

BIOLÓGIAI MINTÁK TÖMEGSPEKTROMETRIÁS VIZSGÁLATA

Dr. Drahos László

MTA Kémiai Kutatóközpont Szerkezeti Kémiai Intézet

Tömegspektrometria Osztály

E-mail: drahos@chemres.hu

1. Rövidítések jegyzéke

| Rövidítés | Név |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| APCI | atmoszférikus nyomású kémiai ionizáció (atmospheric pressure chemical ionization) |
| APPI | atmoszférikus nyomású fotoionizáció (atmospheric pressure photo ionization) |
| CI | kémiai ionizáció (chemical ionization) |
| CID | ütköztetéssel kiváltott bomlás (collision induced dissociation) |
| ESI | elektroporlasztásos ionizáció (electrospray ionization) |
| FAB | gyorsatom bombázás (fast atom bombardment) |
| IgG | immunglobulin G |
| LC-MS | folyadékkromatográffal kapcsolt tömegspektrométer (liquid chromatography – mass spectrometry) |
| MALDI | mátrixszal segített lézer deszorpció/ionizáció (matrix assisted laser desorption/ionization) |
| MRM | többcsatornás reakciókövetés (multiple reaction monitoring) |
| MS | tömegspektrometria (mass spectrometry) |
| MS/MS | tandem tömegspektrometria (tandem mass spectrometry) |
| QQQ | hármaskvadrupól analízátor (triple quadrupole analyser) |
| QTOF | kvadrupól-repülési idő analízátor |
| QTrap | kvadrupól-ioncsapda analízátor |
| TOF | repülési idő analízátor (time of flight analyser) |

2. Bevezetés

A tömegspektrometria (MS, mass spectrometry), mint szerkezetkutató és analitikai módszer egyre nagyobb teret hódít előnyeinek köszönhetően komplex biológiai minták analizálásában, a molekuláris biológia, proteomika és a glikoproteomika területén. A tömegspektrometriás analízis előnye, hogy kis anyagmennyiségek és komplex biológiai minták komponenseinek kvalitatív és kvantitatív meghatározására alkalmas. Az MS analízisek mellett szól a rövid analízis idő, az extrém érzékenység és a kromatográfiával történő kapcsolási lehetőség. Hátránya, hogy a kapott spektrumok értékelése bonyolult lehet és az izomerek megkülönböztetése akadályokba ütközhet kromatográfiás technikák vagy egyes mintaelőkészítési lépések alkalmazása nélkül.

A ma már hagyományosnak tekinthető és csak illékony komponensek vizsgálatára alkalmas elektronütközéses (EI) és kémiai (CI) ionizáció mellett új, „kíméletesebb” ionizációs módszerek jelentek meg (pl.: FAB, MALDI, APCI, ESI, APPI, stb.), amelyek a tömegspektrometria alkalmazhatóságát poláros és nagy molekulatömegű ill. bomlékony anyagokra is kiterjesztették. Az ionizációs módszer megválasztását a vizsgált vegyület polaritása és mérete határozza meg. Az elektronütközéses ionizációt (EI, electron impact) elsősorban kis móltömegű, illékony, apoláros vegyületek (szénhidrogének, aromás vegyületek, flavonoidok, szteroidok, stb.), az elektroporlasztásos ionizációt (Electrospray, ESI), atmoszférikus nyomáson történő kémiai ionizációt (APCI) és a mátrixszal segített lézer deszorpciós ionizációt (MALDI) nagyobb móltömegű, polárosabb vegyületek, pl. peptidek, proteinek, nukleotidok, stb. vizsgálatára használják.

A molekuláris biológiai és proteomikai kutatások eszköztárában fontos szerepet töltenek be a MALDI és elektroporlasztásos ionforrással rendelkező tömegspektrométerek. A következőkben ezen ionforrások tulajdonságait tekintjük át meg részletesen.

3. Mátrixszal segített lézer deszorpció és ionizáció (MALDI)

1988-ban Tanaka és a tőle függetlenül tevékenykedő Hillenkamp és mtsai nagy molekulatömegű biomolekulák ionizációra alkalmas mátrixszal segített lézer deszorpció/ionizációs ionforrást fejlesztettek ki. Ezért a felfedezésért Tanaka 2002-ben megosztott NOBEL díjat kapott.

A MALDI szintetikus makromolekulák, proteinek vizsgálatára alkalmas ionizációs technika, a nagy molekulatömegű intakt fehérjék vizsgálatának legjobb ionizációs módszere. A mintát egy olyan molekulával kristályosítjuk együtt, amely az alkalmazott lézer hullámhosszán erős fényelnyelést mutat (pl.: nikotinsav, fahéjsav, 2,5-dihidroxi-benzoésav, stb). Ezekben a mátrixokban a minta bomlása minimális és gázfázisban segíti a minta ionizációját. A lézer impulzus hatására a kristályos anyag elpárolgásánál a minta molekulái szeparáltan lépnek át a gőzfázisba. Érzékeny módszer, $10^{-15} - 10^{-21}$ mol mennyiségű minta kimutatására alkalmas pozitív és negatív üzemmódban. Főként egyszeres, esetleg kétszeres töltésű ionok, protonált, gyakran kationizált molekulák (pl. $(M+Na)^+$, $(M+K)^+$) láthatók a spektrumban, fragmentáció nem jellemző.

A módszer előnye, hogy nagy tömegű molekulák vizsgálatára is alkalmas (~ 3-400 - 200.000 Da), toleráns sószennyezésre (mmol koncentrációban) és alkalmas keverékek direkt analizésére. Hátránya, hogy on-line nem kapcsolható elválasztástechnikai módszerekkel, mivel a vizsgálat előtt a minta kristályosítása szükséges. Hátránya továbbá, hogy nagy tömegű molekulák esetén a molekulacsúcs széles lehet, valamint mennyiségi meghatározásra nem alkalmas.

A MALDI ionforrást leggyakrabban repülési idő analizátorral (Time of Flight, TOF) kapcsolják.

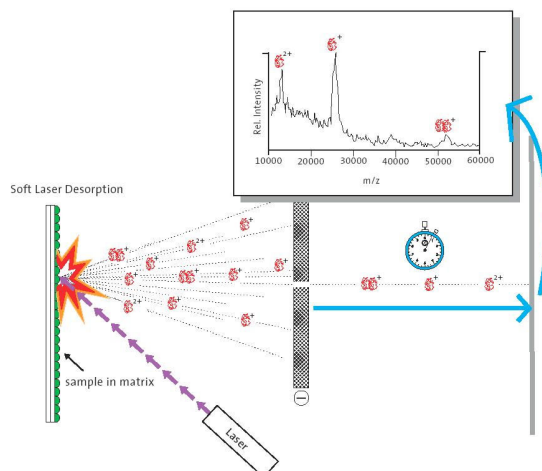
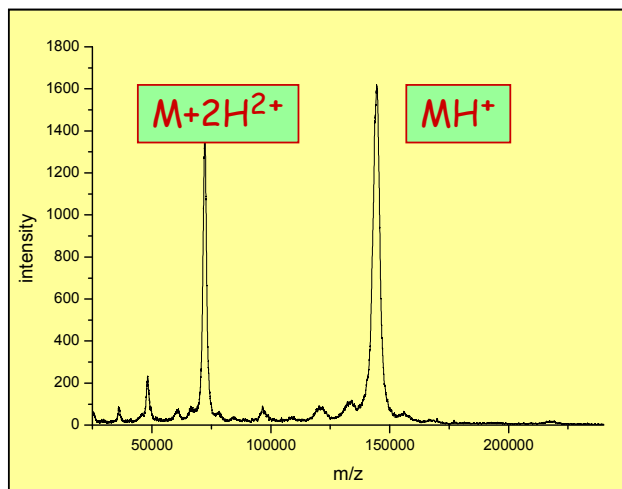


Figure 2. The soft laser desorption process.

A MALDI ionizációs technika elvi ábrája

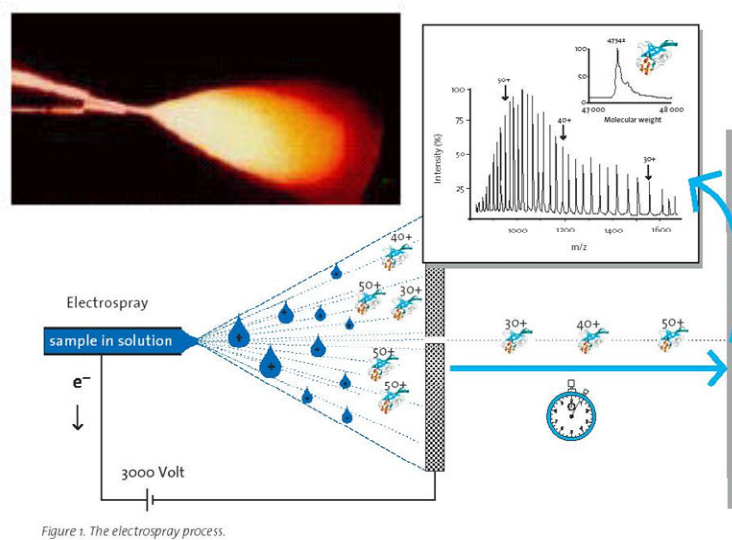
Példaként egy nagy molekulatömegű fehérjéről (IgG) felvett tipikus MALDI spektrum látható a következő ábrán. A fehérje molekulatömege az 1 és 2 szeresen töltött protonált molekulaionok alapján határozható meg.



Nagy molekulatömegű fehérjéről (IgG) felvett tipikus MALDI spektrum

4. Elektroporlasztásos ionizáció (Electrospray, ESI)

A porlasztáson alapuló electrospray ionforrás a proteomikai kutatásokban alkalmazott egyik leggyakoribb ionizációs technika. A folyékony halmazállapotú mintaoldat kapillárison keresztül jut az ionforrásba, ahol nagy feszültség alkalmazása, porlasztó gáz és fűtés segíti az ionizációt. A kapilláris és a vele szemben elhelyezkedő ellenelektrod között elektrosztatikus tér jön létre és ennek következtében a kapillárisból kilépő folyadék töltéssel rendelkező cseppekre hullik szét.

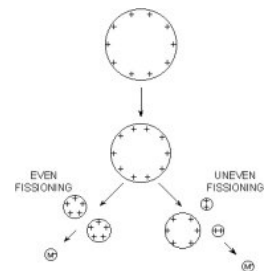


Electrospray ionizációs technika elvi ábrája

Az elektroporlasztásos ionizáció mechanizmusa kétféle modellel magyarázható:

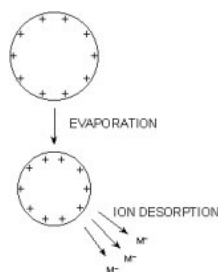
- *Töltésmaradvány modell (Charge residue model):*

többszörösen töltött cseppek párolognak és kritikus méretet elérve a töltéstartás hatására „szétrobbannak” (Coulomb robbanás). Egyre kisebb méretű cseppek jönnek létre és a folyamat végén a minta szolvatált/



hidratált protonált (MH^+) ionjai jelennek meg.

- *Ion-evaporációs modell (Ion evaporation modell):*

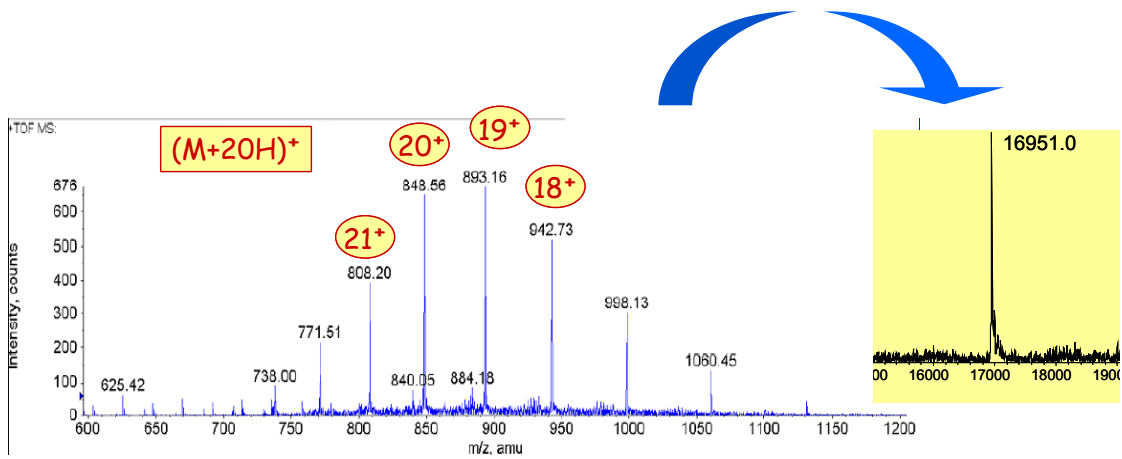


a töltött aeroszol csepp egy kisebb oldószer cseppet lök ki magából, amelynek következtében az összes oldószer elpárolgása után többszörösen töltött ionok jönnek létre az ionforrásban.

Az elektroporlasztás nagyon érzékeny módszer ($\sim 10^{-12} - 10^{-15}$ mol), mely kis és nagy tömegű molekulák, pozitív és negatív ionok, erősen poláris/ionos komponensek meghatározására is alkalmas. Előnye, hogy kapcsolható kromatográfiával és mennyiségi meghatározásra is alkalmas. Kevésbé tolerálja a szerves sókat és egyéb szennyezőket, ezért a kromatográfias rendszerben csak illékony puffer használható (pl.: ammónium-formiát, ammónium-acetát). Az ionizációs folyamat során többszörösen töltött molekulaionok is keletkezhetnek, ezért alkalmas nagy molekulatömegű proteinek, glikoproteinek, oligonukleotidok, polimerek szerkezeti meghatározására. Az ESI-vel történő mérések reprodukálhatósága kedvezőbb, mint a MALDI ionforrással történő analíziséké MALDI-nál alkalmazott kristályosítás rossz reprodukálhatósága miatt. Az ionforrás folyadékkromatográffal közvetlenül kapcsolható (LC-MS).

Az ESI interfészt leggyakrabban kvadрупól(Q)/hármás kvadрупól(QQQ), repülési idő (TOF) ill. ioncsapda (iontrap) analizátorokkal kapcsolják, de manapság egyre gyakrabban alkalmazzák ezek kombinációit is (pl. QTOF, QTrap, stb.)

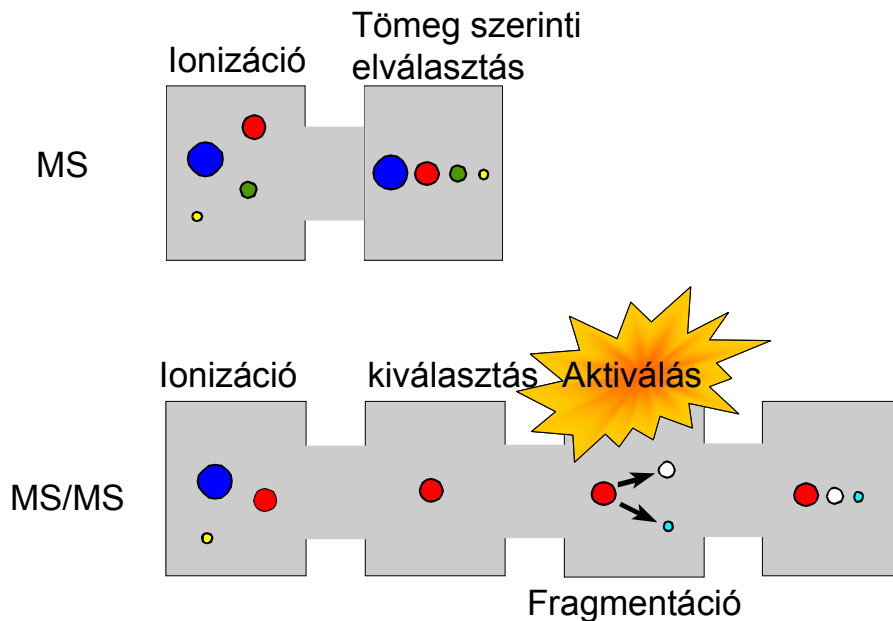
Példaként a mioglobin elektroporlasztásos ionizációval felvett spektruma látható az ábrán. A spektrumban a többszörösen töltött ionok jelennek meg, amelyből a molekulatömeg számítógépes program segítségével meghatározható.



Mioglobin (MW=16951 Da) ESI spektruma

5. Tandem tömegspektrometria

Az új ionizációs lehetőségek, ill. a műszertechnikai fejlesztések lehetővé tették a tandem tömegspektrometria (MS/MS) szélesebb körű elterjedését, amely a vizsgált vegyületről a korábnál sokkal részletesebb információt szolgáltat. Tandem tömegspektrometriának nevezzük azokat a módszereket, amelyek során gázfázisú fragmentációs folyamatokban anyaion-leányion kapcsolat határozható meg. A hagyományos tömegspektrometria (MS) és tandem tömegspektrometria (MS/MS) közötti különbség az alábbi ábrán látható:



A hagyományos tömegspektrometriás kísérletek esetén az ionizációt követően az ionforrásban képződő ionokat „azonnal” tömeg szerint elválasztjuk és detektáljuk. Tandem tömegspektrometria esetén az ionizációt követően kiválasztjuk azt az iont, amelynek szerkezetét meg akarjuk határozni (piros kör) és ezt az iont gerjesztjük/fragmentáltatjuk. Az így nyert fragmentumokat m/z értékük szerint szétválasztjuk. A tandem tömegspektrometriás vizsgálatok során két azonos vagy különböző analizátort használunk, melyek között ütközési cella található a fragmentáció elősegítésére.

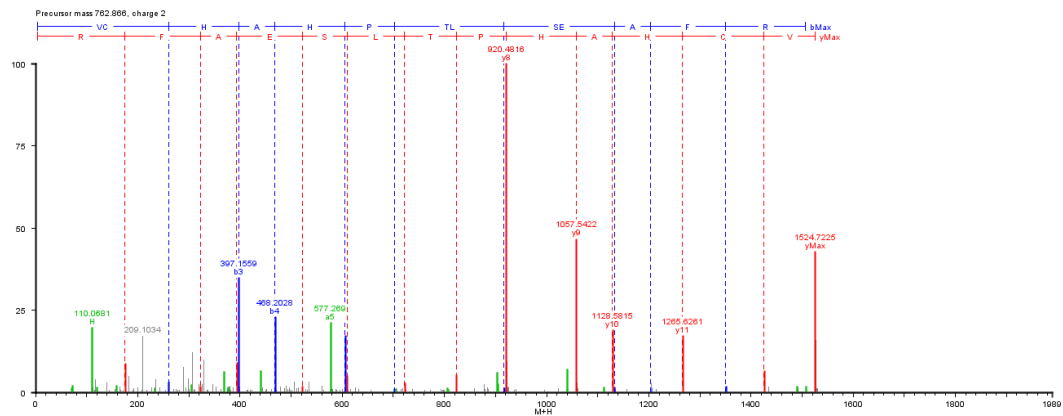
Ily módon lehetőség van a tömegspektrumban észlelt minden egyes ionról újabb tömegspektrum felvételére, és ennek segítségével egy ionnak nem csak a tömegéről, hanem szerkezetéről is információt kaphatunk, pl. anyagkeverékek vizsgálata esetén MS/MS technikával az egyes komponensekről “tisztá” spektrum nyerhető. Egyes jellegzetes fragmentációs folyamatok tandem tömegspektrometriával történő monitorozásával adott szerkezeti egységet tartalmazó molekulák azonosíthatók.

Az ionok belső energiája (gerjesztettsége) jelentős szerepet játszik a fragmentációs folyamatok során. Ha az ion belső energiája nagy, akkor spontán bomlás következik be. Abban az esetben, ha ez nem elég a fragmentációhoz, akkor másodlagos gerjesztés szükséges. A gerjesztés történhet gázmolekulákkal, felülettel, fotonokkal, ill. elektronokkal történő ütköztetéssel. A legegyszerűbb és legelterjedtebb a gázmolekulákkal (nitrogén, nemesgáz) történő ütköztetés (collision induced dissociation, CID), amikor a nagy kinetikus energiájú ionok a gázmolekulákkal ütköznek és ez a kinetikus energia belső energiává alakul át.

A leggyakrabban alkalmazott tandem tömegspektrometriás mérési mód az ún. *termékion analízis (leányion analízis/product ion scan)*: az első analizátorral kiválasztjuk a vizsgálandó anyaiont, majd fragmentáljuk az ütközési cellában és a második analizátor felhasználásával kapjuk a leányionok tömegspektrumát. A kapott spektrumok az anyaiont jellemzik, így a vegyületek szerkezet meghatározására alkalmasak. Leggyakrabban metabolitok szerkezetazonosítására, fehérjék, biológiailag aktív molekulák szekvenciájának meghatározására használják. Az anyaion analízis (precursor ion scan) a molekulaion meghatározására alkalmas, ha a minta több komponenst is tartalmaz és nem egyértelműen azonosíthatók a molekula és- fragmentumok a spektrumban. A semleges

molekula vesztés analízis (neutral loss) a jellegzetes változások (pl. vízvesztés) monitorozásával különböző vegyületcsaládok meghatározását teszi lehetővé (pl. metabolitok vizsgálatakor a konjugátumok kiszűrése). A fragmentációs folyamatok monitorozása (multiple reaction monitoring, MRM) a már azonosított lehetséges szerkezetek azonosítására alkalmas, ill. kvantitatív vizsgálatokban a legszelektívebb mennyiségi meghatározást teszi lehetővé.

Példaként egy peptid tandem tömegspektruma látható az ábrán.

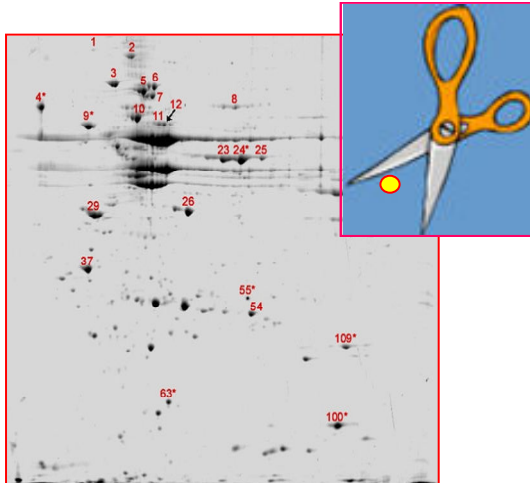


VCHAHPTLSEARF szekvenciájú peptid tandem tömegspektruma

A spektrumban észlelhető csúcsok távolságából (tömegkülönbségéből) a peptid szekvenciája meghatározható.

6. Proteomikában alkalmazott tömegspektrometriás módszerek

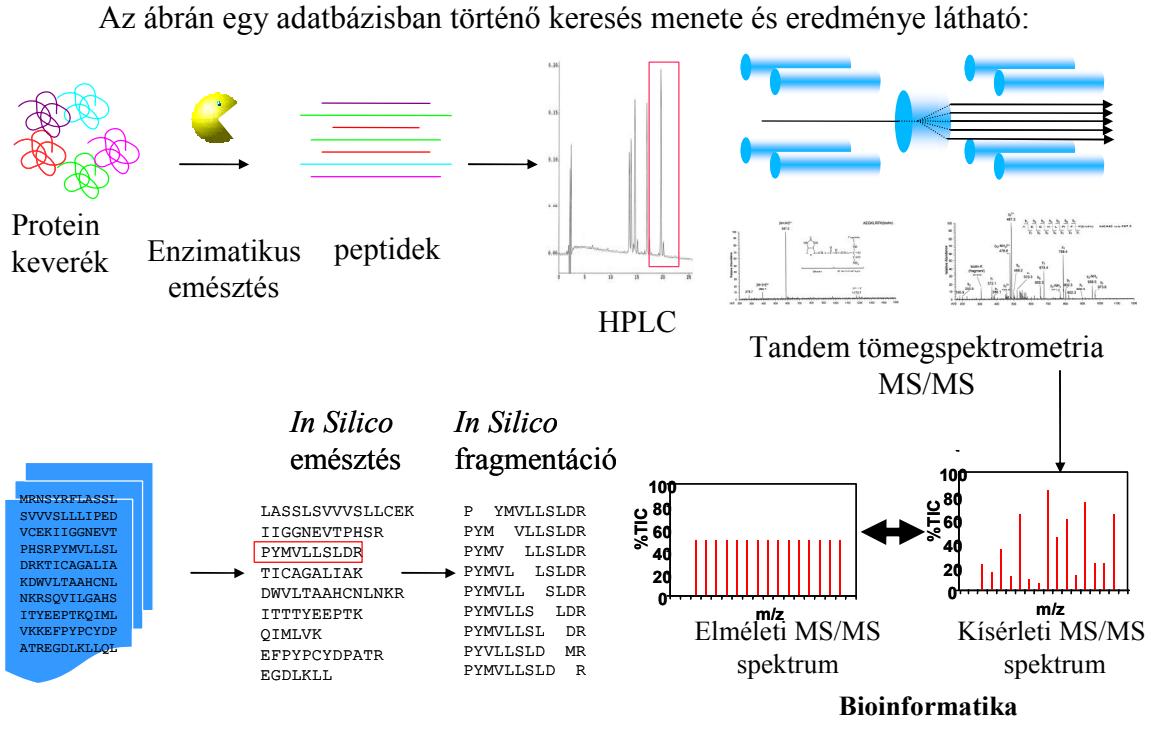
Biológiai minták részletes és pontos analízisét a minták komplexitása (több komponens egyszerre történő jelenléte) nehezíti. Ahhoz, hogy a vizsgálni kívánt mintáról részletes mennyiségi és minőségi információt szerezzünk, érzékeny és szelektív technikák együttes alkalmazására van szükség. A tipikus proteomikai vizsgálat első lépése a fehérjék izolálása és elválasztása. Erre a célra egyre gyakrabban 2D gélelektroforézist használnak, amelyet a meghatározni kívánt folt kivágása követ.



A proteomikai kutatások egyik, és a tömegspektrometriában leggyakrabban alkalmazott módszere az ún. „bottom-up” technika. A bottom-up technika az alulról fölfelé történő építkezésre utalva azt jelenti, hogy az ismeretlen protein azonosítása a peptidek meghatározásával történik, azaz a vizsgálni kívánt proteint peptidekre bontják a műszeres analízist megelőzően. A peptidekre hasítás általában enzimatis módszerrel, pl. tripszinnel történik. Az MS-mérést megelőző mintaelőkészítés kulcsfontosságú szerepet tölt be, hiszen a tömegspektrometriás analízis érzékenységét növeli a tiszta, szennyeződés (mátrix) nélküli minta.

A peptideket az MS-analízist megelőzően folyadékkromatográfiás módszerrel (HPLC) elválasztjuk, amely nagymértékben csökkenti az elnyomási effektusokat és segíti a többszörösen töltött ionokat tartalmazó, bonyolult spektrumok értékelését. Az enzimmel emésztett protein peptidjeinek keverékét leggyakrabban fordított fázisú oszlopon választjuk szét, a HPLC közvetlenül kapcsolható ESI ionforráshoz. A vizsgálatokat tandem MS mérésekkel kiegészítve, a peptidekről (és a vizsgálni kívánt fehérjéről) részletes szerkezeti információkat kapunk. A „bottom-up” módszerrel végzett kutatások eredményeinek értékelését bioinformatikai szoftverek és adatbázisok segítik (pl. MASCOT, PLGS programok, Uniprot adatbázis): az MS-mérés során a spektrumban látható peptid-tömegeket genomikai vagy tömegspektrometriai adatbázisokban található tömegadatokkal hasonlítják össze és az egyezés alapján határozzák meg a fehérjék szekvenciáját. A módszer sikeres alkalmazásához és az adott protein azonosításához több peptid meghatározására van szükség. Több peptid azonosításával a protein aminosav-

szekvenciájának lefedettsége növekszik és az értékelés és meghatározás pontosabbá válik.



A tömegspektrometriával történő fehérje azonosítást nagymértékben nehezíti a fehérjék kémiai módosulásai (ún. post-transzlációs módosulások, PTM). Ezt segítik a különböző tandemtömegspektrometriás módszerek együttes alkalmazásai, ill. A pontos tömegmérés.

Összefoglalásként elmondható, hogy a tömegspektrometria - kromatográfias technikákkal kapcsolva - érzékenységének, robosztusságának és szelektivitásának köszönhetően széles körben alkalmazható biológiai rendszerek komplex analízisére. Napjainkban a proteomikai kutatásokban a módszer nélkülözhetetlenné vált és egyre gyakrabban használják orvosi diagnosztikai célokra is.

7. Ajánlott irodalom

- 1 Robert E. Ardrey, Liquid Chromatography –Mass Spectrometry: An Introduction, John Wiley & Sons ,2003
- 2 Vékey K, Telekes A, Vertes A. Medical applications of mass spectrometry. Elsevier, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Sydney, Tokyo, 2008: 7-18, 37-137, 173-220, 253-551.
- 3 Chen CH. (2008) Review of a current role of mass spectrometry for proteome research. Anal Chim Acta, 624: 16-36.
- 4 Aldred S, Grant MM, Griffiths HR. (2004) The use of proteomics for the assessment of clinical samples in research. Clin Biochem, 37: 943-952.
- 5 Chen GD, Pramanik BN. (2008) LC-MS for protein characterization: current capabilities and future trends. Expert Rev. Proteomics, 5: 435-444.
- 6 Wysocki VH, Resing KA, Zhang QF, Cheng GL. (2005) Mass spectrometry of peptides and proteins. Methods, 35: 211-222.
- 7 Romijn EP, Krijgsveld J, Heck AJR. (2003) Recent liquid chromatographic-(tandem) mass spectrometric applications in proteomics. J. Chromatogr. A, 1000: 589-608.
- 8 Henzel WJ, Billeci TM, Stults JT, Wong SC, Grimley C, Watanabe C. (1993) Identifying Proteins from 2-Dimensional Gels by Molecular Mass Searching of Peptide-Fragments in Protein-Sequence Databases. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90: 5011-5015.
- 10 Hudecz Ferenc, Proteomika – az új kihívás, LAM 2003;13(3):216–224
http://www.elitmed.hu/upload/pdf/proteomika_az_uj_kihivas-2346.pdf