

Cos'è uno spettrometro di massa

Uno spettrometro di massa è uno strumento in grado di generare ioni e di separarli in fase gassosa in base al rapporto massa/carica

Cosa fa uno spettrometro di massa

- ✓ Genera ioni in fase gassosa
- ✓ Separa gli ioni nello spazio o nel tempo in base al rapporto massa/carica
- ✓ Misura la quantità di ioni prodotti per ciascun rapporto m/z

Vantaggi della spettrometria di massa

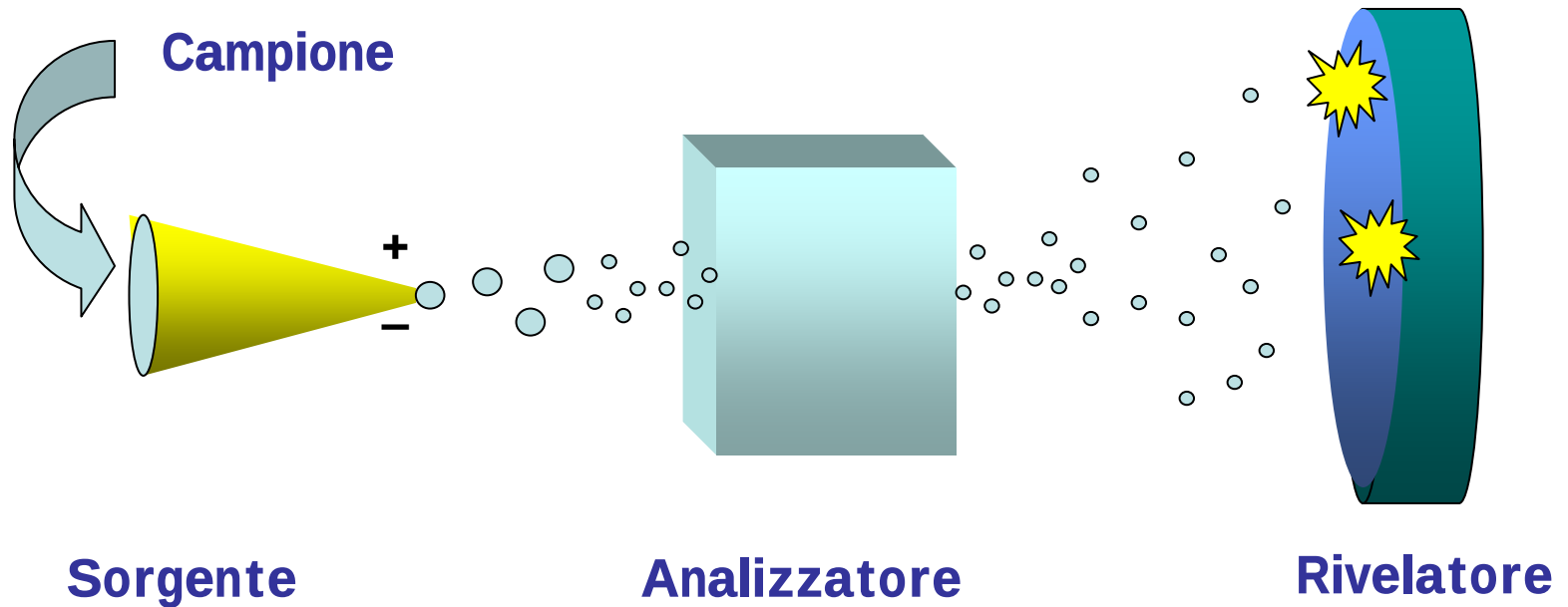
...Such mass or weight information is sometimes sufficient, frequently necessary, and always useful in determining the identity of a species.....

(J.B. Fenn, premio Nobel per la Chimica 2002)

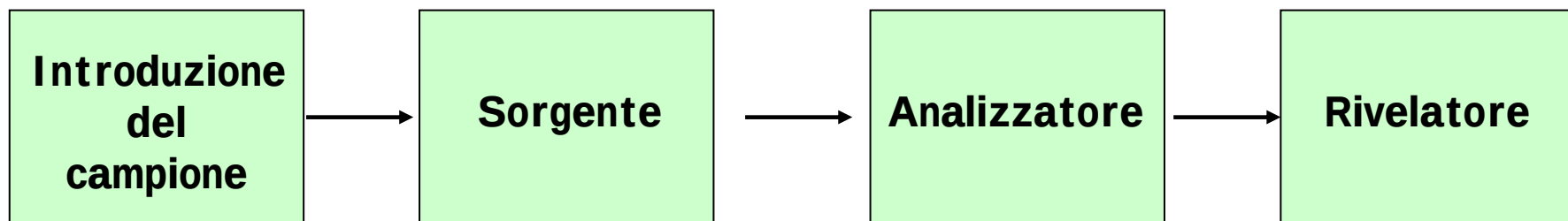
- ✓ Elevato potere risolutivo (capacità di distinguere specie molto simili)
- ✓ Elevata accuratezza della misura (tipicamente riportata in ppm, consente di determinare il valore di massa con una precisione oltre la prima cifra decimale)
- ✓ Elevata sensibilità
- ✓ Velocità della misura
- ✓ Ampio intervallo di masse analizzabili

- ✓ A quali domande la spettrometria di massa può rispondere?
- ✓ Che tipi di misure è possibile fare?
- ✓ Come devono essere preparati i campioni per ottenere i risultati migliori?
- ✓ Quanto campione è necessario?
- ✓ Quale è la tecnica più adatta?

Schema di uno spettrometro di massa



Schema di uno spettrometro di massa



- ✓ Introduzione diretta
- ✓ Gas cromatografia
- ✓ Cromatografia liquida
- ✓ Elettroforesi capillare

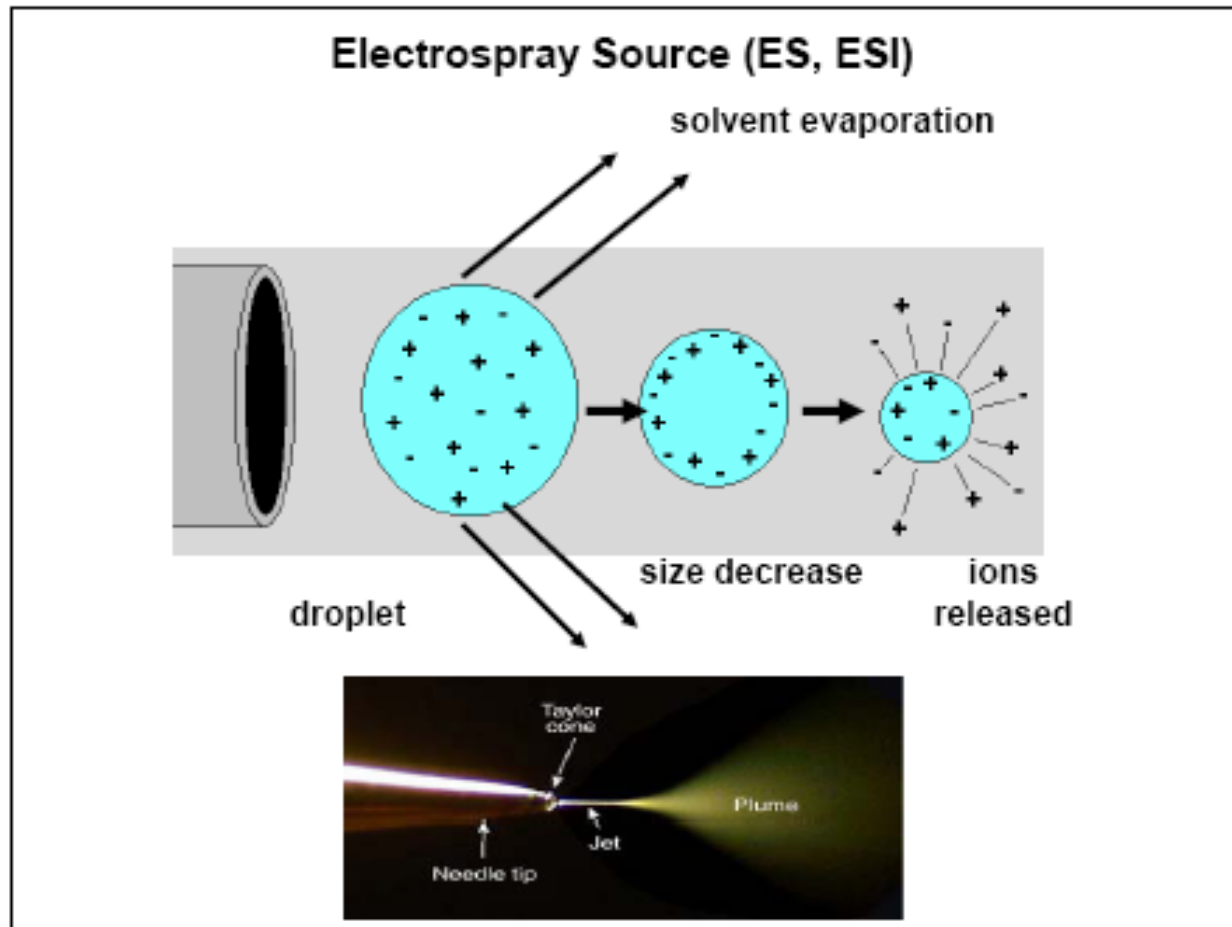
- ✓ Impatto elettronico (EI)
- ✓ Electrospray (ESI)
- ✓ Matrix assisted laser desorption (MALDI)
- ✓ Fast atom bombardment (FAB)

- ✓ Quadrupolo
- ✓ Tempo di volo
- ✓ Trappola ionica
- ✓ Settore magnetico
- ✓ A trasformata di Fourier

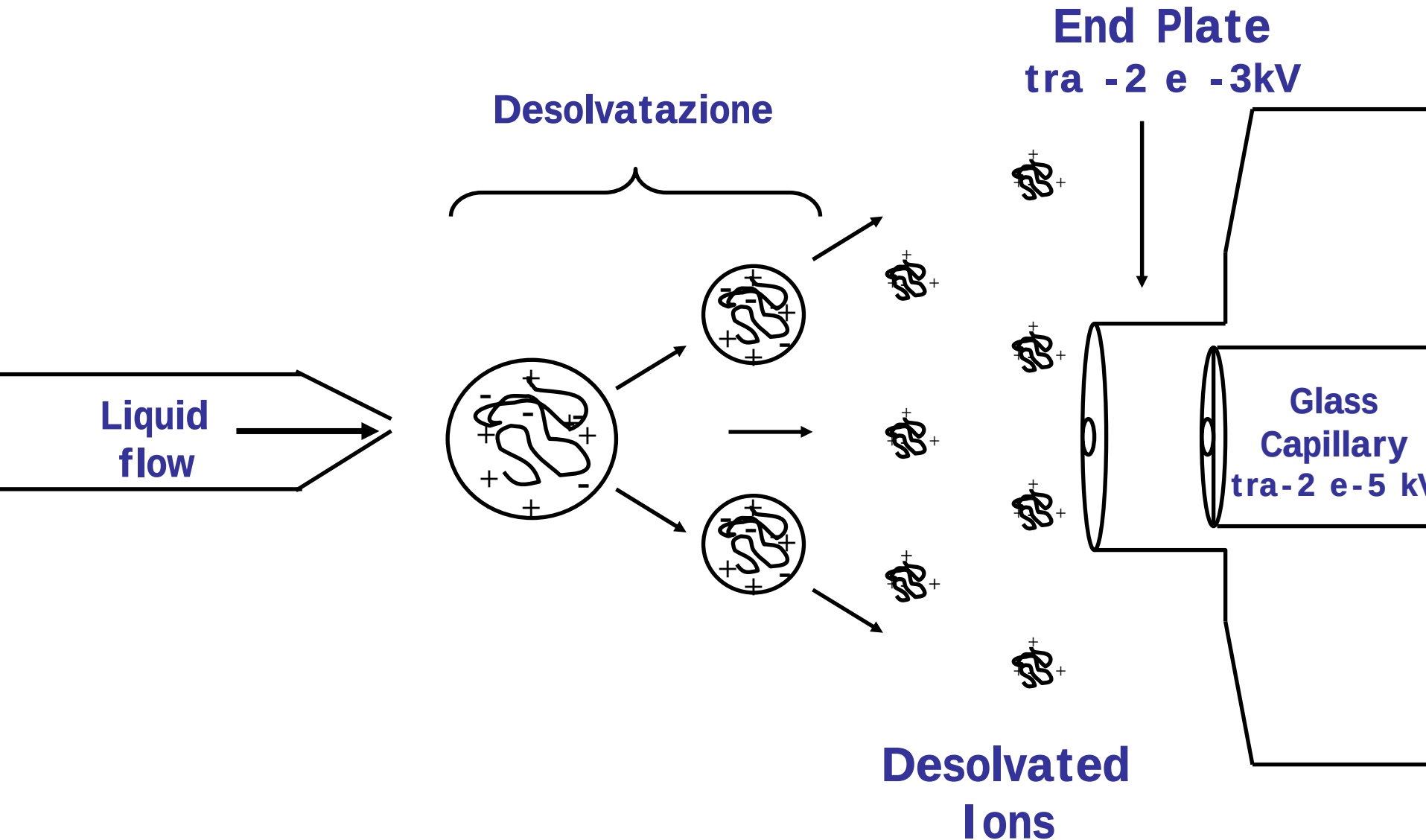
- ✓ Electron multiplier

Electrospray (ESI)

Metodo utilizzato per produrre ioni in fase gassosa a partire da una soluzione, generando un sottile spray di gocce in presenza di un forte campo elettrico.

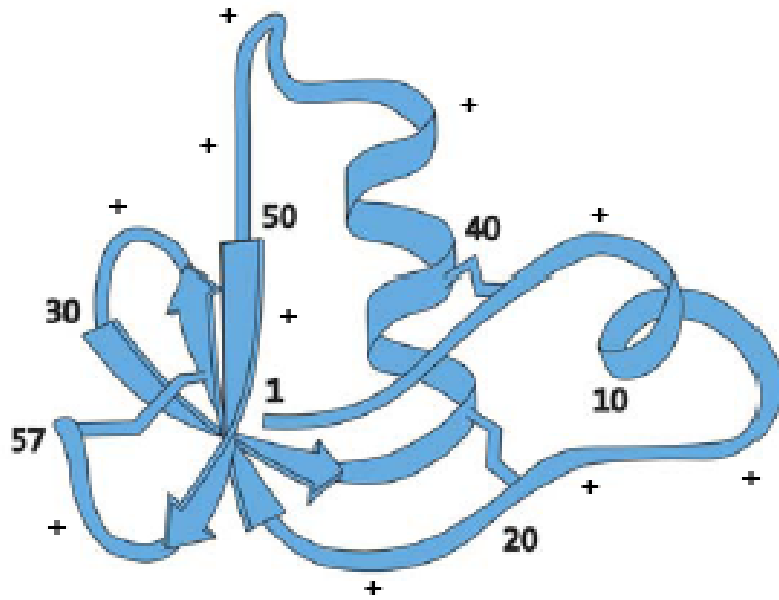


Processo di Ionizzazione per Electrospray



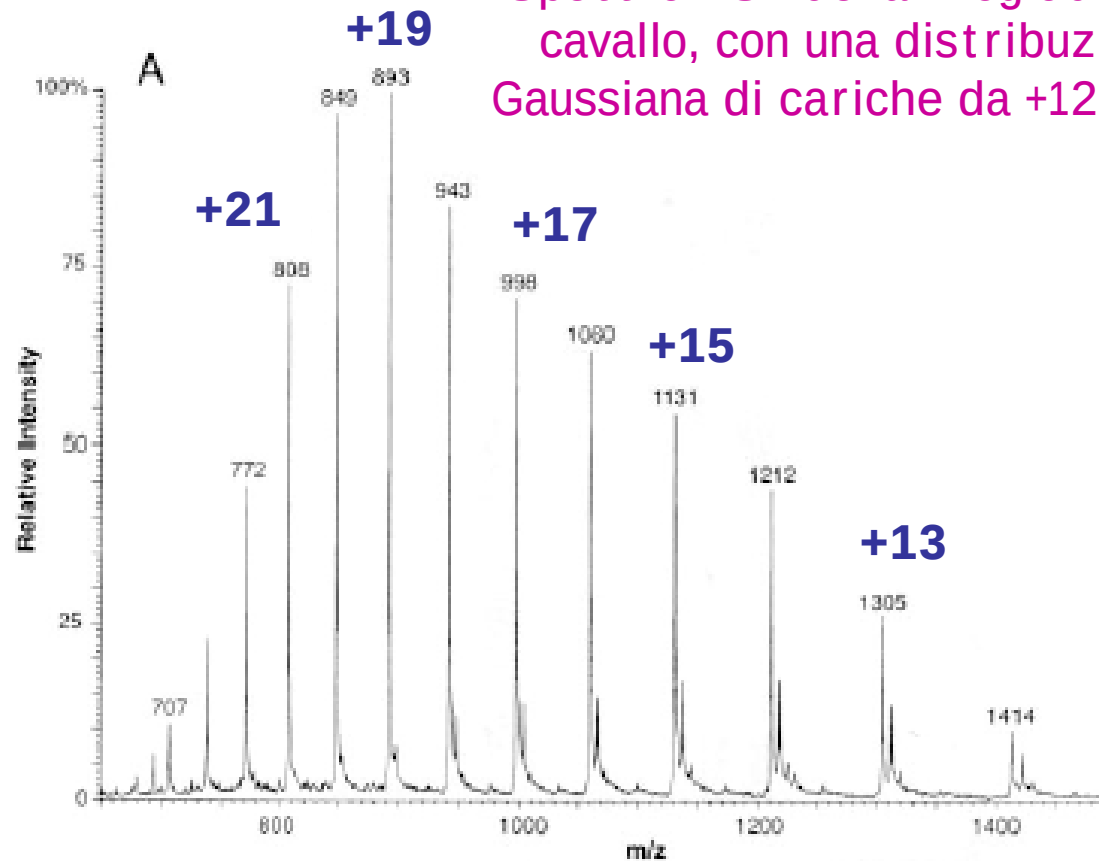


Le proteine hanno molti siti “protonabili” sulla superficie



pH acidi favoriscono la protonazione

Spettro ESI della mioglobina da cavallo, con una distribuzione Gaussiana di cariche da +12 a +24



Come calcolare il valore di massa da uno spettro ESI

- ✓ $(m/z)_1$ e $(m/z)_2$ sono i valori di m/z determinati per due segnali adiacenti
- ✓ Si assume che la carica degli ioni è determinata da H^+ , in modo che ciascun protone determina un aumento di una unità di massa.

- ✓ di conseguenza:

$$(m/z)_1 = (m + z_1)/z_1 \quad \text{e} \quad (m/z)_2 = (m + z_2)/z_2$$

dove m è la massa della proteina e z è il numero di cariche

- ✓ Assumendo che $z_1 = z_2 + 1$ che la carica degli ioni è determinata da H^+ , in modo che ciascun protone determina un aumento di una unità di massa.

Quindi:

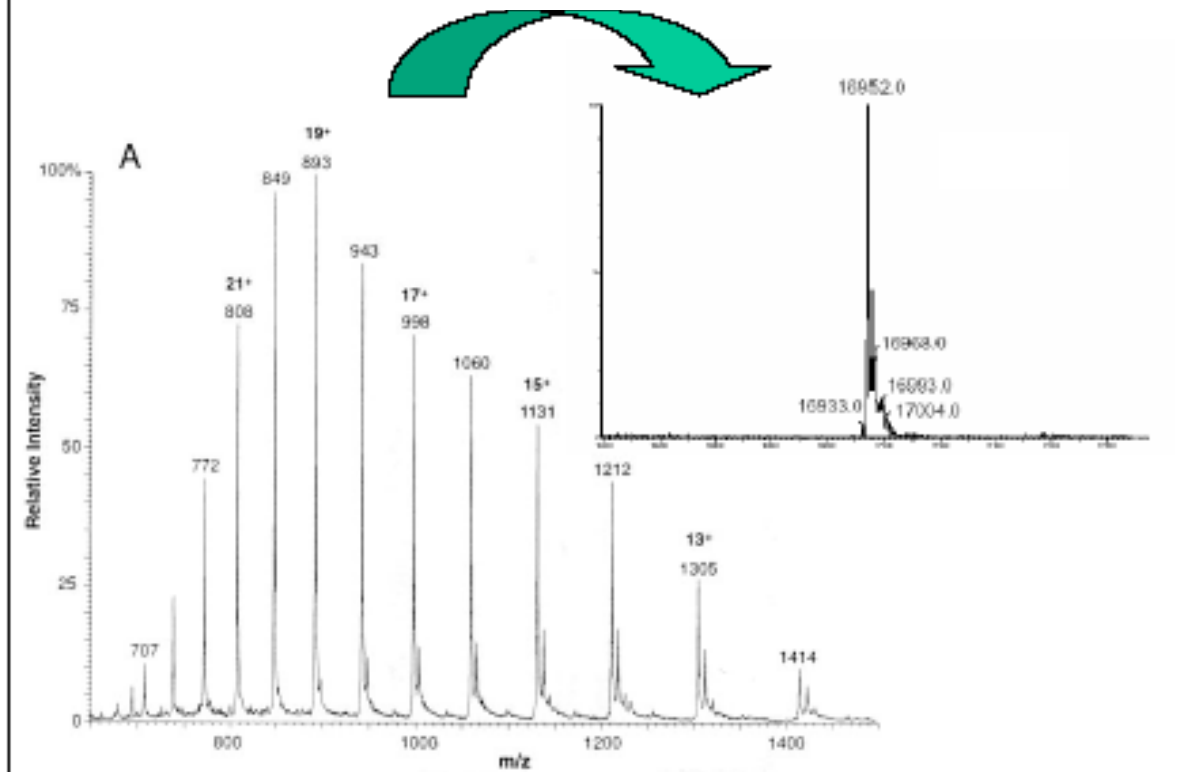
$$(m/z)_1 = (m + z_2 + 1)/(z_2 + 1) \quad \text{e} \quad (m/z)_2 = (m + z_2)/z_2$$

- ✓ Ci troviamo ora a dover risolvere un sistema di due equazioni a due variabili, m e z_2 , per il cui il valore di m può essere determinato.
- ✓ Lo stesso processo può essere reiterato per ogni coppia di ioni adiacenti, aumentando la precisione della misura di massa.

Spettro ESI della mioglobina, (massa teorica 16951 amu)

$$\begin{array}{lcl} 19 \times 893 = 16967 & \longrightarrow & -19 = 16948 \\ 18 \times 943 = 16974 & \longrightarrow & -18 = 16956 \\ 13 \times 1305 = 16965 & \longrightarrow & -13 = 16952 \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} 19 \times 893 \\ 18 \times 943 \\ 13 \times 1305 \end{array}} \right\} \longrightarrow \begin{array}{l} 16952 \\ \Delta m = 0.006\% \end{array}$$

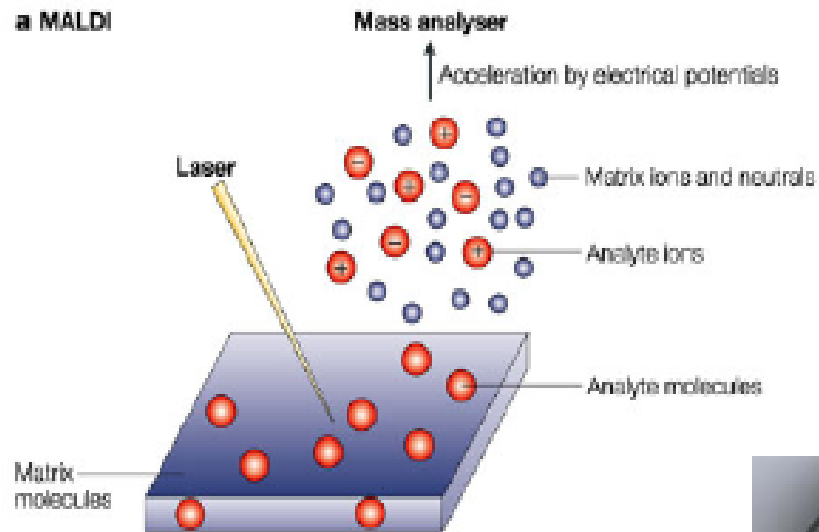
Lo spettro originale viene “trasformato” in un singolo picco



Processo di Ionizzazione MALDI

Matrix assisted laser desorption (MALDI) MS (1980s)

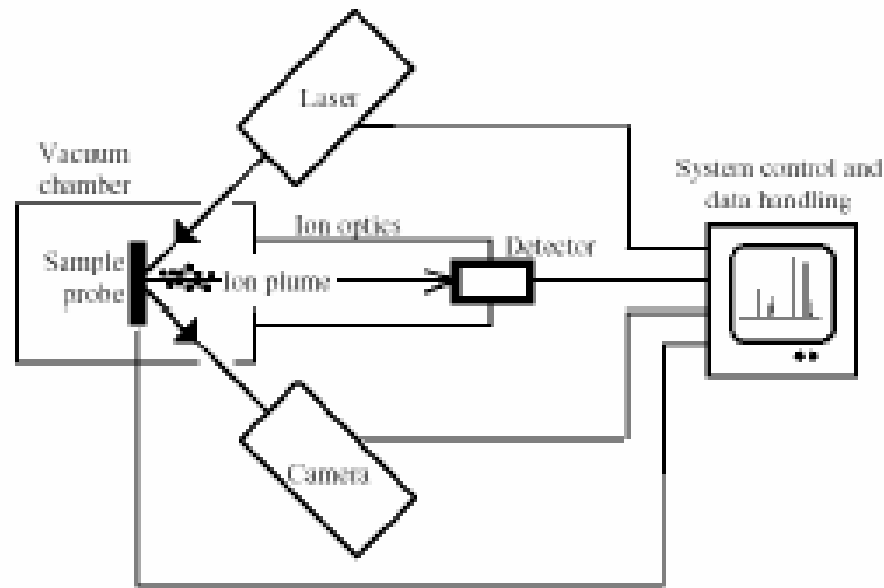
a MALDI



a MALDI steel target spotted with different matrices

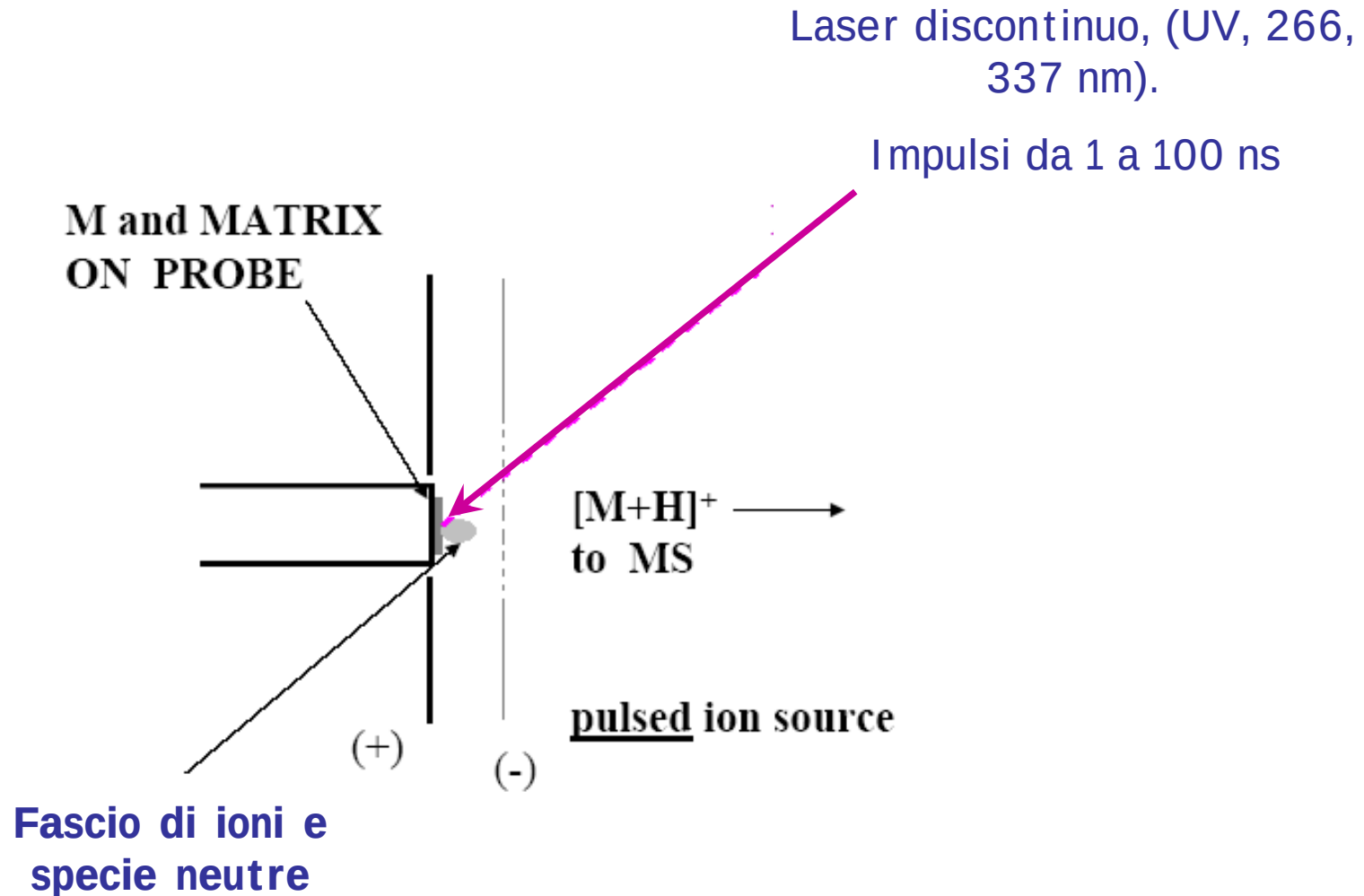


MALDI SET UP



In una sorgente MALDI il campione viene miscelato con un eccesso di “matrice” (solitamente un acido organico) e depositato su di una piastra che viene inserita in una camera sotto vuoto e bombardata con un laser. Una fotocamera consente di dirigere il raggio laser sul campione cristallizzato che darà origine ad un fascio di ioni

Schema del Processo di Ionizzazione MALDI



Matrix Assisted Laser Desorption Ionization

La matrice ha il ruolo di promuovere la ionizzazione delle molecole dell'analita probabilmente mediante la propria fotoeccitazione o fotoionizzazione e successivo trasferimento di protoni all'analita.

Le molecole della matrice assorbono energia dal laser e la trasformano in energia di eccitazione del sistema, determinando una transizione alla fase gassosa di piccoli strati di molecole.

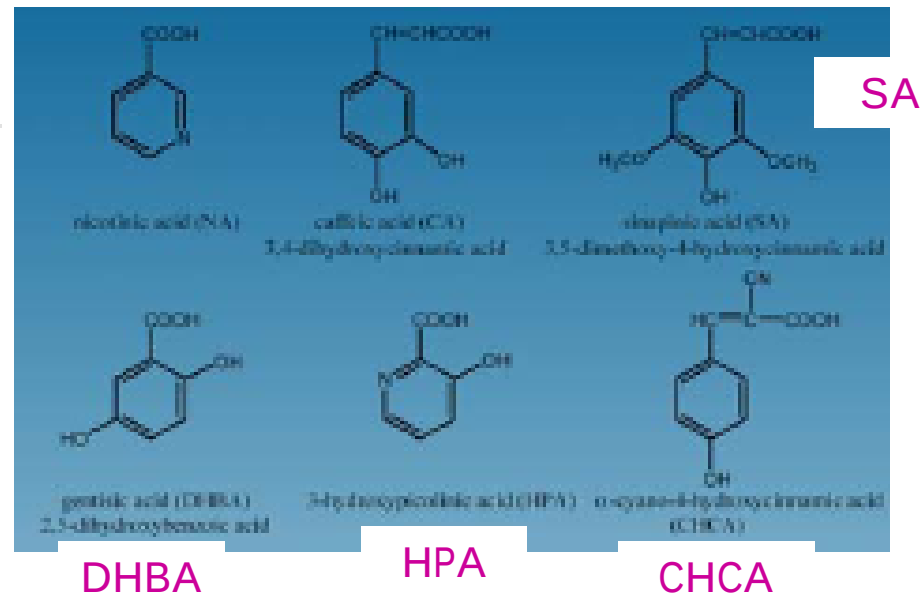
Common matrix compounds

SA – used for proteins >10kDa

CHCA – used for peptides and proteins <10,000 Da

DHBA – carbohydrates, small organics

HPA – oligonucleotides

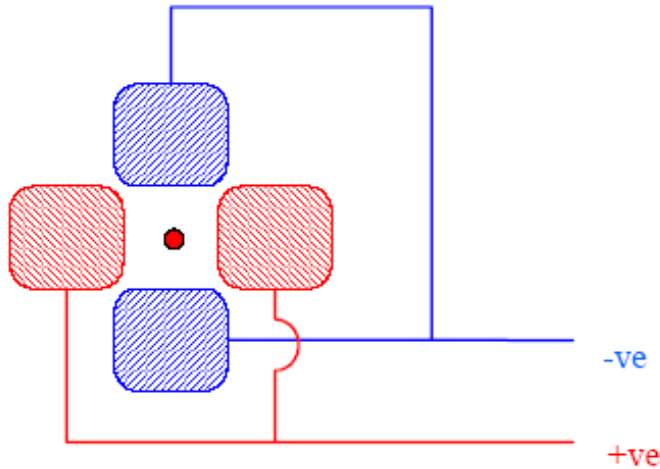


Generalmente la ionizzazione in sorgente MALDI produce ioni MH^+

Analizzatori di massa

- ✓ **Settore magnetico**
- ✓ **Tempo di volo**
- ✓ **Quadrupolo**
- ✓ **Trappola ionica**

Quadrupolo

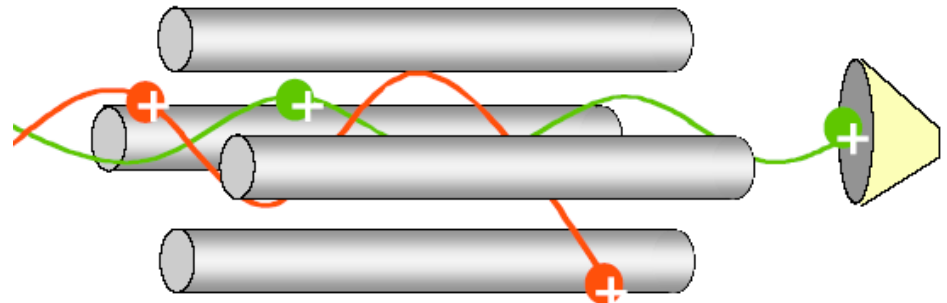


Un quadrupolo consiste di quattro barre parallele.
Barre opposte hanno la stessa polarità, barre adiacenti polarità opposta.

Ad ogni barra sono applicati voltaggi continui (DC) e in radiofrequenza (RF).

Per ogni combinazione di DC e RF solo ioni con uno specifico rapporto m/z avranno una traiettoria stabile e saranno in grado di attraversare il quadrupolo e raggiungere il rivelatore.

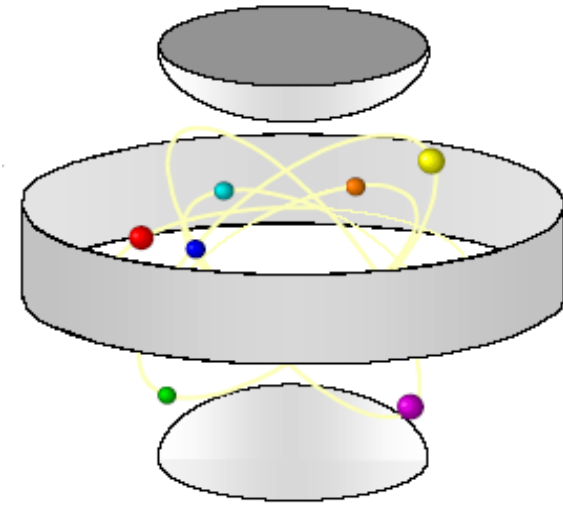
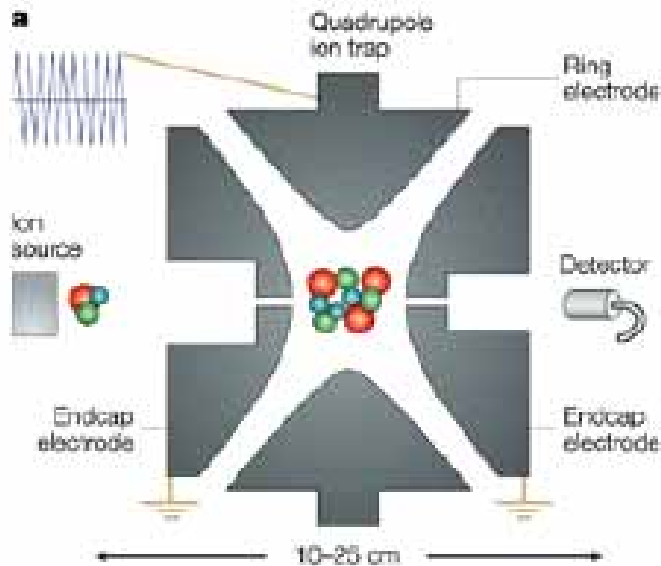
Uno spettro di massa si ottiene seguendo gli ioni che passano attraverso il quadrupolo al variare dei voltaggi applicati.



The ● ion is transmitted along the quadrupole in a stable trajectory Rf field. The ● ion does not have a stable trajectory and is ejected from the quadrupole.

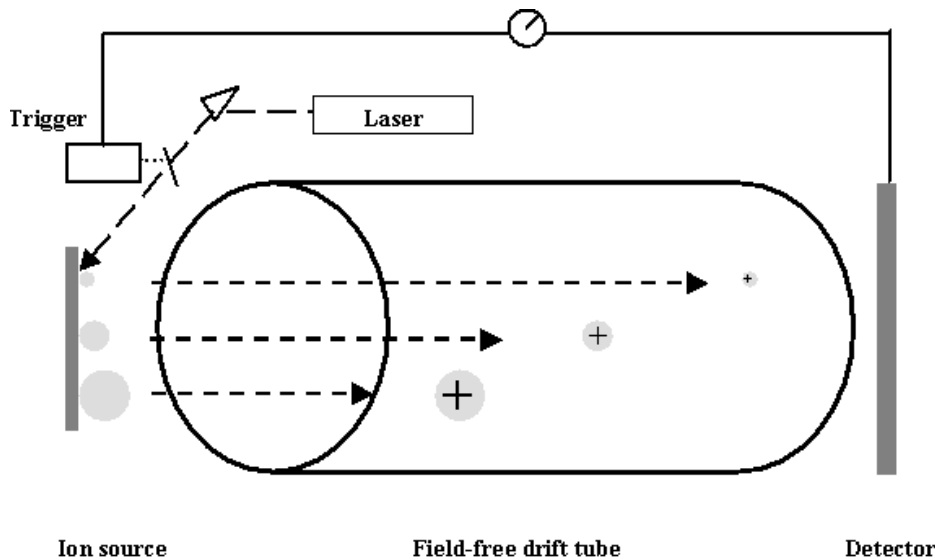
Trappola ionica

Consiste di un elettrodo ad anello e due elettrodi a semisfera, che vengono utilizzati per “intrappolare” gli ioni prodotti in sorgente.



Lo spettro di massa si ottiene variando i valori di RF a DC applicati agli elettrodi, in modo da “espellere” dalla trappola ioni con uno specifico rapporto m/z

TOF- Time of Flight



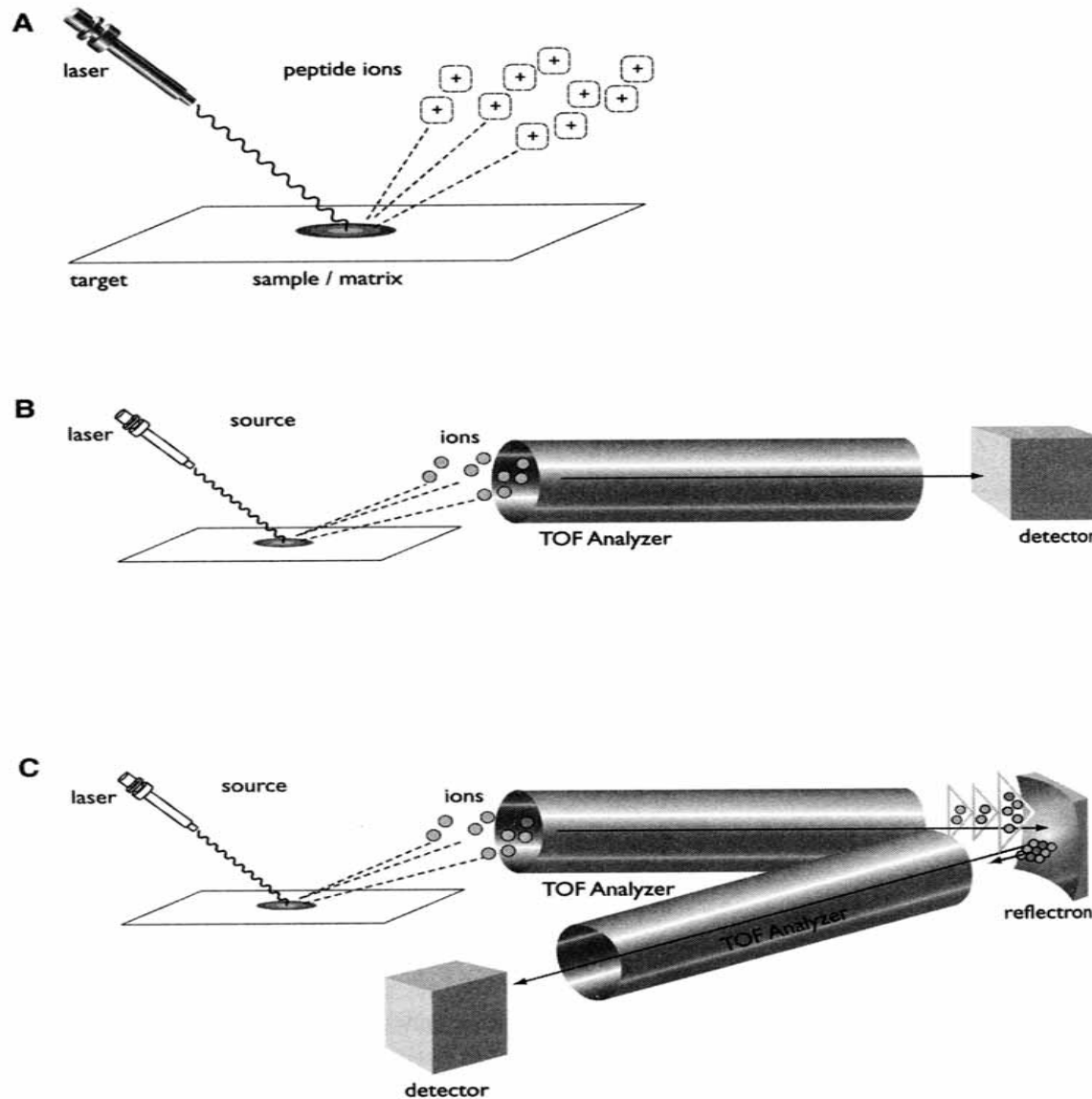
Il TOF sfrutta il diverso tempo impiegato da specie con massa diversa per attraversare un “tubo di volo” e raggiungere il rivelatore

Un campo elettrico accelera tutti gli ioni prodotti in sorgente fornendo loro la stessa energia.

Dato che gli ioni hanno sì la stessa energia, ma masse differenti, le specie leggere e pesanti raggiungeranno il rivelatore in tempi diversi

La massa viene determinata in base al tempo impiegato dagli ioni per raggiungere il rivelatore.

Un comune accoppiamento sorgente-analizzatore è il MALDI-TOF



Spettrometria di Massa “TANDEM”

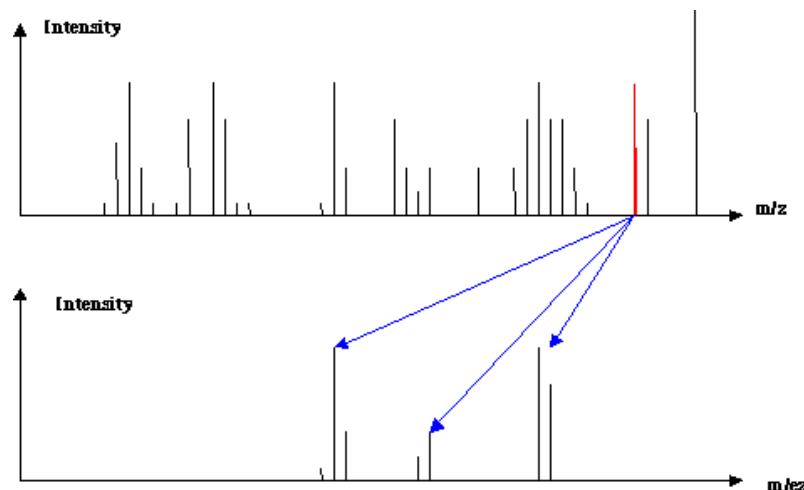
Due analisi per spettrometria di massa condotti in “tandem” (MS/MS)

Ioni, selezionati in base al rapporto m/z vengono “isolati” in una cella di collisione, dove sono sottoposti a frammentazione, generalmente per collisione con gas inerte.

L'energia cinetica viene trasformata in energia interna che determina la frammentazione dello ione “parente” in ioni “figlia”.

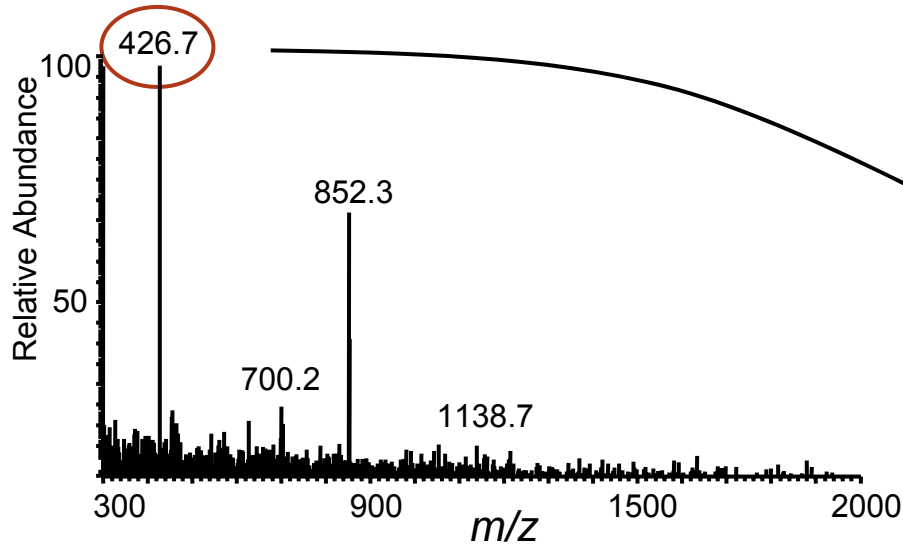


Gli ioni “figlia” generati sono quindi analizzati in un secondo analizzatore



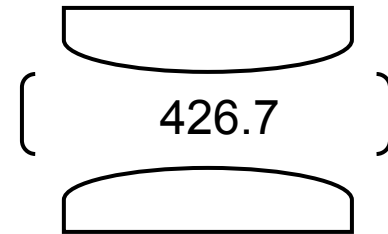
Tandem Mass Spectrometry in an Ion Trap

1) Measure Full Spectrum

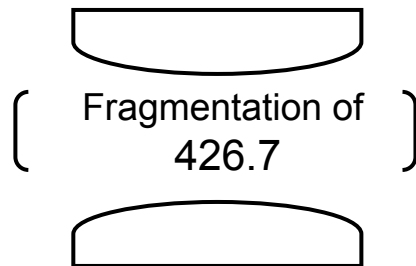


2) Ion Isolation:

e.g., Precursor m/z 426.7 ± 1.5



3) Add Collision Energy

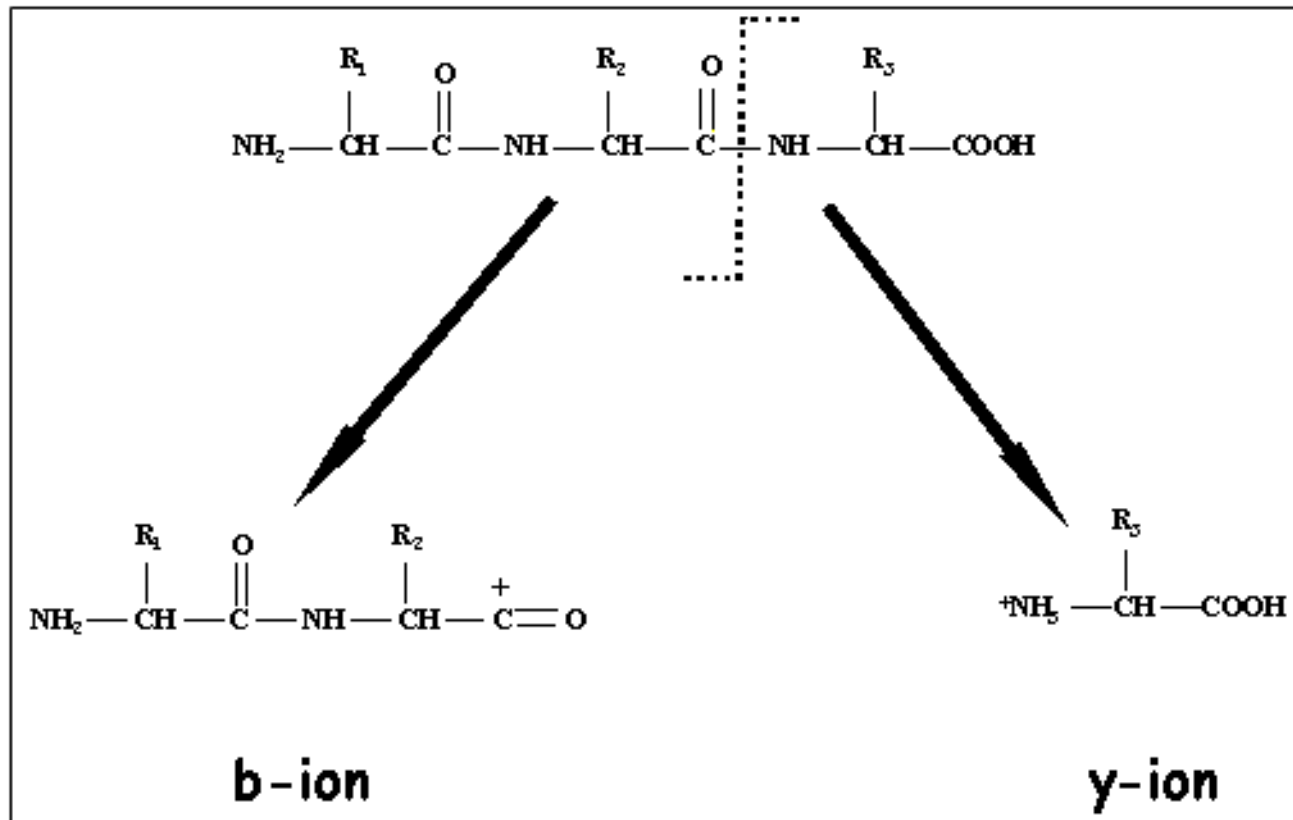


4) Measure m/z of Fragment Ions

[For Peptide SLNVALR]

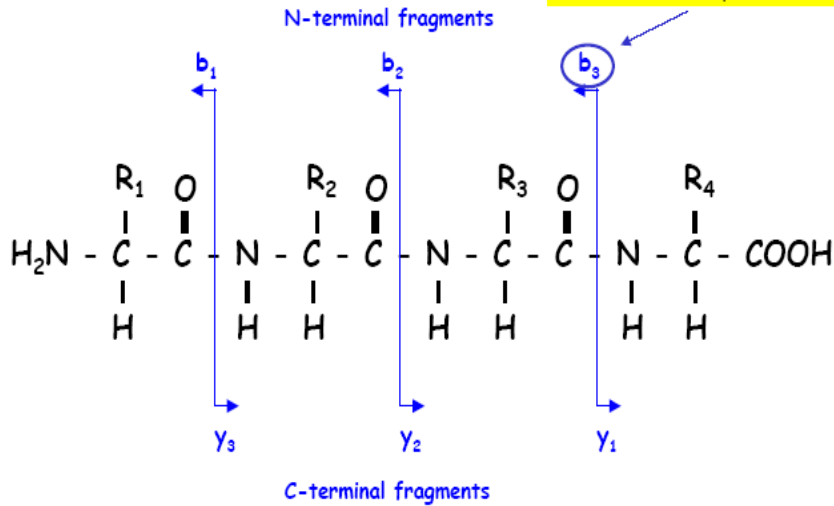
SLNVAL	R
SLNVA	LR
SLNV	ALR
SLN	VALR
SL	NVALR
S	LNVALR

Sulla base di regole generali di frammentazione, è possibile ottenere informazioni sulla struttura delle molecole in esame

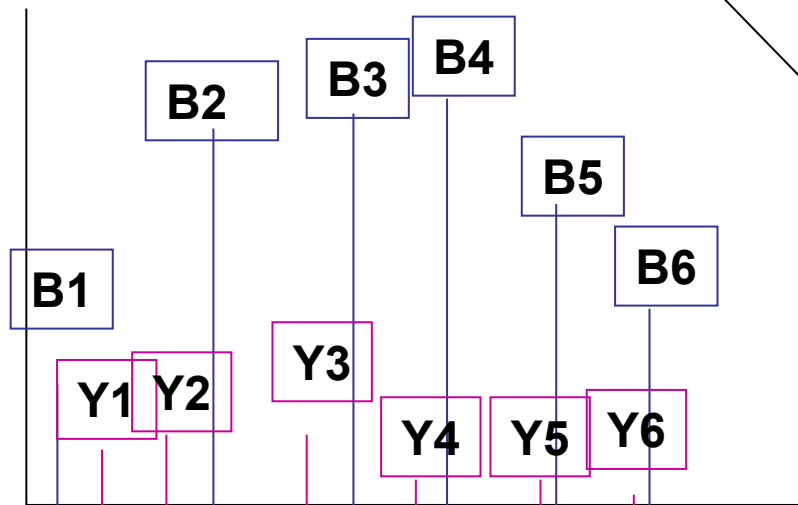


È possibile ricostruire la sequenza di peptidi

subscript denotes the number of residues contained in product ion



NH_3^+ -Gly-Leu-Asp-Pro-Trp-Tyr-Arg⁺-CO₂H



NH_3^+ -Gly

-Leu-Asp-Pro-Trp-Tyr-Arg⁺-CO₂H

NH_3^+ -Gly-Leu

-Asp-Pro-Trp-Tyr-Arg⁺-CO₂H

NH_3^+ -Gly-Leu-Asp

-Pro-Trp-Tyr-Arg⁺-CO₂H

NH_3^+ -Gly-Leu-Asp-Pro

-Trp-Tyr-Arg⁺-CO₂H

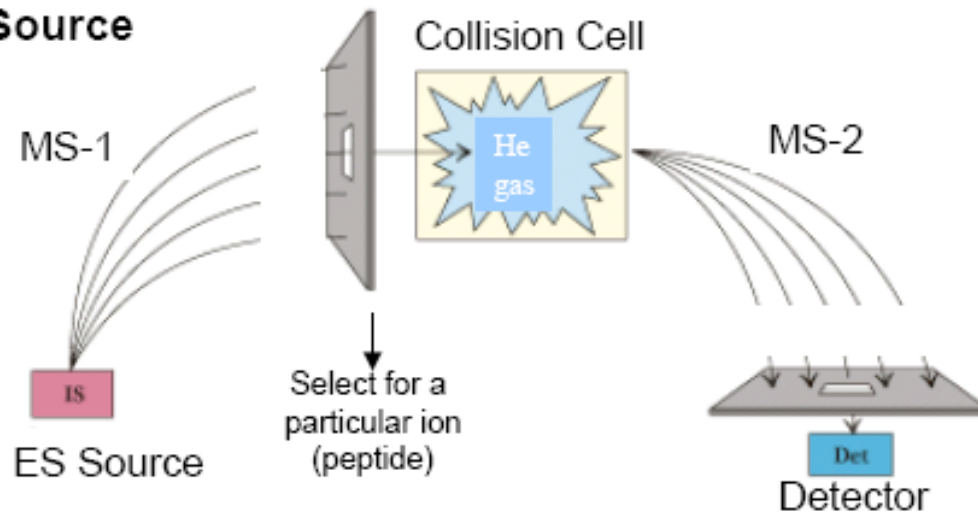
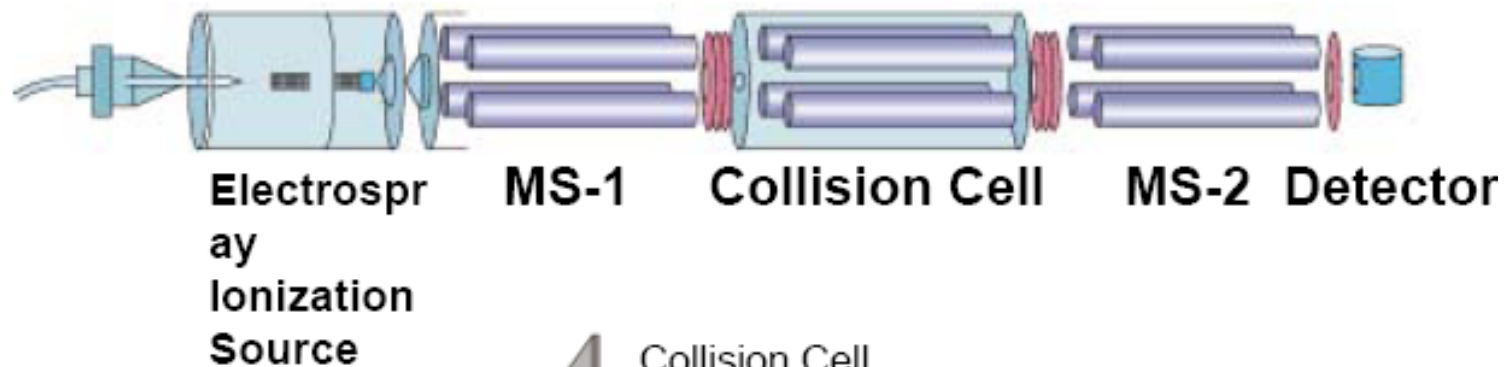
NH_3^+ -Gly-Leu-Asp-Pro-Trp

-Tyr-Arg⁺-CO₂H

NH_3^+ -Gly-Leu-Asp-Pro-Trp-Tyr

-Arg⁺-CO₂H

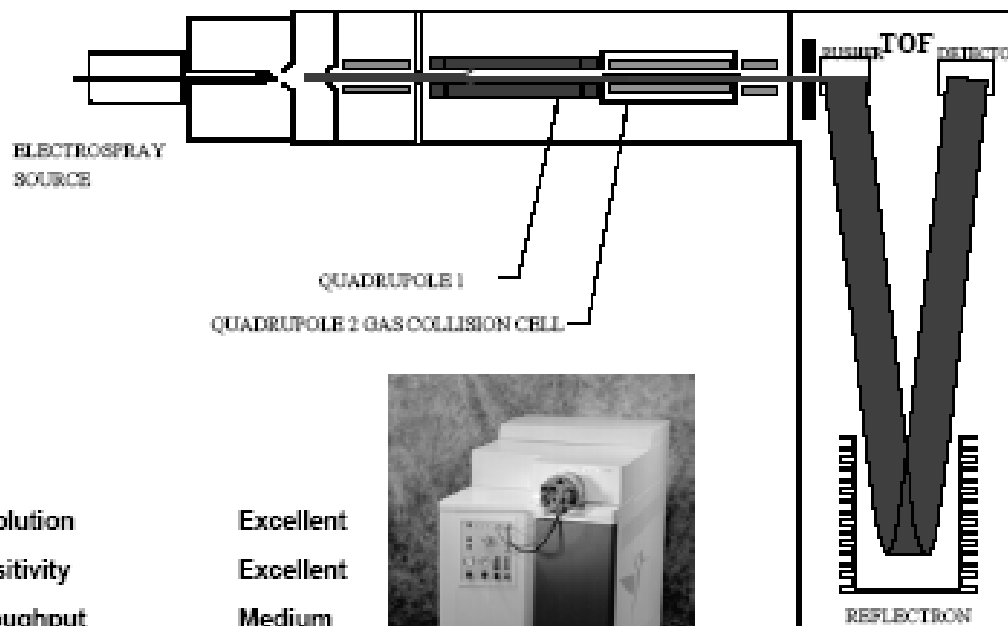
ESI-Tandem MS



Input: peptides from enzymatic digest

Output: fragments from daughter

Q-ToF™ High Resolution MS-MS



Resolution	Excellent
Sensitivity	Excellent
Throughput	Medium
Sequencing Capability	Excellent

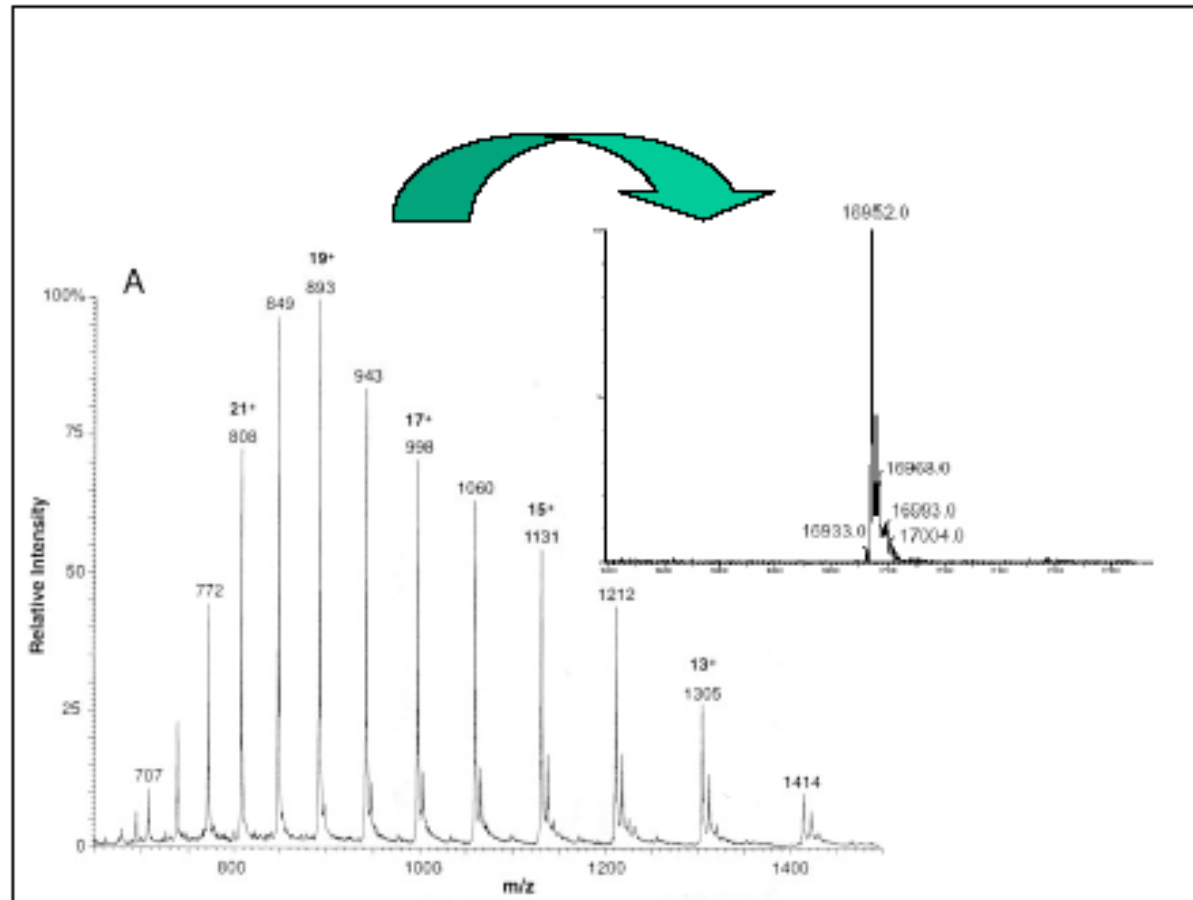


A cosa può servire la spettrometria di massa?

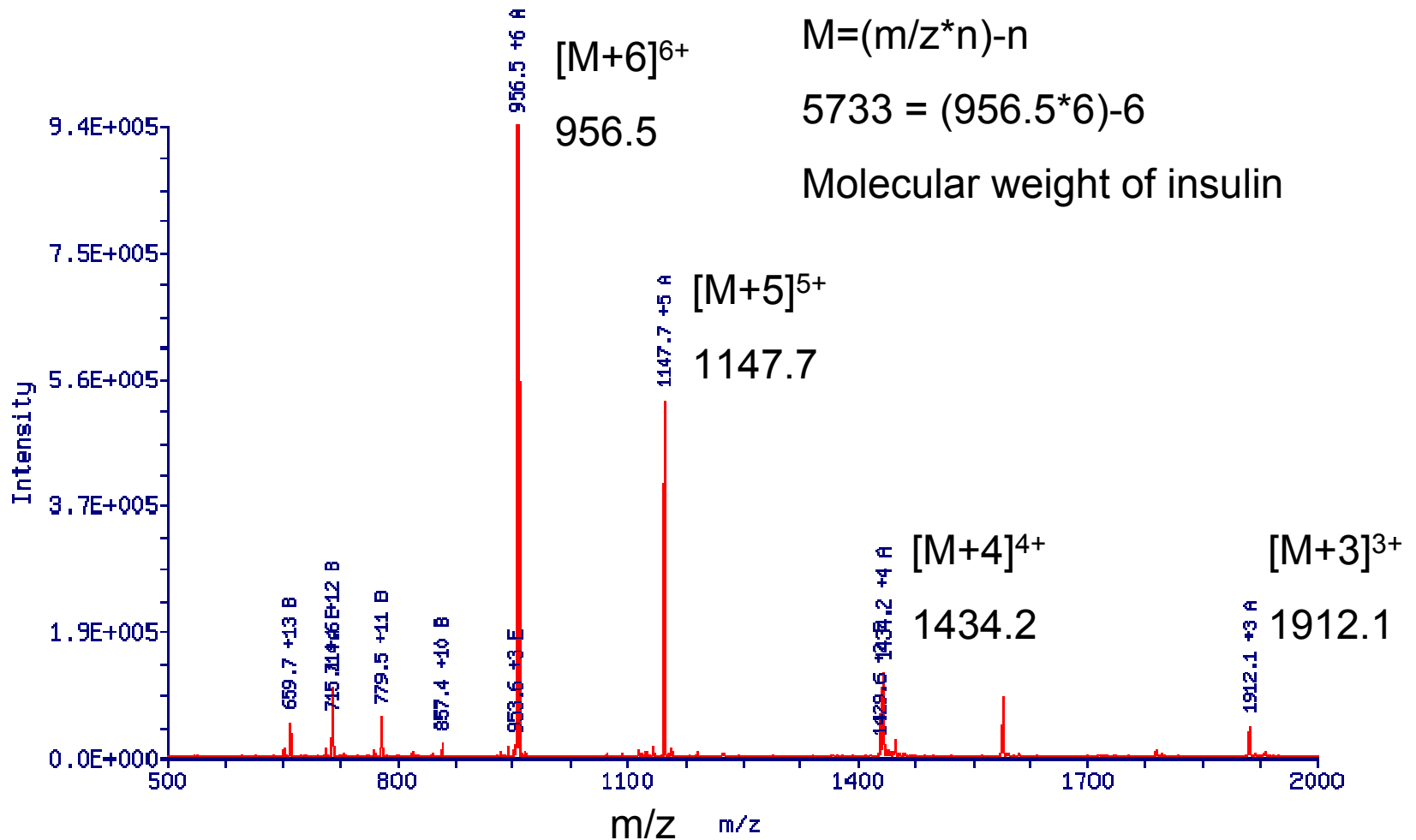
- ✓ Controllo di qualità di proteine ricombinanti.
- ✓ Determinare la mappa peptidica
- ✓ Determinare mutazioni sito-specifiche
- ✓ Identificare e localizzare modifiche post-traduzionali
- ✓ Identificare proteine.
- ✓ Analisi conformazionale
- ✓ Etc.....

.....proteomica

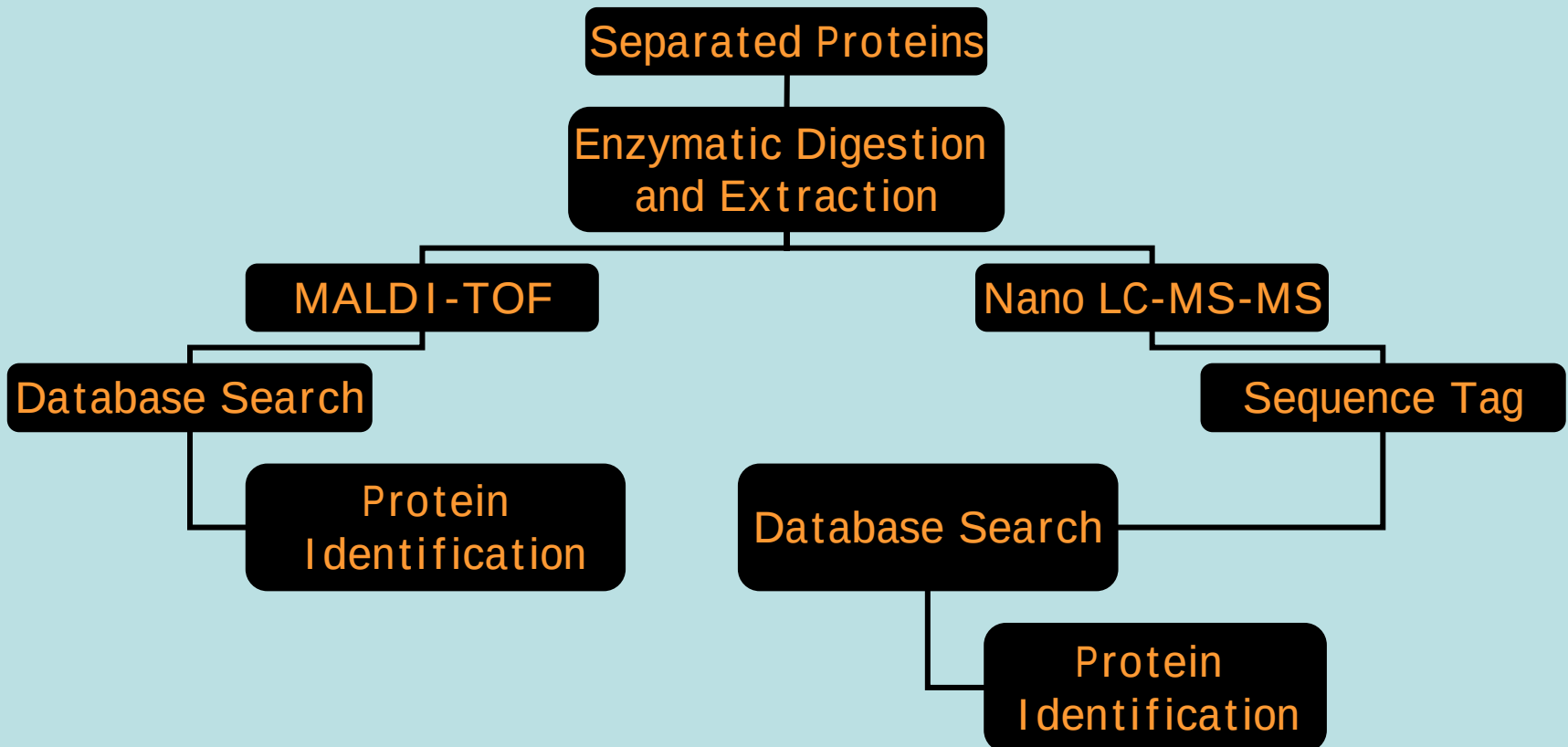
Un semplice spettro electrospray è in grado di confermare la corretta sintesi del prodotto ricombinante



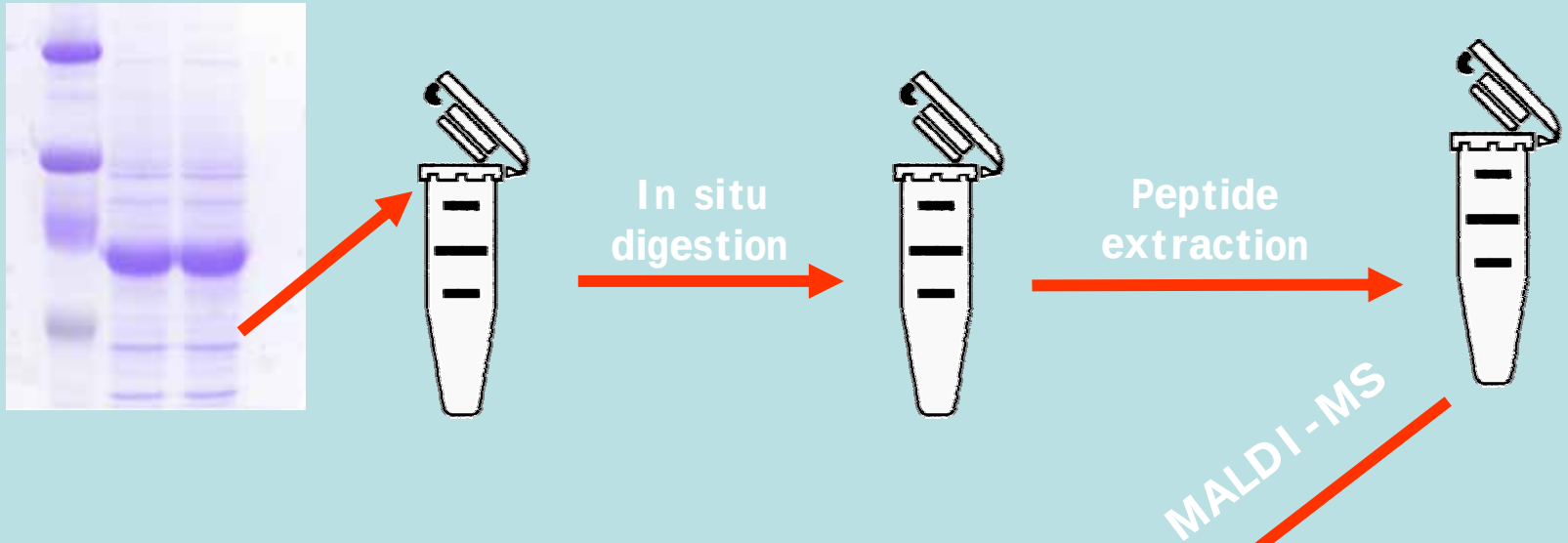
ESI spectrum of Insulin



Protein Identification Experiment

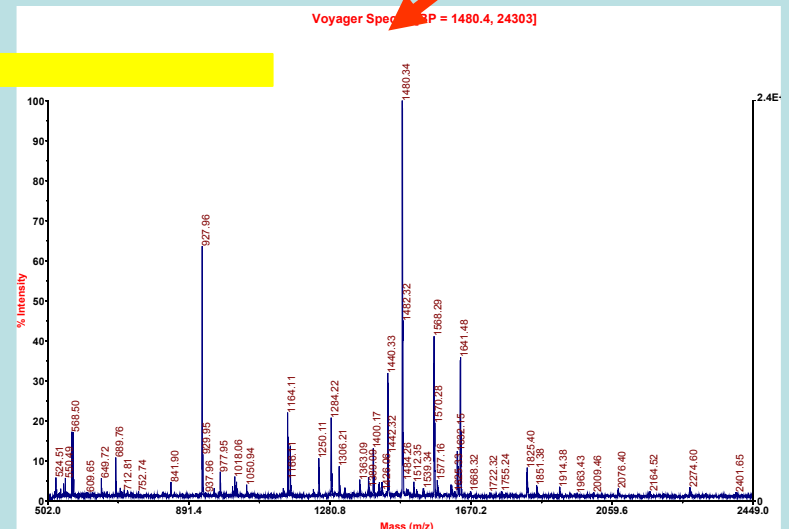


Protein identification

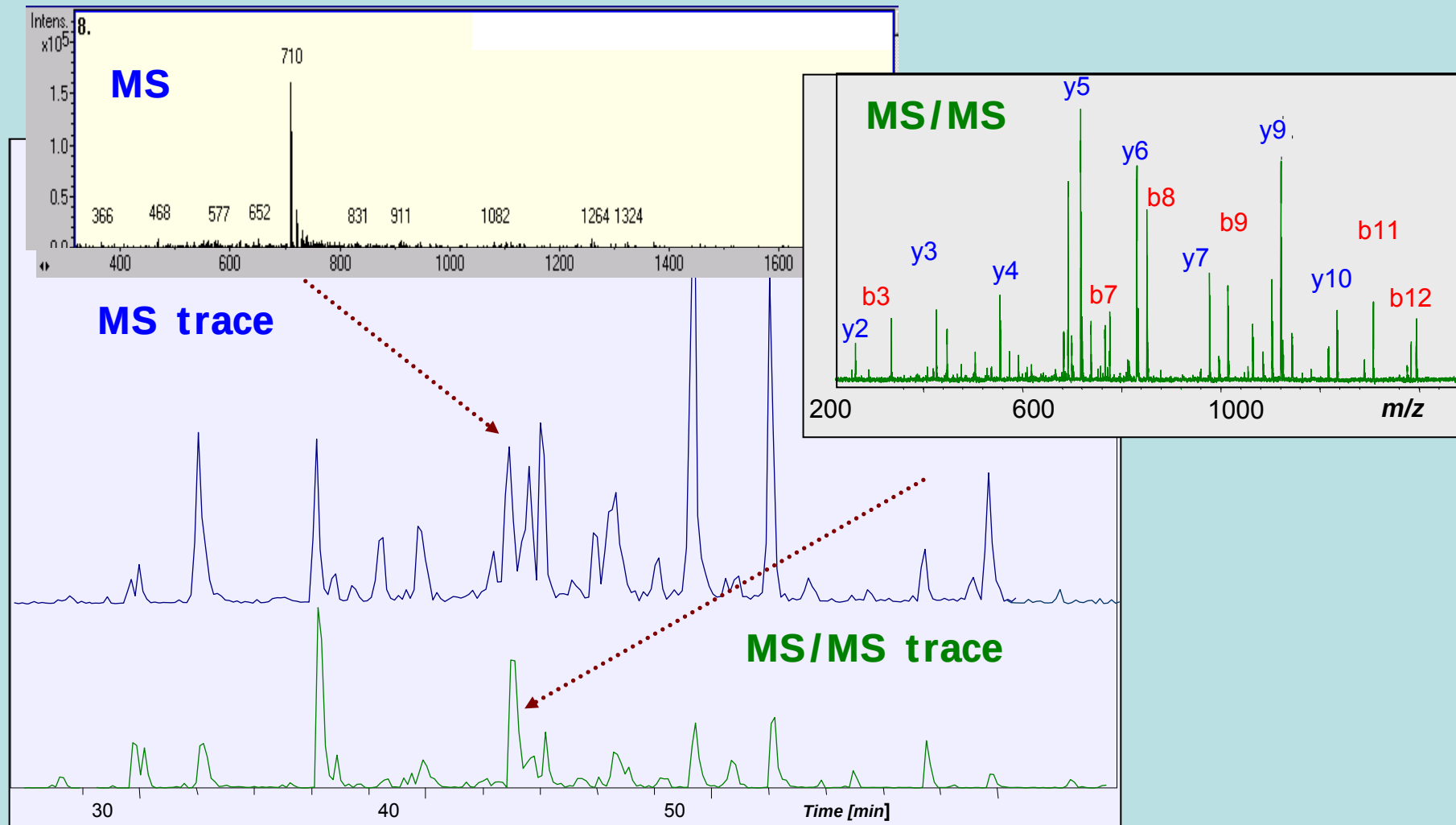


Protein Candidates for search C164867D-03F8-3A3A52F8 [52238 sequences searched]

Rank	Probability	Est'd Z	Protein Information and Sequence Analyse Tools (T)	% pI	kDa	®
1	1.0e+000	2.20	Tgi119120.sp P07896 EHP RAT PEROXISOMAL BIFUNCTIONAL ENZYME (PBE) (PBFE) [INCLUDES: ENOYL-COA HYDRATASE ; 3,2-TRANS- ENOYL-COA ISOMERASE ; 3-HYDROXYACYL-COA DEHYDROGENASE]	32	9.5	79.21
2	1.9e-007	-	Tgi7804953.gb AAF70194.1 (AF251798) adenosine 5'-phosphosulfate kinase/ATP sulfurylase 2 [Cavia porcellus]	27	7.4	70.76

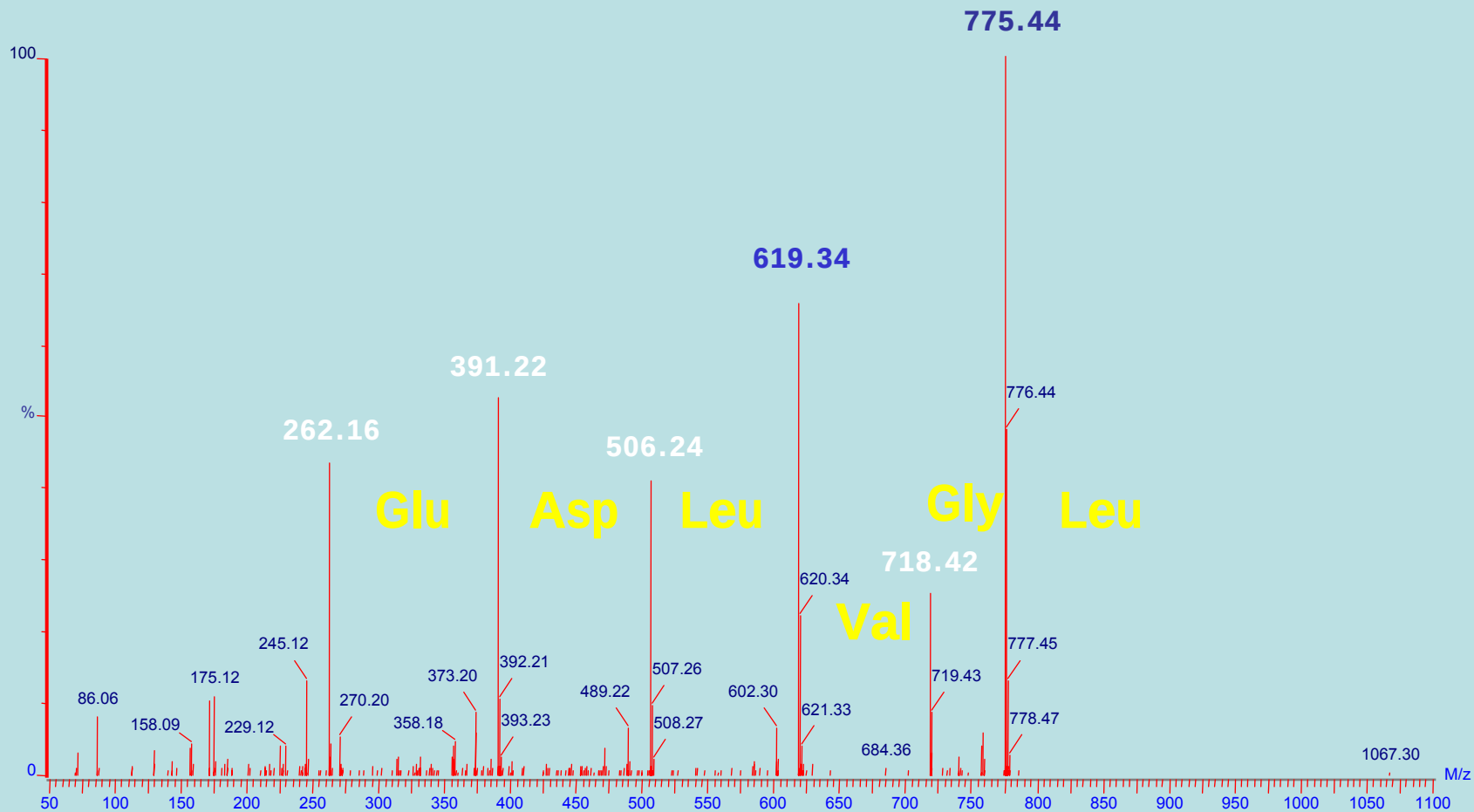


LC MS/MS ANALYSIS



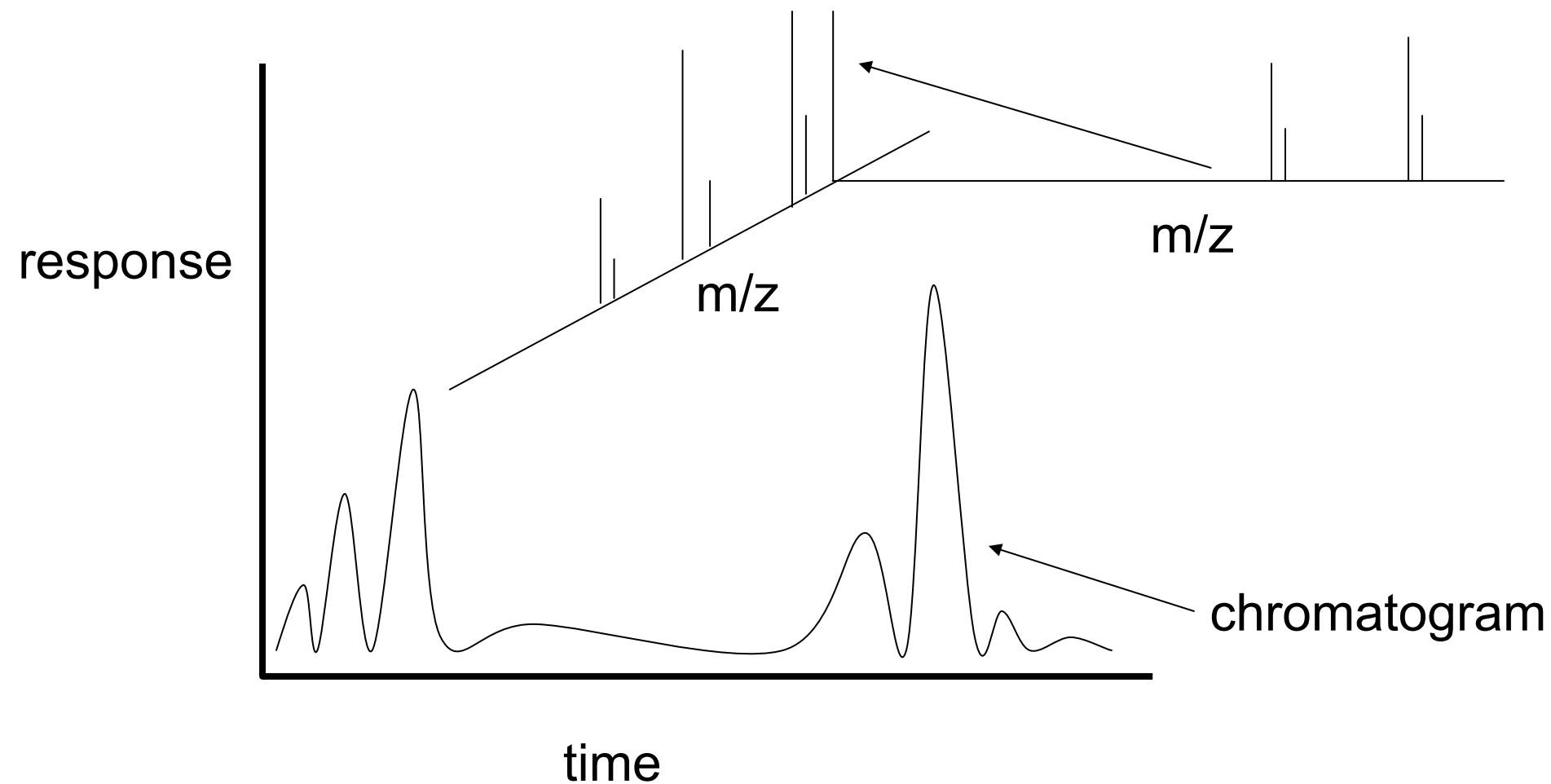
100 fmol BSA injected on column. BPC of m/z 300-2200, and typical MS/MS spectrum (right inset).

MS/MS 444.71

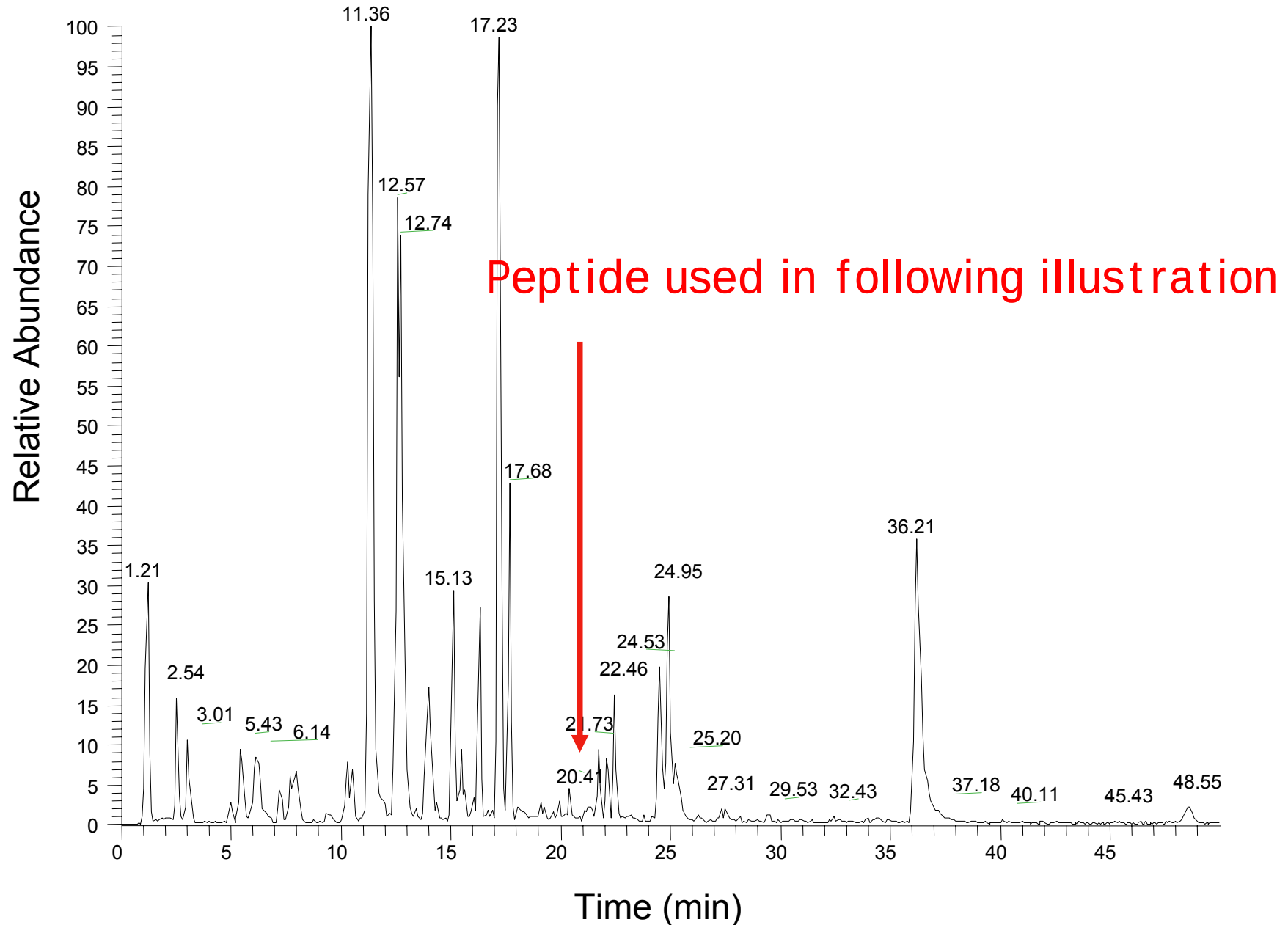


Leu - Gly - Val - Asp - Glu -

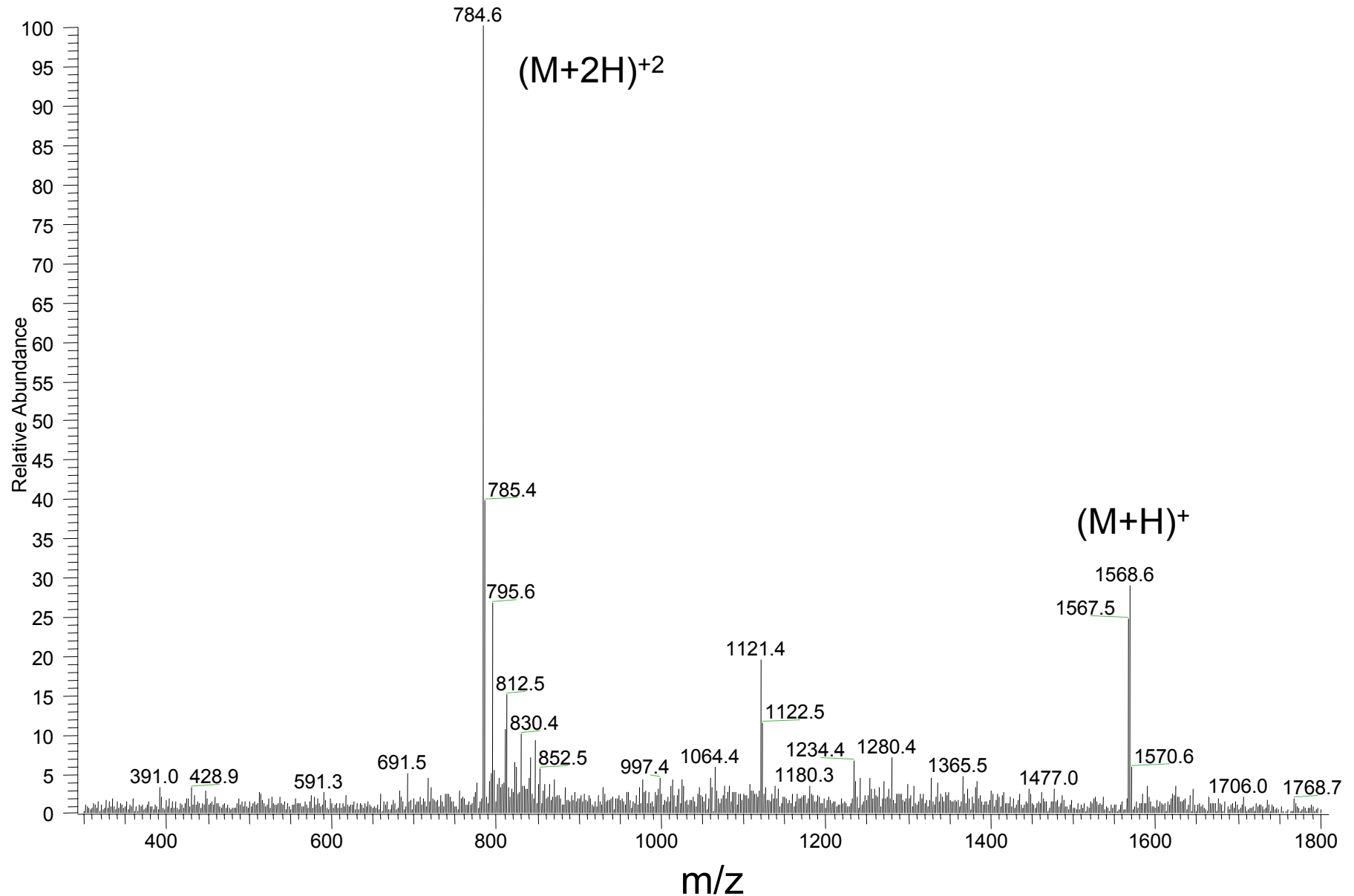
HPLC-MS-MS



RP-HPLC Separation of a Tryptic Digest of BSA

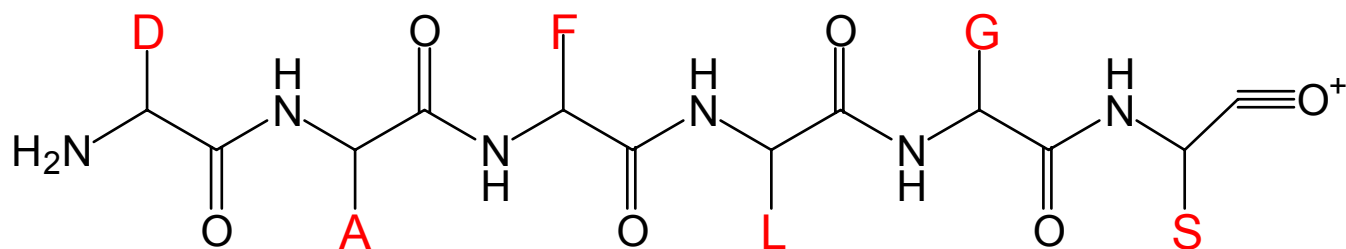
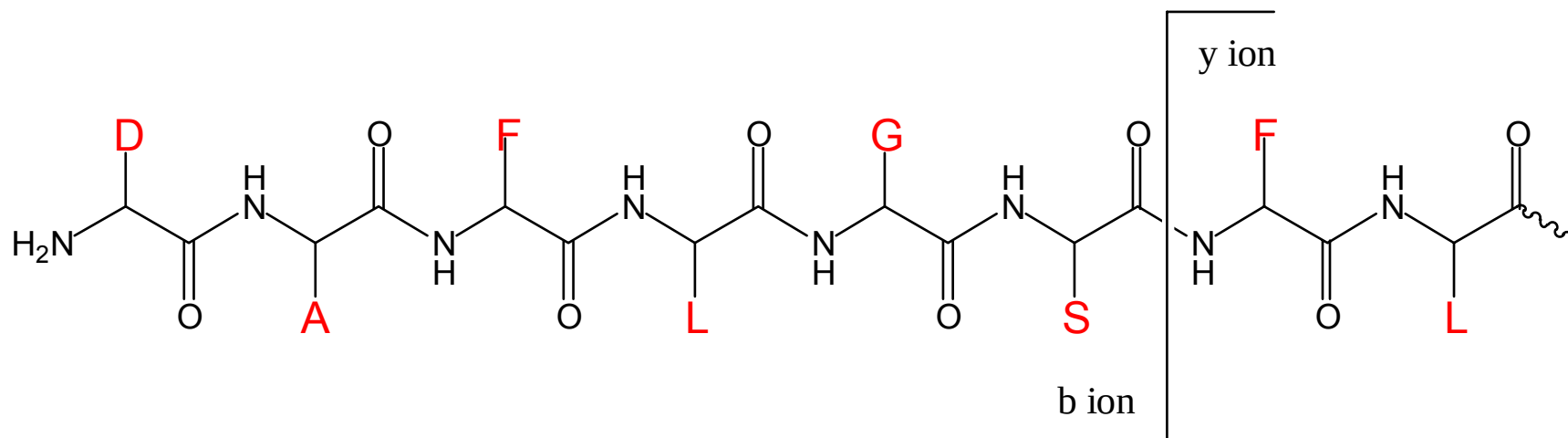


Mass Spectrum of a Tryptic Peptide from BSA



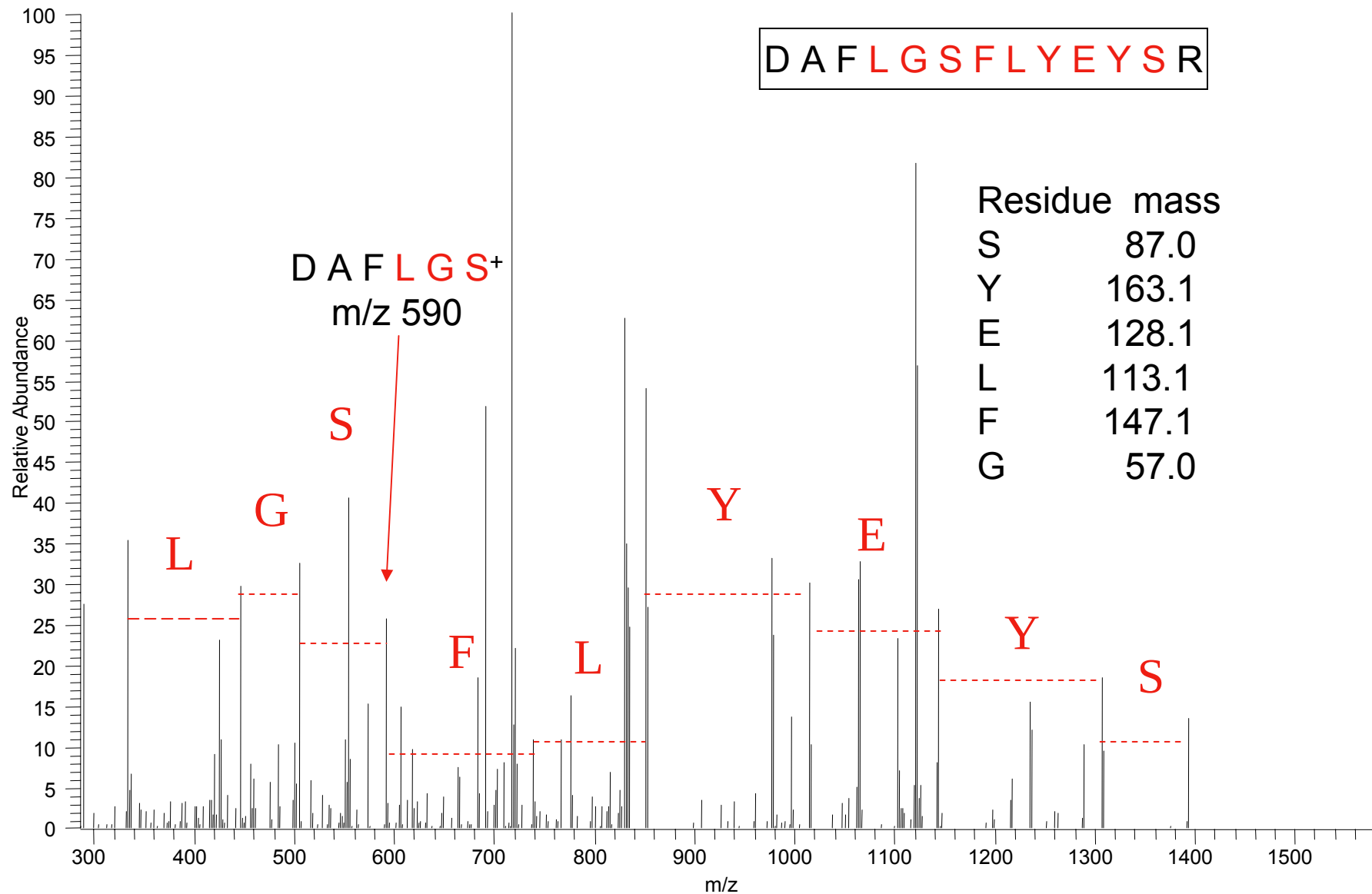
N term $\longrightarrow$ C term

DAFLGSFLYEYSR

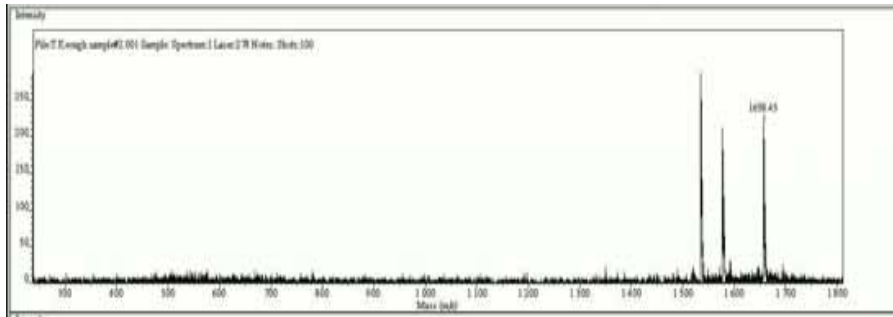
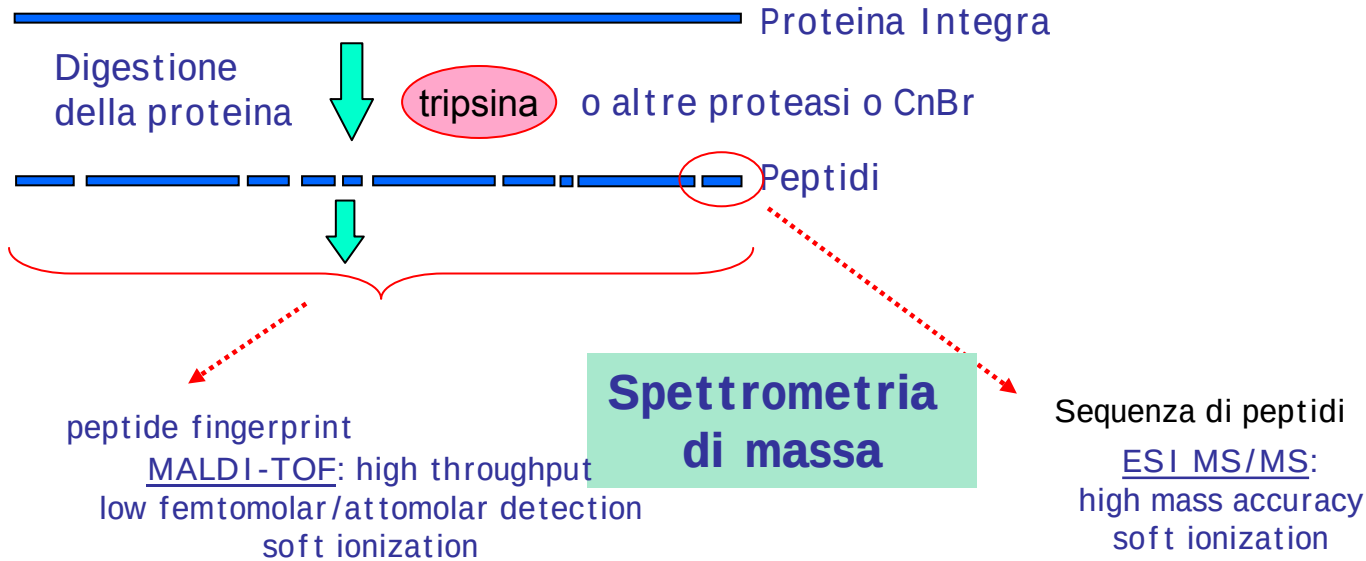


b ion
(m/z 590)

MS-MS Spectrum



Protein Sequencing and Identification



Lista delle masse dei peptidi

Mw Teorici



EAI/LFNGEEGSQ

Sequenza di Peptidi



**Verifica della sequenza
e/o
ricerca in banca dati**

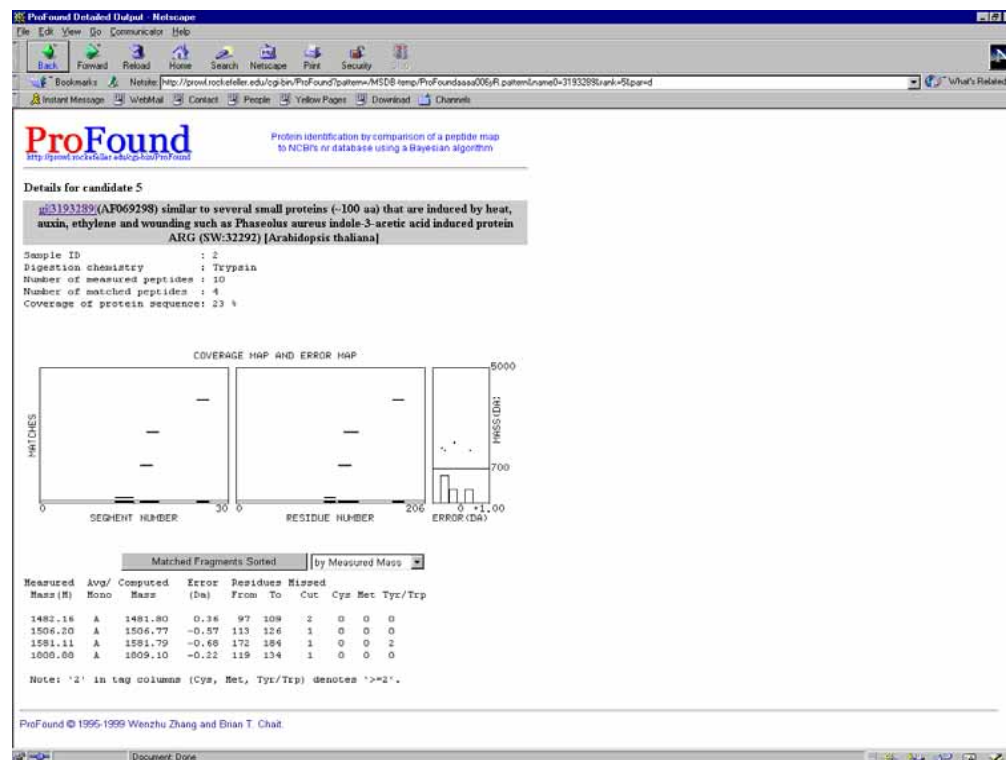
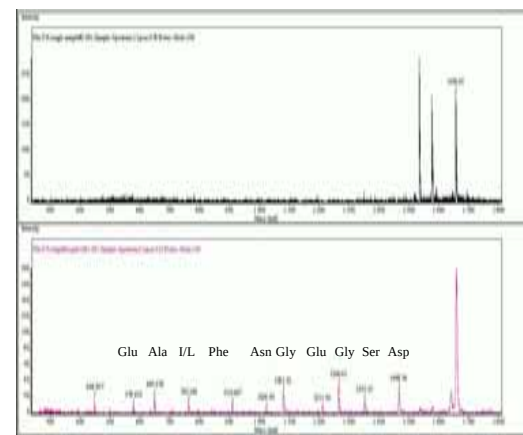
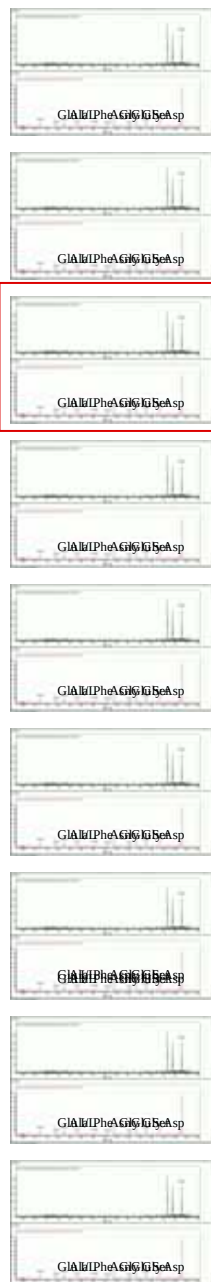


“Spettri teorici”

Spettri MS e/o MS/MS

Banca Dati di sequenze

- DNA genomico
- EST



Modifiche Post-traduzionali

- ✓ Importanti elementi per la funzione biologica delle proteine
- ✓ Modifiche covalenti della proteina



Variazioni del peso molecolare

Alcune modifiche post-traduzionali evidenziabili con la spettrometria di massa

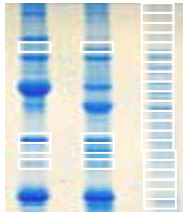
- ✓ *Processing proteolitico*
- ✓ *Glicosilazione* (Asn, Thr, or Ser)
- ✓ *Fosforilazione* (Ser, Thr, Tyr)
- ✓ *Ossidrilazione* (Pro, Lys)
- ✓ *Acetilazione* (N-terminale, gruppo ϵ -amminico di Lys)
- ✓ *N-metilazione* (Lys, Arg, His)
- ✓ *Carbossilazione* (Glu, Asp)
- ✓ *Solfonazione* (Tyr)
- ✓ *Amidazione* (C-terminale)

Variazioni di Massa per Modifiche Posttraduzionali

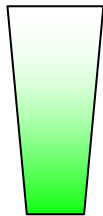
ΔM	Modifica
-2.0	Formazione di un ponte disolfurico
+14.0	Metilazione
+16.0	Ossidrilazione
+28.0	Formilazione
+30.0	Nitrosilazione
+42.0	Acetilazione
+80.0	Solfonazione
+80.1	Fosforilazione
+180	Mono - glicosilazione
+204.4	Farnesilazione
+210.4	Miristoilazione

Per localizzare la modifica post-traduzionale e/o una mutazione sitospecifica

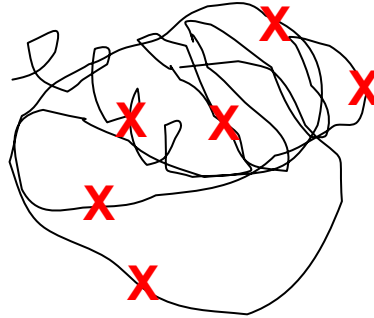
Proteine
In gel



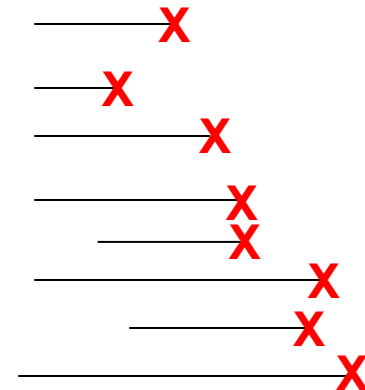
Proteine
In soluzione



Digestione delle
Proteine con una
Proteasi specifica



Peptidi

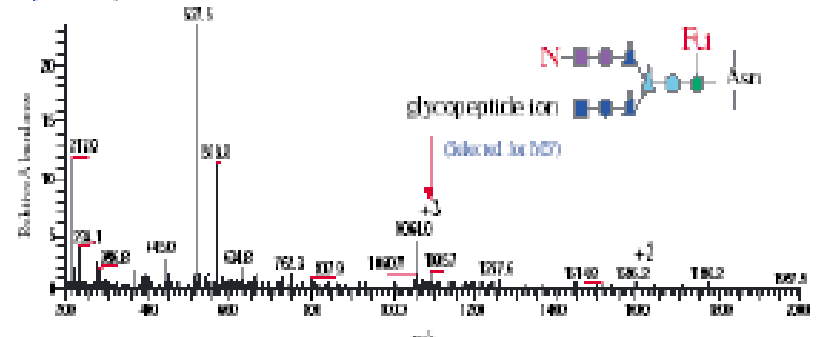


Analisi della miscela via MALDI-TOF o
LC-ESI MS/MS



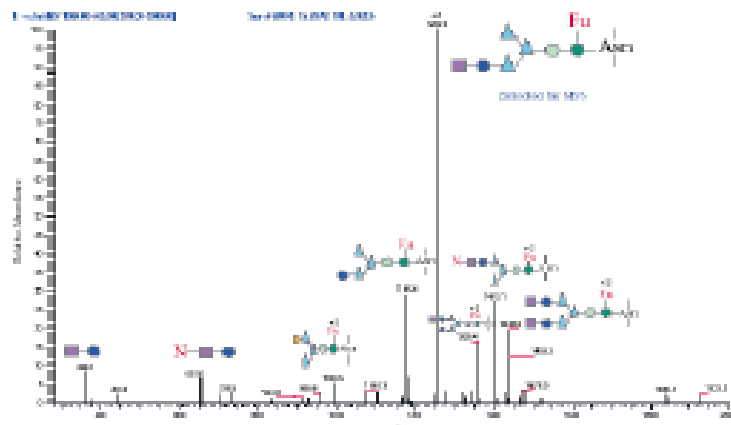
1+chitin (2000-2000.00)

2+chitin (11:15.57 1628.16:12.08)



PNGase F

A schematic diagram showing a glycopeptide (a chain of colored circles) being treated with PNGase F. A pink arrow points from the glycopeptide to the right, indicating the direction of the treatment.



MALDI/MS

