

- [14] Einkristall-Strukturdaten von **1**: kubisch, Raumgruppe  $Pn\bar{3}$  (Nr. 201),  $a = 20.404(1) \text{ \AA}$ ,  $V = 8494 \text{ \AA}^3$ ,  $T = -115^\circ\text{C}$ ,  $\text{MoK}\alpha$ ,  $\mu = 19.7 \text{ cm}^{-1}$ , empirische Absorptionskorrektur. 1170 unabhängige Reflexe mit  $I > 3\sigma(I)$ ,  $R(R_w) = 0.049$  (0.051), maximale (minimale) Restelektronendichte 1.27 ( $-0.78$ )  $\text{e\AA}^{-3}$ . Weitere Einzelheiten zur Kristallstrukturuntersuchung können beim Fachinformationszentrum Energie, Physik, Mathematik GmbH, D-7514 Eggenstein-Leopoldshafen 2, unter Angabe der Hinterlegungsnummer CSD-53847, der Autoren und des Zeitschriftenzitats angefordert werden.
- [15] H. G. von Schnering, R. Nesper, *Angew. Chem.* 99 (1987) 1097; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 26 (1987) 1059.
- [16] *Chem-X*, entwickelt und vertrieben von Chemical Design, Ltd., Mahwah, NJ, USA.

## Laserdesorptions-Massenspektrometrie von Proteinen mit Molmassen zwischen 100 000 und 250 000 Dalton\*\*

Von Michael Karas\*, Ute Bahr, Arndt Ingendoh und Franz Hillenkamp

In den letzten Jahren sind mehrere neue Ionisierungstechniken für die massenspektrometrische Analyse thermisch labiler Biomoleküle entwickelt worden. Mit diesen „sanften“ Ionisierungsverfahren ist der zugängliche Massenbereich mehr und mehr erweitert worden. Fast-Atom-Bombardement(FAB)- oder Flüssig-Sekundär-Ionen-Massenspektrometrie (SIMS) werden hauptsächlich im Massenbereich bis etwa 5000 Dalton angewendet, über eine Ausdehnung des Massenbereichs bis 24 000 Dalton wurde berichtet<sup>[1]</sup>. Mit der Plasmasorptions-Massenspektrometrie (PD-MS) gelang es erstmals, Proteine bis zu einem Molekulargewicht von 35 000 zu ionisieren<sup>[2]</sup>; die Routineanwendung erfolgt allerdings eher bei Massen unter 15 000 Dalton<sup>[3]</sup>.

Kürzlich wurde berichtet, daß es mit der Ultraviolett-Laserdesorptions/Ionisations(UVLDI)-Massenspektrometrie, die bisher hauptsächlich zur Analyse kleinerer Moleküle bis ca. 1000 Dalton eingesetzt wurde, gelang, Biomoleküle bis zu 100 000 Dalton intakt zu desorbieren und zu ionisieren<sup>[4-6]</sup>. Möglich wurde dies durch den Einsatz einer Matrix, die eine starke Resonanzabsorption bei der verwendeten Laserwellenlänge hat.

Wir berichten hier über neue Ergebnisse der matrixunterstützten UV-Laserdesorption, die erwarten lassen, daß sich diese Methode zu einem schnellen, hochempfindlichen und genauen Verfahren zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen bis mindestens 250 000 Dalton entwickeln wird.

Verwendet wurde ein Flugzeit-Massenspektrometer mit einer Beschleunigungsenergie von 3 keV sowie zur Desorption und Ionisation der Probe ein frequenz-vervierelter Nd-YAG-Laser mit einer Wellenlänge von 266 nm und einer Pulsdauer von 10 ns. Typische Werte für den Laserfokus liegen zwischen 10 und 50  $\mu\text{m}$  und für die Bestrahlungsstärke bei  $1 \times 10^7 - 5 \times 10^7 \text{ W cm}^{-2}$ . Zum Nachweis werden die Ionen auf 20 keV nachbeschleunigt. Die Ionensignale für jeden einzelnen Laserpuls werden mit einem Transientenrecorder mit einer Zeitauflösung pro Kanal von 40–80 ns (Lecroy 9400) registriert und gespeichert.

Die Proteine  $\beta$ -D-Galactosidase (*e. coli*; Sigma, G8511) und Catalase (aus Rinderleber; Serva, 26 902) wurden ohne weitere Aufarbeitung untersucht, Glucose-Isomerase wurde von Prof. Witzel, Münster, zur Verfügung gestellt.  $10^{-6} \text{ M}$

Lösungen der Proteine in hochreinem Wasser wurden mit Nicotinsäure als Matrix im Molverhältnis 1:50 000 gemischt. 1  $\mu\text{L}$  dieser Lösungen (entsprechend 500 fmol Protein) wurde auf einen Silberträger getropft und getrocknet. Die für Probenpräparation und Messung benötigte Zeit beträgt ungefähr 10 Minuten.

Abbildung 1 zeigt das LDI-Massenspektrum von  $\beta$ -D-Galactosidase. Das aus dem Peak-Zentroiden bestimmte Mole-

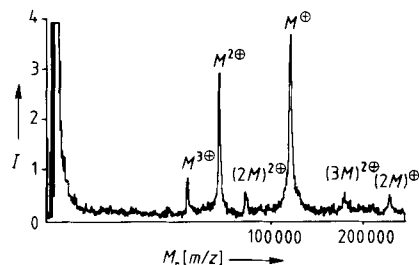


Abb. 1. LDI-Massenspektrum von  $\beta$ -D-Galactosidase. Gemessenes Molekulargewicht: 117 130. Summe von 30 Einzelspektren.  $I$  = relative Intensität in willkürlichen Einheiten.

kulargewicht ist 117 130. Obwohl die Breite des Molekülion-Peaks ca. 1800 Dalton beträgt, liegt die Genauigkeit der Molekulargewichtsbestimmung bei ungefähr 0.1%. Der Basispeak im Spektrum ist der Peak des einfach geladenen Molekülions. Die Peaks von mehrfach geladenen Molekülionen wie  $M^{2+}$  und  $M^{3+}$  sowie von Clusterionen wie  $(2M)^+$ ,  $(3M)^{2+}$  und  $(2M)^{3+}$  sind typisch für die LDI-Spektren hochmolekularer Peptide. Ihr Auftreten und ihre Intensitätsverteilung sind von der Bestrahlungsstärke abhängig. Normalerweise liefert das einfach geladene Molekülion das Hauptsignal.

Auch wenn die Breite der Signale relativ groß ist, entsprechend einer Massenauflösung von  $m/\Delta m = 50$ , können die Peak-Zentroiden mit guter Genauigkeit bestimmt werden. Für mehrere Proteine ergaben unabhängige Massenkalibrierungen, die auf Matrixsignalen im Bereich niedriger Massen und auf den ganzzahligen Massenverhältnissen von mehrfach geladenen Ionen und Oligomer-Ionen basieren, eine Standardabweichung von 0.1% und weniger. In den Fällen, in denen das Molekulargewicht des analysierten Proteins genau bekannt war, lag die gemessene Masse innerhalb des 0.1%-Bereichs. In einigen Fällen, in denen Abweichungen bis zu 1% auftraten, können auch ungenaue Massenangaben der Hersteller vorliegen.

Abbildung 2 zeigt das Spektrum von Glucose-Isomerase. Auch hier hat der Peak des Molekülions  $M^+$  mit der gemessenen Masse 172 420 eine überraschend hohe Intensität. Die Geschwindigkeit dieser Ionen an der Konversionsdynode beträgt nur  $0.48 \times 10^4 \text{ ms}^{-1}$ , die Nachweeffizienz sollte daher sehr gering sein<sup>[7]</sup>. Wieder werden mehrfach geladene Molekülionen  $M^{n+}$  ( $n = 2-4$ ) sowie ein Clusterion  $(2M)^{3+}$  mit

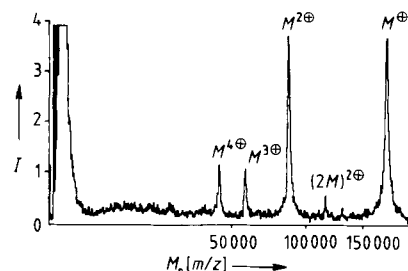


Abb. 2. LDI-Massenspektrum von Glucose-Isomerase. Gemessenes Molekulargewicht: 172 420. Summe von 30 Einzelspektren.

[\*] Dr. M. Karas, Dr. U. Bahr, A. Ingendoh, Prof. Dr. F. Hillenkamp  
Institut für Medizinische Physik der Universität  
Hüfferstraße 68, D-4400 Münster

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Bundesministerium für Forschung und Technologie gefördert. Der Firma Finnigan MAT, Bremen, danken wir für ihre technische Unterstützung.

geringerer Intensität nachgewiesen. Alle diese Signale können zur Verbesserung der Genauigkeit der Massenbestimmung herangezogen werden. Die Tatsache, daß Glucose-Isomerase, die aus vier nicht-kovalent gebundenen Untereinheiten besteht, vorwiegend, wenn nicht sogar vollständig als intaktes Protein desorbiert wird, ist ein weiterer Beweis für die extreme „Sanftheit“ der Matrix-UVLDI-Methode.

Die gesamte aufgetragene Probenmenge betrug 500 fmol, verteilt über einige mm<sup>2</sup>. Mindestens einige tausend Einzelspektren können aus einer solchen Präparation gewonnen werden. Eine Abschätzung der pro Einzelspektrum verbrauchten Probenmenge ergibt ca. 10<sup>-17</sup> mol<sup>[6]</sup>, so daß noch viel Spielraum für eine weitere Reduzierung der einzusetzenden Probenmenge existiert.

Abbildung 3 zeigt das Spektrum von Catalase mit einem ermittelten Molekulargewicht von 236 230. Auch hier ist der

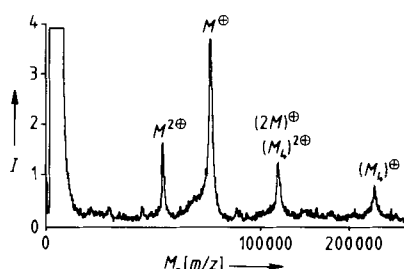


Abb. 3. LDI-Massenspektrum von Catalase. Gemessenes Molekulargewicht: 236 230. Summe von 50 Einzelspektren.

Peak des Molekülions des Proteins, das aus vier gleichen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von je 59 060 besteht, ( $M_4$ )<sup>+</sup>, deutlich zu erkennen, ebenso der des doppelt geladenen Molekülions ( $M_4$ )<sup>2+</sup>. Das Fehlen des Peaks des dreifach geladenen Molekülions legt den Schluß nahe, daß es sich bei dem Peak mit  $m/z$  59 060 um den der einfach geladenen Untereinheit  $M_2^+$  und nicht um den des vierfach geladenen Molekülions ( $M_4$ )<sup>4+</sup> handelt. Demnach ist das Signal mit  $m/z$  29 500

das der doppelt geladenen Untereinheit  $M_2^{2+}$ . Ob das Protein zum großen Teil schon bei der Probenpräparation (und dem Verdampfen des Lösungsmittels) in seine Untereinheiten zerfällt oder ob die Spaltung durch den Desorptionsprozeß hervorgerufen wird, muß noch untersucht werden.

Wie bei allen Desorptionstechniken spielt die Probenpräparation auch bei der Laserdesorption großer Moleküle eine wesentliche Rolle. Hochreine Proben und ultrareines Wasser zum Lösen der Proteine sind eine Grundvoraussetzung für das Gelingen der Analysen. Dies legt den Schluß nahe, daß die üblicherweise vorhandene Salzkontaminationen die zur Desorption großer Moleküle notwendige Homogenität der Protein-Matrix-Anordnung stören, und bedeutet natürlich zugleich, daß die ursprünglich isolierte Proteinmenge deutlich größer sein muß als die für die massenspektrometrische Untersuchung benötigte. Unter optimalen Präparationsbedingungen zeigen alle Spektren ein sehr gutes Signal/Rausch-Verhältnis.

Die hier gezeigten Spektren sind typisch für die Matrix-UVLDI-Massenspektrometrie von Proteinen: Die Spaltung kovalenter Bindungen wurde bisher nicht beobachtet. Die intensiven Signale im Massenbereich unter ca. 1000 Dalton werden ausschließlich durch die Matrix hervorgerufen. Ob durch eine nachfolgende Spaltung, die zweckmäßigerweise durch einen zweiten Laser erfolgen sollte, eine Sequenzierung analog zu der durch Stoßdissoziation möglich ist, muß noch geklärt werden.

Eingegangen am 13. Februar 1989 [Z 3172]

- [1] M. Barber, B. N. Green, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1 (1987) 80.
- [2] A. G. Craig, A. Engström, H. Bennis, I. Kamensky, *35th ASMS Conf. Mass Spectrom. Allied Top.*, Denver, CO, USA 1987, S. 528.
- [3] P. Roepstorff, P. F. Nielson, K. Klarskov, P. Hojrup, *Biomed. Environm. Mass Spectrom.* 16 (1988) 9; R. J. Cotter, *Anal. Chem.* 60 (1988) 781 A.
- [4] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 8 (1988) 151.
- [5] M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* 60 (1988) 2299.
- [6] M. Karas, U. Bahr, F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, im Druck.
- [7] R. J. Beuhler, *J. Appl. Phys.* 54 (1983) 4118.

## BUCHBESPRECHUNGEN

**Buchbesprechungen werden auf Einladung der Redaktion geschrieben. Vorschläge für zu besprechende Bücher und für Rezensenten sind willkommen. Verlage sollten Buchankündigungen oder (besser) Bücher an folgende Adresse senden: Redaktion Angewandte Chemie, Postfach 10 11 61, D-6940 Weinheim, Bundesrepublik Deutschland. Die Redaktion behält sich bei der Besprechung von Büchern, die unverlangt zur Rezension eingehen, eine Auswahl vor. Nicht-rezensierte Bücher werden nicht zurückgesandt.**

### Koordinationsverbindungen en gros und en detail

**Comprehensive Coordination Chemistry. The Synthesis, Reactions, Properties and Applications of Coordination Compounds (7 Bände).** Herausgegeben von G. Wilkinson, R. Gillard und J. A. McCleverty. Pergamon Press, Oxford 1987. Insgesamt ca. 7000 S., geb. \$ 2450.00. – ISBN 0-08-026232-5

#### Volume 1: Theory and Background

Insgesamt 18 Autoren haben sich der Aufgabe gestellt, den einleitenden Band dieses neuen Nachschlagewerks zu strukturieren. In 17 Kapiteln wird der Versuch unternommen, dem potentiellen Benutzer von „Comprehensive Coordina-