

Nóbelsverðlaunin í efnafræði 2002. Massagreiningar lífsameinda



John B. Fenn og Koichi Tanaka

Nóbelsverðlaunin 2002 voru að venju veitt í Stokkhólmi 10. desember við hátíðlega athöfn. Verðlaunin í efnafræði komu þá í hlut þriggja manna, John B. Fenn frá Bandaríkjunum, Koichi Tanaka frá Japan og Kurt Wüthrich frá Sviss[1, 2]. Þeir John B. Fenn og Koichi Tanaka deildu með sér helmingi verðlaunanna fyrir þróun aðferða til að massagreina stórar lífsameindir, en Kurt Wüthrich hlaut helming verðlaunanna fyrir þróun aðferða til að greina lögum lífsameinda með kjarnrófsgreiningu(NMR). Hér á eftir verður greint fá niðurstöðum rannsókna þeirra John B. Fenn og Koichi Tanaka viðkomandi massagreiningar lífsameinda.

Massagreiningar sameinda er ein öflugasta efna-greiningaraðferð sem völ er á og hefur víða verið notuð allt frá því um 1940. Í fyrstu beindist þessi tækni einkum að greiningu sameinda í efnablöndum eftir massa, en upp úr 1960 var þessi tækni í vaxandi mæli einnig notuð við greiningar á lögum sameinda. Hefðbundin massagreining sameinda felur í sér að viðkomandi sýni er í fyrstu leitt inn í jónunarhylki á gasformi. Þar eru viðkomandi sameindir jónaðar og/eða rofnar í sameindabrot með rafstraumi. Jónir eru því næst aðskildar með raf- og/eða segulsviði háð massa og hleðslu og loks numdar með jónskynjara. Af tæknilegum ástæðum hefur þessi aðferð lengstum verið bundin við greiningar smárra eða meðalstórra sameinda. Stórsameindir á borð við prótein eða fjölsykrur voru torgreinanlegar með þessari aðferð, annars vegar vegna örðugleika við gasmyndun og hins vegar vegna flókins og margbreytilegs niðurbrots og jónunar sameindanna.

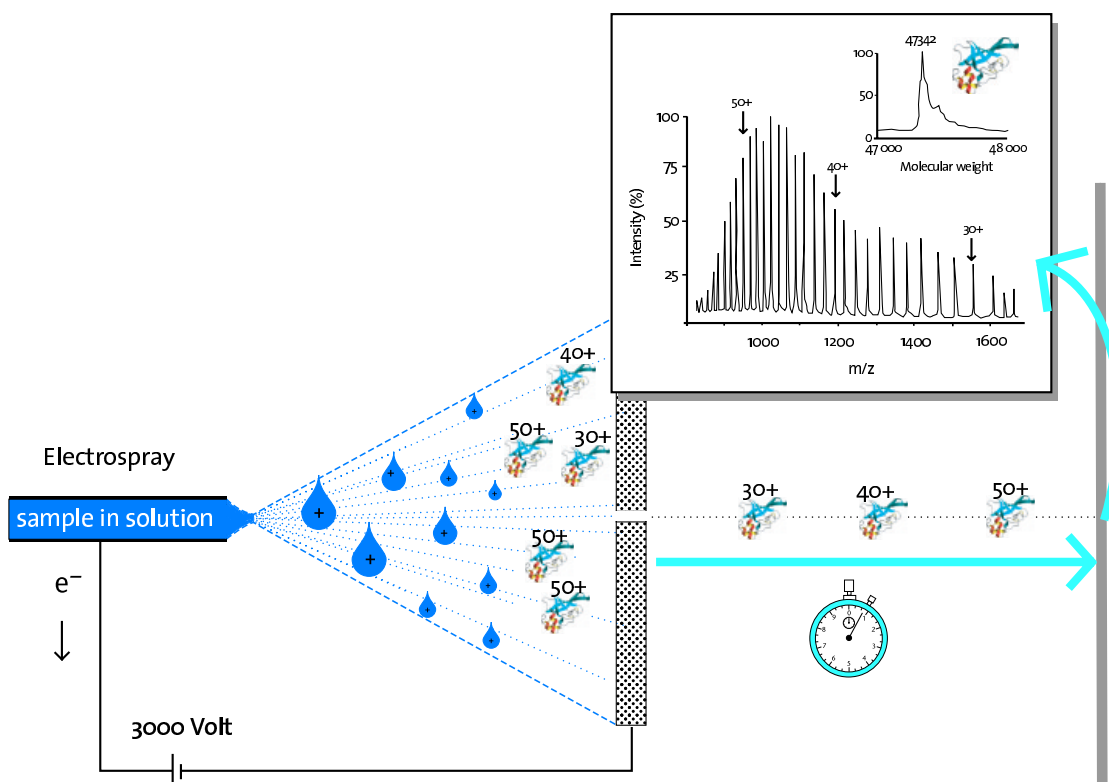
Það var ekki fyrr en upp úr níunda áratug síðustu aldar að skriður komst á massagreiningar stórra

lífsameinda. Það gerðist í kjölfar þróunar tveggja aðferða til að koma slíkum sameindum greiðlega í gasfasa á jónaform án verulegrar röskunar sameindabyggingar. Önnur aðferðin byggir á gasmyndun og jónun stórsameinda í kjölfar rafúðunar vökvalausna (e. ElectroSpray Ionization, skammstafað ESI). Hin aðferðin byggir á gasmyndun og jónun stórsameinda við LASER-geisla-gleypni burðarefnis (leysiefnis) á föstu formi (e. Soft LASER Desorption, skammstafað SLD).

Jónun og gasmyndun með rafúðun

Birting rannsóknarniðurstaðna John B. Fenn, prófessors við Virginia Commonwealth háskólann í Bandaríkjunum, árið 1988 markaði upphaf notkunar rafúðunar við massagreiningar stórsameinda.

Aðferð þessari er lýst á myndrænan hátt á mynd 1. Vatnslausn af uppleystum próteinum er úðað inn í massagreini í gegnum þröngt op vökvaúðara með háa jákvæða rafspennu. Við slíka úðun myndast örsmáir jákvætt hlaðnir vatnsdropar eða sameindaþyrpingar með mismiklar hleðslur. Vatnssameindir gufa hratt upp af dropunum og hleðsluþéttleikinn eykst. Þar kemur að fráhrindikraftar milli +hleðslna innan sama dropa verða svo miklir að viðkomandi dropi sundrast í vatnssameindir og hlaðnar stórsameindir. Jónir stórsameindanna dragast því næst að neikvæðu rafskauti. Hluti jónanna sleppur í gegnum rauf rafskautsins inn í flugtímagreini, þar sem þær svífa í átt að jónskynjara, mishratt eftir massa og/eða hleðslu. Léttustu jónirnar með mestu rafhleðslurnar svífa hraðast meðan þyngstu jónirnar með minnstu hleðslurnar svífa hægst. Mæliútslag í réttu hlutfalli við fjölda jóna er því næst skráð sem fall af hlutfalli massa (m) og



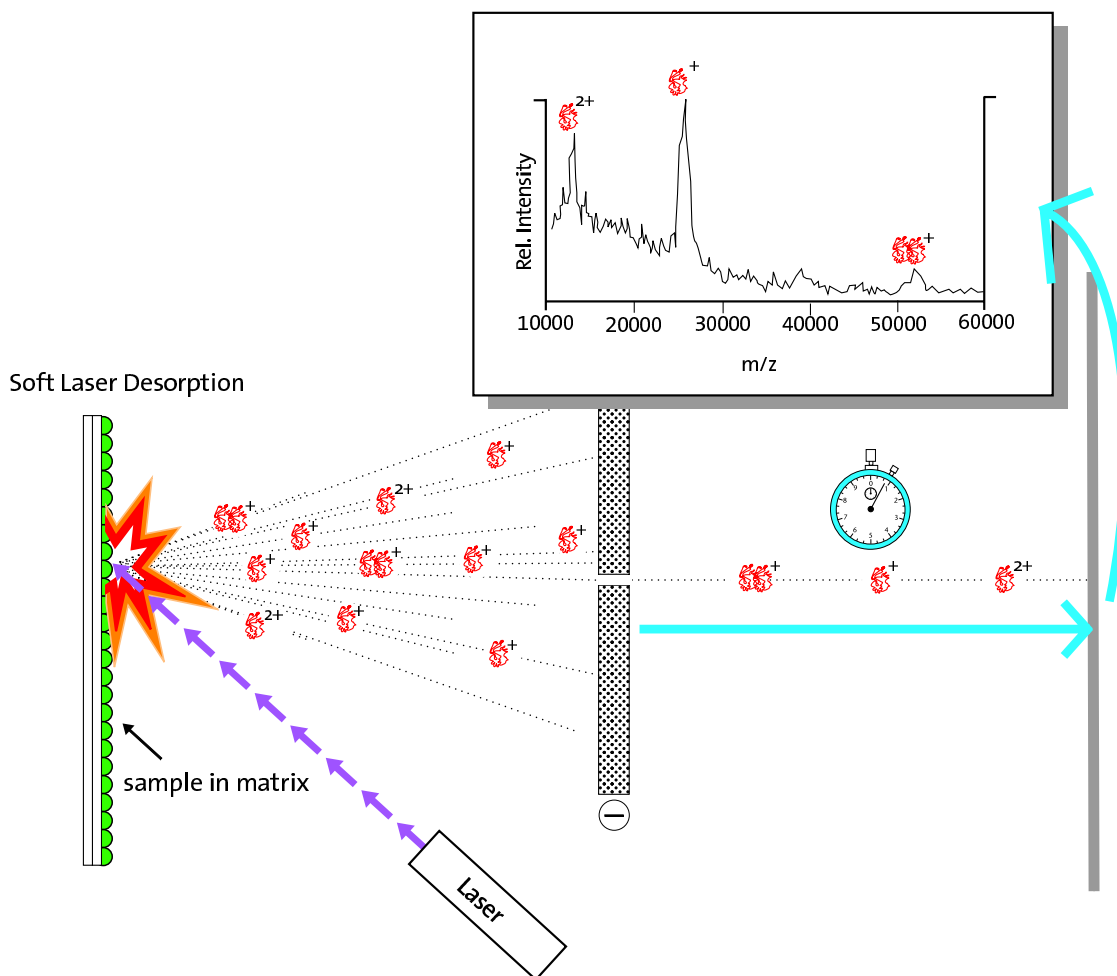
Mynd 1. Massagreining stórsameinda með tímaflugsgreini í kjölfar jónunar og gasmyndunar með rafúðun (e. ElectroSpray Ionization, ESI).

hleðslugildi (z) (þ.e. m/z). Þannig fæst massaróf líkt og sýnt er á stærri myndinni efst til hægri á mynd 1. Massarófið sem sýnt er á mynd 1 á við eitt prótein (einn massa) en sýnir fjölmarga toppa fyrir mismunandi hleðslugildi nálægt +30 til +60 eins og tilgreint er. Nánari tölfræðileg úrvinnsla á slíku massarófi gefur mjög nákvæmt gildi á massa viðkomandi próteins (47342 g/mól í dæminu á myndinni; sjá efst til hægri á mynd 1).

Jónun og gasmyndun með LASER geislun

Um svipað leiti og ofangreindar niðurstöður prófessors Fenns litu dagsins ljós gerði ungur japanskur verkfræðingur, Koichi Tanaka að nafni, við rannsóknarstofnun í Kyoto grein fyrir ólíkri aðferð við gasmyndun og jónun lífsameinda. Á ráðstefnu í Osaka í Japan, árið 1987, skýrði Koichi Tanaka frá notkun LASER geislunar við fyrsta stig massagreiningar stórsameinda. Aðferð þessari er lýst á myndrænan hátt á mynd 2.

Stórsameindum umluktum burðarefni (e. matrix) er í fyrstu komið fyrir á plötuyfirborði í massagreini (e. sample in matrix) á mynd 2. Viðkomandi sýni er gjarnan myndað með þeim hætti að dropi af lausn með lífsameindum og burðarefni er fyrst settur á plötuyfirborðið. Leysiefnið er því næst fjarlægt með uppgufun við lofttæmingu þannig að eftir situr blanda af stórsameindum og burðarefni á föstu formi. Burðarefnið þarf að vera gætt þeim eiginleika að gleypa geislun á ólíku bylgjusviði en viðkomandi lífsameindir. LASER-geisla af bylgjulengd sem burðarefnið eitt gleypir er því næst beint í brennipunkt á sýnið. Við það yfirfærir ljósorka LASER-geislans á sameindir burðarefnisins sem öðlast við það aukna hreyfiorku. Efnatengi burðarefnisins rofna og sameindir og sameindabrot þess leita í gasfasa og hrifsa með sér lífsameindirnar í sýninu. Ferli þetta felur í sér fjölbreytilegar orkutílfærslur innan og milli sameinda og leiðir til myndunar jónaðra lífsameinda með lág hleðslugildi (dæmigert +1 eða +2). Ennfremur geta



Mynd 2. Massagreining stórsameinda með tímaflugsgreini í kjölfar jónunar og gasmyndunar með LASER-geisla-gleypni burðarefnis (e. Soft LASER Desorption, SLD).

jónaþyrpingar fleiri en einnar lífsameindar myndast eins og sýnt er á mynd 2. Líkt og í ofangreindri aðferð dragast viðkomandi jónir því næst að neikvæðu rafskauti og fara inn í flugtímamassagreini þar sem þær aðgreinast eftir massa og hleðslu. Loks eru jónirnar numdar líkt og fyrr og massaróf skráð sem hlutfallslegt magn jóna vs massa/hleðslu-hlutfall (m/z).

Lokaorð

Frá fyrstu opinberun þessara tveggja aðferða við massagreiningar lífsameinda, fyrir um 15 árum, hefur viðkomandi mælitækni breiðst hratt út til rannsóknarstofnana og fyrirtækja sem fást við efnifræði- og lífefnafræðirannsóknir. Sú mælitækni sem bygg-

ir á jónun með rafúðun gengur undir skammstöfunarheitinu ESI-MS (e. ElectroSpray Ionisation Mass Spectrometry) en útbreiddasta massagreinitæknin sem byggir á jónun með LASER geislun ber skammstöfunarheitið MALDI-TOF (e. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation, Time-Of-Flight mass spectrometry) [3, 4].

Sem dæmi um byltingarkennda þróun á sviði efnarannsókna vegna notkunar þessara mælitækni má nefna að ESI-MS aðferðin hefur gert kleift að efnagreina margfalt fleiri efnasambönd í lyfjarannsóknum og lyfjaframleiðslu en áður var unnt. MALDI-TOF tæknin hefur valdið straumhvörfum í baráttu heilbrigðisyfirvalda gegn útbreiðslu malarúu með fljót-

virtri og nákvæmri greiningu á hemoglóbíni í blóði. Þá hefur sama tækni nýst við greiningar á forstigs-einkennum ýmissa krabbameina og ESI-MS nýtist í vaxandi mæli við gæða- og heilbrigðiseftirlit á matvælum, svo nokkuð sé nefnt.

Sem dæmi um nýtingu þessara aðferða hérlendis má nefna að fyrirtækið Íslensk Erfðagreining hefur nú um nokkurt skeið notað bæði ESI-MS og MALDI-TOF við greiningar á kjarnsýrusameindum. Þá hefur fyrirtækið Primex ehf (fyrrum Genis hf) notast við MALDI-TOF við efnagreiningar á fjölsykrum sem unnar eru úr rækjuskel.

Heimildir

- [1] The Nobel Prize in Chemistry 2002 - Information for the Public, Nobel-stofnunin.
<http://www.nobel.se/chemistry/laureates/2002/public.html>
- [2] The Nobel Prize in Chemistry 2002 - Advanced Information; Nobel-stofnunin.
<http://www.nobel.se/chemistry/laureates/2002/adv.html>
- [3] D.C. Muddiman o.fl., Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization Mass Spectrometry, *J. Chem. Education* **74:11**, 1288-1292 (1997).
- [4] P. Atkins og J.d. Paula, *Physical Chemistry*, **7**, 1149 (2002).

Ágúst Kvaran
Raunvísindastofnun Háskólans
Dunhaga 3
IS-107 Reykjavík
agust@hi.is