



IOCB
PRAGUE



CHARLES UNIVERSITY
Faculty of science



BIOCEV

Biotechnology and Biomedicine Centre of the Academy
of Sciences and Charles University in Vestec

Kvantifikace, isotopy, cílená proteomika

Karel Harant

harant@natur.cuni.cz



IOCB
PRAGUE

IOCB Prague

Mass Spectrometry of Biopolymers

Karel Harant Group

Core Facility

BIO cluster

Obsah přednášky:

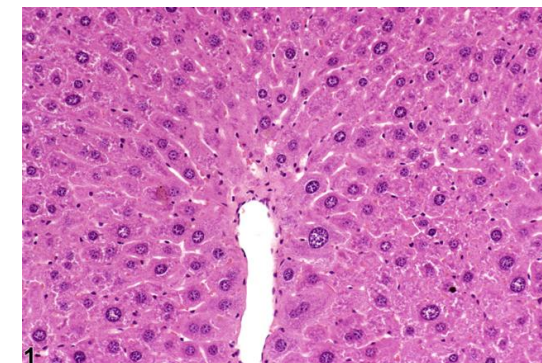
- Separační strategie v proteomickém experiment
- Kvantifikace – značení stabilními isotopy
- Cílená analýza peptidů
 - Absolutní kvantifikace

Separační strategie v shotgun experimentech

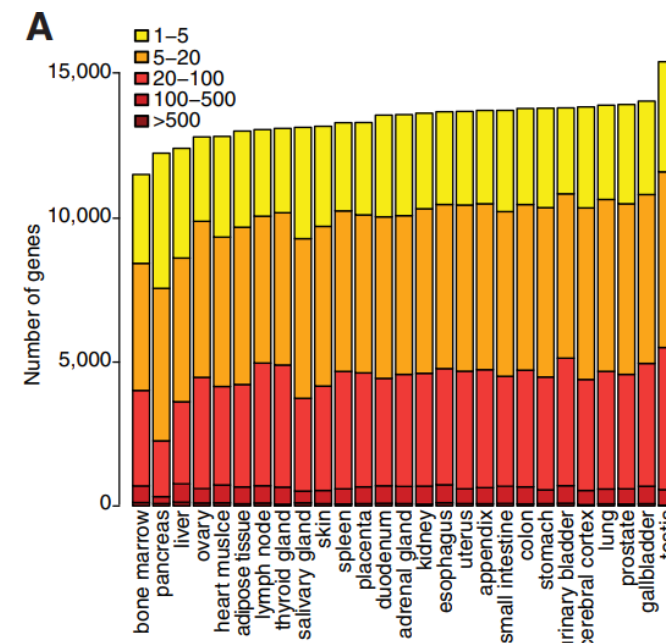
Kolik různých proteinů může být ve vzorku



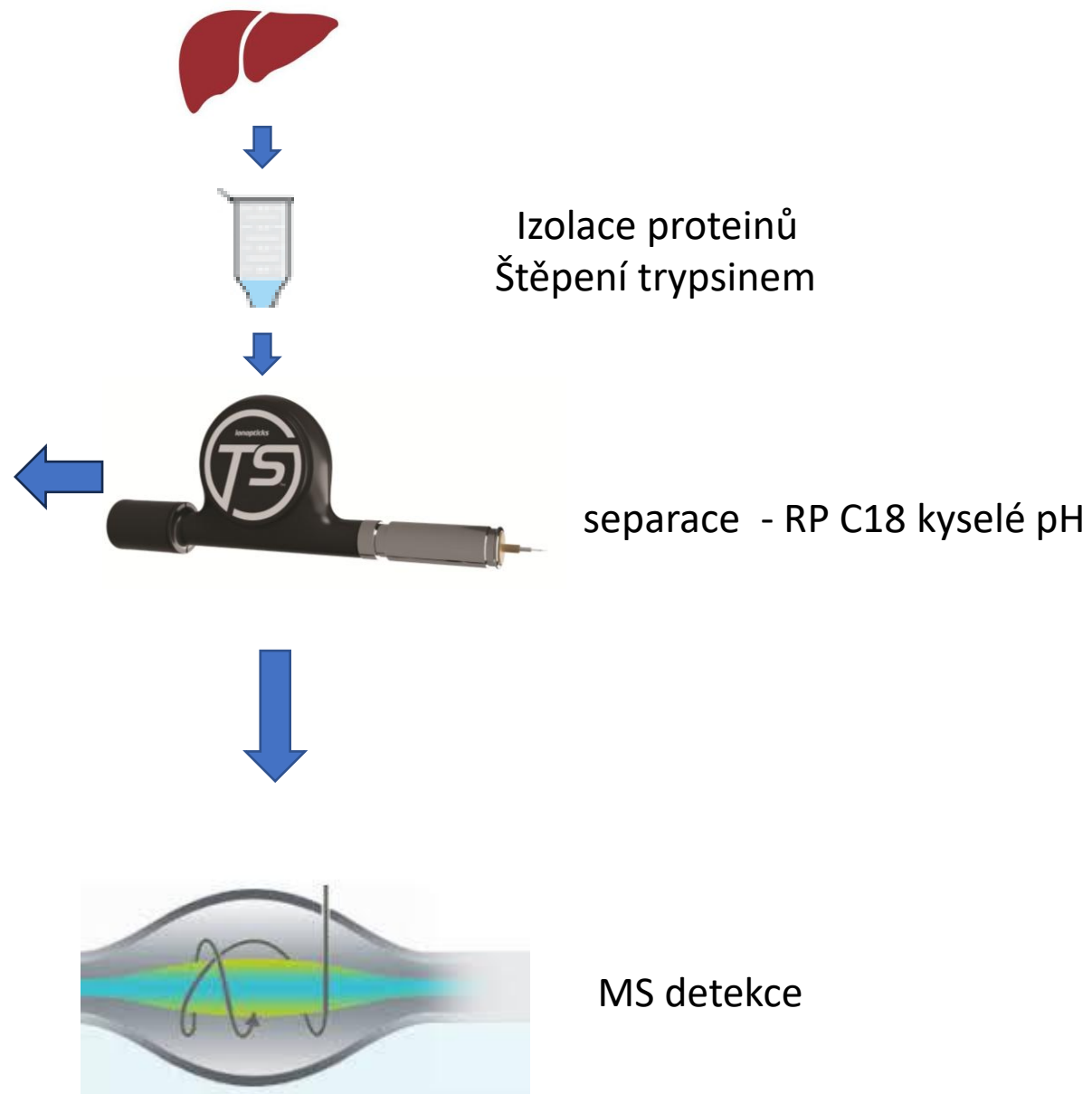
20 000
genů



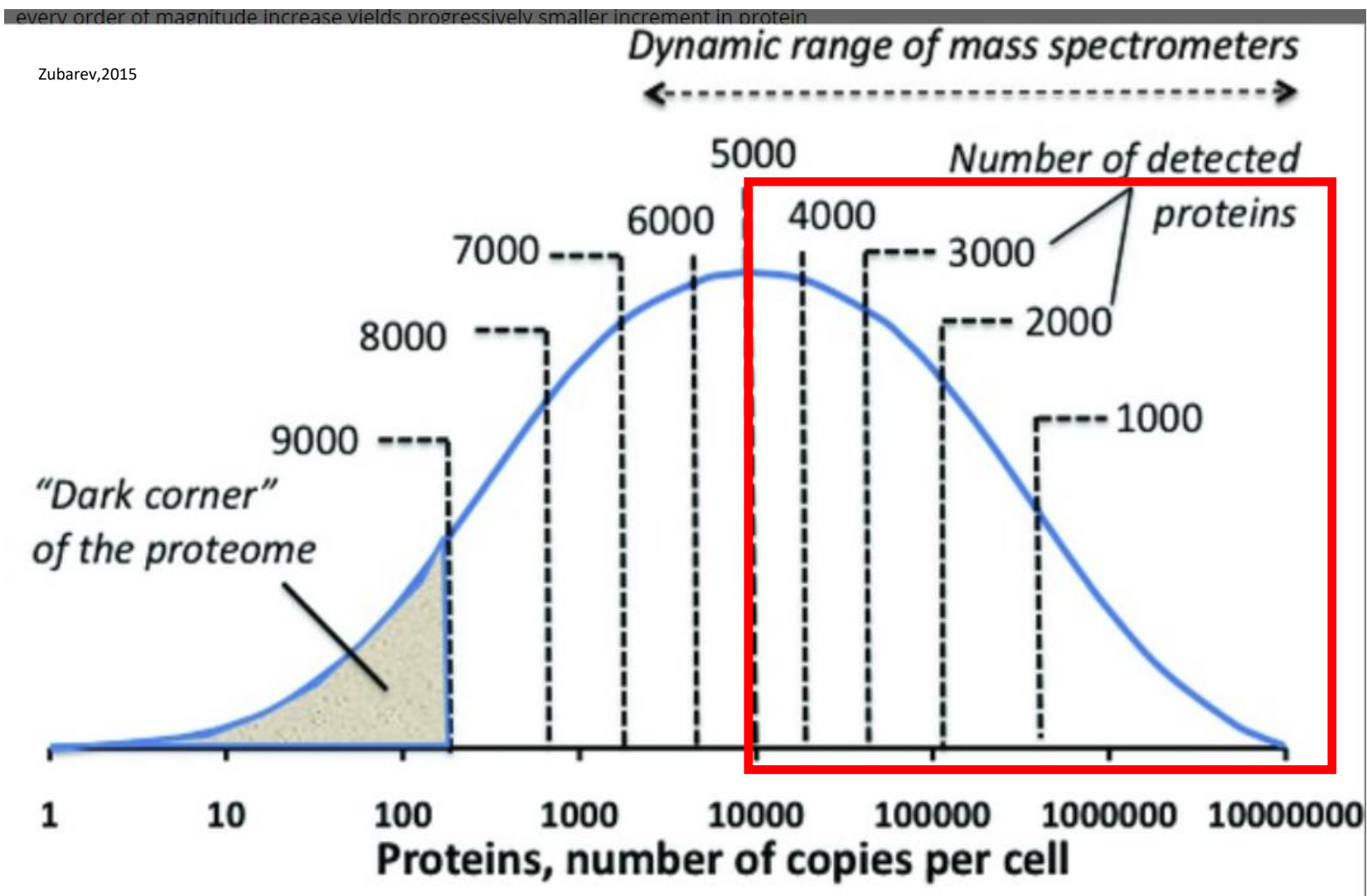
V jedné tkáni je přepisováno kolem 12 000 genů



Not a reel , it is chromatographic column



Pokrytí proteomu : 5000 identifikací (DDA metoda)

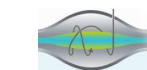
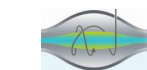
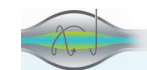
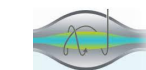
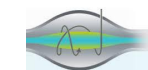
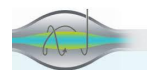
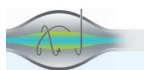
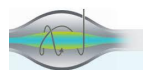




Frakcionace vzorku
RP C18 pH10
nebo
iontoměnič



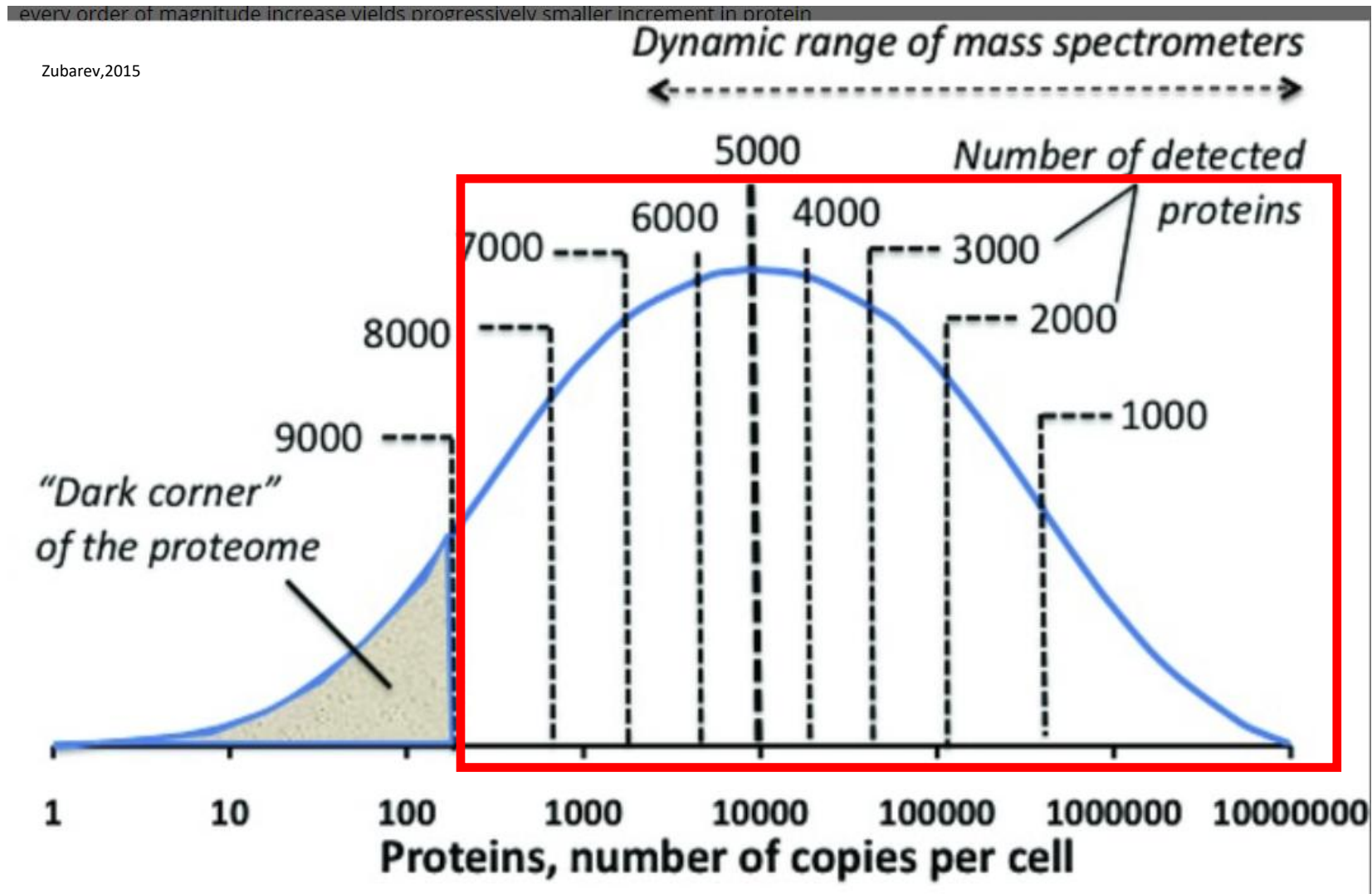
8 frakcí



separace -
RP C18 kyselý pH

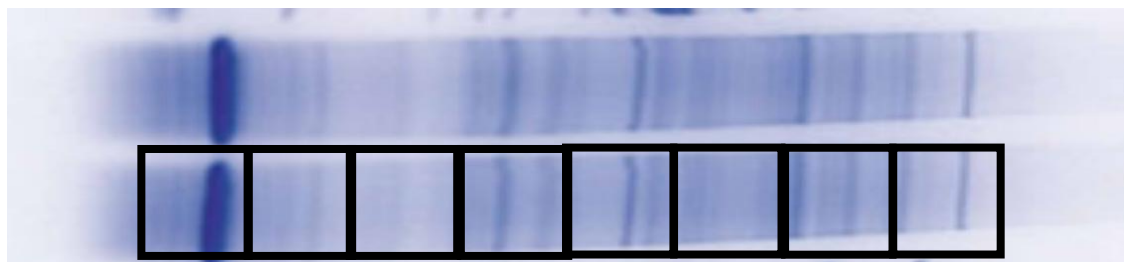
MS detekce

Pokrytí frakcionovaného proteomu : 8 000-10 000 identifikací (DDA metoda)





Izolace proteinů



SDS elektroforetická separace



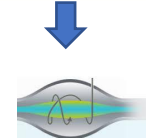
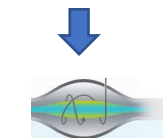
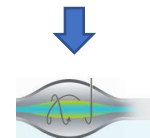
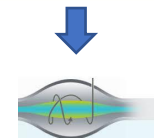
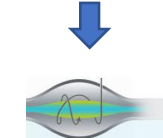
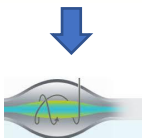
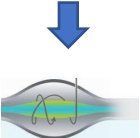
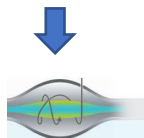
Rozdělení gelu na části



Štěpení v gelu



separace -
RP C18 kyselé pH



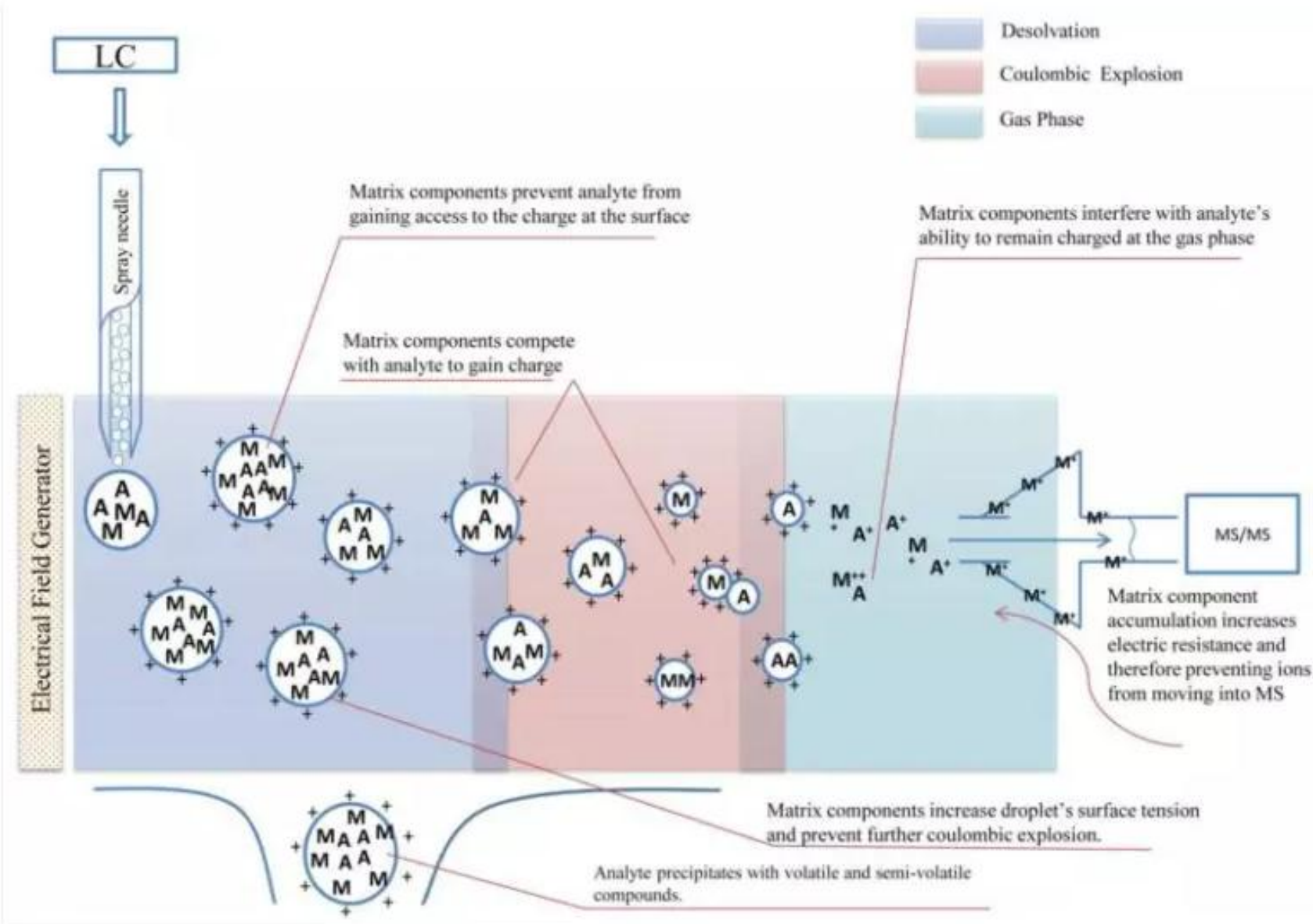
MS detekce

MS měření není kvantitativní

Stejná intenzita v různých vzorcích nemusí
znamenat stejnou koncentraci

Stejná koncentrace v různých vzorcích nemusí
dát stejnou intenzitu signálu

Matriční efekt



Možné zeslabení signálu

Možné zesílení signálu

Vzorky shodného složení



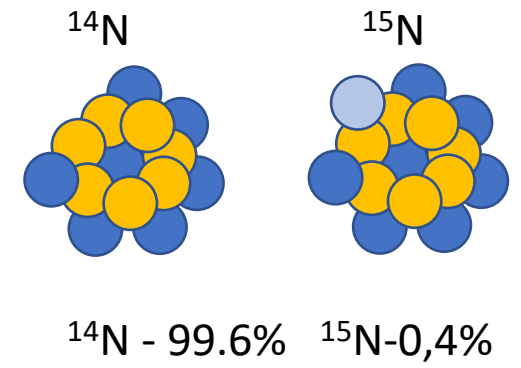
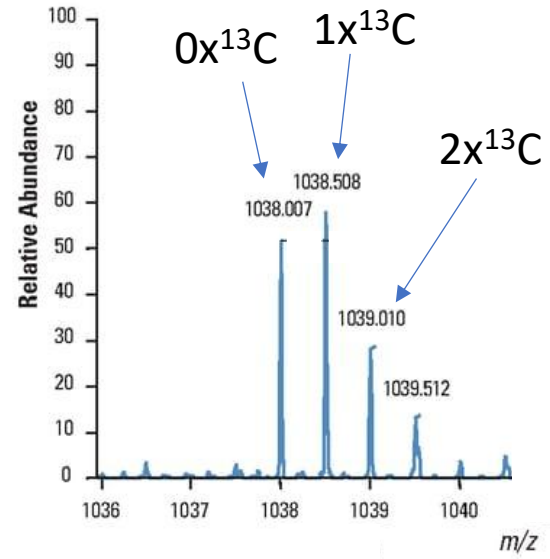
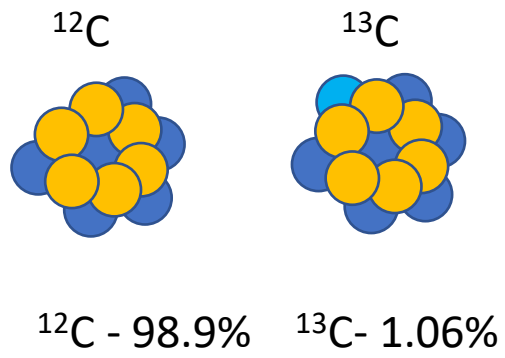
předpoklad shodného
matričního efektu

Provádíme relativní kvantifikaci
LFQ, DIA

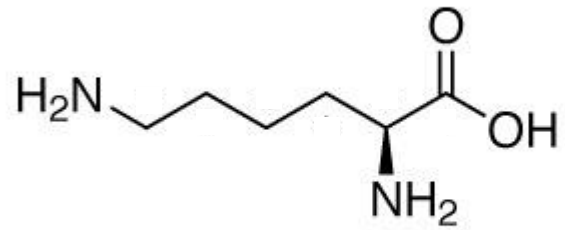
Založeno na předpokladu
Nikoliv jistotě

Relativní kvantifikace může být provedena u dvou chemicky identických látek v jednom spektru.

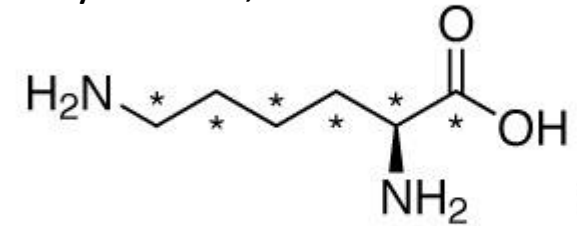
Tyto látky se mohou lišit v izotopickém složení



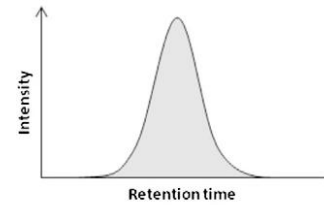
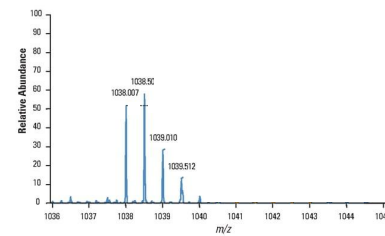
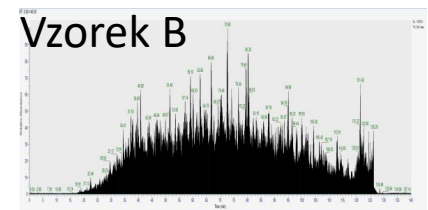
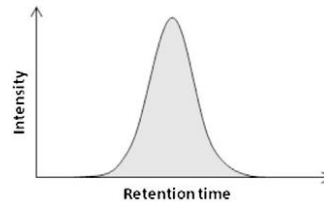
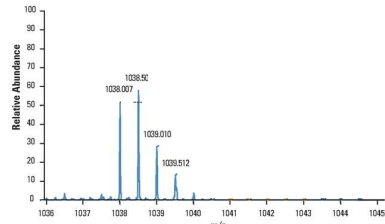
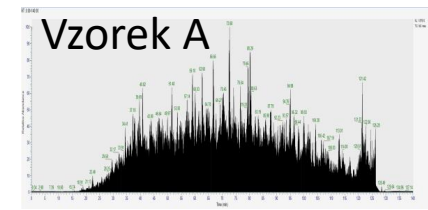
Lysin 146,19 Da $0\times^{13}\text{C}$



Lysin 152,19 Da $6\times^{13}\text{C}$



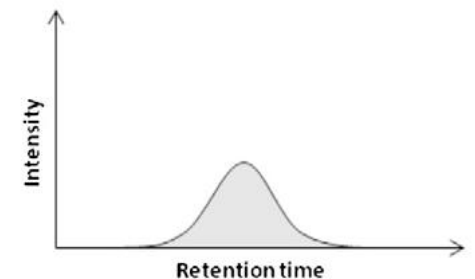
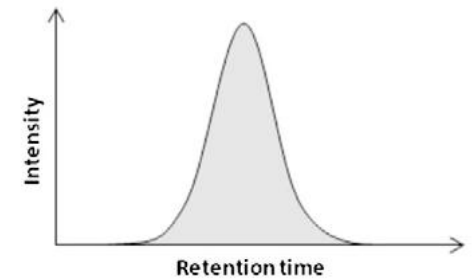
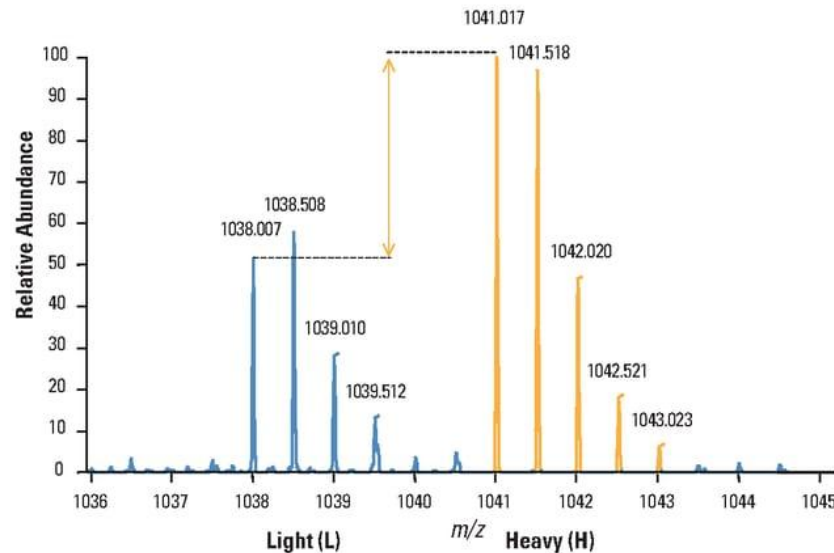
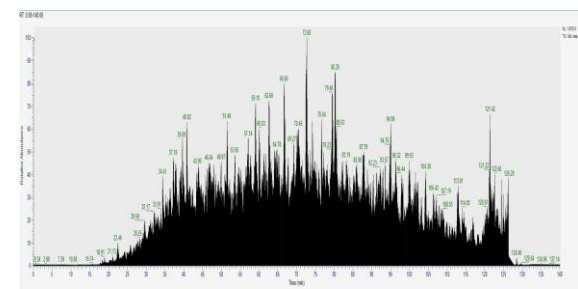
Kvantifikace proteinů bez značení



Náchylné k artefaktům,
Nutné měřit všechny vzorky v
jeden čas, na jednom stroji, jedné
chromatografii

Kvantifikace proteinů pomocí značení

Vzorek A a B - směs



Kvantifikace pomocí MS – stabilní izotopy

METABOLICKÉ

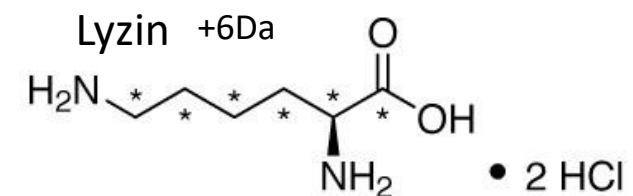
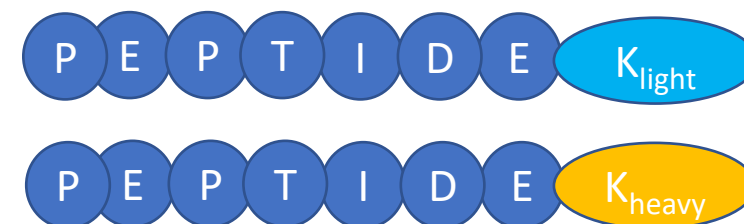
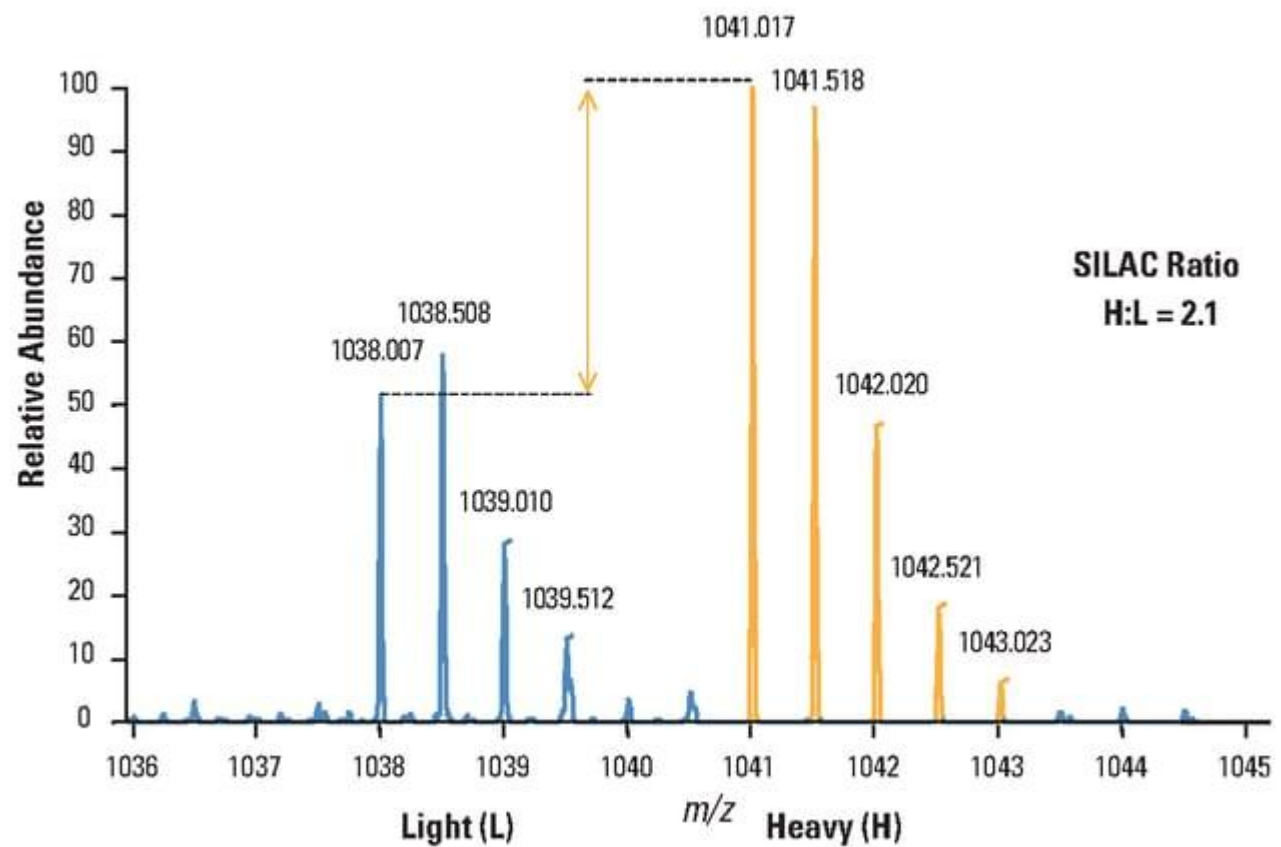
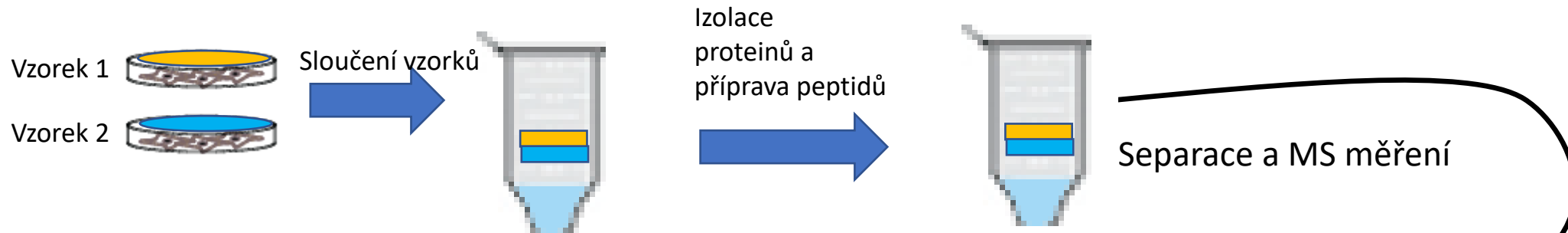
- **SILAC** – Stable Isotope Labeling with Aminoacids in Culture

CHEMICKÉ

- **Dimethylation isotope labeling**
- **iTRAQ** - Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation
- **TMT** – Tandem Mass Tags

METABOLICKÉ ZNAČENÍ

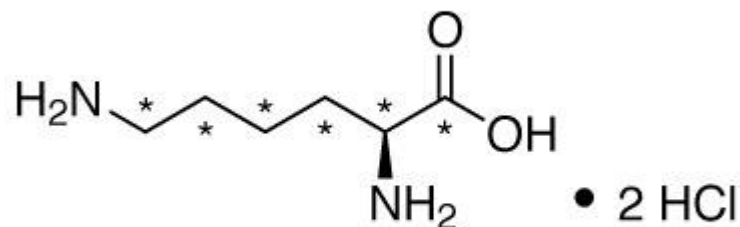
- **SILAC** – Stable Isotope Labeling with Aminoacids in Culture



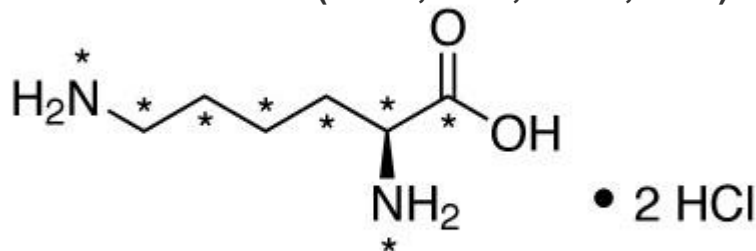
“Těžké” aminokyseliny využívané pro SILAC

- Uměle je možné vyrobit aminokyseliny se zvýšeným výskytem těžkých izotopů

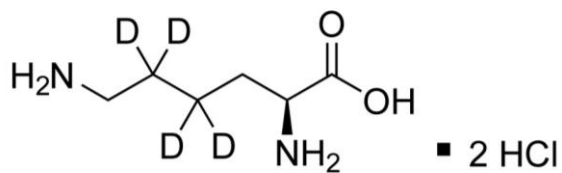
L-LYSINE:2HCL ($^{13}\text{C}_6$, 99%) +6Da



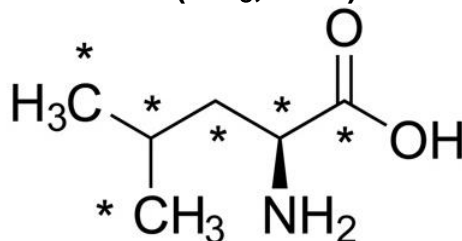
L-LYSINE:2HCL ($^{13}\text{C}_6$, 99%; $^{15}\text{N}_2$, 99%) +8Da



L-LYSINE:2HCL (4,4,5,5- D_4 , 96-98%) +4Da

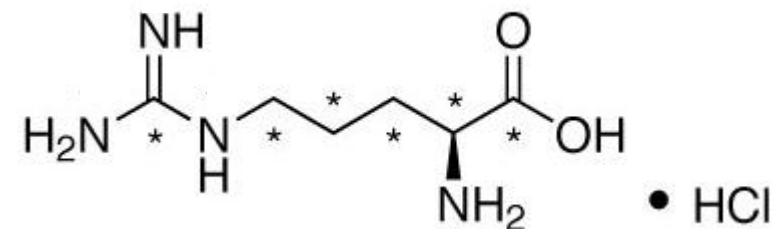


L-Leucine ($^{13}\text{C}_6$, 99%) +6Da

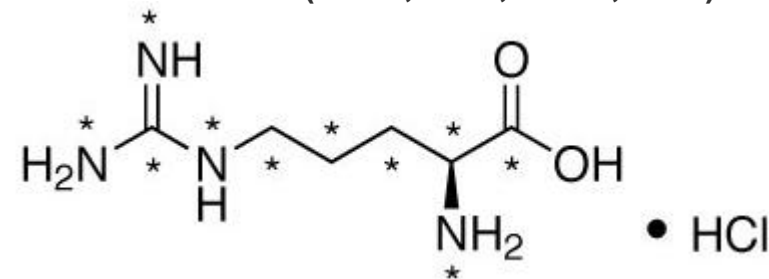


mass shift	+4	+6	+8	+10
Arginine		X		X
Leucine		X		
Lysine	X	X	X	

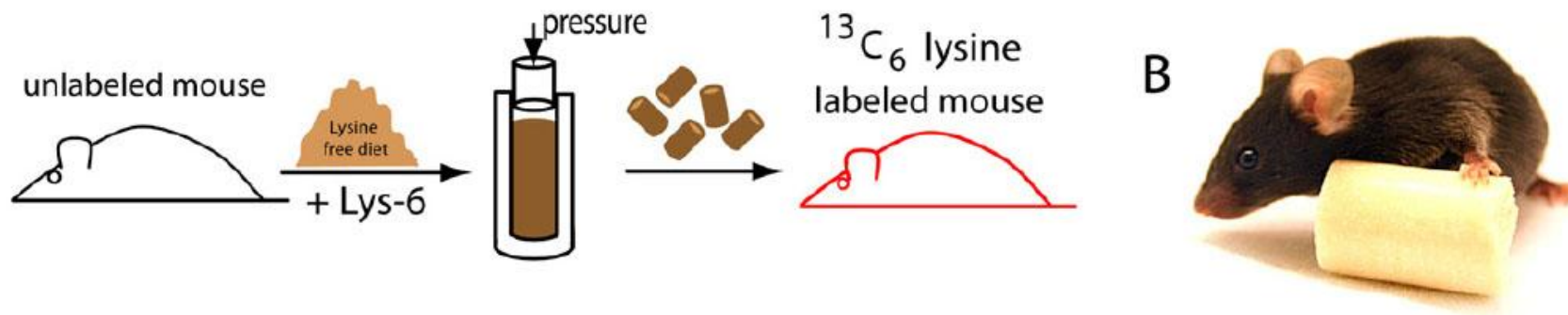
L-ARGININE:HCL ($^{13}\text{C}_6$, 99%) +6 Da



L-ARGININE:HCL ($^{13}\text{C}_6$, 99%; $^{15}\text{N}_4$, 99%) +10 Da



SILAC MYŠ



F1 93% $^{13}\text{C}_6$ lysine

F2 97% $^{13}\text{C}_6$ lysine

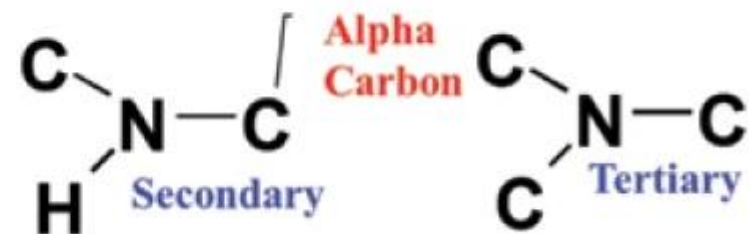
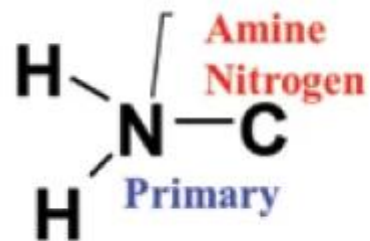
F3-F4 téměř 100 % $^{13}\text{C}_6$ lysine

- Aminokyseliny jsou poskytnuty jako živina
- Musí se jednat o esenciální aminokyselinu
- Využití proteosyntetického aparátu k naznačení proteinů
 - Kultivace buněk v médiu s “těžkou” aminokyselinou
 - Po několika generacích (šesti) je kultura kompletně proznačena
 - Krmení zvířete krmivem s “těžkou” aminokyselinou
- Omezeno na bezsérové (dializované), nekomplexní médium/krmivo
- Při multiplexingu větším než 2 by odstup hmot by měl být alespoň 4Da
- Velmi přesný
 - Z uváděných metod nejpřesnější
 - Artefakty potlačeny i v průběhu lyze buněk a přípravy peptidů
 - Velmi drahý

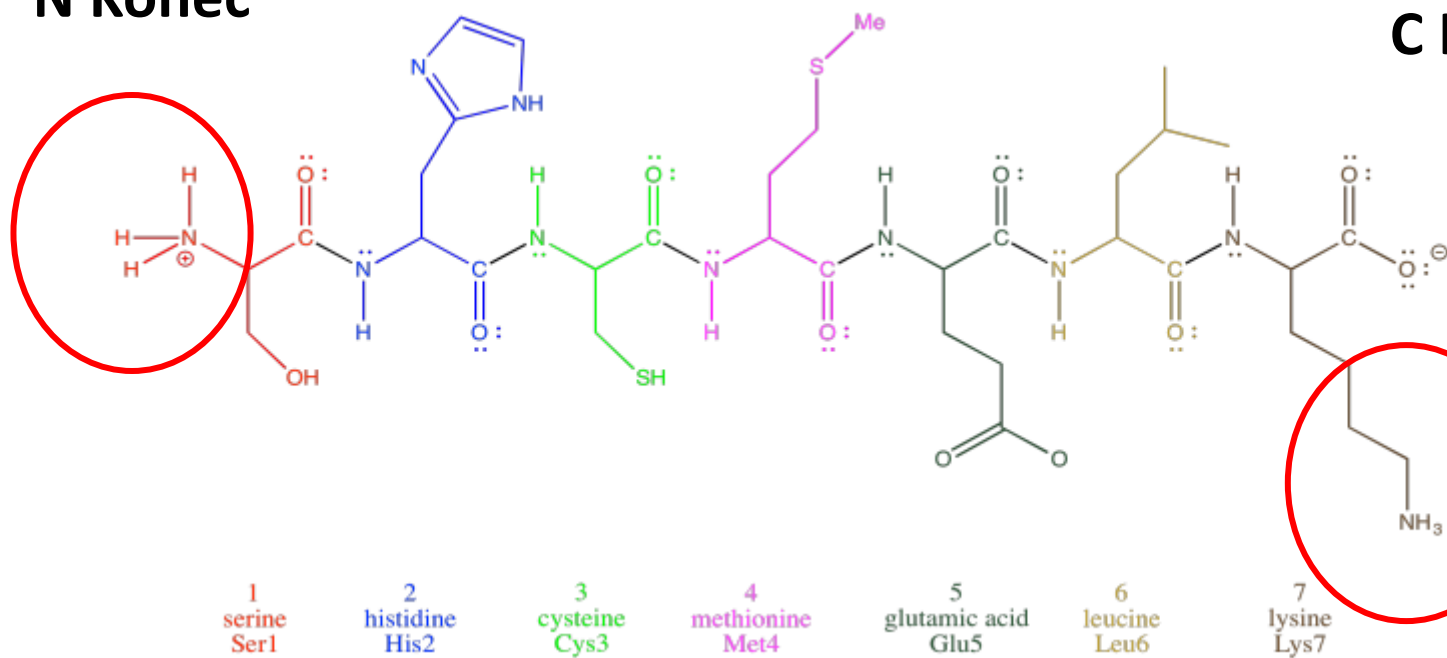
CHEMICKÉ ZNAČENÍ

- Dimethylation isotope labeling

Primární amin

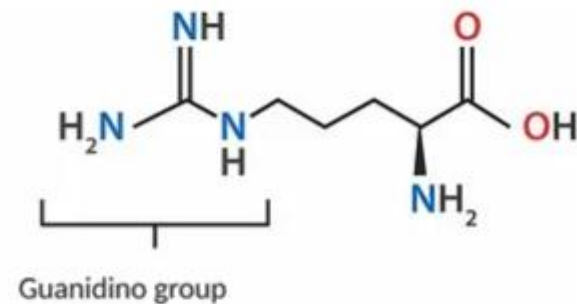


N Konec

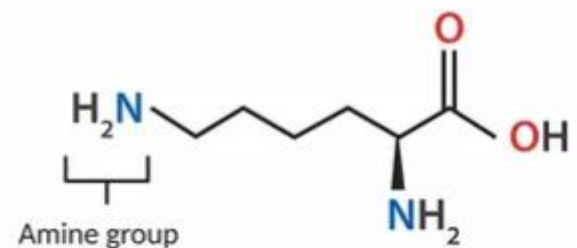


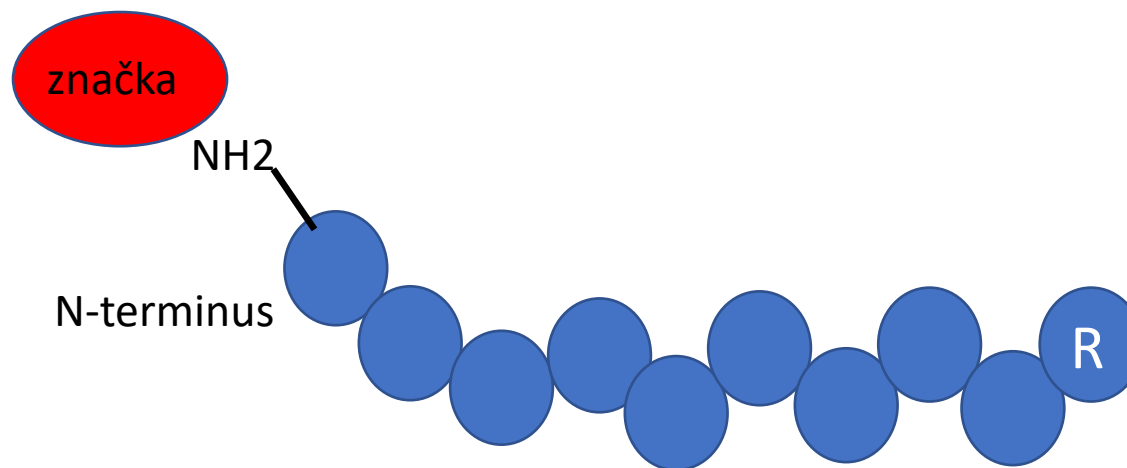
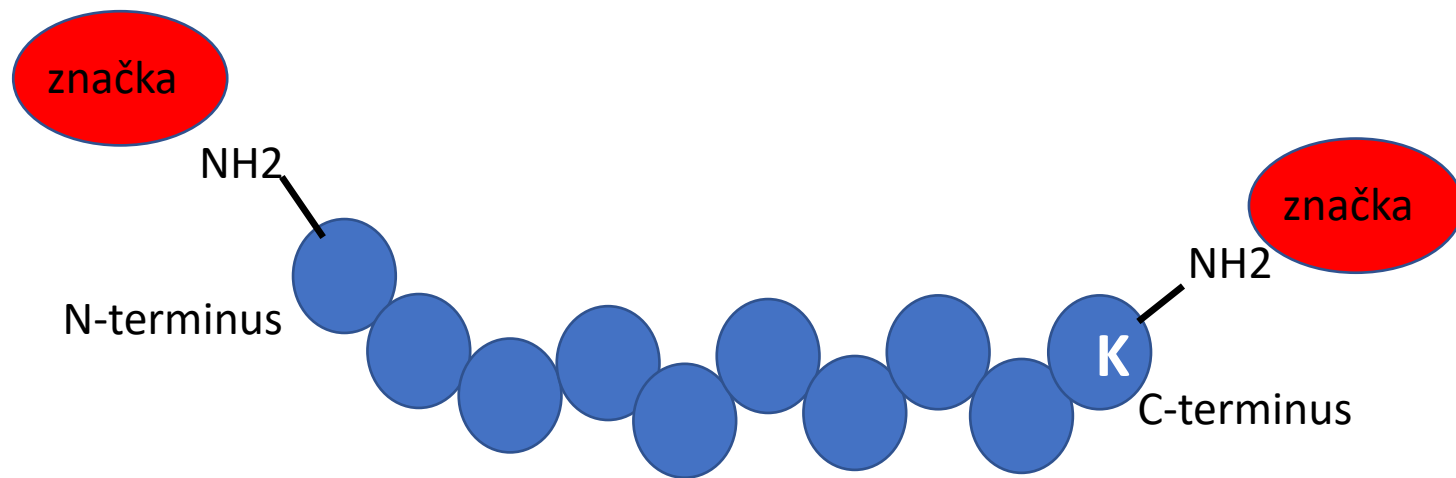
C Konec

Arginine

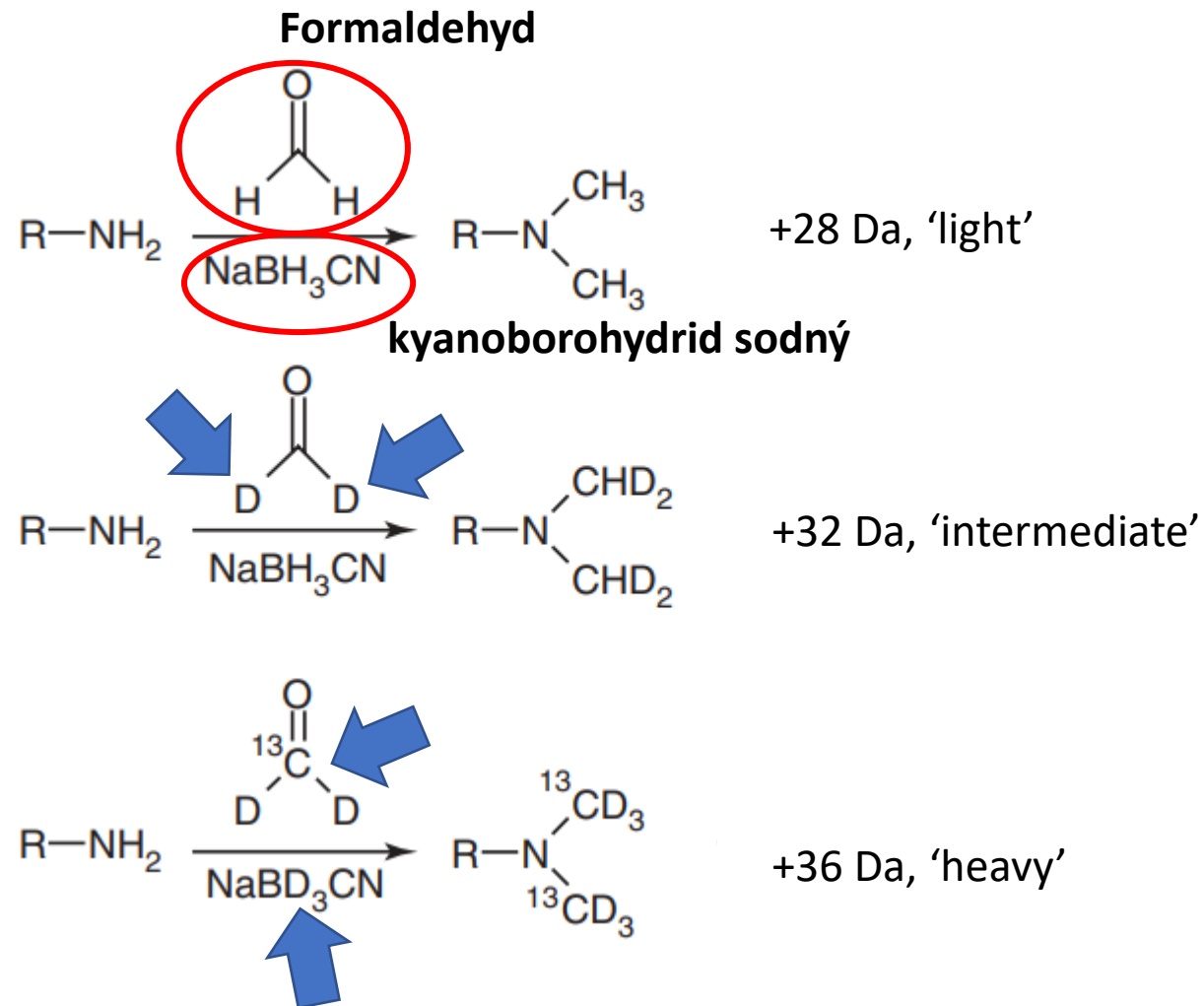


Pr
Lysine





Di-methylace

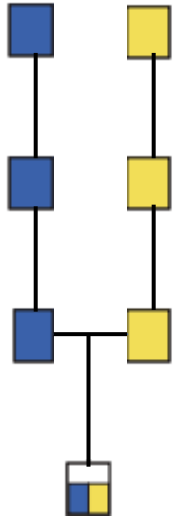


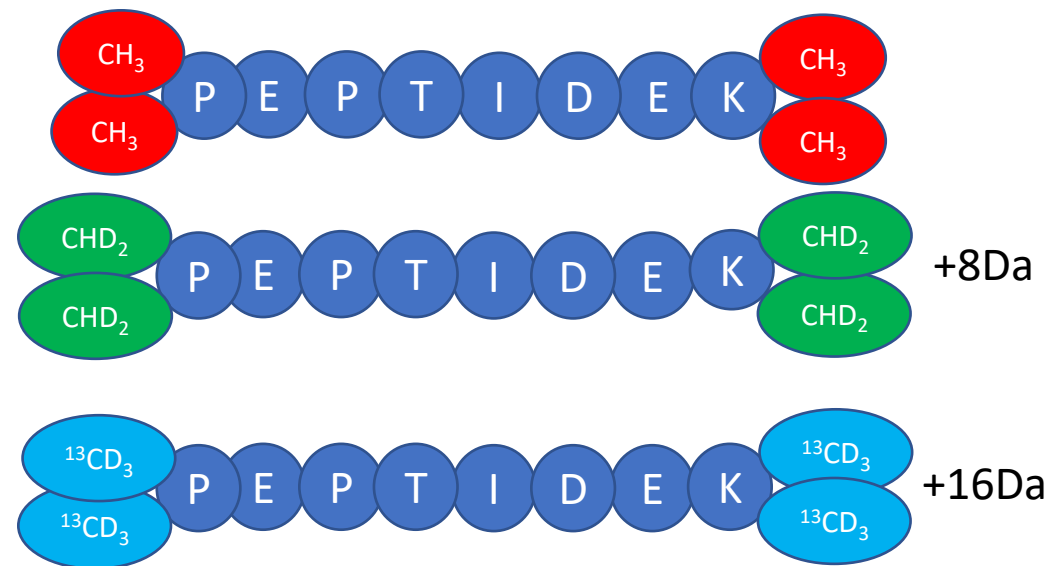
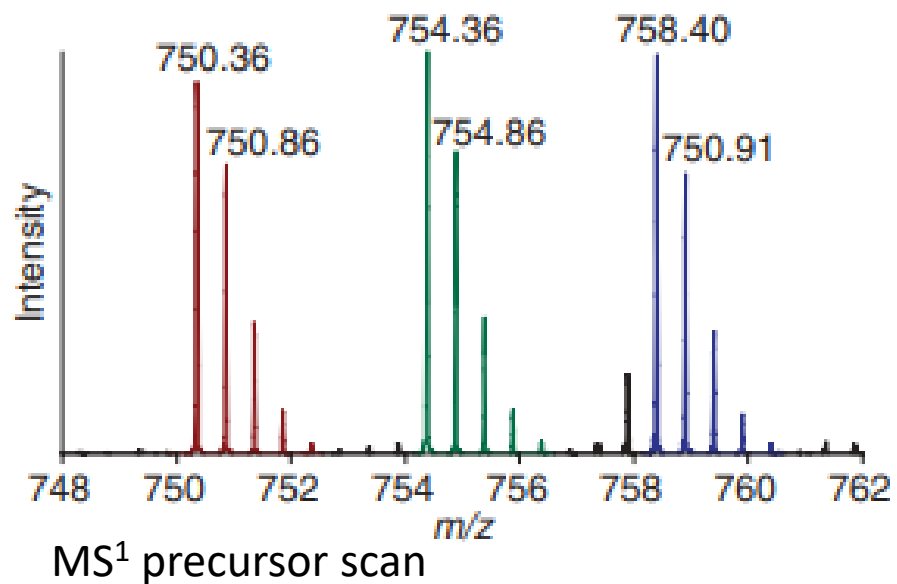
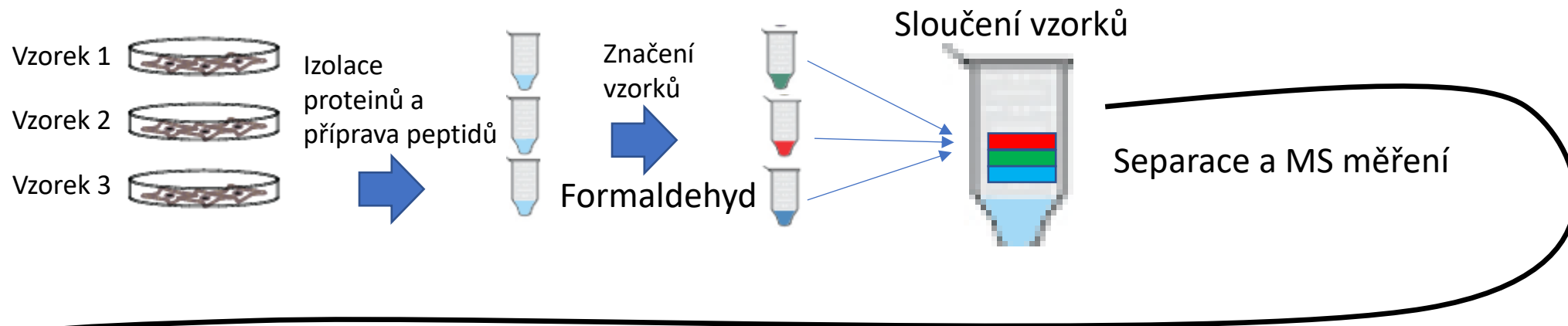
Kultivace

Izolace proteinů

Štěpení a značení

LC separace a MS

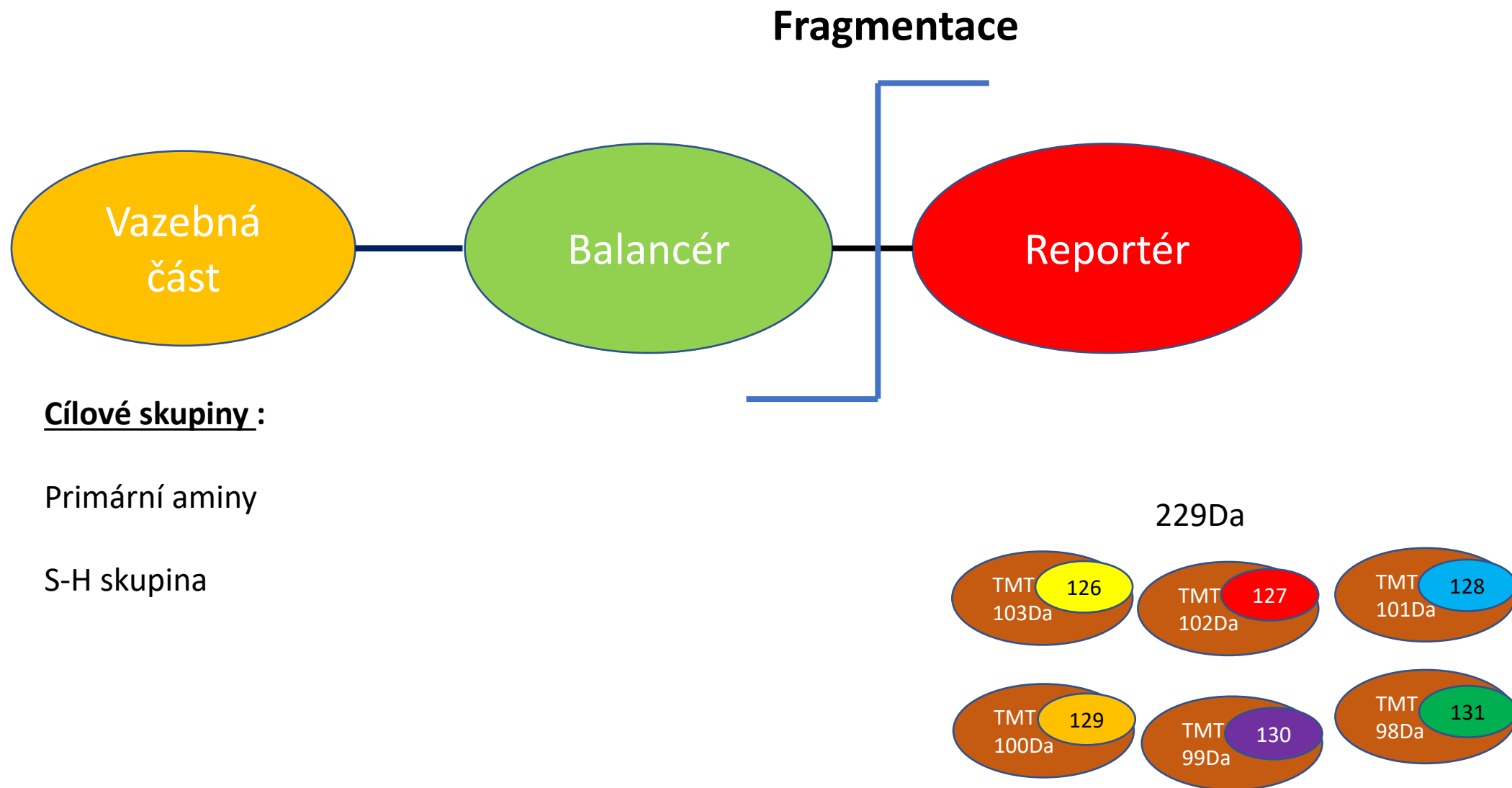


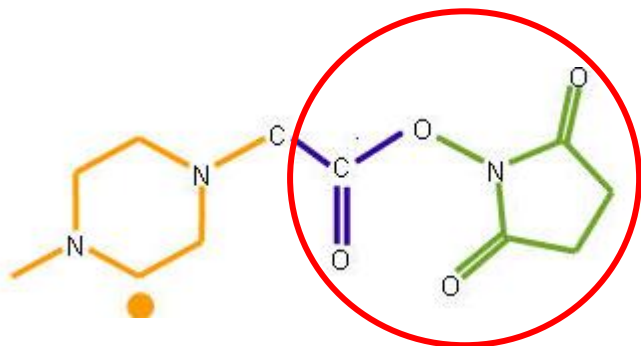


CHEMICKÉ ZNAČENÍ

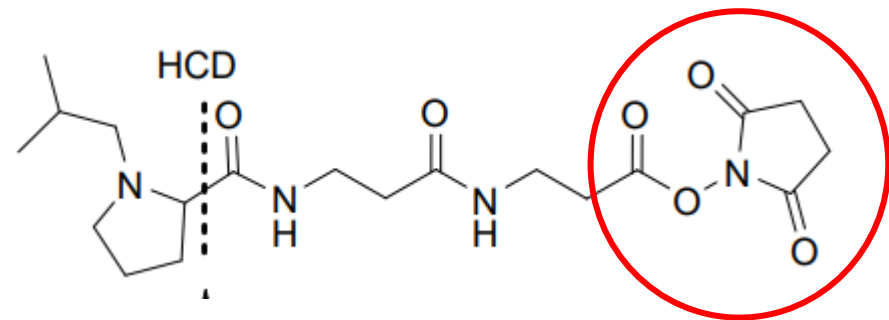
- **TMT** – Tandem Mass Tags
- **iTRAQ** - Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation

Obecná struktura izobarických značek



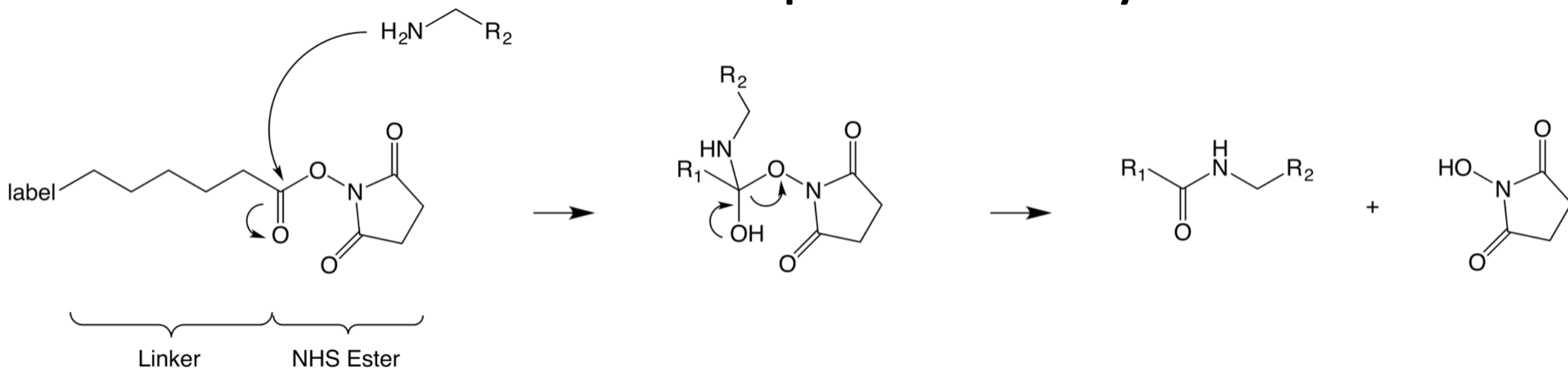


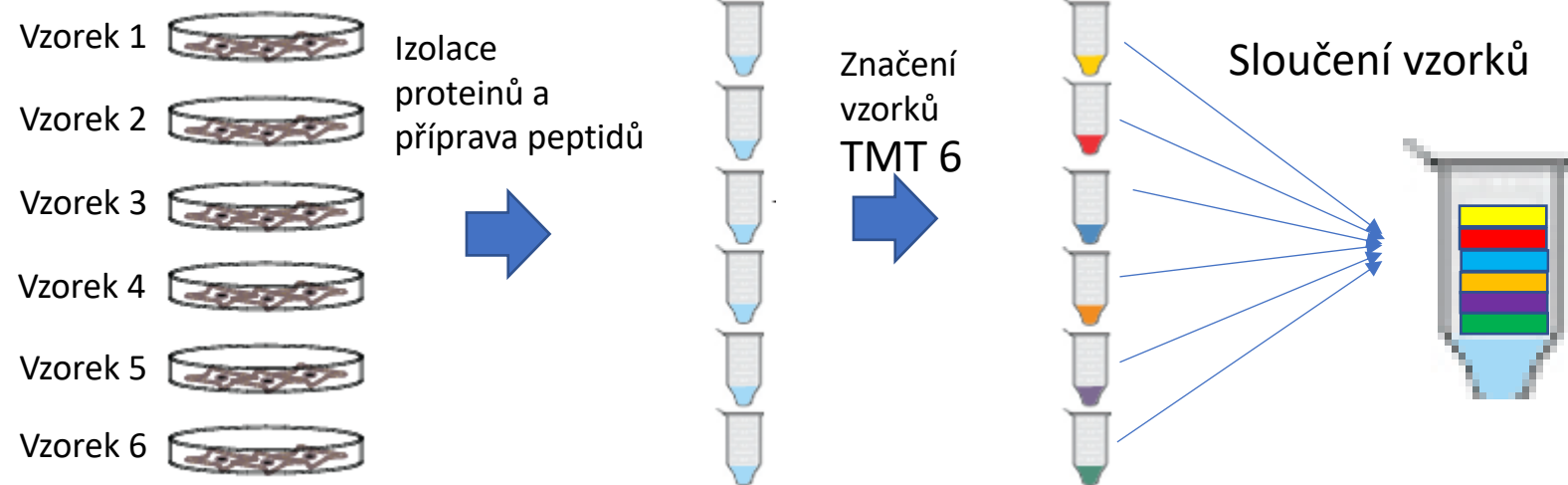
mTraq/iTraq



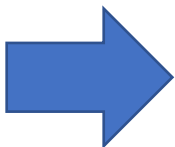
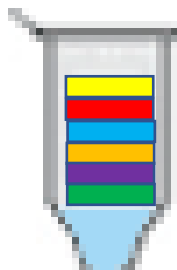
TMT

N-Hydroxysuccinimide (NHS) ester Reakce s primárními aminy



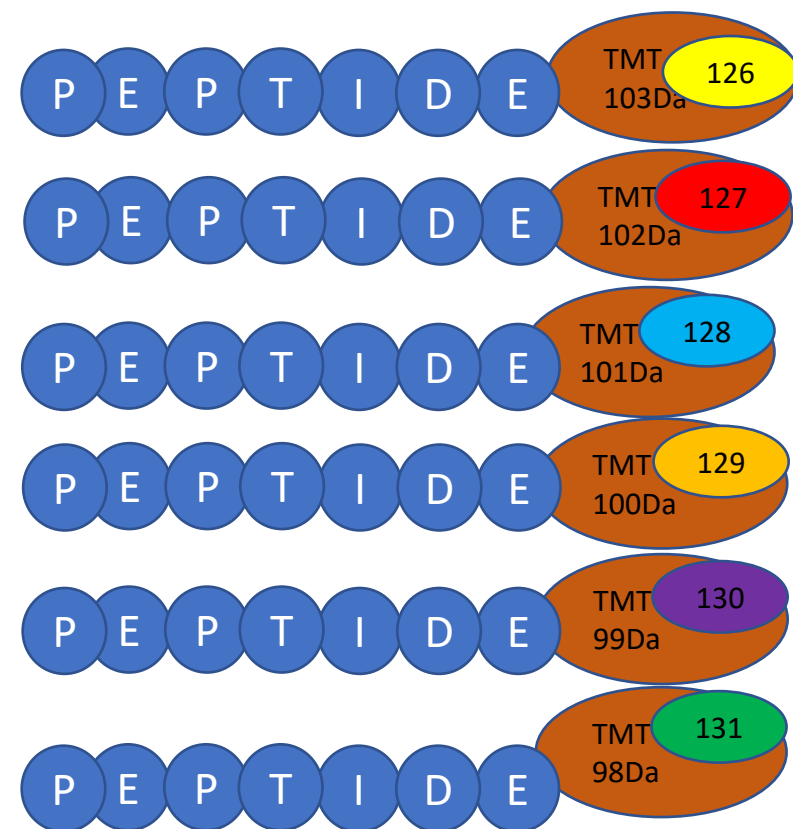
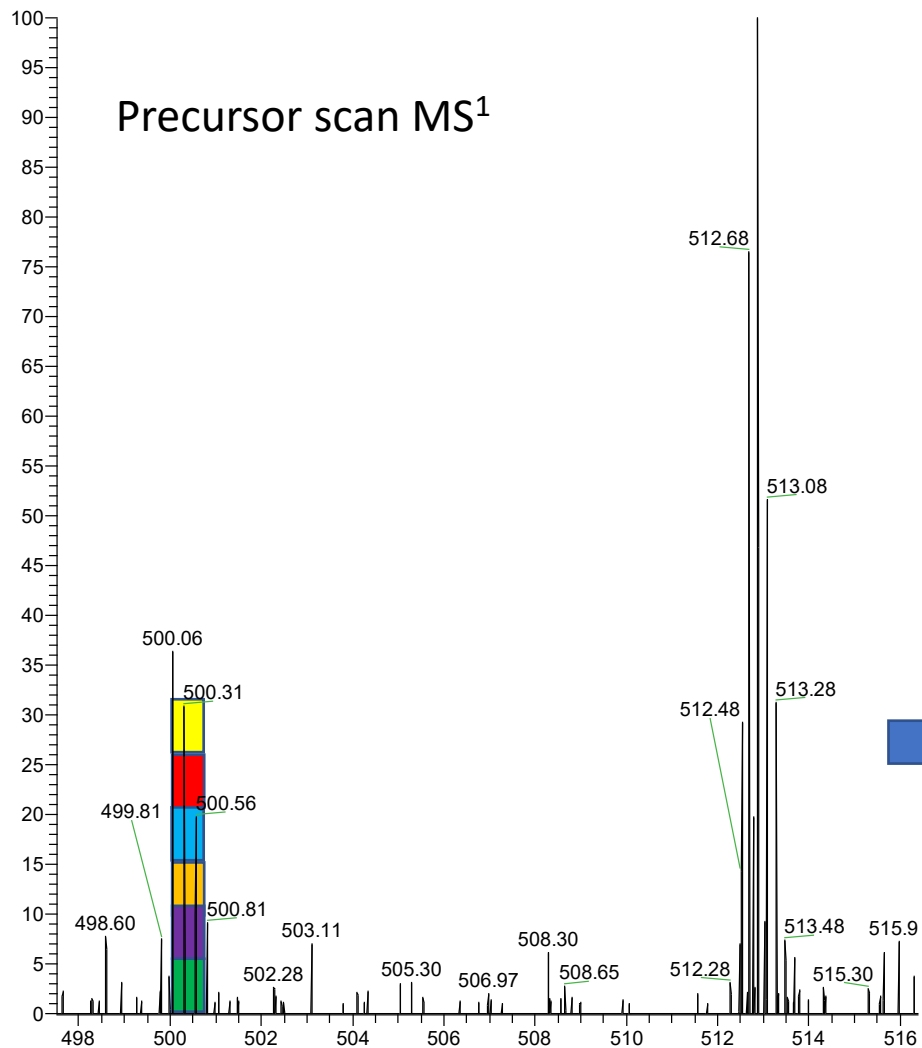


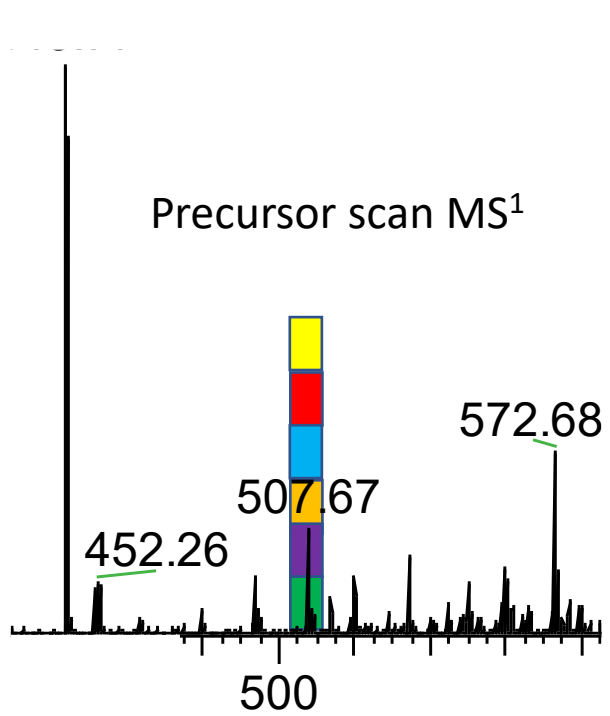
Separace a MS měření



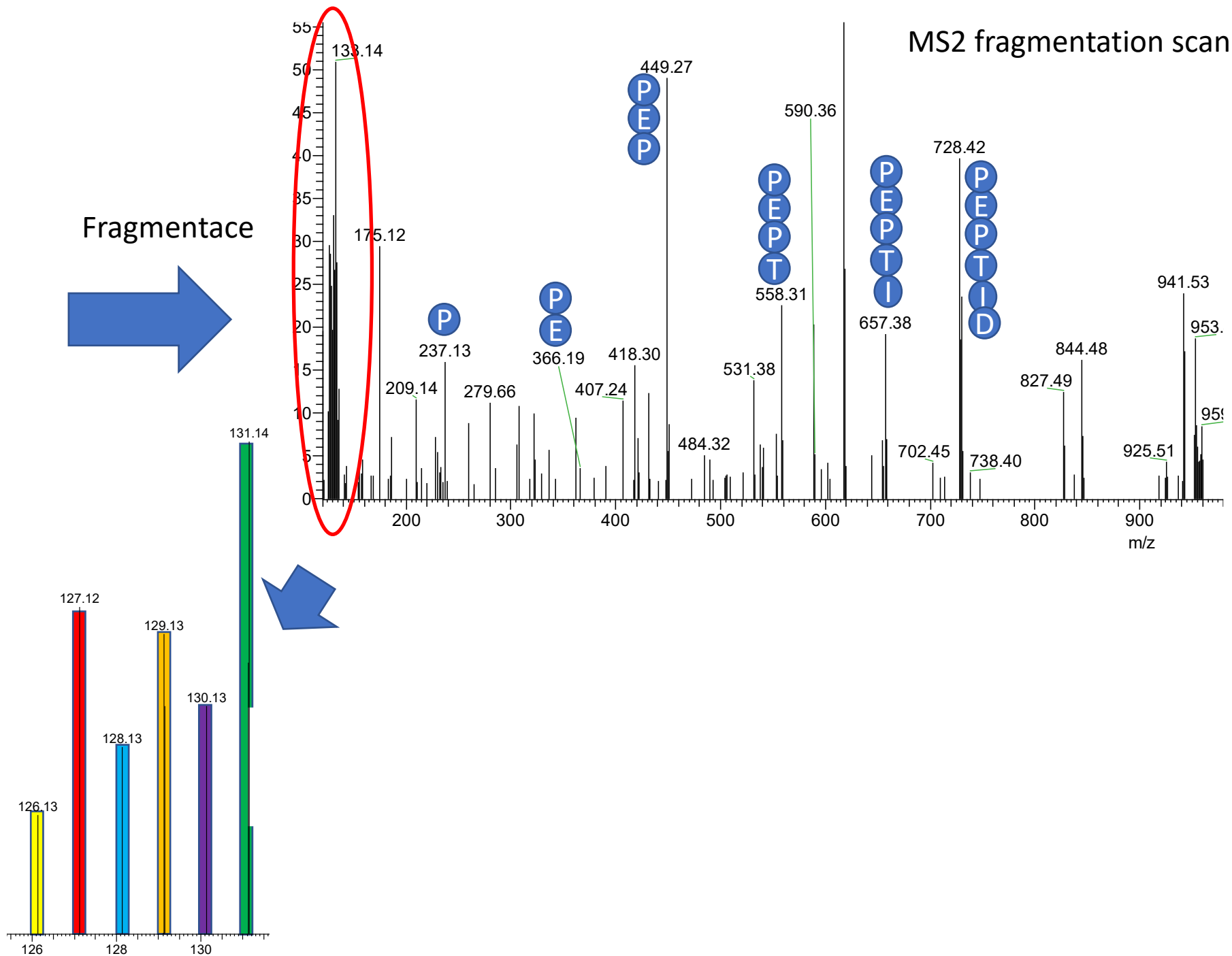
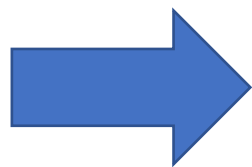
test-TMT_20231025121743 #35621 RT: 57.45 AV: 1 NL: 2.33E7
T: FTMS + p NSI Full ms [400.0000-1600.0000]

Precursor scan MS¹

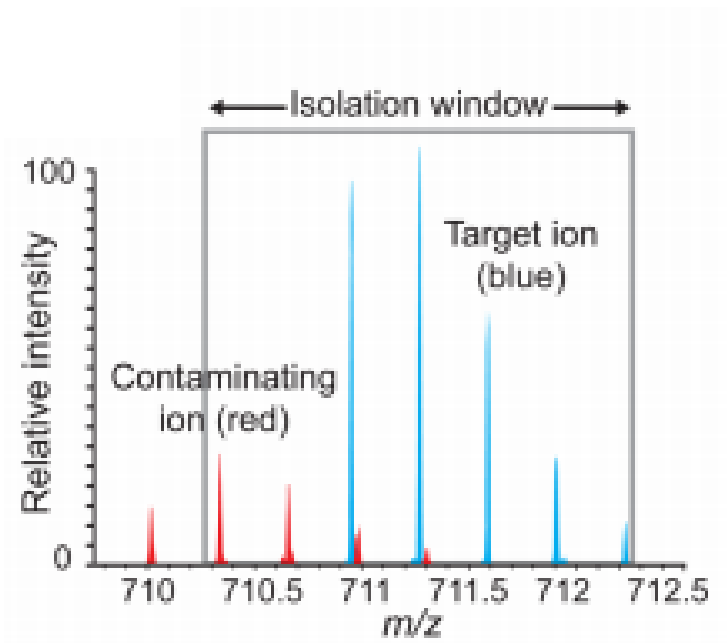




Fragmentace



Koizolace– zplošťování poměrů

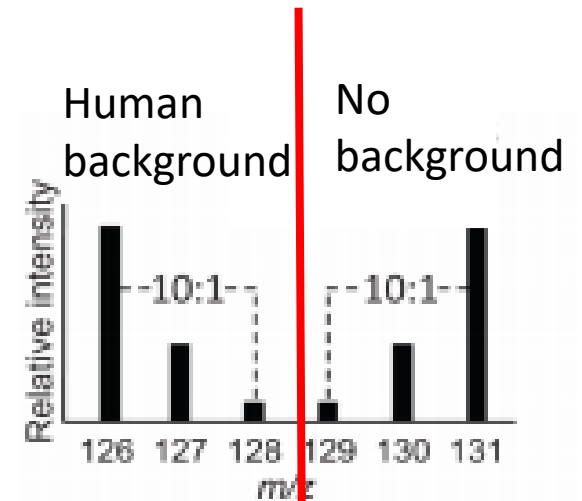


Přesnost měření je v milidaltonech
ale

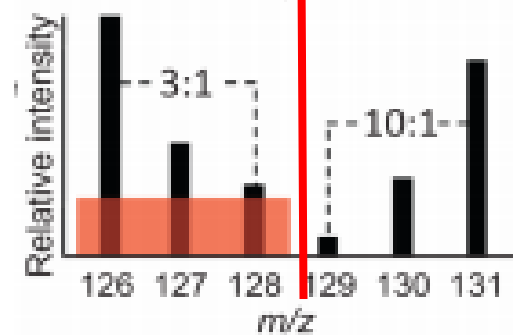
Izolace prekursoru v Daltonech

Vždy máme nějakou formu koizolace

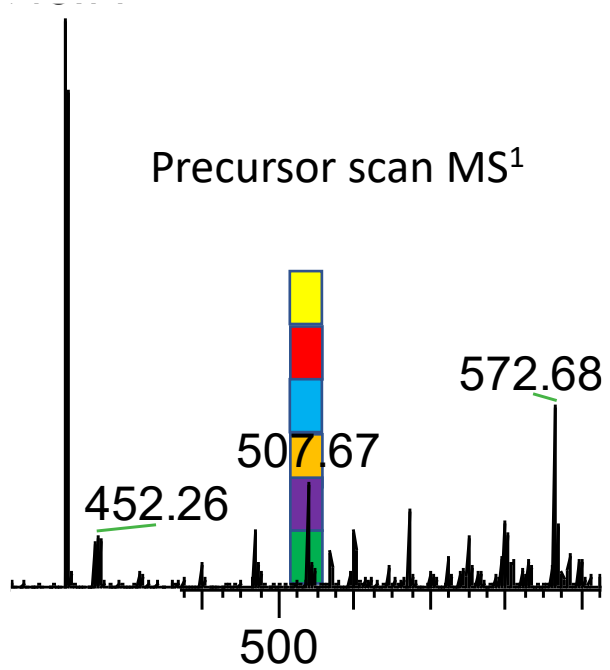
No interference



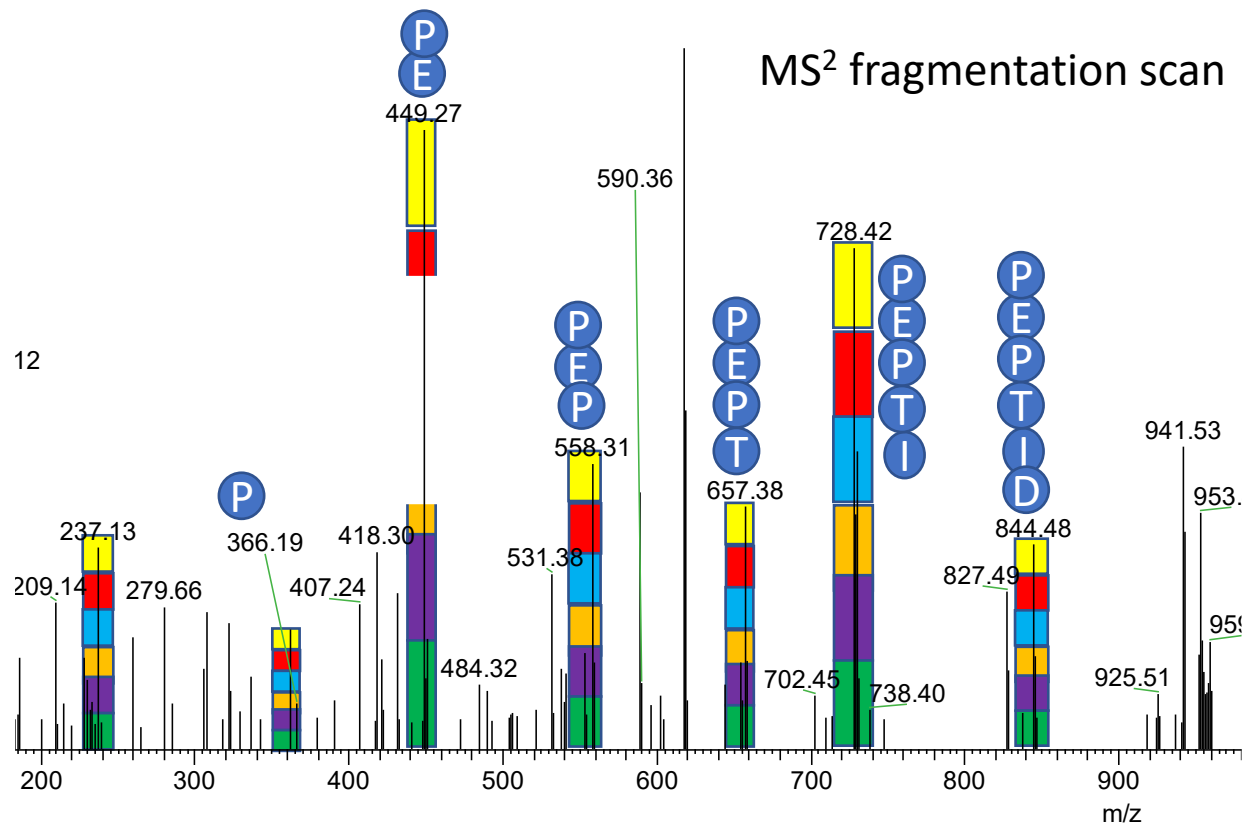
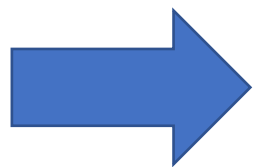
Typical
interference



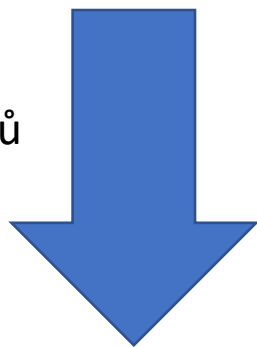
Jak by se šlo tohoto pozadí zbavit?



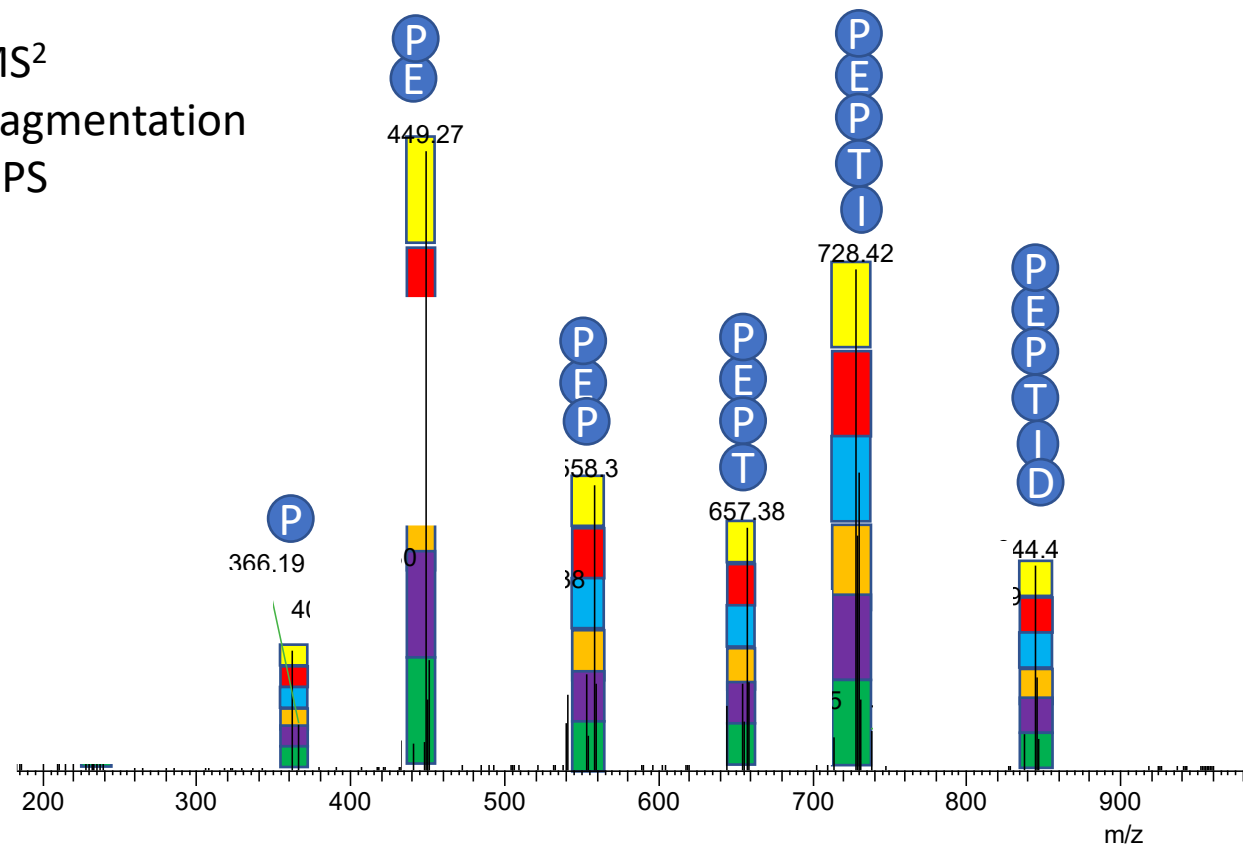
Fragmentace



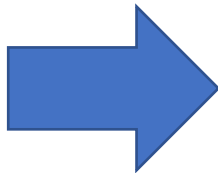
Synchronní izolace fragmentů
Nechat anglicky



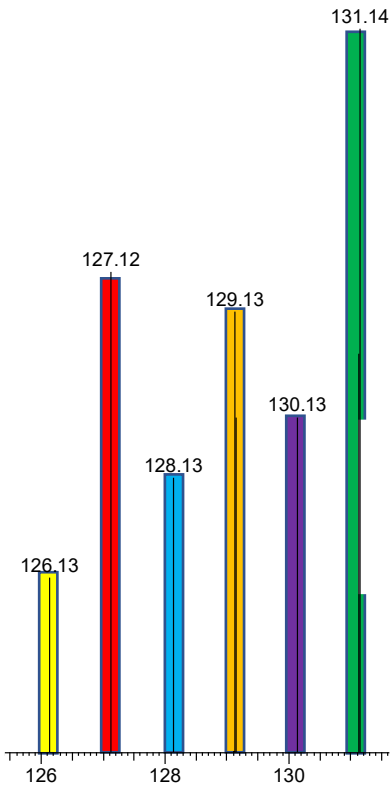
MS²
fragmentation
SPS



Fragmentace



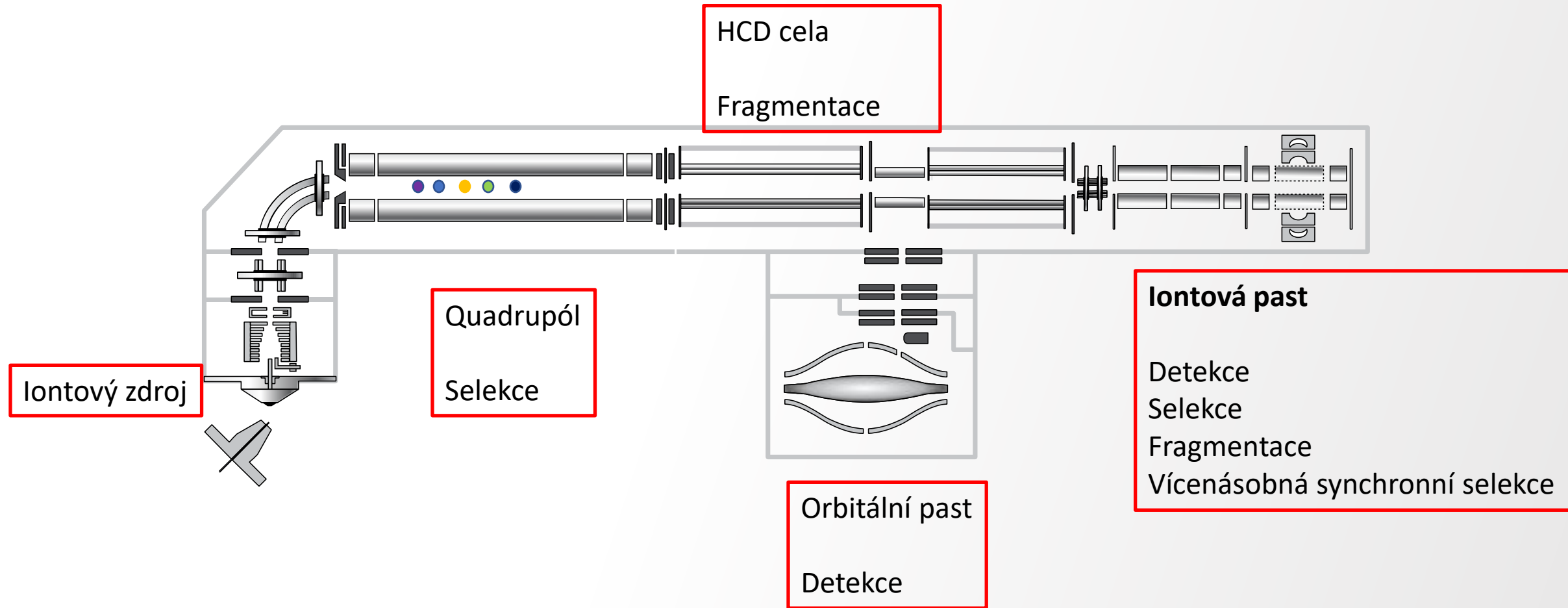
MS³ scan



SPS – synchronous precursor selection
Možnost vybrat více hmot najednou

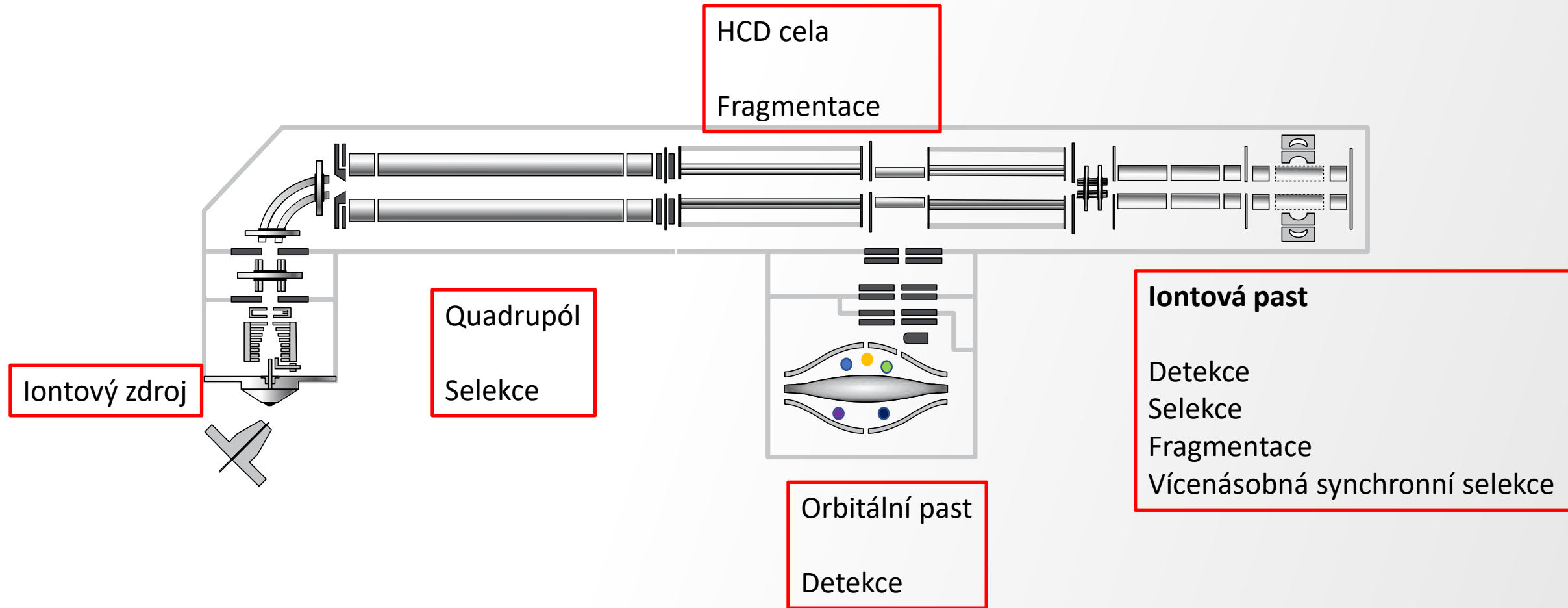
Tribridní Orbitrapy

● ● ● ● ● Prekurzory MS¹ scan



Tribridní Orbitrapy

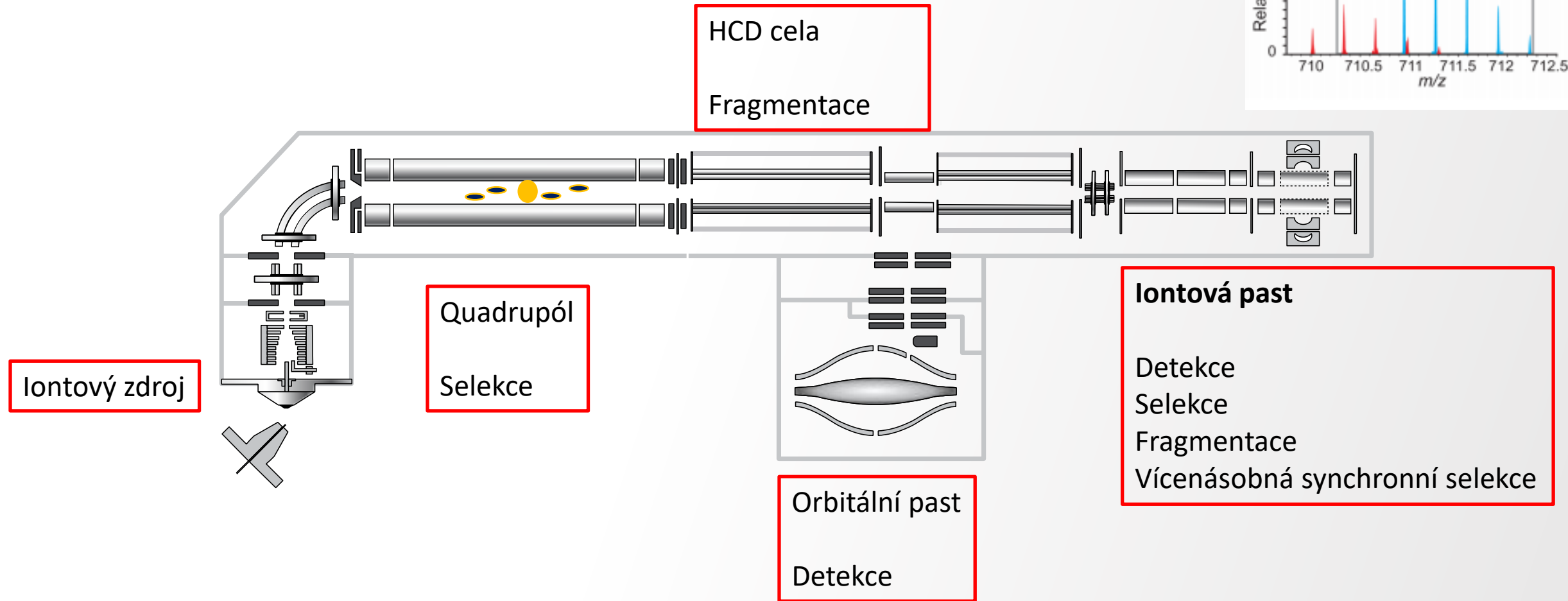
● ● ● ● ● Prekurzory MS¹ scan



Tribridní Orbitrapy

● Koizolované pozadí

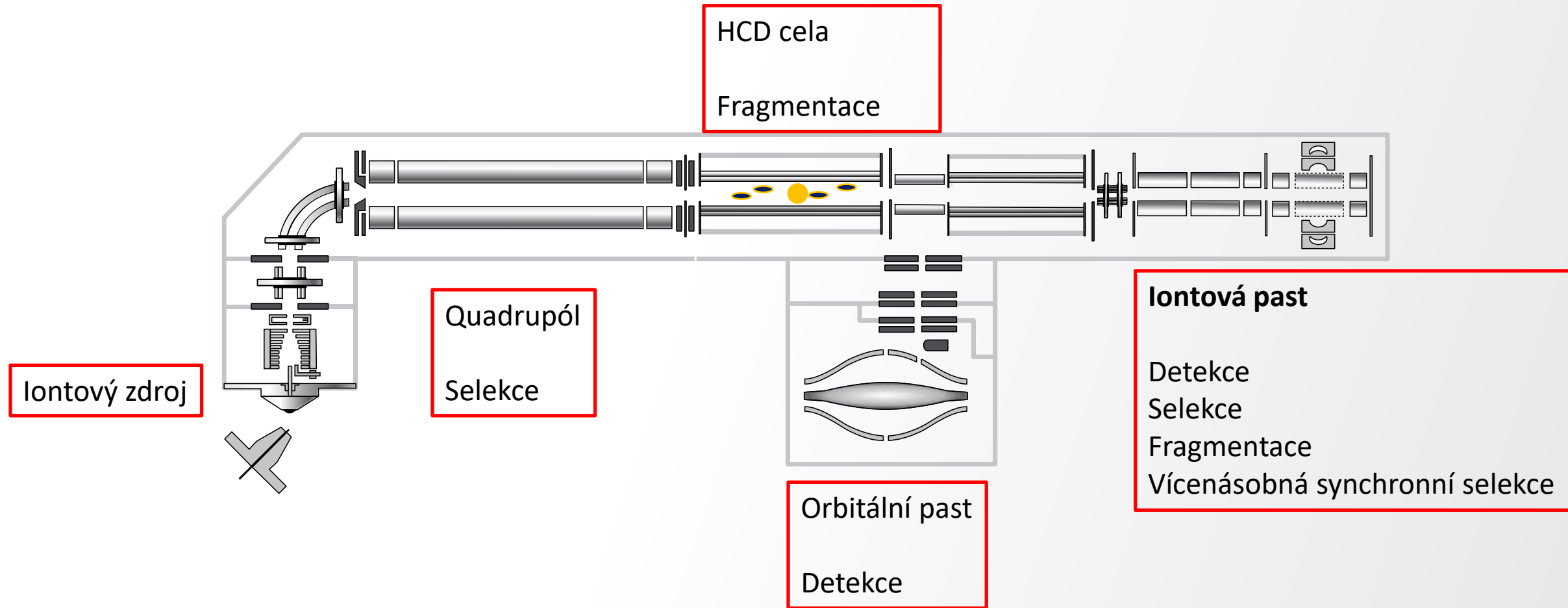
● Prekurzor



Tribridní Orbitrapy

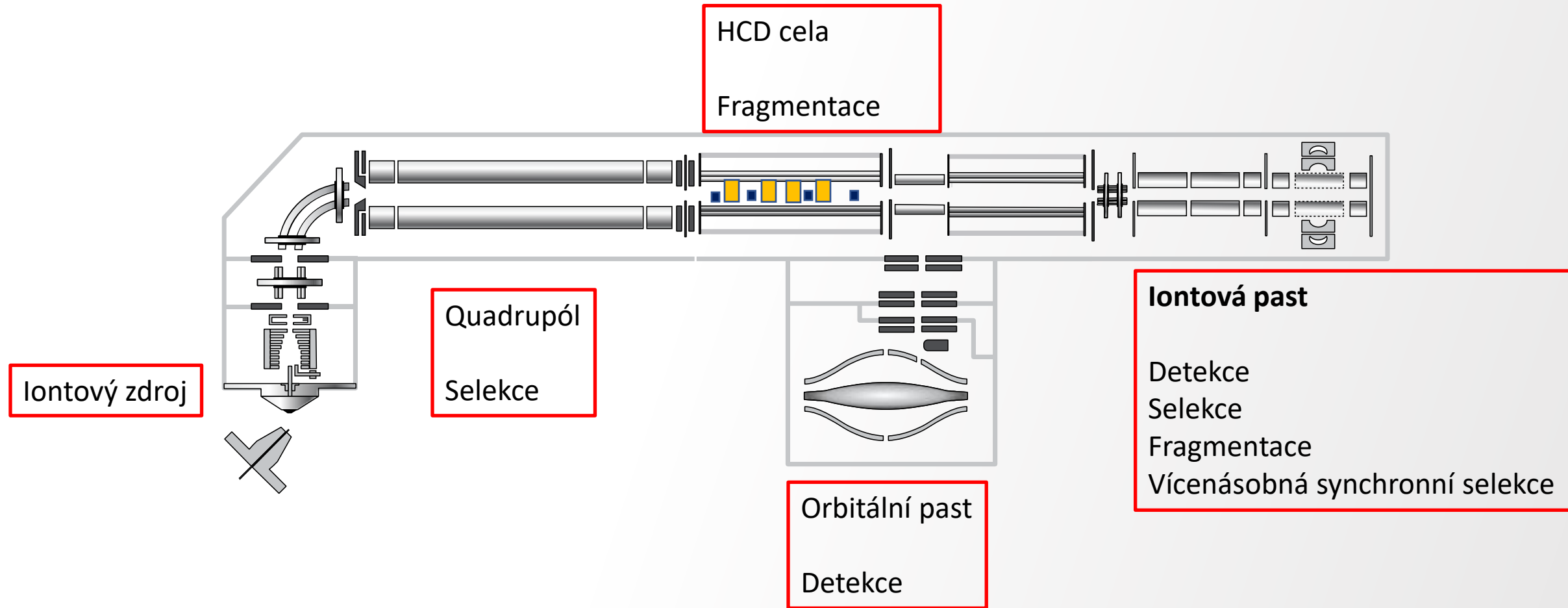
● Koizolované pozadí

● Prekurzor



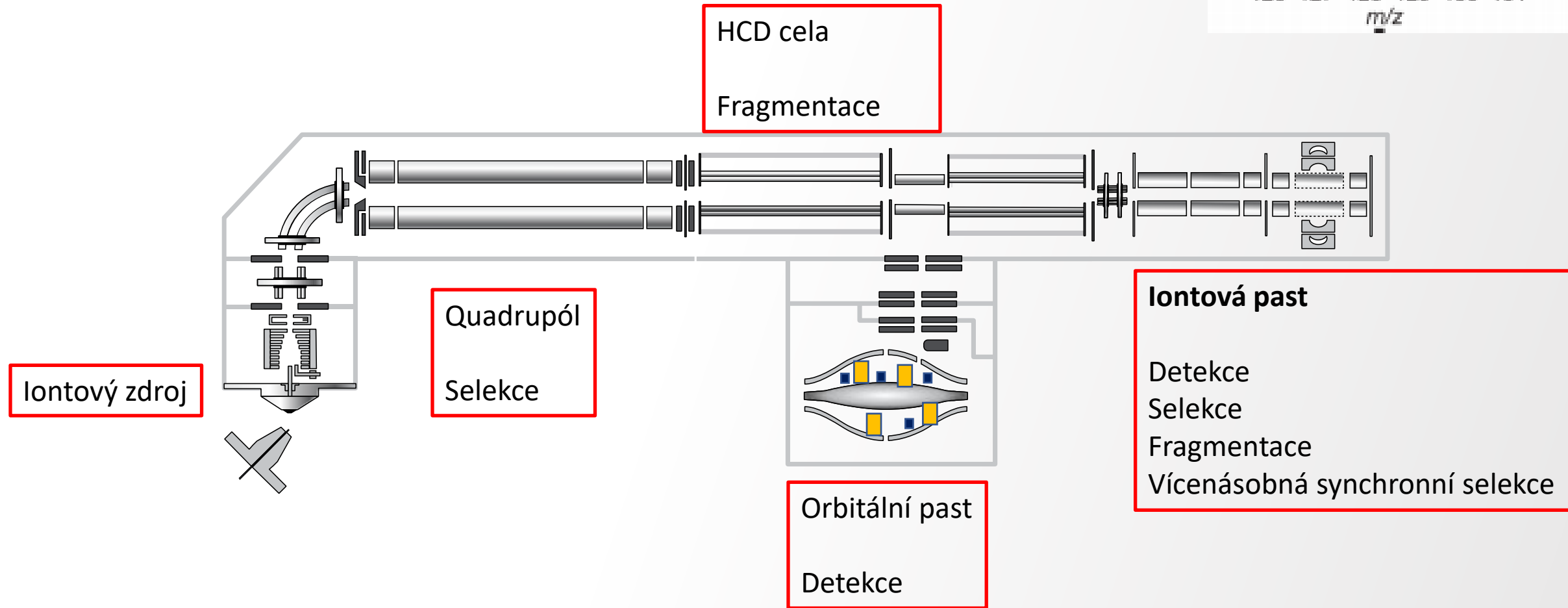
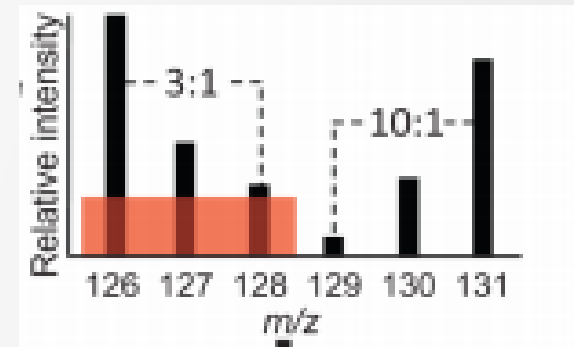
Tribridní Orbitrapy

- Fragmenty prekursoru
- Fragmenty pozadí



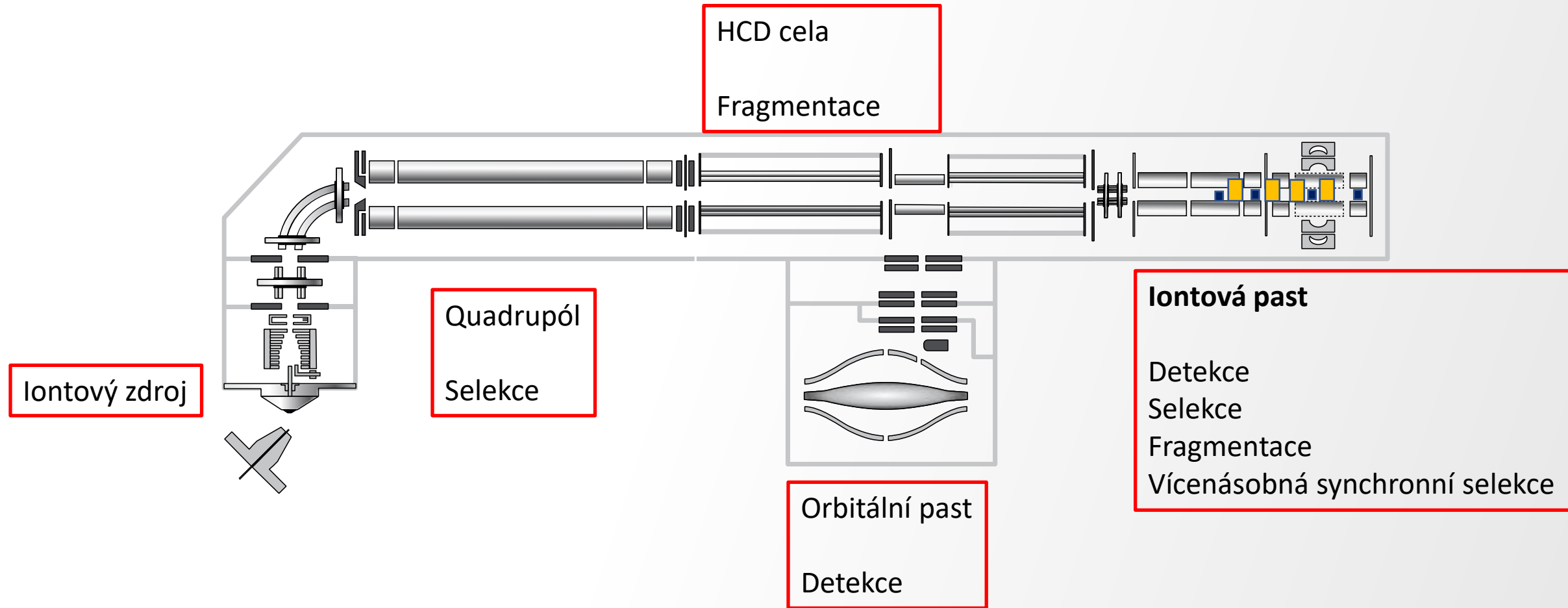
Tribridní Orbitrapy

- Fragmenty prekursoru
- Fragmenty pozadí



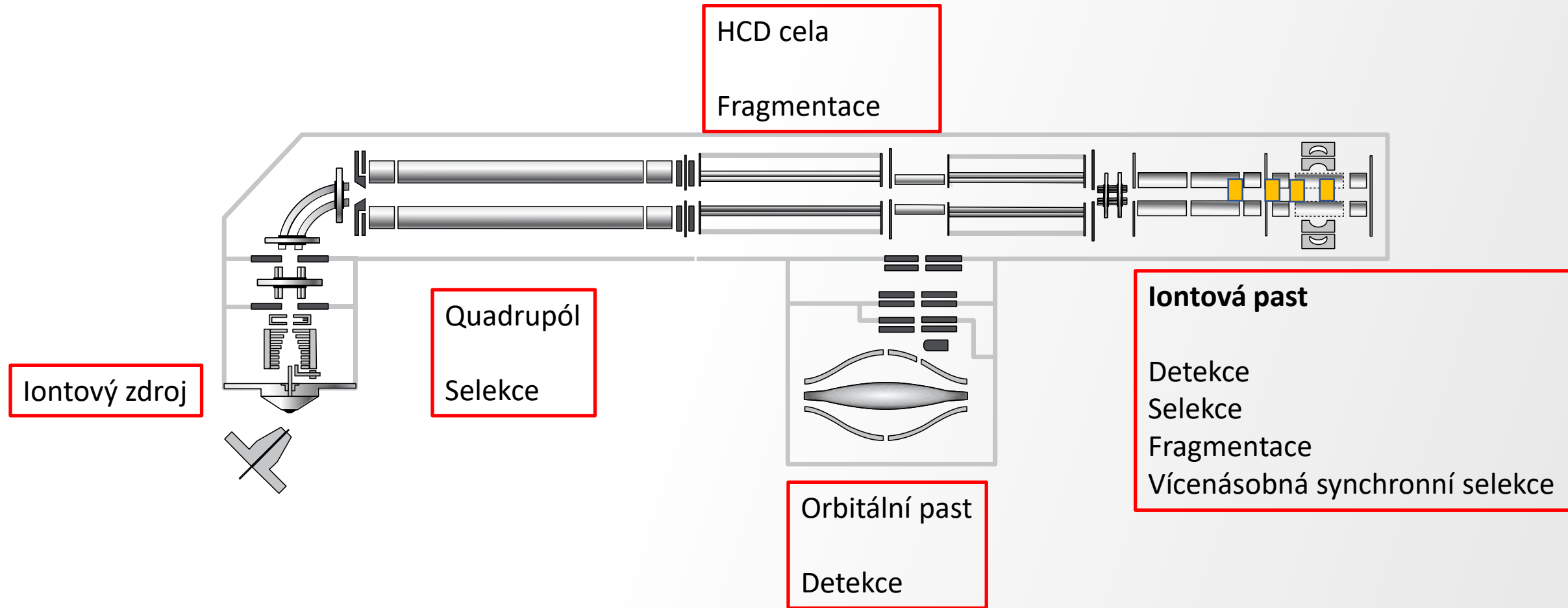
Tribridní Orbitrapy

- Fragmenty prekursoru
- Fragmenty pozadí



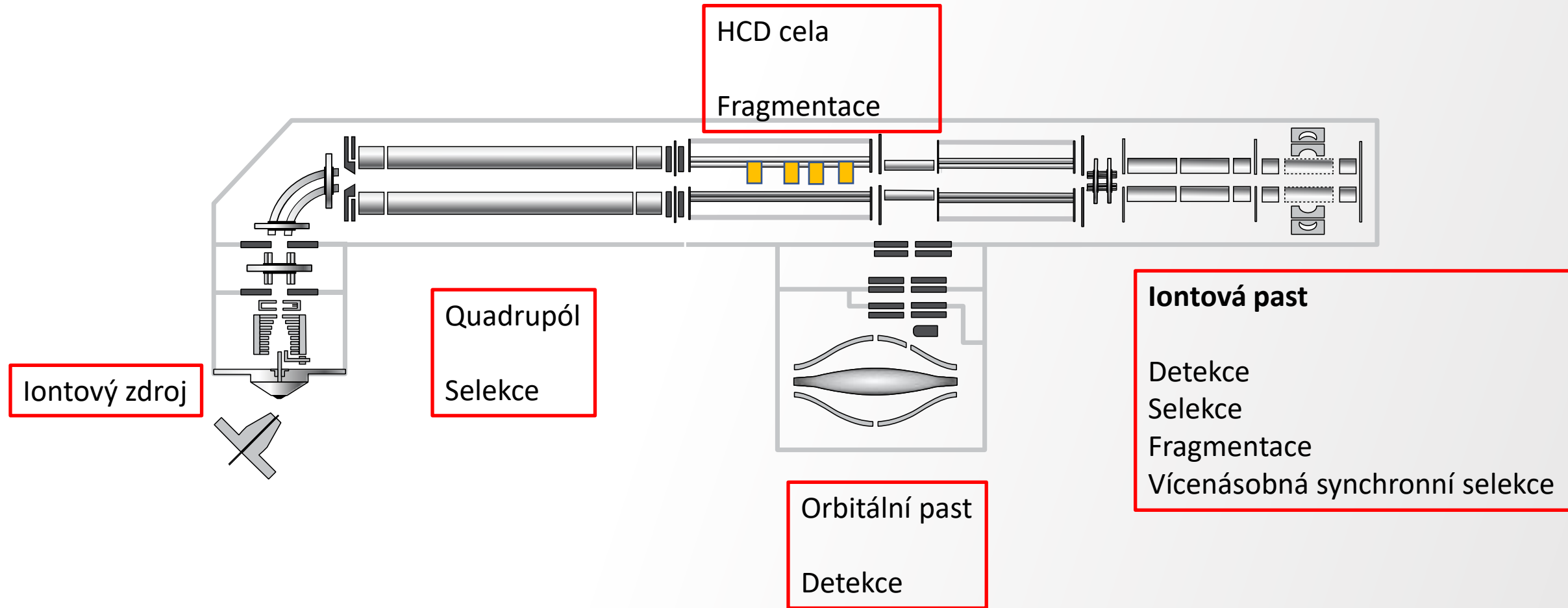
Tribridní Orbitrapy

Fragmenty prekursoru

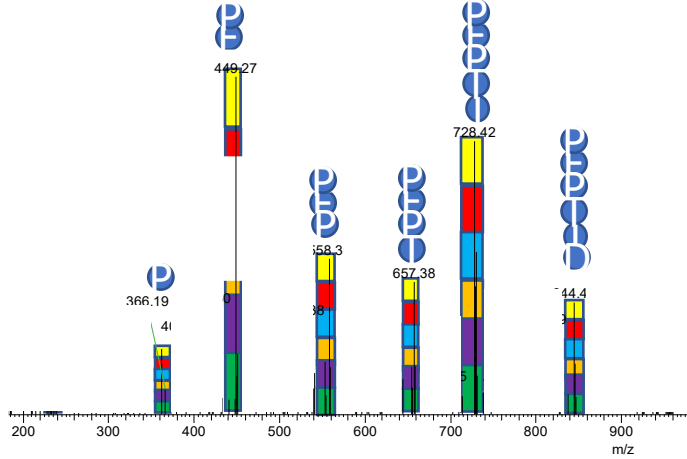


Tribridní Orbitrapy

Fragmenty prekursoru



Tribridní Orbitrapy



HCD cela

Fragmentace

Iontový zdroj

Quadrupól

Selekce

Orbitální past

Detekce

Iontová past

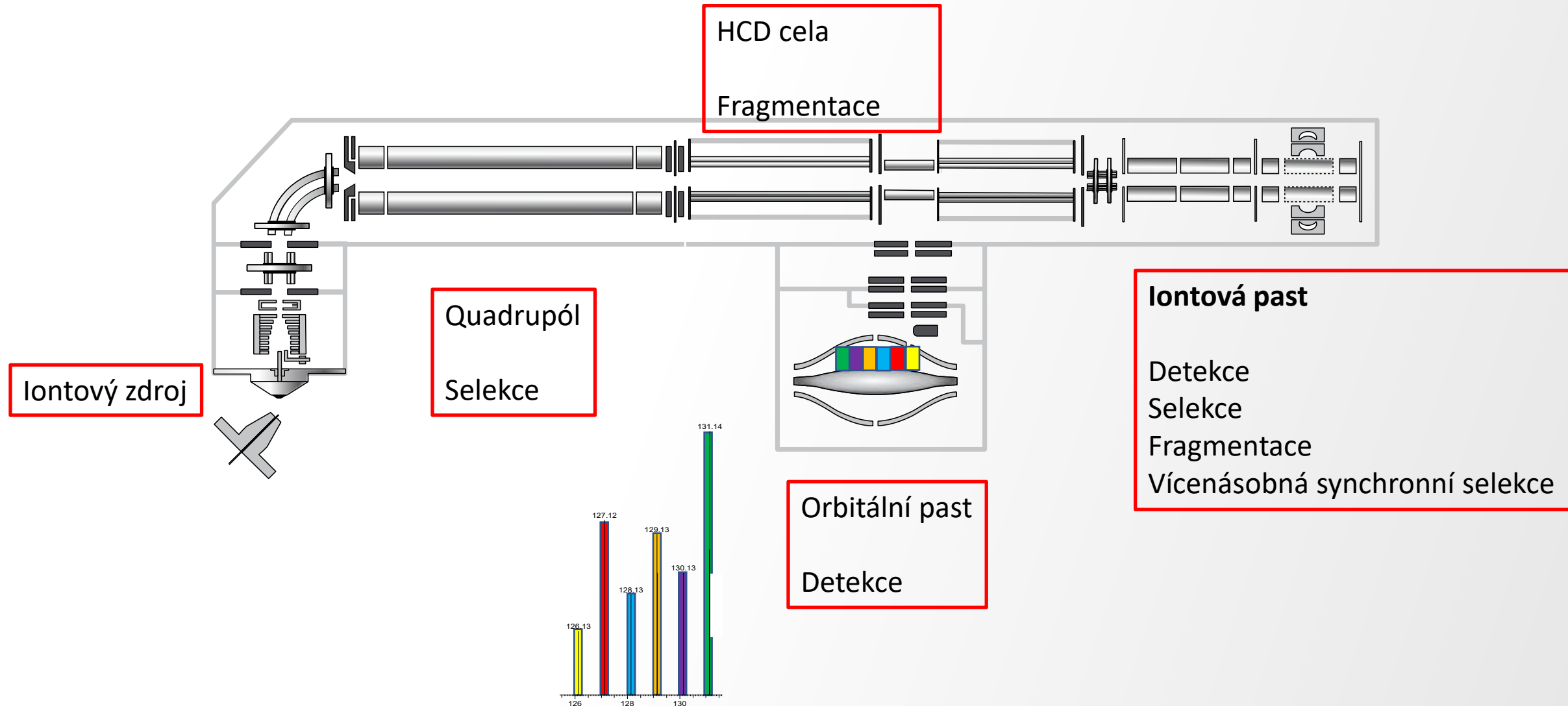
Detekce

Selekce

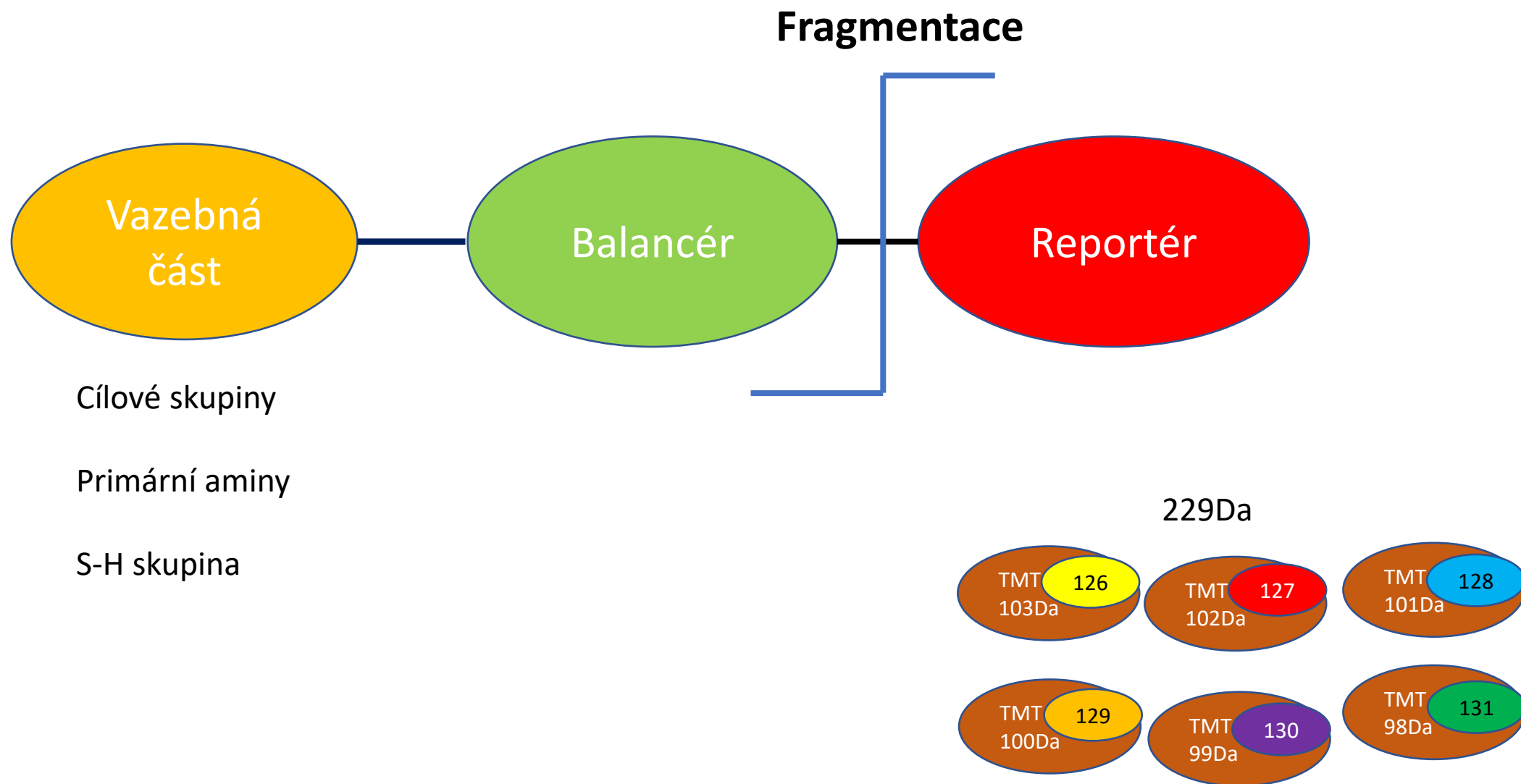
Fragmentace

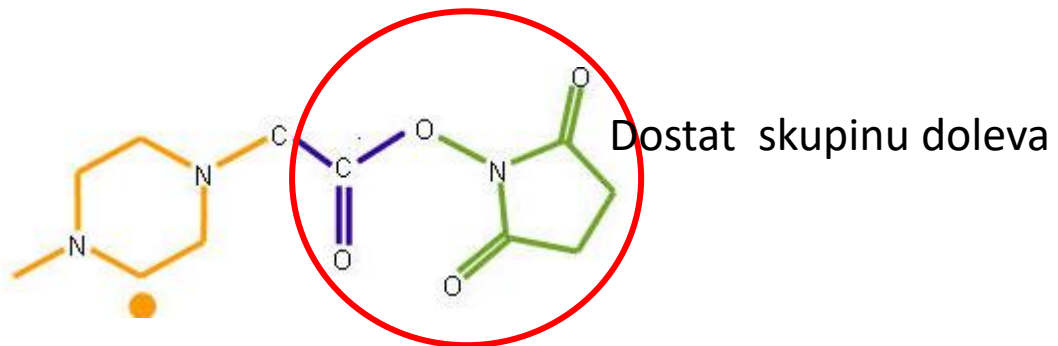
Vícenásobná synchronní selekce

Tribridní Orbitrapy

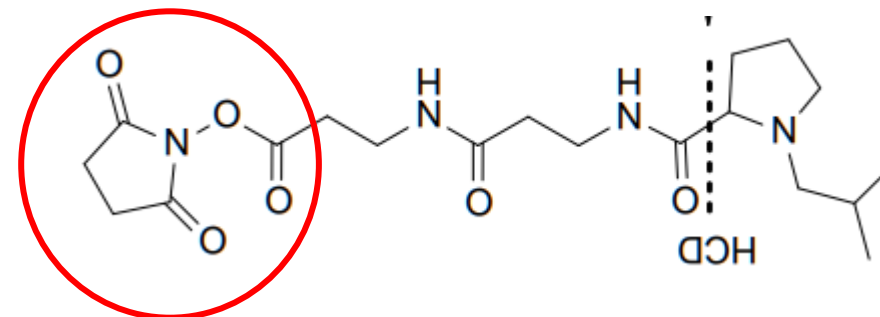


Obecná struktura izobarických značek



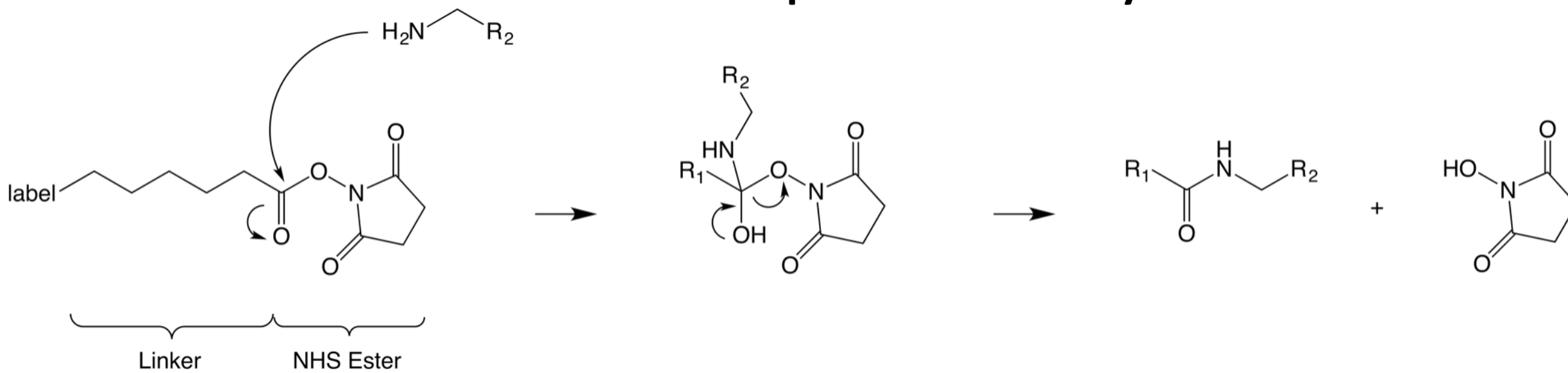


mTraq/iTraq



TMT

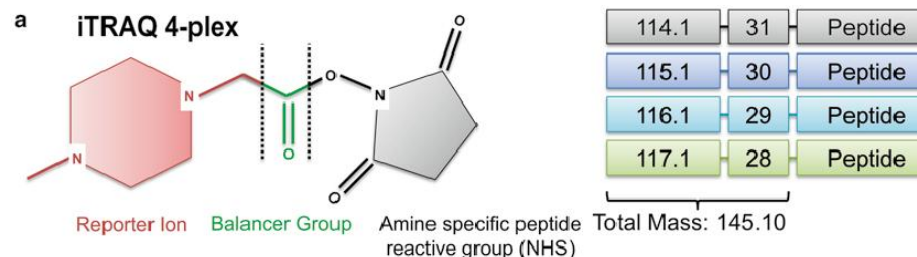
N-Hydroxysuccinimide (NHS) ester Reakce s primárními aminy



iTRAQ a TMT

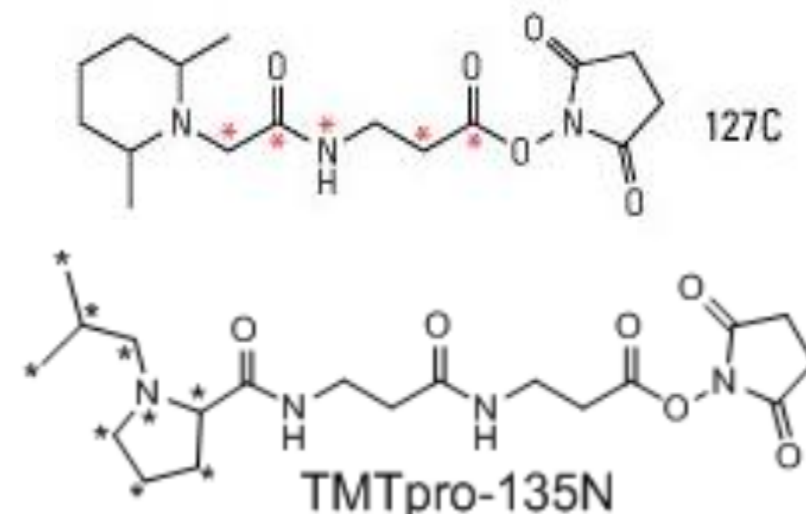
- iTRAQ

- Varianta pro 4 značky
- Varianta pro 8 značek
- Odstup značek 1Da
- Kompatibilní se všemi MS instrumenty



- TMT

- Varianta pro 10 značek (odvozeno od dimethylpiperidine)
- Varianta pro 18 kanálů (odvozeno od prolinu)
- V plném počtu značek požaduje vysoké rozlišení
 - Není kompatibilní se všemi MS stroji



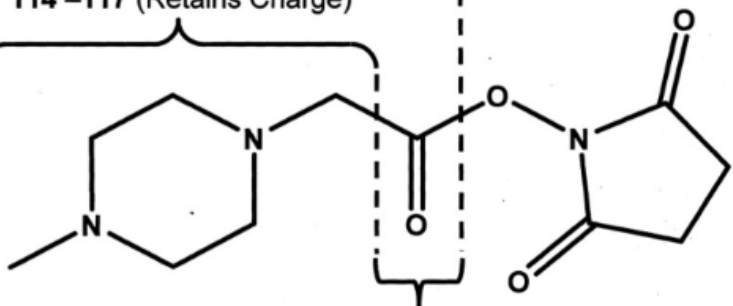
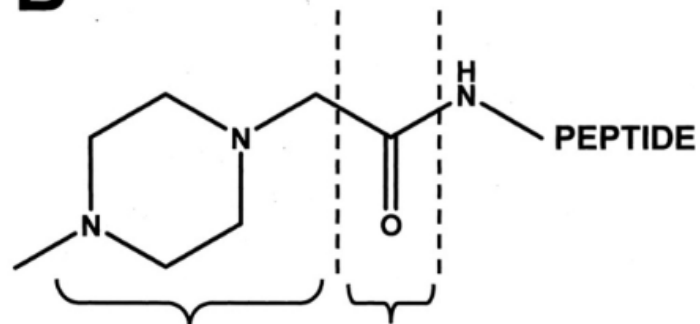
A

Isobaric Tag
Total mass = 145

Amine specific peptide
reactive group (NHS)

Reporter Group mass
114 –117 (Retains Charge)

Balance Group
Mass 31-28 (Neutral loss)

**B**

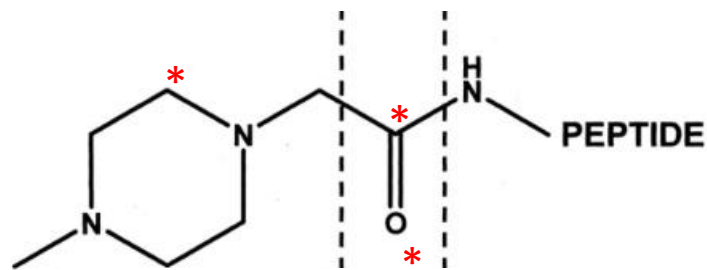
m/z 114 (+1) ^{13}C $^{13}\text{C}^{18}\text{O}$ (+3)

m/z 115 (+2) $^{13}\text{C}_2$ ^{18}O (+2)

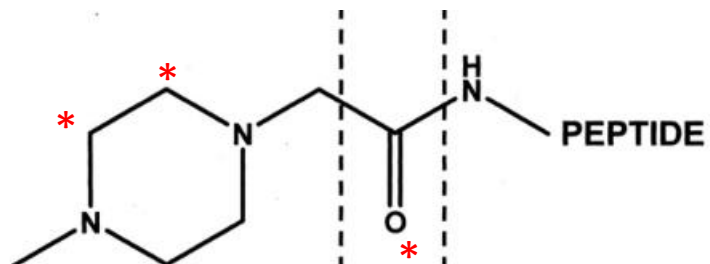
m/z 116 (+3) $^{13}\text{C}_2^{15}\text{N}$ ^{13}C (+1)

m/z 117 (+4) $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}$ (+0)

iTRAQ 4plex

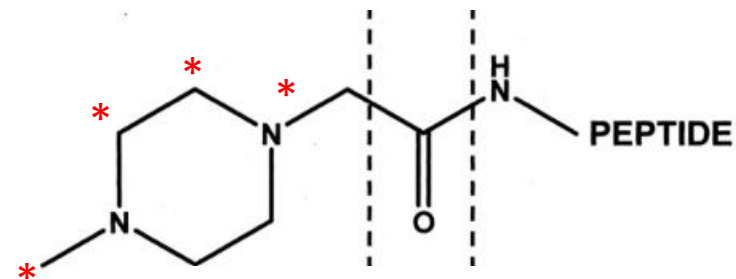


114

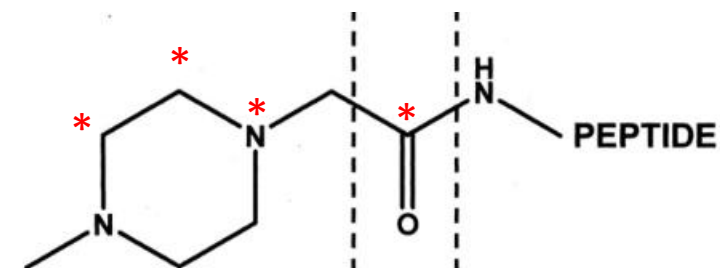


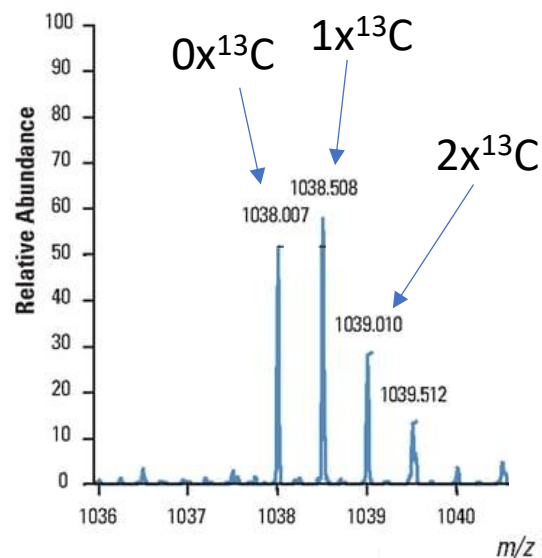
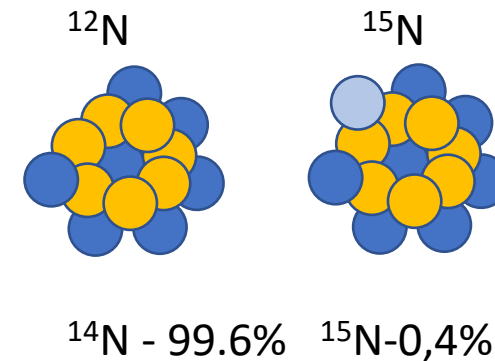
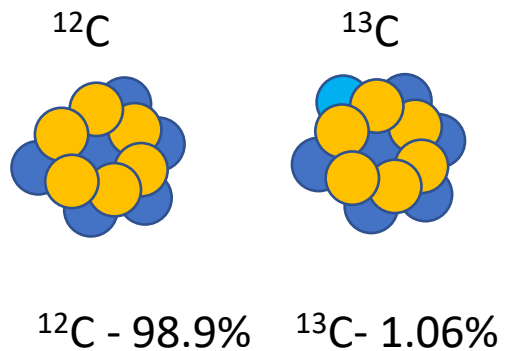
115

117

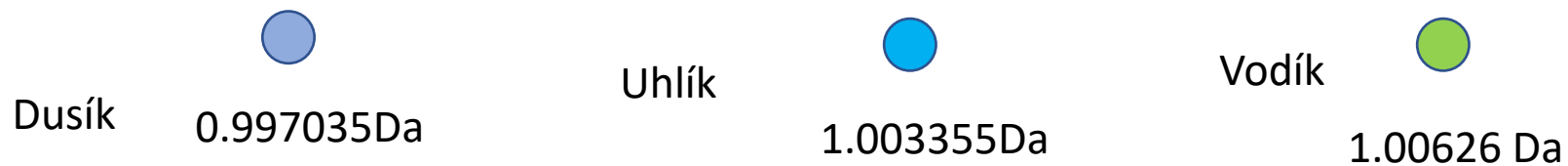


116





Není neutron jako neutron
 Neutron v ^{13}C je nepatrně těžší než ten v ^{15}N a
 neutron v ^3H je těžší než ten v ^{13}C

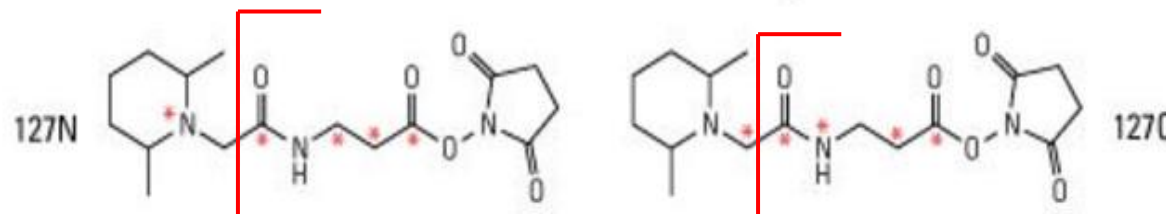
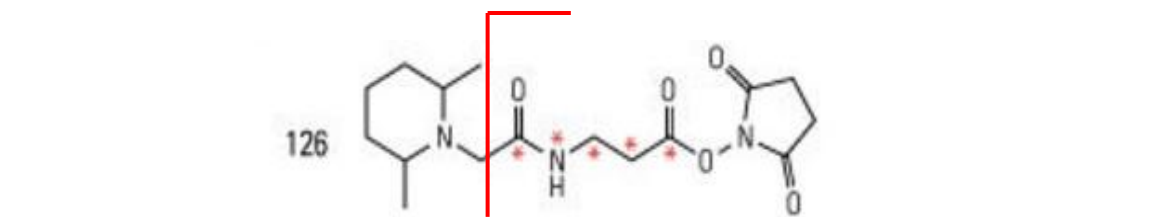


Rozdíl hmot 0.00632 Da

Rozdíl hmot 0.002905 Da

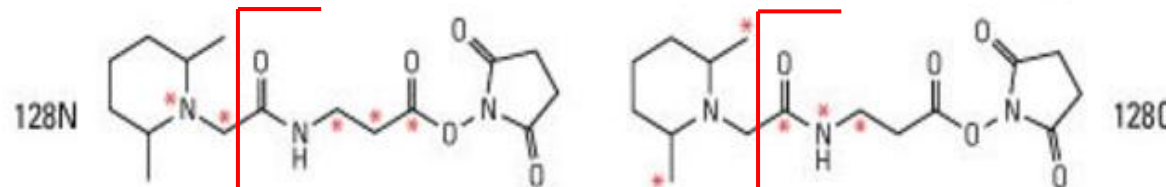
Izobarické značky TMT
(ThermoScientific)
10 plex

1N



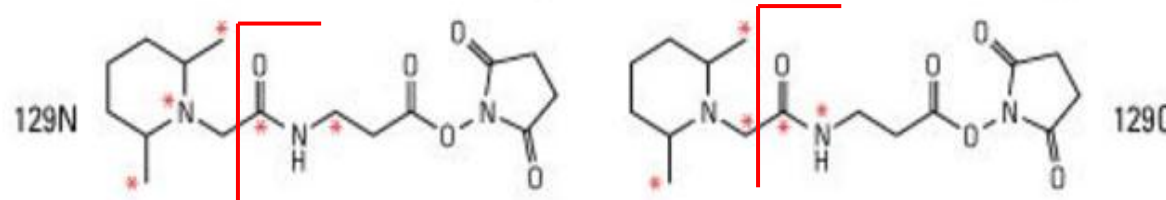
127C **1C**

1N1C



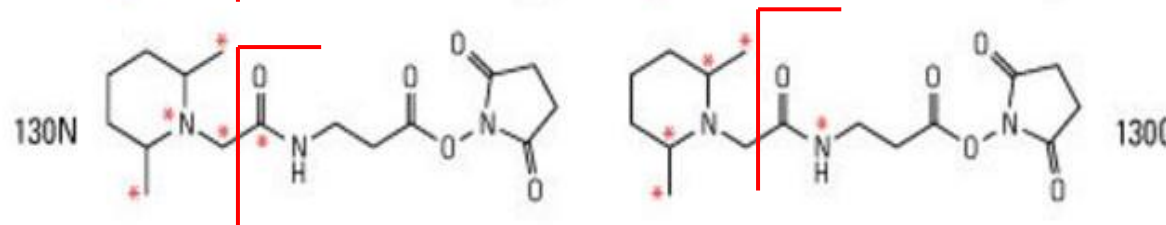
128C **2C**

1N2C

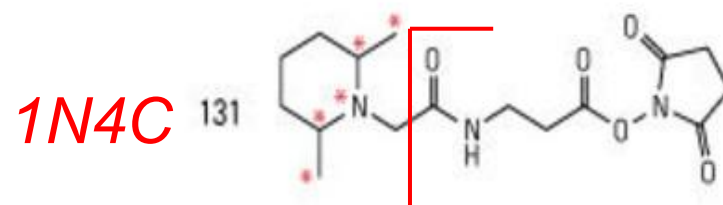


129C **3C**

1N3C

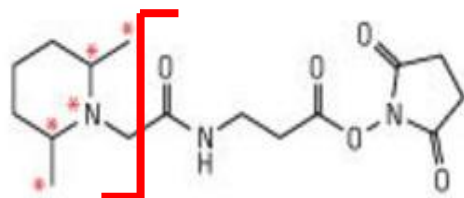


130C **4C**

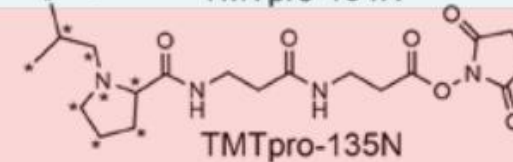
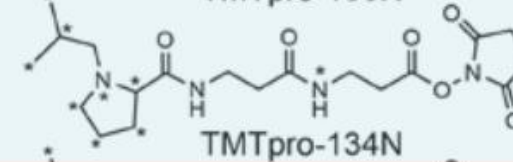
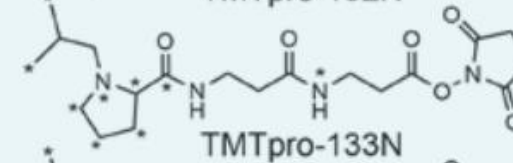
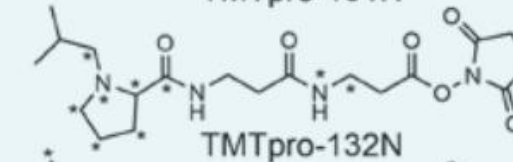
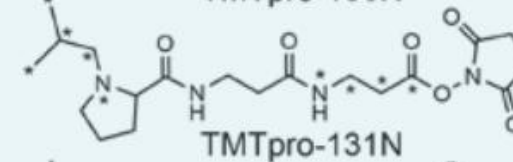
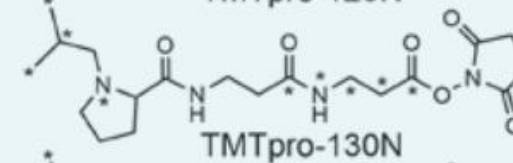
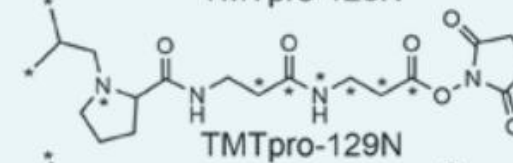
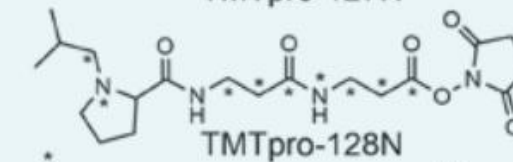
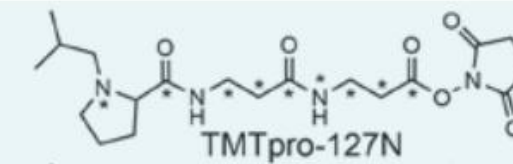
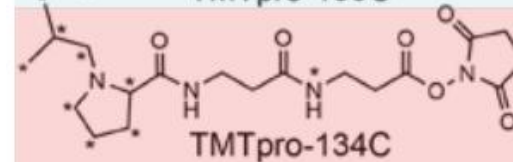
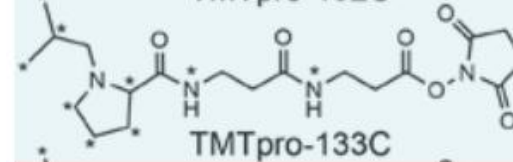
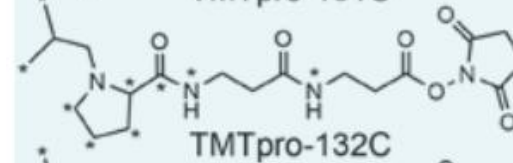
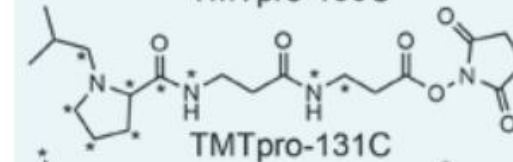
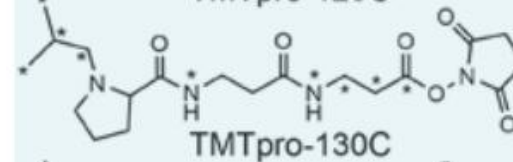
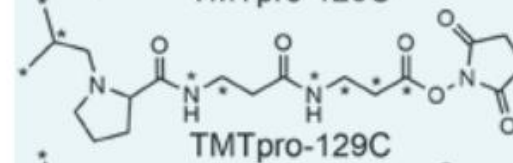
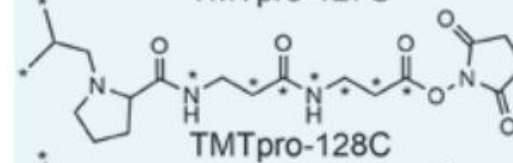
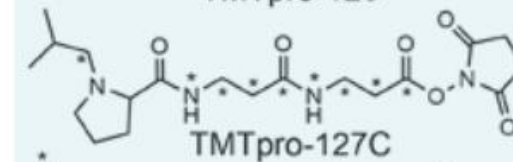
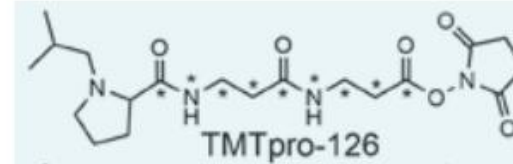
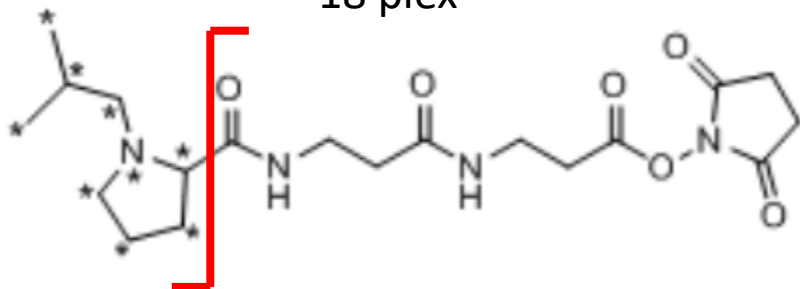


Izobarické značky TMT
(ThermoScientific)
18 plex, 2021

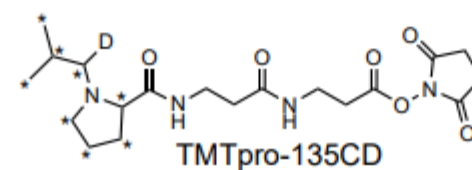
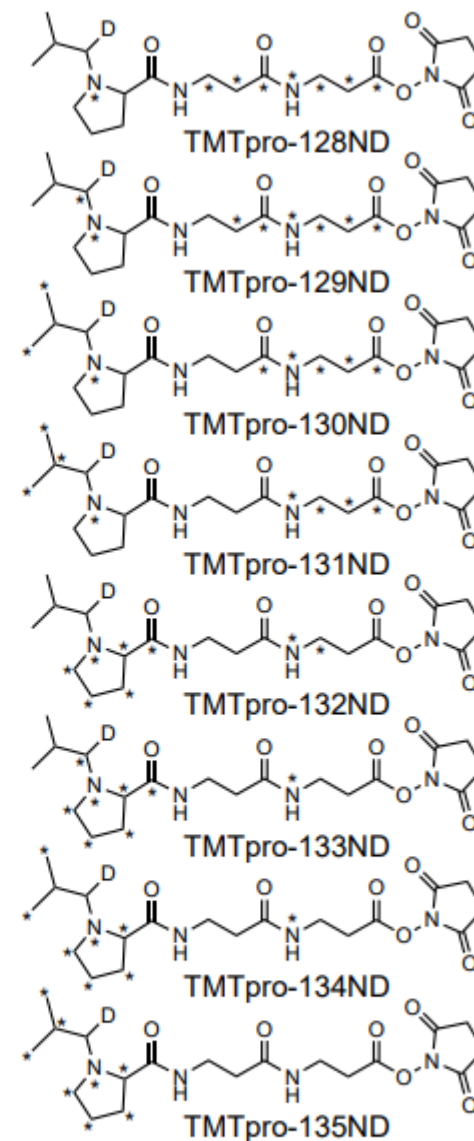
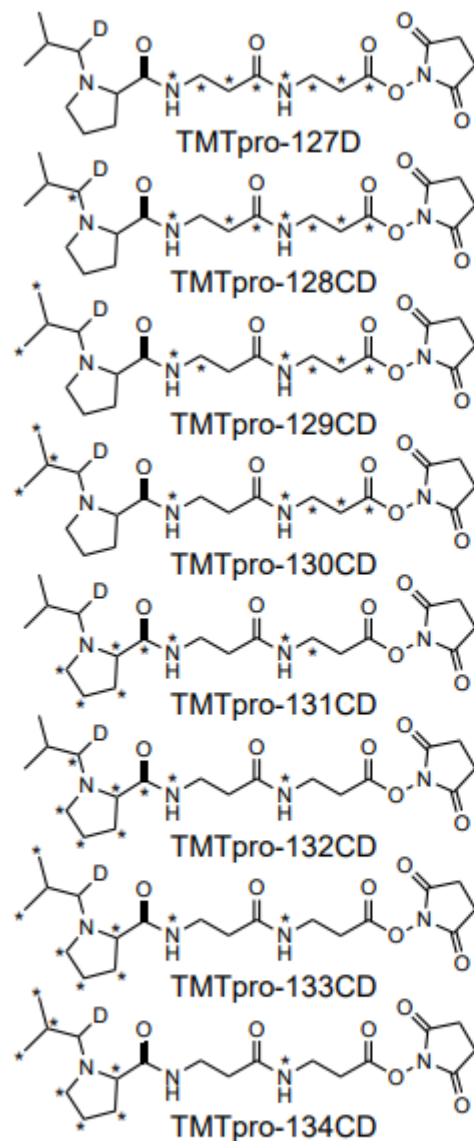
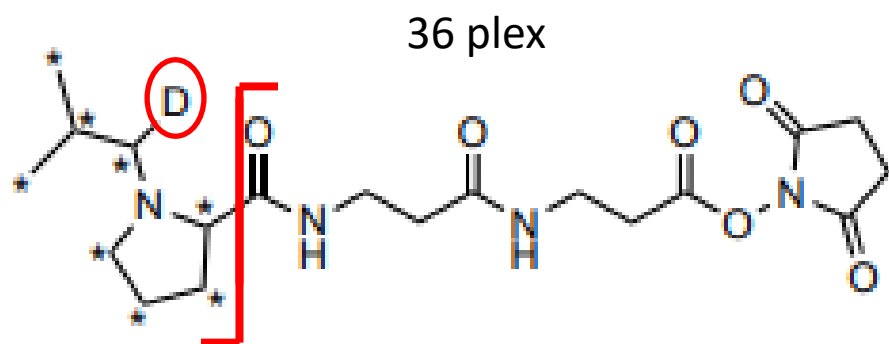
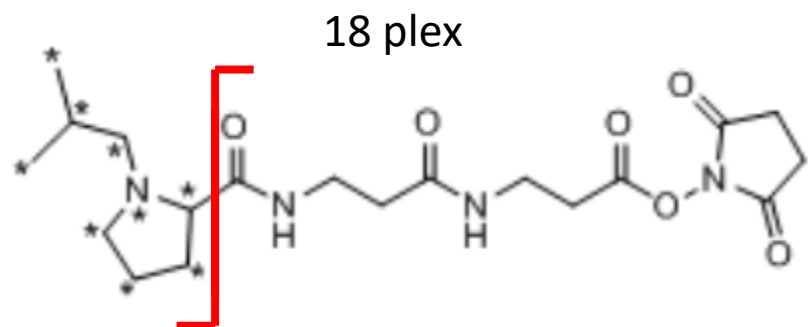
10 plex

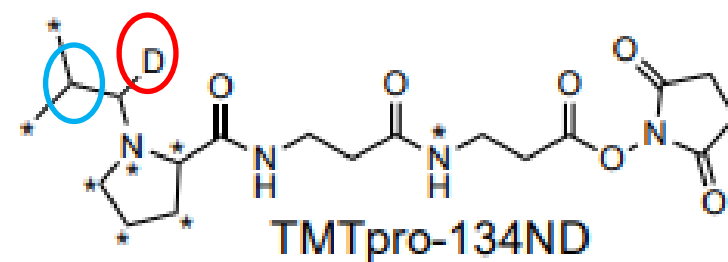
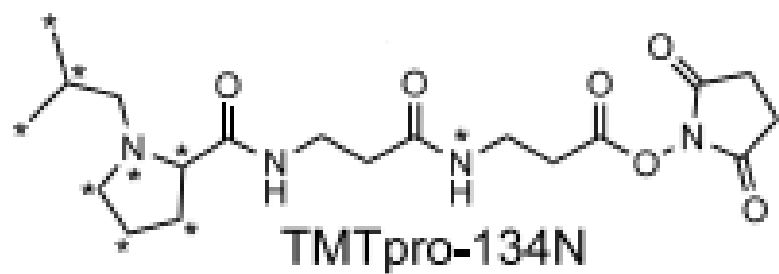


18 plex

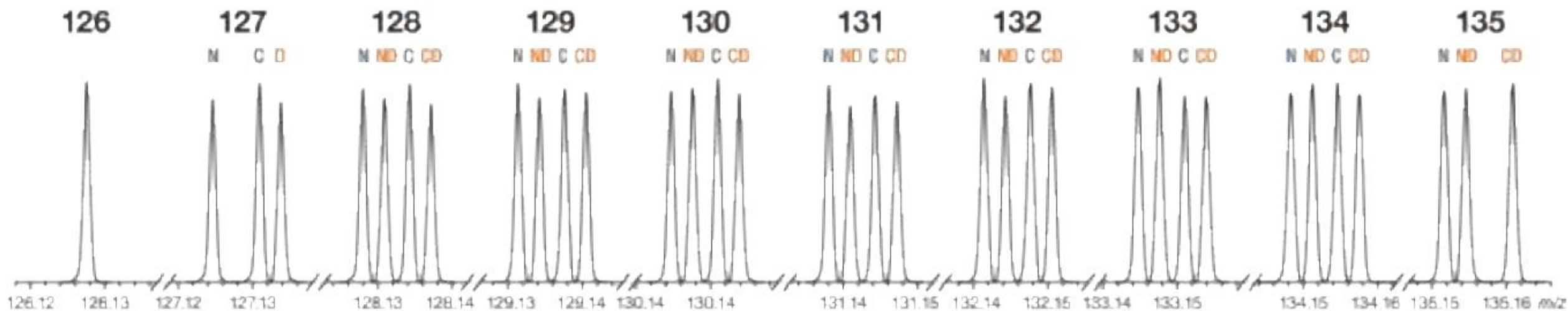
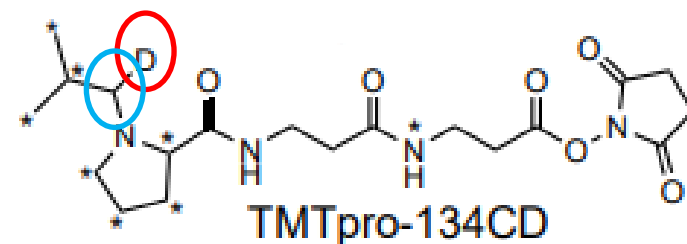
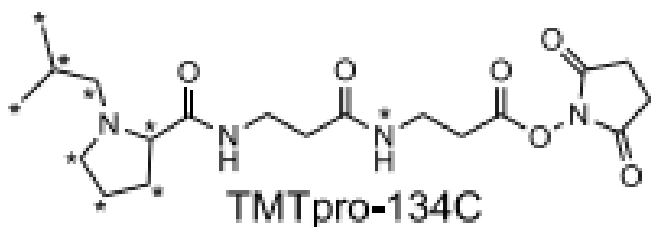


Izobarické značky TMT
(ThermoScientific)
36 plex, 2023





Potřebné rozlišení 90K na hmotě 200Da



Kvantifikace pomocí MS – stabilní izotopy

METABOLICKÉ

SILAC

jen živé buňky, metabolické značení, kvantifikace MS,

CHEMICKÉ

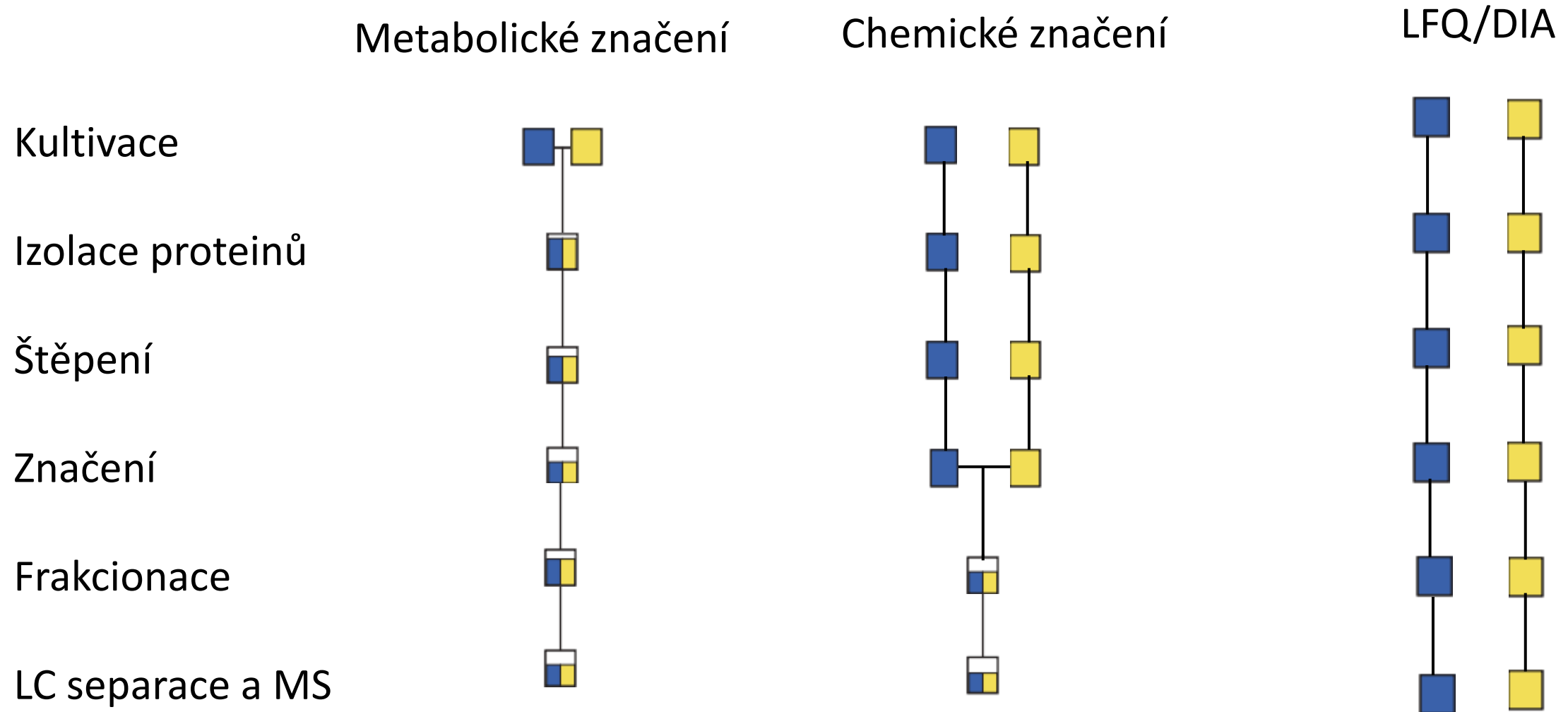
dimetylace

značí aminoskupiny, značení na úrovni peptidů, kvantifikace MS, možno i v DIA, maximálně 3 kanály

iTRAQ TMT

značí aminoskupiny, značení na úrovni peptidů, multiplex, kvantifikace až při MS/MS, případně při MS³, nízké množství missing values

Kvantifikace v proteomice



Cílená analýza

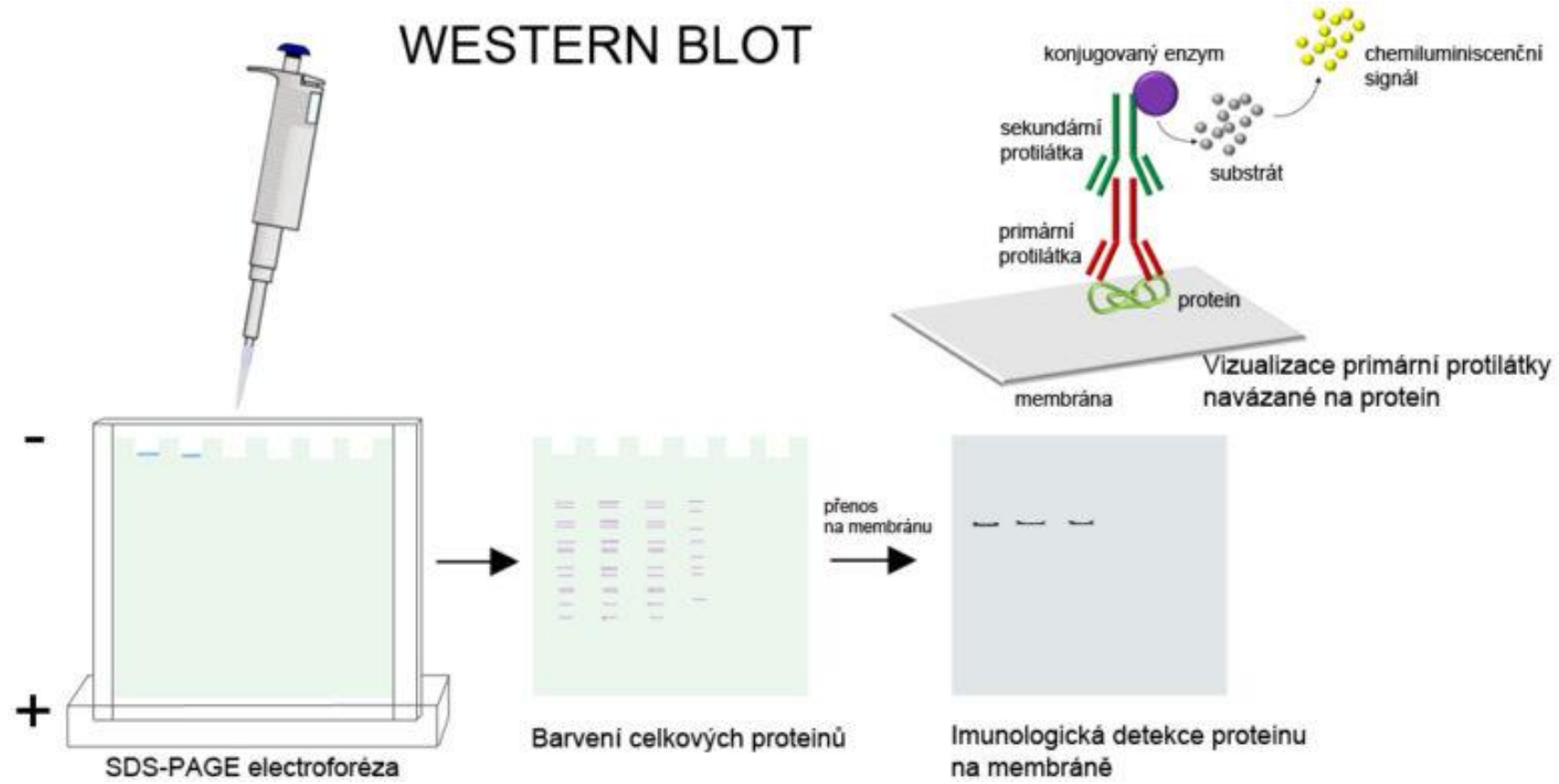
Víme co hledáme

- Necílená proteomika – 2 nebo více podmínek a hledáme co se mění



- Cílená proteomika – víme co hledáme
 - Sledujeme přítomnost/nepřítomnost konkrétního proteinu
 - Sledujeme míru změny

WESTERN BLOT



Izolace
proteinů a
příprava peptidů



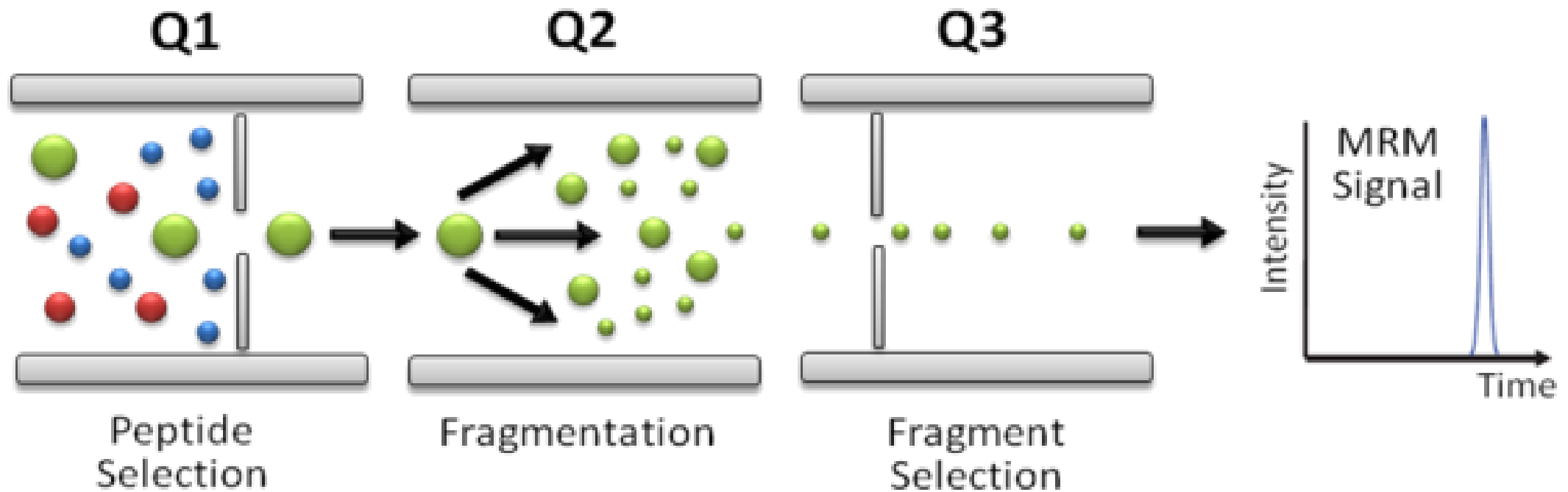
Cílená kvantifikace x necílená kvantifikace

- Odhalí pouze malou část celkového obrazu, musíme dopředu vědět kam se koukat
 - Častá posloupnost experiment necílená analýza  cílená analýza
- Vyšší přesnost
 - Sledujete plochu po peakem, dostatečný počet bodů přes peak
- Vyšší reproducibilita
 - Vždy v daný čas sledujete určený prekurzor, metoda není stochastická
- Vyšší citlivost
 - Sledujete omezený počet prekurzorů - lze na nich strávit více času
- Vyšší selektivita
 - Ladíte MS instrument na jeden konkrétní prekurzor
- Instrumentální univerzálnost
 - Lze měřit na mnoha typech MS instrumentů dle varianty metody
 - Použití i s klasickým HPLC

Selected reaction monitoring - SRM

Když to opakují pro několik fragmentů

Multiple reaction monitoring - MRM



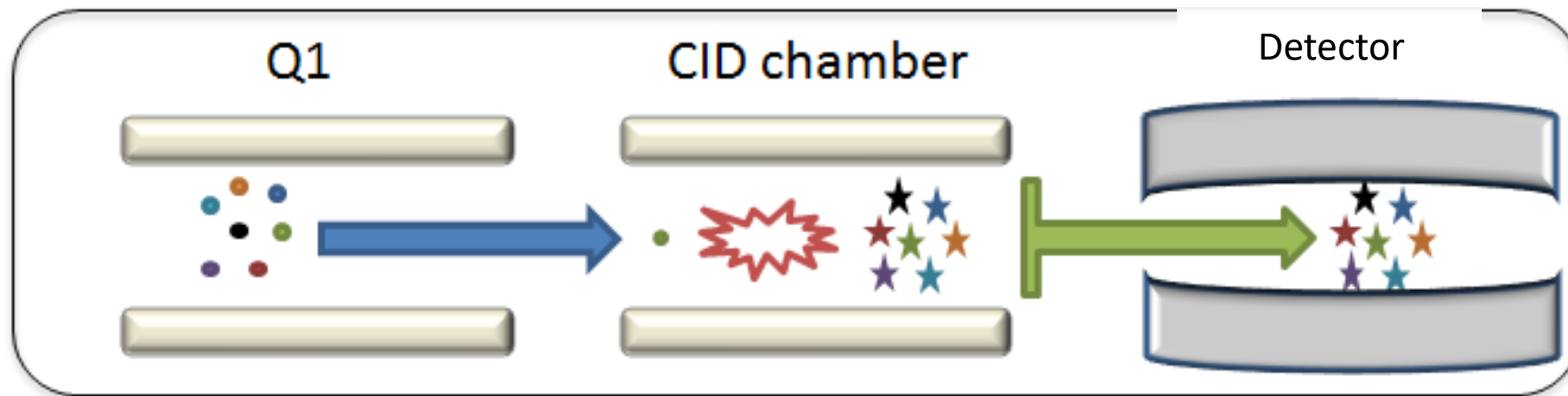
Metoda je proveditelná na trojitých quadrapólech

SRM selected reaction monitoring

- Původní varianta metody
- Určeno pro trojité quadrupóly
 - Relativně levný instrument
- Sledujeme fragment vzniklý z prekurzoru
 - Dvojitě filtrování – prekurzor na Q1 a fragment na Q3
 - Velmi specifické
 - Velmi citlivé

PRM

Parallel reaction monitoring (PRM)



PRM- paralel reaction monitoring

- Varianta SRM pro instrumenty zaznamenávající celé spektrum
 - TOF
 - Orbitrap
- Ty zároveň nemají třetí quadrupól
- Místo izolace fragmentu tedy zaznamenáme všechny vzniklé fragmenty
- Výhoda vysokého rozlišení
- Nevýhodou je ztráta citlivosti
 - Dáno principem detekce iontů

Využití těžkých peptide

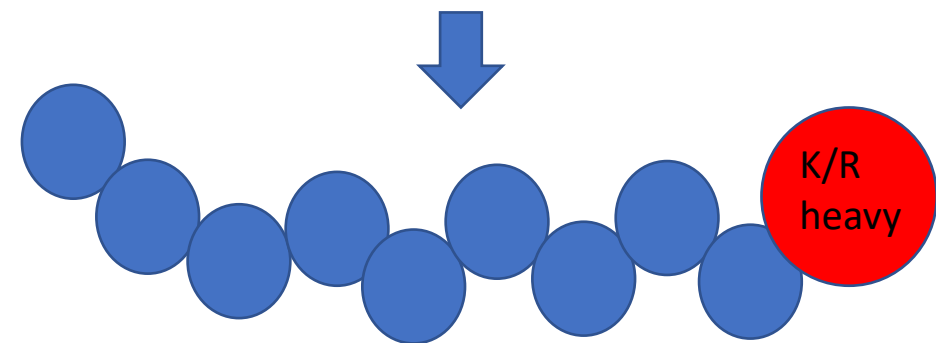
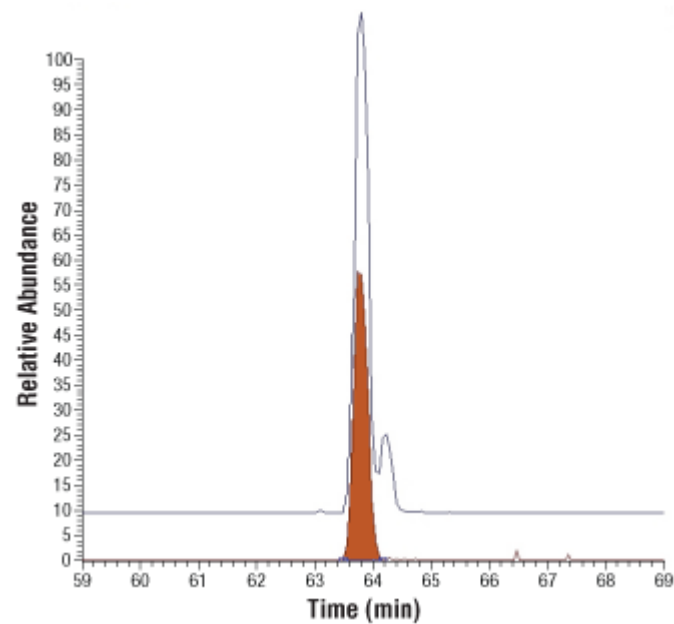
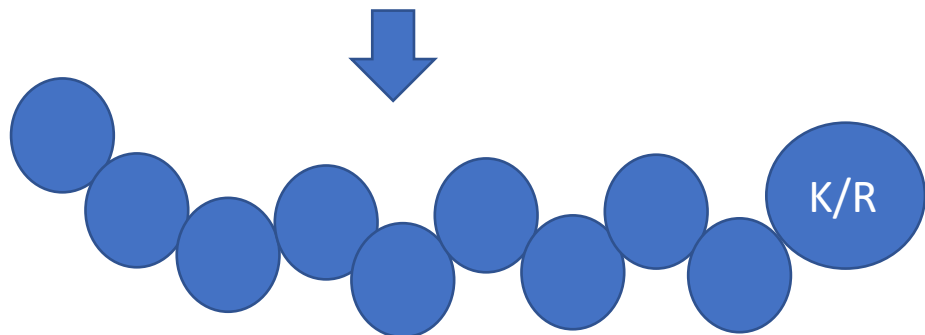
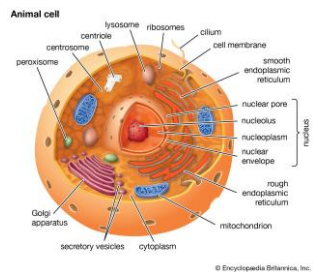
- Podobně jako SILAC
 - Nevyužívá se přirozené syntézy ale umělé výroby
- Cena kolem do 1000kč za peptid
 - Hrubý nečištěný výsledek syntézy
- Vnitřní standard
 - Potvrzení identifikace
 - Potvrzení retenčního času

Výsledek opakovatelný v čase

Přenositelnost mezi instrumenty

Přenositelnost mezi laboratořemi

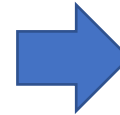
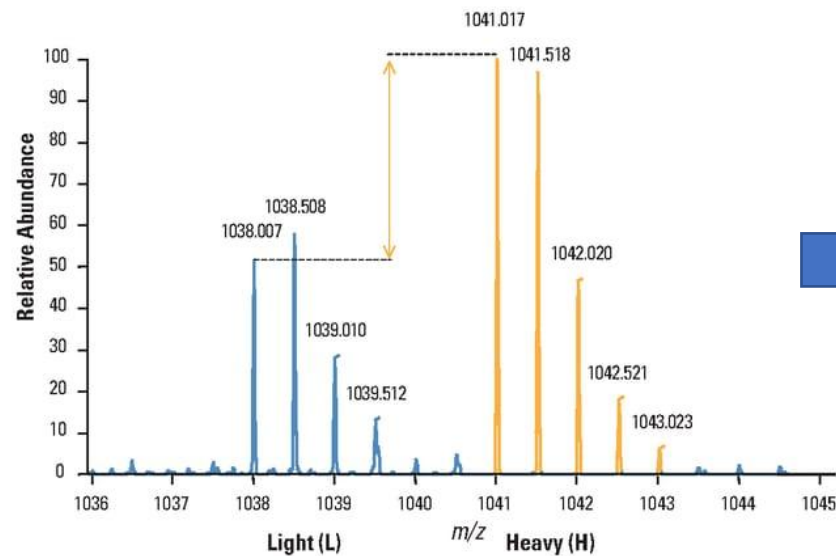




Absolutní kvantifikace

- Použití peptidu o známé koncentraci
 - Výrazně nákladnější – 10 000,- Kč za kus





Z poměru odečíst absolutní koncentrace

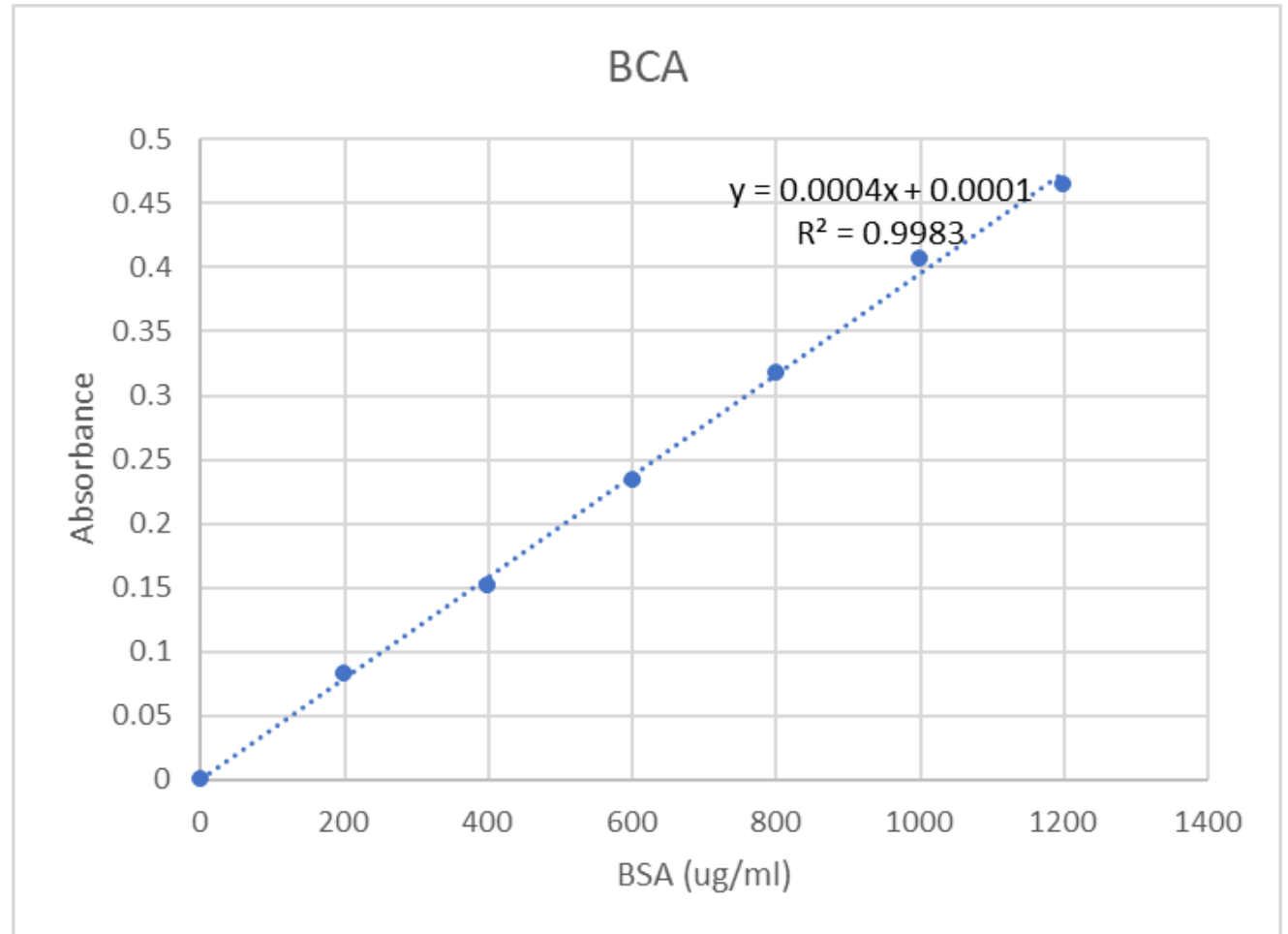
- Přídavek známé koncentrace těžkého peptidu
- Koncentrace maximálně 10x odlišná od koncentrace sledovaného peptidu
- Kvalitativně hodnotnější informace než relativní porovnání

Množství proteinu se liší více než 10x

Co s tím?

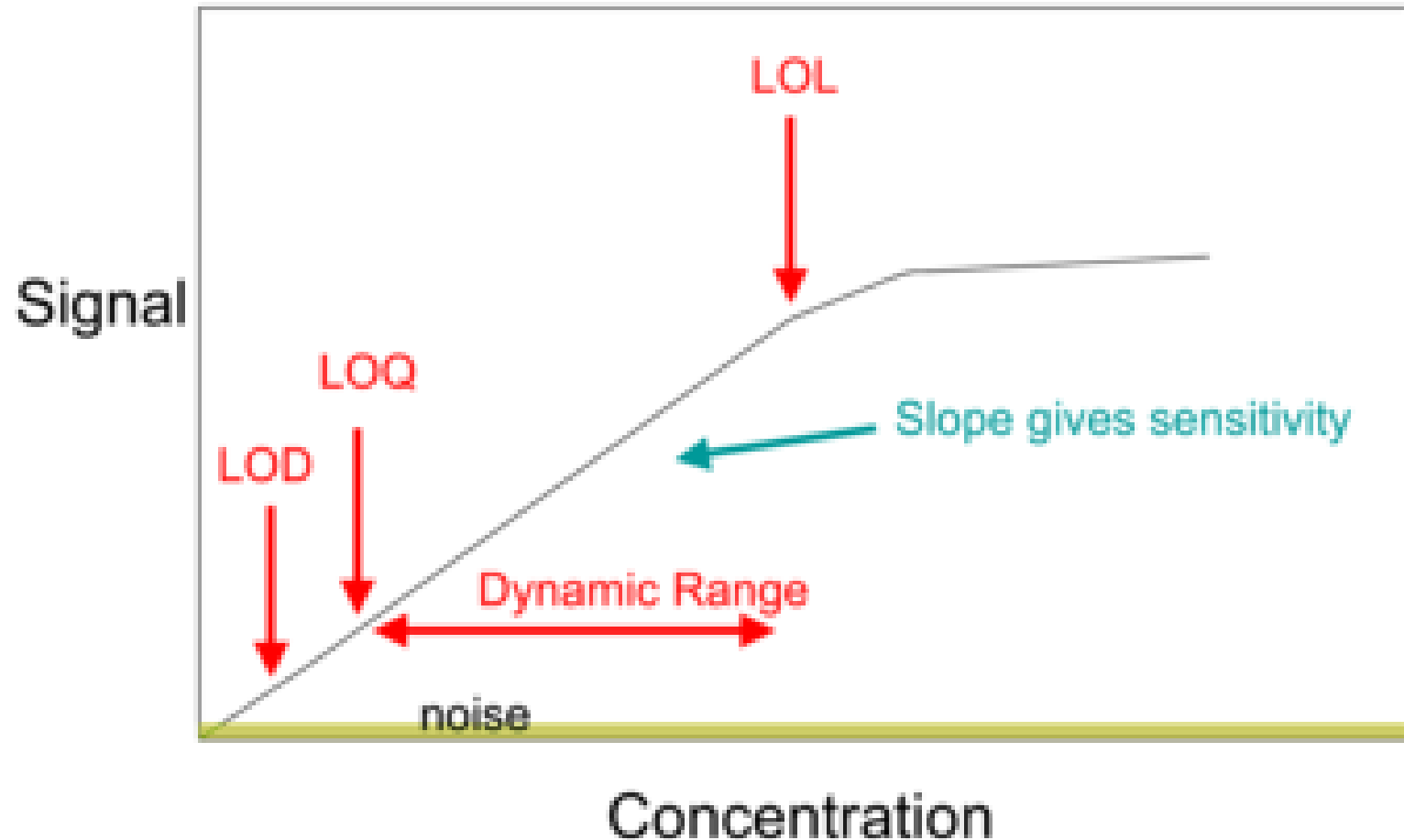
Externí kalibrace – kalibrační křivka

- Metoda jak určit absolutní množství látky ve vzorku
- Univerzální, není omezena na konkrétní metodu získávání dat
 - UV/VIS detekce
 - Fluorescence
 - MS signál



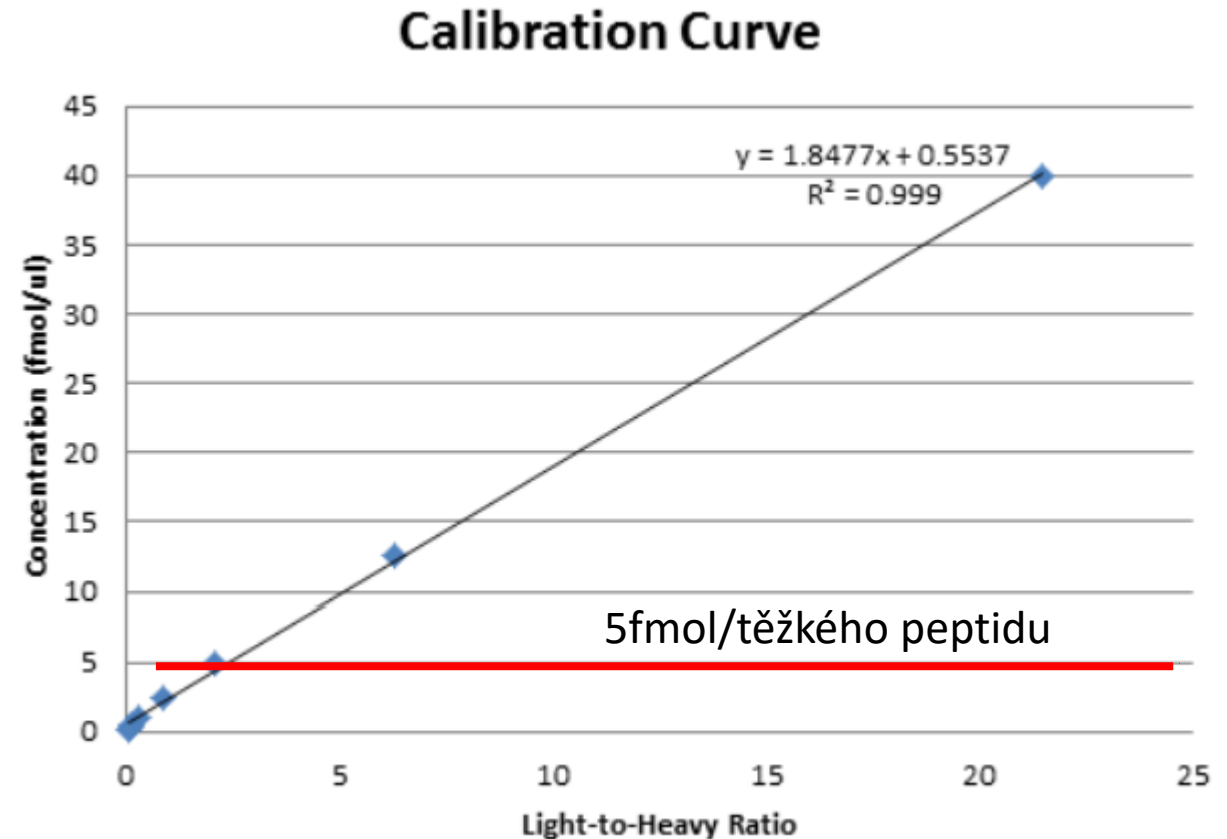
Linearita měření, LOD, LOQ

- LOD – limit of detection
 - Nejnižší množství látky poskytující odstup signálu od šumu 2:1
 - Pracujeme s chromatografickým peakem
 - Nejedná se o identifikaci spektra
- LOQ – limit of quantification
 - Nejnižší množství látky poskytující odstup signálu od šumu 10:1
- LOL- Limit of linearity



Kombinace vnitřního standardu a externí kalibrace

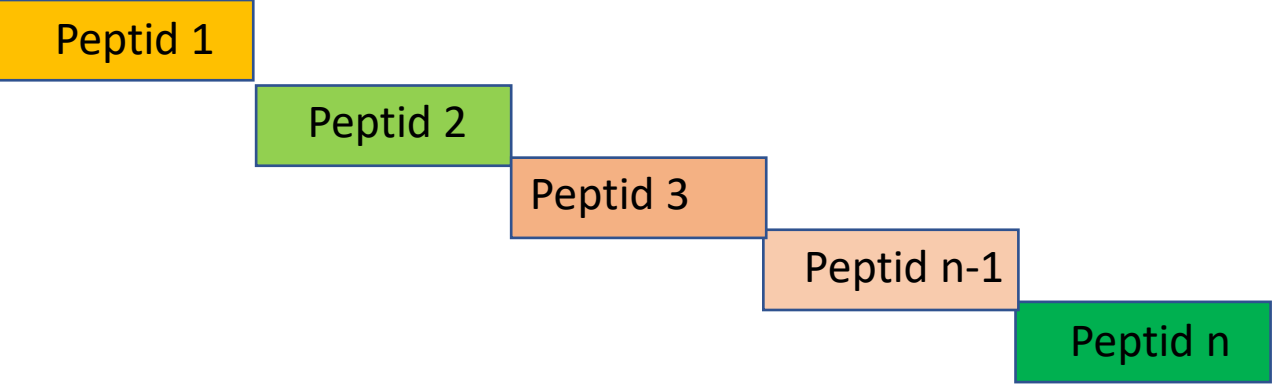
- Kalibrační křivka měřena takto:
 - Konstantní množství těžkého peptidu
 - Stoupající množství lehkého
- Použijeme externí kalibrační křivku
 - Na ní jsou vyneseny poměry pro jednotlivá porovnání
 - Z reálných vzorků pak odečítáme poměr light/heavy



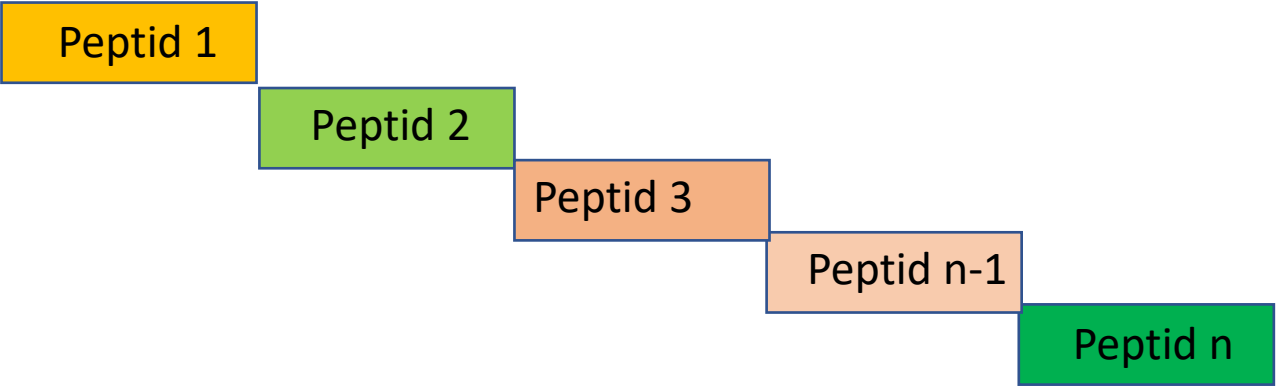


Software Skyline

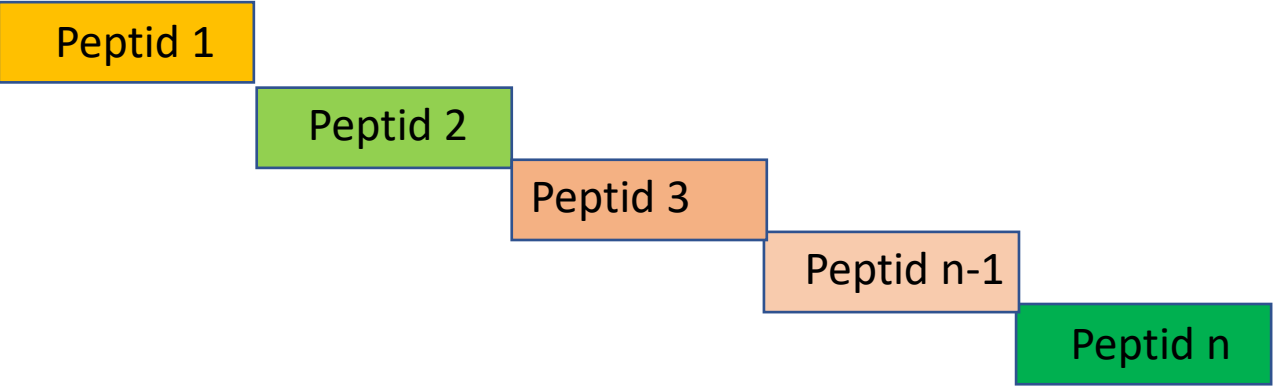
- <https://skyline.ms/project/home/software/Skyline/begin.view>
- Zdarma
- Aktivně vyvíjený od roku 2009
- Pokrývá vše co se týče cílené proteomiky
- Kvalitní soubor tutoriálů



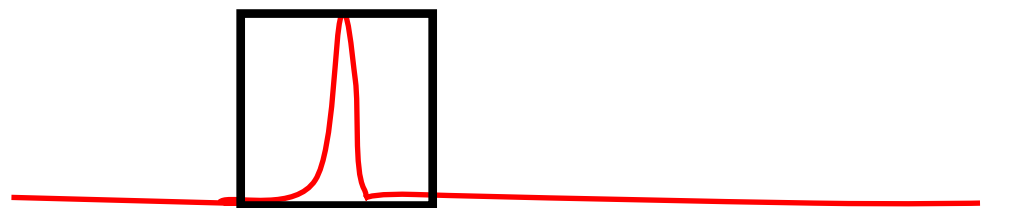
Cycle 1



Cycle 2

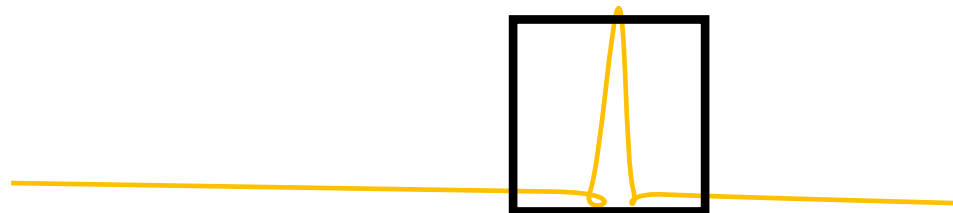


Cycle 3



Peptid 1

Nesledujeme peptid celou analýzu



Peptid 2

Detekce pouze v čase kdy se eluuje



Peptid 3

Tato strategie umožní sledovat desítky až stovky peptidů v jedné analýze

Strategie tvorby metody - okna

- Dobrá kvantifikace vyžaduje
 - Dobrý odstup signálu od šumu, viz LOQ
 - Dostatečná doba na akumulaci prekurzoru
 - Dobře prokreslený peak – dostatek bodů
 - Vhodný cycle time
- Tyto dva požadavky jdou proti sobě
- Často je potřeba kvantifikovat více peptidů v jenom nástříku
 - Desítky až stovky
 - Pokud budeme všechna detekovat celou metodu
 - Budeme mít velmi dlouhý cycle time
 - Nebo velmi krátkou akumulaci/sumaci
- Zjistíme retenční čas peptidů a detekujeme je jen v úzkém okně
 - Úspora času
 - Vysoké nároky na reproduibilitu chromatografie

Jak vybrat vhodný peptid do analýzy

Proteotypický peptid – peptid unikátní pro daný protein

- dobře ionizovatelný, pozorovatelný MS
 - Lze vybrat z předchozího shotgun měření
 - On line knihovny
 - On line nástroj – ESP predictor
<https://www.genepattern.org/esppredictor#gsc.tab=0>
- nesmí být náchylný k PTM
 - Aminokyseliny náchylné k tvorbě artefaktů
 - Methionin, tryptofan - Oxidace
 - Glutamin, asparagin – konverze na Kys Glutamovou a Kys Asparagovou

Fragment

- hojný, dobře ionizovatelný, pozorovatelný MS