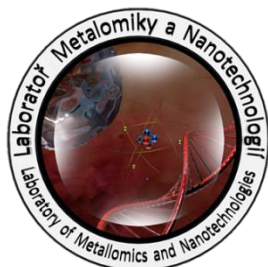


Laboratoř Metalomiky a Nanotechnologií



Hmotnostní detekce biologicky významných sloučenin pro biotechnologie – část 1 - Představení systému MALDI-TOF/TOF (Bruker ultrafleXtreme)

Anotace

V této úvodní části kurzu bude věnována pozornost vysvětlení teorie. Vysvětlen bude princip MALDI, princip TOF, teorie přípravy vzorků pro měření a použití matrice, nutnost provádění kalibrace a metoda peptide mas fingerprintingu (PMF). Bude proveden obecný technický popis celého zařízení a jednotlivých součástí, které jej tvoří. Vysvětlení funkce jednotlivých součástí jako je letová trubice, vakuová vývěva, laser, Iontový zdroj bude provedeno s názornou ukázkou přímo u přístroje.

Teorie

PRINCIP MALDI

Laserová desorpce/ionizace za účasti matrice (MALDI) – měkká ionizační technika; převážně dochází k tvorbě molekulárních iontů $[A+H]^+$, kde A je analyt a H je atom vodíku. Na MALDI destičku je nanesen analyt smíchaný s matricí (převážně organické kyseliny), která je v nadbytku, aby absorbovala většinu energie laseru. Po vysušení nanesené směsi a vytvoření vrstvy krystalků matrice s analytem se vloží MALDI destička do iontového zdroje. Následně se vzniklá skvrna ozáří nanosekundovými laserovými pulsy. Po absorbování energie laseru matricí dochází k desorpci matrice spolu s analytem; matrice se zároveň ionizuje a předává svůj náboj (proton) molekulám analytu. Díky vloženému extrakčnímu napětí dochází k



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

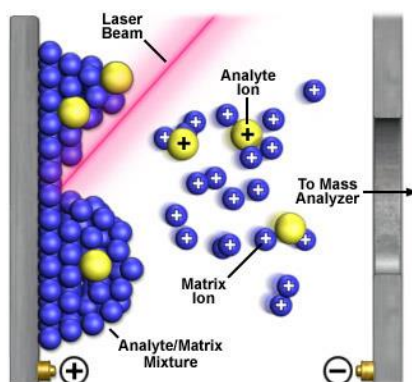


OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Typ laseru	Vlnová délka
UV-MALDI	
N₂	337 nm
Nd:YAG (3xf)	355 nm
Nd:YAG (4xf)	266 nm
ArF (fragmentuje!)	193 nm
IR-MALDI	
Er:YAG	2.94 μm
CO ₂	10.6 μm

Tab. 1: Lasery v MALDI [1].



Obr. 1: Schéma MALDI [2].

V MALDI-TOF MS spektrech v pozitivním módu lze kromě jedenkrát nabitých molekulárních iontů $[A+H]^+$ pozorovat také vícenásobně nabité ionty analytu $[A+2H]^{2+}$, $[A+3H]^{3+}$, dimer analytu $[2A+H]^+$, adukty analytu s alkalickými kovy a/nebo s matricí $[A+Na]^+$, $[A+K]^+$, $[A+MH]^+$, $[A+MK]^+$, iontové klastry, např. $[2M+Na]^+$, fragmenty matrice, analytu (ztráta funkční skupiny), apod.

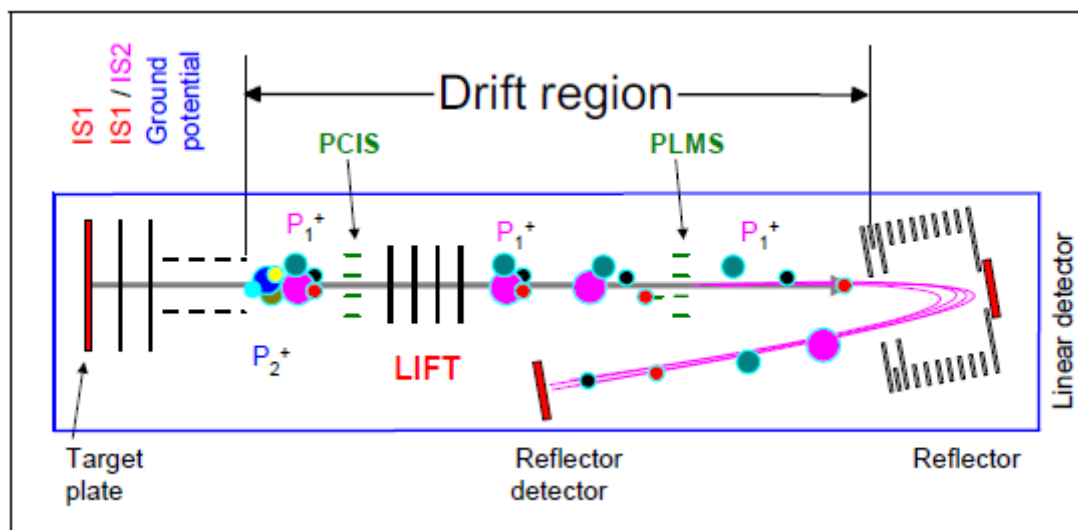
MALDI-TOF MS se moc nehodí pro analýzu hmotností pod cca 500 Da, protože zde ruší intenzivní píky iontů matrice, jejich aduktů, fragmentů, atd.

PRINCIP TOF

Průletový hmotnostní analyzátor (Time-of-flight, TOF) – analýza hmotnosti iontů na základě doby jejich letu v průletové trubici. Měří se čas, který iont potřebuje k překonání vzdálenosti od iontového zdroje k detektoru. Měrná hmotnost $\frac{m}{z}$ se následně může přibližně vypočítat podle následujícího vztahu:

$$\frac{m}{z} = 2eU \frac{t^2}{L^2}$$

kde t je doba letu, L je délka driftové zóny, U je vložené napětí, e je elementární náboj, m je hmotnost, z je náboj.



Obr. 2: Schéma průletového hmotnostního analyzátoru [návod k přístroji]. PCIS – precursor ion selector.

Mezi výhody průletového hmotnostního analyzátoru patří [3]:

- po každém pulsu laseru je vždy zaznamenáno celé hmotnostní spektrum, nemusí se proto dělat sken
- analýza molekul o velmi vysoké hodnotě $\frac{m}{z}$; rozsah je teoreticky neomezený
- krátká doba záznamu jednoho spektra – to umožňuje měřit několik set spekter z jedné skvrny a tyto spektra pak zprůměrovat
- vysoká citlivost díky dobré propustnosti iontů



- vysokého rozlišení lze dosáhnout díky použití reflektoru (iontového zrcadla) a zpožděné extrakce

Reflektor (iontové zrcadlo) – prvek TOF analyzátoru, který umožňuje zvýšit rozlišení vlivem zaostřovacího efektu, kdy ionty s větší kinetickou energií pronikají hlouběji do reflektoru a tím dochází k prodloužení jejich doby letu oproti iontům s menší kinetickou energií, ale se stejným poměrem $\frac{m}{z}$. Napětí na elektrodách reflektoru má opačnou polaritu než má urychlovací napětí na mřížkách iontového zdroje – díky tomu dochází ke zpomalování iontů až k obrácení směru jejich letu a dopadu na druhý (reflektorový) detektor.

Zpožděná extrakce – díky zpožděné extrakci dochází ke zpoždění urychlení iontů z iontového zdroje po jejich desorpci a ionizaci laserovým pulsem. Urychlovací napětí se aplikuje krátce po desorpci a ionizaci molekul vzorku, díky tomu dochází v určité míře k vyrovnání rozdílů v počátečních rychlostech iontů vzniklých při desorpci. Nevýhodou je, že zpožděná extrakce funguje jen ve vymezeném, předem zvoleném intervalu $\frac{m}{z}$.

MATRICE

Mezi nejběžnější typy matrice patří kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (HCCA), kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (gentisová; DHB), kyselina 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová (sinapová; SA), 2',4',6'-trihydroxyacetofenon (THAP), kyselina 3-hydroxypikolinová (3-HPA), dithranol (DIT), kyselina trans-3-indolakrylová (IAA). V tabulce 2 je popsáno, k čemu se která matrice hodí.

Analyt	Použitá matrice
peptidy (< 10 kDa)	HCCA, DHB
peptidy, proteiny (> 10 kDa)	SA, DHB
oligonukleotidy (< 3 kDa)	THAP
nukleové kyseliny (> 3 kDa)	HPA
syntetické polární polymery	DHB
syntetické nepolární polymery	DIT, IAA
sacharidy	DHB, CHCA, THAP

Tab. 2: Výběr matrice podle analytu [1].



PŘÍPRAVA ANALYTU PRO MĚŘENÍ

Před vlastním měřením je potřeba provést výběr vhodné matrice a rozpouštědla pro daný typ analytu. Výběr probíhá na základě kombinací různých maticí s různými rozpouštědly a s analytem.

Základní aspekty pro přípravu analytu jsou následující [3]:

- matrice musí být v nadbytku nad analytem; $c_{matrice} \geq 1000c_{analytu}$
- roztok matrice by se měl připravit vždy čerstvý pro daný den
- pH roztoku matrice musí být kyselé pro analýzu v pozitivním módu; pro okyselení se používá např. kyselina trifluoroctová (TFA)
- ↑ podíl organického rozpouštědla ... ↑ rychlejší odpaření rozpouštědla ... ↓ méně času pro tvorbu krystalků matrice s analytem
- analyt se musí kompletně rozpustit a měl by být čirý, případně se provede jeho purifikace (odsolením,...)
- MALDI destička musí být čistá

Mezi hlavní způsoby nanesení roztoků analytu a matrice na destičku patří [3]:

- *dried-droplet* – roztok analytu se smíchá s roztokem matrice v poměru 1:1 a vzniklá směs se nanese na destičku
- *quick and dirty* – roztok analytu se s roztokem matrice smíchá až přímo na destičce; většinou se jako první nanese roztok matrice, poté roztok analytu a nakonec se pomocí špičky mikropipety smíchají
- *overlayer* – nejprve se na destičku nanese roztok matrice v koncentrovaném organickém rozpouštědle (nejčastěji acetonu), pak se nanese směs roztoku analytu s roztokem matrice
- *sandwich* – jako první se nanese roztok matrice s vysokým obsahem organického rozpouštědla, poté se nanese roztok analytu a nakonec se nanese roztok matrice s menším obsahem organického rozpouštědla
- *fast evaporation* – nejprve se nanese roztok matrice s vysokým obsahem organického rozpouštědla, počká se, až se rozpouštědlo vypaří, a poté se nanese roztok analytu
- *vacuum drying* – postup je stejný jako u fast evaporation, akorát se rychlost vypařování rozpouštědla urychlí pomocí sníženého tlaku

PEPTIDOVÉ MAPOVÁNÍ (PMF = PEPTIDE MASS FINGERPRINTING)



evropský
sociální
fond v ČR



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

CZ.1.07/2.3.00/20.0148 NANOLABSYS

Mezinárodní spolupráce v oblasti „*in vivo*“ zobrazovacích technik

http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/nanolabsys/

Oblastí, ve které MALDI-TOF MS nachází pravděpodobně největší

uplatnění, je identifikace proteinů v proteomice. Sekvence známých proteinů jsou uloženy v různých genových (EMBL, DDBJ, GenBank, aj.) a proteinových (SwissProt, NRDB, TrEMBL, aj.) databázích.

Jelikož pro jednoznačnou identifikaci proteinů nestačí znát jen jejich molekulovou hmotnost, používají se další metody založené na rozložení proteinu na peptidy a jejich identifikaci. Využívá se fragmentace nebo specifického štěpení proteinu. Na základě informací o skupině peptidů se identifikuje původní protein podle shody s databází, tzv. fingerprinting.

Při peptidovém mapování se nejprve provádí selektivní enzymatické štěpení proteinu nejčastěji pomocí trypsinu. Trypsin hydrolyticky štěpí peptidové vazby v proteinu za X-K nebo X-R, pokud $X \neq P$. Následně se směs vzniklých tryptických peptidů (digest) analyzuje na MALDI-TOF MS a monoizotopické hmotnosti peptidů ze spektra se porovnají s daty obsaženými v databázích pomocí vhodného statistického programu (např. Mascot). Výsledkem je seznam proteinů, ze kterých mohly po enzymatickém štěpení vzniknout peptidy o daných molekulových hmotnostech. Pravděpodobnost správné identifikace původního proteinu závisí na několika faktorech, jako např. na poměru nalezených/zadaných peptidů (expectation factor) nebo na procentu pokrytí sekvence. Pro úspěšnou identifikaci je nutná vysoká přesnost stanovení $\frac{m}{z}$ a nízký počet původních proteinů ve vzorku, nejlépe jen jeden – pokud je to nutné, provede se před analýzou na MALDI-MS separace proteinů např. pomocí gelové elektroforézy nebo kapalinové chromatografie [4].

KALIBRACE MALDI-TOF MS

V hmotnostní spektrometrii MALDI-TOF se kalibruje pouze osa x ; osa y je většinou normalizovaná – největšímu píku ve spektru je přiřazena 100% intenzita. Kalibrace se provádí pomocí připravené kalibrační směsi standardů peptidů nebo proteinů, podle toho, v jakém rozsahu $\frac{m}{z}$ se bude měřit. Pro hmotnosti do cca 500 Da lze ke kalibraci využít píků matrice, pro hmotnosti v rozsahu 1000 – 5000 Da se využívá směsi standardů peptidů a pro hmotnosti od 5000 Da výše se využívá standardů proteinů, syntetických látek, apod.

ZIPTIPTM SPE (EXTRAKCE NA PEVNOU FÁZI)

ZipTipTM – polypropylenové špičky s objemem 10 μ l; jsou částečně naplněné chromatografickou stacionární fází, nejčastěji C4 nebo C18. Sorbent je umístěn téměř u okraje špičky, což zajišťuje prakticky nulový mrtvý objem. Špičky naplněné sorbentem C4 mají póry o velikosti cca 30 nm, zatímco špičky s C18 mají póry o velikosti cca 20 nm. ZipTipTM špičky se využívají pro purifikaci a zakoncentrování peptidů, proteinů či

CZ.1.07/2.3.00/20.0148 NANOLABSYS

Mezinárodní spolupráce v oblasti „*in vivo*“ zobrazovacích technik
http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/nanolabsys/
oligonukleotidů pro různé analytické metody, nejčastěji pro
kapalinovou chromatografii a hmotnostní spektrometrii [4].



Doporučená literatura

- [1] <http://bart.chemi.muni.cz/courses/MS%20Bio%20CZ%202012.pdf> (cit. 21.6.2013)
- [2] <http://prescottbiochem09.wikispaces.com/How+does+MALDI-TOF+work%3F> (cit. 21.6.2013)
- [3] GURÁŇ, Roman. Nanášení vzorků pro desorpční analytické metody (online). 2010 (cit. 21.6.2013). Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Jan Preisler. Dostupné z: <http://is.muni.cz/th/270205/prif_b/>.
- [4] <http://bart.chemi.muni.cz/courses/Lab%20Cv%20MALDI%202008%20CZ.doc> (cit. 21.6.2013)
- [5] http://www2.bdal.de/data/care-online_data/206195/PI_206195_Peptide%20Cal%20Stand_V2.pdf (cit. 21.6.2013)
- [6] http://www2.bdal.de/data/care-online_data/206355/PI_206355_Protein%20Cal%20Stand%20I_V3.pdf (cit. 21.6.2013)
- [7] http://www2.bdal.de/data/care-online_data/207234/PI_207234_Protein%20Stand%20II_V5.pdf (cit. 21.6.2013)



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ