



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108257846 A

(43)申请公布日 2018.07.06

(21)申请号 201711457511.6

(22)申请日 2017.12.28

(30)优先权数据

62/440,327 2016.12.29 US

(71)申请人 萨默费尼根有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 V·扎布洛斯科夫

C·R·威斯布洛德 C·马伦

S·沙玛

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 陈洁 姬利永

(51)Int.Cl.

H01J 49/26(2006.01)

H01J 49/06(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页 附图6页

(54)发明名称

针对质谱的紫外光致解离的方法

(57)摘要

描述了一种产生产物离子以进行质量分析的方法。所述方法涉及UVPD质谱的简化并且包括选择前体离子以进行UVPD碎片化,通过使用一个高能激光脉冲或通过使用多个较低能量脉冲对所选择的前体离子执行UVPD碎片化从而得到UVPD碎片离子。接着可用任选的离子布置对所述UVPD碎片离子执行PTR以产生电荷态减小的UVPD碎片离子。UVPD-PTR步骤可重复n次以上,其中n=1到50。离子布置可增强所选择的较低碎片离子电荷态的强度或增加所选择的m/z范围中的峰的强度。在多次PTR-UVPD迭代之后,对碎片离子进行质量分析。与单独使用UVPD碎片化相比,所述方法提供通过以下方式简化UVPD质谱产物离子的方式:降低碎片离子电荷态并且扩散出m/z质谱空间中的所得产物离子。



1. 一种产生产物离子以进行质量分析的方法,包括:
 - (a) 选择前体离子以进行UVPD碎片化;
 - (b) 对所述所选择的前体离子执行UVPD碎片化从而得到UVPD碎片离子;
 - (c) 对所述UVPD碎片离子执行PTR以产生电荷态减小的UVPD碎片离子;
 - (d) 重复步骤 (b) 和 (c) n 次以上,其中 $n=1$ 到50;并且
 - (e) 对所述电荷态减小的UVPD碎片离子进行质量分析。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中通过四极滤质器选择所述前体离子。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中在四极离子阱装置中选择所述前体离子。
4. 根据权利要求3所述的方法,其中在线性四极杆离子阱装置中选择所述前体离子。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中对步骤 (a) 至 (c) 重复 n 次,其中 $n=1$ 到25。
6. 根据权利要求1所述的方法,其中对步骤 (a) 至 (c) 重复 n 次,其中 $n=1$ 到10。
7. 根据权利要求1所述的方法,其中对步骤 (a) 至 (c) 重复 n 次,其中 $n=1$ 到5。
8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述前体离子是完整蛋白质。
9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述前体离子是寡核苷酸。
10. 根据权利要求1所述的方法,其中通过激光器执行所述UVPD碎片化。
11. 根据权利要求1所述的方法,其中 $n=1$ 到20或1到10或1到5。
12. 根据权利要求1所述的方法,其中通过发光二极管执行所述UVPD碎片化。
13. 根据权利要求10所述的方法,其中使用213nm激光器执行所述UVPD碎片化步骤。
14. 根据权利要求10所述的方法,其中使用193nm激光器执行所述UVPD碎片化步骤。
15. 根据权利要求1所述的方法,其中所述UVPD碎片化步骤使用单个激光辐射脉冲。
16. 根据权利要求1所述的方法,其中所述UVPD碎片化步骤使用多个UVPD激光脉冲。
17. 根据权利要求1所述的方法,其中使用 SF_6^- 阴离子执行所述质子转移反应步骤。
18. 根据权利要求1所述的方法,其中使用全氟代烃阴离子执行所述质子转移反应步骤。
19. 根据权利要求1所述的方法,其中使用全氟萘烷阴离子执行所述质子转移反应步骤。
20. 根据权利要求1所述的方法,其中在所述UVPD碎片化步骤之后并且在所述PTR步骤之前执行 MS^3 隔离。
21. 根据权利要求1所述的方法,其中在所述UVPD碎片化步骤之后并且在所述PTR步骤之前执行 MS^n 隔离。
22. 根据权利要求1所述的方法,其中在步骤 (c) 期间执行离子布置,其中保护所选择的离子群体免于更多轮UVPD碎片化。

针对质谱的紫外光致解离的方法

技术领域

[0001] 本发明大体上涉及质谱方法,并且更具体地说涉及使用紫外光致解离(UVPD)结合质子转移反应(PTR)在质谱中产生简化碎片离子的方法。

背景技术

[0002] 通过质谱(MS)对样本进行的分析常常包括一个或多个离子解离阶段的使用,大体上被称作串联MS、MS/MS或MS_n分析。对由样本生成的离子的解离得到产物离子,并且这些产物离子的所测量强度和质荷比(m/z 's)可用于结构性阐明以及用于检测和/或量化具有高度特异性的目标或非目标分析物。历史上,通过碰撞活化解离(CAD,常常被称为碰撞诱导解离或CID)技术已经最常在质谱仪中执行解离,所述技术利用前体离子与例如氦气、氮气或氩气等惰性气体(通常被称为碰撞气体)之间的相对高能量的碰撞来生成主要由热力学上有利的碎片构成的产物离子,这些产物离子在蛋白/肽质谱法中被称为b型和y型离子并且由于肽主链中的N-C酰胺键断裂而产生。

[0003] 虽然CAD已经成功地用于分析广泛多种分子,包含例如肽等生物分子,但是近年来已经发现例如电子转移解离(ETD)等成熟的解离技术特别适用于分析完整蛋白质,尤其是具有翻译后修饰的那些完整蛋白质,除了别的相对大的分子且尤其是更大的生物分子外。另一此类技术是紫外光致解离(UVPD),其中分析物前体离子用由UV源(通常是激光器)产生的紫外(UV)辐射照射。对于蛋白质或多肽分析物,UV辐射的吸收致使碎片化继续经过所有已知肽主链碎片化路径,主要产生a型和x型碎片离子,但也产生b型、c型、y型和z型碎片离子以及侧链碎片离子。UVPD的原理和使用由Brodbelt等人(《美国化学学会杂志(Journal of the American Chemical Society)》,(2013年),135(34)页,12646-12651)并且由Reilly等人(第7,618,806B2号美国专利)描述。大体上,术语蛋白质和肽都指示不同长度的氨基酸聚合物的聚合物,其中蛋白质大体上具有比肽更大数目的氨基酸。如本文所使用的术语多肽可意味着蛋白质或肽并且大体上用于指示可被视为大型肽或小型蛋白质的氨基酸聚合物。在本文中,术语蛋白质、多肽和肽可互换使用以描述任何长度的氨基酸聚合物。

[0004] 如本文所使用的术语离子阱意味着RF电场离子包含装置,其中离子可包含于三维中(而不仅是就像离子导向器一样的二维)并且可以是线性二维(2D)离子阱或3D Paul阱。线性离子阱可被分段成多个区段,每个区段具有独立电极集合,例如,具有三个离散离子包含区段的线性离子阱可具有正面区段、中间区段和背面区段。在这种装置中,离子可以不同方式包含于阱中,例如,正离子可包含于一个或多个区段中,而与此同时,负离子可包含于阱的不同区段中。分段式线性离子阱的此特征极大地促进了离子-离子反应,例如质子转移反应(PTR)。线性离子阱可包括两个不同的线性离子阱,例如高压离子阱和低压离子阱(加州圣何塞的赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific)的质谱仪的Thermo Velos或熔合线)。

[0005] 紫外光致解离(UVPD)是一种利用来自UV发射激光器的紫外(UV)光线的技术,其中具有导致前体离子碎片化并后续生成产物离子的基本过程。多肽序列测定是研究生物分子

以及用于改进蛋白质组学和临床诊断学领域的核心。通过质谱法最有效地探测多肽序列的探查。现代质谱仪开始配备有大阵列碎片化技术以实现对广泛范围的分子化合物的研究。利用适当技术进行的完整多肽种类的碎片化实现了可预测的肽主链碎片化。UVPD提供蛋白质的广泛而深度的碎片化,因此给出高序列范围,并且非常适合于高通量蛋白质组学。这对于在其碎片产物中是相对无差别的多肽碎片化是有前景的技术。在此技术中,气相完整蛋白质离子用UV光源(通常是激光器)照射。当使用相对高光子密度和能量的激光时,光致解离可经由单个光子机构继续或可通过2或3或更多个光子机构继续。利用此类技术,碎片化可继续同时经过所有已知肽主链碎片化路径,从而产生a、b、c、x、y和z碎片离子,并且还可包含侧链碎片化。

[0006] 完整蛋白质的UVPD碎片化谱的复杂性在于具有分布在相对窄的质荷比(m/z)范围上的许多重叠的多电荷碎片离子,从而使得难以进行确信的峰的分配,由此需要简化此类谱。MS/MS中最常见的反应是离子活化之后的解离。在最简单的情况下,单电荷母离子碎片化以产生单电荷和中性产物。从质谱法开始已经已知涉及电荷改变的反应,其常常共同被称为电荷置换反应。UVPD的一个特定优点在于其不仅自身提供广泛范围的蛋白质/肽碎片化范围,而且在多数情况下适用于识别翻译后修饰(PTM),原因在于例如磷酸盐或聚糖等弱键合的PTM常常幸免于此碎片化过程。PTM的检测在蛋白质组学中显得愈发重要。

[0007] 如上文所概述,宽的碎片化范围是UVPD碎片化的明显优点。然而,此宽的范围常常导致相对大量叠加的更高电荷态产物离子峰包络,从而通过增加碎片离子的分子量变得愈发难以去卷积。因此,UVPD质谱的简化的进步是合乎希望的。

发明内容

[0008] 描述了一种产生产物离子以进行质量分析的方法。所述方法可简化解译UVPD质量块并且任选地包括用于例如通过以下方式进行UVPD碎片化的质量选择前体离子:使用四极滤质器或离子阱,对(所选择的)前体离子执行UVPD碎片化从而得到UVPD碎片离子。UVPD碎片化可通过使用单个激光脉冲或通过使用多个激光脉冲来执行。可使用产生高度碎片化的相对高能量(在毫焦脉冲范围内)的单个激光脉冲,或可使用产生显著较低的碎片化的单个激光脉冲。当使用多个激光脉冲时,每个激光脉冲可具有相对低的能量,其中每个脉冲可产生显著较低的碎片化(微焦脉冲范围)。在每个UVPD事件之后(其中使用单个脉冲或使用多个脉冲),可对UVPD碎片离子执行PTR(也被称作离子-离子质子转移,IIPT)以产生电荷态减小的UVPD碎片离子并且以上UVPD-PTR步骤可重复 n 次,其中 $n=1$ 到50。在多次PTR-UVPD迭代之后,对碎片离子进行质量分析。与单独使用UVPD碎片化相比,所述方法提供通过以下方式简化UVPD质谱产物离子的方式:降低碎片离子电荷态并且扩散出 m/z 质谱空间中的所得产物离子。产物离子同位素包络峰与在 m/z 空间中完全分离的较小数目的电荷态的混合物相比于尚未经受PTR并且具有挤在更窄范围的 m/z 空间中的较大数目的电荷态的UVPD碎片更易于去卷积。

[0009] 所述方法可通过使用四极滤质器或者通过使用四极或离子阱以进行质量选择而执行。可在PTR步骤的任何迭代期间进行前体或产物离子的离子布置(ion parking),从而使得所选择的前体或产物离子群体被从发生PTR的区域去除,由此防止所希望的前体或产物离子的不合乎希望的消耗。

附图说明

- [0010] 图1示出描绘本发明的实施例的工作流的流程图。
- [0011] 图2示出用于在线性离子阱或RF离子包含装置中执行UVPD的设备,所述设备包括控制器、电压源、分段式线性离子阱和激光源。
- [0012] 图3示出没有进行PTR简化的UVPD质谱的实例。
- [0013] 图4A示出没有进行UVPD简化的UVPD质谱的另一实例。
- [0014] 图4B示出在进行PTR简化之后图4A中的UVPD质谱。
- [0015] 图5示出将质谱中UVPD碎片数与肽离子型进行比较的条形图。

具体实施方式

[0016] 大型分子并且尤其是大型生物分子以及这些分子的更大解离碎片在正离子和负离子MS两个、尤其是电喷射电离质谱法(ESI-MS)中常常显示大量电荷态。这常常是成问题的,原因是大量电荷态可显得非常靠近并且常常在产物离子显现的相对小的 m/z 范围中重叠。本文描述一种质谱方法,其中通过用UV光的一个或多个脉冲照射到产物离子中来选择并解离前体离子,并且所得带正电产物离子经受使用例如 SF_6^- 、阴离子全氟萘烷或其它全氟代烃等反应剂的PTR,这导致以较小的电荷态编号使更多产物离子电荷态移位并且因此通过降低显现在相同 m/z 分析窗口中的质谱峰数或通过降低谱峰密度(每 m/z 的峰数)而“简化了”质谱分析。在质量分析之前,可执行前体离子的UV照射、接着是以各个组合的PTR的进一步循环以便优化简化过程。

[0017] 在自下而上或自上而下的蛋白质组学中,可执行UVPD实验以便通过最大化质谱 m/z 内已解离的产物离子的丰度而最大化可供使用的信息。UVPD碎片化的程度取决于阳离子(或阴离子)的构象、所辐射离子的量、激光波长和功率以及其它起作用的因素。此外,可能难以根据LC运转预先知道每个阴离子-阳离子组合的理想参数。

[0018] 由UVPD过程产生的碎片离子包含高级多电荷种类,其具有增加的电荷态数,同时具有增加的碎片离子质量。这些离子在许多电荷态上分成许多碎片通道,从而产生重叠的同位素群集。这是成问题的,原因在于高度带电的碎片或产物离子对于质谱仪来说可能难以解析。通过UVPD分段的前体离子可例如具有 5^+ 、 6^+ 、 7^+ 、 8^+ 、 9^+ 、 10^+ 或高得多的电荷态,并且所得碎片或产物离子可例如具有 4^+ 、 5^+ 、 6^+ 、 7^+ 、 8^+ 、 9^+ 或高得多的电荷态。在UVPD事件期间,存在极小的(如果存在的话)净电荷减小并且大量碎片往往会保持在围绕初始前体的相对窄的 m/z 面元中,从而增加谱峰密度并且使去卷积复杂化。

[0019] 如本文所使用,术语“产物离子”是指为前体离子的碎片离子(也被称作二次离子或子离子)的任何离子。术语“前体离子”是指离子化完整分子,例如离子化完整蛋白质或离子化寡核苷酸或携带全部正电荷或负电荷的类似物。其可以是指加合离子,其中在正离子模式下,完整分子与质子、铵离子或金属离子中的一或多个结合以产生全部带正电的离子。在负离子质谱法中,完整蛋白质或寡核苷酸或类似物全部携带负电荷。如本文所使用的术语“前体离子”还可是指选择以进行另一(更多)轮碎片化的产物离子。

[0020] 根据本发明的实施例,描述了一种产生产物离子的方法,包括选择前体离子以进行UVPD碎片化。带正电或带负电前体离子的选择可通过使用四极滤质器或通过使用例如3D

四极离子阱等四极离子阱装置或通过使用2D线性四极杆离子阱(LIT)而实现。从离子阱去除不想要的离子可例如通过共振喷出而实现,其中任何不想要的离子通过轴向喷出模式或通过径向喷出模式离开阱。前体离子可以是例如完整蛋白质或寡核苷酸等生物聚合物,或者它们可以是例如聚酯、聚亚胺或聚乙二醇、任何这些聚合物的组合或分子等相对极性的合成聚合物,其中已经将此类聚合物加入其它分子例如以增加小分子药物的生物可用性。如本文所使用的术语“前体离子”还可适用于例如由蛋白质的酶分解衍生的肽等更小单位的生物聚合物,并且重要的是,这些截短分子或分子离子可具有选择以进行至少一个另一轮碎片化、接着进行质量分析的先前分段的离子。

[0021] 本发明的实施例具体地说涉及对蛋白质的自上而下的分析,即,其中质谱分析物是完整蛋白质而不是由自下而上蛋白质酶分解产生的多个更小的肽。蛋白质分析物可由质谱仪内的UVPD分段,从而产生一系列产物离子。每个产物离子可显现为表示碎片的不同电荷态的一系列峰。每个系列中的每个电荷态群具有一组细微的同位素包络峰,每个单独电荷态同位素包络的外观将取决于其电荷态的值、其分子量、其相对丰度并且取决于质谱仪的分辨率。举例来说,在相对低分辨率的质谱仪上进行分析的具有高分子量、高电荷态的电荷态包络可显现为单个宽峰。这种峰表示同位素包络峰的平均量。不完全碎片化还将产生完整蛋白质的一群前体离子电荷态峰的外观,这可使碎片离子去卷积进一步复杂化。在ESI质谱中,具有20,000道尔顿分子量的蛋白质的前体离子可显现为 m/z 1000到2000之间的一系列电荷态。举例来说,10+电荷态可显现为大约2001 m/z 的峰的同位素包络—这将表示蛋白质自身(20,000个)加上贡献10个正电荷的10个质子($20,000+10=20010$)除以10(电荷态,因为MS只看到 m/z) = 2001.0+电荷态将显现为大约1001 m/z 的峰的同位素包络—这将表示蛋白质自身(20,000个)加上贡献20个正电荷的20个质子(总质量 $20,000+20=20020$)除以10(电荷态 z ,因为MS只看到 m/z) = 1001.11+,12+,13+,14+,15+,16+,17+,18+和19+电荷态同位素包络将在1001与2002 m/z 之间的适当 m/z 范围下显现。表示单独电荷态的每个同位素包络将主要由于同位素H、C、N、O和S的存在而包括一系列同位素峰。

[0022] 这种蛋白质的UVPD碎片化可承担例如处于1000 m/z 的碎片以及处于19,000 m/z 的互补碎片。并且,具有所述中间的20+碎片的20k蛋白质可承担 2×10^4 10+种类,与前体具有相同 m/z 。这就是靠近前体 m/z 存在UVPD谱群集的原因。这些碎片中的每一个可示出与上文前体蛋白质所示出类似类型的电荷态分布,并且由于存在数千个潜在的UVPD产物离子碎片,明显的是 m/z 空间中可能会发生严重过度拥挤,所述拥挤随电荷态数增加而增加。因此,如果碎片离子电荷态数可通过PTR降低,那么UVPD质谱将不太过度拥挤并且因此简化质谱分析。

[0023] 在PTR过程中,已知当多电荷前体分析物离子与相反极性的反应剂离子混合时,质子可从阳离子转移成阴离子,因此减小阳离子的电荷态。在正离子模式中,阳离子可以是例如蛋白质或肽等分析物并,且阴离子可以是富电子PTR反应剂。

[0024] 已经描述了多种离子-离子质子转移(IIPT)反应,例如参见McLuckey等人;《分析化学(Anal Chem.)》,2002,74(2)336-346;Hunt等人;《分子细胞蛋白质组学(Mol. Cell Proteomics)》,2016,15(3),975-988;Brodbeck等人;《分析化学(Anal Chem.)》,2015,88,1008-1016)。在本发明的实施例中,可通过使用激励激光器的一个脉冲、接着考虑到PTR而使用可变时间量来执行完整蛋白质的UVPD碎片化。

[0025] 例如SF₆⁻阴离子反应剂等PTR反应剂离子可在独立电子碰撞(EI)离子源(负离子模式)中或在辉光放电离子源(此源不同于主要ESI分析物离子源)中产生并且可以是例如设计用于电子转移解离(FETD)的前端离子源。PTR负离子可以不同方式引入到阱中,例如,前体离子可分成线性离子阱的一个片段,并且PTR离子接着可引入到阱的独立片段中。带正电前体离子接着可与PTR阴离子混合持续用户限定的时间量(例如,20到200ms)。在此步骤期间,碎片离子电荷态将由于一个或多个质子丢失到阴离子PTR反应剂而减少。在此步骤期间可任选地执行并行离子布置。PTR离子-离子反应可通过若干已知方法进行淬灭,所述方法包含从阱去除剩余PTR阴离子或从阱去除产物离子。

[0026] 在使用离子阱内的所选离子的谐波激励的PTR期间可执行并行离子布置以减少其在气相离子/离子反应中的反应性。这允许在不超出目标产物m/z范围地使前体反应的情况下执行PTR。接着可重复或循环以上过程,直到已经实现适当程度的谱简化。

[0027] 在替代实施例中,涉及多个激光脉冲的循环涉及前体离子,接着是可在质量分析之前执行适当PTR时间量。激光器功率可相应地变化,从而使得例如在以上在PTR之前执行多个激光脉冲的情况下,使用具有较低功率的激光器。或者,更高功率的激光器可用于在PTR之前仅使用一个激光脉冲的情况。在另一情况下,相同激光器功率可用于两种情况。又另一实施例可涉及在质量分析之前进行上文两个循环的组合。应注意,相对于操作较低脉冲能量的高度功率激光器,对UVPD活化的非常细微的控制可用此途径实现。

[0028] 在本发明的替代实施例中,可在合乎希望的(较低)电荷态下或在合乎希望的更高m/z质量范围下执行产物离子布置以防止离子形成超出质谱仪的检测范围的较低电荷态并且因此将出于分析目的而丢失。举例来说,具有大约10,000amu分子量的蛋白质碎片的4⁺电荷态将是大约2500m/z,这将超出许多商业ESI质谱仪的“最高”2000m/z质量范围。在此情况下,产物离子布置可涉及例如10,000amu产物离子的7⁺电荷态,这将导致离子以大约1430m/z方便地积聚在例如离子阱中。

[0029] 图1示出描绘本发明的实施例的流程图,其中所选择的前体离子经受UVPD碎片化100。如上文所描述,UVPD碎片化可由处于具体功率或能级的单个脉冲构成,或可由来自多种适当UV激光器的处于具体功率或能级的多个激光脉冲构成。在通过PTR 120进行的任何轮谱简化之前,在110中,可执行任选隔离或任选MS₃或MS_n隔离,原因在于UVPD活化可使初始碎片分段从而得到MS_n产物离子。可通过允许UVPD碎片离子与预定总数的例如SF₆⁻离子(针对带正电碎片离子)等PTR反应剂离子反应而实现PTR谱简化120,所述反应可执行持续预定时间量。可在任何轮PTR期间执行任选的离子布置。这可导致碎片离子群体的更高电荷态数减小,即,碎片离子群体可分布在比PTR之前更大数目的更低电荷态上并且因此将在m/z空间中进一步间隔开。由于碎片离子群体之间更大的间距,m/z空间中的这些群体之间的显著重叠变得不太成问题,并且值得注意的是,将预期更高效的谱去卷积(m/z空间中碎片离子群体之间的重叠越少,清理器去卷积的机会越大),从而产生UVPD m/z分配的更大可信度。这可接着进行质量分析或MS_n实验130的下一阶段。

[0030] 图2示出分段式线性离子阱的截面视图。激光器280发射辐射UV激光束170以激励分段式线性离子阱210中的前体离子群体260。简要地,阱具有允许离子进入并且将离子约束在阱中的两个末端透镜250、控制器255、电压源230、240、245以及十二个电极(示出六个)224和222。离子可经由末端透镜250中的孔进入和离开或者可通过电极220中的孔通过共振

以放射状从阱喷射出。通过用RF电压源230向电极220应用射频(RF)电压来实现离子的径向限制。在典型操作模式中,两个电极对接收处于反相关系的大体上等幅的RF电压。可通过将来自DC电压源240的不同DC电压应用到电极的末端224和中心222片段来实现离子在纵向维度(即,沿着离子阱的中心轴线)中的限制,从而限定电势井与中心片段大致共同延伸。举例来说,如果所限定的离子是阳离子,那么可通过向末端片段应用相对于应用到中心片段的DC电压更高的DC电压来建立向电势井。在其它实施例中,可通过向从电极220轴向向外定位的末端透镜250应用合适的DC电压来建立DC电势井。RF电压源230和DC电压源240、以及激励电压源245和UV源285和相关联质谱仪的其它组件的操作由控制器255指示,所述控制器255的功能可跨若干分立组件(例如通用和专用处理器、应用专用电路、存储器和存储装置)分布,并且可被配置成执行软件代码以实施以下描述的步骤中的一个或多个。

[0031] 上文描述的RF和DC域的组合限定将未激发离子限制为靠近离子阱中心轴线放置并且沿着DC电势井延伸(例如,大体上与中心片段共同延伸)的薄的大体上圆柱形体积,在本文中被称为离子云260。如本领域中已知,离子云260的维度并且具体地说其半径将根据所应用RF电压的振幅和频率、所捕获离子的 m/z 和质量以及离子阱210内的背景气体的压力而变化。

[0032] 为了通过UVPD解离离子阱210中的离子,将合适特性的UV辐射的束270传递到离子阱210中,优选地沿着与离子阱中心轴线共轴或平行的路径。UV束270由源280发射并且光束路径可由一个或多个反射器或其它离子光学件(例如镜282)沿着离子阱引入。源280可采取激光器或能够发射具有适合于致使由所关注的分析物离子吸收和随之而来的碎片化的特性(例如,波长、功率、脉冲持续时间、重复率)的UV辐射束的其它装置的形式。本发明的实施例的实施方案可采用激光器(例如,固态激光器如CryLas (NdYAg)激光器),所述激光器可发射大约213nm波长的经脉冲UV辐射,如UV源280。本领域的技术人员将认识到在本文中可在不脱离本发明的精神和范围的情况下采用许多不同类型的UV或光学激光器,例如,可使用更大功率的准分子193nm激光器。UV束270的直径和定位被设定或调整以得到离子云260与所辐射区域285之间的良好重叠,使得离子阱210内的大部分或所有未激发离子暴露于UV辐射以进行随之而来的吸收和碎片化。在图2中,离子云260完全由所辐射区域285包封,尽管这并不是必需的并且所述离子云的一部分可延伸超出辐射区域的范围。在UVPD-PTR过程期间,可通过允许所选择的离子碎片具有将包含于超出激光器路径285的范围的阱中的具体电荷态或一定范围的电荷态来使离子布置或者通过挑选 m/z 空间中的一定范围以便于离子布置。可例如通过使用离子阱内的所选离子的谐波激励减少其在气相离子/离子反应中的反应性来实现PTR期间的离子布置(或并行离子布置)(首先由McLuckey等人报告,2002,分析化学74,336-346页;以及分析化学2006,78(1),310-316页)。用于并行离子布置的波形可包含经滤波噪声域(FNF)波形,其中包含波形中的陷波以允许所选择的阳离子与阴离子的不受抑制的反应,同时 m/z 与所选择的反应物不同的所有产物经受加速度,因此抑制其离子/离子反应速率。经由应用宽带波形的并行离子布置还可用于通过将每蛋白质电荷态的数目减少到一个或两个来简化蛋白质混合物的ESI质谱。并行离子布置还可通过在离子/离子反应阶段期间向离子阱的端盖电极应用单个高振幅两极频率来实现。高振幅的单个频率电压的使用引起 m/z 值的宽带相对于在低得多振幅下的相同频率的使用的加速。

[0033] 离子布置可取决于采用来抑制离子/离子反应速率的装置而以不同选择度在离子

阱中实施。与所关注的离子共振应用的低振幅、单频互补ac电压是最大选择性途径。宽带波形或高振幅、单频ac电压的使用提供用于非选择性离子布置的装置,由此,由分析物种类的混合物衍生的离子可在被称作并行离子布置的过程中同时布置。利用后一技术,离子可被聚集到根据所应用波形的特性以及离子的碰撞横截面确定的 m/z 区域中,其中混合物的每个分量主要由一个或两个电荷态表示。具有重叠 m/z 值的电荷态常常使初始蛋白质混合物质谱的去卷积复杂化。并行离子布置可帮助控制观察以最小化此类重叠问题的电荷态的范围。

[0034] 图3示出由UVPD碎片化衍生的在大约800到1000 m/z 的相对窄的范围上传播以形成超过10%相对丰度或强度的离子的大量主要产物离子峰。清楚地,这种拥挤的 m/z 空间的去卷积对如此多的靠近或重叠的产物离子同位素包络将是成问题的。

[0035] 图4A示出质谱,其中大部分碎片离子峰发生在400到1200 m/z 范围内,而在200ms PTR之后,图4B示出相同UVPD碎片离子EIC,其中UVPD碎片离子群体在宽得多的400到1750 m/z 范围上传播出去。特别地,图4A中在大约855 m/z 处的碎片离子峰集群已经在PTR之后大大地简化。

[0036] 图5是根据在UVPD(黑色)之后并且在UVPD-PTR之后发生的具体碎片类型(a、b、c、x、y、z)示出肽碎片数的条形图。

[0037] 电荷态与UVPD活化存在依赖性,即,电荷态越高,UVPD横截面越高。此处目的是减少碎片化。对于接着PTR之后完成极少的UVPD的情况,后续UVPD步骤可看到电荷已经减少的碎片群体。如果其横截面低于否则将不进行PTR的情况,那么可存在更少的次级、三级等活化。

[0038] 蛋白质的UVPD活化的横截面不同于肽的横截面,其中蛋白质在高得多的速率下活化,即,需要更少的脉冲以得到相同量的前体消耗。因此,来自UVPD的肽类碎片随着其质量下降而激活地更慢。它们可被称为由于其减小的横截面而受到天然保护。多个脉冲实验看起来可不同于单个脉冲实验吗?答案可存在于碎片分区过程中。如果碰撞影响UVPD激励的结果,那么单个脉冲实验可在碰撞发生之前结束。在多脉冲的情况下,可更改脉冲之间的时间以允许碰撞冷却和分区。证明情况如此可被视为见于高压线性离子阱(HPT)中的谱不同于见于低压线性离子阱(LPT)中的那些谱。通过多个UVPD脉冲实验对解离进行细微控制在本文中可以是有益的。

[0039] UVPD-PTR可用离子布置完成到具体 m/z 范围,接着重复此过程(以积聚离子群体)或进行 m/z 分析。这可通过改变布置范围而重复多次,从而实际上将各个 m/z 区域中的质谱拼接在一起。其它实施例包含(a)在PTR期间的产物布置和(b)在PTR期间的前体布置。这在产物群体在 m/z 空间中环绕时可能是有利的,而不在前体上进行PTR(即,将其传播出去变成许多电荷态)。UVPD-PTR的后续步骤在单个电荷态中可具有更多前体一起作用。(c)“通过多脉冲活化”对UVPD活化非常细微的控制可用此途径相对于操作更低脉冲能量的高功率激光器实现。(d)MSn隔离可在UVPD PTR循环期间的任何时间在 m/z 空间的一部分中进行。其可在PTR之前或在PTR之后且在下一UVPD脉冲之前等执行。

[0040] 本发明已经关于具体实施例结合细节进行了描述以促进对本发明的构造和操作的原理的理解。本文中对具体实施例及其细节的参考并不意图限制在此所附权利要求书的范围。本领域的技术人员将显而易见,在不脱离如由权利要求所定义的本发明的精神和范

围的情况下,可对选择用于图示的实施例进行各种其它修改。

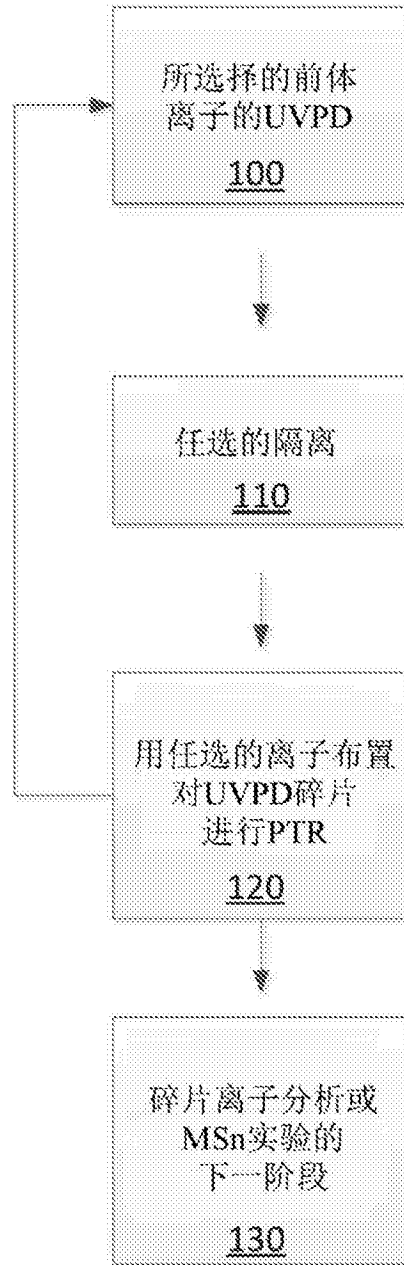


图1

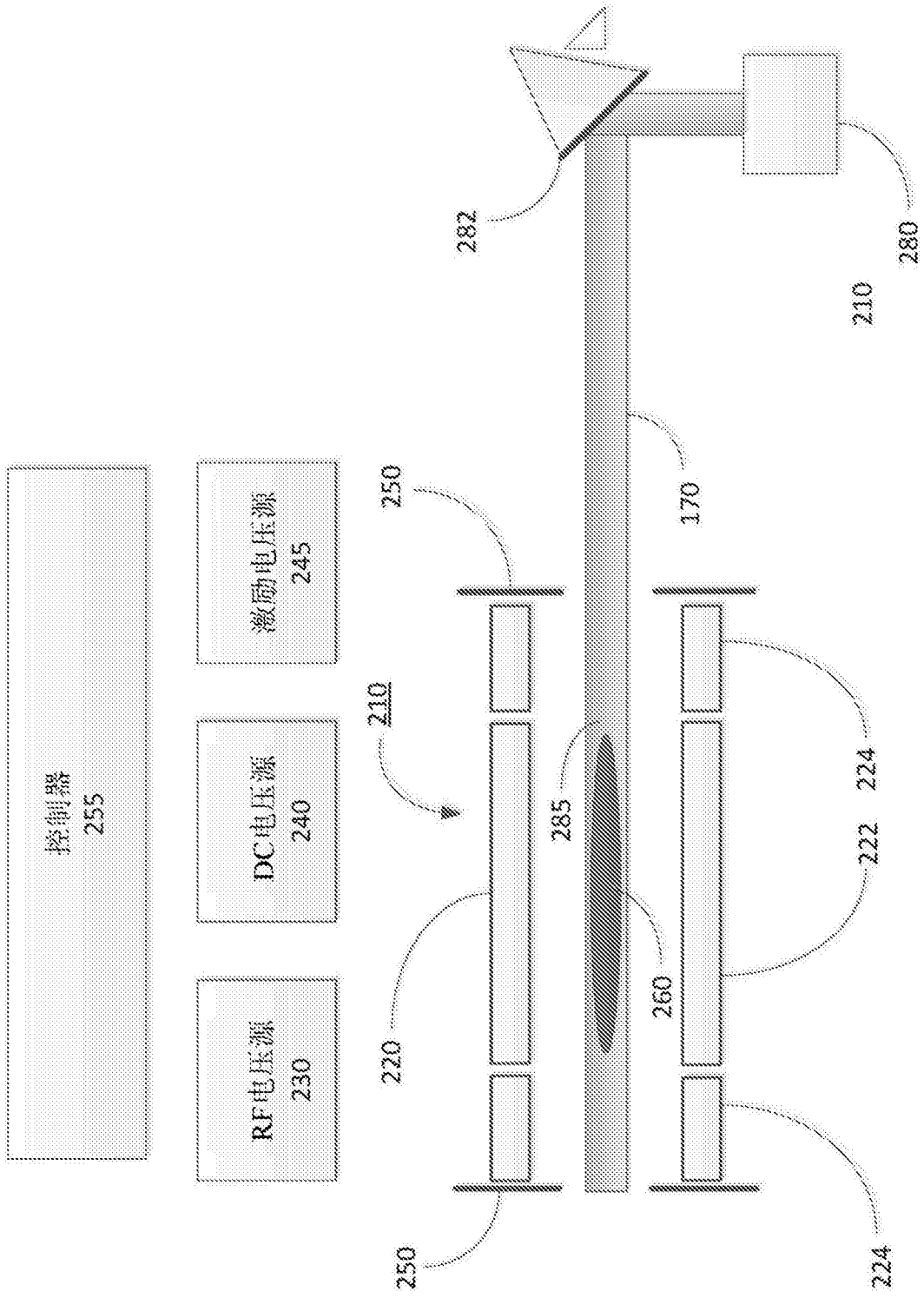


图2

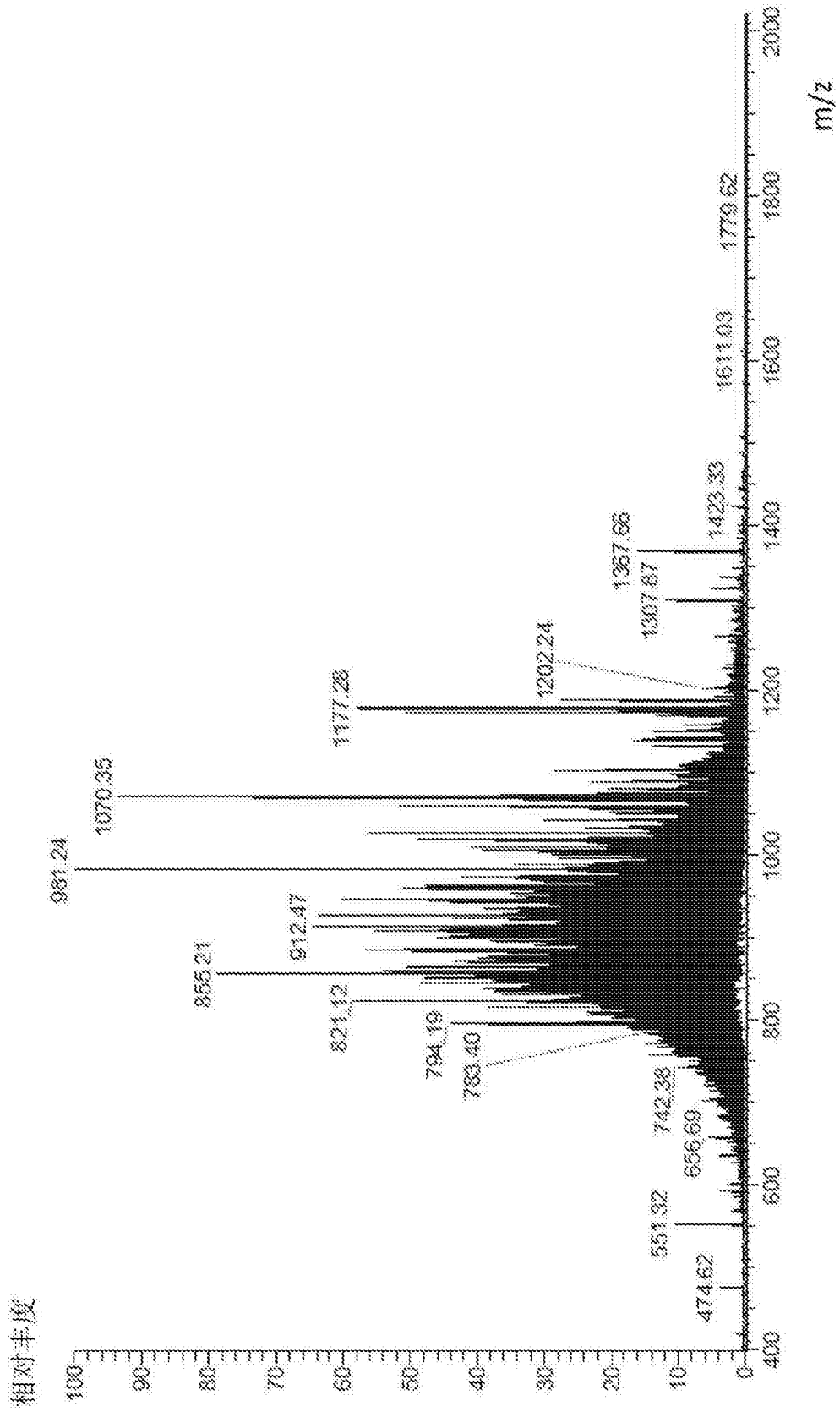


图3

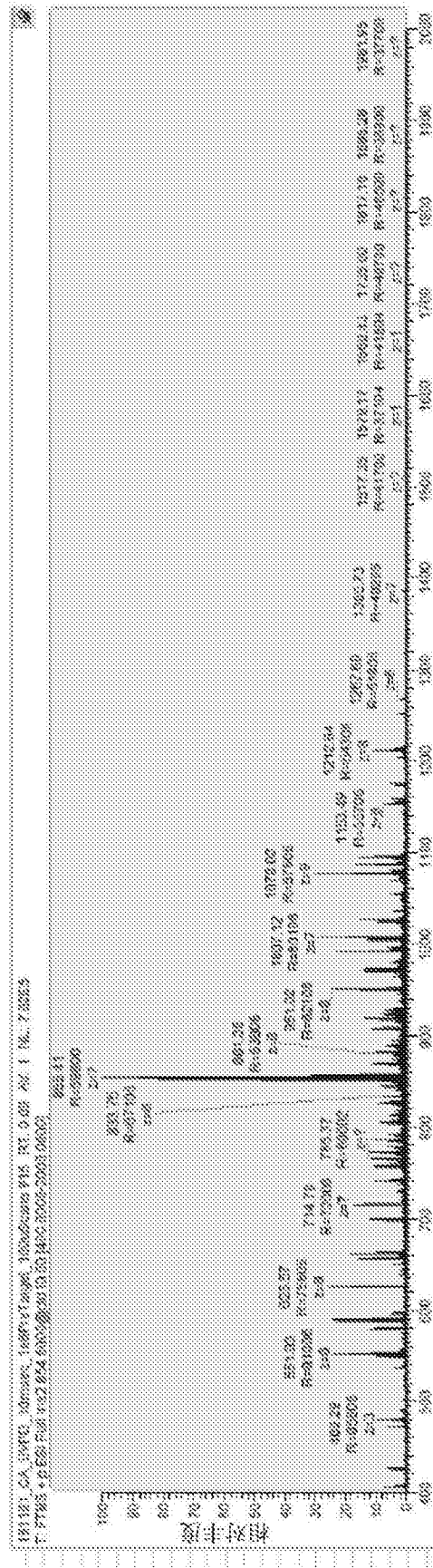


图4A

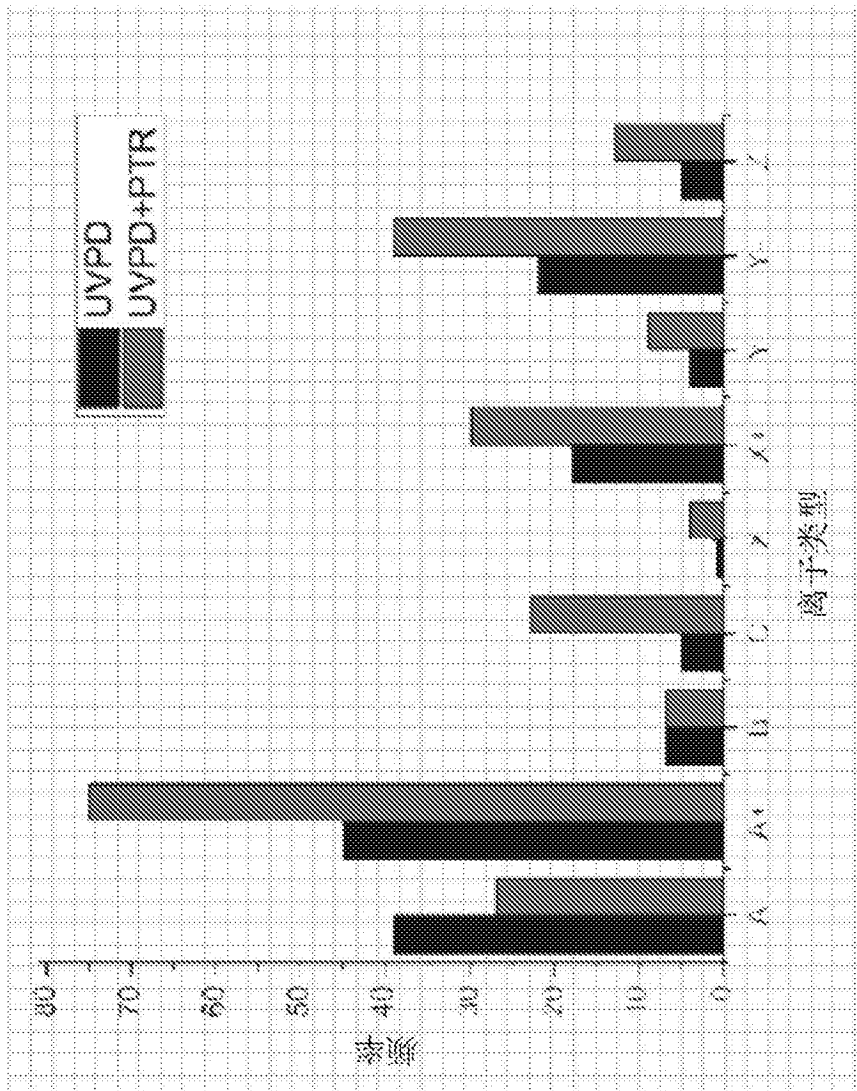


图5