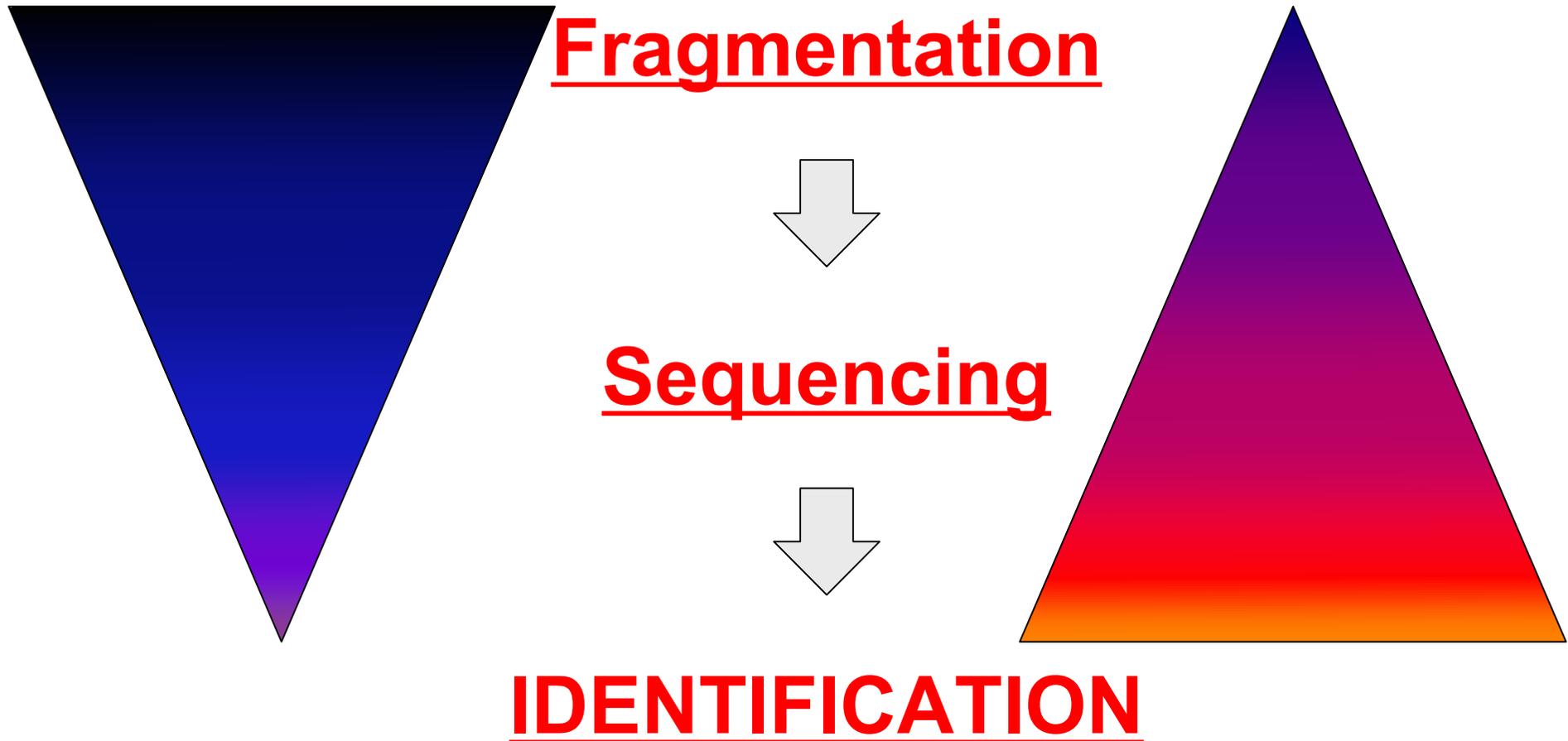


# BOTTOM-UP vs TOP-DOWN protein identification strategies

Peptides

- MS/MS -

Protein



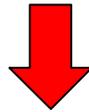
Essenziale per il processo d'identificazione mediante MS è la capacità di frammentare le proteine o i peptidi in modo da riuscire ad ottenere informazioni strutturali, ovvero dati relativi alla loro sequenza amminoacidica.

# STRATEGIE di FRAMMENTAZIONE



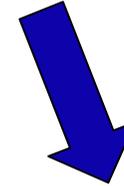
**ECD**

**Electron Capture Dissociation**



**ETD**

**Electron Transfer Dissociation**



**CID or CAD**

**Collision Induced Dissociation  
or  
Collision Activated Dissociation**

# TANDEM MASS SPECTROMETRY

## -informazioni strutturali sulle molecole-

**Trappole ioniche tridimensionali**

} Frammentazione nel **TEMPO** – isolamento successivo di ioni e loro frammentazione => MS<sup>n</sup>

**QqQ** – Tripli quadrupoli – 2 Quadrupoli come analizzatori ed uno a funzione di cella di collisione (intermedio)

**TOF-TOF** – Due analizzatori a tempo di volo in serie a cui si frappono una cella di collisione.

**QqLIT** – Tripli quadrupoli – 2 Quadrupoli come analizzatori, di cui uno può funzionare in modalità LIT ed uno a funzione di cella di collisione (intermedio)

**QqTOF** – Singolo quadrupolo posto in testa ad un TOF ai quali si frappono una cella di collisione

} Frammentazione nello **SPAZIO** – lo ione da sottoporre a frammentazione viene selezionato da un primo analizzatore, frammentato in una cella di collisione e i prodotti analizzati da un altro analizzatore

Nelle sorgenti MALDI, le molecole possono anche subire delle frammentazioni a causa dell'acquisizione di energia, e anche queste rotture possono essere utilizzate per ottenere informazioni strutturali. Questo particolare modalità di frammentazione viene chiamata PSD, post-source decay.

# TANDEM MASS SPECTROMETRY

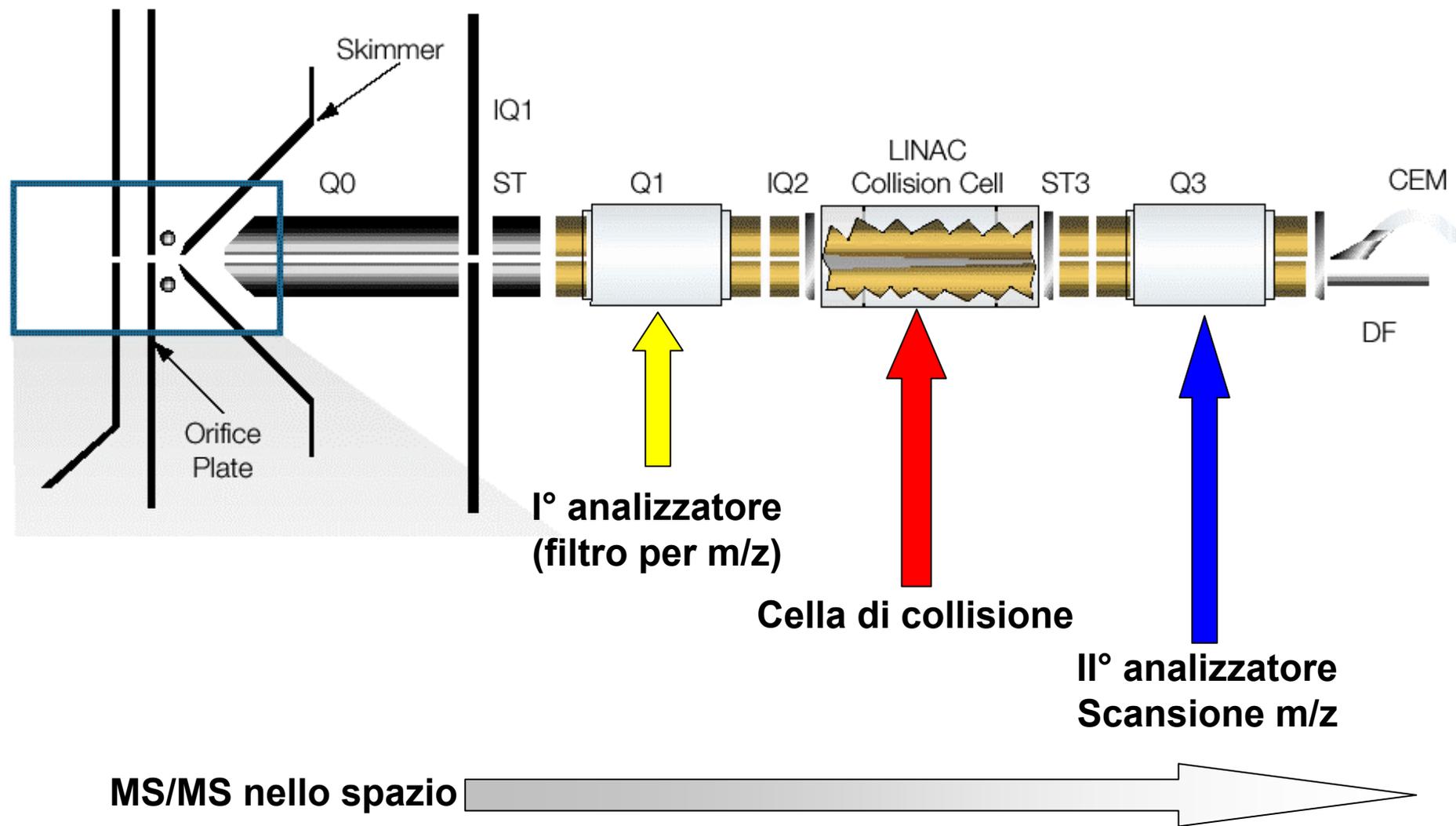
## -informazioni strutturali sulle molecole-

### CELLA di COLLISIONE

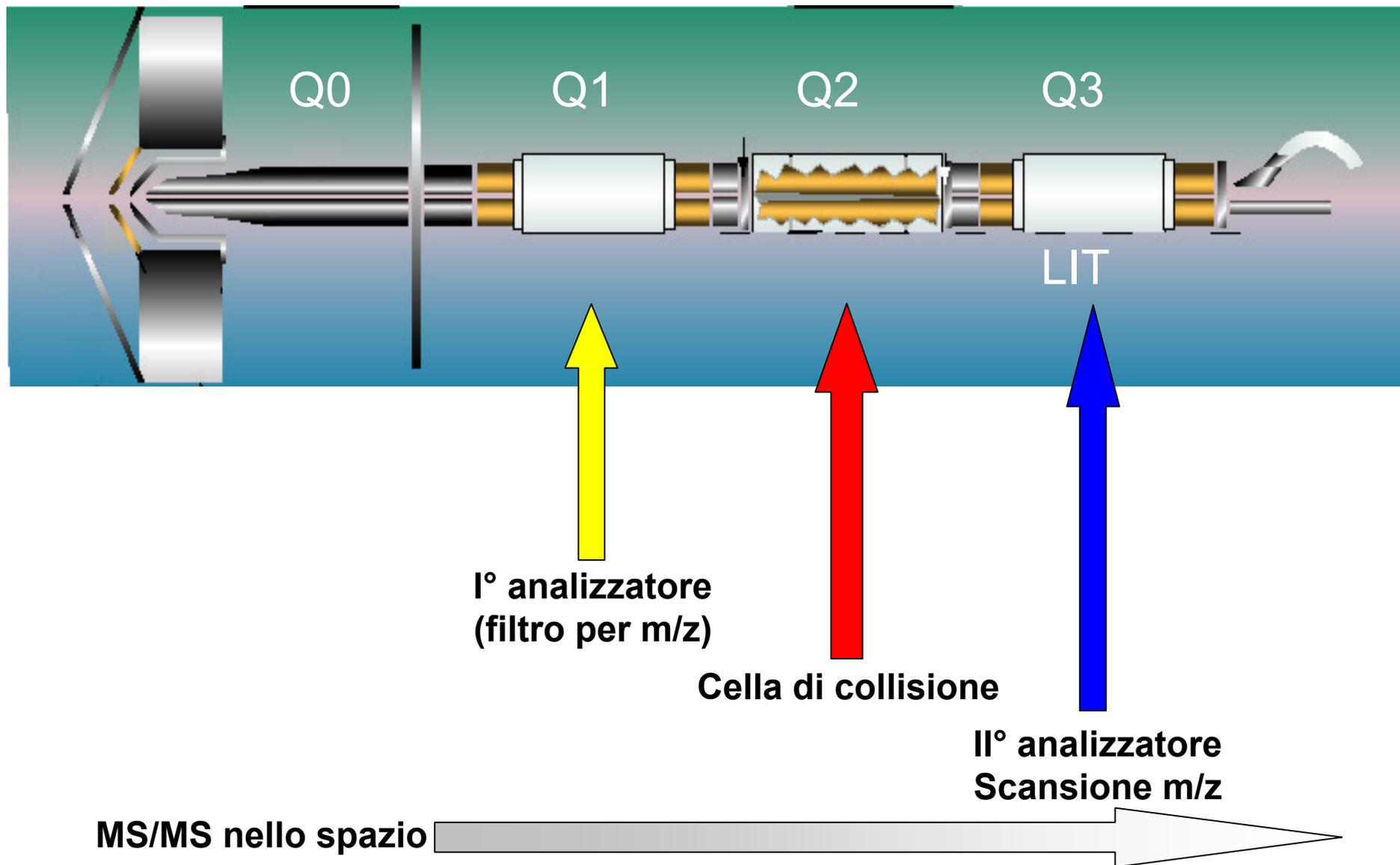
Lo spazio dedicato alla frammentazione

- a) può essere in alcuni casi l'analizzatore stesso (i.e trappole ioniche)
  - b) può essere una porzione a se dello strumento dedicata alla rottura delle molecole
- dai frammenti di una molecola si possono avere informazioni circa la sua struttura
- 1) piccole molecole: certezza circa l'identità – livello di confidenza maggiore rispetto al dato basato esclusivamente sul peso molecolare
  - 2) proteine: informazioni circa la sequenza o la presenza di particolari modificazioni post-traduzionali

# TANDEM MASS SPECTROMETRY - Tripli Quadrupoli QqQ

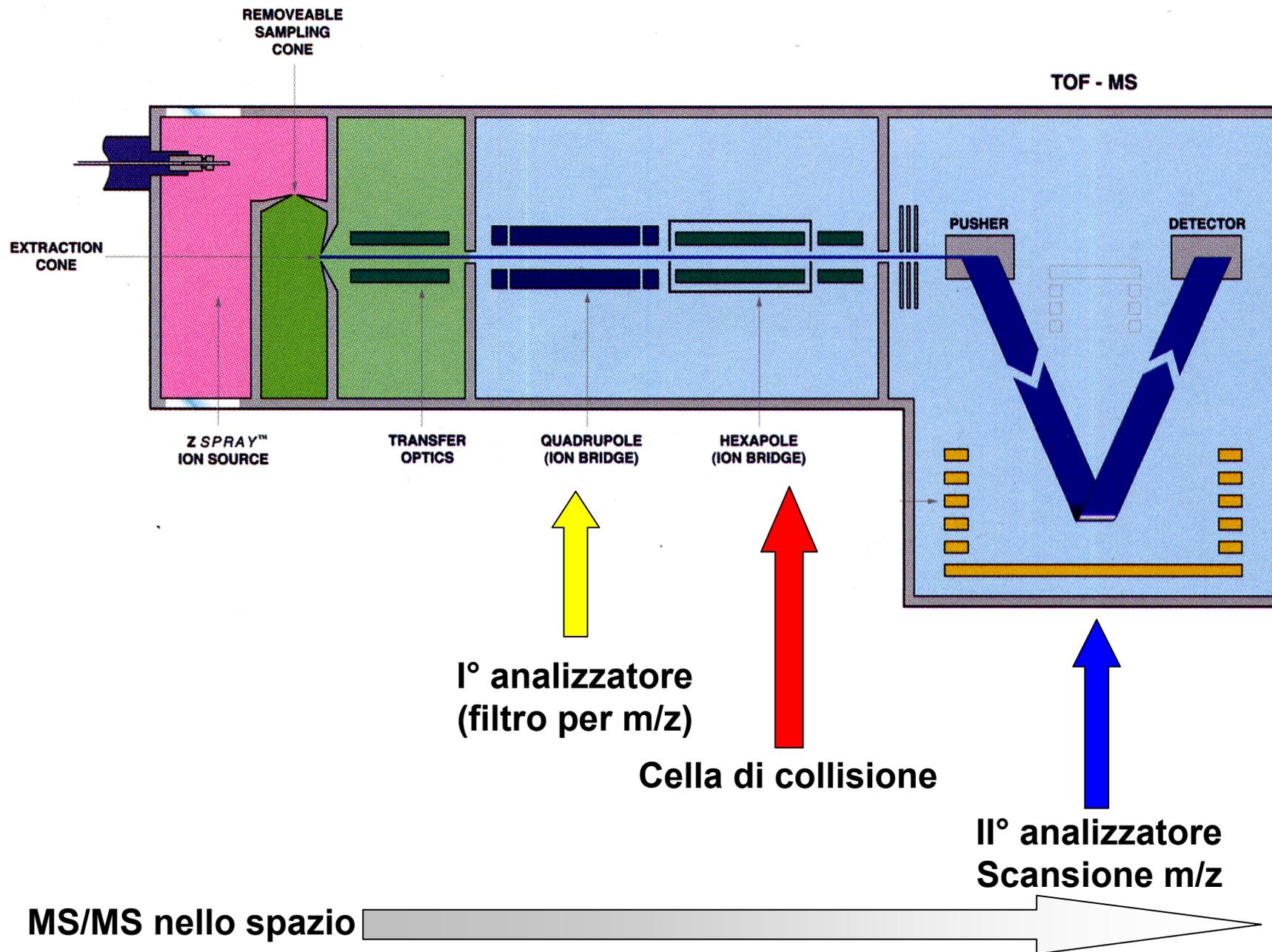


# TANDEM MASS SPECTROMETRY - Tripli Quadrupoli QqQ - QqLIT (Q3 che funziona anche da trappola ionica lineare LIT)



# TANDEM MASS SPECTROMETRY - Q-TOF

Strumenti ibridi che accoppiano un quadrupolo ad un TOF con in mezzouna cella di collisione



# TANDEM MASS SPECTROMETRY - TOF/TOF

TECHNOLOGY  
HOW IT WORKS

TECHNOLOGY  
HOW IT WORKS

## MALDI-TOF/TOF Mass Spectrometer

By Jeffrey M. Perkal

Perhaps no tool has been as instrumental to the proteomics revolution as the mass spectrometer. With the ability to deconvolute highly complex mixtures over a wide range of abundance levels, these machines enable researchers to identify and quantify proteins and to determine if and how these proteins have been posttranslationally modified.

The basic mass spectrometer measures an ion's mass-to-charge ( $m/z$ ) ratio only. This enables peptide mass fingerprinting, which is the identification of a protein based on the specific group of peptide masses it produces. But tandem devices, the so-called MS/MS instruments, can provide peptide sequence information as well. The key components shown on these pages demonstrate one of these instruments: the 4700 Proteomics Analyzer made by Applied Biosystems of Foster City, Calif., which features a MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization) source and tandem time-of-flight (TOF/TOF) mass analyzers.

**1** The process typically begins either with a protein spot extracted from a 1-D or 2-D protein gel, or with liquid chromatography fractions. The proteins are enzymatically treated (e.g., with trypsin), mixed with matrix (typically alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid or dihydrobenzoic acid), arranged on a metal target plate, and allowed to dry. The plates enable high-throughput research, sometimes holding several hundred samples at once. Topping the instrument with an autoloader increases the level of walk-away automation.

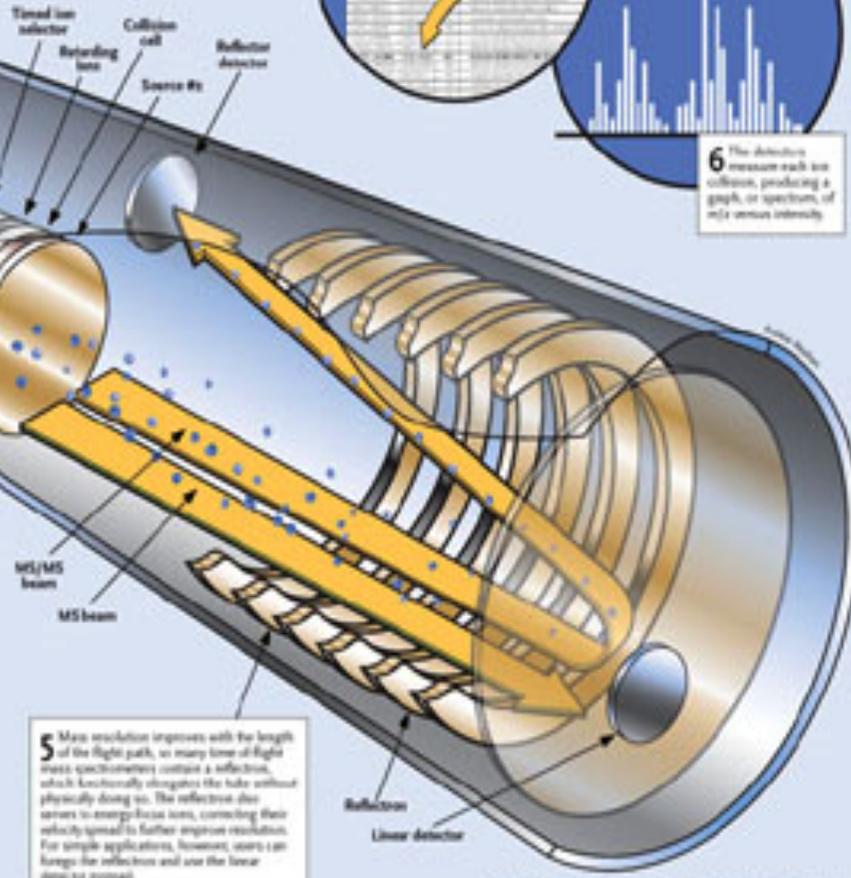
**2** Once an RF bundle from stage has positioned a specific spot, an ultraviolet laser (a nitrogen laser firing at 337 nm or a Nd:YAG laser at 355 nm, for instance) strikes the sample. The matrix material absorbs this light energy, generating enough heat to vaporize and ionize the peptide sample, generally with a charge of +1.

**3** As an ion starts down the flight tube, its speed is a function of its  $m/z$  ratio. Hence, a particle's  $m/z$  ratio is measured based upon its time of flight.

**4** In tandem MS (MS/MS) mode, the ions pass through a quadrupole of components that select specific ions for further analysis, slice them down, fragment them, and then re-accelerate them. (In standard MS mode, these four components are not used.) Of the two ions shown (blue and green) in the original sample, only the blue one is selected for fragmentation, known as collision-induced dissociation (CID) analysis.

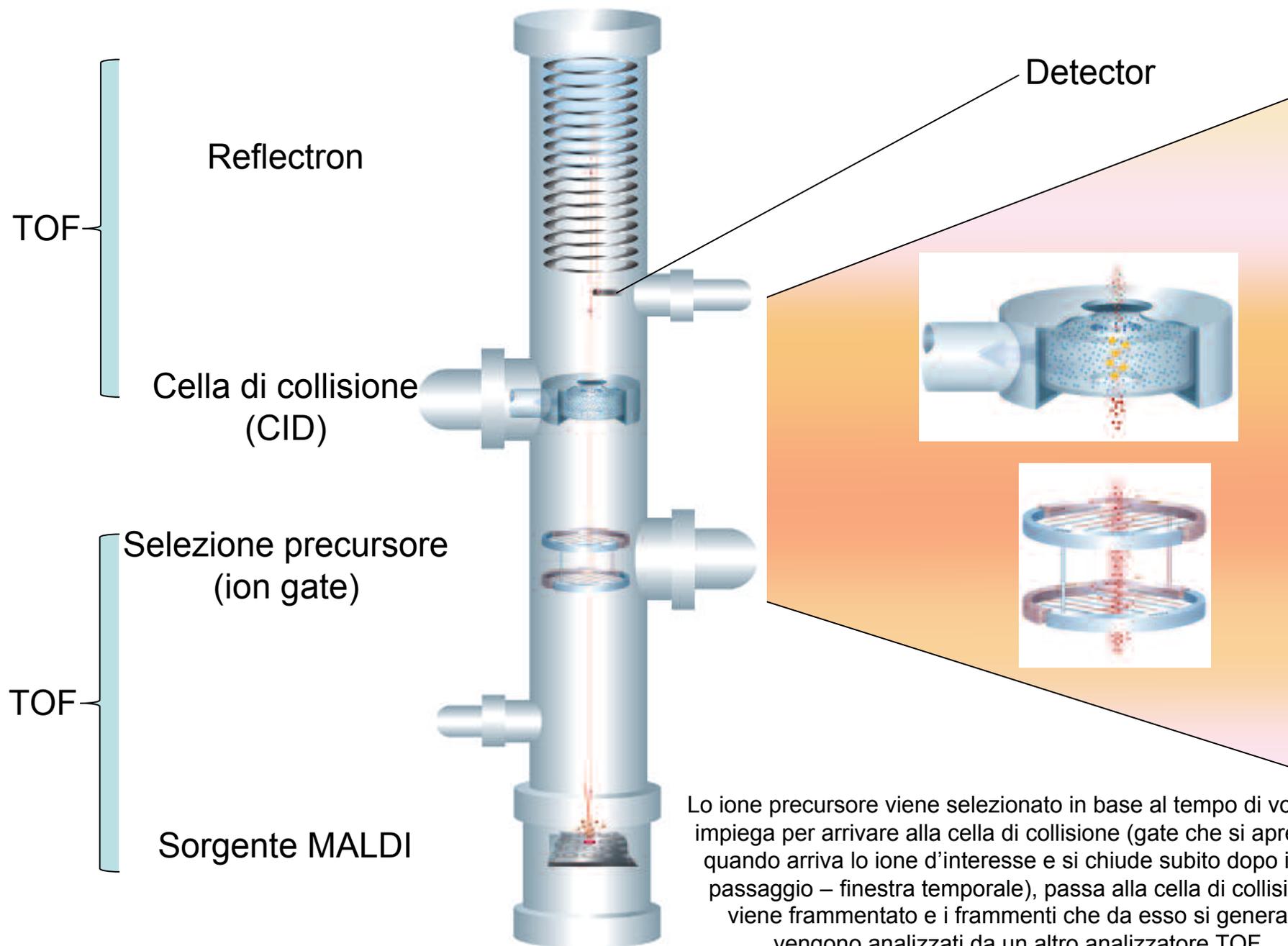
**7** Comparing the resulting constellation of  $m/z$  values against a database identifies the peptide, and by extension, the protein from which it derives. Tandem MS/MS analysis of fragmented peptide products as actual sequences, providing a more accurate protein ID. Today's mass spectrometers have high enough resolution and mass accuracy to distinguish peptides bearing only subtle differences, resulting in confident and thorough identifications of proteins from extremely complex mixtures.

**6** The detector measures each ion collision, producing a graph, or spectrum, of  $m/z$  versus intensity.

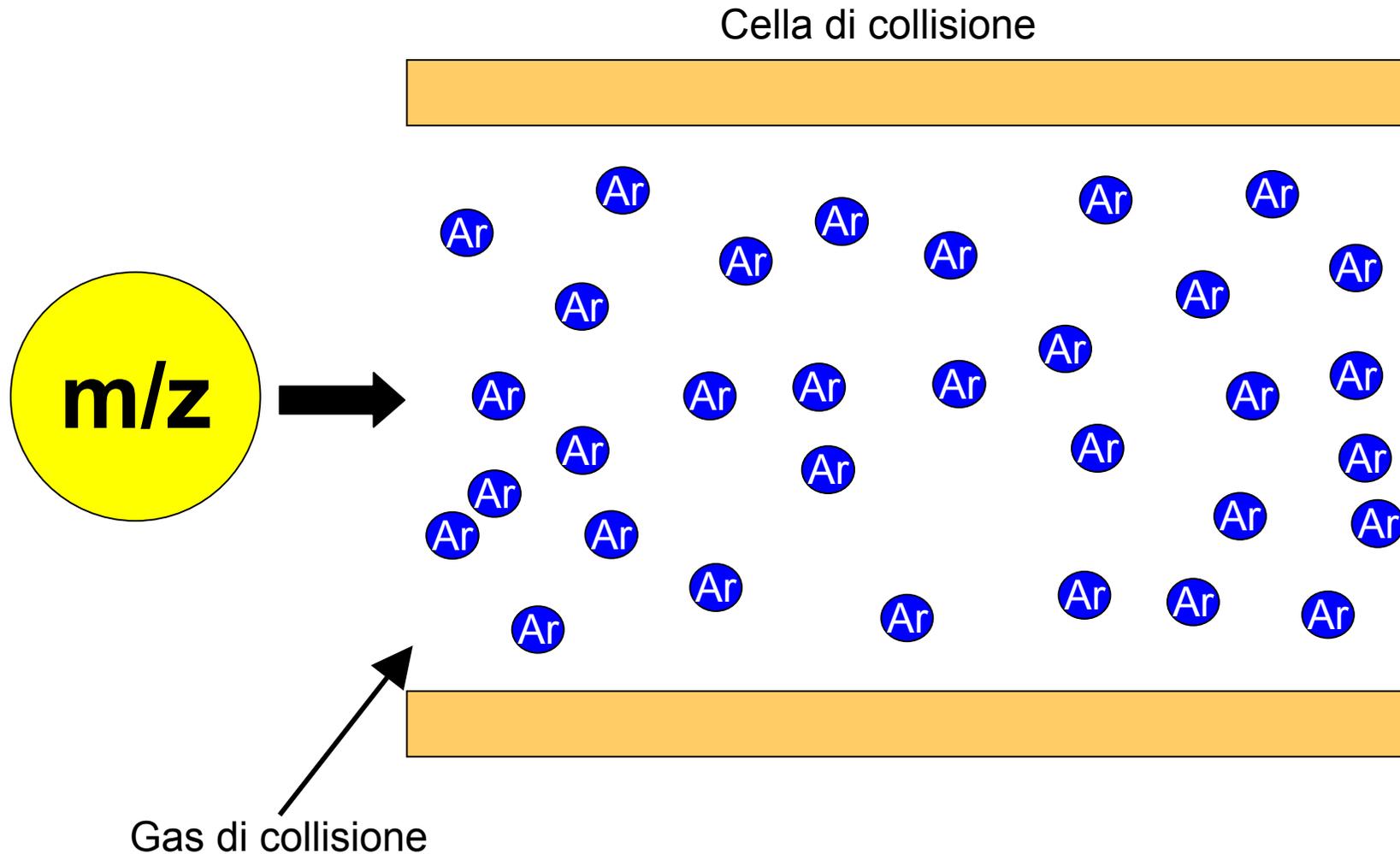


Jeffrey M. Perkal can be contacted at [jperkal@the-scientist.com](mailto:jperkal@the-scientist.com).

# TANDEM MASS SPECTROMETRY - TOF/TOF

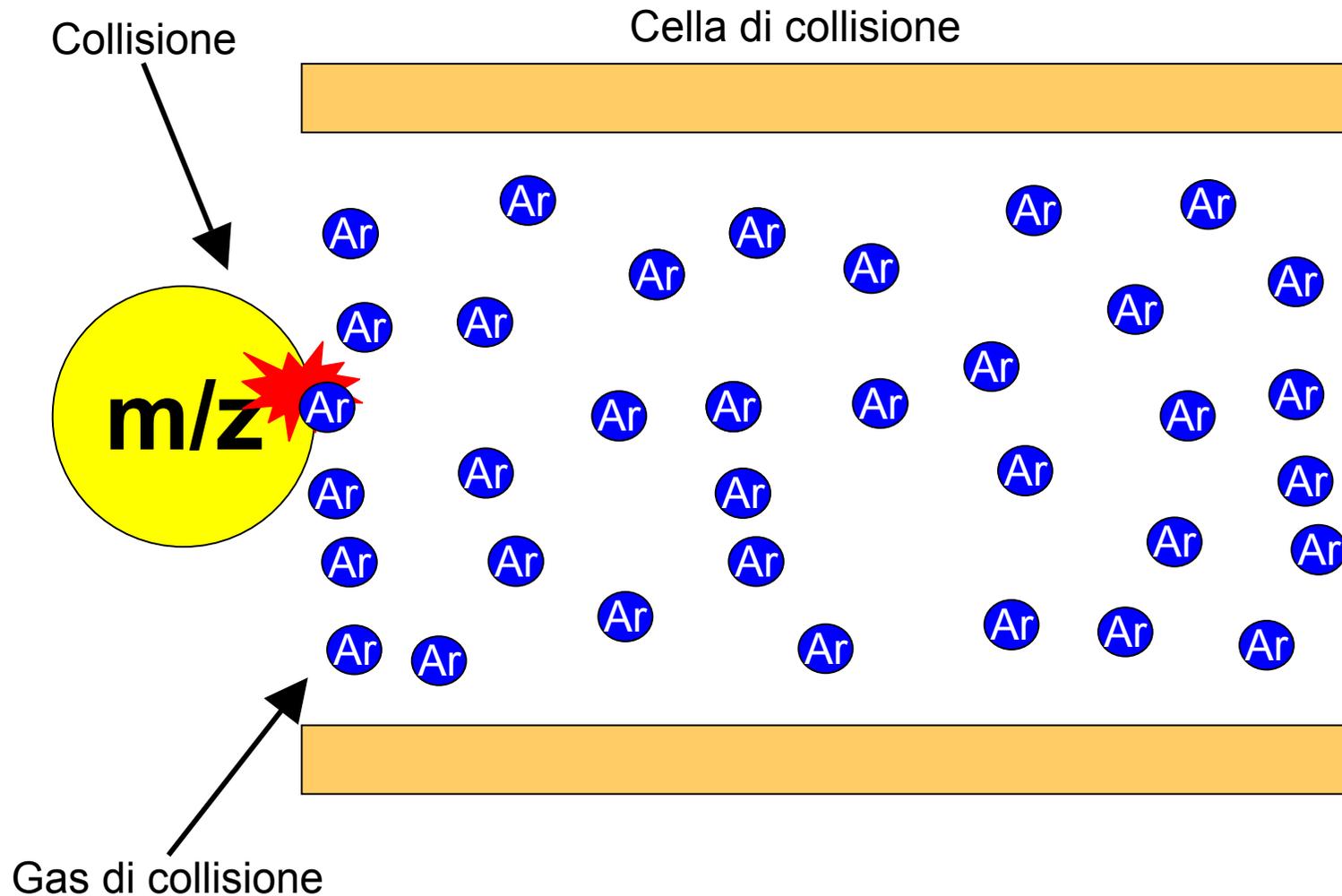


CID: Collision-Induced Dissociation  
CAD: Collision Activated Dissociation



Lo ione entra nella cella di collisione

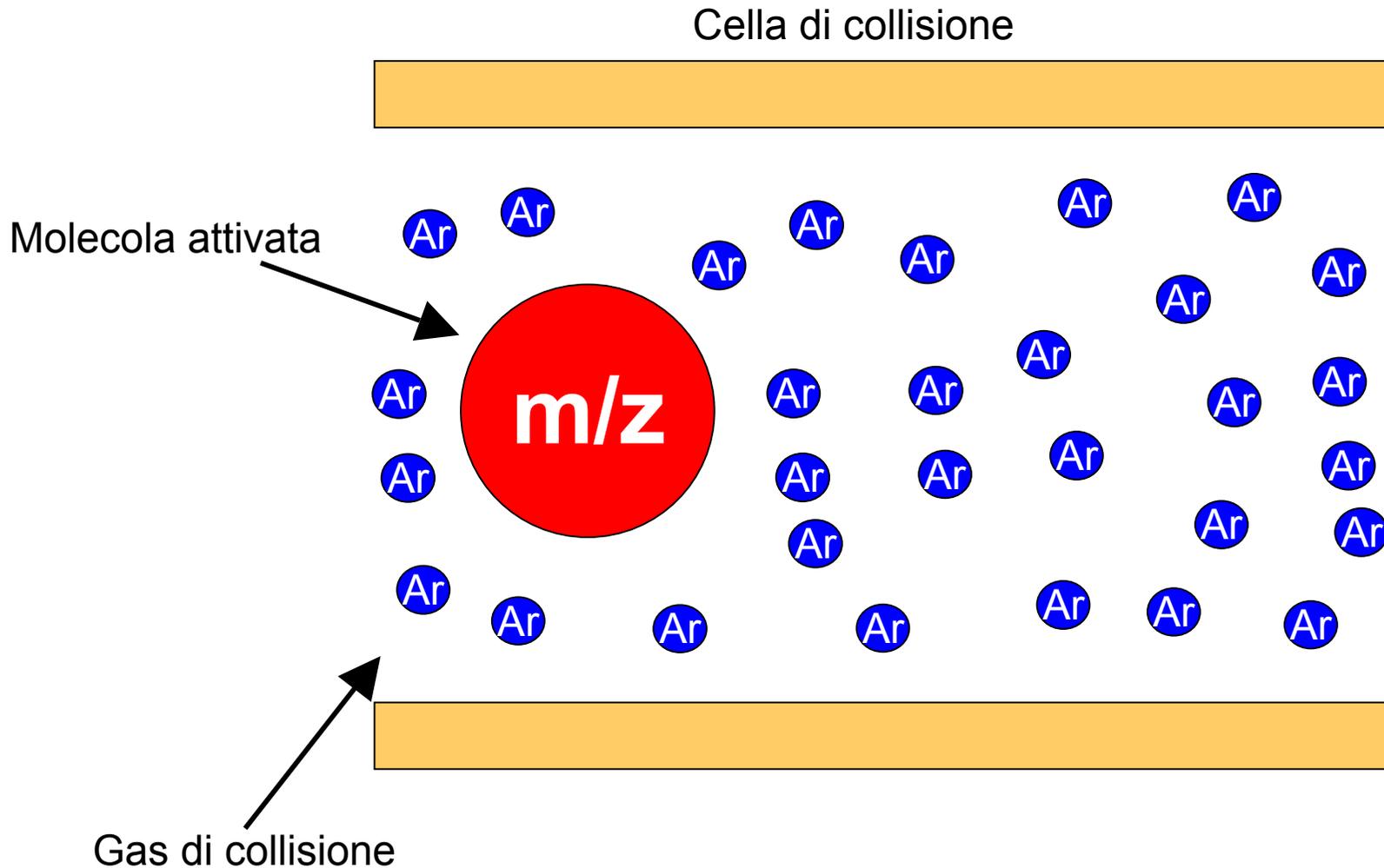
CID: Collision-Induced Dissociation  
CAD: Collision Activated Dissociation



Lo ione collide con una molecola di gas presente nella cella di collisione

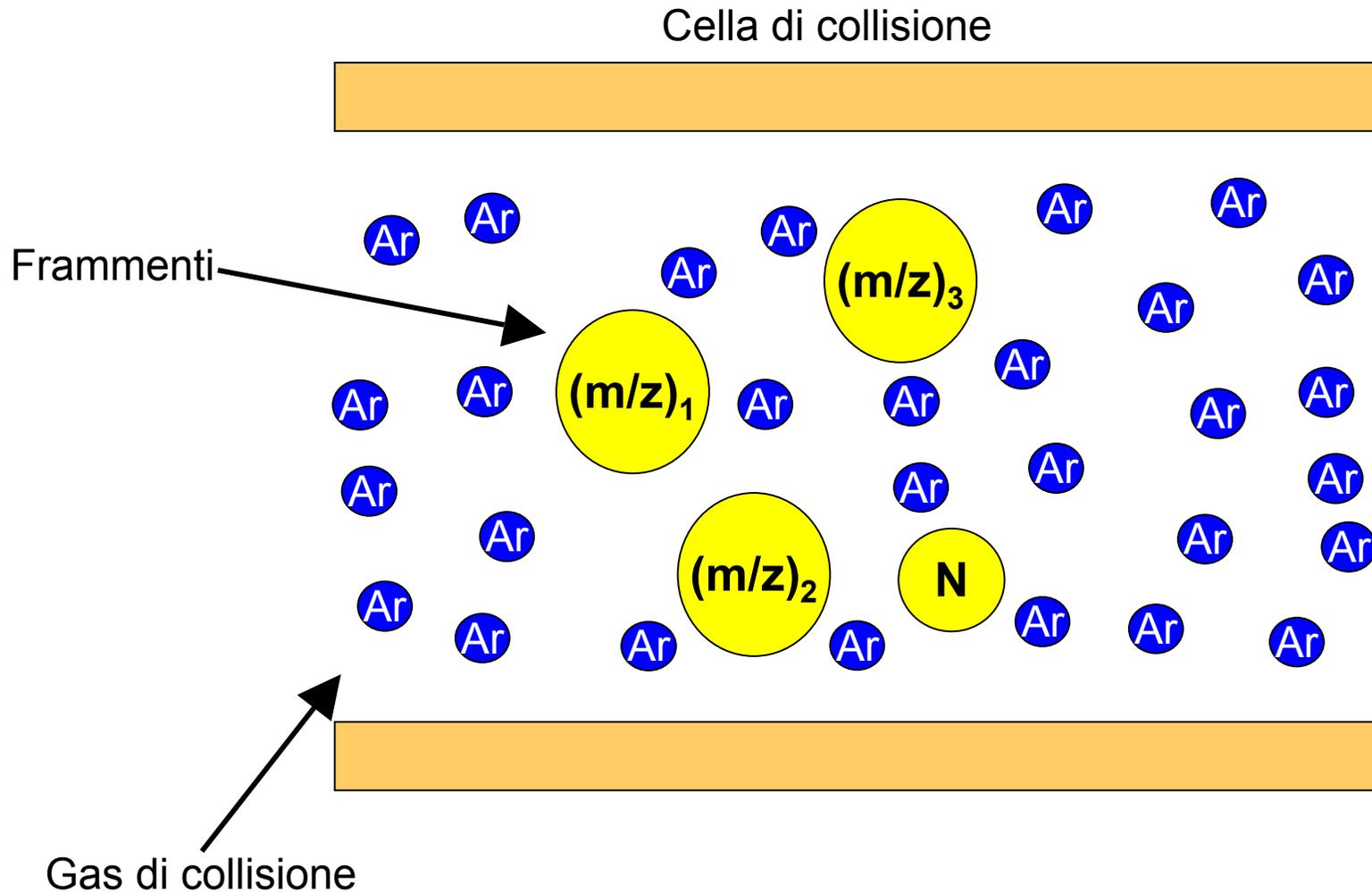
# CID: Collision-Induced Dissociation

## CAD: Collision Activated Dissociation



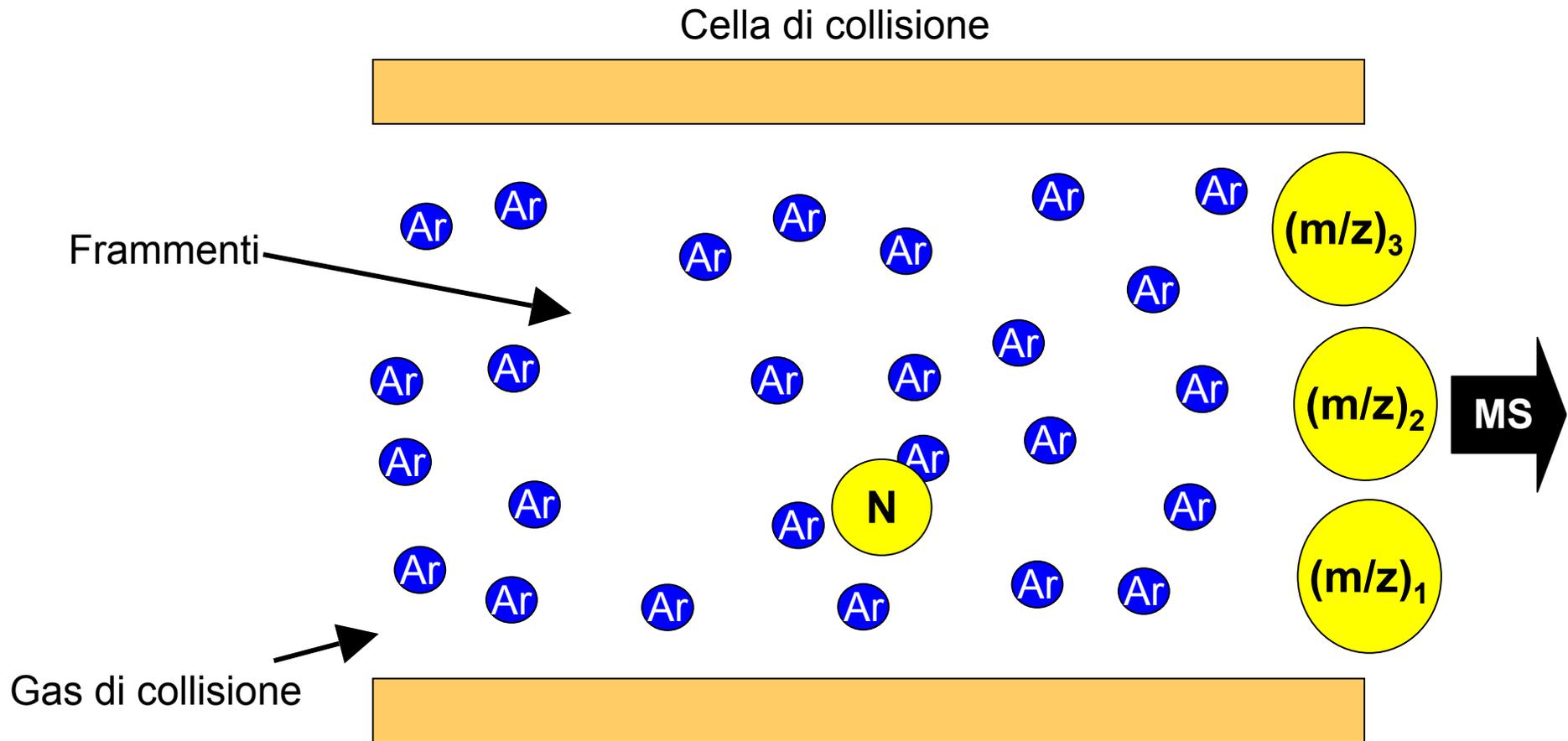
Lo ione passa ad uno stato attivato (energia dell'urto)

CID: Collision-Induced Dissociation  
CAD: Collision Activated Dissociation



Lo ione Dissipa l'energia frammentandosi

# CID: Collision-Induced Dissociation CAD: Collision Activated Dissociation



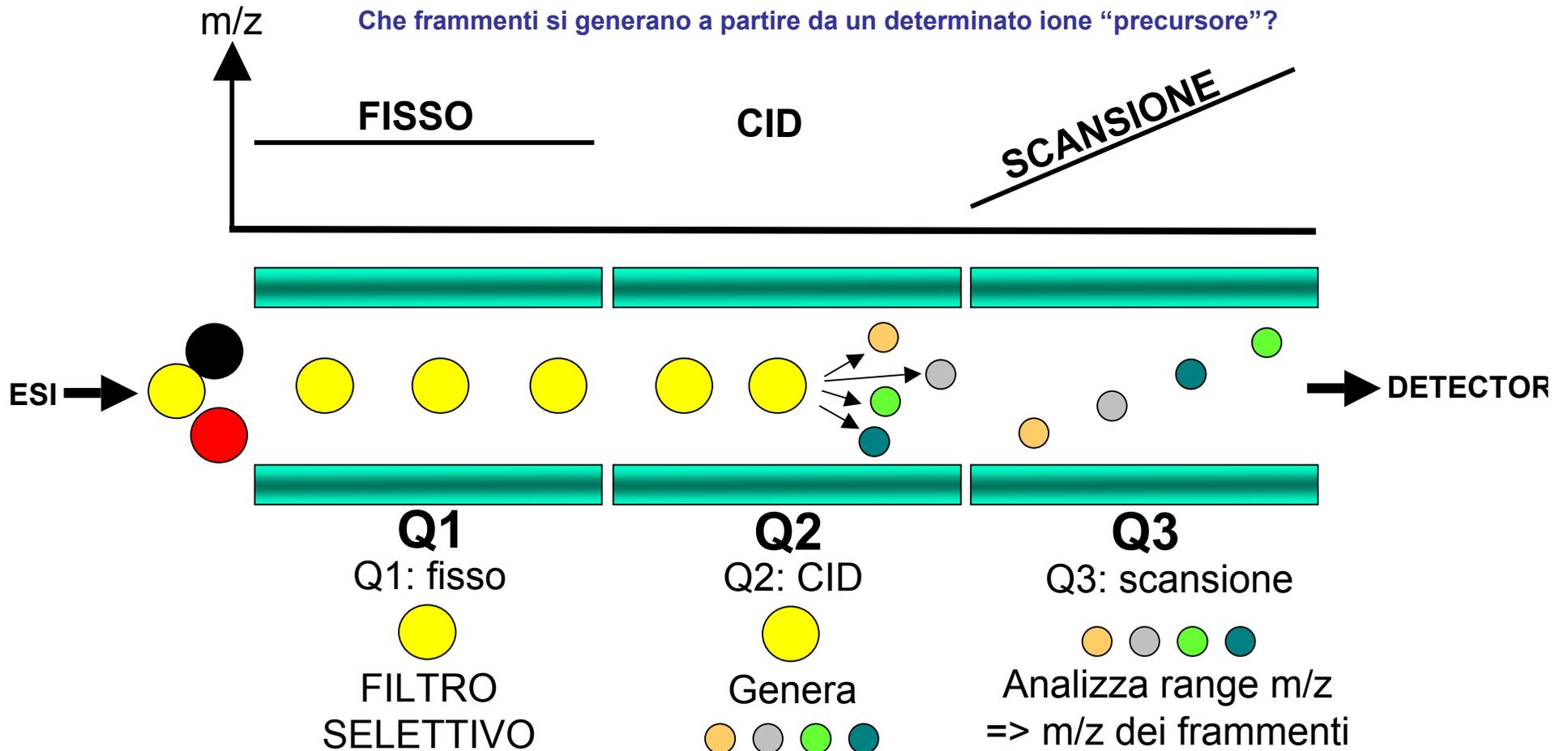
**Gli ioni generatisi per frammentazione possono essere analizzati dal secondo analizzatore. NB: solo i frammenti che mantengono una carica possono essere analizzati. Frammenti neutri non sono soggetti al campo elettrico e vengono persi**

# Tandem mass spectrometry - Triplo quadrupolo

Ricordiamoci come può funzionare un quadrupolo. Può sia effettuare delle scansioni che rimanere fisso per selezionare un particolare ione con specifico  $m/z$ .

## PRODUCT ION SCAN

Che frammenti si generano a partire da un determinato ione "precursore"?

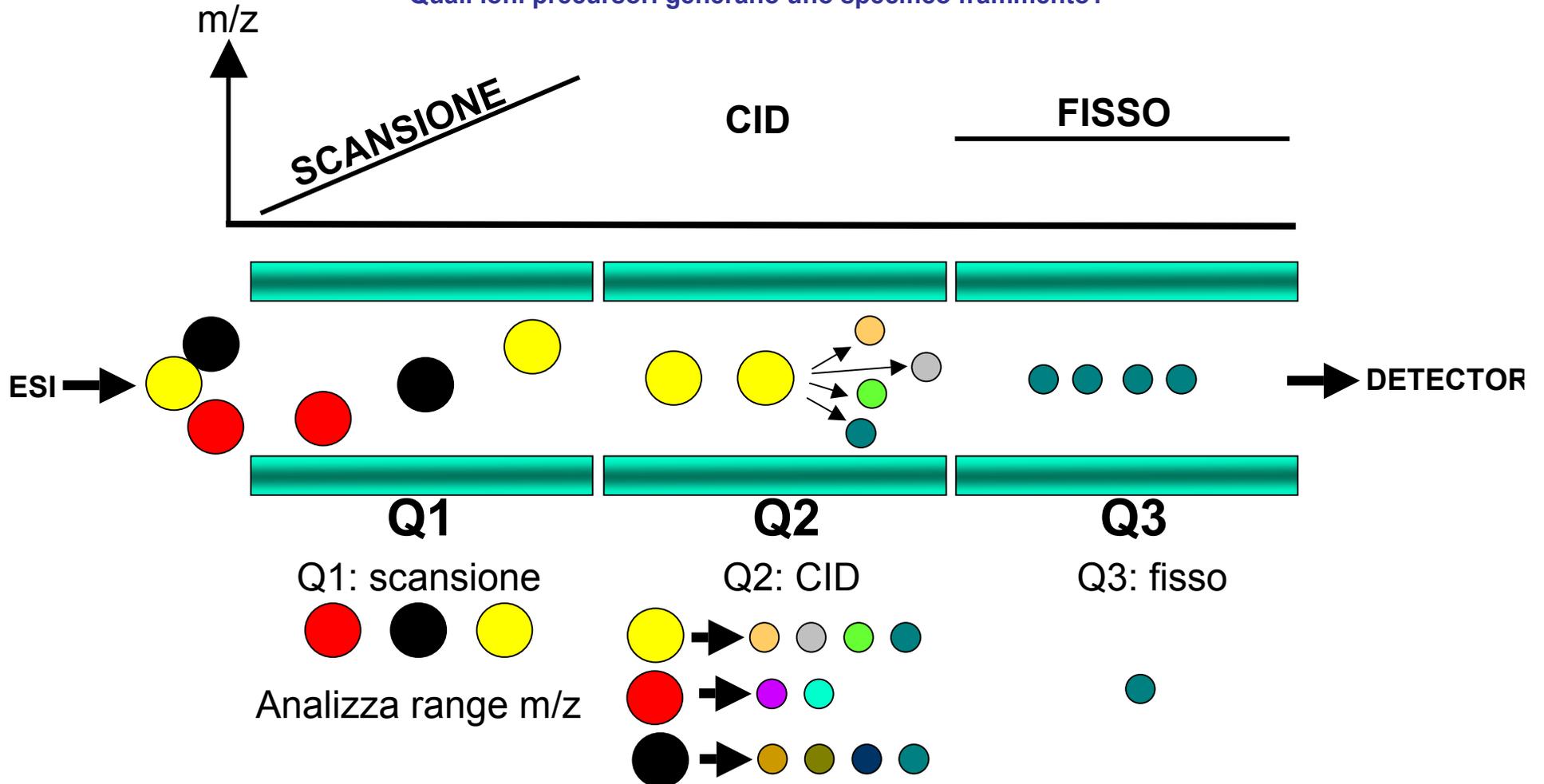


**RISULTATO: lo ione [yellow circle] da origine agli ioni frammento [orange, grey, green, blue circles]**

# Tandem mass spectrometry - Triplo quadrupolo

## PRECURSOR ION SCAN

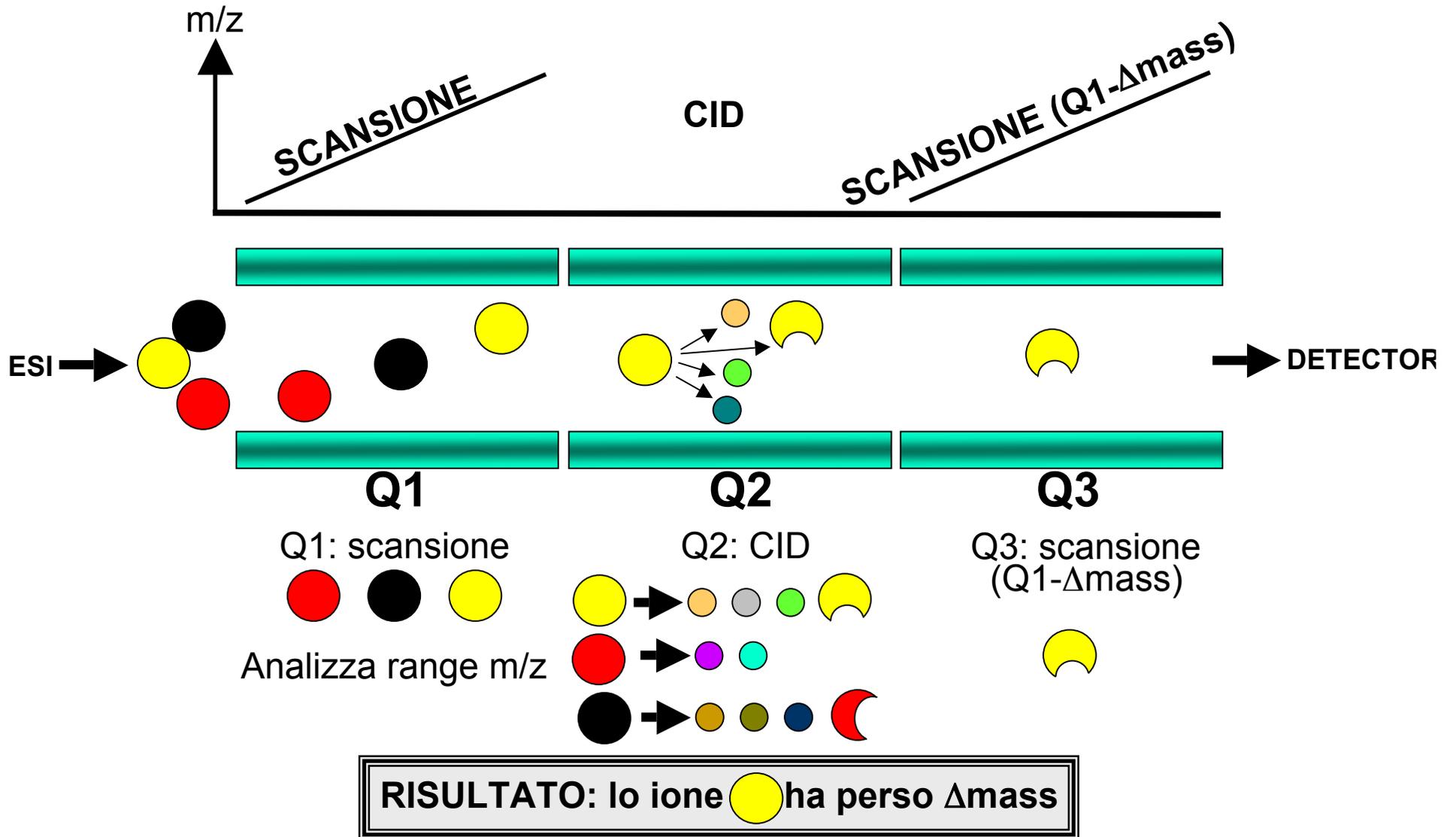
Quali ioni precursori generano uno specifico frammento?



**RISULTATO:** lo ione frammento ● è originato dagli ioni ● ●

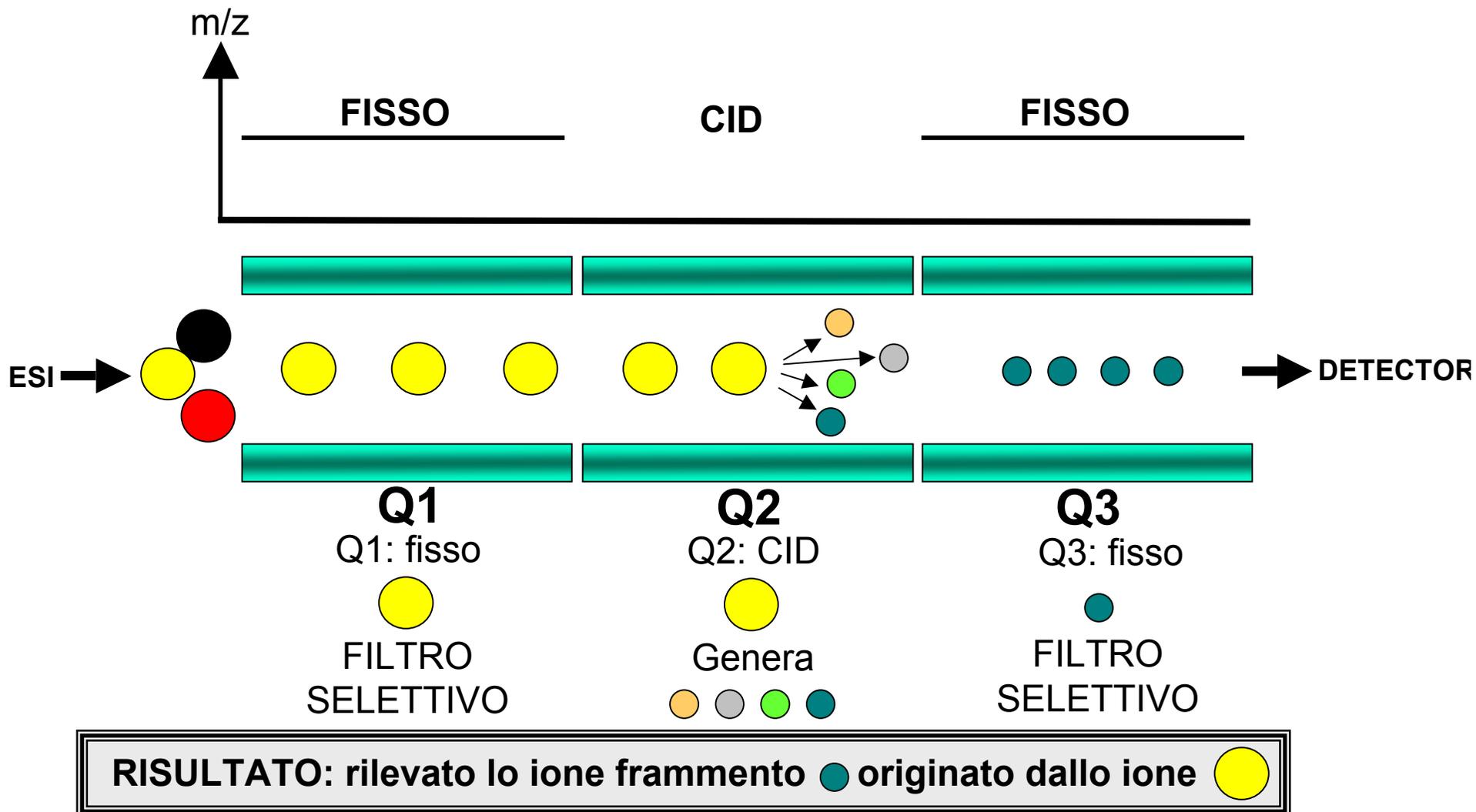
# Tandem mass spectrometry - Triplo quadrupolo

## NEUTRAL LOSS ION SCAN

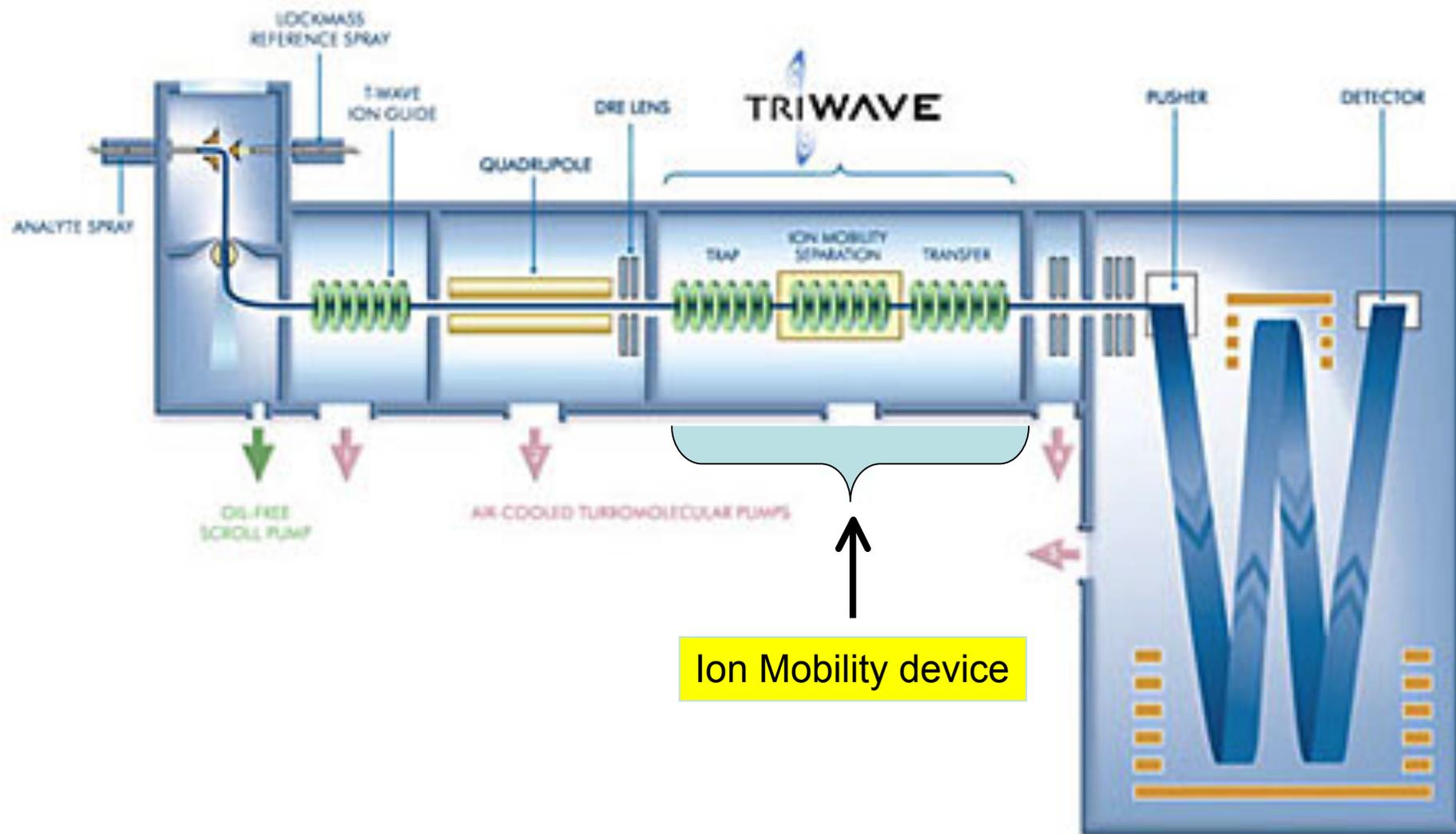


# Tandem mass spectrometry - Triplo quadrupolo

## MULTIPLE REACTION MONITORING (MRM)

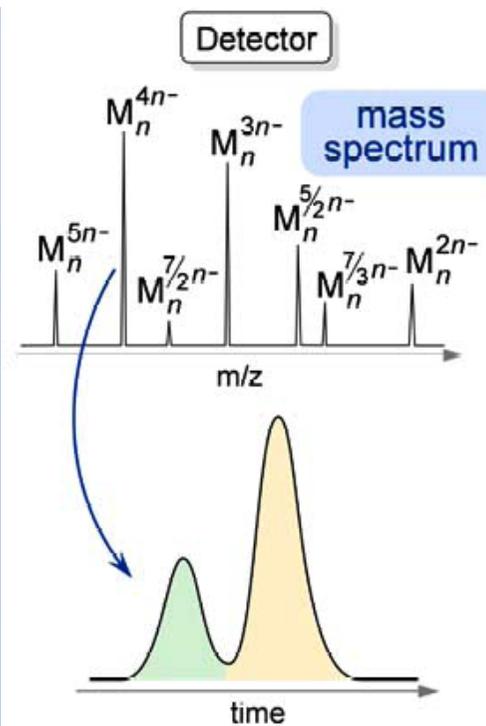
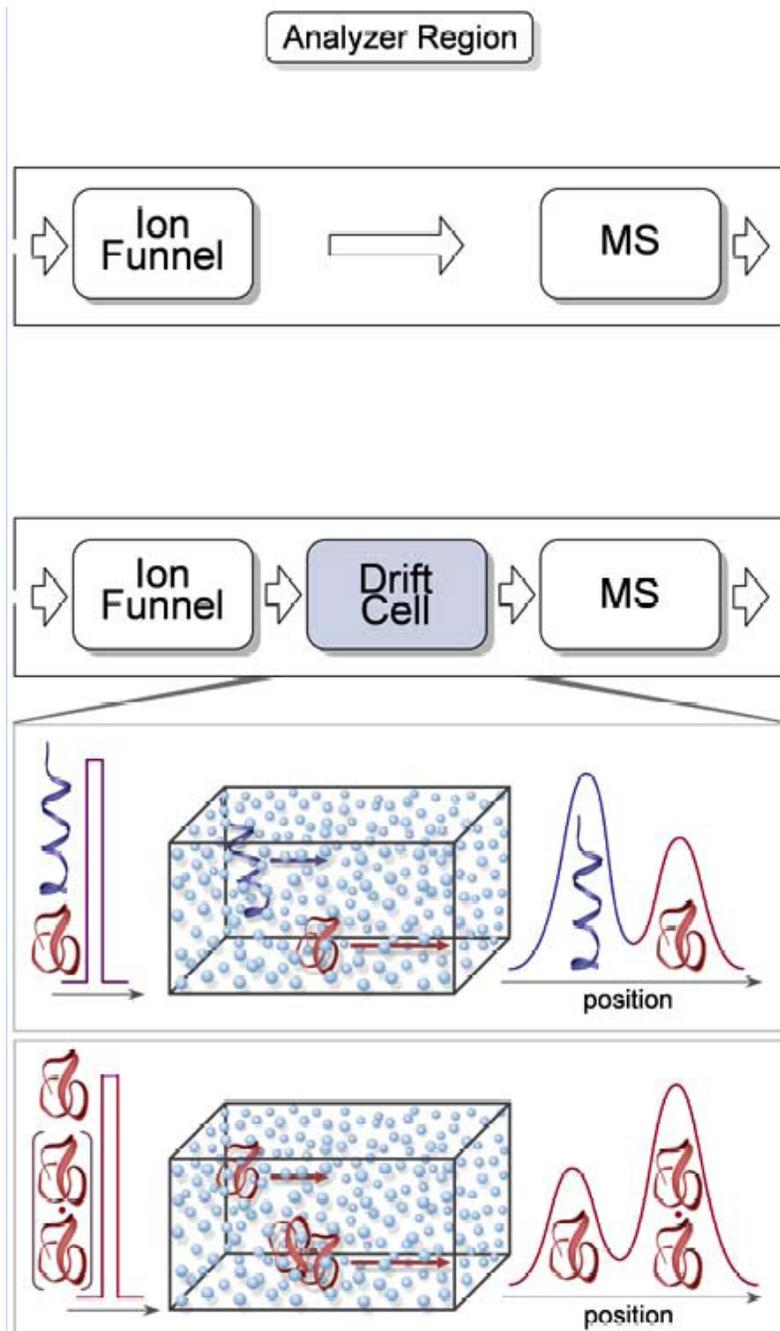


# ION MOBILITY MASS SPECTROMETRY



Ioni sottoposti all'azione di un campo elettrico si muovono in un ambiente con una determinata pressione (gas inerte) e vengono rallentati in base all'attrito che incontrano nel muoversi. Tale attrito è "proporzionale" al loro ingombro sterico – Collision Cross Section (CCS) - , quindi molecole con stesso rapporto  $m/z$  ma con conformazioni diverse vengono ad avere **mobilità** differenti – ion mobility -

# ION MOBILITY MASS SPECTROMETRY



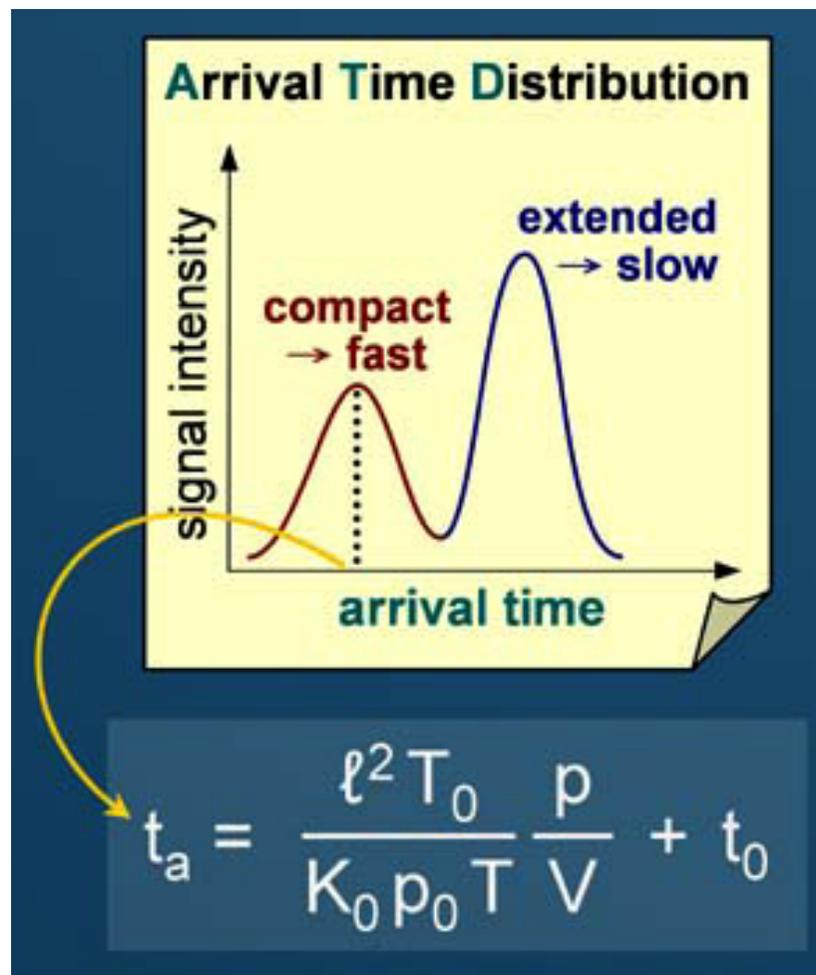
arrival-time distribution for  $M_n^{4n-}$

$n$  = oligomer order  
 $z$  = charge =  $-4n$   
 $z/n = -4$

closed conformation → fast  
 large  $n$  → fast

open conformation → slow  
 small  $n$  → slow

# ION MOBILITY MASS SPECTROMETRY



- Distinguere conformeri strutturali
- Distinguere molecole strutturalmente differenti ma con stesso rapporto m/z
- “Risoluzione” strumentale maggiore – capacità di visualizzare in modo contemporaneo un numero maggiore di molecole – Lipidi, carboidrati e proteine/peptidi hanno mobilità ioniche tipicamente diverse => sono distinguibili per il diverso profilo ottenuto in ion mobility.