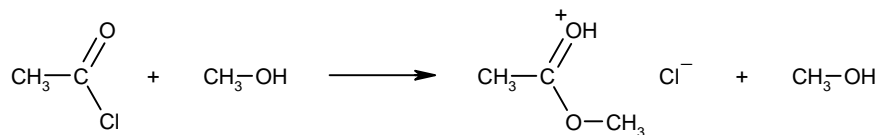


Problema 22 Electro-spray Ionization Mass-spectrometry of Peptides

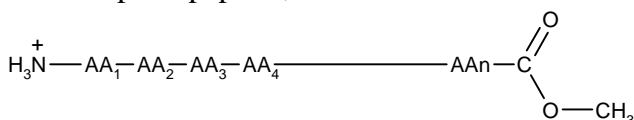
a) Scrivere le reazioni coinvolte nella preparazione della soluzione metanolica di cloruro di acetile. Dato che il cloruro di acetile è presente con solo 160 su 1000 μL di metanolo, consuma solo una minima quantità di metanolo (circa il 6,5 %)

Nella soluzione metanolica si trova quindi acetato di etile, HCl e metanolo, ma l'HCl non è libero, si trova sotto forma di cloruro dell'estere protonato o cloruro dell'alcol protonato.



b) Quali reazioni chimiche avvengono durante la sintesi dei peptidi marcati e qual è il ruolo del cloruro di acetile?

A giudicare dalla massa dei peptidi individuati con la spettrometria di massa ESI, c'è stata l'esterificazione del carbossile terminale del peptide. Probabilmente non ci sono amminoacidi come Glu o Asp nel peptide, altrimenti si sarebbero avute altre esterificazioni in catena laterale.



Il cloruro di acetile è una fonte comoda e conveniente di HCl anidro, inoltre lo fornisce legato all'acetato di etile quindi in condizioni meno acide del semplice HCl che potrebbe danneggiare il peptide. Infine l'acetato di etile è un buon solvente e viene totalmente rimosso per liofilizzazione.

Si trovano i seguenti picchi

703.9	704.4	704.9	705.4	705.9	706.4	massa/carica
(100)	(81)	(36)	(61)	(44)	(19)	area relativa

c) Qual è la carica dei peptidi marcati in questa serie di picchi?

Si osserva che l'incremento è di mezza unità da un picco all'altro, quindi si tratta di peptidi con carica 2+. La loro massa è quindi

1407.8	1408.8	1409.8	1410.8	1411.8	1412.8	massa [peptidi+2H] ²⁺
(100)	(81)	(36)	(61)	(44)	(19)	area relativa

d) Qual è il picco monoisotopico del peptide marcato con l'isotopo leggero? Individuane la massa.

Si tratta del primo picco che ha denunciato massa 1407,8, ma poiché aveva carica 2+ era doppiamente protonato, quindi la massa richiesta è di due unità più leggera

Massa = 1405,8 u (peptide marcato con l'isotopo leggero)

e) Gli ultimi tre valori m/z sono attribuibili al peptide marcato con l'isotopo pesante. Calcolando però i rapporti tra le abbondanze relative, si ottengono valori leggermente diversi nelle due serie, si deduce quindi che le varietà isotopiche sono più di tre e quindi gli ultimi picchi del peptide "leggero" si sovrappongono ai primi di quello "pesante". Assumendo che i primi tre picchi siano dovuti solo al peptide "leggero", e che l'ultimo picco sia dovuto al solo peptide "pesante", le abbondanze relative vanno così ricalcolate.

	mono isotopico leggero			mono isotopico pesante		
	1407.8	1408.8	1409.8	1410.8	1411.8	1412.8
Abbondanza relativa peptide "leggero"	100	81	36	8,4	1	
Abbondanza relativa peptide "pesante"				52,6	43	19
Abbondanza relativa totale	100	81	36	61	44	19

f) La massa del peptide libero, non marcato si ricava togliendo OCH_3 e due H^+ e sostituendoli con OH , quindi togliendo CH_4 , 16

$$\text{Massa peptide libero} = 1407,8 - 16 = 1391,8 \text{ u}$$

g) Rifacendosi alle abbondanze relative calcolate sopra, il rapporto tra la mioglobina nei due campioni è dato dal rapporto tra i corrispondenti picchi per i due peptidi

$$100/52,6 = 1,9 \quad 81/43 = 1,9 \quad 36/19 = 1,9$$

h) Usando $^{13}\text{CH}_3\text{OH}$ come marcatore isotopico al posto di CD_3OH si sarebbe creata una differenza di massa di una sola unità tra i corrispondenti peptidi “leggero” e “pesante” e il grafico delle abbondanze relative sarebbe diventato il seguente:

	mono isotopico leggero	mono isotopico pesante			
Abbondanza relativa peptide “leggero”	100	81	36	8,4	1
Abbondanza relativa peptide “pesante”		52,6	43	19	4,4
Abbondanza relativa totale	100	134	79	27	5,4

i) La scelta migliore è il metanolo deuterato CD_3OH perchè usando metanolo marcato con ^{13}C le due serie di picchi sono troppo sovrapposte e questo rende illeggibili i risultati dell’esperimento.

Soluzione proposta da
prof. Mauro Tonellato
ITI Marconi - Padova