

The background features a complex network of nodes and edges, with nodes in shades of purple, pink, and green. Overlaid on this are several protein ribbons in blue and green, some forming alpha-helices and others as flat sheets. A central white rectangular box contains the text.

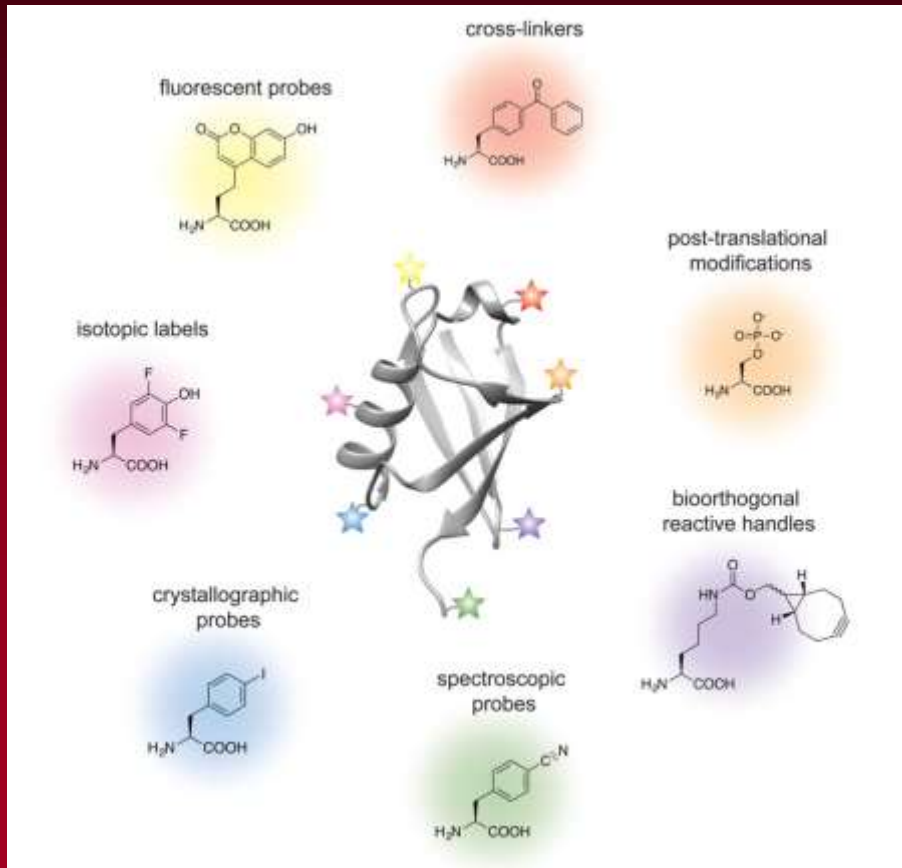
Proteomika 2024

PROTEOMIKA

2024

- Proteomika, Metody práce s bílkovinami (Petrák 7/10)
- **Separační metody, digesce a principy ID bílkovin pomocí MS** (Petrák 14/10)
- **Principy hmotnostní spektrometrie, instrumentace** (Man 4/11)
- **Hmotnostní spektrometrie v proteomice, analýza PTM** (Man 11/11)
- **ID proteinů, DDA, DIA, databáze, FDR** (Talacko 18/11)
- **Kvantifikace, isotopy, LFQ, cílená proteomika** (Harant 25/11)
- **Design experimentu, zpracování dat, bioinformatika...**(Harant 2/12)
- **Proteomika membránových proteinů, proteinové komplexy** (Petrák 9/12)
- **Klinická proteomika, speciální metody** (Petrák 16/12)

ZNAČENÍ A ZAKOTVOVÁNÍ PROTEINŮ



Reaktivní skupiny bílkovin

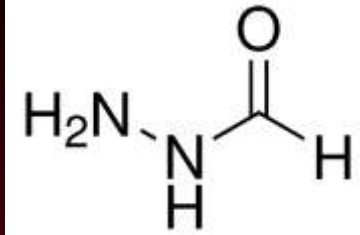
sulfhydryl ($-\text{SH}$)

primární amin ($-\text{NH}_2$)

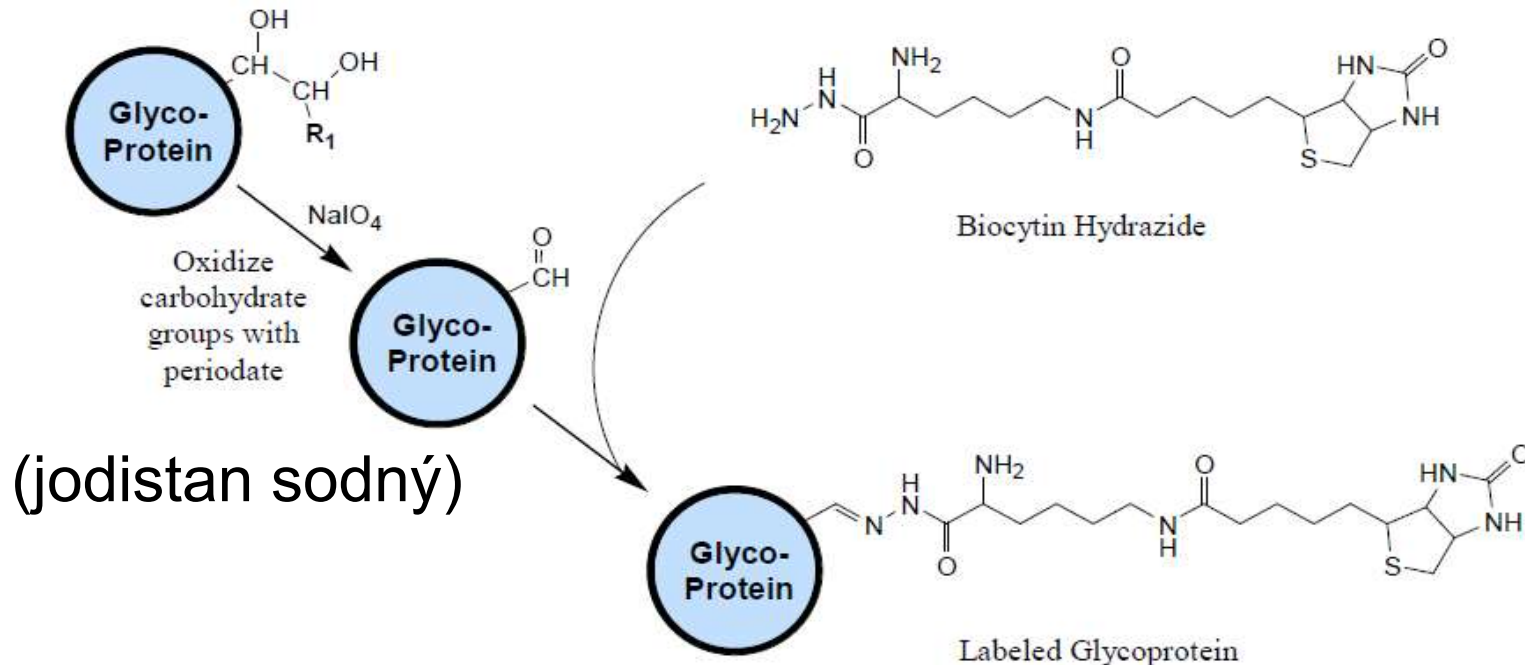
karboxyl ($-\text{COOH}$)

karbonyl sacharidu ($-\text{CHO}$)

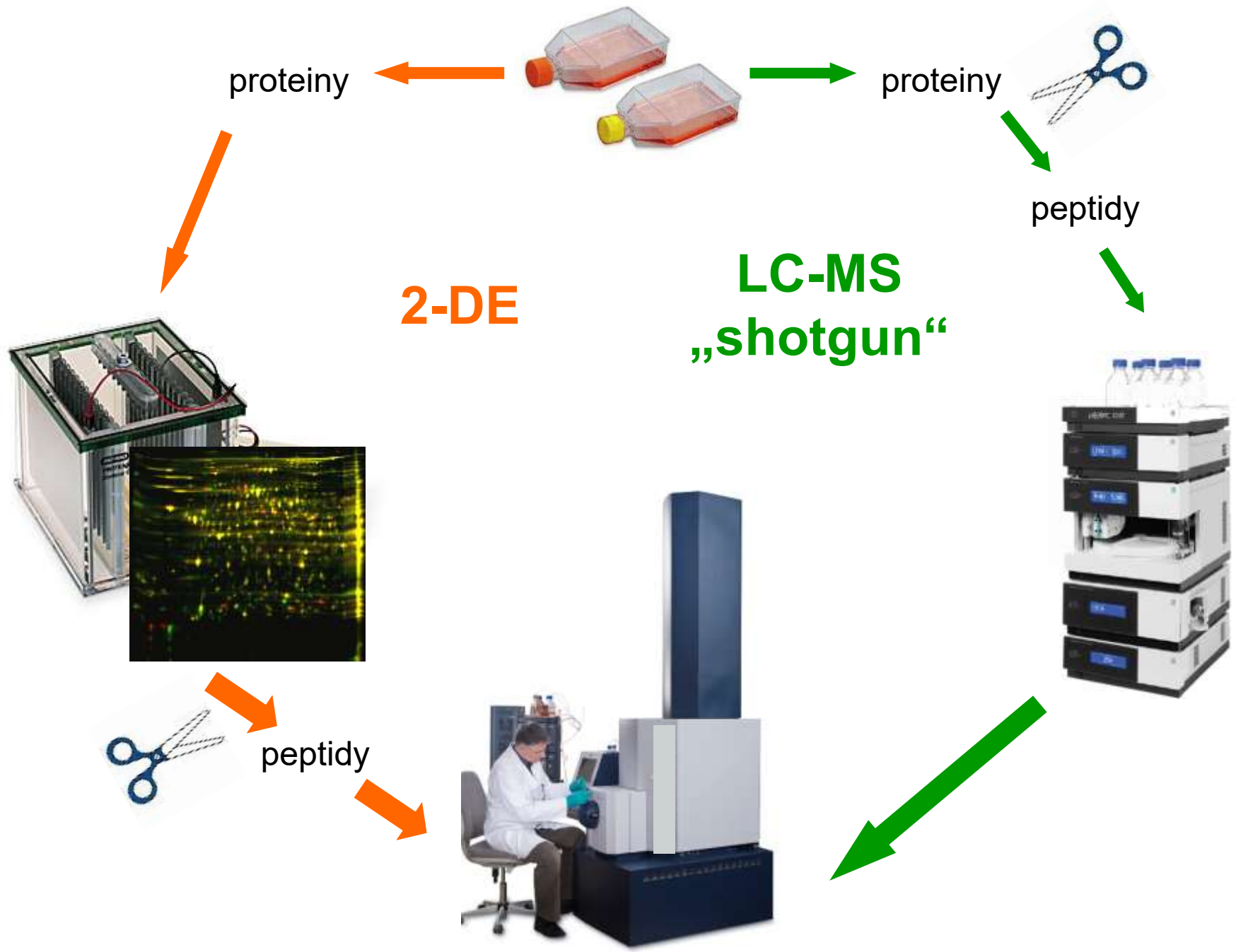
Cukry



hydrazid



Biotin Hydrazide **bind to oxidized carbohydrates through the hydrazide group ($-\text{NH}-\text{NH}_2$)**, forming a **hydrazone linkage**. Oxidation of glycoproteins generates reactive aldehydes that react specifically with hydrazide groups.



SEPARAČNÍ METODY

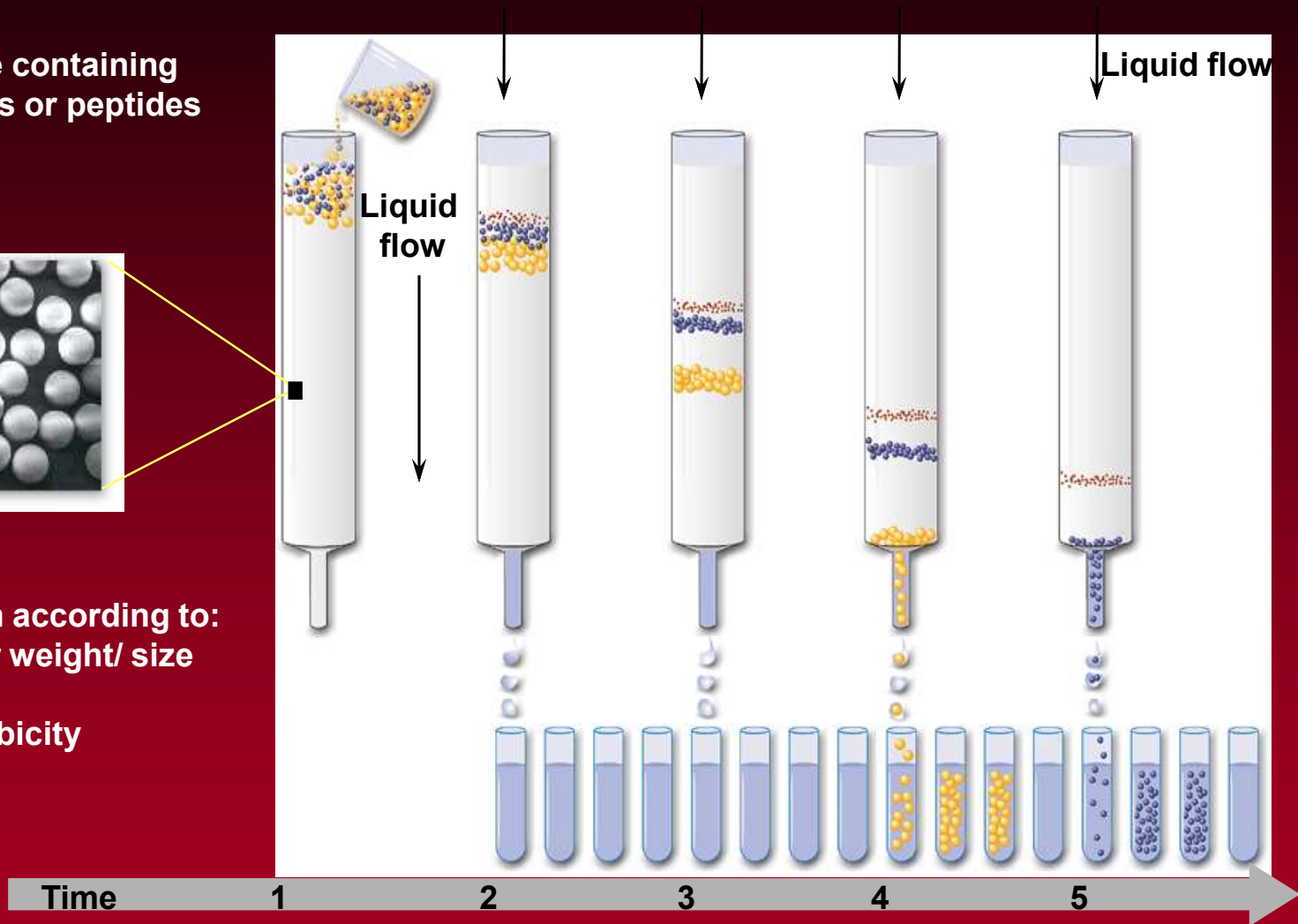
- CHROMATOGRRAFIE
 - Gelová filtrace, SEC
 - Iontoměničová chromatografie
 - Afinitní chromatografie
 - Chromatografie v reverzní (obrácené) fázi
 - HILIC (chromatografie hydrofilních interakcí)
- ELEKTROFORÉZY

Liquid Chromatography (LC)

Sample containing proteins or peptides



Separation according to:
-molecular weight/ size
-charge
-hydrophobicity
-affinity



•Vzorek se rozděluje mezi mobilní a stacionární (pevnou) fázi

KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE (LC)



- Atmosférická
- Nízkotlaká (FPLC, MPLC)
- **Vysokotlaká (HPLC)**

Klesá : objem vzorku, průtok
a průměr kolony
Roste: rychlost separace

MATRIX :

- kroslinkovaný dextran (Sephadex)
- kroslinkovaná celulóza (Sephacel)
- kroslinkovaná agarosa (Sephrose)
- polyakrylamid (Sepahacryl)
- silica - kyselina ortokřemičitá
- polystyren a jiné synt. polymery

METODY Chromatografické SEPRACE BIOMOLEKUL

VELIKOST



Gelová filtrace
(Size-exclusion chromatography)

AKTUÁLNÍ NÁBOJ



Iontoměničová chromatografie
(Ion exchange chromatography)

**SPECIFICKÉ
INTERAKCE**



Afinitní chromatografie
(Affinity chromatography)

HYDROFOBICITA



Chromatografie v reverzní fázi
(Reverse phase chromatography)

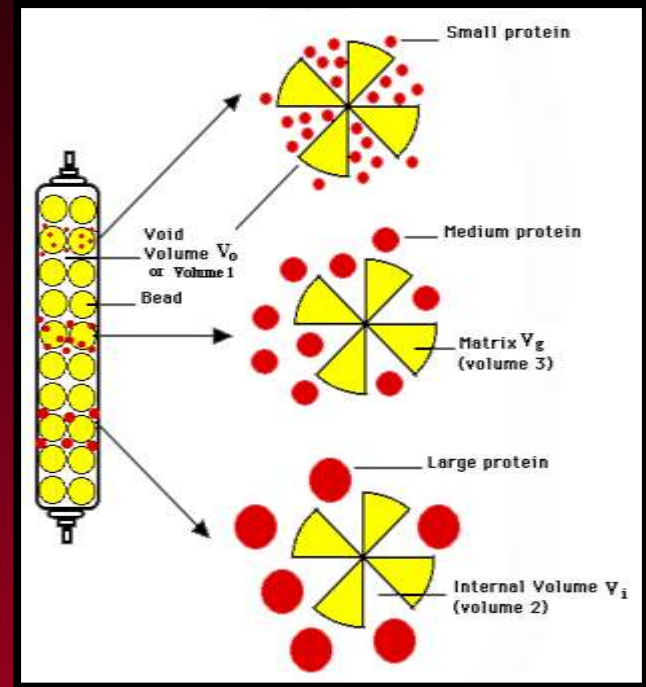
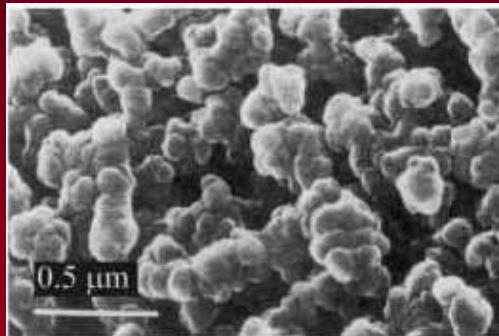
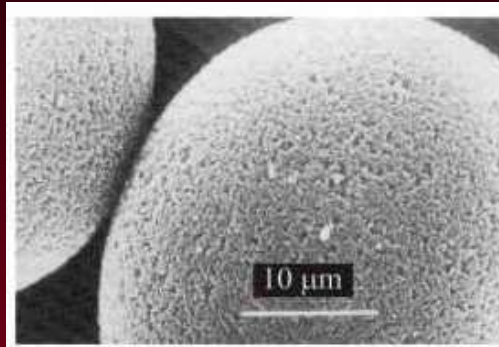
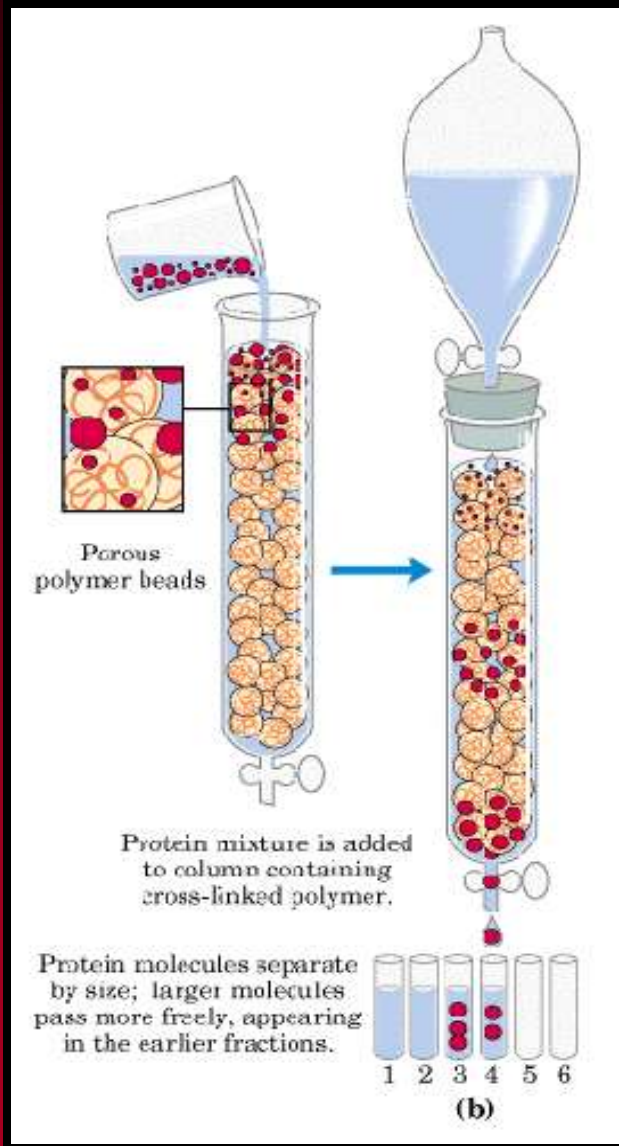
HYDROFILNOST



Chromatografie hydrofilních interakcí
(Hydrophilic interaction LC)

GELOVÁ FILTRACE

SIZE-EXCLUSION CHROMATOGRAPHY GEL-PERMEATION CHROMATOGRAPHY



Částice se v porézní matrix rozdělují na základě velikosti

Lze provádět za nativních podmínek !

Separáční rozmezí až do 1000-2 000 000 Da

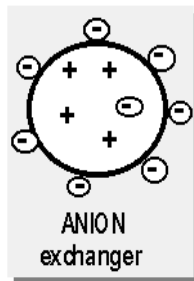
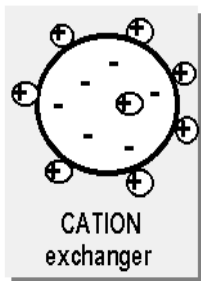
Vhodná pro proteiny a proteinové komplexy

ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY

IONTOMĚNIČOVÁ CHROMATOGRAFIE

- Dělí na základě aktuálního celkového náboje

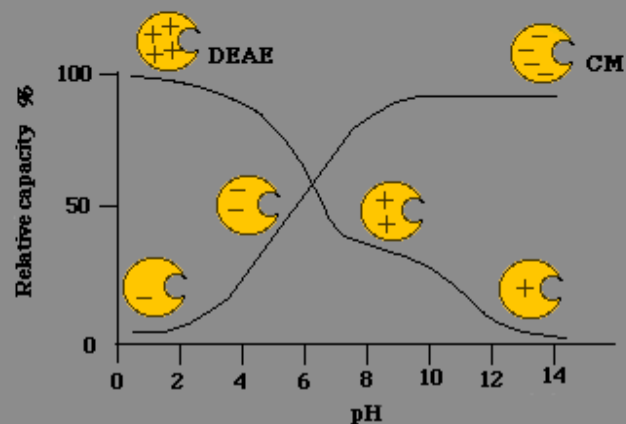
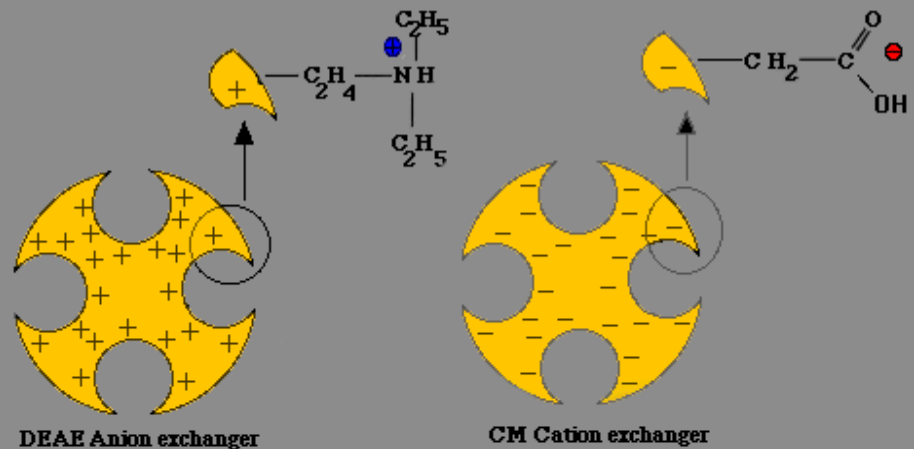
Ion exchange resins



Anex je pozitivně nabitý

Katex je negativně nabitý

Charge Properties of Ion Exchangers



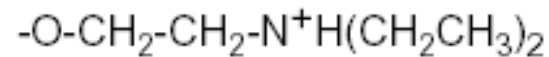
Vhodná pro proteiny i peptidy

Funkční skupiny iontoměničů

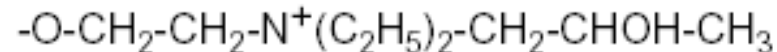
Anion exchangers

Functional group

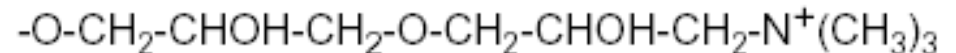
Diethylaminoethyl (DEAE)



Quaternary aminoethyl (QAE)



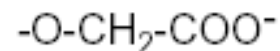
Quaternary ammonium (Q)



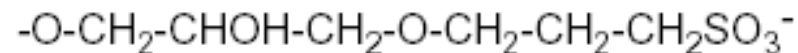
Cation exchangers

Functional group

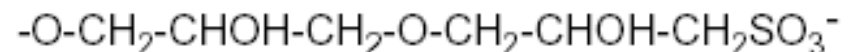
Carboxymethyl (CM)



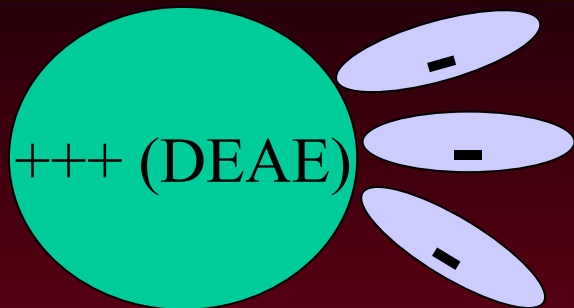
Sulphopropyl (SP)



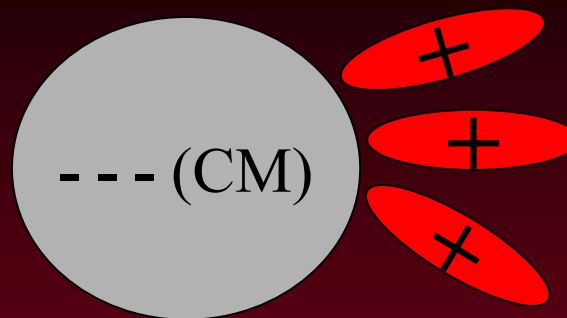
Methyl sulphonate (S)



ANEX



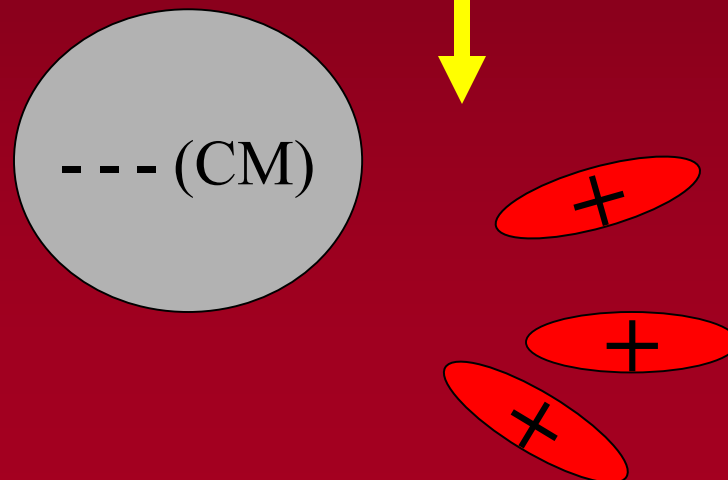
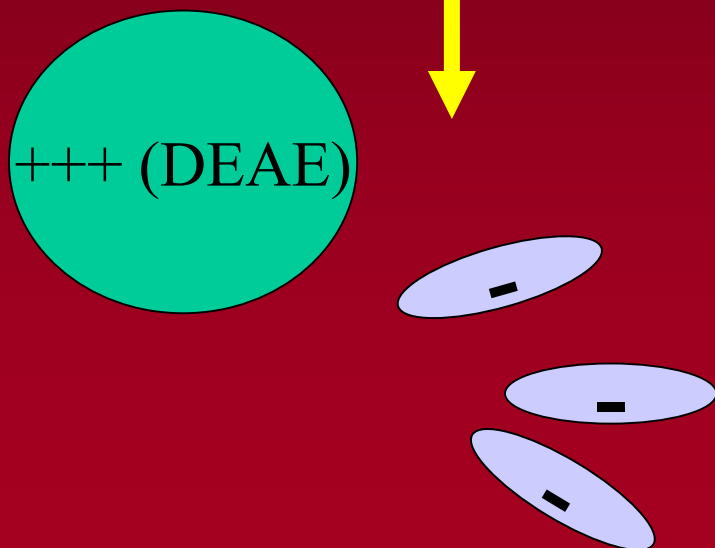
KATEX



ELUCE:

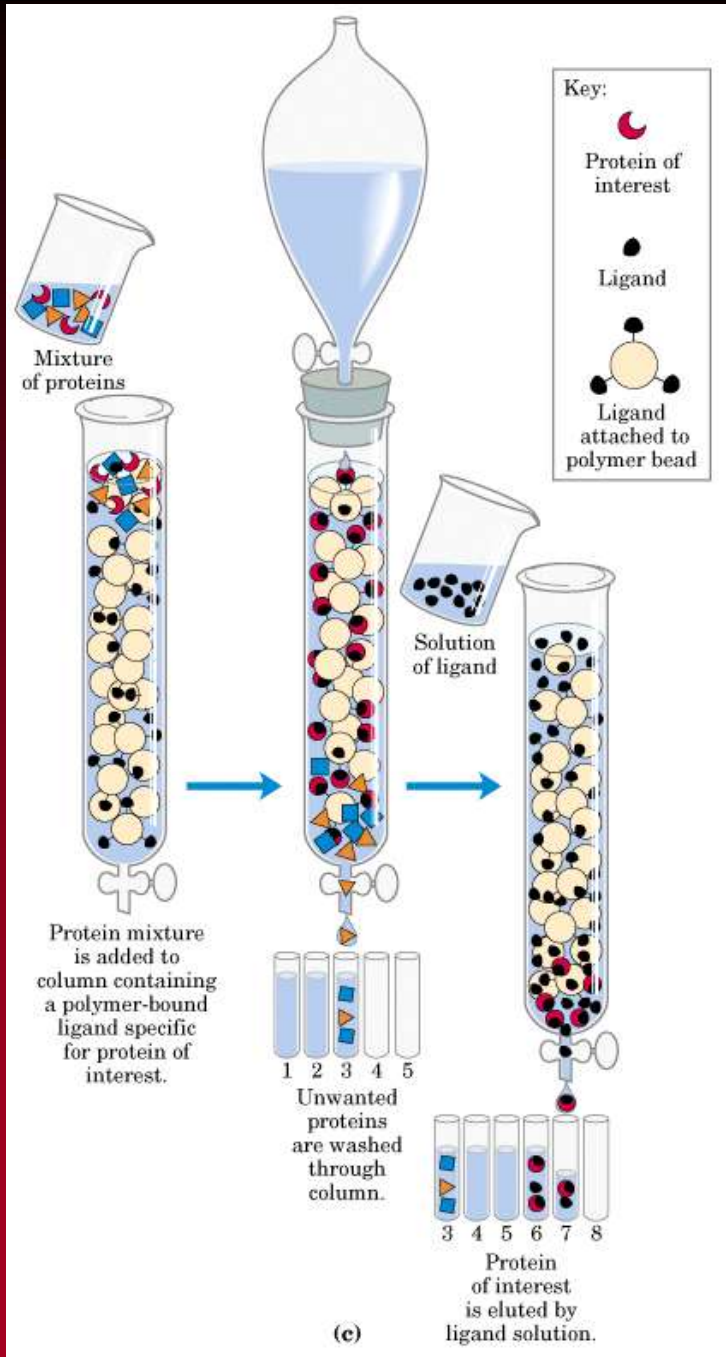
Zvýšená iontová síla (snížení ES interakcí)

Změna pH = chromatofokusace



AFINITNÍ CHROMATOGRFIE

Interakce proteinu/peptidu s jeho specifickým ligandem
metabolit, kov, DNA,
protilátka.....



Eluce:

- ligand
- pH
- iontová síla
- denaturační činidlo

Vhodná pro proteiny i peptidy

AFINITNÍ MATRIX

Aktivované matrice:

NHS Sepharose.....lze vázat za aminoskupinu (succinimid)

CNBr Sepharose.....lze vázat za aminoskupinu

EAH Sepharoselze vázat za karboxyl

Thiol sepharose.....lze vázat za SH cysteinu

Matrice s afinitou pro IgG a některé další Ig (nekovalentní)

Protein G Sepharose

Protein A Sepharose

Protein A, G magnetic beads

Matrice s afinitou pro glykoproteiny (nekovalentní)

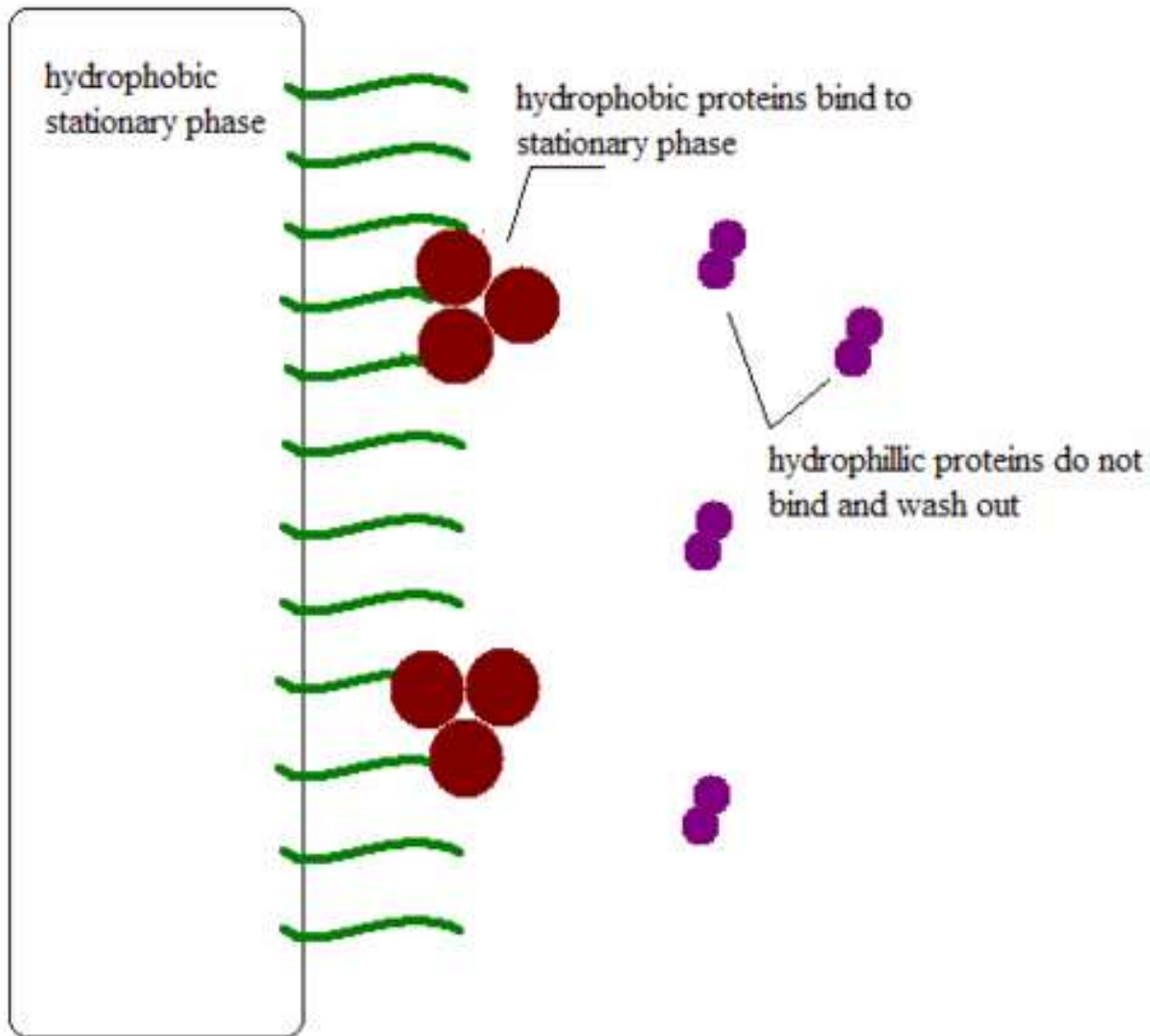
ConA Sepharose

Velké ligandy (DNA, protein) lze vázat přímo na matrix.

Malé ligandy (nukleotid, NADP, hormon...) možnost vazby přes inertní „spacer arm“.

REVERZNÍ FÁZE (REVERSE PHASE CHROMATOGRAPHY)

Dělení na základě interakce s hydrofobní matricí
(na základě odlišné hydrofobicity peptidů/proteinů)



- Matrice a ligand: vysoce hydrofobní alifatické řetězce
- Vzorek je v hydrofilním rozpouštědle
- Eluce: **gradientem organického rozpouštědla**

$\text{CH}_3\text{-OH}$
Methanol

$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$
Propanol

$\text{CH}_3\text{-C}\equiv\text{N}$
Acetonitrile

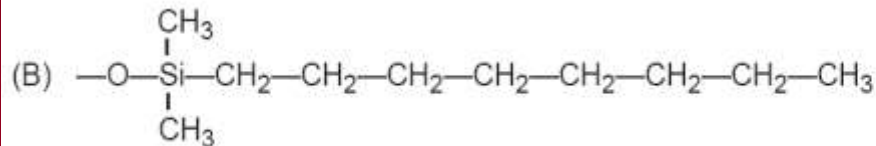
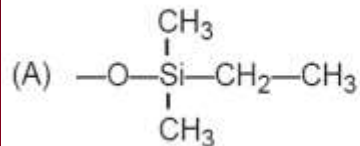
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_2 \quad \text{CH}_2 \\ | \quad | \\ \text{CH}_2\text{-CH}_2 \end{array}$
Tetrahydrofuran

REVERZNÍ FÁZE (REVERSE PHASE CHROMATOGRAPHY)

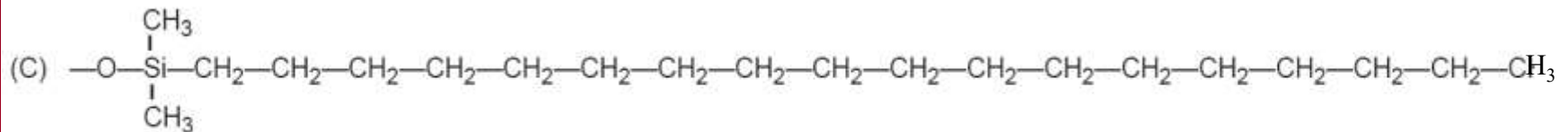
Dělení na základě interakce s hydrofobní matricí
(na základě odlišné hydrofobicity peptidů/proteinů)

Matrice - nerozpustná, odolná organice a vysokému tlaku
– silica, polystyren...

Ligandy – hydrofobní alifatické řetězce C2-C18, nebo jiné polymery



C18



Kompatibilita s MS!

Vhodná pro proteiny i peptidy

HILIC – hydrophilic interaction liquid chromatography (chromatografie hydrofilních interakcí)

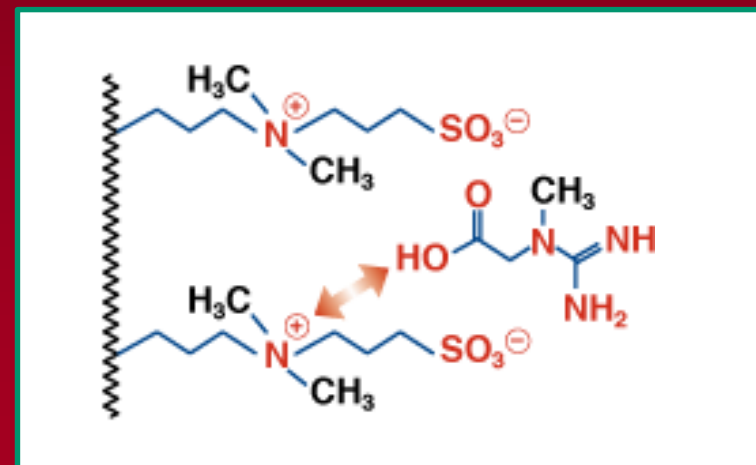
Dělí analyty na základě polárních interakcí

Stacionární fáze – polární, retenční čas roste s polaritou analytu

Mobilní fáze – organické rozpouštědlo, eluce zvyšující se polaritou
(podílem vody a/nebo soli)

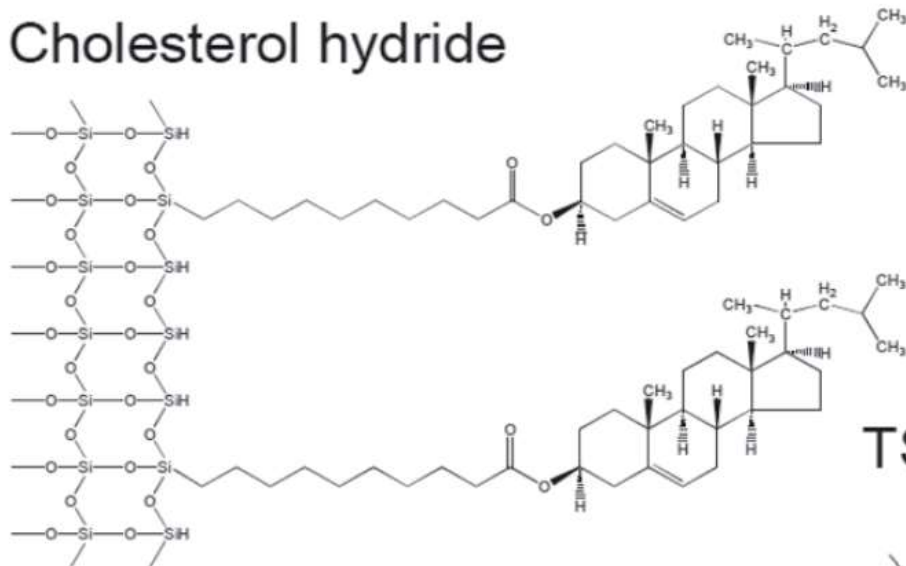
Komplexní proces - Podílí se více typů interakcí a mechanismů separace

Polární interakce OH skupiny na
peptidu s polární skupinou
stacionární fáze



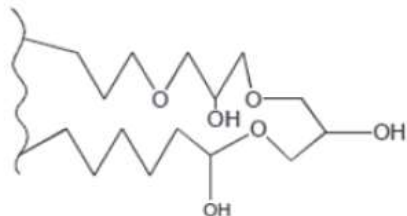
Vhodná pro proteiny i peptidy

Cholesterol hydride

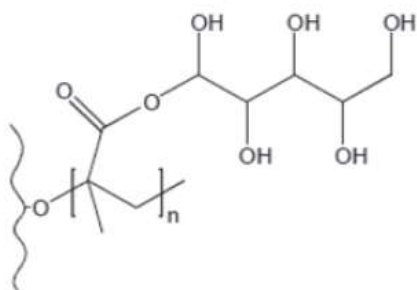


HILIC matrix

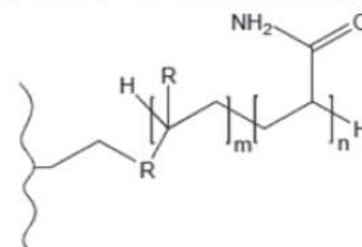
Cross-linked diol



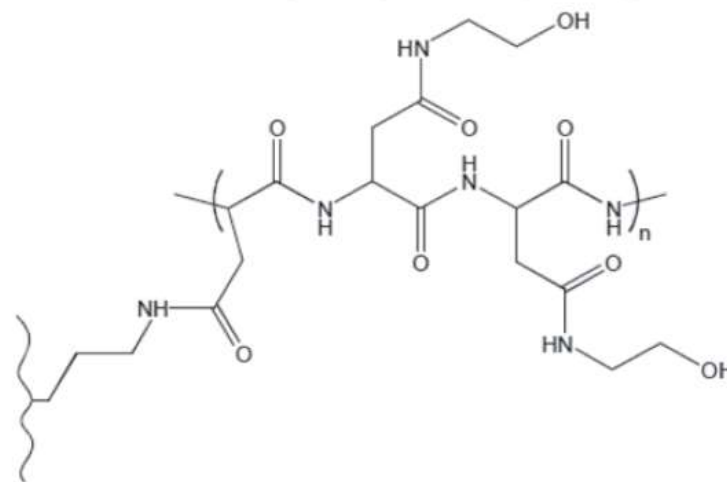
Sorbitol methacrylate-silica



TSK-Gel Amide-80



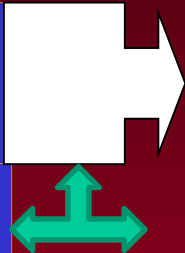
Silica - Poly Hydroxyethyl A



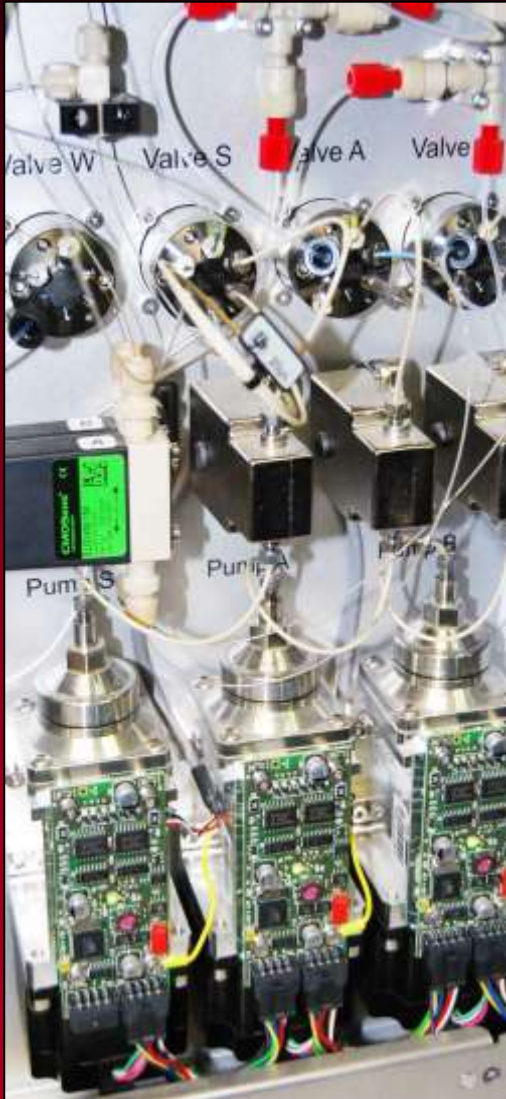
HPLC podle průtoku

Vnitřní průměr
kolony

Průtok

Nano HPLC	20-100 μm	20-10000 nL/min		On-line MS
Capillary HPLC	100-100 μm	0.4-200 $\mu\text{L}/\text{min}$		
Micro HPLC	1.0-2.1 mm	50-1000 $\mu\text{L}/\text{min}$		
Normal HPLC	4.0-5.0 mm	1.0 -10.0 mL/min		

HPLC

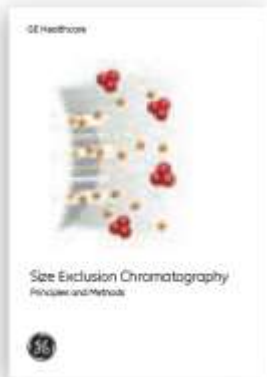


Macrotrap



Zip-Tips

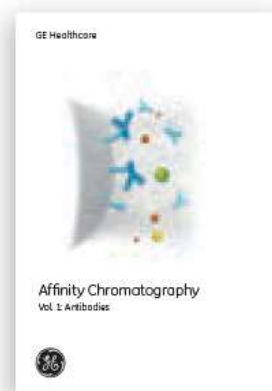




Size Exclusion Chromatography

Principles and Methods

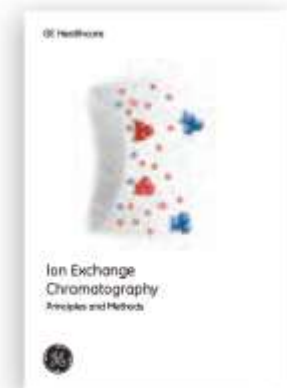
18102218



Affinity Chromatography

Vol. 1: Antibodies

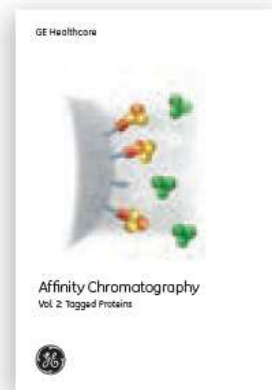
18103746



Ion Exchange Chromatography

Principles and Methods

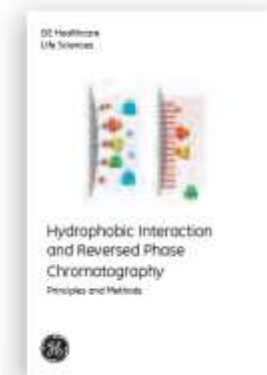
11000421



Affinity Chromatography

Vol. 2: Tagged Proteins

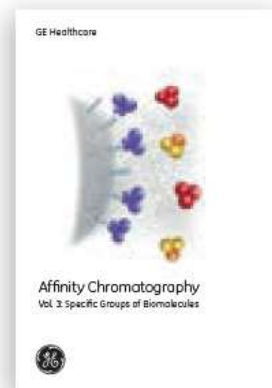
18114275



Hydrophobic Interaction and Reversed Phase Chromatography

Principles and Methods

11001269



Affinity Chromatography

Vol. 3: Specific Groups of Biomolecules

18102229

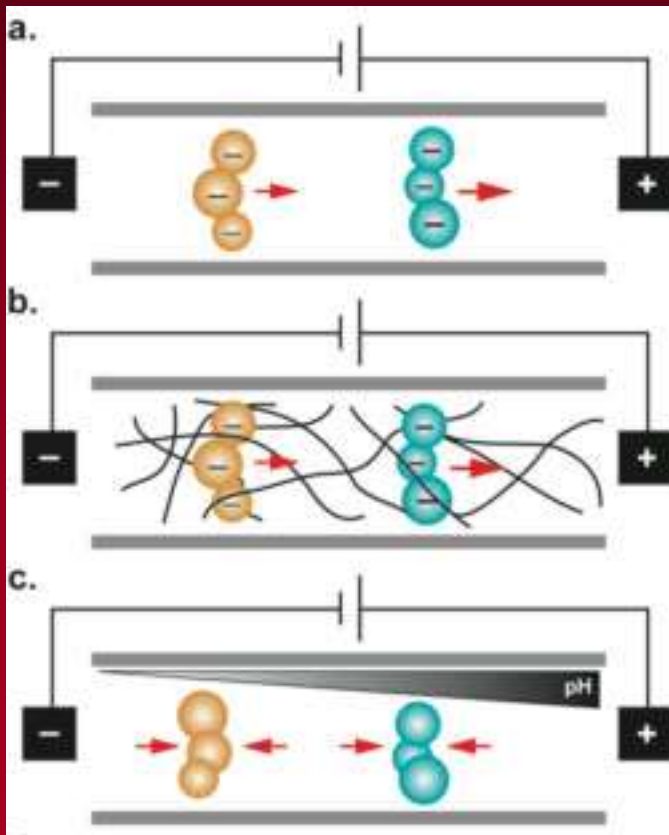
SEPARAČNÍ METODY

- CHROMATOGRRAFIE
 - Gelová filtrace, SEC
 - Iontoměničová chromatografie
 - Afinitní chromatografie
 - Chromatografie v reverzní (obrácené) fázi
 - HILIC (chromatografie hydrofilních interakcí)
- ELEKTROFORÉZY, 2-DE

Elektroforéza

Specifická mobilita $u = \frac{z}{6\pi\eta r}$

z - náboj
 η viskozita
 r Stokesův poloměr částice



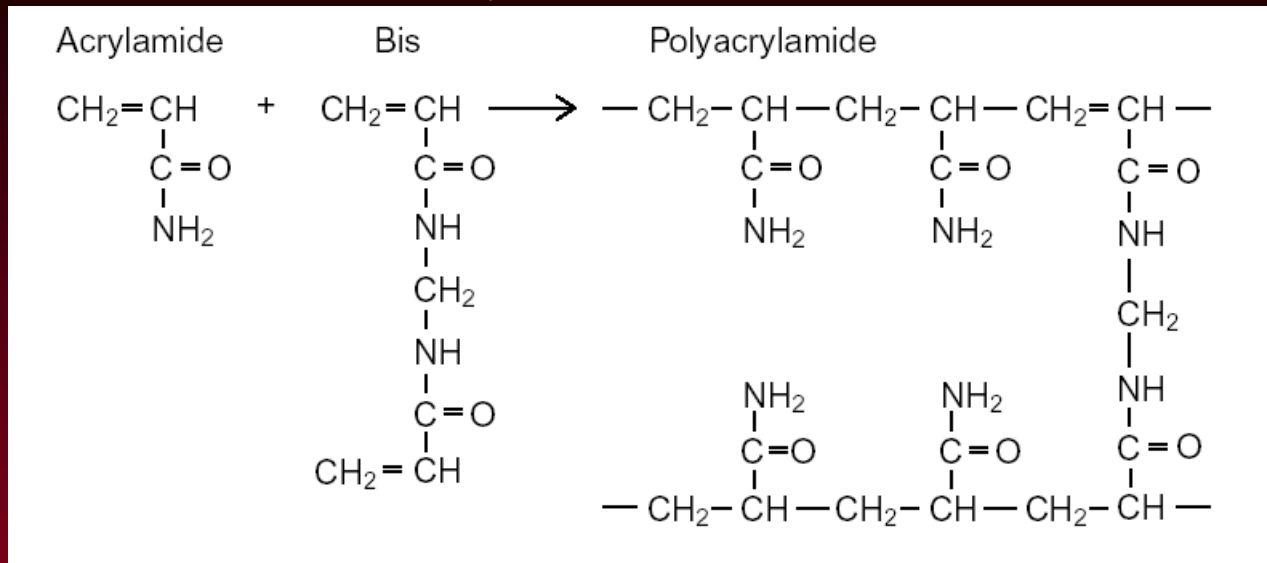
Elektroforéza v roztoku

Elektroforéza v gelu

Izoelektrická fokusace

POLYAKRYLAMIDOVÉ GELY

1959 *Raymond and Weintraub*



Složení a příprava gelu:

- **akrylamid** (monomerní) **NEUROTOXIN !**
- **bis-akrylamid** (zesíťování polymeru) **NEUROTOXIN !**
- **APS** (peroxodisíran amonný, katalyzátor, produkuje volné radikály),
- **TEMED** (tetramethylethylendiamin, stabilizuje volné radikály)
- **pufř a SDS**

Celková koncentrace akrylamidu a bis-akrylamidu určuje **KONCENTRACI (T)** gelu v procentech (2-20 %)
Poměr bis-akrylamidu a akrylamidu **POROZITU (C)** gelu.

Lämmli gels tris-glycine

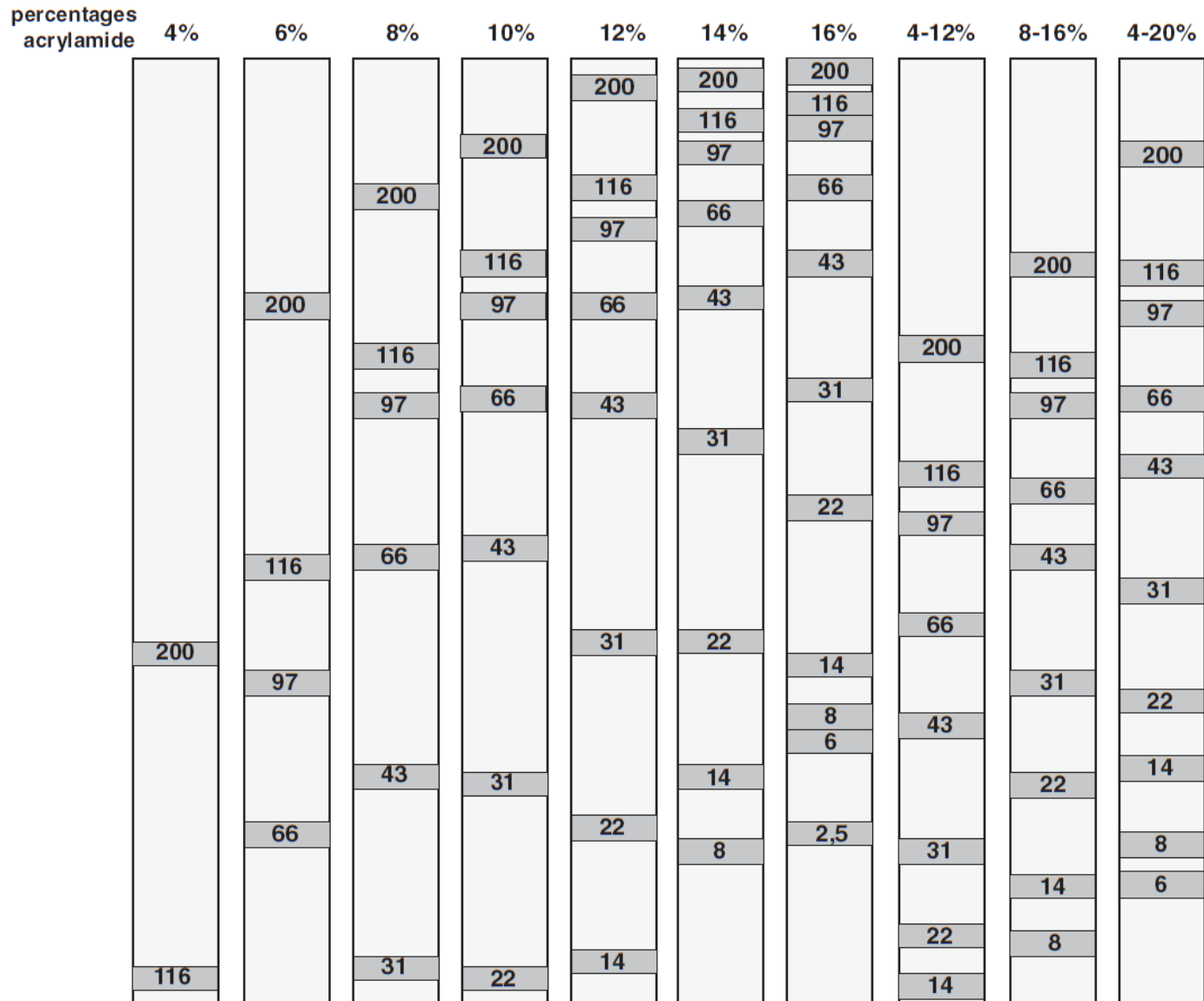
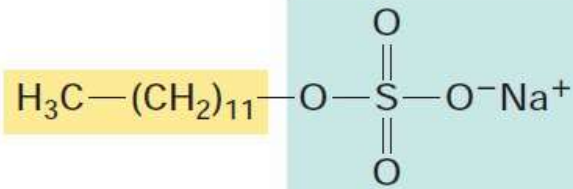


Figure 1.2. Run speed of MW markers in SDS gels.

SDS ELEKTROFORÉZA

SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)

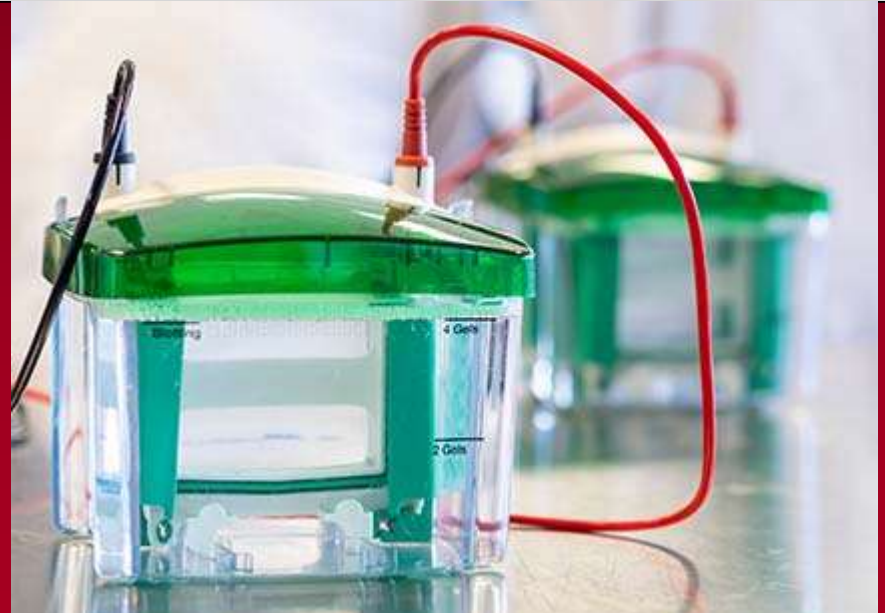
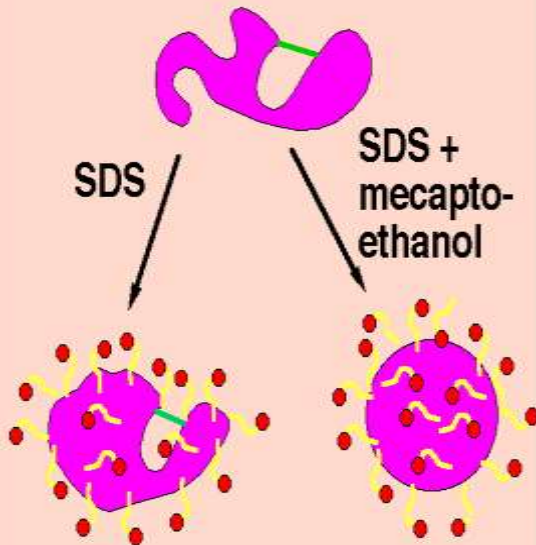


- Bílkoviny se rozdělují na základě jejich MW

- Záporně nabitě SDS tvoří komplexy s bílkovinami a stíní náboje proteinu (1,4g SDS :1g proteinu)

- Komplex má jednotkový náboj na hmotnostní jednotku.

- Všechny komplexy jsou záporně nabitě a migrují k anodě



Dvojrozměrná elektroforéza, 2-DE

(proteomika 1990-2010)

1975

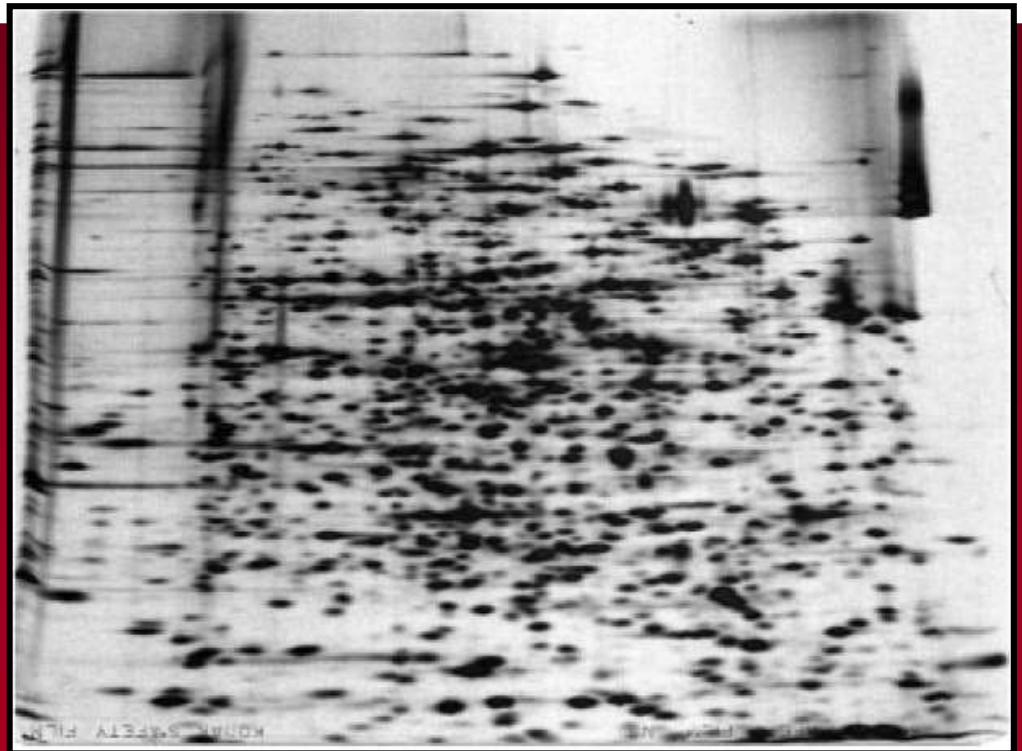
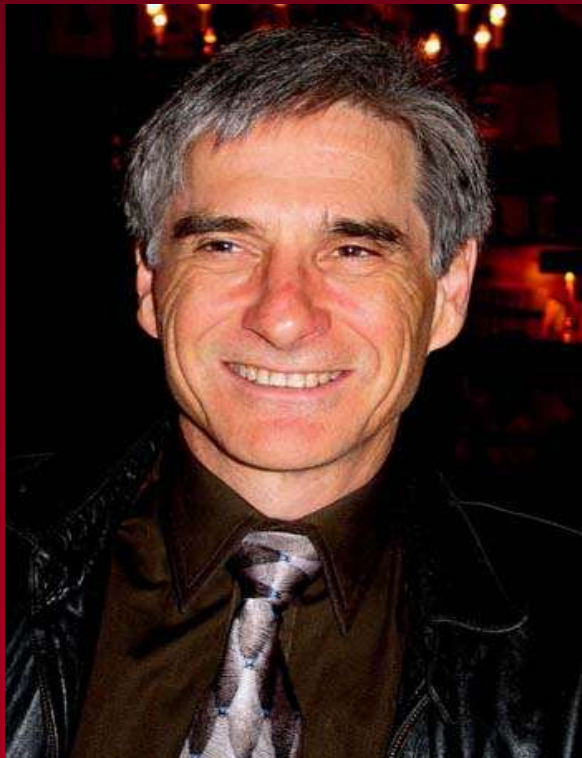
High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins*

(Received for publication, September 5, 1974)

PATRICK H. O'FARRELL†

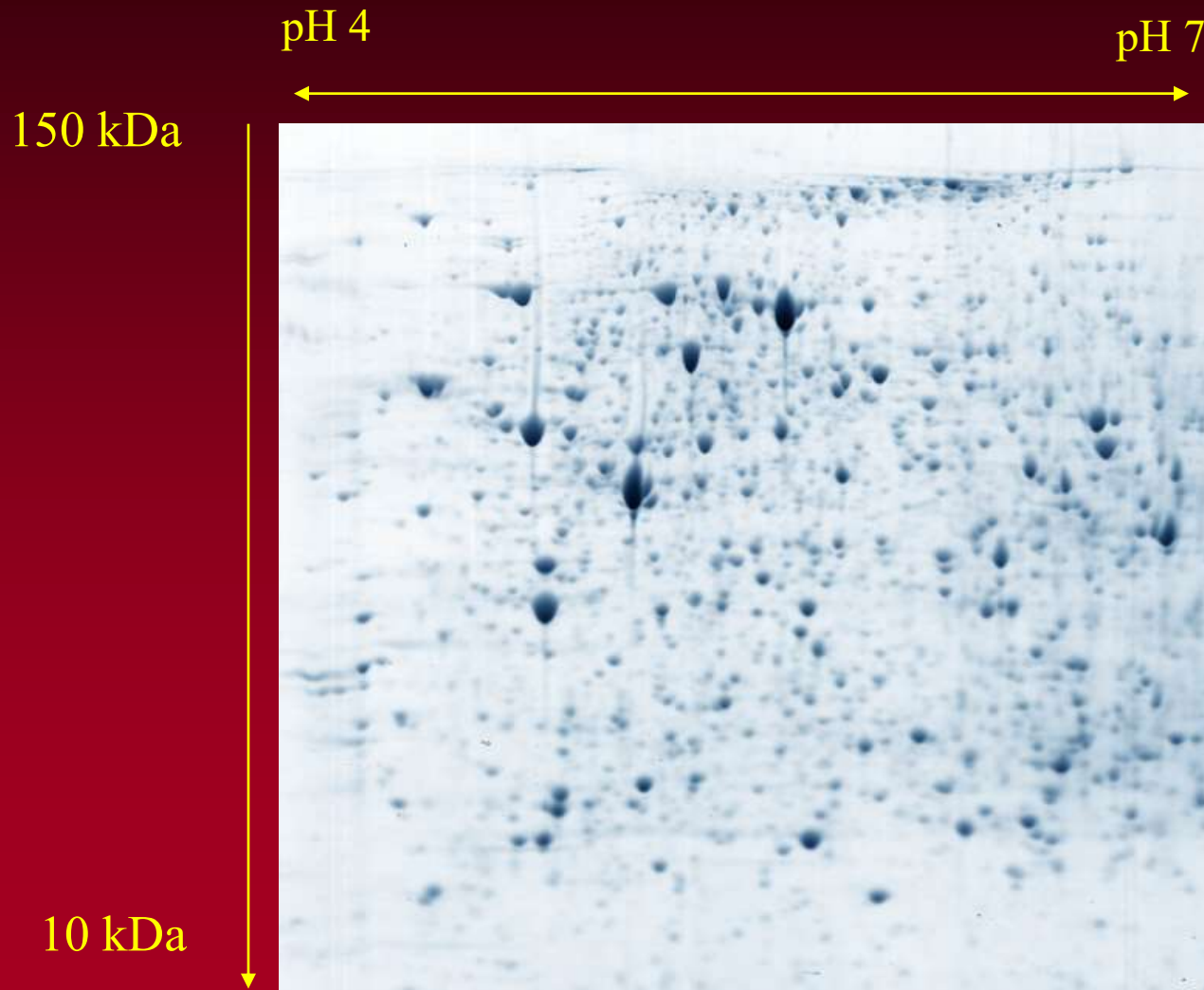
*From the Department of Molecular, Cellular and Developmental Biology, University of Colorado, Boulder,
Colorado 80302*

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
Vol. 250, No. 10, Issue of May 25, pp. 4007-4021, 1975
Printed in U.S.A.



DVOJROZMĚRNÁ ELEKTROFORÉZA (2-DE)

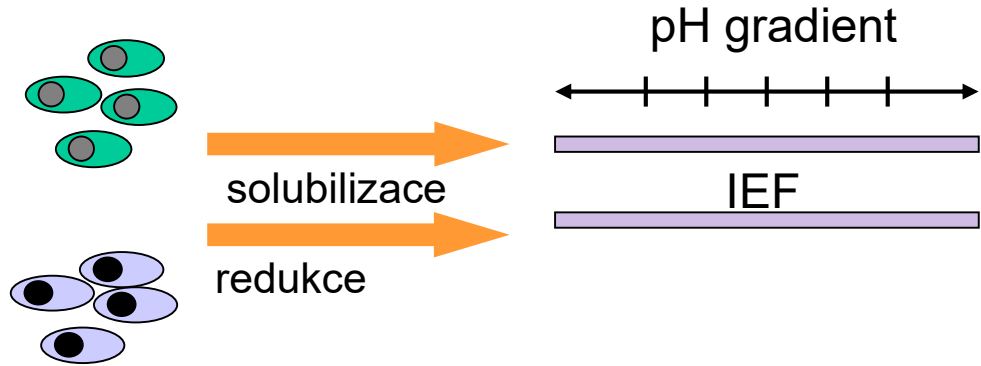
Rozděluje proteiny nejdříve podle jejich **náboje** a následně kolmo na směr původní migrace dle jejich **MW**



Jaterní homogenát,

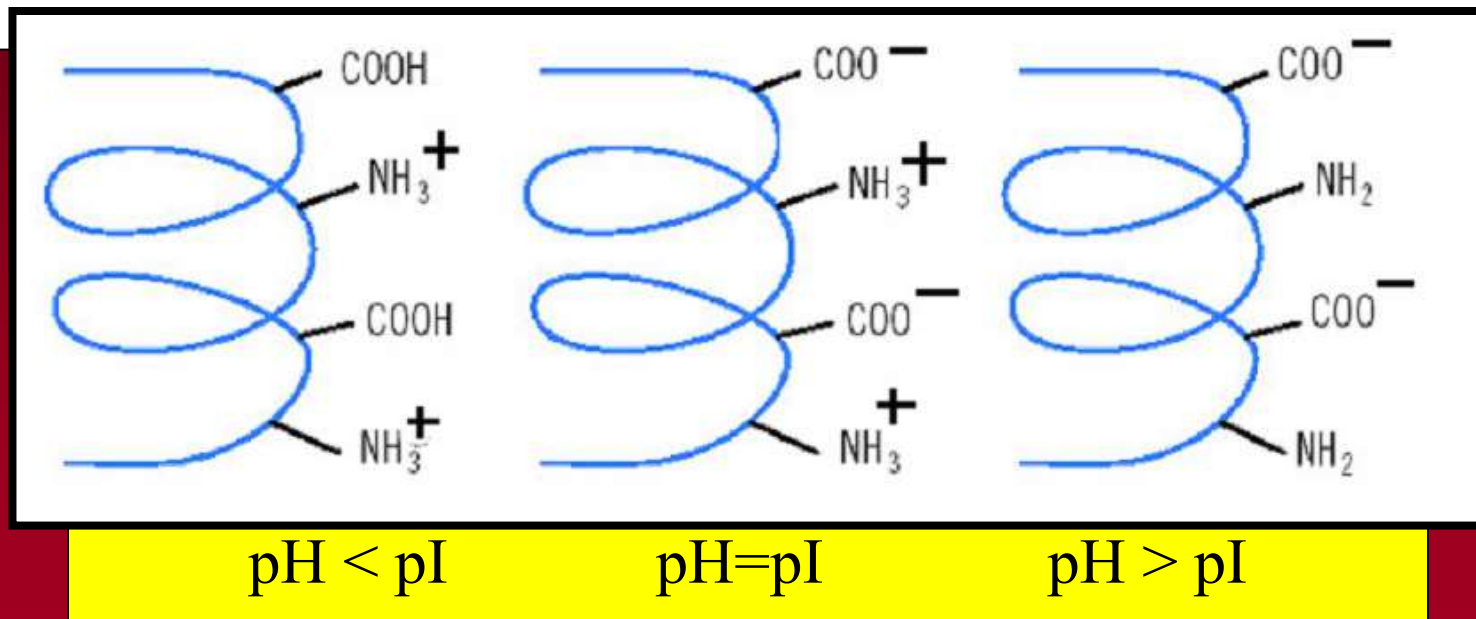
**1025 proteinových
skvrn**

Typický 2-DE experiment (cca 1990-2010)



Izoelektrická fokusace - pohyb nabité částice v gradientu pH

- Celkový náboj proteinu (net charge) je součtem všech jeho negativních i pozitivních nábojů.
- Kyselé a zásadité skupiny polypeptidu jsou protonovány a deprotonovány v závislosti na pH prostředí.
- Bílkovina/peptid v elektrickém poli v gradientu pH migruje do bodu, kde je její/jeho celkový náboj rovný nule.
- pH tohoto bodu odpovídá izoelektrickému bodu (pI) dané bílkoviny/peptidu.

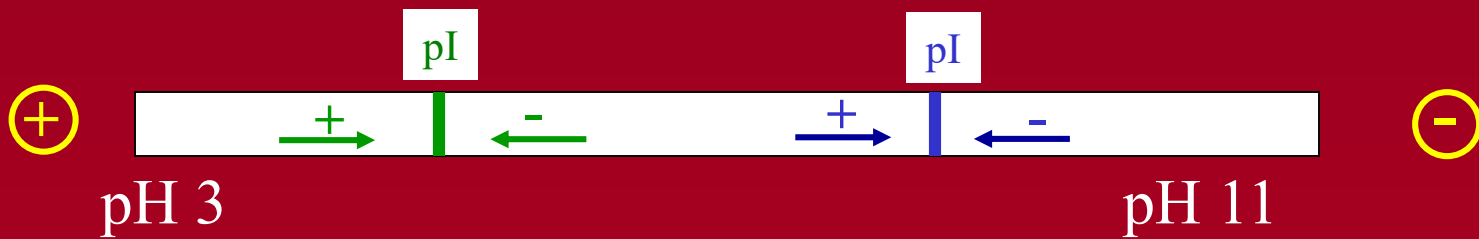
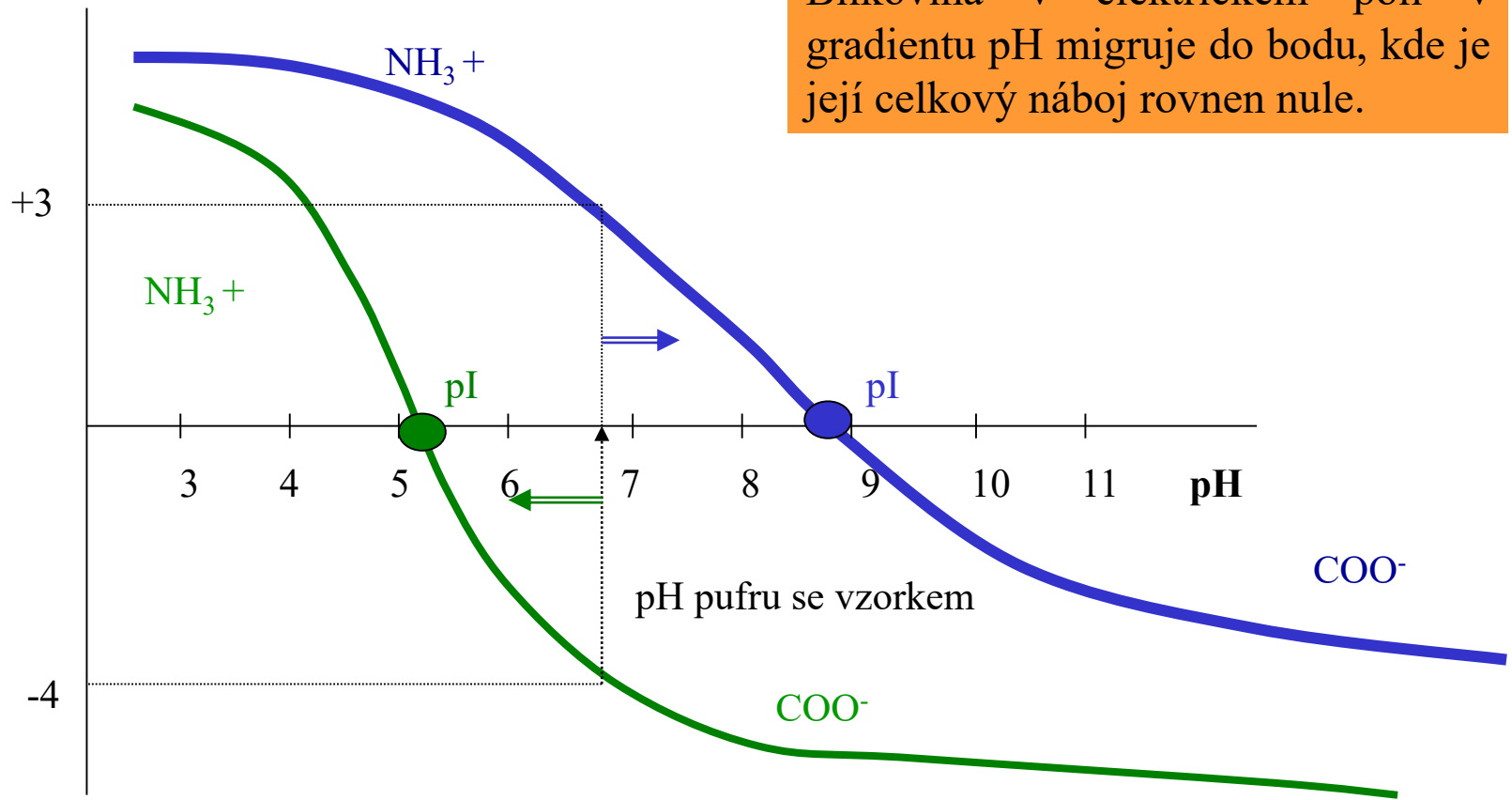


migruje k -

migruje k +

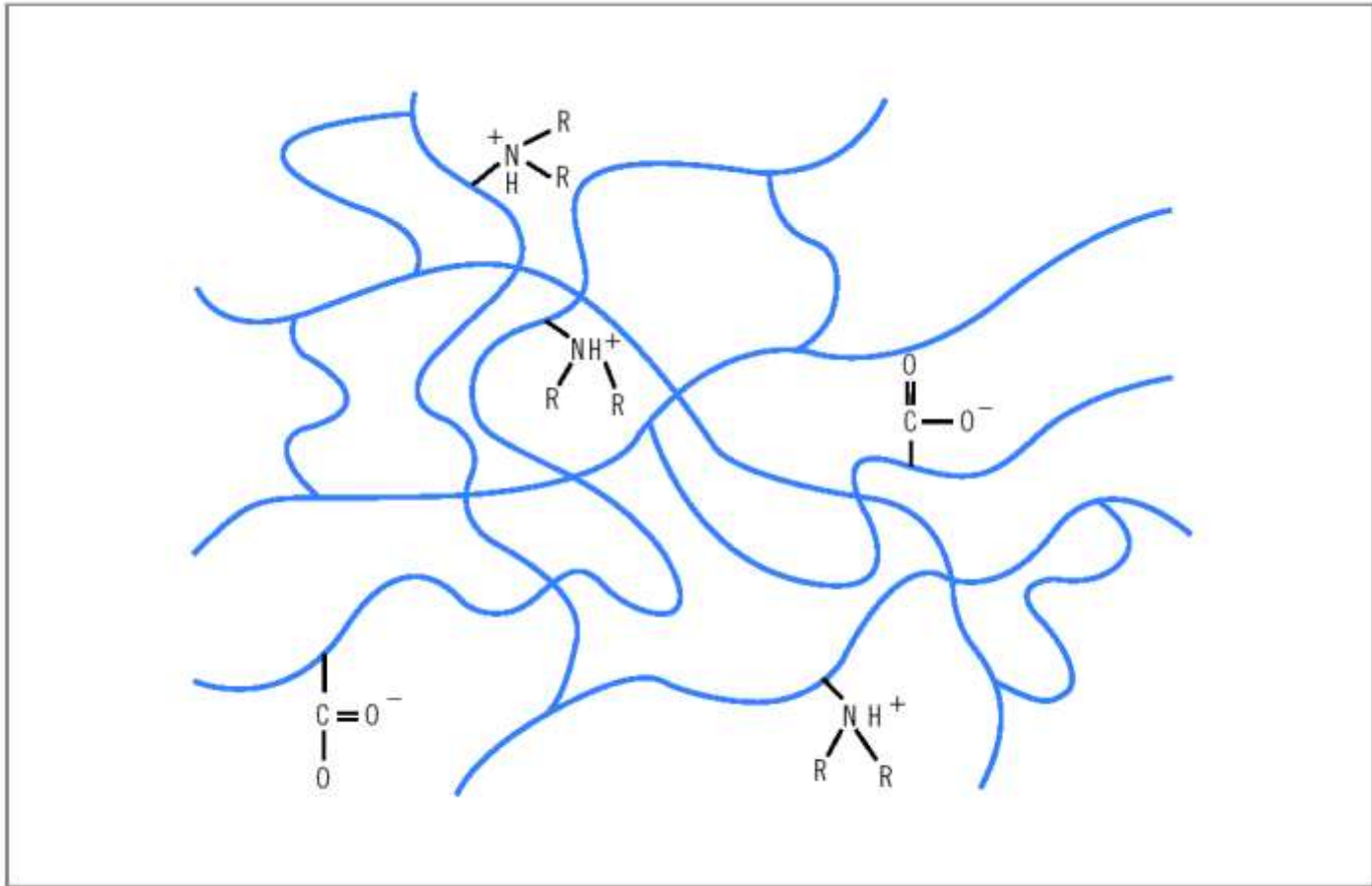
TEORETICKÁ DISOCIAČNÍ KŘIVKA DVOU BÍLKOVIN

Net charge



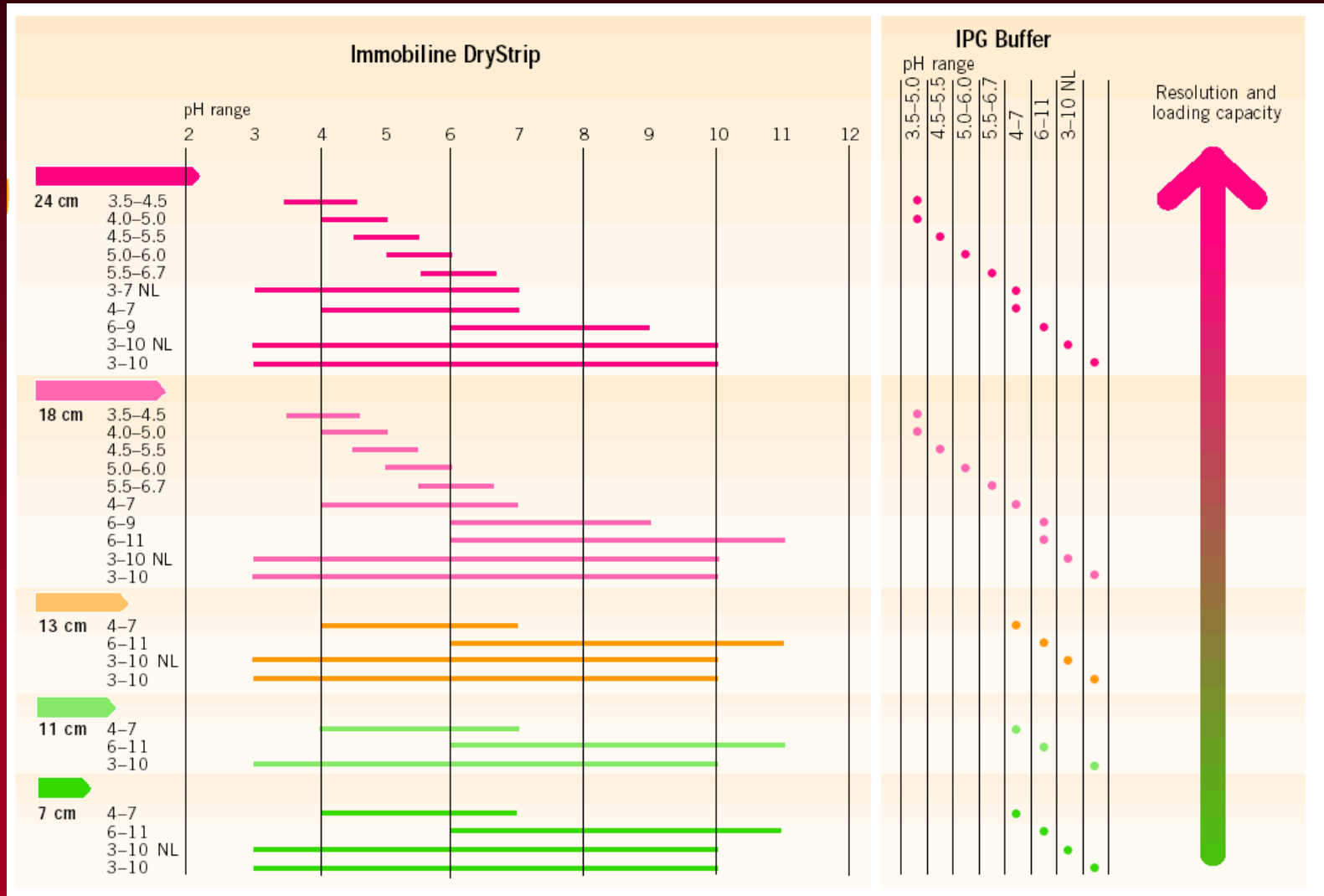
ZAKOTVENÉ PH GRADIENTY (IMMOBILIZED pH GRADIENTS – IPG)

Derivovaný akrylamid s disociovatelnými karboxy- a aminoskupinami



IPG STRIPY (IPG STRIPS)

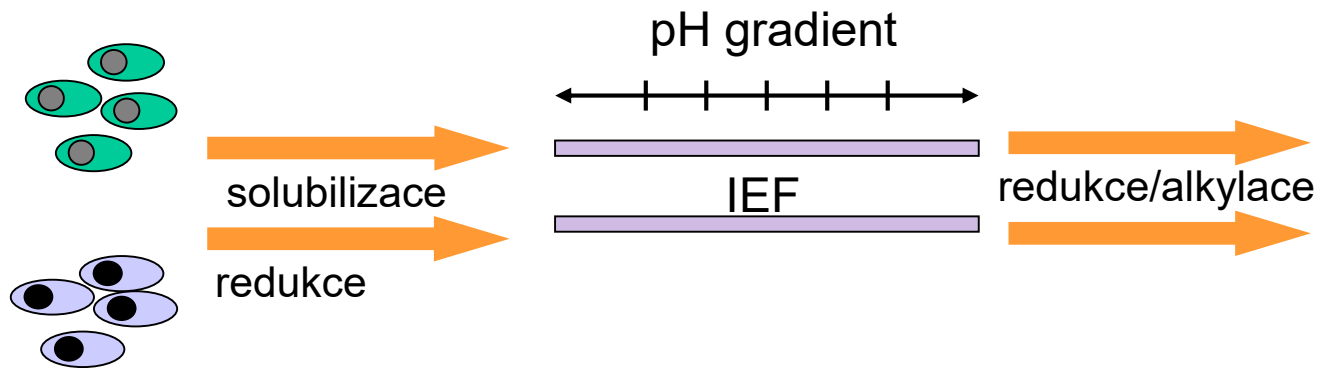
3 mm široké, 0.5 mm silné, dehydrované - trvanlivost, reproducibilita, plastova podložka, stabilita, nemigrují, neinterferují s nimi redukční činidla.



INSTRUMENTACE IEF

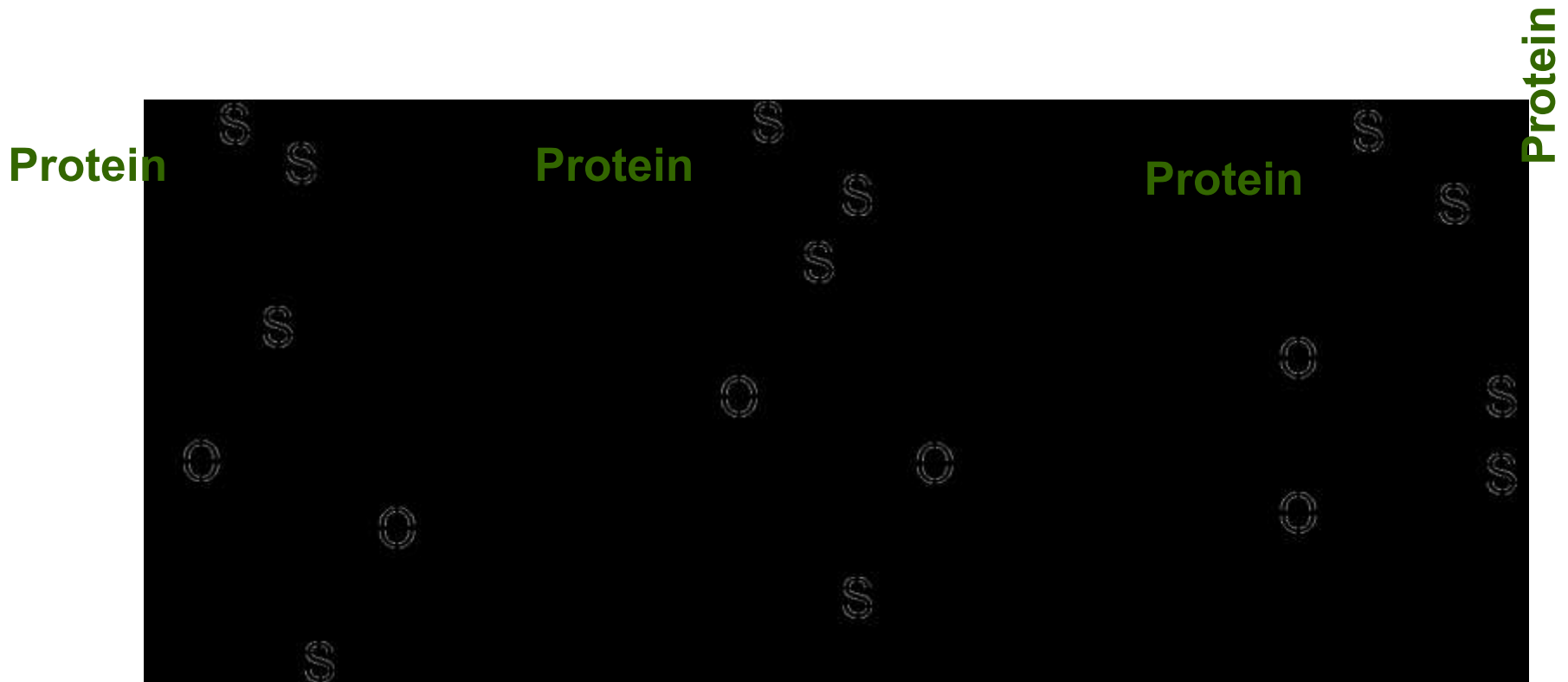


Typický 2-DE experiment (cca 1990-2010)



Redukce disulfidických vazeb

Thiol-disulfidová výměna DTT s proteinem



Alkylace cysteinů iodacetamidem



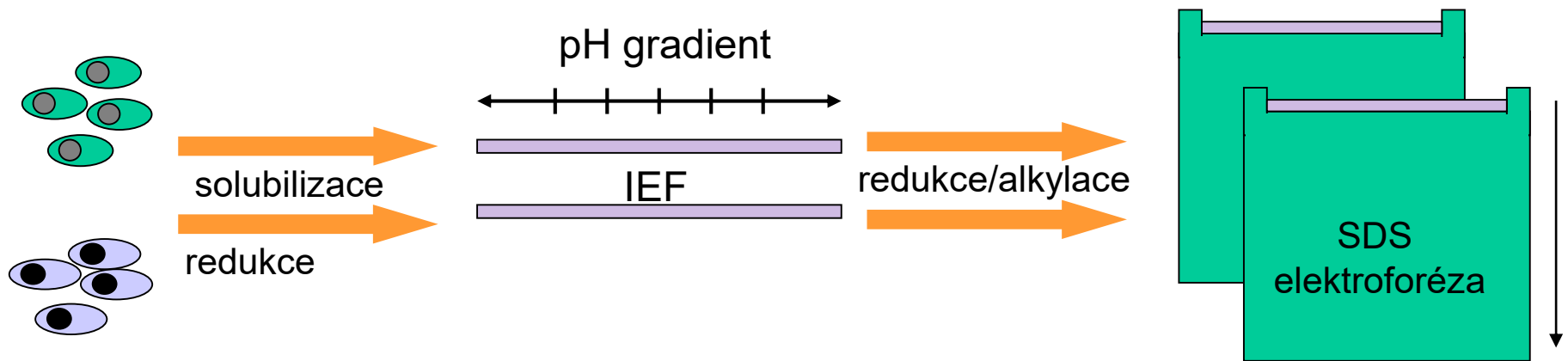
The diagram shows a horizontal black bar representing a protein chain. On the left side, the word "Protein" is written in green, with a white rectangular highlight behind it. On the right side, the word "Protein" is also written in green, with a white rectangular highlight behind it. A red rectangular box is drawn around a portion of the black bar, located towards the right side of the diagram.

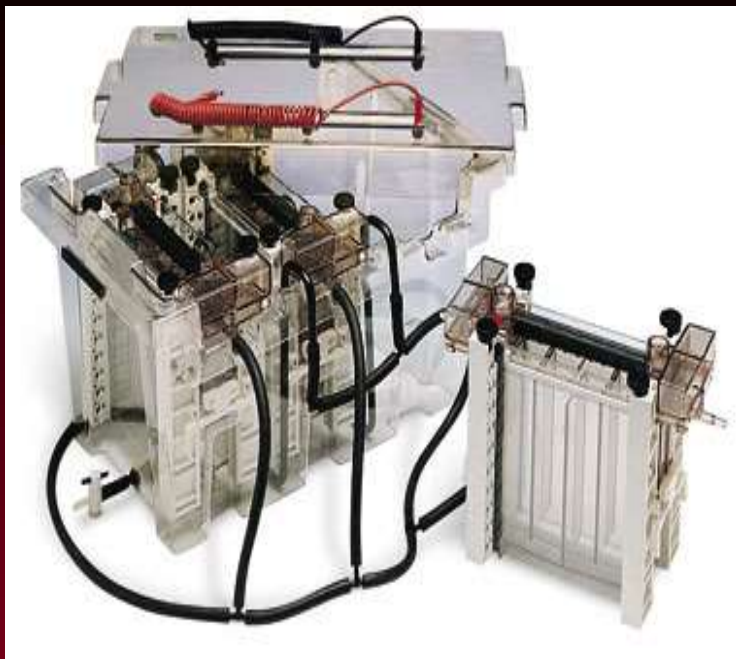
Protein

iodacetamid

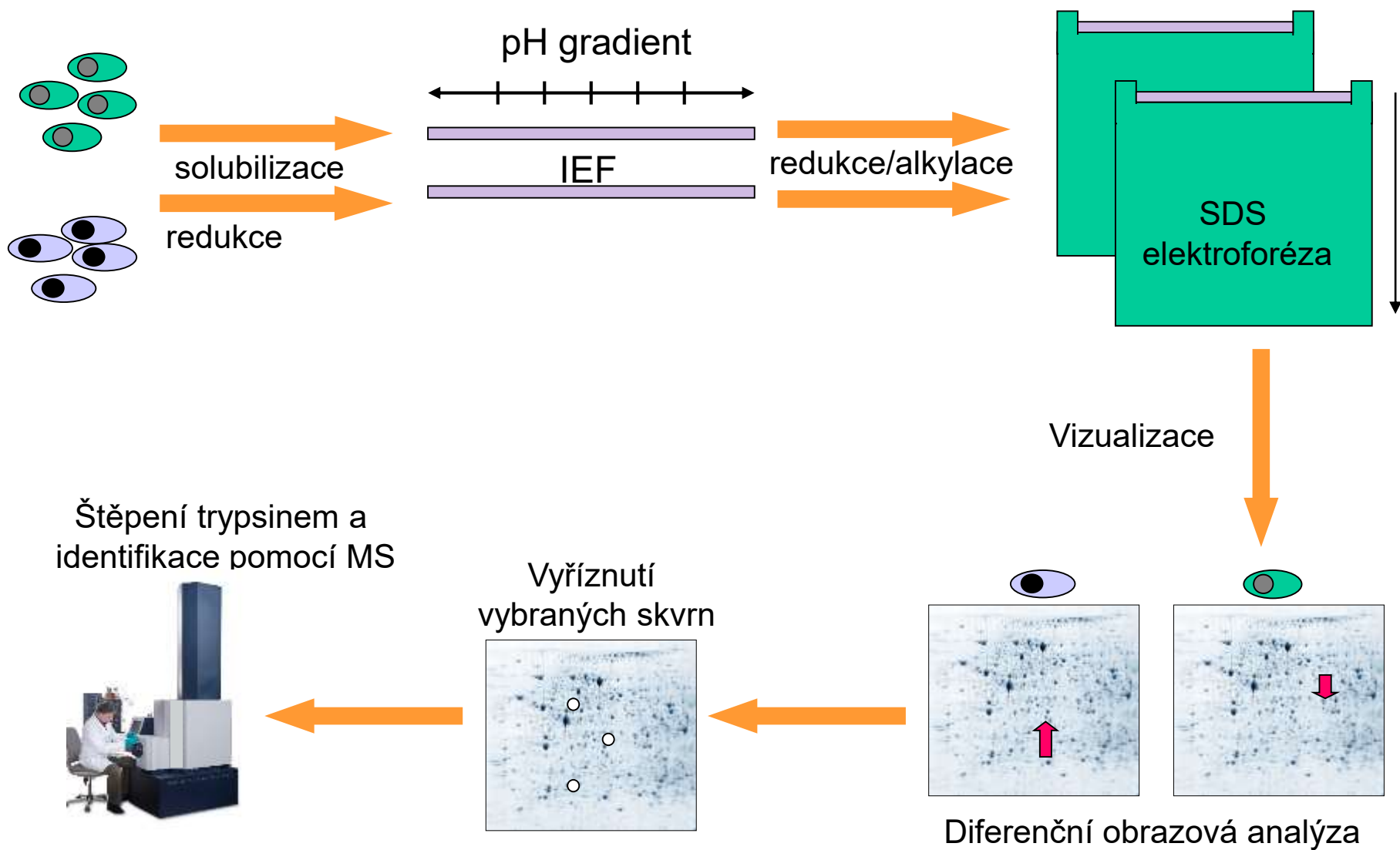
Karbamidometyl

Typický 2-DE experiment





Typický 2-DE experiment



DETEKCE a VIZUALIZACE BÍLKOVIN V GELECH

- Citlivost
- Možnost kvantifikace
- Linearita signálu
- Dynamický rozsah
- Kompatibilita s MS
- Cena

Kolorimetrické „viditelné“ barvení

- CBB
- Stříbro

Fluorescenční barvení A DIGE

- Sypro
- Deep Purple
- Flamingo
- Krypton

- DIGE

DETEKCE BÍLKOVIN VIDITELNÝMI PIGMENTY

- COOMASSIE BLUE G250/ R250

! Různá účinnost na různé proteiny !
Barví: Lys, Arg, His, Tyr (Trp, Leu)

COOMASSIE BRILIANT BLUE

R 250

**KLASICKÁ CBB
(CBB-R250)**

Citlivost 50-100 ng

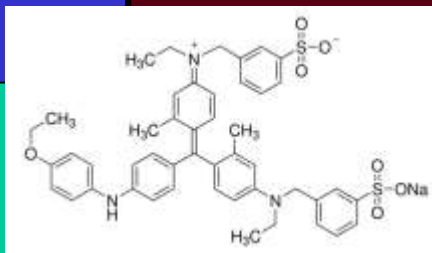
Alkohol-kyselina
Odbarvování proteinů
Špatná kvantifikace
Nízká cena

G 250

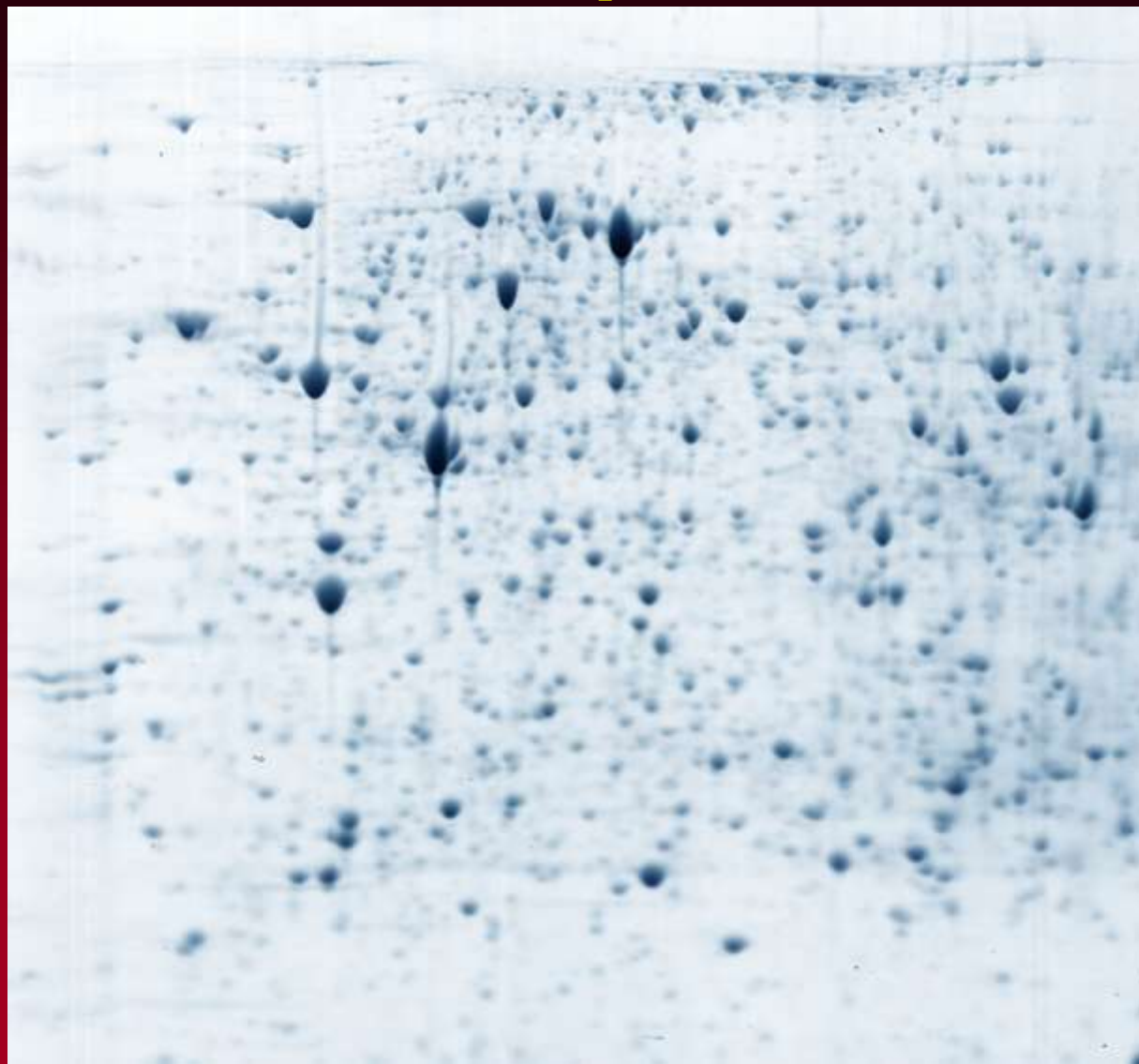
**KOLOIDNÍ CBB
(CBB-G250)**

Citlivost 10-30 ng

Alkohol - kyselina – síran amonný
„Steady state“ (bez ztráty při odbarvení)
Dobrá kvantifikace



**Jaterní homogenát, preparativní nanáška 2 mg, barvení koloidní Coomassie Blue
1025 spotů**



← pH 4 pH 7 →

DETEKCE BÍLKOVIN VIDITELNÝMI PIGMENTY

• DETEKCE STŘÍBŘENÍM

Redukce dusičnanu stříbrného na kovové stříbro,

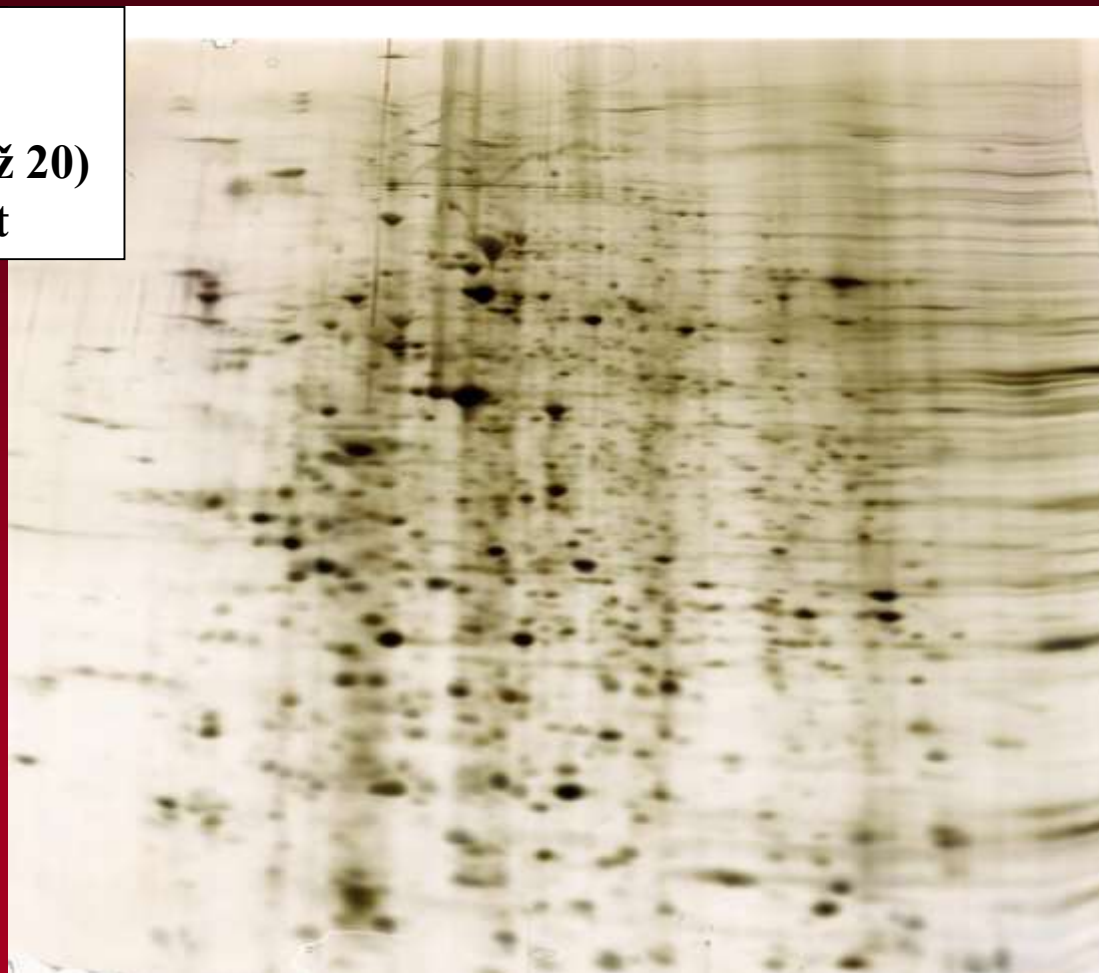
barví : Lys, Arg, His, Tyr, Trp

Citlivost 0.5 ng !

nízká cena

Vícekový postup (až 20)

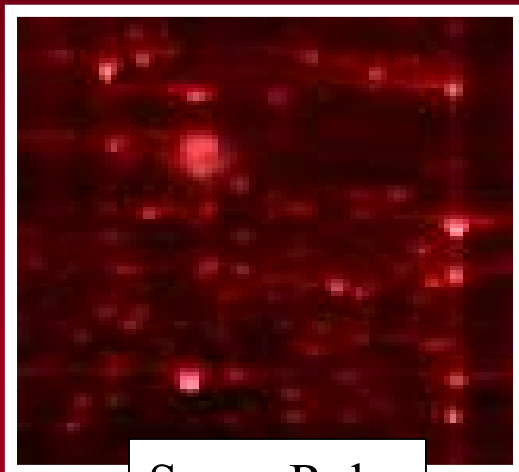
Citlivý na přesnost



FLUORESCENČNÍ DETEKCE

<u>SYPRO Orange (470 nm, 570 nm)</u>	• (4–8 ng/band)
<u>SYPRO Red (550 nm, 630 nm)</u>	• (4–8 ng/band)
<u>SYPRO Ruby (450 nm, 610 nm)</u>	• (1–2 ng/band; comparable to silver staining)
<u>SYPRO Tangerine (490 nm, 640 nm)</u>	• (4–8 ng/band)

Pigmenty se váží na detergentový (SDS) obal proteinu
(kromě Sypro Ruby, ta se váže na bazické AA a Tyr, Trp)



Sypro Ruby

SYPRO RUBY (Molecular Probes)

FLAMINGO (BIO-RAD)

(DEEP) LAVA PURPLE (GE-Amersham)

KRYPTON (Pierce)

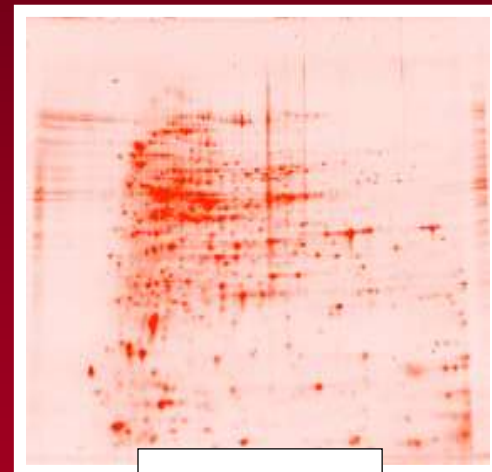
Dobrá kvantifikace

Minimum kroků

Dynamický rozsah

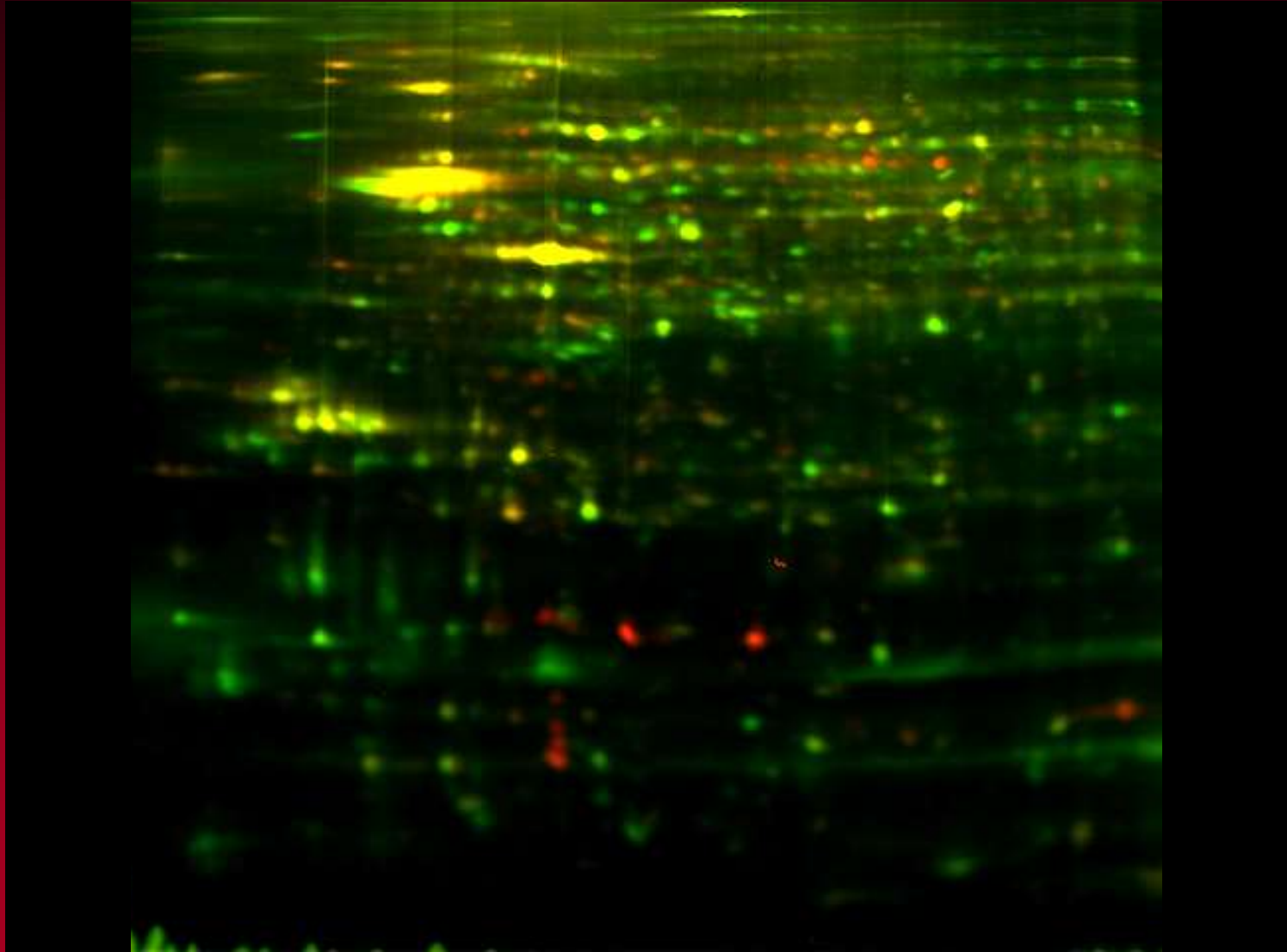
Fluorescenční scanner

CCD kamera



Flamingo

DIGE - Differential gel electrophoresis

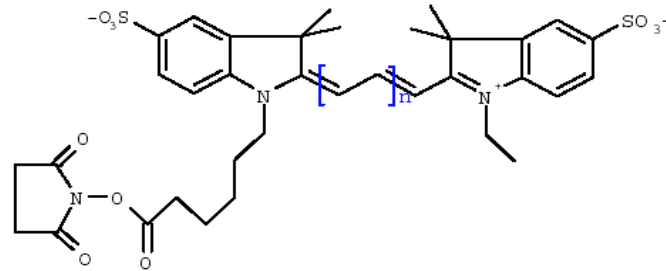


2D-DIGE : 2D DIFFERENČNÍ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA

(Cy2, Cy3, Cy5 Difference gel electrophoresis)

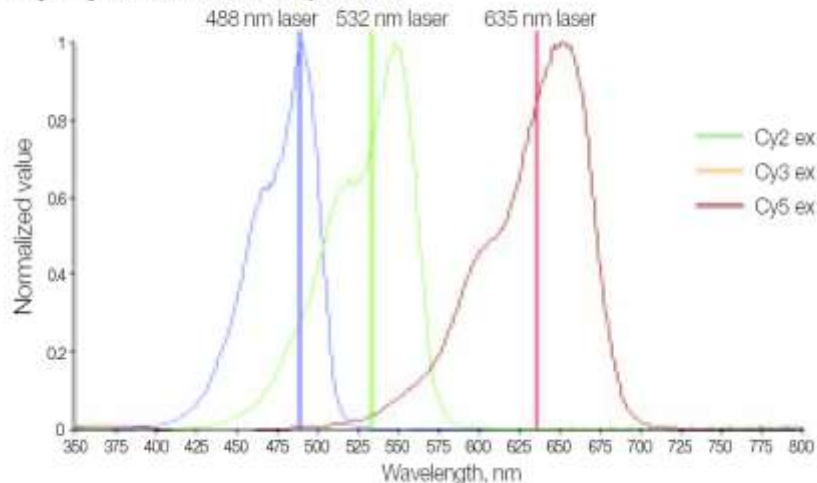


Cyaninové fluorofory

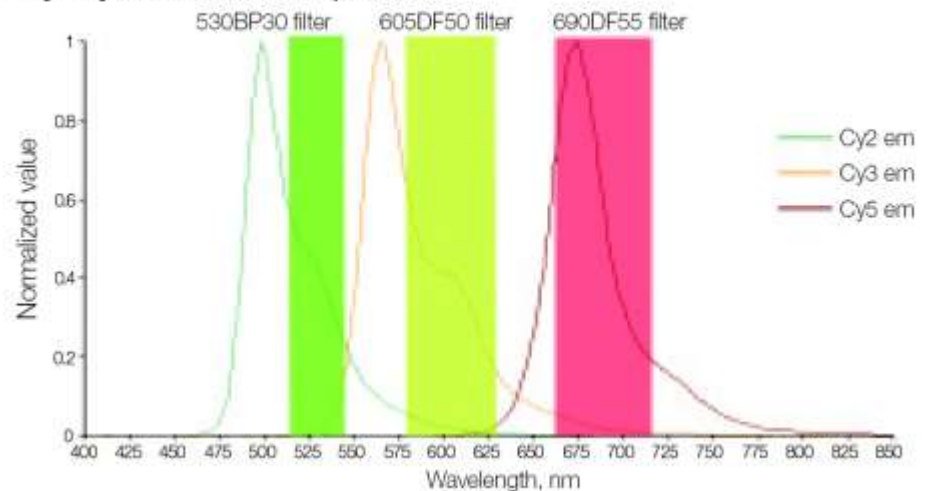


Maleimid - Cys (-SH)
Succinimid - N-term a Lys (ε)

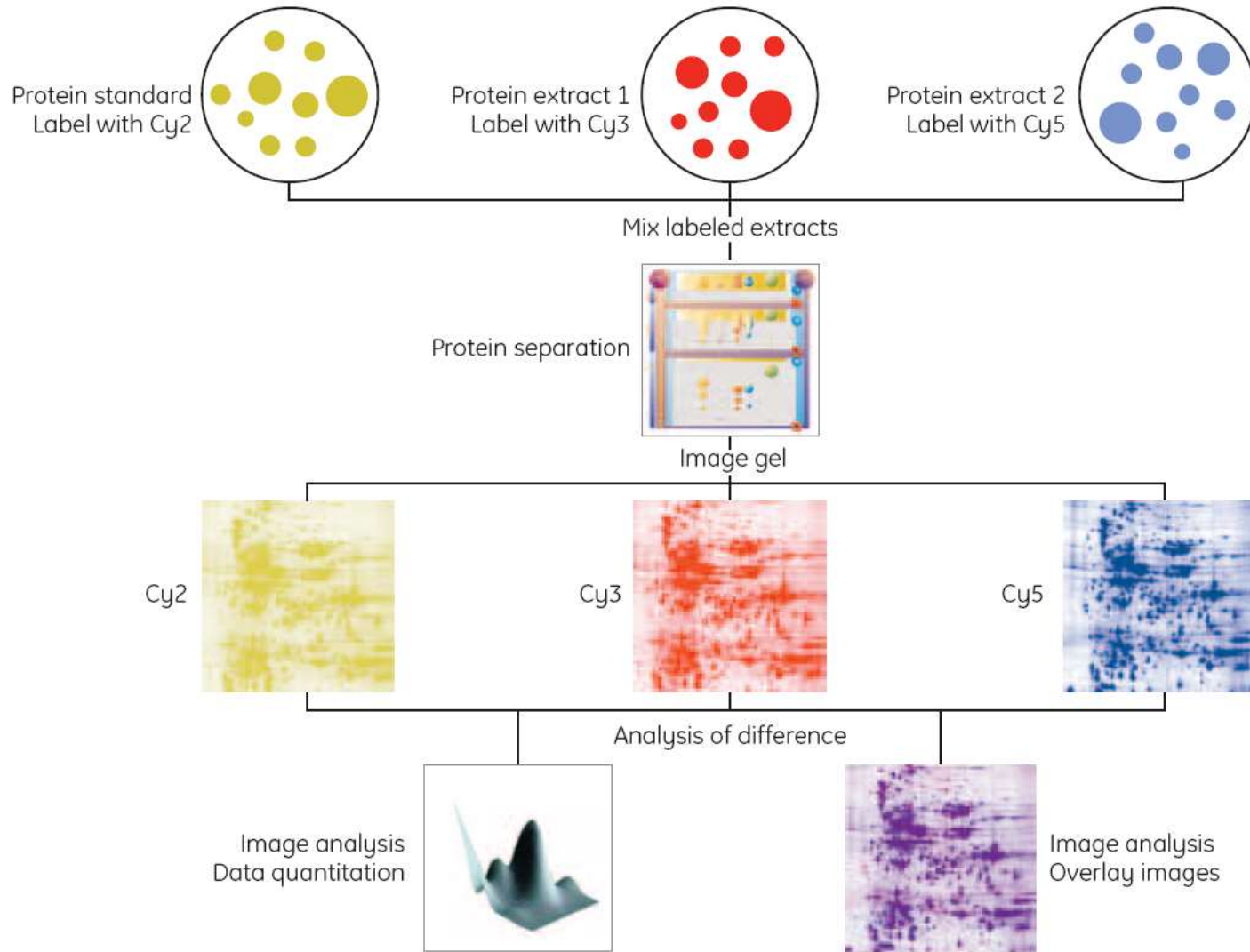
Cy Dye Excitation Spectra



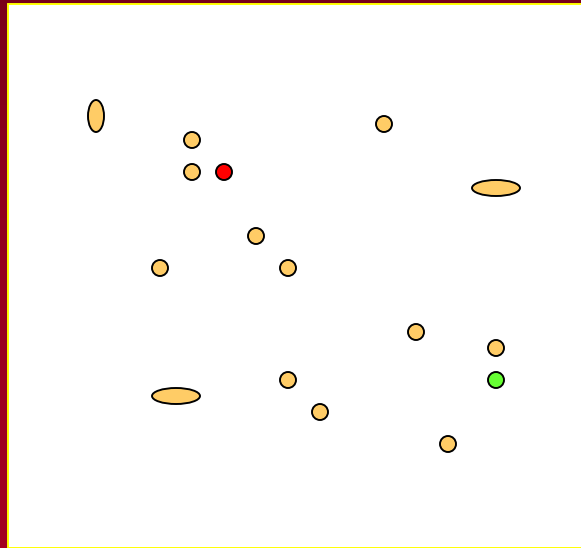
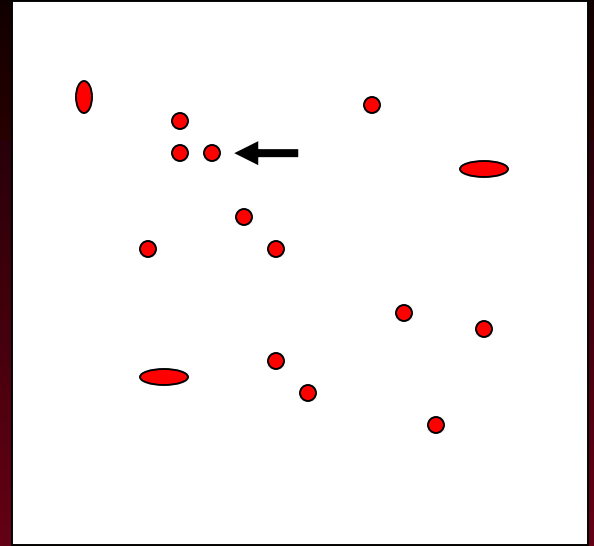
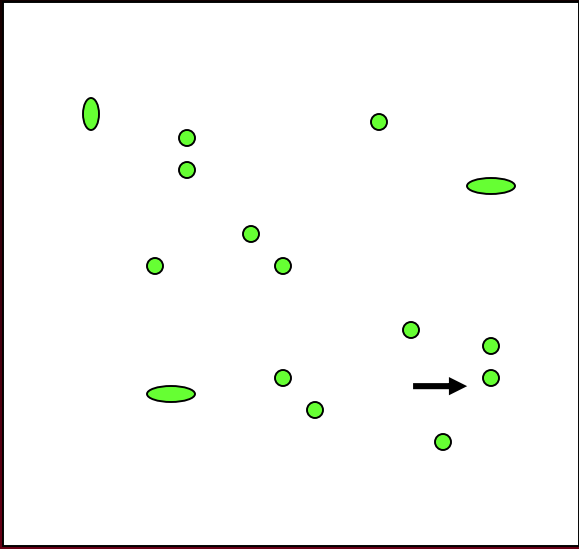
Cy Dye Emission Spectra

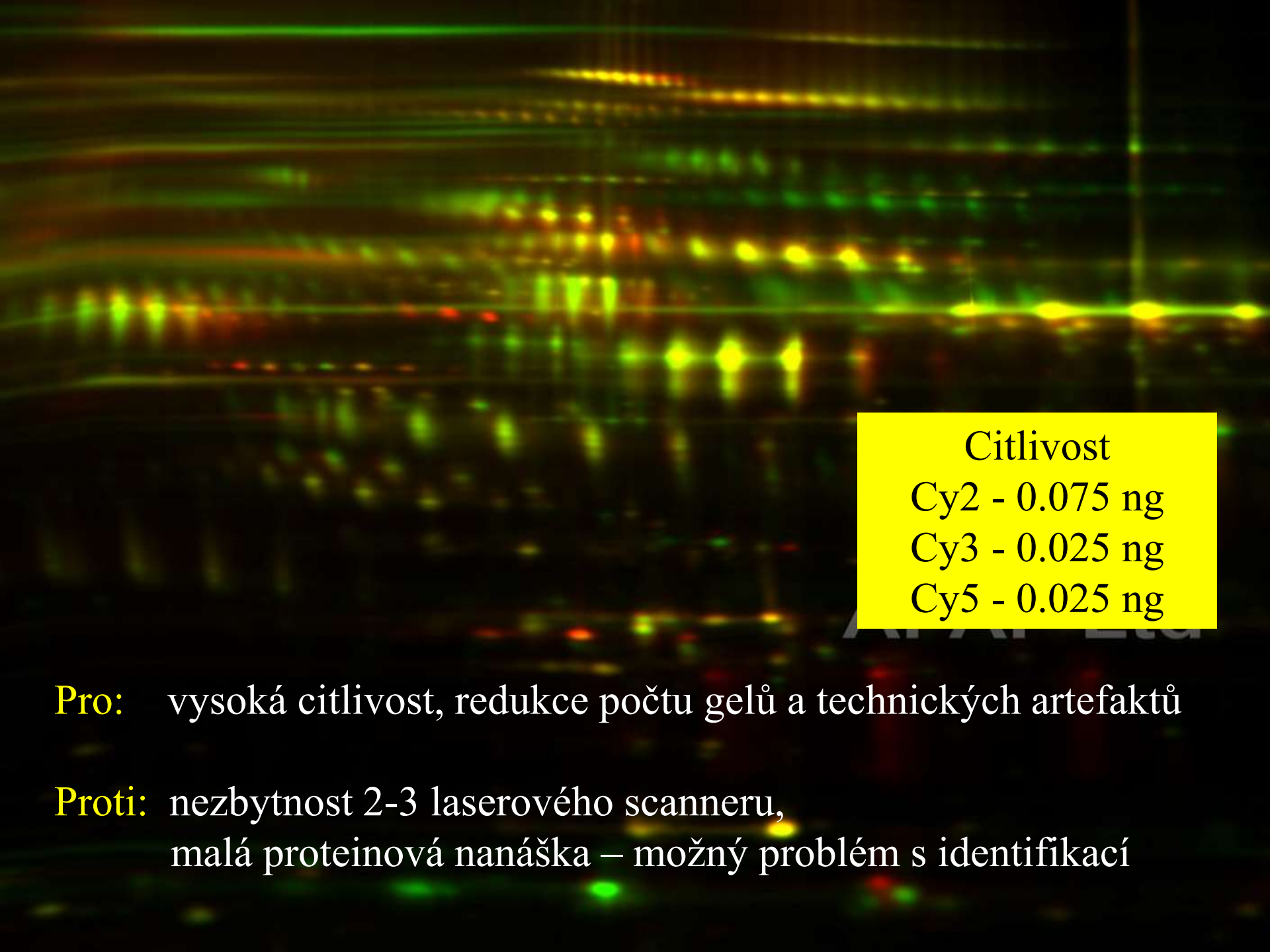


EXPERIMENTÁLNÍ USPOŘÁDÁNÍ PRO DIGE



Minimální versus maximální značení
Rozdíly v migraci, off-set



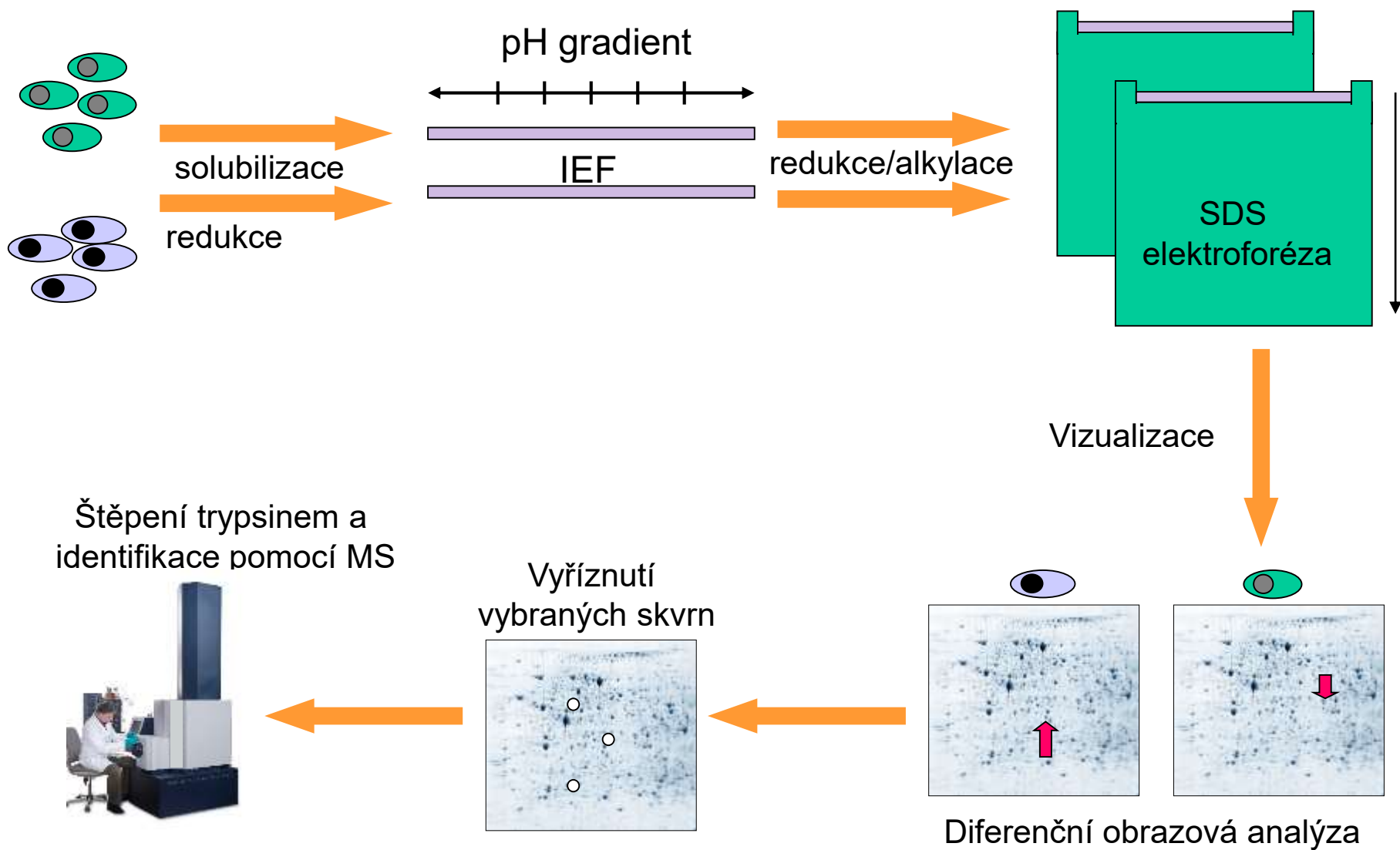


Citlivost
Cy2 - 0.075 ng
Cy3 - 0.025 ng
Cy5 - 0.025 ng

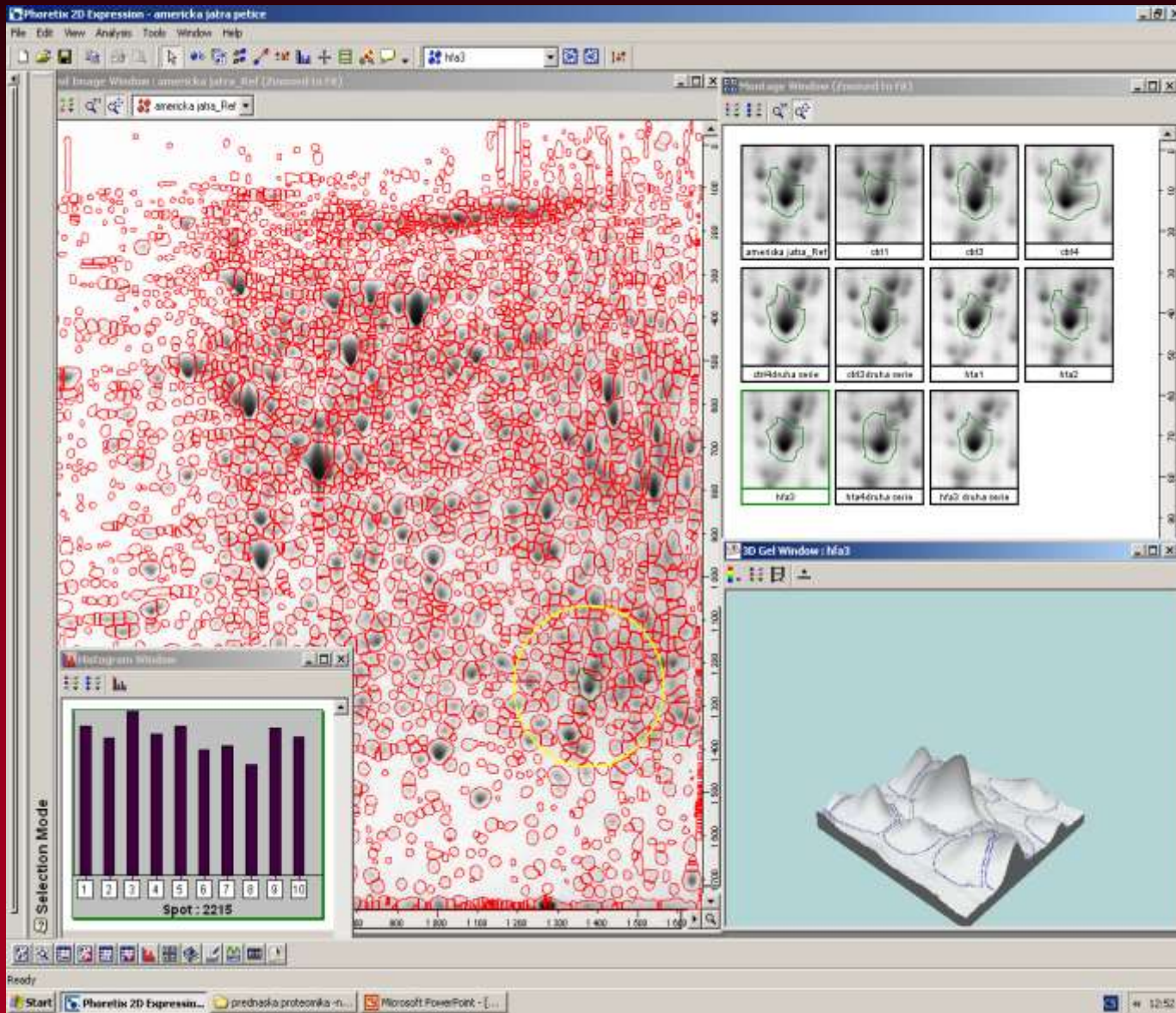
Pro: vysoká citlivost, redukce počtu gelů a technických artefaktů

Proti: nezbytnost 2-3 laserového scanneru,
malá proteinová nanáška – možný problém s identifikací

Typický 2-DE experiment

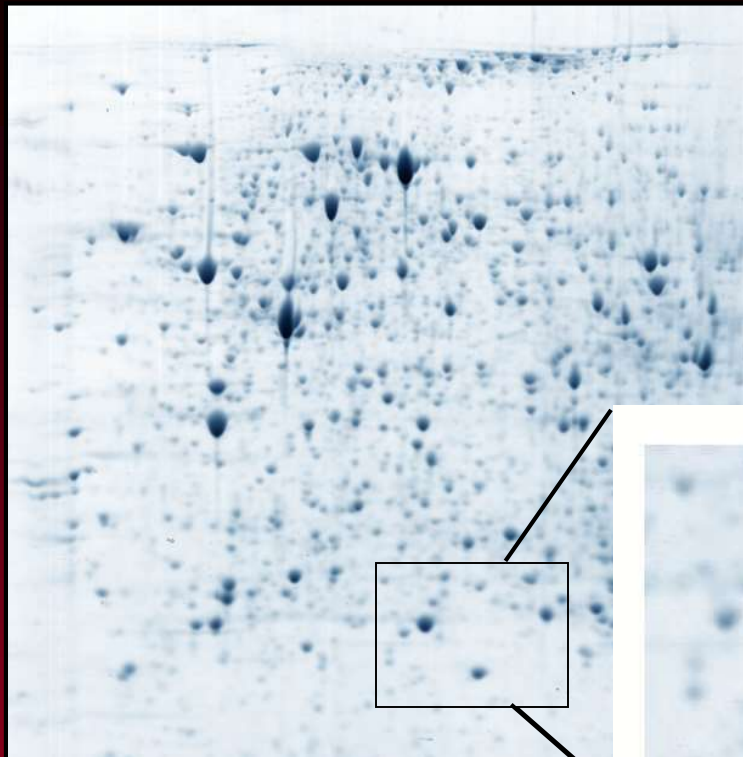


Softwarové vyhodnocení 2D gelů

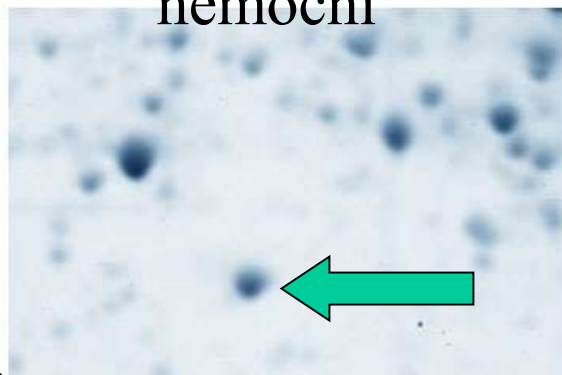


IDENTIFIKACE PROTEINU

- digesce vzorku a extrakce peptidů
- principy identifikace proteinu pomocí MS



nemocní



zdraví

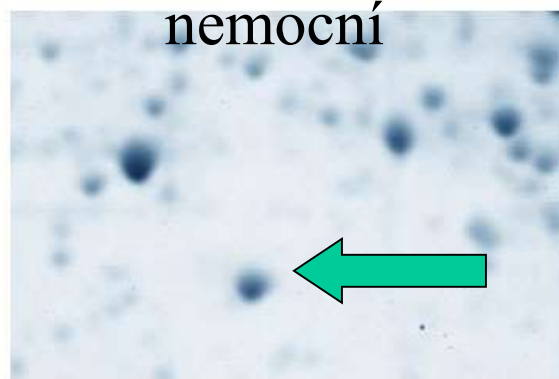
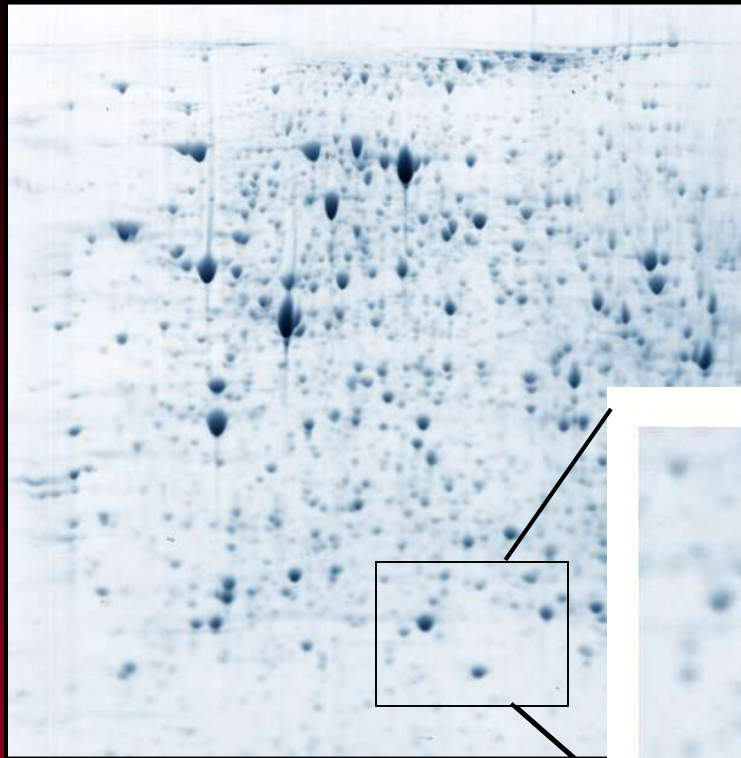


Neznámý diferenciólně exprimovaný protein „XY“ (20 kDa)



Identifikace s využitím hmotnostní spektrometrie

Identifikace diferenciálně exprimovaného proteinu



Neznámý diferenciálně exprimovaný protein „XY“ (20 kDa)

- Extrahovat intaktní protein z gelu je obtížné/nemožné
- Celý protein je nevhodný pro MS analýzu



Naštěpení specifickou endoproteázou přímo v gelu

SPECIFICKÉ ŠTĚPENÍ BÍLKOVIN

Cíl fragmentace:

Definovaně fragmentovat protein, aby jednotlivé peptidy byly dostatečně malé na optimální MS analýzu, ale zároveň poskytly dostatečnou sekvenční informaci

Optimum 6-20 AA, cca 800-2500 Da

Proteáza	Místo štěpení	Poznámka
Trypsin	za Lys, Arg	nenásleduje Pro
Lys-C	za Lys	nenásleduje Pro
Asp-N	před Asp, Cys	
Chymotrypsin	za Phe, Trp, Tyr, Leu, Ileu, Val, Met	nenásleduje Pro
Arg-C	za Arg	nenásleduje Pro
Glu-C (Proteáza V8)	za Glu a Asp	nenásleduje Pro
Chemická digesce		
CNBr	Met	organika, hydrofobní P.

TRYPSIN

MW 23 kDa

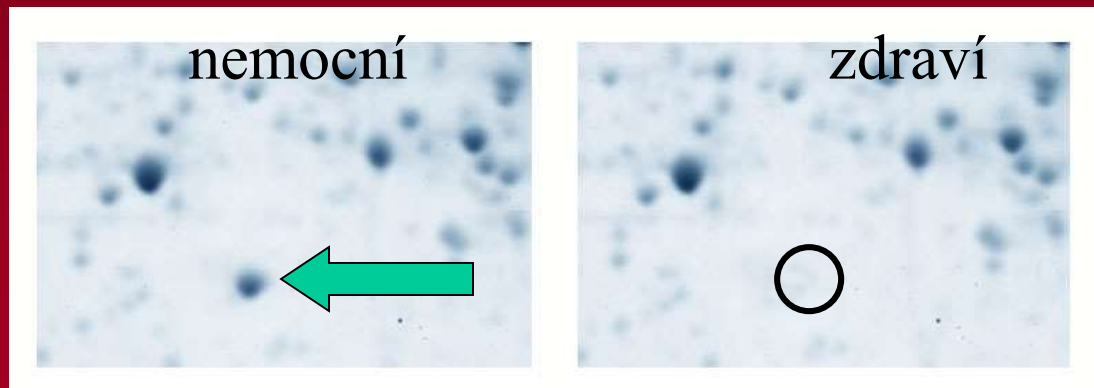
z kravského nebo prasečího pankreatu

štěpí v mírně bazickém pH

• 50 kDa protein → cca 30 peptidů

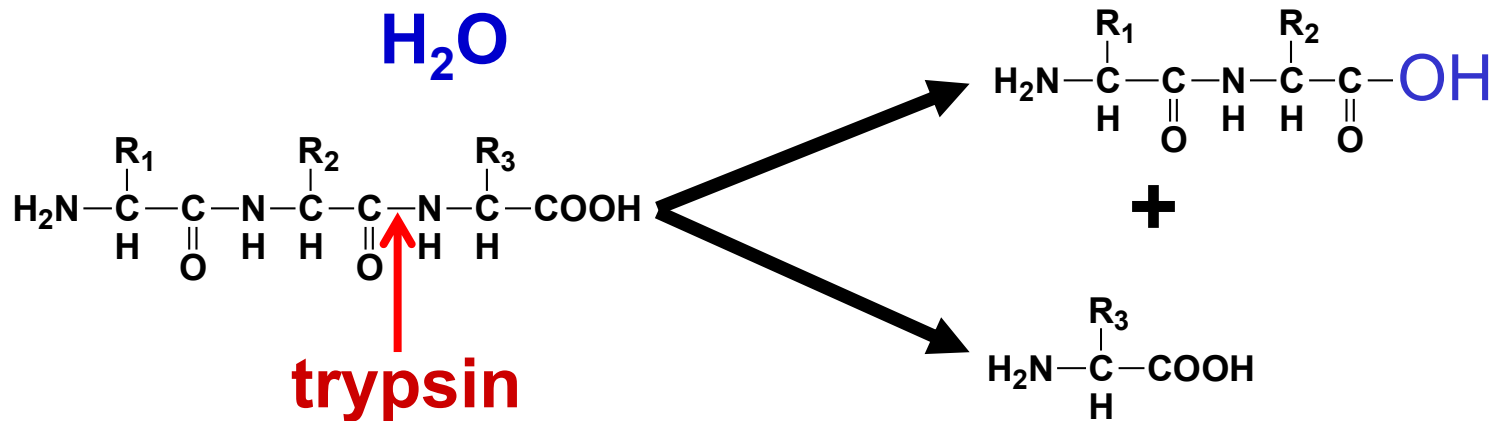
• Použití v roztoku, na blotu, v gelu

Trypsin **štěpí za Lys a Arg** pokud nenásleduje Pro

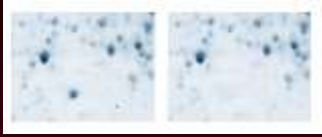


*SSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEKREG
YERLLKMQNQRGGRALFQD IKKPAEDEWGTKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHAL
GSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKL IKKMGDHLTNLHRLGGPEAG LGEYLFERLT LKHD*

Štěpení trypsinem



PŘÍPRAVA VZORKŮ Z GELU PRO IDENTIFIKACI POMOCÍ MS



Výběr a vyříznutí spotu/PROTEINU (spotpicking)

Dehydratace gelu (redukce, alkylace)
ACN, vakuum

Rehydratace v pufru s Trypsinem

Digeste 37 °C

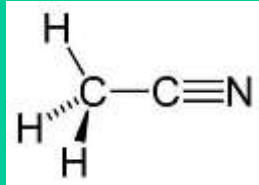
Extrakce PEPTIDŮ (ACN)

Čištění a koncentrace

MS analýza
a identifikace

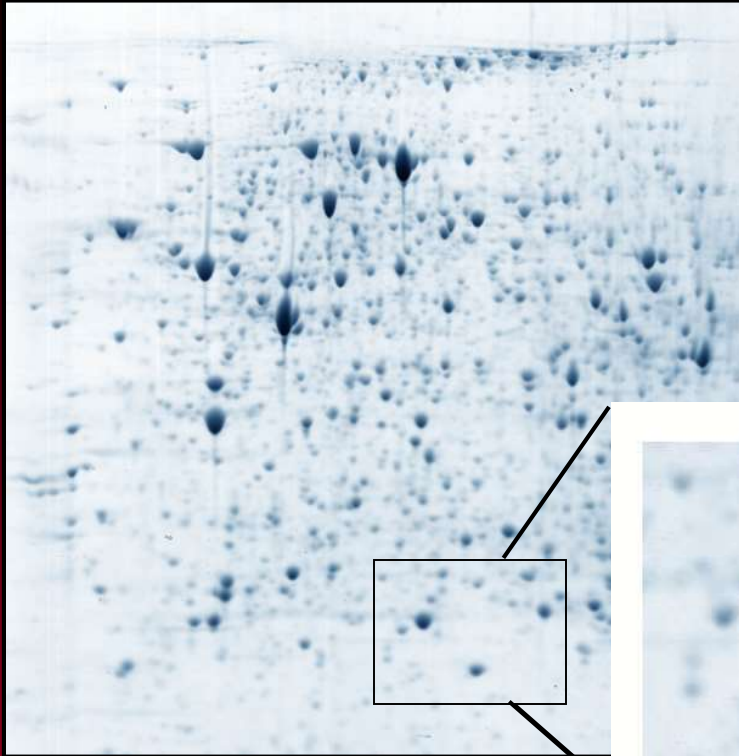
KERATIN !!!

Acetonitril
(ACN, MeCN)

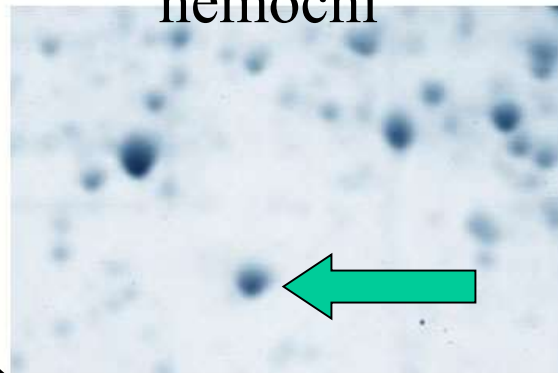


- nesráží proteiny/peptidy
- neabsorbuje v UV
- má nízkou viskozitu
- kompatibilní s RP-LC

Identifikace diferenciálně exprimovaného proteinu



nemocní



zdraví



„In gel“ **naštěpení trypsinem** (za Arg, Lys)

SSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEKREGYERLLK
MQNQRGGRALFQDIKKPAEDEWGTKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHAL
GSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLT LKHD



Extrakce směsi peptidů z gelu

In-gel štěpení trypsinem (za R a K)

LLK (373.280)
L IK (373.280)
LT LK (474.328)
SSQIR (590.327)
EGYER (653.673)
MQNQR (676.319)
TPDAMK (662.317)
ELAEK (718.361)
AAMALEK (733.391)
KPAEDEWGK (1059.510)
MGDHLTNLHR (1079.54)
DDVALEGVSHFFR (1491.722)
LNQALLDLHALGSAR (1591.891)
LGGPEAGLGEYLFER (1607.806)
TDPHLCDFLETHFLDEEVK (2288.054)
QNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDR (3924.897)

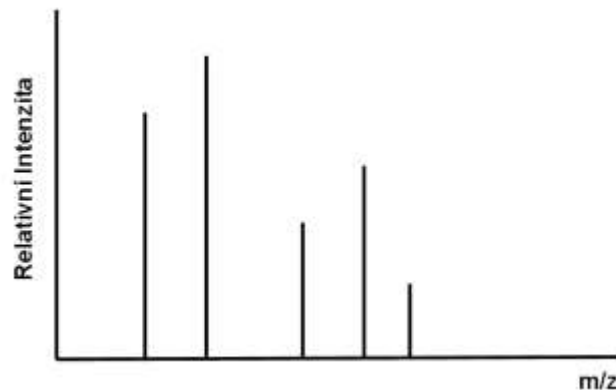


The slide features a decorative design of four overlapping rectangular frames. The frames are positioned in the upper half of the slide, with each subsequent frame being slightly larger and shifted to the right and down from the previous one. The text is centered within the innermost frame.

**Identifikace bílkovin
pomocí hmotnostní spektrometrie**

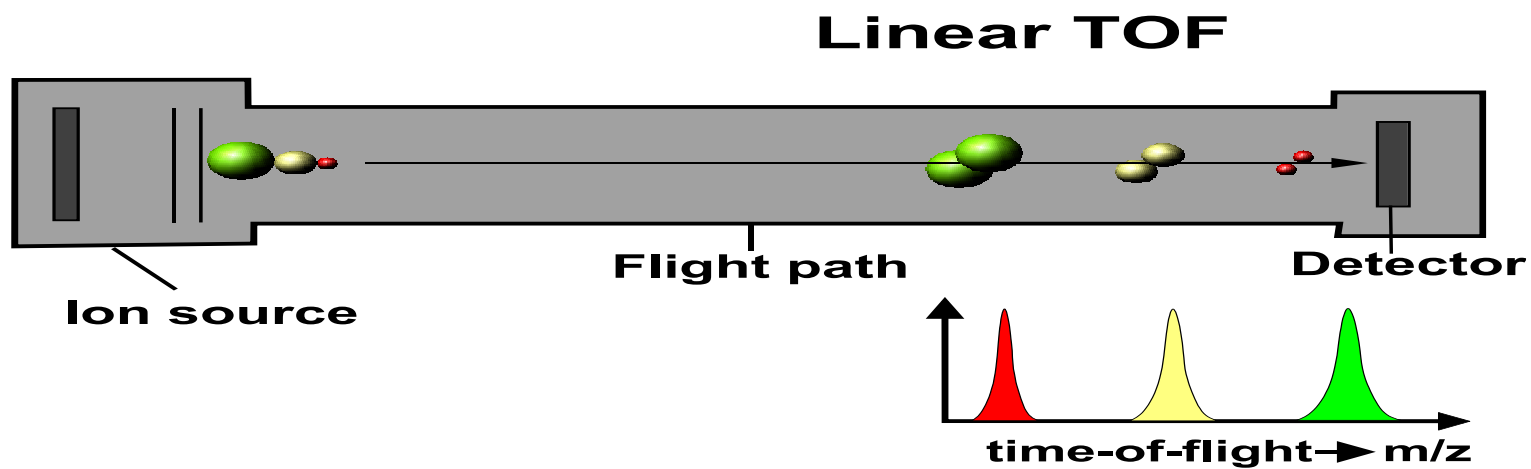
Identifikace bílkovin pomocí hmotnostní spektrometrie (MS)

- Stanovení velmi **přesné hmotnosti peptidů nebo jejich fragmentů**.
- Pohyb nabitě částice ve vakuu, elektromagnetickém poli je funkcí její hmotnosti (m) a náboje (z).
- Hmotnostní spektrometr částice ionizuje (pseudomolekulární ionty) a separuje podle jejich m/z . Hmotnostní spektrum ukazuje závislost četnosti jednotlivých iontů na m/z .



Přesné hmotnosti peptidů, nebo jejich fragmentů jsou porovnávány s vypočtenými hmotnostmi všech (teoretických) peptidů nebo fragmentů, které jsou přítomny v proteinových a genových databázích.

Hmotnostní spektrometr typu TIME OF FLIGHT (TOF)



Identifikace bílkovin pomocí hmotnostní spektrometrie (MS)

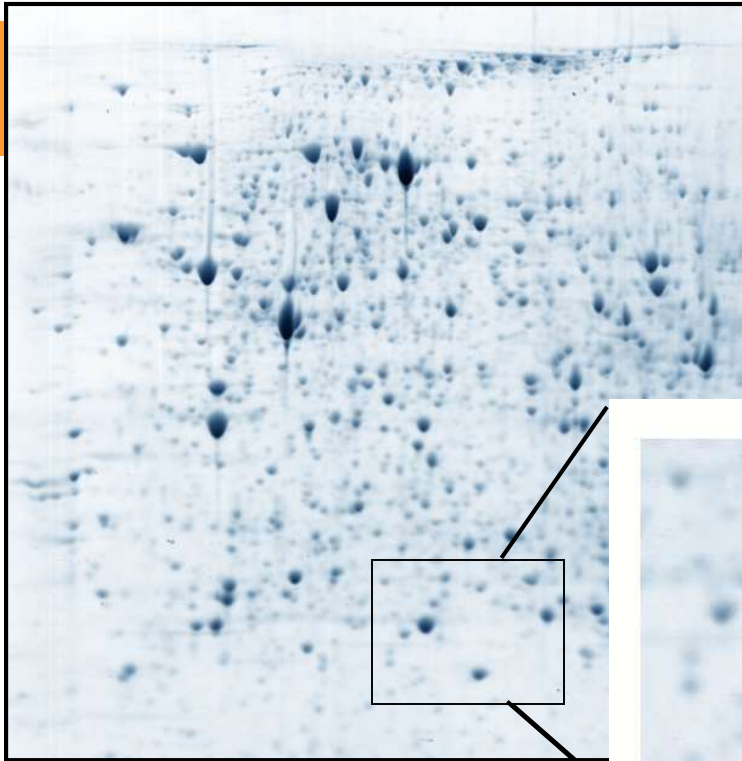
Peptidové mapování (Peptidový fingerprinting)

na základě změření přesných **hmotností peptidů** vzniklých štěpením specifickou endoproteázou

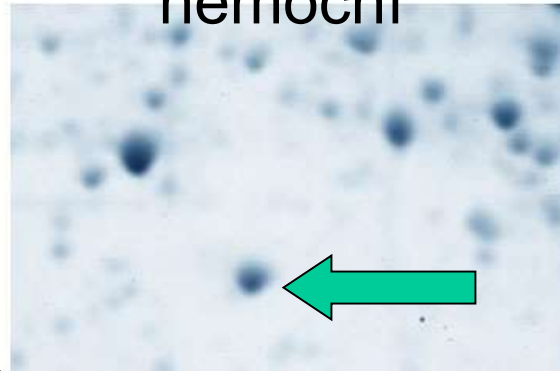
Fragmentace peptidů/sekvenování (MS/MS)

na základě změření přesných **hmotností fragmentů peptidu**. Peptid nejnáze fragmentuje v peptidické vazbě. Je tak získána (částečná) aminokyselinová sekvence v daném peptidu.

Identifikace diferenciálně exprimovaného proteinu



nemocní

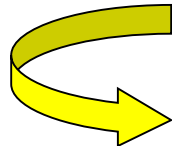


zdraví



„In gel“ **naštěpení trypsinem** (za Arg, Lys)

*SSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEKREG
YERLLKMQNQRGGRALFQD IKKPAEDEWGTKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHAL
GSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKL IKKMGDHLTNLHRLGGPEAG LGEYLFERLT LKHD*



Extrakce směsi peptidů z gelu

Peptidové mapování (Peptidový fingerprinting)

LLK

GGR

SSQIR

L IKK

LT LK

EGYER

MQNQR

TPDAMK

ELAEER

ALFQD IK

AAMALEKK

KPAEDEWVK

MGDHLTNLHR

DDVALEGVSHFFR

LNQALLDLHALGSAR

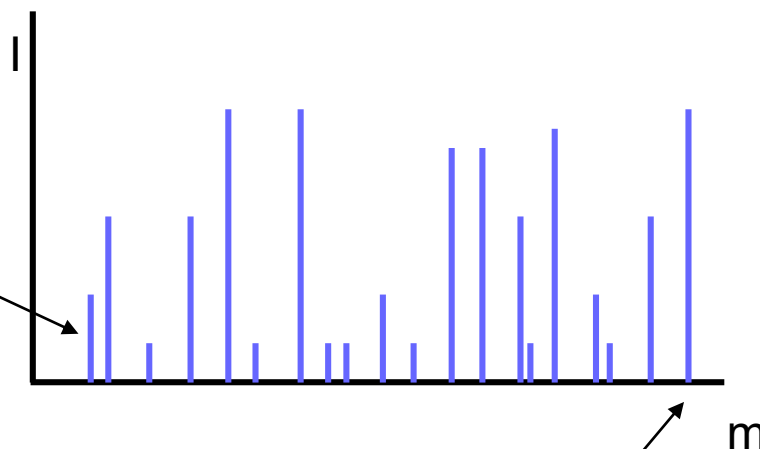
LGGPEAG LGEYLFER

TDPHLCDFLETHFLDEEVK

QNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDR

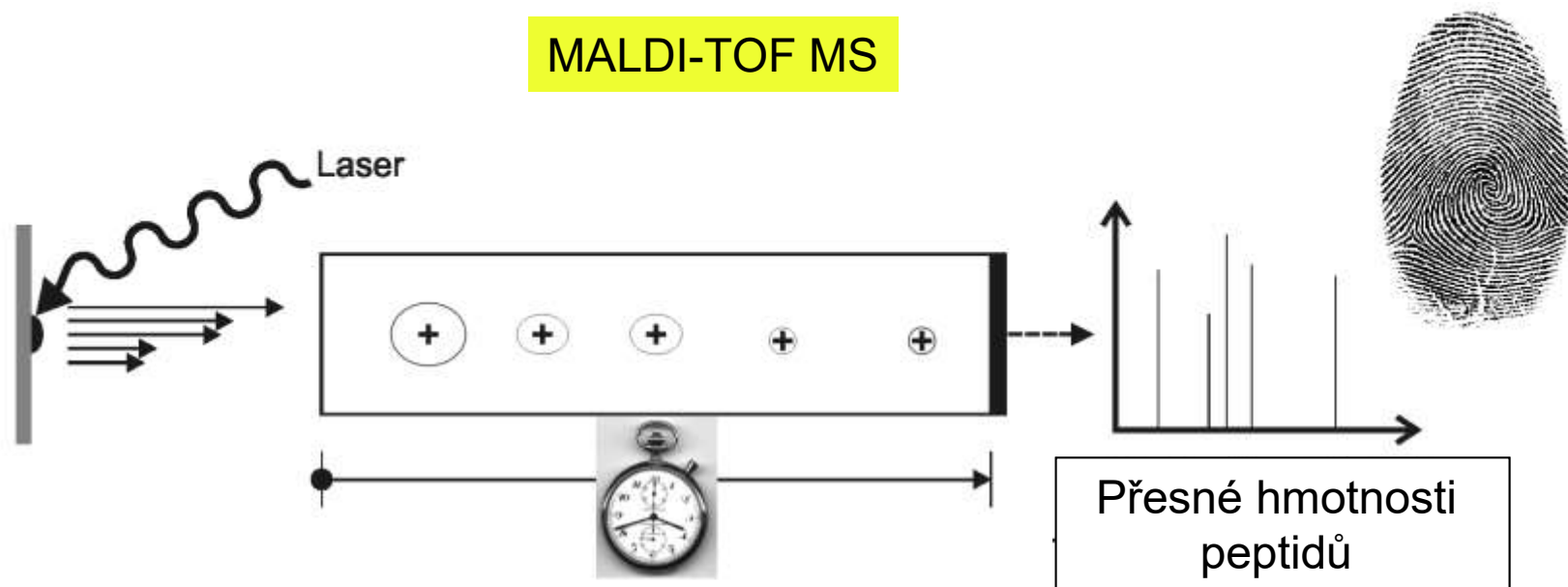
Peptidové mapování (Peptidový fingerprinting)

LLK	(373.280)
L IK	(373.280)
LT LK	(474.328)
SSQIR	(590.327)
EGYER	(653.673)
MQNQ R	(676.319)
TPDAMK	(662.317)
ELAE EK	(718.361)
AAMALEK	(733.391)
KPAEDEW GK	(1059.510)
MGDHLTNLHR	(1079.54)
DDVALEGVSHFFR	(1491.722)
LNQALLDLHALGSAR	(1591.891)
LGGPEAGLGEYLFER	(1607.806)
TDPHLCDFLETHFLDEEVK	(2288.054)
QNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDR	(3924.897)



Peptidové mapování (Peptidový fingerprinting)

MALDI-TOF MS



Identification of protein in databases from MS data

GENES, ORFs



In silico translation

PROTEINS



In silico digestion with trypsin (-R/-K)

PEPTIDES

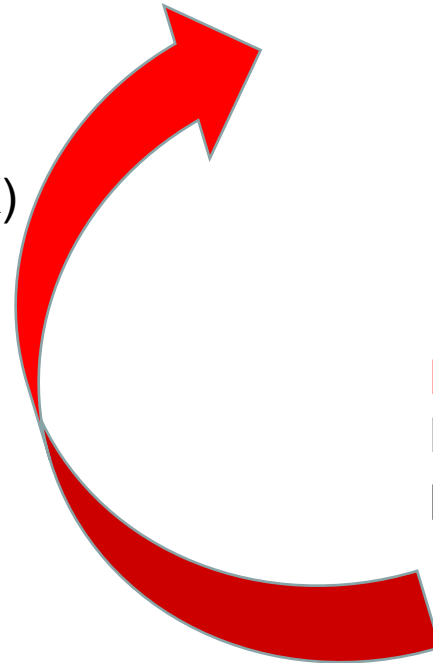


theoretical MWs of peptides

Gene/Protein identification

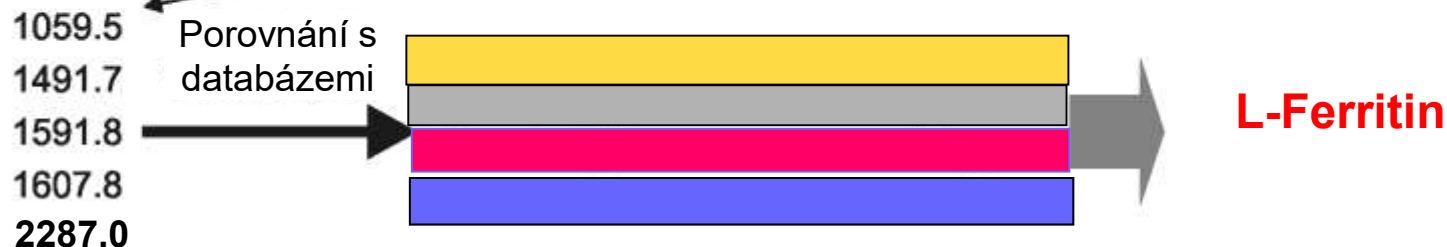
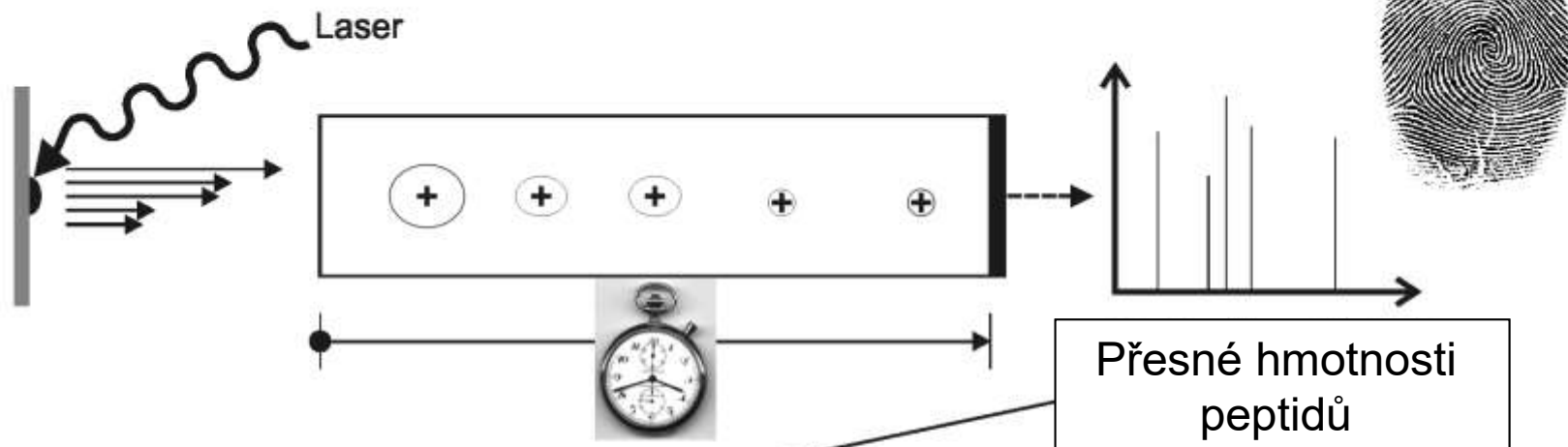
MS data

Masses/MWs of
peptides



Peptidové mapování (Peptidový fingerprinting)

MALDI-TOF MS



SSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDR [redacted] *ELAEKREG*
YERLLKMQNQRGGRALFQD [redacted] *TPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHAL*
GSAR [redacted] *L IKKMGDHLTNLHR* [redacted] *LTLKHD*

Co když máme ve vzorku směs proteinů?

Identifikace bílkovin pomocí hmotnostní spektrometrie

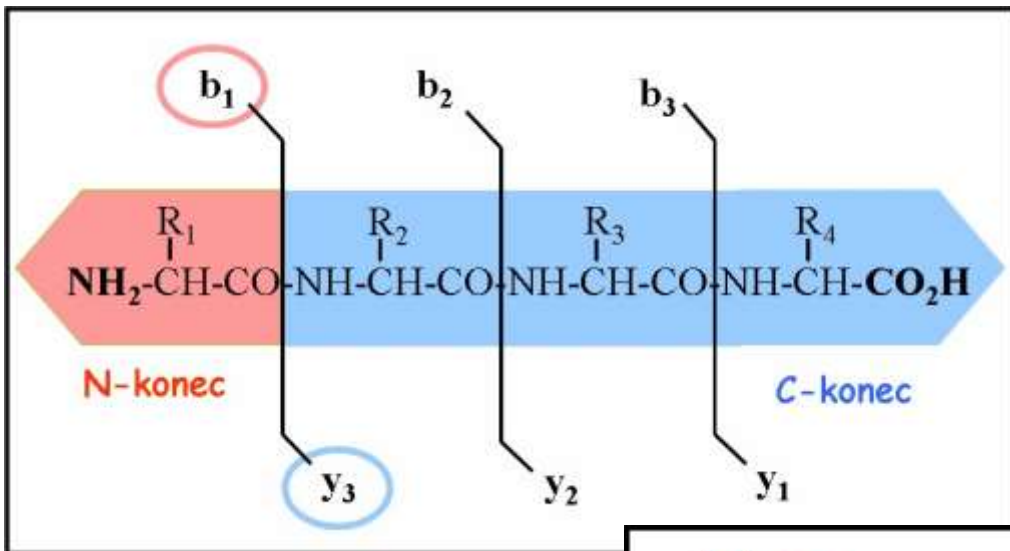
Peptidové mapování (Peptidový fingerprinting)

na základě změření přesných **hmotností peptidů** vzniklých štěpením specifickou endoproteázou

Fragmentace peptidů/sekvenování (MS/MS)

na základě změření přesných **hmotností fragmentů peptidu**. Peptid nejnáze fragmentuje v peptidické vazbě. Je tak získána (částečná) aminokyselinová sekvence v daném peptidu.

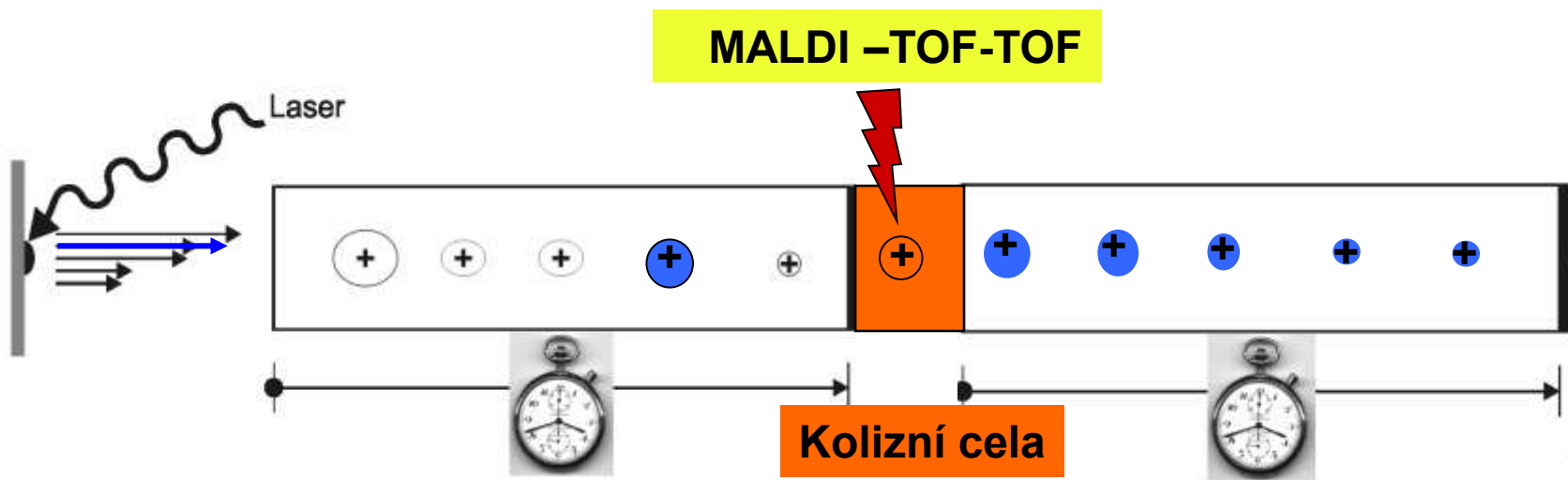
Fragmentace peptidu (mikrosekvenování, MS/MS)



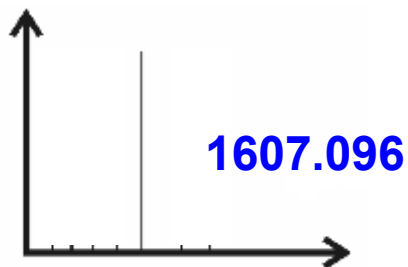
S-P-A-F-D-S-I-M-A-E-T-L-K
MH⁺ = 1410.6

<u>b-ions⁺</u>		<u>y-ions⁺</u>
88.1	S ----- PAFDSIMAETLK	1323.6
185.2	SP ----- AFDSIMAETLK	1226.4
256.3	SPA ----- FDSIMAETLK	1155.4
403.5	SPAF ----- DSIMAETLK	1008.2
518.5	SPAFD ----- SIMAETLK	893.1
605.6	SPAFDS ----- IMAETLK	806.0
718.8	SPAFDSI ----- MAETLK	692.3
850.0	SPAFDSIM ----- AETLK	561.7
921.1	SPAFDSIMA ----- ETLK	490.6
1050.2	SPAFDSIMAE ----- TLK	361.5
1151.3	SPAFDSIMAET ----- LK	260.4
1264.4	SPAFDSIMAETL ----- K	147.2

Fragmentace peptidu (mikrosekvenování, MS/MS)

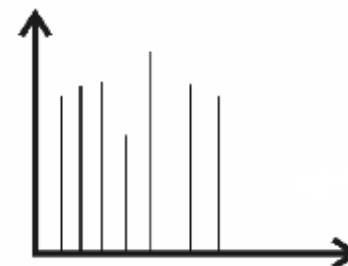


MW peptidu



LGGPEAGLGEYLFER
LGGPEAGLGEYLFE...R
LGGPEAGLGEYLF...ER
LGGPEAGLGEYL...FER
LGGPEAGLGEY...LFER
LGGPEAGLGE...YLFER

m/z jeho fragmentů



Identifikace peptidu **LGGPEAGLGEYLFER**
a proteinu **L-FERRITIN**

Identification of protein in databases from MS data

GENES, ORFs



In silico translation

PROTEINS



In silico digestion with trypsin (-R/-K)

PEPTIDES



theoretical MWs of peptides

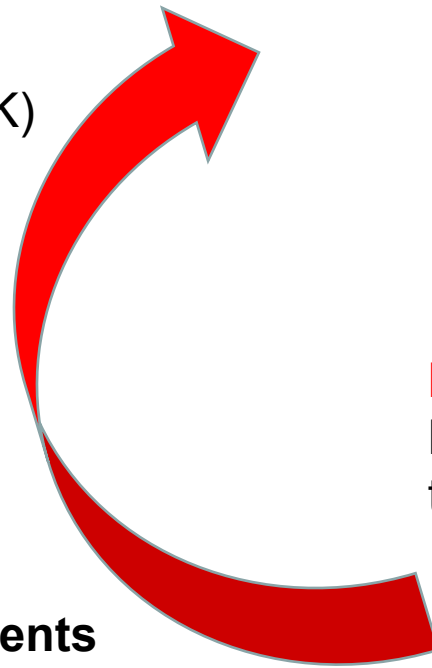
FRAGMENTS



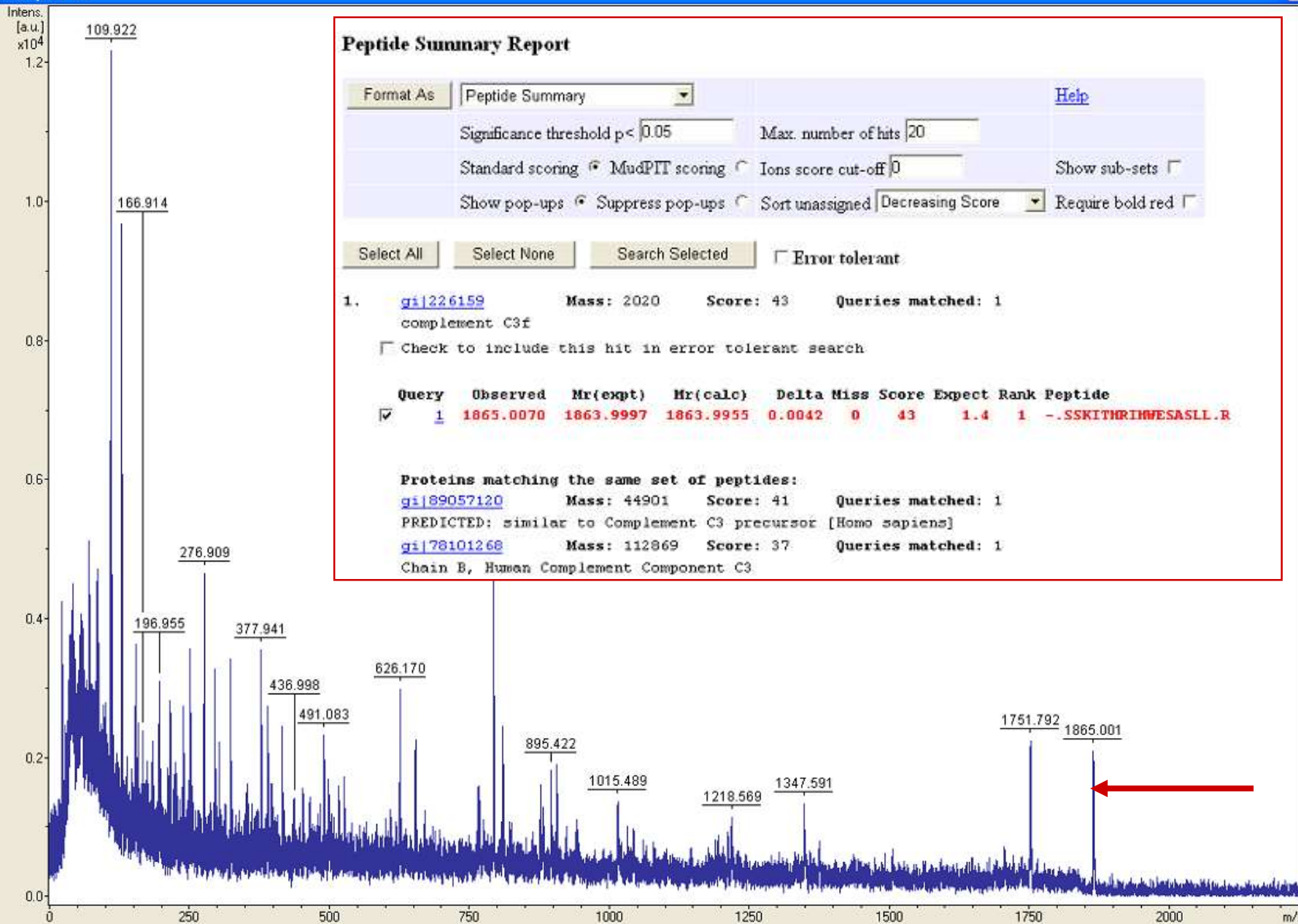
theoretical MWs of peptide fragments

Gene/Protein identification

MS data
MWs of **peptides** and
their **fragments**



Mass Spectrum



Peptide Summary Report

Format As Peptide Summary [Help](#)

Significance threshold $p < 0.05$ Max. number of hits 20

Standard scoring MudPIT scoring Ions score cut-off 0 Show sub-sets

Show pop-ups Suppress pop-ups Sort unassigned Decreasing Score Require bold red

Select All Select None Search Selected Error tolerant

1. [gi|226159](#) Mass: 2020 Score: 43 Queries matched: 1
 complement C3f
 Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 1	1865.0070	1863.9997	1863.9955	0.0042	0	43	1.4	1	-.SSKITHRIHWESASLL.R

Proteins matching the same set of peptides:

- [gi|89057120](#) Mass: 44901 Score: 41 Queries matched: 1
 PREDICTED: similar to Complement C3 precursor [Homo sapiens]
- [gi|78101268](#) Mass: 112869 Score: 37 Queries matched: 1
 Chain B, Human Complement Component C3

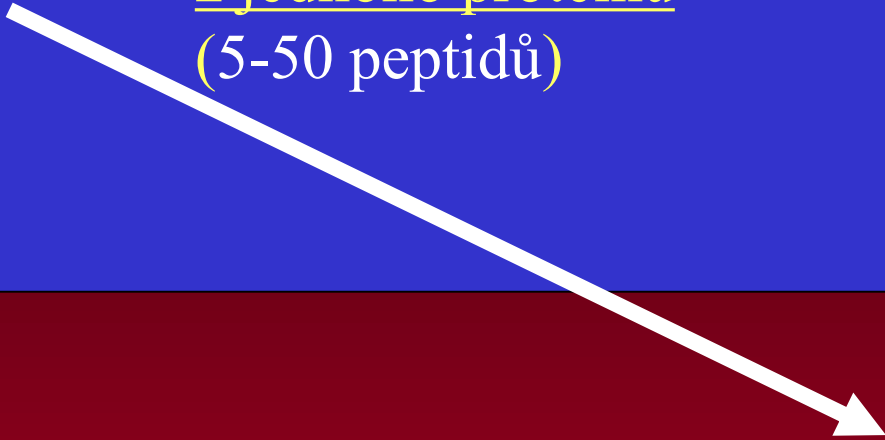
Jediný protein



Směs peptidů
z jednoho proteinu
(5-50 peptidů)



MS
(PMF)



Směs proteinů



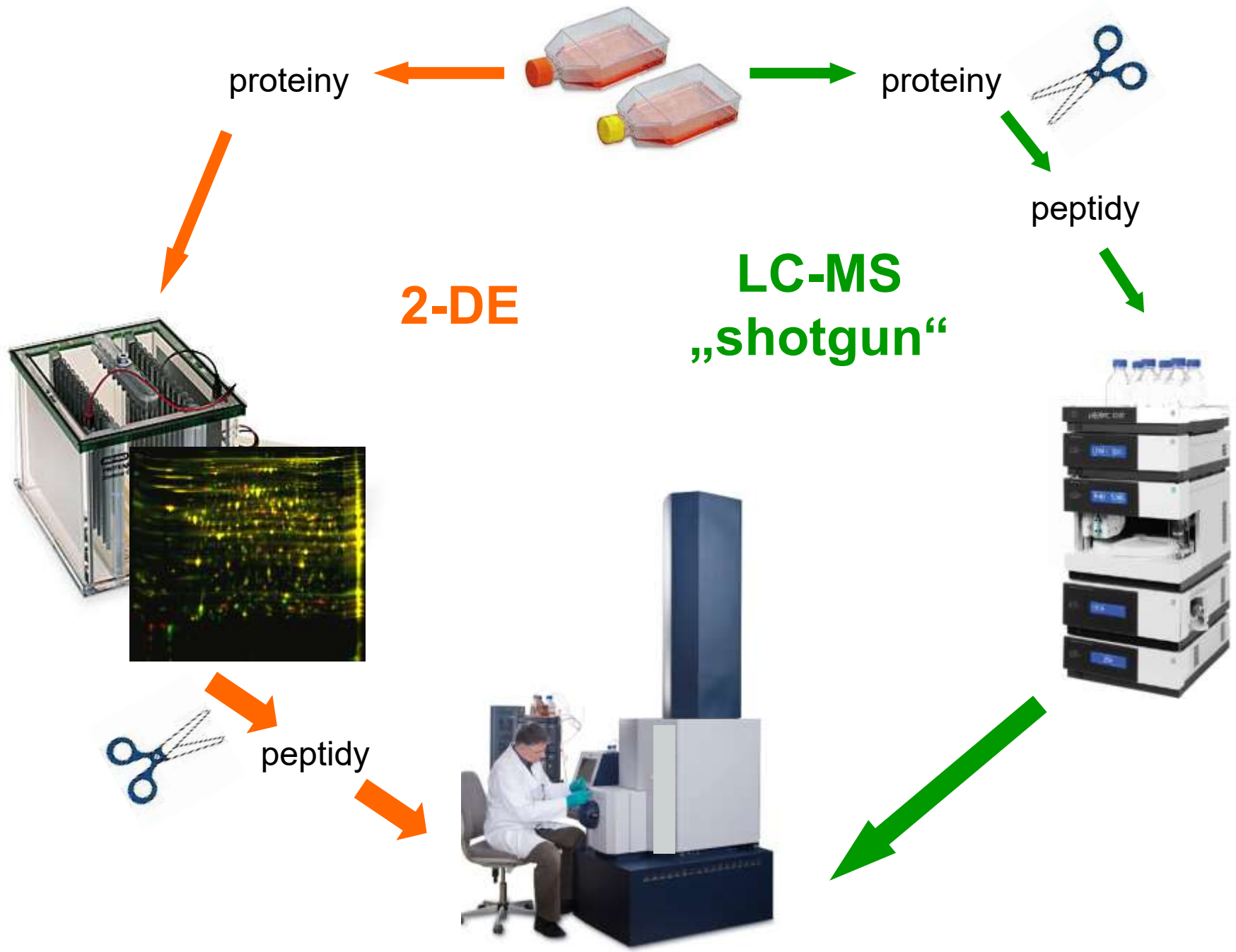
Směs peptidů
z mnoha proteinu
(300-10⁶ peptidů)



chromatografická
separace

MS/MS
(fragmentace)





proteiny

proteiny

peptidy

2-DE

LC-MS
„shotgun“

peptidy

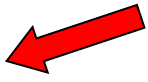
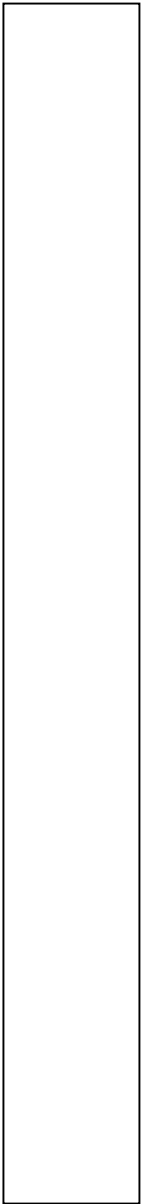


Identifikace proteinů v shot-gun experimentech

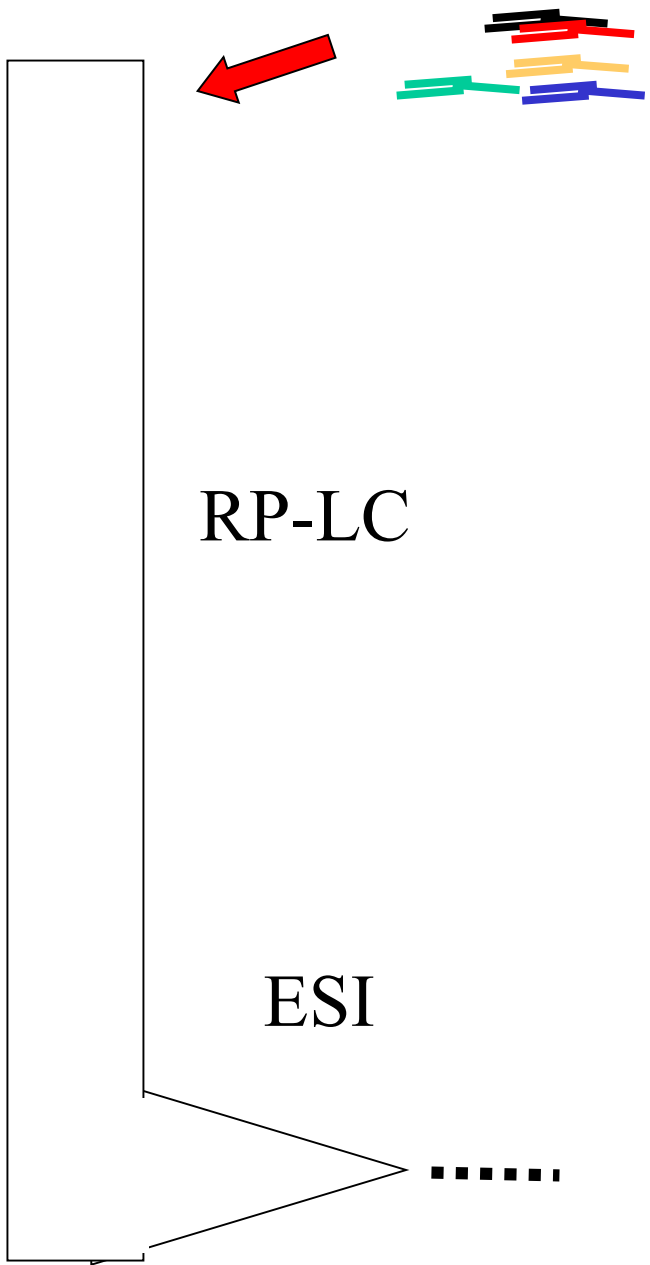
Až stovky tisíc různých peptidů
kontinuálně eluovaných z (RP) LC

On-line MS – přímé spojení LC kolony s **ESI-MS**.
V reálném čase (60-600 minut) jsou eluované peptidy
ionizovány. Změřeno MS, izolován prekurzor a
provedena fragmentace. Cyklus přepnutí MS-MS/MS
až několikrát za sekundu.

Off-line MS – např. **LC-MALDI**. Frakce eluujících peptidů jsou sbírány a MS probíhá
až po sběru. Typicky sběr mikrofrakcí (nL) na MALDI destičku s následným měřením
MS a MS/MS.

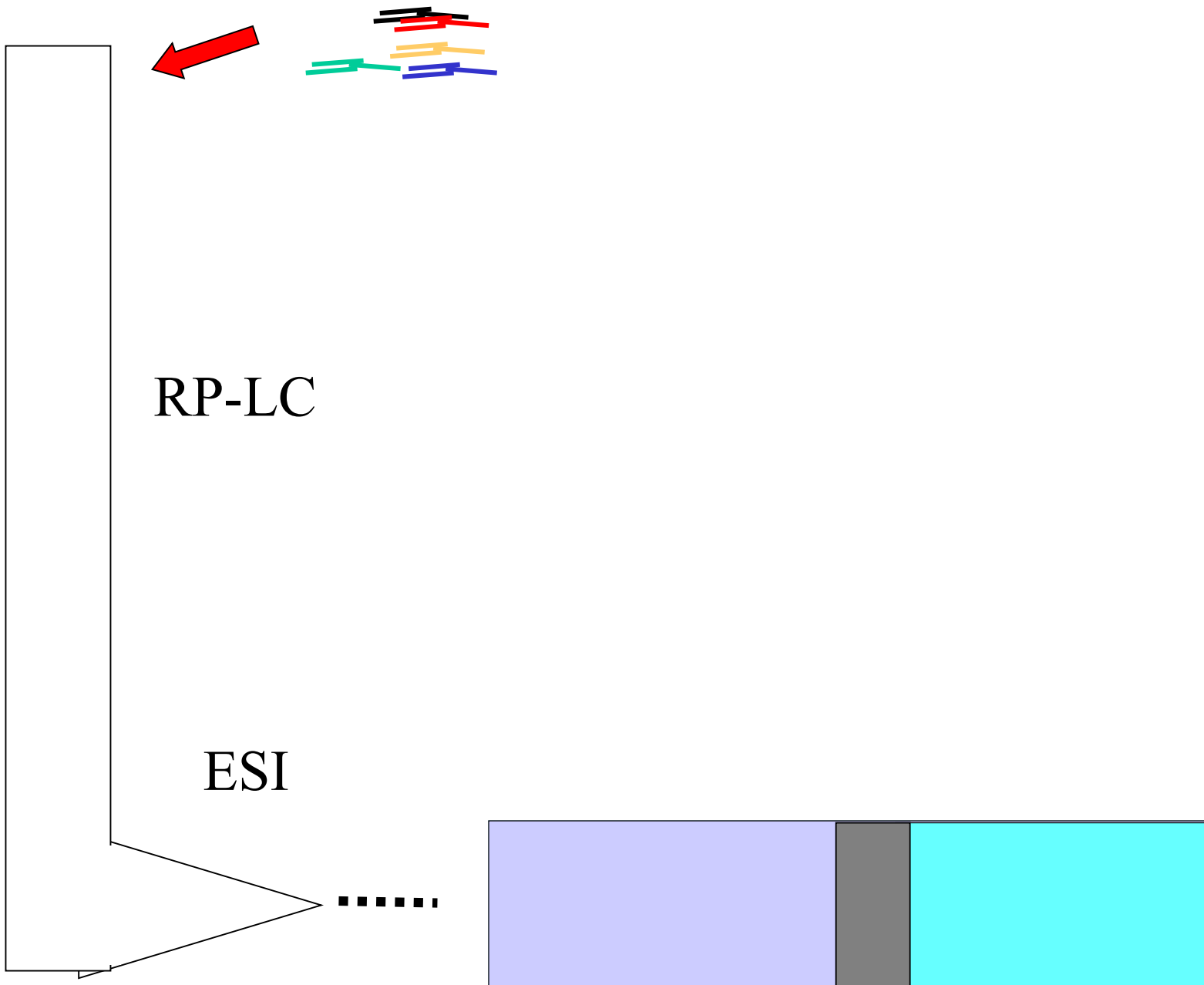


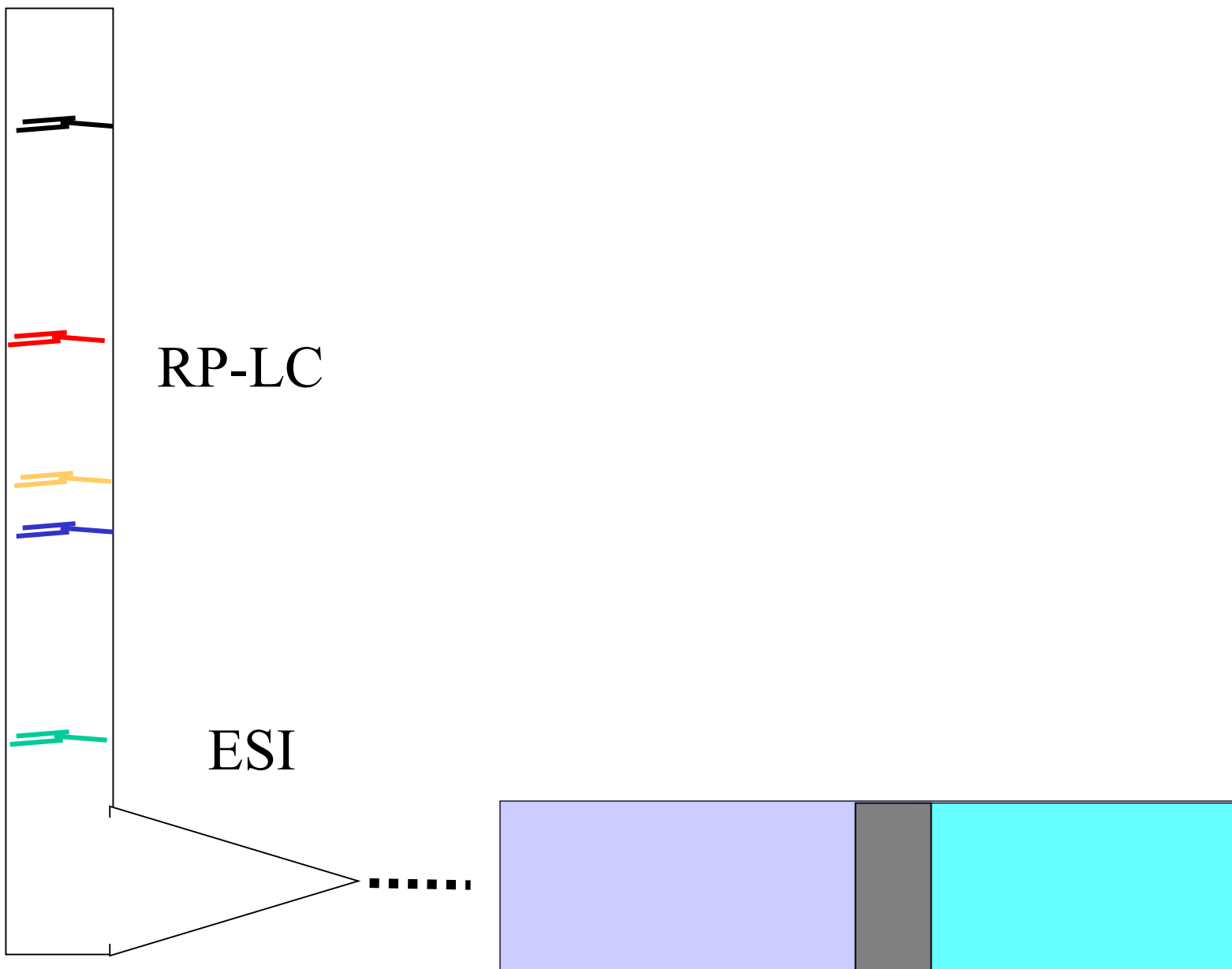
RP-LC

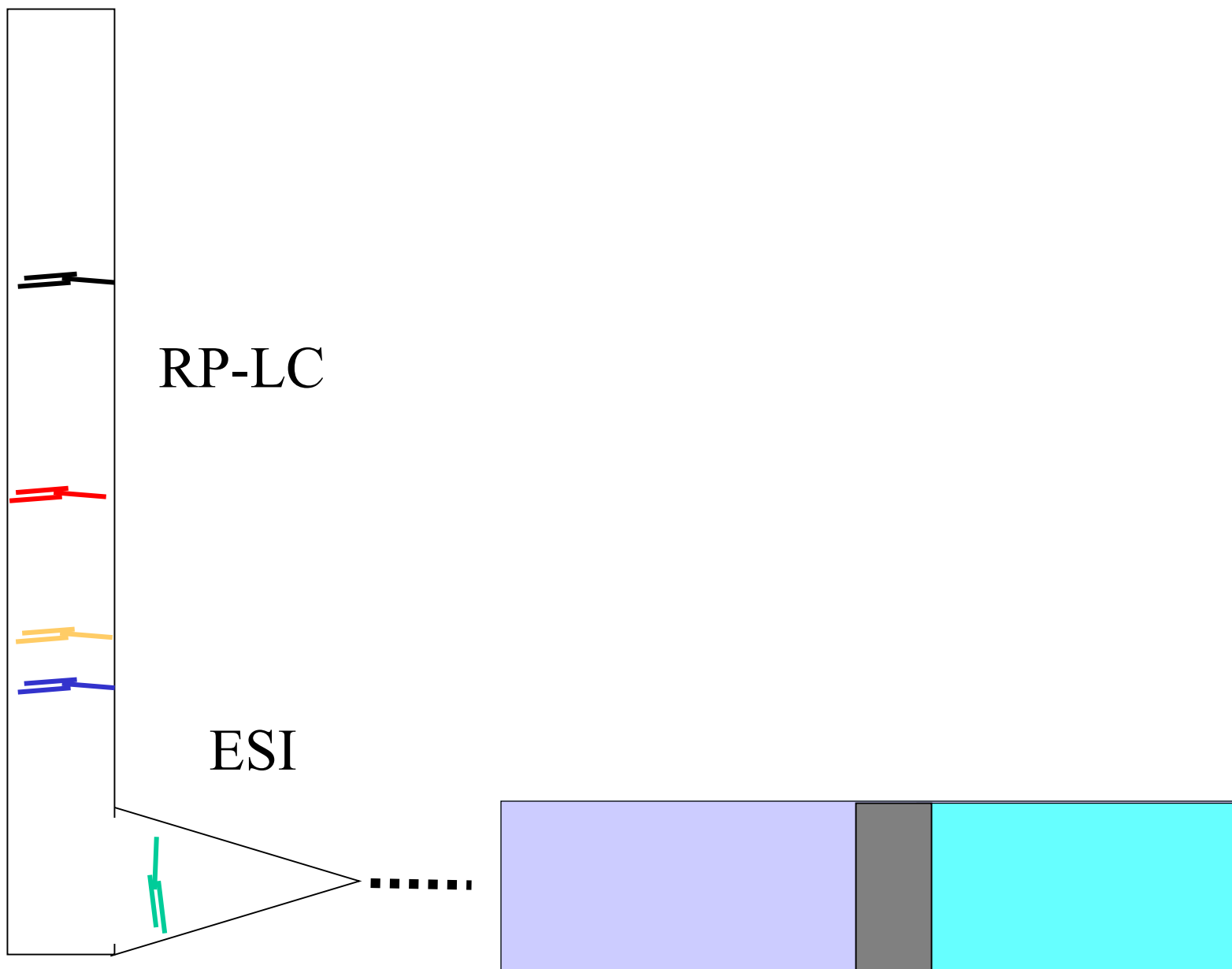


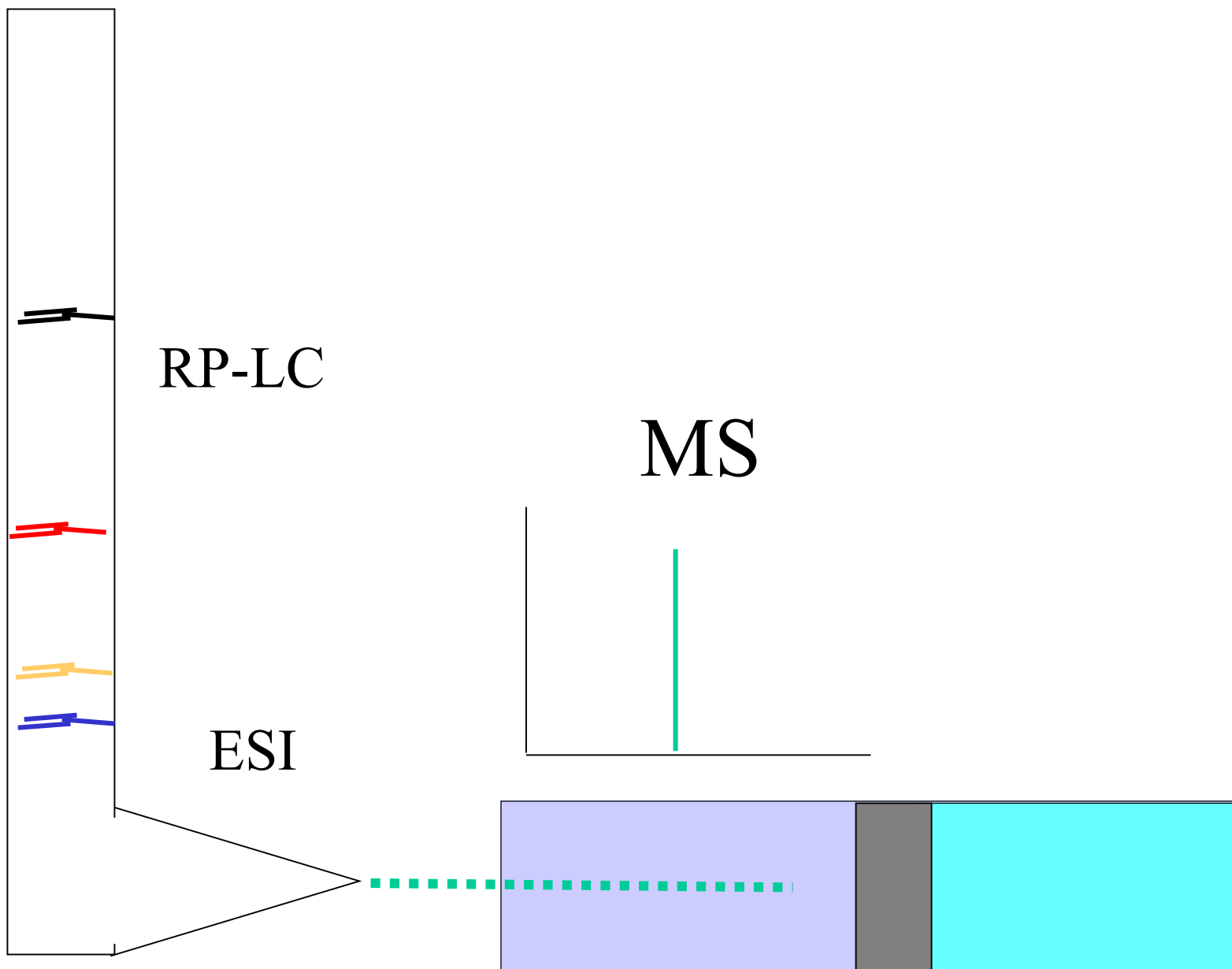
RP-LC

ESI





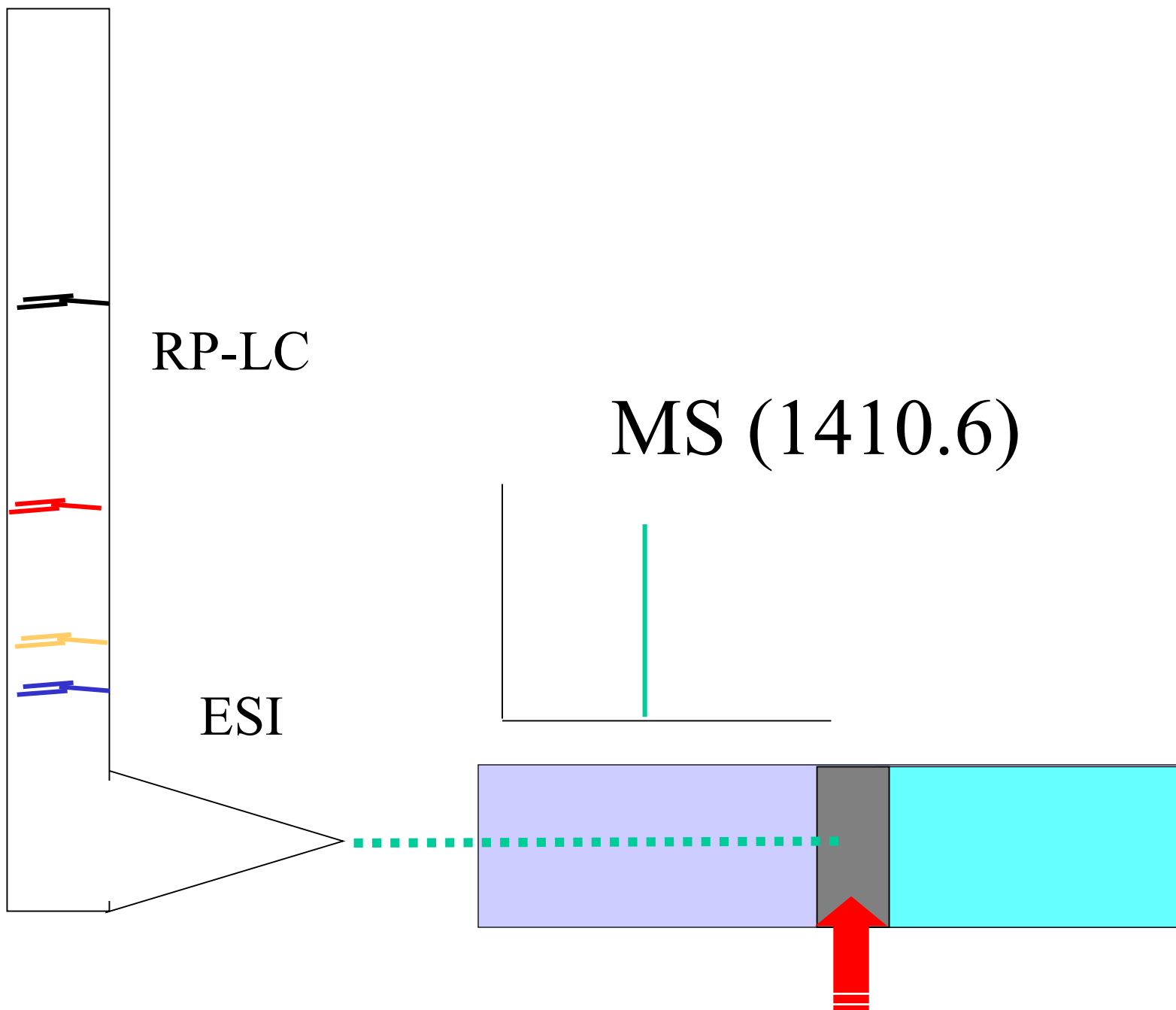




RP-LC

MS

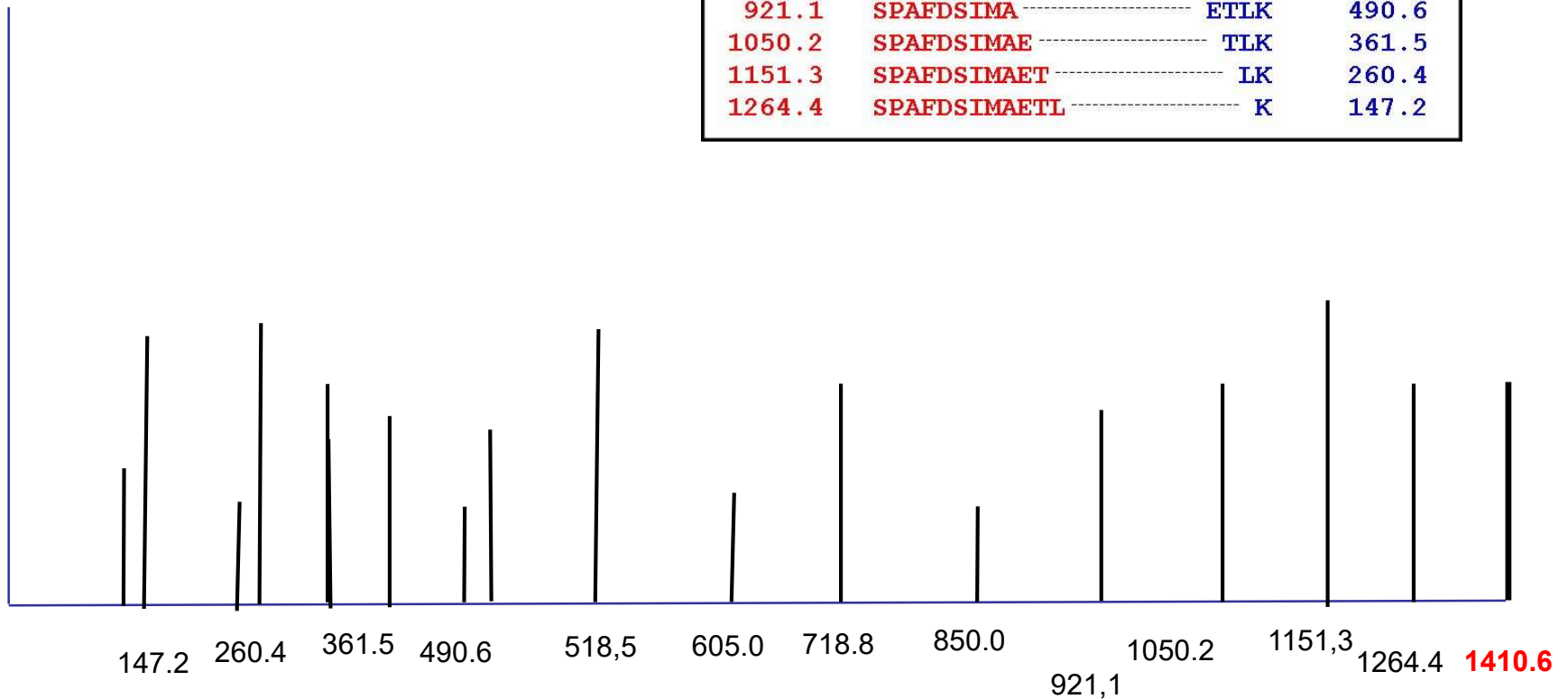
ESI



S-P-A-F-D-S-I-M-A-E-T-L-K

MH⁺ = 1410.6

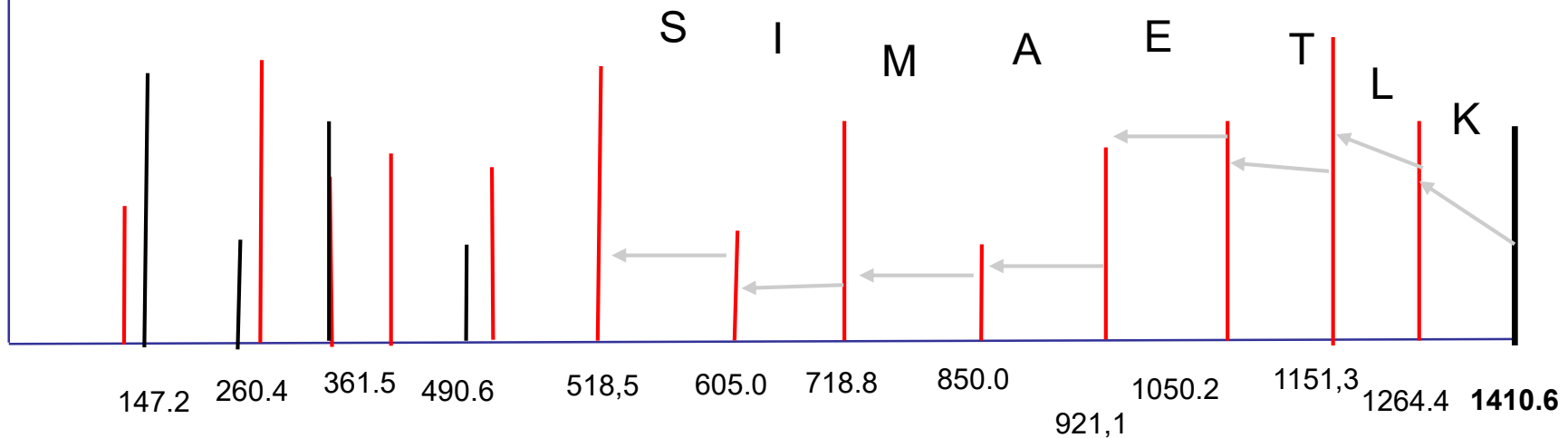
<u>b-ions</u> ⁺		<u>y-ions</u> ⁺	
88.1	S	PAFDSIMAETLK	1323.6
185.2	SP	AFDSIMAETLK	1226.4
256.3	SPA	FDSIMAETLK	1155.4
403.5	SPAF	DSIMAETLK	1008.2
518.5	SPAFD	SIMAETLK	893.1
605.6	SPAFDS	IMAETLK	806.0
718.8	SPAFDSI	MAETLK	692.3
850.0	SPAFDSIM	AETLK	561.7
921.1	SPAFDSIMA	ETLK	490.6
1050.2	SPAFDSIMAE	TLK	361.5
1151.3	SPAFDSIMAET	LK	260.4
1264.4	SPAFDSIMAETL	K	147.2



S-P-A-F-D-S-I-M-A-E-T-L-K

MH⁺ = 1410.6

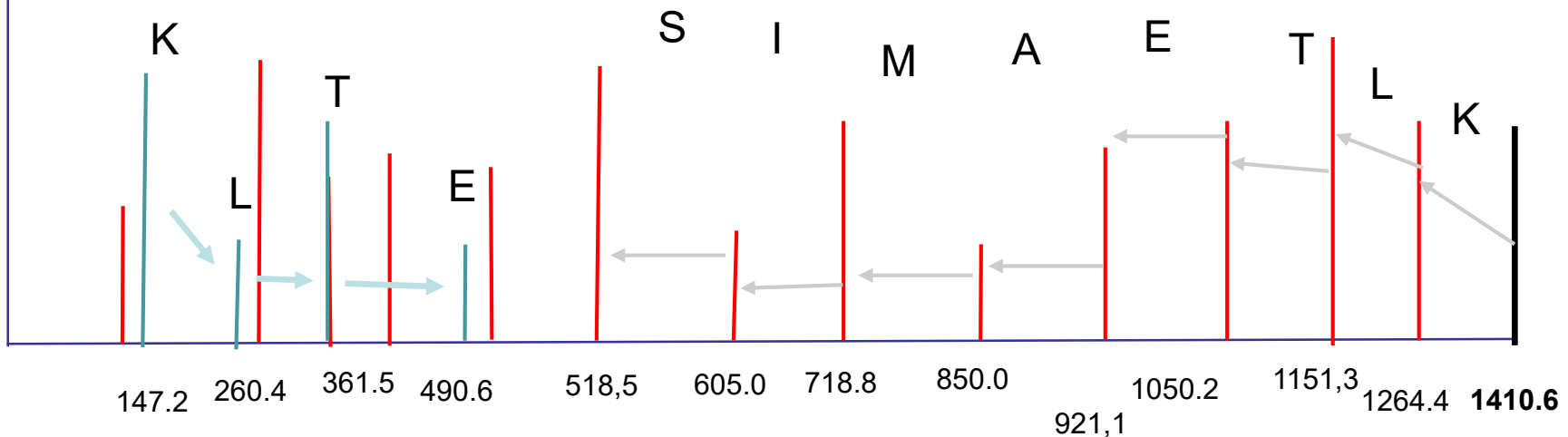
<u>b-ions⁺</u>		<u>y-ions⁺</u>	
88.1	S	PAFDSIMAETLK	1323.6
185.2	SP	AFDSIMAETLK	1226.4
256.3	SPA	FDSIMAETLK	1155.4
403.5	SPAF	DSIMAETLK	1008.2
518.5	SPAFD	SIMAETLK	893.1
605.6	SPAFDS	IMAETLK	806.0
718.8	SPAFDSI	MAETLK	692.3
850.0	SPAFDSIM	AETLK	561.7
921.1	SPAFDSIMA	ETLK	490.6
1050.2	SPAFDSIMAE	TLK	361.5
1151.3	SPAFDSIMAET	LK	260.4
1264.4	SPAFDSIMAETL	K	147.2



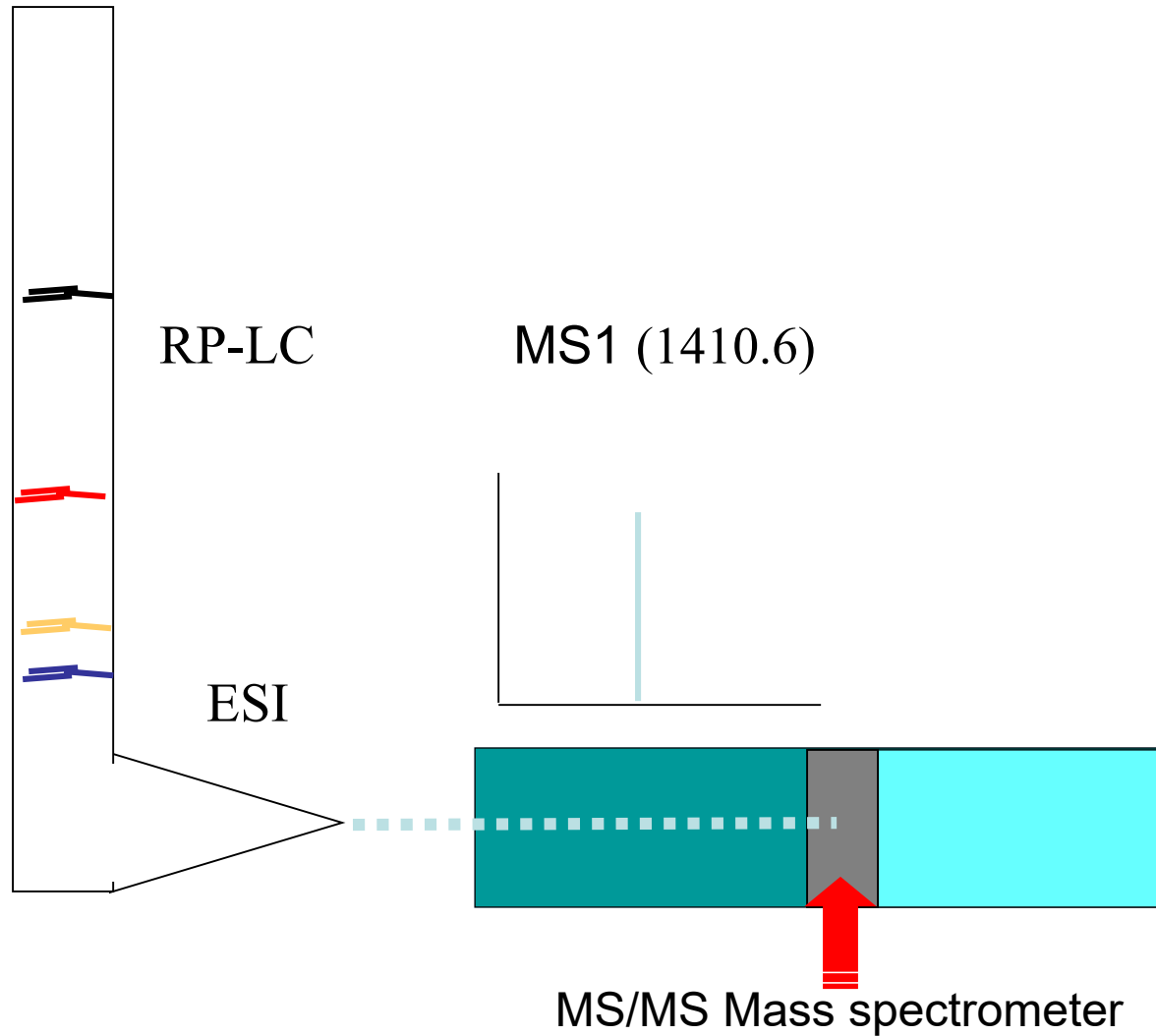
S-P-A-F-D-S-I-M-A-E-T-L-K

MH⁺ = 1410.6

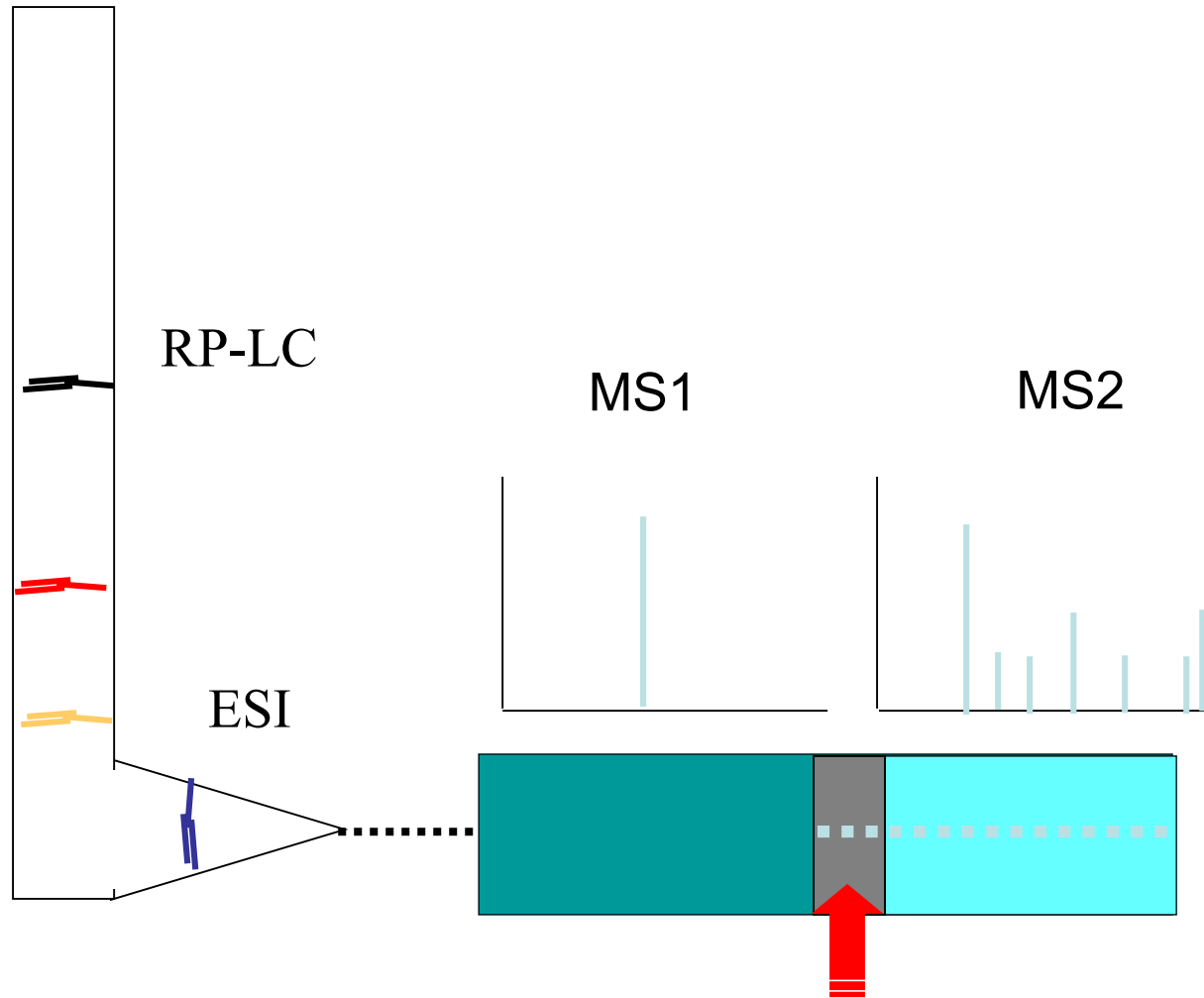
<u>b-ions⁺</u>		<u>y-ions⁺</u>	
88.1	S	PAFDSIMAETLK	1323.6
185.2	SP	AFDSIMAETLK	1226.4
256.3	SPA	FDSIMAETLK	1155.4
403.5	SPAF	DSIMAETLK	1008.2
518.5	SPAFD	SIMAETLK	893.1
605.6	SPAFDS	IMAETLK	806.0
718.8	SPAFDSI	MAETLK	692.3
850.0	SPAFDSIM	AETLK	561.7
921.1	SPAFDSIMA	ETLK	490.6
1050.2	SPAFDSIMAE	TLK	361.5
1151.3	SPAFDSIMAET	LK	260.4
1264.4	SPAFDSIMAETL	K	147.2



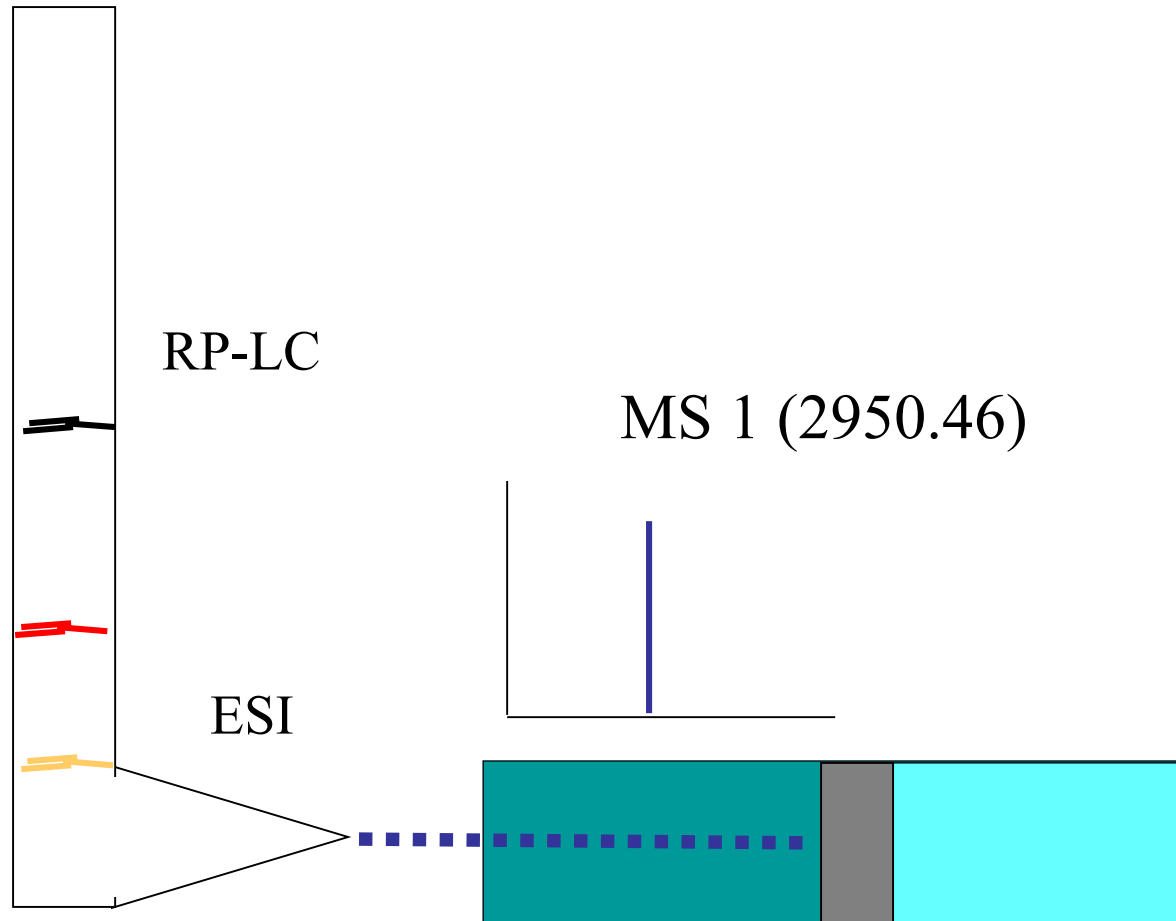
LC-MS/MS



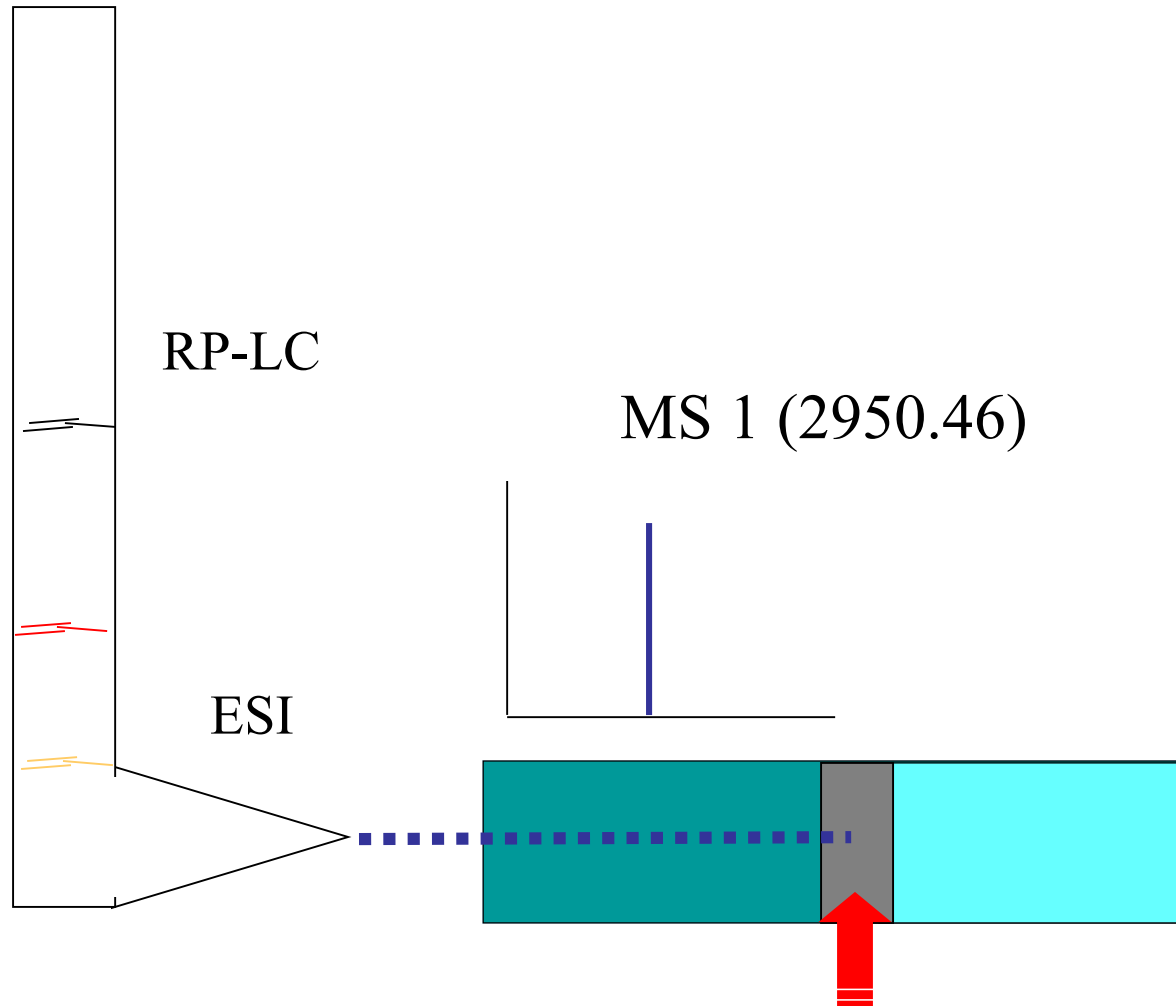
LC-MS/MS



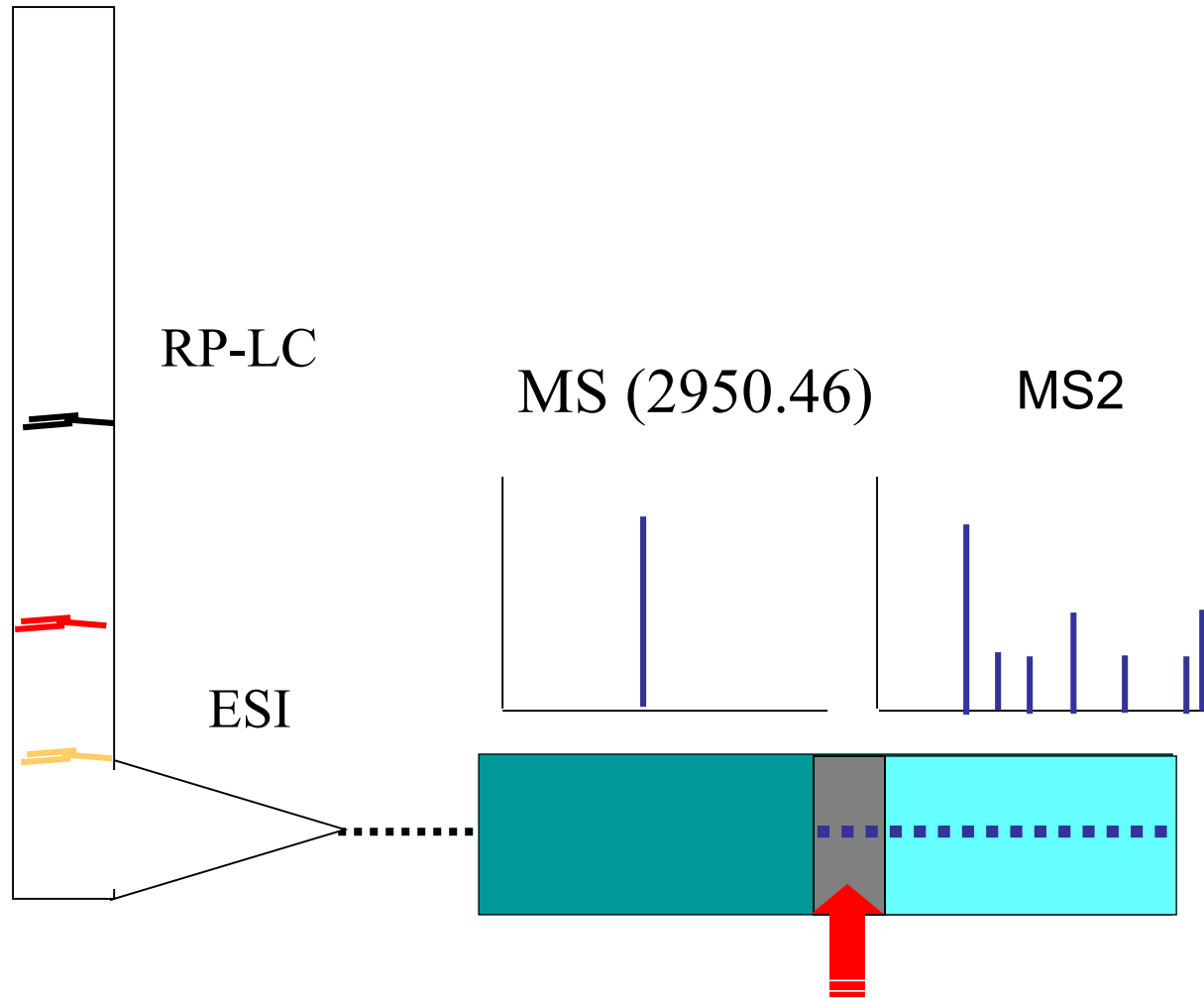
LC-MS/MS



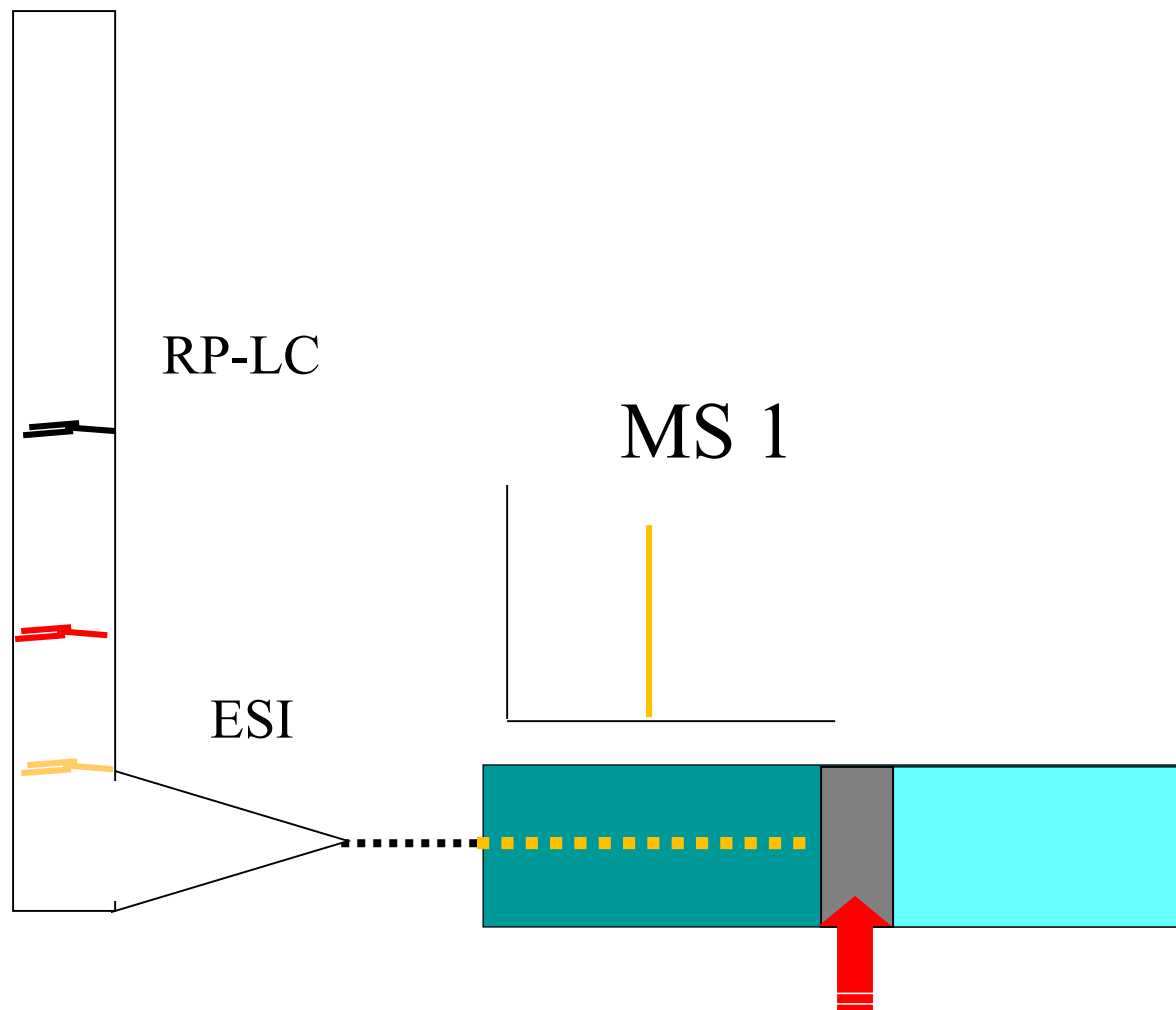
LC-MS/MS



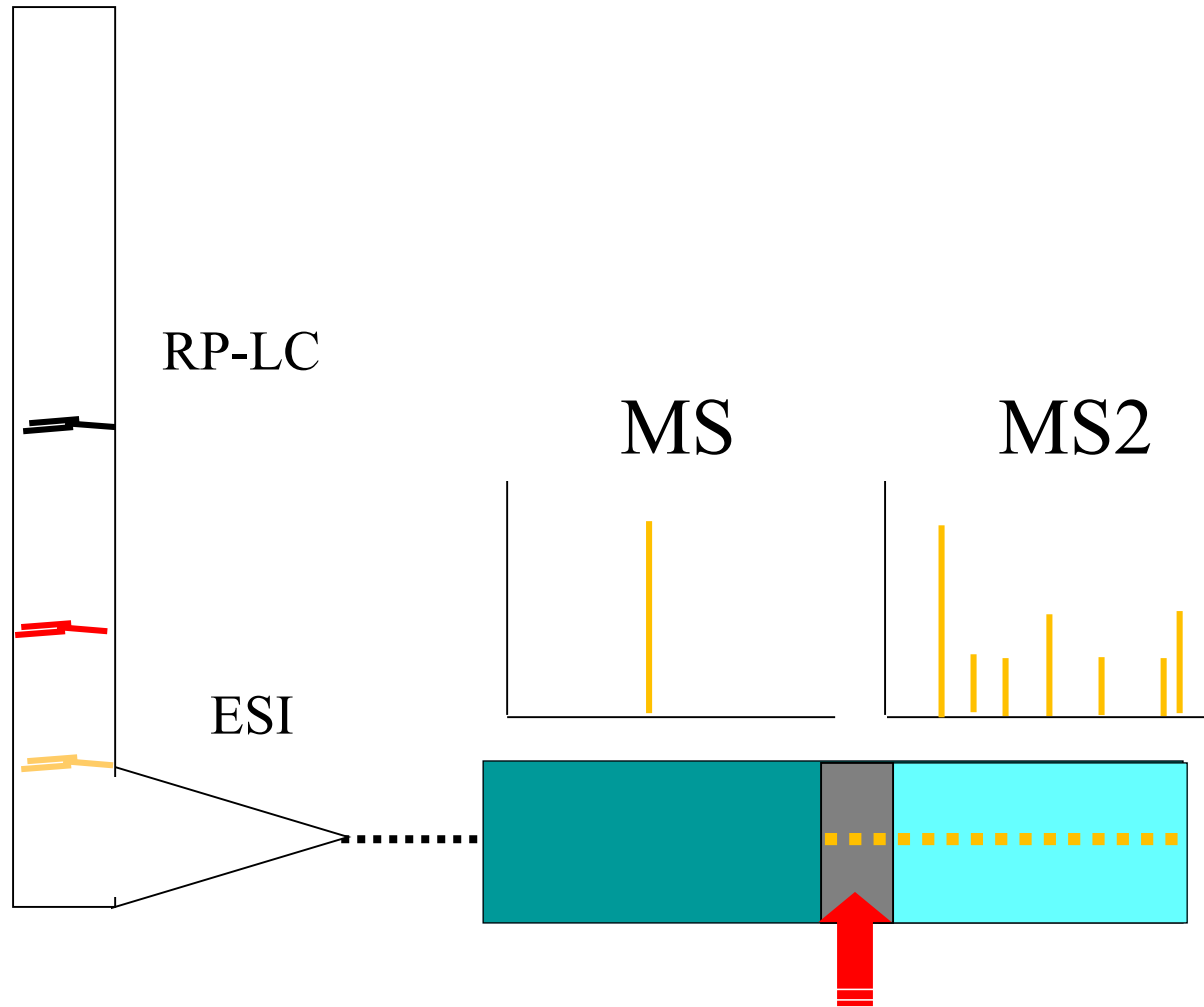
LC-MS/MS



LC-MS/MS



LC-MS/MS



RP-LC

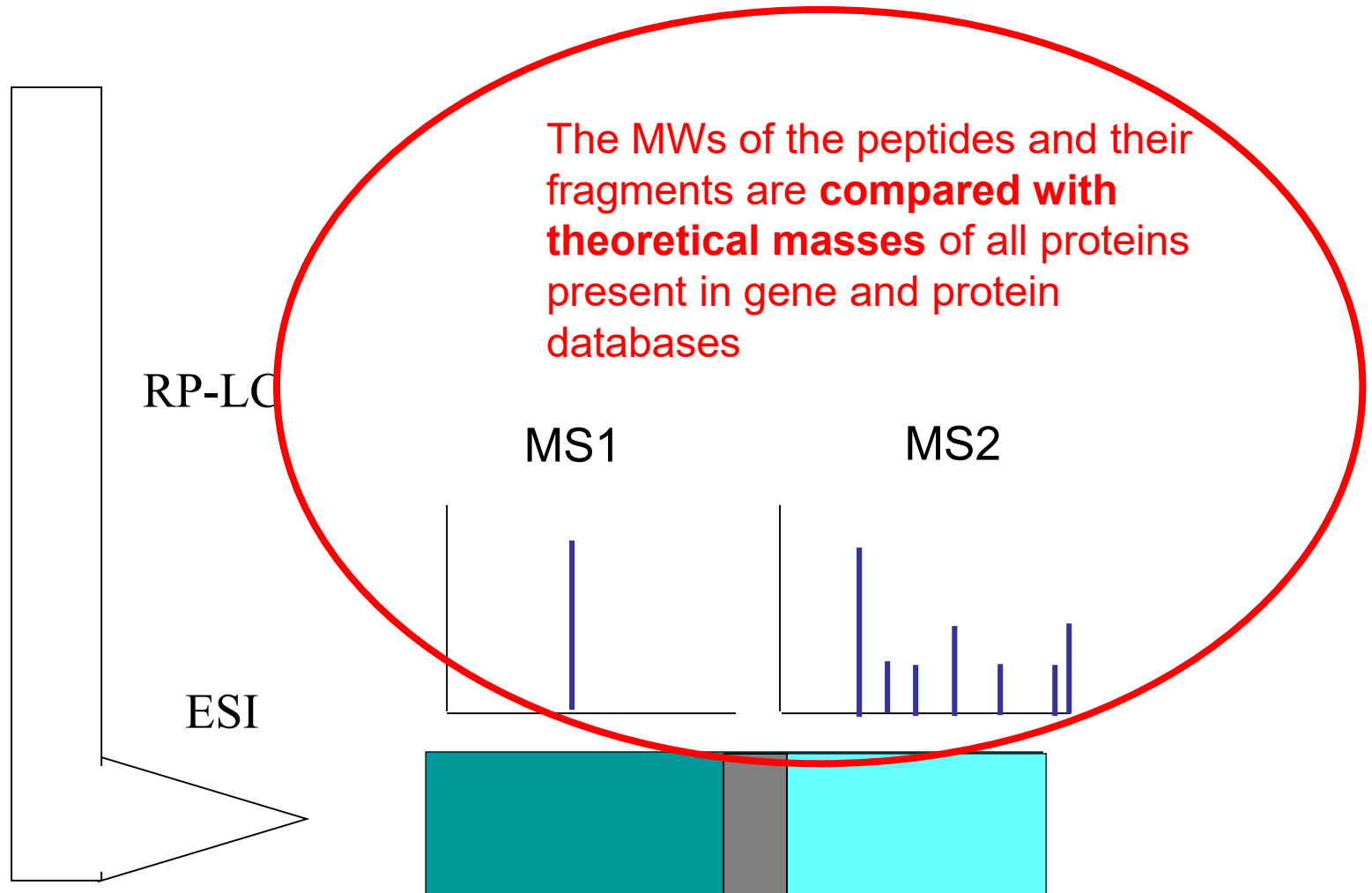
ESI

MS

MS2

Collision cell

LC-MS/MS



Identification of protein in databases from MS data

GENES, ORFs



In silico translation

PROTEINS



In silico digestion with trypsin (-R/-K)

PEPTIDES



theoretical MWs of peptides

FRAGMENTS



theoretical MWs of peptide fragments

Gene/Protein identification

MS data
MWs of **peptides** and
their **fragments**

