ژنتیک نوین
دوره سوم ، شماره٤ ، زمستان ۱۳۸۷
صفحه۲۸-۵

طیف سنج جرمی و کاربرد آن در پروتئومیکس

جواد قره چاهی*[۱]، محمد رضا نقوی[۲]، هوشنگ علیزاده[۳]
۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه تهران
۲و۳- به ترتیب استادیار، دانشیارگروه زراعت و اصلاح نباتات، اعضای هیئت علمی
دانشگاه تهران
*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی : jgharehchahi@yahoo.com

(تاریخ دریافت: - تاریخ پذیرش:)

چکیده

طیف سنج جرمی دستگاهی است که از نمونه مورد نظر یون ایجاد کرده و سپس یون‌های ایجاد شده را بر اساس نسبت جرم به بار در فاز گازی از هم جدا می‌کند. منشاء تکنیک طیف سنج جرمی به مطالعات جی‌جی‌تامپسون و دانشجویش اف‌دبلیوآستون در قرن گذشته برمی‌گردد. امروزه طیف سنجی جرمی یک روش بسیار حساس برای بررسی ساختاری بیومولکول‌ها است. در حال حاضر هر طیف سنج جرمی شامل: یک منبع یونی جهت ایجاد یون‌ها از نمونه، یک یا چند آنالیزور جرمی جهت جدا سازی یون‌ها براساس نسبت جرم به بار، یک آشکارساز جهت ثبت تعداد یون‌های خارج شده از آخرین آنالیزور و یک کامپیوتر جهت پردازش داده‌ها و ایجاد طیف و کنترل دستگاه از طریق مکانیزم باز خورد (فیدبک؛ کامپیوتر با توجه به عملکرد هر کدام از اجزاء به کنترل و تنظیم هر جزء می‌پردازد). در واقع طیف سنجی جرمی پپتیدها و پروتئین‌ها متکی بر تکنیک‌های یونیزاسیون ملایم است که یون‌های سالم گازی از مولکول‌های زیستی ایجاد می‌کنند. دو تکنیک یونیزاسیون ملایم الکترواسپری (ESI) و Matrix-assisted laser desorption ionisation(MALDI) به طور گسترده برای بررسی پروتئین‌ها استفاده می‌شوند. دو روش اصلی برای شناسایی پروتئین‌ها به استفاده از طیف سنج جرمی وجود دارد. روش کلاسیک پروتئومیکس شامل جداسازی مخلوط پروتئینی بوسیله ژل الکتروفورز دو بعدی (DE۲) و سپس هضم پروتئین در ژل و انگشت نگاری جرم پپتیدی (Peptide Mass Fingerprinting,PMF) بوسیله طیف سنج MALDI-TOF است. در این روش پروتئین‌ها بوسیله مقایسه فهرست جرم پپتیدهای حاصله با فهرست جرم پپتیدهای حاصل از هضم تئوریکی پروتئین‌های موجود در بانک‌های اطلاعاتی شناسایی می‌شوند. روش دیگر شامل انجام طیف سنجی جرمی متوالی (MS\MS) و بدست آوردن توالی کوتاه آمینواسیدی (توالی نشانمند) و جستجو در بانک‌های اطلاعاتی با استفاده ازاین توالی کوتاه است. طیف سنج جرمی را همچنین می‌توان برای تعیین نوع و محل تغییرات پس از ترجمه بر روی یک پروتئین خالص بکار برد

واژه های کلیدی
طیف سنج جرمی ،
پروتئومیکس ،
شناسایی پروتئین‌ها ،
آنالیزور جرمی

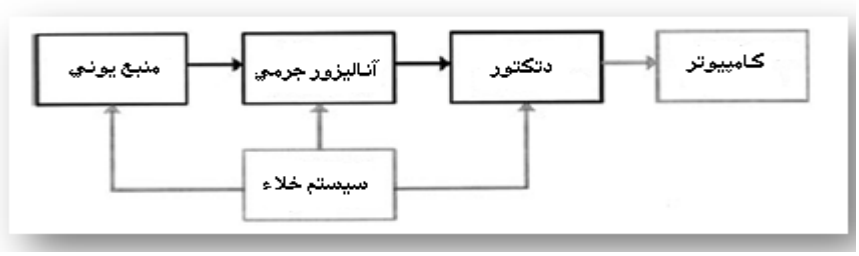
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.4.1.4]

مقدمه

با توجه به تکمیل چندین پروژه توالی‌یابی ژنومی در حال حاضر هدف اصلی محققین پی بردن به نقش ژن‌ها و ارتباط بین توالی‌های خام ژنومی با کنش‌های بیولوژیکی که در سلول رخ می‌دهد است. تکنیکی مانند ژل الکتروفورز دو بعدی که از توان بالایی در تفکیک پروتئین‌ها برخوردار است به عنوان یکی از ابزارهای بیولوژیکی برای جداسازی و شناسایی پروتئین‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. تفکیک و جداسازی پروتئین گام اول در جهت شناسایی پروتئین محسوب می‌شود. در حال حاضر آنالیز پروتئین‌ها به وسیله ژل الکتروفورز دوبعدی متکی به طیف‌سنج جرمی است. شناسایی پروتئین‌ها به کمک طیف‌سنج جرمی مبتنی بر هضم آنزیمی پروتئین‌ها با آنزیم تریپسین و اندازه‌گیری جرم قطعات پپتیدی حاصل به کمک طیف‌سنج جرمی و یا دست‌یابی به توالی آمینواسیدی پروتئین با استفاده از طیف‌سنج جرمی متوالی است. جستجو در بانک‌های اطلاعاتی با استفاده از داده‌های حاصل از طیف‌سنج جرمی به منظور شناسایی پروتئین مورد نظر گام آخر در شناسایی پروتئین به کمک طیف‌سنج جرمی است. اهمیت طیف‌سنج جرمی روز به روز در مطالعه پروتئین‌ها بیشتر می‌شود. در اینجا سعی شده است کلیاتی راجع به تکنیک طیف‌سنج جرمی و چگونگی استفاده از آن در شناسایی پروتئین‌ها آورده شود.

تعریف طیف‌سنج جرمی (MS) شاید ساده به نظر برسد طیف‌سنج جرمی ابزاریست که نمونه (analyte) را یونیزه نموده و سپس نسبت جرم به بار (m/z) آنرا اندازه‌گیری می‌کند. J.J.Thompson در سال ۱۹۱۲ اولین طیف‌سنج جرمی را ساخت. طیف‌سنج جرمی در ابتدا بیشتر بوسیله فیزیکدانان برای مطالعه وزن اتمی عناصر و فراوانی نسبی ایزوتوپ‌های عناصر به کار می‌رفت. طیف‌سنج‌های اولیه برای استفاده در تحقیقات زیستی مناسب نبودند. اما از سال ۱۹٤۰ با پیشرفت‌هایی که در بکارگیری ایزوتوپهای سنگین در مطالعات زیستی صورت گرفت، استفاده از طیف‌سنجی جرمی در مطالعات زیستی آغاز شد(۹). اهمیت کنونی طیف‌سنج جرمی در تحقیقات زیستی بواسطه دو جایزه نوبل شیمی که درسال ۲۰۰۲ به Koich Tanaka , Jann Fenn اعطا شد، بیشتر نمایان شده است(۹). همه طیف‌سنج‌های جرمی حداقل از سه بخش اصلی تشکیل شده‌اند(شکل-۱): منبع یونی، آنالیزور جرمی و آشکار ساز. نمونه‌ها در منبع یونی یونیزه می‌شوند (یون‌ها را بهتر از مولکول‌های خنثی می‌توان مورد بررسی قرار داد) سپس بوسیله آنالیزور جرمی بر اساس نسبت m/z از هم جدا می‌شوند و توسط آشکارساز شناسایی و شمارش می‌شوند. اطلاعات بدست آمده توسط سیستم کامپیوتری دستگاه بصورت طیف جرمی ثبت می‌شود.



شکل-۱: شماتیک اجزاء تشکیل دهنده طیف‌سنج جرمی

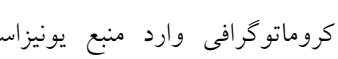
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.4.1.4]

نمونه را می‌توان به حالت گازی، مایع یا جامد وارد دستگاه کرد در مورد نمونه‌های مایع و یا جامد، تبخیر و یا تصعید نمونه بایستی قبل یا به همراه یونیزاسیون صورت گیرد. چندین روش یونیزاسیون مختلف وجود دارد مانند: یونیزاسیون الکترونی (EI)، یونیزاسیون شیمیایی (CI)، یونیزاسیون الکترواسپری (ESI) و MALDI. به منظور کاهش برخورد یون‌ها با یکدیگر و نیز با مولکول‌های گازی در آنالیزور و نیز در هنگام عبور از منبع یونی به آشکار ساز، طیف‌سنج جرمی بایستی در محیط خلاء کار کند. خلاء بایستی به‌اندازه باشد که طول Mean Free Path یون، یعنی متوسط فاصله‌ای که یون قبل از برخورد با مولکول گازی دیگر طی می‌کند بیشتر از فاصله منبع یونیزاسیون تا آشکار ساز باشد. برای مثال در فشار 5×10^{-5} torr طول Mean Free Path یون حدود یک متر است.

۱- انواع روش‌های یونیزاسیون:

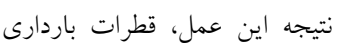
۱-۱- یونیزاسیون الکتریکی(Electron Ionization, EI):

هنگامی که یک الکترون (بار منفی) بوسیله میدان الکتریکی تشدید می‌شود این الکترون انرژی جنبشی می‌گیرد. پس از تشدید در یک میدان ۷۰ ولتی، الکترون انرژی حدود ۷۰ eV (الکترون ولت) خواهد گرفت این الکترون پر انرژی قادر است با مولکول‌های خنثی و بدون بار میان کنش کند. نتیجه این پدیده خارج شدن الکترون از مولکول خنثی و تشکیل یون از مولکول خنثی است.



$$e^- + m \longrightarrow m^+ + 2e^-$$

یون ایجاد شده در اینجا رادیکال کاتیون است. این پدیده در ابتدا برخورد الکترون (electron impact) نامیده شد هر چند که هیچ برخوردی واقعاً رخ نمی‌دهد. در ۷۰ eV و در خلاء بالا بر هم کنش الکترون‌ها و مولکول‌ها منجر به ایجاد یون‌های مثبت (M^+) با انرژی بالایی می‌شود که این یون‌ها سپس شکسته و به یون‌های با جرم کمتر (A^+ , B^+ , ...) تبدیل می‌شوند.



$$e^- + M \longrightarrow M^+ + 2e^- + A^+ , B^+ , \ldots$$

برای معدودی از مواد یون‌های منفی (M^-) نیز در فرایند یونیزاسیون الکتریکی (EI) ایجاد می‌شوند.

چون جرم الکترون در مقایسه با جرم کامل مولکول بسیار ناچیز است جرم نسبی مولکول (Mr) برابر با جرم یون بدست آمده است. بنابراین $Mr = M^+$. یون با جرم (M) و یک بار مثبت (z = 1) نسبت جرم به بار

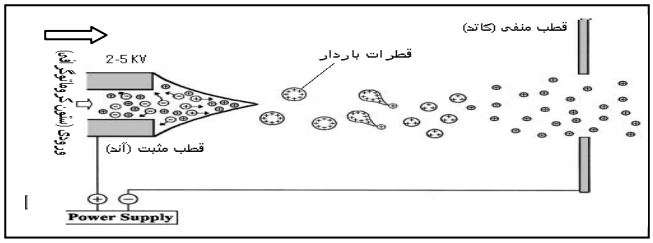
$m/z = m/1 = m$ خواهد داشت. بنابراین نسبت جرم به بار برابر با جرم یون خواهد بود. بیشتر یون‌های ایجاد شده بوسیله روش یونیزاسیون الکتریکی تک باره هستند.

۱-۲ یونیزاسیون به روش الکترو اسپری (Electrospray ionization, ESI):

ESI یکی از تکنیک‌های یونیزاسیون تحت فشار اتمسفری است که برای آنالیز مولکول‌های قطبی در محدوده جرمی ۱۰۰ تا ۱۰۰۰۰۰۰ دالتن مناسب است(۲). یونیزاسیون به روش ESI اولین بار بوسیله Dole و همکاران در سال ۱۹٦۸ گزارش شد. اما گروه Fenn در دانشگاه یل (Yale) برای اولین بار این روش یونیزاسیون را با طیف‌سنج جرمی جفت نمودند(۱۹). در فرآیند یونیزاسیون به روش ESI یون‌های موجود در محلول در فشار اتمسفری به فاز گازی منتقل می‌شوند و سپس از طریق یک سری منافذ وارد سیستم خلاء طیف‌سنج جرمی می‌شوند. در داخل منبع یونی ESI، یون‌ها در شرایط فشار اتمسفری و با بکارگیری جریان ملایم گاز نیتروژن از حلال آزاد می‌شوند. در مورد طیف‌سنج‌های جرمی که منبع یونیزاسیون به کروماتوگرافی مایع متصل است (LC-MS) مخلوط نمونه در فاز مایع در کروماتوگرافی بر اساس اصول کروماتوگرافی از هم تفکیک شده و سپس اجزاء تفکیک شده به ترتیب از انتهای ستون کروماتوگرافی وارد منبع یونیزاسیون می‌شوند. مکانیزم درگیر در فرایند یونیزاسیون به روش ESI هنوز به طور کامل شناخته نشده است. در این روش نمونه را در یک حلال قطبی فرار حل کرده و از درون یک لوله موئینه ضد زنگ (به قطر داخلی ۱۰۰-۷۵ μm) با سرعت جریان 1 ml/min تا 1μl/min پمپ می‌کنند. در دهانه لوله موئینه ولتاژ نسبتاً بالایی ٤ KV اِعمال می‌کنند در نتیجه این عمل، قطرات بارداری از مخلوط نمونه و حلال از دهانه لوله به بیرون پاشیده (spray) می‌شوند. قطرات باردار به تدریج با وارد شدن به داخل محفظه منبع یونیزاسیون تبخیر شده و کوچک می‌شوند. در داخل منبع یونیزاسیون با استفاده از جریان ملایمی از گاز خشک نیتروژن در

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.4.1.4]

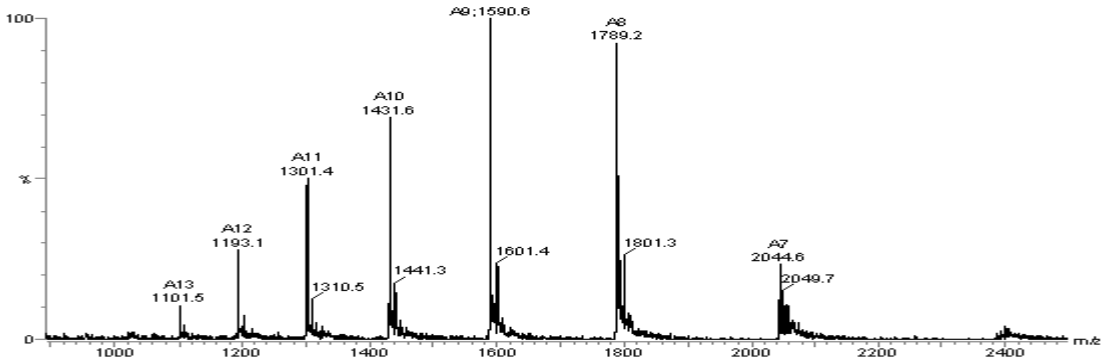
جهت حرکت یون‌ها به سمت آنالیزور سبب تسریع تبخیر شدن قطرات و آزاد شدن یون‌های نمونه می‌شوند. با تبخیر شدن حلال تراکم بارهای الکتریکی هم نام افزایش یافته تا جایی که نیروی (دافعه) کلمبی ناشی از بارهای هم نام بر نیروی کشش سطحی قطره غلبه کرده و قطره شکسته شده و به قطرات کوچکتر تبدیل شود. این فرایند تا جایی که یون‌های نمونه بطور کامل از قطره خارج شوند و حلال نیز به طور کامل تبخیر شود ادامه پیدا می‌کند. یون‌های مثبت و منفی بسته به پتانسیل الکتریکی بکار رفته به دهانه لوله موئینه مهاجرت می‌کنند. اگر پتانسیل بکار رفته در انتهای لوله موئینه مثبت باشد یون‌های منفی در دهانه لوله تجمع کرده در حالی که یون‌های مثبت همراه با حلال به صورت قطرات بارداری وارد سیستم طیف‌سنج می‌شوند(۲۱). فرایند ESI به طور قابل ملاحظه‌ای در دمای نسبتاً پایین (دمای اتاق) انجام می‌گیرد. بنابراین مولکول‌های بسیار بزرگ، قطبی و مولکول‌هایی که از نظر حرارتی ناپایدارند را می‌توان بدون تغییر ترکیب آنها با این روش یونیزه نمود. از این رو ESI را جزء روش‌های یونیزاسیون ملایم (soft) طبقه بندی می‌کنند(۲). یون‌های ایجاد شده از نمونه اغلب پروتونه شده (یونیزاسیون مثبت) و یا دِپروتونه (یونیزاسیون منفی) و یا اینکه با اضافه شدن یون تک ظرفیتی +Na، باردار می‌شوند. اگر چندین جایگاه یونیزاسیون در نمونه (analyte) وجود داشته باشد، یون‌های چند شارژه تشکیل خواهد شد. در مورد پروتئین‌های دناتوره شده به ازاء هر Da ۱۰۰۰ وزن یک بار اضافه می‌شود. با تشکیل یون‌های چند شارژه می‌توان دامنه جرمی طیف‌سنج جرمی را تا هزاران دالتون افزایش داد(۱۹). در حالت یونیزاسیون مثبت مقدار کمی اسید فورمیک (۱:۱ (v/v)استونیتریل:اسید فورمیک ۰.۰۱٪) به محلول حاوی نمونه اضافه می‌کنند تا پروتونه شدن مولکول‌های نمونه بهتر انجام شود. در حالت یونیزاسیون منفی مقداری محلول آمونیا به منظور پروتون‌گیری از نمونه به محلول اضافه می‌کنند. حضور گروه فعالی مانند آمین (R-NH2) در ساختار پروتئین‌ها و پپتیدها که به سهولت پروتون پذیرفته و یون مثبت ایجاد می‌کند، سبب شده که پروتئین‌ها را به طور معمول تحت شرایط یونیزاسیون مثبت آنالیز کنند در حالی که قندها و نوکلئوتیدها را به علت حضور گروه‌هایی مانند کربوکسیلیک اسید (R-CO2H) و عامل الکلی (R-OH) در ساختارشان که به راحتی پروتون از دست داده و یون منفی ایجاد می‌کنند تحت شرایط یونیزاسیون منفی آنالیز می‌کنند. برای مثال تریپسین سبب برش زنجیره پلی پپتیدی از انتهای کربوکسیل اسیدهای آمینه بازی لیزین و آرژنین می‌شود. بنابراین چون انتهای آمین همه پپتیدهای حاصل از هضم بجز پپتید انتهای کربوکسیل پلی پپتید، بازی است، پپتیدهای حاصل از هضم با تریپسین در ESI دو تا سه بار خواهند گرفت. شکل-۲ جزئیات روش یونیزاسیون ESI را نشان می‌دهد.



شکل-۲: شمای کلی روش یونیزاسیون با الکترواسپری

یک مثال از طیف یونی ایجاد شده بوسیله ESI از بررسی پروتئین لیزوزیم سفیده تخم مرغ در شکل-۳ نشان داده شده است. برای آنالیز این پروتئین نمونه در محلول ۱:۱ (v/v) (استونیتریل به ۰/۱٪ محلول اسید فورمیک) حل شده و سپس بوسیله ESI-MS مورد بررسی قرار گرفته است. طیف جرمی این پروتئین به صورت توزیع گوس در شکل نشان داده شده است. ازنسبت m/z ۱۱۰۱/۵ تا ۲۰۴٤/٦ هر پیک پروتئین لیزوزیم را نشان دهد که در تعداد بار با هم اختلاف دارند.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.4.1.4]



شکل-۳: طیف جرمی ESI پروتئین لیزوزیم سفیده تخم مرغ(۲)

جرم تئوریکی پروتئین لیزوزیم سفیده تخم مرغ 14305.14 است. چون وزن مولکولی برای همه پیک‌ها یکسان است یون‌هایی که بار زیادتری دارند در m/z کمتر ظاهر می‌شوند. مقدار m/z را می‌توان طبق فرمول زیر بدست آورد(۲).

$$m/z = (Mw + nH^{+}) / n$$

در اینجا m/z نسبت جرم به بار است که بر روی محور افقی طیف نشان داده شده است.

Mw جرم مولکولی نمونه، n تعداد بار یون و H^{+} جرم پروتون (۱/۰۰۸ Da)

اگر تعداد بارهای یون مشخص باشد بسادگی می‌توان با قرائت مقادیر m/z از طیف و قرار دادن در فرمول بالا وزن مولکولی یون‌ها را محاسبه نمود. اما معمولاً تعداد بار مشخص نیست ولی می‌توان با فرض اینکه دو پیک مجاور در یک سری از یون‌های چند شارژه در یک بار با هم اختلاف دارد. آنرا محاسبه نمود.

برای مثال اگر یون‌های ظاهر شده در m/z برابر با ۱۴۳۱/٦ در طیف جرمی لیزوزیم دارای n بار باشد، آنگاه یون‌های با m/z برابر با ۱۳۰۱/٤ ، n+1 بار خواهند داشت. معادله بالا را برای این دو یون می‌توان بصورت زیر نوشت:

$$1431/6 = (Mw + nH^{+}) / n \;,\; 1301/4 = [Mw + (n+1)H^{+}] / (n+1)$$

این دو معادله را می‌توان برای حذف مقدار یکسان Mw در هر دو، به صورت زیر مرتب کرد:

$$n(1431/6) - nH^{+} = (n+1)1301/4 - (n+1)H^{+}$$
$$n(1431/6) = N(1301/4) + 1301/4 - H^{+}$$
$$n(1431/6 - 1301/4) = 1301/4 - H^{+}$$
$$n = (1301 - H^{+}) / (1431/6 - 1301/4)$$
$$n = 10$$

با قرار دادن مقدار n در معادله مقدار Mw بدست خواهد آمد.

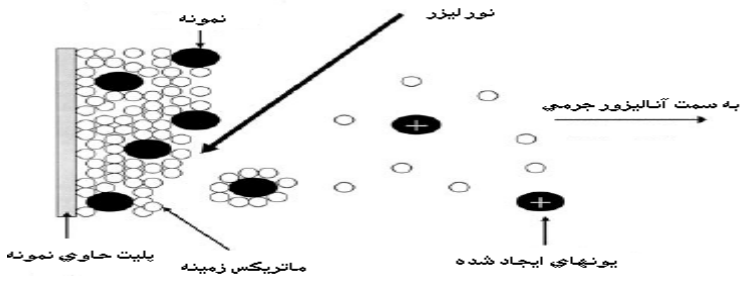
$1431/6 = (Mw + nH^{+})/n$
$10(1431/6) = Mw + (10 \times 1/008)$
Mw=14305/9Da Mw=14316-10/8

۱-۳ (MALDI) Matrix Assisted Laser Desorpsion Ionization:

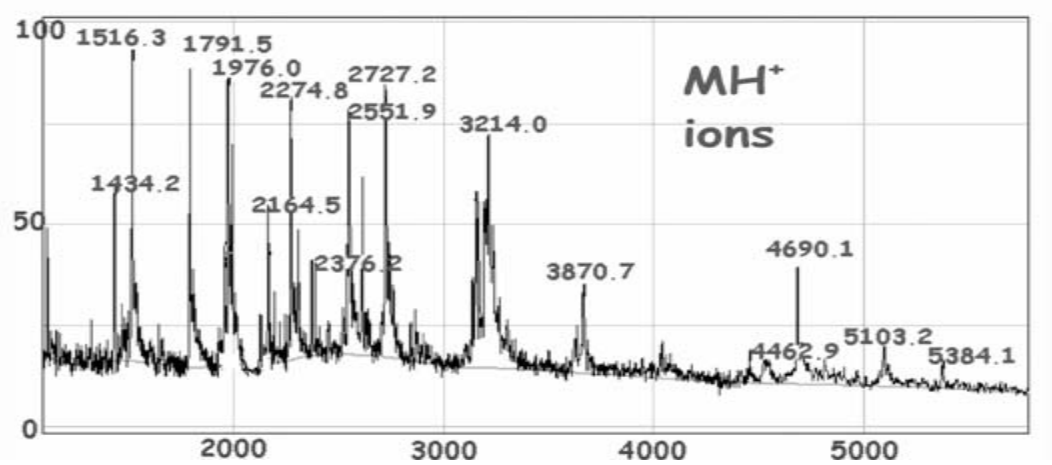
MALDI برای اولین بار در سال ۱۹۸۸ توسط Hillenkamp, Karas برای آنالیز پروتئین‌ها استفاده شد(۱۱). از آن به بعد از MALDI بطور گسترده‌ای در تحقیقات بیولوژی بویژه مطالعه پروتئین‌ها استفاده شده است. همانند ESI، MALDI نیز قابلیت تبخیر و یونیزه نمودن مولکول‌های بزرگ قطبی را دارد(۹). با MALDI می‌توان نمونه‌های با جرم ٤٠٠٠٠Da را با دقت ۰/۰۱٪ آنالیز نمود. ایجاد یون در MALDI بر پایه بمباران نمونه با نور لیزر استوار است. از این نظر MALDI مانند یونیزاسیون به روش بمباران سریع اتمی (FAB) عمل می‌کند با این تفاوت که در FAB نمونه در ماتریکس گلیسرول حل می‌شود اما در MALDI نمونه به همراه ماتریکس جاذب نور لیزر کریستاله می‌شود. مکانیزم یونیزاسیون در MALDI بدین شرح است که ابتدا نمونه

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.4.1.4]

را با مقدار زیادی ماتریکس (Sinapinic acid و یا α-cyano-4-hydroxy cinamic) مخلوط می‌کنند. مخلوط حاصل را روی صفحه فلزی(Target plate) می‌ریزند و اجازه می‌دهند بطور کامل خشک شده و کریستاله شود. نقش ماتریکس جذب نور لیزر در طول موج ۳۳۷ نانومتر(لیزر نیتروژن) و کمک به پایداری نمونه است. تاباندن پالس‌هایی از نور لیزر (در حد نانو ثانیه) منجر به جذب نور لیزر و گرم شدن سریع و تصعید مولکول‌های ماتریکس به همراه نمونه می‌شود(شکل-٤). هنگامی که ماتریکس به همراه نمونه وارد فاز گازی می‌شود مقداری از انرژی مولکول‌های برانگیخته شدهٔ ماتریکس به مولکول‌های نمونه منتقل شده و سبب یونیزاسیون نمونه می‌شود(۱۹). البته علت اصلی یونیزاسیون مولکول‌های نمونه هنوز به طور دقیق مشخص نیست. یونیزاسیون پپتیدها بیشتر بصورت مثبت و با جذب پروتون از مولکول‌های ماتریکس صورت می‌گیرد. در واقع انرژی نور لیزر سبب برانگیخته شدن ماتریکس و جدا شدن پروتون و انتقال آن به گروه‌های جاذب پروتون در ساختار پروتئین یا پپتید می‌شود (۲۱). MALDI در مقایسه با ESI حساسیت کمتری نسبت به آلودگی نمک‌ها دارد، آلودگی به نمک‌ها (Na^+ و K^+) سبب عریض شدن پیک‌ها و کاهش حساسیت و دقت جرمی می‌شود (١٦). MALDI نیز مانند ESI یک تکنیک یونیزاسیون ملایم است. یون‌های ایجاد شده در MALDI بیشتر تک شارژه هستند. البته در آنالیز اولیگوساکاریدها و الیگونوکلئوتیدها بوسیله MALDI به واسطه حضور گروه‌های فعال دهنده پروتون بیشتر از یونیزاسیون منفی استفاده می‌شود. نحوه آنالیز(یونیزاسیون منفی یا مثبت) به ماهیت ماتریکس بکار رفته نیز بستگی دارد(١٦).



شکل-۴: شماتیک فرایند یونیزاسیون به روش MALDI(۹)



شکل-۵: نمونه ای از طیف مخلوط پپتیدی بدست آمده با استفاده از منبع یونیزاسیون MALDI

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.4.1.4]

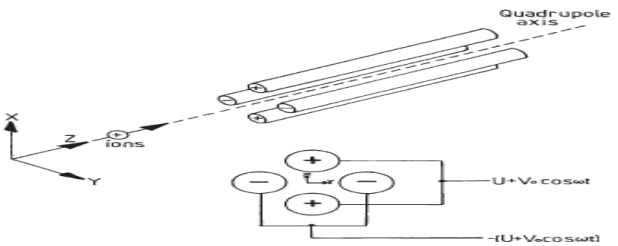
باتوجه به اینکه در یونیزاسیون به روش MALDI یون‌های ایجاد شده تک شارژه هستند بنابراین در طیف حاصله نسبت جرم به بار برابر با جرم یون (z=1,m/z=m) خواهد بود، از این رو تفسیر طیف بدست آمده از MALDI در مقایسه با طیف حاصل از ESI بسیار ساده‌تر است(شکل-۵). منبع یونیزاسیون MALDI همراه با آنالیزورTOF بیشتر برای شناسایی پروتئین‌ها با استفاده از روش انگشت‌نگاری جرم پپتیدی (PMF) بکار می‌رود.

۲- آنالیزورهای جرمی:

قلب هر دستگاه طیف‌سنج جرمی را آنالیزور جرمی تشکیل می‌دهد. کار اصلی هر آنالیزور جرمی، جمع کردن یون‌های با نسبت جرم به بار یکسان و متمرکز نمودن آنها به ترتیب یا بطور همزمان به داخل آشکارساز (در مورد طیف‌سنج های معمولی) یا به داخل محفظه برخورد (در مورد طیف‌سنج جرمی متوالی) است. در حال حاضر از ۵ نوع آنالیزورجرمی استفاده می‌شود . در سه نوع آنها یون‌ها بصورت خطی یا (in-space) از هم جدا می‌شوند مانند:(Time-Of-Flight , Magnetic sector , Quadrupole). در هر دو نوع دیگر یون‌ها بصورت in-time از هم جدا می‌شوند. مانند (Ion trap , Ion cyclotron resonance) چون هر کدام از این آنالیزورهای جرمی بر پایه اصول متفاوتی عمل می‌کنند. هر یک مزایا و محدودیت‌های خاص خود را دارند.

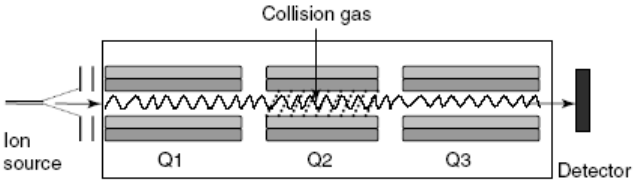
۲-۱- آنالیزور جرمی Quadrupole (Q):

آنالیزور جرمی Quadrupole به طور گسترده در ترکیب با منبع یونیزاسیون ESI بکار می‌رود. این آنالیزور قدرت تفکیک متوسط (تا ۲۵۰۰ دالتون) و حساسیت متوسطی را فراهم می‌کند(۳٤). آنالیزور جرمی Q از چهار میله موازی با مقطع هذلولی (هیپربولیک) ساخته شده است(شکل-٦). هر یک از این میله‌ها طولی در حدود ۰/۲ متر و قطری در حدود ٦ میلی متر دارند. جفت لوله‌هایی که بطور قطری مقابل یکدیگر قرار گرفته‌اند به ولتاژ dc (Direct current) مثبت و rf (radio frequency) متصل می‌شوند و جفت دیگر به ولتاژ dc منفی و ولتاژ rf که ۱۸۰ درجه خارج از فاز است، متصل می‌شود(۲۴،۱۹،۱۲). بنابراین یک میدان چهار قطبی در فضای بین لوله‌ها ایجاد می‌شود . یون‌هایی که در منبع یونی ایجاد شده‌اند بطور الکترواستاتیکی در داخل این میدان تشدید می‌شوند. یون‌های با نسبت جرم به بار متفاوت از طریق تغییر در ولتاژ جریان dc یا rf در فرکانس ثابت از هم جدا می‌شوند(۲۴). تنها یون‌های با نسبت جرم به بار مشخص در دامنه ولتاژ اِعمال شده، مسیر حرکت پایدار داشته و قادرند به آشکارساز برسند. یون‌های دیگر که مسیر حرکت ناپایدار دارند به میله‌ها برخورد کرده و از بین می‌روند. بنابراین Q در هر زمان فقط اجازه عبور به یون‌های با m/z مشخصی می‌دهد. برای آنالیز بوسیله MS/MS (طیف‌سنج جرمی متوالی) سه Quadrupole را با هم به شکل Triple Quadrupole ترکیب می‌کنند(شکل-۷). در اینجا اولین و سومین Quadrupole برای Scanning (تفکیک یون‌ها براساس m/z) بکار می‌روند در حالی که Quadrupole میانی به عنوان محفظه برخورد عمل میکند. آنالیزور اول تنها اجازه عبور یون‌های انتخابی توسط کاربر را فراهم میکند در حالی که آنالیزور سوم یون‌های حاصل از قطعه قطعه شدن یون انتخابی در محفظه برخورد را، بر اساس نسبت جرم به بار از هم تفکیک کرده و طیف MS/MS را بوجود می‌آورد. در محفظه برخورد یون‌ها طی فرایند Collision-Induced Dissociation (CID) و بمباران با گازهای خنثی نظیر هلیوم و آرگون قطعه قطعه می‌شوند.



شکل-۶: شماتیک نحوه قرارگیری لوله‌های تشکیل دهندهٔ و مسیر حرکت یون در Quadrupole(۱۳)

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.4.1.4]

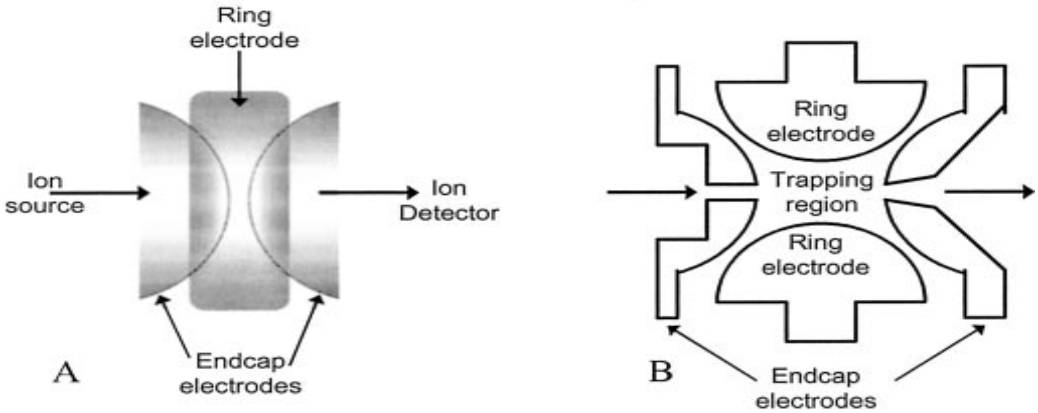


شکل-۷: Triple Quadrupole، آنالیزور اول (Q1) امکان عبور یون‌هایی که برای قطعه قطعه شدن انتخاب شده‌اند را فراهم می‌کند. در داخل آنالیزور دوم (Q2) یون‌های انتخابی طی فرایند CID قطعه قطعه می‌شوند. قطعات یونی حاصل سپس بوسیله آنالیزور سوم (Q3) بر اساس m/z از هم تفکیک می‌شوند.

۲-۲- آنالیزور جرمی Ion trap:

(تله یونی) مکانیزم Ion trap همانند Quadrupole است. از نظر مفهومی Ion trap همان Quadrupole است که به دور خود پیچیده و تشکیل حلقه بسته‌ای داده است(۱۹). هر Ion trap از یک الکترود حلقوی و دو الکترود end-cup ساخته شده است(شکل-۸). در ابتدا میدان درون تله (trap) به گونه ایست که یون‌هایی که وارد آنالیزور می‌شوند شروع به نوسان ثابتی می‌کنند و در آنالیزور به دام می‌افتند. سپس با تغییر ولتاژ rf بکار رفته در الکترودحلقوی امکان خروج یون‌های خاصی فراهم می‌شود(۱۹).

برای اسکن نمودن یون‌ها ولتاژ rf اِعمال شده روی الکترود حلقوی را افزایش می‌دهند در همین لحظه ولتاژ rf کوچکی نیز به الکترود end cup وارد می‌کنند. همان طور که دامنه یا ولتاژ rf در الکترود حلقوی افزایش می‌یابد بسامد حرکت نوسانی یون نیز افزایش می‌یابد. زمانی که بسامد تشدید (Resonant Frequency) یک یون به بسامد الکترود end cup می‌رسد حرکت نوسانی یون افزایش یافته و حرکت یون ناپایدار شده و در نهایت در طول محور الکترود end cup تله (trap) را ترک می‌کند. چون بسامد نوسان یون تابعی ازجرم آن است یون‌های با نسبت جرم به بار (m/z) مختلف، تله (trap) را در ولتاژهای متفاوت و بنابراین در زمان‌های متفاوتی ترک می‌کنند(۱۹). افزایش فرکانس جریان متناوب (rf) منجر به خروج یون‌ها به ترتیب افزایش نسبت m/z از آنالیزور می‌شود (۹). یون‌های خارج شده از آنالیزور به سمت آشکارساز هدایت می‌شوند. براساس فرکانس بکار رفته در هنگام خروج یون از تله یونی نسبت جرم به بار محاسبه می‌شود. تله یونی در مقایسه با آنالیزور TOF از حساسیت بیشتر و قدرت تفکیک و دامنه جرمی کمتری بر خوردار است.



شکل-۸: آنالیزور جرمی (Ion trap) A؛ نمای خارجی الکترود حلقوی و الکترود endcup. B؛ مقطع عرضی آنالیزور تله یونی که ناحیه Trapping را نشان می‌دهد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.4.1.4]

۳-۲- آنالیزور جرمی Time-Of-Flight (TOF) :

اندازه‌گیری نسبت جرم به بار در آنالیزور TOF بر اساس این اصل که اِعمال پتانسیل شتاب دهی (V) به یک یون با بار (z)، انرژی جنبشی معادل zV به یون خواهد داد، انجام می‌گیرد(۱۹).

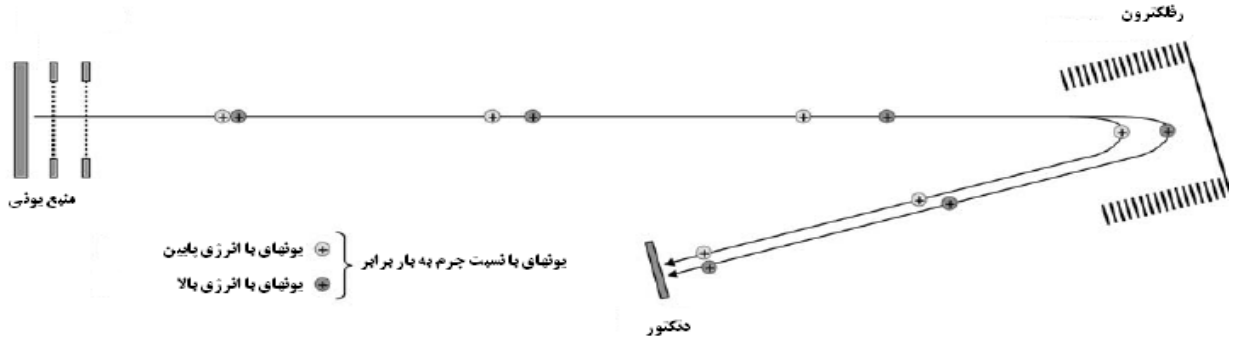
$$zV = \frac{mv^2}{2}$$

در اینجا m جرم و v سرعت است.

اگر همه یون‌ها با پتانسیل یکسانی شتاب دهی شوند. یون‌های با جرم متفاوت و بار یکسان با سرعت متفاوتی به سمت آشکارساز حرکت خواهند کرد چون $v = \frac{(d)}{(t)}$ است پس می‌توان معادله را بصورت زیر باز نویسی کرد.

$$\frac{m}{z} = \frac{2Vt^2}{d^2}$$

بنابراین یون‌های با جرم متفاوت مسافت یکسان را در مدت زمان متفاوتی طی می‌کنند. نسبت جرم به بار بوسیله‌اندازگیری زمانی که یون فاصله بین منبع یونی و آشکار ساز(Flight Path) را طی می‌کند بدست می‌آید. TOF در مقایسه با سایر آنالیزورهای جرمی دارای قدرت تفکیک جرمی بهتر و دامنه جرمی بالاتری است. هرچه مسیر فرار (Flight Path) طولانی‌تر باشد قدرت تفکیک بهتری حاصل می‌شود . در آنالیزورهای TOF تجاری، معمولاً مسیر فرار را چندین متر در نظر می‌گیرند. در برخی از آنالیزورهای جرمی TOF یک آینه منعکس کننده یون (IonReflectron) در انتهای لوله فرار قرار می‌گیرد که سبب منعکس شدن یون به عقب و به داخل لوله فرار می‌شود . از این طریق آینه سبب افزایش طول لوله فرار می‌شود . از طرفی این انعکاس سبب تصحیح اختلاف انرژی بین یون‌ها می‌شود (شکل-۹)(۳۲).



شکل-۹: شماتیک آنالیزور جرمی TOF[۱۹]

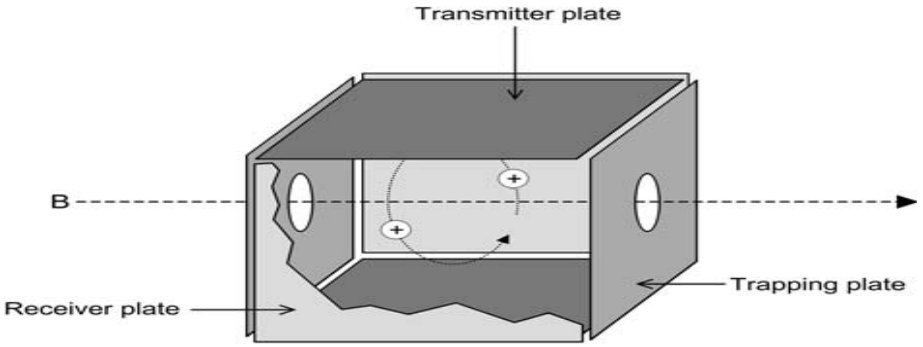
آنالیزور TOF بیشتر با منبع یونی MALDI همراه است. در حقیقت MALDI-TOF یکی از طیف‌سنج های جرمی معمول در پروتئومیکس است(۳۴). از آنالیزور هیبرید Q-TOF نیز در ترکیب با منبع یونیزاسیون MALDI بصورت MALDI-Q-TOF در طیف‌سنج جرمی متوالی (MS\MS) استفاده می‌شود (۲۵). هدف از ساخت این دستگاه ترکیب نمودن سرعت بالای MALDI-TOF در انگشت نگاری جرم پپتیدی (PMF) و اختصاصیت بالای MS\MS است. در این نوع طیف‌سنج آنالیزور اول (Q) بوسیله محفظه برخورد (Collision Cell) از آنالیزور دوم (TOF) جدا می‌شود. این طیف‌سنج جرمی‌توانایی انجام CID با انرژی بالا را داشته و سرعت اسکن بالایی نیز دارد. استفاده از چنین طیف‌سنج‌هایی نیاز به تمونه خالص برای آنالیز با ESI-MS را برطرف نموده است. دقت جرمی بالا و قدرت تفکیک عالی در MALDI-Q-TOF امکان شناسایی پروتئین‌ها از طریق PMF و طیف MS\MS را فراهم نموده است.

در طیف‌سنج MALDI-TOF-TOF از آنالیزور جرمی TOF هم برای انتخاب یون و هم برای تفکیک قطعات یونی ایجاد شده طی فرایند CID استفاده شده است. هدف از ساخت این دستگاه ایجاد طیف جرمی MS\MS با قدرت تفکیک و دقت جرمی در حد دستگاه‌های Magnetic Sector همراه با سرعت و دامنه جرمی بالای MALDI-TOF است.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.4.1.4]

٤-٢- آنالیزور جرمی Fourier Transform (FT):

آنالیزور جرمی FT، Ion Cyclotron Resonance (ICR) نیز نامیده می‌شود . در واقع FT نوعی Ion Trap متشکل از یک محفظه مکعبی شکل است که در یک میدان مغناطیسی قوی قرار گرفته است. این محفظه مکعبی شکل از سه دسته صفحه Trapping، Transmitter و Reciever که بطور دو به دو مقابل یکدیگر قرار گرفته‌اند ساخته شده است(شکل-١٠).



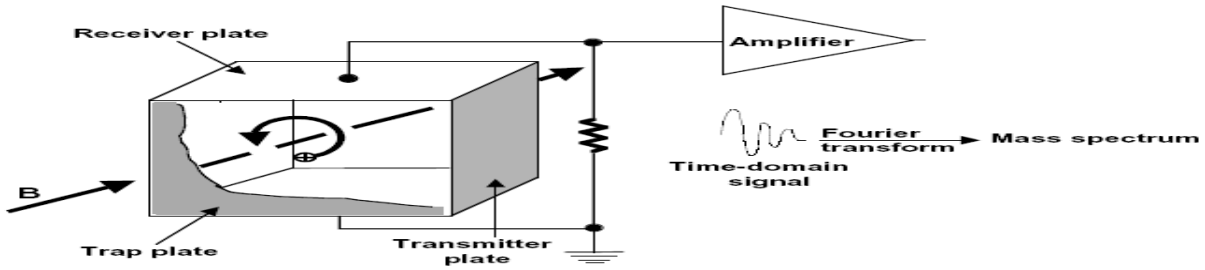
شکل-١٠: تصویر شماتیک آنالیزور جرمی FT. یون‌ها به موازات میدان مغناطیسی (B) وارد محفظه آنالیزو می‌شوند.

درک مکانیزم عمل FT در واقع از این واقعیت که زمانی که یک یون در یک میدان مغناطیسی ثابت قرار می گیرد شروع به چرخیدن حول یک محور و عمود بر جهت میدان می کند، سرچشمه گرفته است(٢۴). در مورد طیف‌سنج جرمی یون‌هایی که در منبع یونیزاسیون ایجاد شده‌اند زمانی که به داخل محفظه آنالیزور FT هدایت می‌شوند تحت تاثیر میدان مغناطیسی در جهت عمود بر میدان مغناطیسی اِعمال شده شروع به چرخش کرده و در داخل محفظه به دام می افتند. بسامد حرکت دورانی یون با شدت میدان مغناطیسی نسبت مستقیم و با m/z یون نسبت عکس دارد. بسامد حرکت دورانی یون (fc) بوسیله شدت میدان مغناطیسی (B)، بار یون (z) و جرم یون (m) طبق فرمول زیر تعیین می‌شود .

$$fc=zB/2\pi m$$

بنابراین در یک میدان مغناطیسی ثابت نسبت جرم به بار (m/z) یون بوسیله‌اندازه گیری بسامد حرکت دورانی (Cyclotron Frequency) یون تعیین می‌شود . شعاع مدار چرخشی یون بستگی به انرژی جنبشی آن دارد. چون بسامد حرکت دورانی برای یک یون با نسبت m/z مشخص ثابت است بنابراین شعاع حرکت دورانی یون بطور مستقیم با سرعت یون و یا ریشه دوم انرژی جنبشی آن متناسب است. زمانی که یک یون در محفظه FT به دام می افتد شعاع حرکت دورانی اش در مقایسه با ابعاد محفظه کم است. برای شناسایی یون‌ها، به صفحات Transmitter که رو به روی هم قرار گرفته‌اند پتانسیل الکتریکی rf اِعمال می‌کنند. یونی که بسامد حرکتش در تشدید (Resonance) با بسامد rf اِعمال شده باشد انرژی گرفته و شعاع چرخشش افزایش می یابد. یون برانگیخته شده در نهایت در اثر افزایش شعاع حرکت دورانی اش به صفحه Reciver برخورد خواهد کرد. در اثر برخورد یون به صفحه Reciver بسامد عبورش بصورت یک جریان القایی به نام Image Current آشکار می‌شود (شکل-١١)(١٩). برای شناسایی هم زمان یون‌های با نسبت جرم به بار مختلف بسامد rf اِعمال شده به صفحات Transmitter را تغییر می دهند. سیگنال ناشی از Image Current سپس به طیف جرمی تبدیل می‌شود . زمانی که یون‌های با یک نسبت جرم به بار شناسایی شدند با استفاده از پالسی از جریان rf و قبل از ورود یون‌های دیگر از محفظه دفع می‌شوند. بنابراین FT-MS بر خلاف سایر آنالیزورها به آشکارسازهای مرسوم نیازی ندارد(٢۴).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.4.1.4]



شکل-۱۱: آنالیزور جرمی FT. برخورد یون به صفحه Reciver منجر به ایجاد سیگنالی می‌شود که در نهایت به طیف جرمی تبدیل می‌شود.

از FT-MS برای انجام طیف‌سنجی متوالی (MS\MS) همانند Ion trap-MS استفاده می‌کنند. در اینجا یون مورد نظر را از سایر یون‌ها طی فرایند Resonance excitation جدا می‌کنند (یون‌های دیگر را از محفظه دفع می‌کنند و یون مورد نظر را نگه می‌دارند). سپس پالسی‌هایی از گاز هلیوم وارد محفظه می‌کنند و با تغییر دامنه Resonating Frequency یون‌های انتخابی شروع به نوسان کرده و با مولکول‌های گازی برخورد می‌کنند و طی فرایند CID قطعه قطعه می‌شوند. قطعات یونی ایجاد شده سپس از طریق تغییر بسامد rf برانگیخته شده و شناسایی می‌شوند.

۳- آشکارساز (Detector) :

یون‌های با نسبت جرم به بار یکسان که توسط آنالیزور جرمی از سایر یون‌ها جدا شده‌اند بصورت پرتوی به آشکارساز می‌رسند. آشکارساز تعداد یون‌های با نسبت جرم به بار یکسان را شمارش می‌کند (تعداد یون‌ها نشان دهنده فراوانی نسبی آنها است). آشکارساز اطلاعات مربوط به هر یون را به سیستم کامپیوتری دستگاه منتقل می‌کند. در سیستم کامپیوتری طیف یون‌ها ترسیم می‌شود. روی محور افقی (x ها) نسبت جرم به بار و روی محور عمودی (y ها) شدت هر یون (فراوانی نسبی) نشان داده می‌شود. نوع آشکارساز را متناسب با نوع آنالیزور انتخاب می‌کنند. Electron multiplier و Microcannel plate دو آشکارسازی هستند که به طور گسترده در طیف‌سنج های جرمی مورد استفاده قرار می‌گیرند(۱۴). در هر دوی این آشکارسازها یون‌ها به یک صفحه فلزی برخورد کرده و سبب ساطع شدن یک پرتو الکترونی و ایجاد یک جریان قابل اندازه گیری می‌شوند(۲۹).

٤- توالی‌یابی پپتیدها بوسیله طیف‌سنج جرمی متوالی: (MS/MS) (Tandem mass spectrometry)

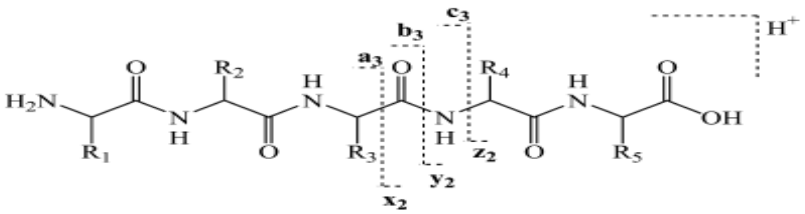
برای بدست آوردن اطلاعات ساختاری و توالی پپتیدی، از طیف‌سنج متوالی($MS\backslash MS,MS^2$) استفاده می‌کنند. در طیف‌سنج جرمی متوالی بطور معمول از دو آنالیزور جرمی که با یک محفظه برخورد (Collision Cell) از هم جدا شده‌اند و یا یک آنالیزور جرمی Ion trap استفاده می‌شود. در حالتی که از دو آنالیزور استفاده می‌شود در فاصله بین دو آنالیزور جرمی یک محفظه برخورد قرار می‌گیرد که در آن با بکارگیری یک گازخنثی مانند هلیوم و یا آرگون طی فرایند Collision Induced Dissociation (CID) یون انتخابی را قطعه قطعه می‌کنند. قطعه قطعه شدن در اثر برخورد مولکول‌های گاز به مولکول یون رخ می‌دهد. آنالیزورهای جرمی مورد استفاده ممکن است از یک نوع یا از انواع مختلف (هیبرید) باشند بنابراین ممکن است آنالیزور اول Quadrupole و آنالیز دوم TOF باشد. اولین آنالیزور جرمی امکان عبور همه یون‌های نمونه را فراهم می‌کند در حالیکه آنالیزور ثانویه به گونه‌ای تنظیم می‌شود تا تنها امکان عبور یون‌های حاصل از بمباران یون انتخابی فراهم شود. آنالیزور دوم یون‌های حاصل از شکست یون انتخابی را بر اساس نسبت جرم به بار از هم جدا می‌کند و آشکارسازی که در انتهای طیف‌سنج قرار دارد تعداد یون‌های متناظر هر قطعه را ثبت می‌کند. طیف بدست آمده جرم هر قطعه را مشخص می‌نماید. در حالتی که از آنالیزور جرمی تله یونی(Ion tarp) استفاده می‌شود تمام یون‌ها با اِعمال ولتاژ rf مناسب به الکترود حلقوی از تله یونی خارج می‌شوند بجز یون مورد نظر کاربر. پس از به دام انداختن یون مورد نظر با بکارگیری گاز خنثی طی فرایند(CID) آنرا قطعه قطعه می‌کنند. سپس قطعات

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.4.1.4]

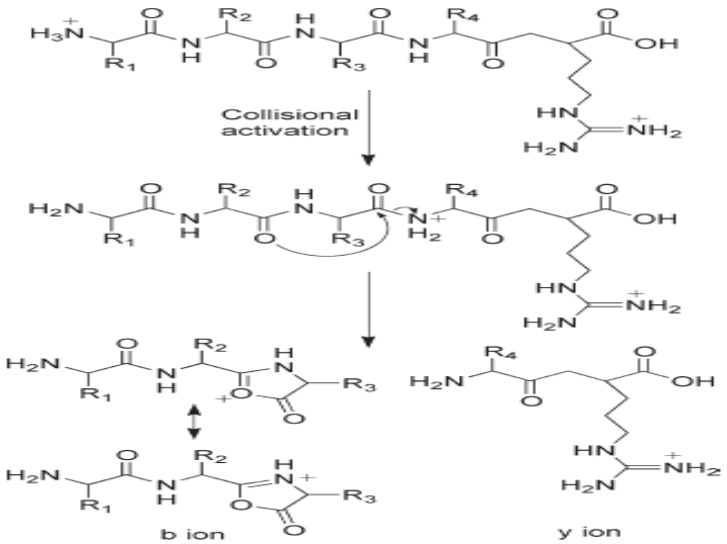
حاصله بر اساس نسبت m/z از هم تفکیک شده و طیف MS/MS را بوجود می‌آورند.

سه نوع پیوند CO-NH،CH-CO و NH–CH در طول زنجیره پپتیدی جزء ضعیف ترین پیوندهای موجود در چهارچوب (Backbone) پپتید بوده و به راحتی قابل شکستن هستند. بنابراین با بکارگیری CID با انرژی پایین این پیوندها به راحتی قابل شکستن هستند. با کنترل سرعت برخورد مولکول‌های گازی با یون‌ها و کاهش فشار گاز خنثی می‌توان انرژی ناشی از برخورد بین آنها را کنترل نمود. هر کدام از این پیوندها اگر در یک پپتید تک باره شکسته شوند دو پپتید کوچکتر ایجاد خواهند کرد که یکی باردار و دیگری بدون بار خواهد بود. تنها نوع بار دار بوسیله طیف‌سنج جرمی قابل ردیابی است. بار الکتریکی قطعات حاصله بستگی به میل ترکیبی هر قطعه با پروتون، دارد. با توجه به اینکه شکستن در هر یک از سه پیوندCO-NH, CH-CO, NH-CH در هر باقیمانده اسید آمینه در طول زنجیره پپتیدی ممکن است رخ دهد امکان ایجاد شش نوع یون مختلف وجود دارد(شکل-۱۲). در یون‌های نوعa_m, b_m , c_m بار الکتریکی روی پپتید انتهای آمین حفظ می‌شود . ولی در یون‌های z_n, y_n , x_n بار الکتریکی در انتهای کربوکسیل پپتید باقی می‌ماند (n و m جایگاه برش در طول پپتید را نشان می‌دهد، m +n = تعداد کل اسیدهای آمینه پپتید). جایگاه اصلی برش طی فرایند CID در محل پیوند CO-NH است که ایجاد یون‌های نوع b_m و یا y_n می کند. چون این دو نوع یون از نظر میزان پایداری با هم اختلاف دارند معمولاً با فراوانی یکسانی در طیف دیده نمی‌شوند(۳۰). یون‌های نوع b ناپایدارتر بوده و در اثر برش مجدد به یون‌های نوع a، b کوچکتر و ایمونیوم (Immonium) تبدیل می‌شوند(۱۱). اختلاف جرم بین دو یون b و یا y مجاور در یک سری پیک برابر با جرم باقیمانده اسید آمینه خاصی است. اگرچه یون‌های نوع b و y یون‌های اصلی برای تعیین توالی پپتید هستند، سایر یون‌ها نیز در طیف دیده می‌شوند که از آنها برای تفسیر طیف و جستجو در بانک‌های اطلاعاتی استفاده می‌کنند. برای مثال یون‌های نوع a که یک CO کمتر از یون‌های نوع b دارند نیز در طیف دیده می‌شوند(شکل-۱۴(ب)). اختلاف m/z برابر با ۲۸ (O_{16} و C_{12}) بین دو پیک در یک طیف نشان دهنده یک جفت یون a-b است که برای شناسایی یون‌های موجود در طیف مفید است. قطعه قطعه شدن یون‌های پپتیدی بواسطه پروتون متحرک (Mobile Proton) رخ می‌دهد؛ یعنی قطعه قطعه شدن بیشتر پپتیدهای پروتونه شده نیاز به اضافه شدن پروتون در جایگاه برش دارد(شکل-۱۳)(۳۰). پروتونه شدن در جایگاه پیوند CO-NH سبب شکسته شدن پپتید و ایجاد یون‌های نوع b_m و y_n می‌شود (۱۹). حضور برخی از اسیدهای آمینه در توالی پپتیدی سبب برش انتخابی پپتید در آن ناحیه می‌شود . برای مثال برش در ناحیه پایانه آمین اسید آمینه پرولین (به عنوان یک آمین نوع سوم) با فراوانی بالایی رخ می‌دهد، به دلیل اینکه اتم نیتروژن این گروه آمین در مقایسه با سایر اتم های نیتروژن موجود در چارچوب پپتید (Peptide Backbone) خاصیت بازی بیشتری داشته و تمایل بیشتری به پروتون دارد(۱۳،۲۶). برعکس برش در ناحیه پایانه کربوکسیل اسید آمینه پرولین به دلیل ممانعت فضایی به ندرت رخ می‌دهد(شکل-۱۴(الف)) پپتیدهای حاصل از هضم آنزیمی با تریپسین به طور متوسط ۳۰ اسید آمینه طول داشته و برای انجام MS\MS بسیار مناسبند. حضور آمینواسیدهای بازی لیزین و آرژنین در انتهای کربوکسیل پپتیدهای ناشی از هضم با تریپسین سبب شده یون‌های حاصل از قطعه قطعه شدن طی فرایند CID، بارالکتریکی را در انتهای کربوکسیل خود حفظ کنند، بنابراین یون‌های غالب طیف MS\MS را یون‌های نوع b تشکیل می دهند(۳). اگر پپتید انتخابی دو بار داشته باشد پس از قطعه قطعه شدن هر دو نوع یون b و y ایجاد خواهد شد. یون‌های ایمونیوم (Immonium) (شکل-۱۵) که دارای نسبت جرم به بار منحصر به یک آمینواسید خاص هستند (بجز در مورد لیزین و ایزولوسین) نیز در طیف MS\MS دیده می‌شوند. این یون‌ها برای شناسایی اسیدهای آمینه بسیار مفیدند اما نمی‌توان جهت تعیین توالی از آنها استفاده کرد بلکه برای تائید حضور اسید های آمینه خاص در توالی پپتید مناسبند. یون‌های ایمونیوم در نسبت های m/z کمتر از ۱۵۹ (m/z ≤159) ظاهر می‌شوند.

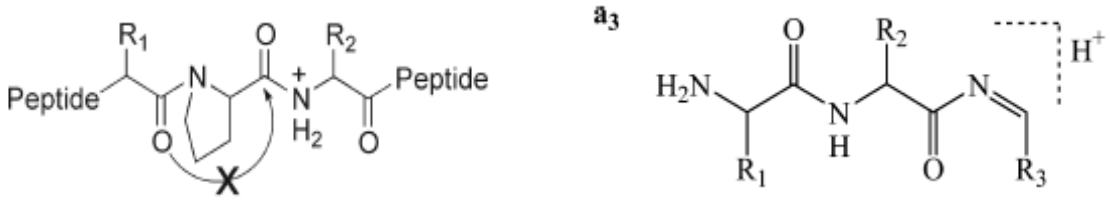
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.4.1.4]



شکل-۱۲: نام گذاری یونهای حاصل از شکست در چارچوب پپتید(۲۷)

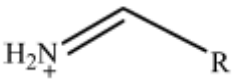


شکل-۱۳: مکانیزم تشکیل یونهای نوع b و y در اثر فرایند برخورد و انتقال پروتون گروه آمین در محفظه برخورد (Collision cell)(۱۹)



(الف) (ب)

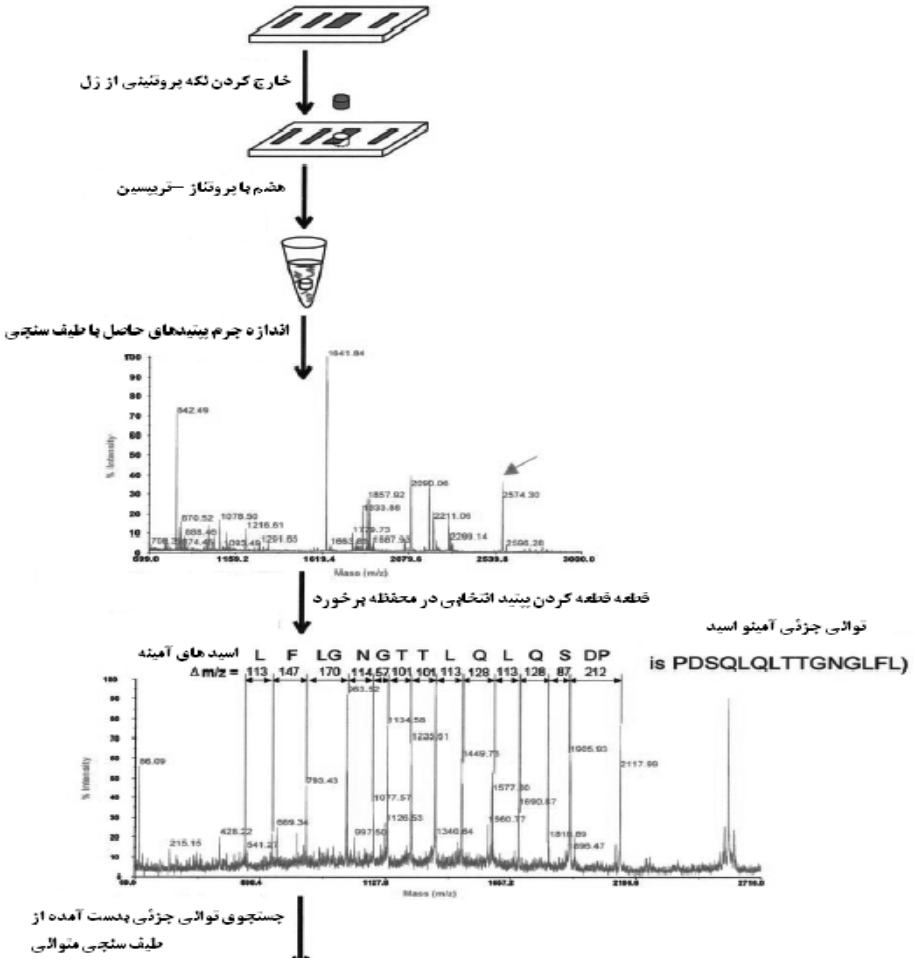
شکل-۱۴: (الف) برش در ناحیه انتهای کربوکسیل اسید آمینه پرولین بواسطه ممانعت فضایی به ندرت رخ می‌دهد،(ب) ساختار یون‌های نوعa



شکل-۱۵: ساختار یون‌های ایمونیوم (Immonium)

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.4.1.4]

نمونه‌ای از طیف جرمی حاصل از طیف‌سنجی جرمی متوالی (MS\MS) در شکل-۱۶ آورده شده است. در این مثال پپتید انتخابی که با فلش نشان داده شده طی فرایند CID شکسته شده و از طیف MS\MS حاصل از آن برای تعیین توالی آمینواسیدی آن استفاده شده است. تفاوت جرم بین دو یون مجاور در یک سری پیک را می‌توان محاسبه نمود که برابر با جرم یک اسید آمینه خاص است. در حالت عادی امکان تمایز بین اسیدهای آمینه با جرم مولکولی مشابه مانند لوسین و ایزولوسین وجود ندارد مگر اینکه با بکار گیری CID با انرژی بالا زنجیره جانبی اسیدهای آمینه را نیز قطعه قطعه نموده و از اطلاعات بدست آمده برای تمایز اسیدهای آمینه با جرم مولکولی مشابه و یا ایزومرها استفاده کرد(۱۴). شکست در ناحیه زنجیره جانبی اسیدهای آمینه سبب ایجاد یون‌های نوع d، v و w می‌شود(۳۰).



شکل-۱۶: شناسایی پروتئین به روش طیف‌سنج جرمی متوالی(Tandem Mass spectrometry)(۹)

۵- شناسایی پروتئین‌ها بوسیله طیف‌سنج جرمی:

توالی‌یابی ژنوم برخی از موجودات زنده زمینه‌های تحقیقاتی بیولوژی مولکولی را متحول کرده است. واژه پروتئوم برای اولین بار در سال ۱۹۹٤ توسط ویلکینز برای توصیف مجموعه کل پروتئین‌های بیان شده بوسیله یک ژنوم پیشنهاد شد(۲۸). علم پروتئومیکس به مطالعه پروتئوم‌ها می‌پردازد. در حقیقت پروتئومیکس مطالعه بیان ژن‌ها در سطح پروتئین‌ها است. برای درک چگونگی کار سلول‌ها مطالعه پروتئین‌ها، نحوه عمل و چگونگی برقراری اثر متقابل با دیگر پروتئین‌ها ضروری است. برخلاف طبیعت ثابت ژنوم که در همه سلول‌های یک موجود

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.4.1.4]

یکسان است، پروتئوم دائماً تحت تحریکات محیطی و داخلی تغییر می‌کند(۱۸). تهیه فهرست تمام پروتئین‌های کد شده توسط ژنوم یک موجود و تجزیه و تحلیل ساختاری و کنش این پروتئین‌ها هدف اصلی پروتئومیکس است. طبق محاسبات دانشمندان تعداد پروتئین‌ها بین 1×10^6 تا 5×10^6 متغیر است.

در حقیقت پروتئومیکس را براساس نوع سوال بیولوژیکی که مطرح شده به پروتئومیکس بیان (Profiling proteomics) ، پروتئومیکس کارکردی (Functional proteomics) و پروتومیکس ساختاری (Structural proteomics) تقسیم بندی می‌کنند(۳٤). شناسایی کلی پروتئین‌هایی که در سلول یا بافت تحت شرایط بیولوژیکی خاصی وجود دارند، همچنین مقایسۀ تنوع در الگوی پروتئینی ناشی از تاثیر هورمون‌ها، تغییرات محیطی و یا موتاسیون‌های ژنتیکی و تشخیص پروتئین‌هایی که دچار تغییر در غلظت و یا تعدیلات پس از ترجمه شده‌اند از اهداف پروتئومیکس بیان است. هدف پروتئومیکس کارکردی شناخت وظیفه و عمل پروتئین‌ها در سلول می‌باشد. این شناخت بر اساس بررسی اثرات متقابل پروتئین-پروتئین و پروتئین-لیگاند و یا ترکیب آمینواسیدی، نقطۀ ایزوالکتریک و جرم مولکولی و یا تغییرات پس از ترجمه که در ساختار پروتئین‌ها رخ می‌دهد، حاصل می‌شود . هدف از مطالعات پروتئومیکس ساختار، تعیین ساختار کمپلکس‌های پروتئینی یا به نقشه در آوردن کمپلکس‌های پروتئینی است(۵). این شاخه از پروتئومیکس به بررسی و تعیین ساختمان سوم پروتئین‌ها و ساختمان مجموعه‌های کوچک و بزرگ پروتئینی با استفاده از کریستالوگرافی با اشعۀ ایکس (X-Ray) و یا NMR و سایر روش‌های محاسباتی می‌پردازد(۳٤). موفقیت‌های سریع در برنامه‌های توالی‌یابی ژنوم یکی از عوامل اصلی توسعه روش‌های پروتئومیکس است. در حقیقت جستجو در توالی‌های ژنومی موجود در بانک‌های اطلاعاتی یکی از بخش‌های حیاتی در آنالیز پروتئومیکس بر پایه طیف‌سنج جرمی است.

در برخی مواد می‌توان با آنالیز رونوشت‌های mRNA پی به کنش پروتئین مربوطهِ برد. بطور معمول از الگوی بیان mRNA به وفور برای تخمین سطح بیان پروتئین استفاده می‌شود. روش‌هایی که به طور گسترده برای اندازه گیری سطوح بیان mRNA استفاده می‌شود شامل cDNA میکروآری و آنالیز ردیفی بیان ژن (SAGE) است. هر چند در بسیاری از موارد همبستگی بین سطح mRNA و پروتئین برای پیش بینی بیان پروتئین‌ها به دلایلی مانند تفاوت در نیمه عمر پروتئین‌ها و mRNA و مکانیزم‌های پس از ترجمه که سرعت ترجمه را کنترل می‌کنند کافی نیست. در موجودات زنده تفاوت زیادی بین تعداد ژن‌ها و تعداد پروتئین‌ها وجود دارد. در مورد انسان تخمین زده شده که حدود ۳۰ هزار ژن وجود دارد در حالی که وجود حدود ۱۰۰ هزار پروتئین مختلف حدس زده می‌شود. تغییرات پس از ترجمه، فرم‌های مختلف یک پروتئین (آیزوزایم ها) و سطوح بیان متفاوت، پیچیدگی پروتئوم را در مقایسه با ژنوم افزایش می‌دهند. مشکلاتی که در حال حاضر در پروتئومیکس وجود دارد شامل: مشکلات مربوط به تشخیص پروتئین‌های با فراوانی پائین، مشکلات در کسب اطلاعات کمّی، مشکلات در شناسایی تغییرات پس از ترجمه و مشکلات در آنالیز اطلاعات و تفسیر نتایج بدست آمده از آزمایشات در مقیاس وسیع و تکرار پذیری پائین است.

توالی‌یابی به روش اِدمن برای مدت ۲۵ سال یک روش استاندارد خوب برای توالی‌یابی پروتئین‌ها بود. اما پروتئین مورد مطالعه قبل از توالی‌یابی بایستی خالص سازی و همونیژه شود و سپس طی چرخه‌هایی دستخوش واکنش‌های هضم اِدمن قرار گرفته و توالی آن تعیین شود. محدودیت اصلی روش اِدمن سرعت پایین آن و نیاز به پروتئین خالص است. در حال حاضر روش‌های شناسایی پروتئین‌ها بوسیله طیف‌سنج جرمی مبتنی بر دو استراتژی اصلی Bottom-up و Top-down هستند(۲۳).

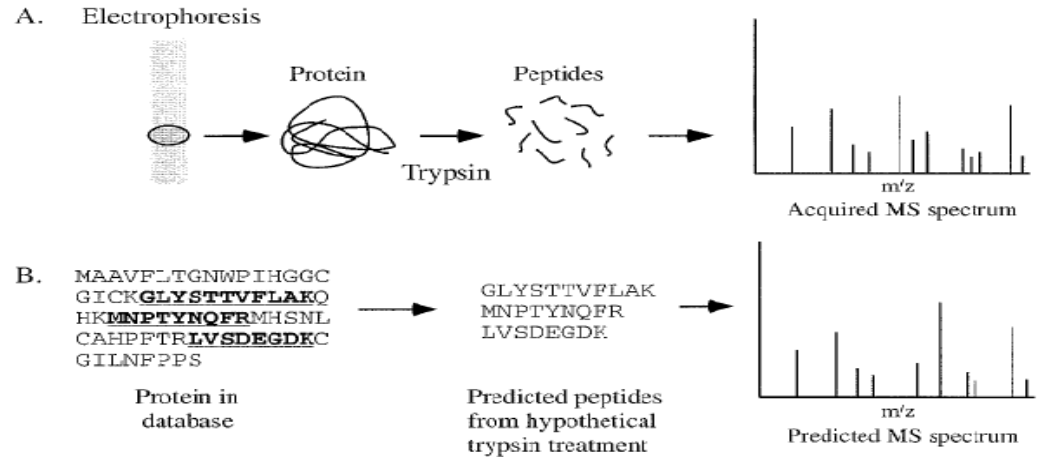
۱-۵ شناسایی پروتئین‌ها به کمک روش‌های مبتنی بر استراتژی Bottom-up:

این روش شناسایی پروتئین‌ها اولین بار با بکارگیری تکنیک‌های ژل الکتروفورز یک بعدی و دو بعدی استفاده شد. در این جا لکه پروتئینی را از ژل خارج می‌کنند و سپس مورد هضم آنزیمی قرار می‌دهند. (بطور معمول از آنزیم تریپسین برای این کار استفاده می‌کنند). آنزیم تریپسین پیوند پپتیدی را از انتهای کربوکسیل

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.4.1.4]

اسیدهای آمینه لیزین و آرژینین برش می‌دهد. مخلوط پپتیدی حاصل از هضم آنزیمی بوسیله طیف‌سنج جرمی MALDI-TOF و یا ESI-MS بررسی می‌شود . جرم پپتیدهای حاصل از هضم، اثر انگشت جرم پپتیدی (PMF) را بوجود می‌آورند. در روش انگشت‌نگاری جرم پپتیدی، جرم پپتیدهای حاصل از هضم آنزیمی پروتئین ناشناخته با جرم تئوریکی پپتیدهای حاصل از هضم فرضی پروتئین‌های موجود در بانک‌های اطلاعاتی مقایسه می‌شود (شکل-۱۷)(۱۱). اگر تعداد کافی از پپتیدهای موجود در طیف واقعی با پپتیدهای حاصل از هضم تئوریکی از نظر جرمی همپوشانی داشته باشند می‌توان پروتئین را با قطعیت شناسایی نمود. معمولاً برای شناسایی یک پروتئین به روش PMF حداقل نیاز به جرم دقیق سه پپتید می‌باشد تا بتوان پروتئین مورد نظر را با حداقل خطا شناسایی نمود(۱). هر چه تعداد پپتیدهای حاصل از هضم آنزیمی یک پروتئین بیشتر باشد امکان شناسایی دقیق پروتئین به روش PMF بیشتر است.

مزیت اصلی PMF سرعت بالای آن است. آنالیز و جستجوی بانک‌های اطلاعاتی بطور کامل اتوماتیک است. مهمترین عیب PMF ابهام در شناسایی پروتئین است. زیرا جرم پپتیدی حشو (Redundancy) است. برای مثال پپتیدهای با ۵ آمینواسید مشابه ولی با توالی متفاوت، جرم یکسانی دارند، یعنی پپتید VAGSE جرم یکسانی با پپتیدهای GSEVA و ESAGV دارد. بنابراین برای اینکه این روش موفقیت آمیز باشد جرم تعداد زیادی پپتید از یک پروتئین بایستی تعیین شود تا حداقل اختصاصیت بدست آید. PMF برای موجوداتی که ژنوم کوچکی داشته و ژنومشان به طور کامل توالی‌یابی شده است کارایی بالایی دارد. فاکتور دیگری که موفقیت PMF را متاثر می‌کند دقت جرمی است(۶،۷). بدست آوردن جرم دقیق پپتیدها برای شناسایی دقیق پروتئین یک ضرورت اجتناب ناپذیر است. بنابراین فاکتورهایی که سبب تغییر جرم پپتید می‌شوند سبب کاهش دقت جرمی نیز می‌شوند. یکی از این فاکتورها تغییرات پس از ترجمه‌ای است که در ساختار پروتئین‌ها رخ می‌دهد. اگر یک پروتئین ناشناخته به طور گسترده‌ای تغییرات پس از ترجمه یافته باشد پپتیدهای حاصل از آن با پپتیدهای حاصل از هضم پروتئین تغییر نیافته در بانک اطلاعاتی همخوانی نخواهد داشت.PMF را نمی‌توان بر روی یک مخلوط پروتئینی بکار برد چون هضم مخلوط پروتئینی ایجاد یک مخلوط پیچیده پپتیدی می‌کند که سبب افزایش پیچیدگی PMF می‌شود . بنابراین حتی اگر لکه پروتئینی جدا شده از ژل دارای ۲ تا ۳ پروتئین باشد امکان شناسایی آن با PMF وجود نخواهد داشت. برنامه‌های جستجوگری که برای انگشت‌نگاری جرم پپتیدی بکار می‌روند در جدول-۱ لیست شده‌اند.

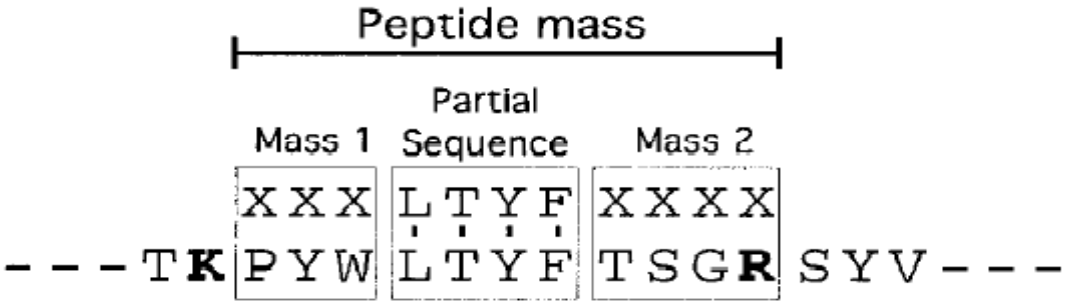


شکل-۱۷: شناسایی پروتئین‌ها بوسیله انگشت‌نگاری جرم پپتیدی (PMF). (A) پروتئین ناشناخته از ژل جدا می‌شود و بوسیله عمل یک آنزیم پروتئازی به یک مجموعهٔ پپتیدی تبدیل می‌شود. سپس جرم پپتیدها بوسیله طیف‌سنج جرمی اندازه گیری می‌شود . (B) طیف جرمی پروتئین ناشناخته با طیف حاصل از هضم مجازی پروتئین‌های موجود در بانک اطلاعاتی با همان آنزیم مقایسه می‌شود.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.4.1.4]

واضح است که هر چه جرم پپتیدهای حاصل از هضم آنزیمی دقیقتر اندازه گیری شوند احتمال اینکه پروتئین بطور صحیحی شناسایی شود بیشتر است. این موضوع بیشتر زمانی حائز اهمیت است که نقشه جرم پپتیدی مرکب از چندین پروتئین باشد.

در بین روش‌هایی که برای شناسایی پروتئین‌ها در مسیر Bottom-up از MS\MS بهره می‌گیرند، دو روش در زیر به اجمال شرح داده شده است. روش اول تبدیل طیف MS/MS به توالی آمینو اسیدی پپتید (روش توالی‌یابی de novo)، روش دوم جستجوی بانک‌های اطلاعاتی حاوی طیف‌های تئوریکی MS/MS. به دلیل اینکه تفسیر طیف حاصل از MS/MS بسیار دشوار است توالی‌یابی به روش de novo به ندرت در پروتئومیکس استفاده می‌شود. مزیت اصلی توالی‌یابی به روش de novo امکان جستجوی توالی آمینواسیدی بدست آمده در بانک‌های اطلاعاتی پروتئین و DNA است. در عوض از طریق مقایسه طیف MS/MS بدست آمده با طیف مجازی حاصل از پپتیدهای موجود در بانک‌های اطلاعاتی (روش دوم) می‌توان پروتئین را شناسایی نمود. در حال حاضر الگوریتم‌های زیادی برای انجام چنین جستجوهایی توسعه یافته‌اند از آن جمله می‌توان به SEQUEST که توسط Eng وهمکاران بوجود آمده، اشاره کرد (جدول-۱)(۸). در این روش آنالیز داده‌های حاصل از طیف‌سنج جرمی متوالی با کاهش در پیچیدگی طیف حاصله شروع می‌شود. برای این منظور تنها تعداد محدودی از یون‌های موجود در طیف برای جستجو انتخاب می‌شوند. ابتدا SEQUEST با توجه به توالی‌های موجود در بانک‌های اطلاعاتی لیستی از پپتیدهایی که جرمی نزدیک به جرم پپتید انتخابی برای CID دارند بوجود می‌آورد آنگاه طیف MS\MS بدست آمده از پپتید انتخابی را با طیف MS\MS مجازی پپتیدهای لیست شده مقایسه می‌کند و پپتیدهایی که طیف آنها به طیف پپتید انتخابی شباهت بیشتری دارد را انتخاب می‌کند. از این طریق می‌توان پروتئین را در بانک‌های اطلاعاتی شناسایی نمود(۳۴).یکی دیگر از روش‌ها برای شناسایی پروتئین‌ها بوسیله داده‌های حاصل از MS\MS استفاده از Peptide Mass Tag است. دراین روش توالی آمینواسیدی جزئی از پروتئین که از تفسیر طیف MS\MS بدست آمده همراه با جرم پپتیدی Tag(با توالی مشخص) و جرم پپتیدهای دو طرف Tag برای جستجو در بانک‌های اطلاعاتی مورد استفاده قرار می‌گیرد(شکل-۱۸).



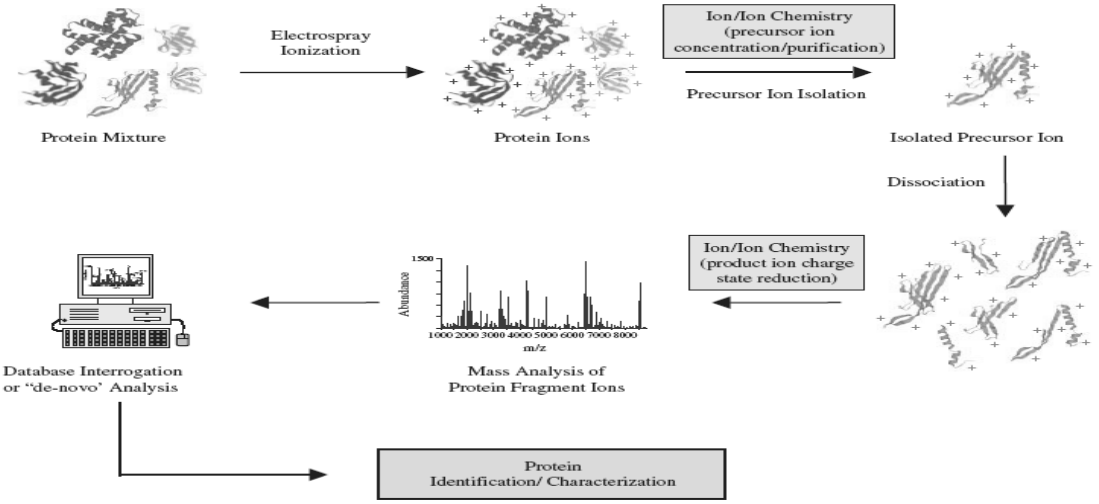
شکل-۱۸: جستجوی Peptide Mass Tag در بانک اطلاعاتی. توالی آمینو اسیدی جزئی (Tag) که از طیف MS\MS بدست آمده همراه با جرم پپتید اصلی (Parent Peptide) و جرم پپتید ابتدای توالی (Mass1)و جرم پپتید در انتهای توالی (Mass 2)برای جستجو در بانک اطلاعاتی بکار می‌رود.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.4.1.4]

Peptide Mass Tag در مقایسه با PMF بسیار اختصاصی‌تر است(۸،۲۲). نتایج حاصل از طیف‌سنج جرمی متوالی چون به توالی آمینواسیدی پروتئین متکی است در مقایسه به انگشت‌نگاری جرم پپتیدی از اعتبار بیشتری برخوردار است. بانک‌های اطلاعاتی که می‌توان برای شناسایی پروتئین‌ها بوسیله طیف‌سنج جرمی از آنها استفاده کرد شامل بانک‌های اطلاعاتی پروتئین، EST ها و توالی‌های ژنومی است. استراتژی Bottom-up تاکنون در شناسایی پروتئین‌ها بسیار موفقیت آمیز بوده است. هر چند که هیچ روشی خالی از محدودیت نمی‌باشد.

۲-۵ شناسایی پروتئین‌ها به وسیله روش‌های مبتنی بر استراتژی Top-down:

جرم پروتئین به تنهایی برای شناسایی پروتئینی که از قبل شناسایی نشده است کافی نیست. تغییرات پس از ترجمه‌ای که روی پروتئین‌ها صورت می‌گیرد منجر به تفاوت جرم پیش بینی شده با جرم اندازه‌گیری شده می‌شود. اما اطلاعاتی راجع به توالی جزئی از پروتئین به همراه جرم پروتئین کامل (Intact) برای شناسایی پروتئین بهتر از، تنها اطلاعات جزئی نسبت به توالی پروتئین است. اخیراً روش‌هایی مبتنی بر Top-down برای شناسایی پروتئین‌ها توسعه یافته‌اند که قادرند اطلاعاتی درباره ساختار اولیه پروتئین اصلی (intact) بدون نیاز به هضم آنزیمی فراهم آورند. در این روش، پروتئین اصلی را یونیزه می‌کنند سپس یون‌های حاصل را در طیف‌سنج جرمی قطعه قطعه می‌کنند و طیف جرمی قطعات حاصل را بدست می‌آورند. سپس با جستجو در بانک‌های اطلاعاتی و با کمک توالی نشانمند (Sequence tag) پروتئین را شناسایی می‌کنند(شکل-۱۹). مزیت اصلی روش‌های Top-down انجام MS/MS بر روی پروتئین اصلی است که امکان شناسایی توالی کامل پروتئین و تغییرات پس از ترجمه بر روی پروتئین وجود دارد. مشکل اصلی روش Top-down یونیزه کردن پروتئین‌های بزرگ است که با روش‌های یونیزاسیون فعلی این کار بسیار دشوار است(۲۳).



شکل-۱۹: شناسایی پروتئین‌ها به روش ToP-down(۲۳)

در حال حاضر از طیف‌سنج جرمی FT-MS برای شناسایی پروتئین‌ها در مسیر Top-down استفاده می‌شود. با این وجود تکنیک‌های یونیزاسیون مولکول‌های بزرگ پروتئینی هنوز بطور کامل جا نیفتاده‌اند.

جدول-۱ لیست الگوریتم‌هایی که در حال حاضر برای شناسایی پروتئین‌ها بوسیله داده‌های طیف‌سنجی جرمی متوالی مورد استفاده قرار می‌گیرند را همراه با آدرس الکترونیکی آنها نشان می‌دهد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.4.1.4]

Peptide Mass Fingerprinting (PMF) (Database Searching Algorithms)
Mascot (http://www.matrixscience.com)
Mowse (http://www.hgmp.mrc.ac.uk/Bioinformatics/Webapp/mowse)
MS-Fit (http://www.prospector.ucsf.edu)
Pepsea (http://www.pepsea.protana.com)
Profound (http://www.proteometrics.com)

Tandem Mass Spectrometry (Database Searching Algorithm)
Mascot (http://www. matrixscience.com)
MS-Tag (http://www. prospector.ucsf.edu)
Pepsea (http://www.pepsea.protana.com)
SEQUEST (http://www.fields.scripps.edu/sequest)
Sonar (http://www.proteometrics.com)

جدول :الگوریتم های موجود برای شناسایی پروتئین در بانک‌های اطلاعاتی

٦- شناسایی تغییرات پس از ترجمه (PTM) بوسیله طیف‌سنج جرمی:

تنها ساختار اول پروتئین برای کنش بیولوژیکی کافی نمی‌باشد. تغییرات همواستاتیک سلولی پروتئین‌ها برای شروع فرایندهای داخل سلول بسیار با اهمیت است. تغییرات پس از ترجمه (PTM) پروتئین‌ها، تغییرات کوالانسی هستند که در اسیدهای آمینه موجود در زنجیره پلی پپتیدی رخ می‌دهند(۲۷).

در حقیقت تغییرات پس از ترجمه وقایع پردازشی شیمیایی هستند که خواص پروتئین‌ها را پس از ترجمه تغییر می‌دهند بنابراین تغییرات پس از ترجمه ساختار سوم و چهارم پروتئین را تعیین و فعالیت و کنش پروتئین را تنظیم می‌کنند(۱۵). تغییرات پس از ترجمه به دو صورت روی پروتئین‌ها اِعمال می‌شوند یا با برش پرتئولیتیک و یا با اضافه شدن گروه‌های خاصی به زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینهٔ در ساختار پروتئین. تغییرات پس از ترجمه‌ای که بطور معمول در ساختمان پروتئین رخ می‌دهند شامل؛ فسفوریلاسیون، گلیکوزیلاسیون، استیلاسیون، متیلاسیون، سولفاته شدن، تشکیل پیوند دی سولفیدی، آمین زدائی و یوبیکوئیتینه شدن است. بسیاری از پروتئین‌های یوکاریوتی پس از ترجمه دستخوش این تغییرات می‌شوند. بسیاری از این تغییرات تنظیمی و قابل برگشت هستند. زمانی که پروتئینی در ژل شناسایی شد گام بعدی شناسایی تغییرات پس از ترجمه ایست که ممکن است در آن وجود داشته باشد. البته گاهی امکان شناسایی برخی از تغییرات پس ترجمه مانند فسفوریلاسیون و گلیکوزیلاسیون در ژل وجود دارد برای مثال، اضافه شدن یک گروه فسفات به پروتئین منجر به اضافه شدن دو بار منفی به بار خالص پروتئین می‌شود که سبب تغییر pH ایزوالکتریک پروتئین بدون تغییر قابل مشاهده‌ای در وزن مولکولی پروتئین می‌شود بنابراین موقعیت پروتئین فسفوریله شده در ژل به طور افقی تغییر می‌کند. برخی از تغییرات پس از ترجمه حلالیت پروتئین‌ها را تغییر می‌دهند. برخی به عنوان سوئیچ‌های مولکولی برای فعال یا غیر فعال کردن و یا تغییر فعالیت سایر پروتئین‌ها استفاده می‌شوند. اضافه شدن گروه‌های شیمیایی به پروتئین‌ها منجر به تغییر جرم مولکولی پپتیدهای حاصل ازهضم پروتئین می‌شود. از این خصوصیت می‌توان برای شناسایی این تغییرات بوسیله طیف‌سنج جرمی استفاده کرد(۹). پیشرفت‌های اخیر در تکنیک‌های طیف‌سنجی جرمی امکان شناسایی سریع پروتئین‌ها را فراهم نموده است. با این حال نقشه‌یابی تغییرات پس از ترجمه به پوشش کامل پپتیدی پروتئین نیاز دارد. تغییرات پس از ترجمه در محیط زنده (in vivo) تنها در بخش کوچکی از کل پروتئین‌ها رخ می‌دهند (کمتر از یک درصد) بنابراین یک نمونه پروتئینی، مخلوط ناهمگنی از پروتئین‌های تغییر یافته و تغییر نیافته است. تاکنون بیش از ۲۰۰ نوع تغییر پس از ترجمه شناسایی شده است. تغییرات پس از ترجمه در تمام جنبه‌های آبشارهای سیگنالی نقش مرکزی دارند. بنابراین شناخت تغییرات پس از ترجمه پروتئین‌ها در مسیرهای

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.4.1.4]

پیام‌رسانی امکان یافتن اصول پایه‌ای تنظیم سیستم های بیولوژیکی را فراهم خواهد کرد.

فسفوریلاسیون و دِفسفوریلاسیون در باقیمانده اسیدهای آمینه سرین (S)، ترئونین (T)، تایروزین (Y) و هیستیدین (H) در ساختار پروتئین‌ها نمونه بسیار شناخته شدهٔ تغییرات قابل برگشتی هستند که فعال سازی و غیر فعال سازی فعالیت آنزیم ها و تنظیم اثرات متقابل مولکول‌ها در مسیرهای پیام رسانی را برعهده دارند. چون بخش بسیار کوچکی از پروتئین‌ها در محیط زنده فسفریله شده‌اند، از این رو برای مطالعه تغییرات فسفوریلاسیون پروتئین‌ها استفاده از بازدارنده‌های فسفاتازی ضروری است. استیلاسیون و دِاستیلاسیون در پایانه آمین و باقیمانده اسید آمینه لیزین به عنوان رقیبی برای فسفوریلاسیون است. یوبیکوئیتینه شدن و دِیوبیکوئیتینه شدن نقش بسیار مهمی در نشانمند کردن پروتئین‌ها برای تخریب بوسیله پروتئازوم دارد. عدم تعادل در بسیاری از تغییرات پس از ترجمه منجر به بیماری‌های متعددی در انسان می‌شود . تغییرات پس از ترجمه‌ای که بیشتر مطالعه شده‌اند شامل فسفوریلاسیون برگشت‌پذیر که در جایگاه باقیمانده‌های ترئونین، سرین و تیروزین رخ می‌دهد و گلیکوزیداسیون که شامل اتصال کووالانسی اولیگوساکاریدها به باقیمانده اسید آمینه آسپاژین (به اصطلاح N-liked) یا سرین- ترئونین (O-linked) است. طیف‌سنج جرمی روش عمومی برای آنالیز تغییرات پس از ترجمه است. اکثر تغییرات پس از ترجمه سبب افزایش یا کاهش جرم مولکولی مورد انتظار می‌شوند(۱۵). آنالیز تغییرات پس از ترجمه به مراتب دشوارتر از شناسایی پروتئین است. چون اولاً: به روش‌های بسیار حساسی برای شناسایی آنها نیاز است. برای مثال چون تنها ٪۱۰-۵ سوبستراهای پروتئین کینازها فسفریله شده‌اند ما نیاز به ابزارهای برای شناسایی پروتئین تغییر یافته (فسفریله شده) در سطح بسیار پایین داریم. ثانیاً پیوند کوالانسی بین گروه شیمیایی ناشی از تغییر پس از ترجمه و زنجیره پلی‌پپتیدی ناپایدار است. ثالثاً تغییرات پس از ترجمه بسیار موقتی‌اند و در یک تعادل پویا وجود دارند. اگر توالی آمینو اسیدی پروتئین از قبل شناخته شده باشد، می‌توان با هضم پروتئین مورد نظر (نمونه مورد آزمایش) با آنزیم تریپسین و آنالیز پپتیدهای حاصله با طیف‌سنج جرمی و مقایسه جرم های محاسباتی با جرم مورد انتظارِ حاصل از هضم فرضی پروتئین با آنزیم مشابه، نوع تغییری که در پروتئین رخ داده را شناسایی نمود. مثلاً در مورد فسفوریلاسیون، افزایش ۸۰ دالتونی در جرم پپتید نشان دهنده اضافه شدن یک گروه فسفات به پپتید است. پپتید فسفریله شده (پپتیدی که اضافه جرمی در حدود ۸۰ Da نشان دهد) سپس بوسیله MS\MS مورد آنالیز قرار می‌گیرد تا جایگاه دقیق فسفوریلاسیون مشخص شود. حال اگر پروتئین از قبل شناسایی نشده باشد. نمونه پروتئین بعد از هضم آنزیمی، به دو قسمت مساوی تقسیم می‌شود. یک قسمت را با آنزیم فسفاتاز تیمار می‌کنند تا تمام گروه‌های فسفات را حذف نمایند. سپس طیف جرمی هر دو قسمت را با هم مقایسه می‌کنند تا تغییرات پس از ترجمه نمایان شود. روش‌هایی که برای شناسایی پروتئین‌های فسفریله شده در مقیاس وسیع به کار می‌روند شامل immobilized metal affinity chromatography (IMAC) ، chemical tagging و Immuno-precipitation با آنتی بادی ویژه گروه فسفات است. IMAC بر اساس روش ابداع شده توسط آندرسون و همکارانش است. در این روش از یون Fe^{3+} برای جذب گروه فسفات استفاده می‌شود . فیکارو و همکاران از این روش در ترکیب با LC\MS\MS برای مطالعه پروتئین‌های فسفریله شدهٔ مخمر استفاده کرد. او در این تحقیق نشان داد که گروه کربوکسیلیک در خالص سازی به روش IMAC اختلال ایجاد می‌کند و بایستی محافظت شود. برای محافظت از گروه کربوکسیلیک می‌توان از واکنش استریفیکاسیون با متانول در حضور اسید کلریدریک استفاده نمود. پپتیدهای فسفریله شده حاصل از هضم آنزیمی سپس به وسیله برنامه SEQUEST تائید شدند. فیکارو در این تحقیق از کل عصاره سلولی ۱۰۰۰ فسفو پپتید شناسایی کرد. در بین اینها ۳۸۳ جایگاه فسفوریلاسیون شناسایی نمود(۳٤). روش کلی شناسایی گلیکوپروتئین‌های خالص شده شامل اندازه‌گیری وزن مولکولی پروتئین کامل (intact) بوسیله طیف‌سنج جرمی و سپس شناسایی جایگاه‌های گلیکوزیله شده بوسیله طیف‌سنجی متوالی است. شناسایی بنیان قندی اضافه شده را می‌توان بعد از آزادسازی آن با تیمارهای شیمیایی یا آنزیمی و ردیابی آن با (High-HPAEC-PAD)

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.4.1.4]

performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection) انجام داد. روش دیگر آنالیز طیف‌سنجی جرمی مستقیم گلیکوپپتیدها در ترکیب با تیمار پی در پی با اگزوگلیکوزیدازها است. روش‌های مورد استفاده برای تعیین ساختار بنیان قندی را نمی‌توان بطور مستقیم در مطالعات پروتئومیکس بکار برد زیرا مقدار پروتئین موجود در هر لکه در ژل عموماً پایین است(۳٤). علائم گلیکوپپتیدها در طیف اغلب در حضور پپتیدهای غیر گلیکوزیله پوشیده می‌شود بویژه اگر قندها به باقیمانده منفی اسید سیالیک ختم شده باشند. در وهله اول برای مطالعه تغییرات پس از ترجمه نیاز به مقدار بسیار زیادی پروتئین است. عموماً لکه‌ای که بوضوح با رنگ‌آمیزی کوماسی بلو در ژل نمایان شده برای مکان یابی و تأئید تغییرات پس از ترجمه کافی به نظر می رسد(۱۷). اکثر پروتئین‌ها کنش خود را از طریق اثرات متقابل با سایر پروتئین‌ها انجام می‌دهند. برای تعیین پروتئین‌هایی که در اثر متقابل با یک پروتئین شرکت دارند، خود پروتئین را به عنوان واکنشگر میل ترکیبی برای به دام انداختن سایر پروتئین‌ها بکار می‌برند. اگر آنتی بادی پروتئین مورد نظر وجود داشته باشد می‌توان از آن برای جداسازی اختصاصی پروتئین مورد نظر و سایر پروتئین‌های همراه آن استفاده نمود. از روش Yeast Two Hybrid به طور گسترده برای بررسی اثرات متقابل پروتئین-پروتئین استفاده می‌شود (۲۰). پس از شناسایی پروتئین‌های دارای اثر متقابل با پروتئین مورد نظر با استفاده از طیف‌سنجی جرمی به شناسایی آنها اقدام می‌کنند.

۷- بررسی کمّی پروتئین‌ها بوسیله MS:

روشی که به طور معمول در پروتئومیکس برای بررسی کمّی پروتئین‌ها بکار می‌رود شامل جداسازی مخلوط پیچیده پروتئینی در ژل الکتروفورز دو بعدی و سپس بررسی کمّی پروتئین‌ها بر اساس مقایسه شدت لکه بین دو تیمار و شناسایی پروتئین متناظر با لکه بوسیله MS است. مشکل اصلی این روش تکرارپذیری پایین و عدم امکان تعمیم نتایج بین آزمایشات مختلف است. با ابداع روش ژل الکتروفورز افتراقی (Difference Gel Electrophoresis, DIGE) امکان بررسی کمّی پروتئین‌ها در ژل تا حدودی بهبود یافته است. اما با این حال مطالعه کمّی برخی از پروتئین‌ها مانند پروتئین‌های غشایی، پروتئین‌های بسیار بزرگ و یا بسیار کوچک و پروتئین‌های خیلی اسیدی و یا خیلی بازی با این روش‌ها امکان پذیر نیست. مشکل دیگر این روش است که مهاجرت برخی از پروتئین‌ها در ژل با هم رخ می‌دهد (Co-migration)، و از طرفی حضور بیش از یک پروتئین در لکه سبب ابهام در نتایج کمّی خواهد شد(۳۱). در حال حاضر روش‌هایی بر پایه طیف‌سنج جرمی برای بررسی کمّی پروتئین‌ها ابداع شده‌اند که از نشان‌دار کردن in vivo یا in vitro پروتئین‌ها برای مطالعه کمّی آنها استفاده می‌کنند.

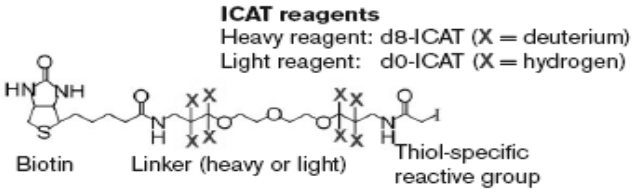
۱-۷- نشان‌دار کردن در شرایط زنده (in vivo):

نشان‌دار کردن در شرایط زنده (In vivo Labelling) شامل وارد کردن ایزوتوپ پایدار (Stable Isotope) به ساختمان پروتئین‌ها بصورت متابولیکی است. برای مثال در اوایل با کشت باکتری یا مخمر در محیط کشت حاوی ایزوتوپ سبک نیتروژن (^{14}N) و یا ایزوتوپ سنگین نیتروژن (^{15}N) پروتئین‌ها را نشان‌دار می‌کردند. پس از نشان‌دار کردن پروتئین‌ها، عصاره پروتئینی نشان‌دار شده با ایزوتوپ سبک و سنگین را با هم مخلوط کرده و بوسیله طیف‌سنج جرمی مورد بررسی قرار می‌دادند. تفاوت جرم بین دو ایزوتوپ سبک و سنگین سبب تغییر موقعیت پیک‌های متناظر با پروتئین‌های مشابه در هر نمونه می‌شود . با مقایسه ارتفاع پیک‌های متناظر می‌توان به اختلاف کمّی بین پروتئین‌های دو نمونه پی برد. روش دیگر نشان‌دار کردن متابولیکی در شرایط زنده استفاده از اسید های آمینه نشان‌دار (^{2}H–Leucine ، ^{13}C–Lysine ، ^{1513}C-Arginine) است. در این روش پروتئین‌ها از طریق وارد کردن اسیدهای آمینه نشان‌دار به محیط کشت نشان‌دار می‌شوند. در حال حاضر از این روش به طور گسترده‌ای استفاده می‌شود. مشکل اصلی این روش‌ها عدم کارایی آنها در نشان‌دار کردن نمونه‌هایی که قابل کشت نیستند مانند بافت‌ها و مایعات بدن است.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.4.1.4]

۲-۷- نشان‌دار کردن در شرایط درون شیشه (In vitro Labelling):

در اینجا ایزوتوپ پایدار را در محیط درون شیشه طی یک واکنش شیمیایی به جایگاه خاصی در طول زنجیره پلی‌پپتیدی وارد می‌کنند. نشان‌دار کردن در محیط درون شیشه یا در انتهای پپتید (آمین یا کربوکسیل) و یا در محل اسید آمینه خاصی (سیستئین، لیزین و تایروزین) در طول زنجیره پلی‌پپتیدی صورت می‌گیرد. نشاندار کردن پایدار ایزوتوپی اولین بار بوسیله گایگی و همکاران تحت عنوان ICAT (Isotope-Coded Affinity Tag) معرفی شد(۳۱). واکنشگر ICAT حاوی یک گروه بیوتین برای جدا کردن اختصاصی آن با ستون حاوی آویدین، یک لینکر که در ساختار خود حاوی ۸ اتم ایزوتوپ سبک هیدروژن (^{1}H) یا ۸ اتم ایزوتوپ سنگین دوتریوم (^{2}H) است و یک گروه واکنش‌گر یدواستامید که به طور اختصاصی با گروه تیول اسیدآمینه‌سیستئین در ساختار پروتئین واکنش می‌دهد(شکل-۲۰). در این روش پروتئین‌های استخراج شده از دو تیمار را با یکی از دو واکنش‌گر ICAT سبک یا سنگین نشان‌دار می‌کنند. سپس نمونه‌های نشان‌دار شده با واکنش‌گرهای ICAT سبک و سنگین را به میزان مساوی مخلوط می‌کنند و مخلوط حاصله را مورد هضم آنزیمی تریپسین قرار می دهند.



شکل-۲۰: ساختار واکنشگر ICAT

پس از جدا نمودن پپتیدهای نشان‌دار در ستون حاوی آویدین آنها را مورد آنالیز MS قرار می‌دهند. از روی تفاوت جرم (۸ دالتون) بین دو ICAT سبک و سنگین می‌توان پپتیدهای مشابه را از نظر کمی مقایسه نمود. روش ICAT به طور اختصاصی سبب خالص سازی پپتیدهای حاوی سیستئین می‌شود بنابراین به طور چشمگیری سبب کاهش پیچیدگی نمونه می‌شود و انجام طیف‌سنجی جرمی را تسهیل می‌کند. اما مشکل عمده ICAT عدم پوشش پروتئین‌هایست که فاقد اسیدآمینه سیستئین در توالی خود هستند. برای مثال حدود ۲۶/۶٪ از کل پپتیدهای حاصل از هضم پروتئین‌های انسان با آنزیم تریپسین حاوی حداقل یک سیستئین در ساختار خود هستند. بنابراین ICAT تنها ۹۶/۱٪ کل پروتئوم انسان را پوشش می‌دهد و چیزی کمتر از ۴٪ از پروتئین‌ها را از دست خواهیم داد(۳۳). برای پوشش کامل پروتئین‌های یک پروتئوم، نشاندار کردن انتهای آمین یا کربوکسیل پپتیدهای حاصل از هضم پیشنهاد شده است. برای مثال از واکنش اسیلاسیون گروه آمین نوع اول موجود در ساختمان پروتئین‌ها (گروه آمین انتهایی و گروه آمین زنجیره جانبی اسید آمینه لیزین) می‌توان برای وارد کردن ایزوتوپ پایدار و نشاندار کردن پپتیدها استفاده نمود. از واکنش استریفیکاسیون انتهای کربوکسیل پپتیدها نیز می‌توان برای وارد کردن ایزوتوپ پایدار و نشاندار نمودن پپتیدها استفاده کرد. در یک مورد گودلِت و همکاران از این روش برای وارد نمودن متانول داری ایزوتوپ‌های سبک هیدروژن (^{1}H) و سنگین دوتریوم (^{2}H) به انتهای کربوکسیل پپتیدهای حاصل از هضم آنزیمی تریپسین استفاده کردند(۱۰). مشکل عمده این روش نشان‌دار شدن گروه کربوکسیل زنجیره جانبی اسیدهای آمینه آسپارتات و گلوتامات است که سبب پیچیدگی نتایج خواهد شد. روش دیگر برای نشان‌دار نمودن انتهای کربوکسیل پپتیدهای حاصل از هضم با تریپسین استفاده از آب حاوی ایزوتوپ‌های سبک و سنگین اکسیژن است. واکنش برشی آنزیم تریپسین مستلزم مصرف یک مولکول آب است. از این رو می‌توان با استفاده از آب حاوی ایزوتوپ سبک اکسیژن (^{16}O) و یا ایزوتوپ سنگین اکسیژن (^{18}O) در محیط واکنش تریپسین انتهای کربوکسیل پپتیدهای حاصل را نشاندار نمود. پس از انجام طیف‌سنجی جرمی بر روی مخلوط پپتیدی، می‌توان پپتیدهای مشابه مربوط به دو نمونه را بر اساس اختلاف جرم بین دو ایزوتوپ بکار رفته شناسایی کرده و از نظر کمّی مقایسه نمود.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.4.1.4]

منابع

1. Aebersold R and Mann M (2003) Mass spectrometry-based proteomics. Nature, 422: .198 207.
2. Ashcroft AE (2002) An Introduction to Mass Spectrometry. Mass Spectrometry Facility Manager, Astbury Centre for Structural Molecular Biology, Astbury Building, the University of Leeds.
3. Ashcroft AE (2003) Protein and peptide identification: the rôle of mass spectrometry in Proteomics. Nat. Prod. Rep, 20: 202 215.
4. Berg JM, Tymoczko JL and Stryer L (2002) Biochemistry.pp: 77-100. (5ed) W. H. Freeman Company, 950pp.
5. Blackstock WP and Weir MP (1999) Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. Trends Biotechnol, 17: 121 127.
6. Clauser KR, Baker P and. Burlingame AL (1999) Role of accurate mass measurement (+/_ 10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching. Anal. Chem, 71: 2871 2882.
7. Corthals GL, Wasinger VC, Hochstrasser DF and Sanchez JC (2000) The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research. Electrophoresis, 21: 1104 1115.
8. Eng JK, McCormack AL and Yates JR (1994) An approach to correlate tandem mass-spectral data of peptides with amino-acid-sequences in a protein database. J. Am. Soc. Mass Spectrom, 5: 976 989.
9. Erin JF and Lee KH (2004) An Introduction to Mass Spectrometry Applications in Biological Research. Biochemistry and Molecular Biology, 32(2): 93 100.
10. Goodlett DR, Keller A and Watts JD (2001) Differential stable isotope labeling of peptides for quantitation and de novo sequence derivation. Mass Spectrom, 15: 1214 1221.
11. Griffith WJ, Andreas PJ, Suya LIU, Rai KD and Yuqin W (2001) Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry. Biochem. J, 355: 545 561.
12. http://staging.mc.vanderbilt.edu/msrc/tutorials/ms/ms.htm.
13. Hunt DF, Yates JR, Shabanowitz J, Winston S and Hauer CR (1986) Protein sequencing by tandem mass spectrometry. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 83: 6233 6237.
14. James PE (2001) Proteome Research: Mass Spectrometry, Springer-Verlag, Germany.
15. Jawon S and Kong-Joo L (2004) Post-translational Modifications and Their Biological Functions: Proteomic Analysis and Systematic Approaches. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 3(1): 35 44.
16. Jonsson AP (2001) Mass spectrometry for protein and peptide characterization. CMLS, Cell. Mol. Life Sci, 58: 868 884.
17. Jungblut P and Thiede B (1997) Protein identification from 2-DE gels by MALDI-MS .j.mass spectrometry, 16: 145 162.
18. Junmin P and Gygi SP (2001) Proteomics: the move to mixtures. J. Mass Spectrom. 36: 1083 1091.
19. Lane CS (2005) Mass spectrometry-based proteomics in the life sciences. CMLS, Cell. Mol. Life Sci, 62: 848 869.
20. Larsen MR and Roepstorff p (2000) Mass spectrometric identification of proteins and characterization of their post-translational modifications in proteome analysis. Fresenius J Anal Chem, 366: 677 690.
21. Lin D, Tabb DL and Yates JR (2003) Large-scale protein identification using mass spectrometry. Biochimica et Biophysica Acta, 1646: 1 10.
22. Mann M and Wilm M (1994) Error-tolerant identification of peptides in sequence databases by peptide sequence tags. Anal. Chem, 66: 4390 4399.
23. Reid GE and McLuckey SA (2002) 'Top-down' protein characterization via tandem mass Spectrometry. J. Mass Spectrom, 37: 663 675.
24. Roboz J (2002) Mass Spectrometry in Cancer Research.pp 34-40.frist edition. Taylor & Francis Group, LLC, 520pp.
25. Shevchenko A, Loboda A, Shevchenko A, Ens W and Standing KG (2000) MALDI quadrupole time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for proteomic research. Anal. Chem, 72: 2132 2141.
26. Vaisar T and Urban J (1996) Probing the proline effect in CID of protonated peptides. J. Mass Spectrom, 31: 1185 1187.
27. Vicki HW, Katheryn AR, Qingfen Z and Cheng G (2005) Mass spectrometry of peptides and proteins. Methods, 35: 211 222.
28. Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF and. Williams KL (1995) Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. Biotechnol. Genet. Eng. Rev, 13:19 50.
29. Willard HH, Merritt LL, Dean JA and Settle FA (1988) Instrumental Methods of Analysis, Wadsworth Publishing Co., Belmont, CA: 465 507.
30. Wysocki VH, Tsaprailis G, Smith LL and Breci LA (2000) Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation. J. Mass Spectrom, 35: 1399 1406.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.4.1.4]

31. Yan W and Chen SS (2005) Mass spectrometry-based quantitative proteomics profiling.Briefings in functional genomics and proteomics, 4(1): 1 12.
32. Yates JR (1998) Mass spectrometry and the age of the proteome. J. Mass Spectrom, 33:1 19.
33. Zhang H, Yan W and Aebersold R (2004) Chemical probes and tandem mass spectrometry: A strategy for the quantitative analysis of proteomes and subproteomes. Curr. Opin. Chem. Biol, 8: 66 75.
34. Zybailov BL and Michael PW (2005) Mass Spectrometry-based Methods of Proteome Analysis. Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine, 2nd Edition Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 8: 1 44.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.4.1.4]