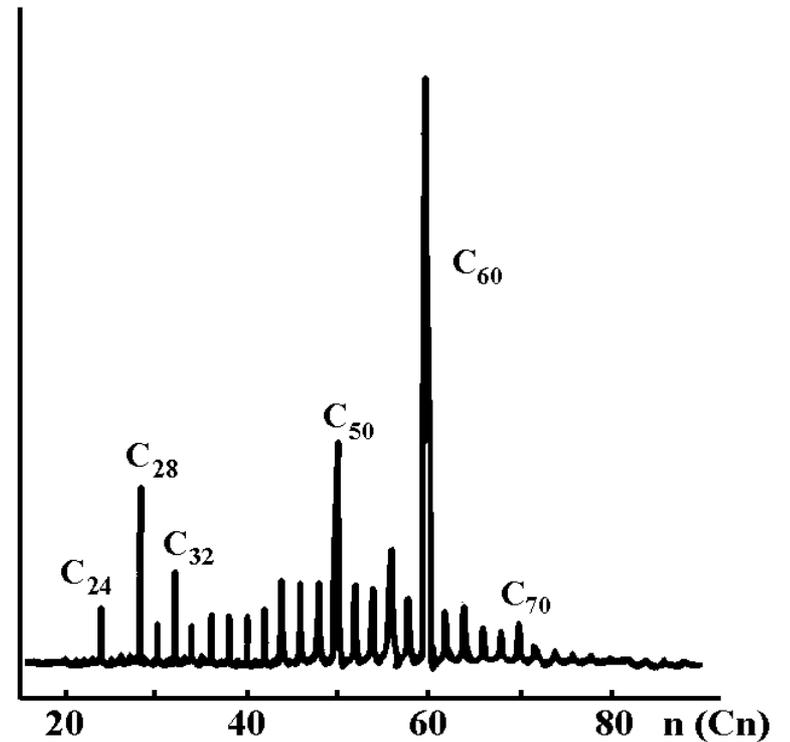
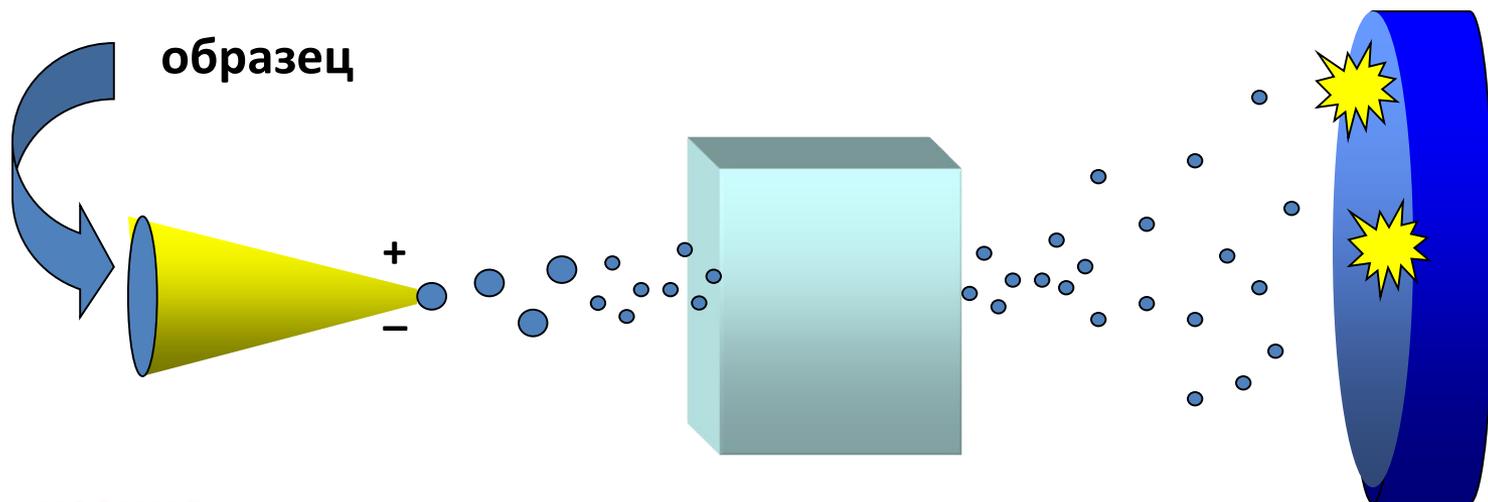


# Масс-спектрометрия



# Принципы работы масс-спектра



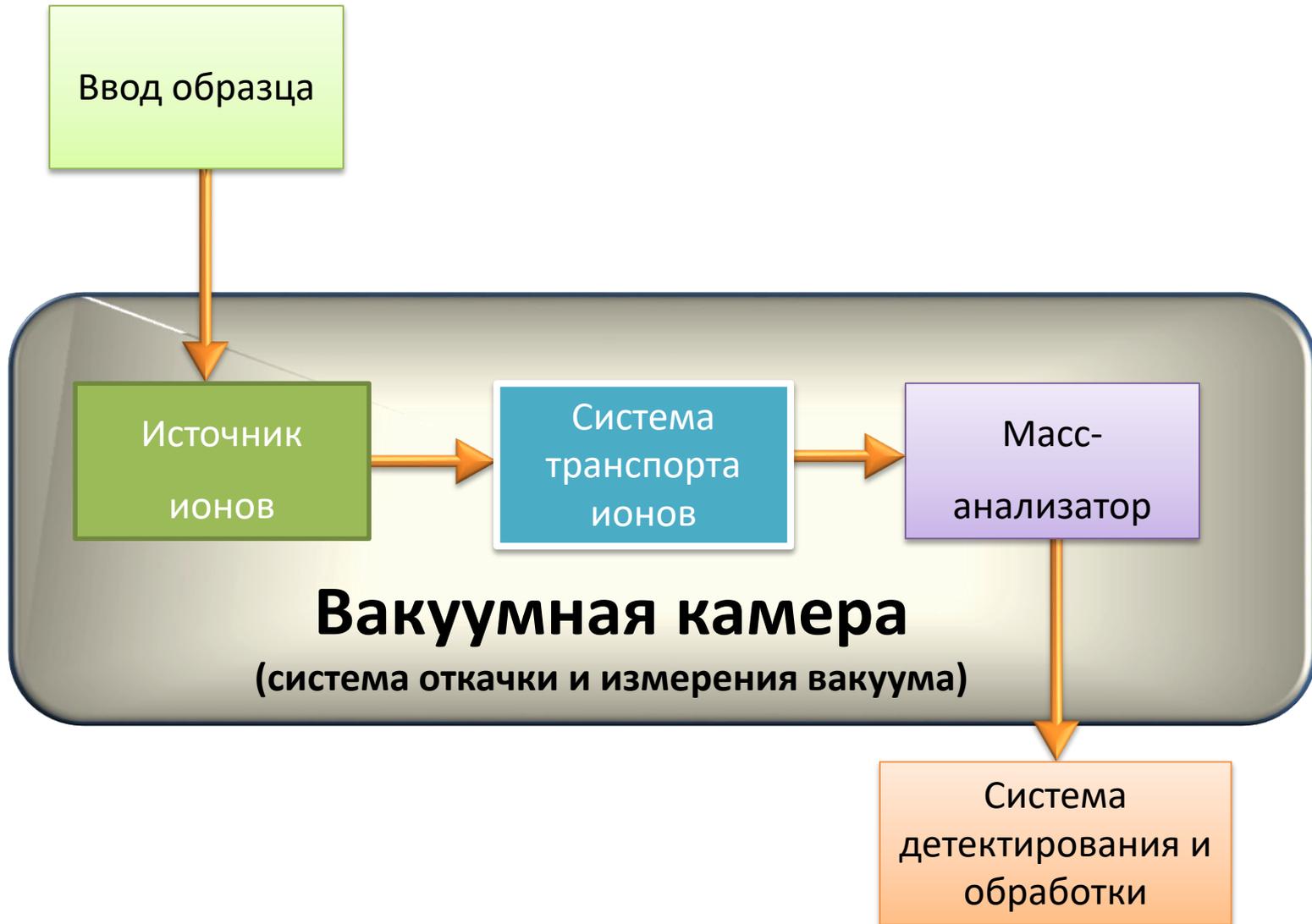
**Ионизация,  
переход в газовую фазу**

**Масс-анализатор**

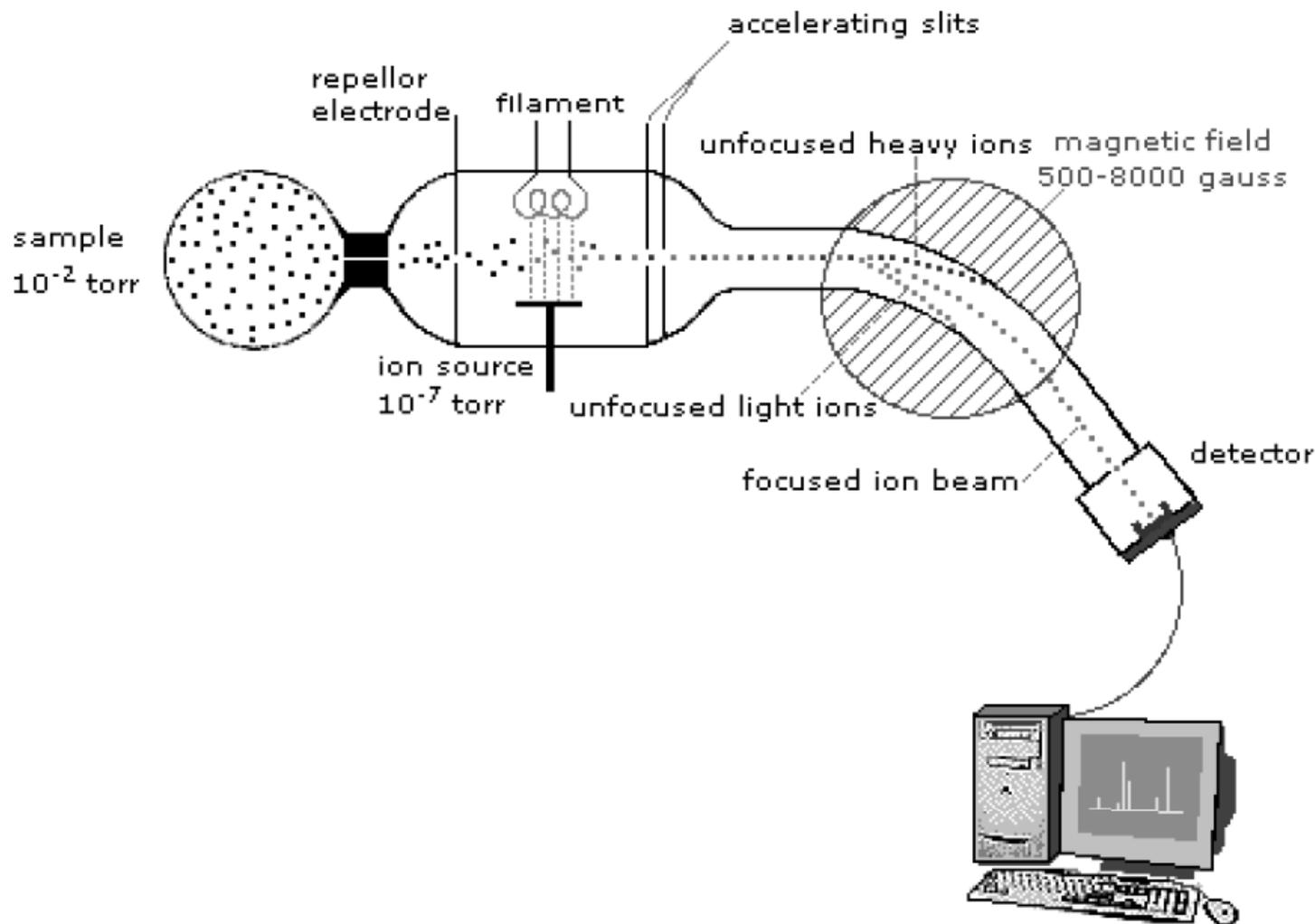
**Детектор**

# Блок-схема масс-спектрометра

(Основные шаги при измерении масс-спектра)



# Неумирающая классика – магнитный секторный масс-спектрометр (масс-спектрометр Астоновского типа) с ионным источником на основе электронного удара

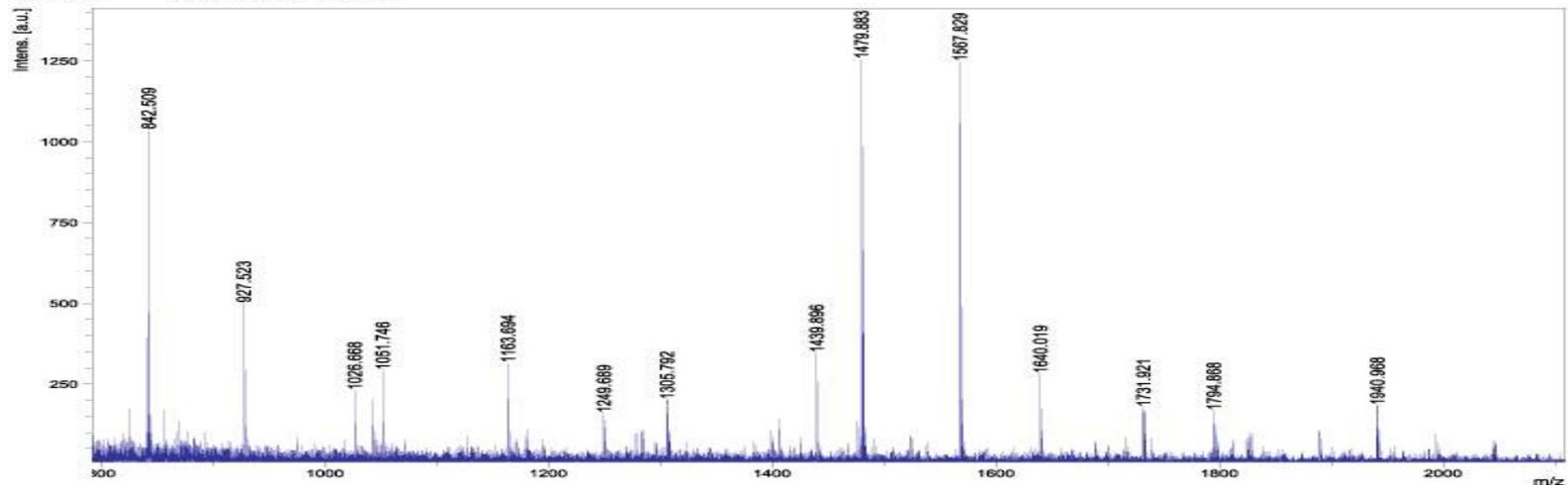


# Типичный масс-спектр

- Характеризуется «острыми» пиками
- По оси X отложено отношение  $m/z$  для данного иона
- По оси Y откладывается интенсивность сигнала, которая определяется количеством ионов (зависит от их способности к десорбции)

D:\Proteomics\_Data\030916\Standards\0\_C12\1

Comment 1 FLEXControl generated XMASS data  
Comment 2 (c) 2000 Bruker Daltonics



# Единицы измерения атомных и молекулярных масс

- Единицы массы:
  - а.е.м. (атомные) = у.е. (углеродные):  $1/12 \text{ }^{12}\text{C} = \text{Да}$  (Дальтон)
  - $1 \text{ Th} = 1\text{Da}/z$  (Thomson)

# Чем характеризуется качество работы масс-спектрометра?

разрешение

чувствительность

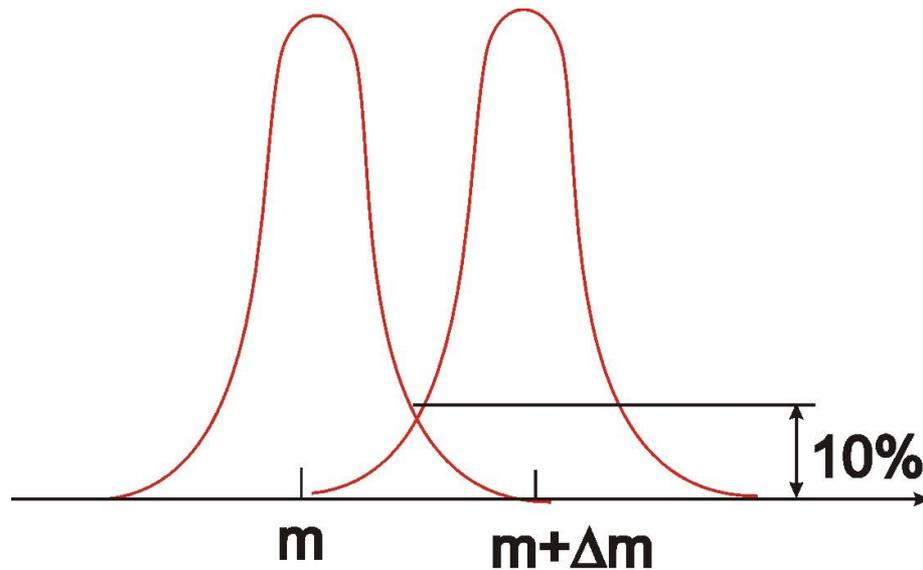
динамический диапазон

скорость получения спектра

# Разрешение масс-спектрометра

Ионы с массами  $m$  и  $(m+\Delta m)$

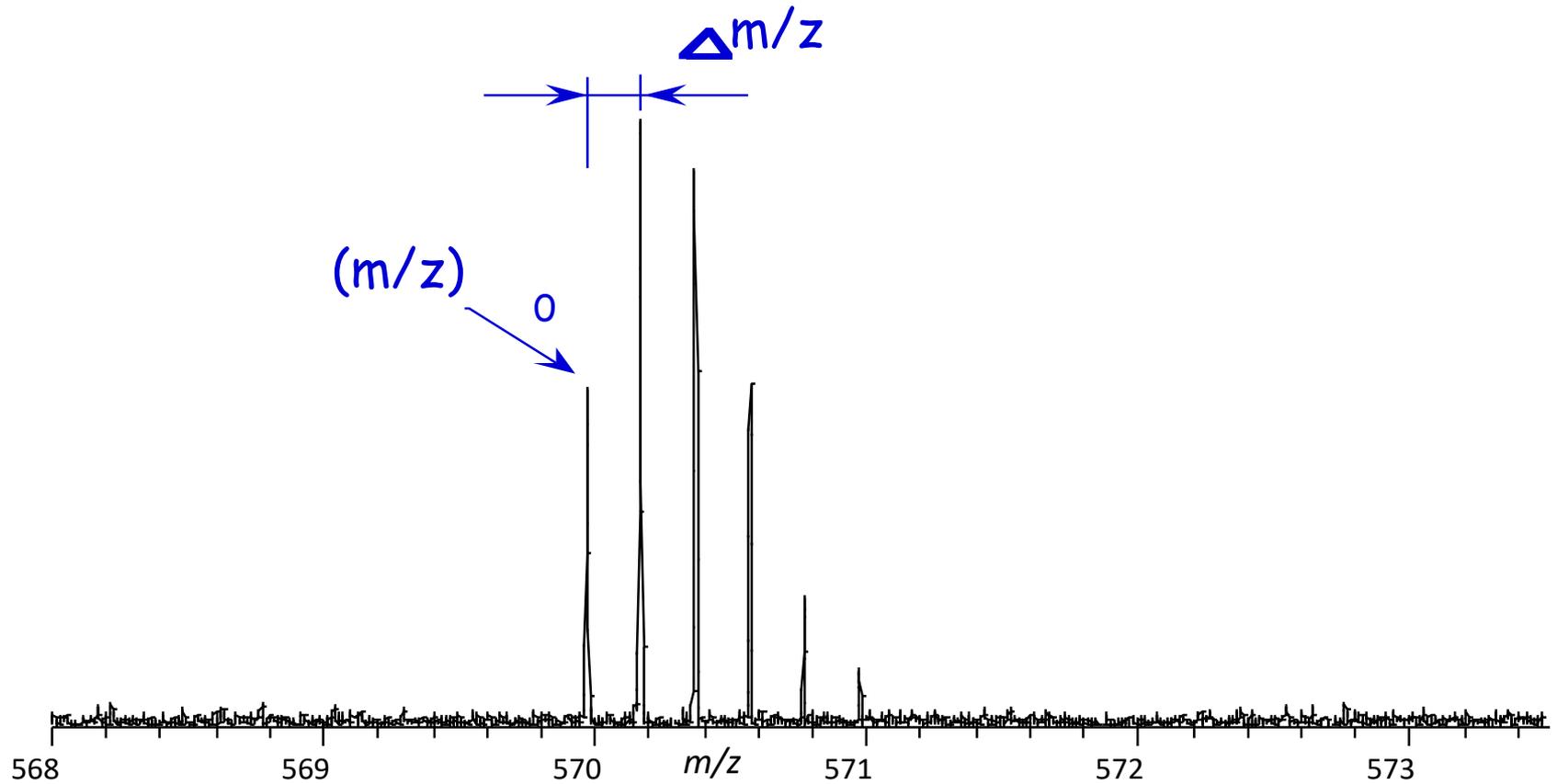
$$R = m / \Delta m$$



# Разрешение масс-спектрометра

- $^{12}\text{C}=12.000000000$  а.е.м.
- $^1\text{H} = 1.00782506$  а.е.м.
- $^{14}\text{N}=14.00307407$  а.е.м.
- $^{16}\text{O}=15.99491475$  а.е.м.
  
- Азот ( $\text{N}_2$ ), монооксид углерода ( $\text{CO}$ ), этилен ( $\text{C}_2\text{H}_4$ ):
  - $\text{CO}: 27.994915$  а.е.м.
  - $\text{N}_2: 28.006148$  а.е.м.
  - $\text{C}_2\text{H}_4: 28.03300$  а.е.м.
  
- $R=770$  –  $\text{CO}$  и  $\text{C}_2\text{H}_4$ ;  $R=2500$  –  $\text{CO}$  и  $\text{N}_2$

# Изотопное распределение



$^{12}\text{C}$	12.000000	98.93	Hydrogen	$^1\text{H}$	1.007825	99.9885
$^{13}\text{C}$	13.003355	1.07	Deuterium	$^2\text{H}$	2.014102	0.115
$^{14}\text{C}$	14.003242	*	Tritium	$^3\text{H}$	3.016049	*

# Применение МС

- **Определение изотопного состава элементов:**
  - $C^{12}:C^{13} = 99:1$
  - $Cl^{35}:Cl^{37} = 76:24$  (35.5 а.е.м.)
  - $Br^{79}:Br^{81} = 51:49$  (80 а.е.м.)
- **Разделение изотопов**
- **Точное определение масс:**
  - $I^{127}$  (126.904 а.е.м.)
  - $53p+74n = 128.027$  а.е.м.
  - $E_{св} = c^2 Dm_{я}$ ;  $Dm_{я} = 1.152$  а.е.м.
- **Характеристики ядерных процессов: энергия распада ядер; сечения захвата;**
- **Определение геологического возраста по периоду полураспада ( $Pb^{206}:Pb^{207}$ )**
- **Специальное применение (детектор в различных системах)**

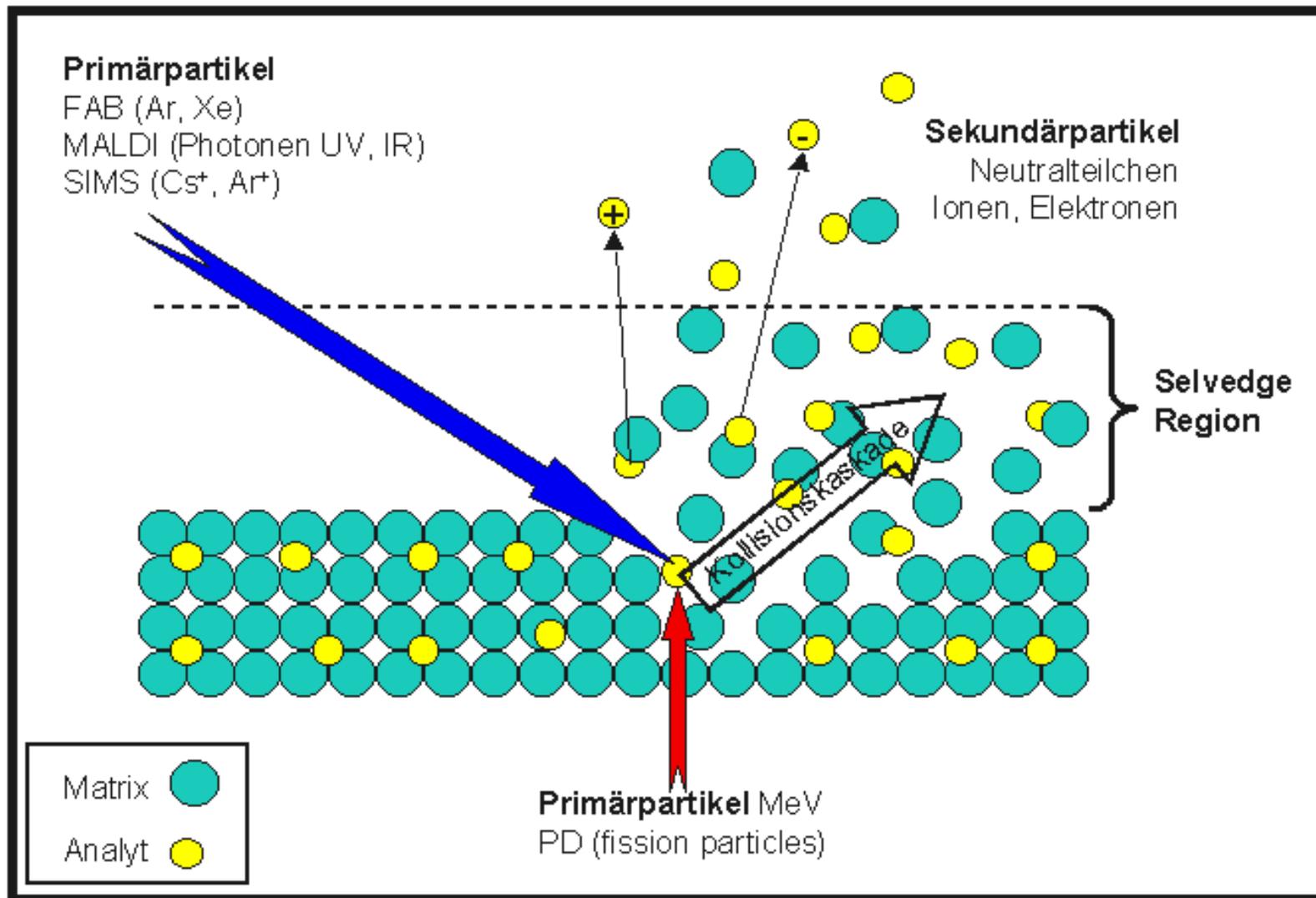
# Применение МС

- *Определение состава вещества (органическая химия):*
- *Определение количественного состава смесей; определение энергий связи, химических и термодинамических характеристик*
- ***Определение массы больших молекул:***
  - **ДНК**
  - **Белки**
  - **Сахара**
- ***Исследование структуры молекул и кинетики реакций***
- ***И многие другие !***

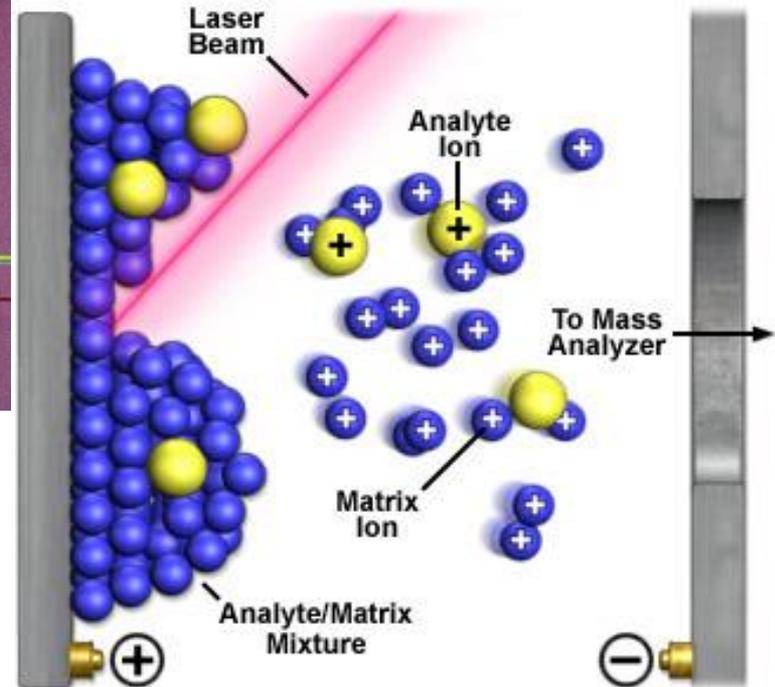
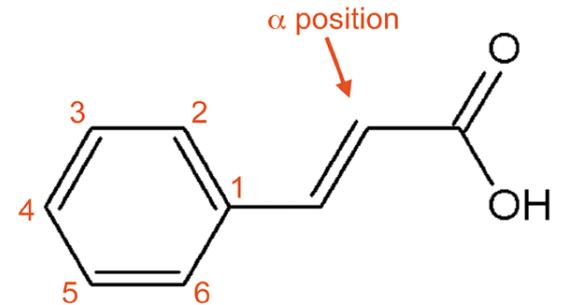
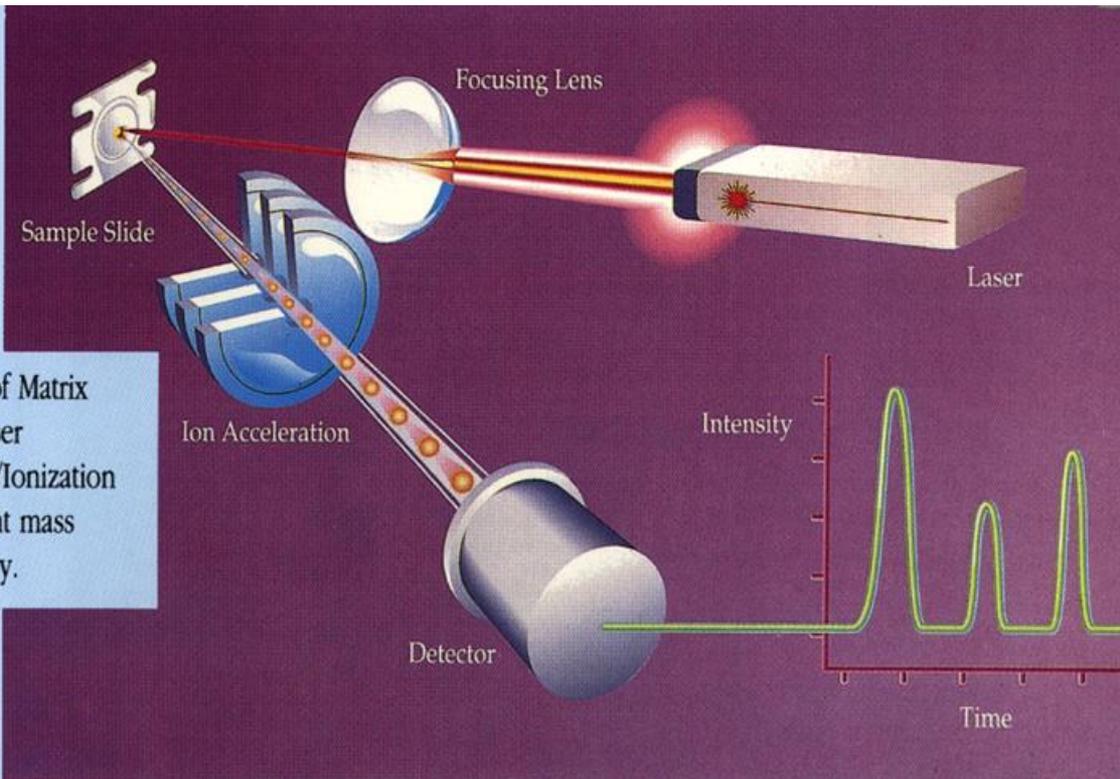
# Типы ионизации

- Электронная ионизация
- Ионизация полем
- Бомбардировка быстрыми атомами (ББА)
- Плазменная десорбция
- **Ионизация лазерной десорбцией при содействии матрицы ( ИЛДМ = MALDI)**
- **Ионизация электрораспылением**

# Плазменная десорбция, ББА и ИЛДМ

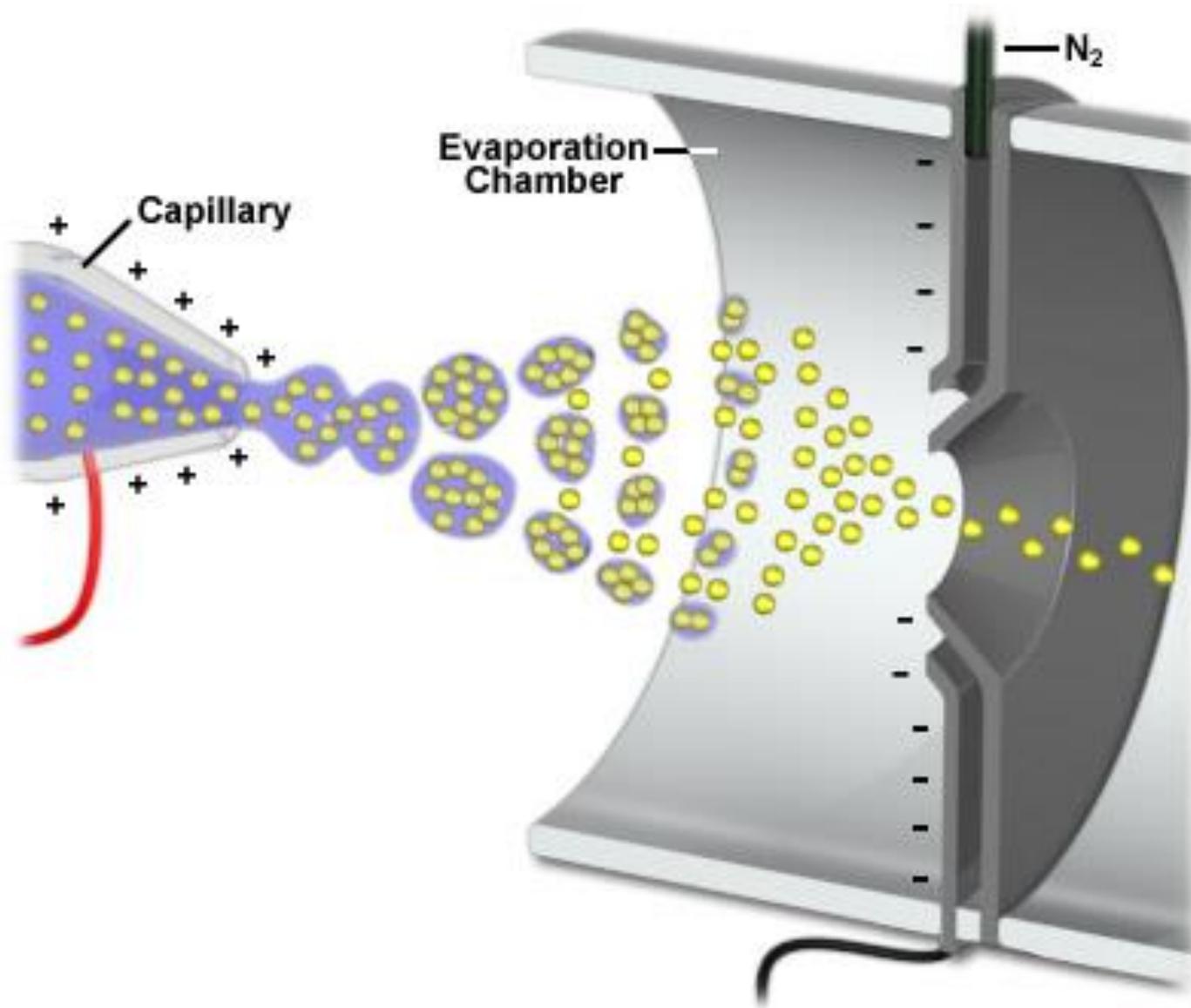


# ИЛДМ: импульсная ионизация

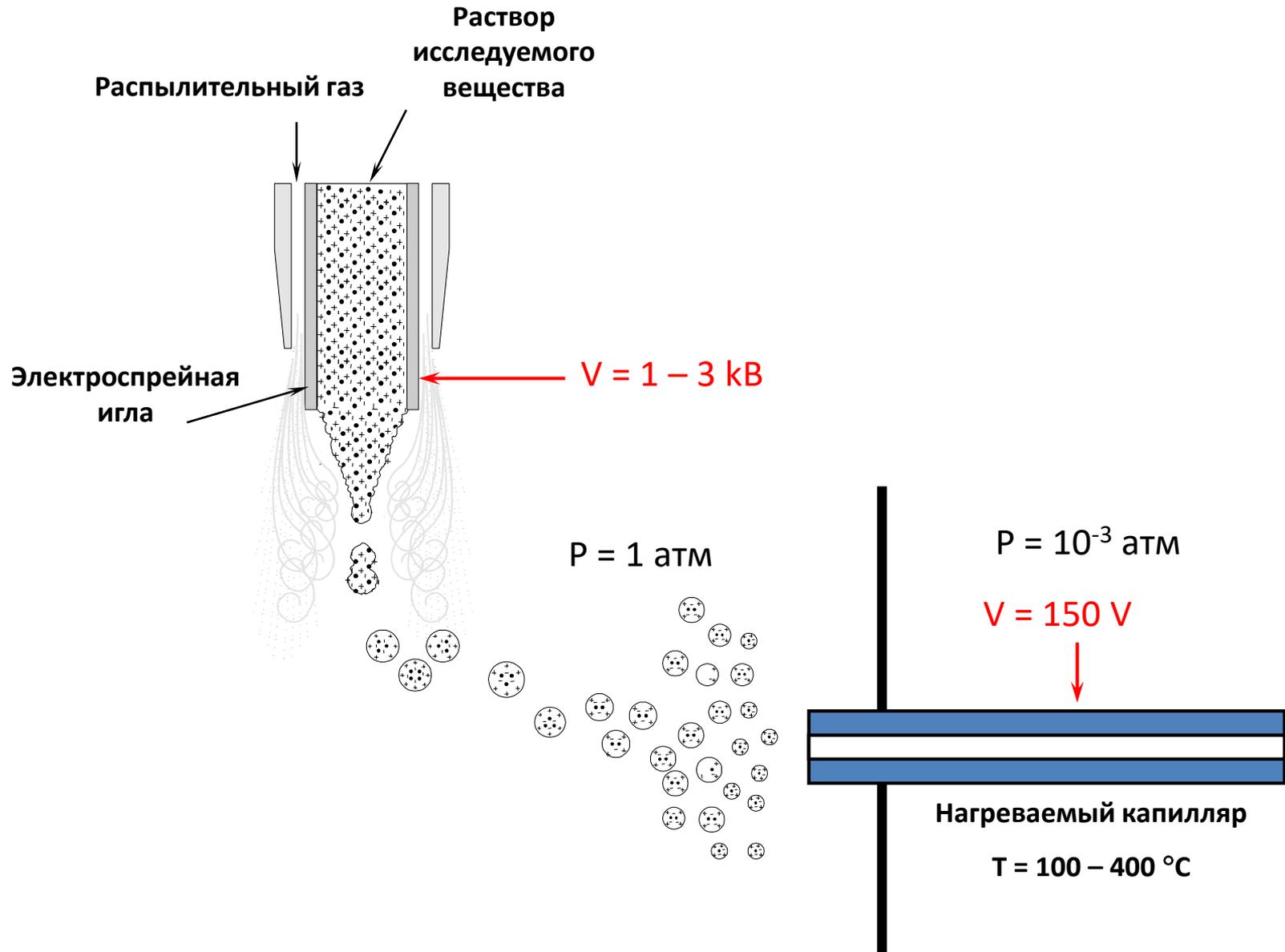


$M < 1000$  кДа

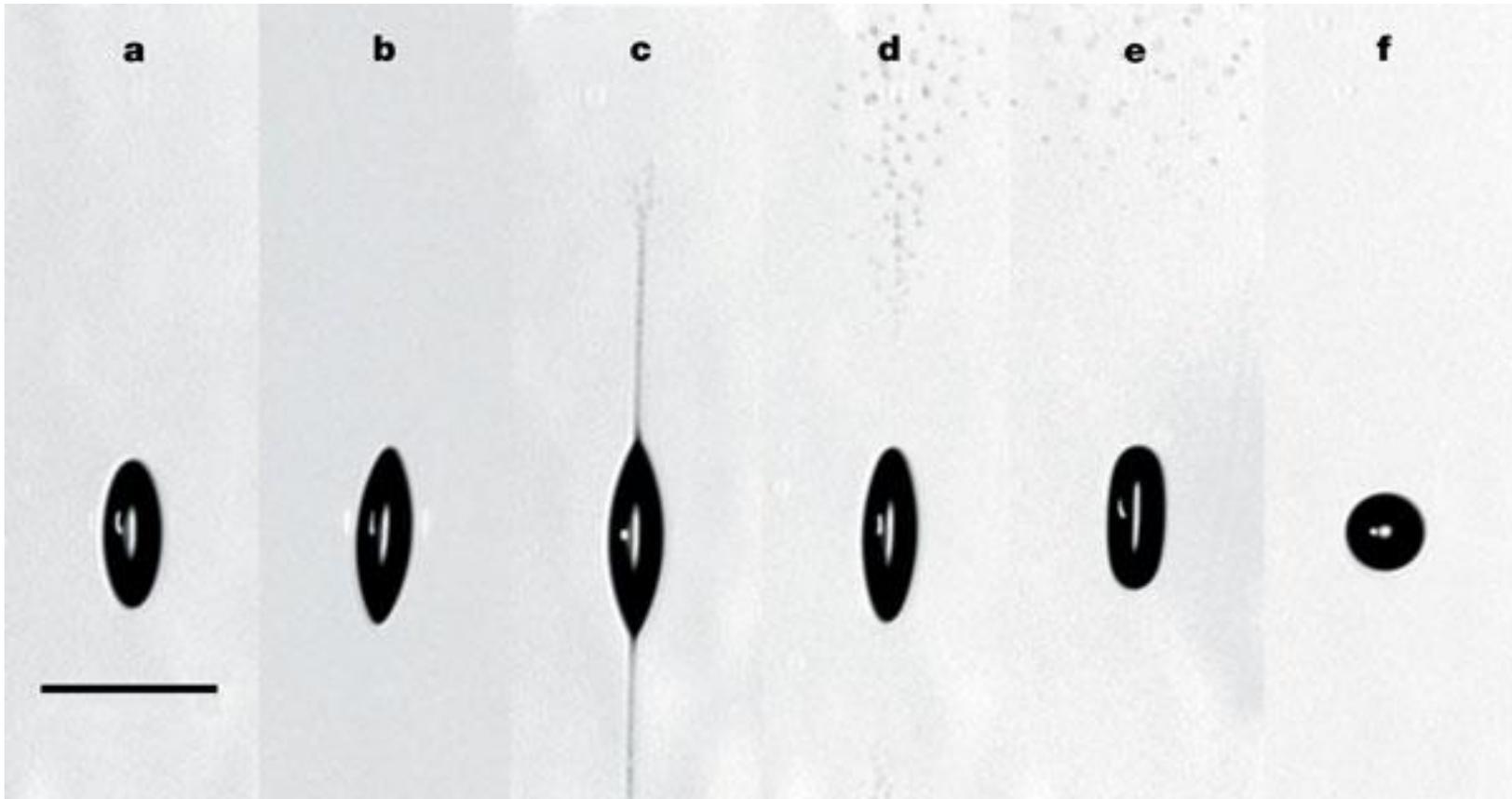
# Ионизация электрораспылением



# Ионизация электрораспылением



# Кулоновский распад и струя Рэлея

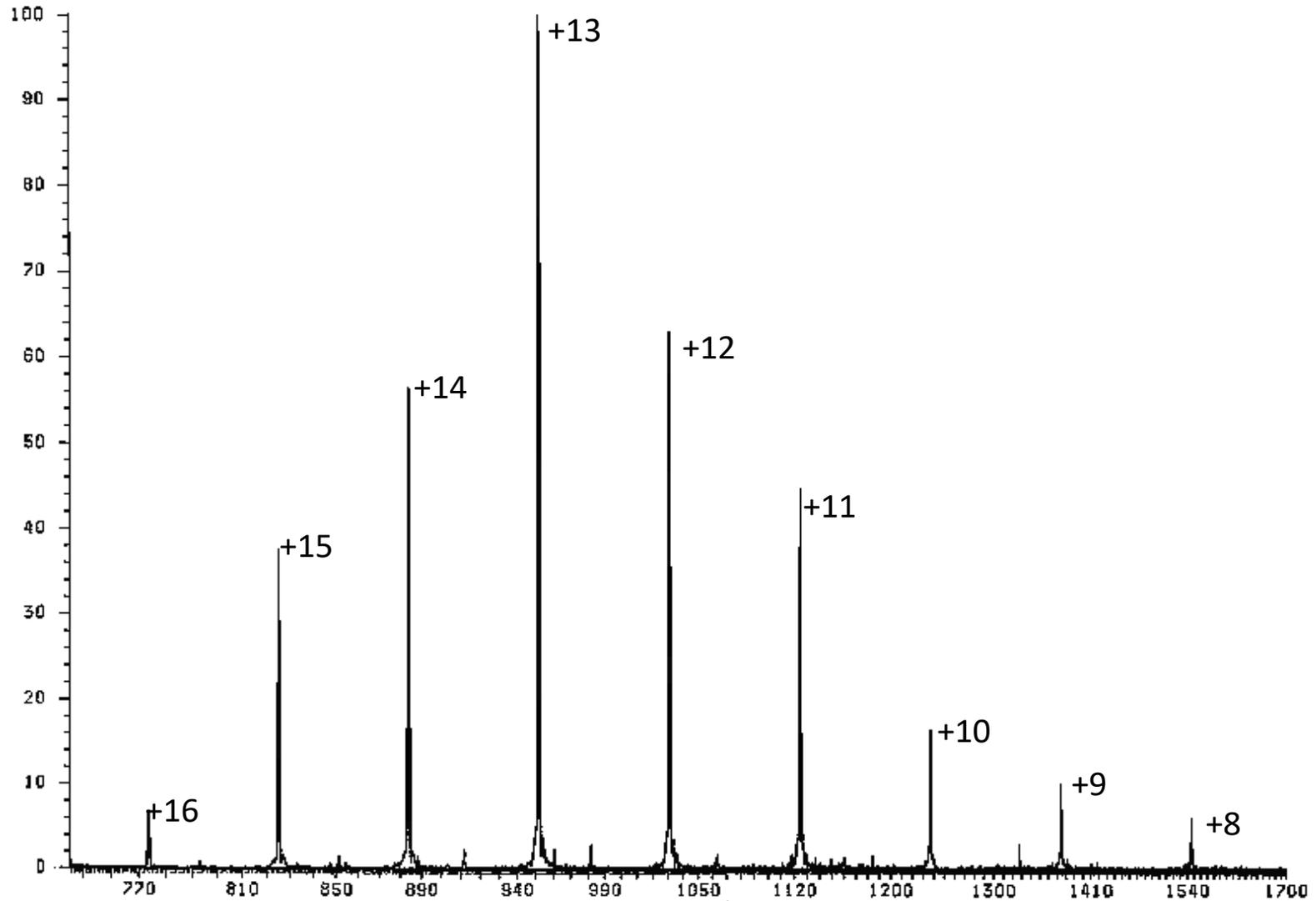


# Электроспрей

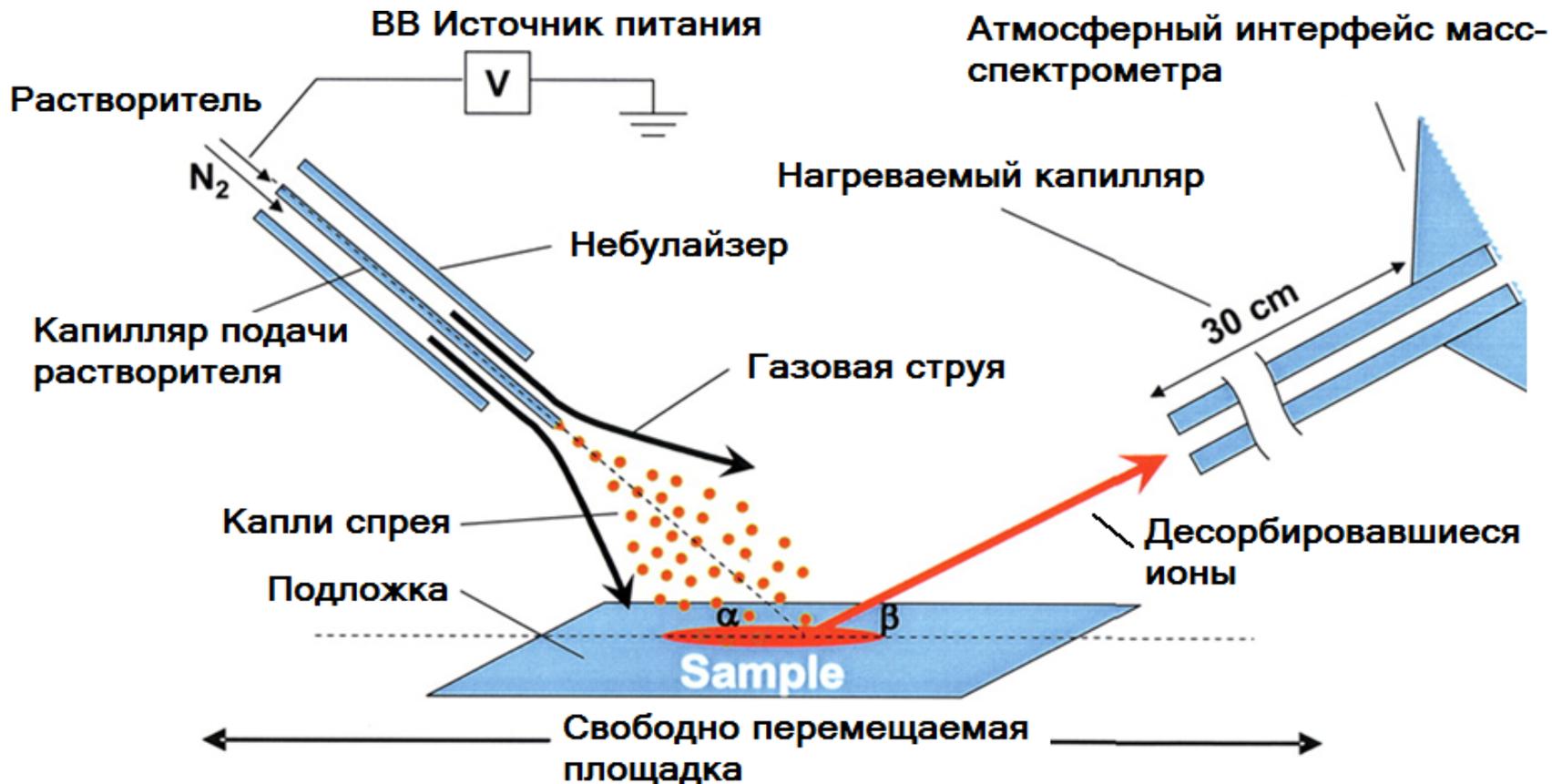


# Масс-спектр белка Cytochrome C

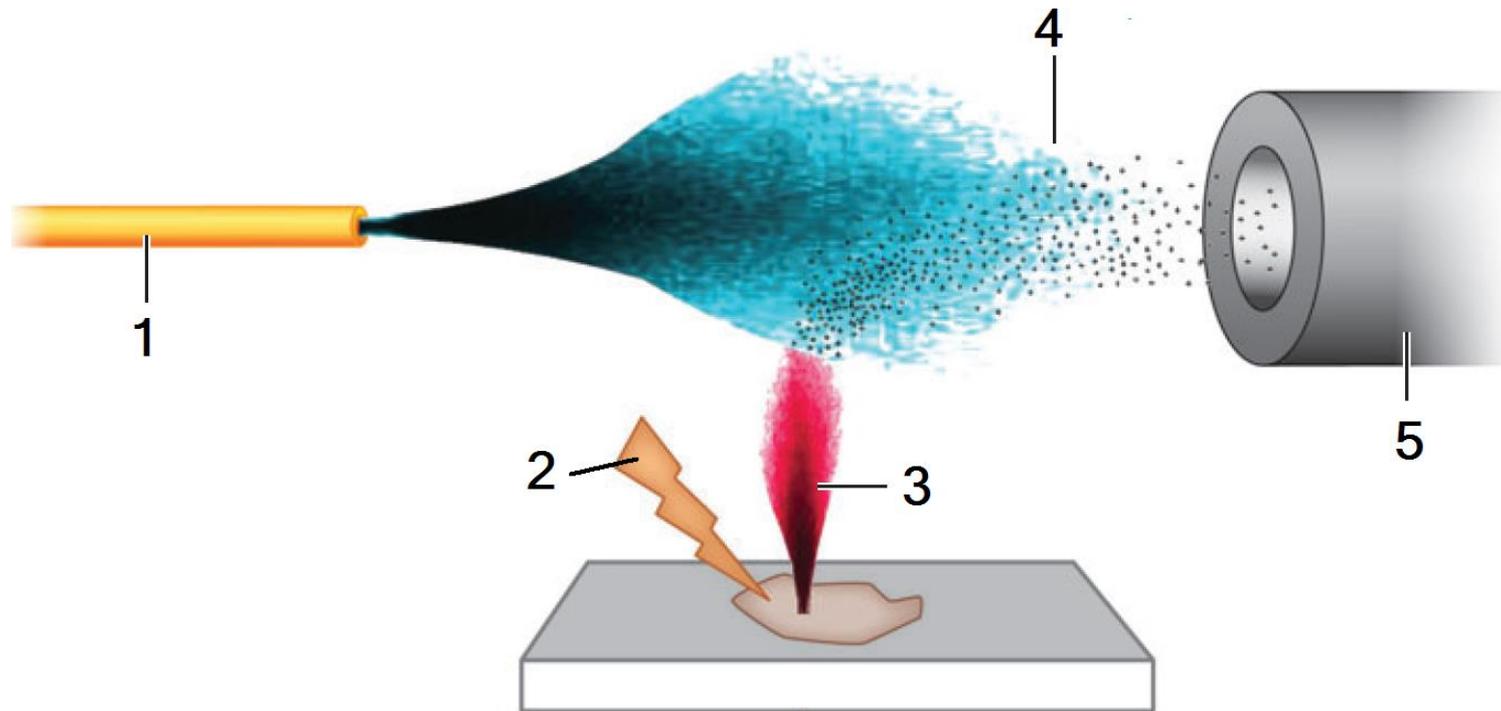
## Молекулярный вес – 12300 Да



# Десорбционно-электроспрейная ИОНИЗАЦИЯ



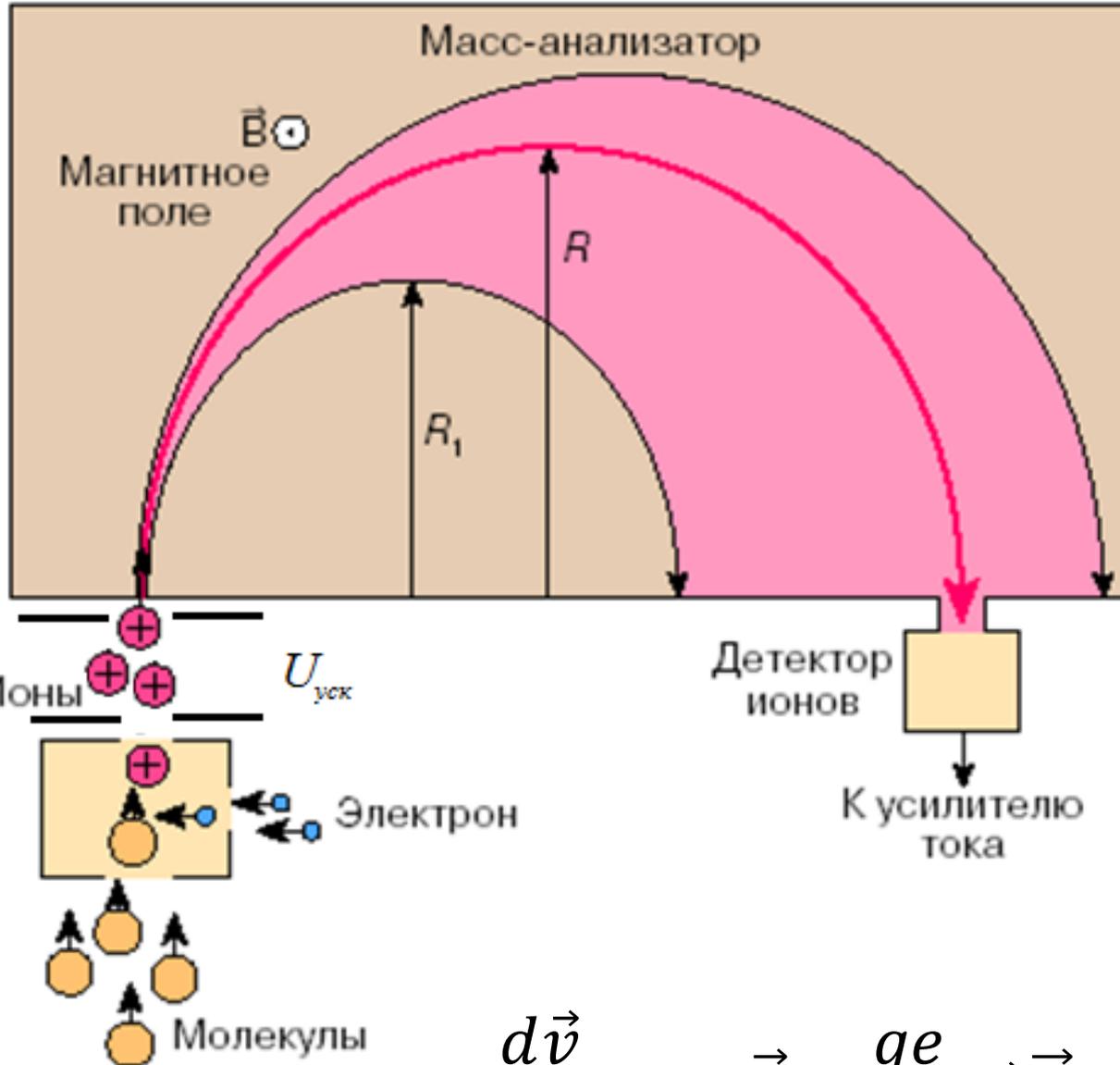
# Электроспрейная лазерно-десорбционная ионизация



# Типы масс-анализаторов

- Секторные (классика)
- Квадрупольный масс-фильтр
- Квадрупольная ионная ловушка
- Ионно-циклотронно-резонансный (ЦИР)
- Время-пролетный

# Секторный MS. Принцип работы



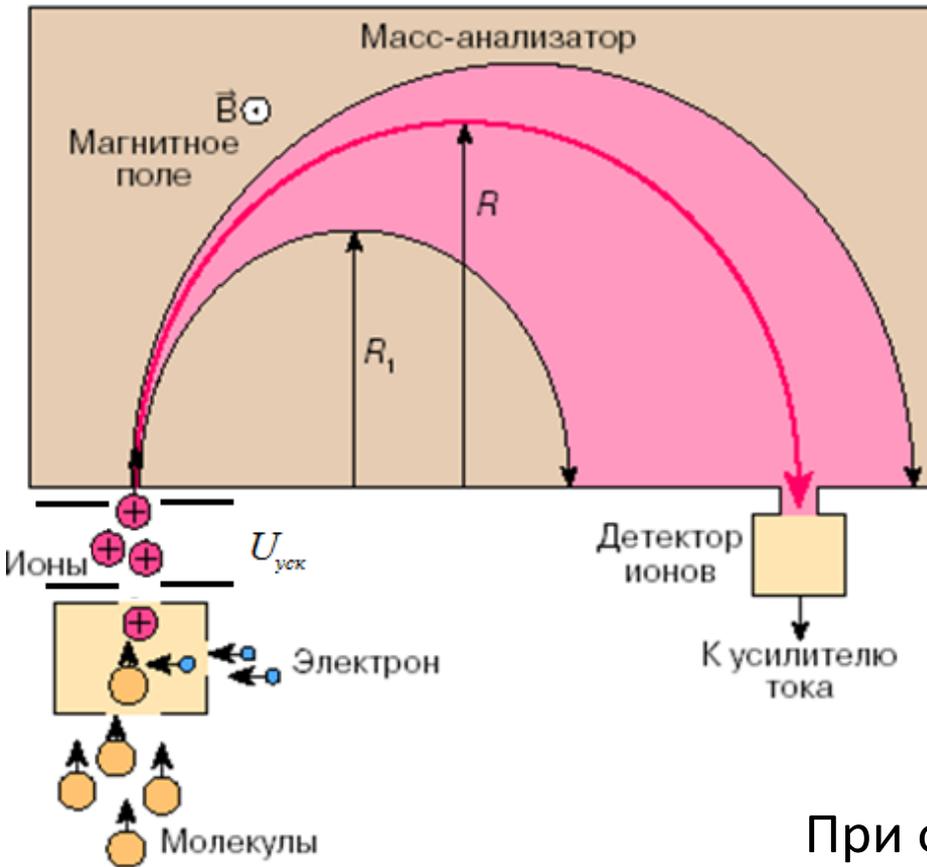
$$m \frac{d\vec{v}}{dt} = qe\vec{E} + \frac{qe}{c} [\vec{v}\vec{H}]$$

$$\frac{1}{2} mv^2 = qU$$

$$\frac{mv^2}{r} = qvB$$

$$r = \frac{1}{B} \sqrt{\frac{2Um}{q}}$$

# Секторный масс-спектрометр как масс-фильтр



## Сканирование по

- ✓ магнитному полю
- ✓ величине ускоряющей разности потенциалов

Обычно применяется временная развертка:

$$I = I(t)$$

$$B = B(t)$$

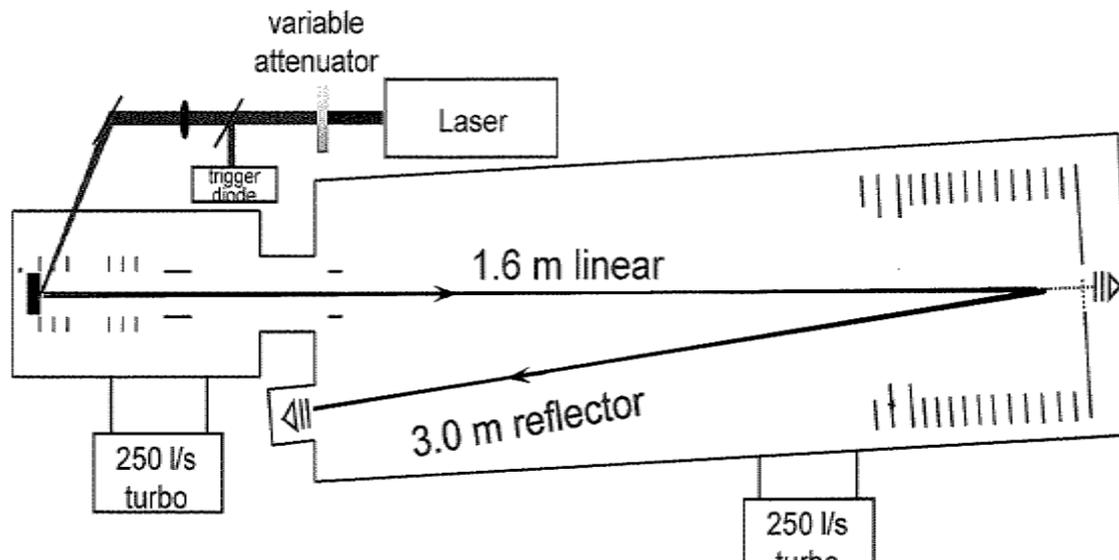
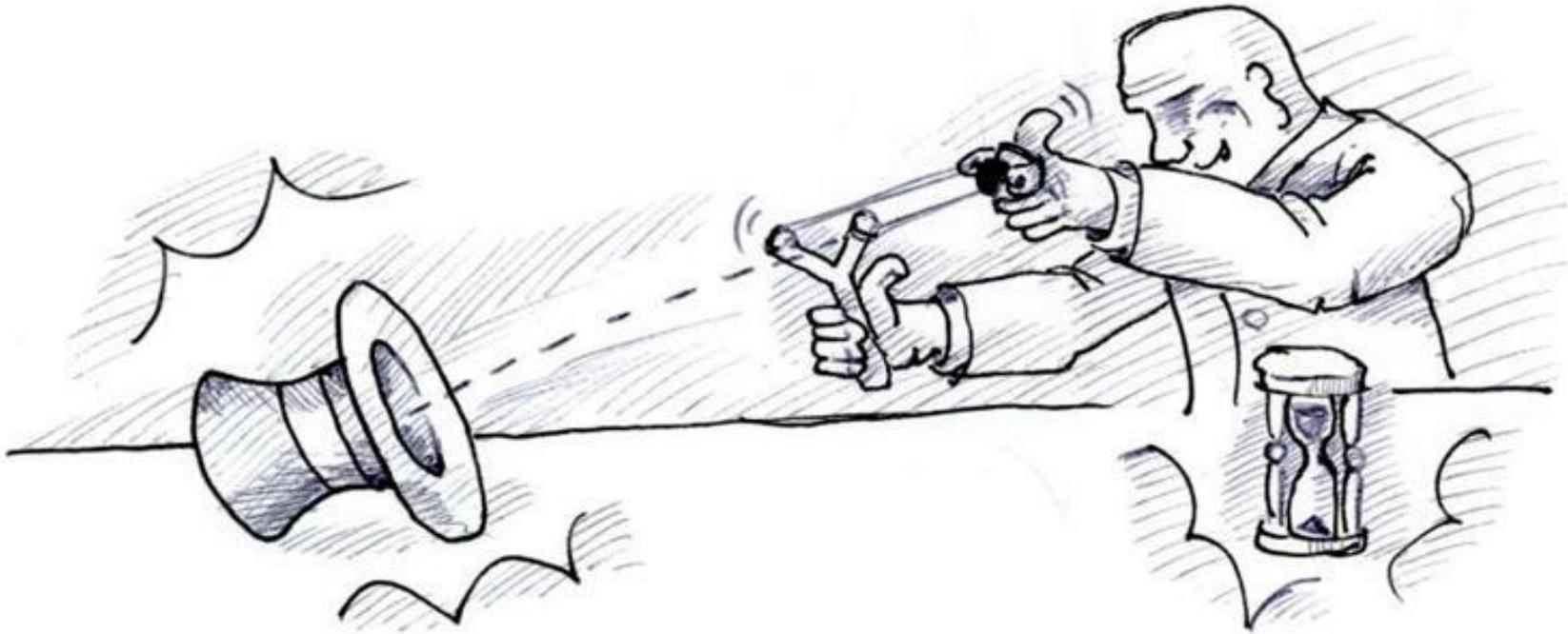
⇓

$$MS : I = I(B)$$

$$r = \frac{1}{B} \sqrt{\frac{2 \cdot U \cdot m}{q}}$$

При фиксированных значениях  $B$  и  $U$  такое устройство работает как **масс-фильтр** – пропускает только ионы с фиксированным в некотором диапазоне  $m/z$

# Время-пролетный анализ



# Mass Spec Equation (TOF)

$$\frac{m}{z} = \frac{2Vt^2}{L^2}$$

**m** = mass of ion

**z** = charge of ion

**V** = ?

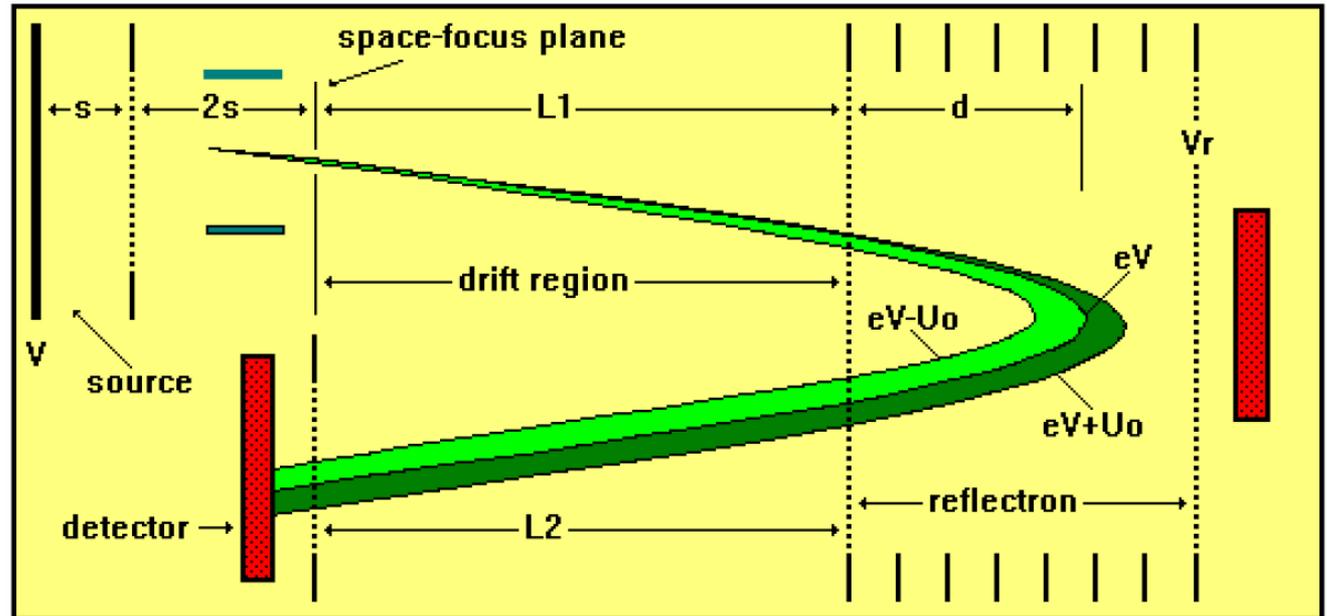
**L** = drift tube length

**t** = time of travel

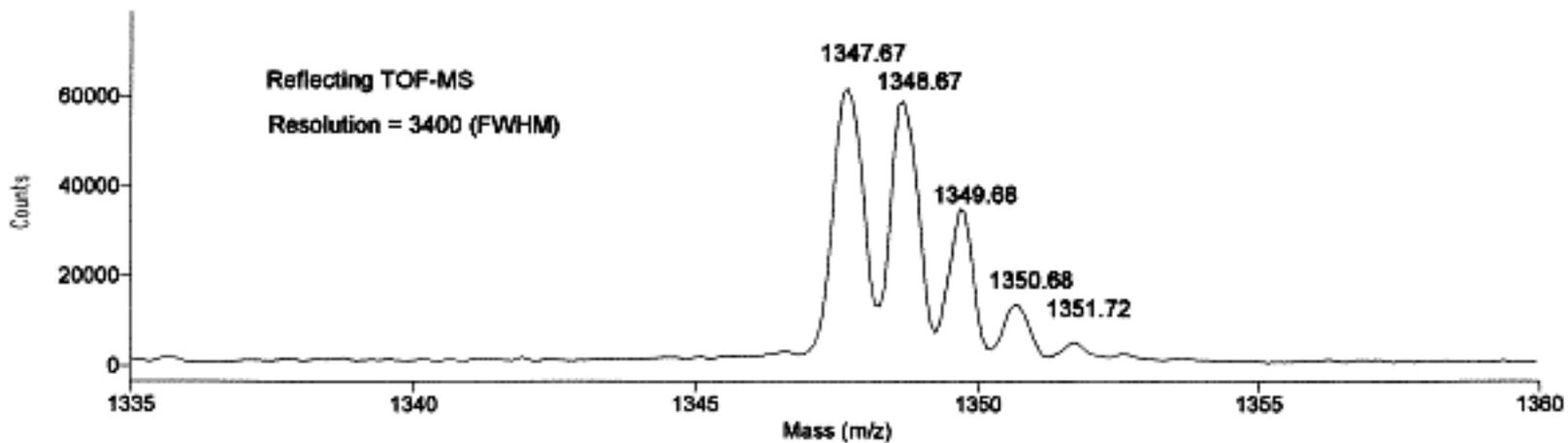
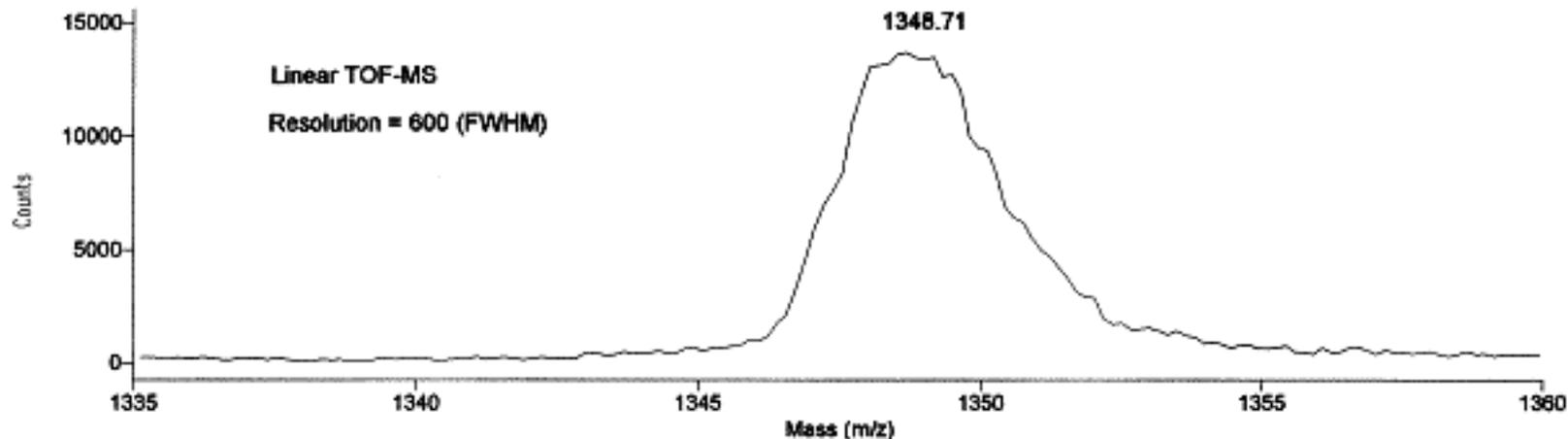


# Времяпролетный масс-спектрометр с рефлектроном

Б.А. Мамырин  
1919-2007

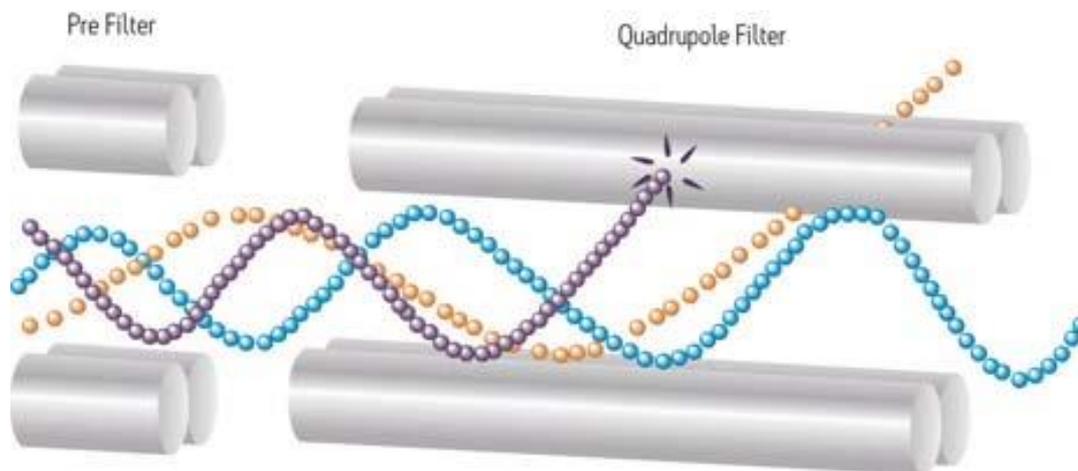
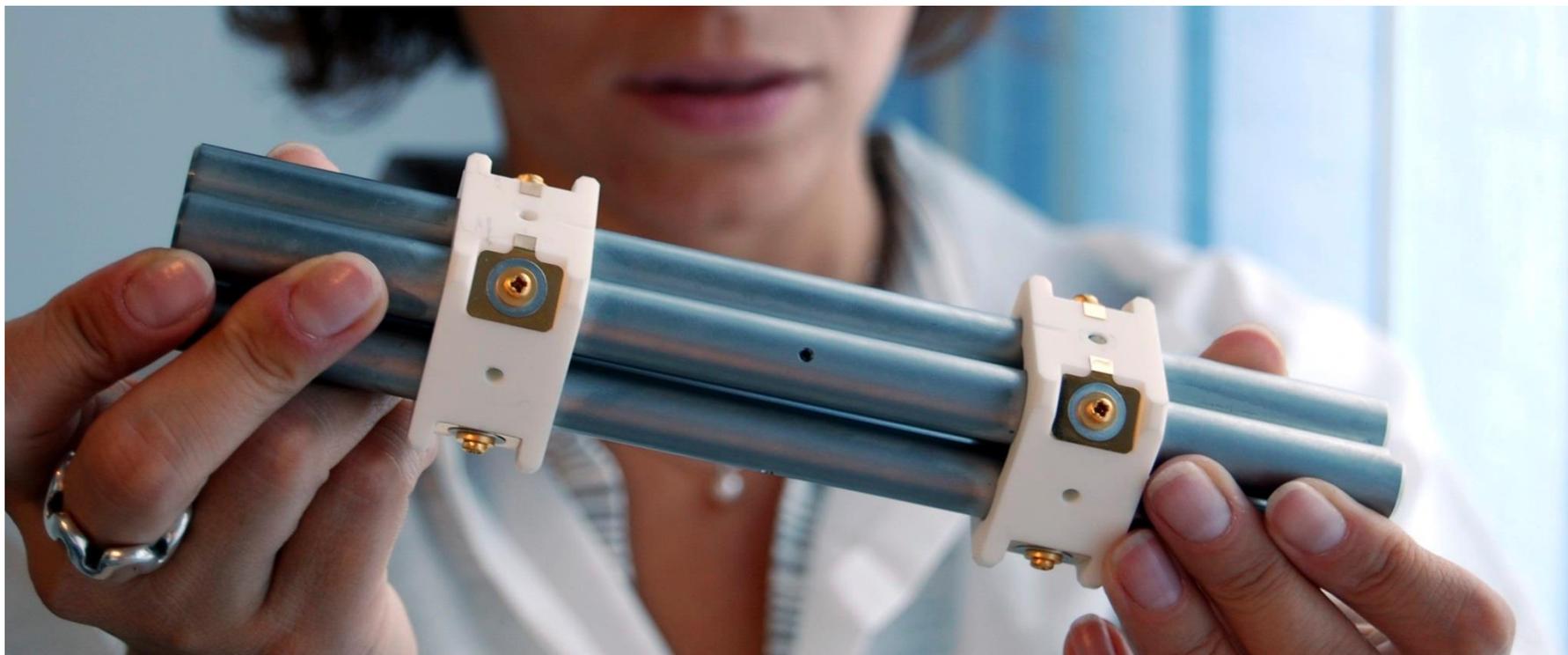


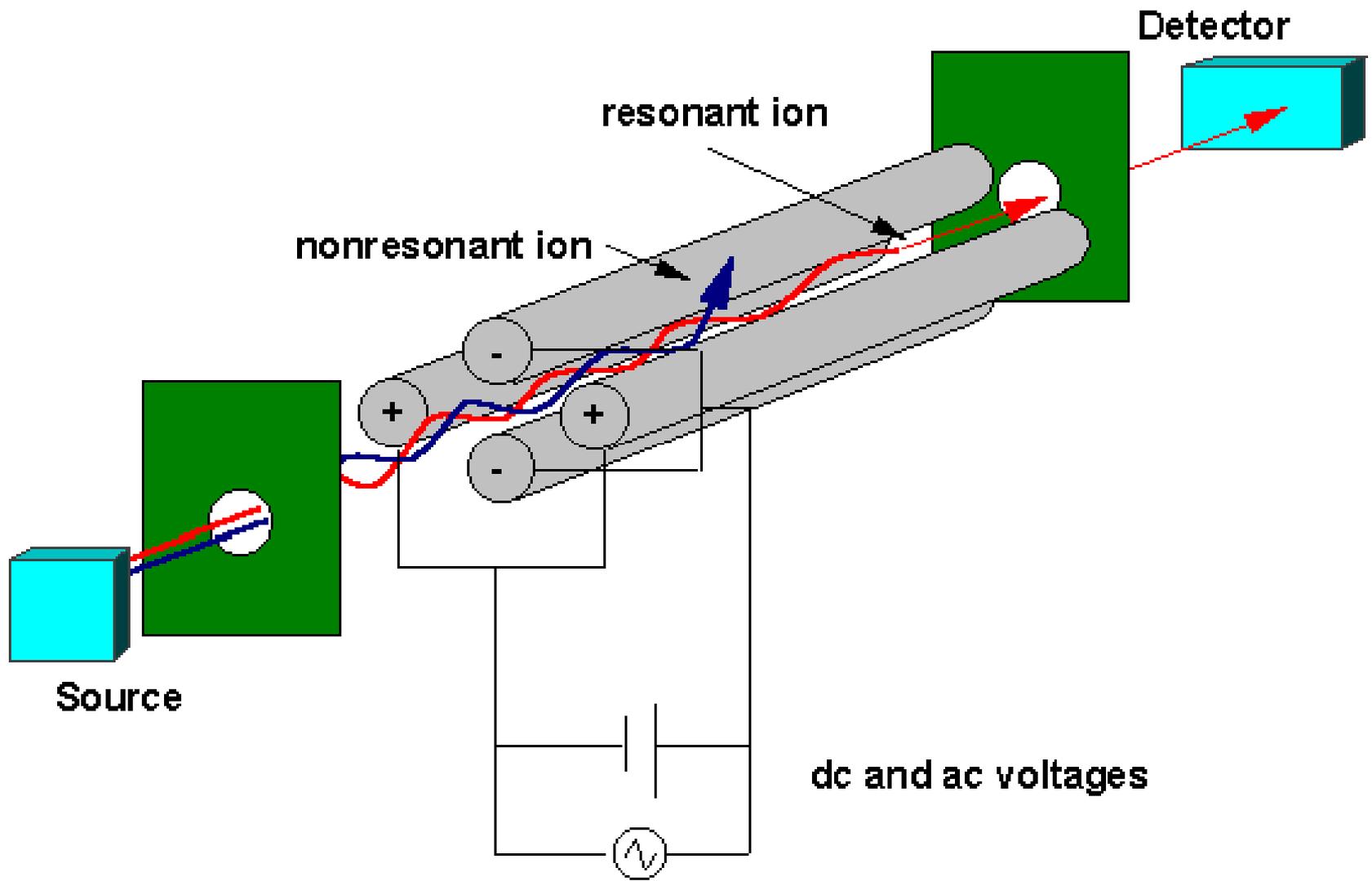
$$t = \left( \frac{m}{2eV} \right)^{1/2} [L_1 + L_2 + 4d]$$



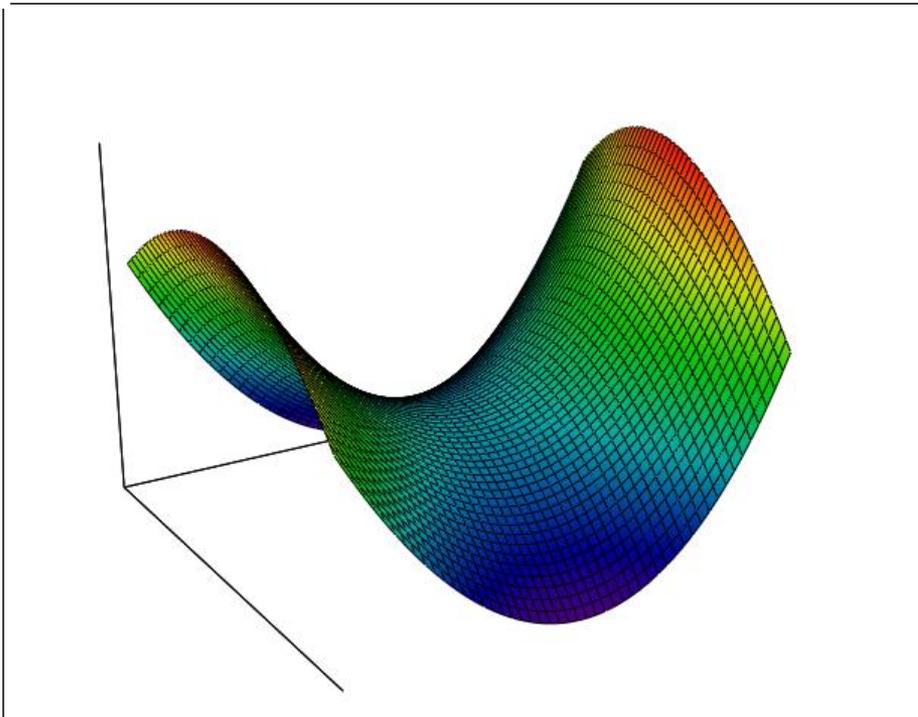
MALDI mass spectra of substance P in CHCA comparing mass resolution obtained in the linear (upper) and reflecting (lower) modes utilizing continuous ion extraction at threshold laser irradiance. 25 kV accelerating potential, 50 laser pulses averaged. <sup>29</sup>

# Квадрупольный масс-фильтр





# Почему в ВЧ поле ?



Экстремум : 
$$\frac{\partial \Phi}{\partial x} = \frac{\partial \Phi}{\partial y} = \frac{\partial \Phi}{\partial z} = 0$$

$$\Phi = a \cdot x^2 + b \cdot y^2 + c \cdot z^2 + \dots$$

Уравнение  
Лапласа : 
$$\frac{\partial^2 \Phi}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \Phi}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 \Phi}{\partial z^2} = 0$$

$$a + b + c = 0$$

Т.Ирншоу: Малые колебания вблизи экстремума электростатического поля неустойчивы хотя бы в одном направлении.

$$\Phi = (U + V \cos \Omega t) \cdot \frac{x^2 - y^2}{r_0^2}$$

## Переменное (периодическое) поле

П.Л. Капица 1930, Миллер 1958,  
В. Пауль, 1956г

# Почему Квадрупольные поля ?

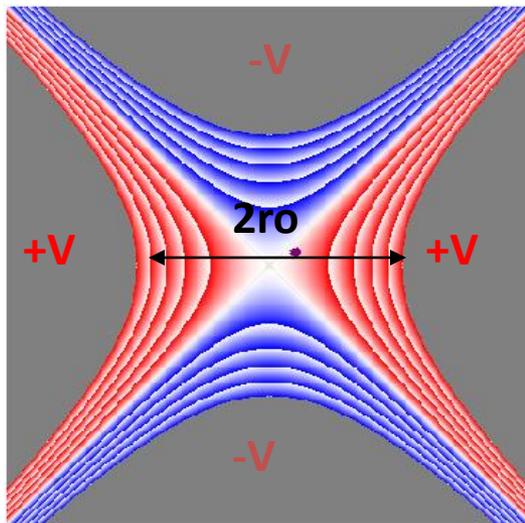
- Возвращающая сила прямо пропорциональна смещению → линейная система → частоты колебаний не зависят от амплитуды колебаний (энергии) и однозначно определяется удельной массой частиц.

$$\Phi = a \cdot x^2 + b \cdot y^2 + c \cdot z^2 + \dots$$

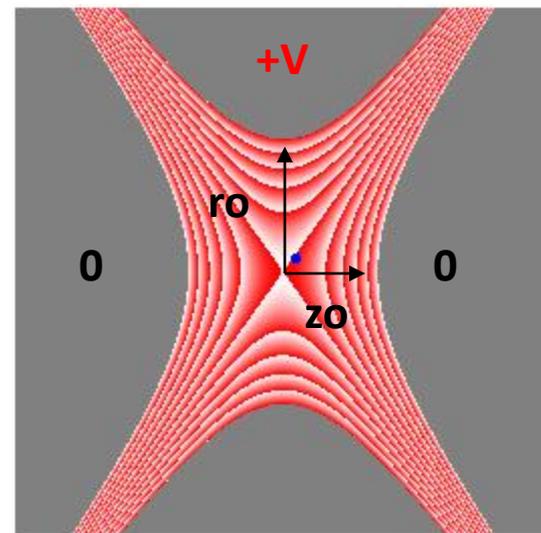
$$\Phi = (U + V \cos \Omega t) \cdot \frac{x^2 - y^2}{r_0^2}$$

$$\Phi = (U + V \cos \Omega t) \cdot \left[ \frac{x^2 + y^2 - 2z^2}{2r_0^2} + \frac{1}{2} \right]$$

Квадрупольный  
фильтр  
масс

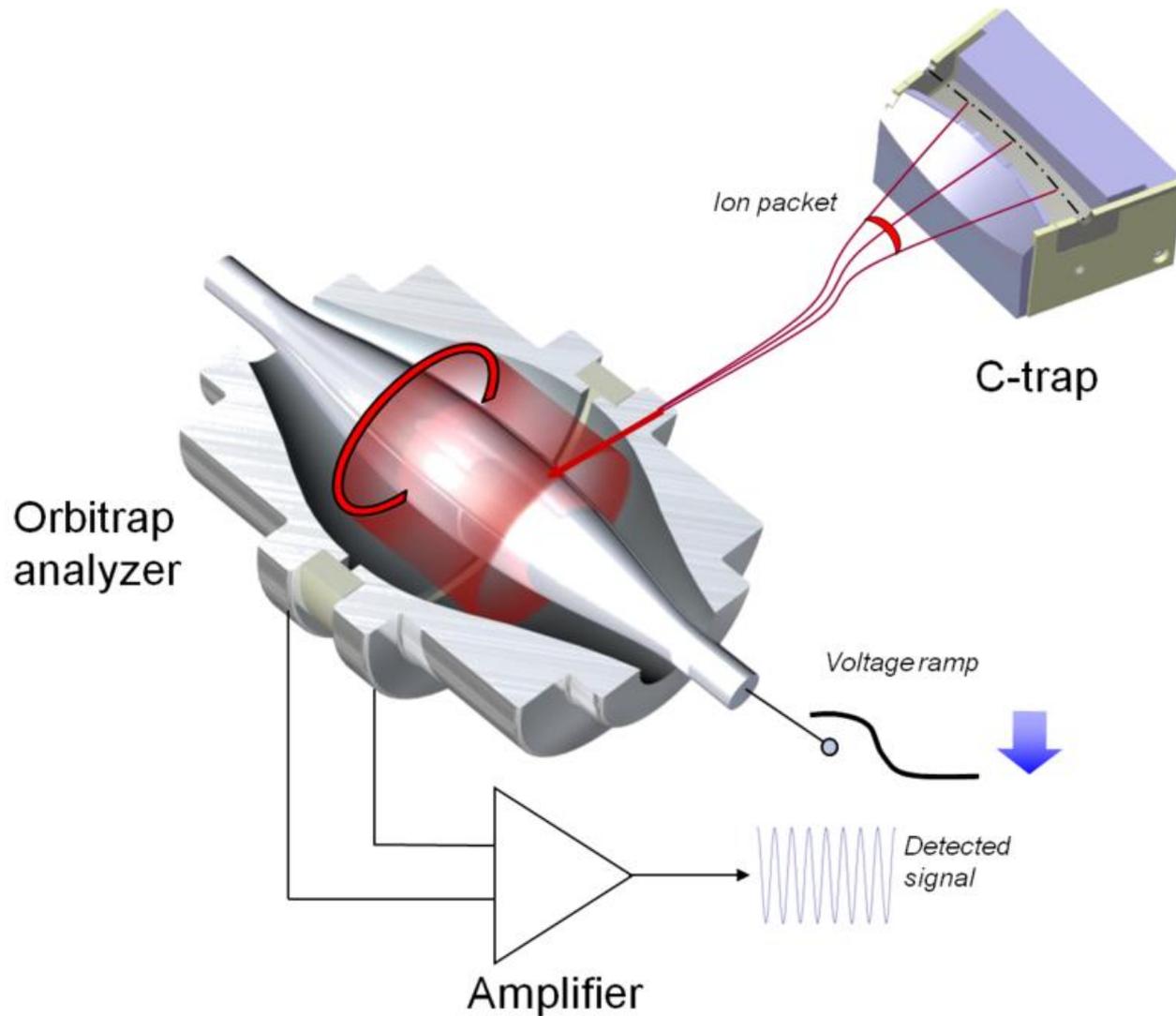


Трехмерная  
осесимметричная  
ловушка

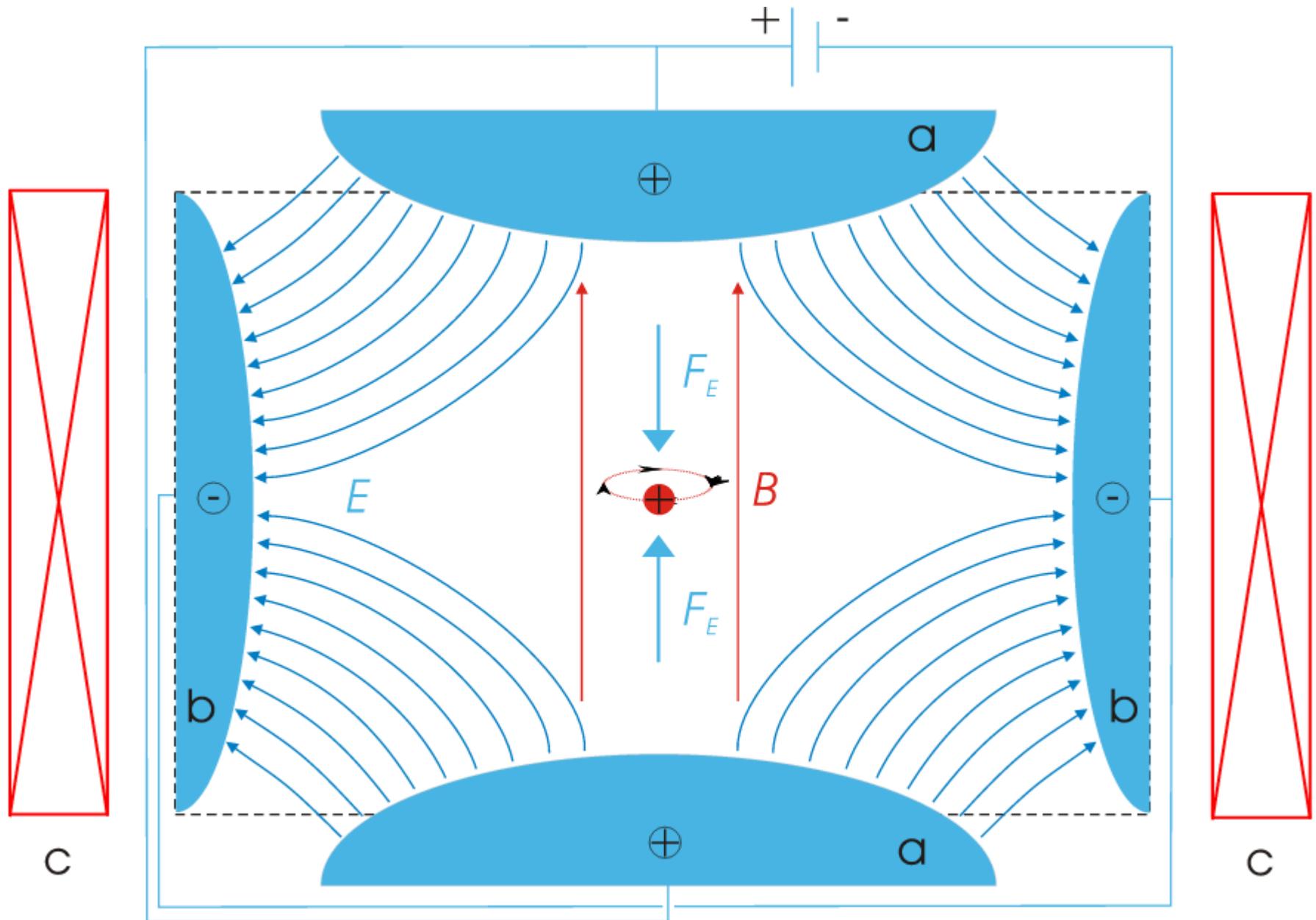


$$z_0 = r_0 / \sqrt{2}$$

# Ионные ловушки

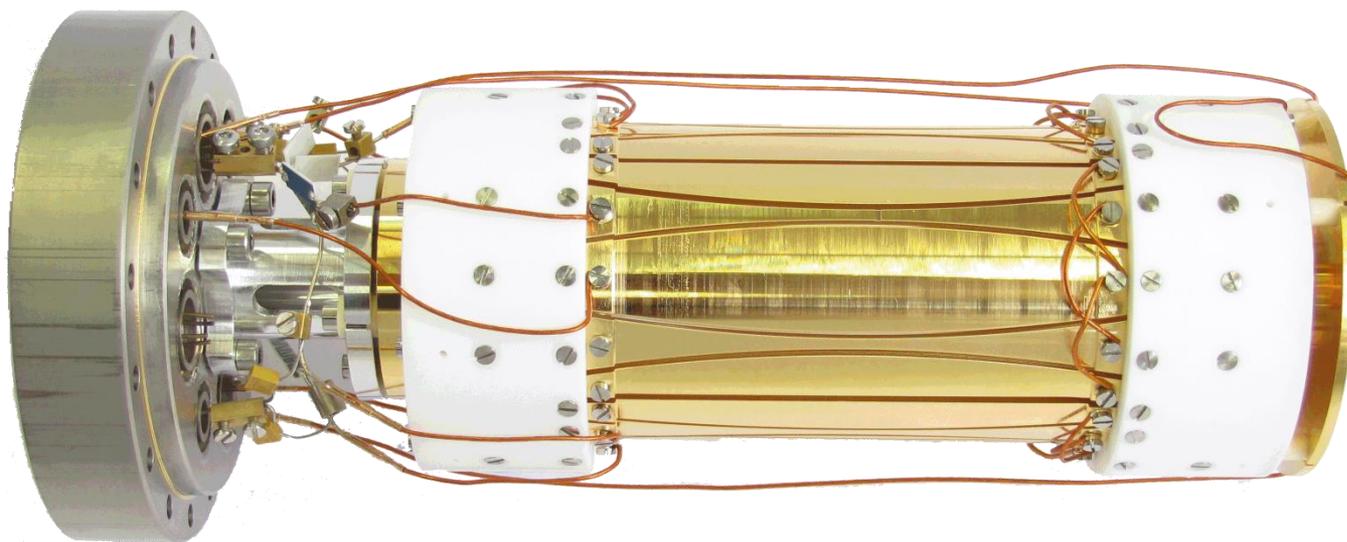


# Ионно-циклотронный резонанс



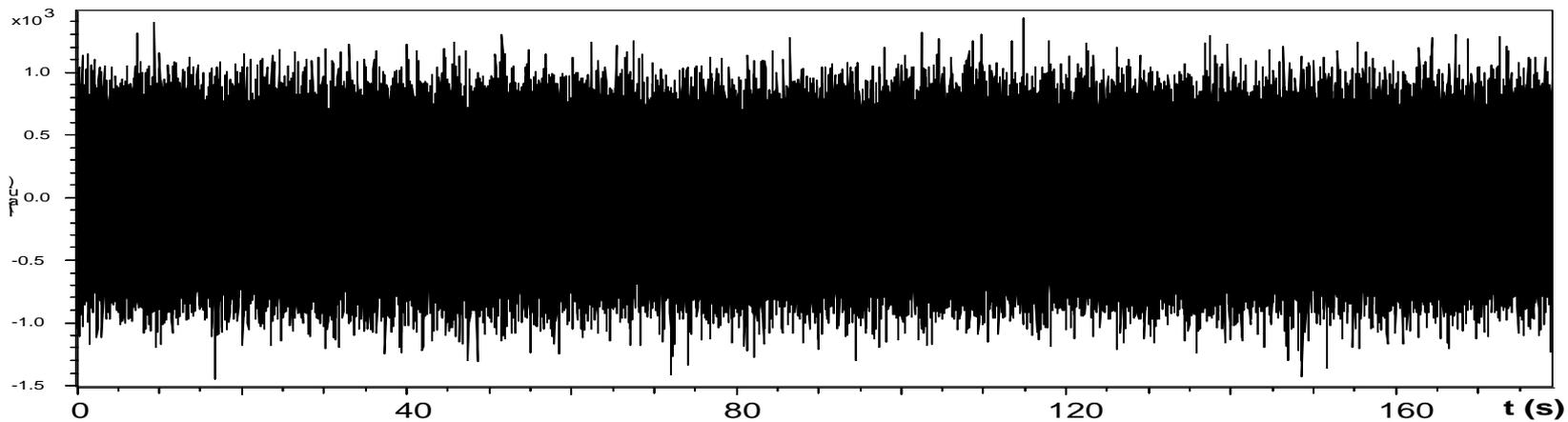
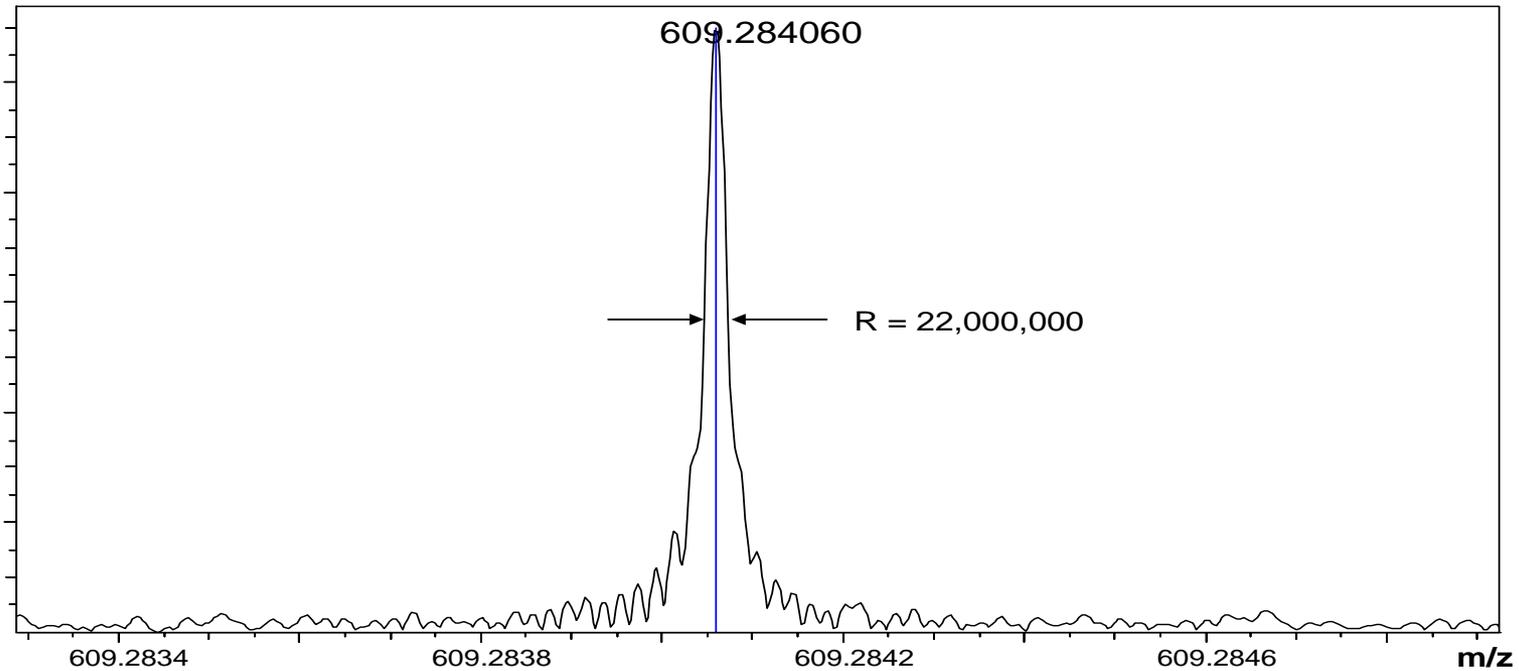
Создан новый класс ионных ловушек Пеннинга для масс-спектрометрии ионного циклотронного резонанса, в которых электрические поля гармонизируются за счет усреднения потенциала при циклотронном движении ионов.

Евгений Николаев, Иван Болдин



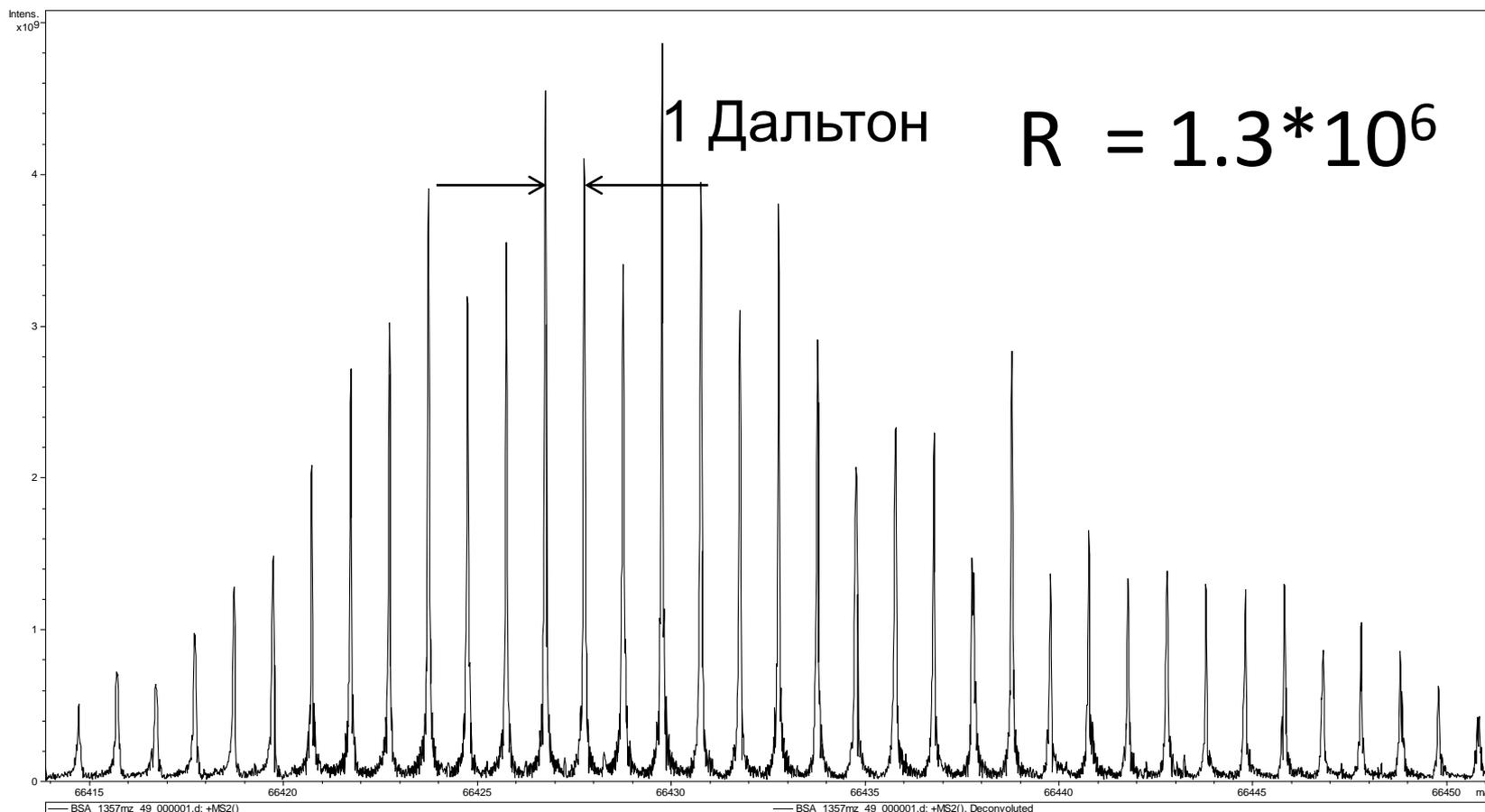
# Масс-спектр двухзарядного резерпина

## Абсолютный мировой рекорд в масс-спектрометрии

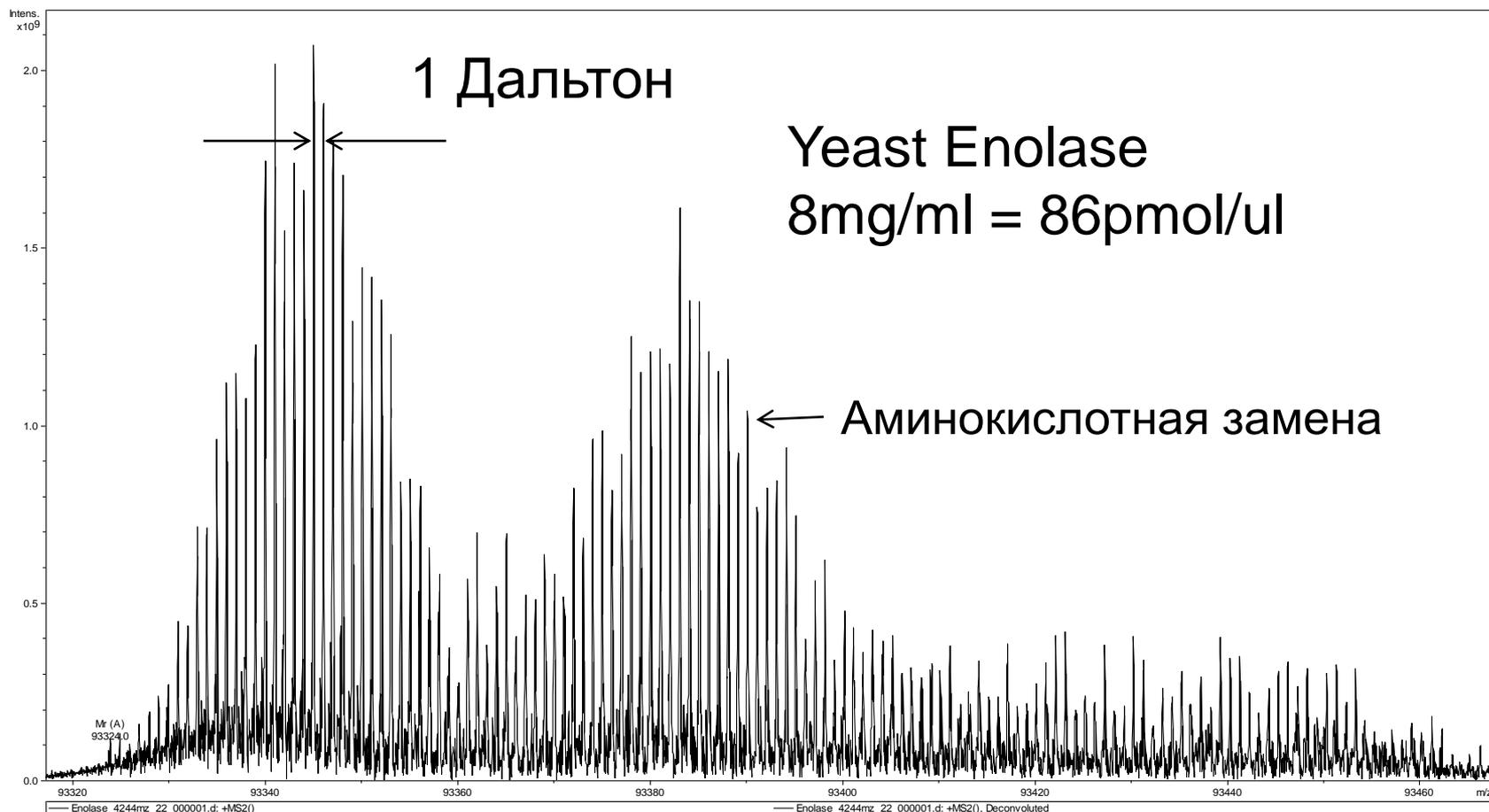


180s

# BSA, Бычий альбумин, (66420 Да) изолирован 28+ зарядный ион (магнит 7 Тесла)



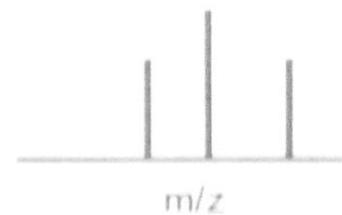
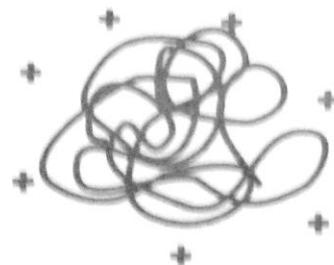
# Димер енолазы (93340 Da) изолирован 22+ зарядный ион (магнит 7 Тесла)



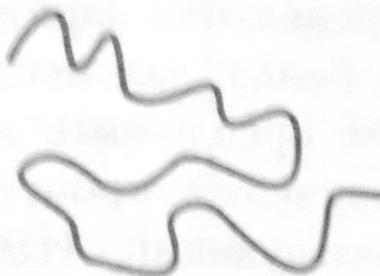
Свернутый белок



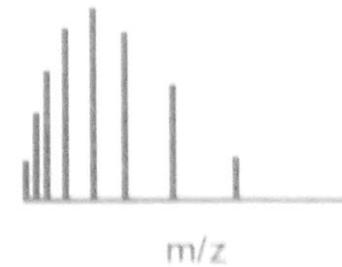
ЭСИ-МС

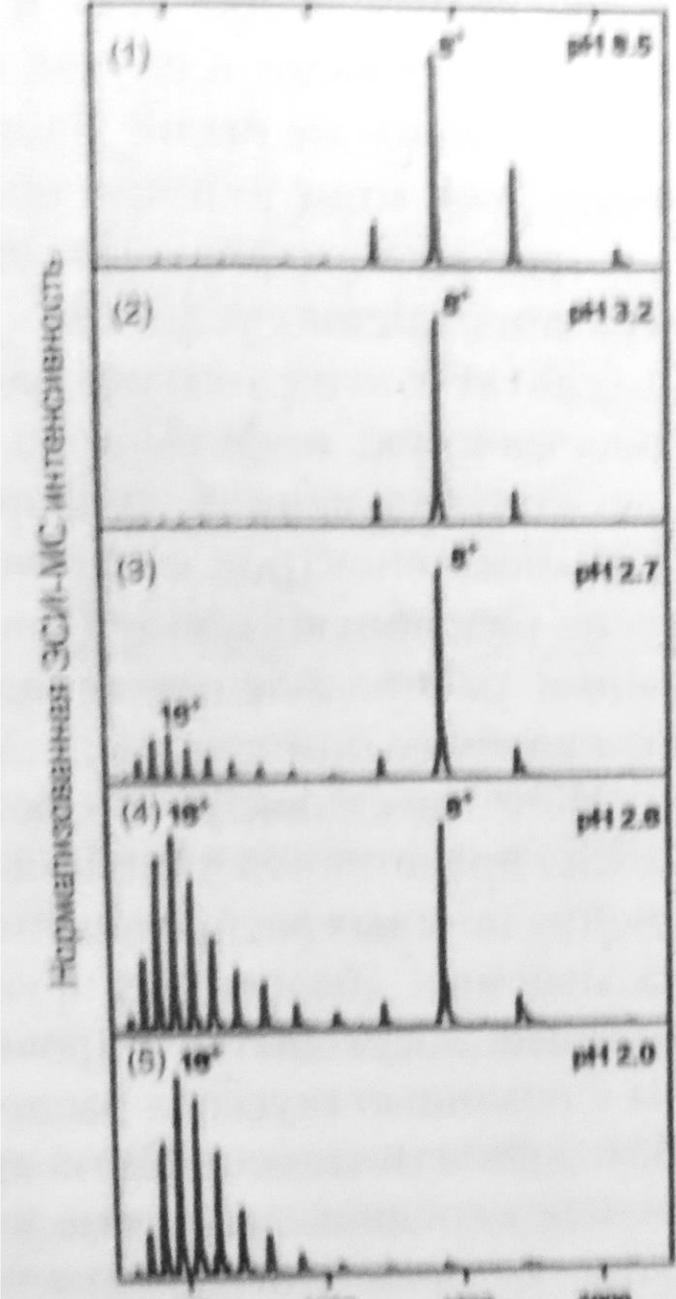


Развернутый белок

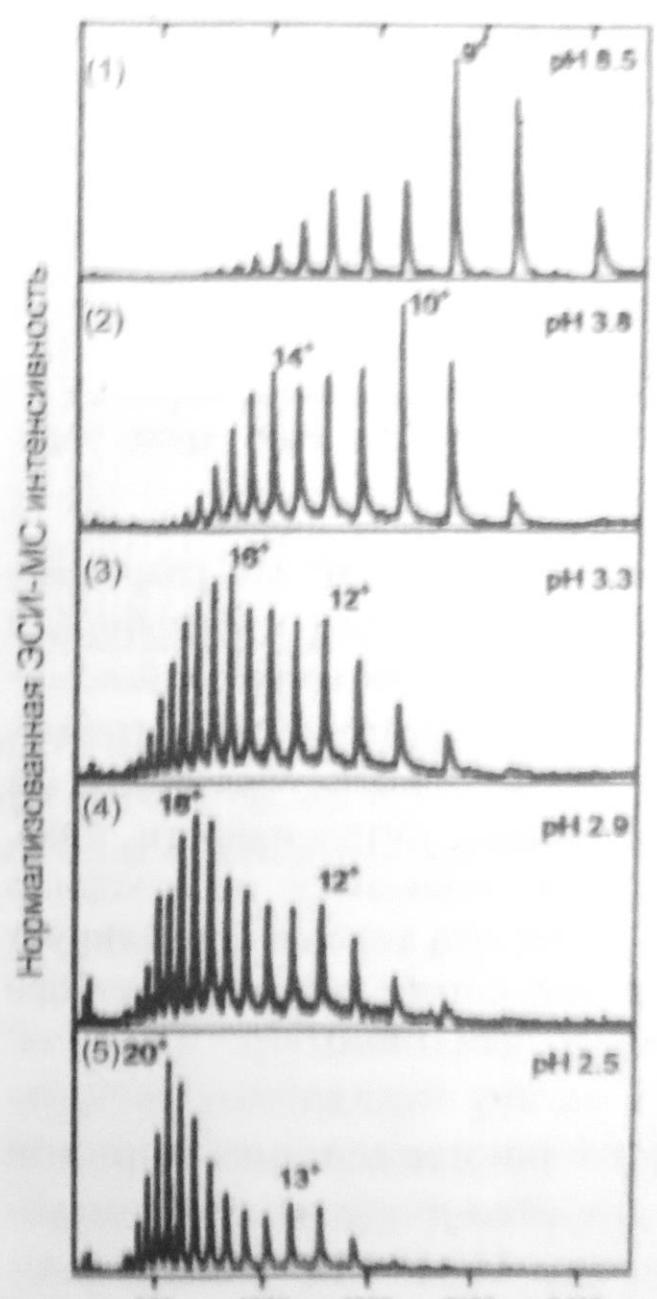


ЭСИ-МС





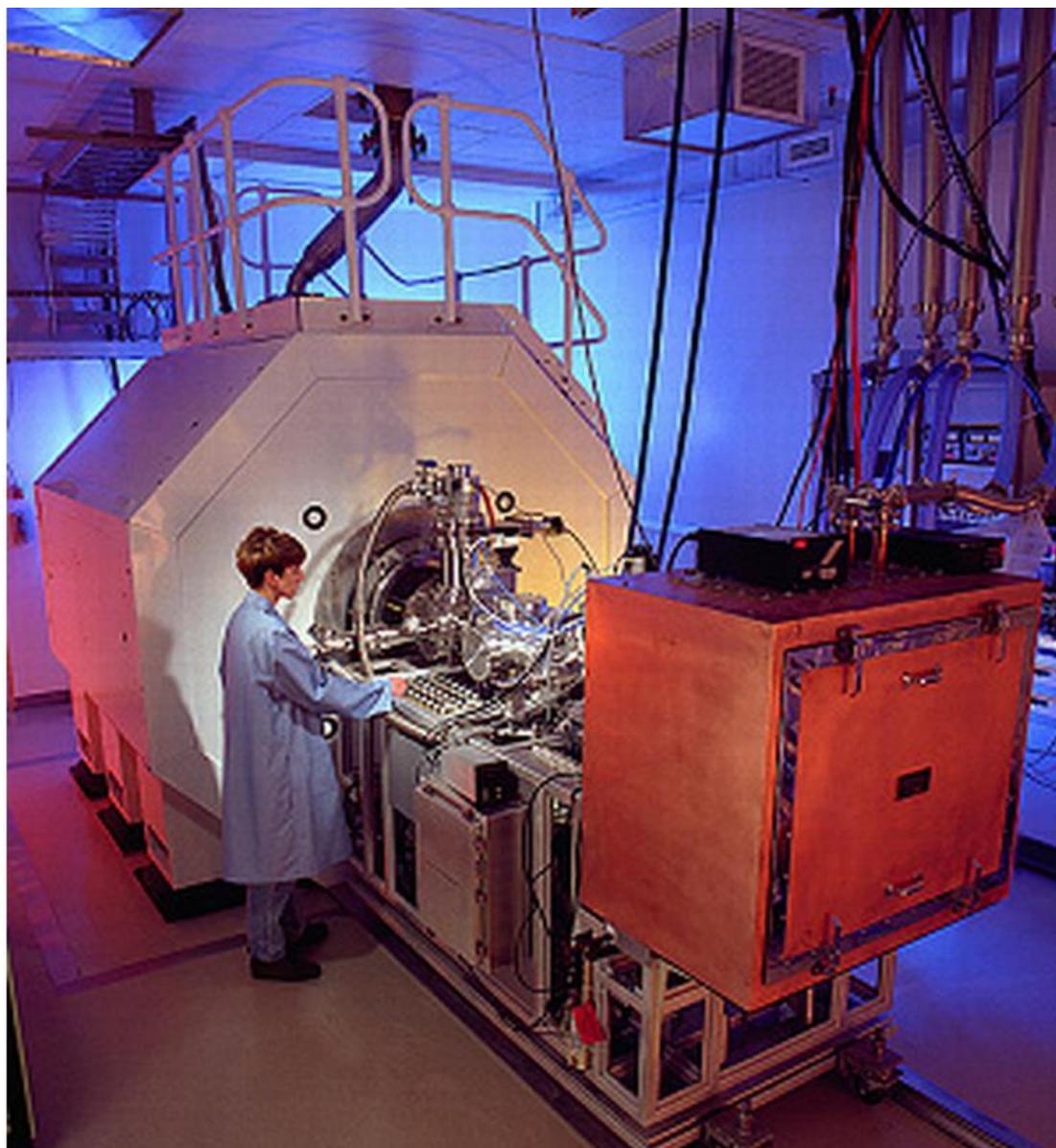
**Цитохром С**



**апо-миоглобин**

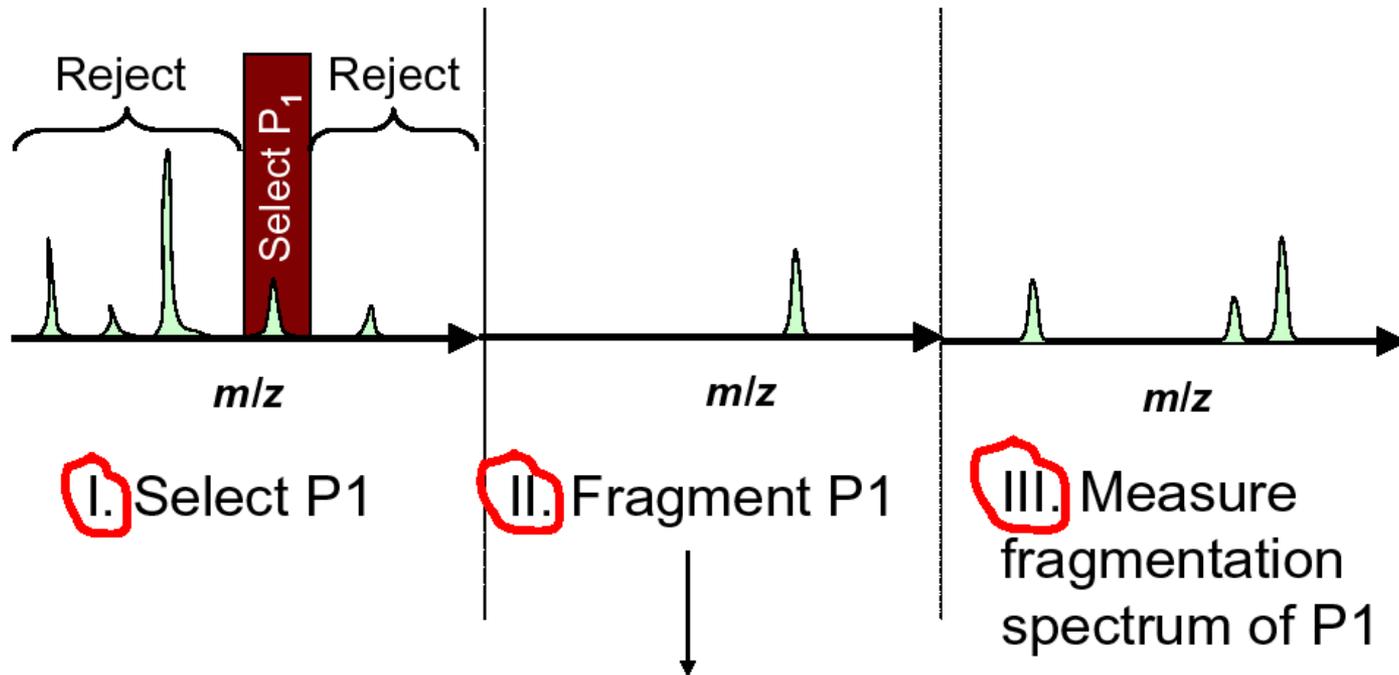
# Комплекс жидкостной хроматограф + масс-спектрометр



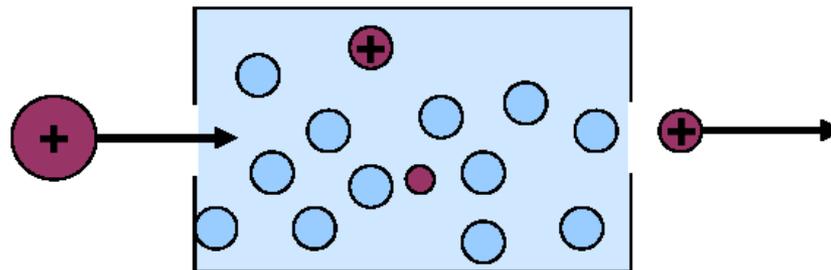


# Тандемная масс- спектрометрия (MS/MS)

# Tandem MS (or MS/MS)



## Collision Induced Dissociation (CID)



## Методы фрагментирования ионов белковых молекул

**Столкновительная диссоциация Collision-Induced Dissociation**

**(SORI-CID)**



**Многофотонная ИК диссоциация Infrared Multiphoton Dissociation**

**(IRMPD)**



**Диссоциация при захвате медленных электронов Electron Capture Dissociation**

**(ECD)**



**Диссоциация при передаче электрона Electron Transfer Dissociation**

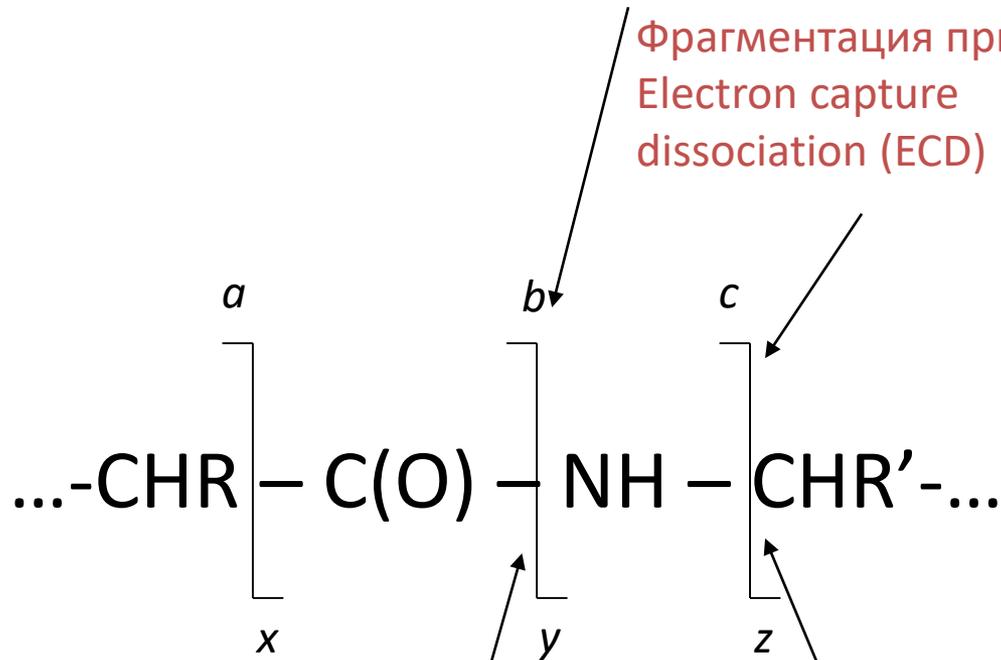
**(ETD)**



# Методы фрагментации пептидов

Фрагментация, индуцированная  
соударениями/  
Collision induced dissociation (CID)

Фрагментация при захвате электрона/  
Electron capture  
dissociation (ECD)

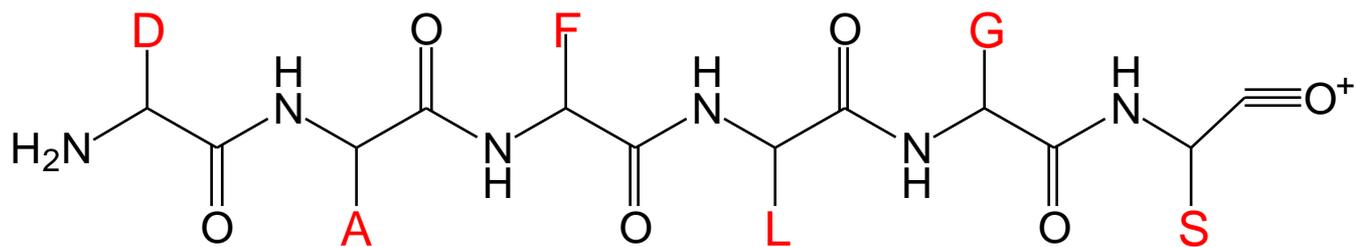
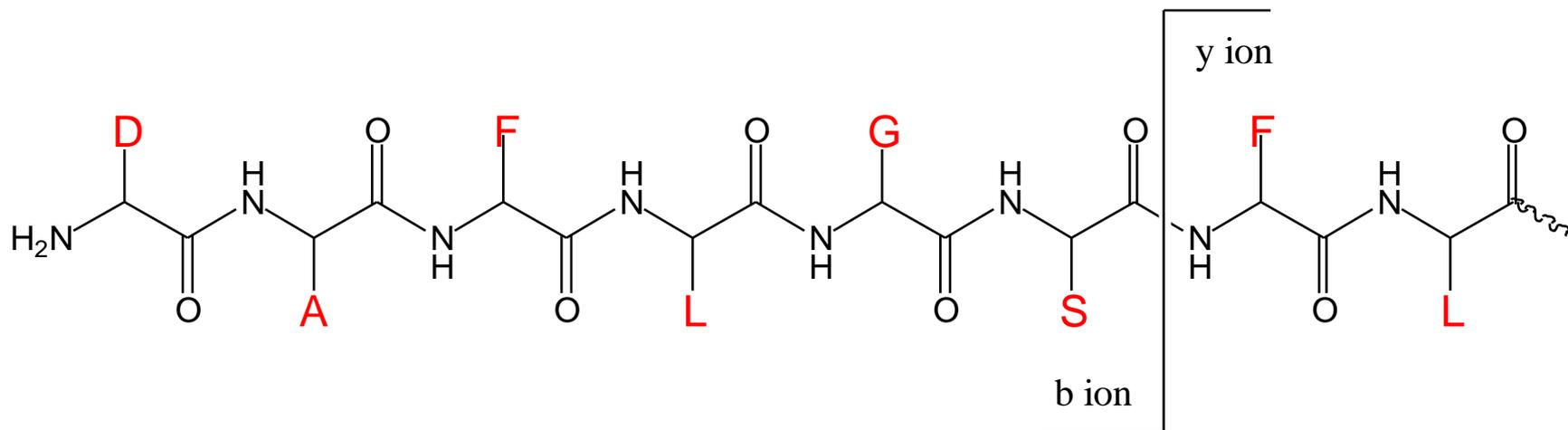


Многофотонная ИК фрагментация  
Infrared multiphoton dissociation  
(IRMPD)

Фрагментация при передаче  
электрона  
Electron transfer  
dissociation (ETD)

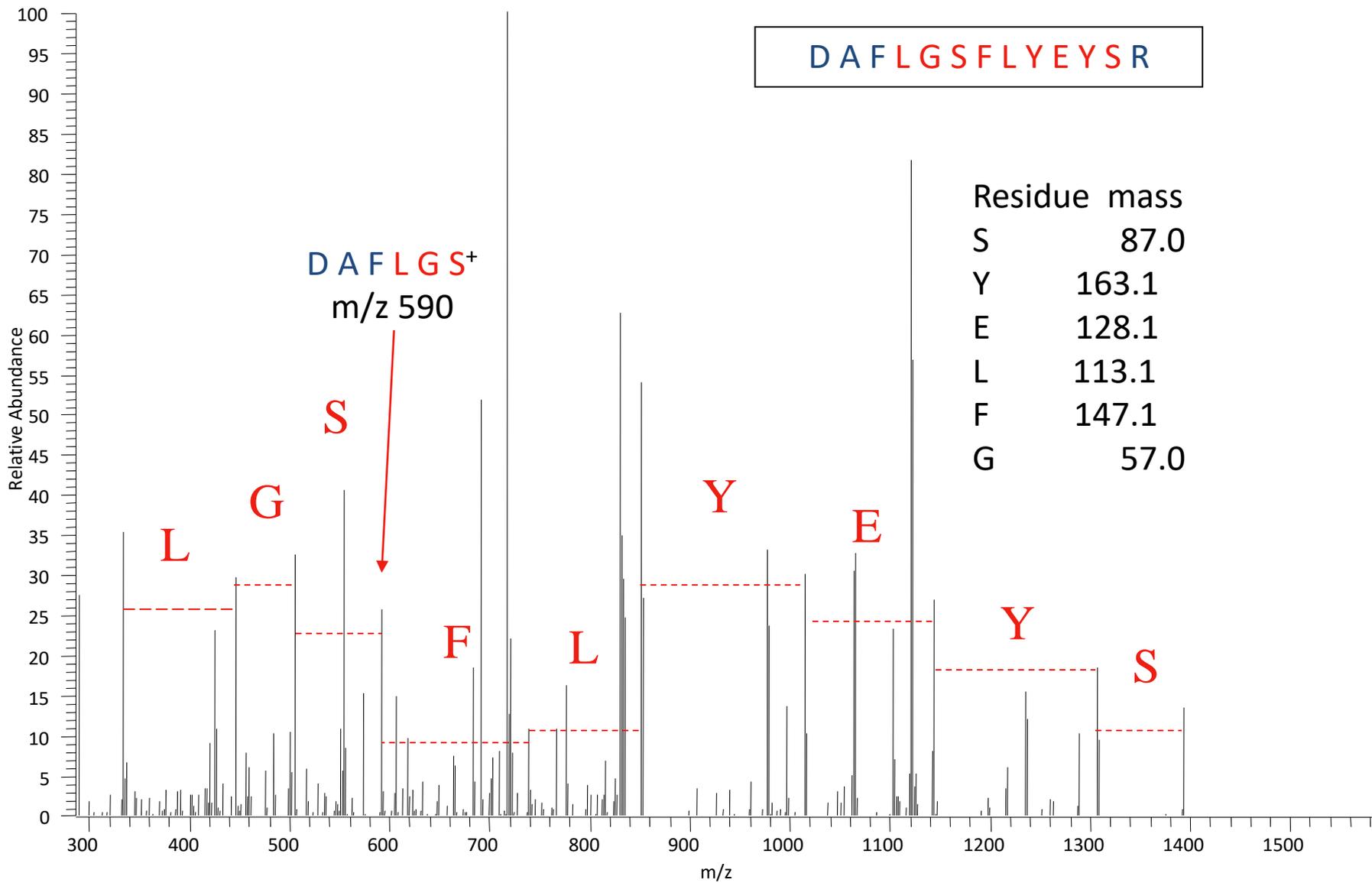
N term  $\longrightarrow$  C term

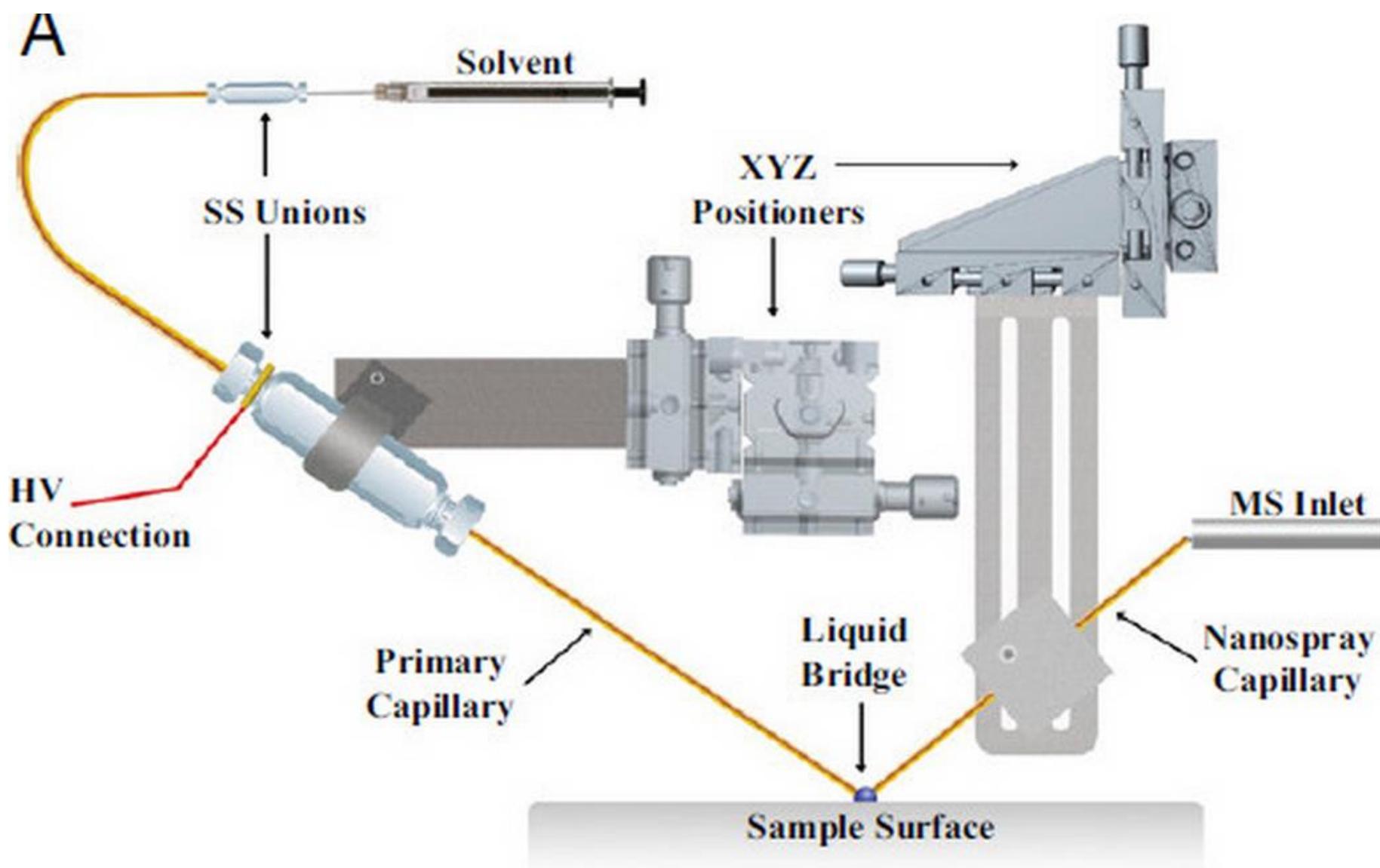
DAFLGSFLYEYSR



b ion  
(m/z 590)

# MS-MS Spectrum





## Methods of the Year

**2007** : NGS (Next Generation Sequencing)

**2008** : **STED** microscopy (STimulated Emission Depletion)

**2009** : iPS cells (induced Pluripotent Stem cells)

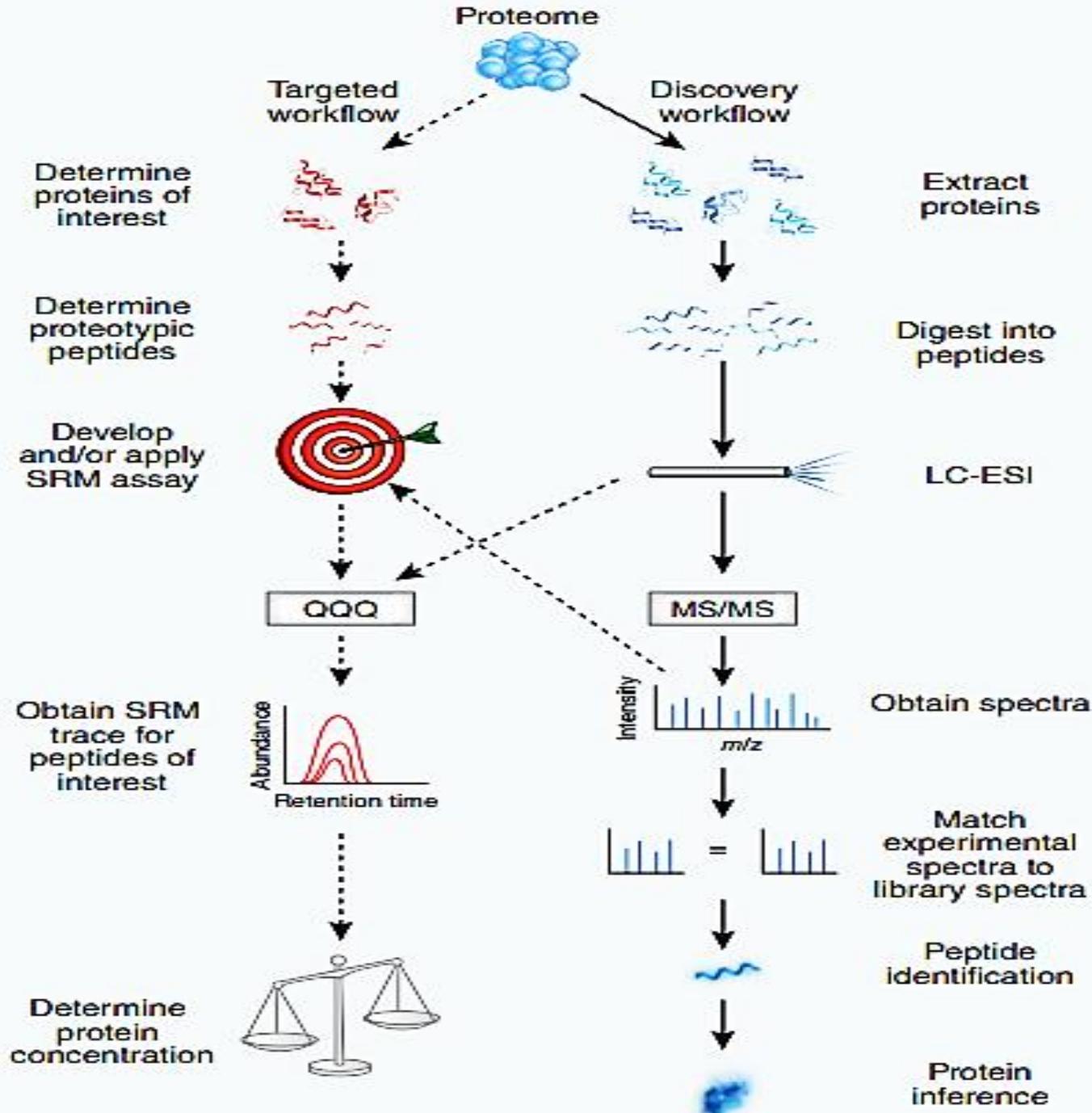
**2010** : Optogenetics

**2011** : Genome Editing with Engineered Nucleases

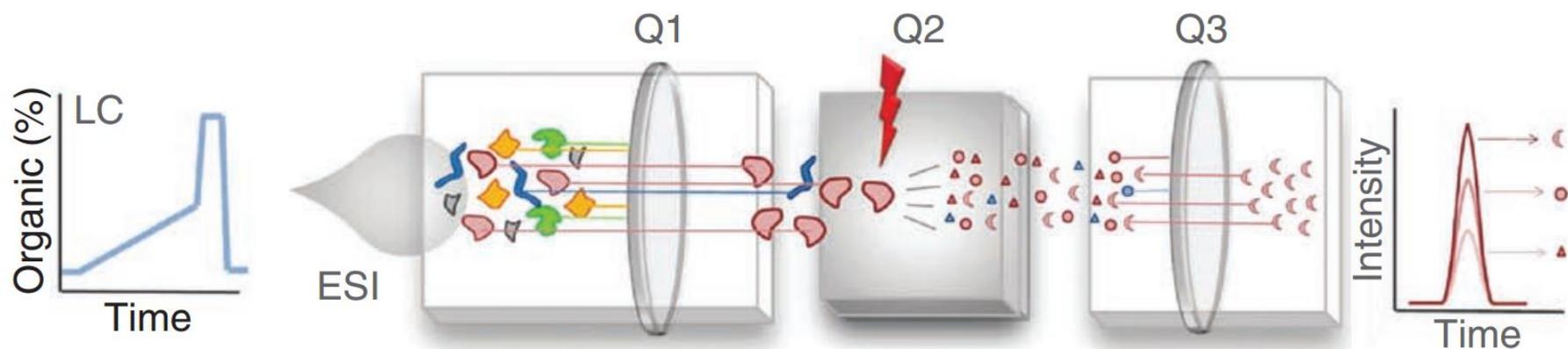
**2012** : **Targeted Proteome Analysis**

**2013** : DNA & RNA sequencing of single cells





# Method of the Year 2012: Single and Multiple Reaction Monitoring (SRM & MRM)



# Отбор физико-химических характеристик пептидов для предсказания протеотипических пиптидов

Protein sequence

RAGMCIAEKT

	Peptide sequence										Total	Average
	R	A	G	M	C	I	A	E	K	T		
Hydrophobic moment	10.0	0.00	0.00	1.90	0.17	1.20	0.00	3.00	5.70	1.50	21.97	2.44
Negative charge	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	1.00	0.11
Hydrophilicity	3.00	-0.50	0.00	-1.30	-1.00	-1.80	-0.50	3.00	3.00	-0.40	4.90	0.54
Beta sheet propensity	-0.40	-0.35	0.00	-0.46	-0.50	-0.60	-0.35	-0.40	-0.40	-0.48	3.46	0.38

# Заключение

## Современные методы биологической масс-спектрометрии:

### Масс-анализаторы

- Квадрупольные ионные ловушки
- Времяпролетные (TOF)
- Масс-спектрометры с преобразованием Фурье (ИЦР ПФ, орбитальная ловушка)

### Методы ионизации

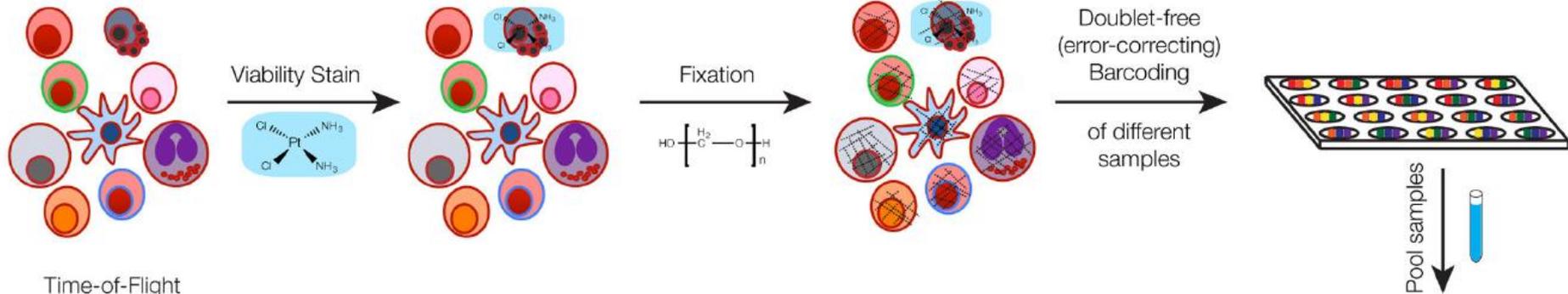
- **Электроспрей**
- MALDI
- ББА

### Методы фрагментации ионов

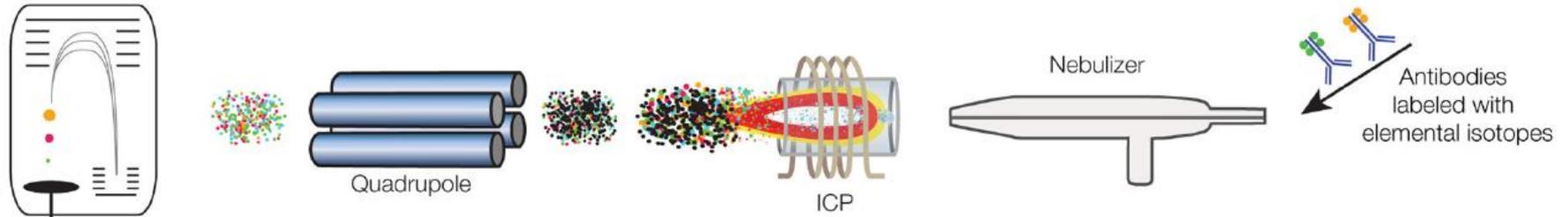
- **В столкновениях с нейтралями**
- При поглощении ИК излучения
- При захвате/передаче электрона

# CyTOF : масс-цитометрия

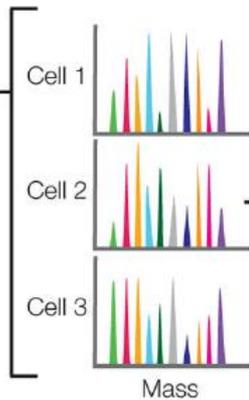
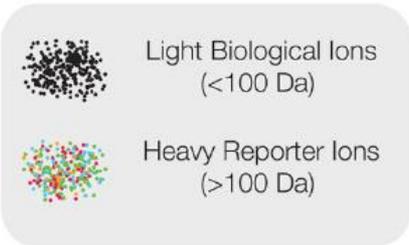
Single-Cell Suspension



Time-of-Flight



Integrate signal for each cell



Element	A	B	C	D	...N
Cell 1	3	8	9	7	...8
Cell 2	1	8	6	5	...4
Cell 3	9	9	4	5	...7
...					

.FCS file

Analysis

