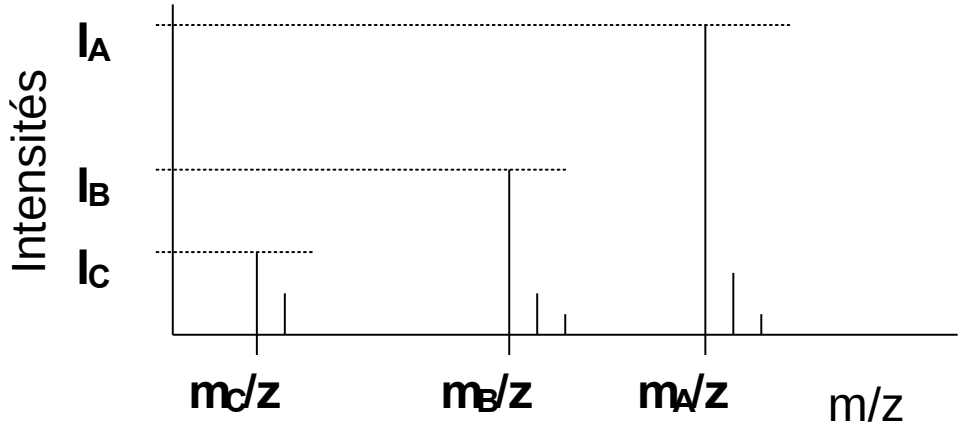
Étude d'Interaction protéine-ligand en spectrométrie de masse (MS)

Principe

- m/z d'un ion en phase gazeuse

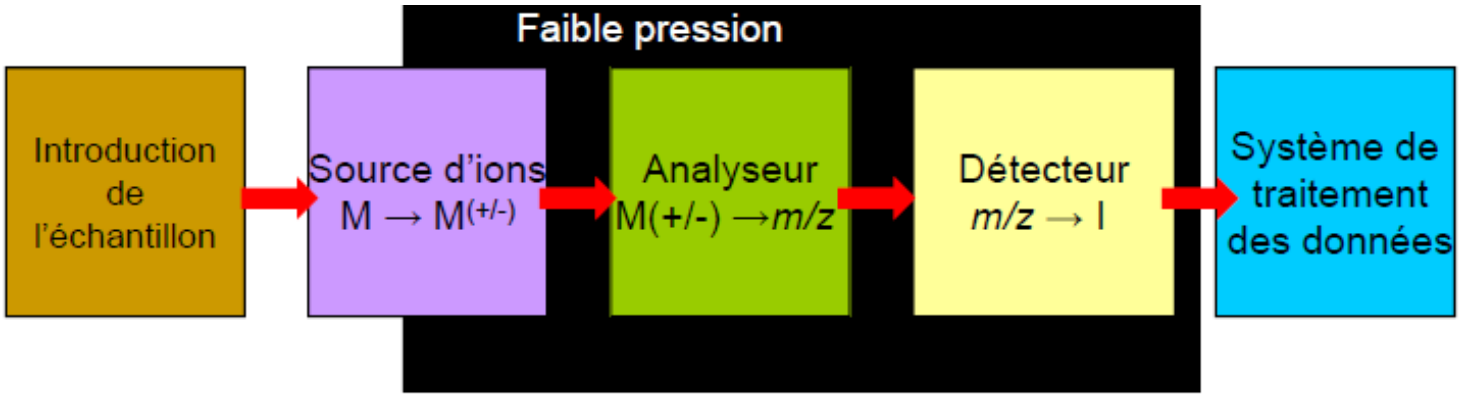
La MS supramoléculaire ou native
(Conditions non dénaturantes)

- Stœchiométrie
  Spécificité
  Sélectivité
  Affinité



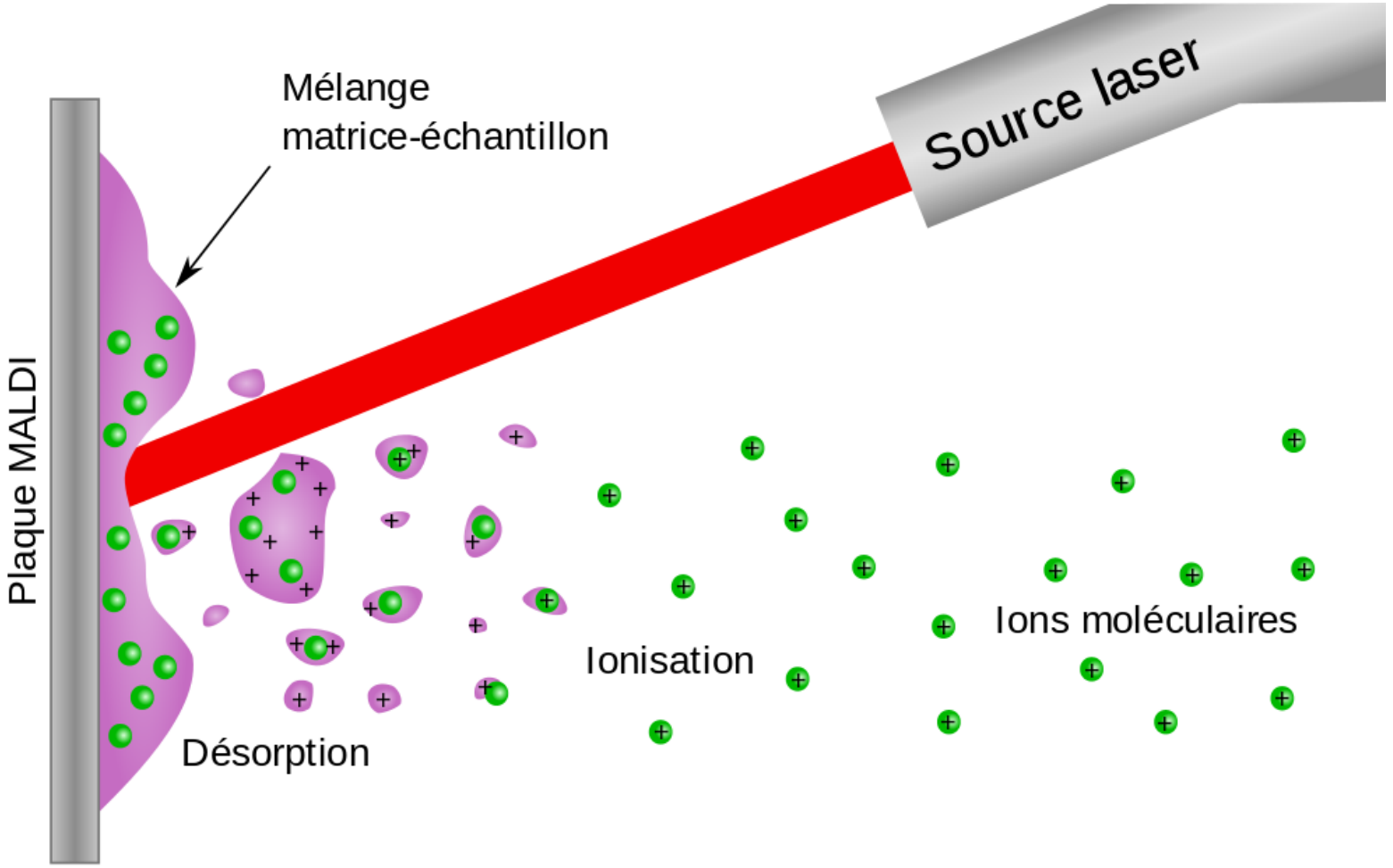
Spectre de masse

Appareillage

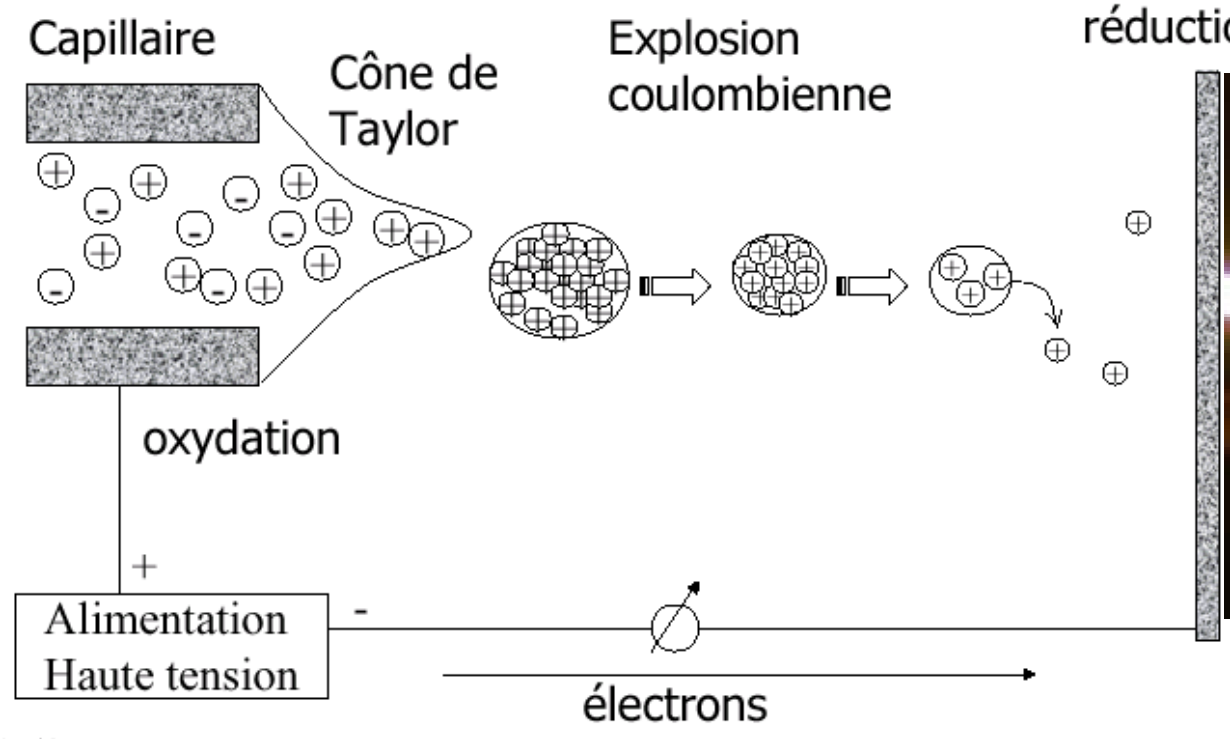


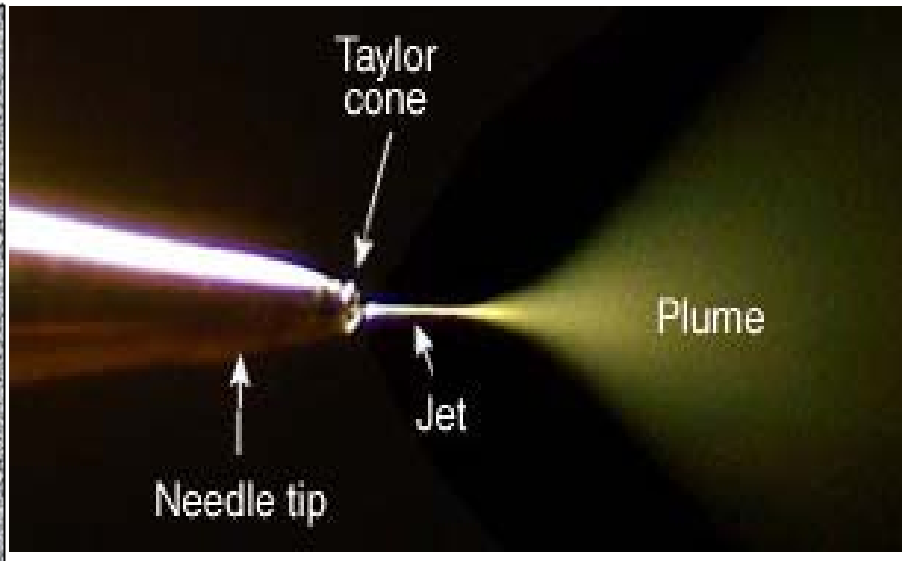
- 3 étapes essentielles:
  - Ionisation de l'échantillon
  - Analyse des ions formés
  - Détection du signal

Le MALDI


Mélange
matrice-échantillon
Source laser
Plaque MALDI
Désorption
Ionisation
Ions moléculaires

La source d'ionisation par Electronébulisation (*Electrospray*) (ESI)

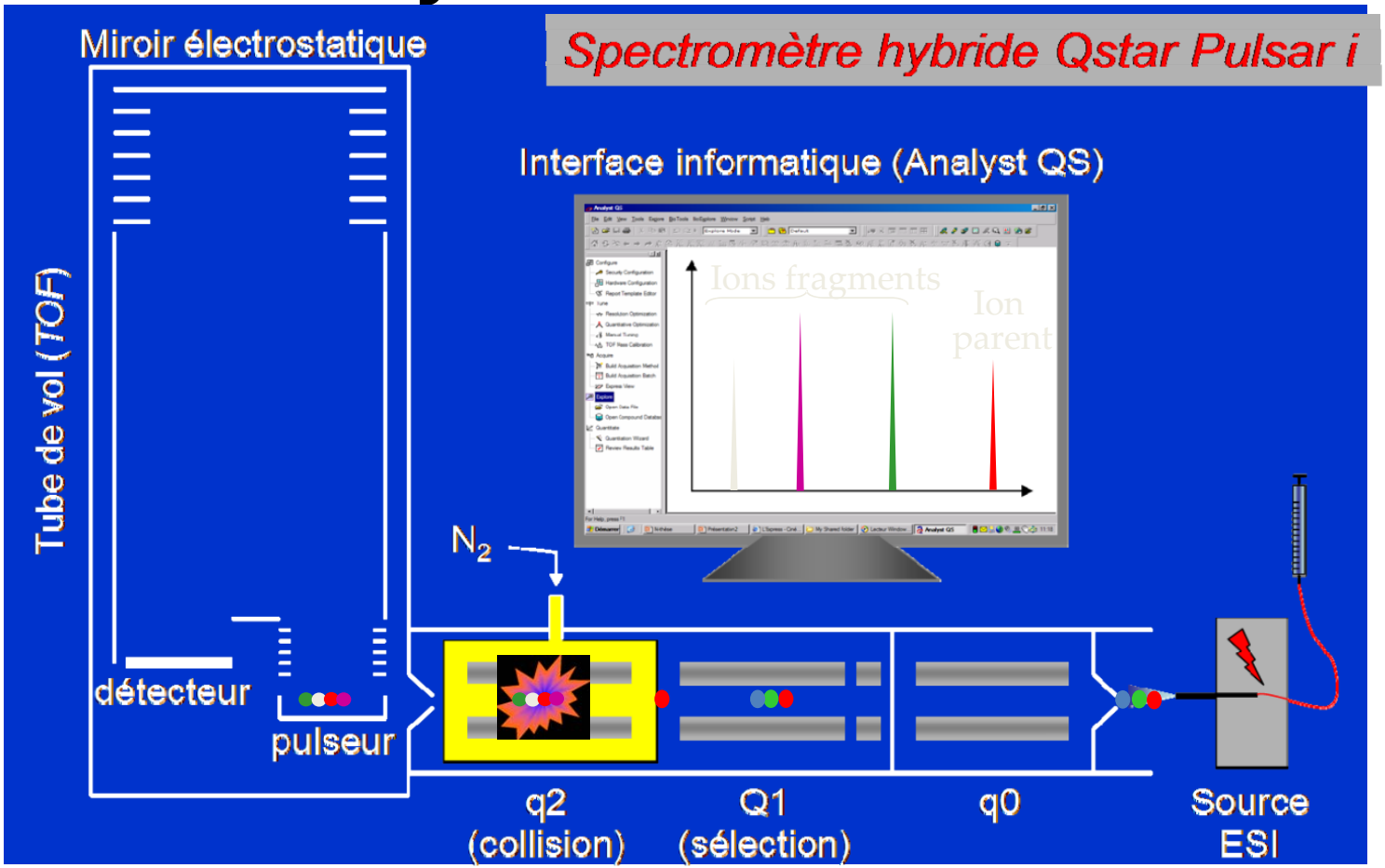




formation du nébulisat (*spray*)

Miniaturisation de la source electrospray: le nanospray

L’analyseur, le détecteur



Application de la spectrométrie de Masse: L'étude d'interactions non covalentes

Paramètres:

-conditions non dénaturantes (en solution)=Electrospray

-Tampon Ph 7= acétate d'ammonium

-Réduire la pression à l'interface du nébuliseur et analyseur

-Réduire la tension d'accélération des ions à l'interface

-Utiliser un analyseur « doux » (TOF)

Application de L'ESI-MS :Etude de constantes d'équilibres de complexes non-covalents.

1ere étape: spectre de l'insuline(5800 DA) seule

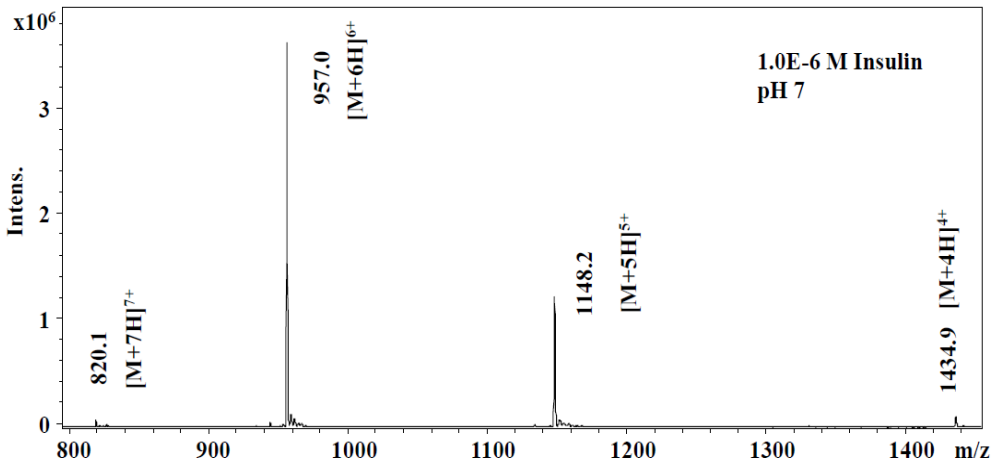


Figure 1. ESI-MS spectrum of 1.0×10^{-6} M insulin in positive ion mode at pH 7 (Mean values of target mass with m/z at 1000 and target m/z at 1500).

- Plusieurs pics correspondant à l'insuline plus ou moins multi protonée

"Investigation of non-covalent complexations of Ca(II) and Mg(II) ions with insulin by using electrospray ionization mass spectrometry"Mustafa gulfen et al 2016

Application de L'ESI-MS :Etude de constantes d'équilibres de complexes non-covalents.

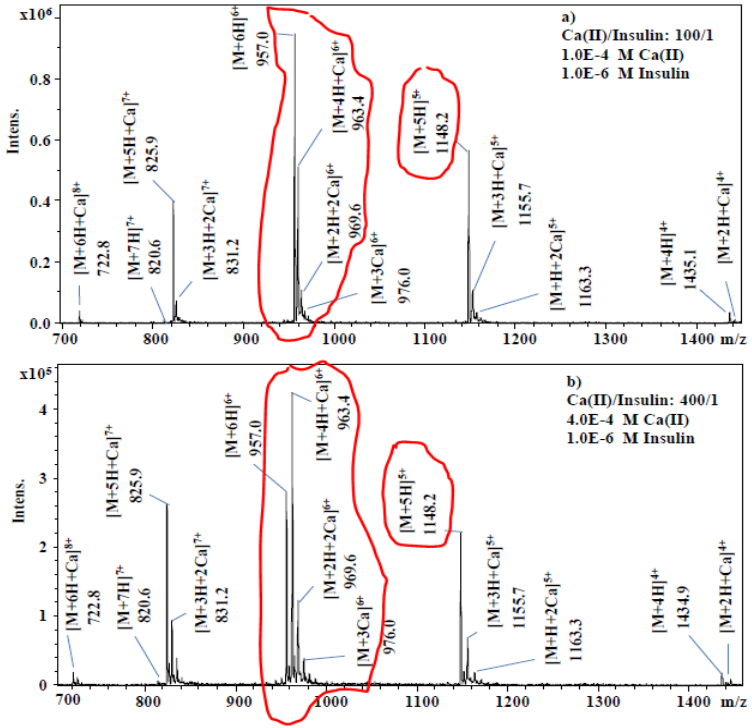


Figure 4. ESI mass spectra at different mole ratios of Ca(II)-insulin to insulin at pH 7: (a) Ca(II)/Insulin:100/1 and (b) Ca(II)/Insulin: 400/1.

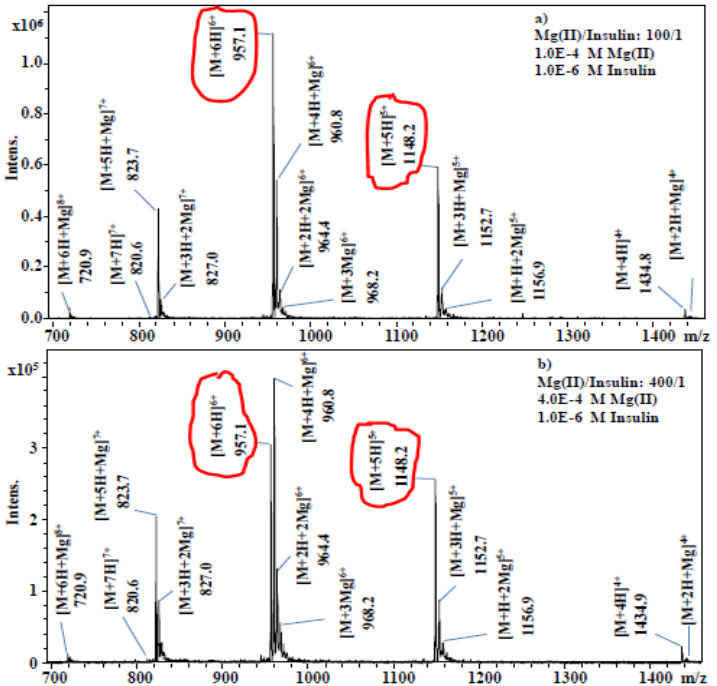


Figure 6. ESI mass spectra at different mole ratios of Mg(II)-insulin to insulin at pH 7: (a) Mg(II)/Insulin: 100/1 and (b) Mg(II)/Insulin: 400/1.

[ions ajoutés]

Abondance insuline libre

2ème étape: spectre de l'insuline en présence de concentration croissante d'ions Ca2+ ou Mg2+

"Investigation of non-covalent complexations of Ca(II) and Mg(II) ions with insulin by using electrospray ionization mass spectrometry"Mustafa gulfen et al 2016

Application de L'ESI-MS :Etude de constantes d'équilibres de complexes non-covalents.

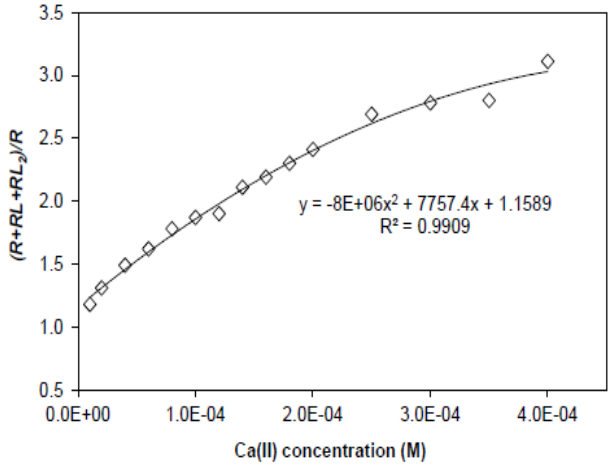


Figure 5. Calculation of the equilibrium constants of Ca(II)-insulin complexes.

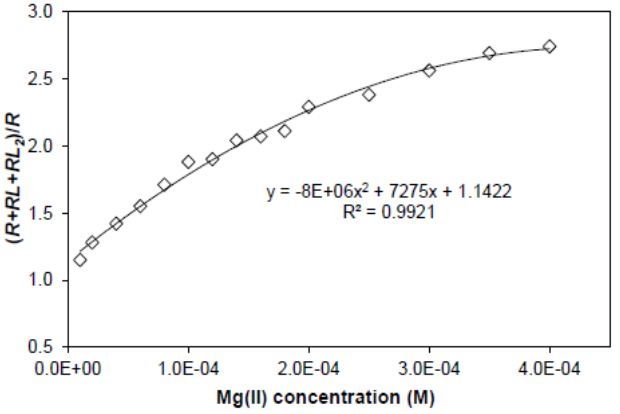


Figure 7. Calculation of the equilibrium constants of Mg(II)-insulin complexes.

a=1/K1K2

b=1/K1

Table 1. Equilibrium constants of Ca(II)-insulin complexes

Equilibrium reactions	Equilibrium constants
Ca(II)-insulin = Ca(II) + Insulin	K_1: 1.29×10^{-4} M
$Ca(II)_2$-insulin = Ca(II) + Ca(II)-insulin	K_2: 9.69×10^{-4} M

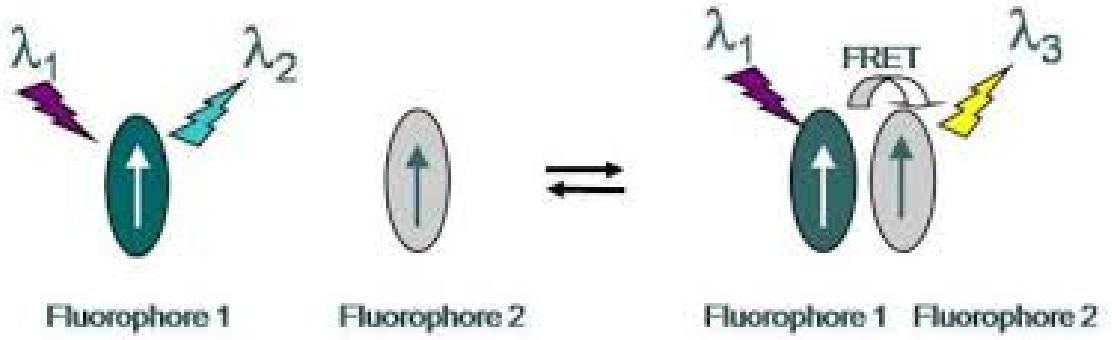
Table 2. Equilibrium constants of Mg(II)-insulin complexes

Equilibrium reactions	Equilibrium constants
Mg(II)-insulin = Mg(II) + Insulin	K_1: 1.37×10^{-4} M
$Mg(II)_2$-insulin = Mg(II) + Mg(II)-insulin	K_2: 9.12×10^{-4} M

"Investigation of non-covalent complexations of Ca(II) and Mg(II) ions with insulin by using electrospray ionization mass spectrometry"Mustafa gulfen et al 2016

Complémentarité avec d'autres techniques d'analyse

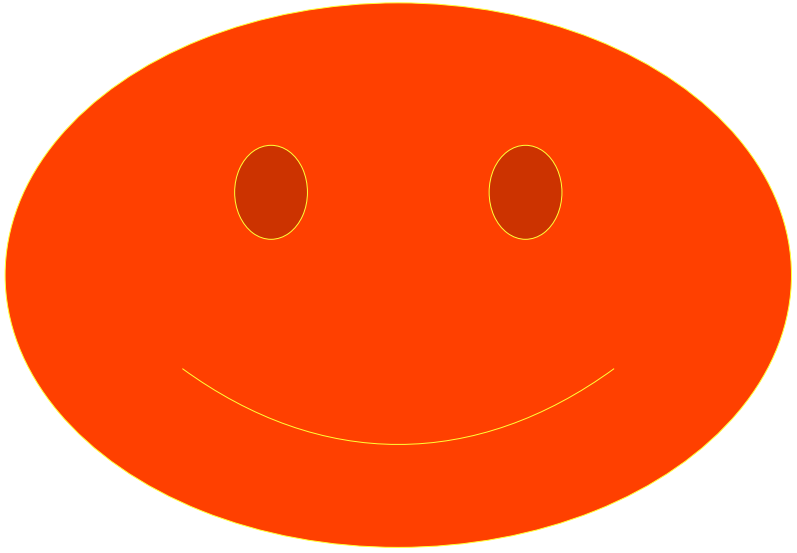
- Techniques spectroscopiques (FRET)



- Sensible mais artéfacts possibles
- In vivo

Conclusion sur les Avantages et inconvénients/Limitations de la MS

- Faibles quantités requises
- Étude des ligands sans avoir à les étiqueter/marquer
- Mesure de masse précise
- Sensible, détection rapide

- Limites de l’étude par MS de systèmes à faible affinité

Merci de votre attention