

IONIZACE LASEREM ZA PŘÍTOMNOSTI MATRICE ZA ATMOSFÉRICKÉHO TLAKU (AP-MALDI) – NOVÝ SMĚR V ANALÝZE PEPTIDŮ A PROTEINŮ

MICHAL GODULA

HPST s.r.o., Písnická 372/20, 142 00 Praha 4
michal.godula@hpst.cz

Došlo 27.8.05, přijato 27.10.05.

Klíčová slova: ionizace laserem, MALDI, proteiny

Obsah

1. Úvod
2. Princip ionizace MALDI za atmosférického tlaku (AP-MALDI)
3. AP-MALDI v praxi
 - 3.1. AP-MALDI-IT-MS
 - 3.2. AP-MALDI-*oa*TOF
4. AP-MALDI v kombinaci s 2D-nanoHPLC
 - 4.1. Online 2D-HPLC-MS-MS s diskontinuálním gradientem
 - 4.2. Online 2D-HPLC-MS-MS se semi-kontinuálním gradientem
 - 4.3. Offline 2D-HPLC-MS-MS
 - 4.4. Offline 2D-nanoLC-MALDI-MS-MS
5. Závěr

1. Úvod

Proteiny či peptidy obsažené v buňkách v relativně nízkých koncentracích mohou hrát významnou roli v procesech probíhajících v buňce. Mezi tyto procesy patří např. regulace metabolismu, vliv na vznik různých nemocí atd. Hlavním úkolem hmotnostní spektrometrie je identifikace a kvantifikace těchto proteinů i ve velmi komplexních směsích proteinů obsažených v buňkách.

Nejrozšířenější MS technikou v analýze proteinů či peptidů je v současnosti beze sporu hmotnostní spektrometrie s ionizací MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)^{1,2}. Principem MALDI ionizace je nanesení malého množství vzorku společně s vhodnou maticí (kyselina 2,5-dihydroxybenzoová, kyselina α -kyano-4-hydroxy-skořicová a další) na terčík a následná desorpce a ionizace laserem. Výsledkem celého procesu je ionizace peptidů nebo proteinů a jejich následná hmotnostní analýza.

V minulosti byla většina systémů určených pro analý-

zu proteinů a peptidů konstruována s ionizací MALDI realizovanou ve vakuu a v kombinaci s analyzátozem doby letu iontů (Time of Flight, TOF).

Výhody klasického uspořádání MALDI-TOF jsou následující:

- vysoký hmotnostní rozsah systému umožňující analýzu intaktních proteinů,
- potenciálně lepší přesnost stanovení hmotností iontů,
- dobré rozlišovací schopnosti systému.

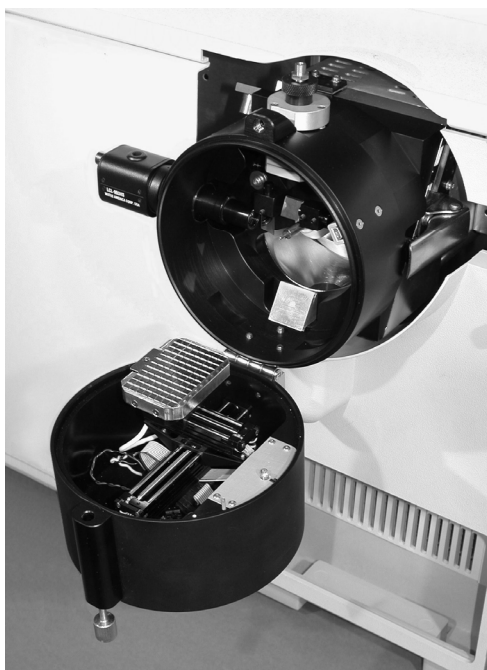
2. Princip ionizace MALDI za atmosférického tlaku (AP-MALDI)

V nedávné době byly publikovány pokusy realizovat MALDI za atmosférického tlaku (AP-MALDI)³⁻⁶ v kombinaci s dalšími typy hmotnostních spektrometrů, např. na bázi iontové pasti (IT-MS). Bohužel, první experimenty s ionizací AP-MALDI poukázaly na možné problémy, zejména na nižší citlivost a poměrně intenzivní tvorbu aduktů matrice⁴. V současnosti již umožňuje technické řešení zdroje AP-MALDI analýzy směsí peptidů vzniklých enzymatickým štěpením proteinů o velmi nízkých koncentracích a navíc s možností získání MS/MS spekter. Využití MS/MS dat také výrazně zvyšuje specifitu vyhledávání v databázích peptidů a proteinů v porovnání s metodou PMF (peptide mass fingerprint) využívanou při identifikaci spekter získaných prostřednictvím konvenčních systémů MALDI-TOF.

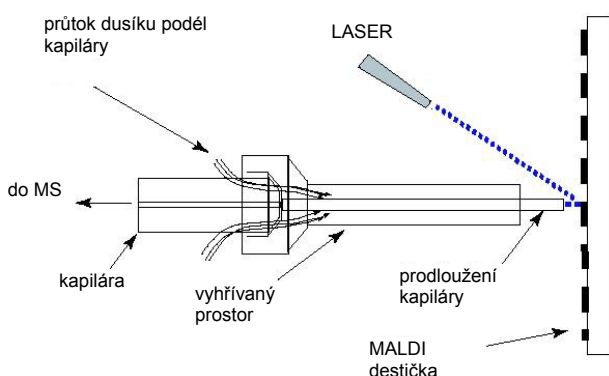
Nespornou výhodou ionizace AP-MALDI je možnost využití různých druhů hmotnostních analyzátorů, jako např. iontové pasti⁷ nebo systému TOF s ortogonální akcelerací⁸. Navíc je možné využít jeden druh analyzátoru, např. systém s iontovou pastí pro analýzu jak intaktních proteinů s ionizací elektrosprejem (ESI), tak i směsí peptidů ionizací AP-MALDI. Výhody AP-MALDI v kombinaci s hmotnostním spektrometrem na bázi iontové pasti jsou následující:

- proces ionizace je realizován nezávisle na hmotnostním analyzátoru, a proto podmínky ionizace a kvalita povrchu terčíku popř. nanesení vzorku neovlivňují parametry analyzátoru (zejména rozlišení a přesnost měření hmotností iontů),
- je možné získat velmi rychle MS/MS data (na rozdíl od vakuového MALDI-TOF-MS) a informaci o sekvenci peptidů se subfemtomolovými koncentracemi,
- MS/MS data je možné získat nepoměrně levnější instrumentací oproti systémům Q-TOF nebo TOF-TOF,
- flexibilita – doba výměny zdroje z AP-MALDI např. za ESI velmi krátká (několik minut) a je možné využít jeden systém MS pro širší škálu experimentů.

Na obr. 1. je zobrazen zdroj AP-MALDI firmy Agi-



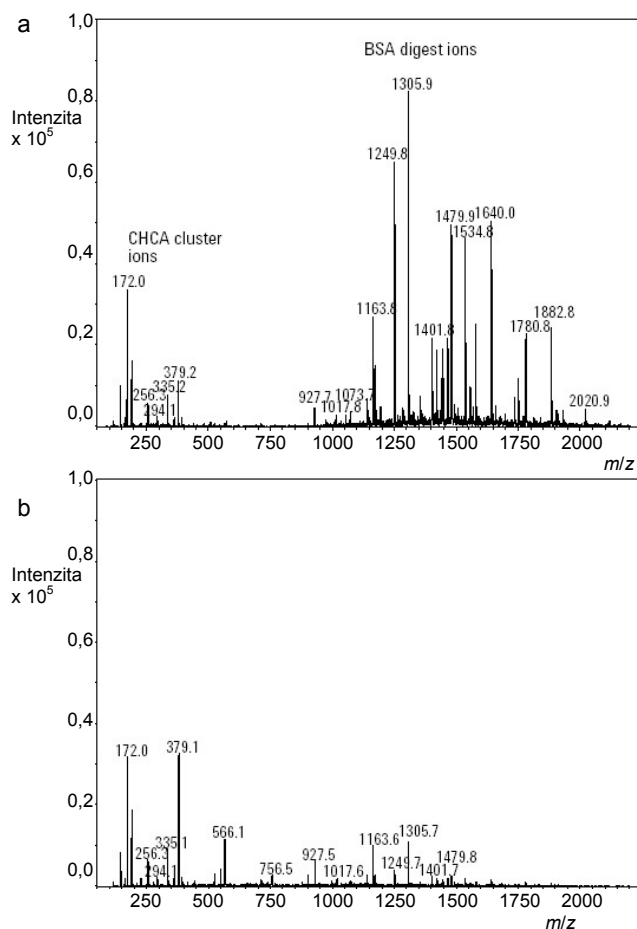
Obr. 1. AP-MALDI zdroj firmy Agilent Technologies



Obr. 2. Schéma zdroje AP-MALDI firmy Agilent Technologies

lent Technologies, uvedený na trh v roce 2004. Zdroj je vybaven dusíkovým laserem o vlnové délce 337 nm (10 Hz), který je přiváděn skrze optické vlákno o průměru 400 μm na pozici na terčiku o velikosti 200–250 μm . Energie laseru je 20–24 μJ . Schéma zdroje je pak uvedeno na obr. 2.

Hlavním rysem konstrukce zdroje je využití protiproudého uspořádání toku sušícího plynu oproti pohybu iontů při desorpci laserem. Ionty vzniklé při ionizaci jsou vtahovány do kapiláry MS kombinací účinku elektrostatického pole a vakua. Během jejich krátkého letu atmosférickou částí dochází k rozrušení shluků iontů vzniklých během ionizace účinkem proudu horkého dusíku. Účinek protiproudu sušícího plynu je velmi výrazný, jak je doku-

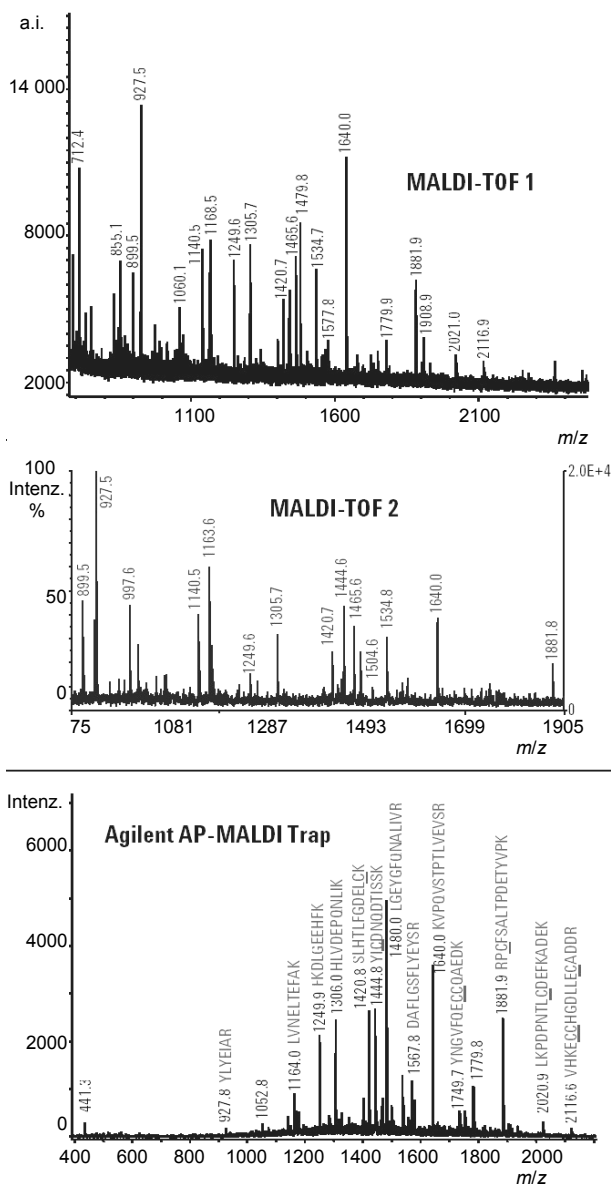
Obr. 3. Vliv protiproudu sušícího plynu na tvorbu shluků a intenzitu iontů peptidů z tryptického rozkladu hovězího serumalbuminu, matrice kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová; a) spektrum získané při použití vyhřívavého proudu sušícího plynu, b) spektrum získané po vypnutí vyhřívání sušícího plynu

mentováno na obr. 3. Zatímco při využití sušícího plynu o teplotě 325 $^{\circ}\text{C}$ jsou dominantními ionty ve spektru ionty peptidů serumalbuminu, při experimentu bez vyhřívání sušícího plynu jsou dominantní ionty matrice v oblasti 100 až 600 amu (spodní obrázek)⁸.

3. AP-MALDI v praxi

3.1. AP-MALDI-IT-MS

První z možností využití zdroje AP-MALDI, která bude zmíněna v tomto článku, je kombinace s hmotnostním analyzátozem na bázi iontové pasti (IT-MS). Pulsy laseru při ionizaci jsou synchronizovány s akumulací fázemi iontové pasti hmotnostního spektrometru. Na obr. 4. je zobrazeno porovnání spekter směsi peptidů získaných enzymatickým štěpením hovězího serumalbuminu (BSA) trypsinem. Spektra byla pořízena po-



Obr. 4. Porovnání spekter získaných pomocí dvou typů MALDI-TOF-MS a AP-MALDI-IT-MS systémů; hovězí serumalbumin 5 fmol; C = carboxymethylovaný cystein

mocí dvou typů konvenčních systémů MALDI-TOF a systému IT-MS vybaveného zdrojem AP-MALDI.

Z porovnání uvedeného v tab. I je zřejmé, že jak MALDI-TOF, tak i AP-MALDI-IT-MS, jsou zařízení schopná produkovat velmi podobná spektra. Klasické systémy MALDI-TOF ale produkují spektra s vyšší odezvou hmot o nižší a střední molekulové hmotnosti. V případě AP-MALDI-IT-MS nejsou ionty o nízké hmotnosti příliš významné. Tento jev je způsoben četnými kolizemi nízko-molekulárních iontů za atmosférických podmínek, čímž dochází ke snížení vnitřních energií iontů a tím i k jejich přenosu ze zdroje do hmotnostního detektoru. Zároveň je

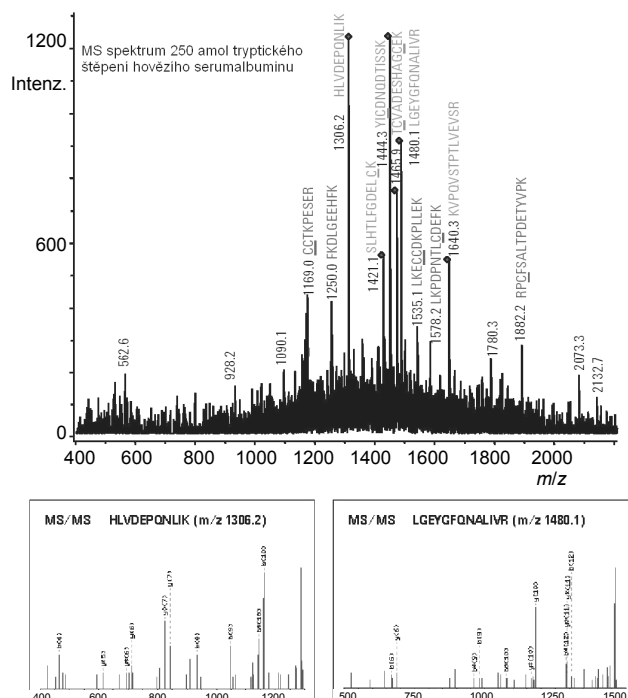
optická část systému IT-MS optimalizována pro přenos iontů o vyšších hmotnostech a tím dochází k potlačení transmise iontů o nízké hmotnosti, zejména pak iontů matrice.

Oproti klasickým systémům MALDI-TOF nabízí uspořádání AP-MALDI-IT-MS zřejmou výhodu v možnosti získání MS i MS/MS spekter na koncentračních hladinách nižších než 1 fmol. Např. na obr. 5. jsou znázorněna MS a MS/MS spektra získaná analýzou 250 amol BSA pomocí AP-MALDI-IT-MS systému⁶. Ionty označené v MS spektru kosočtvercem byly vybrány režimem AUTO-MS/MS pro izolaci a následnou fragmentaci. Na dvou spodních obrázcích jsou pak znázorněny příklady takto získaných spekter MS/MS. Takto získaná data lze následně využít pro vyhledávání v databázích proteinových nebo nukleotidových sekvencí.

Na druhé straně ale stále zůstává velkou výhodou klasického uspořádání MALDI-TOF možnost měření s vysokou přesností. Proto další část tohoto článku bude věnována možnostem propojení AP-MALDI s TOF-MS systémy.

3.2. AP-MALDI-*o*aTOF

Další alternativou využití AP-MALDI je aplikace této ionizace v systému vybaveném analyzátozem TOF s orthogonální akcelerací (*o*aTOF). Systém *o*aTOF může být využit v kombinaci s elektrospřejem např. pro 2D-HPLC-TOF-MS analýzu a v dalším kroku pro AP-MALDI analýzu peptidů vzniklých enzymatickým štěpe-



Obr. 5. MS a MS/MS spektra BSA na hladině 250 amol, AP-MALDI-IT-MS a MS-MS

Tabulka I
Identifikované sekvence peptidů trypsinového štěpení hovězího serumalbuminu (BSA)

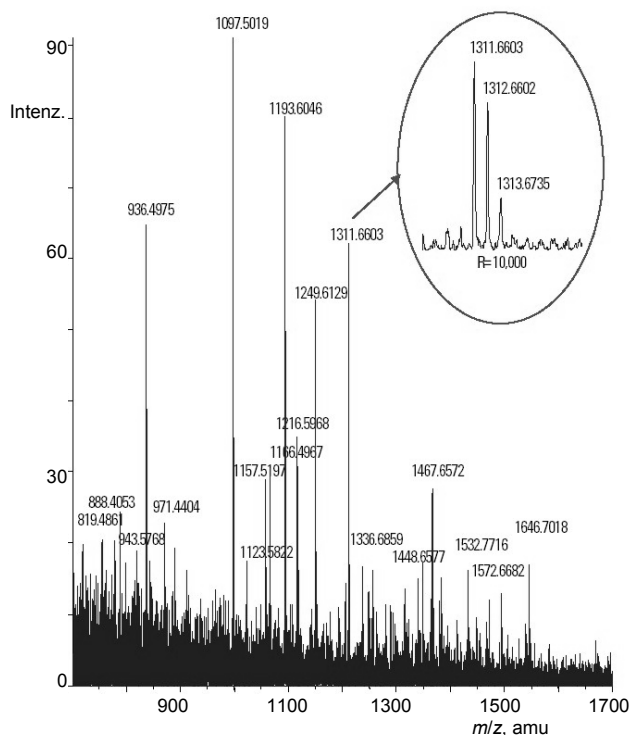
Sekvence peptidů ^a	Teoretická <i>m/z</i> [<i>m/z</i>]	AP-MALDI-IT-MS [<i>m/z</i>]	MALDI-TOF 1 [<i>m/z</i>]	MALDI-TOF 2 [<i>m/z</i>]
AWSVAR	689,4		689,4	
SEIAHR	712,4		712,4	
NYQEAK	752,4		752,4	
^a				833,1
LSQKFPK	847,5		847,5	847,5
^a				855,1
LCVLHEK	899,5		899,5	899,5
IETMREK	922,5		922,5	922,5
YLYEIAR	927,5	927,8	927,5	927,5
^a				997,6
^a				1060,1
CCTESLVNR	1140,5		1140,5	1140,5
LVNELTEFAK	1163,6	1164,0	1163,6	1163,6
CCTKPESER	1168,5	1168,9	1168,5	1168,5
FKDLGEEHFK	1249,6	1249,9	1249,6	1249,6
HLVDEPQNLIK	1305,7	1306,0	1305,7	1305,7
SLHTLFGDELCK	1420,7	1420,8	1420,7	1420,7
RHPEYAVSVLLR	1439,8	1439,5	1439,8	1439,8
YICDNQDTISSK	1444,6	1444,8	1444,6	1444,6
TCVADESHAGCEK	1465,6	1465,7	1465,6	1465,6
LGEYGFQNALIVR	1479,8	1480,0	1479,8	1479,8
QTALVELLKHKPK	1504,9	1504,7		1504,6
LKECCDKP LLEK	1534,7	1534,8	1534,7	1534,8
DDPHACYSTVFDK	1555,6	1555,7		
DAFLGSFLYEYSR	1567,7	1567,8		
LKPD PNTLCDEFK	1577,8	1577,7	1577,8	
KVPQVSTPTLVEVSR	1639,9	1640,0	1640,0	1640,0
YNGVFQECCQAEDK	1749,7	1749,7		
^a		1779,8	1779,9	
RPCFSALTPDETYVPK	1881,9	1881,9	1881,9	1881,8
NECF LSHKDDSPDLPK	1902,9	1902,8		
LFTFHADICTLPDTEK	1908,9	1909,0	1908,9	
LKPD PNTLCDEFK ADEK	2021,0	2020,9	2021,0	
VHKECCHGDLLECADDR	2116,8	2116,6	2116,9	

Pozn.: Koncentrace 5 fmol; ^a označuje hmoty, které neodpovídají žádné sekvenci vzniklé rozkladem BSA; C = karboxymetylovaný cystein⁶

ním proteinů. Jednoznačnou předností je pak rychlá výměna obou zdrojů a tedy i vysoká flexibilita přístroje. Podobně jako u AP-MALDI-IT-MS i zde je výhodou oddělení kroků ionizace a vlastní hmotnostní analýzy. Parametry ionizace tudíž neovlivňují dosažené rozlišení a přesnost stanovení hmotnosti analyzátoru oATOF. Tím je dosaženo rutinního měření spekter s přesností hmot lepší než 5 ppm a vynikajícího rozlišení (>10 000). Výhodou systému oATOF firmy Agilent Technologies je kromě již zmíněných parametrů i velmi široký dynamický rozsah (3–4 řády), který umožňuje simultánní stanovení peptidů přítomných

ve vzorku na velmi rozdílných koncentračních hladinách.

Další výhodou již zmíněného uspořádání je mimo jiné také vynikající citlivost. Na obr. 6 je znázorněno spektrum produktů tryptického štěpení 500 amol apotransferrinu. Pro interní kalibraci hmotnostní osy bylo použito iontů matrice (190,0499, 379,0925, 568,1351), čímž bylo dosaženo rutinně stanovení hmot s přesností lepší než 5 ppm. Pro PMF vyhledávání v databázi pak byl použit užší limit 10 ppm, čímž bylo dosaženo také vyšší pravděpodobnosti shody a eliminace potenciálně falešných výsledků⁷.



Obr. 6. Spektrum AP-MALDI-MS 500 amol apotransferrinu (APO) (tryptické štěpení)

4. AP-MALDI v kombinaci s 2D-nanoHPLC

Identifikace proteinů v komplexních směsích v minulosti byla a stále je většinou realizována klasickým postupem, tj. separací směsi proteinů technikou dvourozměrné gelové elektroforézy (2D-GE), následným štěpením izolovaných proteinů vhodným enzymem a identifikací vzniklé směsi peptidů metodou MALDI-TOF. Nevýhodou tohoto uspořádání je časová a manuální náročnost. Na druhé straně, výhodou je možnost dosažení velmi spolehlivých výsledků díky vysokému rozlišení 2D-GE a spolehlivé iden-

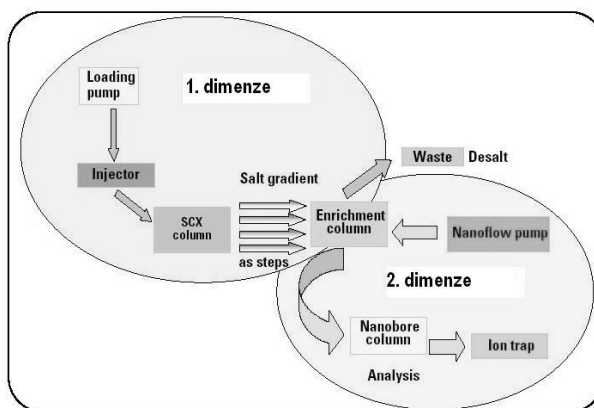
tifikaci vyhledáváním v proteinových databázích (PMF).

Alternativní technikou, která nabývá stále většího významu, je analýza komplexních směsí peptidů vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií ve spojení s MS detekcí. Vzhledem k tomu, že množství vzorku je obvykle velmi malé, využívá se k separaci směsí peptidů HPLC v kapilárním (průtok mobilní fáze 1–20 $\mu\text{l min}^{-1}$) nebo nano (10–1000 nL min^{-1}) uspořádání. Výhodou 2D-HPLC je možnost automatizace celého procesu a tím i dosažení reprodukovatelnějších výsledků.

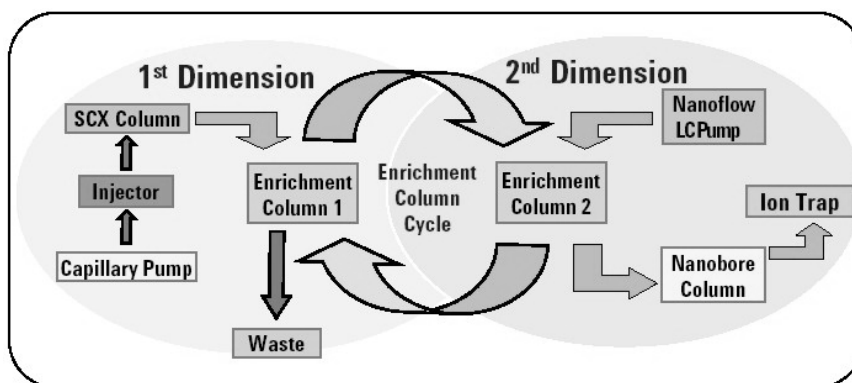
Existuje několik možností realizace 2D-HPLC v kombinaci s MS detekcí, které se liší v konfiguraci systému. Zároveň je prostřednictvím různého uspořádání systému dosaženo velmi odlišné kvality získaných dat.

4.1. Online 2D-HPLC-MS-MS s diskontinuálním gradientem

Nejjednodušší způsob realizace 2D-HPLC je zobrazen na obr. 7 (cit. ¹⁰). V první dimenzi je vzorek obsahující peptidy vzniklé enzymatickým štěpením směsi proteinů nanosen automatickým dávkovačem na kolonu obsahující silný katex (SCX). Eluce frakcí peptidů z kolony SCX je realizována postupnými nástřiky roztoku mravenčanu

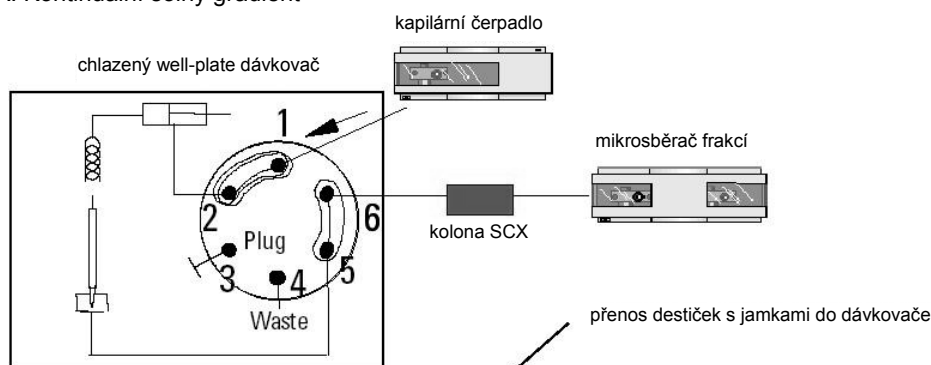


Obr. 7. Princip online 2D-HPLC s diskontinuálním gradientem

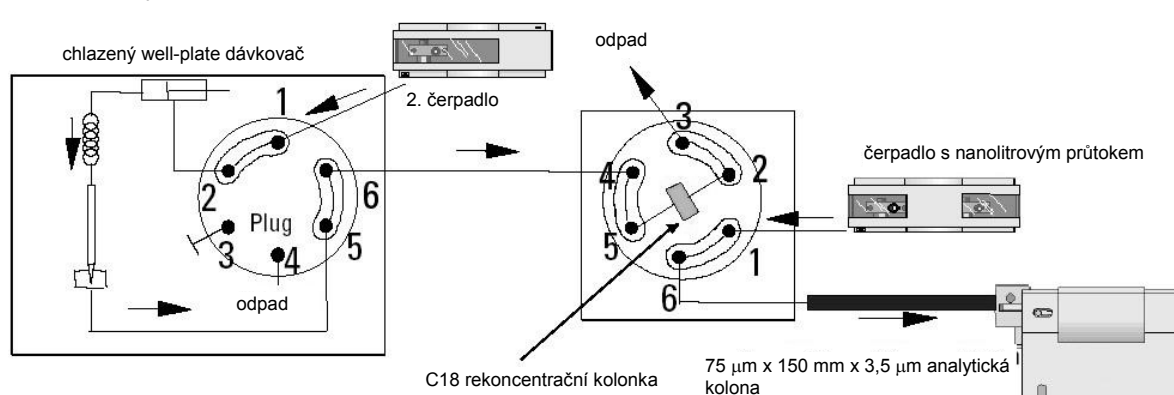


Obr. 8. Online 2D-HPLC se semikontinuálním gradientem

A. Kontinuální solný gradient



B. Nástřik frakcí na záchytnou kolonku, promytí a separace



Obr. 9. Offline 2D-HPLC-MS/MS

amonného o rostoucích koncentracích (např. 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 300, 500, 1000 mM). Každá z frakcí je nejprve vedena na rekoncentrační kolonku, kde dojde k zachycení eluovaných peptidů. Poté dojde k přepnutí rekoncentrační kolony do druhé dimenze (průtok řízený např. nano pumpou) a postupným gradientem organické fáze dochází k vymytí peptidů na analytickou kolonu. Následně je realizována jejich separace a detekce systémem ESI-IT-MS-MS.

4.2. Online 2D-HPLC-MS-MS se semi-kontinuálním gradientem

Diskontinuální 2D-HPLC, zmíněná v předchozím odstavci, má několik nevýhod. Jako hlavní je možno uvést tu, že kolona SCX není provozována v optimálním rovnovážném režimu a že dochází pouze k nástřikům jednotlivých dávek soli. To může vést např. k eluci jednoho peptidu ve dvou různých frakcích a tím ke snižování detekčních možností (citlivosti) systému. Optimalizovaným řešením je 2D-nanoHPLC se semikontinuálním gradientem – viz obr. 8. Základní princip je totožný s předchozím systémem. Nicméně v tomto uspořádání jsou peptidy vymývá-

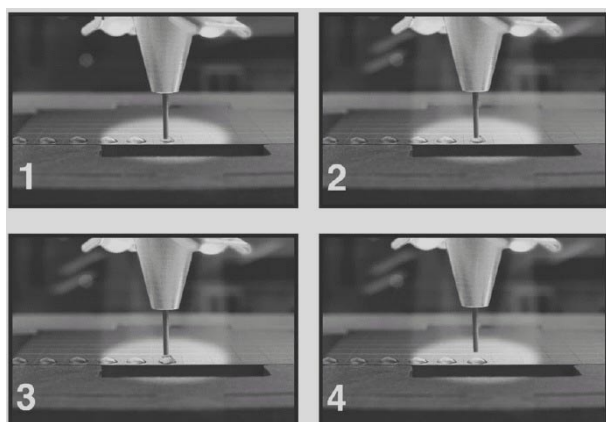
ny z katexové kolony kontinuálním gradientem na dvě cyklicky se přepínající rekoncentrační kolony. Tímto uspořádáním je dosaženo podstatně lepšího rozlišení peptidů a tím i spolehlivější identifikace¹¹.

4.3. Offline 2D-HPLC-MS-MS

Další možností zvýšení rozlišení systému 2D-HPLC je oddělení frakcionace peptidů na koloně SCX a vlastní chromatografické separace jednotlivých frakcí. Jedno z možných uspořádání je zobrazeno na obr. 9. V této konfiguraci je směs peptidů nanesena na katexovou kolonu a jednotlivé frakce peptidů jsou postupně vymývány rostoucím gradientem soli a frakcionovány sběračem frakcí. Frakce obsahující eluované peptidy jsou sbírány přímo do mikrotitračních destiček. Mikrotitrační destička s frakcemi je pak přenesena do systému 2D-nanoHPLC-MS-MS a jednotlivé frakce z kolony SCX jsou nástřikovány a analyzovány pomocí 2D-HPLC na reverzní fázi¹². Výhodou tohoto uspořádání je podstatně vyšší rozlišení než v případě online systémů. Je možné provést také frakcionaci na destičky MALDI a provést jejich analýzy libovolným systémem MALDI-MS.

4.4. Offline 2D-nanoLC-MALDI-MS-MS

Ačkoliv je systémem offline dosaženo velmi kvalitních výsledků zejména díky vynikajícímu rozlišení techniky, problémem je omezená kapacita systému MS-MS na bázi iontové pasti. Při koeluci několika peptidů během separace není systém MS-MS na bázi iontové pasti schopen provést dostatečný počet cyklů a identifikovat všechny složky v píku. Proto je výhodnější převod jednotlivých frakcí na MALDI destičky a analýza např. systémem AP-MALDI-IT-MS-MS. Tento proces je ovšem samozřejmě poměrně časově náročný a je také relativně pracný. Proto byla provedena úprava mikrosběrače frakcí pro možnost frakcionace přímo na MALDI destičky¹³. Základním problémem tohoto řešení je nutnost spolehlivé depozice frakce o minimálním objemu (stovky nl) na destičku.



Obr. 10. Proces depozice frakce na destičku MALDI mikrosběračem frakcí Agilent Technologies

Na obr. 10. je znázorněn proces depozice frakce na destičku MALDI pomocí mikro sběrače frakcí firmy Agilent Technologies. Klíčovým rysem je pohyb jehly ve vertikálním směru souběžně se zvětšováním velikosti kapky. Tím je zabráněno ulpívání kapky na jehle a zhoršení reprodukovatelnosti frakcionace. Navíc je možné do systému zařadit i zařízení pro online přidávání matrice MALDI do proudu mobilní fáze pístovou pumpou. Posledním krokem je pak pouze vysušení kapek na destičce a přenesení destičky do systému MALDI-MS-MS. Mikrosběrač frakcí je možné použít pro depozici na jakékoli destičky MALDI od různých výrobců systémů MS.

5. Závěr

Cílem tohoto článku bylo představit alternativní techniky ke klasickým technikám používaným v proteomické analýze. Výhodami ionizace AP-MALDI oproti klasické MALDI jsou lepší citlivost, vysoká flexibilita a možnost využití s celou řadou MS systémů. Kombinací systému

2D-HPLC se sběračem frakcí schopným přímé depozice na destičky MALDI je pak možné získat velmi kvalitní data i v případě analýz poměrně složitých směsí peptidů. Velkou výhodou kombinace systémů 2D-nanoHPLC s AP-MALDI je možnost automatizace celého procesu a tím i dosažení vysoké spolehlivosti naměřených dat.

LITERATURA

1. Tanaka K., Ido Y., Akita S., Yoshida Y., Yoshida T.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2, 151 (1998).
2. Karas M., Hillenkamp F.: *Anal. Chem.* 60, 229 (1988).
3. Laiko V. V., Burlingame A. L.: U.S. Patent 5965884 (1999).
4. Laiko V. V., Moyer S. C., Cotter R. J.: *Anal. Chem.* 72, 5239 (2000).
5. Moyer S. C., Cotter R. J.: *Anal. Chem.* 74, 469A (2002).
6. Doroshenko V. M., Laiko V. V., Taranenko N. I., Berkout V. D., Lee H. S.: *Int. J. Mass Spectrom.* 221, 39 (2002).
7. Perkins P., Bai J., Lopez-Avila V., Miller C.: Application Note 5988–8625EN, Agilent Technologies, 2003.
8. Yi D., Bai J., Perkins P.: Application Note 5989–1235EN, Agilent Technologies, 2003.
9. Meza J. E., Perkins P. D.: Application Note 5988–7930EN, Agilent Technologies, 2003.
10. Nägele E., Vollmer M., Hörth P.: Application Note 5988–9862EN, Agilent Technologies, 2003.
11. Nägele E.: Application Note 5989–0210EN, Agilent Technologies, 2003.
12. Mortiz R., Vollmer M., Nägele E.: Application Note 5988–9913EN, Agilent Technologies, 2003.
13. Nägele E., Vollmer M.: Application Note 5989–1479EN, Agilent Technologies, 2004.

M. Godula (HPST Co., Prague): Laser Ionization in the Presence of Matrix at Atmospheric Pressure (AP-MALDI) – A New Direction in Peptide and Protein Analysis

Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) is a popular technique for protein and peptide analysis. Historically, MALDI analyses have been accomplished with the sample under vacuum in combination with time-of-flight (TOF) mass analyzers, MALDI-TOF. More recently, MALDI has been performed at atmospheric pressure (AP-MALDI), in combination with various MS systems. A short overview is given on the advantages and application potential of AP-MALDI in proteomics area.