

Лекция 6
МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ

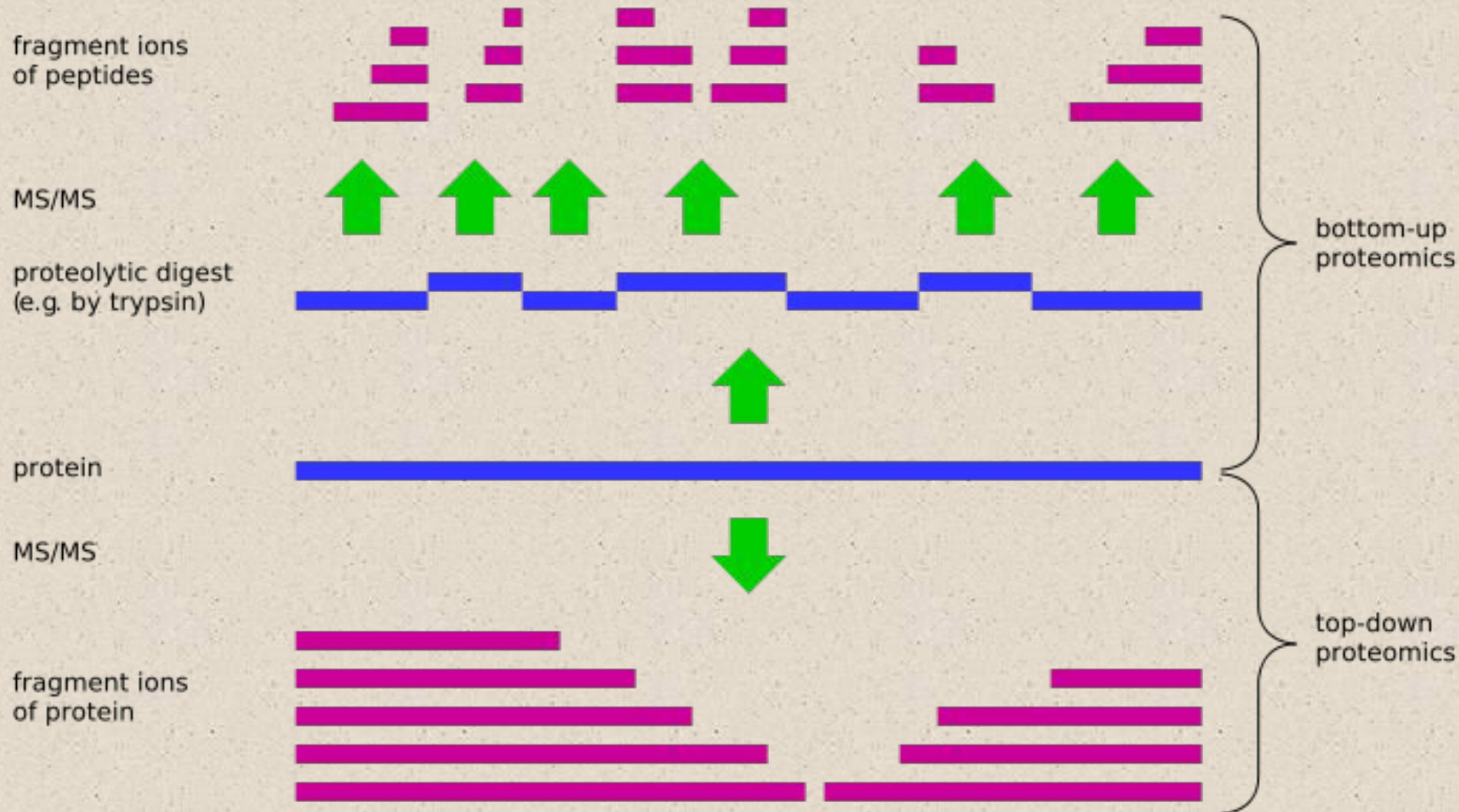
В ПРОТЕОМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Часть 1: Масс-спектрометрия

Основные протеомные подходы

Протеомика «сверху-вниз» или «top-down»,

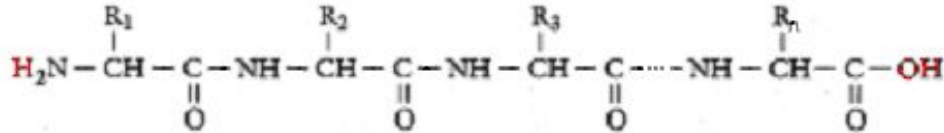
протеомика «снизу-вверх» или «bottom-up», «shot-gun» протеомика



Белки и пептиды

ADLKQLMDNEVLMAFTSYATIILAKMMFLSSATAFQRLTNKVFANPEDCAGFGKGENAKKFLRT
 DEKVERVRRRAHLNDLENIVPFLGIGLLYSLSGPDSTALIHFRIFVGARIYHTIAYLTPLPQPNRGL
 AFFVGYGVTLSMAYRLLRSRLYL

(Глутатион-трансфераза человека)



пептидная
связь

аминокислотный
остаток

$$[Mn]^+ = \sum \text{a.o.} + 18 (\text{H}, \text{OH}) + 1 (\text{H}^+)$$

МОНОИЗОТОПН.

C12	12.00000	98.9%
C13	13.00335	1.1%
H	1.00783	100%
O16	15.99491	99.8%
O18	17.99916	0.2%
N14	14.00307	99.6%
N15	15.00011	0.4%
S32	31.97207	95%
S33	32.97146	0.8%
S34	33.96786	4.2%
Na	22.98980	100%
K39	38.96371	93.3%
K41	40.96183	6.7%

Моноизотопные массы аминокислотных остатков

Alanine	Ala	A	C3H5N1O1	71.0788
Cysteine (SH)	Cys	C	C3H5N1O1S1	103.1448
Asp. acid	Asp	D	C4H5N1O3	115.0886
Glu. acid	Glu	E	C5H7N1O3	129.1155
Phenylala.	Phe	F	C9H9N1O1	147.1766
Glycine	Gly	G	C2H3N1O1	57.0519
Histidine	His	H	C6H7N3O1	137.1411
Isoleu.	Ile	I	C6H11N1O1	113.1594
Lysine	Lys	K	C6H12N2O1	128.1741
Leucine	Leu	L	C6H11N1O1	113.1594
Methionine	Met	M	C5H9N1O1S1	131.1986
Asparagine	Asn	N	C4H6N2O2	114.1038
Proline	Pro	P	C5H7N1O1	97.1167
Glutamine	Gln	Q	C5H8N2O2	128.1307
Arginine	Arg	R	C6H12N4O1	156.1875
Serine	Ser	S	C3H5N1O2	87.0782
Threonine	Thr	T	C4H7N1O2	101.1051
Valine	Val	V	C5H9N1O1	99.1326
Tryptopha.	Trp	W	C11H10N2O1	186.2132
Tyrosine	Tyr	Y	C9H9N1O2	163.1760

Пептидный фингерпринт

**SAPASTTQPIGSTTTSTTTKTAGATPATASGLFTIPDGDFFFSTARAIVASNAVATNEDLSKIEAIWKD
MKVPTDTMAQAAWDLVRHCADVGSSAQTEMIDTGPYSNGISRARLAAAIKEVCTLRQFCMKYA
PVVWNWMLTNNSP PANWQAQGFKPEHKFAAFDFFNGVTNPAAIMPK EGLIRPPSEAEMNAAQT
AAFVKITKARAQSNDFASLDAAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP**

(Белок оболочки X-вируса картофеля)

Num	From-To	MH+	HPLC	pI	Sequence
1	1- 19	1836.92	14,27	9,85	SAPASTTQPIGSTTTSTTTK
1	1- 19	1878.93	14,27	9,85	SAPASTTQPIGSTTTSTTTK
2	20- 44	2472.20	24,79	3,92	TAGATPA. .PDGDFFFSTAR
3	45- 60	1602.83	12,87	4,11	AIVASNAVATNEDLSK
4	61- 66	759.44	19,33	6,99	IEAIWK
5	67- 69	393.18	4,27	6,99	DMK
6	70- 84	1673.83	19,51	3,92	VPTDTMAQAAWDLVR
7	85-109	2595.13	22,48	4,34	HCADVGSS. .GPYSNGISR
8	110-111	246.16	1,78	11,20	AR
9	112-117	586.39	12,82	10,10	LAAAIK
10	118-123	719.36	14,84	6,29	EVCTLR
11	124-128	655.28	17,08	8,68	QFCMK
12	129-157	3410.65	28,07	9,42	YAPVVWNWM. .QGFKPEHK
13	158-176	2058.02	24,21	6,97	FAAFDFFNGVTNPAAIMPK
14	177-198	2330.18	20,92	4,60	EGLIRPPS. .AAQTAAAFVK
15	199-201	361.25	6,80	10,15	ITK
16	202-203	246.16	1,78	11,20	AR
17	204-218	1565.76	14,77	3,92	AQSNDFASLDAAVTR
18	219-220	232.14	2,11	11,15	GR
19	221-236	1567.86	17,90	3,15	ITGTTTAEAVVTLPPP

← Трипсин (/R,K)
Стафилококковая протеаза V8 (/E)
↓

Num	From-To	MH+	HPLC	pI	Sequence
1	1- 56	5430.68	29,08	4,35	SAPASTTQPI...IVASNAVATNE
1	1- 56	5472.69	29,08	4,35	SAPASTTQPI...IVASNAVATNE
2	57- 62	704.38	12,90	4,11	DLSKIE
3	63- 96	3730.75	28,42	4,58	AIWKDMKVPT. .ADV GSSAQTE
4	97-118	2334.22	22,73	9,58	MIDTGPYSNGISRARLAAAIKE
5	119-155	4353.07	35,01	9,02	VCTLRQFCMKY...NWQAQGFKPE
6	156-177	2452.21	24,30	7,58	HKFAAFDFFNGVTNPAAIMPK E
7	178-185	868.49	16,16	7,04	GLIRPPSE
8	186-187	219.10	1,83	3,25	AE
9	188-228	4255.19	24,38	10,52	MNAAQTAAAFV...RGRITGTTTAE
10	229-236	793.48	14,07	6,96	AVVTLPPP

История масс-спектрометрии

1912 год — Томсон создает первый масс-спектрограф и получает масс-спектры молекул кислорода, азота, угарного газа, углекислого газа и фосгена.

1948 год — Камероном и Эггером создан первый масс-спектрометр с время-пролётным масс-анализатором.

1953 год — Пауль патентует квадрупольный масс-анализатор и ионную ловушку.

1956 год — МакЛаферти и Голке создают первый газовый хромато-масс-спектрометр.

1966 год — Мансон и Филд создают ионный источник с химической ионизацией.

1972 год — Каратаев и Мамырин изобретают время-пролётный масс-анализатор с фокусировкой, значительно улучшающий разрешение анализатора.

1974 год — Первый жидкостный хромато-масс-спектрометр создан Арпино, Болдуином и МакЛаферти

1981 год — Барбер, Бордоли, Седжвик и Тайлор создают ионизатор с бомбардировкой быстрыми атомами (FAB).

1982 год — Первый масс-спектр целого белка (инсулин) с помощью бомбардировки быстрыми атомами (FAB).

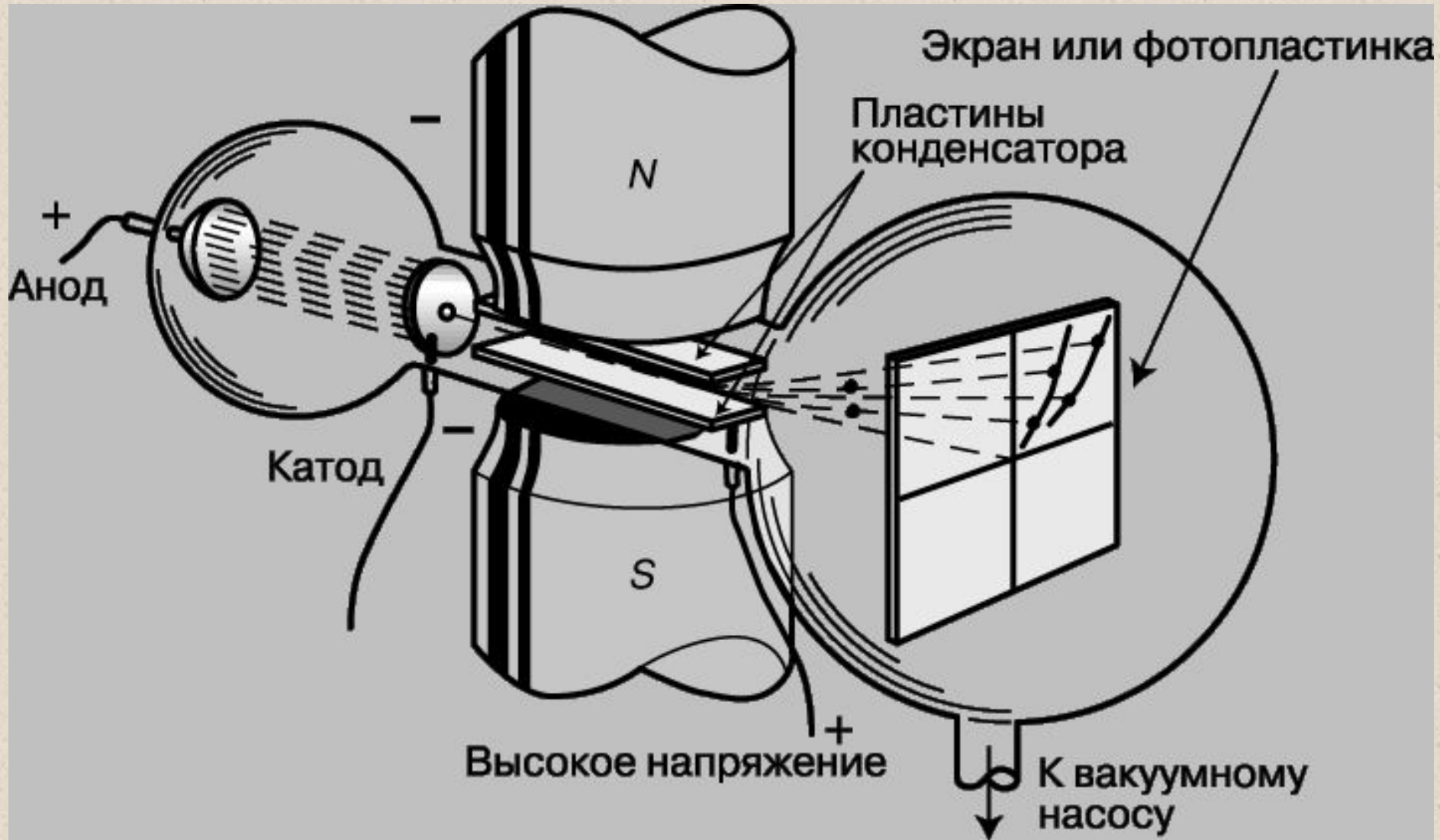
1983 год — Бланки и Бестал изобретают термоспрей.

1984 год — Галль, а затем Фенн публикуют работы по методу электроспрей.

1987 год — Карас, Бахман, Бар и Хилленкамп изобретают ионизацию лазерной десорбцией при содействии матрицы (MALDI).

1999 год — Александр Макаров изобретает электростатическую ионную ловушку.

Масс-спектрометр Томсона



ICP масс-спектрометр (ICP-MS) Серия 7700х



Электроспрей-TOF (ESI-TOF) масс-спектрометр Серия 6500



Квадрупольный масс-спектрометр (QMS) 10 000 u/sec | серия 6100



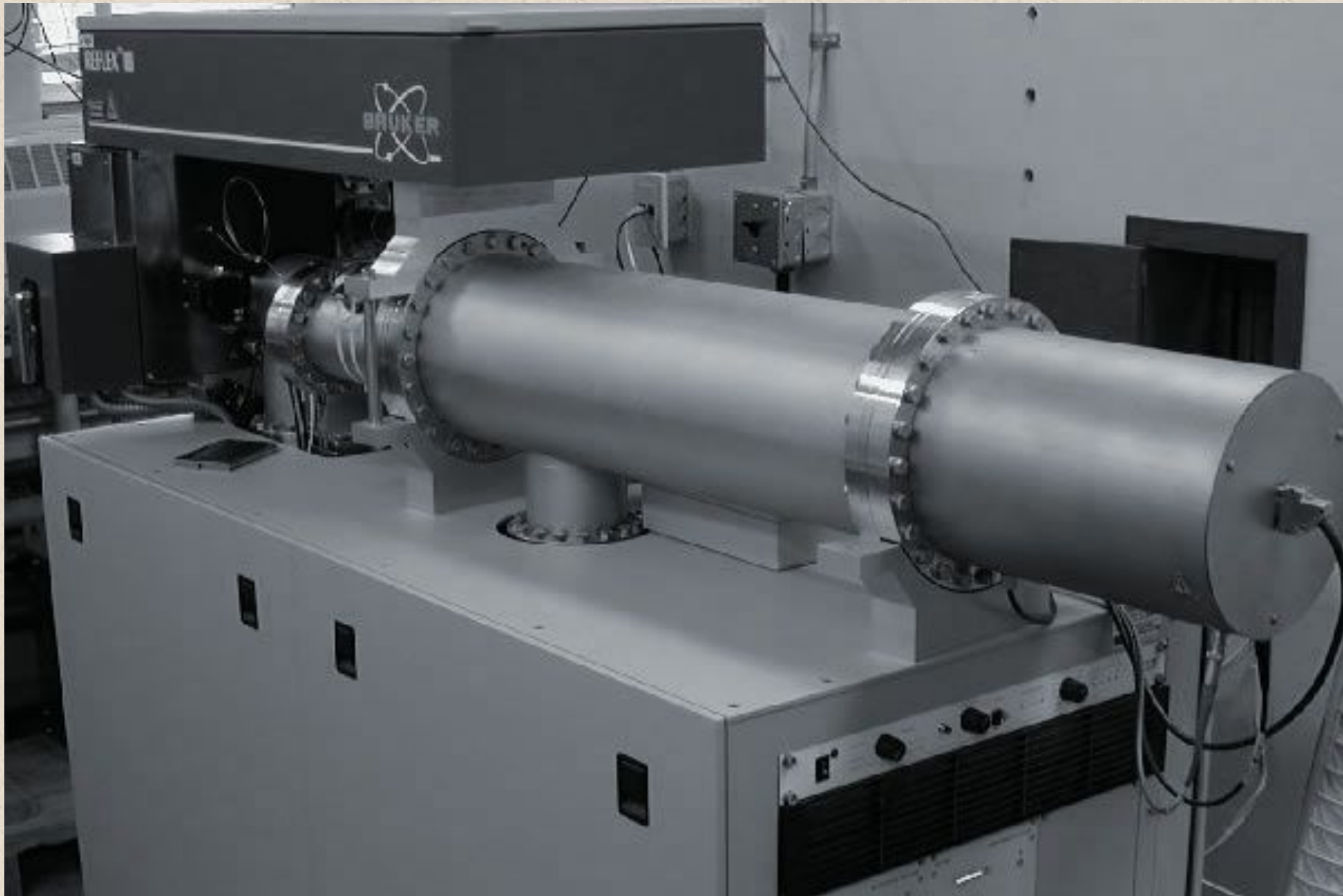
Тройной квадруполь (QMS) Серия 7000



Ионная ловушка (ITMS) Серия 6300



MALDI-TOF: Bruker Reflex III



Прибор для капиллярного электрофореза с масс-спектрометрическим детектором (CE/MS)



МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ

Общий вопрос - что измеряется?

m/z

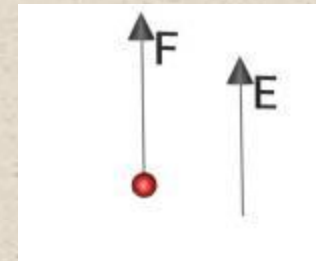


Масс- спектрометрия –
расчет молекулярной массы ионов
по их поведению в электрических и/или магнитных полях

Примеры:

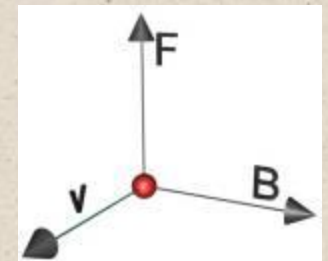
Сила, действующая на ион массы m и заряда z
в однородном электрическом поле:

$$F_q = zeE \quad a = (z/m)eE$$



Сила, действующая на ион массы m , заряда z , скорости v
в однородном магнитном поле:

$$F_L = ze[v \times B] \quad a = (z/m)e[v \times B]$$

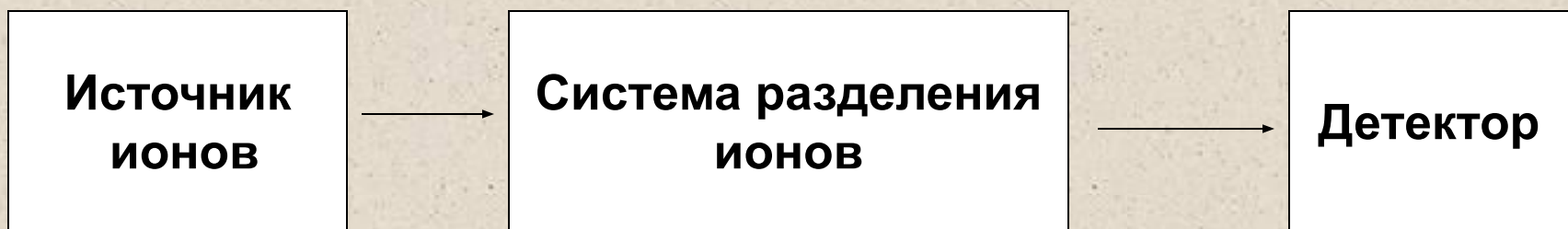


Типы ионов

Положительные: - захват протона либо другого катиона (Na, K);
- потеря электрона (катион-радикал).

Отрицательные: - утрата протона;
- захват электрона.

Общая схема масс-спектрометра

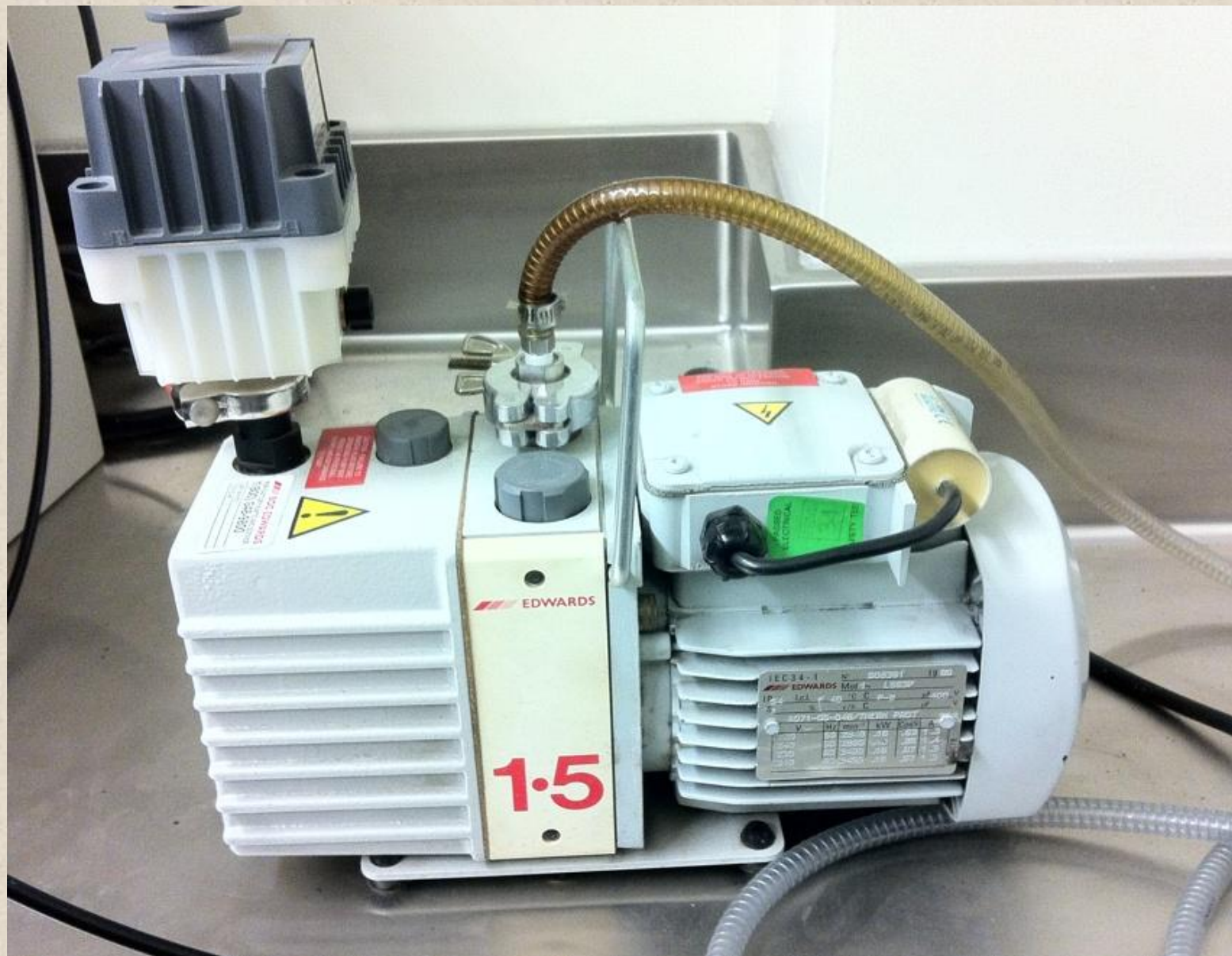


MALDI
ESI

Времяпролетные (TOF)
Квадрупольные (Q)
Ионные ловушки (IT)
Ионно-циклотронного резонанса (ICR-FT)

Микроканальные пластины (MCP)
Диноды
Магнит (ICR-FT)

! Масс-спектрометр – вакуумный прибор



Способы ионизации

□ Газовая фаза

- электронная ионизация (EI)
- химическая ионизация (CI)
- электронный захват (EC)
- ионизация в электрическом поле (FI)

□ Жидкая фаза

- термоспрей
- ионизация при атмосферном давлении (AP)
- электроспрей (APESI)
- химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI)
- фотоионизация при атмосферном давлении (APPI)

□ Твёрдая фаза

- прямая лазерная десорбция - масс-спектрометрия (LDMS)
- матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (MALDI)
- масс-спектрометрия вторичных ионов (SIMS)
- бомбардировка быстрыми атомами (FAB)
- десорбция в электрическом поле (FD)
- плазменная десорбция (PD)

Источники ионизации

ESI

MALDI



APCI



Масс-анализаторы

▮ *Непрерывные масс-анализаторы*

- ▮ Магнитный и электростатический секторный масс-анализатор (англ. Sector instrument)
- ▮ Квадрупольный масс-анализатор (англ. Quadrupole mass analyzer)

▮ *Импульсные масс-анализаторы*

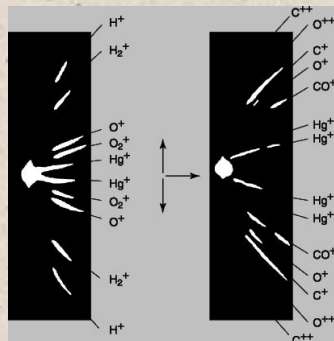
- ▮ Времяпролётный масс-анализатор (англ. Time-of-flight mass spectrometry)
- ▮ Ионная ловушка (англ. Ion trap)
- ▮ Квадрупольная линейная ловушка (англ. Quadrupole ion trap)
- ▮ Масс-анализатор ионно-циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием (англ. Fourier transform ion cyclotron resonance)
- ▮ Орбитрэп (англ. Orbitrap)

▮ *Тандемные масс-анализаторы*

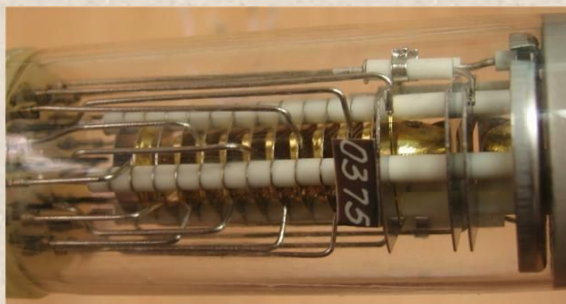
- ▮ Квадруполь-квадрупольный (3Q)
- ▮ Квадруполь-времяпролётный (Q-TOF)
- ▮ другие

Детекторы

□ *фотопластина*



□ *диодные вторично-электронные умножители*

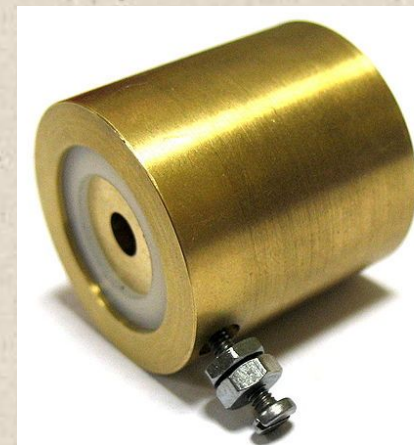


□ *фотоумножители*



□ *микроканальные пластины*

□ *коллекторы Фарадея*



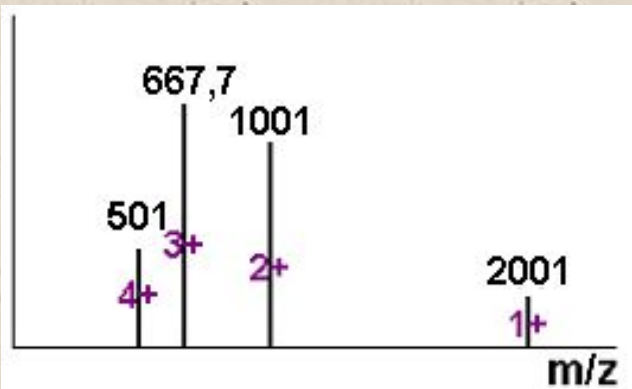
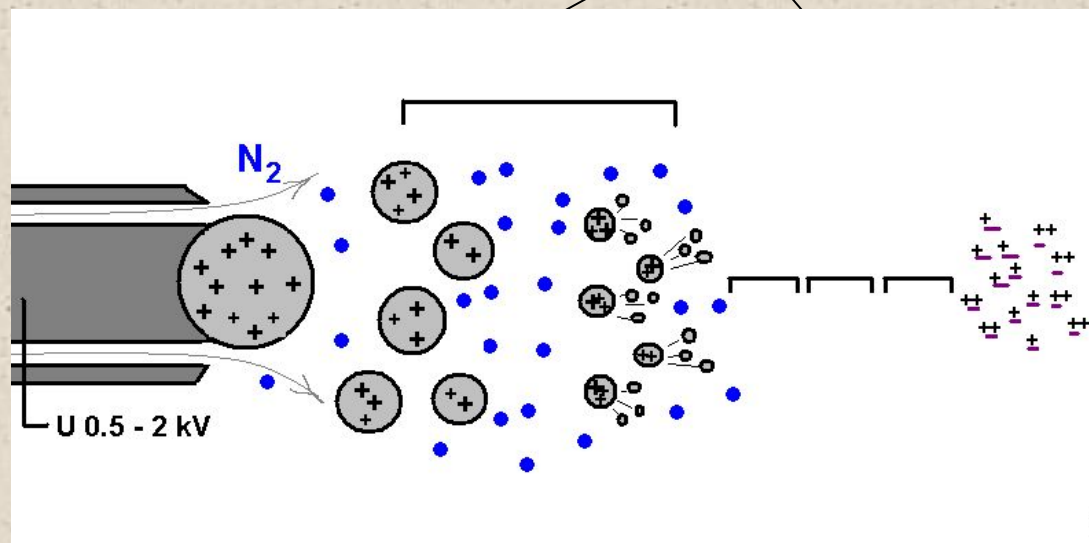
ИСТОЧНИКИ ИОНОВ

ESI – электрораспыление и ионизация

Анализируемое вещество подается в растворе через капилляр с поданным на него напряжением.

Растворители:
вода, ацетонитрил, метанол

несколько последовательных
«упариваний-взрывов» микрокапель

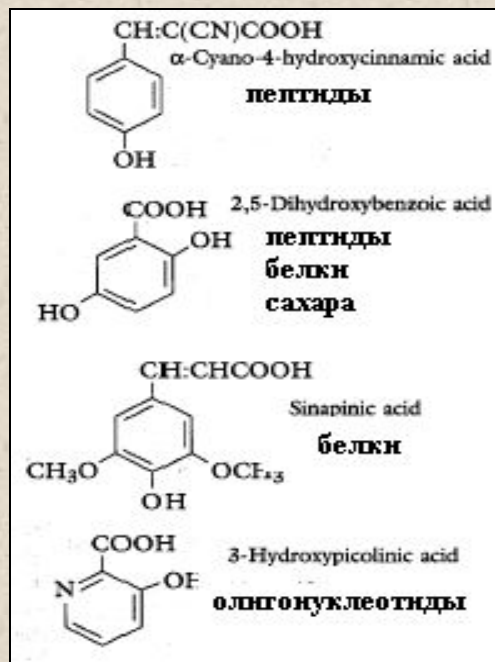


В результате получают многозарядные газофазные ионы, захватившие на себя разное количество протонов, вплоть до максимально возможного.

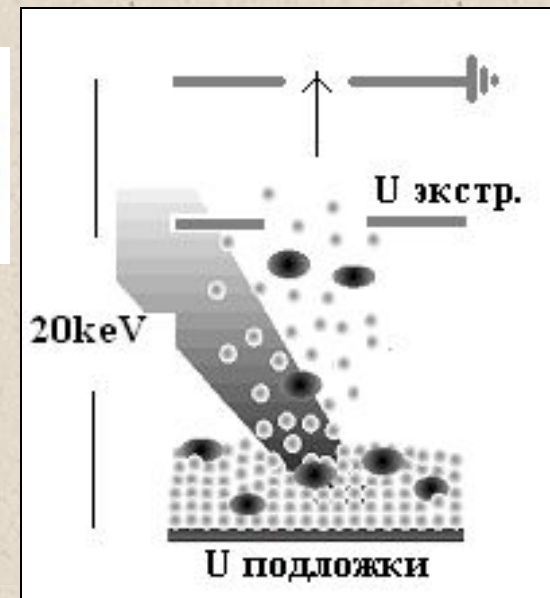
MALDI - matrix assisted laser desorption / ionization

лазерная десорбция и ионизация в присутствии
вспомогательного вещества - матрицы

Матрицы для УФ лазера (336нм)



Анализируемое вещество
(раствор 10^{-4} - 10^{-8} М, <1 мкл)
смешивается с матрицей
(раствор 10^{-1} - 10^{-2} М, <1 мкл),
высушивается на подложке,
образуя кристаллоиды

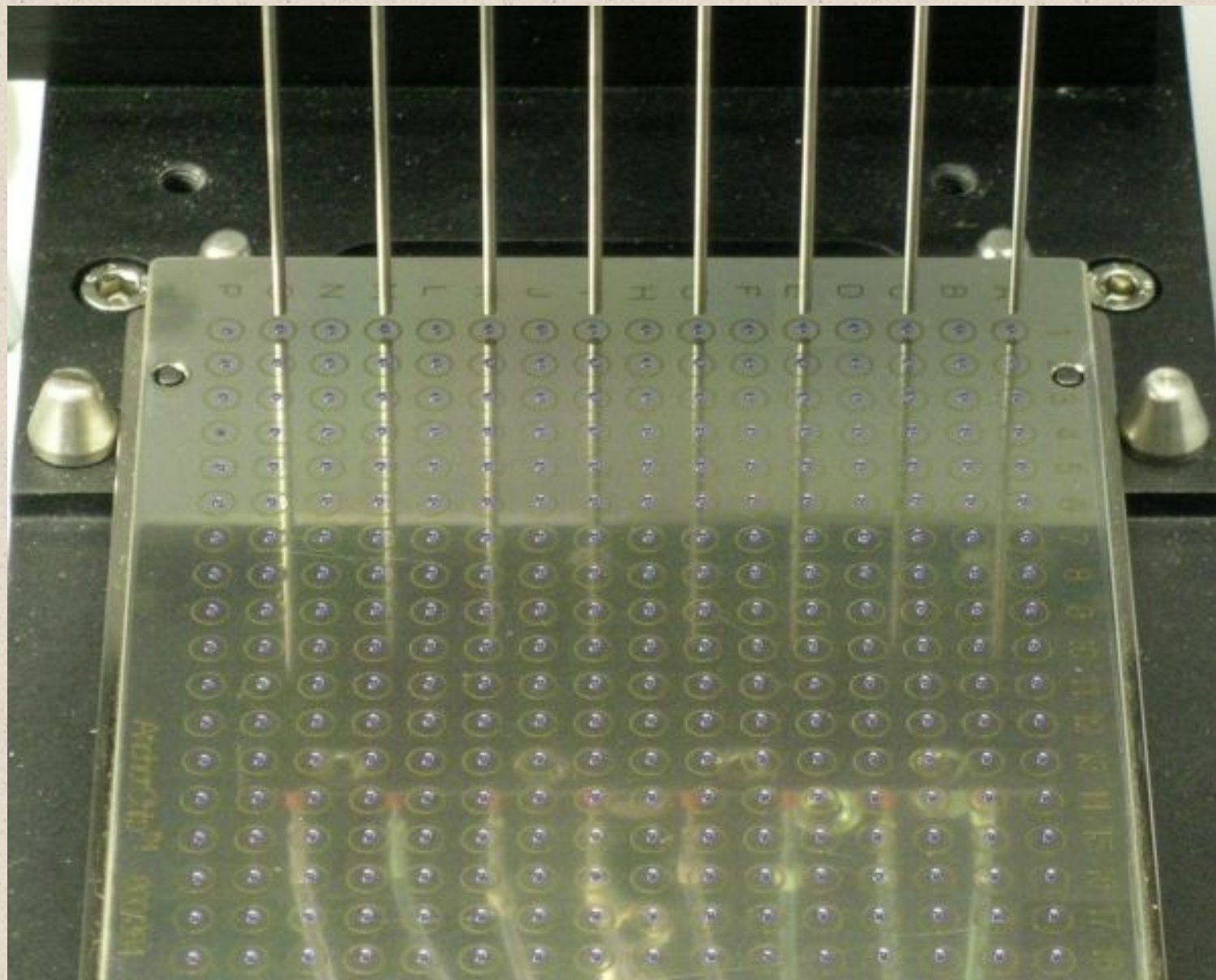


МАТРИЦА:

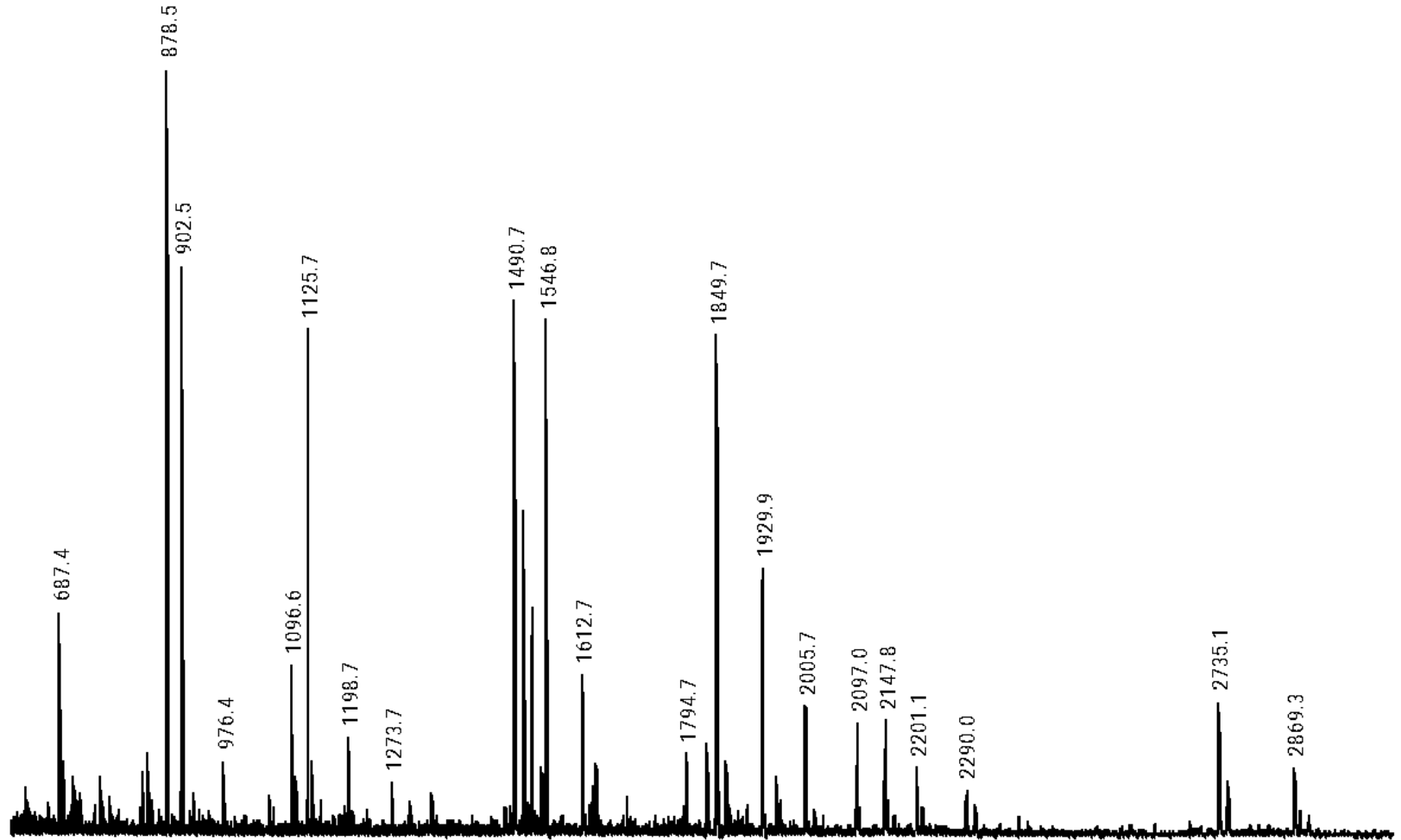
- * Поглощает энергию лазерного излучения, “вскипая”, увлекает в газовую фазу молекулы анализируемого вещества
- * Способствует ионизации

Лазер: 2нс, 50-300 мкДж/имп , 50мкм

Пластина для MALDI

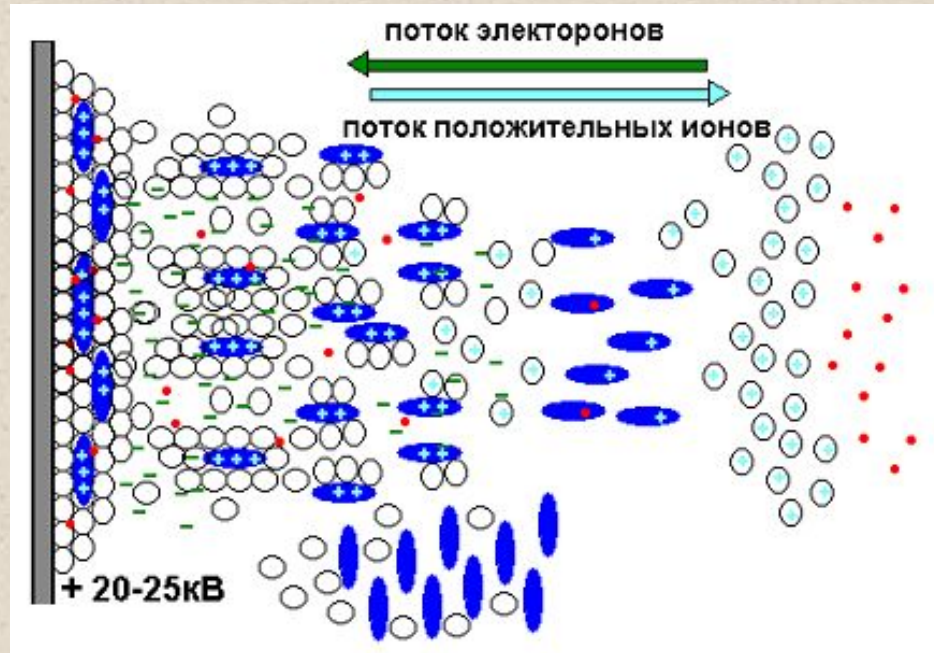
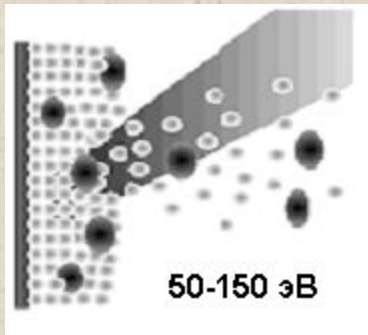


Пример MALDI масс-спектра: триптический гидролизат фрагмента белка М1 вируса гриппа

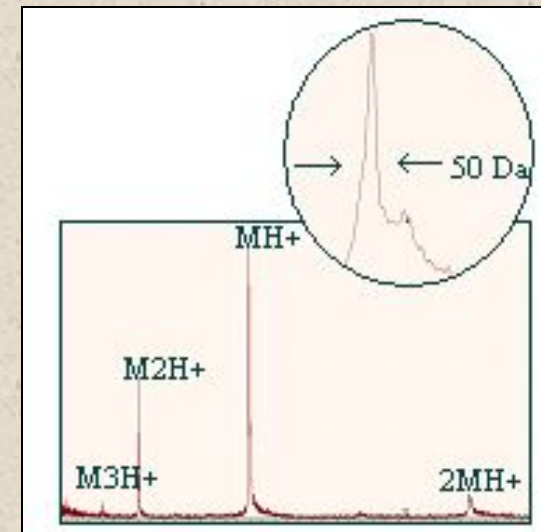
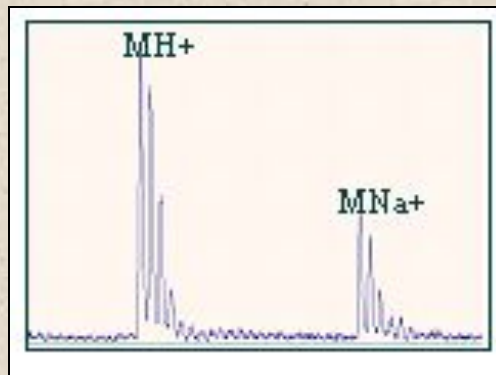


MLLTQVQTYVLSIIPSGPLKAEIAQRLEDVFAGKNTDLEVLMEWLKTRPILSPLTKGILGFVFTLTPSERGLQ
RRRFVQNALNGNDPNNMDKAVKLYRKLKREITFHGAKEISLSYSAGALASCMGLIYNRMGAVTTEVAFGL
VCATCEQIADSQHRSHRQMVTTTNPLIRHENRMVLASTTAKAMEQMAGSSEQAAEAMEVASQARQMVQAM
RTIGTHPSSAGLKNLLENLQAYQKRMGVQMQRFK

MALDI : типы положительных ионов и вид спектра



Точный механизм MALDI ионизации неизвестен, однако в результате образуются, как правило, однозарядные ионы, захватившие протон либо иной катион.



Естественное изотопное распределение в белках и пептидах

^1H	99.98%	^{13}C 1.11%
^{12}C	98.89%	
^{14}N	99.64%	
^{16}O	99.76%	
^{32}S	95.06%	^{34}S 4.18%

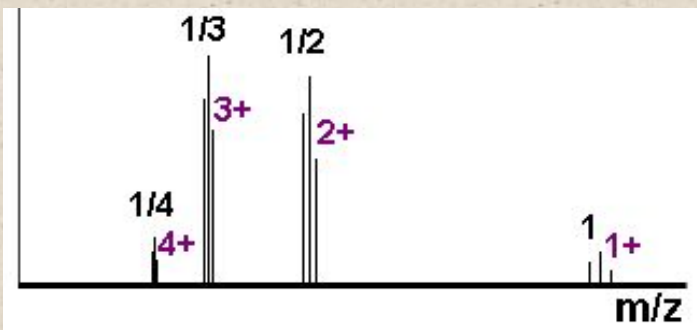
Пептид массой 2000 Д содержит ~ 100 атомов углерода в нем с вероятностью ~ 30% не встретится ^{13}C , с вероятностью ~ 37% встретится один ^{13}C , с вероятностью ~ 20% встретится два ^{13}C .

ВВ: в масс-спектре детектируется $10^3 - 10^6$ молекул аналита. Этого достаточно для наблюдения изотопного распределения. Моноизотопная масса – масса пептида, не содержащего ни одного ^{13}C

вид MALDI масс-спектра



вид ESI масс-спектра



$$m/z \text{ } i\text{-го изотопного пика} = \left[M_{\text{моно}} + i + \frac{\text{H} + \text{Na}}{\text{K}} \right]^+$$

Замечания о ESI и MALDI:

- * Оба метода ионизации требуют высокой химической чистоты анализируемого вещества.**
- * Диапазон концентрации аналита при ESI и MALDI 10^{-3} – 10^{-7} М.**
- * Поскольку разные вещества (например, пептиды) обладают разной способностью к ионизации (захвату протона либо другого катиона), то невозможно делать выводы о количественном соотношении компонентов сложной смеси на основании высот пиков в спектре.**

ESI является более “мягким” способом ионизации, чем MALDI.

При ESI образуется непрерывный поток ионов, при MALDI - сильно ограниченный во времени (до 10нс) пакет ионов.

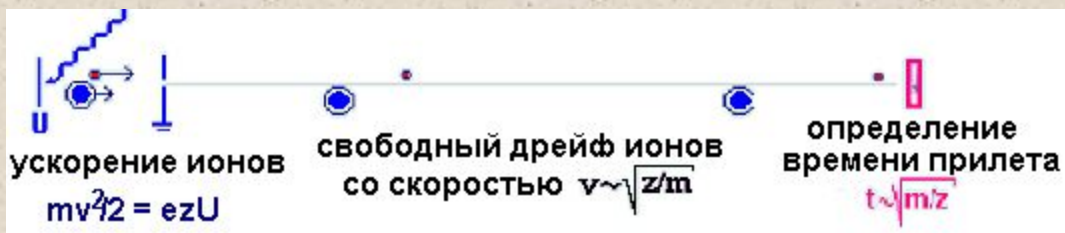
При ESI анализу подлежит более 10 фемтомолей вещества, при MALDI - более 1 фемтомоля вещества.

При ESI образуются ионы m/z 0-5000, возможно измерение белков до ~50 000 Да.

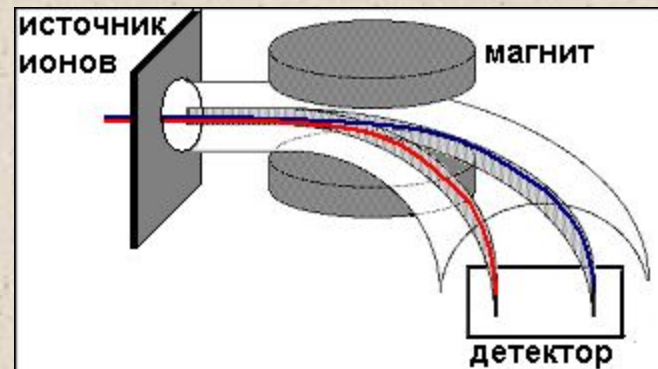
При MALDI возможно измерение белков до ~200 000 Да, диапазон измеряемых масс ограничен снизу до ~500 Да из-за присутствия с спектрах пиков матрицы.

СИСТЕМЫ РАЗДЕЛЕНИЯ ИОНОВ

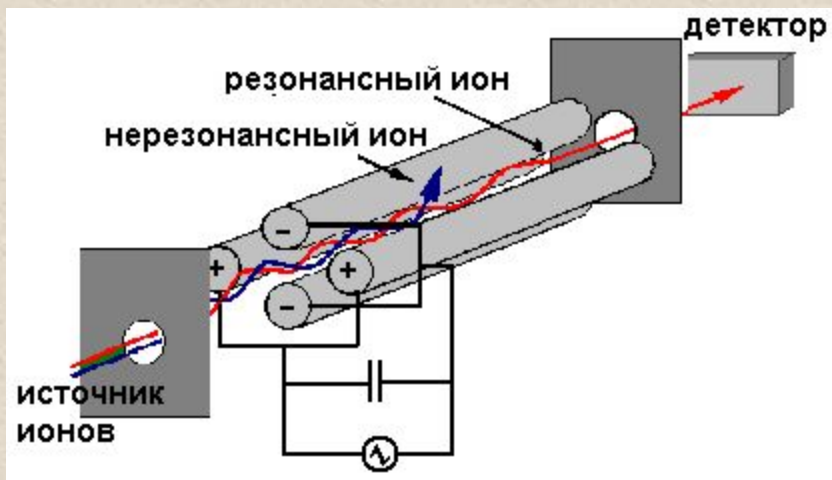
Времяпролетный масс-анализатор



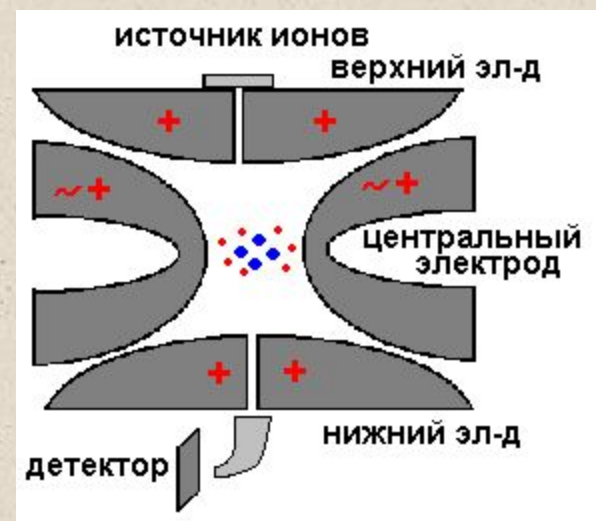
Магнитный анализатор



Квадрупольный анализатор

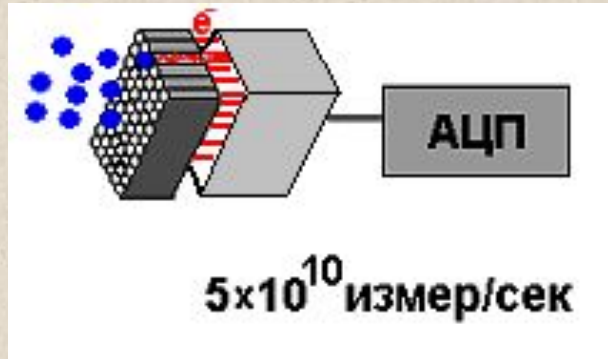


Ионная ловушка



MALDI-времяпролетный масс-спектрометр с MCP детектором

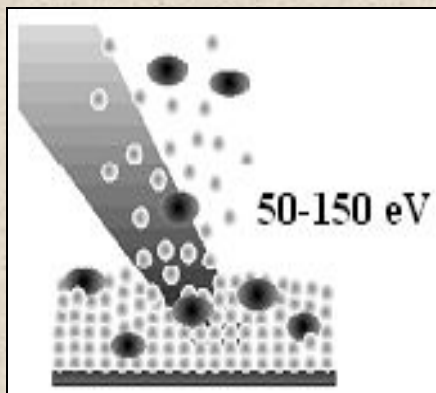
Микроканальные пластины



Энергия ускорения 20 кэВ и длина пути 1 м

масса	t пролета	Δt пролета 1Да	Кол-во измер.
1 Да	5×10^{-7} сек	5000×10^{-10} сек	1000
100 Да	50×10^{-7} сек	250×10^{-10} сек	50
1000 Да	150×10^{-7} сек	75×10^{-10} сек	15
10000 Да	500×10^{-7} сек	25×10^{-10} сек	5

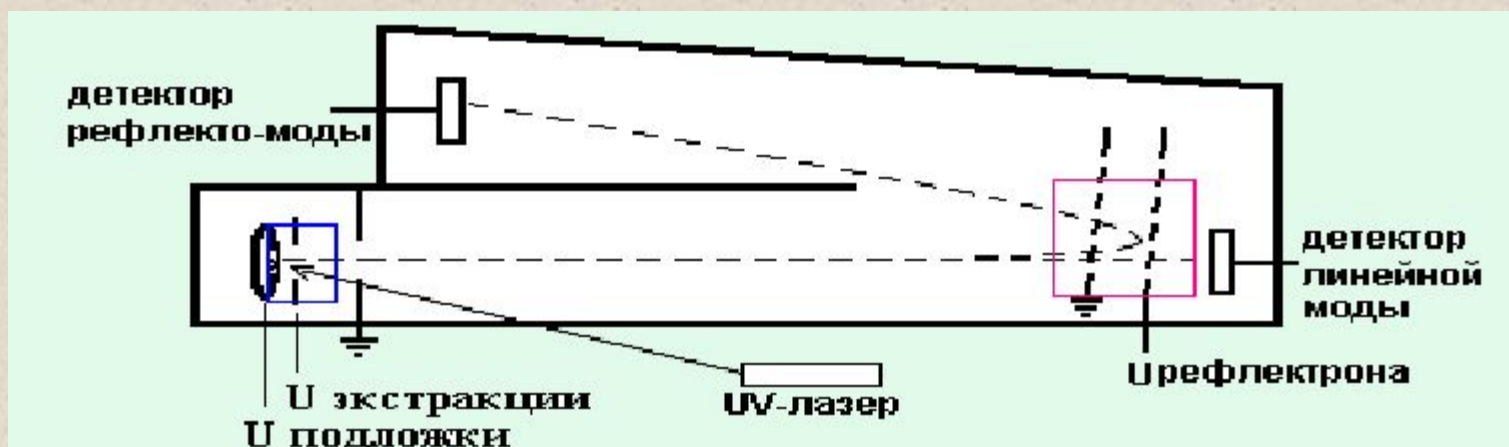
При MALDI существует разброс по энергиям, приводящий к уширению пиков.



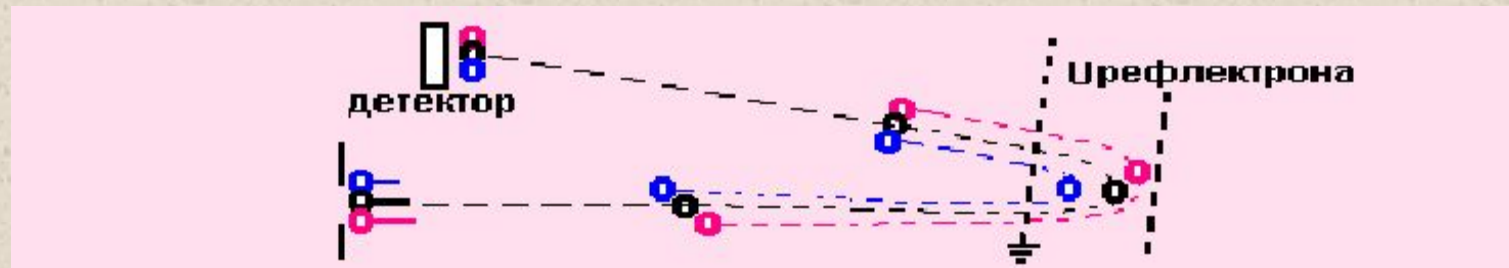
При энергии ускорения 20 кэВ разброс в 100эВ составляет 0.5%.

Так пик пептида м.в. 1000Д имел бы ширину на половине высоте около 2 Да !

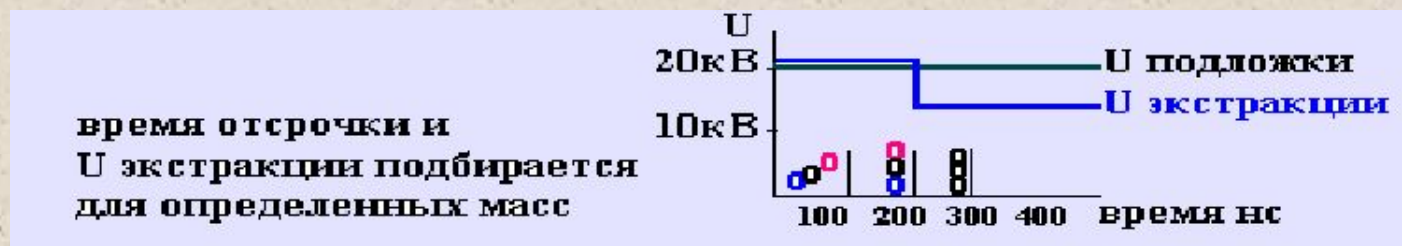
Уменьшение стартового разброса ионов – повышение разрешения MALDI-TOF-MS



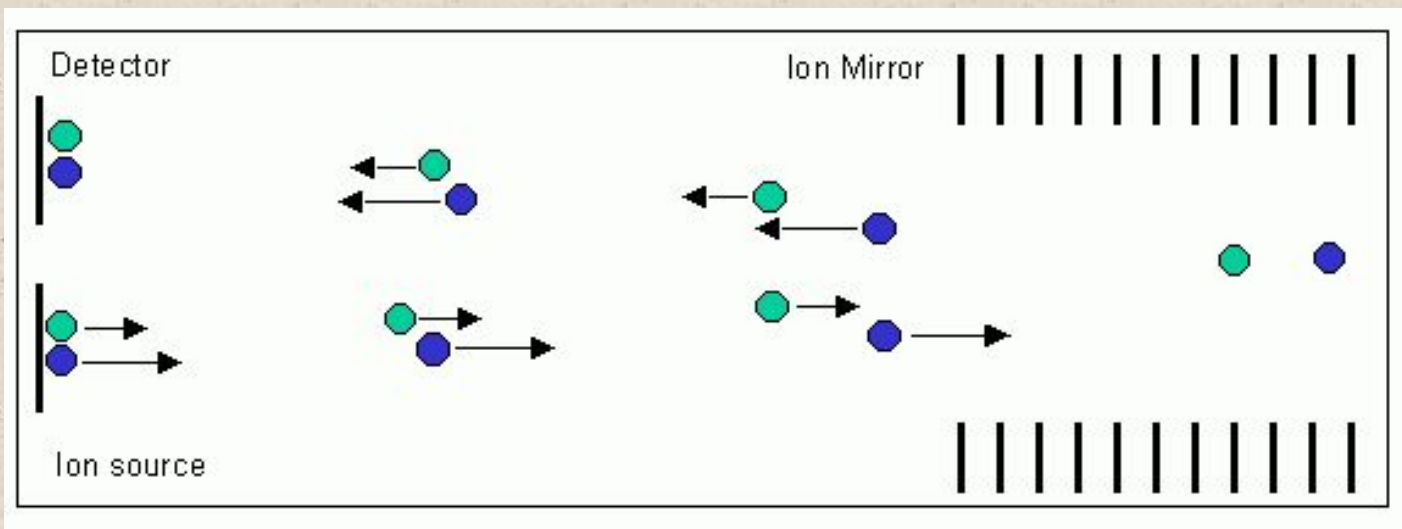
Использование отражающего напряжения (рефлектрона Мамырина)



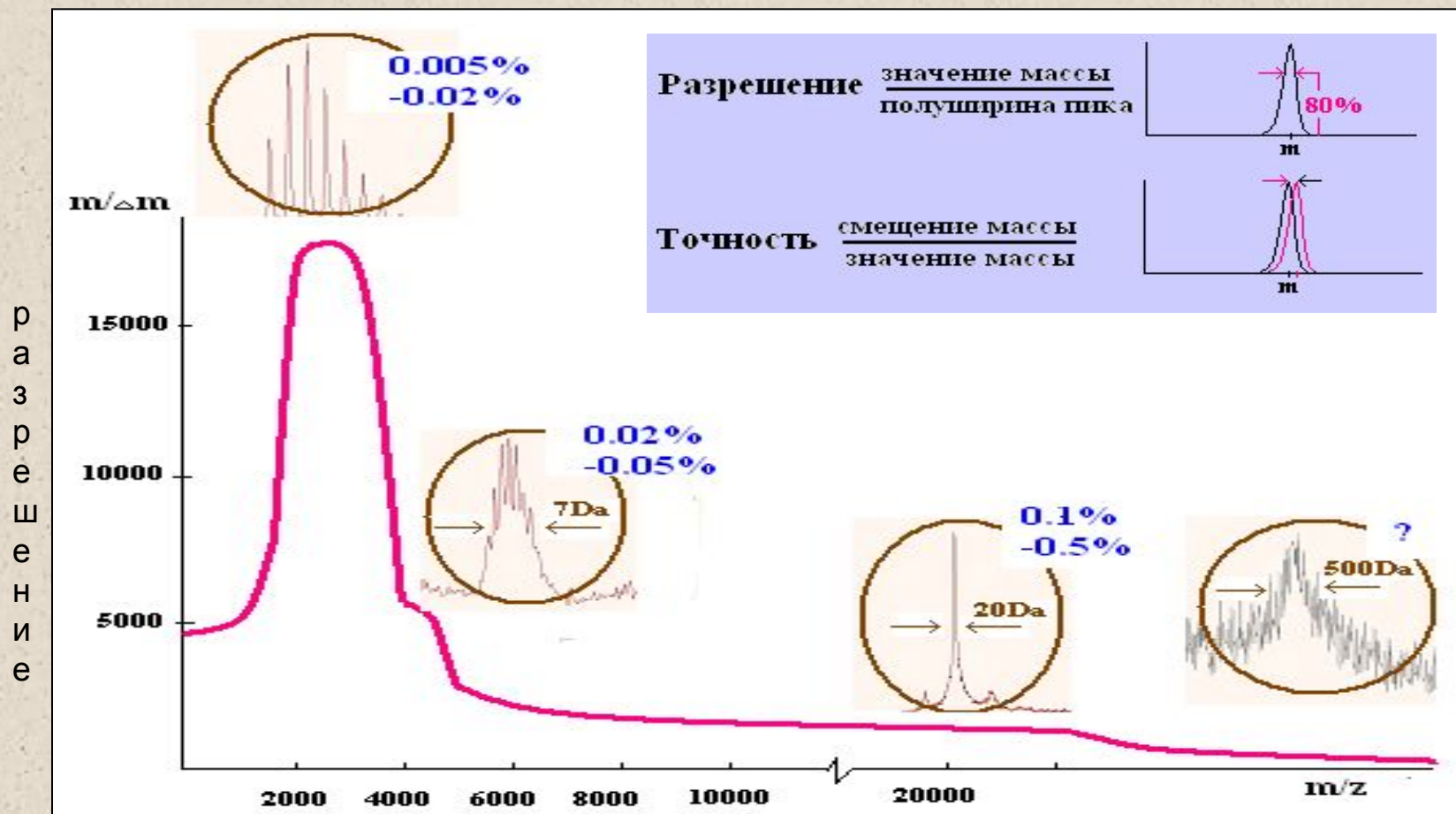
Использование «отсрочки экстракции»



Рефлектрон

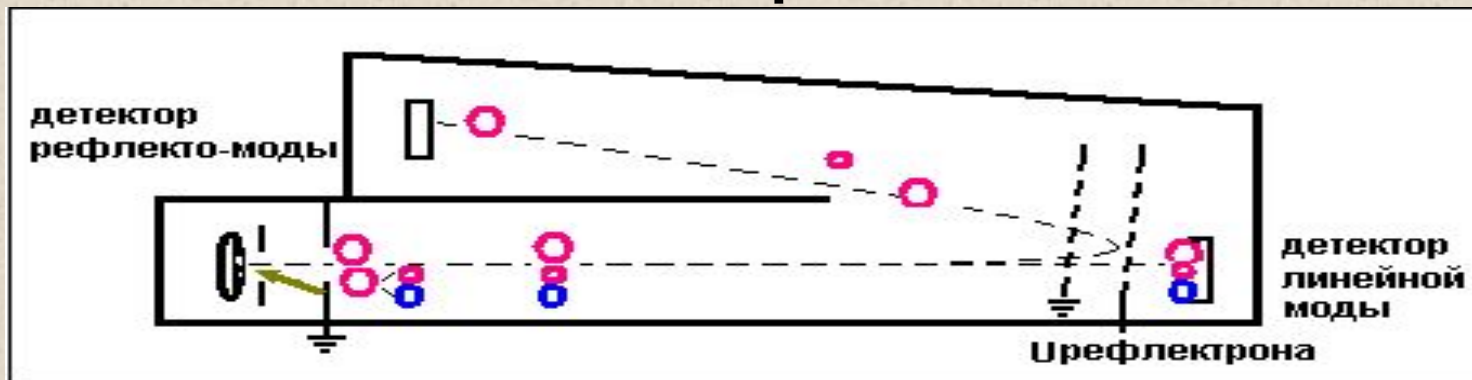


Разрешение и точность MALDI-TOF-MS

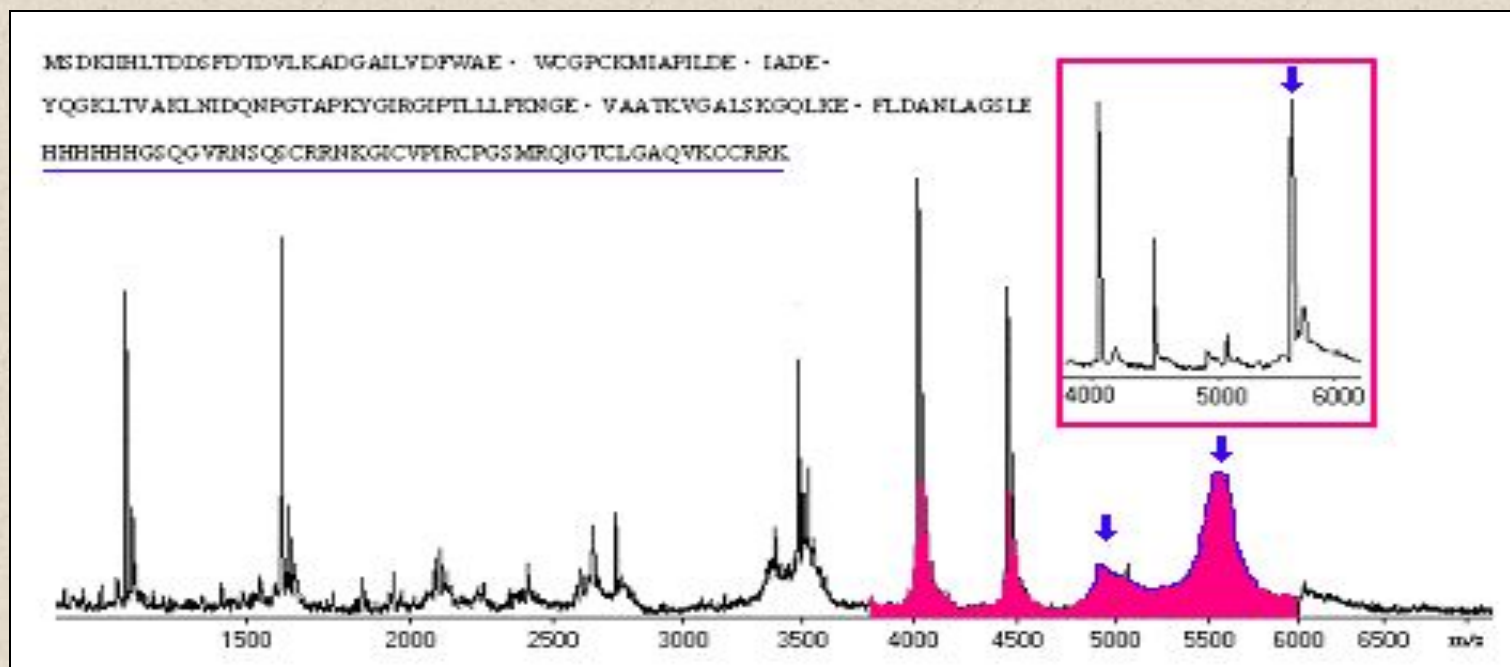


Разрешение до 30 000,
точность до 0.002% (=20ppm).

Распад ионов в процессе MALDI



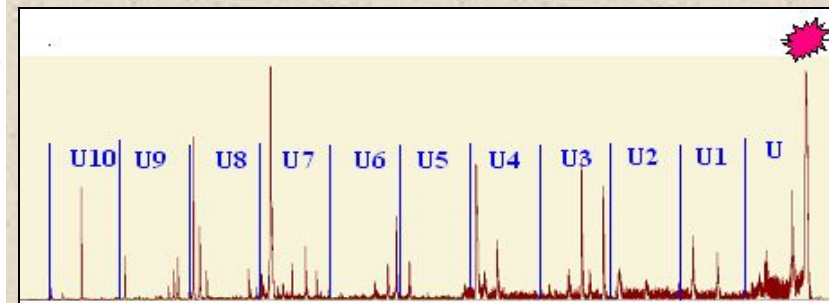
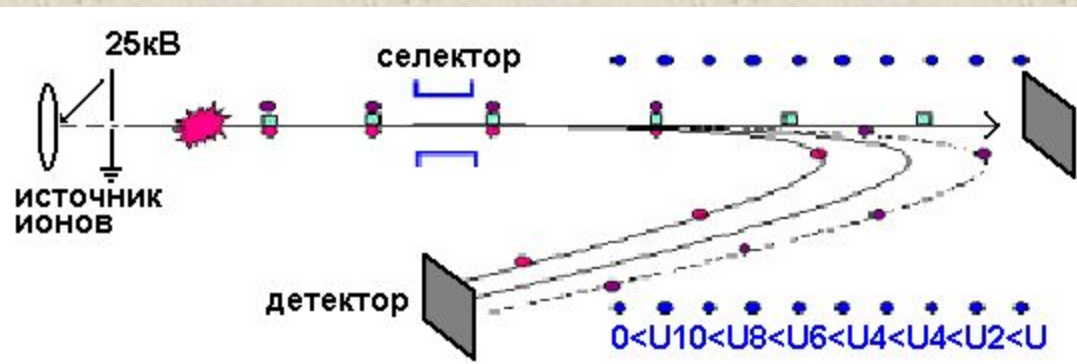
Когда ион, захвативший избыток энергии в процессе MALDI, распадается в области свободного дрейфа, фрагменты имеют ту же скорость, что и их родительский ион, а энергию - меньшую ($\sim m$)



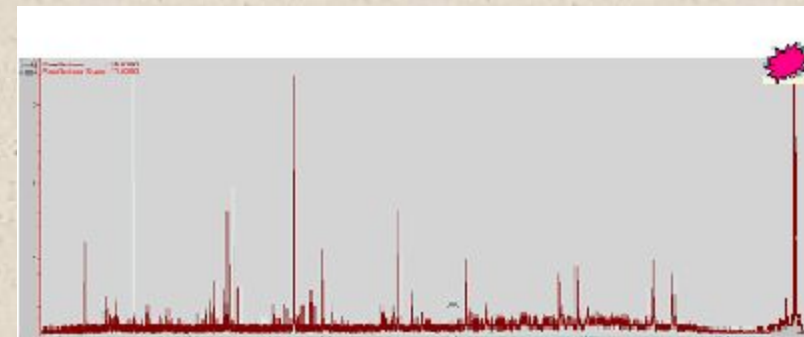
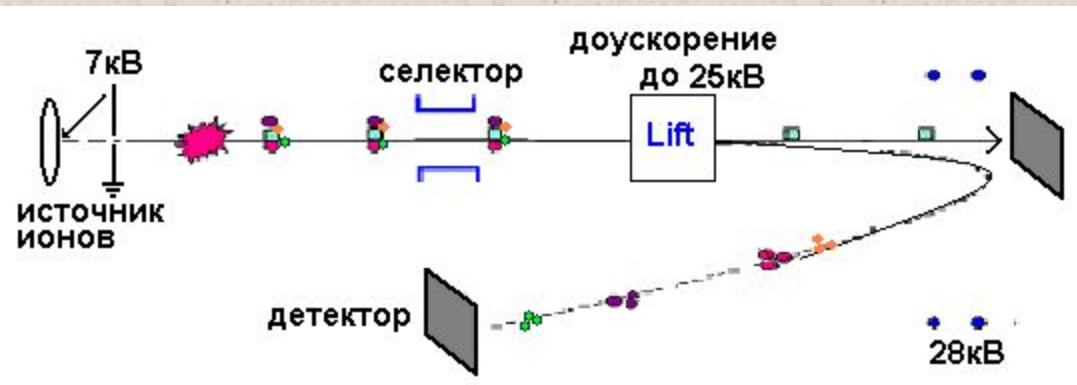
PSD (post source decay) и TOF-TOF

детекция распада ионов во время свободного дрейфа

для адекватного отражения дочерних ионов: $U1_{ref}/U0_{ref} = m1/m0$



набор масс-спектров с разным U рефлектрона
компьютерно “сшиваются” в один спектр PSD



получается один спектр
фрагментации TOF-TOF

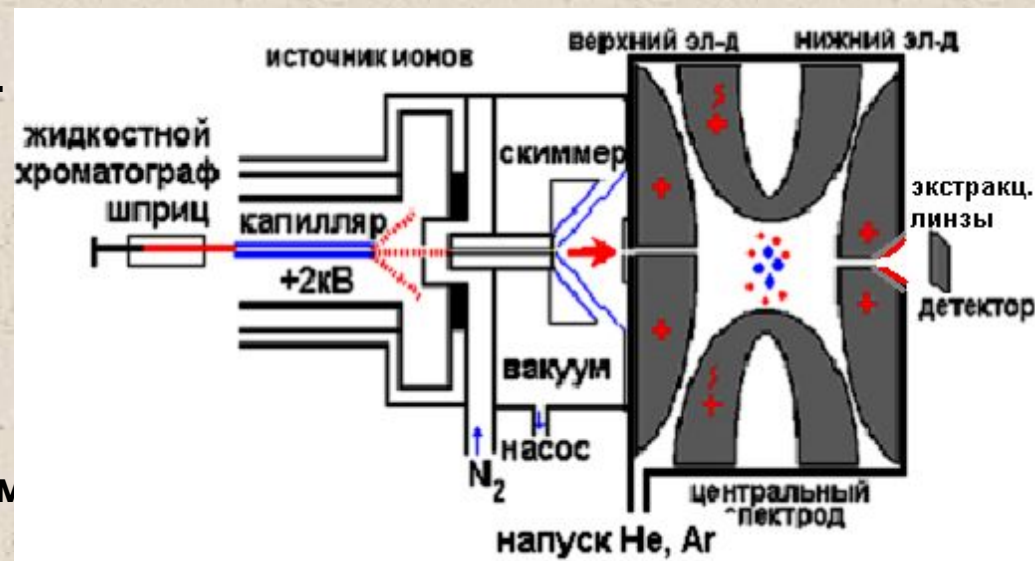
точность измерения масс фрагментов 0.02-0.1%

ESI – ионная ловушка с MCP детектором

На верхний и нижний электроды подано постоянное положительное напряжение.

На короткое время отталкивающее напряжение с верхнего электрода снимается, позволяя пакету ионов влететь в ловушку.

На центральном электроде - быстропеременное напряжение, которое заставляет ионы всех m/z двигаться со своими частотами по своим орбитам.



Затем, на экстрагирующие линзы подается осцилирующее напряжение, последовательно вытягивающее ионы согласно их m/z .

Ионные ловушки позволяют, варьируя напряжения, оставлять в ловушке определенные ионы и получать спектры их фрагментов.

При этом возможен ряд последовательных фрагментаций иона.

Характеристиками ловушки являются:

ёмкость (верхнее значение разделяемых m/z) до 4000,
разрешение до 0.2 Да по диапазону,
точность до 0.01% (=100ppm) для родительских ионов и фрагментов.

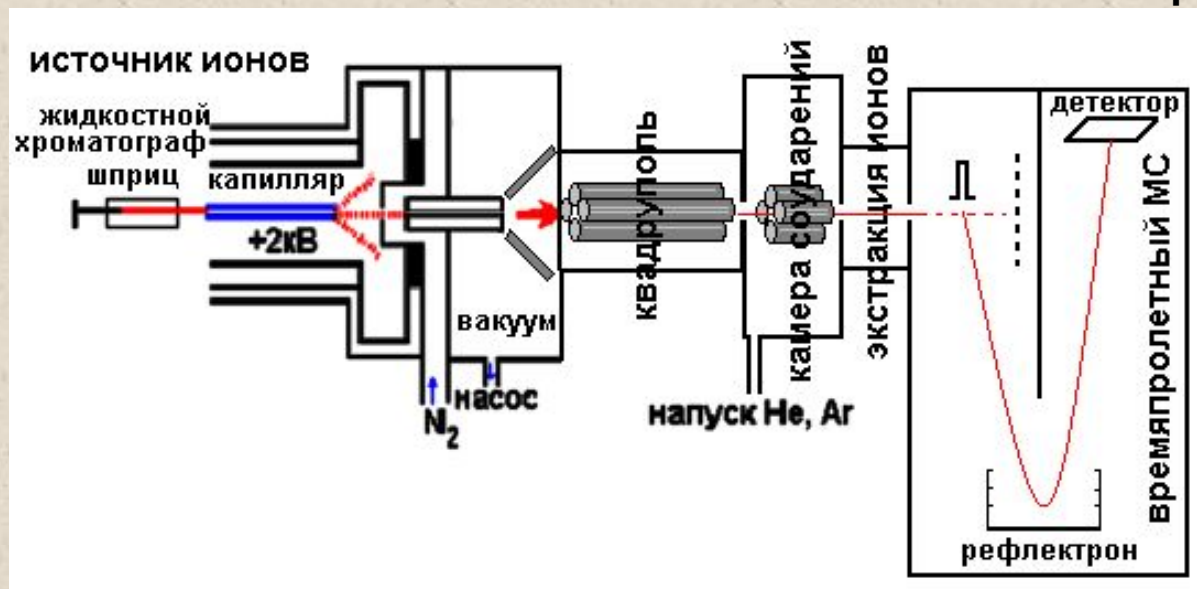
Ионная ловушка хорошо сочетается с жидкостным хроматографом.

«Гибридные» приборы:

ESI – квадруполь – ортогональный времяпролетный MS

На электроды квадруполя подается переменное напряжение, позволяющее пролетать только резонансным ионам.

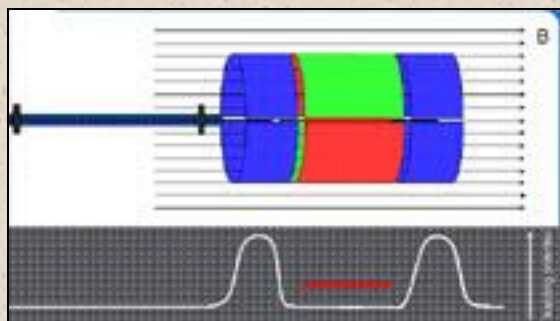
Напуск инертного газа приводит к столкновительной фрагментации ионов.



Сочетает хорошее разрешение времяпролетного масс-спектрометра с возможностью хорошего выделения (включением квадруполя) определенных ионов для получения спектров фрагментации.

точность 0.01-0.03% для родительских ионов и фрагментов

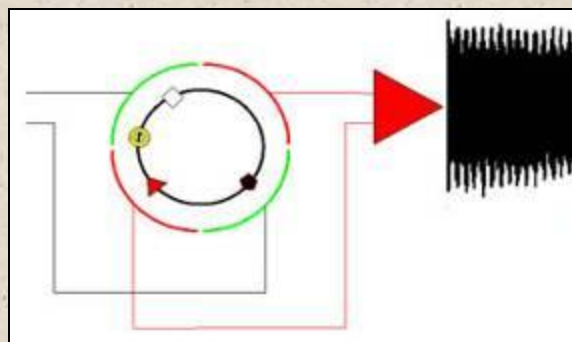
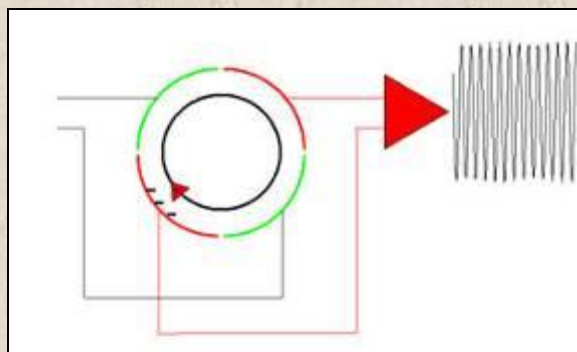
ESI - масс-спектрометры ионно-циклотронног резонанса с последующим Фурье- преобразованием (ICR-FT)



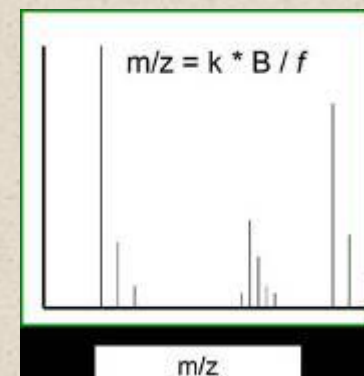
Ионы «запираются» в мощный (7-14 тесла) секторный сверхпроводящий магнит, где вращаются под действием силы Лоренца с частотой, зависящей от m/z .

Два сектора магнита используются для снятия токов, наведенных пролетающими мимо них ионами.

Сложный сигнал от ионов разных m/z подлежит разложению по частотам (Фурье-преобразованию).



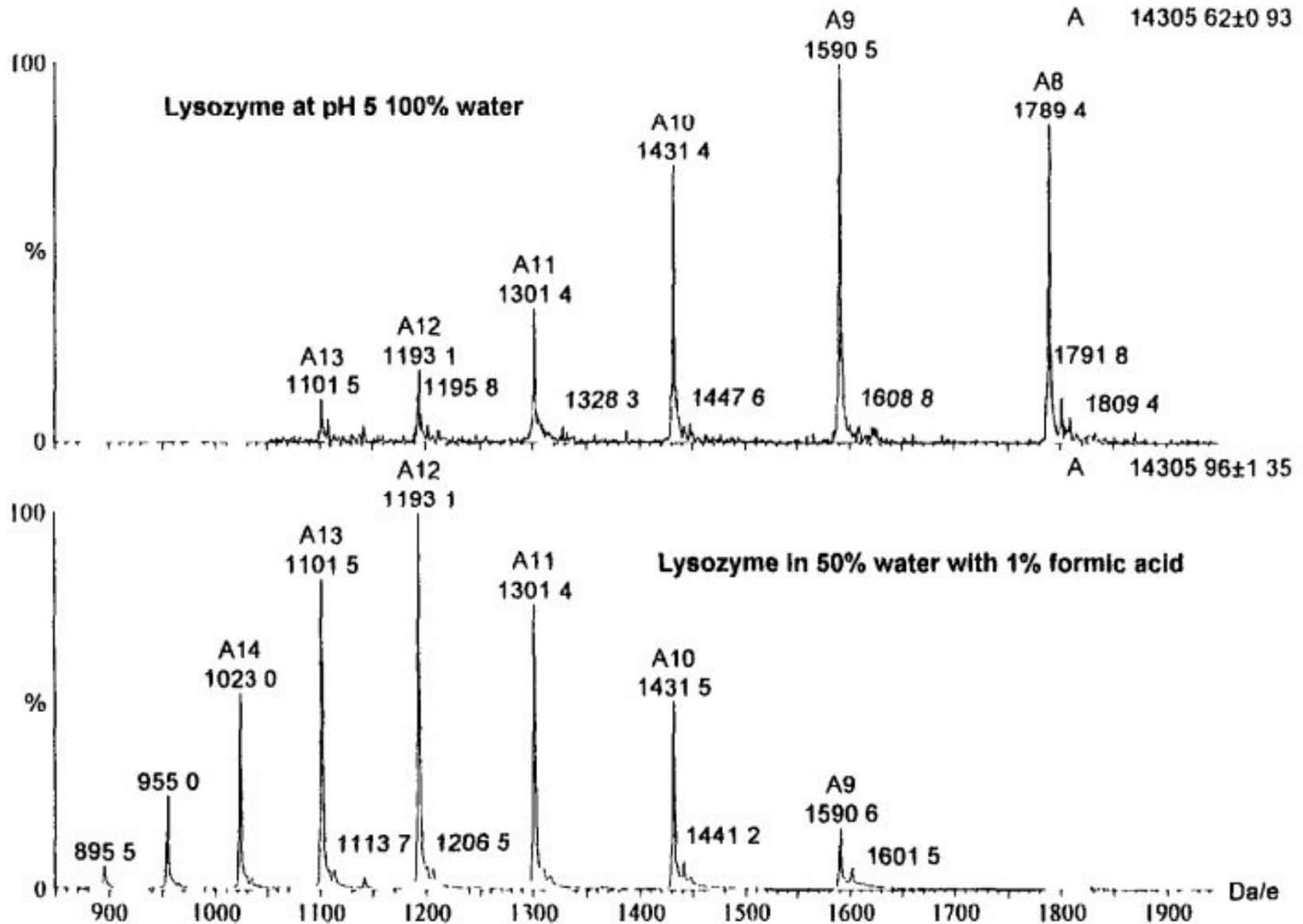
Характеристики ICR-FT :
разрешение до 10 000 000,
точность до 0.0001%
(=1ppm).



Сравнение характеристик приборов

	MALDI-TOF-MS	ESI-IonTrap-MS	ESI-FICR-MS
точность спектров родительских ионов	+++	++	+++++
точность спектров фрагментов	+	+++	+++++
тип спектров фрагментации	LID, CID	CID	CID, ECD
степень фрагментации	не регулируется	регулируется	регулируется
информативность спектров фрагментации	++	++++	+++++
измерения масс белков < 30кДа	++	+++	+++++
измерения масс белков > 30кДа	++	+	+
спектры многокомпонентных смесей пептидов	+++++	+++	+++
спектры многокомпонентных смесей белков	+++	+	+
требования к пробоподготовке	высокие	очень высокие	очень высокие
сложность работы оператора	средняя	высокая	очень высокая
скорость пробоподготовки + получения спектров	высокая	низкая	низкая
интерпретация спектров многокомпонентной смеси	легкая	сложная	сложная
интерпретация спектров фрагментации	сложная	сложная	сложная
стоимость оборудования	высокая	средняя	очень высокая
стоимость эксперимента	низкая	высокая	очень высокая

Интерпретация ESI-масс-спектров (что можно узнать из ESI-масс-спектра?)

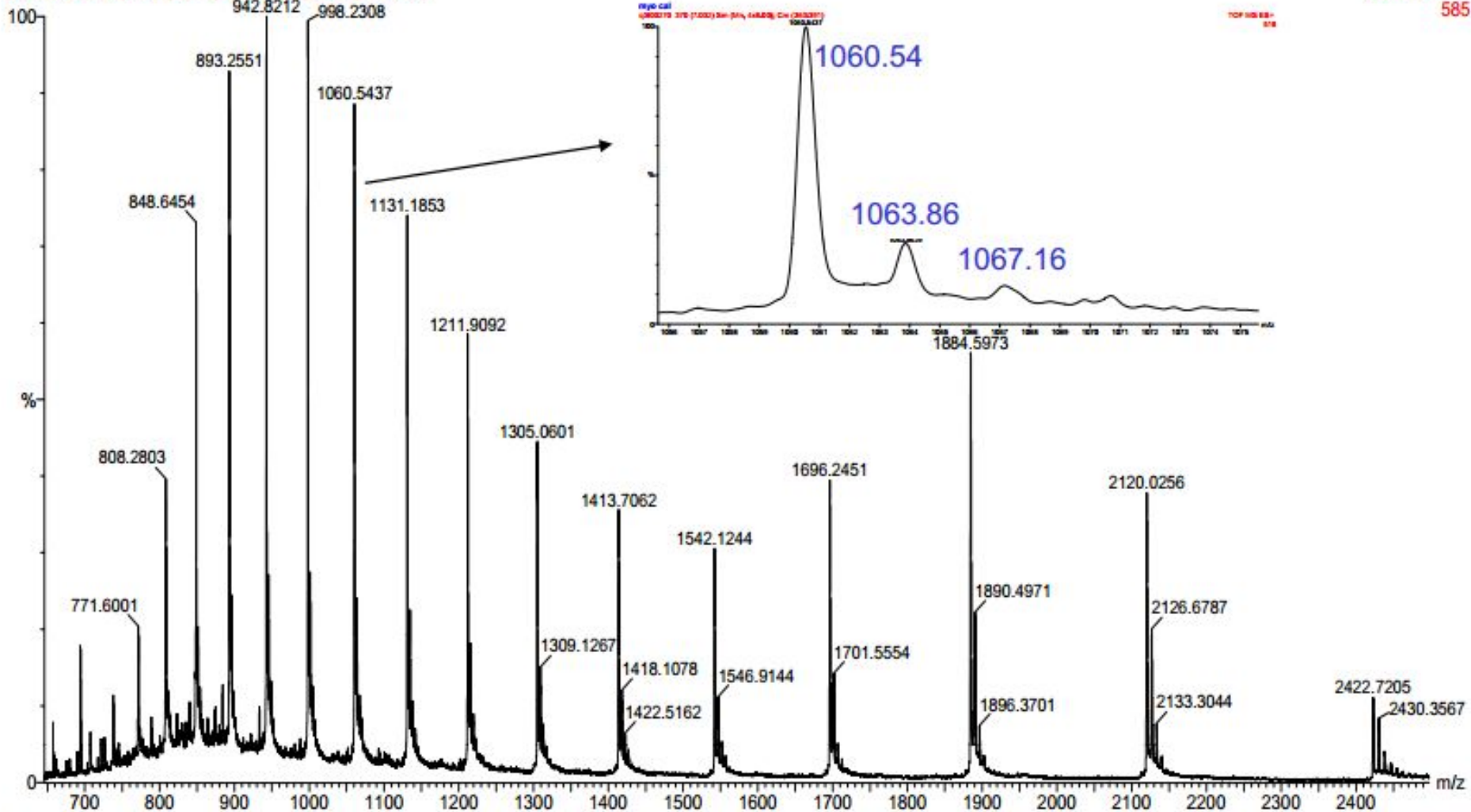


Масс-спектр миоглобина

myo cal

q3t00270 370 (7.032) Sm (Mn, 4x8.00); Cm (363:391)

TOF MS ES+
585



ESI-масс-спектры

- ❑ Определение молекулярной массы белка
- ❑ Исследование вторичной структуры (распределение зарядов и водородный обмен)

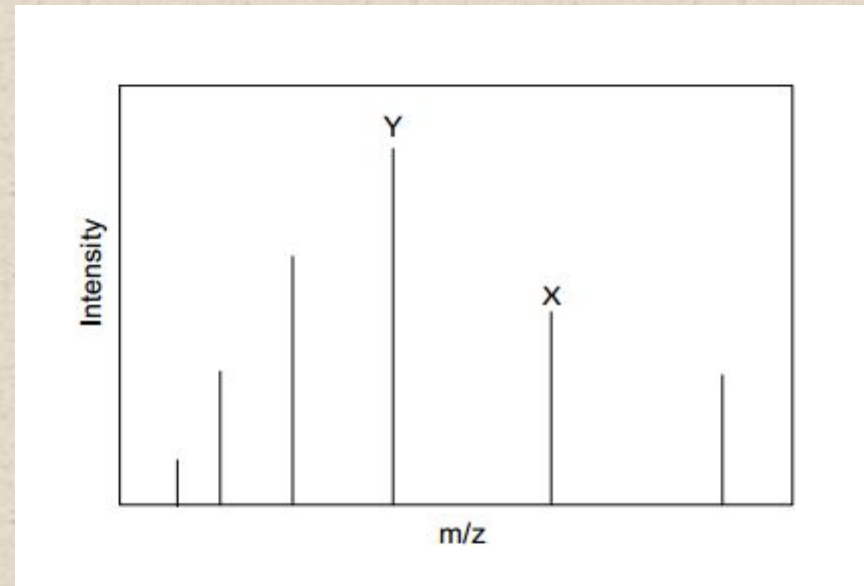
❑ Как определить молекулярную массу белка из ESI масс-спектров

- ❑ Определить заряды используя m/z рядом стоящих ионов

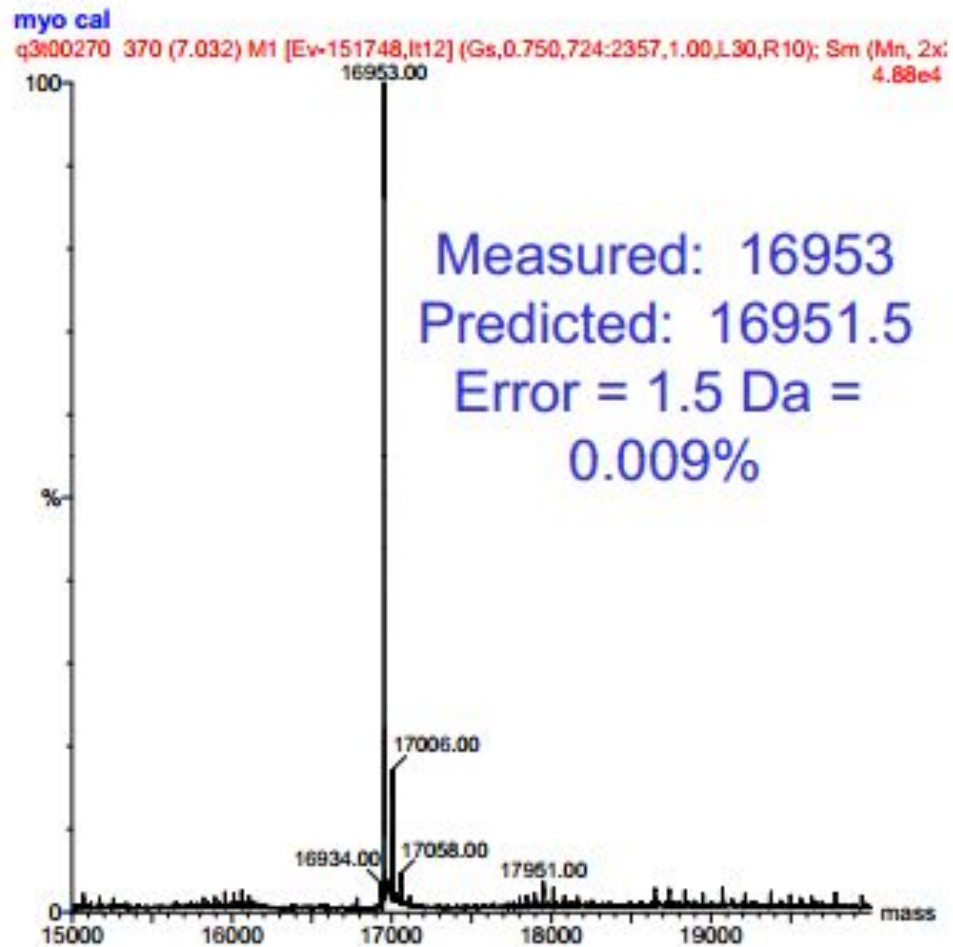
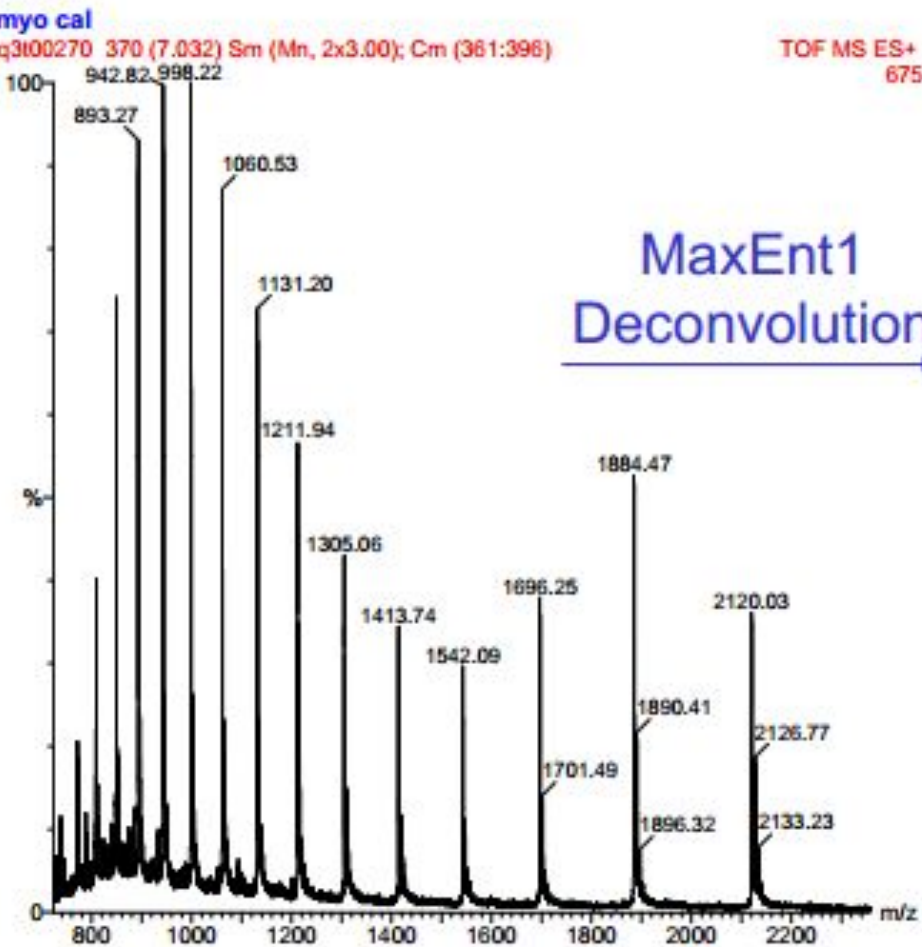
$$z_x = (Y-1)/(X-Y)$$

- ❑ Определить массу белка

$$M = X \cdot z_x - z_x = Y \cdot z_y - z_y$$



Автоматическая деконволюция ESI-спектров



Историческая справка:

Современный масс-спектрометр основан на работе, сделанной сэром Дж. Томсоном в Кэвендишевской лаборатории Кембриджского университета. Исследования Томсона, приведшие к открытию электрона в 1897 году, также привели к созданию первого масс-спектрометра, построенного им для изучения влияния электрического и магнитного полей на ионы, генерируемые в остаточном газе на катоде рентгеновской трубки. В 1906 году Томсон получил Нобелевскую премию по физике за "Выдающиеся заслуги в теоретическом и экспериментальном изучении электропроводимости газов".

К концу Первой мировой войны работы Френсиса Астона и Артура Демпстера привели к значительному улучшению точности и воспроизводимости измерений на масс-спектрометрах. Позднее Альфред Нир воплотил эти достижения вместе со значительным продвижением в вакуумной технике и электронике в конструкцию масс-спектрометра, значительно сократив его размеры. Еще раньше, в 1946 году, Уильям Стивенс предложил концепцию времяпролетных анализаторов.

В середине 1950-ых годов Вольфганг Пол разработал квадрупольный масс-анализатор. Другой разработкой Пола было создание квадрупольной ионной ловушки, специально предназначенной для захвата и измерения масс ионов. За свои инновационные работы Вольфганг Пол получил в 1989 году Нобелевскую премию по физике. В 1950-е годы впервые были соединены газовый хроматограф и масс-спектрометр (Голке, Маклаферти и Рихаге).

Затем появились новые методы ионизации - бомбардировка быстрыми атомами (Барбер), химическая ионизация (Тальрозе, Филд, Мансон), полевая десорбция/ионизация (Беки), MALDI (Танака, Карас, Хилленкампф), ESI (Доул, Фенн), ионизация в индуктивно-связанной плазме (Фассел). Были разработаны масс-спектрометры ионно-циклотронного резонанса (Хиппл) и, затем, с Фурье-преобразованием сигнала (Комиссаров, Маршалл), тройные квадрупольные тандемные масс-спектрометры (Йоуст, Энке).