



Optimierung der Probenvorbereitung bei der Messung von Oligonukleotiden mit MALDI-TOF-MS

R. Limberg, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg

R. Römling, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg

Dr. M. Resch, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg

Die Größe von DNA Fragmenten wird heutzutage routinemäßig mit Hilfe der Gelelektrophorese bestimmt. Diese Methode ist zeitintensiv und ungenau ($\pm 10\%$)¹. Insbesondere aufgrund umfangreicher Sequenzierungsprojekte (z.B. Human genome project) besteht zur Zeit ein Bedarf an einer schnellen, präzisen und für einen hohen Probendurchsatz automatisierbaren Alternativmethode. Die "matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry" (MALDI-TOF-MS) wurde 1988 von Karas und Hillenkamp sowie Tanaka und Mitarbeitern eingeführt^{2, 3}. Seitdem hat sich diese Methode aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit, Flexibilität und Schnelligkeit zu einer Alternative zur klassischen Gelelektrophorese entwickelt. MALDI-TOF-MS wird bei der Analyse von

natürlichen und synthetischen Oligonukleotiden z.B. zur Qualitätskontrolle von Primern oder von PCR (polymerase chain reaction) -Produkten und auch zur Sequenzierung⁴ eingesetzt.

Üblicherweise werden Oligonukleotide als negativ geladene Ionen gemessen. Als Matrix hat sich 3-Hydroxypicolinsäure⁵ (HPA) bewährt. Oligonukleotide neigen aufgrund ihrer zahlreichen Phosphatgruppen zur inhomogenen Adduktbildung mit Alkali-Ionen, was eine geringe Massenauflösung ($R=M/\Delta M$) und ein schlechtes Signal/Rausch-Verhältnis zur Folge hat. In Abbildung 1 ist als Beispiel das Spektrum eines d(T)₆₅-Oligonukleotids gezeigt.

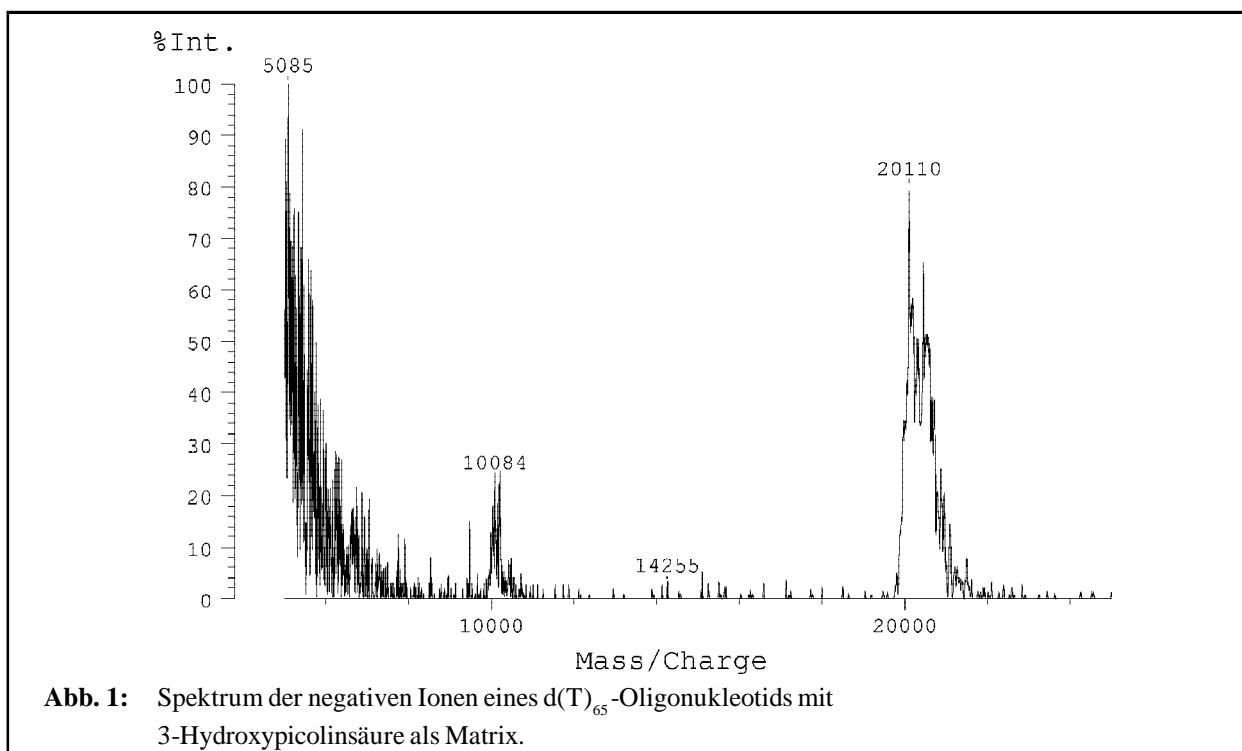


Abb. 1: Spektrum der negativen Ionen eines d(T)₆₅-Oligonukleotids mit 3-Hydroxypicolinsäure als Matrix.

¹ Weber K. and Osborn M.: J. Biol. Chem. 244: 4406 (1969)

² Karas M., Hillenkamp F.: Anal. Chem. 60: 2299-2301 (1988)

³ Tanaka K., et al.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 2:151-153 (1988)

⁴ Taranenko N.I.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 11: 386-392 (1997)

⁵ Wu K.J.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 7: 142-146 (1993)

Wie man erkennen kann, resultiert aus der Adduktbildung ein breiter nicht aufgelöster Peak, der eine genaue Massenbestimmung nicht zuläßt. Dieser Effekt kann minimiert werden, indem man die Alkalikationen durch ~~Ammoniumionen ersetzt~~. Eine Möglichkeit dieses zu erreichen ist die Zugabe eines entsprechenden Kationenaustauschers direkt auf den Probenhalter⁷. Auf

diese Weise läßt sich die Messung von Oligonukleotiden zwar optimieren, aber diese Methode ist schlecht reproduzierbar und nur bedingt für eine Automatisierung geeignet. Eine andere Möglichkeit ist die Zugabe eines Überschusses von Ammoniumionen in Form von Ammoniumhydrogencitrat direkt auf dem Probenhalter⁸.

Ionenaustausch durch Zugabe von Ammoniumhydrogencitrat

Durchführung

Die folgenden Lösungen wurden auf den Probenhalter aufgetragen, gemischt und im Luftstrom getrocknet:

- 0,5µl HPA (40mg/ml in Acetonitril/H₂O (50/50))
- 0,5µl Oligonukleotidlösung (einige pmol/µl)
- 0,5µl Ammoniumhydrogencitrat (0,3M)

In Abbildung 2 sind zwei Spektren, gegenübergestellt, die den Effekt der Zugabe von Ammoniumhydrogencitrat zeigen.

Ein Vergleich der beiden Spektren zeigt, daß durch die Zugabe von Ammoniumhydrogencitrat die Auflösung von R=35 auf R=47 gesteigert worden ist, das Signal/Rausch-Verhältnis aber unbeeinflußt bleibt.

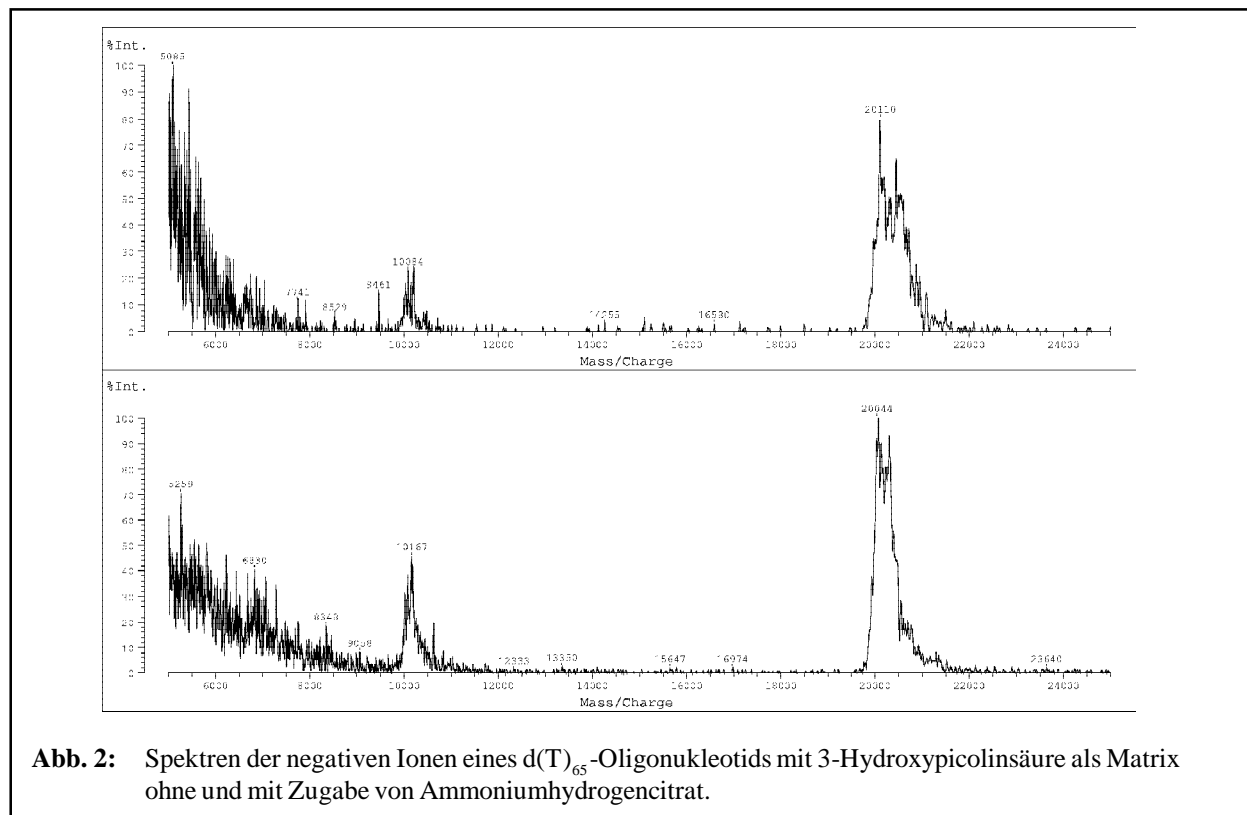


Abb. 2: Spektren der negativen Ionen eines d(T)₆₅-Oligonukleotids mit 3-Hydroxypicolinsäure als Matrix ohne und mit Zugabe von Ammoniumhydrogencitrat.

⁶ Nordhoff E. et.al.: Rapid Commun. Mass Spectrom 6: 771-776 (1992)

⁷ Bahr U., Karas M., Hillenkamp F.: J. Anal. Chem. 348: 783-791 (1994)

⁸ Zhu Y.F.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 10: 1591-1596 (1996)

“on probe purification”

Eine weitere Methode zur Optimierung der Messung von Oligonukleotiden ist die “on probe purification” nach Liu et al.⁹.

Durch eine Vorbeschichtung des Probenhalters mit Nitrocellulose (NC)¹⁰ können störende Effekte von Salz, Puffer und anderen Kontaminanten, die üblicherweise in DNA-Proben enthalten sind reduziert werden, wodurch ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis erreicht wird.

Durchführung

Folgende Lösungen werden der Reihe nach auf den Probenhalter aufgetragen und nach jedem Pipettierschritt im Luftstrom getrocknet:

- 2 µl NC-Lösung (16 mg/ml NC in Aceton)
- 0,5 µl HPA
- 0,5 µl Oligonukleotidlösung (einige pmol)
- 0,5 µl HPA

Abbildung 3 zeigt zwei Spektren, die den Effekt der Vorbeschichtung des Probenhalters mit Nitrocellulose demonstrieren.

Ein Vergleich der beiden Spektren veranschaulicht, daß durch die Vorbeschichtung des Probenhalters die Auflösung kaum beeinflusst worden ist, das Signal/Rausch-Verhältnis aber signifikant optimiert wurde.

Aufgrund der oben dargestellten Ergebnisse wurden die beiden Probenvorbereitungsmethoden kombiniert, um sowohl die Massenauflösung als auch das Signal/Rauschverhältnis zu verbessern.

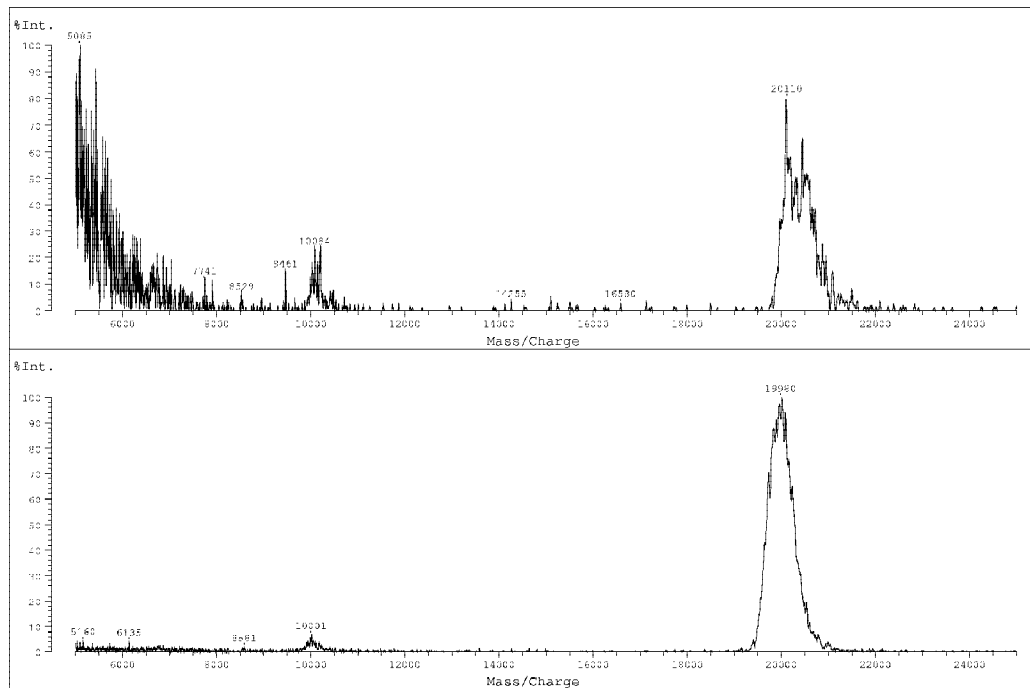


Abb. 3: Spektren der negativen Ionen eines d(T)₆₅-Oligonukleotids mit 3-Hydroxypicolinsäure als Matrix ohne und mit Vorbeschichtung des Probenhalters mit Nitrocellulose.

⁹ Liu Y.H. et.al.: Anal. Chem. 67: (No. 19) 3482-3490 (1995)

¹⁰ Schleicher & Schüell: Protean BA85 (0,45µm)

Optimierung der Messung von Oligonukleotiden durch Zugabe von Ammoniumhydrogencitrat und Vorbeschichtung des Probenhalters mit Nitrocellulose.

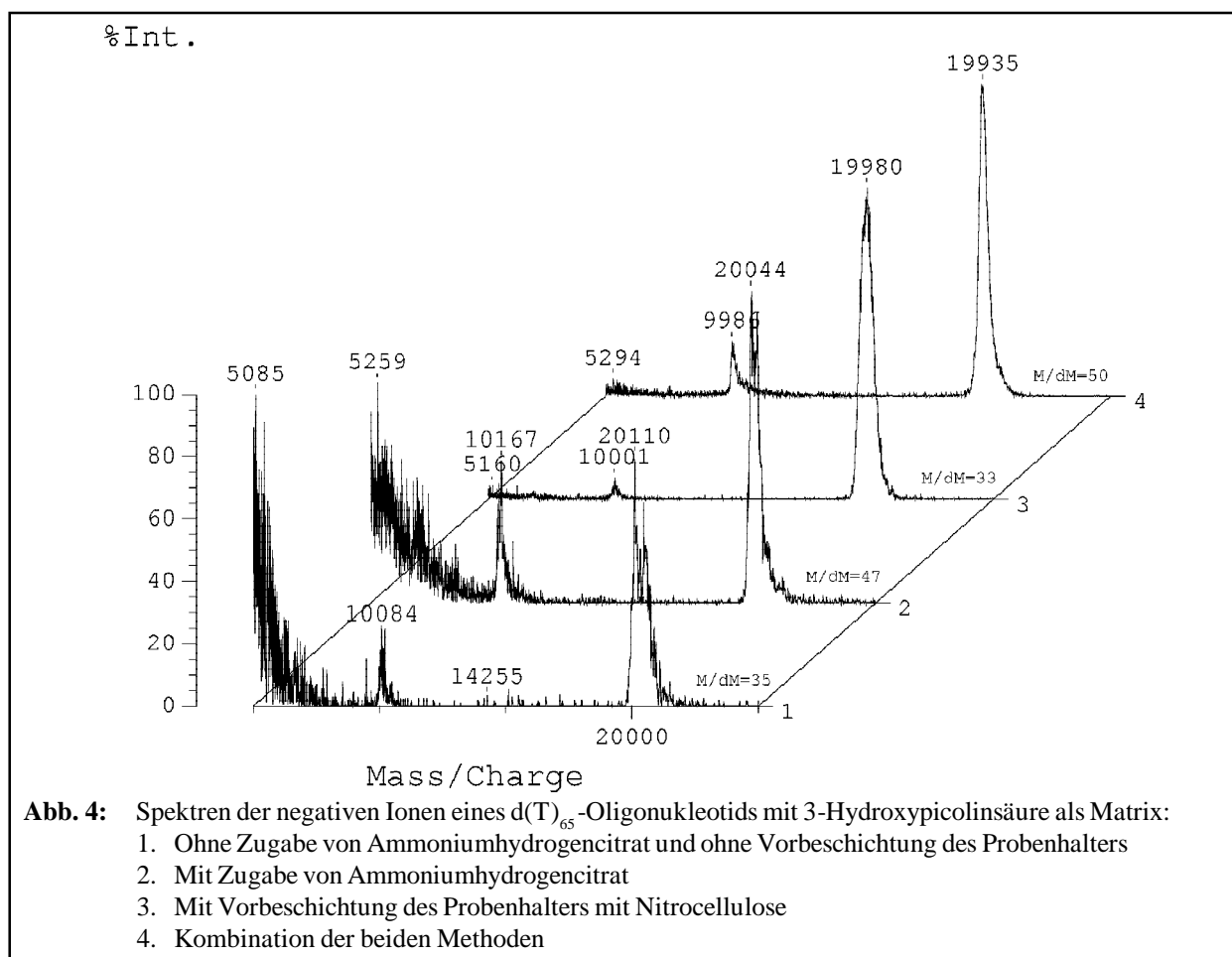
Durchführung

Folgende Lösungen werden der Reihe nach auf den Probenhalter aufgetragen und nach jedem Pipettierschritt im Luftstrom getrocknet.

- 2 µl NC-Lösung (16 mg/ml NC in Aceton)
- 0,5 µl Matrix (s. u.)
- 0,5 µl Oligonukleotidlösung (einige pmol/µl)
- 0,5 µl Matrix

Die Matrix wird bei dieser Methode wie folgt angesetzt: HPA (80 mg/ml in Acetonitril/H₂O (50:50)) werden im Verhältnis 50:50 mit einer Ammoniumhydrogencitrat-Lösung (0,3M) gemischt.

In Abbildung 4 sind vier Spektren gegenübergestellt, die den Effekt der unterschiedlichen Optimierungsschritte zusammenfassen. Mit der kombinierten Probenvorbereitungsmethode ist es möglich, sowohl das Signal/Rauschverhältnis als auch die Auflösung zu optimieren.



Zusammenfassung

Anhand der gezeigten Spektren konnte gezeigt werden, daß MALDI-TOF-MS eine Alternative zur Größenbestimmung von Oligonukleotiden ist. Mit der beschriebenen Probenvorbereitung lassen sich sowohl die Auflösung als auch das Signal/Rauschverhältnis mit

einfachen Mitteln optimieren. Die gesamte Probenvorbereitung wird direkt auf dem Probenhalter durchgeführt. Daraus ergibt sich neben der Schnelligkeit der Methode als weiterer Vorteil eine einfache Automatisierbarkeit.