

Proteomika

**Spektrometria mas
i jej zastosowanie do badań białek**

Spektrometria mas (MS)

- Metoda pozwalająca na pomiar stosunku masy do ładunku jonów (m/z)
 - m/z można przeliczyć na masę
 - jednostką m/z jest Thompson (Th): $1 \text{ Th} = 1/\text{Da}$
- Spektrometr mas oddziałuje z cząsteczkami przy pomocy pól elektromagnetycznych
 - pracuje na cząsteczkach obdarzonych ładunkiem — jonach

Krótka historia MS cz. 1

- J.J. Thompsona 1899 – 1911
 - 1912 widmo O₂, N₂, CO, CO₂, itp.
 - 1913 izotopy ²⁰Ne, ²²Ne
- Dempster, Aston, Conrad, Bainbridge
 - pomiary masy atomów, źródło jonów EI, cząsteczki organiczne, pokazanie równoważności masy i energii
- 1942 pierwsza komercyjna konstrukcja
- Analizatory TOF, ICR, sektor magnetyczny i elektryczny, kwadrupol
- 1958 GC-MS
- 1966 Sekwencjonowanie peptydów

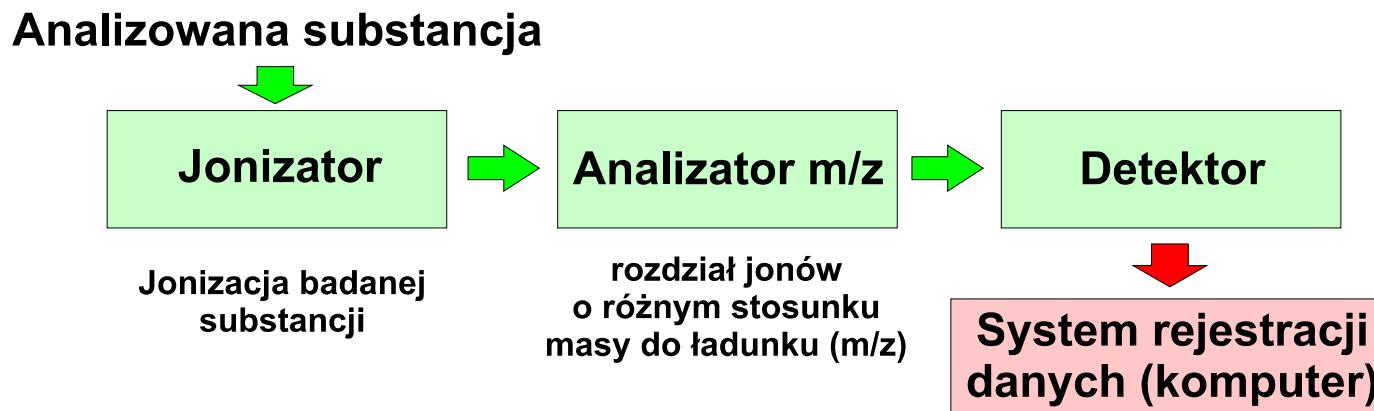


Krótką historią MS cz. 2

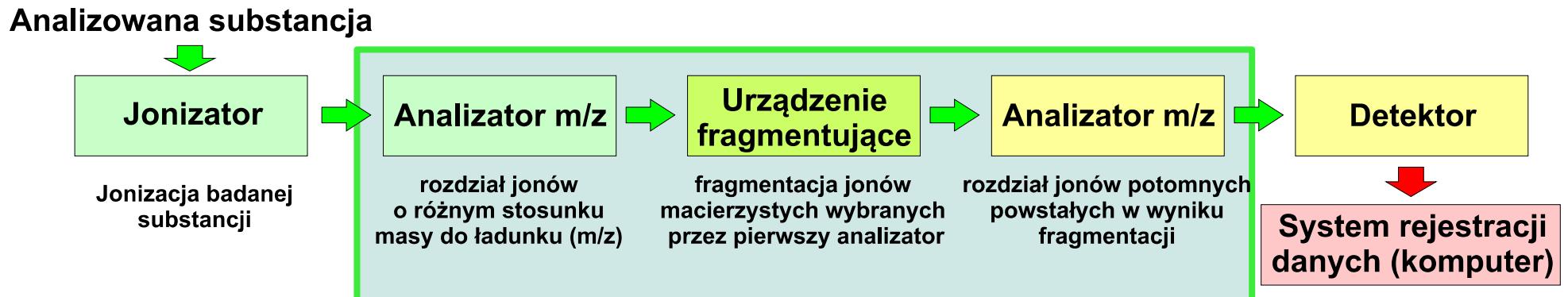
- 1968 Elektrorozpylanie (ESI)
- 1974 FT-ICR
- 1978 Tandemowy spektrometr mas (Triple Quad)
- 1983 MALDI
- 1984 Pułapka jonowa
- 1999 Orbitrap

Działanie spektrometru mas

MS

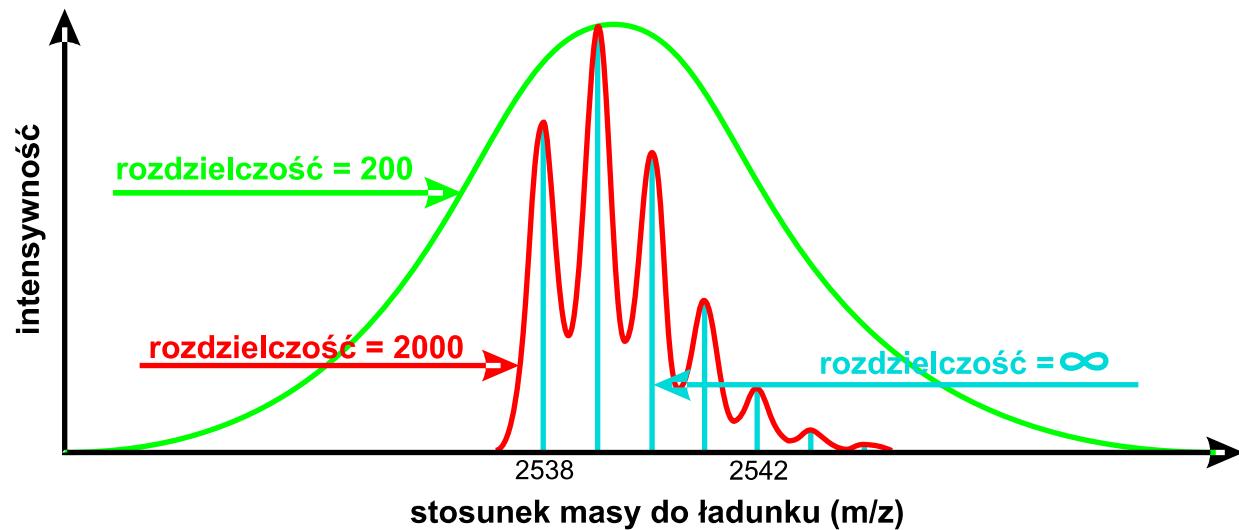


MS/MS



Parametry spektrometru mas

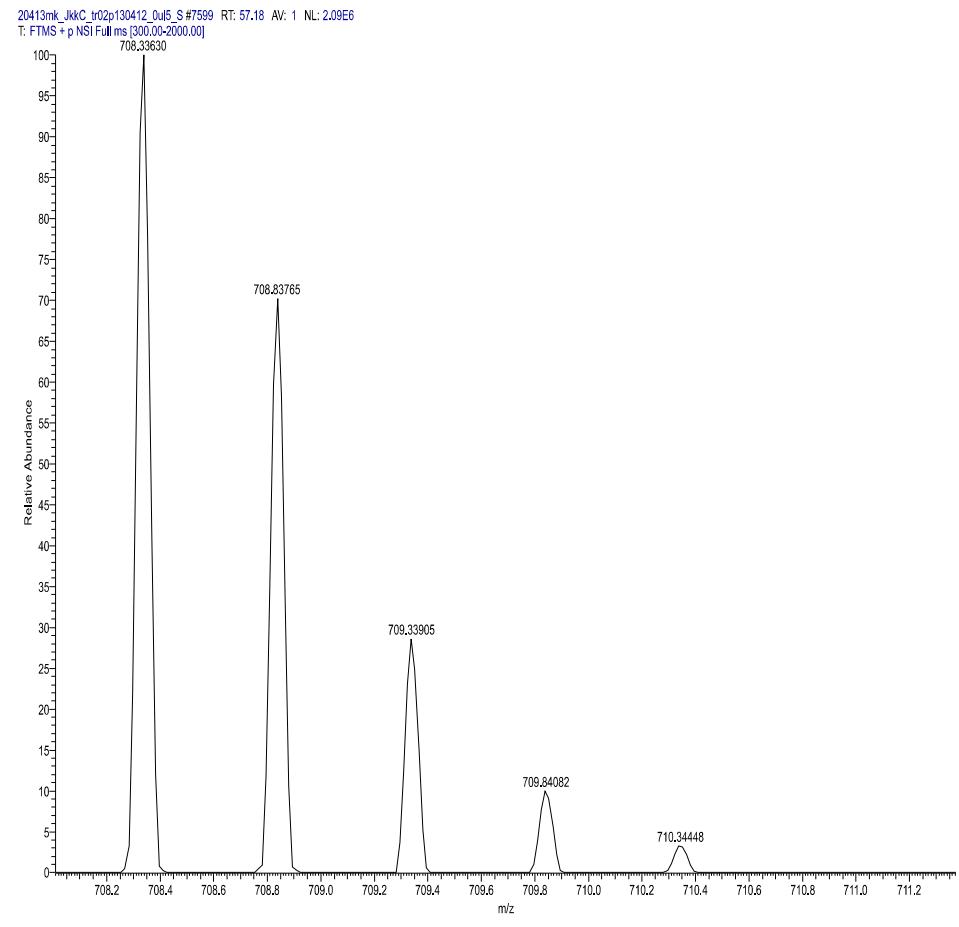
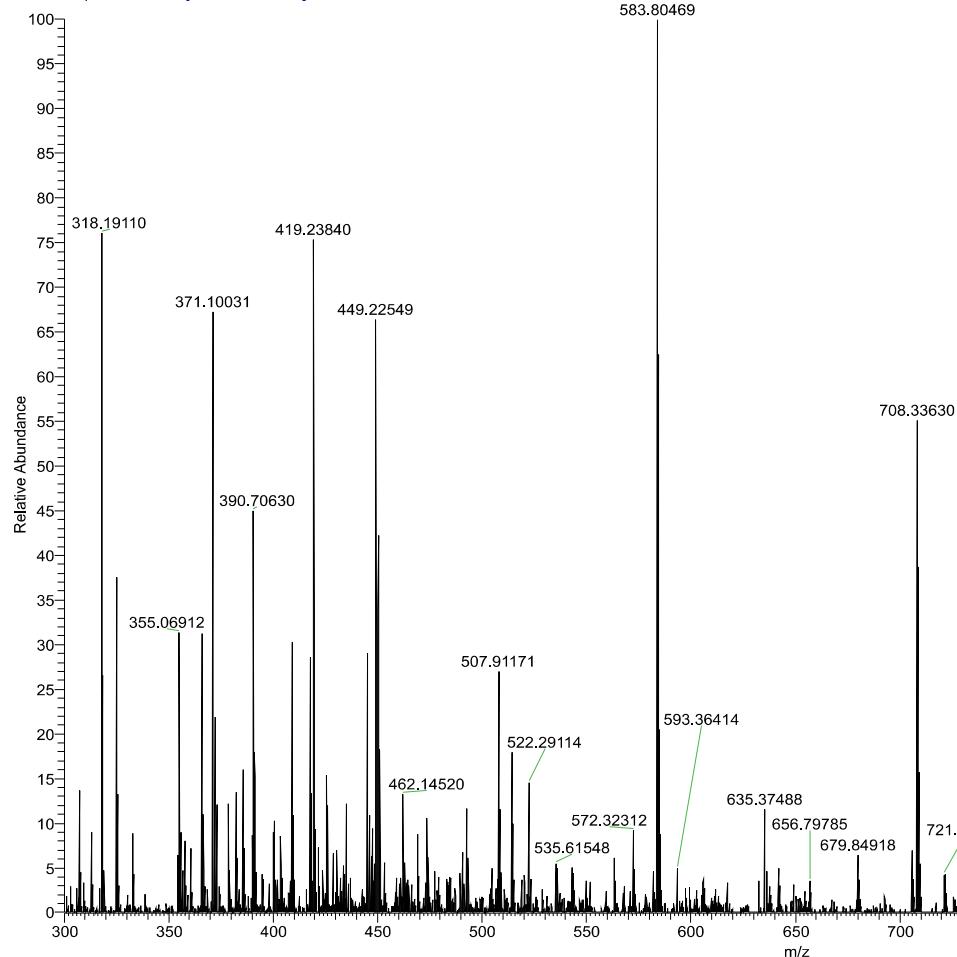
- Rozdzielcość
 - przy m/z np. 500 Th
 - dokładność [ppm]
- Zakres pomiaru m/z
- Czułość
- Zakres dynamiczny
- Szybkość
 - pomiaru MS
 - pomiaru MS/MS



Dane rejestrowane przez spektrometr mas

- Widmo stosunku masy do ładunku (m/z)

20413mk_JkkC_tr02p130412_0u15_S #7599 RT: 57.18 AV: 1 NL: 3.79E6
T: FTMS + p NSI Full ms [300.00-2000.00]



Rozkład izotopowy

- Izotopy pierwiastków

- więcej cząsteczek cięższych izotopów w dużej cząsteczce

- Obliczanie ładunku

- masa – piki co ~ 1 Da (neutron)

- m/z (masa/ładunek) – piki co:

- 1 Th – ładunek 1

- 1/2 Th – ładunek 2

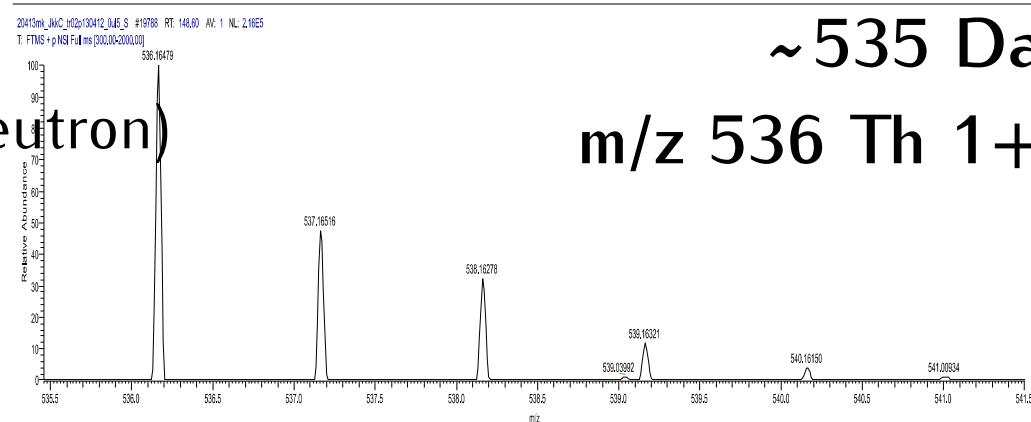
- 1/3 Th – ładunek 3...

- pamiętać o protonach

- Malejąca rozdzielcość

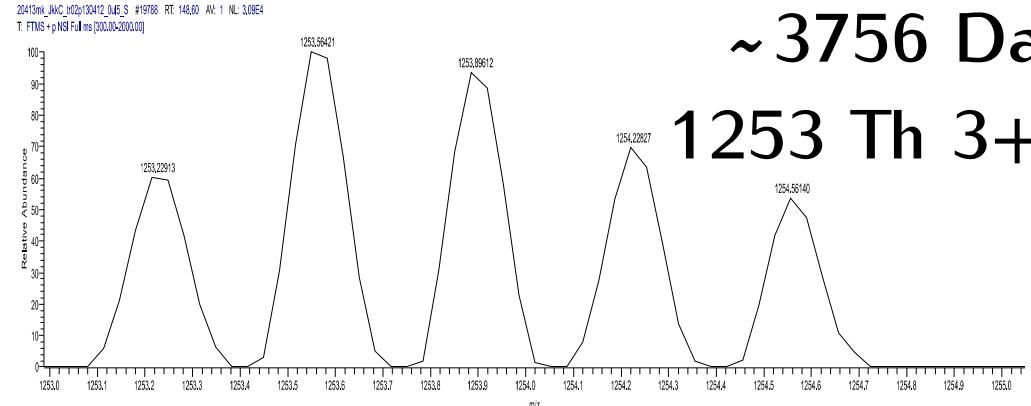
~ 535 Da

m/z 536 Th 1+



~ 3756 Da

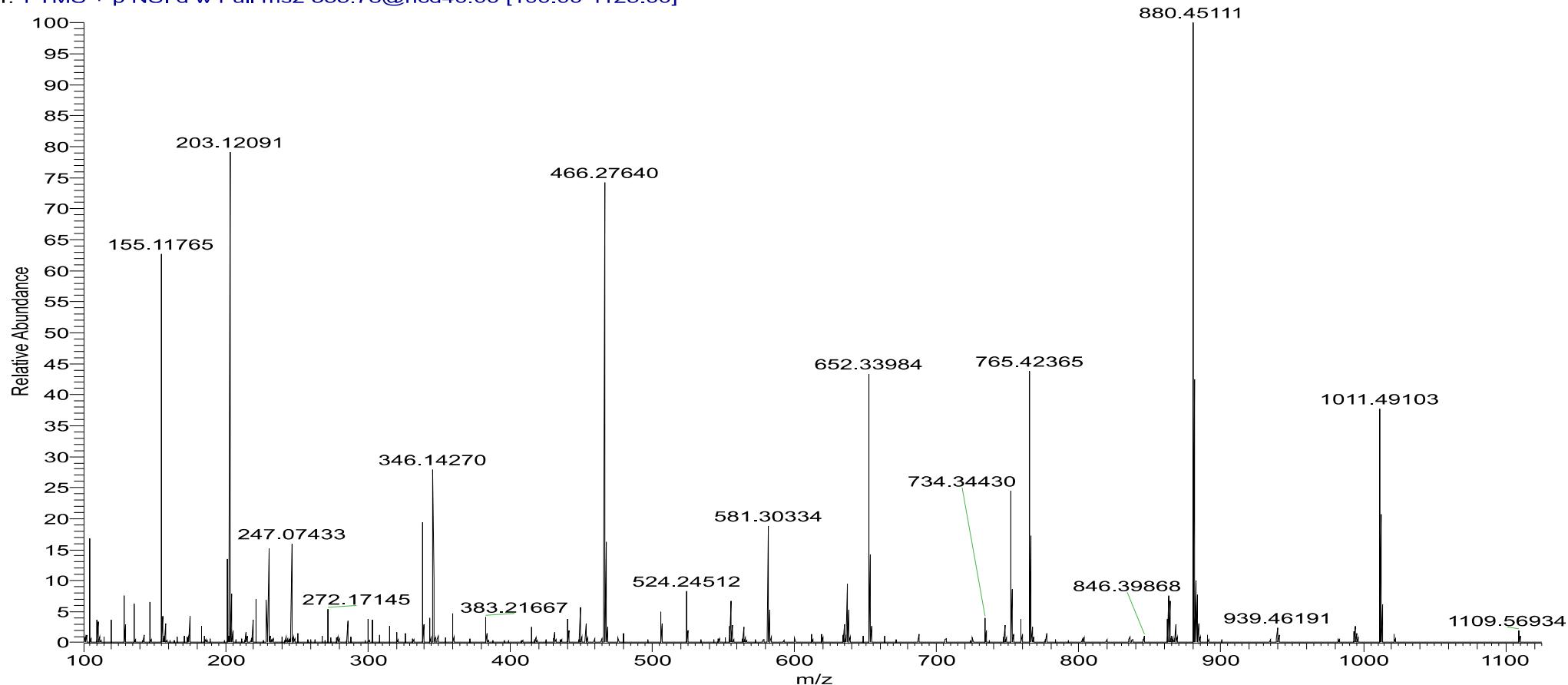
1253 Th 3+



Widmo MS/MS

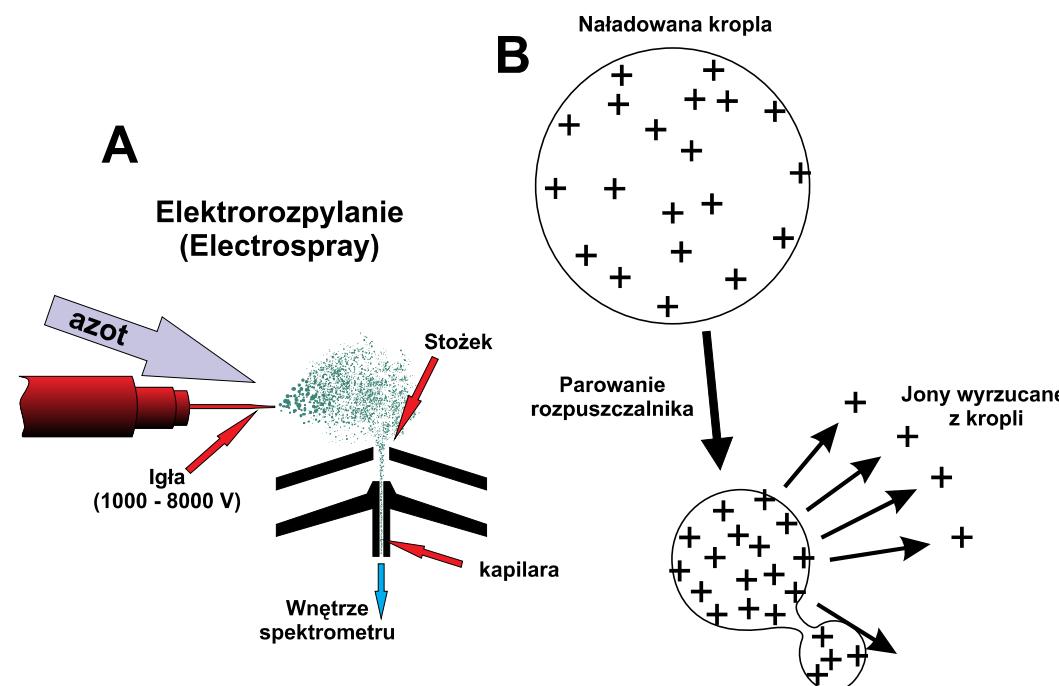
- Informacja o m/z prekursora (tutaj peptydu)
- Mniejsze intensywności

20413mk_JkkC_tr02p130412_0ul5_S #7100 RT: 53.64 AV: 1 NL: 5.68E4
T: FTMS + p NSI d w Full ms2 555.78@hcd40.00 [100.00-1125.00]



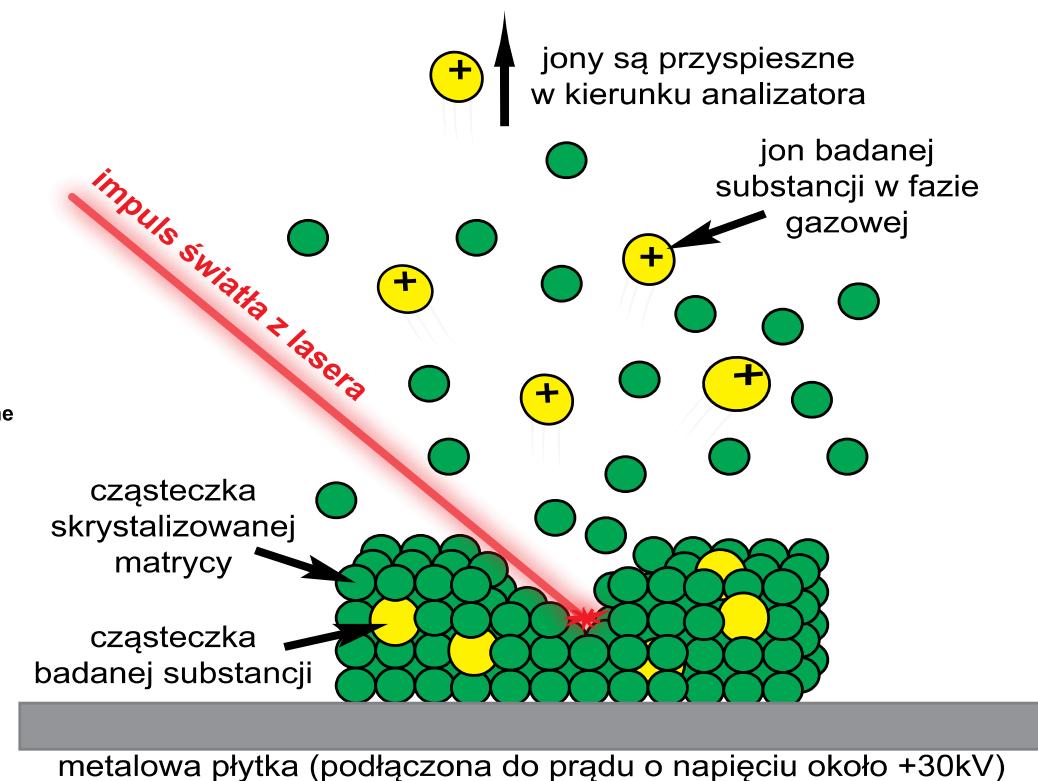
Źródło jonów

Elektrorozpylacz (ESI)



MALDI

Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation



- Formowanie wiązki (lub pakietu) jonów i przesłanie do analizatora
→ optyka jonowa

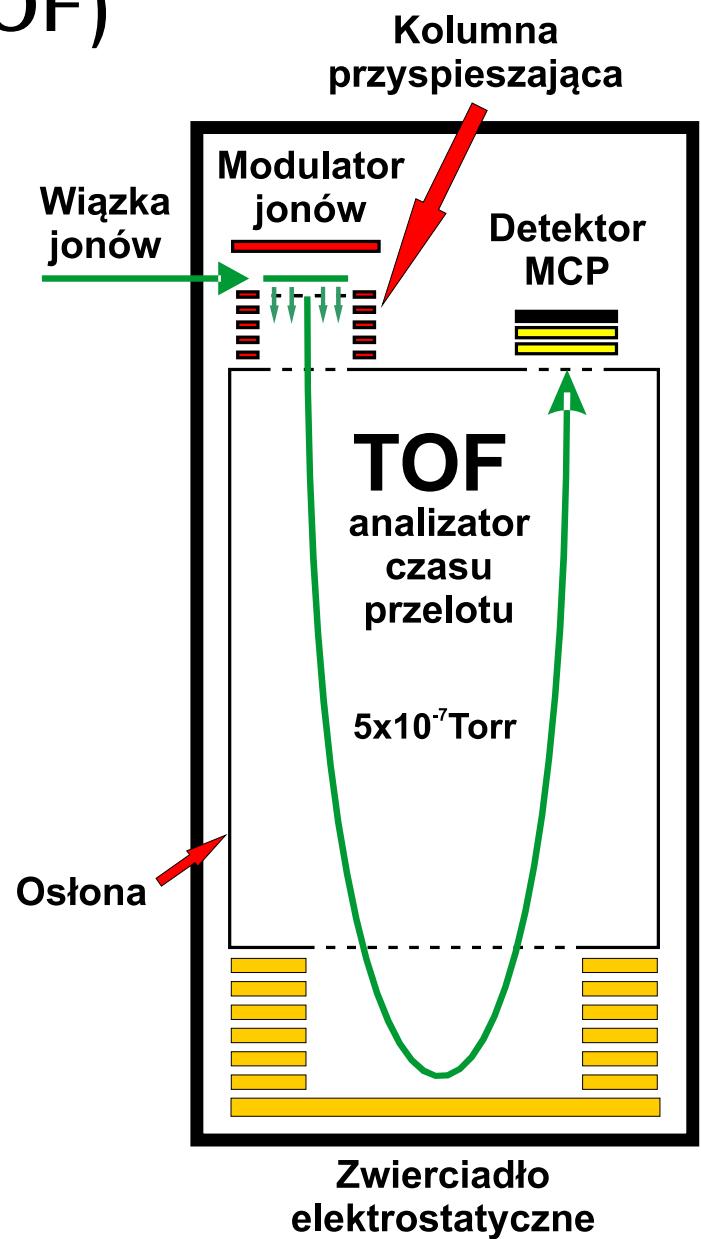
Analizator masu

- Rozdziela jony pod względem stosunku masy do ładunku (m/z)
 - Sektor magnetyczny/elektryczny (nie stosowany w proteomice)
 - Analizator czasu przelotu (TOF)
 - Kwadrupol
 - Pułapka jonowa
 - FT-ICR
 - Orbitrap

Analizator czasu przelotu

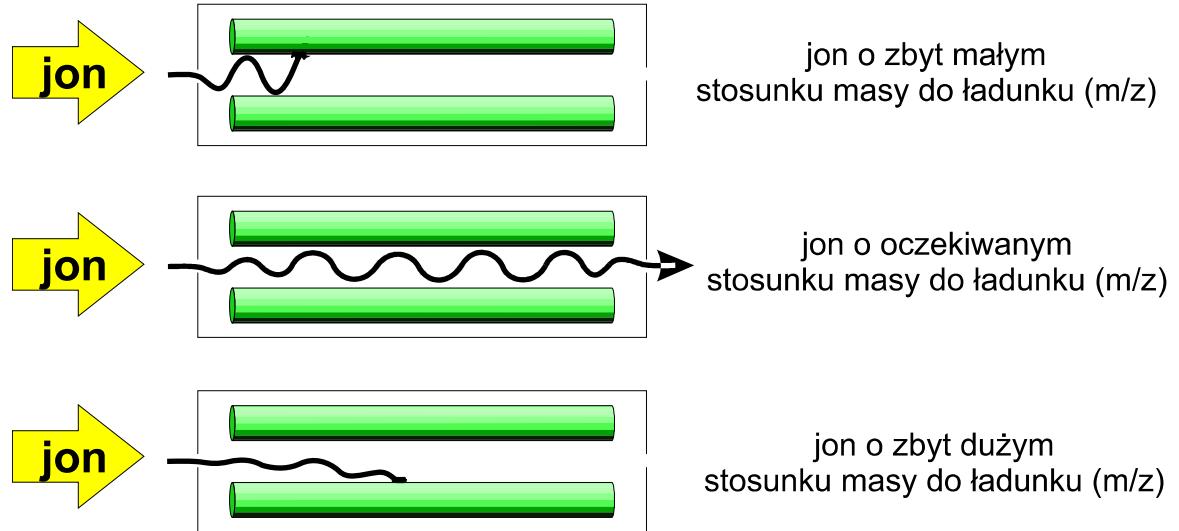
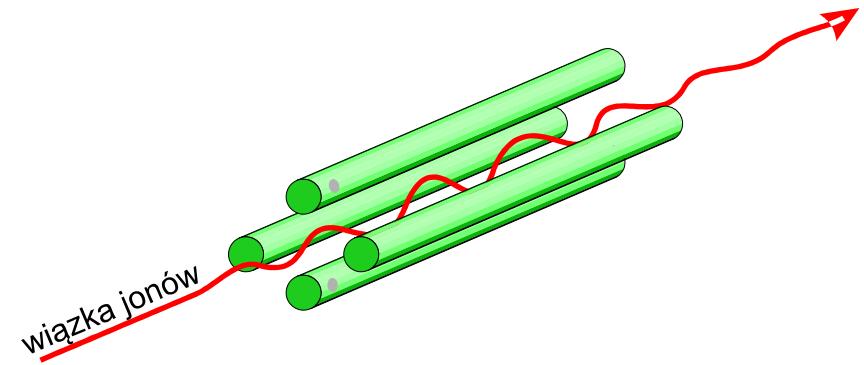
(Time Of Flight – TOF)

- Stosunkowo duża rozdzielcość (do kilkudziesiąt tysięcy)
 - w trybie ze zwierciadłem
- Pomiar do kilkunastu tys. Th
 - bez zwierciadła nawet do milionów Th
- Dość duża czułość
- Praca impulsowa
- Wrażliwy na zmiany temperatury
- Łatwo wysycić detektor



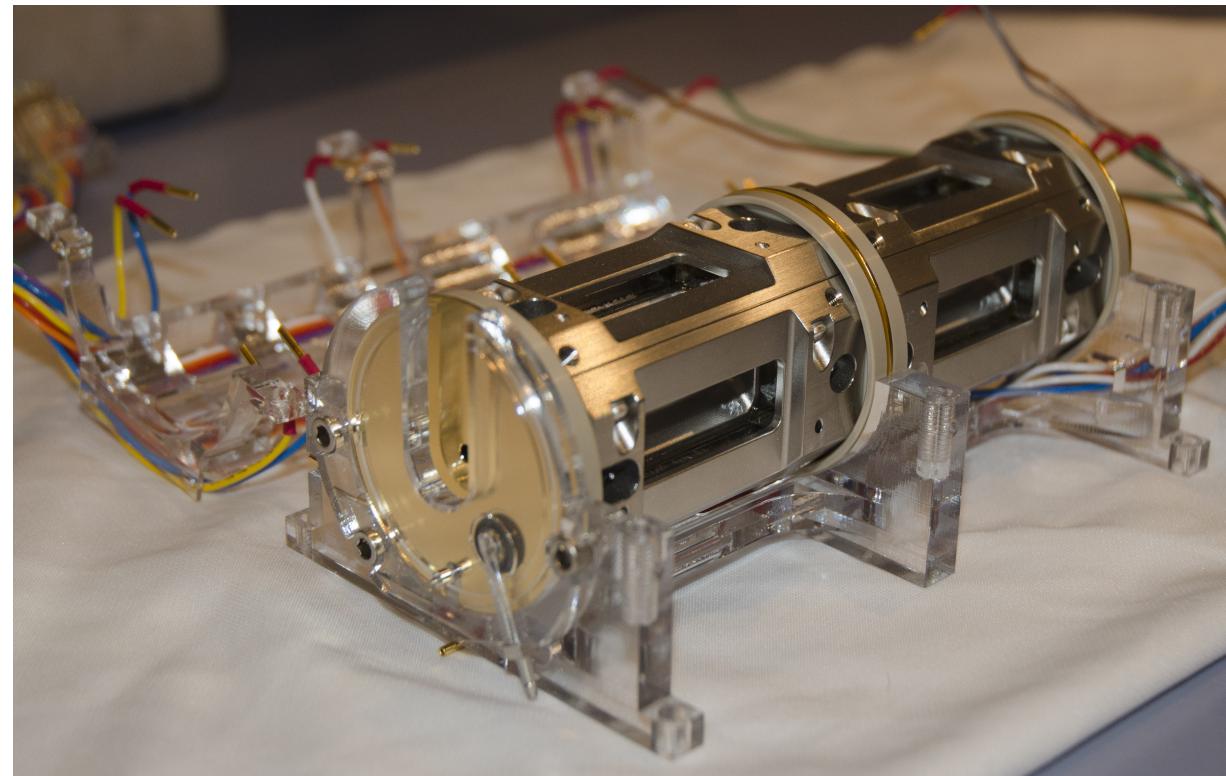
Kwadrupol

- Filtr masy
 - może przepuszczać szeroki zakres m/z
- Pomiar poprzez skanowanie
 - mała sprawność
 - mała rozdzielczość
- Inne zastosowania niż pomiar masy
 - selekcja jonów
 - analiza znanych cząsteczek



Pułapka jonowa

- Utrzymuje jony wewnątrz analizatora
- Pomiar poprzez wyrzucanie jonów o określonym m/z
- Liniowa (może być podwójna) lub trójwymiarowa
- Duża czułość
- Mała rozdzielcość
- Szybka praca
- Możliwość selekcji i fragmentacji jonów
 - reguła 1/3

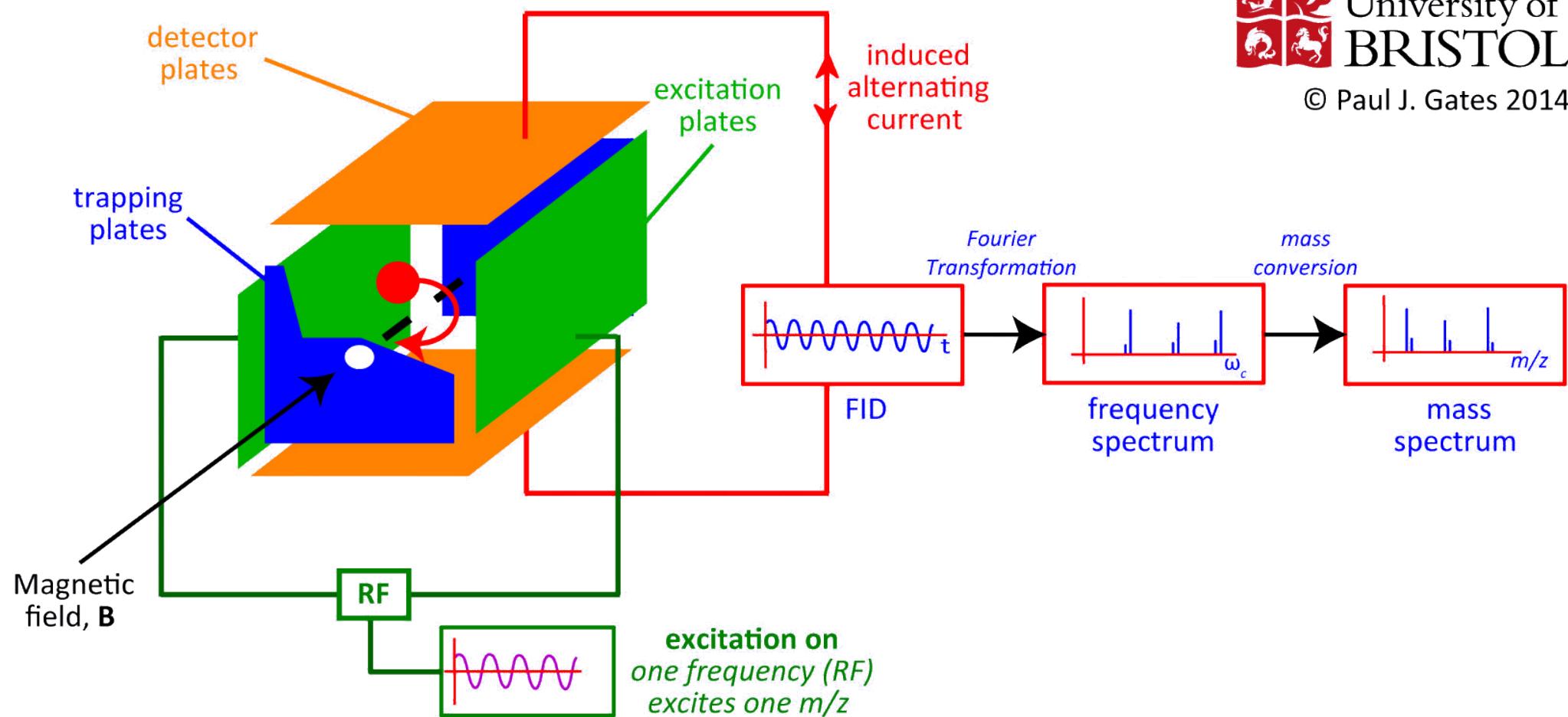


FT-ICR

(analizator cyklotronowy z Fourierowską transformacją wyników)

- Rodzaj pułapki jonowej
- Jony wprowadzane do silnego pola magnetycznego (zwykle $>5\text{T}$) zaczynają poruszać po torach kołowych
- Częstotliwość obiegu jonu wokół osi jest zależna od m/z
- Jony mogą być wzbudzane falą o odpowiedniej częstotliwości
 - można wzbudzać wiele jonów falą złożoną
- Detekcja przez rejestrację prądu wzbudzanego przez przelatujące jony w elektrodach
 - częstotliwość prądu wzbudzanego przez jon o określonym m/z można wyliczyć
 - falę złożoną z wielu częstotliwości można przekształcić w widmo częstotliwości przy pomocy transformaty Fouriera
 - widmo częstotliwości można przeliczyć na widmo masy
 - jony nie uderzają w detektor

FT-ICR



University of
BRISTOL

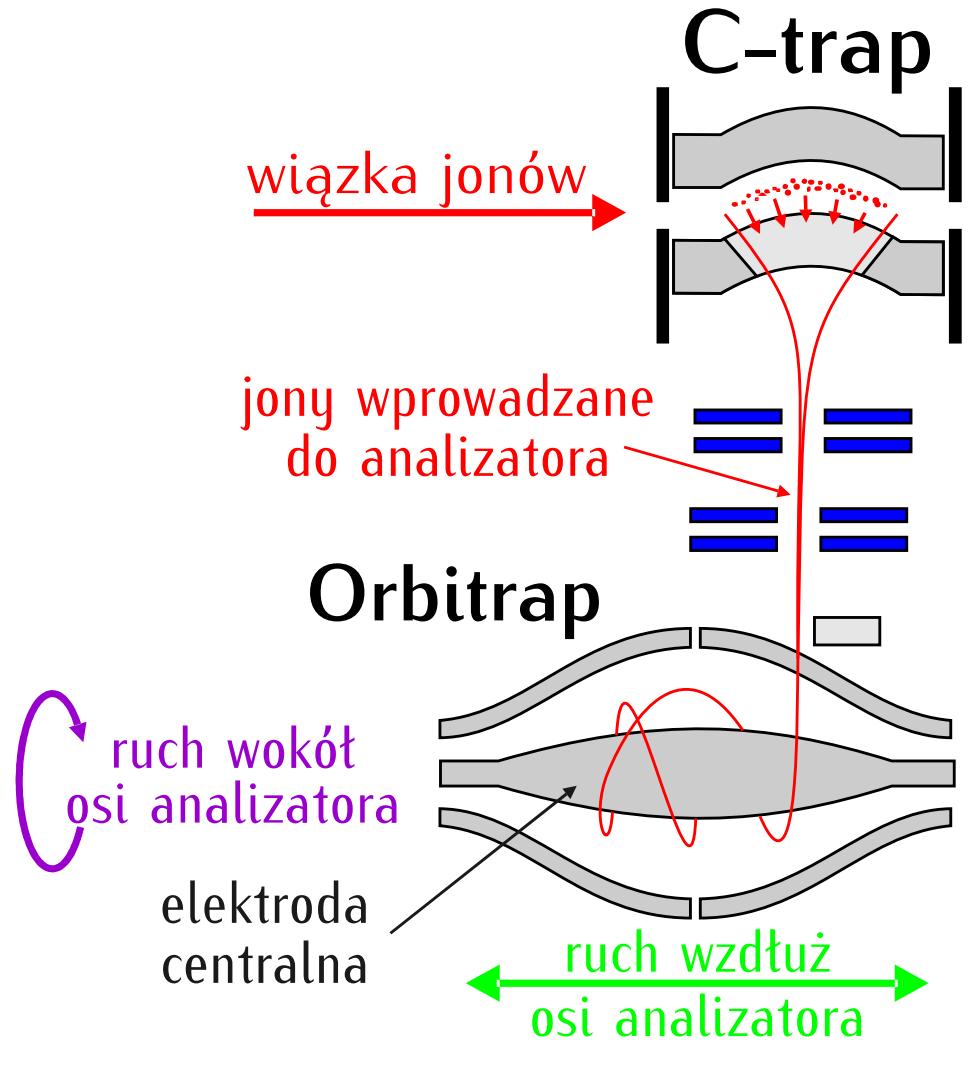
© Paul J. Gates 2014

Cechy FT-ICR

- Najwyższa rozdzielcość (do 10^6)
 - zwiększenie rozdzielcości poprzez ustawienie czasu pomiaru
- Największa dokładność (<1 ppm)
- Duża czułość
- Dość duża szybkość (zależnie od rozdzielcości)
- Duży zakres dynamiczny
- Pomiar m/z do 10 tysięcy
- Wymagane zastosowanie magnesu nadprzewodzącego
 - Duże rozmiary
 - Wysoka cena

Orbitrap

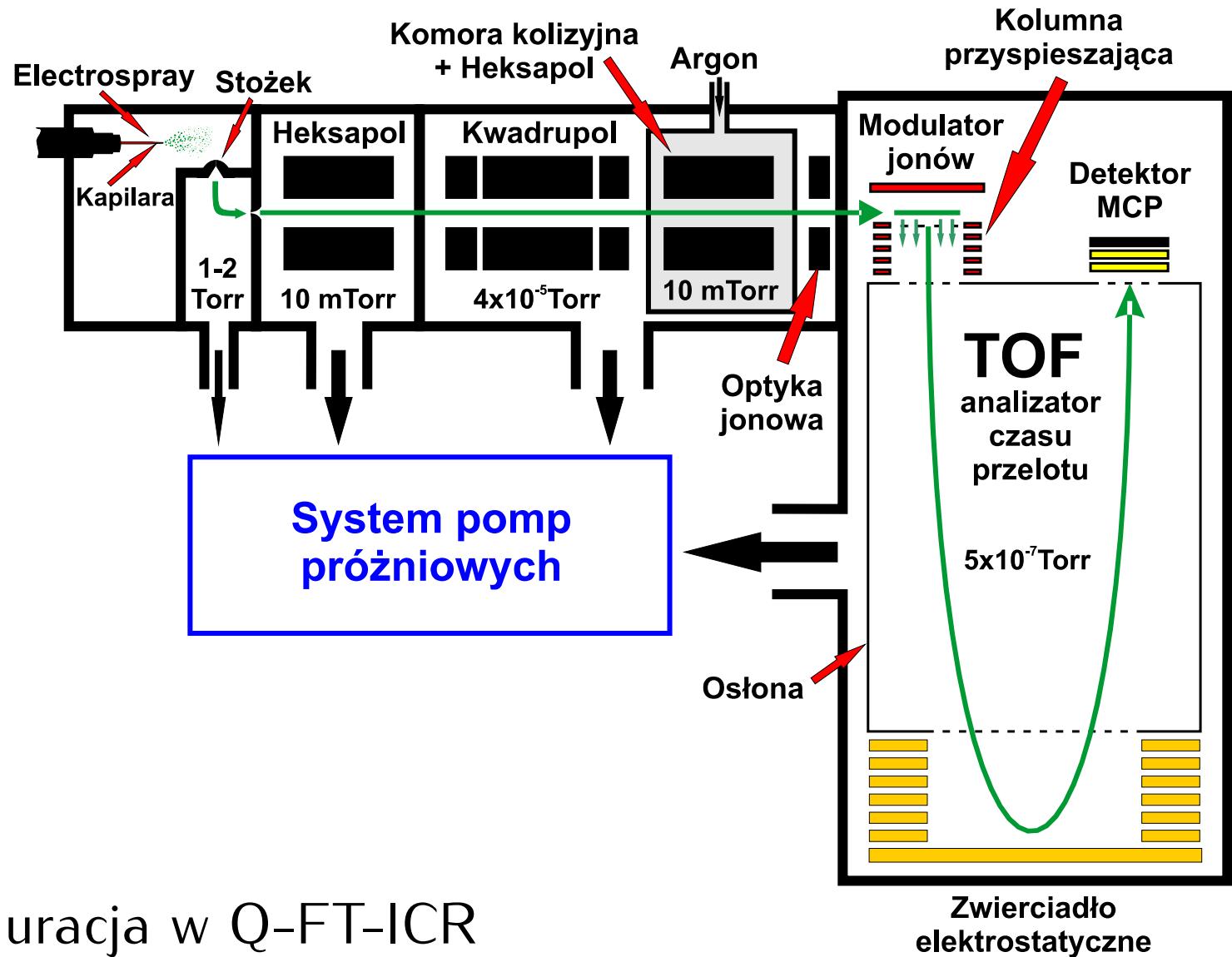
- Rodzaj pułapki jonowej
- Rozdzielcość 250 ~ 700 tys.
- Duża czułość
- Duża szybkość
- Dobry zakres dynamiczny
- Detekcja bez zderzenia
 - transformata Fouriera
- Brak magnesu nadprzewodzącego
 - tańszy niż FT-ICR
- Najnowszy typ analizatora
 - ciągły rozwój



Spektrometry tandemowe i hybrydowe

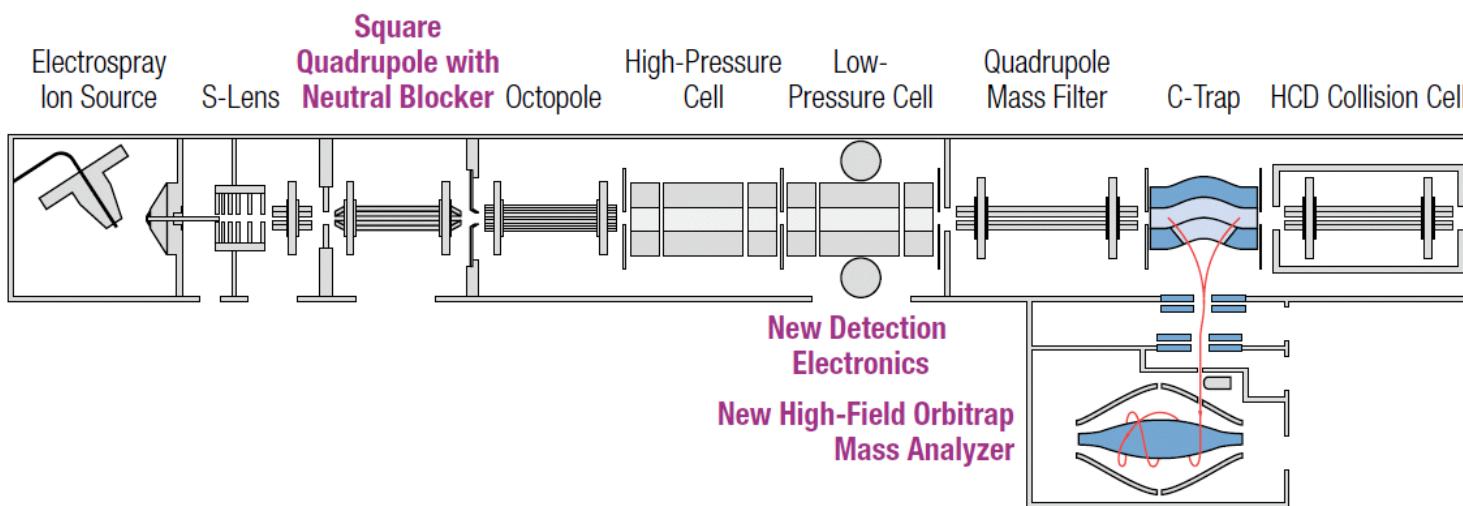
- Triple Quadrupole
- Q-TOF
- Q-FTICR
- Pułapka liniowa FT-ICR
- Orbitrap Velos/Elite (podwójna pułapka + Orbitrap)
- Q-Exactive (kwadrupol – Orbitrap)
- Orbitrap Fusion

Q-TOF



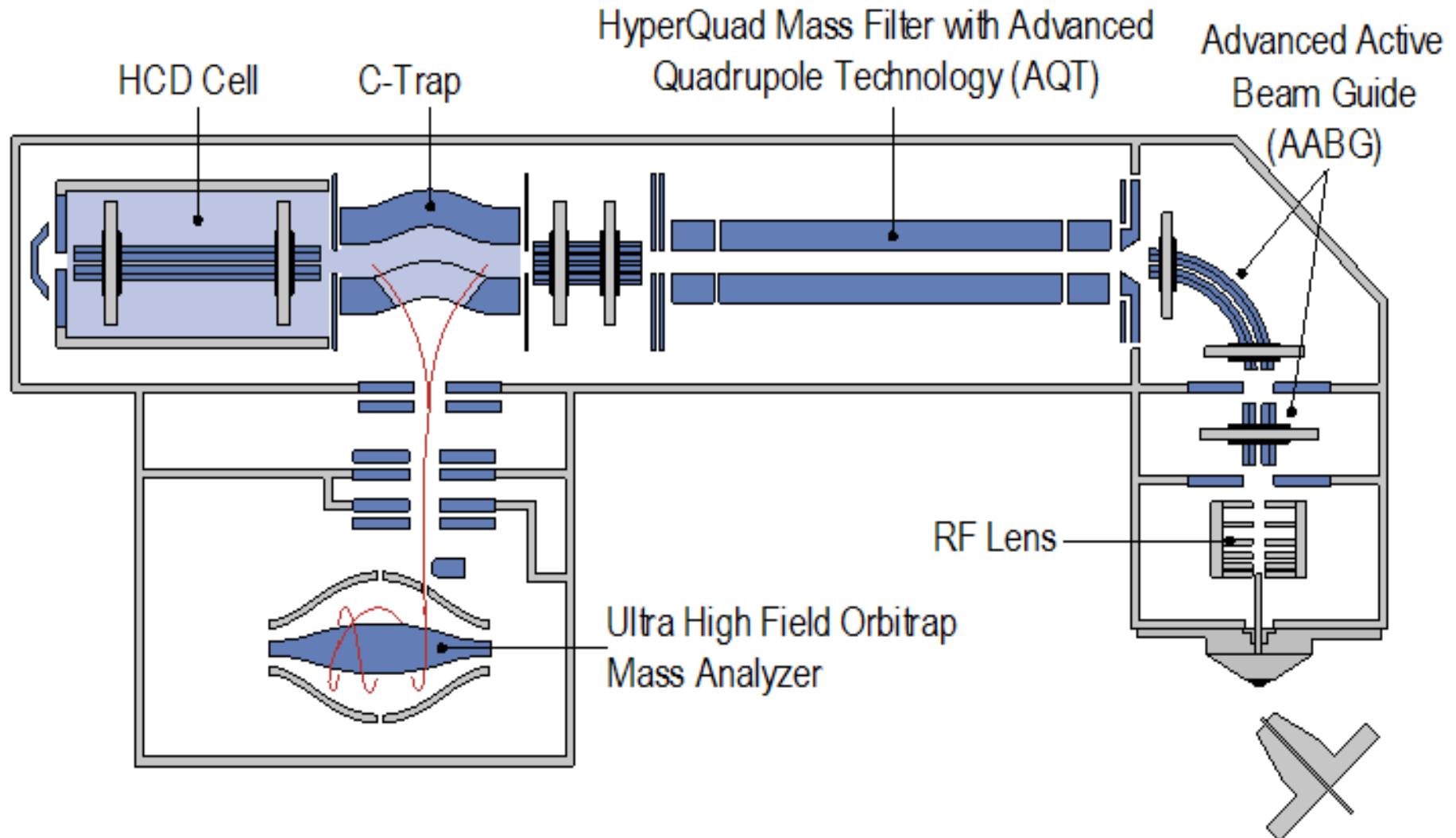
Podobna konfiguracja w Q-FT-ICR

Orbitrap Velos/Elite

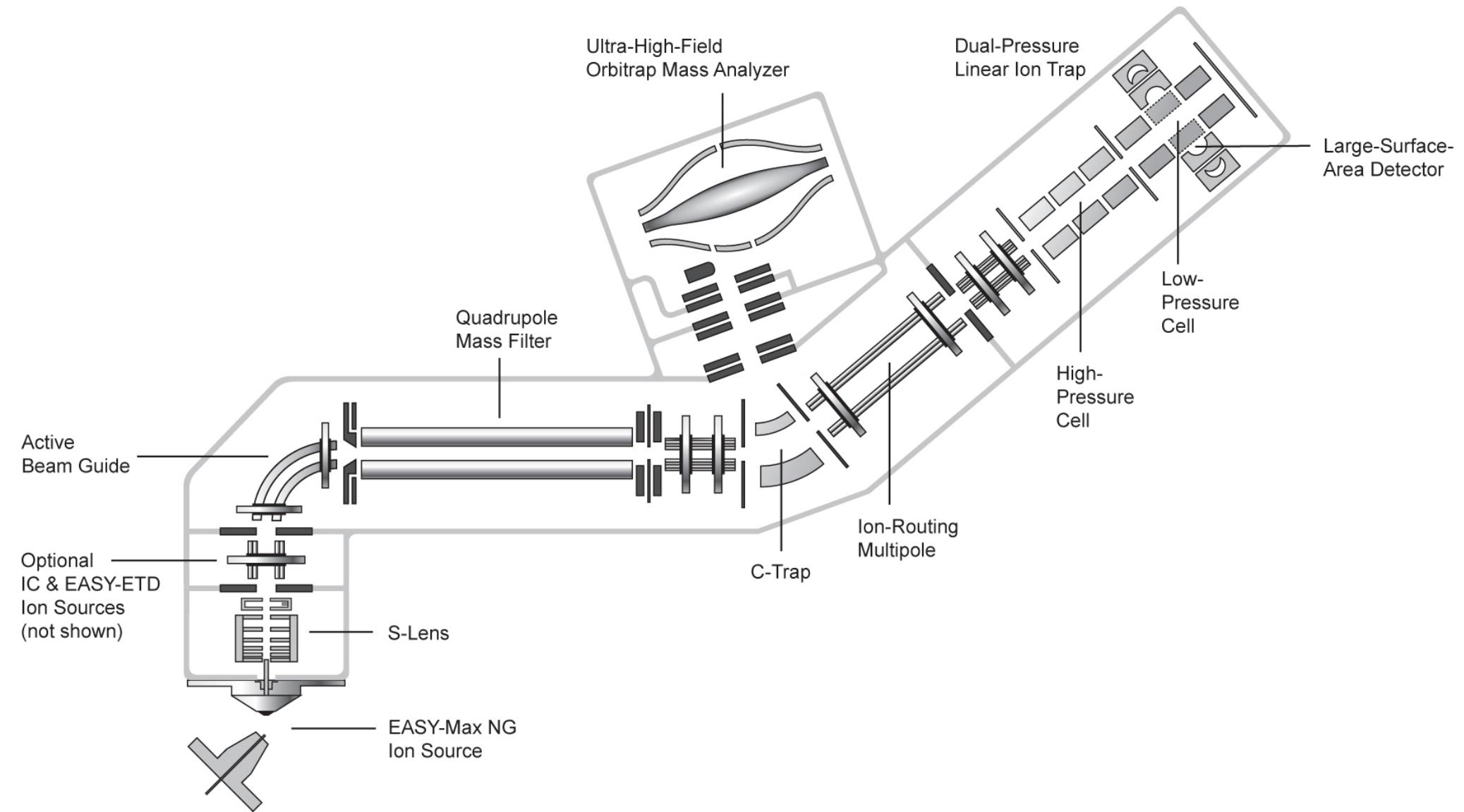


Podobna konfiguracja w LTQ-FTICR

Q-Exactive



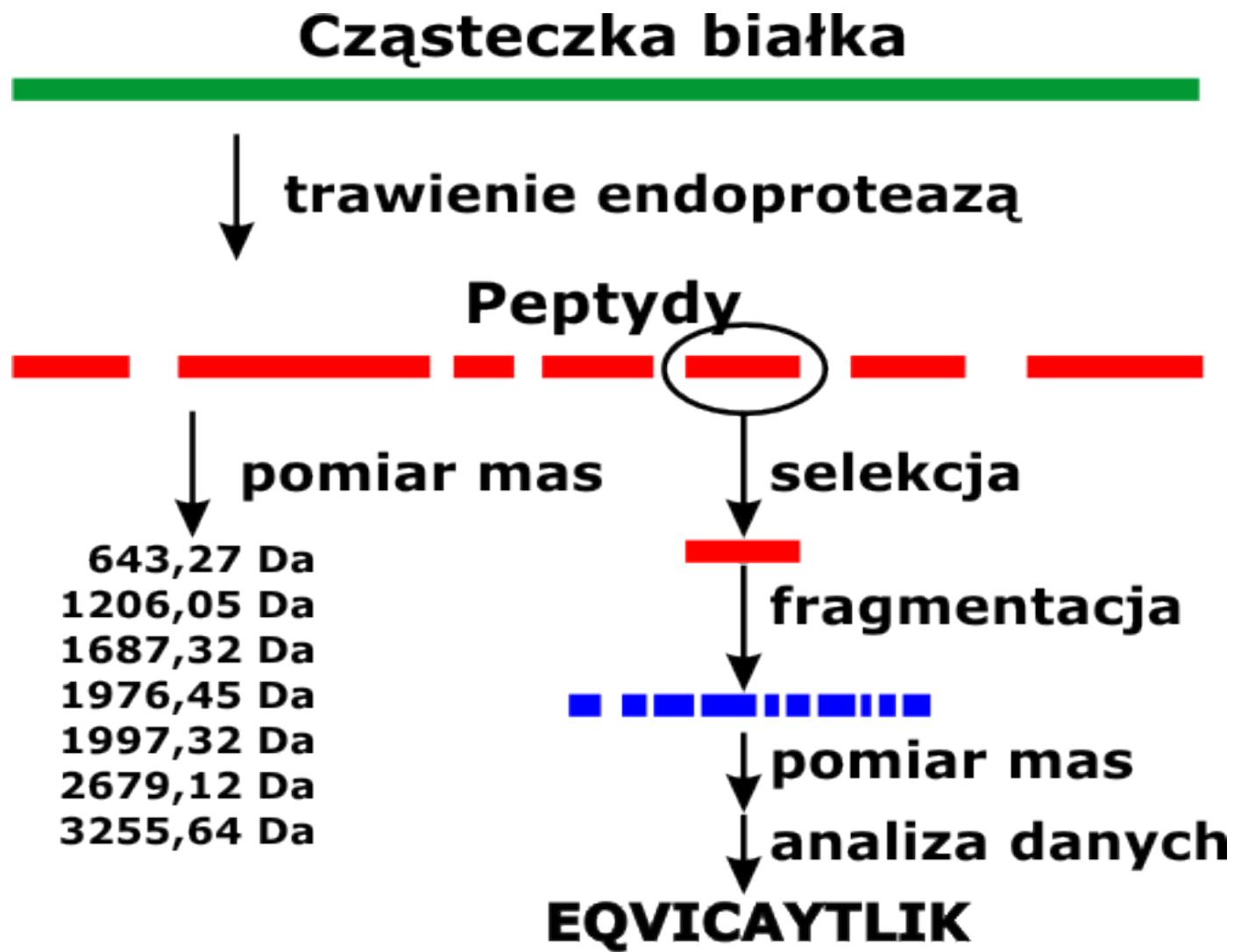
Orbitrap Fusion



Oprogramowanie

- Obsługujące spektrometr
 - wewnętrzne komputery urządzeń
 - komputer PC połączony z urządzeniem
 - Programowanie maszyny i rejestracja danych
- Przeglądanie surowych widm i chromatogramów
- Wstępne przetwarzanie danych z przebiegów
 - generowanie plików zawierających masy jonów macierzystych i potomnych (.MGF, .PKL, itp)
- Identyfikacja peptydów i białek
 - komercyjne: Mascot, Sequest
 - poprawiacze wyników/sumowanie wyników: Percolator, PeptideProphet, MScan
 - darmowe: X!tandem, MaxQuant (Andromeda)
- Narzędzia wspomagające np. Protein Prospector

Identyfikacja białek



MASCOT MS/MS Ions Search

Your name	mk	Email	mkotl@ibb.waw.pl
Search title	Ble ble ble		
Database(s)	SprotHumanRM SprotRandHumanMerge Sumo Synaptosomy TAIR10	Enzyme	Trypsin
		Allow up to	2 missed cleavages
		Quantitation	None
Taxonomy	All entries		
Fixed modifications	Carbamidomethyl (C)	> <	2-dimethylsuccinyl (C) 2-monomethylsuccinyl (C) 2-nitrobenzyl (Y) 2-succinyl (C) 2HPG (R) 3-deoxyglucosone (R) 3sulfo (N-term) 4-ONE (C) 4-ONE (H) 4-ONE (K) 4-ONE+Delta:H(-2)O(-1) (C)
	Display all modifications <input checked="" type="checkbox"/>		
Variable modifications	Oxidation (M)	> <	
Peptide tol. ±	15 ppm	# ^{13}C 0	MS/MS tol. ± 50 mmu
Peptide charge	Mr	Monoisotopic	Average
Data file	Browse... No file selected.		
Data format	Mascot generic	Precursor	m/z
Instrument	HCD	Error tolerant	<input type="checkbox"/>
Decoy	<input checked="" type="checkbox"/>	Report top	AUTO hits
	Start Search ...		Reset Form

MS/MS Fragmentation of EFAAEEISSLMLIK

Found in AT5G02500.1 in TAIR10plus, HSC70-1, HSP70-1...

Match to Query 7695: 1565.824308 from(783.919430,2+) intensity(355477.4100) scans(16180)

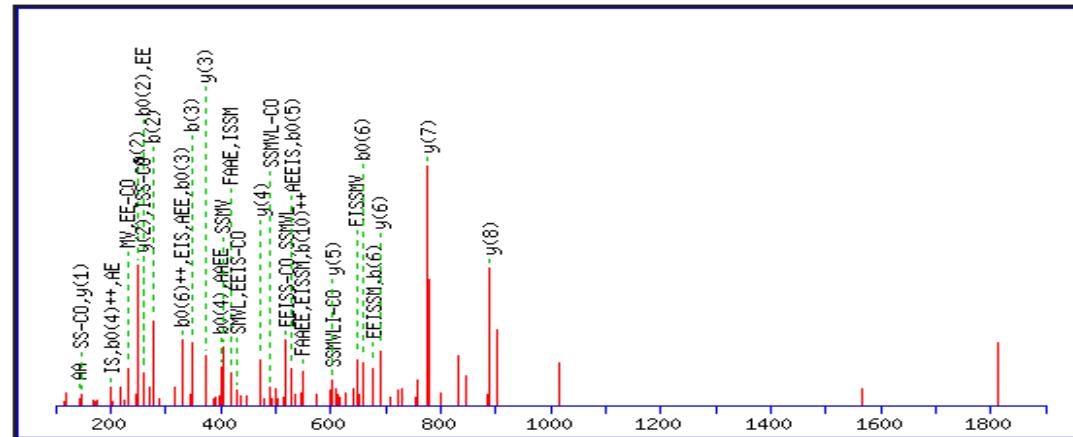
Title: 9766: Scan 16180 (rt=7492.64) [Z:\DO\1407-lipiec\40704mk_jadra.raw]

Monoisotopic mass of neutral peptide Mr(calc): 1565.8011

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Ions Score: 64 Expect: 8.7e-06

Matches : 50/238 fragment ions
using 41 most intense peaks



#	a	a ⁺⁺	b	b ⁺⁺	b ⁰	b ⁰⁺⁺	Seq.	y	y ⁺⁺	y*	y ^{***}	y ⁰	y ⁰⁺⁺	#
1	102.0550	51.5311	130.0499	65.5286	112.0393	56.5233	E							14
2	249.1234	125.0653	277.1183	139.0628	259.1077	130.0575	F	1437.7658	719.3865	1420.7392	710.8733	1419.7552	710.3812	13
3	320.1605	160.5839	348.1554	174.5813	330.1448	165.5761	A	1290.6974	645.8523	1273.6708	637.3390	1272.6868	636.8470	12
4	391.1976	196.1024	419.1925	210.0999	401.1819	201.0946	A	1219.6603	610.3338	1202.6337	601.8205	1201.6497	601.3285	11
5	520.2402	260.6237	548.2351	274.6212	530.2245	265.6159	E	1148.6231	574.8152	1131.5966	566.3019	1130.6126	565.8099	10
6	649.2828	325.1450	677.2777	339.1425	659.2671	330.1372	E	1019.5805	510.2939	1002.5540	501.7806	1001.5700	501.2886	9
7	762.3668	381.6871	790.3618	395.6845	772.3512	386.6792	I	890.5380	445.7726	873.5114	437.2593	872.5274	436.7673	8
8	849.3989	425.2031	877.3938	439.2005	859.3832	430.1952	S	777.4539	389.2306	760.4273	380.7173	759.4433	380.2253	7
9	936.4309	468.7191	964.4258	482.7165	946.4153	473.7113	S	690.4219	345.7146	673.3953	337.2013	672.4113	336.7093	6
10	1067.4714	534.2393	1095.4663	548.2368	1077.4557	539.2315	M	603.3898	302.1986	586.3633	293.6853			5
11	1166.5398	583.7735	1194.5347	597.7710	1176.5242	588.7657	V	472.3493	236.6783	455.3228	228.1650			4
12	1279.6239	640.3156	1307.6188	654.3130	1289.6082	645.3077	L	373.2809	187.1441	356.2544	178.6308			3
13	1392.7079	696.8576	1420.7028	710.8551	1402.6923	701.8498	I	260.1969	130.6021	243.1703	122.0888			2
14							K	147.1128	74.0600	130.0863	65.5468			1

Protein Family Summary (scores adjusted by Percolator)

Filter Significance threshold p< Max. number of families [\[help\]](#)
Ions score or expect cut-off Dendograms cut at
Show Percolator scores
Preferred taxonomy

▼Decoy search summary (reversed protein sequences)

Peptide matches	in TAIR10plus	in Decoy	FDR
- above identity threshold	2053	9	0.44% <input type="button" value="Adjust to 1%"/>
- above identity or homology threshold	2053	9	0.44% <input type="button" value="Adjust to 1%"/>

Decoy results are available in [the decoy report](#).

Proteins (889)

[Report Builder](#)

[Unassigned \(10882\)](#)

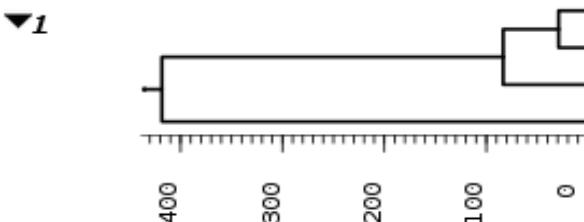
Protein families 1–10 (out of 889)

10 per page 1 [2](#) [3](#) [4](#) [5](#) [6](#) ... [89](#) [Next](#)

Accession

► 1	 	1 AT5G02500.1 4 AT1G16030.1 2 AT3G09440.1 3 AT5G28540.1	1244 HSC70-1, HSP70-1, AT-HSC70-1, HSC70 heat shock cognate protein 70-1 chr5:5540... 238 Hsp70b heat shock protein 70B chr1:5502386-5504326 REVERSE LENGTH=646 737 Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein chr3:2903434-2905632 REVERSE LENGTH=... 503 BIP1 heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein chr5:10540665-10543274 REVER...
► 2	 	1 AT2G18960.1 2 AT2G07560.1	955 AHA1, PMA, OST2, HA1 H(+)-ATPase 1 chr2:8221858-8227268 FORWARD LENGTH=9... 149 AHA6, HA6 H(+)-ATPase 6 chr2:3170394-3173952 REVERSE LENGTH=949
► 3		ATCG00490.1	898 RBCL ribulose-bisphosphate carboxylases chrC:54958-56397 FORWARD LENGTH=47...
► 4		AT4G37930.1	746 SHM1, STM, SHMT1 serine transhydroxymethyltransferase 1 chr4:17831891-178347...
► 5	 	1 AT1G20620.1 2 AT4G35090.1	734 CAT3, SEN2, ATCAT3 catalase 3 chr1:7143142-7146193 FORWARD LENGTH=492 265 CAT2 catalase 2 chr4:16700937-16703215 REVERSE LENGTH=492

Protein families 1–10 (out of 1090)

10 per page 1 [2](#) [3](#) [4](#) [5](#) [6](#) ... [109](#) [Next](#)[Expand all](#) [Collapse all](#)Accession [contains](#)[Find](#)

- 1** [AT5G02500.1](#)
4 [AT1G16030.1](#)
2 [AT3G09440.1](#)
3 [AT5G28540.1](#)

1098 HSC70-1, HSP70-1, AT-HSC70-1, HSC70 | heat shock cognate protein 70
217 Hsp70b | heat shock protein 70B | chr1:5502386-5504326 REVERSE LEN
701 | Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein | chr3:2903434-290563
468 BIP1 | heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein | chr5:10540665-1

Threshold (0): [Cut](#)

		Score	Mass	Matches	Sequences	emPAI	
<input checked="" type="checkbox"/>	1.1 AT5G02500.1	1098	71712	27 (21)	20 (15)	1.45	HSC70-1, HSP70-1, AT-HSC70-1, HSC70 heat shock cognate protein 70
<input checked="" type="checkbox"/>	1.2 AT3G09440.1	701	71559	22 (15)	19 (12)	0.96	Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein chr3:2903434-290563
	►1 same set of AT3G09440.1						
<input checked="" type="checkbox"/>	AT5G28540.1	468	73869	14 (11)	14 (11)	0.61	BIP1 heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein chr5:10540665-1
<input checked="" type="checkbox"/>	AT1G16030.1	217	71270	10 (4)	8 (4)	0.20	Hsp70b heat shock protein 70B chr1:5502386-5504326

[Redisplay](#) [All](#) [None](#)

▼55 peptide matches (53 non-duplicate, 2 duplicate)

 Auto-fit to window

Query	Dupes	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	M	Score	Expect	Rank	U	1	2	3	4	Peptide
373		345.1970	688.3794	688.3755	5.57	1	12		2	►7	U			■	K.DAKLDK.S
1440		428.2388	854.4630	854.4610	2.40	1	9		1.4	►4	U		■	K.HQKDISK.D	
2237		481.2706	960.5267	960.5127	14.5	1	53	0.00015	►1		■	■			R.LSKDEIEK.M
2495		495.2556	988.4966	988.4825	14.2	0	51	0.00019	►1		U		■		R.LSQEEIDR.M
2516		496.2709	990.5272	990.5134	14.0	0	16		0.75	►2	U			■	K.EVAEAFLGR.T
3256		537.3289	1072.6432	1072.6281	14.1	0	27	0.016	►1		U		■		K.LVPYQIVNK.D
3750		564.8147	1127.6148	1127.6047	9.01	2	6		0.89	►2	U		■		K.NKKDISGNPR.A