

TÜBİTAK

2008-139

V

TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU
THE SCIENTIFIC AND TECHNOLOGICAL RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

Temel Bilimler Araştırma Grubu
Basic Sciences Research Grant Group

Proje No: 105T384

93822

**Tek Kullanımlık MALDI Targetlerin Gelistirilmesi:
Karakterizasyonu ve Uygulamaları**

Doç. Dr. Talat Yalçın

Mayıs 2008

İZMİR

ÖNSÖZ

Tübitak tarafından desteklenen 105T384 nolu "Tek kullanımlık yüzeyi kaplanmış MALDI target geliştirilmesi, karakterizasyonu ve uygulamaları." başlıklı bu çalışmada, tek kullanımlık MALDI-TOF sistemi için target geliştirilmiş ve bu sayede düşük molekül ağırlıklı örneklerin bu tür sistemler ile analiz edilebilirliği gösterilmiştir.

Proje ekibi TÜBİTAK'a katkılarından dolayı teşekkür eder.

1. Giriş

1.1. Giriş

1.2. Giriş

1.3. Giriş

2. Çalışma Alanı

2.1. Çalışma Alanı

2.2. Çalışma Alanı

2.3. Çalışma Alanı

2.4. Çalışma Alanı

3. Sonuç

4. Referanslar

5. Proje Çekirdek Bilgi Formu

İÇİNDEKİLER

Önsöz	2
İçindekiler.....	3
Şekil Listesi	4
Özet	5
Abstract	6
1. Giriş.....	7
1.1 Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon İyonlaştırılmalı Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi, MALDI TOF.....	8
1.2. Mıknatısal Sıçratma Sistemi (Magnetron Sputtering System).....	10
1.3 Kobalt Kaplı Targetlerin SEM, AFM ve XRD ile Karakterizasyonu.....	11
2. Geliştirilen Targetlerin Kütle Spektrometre Uygulamaları.....	14
2.1. Amino Asit Analizleri	14
2.2. Peptid Analizleri:.....	17
2.3. Farmakolojik Önemi Sahip Örneklerin Analizi.....	18
2.4 Protein Analizi.....	20
3. Sonuç	21
4. Referanslar	22
5. Proje Özet Bilgi Formu.....	23

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. MALDI-TOF-MS sistemi	8
Şekil 2. Yaygın Kullanılan Bazı Matrislerin Kütle Spektrumları.....	9
Şekil 3. Miknatısal Sıçratma Sistem.....	11
Şekil 4. Kobalt (100nm) kaplanmış Silikon (001) yüzeyinin kesitinin SEM görüntüsü...12	
Şekil 5. Kobalt ile kaplanmış Silikon yüzeyinin XRD spektrumu.....	13
Şekil 6. Si/Co yüzeyinin AFM görüntüsü.....	13
Şekil 7. Glutamic Asit Kütle Spektrumu.....	15
Şekil 8. Amino Asitlerin Kütle Spektrumu.....	16
Şekil 9. Peptidlerin Kütle Spektrumu.....	18
Şekil 10. Farmakolojik Öneme Sahip Örneklerin Kütle Spektrumu.....	20
Şekil 11. Sulfat Grubu Bağlı Örneklerin Kütle Spektrumu	21

ÖZET

Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon İyonlaştırmalı Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi, MALDI-TOF yüksek ağırlıklı ve uçucu olmayan moleküllerin (sanayi polimerleri ve biyopolimerler) analizinde yaygın olarak kullanılan oldukça etkili bir tekniktir. Bu teknikte uygun bir matriks ile belirli oranlarda karıştırılan örnek target üzerine uygulanarak analiz edilir. Kullanılan matriksler düşük molekül ağırlığına sahip, ultraviole dalga boyunda lazer enerjisini absorblama özelliği bulunan organik boyalar olup genellikle kütle aralığı 0 ila 700 Da arasında baskın sinyaller gösterirler. Bu sebepten, yaygın olarak bilinen matriksleri kullanarak düşük molekül ağırlığı olan maddelerin analizini MALDI-TOF sistemi ile gerçekleştirmek oldukça güçtür. Ayrıca, matriks ile örneğin belirli oranlarda karıştırılarak MALDI target üstüne uygulanması ve homogen bir kristallenme oluşumunun sağlanması güçlü sinyaller elde edilmesi için bir gerekliliktir. Ancak, örnek ile matriksin her zaman homojen bir kristallenme gösterememeleri, bazı örneklerde değişik matriks kullanma gerekliliği ve targetlerin kısa sürede kirlenebilmesi gibi durumlar analiz sırasında karşılaşılan problemler arasında gösterebilir. Bu problemlerin üstesinden gelebilmek için günümüzde yüzeyi değişik kimyasallar ve materyaller ile modifiye edilmiş MALDI targetler geliştirilmektedir.

Bu proje kapsamında MALDI-TOF kütle spektrometre sistemi için tek kullanımlık, düşük maliyetli, yüzeyi modifiye edilmiş ve matriks görevi gören targetler geliştirilmiş ve bu targetlerin düşük moleküler ağırlıklı maddelerin analizinde kullanılabilirliği gösterilmiştir. Analiz edilecek örnek herhangi bir matriks kullanılmadan geliştirilmiş olan target üzerine konularak direk olarak analiz edilmiş ve bu sayede homojen olmayan kristallenme oluşumu problemi ile 0-700 Da kütle aralığında gözlenen baskın matriks sinyalleri problemi de ortadan kaldırılmıştır. Geliştirilen target ile yüzlerce örneğin kısa sürede analizini gerçekleştirmeyi sağlayan otomasyon analiz sistemlerinde, ayrıştırma kolonlarından gelen örnekler hiçbir matriks ile karıştırılma ihtiyacı duyulmadan direk olarak MALDI targetler üzerine uygulanarak analiz edilebilecektir. Bu sayede büyük ölçüde zaman ve kimyasal madde tasarrufu da sağlanmış olacaktır.

Anahtar Sözcükler:

MALDI-TOF, target, kütle spektrometresi, matriks, kaplama

ABSTRACT

2000 yıllarda geliştirilen ve kütle spektrometresinde yumuşak iyonlaşma metodu olarak MALDI-TOF Mass Spectrometry has been widely used to analyze large, unvolatile polymers and biopolymers. In this technique, sample and a suitable matrix have to be mixed at certain molar ratio before to apply MALDI target. Generally, small organic dyes are used as a matrix to absorb laser energy (at UV region) during the ionization. Most of these matrices have molecular weight less than 300 and during the ionization, these matrixes can produce a variety of matrix-related ions around 0 to 700 Da mass ranges. Therefore, it has been a challenge to use MALDI for the analysis of low-molecular weight samples ($m/z < 500$). Generally, a small amount should be applied to MALDI target to obtain uniform crystallization on the target before introducing to the system. Without having a uniform crystallization on the target, it is difficult to obtain suitable signal. Those can be certain problem for MALDI technique as well as including the automated, high-throughput combinatorial and chip-array analysis. In addition, left over on target are always problems during unknown analysis. MALDI target has to be clean so well before every analysis to prevent this problem. In order to overcome these problems, there are several attempts for development of modified and coated MALDI targets in the literature.

In this project, disposable, pre-coated MALDI target has been developed and tested for the analysis of low molecular weight compounds. This targets developed allows analysis of hundreds of sample in a very short time without mixing any matrices. Especially, in automated, high-throughput combinatorial and chip-array analysis. This will save time, money and can be a break-through for the TOF mass spectrometry.

Keywords:

MALDI - TOF, target, mass spectrometry, matrix, pre-coating

ABSTRACT

MALDI-TOF Mass Spectrometry has been widely used to analyze large, unvolatile polymers and biopolymers. In this technique, sample and a suitable matrix have to be mixed at certain molar ratio before to apply MALDI target. Generally, small organic dyes are used as a matrix to absorb laser energy (at UV region) during the ionization. Most of these matrices have molecular weight less than 300 and during the ionization, these matrixes can produce a variety of matrix-related ions around 0 to 700 Da mass ranges. Therefore, it has been a challenge to use MALDI for the analysis of low-molecular weight samples ($m/z < 500$). Generally, a small amount should be applied to MALDI target to obtain uniform crystallization on the target before introducing to the system. Without having a uniform crystallization on the target, it is difficult to obtain suitable signal. Those can be certain problem for MALDI technique as well as including the automated, high-throughput combinatorial and chip-array analysis. In addition, left over on target are always problems during unknown analysis. MALDI target has to be clean so well before every analysis to prevent this problem. In order to overcome these problems, there are several attempts for development of modified and coated MALDI targets in the literature.

In this project, disposable, pre-coated MALDI target has been developed and tested for the analysis of low molecular weight compounds. This targets developed allows analysis of hundreds of sample in a very short time without mixing any matrices. Especially, in automated, high-throughput combinatorial and chip-array analysis. This will save time, money and can be a break-through for the TOF mass spectrometry.

Keywords:

MALDI - TOF, target, mass spectrometry, matrix, pre-coating

1. GİRİŞ:

90'lı yıllarda geliştirilen ve kütle spektrometresinde yumuşak iyonlaşma metodu olarak da bilinen MALDI (Tanaka et. all., 1987, Karas et. all., 1987, Karas and Hillenkamp, 1988). (matriks yardımcı lazer desorpsiyon iyonlaştırmalı) ile uçucu olmayan büyük biyolojik moleküller rahatlıkla gaz fazına geçirilebilmektedir. MALDI-TOF sistemi günümüzde en yaygın kullanılan bir tekniktir. Bu tekniğin en önemli özelliği yüksek molekül ağırlıklı maddeleri katı fazdan gaz fazına maddeyi parçalamadan geçirebilmesidir (Medzihradsky et. all., 2000, Loboda et. all., 2000). Kullanım kolaylığı, deney sırasında çok az madde harcanması ve bir kaç saniye gibi kısa bir süre içerisinde bütün kütle spektrumunun alınması günümüzde bu tekniği polimerlerin and biopolimerlerin analizlerinde rakipsiz kılmaktadır. Fakat, MALDI-TOF kütle spektrometre ile örnek analizlerinde, sinyal kalitesi açısından, doğru matriks seçimi, kullanılan çözücü ve örnek/matriks homojen karışımı çok önemlidir.

Bu teknikte matriks kullanmak gerekliliği ve örneğin matriks ile belirli oranlarda karıştırılmak zorunda olması ve homojen bir kristallenme gözlenmesi gerekliliği bu sistemin ana problemlerindedir. Buna ek olarak, kullanılan bütün matrikslerin düşük molekül ağırlığına sahip olması ve genelde kütle aralığı 0 ila 700 Da arasında baskın sinyaller göstermeleride MALDI-TOF sistemi ile düşük molekül ağırlıklı maddelerin analizini, bilinen matriksler yardımı ile yapılmasını güç kılmaktadır. Ayrıca, matriks kullanımının gerekliliği otomasyonla yapılan analizlerde sorunlar yaratmaktadır.

Günümüzde yüzeyleri modifiye edilmiş MALDI targetler geliştirilmiştir. Ticari olarak paslanmaz çelik ve altın kaplanmış çelik targetler MALDI target olarak kullanılmaktadır. Han ve arkadaşları (Han and Sunner, 2000) aktive edilmiş carbon maddesini ince film tabakası olarak alüminyum yüzeye immobilize etmiş ve bu sayede matriks sinyalleri minimize edebilmiş ve örnek sinyallerinin matriks sinyalleri tarafından etkilenmesini azaltmıştır. Ayrıca daha az örnek harcanması ve daha hassas olması bu metodun artılarıdır. Bu çalışmanın en önemli dezavantajı, aktive edilmiş yüzeye gliserol maddesinin uzun süreli sinyal elde edebilmek için örnek ile birlikte tatbik edilmesidir ki bu otomasyon çalışmalarında problem teşkil etmektedir, ayrıca, uzun süreli kullanımlarda yüzeyde kirlenmeye yol açması muhtemeldir. Yüzeyi modifiye edilmiş ve MALDI target olarak en fazla kullanılan malzeme silikondur (Bhattacharya, 2002, Shen, 2001, Wei, 1999, Hayes, 2001, Laiko, 2002). Murray ve arkadaşları (Murray, 2002) silikon yüzeyini direkt olarak maldi target olarak kullanmış ve herhangi bir matriks kullanılmadan düşük molekül ağırlıklı moleküllerin analizinde bu metodun kullanılabilirliğini göstermiştir. Siuzdak ve arkadaşları (Siuzdak, 2001) elektro kimyasal yolla aşındırdığı poroz silikon yüzeyini maldi target olarak kullanarak polimer ve enzimle parçalanmış proteinlerin analizlerini gerçekleştirmiştir. Hayes ve arkadaşları (Hayes, 2001) ince film tabakası halinde kaplanmış silikonlu yüzeyi maldi target olarak kullanmış ve 0-6000 Da molekül ağırlığı aralığında kullanılabilirliğini göstermiştir. Bunlara ek olarak değişik metal tuzları ve metal tozları ile doyurulmuş çözücülerde düşük molekül ağırlıklı örneklerin analizinde kullanılmıştır (Schürenberg, 1999, Ho, 1998, Tanaka, 1998). Tanaka ve arkadaşları (Tanaka, 1998) ince kobalt metal tozu ile gliserol içerisinde suspansiyon çözelti hazırlayarak bu yaklaşımın biyolojik örneklerin analizinde kullanılabilirliğini göstermiştir. Yalçın ve arkadaşları (Yalçın, 2002) değişik metal tozları (bakır, nikel, demir, kobalt vs.) ile izopropanol alkol içerisinde hazırladıkları suspansiyon çözeltisini polimerlerin analizlerinde matriks yerine kullanmışlar ve özellikle bu yaklaşım ile literatürde ilk defa polietilen polimerlerinin analizinde başarı sağlamışlardır. Matriks olarak kullanılan suspansiyon metal çözeltileri 0-500 Da kütle aralığında çok güçlü sinyaller göstermemişlerdir.

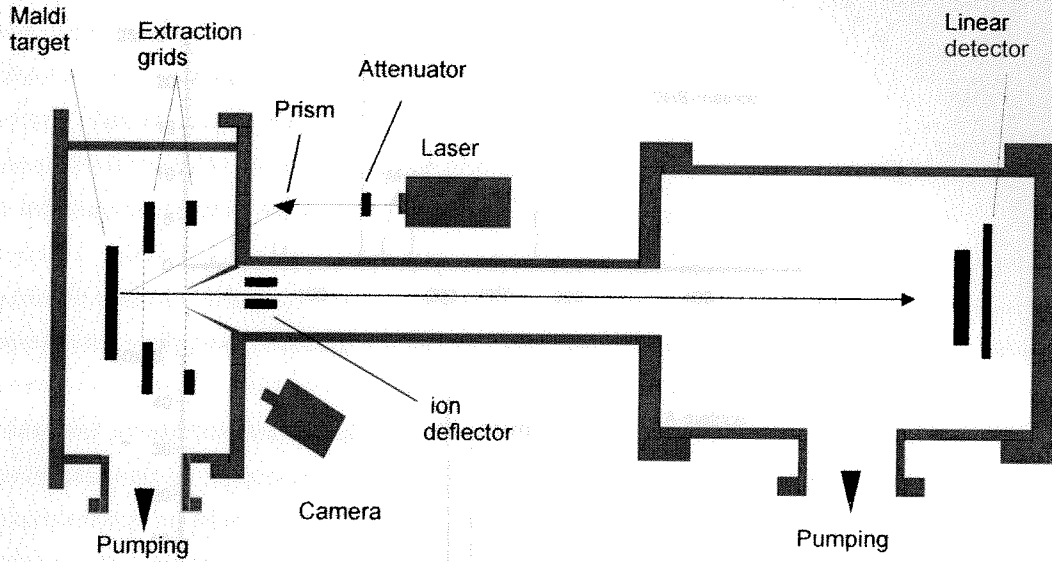
Son yıllarda düşük molekül ağırlıklı örneklerin analizi için gliserol/graphite karışımı (Dale, 1996) ve alfa-cyano-4-hidroksi-cinnamik asid/centrimonium bromide

karışımı(Guo, 2002) gibi çeşitli matriks kombinasyonları geliştirilmekte beraber matriksden kaynaklanan kütle sinyallerinin örnek kütle sinyalleri ile örtüşmesini tamamen engellemek mümkün olamamıştır.

Bu çalışmada tek kullanımlık, düşük maliyetli ve yüzeyi matriks gibi davranan metal ile ince filim halinde kaplanmış maldi targetler geliştirilmiş ve buna bağlı olarak değişik uygulamaları gösterilmiştir.

1.1 Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon İyonlaştırmalı Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi, MALDI-TOF :

MALDI-TOF sistemi günümüzde yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Bu tekniğin en önemli özelliği yüksek molekül ağırlıklı uçucu olmayan örnekleri katı fazdan gaz fazına örneğe zarar vermeden ve parçalamadan geçirebilmesidir. Kullanım kolaylığı, deney sırasında çok az madde harcanması ve bir kaç saniye gibi kısa bir süre içerisinde toplam kütle spektrumunun alınabilmesi günümüzde bu tekniği polimerlerin ve biopolimerlerin analizlerinde rakipsiz kılmaktadır. Genel bir MALDI-TOF sistemi Şekil 1. de gösterilmiştir. Şekilde de görüldüğü üzere örnek yüklenen maldi target düşük vakum sistemine konulduktan sonra target yüzeyine gönderilen ışık ve matriks yardımı ile analiz edilecek örnek katı fazdan gaz fazına geçirilmektedir.



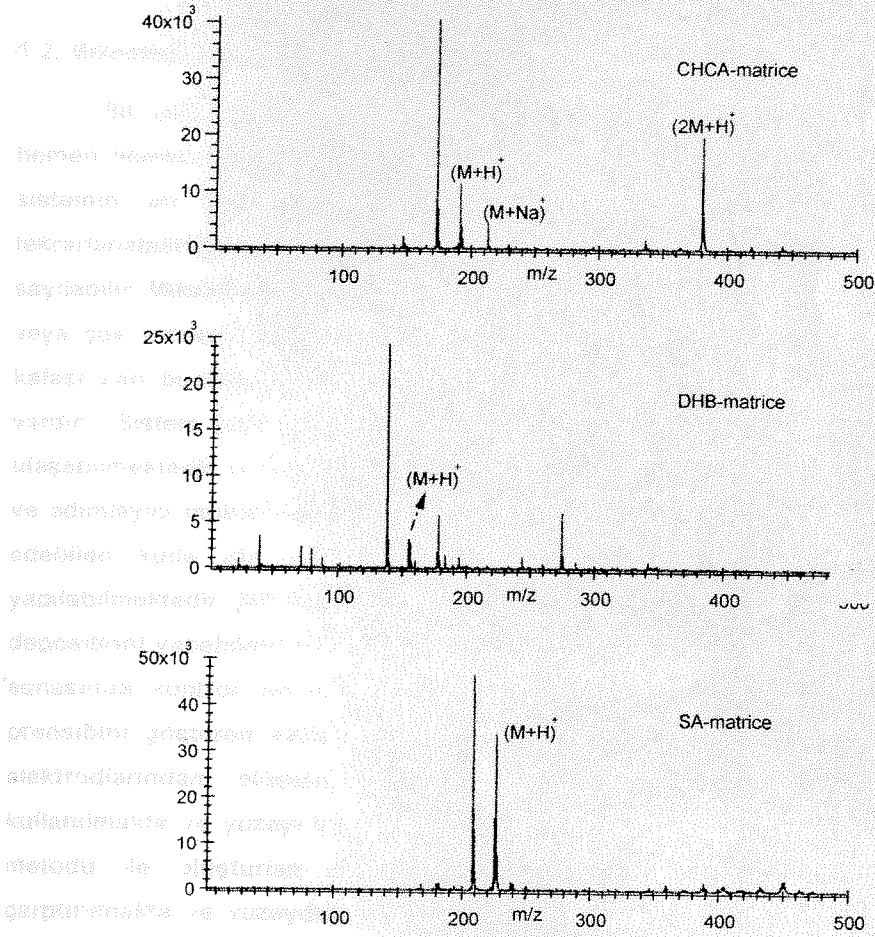
Şekil 1. MALDI-TOF-MS sistemi

MALDI-TOF sisteminde genel olarak 337.1 nm dalga boyunda ve 1-60 Hz hızında çalışan nitrogen laser kullanılmaktadır. Pulse genişliği 4 ns ve 10 Hz teki pulse enerjisi ise 260 μ J civarındadır. Lazer enerjisi, kullanılan matriks ve örneğe bağlı

olarak ayarlanabilir. Matrik yardımcı lazer desorpsiyon iyonlaştırmalı uçuş zamanlı kütle spektrometresindeki iyonlaştırma işleminin aşamaları şu şekilde sıralanabilir.

1. Matriks tarafından UV ışığın absorblanması ve matriksin iyonlaşması
2. Matriksin parçalanması ve katı fazdan gaz fazına geçmesi ve analiz edilecek örneğe yük transferinin gerçekleşmesi
3. Süpersonik hız ile matriksin genişlemesi ve bu esnada analiz edilecek örneğin genişleme yapan matriks içerisinde hapsolmuş örneklerin iyonlaşması ve gaz fazına geçmesi.

Matriks kullanılarak elde edilen düşük molekül ağırlıklı örneklerin kütle spektrumlarında genel olarak mass aralığı 0 ile 500 Da civarında güçlü matriks sinyalleri gözlenebilmektedir. Yaygın olarak kullanılan alpha cyano-CHCA, DHB ve SA matrikslerinin MALDI-TOF sistemi ile alınmış spektrumu Şekil 2 de gösterilmektedir.



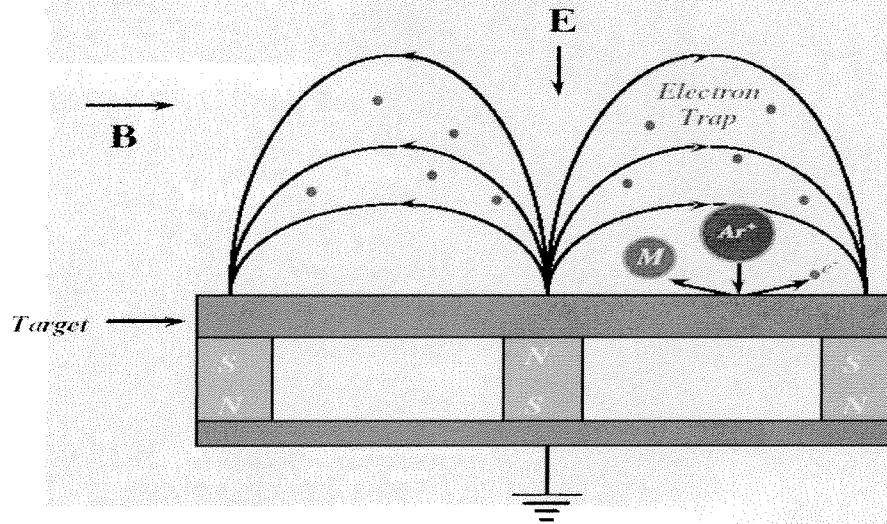
Şekil 2. Yaygın Kullanılan Bazı Matrikslerin Kütle Spektrumları.

Şekilde de görüleceği gibi matriks ve içindeki safsızlıklardan kaynaklanan iyonlar güçlü sinyaller verebilmektedir. Buna ek olarak analiz edilecek örnekte bulunabilecek değişik orandaki safsızlıkların matriks ile yaptıkları komplekslerin oluşturdukları kütle sinyalleri de yaygın olarak gözlenebilmekte ve bu şekilde elde edilen kütle sinyalleri 0-500 Da aralığında çok daha fazla istenmeyen sinyaller göstermektedirler. Bu tür problemlerin üstesinden gelebilmek için girişte de belirtildiği gibi değişik yaklaşımlar ve teknikler geliştirilmiş ve hala da geliştirilmektedir. Bu çalışmada silikon yüzeyi, manyetik sıçratma sistemi kullanılarak kobalt metali ile kaplanmış ve tek kullanımlık mald-targetleri geliştirilmiştir. Bu sayede matriksden kaynaklanan ve 0-500 Da aralığında oluşan matriks iyonlarının oluşumunun engellenebilmesi tasarlanmıştır.

1.2. Miknatısal Sıçratma Sistemi (Magnetron Sputtering System)

Bir çok ince film kaplama teknikleri içerisinde miknatısal sıçratma sistemi, hemen hemen her türlü sistem için ince film hazırlayabilme özelliğine sahiptir. Bu sistemin en önemli avantajları, düzgün kaplama yapılabilmesi, kaplamaların tekrarlanabilirliği, yüzeye güçlü tutanabilmesi ve kolay bir yöntem olması olarak sayılabilir. Miknatısal sıçratma yöntemi ile iletken, yalıtkan ve manyetik ince filmler tek veya çok katmanlı kaplanabilmektedir. Üç adet iki inç çapında miknatısal sıçratma kafası olan, bu kafaların herbirinin in-situ eğmesi, kapaması, bacası ve gaz injeksiyonu vardır. Sistem turbo moleküler pompa ile pompalanıp, taban basıncı 7×10^{-7} torr'a ulaşabilmektedir ve baratron vakum göstergesi ile çalışma basıncı kontrol edilmekte ve adımlayıcı motorlu kapı vana ile basınç sabit tutulmaktadır. Dört ayrı gaz kontrol edebilen kütle akı kontrolcüsü ile çeşitli gaz karışımlarında reaktif sıçratma yapılabilir. DC ve RF güç kaynakları bulunan sistemin, birlikte biriktirme (co-deposition) yapabilme özelliği vardır. Kalınlık monitörü ile film kalınlığı film büyütme esnasında kontrol edilebilmektedir. Şekil 4 de miknatısal sıçratma sisteminin prensibini gösteren karton gösterilmektedir. DC sıçratma sistemi katod ve anod elektrodlarından oluşmaktadır. Yüzeye kaplanacak malzeme katod olarak kullanılmakta ve yüzeyi kaplanacak malzemede anod olarak kullanılmaktadır. Ark metodu ile oluşturulan Argon iyonları katode doğru hızlandırılarak targete çarptırılmakta ve yüzeyden kopan iyonlar anode doğru hızlanarak yüzeyi ince film olarak kaplamaktadır.

Magnetron Sputtering Principle



Şekil 3. Miknatısal Sıçratma Sistemi

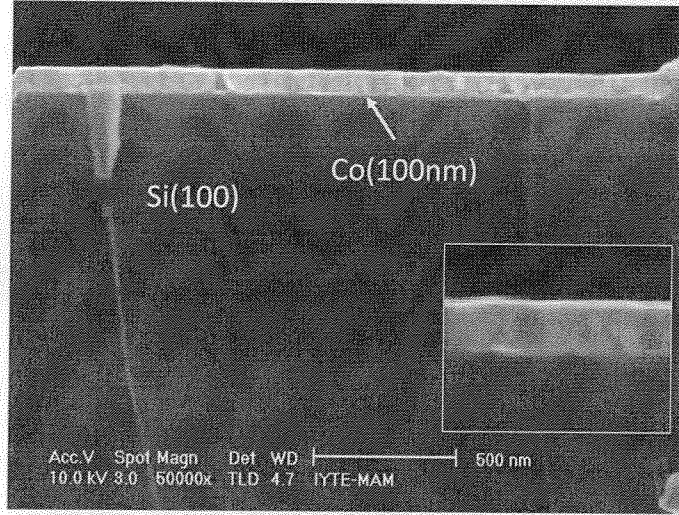
Bu çalışmada, İYTE Fizik Bölümünde bulunan Miknatısal Sıçratma Sistemi kullanılarak silikon üzerine 100 nm kalınlığında Kobalt metali kaplanmıştır. Kaplanan targetlerin özellikleri SEM, AFM ve XRD ile karakterize edilmiştir.

1.3. Kobalt Kaplı Targetlerin SEM, AFM ve XRD ile Karakterizasyonu:

SEM:

Taramalı Elektron Mikroskopu, SEM, ince film kaplanan yüzeyleri karakterize etmeye yarayan ve çok yaygın olarak kullanılan güçlü bir tekniktir. Yüze kaplanan malzemenin morfolojisi ve yüzey yapısı hakkında bilgi veren bir tekniktir. Diğer yüzey analiz tekniklere göre (örneğin, AFM) hızlı sonuç verebilme özelliğine sahiptir.

Miknatısal sıçratma sistemi ile kobalt kaplanmış silikon malzemenin kesiti Şekil 4 de gösterilmektedir. Yüze kaplanan kobaltın homojenliği ve düzgünlüğü şekilde açık olarak gösterilmektedir. İki saat süreli kaplama sonunda cobaltın kaplanma kalınlığı 100 nm olarak bulunmuştur.



Şekil 4. Kobalt (100nm) kaplanmış Silikon (001) yüzeyinin kesitinin SEM görüntüsü

XRD:

X-ışınları yansıtma sistemi, analiz edilecek malzemenin kristal yapısı hakkında bilgi veren ve çok yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Katı malzemelerin kristal yapıları %95 oranında bu metod ile görüntülenmektedir. X-ışınları sisteminin çalışma prensibi genel olarak, yüzeye gönderilen ışımının geri yansımalarının oluşturduğu bilgilerin analiz edilmesi ile elde edilmektedir. Genel olarak, yüzeye gönderilen X-ışınları ışığın yüzeydeki atoma çarpması sonucu atomun çevresinde bulunan elektronlar gelen ışığın frekansı (birebir aynı frekas) ile osilasyon yaparlar. Her yönde birbirini söndüren dalga girişimleri oluşur. Fakat kristal yapıyı oluşturan atomlar belli bir düzende buldukları için azda olsa birbirlerini artı yönde tetikleyen dalga girişimleride oluşmaktadır. X-ışınları ve oluşan dalga belli bir fazda düzgün olarak malzemeden değişik yönlere yansır. Artı yönde oluşan dalga girişimlerinin olduğu açılar yardımı ile kristal yapının oluşturduğu aralıklar Bragg yasası kullanılarak kolaylıkla hesaplanabilir. Şekil 5 de kobalt kaplanmış Silikon yüzeyinin XRD spektrumu gösterilmektedir. Şekilde de görüldüğü gibi cobalt yüzeyde tek kristal yapısı göstermektedir [hcp (002)].

2. Çeşitli Targatların Kütle Spektrometiri Uygulanması

Bu çalışmada geliştirilen Si/Co(60) Annealed 450C° spektrumu ile uygulanan diğer sonuçları karşılaştırmak için amino asit grupları, peptideler, proteinler ve biyomoleküller kullanılmıştır.

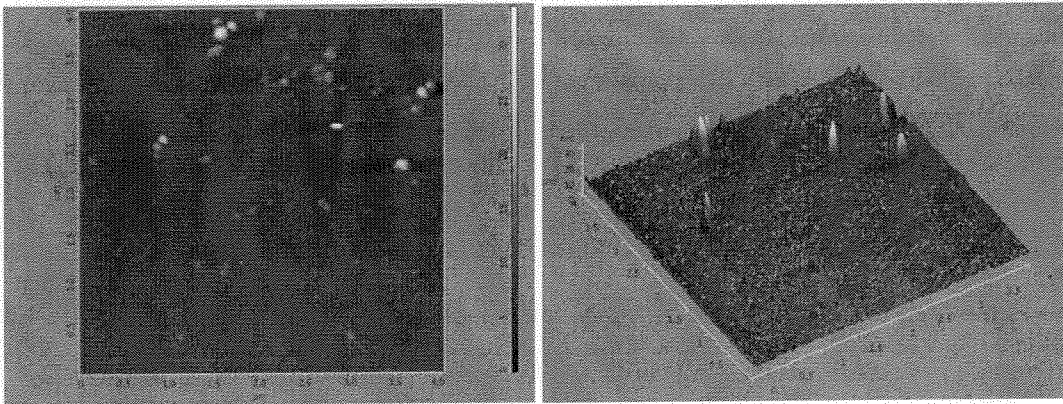
2.1. Amino Asit Analizi:

İn vivo yaşta taşlanın oluştuğu ve düşük molekül ağırlığına sahip olan polimerler, target uygulamalarında kullanılan ilk örneklerdir. Şekil 5 de Co kaplı Si yüzeyi üzerine konan gırtlak asit sınyalı 170 Da olarak görülmüştür. Aynı zamanda Co(002) sınyalı da görülmüştür. Şekil 5'te Co kaplı Si yüzeyden elde edilen sonuçlar sınyalı çözümler ve kalite kontrol için kullanılmıştır. Şekil 5'te Co kaplı Si yüzeyden elde edilen sonuçlar sınyalı çözümler ve kalite kontrol için kullanılmıştır. Şekil 5'te Co kaplı Si yüzeyden elde edilen sonuçlar sınyalı çözümler ve kalite kontrol için kullanılmıştır.

Şekil 5. Kobalt ile kaplanmış Silikon yüzeyinin XRD spektrumu

AFM:

Büyüme morfolojisine görmek için AFM görüntüleri değişik aralıklarda tarandı. Kobalt kaplanmış silikon yüzeyinin değişik aralıklarla taranmış AFM görüntüsü Şekil 6 da verilmektedir. Görüntünün büyüklüğü 4.0X4.0 µm ve yüksekliği 30 nm dir. Homogen bir kaplama görülmese de yer yer homogen olmayan bölümlerde gözlenmiştir.



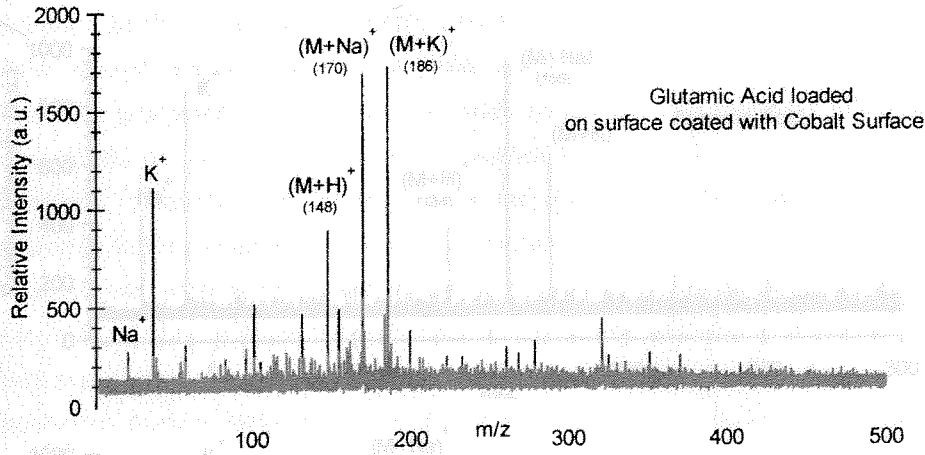
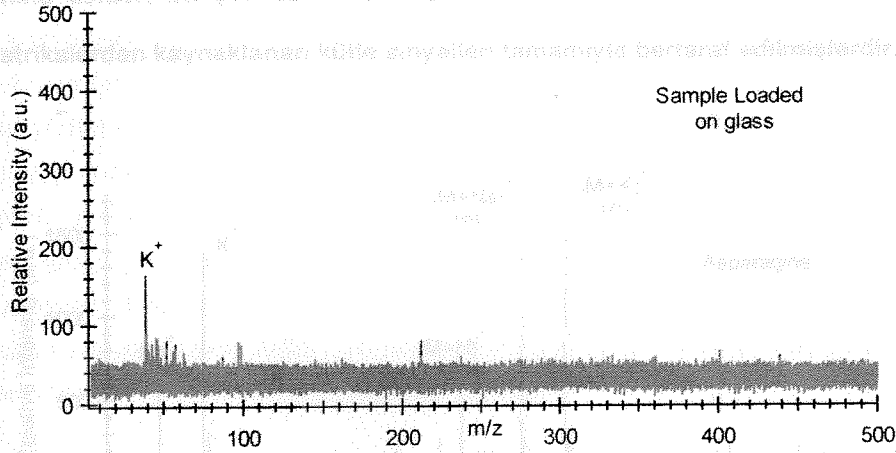
Şekil 6. Si/Co yüzeyinin AFM görüntüsü

2. Geliştirilen Targetlerin Kütle Spektrometre Uygulamaları:

Bu çalışmada geliştirilen maldi targetler, değişik örnek grupları seçilerek kütle spektrometreside uygulanabilirliği denenmiştir. Bu uygulamalar sırasında, basit amino asit grupları, peptideler, proteinler ve farmakolojik öneme sahip örnekler kullanılmıştır.

2.1. Amino Asit Analizleri:

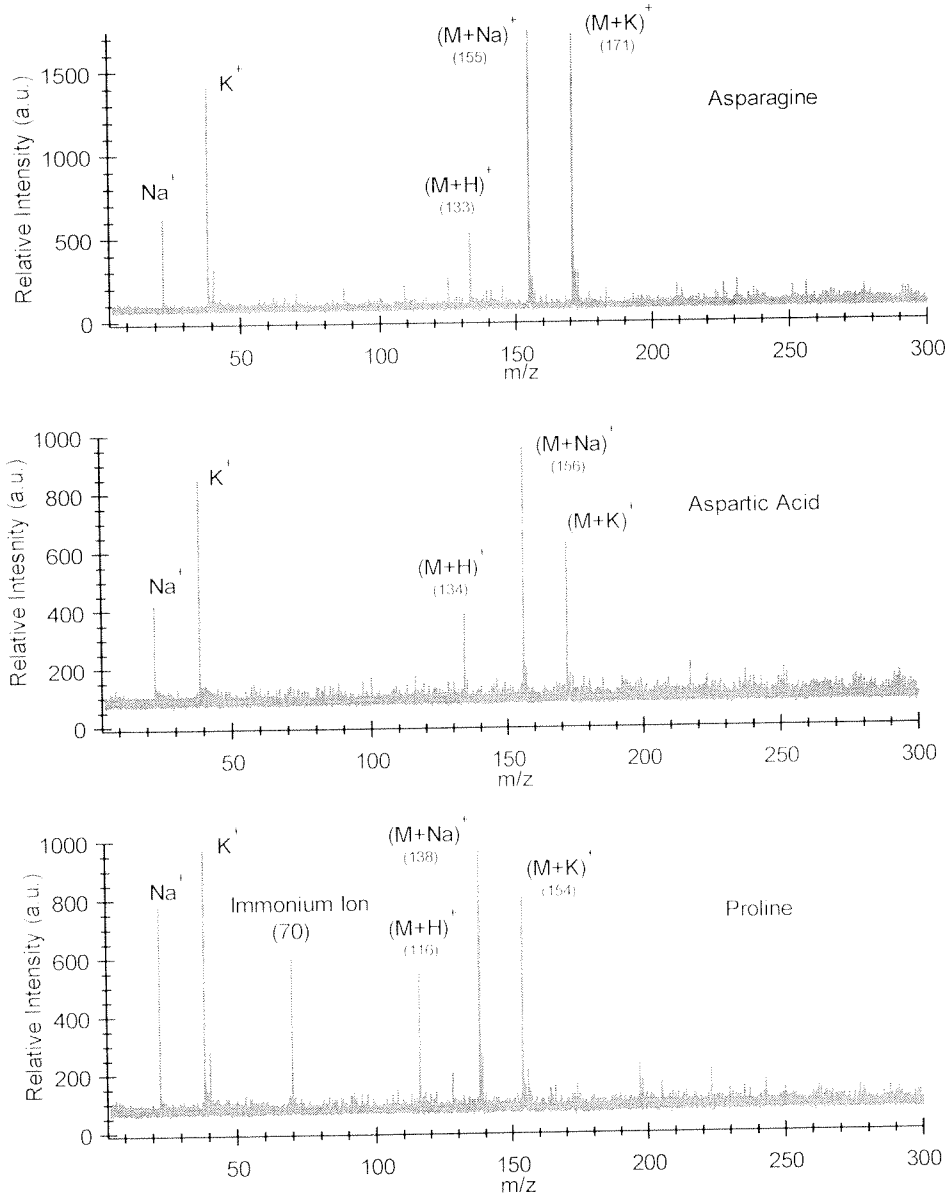
Proteinlerin yapı taşlarını oluşturan ve düşük molekül ağırlığına sahip olan amino asitler bu çalışmada target uygulamalarında kullanılan ilk örnekler olarak seçildiler. Şekil 7 de kobalt kaplı olmayan yüzeye konan glutamik asit sinyali ile kobalt kaplı yüzeye konan glutamik asit sinyali karşılaştırılmaktadır. Şekilden de görüleceği gibi kobalt kaplı olmayan yüzeye konan örnekten hiçbir analitik sinyal gözlenemezken, kobalt kaplı yüzeyden elde edilen analitik sinyali çok net ve kabul edilebilir bir kalitededir. Spektrumda hem protonlanmış kütle sinyali hemde sodyum ve potasyum takılmış kütle sinyalleri gözlenmiştir. Aralarındaki kütle sinyallerine bakıldığında protonlanmış kütle sinyali 148 Da , sodyum takılı sinyal 170 Da ve potasyum takılı kütle sinyali 186 Da olarak gözlenmiştir. Aralarındaki kütle farklarına bakıldığında protonlanmış kütle sinyali ile sodyum takılı kütle sinyalinin farkının 22 olduğu görülmektedir ki buda tam olarak protonlanmış kütle sinyaline sodyum atomun ağırlığının eklenmiş olmasındandır. Potasyum ile sodyum sinyallerinin arasındaki 16 Da fark da tam olarak potasyum atomu ile sodyum atomu arasındaki kütle farkının aynısıdır ki buda gördüğümüz sinyallerin analiz edilmek istenen örneğin protonlanmış, sodyum takılmış ve potasyum takılmış kütle sinyalleri olduğunun göstergesidir.



Şekil 7. Glutamic Asit Kütle Spektrumu

Test amaçlı yapılan bu deneyden sonra asparagine, aspartik asit ve proline gibi amino asitlerin kobalt kaplı target yüzeylerinde analizi denenmiştir. Şekil 8 de bu amino asitlerin Kütle Spektrumları verilmiştir. Deney sonucunda, her bir amino asit ile yapılan deneylerde, en şiddetli kütle sinyali olarak potasyum veya sodyum takılı sinyaller gözlenmiştir. Bunun sebebi yüzeyde yoğun olarak bulunan sodyum ve potasyum gruplarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu proje kapsamında gözlenmek istenen sonuç başarılı bir şekilde gözlenmiştir. Düşük molekül ağırlıklı

amino asitler, bu şekilde MALDI-TOF sistemi kullanılarak analiz edilebilmektedir. Matrikslerden kaynaklanan kütle sinyalleri tamamıyla bertaraf edilmişlerdir.



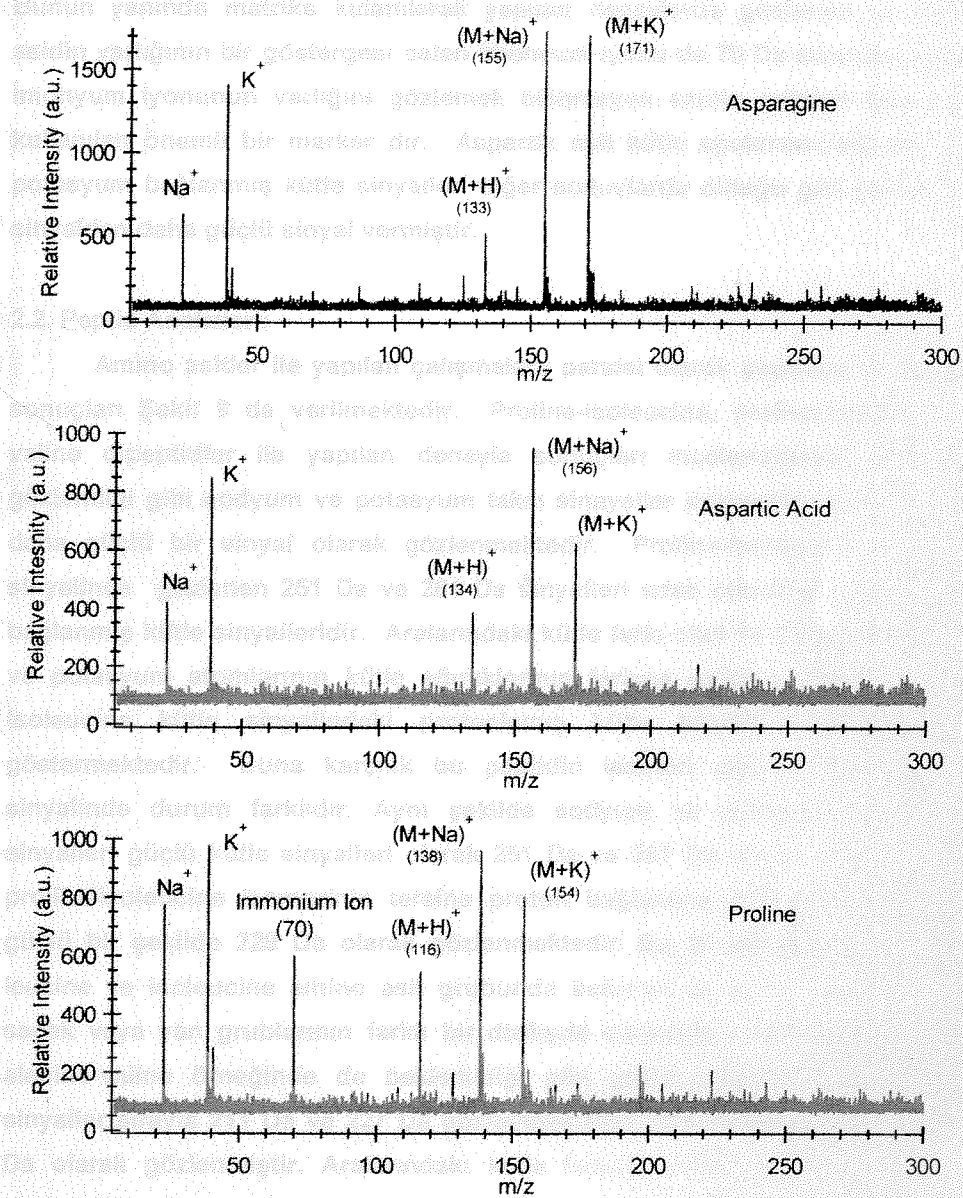
Şekil 8. Amino Asitlerin Kütle Spektrumu

Şekil 8 de görüldüğü gibi asparagine kütle sinyalinde sodyum ve potasyum bağlı kütle sinyalleri sırası ile kütle ağırlığı 155 Da ve 171 Da civarında gözlenmiştir.

amino asitler, bu şekilde MALDI-TOF sistemi kullanılarak analiz edilebilmektedir.

Matrikslerden kaynaklanan kütle sinyalleri tamamıyla bertaraf edilmişlerdir.

Şekil 8 de görüldüğü gibi asparagine kütle sinyalinde sodyum ve potasyum bağlı kütle sinyalleri sırası ile kütle ağırlığı 155 Da ve 171 Da civarında gözlenmiştir.



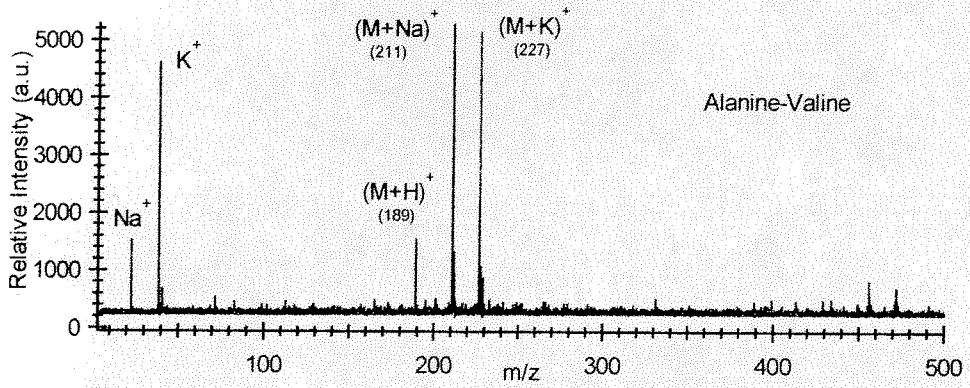
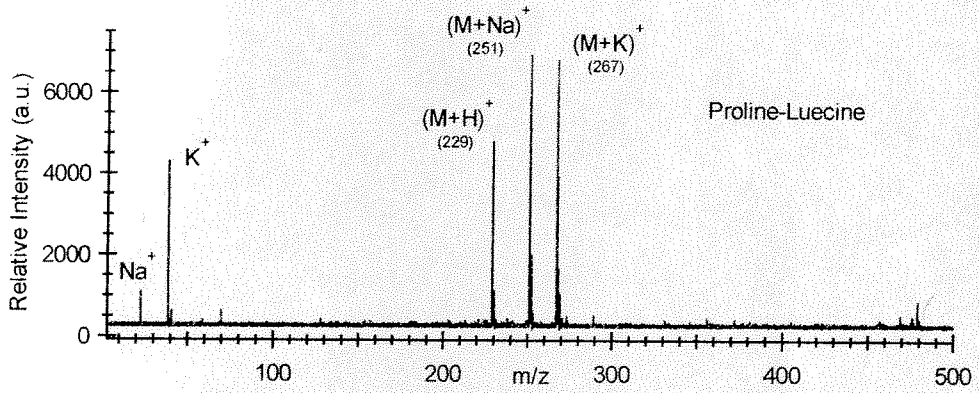
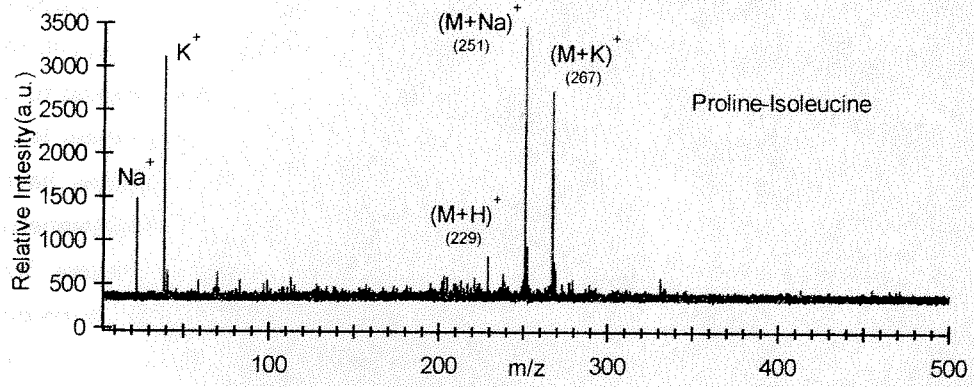
Şekil 8. Amino Asitlerin Kütle Spektrumu

Şekil 8 de görüldüğü gibi asparagine kütle sinyalinde sodyum ve potasyum bağlı kütle sinyalleri sırası ile kütle ağırlığı 155 Da ve 171 Da civarında gözlenmiştir.

Aralarındaki kütle farkıda sodyum ve potasyum atomunun kütle farklarına eşittir. Protonlanmış kütle sinyali ise 133 Da civarında gözlenmektedir ki buda aynı şekilde sodyum takılı sinyalden 22 Da daha az ve potasyum takılı sinyalden 38 Da daha azdır ve gözlenen sinyallerin asparagine amino asit sinyalli olduğunun doğrulanmasıdır. Bunun yanında matriks kullanılarak yapılan deneylerde gözlenen ve prolin amino asidinin varlığının bir göstergesi olan imonyum iyonu da 70 Da civarında gözlenmiştir. İmonyum iyonunun varlığını gözlemek bilinmeyen amino asitleri tanımlanmasında kullanılan önemli bir marker dir. Aspartik asit kütle spektrumunda da sodyum ve potasyum bağlanmış kütle sinyalleri diğer sonuçlarda olduğu gibi proton bağlanmış sinyalden daha güçlü sinyal vermiştir.

2.2. Peptid Analizleri:

Amino asitler ile yapılan çalışmalara paralel olarak peptidler ile yapılan deney sonuçları Şekil 9 da verilmektedir. Proline-isoleucine, proline-leucine ve alanine-valine dipeptidler ile yapılan deney sonuçları incelendiğinde amino asitlerde gözlemlendiği gibi sodyum ve potasyum takılı sinyaller protonlanmış kütle sinyalinden daha güçlü bir sinyal olarak gözlenmektedir. Proline-isoleucine peptidinin kütle sinyalinde gözlenen 251 Da ve 261 Da sinyalleri sıralı olarak sodyum ve potasyum bağlanmış kütle sinyalleridir. Aralarındaki kütle farkı olan 16 Da aynı şekilde sodyum ve potasyum atomlarının kütle ağırlıklarının farkına eşittir. Farklı olarak Proline-isoleucine kütle sinyalindeki protonlanmış kütle sinyali çok zayıf bir sinyal göstermektedir. Buna karşılık bu peptidin isomeri olan proline-isoprolin kütle sinyalinde durum farklıdır. Aynı şekilde sodyum ve potasyum bağlanmış kütle sinyalleri güçlü kütle sinyalleri olarak 251 Da ve 267 Da olarak gözlenmektedir ama proline-isoleucine isomerinin tersine proton bağlanmış kütle sinyalinde belirgin ve güçlü bir şekilde 229 Da olarak gözlenmektedir. Bu iki isomer arasındaki tek fark leucine ve isoleucine amino asit grubunda bulunan ve amino asitleri sınıflandıran saçak veya yan gruplarının farklı bir dizilişinde olmasıdır. En son kısımda bulunan alanine-valine örneğinde de beklenildiği gibi güçlü sodyum ve potasyum bağlı sinyaller sırayla 211 Da ve 227 Da gözlenmektedir. Protonlanmış kütle sinyalinde 189 Da olarak gözlenmiştir. Aralarındaki kütle farkları daha önceki kütle sinyalinde gözlemlendiği gibi sodyum ve potasyum atomlarının kütle ağırlıklarının farkına eşittir ve sırasıyla proton bağlanmış kütle sinyali ile sodyum bağlanmış kütle sinyali beklenildiği gibi 22 Da ve potasyum bağlanmış sinyal ile sodyum bağlanmış sinyal arasındaki fark ise 16 Da olarak gözlenmektedir.

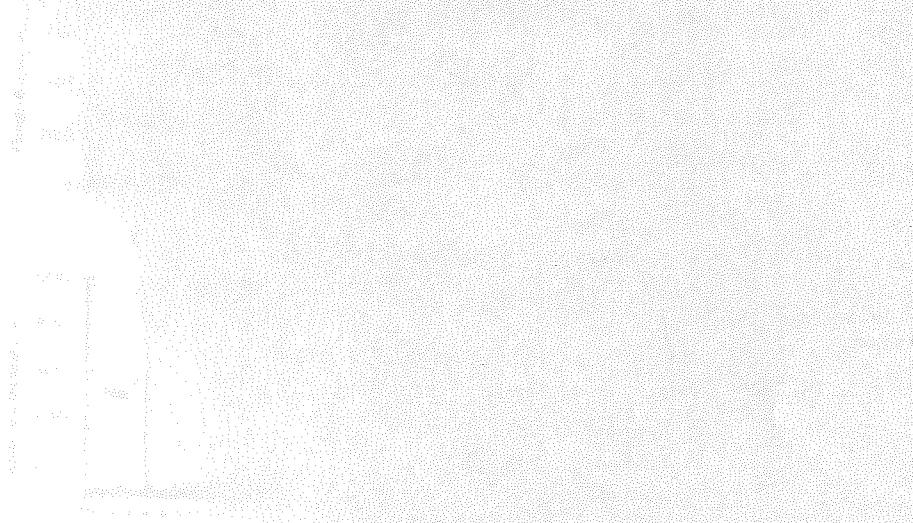


Şekil 9. Peptidlerin Kütle Spektrumu

2.3. Farmakolojik Öneme Sahip Örneklerin Analizi:

Farmakolojik öneme sahip, ilaç grupları için önem teşkil eden ve yoğun olarak kullanılan sulfamerazine, sulfathiazole ve sulfachlorpyridazine gibi moleküller bu

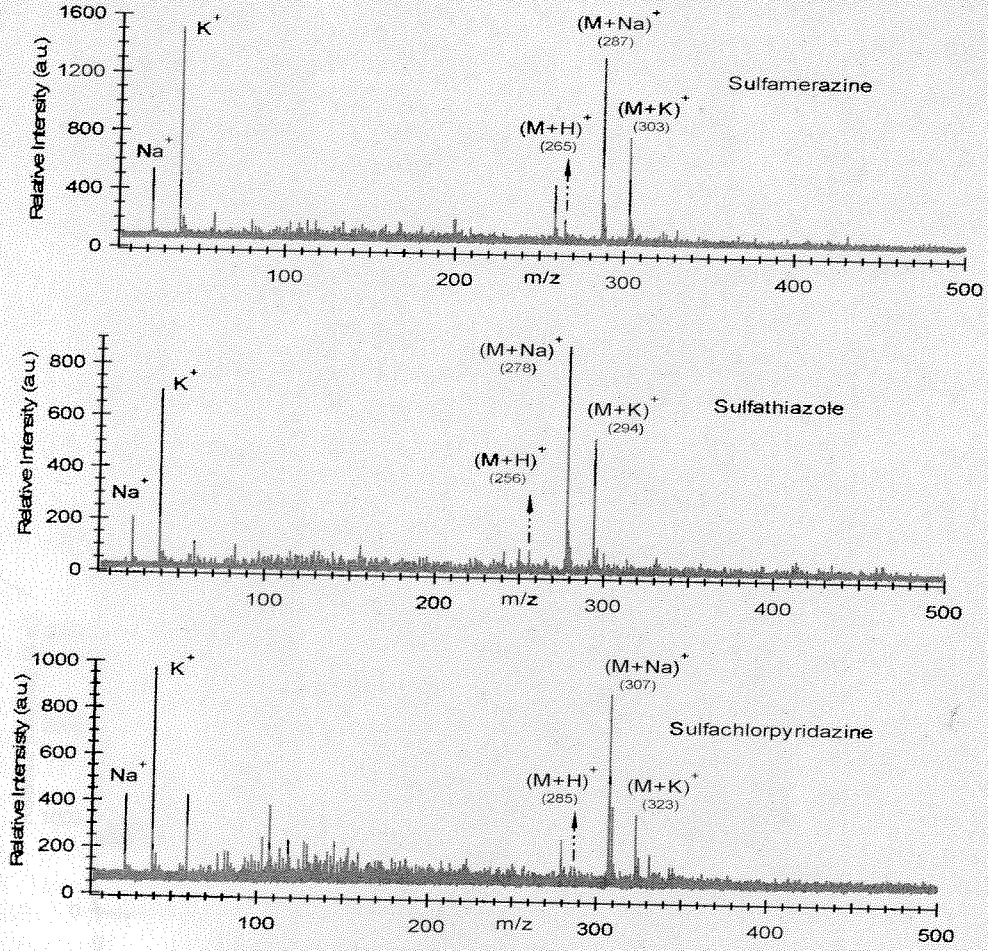
çalışmada test grubu olarak seçildi. Özellikle geliştirilen yeni tür ilaçların analizlerinde MALDI-TOF sistemleri kullanılmamaktadır. Bu projede geliştirilen targetler sayesinde bu tür grupların analizleri mümkün kılınabilmektedir. Şekil 10. da gösterildiği gibi ana sinyal olarak sodyum bağlanmış kütle sinyalleri her üç örnek içinde en güçlü kütle sinyali olarak gözlenmektedir. İkinci olarak da potasyum bağlanmış kütle sinyali gözlenmektedir. Bunun yanında her üç örnek içinde proton bağlanmış kütle sinyali en zayıf sinyaller olarak gözlenmektedir. Bunun sebebi örneklerde bulunan sulfat gruplarının sodyum veya potasyuma bağlanmayı protona bağlanmaya göre daha güçlü tercih etmelerinden kaynaklanmış olabilir.



Şekil 10: MALDI-TOF MS

2.4 Protein Analizi

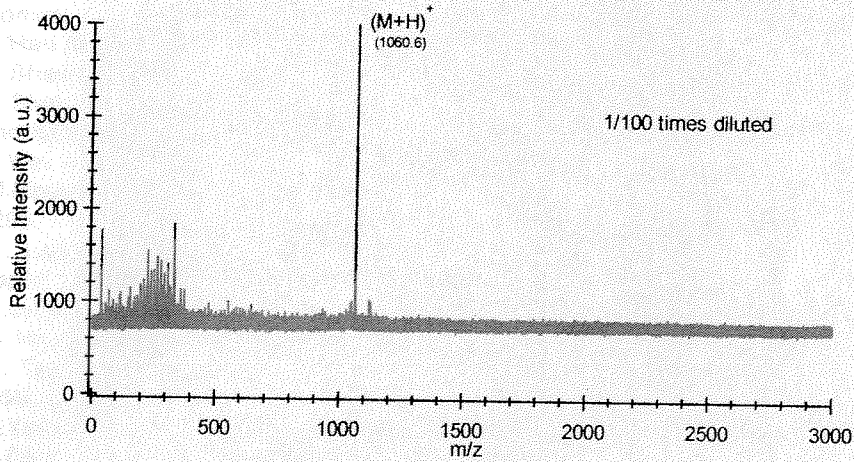
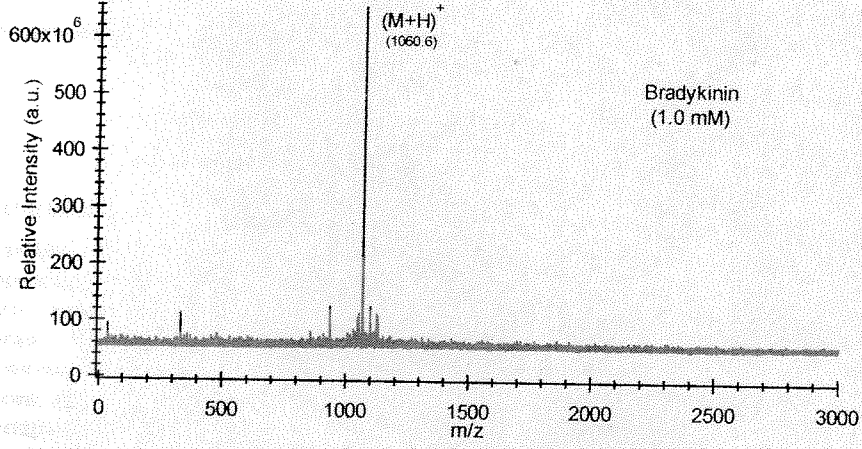
Azotun en yaygın izotopu ^{14}N olduğundan dolayı, proteinlerin kütle spektrometrisinde ^{14}N izotopunun kullanılmasıyla elde edilen kütle spektrumu, ^{15}N izotopunun kullanılmasıyla elde edilen kütle spektrumuna göre daha düşük kütle sinyalleri göstermektedir. Moleküllerin kütle spektrometrisinde, sodyum, potasyum ve proton bağlanmış kütle sinyalleri en güçlü sinyaller olarak gözlemlenmektedir. Sodyum bağlanmış kütle sinyali m/z 2000 civarında, potasyum bağlanmış kütle sinyali m/z 1000 civarında ve proton bağlanmış kütle sinyali m/z 500 civarında gözlemlenmektedir. Bu sinyallerin varlığı, proteinlerin kütle spektrometrisinde kullanılmasıyla elde edilen kütle spektrumu için önemli bir göstergedir. Bu sinyallerin varlığı, proteinlerin kütle spektrometrisinde kullanılmasıyla elde edilen kütle spektrumu için önemli bir göstergedir. Bu sinyallerin varlığı, proteinlerin kütle spektrometrisinde kullanılmasıyla elde edilen kütle spektrumu için önemli bir göstergedir.



Şekil 10. Farmakolojik Öneme Sahip Örneklerin Kütle Spektrumu

2.4 Protein Analizi:

Bu çalışmada son olarak molekül ağırlığı 1000 Da civarında olan bradykinen proteini yeni geliştirilen target ile test edildi ve elde edilen kütle sinyali Şekil 11. de gösterilmektedir. Molekül ağırlığı 1000 Da civarında olan bu proteinin proton bağlanmış kütle sinyali en güçlü sinyal olarak gözlemlendi. Bunun yanında potasyum bağlanmış kütle sinyali 1098.6 Da civarında küçük bir sinyal olarak gözlemlendi. Sodyum bağlanmış kütle sinyali gürültü seviyesinde olduğu için göz önüne alınmadı. Bu çalışmada gösteriyorki geliştirilen targetler düşük molekül ağırlıklı örneklerin analizinde kullanılacağı gibi molekül ağırlığı 1000 Da civarında olan ve matriks ile kluster yapan örnekler içinde kullanılabilir.



Şekil 11. Sulfat Grubu Bağlı Örneklerin Kütle Spektrumu

3. Sonuç

Bu proje kapsamında İYTE-Kimya bölümünde düşük molekül ağırlıklı örneklerin analizi için MALDI targetler geliştirilmiş, target yüzeyleri karakterize edilmiş ve gerçek örneklere uygulanabilirliği amino asitler, peptidler ve protein üzerinde test edilmiştir. Target yüzeyine kaplanacak materyal matriks gibi davranarak matriksden kaynaklanan sorunlar, örnek/matriks homojen karışma problemi gibi, ortadan kaldırılmıştır.

Geliştirilen targetler, amino asit, peptit, ve protein örnekleri kullanılarak test edilmiştir. Bu sayede düşük molekül ağırlıklı örneklerin MALDI-TOF sistemleri ile

rahatlıkla analiz edilebilirliği gösterilmiş ve örnek/matriks karışımından kaynaklanan homojen olmayan karışımların getireceği problemler giderilmiştir.

4. Referanslar:

1. Tanaka, K.; Ido, Y.; Akita, S. in *Proceedings of the Second Japan-China Joint Symposium on Mass Spectrometry*; Matsuda, H., Liang, X.-T., Eds.; Bando Press: Osaka, Japan, 1987, 185-188.
2. Karas, M.; Bachmann, D.; Bahr, Y.; Hillenkamp, F. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 1987, 78, 53-68.
3. Karas, M.; Hillenkamp, F. *Anal. Chem.* 1988, 60, 2299-2301.
4. Medzihradsky, K. F.; Campbell, J. M.; Baldwin, M. A.; Falick, A. M.; Juhasz, P.; Vestal, M. L.; Burlingame, A. L. *Anal. Chem.* 2000, 72, 552-558.
5. Loboda, A. V.; Krutchinsky, A. N.; Bromirski, M.; Ens, W.; Standing, K. G. *Rapid Comm. Mass. Spectrom.* 2000, 14, 1047-1057.
6. Han M. and Sunner J., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2000, 11, 644-649.
7. Bhattacharya S.H., Raifor T.J., and Murray K.K., *Anal. Chem.*, 2002, 74, 2228-2231.
8. Shen Z., Thomas J.J., Averbuj C., Broo K.M., Engelhard M., Crowell J.E., Finn M.G., and Siuzdak G., *Anal. Chem.*, 2001, 73, 612-619.
9. Wei J., Buriak J.M, and Siuzdak G., 1999, *Nature*, vol.399, 243-246.
10. Hayes D.J., Fonash S.J., Brown K.N., and Jones A.D., *Anal. Chem.*, 2001, 73, 1292-1295.
11. Laiko V.V., Taranenko N.I., Berkout V.D., Musselman B.D., and Doroshenko V.M., *Rapid Comm. Mass. Spectrom.* 2002, 16, 1737-1742.
12. Schürenberg M., Dreisewerd K., and Hillenkamp F., *Anal. Chem.*, 1999, 71, 221-229.
13. Ho Y-P., and Fenselau C., *Anal. Chem.*, 1998, 70, 4890-4895.
14. Tanaka K., Waki H., Ido Y., Akita S., and Yoshida T., *Rapid Comm. Mass. Spectrom.* 1998, 2, 151-153.
15. Yalcin, T.; Wallace, W. E.; Guttman, C. M.; Li, L. *Anal. Chem.*, 2002, 74, 4750-4756.
16. Dale M.J., Knochenmuss R., and Zenobi R., *Anal. Chem.*, 1996, 68, 3321-3329.
17. Guo Z., Zhang Q., Zou H., Guo B., and Ni J., *Anal. Chem.*, 2002, 74, 1637-1641.

**TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje No: 105T384
Proje Başlığı: Tek Kullanımlık MALDI Targetlerin Gelistirilmesi: Karakterizasyonu ve Uygulamaları
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Yürütücü: Doç. Dr. Talat Yalçın Bursiyer: Pınar Baydara
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Fen Fakültesi Kimya Bölümü, Gülbahçe-URLA 35430 İzmir
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Gülbahçe-URLA 35430 İzmir
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01-05-2006 - 01-05-2008
Öz : Bu çalışmada MALDI-TOF kütle spektrometre sistemi için tek kullanımlık, düşük maliyetli, yüzeyi modifiye edilmiş ve matriks görevi gören target geliştirilmiştir. Bu targetin düşük moleküler ağırlıklı maddelerin analizinde kullanılabilirliği gösterilmiştir. Bu sayede herhangi bir matriks kullanılmadan geliştirilmiş olan target üzerine konulan örnekler direk analiz edilebileceği gösterilmiştir. Böylece homojen olmayan kristallenme oluşumu problemi ile 0-700 Da kütle aralığında gözlenen baskın matriks sinyal problemi de ortadan kaldırılmıştır. Geliştirilen target ile yüzlerce örneğin kısa sürede analizini gerçekleştirmeyi sağlayan otomasyon analiz sistemlerinde, ayrıştırma kolonlarından gelen örnekler hiçbir matriks ile karıştırılma ihtiyacı duyulmadan direk olarak MALDI targetler üzerine uygulanarak analiz edilebilirliğinin mümkün olduğu bu çalışma kapsamında gösterilmiştir. Bu sayede büyük ölçüde zaman ve kimyasal madde tasarrufu da sağlanmış olacaktır.
Anahtar Kelimeler: MALDI-TOF, target, kütle spektrometresi, matriks, kaplama
Projeden Yapılan Yayınlar: