

LAVORARE CON LE PROTEINE

SPETTROMETRIA DI MASSA (MS)

Molto utile per:

- ottenere una misura molto accurata della massa molecolare di una proteina
- ottenere le sequenze di molti segmenti polipeptidici relativamente corti (da 20 a 30 residui amminioacidici) presenti in un campione proteico.

Le molecole che devono essere analizzate, dette anche analiti, sono prima ionizzate nel vuoto. Quando le molecole, dotate di carica elettrica, vengono introdotte in un campo elettrico e/o magnetico, il percorso che compiono diventa funzione del loro rapporto massa/carica, (m/z). Questa proprietà misurabile delle specie ionizzate può essere usata per dedurre la massa (m) dell'analita con una precisione molto elevata.

Inizialmente la spettrometria di massa poteva analizzare solo molecole già in fase gassosa (molecole di piccole dimensioni).

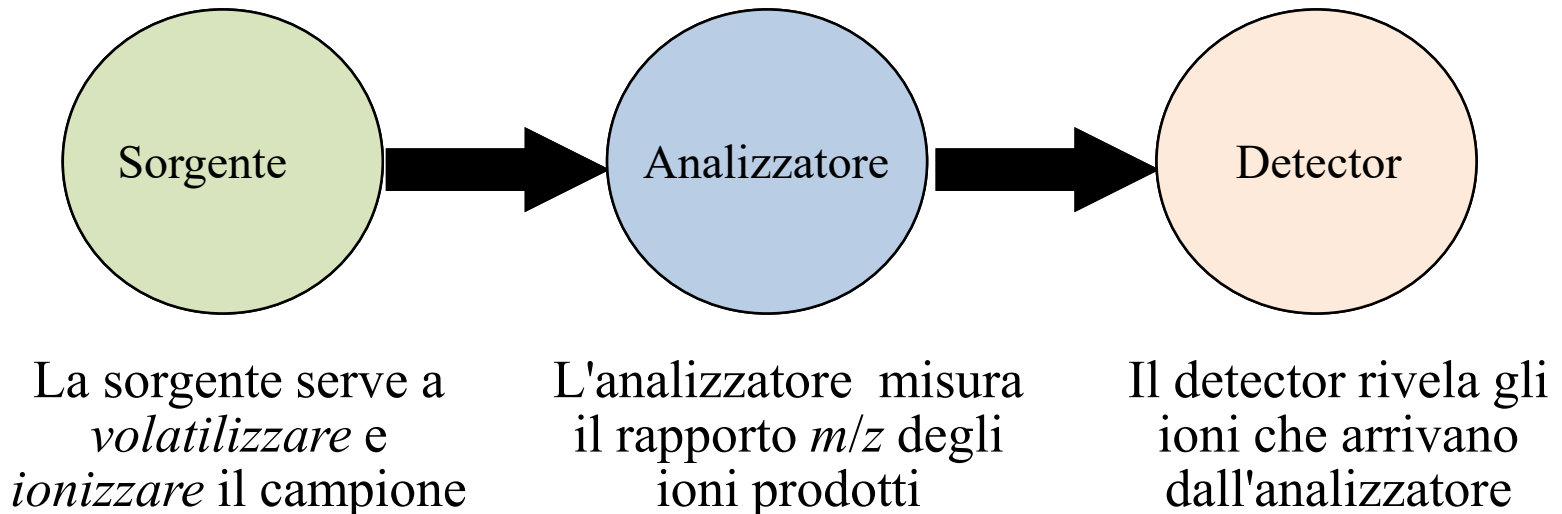
1988: sviluppo di due nuove tecniche di ionizzazione che portano le macromolecole in fase gassosa senza decomporle, MALDI-MS, ESI-MS.

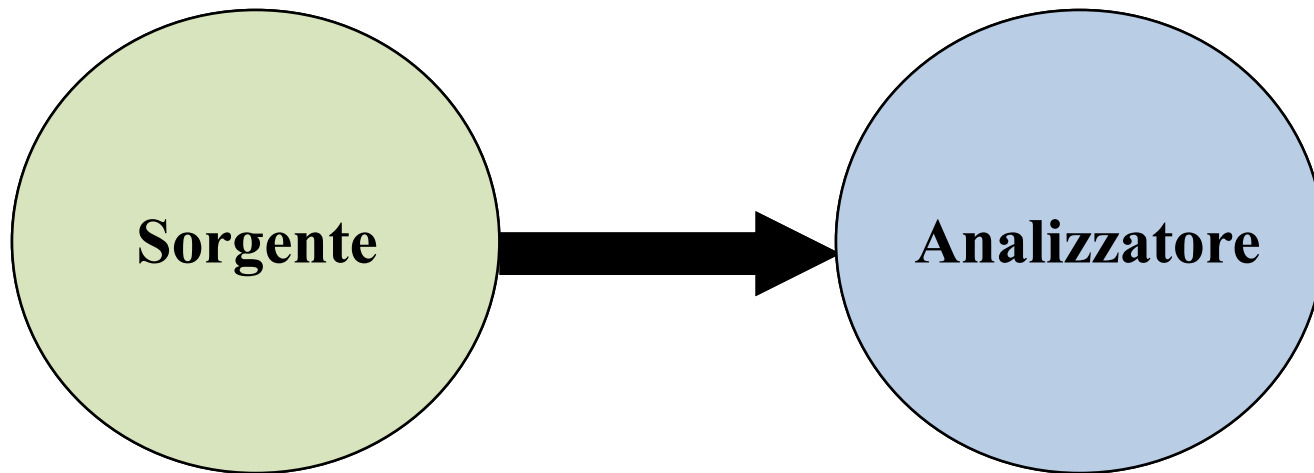
Queste tecniche hanno rivoluzionato il sequenziamento proteico.

The Nobel Prize in Chemistry for 2002 to John B. Fenn and Koichi Tanaka

SPETTROMETRIA DI MASSA

- Serve a misurare la massa delle molecole.
- La molecola deve essere ionizzata, in modo da misurare il rapporto massa/carica (m/z) dello ione risultante.





Sorgenti:

Tipi diversi di sorgenti fra cui:

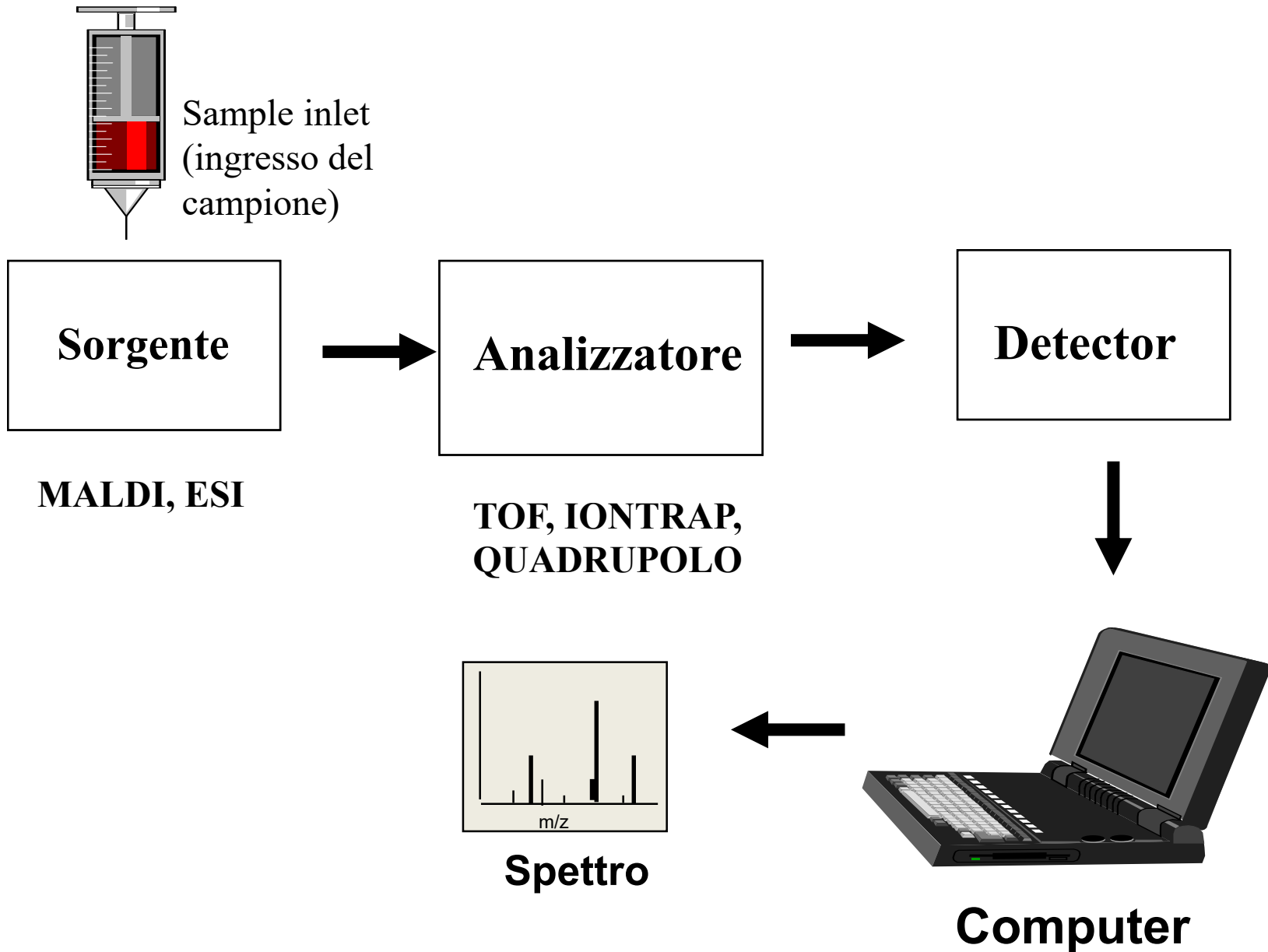
- **Electrospray**
- **MALDI** (Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization).

Analizzatori:

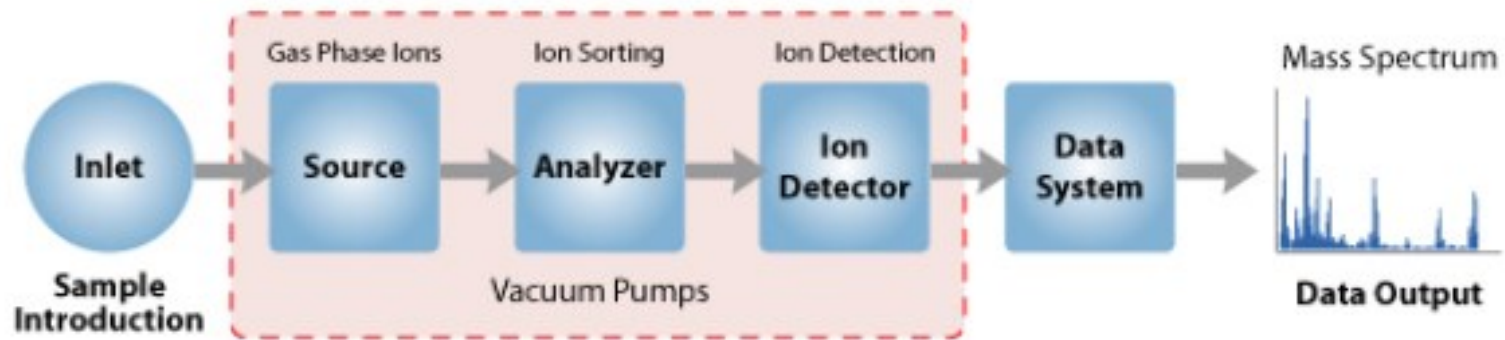
Tipi diversi di analizzatori fra cui:

- **quadrupolo**
- **trappola ionica** (ion-trap)
- **TOF** (time of flight – tempo di volo)

I componenti dello spettrometro di massa



SPETTROMETRO DI MASSA



Processo:

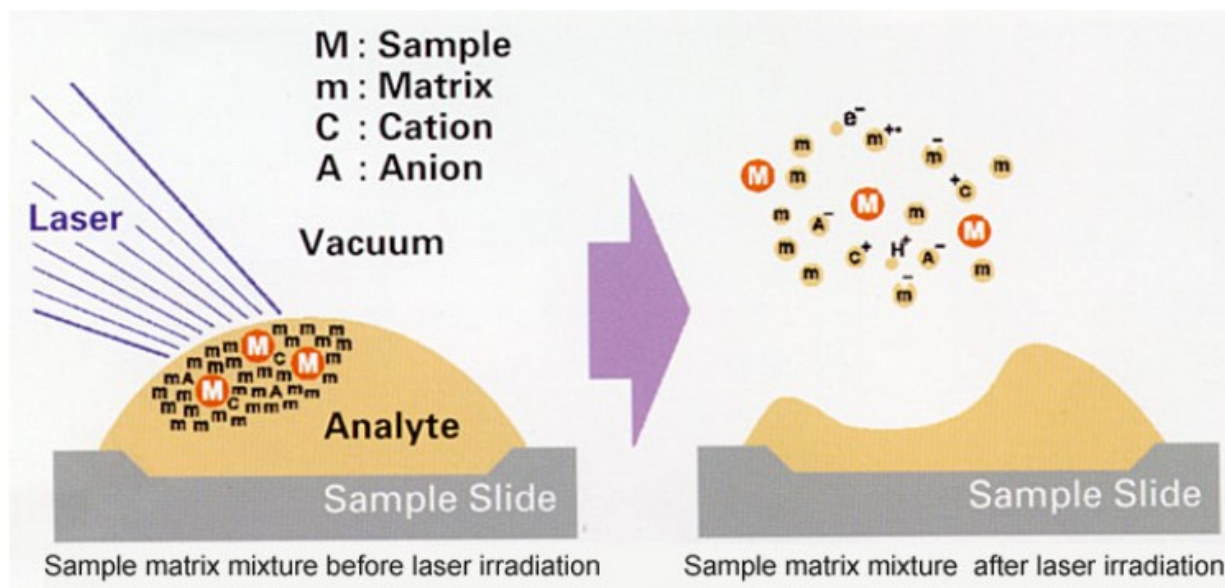
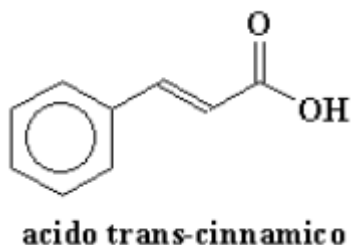
- le molecole del campione vengono introdotte nello strumento attraverso il sample inlet
- nella sorgente di ionizzazione le molecole del campione vengono convertite in ioni
- sono spinte elettrostaticamente nell'analizzatore di massa dove gli ioni vengono separati in base al loro m/z
- Il rivelatore converte l'energia degli ioni in segnali elettrici, che vengono poi trasmessi a un computer.

SPETTROMETRIA DI MASSA MALDI

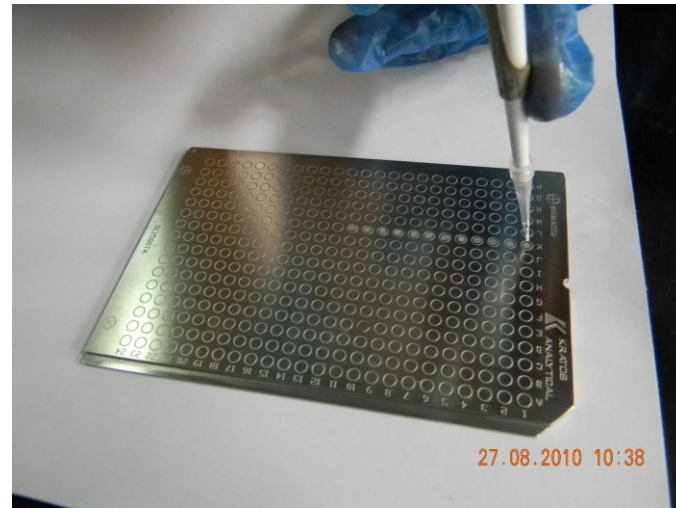
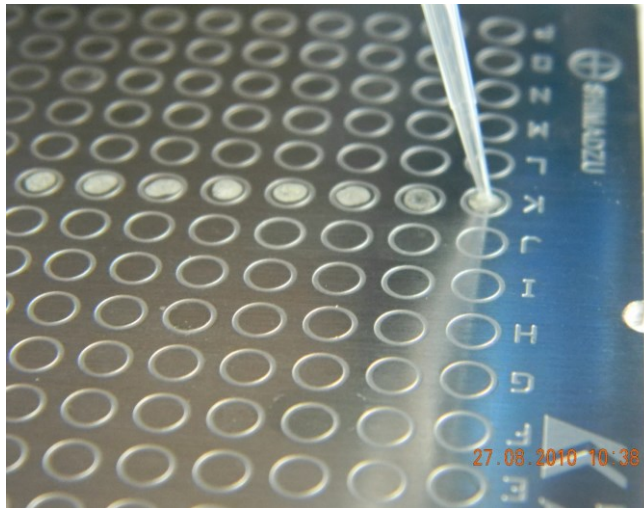
MALDI = Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization

Il campione per MALDI MS viene mescolato uniformemente in una grande quantità di matrice.

La matrice viene colpita con luce ultravioletta (luce laser dell'azoto, lunghezza d'onda 337 nm). Una piccola parte della matrice si riscalda rapidamente (in alcuni nanosecondi) e viene vaporizzata insieme al campione che viene convertito in gas senza essere frammentato.



Deposizione del campione e della matrice sulla piastra MALDI



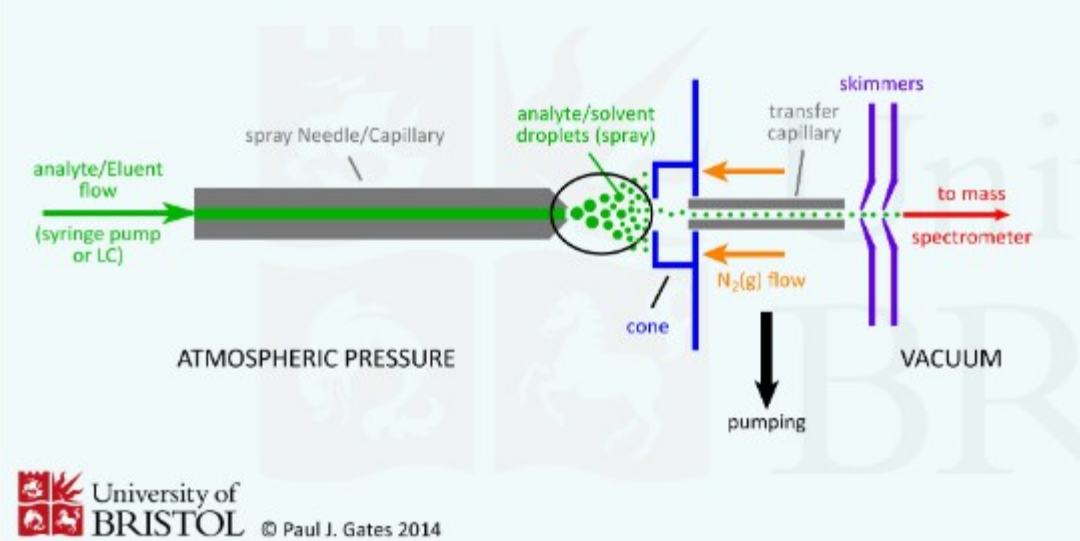
Esistono in commercio sistemi automatizzati per la deposizione del campione

SPETTROMETRIA DI MASSA ESI

**ESI = ElectroSpray Ionization mass spectrometry o
elettronebulizzazione**

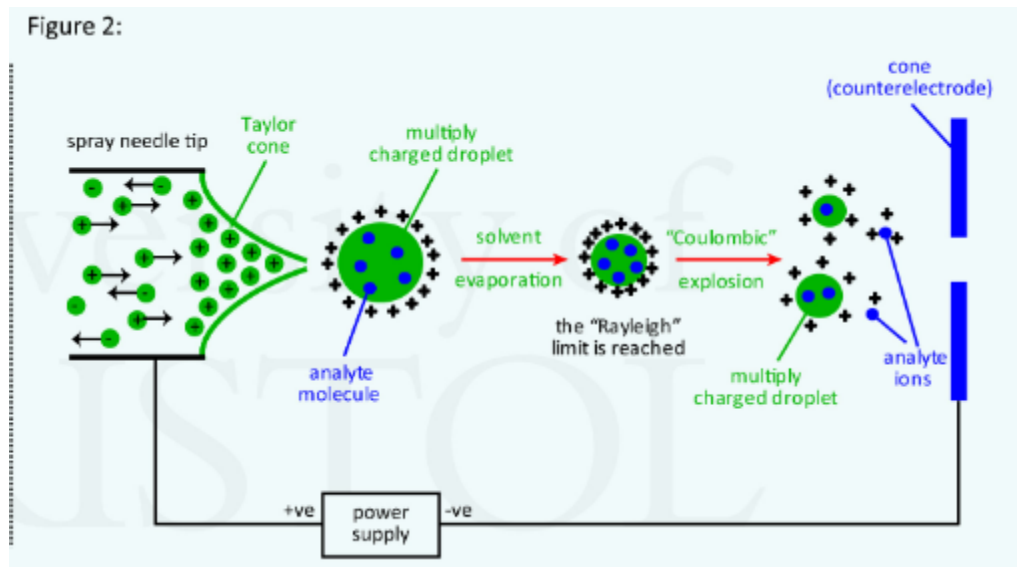
- è una tecnica di ionizzazione evaporativa utilizzata accoppiata alla cromatografia liquida.
- Le macromolecole sono forzate a passare direttamente dal liquido alla fase gassosa. **COME???**
- La soluzione di analiti passa attraverso un ago carico mantenuto a un alto potenziale elettrico e viene dispersa sotto forma di una “nebbia” di microgocce cariche. Il solvente che circonda le macromolecole evapora rapidamente, lasciando nella fase gassosa ioni macromolecolari dotati di cariche multiple.
- Ha la caratteristica di dare solitamente ioni multi-carica.

Figure 1:



Come il solvente evapora, la goccia si rimpicciolisce fino al punto in cui la tensione superficiale non può più sostenere la carica (il limite di Rayleigh). “esplosione coulombiana” e la gocciolina si rompe in gocce più piccole e analita carico.

Figure 2:



SPETTROMETRIA DI MASSA ESI

- L'analita viene introdotto nella sorgente ESI in soluzione da una pompa a siringa o come flusso eluente direttamente dalla cromatografia HPLC.
- Le velocità di flusso sono tipicamente dell'ordine di 1-3 $\mu\text{L}/\text{min}$.
- La soluzione di analita passa attraverso l'ago elettrospray a cui viene applicata un'elevata differenza di potenziale (rispetto al contro elettrodo), tipicamente nell'intervallo tra 2,5 e 5 kV.
- Questo causa la formazione di uno spray di goccioline cariche dall'ago con una carica superficiale della stessa polarità della carica sull'ago.
- Le goccioline vengono respinte dall'ago verso il cono di campionamento della sorgente sul contro elettrodo (in blu).
- Come le gocce attraversano lo spazio tra la punta dell'ago e il cono si verifica l'evaporazione del solvente.
- Le molecole di analita possono avere cariche singole o multiple. Si tratta di un metodo di ionizzazione molto «soft» (delicato) che non causa la formazione di frammenti molecolari.

- Dopo la ionizzazione, gli analiti vengono accelerati nella camera ad alto vuoto dello spettrometro di massa.
- **L'analizzatore di massa** filtra e, se desiderato, può anche frammentare gli ioni carichi.
- Gli ioni filtrati colpiscono i rivelatori, i loro segnali sono amplificati da moltiplicatori di rivelazione e i risultati finali sono analizzati da sistemi software.
- Gli ioni possono essere frammentati e filtrati una seconda o addirittura una terza volta prima dell'analisi. Gli ioni possono passare attraverso diverse analisi di massa in seguito a più cicli di frammentazione, spesso abbreviati in MS/MS o MSⁿ.

ANALIZZATORI DI MASSA

- **TOF (time of flight)**
- **ION TRAP**
- **QUADRUPOLO**

TOF

molto utilizzato con spettrometria di massa MALDI ed ESI

Molto sensibile

Velocità di analisi

ION TRAP

Gli analizzatori di massa a trappola ionica utilizzano una combinazione di campi elettrici o magnetici per catturare o "intrappolare" gli ioni all'interno dell'analizzatore di massa

MALDI TOF

Molto spesso la tecnica MALDI viene abbinata a spettrometri dotati di **ANALIZZATORE A TEMPO DI VOLO (TOF)**.

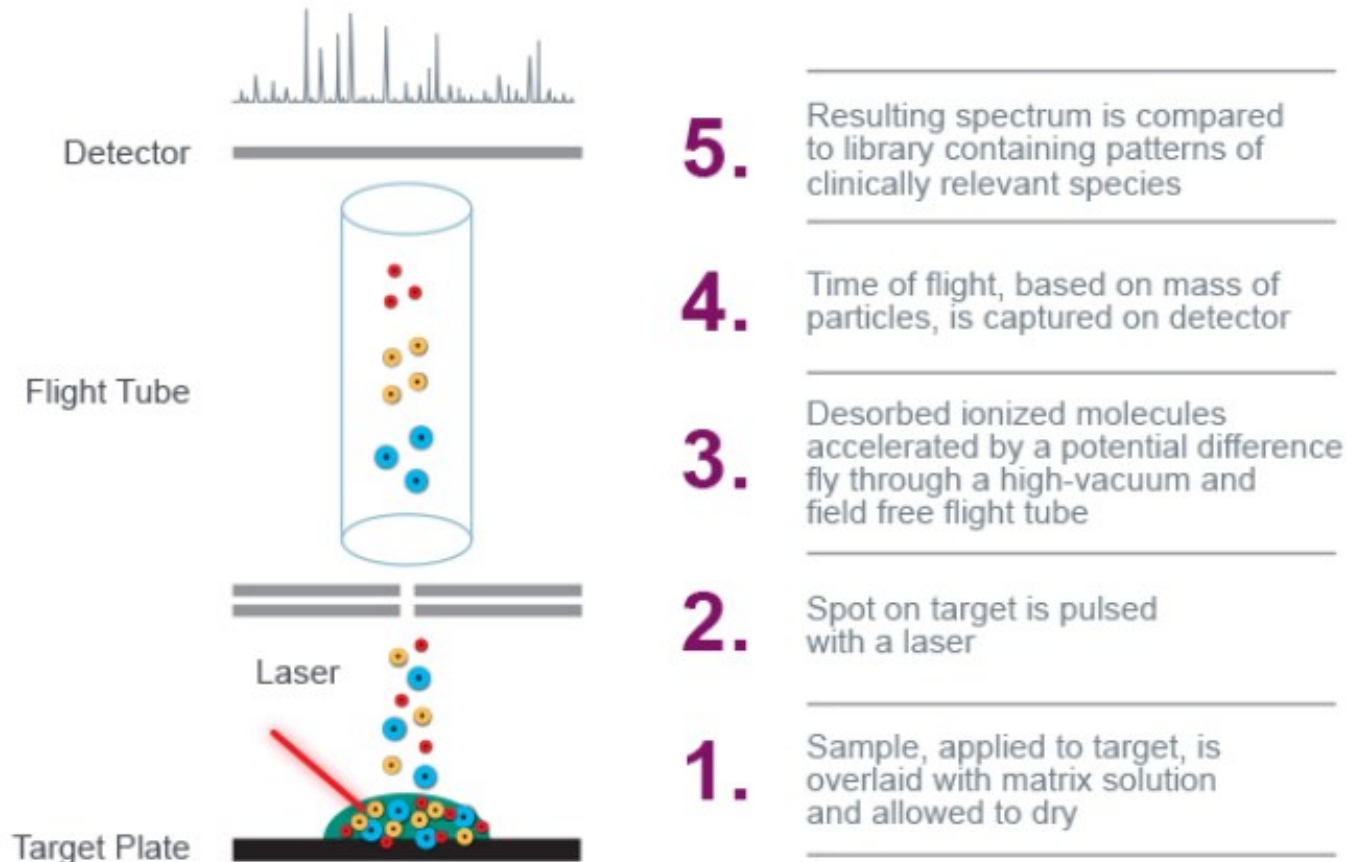


Figure 1. Depiction of internal MALDI-TOF mass spectrometry process.

MALDI TOF

Le molecole ionizzate vengono successivamente accelerate da una differenza di potenziale e volano attraverso il tubo di volo ad alto vuoto verso il rivelatore. Il sistema misura il tempo di volo degli analiti verso il rivelatore e produce uno spettro di massa caratteristico. Gli ioni più leggeri impiegano poco tempo per raggiungere il rivelatore, mentre quelli più pesanti ne impiegano di più.

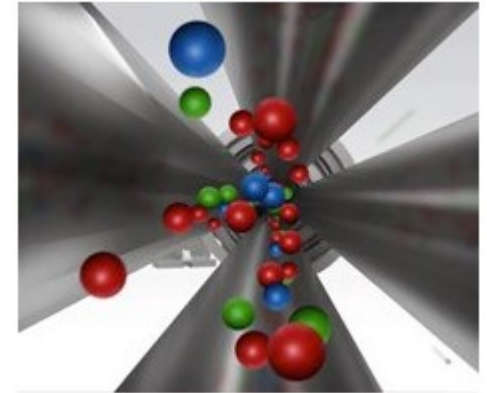
Per alcuni tipi di campioni, un'applicazione software identifica il campione confrontando i picchi di massa ottenuti con una libreria di spettri.

QUADRUPOLO

Quattro magneti cilindrici posti parallelamente l'uno all'altro.

Filtra gli ioni in base al loro rapporto massa/carica (m/z).

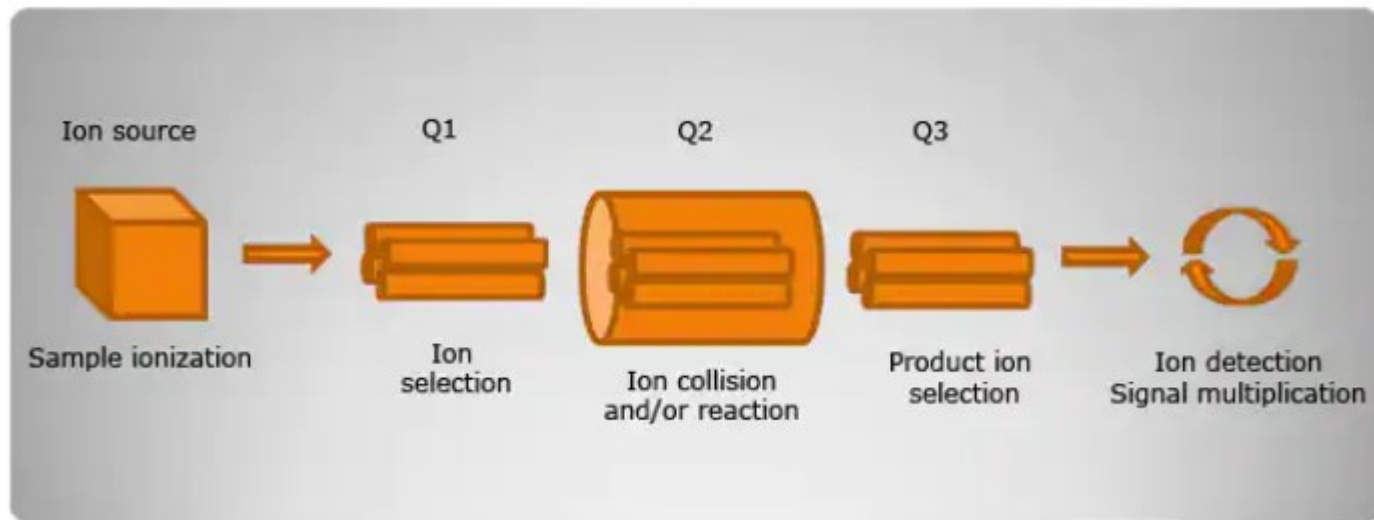
Quadrupolo: costituito da due coppie di magneti con carica simile che si oppongono l'uno all'altro e mantengono gli ioni all'interno del percorso ionico del quadrupolo sotto vuoto.



Analizzatore a triplo stadio: serie lineare di tre quadrupoli in grado di filtrare e frammentare il flusso di ioni. Nella maggior parte dei casi, il primo (Q1) e il terzo (Q3) quadrupolo fungono da filtri di massa, mentre il secondo (Q2) dissocia gli ioni facendoli collidere con argon, elio o azoto.

Molto utilizzato per l'analisi di farmaci e sostanze inquinanti, nei campi della sicurezza alimentare, dell'analisi ambientale e degli studi di tossicologia clinica e forense.

SPETTROMETRO DI MASSA CON TRIPLO QUADRUPOLO



Il primo (Q1) e il terzo (Q3) quadrupolo fungono da filtri di massa, mentre il secondo (Q2) funziona da cella di collisione dove gli ioni si frammentano in seguito alla collisione con argon, elio o azoto.

ION TRAP (TRAPPOLA IONICA)

Ci sono più configurazioni di analizzatori ion-trap

Trappola ionica a quadrupolo: gli ioni vengono intrappolati in orbite stabili in una camera 3-D e poi espulsi in sequenza.

L'analizzatore di massa a trappola ionica quadrupolare è costituito da tre elettrodi iperbolici: un elettrodo ad anello a forma di ciambella, un elettrodo di ingresso e un elettrodo di uscita. Questi elettrodi formano una cavità in cui è possibile intrappolare (immagazzinare) e analizzare gli ioni.

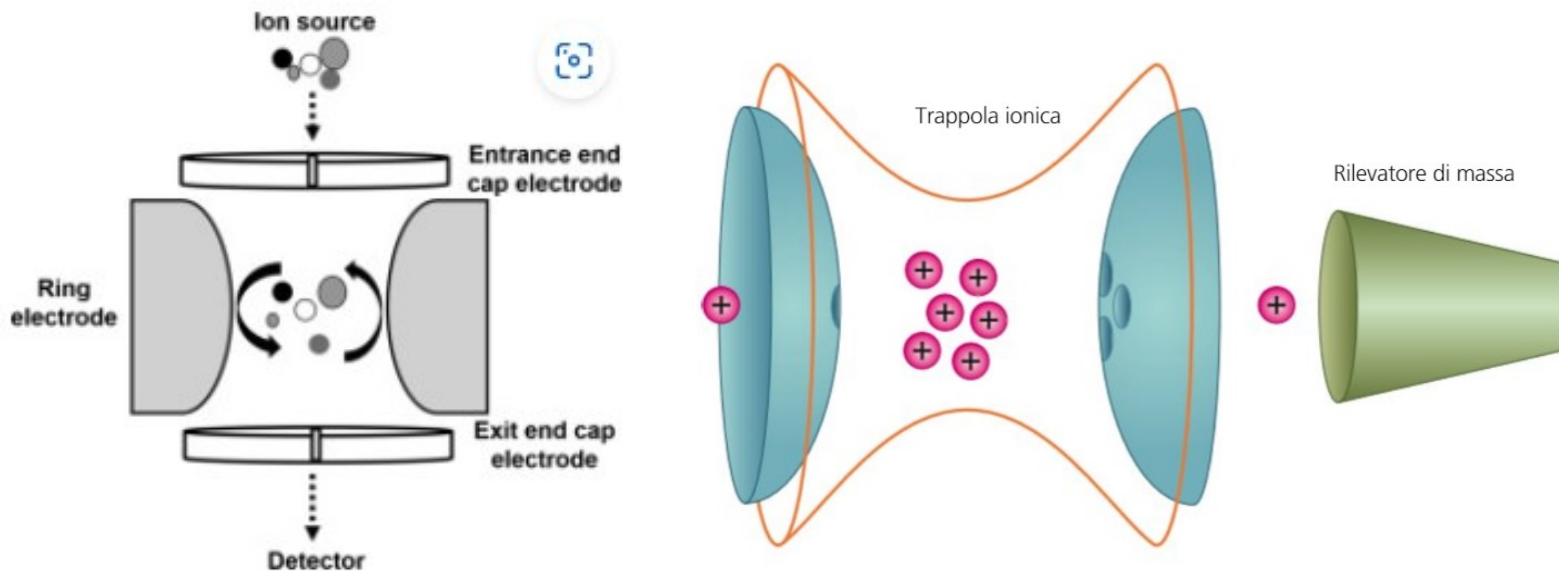
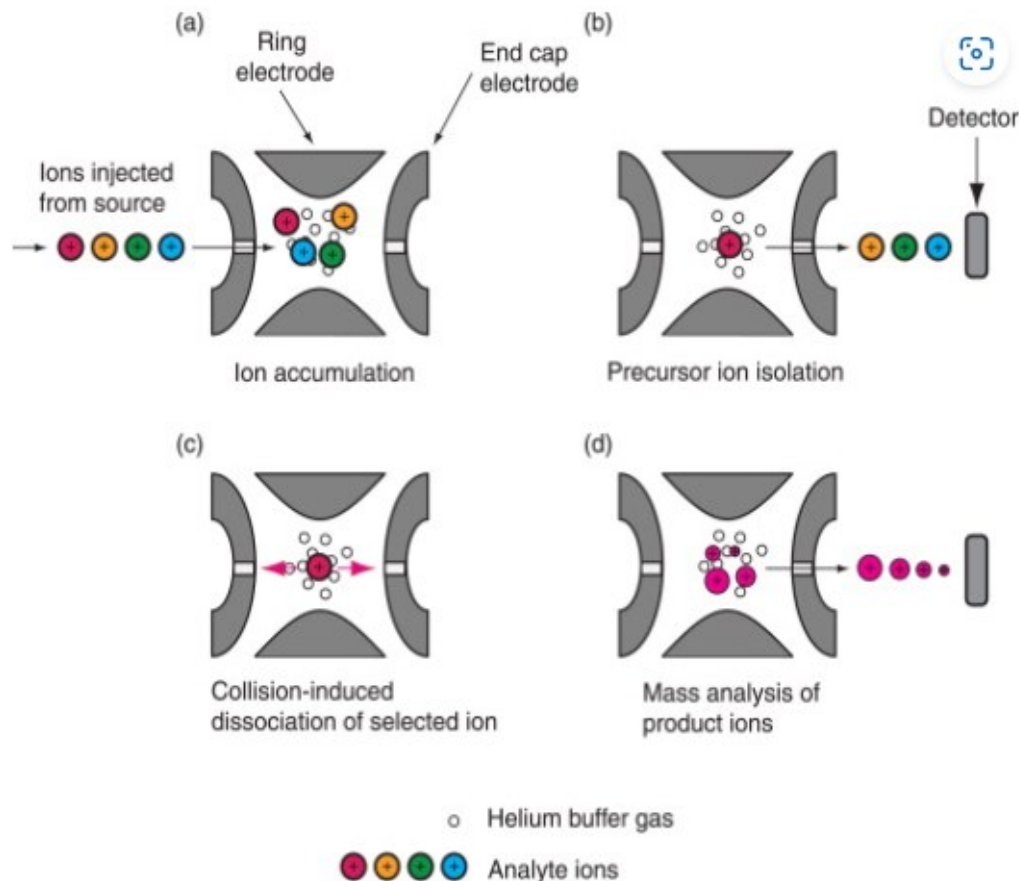


Figura 9.9
Schema semplificato dell'analizzatore a trappola ionica, in cui si distingue l'elettrodo ad anello (in arancione) e i due elettrodi a coperchio (in azzurro).

ION TRAP (TRAPPOLA IONICA)

- Gli ioni entrano nella trappola ionica a quadrupolo attraverso l'elettrodo di ingresso.
- Gli ioni vengono intrappolati nello spazio tra gli elettrodi
- Agli elettrodi vengono applicate diverse tensioni per intrappolare gli ioni
- I potenziali del sistema di elettrodi vengono modificati per produrre instabilità nelle traiettorie degli ioni, causando l'espulsione assiale degli ioni in ordine crescente di valore m/z
- Vantaggio: possibilità di effettuare analisi tandem MS

ION-TRAP TANDEM MS



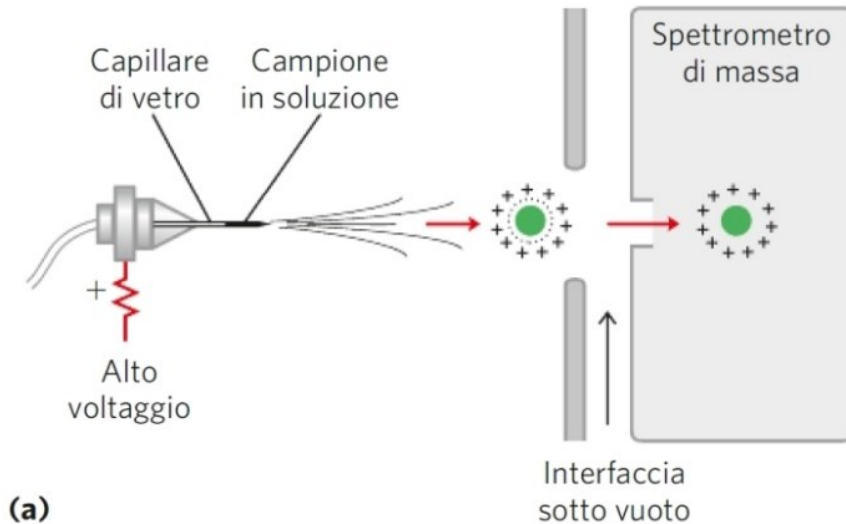
Esperimento MS²: gli ioni provenienti dalla sorgente vengono accumulati e intrappolati nello spazio al centro degli elettrodi (a). Gli ioni con un determinato valore m/z vengono trattiene nella trappola e tutti gli altri espulsi (b). Gli ioni specificati vengono quindi frammentati per collisione (c). Gli ioni prodotto risultanti vengono quindi espulsi in sequenza per generare lo spettro degli ioni prodotto (d). In un esperimento MS³, uno di questi ioni prodotto può essere trattenuto selettivamente nella trappola, eccitato e frammentato.

DETERMINAZIONE DELLA MASSA MOLECOLARE DI UNA PROTEINA

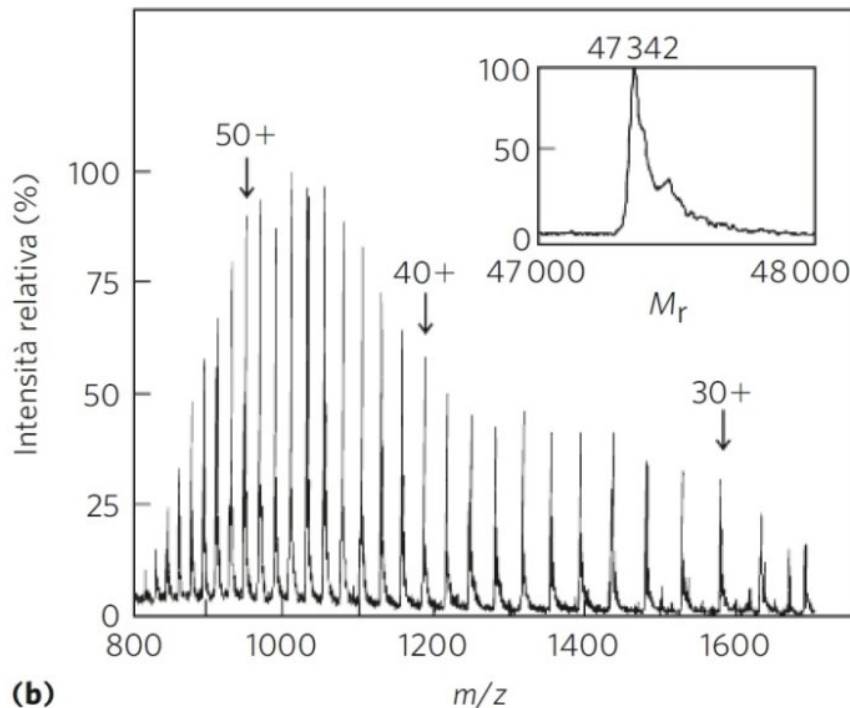
L'uso della spettrometria di massa per l'analisi delle proteine è possibile solo perché sono state sviluppate tecniche di ionizzazione "soft", come la rivelazione laser di desorbimento/ionizzazione assistita da matrice (MALDI) e la ionizzazione elettrospray (ESI).

- Mediante ESI MS
- Mentre la proteina passa in fase gassosa acquista dal solvente un numero variabile di protoni
- si carica positivamente
- Il numero variabile di cariche crea uno spettro costituito da picchi con valori di m/z che differiscono fra loro per un protone in più o in meno, e quindi per la massa di un protone (pari a 1)
- La massa molecolare della proteina viene calcolata utilizzando picchi vicini.

SPETTROMETRIA DI MASSA ESI DI UNA PROTEINA

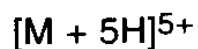
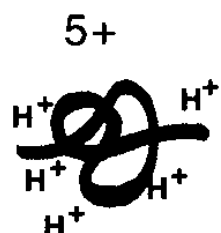
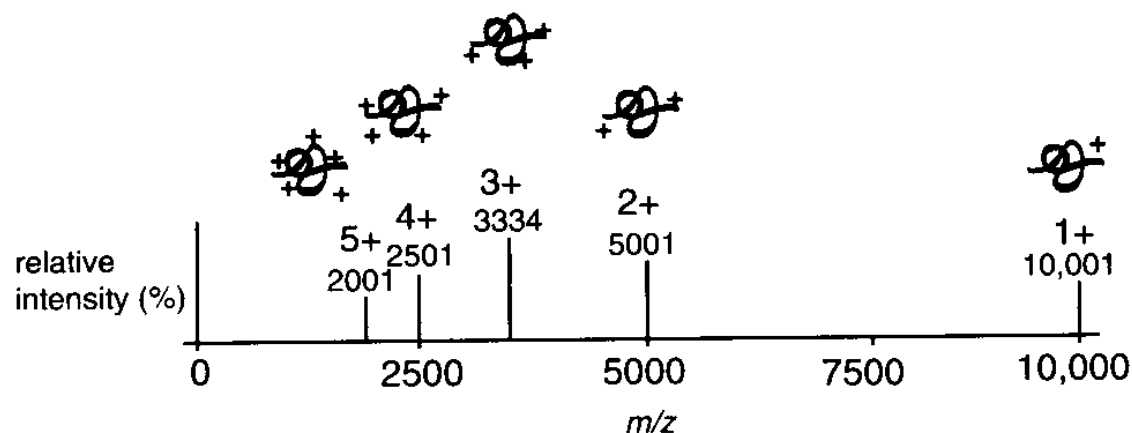


Lo spettro è costituito da un gruppo di picchi e ogni picco successivo (da destra verso sinistra) corrisponde a una specie che ha una carica positiva in più. Nell'inserto è mostrata una trasformazione dello spettro generata al computer che dà la massa molecolare della proteina. [Mann, M. e Wilm, M., Trends Biochem. Sci. 20, 219 (1995).]



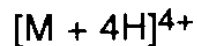
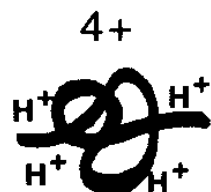
Generazione di ioni multicarica.

Per molti composti il numero di cariche è proporzionale alla grandezza del composto in esame per cui il rapporto m/z per le molecole che arrivano all'analizzatore è dell'ordine di 500-2000. Il numero di cariche assunte dalla molecola dipende dalla presenza di gruppi basici e dal pH del solvente.



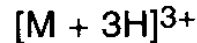
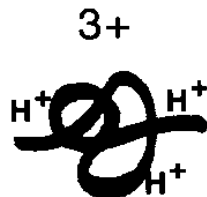
$m/z = 10,005 \div 5$

$m/z = 2001$



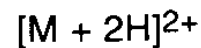
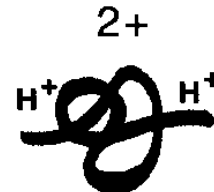
$m/z = 10,004 \div 4$

$m/z = 2501$



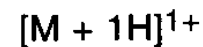
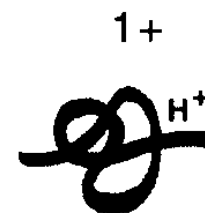
$m/z = 10,003 \div 3$

$m/z = 3334$



$m/z = 10,002 \div 2$

$m/z = 5,001$



$m/z = 10,001 \div 1$

$m/z = 10,001$

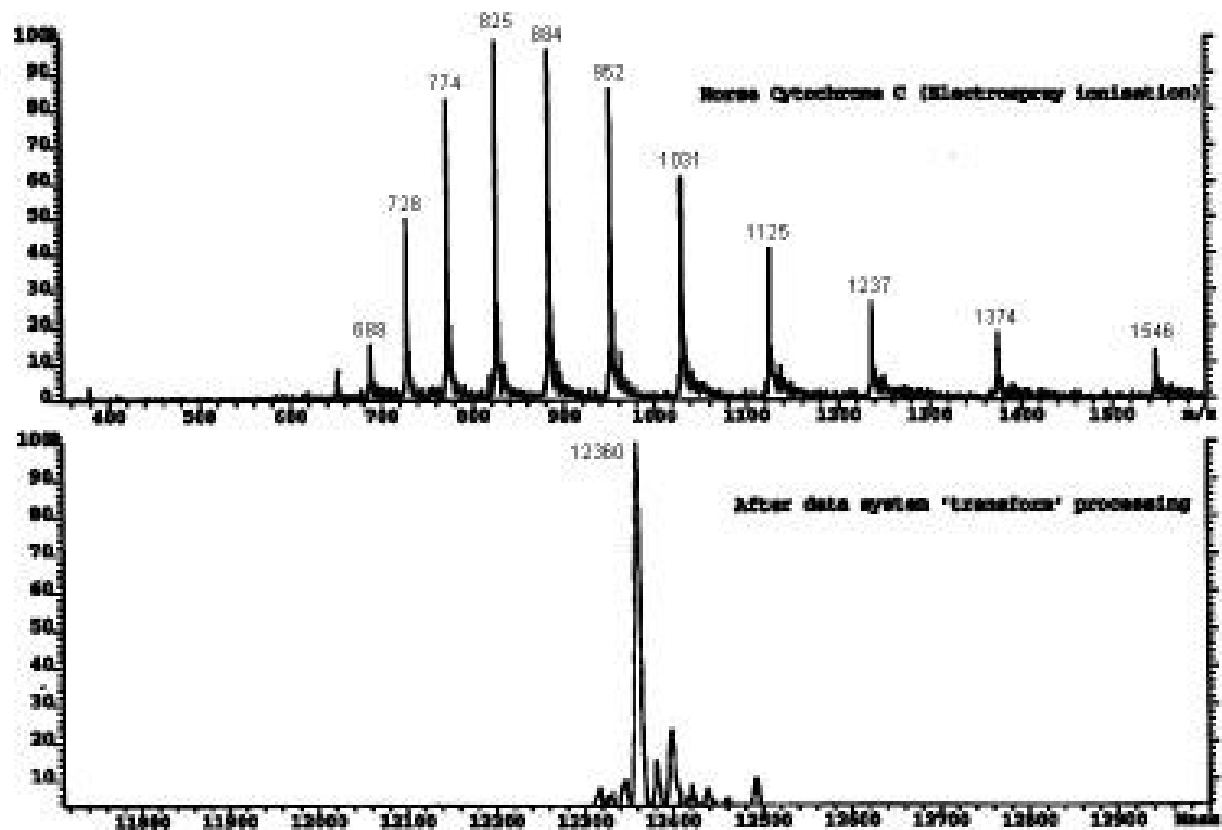
COME SI CALCOLA LA MASSA MOLECOLARE DA UNA SERIE DI PICCHI MULTICARICA?

✓ Picchi consecutivi differiscono per una carica.

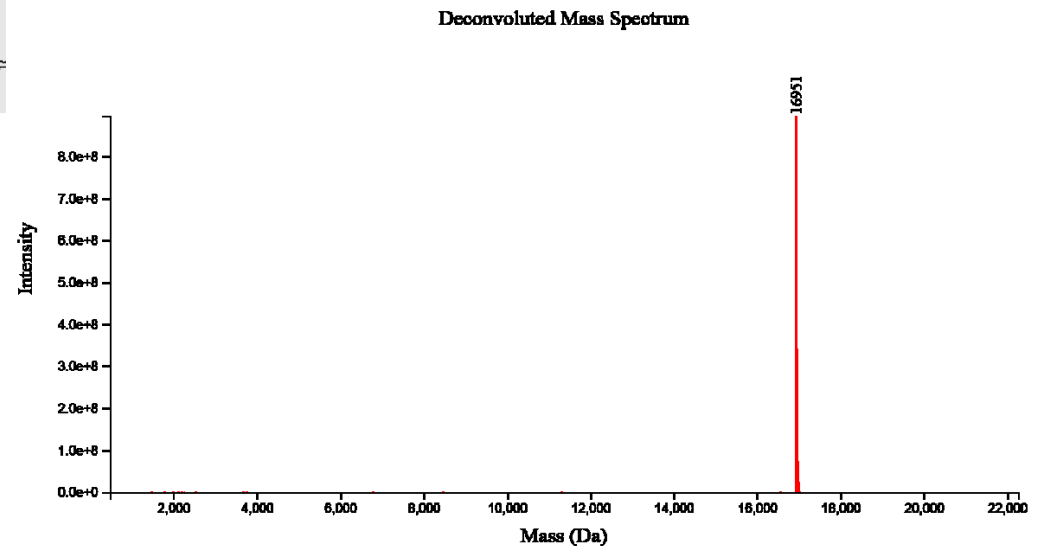
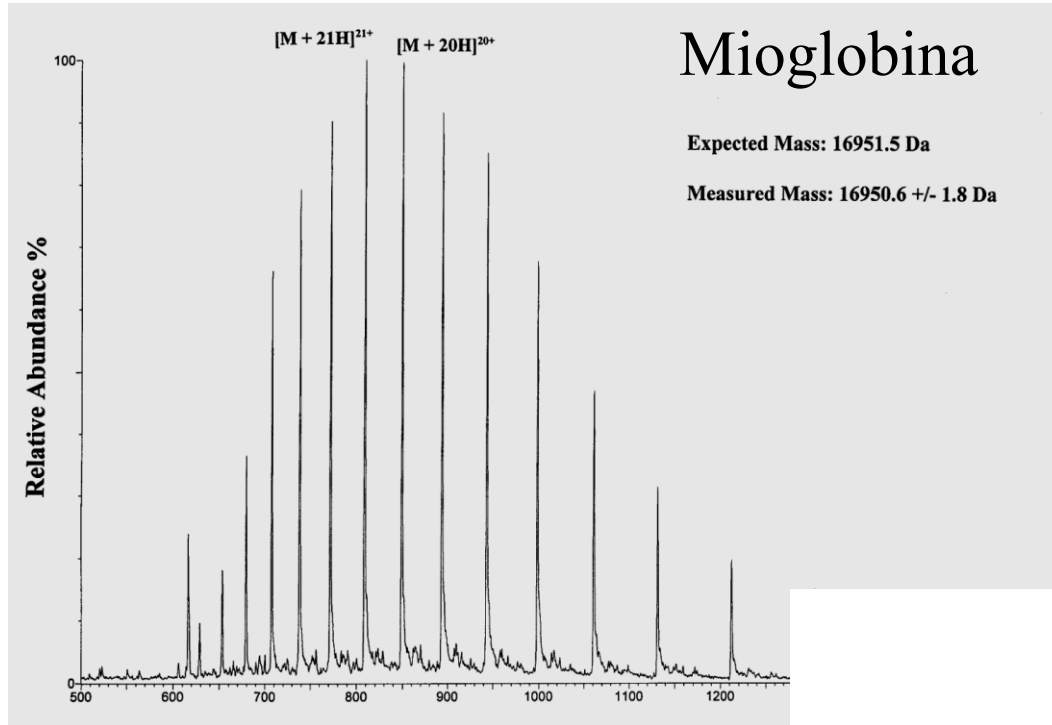
$$m/z = \frac{(M+n)}{n} = 1546$$

$$m/z = \frac{(M+n+1)}{n+1} = 1374$$

M e n



algoritmi, detti di convoluzione, permettono di ottenere uno spettro in cui è presente un solo picco al reale valore di massa.

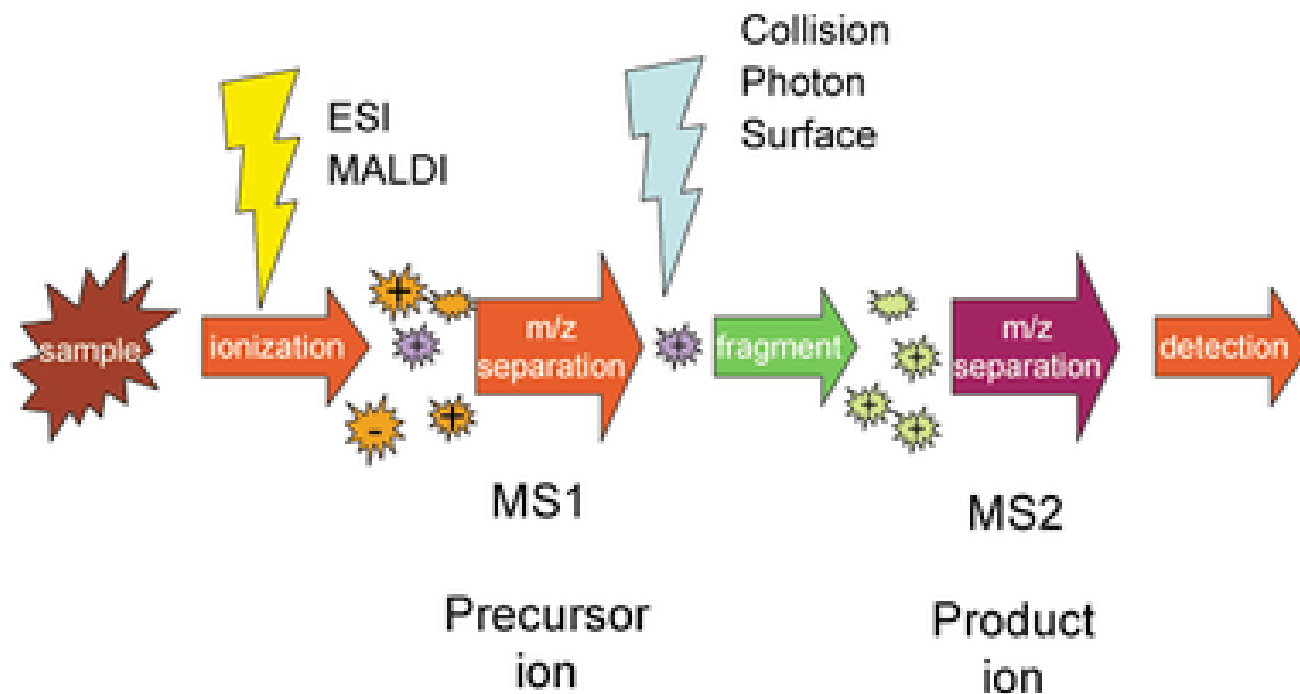


IDENTIFICAZIONE DELLE PROTEINE MEDIANTE MS

L'identificazione delle proteine viene generalmente eseguita in due modi:

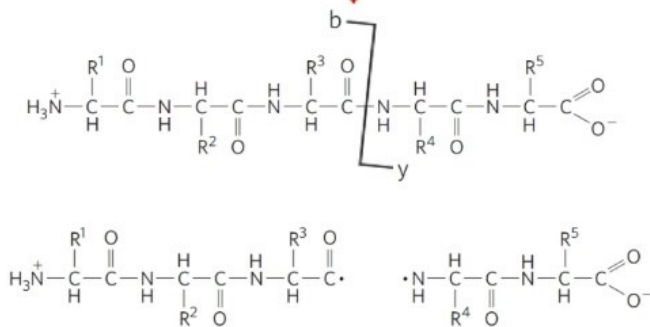
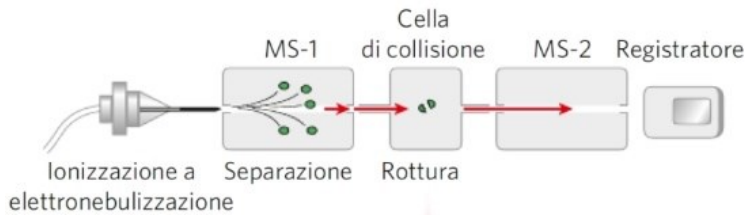
1. Utilizzando strumenti bioinformatici: le proteine vengono digerite con tripsina o un altro enzima proteolitico in peptidi più piccoli e i loro precisi pesi molecolari vengono misurati con la MS. Lo spettro di questi pesi molecolari viene poi confrontato con gli spettri teorici calcolati a partire dalle sequenze proteiche delle banche dati disponibili.
2. Utilizzando la MS tandem: dopo la digestione con tripsina, scelta di un peptide di interesse mediante MS che viene poi frammentato dalla collisione con un gas inerte. Lo schema di frammentazione fornisce informazioni complete o parziali sulla sequenza proteica che viene sottoposta a ricerca nelle banche dati.

SEQUENZIAMENTO DI UNA PROTEINA MEDIANTE SPETTROMETRIA DI MASSA TANDEM (MS TANDEM, O MS/MS).

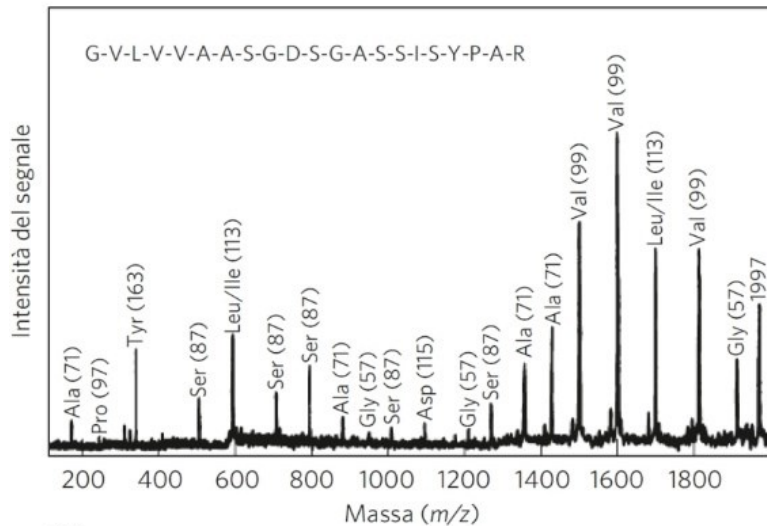


Spettrometria di massa tandem (MS/MS o MS²)

- Due o più analizzatori di massa sono accoppiati tra loro
- Utilizzata per l'analisi di biomolecole, come proteine e peptidi.
- Le molecole di un determinato campione vengono ionizzate e il primo spettrometro (MS1) separa questi ioni in base al loro rapporto massa/carica (m/z).
- Gli ioni con un particolare rapporto m/z provenienti da MS1 vengono selezionati e poi frammentati, ad esempio per collisione con un gas.
- I frammenti entrano in un secondo spettrometro di massa (MS²), che li separa in base al loro rapporto m/z e li rileva.



(a)



(b)

- Proteolisi (tripsina: noto sito di taglio)
- la soluzione di peptidi viene iniettata in uno spettrometro di massa (MS-1).
- Selezione di un peptide per essere frammentato
- Il peptide scelto viene frammentato in una cella posta tra i due spettrometri di massa, e il rapporto m/z di ogni frammento prodotto viene misurato nel secondo spettrometro di massa (MS-2).
- gli ioni che si formano derivano dalla rottura del legame peptidico
- La carica può essere mantenuta sul lato N-terminale o C-terminale.
- Ottenimento di uno spettro con picchi che rappresentano i frammenti generati da un piccolo peptide di 21 aa
- I picchi successivi si differenziano per la massa di un particolare amminoacido nel peptide originario. [Keough, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 7131 (1999), Fig. 3.]

LC-MS/MS

- Accoppiamento della cromatografia liquida (LC) alla MS
- Analisi di miscele complesse di proteine, o addirittura dell'intero proteoma cellulare
- In genere, la sequenza genomica dell'organismo oggetto di studio è nota.
- Le proteine cellulari isolate in un estratto, poi digerite in peptidi relativamente corti con una proteasi (tripsina).
- LC della miscela di peptidi: in questo modo, nello spettrometro di massa vengono successivamente introdotti dei peptidi già separati.
- Il passaggio dalla fase liquida a quella gassosa è realizzato con la tecnica MALDI o con l'ESI.
- Viene determinata la sequenza amminoacidica di ciascun peptide, che è poi confrontata con la sequenza genomica nota, disponibile nelle banche dati, per determinare di quale proteina il peptide faccia parte.
- Tecnica molto veloce

Flusso di lavoro di un tipico approccio LC-MALDI, che prevede tre fasi indipendenti: la preparazione del campione, la separazione dei peptidi mediante cromatografia liquida nano e l'analisi delle corrispondenti frazioni LC mediante spettrometria di massa MALDI.

