

MALDI TOF MS

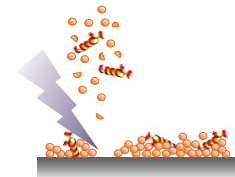
Základy MALDI, TOF a vybrané aplikace

Iva Tomalová

Metody chemického výzkumu, 10.12.2014

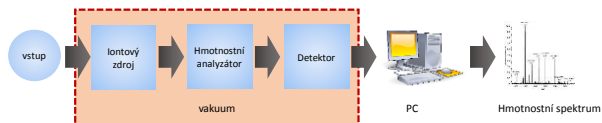
Náplň přednášky

1. MALDI
 - princip, role matrice
2. Průletové analyzátory
3. Vybrané aplikace MALDI MS



2

Hmotnostní spektrometrie



3

MALDI

- z anglického *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization* (=laserové desorpce a ionizace za účasti matrice)
- měkká ionizační technika pro analýzu biomolekul
- velmi nízký stupeň fragmentace
- jednoduchá spektra (typicky: $z = 1$)
- rychlá příprava a analýza
- nízké detekční limity (LOD pro peptidy: *amol*)



4

Z historie

Franz Karas a Michael Hillenkamp:

- MALDI pro ionizaci analaninu (1985) i větších peptidů (1987) v přítomnosti tryptofanu jako matrice s 266 nm laserem

Koichi Tanaka:

- „ultra fine metal plus liquid matrix method“
- nanočástice kobaltu + glycerol pro ionizaci karboxypeptidasy A (35 kDa) s 337 nm laserem (1987)

Nobelova cena
za chemii (2002)

Karas, M.; Bachmann, D.; Hillenkamp, F. (1985). "Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules". *Analytical Chemistry* 57 (14): 2935-9.
Karas, M.; Bachmann, D.; Bahr, U.; Hillenkamp, F. (1987). "Matrix-Assisted Ultraviolet Laser Desorption of Non-Volatile Compounds". *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 78: 53-68.
Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T.; Matsuo, T. (1988). "Protein and Polymer Analyses up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry". *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2 (20): 151-3.

MALDI

MALDI = **M**atrice + **A**lyt + **L**aser + **D**estička + **I**nstrumentace

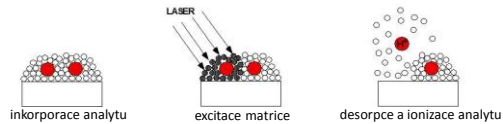
Široký pojem:

- různé analyty
- různé matrice
- odlišné způsoby přípravy vzorku
- různá instrumentace (AP-MALDI, vakuová MALDI)
- ...

Matrice MALDI

V nadbytku nad analytem

- matrice: analyt (**malé molekuly**) **100 : 1**
- matrice: analyt (**proteiny**) **10 000 : 1**



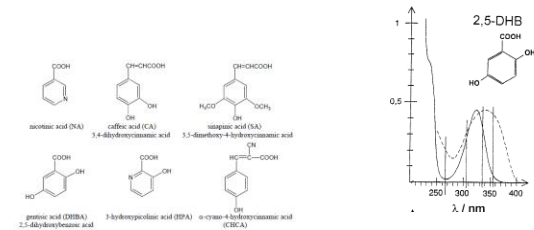
Matrice MALDI by měla splňovat následující podmínky:

- separovat (fedit) a inkorporovat jednotlivé molekuly analytu (např. skrze ko-krytalizaci)
- být rozpustná v solventech kompatibilních s analytem
- být stabilní ve vakuu
- absorbovat při vlnové délce použitého laseru
- mediovat ko-desorpci analytu při ozáření laserem
- ionizovat analyt

7

Matrice MALDI

- deriváty kyseliny benzoové, nikotinové, skořicové,... (aromatické kyseliny)
- nekyselé matrice



8

Matrice MALDI

Peptidy: 4-hydroxy- α -kyanoskořicová kyselina (**HCCA**)
4-chloro- α -kyanoskořicová kyselina (**CICCA**)

Proteiny: sinapová kyselina (**SA**)
2,5-dihydroxybenzoová kyselina (**DHB**)
2,5-dihydroxyacetofenon (**DHAP**)

Glykany: **DHB, sDHB**

Nukl. kys.: 3-hydroxypicolinová kyselina (**HPA**)
2,4,6-trihydroxyacetofenon (**THAP**)

Malé mol.: 9-aminoakridin (**9AA**)

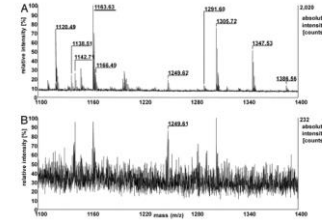
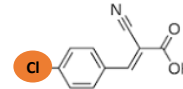
Univerzální MALDI matrice: **HCCA/DHB, 1:1**

Nekovalentní komplexy: 6-aza-2-thiothymín (**ATT**)
DHAP
DHB/NH₃

9

4-chloro- α -kyanoskořicová kyselina

- 1. „racionálně“ navržená matrice pro MALDI MS
- Substituce na poloze R1 (OH \rightarrow Cl):
nižší protonová afinita (841 \rightarrow 832 kJ/mol)
 - vyšší citlivost
 - jednodušší odezva různých analytů (nižší efekt suprese analytu analytem): lepší pokrytí sekvence proteinu při PMF



MALDI mass spectra of a tryptic in-solution digest of BSA using Cl-CCA (A) or CHCA (B) as a matrix. Mass numbers of assigned BSA peptides are given only for those signals occurring in three independent mass spectra within ± 20 ppm; m/z section 1,100–1,400 Da; total sample load, 1 fmol.

10

Jaskolla TW, Lehmann WD, and Karas M: 4-Chloro- α -cyanocinnamic acid is an advanced, rationally designed MALDI matrix (2008), PNAS 105, 34, 12200-12205

Alternativní “matrice” a aditiva

- Nanomateriály (SALDI)
- Absorbující, strukturované povrchy (SALDI, DIOS, ...)
- LDI (bez matrice)
- aditiva:
 - sacharidy, kationizační činidla

11

Příprava vzorku pro MALDI MS

- vysušení kapky směsného roztoku (**dry droplet**)
- smíchání a vysušení na terčiku (**quick & dirty**)
- urychlení vysušení ve vakuu (**vacuum drying**)
- nejprve vrstva matrice v těkavém solventu (**fast evaporation**)
- vrstva matrice, pak vrstva matrice s analytem (**overlayer**)
- vrstvy: matrice, analyt, matrice (**sandwich**)
- krystaly rozdrceny, převrstveny roztokem vzorku (**crushed crystals**)
- rozpouštění vzorku v kapce acetonu (**acetone redeposition**)
- nanášení na rotující terčík (**spin coating**)
- pomalý růst krystalů (**slow crystallization**)
- nanášení elektrospřejem (**electrospray deposition**)

**VELIKOST,
MORFOLOGIE
KRYSŤALŮ**

**INKORPORACE
ANALYTU**

**SELEKTIVNÍ
EXTRAKCE**

**ELIMINACE
KONTAMINANTŮ**

12

Příprava vzorku pro MALDI

- MALDI MS nespotřebuje velké množství vzorku
- empirický přístup
- tenké vrstvy, nižší koncentrace matrice mohou poskytnout lepší data:
vyšší rozlišení, nižší LOD
- Neexistuje univerzální protokol nebo matrice pro všechny analyty
- **Dry-droplet** (suchá kapka) je obvykle nejlepší startovní bod pro další optimalizace

13

Zásady přípravy vzorku

- **Čistá** matrice
- **Čerstvý** roztok matrice
- Vhodná volba solventu (ACN, EtOH, MeOH, aceton, voda)
- Analyt musí být **rozpuštěný**
- Matrice musí být **rozpuštěná** (nasyčený roztok centrifugovat!)
- **Čistý** terčik
- Purifikace analytu před MALDI analýzou
- Neznámý analyt – příprava série roztoků o různých koncentracích
- Nanesené vzorky jsou obvykle stabilní (skladování terčiků se vzorky, ne ve vakuu!)

14

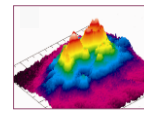
Převzato (a upraveno) z: www.bart.chemi.muni.cz

Lasery

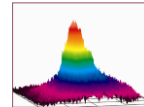
- pulsní lasery
- 1 puls = 1 spektrum
- typicky průměrování několika set až tisíc spekter
- Klíčový parameter pro MALDI MS měření: **zářivá expozice (laser fluence)**
!!! **zářivá expozice** (fluence; energie pulsu laseru vztažená na plochu; J/m²)
vs. **hustota výkonu** (výkon laseru vztažený na plochu, W/m²) !!!
- pro MALDI je určující zářivá expozice, ne hustota výkonu
(*nicméně délka pulsu je podobná pro dusíková a Nd:YAG laser*)

15

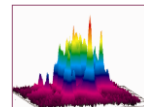
Nejběžnější lasery:



Dusíkový laser (337 nm, 3 ns):
pro: dobře strukturovaný energetický profil
contra: pomalý (maximum 50Hz)



Nd:YAG laser (355 nm, 4-7 ns):
pro: rychlý (až 1000Hz)
contra: Gausovský energetický profil



Smartbeam/Smartbeam II (modifikovaný Nd:YAG laser):
pro: rychlý (až 2000Hz)
pro: dobře strukturovaný energetický profil

16

Zdroj: materiály firmy Bruker

Další lasery

IR lasery

- **Er:YAG laser:** 2.94 μm ; **Er:YSGG:** 2,79 μm ($t_{\text{puls}} = 50 - 100 \text{ ns}$)
- absorpce: změny vibračních stavů molekul matrice (O-H, N-H vibrace)
- **CO₂ laser:** 10.6 μm
- „měkkčí“ než typické UV, méně aduktů
- jiné matrice MALDI: glycerol, sukcinová kyselina

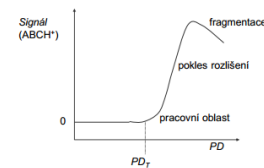
Laditelné lasery

- UV i IR
- speciální aplikace

17

Prahová hodnota zářivé expozice laseru

- Hodnota, při které se začínají objevovat signály
 - Různá pro různé matrice
 - Různá pro různé analyty
 - Různá pro různé analyzátoři i detektory
- Pracovní oblast: 10 – 30% nad prahovou hodnotou



www.bart.chemi.muni.cz

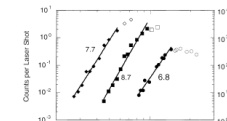


Figure 4. Measured signal intensities of molecular ions of bovine insulin desorbed from a sinapinic acid matrix as a function of laser fluence. An axial-time-of-flight (TOF) mass spectrometer was used and desorption/ionization was achieved with an N₂ laser ($\lambda = 337 \text{ nm}$, $\tau = 3 \text{ ns}$). The circles represent analogue measurements with a digital oscilloscope and individual single laser shot desorption/ionization events, the squares pulse-counting TDC measurements with an active detector (MCP) area of 1 mm in diameter, and the diamonds pulse-counting measurement with an active detector area of 20 mm in diameter. Between a few hundred to several thousand single shot mass spectra have been accumulated in the TDC measurements. Open symbols represent the onset of detector saturation (Reproduced with permission from ref 66; copyright Elsevier Science, 2006).

K. Dreisewerd: The Desorption Process in MALDI, Chem. Rev. 2003, 103, 395–425

18

Některé parametry pro UV-MALDI

$$H = H_0 * e^{-\alpha z}$$

H zářivá expozice ve hloubce z vzorku (J/m^2)
(energie 1 pulsu vztážená na plochu)

H_0 zářivá expozice na povrchu vzorku (obvykle 20-200 J/m^2)

α absorpční koeficient
($1/\alpha$ – penetrační hloubka: hloubka, kde dojde k poklesu "fluence" na 30%; 20-200 nm)

množství absorbované energie vztážené na jednotku objemu... E_0/V

$$E_0/V = H * \alpha$$

JÁDRO PROCESU MALDI:
jde především
o množství energie
absorbované matricí !!!

19

Některé parametry pro UV-MALDI

zářivá expozice 100 J/m^2

tok fotonů 1.7 x 10¹⁶ foton/cm² (337 nm, 3.7 eV)

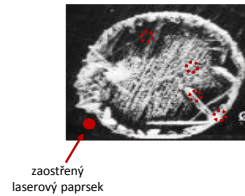
0.7 fotonů absorbovaných na 1 molekulu matrice

- velké množství energie odpovídající celkové energii všech intermolekulárním interakcím v pevné fázi
-> **ablace, exploze materiálu**
- nedostatečné pro 2 fotonovou absorpci a ionizaci (IP matric MALDI: 8 eV)

20

Kvantifikace?

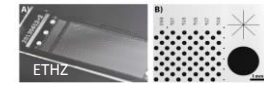
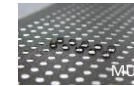
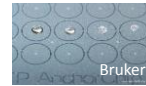
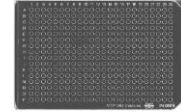
- obtížná
- homogení vzorky
- průměrování velkého množství spekter z mnoha pozic
- kapalná matrice MALDI (netěkavé, glycerol jako solvent)
- vnitřní standard
- diskriminační efekty (kompetice o náboj)



21

Terčik MALDI

- klasický MALDI terčik
- modifikované terčiky
 - AnchorChip
 - "home-made"
 - koncentrace analytu, lokalizace pro automatická měření



- ITO skříčka (zobrazovací MS)

22

Terčik MALDI: nejen nosič vzorku

- Možnost re-analýzy a archivace
- pole na terčiku: "mikroreaktor"
 - enzymatické i jiné reakce
- možnost aplikace více detekčních technik



23

Hmotnostní analyzátoři pro MALDI

- MALDI bylo spojeno s prakticky všemi hmotnostními analyzátoři
- pulsní generace iontů předurčuje MALDI pro spojení s průletovým hmotnostním analyzátořem: MALDI TOF MS
 - iontový zdroj ve vakuu = vakuová ionizace
 - geometrie iontového zdroje (vložená napětí) ovlivní kvalitu spekter
- spojení s pastovými analyzátoři (FT-ICR MS, Orbitrap, ...)
 - nutný transport iontů
 - delší doba analýzy!
 - často AP-MALDI (měkkčí ionizace?)

24

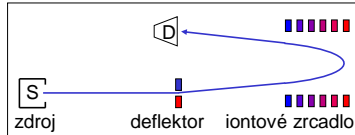
Průletový analyzátor

- axiální uspořádání

- Lineární

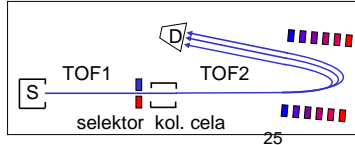


- Reflektorové

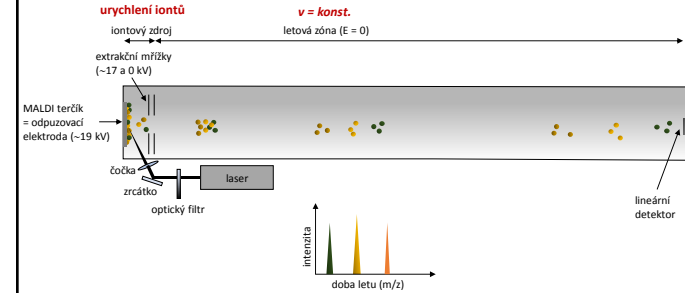


- TOF/TOF

- lineární kolizní cela
- reflektor pro MS2



Průletový analyzátor: lineární uspořádání



Princip průletového analyzátoru

1. Pulsní ionizace (doba pulsu ~ ns): rychlé vytvoření obláčku iontů (LDI, MALDI, PD, EI ...)
2. Extrakce a urychlení iontů v elektrickém poli
3. Separace iontů v driftové zóně při $E = 0$ (field-free region, flight tube)
4. Detekce iontů, záznam signálu, transformace do m/z domény

urychlovací energie $zeU = \frac{mv^2}{2}$ kinetická energie

$v = \frac{L}{t}$ — délka driftové zóny
 — doba letu

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

Lineární uspořádání

- energie (rychlost) iontů s daným m/z se po laserové desorpci liší velikostí i směrem
- důsledek vysoké počáteční disperze energií: ionty s daným m/z dopadají na detektor v různých časech: rozšíření píků

• rozlišení: $R = \frac{m}{\Delta m}$

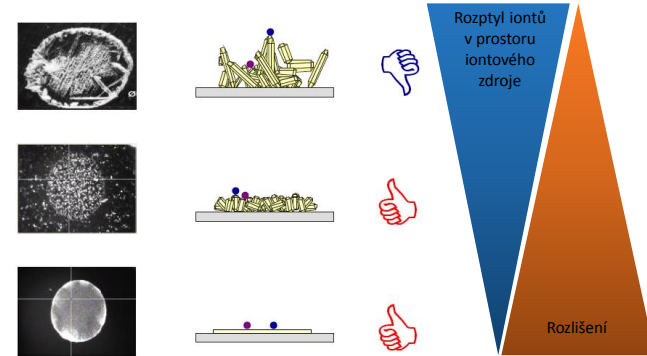


Zvyšování rozlišení:

1. Příprava vzorku
2. Použití zpožděné extrakce
3. Použití reflektoru

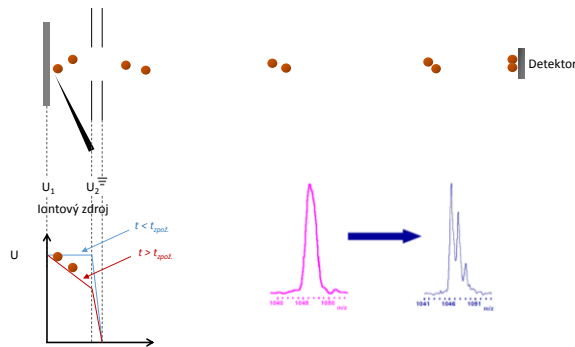
29

1. Příprava vzorku



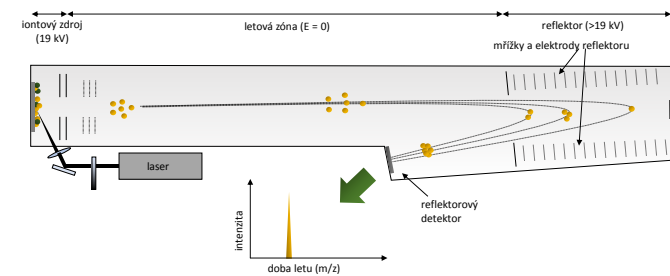
30

2. Zpožděná extrakce



31

3. Reflektor



- na reflektor je vloženo vyšší napětí než je urychlovací napětí

- ionty s vyšší počáteční rychlostí/energií pronikají hlouběji do reflektoru, urazí v analyzátoru delší dráhu a dopadají na detektor ve stejném čase jako ionty o stejné m/z s nižší počáteční energií

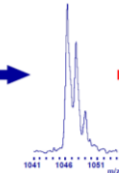
32

Zvyšování rozlišení

MALDI TOF MS
lineární uspořádání

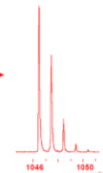


MALDI TOF MS
lineární uspořádání
+ zpožděná extrakce



proteiny

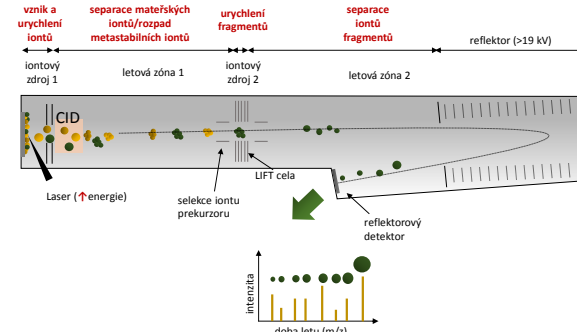
MALDI TOF MS
reflektorové uspořádání
+ zpožděná extrakce



peptidy, malé molekuly,
lipidy, ...

33

MALDI TOF/TOF MS



34

MALDI TOF/TOF MS

- Tandemová hmotnostní spektrometrie:
fragmentace iontů -> strukturální analýza

1. Fragmentace:

- využívá vyšší energie laseru: vznik metastabilních iontů (laserem indukovaná disociace, LID)
- fragmentace může být podpořena kolizním plynem (kolizemí indukovaná disociace, CID)

! K fragmentaci dochází za zdrojem, fragmenty i prekurzory letí stejnou rychlostí!

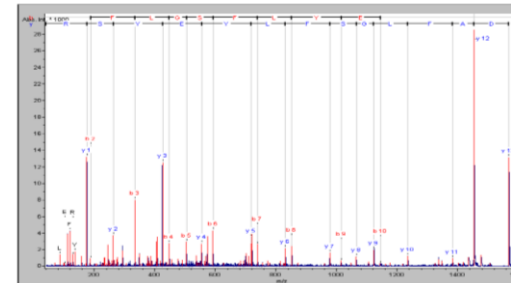
2. Výběr mateřských iontů v 1. letové zóně

3. Re-akcelerace iontů fragmentů

4. MS analýza iontů fragmentů

35

MALDI TOF/TOF MS



36

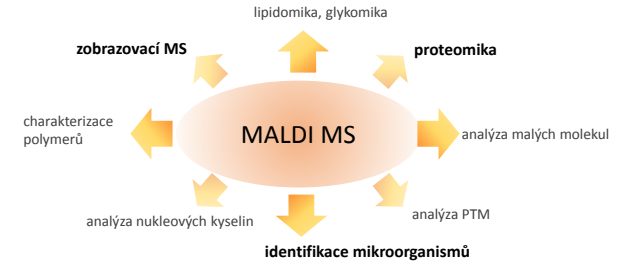
Vlastnosti TOFMS

- Teoreticky neomezený rozsah m/z (analýza celých buněk či nanočástic)
- Ideální pro pulsní ionizaci
- pro každý puls zaznamenáno celé spektrum, není třeba skenovat
- Velmi krátká doba záznamu spektra ($\sim 10^{-4}$ s)
- Vysoká propustnost iontů ... předpoklad vysoké citlivosti
- Jednoduchost

37

Typické analyty/aplikace MALDI:

aplikace s vyžadující rychlé analýzy (high throughput), zachování informace o distribuci vzorku, malé množství vzorku, nepolární analyty, ...



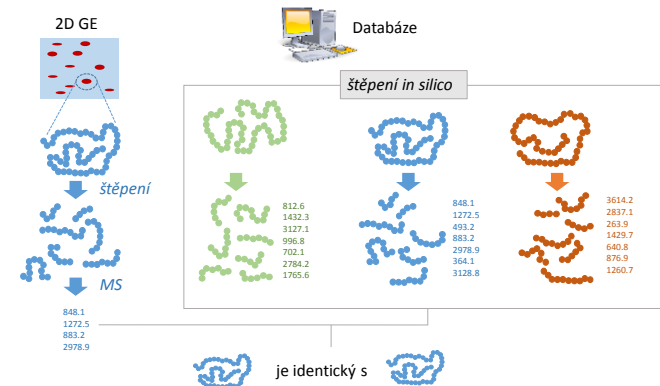
38

Proteomické aplikace MALDI TOF MS: peptidové mapování

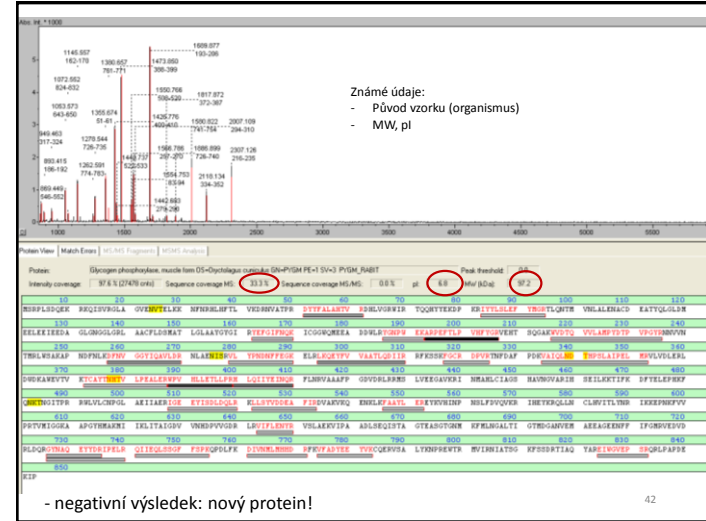
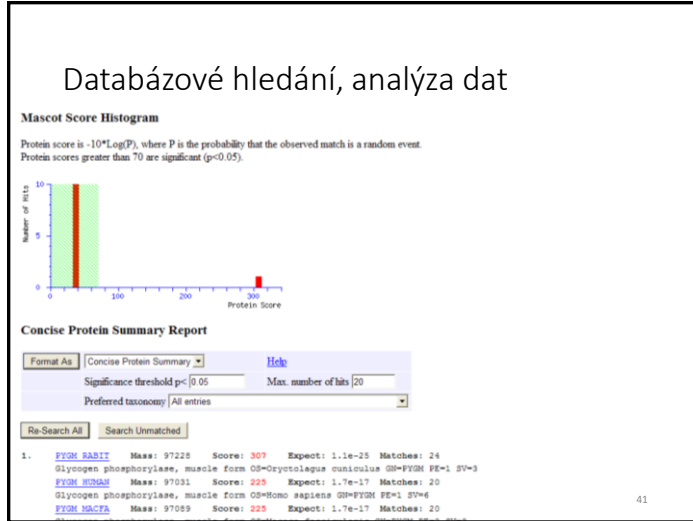
- identifikace proteinů: obvykle na základě separace (GE, LC), tryptického štěpení proteinů a MS
- peptidové mapování (PMF, peptide mass fingerprinting): identifikace na základě specifického "fingerprintu" – produktů enzymatického štěpení proteinu; srovnání fingerprintu s knihovnou známých proteinů
- vyžaduje izolaci jednotlivých protein (ne více než 2-3)
- typicky používaný enzym: trypsin

39

Peptidové mapování



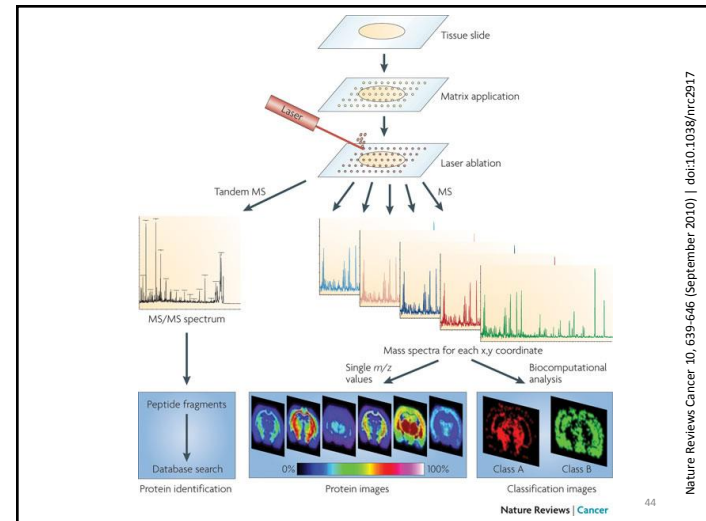
40



Zobrazovací hmotnostní spektrometrie

- zobrazování prostorové distribuce analytů v biologických vzorcích
- přímá vizualizace bez derivatizace
- typické analyty: lipidy, metabolity, proteiny, peptidy
- vzorky: řezy orgány, celými organismy, rostlinný materiál, ...
- rozlišení: hmotnostní, laterální a hloubkové

43



Zobrazovací hmotnostní spektrometrie

- Příprava vzorku:
 - řezání na kryotomu (tloušťka: 5-20 μm)
 - fixace na mikroskopová sklíčka (vodivá)
- Nanášení matrice:
 - piezoelektrické dispensery, nebulizéry, elektrosprej, sublimace
 - dramaticky může ovlivnit laterální rozlišení
- MALDI MS
 - nastavení velikosti rastru, zaostření laserového paprsku
 - kompromis mezi dobou akvizice a laterálním rozlišením

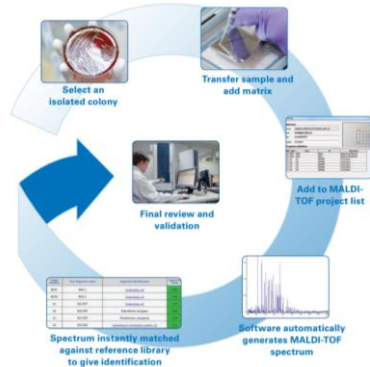
45

Identifikace mikroorganismů

- klinická aplikace; "MALDI biotyping"
- rychlá identifikace/klasifikace bakterií, mnohobuněčných hub i kvasinek
- identifikace na základě porovnání spektrálních profilů lyzátů celých bakterií (ribosomální proteiny)

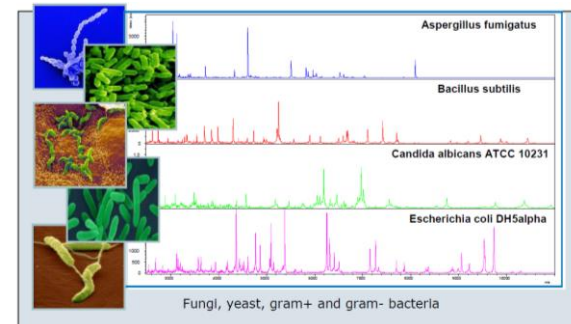
46

MALDI biotyping: schéma



47

„Fingerprints“ ribosomálních proteinů různých organismů



48

Dále...

Navazující předměty:

- C7895 Hmotnostní spektrometrie biomolekul
- C8102 Speciální metody – praktikum

Pracoviště na MU:

- Oddělení analytické chemie, PŘF MU
- CEITEC, výzkumná skupina *Proteomika*