

Hmotnostní spektrometrie s analyzátozem doby letu a laserovou desorpcí/ionizací za účasti matrice (MALDI TOF MS)

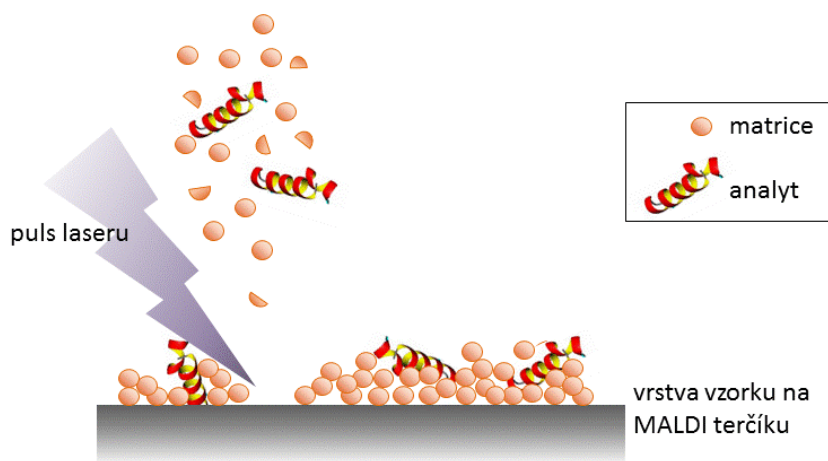
MALDI TOF MS (z anglického *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*) patří v současnosti k nepostradatelným nástrojům moderní analýzy. Do širokého spektra látek, které lze pomocí MALDI MS studovat a identifikovat, patří zejména biopolymery (proteiny, peptidy, sacharidy, nukleové kyseliny), ale i syntetické polymery, farmaceutika a další nízkomolekulární organické i anorganické látky.

Teoretická část

A. Princip MALDI

MALDI je vedle ionizace elektrosprejem „měkká“ ionizační technika, která umožňuje šetrnou analýzu biomolekul (biopolymerů) i syntetických polymerů, které mají tendenci k fragmentaci při použití klasických ionizačních technik.

MALDI je dvoustupňový proces (Obr. 1): V prvním kroku je vzorek, složený z analytu (A) smíchaného s nadbytkem matrice (M), ozařován krátkými (~ ns) pulsy laseru. Energie laserového pulsu je absorbována převážně matricí, čímž dochází k její rychlé desorpci. Odpařující se částice matrice s sebou strhávají molekuly analytu a převádějí je do plynného skupenství. V druhém kroku protonované specíe matrice ionizují molekuly analytu přenosem protonu; pro MALDI je typický vznik tzv. pseudomolekulárních iontů $[A+H]^+$ a díky přítomnosti matrice i velmi nízký stupeň fragmentace.

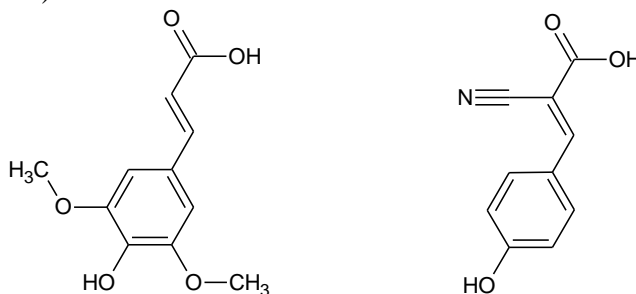


Obrázek 1: Schéma MALDI

Z mechanismu MALDI plynou i základní požadavky na vhodné matrice:

- **silná absorpce** při vlnové délce použitého laseru, obvykle dusíkový (337 nm) nebo frekvenčně násobený Nd:YAG laser (355 nm, 3xf)
- tvorba **žádoucích krystalů** s analytem (nutno stanovit empiricky)
- **kyselý charakter** matrice (účinná ionizace přenosem protonu na analyt)

Většinou se jako matrice používají malé aromatické kyseliny, např. α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (CHCA); 3,5-dimethoxy-4-hydroxy skořicová kyselina (kyselina sinapová; SA) aj. (Obr. 2)



Obr. 2: Běžně používané MALDI matrice: kyselina sinapová a kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová

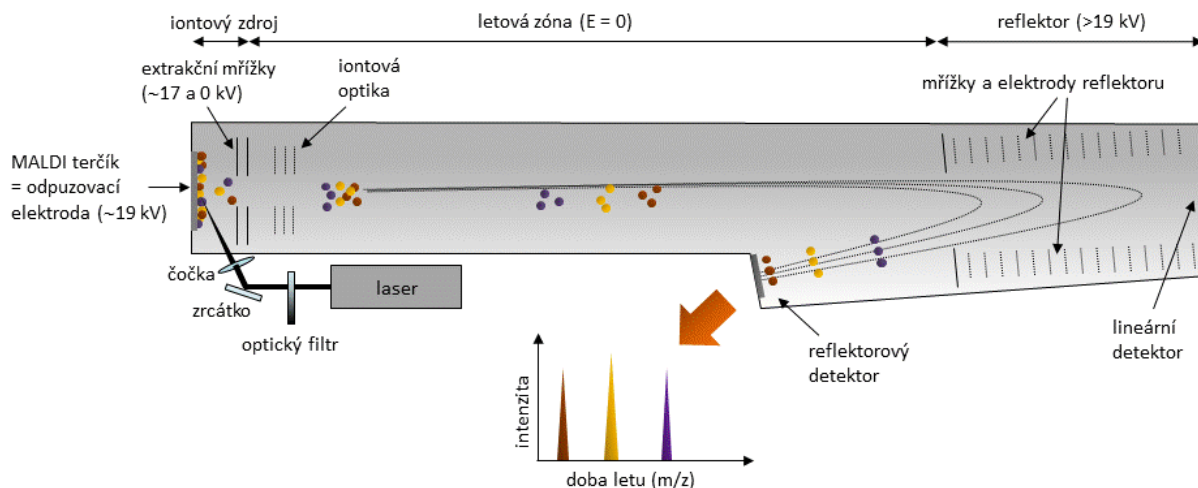
B. Princip TOF

Ionty generované MALDI bývají obvykle analyzovány hmotnostním analyzátozem doby letu (Time Of Flight, TOF), viz Obr. 3. Jeho princip spočívá v měření času, který potřebuje ion k překonání vzdálenosti mezi iontovým zdrojem a detektorem, tzv. doby letu, t . Doba letu je funkcí měrné hmotnosti iontu, m/z , kterou můžeme přibližně vypočítat ze vztahu:

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

kde m je hmotnost, z je počet nábojů, e je elementární náboj, U je urychlovací napětí a L je délka letové zóny.

Výhodami TOF analyzátoru jsou vysoká transmise iontů (a tedy i vysoká citlivost), velmi krátká doba analýzy ($\sim 100 \mu\text{s}$ pro spektrum z jednoho pulsu laseru) a teoreticky neomezená maximální hodnota m/z .



Obrázek 3: Schéma hmotnostního spektrometru MALDI TOF v reflektorovém režimu

V MALDI TOF MS se pro zvýšení rozlišení využívá dvou prvků, které korigují negativní vliv disperze počáteční kinetické energie (E_{kin}) iontů:

Použití tzv. **pulzní (zpožděné) extrakce** spočívá v aplikaci extrakčního napětí až po uplynutí doby cca 100 – 1000 ns po laserovém pulsu. Ionty o dané m/z s vysokou E_{kin} se po uplynutí této doby budou nacházet dále od nosiče vzorku (odpuzovací elektroda) než ionty s nízkou E_{kin} . Následnou aplikací extrakčního napětí jsou pomalejší ionty blíže nosiči vzorku urychleny více než rychlejší ionty o stejném m/z , v důsledku čehož dopadnou na detektor ionty o dané současně bez ohledu na jejich E_{kin} . Nevýhodou zpožděné extrakce je její funkčnost pouze ve vymezeném, předem zvoleném intervalu m/z .

Druhý způsob pro zvýšení rozlišení je použití tzv. **iontového zrcadla** neboli **reflektoru, reflektoru**, který taktéž slouží ke kompenzaci různých E_{kin} iontů se stejnou hodnotou m/z . Iontové zrcadlo je tvořeno soustavou prstencových elektrod. Na první elektrodu je přivedeno napětí o stejné polaritě jako urychlovací, ale mírně vyšší, napětí dalších elektrod postupně klesá až k nule na poslední elektrodě. V iontovém zrcadle se tak vytváří elektrické pole, jehož intenzita působí proti pohybu iontů přilétajících ze zdroje. Ionty s vyšší hodnotou E_{kin} proniknou hlouběji do elektrického pole reflektoru, čímž dojde k jejich zpoždění oproti iontům s E_{kin} energií a tím i k vyrovnání celkové doby strávené v analyzátoru. Nevýhodou je jisté snížení iontové transmise a tím i citlivosti.

C. Vybrané aplikace MALDI TOF MS

1. Stanovení molární hmotnosti látek

Jak již bylo zmíněno, produkty MALDI jsou v pozitivním módu (kladné extrakční napětí) převážně molekulární, přesněji pseudomolekulární $[A+H]^+$ ionty analytu, přičemž náboj iontů je běžně jednotkový ($z = 1$). Avšak ve spektrech lze pozorovat též vícenásobně nabitě ionty analytu $[A+2H]^{2+}$, $[A+3H]^{3+}$ „dimer“ analytu $[2A+H]^+$, adukty analytu s alkalickými kovy a/nebo maticí $[A+Na]^+$, $[A+K]^+$, $[A+MH]^+$, $[A+MNa]^+$, fragmenty matrice, analytu (ztráta funkční skupiny) a iontové klastry, např. $[M_2+Na]^+$ apod. MALDI se zpravidla nepoužívá pro stanovení látek s molekulovou hmotností pod ~500 Da, protože v této oblasti ve spektru ruší intenzivní píky iontů matrice, jejich fragmentů, aduktů a klastrů.

MALDI TOF MS se používá pro stanovení hmotnosti peptidů, proteinů, nukleových kyselin a sacharidů. V případě syntetických polymerů může MALDI MS být užitečná pro charakterizaci distribuce a struktury polymeru.

Stanovení molekulové hmotnosti ovšem není obvykle dostačující pro jednoznačnou identifikaci látky.

2. Peptidové mapování (Peptide Mass Fingerprinting, PMF)

Pravděpodobně nejrozsáhlejší uplatnění nachází MALDI TOF MS v proteomice při identifikaci proteinů. Sekvence celé řady proteinů jsou známy a uloženy v rozsáhlých genových a proteinových databázích. Protože pouhé stanovení molekulové hmotnosti proteinu není dostačující pro jeho identifikaci, používají se k identifikaci další metody založené na specifickém štěpení proteinu na menší peptidy. Na základě podrobnějších informací o skupině peptidů (PMF) nebo z tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS) o jednom peptidu lze poté identifikovat původní protein.

Při peptidovém mapování je vzorek proteinu nejprve podroben selektivnímu enzymatickému štěpení, nejčastěji trypsinem (hydrolýza peptidové vazby za X-K nebo X-R,



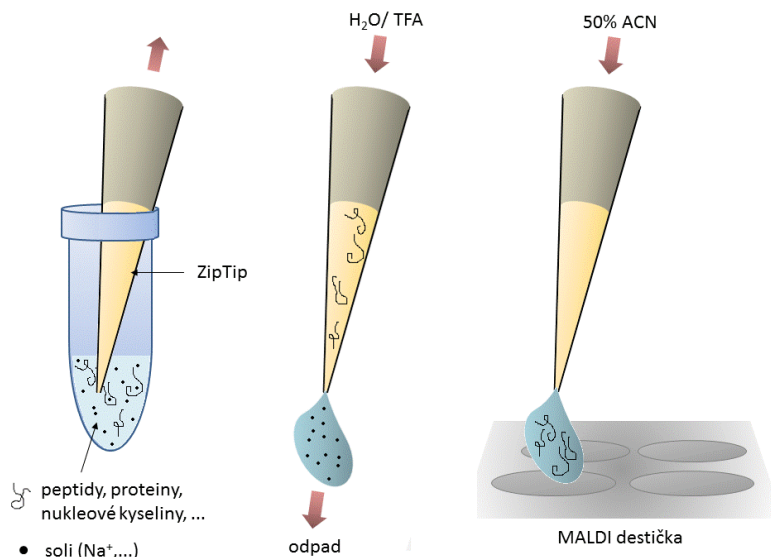
pokud $X \neq P$). Směs těchto tryptických štěpů peptidu (digest) se poté analyzuje metodou MALDI TOF MS. Hmotnosti peptidů odečtené ze spektra se porovnají s daty obsaženými v proteinové databázi pomocí programů umožňující statistickou analýzu (Protein Prospector, Mascot, Proteomics, aj.). Výsledkem takového hledání bývá seznam proteinů, jejichž štěpením mohly vzniknout peptidy o naměřených hmotnostech. Pravděpodobnost identifikace původního proteinu je určena několika různými parametry, jako poměr nalezených/zadaných peptidů, tzv. „expectation factor“, či procento pokrytí sekvence. Podmínkou pro úspěšnou identifikaci je vysoká přesnost stanovení m/z a nízký počet původních proteinů (nejlépe pouze jeden protein) ve vzorku. Pokud se ve vzorku nachází směs proteinů, je nezbytné před nebo po štěpení použít některou ze separačních technik.

Pro proteinové separace se dnes využívají výhradně gelová elektroforéza a kapalinová chromatografie. Výstupem obou je v ideálním případě samotný protein, avšak v rozdílném médiu, které určuje další postup identifikace s použitím enzymatického štěpení.

D. Extrakce na pevnou fázi (Solid Phase Extraction, SPE) ZipTip™

ZipTip™ (Millipore, MA) jsou polypropylenové špičky o objemu 10 μ l částečně naplněné chromatografickým médiem sloužící k purifikaci a/nebo zakoncentrování peptidů, proteinů nebo oligonukleotidů pro hmotnostní spektrometrii, kapalinovou chromatografii, kapilární elektroforézu, příp. další analytické metody (Obr. 4). Médium je umístěno na samém konci špičky, čímž je zajištěn prakticky nulový mrtvý objem.

Běžně se setkáváme s dvěma typy média (sorbetů) umístěných do těchto špiček. S kratším řetězcem (C4) a póry cca 30 nm pro použití s proteiny, a s delším řetězcem (C18) a póry cca 20 nm pro sorpci a eluci peptidů.



Obrázek 4: Princip fungování ZipTip™ špiček. Detaily použití jsou vysvětleny v následující kapitole

Experimentální část

Úkol: Identifikujte dva neznámé proteiny pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI TOF MS a peptidového mapování. Pro purifikaci proteinových digestů využijte SPE ZipTip™.

A. Příprava roztoků

MALDI matrice

- **roztok TA30** (30% acetonitril, 0,1% TFA): smíchat 300 μl ACN, 600 μl vody a 100 μl 1% TFA
- **roztoky matrice CHCA:**
rozpustit cca 2 mg ve 200 μl TA30, ponechat cca 1 min v ultrazvukové lázni a nerozpuštěné krystaly matrice zcentrifugovat
- **roztoky matrice SA:**
 - **roztok 1:** rozpustit cca 2 mg ve 200 μl 100% EtOH, ponechat 1 min v ultrazvukové lázni a nerozpuštěné krystaly SA zcentrifugovat
 - **roztok 2:** rozpustit cca 2 mg ve 200 μl TA30, ponechat cca 1 min v ultrazvukové lázni a nerozpuštěné krystaly matrice zcentrifugovat

Odsolení pomocí ZipTip™

- ZipTip™ C₁₈ špičky
- **0,1% TFA:** smíchat 50 μl 1% TFA se 450 μl vody
- **50% acetonitril (ACN):** smíchat 200 μl ACN a 200 μl vody

Proteiny – neznámé vzorky

- Roztoky proteinů: 0,1 mg.ml⁻¹ v 50 mmol.l⁻¹ NH₄HCO₃
- Předem připravené trypsinové digesty neznámých proteinů 0,1 mg.ml⁻¹

Kalibrační směs peptidů

- Předem připravená směs peptidů pro kalibraci hmotnostního spektrometru. Složení směsi udává následující tabulka:

Peptid	Koncentrace (μM)	Relativní molekulová hmotnost, <i>M</i>	<i>m/z</i> ([M+H] ⁺)	
			Monoisotopická	Dominantní
Bradykinin	1	1059,5610	1060,5692	1060,5692
Angiotensin I	1	1295,6775	1296,6853	1296,6853
Renin	2	1758,9332	1759,9396	1760,9474
ACTH	5	2464,1911	2465,1989	2466,2067
Insulin	10	5733,7	5734,7 – průměrná	

Kalibrační směs proteinů

- Předem připravená směs proteinů pro kalibraci hmotnostního spektrometru. Složení směsi udává následující tabulka:

Proteiny	<i>M</i>	Ion	<i>m/z</i> (průměr)
Trypsinogen	23981	[M+H] ⁺	23982 Da
Protein A	44612	[M+H] ⁺	44613 Da
Protein A		[M+2H] ²⁺	22307 Da
Albumin-hovězí (BSA)	66463	[M+H] ⁺	approx. 66,5 kDa
Albumin-hovězí (BSA)		[M+2H] ²⁺	approx. 33,3 kDa

Odsolení digestů proteinů neznámých vzorků pomocí ZipTip™

1. Připravit 3*n* alikvotů 0,1% TFA o objemu 50 μl, kde *n* je počet vzorků. Pro každý ze vzorků bude jeden alikvot určen pro ekvilibraci a 2 alikvoty pro vymývání.
2. Ke vzorkům určeným pro odsolení pomocí ZipTip™ přidat 1 μl 1% TFA
3. Do prázdné mikrozkuhavky napipetovat 5 μl 50% ACN a uzavřít. Tato mikrozkuhavka bude určena k eluci peptidů v kroku 7.
4. **Příprava špičky ZipTip™:**
 - a. Nasadit špičku a nasát 10 μl 50% ACN, poté vypustit do odpadu. Zopakovat ještě jednou.
 - b. Nasát 10 μl 0,1% TFA z nepoužitého alikvotu, poté vypustit do odpadu. Zopakovat ještě jednou.
5. **Sorpce peptidů na špičku.** Opakovaně zvolna nasávat a vypouštět (nejméně desetkrát) digest proteinu přes ZipTip™ špičku v příslušné mikrozkuhavce. Provádět pomalu a opatrně, bez tvorby vzduchových bublinek.
6. **Promytí peptidů:** Z nového alikvotu 0.1% TFA nasát 10 μl a vypustit do odpadu. Zopakovat s použitím dalšího alikvotu.
7. **Eluce peptidů ze špičky.** Objem pipety snížit na 5 μl. Do předem připravené mikrozkuhavky s 50% ACN (z kroku 3) vložit špičku ZipTip™ a opatrně nasávat a vypouštět kapalinu. Provádět pomalu, aby rozpouštědlo mělo dostatek času dostat se ke stacionární fázi ve špičce. Opět se snažit o nevniknutí vzduchových bublin do špičky.
8. Peptidy přečištěné pomocí SPE ZipTip™ jsou v 5 μl 50% ACN.

B. Příprava vzorků pro MALDI MS

Do dvou volných sloupců na MALDI destičce naneste níže popsáním postupem vzorky v následujícím pořadí (přesné pozice si zaznamenejte). Každý vzorek naneste vždy dvakrát na dvě sousední pozice.

řada	analyt	matrice
1	H ₂ O	SA (2)
2	H ₂ O	SA (1+2)
3	kalibrační směs proteinů	SA (1+2)
4	neznámý protein 1	SA (1+2)
5	neznámý protein 2	SA (1+2)
6	-	-
7	H ₂ O	CHCA
8	digest proteinu 1 (neodsolený)	CHCA
9	kalibrační směs peptidů	CHCA
10	digest proteinu 2 (neodsolený)	CHCA
11	digest proteinu 1 (odsolený)	CHCA
12	kalibrační směs peptidů	CHCA
13	digest proteinu 2 (odsolený)	CHCA

Nanášení vzorků proteinů – metoda „double layer“

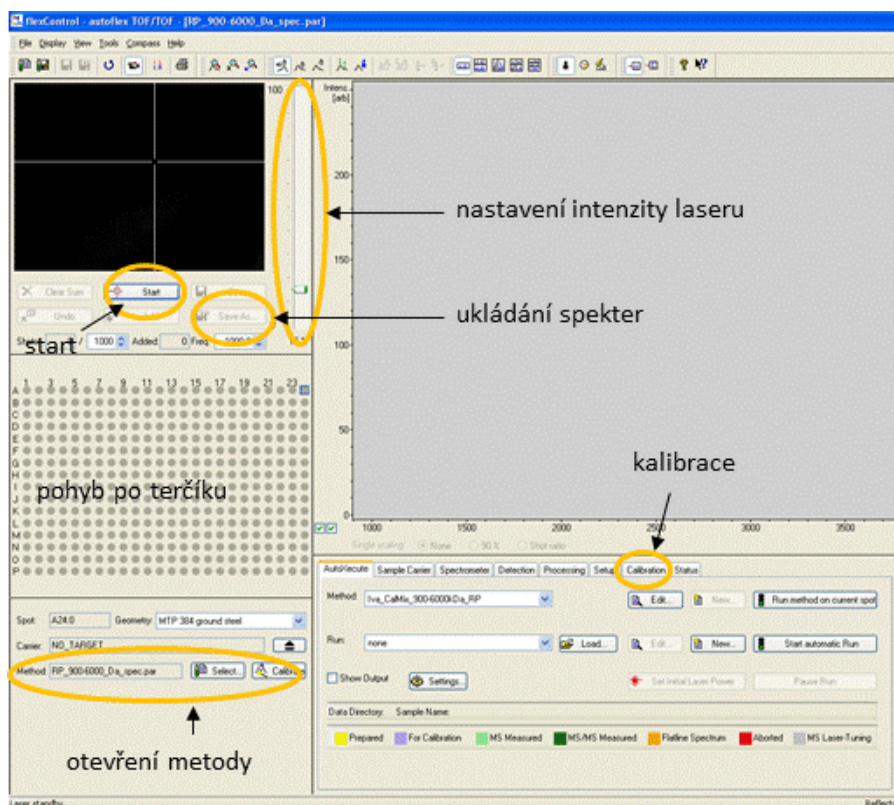
Do každé pozice v řadách 2-5 naneste 0,1 µl roztoku 1 matrice SA (100 % EtOH). Dojde ke vzniku tenké vrstvy krystalků. Ve víčku mikrozkušavky (200 µl) smíchejte 2 µl matrice SA (roztok 2) a 2 µl vody/kalibrační směsi proteinů/neznámého proteinu. 0,5 µl tohoto roztoku naneste do daných pozic na připravenou tenkou vrstvu. V řadě 1 naneste 0,5 µl roztoku matrice s vodou přímo na čistý terčík (metoda „dry droplet“), pozice zaznamenejte.

Nanášení vzorků peptidů – metoda „quick and dirty“

Na MALDI destičku naneste vždy 0,5 µl vzorku a 0,5 µl roztoku matrice CHCA a opatrně promíchejte špičkou pipety přímo na destičce.

C. MALDI TOF MS peptidů a proteinů

Měření vzorků je prováděno na hmotnostním spektrometru MALDI TOF MS Autoflex Speed (Bruker). Jedná se o hmotnostní spektrometr s 1 kHz Nd:YAG laserem (355 nm). Mimo vkládání MALDI destičky do přístroje, je celý systém ovládán pomocí software FlexControl (Obr. 5). Pro práci s naměřenými hmotnostními spektry je k dispozici software FlexAnalysis a BioTools.



Obrázek 5: Základní obrazovka software FlexControl

1. Stanovení molekulové hmotnosti proteinů

- Po vložení MALDI destičky do přístroje vyčkáme na evakuaci systému ($p < 3 \times 10^{-6}$ mbar)
- Nahrajeme metodu pro měření proteinů (Select Method -> složka *vyuka* -> metoda *linear_proteins.par*). Tato metoda má optimálně přednastavené parametry pro měření proteinů o velikosti 10-100 kDa v lineárním pozitivním módu, tj. napětí na destičce, extrakční mřížce, dobu zpožděné extrakce, apod.
- Na terčiku najedeme na pozici se vzorkem s kalibrační směsí proteinů.
- Měření začneme kliknutím na tlačítko **Start**, výsledné spektrum je průměrné spektrum z 1000 akumulovaných spekter.

Nastavení optimální energie laseru

Postupně navyšujte energii laseru až do objevení prvních píků analytu (tato energie se nazývá jako prahová energie a může se lišit pro různé matrice, různé druhy analytů i způsoby přípravy vzorku), energii dále navyšujte přibližně o 10 – 30% nad prahovou hodnotu, tuto hodnotu zaznamenejte a použijte pro další měření.

Kalibrace přístroje:

Na rozdíl od ostatních metod se v hmotnostní spektrometrii TOF kalibruje pouze osa x, osa y bývá často normalizovaná, tzn. že nejvyššímu píku ve spektru je udělena 100% intenzita. Kalibrace se provádí v předem zvoleném rozmezí m/z, pro které je připravena příslušná kalibrační směs. V případě hodnot m/z do 500 Da lze využít píků matrice, od 1000 do 5000 Da se obvykle používá směs peptidů a pro kalibraci rozmezí m/z nad 6000 Da se využívá proteinů, syntetických látek, polymerů, atd. V tomto rozmezí se totiž často vyskytují i vícenásobné píky, dimery, a jiné píky, které mají spolu s původní látkou definovanou hodnotu m/z.

Po naměření spektra kalibrační směsi proteinů otevřete záložku *Calibration* a postupně přiřazujte jednotlivým píkům jejich správnou m/z; po přiřazení posledního píku potvrďte kalibraci tlačítkem *Apply*. V dalších krocích již přístroj pracuje s touto kalibrací.

Spektrum naměřené kalibrační směsi uložte (tlačítko *Save as*).

Vlastní měření spekter neznámých proteinů:

Stejným způsobem jako kalibrační proteiny změřte postupně spektra dvou neznámých proteinů i čisté matrice. Všechna spektra uložte.

Otázky:

- 1) *Porovnejte morfologii krystalů sinapové kyseliny při přípravě „double layer“ a „dry droplet“. Pokuste se odhadnout, jaké výhody přináší tenká vrstva pro analýzu proteinu.*
- 2) *Pokuste se vysvětlit, co pozorujete ve spektru – počet píků, jejich tvar a rozlišení.*
- 3) *Spočítejte přibližné látkové množství a počet molekul neznámého proteinu, který byl nanesen na destičku.*



2. Měření peptidů/ proteinových digestů

Podobným způsobem jako v případě měření proteinů, postupujte při měření peptidů/digestů proteinů. Vzorky měřte nejdříve v lineárním módu (metoda: *linear_peptides.par*) a následně v reflektorovém módu (*reflector_peptides.par*). V obou případech přístroj před měřením digestů nakalibrujte pomocí směsi kalibračních peptidů. Zaznamenejte si chybu kalibrace. Spektra uložte pro pozdější databázové hledání. Při ukládání spekter zvolte v sekci *Processing* metodu *PMF.FAMS* a zaškrtněte pole *Open in FlexAnalysis*.

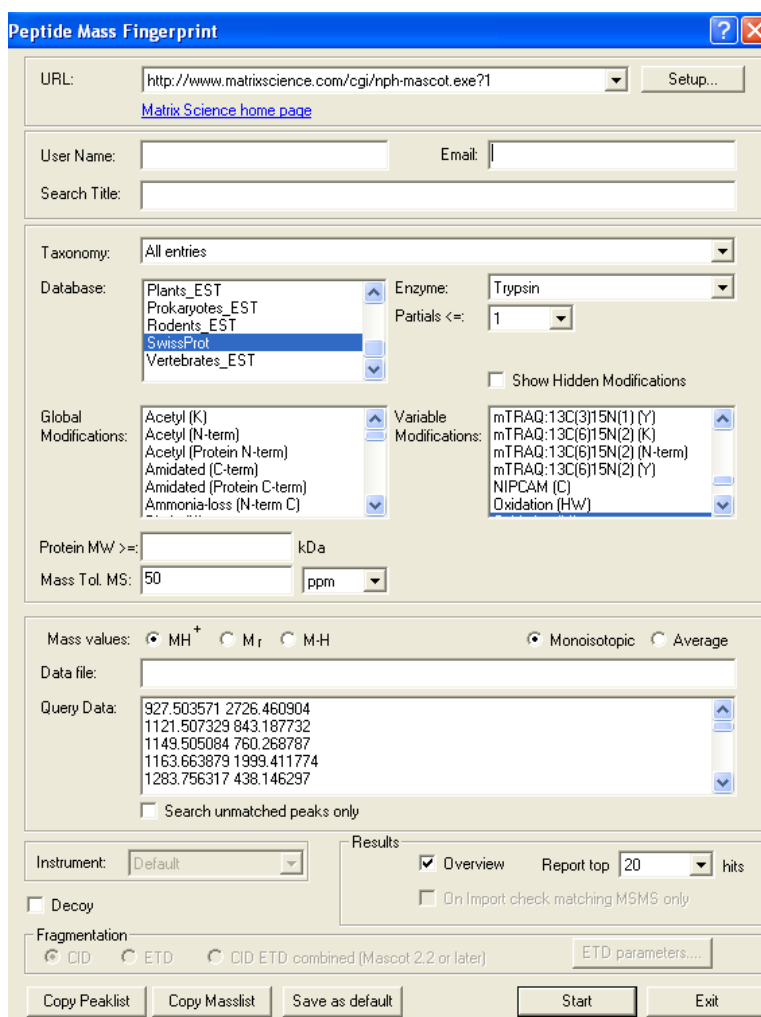
Otázky:

- 4) *Vysvětlete izotopovou distribuci píků. Charakterizujte monoizotopický pík.*
- 5) *Vysvětlete původ píků naměřených ve slepém vzorku.*
- 6) *Uveďte výhody a nevýhody obou módů.*

D. Peptidové mapování (PMF)

V programu *FlexAnalysis* zobrazte spektrum digestu neznámého proteinu. Ikonou  toto spektrum odešlete do programu *BioTools*, který slouží k analýze dat. V tomto programu klikněte na ikonu , která otevře dialog (Obr. 6) pro databázové hledání. Postupně zadejte váš jméno, email, název databáze (Swissprot), štěpící enzym (trypsin), maximální počet neštěpených míst (partials; 1), variabilní modifikace (oxidace na methioninu), toleranci (50 ppm) a hledání začněte tlačítkem *Start*.

V novém okně se zobrazí výsledky hledání, které je možné tlačítkem *Get Hits* podrobněji zobrazit v programu *BioTools*. Výsledky konzultujte s vedoucím cvičení.



Peptide Mass Fingerprint

URL: Setup...

[Matrix Science home page](#)

User Name: Email:

Search Title:

Taxonomy:

Database:

Enzyme:
 Partials <=:

Show Hidden Modifications

Global Modifications:

Variable Modifications:

Protein MW >=: kDa

Mass Tol. MS: ppm

Mass values: MH⁺ M_T M-H Monoisotopic Average

Data file:

Query Data:

Search unmatched peaks only

Instrument:

Results: Overview Report top hits

Decoy On Import check matching MSMS only

Fragmentation: CID ETD CID ETD combined (Mascot 2.2 or later)

Obrázek 6: Dialog pro databázové hledání PMF

E. Protokol

V protokolu uveďte svá jména, název úlohy a datum, přičemž za celou skupinu postačí jeden protokol. Preferován je protokol v elektronické formě. Dále připojte experimentální výsledky (reprezentativní spektra a tabulky), odpovědi na otázky a diskusi výsledků. Srovnajte výsledky získané s použitím a bez použití SPE. Uveďte všechna data, která jsou nutná pro reprodukování úlohy. Budeme vděčni za všechny komentáře a návrhy, jak úlohu vylepšit.