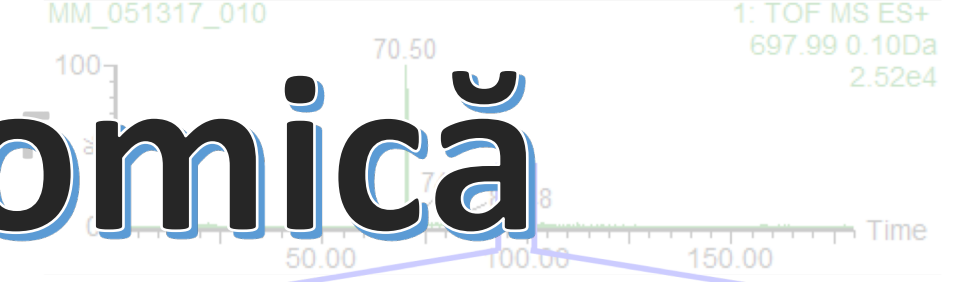
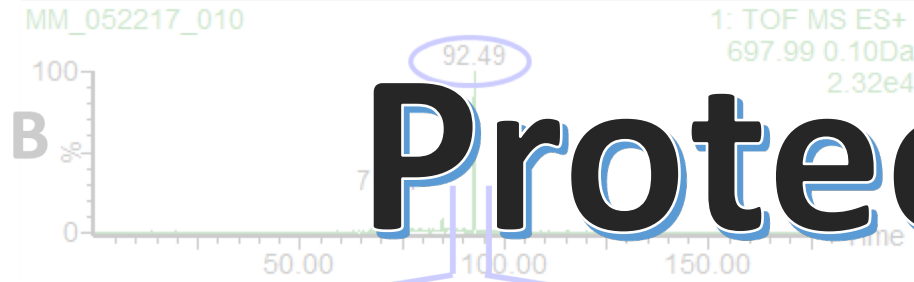
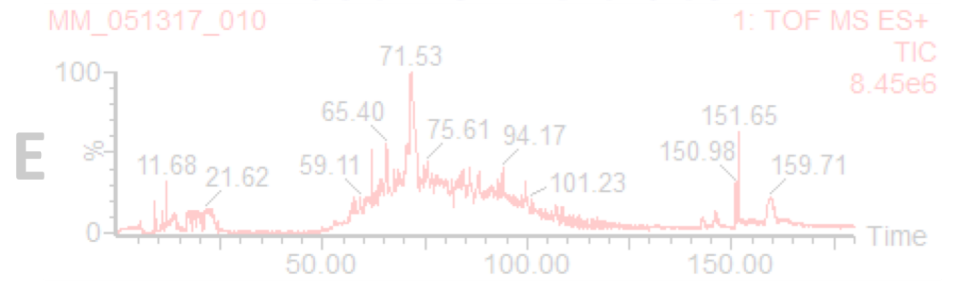
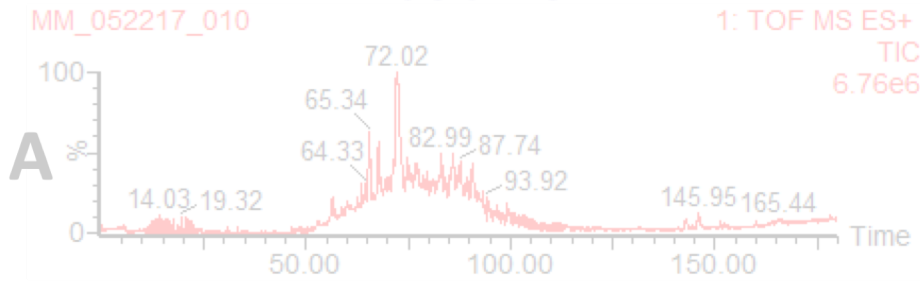
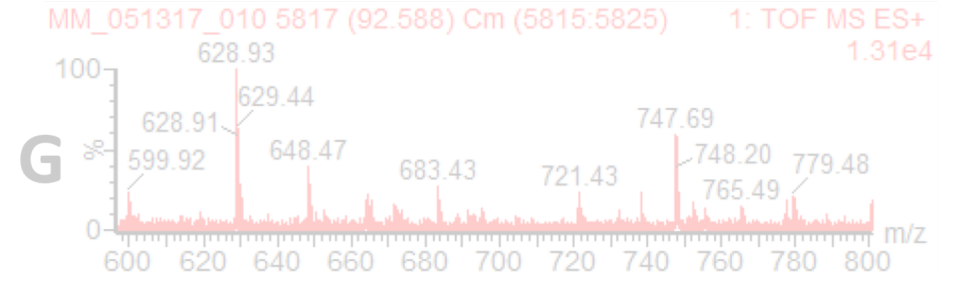
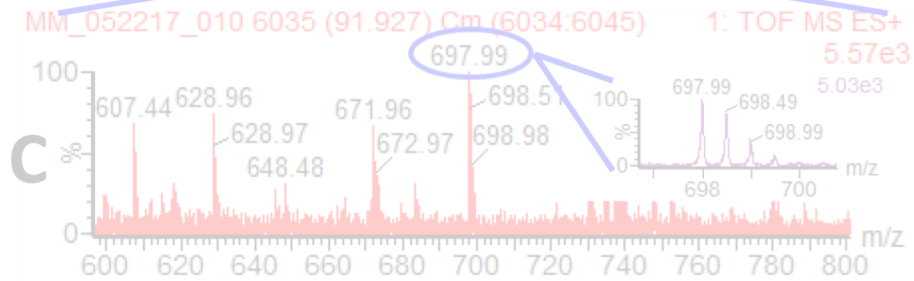


Nicotine

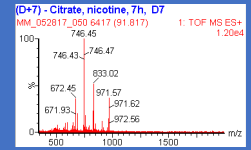
Nicotine + Citrate



Proteomică

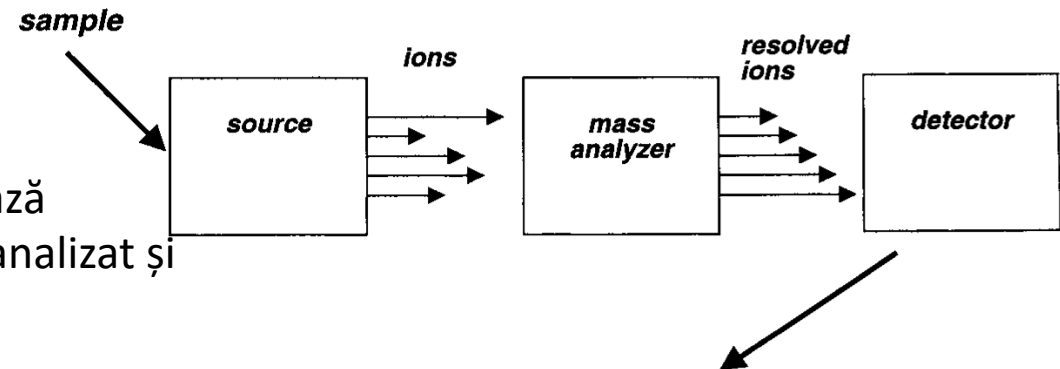


II. Spectrometria de masă



II. 1. Principii generale și particularități legate de măsurarea peptidelor/proteinelor

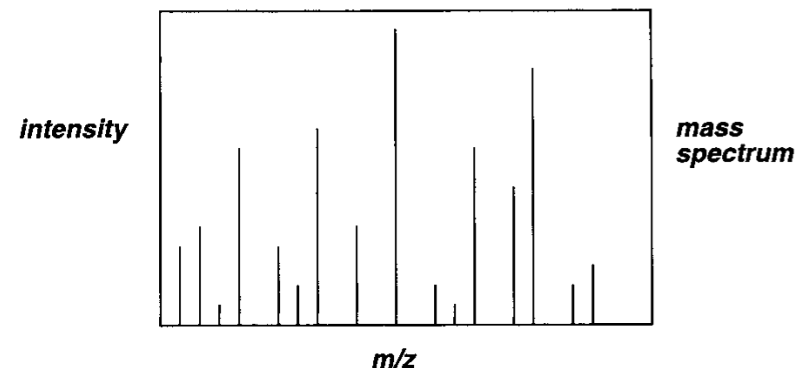
Spectrometria de masă este o tehnică analitică prin care este măsurat raportul masă-sarcină (m/z) al moleculelor încărcate electric. Raportul m/z poate fi mai apoi utilizat pentru a identifica cu precizia masa moleculară (M_w - molecular weight) a moleculelor neutre. Rezultatul unei analize de spectrometrie de masă este **un spectru de masă – un grafic ce are pe axa OX valoarea m/z în Da a ionilor analizați, iar pe OY intensitatea semnalului corespunzătoare ionului analizat.** Instrumentul ce înregistrează spectrul de masă poartă numele de **spectrometru de masă** și este alcătuit din 3 componente principale:



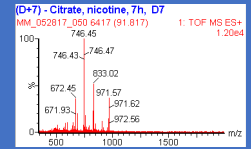
A. O **sursă de ioni** – asigură trecerea probei în fază gazoasă, ionizarea moleculelor din proba de analizat și transferul ionilor către

B. Un **analizor de masă** – în care ionii sunt separați funcție de m/z și sunt transferați către

C. Un **detector** sensibil la prezența ionilor separați de analizor care trimite semnale către un computer ce înregistrează **spectrul de masă**.



II. 1. Spectrometria de masă – principii generale



A. Surse de ioni utilizabile în proteomică

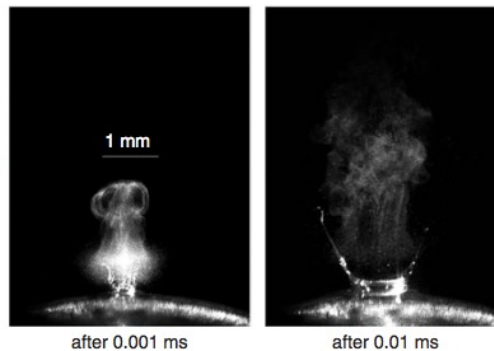
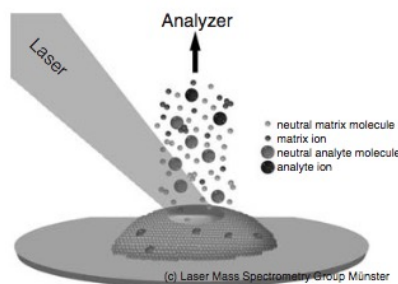
Moleculele neutre pot fi convertite în ioni prin diverse mecanisme chimice sau fizice.. Pentru a putea fi preluate de analizorul de masă, ionii generați în sursă trebuie să fie în stare gazoasă. În cazul moleculelor biologice, metodele de ionizare trebuie să fie foarte eficiente, dar să nu distrugă/fragmenteze analitul. Din aceste motive, în studiile de proteomică s-au impus preponderent două tipuri de ionizare:

Compuși frecvent utilizați ca matrice în MALDI

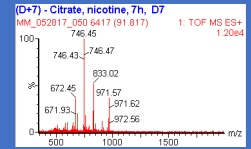
1. **MALDI** - Matrix assisted LASER desorption ionization - Proba de analizat amplasată într-o matrice cu caracter acid este supusă unor pulsuri laser repetate de 50-200 ori. Pulsurile au loc în general în vacuum și generează explozii de mici dimensiuni ale probei de analizat, peptidele și proteinele ionizând norul ce apare în urma exploziei. Deoarece mediul este acid, **ionii ce se formează sunt preponderent pozitivi**. Matricea utilizată în MALDI are rolul de a genera protoni, dar de asemenea și de a prelua majoritar energia pulsurilor laser. Moleculele din matrix ionizează și ele, însă masa lor moleculară (100-200 Da) este semnificativ mai mică decât cea a peptidelor sau proteinelor (peste 1000 Da), fiind ușor de ignorat în analizorul de masă.

Matrix	Structure	Wavelength	Major applications
Nicotinic acid		UV 266 nm	Proteins, peptides, adduct formation
2,5-Dihydroxybenzoic acid (plus 10% 2-hydroxy-5-methoxybenzoic acid)		UV 337 nm, 353 nm	Proteins, peptides, carbohydrates, synthetic polymers
Sinapinic acid		UV 337 nm, 353 nm	Proteins, peptides
α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid		UV 337 nm, 353 nm	Peptides, fragmentation
3-Hydroxy-picolinic acid		UV 337 nm, 353 nm	Best for nucleic acids
6-Aza-2-thiothymine		UV 337 nm, 353 nm	Proteins, peptides, non-covalent complexes; near-neutral pH
k,m,n-Di(tri)hydroxy-acetophenone		UV 337 nm, 353 nm	Protein, peptides, non-covalent complexes; near-neutral pH
Succinic acid	<chem>HOOC-CH2-CH2-COOH</chem>	IR 2.94 μm, 2.79 μm	Proteins, peptides
Glycerol	<chem>H2C-CH(OH)-CH2(OH)</chem>	IR 2.94 μm, 2.79 μm	Proteins, peptides, liquid matrix

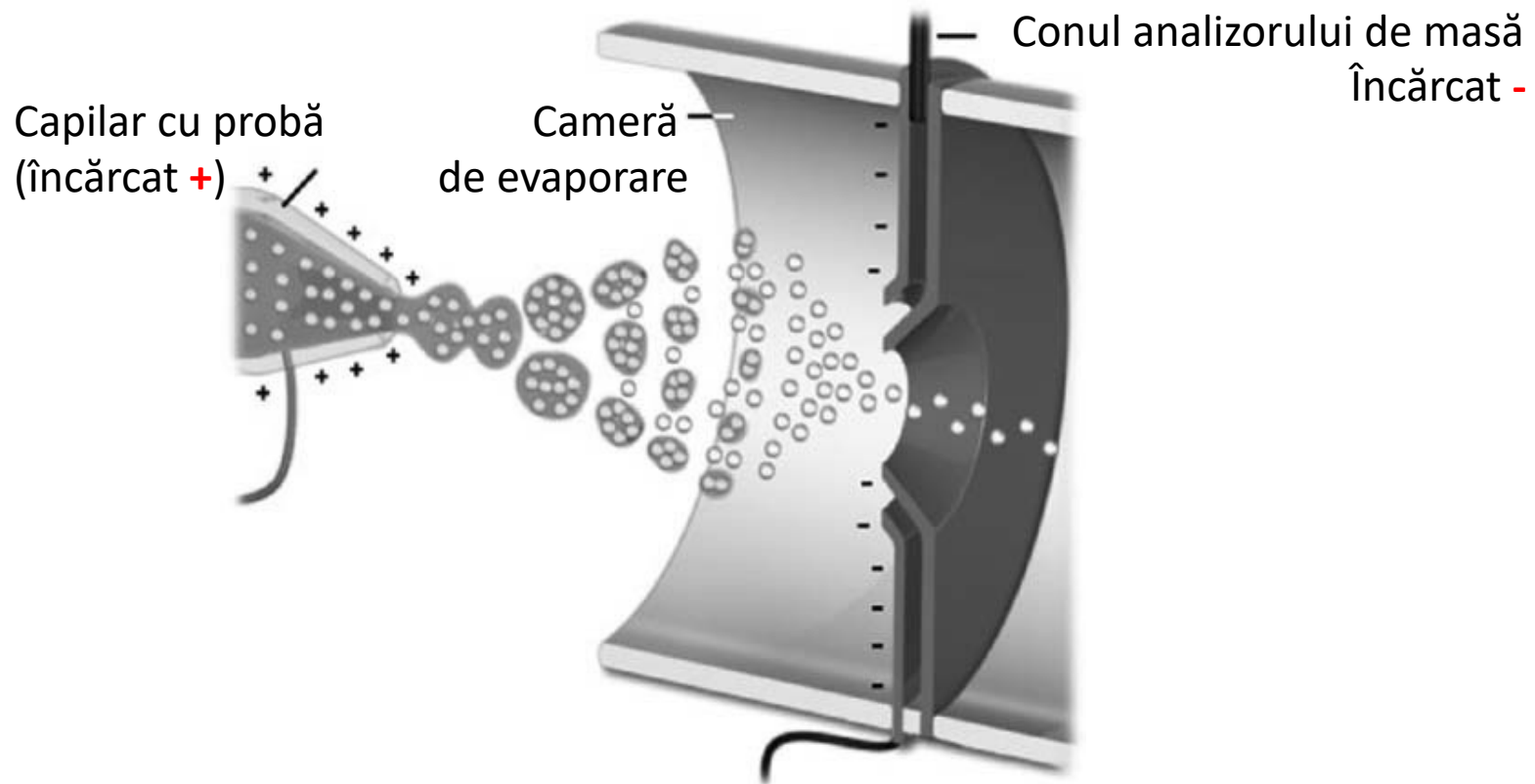
IR = infrared; UV = ultraviolet.



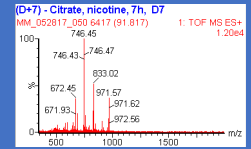
II. 1. Spectrometria de masă – principii generale



2. **ESI** - **electrospray ionization** – dacă în MALDI proba de analizat trebuie să fie solidă, în ESI aceasta este în soluție. Proba de analizat dizolvată într-un solvent volatil și acid este pulverizată foarte fin printr-un capilar într-o cameră de evaporare ce comunică cu conul analizorului de masă. Solventul este treptat eliminat din picăturile formate în camera de evaporare, analitul devenind astfel gaz. Prin evaporarea solventului acid se generează un exces de protoni, ceea ce face ca analitul să ionizeze. Între capilarul ce pulverizează proba și conul analizorului de masă există o diferență mare de voltaj ce direcționează ionii către conul detectorului de masă.



II. 1. Spectrometria de masă – principii generale



În cazul peptidelor, sarcina lor netă este variabilă, astfel:

1. În soluție, **gradul de ionizare al peptidelor depinde de pH:**

- catenele laterale ale aminoacizilor dicarboxilici sunt ne-ionizate la valori de pH mai mici de 3.0 și ionizate (încărcate negativ) la valori de pH mai mari de 7.0
- capătul N terminal și aminoacizii di-aminici sunt ionizați la pH mai mic de 8.5
- funcție de valoare de pH a mediului, peptidele pot fi așadar încărcate pozitiv ($\text{pH} < 3.5$) sau negativ (la valori bazice de pH). De cele mai multe ori ionizarea peptidelor se face în mediu acid, ionii rezultând prin protonarea resturilor NH_2 și având astfel sarcină pozitivă.

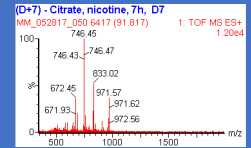
2. În **ESI peptidele nu ionizează uniform**. Orice peptidă obținută prin utilizarea tripsinei în faza de hidroliză va avea cel puțin 2 radicali ionizabili: capătul N terminal și restul de Lys/Arg unde a avut loc hidroliza la capătul C-terminal. Prin ESI, din peptida va produce așadar cel puțin 3 tipuri de molecule:

- **peptida neionizată** – nu poate fi preluată de analizorul de masă și deci nu va apărea în spectrul de masă;
- **peptida ionizată la un capăt** – are o sarcină pozitivă, va apărea în spectrul de masă cu $m/z = M_w + 1A_H / 1 = M_w + 1 \text{ Da}$
- **peptida ionizată la ambele capete** – are două sarcini pozitive, va apărea în spectrul de masă cu $m/z = M_w + 2A_H / 2 \text{ Da}$.

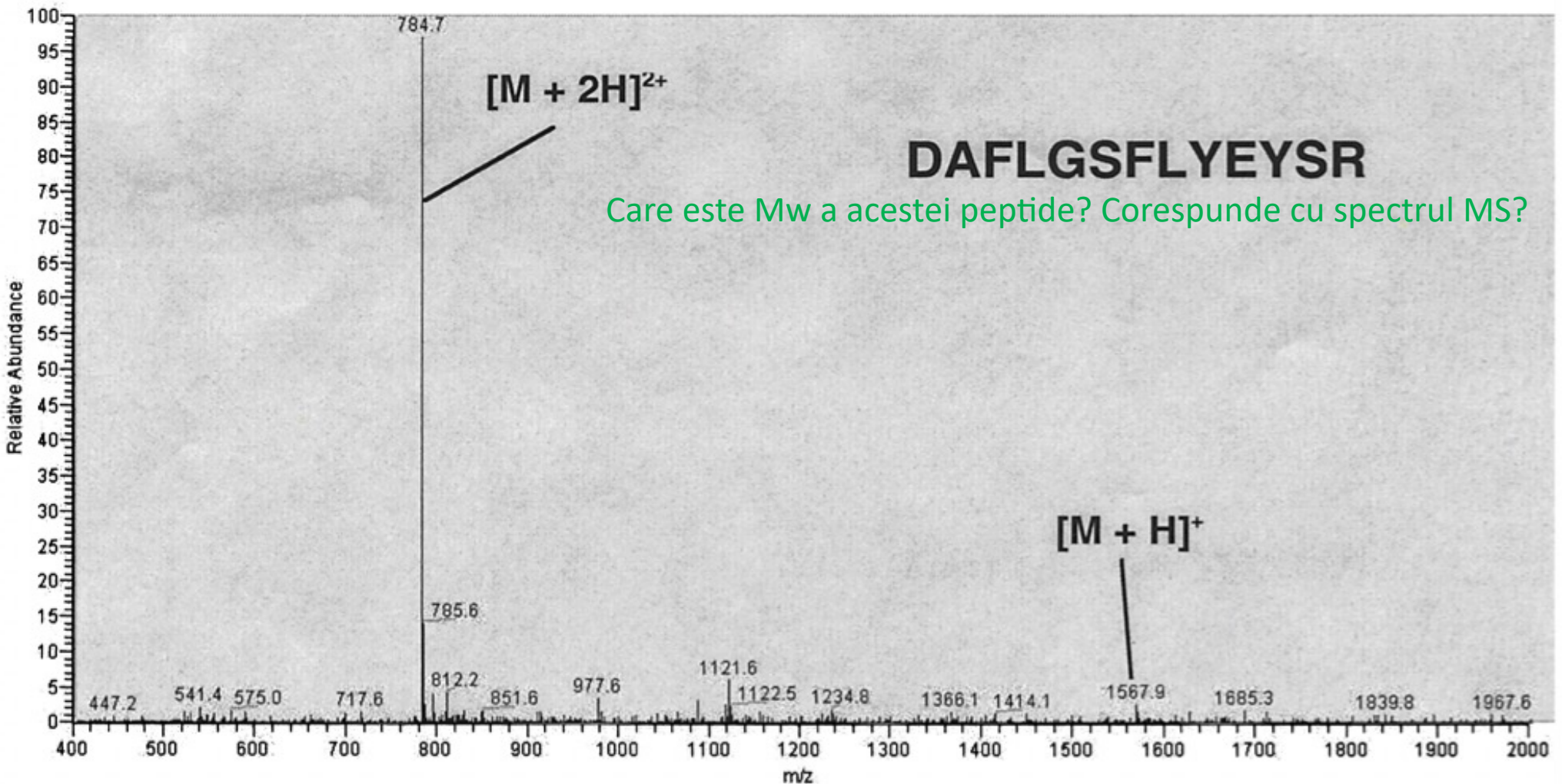
Și proteinele native pot fi ionizate prin ESI. Proteinele prin catenele laterale ale aminoacizilor expuși la exterior pot accepta 10-30 protoni. Similar cu o peptidă, și **o proteină va genera o populație de ioni cu m/z cuprins între $m+10/10 \dots m+30/30$.**

Distribuția populației de ioni proveniți din aceeași moleculă dar având cu m/z diferite poartă numele de anvelopă multi-sarcină. În cazul **peptidelor, anvelopa multi-sarcină conține 2 semnale** în cele mai multe cazuri, **3 semnale dacă în secvență există aminoacizi bazici**. Anvelopa multi-sarcină a proteinelor conține numeroase semnale și poate fi utilizată pentru identificarea masei moleculare a proteinei de interes printr-un proces automatizat de deconvoluție a semnalelor.

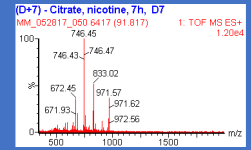
II. 1. Spectrometria de masă – principii generale



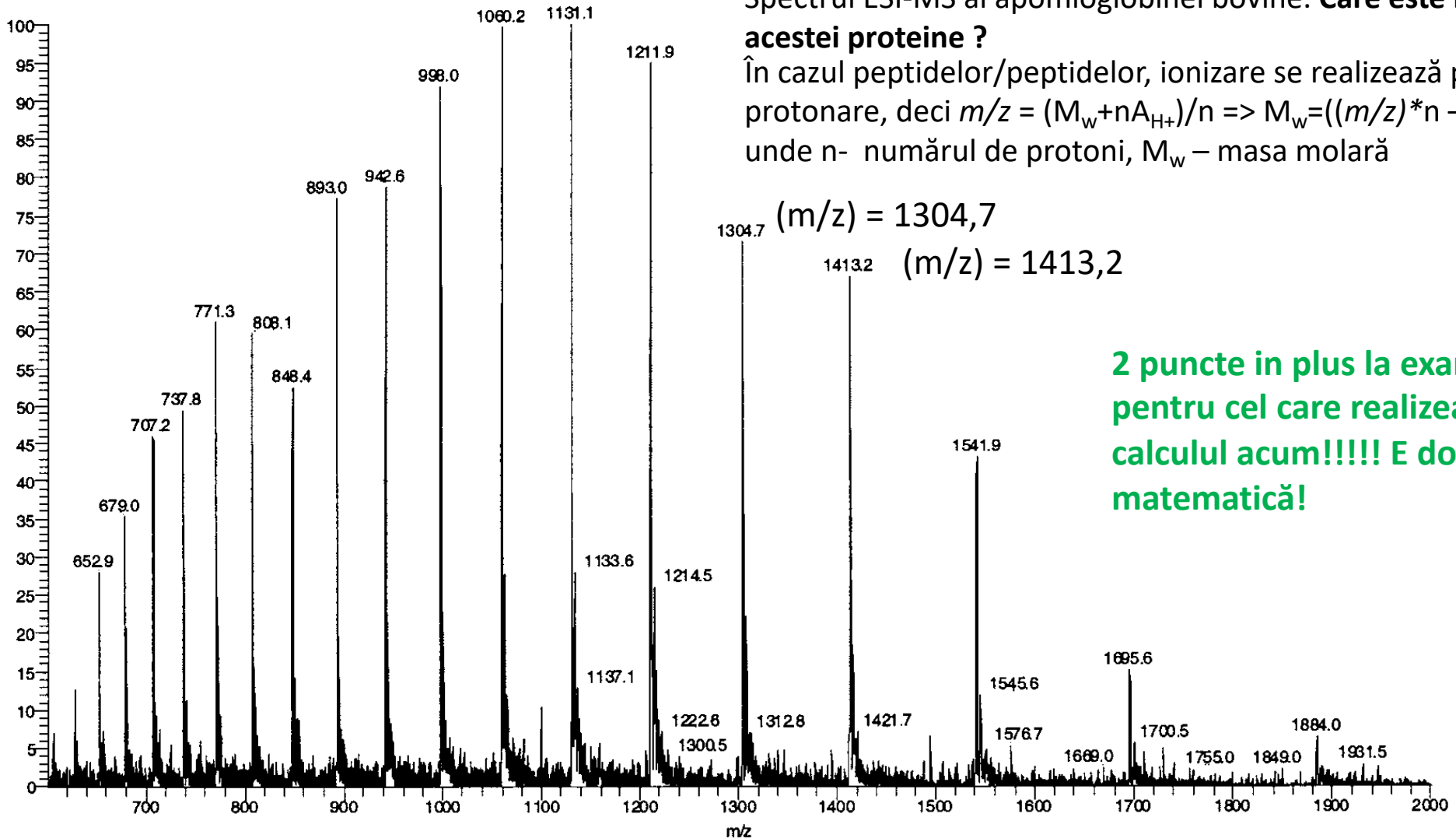
Spectrul ESI-MS al peptidei cu secvența indicată. Cele două semnale corespunzătoare celor două stări de ionizare sunt evidențiate



II. 1. Spectrometria de masă – principii generale



ib_200336_J_ab_95 #32-64 RT: 0.79-1.54 AV: 33 NL: 7.94E5
T: + p ESI ms [600.00-2000.04]

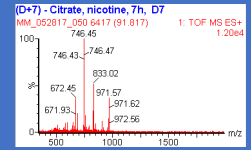


Spectrul ESI-MS al apomioglobinei bovine. **Care este Mw a acestei proteine ?**

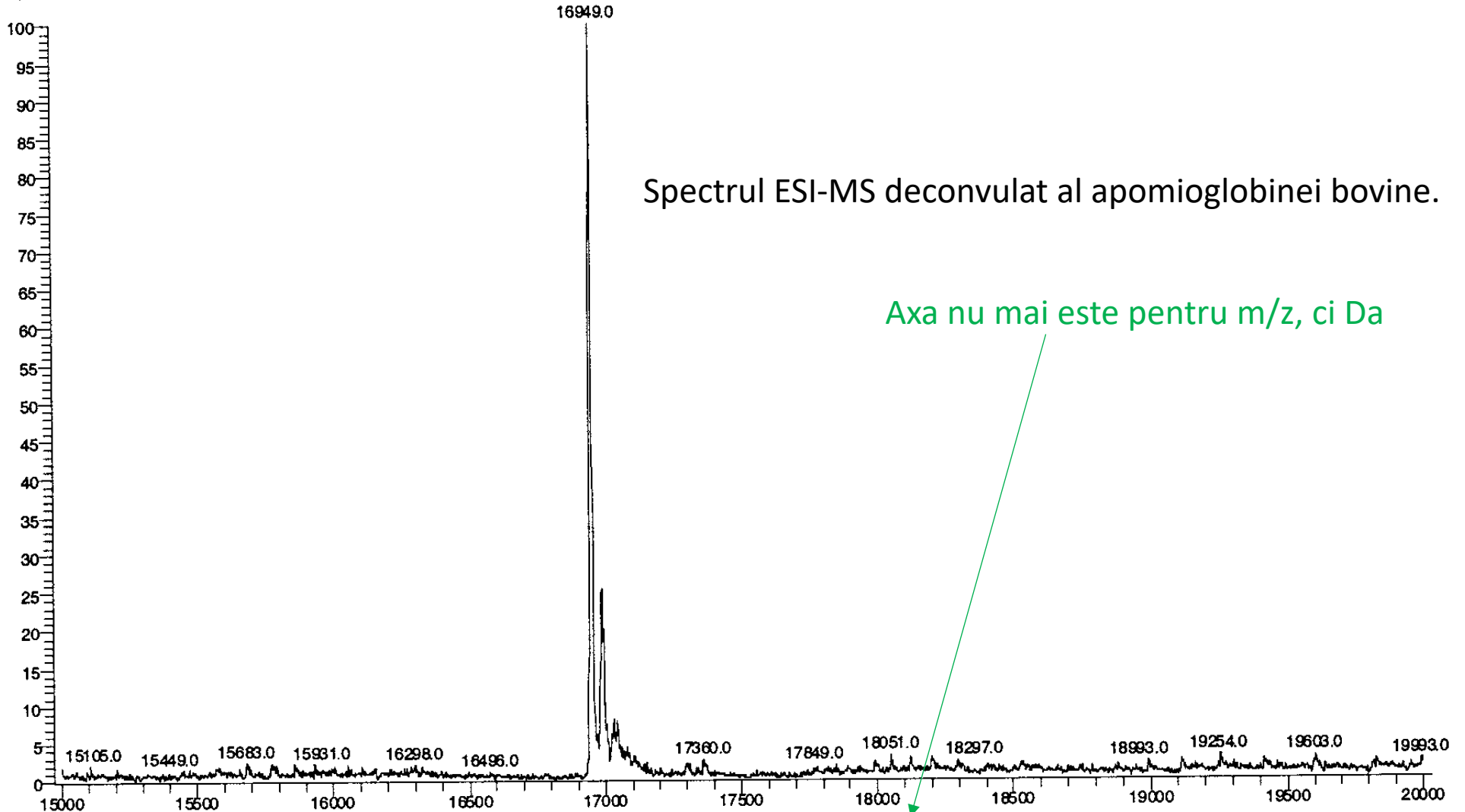
În cazul peptidelor/peptidelor, ionizare se realizează prin protonare, deci $m/z = (M_w + nA_{H^+})/n \Rightarrow M_w = ((m/z) * n - n)$, unde n- numărul de protoni, M_w – masa molară

2 puncte in plus la examen pentru cel care realizează calculul acum!!!! E doar matematică!

II. 1. Spectrometria de masă – principii generale



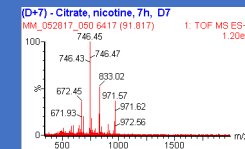
1 RT: 0.00 P: + NL: 1.17E7
T: + p ESI ms [600.00-2000.04]



Spectrul ESI-MS deconvulat al apomioglobinei bovine.

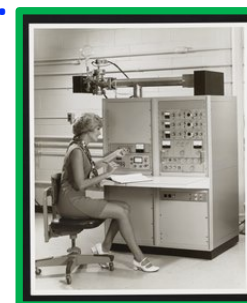
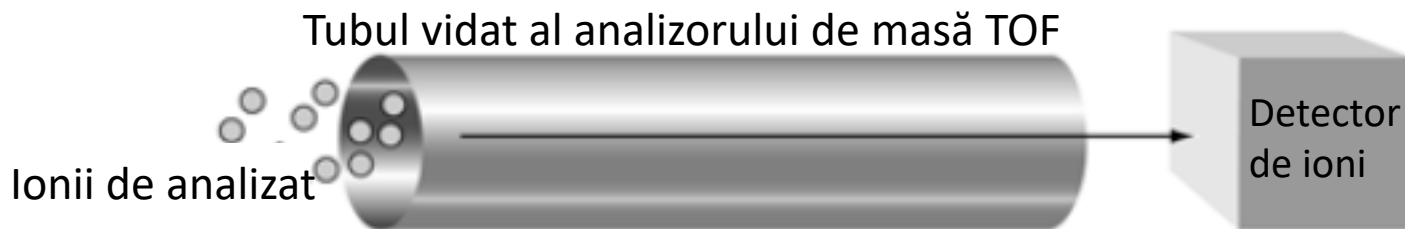
Axa nu mai este pentru m/z, ci Da

II. 1. Spectrometria de masă – principii generale



B. Analizoare de masă utilizate în proteomică

1. **Analizor de masă TOF** – time of flight – ionii generați de sursă sunt transferați într-un tub vidat și accelerați printr-un tub cu ajutorul unui câmp electric constant. Viteza de deplasare a ionilor este dependentă de sarcina acestora – cu cât sarcina este mai mare, cu atât au fost accelerați mai puternic și deci viteza de deplasare va fi mai mare. Pentru ionii cu sarcini egale, viteza de deplasare depinde doar de masa ionilor – ionii mai grei vor avea o viteză mai mică, iar cei mai ușori o viteză mai mare. **Analizorul de masă separă ionii pe baza timpului necesar ca aceștia să parcurgă în zbor o distanță prestabilită - lungimea tubului vidat al detectorului TOF.**

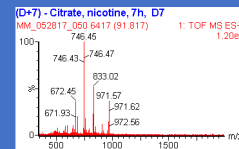


Bendix MA-2 Time-of-Flight Mass Spectrometer, 1960s



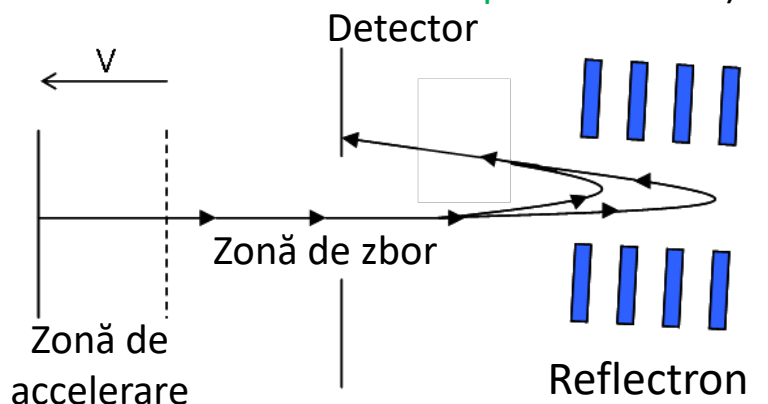
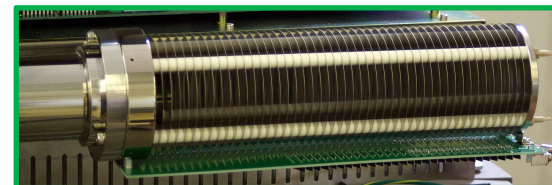
Despre un analizor de masă TOF funcționând după principiile de mai sus se spune că funcționează în **modul liniar**. Indiferent care ar fi sursa de ioni, toate detectoarele TOF funcționând în acest mod au o rezoluție scăzută datorită distribuției spațiale a ionilor cu același m/z (**distribuția în norul ce se formează printr-un puls laser în MALDI a ionilor de aceeași sarcină**). Deoarece ionii cu același m/z nu pleacă simultan din același loc în spațiu, distanța pe care o parcurg până la detector este diferită și deci timpul de zbor înregistrat de detector pentru ioni cu același m/z va varia și se va suprapune cu ioni ce au m/z foarte apropiat => **rezoluție scăzută**.

II. 1. Spectrometria de masă – principii generale



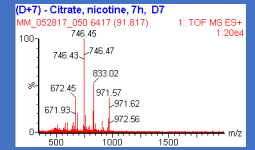
Rezoluția de separare a analizoarelor de masă TOF a fost însă îmbunătățită prin apariția a 2 inovații tehnice:

1. Introducerea unui **reflectron** – un dispozitiv ce generează un câmp electrostatic care acționează asemănător unei oglinzi ionice, reflectând fluxul de ioni înapoi în tubul de zbor, însă pe o traiectorie ușor diferită. Ionii ce au viteză mare vor pătrunde mai adânc în câmpul electrostatic al reflectronului, vor fi astfel frânați mai puternic și reflectați târziu. Ionii mai lenți nu vor avea energia cinetică necesară pentru a pătrunde adânc în câmpul reflectronului, și vor fi reflectați mai repede către detector. În această manieră, pe de o parte, distanța de zbor se dublează pentru aceeași lungime a tubului TOF, iar pe de altă parte ionii de același m/z sunt concentrați în interiorul reflectronului. Astfel, diferențele în timpul de zbor dintre ionii cu m/z foarte apropiate ce pleacă din puncte diferite în spațiu sunt mult amplificate, ei vor sosi la distanțe mai mari de timp pe detector și deci rezoluția instrumentului este semnificativ îmbunătățită. În prezent, analizarele de masă TOF au o rezoluție de 0.001 amu – **separă 2 ioni ce diferă unul de celălalt prin 0.001 Da**).

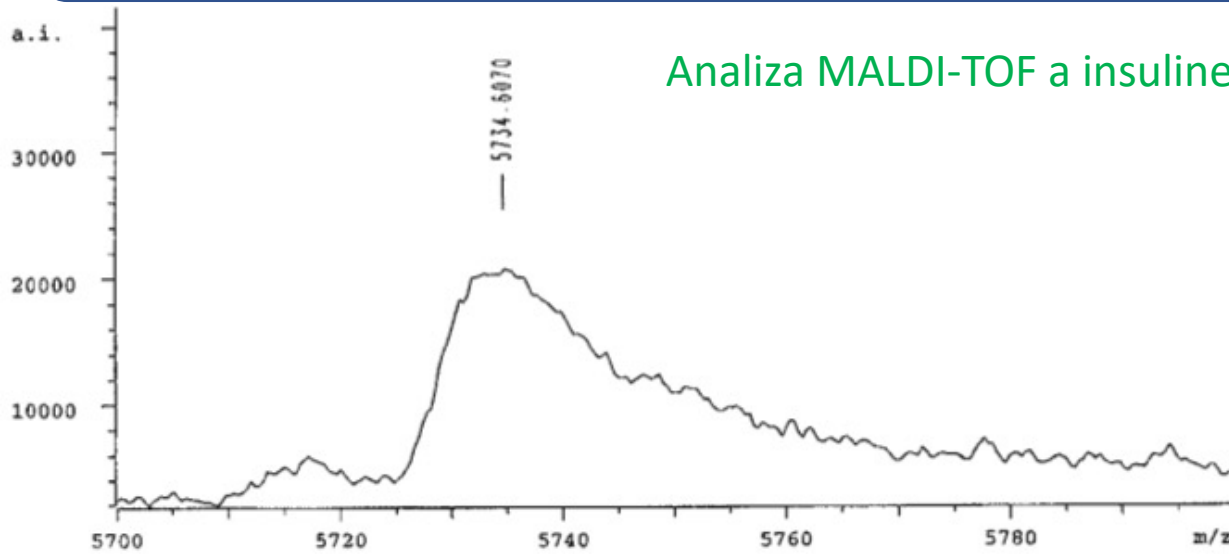


2. Modificare sursei de ioni MALDI prin introducerea unei întârzieri între pulsul laser ce generează explozia matrix-ului cu probă și introducerea propriu-zisă a ionilor în detectorul de masă – **delayed extraction MALDI**. Această întârziere permite o distribuție uniformă a ionilor la începutul tubului de zbor.

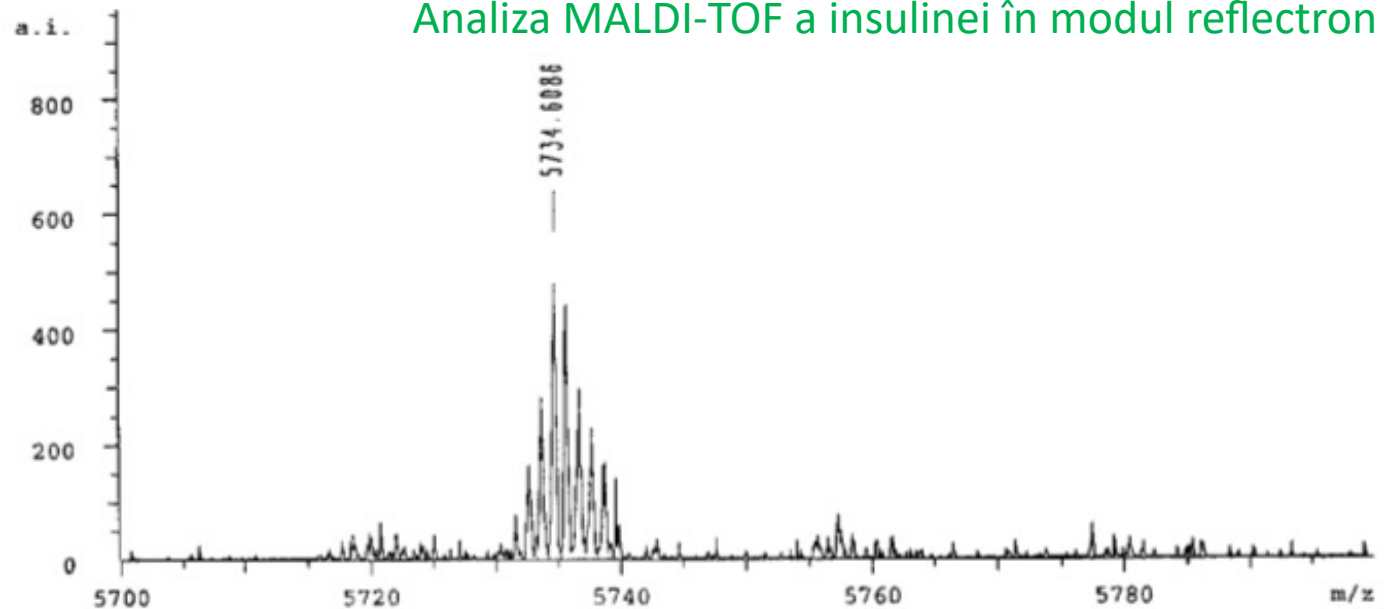
II. 1. Spectrometria de masă – principii generale



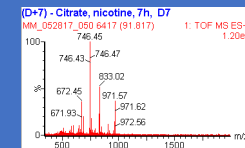
Analiza MALDI-TOF a insulinei în modul liniar



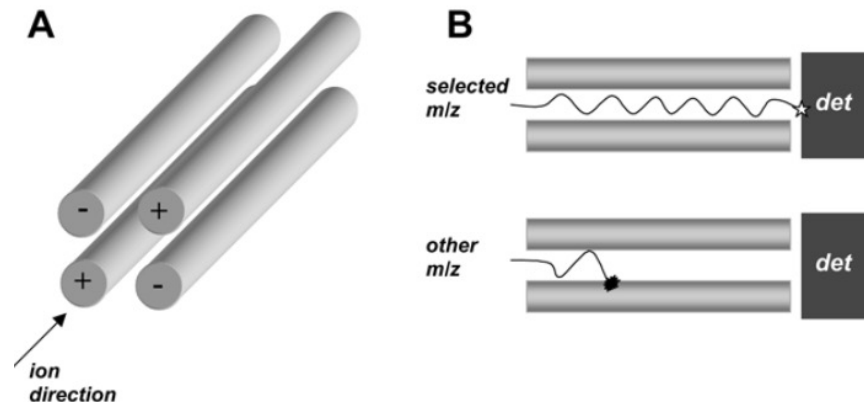
Analiza MALDI-TOF a insulinei în modul reflectron



II. 1. Spectrometria de masă – principii generale



2. **Analizor de masă cuadrupol** — conține 4 bare metalice dispuse în paralel ce alcătuiesc 4 electrozi pe care se aplică, controlat, în mod repetat, cu o anumită frecvență, curenți de voltaje variabile. În acest fel se generează un câmp magnetic ce forțează ionii să se deplaseze între cele 4 bare pe o traiectorie în spirală spre capătul opus celui în care au intrat în cuadrupol. Prin controlul foarte strict al voltajului aplicat și al frecvențelor cu care acesta se schimbă, doar ionii de un anumit m/z se vor deplasa



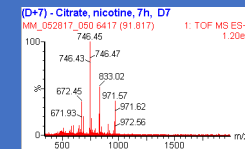
spre ieșirea din cuadrupol unde este amplasat detectorul. Prin modificarea controlată periodică a voltajului aplicat (**scanare**) și sincronizarea acestor modificări cu informațiile de la detector se poate identifica prezența de ioni cu valori m/z diferite.

În proteomică analizorul cuadrupol de sine stătător este mai puțin utilizat. Cel mai frecvent 3 asemenea analizoare sunt grupate și funcționează sincronizat (**in tandem**) pentru a forma un spectrometru de masă numit **triplu-quad**. Într-un triplu-quad, cele **3 detectoare au funcții diferite**:

- două dintre detectoarele cuadrupol notate **Q1** și **Q3** ce funcționează după principiile descrise mai sus, separând ionii funcție de m/z – **sunt realmente analizoare de masă**;
- un analizor cuadrupol notat **q2** ce funcționează ca o cameră în care ionii, indiferent de m/z , sunt reținuți pentru o perioadă de timp și pot fi eliberați simultan prin modificarea tensiunii aplicate. Frecvent, acest cuadrupol este numit **celulă de coliziune** deoarece aici ionii sunt bombardați cu un gaz neutru precum N_2 , He sau Ar. Impactul dintre moleculele gazului și cele ale ionilor duce la fragmentarea ionilor printr-un proces numit **disociere indusă prin coliziune – collision-induced dissociation, CID**.

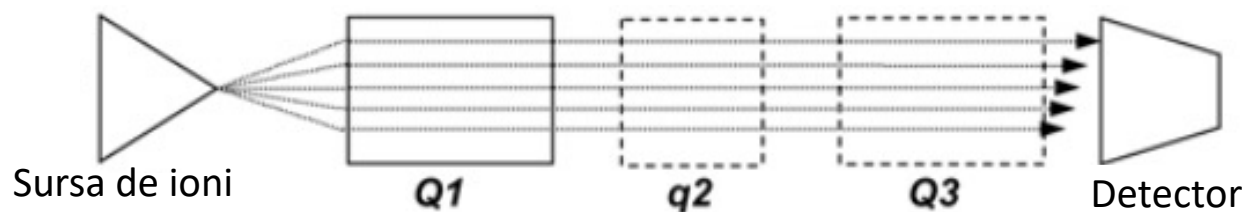
Într-un triplu-quad, cele 3 detectoare cuadrupol sunt dispuse unul după celălalt, ionii parcurgându-i în ordinea Q1, q2, Q3.

II. 1. Spectrometria de masă – principii generale

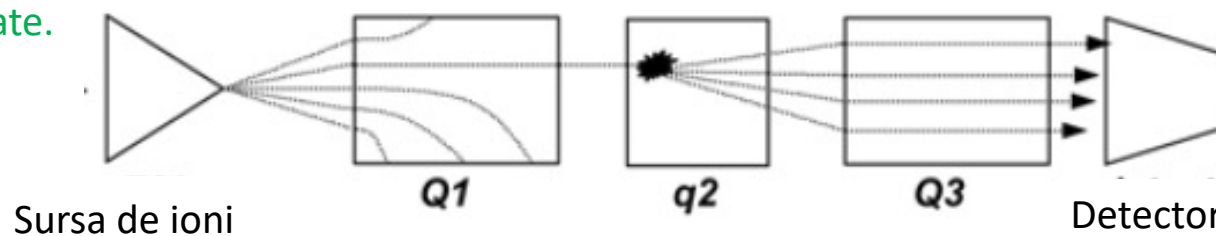


Un detector **triplu-quad** poate funcționa în **două moduri**:

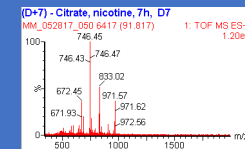
1. **Scanare completă (full-scan, MS^1)** – ionii ce provin de la sursă sunt separați în **Q1** ce **funcționează în acest caz ca un analizor de masă în adevăratul sens al cuvântului**. Ionii separați trec fără să interacționeze cu $q2$ și $Q3$ pentru a ajunge la detector. Acest mod este implementat în general timp de 1 s, timp în care spectrometrul de masă identifică toți ionii ce pătrund în $Q1$. **Aplicat în cazul peptidelor – toate peptidele ce sunt livrate spectrometrului de masă timp de 1s de către un sistem nanoHPLC prin intermediul unei interfețe ESI.**



2. **Mod în tandem** sau **MS-MS**, uneori notat și **MS/MS**, sau **MS^2** – toți cei 3 quadrupoli funcționează sincronizat. În acest caz **Q1** joacă rol de **filtru de masă**, permițând doar ionilor cu un anumit m/z să treacă în $q2$. **Ionii ce ajung în camera de coliziune poartă numele de ioni precursori și sunt fragmentați, iar fragmentele rezultate sunt analizate pe bază de m/z în $Q3$.** În acest mod $Q3$ joacă rolul de analizor de masă, însă un separatoră ionii din proba de analizat, ci fragmentele rezultate prin disocierea acestora. Valorile m/z ale fragmentelor generate împreună cu m/z ionului precursor sunt mai apoi utilizate pentru a stabili natura/structura acestuia. **Acesta este modul de funcționare ce permite fragmentarea și secvențiere a peptidelor. În proteomică, un triplu-quad este folosit alternativ, pentru a realiza o scanare completă și identificarea peptidelor din probă, și mai apoi în modul MS/MS pentru a determina secvența acestora din fragmentele generate.**



II. 1. Spectrometria de masă – principii generale

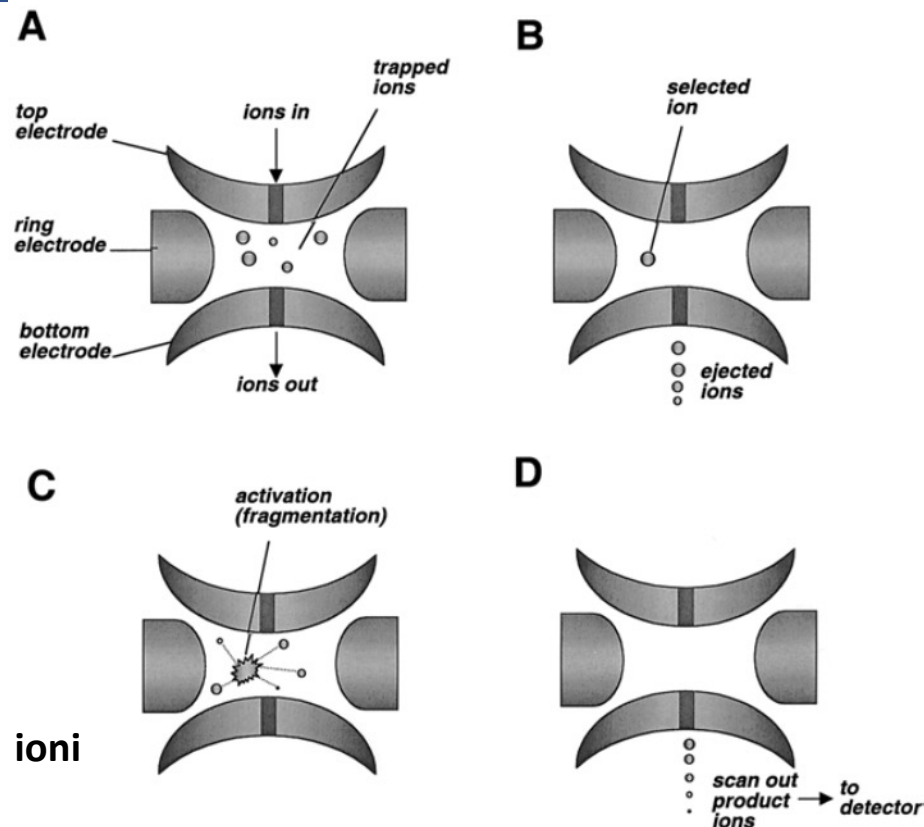


3. **Analizor de masă tip „capcană” pentru ioni** – acest tip de analizor de masă nu separă ionii pe măsură ce sunt livrați de către sursă așa cum o fac analizoarele TOF și quadrupol. Ioni se acumulează în interiorul unei camere delimitate de 3 electrozi:

- **un electrod superior** ce alcătuiește plafonul camerei, prevăzut cu un orificiu ce comunică cu sursa. Prin acest orificiu ionii sunt introduși în cameră;

- **un electrod inferior** ce alcătuiește podeaua camerei. Și acest prevăzut cu un orificiu, însă acesta comunică cu detectorul;

- **un electrod circular** ce corespunde pereților camerei. Prin aplicarea cu o controlată, cu o anumită frecvență a curenților de voltaje variate, în spațiul dintre electrozi se generează un câmp magnetic ce menține în permanență ionii în mișcare în interiorul său – „capcană” pentru ionii.

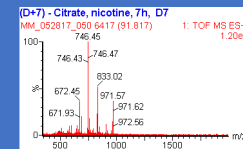


Similar cu un sistem triplu-quad, și un **detector tip capcană de ioni funcționează în mod alternativ, în două moduri:**

1. Scanare completă (full-scan, A din figură) – ionii sunt introduși în câmpul dintre electrozi. După ce toți ionii sunt în capcană, prin modificare controlată a frecvenței cu care sunt aplicații curenții generatori de câmp (**scanare**), ionii vor părăsi în mod ordonat incintă, funcție de m/z ;

2. Mod în tandem (A, B, C, D din figură) – un nou set de ioni sunt introduși în capcană (A). Prin modificarea câmpului magnetic, din capcană sunt eliminați ionii ce nu sunt de interes pentru analiză și se selectează un singur ion de analizat (B). Ionul precursor selectat este fragmentat prin CID (C), iar printr-o nouă modificare a câmpului magnetic fragmentele rezultate vor părăsi în mod ordonat incintă, funcție de m/z (D);

II. 1. Spectrometria de masă – principii generale

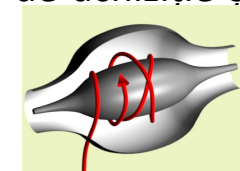


Față de un triplu-quad, analizorul de masă tip „capcană” pentru ioni are avantajul că ciclizarea între cele două moduri precum și fragmentarea se realizează în același spațiu fizic (în interiorul capcanei, ionii nu sunt transferați între Q1, q2 și Q3 ca în cazul triplu-quad-ului). Acest lucru permite ca unul dintre ionii rezultați din fragmentare ionului precursor să fie reținut și fragmentat încă o dată, adică realizarea unei analize MS/MS/MS sau **MS³**. În principiu această analiză în tandem ar putea fi repetată la infinit – analize **MSⁿ**, însă în realitate acest tip de abordare este rar utilizată în proteomică deoarece:

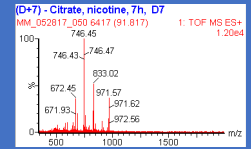
1. în cazul peptidelor în prezent nu se poate anticipa ce fragmente vor rezulta din fragmentarea MS/MS, și, în consecință, nu se poate selecta înainte de analiza propriu-zisă ce fragment va fi păstrat în capcană pentru o nouă fragmentare și o nouă analiză MS;
2. numărul total de ioni disponibili pentru analiză descrește odată cu creșterea ciclurilor MS. După un MS/MS al unei peptide, în general cantitatea de ioni produsă nu este suficientă pentru ca o nouă fragmentare să genereze ioni decelabili de către detector.

Analizoarele de masă prezentate pot fi combinate sau modificate pentru a obține analizoare în tandem precum:

- **Analizorul de masă Q-TOF** - identic din punct de vedere funcțional cu un triplu-quad, dar Q3 este înlocuit de un analizor TOF. Scanarea completă (MS¹) este deci realizată de Q1, fragmentarea se realizează în q2 dar analiza fragmentelor rezultate se realizează în TOF care are avantajul de a avea o rezoluție semnificativ mai bună decât un analizor cuadrupol;
- **Analizorul de masă FT-ICR** - **Fourier transform ion cyclotron resonance MS** – similar ca principii cu o capcană pentru ioni, doar că ionii nu sunt evacuați către un detector, ci prezența lor este identificată pe baza modificărilor produse de aceștia într-un câmpul magnetic de intensitate mare; prezintă o rezoluție foarte bună dar și costuri de achiziție și operare foarte mari;
- **Analizorul Orbitrap** – poate fi considerat ca un tip aparte de FT-ICR cu costuri considerabil mai reduse

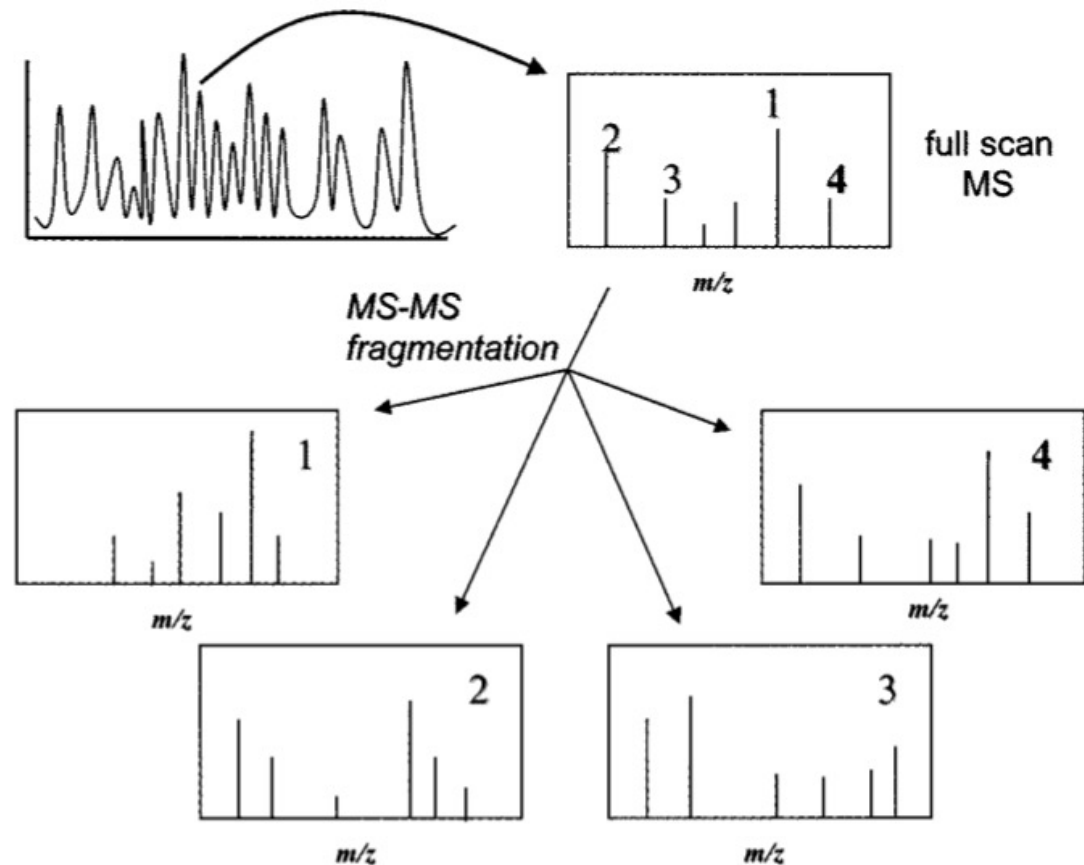


II. 1. Spectrometria de masă – principii generale

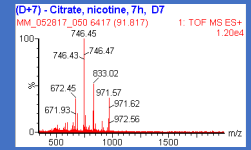


Indiferent de tipul lor, analizoarele de masă capabile să realizeze analize **MS în tandem** pot fi deosebit de utile pentru analiza în masă a unui foarte mare de peptide deoarece pot fi programate pentru realiza în mod automat trecerea de la un mod de măsurare la altul astfel:

- A.** Instrumentul funcționează în modul scanare completă și identifică ce peptide există în proba furnizată de sursă;
- B.** Peptidele cele mai abundente sunt selectate pe rând și fragmentate prin CID; spectrele MS/MS sunt înregistrate pentru fiecare peptidă în parte
- C.** Instrumentul revine la modul scanare completă și ciclul se reia.



II. 1. Spectrometria de masă – principii generale



C. Detectoare de ioni utilizate în proteomică

În proteomică, pentru detectarea ionilor în analiza de masă, sunt utilizate diverse tipuri de detectoare, fiecare cu avantajele și limitările sale. Unele dintre cele mai comune detectoare de ioni utilizate în proteomică includ:

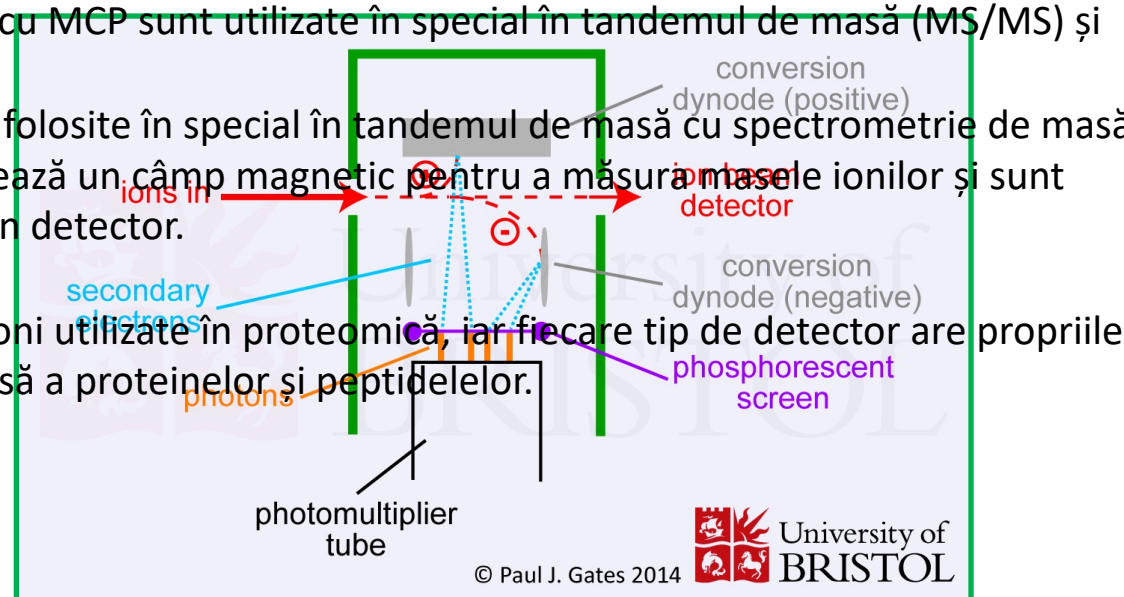
- Detectoare cu multiplicare de electroni (EMD) - Acestea sunt detectoare sensibile și versatile utilizate într-o gamă largă de instrumente de analiză de masă. EMD-urile funcționează prin convertirea ionilor în electroni, care sunt apoi multiplicați într-un tub al detectorului, generând un semnal măsurabil proporțional cu numărul de ionizări inițiale.

- Detectoare cu fotodiodă - Acestea sunt folosite în special în spectrometria de masă cu spectru de masă cu analiză de timp (TOF-MS). Detectoarele cu fotodiodă detectează impulsurile de lumină generate de ionii care intră în detector și generează semnale electrice proporționale cu intensitatea luminii.

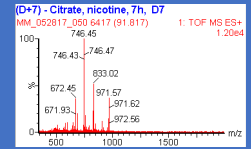
- Detectoare cu microcanal (MCP) - Acestea sunt detectoare sensibile care utilizează un set de canale microscopice pentru a amplifica semnalele de la ioni. Detectoarele cu MCP sunt utilizate în special în tandemul de masă (MS/MS) și oferă o sensibilitate ridicată și o rezoluție bună.

- Detectoare cu inducție de canal (CID) - Acestea sunt folosite în special în tandemul de masă cu spectrometrie de masă cu inducție de canal (CID-MS). Detectoarele CID utilizează un câmp magnetic pentru a măsura masele ionilor și sunt sensibile la modificările generate de ionii care trec prin detector.

Acestea sunt doar câteva exemple de detectoare de ioni utilizate în proteomică, iar fiecare tip de detector are propriile sale caracteristici și aplicații specifice în analiza de masă a proteinelor și peptidelor.



II. 1. Spectrometria de masă – principii generale



Detectorul cu fotodiodă

Detectorii folosiți în spectrometria de masă au rolul de a identifica prezența, la un moment de timp bine precizat, a unui ion. Majoritatea lor au ca principiu de funcționare detectorul numit **cupa lui Faraday**. Aceasta este reprezentată dintr-un electrod cilindric confecționat din materiale ce emit electroni la contact cu ionii, precum GaP sau BeO. Electronii emiși vor genera un curent ce poate fi amplificat și înregistrat.

În prezent, principalul detector folosit la spectrometrele de masă cu aplicații în proteomică **este fotomultiplicatorul** ca funcționează după următoarele principii:

- Ionii din analizorul de masă lovesc o suprafață acoperită cu GaP sau BeO ceea ce duce la emisia unor electroni;
- Electronii sunt captați de un ecran fosforescent ce emite un foton pentru fiecare electron;
- Fotonii sunt apoi captați de un fotomultiplicator ce crește intensitatea semnalului luminos și îl convertește în curent electric ce poate fi apoi înregistrat.

