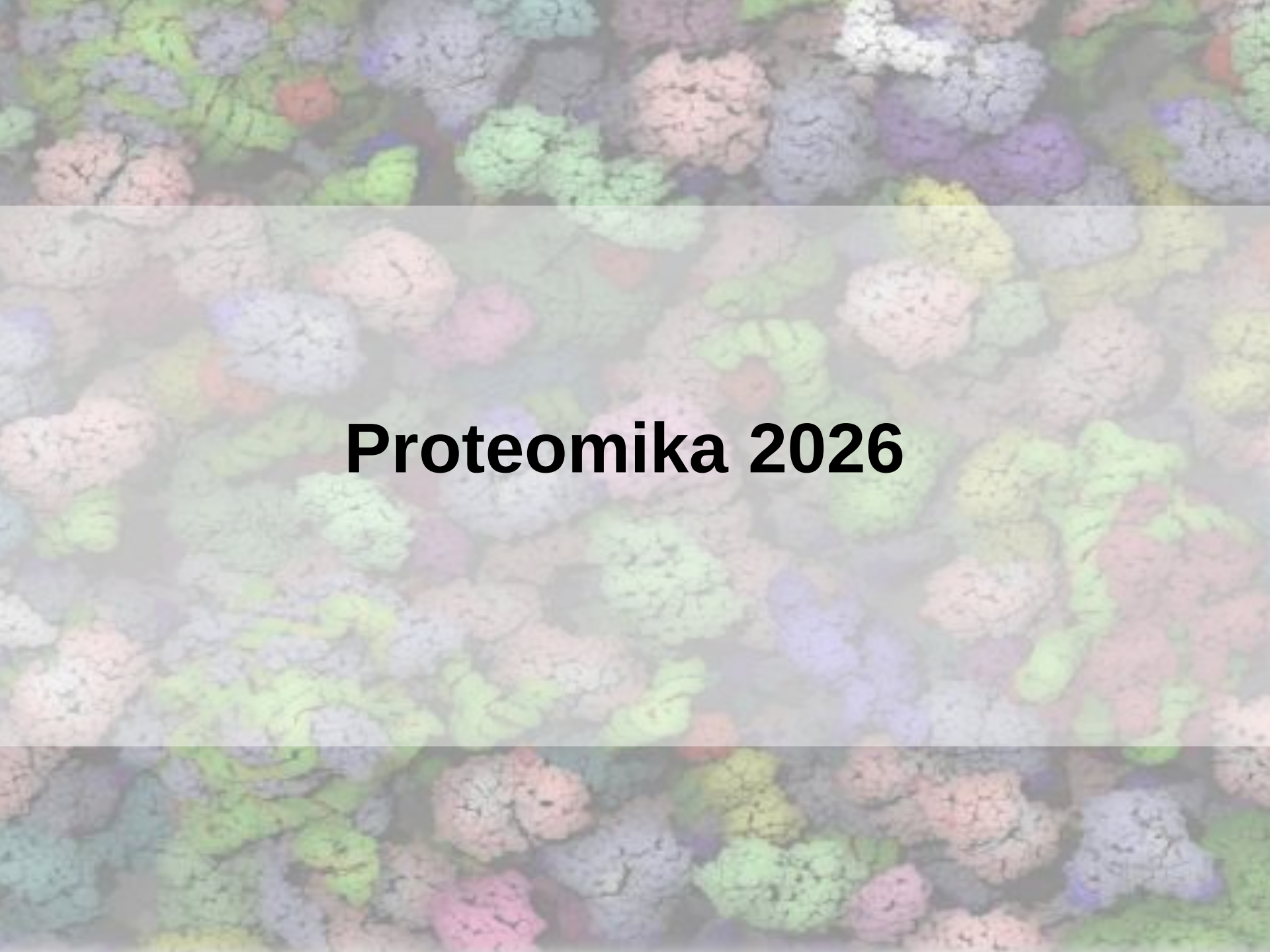




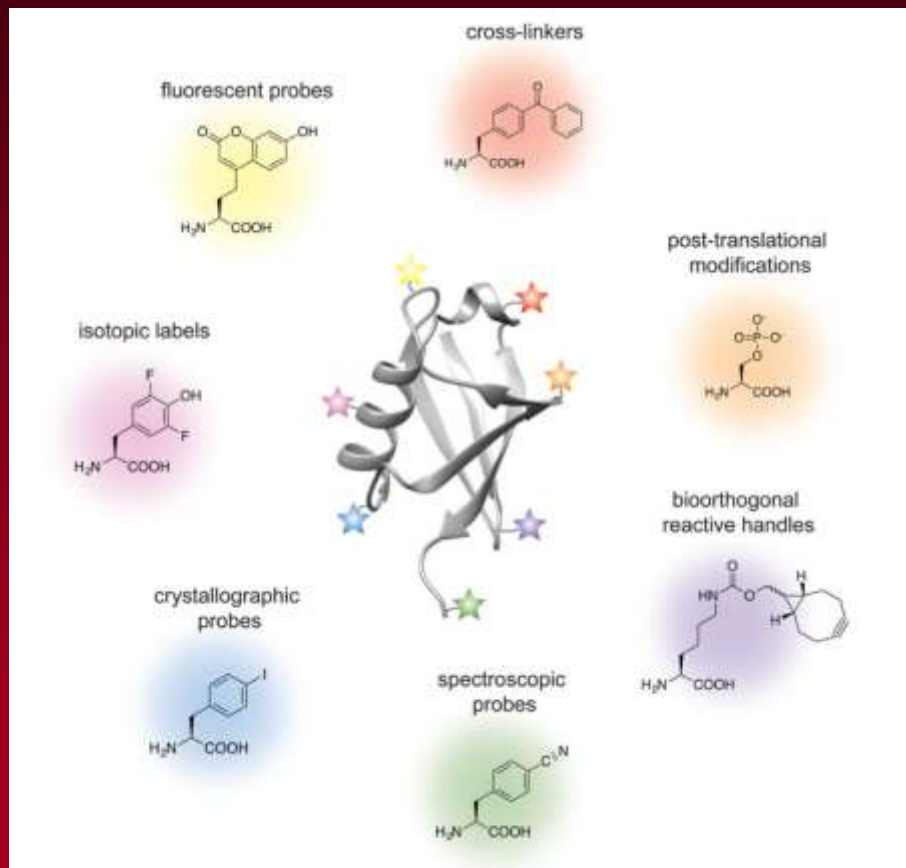
Proteomika 2026

PROTEOMIKA

2026

- **Proteomika, metody práce s bílkovinami** (Petrák 5/10)
- **Separační metody, digesce a principy ID bílkovin pomocí MS** (Petrák 12/10)
- **Principy hmotnostní spektrometrie, instrumentace** (Man 19/10)
- **Hmotnostní spektrometrie v proteomice, analýza PTM** (Man 26/10)
- **ID proteinů, akvizice dat DDA, DIA, databáze, FDR** (Talacko 2/11)
- **Kvantifikace, isotopy, LFQ, cílená proteomika** (Harant 9/11)
- **Příprava vzorku, Design experimentu, zpracování dat....**(Petrák 16/11)
- **Proteomika membránových proteinů, proteinové komplexy** (Petrák 23/11)
- ----- 30/11/2026 přednáška není -----
- **Klinická proteomika, plazma, biomarkery, speciální metody** (Petrák 7/12)

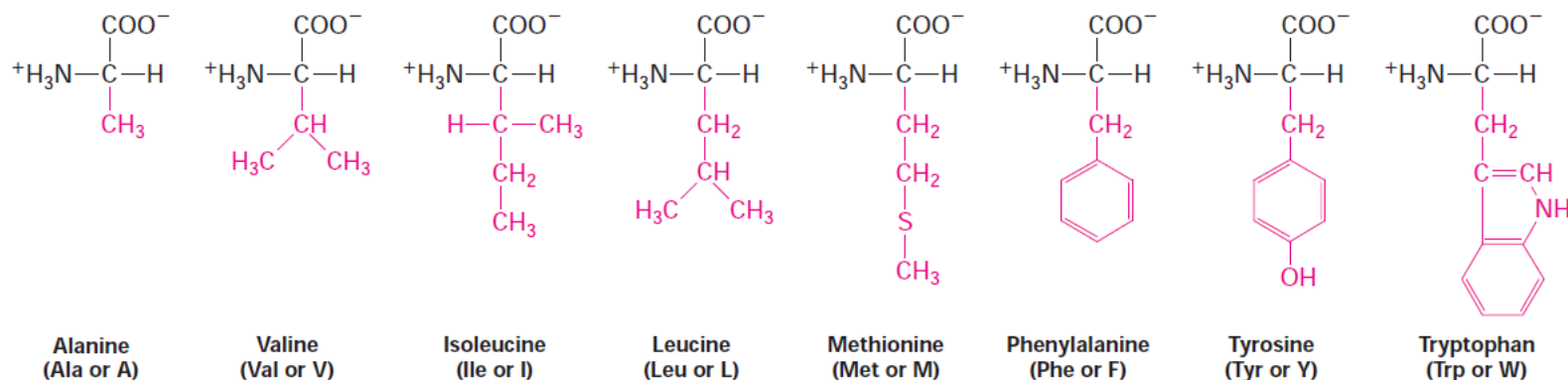
ZNAČENÍ A ZAKOTVOVÁNÍ PROTEINŮ



Reaktivní skupiny bílkovin

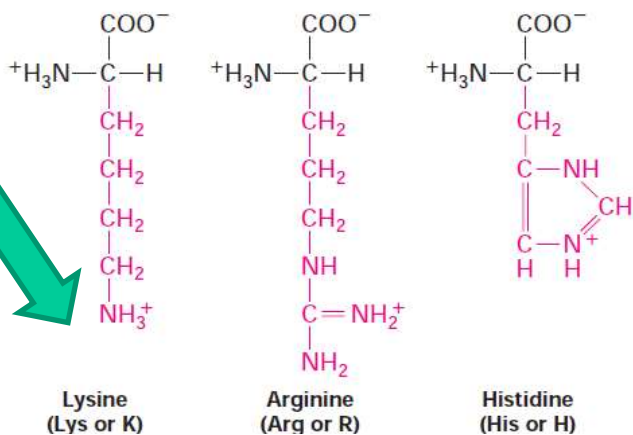
sulfhydryl (–SH)
primární amin (–NH₂)
karboxyl (–COOH)
karbonyl sacharidu (–CHO)

HYDROPHOBIC AMINO ACIDS

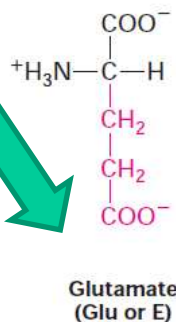
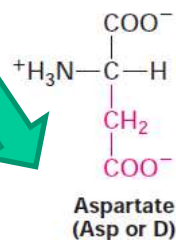


HYDROPHILIC AMINO ACIDS

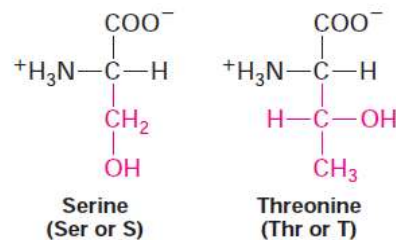
Basic amino acids



Acidic amino acids



Polar amino acids with uncharged R groups



Vhodně reaktivní:

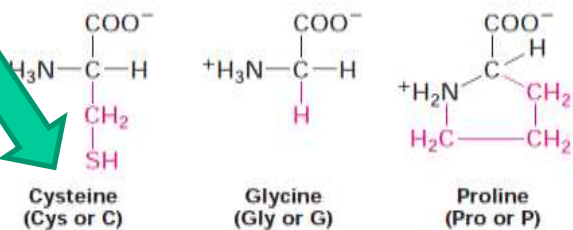
Cystein (-SH)

Lyzin (epsilon aminoskupina)

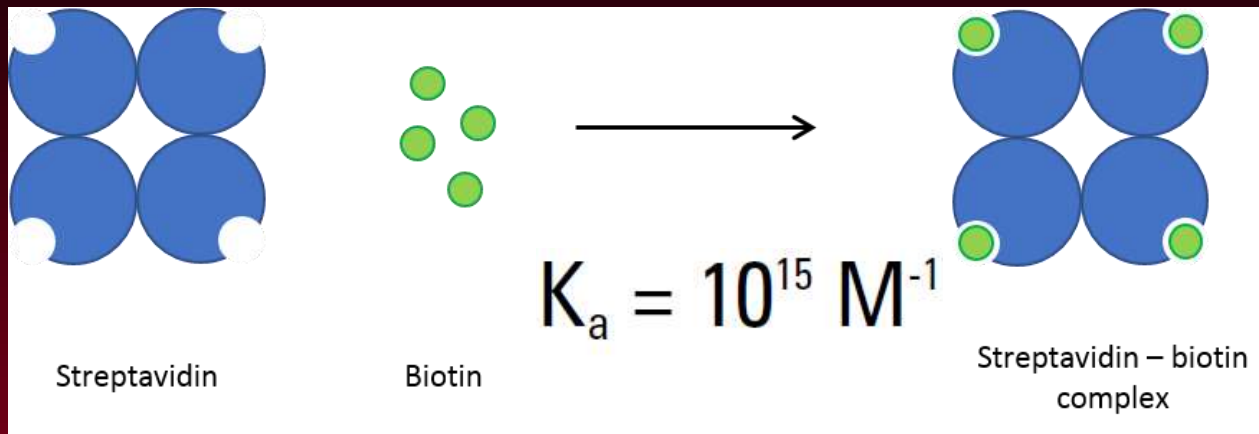
N'konec - (aminoskupina)

C'konec (karboxyl + Asp, Glu)

SPECIAL AMINO ACIDS



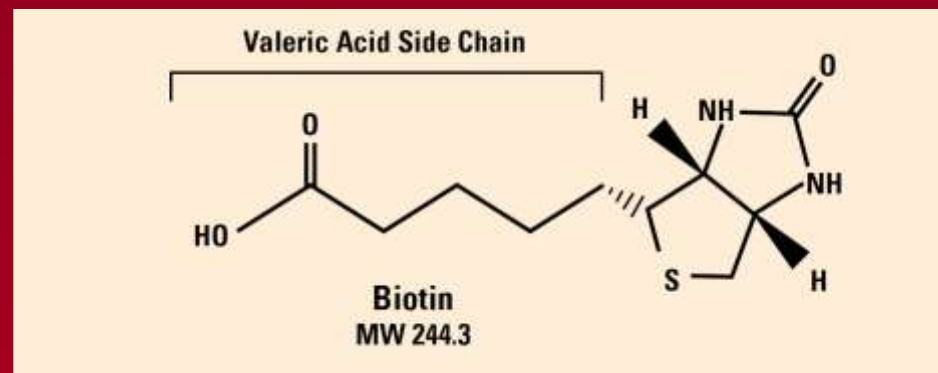
Vazba Avidin (Streptavidin)-Biotin



Nejsilnější známá nekovalentní interakce
mezi proteinem a ligandem

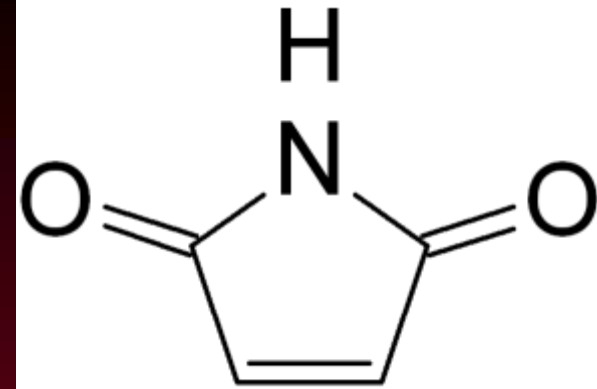
Avidin (Streptavidin), tetramerní proteiny 50-70 kDa

Biotin

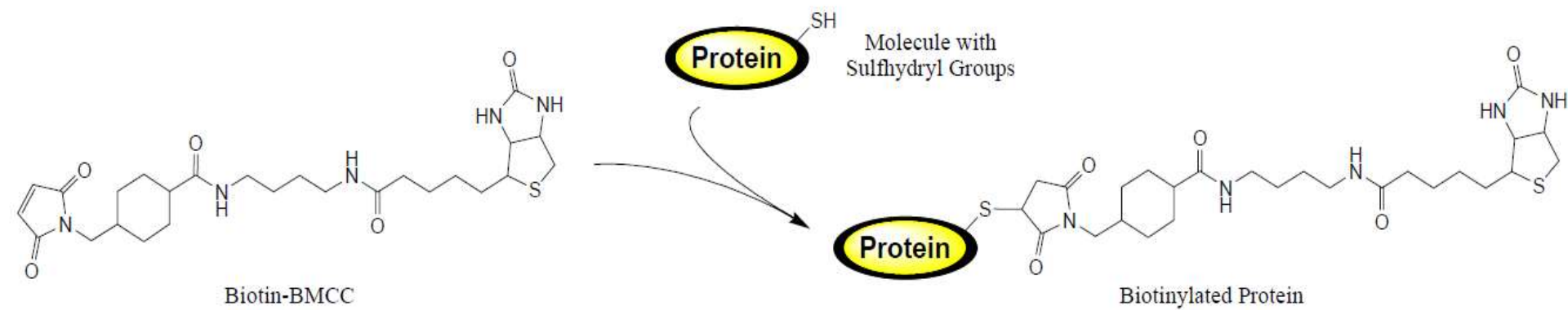


SH-

Cys

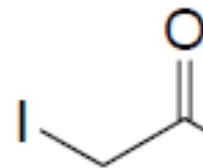


Maleimid

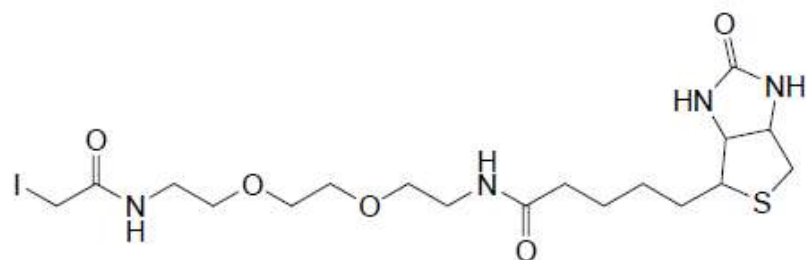


SH-

Cys

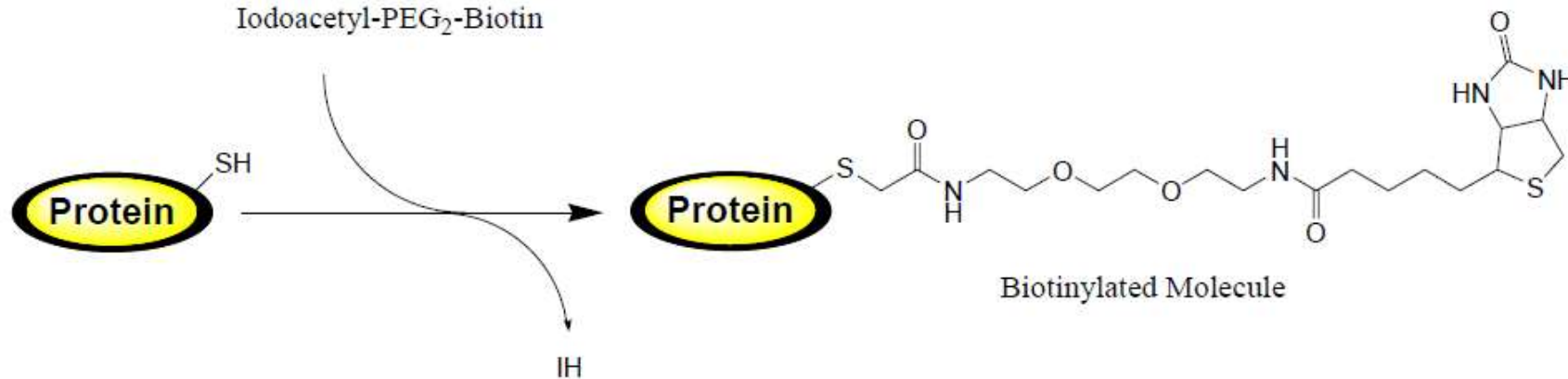


Iodoacetyl



Iodoacetyl-PEG₂-Biotin

PEG₂- inertní spacer

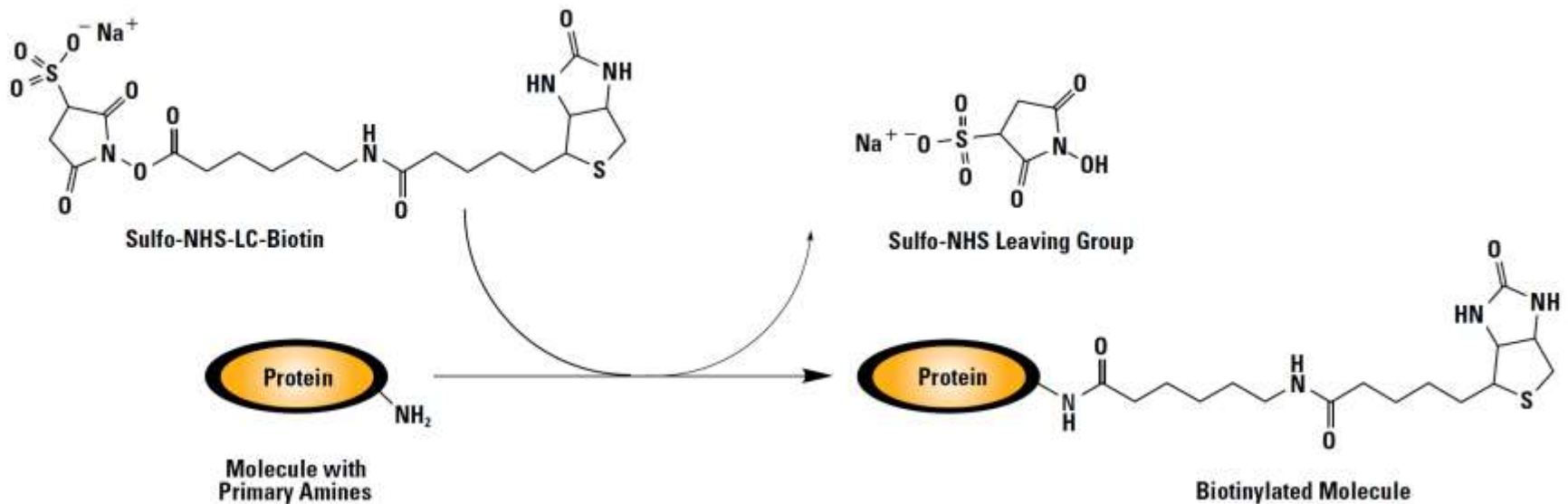
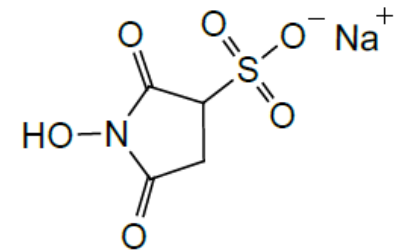
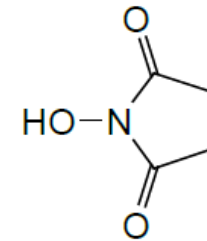




N', epsilon aminoskupina Lys

N-hydroxysukcinimid (NHS)

sulfo N-hydroxysukcinimid (NHS)

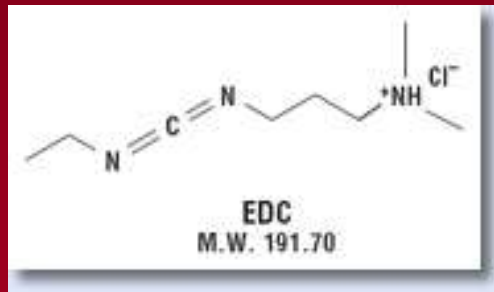
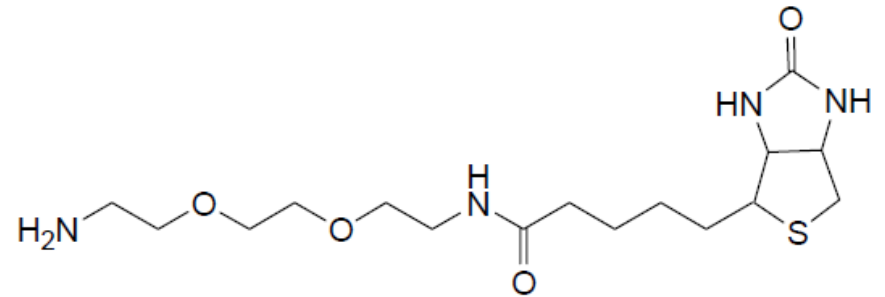


COOH-

C', Asp. Glu

Protein-COOH

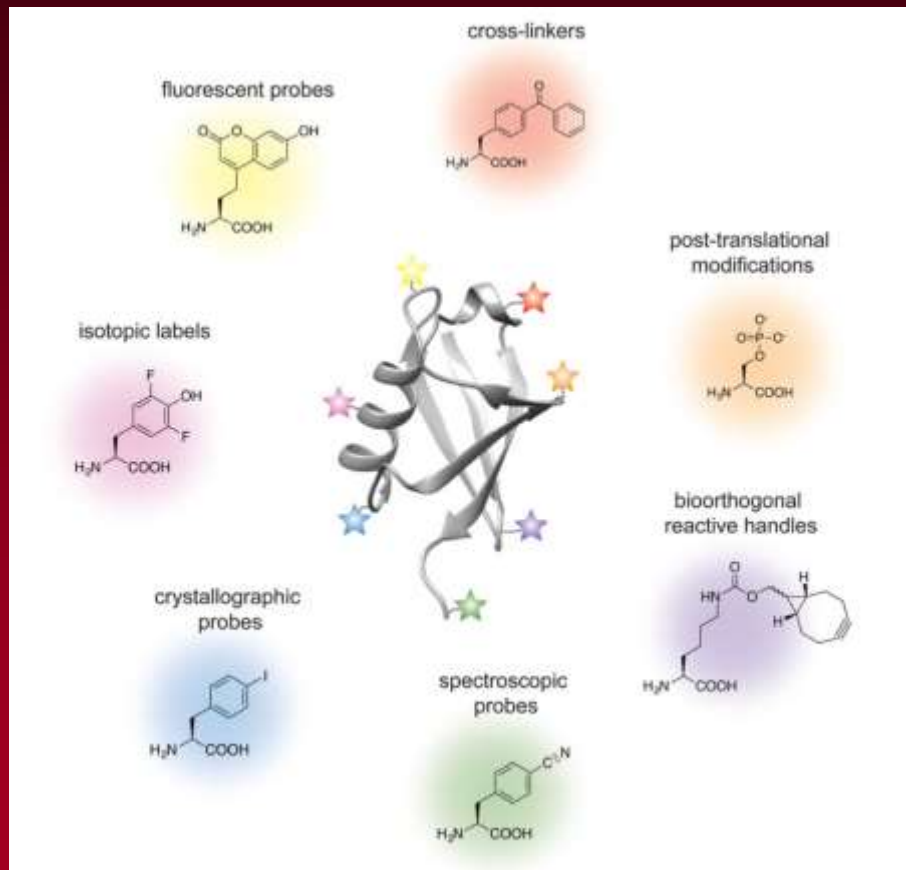
+



crosslinker EDC aktivuje karboxylovou skupinu

(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid)

ZNAČENÍ A ZAKOTVOVÁNÍ PROTEINŮ



Reaktivní skupiny bílkovin

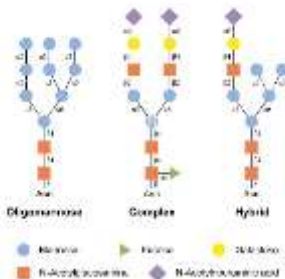
sulfhydryl ($-\text{SH}$)

primární amin ($-\text{NH}_2$)

karboxyl ($-\text{COOH}$)

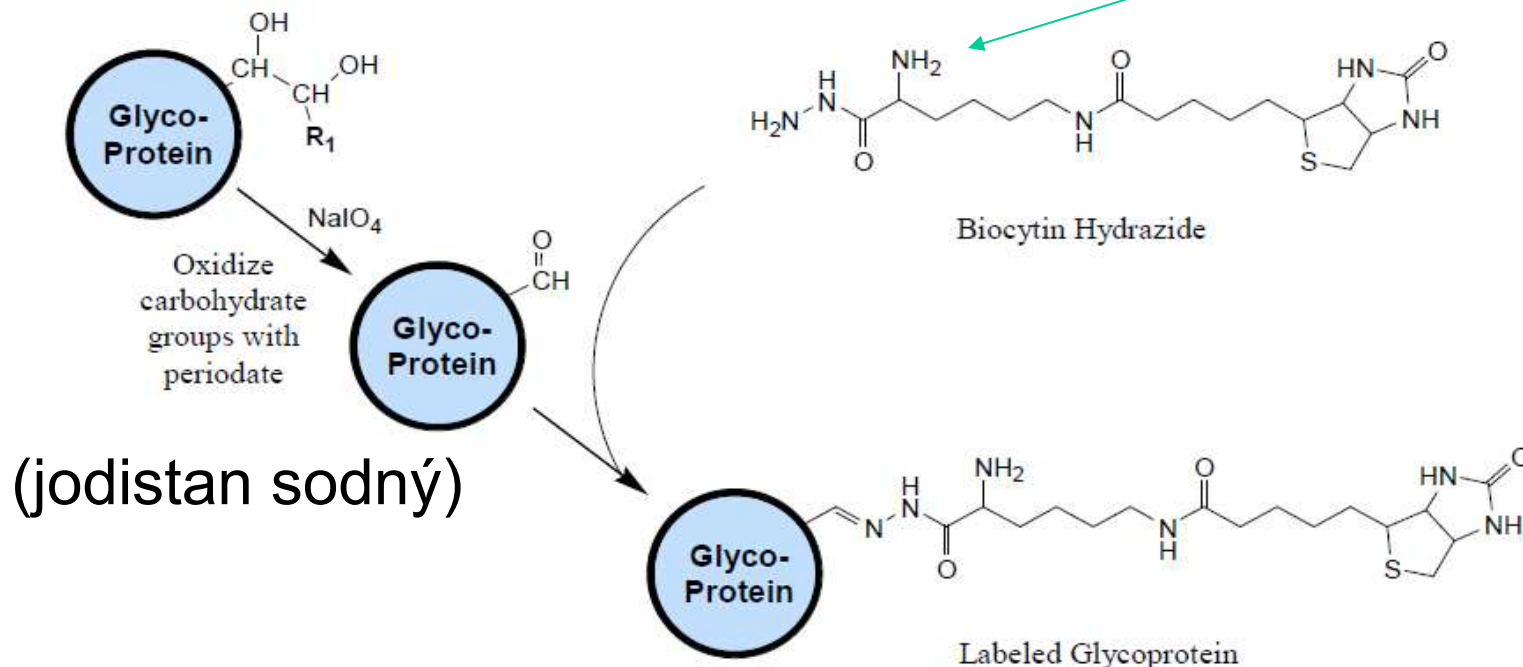
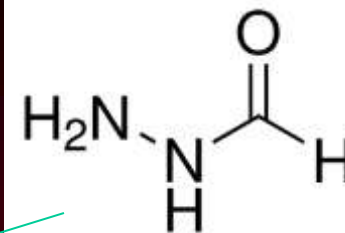
karbonyl sacharidu ($-\text{CHO}$)

N-glycans Types



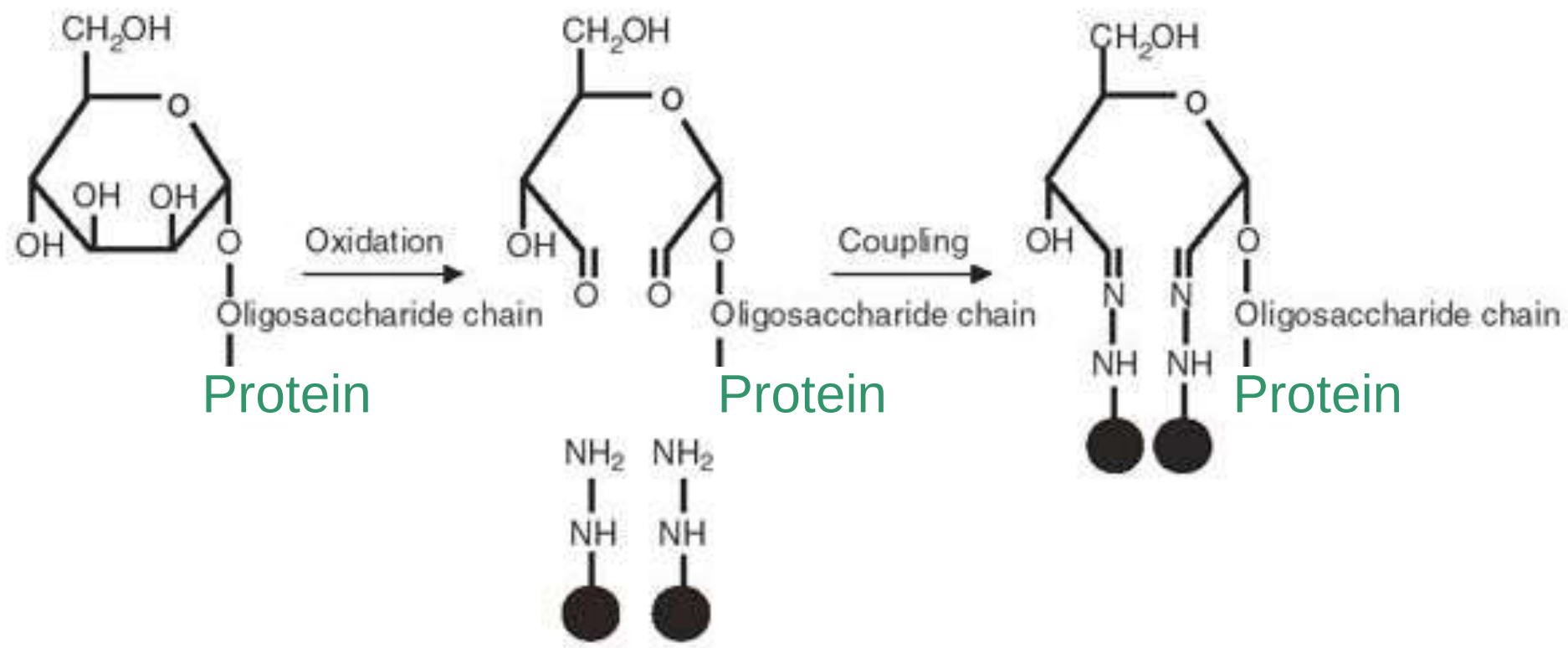
Glykopeptidy

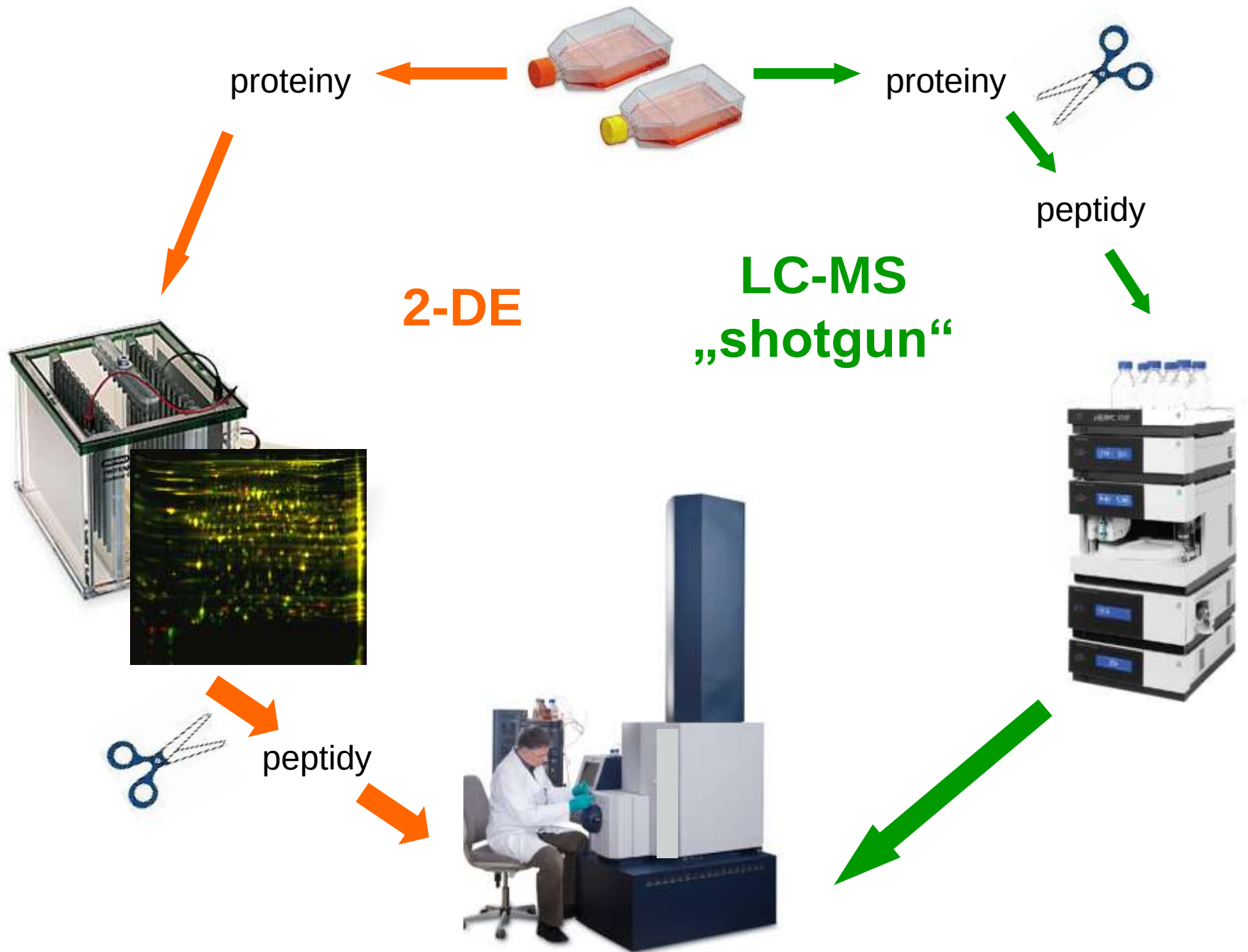
hydrazid



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.

Imobilizace glykopeptidů/glykoproteinů na hydrazidových kuličkách





SEPARAČNÍ METODY

- CHROMATOGRRAFIE

- Gelová filtrace, SEC

- Iontoměničová chromatografie

- Afinitní chromatografie

- Chromatografie v reverzní (obrácené) fázi

- HILIC (chromatografie hydrofilních interakcí)

- ELEKTROFORÉZY

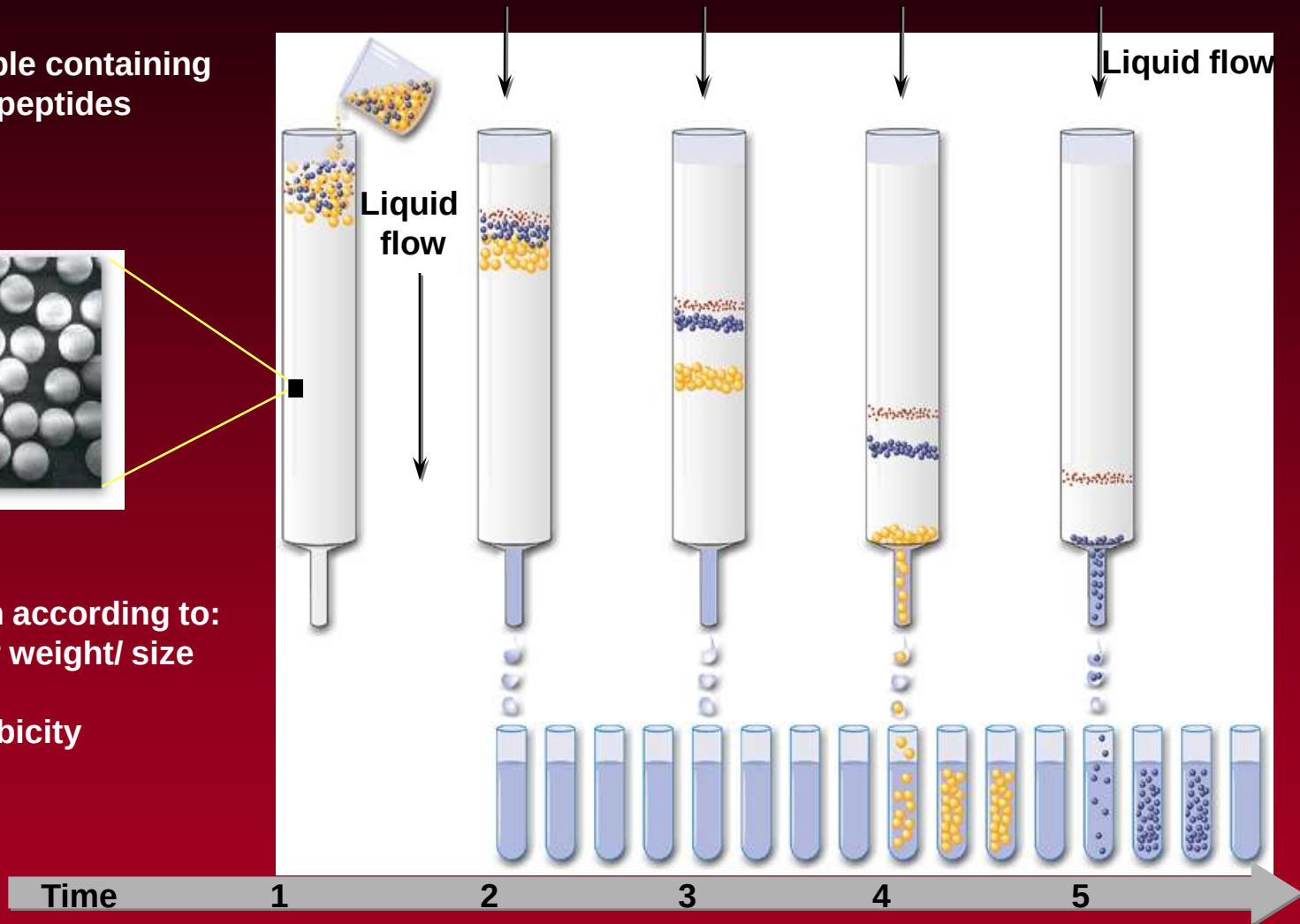
Liquid Chromatography (LC)

Liquid 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 (Sephacrose)
- 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**



Afinní chromatografie
(Affinity chromatography)

HYDROFOBICITA



Chromatografie v reverzní fázi
(Reverse phase chromatography)

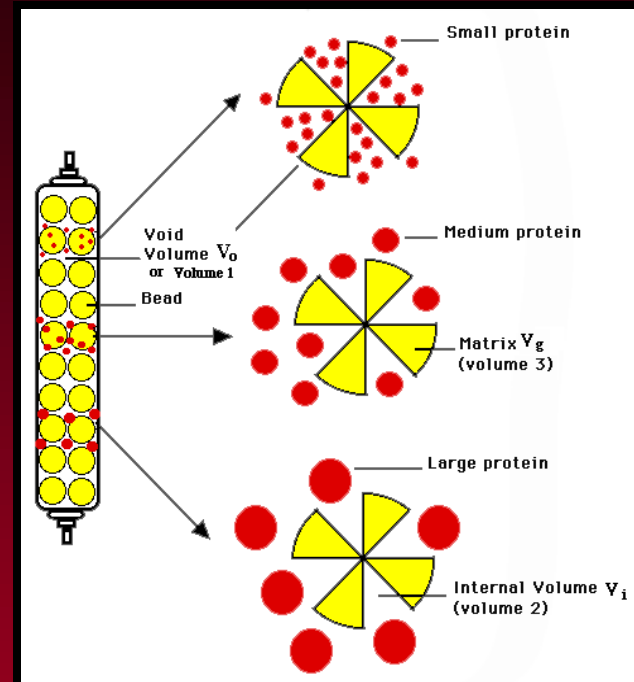
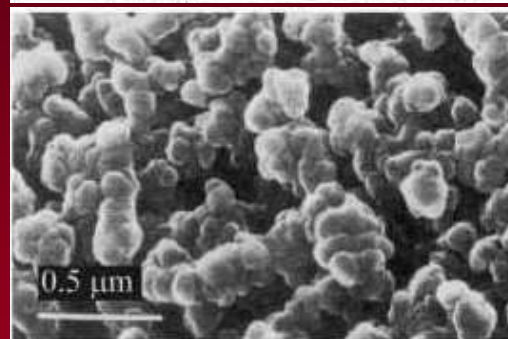
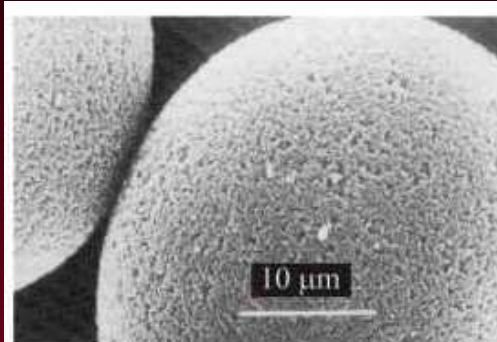
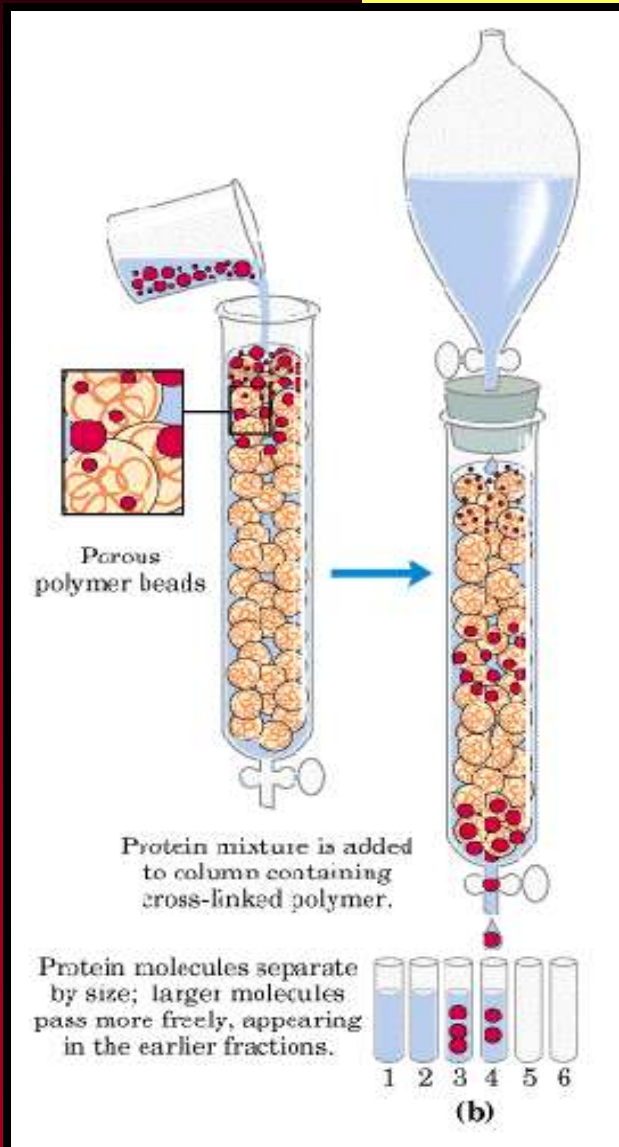
HYDROFILNOST



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

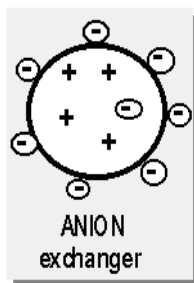
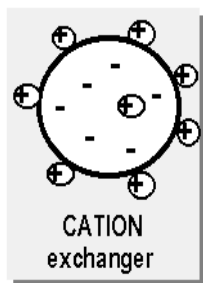
Vhodná pro proteiny a proteinové komplexy

ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY

IONTOMĚNIČOVÁ CHROMATOGRAFIE

- Dělí na základě aktuálního celkového náboje

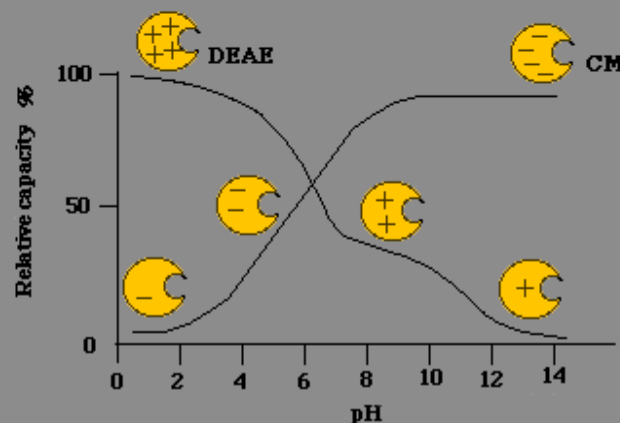
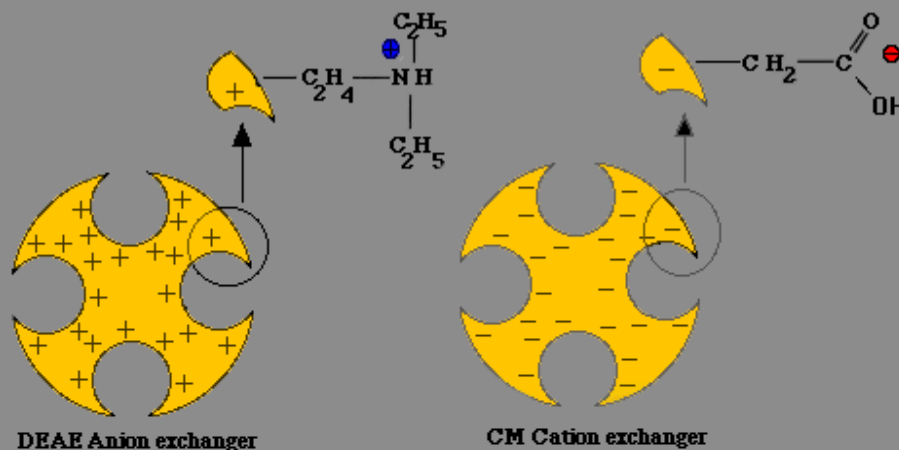
Ion exchange resins



Anex je pozitivně nabitý

Katex je negativně nabitý

Charge Properties of Ion Exchangers



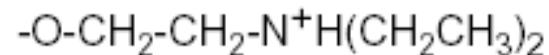
Vhodná pro proteiny i peptidy

Funkční skupiny iontoměničů

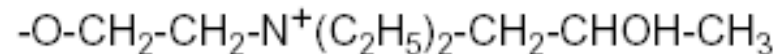
Anion exchangers

Functional group

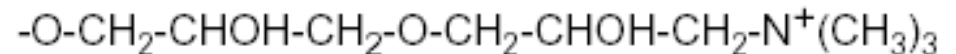
Diethylaminoethyl (DEAE)



Quaternary aminoethyl (QAE)



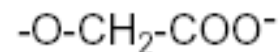
Quaternary ammonium (Q)



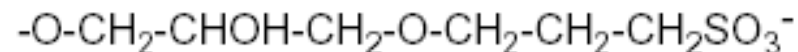
Cation exchangers

Functional group

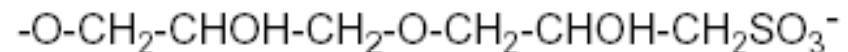
Carboxymethyl (CM)



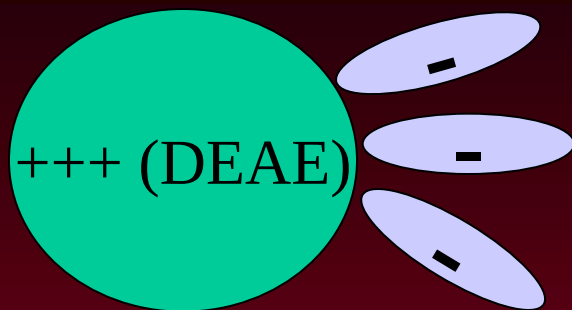
Sulphopropyl (SP)



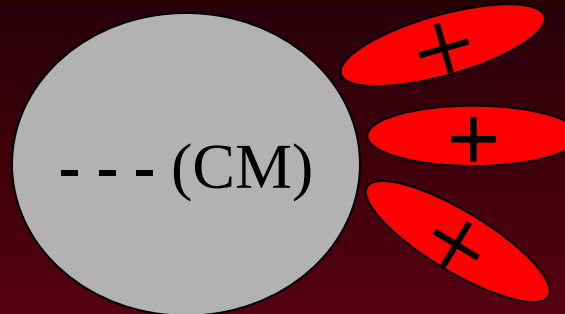
Methyl sulphonate (S)



ANEX



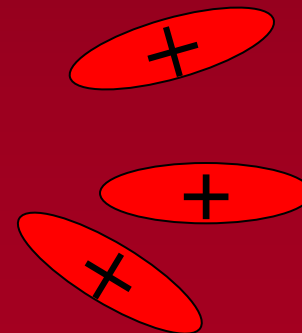
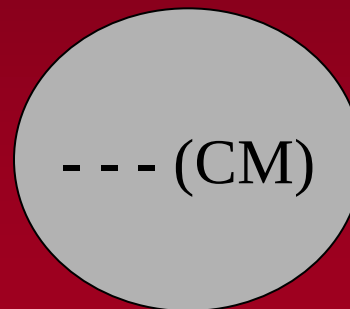
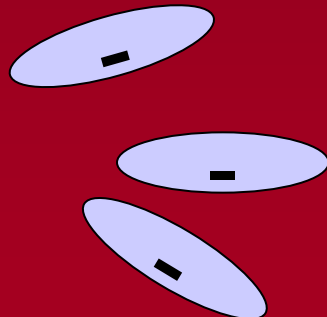
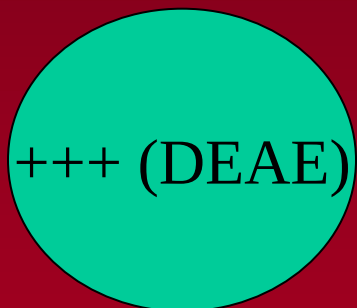
KATEX



ELUCE:

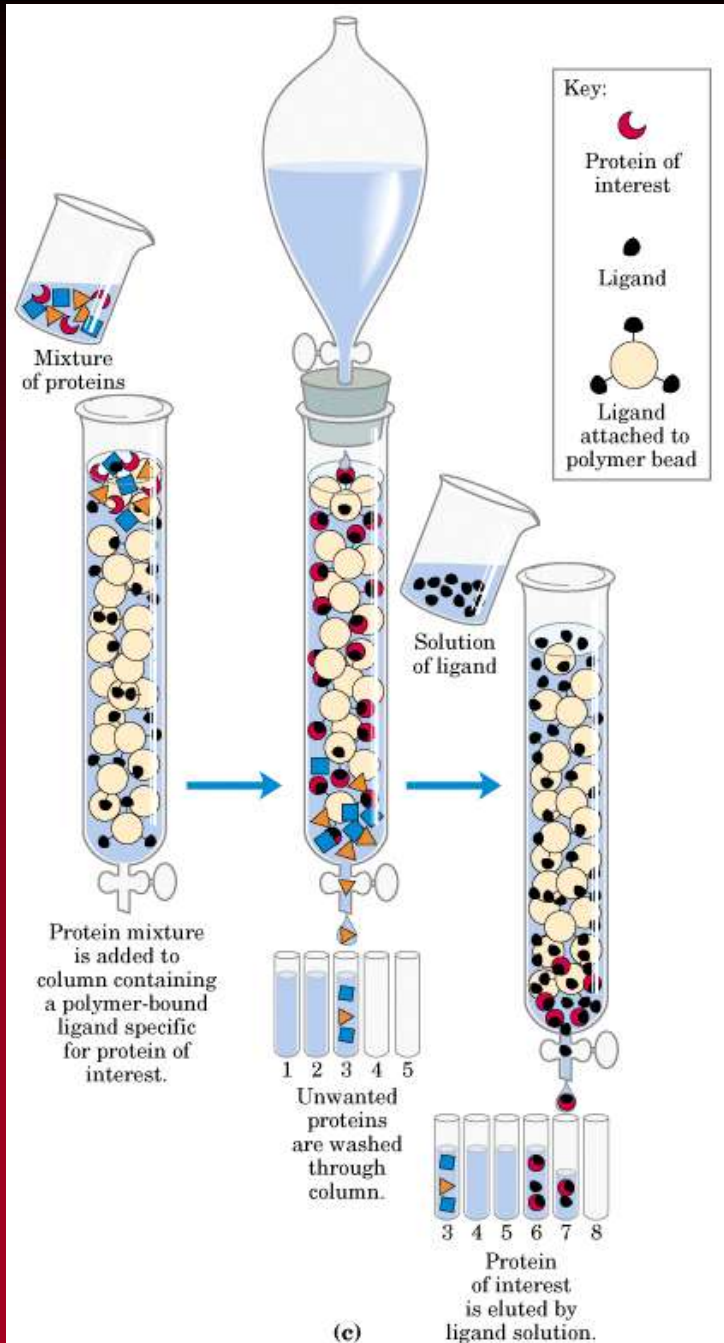
Zvýšená iontová síla (snížení ES interakcí)

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 Sepharose lze 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

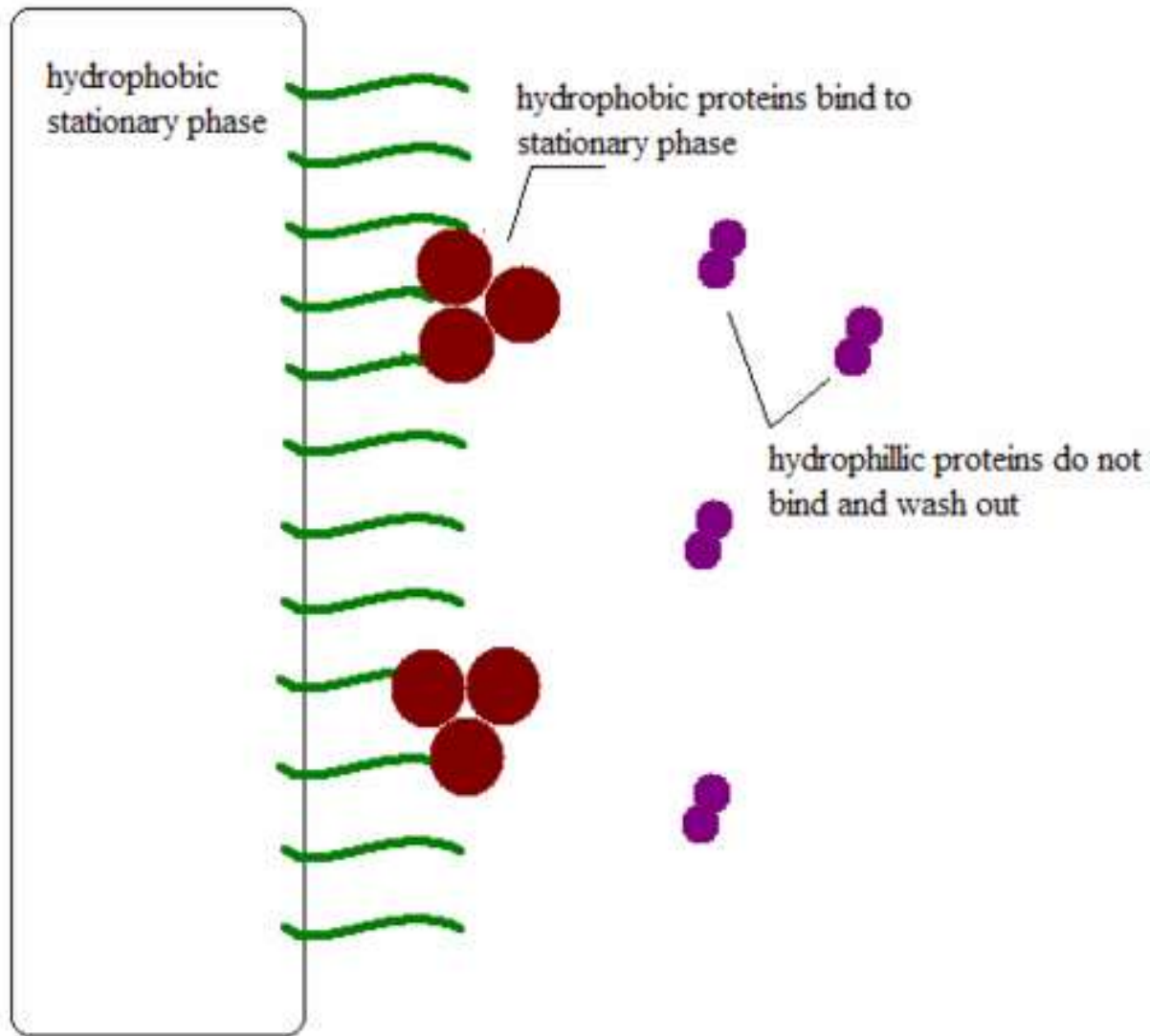
Protein A, G magnetic beads

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

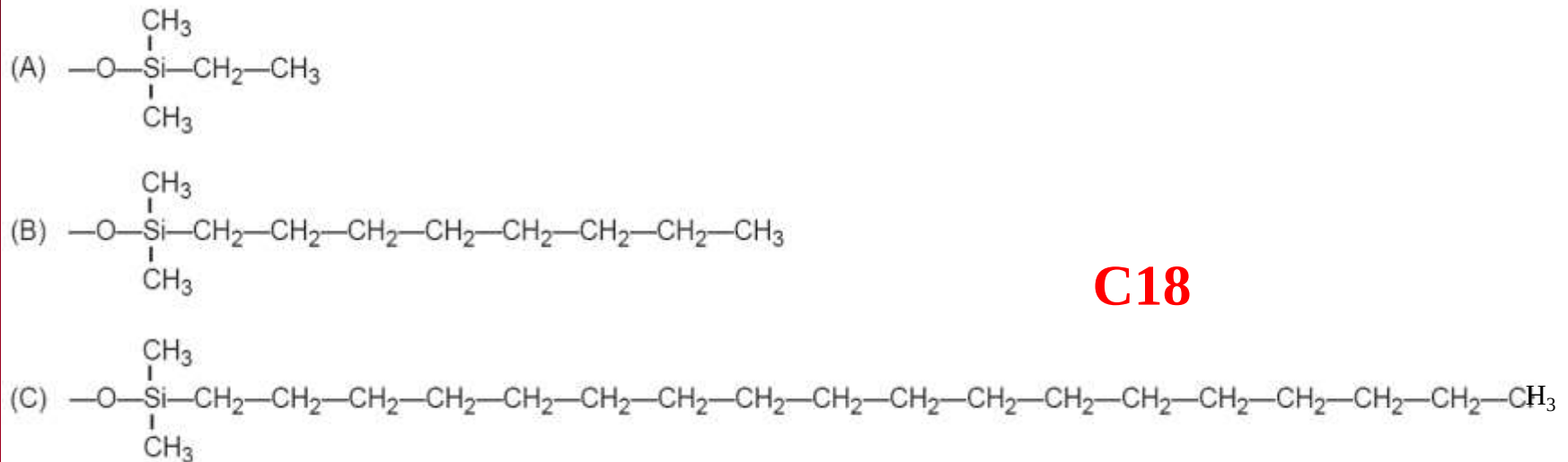
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_2 \quad \text{CH}_2 \\ | \quad | \\ \text{CH}_2\text{---CH}_2 \end{array}$
Tetrahydrofuran

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



Kompatibilita s MS!

Vhodná pro proteiny i peptidy

HILIC – hydrophilic interaction liquid chromatography (chromatografie hydrofilních interakcí)

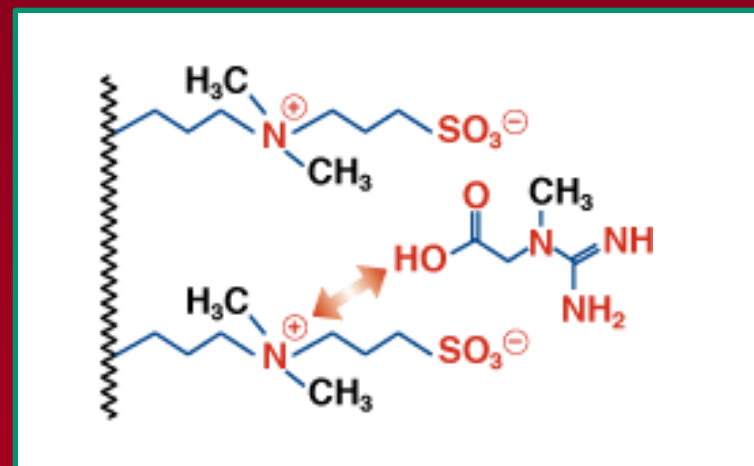
Dělí analyty na základě polárních interakcí

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

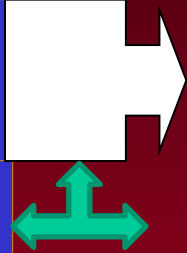


Vhodná pro proteiny i peptidy

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

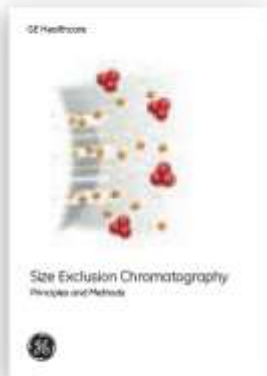


Macrotrap



Zip-Tips

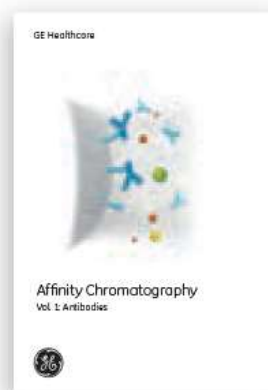




Size Exclusion Chromatography

Principles and Methods

18102218



Affinity Chromatography

Vol. 1: Antibodies

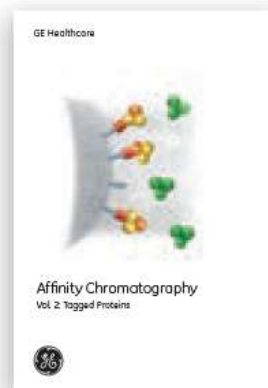
18103746



Ion Exchange Chromatography

Principles and Methods

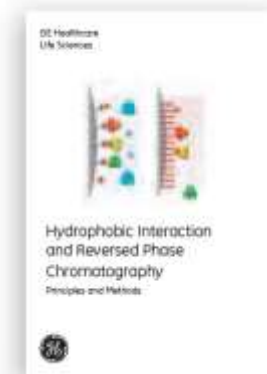
11000421



Affinity Chromatography

Vol. 2: Tagged Proteins

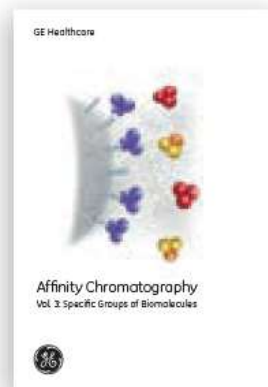
18114275



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

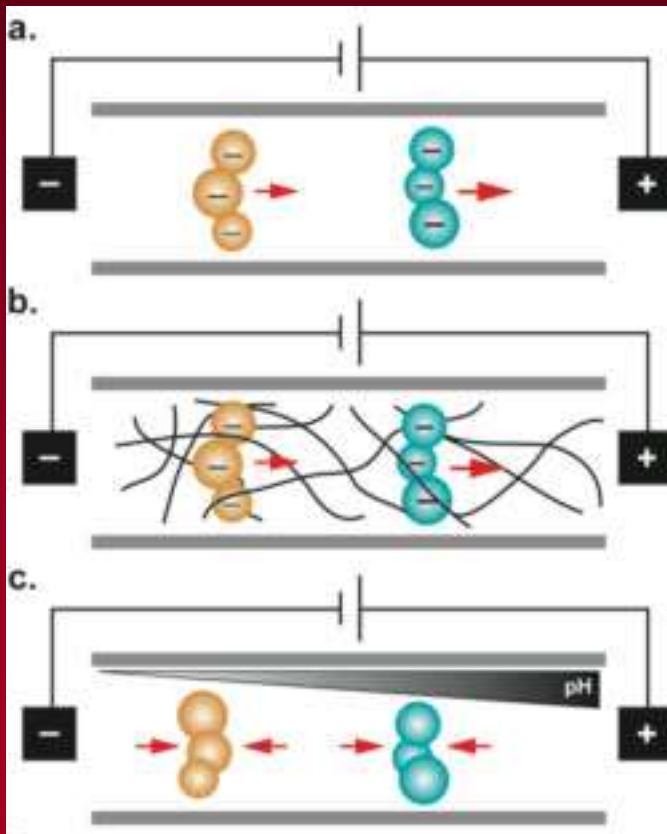
Specifická mobilita

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

z - náboj

η viskozita

r Stokesův poloměr částice



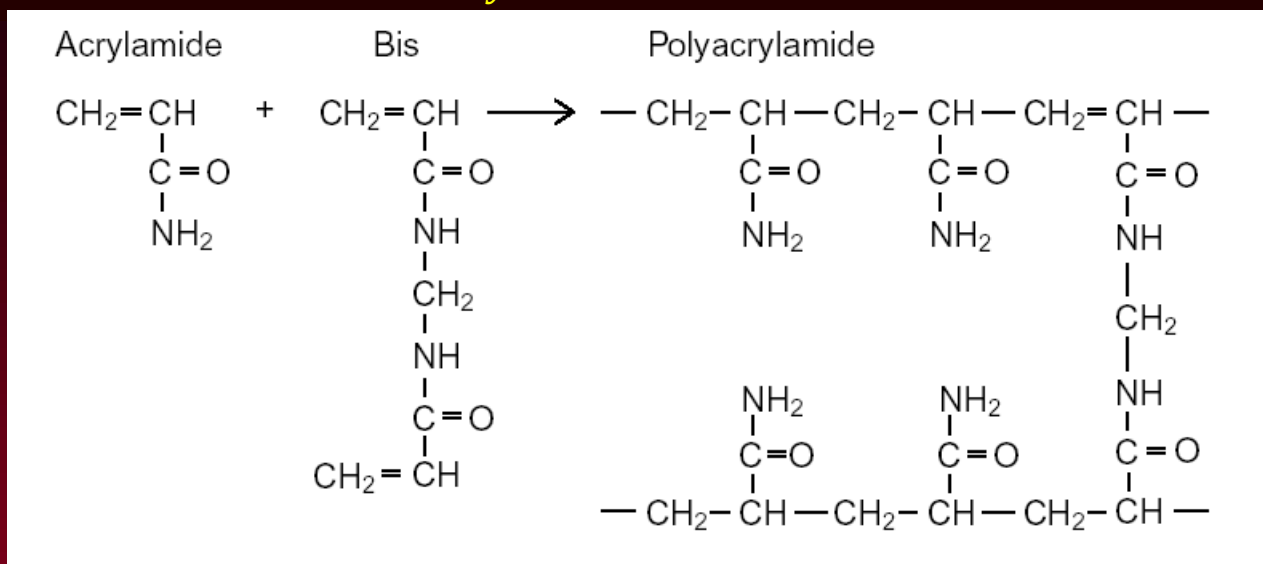
Elektroforéza v roztoku

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.

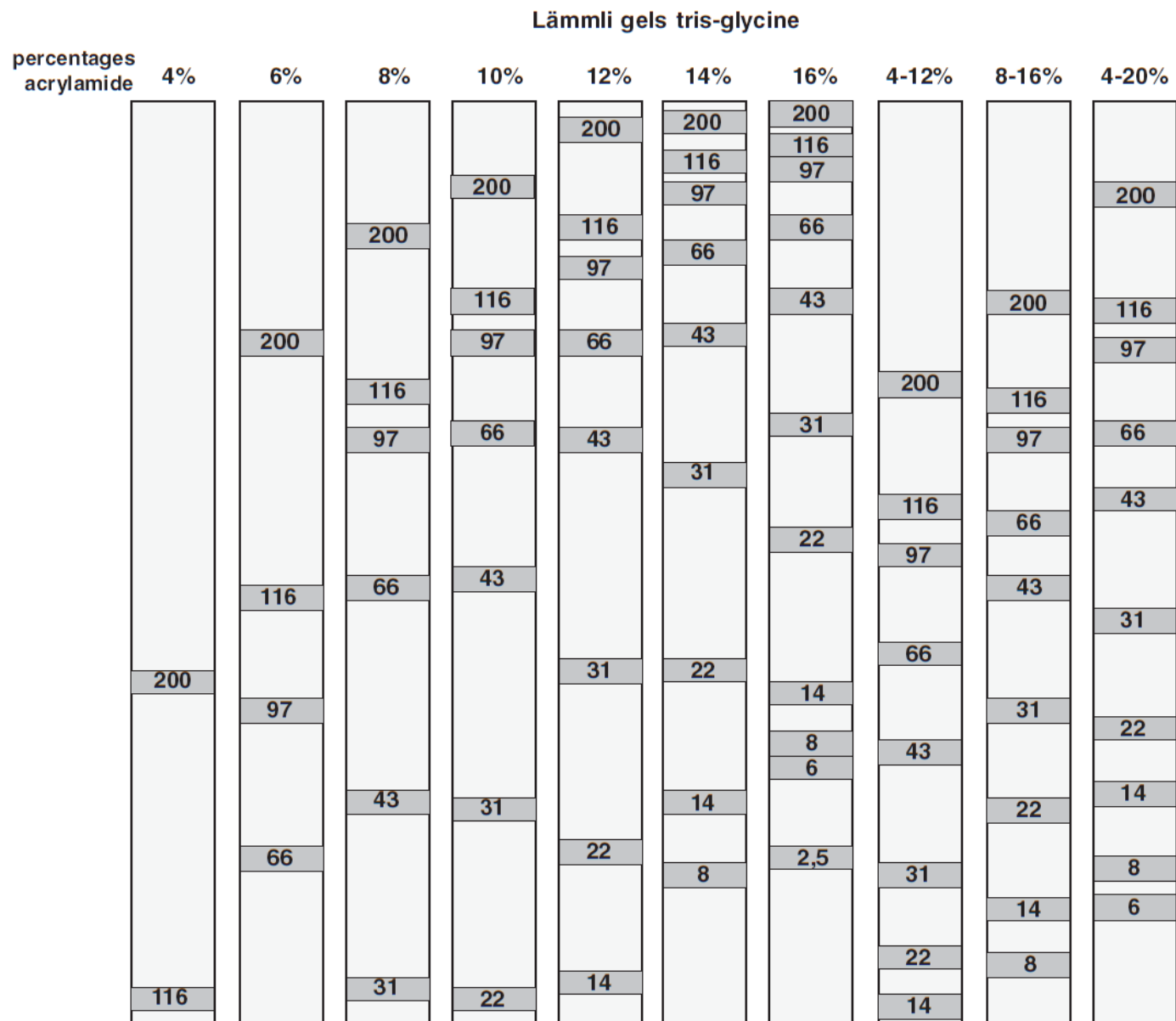
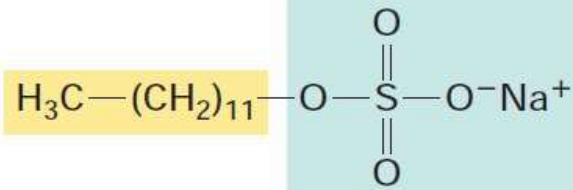


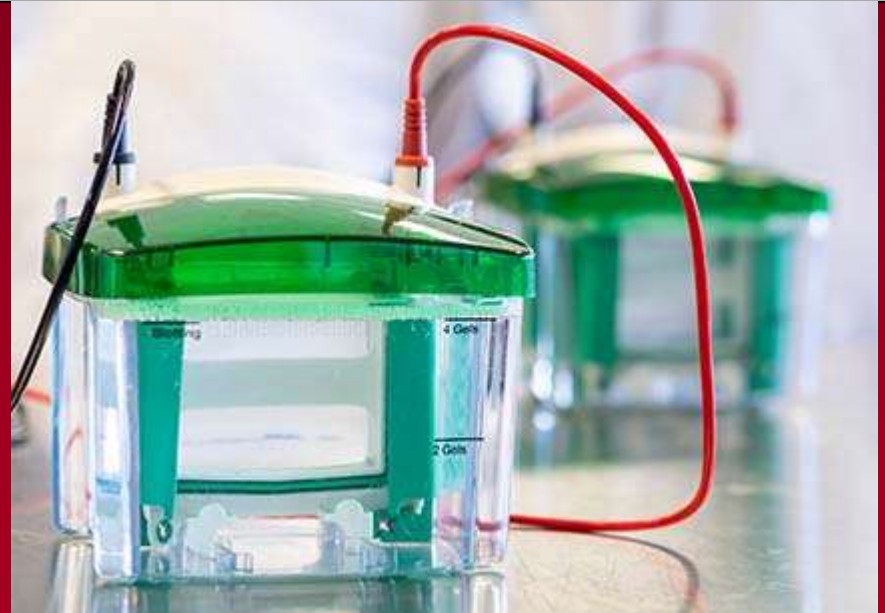
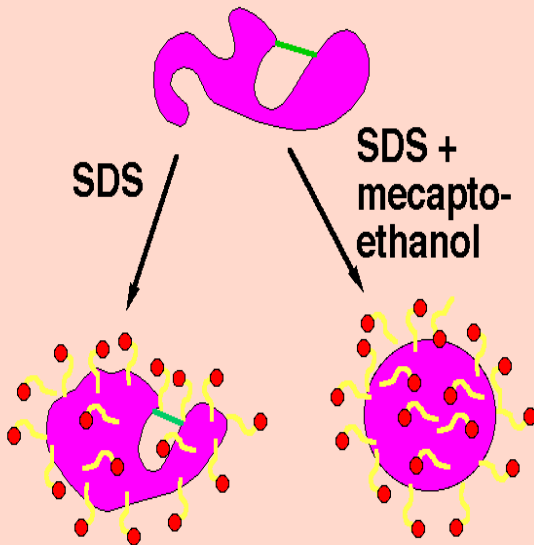
Figure 1.2. Run speed of MW markers in SDS gels.

SDS ELEKTROFORÉZA

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



- Bílkoviny se rozdělují na základě jejich MW
- Záporně nabitě SDS tvoří komplexy s bílkoviny 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

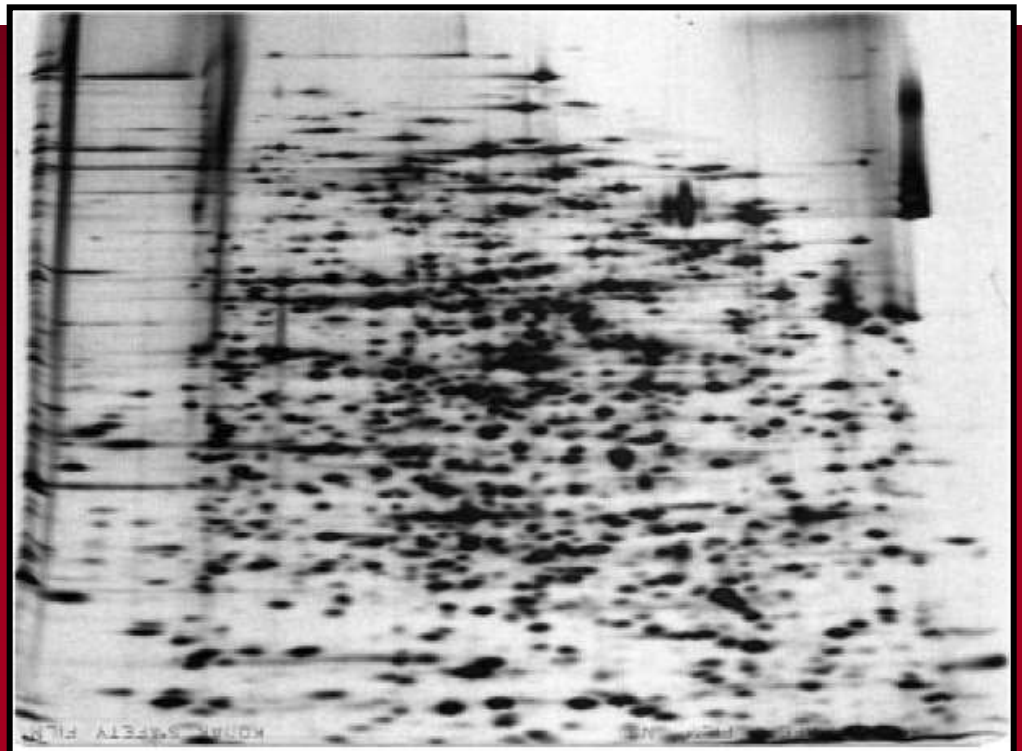
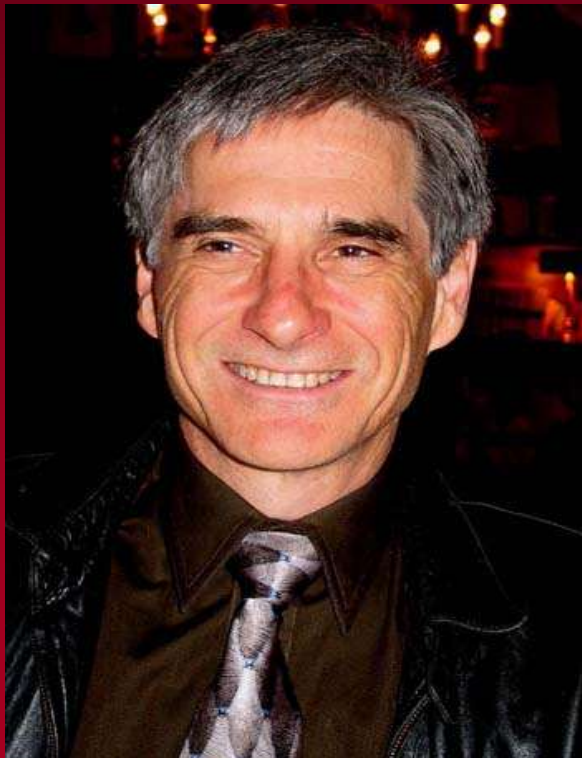
High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins*

(Received for publication, September 5, 1974)

PATRICK H. O'FARRELL†

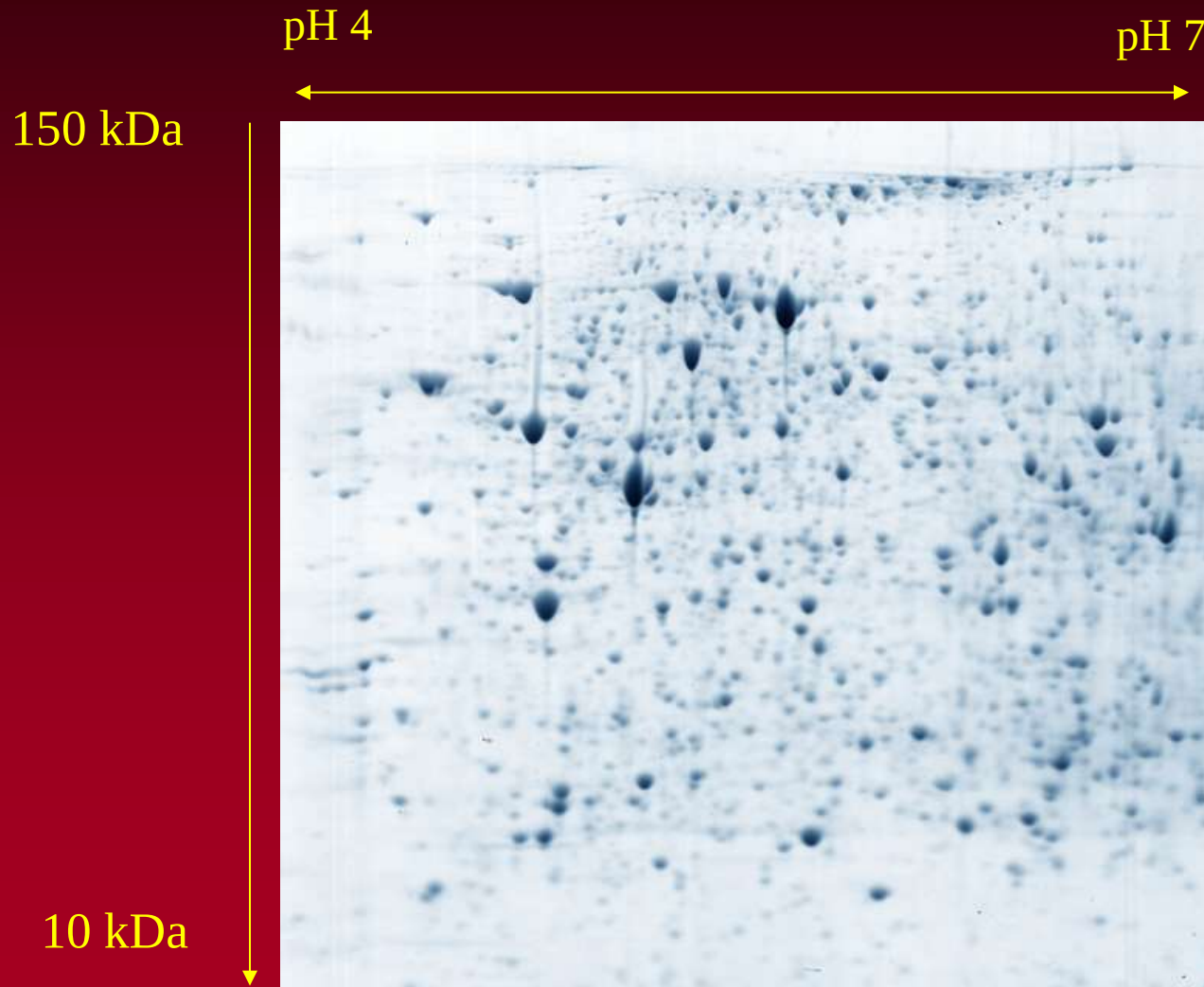
*From the Department of Molecular, Cellular and Developmental Biology, University of Colorado, Boulder,
Colorado 80302*

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)

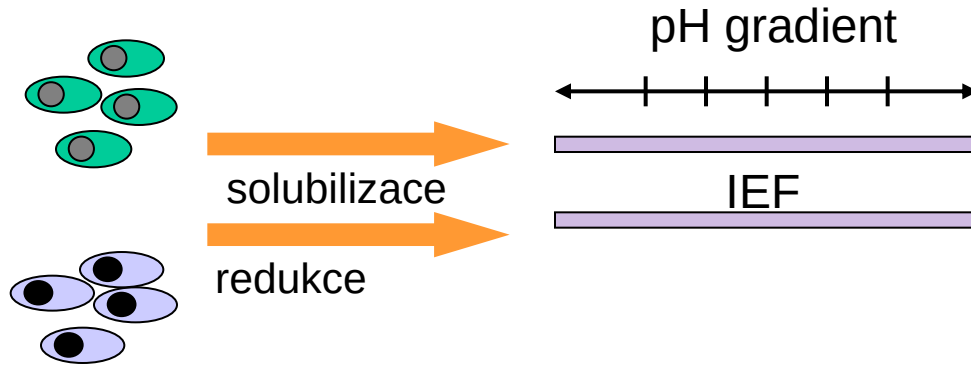
Rozděluje proteiny nejdříve podle jejich **náboje** a následně kolmo na směr původní migrace dle jejich **MW**



Jaterní homogenát,

1025 proteinových
skvrn

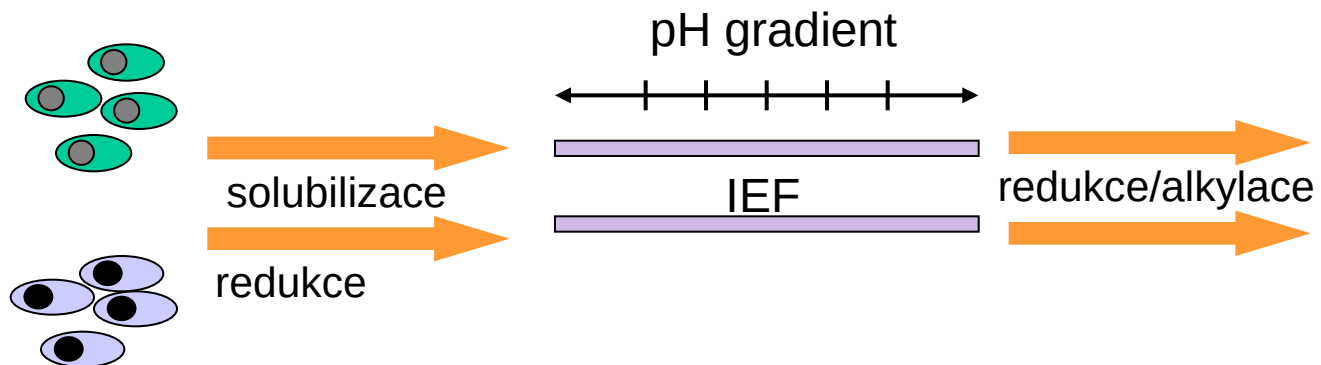
Typický 2-DE experiment (cca 1990-2010)



INSTRUMENTACE IEF

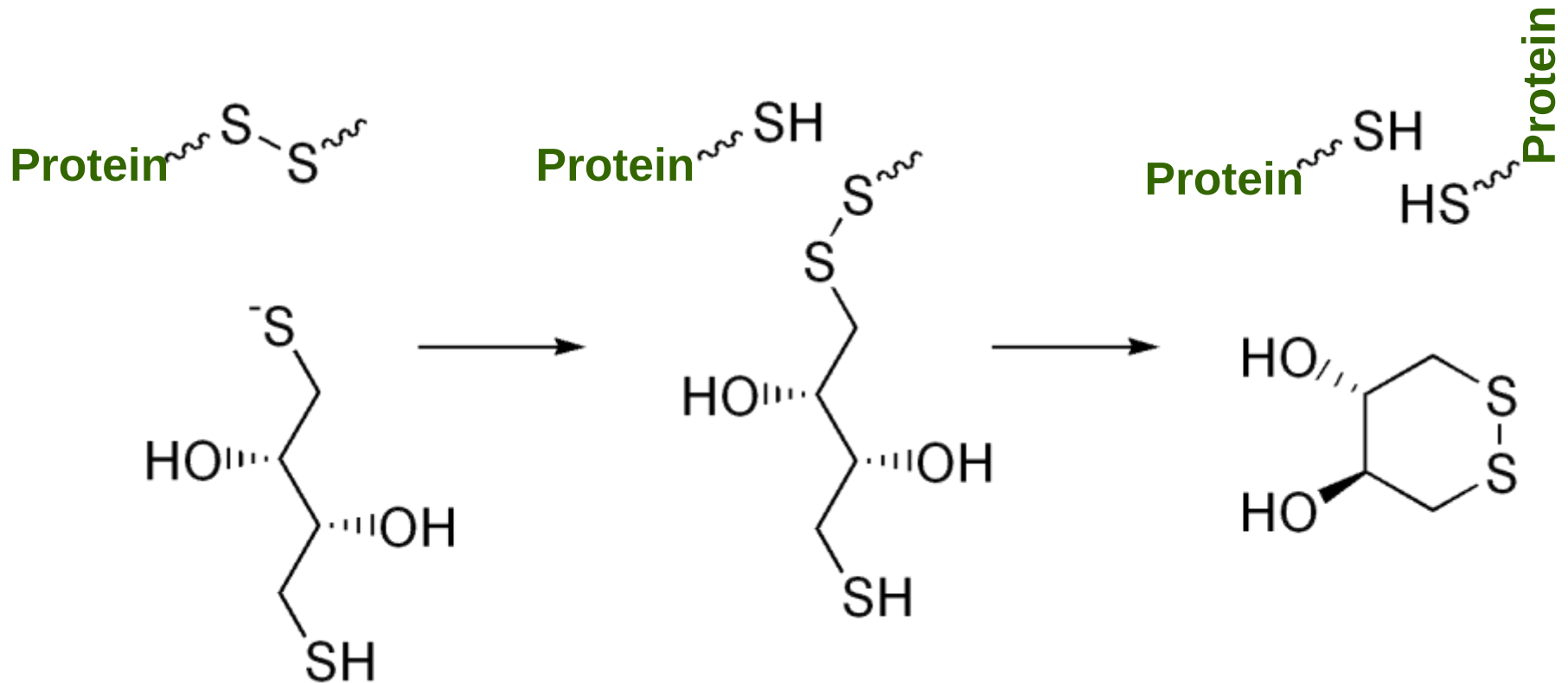


Typický 2-DE experiment (cca 1990-2010)

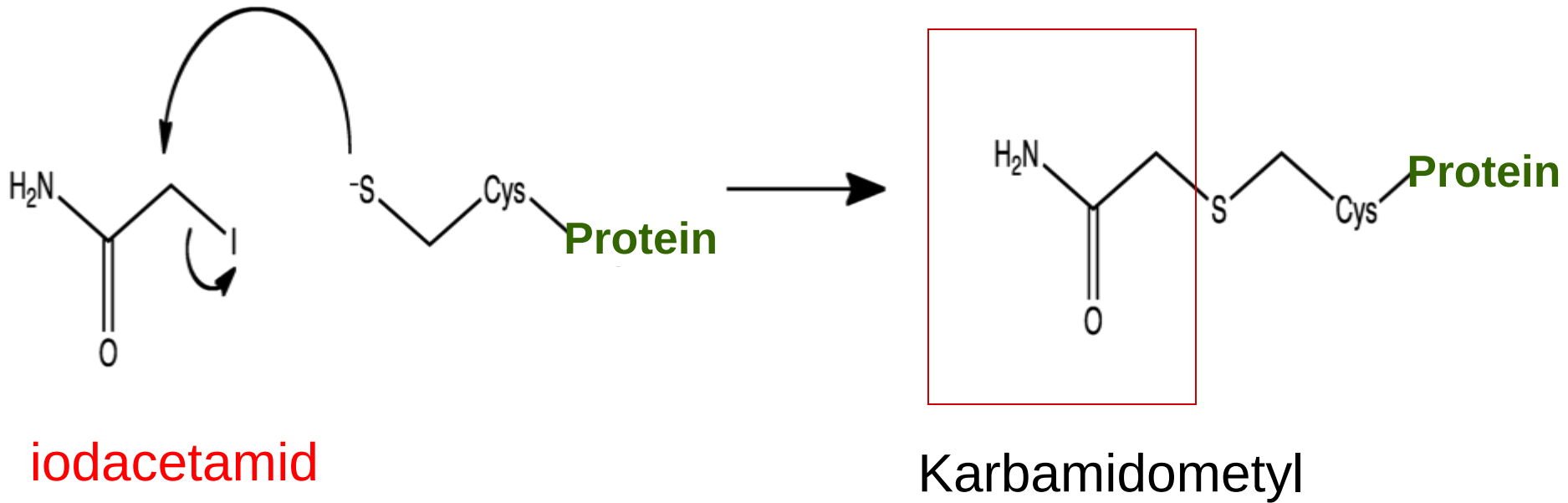


Redukce disulfidických vazeb

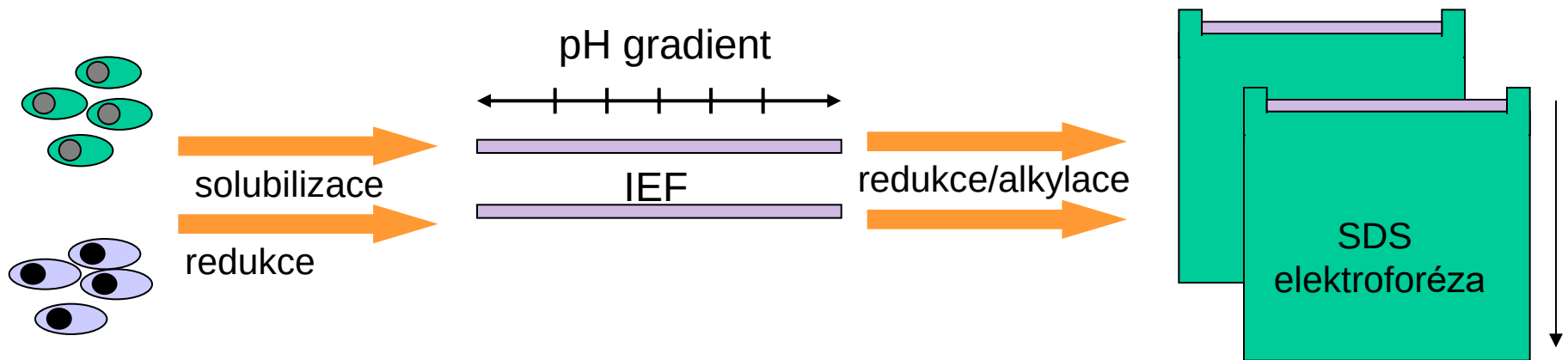
Thiol-disulfidová výměna DTT s proteinem

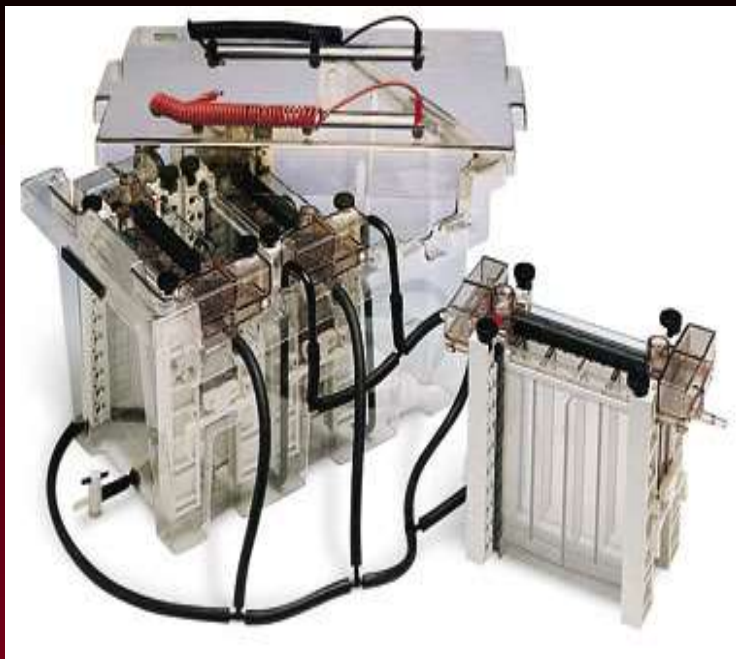


Alkylace cysteinů iodacetamidem

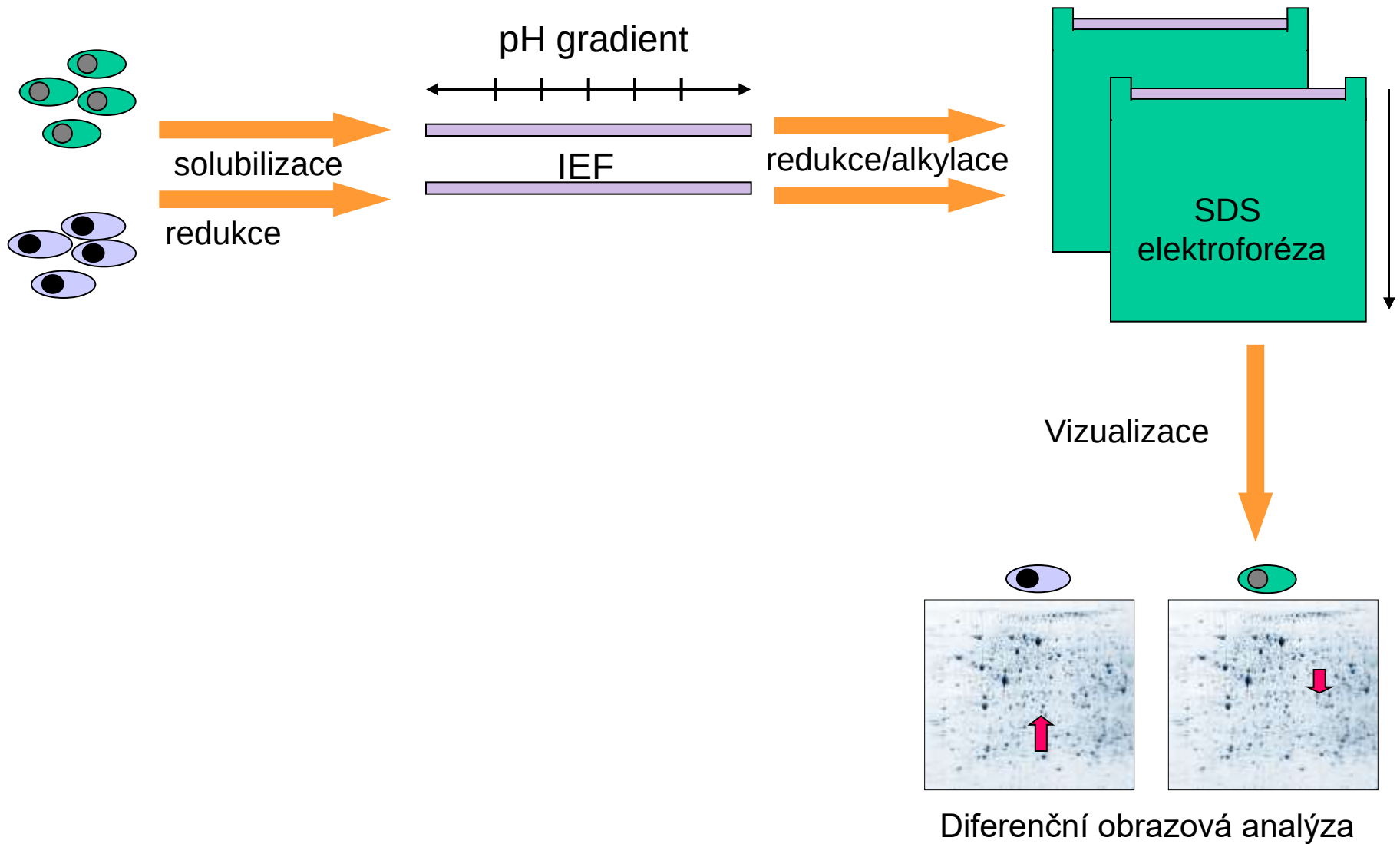


Typický 2-DE experiment

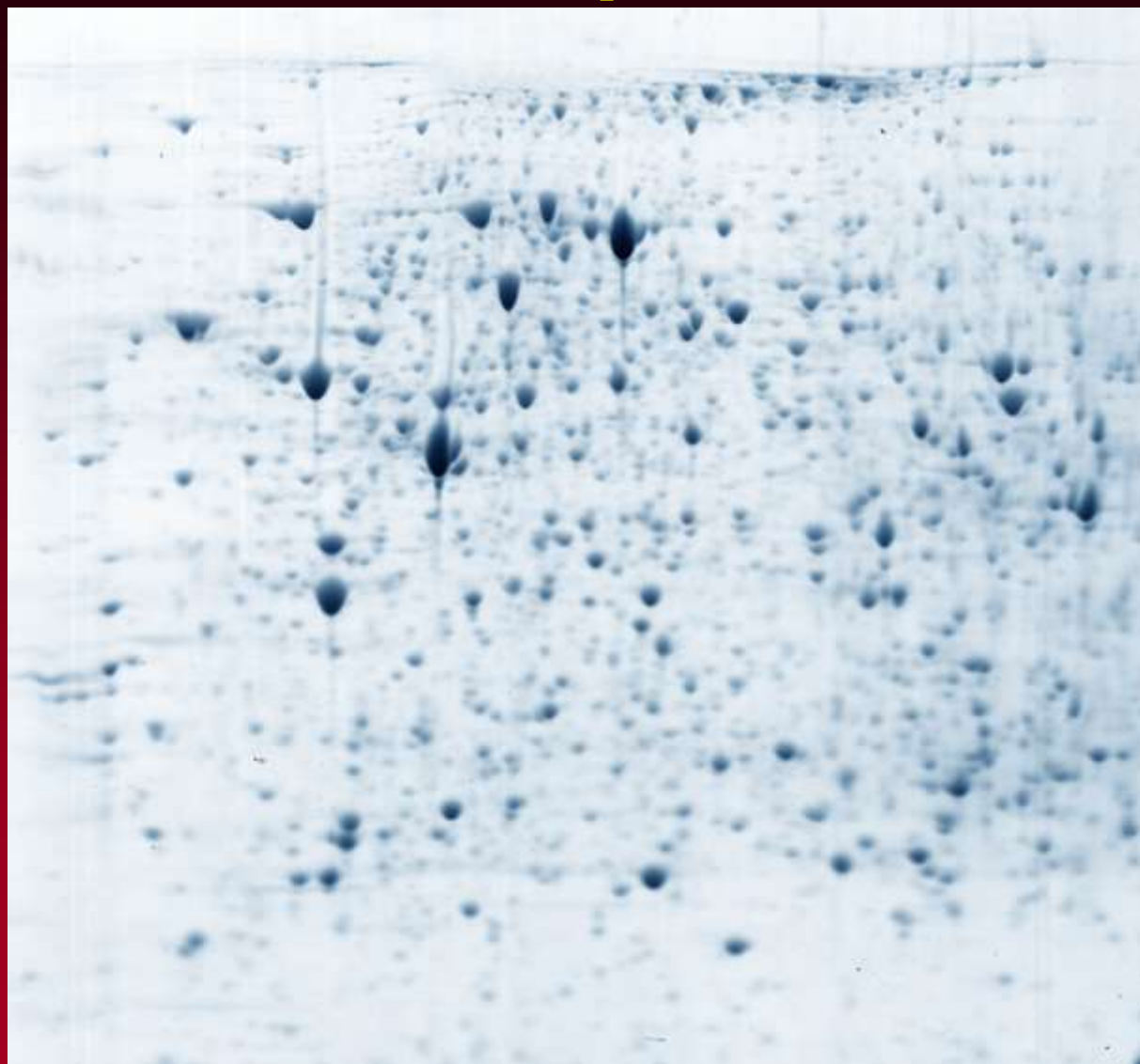




Typický 2-DE experiment



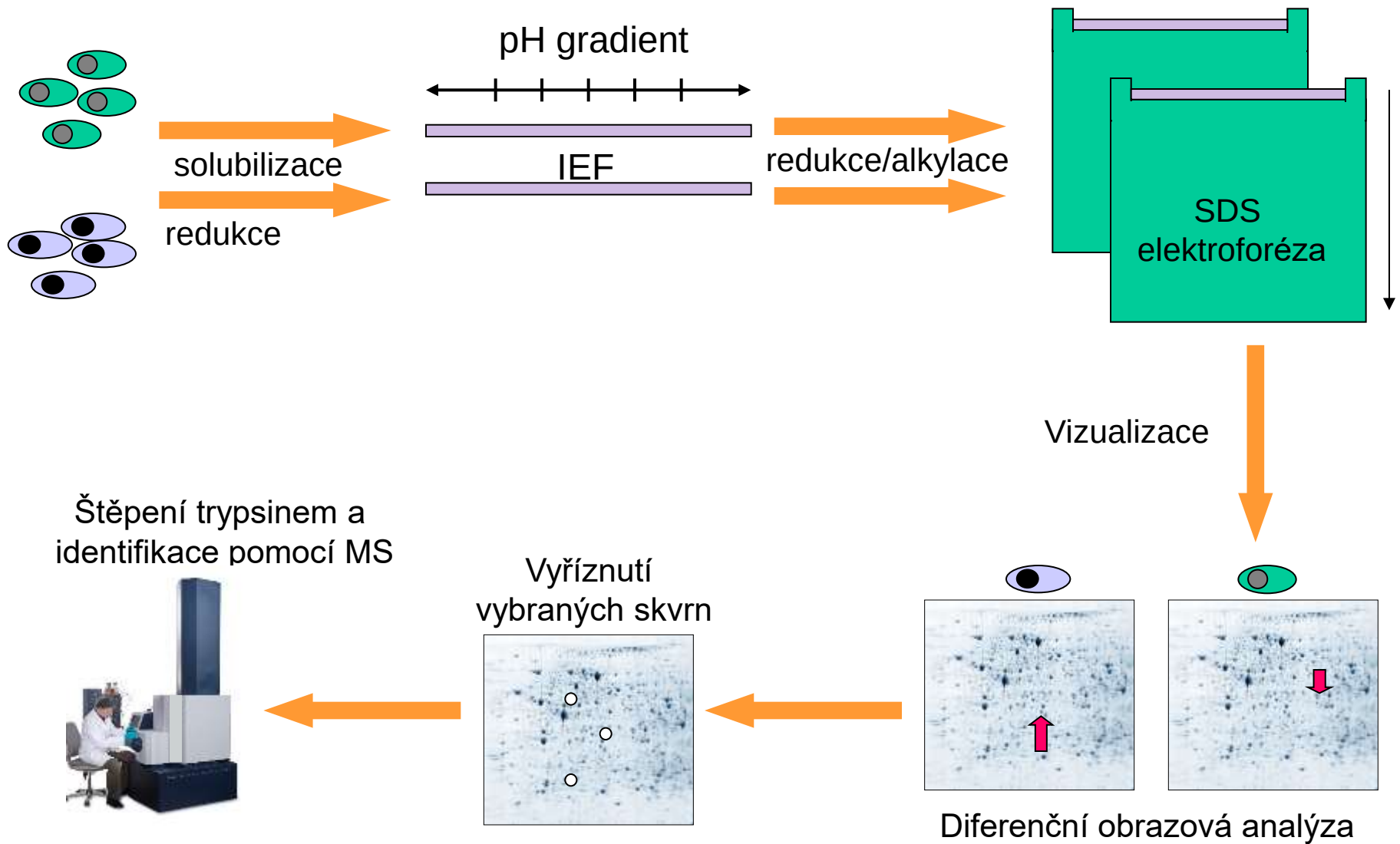
**Jaterní homogenát, preparativní nanáška 2 mg, barvení koloidní Coomassie Blue
1025 spotů**



pH 4

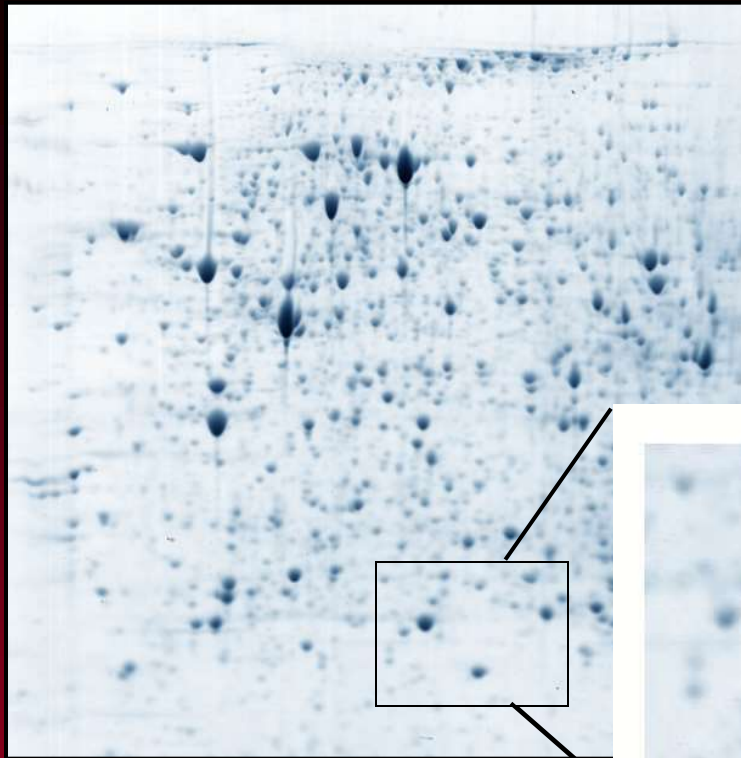
pH 7

Typický 2-DE experiment

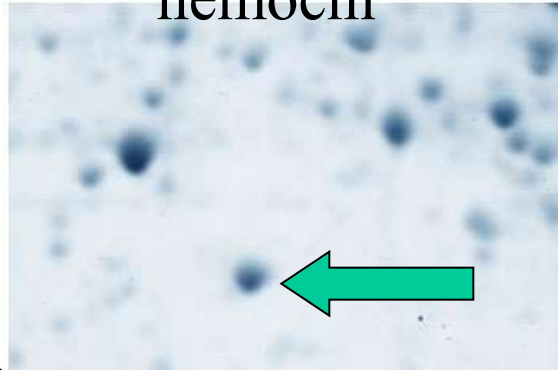


IDENTIFIKACE PROTEINU

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



nemocní



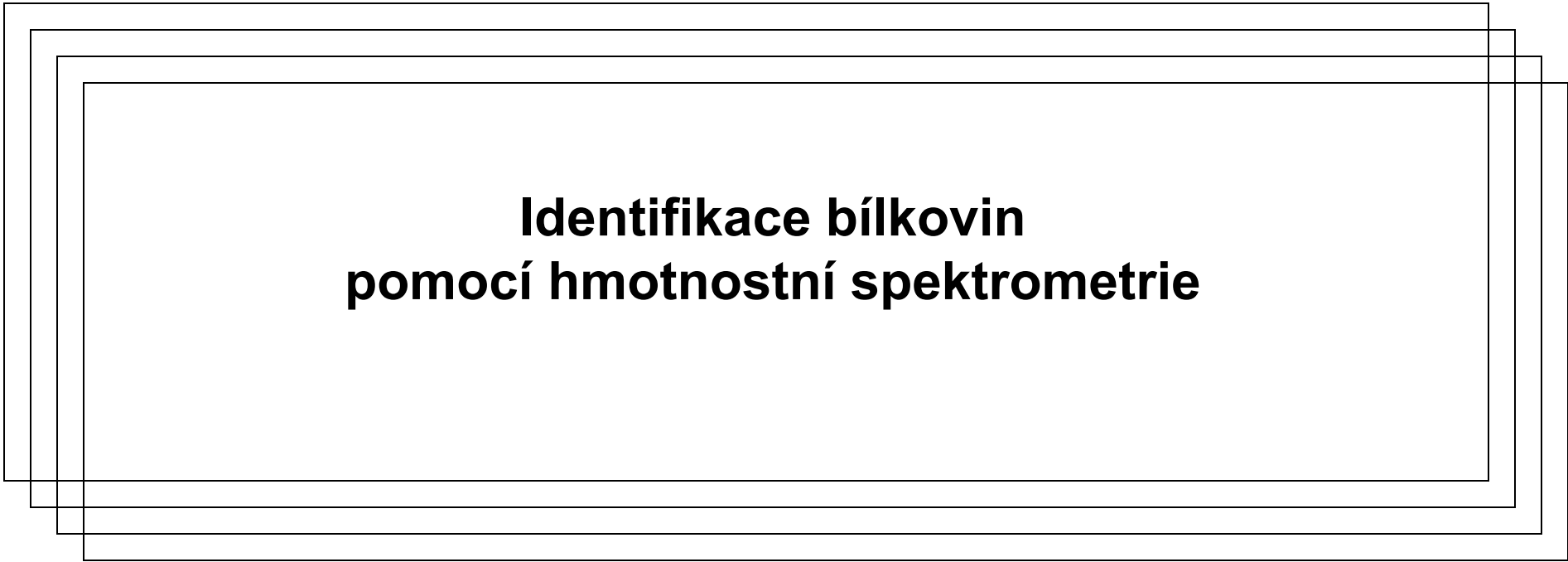
zdraví



Neznámý diferencially exprimovaný protein „XY“ (20 kDa)

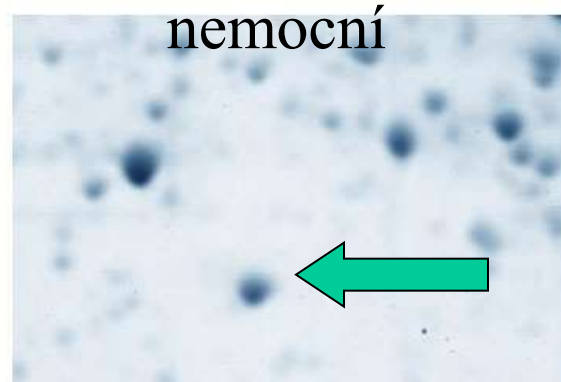
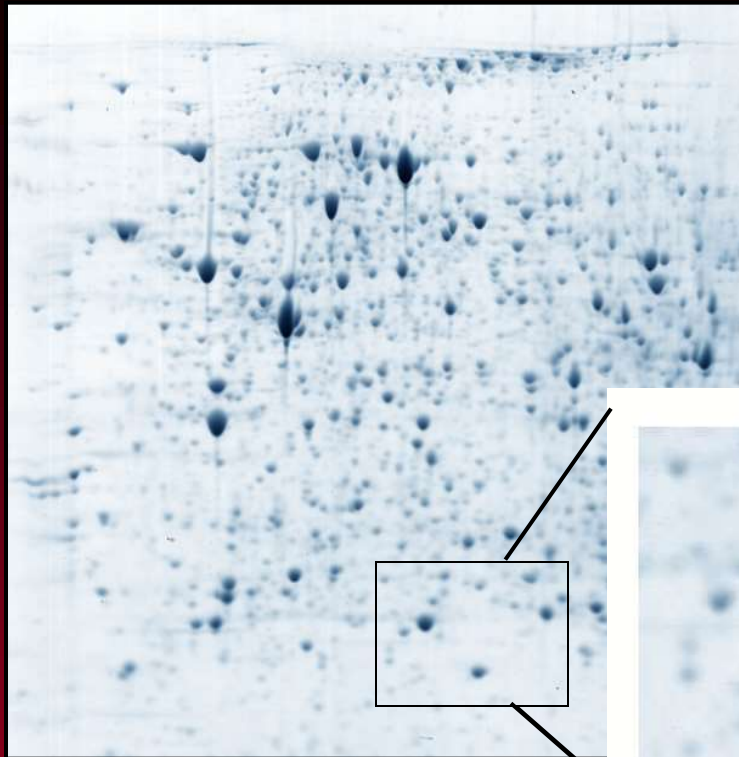


Identifikace s využitím hmotnostní spektrometrie



Identifikace bílkovin pomocí 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.

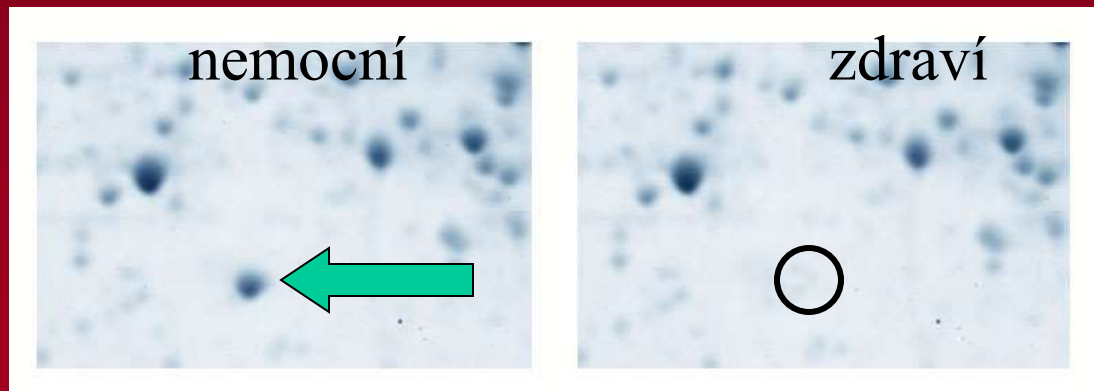
TRYPSIN

MW 23 kDa

z kravského nebo prasečího pankreatu
štěpí v mírně bazickém pH

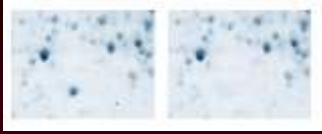
- 50 kDa protein → cca 30 peptidů
- Použití v roztoku, na blotu, v gelu

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



SSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEREG
YERLLKMQNQRGGRALFQD IKKPAEDEWGKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHAL
GSA RTDPHLCDFLETHFLDEEVKL 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

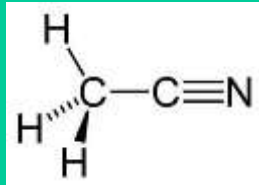
Extrakce PEPTIDŮ (ACN)

Čištění a koncentrace

**MS analýza
a identifikace**

KERATIN !!!

Acetonitril
(ACN, MeCN)

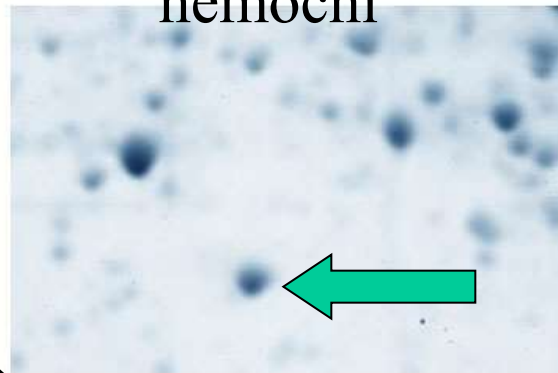


- nesráží proteiny/peptidy
- neabsorbuje v UV
- má nízkou viskozitu
- kompatibilní s RP-LC

Identifikace diferenciálně exprimovaného proteinu



nemocní



zdraví



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

SSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAAEKREGYERLLK
MQNQRGGRALFQD IKKPAEDEWGKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHAL
GSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKL IKKMGDHLTNLHRLGGPEAG LGEYLFERLT LKHD

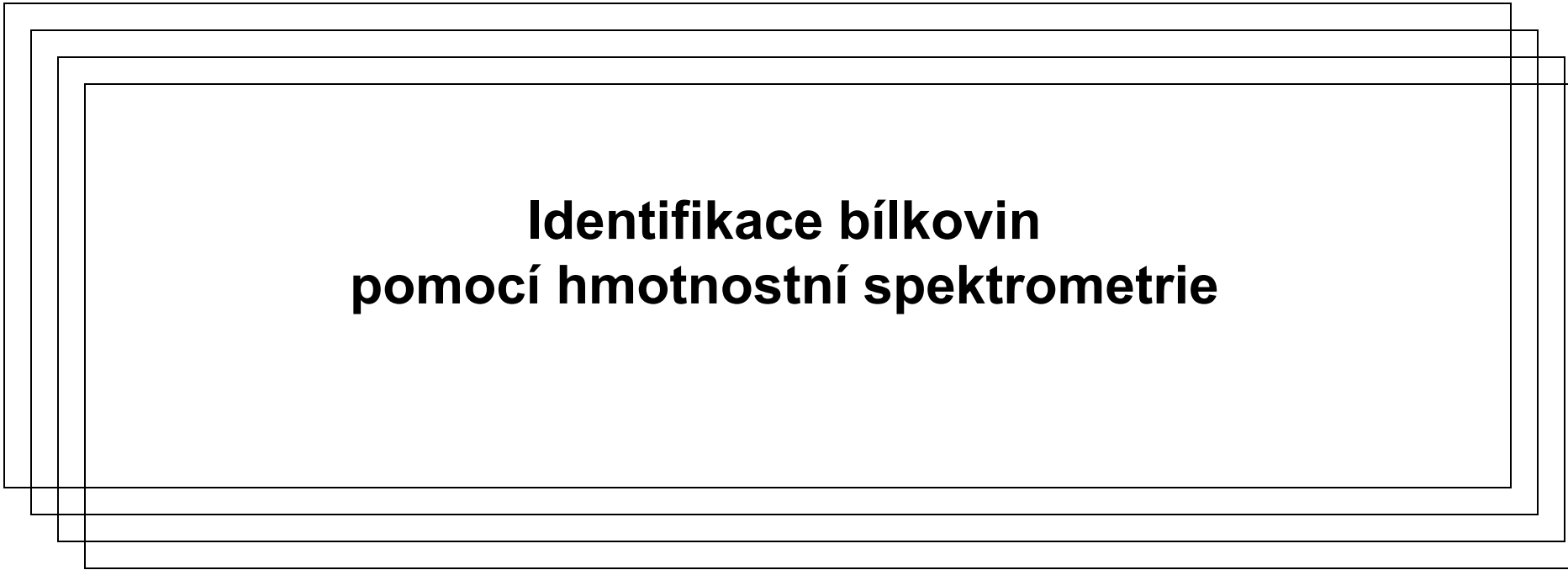


Extrakce směsi peptidů z gelu

In-gel štěpení trypsinem (za R a K)

LL**K** (373.280)
L**IK** (373.280)
LT**LK** (474.328)
SSQ**IR** (590.327)
EGY**ER** (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)

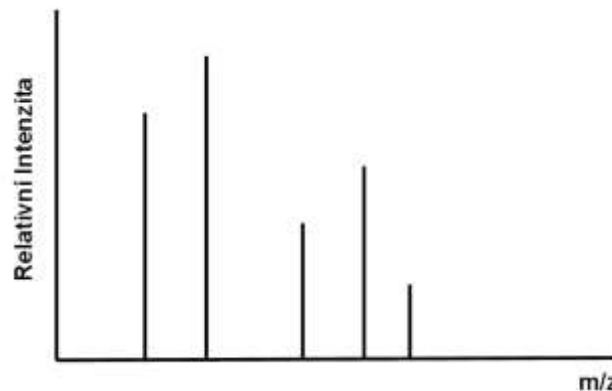




Identifikace bílkovin pomocí hmotnostní spektrometrie

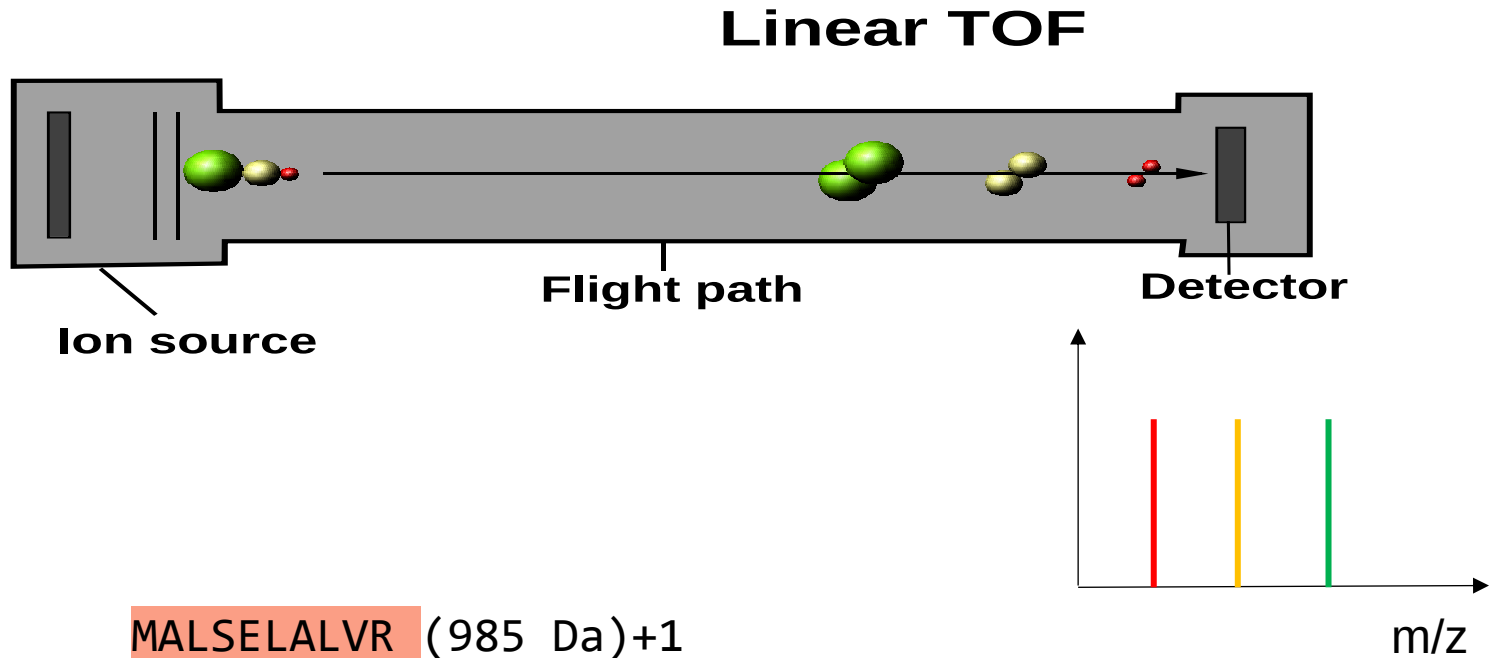
Identifikace bílkovin pomocí hmotnostní spektrometrie (MS)

- 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.

MASS ANALYZER TIME OF FLIGHT (TOF)



MALSELALVR (985 Da)+1

WLQESRRSRKLILFIVFLA (2038 Da)+1

LDNMLLTVVVPIIPSYLYSIKHEKNATEIQTARPVHTSI (3145 Da)+1

Identifikace bílkovin pomocí hmotnostní spektrometrie (MS)

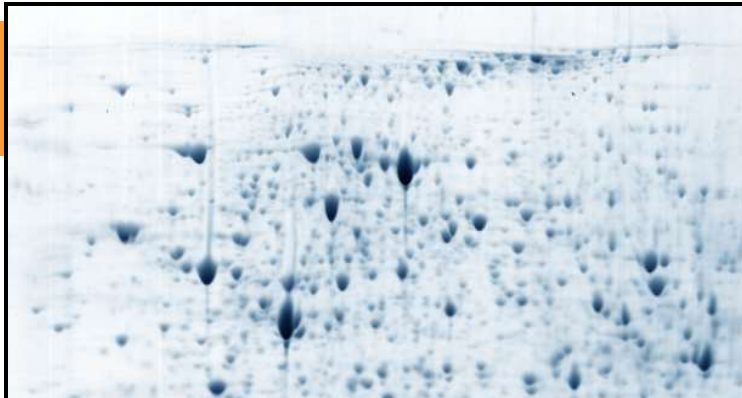
Peptidové mapování (Peptidový fingerprinting)

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

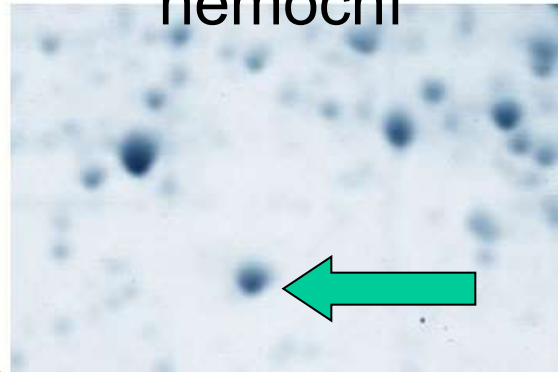
Fragmentace peptidů/sekvenování (MS/MS)

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

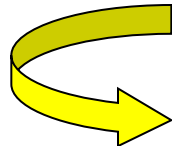


zdraví



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

SSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEREG
YERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDEWGTKPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHAL
GSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKL IKKMGDHLTNLHRLGGPEAG LGEYLFERLT LKHD



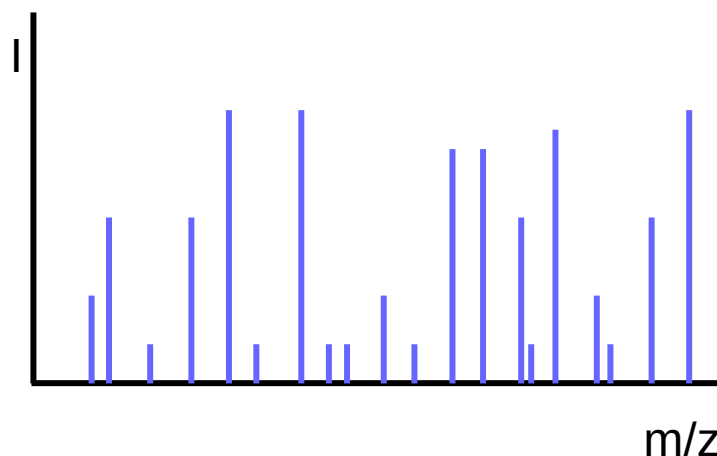
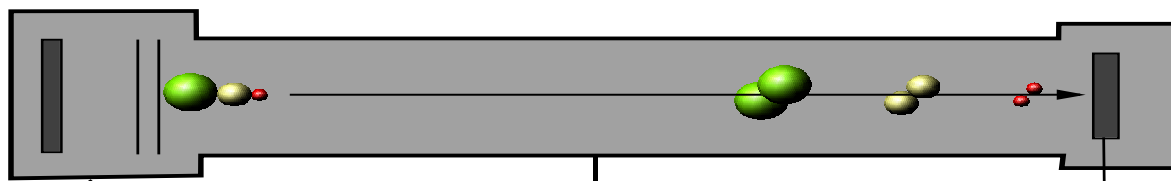
Extrakce směsi peptidů z gelu

Peptidové mapování (Peptidový fingerprinting)

LLK (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)
KPAEDEWGK (1059.510)
MGDHLTNLHR (1079.54)
DDVALEGVSHFFR (1491.722)
LNQALLDLHALGSAR (1591.891)
LGGPEAGLGEYLFER (1607.806)
TDPHLCDFLETHFLDEEVK (2288.054)
QNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFD R (3924.897)

Peptidové mapování (Peptidový fingerprinting)

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



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

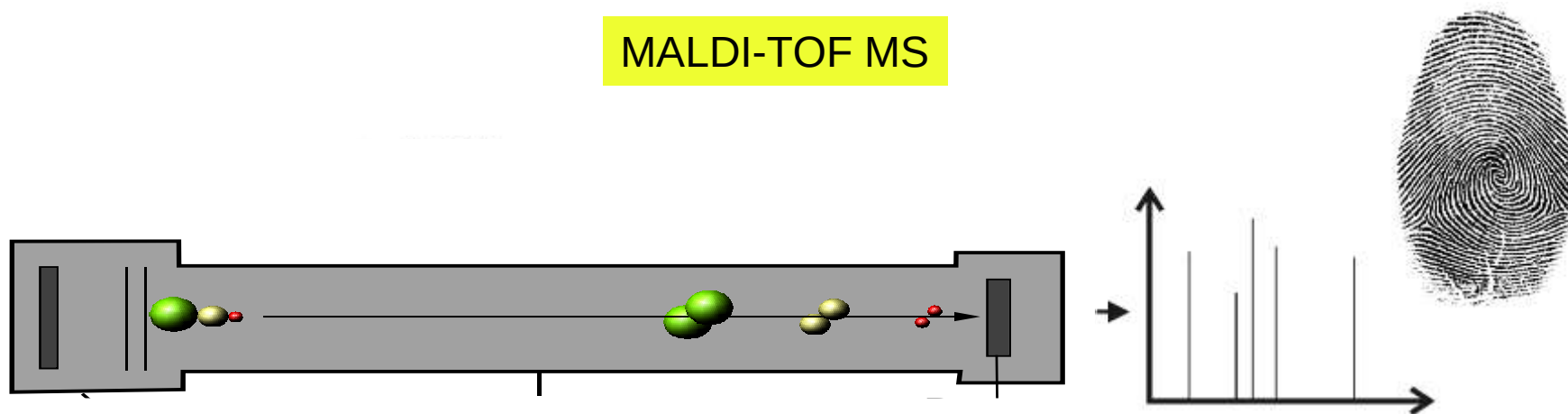
MS data

Masses/MWs of
peptides



Peptidové mapování (Peptidový fingerprinting)

MALDI-TOF MS



Přesné hmotnosti
peptidů

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

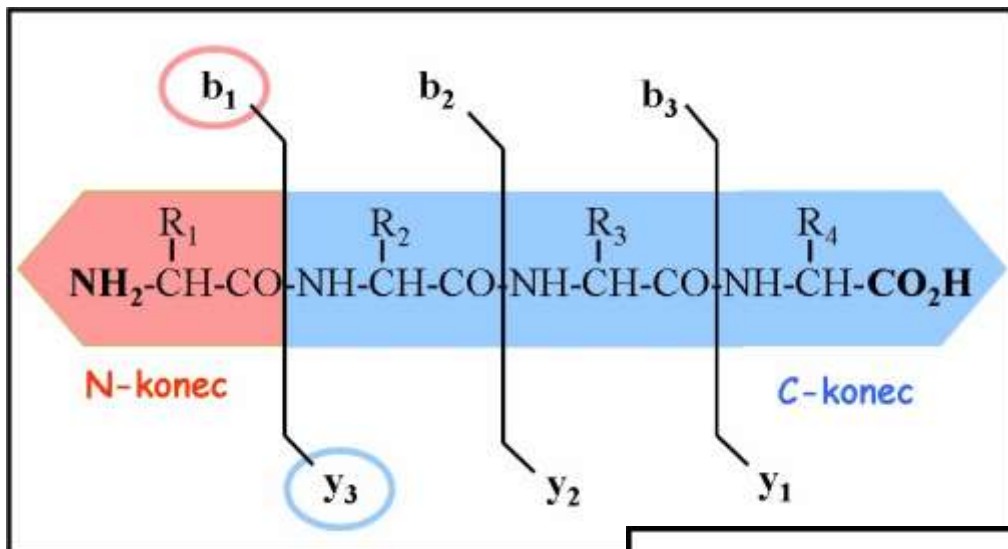
Peptidové mapování (Peptidový fingerprinting)

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



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

$\text{MH}^+ = 1410.6$

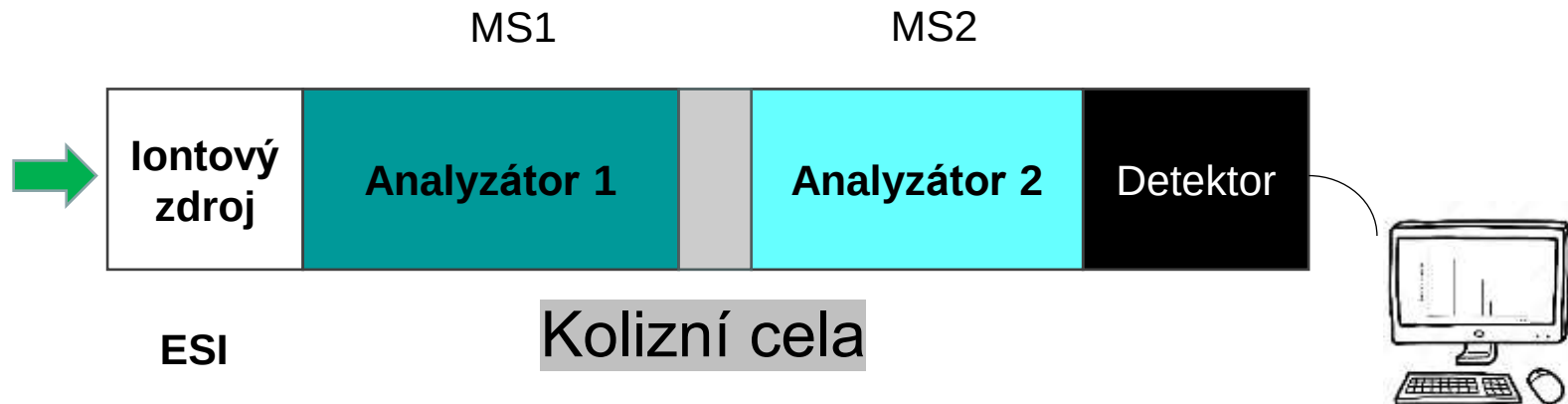
b-ions⁺

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⁺

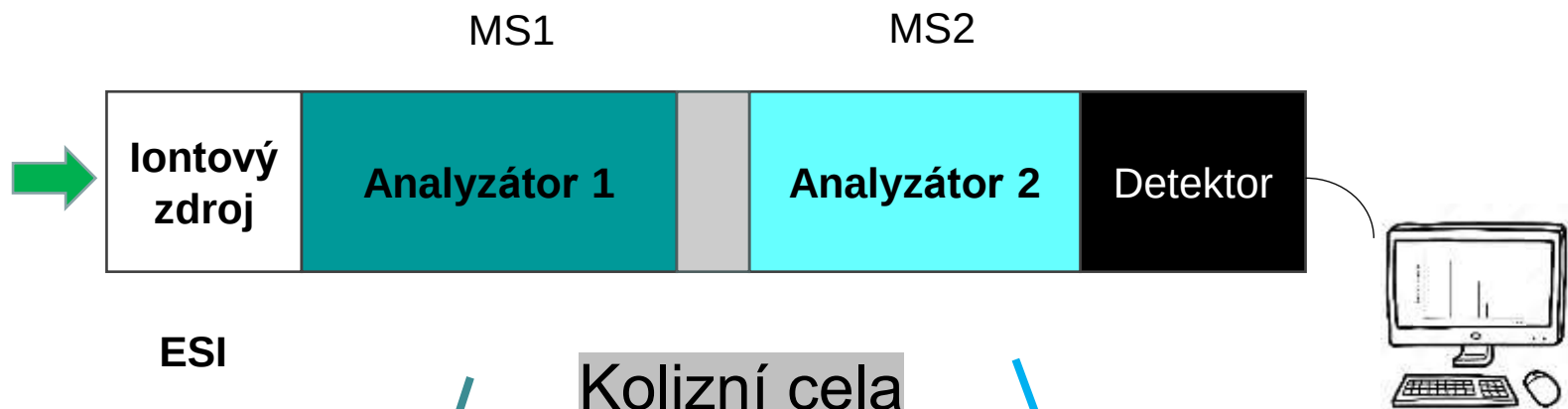


PROTEIN IDENTIFICATION BY TANDEM MASS SPECTROMETRY (MS/MS)



Běžné analyzátory:

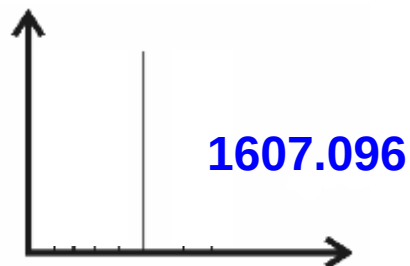
TOF
quadrupole
ion trap
orbital ion trap
FT-ICR



ESI

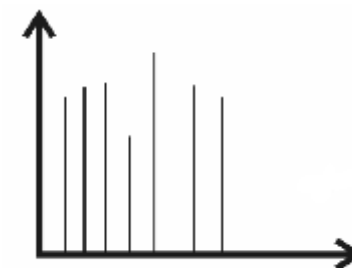
Kolizní cela

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

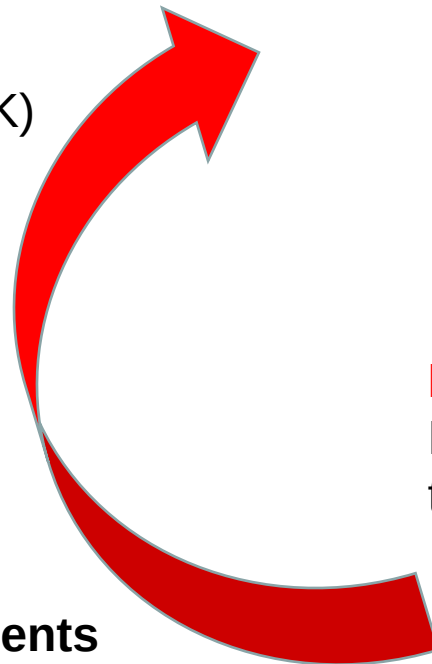


theoretical MWs of peptide fragments

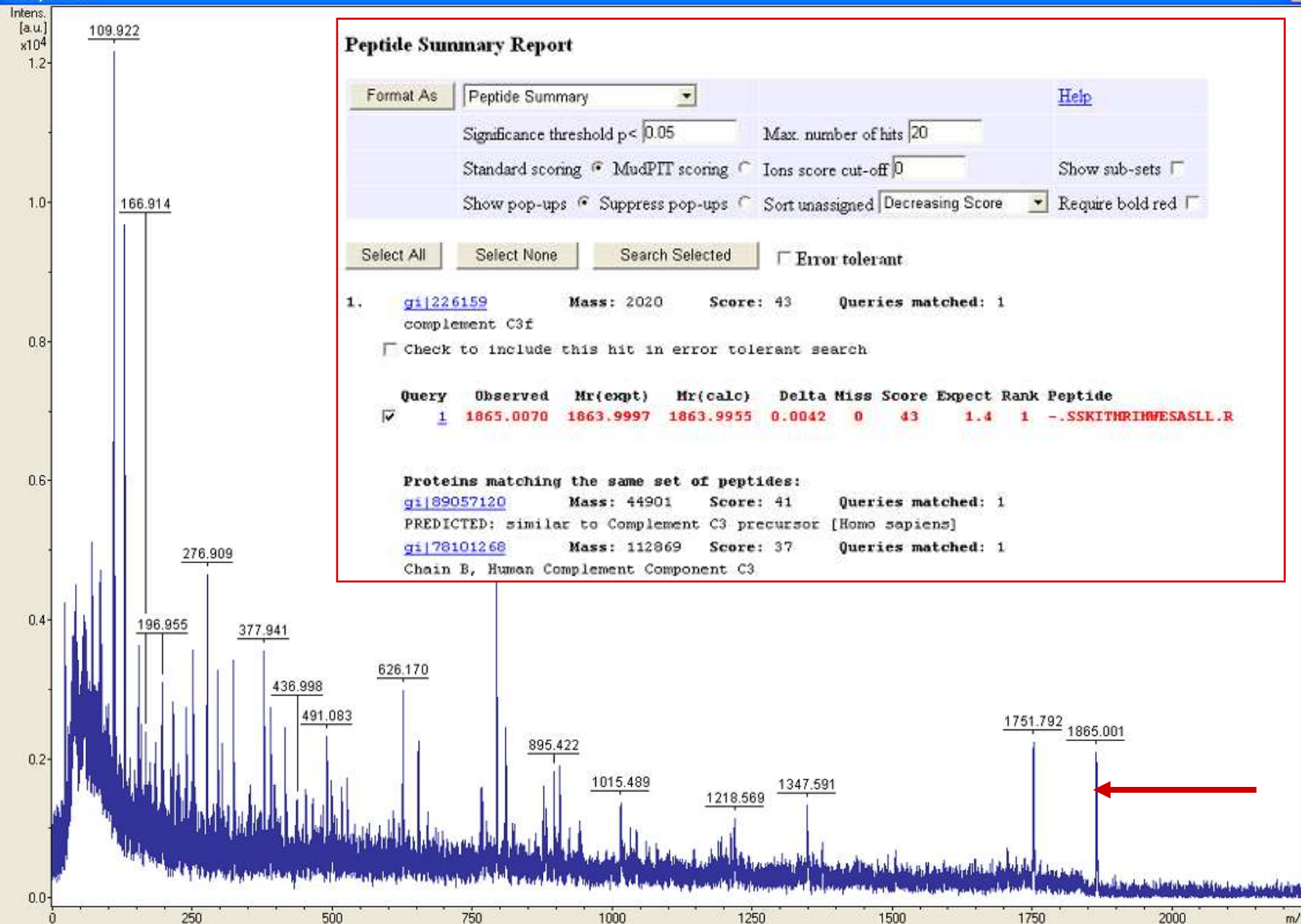
Gene/Protein identification

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. [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
☒ 1	1865.0070	1863.9997	1863.9955	0.0042	0	43	1.4	1	-.SSKITHRIHWESALL.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)

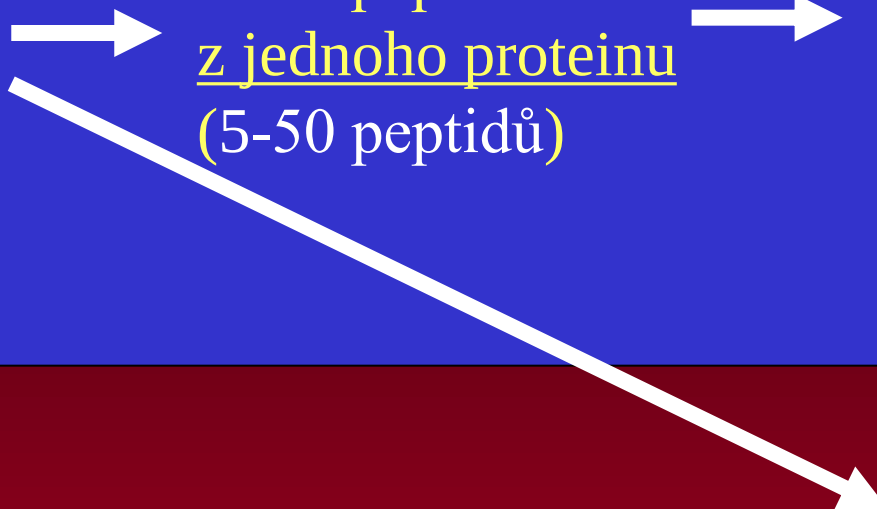
MS
(PMF)

Směs proteinů

Směs peptidů
z mnoha proteinu
(300-10⁶ peptidů)

MS/MS
(fragmentace)

chromatografická
separace



Current proteomic workflow LC-MS/MS



proteins



trypsin...

peptides



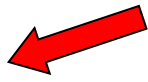
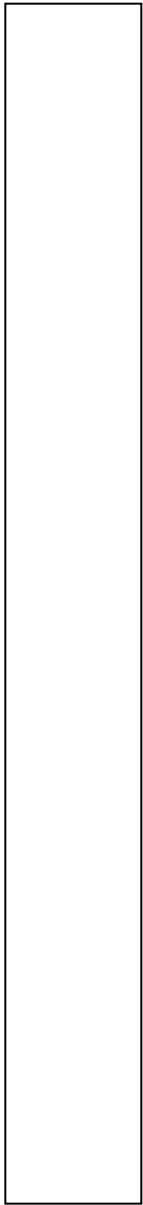
Micro or nano-LC
1D or 2D



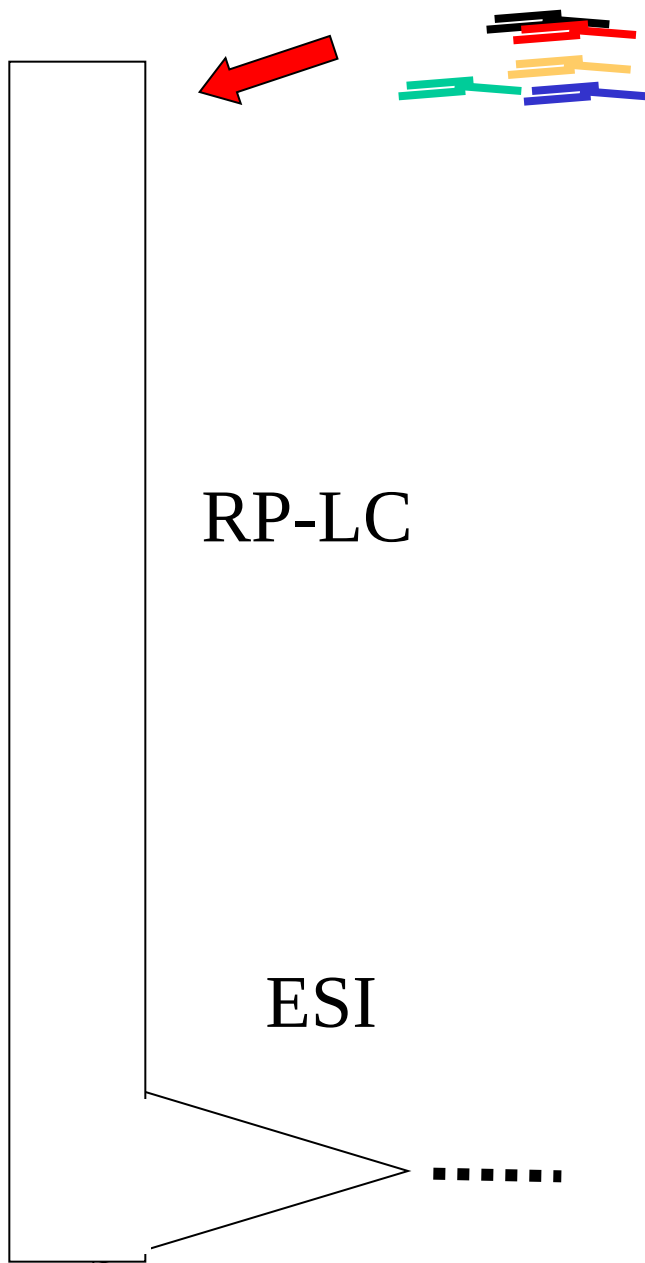
Mass spectrometry

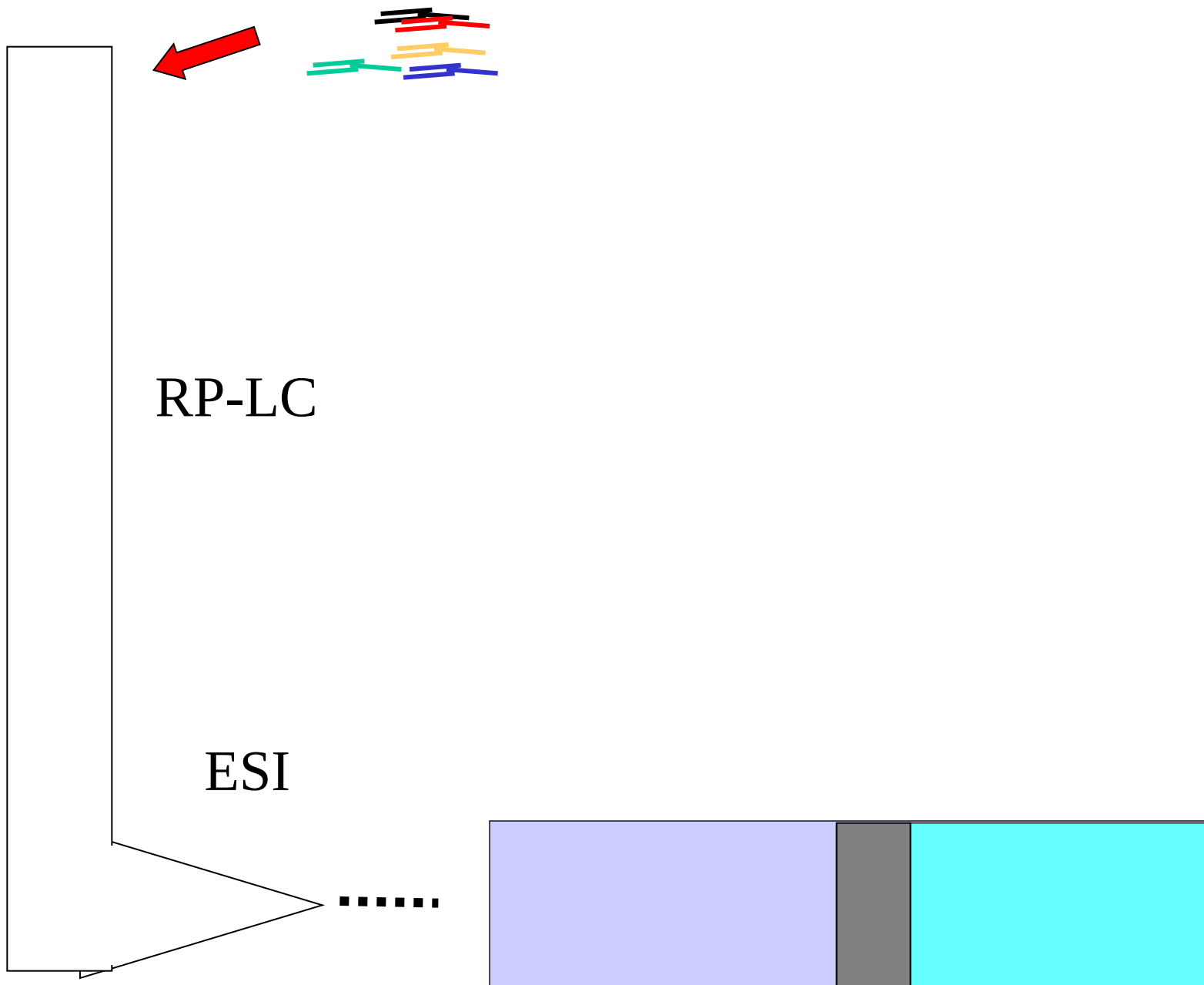


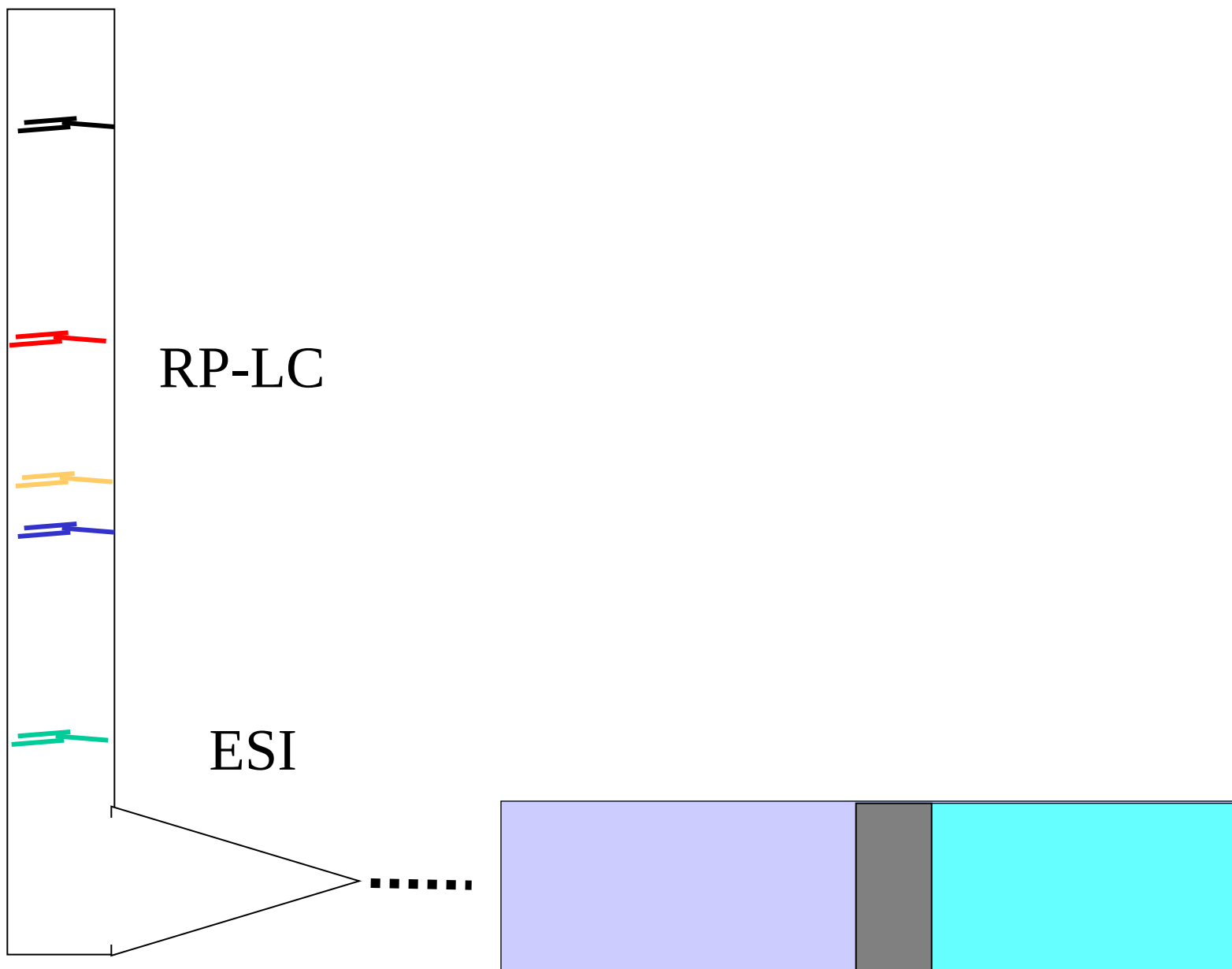
**Peptide/protein
identification and quantification**

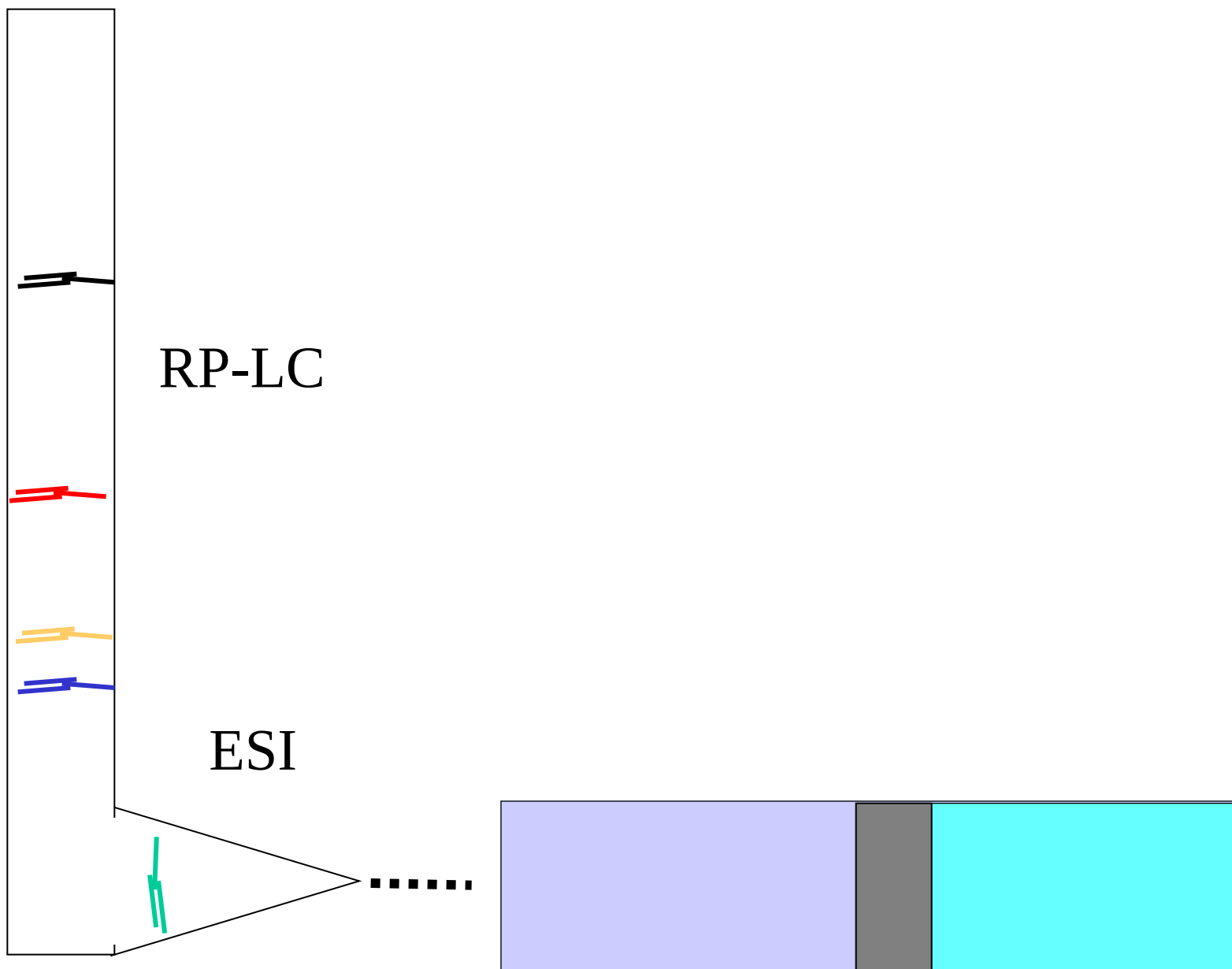


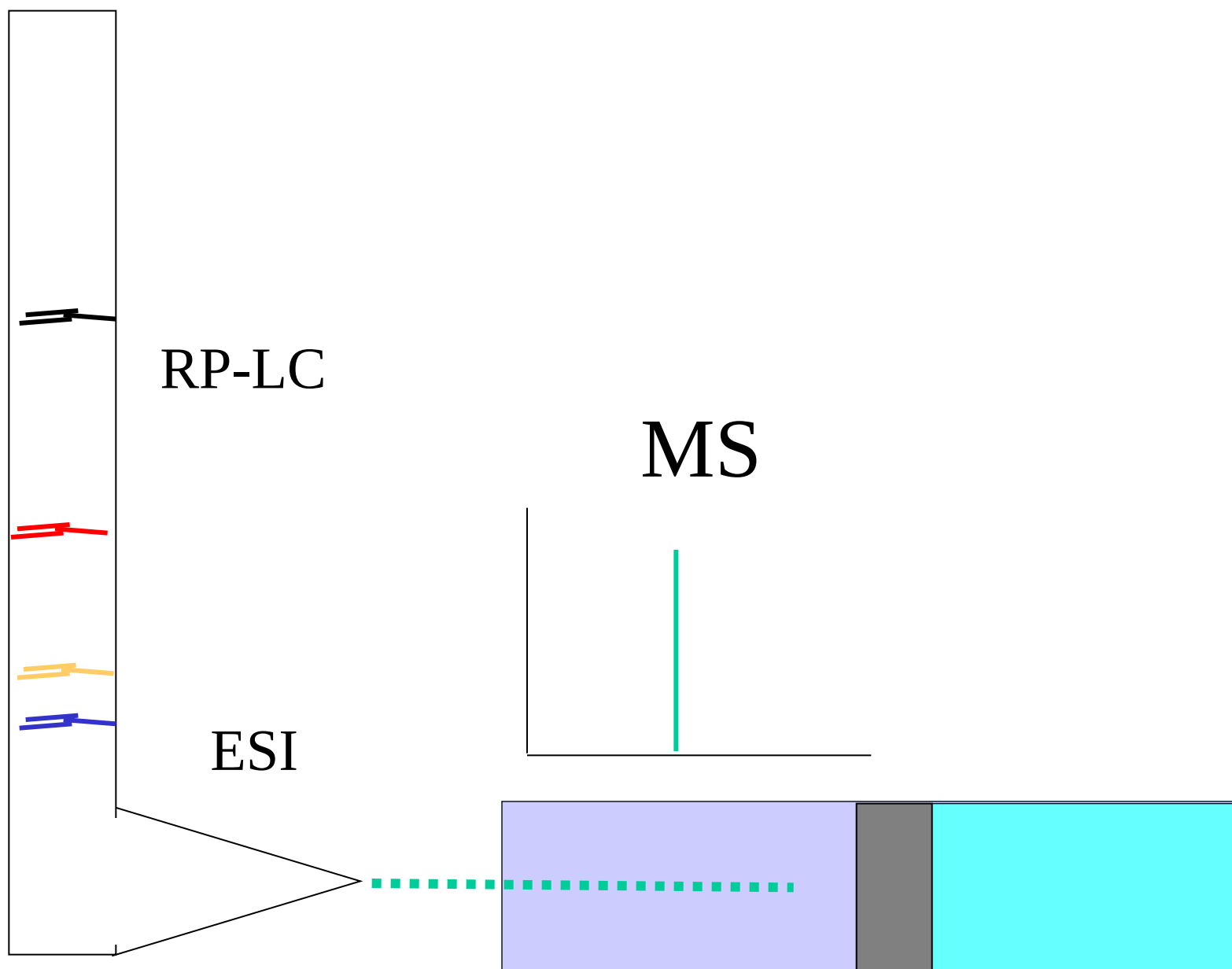
RP-LC

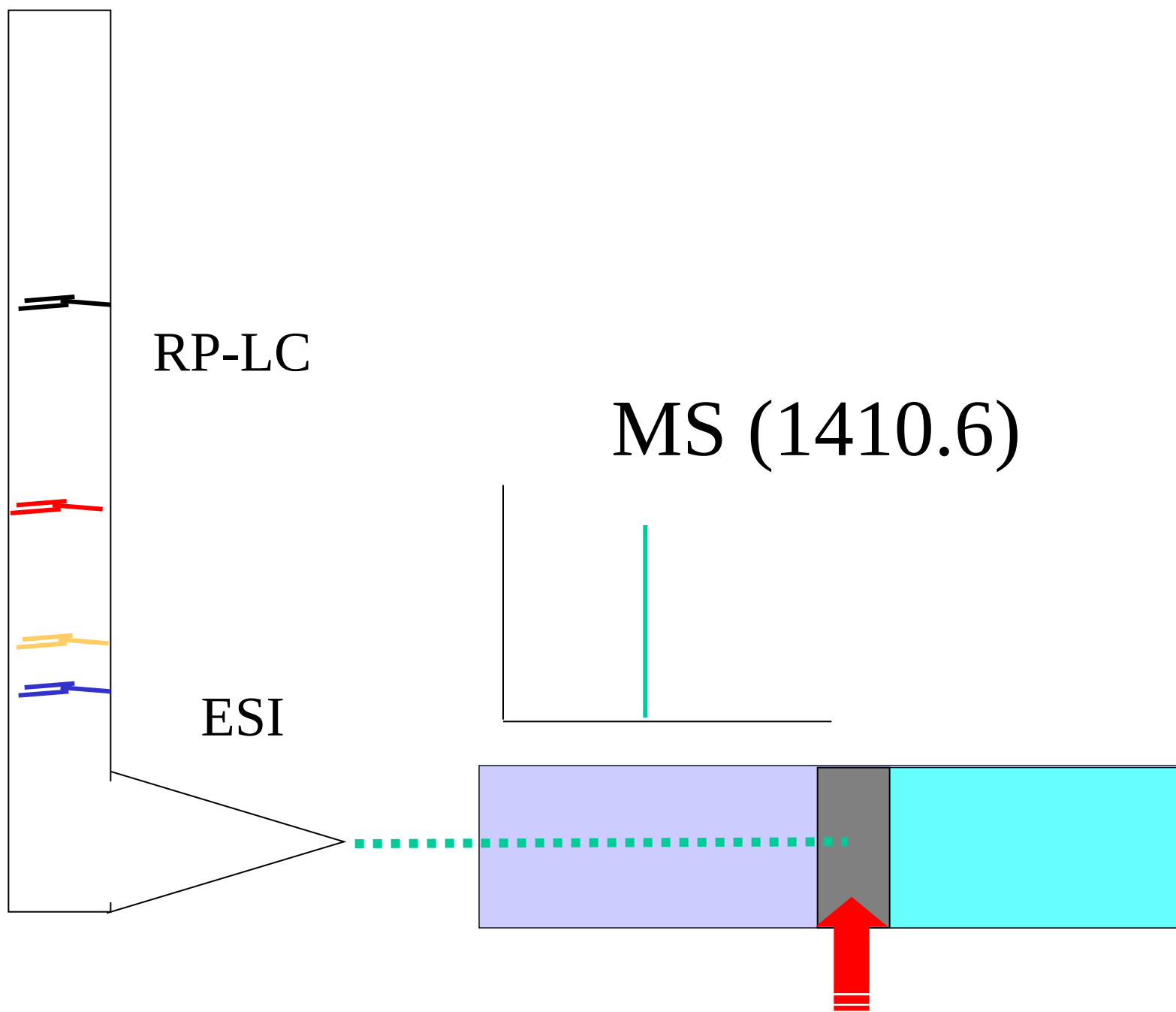








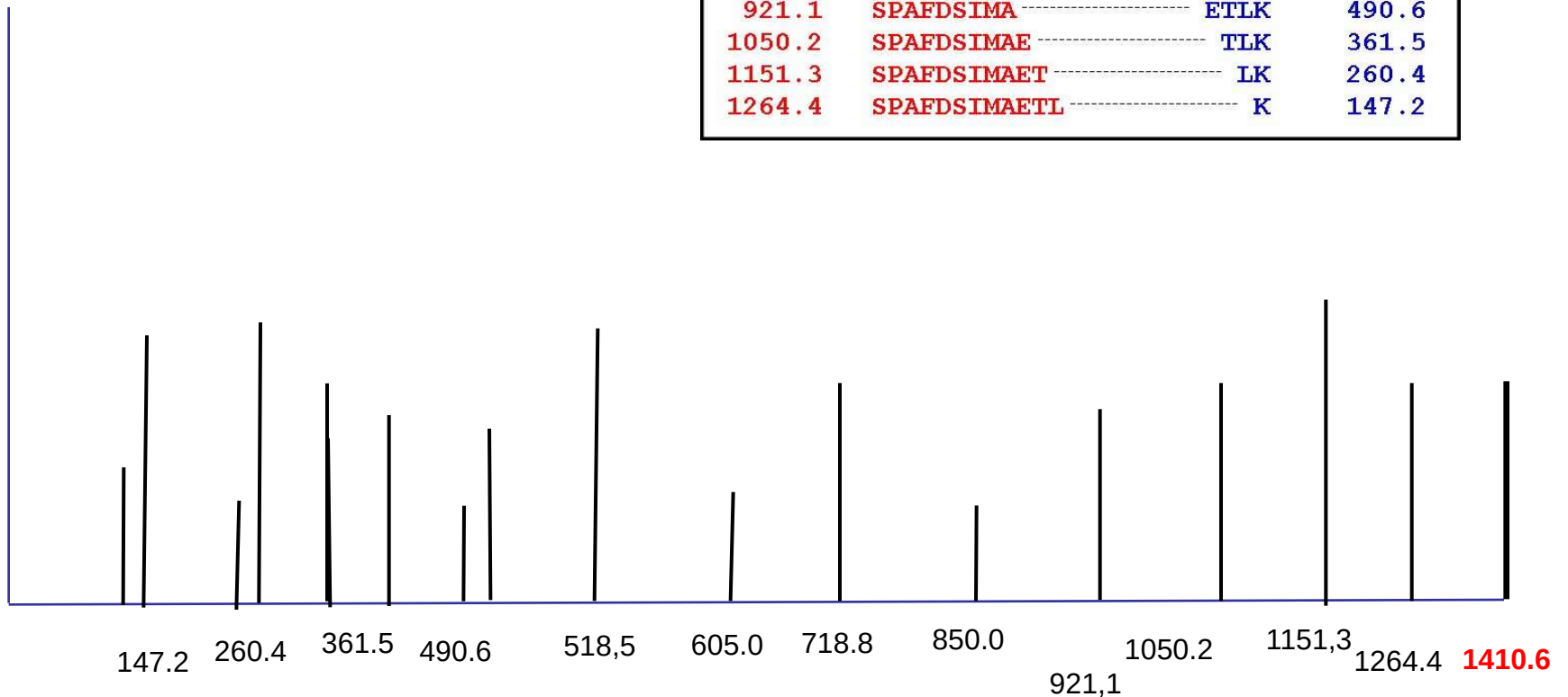




S-P-A-F-D-S-I-M-A-E-T-L-K

$MH^+ = 1410.6$

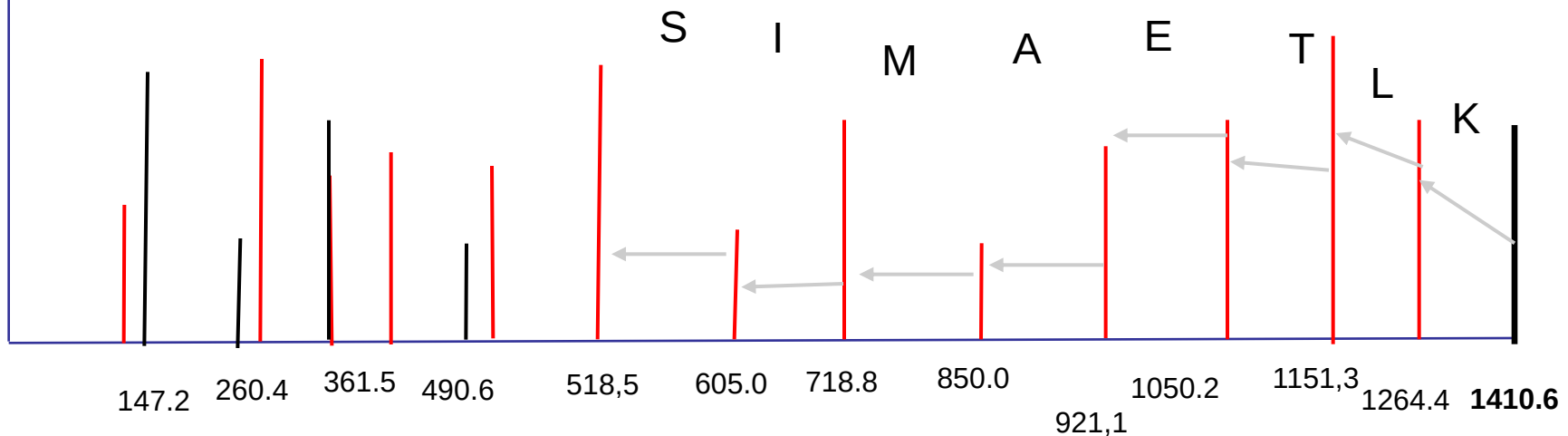
<u>b-ions⁺</u>		<u>y-ions⁺</u>
88.1	S -----	PAFDSIMAETLK 1323.6
185.2	SP -----	AFDSIMAETLK 1226.4
256.3	SPA -----	FDSIMAETLK 1155.4
403.5	SPAF -----	DSIMAETLK 1008.2
518.5	SPAFD -----	SIMAETLK 893.1
605.6	SPAFDS -----	IMAETLK 806.0
718.8	SPAFDSI -----	MAETLK 692.3
850.0	SPAFDSIM -----	AETLK 561.7
921.1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

$MH^+ = 1410.6$

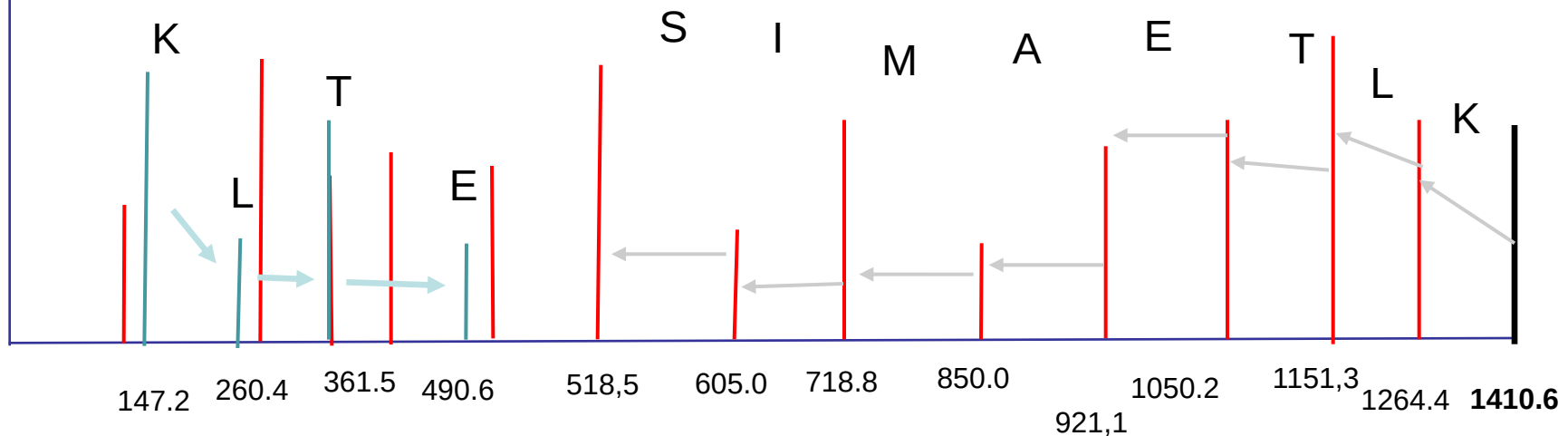
<u>b-ions⁺</u>		<u>y-ions⁺</u>
88.1	S ----- PAFDSIMAETLK	1323.6
185.2	SP ----- AFDSIMAETLK	1226.4
256.3	SPA ----- FDSIMAETLK	1155.4
403.5	SPAF ----- DSIMAETLK	1008.2
518.5	SPAFD ----- SIMAETLK	893.1
605.6	SPAFDS ----- IMAETLK	806.0
718.8	SPAFDSI ----- MAETLK	692.3
850.0	SPAFDSIM ----- AETLK	561.7
921.1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



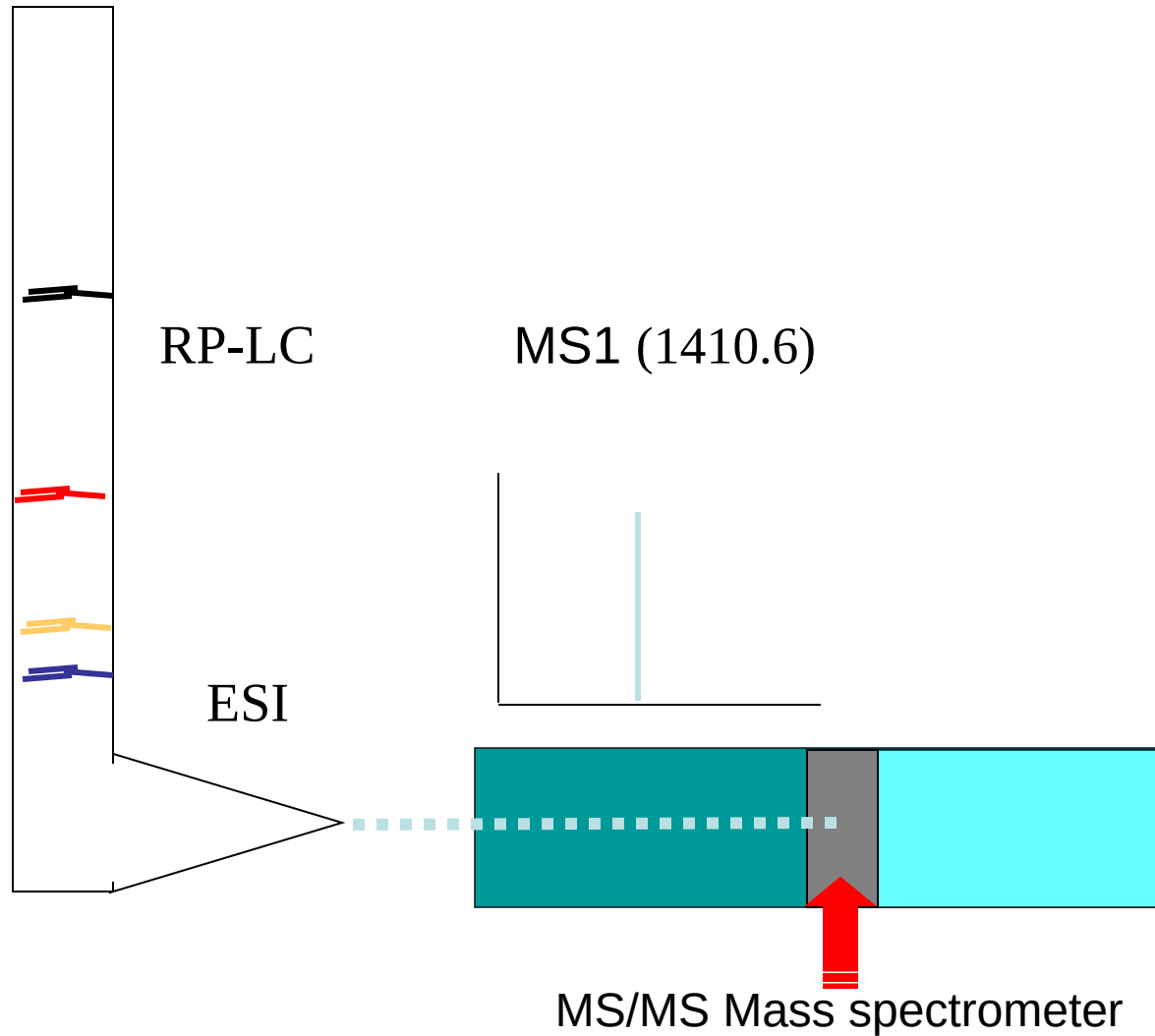
S-P-A-F-D-S-I-M-A-E-T-L-K

$MH^+ = 1410.6$

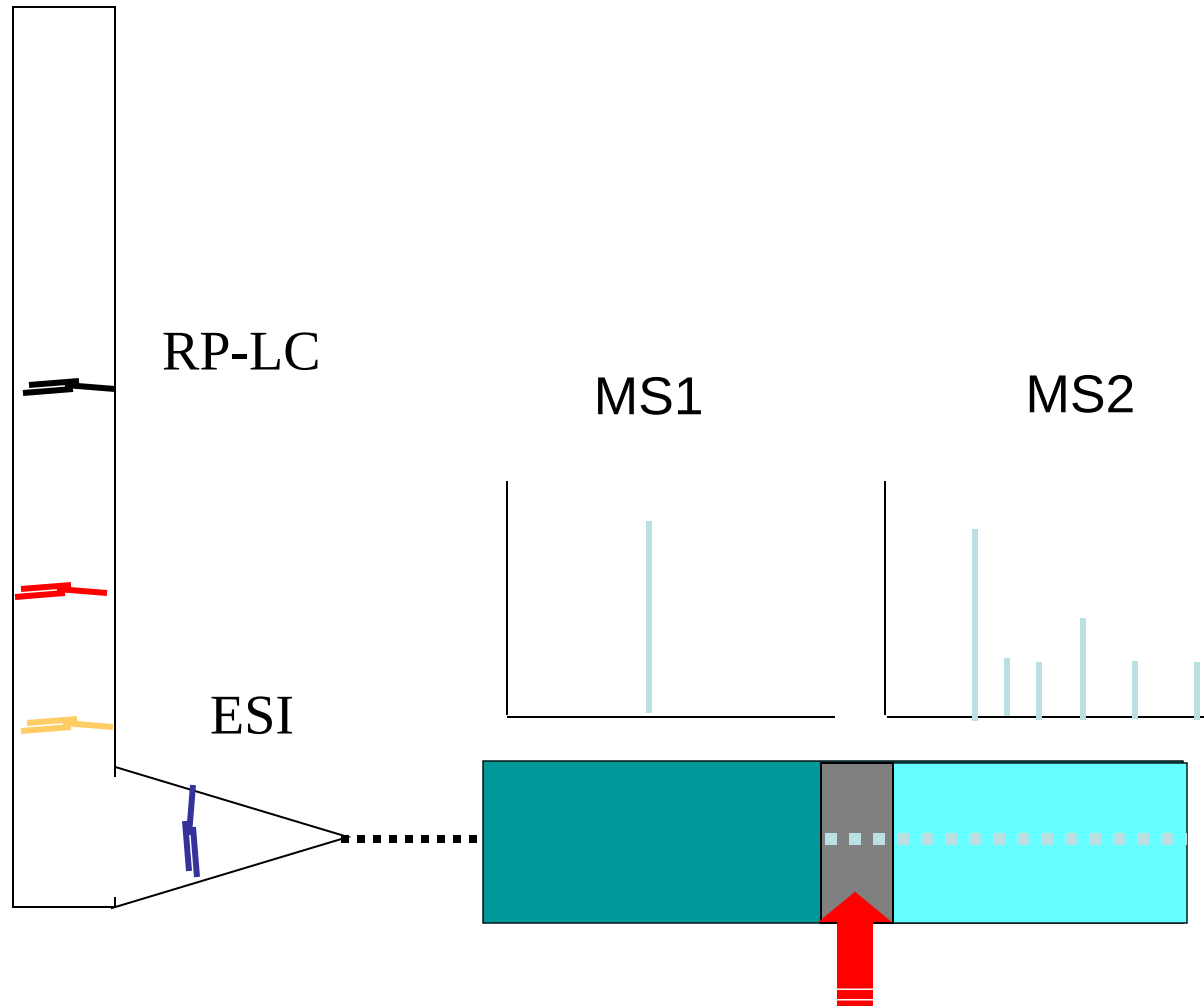
<u>b-ions⁺</u>		<u>y-ions⁺</u>
88.1	S ----- PAFDSIMAETLK	1323.6
185.2	SP ----- AFDSIMAETLK	1226.4
256.3	SPA ----- FDSIMAETLK	1155.4
403.5	SPAF ----- DSIMAETLK	1008.2
518.5	SPAFD ----- SIMAETLK	893.1
605.6	SPAFDS ----- IMAETLK	806.0
718.8	SPAFDSI ----- MAETLK	692.3
850.0	SPAFDSIM ----- AETLK	561.7
921.1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



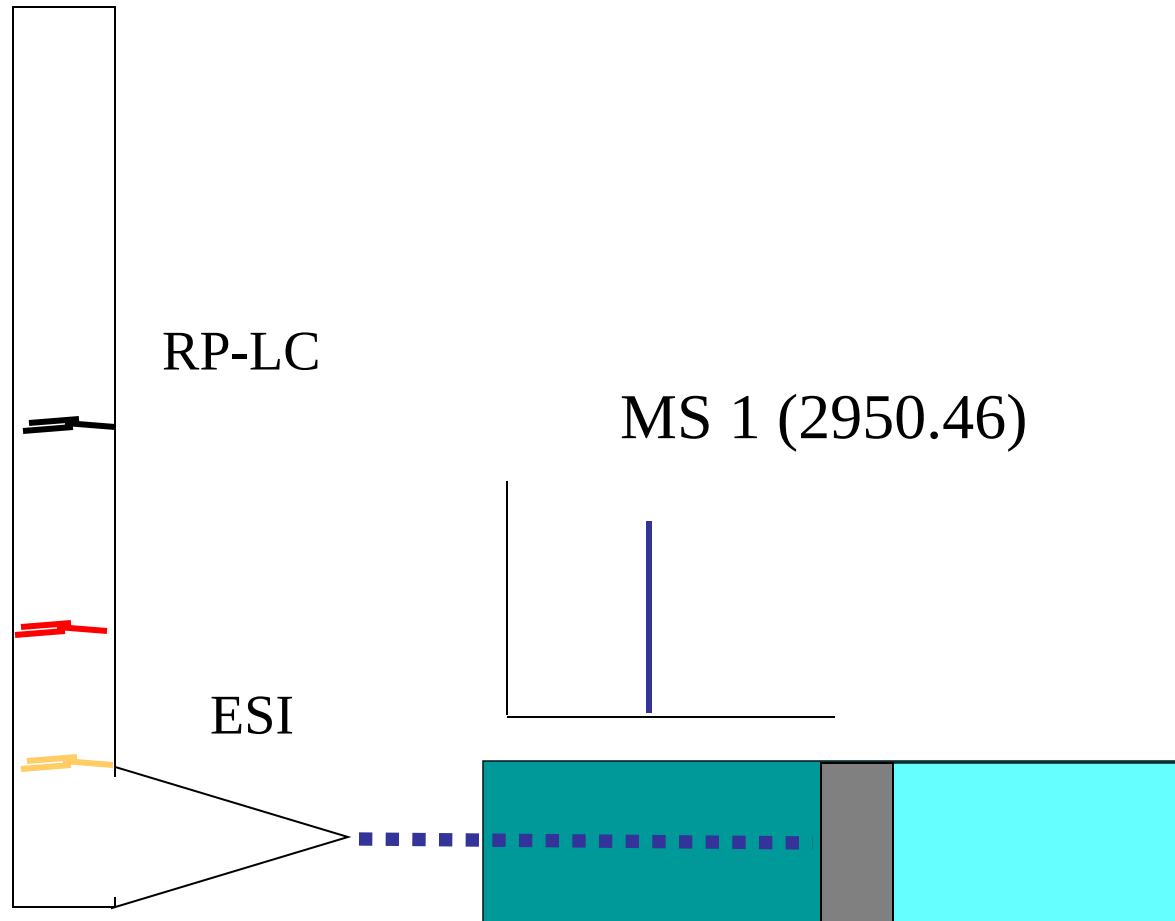
LC-MS/MS



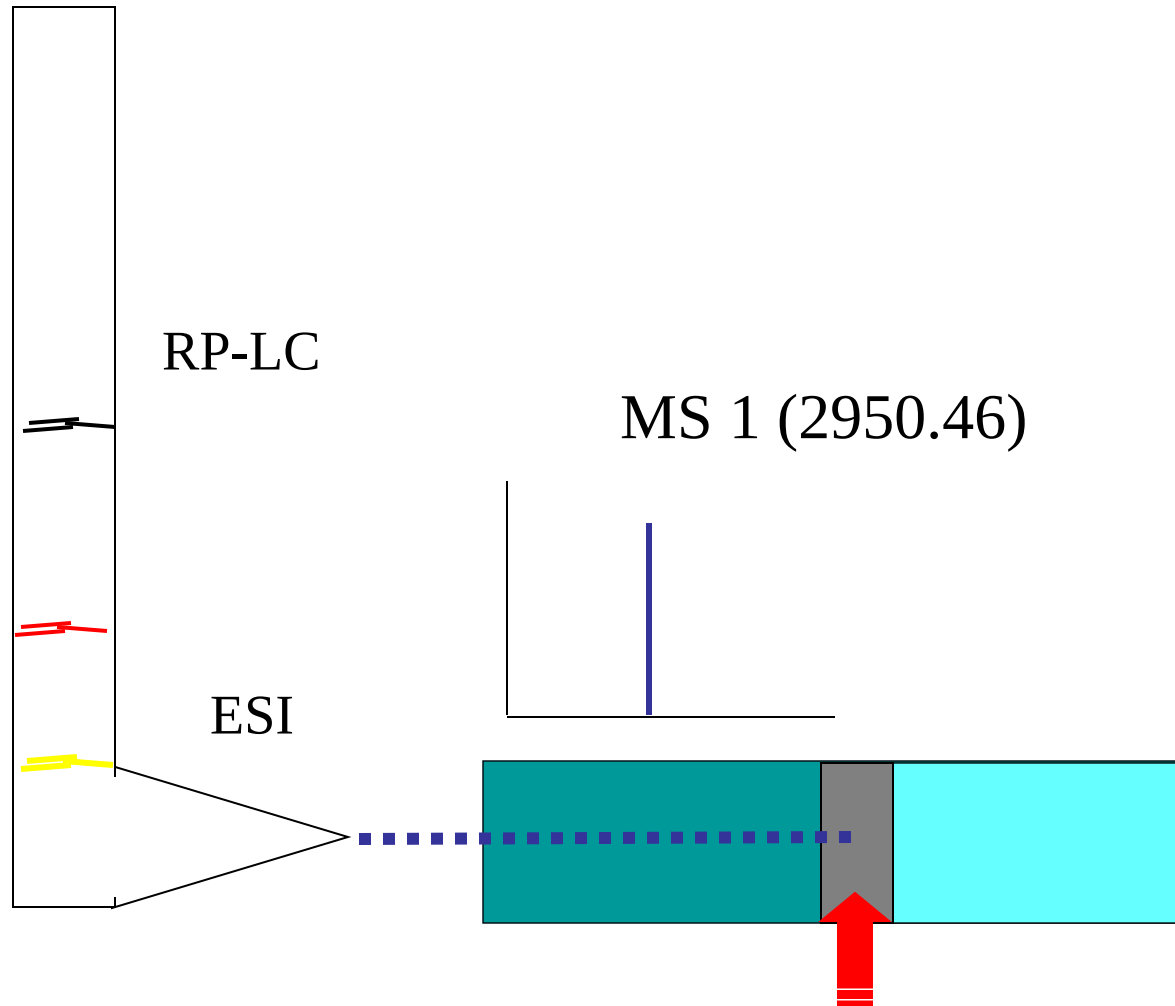
LC-MS/MS



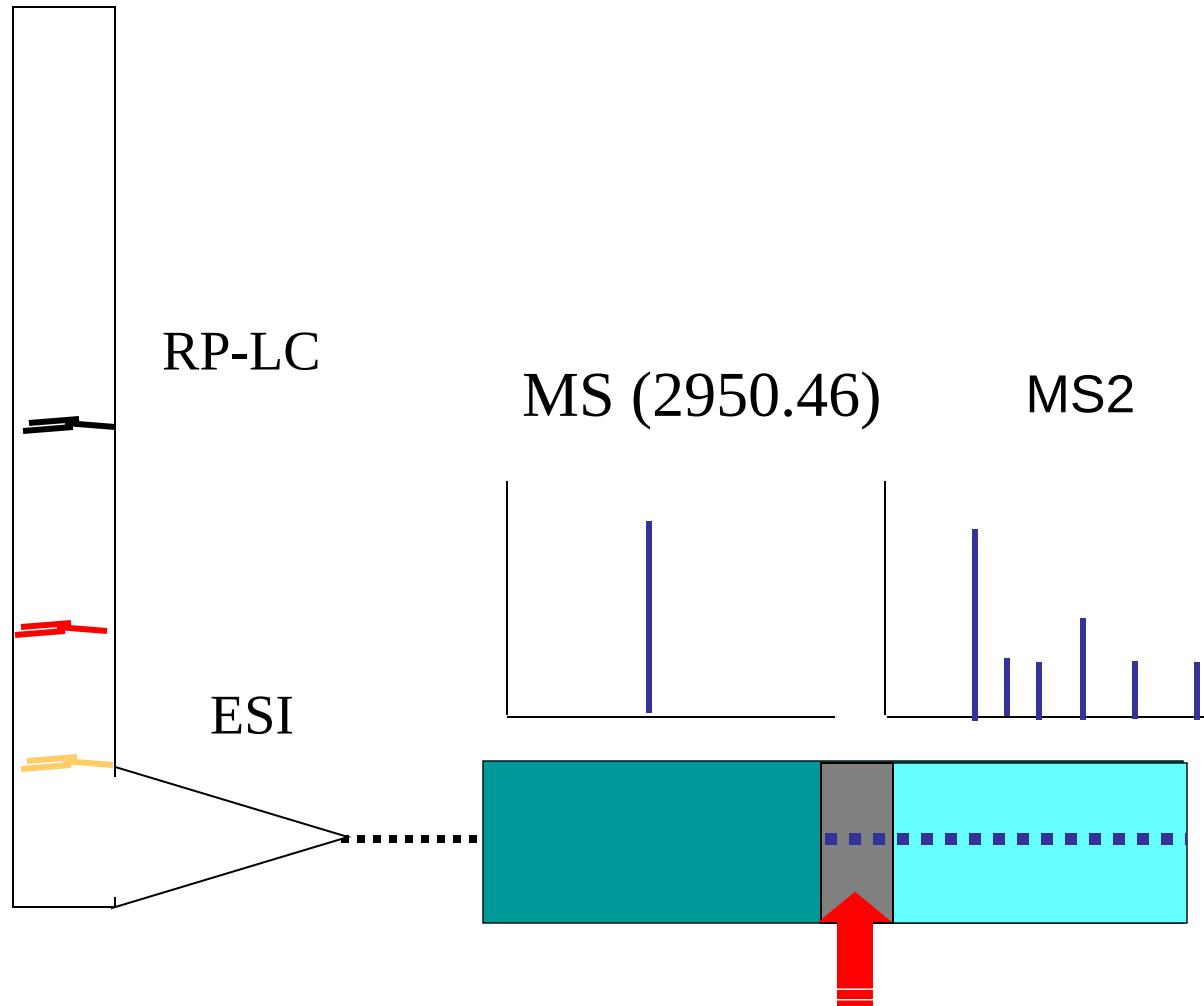
LC-MS/MS



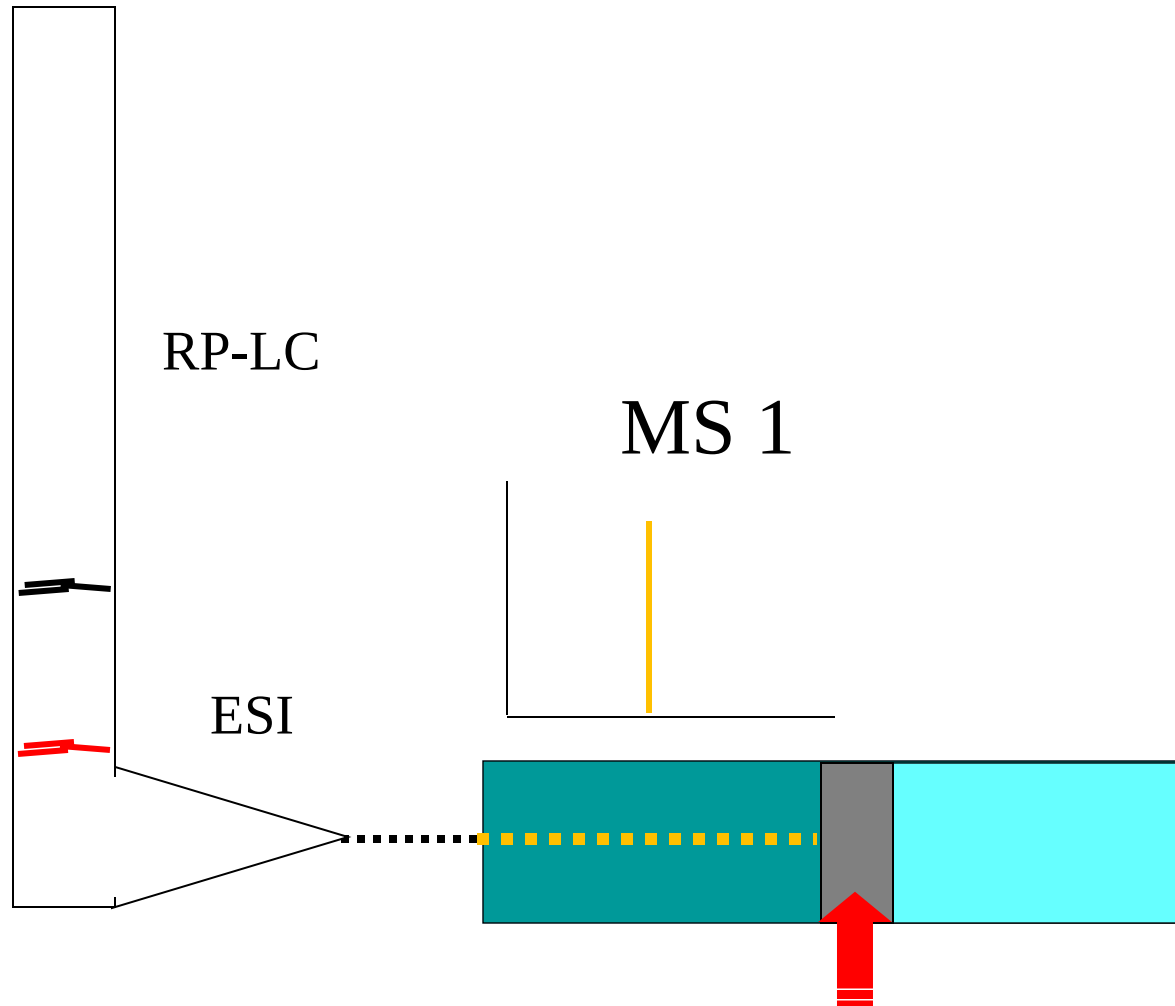
LC-MS/MS



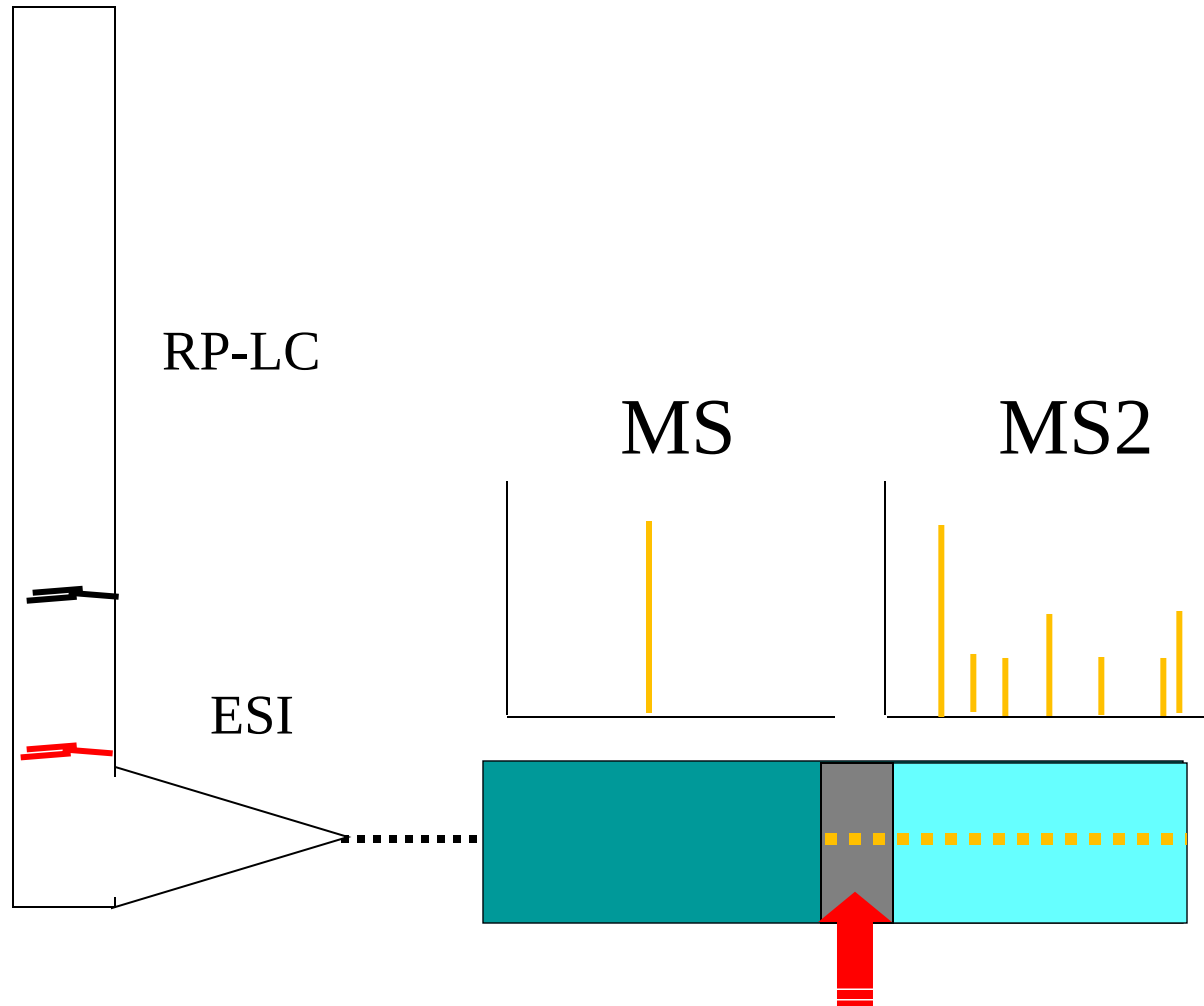
LC-MS/MS



LC-MS/MS

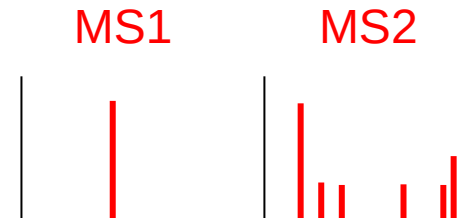
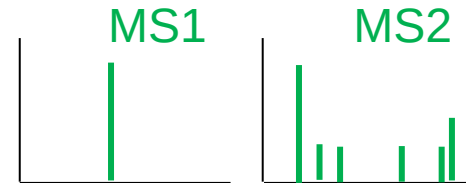
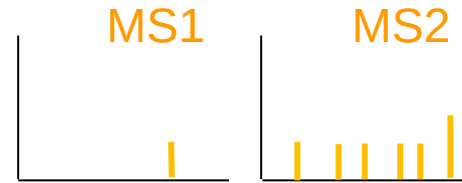
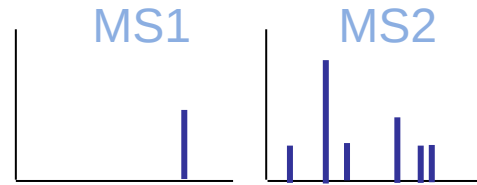
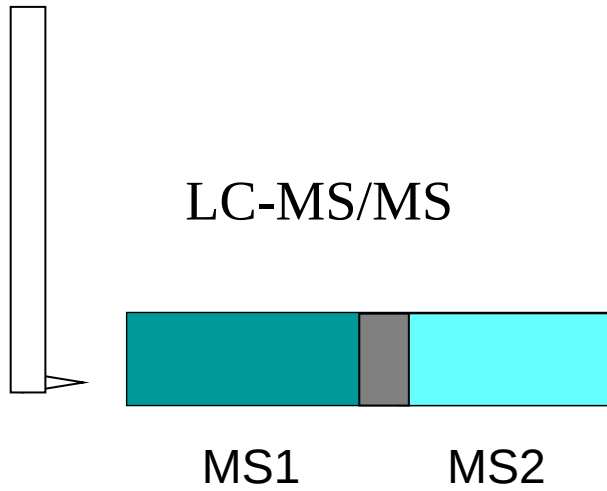


LC-MS/MS

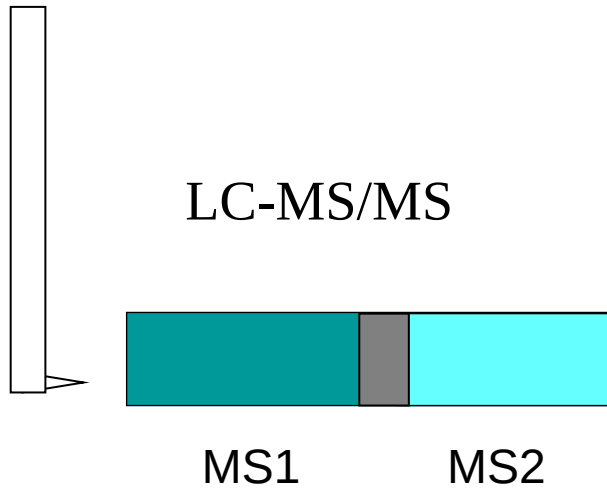


Collision cell

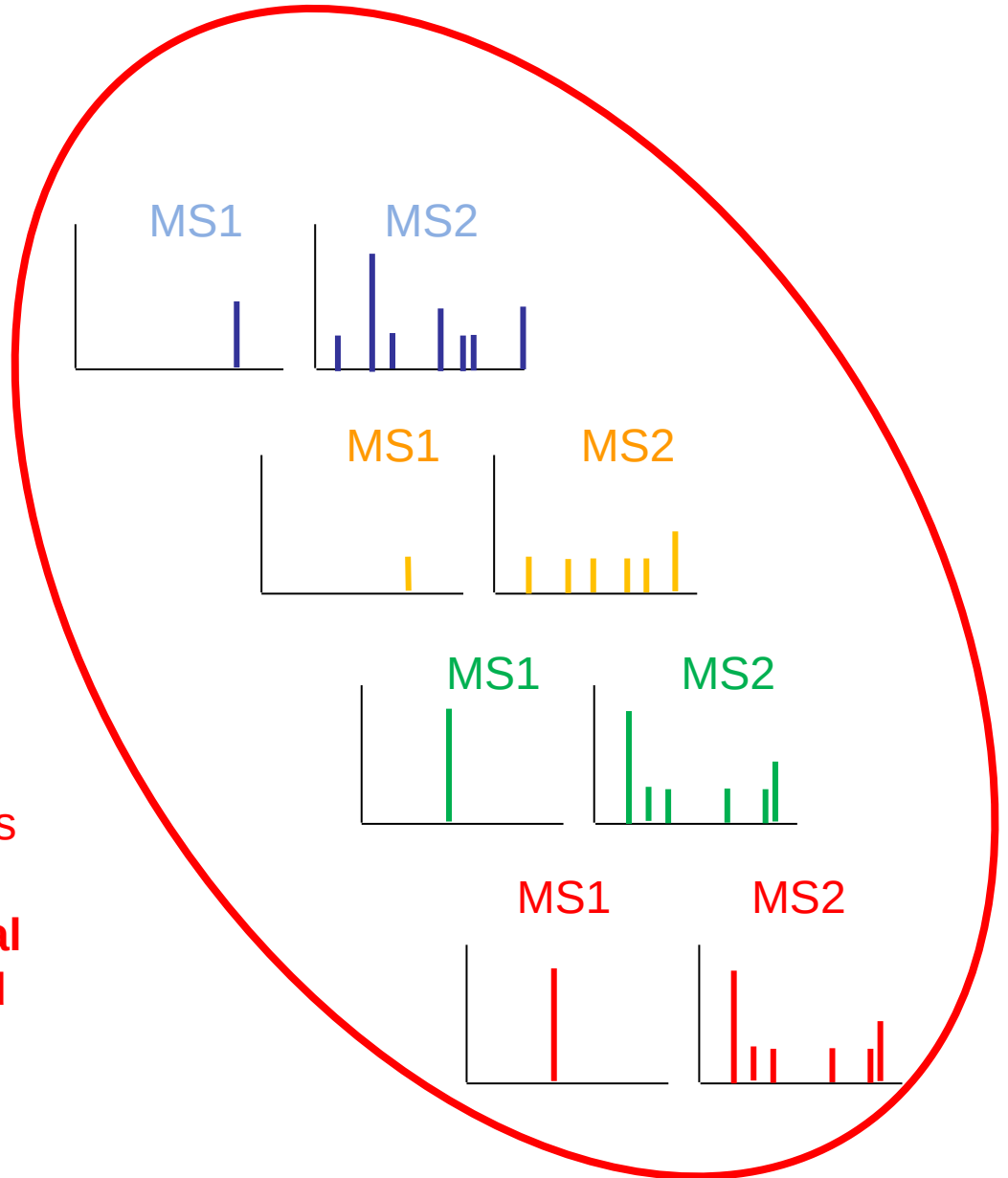
LC-MS/MS



LC-MS/MS



The masses of the peptides and their fragments are **compared with theoretical masses** of all peptides and their fragments present in gene/protein databases



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**

