

***CORSO DI LAUREA IN BIOLOGIA PER LA
SOSTENIBILITÀ***



***BIOCHIMICA APPLICATA
(6 CFU)***

LEZIONE 9

Prof. Paola Di Donato

Dipartimento di Scienze e Tecnologie

Stanza 520, V piano lato NORD

Tel. 081 547 6625

E-mail: paola.didonato@uniparthenope.it

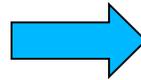
Spettrometria di massa (MS)

- Insieme di tecniche analitiche che consentono di effettuare la caratterizzazione strutturale di molecole incognite, sia a basso peso molecolare che ad alto PM quali proteine
- Posseggono una elevata sensibilità in quanto consentono di rivelare ed analizzare fino a quantità dell'ordine dei picogrammi (10^{-12} g)
- Utile per determinare il peso molecolare e la sequenza amminoacidica di proteine anche in miscele complesse (analisi proteomica)

La spettrometria di massa per l'analisi di proteine

identificazione di proteine incognite/studi strutturali

determinazione del PM



FAB, ESI, MALDI

determinazione della
sequenza amminoacidica



spettrometria di massa
tandem MS/MS

Principi generali

Le fasi principali di un esperimento di spettrometria di massa includono:

- 1. Ionizzazione**
- 2. Frammentazione**
- 3. Analisi della massa**
- 4. Rivelazione**

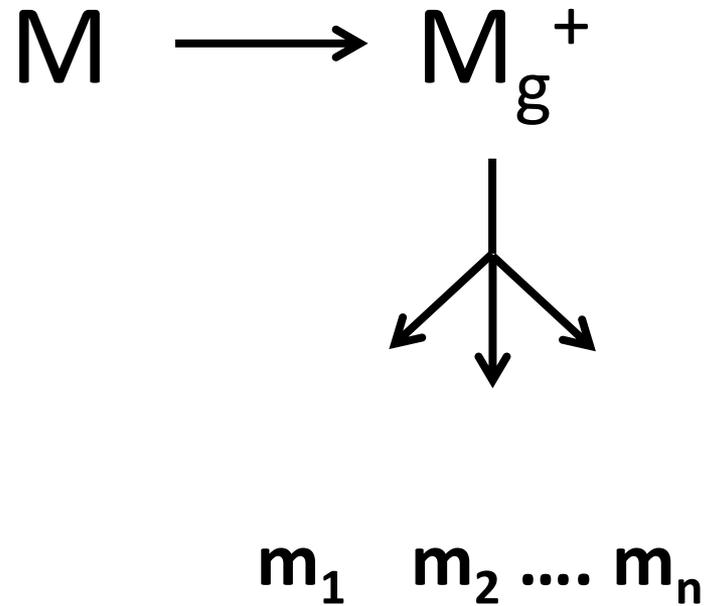
Principi generali

- La MS consente di determinare il peso molecolare di specie che siano **ionizzate** ed **in fase gassosa**
- Gli spettrometri di massa calcolano il rapporto **massa/carica** di molecole in fase gassosa misurandone la velocità di movimento **nel vuoto** sotto l'effetto di un **campo elettrico**

$$v = E m/z$$

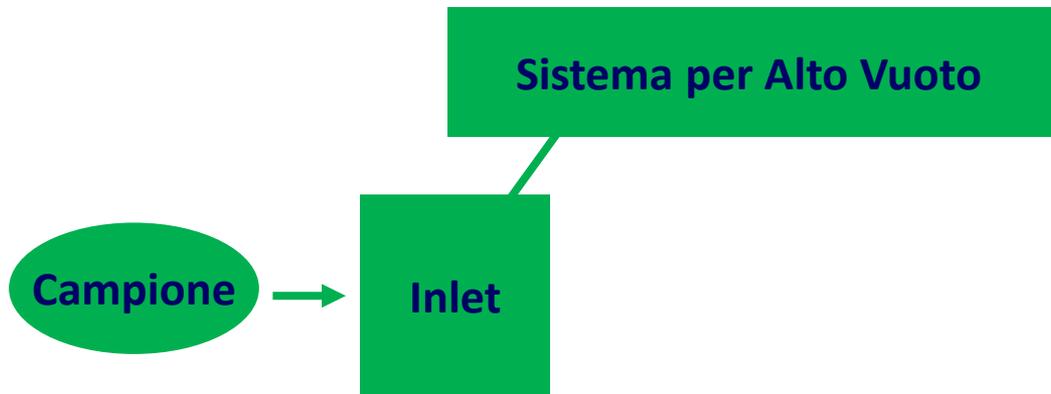
- Le diverse tecniche di MS differiscono in particolare per due fattori:
 - ✓ modalità con cui le molecole vengono ionizzate
 - ✓ modalità con cui viene misurato il rapporto massa/carica

Principi generali



La strumentazione

Schema degli elementi che compongono uno SPETTROMETRO DI MASSA



Diretto: campione iniettato come tale nello strumento

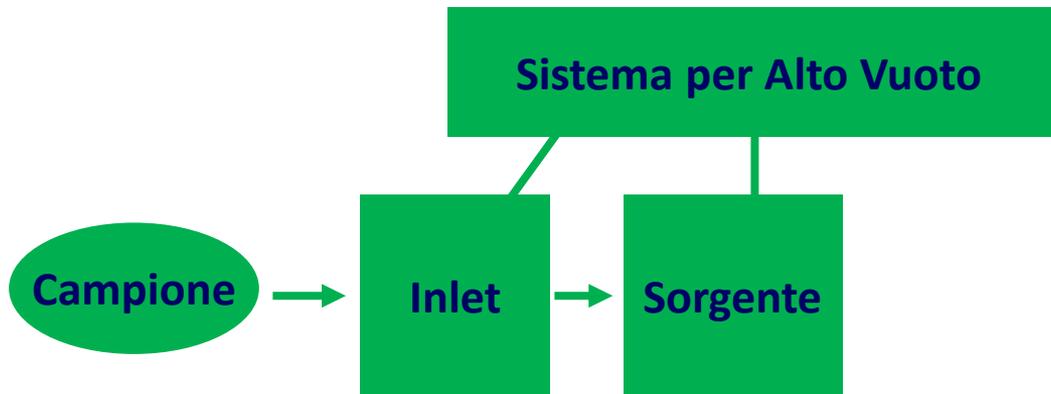
GC: eluato di un gas cromatografo

LC: eluato di un cromatografo liquido

CE: eluato da elettroforesi capillare

La strumentazione

Schema degli elementi che compongono uno SPETTROMETRO DI MASSA

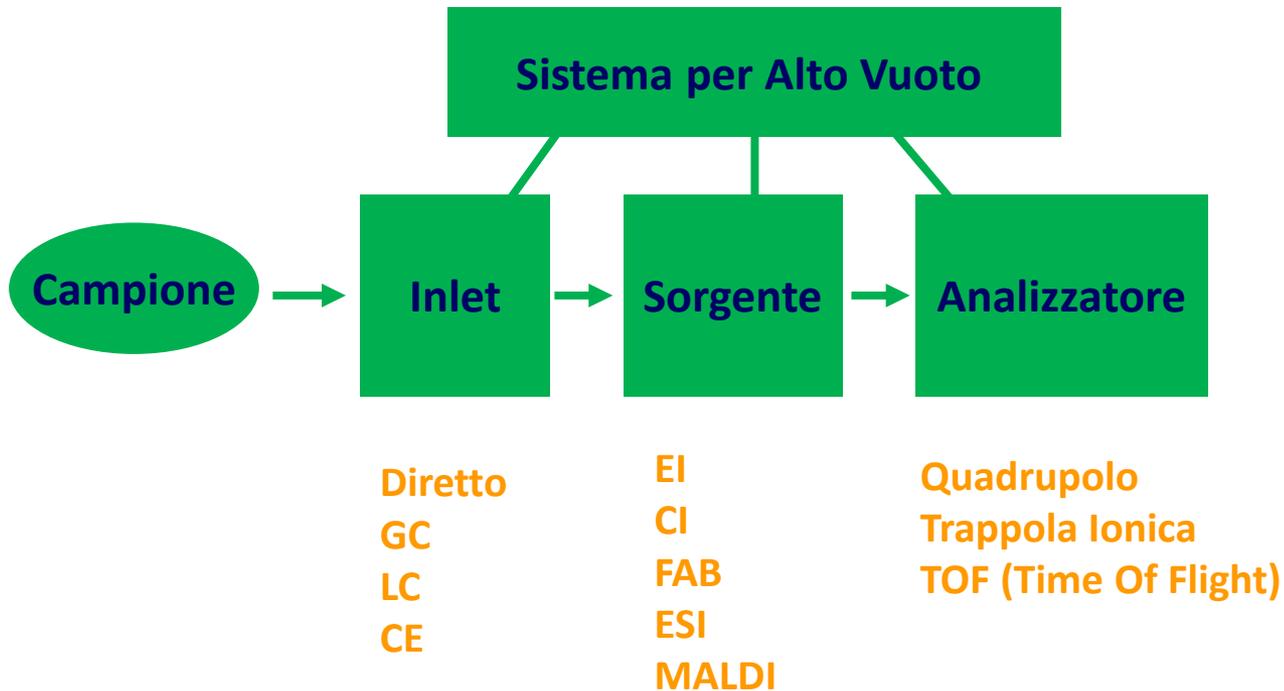


Diretto
GC
LC
CE

EI: Electron Impact
CI: Chemical Ionization
FAB: Fast Atoms Bomardment
ESI: ElectroSpray Ionization
MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization

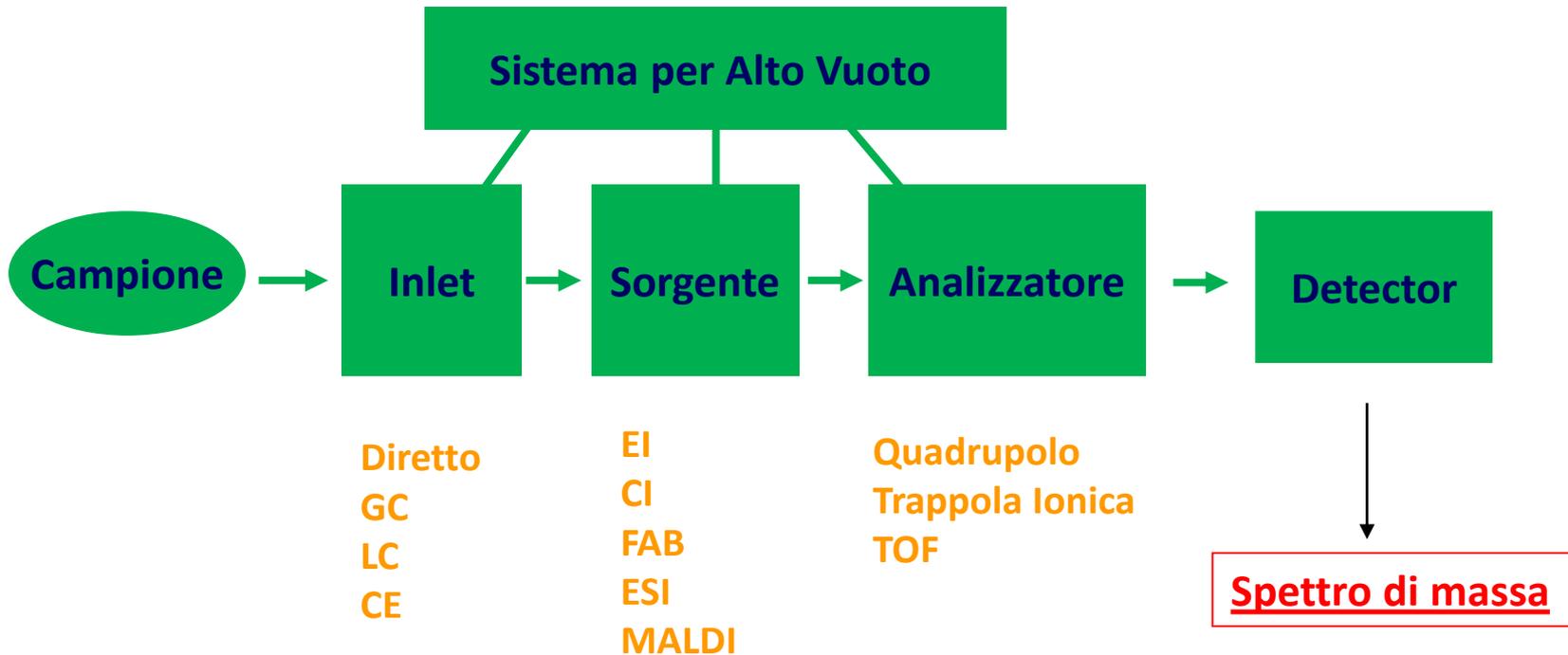
La strumentazione

Schema degli elementi che compongono uno SPETTROMETRO DI MASSA

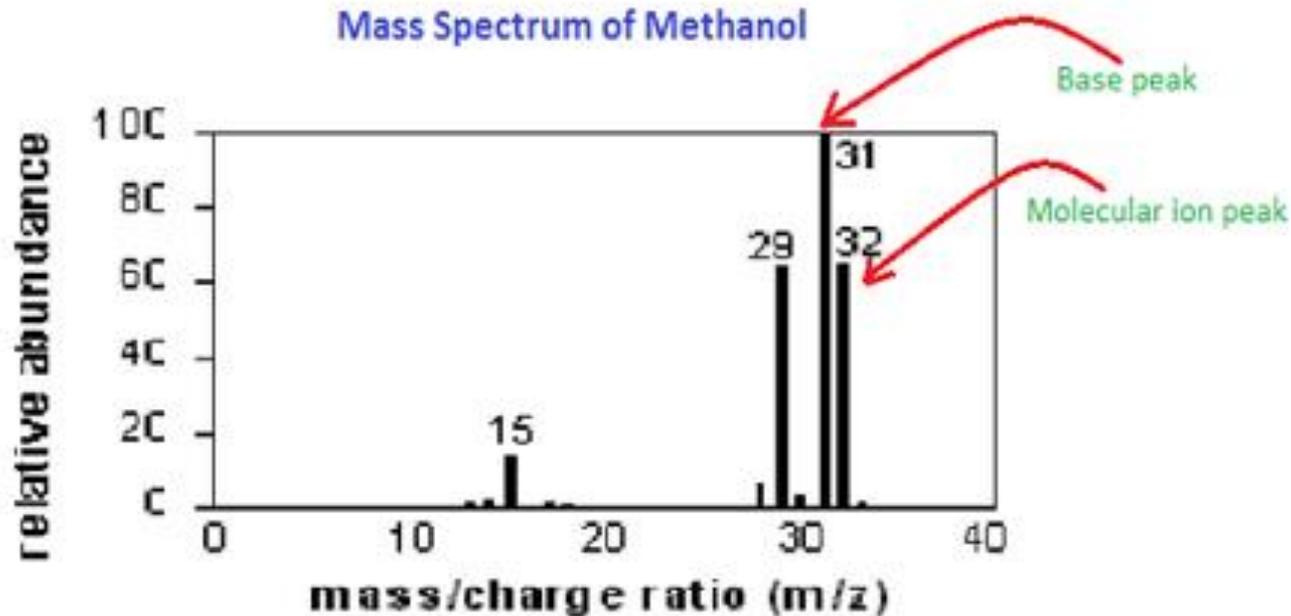


Principi generali

Schema degli elementi che compongono uno SPETTROMETRO DI MASSA



Lo spettro di massa



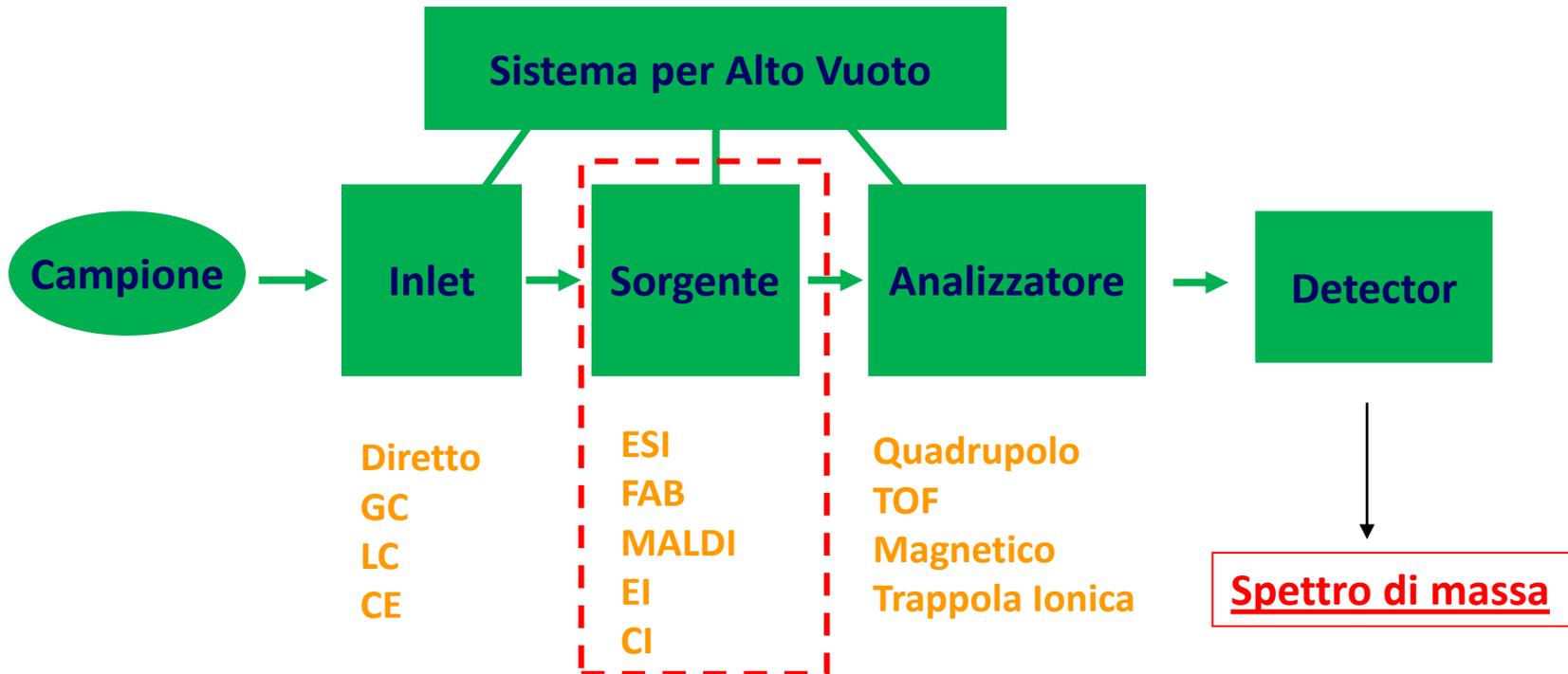
Il **picco base** è il segnale più intenso dello spettro a cui si assegna arbitrariamente il valore 100: le intensità degli altri picchi sono espresse in percentuali rispetto ad esso

Lo **ione molecolare** (che talvolta può coincidere con il **picco base**) è quello relativo alla molecola intatta ionizzata

↓
Spettro di massa

La strumentazione: le sorgenti ioniche

Schema degli elementi che compongono uno SPETTROMETRO DI MASSA



Metodi di ionizzazione

La ionizzazione che si produce nella sorgente può essere elettronica o chimica, le due tecniche storiche di ionizzazione per piccole molecole volatili e termolabili.

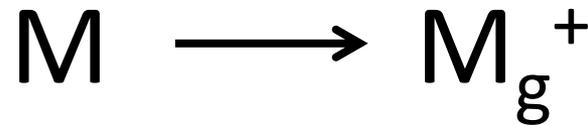
Nel caso delle proteine i metodi di ionizzazione più usati comprendono la protonazione o il bombardamento con atomi veloci (FAB) oppure i metodi di desorbimento (MALDI) che consentono di ottenere in un unico passaggio l'evaporazione e la ionizzazione dei peptidi.

Metodi di ionizzazione: classificazione

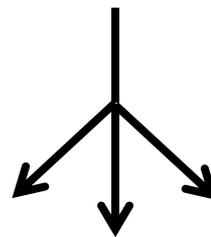
tecnica	Energie coinvolte	Metodo di volatilizzazione
Impatto elettronico (EI)	Tecnica «hard»	vaporizzazione
Ionizzazione chimica (CI)	Tecnica «soft»	vaporizzazione
Bombardamento con atomi veloci (FAB)	Tecnica «soft»	desorbimento
Ionizzazione laser assistita da matrice (MALDI)	Tecnica «soft»	desorbimento
ionizzazione per elettro-nebulizzazione (ESI)	Tecnica «soft»	nebulizzazione

- Tecniche «hard» producono estesa frammentazione delle molecole
- Tecniche «soft» consentono la determinazione del peso molecolare

Metodi di ionizzazione: classificazione



Tecniche «soft»

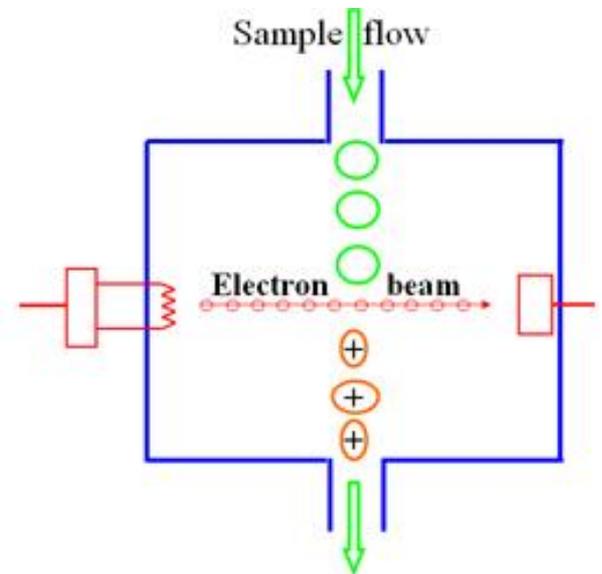


m_1 m_2 ... m_n

Tecniche «hard»

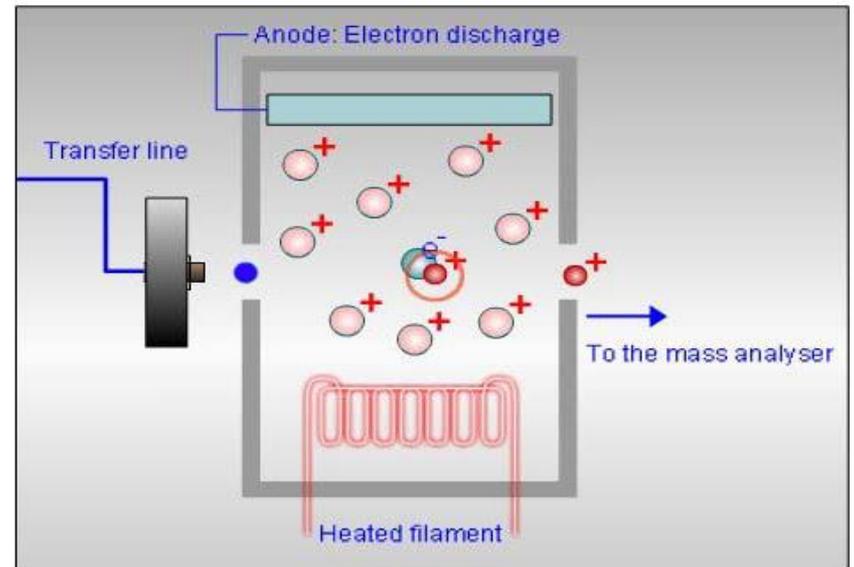
Metodi di ionizzazione: impatto elettronico (EI)

- Tecnica utile per sostanze organiche volatili e non termolabili con $PM < 600$ Da, produce estesa frammentazione delle molecole
- All'interno della sorgente EI molecole del campione da analizzare vengono bombardate da un fascio di elettroni generato con un filamento riscaldato ed accelerati da un forte potenziale (50-100eV)



Metodi di ionizzazione: ionizzazione chimica (CI)

- Tecnica utile per sostanze organiche volatili e non termolabili con $PM < 800 \text{ Da}$, è utile nella determinazione delle masse molecolari, dal momento che vengono prodotti ioni molecolari o pseudomolecolari con elevata intensità.
- La ionizzazione chimica utilizza una sorgente ad impatto elettronico nella quale è presente un gas, ad esempio metano, ad elevata pressione ($\sim 1 \text{ mbar}$)
- Il fascio di elettroni collide con le molecole di gas producendo degli ioni che provocano un processo di trasferimento di protoni all'analita



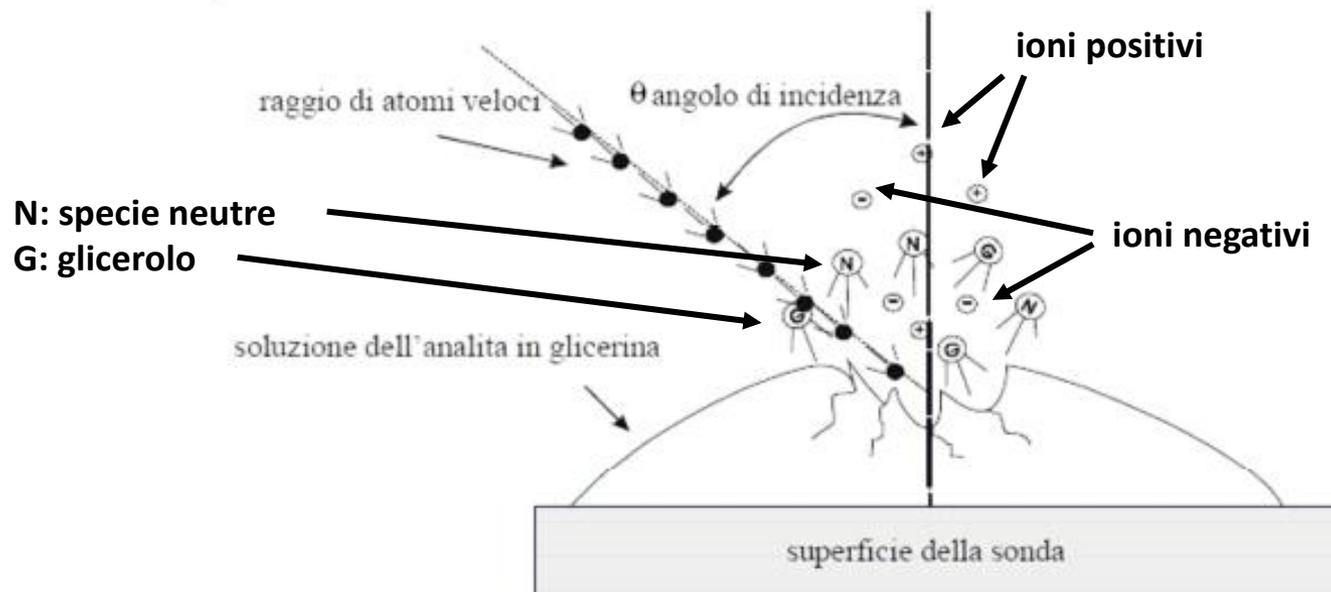
Key:	Analyte	Reagent gas
Non Ionised	●	●
Ionised	● ⁺	● ⁺

Metodi di ionizzazione: bombardamento con atomi veloci (FAB)

- **Il metodo FAB è stata la tecnica antesignana nella spettrometria di massa applicata alle proteine in quanto consente di ionizzare sostanze ad alto peso molecolare, molto polari e poco volatili per le quali non è possibile applicare le tecniche precedenti.**
- **Questa tecnica si basa sul bombardamento con atomi veloci (Xe, Ar) a differenza delle altre tecniche non utilizza elettroni e neanche una camera riempita di gas e le pressioni utilizzate sono bassissime.**
- **Il campione proteico viene introdotto nel fascio ionizzante in soluzione con una matrice liquida e viscosa e poco volatile quale glicerolo, tioglicerolo, nitrobenzil alcol oppure dietilammina.**

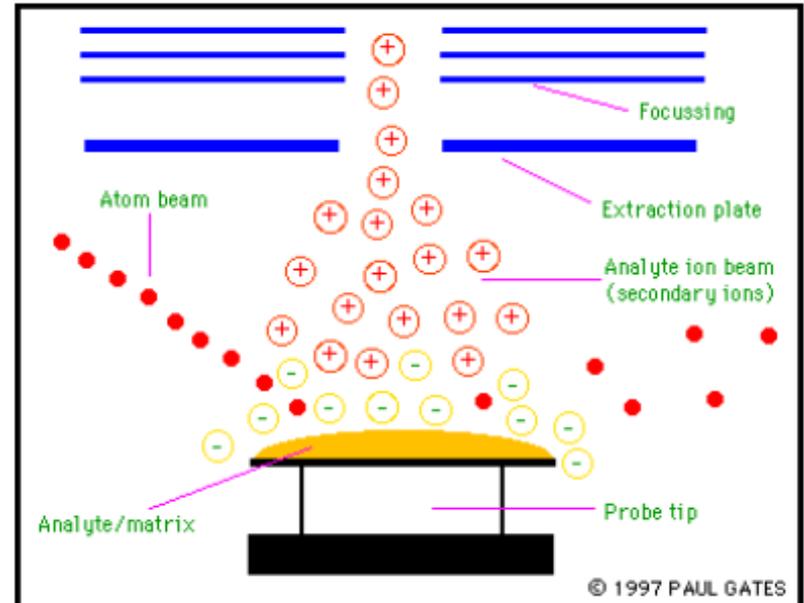
Metodi di ionizzazione: bombardamento con atomi veloci (FAB)

- La miscela liquida dell'analita con il glicerolo viene posta su di una sonda che viene introdotta nella camera della sorgente ionica
- La miscela viene bombardata con un fascio di atomi neutri (Xe, Ar) che si muovono ad alta velocità (energia cinetica dell'ordine di 8-10 KeV).
- L'impatto degli atomi sulla miscela genera un fenomeno di superficie che comporta la ionizzazione dell'analita che in tal modo si allontana dalla matrice



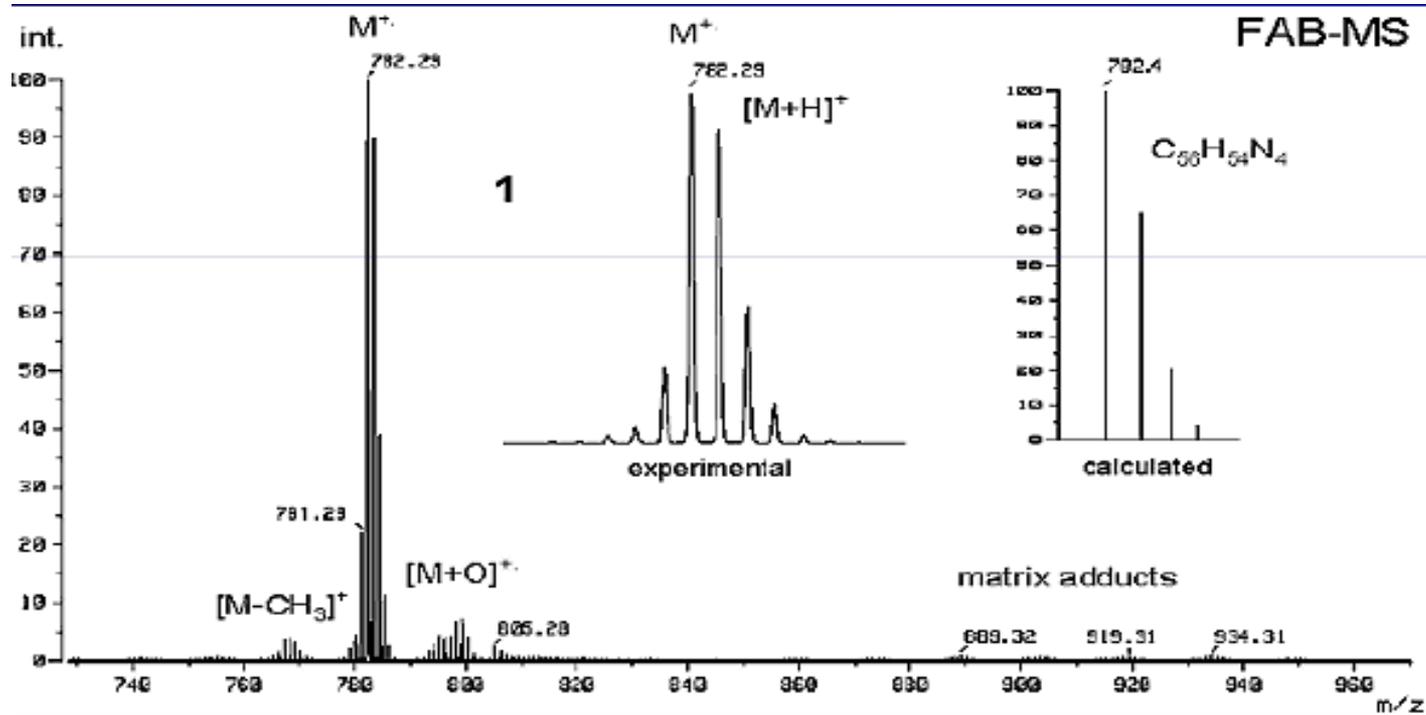
Metodi di ionizzazione: bombardamento con atomi veloci (FAB)

- La miscela bombardata dagli atomi neutri subisce un elevato innalzamento della temperatura per un intervallo di tempo periodo breve che non causa la rottura dei legami chimici, ma che è sufficiente a provocare la ionizzazione per protonazione.
- Tra i vantaggi di questa tecnica
 - ✓ gli ioni possono essere generati da campioni a T ambiente;
 - ✓ non è necessario volatilizzare i campioni.
 - ✓ possono essere prodotte, molecole, quasi molecole e frammenti (ioni + o -)
 - ✓ la sensibilità del campione è alta (min. 20 picomol)



Metodi di ionizzazione: bombardamento con atomi veloci (FAB)

Spettro FAB della trimetilporfirina

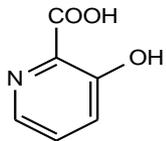


Tipicamente in uno spettro FAB troviamo:

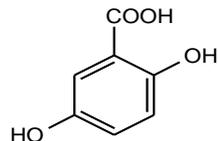
- ione molecolare M^+ e pseudo-molecolare $[M+H]^+$ sono sempre visibili
- gli ioni $[M+Na]^+$ e $[M+K]^+$
- picchi della matrice S: $[S+H]^+$, $[2S+H]^+$, $[3S+H]^+$, $[4S+H]^+$ et cetera rispettivamente a m/z pari a 93, 185, 277, 369...

Metodi di ionizzazione: MALDI

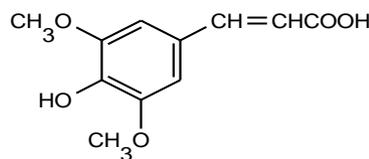
- Introdotta da Karas e Hillkamp nel 1988, è utile per determinare il PM di peptidi e di proteine ed altre biomolecole (polisaccaridi ed acidi nucleici).
- Il campione viene miscelato con matrici in grado di assorbire la radiazione UV viene deposto su di un supporto metallico sul quale cristallizza per evaporazione del solvente.
- La miscela della matrice e del campione co-cristallizzati viene irradiata con un raggio laser che permette alle molecole sulla superficie della matrice di essere proiettate ad alte velocità nell'analizzatore.



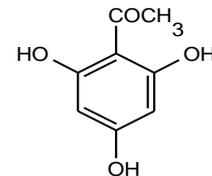
acido
3-idrossipicolinico



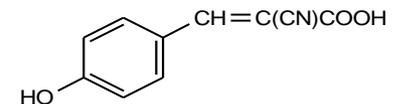
acido
2,5-diidrossibenzoico



acido sinapinico



2,4,6-triidrossi-
acetofenone

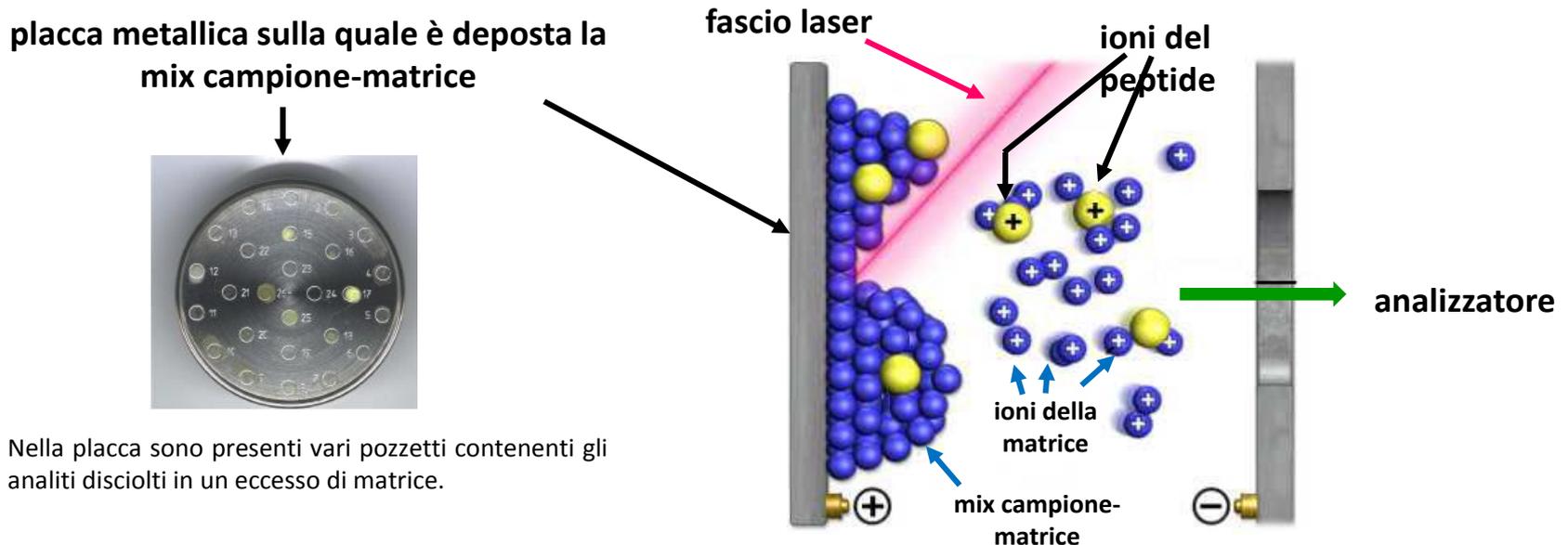


acido α -ciano-4-
idrossicinnamico

Principali matrici per MALDI

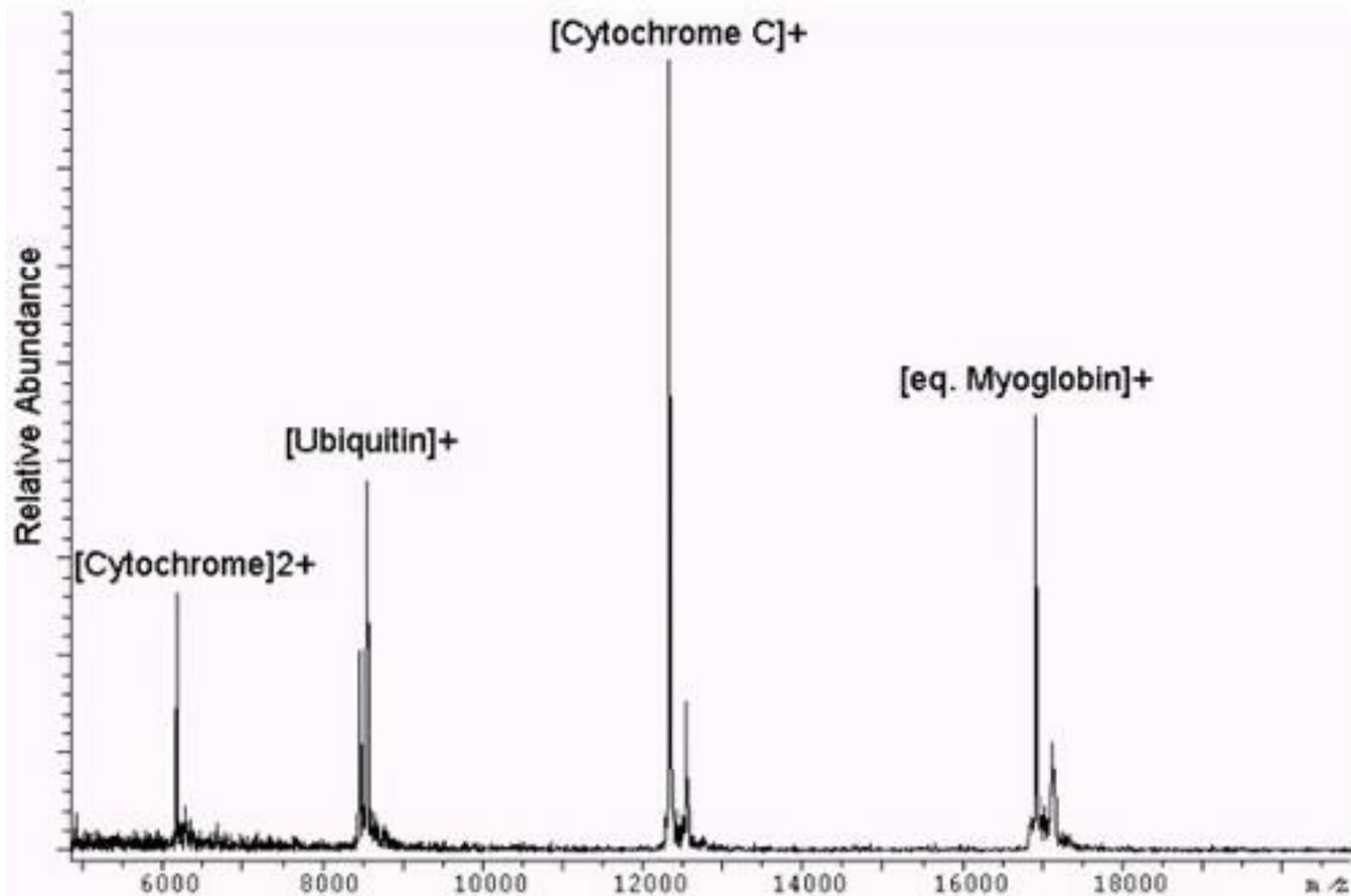
Metodi di ionizzazione: MALDI

- La miscela della matrice con l'analita posta su di una placca metallica, viene irradiata con un fascio laser sotto vuoto.
- La matrice assorbe la componente UV del laser e viene così eccitata: in tal modo si ha il desorbimento di un aggregati composti dall'analita solvatato dalle molecole di matrice.
- La desolvatazione provoca il trasferimento di un protone per reazione acido-base tra matrice e analita.
- La quantità rivelabile varia tra 1 e 10pmol



Metodi di ionizzazione: MALDI

Spettro MALDI di una miscela proteica

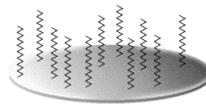


Metodi di ionizzazione: SELDI

La tecnica SELDI (Surface Enhanced Laser Desorption Ionization) è una estensione della tecnica MALDI nella quale le proteine da analizzare vengono prima separate su di una superficie opportunamente funzionalizzata e poi irradiate con laser per provocare la ionizzazione.

Il campione da analizzare viene introdotto in un chip proteico la cui superficie è funzionalizzata con opportuni gruppi funzionali: le proteine e peptidi si separano dalla miscela legandosi, in base alle proprie caratteristiche biochimiche, in modo specifico ai gruppi funzionali legati sulla superficie del chip.

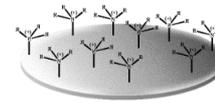
Superfici chimiche



(Hydrophobic)



(Anionic)

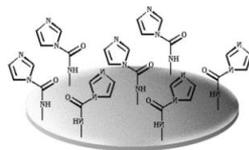


(Cationic)

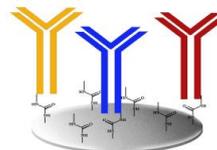


(Metal Ion)

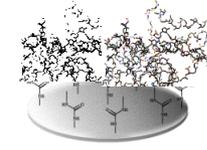
Superfici biologiche



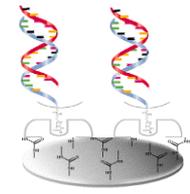
Carbonyldiimidazole



(Antibody - Antigen)



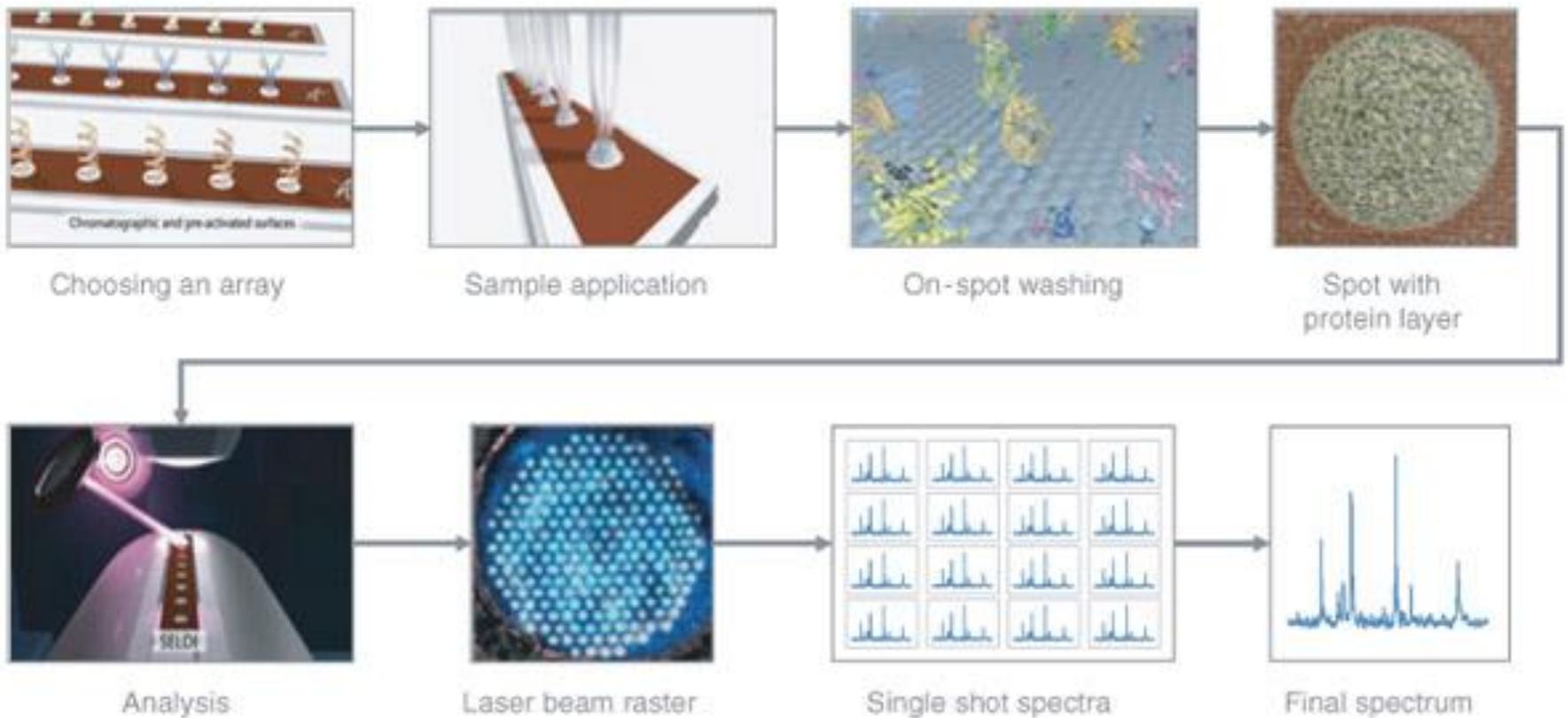
(Receptor - Ligand)



(DNA - Protein)

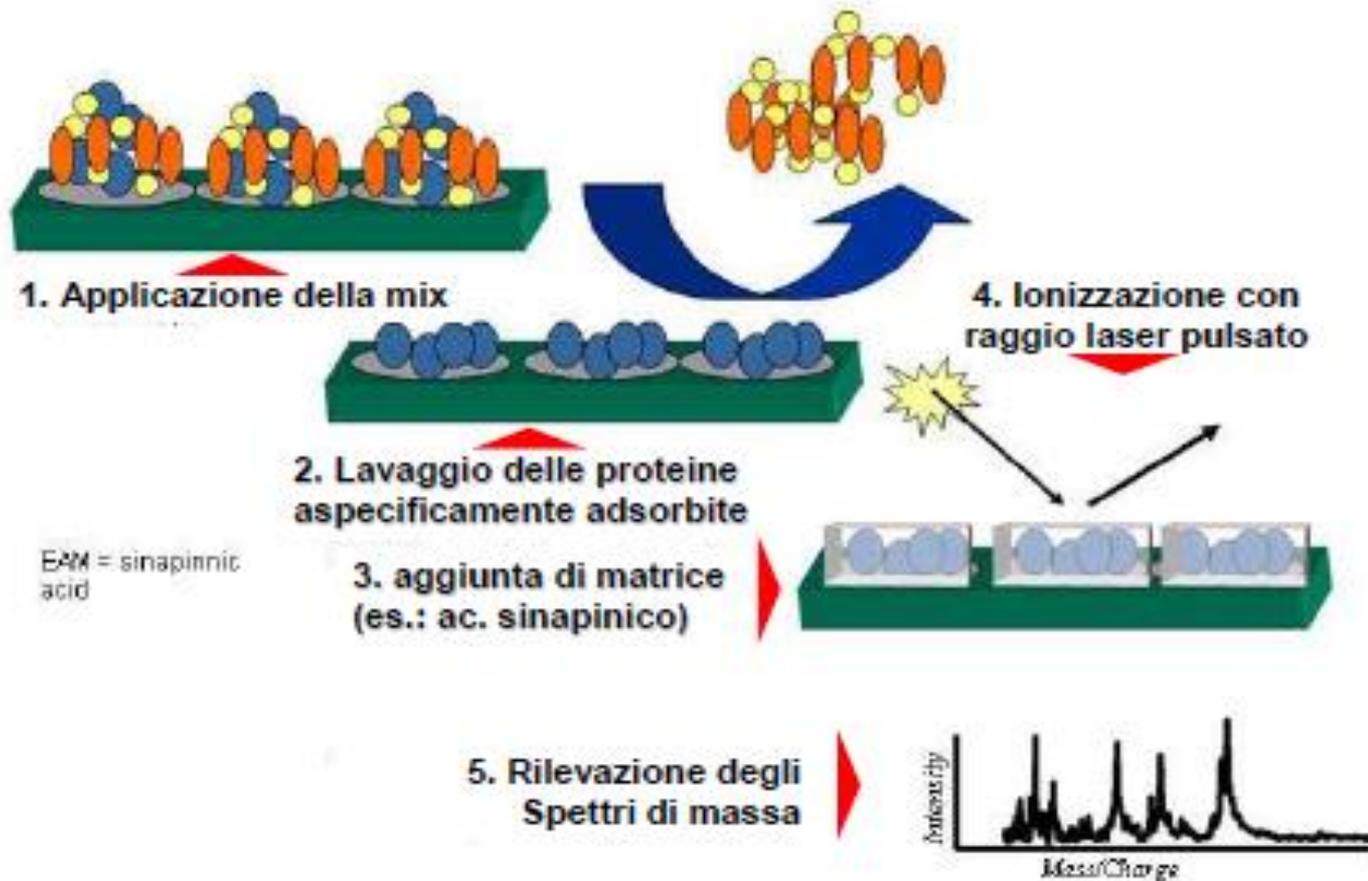
Metodi di ionizzazione: SELDI

Rappresentazione schematica di un esperimento SELDI



Metodi di ionizzazione: SELDI

Rappresentazione schematica di un esperimento SELDI



Metodi di ionizzazione: elettrospray (ESI)

Tecnica ideale per macromolecole polari, consente di studiare proteine in un range di massa compreso fra 10^2 e 10^6 Da.

Possiede una elevata sensibilità e non presenta interferenze dovuta alle matrici.

Non comporta frammentazione delle proteine nella sorgente ionica e può essere accoppiata a strumenti quali HPLC per la risoluzione di miscele complesse.

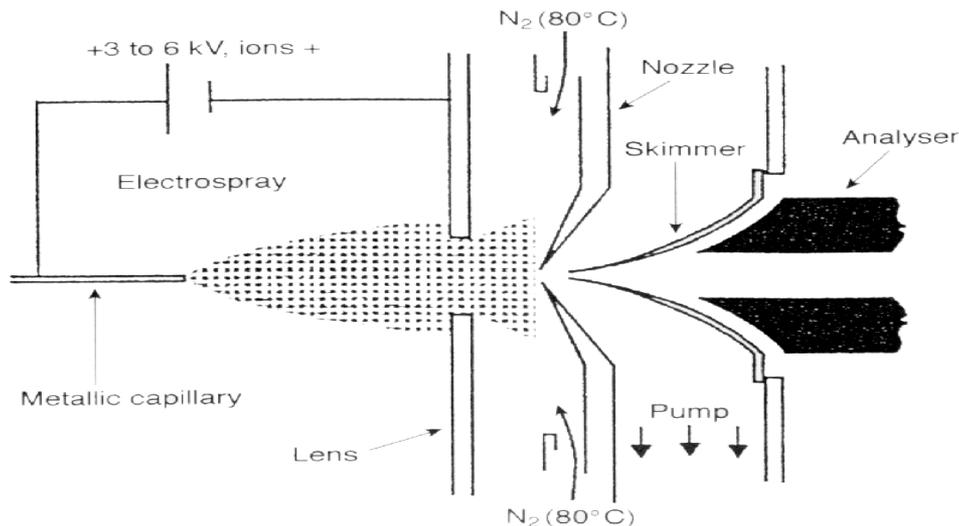
Provoca la formazione di ioni multicarica che consentono di aumentare il limite massimo di PM misurabile.

Metodi di ionizzazione: elettrospray (ESI)

Le sostanze vengono ionizzate a pressione atmosferica ed in soluzione con tracce di un acido volatile (acido metanoico o trifluoroacetico)

La soluzione contenente l'analita, trasportato da un flusso di 1-2 $\mu\text{l}/\text{min}$ di solvente, emerge da un capillare di acciaio di diametro interno 75-100 μm .

Tra il capillare ed il controelettrodo viene generata una differenza di potenziale di 3-5 KeV.

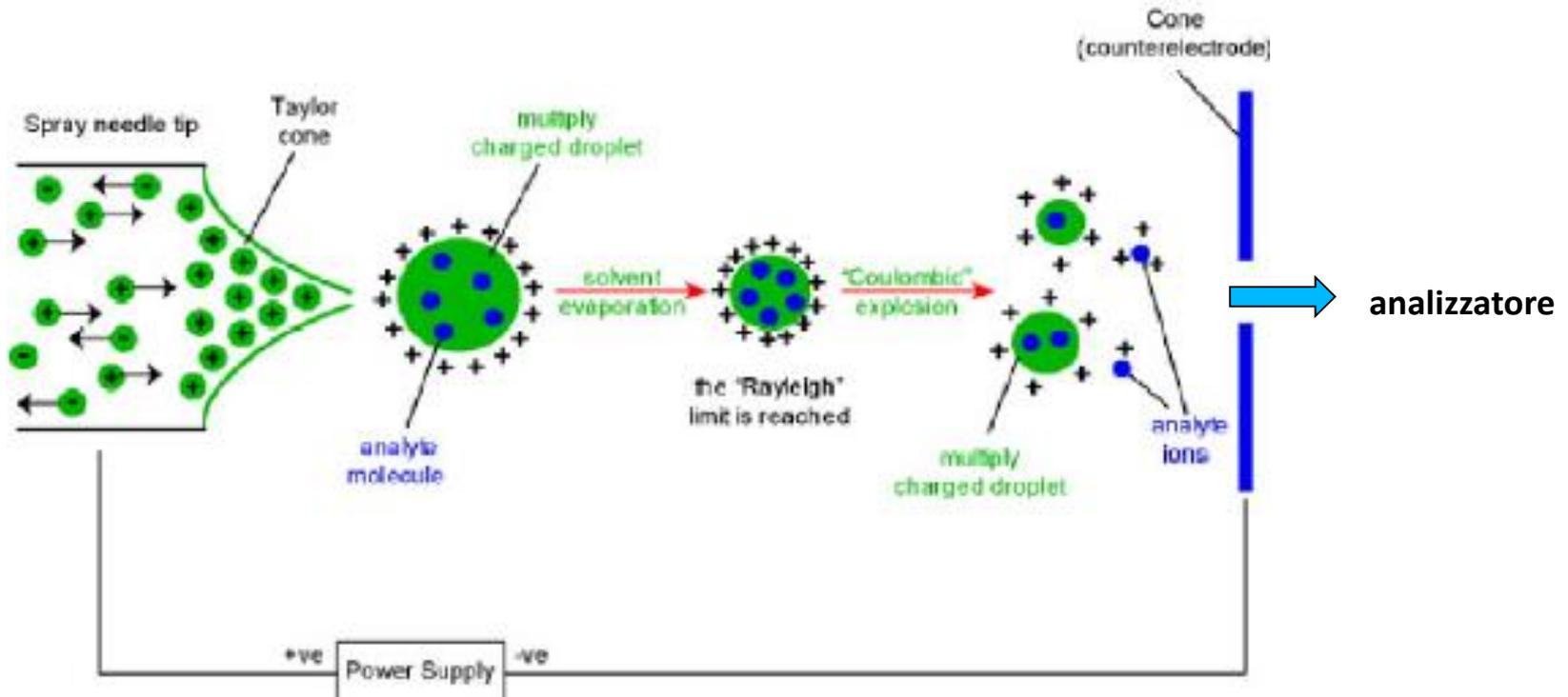


Un flusso coassiale di gas inerte (azoto) produce la formazione di un aerosol di analita misto al solvente all'uscita del capillare metallico.

Le goccioline che compongono l'aerosol sono protonate e man mano che il solvente evapora diminuiscono di dimensione.

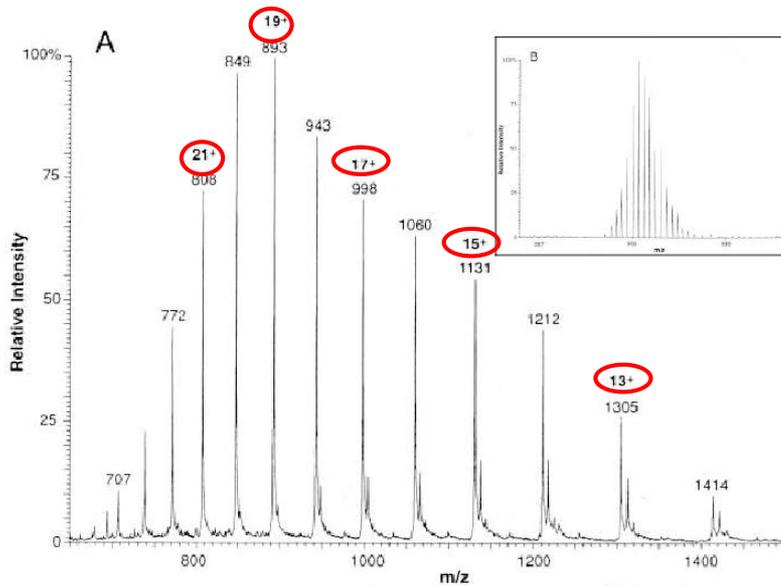
Metodi di ionizzazione: elettrospray (ESI)

Man mano che il solvente contenuto nelle goccioline evapora, queste si rimpiccioliscono fino a che la repulsione elettrica, aumentata a causa della forte densità elettrica, supera la tensione superficiale della goccia; a questo punto la gocciolina “scoppia”, creando una corrente di ioni nudi che vengono poi indirizzati da un gradiente di campo verso l’analizzatore.

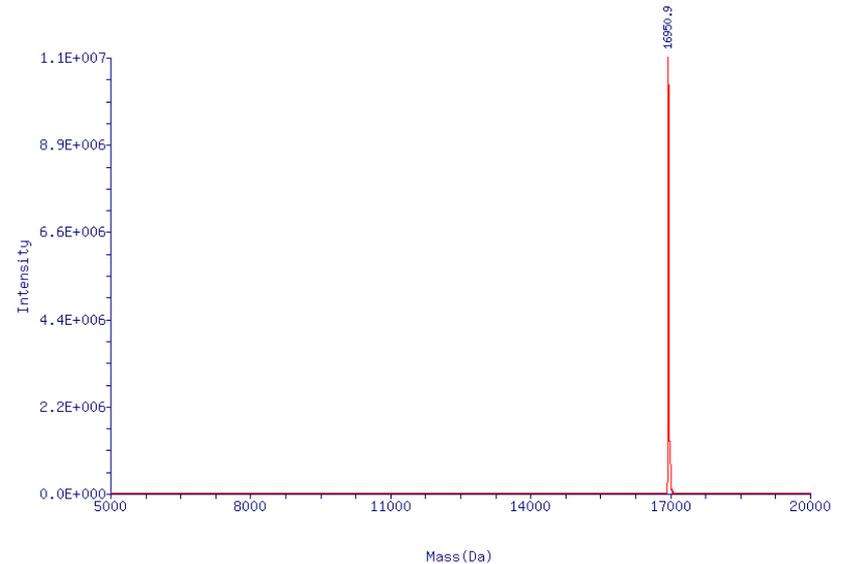


Metodi di ionizzazione: elettrospray (ESI)

Una caratteristica peculiare di questa tecnica di ionizzazione è di essere capace di provocare la formazione di **specie multicarica**.



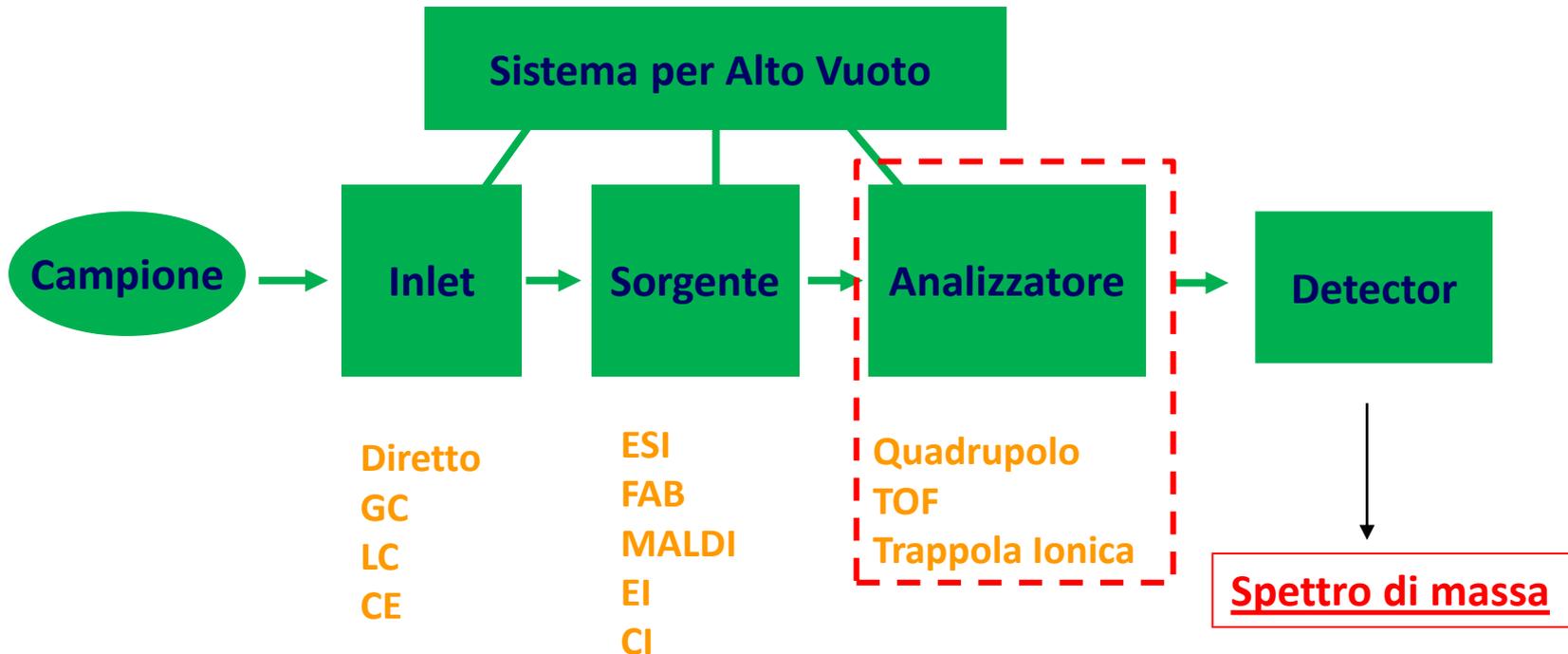
Spettro ESI della mioglobina da cuore di cavallo (PM: 16950.7) con **specie multicarica**.



Spettro **deconvoluto** della mioglobina da cuore di cavallo

Principi generali

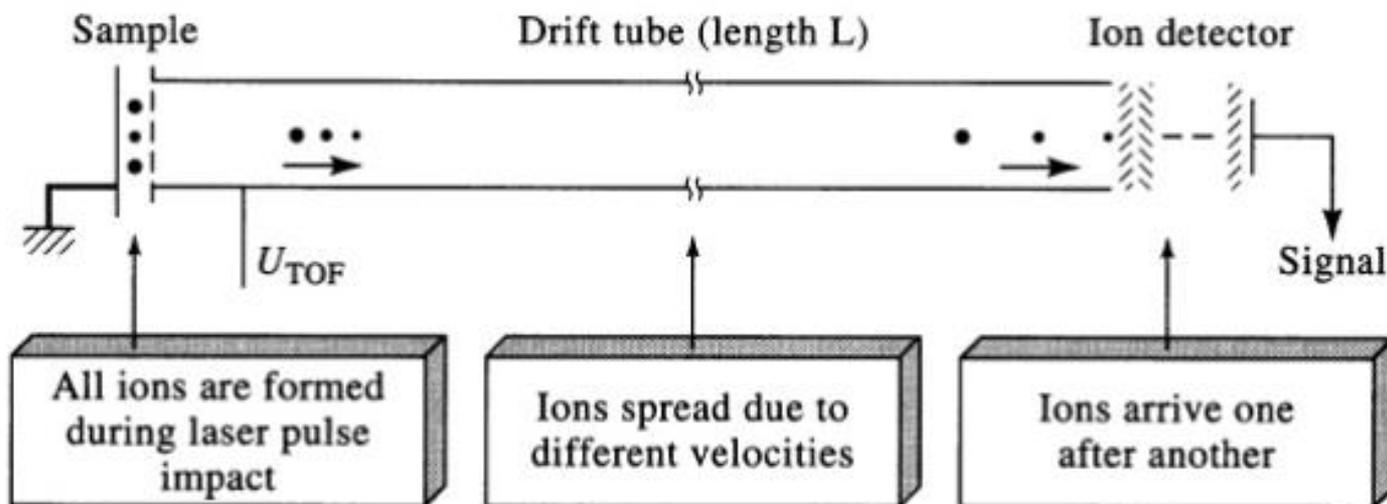
Schema degli elementi che compongono uno SPETTROMETRO DI MASSA



Gli analizzatori: analizzatore a tempo di volo lineare (Time Of Flight, TOF)

L'analizzatore a tempo di volo separa gli ioni sfruttando le differenze nel tempo che essi impiegano a transitare all'interno di un tubo lineare (drift tube) posto all'uscita della camera di ionizzazione e nel quale è stato generato il vuoto.

Tra la camera di ionizzazione ed il tubo è posta un'area che accelera gli ioni grazie ad un campo elettrico: gli ioni sono dotati tutti della stessa energia cinetica ($E = \frac{1}{2} mv^2$) pertanto quelli più leggeri si muoveranno più velocemente all'interno del tubo e raggiungeranno il detector prima di quelli più pesanti.

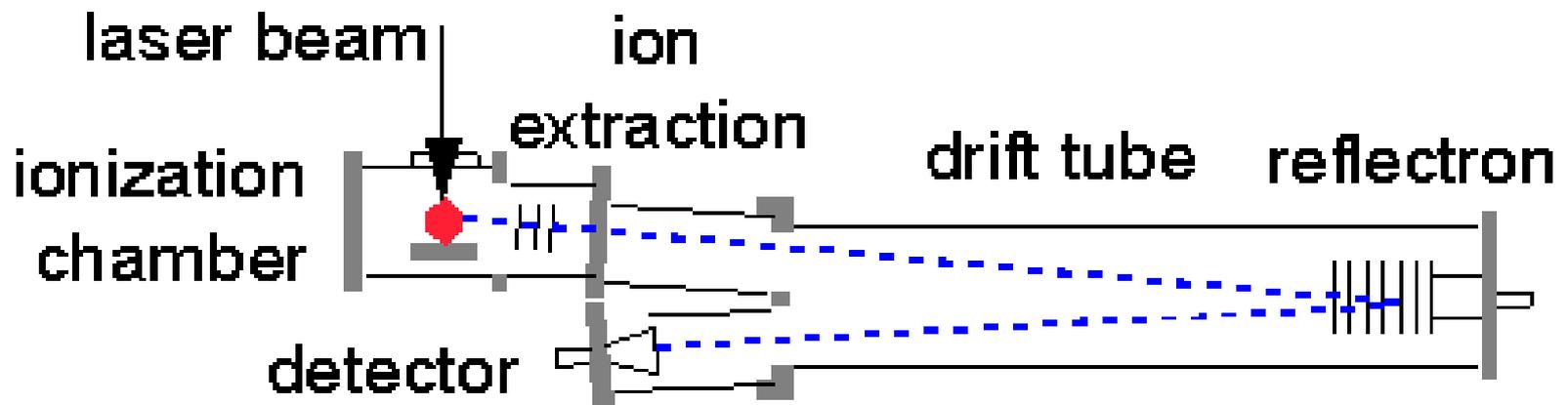


Gli analizzatori: analizzatore a tempo di volo reflectron (Time Of Flight, TOF)

L'analizzatore a tempo di volo reflectron separa gli ioni con maggior risoluzione rispetto al semplice TOF lineare in quanto consente di abbattere le piccole differenze di energia cinetica tra particelle che hanno lo stesso rapporto z/m .

Il reflectron ritarda gli ioni a energia cinetica maggiore (che percorrono una traiettoria più lunga al suo interno) e li fa arrivare al detector insieme a quelli ad energia cinetica minore.

In tal modo quando un pacchetto di ioni che presentano uno stesso valore di z/m ma energie cinetiche diverse, impatta sul riflettore si verificherà una diminuzione nella distribuzione delle energie cinetiche e quindi aumenterà la risoluzione dello spettro (PM fino a 10^4).



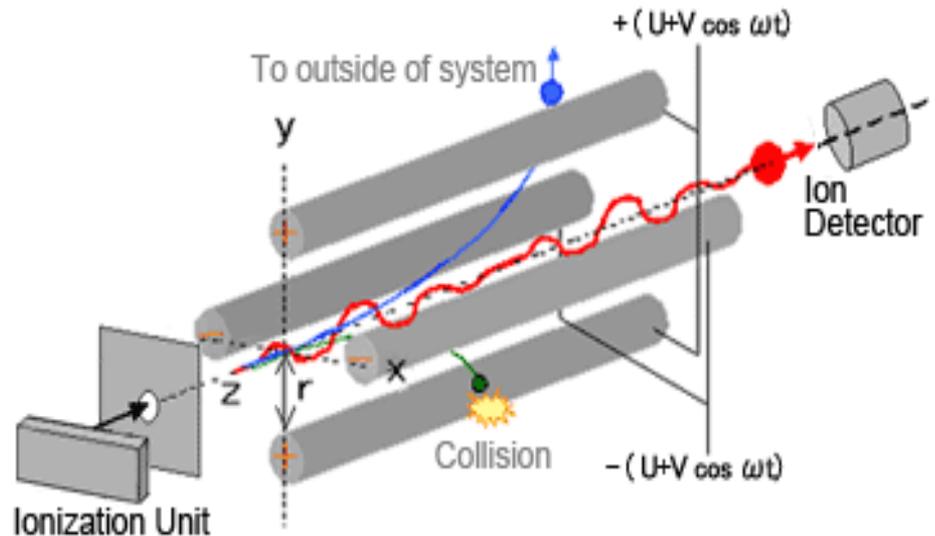
Gli analizzatori: il quadrupolo (Q)

Il quadrupolo è costituito da quattro barre cilindriche di acciaio disposte parallelamente: tra le coppie opposte viene applicato un voltaggio oscillante ed uno costante .

I potenziali applicati alle coppie di barre opposte variano sinusoidalmente nel tempo così che la traiettoria degli ioni che attraversano il quadrupolo, sottoposti a forze che variano con legge sinusoidale, percorrono traiettorie complesse dipendenti dal loro rapporto m/z .

Gli ioni accelerati dal campo elettrico nella sorgente vengono “sparati” all’interno del quadrupolo analizzatore.

Nel loro percorso all’interno del quadrupolo gli ioni vengono separati sfruttando la deflessione della traiettoria indotta dal campo elettrico: solo le particelle con il «giusto» rapporto m/z fuoriescono dal quadrupolo e vanno all’analizzatore.



La risoluzione di questo analizzatore è nel range di PM da 5000 fino a 10^4 .

Gli analizzatori: la trappola ionica (Ion Trap)

La trappola ionica è costituita da tre elettrodi tra i quali sono applicati analogamente al quadrupolo, un voltaggio costante ed uno oscillante.

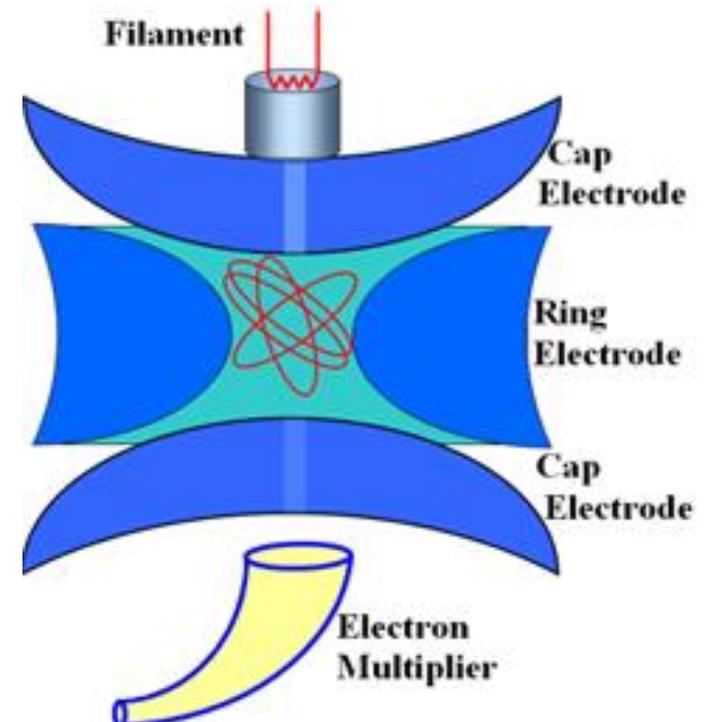
Due elettrodi semisferici (edncaps) circondano il terzo di forma tubolare (ring electrode) e creano una camera all'interno della quale le particelle vengono trattenute e successivamente rilasciate in base al loro rapporto m/z .

Gli ioni vengono trasportati e «conservati» all'interno della trappola grazie a ioni di He.

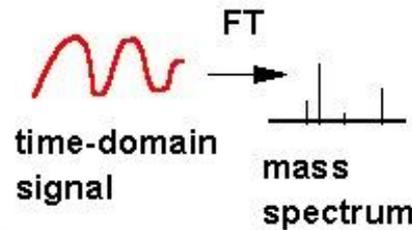
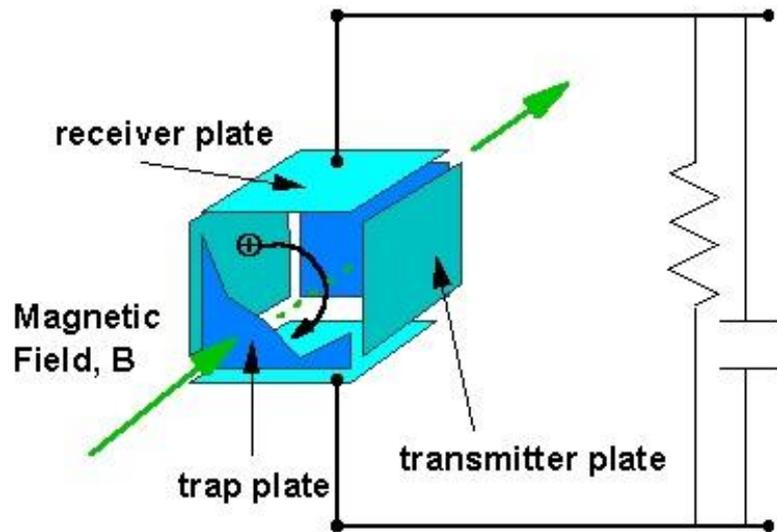
Modulando opportunamente i voltaggi è possibile aumentare l'energia cinetica degli ioni all'interno della trappola fino a provocarne la frammentazione.

La trappola consente di misurare anche il peso dei frammenti e da questi a ricavare informazioni di carattere strutturale sulle molecole ionizzate (spettrometria di massa tandem, tecniche MS/MS)

La risoluzione è nel range di PM 10^3 - 10^4 .

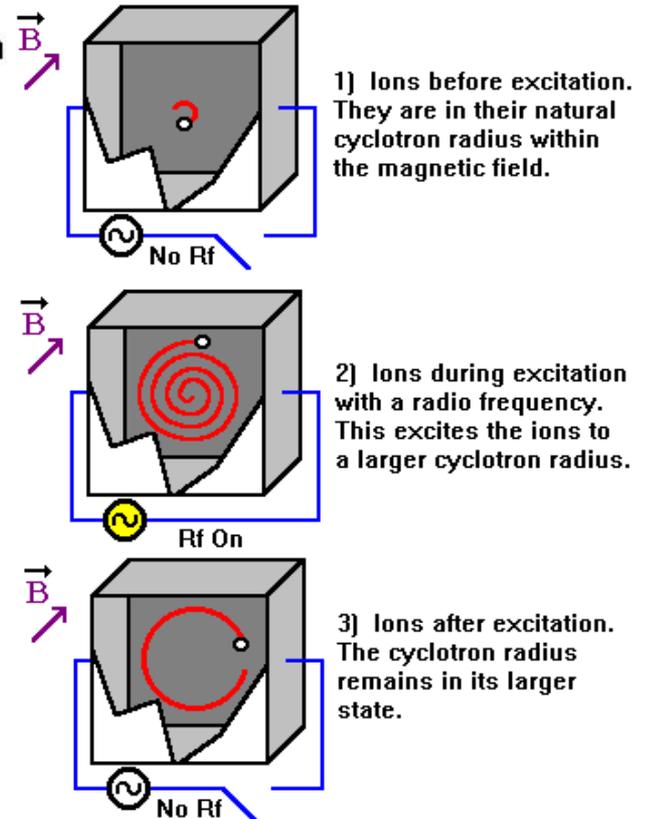


Gli analizzatori: la risonanza ciclotronica ionica (FT ICR, Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance)



Gli ioni vengono intrappolati in una cella cubica in cui per opera di un campo magnetico elevatissimo (criomagneti: 4-12 Tesla) unitamente ad un campo elettrico, assumono un'orbita elicoidale con frequenza dipendente dal rapporto m/z .

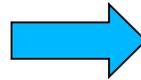
Quest'analizzatore è in questo momento al top della tecnologia, ad alta sensibilità, accuratezza e potere risolutivo elevatissimo (10^5 - 10^7).



La spettrometria di massa per l'analisi di proteine

identificazione di proteine incognite/studi strutturali

determinazione del PM



FAB, ESI, MALDI

determinazione della
sequenza amminoacidica



- Peptide Mass Fingerprint
- Spettrometria di massa tandem (MS/MS o MS²)

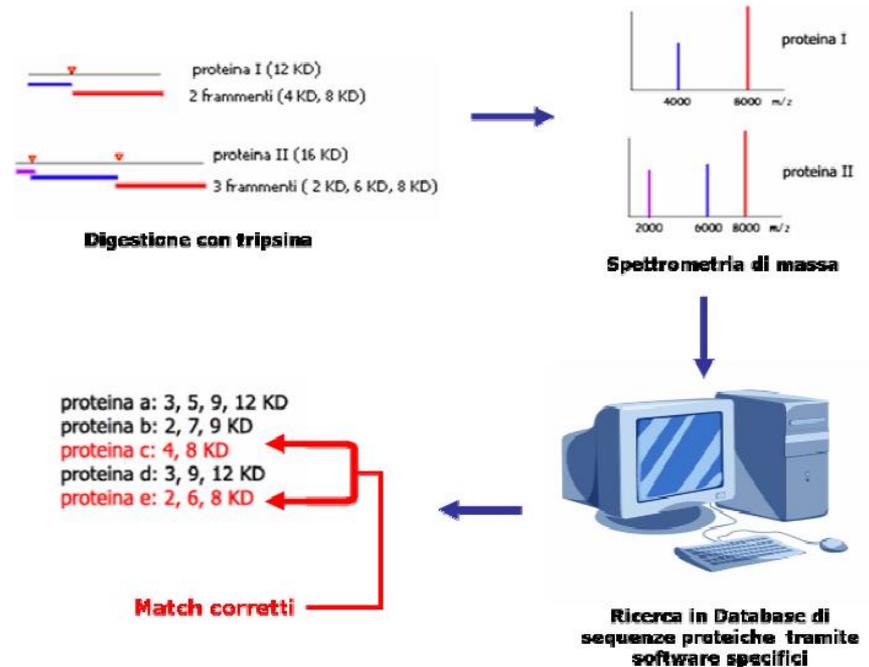
Peptide Mass Fingerprint (PMF)

Lo spettro di massa degli oligopeptidi generati da una data proteina mediante l'uso di una determinata procedura chimica o enzimatica di frammentazione.

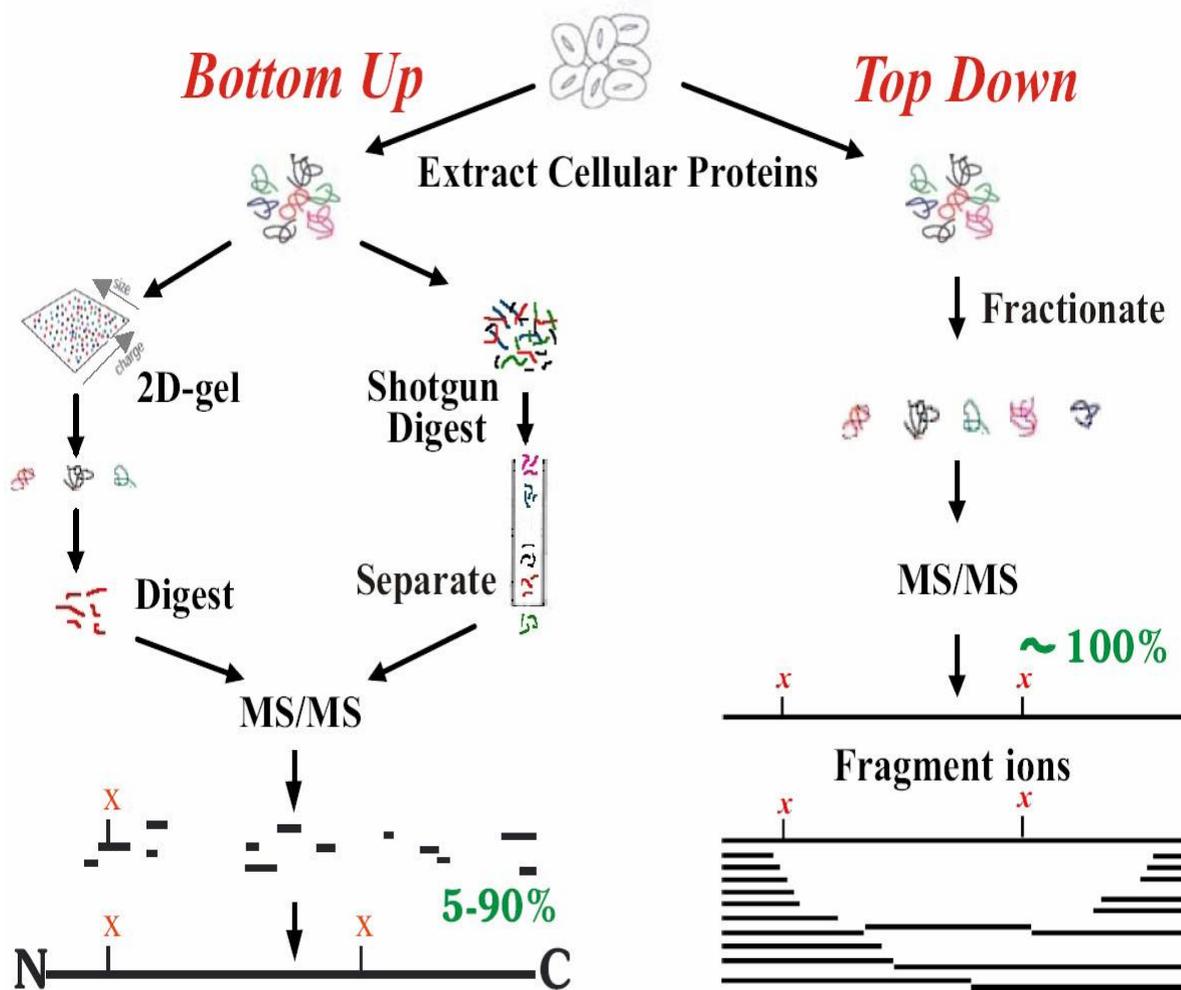
Il metodo si basa sul confronto per omologia tra i dati sperimentali (lo spettro di massa) e i dati ottenuti dalla digestione "in silico" (o virtuale) delle proteine presenti nelle banche dati disponibili in rete.

La digestione con un enzima proteolitico, nella maggior parte dei casi tripsina, va a frammentare il polipeptide o la miscela di proteine in oligopeptidi.

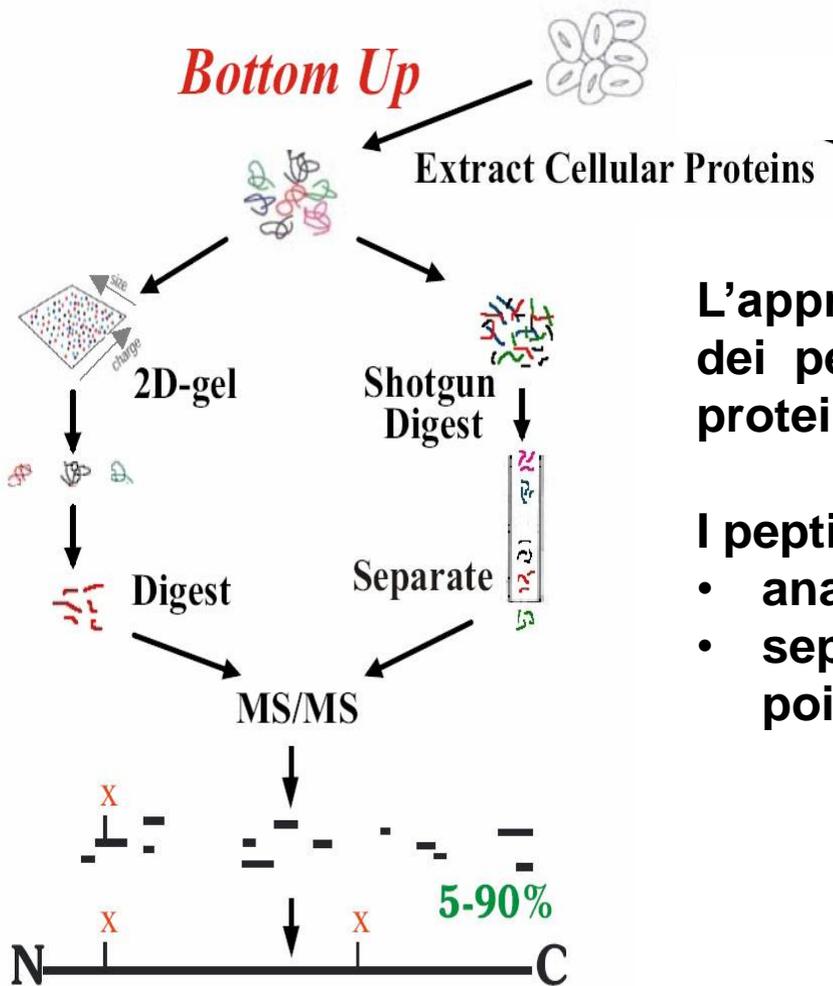
L'analisi spettrometrica dei frammenti ottenuti fornisce una misura accurata dei loro valori di massa nella forma di uno spettro di massa



La spettrometria di massa per l'analisi di proteine



La spettrometria di massa per l'analisi di proteine



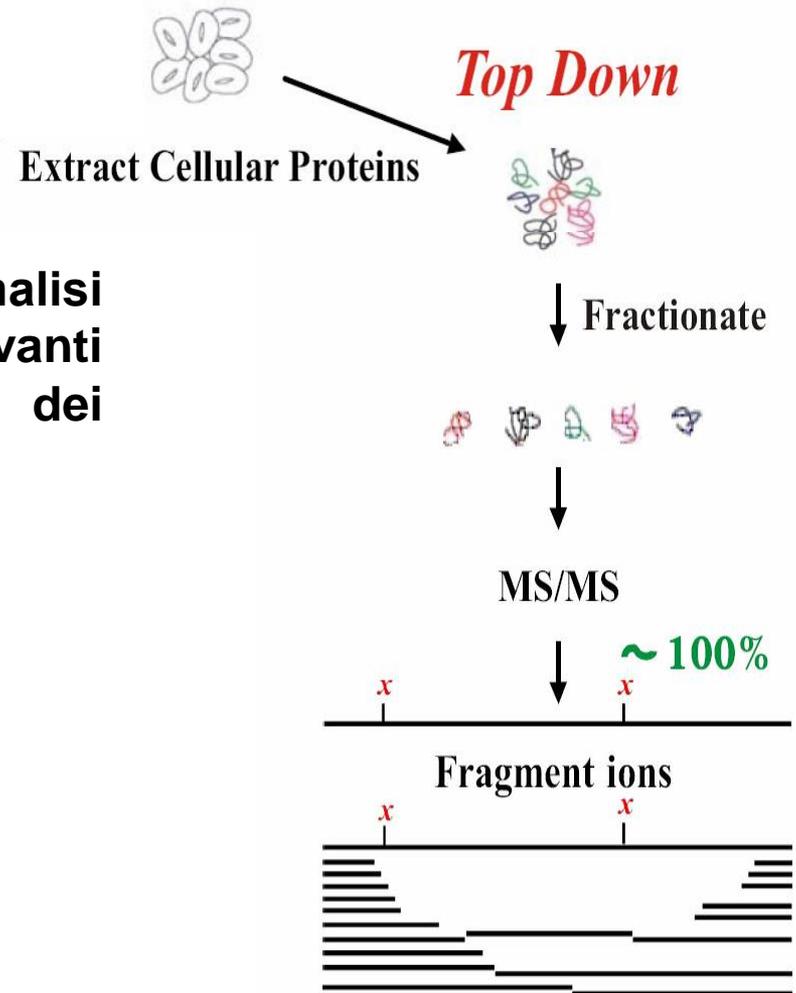
L'approccio "bottom-up" prevede l'analisi dei peptidi derivanti dalla digestione delle proteine.

I peptidi ottenuti dalla digestione sono:

- analizzati mediante spettrometria tandem
- separati mediante LC (shotgun digest) e poi identificati mediante MS/MS

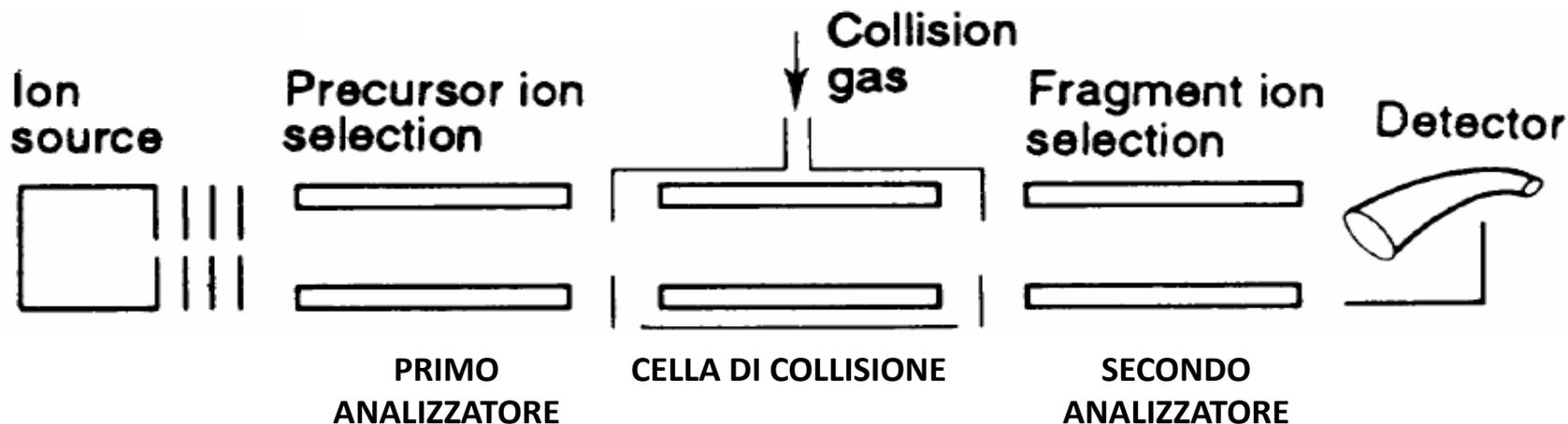
La spettrometria di massa per l'analisi di proteine

L'approccio "top down" prevede l'analisi delle proteine intatte e dei peptidi derivanti dal loro frazionamento all'interno dei spettrometri di massa tandem



La spettrometria di massa tandem

Schema di uno SPETTROMETRO DI MASSA TANDEM



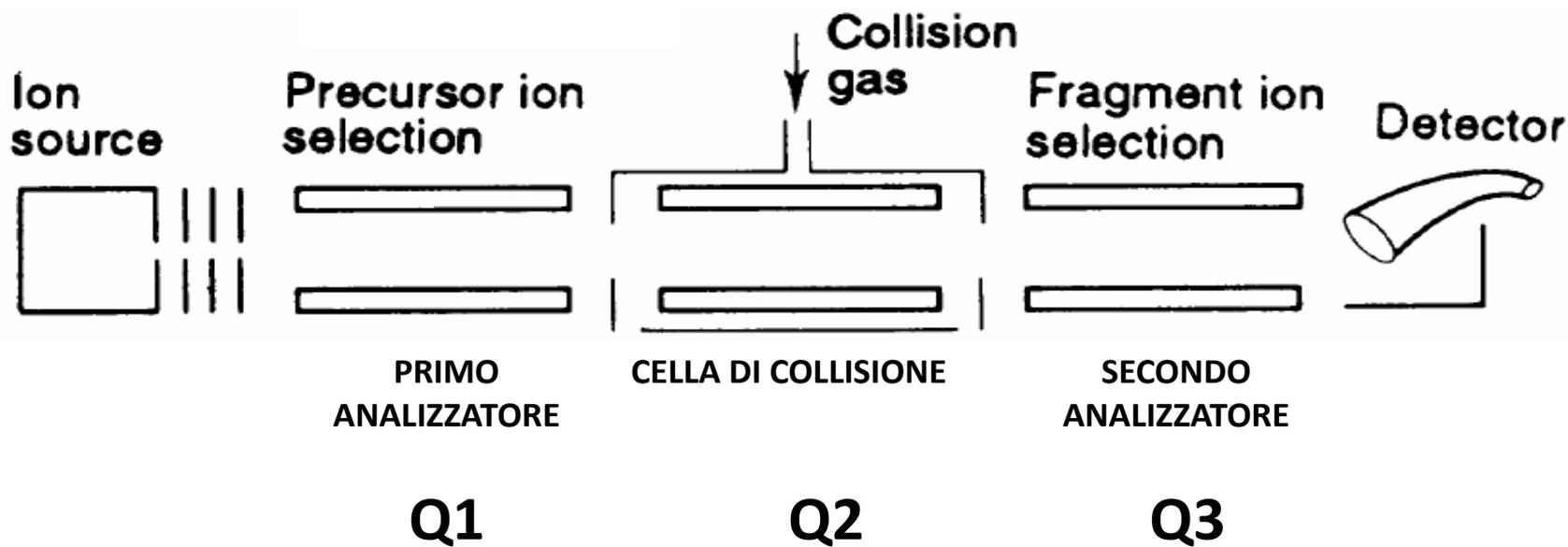
Uno spettrometro tandem è costituito da **due analizzatori disposti in serie**.

Il primo analizzatore ha la funzione di selezionare (filtrare) tra i vari ioni presenti in uno spettro lo ione desiderato.

Lo ione selezionato (ione padre o genitore) viene successivamente fatto collidere con un opportuno gas di collisione (He, Ar) in una **cella di collisione**, e i frammenti (ioni figli), generati dalla dissociazione dello ione molecolare a causa degli urti con il gas, vengono separati dal secondo analizzatore in base al loro rapporto m/z .

La spettrometria di massa tandem

Schema di uno SPETTROMETRO DI MASSA TANDEM

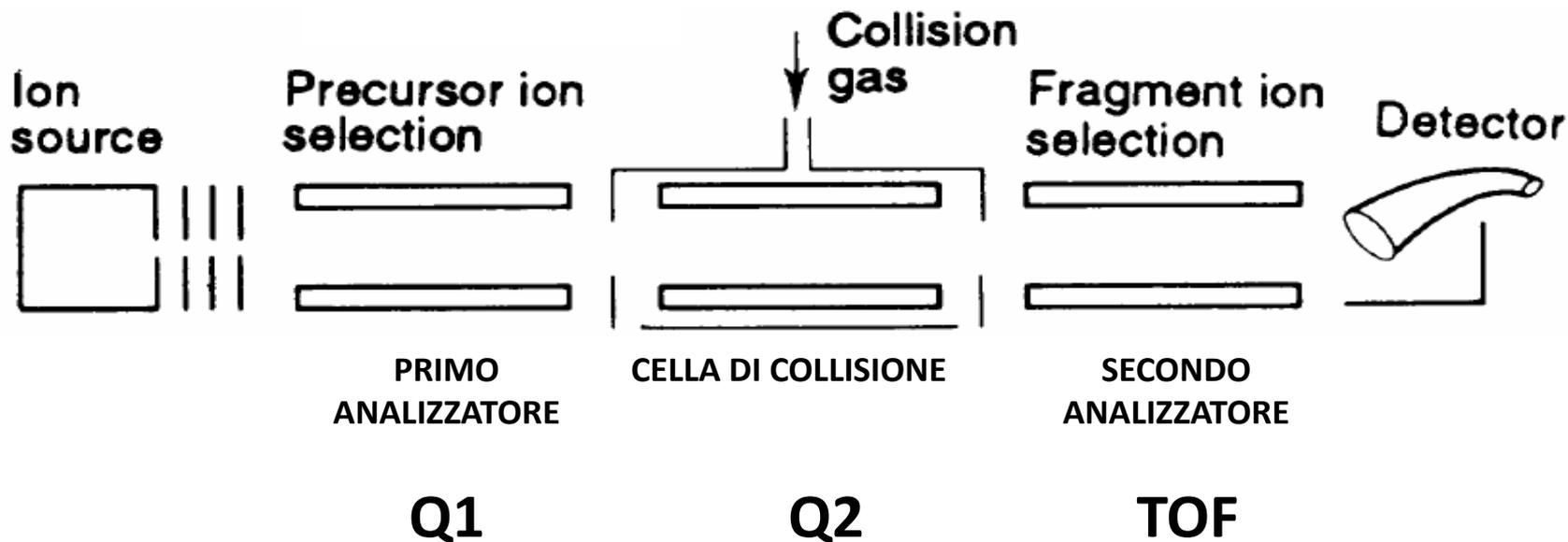


SPETTROMETRO A TRIPLO QUADRUPOLO

Progressione nello spazio: la selezione dello ione, la sua dissociazione e l'analisi dei frammenti generati avvengono in spazi diversi cioè in diversi settori dello spettrometro.

La spettrometria di massa tandem

Schema di uno SPETTROMETRO DI MASSA TANDEM

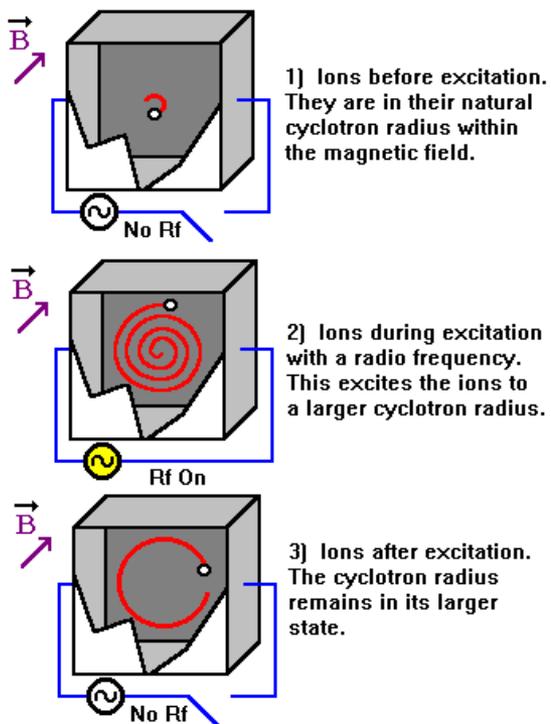


SPETTROMETRO IBRIDO QTOF

Progressione nello spazio: la selezione dello ione, la sua dissociazione e l'analisi dei frammenti generati avvengono in spazi diversi cioè in diversi settori dello spettrometro.

La spettrometria di massa tandem

Schema di uno SPETTROMETRO DI MASSA TANDEM



Mediante l'ion trap è possibile:

- isolare lo ione desiderato (espellendo gli altri dalla trappola),
- indurne la dissociazione
- analizzare i frammenti generati all'interno della stessa trappola.

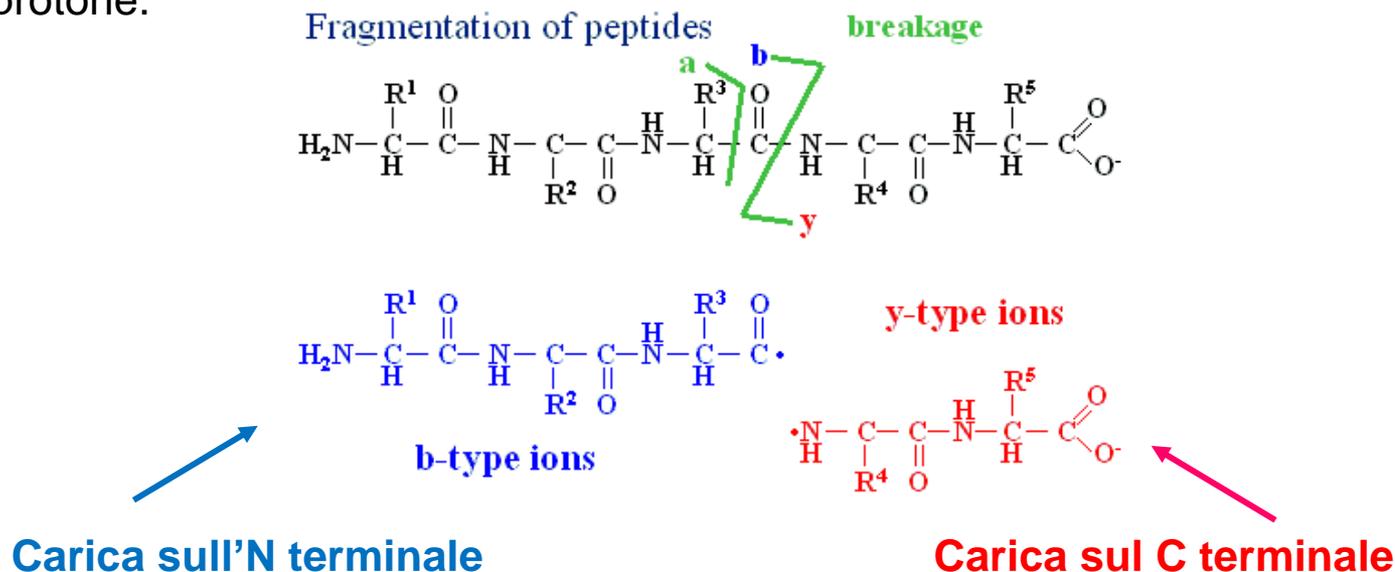
Il processo potrebbe essere ripetuto varie volte per ogni singolo frammento ottenuto: si parla in questi casi di tandem MS^n .

Progressione nel tempo: la selezione dello ione, la sua dissociazione e l'analisi dei frammenti generati avvengono in momenti diversi nello stesso settore dello spettrometro.

La spettrometria di massa tandem

Frammentazione di un peptide all'interno dello spettrometro di massa tandem

Nella camera di collisione possono essere frammentati tre diversi tipi di legame della sequenza amminoacidica: I legami **NH-CH**, **CH-CO** e **CO-NH**. Per rottura di ciascun legame si ottengono due frammenti: il primo è neutro mentre l'altro (l'unico da considerare perché rilevabile dallo spettrometro) è carico. La carica può trovarsi in uno qualsiasi dei due frammenti; quale dei due dipende dalla loro affinità relativa per il protone.



Dai risultati dell'analisi spettrometrica all'identificazione della proteina

Confronto con i dati presenti nei database di sequenze proteiche per effettuare il lavoro di identificazione delle proteine: se due proteine diverse si frammentano dando lo stesso pattern di prodotti allora sono la stessa proteina.

Esiste un'ampia varietà di software che usano un semplice schema di scoring basato sul numero di masse coincidenti quando lo spettro sperimentale viene messo a confronto con lo spettro teorico

PeptideSearch [*Mann, M., Wilm, M., Anal. Chem. 1994,66, 4390–4399*]

PepFrag [*Fenyo, D., Qin, J., Chait, B.T., Electrophoresis 1998,19, 998–1005*]

MOWSE, acronimo di **M**olecular **W**eight **S**earch [*Pappin et al. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. Curr Biol. 1993 Jun 1;3(6):327-32.*]

MASCOT, (<http://www.matrixscience.com/>).

MS Fit [*Clauser, K.R., Baker, P., Burlingame, A.L., Anal. Chem. 1999 71, 2871–2882.*]

Aldente [*Tuloup M, Hernandez C, Coro I, Hoogland C, Binz PA, Appel RD. 2003. Aldente and BioGraph: An improved peptide mass fingerprinting protein identification environment. Swiss Proteomics Society 2003 Congress [Fontis Media], 174–176, 12thFeb, 2003.*]