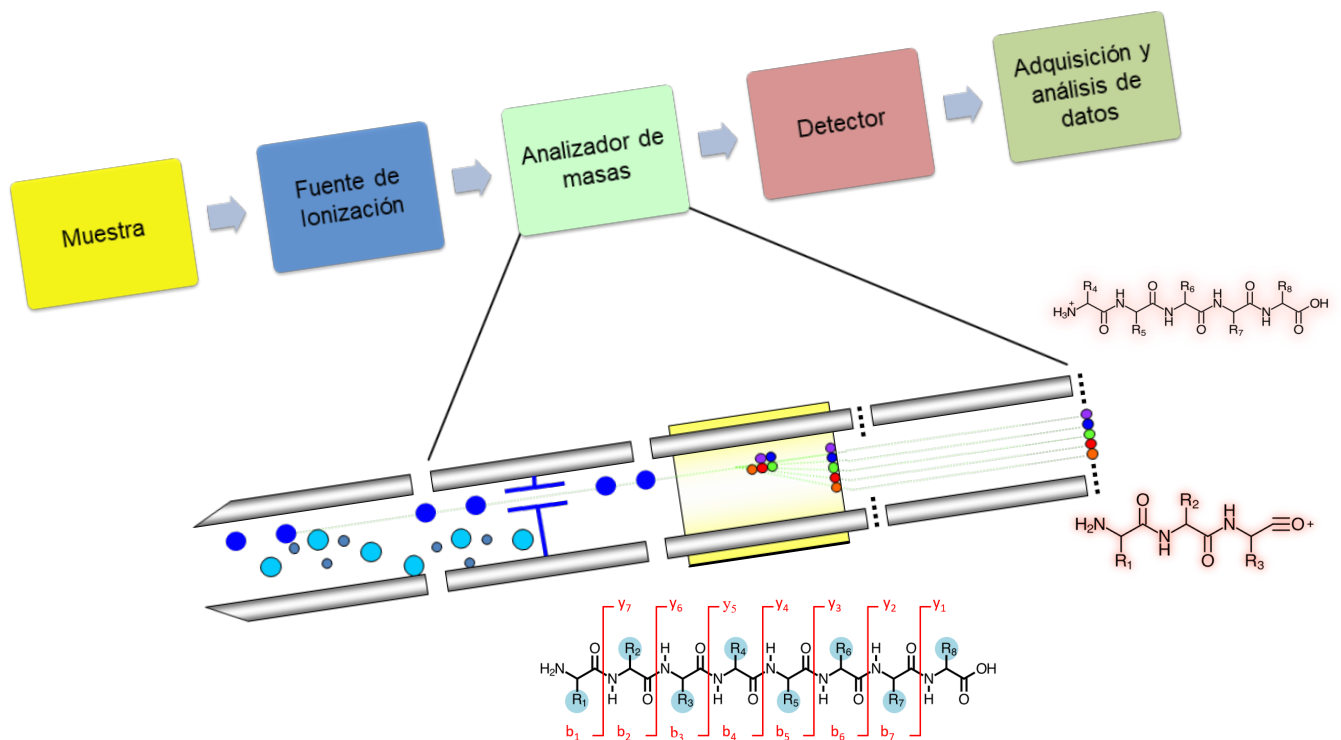
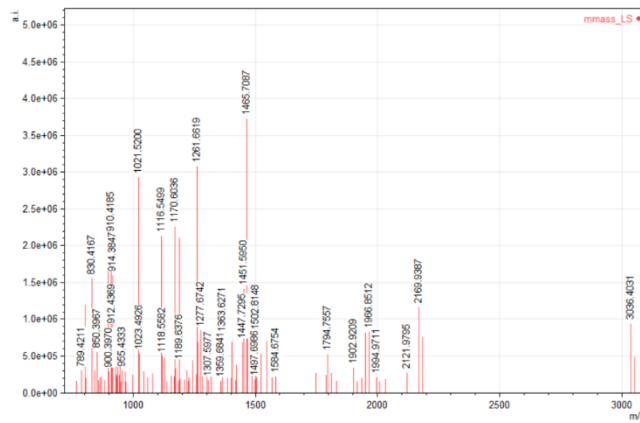


# PROBLEMAS DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS



## MÉTODOS EN BIOQUÍMICA

### GRADO BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

María Jesús García Murria

murria@uv.es

En el siguiente documento se presentan los problemas que se trabajarán en las sesiones de problemas de la parte de Espectrometría de Masas de la asignatura de Métodos en Bioquímica del Grado de Bioquímica y Ciencias Biomédicas.

En un primer lugar se plantean los problemas y posteriormente se describe con detalle cómo resolverlos. Los archivos necesarios se encuentran en el aula virtual en la carpeta de problemas de espectrometría de masas.

Índice:

Sesión 1. Identificación de proteínas por huella peptídica. ....	pág.3
Sesión 2. Secuenciación de péptidos de <i>novo</i> . ....	pág.4
Explicación detallada de cómo identificar proteínas por huella peptídica.....	pág.5
1.1    Análisis de los espectros.....	pág.7
1.2    Identificación de la proteína.....	pág.9
1.3    Procedimiento experimental.....	pág.14
Explicación detallada de la secuenciación de péptidos de <i>novo</i> .....	pág.17

## Sesión 1. Identificación de proteínas por huella peptídica.

A partir de los datos del digerido trípico de una banda de gel SDS-PAGE realiza la identificación de la proteína usando la herramienta online de MASCOT. Sigue las instrucciones explicadas en clase o detalladas en la descripción del problema. Identifica la proteína y analiza la información que se obtiene del resultado.

Archivo: MASCOT\_CONTROL.txt

Enlace a la herramienta de búsqueda:

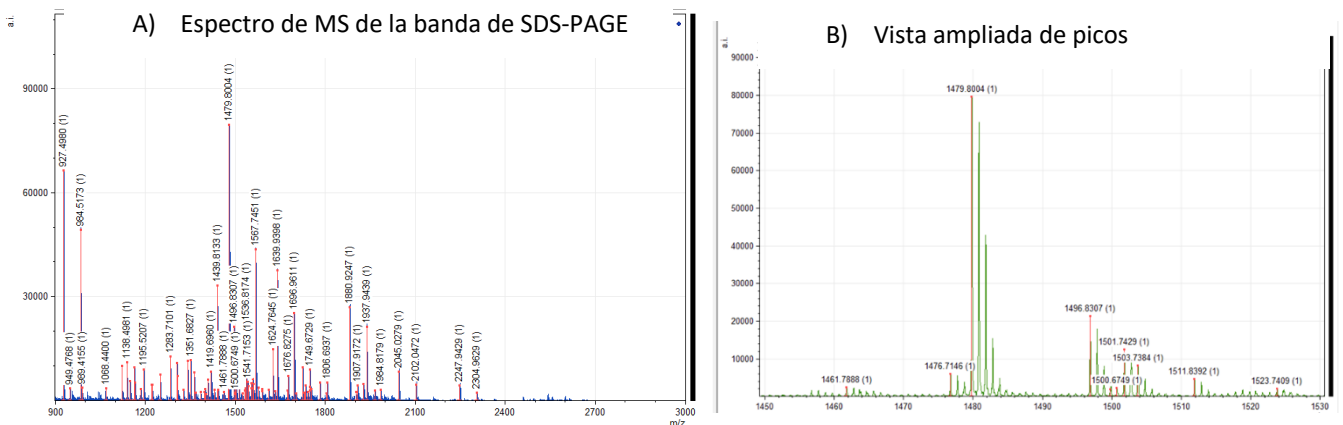
[http://www.matrixscience.com/cgi/search\\_form.pl?formver=2&SEARCH=PMF](http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?formver=2&SEARCH=PMF)

¿Qué cobertura de la proteína se ha conseguido? ¿Por qué no se ha conseguido una cobertura del 100%?

Observa la lista de péptidos identificados, cómo se obtiene la  $M_r(\text{exp})$  a partir de la Masa Observada? Recuerda que los datos se han obtenido en un espectrómetro MALDI-TOF

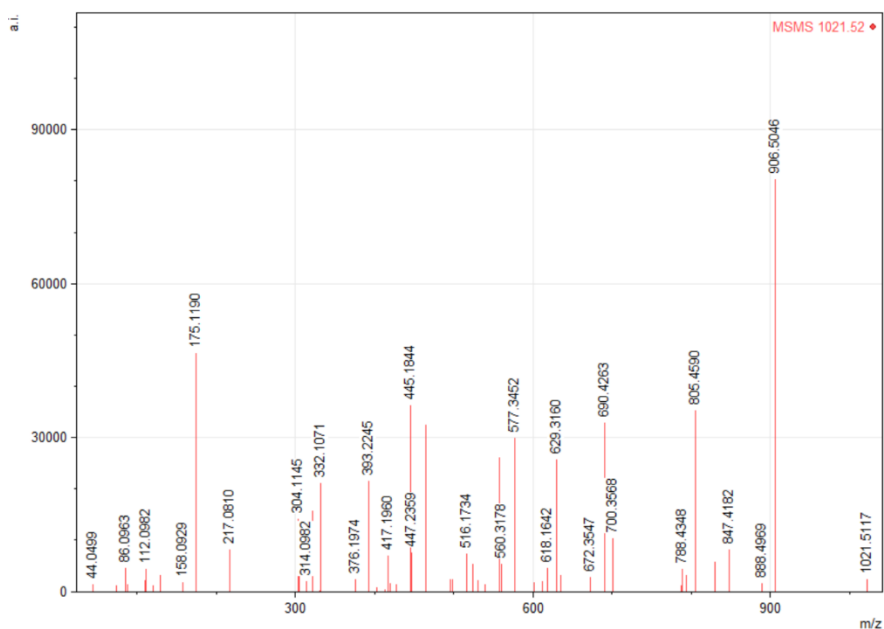
Analiza también el espectro obtenido. A) Si estamos observando el espectro de un digerido de una proteína purificada, ¿por qué no tienen todos los picos la misma intensidad?

B) ¿Por qué todos los picos tienen el mismo patrón donde solo el pico etiquetado es el de mayor intensidad y después de él le siguen una serie de picos más de menor intensidad?



## Sesión 2. Secuenciación de péptidos de *novο*.

A partir del espectro de fragmentación de un péptido deduce su secuencia. Para ello has de identificar los posibles iones y, b e imonio. Calcula la diferencia entre picos contiguos. Aquel que coincida con un valor de masa de un residuo de aminoácido **indicará el residuo** que se encuentra entre esos iones.



Aminoácido	Código de 3 letras	Código de 1 letra	Masa del residuo	Ion imonio
Glicina	Gly	G	57,02	30
Alanina	Ala	A	71,04	44
Serina	Ser	S	87,03	60
Prolina	Pro	P	97,05	70
Valina	Val	V	99,07	72
Treonina	Thr	T	101,05	74
Cisteína	Cys	C	103,01	76
Isoleucina	Ile	I	113,08	86
Leucina	Leu	L	113,08	86
Asparagina	Asn	N	114,04	87
Ácido aspártico	Asp	D	115,03	88
Glutamina	Gln	Q	128,06	101
Lisina	Lys	K	128,09	101
Ácid glutámico	Glu	E	129,04	102
Metionina	Met	M	131,04	104
Histidina	His	H	137,06	110
Fenilalanina	Phe	F	147,07	120
Arginina	Arg	R	156,01	129
Tirosina	Tyr	Y	163,06	136
Triptófano	Trp	W	186,08	159
Cisteína carbamidometilada			160.03	

## Explicación detallada sesión 1: BÚSQUEDA DE HUELLA PEPTÍDICA UTILIZANDO MASCOT

Una vez realizado el proceso de purificación de Rubisco en las prácticas de Métodos en Bioquímica del segundo cuatrimestre, se evaluó el proceso analizando cada una de las muestras tomadas a lo largo de todo el proceso por electroforesis SDS-PAGE.

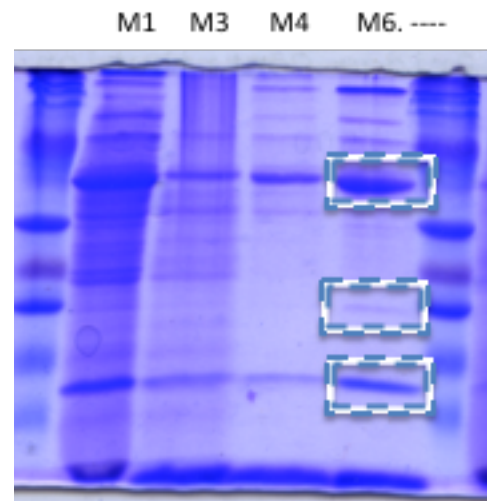
En la carrera que correspondía a la muestra purificada M6 que provenía del pico de elución de la cromatografía de intercambio iónico se detectaron más bandas de las esperadas. Para comprobar la presencia de Rubisco, se recortó la banda que por migración correspondería a la subunidad grande y a la subunidad pequeña, y, además se recortó una banda con una migración intermedia que aparecía en la mayoría de los grupos.

El protocolo exacto del tratamiento de las bandas se adjunta al final del documento.

Brevemente, cada banda señalada del gel de acrilamida se cortó con una cuchilla, se destiñó, se redujo con DTT y se alquiló con **iodoacetamida**, antes de la digestión con **tripsina**.

Directamente el digerido sin concentrar fue analizado en modo **Reflector +** en un **MALDI-TOF** previamente calibrado con estándares comerciales de m/z conocida.

Como control de digestión y detección se usó una proteína estándar, la cual se sometió al mismo proceso.



En el aula virtual están los archivos que contienen la lista de todos los picos exportada directamente del MALDI.

Estos espectros se pueden visualizar en programas libres como el mmass <http://www.mmass.org/download/> (que no es compatible con las últimas actualizaciones de Mac).

A continuación, se explicará el proceso de visualización y búsqueda de la huella peptídica, usando el programa mmass que se puede descargar gratuitamente (*instrucciones indicadas en color azul*) pero para aquellos que no puedan o no quieran descargarse el programa se mostraran pantallazos de lo que se vería en ese programa.

No es necesario descargarse el programa, se puede seguir el proceso con las explicaciones del cuestionario.

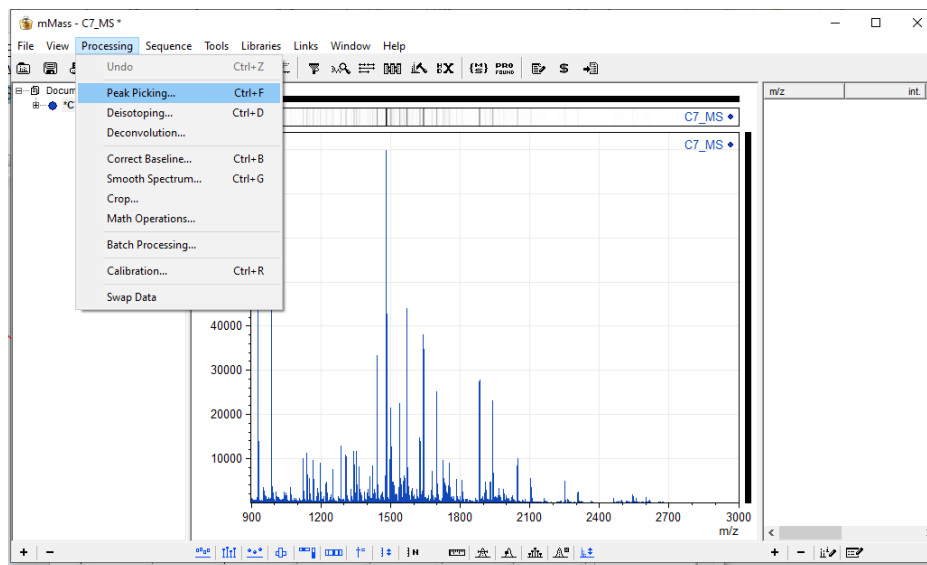
Las cuestiones que deberéis contestar están en enmarcadas en un cuadrado color oro.

Una vez descargado el programa mmass

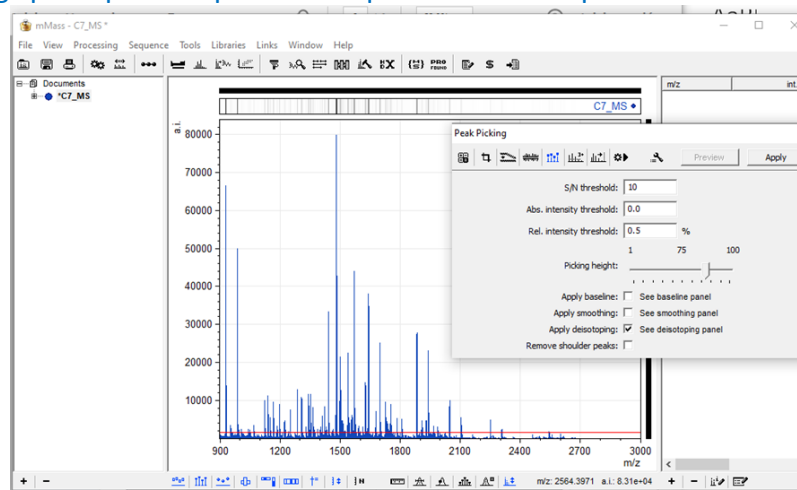
Se ha de descargar los datos de MS de los archivos del aula virtual (mmass\_Control.txt; mmass\_LS.txt )

Empezaremos analizando la **muestra control**:  
Abrir el documento “**mmass\_CONTROL.txt**”

Se ha de procesar el espectro para que identifique los péptidos.  
*Processing y luego Peak Picking (Ctrl+F)*



Para Seleccionar los picos se realizan con los criterios siguientes, con una señal/ruido de 10; un % de límite de detección de 0.5% de intensidad relativa y que aplique el “deisotoping” para que marque solo los picos monoisotópicos.

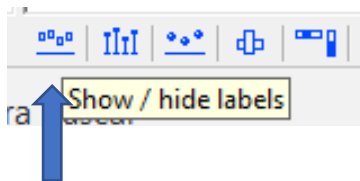
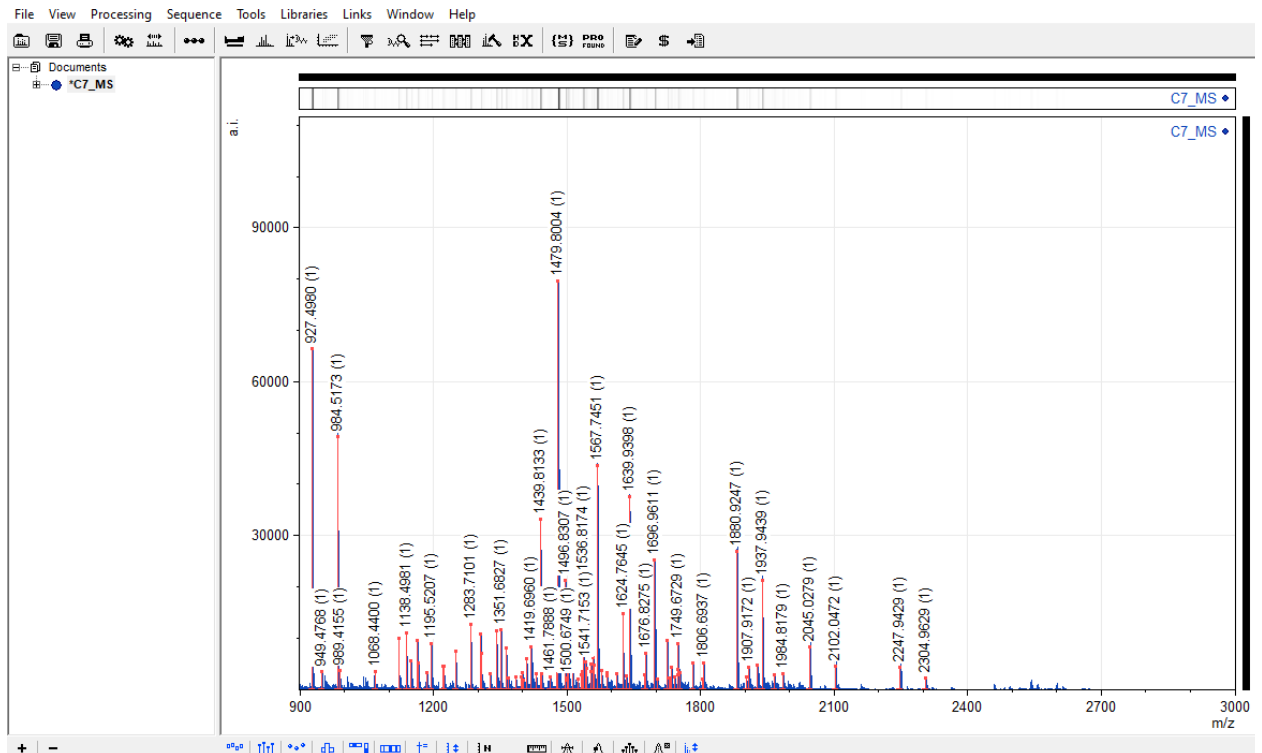


Y aparecerá el espectro con los picos anotados

# 1.1 ANÁLISIS DE LOS ESPECTROS

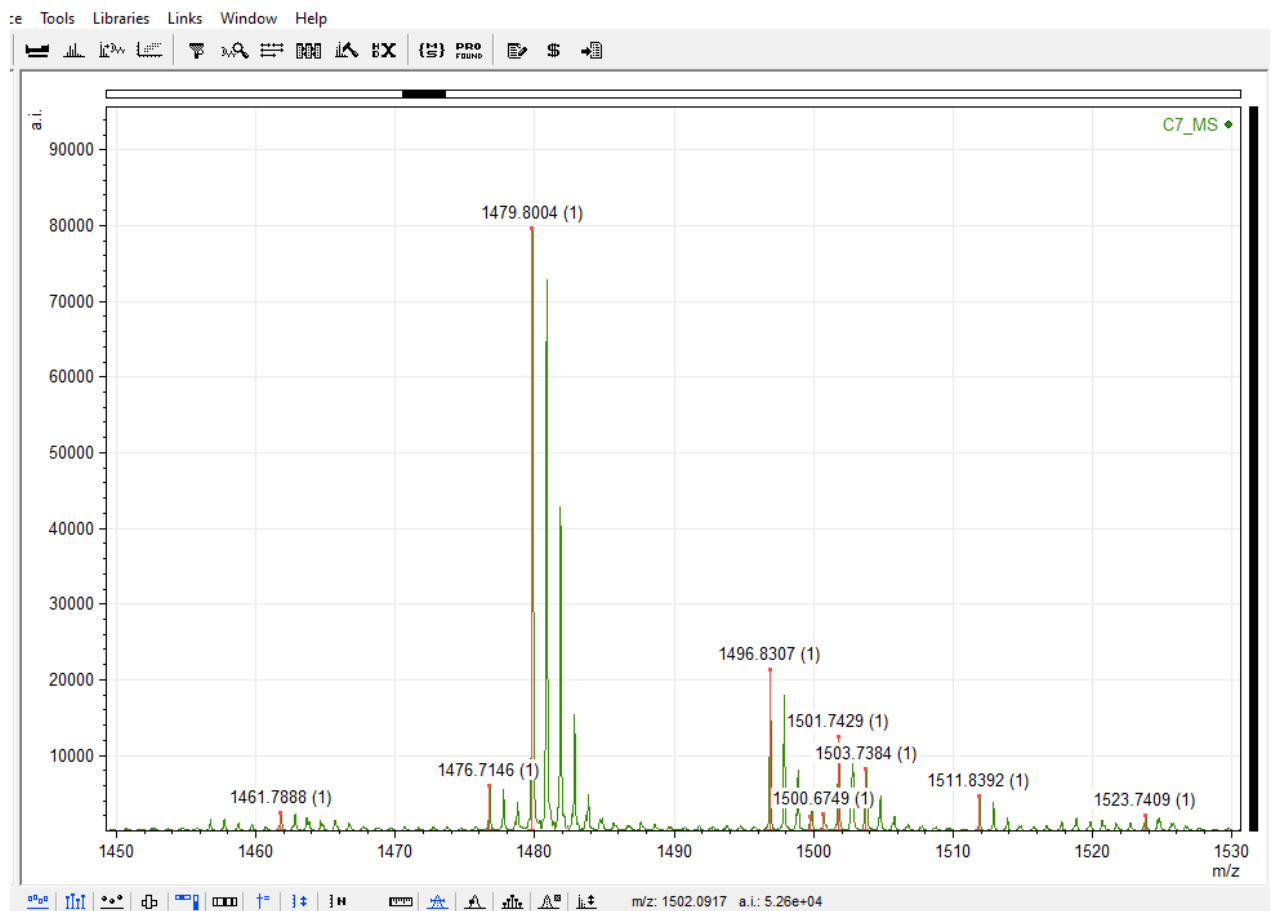
Antes de hacer la búsqueda vamos a analizar el espectro.

Si estamos observando el espectro de un digerido de una proteína purificada, ¿por qué no tienen todos los picos la misma intensidad?



Para hacer zoom en un pico utiliza el botón derecho y el cursor para seleccionar la zona a ampliar. Con doble click en el espectro se vuelve a la visión global.

Al hacer zoom en cualquier pico aparece en todos la misma distribución



¿Por qué todos los picos tienen el mismo patrón donde solo el pico etiquetado es el de mayor intensidad y después de él le siguen una serie de picos más de menor intensidad?



## 1.2. IDENTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA

Para hacer la **búsqueda** de la huella peptídica, se pueden usar diferentes motores de búsqueda. Se puede hacer directamente desde el programa mMass o directamente desde la web de MASCOT exportando la lista de picos monoisotópicos de mMass.

### Opción1: Búsqueda en web de MASCOT

[http://www.matrixscience.com/cgi/search\\_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF](http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF)

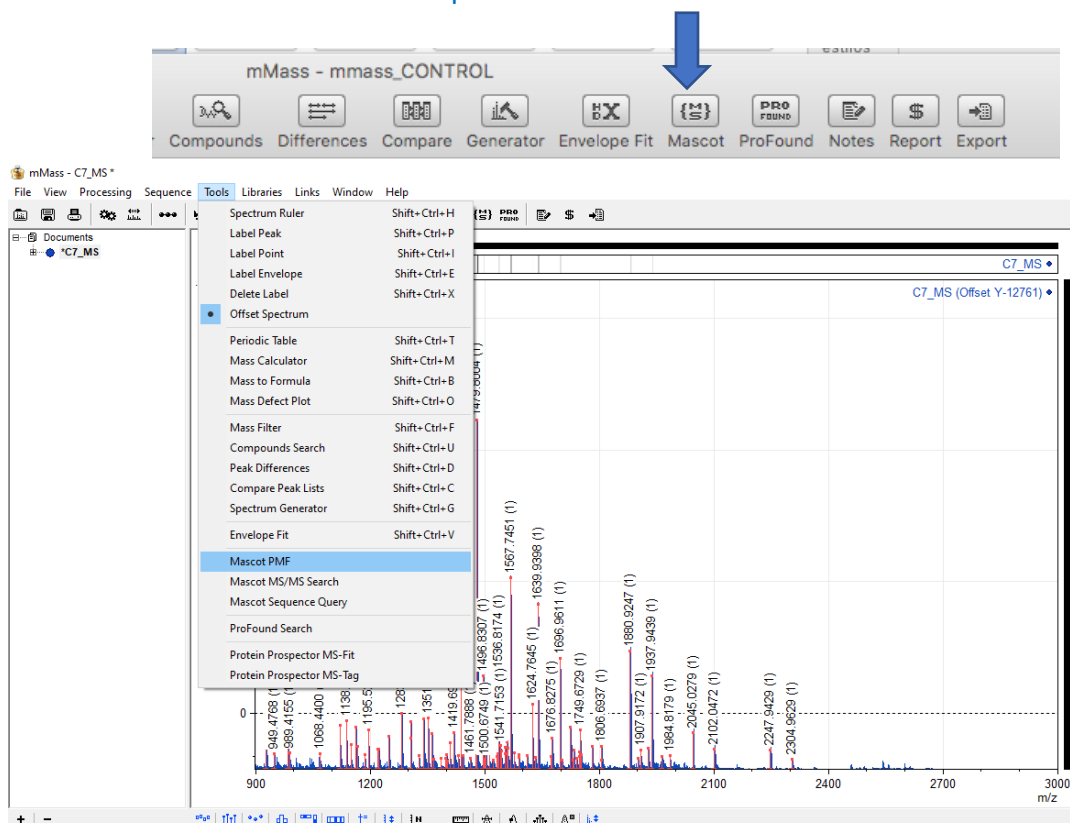
Será necesario descargar desde el aula virtual los archivos que contienen la lista de picos monoisotópicos

(MASCOT\_CONTROL.txt ; MASCOT\_LS.txt)

Asegúrate de estar en la opción **“Mascot - Peptide Mass Fingerprinting”**. Después de indicar el nombre y el correo (que tendrás que validar la primera vez), selecciona los valores y opciones que consideres teniendo en cuenta el enunciado del principio. *Lee de nuevo el enunciado y piensa qué modificación deberías añadir.* Al final de este apartado tienes una explicación y recomendaciones para cada parámetro que has de indicar en la búsqueda.

### Opción2: Búsqueda a través de mMass usando MASCOT

Para hacer búsqueda en Mascot directamente desde el programa, pincha sobre el botón de Mascot o selecciona la opción **“Mascot PMF”** a través del menú **“Tools”**.



## Parámetros modificables del motor de Búsqueda

### Base de Datos

Si el organismo en el que se trabaja está bien caracterizado se recomienda utilizar la base de datos Swiss-Prot porque las entradas son de alta calidad y están bien anotadas. Además, al no ser redundante, es relativamente pequeña y es más fácil tener un resultado estadísticamente positivo. Las ESTs (**Expressed Sequence Tags**) se usan para datos de MS/MS si el genoma no está secuenciado.

*Una vez tengas la proteína identificada podrías jugar a realizar búsquedas en otras bases de datos y ver qué pasa.*

### Enzima y missed cleavages

Selecciona la proteasa utilizada y el número de sitios sin cortar que se salta el enzima. Lo habitual es permitir 1-2 sitios, más “misscleavaged” podría afectar para obtener un resultado positivo porque aumentamos el número de posibles péptidos teóricos que se deben enfrentar al resultado experimental. *Podrías probarlo y comprobarlo.*

### Taxonomía:

Fijar la taxonomía acelera y simplifica el resultado porque no dará las proteínas homólogas de otras especies.

A veces interesa hacer una búsqueda sin fijar la taxonomía para poder detectar posibles contaminaciones o proteínas que no se encuentran en la base de datos del organismo que trabajamos.

### Modificaciones Fijas y Variables:

La recomendación es si una modificación es segura que está, añadirla como fija. El número de modificaciones variables hará que el número de péptidos posibles sea mayor y penaliza a la hora de obtener un resultado significativo.

En general: Cuantas más variables haya, **aumenta el número de masas de péptidos calculados para ser enfrentados contra los datos experimentales** y esto disminuirá la puntuación de la identificación y por tanto la posibilidad de encontrar un resultado estadísticamente significativo.

**Prot Mass** aunque sepamos el rango por la migración en el gel SDS-PAGE mejor no añadir nada, y usar el dato de migración electroforética para validar el resultado final

### Tolerancia:

El valor de tolerancia es crítico. Con una tolerancia muy ajustada puede ser que no se obtenga resultado positivo por un problema en la calibración de los datos. Por el contrario, una tolerancia demasiado laxa puede generar falsos positivos y artefactos.

Habitualmente se establece una tolerancia **50 ppm** para las búsquedas de huella peptídica. Aun así, una vez obtenido un resultado se debe analizar el

gráfico de error (ppm) vs Mass (Da) y comprobar que el error de los péptidos asignados (diferencia entre el valor teórico y experimental) está en un rango muy estrecho.

**Mass Value:** Seleccionar lo que corresponda. En este caso los resultados se han obtenido en un **MALDI en modo reflector positivo** por tanto indica en qué forma se obtienen los fragmentos.

**Data file** (solo si haces la búsqueda desde la web) Seleccionar el archivo **MASCOT\_CONTROL.TXT** del aula virtual o el obtenido al exportar los datos del mmass

*Si se hace directamente desde el mmass está opción no aparecerá*

### Start search

*(si es la primera vez que se hace la búsqueda, se ha de validar el correo y volver atrás a hacer la búsqueda)*

Cada entrada en la base de datos se digiere in silico, se calculan las masas de los péptidos teóricos según las condiciones de la digestión y modificaciones indicadas y para cada péptido se deduce su masa teórica (M(calc)).

Mediante algoritmos, se **calcula una puntuación** para decidir si el número de coincidencias de alguna de las proteínas anotadas es suficiente para que no se deban al azar. En ese caso, se da esa proteína como identificada.

Para ello el programa realiza un cálculo (Expect) de si la coincidencia entre los datos experimentales y teóricos se debe al azar y genera una puntuación. Según los parámetros de búsqueda considera que a partir de cierta puntuación (Score) el resultado es significativo y no es debido al azar.

*Realiza la búsqueda. En caso de no obtener un resultado significativo cambia parámetros siguiendo las recomendaciones anteriores. En caso de tener información de la masa o pl puedes comprobar si la identificación cuadra con los datos experimentales*

Una vez tengas la proteína identificada con una puntuación superior al valor que considera significativo, se puede pinchar sobre el resultado y se abrirá una nueva página.

### Dedica tiempo a analizar el resultado obtenido.

Al principio aparecerá una lista de los parámetros seleccionados y de la proteína identificada.

En medio, aparecerá la secuencia de la proteína en negro y en rojo los péptidos detectados. A partir de estos datos se **calcula la cobertura** de la secuencia que representaría el porcentaje de secuencia cubierta a partir de los péptidos detectados.

Protein sequence coverage: 54%

Matched peptides shown in **bold red**.

```
1 MKWVTFISLL LFFSSAYSRG VFRDTHKSE IAHRPKDLGR RHPKGLVLIA
51 FSQVLQQCF DEHVKLINEL TRFAKTCVAD ESHAGCEKSL HTLFGDELCK
101 VASLRETYGD MADCCERQEP ERNCPILSHK DDSFDLEKLK FQNTLQDEF
151 KADEKKEFWGK YLYETARRHP YFYAPPELLYY ANKYNVQGE CCQARDKQAC
201 LFPKIEITMRE FVLASSARQR LRCASIQKFS EBAKANSVA RLSQRFKAE
251 FVEVTKLVTD LTRVHKQCH GDLLCADDR ADLARYICDN QDTISSKLRK
```

*¿Qué cobertura de la proteína se ha conseguido?*

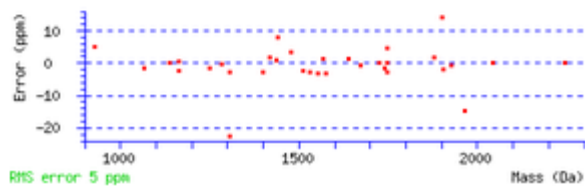
Bajo la secuencia aparece una lista de los péptidos detectados ordenados por posición en la secuencia. Cada columna indica:  
 Posición inicial y final del aminoácido, la masa observada, la masa experimental (exp), la masa calculada (teóricamente a partir de la secuencia de aminoácidos), la diferencia en ppm de Mr(exp)-Mr(calc), los “misscleaveages” (M) y la secuencia del péptido

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Peptide
35 - 44	1249.6192	1248.6119	1248.6139	-1.57	1	R.FKDLGEEHFK.G
66 - 75	1163.6277	1162.6204	1162.6234	-2.53	0	K.LVNELTEPAK.T

*¿Cómo se obtiene la Mr(exp) a partir de la Masa Observada? Recuerda que los datos se han obtenido en un espectrómetro MALDI TOF*

Por último, aparece la relación de picos no asignados y la gráfica del error(ppm) respecto la masa de los iones asignados.

No match to: 949.4768, 984.5173, 989.4155, 1121.4718, 1149.4663, 1185.6135, 1195.5207, 1220.6466, 1223.1500.6749, 1501.7429, 1503.7384, 1523.7409, 1533.7606, 1536.8174, 1541.7153, 1543.7163, 1553.8498, 1558.1804.7205, 1806.6937, 1937.9439, 1984.8179, 2102.0472, 2304.9629



*¿Por qué no se ha conseguido una cobertura del 100%?*

Para comprobar los péptidos detectables, puedes usar la herramienta Peptide Mass de ExPASy ([https://web.expasy.org/peptide\\_mass/](https://web.expasy.org/peptide_mass/)) para hacer una digestión in silico de la secuencia que le indiques.

Para ellos debes añadir la secuencia de la proteína conocida (añadiendo la secuencia de aminoácidos o indicándole el identificador de UniprotKb ej. ALBU\_BOVIN) indicarle las modificaciones

Ten en cuenta que en un MALDI-TOF en modo reflector positivo se suele determinar el rango entre 850-2500 Da (valores inferiores sale espectro contaminado con picos de la matriz, valores superiores no suelen detectar iones).

Desmarca todas las opciones de “For UniProtKB (Swiss-Prot/TrEMBL) entries only:

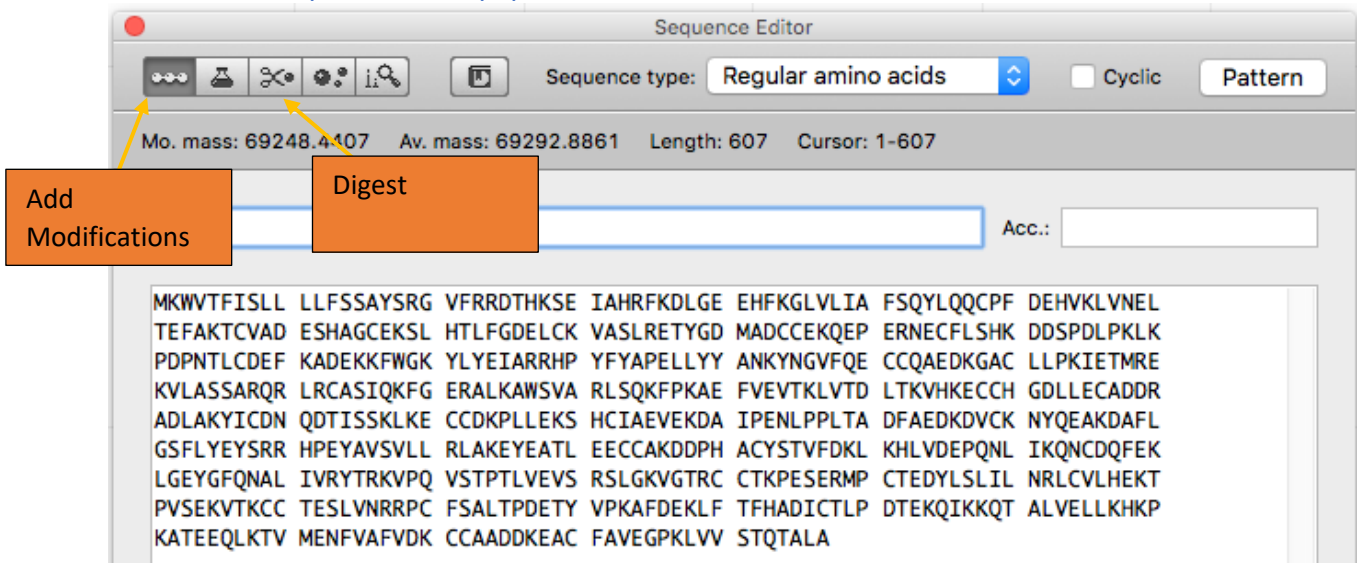
For each peptide display)

Una vez tengas todo marcado dale a PERFORM the cleavage (bajo el cuadrado de la secuencia) para digerir

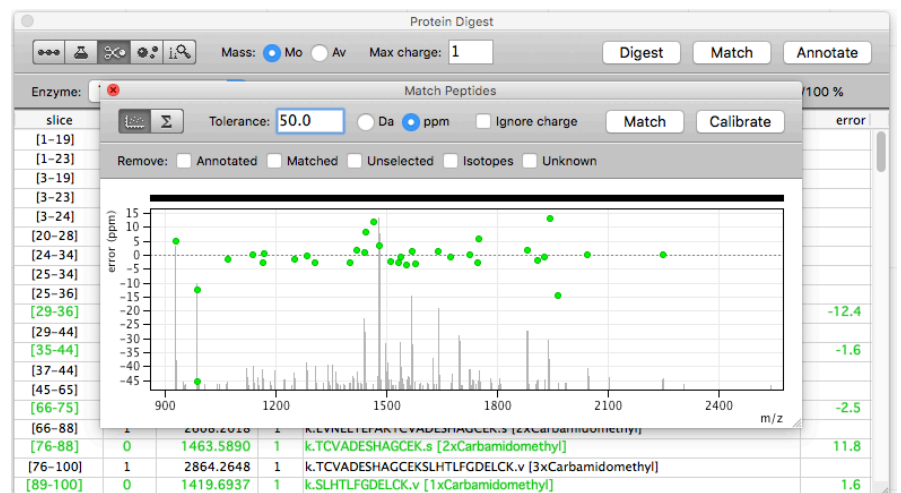
*La digestión también se puede realizar con el programa mmass y en este caso que asigne a cada pico el péptido que por masa cuadraría.*

*Abre la herramienta y añade la secuencia del resultado anterior (la puedes copiar directamente del resultado de Mascot)*

Muevete por los menús laterales para añadir modificaciones, hacer digestión in silico y “matchear” los picos con los péptidos.



Una vez le has dado a **Digest**, Haz que se marquen los picos experimentales que cuadren con un péptido (**Match**), éstos se marcarán de verde. Cierra la ventana y de nuevo sobre la ventana de **Digest** indica **Annotate** para que saque lista de picos anotados.



**EXTRAS:** El programa mmass permite en caso de que no se haya realizado, una **calibración del espectro con estándares internos de calibración o las masas de los péptidos autoproteolíticos de tripsina porcina (841.50 and 2210.10)**. En este caso no es necesario porque la calibración ya se ha realizado previamente.

La herramienta de **Peak differences** del programa mmass es muy útil para ayudar en la secuenciación de novo manual de péptidos.

Repite la búsqueda para las bandas LS

Si lo haces directamente en Mascot, usa los archivos llamados **MASCOT\_LS.txt**

Si lo haces a través del mmass usa los archivos **mmass\_LS.txt**

Los resultados de SS y contaminant están en un documento aparte en el Aula Virtual.

## 1.3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

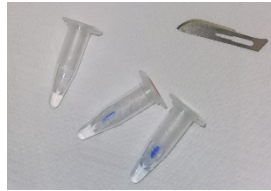
### PROTOCOLO DIGESTIÓN BANDA DE GEL

ACN: acetonitrilo

DTT: Ditioneitol

IAM: Iodoacetamida

TFA: ácido trifluoroacético



Siempre que no se indique lo contrario se eliminará todo el volumen del reactivo antes de añadir el siguiente:

#### Destinción Coomassie

- 2x10' H<sub>2</sub>O/ACN (1:1, v/v)

- ACN Cuando el gel se ha deshidratado sacar el líquido

- Rehidratar con 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, después de 5' añadir ACN. Esperar 15 min.

- 1x5' ACN



#### Reducción y alquilación de las Cisteínas

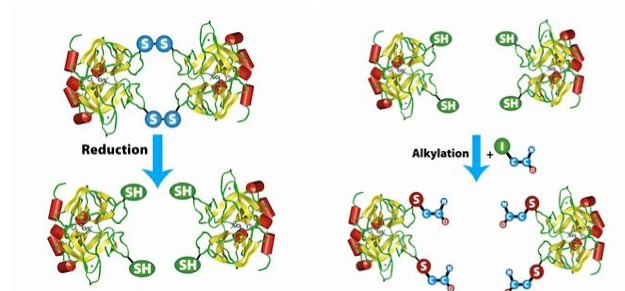
- 1x20' (60°C) 10mM DTT en 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>

- 1x30' (oscuridad) 55mM IAM en 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>

- 1x2' H<sub>2</sub>O/ACN

- 1x5' ACN

- Speed-Vac o dejar secar completamente



#### Digestión

- Tripsina (50 ng en 10 µL ). Incubar 30' en hielo. Adicionar 50 µL 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>

- o.n. 37°C

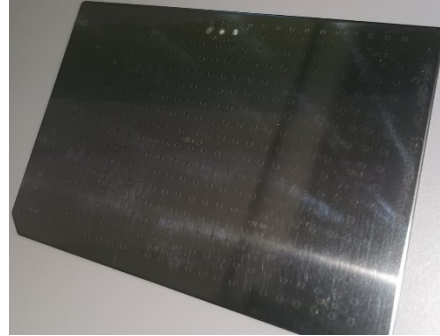
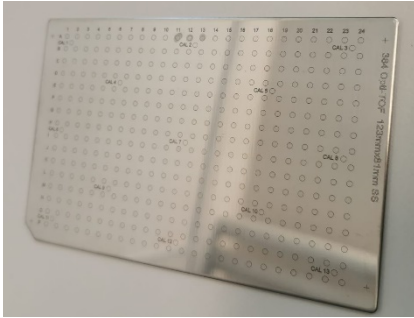
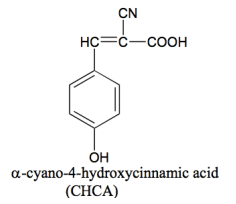
Parada de la reacción:

-3 µL 10%TFA (pH=1)

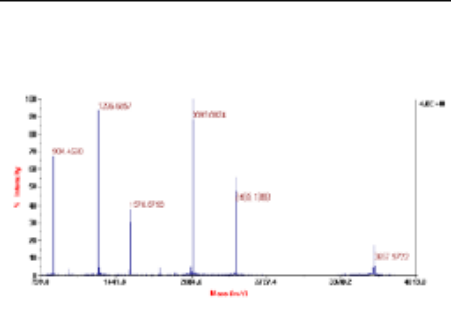
# ADQUISICIÓN DE DATOS EN MALDI TOFTOF 5800 (AB Sciex)

1 µL de la solución de péptidos se deposita en la placa de MALDI.

Se deja secar al aire y a continuación se adicionan 0.5 µL de solución de matriz (5 mg/mL de ACH (ácido α-ciano-4-hidroxicinámico) - en 50% ACN 0.1% TFA).

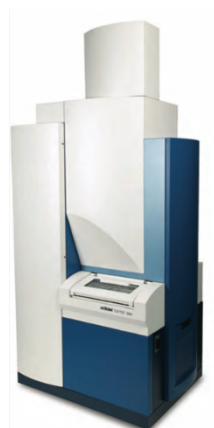


En el MALDI: se debe calibrar la geometría de la placa y los métodos de adquisición 1 µL de la solución de calibración TOFTOF (Referencia 4333604, ABSciex), en 13 posiciones de la placa. Los métodos de MSMS se calibran con el espectro de fragmentación de Angiotensin I

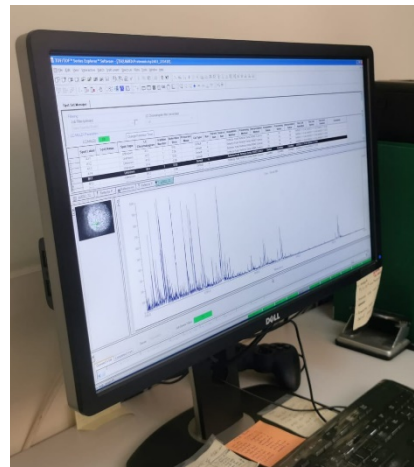
Standard Mixture Component	Final Standard Concentration	CALIBRATION SPECTRUM
des-Arg1-Bradykinin	1.0 pmol/µL	
Angiotensin I	2.0 pmol/µL	
Glu1-Fibrinopeptide B	1.3 pmol/µL	
ACTH (1-17 clip)	2.0 pmol/µL	
ACTH (18-39 clip)	5 pmol/µL	
ACTH (7-38 clip)	3.0 pmol/µL	

Se adquieren los espectros de MS en modo reflector positivo.

El rango de masa analizado es 850-3500 m/z. La intensidad y el número de disparos de láser se ajustan manualmente para optimizar la resolución y la relación señal/ruido del espectro.



MALDI TOF/TOF 5800



Para hacer MS/MS:

Posteriormente **se seleccionan automáticamente 5 iones**, entre aquellos de mayor intensidad, excluyendo los que corresponden a contaminaciones conocidas. De cada uno de estos péptidos se obtiene un **espectro de fragmentación**.

Como veis en el protocolo de adquisición, en realidad se realizó un ensayo de MS, y después se seleccionaron los iones MS/MS. En la web del MASCOT en el apartado de **MS/MS Ions Search**

([https://www.matrixscience.com/cgi/search\\_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS](https://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS)) se podría hacer la búsqueda con los MS/MS.

Por si queréis probar en el AV tenéis un archivo llamado **MSMSdeLS.txt**

El resultado que da será es el nombre de la proteína identificada y los péptidos a partir de los cuales se ha obtenido el MSMS.

▼1 **RBL\_BERBR** 133 Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Bertiera breviflora OX=43448 GN=rbcl PE=3 SV=1

	Score	Mass	Matches	Sequences	emPAI	
1.1	133	52522	4 (4)	4 (4)	0.49	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Bertiera breviflora OX=
						▶ 122 same sets of RBL_BERBR

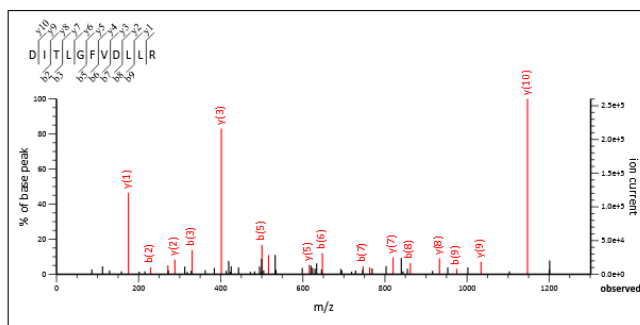
▼4 peptide matches (4 non-duplicate, 0 duplicate)

Auto-fit to window

Query Dupes	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	M	Score	Expect	Rank	U	Peptide
16	910.4185	909.4112	909.4378	-29.3	0	37	0.0068	▶1	U	R.AVYECLR.G
34	1021.4899	1020.4826	1020.5240	-40.5	0	59	0.00057	▶1	U	K.DTDILAAFR.V
60	1261.6619	1260.6546	1260.7078	-42.2	0	75	2e-05	▶1	U	R.DITLGFVDLLR.D
77	1465.7087	1464.7014	1464.7474	-31.4	0	66	1.9e-05	▶1	U	K.TFQGPFGIQVER.D

Fíjate que genera 122 resultados similares con la misma puntuación, ordenados alfabéticamente. Se tratan de péptidos conservados en diferentes especies, entre ellas se encuentra *Citrus sinensis*

Al pinchar sobre un péptido aparecerá el espectro de MS/MS con la asignación de cada fragmento al ion correspondiente



Label all possible matches  Label matches used for scoring

Monoisotopic mass of neutral peptide Mr(calc): 1260.7078  
 Fixed modifications: Carbamidomethyl (C) (apply to specified residues or termini only)  
 Ions Score: 75 Expect: 2e-05  
 Matches: 18/40 Fragment Ions using 33 most intense peaks (bale)

#	a	b	Seq.	y	y*	#
1	88.0393	116.0342	D			11
2	201.1234	329.1183	I	1146.6881	1129.6616	10
3	302.1710	330.1660	T	1033.6041	1016.5775	9
4	415.2551	443.2500	L	932.5564	915.5298	8
5	472.2766	500.2715	G	819.4723	802.4458	7
6	619.3450	647.3399	F	762.4509	745.4243	6
7	718.4134	746.4083	V	615.3824	598.3559	5
8	833.4403	861.4353	D	516.3140	499.2875	4
9	946.5244	974.5193	L	401.2871	384.2605	3
10	1059.6085	1087.6034	L	288.2030	271.1765	2
11			R	175.1190	158.0924	1



## Explicación Detallada Sesión 2: SECUENCIACIÓN DE PÉPTIDOS DE NOVO

La "secuenciación de péptidos de *novo*" es la secuenciación de péptidos realizada sin conocimiento previo de la secuencia de aminoácidos a partir de un espectro de fragmentación MS/MS.

El espectro se obtiene una vez se selecciona y aísla un péptido precursor en una cámara de colisión donde al colisionar con moléculas de gas inerte se generan diferentes tipos de fragmentos (Fig.1).

El conjunto de picos que se observa en un espectro de fragmentación es un reflejo de la población de iones fragmento producidos en la celda de colisión del espectrómetro de masas ordenados de acuerdo con su relación  $m/z$ .

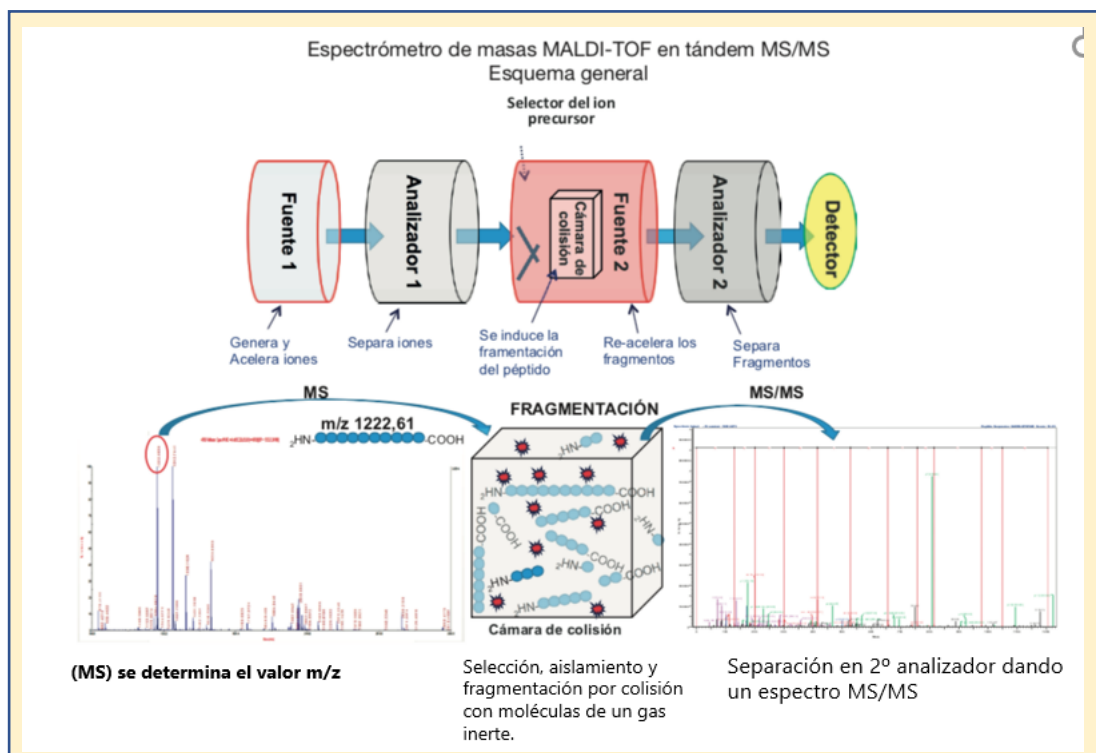


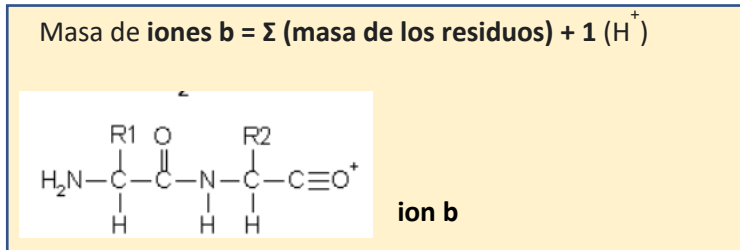
Figura 1. Esquema general de obtención de espectro de fragmentación MS/MS.

Un espectro de MS/MS es un puzzle en el cual no suelen estar todas las piezas. El éxito de una interpretación *de novo* dependerá mucho de la "calidad" del espectro que estamos analizando.

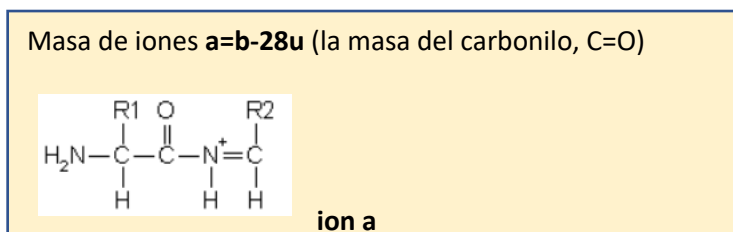
Aunque las normas son claras, los espectros no siempre están completos y no siempre es fácil. Hay que tener cuidado porque hay trampas, como residuos isobáricos y combinaciones de residuos con masas similares. A pesar de que prácticamente siempre se usa software específico para resolverlos, es bueno saber cómo funciona el proceso.



Los **iones b** corresponden a los fragmentos del extremo amino. Los picos del fragmento b se numeran desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo. *El fragmento que contiene solo el aminoácido amino terminal se denomina b1. El fragmento que contiene los dos primeros aminoácidos amino terminales se denomina ion b2, y así sucesivamente. La nomenclatura es sencilla de seguir.*

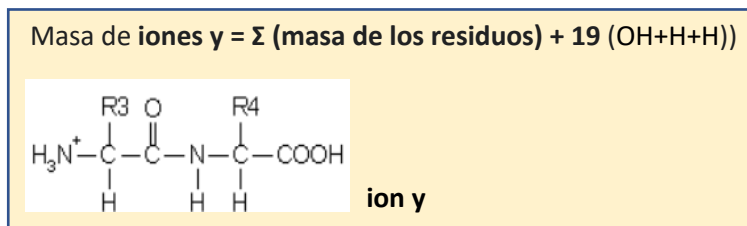


Los **iones a** ocurren con menor frecuencia y abundancia que los iones **b**.



Los **iones a** se usan a menudo como un **ion diagnóstico para confirmar los iones b**.

De manera similar, los grupos de iones de **fragmentos de péptidos** que van desde el extremo **C-terminal** se denominan "**iones y**". Los **péptidos trípticos** tienden a ser más básicos en el extremo C-terminal por lo que en general se **identificarán mejor los iones y** que los **b**.



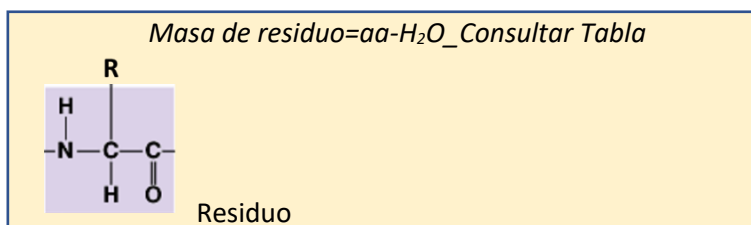
**y1** indicará el residuo **Ct**. En caso de péptidos trípticos, la presencia del **ion 147** indica que el péptido acaba en **Lys** o **175** si se trata de **Arg**.

$$y1=R = 156.1 + 19 = 175.1$$

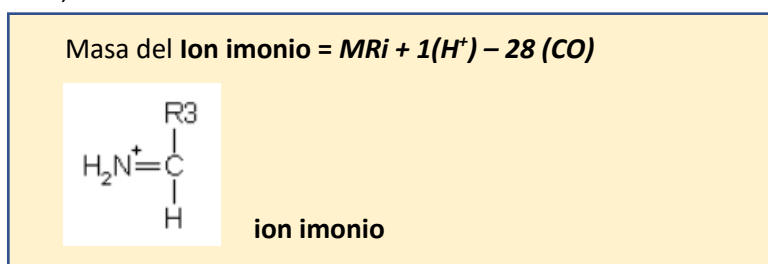
$$y1=K = 128.09 + 19 = 147$$

La secuencia del péptido se determinará por la **diferencia de masa entre los picos** del espectro de MS/MS. Los **iones y y b** se encontrarán **entremezclados**. Su identificación permitirá determinar la secuencia, tanto hacia en Nt como al Ct.

Será necesario consultar la **tabla I o II** continuamente para poder **identificar el residuo** que se encuentra entre los diferentes iones **y** o **b**. Una vez tengamos un ion identificado iremos calculando la diferencia entre picos contiguos buscando aquel que coincida con el valor de la columna (Residue mass) que nos **indicará el residuo** que se encuentra entre esos iones.



Además, es posible observar **iones de imonio** en el extremo inferior del espectro que **pueden dar una pista sobre la composición de aminoácidos de un péptido**. No siempre se detectan todos los iones imonio. Estos iones son fragmentos “internos” de **un solo residuo** que pierden el grupo C = O. Por ejemplo, para la lisina cuya masa monoisotópica es de aproximadamente 128 Daltons, su ion imonio sería:  $Masa\ del\ Residuo + 1 - 28 = 128 + 1 - 28 = 101$



**Tabla I. Valores de masa de los residuos e iones imonios.**

Name	3-letter code	1-letter code	Residue Mass	Immonium ion	Related ions	Composition
Alanine	Ala	A	71.03711	44		C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NO
Arginine	Arg	R	156.10111	129	59,70,73,87,100,112	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O
Asparagine	Asn	N	114.04293	87	70	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Aspartic Acid	Asp	D	115.02694	88	70	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>3</sub>
Cysteine	Cys	C	103.00919	76		C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NOS
Glutamic Acid	Glu	E	129.04259	102		C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>
Glutamine	Gln	Q	128.05858	101	56,84,129	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Glycine	Gly	G	57.02146	30		C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NO
Histidine	His	H	137.05891	110	82,121,123,138,166	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O
Isoleucine	Ile	I	113.08406	86	44,72	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO
Leucine	Leu	L	113.08406	86	44,72	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO
Lysine	Lys	K	128.09496	101	70,84,112,129	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O
Methionine	Met	M	131.04049	104	61	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NOS
Phenylalanine	Phe	F	147.06841	120	91	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO
Proline	Pro	P	97.05276	70		C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO
Serine	Ser	S	87.03203	60		C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>
Threonine	Thr	T	101.04768	74		C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>
Tryptophan	Trp	W	186.07931	159	11,117,130,132,170,100	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O
Tyrosine	Tyr	Y	163.06333	136	91,107	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>
Valine	Val	V	99.06841	72	44,55,69	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO

## Reglas generales para la secuenciación

1. En el rango de menor masa se pueden detectar los iones imonio que pueden dar una idea de la composición de aminoácidos.
2. Para saber si el péptido tríptico **termina en K o en R** busca los iones de diagnóstico **y1 en el extremo inferior del espectro; 147 indica Lys y 175 Arg.**
3. Para iniciar un proyecto de secuenciación de *novo*, se comienza habitualmente en el extremo de masa alta del espectro. La secuencia del péptido se determinará por la **diferencia de masa entre los picos** del espectro de MS/MS.
5. Una vez se conoce la masa de un ion b o y, el ion y o b correspondiente se puede calcular usando las siguientes fórmulas y buscar el ion en el espectro

$$(\text{Masa precursor} + \text{H})^{1+} = \text{b} + \text{y}$$

Cuando se detecte un ion debe estar protonado, por tanto:

$$\mathbf{y = (M+H)^{1+} - b + 1}$$

$$\mathbf{b = (M+H)^{1+} - y + 1}$$

Hay diferentes maneras de abordar una secuenciación de *novo*. Se puede empezar siguiendo los **iones y** ya que estos fragmentos **se detectan mejor** como se ha comentado anteriormente.

1. Busca en el espectro un pico intenso, calcula la diferencia entre picos contiguos. Aquel que coincida con el valor de la columna (Residue mass) de la tabla I o II nos **indicará el residuo** que se encuentra entre esos iones.

**penúltimo ion  $y_{n-1} = (M+H)^{1+} - \text{masa residuo}$**

*Este ion y debe encontrarse entre la masa de residuos de aminoácido más pequeña y la más grande, según tabla I o II, entre 57-186 u.*

**$(M+H)^{1+} - \text{ion observado} = \text{Masa del Residuo}$**

2. Una vez que se encuentra un ion y, calcula el ion b correspondiente, búscalo, y etiquétalo en el espectro.  
$$b = (M+H)^{1+} - y + 1$$
3. Continúa siguiendo la serie de iones y hasta el extremo inferior del espectro de masas. Una vez se alcance el extremo inferior y se llegue al y1 (147 o 175) construye la serie de iones

Para cada ion **y** puedes buscar el ion **b** correspondiente o realizar el proceso independientemente. Todos estos datos deben encajar para ayudar a reafirmar las asignaciones.

4. Además, cada vez que se identifique **un ion b**,  
A -28u se encontrará el **ion a** (no siempre está presente)  
A veces también hay **pérdidas de amoníaco y agua**, -17 y -18u respectivamente.

5. Rara vez se observa el fragmento b1, lo que dificulta determinar el orden de los dos primeros aminoácidos N-terminales en una secuencia peptídica, pero que se puede resolver con los **iones y** más largos

Más consejos:

#### **Cuidado con aminoácidos con Masa isobárica**

1. La **leucina y la isoleucina tienen masas isobáricas y no se pueden diferenciar** en una colisión de baja energía.
2. La **lisina y la glutamina tienen masas casi isobáricas**, 128,09496 y 128,05858 respectivamente.

#### **Pérdida de amoníaco y agua**

1. A veces algunos fragmentos de **iones pierden amoníaco -17 o agua, -18**.

Aunque en este ejercicio solo vamos a seguir los iones y, b, a y los posibles ocasionados por pérdida de agua o grupo amonio, también se pueden detectar fragmentos internos. Hay tablas que ayudan a su identificación, pero por simplificar no lo usaremos en este ejemplo. Estos fragmentos nos pueden ayudar a resolver conflictos en casos de espectros de baja calidad.

## EJEMPLO 1

Empezaremos con un ejemplo de MS/MS obtenido en el análisis de la banda LS (**Fig.3**)

Tras realizar el espectro de MS del digerido tróptico, se seleccionaron los iones más intensos para ser fragmentados.

Para este ejemplo analizaremos el ion 1021,52 que corresponderá a un péptido de masa 1020,52

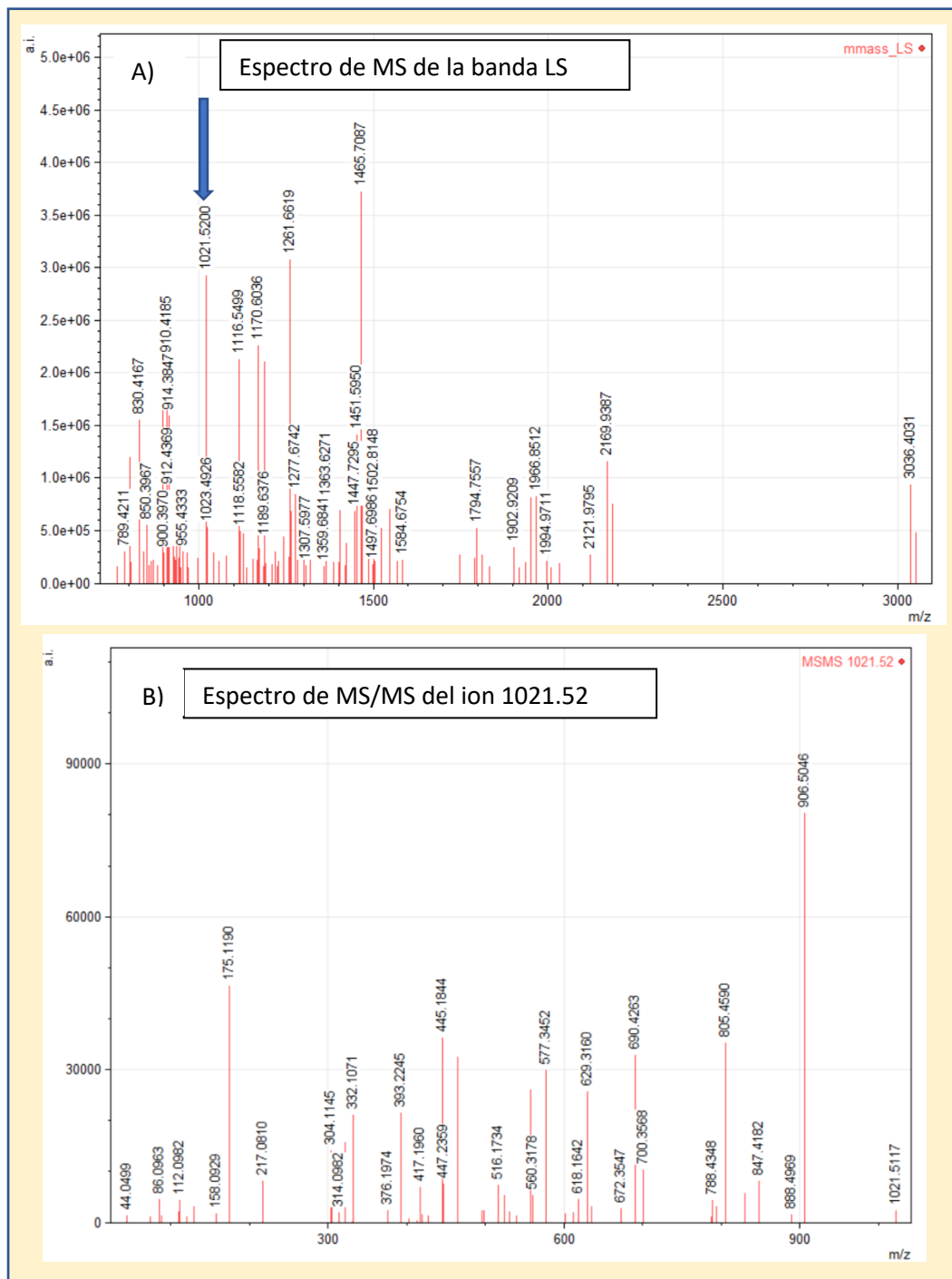


Figura 3. Espectros de masas obtenidos al analizar la banda LS. A) Espectro de masas B) espectro de MS/MS del ion 1021.52

El espectro de MS/MS lo podéis analizar en el programa mmass (archivo MSMS\_1021.52.txt) o directamente a partir de las imágenes ampliadas y lista de picos que se encuentran al final del documento.

Podemos empezar identificando la **serie y** que corresponde a los fragmentos Ct y que al incorporar la R o K suele ser la más intensa.

Para empezar, identificaremos si el péptido acaba en R o K buscando el ion diagnóstico (175 Arg; 147 Lys).

En este caso detectamos el **ion 175** que indica que el péptido acaba en R y por tanto **y1=R**

Ahora vamos a la zona de m/z más alta para identificar los fragmentos **y** más largos. Para ello se calculan las diferencias entre picos buscando a qué residuo correspondería esa diferencia de masa (Tabla I o tabla II).

**Tabla II. Masa de los residuos de aminoácidos ordenados de menor a mayor**

<b>letter</b>	<b>name</b>	<b>mass, Da</b>
G	glycine	57.02
A	alanine	71.04
S	serine	87.03
P	proline	97.05
V	valine	99.07
T	threonine	101.05
C	cysteine	103.01
I	isoleucine	113.08
L	leucine	113.08
N	asparagine	114.04
D	aspartic acid	115.03
Q	glutamine	128.06
K	lysine	128.09
E	glutamic acid	129.04
M	methionine	131.04
H	histidine	137.06
F	phenylalanine	147.07
R	arginine	156.10
Y	tyrosine	163.06
W	tryptophan	186.08
	carboxymethyl cysteine	161.05
	carbamidated cysteine	160.03
	oxidised methionine	147.04



Por ej.

Empezamos con el 1021.5 que corresponde al precursor protonado. Como en estos momentos no sabemos la longitud del péptido, lo nombraremos n.

Calculamos la diferencia entre picos anteriores

$1021-906=115$  según la tabla **correspondería a un aspártico** por tanto parece que el residuo Nt sea un Asp

n	<b>Dxxxxxx...R</b>	<b>1021,5</b>
yn-1	<b>xxxxxx...R</b>	<b>906,49</b>

Seguimos buscando diferencias entre picos (si se trata de **iones y** suelen ser más intensos, pero aun así podemos calcular la diferencia entre los picos siguientes).

$906-888=18$  (esto indicaría una deshidratación n-H<sub>2</sub>O)

$906-847=59$

$906-829=77$

**906-805=101.03** correspondería a una Thr

n	<b>DTxxxxxx...R</b>	<b>1021,49</b>
yn-1	<b>Txxxxxx...R</b>	<b>906,49</b>
yn-2	<b>xxxxxx...R</b>	<b>805,46</b>

**Búsqueda del ion yn-3**

**805 -788= 17** (esto correspondería a una pérdida de grupo amonio y<sub>n-1</sub>-17)

$805 -700= 105$

**805 -690 =115** que correspondería a D

n	<b>DTDxxxxxx...R</b>	<b>1021,49</b>
yn-1	<b>TDxxxxxx...R</b>	<b>906,49</b>
yn-2	<b>Dxxxxxx...R</b>	<b>805,46</b>
yn-3	<b>xxxxxx...R</b>	<b>690,43</b>

#### Búsqueda del ion $y_{n-4}$

690-672=18 (esto correspondería a una deshidratación  $y_{n-3}-H_2O$ )

690-635=55

690-629=61

690-611=79

690-601=89

690-577=113 (esta diferencia de masa correspondería a L o I es imposible diferenciarlos)

n	DTDI/Lxxxxx...R	1021,49
$y_{n-1}$	TDI/Lxxxxx...R	906,49
$y_{n-2}$	DI/Lxxxxx...R	805,46
$y_{n-3}$	I/Lxxxxx...R	690,43
$y_{n-4}$	xxxxx...R	577,34

#### Búsqueda del ion $y_{n-5}$

577-560=17 ( $y_{n-4}-NH_3$ )

577-558=19

577-540=37

577-530=47

577-464=113 (de nuevo esta diferencia de masa correspondería a L o I es imposible diferenciarlos)

n	D T D I/L I/L xxxxx...R	1021,49
$y_{n-1}$	T D I/L I/L xxxxx...R	906,49
$y_{n-2}$	D I/L I/L xxxxx...R	805,46
$y_{n-3}$	I/L I/L xxxxx...R	690,43
$y_{n-4}$	I/L xxxxx...R	577,34
$y_{n-5}$	xxxxx...R	464,26

#### Búsqueda del ion $y_{n-6}$

464-447=17 ( $y_{n-5}-NH_3$ )

464-445=19

464-427=37

464-419=45

#### 464 -393=71 Ala

n	D T D I/L I/L A xxx...R	1021,49
yn-1	T D I/L I/L A xxx...R	906,49
yn-2	D I/L I/L A xxx...R	805,46
yn-3	I/L I/L A xxx...R	690,43
yn-4	I/L A xxx...R	577,43
yn-5	A xxx...R	464,26
yn-6	xxx...R	393,22

#### Búsqueda del ion yn-7

##### 393-376 =17 ( yn-6-NH<sub>3</sub> )

393-332=61

##### 393-322=71 Corresponde a Ala

n	D T D I/L I/L A A XX...R	1021,49
yn-1	T D I/L I/L A A XX...R	906,49
yn-2	D I/L I/L A A XX...R	805,46
yn-3	I/L I/L A A XX...R	690,43
yn-4	I/L A A XX...R	577,43
yn-5	A A XX...R	464,26
yn-6	A XX...R	393,22
yn-7	XX...R	322,10

Para identificar el siguiente residuo, se continúa igual, aunque todo apunta que debe ser el y2 porque el y1 (175) se encuentra cercano. Aun así, se puede probar a medir la diferencia entre todos los picos:

322 -314=8

##### 322-305=17 ( yn-7-NH<sub>3</sub> )

##### 322-304=18 ( yn-7-H<sub>2</sub>O )

322 -217=105

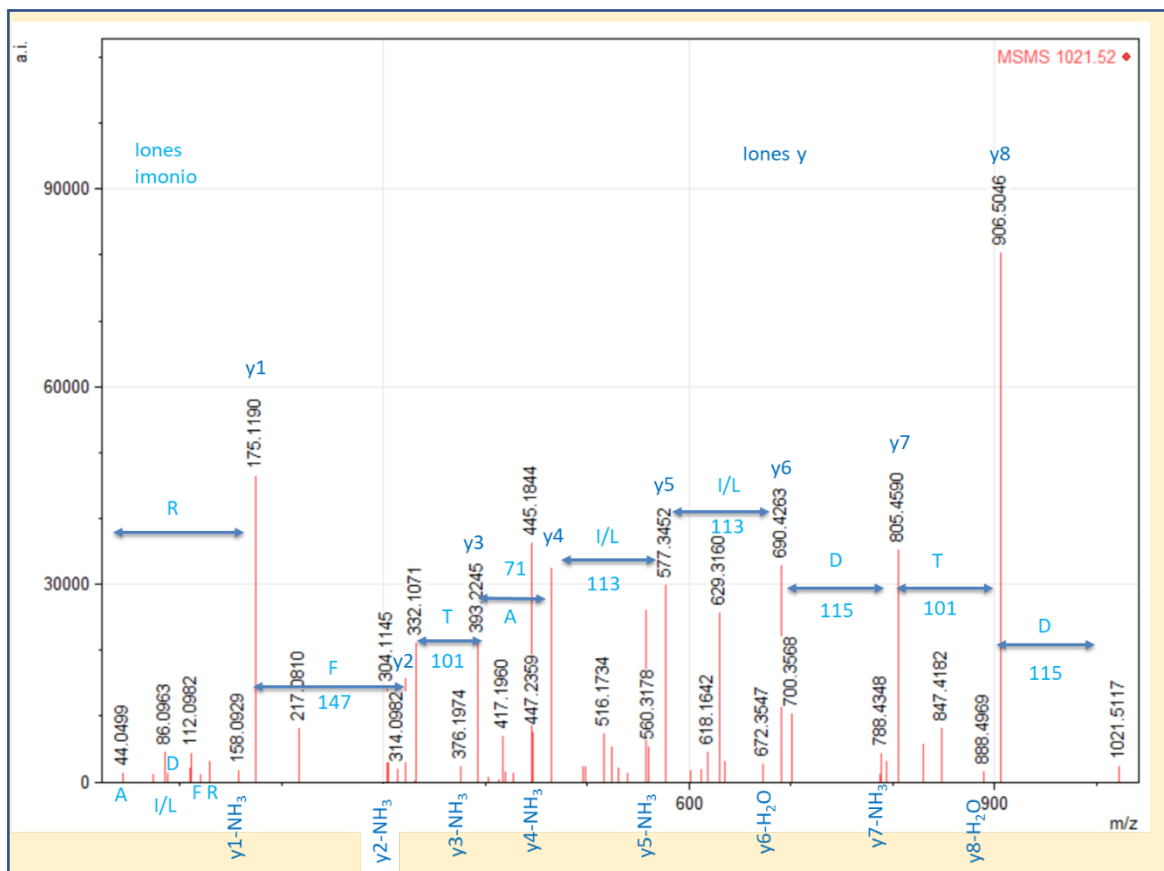
##### 322-175=147 Corresponde a Phe

Precursor	D	T	D	I/L	I/L	A	A	F	R	1021,49
y8		T	D	I/L	I/L	A	A	F	R	906,49
y7		D		I/L	I/L	A	A	F	R	805,46
y6				I/L	I/L	A	A	F	R	690,43
y5					I/L	A	A	F	R	577,43
y4						A	A	F	R	464,26
y3							A	F	R	393,22
y2								F	R	322,10
y1									R	175,11

Se puede comprobar la presencia de estos aminoácidos buscando los **iones imonio** en la **tabla I** de D=88 T=74 I/L=86 A=44 F=120 R=129

Se encuentran todos, hecho que confirma la composición.

El resumen de estas asignaciones se muestra en la **figura 4**.



**Figura 4. Identificación de los iones imonio e iones y.** A partir de la diferencia de masa entre los iones y se puede deducir la secuencia del péptido

Además, se puede buscar la **serie b** de dos maneras, a partir de los **iones y** o analizando la diferencia entre los picos igual que se ha hecho para la serie y.

Una vez tenemos identificado los iones y, se puede comprobar buscando los iones de la serie b

$$b = (M+H)^{1+} - y + 1$$

A partir de y1 se calcula el b8. El precursor es 1021,5 y el ion y1 es 175

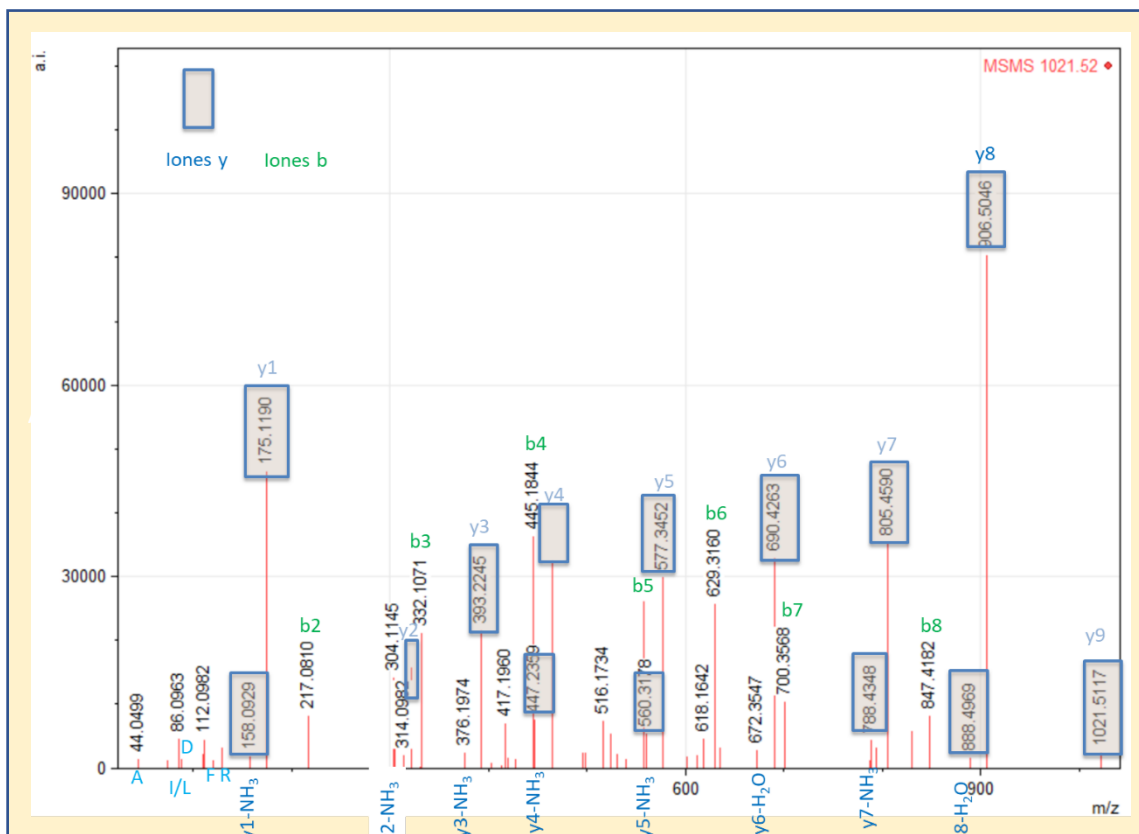
$$b8=1021,5-175,2+1=847$$

Se busca el pico en el espectro y se marca.

El cálculo para la determinación del resto de iones b se resume en tabla III y se marcan en la figura 5.

**Tabla III. Cálculo de iones b a partir de los iones y identificados previamente.**

secuencia	ion y	masa	cálculo de ion b	ion b	ion b	secuencia
R	y1	175,11	= 1021,5-175,1+1	847	b8	DTDILAAF
FR	y2	322,18	= 1021,5-322,2+1	700	b7	DTDILAA
AFR	y3	393,22	= 1021,5-393,2+1	629	b6	DTDILA
AAFR	y4	464,53	= 1021,5-464,5+1	558	b5	DTDIL
LAAFR	y5	577,35	= 1021,5-577,3+1	445	b4	DTDI
ILAAFR	y6	690,43	= 1021,5-690,4+1	332	b3	DTD
DILAAFR	y7	805,46	= 1021,5-805,5+1	217	b2	DT
TDILAAFR	y8	906,50	= 1021,5-906,5+1	116	b1	



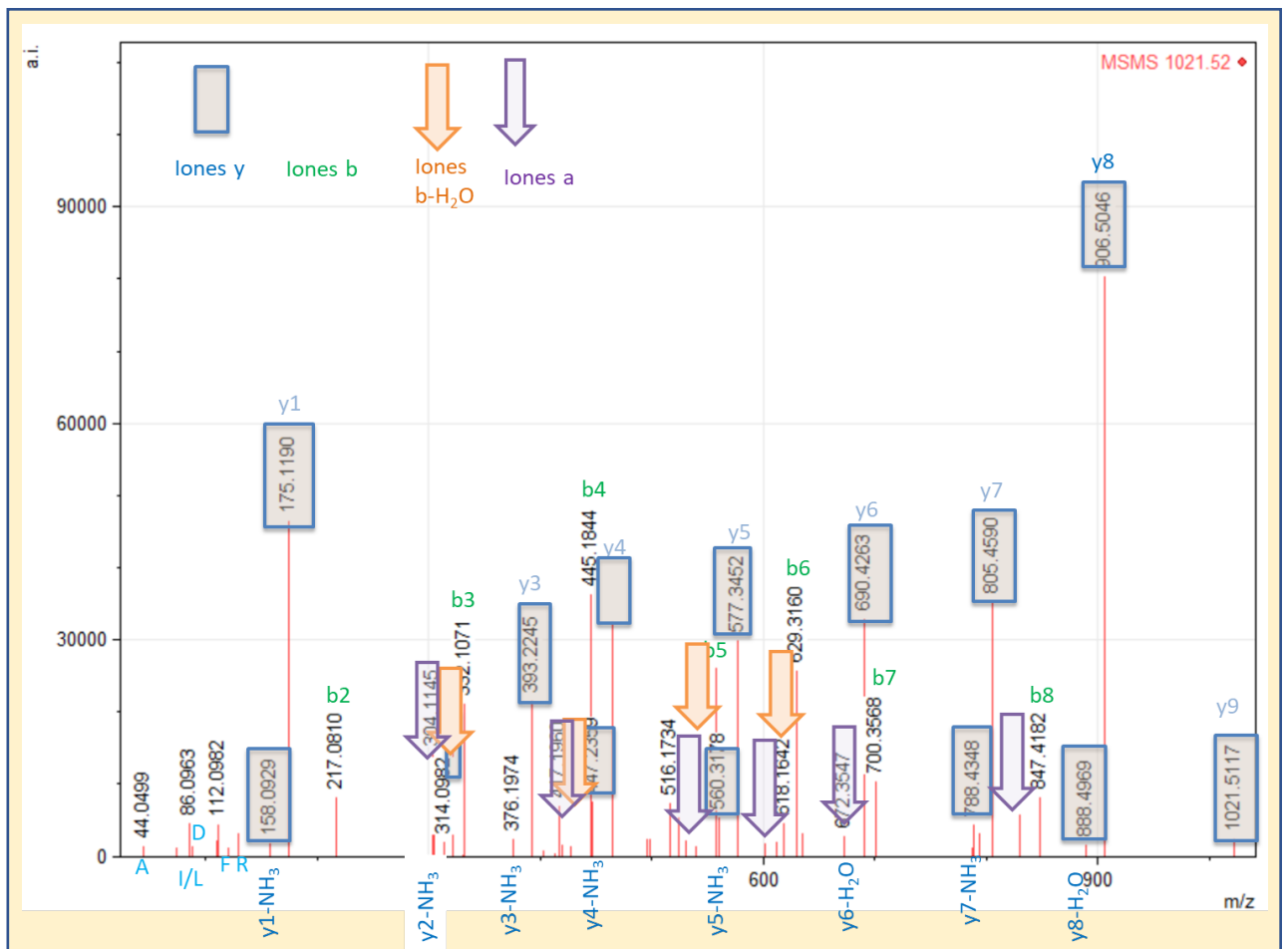
**Figura 5. Identificación de los iones b a partir de los iones y identificados previamente.**

Además, se puede buscar los iones b que pierden agua (b-H<sub>2</sub>O) (b-18) y los iones a (b-carbonilo) (b-28). Los picos identificados en el espectro se muestran coloreados en la **tabla IV** y marcados en la **figura 6**.

**Tabla IV. Cálculo de iones b a partir de los iones y identificados previamente.**

	iones b	b-18 b-H <sub>2</sub> O	b-28(CO) iones a
b2	217	199	189
b3	332	314	304
b4	445	427	417
b5	558	540	530
b6	629	611	601
b7	700	682	672
b8	847	829	819

Todo esto confirmaría que la **asignación** realizada con los iones y es **correcta**.



**Figura 6. Asignación de los picos del espectro al ion correspondiente.**

De manera alternativa, en caso de que no se detectarán bien todos los iones y, se podría proceder igual que antes con los iones b, analizando la **diferencia entre picos que corresponde a una diferencia de residuo.**

Como el ion y1 se suele visualizar fácilmente, será igualmente fácil de localizar el **ion b<sub>máslargo</sub>** (b8 en este caso)

**b8= (Masa del precursor protonada-y1) +H**

$$b8=1021,5-175,2+1=847$$

En caso de que no se haya detectado el y1 iríamos buscando la diferencia entre el precursor y picos de masa superior para buscar el b más largo teniendo en cuenta que:

**Precursor protonado= b<sub>máslargo</sub> +18+aminoácido en Ct.**

De esta manera se iría buscando el ion b más largo mediante diferencias de picos:

$$1021,5 -847,48-18=156 \text{ lo que indicaría que el residuo Ct es una Arginina.}$$

Una vez tenemos localizado el ion b más largo (en este caso b8=847), se calcula la diferencia con los picos anteriores buscando la coincidencia con la masa de algún residuo según la **tabla II** o I, igual que hemos hecho para la serie y.

Al igual que antes pueden aparecer iones que **pierden agua -18, grupo amonio -17** e incluso se puede calcular el **ion a=b-28** del carbonilo. Como estos cálculos ya están mostrados en la tabla IV no se realizarán de nuevo.

Como vemos que la tabla II la masa de los residuos va desde 57 a 18, por tanto, buscaremos picos que se encuentren entre esas distancias. Además, como ya tenemos identificados los **iones y**, no los tendremos en cuenta ahora para simplificar el cálculo.

Búsqueda del ion b7:

$$847-700= 147 \text{ corresponde con una Phe}$$

b8	<b>F</b> xxxxxxx <b>R</b>	847
b7	xxxxxxx <b>R</b>	700

Búsqueda del ion b6:

$$700-635=65$$

**700-629=71 corresponde a una Ala**

b8	<b>FA</b> xxxxxxx <b>R</b>	847
b7	<b>A</b> xxxxxxx <b>R</b>	700
b6	xxxxxxx <b>R</b>	629

Búsqueda del ion b5:

**629-558=71** Corresponde de nuevo a una Ala

b8	<b>FAAxxxxR</b>	847
b7	<b>AAxxxxR</b>	700
b6	<b>AxxxxR</b>	629
b5	<b>xxxxR</b>	558

Búsqueda del ion b4:

558-496=62.1

**558-445=113** corresponde a Leu o Ile

b8	<b>F A A I/L xxxR</b>	847
b7	<b>A A I/L xxxR</b>	700
b6	<b>A I/L xxxR</b>	629
b5	<b>I/L xxxR</b>	558
b4	<b>xxxR</b>	445

Búsqueda ion b3:

**445-332=113** corresponde a Leu o Ile

b8	<b>F A A I/L I/L xxR</b>	847
b7	<b>A A I/L I/L xxR</b>	700
b6	<b>A I/L I/L xxR</b>	629
b5	<b>I/L I/L xxR</b>	558
b4	<b>I/L xxR</b>	445
b3	<b>xxR</b>	332

Búsqueda ion b2

**332- 217=115** corresponde con un Asp

b8	<b>F A A I/L I/L DxxR</b>	847
b7	<b>A A I/L I/L DxxR</b>	700
b6	<b>A I/L I/L DxxR</b>	629
b5	<b>I/L I/L DxxR</b>	558
b4	<b>I/L DxxR</b>	445
b3	<b>DxxR</b>	332
b2	<b>xR</b>	217

El ion b1 no se suele detectar. Con la serie b habitualmente falta completar los residuos finales del Ct que se podrían deducir del resto de datos.

Por un lado, se sabe que es un péptido que acaba en Arg, se detecta y1 y el ion imonio de Arg.

Y si miramos los iones imonio se detecta un pico a 74 que corresponde al ion imonio de la Thr.



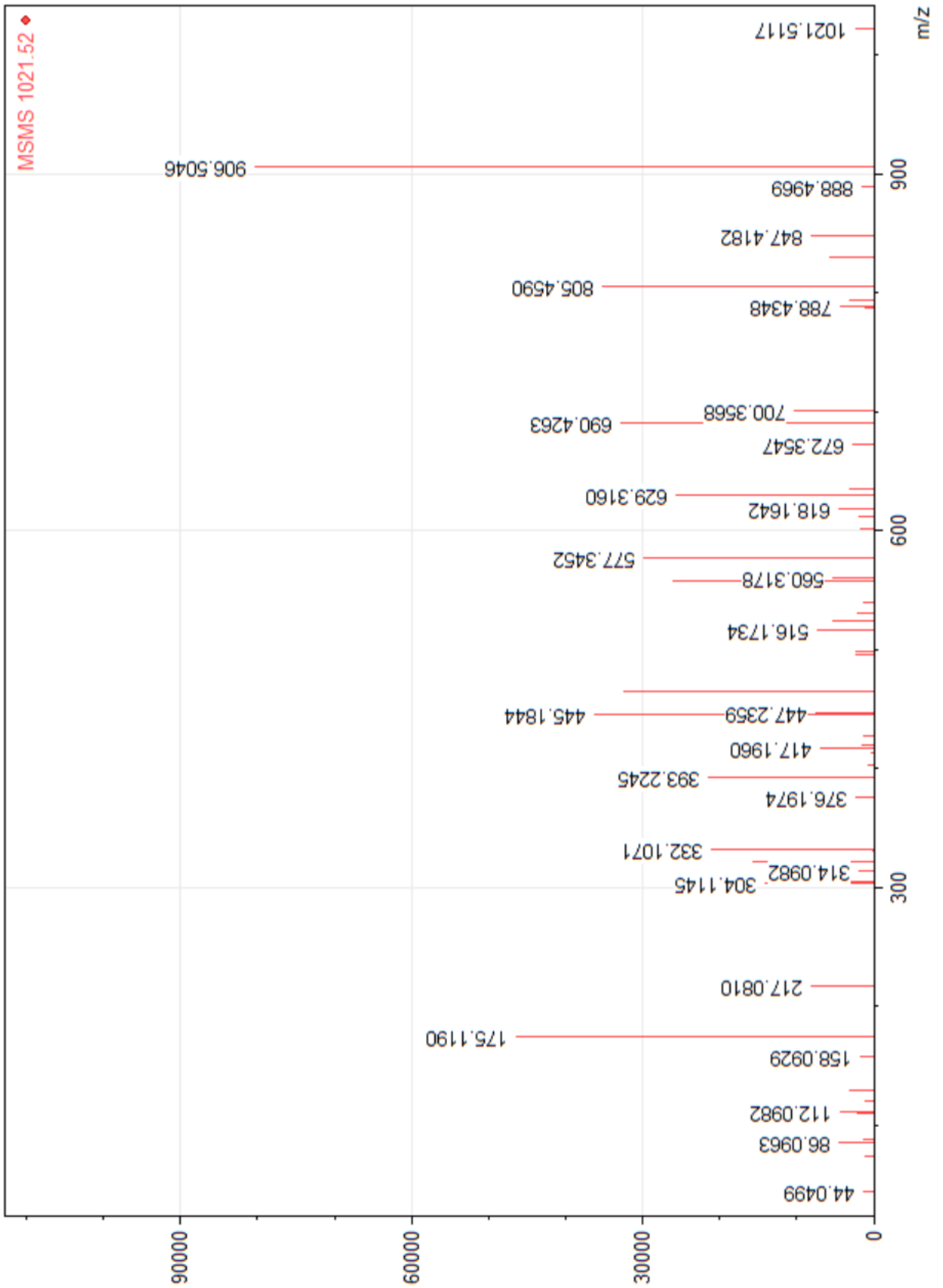
Prueba a hacerlo tú a partir de los espectros de MSMS del precursor **1021.52** ampliados a continuación.

Si quieres probar con otro espectro de secuencia desconocida, se adjuntan al final la lista de picos e imágenes del espectro de MSMS del ion 1465 del digerido de la banda LS. En el aula virtual está el archivo MSMS\_1465.txt que se puede visualizar en el programa mmass.

En el Aula virtual también están los archivos Sequencequery de cada ion, donde se encuentra la lista de picos para realizar la identificación del MSMS usando el motor de búsqueda de MASCOT en la sección de Sequence Query.

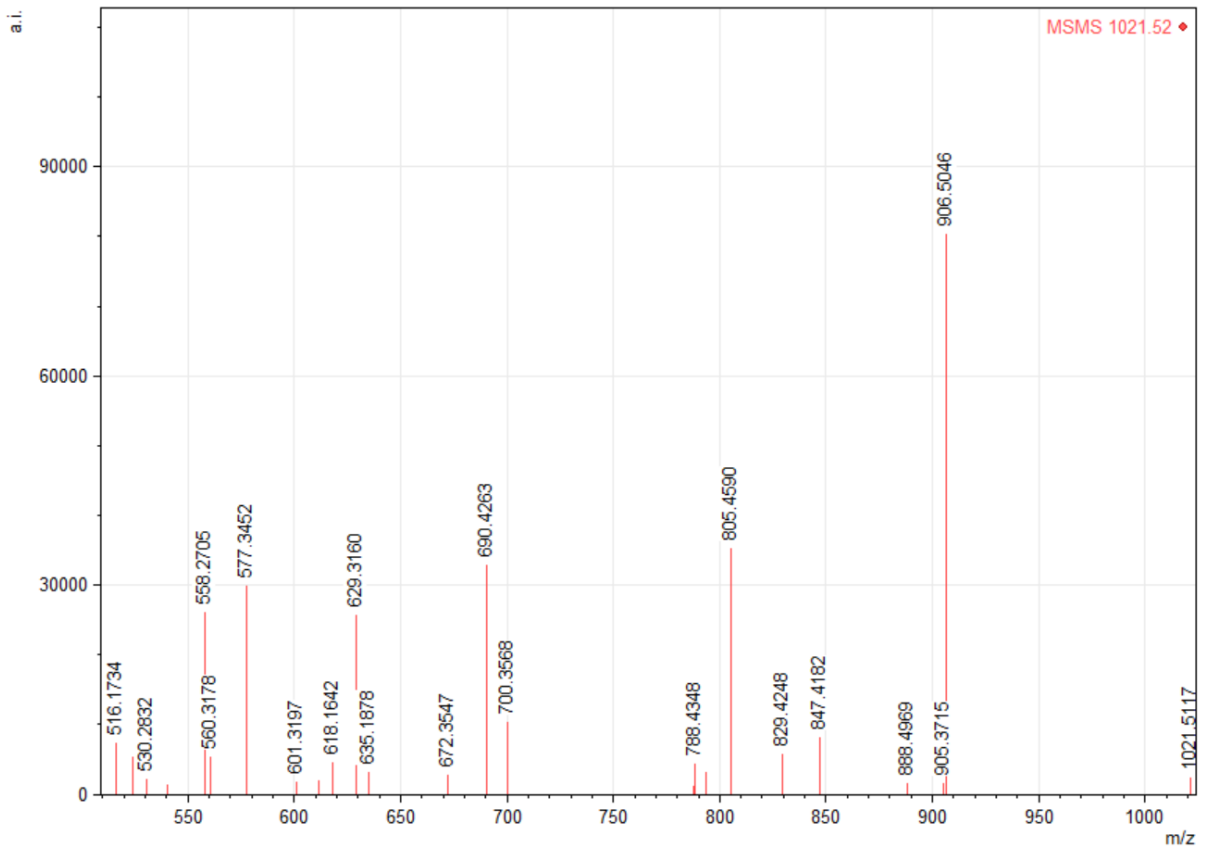
[http://www.matrixscience.com/cgi/search\\_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=SQ](http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=SQ)

Espectro MSMS del ion 1021.52

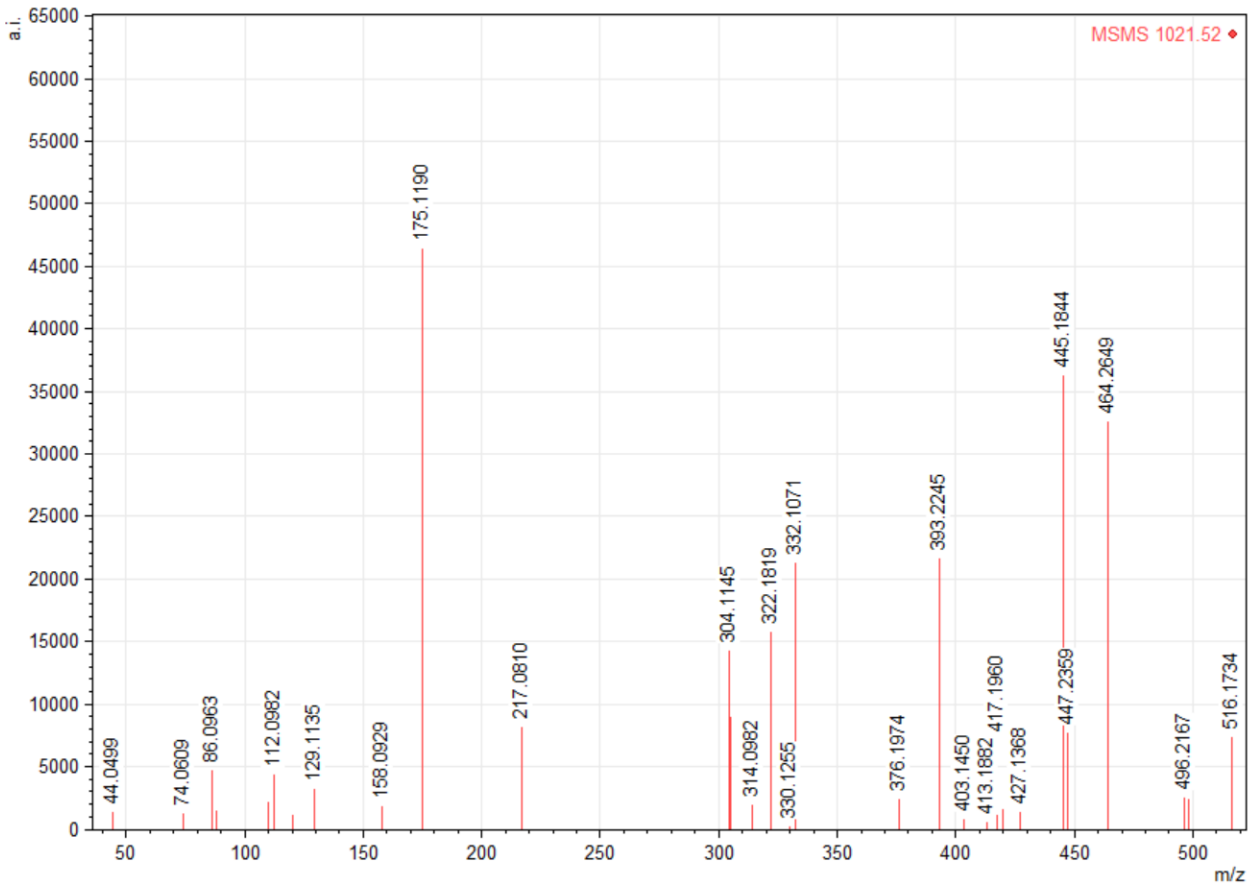


a.l.

### Zoom rango superior de masas



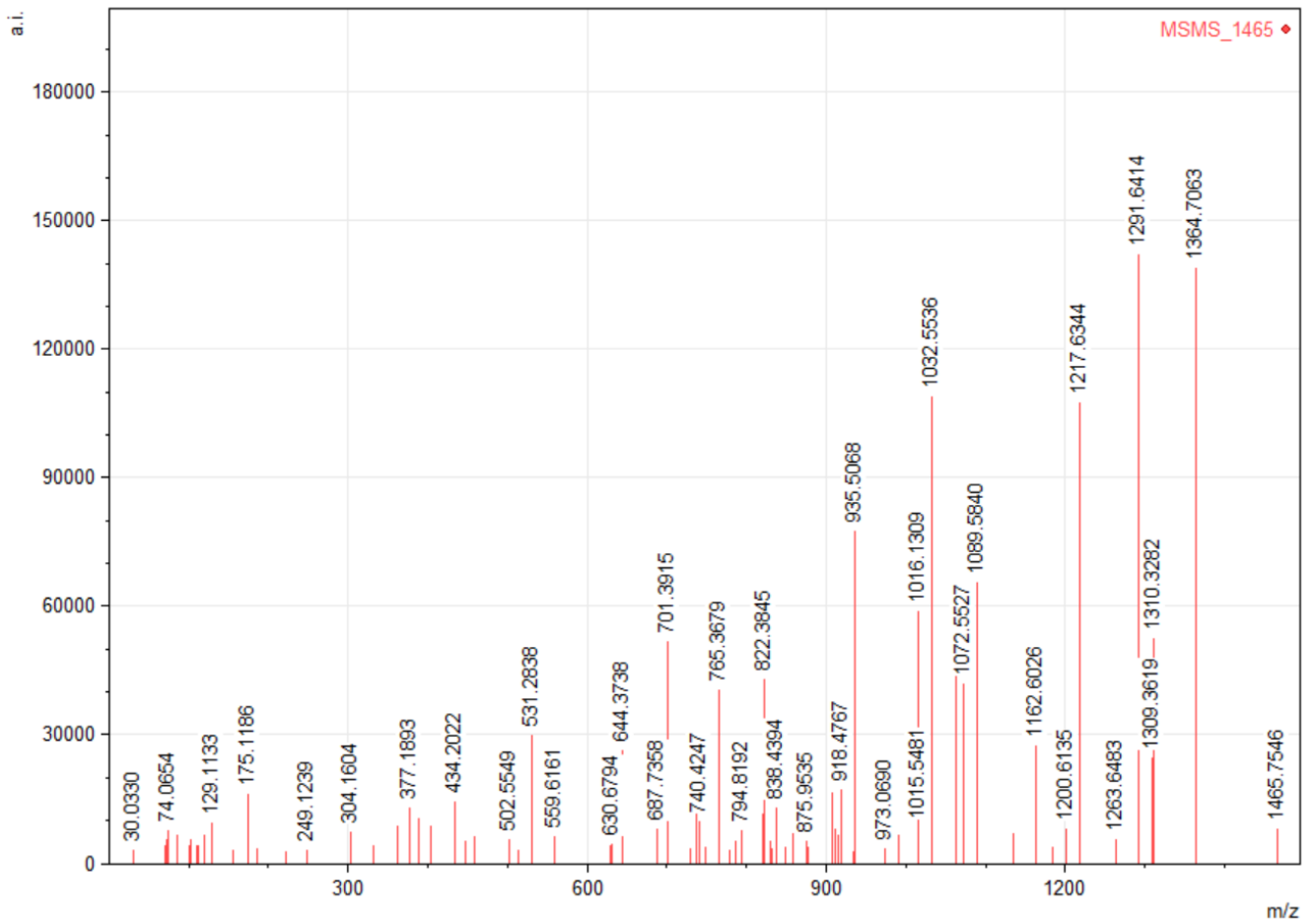
### Zoom rango inferior de masas



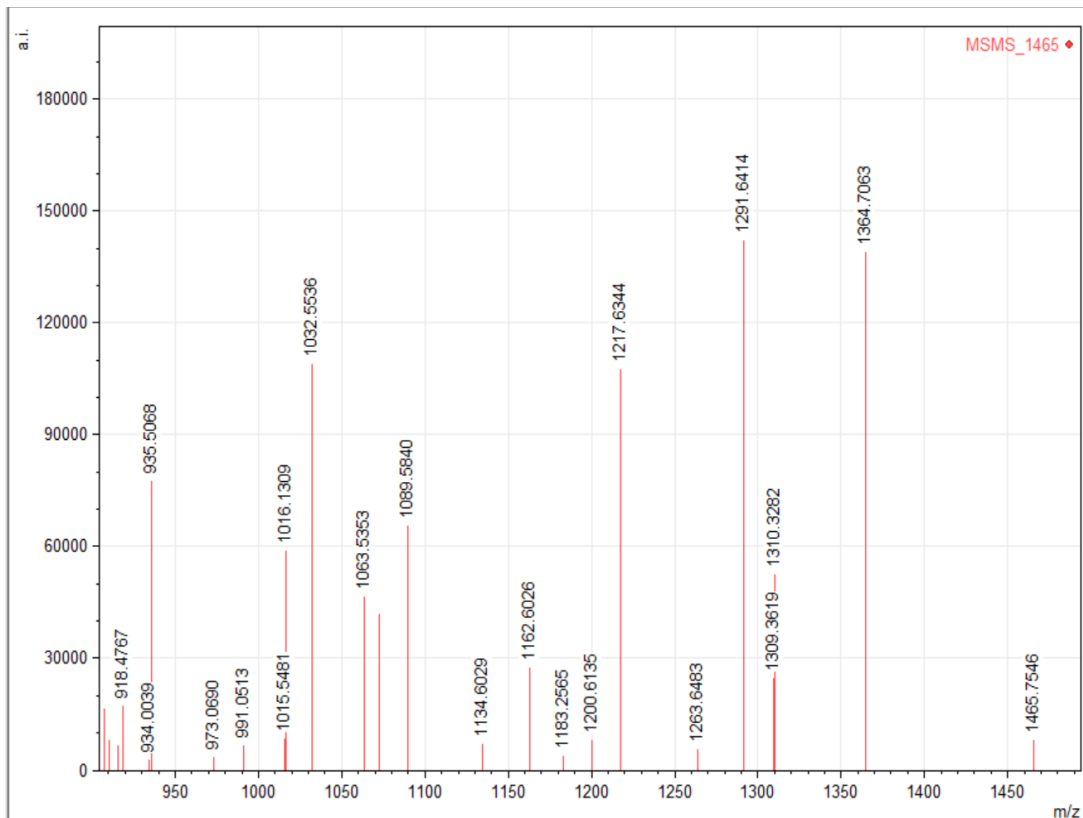
Lista de picos de espectro MSMS del 1021.65

m/z	Intensidad	m/z	Intensidad
44,05	1400,91	496,22	2561,55
74,06	1316,21	498,16	2519,97
86,10	4739,62	516,17	7444,00
88,04	1587,79	524,21	5465,02
110,05	2258,85	530,28	2306,40
112,10	4435,02	540,26	1567,16
120,12	1261,35	558,27	26210,90
129,11	3266,59	560,32	5465,45
158,09	1906,21	577,35	29951,59
175,12	46476,70	601,32	1796,59
217,08	8261,35	611,30	2107,93
304,11	14338,41	618,16	4723,79
305,16	9023,27	629,32	25918,02
314,10	1998,48	635,19	3228,11
322,18	15792,89	672,35	2887,02
330,13	316,29	690,43	32941,83
332,11	21338,41	700,36	10548,65
376,20	2516,83	787,45	1307,81
393,22	21714,72	788,43	4513,89
403,14	825,30	793,35	3311,75
413,19	580,93	805,46	35382,45
417,20	7153,32	829,42	5817,73
419,81	1706,20	847,42	8183,02
427,14	1410,14	888,50	1681,54
445,18	36337,37	905,37	1670,86
447,24	7727,61	906,50	80492,34
464,26	32609,75	1021,51	2500,00

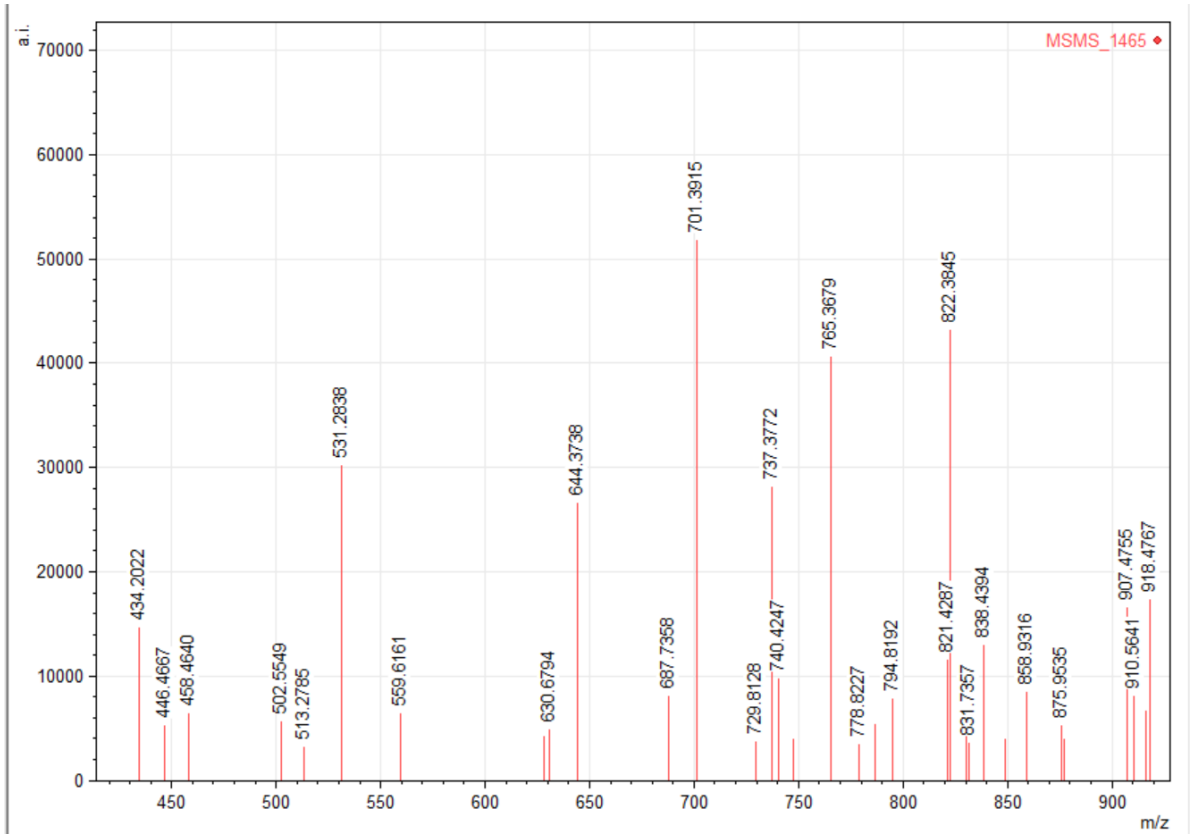
### Espectro MSMS del ion 1465



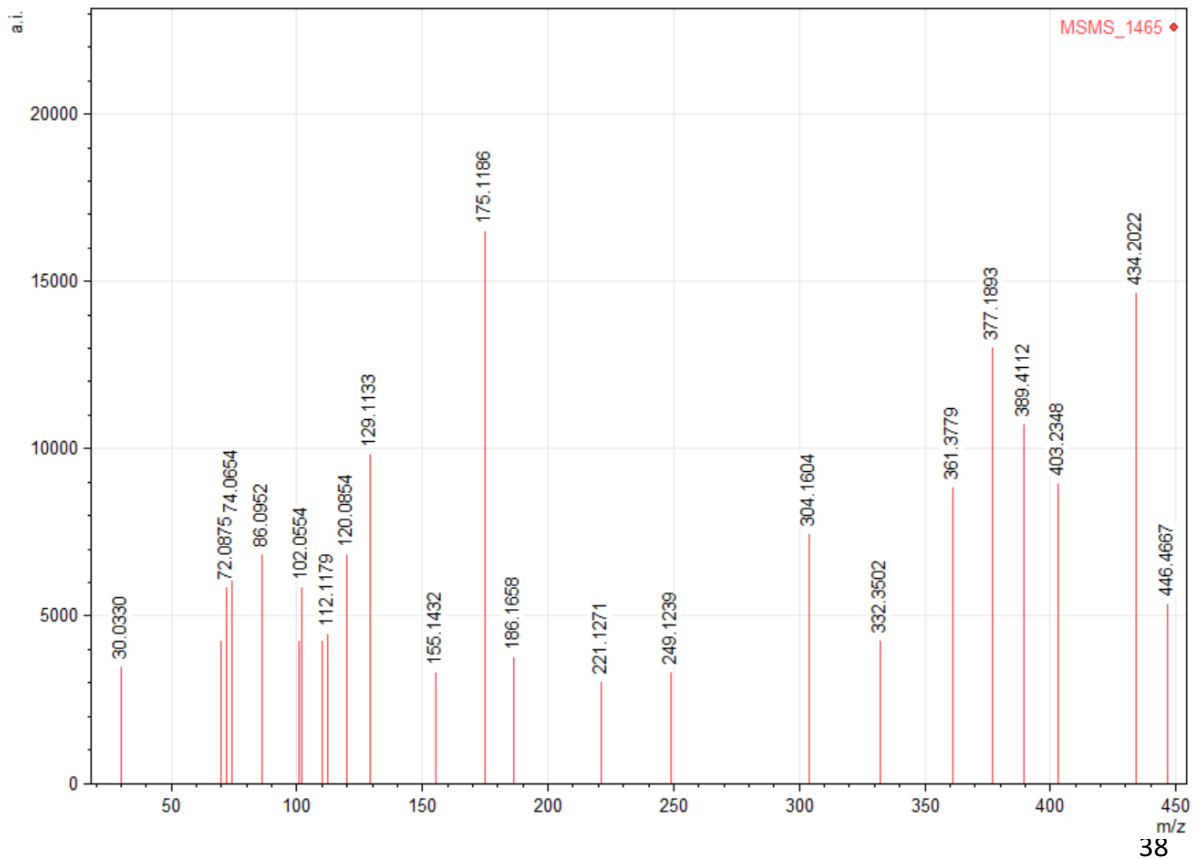
### Zoom rango superior de masas



### Zoom rango medio de masas



### Zoom rango de masas



Lista de picos de espectro MSMS del 1465

m/z	Intensidad	m/z	Intensidad
30,03	3500,77	765,37	40693,82
70,07	4287,33	778,82	3514,94
72,09	5865,23	786,85	5407,57
74,07	7865,23	794,82	7957,63
86,10	6865,23	821,43	11695,19
101,08	4262,72	822,38	43325,00
102,06	5865,23	830,62	5555,66
110,07	4287,33	831,74	3664,21
112,12	4494,65	838,44	13076,12
120,09	6865,23	848,90	4098,53
129,11	9865,23	858,93	8590,55
155,14	3336,13	875,95	5366,90
175,12	16528,50	876,96	4103,27
186,17	3808,84	907,48	16700,94
221,13	3055,65	910,56	8168,23
249,12	3336,13	915,98	6780,42
304,16	7488,74	918,48	17408,87
332,35	4279,99	934,00	3017,67
361,38	8852,82	935,51	77846,10
377,19	13052,82	973,07	3784,46
389,41	10747,06	991,05	6718,50
403,23	8987,06	1015,55	8579,05
434,20	14692,92	1016,13	59053,13
446,47	5387,94	1032,55	109144,75
458,46	6553,41	1063,54	46661,22
502,55	5666,03	1072,55	42260,85
513,28	3258,46	1089,58	65960,31
531,28	30326,59	1134,60	7294,84
559,62	6526,93	1162,60	27688,65
628,31	4245,83	1183,26	4173,20
630,68	4911,06	1200,61	8311,59
644,37	26657,08	1217,63	107704,02
687,74	8177,71	1263,65	5778,09
701,39	51899,16	1291,64	142365,94
729,81	3828,94	1309,36	24900,58
737,38	28186,58	1310,33	52845,47
740,42	9888,15	1364,71	139146,88
747,83	3993,73	1465,75	8311,59