



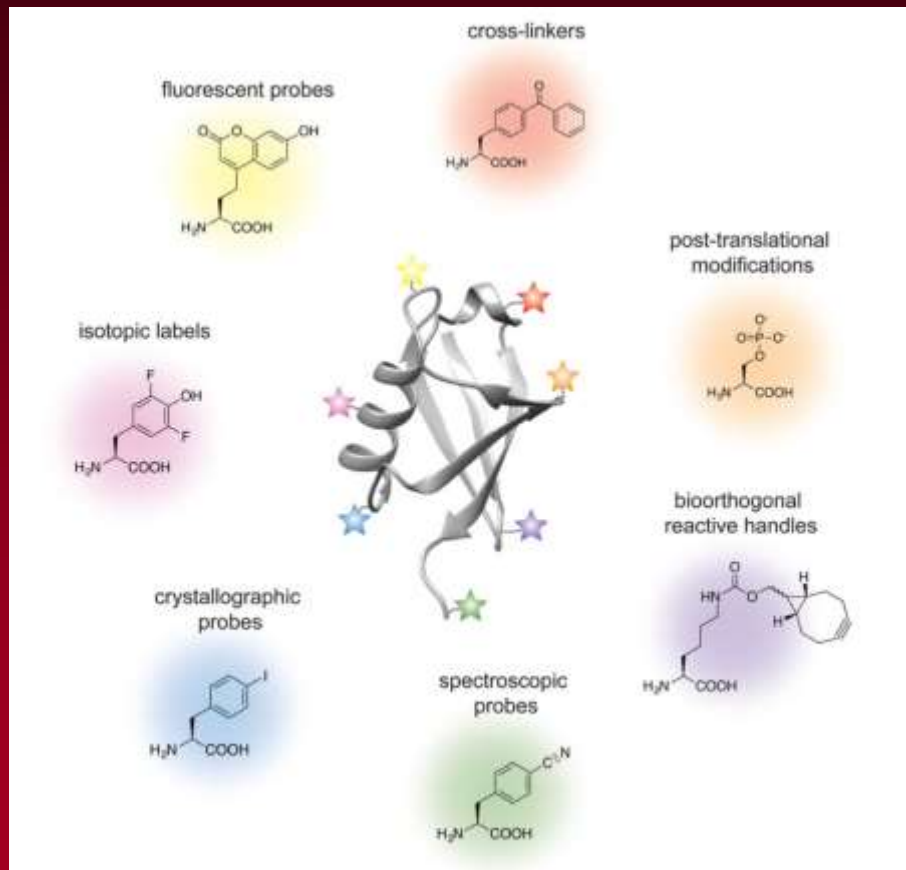
Proteomika 2025

PROTEOMIKA 2025

- **Proteomika, metody práce s bílkovinami** (Petrák 6/10)
- **Separační metody, digesce a principy ID bílkovin pomocí MS** (Petrák 13/10)
- **Principy hmotnostní spektrometrie, instrumentace** (Man 20/10)
- **Hmotnostní spektrometrie v proteomice, analýza PTM** (Man 27/10)
- **ID proteinů, akvizice dat DDA, DIA, databáze, FDR** (Talacko 3/11)
- **Kvantifikace, isotopy, LFQ, cílená proteomika** (Harant 10/11)
- **Design experimentu, zpracování dat, bioinformatika...**(Harant 24/11)
- **Proteomika membránových proteinů, proteinové komplexy** (Petrák 1/12)
- **Klinická proteomika, speciální metody** (Petrák 8/12)

- **Proteomika, protein, proteom, proteoforma**
- **Počet analytů a jejich koncentrace**
- **Důležité vlastnosti proteinů a AMK**
- **Práce s bílkovinami**
 - Dezintegrace tkání a buněk, detergenty
 - Rozpustnost, srážení, denaturace, koncentrace
 - Značení a imobilizace bílkovin

ZNAČENÍ A ZAKOTVOVÁNÍ PROTEINŮ



Reaktivní skupiny bílkovin

sulfhydryl ($-\text{SH}$)

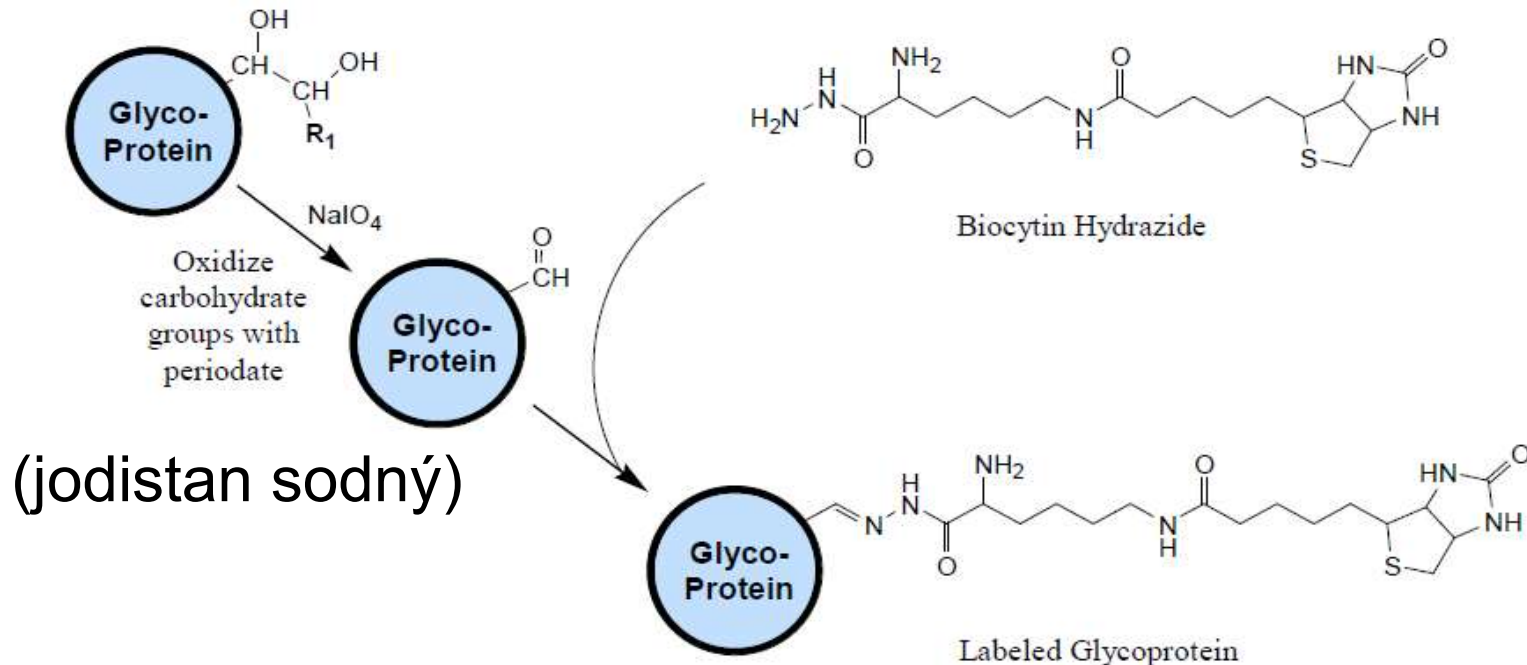
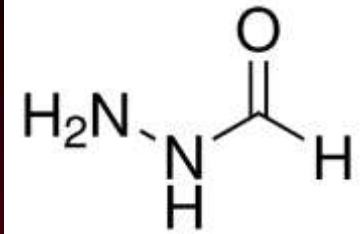
primární amin ($-\text{NH}_2$)

karboxyl ($-\text{COOH}$)

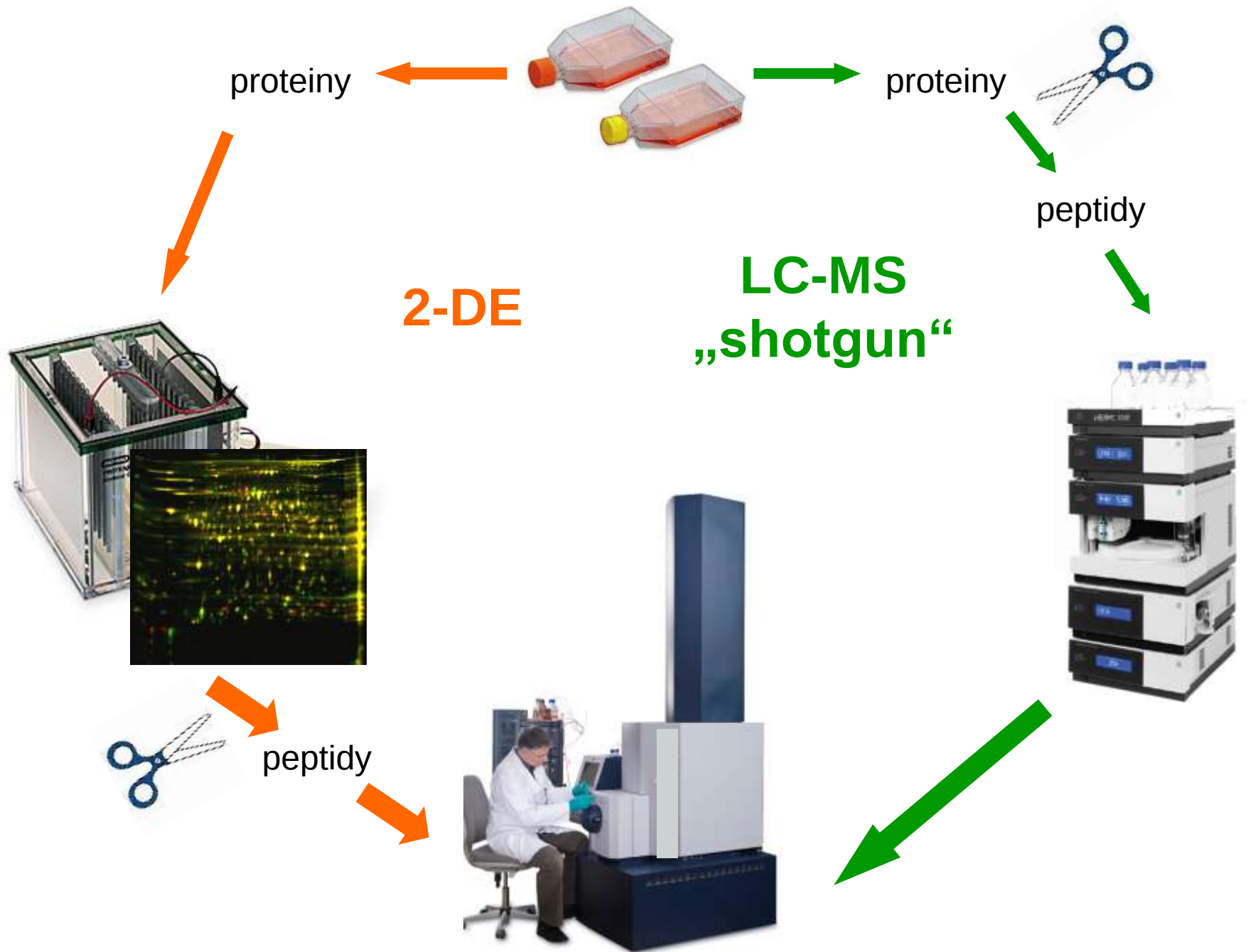
karbonyl sacharidu ($-\text{CHO}$)

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)

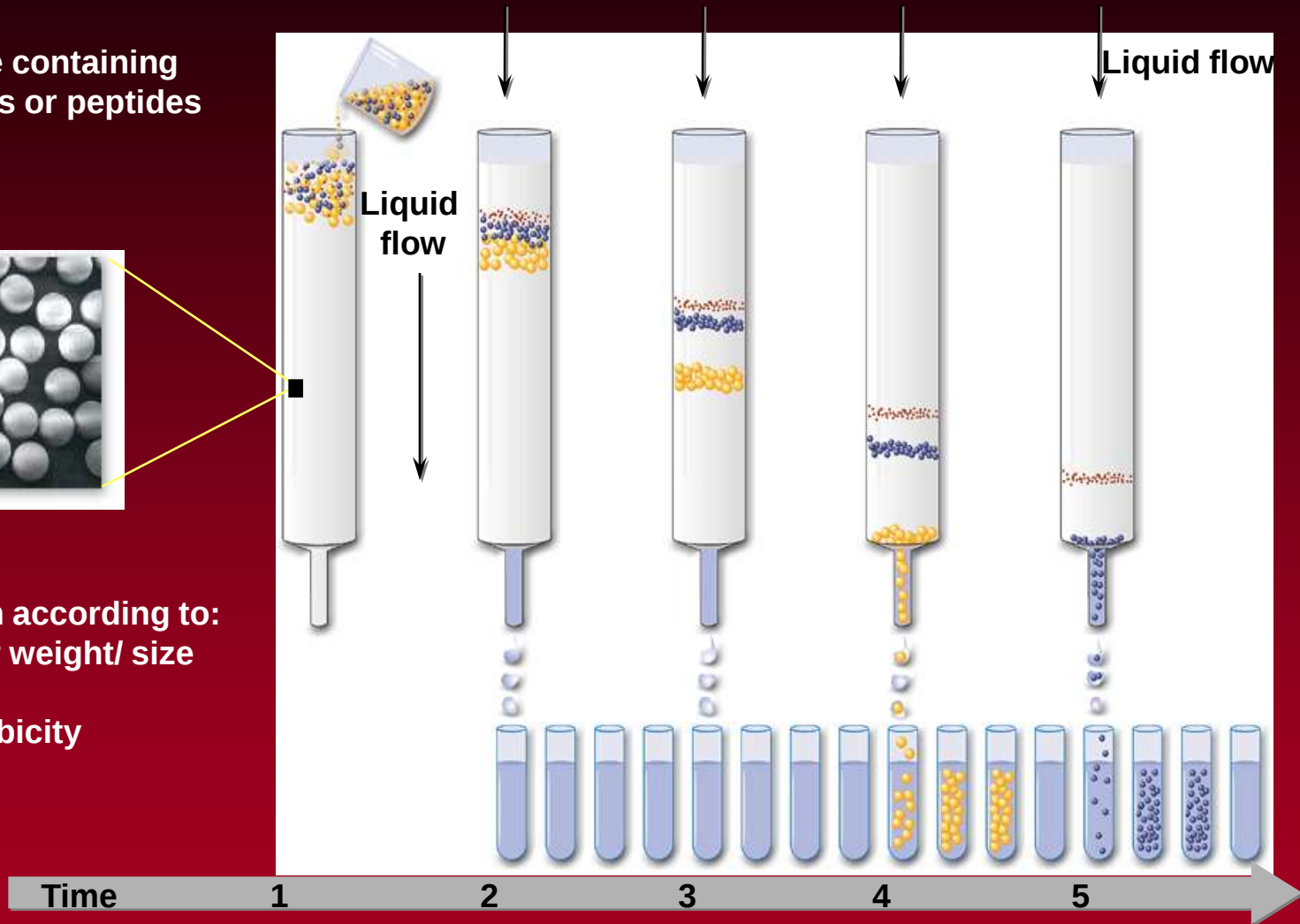
- ELEKTROFORÉZY

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 (Sephарose)
- 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)

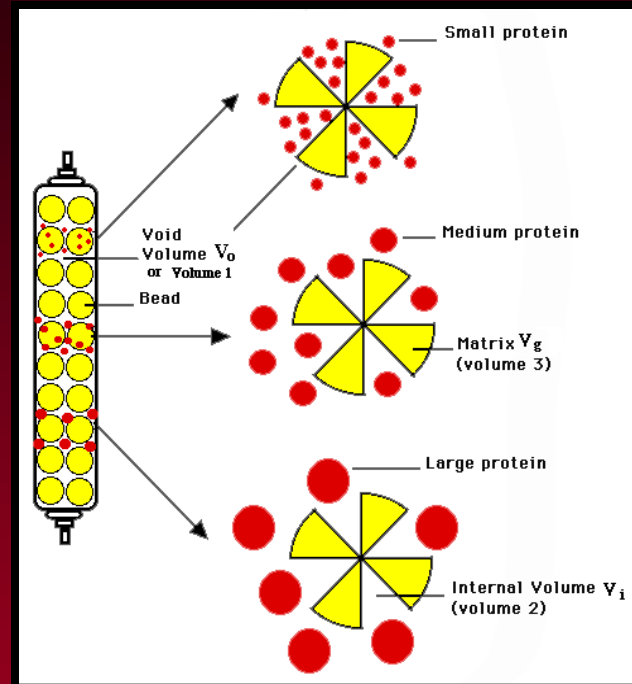
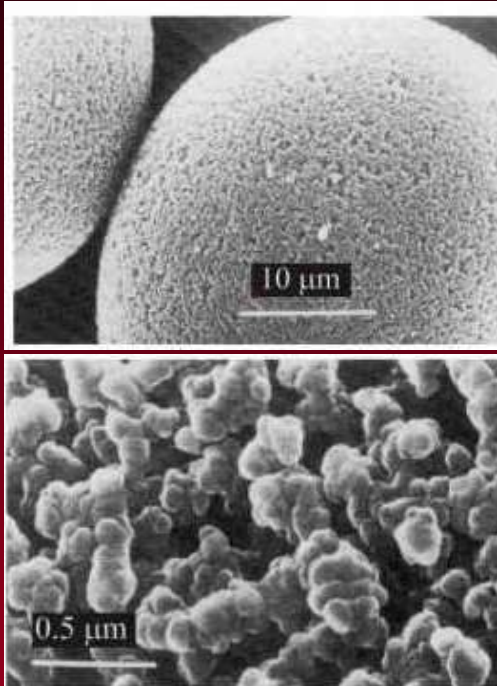
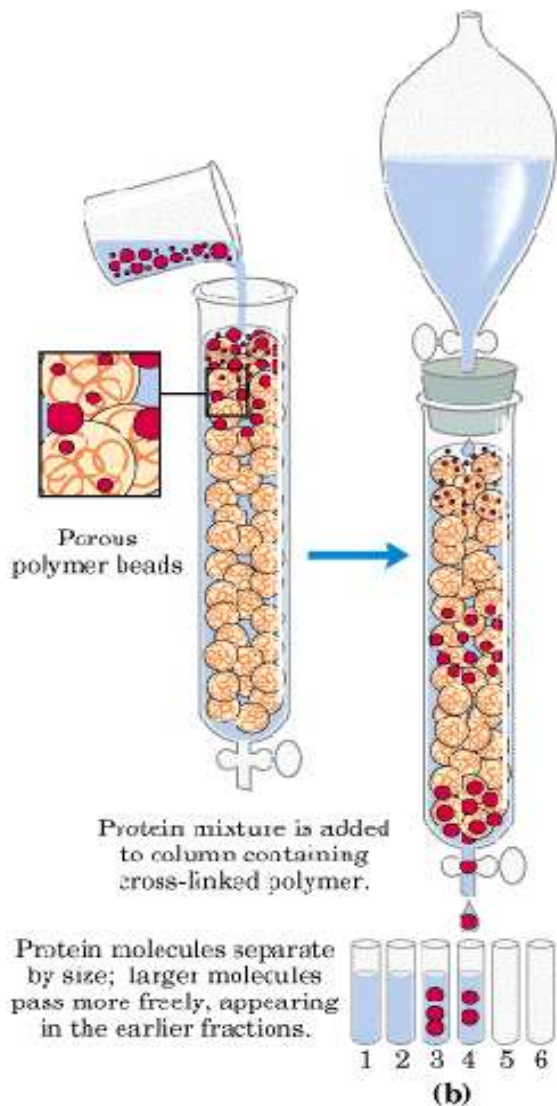
HYDROFILNOST



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 !

Separační rozmezí až do 1000-2 000 000 Da

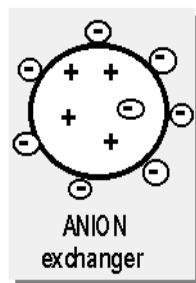
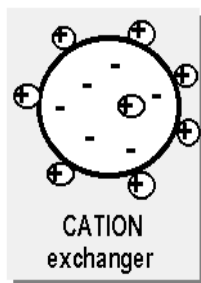
Vhodná pro proteiny a proteinové komplexy

ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY

IONTOMĚNIČOVÁ CHROMATOGRAFIE

- Dělí na základě aktuálního celkového náboje

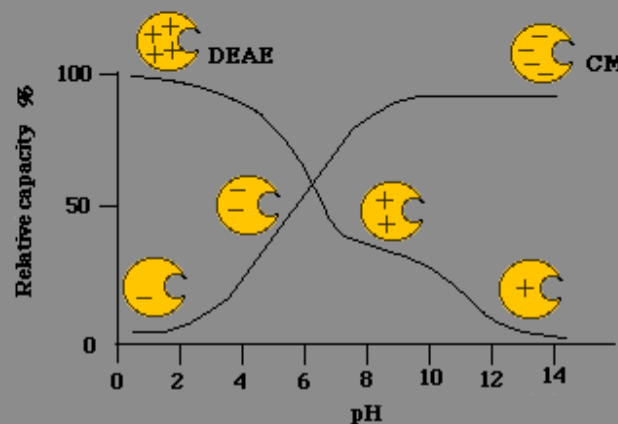
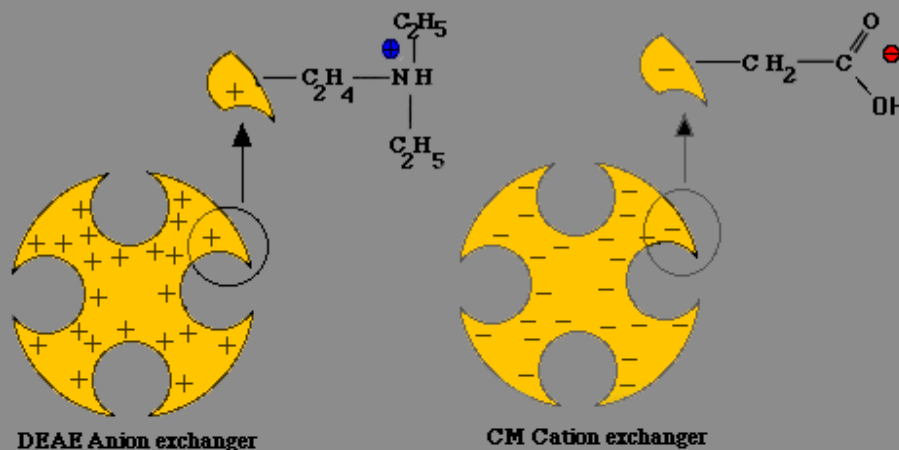
Ion exchange resins



Anex je pozitivně nabitý

Katex je negativně nabitý

Charge Properties of Ion Exchangers



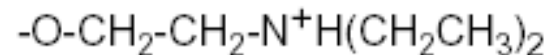
Vhodná pro proteiny i peptidy

Funkční skupiny iontoměničů

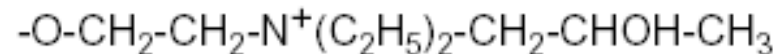
Anion exchangers

Functional group

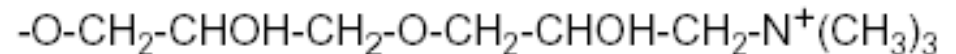
Diethylaminoethyl (DEAE)



Quaternary aminoethyl (QAE)



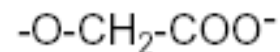
Quaternary ammonium (Q)



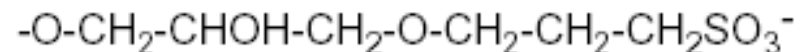
Cation exchangers

Functional group

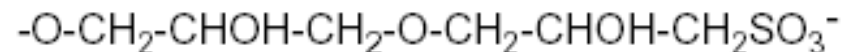
Carboxymethyl (CM)



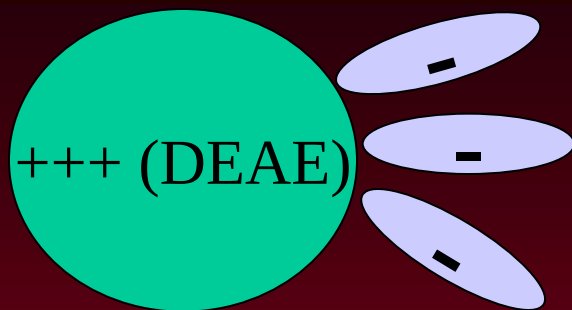
Sulphopropyl (SP)



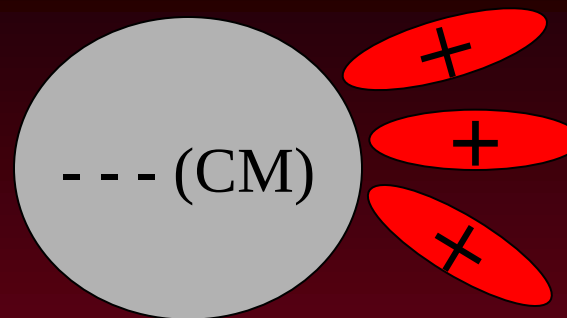
Methyl sulphonate (S)



ANEX



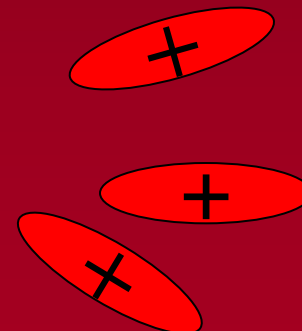
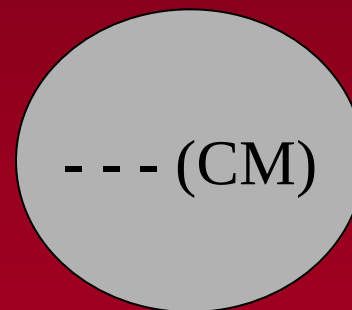
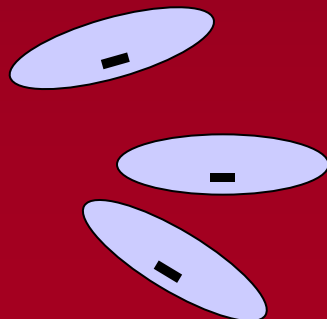
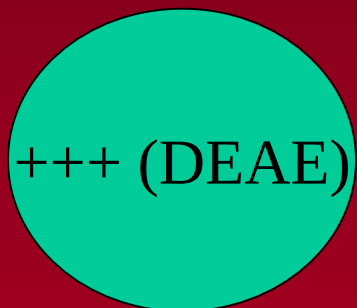
KATEX



ELUCE:

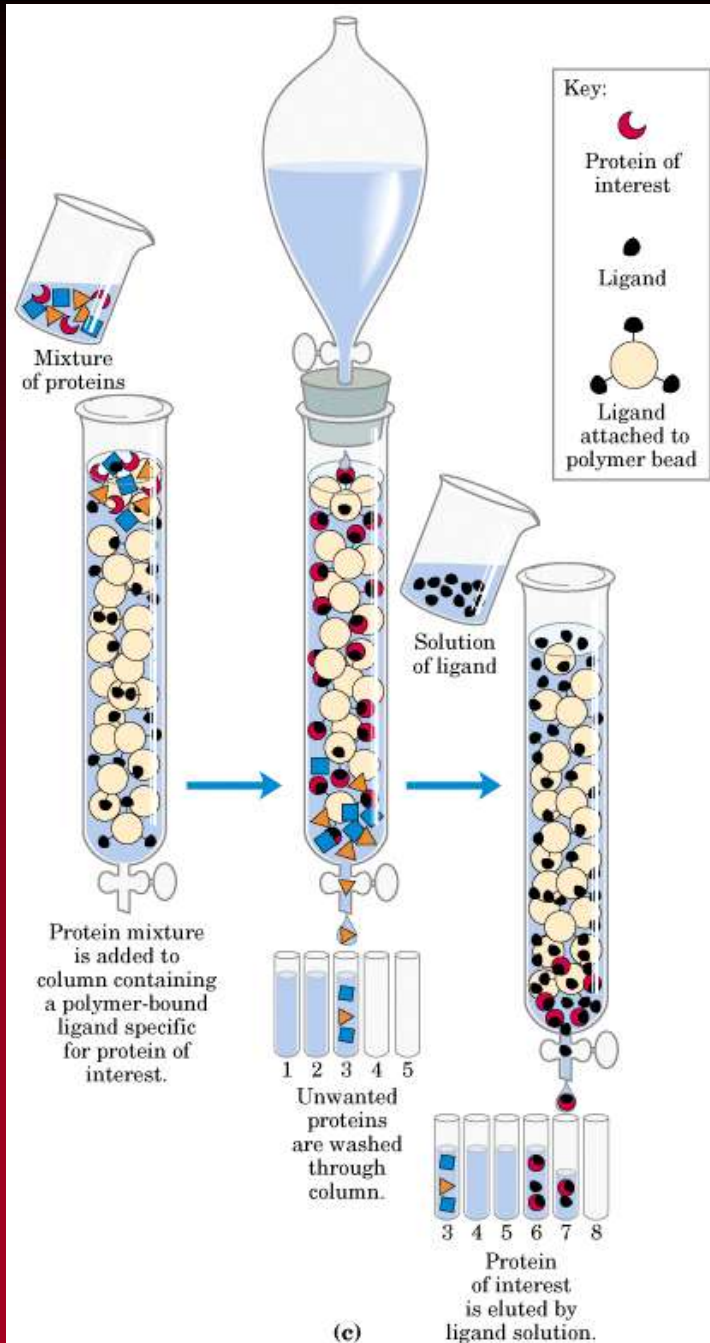
Zvýšená iontová síla (snížení ES interakcí)

Změna pH = chromatofokusace



AFINITNÍ CHROMATOGRAFIE

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



Eluce:

- pH
- iontová síla
- denaturační činidlo
- **volný ligand**

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

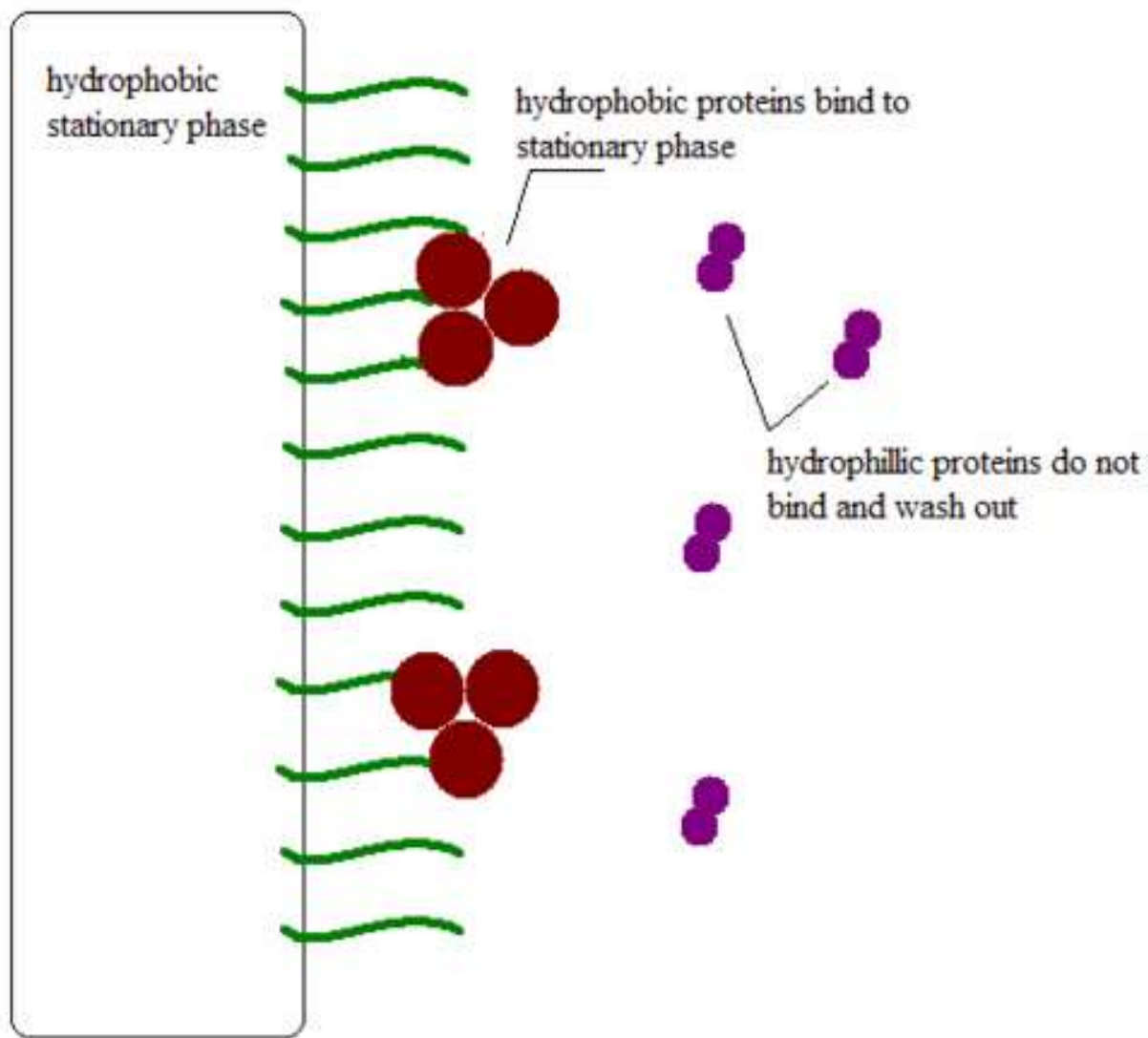
Protein A, G magnetic beads

Matrice s afinitou pro glykoproteiny (nekovalentní)

ConA Sepharose

REVERZNÍ FÁZE (REVERSE PHASE CHROMATOGRAPHY)

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

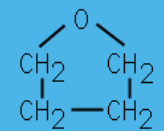


- Matrice a ligand: vysoce hydrofobní alifatické řetězce
- Vzorek je v hydrofilním rozpouštědle
- Eluce: **gradientem organického rozpouštědla**

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

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

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

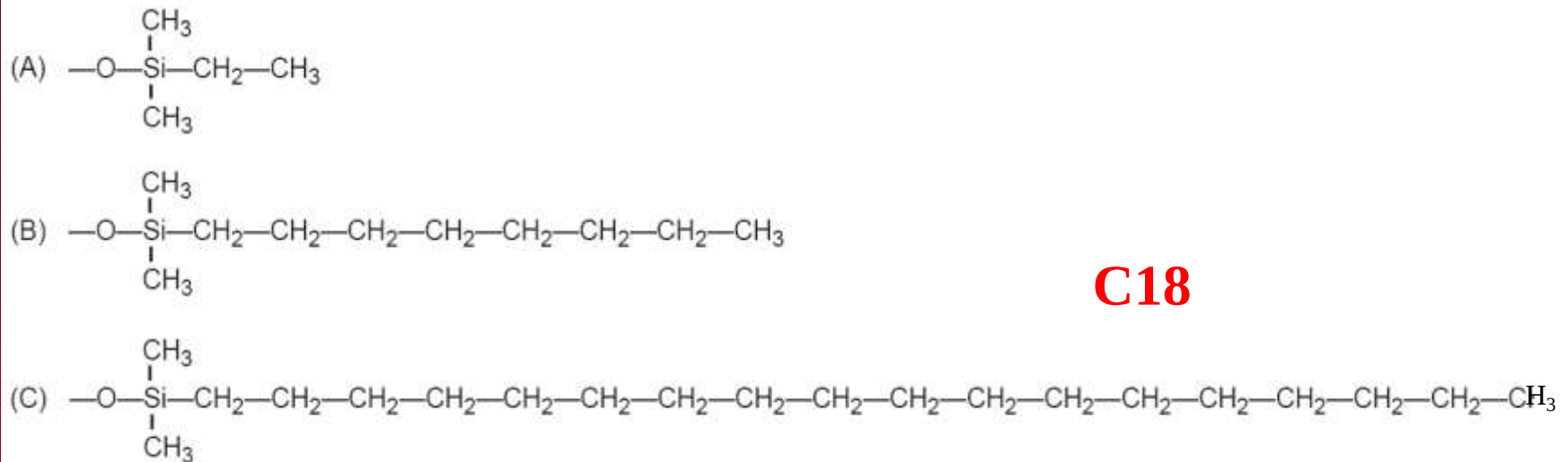

Tetrahydrofuran

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



Kompatibilita s MS!

Vhodná pro proteiny i peptidy

HILIC – hydrophilic interaction liquid chromatography (chromatografie hydrofilních interakcí)

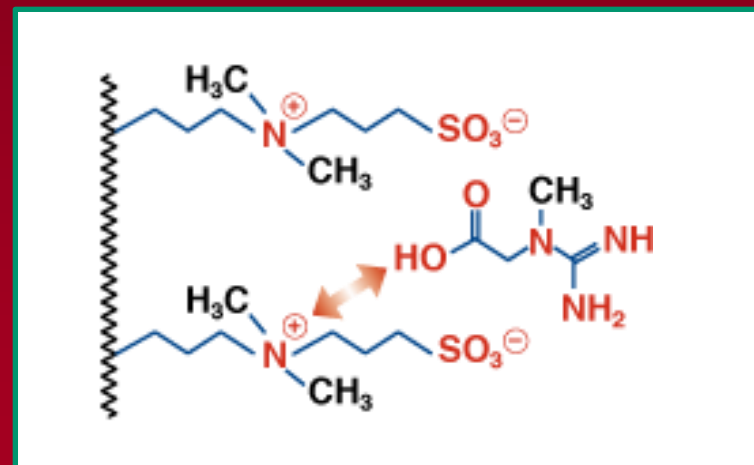
Dělí analyty na základě polárních interakcí

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

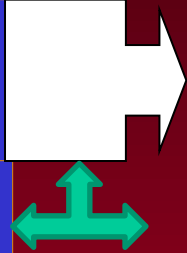


Vhodná pro proteiny i peptidy

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

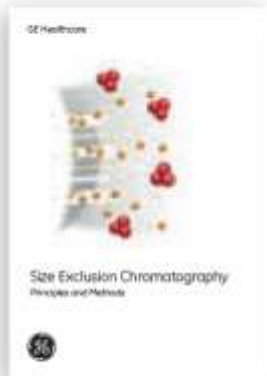


Macrotrap



Zip-Tips

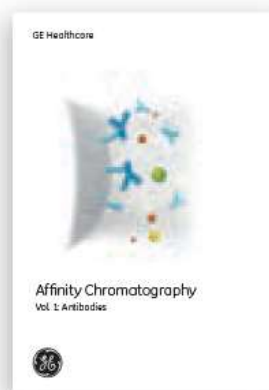




Size Exclusion Chromatography

Principles and Methods

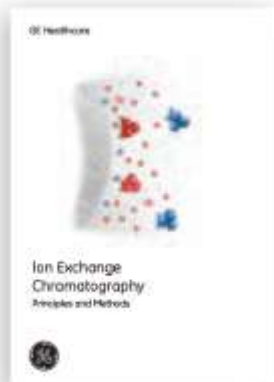
18102218



Affinity Chromatography

Vol. 1: Antibodies

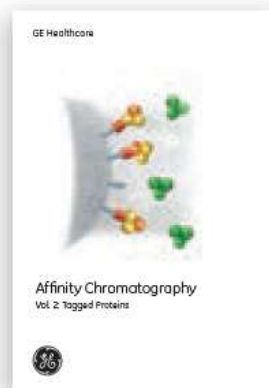
18103746



Ion Exchange Chromatography

Principles and Methods

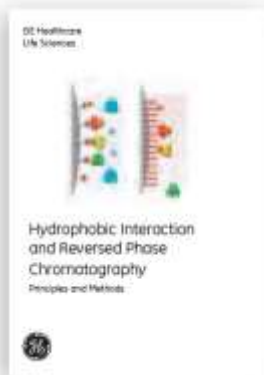
11000421



Affinity Chromatography

Vol. 2: Tagged Proteins

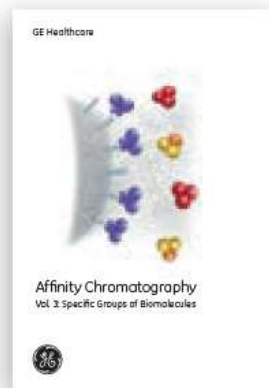
18114275



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

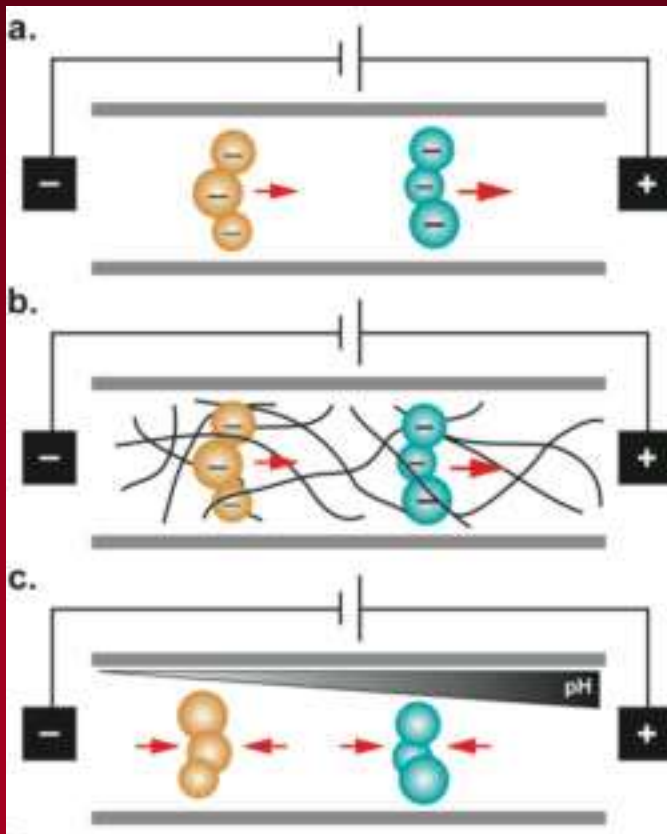
Specifická mobilita

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

z - náboj

η - viskozita

r - Stokesův poloměr částice



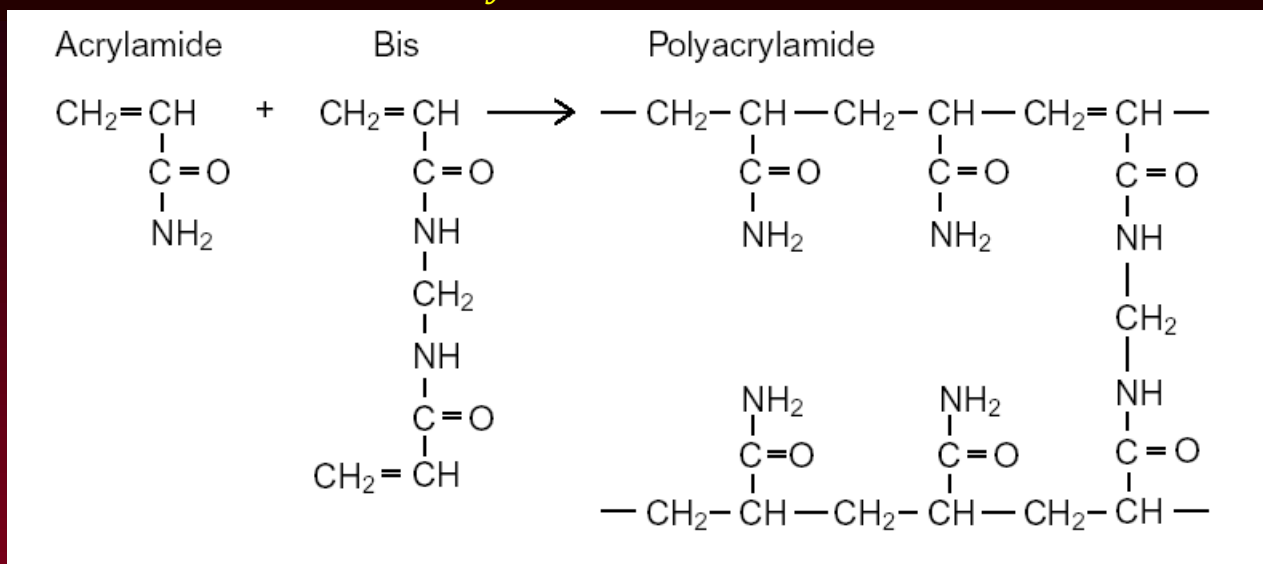
Elektroforéza v roztoku

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)
- **pufr a SDS**

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

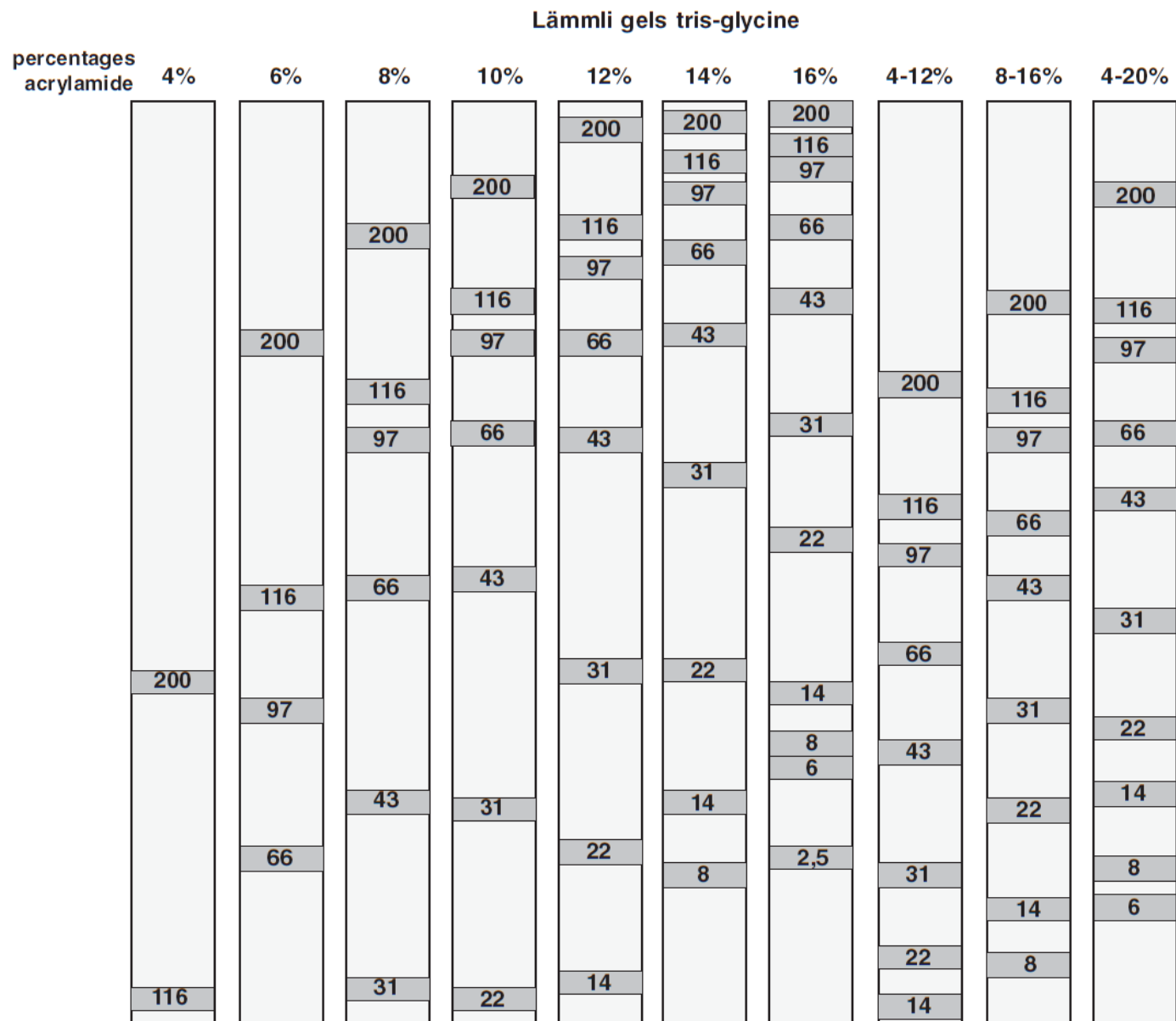
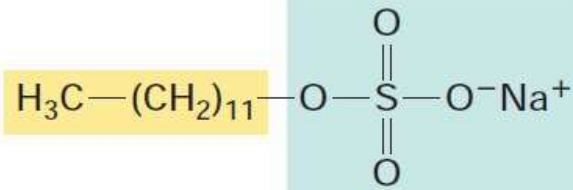


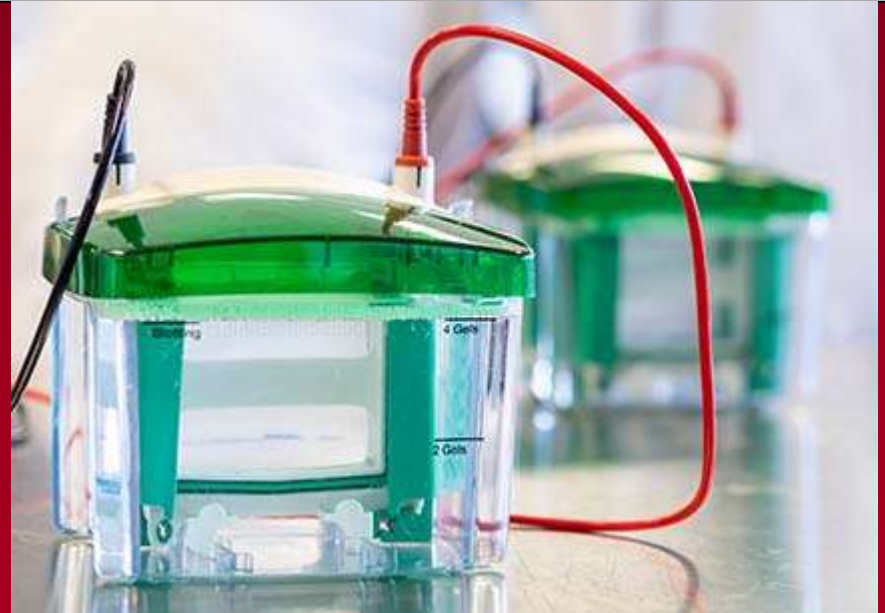
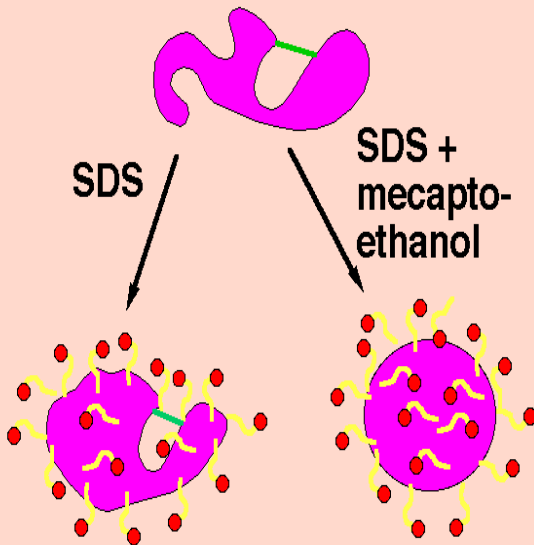
Figure 1.2. Run speed of MW markers in SDS gels.

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

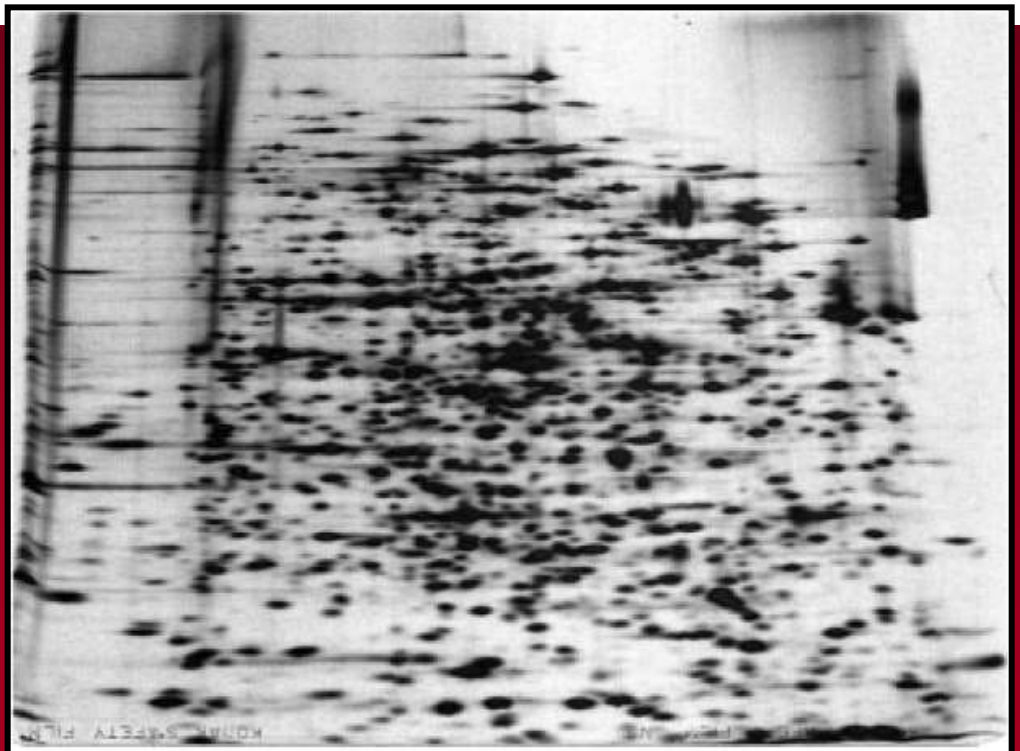
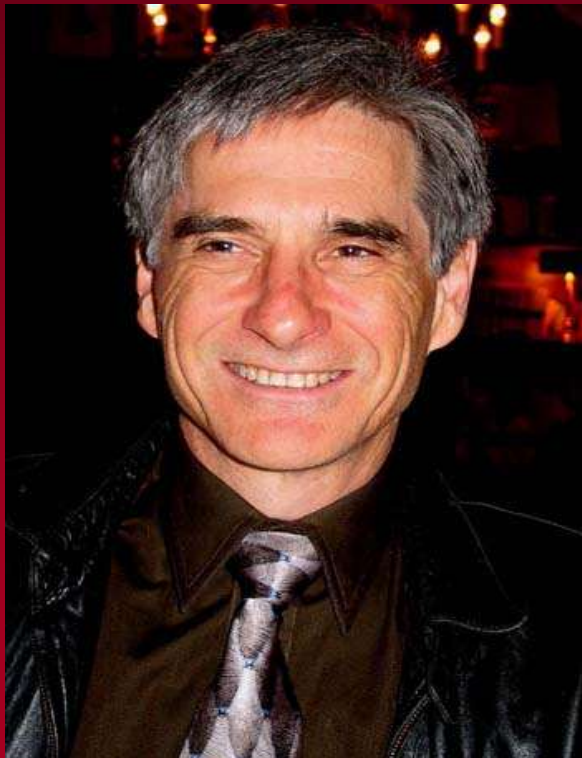
High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins*

(Received for publication, September 5, 1974)

PATRICK H. O'FARRELL†

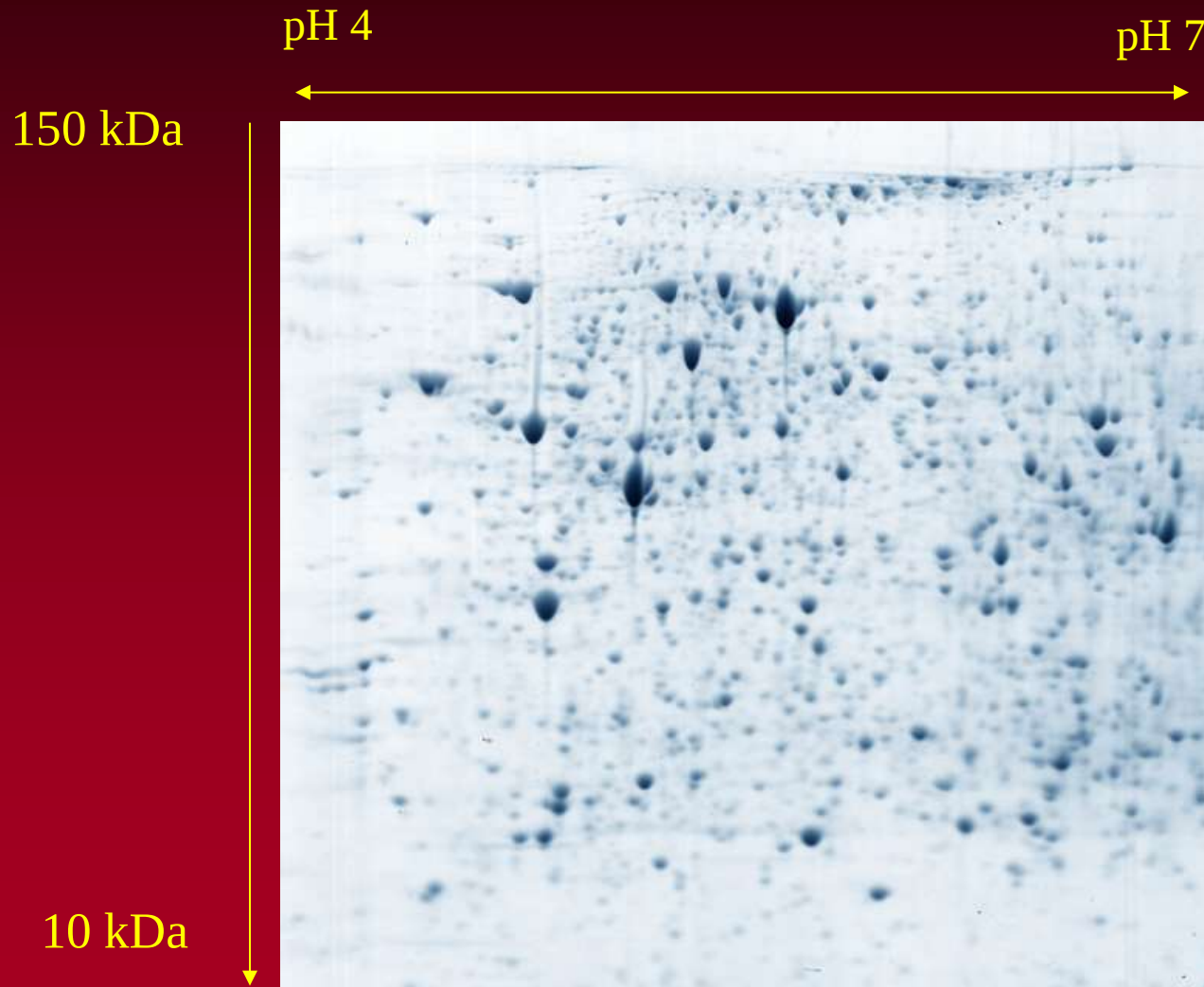
*From the Department of Molecular, Cellular and Developmental Biology, University of Colorado, Boulder,
Colorado 80302*

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)

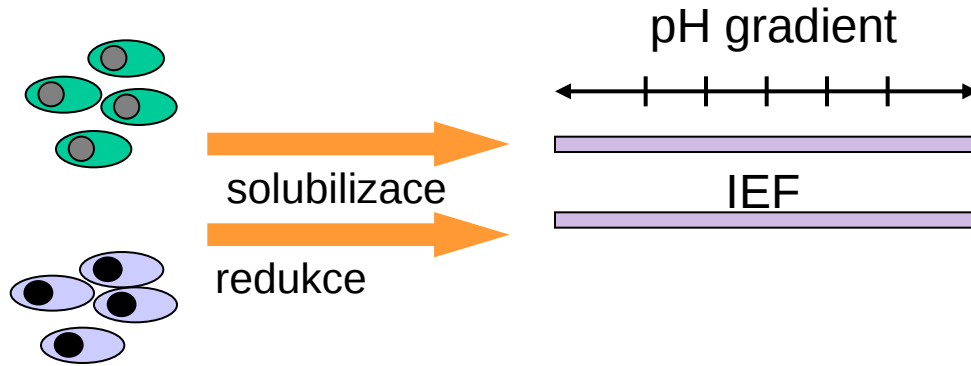
Rozděluje proteiny nejdříve podle jejich **náboje** a následně kolmo na směr původní migrace dle jejich **MW**



Jaterní homogenát,

1025 proteinových
skvrn

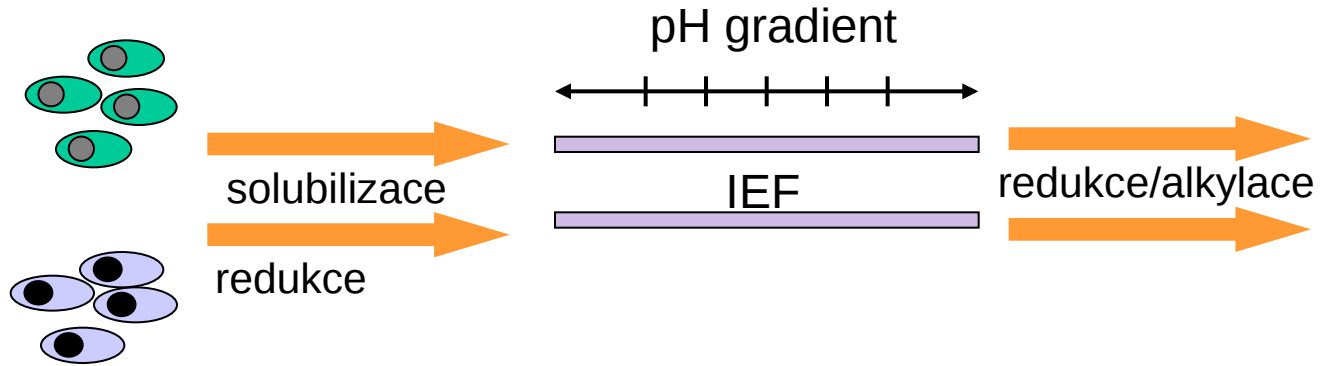
Typický 2-DE experiment (cca 1990-2010)



INSTRUMENTACE IEF

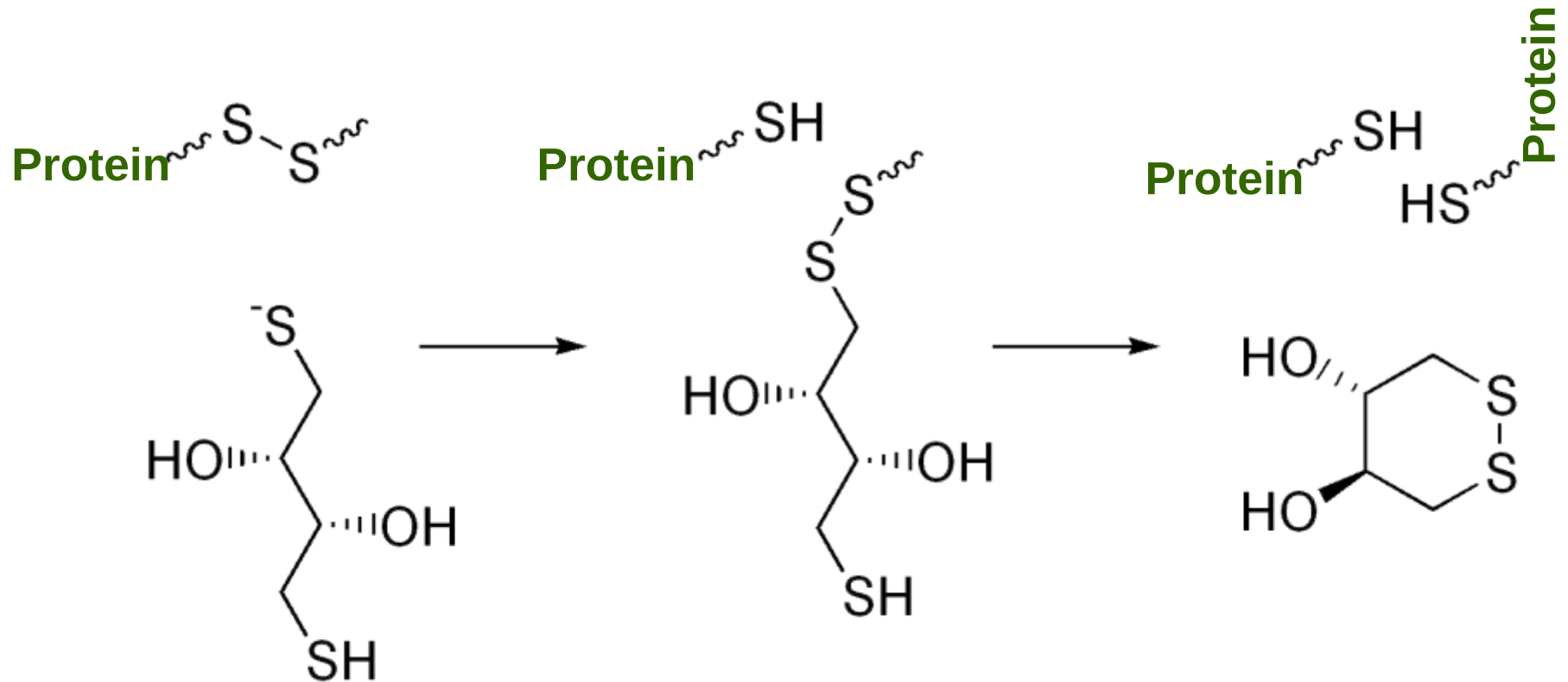


Typický 2-DE experiment (cca 1990-2010)

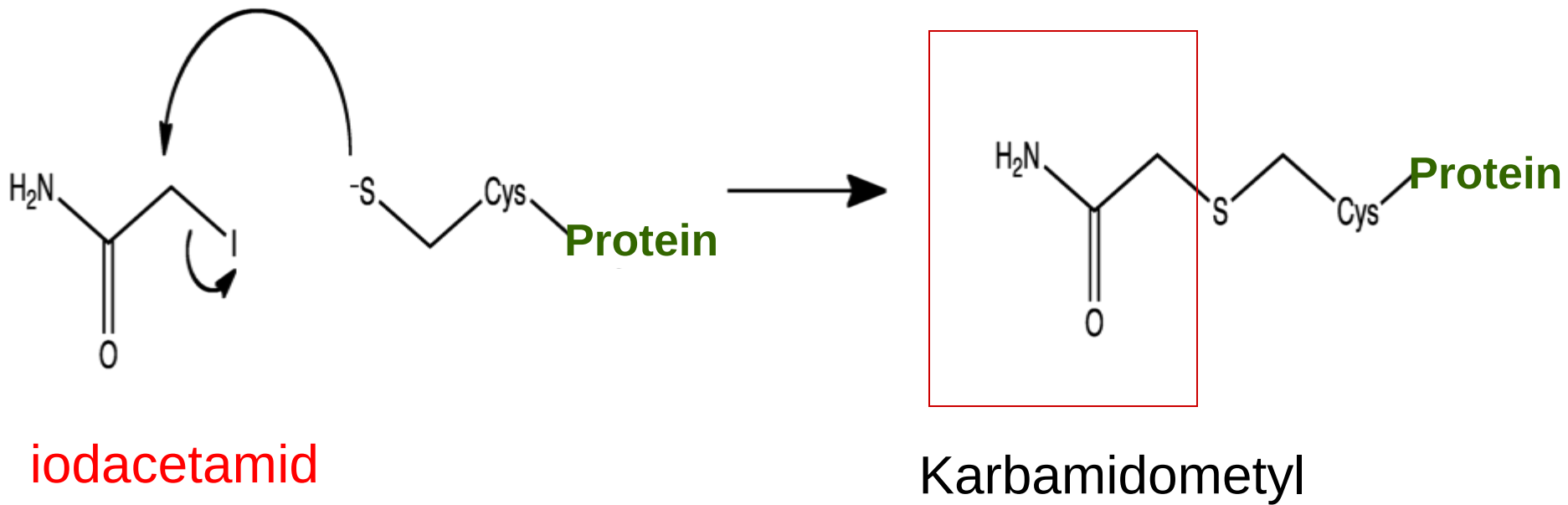


Redukce disulfidických vazeb

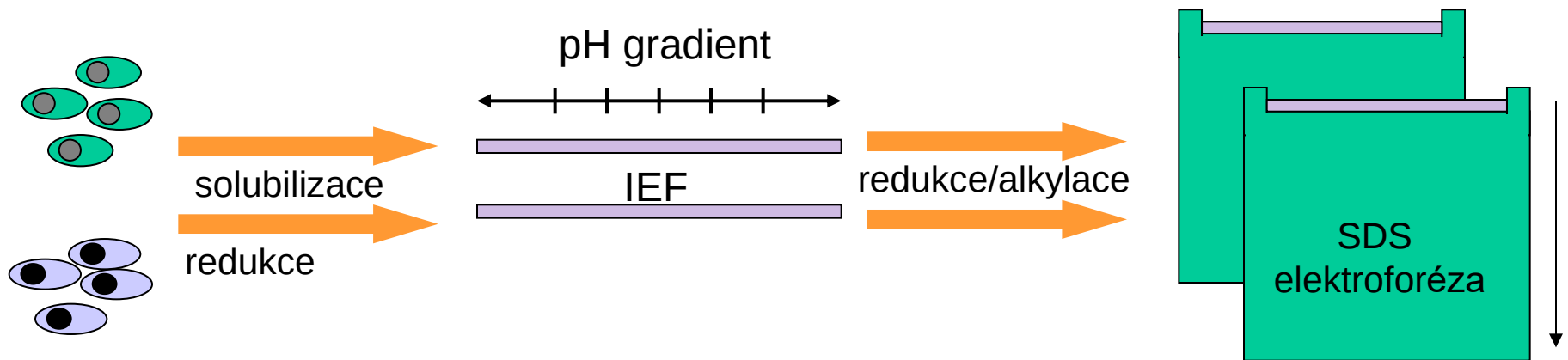
Thiol-disulfidová výměna DTT s proteinem

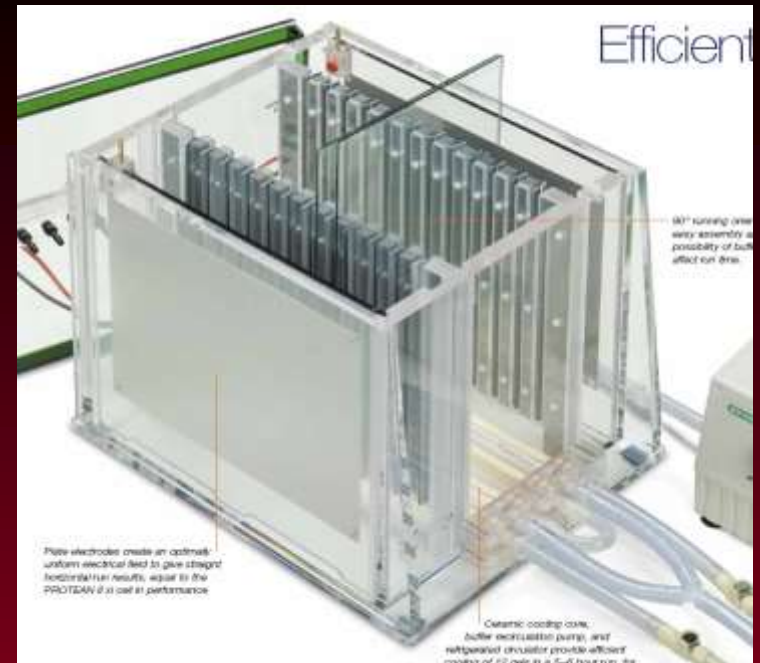
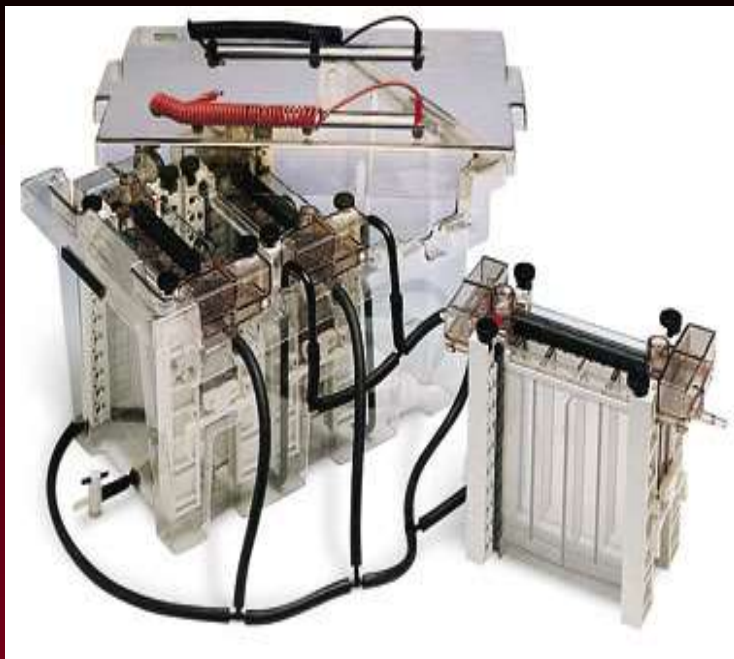


Alkylace cysteinů iodacetamidem

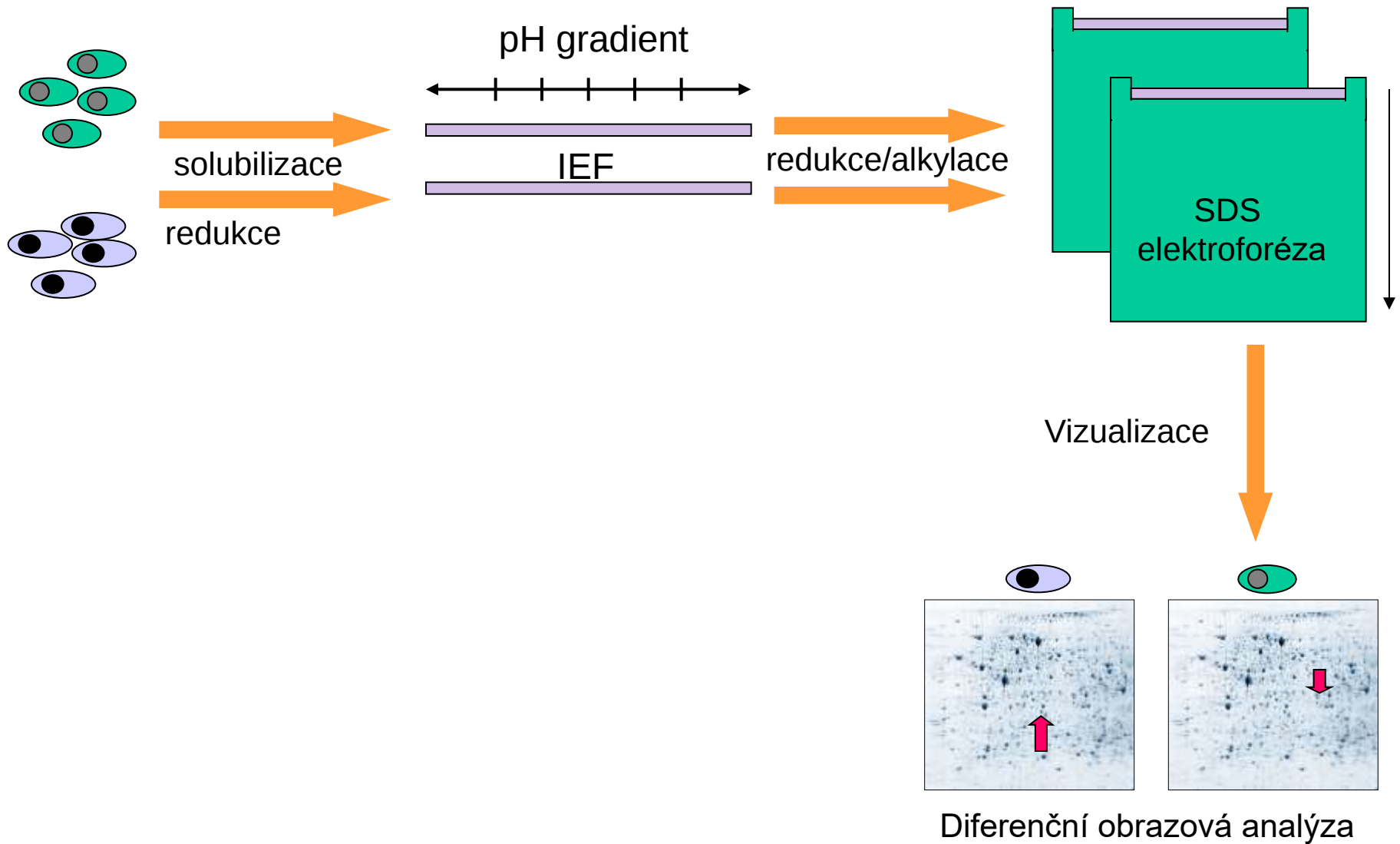


Typický 2-DE experiment





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

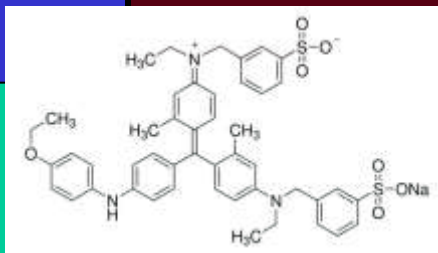
Alkohol-kyselina
Odbarvování proteinů
Špatná kvantifikace
Nízká cena

G 250

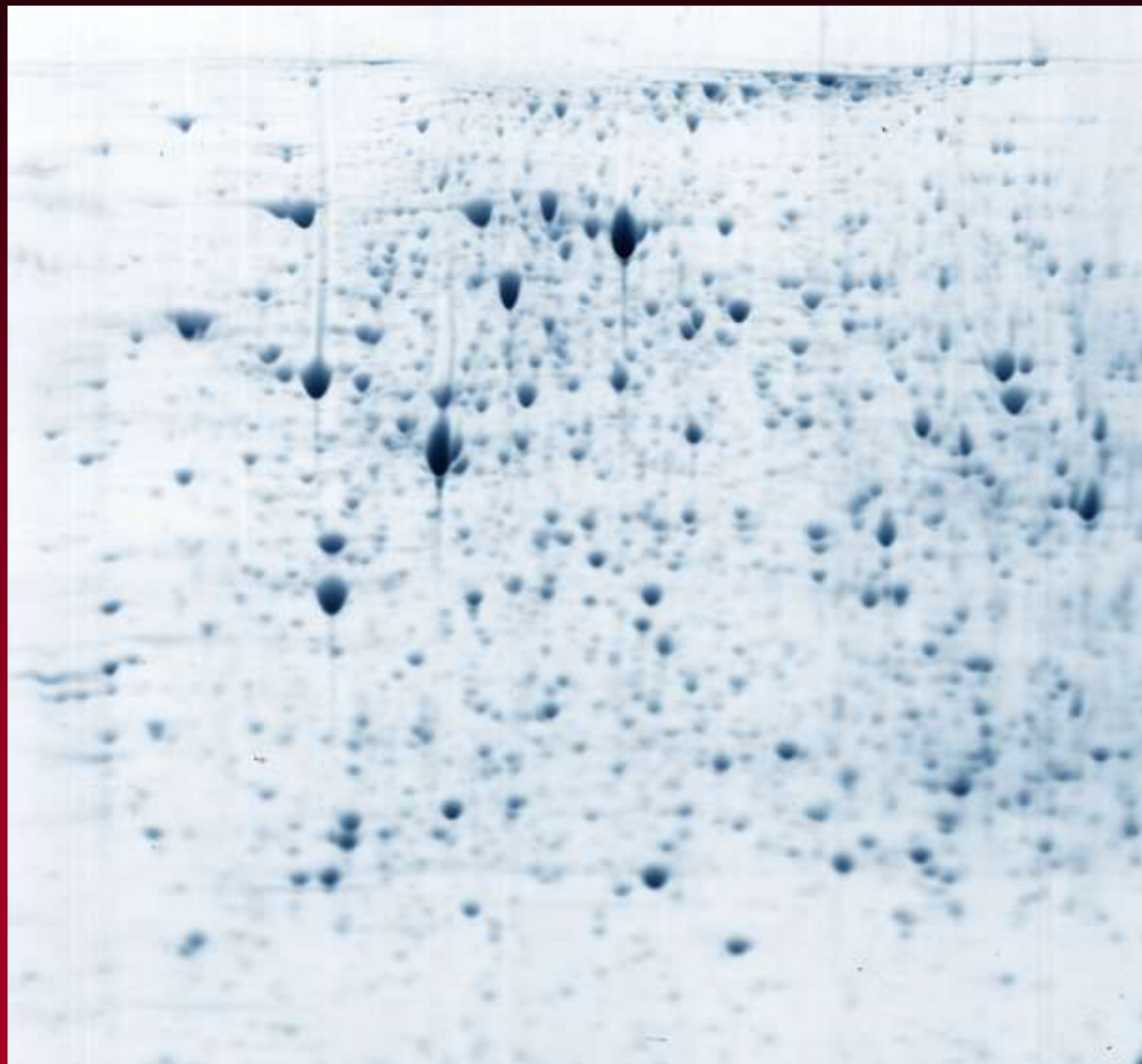
KOLOIDNÍ CBB
(CBB-G250)

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,

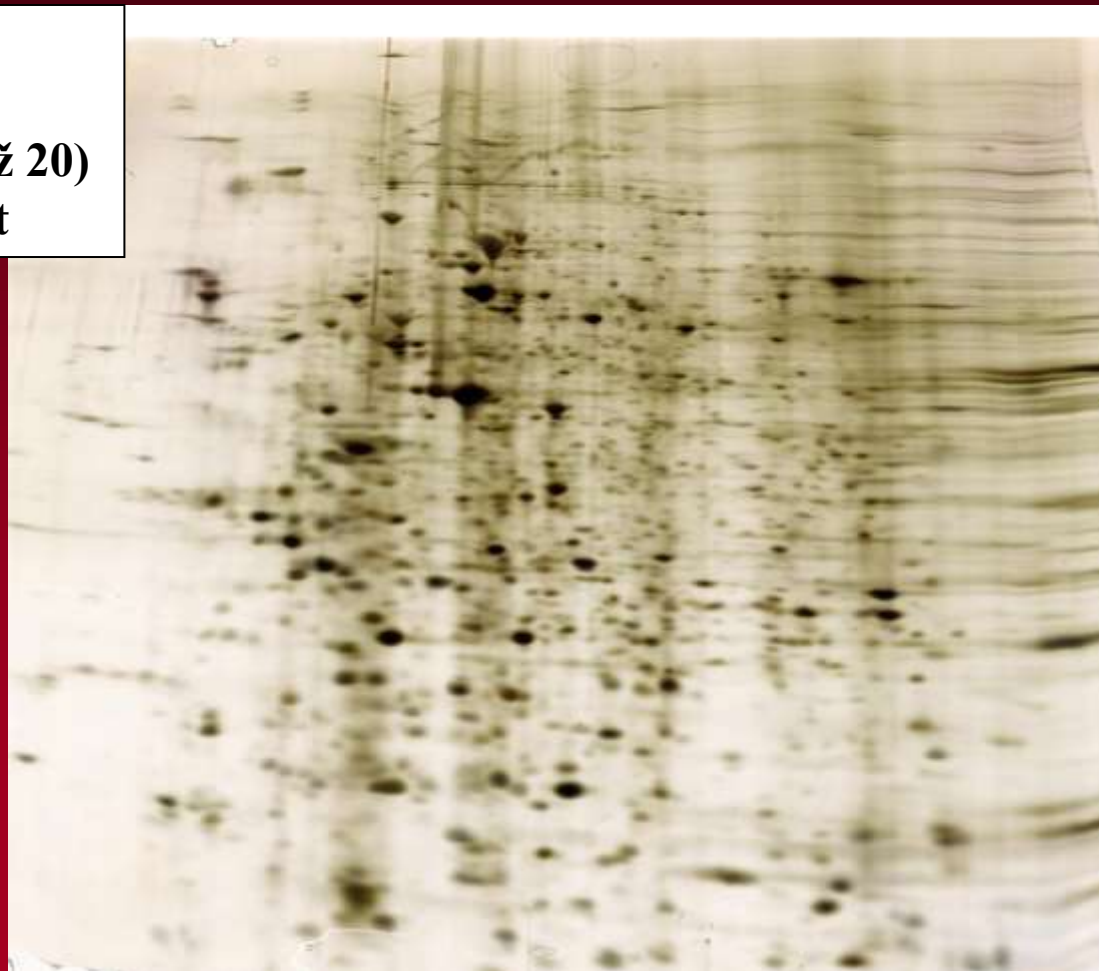
barví : Lys, Arg, His, Tyr, Trp

Citlivost 0.5 ng !

nízká cena

Vícekový postup (až 20)

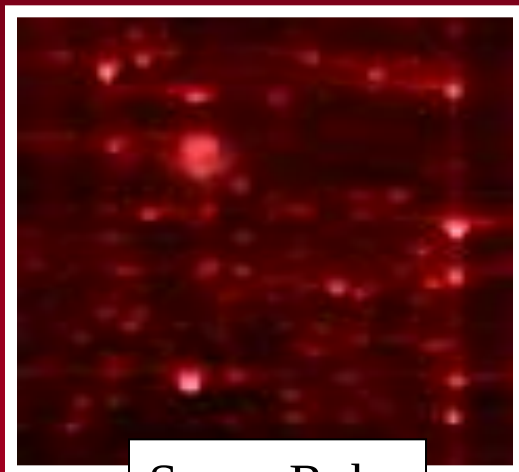
Citlivý na přesnost



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)

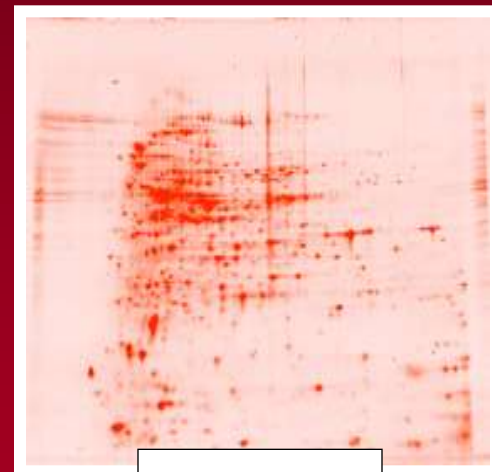
Fluorochromy se váží na detergentový (SDS) obal proteinu
nebo na bazické a aromatické aminokyseliny



Sypro Ruby

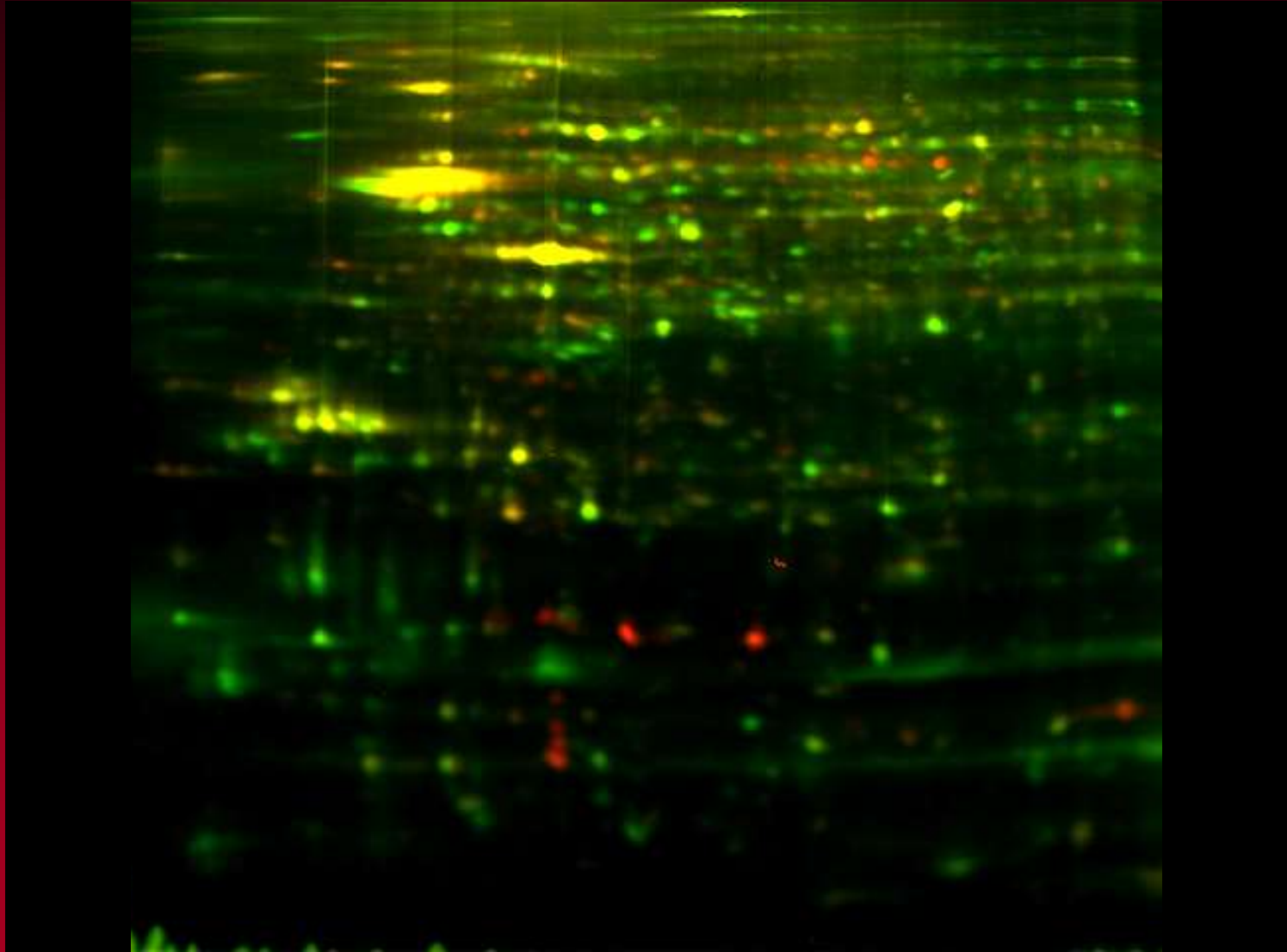
SYPRO RUBY (Molecular Probes)
FLAMINGO (BIO-RAD)
(DEEP) LAVA PURPLE (GE-Amersham)
KRYPTON (Pierce)

Dobrá kvantifikace
Minimum kroků
Dynamický rozsah
Fluorescenční scanner
CCD kamera



Flamingo

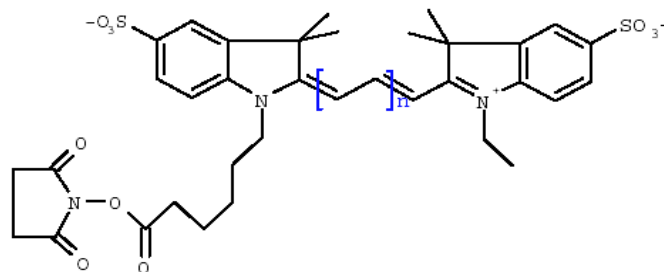
DIGE - Differential gel electrophoresis



(Cy2, Cy3, Cy5 Difference gel electrophoresis)

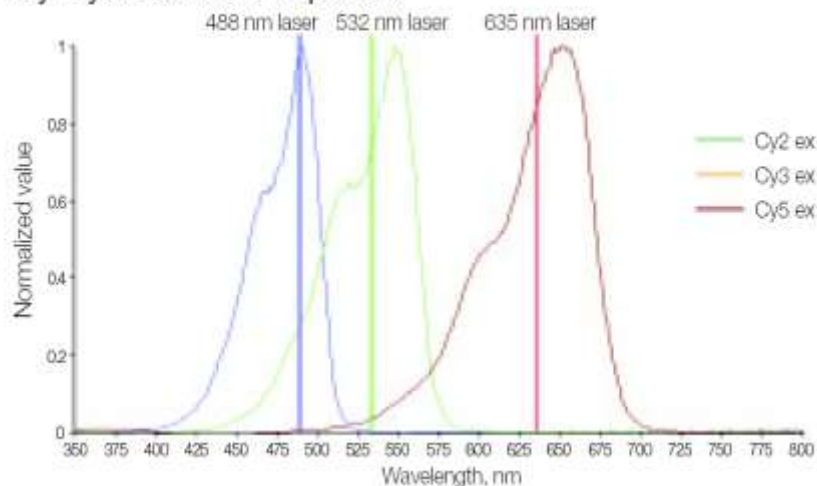


Cyaninové fluorofory

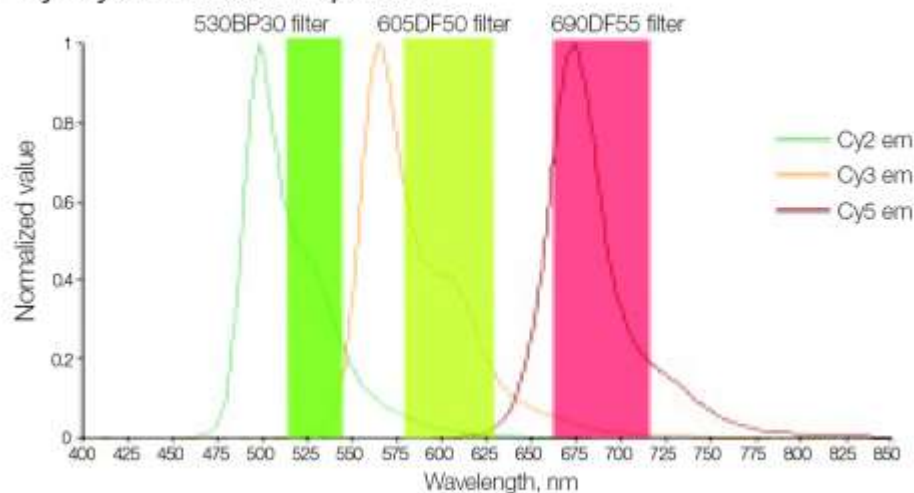


Maleimid - Cys (-SH)
Succinimid - N-term a Lys (ϵ)

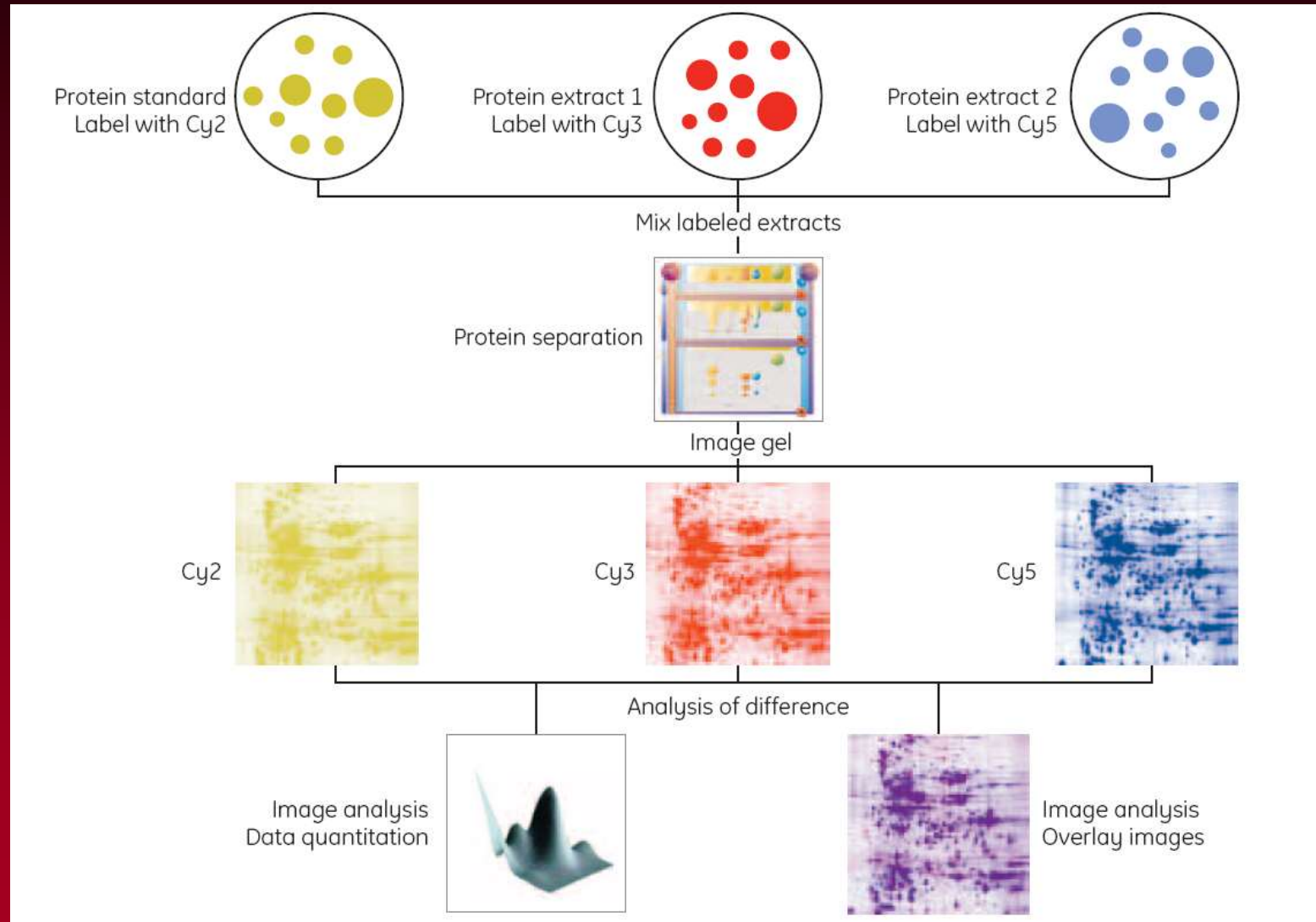
Cy Dye Excitation Spectra

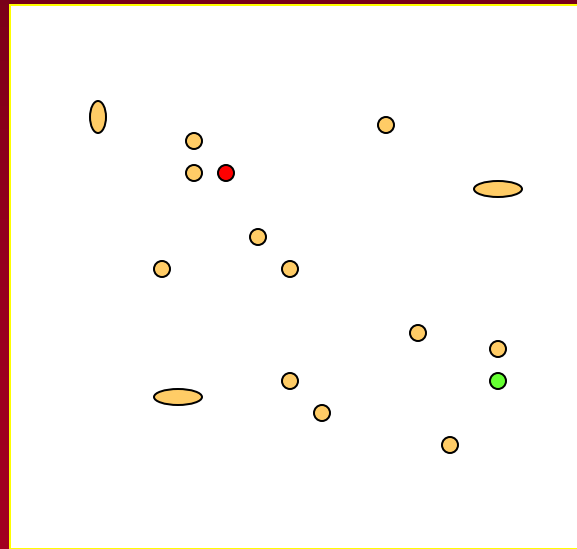
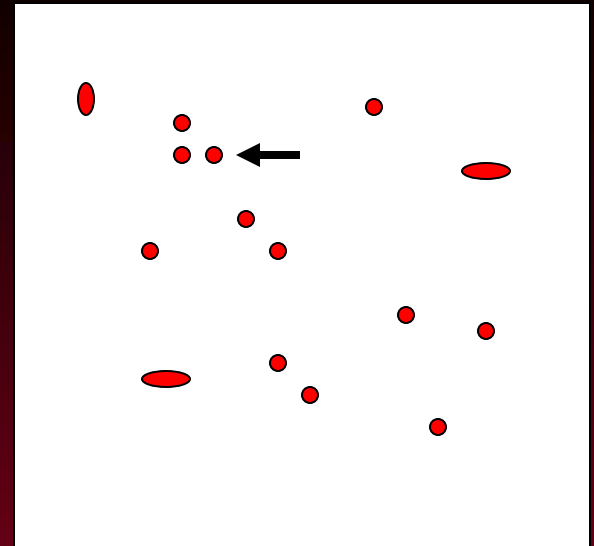
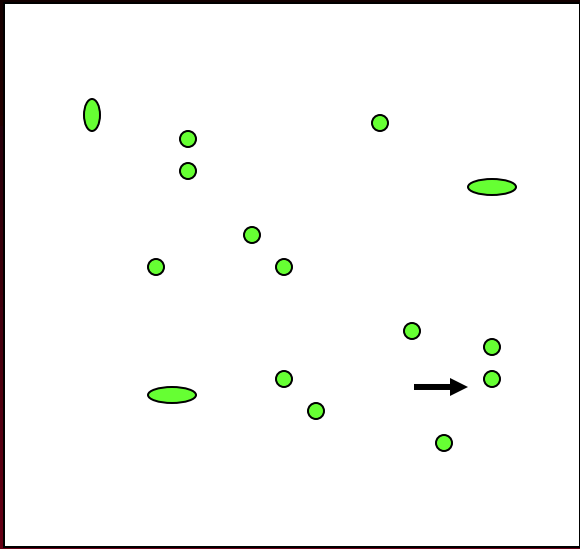


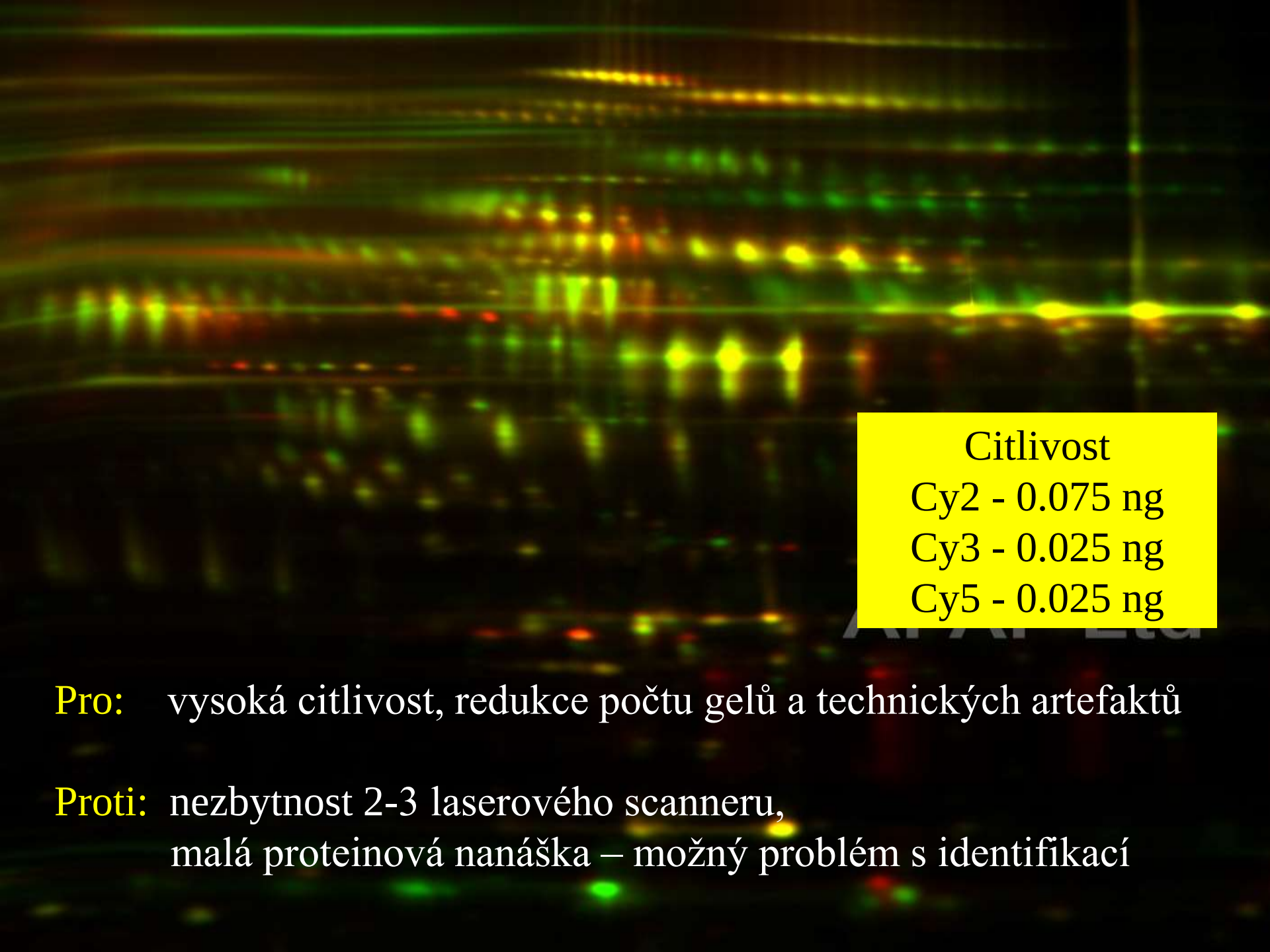
Cy Dye Emission Spectra



EXPERIMENTÁLNÍ USPOŘÁDÁNÍ DIGE







Citlivost

Cy2 - 0.075 ng

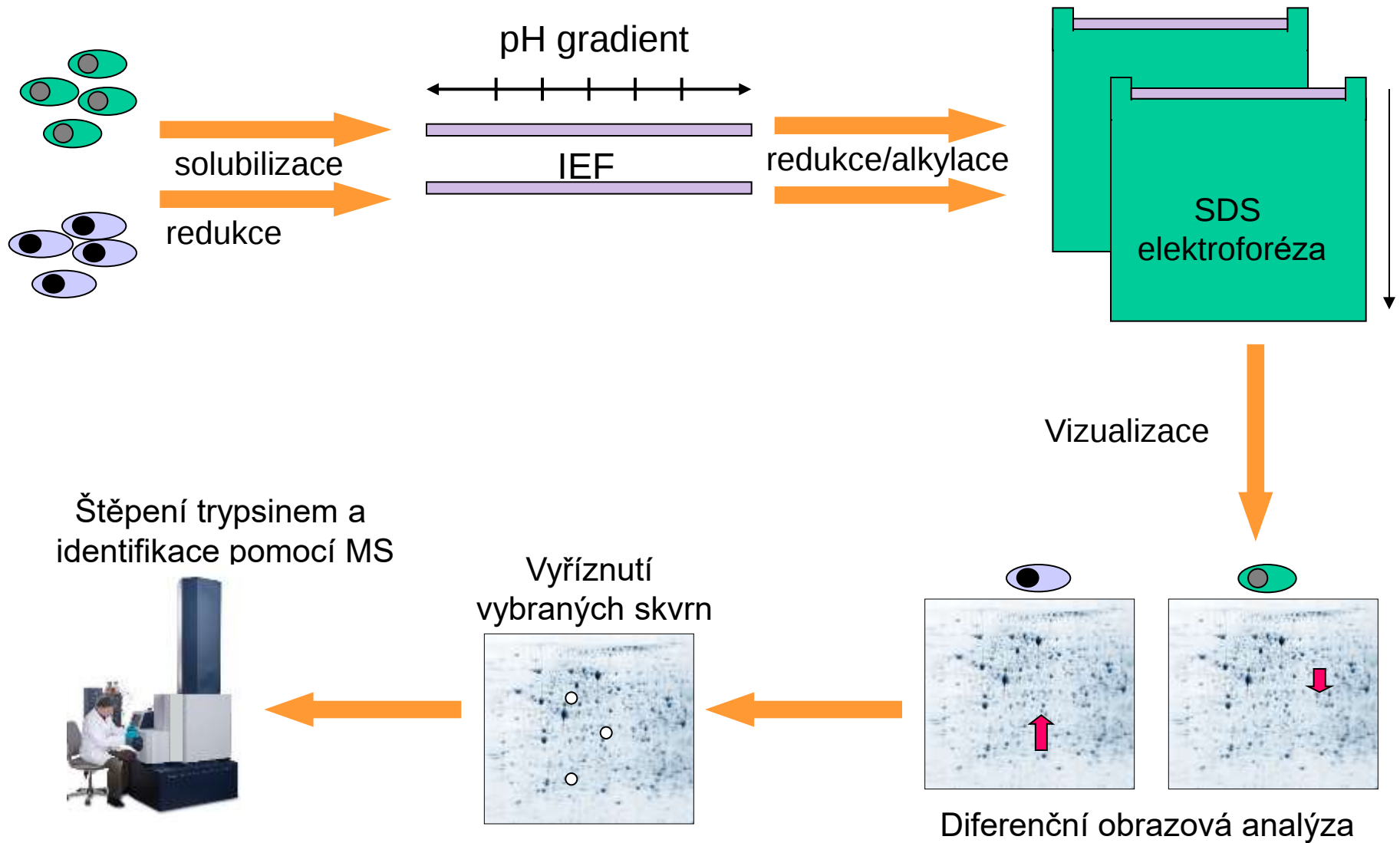
Cy3 - 0.025 ng

Cy5 - 0.025 ng

Pro: vysoká citlivost, redukce počtu gelů a technických artefaktů

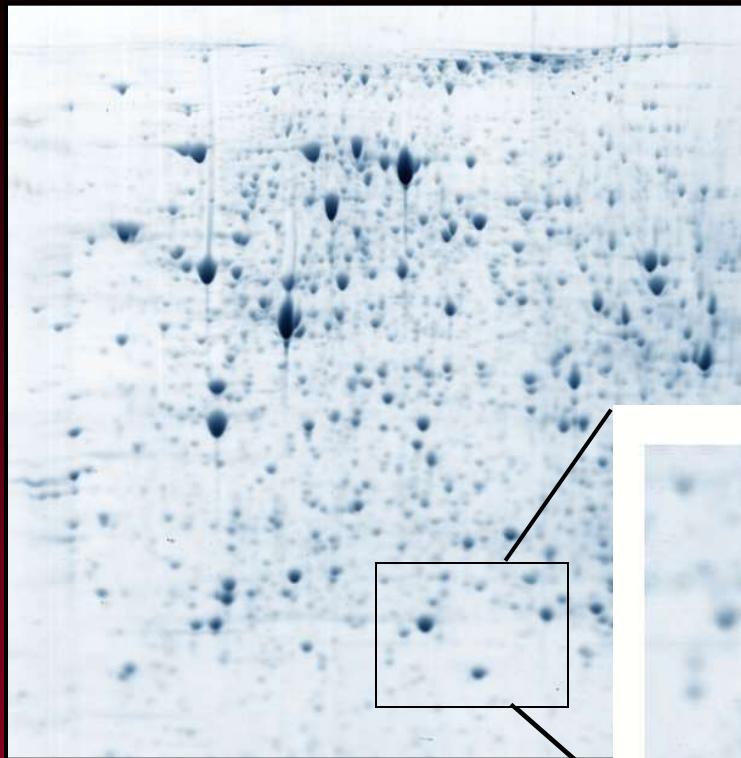
Proti: nezbytnost 2-3 laserového scanneru,
malá proteinová nanáška – možný problém s identifikací

Typický 2-DE experiment

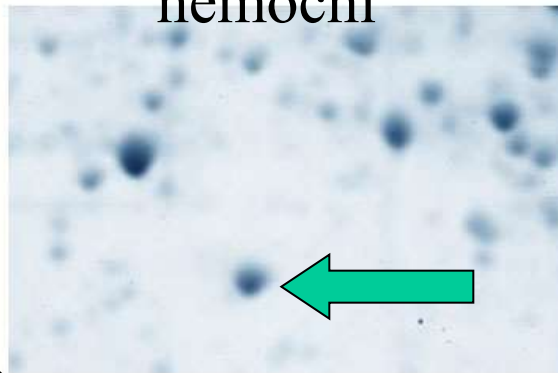


IDENTIFIKACE PROTEINU

- digesce vzorku a extrakce peptidů z gelu
- principy identifikace proteinu pomocí MS
 - peptidový fingerprint
 - fragmentace pomocí MS/MS



nemocní



zdraví

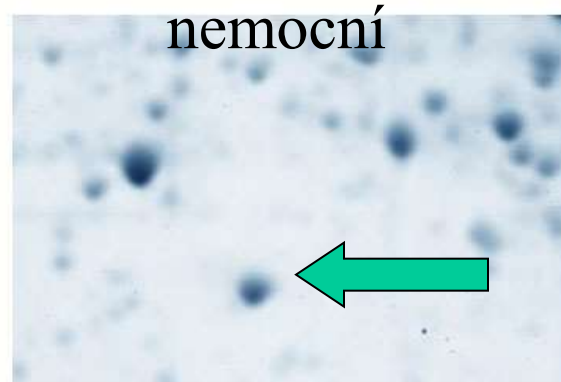
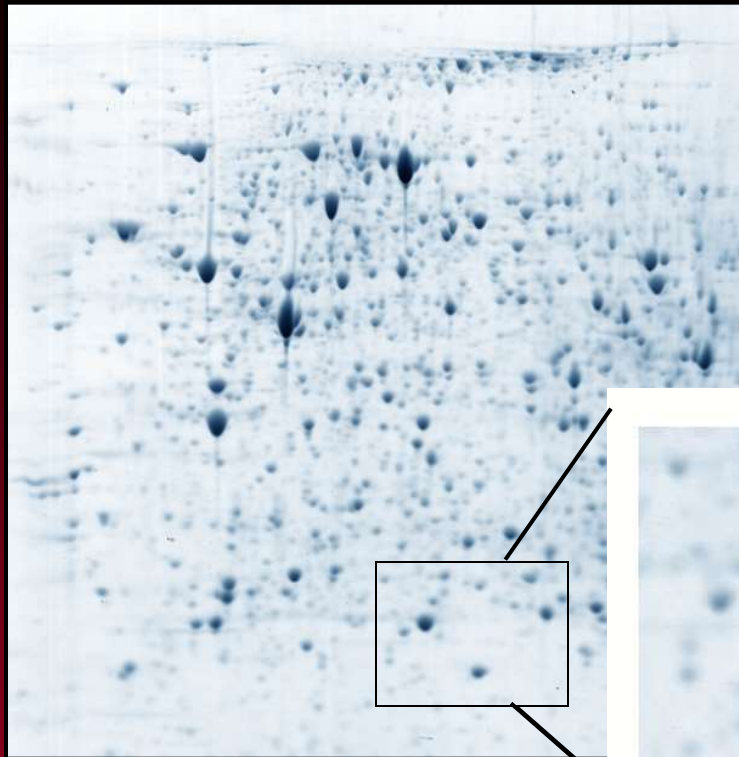


Neznámý diferenciólně exprimovaný protein „XY“ (20 kDa)



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 poskytl 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.

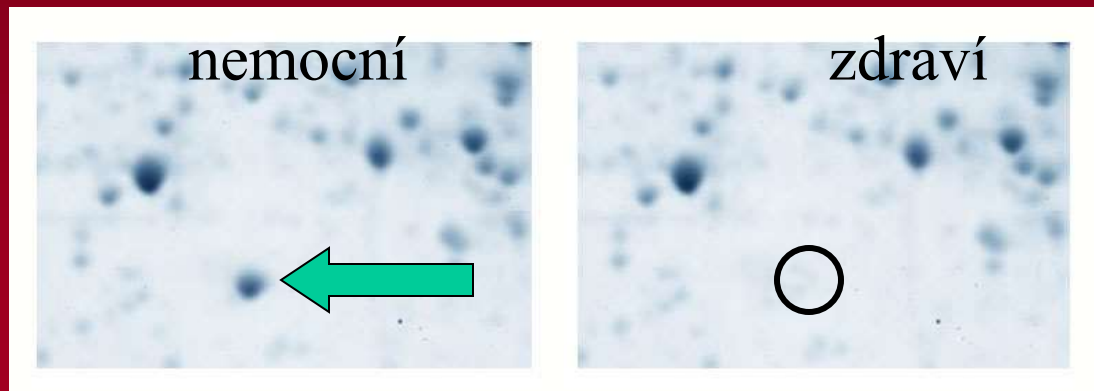
TRYPSIN

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



SSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEREG
YERLLKMQNQRGGRALFQD IKKPAEDEWGKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHAL
GSAITDPHLCDFLETHFLDEEVKL IKKMGDHLTNLHRLGGPEAG LGEYLFERLT LKHD

PŘÍPRAVA VZORKŮ Z GELU PRO IDENTIFIKACI POMOCÍ MS IN-GEL DIGESTION



Výběr a vyříznutí spotu/PROTEINU

**Dehydratace gelu (redukce, alkylace)
ACN, vakuum**

Rehydratace v pufru s Trypsinem

Digesce 37 °C

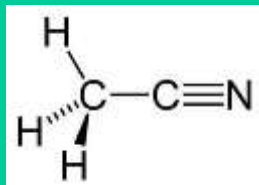
Extrakce PEPTIDŮ (ACN)

Čištění a koncentrace

**MS analýza
a identifikace**

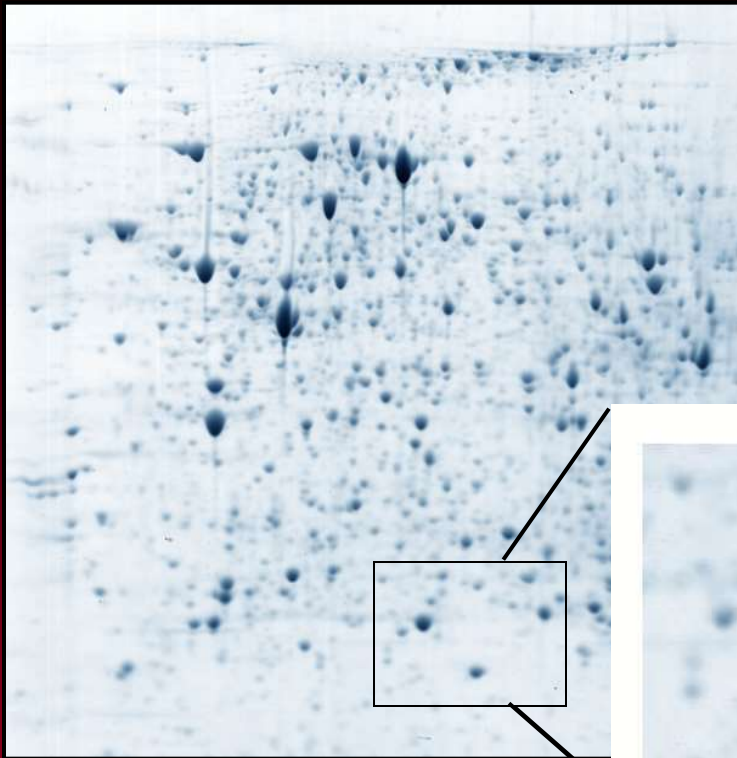
KERATIN !!!

Acetonitril
(ACN, MeCN)

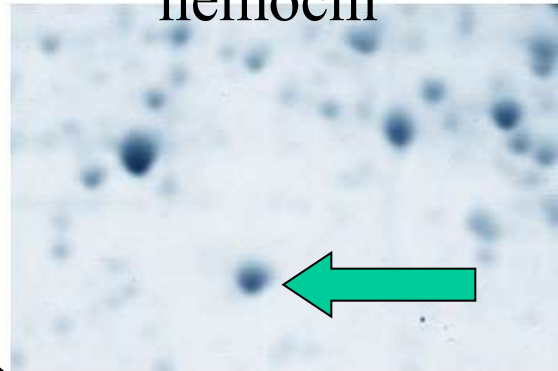


- nesráží proteiny/peptidy
- neabsorbuje v UV
- má nízkou viskozitu
- kompatibilní s RP-LC

Identifikace diferenciálně exprimovaného proteinu



nemocní



zdraví



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

SSQ**I**RQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFD**R**DDVALEGVSHFF**R**ELAE**K**REGYER**LLK**
MQNQ**R**GG**R**ALFQD **IK**KPAEDEWG**K**TPDAM**K**AAMALE**KK**LNQALLDLHAL
GSAR**T**DPHLCDFLETHFLDEEV**KL** **IKK**MGDHLTNLH**R**LGGPEAG LGEYLFER**L**T L**K**HD

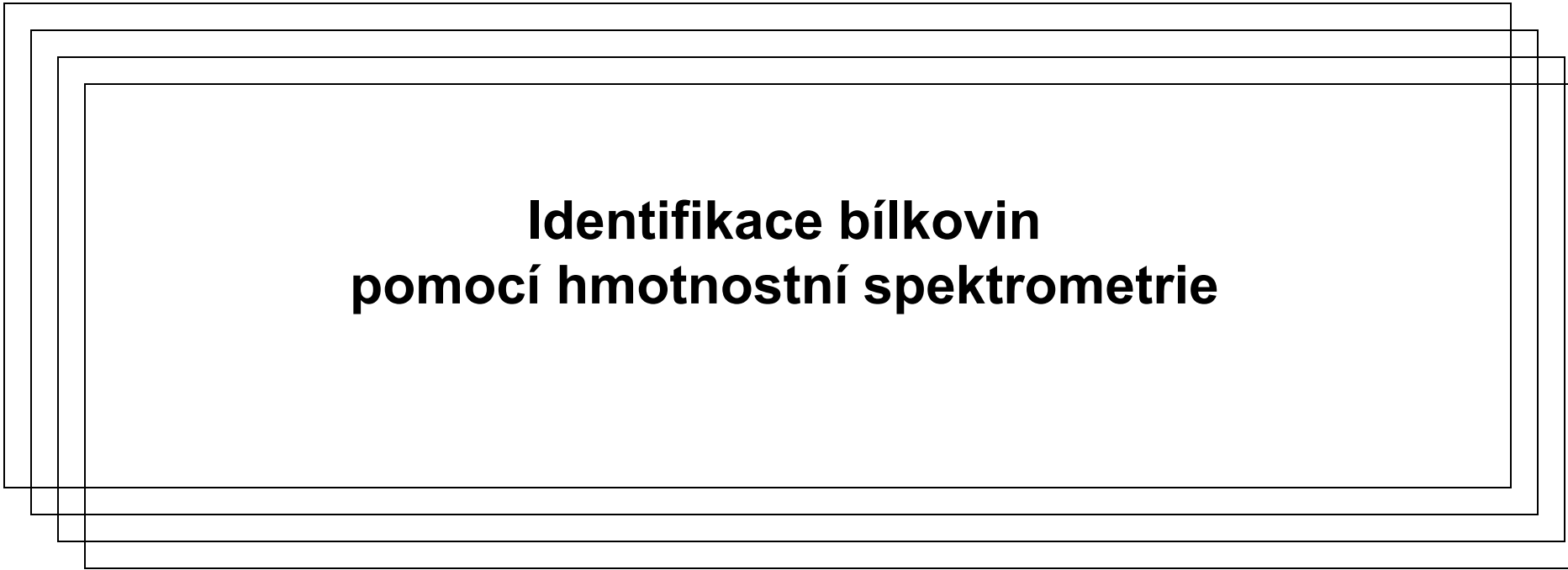


Extrakce směsi peptidů z gelu

In-gel štěpení trypsinem (za R a K)

LL**K** (373.280)
L I**K** (373.280)
LT L**K** (474.328)
SSQI**R** (590.327)
EGYER**R** (653.673)
MQNQ**R** (676.319)
TPDAM**K** (662.317)
ELAE**EK** (718.361)
AAMALE**K** (733.391)
KPAEDEWG**K** (1059.510)
MGDHLTNLH**R** (1079.54)
DDVALEGVSHFF**R** (1491.722)
LNQALLDLHALGS**AR** (1591.891)
LGGPEAGLGEYLF**ER** (1607.806)
TDPHLCDFLETHFLDEEV**K** (2288.054)
QNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFD**R** (3924.897)

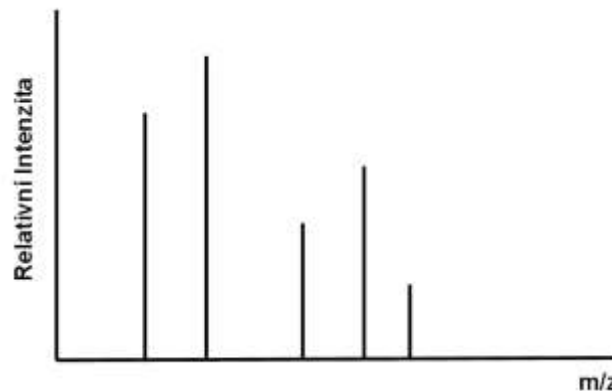




Identifikace bílkovin pomocí hmotnostní spektrometrie

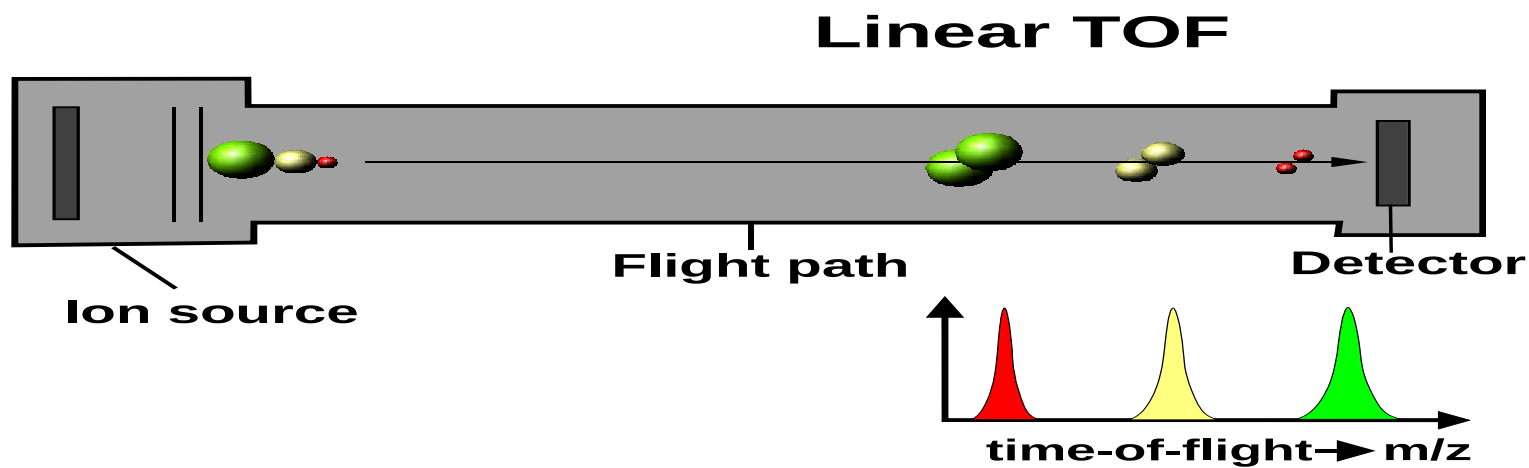
Identifikace bílkovin pomocí hmotnostní spektrometrie (MS)

- 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)

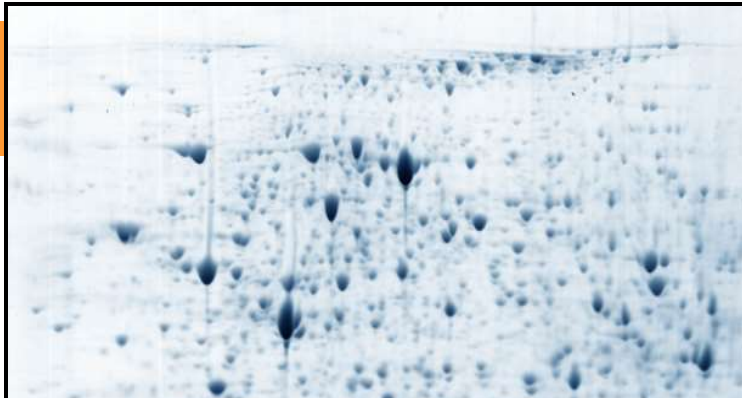
Peptidové mapování (Peptidový fingerprinting)

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

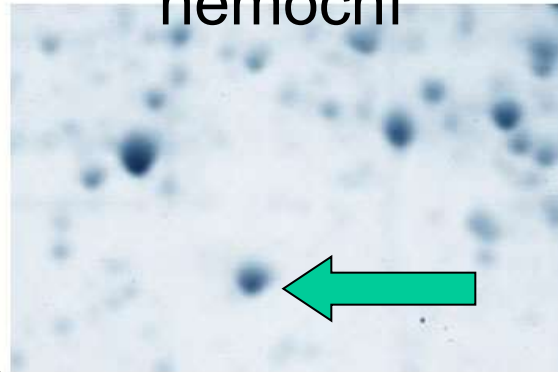
Fragmentace peptidů/sekvenování (MS/MS)

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

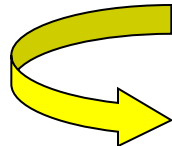


zdraví



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

SSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEREG
YERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDEWGTKPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHAL
GSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKL IKKMGDHLTNLHRLGGPEAG LGEYLFERLT LKHD



Extrakce směsi peptidů z gelu

Peptidové mapování (Peptidový fingerprinting)

LLK

GGR

SSQIR

L IKK

LT LK

EGYER

MQNQ R

TPDAMK

ELAEER

ALFQD IK

AAMALEKK

KPAEDEW GK

MGDHLTNLHR

DDVALEGVSHFFR

LNQALLDLHALGSAR

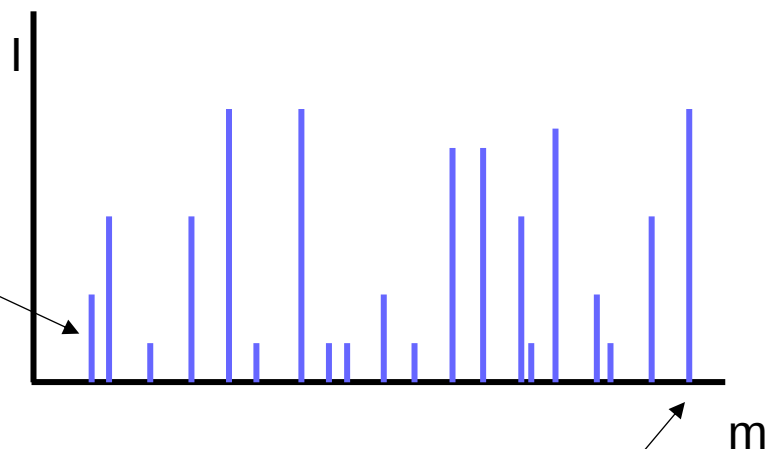
LGGPEAG LGEYLFER

TDPHLCDFLETHFLDEEVK

QNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDR

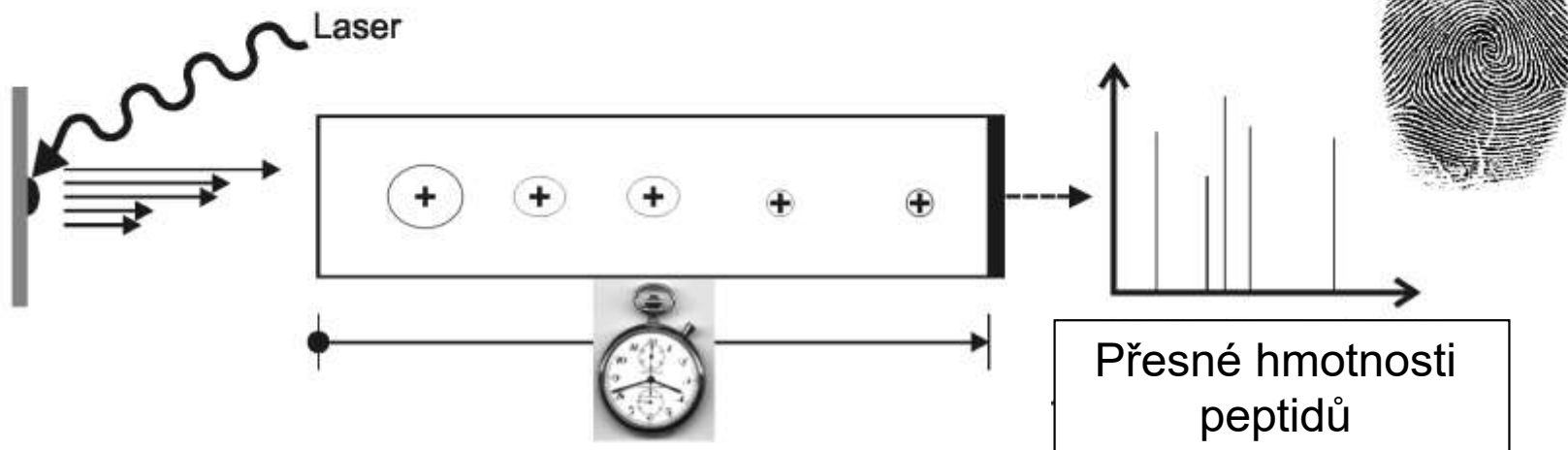
Peptidové mapování (Peptidový fingerprinting)

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

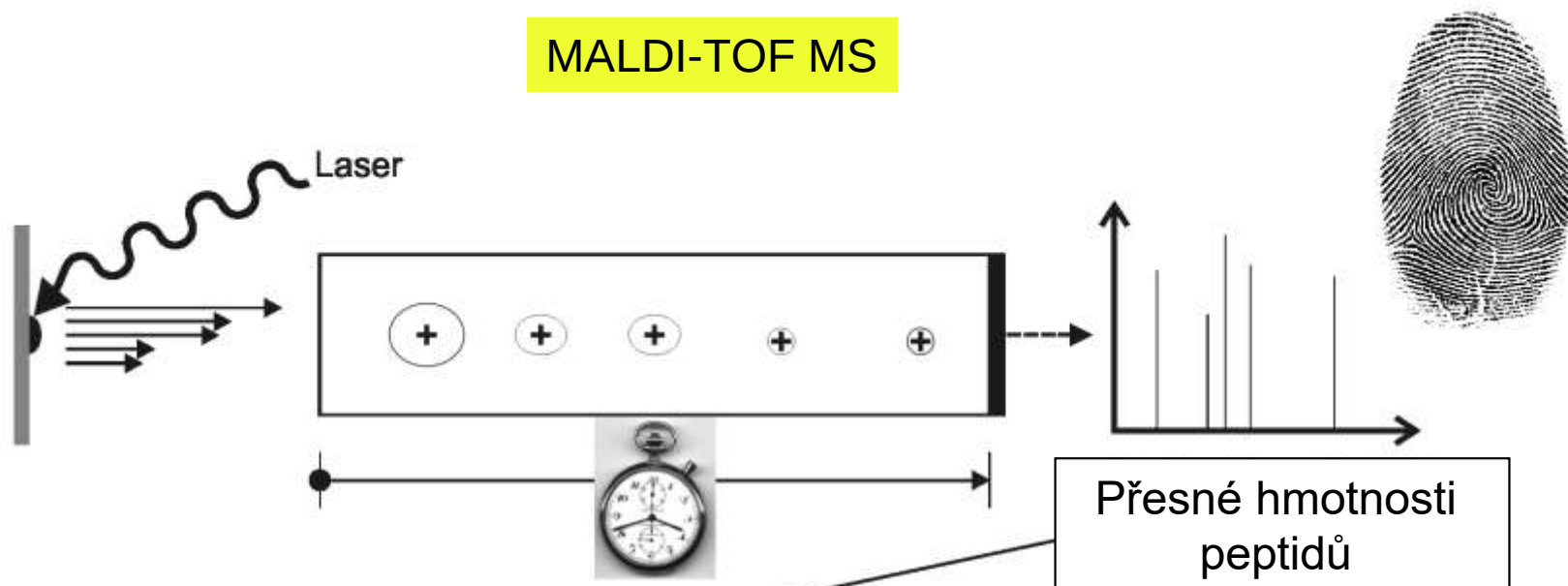
MS data

Masses/MWs of
peptides



Peptidové mapování (Peptidový fingerprinting)

MALDI-TOF MS



1059.5
1491.7
1591.8
1607.8
2287.0

Porovnání s
databázemi

1059.5111	(K)KPAEDEW GK (T)
1491.7232	(R)DDVALEGVSHFFR (E)
1607.8069	(R)LGGPEAGLGEYLFER (L)
2359.0916	(R)TDPHLCDFLETHFLDEEVK (L)

L-Ferritin

SSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEERREG
YERLLKMQNQRRGGRALFQDIKKPAEDEW GKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHAL
GSA RTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLKHD

Co když máme ve vzorku směs proteinů?

Identifikace bílkovin pomocí hmotnostní spektrometrie

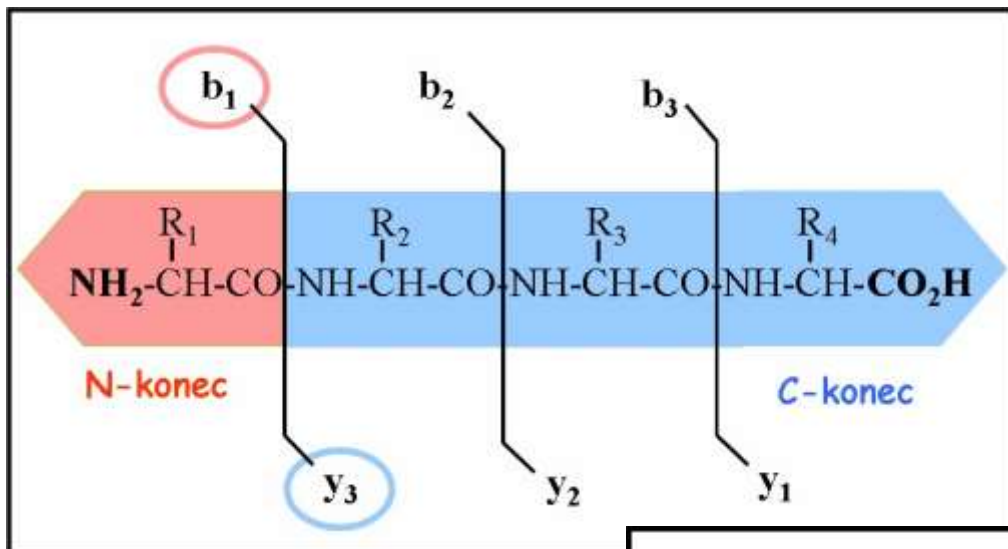
Peptidové mapování (Peptidový fingerprinting)

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

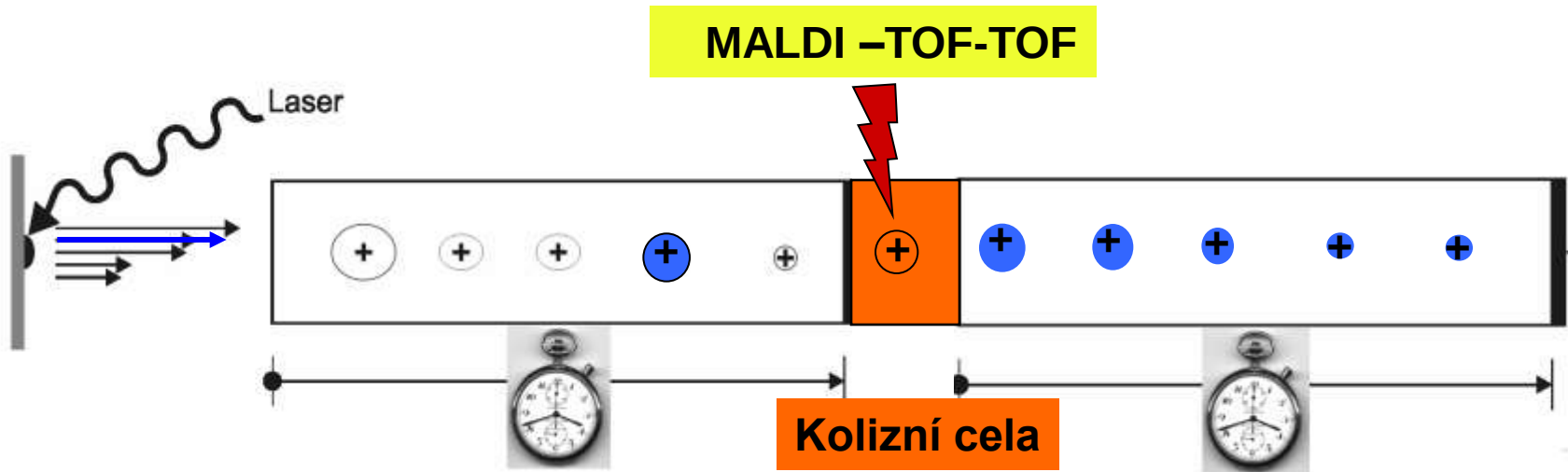
MH⁺ = 1410.6

b-ions⁺

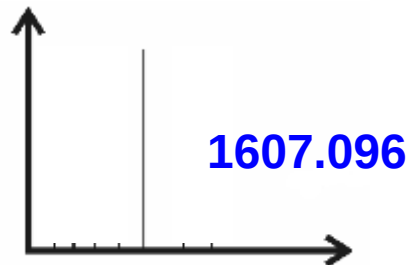
88.1	S -----	PAFDSIMAETLK	1323.6
185.2	SP -----	AFDSIMAETLK	1226.4
256.3	SPA -----	FDSIMAETLK	1155.4
403.5	SPAF -----	DSIMAETLK	1008.2
518.5	SPAFD -----	SIMAETLK	893.1
605.6	SPAFDS -----	IMAETLK	806.0
718.8	SPAFDSI -----	MAETLK	692.3
850.0	SPAFDSIM -----	AETLK	561.7
921.1	SPAFDSIMA -----	ETLK	490.6
1050.2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

y-ions⁺

Fragmentace peptidu (mikrosekvenování, MS/MS)

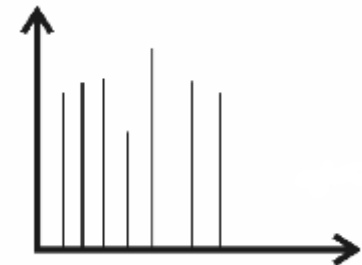


MW peptidu



LGGPEAGLGEYLFER
LGGPEAGLGEYLF...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

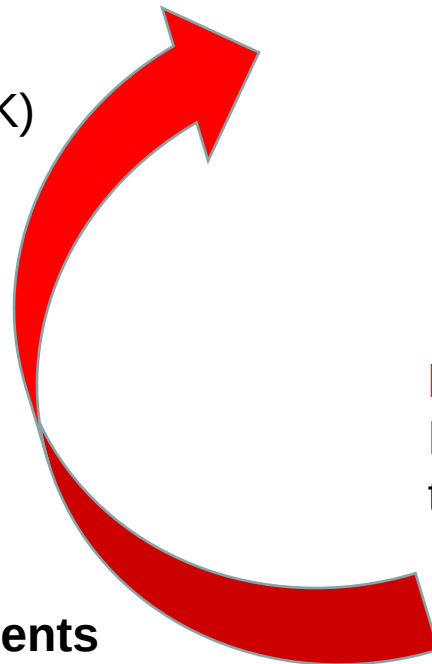


theoretical MWs of peptide fragments

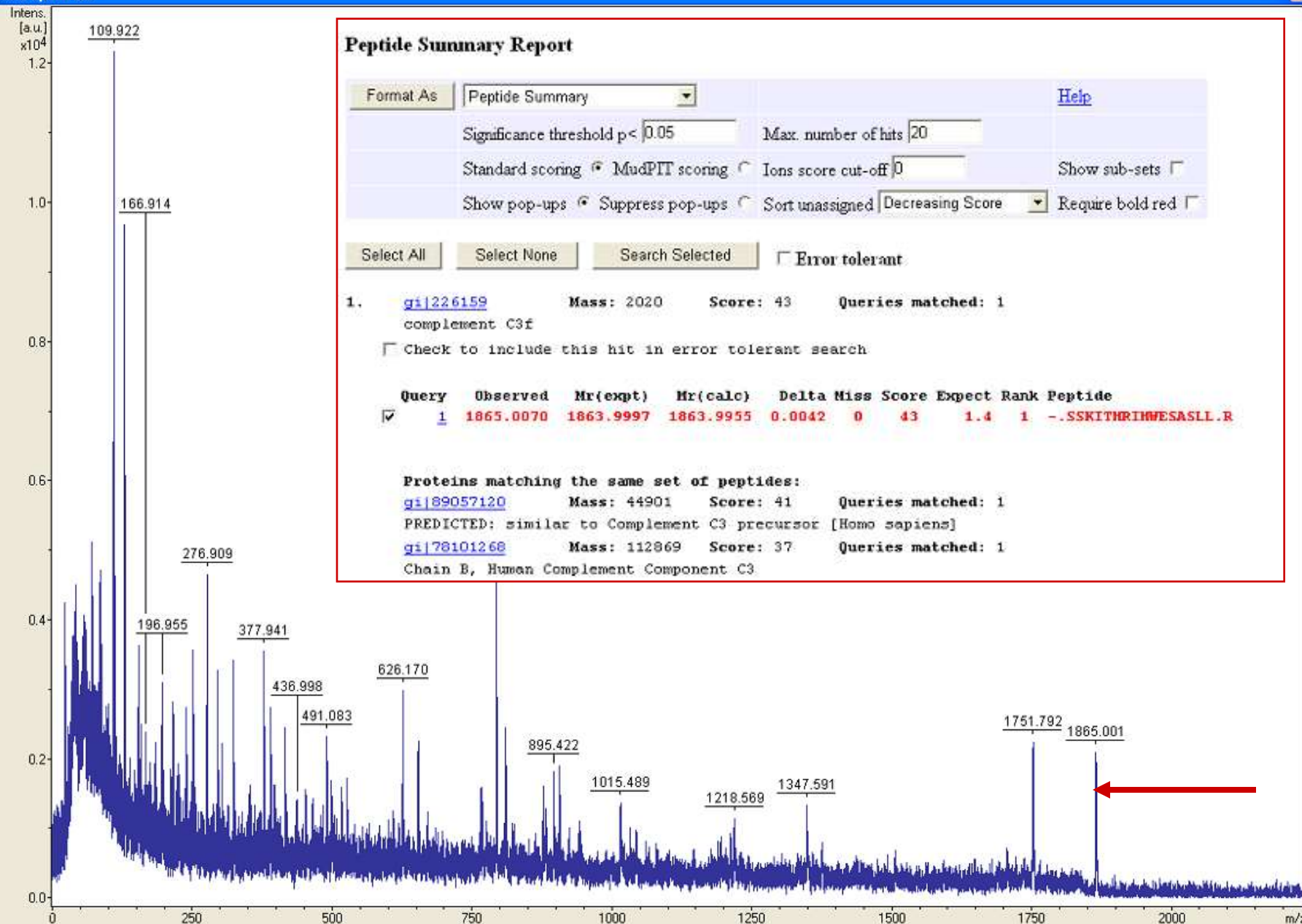
Gene/Protein identification

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. [gi1226159](#) 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
☒ 1	1865.0070	1863.9997	1863.9955	0.0042	0	43	1.4	1	-.SSKITHRIHWESALL.R

Proteins matching the same set of peptides:

[gi189057120](#) Mass: 44901 Score: 41 Queries matched: 1

PREDICTED: similar to Complement C3 precursor [Homo sapiens]

[gi178101268](#) Mass: 112869 Score: 37 Queries matched: 1

Chain B, Human Complement Component C3

Jediný protein

Směs peptidů
z jednoho proteinu
(5-50 peptidů)

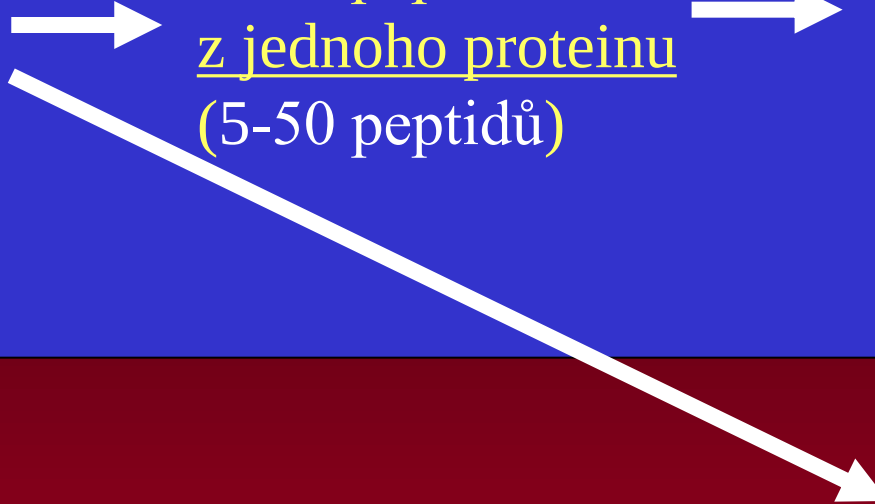
MS
(PMF)

Směs proteinů

Směs peptidů
z mnoha proteinu
(300-10⁶ peptidů)

MS/MS
(fragmentace)

chromatografická
separace



Current proteomic workflow

LC-MS/MS



proteins



trypsin...

peptides



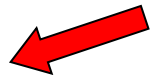
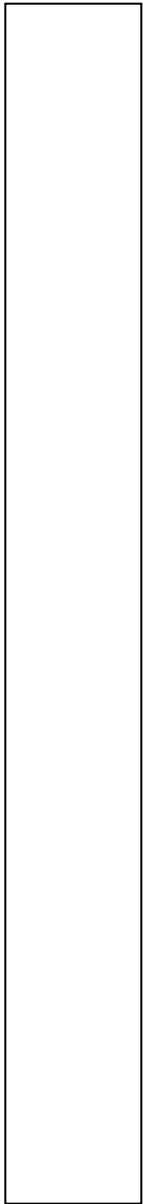
Micro or nano-LC
1D or 2D



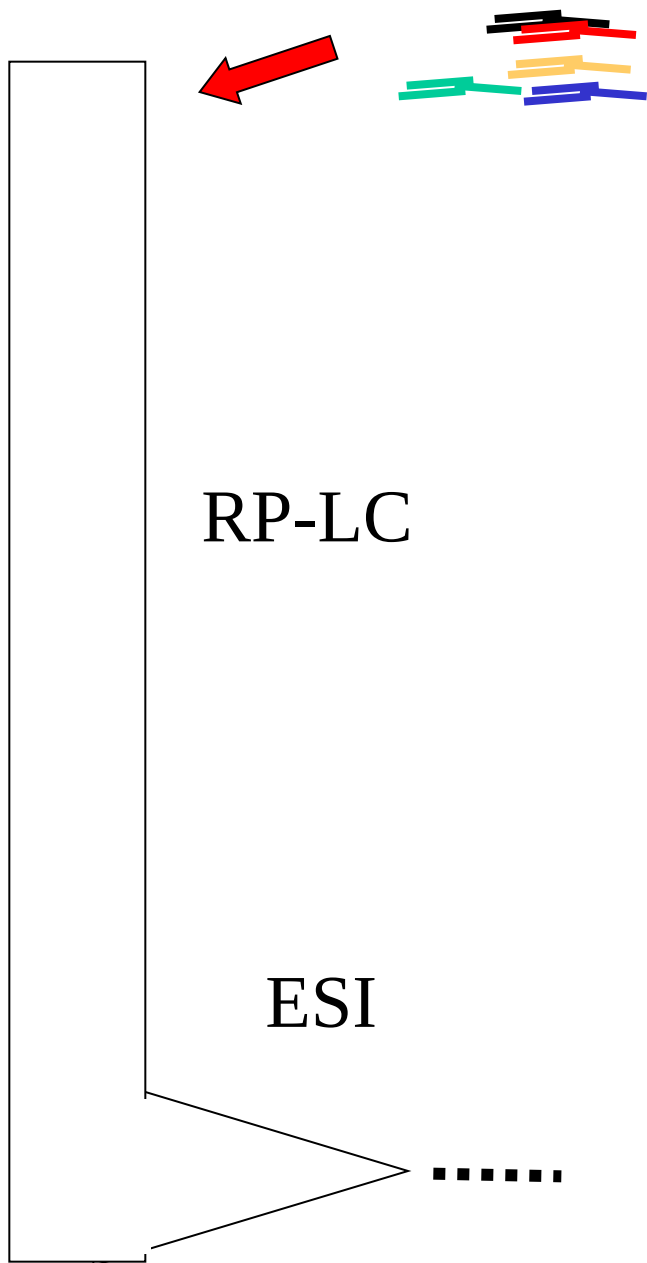
Mass spectrometry

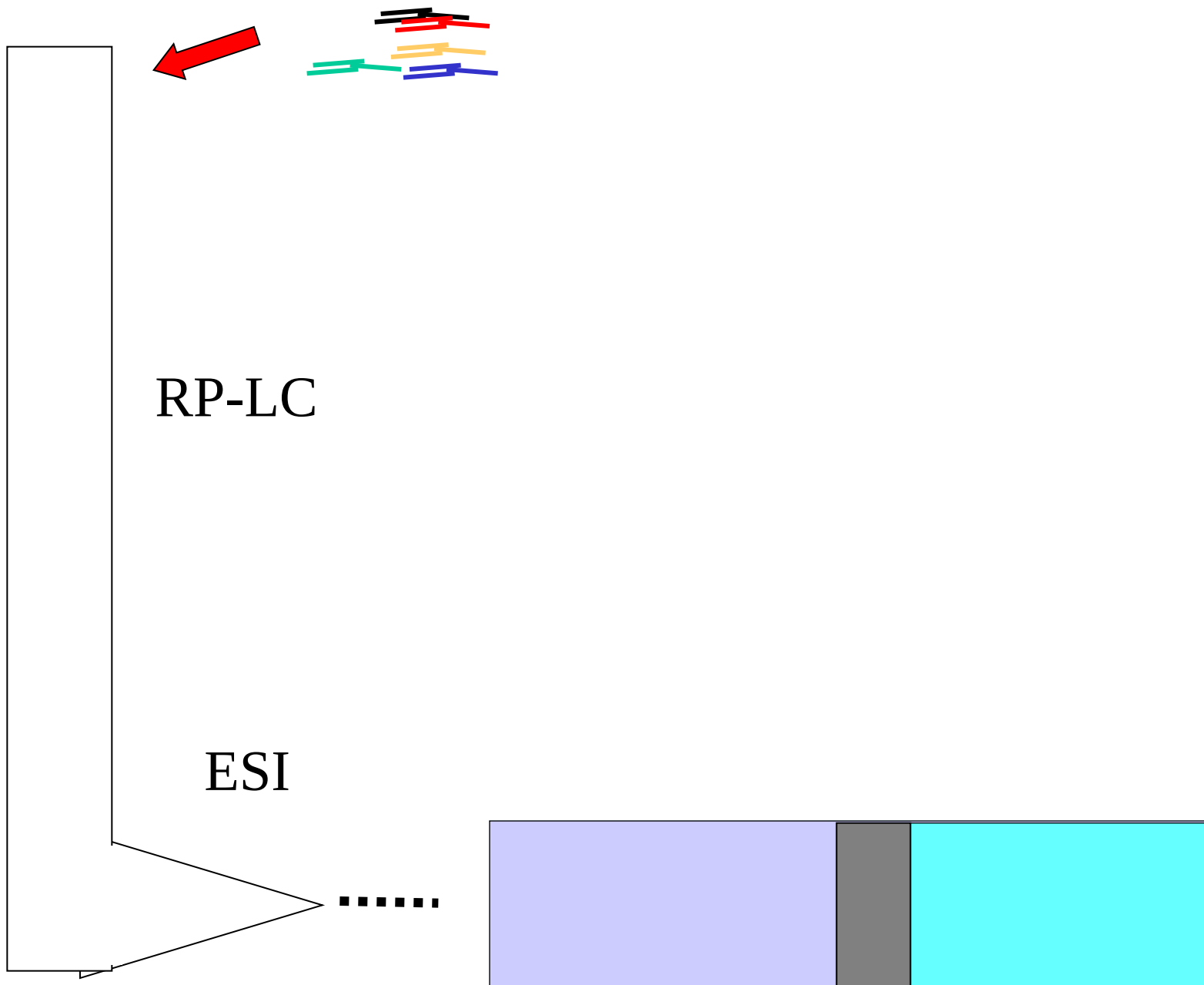


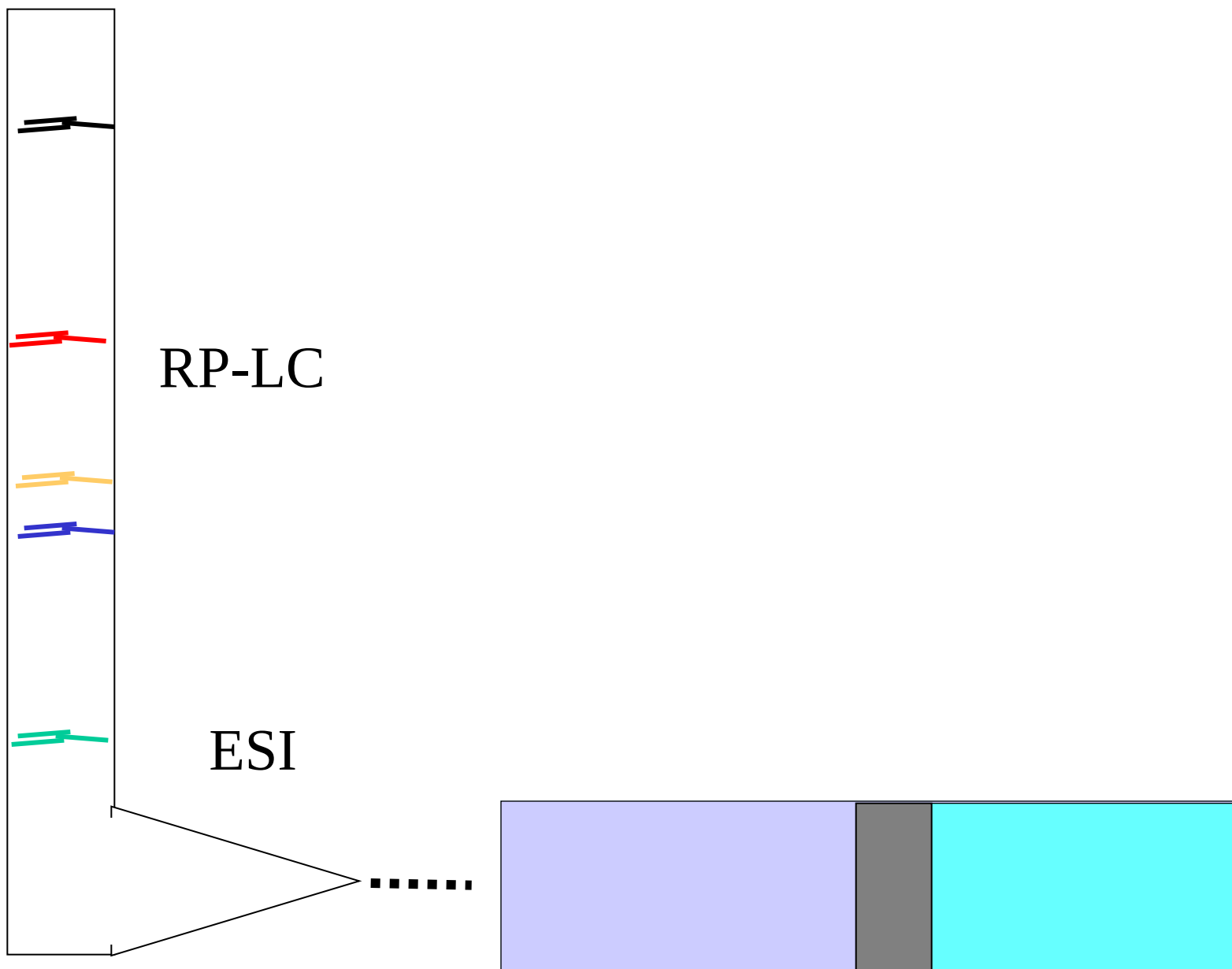
**Peptide/protein
identification and quantification**

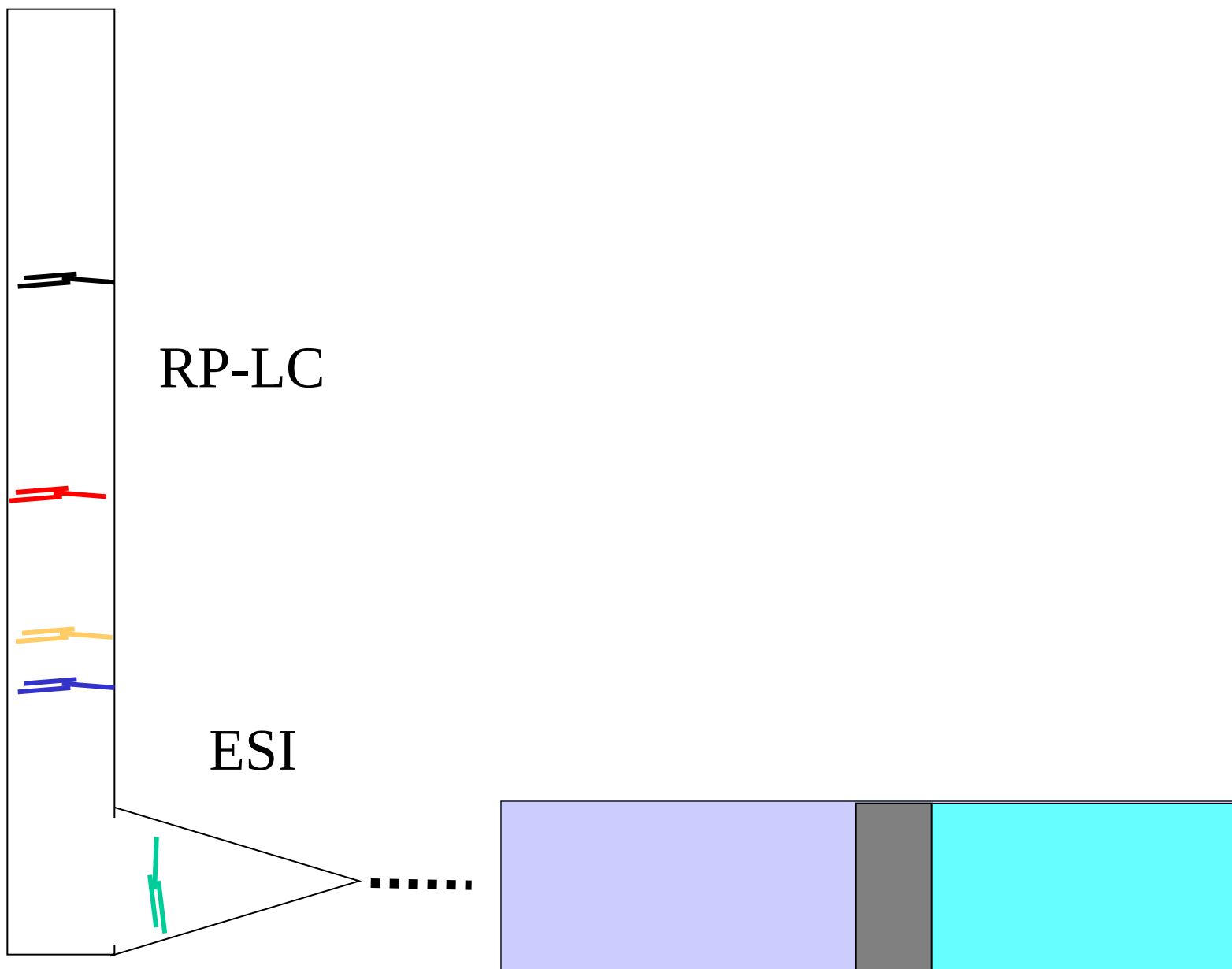


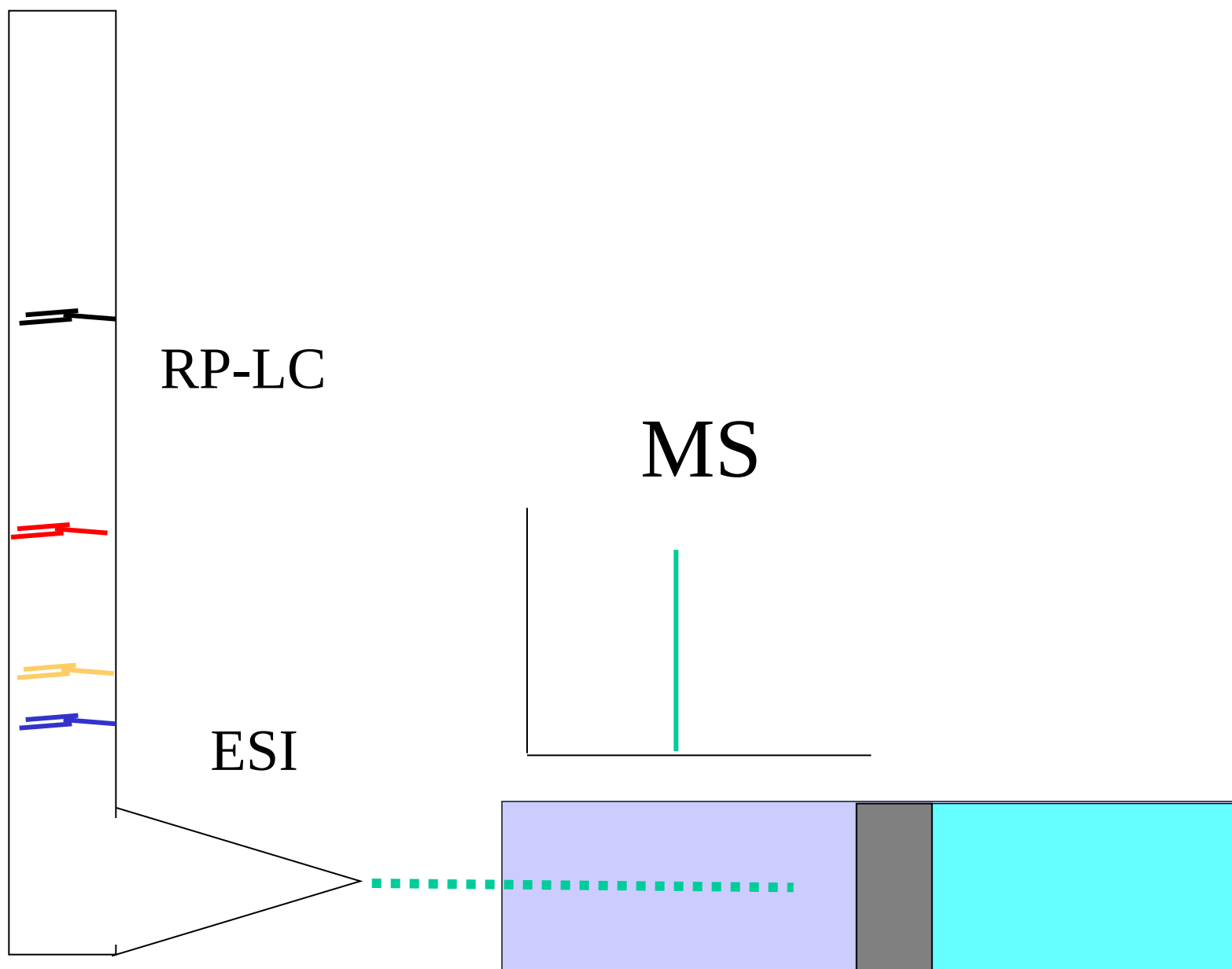
RP-LC

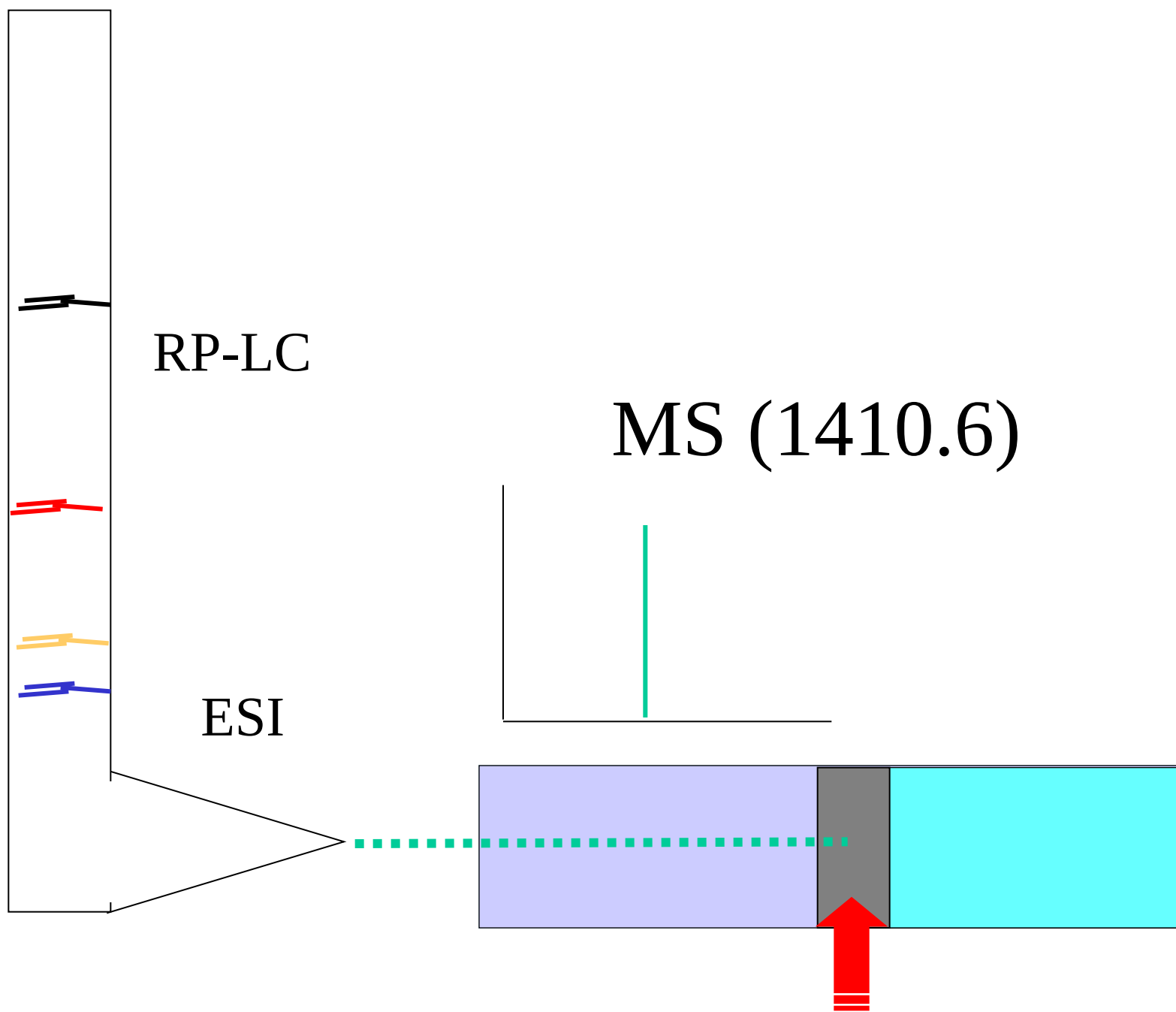








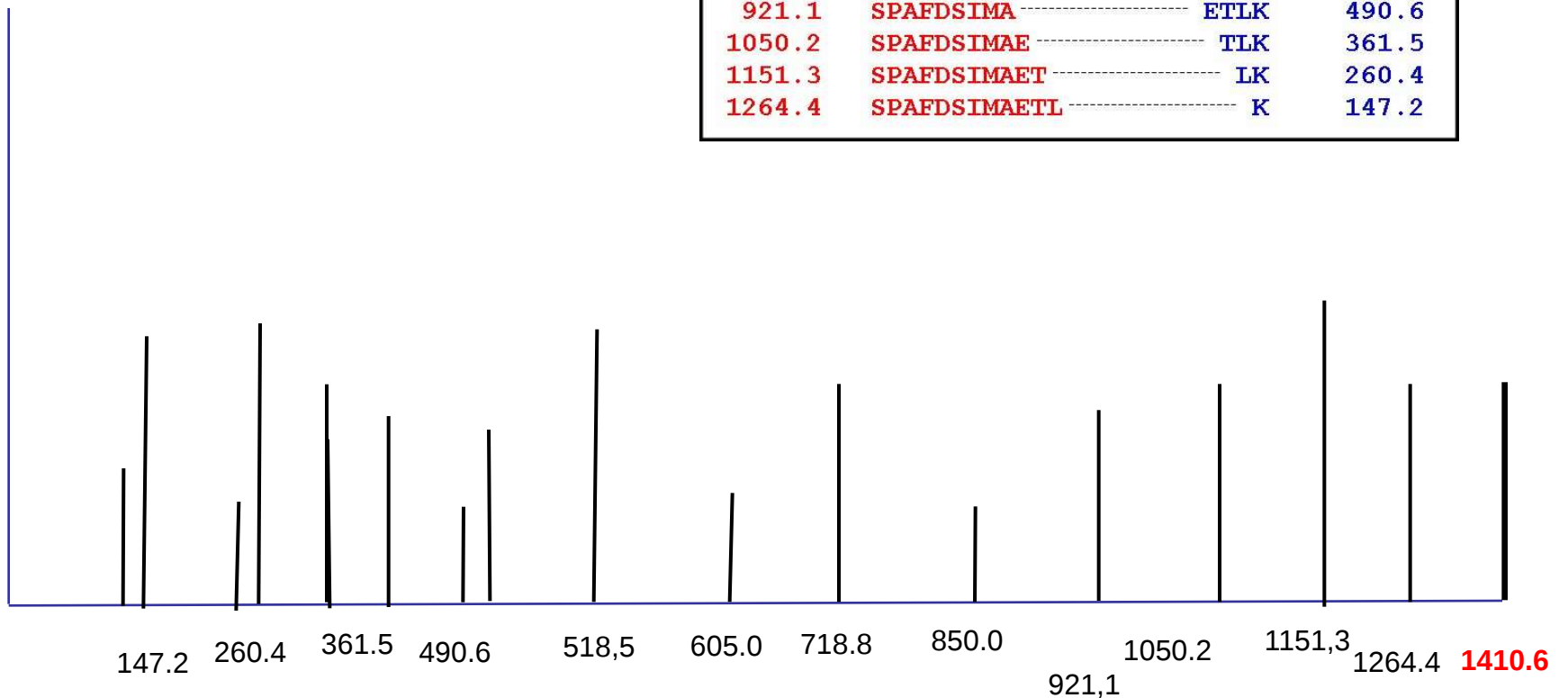




S-P-A-F-D-S-I-M-A-E-T-L-K

$MH^+ = 1410.6$

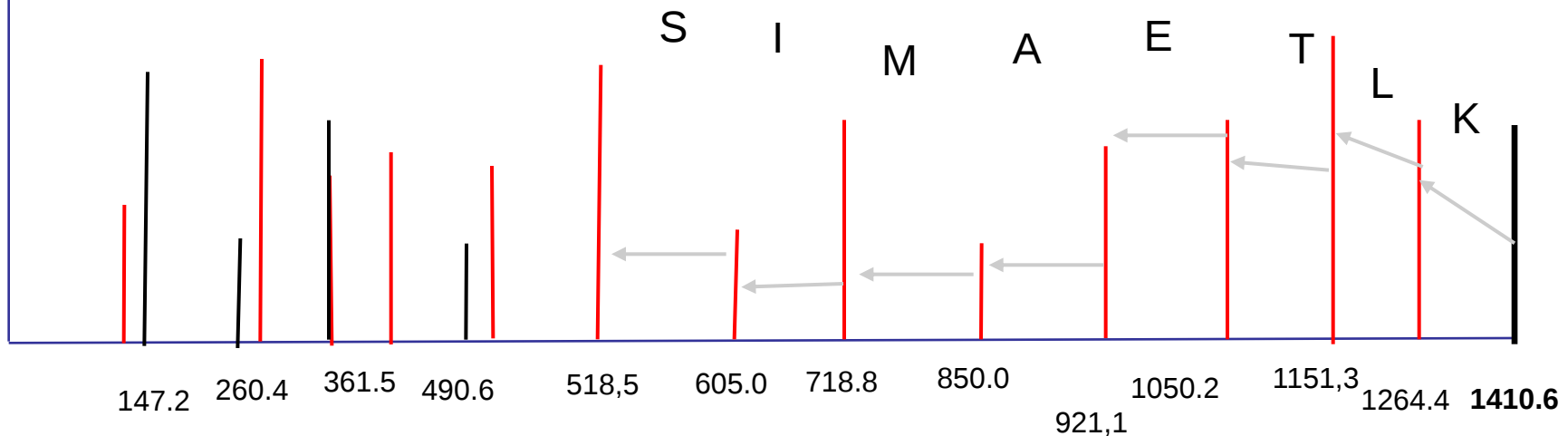
<u>b-ions⁺</u>		<u>y-ions⁺</u>
88.1	S -----	PAFDSIMAETLK 1323.6
185.2	SP -----	AFDSIMAETLK 1226.4
256.3	SPA -----	FDSIMAETLK 1155.4
403.5	SPAF -----	DSIMAETLK 1008.2
518.5	SPAFD -----	SIMAETLK 893.1
605.6	SPAFDS -----	IMAETLK 806.0
718.8	SPAFDSI -----	MAETLK 692.3
850.0	SPAFDSIM -----	AETLK 561.7
921.1	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

$MH^+ = 1410.6$

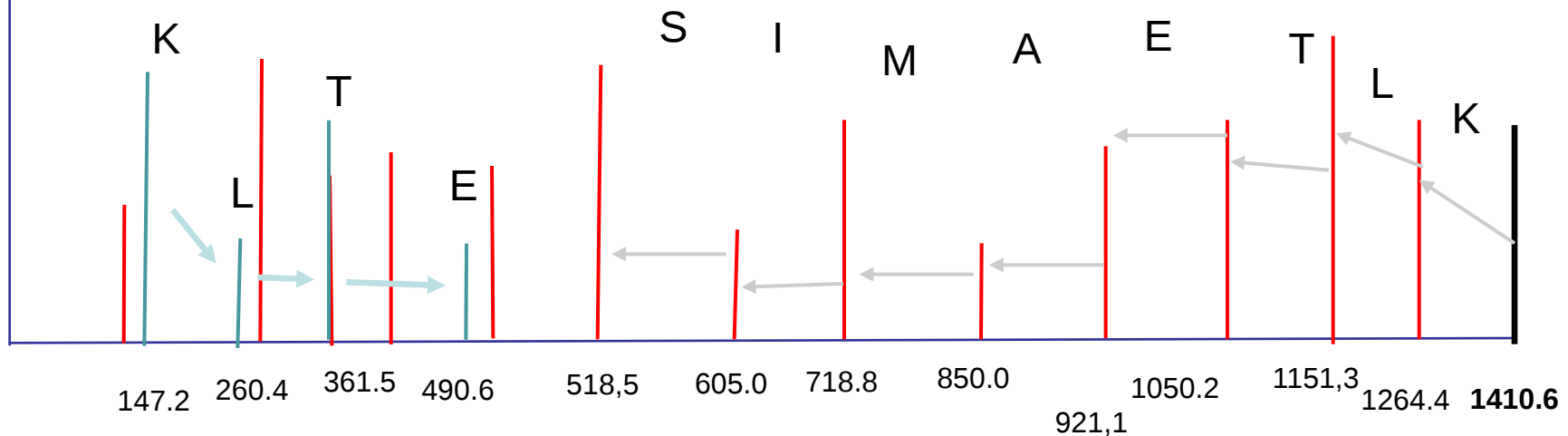
<u>b-ions⁺</u>		<u>y-ions⁺</u>
88.1	S ----- PAFDSIMAETLK	1323.6
185.2	SP ----- AFDSIMAETLK	1226.4
256.3	SPA ----- FDSIMAETLK	1155.4
403.5	SPAF ----- DSIMAETLK	1008.2
518.5	SPAFD ----- SIMAETLK	893.1
605.6	SPAFDS ----- IMAETLK	806.0
718.8	SPAFDSI ----- MAETLK	692.3
850.0	SPAFDSIM ----- AETLK	561.7
921.1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



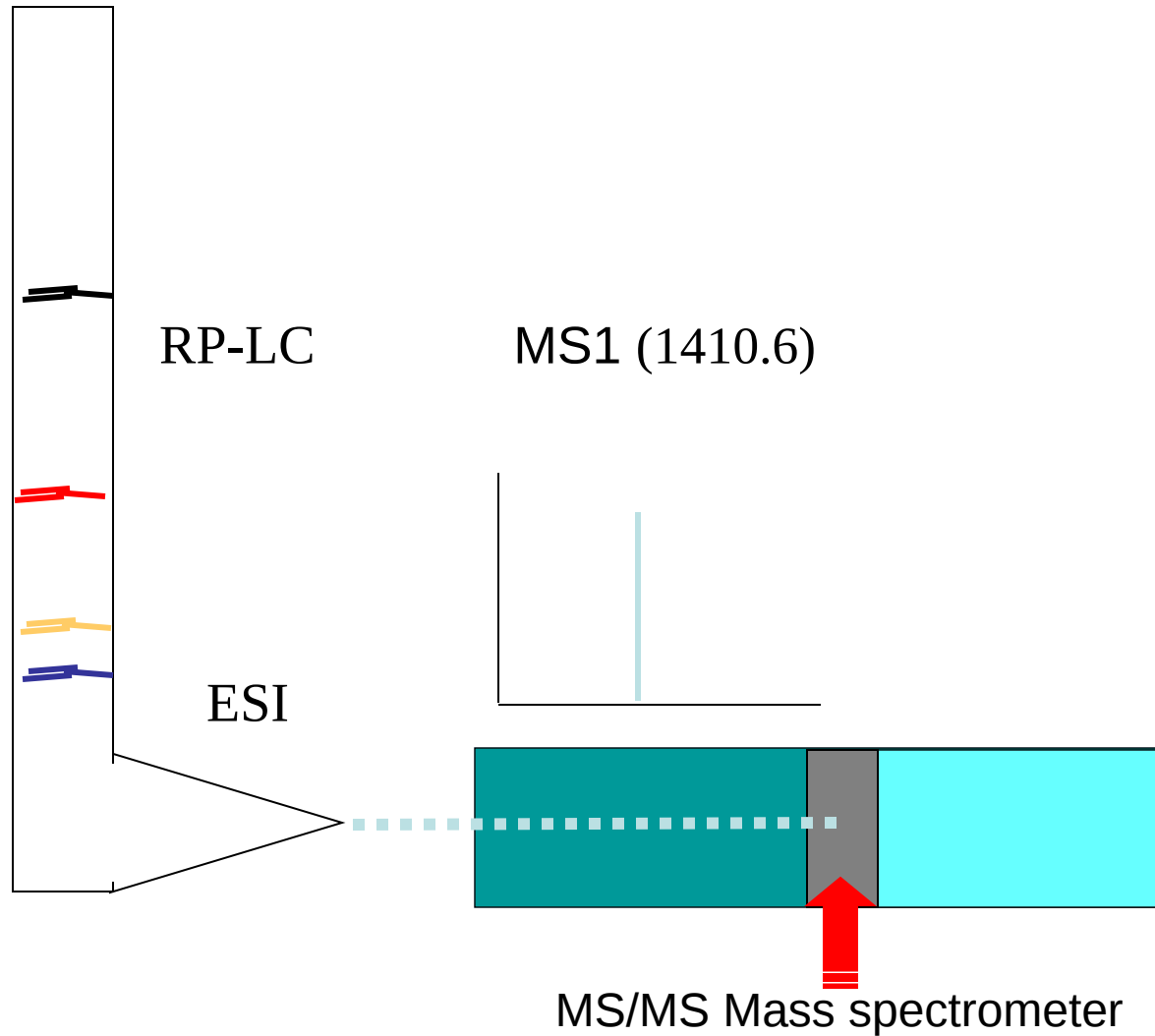
S-P-A-F-D-S-I-M-A-E-T-L-K

$MH^+ = 1410.6$

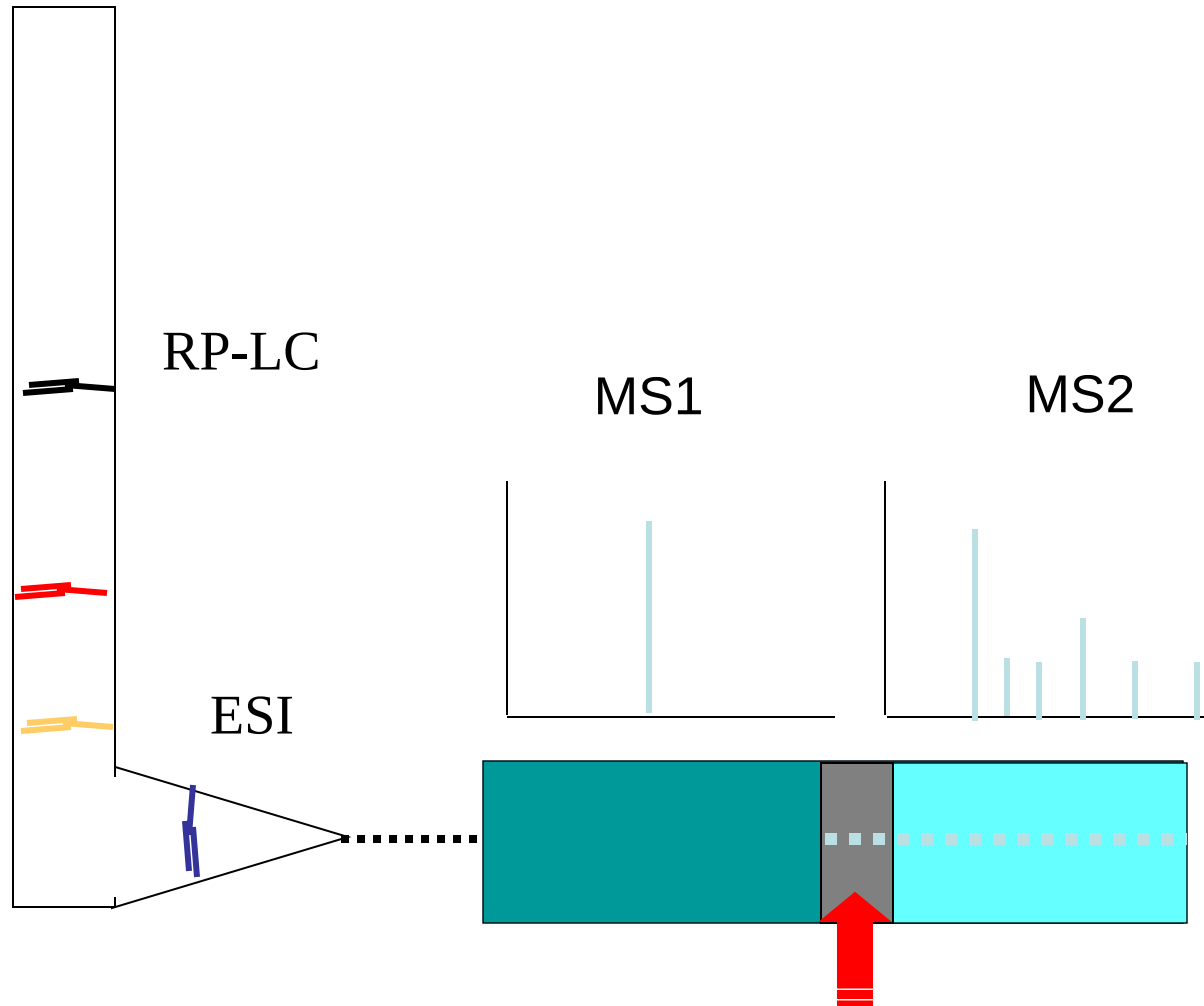
<u>b-ions⁺</u>		<u>y-ions⁺</u>
88.1	S ----- PAFDSIMAETLK	1323.6
185.2	SP ----- AFDSIMAETLK	1226.4
256.3	SPA ----- FDSIMAETLK	1155.4
403.5	SPAF ----- DSIMAETLK	1008.2
518.5	SPAFD ----- SIMAETLK	893.1
605.6	SPAFDS ----- IMAETLK	806.0
718.8	SPAFDSI ----- MAETLK	692.3
850.0	SPAFDSIM ----- AETLK	561.7
921.1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



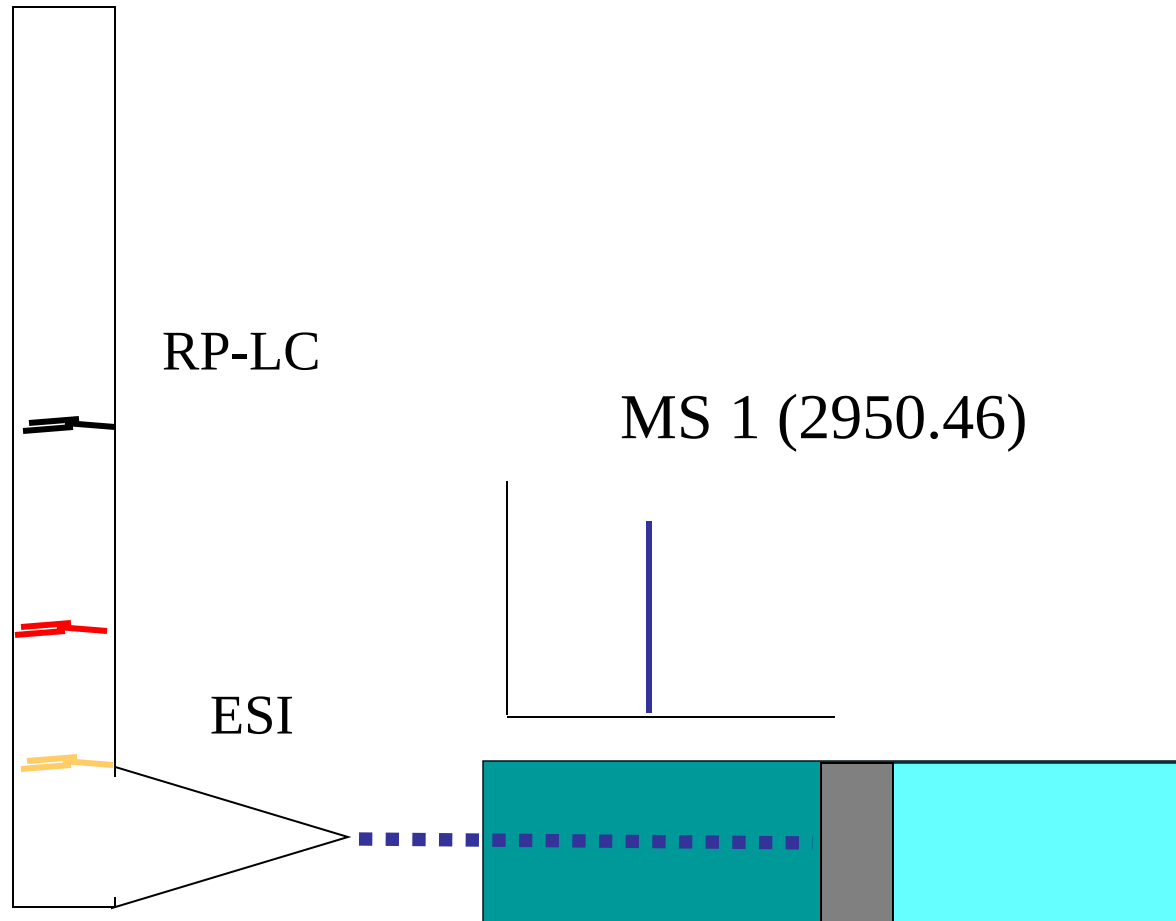
LC-MS/MS



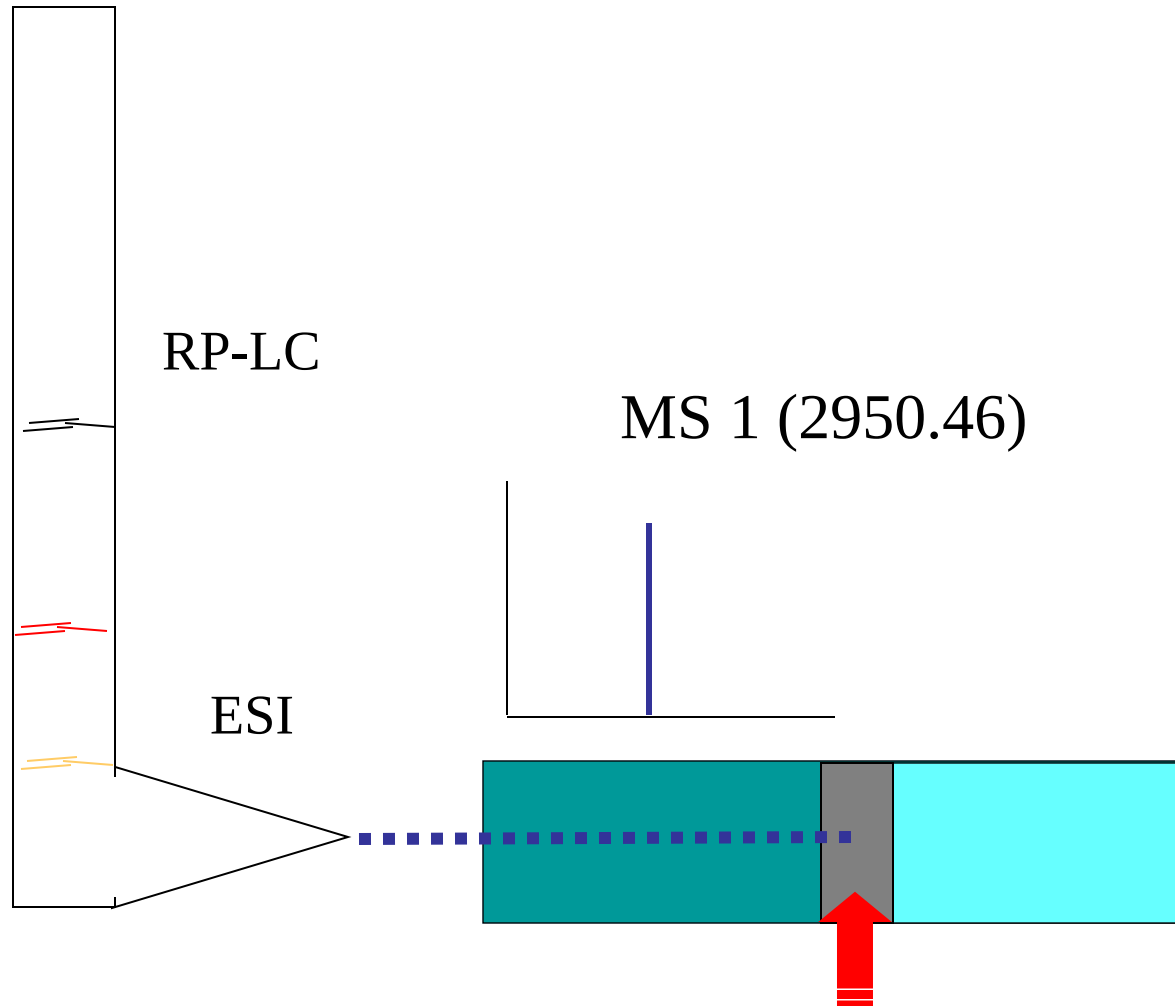
LC-MS/MS



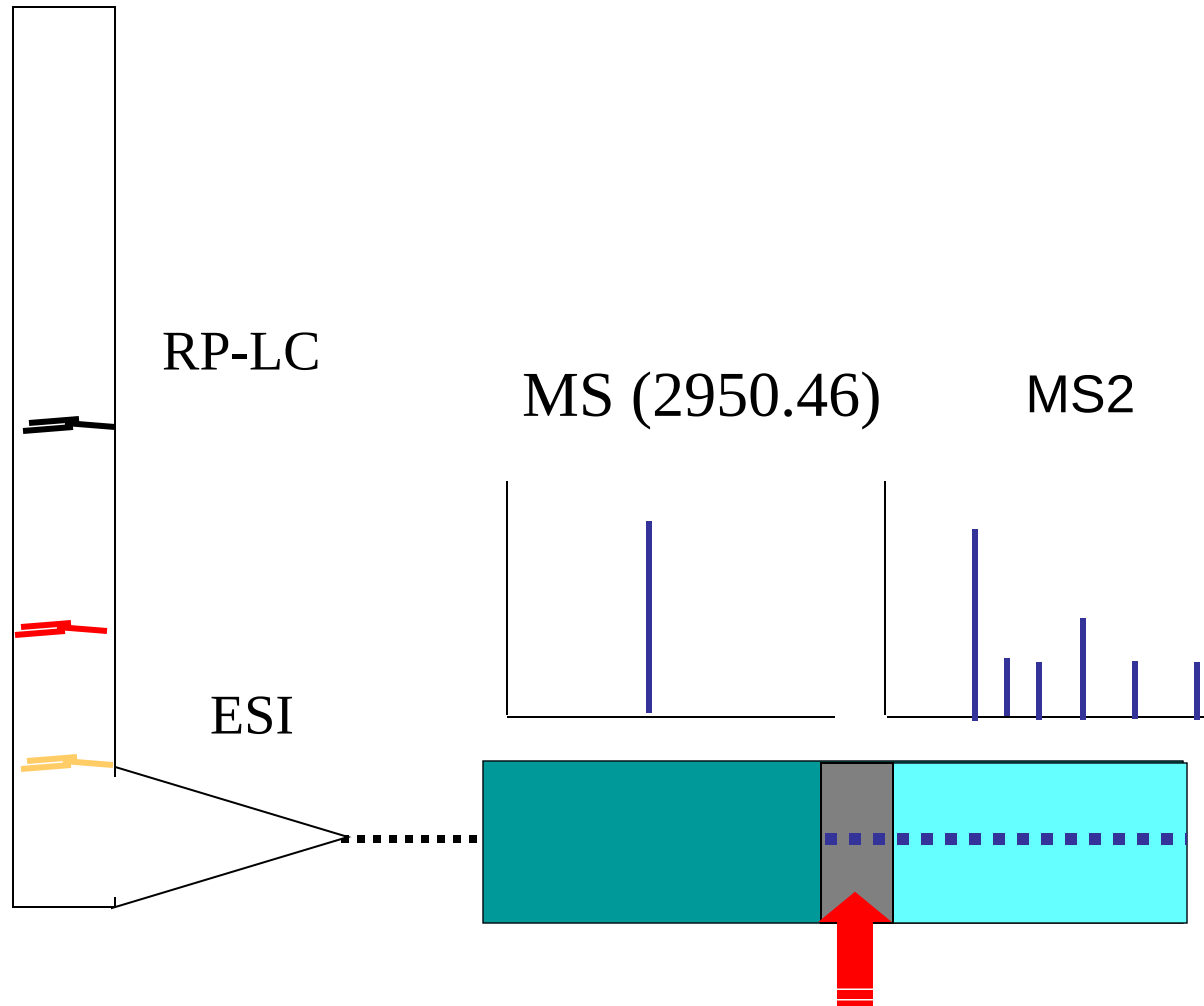
LC-MS/MS



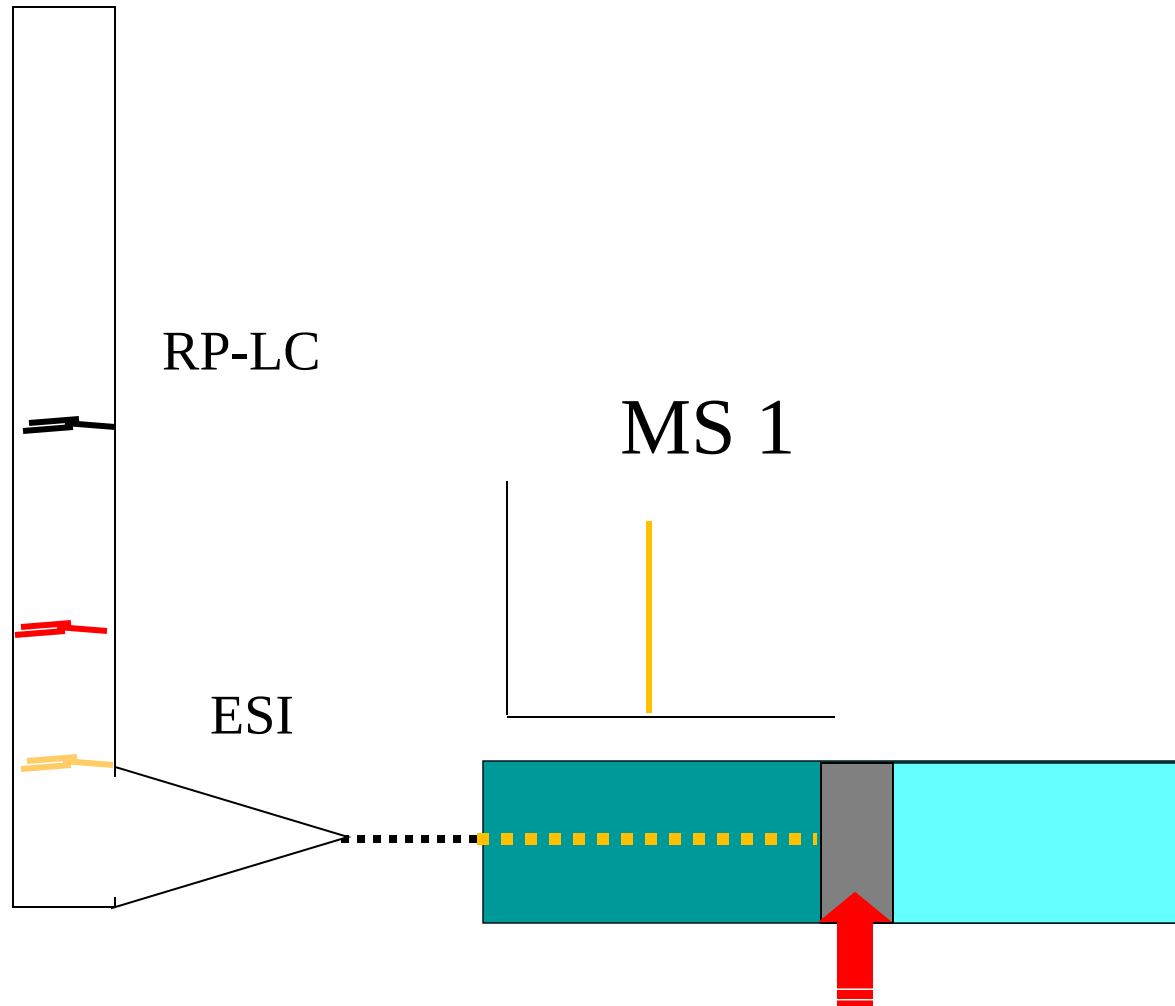
LC-MS/MS



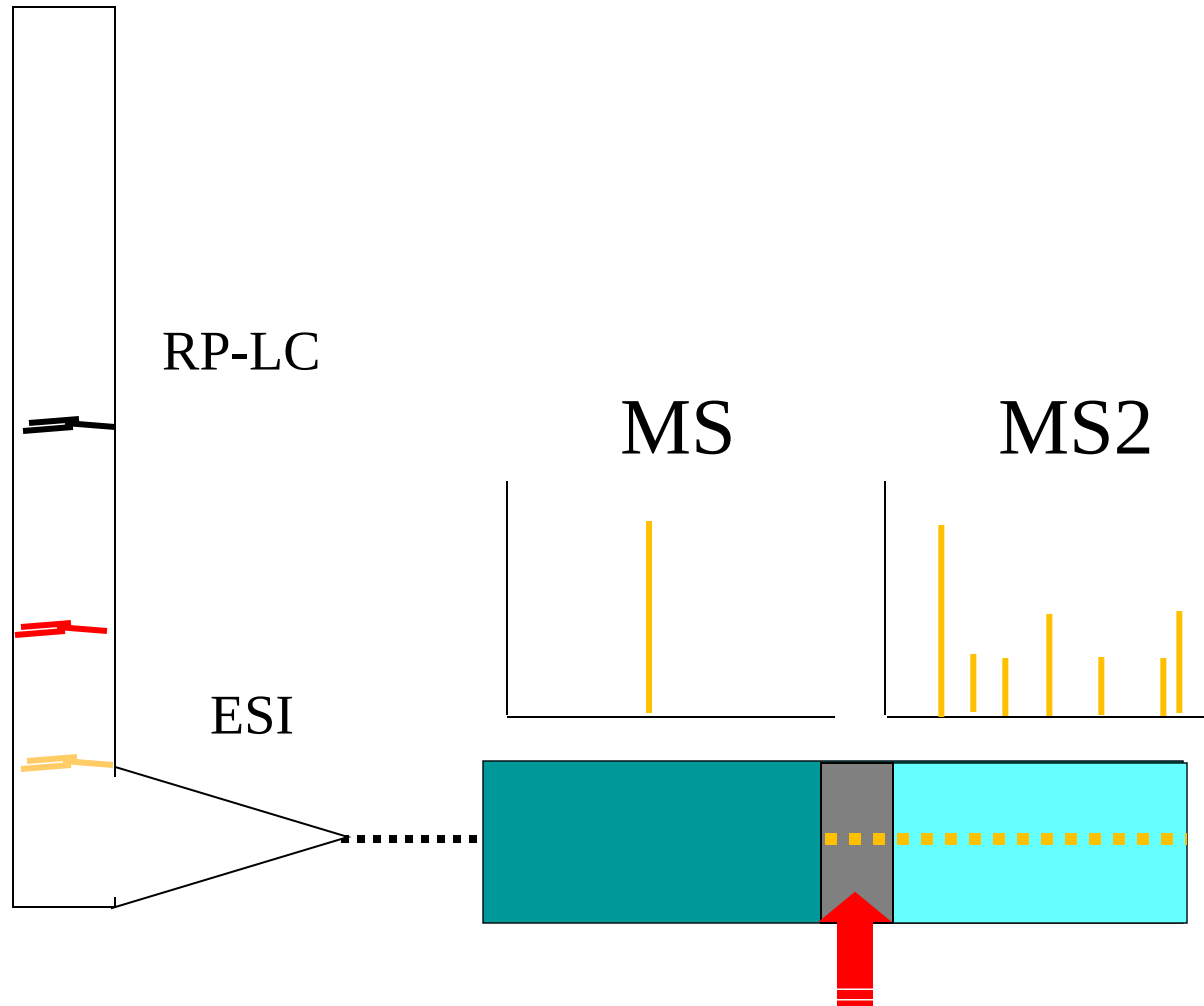
LC-MS/MS



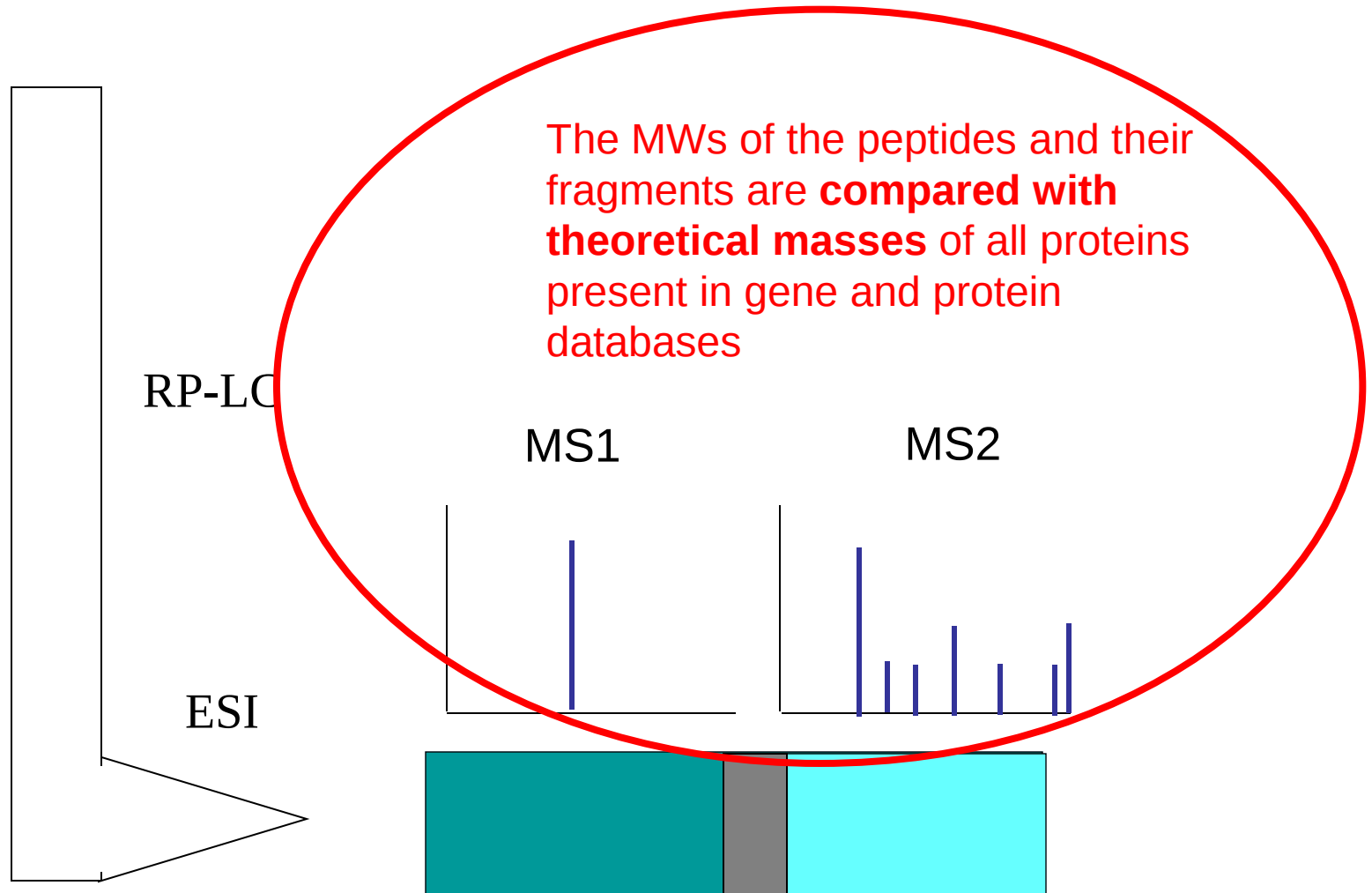
LC-MS/MS



LC-MS/MS



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**

