

## 10. KÜTLE SPEKTROMETRESİ SİSTEMLERİNE GİRİŞ VE UYGULAMALI KÜTLE SPEKTROMETRESİ ANALİZLERİ(MALDI-TOF-MS)

Kullanılan Sistem: Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon İyonizasyon-Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight, MALDI-TOF)

### A. BİLGİ

Kütle spektrometreleri iyon oluşturma ve bu iyonları kütle/yük oranlarına ( $m/z$ ) göre ayırma yeteneğine sahip cihazlardır. Ayırmanın sağlanabilmesi için cihaz içinde elektrik ya da manyetik alanlar oluşturulmuştur. Bu alanlar iyonların uzaysal yörüngelerini, hızını ve/veya istikametini etkileyerek ayırma sağlarlar. Elektromanyetik alanlar iyon hareketini iyonun kütlesiyle ters orantılı ve iyonun yüküyle doğru orantılı olarak etkiler. Böylece moleküler kütlelerin tespit edilebildiği, iyon bolluğuna (abundance) karşı  $m/z$  oranını gösteren kütle spektrumları elde edilir.

Kütle spektrometresinin temel bileşenleri iyonlaştırıcı kaynak, analizör, detektör, veri işlemcisi ve vakum pompasıdır. Etkili bir ayırma için iyonların hava molekülleriyle çarpışması engellenmeli, yani analizör ve detektör vakumlu ortamda bulunmalıdır. İyon üretimi ise iyonlaştırma kaynağının türüne göre atmosferik basınç ya da vakum altında gerçekleştirilebilir

Elektromanyetik alanlarda ayırmanın sağlanabilmesi için nötral moleküllerin iyonlara dönüştürülmesi ve ihtiyaç halinde gaz faz haline geçmeleri gerekmektedir. Peptid ve proteinlerin yüksek moleküler ağırlıkları ve polar yapıları göz önüne alındığında, iyonlaştırıcı kaynak protein ya da peptidleri hem iyon haline hem de gaz faza geçirmelidir. Çeşitli iyonlaştırıcı kaynaklar arasında sadece ESI (elektrosprey iyonizasyon) ve MALDI (matriks yardımcı lazer desorpsiyon iyonizasyon) proteinlerle çalışmaya uygundur. ESI ile iyonlar atmosferik basınç altında oluşturulurken, MALDI'de atmosferik basınç veya vakum altında oluşturulabilir.

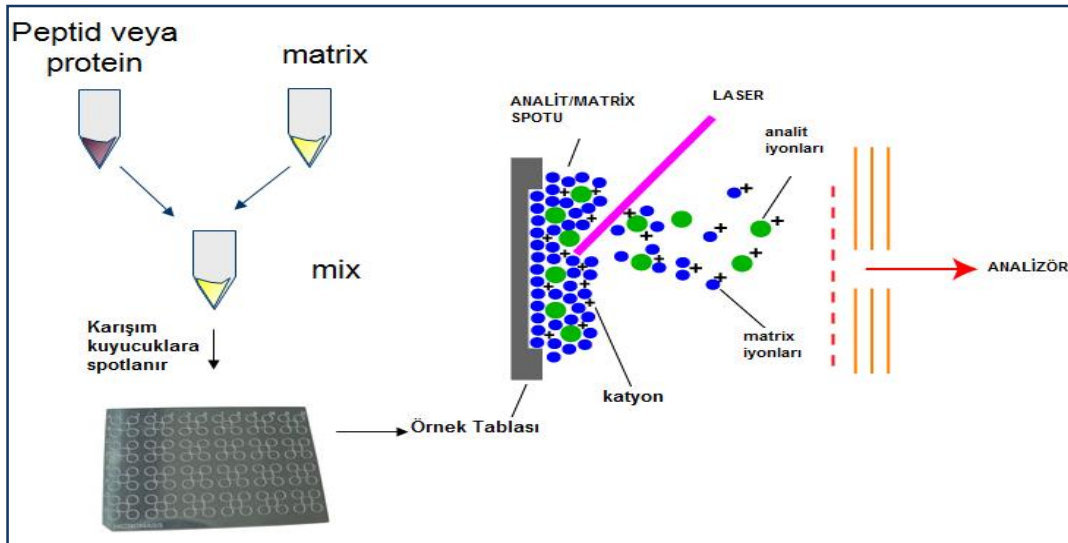
Analizör, iyonlaştırıcı kaynaktan elde edilen iyonların ayrılmasını sağlayan cihaz kısmıdır. Bu kısımda elektrik veya manyetik alanlar kullanılabilir. Tüm analizörler uygun bir iyonlaştırıcı kaynak ile birleştirildiğinde peptid ve proteinlerle çalışmaya uygundur. Kullanım kolaylığı ve düşük maliyetleri nedeniyle en yaygın kullanılan analizörler kuadropoller, uçuş süresi (TOF-time of flight) cihazları ve iyon tuzaklarıdır

Proteomik çalışmalarda en yaygın olarak kullanılan MALDI'nin prensibi, ultraviyole ışınları absorblama özelliğine sahip bir matriksin kullanılmasına dayalıdır. Peptid karışımı ve matriks uygun bir çözücüde çözülerek karıştırılır ve örnek yükleme plakalarına aktarılır. Daha sonra çözücünün buharlaşmasına izin verilir ve böylece kristalleşmiş matriks molekülleri arasına gömülü peptidler elde edilmiş olur. Örnek plakası cihaza yerleştirilir ve vakum altında, genellikle nitrojen kaynaklı UV lazeri ile uyarılır (pulse) yapılır. Matriks molekülleri lazerin

enerjisini absorblar ve peptid moleküllerini de beraberinde taşıyarak gaz fazda iyon haline geçerler

MALDI yarışmalı bir proses olduğundan, bir analitin iyonlaşması diğerleri tarafından inhibe edilebilmektedir. Dolayısıyla triptik peptid karışımlarında arjinin içeren peptitler bu amino asitin güçlü gaz faz bazlığından dolayı ayrıcalıklı olarak iyonlaşmaktadırlar. Lizinin de bazikliğinin artırılabilmesi için kimyasal prosedürler geliştirilmiştir. Fosfopeptitler ise fosfat grubunun asidik özelliğinden dolayı MALDI'de zayıf iyonlaşmaktadırlar.

Sinapinik asit ve  $\alpha$ -siyano-4-hidrosinamik asit sırasıyla, protein ve peptid analizi için en çok kullanılan matrikslerdir. 2,5-Dihidroksi benzoik asit de peptid haritalandırılmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Matrikslere eklenen kimyasal katkıların fosfopeptitlerin daha iyi iyonlaşmasında ya da genel olarak MALDI performansını artırmada faydalı olabileceği iddia edilmektedir. Oktil-beta-glukosit gibi birkaç nötral deterjan, peptid iyonlaşması ile uyumludur ve MALDI performansını artırabilir, ancak sodyum dodesil sülfat gibi yüklü deterjanların zararlı etkisi bulunmaktadır. Düşük derişimlerdeki tampon ve tuz gibi örnek kontaminasyonlarına karşı toleransı olduğu için her durumda MALDI, ESI'ya göre daha avantajlıdır. 2M derişimindeki üre gibi kaotropik ajanların varlığında bile spektrum elde edilebilmektedir. MALDI-TOF kütle spektrometre, 400 ile 350 000 Da molekül ağırlığındaki proteinler, peptitler, oligosakkaritler ve oligonikleotitler gibi biyomoleküllerin dedeksiyonu ve tanımlanmasında kullanılabilir.



MALDI lazer ışınının katı matriksi uyarması ve analitleri iyonize etmesi

(<http://www.chm.bris.ac.uk/ms/images/maldi-mechanism.gif>)

TOF analizi, iyonların tümüne aynı miktarda enerjinin verildiği bir dedektöre doğru hızlanan bir dizi iyon dayanmaktadır. Ancak iyonlar aynı enerjiye sahip olmalarına rağmen farklı kütlelerde olduğundan dedektöre ulaşma zamanları farklıdır. En küçük iyonlar hızlarının fazla olmasından dolayı dedektöre ilk ulaşırken daha büyük olan iyonlar daha büyük olan kütleleri yüzünden dedektöre daha geç ulaşmaktadırlar.

## B. UYGULAMA

### MALDI-TOF Kütle Spektrometresi İçin Örnek Hazırlama Ve Ölçüm

#### MALDI Plakasının Temizlenmesi

MALDI plakasına örnek yüklenmeden önce plakanın çok iyi bir şekilde temizlenmiş olması gerekmektedir.

#### Yıkama Basamakları:

1. 4 adet temiz ve plaka için uygun büyüklükte beher hazırlanır.
  - 1. Behere % 3-4' lük 100 ml amonyum hidroksit çözeltisi koyulur.
  - 2. Behere 100 ml ultra saf su koyulur.
  - 3. Behere 100 ml metanol koyulur.
  - 4. Behere 100 ml asetonitril koyulur.
2. Plaka 1. beher içerisine en az 5 dk ultrasonik banyoda bekletilir.
3. Süre bitiminde plaka 2. behere alınır, en az 5 dk ultrasonik banyoda bekletilir.
4. Ardından plaka 3. beher içerisine alınır, ultrasonik banyoda 5 dk bekletilir.
5. Son olarak plaka 4. beher içerisine alınarak ultrasonik banyoda 5 dk bekletilir.
6. Süre bitiminde ağzı kapaklı bir kutuda kurumaya bırakılır.

#### MALDI Plaka Kuyucuklarının Temizlenmesi

Plaka üzerine yükleme yapılmadan hemen önce kuyucuklar öncelikle (pipet yardımıyla) 3-4 µl ultra saf su ile yıkanır. Su uzaklaştırıldıktan sonra kurumayı hızlandırmak amacı ile tüm kuyucuklar 1-1.5 µl asetonitril ile yıkanır.

#### MALDI Plaka Kuyucuklarına Örnek Yüklenmesi

Uygun bir şekilde yıkanmış olan temiz MALDI-TOF örnek yükleme plakasının (Waters) hazırlanmasının ardından, iyonlaşmayı sağlayacak matriks olarak kullanılmak üzere rekrystalize edilmiş *alpha*-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), mg. başına 50 µl. olacak şekilde matriks çözücü tamponunda çözülür. PCR plakasında kuru bir şekilde bulunan yüklenecek peptit örneklerinin üzerine eşit hacimlerde önce örnek çözücü tamponu eklenerek pipetleme ile peptitler tampona geçirilir, sonra da matriks tamponu eklenerek MALDI-TOF örnek yükleme plakasının kuyucuklarına 1,5-2 µl. yükleme yapılır.

#### Çözeltiler

- Örnek solventi :
  - % 50 ACN
  - % 50 HPLC su
  - % 0.1 TFA

Hazırlanan örnek solventi PCR plakalarındaki kuru örnekleri çözmek için kullanılır.

- Matrix solventi :
  - % 75 ACN
  - % 25 HPLC su
  - % 0.1 TFA

Hazırlanan matrix solvent milligram başına 50µl olacak şekilde CHCA matrix ile karıştırılarak iyice vortexlenir. Eğer gerekiyorsa matrixi çözmek için sonike edilebilir.

### Örnek Yükleme Prosedürü

1. PCR plakalarında kuru halde bulunan örnekler örnek solventi ile pipetleme yapılarak çözülür.
2. Örnek tekrar kullanılmak isteniyorsa karışım ayrı bir PCR tüpüne alınarak, kullanılmayacaksa direkt PCR plakası içerisinde 5µl matrix solventi ile pipetleme yapılarak karıştırılır (1:1 karıştırılır).
3. Elde edilen matrix-örnek karışımından yaklaşık 1,5-2µl MALDI plaka kuyucuğuna yüklenir.
4. Lock mass'ler için 5 peptid karışımı yine matrix solventi ile 1:1 oranında karıştırılarak lock masslere 1,5-2µl yüklenir.
4. MALDI plakası laminar kabin altında kurumaya bırakılır.

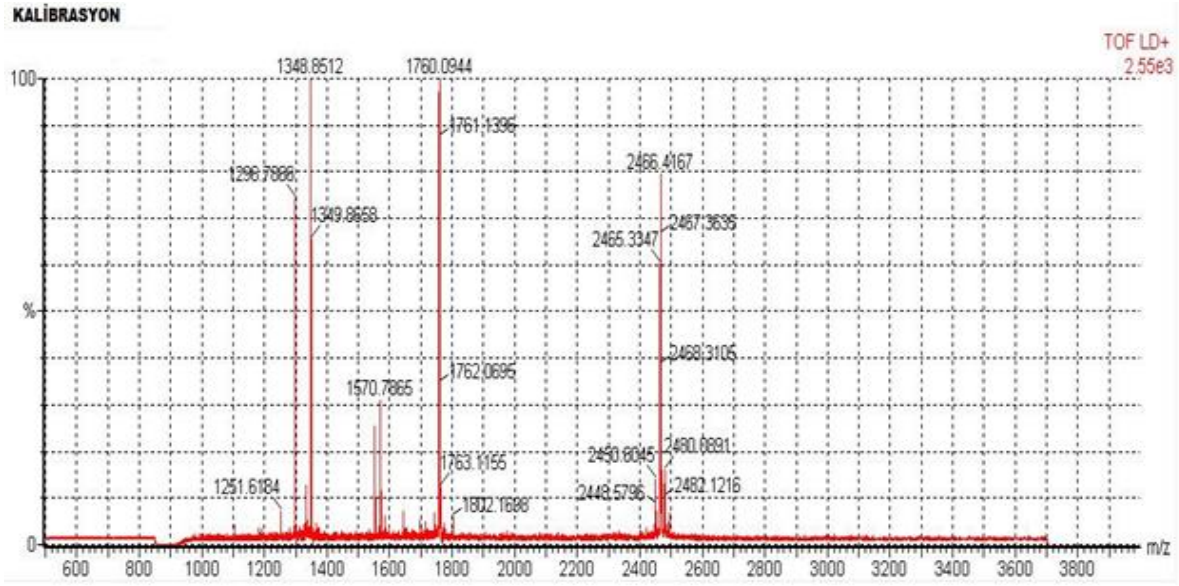
### Kalibrasyon

MALDI-TOF kütle spektrometresinin kalibrasyonu örnek plakasında bulunan "Lock Mass" kalibrasyon kuyucuklarına yüklenen ve moleküler ağırlıkları bilinen beş peptid karışımı ile yapılır (dış kalibrasyon). Bu amaçla, adrenokortikotropik hormon (ACTH) 18-19, (Glu1)-fibrinopeptid B (Glu-Fib), substance P, renin-14 ve anjiyotensin 1 peptitleri son konsantrasyonları 10-40 pmol olacak şekilde stok çözeltilerden örnek çözücü tamponuyla seyreltilir. Yapılan canlı kalibrasyon sonrası peptid karışımı tekrar okunarak ölçümün doğruluğu test edilir.

Tablo. MALDI-TOF kütle spektrometresinin kalibrasyonunda kullanılan peptitlerin kütleleri

Peptidin adı	Kütlesi (Da)
ACTH 18-19	2465.1989
Glu-Fib	1570.6774
Substance P	1347.7360
Renin-14	1758.9326
Anjiyotensin 1	1286.6853

5 peptit karışımının dışında ADH, BSA gibi proteinlerinin triptik peptileri de kalibrasyon için kullanılabilir. Dış kalibrasyonun haricinde, belli peptitleri örneğe koyarak veya tripsinin otolitik peptitleri kullanılarak iç kalibrasyon yapmak da mümkündür.



MALDI-TOF kalibrasyon spektrumu

## Pozitif İyon Reflektron Modunda Manuel Kullanım

Kullanılan cihaz: Micromass M@LDI, Waters

1. Örnek yüklenmiş plate, plate yükleme yerine konur. Yerleştirme sırasında plate'in hangi bölgesinin nereye geleceğini gösteren işarete dikkat edilmelidir. Plate iyi yerleştirilmeli bir köşesi kenara yaslanmalıdır. Aksi durumda plate kalibrasyon aşamasında zorluk yaşanabilir. Bu durumda kapak açılıp plate tekrar yerleştirilmelidir.

**PLATE:** Üzerinde daire şeklinde 120 kuyucuk bulunan metal bir plakadır. Kuyucuklar 4'ü köşede 1 tanesi ortada olmak üzere 5'erli grup halindedir. Ortadaki kuyucuk Lock Mass olarak adlandırılır ve buraya kalibrasyon amaçlı m/z değerleri bilinen peptid karışımları yüklenir.

2. Plate yerleştirildikten sonra bilgisayar masa üstünde bulunan MassLynx (Waters) programı açık değilse açılmalıdır. Normalde bu program devamlı açık bırakılır. İstenilirse başlat-programlarda ya da masaüstünde bulunan plate kuyucuklarını gösteren kamerada açılabilir ve kuyucuklar gözle görülebilir.
3. MassLynx programı açılır sırası ile MS Tune-load probe basılır. Sonra press for operate'e basılır. Bu durumda yazı pres for standby olarak gözükür standby yazısının yanındaki kutucuk yeşil olana kadar beklenir. Vakum göstergeleri menu çubuğu üzerinde vacum -monitör ile ekrana getirilebilir. 3 göstergede yeşil kısma gelmelidir.

Genellikle penning göstergesi en son yeşil kısma gelir. Penning değerininin  $2 \times 10^{-6}$  inmesi vakum için yeterlidir.

4. Vakum tamamlandıktan sonra menüden Options-plate spatil calibration seçilir. Çıkan ekranda search step:0,1, delay per raw:0 ve search Windows 15 çıkar. Bu kalibrasyon plate üzerindeki 2 deliğin bulunması amaçlıdır. Delikler bulunamıyorsa step değerini yükseltir. Yine bulunamazsa unload prob butonuna basılarak vakum boşaltılır, kapak açılır plate tekrar iyice yerleştirilir.
5. Options-Voltage'dan uygun voltage değerleri girilir. Source voltage 15000, Reflektron vantage 2000, pulse voltage 2550 (bu değer pik çözünürlüğüne göre optimize edilir). Detector MCP(V): 2000 Matrix suppression:800. Matriks suppression değeri seçilen matrikse göre değişir. 800 değeri  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) içindir. Bu matriks 10000 Da'dan düşük peptidler için daha uygundur. Kullanılan diğer matriksler aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.
6. Laser enerjisi kontrol edilir. Çalışmaya low ile başlamak uygundur.
7. Laser enerjisi de kontrol edildikten sonra alt kısımda bulunan uygun alana okunacak kuyucu harf ve numarası girilir entere basılır(Kalibrasyon için ilk okuma varsa lock mass kuyucuğu ile yapılmalıdır). Doğru kuyucuğa gidilip gidilmediği kamera açıksa kameradan takip edilir.
8. Aşağıdaki Acquire butonu basılır, dosyaların kaydedileceği yer seçilir isim verilir sonra çıkan pencerede çalışmaya uygun mass aralıkları girilir, laser finger rate manuel okumada 5Hz Shots per spectrum 10 yapılır. Starta basılır. Okuma yapılır.
9. İlk okuma kütleleri bilinen peptid karışımının bulunduğu lock mass kuyucuğunda yapılır. Bulunan spektrum değerlerinde bilinen değerlere göre kayma gösteriyorsa kalibrasyon yapılmalıdır. Kalibrasyon yapıldıktan sonra okumaya geçilir.

Tablo. Matriks olarak kullanılan bazı maddeler ve özellikleri

Madde	Diğer isimler	Çözücü	Uygulama
<b>2,5-dihydroxy benzoic acid</b>	DHB, Gentisic acid	Asetonitril, su, metanol, aseton, kloroform	Peptitler, nükleotitler, oligonükleotitler, oligosakkaritler
<b>3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid</b>	sinapic acid; sinapinic acid; SA	Asetonitril, su, aseton, kloroform	Peptitler, proteinler, lipitler
<b>4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid</b>	Ferulic acid	Asetonitril, su, propanol	Proteinler

<b><math>\alpha</math>-cyano-4-hydroxycinnamic acid</b>	CHCA	Asetonitril, su, etanol, aseton	Peptitler, lipitler, nükleotitler
<b>Picolinic acid</b>	PA	Etanol	Oligonükleotitler
<b>3-hydroxy picolinic acid</b>	HPA	Etanol	Oligonükleotitler

### **Kaynaklar**

Özel Duygu Demiralp, İğci Naşit, Peker Selen, Ayhan Beycan, 2014, Temel Proteomik Stratejiler, Ankara Üniversitesi Yayinevi, ISBN: 978-605-136-148-2, 2014

Özel Duygu Demiralp, İğci Naşit, Peker Selen, Ayhan Beycan, 2013, Temel Proteomik Stratejiler, Ankara Üniversitesi Yayinevi, ISBN: 978-605-136-117-8, 2013.