

ZÁRÓJELENTÉS:

Kapilláris elektrokratográf (CEC)-tömegspektrométer (MS) interfész fejlesztés:

A munka első részében egy új típusú kapilláris elektrokratográf/tömegspektrométer ún. segédanyag nélküli (sheathless) interfészt építettünk meg. Ennél az interfésznél egy cserélhető aranyozott boroszilikát kapillárisba (nanospray kapilláris) egy kihúzott végű kvarc kapilláris van dugva. Ennek az elrendezésnek több előnye is van az általánosan elterjedt megoldásokkal szemben. A sheathless megoldásoknál a CEC kapilláris kihegyezett/kihúzott vége általában valamilyen fémmel borított, ami ki van téve az esetleges elektromos szikrák okozta párolgásnak másrészt a mechanikai sérülésnek. Az általunk előregyártott boroszilikát hegyek sérülés esetén könnyen cserélhetőek, nem kell a jóval időigényesebben elkészíthető kromatográfiás oszlopokat kidobni. Maga a nanoelektroszpré a elektroszpré tömegspektrometria legérzékenyebb módszere, amely egészen kicsi áramlási sebességek mellett (10-50 nanoliter/perc) is stabil jelet ad, ami megfelel a CEC áramlási sebességének. Az általánosan használt 360 μ m-es kapillárisnál vékonyabb ezáltal hajlékonyabb 150 μ m-es CEC oszlop alkalmazásával finomabban lehet a kapillárisokat összeilleszteni, ezáltal sikerült a finom kapilláris hegyek sérülésének valószínűségét csökkenteni és a kisebb átmérőjű kapillárisokkal a hegyek közötti holt térfogatot kb. 0,004 nanoliterre csökkenteni, amely kis térfogat már elhanyagolható a csúcshézagok szempontjából. A CEC tápegység áramköre a kihúzott boroszilikát kapilláris arany bevonatán és a kapillárisok közötti folyadékon keresztül záródik (külső elektród) így a víz elektrolitikus bomlásából származó buborékképződés nem gátolhatja az elektroforézist.

Kis mennyiségben rendelkezésre álló anyagok analízise:

A tömegspektrométer nanoelektroszpré interfészét kis koncentrációjú anyagok csekély mennyiségeinek (néhány μ l) analízisére fejlesztették ki. Sokszor, amikor csak csak néhány mikroliter minta áll rendelkezésre összesen, ez is nagy veszteségnek számít. A nanoszpré kapillárisba ugyanis legalább 0,5-1 μ l-t be kell mérni (ennél kisebb térfogatok elvesznek az üvegfal nedvesítése és a párolgás miatt) annak ellenére, hogy az analízishez a tömegspektrométer érzékenysége alapján néhány nanoliter minta is elegendő lenne. Az általunk kifejlesztett CE-MS interfésszel sikerült megoldani az ilyen kis mennyiségek injektálását, és ha nem szükséges a minta elválasztása, kellően rövid kapillárisokkal az analízis idő is 1-2 percen belül marad. Ennek az új injektálási módszernek az alkalmazásával gyakorlati szempontból kiküszöbölhető a mintavesztés.

Rutin analitikai módszer peptidok gyors elválasztására és gyors analízisére

A rutinszerűen alkalmazott módszereknél fontos követelmény, hogy a ráfordított idő megfelelően rövid legyen. Intézetünkben a szintetikus peptidok tisztítás előtti ellenőrzése analitikai HPLC-vel, majd a megfelelő frakció tömegspektrometriás analízisével történik általában. Azokban az esetekben ha a kromatogram túlságosan komplex ahhoz, hogy el lehessen dönteni hogy az elegyben melyik csúcst tartalmazza, vagy hogy egyáltalán tartalmazza-e az elegy a kívánt komponens, sok esetben HPLC/MS mérésre van szükség. Ennek a módszernek jó alternatívája a CEC/MS vizsgálat. A savas közegben általában pozitívan töltött peptidok viszonylag kicsi a migrációs idejük, így az analízisidő sokkal rövidebb lehet a HPLC-s futásnál, persze ez természetesen függ a vizsgált anyagtól. A házilag készített oszlopok olcsók, a szükséges tölteteket az analitikai feladathoz szabadon

választhatjuk meg. A CEC oszlopok töltésére egy egyszerű módszert dolgoztunk ki. A perfúziós töltetek használata lehetővé tette, hogy oszloptöltéshez szükséges nyomást egy Hamilton fecskendővel is el lehet érni, így ugyanez a fecskendő az oszlop mosására is használható.

A rendszert sikerrel alkalmaztuk olyan sok arginint tartalmazó peptidek gyors (a szükséges 2-3 perc analízisidő kb. ötöde egy HPLC-s mérésnek) mérésére ahol a közvetlen tömegspektrometriás mérést a trifluoracetát ionnal (TFA) történő erős ionpárázó hatás akadályozza. Az elválasztás nélküli mérésben a TFA-val alkotott adduktok miatt gyakorlatilag nem lehetett molekulaiont detektálni (ez a zavaró jelenség a sok bázisos csoportot tartalmazó anyagok analízisének ismert, így valószínűleg a módszer kiterjeszhető más ilyen jellegű problémák megoldására is). A CEC/MS felvétel esetén ezek a zavaró adduktok eltűntek, az így nyert tömegspektrum tisztán tartalmazta a molekulaiont. Az előzőekben leírt eredményekről a közleményben számoltunk be (Kele et al.)

∑-amiloid 1-42 koncentráció meghatározás CEC/MS módszerrel

Az Alzheimer kórban szerepet játszó polipeptid koncentrációjának mérésére a következő stabilizotóp jelzésen alapuló CEC/MS módszert dolgoztunk ki. A vizsgálandó mintához a ∑-amiloid 1-42 deutérium (D) jelzett változatát keverjük ismert mennyiségben. A mintafeldolgozás alatt az ismeretlen, és hozzáadott anyag aránya nem változik, így a D jelzett és a könnyű csúcsok összehasonlításával a meghatározható a polipeptid koncentrációja. Az aggregációra hajlamos, apoláros anyag mérése nem könnyű tömegspektrometriás feladat, de a mérés érzékenysége növelhető, ha a polipeptid tripszines emésztményének fragmenseit vizsgáljuk, hiszen a molekulának vannak polárosabb, önmagában jobban ionizálható, ezáltal nagyobb érzékenységgel detektálható részei is. Megtaláltuk azt a fragmenst, amely a ∑-amiloid 1-42 proteolitikus emésztésekor a legnagyobb érzékenységgel határozható meg (ez a 17-28-as fragmens) így ebbe a szekvenciárészbe építjük be a D-jelzett aminosavat. A jelzett és a jelöletlen peptid természetesen ugyanakkora migrációs idővel jelenik meg, a tömegspektrumban megkettőződött csúcsot adva. A csúcsarányok arányosak a jelölt és a jelöletlen anyag koncentrációjával (megfelelő koncentrációarányon belül). Az eddigi érzékenység tesztek alapján már kevesebb, mint 0,2 µg anyag tripszines emésztményéből kiindulva, annak 1/1000-d részét felhasználva, CEC-MS technikával megvalósítható a mennyiségi meghatározás. Ez a munka jelenleg még folyamatban van, közlése más, ∑-amiloiddal kapcsolatos munka részeként várható.

Peptidek CEC/MS/MS szekvenálása:

A fehérjék azonosítására a proteomikában széleskörűen használt egyik eljárásban a fehérje enzimatis hidrolíziséből származó peptidek szekvenciáját tandem tömegspektrometriás (MS/MS) módszerrel próbálják meghatározni, és összevetni a fehérje adatbázisokban található ismert szekvenciákkal. Ebben a technikában a vizsgálni kívánt peptidet tandem tömegspektrométerben fragmentálják, és a fragmenseknek veszik fel a tömegspektrumát. Az hogy a fragmentáció során peptidekből milyen ionok képződhetnek jól jósolható, így a spektrumot az adatbázisbeli fehérjeszekvenciák fragmenseinek becsült MS/MS spektrumával összehasonlítva megmondható, hogy a mért spektrum melyik fehérjéből származó számolt spektrummal egyezik a legjobban. Természetesen ez a módszer a fehérjeazonosításra csak akkor működik, ha a fehérje benne van az adatbázisban. Ha nincs benne, akkor is lehetőség van a proteolitikus fragmensek szekvenciájának meghatározására az úgynevezett „de novo” szekvenálás (Standing), csak ehhez jól értékelhető MS/MS spektrumokra van szükség. Ugyanis a szekvencia ismeretében mindig jósolható valamilyen

spektrum, de a mért spektrumból nem könnyű a szekvenciát meghatározni. A peptidek MS/MS spektrumának minősége nagymértékben függ a szekvenciától ezért általánosan használható eljárás nincs a megfejtésükre, minél több információt tartalmaz a spektrum annál nagyobb az esély a fehérje azonosítására. A spektrumok komplexitása jelentős mértékben csökkenthető egy állandó pozitív töltést bejuttató N-vagy C-terminális peptidjelölés móddal, amely tandem tömegspektrometriás vizsgálat esetén segítséget nyújt az N-vagy C-terminális ionok elkülönítésében, ezzel megkönnyítve a szekvenciameghatározást. Az ilyen származékképzésre számos módszer ismert az irodalomban (Roth et al.). Az általunk alkalmazott új módszerben 2,5-dibróm-N-etil-tiazólium vegyülettel való gyors származékképzéssel egy olyan peptidszármazékhoz jutunk, ami állandó pozitív töltést és ráadásul brómot tartalmaz. A Br tartalmú jelölések jelenléte a bróm sajátos izotópeloszlása következtében (^{79}Br , ^{81}Br , kb. 1:1 arányban) a tömegspektrumban könnyen azonosítható, az állandó pozitív töltés pedig megnöveli azon csúcsok intenzitását, ahol a fragmentáció után a töltés marad (N-vagy C-terminális). A CEC-MS technika alkalmazásával könnyen megszabadulhatunk a zavaró reagensektől (bázis, jelölőszer maradéka), és többnyire elkülöníthetőek és külön vizsgálhatóak az N-terminális és az esetleges oldallánc jelölés termékei. A legfontosabb eredmény pedig az, hogy a ^{79}Br és a ^{81}Br izotópokat tartalmazó jelölt peptidekről külön-külön CEC-MS ütközési disszociációs (CID) spektrumot felvéve, majd a spektrumokat egyesítve a jelölőszert tartalmazó (N-vagy éppen C-terminális) ionok már eleve nagyobb intenzitású csúcsai megkettőződnek, így azok egyértelműen azonosíthatóak. A különbségi spektrum pedig már csak a jelölt részhez tartozó ionokat fogja tartalmazni számottevő intenzitással. Vizsgálataink szerint a fenti jelölőszer elsősorban a lizin oldalláncához kapcsolódik (a fehérjék tripszines emésztésekor lizin és arginin lehet a C-terminálison) ekkor C-terminálison jelölt iont kapunk, ha nincs lizin a peptidben, akkor pedig az N-terminálishoz. Ekkor a C-terminálison arginin található. Így megkülönböztethető a lizin végű peptid az arginin végétől. Ha a C-terminálison lizin van, valahol középen pedig arginin (ez gyakori eset nem teljes enzimatis hasítás esetén), az MS/MS spektrum rendkívül bonyolult lehet mert a töltés mind a lizinen, mind az argininben lokalizálódhat, így rendkívül sokféle ion lesz a spektrumban. Az ilyen esetekben a lizin jelölése „letisztítja” a spektrumot: azonosítani lehet a C-terminális ionokat.

A jelölőszer alkalmazásával egy olyan módszert sikerült kidolgozni, ami alkalmas gyors származékképzésre, és ami a peptidekkel és a tömegspektrométerrel kompatibilis oldószerben működik (NH_4HCO_3 0,05M vizes oldata). Segítségével egyszerűbbé tehető a tandem tömegspektrometriás spektrumok kiértékelése, megkülönböztethetőek a lizin és az arginin végű peptidek, ezáltal többetinformáció nyerhető az adatbázison alapuló fehérjeazonosításhoz. Az állandó pozitív töltéssel rendelkező származékoknak rövid a migrációs ideje, így CEC/MS rendszerben gyorsan elválaszthatóak.

(CE-MS analysis of bromo-containing derivatives of peptides (poszter) Informal Meeting on Mass Spectrometry Fierri di Primiero Italy 2005). Az eredmények közzlése folyamatban van.

Kutatásaink alapján egy másik reagenssel a 2,5-dibróm-N-etil-piridínium sóval szelektíven jelölhető a cisztein és a tirozin, így állandó pozitív töltés bevitelével megnövelve az ilyen aminosavakat tartalmazó peptidek detektálásának érzékenységét. A jelölt aminosavak a peptid fragmentációja során belső kihalással olyan csak rájuk jellemző Br-tartalmú, állandó pozitív töltést tartalmazó, ezáltal könnyen azonosítható és nagy érzékenységgel detektálható iont adnak, ami diagnosztikus értékű a jelenlétükre. Így nemcsak hogy könnyebben értelmezhető a fragmentációs képük a Br-tartalmú reagensnek köszönhetően, hanem a CEC/MS/MS technika során az úgynevezett prekursor ion szkennemódot alkalmazva (ahol a tömegspektrométer csak azoknak a peptideknek a tömegspektrumát rögzíti, amelyekből egy előre beállított m/z értékű fragmens képződik) a tömeg elektrokromatogramban csak akkor

kapunk jelet, ha éppen Tyr vagy Cys tartalmú peptid eluálódik, a beállítástól függően. Az ilyen elektroforogramot összevetve a totál ion elektroforogrammal megtudhatjuk mely fragmensek tartalmaztak Tyr és melyek Cys aminosavakat. Ezek a többletinformációk szintén megkönnyítik a vizsgált fehérje egyértelmű azonosítását.

Ezeket az eredményeket az Informal Meeting on Mass Spectrometry Ustron Poland 2006 konferencián, valamint folyóiratcikkben mutatjuk be.

Irodalomjegyzék

Kele, Z. et al. "Design and performance of a sheathless capillary electrophoresis/mass spectrometry interface by combining fused-silica capillaries with gold-coated nanoelectrospray tips." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19.7 (2005): 881-85.

Roth, K. D. W. et al. "Charge derivatization of peptides for analysis by mass spectrometry." *Mass Spectrometry Reviews* 17.4 (1998): 255-74.

Standing, K. G. "Peptide and protein de novo sequencing by mass spectrometry." *Current Opinion in Structural Biology* 13.5 (2003): 595-601.