

Spettrometria di massa (MS)

1912

Thompson



Per 30 anni limitata al campo della fisica e della chimica inorganica, dove permise la scoperta di isotopi più o meno rari degli elementi, la determinazione della loro abbondanza relativa e la misurazione delle masse.

1940



MS ha trovato un numero maggiore di applicazioni, inizialmente nella chimica organica e successivamente in campo biochimico.

Spettrometria di Massa



- Proteomica



- Genetica e medicina



- Biologia molecolare e cellulare



- Farmacologia



- Analisi organiche e inorganiche



- Geologia



- Archeologia

Cosa permette di determinare la Spettrometria di massa

La spettrometria di massa è una tecnica analitica che fornisce informazioni sulla struttura della molecola basandosi sulla sua ionizzazione e sulla sua successiva frammentazione in ioni con diverso rapporto massa/carica (m/z).

➤ Fornisce la massa molecolare, e per piccole molecole anche la formula molecolare

- Identificazione di composti sconosciuti
- Identificazione della formula molecolare
- Determinazione del peso molecolare
- Delucidazione della struttura molecolare
- Analisi quantitative

A differenza delle altre tecniche spettroscopiche, questo è un metodo distruttivo e non si basa sull'interazione tra radiazioni e materia.

Principio:

La spettrometria di massa può misurare la massa di una molecola solo se viene convertita in uno ione (positivo o negativo)

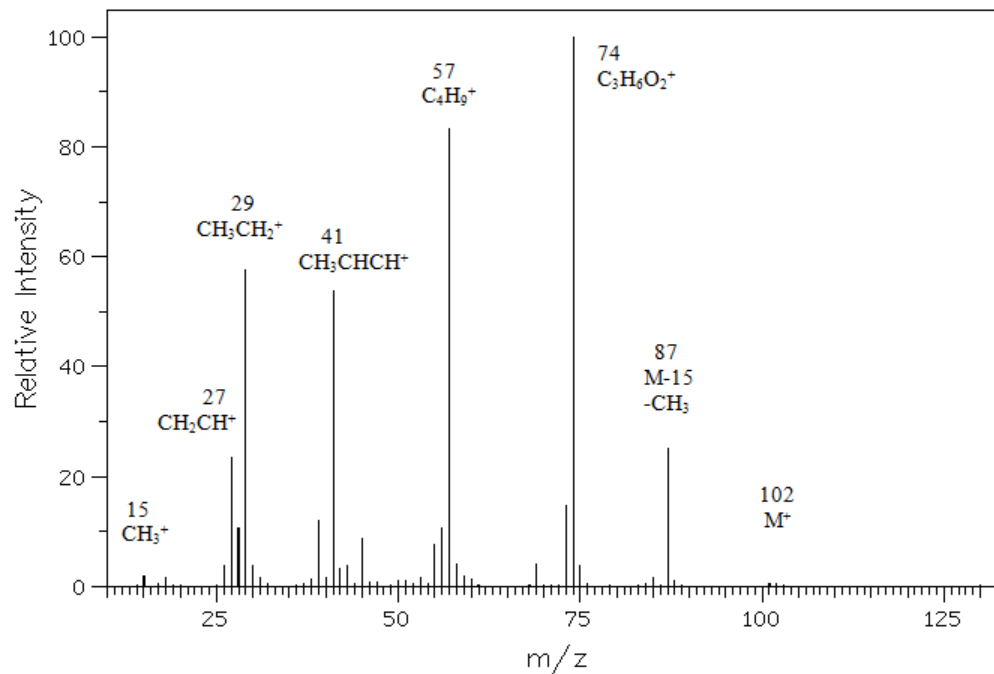
Una molecola viene ionizzata per l'espulsione di un elettrone o di un protone.

Il catione che si forma in parte si frammenta dando molecole e/o radicali neutri, in parte genera cationi e/o radicali cationici.

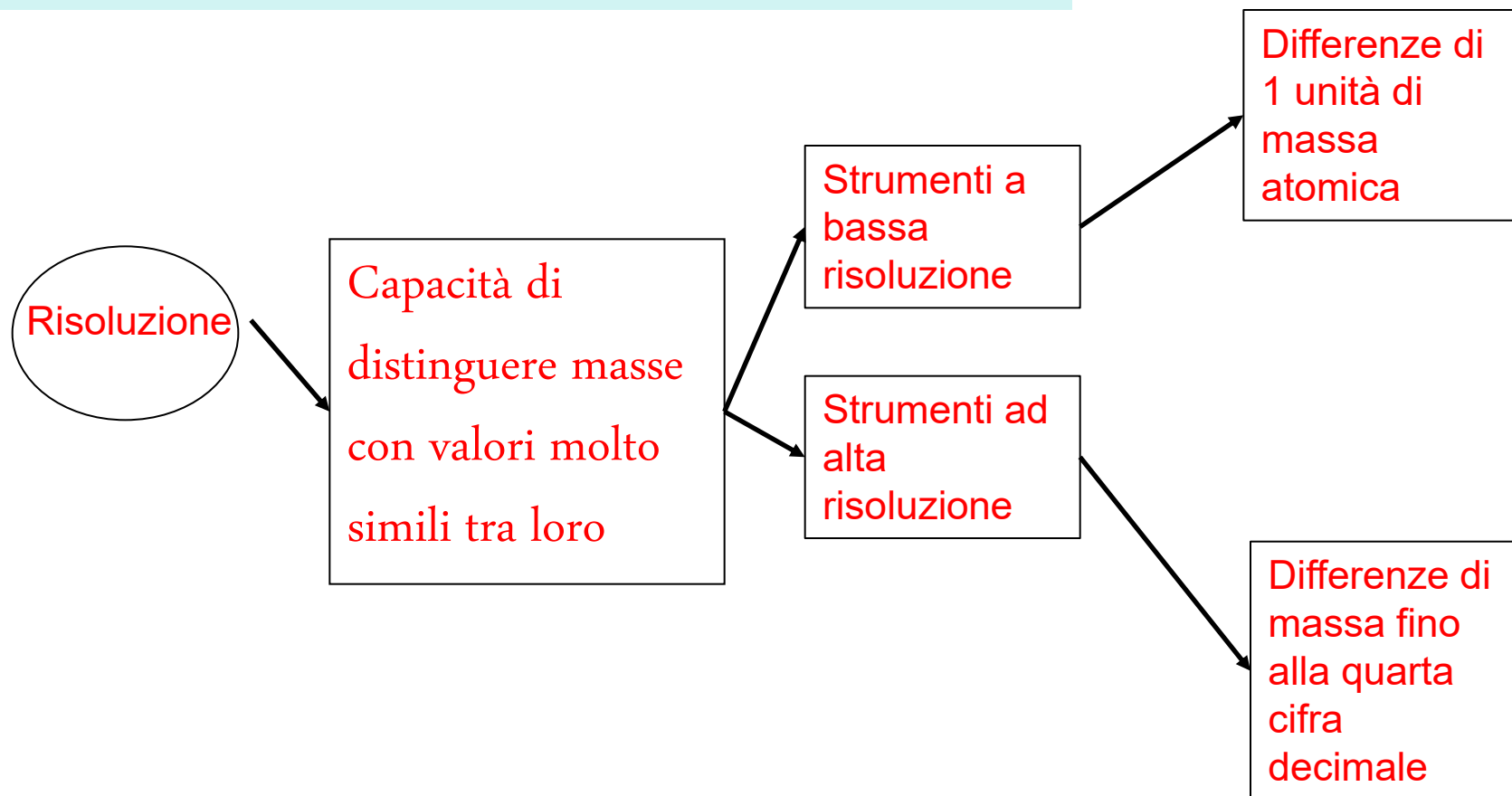
Lo ione molecolare e i vari ioni che si originano per frammentazione vengono distinti in base al loro rapporto massa/carica e rilevati da un detector.

Il risultato dell'esperimento è lo **spettro di massa**, che rappresenta l'abbondanza relativa degli ioni in funzione del loro rapporto m/z

– per ottenere **uno spettro di massa** è necessaria la produzione degli ioni in fase gassosa.



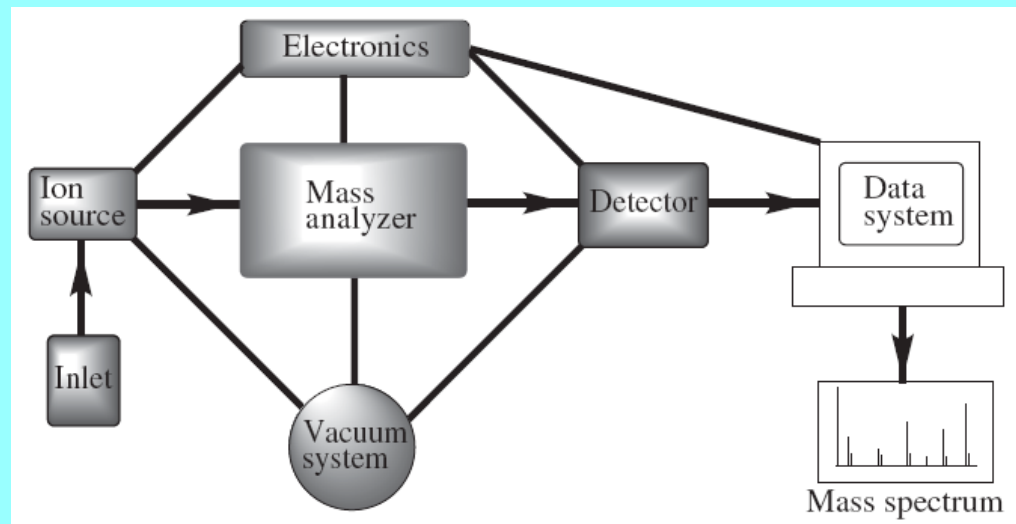
SPETTROMETRO DI MASSA



Accuratezza: quanto il valore sperimentale si avvicina a quello teorico)

(misurata in ppm).

SPETTROMETRO DI MASSA



- Sistema di introduzione del campione;
- Sorgente (camera di ionizzazione; sorgente di ioni);
- Analizzatore (separatore di ioni);
- Rivelatore e sistema di elaborazione dei dati;
- Sistema da vuoto.

Da cosa è costituito uno spettrometro di massa



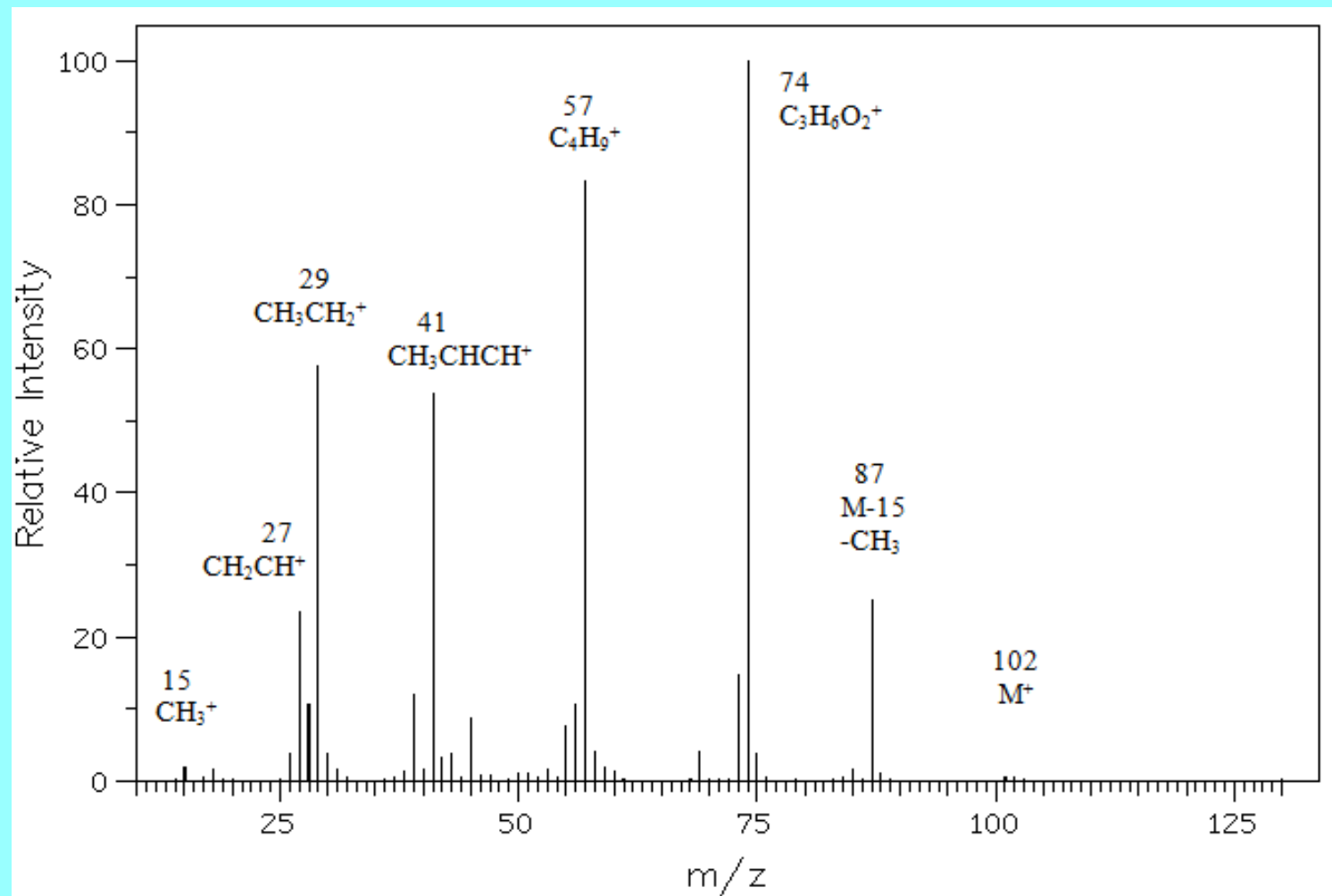
La sorgente serve a volatilizzare e ionizzare il campione

L'analizzatore serve a separare ioni con diverso rapporto m/z

Il detector serve a rivelare gli ioni che arrivano dall'analizzatore

L'analisi MS produce lo spettro di massa,
cioè

la mappa dell'abbondanza relativa degli ioni con diverso rapporto massa/carica (m/z) prodotti alla sorgente





La sorgente serve a volatilizzare e ionizzare il campione

L'analizzatore serve a separare ioni con diverso rapporto m/z

Il detector serve a rivelare gli ioni che arrivano dall'analizzatore



-numero e natura dei frammenti molecolari

TIPI DI IONIZZAZIONE

Alta energia--→ maggiore frammentazione

Es: ionizzazione elettronica (EI)

Bassa energia--→ minore frammentazione
(minore numero di ioni)

Es: ionizzazione chimica (CI)

FAB

MALDI

ESI

Ionizzazione elettronica (EI)

Alta energia-

L'energia per la ionizzazione è fornita da un fascio di elettroni

Utilizzo:

- Composti volatili
- Composti non termolabili
- Composti a basso peso molecolare < 800 Da

70 eV



M⁺ ione molecolare

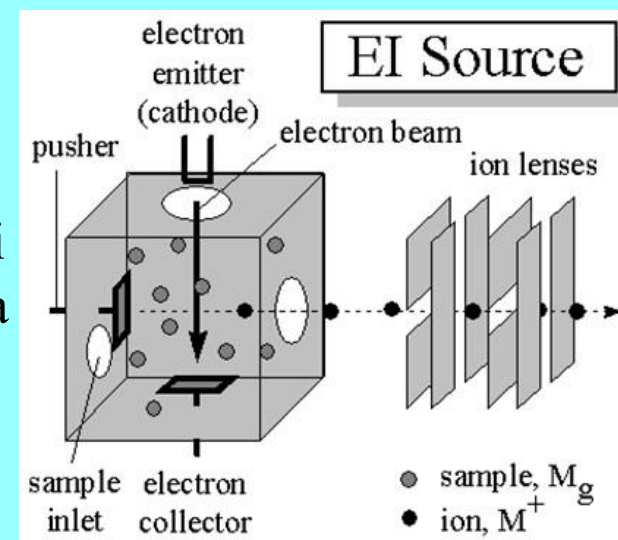
EI : Processo di ionizzazione

Ionizzazione elettronica – tecnica di ionizzazione hard.

Possono essere ionizzati con questa tecnica campioni **solidi o liquidi volatili e non termolabili** ed essere introdotti nella camera di ionizzazione per introduzione diretta o indiretta (GC o HPLC).

Le molecole del campione interagiscono con un fascio di elettroni i quali causano l'espulsione di un elettrone e la formazione di un radicale **catione M^+** .


Le **particelle neutre** che si generano **vengono allontanate** da una pompa a vuoto, mentre **gli ioni** vengono accelerati verso l'**analizzatore** da una piastra di accelerazione tenuta a potenziale crescente.



Ionizzazione chimica (CI)

**Bassa energia--→ minore frammentazione
(minore numero di ioni)**

Camera di ionizzazione --→ gas (metano)

- 1) Bombardamento elettronico
 - 2) Gas---→ si originano specie che possono cedere protoni
 - 3) Disattiva la sorgente di ionizzazione
 - 4) Si introduce il campione (M)
 - 5) M subisce la protonazione (M + 1)
- 

TECNICHE IN FASE GASSOSA

(EI) $M + e^- \rightarrow M^+ + 2 e^-$ **Ionizzazione elettronica (EI)**

M^+ ione molecolare

(CI) sfrutta la collisione con ioni di altre specie

Ionizzazione chimica (CI)

(M + 1)

Altri tipi di ionizzazione

FAB (*Fast Atom Bombardment*)

Bombardamento con atomi veloci

Impatto di atomi a velocità elevata su un campione disciolto in una matrice liquida

FD (*Field Desorption*)

(Desorbimento di campo)

Imposizione di un forte campo elettrico su un campione depositato su una speciale sonda metallica

SIMS (*Secondary Ion Mass Spectrometry*)

Spettrometria di massa di ioni secondari

Impatto di ioni a velocità elevata su un film sottile di campione depositato su un substrato metallico (o disciolto in una matrice liquida, Liquid SIMS)

•Le tecniche di ionizzazione in fase condensata hanno aperto la possibilità di applicare la spettrometria di massa a problemi di interesse biomedico.

Consentono la ionizzazione di macromolecole biologiche perché consentono di lavorare con fasi condensate:

- Sorgente **FAB** (fast atom bombardment), ormai poco usata
- Sorgente **ESI** (Electro Spray Ionisation) permette oggi di analizzare una ampia gamma di molecole e si applica a campi differenti.
- Sorgente **MALDI** (Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization) permette di analizzare macromolecole senza porre virtualmente limiti alla loro massa.

TECNICHE IN FASE CONDENSATA

Le tecniche in fase condensata sono utilizzate per specie non volatili e termicamente labili.

→ **ESI (1984)** (Electro Spray Ionisation)

Formazione di particelle liquide cariche dalle quali gli ioni vengono emessi per desorbimento e/o desolvatazione

→ **MALDI (1987)** (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization),
(Ionizzazione laser assistita da matrice)

Impatto di fotoni ad alta energia su un campione inglobato in una matrice organica solida

Il Premio Nobel per la Chimica 2002 è stato dedicato agli studi sulle macromolecole biologiche e delle proteine, in particolare: la spettroscopia di massa e la risonanza magnetica nucleare.

Il premio è stato attribuito per metà a John B. Fenn (statunitense) e Koichi Tanaka (giapponese) per la spettroscopia di massa

**The Nobel Prize in
Chemistry 2002**



John B. Fenn



Koichi Tanaka



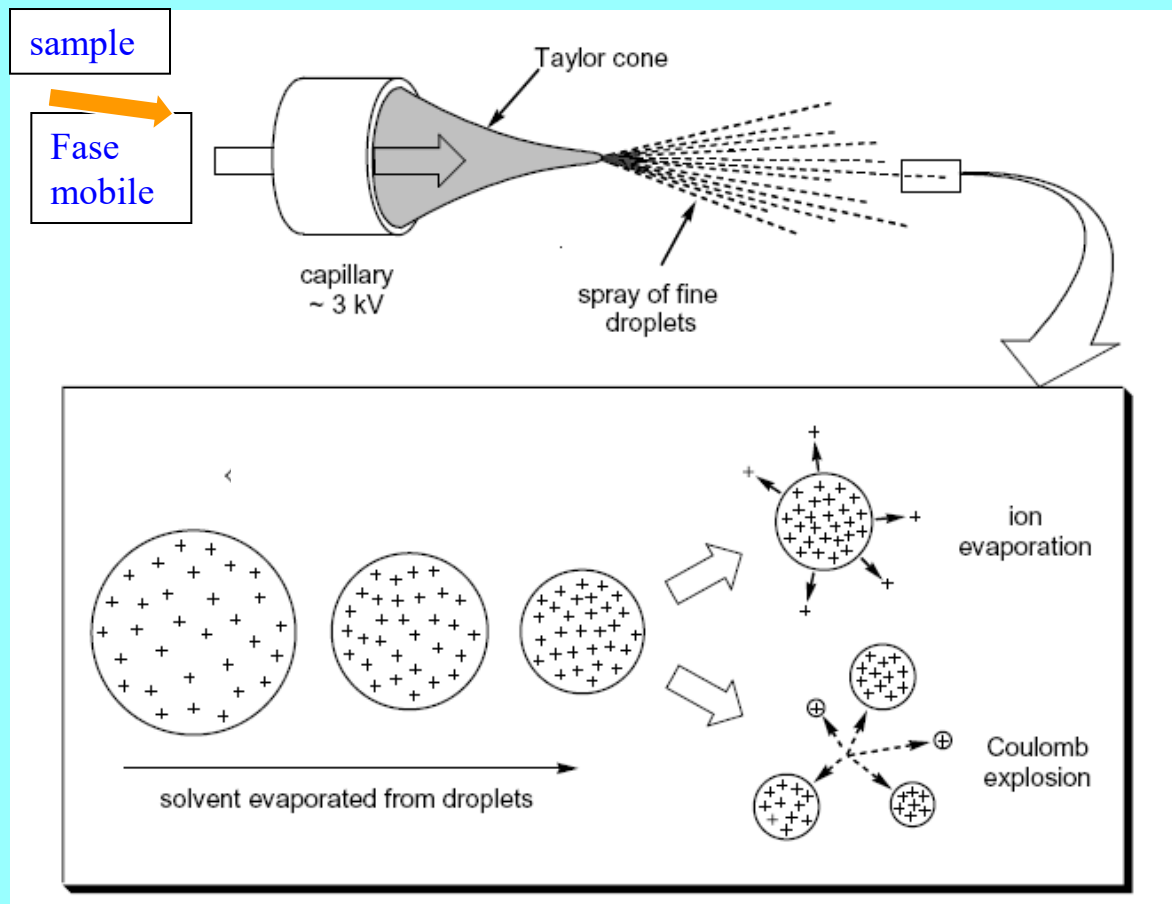
Kurt Wüthrich

e per l'altra metà a Kurt Wüthrich (svizzero) per la risonanza magnetica nucleare.

• Sorgente **ESI** (Electro Spray Ionisation) permette oggi di analizzare una ampia gamma di molecole.

Si tratta di una sorgente di ionizzazione che utilizza un gas inerte (di solito azoto) per provocare un processo di nebulizzazione.

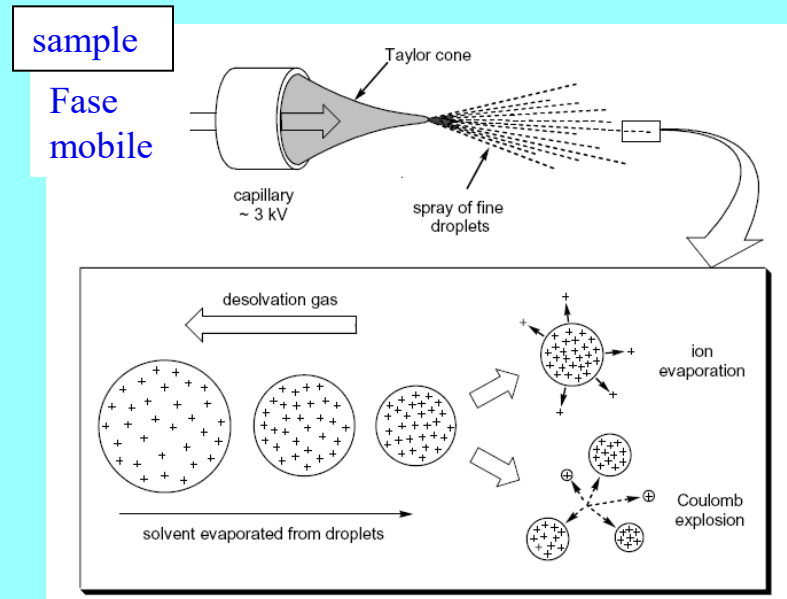
Il campione in soluzione viene introdotto in un capillare in acciaio



Il campione in soluzione **fuoriesce sottoforma di aerosol.**

Il **potenziale applicato** alla fine dell'ago è sufficientemente alto da nebulizzare la soluzione in numerosissime goccioline cariche, contenenti il campione.

Viene applicato un campo elettrico di 3-6 kV

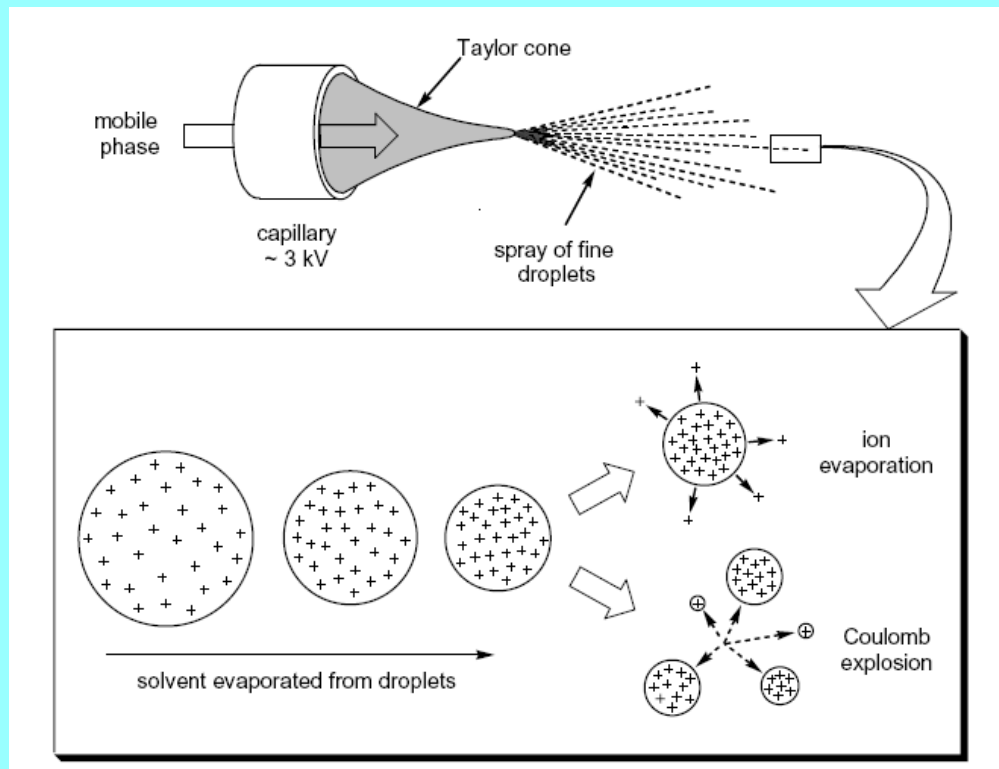


Man mano che il solvente evapora, la concentrazione di carica alla superficie della gocciolina aumenta

→ esplosione 'coulombica' .

Si formano ioni dell'analita privi di solvente.

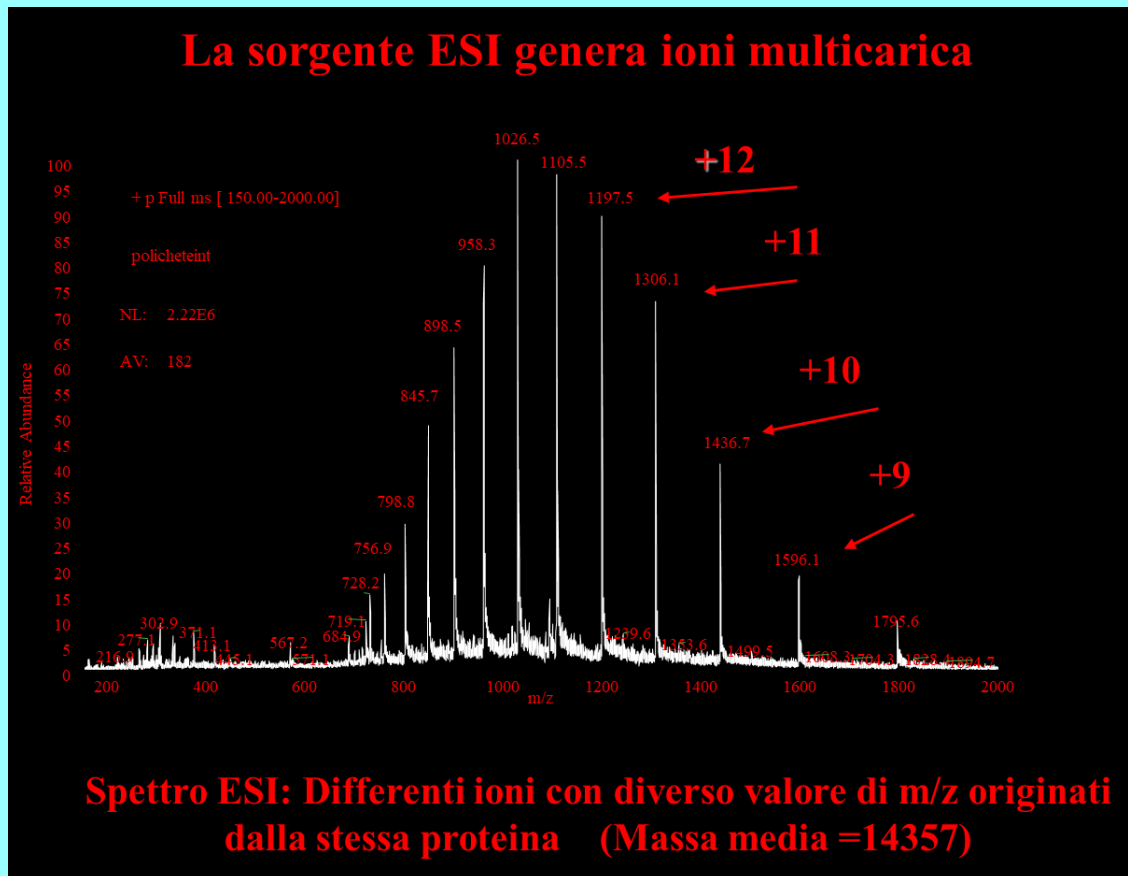
Le cariche sono statisticamente distribuite tra i siti disponibili dell'analita, portando spesso alla formazione di ioni con cariche multiple. (ioni multi-carica)



<https://www.youtube.com/watch?v=r6TGvG7RUyo>

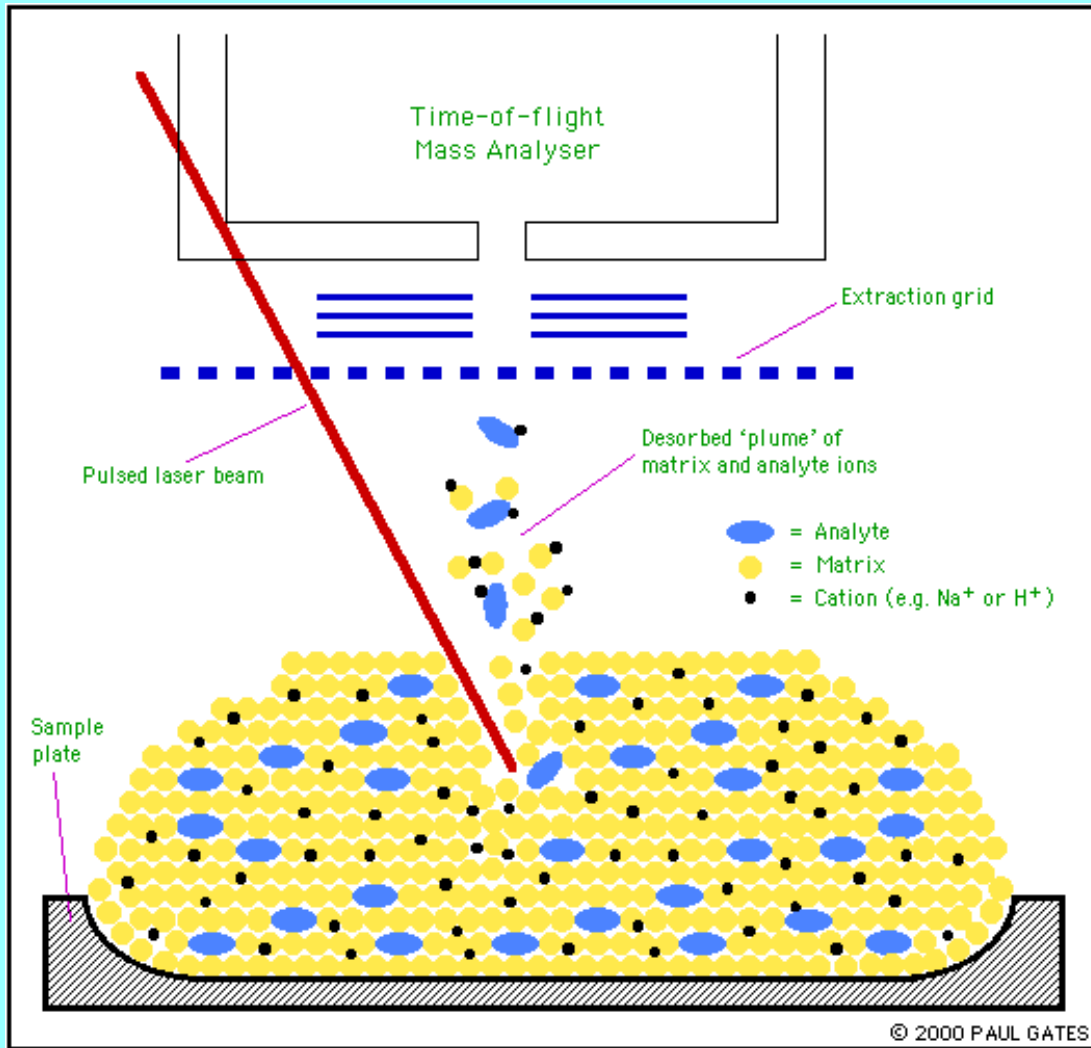
Le due caratteristiche essenziali *dell'ESI* sono:

- La ionizzazione avviene a pressione atmosferica;
- La ionizzazione genera ioni multicarica.



MALDI - Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation

Ionizzazione laser assistita da matrice



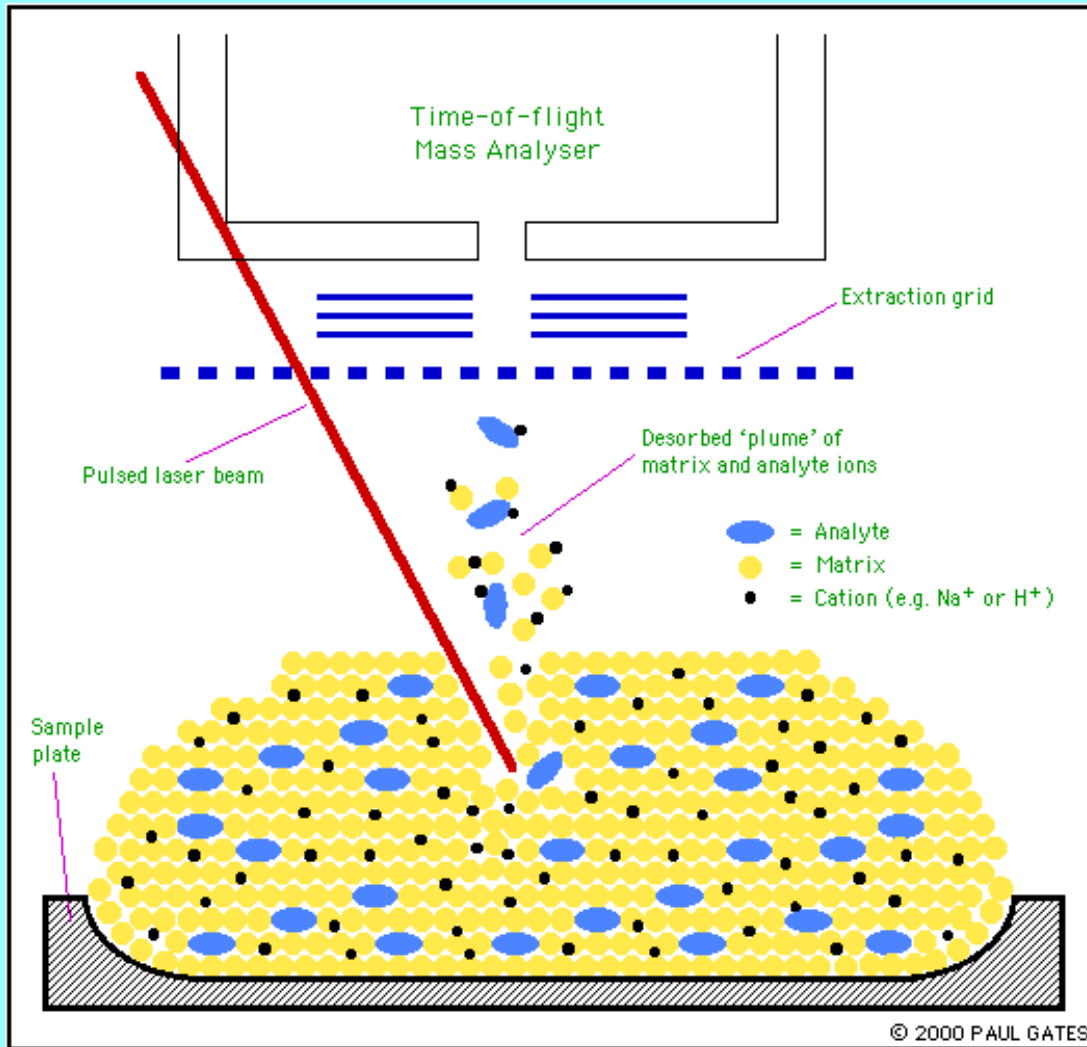
1985 Karas, Bachmann
e Hillekamp

Adatto per composti con pesi
molecolari che possono
arrivare a fino a 300 kD.

L'**analita** viene solubilizzato
in opportuno solvente
insieme ad un composto
detto **matrice** e fatto co-
cristallizzare su un
supporto di metallo
denominato **target**.

MALDI - Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation

Ionizzazione laser assistita da matrice

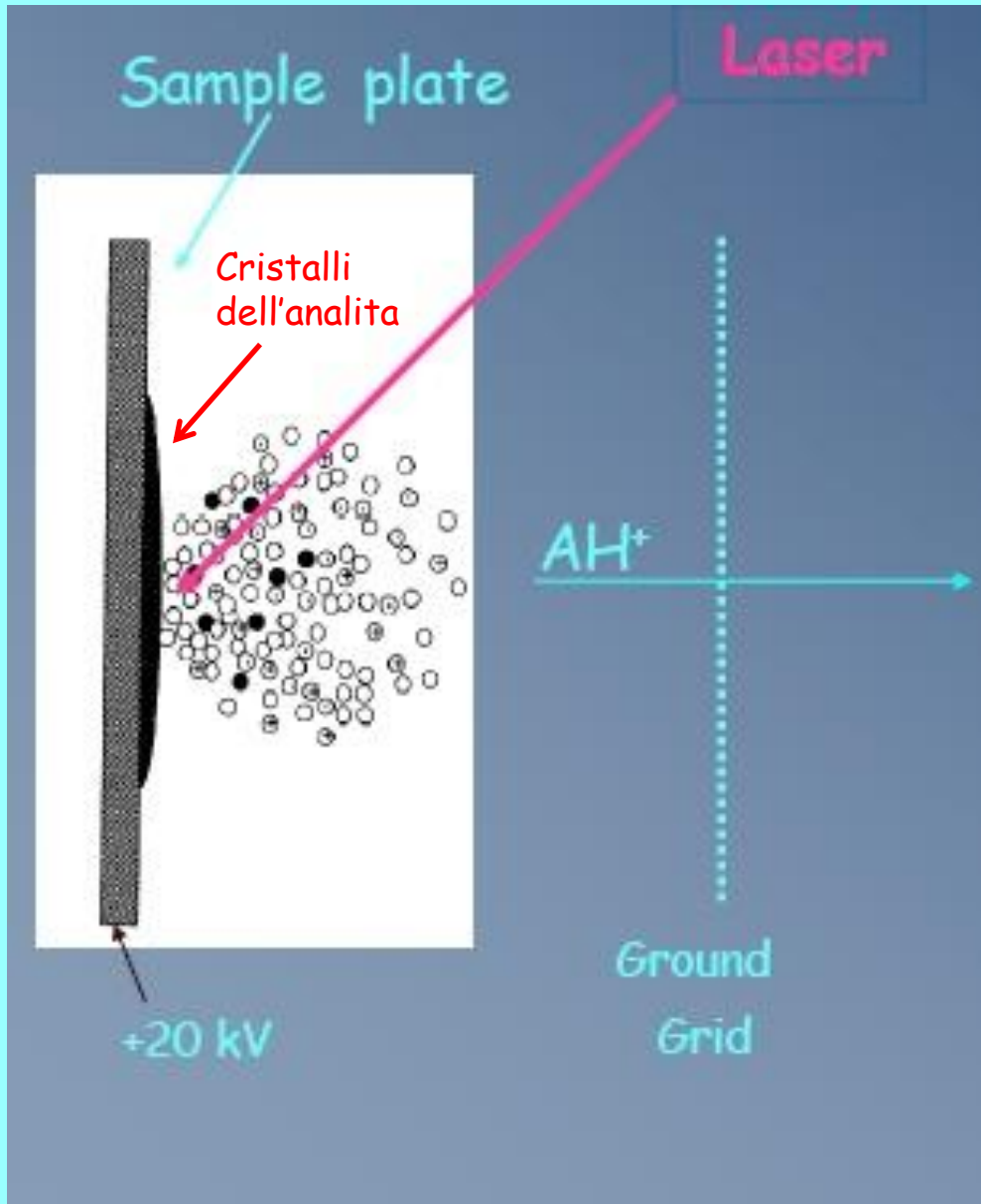


Il **Target** viene introdotto nella camera di ionizzazione (sotto vuoto) e i cristalli colpiti con un **raggio laser**.

L'energia trasferita dal raggio laser alla matrice ne provoca la sublimazione.

La matrice trascina con sé le molecole dell'analita e trasferisce all'analita protoni consentendo così la formazione **di ioni positivi** in fase vapore.

MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization



Gli ioni sono
frequentemente
monocarica

IONI IN FASE
GASSOSA

Funzioni della matrice

- Solvente per le molecole di analita.
- Le molecole di matrice assorbono l'energia dell'impulso laser e la trasferiscono come energia di eccitazione al sistema solido. Alcuni Autori propongono che come risultato si abbia la formazione di un gas denso che si espande nel vuoto in modo supersonico.
- Ruolo attivo nella ionizzazione delle molecole di analita. Reazioni chimiche portano alla formazione di ioni molecolari protonati $[M+H]^+$, ioni molecolari multiprotonati $[M+nH]^{n+}$, a cluster molecolari del tipo $[nM]^+$ ed a ioni del tipo $[M+matrice]^+$.

Caratteristiche della matrice

- **Solubilità:** l'analita e la matrice devono essere solubili nello stesso solvente.
- **Assorbimento:** la matrice deve avere una banda di assorbimento in corrispondenza della lunghezza d'onda del laser usato, in modo che l'energia dell'impulso laser si depositi sulla matrice e non sull'analita
- **Reattività:** la matrice usata non deve modificare covalentemente l'analita

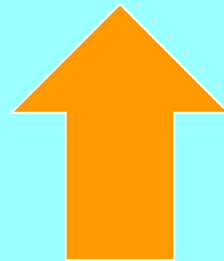
Da cosa è costituito uno spettrometro di massa



La sorgente serve a volatilizzare e ionizzare il campione

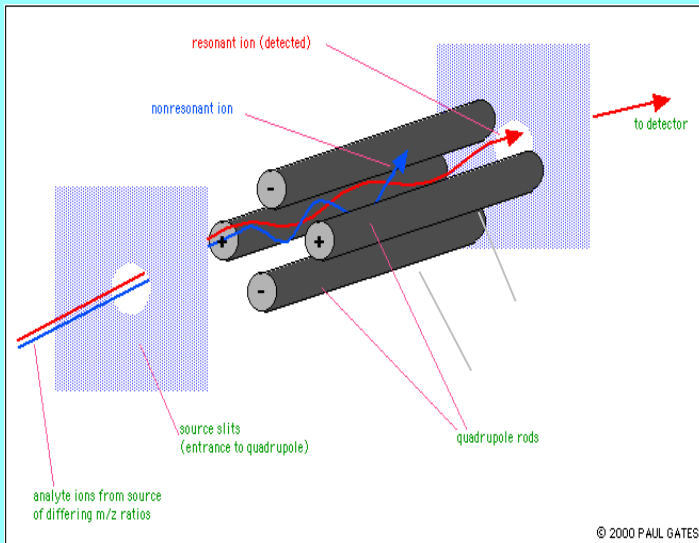
L'analizzatore serve a separare ioni con diverso rapporto m/z

Il detector serve a rivelare gli ioni che arrivano dall'analizzatore

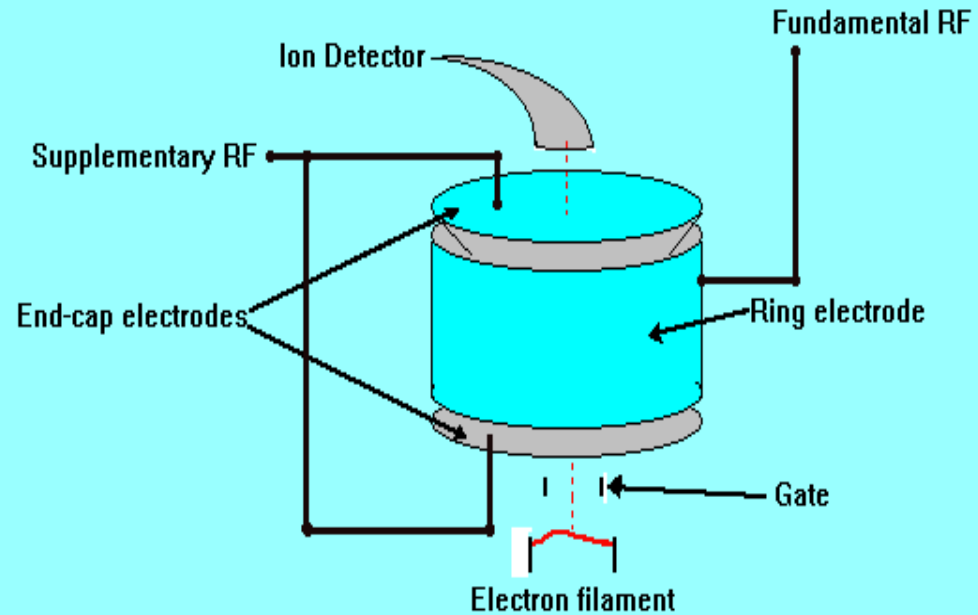


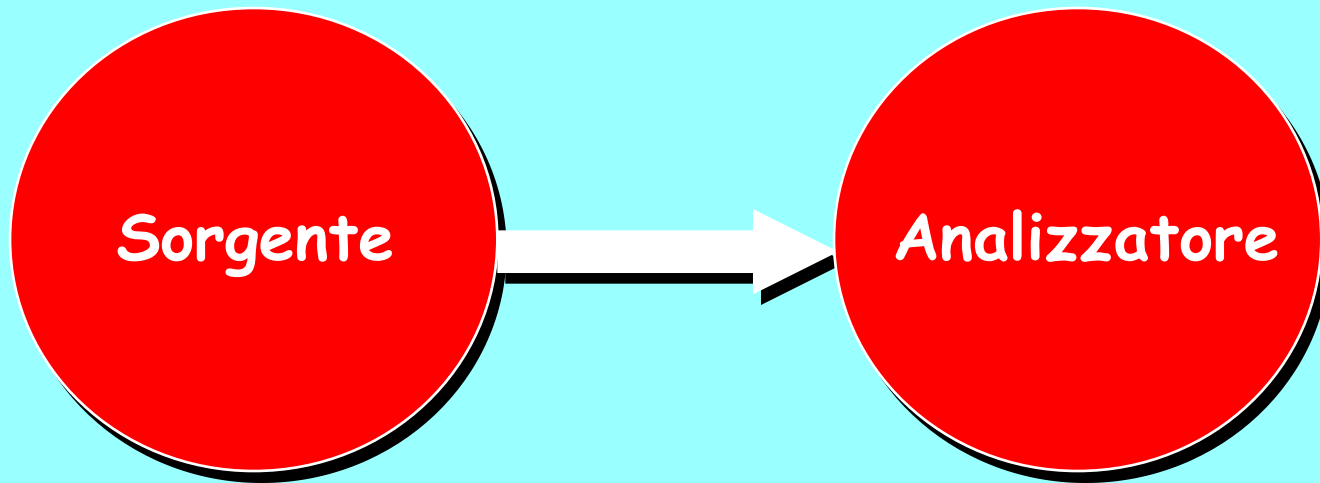
ANALIZZATORE

Quadrupole Mass Analyzer



Ion trap





Ionizzazione

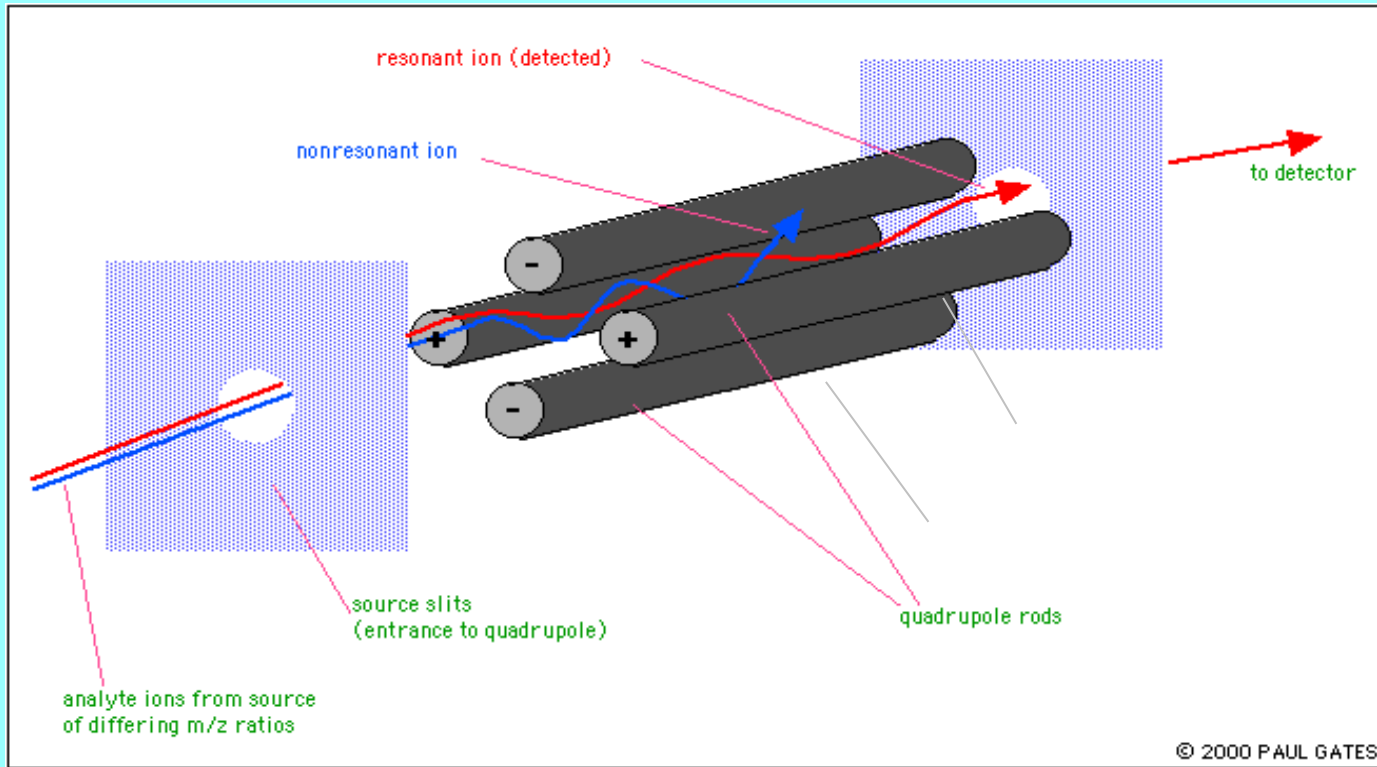
Deve generare ioni in fase gassosa. Gli ioni vengono indirizzati all'analizzatore che li deve separare

Analizzatore

Separa ioni con diverso valore di m/z

- **Analizzatore a quadrupolo**
- **Analizzatore a trappola ionica (ion-trap)**

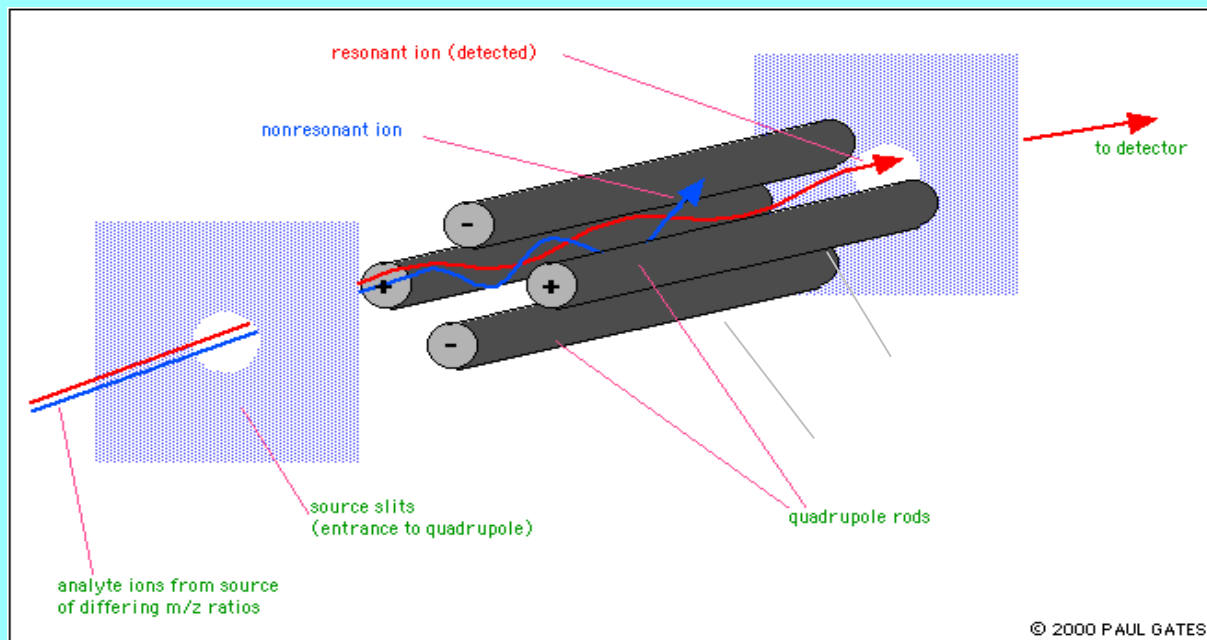
Quadrupole Mass Analyzer



Tubo
(quattro barre
parallele disposte
simmetricamente
intorno all'asse del
tubo)
(vuoto)

Le barre diametralmente opposte sono in contatto elettrico tra di loro, mentre tra barre adiacenti è applicata un voltaggio formato da due componenti:
una differenza di potenziale continua e una oscillante ad alta frequenza.

Quadrupole Mass Analyzer



A causa del campo elettromagnetico gli ioni durante l'attraversamento descrivono traiettorie oscillanti, che possono essere stabili, permettendo allo ione di fuoriuscire dal quadrupolo, o instabili portando alla collisione dello ione con le barre del quadrupolo.

A determinati valori delle tensioni applicate, solo ioni aventi un preciso valore del rapporto m/z usciranno dal quadrupolo stesso.

La scansione di uno spettro si ottiene facendo variare simultaneamente V_{cc} (continua) e V_{ac} (alternata), mantenendo costante il loro rapporto.

Sono piu' piccoli, piu' leggeri e meno costosi.

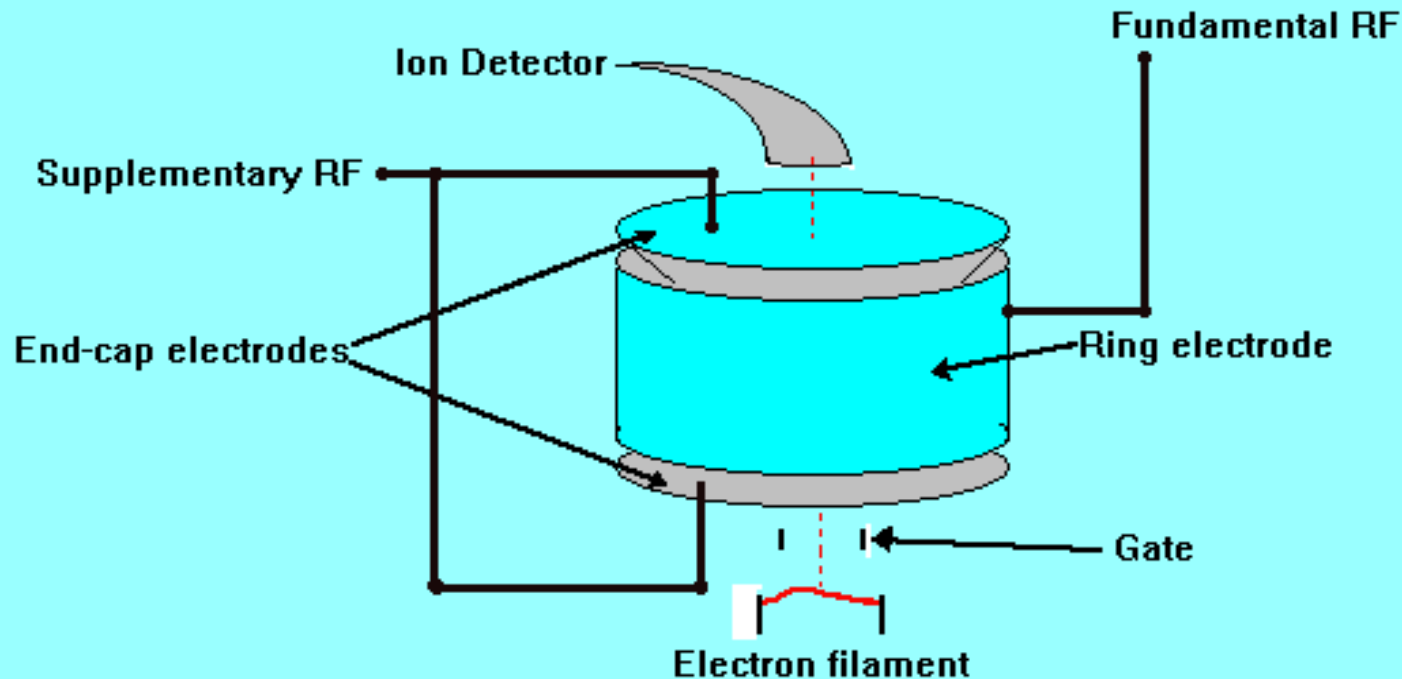
Di solito hanno una risoluzione minore e possono rilevare m/z solo fino a ≈ 4000 Th

Ion trap

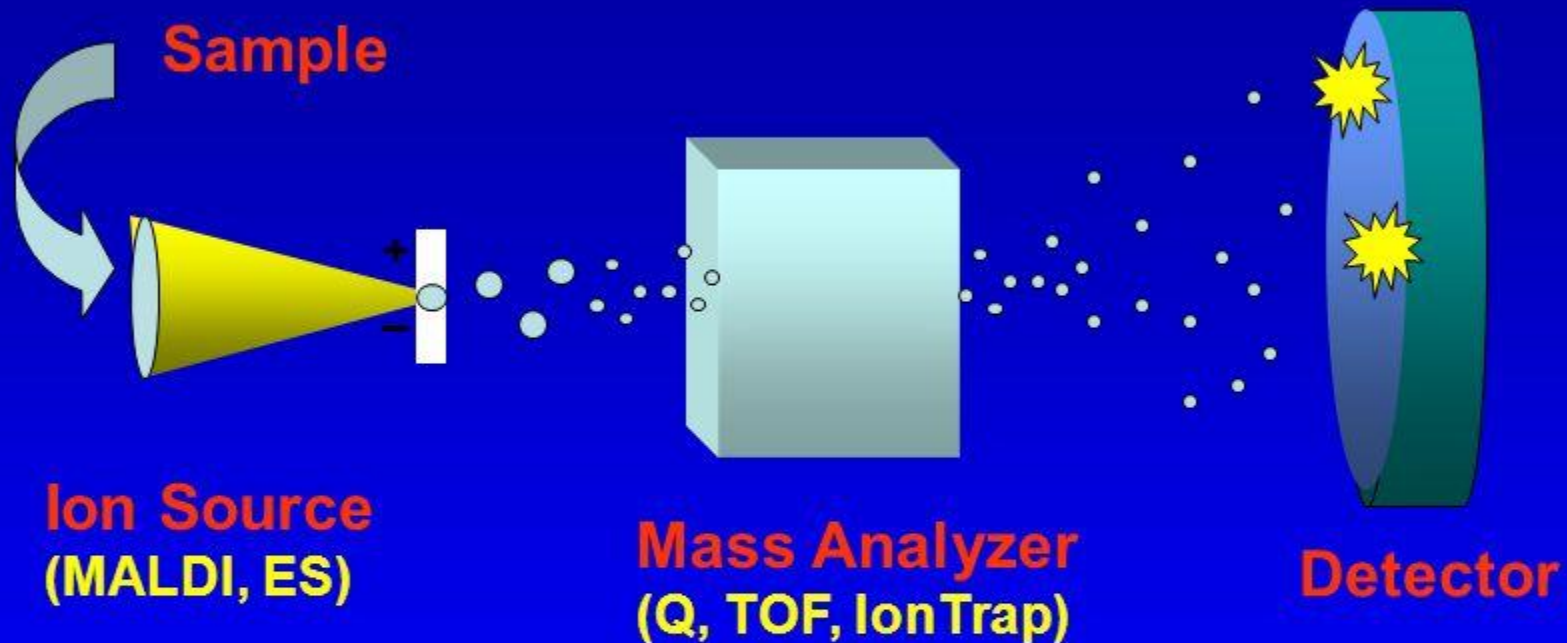
La trappola ionica è un analizzatore a quadrupolo con barre iperboliche ripiegate su se stesse in modo da formare un anello.

Il voltaggio continuo ed alternato sono applicati tra l'elettrodo anulare e gli elettrodi inferiore e superiore, che hanno forma di due superfici convesse.

Due piccoli buchi sugli elettrodi inferiore e superiore permettono la introduzione e l'uscita degli ioni. E' possibile intrappolare per un tempo lungo a piacere gli ioni. E' possibile anche farli frammentare e ottenere spettri MS/MS.



Mass Spec Principles



General operation of MS

create gas-phase ions

separate ions in time or space by their m/z ratio

measure the quantity of ions

Sorgente

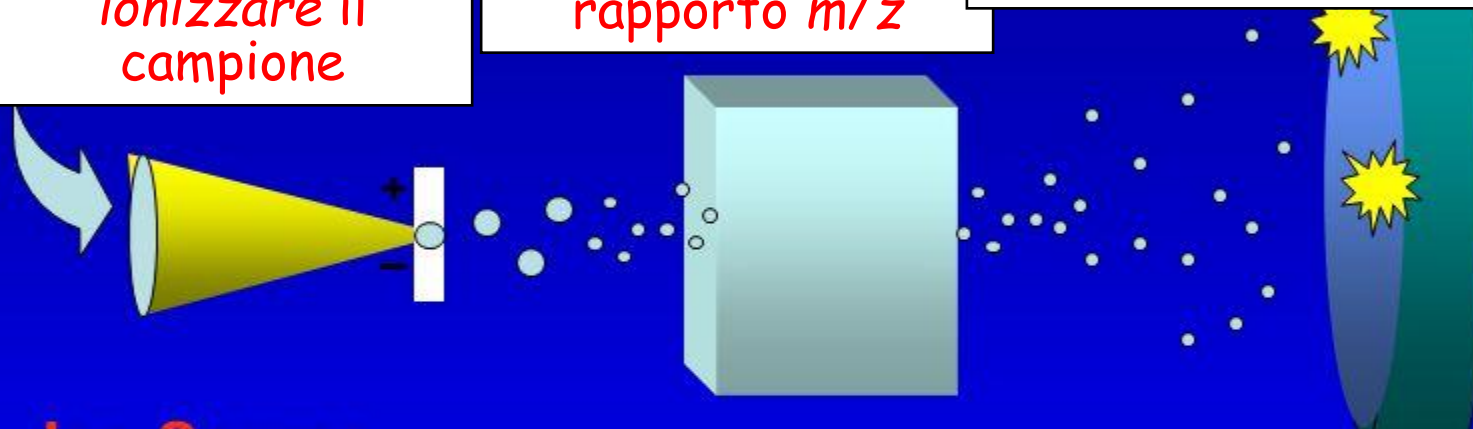
Analizzatore

Detector

La sorgente serve a volatilizzare e ionizzare il campione

L'analizzatore serve a separare ioni con diverso rapporto m/z

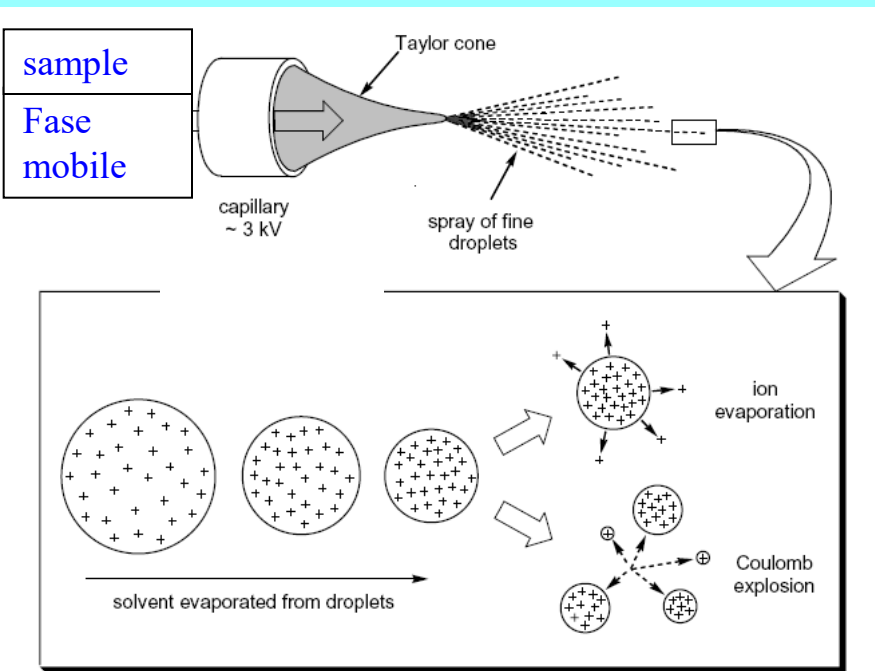
Il detector serve a rivelare gli ioni che arrivano dall'analizzatore



- MALDI → QUADRUPOLO
- ESI → ION TRAP

Detector

• Sorgente **ESI**

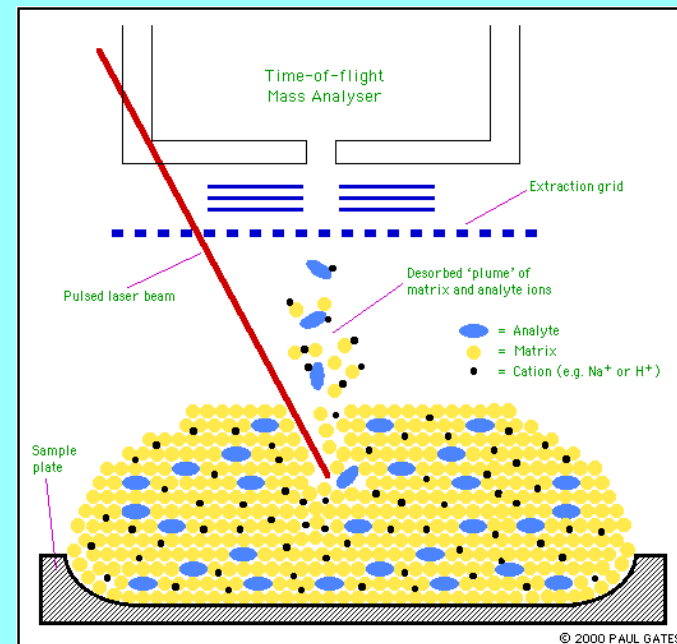


Si tratta di una sorgente di **ionizzazione** che utilizza un gas inerte (di solito azoto) per provocare un processo di nebulizzazione.

Le due caratteristiche essenziali *dell'ESI* sono:

- La ionizzazione avviene a pressione atmosferica;
- La ionizzazione genera **ioni multicarica**.

MALDI - Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation

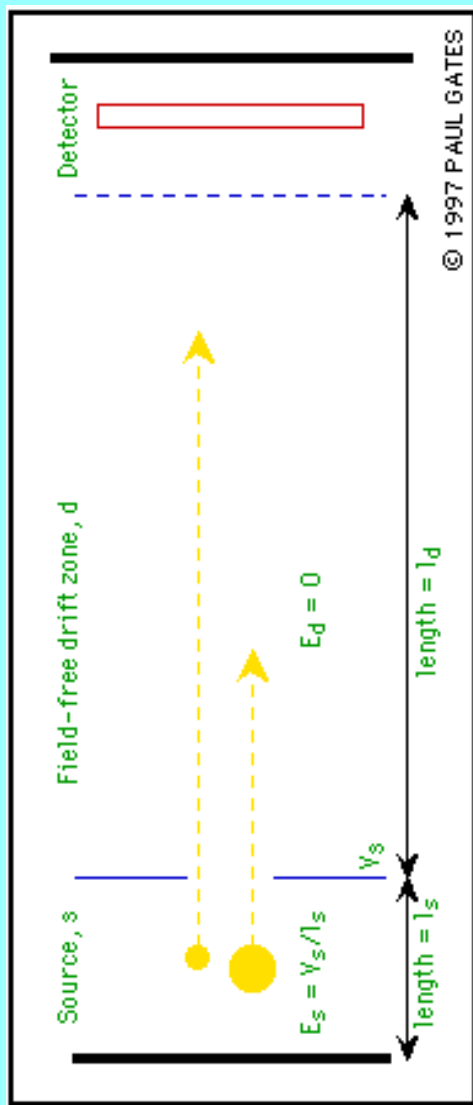


L'analita co-cristallizzato con la matrice su un target.

Il Target viene introdotto nella camera di ionizzazione (sotto vuoto) e i cristalli colpiti con un raggio laser pulsato. L'energia trasferita dal.

Gli ioni sono monocarica

Analizzatore a tempo di volo (TOF – Time of Flight)



La ionizzazione MALDI è comunemente accoppiata ad analizzatori a Tempo di Volo (Time-of Flight).

Dopo la produzione degli ioni nella sorgente MALDI gli ioni vengono accelerati in un "tubo vuoto".

Il principio su cui si basa questo analizzatore è che ioni con differente valore massa/carica hanno uguale energia, ma differente velocità dopo l'accelerazione subita nella camera di ionizzazione. Ne deriva che il tempo che ciascuno impiega per attraversare l'analizzatore è differente.

Le "piccole molecole" arrivano al detector per prime, seguite da molecole via via "più grandi".

La massa molecolare può essere dedotta dal tempo di volo utilizzando opportune miscele di calibrazione (peptidi e proteine di massa nota).

<https://www.youtube.com/watch?v=0jeFpXHZ8W0>

Alta sensibilità e un ambito di misura delle masse virtualmente illimitato.

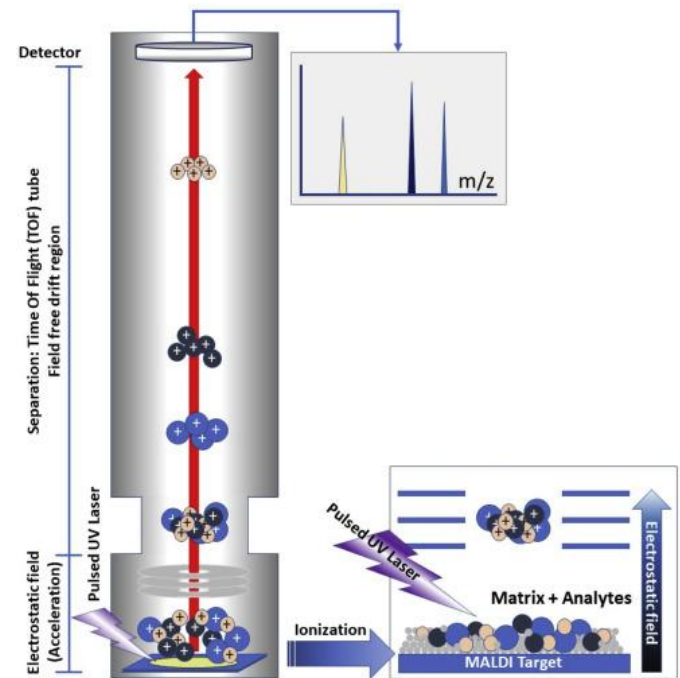
Spettrometria di Massa

Analizzatore

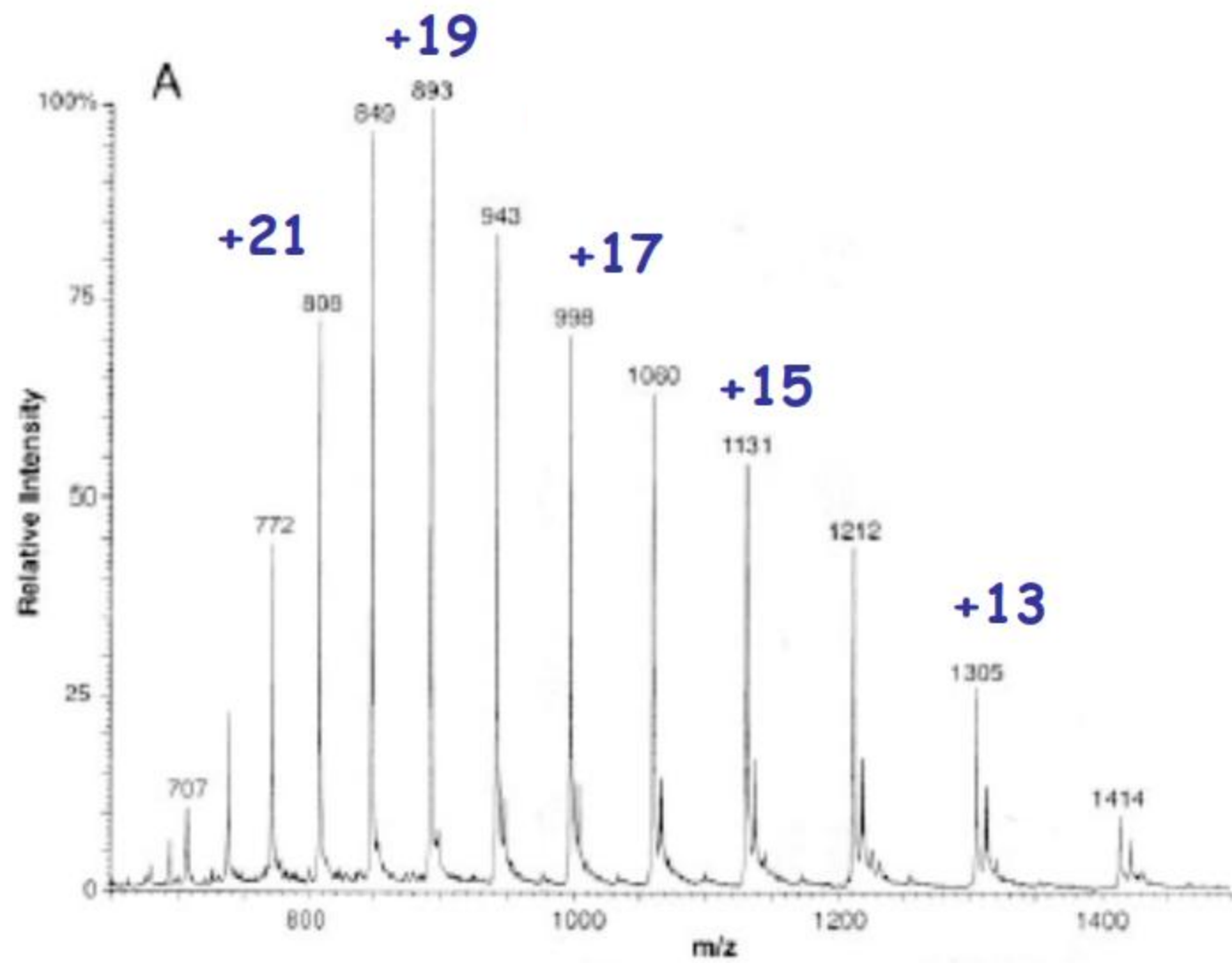
Analizzatore a tempo di volo

La ionizzazione MALDI è comunemente accoppiata ad analizzatori a tempo di volo (Time-of Flight). Dopo la produzione degli ioni nella sorgente MALDI, gli ioni vengono accelerati dallo stesso potenziale in un “tubo vuoto”. Gli ioni con differente rapporto massa/carica hanno uguale energia, ma differente velocità dopo l’accelerazione subita nella camera di ionizzazione – il tempo che ogni ione impiega per attraversare l’analizzatore è differente.

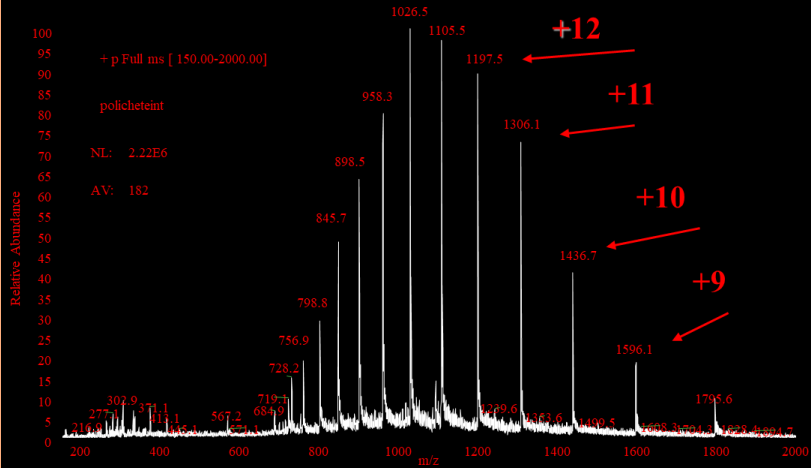
- Gli ioni con rapporto m/z grande saranno più lenti e impiegheranno più tempo per arrivare al detector.
- Gli ioni con rapporto m/z piccolo saranno più veloci e arriveranno prima al detector.



<https://www.youtube.com/watch?v=0jeFpXHZ8W0>

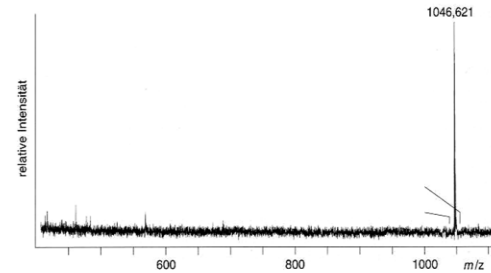


La sorgente ESI genera ioni multicarica

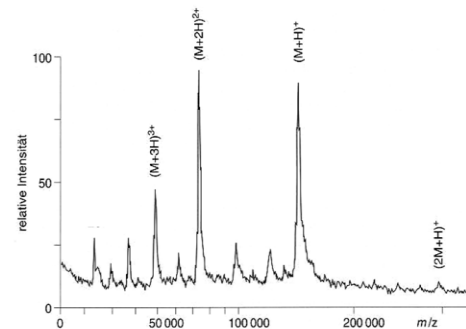


Spettro ESI: Differenti ioni con diverso valore di m/z originati dalla stessa proteina (Massa media = 14357)

Determinazione della massa molecolare con MALDI-TOF



Spettro MALDI-TOF del peptide Angiotensina II



Spettro MALDI-TOF di un anticorpo monoclonale

La sorgente ESI genera ioni MULTICARICA;

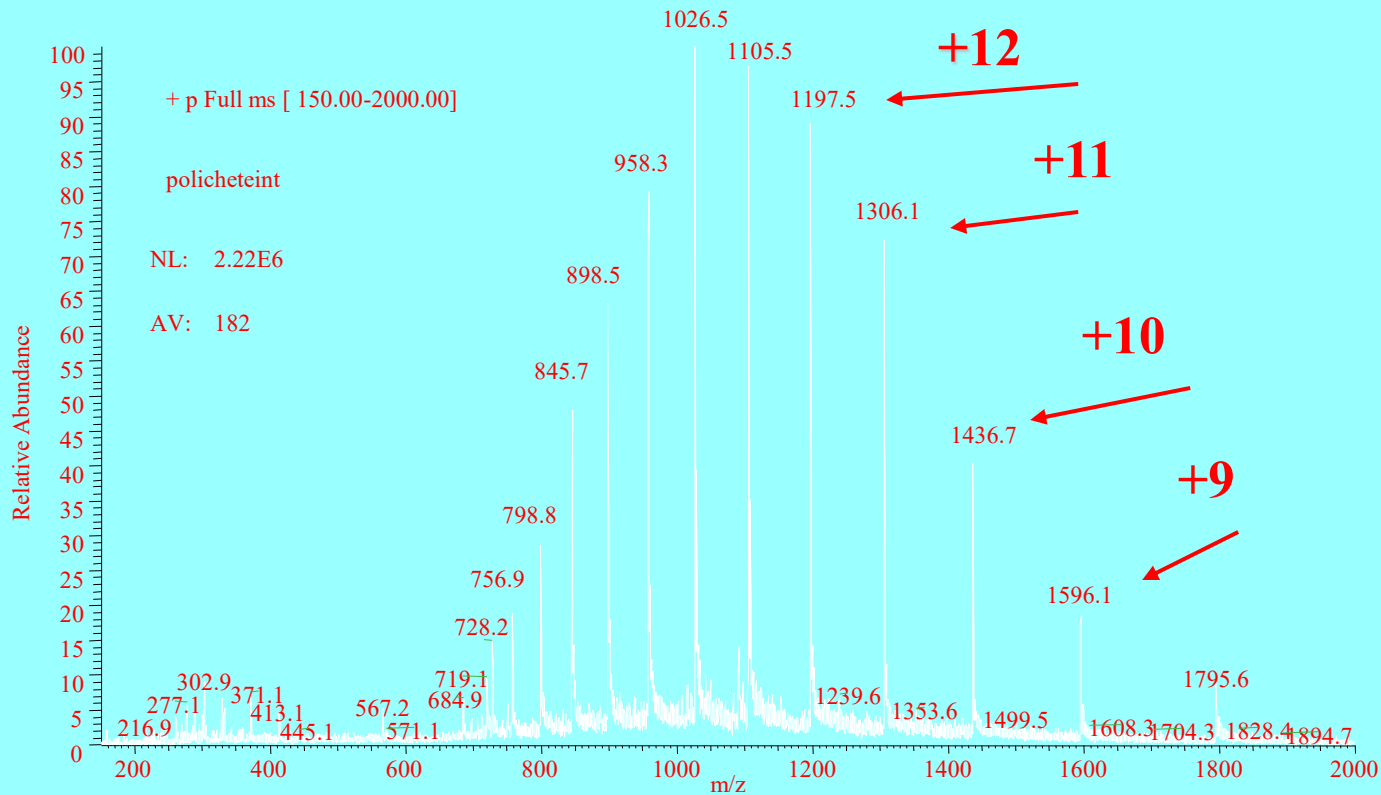
Lo spettrometro di massa misura il rapporto m/z
Da/cariche el. unitarie (Thomson)

[M]= 1200:

Se la carica è data da protoni, ogni carica incrementa la massa di 1
unità, dunque:

ione monocarico	(+1)	$m/z = 1201/1 = 1201$
quello con due cariche	(+2)	$m/z = 1202/2 = 601$
quello con tre cariche	(+3)	$m/z = 1203/3 = 401$

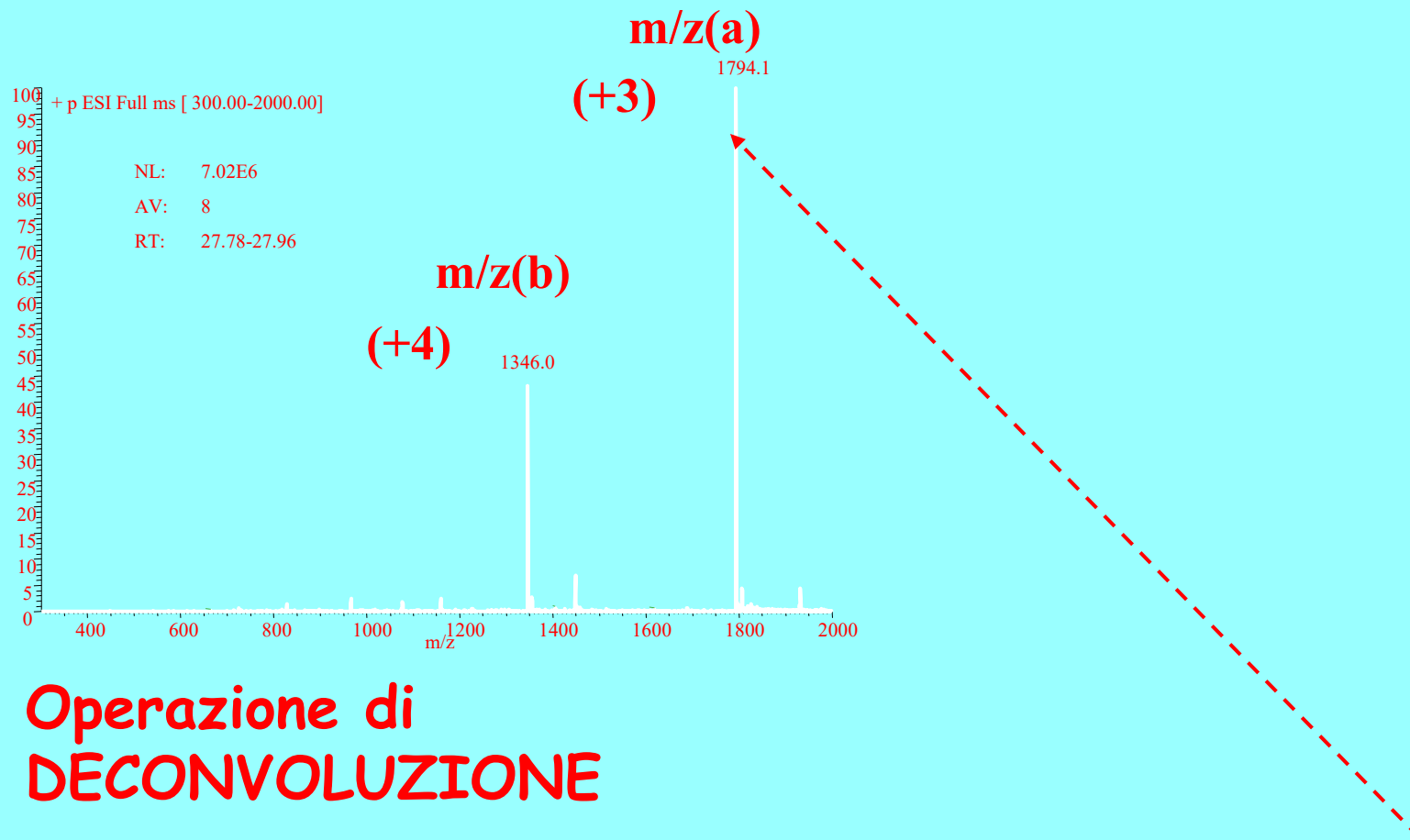
$[M] = (m/z \times z) - z \quad (601 \times 2) - 2 = 1200 \text{ Da}$



Spettro ESI: Differenti ioni con diverso valore di m/z originati dalla stessa proteina (Massa media =14357)

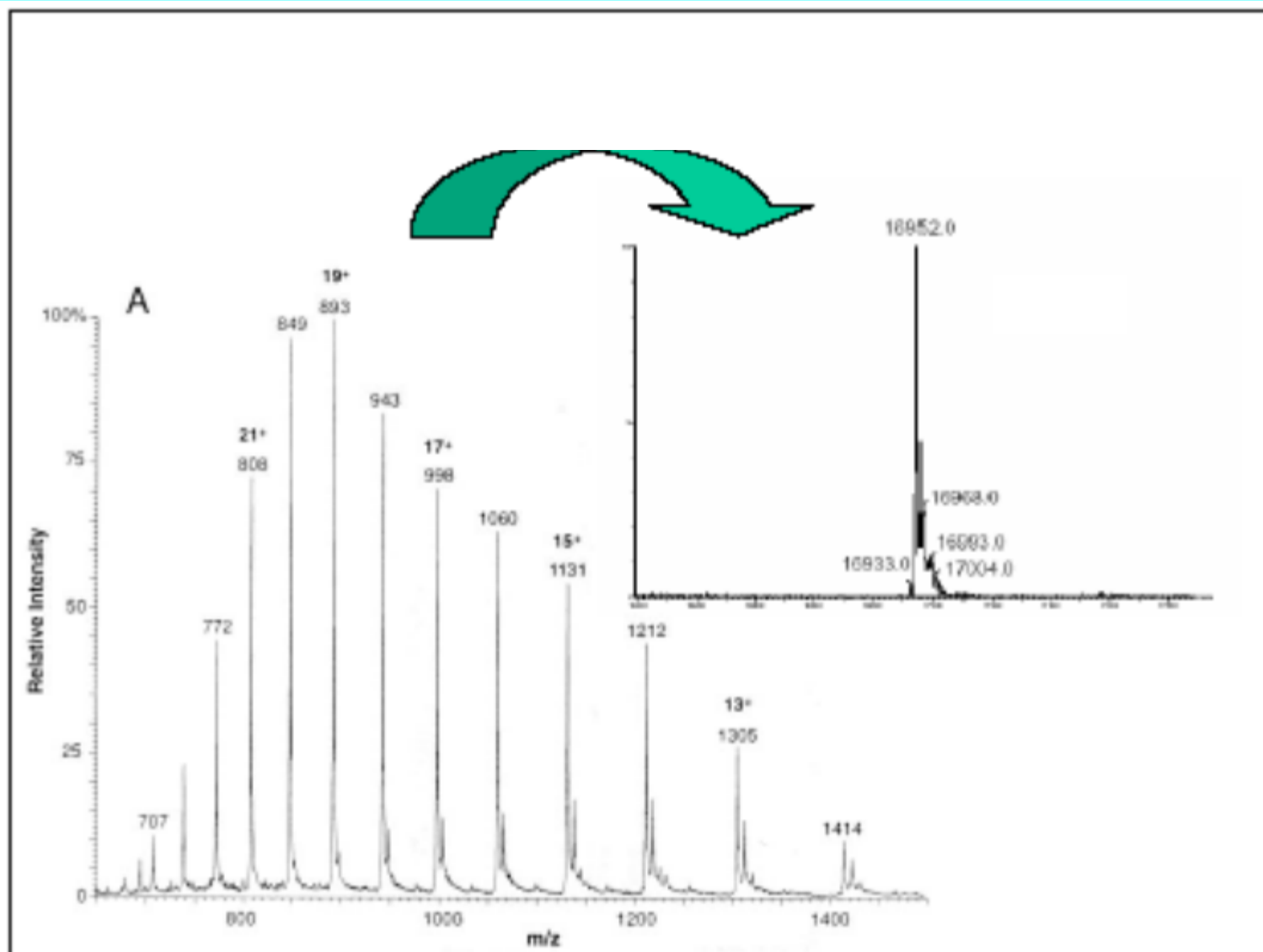
$$M = (1436.7 \times 10) - 10 = 14357$$

Come ricaviamo la massa della proteina dallo spettro ESI?

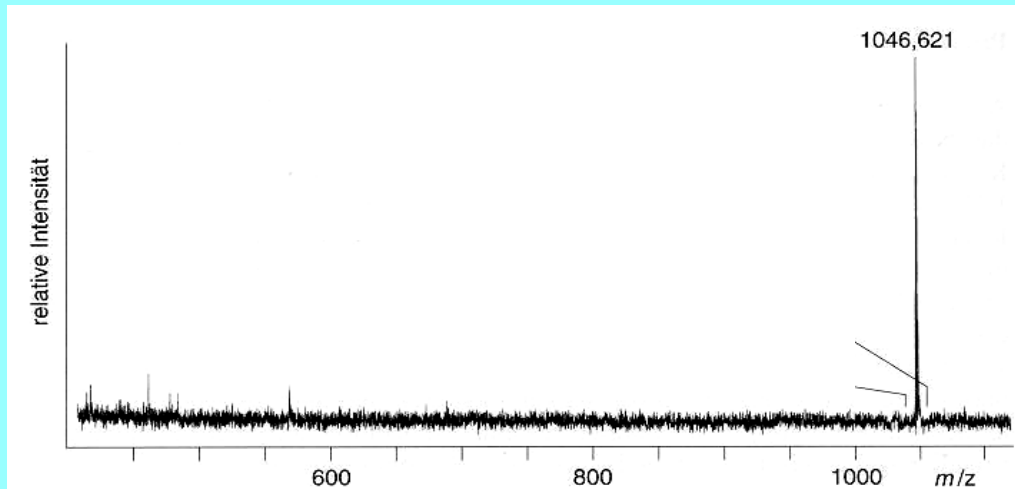


Operazione di DECONVOLUZIONE

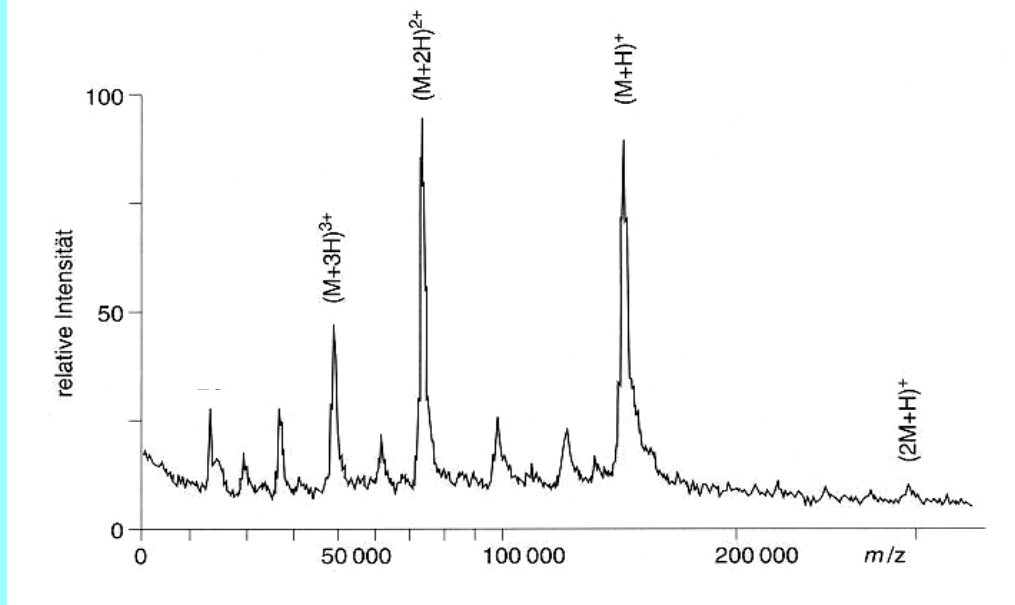
$$M = (1794.1 \times 3) - 3 = 5379.3 \quad (M \text{ av teorica} = 5379.3)$$



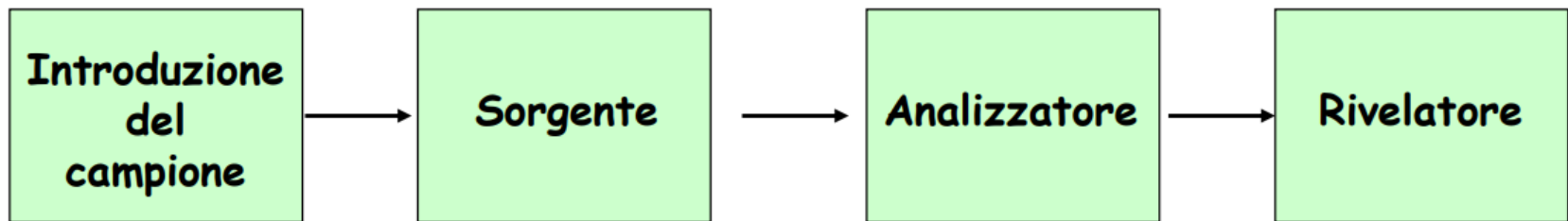
Determinazione della massa molecolare con MALDI-TOF



Spettro MALDI-TOF del peptide Angiotensina II



Spettro MALDI-TOF di un anticorpo monoclonale

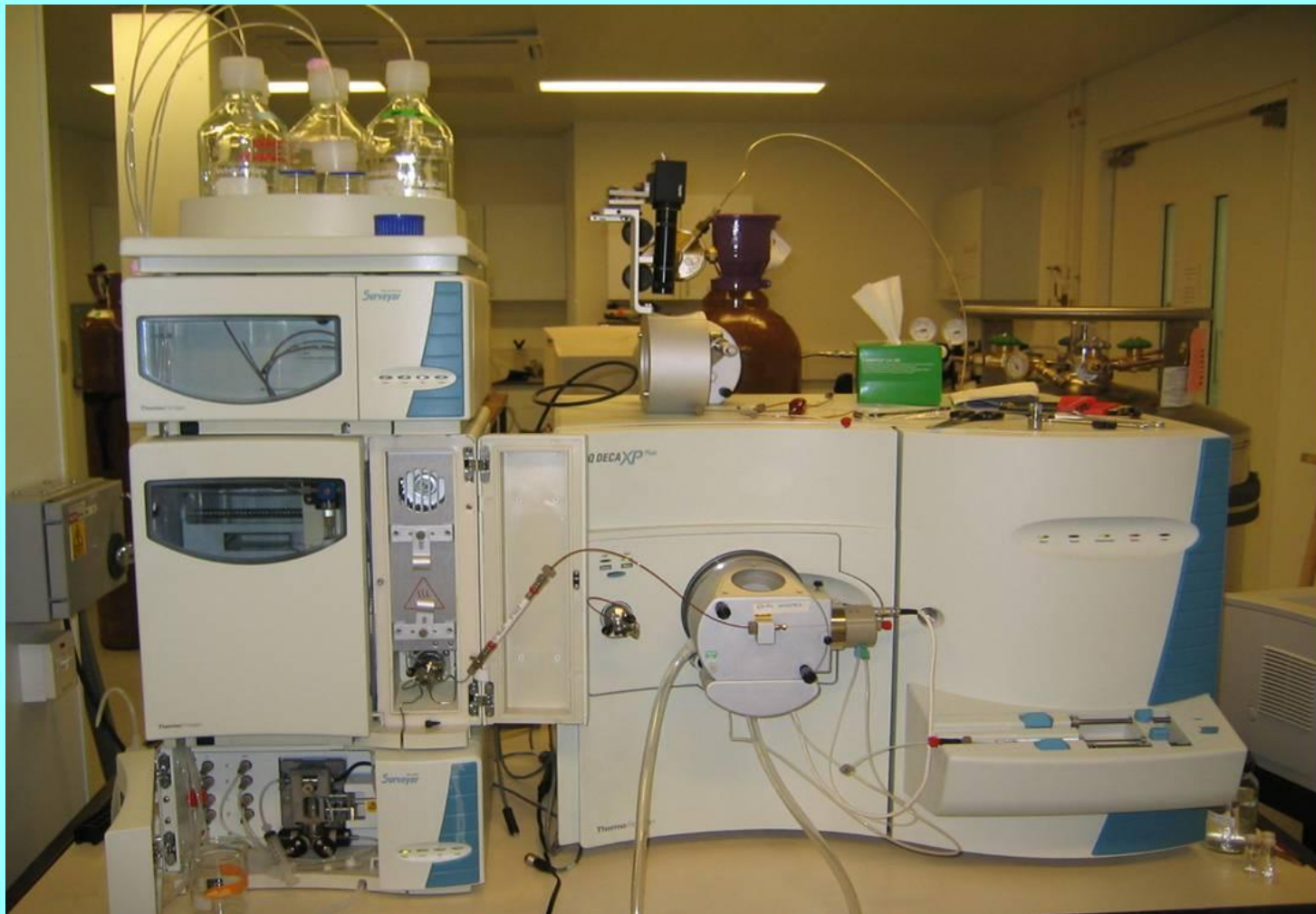


- ✓ Introduzione diretta
- ✓ Gas cromatografia
- ✓ Cromatografia liquida
- ✓ Elettroforesi capillare

- ✓ 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

L'accoppiamento **HPLC** con un analizzatore a trappola ionica attraverso una **sorgente ESI**



RP-HPLC - ESI-MS

L'eluato viene suddiviso da una valvola in due porzioni: una è inviata al rivelatore UV e l'altra alla sorgente ESI, dove avviene il processo di ionizzazione. Gli ioni vengono trasferiti nell'analizzatore (trappola ionica) per essere separati in base al rapporto m/z e poi rivelati dal detector.

Cromatografo liquido (HPLC)

Sorgente electrospray (ESI)

Spettrometro di massa
(Trappola ionica)



L'accoppiamento HPLC con un analizzatore a trappola ionica attraverso una sorgente ESI



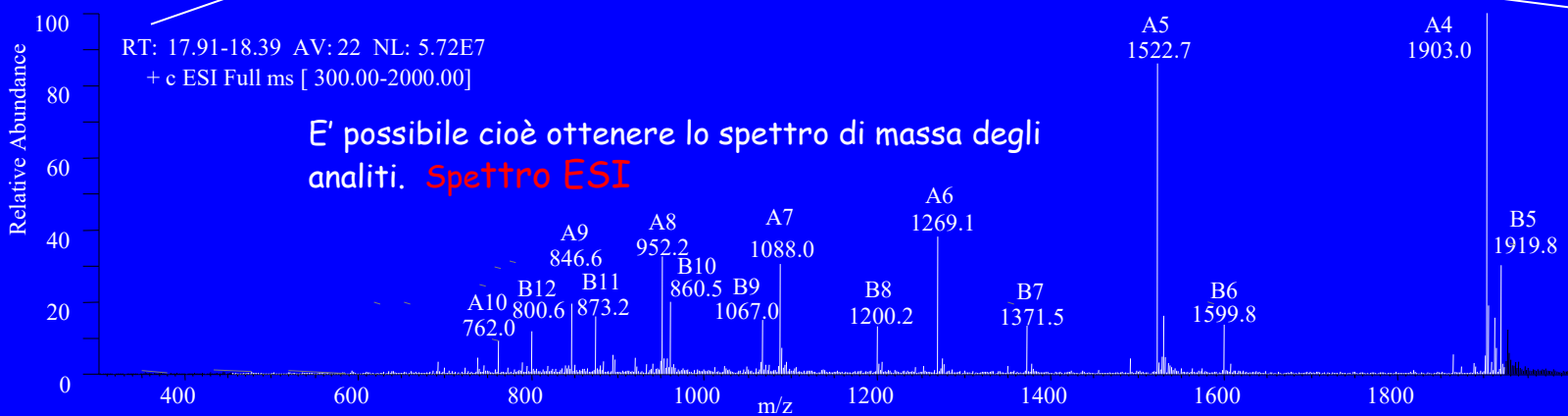
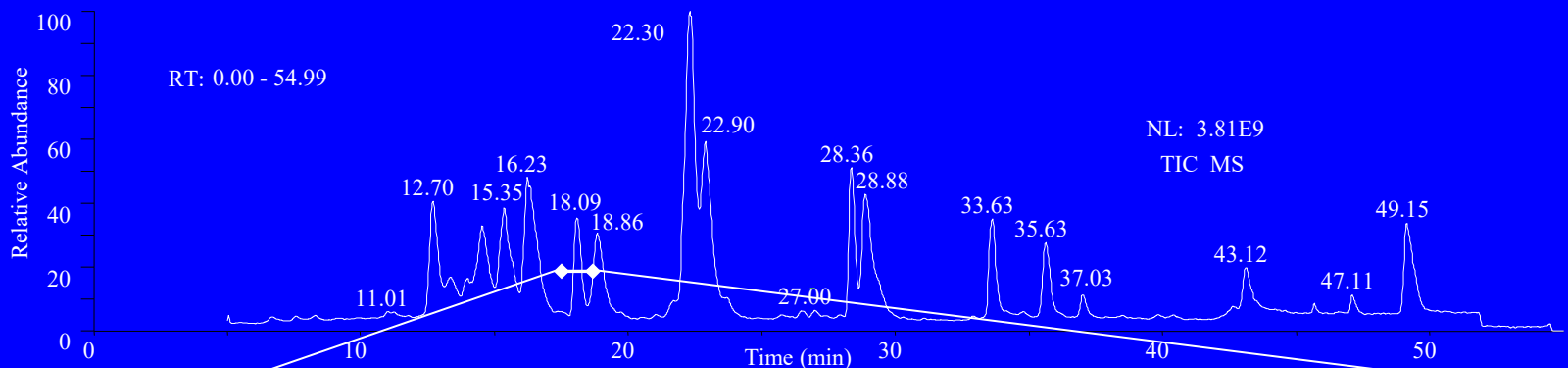
- **(ESI)** La fase mobile sarà in genere composta da acqua, metanolo, acetonitrile. Sono tollerati il THF e l'acetone. Sono ammesse piccole percentuali di solventi clorurati. Sconsigliati solventi apolari. Evitare quanto possibile il DMSO, se non al di sotto dell'1 %.

(HPLC) Sorgente electrospray (ESI)
Spettrometro di massa (Trappola ionica)



- **(ESI)** Il pH ottimale varierà da 4 a 8, e dipenderà anche dal tipo di analita e dalla modalità di ionizzazione, ioni positivi o negativi. Utilizzare preferibilmente acido formico o acido acetico, mentre l'acido trifluoroacetico abbassa la risposta generale e crea problemi quando si debbano rivelare ioni negativi.

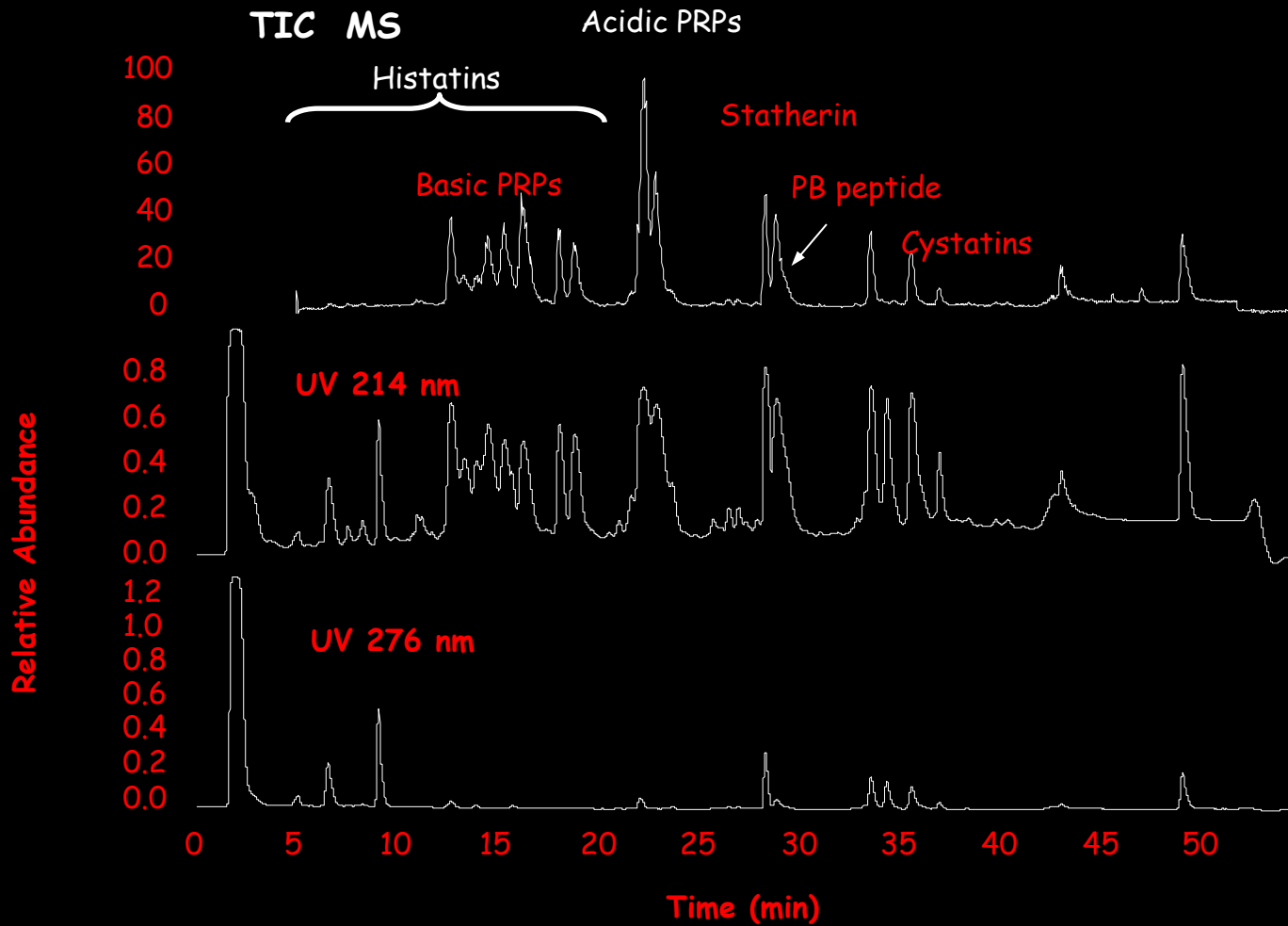
Dal profilo di corrente ionica è possibile dunque estrarre l'informazione su tipo e quantità di ioni arrivati al rivelatore in ogni momento durante la separazione cromatografica.



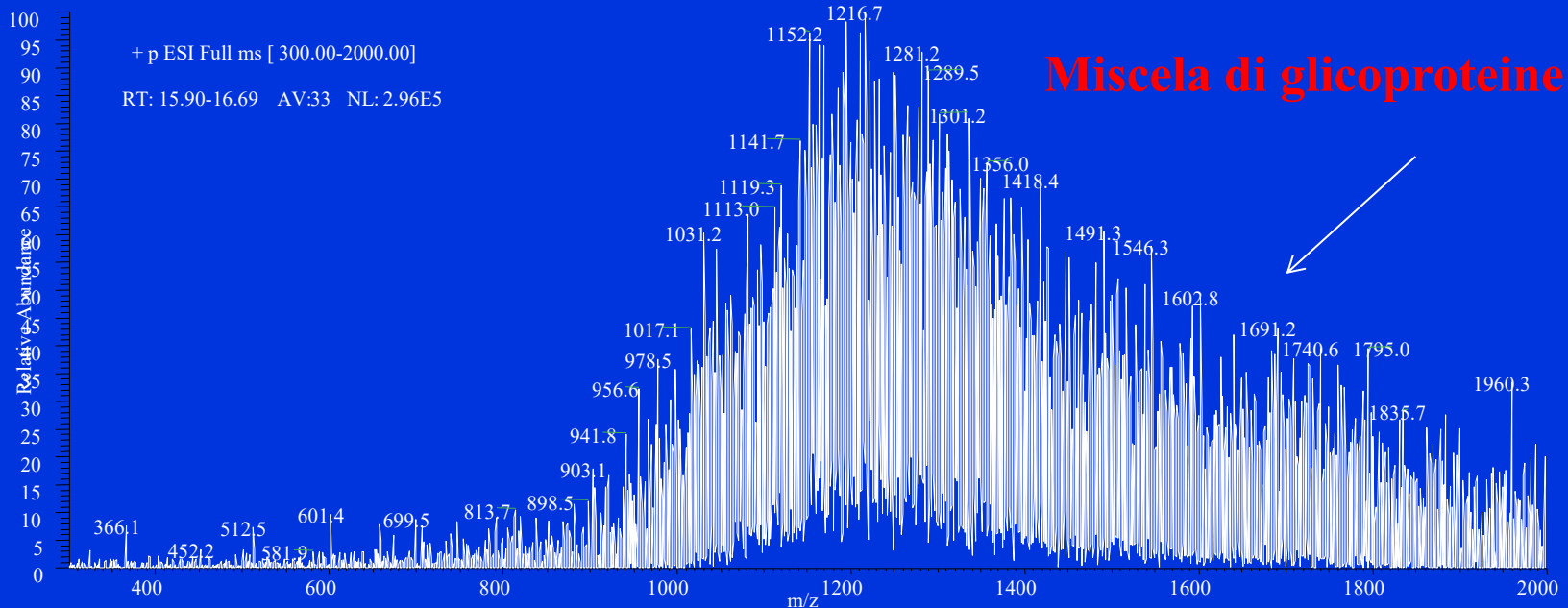
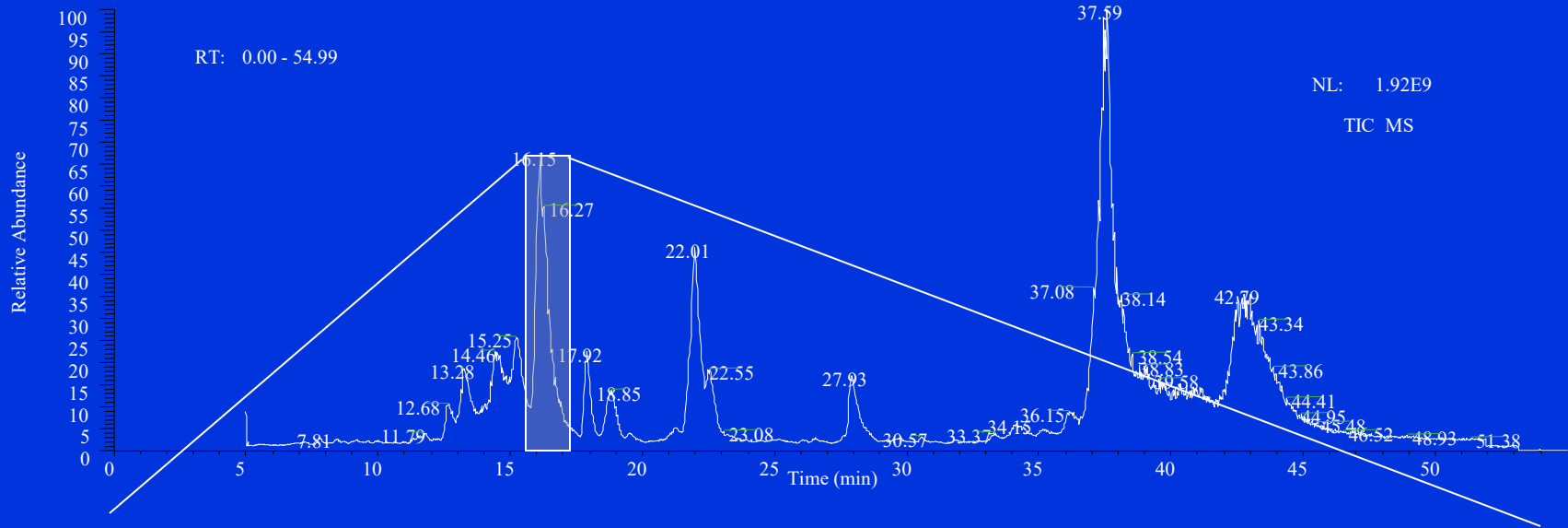
Analisi HPLC-ESI-MS di un campione di saliva umana

Utilizzate una sorgente ESI e una trappola ionica

TIC MS - Profilo di corrente ionica totale, è generato dalla corrente registrata dal detector durante la separazione cromatografica. Gli analiti in uscita dalla colonna cromatografica vengono indirizzati alla sorgente (ESI) e trasformati in ioni (positivi o negativi in funzione della opzione operata). Gli ioni vengono separati dall'analizzatore (Trappola ionica) ed inviati al rivelatore secondo un ordine di m/z crescente.



Non sempre la deconvoluzione è possibile



Spettrometria di massa.



Massa della proteina



Strategia XIC
(Corrente ionica
estratta)

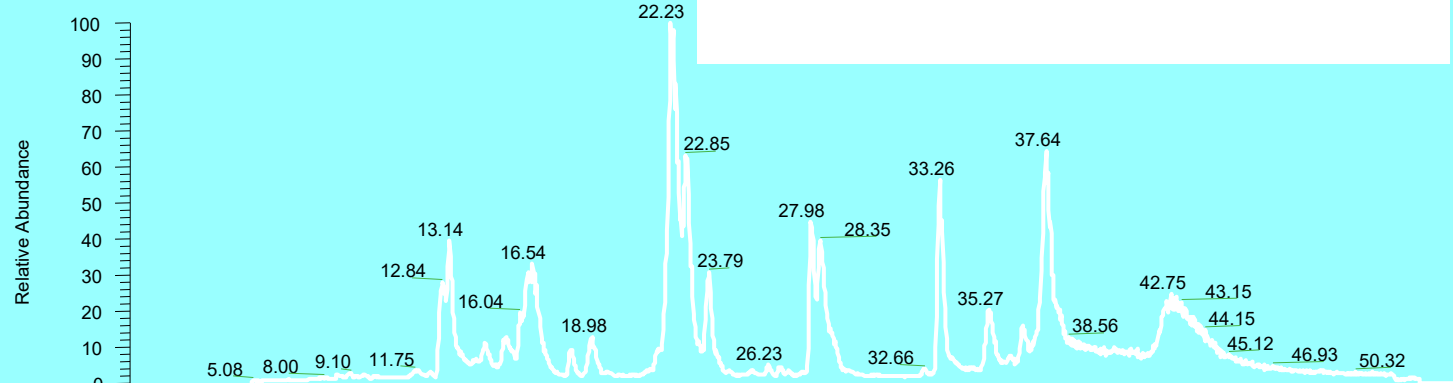
per la ricerca di
analiti di interesse in
miscele complesse



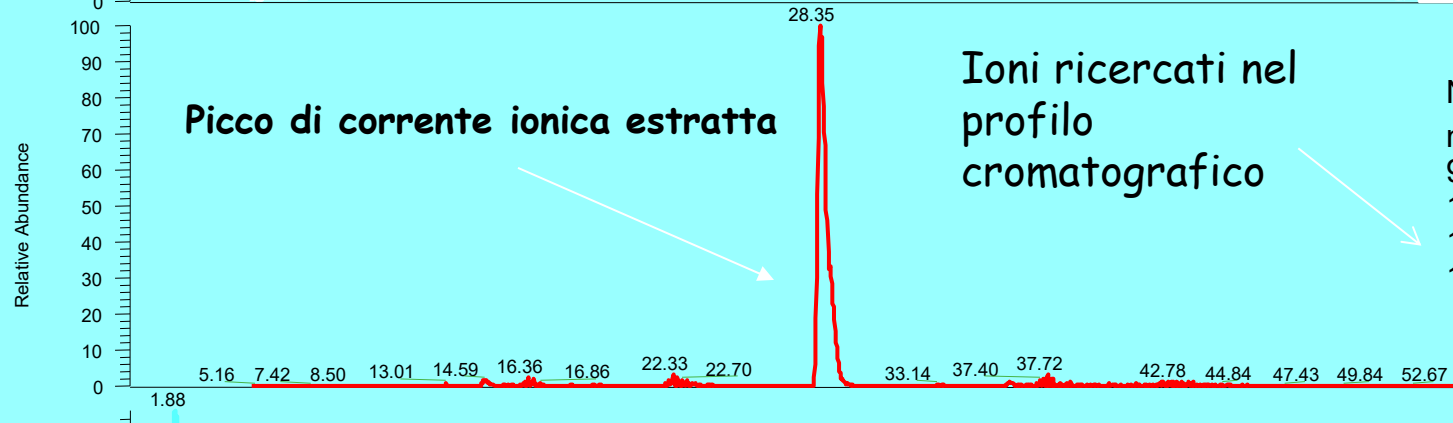
Analisi quantitativa
della proteina di interesse

Un esempio: Ricerca del peptide PB nel profilo cromatografico

RT: 0.00 - 54.99



NL: 2.11E9
TIC MS
Maria(271103)



Picco di corrente ionica estratta

Ioni ricercati nel
profilo
cromatografico

NL: 2.86E8
m/z= 828.2-829.2+
966.0-967.0+
1159.0-1160.0+
1448.6-1449.6+
1931.3-1932.3 MS

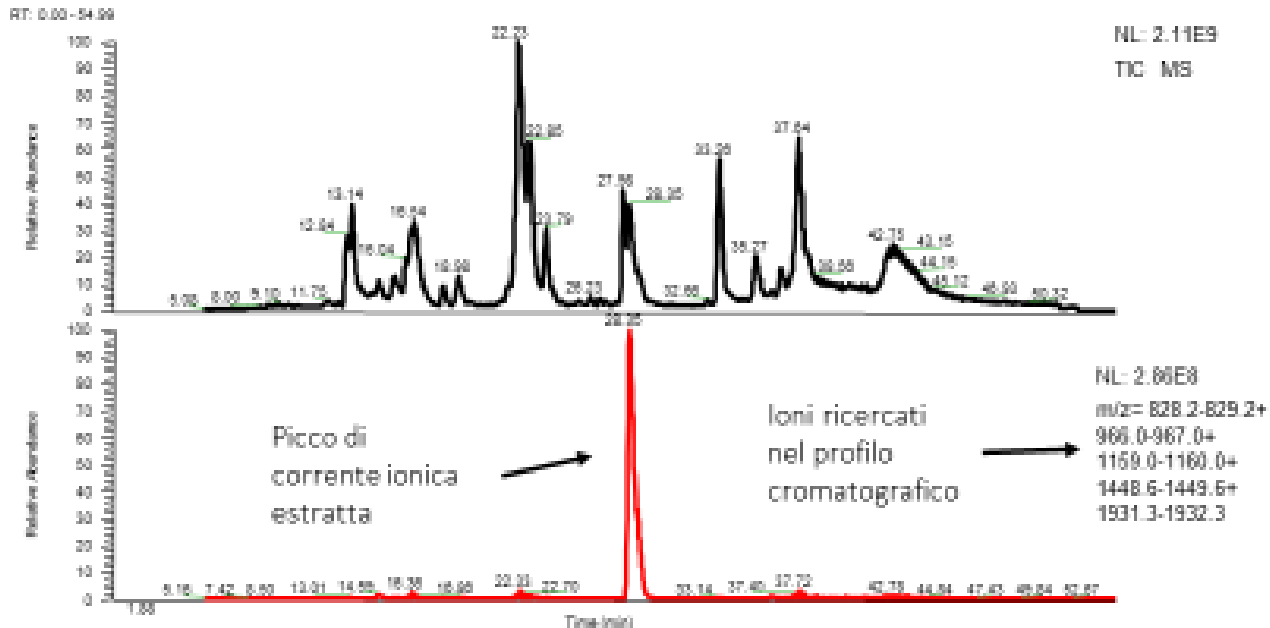
Strategia XIC (Corrente ionica estratta)

per la ricerca di analiti di interesse in miscele complesse

Spettrometria di Massa

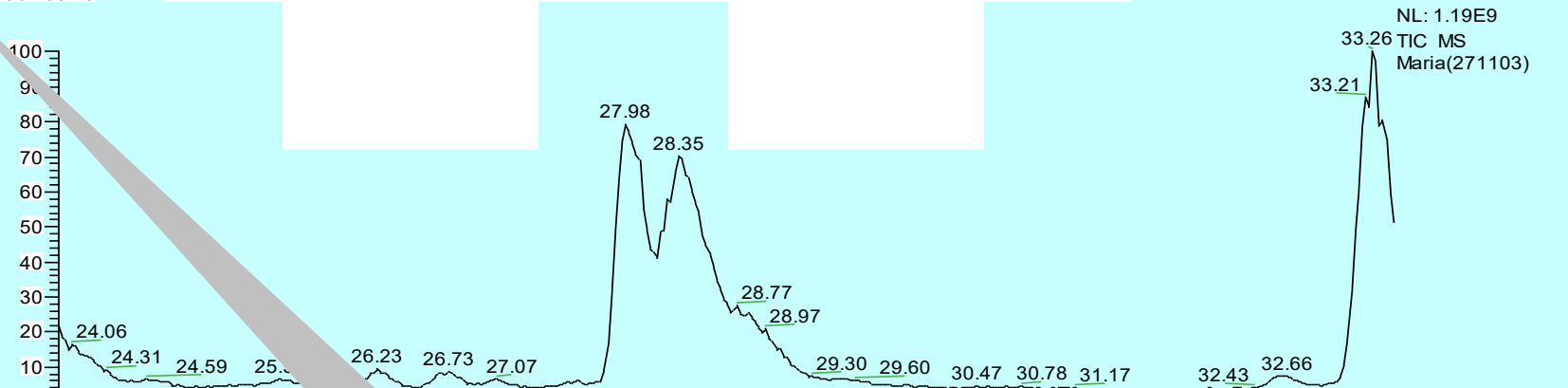
HPLC con "rilevatore" a spettrometria di massa

Strategia XIC (corrente ionica estratta) per la ricerca di analiti in miscele complesse – ricerca del peptide P-B del profilo cromatografico.



Analisi quantitativa e spettrometria di massa.

RT: 23.96 - 33.43



NL: 1.19E9
33.26 TIC MS
Maria(271103)



RT: 28.35
MA: 7220592228

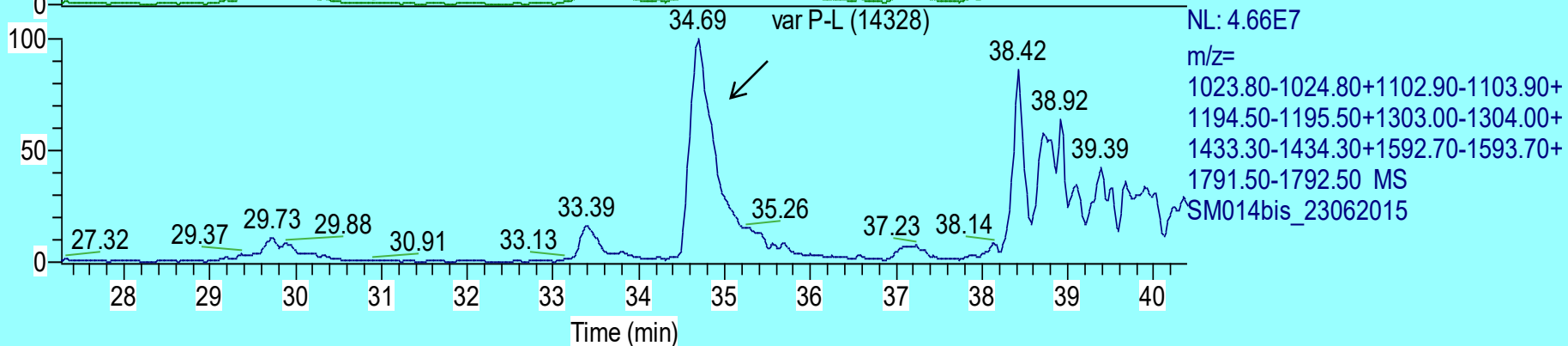
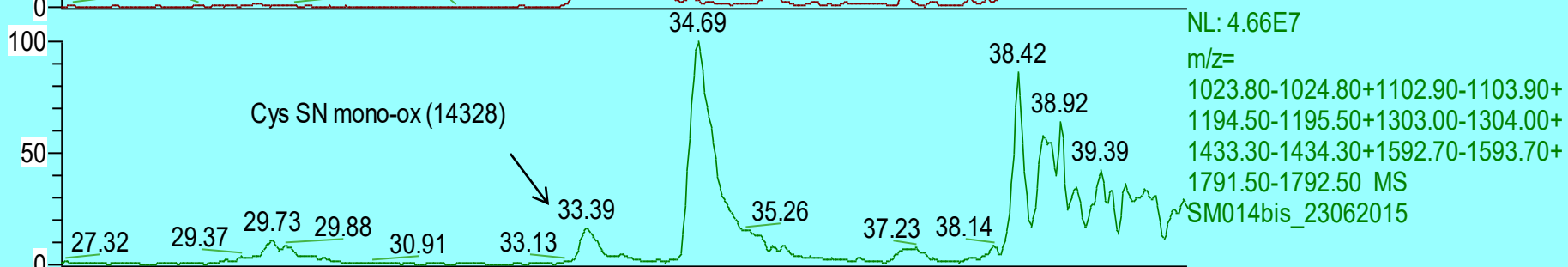
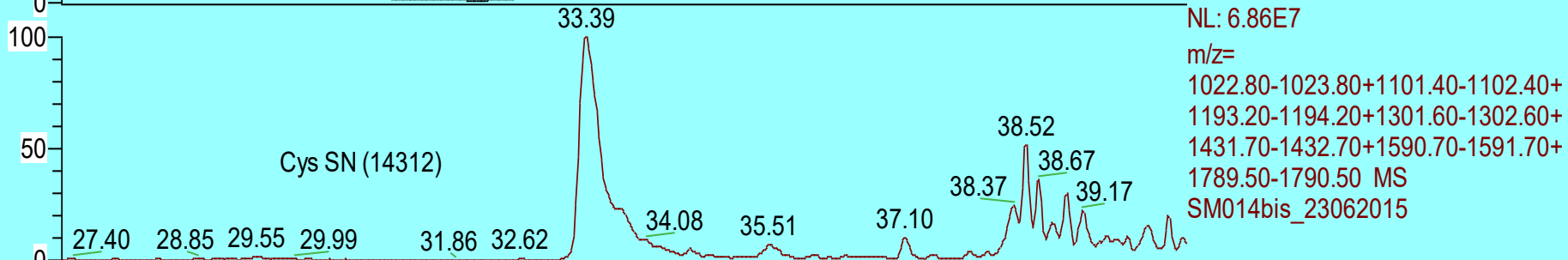
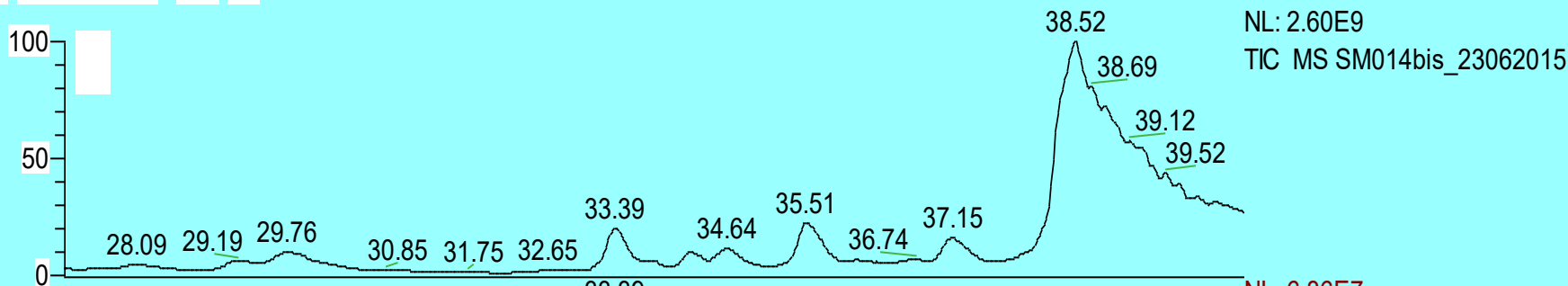
NL: 2.86E8
m/z=
.2-829.2+
.0-967.0+
9.0-1160.0+
8.6-1449.6+
1.3-1932.3 MS
ia(271103)

La disponibilità di uno standard consente di trasformare il dato da unità arbitrarie in concentrazione

L'area del picco di corrente ionica è proporzionale alla concentrazione
Il dato ottenuto è in unità arbitrarie di corrente ionica.
Posso confrontare l'area del picco XIC di questo campione
Con quella misurata in un altro campione nelle stesse condizioni sperimentali. Quantificazione relativa

NL: 4.83E5
Channel B UV

RT: 27.26 - 40.39 SM: 7G

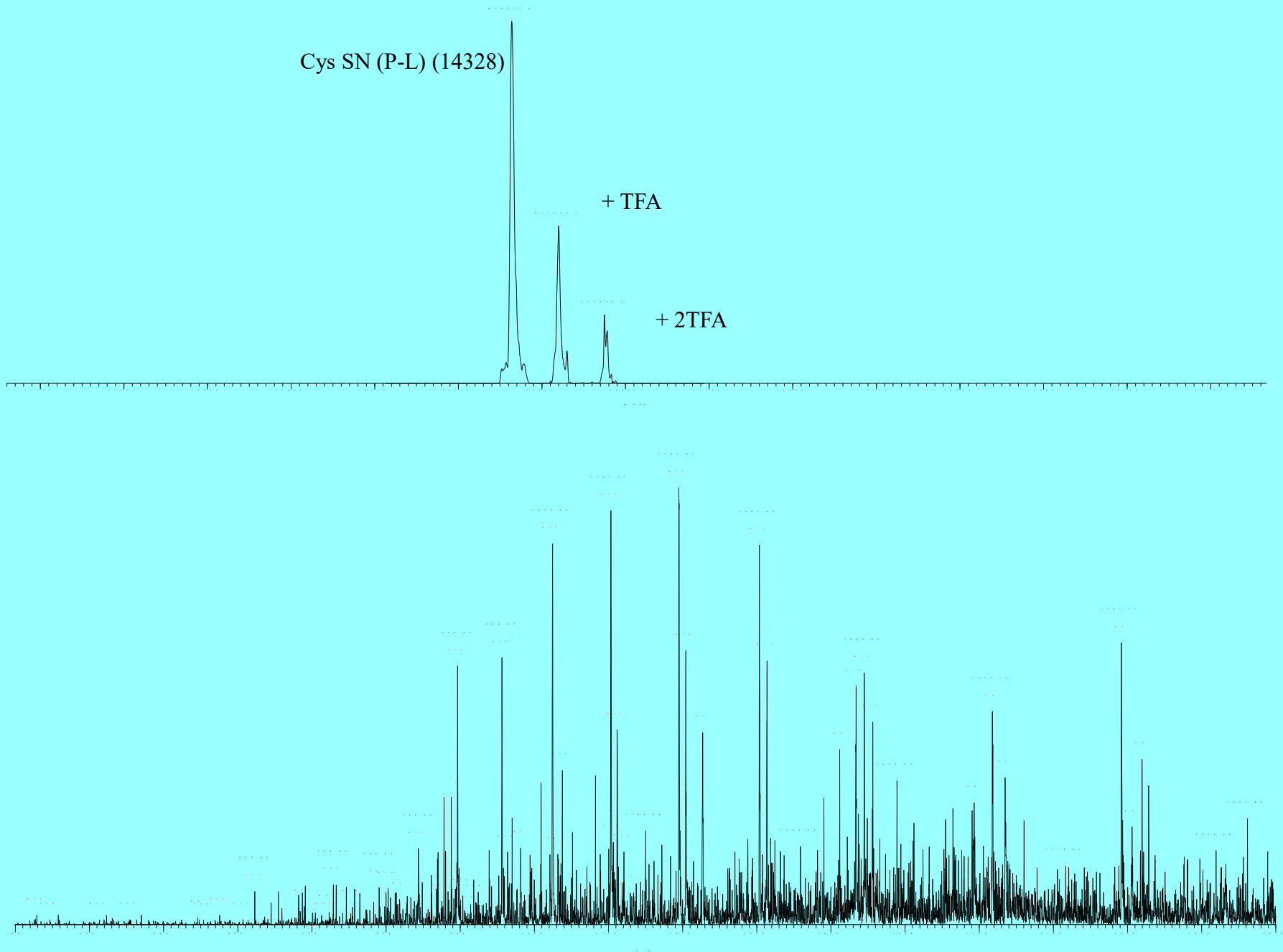


Time (min)

Cys SN (P-L) (14328)

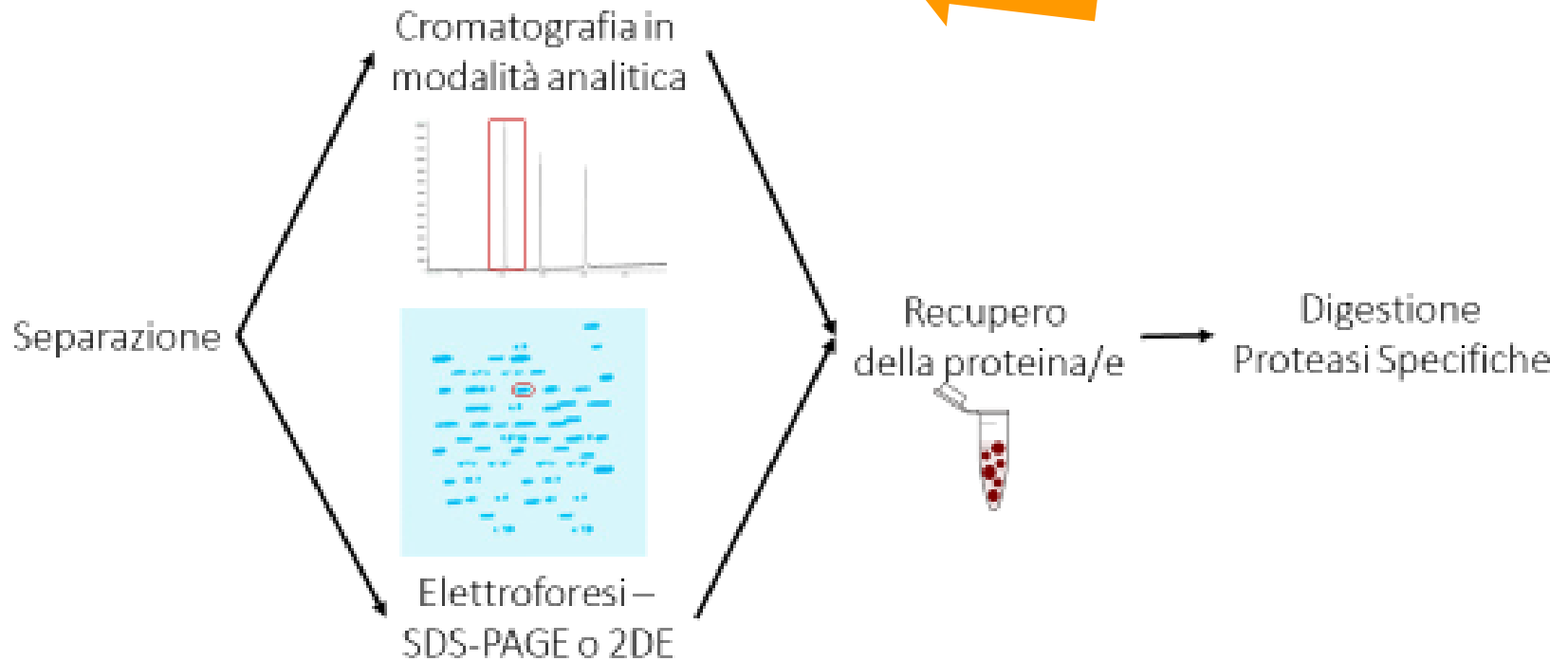
+ TFA

+ 2TFA



Spettrometria di Massa

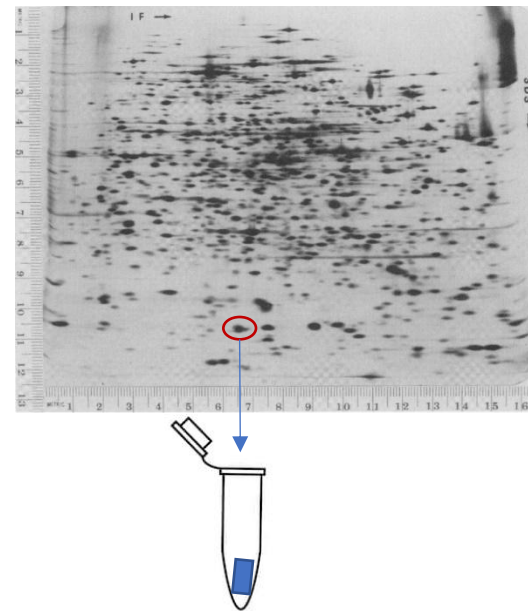
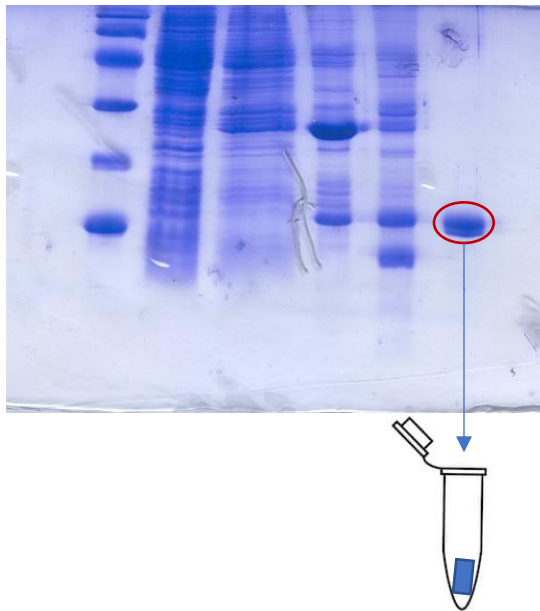
Il valore di una massa molecolare non è sufficiente per l'identificazione – per caratterizzare una proteina dobbiamo stabilire la sequenza proteica.



Spettrometria di Massa

La digestione ideale deve consentire di tagliare la proteina solo a livello di specifici residui amminoacidici e produrre frammenti compatibili con l'analisi con spettrometria di massa.

Digestione triptica su bande di gel:

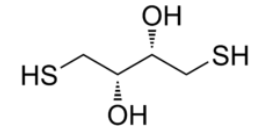


Spettrometria di Massa

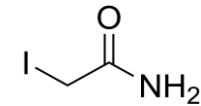
Enzima	Specificità
Tripsina	Arg o Lys
Chimotripsina	Phe, Tyr, Trp
Enzima V8	Glu o Asp
Lys C	Lys
C-peptidasi	C-terminale
N-peptidasi	N-terminale

Digestione triptica in soluzione:

1. Riduzione con ditione di solfuro (Cys-Cys);



2. Alchilazione con iodoacetammide – blocco dei residui di cisteina;



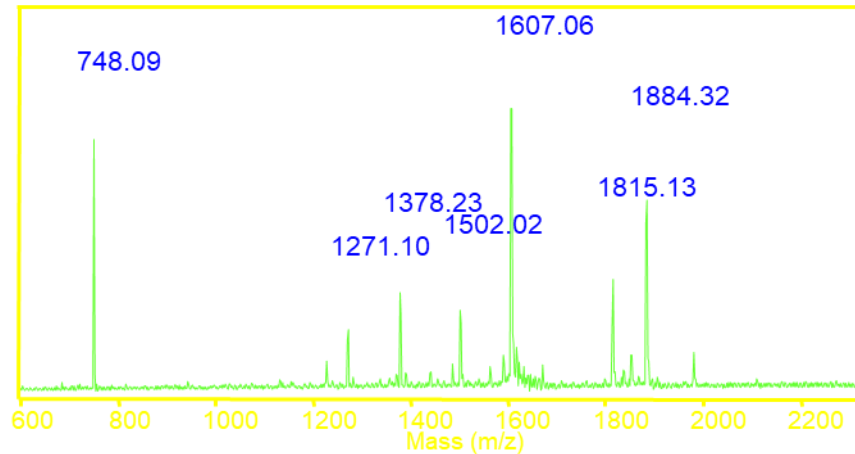
3. Digestione con tripsina – è necessario 1µg di tripsina per 100µg di substrato.

Digestione a 37°C ON;

1. Al termine della digestione viene aggiunto TFA o acido formico per bloccare la reazione.

Il valore di una massa molecolare non è sufficiente per l'identificazione!
Per caratterizzare una proteina dobbiamo stabilire la sequenza proteica!

Peptide mapping



**L'analisi MS dei peptidi triptici
fornisce una lista di masse.**

**“PEPTIDE MAPPING” o “PEPTIDE
MASS FINGERPRINTING”**

- **Confrontiamo i dati
sperimentali con
quelli teorici**

- Swiss Prot.

Simulazioni di digestione della proteina ipotizzata con diversi enzimi.



UniProtKB - P01037 (CYTN_HUMAN)

Basket

Display

BLAST Align Format Add to basket History

Help video Add a publication Feedback

- Entry
- Publications
- Feature viewer
- Feature table

Protein **Cystatin-SN**
 Gene **CST1**
 Organism *Homo sapiens (Human)*
 Status Reviewed - Annotation score: ●●●●● - Experimental evidence at protein levelⁱ

- None
- Function
 - Names & Taxonomy
 - Subcellular location
 - Pathology & Biotech
 - PTM / Processing
 - Expression
 - Interaction
 - Structure
 - Family & Domains
 - Sequence
 - Similar proteins
 - Cross-references

Functionⁱ

Human saliva appears to contain several cysteine proteinase inhibitors that are immunologically related to cystatin S but that differ in their specificity due to amino acid sequence differences. Cystatin SN, with a pI of 7.5, is a much better inhibitor of papain and dipeptidyl peptidase I than is cystatin S, although both inhibit ficin equally well.

Sites

Feature key	Position(s)	Description	Actions	Graphical view	Length
Site ⁱ	32	Reactive site			1

GO - Molecular functionⁱ

- cysteine-type endopeptidase inhibitor activity Source: ProtInc

Complete GO annotation on QuickGO ...

GO - Biological processⁱ

- detection of chemical stimulus involved in sensory perception of bitter taste Source: UniProtKB

Complete GO annotation on QuickGO ...

Attiva Windows
 Passa a Impostazioni per attivare Windows.

PeptideMass

PeptideMass [\[references\]](#) cleaves a protein sequence from the UniProt Knowledgebase (Swiss-Prot and TrEMBL) **or** a user-entered protein sequence with a chosen enzyme, and computes the masses of the generated peptides. The tool also returns theoretical isoelectric point and mass values for the protein of interest. If desired, PeptideMass can return the mass of peptides known to carry post-translational modifications, and can highlight peptides whose masses may be affected by database conflicts, polymorphisms or splice variants.

[Instructions](#) are available.

Enter a UniProtKB protein identifier, ID (e.g. ALBU_HUMAN), or accession number, AC (e.g. P04406), **or** an amino acid sequence (e.g. 'SELVEGVIV'; you may specify post-translational modifications, but **PLEASE read this document first!**):

```
WSPKEEDRIIPGGIYNADLNDEWVQRALHFAISEYNKATKDDYYRRPLRV
LRARQQTVGGVNYFFDVEVGRITCKSQPNLDTCAFHEQPELQKKQLCSF
EIYEVPWENRRSLVKSRCQES
```

the fields. the cleavage of the protein.

The peptide masses are

with cysteines treated with:

- with acrylamide adducts
- with methionines oxidized
- [M+H]⁺ or [M] or [M-H]⁻ or [M+2H]²⁺ or [M+3H]³⁺
- average or monoisotopic.

tps://sib.swiss



Attiva Windows

Passa a Impostazioni per attivare Windows.

<http://www.expasy.org/cgi-bin/peptide-mass.pl>

Maximum number of missed cleavages (MC): 0

All cysteines in reduced form.

Methionines have not been oxidized.

Displaying peptides with a mass bigger than 500 Dalton.

Using monoisotopic masses of the occurring amino acid residues and giving peptide masses as [M+H]⁺.

The peptide masses from your sequence are:

[Theoretical pI: 6.92 / Mw (average mass): 14316.07 / Mw (monoisotopic mass): 14307.12]

mass	position	#MC	modifications	peptide sequence
2084.9705	77-94	0		SQPNLDTCAFHEQPELQK
2073.0399	9-26	0		IIPGGIYNADLNDEWVQR
1914.9344	55-71	0		QQTVGGVNYFFDVEVGR
1912.8898	96-110	0		QLCSFEIYVWPWENR
1292.6633	27-37	0		ALHFAISEYNK
731.2995	41-45	0		DDYYR
565.3014	72-76	0		TICTK
548.2311	5-8	0		EEDR
541.3569	46-49	0		RPLR
517.2769	1-4	0		WSPK

83.5% of sequence covered (you may modify the input parameters to display also peptides < 500 Da or > 10000000000 Da):

10 20 30 40 50 60
WSPKEEDRII PGGIYNADLN DEWVQRALHF AISEYNKatk DDYYRRPLRv lrarQQTVGG
70 80 90 100 110 120
VNYFFDVEVG RTICTKSPQN LDTCAFHEQP ELQKkQLCSF EIYVWPWENR rslvksrcqe

Attiva Windows
Passa a Impostazioni per attiv

<http://www.expasy.org/cgi-bin/peptide-mass.pl>

PeptideMass

The entered sequence is:

1 0 2 0 3 0 4 0
DSSEEKFLRR IGRFGYGYGP YQPVPEQPLY POPYQPQYQQ YTF

The selected enzyme is: Trypsin

Maximum number of missed cleavages (MC): 0

All cysteines in reduced form.

Methionines have not been oxidized.

Using average masses of the occurring amino acid residues and giving peptide masses as [M].

The peptide masses from your sequence are:

[Theoretical pI: 6.25 / Mw (average mass): 5219.76]

mass	position	#MC	modifications	peptide sequence
693.6654	1-6	0		DSSEE K
434.5388	7-9	0		FLR
174.2028	10-10	0		R
344.4141	11-13	0		IGR
3645.0006	14-43	0		FGYGYGPYQPVPEQPLYPQP YQPQYQQYT F

100.0% of sequence covered :

1 0 2 0 3 0 4 0
DSSEEKFLRR IGRFGYGYGP YQPVPEQPLY POPYQPQYQQ YTF

PER CONFERMARE UNA STRUTTURA DOBBIAMO SEQUENZIARE I PEPTIDI

1 - VERIFICA DI UNA SEQUENZA PROTEICA

Spettrometria di massa tandem o MS-MS:

- Dagli anni '90 la spettrometria di massa, attraverso gli esperimenti di frammentazione di un peptide (MS-MS), ha fornito una alternativa alla degradazione di Edman.
- È una tecnica più sensibile;
- Non richiede la proteina purificata;
- Non ci sono limitazioni nell'identificazione di proteine con residuo amino-terminale bloccato (es. acetilazione) che non consente il sequenziamento;
- Permette di frammentare un peptide in un tempo di qualche secondo rispetto a ore.

Spettrometria di massa tandem o MS-MS

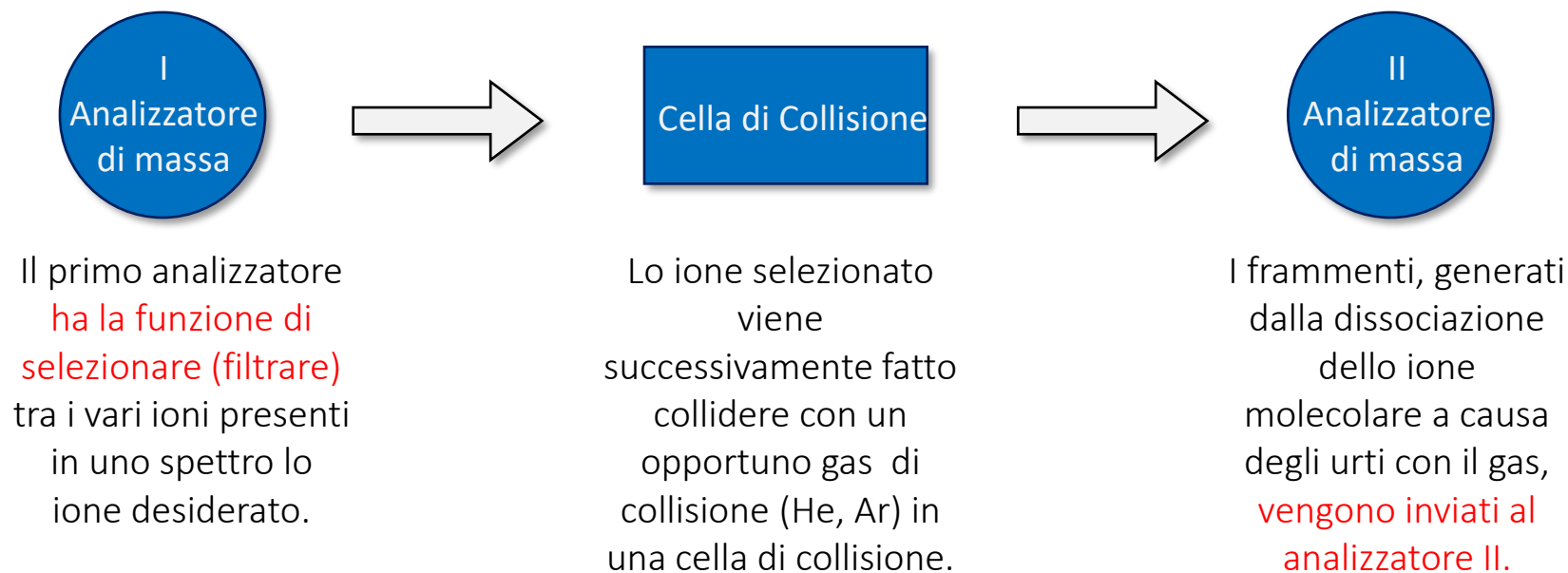


Uno **spettrometro di massa tandem** è costituito da due analizzatori disposti in serie.

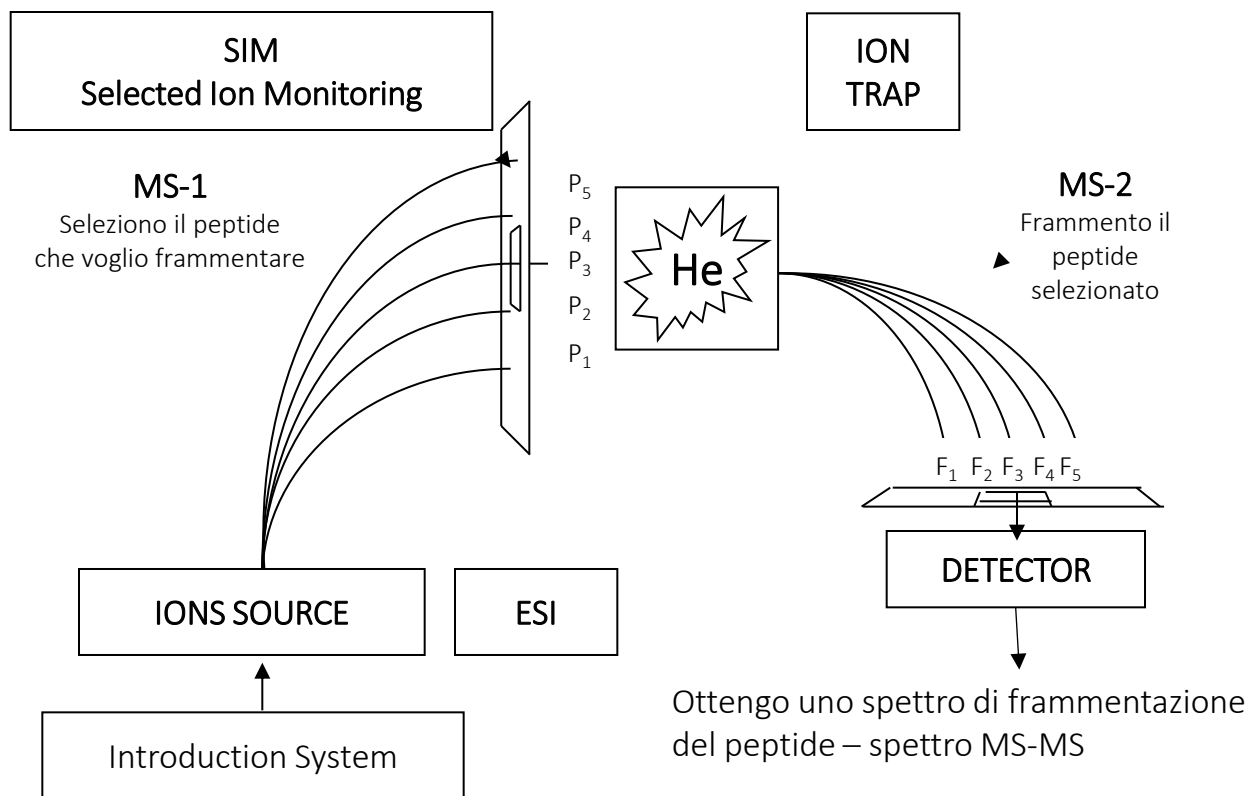
Funzioni della cella di collisione:

1. Frammentare lo ione selezionato
2. Trasmettere gli ioni prodotti al secondo analizzatore di massa.

Spettrometria di massa tandem o MS-MS



Spettrometria di massa tandem o MS-MS

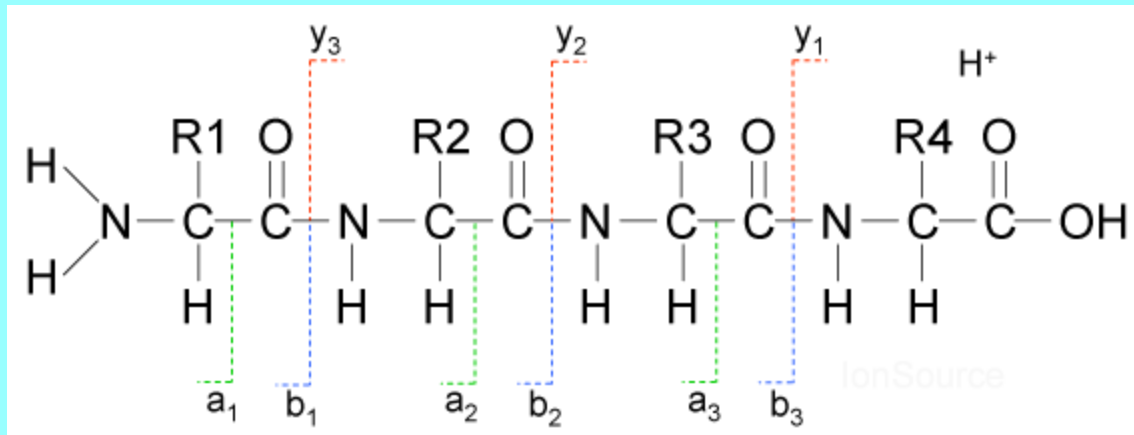


<https://www.youtube.com/watch?v=Jc1uC6EbMCs>

<https://www.jove.com/it/science-education/v/13385/peptide-identification-using-tandem-mass-spectrometry>

Cosa produce la frammentazione di un peptide?

Ioni specifici che posso interpretare e che mi consentono di costruire la sequenza aminoacidica



Il legame tra il $\text{C}=\text{O}$ e il gruppo NH del legame peptidico si rompe e vengono generati frammenti ionici denominati

"ioni-y" e "ioni b"

Uno ione "y" corrisponde ad un frammento in cui la carica positiva viene ritenuta sul frammento C-terminale generato dallo ione molecolare

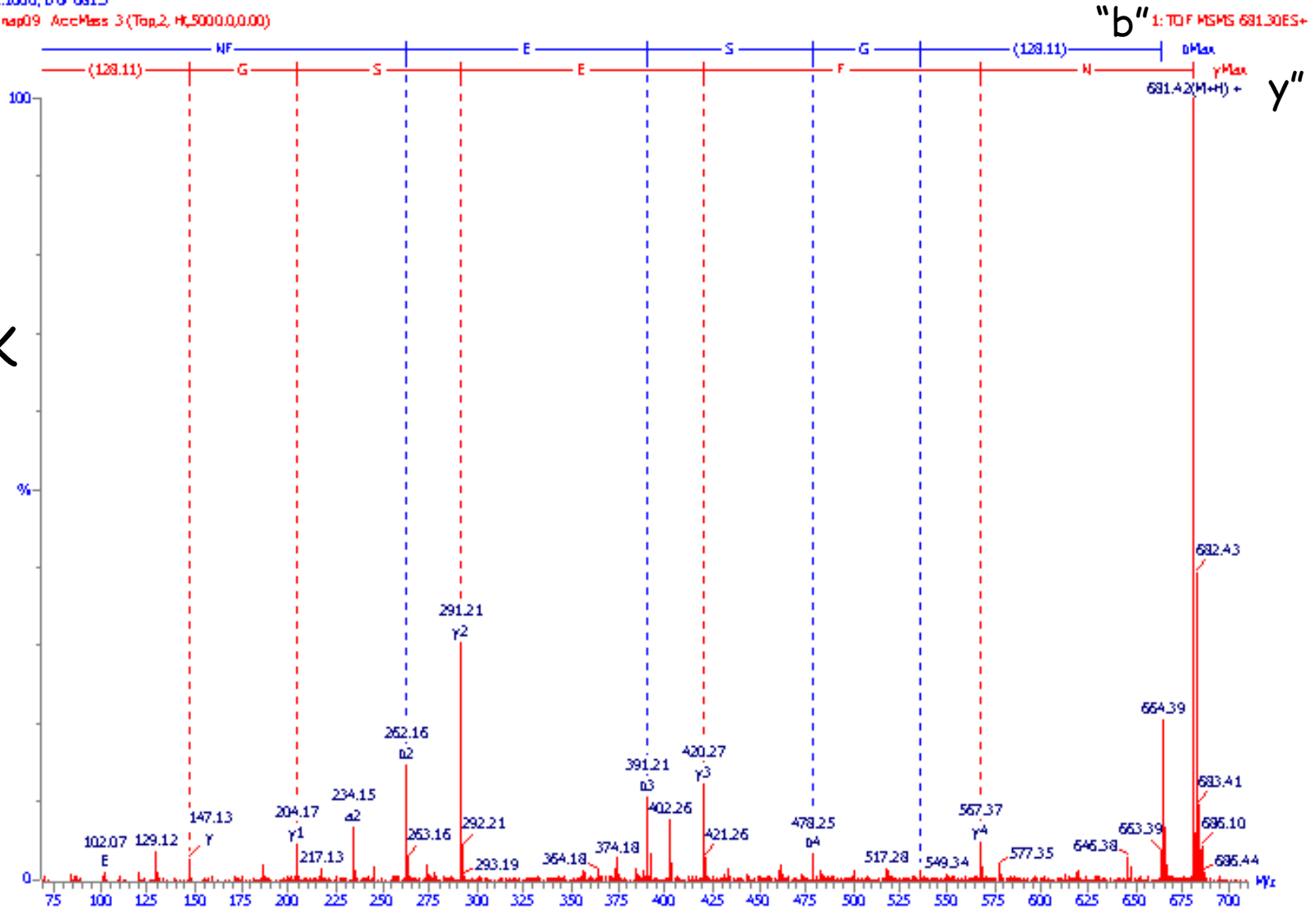
Uno ione "b" corrisponde ad un frammento in cui la carica positiva viene ritenuta sul frammento N-terminale generato dallo ione molecolare.

$b_3 - b_2 = 391.21 - 262.16 = 129.05$ Da che è equivalente ad una glutammina (E)

$y_4 - y_3 = 567.37 - 420.27 = 147.10$ Da che è equivalente ad una fenilalanina (F).

1:1000; D of 681.3

snap09 AccMass 3 (Top2, H₂5000.0,0.00)



Sequenziamento di un peptide mediante spettrometria di massa tandem.

Ipotizzando che la tripsina abbia tagliato la proteina in modo atteso, la sequenza del peptide potrebbe essere: AL(/I)HFAL(/I)SEYNK.

MS-Product

Peptide Sequence

Enter Sequence in Capital letters (B, J, O, X, Z not allowed) except:
| m - Met-ox | h - Homoserine lactone | U - Selenocysteine |
| s, t, y - Phosphorylated S, T, Y | d, e, f, g, h, i, j, k, l - user specified amino acids |>
Modified amino acids may be entered using PSI notation - eg. M(Oxidation), S(Phospho)
[+] Click + to see list of available PSI modifications (enter exactly as shown)
An amino acid can also be followed by an exact mass - eg. P(-27.9949) or N(0.9840)
Modifications may be added together - eg. X(MappingN+Deamidated)
Modified N and C termini must be selected from the menus

<input type="checkbox"/>	N Term	Sequence	C Term
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="text"/>	SAMPLER	<input type="text"/>

[+] Additional Sequences

User Specified AA Elem Comp.(d)	C2 H3 N1 O1
User Specified AA Elem Comp.(e)	
User Specified AA Elem Comp.(f)	
User Specified AA Elem Comp.(g)	
User Specified AA Elem Comp.(h)	
User Specified AA Elem Comp.(i)	
User Specified AA Elem Comp.(j)	
User Specified AA Elem Comp.(k)	
User Specified AA Elem Comp.(l)	

MS-Product

Peptide Sequence

Enter Sequence in Capital letters (B, J, O, X, Z not allowed) except:
| m - Met-ox | h - Homoserine lactone | U - Selenocysteine |
| s, t, y - Phosphorylated S, T, Y | d, e, f, g, h, i, j, k, l - user specified amino acids |>
Modified amino acids may be entered using PSI notation - eg. M(Oxidation), S(Phospho)
[+] Click + to see list of available PSI modifications (enter exactly as shown)
An amino acid can also be followed by an exact mass - eg. P(-27.9949) or N(0.9840)
Modifications may be added together - eg. X(MappingN+Deamidated)
Modified N and C termini must be selected from the menus

<input type="checkbox"/>	N Term	Sequence	C Term
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="text"/>	ALHFAISEYNK	<input type="text"/>

[+] Additional Sequences

User Specified AA Elem Comp (d)	C2 H3 N1 O1
User Specified AA Elem Comp (e)	
User Specified AA Elem Comp (f)	
User Specified AA Elem Comp (g)	
User Specified AA Elem Comp (h)	
User Specified AA Elem Comp (i)	
User Specified AA Elem Comp (j)	
User Specified AA Elem Comp (k)	
User Specified AA Elem Comp (l)	

ALHFAISEYNK

User AA Formula 1: **C2 H3 N1 O1**

Elemental Composition: [C60 H90 N15 O17](#)

MH ⁺ 1(av)	MH ⁺ 1(mono)
1293.4739	1292.6634

[\[-\]](#) Main Sequence Ions

b		y
---	1 A 11	---
185.1285	2 L 10	1221.6262
322.1874	3 H 9	1108.5422
469.2558	4 F 8	971.4833
540.2929	5 A 7	824.4149
653.3770	6 I 6	753.3777
740.4090	7 S 5	640.2937
869.4516	8 E 4	553.2617
1032.5149	9 Y 3	424.2191
1146.5578	10 N 2	261.1557
---	11 K 1	147.1128

[\[-\]](#) All Sequence Ions

ALHFAISEYNK

User AA Formula 1: **C2 H3 N1 O1**

Elemental Composition: [C60 H90 N15 O17](#)

MH⁺1(av)	MH⁺1(mono)
1293.4739	1292.6634

[-] Main Sequence Ions

b		y	
---	1	A 11	---
185.1285	2	L 10	1221.6262
322.1874	3	H 9	1108.5422
469.2558	4	F 8	971.4833
540.2929	5	A 7	824.4149
653.3770	6	I 6	753.3777
740.4090	7	S 5	640.2937
869.4516	8	E 4	553.2617
1032.5149	9	Y 3	424.2191
1146.5578	10	N 2	261.1557
---	11	K 1	147.1128

[-] All Sequence Ions

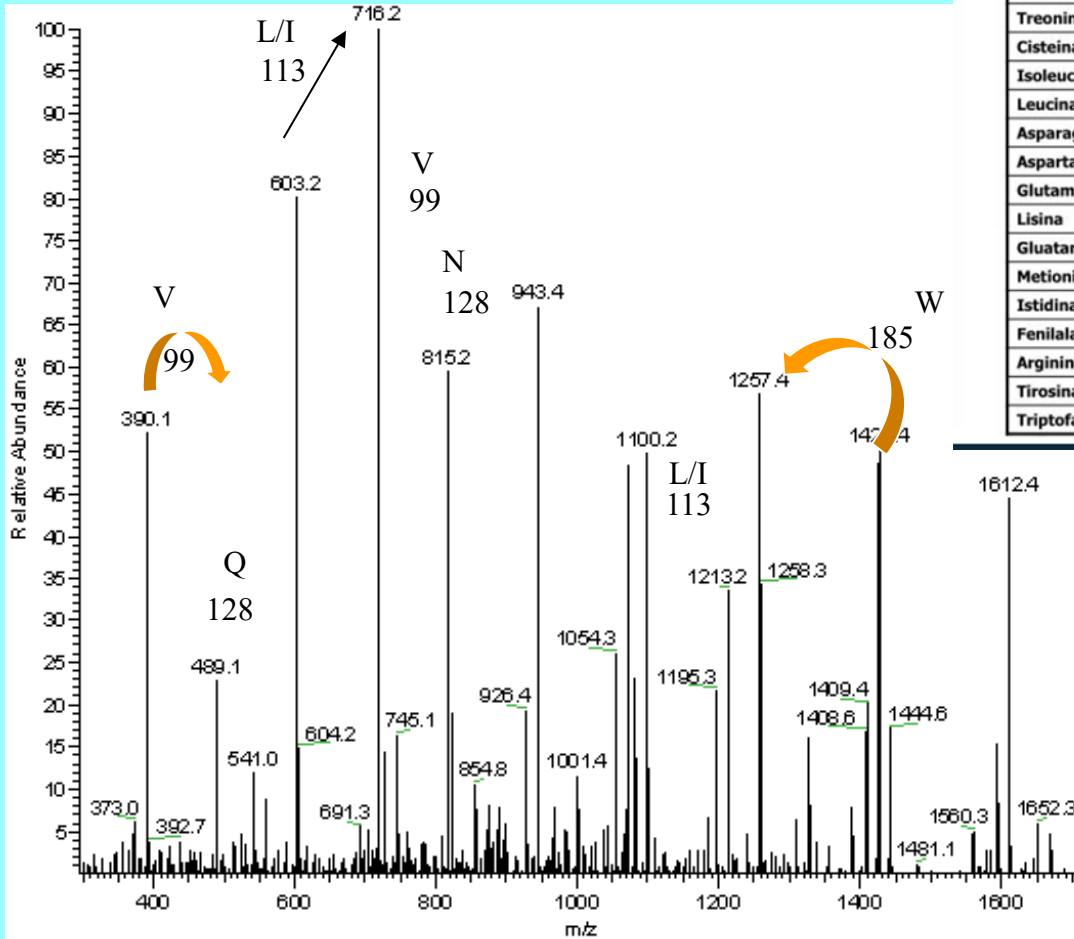


Masse degli aminoacidi



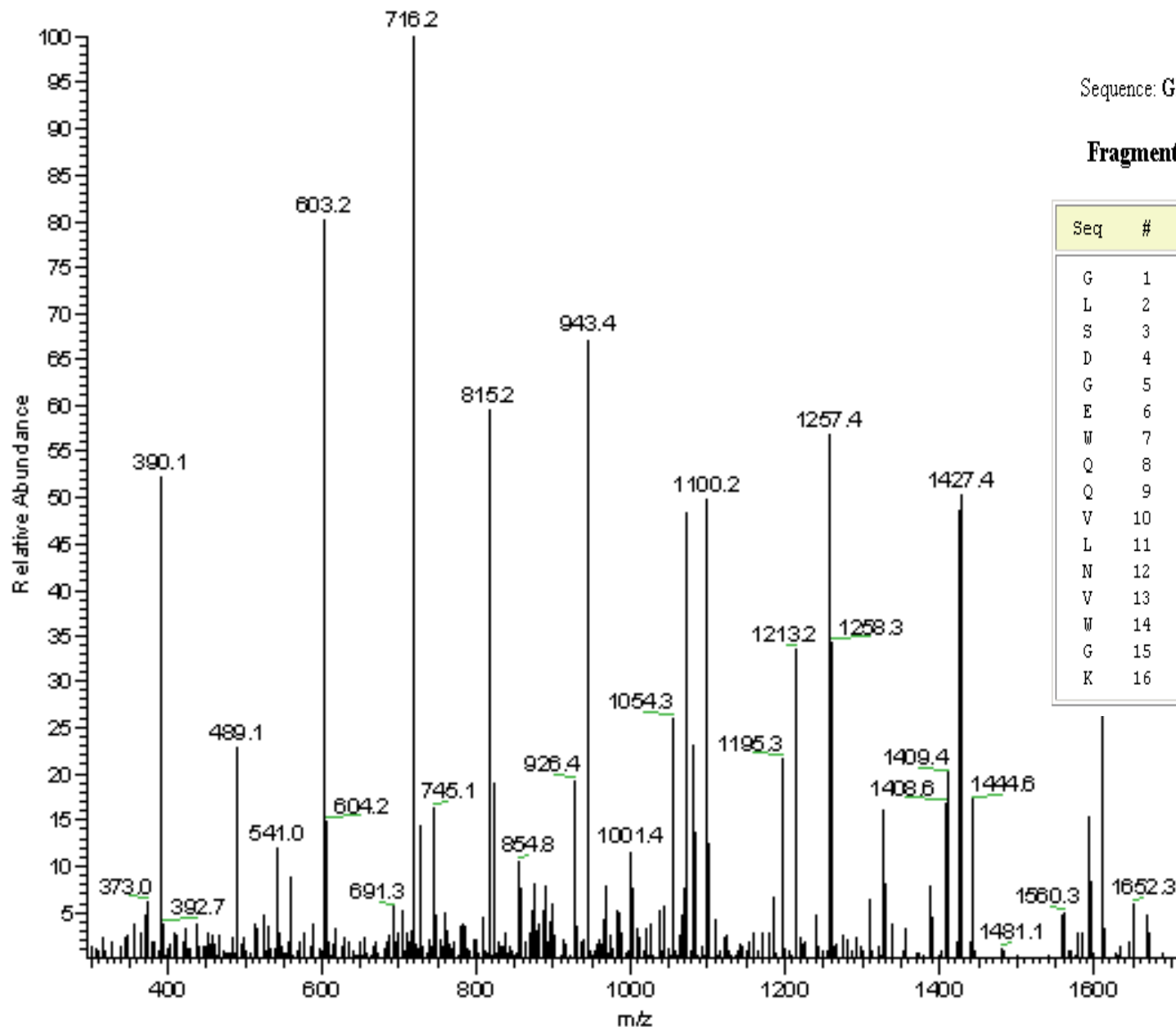
Aminoacido	Codice (3 lettere)	Codice (1 lettera)	Massa monoisotopica	Massa chimica
Glicina	Gly	G	57.02147	57.052
Alanina	Ala	A	71.03712	71.079
Serina	Ser	S	87.03203	87.078
Prolina	Pro	P	97.05277	97.117
Valina	Val	V	99.06842	99.133
Treonina	Thr	T	101.04768	101.105
Cisteina	Cys	C	103.00919	103.144
Isoleucina	Ile	I	113.08407	113.160
Leucina	Leu	L	113.08407	113.160
Asparagina	Asn	N	114.04293	114.104
Aspartato	Asp	D	115.02695	115.089
Glutamina	Gln	Q	128.05858	128.131
Lisina	Lys	K	128.09497	128.174
Glutamato	Glu	E	129.04260	129.116
Metionina	Met	M	131.04049	131.198
Istidina	His	H	137.05891	137.142
Fenilalanina	Phe	F	147.06842	147.177
Arginina	Arg	R	156.10112	156.188
Tirosina	Tyr	Y	163.06333	163.170
Triptofano	Try	W	186.07932	186.213

Sequence: GLSDGEWQQVLNVWGK, pI: 4.37029



Aminoacido	Codice (3 lettere)	Codice (1 lettera)	Massa monoisotopica	Massa chimica
Glicina	Gly	G	57.02147	57.052
Alanina	Ala	A	71.03712	71.079
Serina	Ser	S	87.03203	87.078
Prolina	Pro	P	97.05277	97.117
Valina	Val	V	99.06842	99.133
Treonina	Thr	T	101.04768	101.105
Cisteina	Cys	C	103.00919	103.144
Isoleucina	Ile	I	113.08407	113.160
Leucina	Leu	L	113.08407	113.160
Asparagina	Asn	N	114.04293	114.104
Aspartato	Asp	D	115.02695	115.089
Glutamina	Gln	Q	128.05858	128.131
Lisina	Lys	K	128.09497	128.174
Glutamato	Glu	E	129.04260	129.116
Metionina	Met	M	131.04049	131.198
Istidina	His	H	137.05891	137.142
Fenilalanina	Phe	F	147.06842	147.177
Arginina	Arg	R	156.10112	156.188
Tirosina	Tyr	Y	163.06333	163.170
Triptofano	Try	W	186.07932	186.213

Lo spettro di Tandem MS o MS/MS del peptide e gli ioni teorici



Sequence: GLSDGEWQQVLNVWGK, pI: 4.37029

Fragment Ion Table, monoisotopic masses

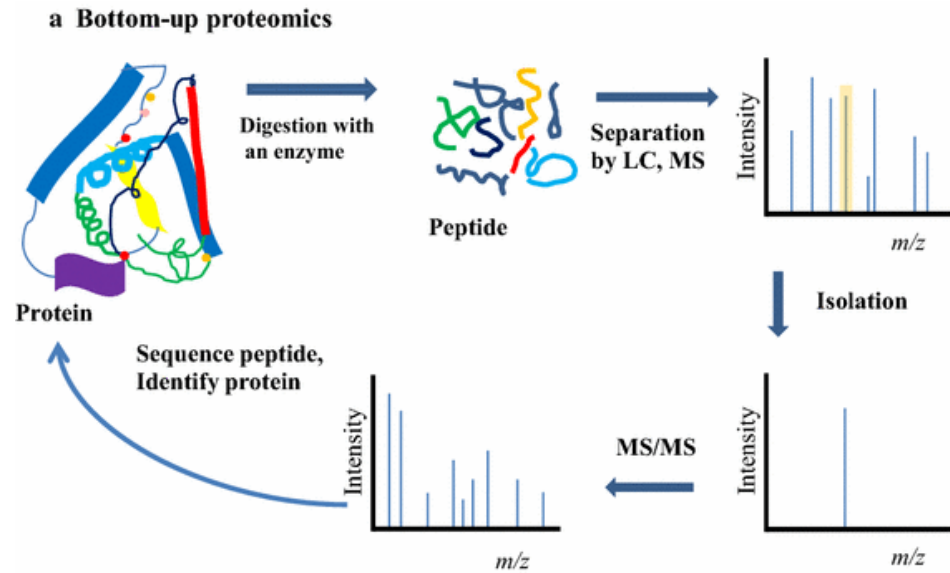
Seq	#	B	Y	# (+1)
G	1	58.02933	1815.90301	16
L	2	171.11340	1758.88155	15
S	3	258.14543	1645.79749	14
D	4	373.17237	1558.76546	13
G	5	430.19383	1443.73851	12
E	6	559.23642	1386.71705	11
W	7	745.31574	1257.67446	10
Q	8	873.37431	1071.59515	9
Q	9	1001.43289	943.53657	8
V	10	1100.50131	815.47799	7
L	11	1213.58537	716.40958	6
N	12	1327.62830	603.32551	5
V	13	1426.69671	489.28259	4
W	14	1612.77602	390.21417	3
G	15	1669.79749	204.13486	2
K	16	1797.89245	147.11340	1

Spettrometria di Massa

Strategie in Proteomica

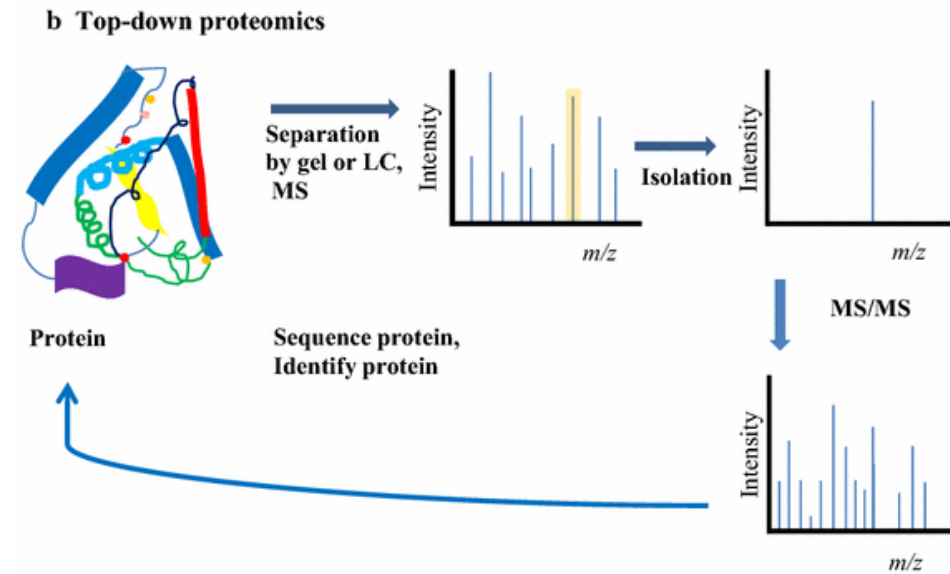
Bottom-up,

l'analisi è preceduta dalla digestione enzimatica delle proteine di interesse



Top-down,

Analizza le proteine intatte



Bottom-up

Nell'analisi **proteine** di grandi dimensioni può dare origine a spettri estremamente complessi da interpretare;

Con la digestione enzimatica, le informazioni relative alle PTMs possono andare perse;

Top-down

Le proteine devono essere solubili in ambiente acido ai fini della corsa cromatografica;

Un elevato grado di **eterogeneità**, come accade per le proteine glicosilate, rende difficile l'attribuzione del valore di massa esatta.

2 - NON ABBIAMO IPOTESI STRUTTURALI

Mascot

Confronta la lista di peptidi con i peptidi ottenuti per digestione di proteine presenti in banche dati.

Propone possibili strutture, che vanno confermate.

Identificazione, difficile!

Il peptide mapping può essere risolutivo se abbiamo già delle ipotesi strutturali da confermare

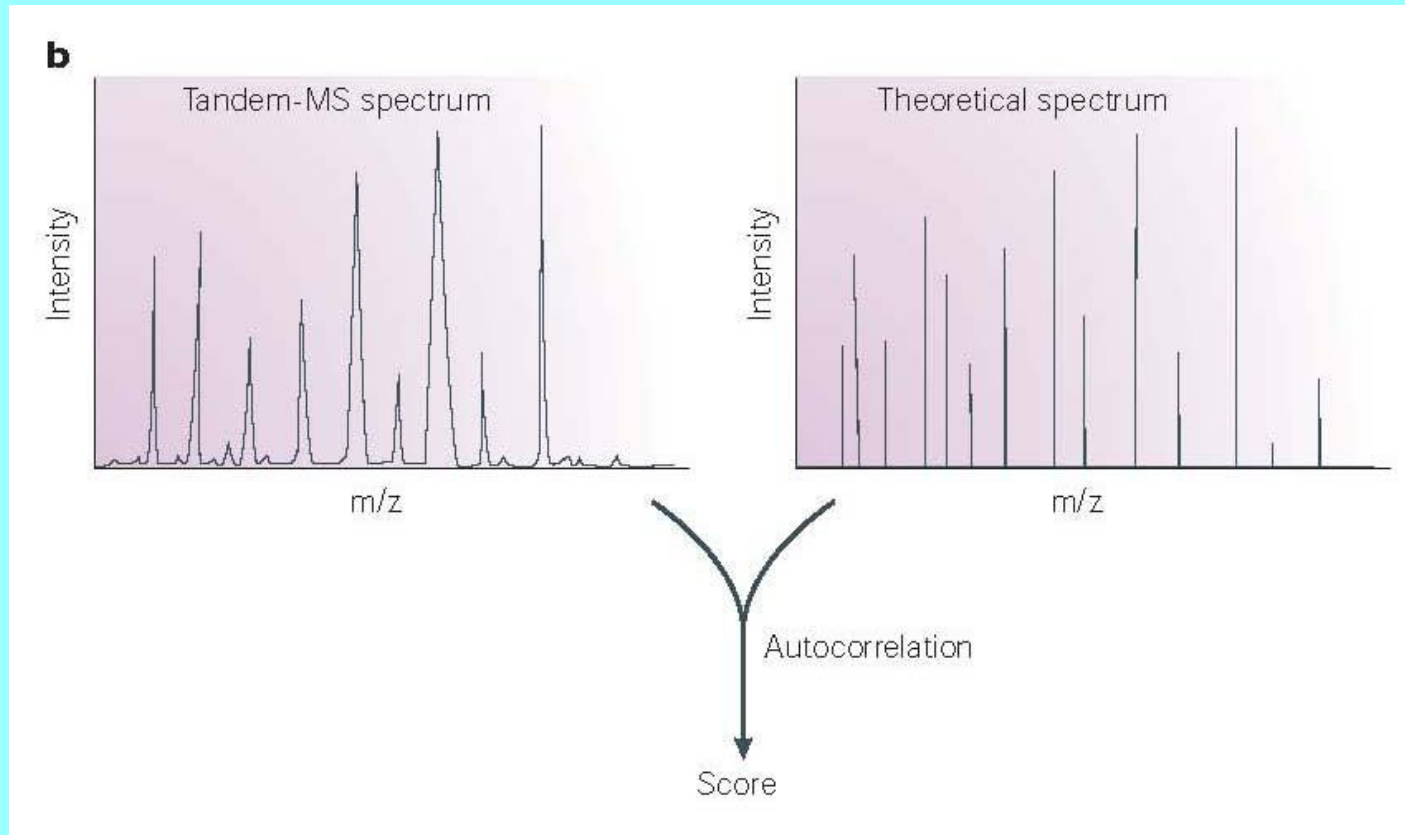
Interpretazione di uno spettro di frammentazione MS-MS

SEQUENZIAMENTO "DE NOVO" *"de novo" sequencing*

- Posso interpretarlo manualmente
- Posso sfruttare programmi e banche dati

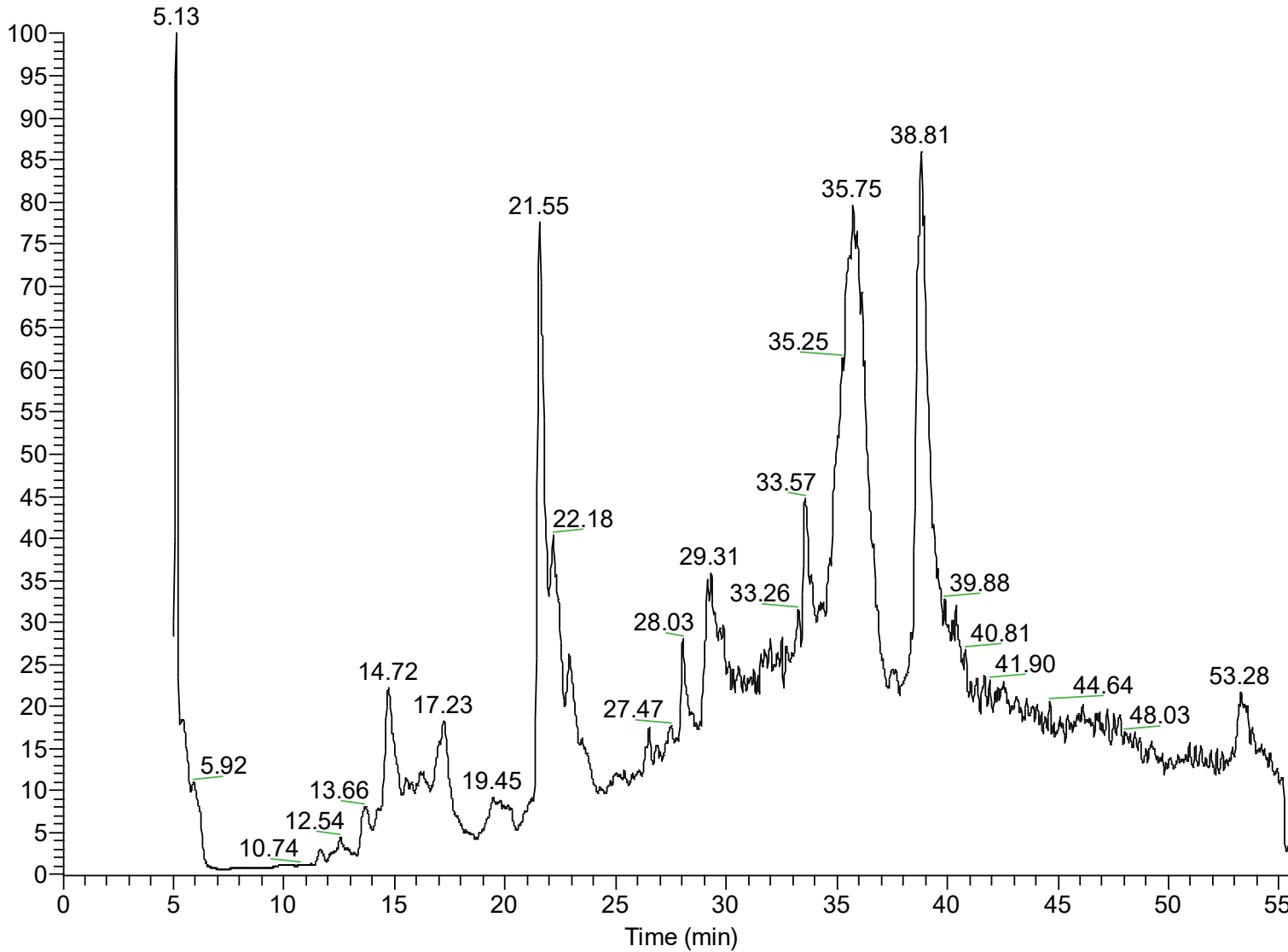
RICERCA IN BANCA DATI: Algoritmo di ricerca

Lo spettro sperimentale è paragonato agli spettri teorici di ogni proteina presente in banca dati



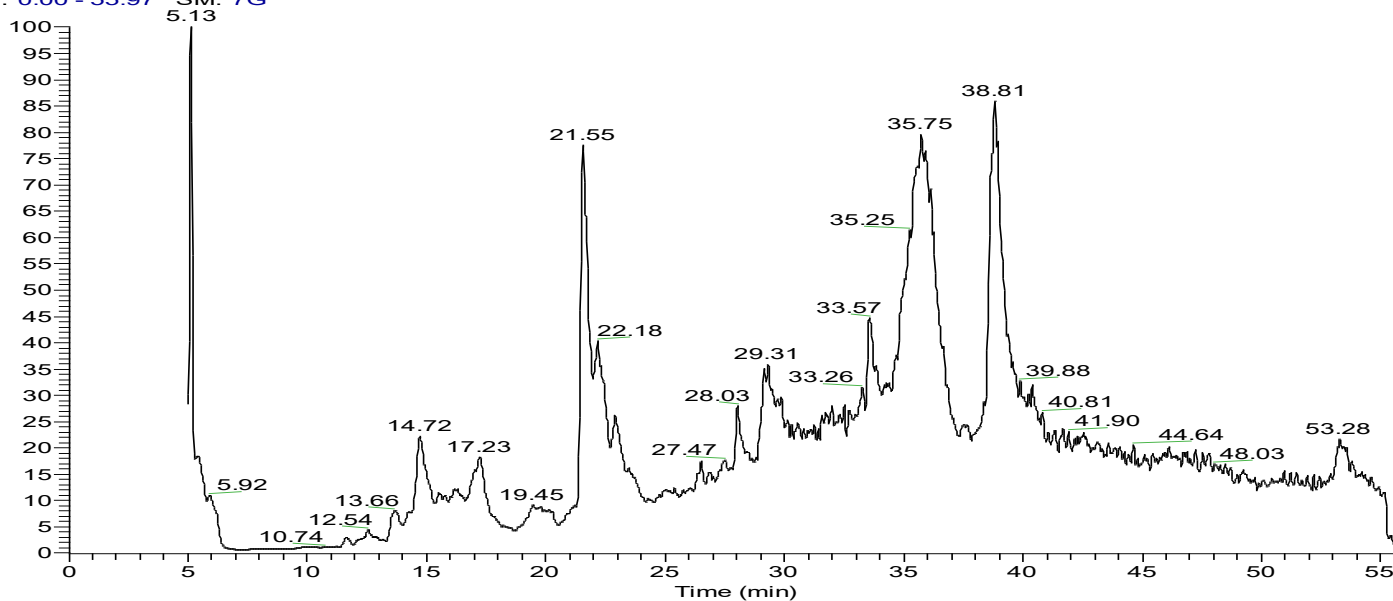
Steen H. and M. Mann, Nat Rev Mol Cell Biol 2004, 5, 699-711.

RT: 0.00 - 55.97 SM: 7G



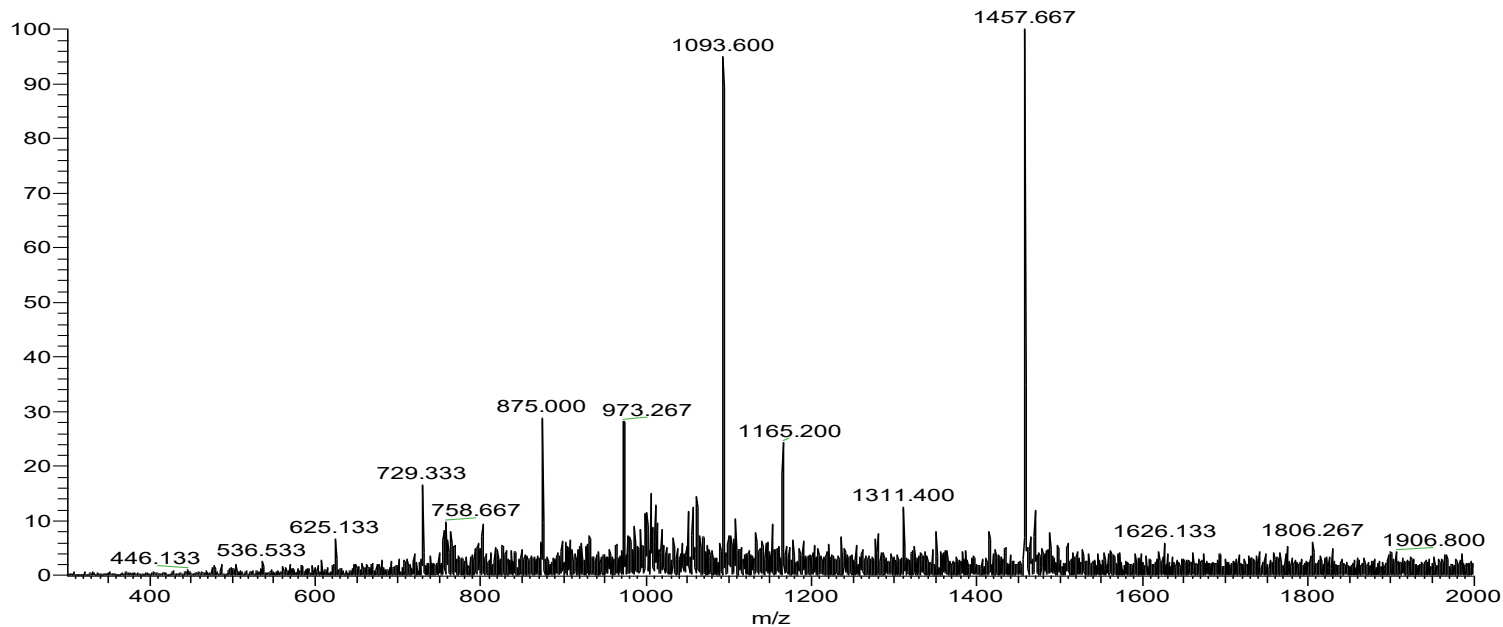
NL:
2.24E9
TIC F: + p ESI
Full ms
[300.00-
2000.00] MS
OlianasC8_(12-
4-17)

RT: 0.00 - 55.97 SM: 7G

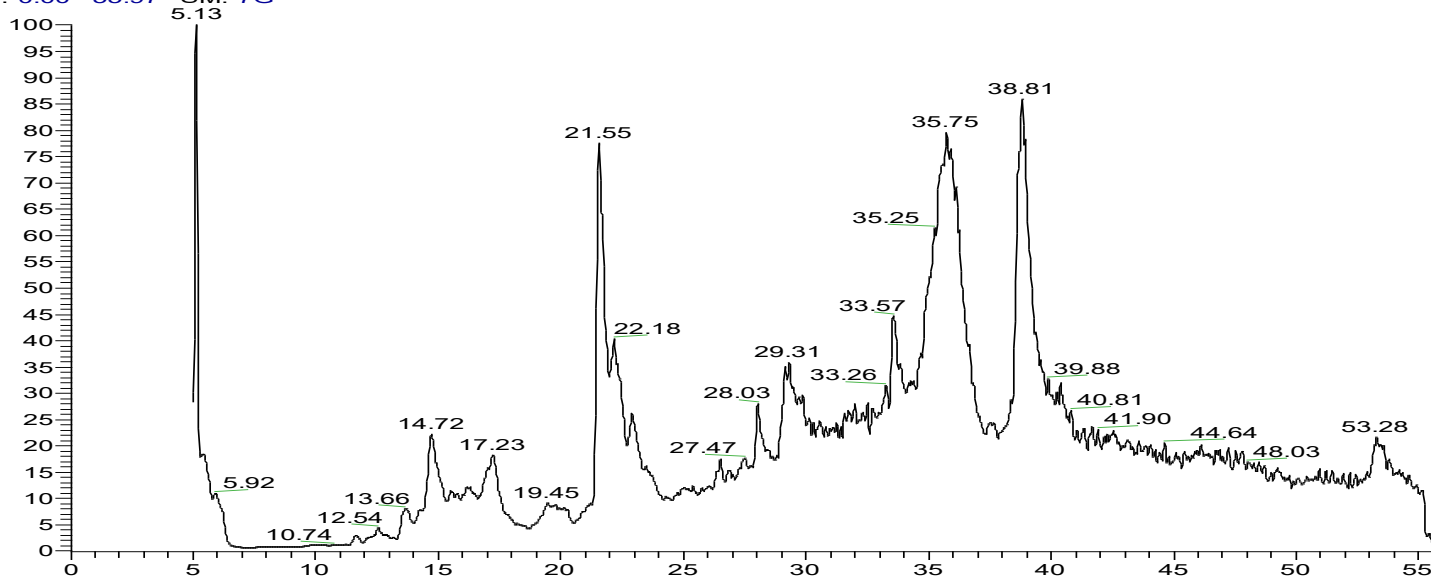


NL:
2.24E9
TIC F: + p ESI
Full ms
[300.00-
2000.00] MS
OlianasC8_(12-
4-17)

OlianasC8_(12-4-17) #332-361 RT: 14.49-15.22 AV: 30 NL: 1.07E6
F: + p ESI Full ms [300.00-2000.00]

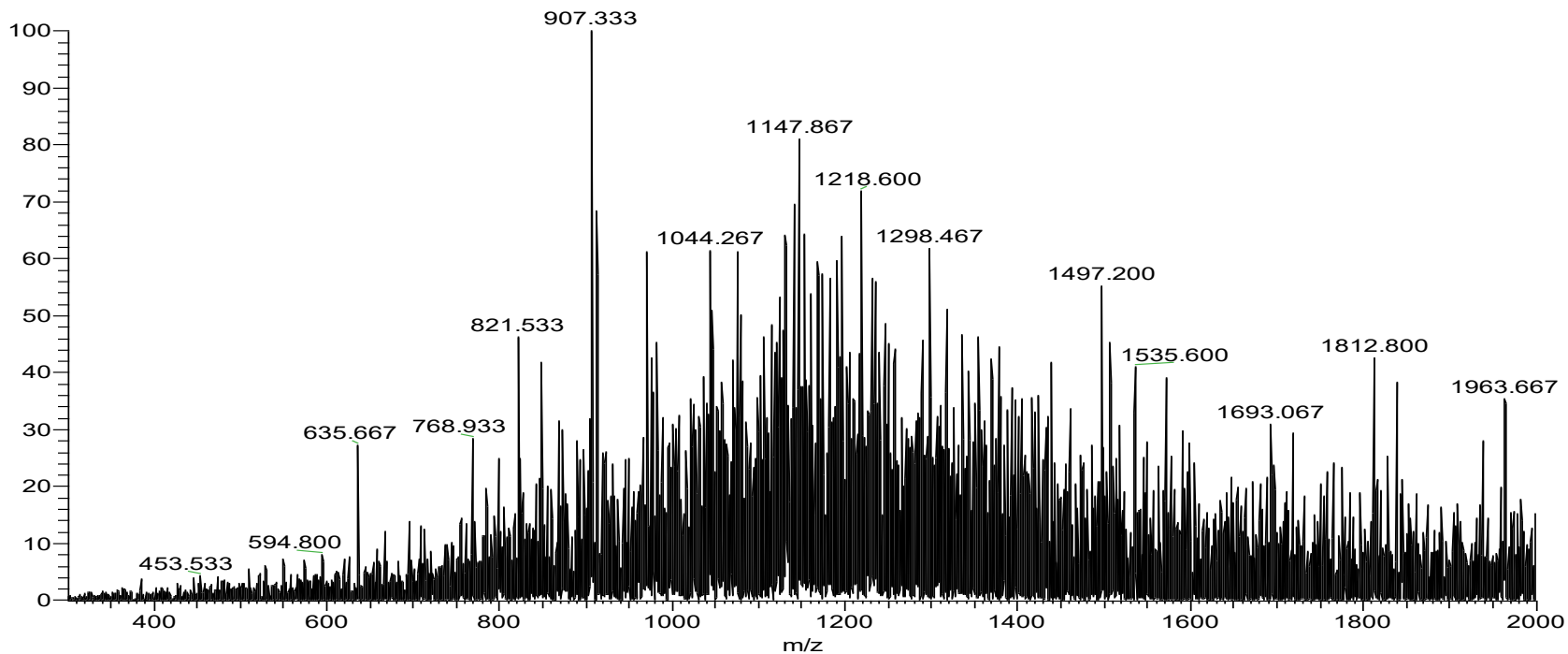


RT: 0.00 - 55.97 SM: 7G

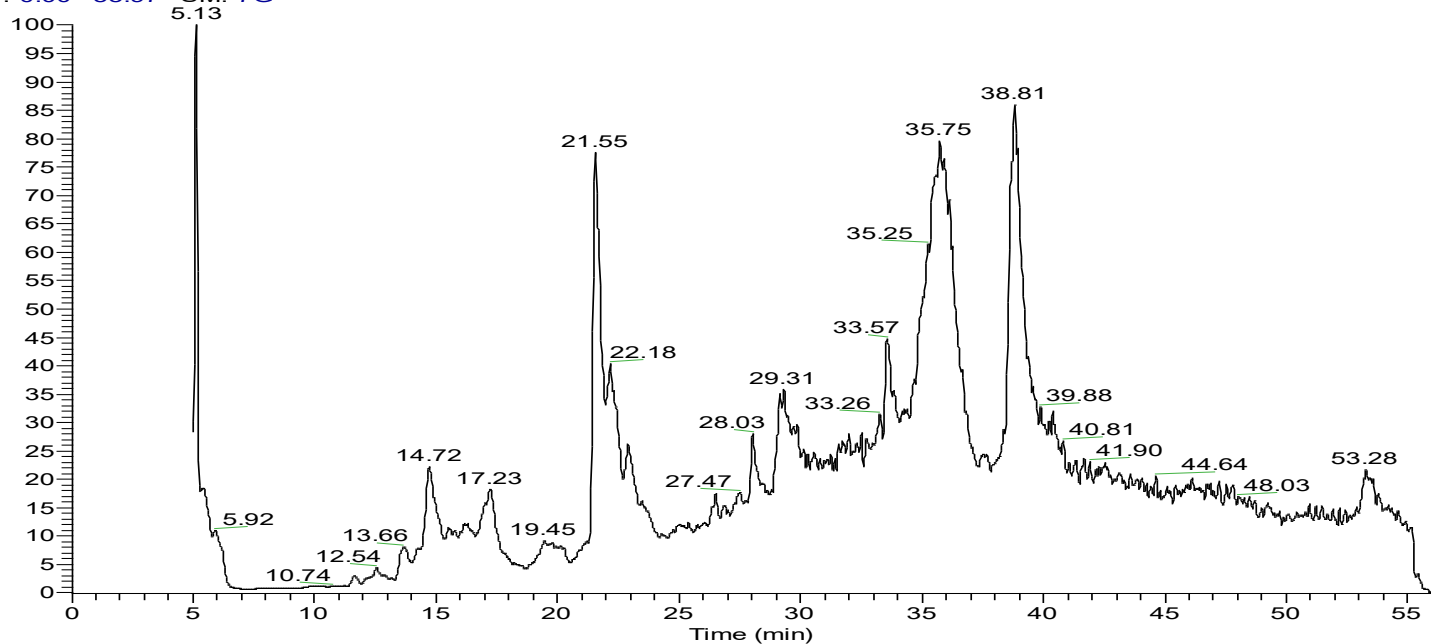


NL:
2.24E9
TIC F: + p ESI
Full ms
[300.00-
2000.00] MS
OlianasC8_(12-
4-17)

OlianasC8_(12-4-17) #414-448 RT: 16.57-17.43 AV: 35 NL: 2.48E5
F: + p ESI Full ms [300.00-2000.00]

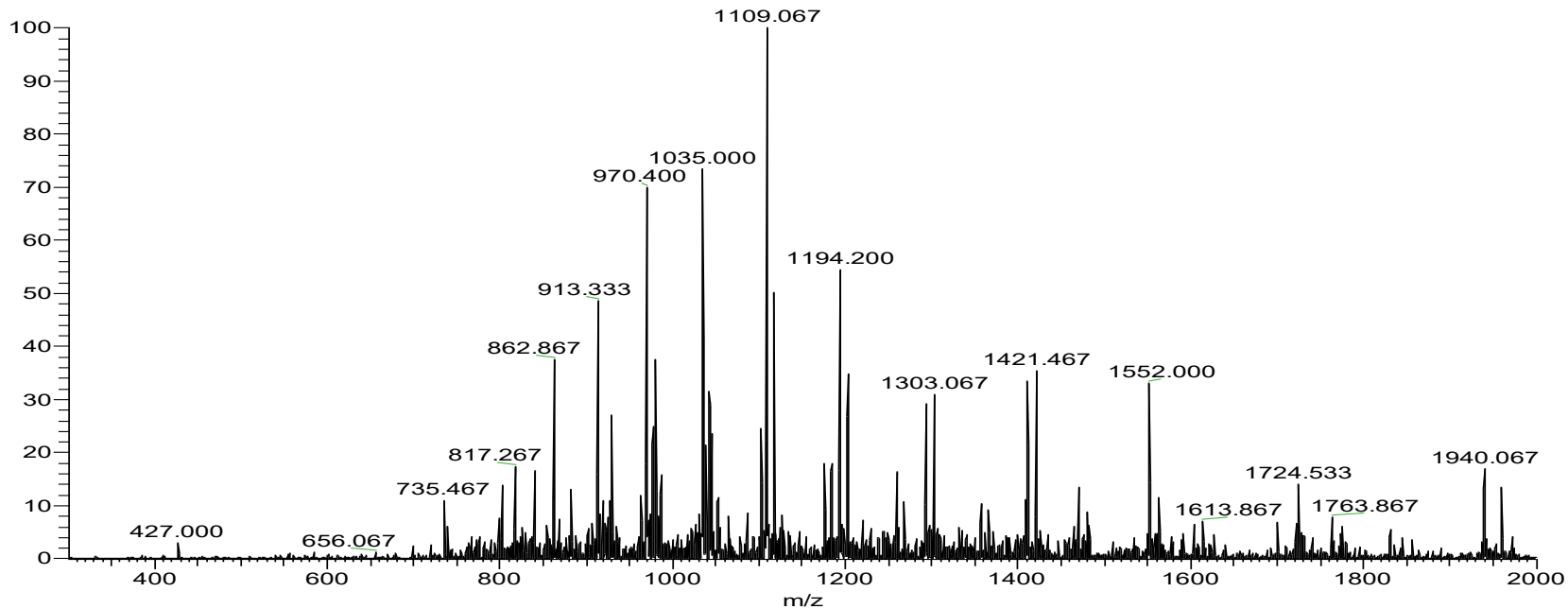


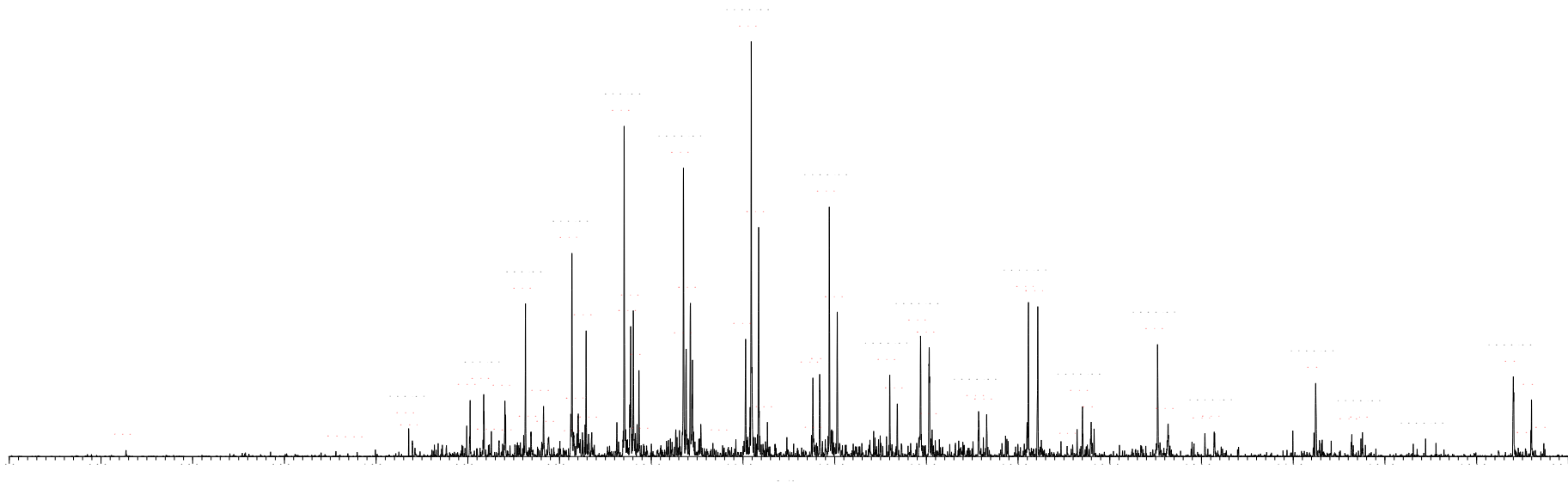
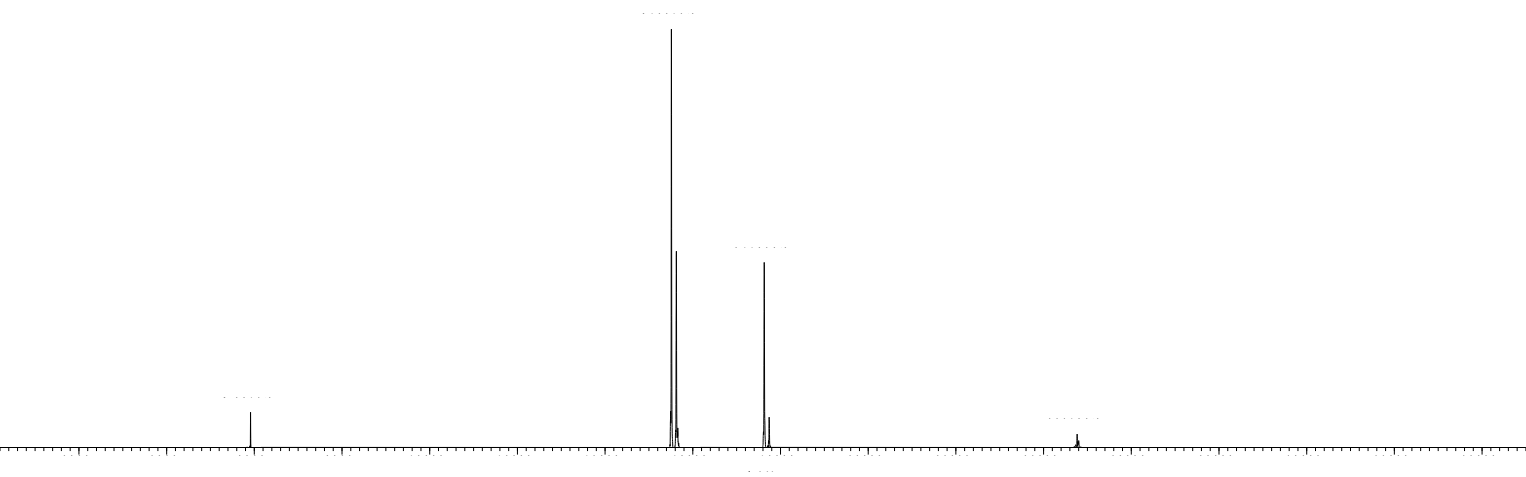
RT: 0.00 - 55.97 SM: 7G

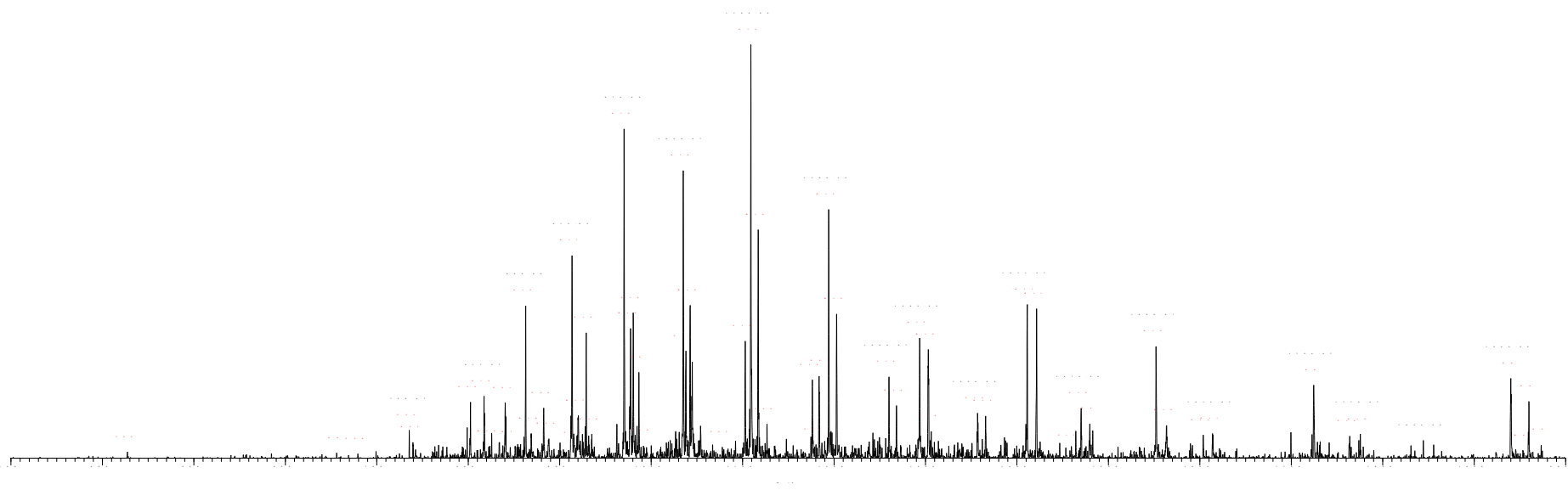
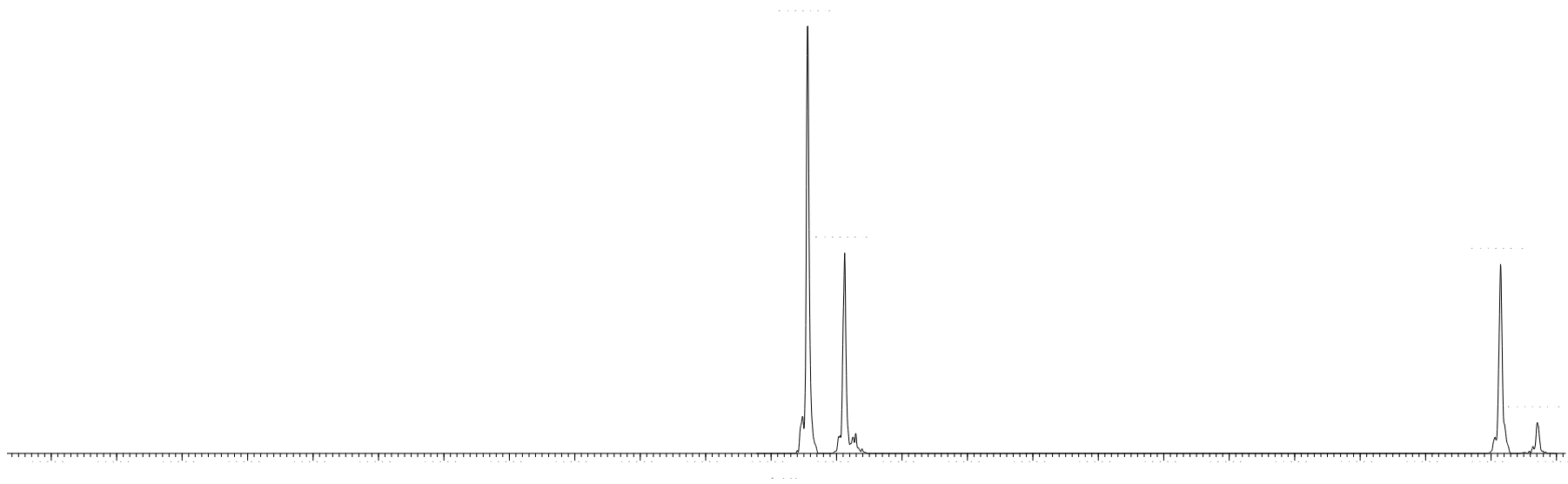


NL:
2.24E9
TIC F: + p ESI
Full ms
[300.00-
2000.00] MS
OlianasC8_(12-
4-17)

OlianasC8_(12-4-17) #599-620 RT: 21.33-21.85 AV: 22 NL: 5.12E6
F: + p ESI Full ms [300.00-2000.00]

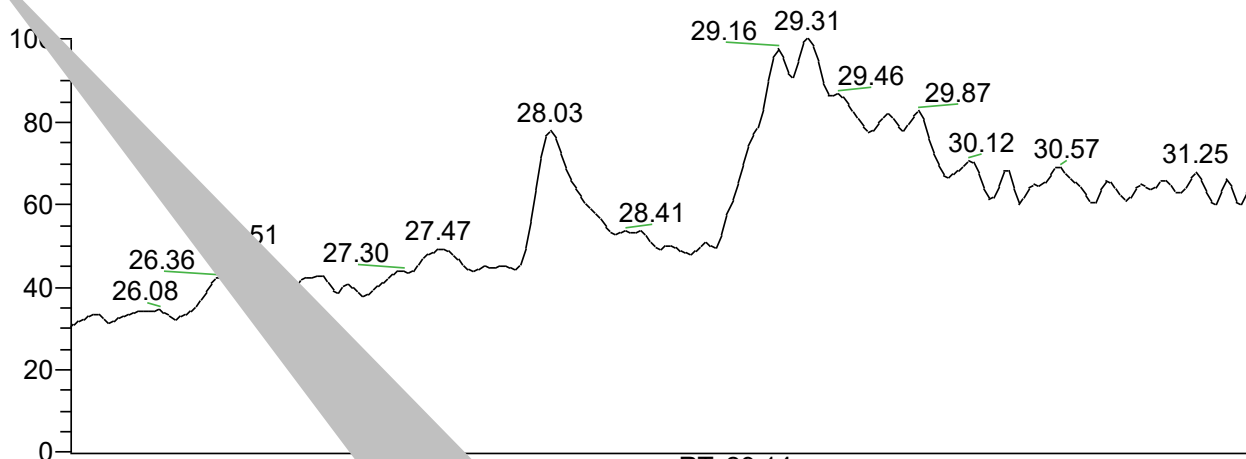






RT: 25.63 - 31.55 SM: 7G

NL: 8.06E8
TIC F: + p ESI Full ms
[300.00-2000.00] MS
OlianasC8_(12-4-17)



RT: 29.14
MA: 309775932

NL: 1.05E7
m/z=
1159.542-1159.658+
1448.928-1449.072+
1931.903-1932.097 F: + p ESI
Full ms [300.00-2000.00] MS
OlianasC8_(12-4-17)

