

Espectrometria de Massas

Objetivos:

Determinar a estrutura primária de um peptídeo, a partir do espectro de massas MALDI-TOF.

Materiais

1. Computador iMac

Espectrometria de Massas (MALDI-TOF)

Vimos na aula teórica que é possível sequenciar um peptídeo a partir da aplicação da técnica de espectrometria de massa, especificamente no caso da determinação da estrutura primária de peptídeos e proteínas, usamos espectrometria de massas MALDI-TOF. Iremos hoje usar um espectro de massas, determinado a partir do método MALDI, para obtermos a estrutura primária de um peptídeo. Durante a análise de um peptídeo, por espectrometria de massas, o mesmo sofre fragmentação, ou seja, sua estrutura é picotada de forma que o espectro de massas registra a razão m/z para uma família de fragmentos. Devido a tal peculiaridade de técnica, é comum usarmos uma nomenclatura para indicar os pedaços esperados no espectro de massas. A figura 1 traz a indicação dos fragmentos y e b. Para aqueles interessados no assunto eu recomendo o artigo de revisão Steen & Mann, 2004.

Fragmentação de peptídeos

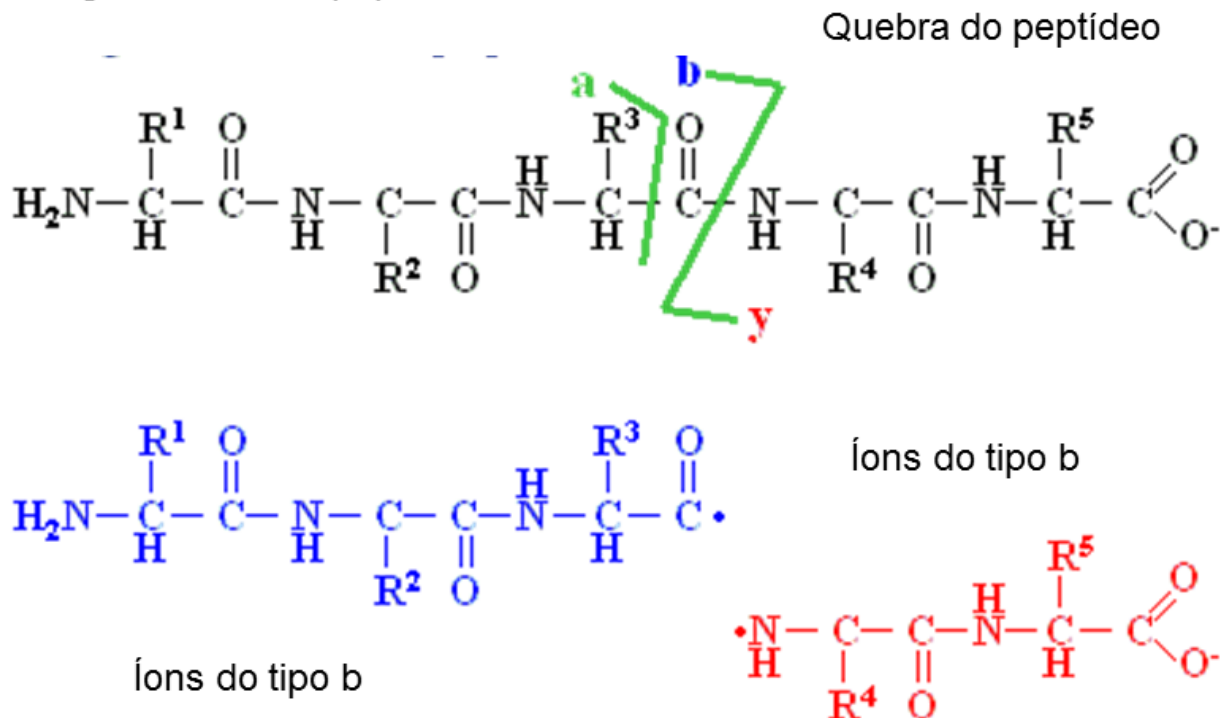


Figura 1. Notação para indicar a fragmentação de peptídeos durante a análise por espectrometria de massa.

Assim, quando temos picos no espectro de massas rotulados com y, é que a massa se refere a um fragmento do tipo y. Essa notação é de uso geral. Para auxiliar na análise do espectro de massas, use a tabela 1, no final deste roteiro. O espectro de massas do peptídeo está na figura 2, o pico

indicado como íon pai refere-se ao pico para o peptídeo intacto com carga positiva (+1). Bem, vamos a análise.

Usamos a indicação dos picos dos fragmentos y, para montar uma tabela com a diferença de massas entre os picos. A tabela 2 traz a análise dos picos. O pico y_1 é referente ao C-terminal, para identificarmos o resíduo de aminoácido do C-terminal temos que subtrair 19,0234 Da do valor lido no espectro de massas. Tal procedimento deve-se à protonação, bem como a adição de uma molécula de água ao fragmento do C-terminal. Assim, na tabela 2, temos o pico y_1 com massa 175,11 Da, subtraindo-se 19,0234 Da, temos 156,0866 Da. Olhando-se a tabela 1, vemos que esta massa (156,0866 Da) é bem próxima à da arginina, assim o resíduo de aminoácido do C-terminal é uma arginina. Para os outros picos é só subtrairmos o valor da massa do pico anterior, para termos a massa molecular do resíduo de aminoácido. A partir do y_2 não é necessário subtrairmos 19,0234 Da do valor lido.

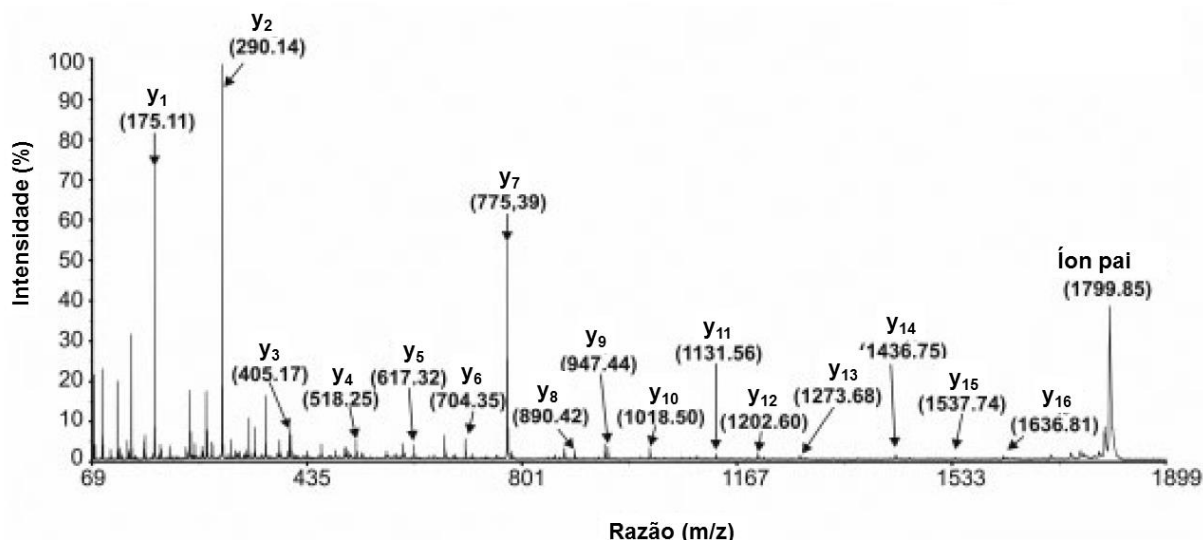


Figura 2. Espectro de massas de um peptídeo com 17 resíduos de aminoácidos (Seidler *et al.*, 2010).

Tabela 2. Picos identificados no espectro de massas da figura 2.

Pico y	Razão m/z do pico	Diferença entre as massas de picos adjacentes além do y_2	Aminoácido
y_1	175,11		R
y_2	290,14	115,03	D
y_3	405,17	115,03	D
y_4	518,25	113,08	I/L
y_5	617,32	99,07	V
y_6	704,35	87,03	S
y_7	775,39	71,04	A
y_8	890,42	115,03	D
y_9	947,44	57,02	G
y_{10}	1018,50	71,06	A
y_{11}	1131,56	113,06	I/L
y_{12}	1202,60	71,04	A
y_{13}	1273,68	71,08	A
y_{14}	1436,75	163,07	Y
y_{15}	1537,74	100,99	T
y_{16}	1636,81	99,07	V
y_{17}	1799,85	163,04	Y

A sequência do peptídeo da figura 2 é a seguinte:
YVTYAA(I/L)AGDASV(I/L)DDR

Veja que os resíduos isoleucina e leucina têm a mesma massa molecular, assim são indistinguíveis a partir do espectro de massas MALDI. Ao representarmos a estrutura primária de um peptídeo, é convenção começarmos a sequência a partir do amino terminal, que na tabela acima é o último resíduo de aminoácido identificado, a tirosina (Y).

Procedimento

Use o processo acima para determinar a sequência do peptídeo indicado no espectro de massas da figura 3.

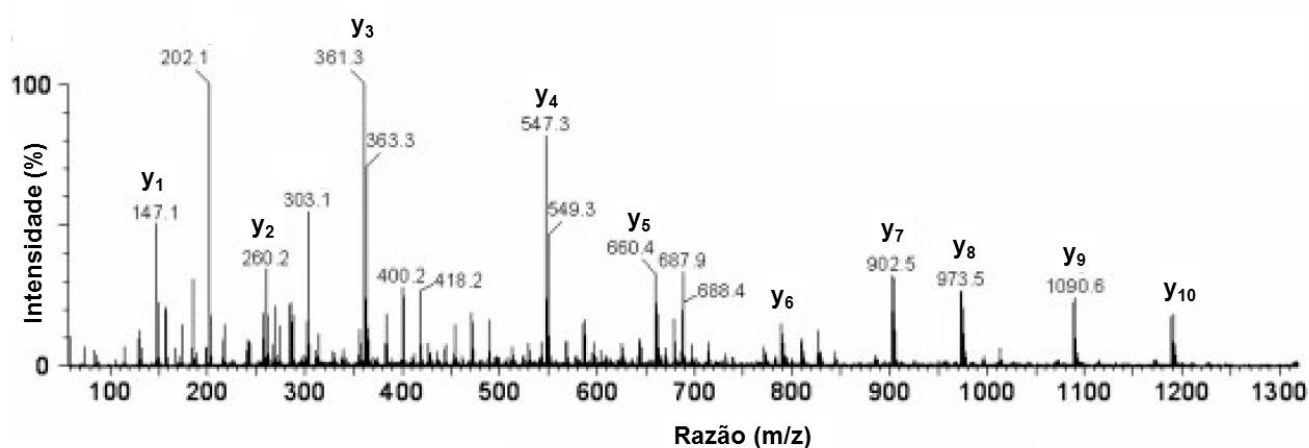


Figura 3. Espectro de massas de um peptídeo com 10 resíduos de aminoácidos (Seidler *et al.*, 2010).

Tabela 3. Picos identificados no espectro de massas da figura 3.

Pico y	Razão m/z do pico	Diferença entre as massas de picos adjacentes além do y ₂	Aminoácido
y ₁	147,1		
y ₂	260,2		
y ₃	361,3		
y ₄	547,3		
y ₅	660,4		
y ₆	788,5		
y ₇	902,5		
y ₈	973,5		
y ₉	1090,6		
y ₁₀	1191,7		

Sequência de aminoácidos: _____

Considere agora o espectro de massas mostrado na figura 4. O primeiro pico de massa 175,87 Da é o pico y_1 . Identifique os outros picos do espectro de massas e determine a sequência de resíduos de aminoácidos do peptídeo.

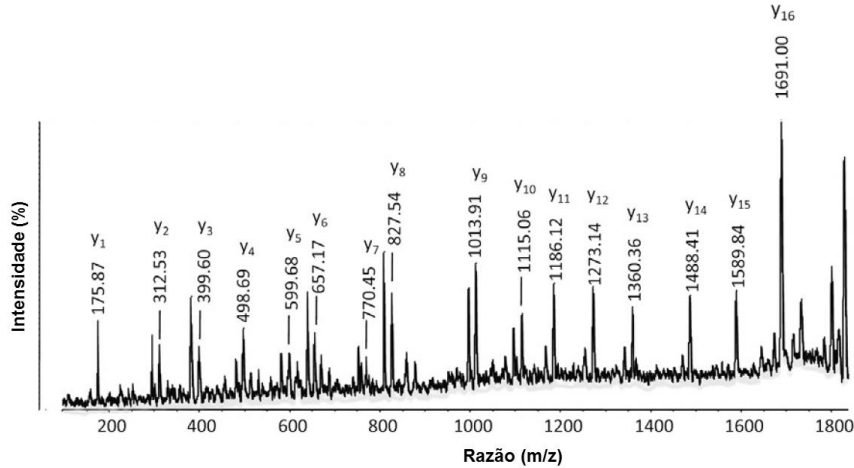


Figura 4. Espectro de massas de um peptídeo com 16 resíduos de aminoácidos (Dong *et al.*, 2004).

Tabela 4. Picos identificados no espectro de massas da figura 4.

Pico y	Razão m/z do pico	Diferença entre as massas de picos adjacentes além do y_2	Aminoácido
y_1	175,87		
y_2			
y_3			
y_4			
y_5			
y_6			
y_7			
y_8			
y_9			
y_{10}			
y_{11}			
y_{12}			
y_{13}			
y_{14}			
y_{15}			
y_{16}			

Sequência de aminoácidos: _____

Tabela 1. Massas dos resíduos de aminoácidos.

Amino Acid	Short	Abbrev.	Formula	Mon. Mass§ (Da)	Avg. Mass (Da)
Alanine	A	Ala	C ₃ H ₅ NO	71.03711	71.0788
Cysteine	C	Cys	C ₃ H ₅ NOS	103.00919	103.1388
Aspartic acid	D	Asp	C ₄ H ₅ NO ₃	115.02694	115.0886
Glutamic acid	E	Glu	C ₅ H ₇ NO ₃	129.04259	129.1155
Phenylalanine	F	Phe	C ₉ H ₉ NO	147.06841	147.1766
Glycine	G	Gly	C ₂ H ₃ NO	57.02146	57.0519
Histidine	H	His	C ₆ H ₇ N ₃ O	137.05891	137.1411
Isoleucine	I	Ile	C ₆ H ₁₁ NO	113.08406	113.1594
Lysine	K	Lys	C ₆ H ₁₂ N ₂ O	128.09496	128.1741
Leucine	L	Leu	C ₆ H ₁₁ NO	113.08406	113.1594
Methionine	M	Met	C ₅ H ₉ NOS	131.04049	131.1986
Asparagine	N	Asn	C ₄ H ₆ N ₂ O ₂	114.04293	114.1039
Pyrrolysine	O	Pyl	C ₁₂ H ₂₁ N ₃ O ₃	255.15829	255.3172
Proline	P	Pro	C ₅ H ₇ NO	97.05276	97.1167
Glutamine	Q	Gln	C ₅ H ₈ N ₂ O ₂	128.05858	128.1307
Arginine	R	Arg	C ₆ H ₁₂ N ₄ O	156.10111	156.1875
Serine	S	Ser	C ₃ H ₅ NO ₂	87.03203	87.0782
Threonine	T	Thr	C ₄ H ₇ NO ₂	101.04768	101.1051
Selenocysteine	U	Sec	C ₃ H ₅ NOSe	150.95364	150.0388
Valine	V	Val	C ₅ H ₉ NO	99.06841	99.1326
Tryptophan	W	Trp	C ₁₁ H ₁₀ N ₂ O	186.07931	186.2132
Tyrosine	Y	Tyr	C ₉ H ₉ NO ₂	163.06333	163.1760

Fonte da tabela em: <

http://en.wikipedia.org/wiki/Proteinogenic_amino_acid >.

Acesso em: 22 de junho de 2014.

Referências

- Dong H., Marchetti-Deschmann M, Allmaier G. Characterization of on-target generated tryptic peptides from *Giberella zeae* conidia spore proteins by means of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Mol and Cel Probes* 2014, 28:91-8.
- Hoffmann, Edmond de & Stroobant, Vincent **Mass spectrometry : principles and applications**. Chichester (UK): John Wiley & Sons Ltd, 2007. 489 p.
- Seidler J., Zinn N., Boehm M.E., Lehmann W.D. De novo sequencing of peptides by MS/MS. *Proteomics* 2010, 10:634-49.
- Steen H., Mann M. The ABC's (and XYZ's) of Peptide Sequencing. *Nat Mol Cell Biol* 2004, 5:699-711.