

Proteomika

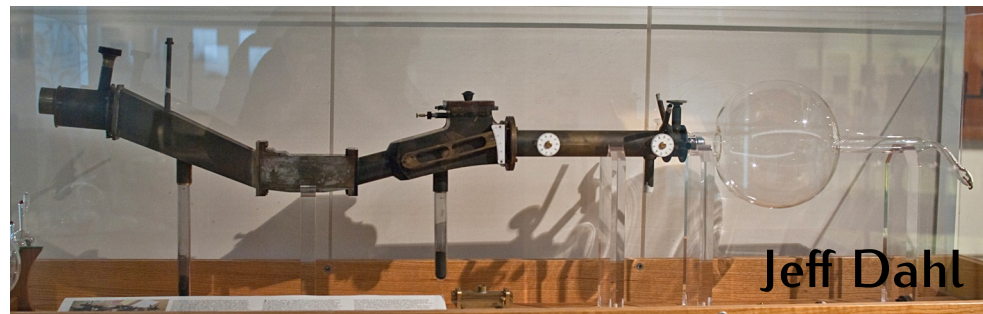
Spektrometria mas i jej zastosowanie do badań białek

Spektrometria mas (MS)

- Metoda pozwalająca na pomiar stosunku masy do ładunku jonów (m/z)
 - m/z można przeliczyć na masę
 - jednostką m/z jest Thompson (Th): $1 \text{ Th} = \text{Da}/1$
- Spektrometr mas oddziałuje z cząsteczkami przy pomocy pól elektromagnetycznych
 - pracuje na cząsteczkach obdarzonych ładunkiem — jonach

Krótką historia MS cz. 1

- J.J. Thompsona 1899 – 1911
 - 1912 widmo O_2 , N_2 , CO , CO_2 , itp.
 - 1913 izotopy ^{20}Ne , ^{22}Ne
- Dempster, Aston, Conrad, Bainbridge
 - pomiary masy atomów, źródło jonów EI, cząsteczki organiczne, pokazanie równoważności masy i energii
- 1942 pierwsza komercyjna konstrukcja
- Analizatory TOF, ICR, sektor magnetyczny i elektryczny, kwadrupol
- 1958 GC-MS
- 1966 Sekwencjonowanie peptydów



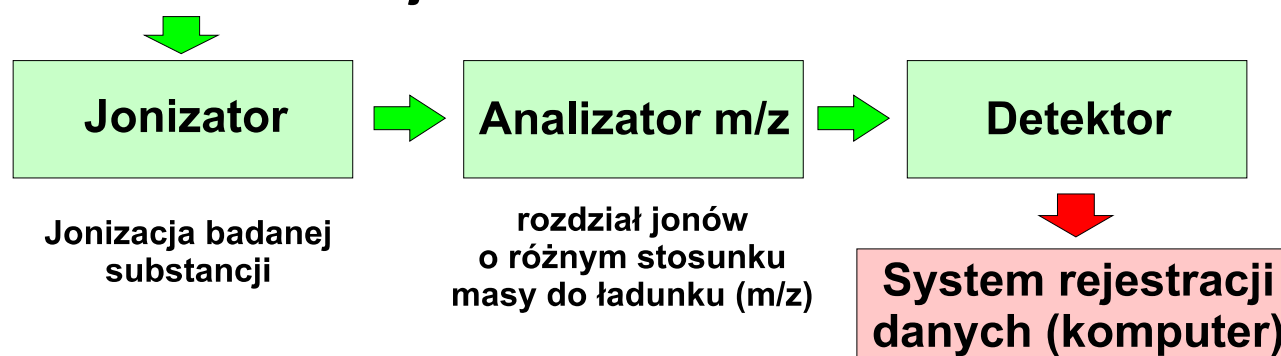
Krótką historia MS cz. 2

- 1968 Elektrozpylanie (ESI)
- 1974 FT-ICR
- 1978 Tandemowy spektrometr mas (Triple Quad)
- 1983 MALDI
- 1984 Pułapka jonowa
- 1999 Orbitrap

Działanie spektrometru mas

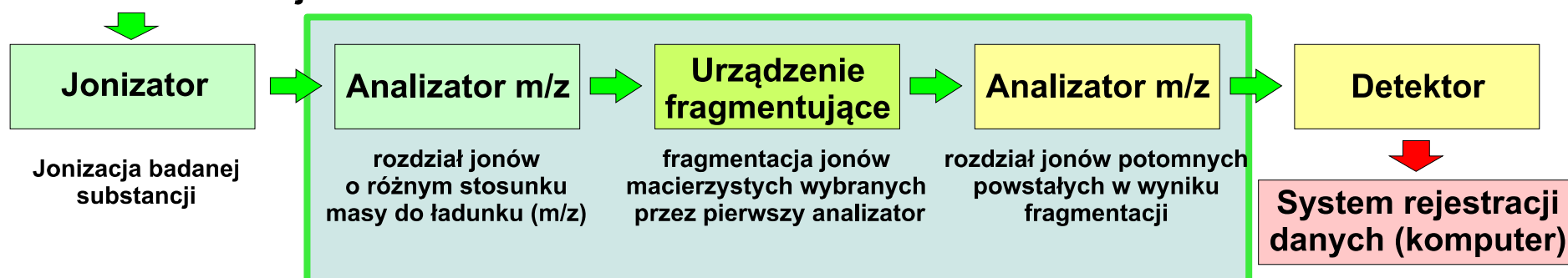
MS

Analizowana substancja



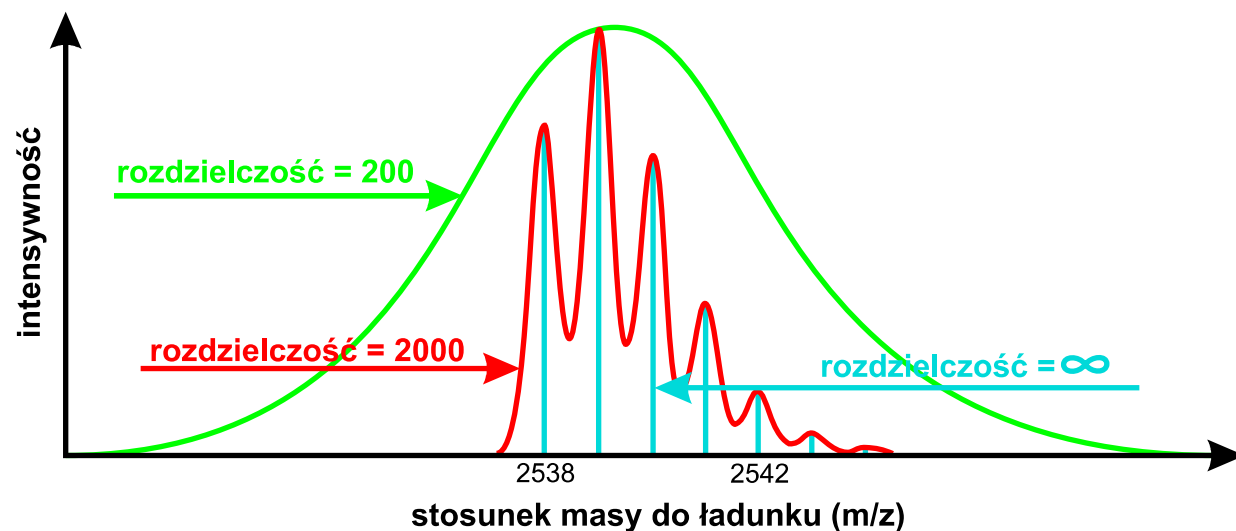
MS/MS

Analizowana substancja



Parametry spektrometru mas

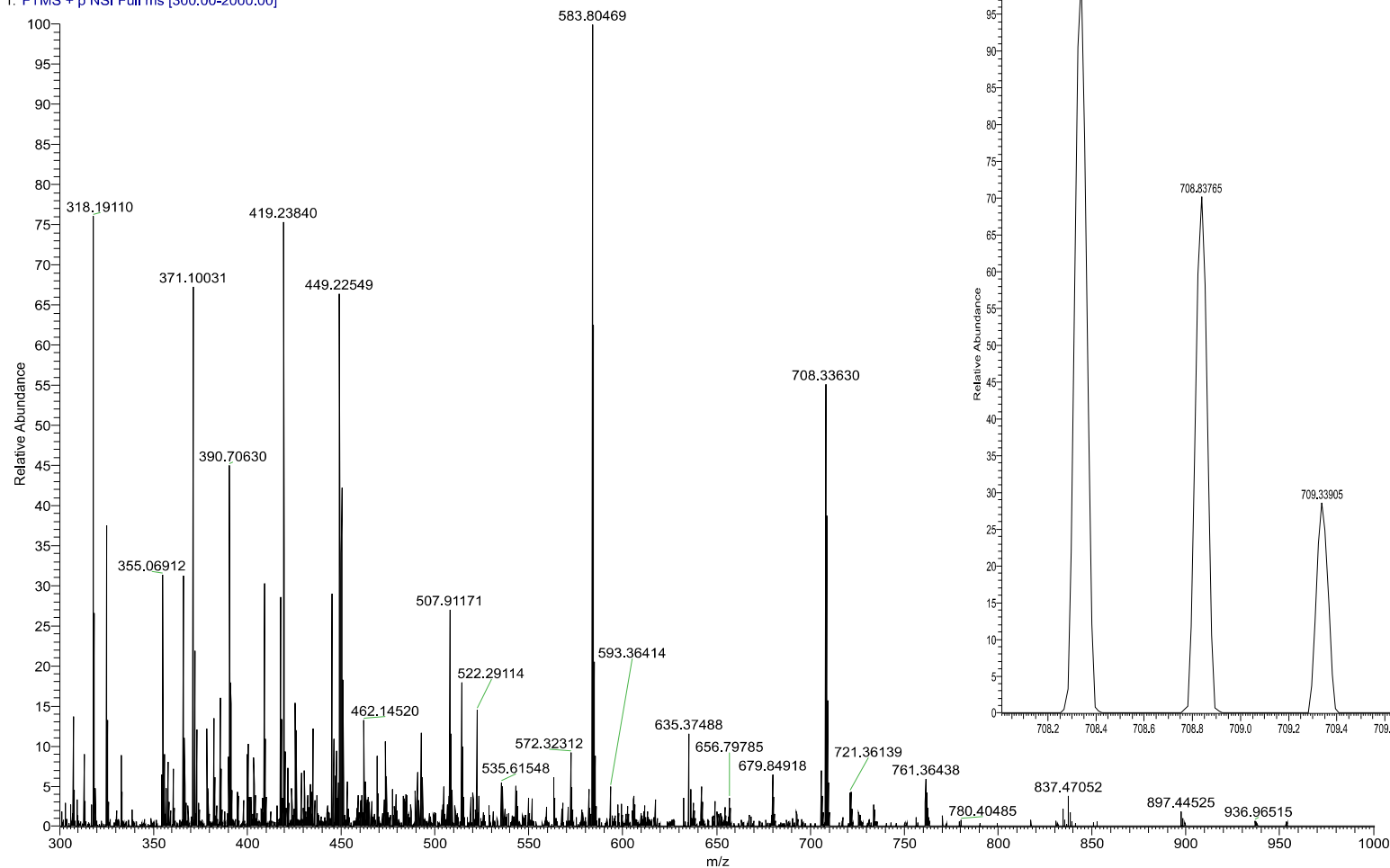
- Rozdzielczość
 - przy m/z np. 500 Th
 - dokładność [ppm]
- Zakres pomiaru m/z
- Czulość
- Zakres dynamiczny
- Szybkość
 - pomiaru MS
 - pomiaru MS/MS



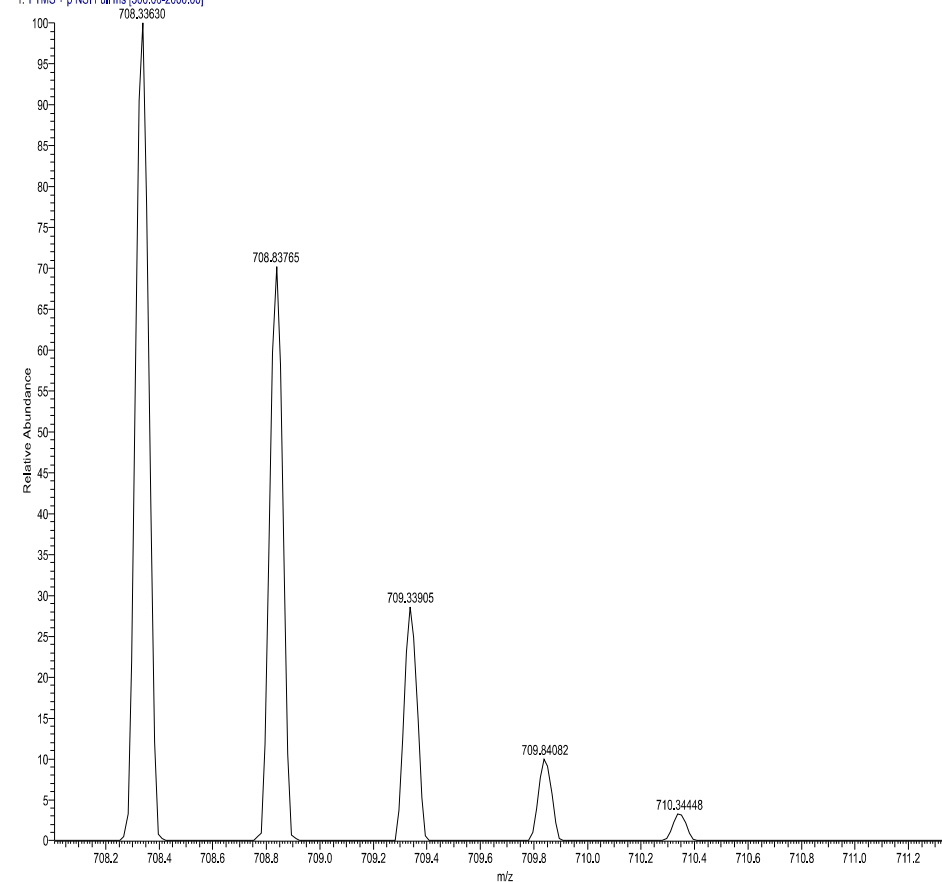
Dane rejestrowane przez spektrometr mas

- Widmo stosunku masy do ładunku (m/z)

20413mk_JkkC_tr02p130412_0ul5_S #7599 RT: 57.18 AV: 1 NL: 3.79E6
T: FTMS + p NSI Full ms [300.00-2000.00]



20413mk_JkkC_tr02p130412_0ul5_S #7599 RT: 57.18 AV: 1 NL: 2.09E6
T: FTMS + p NSI Full ms [300.00-2000.00]



Rozkład izotopowy

- Izotopy pierwiastków
 - więcej cięższych izotopów w dużej cząsteczce

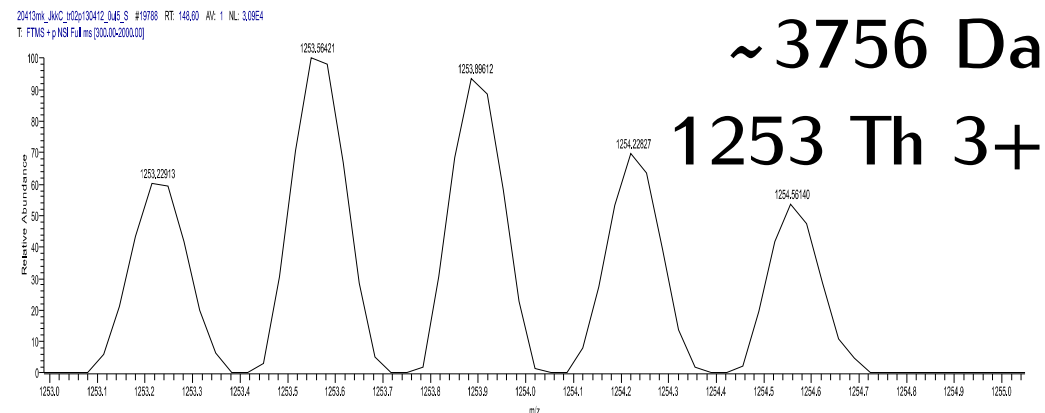
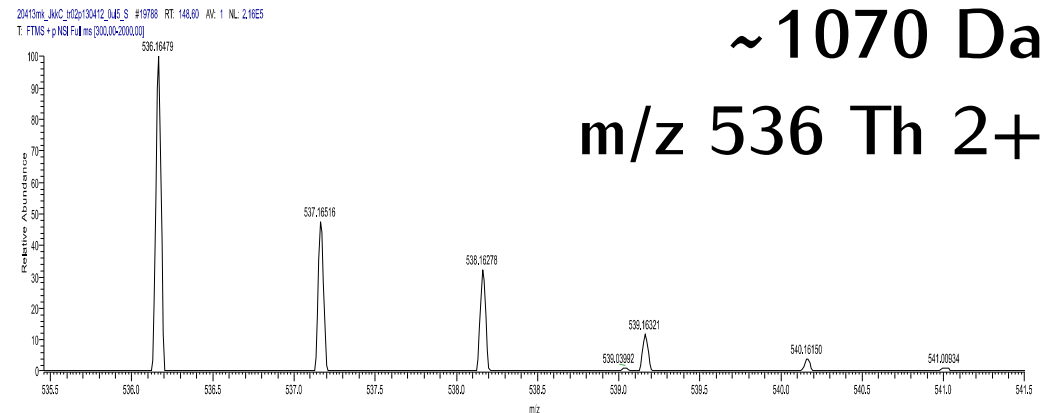
- Obliczanie ładunku
 - piki co ~ 1 Da (neutron)

– 1/2 Th – ładunek 2

1/3 Th – 3

– pamiętać o protonach

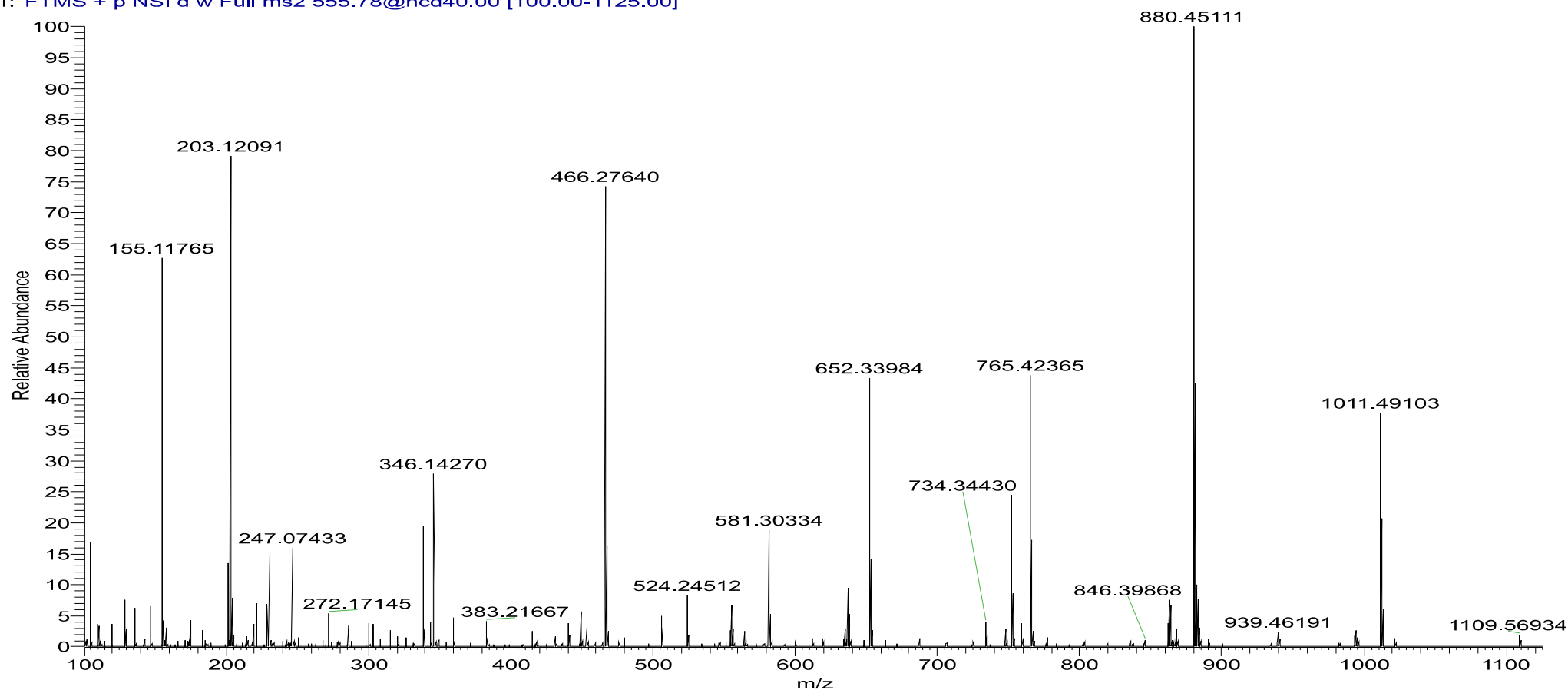
- Malejąca rozdzielczość



Widmo MS/MS

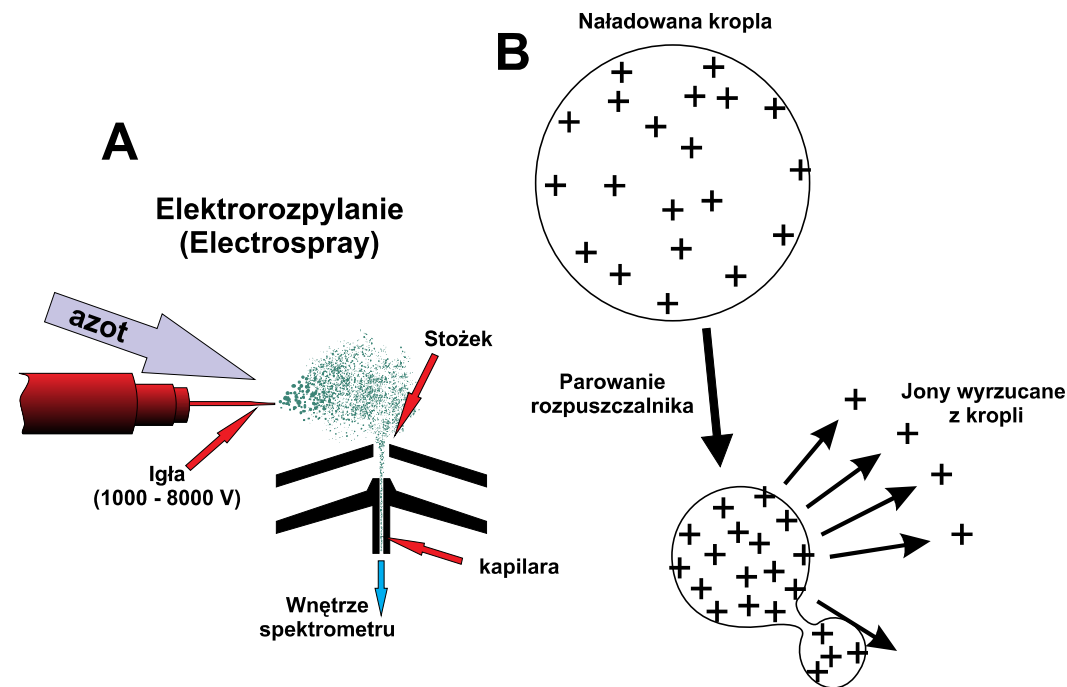
- Informacja o m/z prekursora (tutaj peptydu)
- Mniejsze intensywności

20413mk_JkkC_tr02p130412_0ul5_S #7100 RT: 53.64 AV: 1 NL: 5.68E4
T: FTMS + p NSI d w Full ms2 555.78@hcd40.00 [100.00-1125.00]



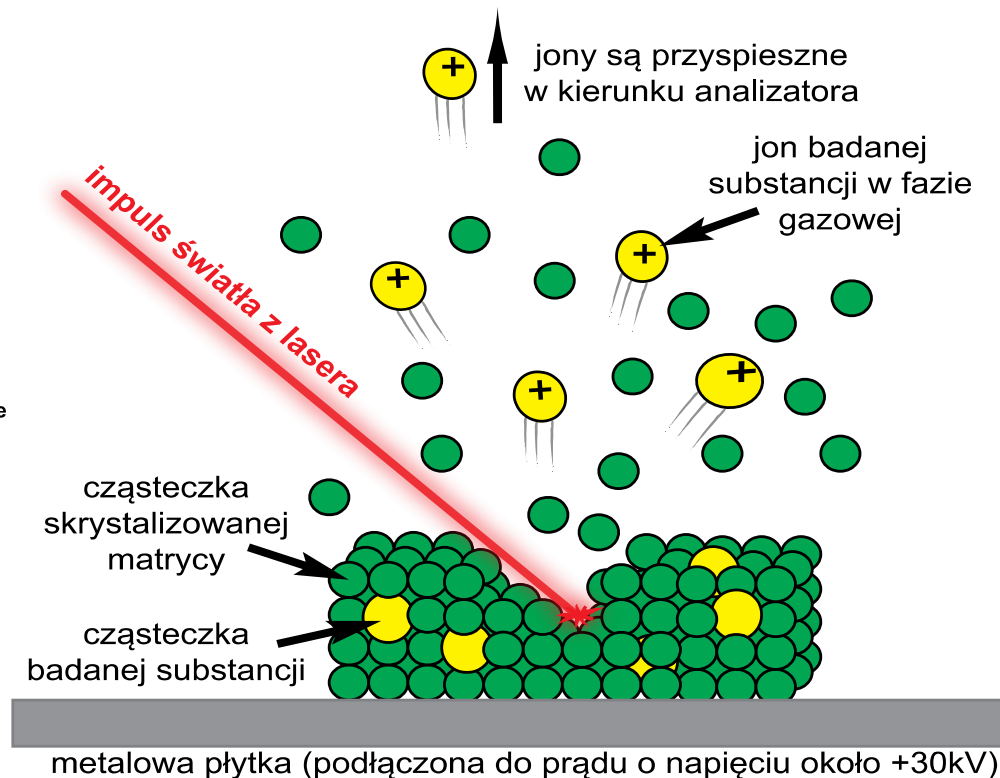
Źródło jonów

Elektrozpylacz (ESI)



MALDI

Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation



- Formowanie wiązki (lub pakietu) jonów i przesłanie do analizatora
→ optyka jonowa

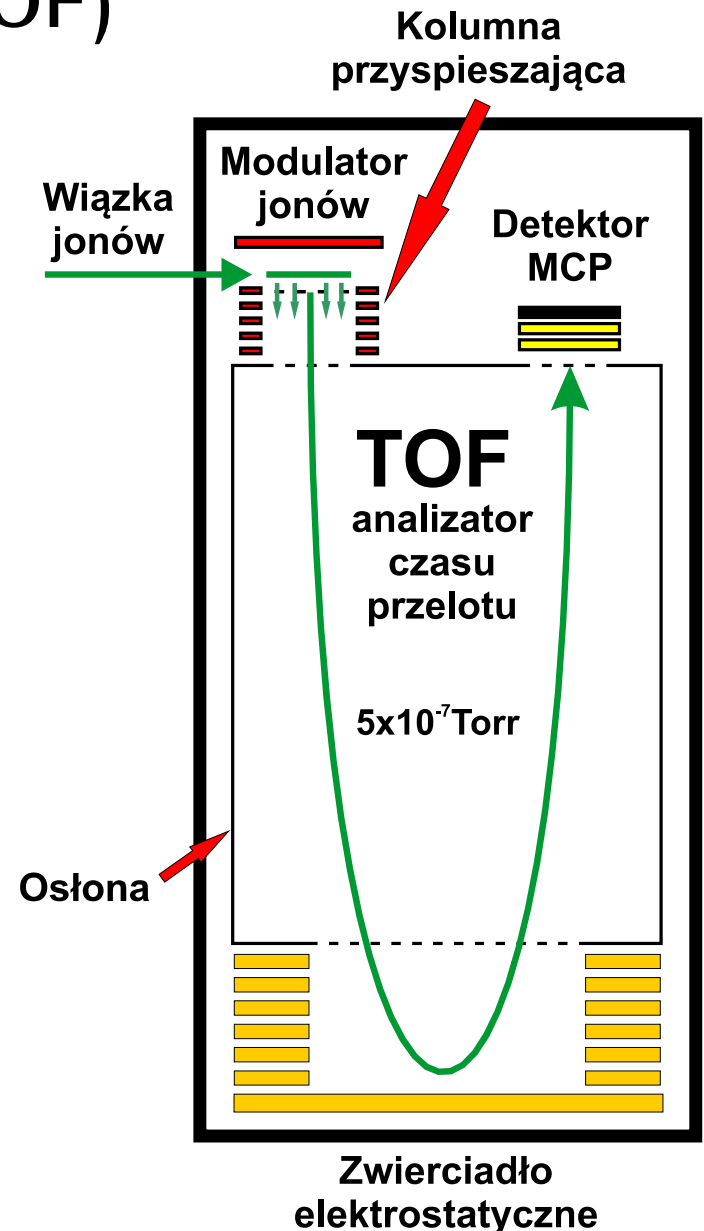
Analizator masy

- Rozdziela jony pod względem stosunku masy do ładunku (m/z)
 - Sektor magnetyczny/elektryczny (nie stosowany w proteomice)
 - Analizator czasu przelotu (TOF)
 - Kwadrupol
 - Pułapka jonowa
 - FT-ICR
 - Orbitrap

Analizator czasu przelotu

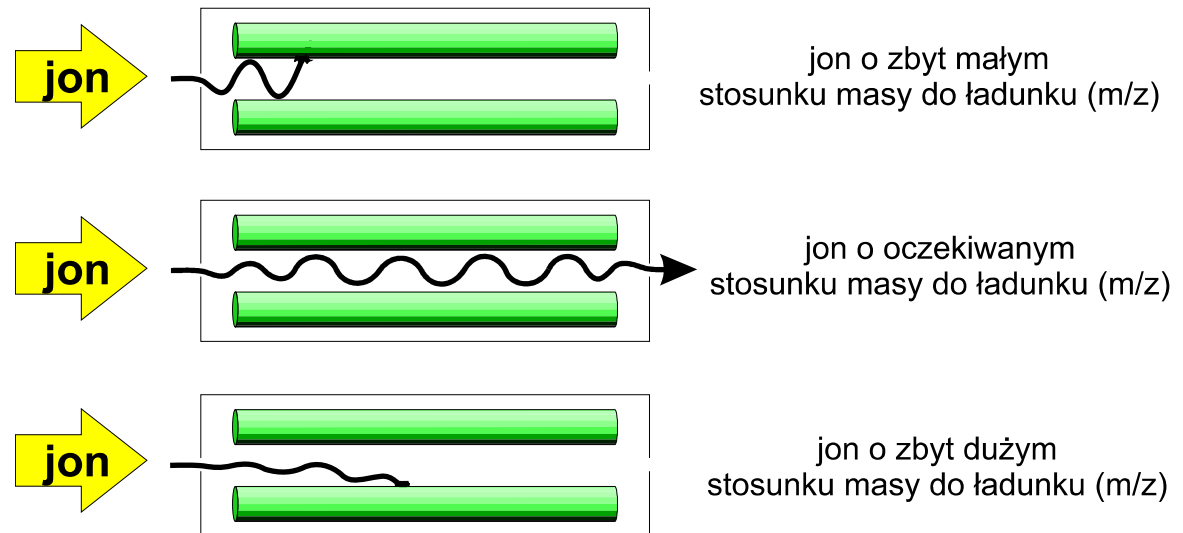
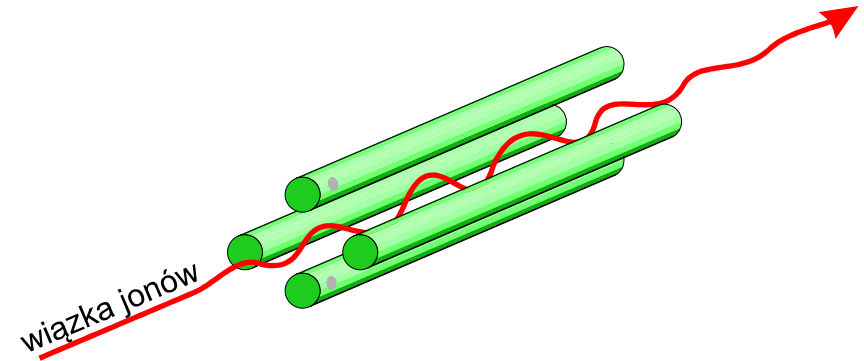
(Time Of Flight – TOF)

- Stosunkowo duża rozdzielczość (do kilkadziesiąt tysięcy)
 - w trybie ze zwierciadłem
- Pomiar do kilkunastu tys. Th
 - bez zwierciadła nawet do milionów Th
- Dość duża czułość
- Praca impulsowa
- Wrażliwy na zmiany temperatury
- Łatwo wysycić detektor



Kwadrupol

- Filtr masy
 - może przepuszczać szeroki zakres m/z
- Pomiar poprzez skanowanie
 - mała sprawność
 - mała rozdzielczość
- Inne zastosowania niż pomiar masy
 - selekcja jonów
 - analiza znanych cząsteczek



Pułapka jonowa

- Utrzymuje jony wewnątrz analizatora
- Pomiar poprzez wyrzucanie jonów o określonym m/z
- Liniowa (może być podwójna) lub trójwymiarowa
- Duża czułość
- Mała rozdzielczość
- Szybka praca
- Możliwość selekcji i fragmentacji jonów
 - reguła 1/3

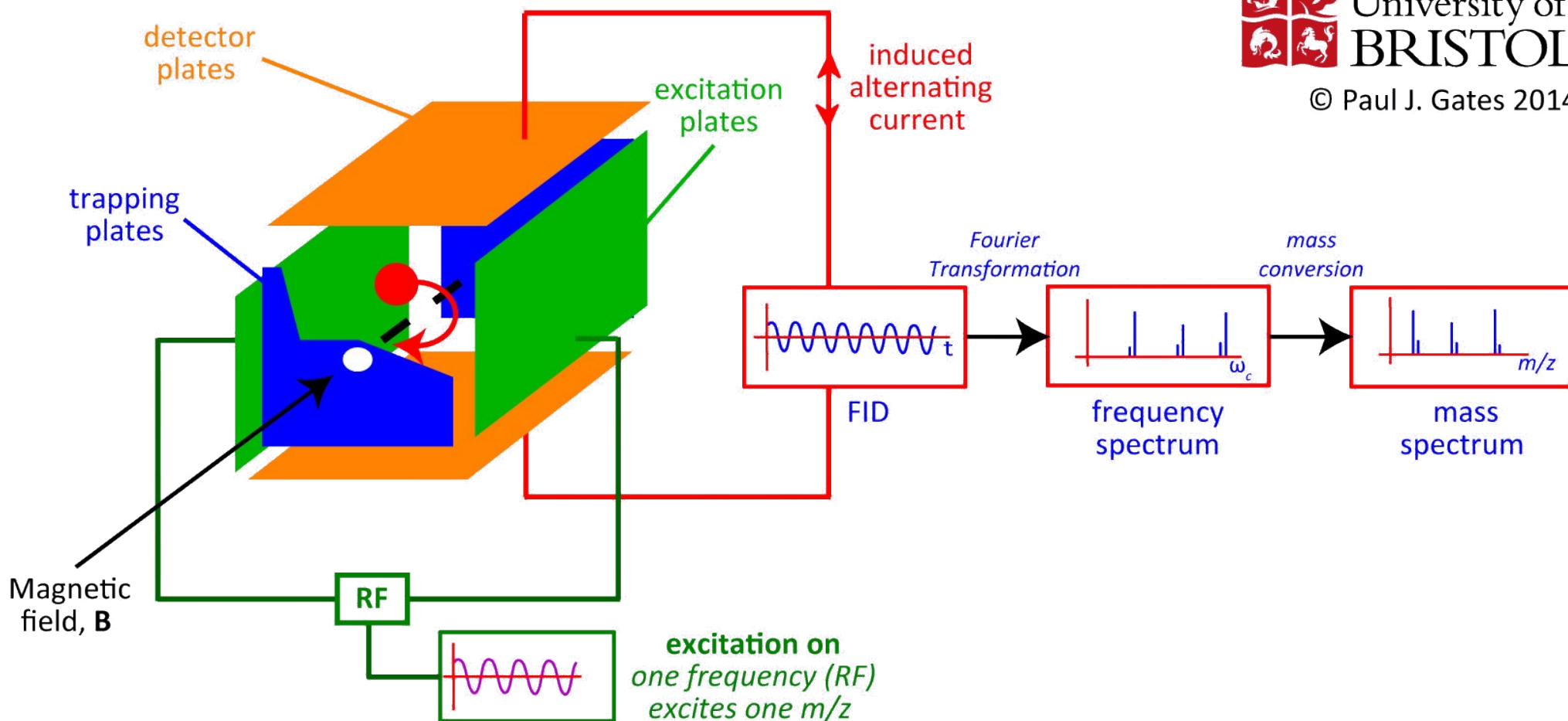


FT-ICR

(analyzer cyklotronowy z Fourierską transformacją wyników)

- Rodzaj pułapki jonowej
- Jony wprowadzane do silnego pola magnetycznego (zwykle $>5\text{T}$) zaczynają poruszać po torach kołowych
- Częstotliwość obiegu jonu wokół osi jest zależna od m/z
- Jony mogą być wzbudzane falą o odpowiedniej częstotliwości
 - można wzbudzać wiele jonów falą złożoną
- Detekcja przez rejestrację prądu wzbudzanego przez przelatujące jony w elektrodach
 - częstotliwość prądu wzbudzanego przez jon o określonym m/z można wyliczyć
 - falę złożoną z wielu częstotliwości można przekształcić w widmo częstotliwości przy pomocy transformaty Fouriera
 - widmo częstotliwości można przeliczyć na widmo masy
 - jony nie uderzają w detektor

FT-ICR

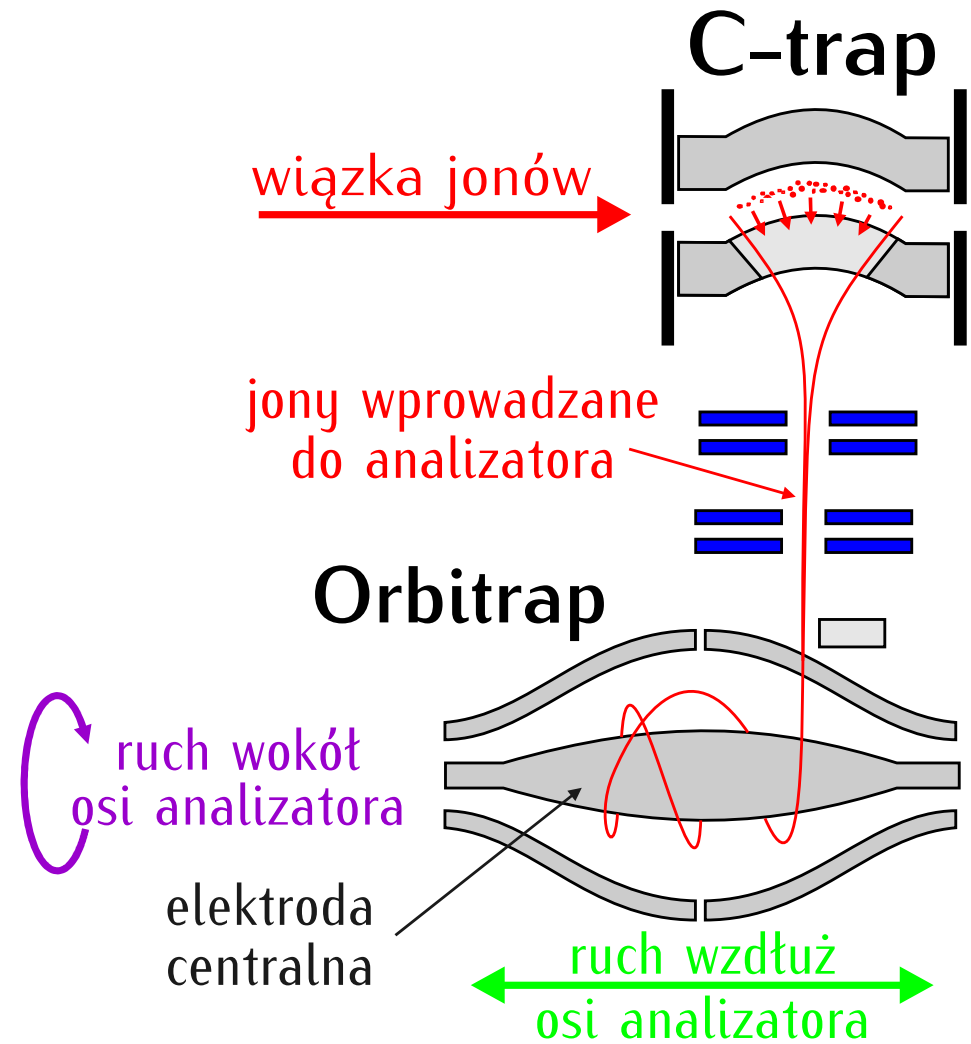


Cechy FT-ICR

- Najwyższa rozdzielczość (do 10^6)s
 - zwiększenie rozdzielczości poprzez ustawienie czasu pomiaru
- Największa dokładność (<1 ppm)
- Duża czułość
- Dość duża szybkość (zależnie od rozdzielczości)
- Duży zakres dynamiczny
- Pomiar m/z do 10 tysięcy
- Wymagane zastosowanie magnesu nadprzewodzącego
 - Duże rozmiary
 - Wysoka cena

Orbitrap

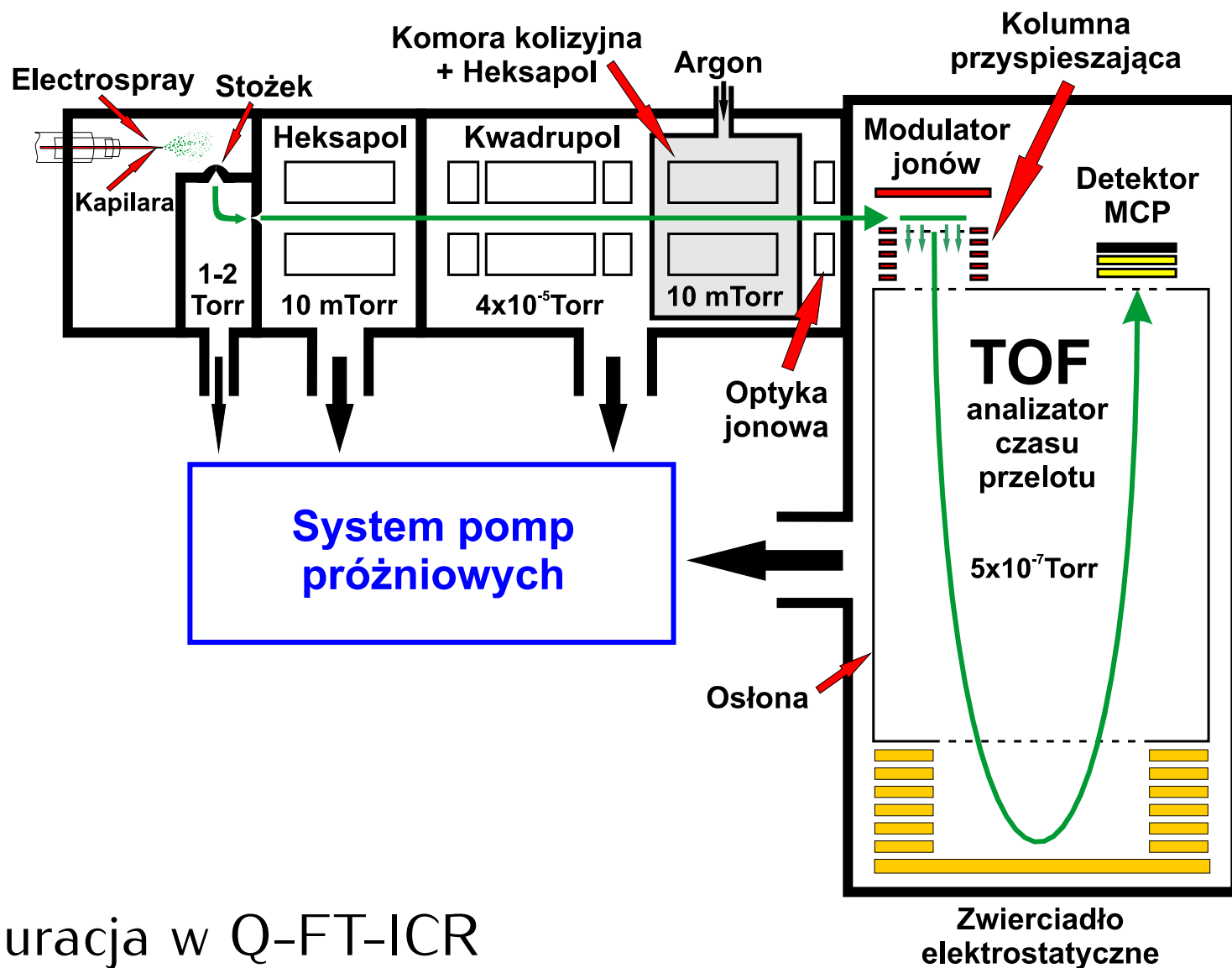
- Rodzaj pułapki jonowej
- Rozdzielczość 250 ~ 700 tys.
- Duża czułość
- Duża szybkość
- Dobry zakres dynamiczny
- Detekcja bez zderzenia
 - transformata Fouriera
- Brak magnezu nadprzewodzącego
 - tańszy niż FT-ICR
- Najnowszy typ analizatora
 - ciągły rozwój



Spektrometry tandemowe i hybrydowe

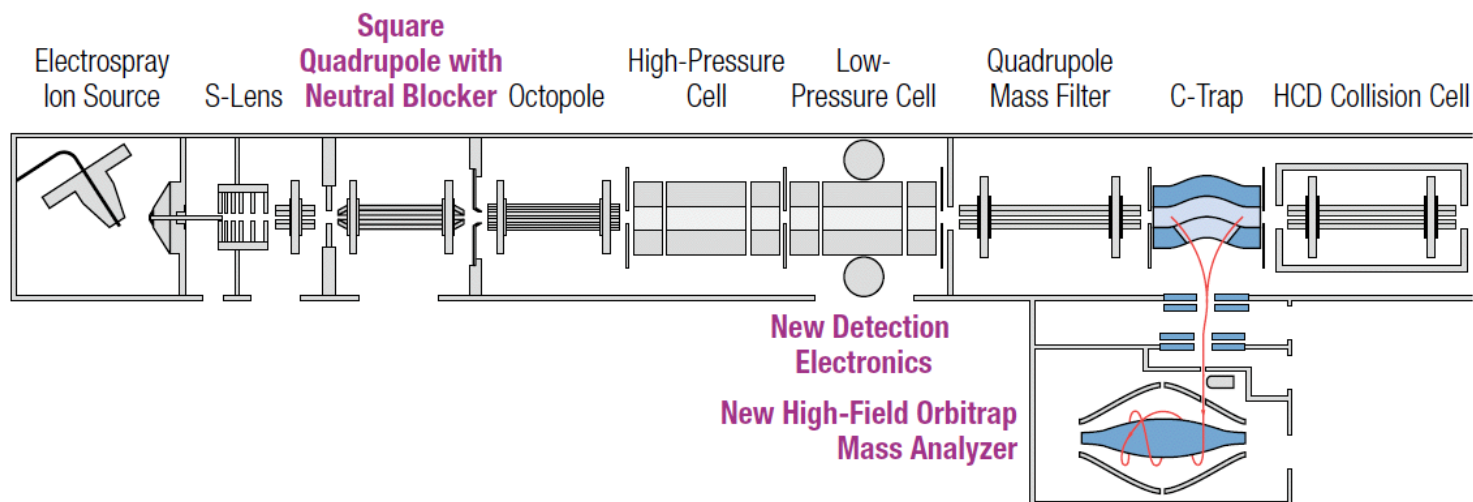
- Triple Quadrupole
- Q-TOF
- Q-FTICR
- Pułapka liniowa FT-ICR
- Orbitrap Velos/Elite (podwójna pułapka + Orbitrap)
- Q-Exactive (kwadrupol – Orbitrap)
- Orbitrap Fusion

Q-TOF



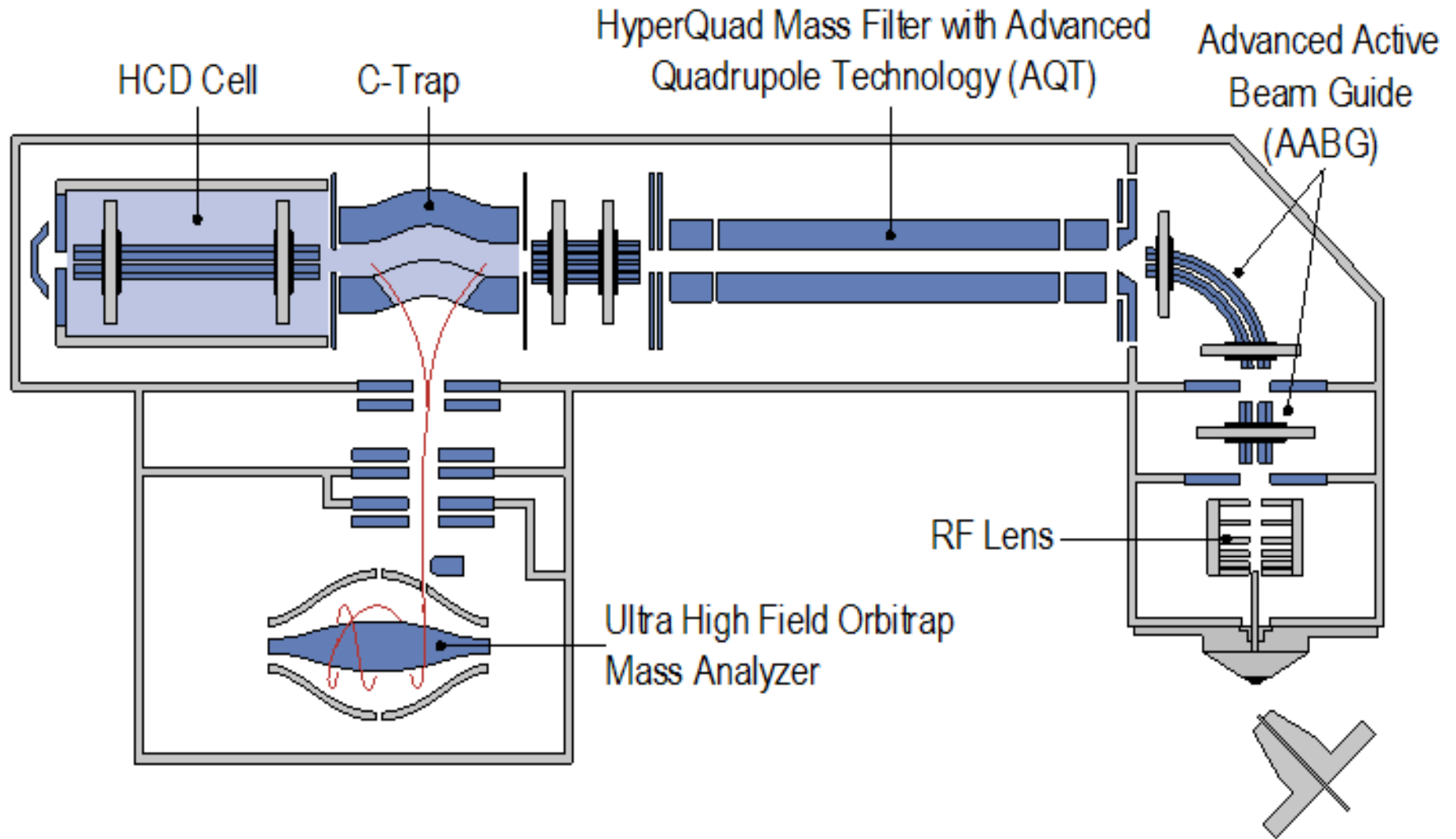
Podobna konfiguracja w Q-FT-ICR

Orbitrap Velos/Elite

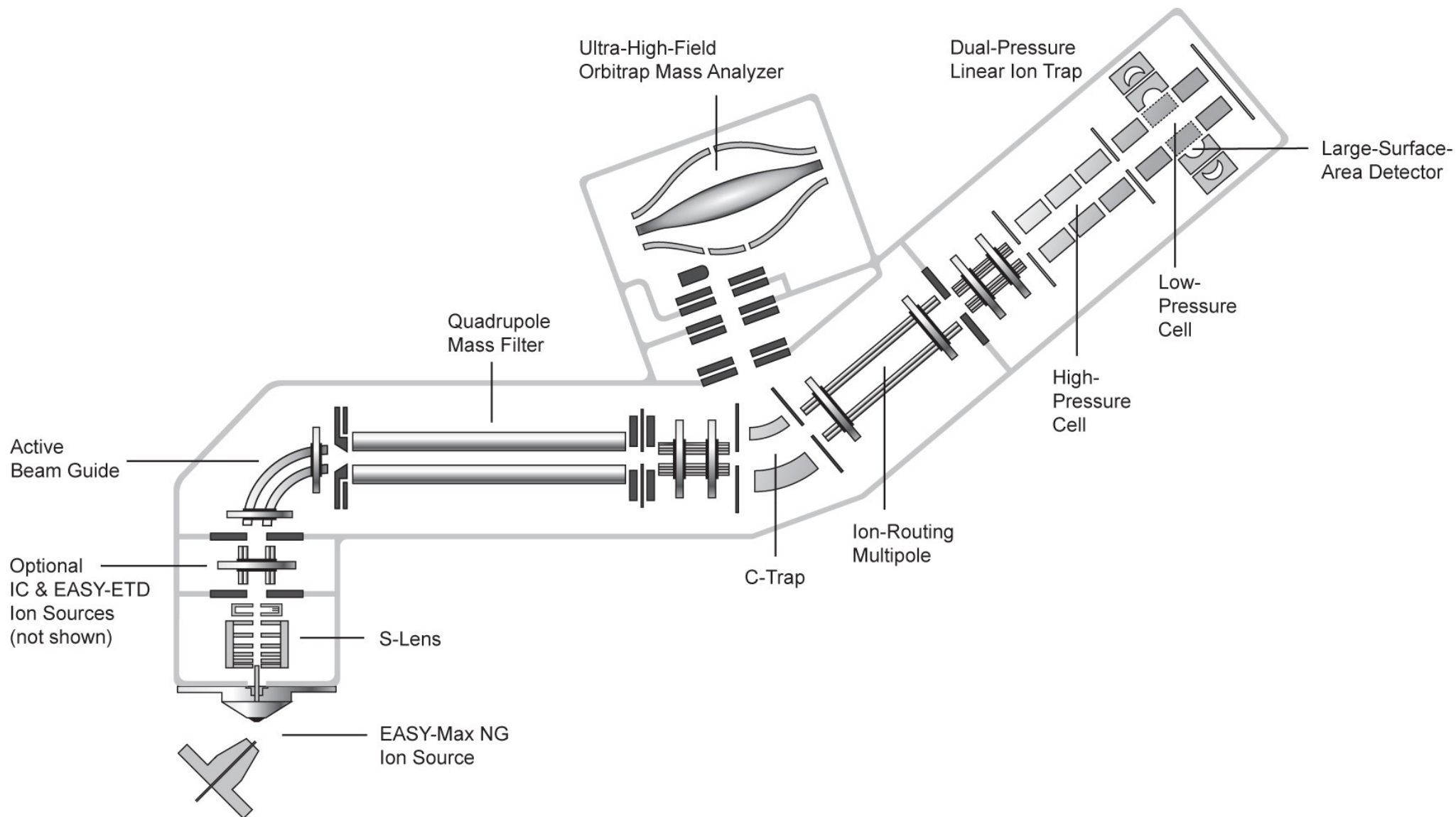


Podobna konfiguracja w LTQ-FTICR

Q-Exactive



Orbitrap Fusion



Oprogramowanie

- Obsługujące spektrometr
 - wewnętrzne komputery urządzeń
 - komputer PC połączony z urządzeniem
 - Programowanie maszyny i rejestracja danych
- Przeglądanie surowych widm i chromatogramów
- Wstępne przetwarzanie danych z przebiegów
 - generowanie plików zawierających masy jonów macierzystych i potomnych (.MGF, .PKL, itp)
- Identyfikacja peptydów i białek
 - komercyjne: Mascot, Sequest
 - poprawiacze wyników/sumowanie wyników: Percolator, PeptideProphet, MScan
 - darmowe: X!tandem, MaxQuant (Andromeda)
- Narzędzia wspomagające np. Protein Prospector