

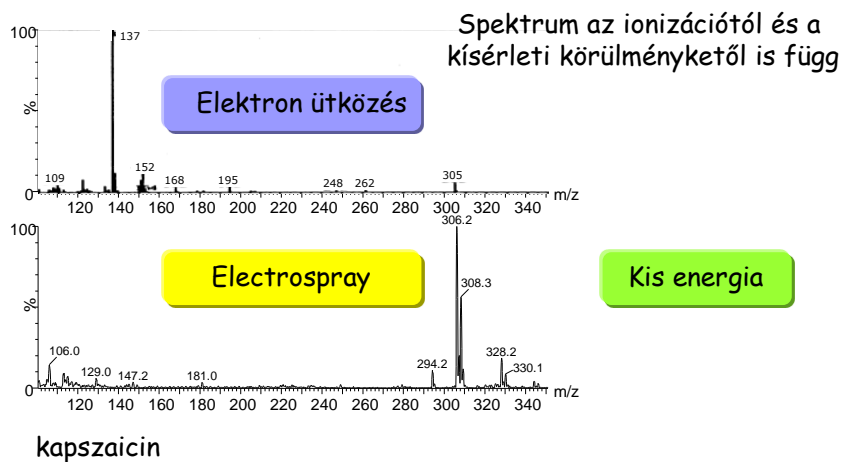
Tömegspektrometria II

Dr. Drahos László
MTA Természettudományi Kutatóközpont
e-mail: drahos.laszlo@ttk.mta.hu

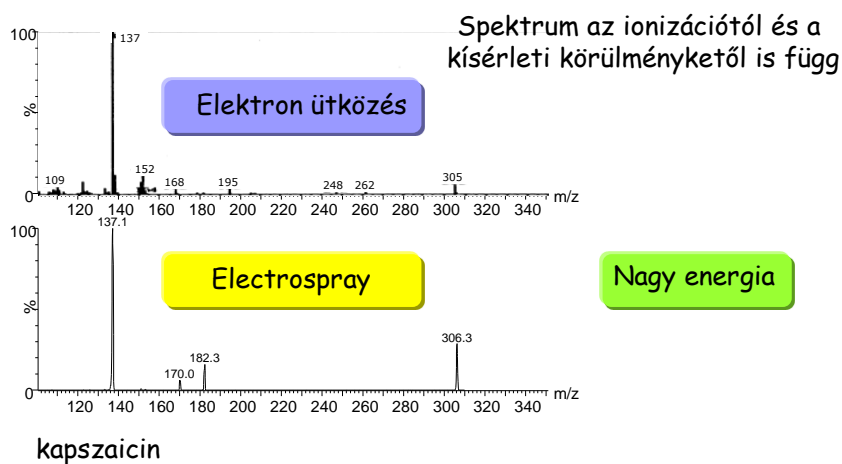
Tartalom

- Tandem MS
- Kapcsolt technikák (LC-MS)
- Biológiai minták vizsgálata, proteomika
- Példák:
 - Űrkutatás, borok vizsgálata
 - élelmiszeranalitika,
 - orvosi alkalmazások - glikoproteomika

Fragmentáció



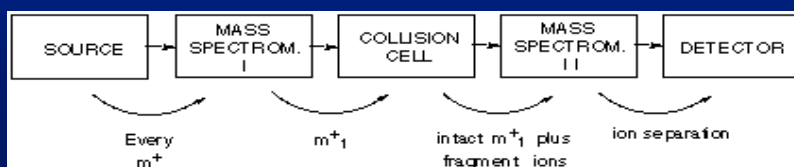
Fragmentáció



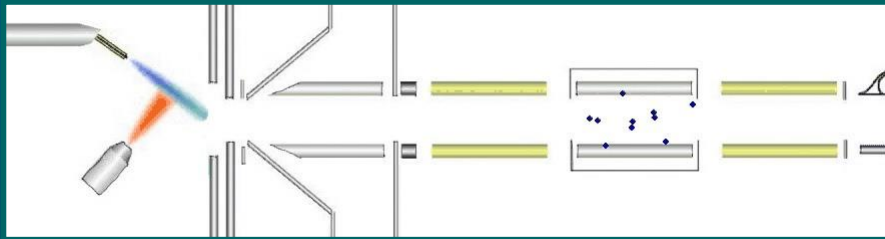
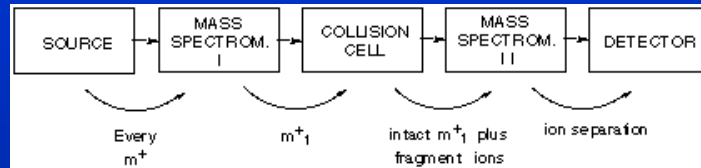
Tandem Tömegspektrometria

Tandem Tömegspektrometria

- Tandem tömegspektrometriának nevezzük azokat a módszereket, amelyek során gázfázisú fragmentációs folyamatokban anyaion-leányion kapcsolat határozható meg.
- Az ionizációt követően a tömeganalízis során a kiválasztott iont újabb reakcióba visszük és az így nyert fragmenseket tömeg/töltés értékük szerint szétválasztjuk.
- Ily módon a vizsgálandó ionról újabb tömegspektrumot veszünk fel.



Tandem tömegspektrométer



ionizáció

tömegszelekció

gerjesztés

tömegszelekció

detektálás

Miért fontos?

Szerkezeti információ (nem csak molekulatömeg):

- szerkezetmeghatározás
- alkalmazás pl. peptidszekvenálás, izomerek megkülönböztetése, metabolitkutatás, stb.

Szelektivitás növelése:

- hatékonyabb mintaeltávolítás:
a kromatográfiát kiegészíti ill. helyettesítheti
- a kémiai zajszintet csökkenti

Másodlagos gerjesztés

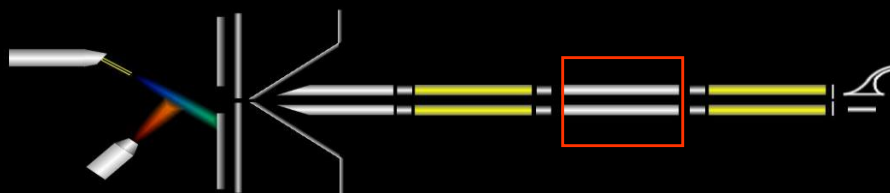
Ha a belsőenergia nem elégséges a fragmentációhoz, másodlagos gerjesztés, ütköztetés:

- Gáz molekulákkal (CID, collision induced dissociation)
- Felülettel (SID, surface induced dissociation)
- Fotonokkal (PID, photon induced dissociation)
- Elektronokkal (ECD, electron capture dissociation)
- Elektron átadás (ETD, electron transfer dissociation)

Ütköztetéses aktiválás (CID)

Legelterjedtebb és legegyszerűbb gerjesztés (egyszerűen kivitelezhető, kereskedelmi készülékek esetén leggyakoribb)

Gáz molekulákkal ütköztetjük az ionokat (nemesgáz, nitrogén)



Mi történik? – a kinetikus energia belső energiává alakul

- az ion nagyobb mértékben ill. más úton is fragmentálódhat
- egyéb folyamatok: töltéscsere, szóródás, kémiai reakció (különféle „trükkökkel” csökkentik, pl. kvadrupóló cella)

Ütköztetési aktiválás (CID)

A molekula méretének növekedtével a fragmentáció mértéke csökken.

Okok:

- lassabb reakciók
- kisebb tömegközépponti ütközési energia

Megoldás?

- Fehérjék: emésztés + tandem tömegspektrometria
- Sokszoros ütközések (ion csapda készülékek esetén)
- Felülettel történő ütköztetés (szektor készüléken)
- ECT, ETD

MS/MS - készülék típusok

- ✓ Különböző készülék típusok, elsősorban az analizátor definiálja
- ✓ MS/MS történhet **térben** (az ionok az egyik analizátorból a másikba repülnek: mágneses (sector), quads, TOF)
- ✓ Vagy **időben** (ionok egy térrészben tartózkodnak, időben más történik velük, ioncsapda, FT-ICR)

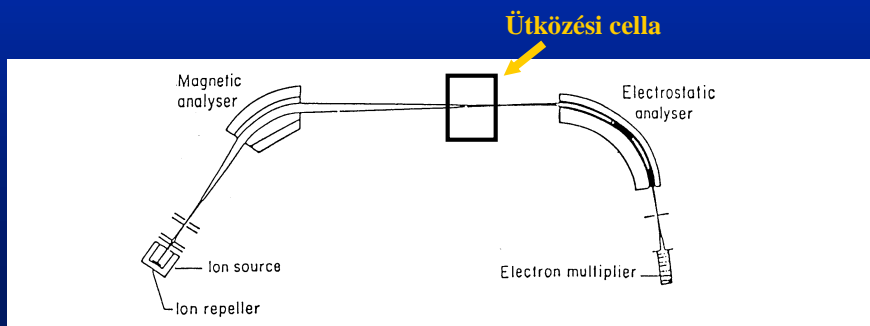
Sectors
Quadrupoles
Ion traps
Time-of-flight (TOF)
Fourier-transform
FT-MS or FT-ICR
Hybrids

MS/MS spektrum jelentősen függ a készülék típusától!
Kvarupólok és ion csapdák a legegyszerűbbek, leggyakoribbak

MS/MS spektrumkönyvtár??????

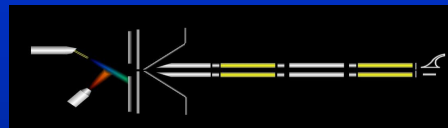
Ütköztetési aktiválás szektor készüléken

- nagyenergiájú ütközések
- az anyaionok kinetikus energiája 3-10 keV (tipikusan 8 keV)
- egy vagy néhány ütközés (csak az ionok töredéke ütközik)
- a fragmensek kis intenzitásúak (kevés idő áll rendelkezésre a bomlásra)



Ütköztetési aktiválás kvadrupól készüléken

- Kis ill. közepes ütközési energia
- Kinetikus energia 1-100 eV között
- Többszörös ütközések, int. frag.
- Változatos pásztázási módok

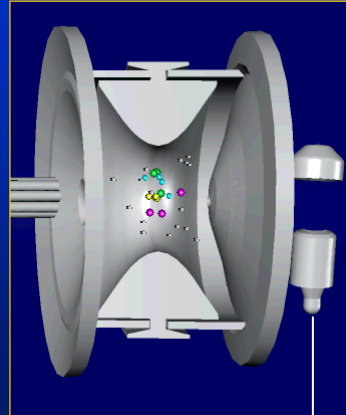


- Product Ion Scan
- Precursor Ion Scan
- Neutral Loss
- Multiple Reaction Monitoring (MRM)

szervezetigazolás!
molekulaion keresés
jellegzetes változások (pl. vízvesztés keresése)
lehetséges szerkezetek monitorozása, kvantitatív mérések

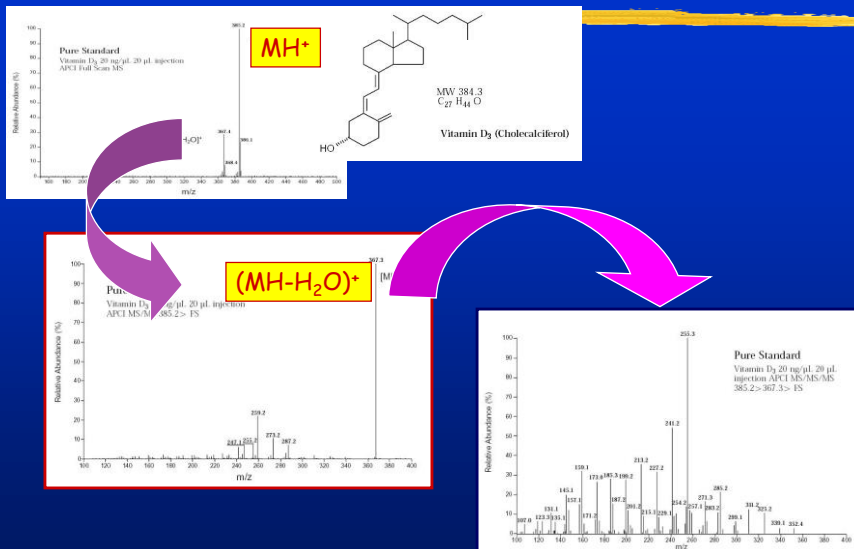
Ütköztetési aktiválás ion csapda készüléken

- Kis energiájú ütközések (1-50 eV)
- Sokütközéses gerjesztés (msec)
- MS^n (szerkezetkutatás!)

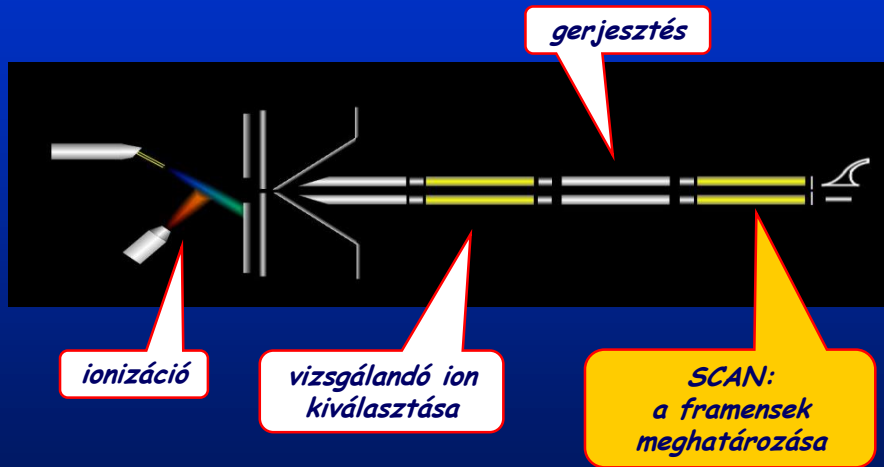


ThermoFinnigan ion csapda

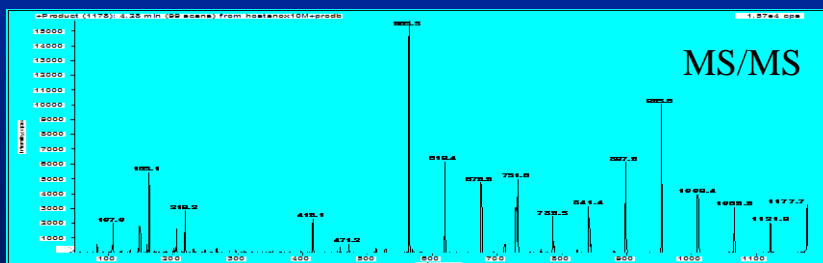
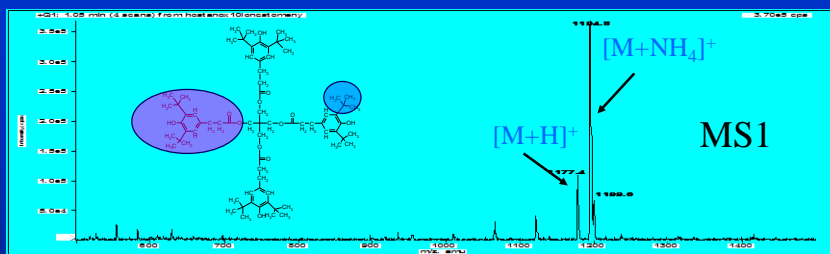
Példa: (MS^3)



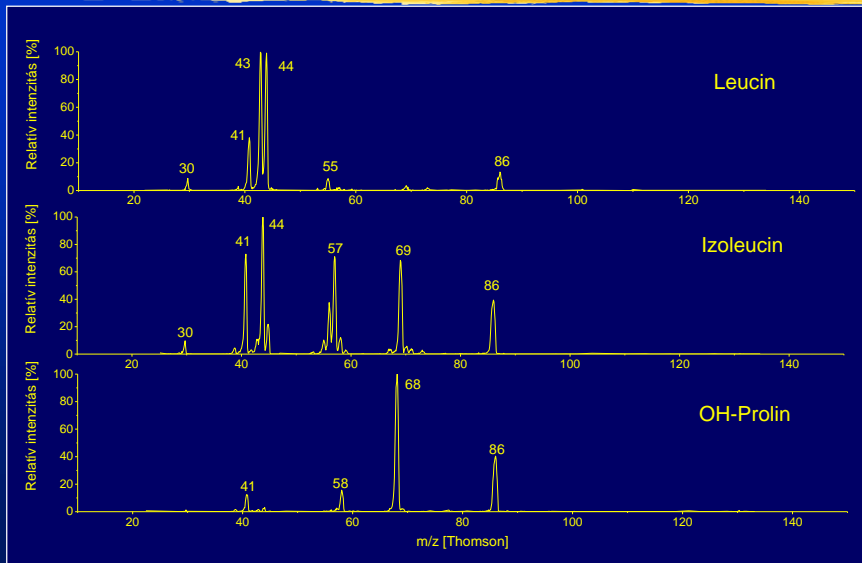
MS/MS: product ion scan



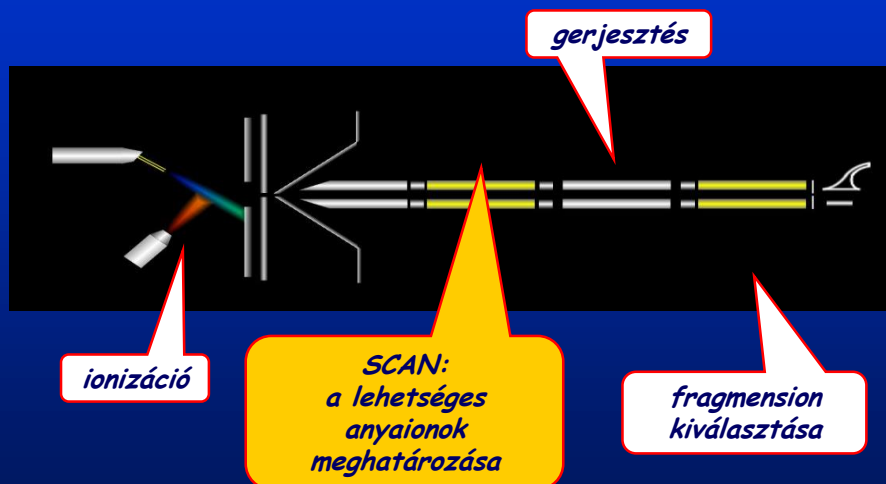
Példa: product ion scan



Példa: product ion scan

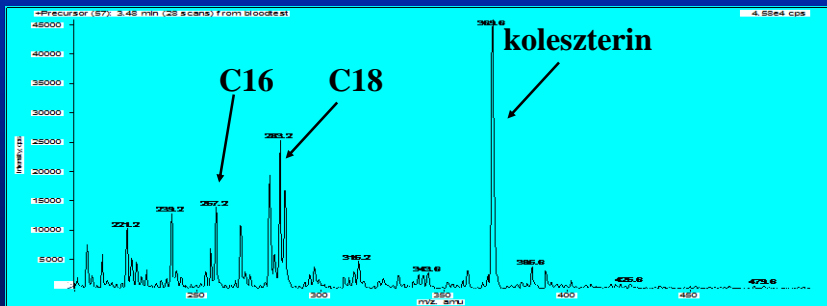


MS/MS: precursor ion scan

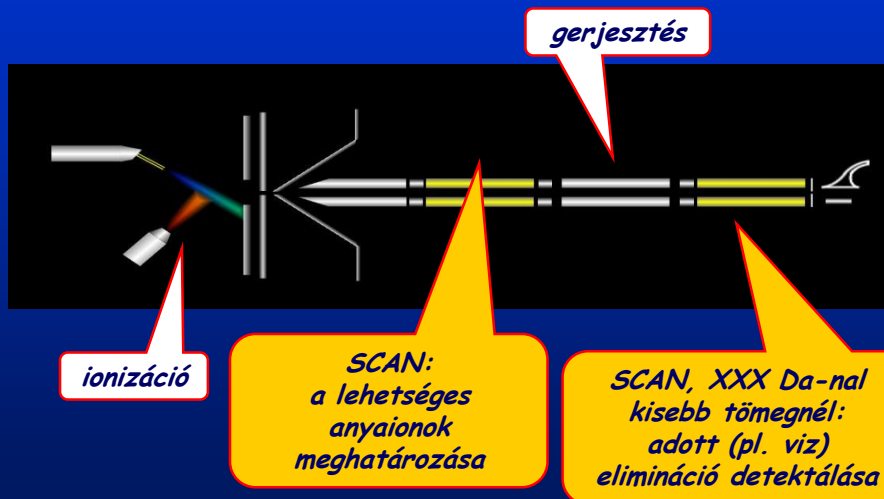


Példa: Miből származik az m/z 57?

- Vércseppből szabad zsírsav meghatározása származékképzéssel, kromatográfia nélkül
- Zsírsavak közös fragmense m/z 57

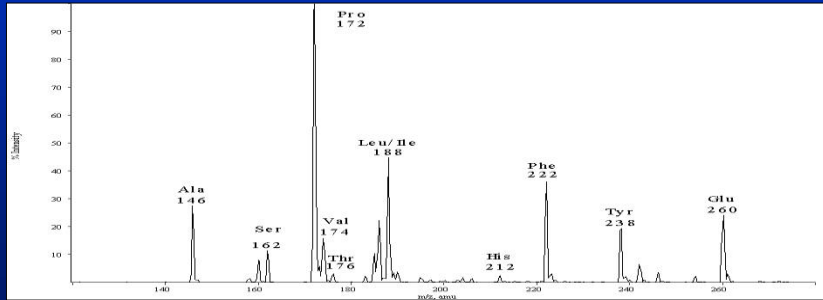


MS/MS: neutral loss

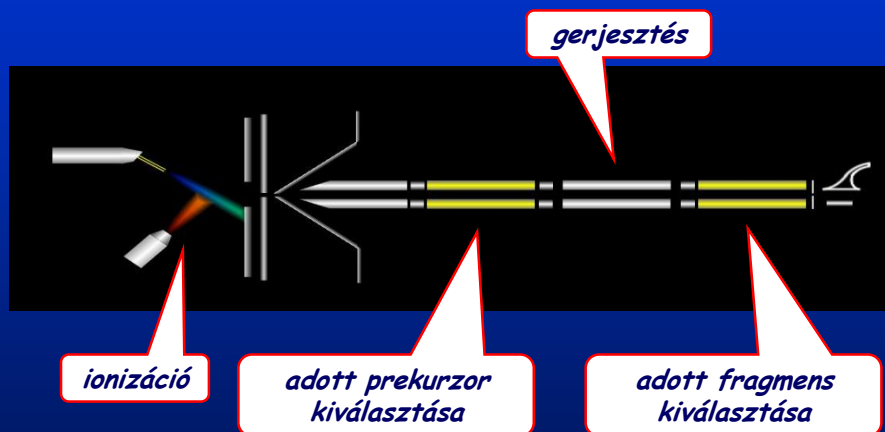


Példa: m/z 102 (butilészter) vesztes

- aminosavak meghatározása vércseppből
- butilezés (~ppm szint, elválasztás nélkül)

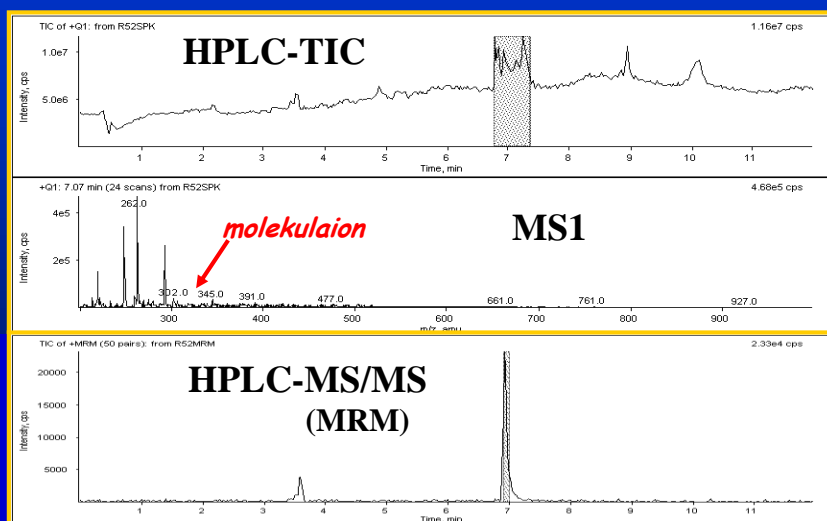


multiple reaction monitoring, MRM



Szelektivitás növelése

100 pg minta/ml plazma



Adatfüggő (data-dependent) mérési mód

- Majdnem minden típusú analizátoron használható
 - Feltétel: MS és MS/MS felvételek gyors változtathatósága
- Folyamata:
 - 1) normál tömegspektrum felvétele
 - 2) Ebből kiválasztjuk az érdekes csúcsokat
 - 3) amiről MS/MS felvétel készül
- Alkalmazási terület
 - pl. proteomika (ismeretlen fehérje meghatározása HPLC-MS(MS) segítségével)

Kapcsolt technikák

- **Gázkromatográfiával (GC-MS)**
- **Folyadékkromatográfiával (LC-MS)**
- **Kapilláris elektroforézissel (CE-MS)**

GC-MS - general comments

- ✓ works with EI (or CI) ionization
- ✓ quite straightforward, no serious problems

some problems with narrow-bore and wide-bore columns
excellent sensitivity monitoring a few compounds
to obtain good quality full spectra is less sensitive
basic understanding of MS is essential, e.g.

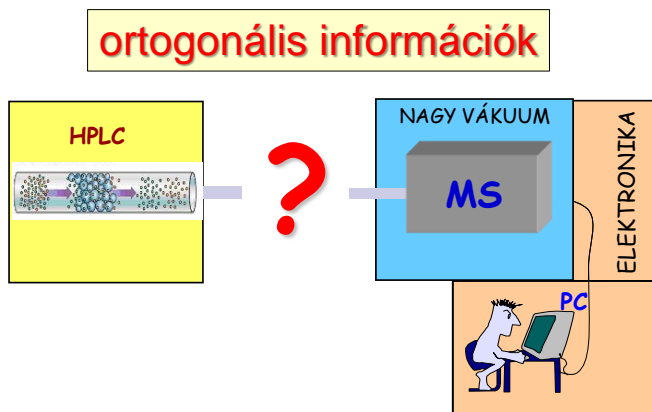
molecular mass is not always evident in EI
many compounds fragment similarly in EI
computer search is often erroneous
spectra interpretation is necessary (difficult!)

consider options with CI, negative ionization, tandem MS

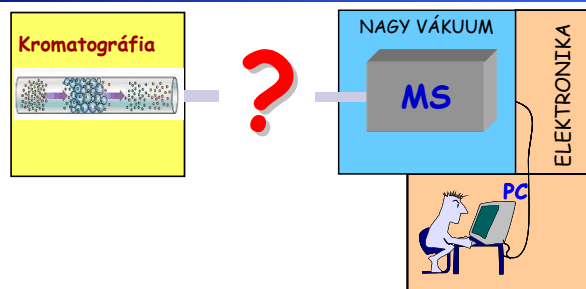
HPLC + Tömegspektrometria

HPLC: komponensek elválasztása (izolálása)

Tömegspektrometria: komponensek azonosítása,
szerkezetmeghatározása



Miért fejlődött ki a HPLC-MS?



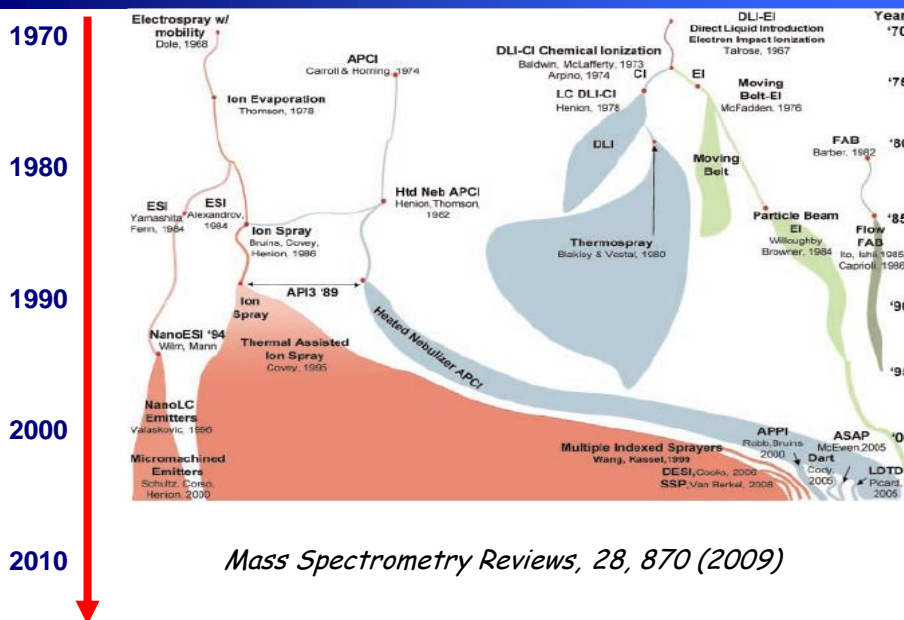
- gyógyszeripari analitika
- kombinatorikus kémia
- GC-MS sikere
- biokémia – makromolekulák



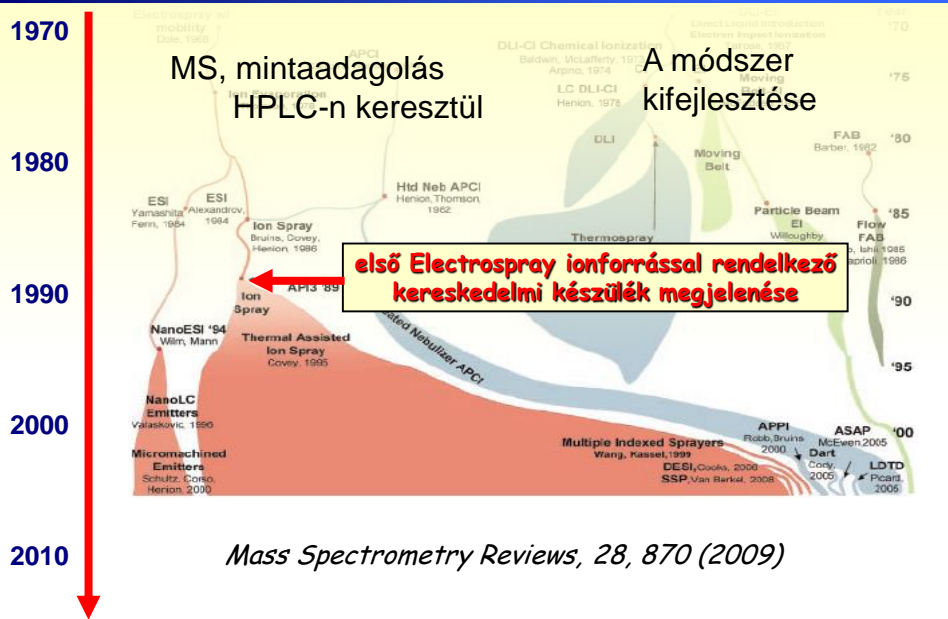
**HPLC-MS:
óriási igény**

HPLC és MS összekapcsolása (interfész) a szűk keresztmetszet!

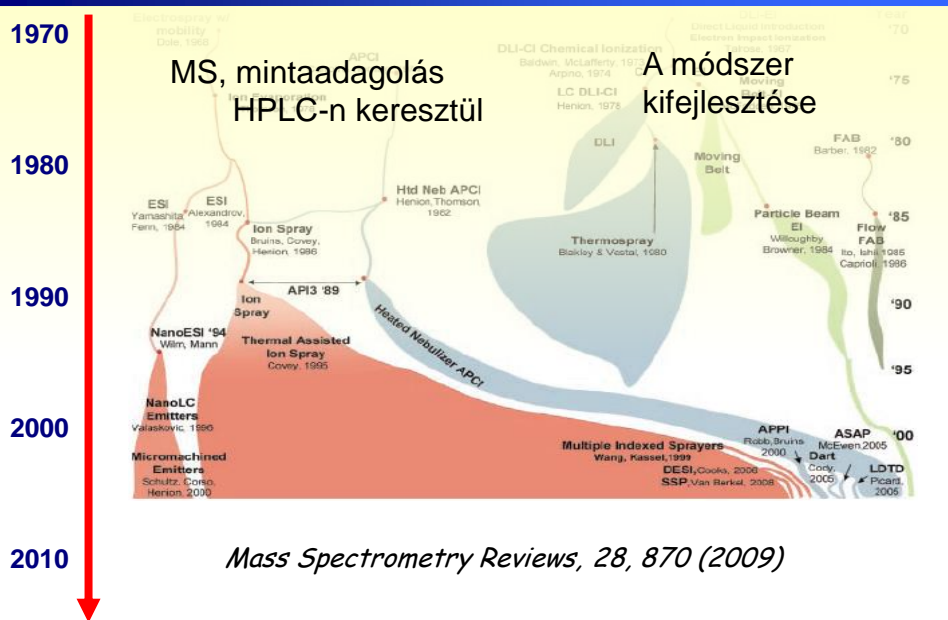
Történeli áttekintés



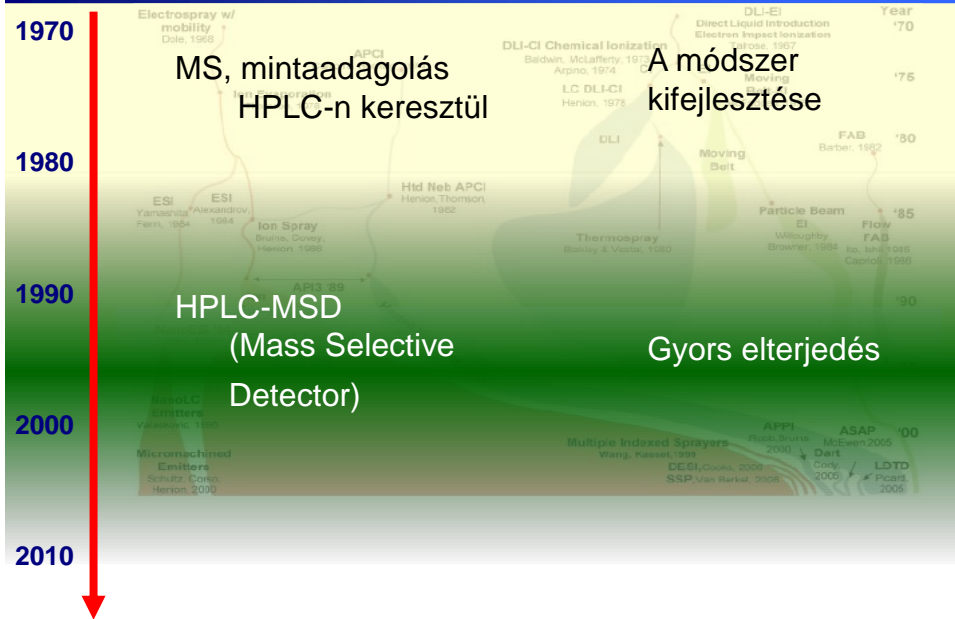
Történeli áttekintés



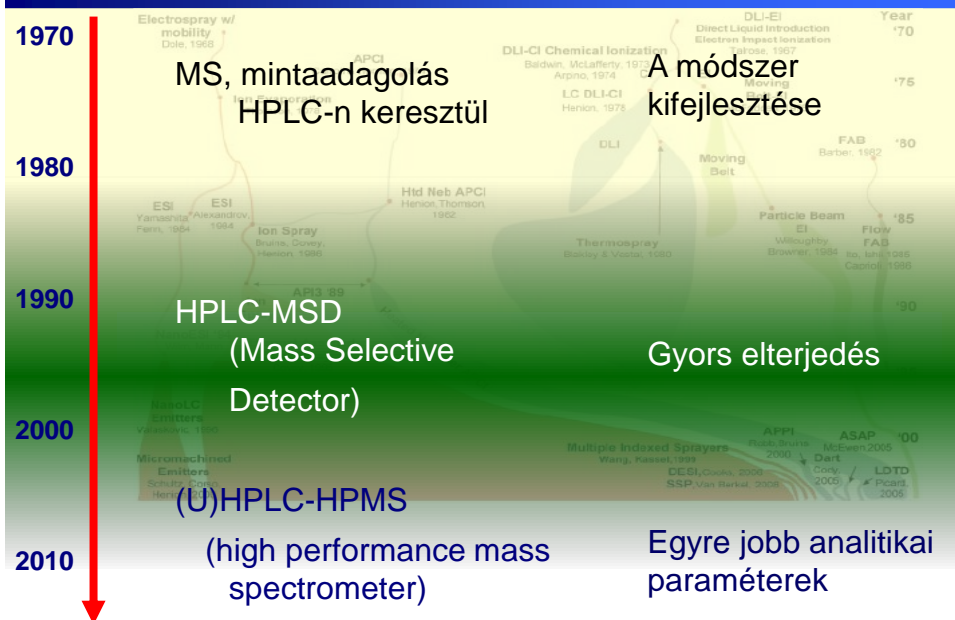
Történeli áttekintés



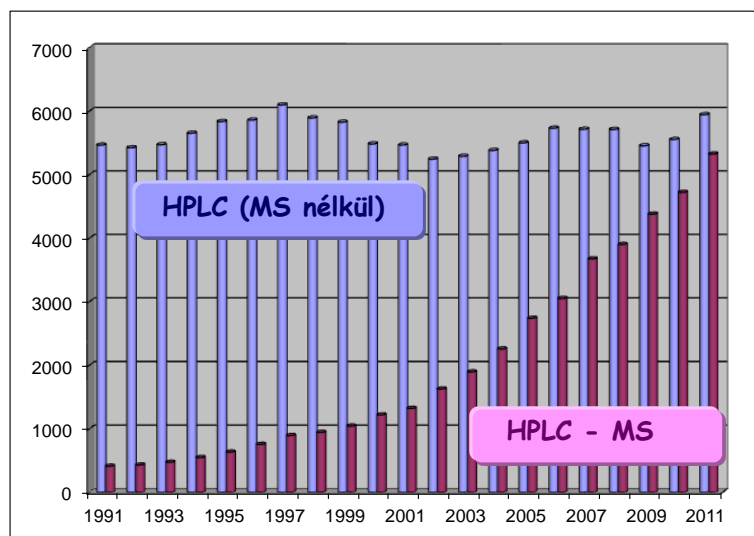
Történeli áttekintés



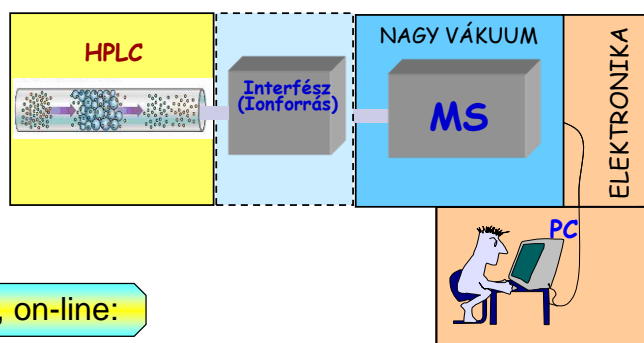
Történeli áttekintés



Publikációk



HPLC-MS elvi felépítése



együtt, on-line:

- ✓ Hatékonyabb (egyszerűbb problémamegoldás)
- ✓ Egyszerűbb mintaelőkészítés
- ✓ Megbízhatóbb
- ✓ Jól megvalósítható

MS mint detektor

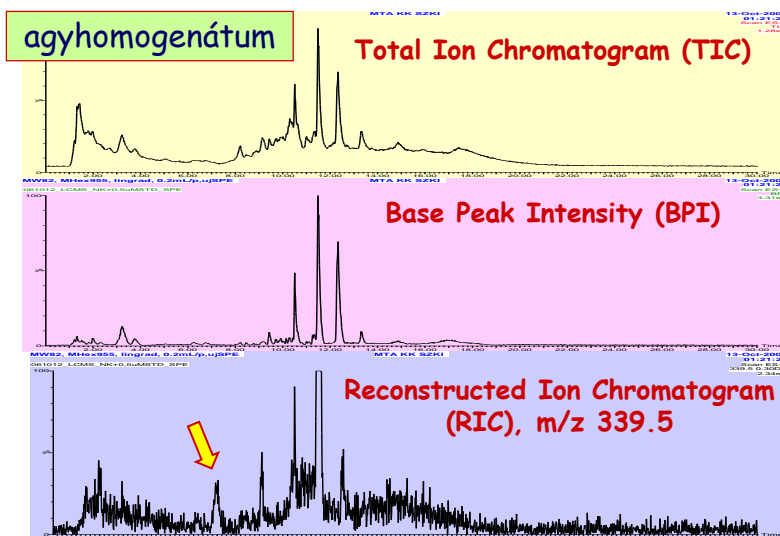
- ✓ Érzékeny (10^{-12} g, 10^{-15} mol)
- ✓ Gyors (>10 Hz)
- ✓ „Multiplex”

kromatogram típusok

- ✓ Total ion chromatogram (TIC):
 - all ions considered; analogous to FID or UV
 - relative sensitivities/peak intensities may differ significantly!
- ✓ Base peak chromatogram (BPI)
 - similar to TIC, but less sensitive to 'chemical' noise
- ✓ Ion chromatograms (selected, extracted, SIM, SIR, XIC)
 - Intensity profile of a given ion is followed in time
 - Molecular ion – given compound can be monitored
 - Fragment ion – given compound type or presence of structural unit
- ✓ Tandem MS chromatograms
 - Selected or multiple reaction monitoring (SRM, MRM)
 - Very selective and specific; chemical noise can be filtered out

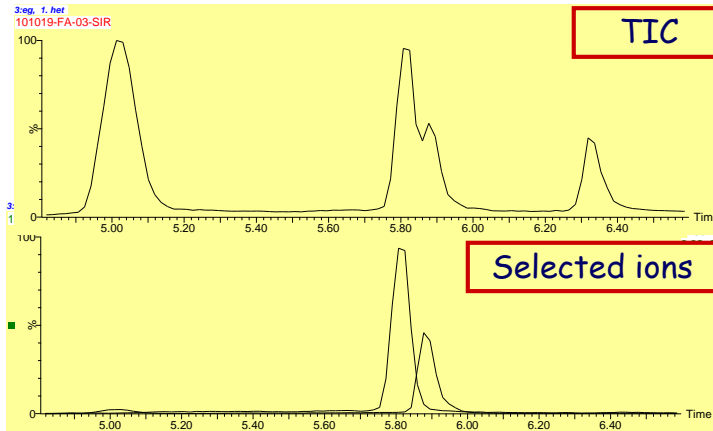
Ion kromatogramok

Céltól függő kromatogram típusok használhatók



Ion kromatogramok

- Felbontás javítása
 - Teljesen egybeeső csúcsok is megkülönböztethetők
 - komplex minták esetén fontos

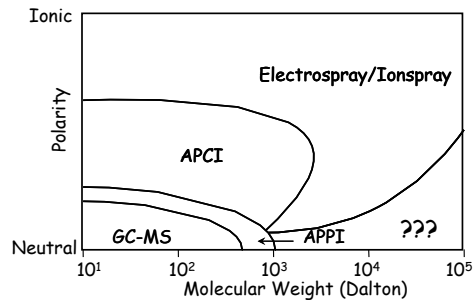


Korlátok, tévhitek

- „mítoszok” az HPLC-MS-ről
 - „bölcsek köve” minden problémát megold
 - Tömegspektrométer = tömegszelektív detektor (olyan egyszerű, mint az GC)
 - MS bármilyen kromatográfiai körülményekkel használható
 - Nem szükséges érteni hozzá, a számítógép mindent megold

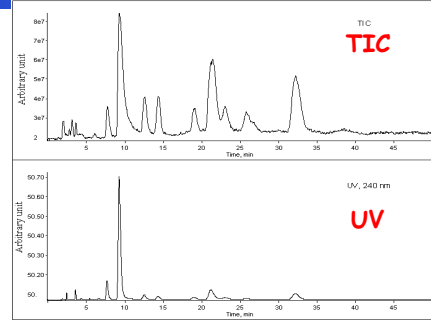


- NEM minden anyag detektálható az MS-ben
- Jelintenzitás arányos a koncentrációval, de különböző típusú anyagok esetén több nagyságrendbeli különbségek lehetnek
 - Metil-benzoát vs. tributilamin
~5 nagyságrend különbség!!!
- Elnyomási effektus (ion suppression)



HPLC-MS korlátai

- ✓ Ionforrás holtterfogata - csúcshélesedés
UV detektor és MS egyaránt kapcsolható a felbontás rovására
UV és MS eltérő érzékenység
MS - tipikusan jobb érzékenység, különösen ionkromatogramokat vizsgálva
- ✓ Pufferek: ESI érzékeny a sókra
csak illékony, kis ionerősségű pufferek ammónium-formiát/acetát alkalmazható, **foszfát puffer TILOS!**
„klasszikus” módszerekben foszfát puffer --- nem kompatibilis
- ✓ Oldószerek: nagy tisztaságú oldószerek
- ✓ Áramlási sebesség függvényében más ionforrás
 - > 0.5(1.0) ml/min felett „splittelés” szükséges
 - 0.005 - 0.5(1.0) ml/min tartományban „hagyományos” ESI forrás
 - < 0.002 ml/min alatt nanoSpray forrás



Technikai változások, tendenciák

Trendek

- ✓ Sokkal egyszerűbb használat
- ✓ Megbízhatóbb berendezések
 - Robosztusabb
 - Folyamatos működés
- ✓ „Dedikált” készülékek
- ✓ Automatizálás, robotizálás
- ✓ mintaelőkészítés - HPLC - MS - bioinformatika egyre nagyobb mértékű integrálása

Egyre gyorsabban elavulnak
Integrált egységek
drága csere-darabok
(házi) javítás alig működik

Jó, jobb, legjobb....

Egyre jobb paraméterek

- ✓ jobb érzékenység
- ✓ nagyobb felbontás
- ✓ pontosabb tömegmérés
- ✓ gyorsabb spektrumfelvétel
- ✓ nagyobb dinamikus tartomány

EI érzékenység 1980-2000 között
2-3 évente megduplázódott

Javuló paraméterek

Waters QTOF
(Gali Attilától)



SYNAPT
17,500 Res.
5x Sensitivity
2ppm
2006



SYNAPT G2
40,000 Res.
50x Sensitivity
1ppm
Dynamic range 4
2009



Q-ToF Ultima
17,500 Resolution
5x Sensitivity
5ppm
2000



Q-ToF 2
10,000 Resolution
2x Sensitivity
5ppm
1998



Q-ToF
5,000 Resolution
1x Sensitivity
5ppm
1996



SYNAPT G2-S
40,000 Res.
150x Sensitivity
1ppm
Dynamic range 4
2011

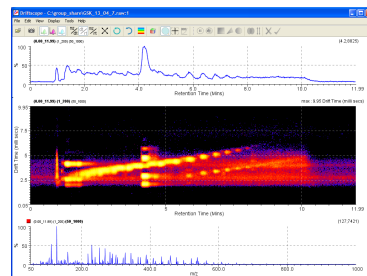
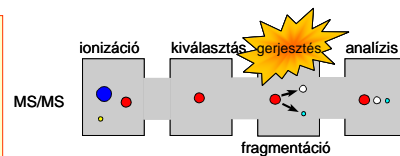
15 év alatt:

- ✓ tömegpontosság 5x
- ✓ felbontás 8x
- ✓ érzékenység 150x

Nagy teljesítőképességű MS módszerek

Újdonság: nem a speciális MS módszerek kifejlesztése, hanem ezek HPLC-vel történő csatolása - gyors elterjedés

- ✓ Nagyfelbontás (HR)
 - ✓ Pontos tömeg – elemi összetétel
 - ✓ Izotópok elválasztása
- ✓ Tandem tömegspektrometria
 - ✓ Tömeg szerinti elválasztás + szerkezet meghatározás
 - ✓ Gerjesztés: CID mellett ETD, ECD
- ✓ Ion mobility (Synapt)
 - ✓ Molekula hatáskeresztmetszete szerinti elválasztás – újabb dimenzió!!!



Nagy teljesítőképességű MS módszerek

- Készüléktípusok:
- ✓ Kvadrupól (Q, QQQ)
 - ✓ Ioncsapda
 - ✓ Repülési idő (TOF, QTOF)
 - ✓ Orbitrap
 - ✓ FT-MS (FT-ICR)

kvantitatív vizsgálat, MS/MS (MRM)
 „workhorse” készülékek

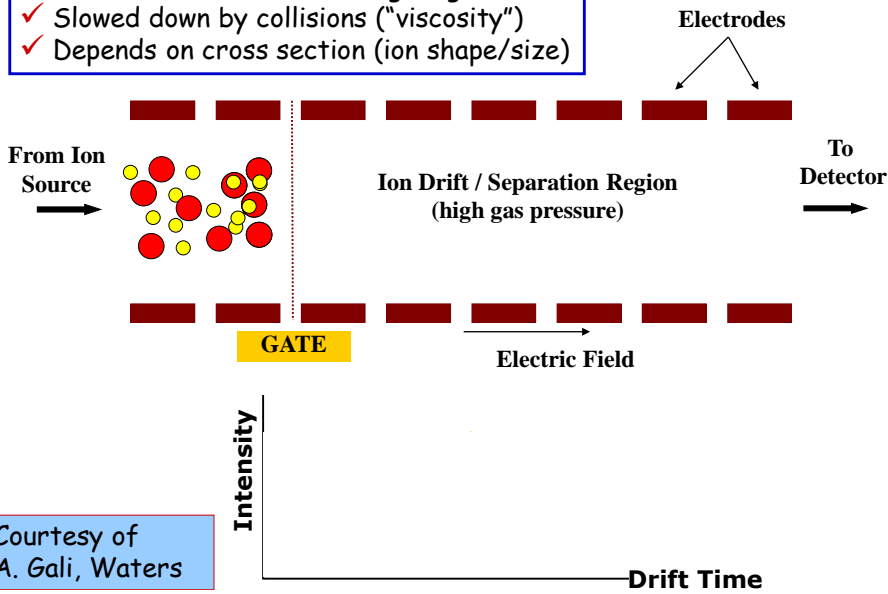
nagy érzékenység, szerkezetfelderítés (MSⁿ)

Pontostömeg, széles tömegtartomány

Csúcskészülékek, legnagyobb felbontás

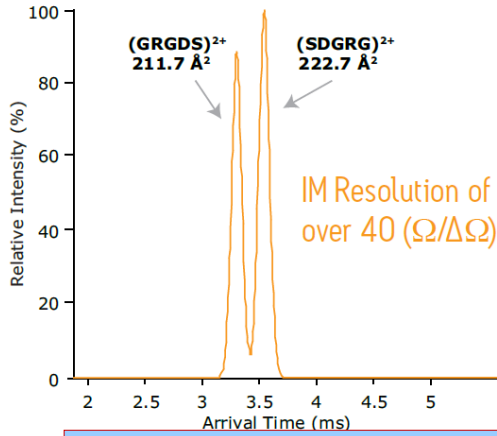
Conventional Ion Mobility Spectrometers

- ✓ Ions are accelerated through a gas cell
- ✓ Slowed down by collisions (“viscosity”)
- ✓ Depends on cross section (ion shape/size)



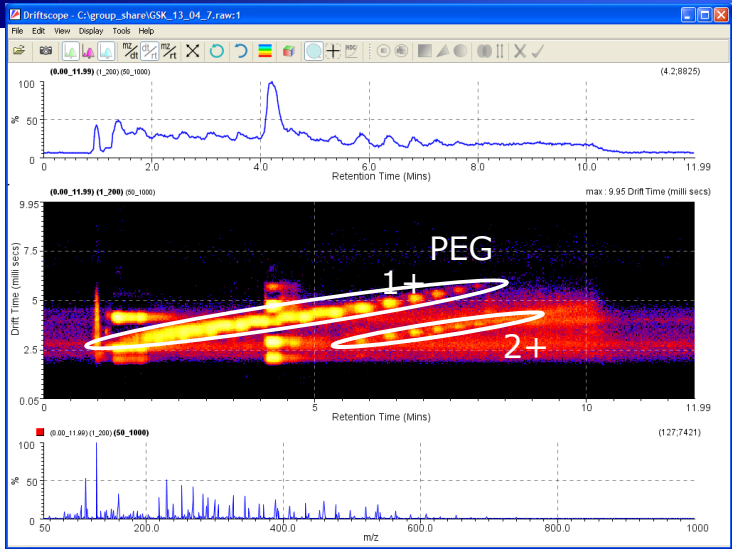
Ion mobility MS (ion chromatography)

- ✓ specialized MS technique
ion chemistry,
"low throughput",
few specialists
 - ✓ adapted for HP MS
instruments:
(works well with HPLC-MS)
Waters Synapt, Synapt G2
- Separates compounds
Yields approximate
cross sections
- ✓ other companies also utilize
the same concept



Courtesy of A. Gali, Waters

Retention time + drift time + MS



2D
Retention Time
& Intensity

3D
Drift Time,
Retention
Time
& Intensity

2D
M/Z & Intensity

Christine Eckers *et al.*, GSK UK, Rapid Communications in MS (*in press*)

Amit mindenki szeret: Automatizálás



Robotizált mintakezelés (pl. származékképzés)



Automatizált (on-line) mintaelőkészítés

Automatikus adagolás
Frakciószedés + MALDI 'spotting'



Automatikus MS spektrumfelvétel
(data dependent analysis, survey scans)



Automatikus spektrumértékelés
(proteinazonosítás, kvanti értékelések)



Integrált statisztikai értékelés
(kemometria)

Robotizált mintakezelés

- ✓ Technikailag megoldható
- ✓ Rendkívül drága
- ✓ Nem elterjedt



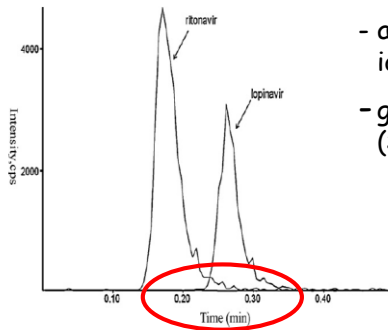
MALDI automatizálás

**Módszertani fejlődések,
alkalmazások**

Gyors HPLC

Rövid kromatogramok

MS „szereti” a rövid kromatogramokat

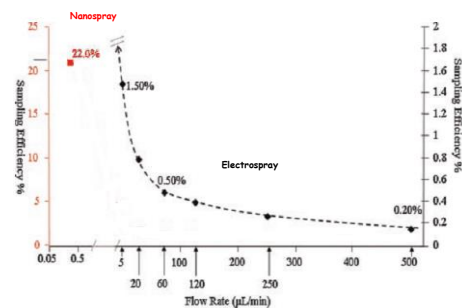


- Prioritás: nagy átteresztőképesség
- Élesebb csúcsok, jobb jel/zaj arány (jobb érzékenység)
- UHPLC, kis szemcseméret
- Rövid hossz ellenére elfogadható csúcskapacitás
- a kisebb felbontást az MS ionszelektivitása kompenzálja
- gyors MS spektrumfelvétel megoldott (>10 Hz)

Miniatürizálás - nanoHPLC

Ionizációs hatékonyság (\Rightarrow érzékenység) sokkal **JOBB** kis áramlási sebességnél

MS tradicionálisan „kedveli” a narrow-bore oszlopokat:
4.6 \gg 2.1 \gg 1.0 mm használata
nanoHPLC térhódítása



nanoHPLC:

- ✓ 75 μ m tipikus átmérő, holtterefogatok problémája!
- ✓ splitless oldószerkeverés fontos (robosztusabb)
- ✓ oszlopok csatlakoztatása cég-specifikus
- ✓ chip technológia, microfluidika ígéretes, de még nem mindennapos (cég specifikus)

Mikrofluidika

Monolithic Integration of Two-Dimensional Liquid Chromatography–Capillary Electrophoresis and Electrospray Ionization on a Microfluidic Device

Andrew G. Chambers, J. Scott Mellors, W. Hampton Henley, and J. Michael Ramsey*
 Department of Chemistry, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina 27599, United States

J. Michael Ramsey, *Anal.Chem.* 2011,83,842-849

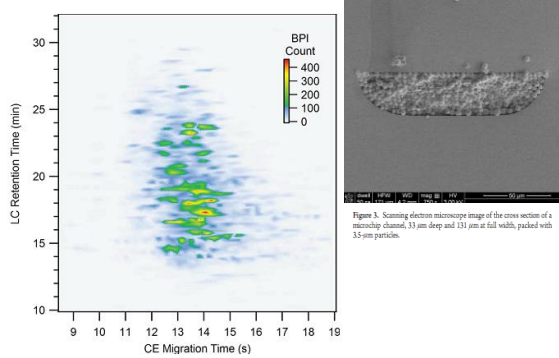


Figure 8. Two-dimensional plot of LC-CE-MS analysis of 800 ng of an *E. coli* cell lysate tryptic digest. Conditions were as in Figure 7.

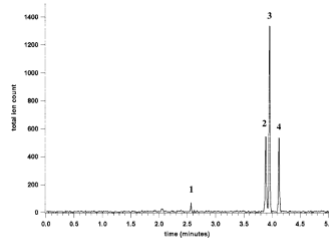
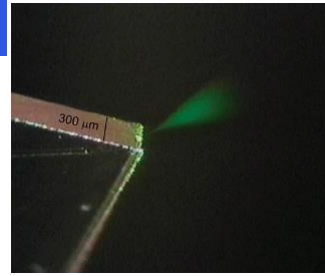
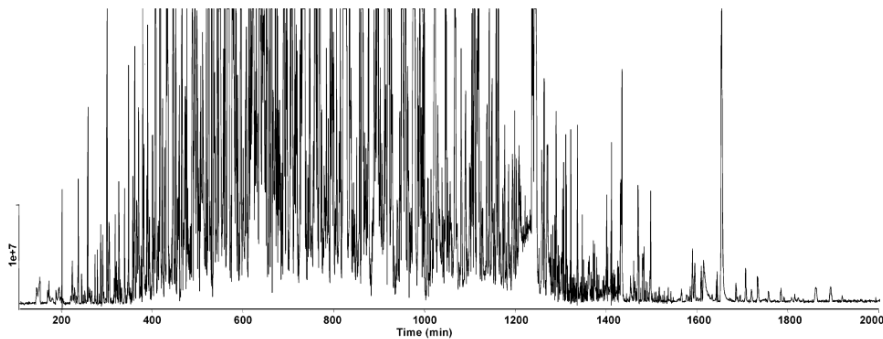


Figure 7. Total ion electropherogram for the separation of three standard proteins on the long-channel CE-ESI-MS chip. The peaks are the heme group of myoglobin (1), ribonuclease A (2), myoglobin (3), and cytochrome c (4). Each protein in the sample was at a concentration of 200 μg/mL. The 0.5-s injection resulted in the injection of ~6 fmol of each protein.

J. Michael Ramsey, *Anal.Chem.* 2008,80,6881

Lassú HPLC futás

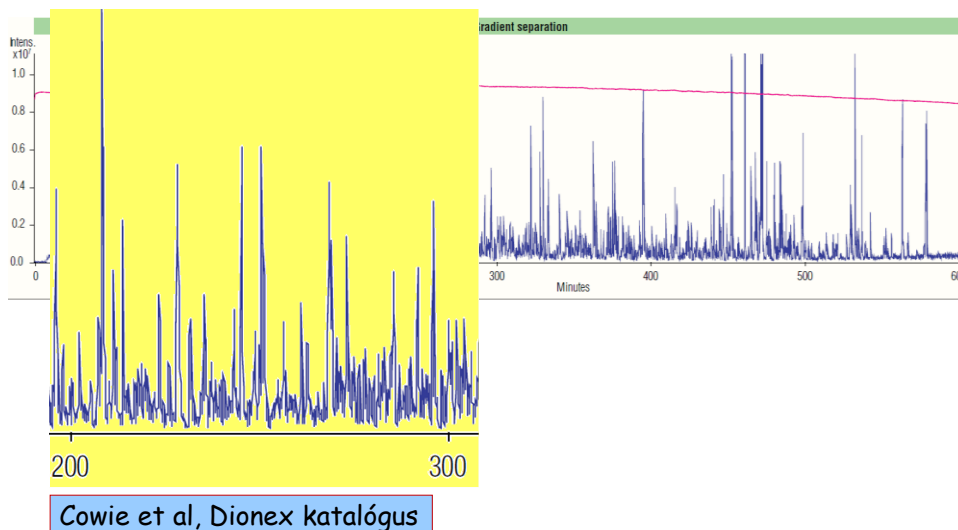
- ✓ Proteomika: sok peptid elválasztása - hosszú futás
- ✓ 20 kpsi, **33 órás gradiens**, 2 μg *S. odeinensis* triptikus emésztmény,
- ✓ nanoHPLC, 200 cm × 65 μm (3 μm porózus C₁₈ töltet)
- ✓ csúcskapacitás =1500



Richard D. Smith, *Anal. Chem.* 2005, 77, 3090-3100

Lassú HPLC futás

- ✓ E. Coli emésztmény, 10 órás gradiens, nano-HPLC, csúcskapacitás =750



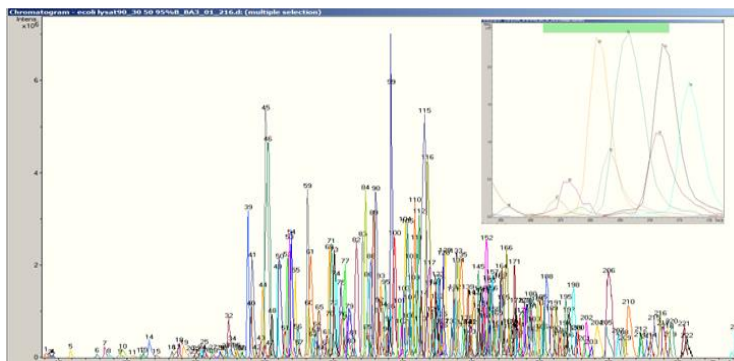
Intakt fehérjék HPLC-MS vizsgálata

500 ng E. coli lizátum

Bruker Maxis MS

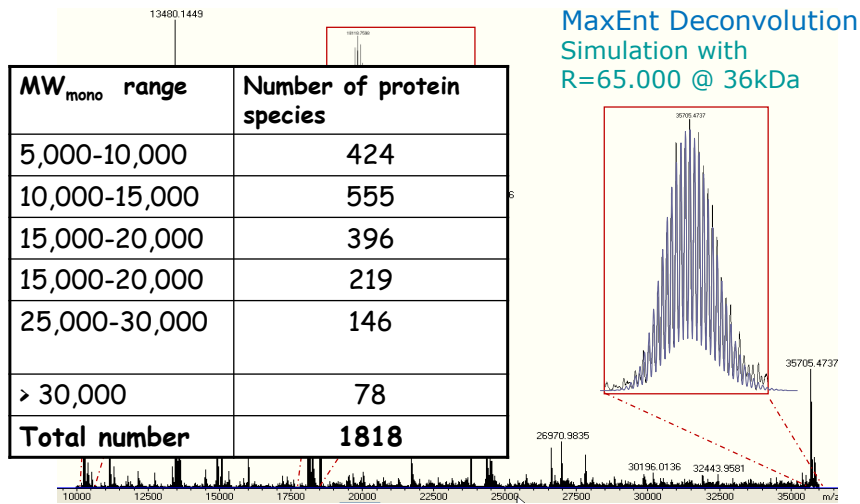
Dionex PepSwift monolithic PS-DVB, 100 μ m ID, 25 cm oszlop

2D géleket kiválthatja ???



A, Ingendoh, Bruker Daltonics

Intakt fehérjék HPLC-MS vizsgálata



A. Ingendoh, Bruker Daltonics

Vegyületek polaritása és illékonysága

Tömeg

Polaritás

Illékonyság

kromatográfia	ionizáció
NP-HPLC	ESI
RP-HPLC	APCI (apoláris oldószerrel)
	APCI
	APPI
GC	CI
	EI

Lágy ionizáció

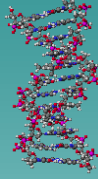
molekulaion sokszor nem látható

Biológiai tömegspektrometria

biokémia

genomika

proteomika



aminosav sorrend (gén által meghatározott)

post-transzlációs módosítások

Idő ill. állapot függő koncentrációk

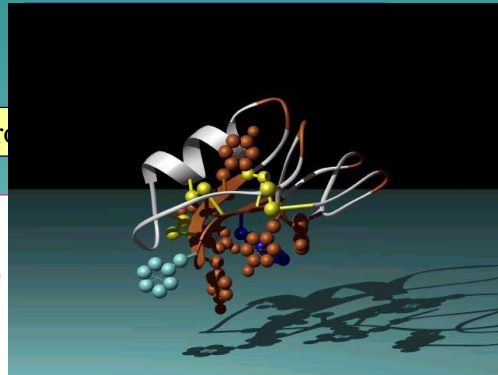
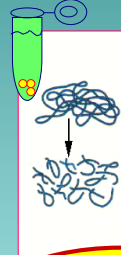
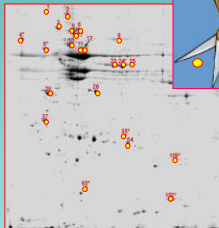
mottó: genomika egyszerű

Proteomics: the basic approach

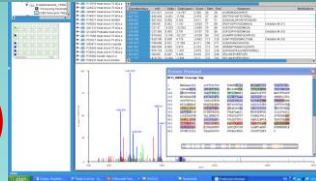
cut out the spots

digest the protein

take a 2D gel



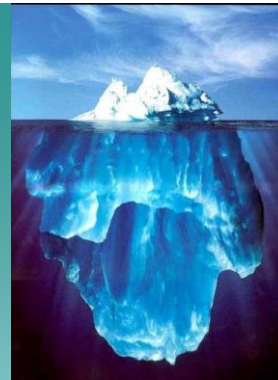
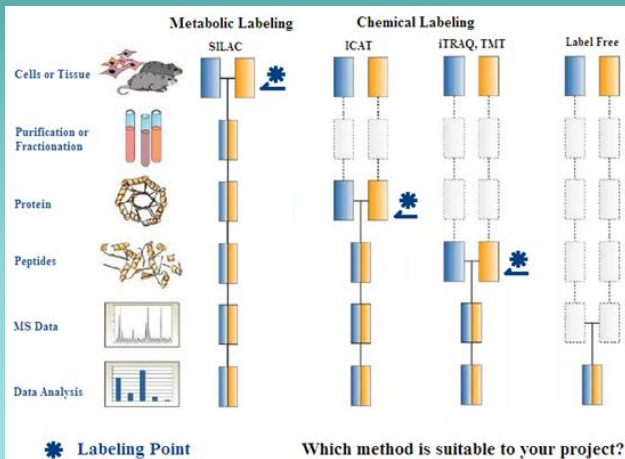
protein identified!



Proteomics: problems

- ✓ dynamic range - 1:10¹⁰ range in protein quantity (low/high copy numbers)
- ✓ quantitation: required, but difficult

isotope labeling (SILAC, ICAT, ITRAQ)



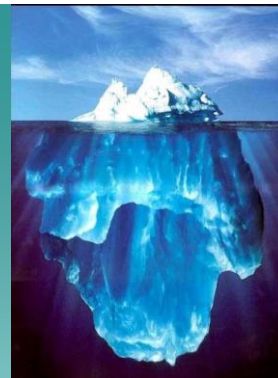
Proteomics: problems

- ✓ dynamic range - 1:10¹⁰ range in protein quantity (low/high copy numbers)
- ✓ quantitation: required, but difficult
- ✓ changing concentrations – given time-window
- ✓ complex PTM

isotope labeling (SILAC, ICAT, ITRAQ)

signal suppression,
limited sensitivity for
e.g. membrane
proteins

too difficult to have a general solution
targeted approach: to solve given problems



Proteomics: toolbox

1. sample preparation & separation
2. mass spectrometry
3. bioinformatics

high throughput,
automatic, robotic
techniques

common methods:

enzymatic digestion (trypsin & others)

1 and 2D HPLC, nanoHPLC
1 and 2D gels (SDS-PAGE)

isotope labeling, isotope coded
affinity tags, (ICAT)

- ✓ MS, mass-tags (molecular masses)
- ✓ MS/MS, sequence tags (fragment mass differences)

computer search (like Mascot)

using mass-tags, peptide mass fingerprint:

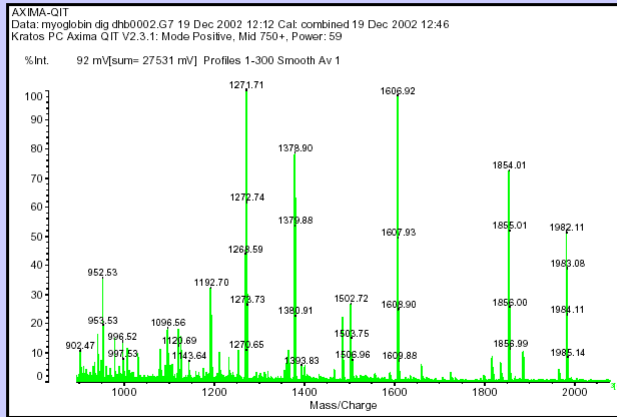
- ✓ usually start from an isolated protein, typically 2D gel spot
- ✓ digest it by trypsin, followed by simple sample prep.
- ✓ resulting peptides studied by MS, usually MALDI-TOF
compare the peaks found with the theoretically possible molecular ion peaks of in-silico tryptic digests of all proteins in database
- ✓ database search using peptide molecular masses
- ✓ identify the protein: sequence coverage & score

- ✓ usually considered as a first approximation
- ✓ 30-70% sequence coverage is typical
- ✓ simple, fast, but not very reliable (especially not for protein mixtures)

uses only the MW

using mass-tags (peptide mass fingerprint):

Peptide mapping: tryptic digest of myoglobin



using mass-tags (peptide mass fingerprint):

PMF: Peptide Mass Fingerprinting

Taxonomy : Mammalia (mammalia) (246067 sequences)
Timestamp : 19 Dec 2002 at 12:18:46 GMT
Top Score : 158 for g112054462, Myoglobin

Probability Based Mowse Score

Protein Summary Report

Switch to Parent Protein Summary Report

To create a bookmark for this report, right click this link: [Protein Summary Report / data/2002/12/18/FITryYe.dat](#)

Index	Accession	Mass	Score	Description
1.	g112054462	16942	158	
2.	g112054461	16940	138	myoglobin [validated] - horse
3.	g112054449	16942	137	Myoglobin (Horse Heart) Mutant With Leu 104 Replaced By Asn (104n)
4.	g112054471	16967	118	Myoglobin (Horse Heart) Mutant With His 64 Replaced By Tyr (64y)
5.	g112043321	16905	118	H64t Variant Of Myoglobin (Horse Heart) Recombinant Wild-Type
Completed WITH aside				
6.	g11998070	16967	117	Myoglobin Mutant With His 93 Replaced By Tyr (89ty)
7.	g11323710	16969	117	Myoglobin (Horse Heart) Mutant With Ser 92 Replaced By Asp (89sd)
8.	g112027084	38929	88	similar to GORP2 (Mus musculus domesticus)
9.	g11127664	17224	66	Myoglobin
10.	g11327671	17034	65	MYOGLOBIN

Results List

1. [g112054462](#) Mass: 16941 Score: 158

Myoglobin

Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
941.49	940.47	940.47	0.01	146	153	1	YELGKQK
1271.67	1270.66	1270.66	0.01	32	42	0	LFTQDSTLEK
1378.83	1377.82	1377.83	-0.01	64	77	0	RSYVLTALQKHLK
1502.68	1501.67	1501.66	0.01	119	132	0	KDQDRLKQDQKTK
1606.94	1605.93	1605.93	0.00	64	78	1	RSYVLTALQKHLK
1606.88	1606.84	1606.88	-0.01	17	31	0	VEADLAKDQVPLIK
1815.88	1814.87	1814.90	-0.02	1	14	0	GLDQDRLKQDQKTK
1853.94	1852.93	1852.95	-0.02	80	96	0	QKQKALKPLAQKQKTK
1855.00	1854.99	1854.01	-0.02	103	118	0	TEFFDRLKINRQK
1982.02	1981.01	1981.05	-0.04	79	96	1	KKQDRLKPLAQKQKTK

No match to: 931.53, 934.49, 949.50, 951.50, 952.52, 968.46, 978.44, 988.49, 1006.54

masses of tryptic peptides is used to identify the protein

identify the parent protein

using sequence tags (MS/MS):

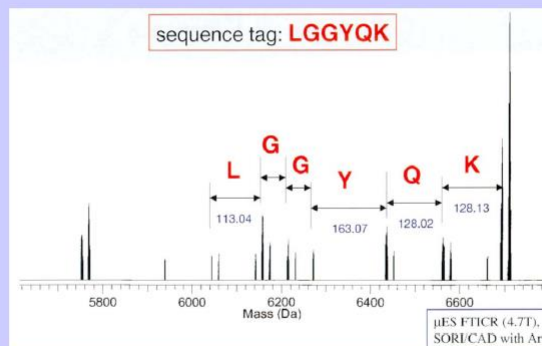
- ✓ usually start from an isolated protein, typically 2D gel spot
 - ✓ digest it by trypsin, followed by simple sample prep.
 - ✓ resulting peptides studied by MS/MS, usually HPLC-ESI-MS/MS using data dependent analysis (computer control of MS/MS) evaluate MS/MS fragmentation, resulting in partial amino acid sequences
 - ✓ database search using partial peptide sequences
 - ✓ identify the protein: sequence coverage & score
-
- ✓ more complex, but also more specific, than mass fingerprint
 - ✓ 5-10% sequence coverage identifies the protein reliably

uses MS/MS fragmentation

using sequence tags (MS/MS):

Sequence tags

For identification we need only a partial sequence ...



FTMS/MS of a bacterial agent biomarker with a mass of 6710.5

using sequence tags (MS/MS):

Identifications are made using Mascot search engine, based on MSMS spectra, and the NCBI database

LC-Q-TOF experiment

MTSVRENILF GMGNPLDIS AVVDKDFLDK YSLKPNDQIL AEDKHKELFD
ELVKKFKVEY HAGGSTONSI KVAQWMIQOP HKAATFFGCI GIDKFGEILK
RKAAEAHVDA HYYEQNEOPT GTCAACITGD NRSLIANLAA ANCYKKEKHL
DLEKNWMLVE KARVCYIAGF FLHVSPESVL KVAHHASENN RIFTLNLSAP
FISQFYKESL MKVMPYVDIL FGNETEATF AREQGFETKD IKEIAKKTQA
LPKMNSKROR IVFTQGRDD TIMATESEVT AFAVLDOQK EIIDTNGAGD
AFVGGFLSQL VSDKPLTECI RAGHYAASII IRRTGCTFPE KPDFH