

## Optimierung der Probenvorbereitung bei der Messung von Proteinen mit einer großen Molekularmasse.

R. Limberg, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg  
Dr. M. Resch, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg

Die Technik “matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry” (MALDI-TOF-MS) wird seit ihrer Einführung im Jahr 1988<sup>1 2</sup> zur Massenbestimmung von Molekülen unterschiedlicher Substanzklassen eingesetzt. Dabei nimmt mit steigender Molekularmasse die Massenauflösung ( $R=M/\Delta M$ ) ab. Bei der Messung sehr großer Biopolymere ( $M>50\text{kDa}$ ) erreicht man auch aufgrund von Adduktbildung mit Kontaminanten nur noch eine geringe Auflösung ( $R<100$ ). Im folgenden wird gezeigt, wie sich MALDI-TOF-MS Messungen von Proteinen mit einer großen Molekularmasse optimieren lassen. Als Beispiel wurde rekombinantes humanes Serumalbumin (rHSA;  $M=66438$ ) ausgewählt, daß in folgender Konstitution kommerziell erhältlich ist:

- 50 mg/ml rHSA (Calbiochem Cat. No.: 126661)
- 145 mM NaCl
- 8 mM Natriumoctanoat
- 0,0015 % TWEEN 80
- 0,003 mM/g Protein  $K^+$

Für die Messungen wurde die Probe 1:100 mit Reinstwasser verdünnt (500 ng/µl; ~10 pmol/µl).

### Wahl der Matrix

In der Regel werden Proteine im MALDI-TOF-MS mit folgenden Matrixes gemessen:

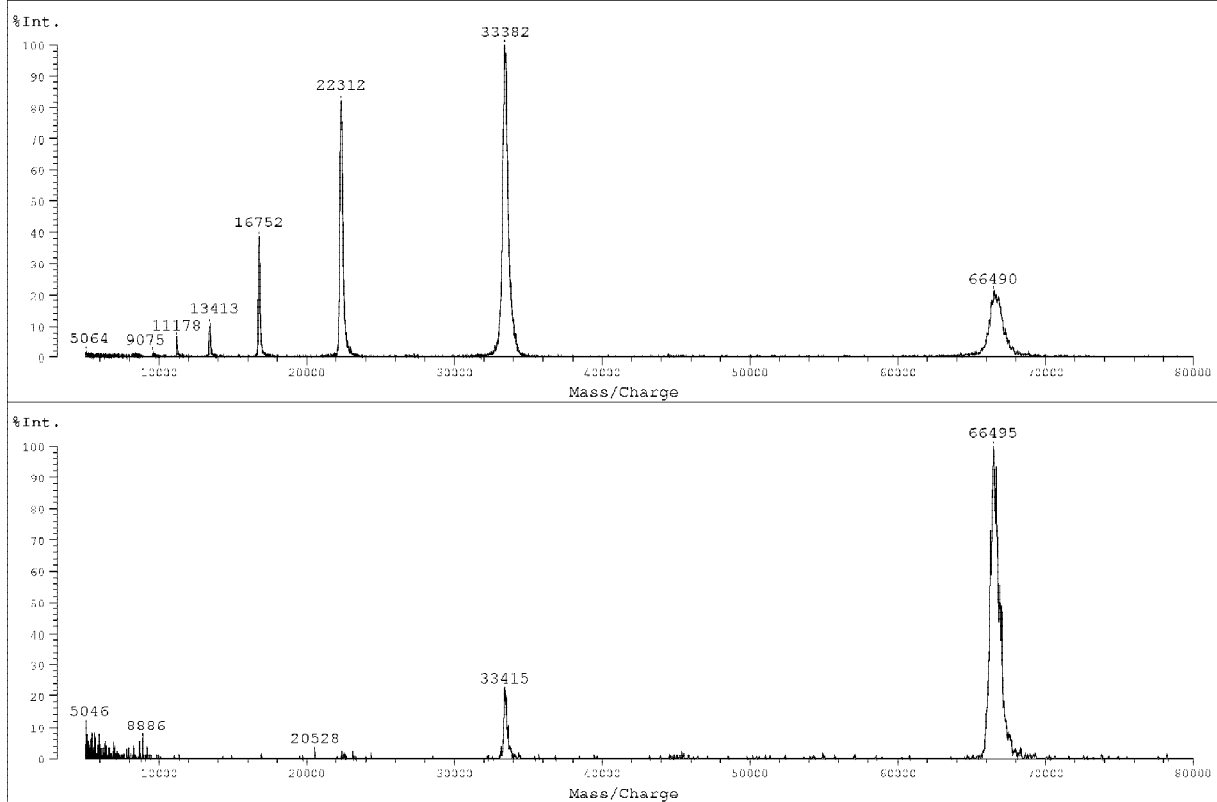
- Dihydroxy-Benzoesäure (DHB)
- $\alpha$ -cyano-4-Hydroxymizsäure (CN)
- Sinapinsäure (SIN)

Die zwei Spektren in Abbildung 1 zeigen den Einfluß der Matrices  $\alpha$ -cyano-4-Hydroxymizsäure und Sinapinsäure auf die Ionisierung von rHSA.

Im Vergleich zu der Messung mit Sinapinsäure, bei der einfach geladene Ionen überwiegen, erhält man mit  $\alpha$ -cyano-4-Hydroxymizsäure einen hohen Anteil mehrfach geladener Ionen. Daher sollte man in der Regel für Proteine mit einer Molekularmasse größer als 6000 Dalton Sinapinsäure als Matrix verwenden.

<sup>1</sup> Karas M., Hillenkamp F.: Anal. Chem. 60: 2299-2301 (1988)

<sup>2</sup> Tanaka K. et.al.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 2:151-153 (1988)



**Abb. 1:** MALDI-MS Spektren von rHSA mit den Matrices  $\alpha$ -cyano-4-Hydroxymizsäure und Sinapinsäure.

## Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung bei MALDI-TOF-MS ist einfach und schnell durchzuführen. Üblicherweise werden die Proben wie folgt auf den Probenhalter aufgetragen: Je 0,5  $\mu$ l Matrix, Probe und nochmals Matrix werden der Reihe nach aufgetragen und nach jedem Pipettierschritt im Luftstrom getrocknet.

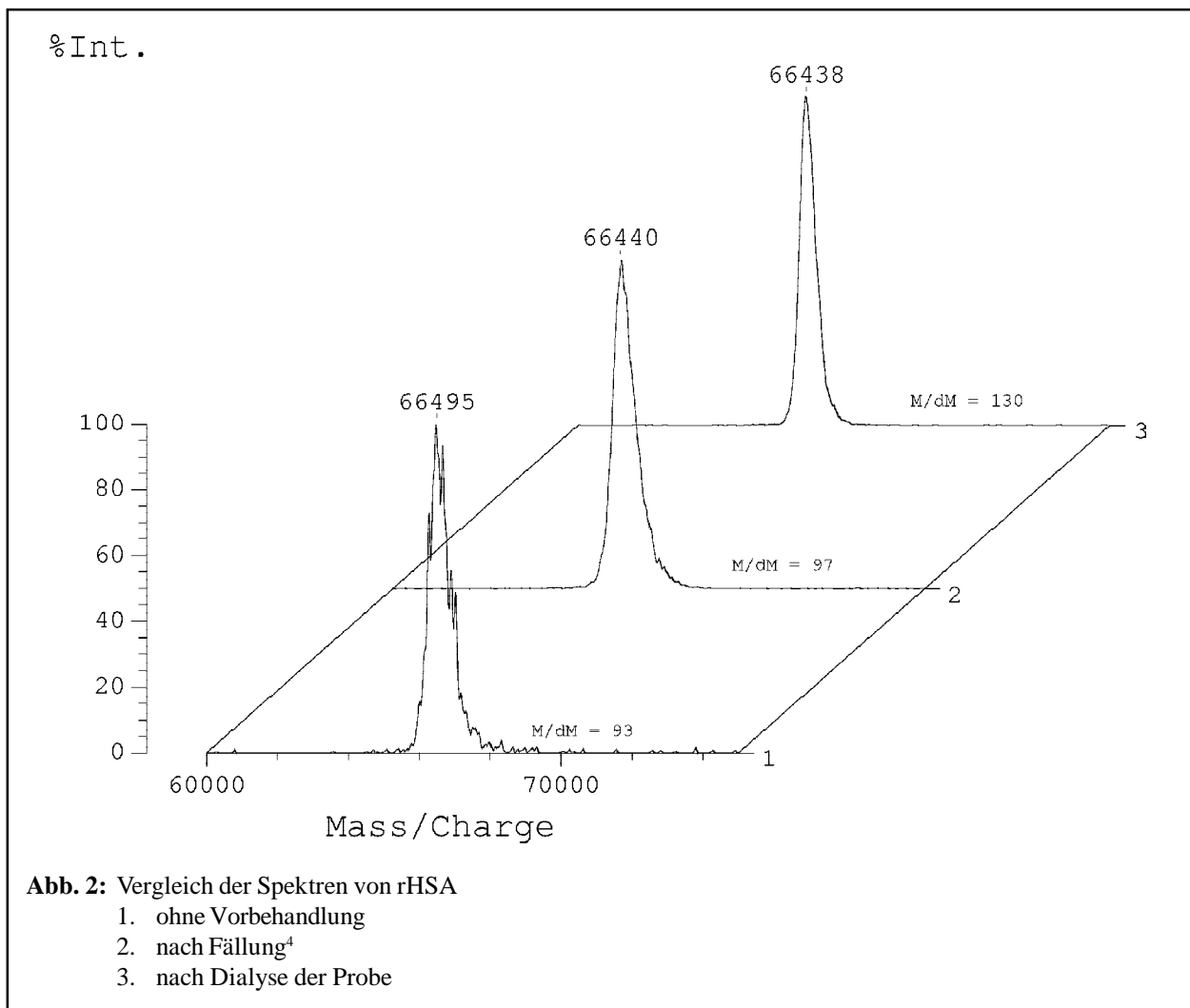
Durch eine Vorbehandlung der Probe vor dem Auftrag auf den Probenhalter lassen sich in vielen Fällen die Messungen optimieren.

Abbildung 2 zeigt drei Spektren von rHSA im Vergleich:

- ohne Vorbehandlung
- nach Methanol/Chloroform Fällung<sup>3</sup>
- nach Dialyse gegen Reinstwasser

Mit der Methanol/Chloroform Fällung<sup>3</sup> werden Detergenzien und Lipide aus der Probe entfernt. Gleichzeitig kann man eine Konzentrierung der Probe erreichen. Die Dialyse gegen Reinstwasser ist mit einer Verdünnung der Probe verbunden und entfernt (je nach Wahl der Membran) alle niedermolekularen Komponenten aus der Probe.

<sup>3</sup> Wessel D., Flügge U.I.: A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. Anal. Biochem. 138: 141-143 (1984)



Durch die Methanol/Chloroform Fällung wurde keine Verbesserung der Auflösung erreicht. Im Gegensatz dazu wurde durch die Dialyse gegen Reinstwasser eine Verbesserung der Auflösung von  $R=93$  zu  $R=130$  erreicht.

### Durchführung der Dialyse

Eine Membran (Millipore VSWP 02500) wurde auf die Oberfläche von Reinstwasser gelegt. Anschließend wurden 10  $\mu$ l Probenlösung auf die Membran aufgetragen und für mehrere Stunden inkubiert. Danach wurde die Probe aufgenommen und wie üblich auf den Probenhalter aufgetragen.

### Anwendungen

In Abbildung 3 ist das Spektrum eines Proteins mit einer molekularen Masse von 280 kDa dargestellt. Vor der Messung wurde die Probe wie oben beschrieben 2 Stunden lang dialysiert. Ohne vorherige Dialyse konnte kein interpretierbares Spektrum erhalten werden.

Mit MALDI-TOF-MS ist es auch möglich einzelne Komponenten aus einem komplexen Gemisch heraus zu bestimmen. In Abbildung 4 ist das Spektrum der Serumprobe einer (sekundär) immunisierten Maus nach einer zweistündigen Dialyse gezeigt.

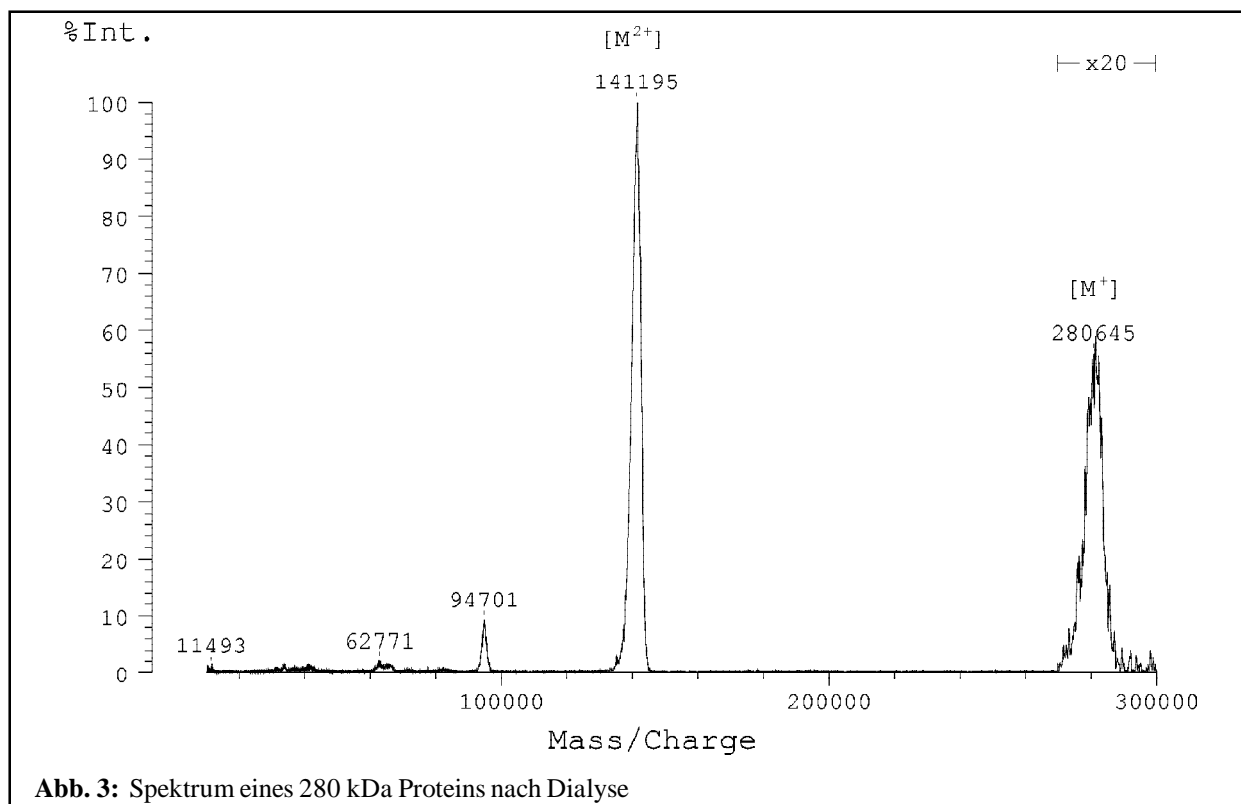


Abb. 3: Spektrum eines 280 kDa Proteins nach Dialyse

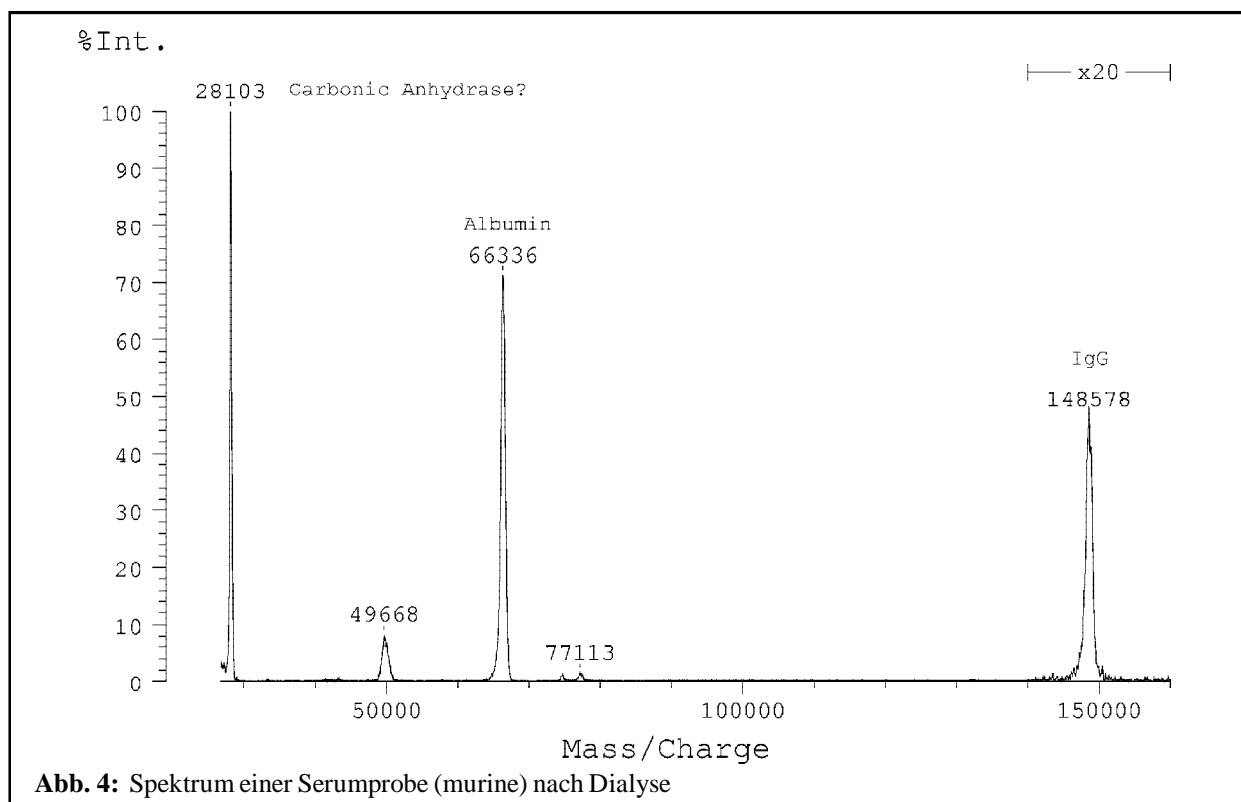


Abb. 4: Spektrum einer Serumprobe (murine) nach Dialyse