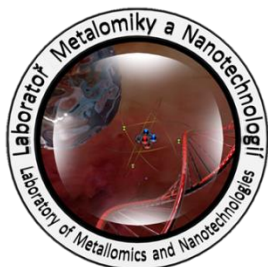




Laboratoř Metalomiky a Nanotechnologií



Hmotnostní detekce biologicky významných sloučenin pro biotechnologie

Anotace

Hmotnostní spektrometry s měkkou ionizací (MALDI) a s detektory doby letu (TOF) jsou uzpůsobeny ke kvalitativní analýze biomolekul, jako jsou proteiny, nukleové kyseliny a další biologicky významné sloučeniny. S rozvojem těchto technik přišlo i využití pro biotechnologické účely na úrovni proteomické analýzy. Přístrojové vybavení využitě v tomto kurzu je na špičkové úrovni, nicméně pro bezproblémové provedení analýz je stále kritickým aspektem příprava vzorku. To a další kroky nutné pro práci s MALDI TOF jsou předmětem kurzu „**Hmotnostní detekce biologicky významných sloučenin pro biotechnologie**“, jehož program je následující:

- Představení systému MALDI-TOF/TOF (Bruker ultrafleXtreme)
- Příprava vzorků standardů a matrice, připravení přístroje k měření a kontrola jeho stavu
- Seznámení s měřícím programem flexControl, Provedení kalibrace přístroje a měření
- Provedení štěpení proteinů
- Vyhodnocení výsledků, diskuse



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

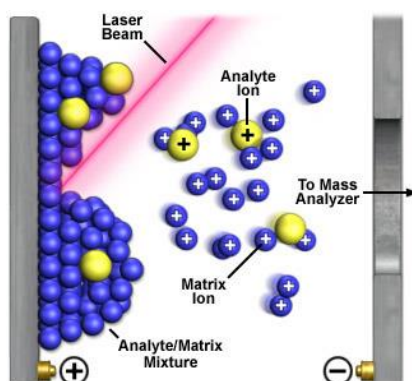
Teorie

PRINCIP MALDI

Laserní desorpce/ionizace za účasti matrice (MALDI) – měkká ionizační technika; převážně dochází k tvorbě molekulárních iontů $[A+H]^+$, kde A je analyt a H je atom vodíku. Na MALDI destičku je nanesen analyt smíchaný s matricí (převážně organické kyseliny), která je v nadbytku, aby absorbovala většinu energie laseru. Po vysušení nanosené směsi a vytvoření vrstvy krystalků matrice s analytem se vloží MALDI destička do iontového zdroje. Následně se vzniklá skvrna ozáří nanosekundovými laserovými pulsy. Po absorbování energie laseru matricí dochází k desorpci matrice spolu s analytem; matrice se zároveň ionizuje a předává svůj náboj (proton) molekulám analytu. Díky vloženému extrakčnímu napětí dochází k transportu iontů analytu do průletového hmotnostního analyzátoru. Nejpoužívanější lasery v MALDI-TOF jsou uvedeny v tabulce 1. Schéma MALDI je znázorněno na obrázku 1.

Typ laseru	Vlnová délka
UV-MALDI	
N ₂	337 nm
Nd:YAG (3xf)	355 nm
Nd:YAG (4xf)	266 nm
ArF (fragmentuje!)	193 nm
IR-MALDI	
Er:YAG	2.94 μm
CO ₂	10.6 μm

Tab. 1: Lasery v MALDI [1].



Obr. 1: Schéma MALDI [2].

V MALDI-TOF MS spektrech v pozitivním módu lze kromě jedenkrát nabitých molekulárních iontů $[A+H]^+$ pozorovat také vícenásobně nabitě ionty analytu $[A+2H]^{2+}$, $[A+3H]^{3+}$, dimer analytu $[2A+H]^+$, adukty analytu s alkalickými kovy a/nebo s matricí $[A+Na]^+$, $[A+K]^+$, $[A+MH]^+$, $[A+MK]^+$, iontové klastry, např. $[2M+Na]^+$, fragmenty matrice, analytu (ztráta funkční skupiny), apod.

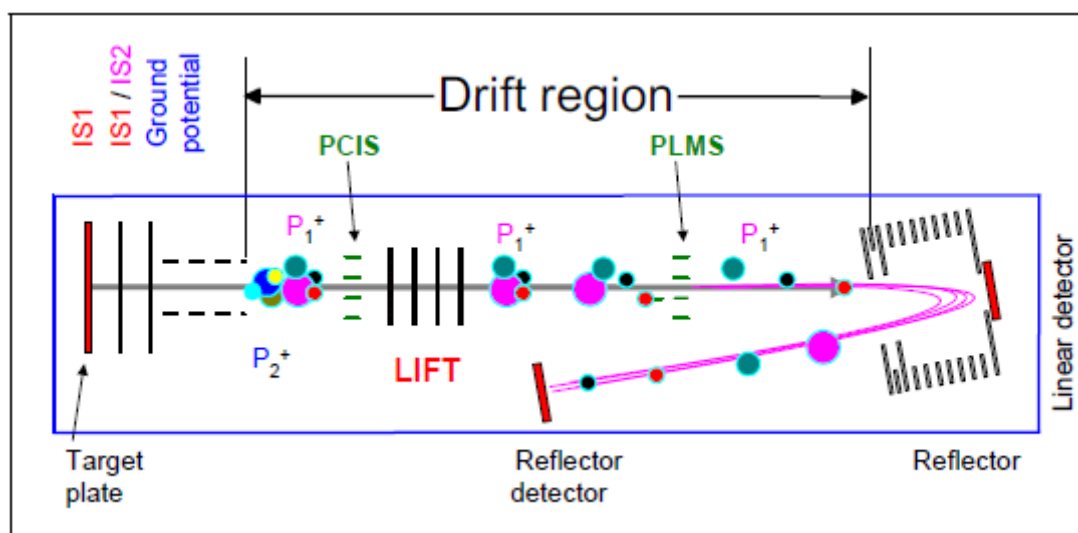
MALDI-TOF MS se moc nehodí pro analýzu hmotností pod cca 500 Da, protože zde ruší intenzivní píky iontů matrice, jejich aduktů, fragmentů, atd.

PRINCIP TOF

Průletový hmotnostní analyzátor (Time-of-flight, TOF) – analýza hmotnosti iontů na základě doby jejich letu v průletové trubici. Měří se čas, který iont potřebuje k překonání vzdálenosti od iontového zdroje k detektoru. Měrná hmotnost $\frac{m}{z}$ se následně může přibližně vypočítat podle následujícího vztahu:

$$\frac{m}{z} = 2eU \frac{t^2}{L^2}$$

kde t je doba letu, L je délka driftové zóny, U je vložené napětí, e je elementární náboj, m je hmotnost, z je náboj.



Obr. 2: Schéma průletového hmotnostního analyzátoru [návod k přístroji]. PCIS – precursor ion selector.



- po každém pulsu laseru je vždy zaznamenáno celé hmotnostní spektrum, nemusí se proto dělat sken
- analýza molekul o velmi vysoké hodnotě $\frac{m}{z}$; rozsah je teoreticky neomezený
- krátká doba záznamu jednoho spektra – to umožňuje měřit několik set spekter z jedné skvrny a tyto spektra pak zprůměrovat
- vysoká citlivost díky dobré propustnosti iontů
- vysokého rozlišení lze dosáhnout díky použitím reflektoru (iontového zrcadla) a zpožděné extrakce

Reflektor (iontové zrcadlo) – prvek TOF analyzátoru, který umožňuje zvýšit rozlišení vlivem zaostřovacího efektu, kdy ionty s větší kinetickou energií pronikají hlouběji do reflektoru a tím dochází k prodloužení jejich doby letu oproti iontům s menší kinetickou energií, ale se stejným poměrem $\frac{m}{z}$. Napětí na elektrodách reflektoru má opačnou polaritu než má urychlovací napětí na mřížkách iontového zdroje – díky tomu dochází ke zpomalování iontů až k obrácení směru jejich letu a dopadu na druhý (reflektorový) detektor.

Zpožděná extrakce – díky zpožděné extrakci dochází ke zpoždění urychlení iontů z iontového zdroje po jejich desorpci a ionizaci laserovým pulsem. Urychlovací napětí se aplikuje krátce po desorpci a ionizaci molekul vzorku, díky tomu dochází v určité míře k vyrovnání rozdílů v počátečních rychlostech iontů vzniklých při desorpci. Nevýhodou je, že zpožděná extrakce funguje jen ve vymezeném, předem zvoleném intervalu $\frac{m}{z}$.

MATRICE

Mezi nejběžnější typy matrice patří kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (HCCA), kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (gentisová; DHB), kyselina 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová (sinapová; SA), 2',4',6'-trihydroxyacetofenon (THAP), kyselina 3-hydroxypikolinová (3-HPA), dithranol (DIT), kyselina trans-3-indolakrylová (IAA). V tabulce 2 je popsáno, k čemu se která matrice hodí.

Analyt	Použitá matrice
peptidy (< 10 kDa)	HCCA, DHB
peptidy, proteiny (> 10 kDa)	SA, DHB
oligonukleotidy (< 3 kDa)	THAP
nukleové kyseliny (> 3 kDa)	HPA
syntetické polární polymery	DHB
syntetické nepolární polymery	DIT, IAA
sacharidy	DHB, CHCA, THAP

Tab. 2: Výběr matrice podle analytu [1].



PŘÍPRAVA ANALYTU PRO MĚŘENÍ

Před vlastním měřením je potřeba provést výběr vhodné matrice a rozpouštědla pro daný typ analytu. Výběr probíhá na základě kombinací různých maticí s různými rozpouštědly a s analytem.

Základní aspekty pro přípravu analytu jsou následující [3]:

- matrice musí být v nadbytku nad analytem; $c_{matrice} \geq 1000c_{analytu}$
- roztok matrice by se měl připravit vždy čerstvý pro daný den
- pH roztoku matrice musí být kyselé pro analýzu v pozitivním módu; pro okyselení se používá např. kyselina trifluoroctová (TFA)
- ↑ podíl organického rozpouštědla ... ↑ rychlejší odpaření rozpouštědla ... ↓ méně času pro tvorbu krystalků matrice s analytem
- analyt se musí kompletně rozpustit a měl by být čirý, případně se provede jeho purifikace (odsolením,...)
- MALDI destička musí být čistá

Mezi hlavní způsoby nanesení roztoků analytu a matrice na destičku patří [3]:

- *dried-droplet* – roztok analytu se smíchá s roztokem matrice v poměru 1:1 a vzniklá směs se nanese na destičku
- *quick and dirty* – roztok analytu se s roztokem matrice smíchá až přímo na destičce; většinou se jako první nanese roztok matrice, poté roztok analytu a nakonec se pomocí špičky mikropipety smíchají
- *overlayer* – nejprve se na destičku nanese roztok matrice v koncentrovaném organickém rozpouštědle (nejčastěji acetonu), pak se nanese směs roztoku analytu s roztokem matrice
- *sandwich* – jako první se nanese roztok matrice s vysokým obsahem organického rozpouštědla, poté se nanese roztok analytu a nakonec se nanese roztok matrice s menším obsahem organického rozpouštědla
- *fast evaporation* – nejprve se nanese roztok matrice s vysokým obsahem organického rozpouštědla, počká se, až se rozpouštědlo vypaří, a poté se nanese roztok analytu
- *vacuum drying* – postup je stejný jako u fast evaporation, akorát se rychlost vypařování rozpouštědla urychlí pomocí sníženého tlaku

PEPTIDOVÉ MAPOVÁNÍ (PMF = PEPTIDE MASS FINGERPRINTING)

Oblastí, ve které MALDI-TOF MS nachází pravděpodobně největší uplatnění, je identifikace proteinů v proteomice. Sekvence známých proteinů jsou uloženy v různých genových (EMBL, DDBJ, GenBank, aj.) a proteinových (SwissProt, NRDB, TrEMBL, aj.) databázích.

Jelikož pro jednoznačnou identifikaci proteinů nestačí znát jen jejich molekulovou hmotnost, používají se další metody založené na rozložení proteinu na peptidy a jejich identifikaci. Využívá se fragmentace nebo specifického štěpení proteinu. Na základě informací o skupině peptidů se identifikuje původní protein podle shody s databází, tzv. fingerprinting.

Při peptidovém mapování se nejprve provádí selektivní enzymatické štěpení proteinu nejčastěji pomocí trypsinu. Trypsin hydrolyticky štěpí peptidové vazby v proteinu za X-K

CZ.1.07/2.3.00/20.0148 NANOLABSYS

Mezinárodní spolupráce v oblasti „*in vivo*“ zobrazovacích technik

http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/nanolabsys/

nebo X-R, pokud $X \neq P$. Následně se směs vzniklých tryptických

peptidů (digest) analyzuje na MALDI-TOF MS a monoizotopické hmotnosti peptidů ze spektra se porovnají s daty obsaženými v databázích pomocí vhodného statistického programu (např. Mascot). Výsledkem je seznam proteinů, ze kterých mohly po enzymatickém štěpení vzniknout peptidy o daných molekulových hmotnostech. Pravděpodobnost správné identifikace původního proteinu závisí na několika faktorech, jako např. na poměru nalezených/zadaných peptidů (expectation factor) nebo na procentu pokrytí sekvence. Pro úspěšnou identifikaci je nutná vysoká přesnost stanovení $\frac{m}{z}$ a nízký počet původních proteinů ve vzorku, nejlépe jen jeden – pokud je to nutné, provede se před analýzou na MALDI-MS separace proteinů např. pomocí gelové elektroforézy nebo kapalinové chromatografie [4].

KALIBRACE MALDI-TOF MS

V hmotnostní spektrometrii MALDI-TOF se kalibruje pouze osa x ; osa y je většinou normalizovaná – největšímu píku ve spektru je přiřazena 100% intenzita. Kalibrace se provádí pomocí připravené kalibrační směsi standardů peptidů nebo proteinů, podle toho, v jakém rozsahu $\frac{m}{z}$ se bude měřit. Pro hmotnosti do cca 500 Da lze ke kalibraci využít píků matrice, pro hmotnosti v rozsahu 1000 – 5000 Da se využívá směsi standardů peptidů a pro hmotnosti od 5000 Da výše se využívá standardů proteinů, syntetických látek, apod.

ZIPTIP™ SPE (EXTRAKCE NA PEVNOU FÁZI)

ZipTip™ – polypropylenové špičky s objemem 10 μ l; jsou částečně naplněné chromatografickou stacionární fází, nejčastěji C4 nebo C18. Sorbent je umístěn téměř u okraje špičky, což zajišťuje prakticky nulový mrtvý objem. Špičky naplněné sorbentem C4 mají póry o velikosti cca 30 nm, zatímco špičky s C18 mají póry o velikosti cca 20 nm. ZipTip™ špičky se využívají pro purifikaci a zakoncentrování peptidů, proteinů či oligonukleotidů pro různé analytické metody, nejčastěji pro kapalinovou chromatografii a hmotnostní spektrometrii [4].



Chemikálie

- voda, ACS
- acetonitril (ACN); 50% ACN
- koncentrovaný amoniak
- koncentrovaná kyselina octová
- koncentrovaná kyselina trifluoroctová (TFA); 1% TFA; 0.1% TFA
- kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (HCCA)
- kyselina 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová (sinapová; SA)
- kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (gentisová; DHB)
- standardy proteinů a peptidů – viz tabulky 3 a 4
- 50 mM NH_4HCO_3 – rozpustí se 40 mg NH_4HCO_3 v 10 ml vody
- trypsin, 0.1 mg/ml v 50 mM NH_4HCO_3 – 0.2 mg trypsinu se rozpustí v 2 ml 50 mM NH_4HCO_3
- extrakční roztok 5% kyselina octová v 75% ACN – k 200 μl vody se přidá 50 μl koncentrované kyseliny octové a 750 μl ACN

Pomůcky

- pH papírky
- ZipTipTM C18 špičky
- mikrokumavky
- mikropipety



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

Pracovní postup

PŘÍPRAVA ROZTOKŮ MATRICE

Pro zrychlení rozpouštění se využije ultrazvuková lázeň; nasycené roztoky matrice se pak centrifugují a na MALDI destičku se nanáší pouze homogenní roztok.

- kyselina 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová (sinapová; SA) – rozpustí se cca 10 mg v 500 μ l ACN, přidá se 400 μ l vody a 100 μ l 1% TFA
- kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (HCCA) – stejná příprava jako u SA
- kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (gentisová; DHB) – stejná příprava jako u SA

PŘÍPRAVA VZORKŮ

Připraví se směs 4 peptidů smícháním stejných objemů (např. 10 μ l každého peptidu) jejich vodných roztoků o koncentraci 1 mg/ml, která poslouží pro kalibraci přístroje pro měření peptidů vzniklých štěpením proteinů. Vyberou se peptidy z následující tabulky (podle dostupnosti):

Peptid	[M+H] ⁺ , monoizotopická m/z [Da]	[M+H] ⁺ , průměrná m/z [Da]
Bradykinin 1-7	757.3992	757.86
Angiotensin II	1046.5418	1047.19
Angiotensin I	1296.6848	1297.49
Substance P	1347.7354	1348.64
Bombesin	1619.8223	1620.86
Renin Substrate	1758.9326	1760.03
ACTH clip 1-17	2093.0862	2094.43
ACTH clip 18-39	2465.1983	2466.68
Somatostatin 28	3147.4710	3149.57

Tab. 3: Standardy peptidů a hmotnosti jejich molekulárních iontů [5].

Dále se připraví zásobní roztoky standardů proteinů o koncentraci 1 mg/ml (pokud již nejsou připravené alikvoty v mrazáku) – proteiny se rozpustí ve vodě (pro štěpení se rozpustí v 50 mM NH₄HCO₃). Připraví se taky směs těchto standardů pro kalibraci přístroje pro měření proteinů.

Vyberou se 3 standardy z následující tabulky (podle dostupnosti):

Protein	Průměrné m/z [Da]
Insulin	[M+H] ⁺ 5734.51
Ubiquitin I	[M+H] ⁺ 8565.76
Cytochrom C	[M+H] ⁺ 12360.97
Myoglobin	[M+H] ⁺ 16952.30



Trypsinogen	[M+H] ⁺	23982
Protein A	[M+H] ⁺	44613
Albumin-hovězí (BSA)	[M+H] ⁺	přibližně 66.5 kDa

Tab. 4: Standardy proteinů a průměrné hmotnosti jejich molekulárních iontů [6,7].

ŠTĚPENÍ

ŠTĚPENÍ PROTEINU V ROZTOKU

1. Připraví se roztok proteinu o koncentraci 1 mg/ml v 50 mM NH₄HCO₃
2. Alikvota o objemu 10 µl se umístí do mikrozkušavky.
3. Přidá se 10 µl 0.1 mg/ml trypsinu v 50 mM NH₄HCO₃.
4. Zkontroluje se pH roztoku univerzálním pH papírkem (opatrně namočit, ať se nenasákne celý objem roztoku); pokud je to nutné, upraví se pH na hodnotu větší než 8 přidáním amoniaku (cca 1 – 2 µl).
5. Mikrozkušavka se vloží do termostatu; ten se nastaví na teplotu 45°C a vzorek se nechá 2 hodiny inkubovat.
6. Štěpení se zastaví přidáním kyseliny octové (cca 1 – 2 µl), když hodnota pH klesne pod 4 (kontrola pH papírkem).
7. 10 µl roztoku se odebere do mikrozkušavky určené pro purifikaci pomocí ZipTip™.

ŠTĚPENÍ PROTEINU V GELU

1. Připraví se 0.02 mg/ml trypsin z 0.1 mg/ml trypsinu – k 20 µl 0.1 mg/ml trypsinu se přidá 80 µl 50 mM NH₄HCO₃.
2. Ke vzorku gelu (gel je odbarvený a vysušený) s ukotveným proteinem se přidá 50 µl 0.02 mg/ml trypsinu, směs se promíchá a nechá se 60 minut inkubovat při pokojové teplotě. Občas se směs lehce promíchá.
3. Mikrozkušavka se vloží do termostatu a nechá se 2 hodiny inkubovat při 45°C.
4. Supernatant se opatrně odsaje mikropipetou do nové mikrozkušavky (I) a sníží se jeho hodnota pH pod 4 pomocí kyseliny octové.
5. Ke kouskům gelu se přidá 50 µl extrakčního roztoku (5% kyselina octová v 75% ACN) a 15 minut se směs nechá jemně třepat.
6. Supernatant se odsaje do nové mikrozkušavky (II) a zopakuje se bod č. 5 s dalším přidáním 50 µl extrakčního roztoku.
7. Roztoky v mikrozkušavkách (I) a (II) se nechají při sníženém tlaku (nebo v dusíkové odparce) zkoncentrovat na objem přibližně 25 µl.
8. Z každé mikrozkušavky se odebere 10 µl do mikrozkušavek určených pro purifikaci pomocí ZipTip™.

PURIFIKACE PEPTIDŮ POMOCÍ ZIPTIP™

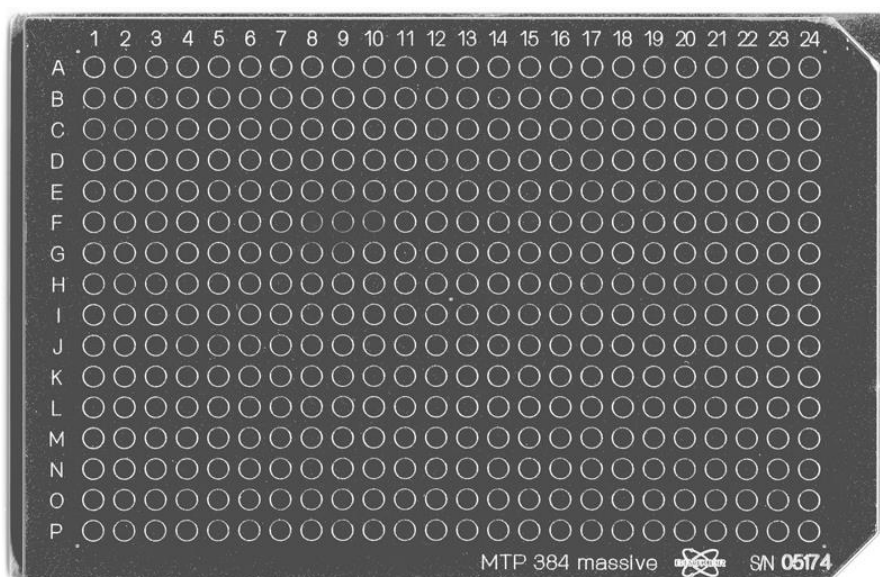
1. Připraví se 50 µl alikvoty 0.1% TFA do mikrozkušavek. Počet alikvotů = 3x počet vzorků.
2. Ke vzorkům v mikrozkušavkách určených pro purifikaci se přidá 1 µl 0.1% TFA.



3. Do prázdné mikrozkušavky se přidá 5 μ l 50% ACN a uzavře se víko.
4. Příprava špičky ZipTipTM:
 - a. Špička se nasadí na mikropipetu a nasaje se 10 μ l 50% ACN. Vypustí se do odpadu. Opakuje se ještě jednou.
 - b. Nasaje se 10 μ l 0.1% TFA z nepoužitého alikvotu a zopakuje se ještě jednou.
5. Sorpce peptidů na špičku ZipTipTM – opakovaně se zvolna nasává a vypouští (nejméně 10krát) digest proteinu přes špičku v mikrozkušavce se vzorkem. Provádí se opatrně tak, aby nedocházelo k vytváření a nasávání vzduchových bublinek.
6. Nasaje se 10 μ l 0.1% TFA z nového alikvotu a vypustí se do odpadu. Opakuje se ještě jednou s použitím dalšího alikvotu.
7. Eluce peptidů ze špičky ZipTipTM – objem mikropipety se upraví na 5 μ l a špička se vloží do předem připravené mikrozkušavky s 50% ACN. Opatrně se nasává a vypouští roztok. Provádí se pomalu; rozpouštědlo se musí dostat ke stacionární fázi ve špičce a nesmí se vytvářet a nasávat vzduchové bubliny.
8. Peptidy purifikované pomocí SPE ZipTipTM a připravené pro měření jsou rozpuštěné v 5 μ l 50% ACN.

NANESENÍ VZORKŮ NA MALDI DESTIČKU

Před nanesením vzorků je nutné se přesvědčit, že je destička čistá. Nanášet se bude metodou *quick and dirty*. Vždy se nanese 1 μ l roztoku matrice a 1 μ l roztoku vzorku a opatrně se roztoky smíchávají špičkou mikropipety. Je vhodné nanést vzorky blízko sebe; **VŽDY JE POTŘEBA SI POZNAČIT POZICI NA DESTIČCE**. Po nanesení všech vzorků se skvrny nechají vyschnout při laboratorní teplotě (případně v digestoři za sníženého tlaku).



www.ms-textbook.com

Obr. 3: Fotka MALDI destičky “MTP 384 massive” od Bruker Daltonik

Na destičku se nanese:



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



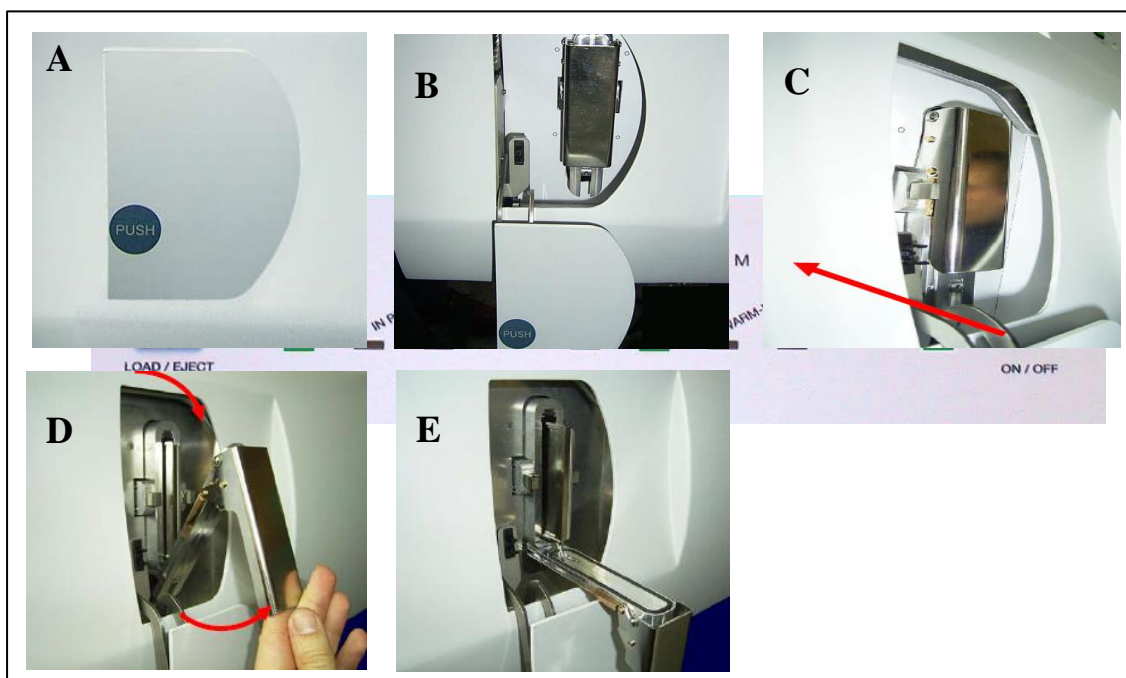
OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

- samotný roztok matrice SA, HCCA a DHB (pro případné změření píků samotné matrice),
- roztok kalibrační směsi peptidů + matrice HCCA (nanesou se 3 skvrny),
- roztok kalibrační směsi proteinů + matrice SA (nanesou se 3 skvrny),
- roztok kalibrační směsi proteinů + matrice DHB (nanesou se 3 skvrny),
- vodné roztoky proteinů + matrice SA,
- vodné roztoky proteinů + matrice DHB,
- digest proteinu před purifikací + matrice HCCA,
- digest proteinu po purifikaci + matrice HCCA,
- supernatant digestu proteinu (z gelu) před purifikací + matrice HCCA,
- supernatant digestu proteinu (z gelu) po purifikaci + matrice HCCA,
- extrakt supernatantu digestu proteinu (z gelu) před purifikací + matrice HCCA,
- extrakt supernatantu digestu proteinu (z gelu) po purifikaci + matrice HCCA.

MĚŘENÍ NA BRUKER ULTRAFLEXTREME

1. MALDI destička s nanesenými a vyschlými skvrnami se nasadí na adaptér a stiskne se tlačítko PUSH (obrázek 4A). Počká se až se kryt dostane dolů (obrázek 4B) a pak se pomocí palce oddělá krytka (obrázek 4C-E). Vloží se MALDI destička s adaptérem a krytka se opět zavře.

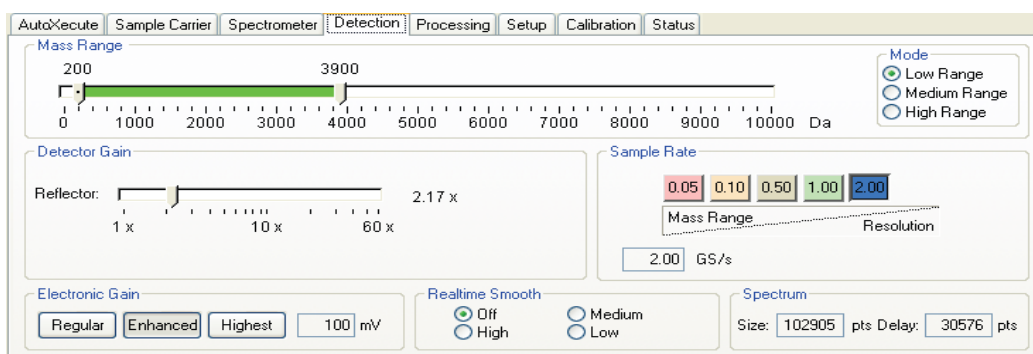


Obr. 4: Zavádění MALDI destičky do iontového zdroje [návod k přístroji].

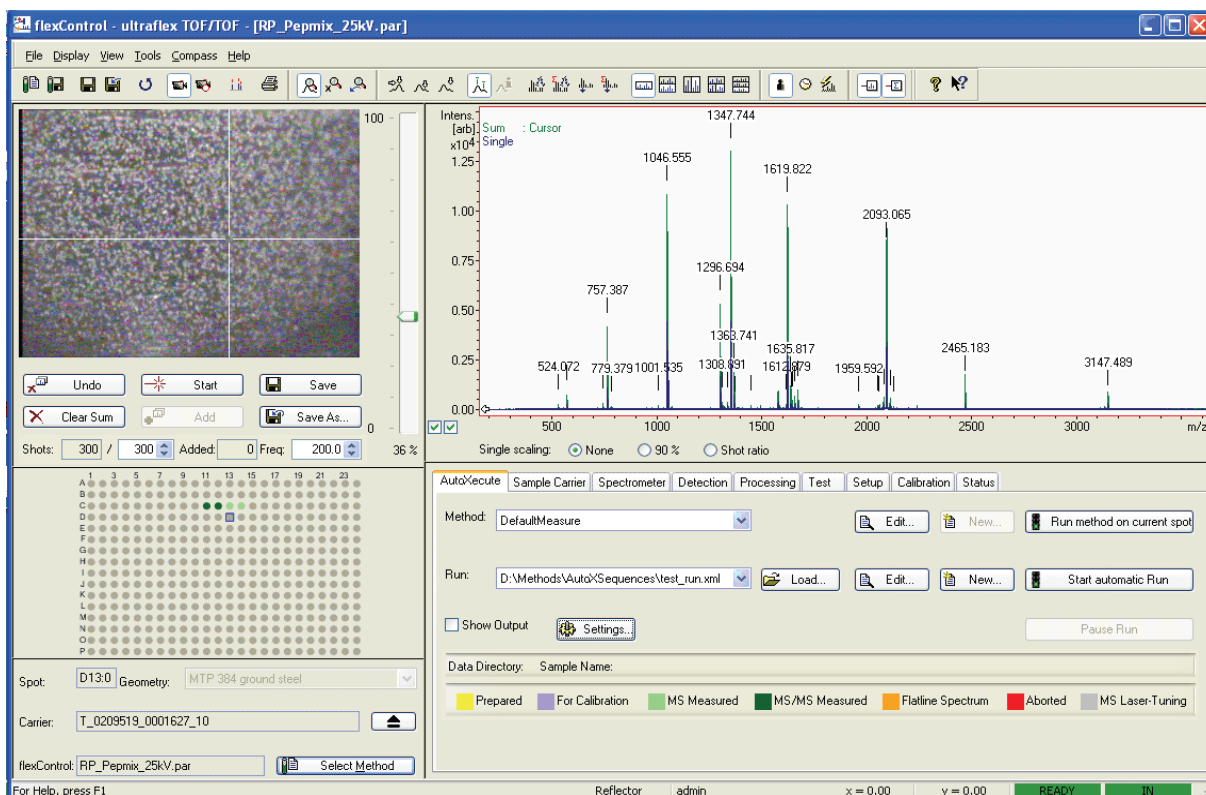
2. Po zavření krytky se zmáčkne zelené tlačítko LOAD/EJECT (obrázek 5). Počká se, až se MALDI destička “usadí” v iontovém zdroji a až se rozsvítí kontrolka READY. Ta značí, že přístroj je připraven k měření.

Obr. 5: Kontrolky na předním panelu Bruker ultrafleXtreme [návod k přístroji]

3. V hlavním panelu programu flexControl (obrázek 7) se klikne na *File*→*Select method* a vybere se vhodná metoda. Pro měření peptidů se použije připravená metoda pro peptidy s RP (reflector positive) a pro měření proteinů metoda s LP (linear positive).
4. V položce *Sample Carrier* se vybere vhodná destička a nahraje se (pokud již není nahraná).
5. V položce *Detection* (obrázek 6) se zkontroluje rozsah $\frac{m}{z}$, ve kterém se bude měřit, a případně se upraví.

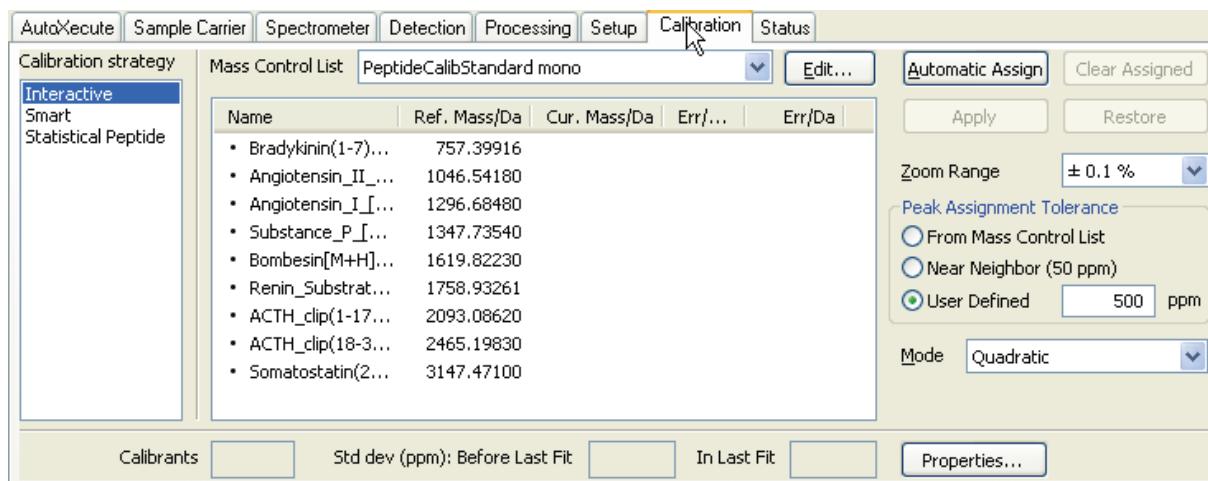


Obr. 6: Položka *Detection* programu flexControl



Obr. 7: Hlavní okno programu flexControl

6. Před začátkem kalibrace se otevře položka *Calibration* (obrázek 8) a načte se vhodný seznam peptidů/proteinů na kterých se přístroj zkalibruje. Pokud není seznam úplný, doplní se název proteinu/peptidu a jeho hmotnost. Je taky potřeba zkontolovat stav přístroje – musí svítit zelená kontrolka READY a ACCES na přístroji. V programu flexControl lze vidět v pravém dolním rohu nápis READY a IN na zeleném podkladu (IN značí, že je destička vložena a připravena k měření).

**Obr. 8:** Položka *Calibration* programu flexControl

7. Na schématu MALDI destičky v levé dolní části hlavního okna programu flexControl (obrázek 7) se klikne na pozici, na které by měla být nanesena kalibrační směs/standard. Na kameře lze sledovat, jak se destička posouvá na požadovanou pozici.
8. V kolonce *Shots* pod kamerou se nastaví počet, kolikrát bude laser „pálit“ krátkými pulsy – tím se taky určí počet spekter, které se z dané skvrny naměří a zprůměrují – hodnotu nastavit na 500. Vhodná energie laseru se nastaví na posuvníku napravo od kamery – začíná se měřit s malou energií laseru a pomalu se posouvá posuvníkem nahoru, dokud dochází ke zlepšování kvality spekter. Jakmile se začne zvedat „baseline“ spektra, přestane se se zvyšováním energie laseru a nastaví se posuvník o zhruba 5% níže.
9. Klikne se na tlačítko Start pod kamerou a začne se měřit. Při „střílení“ laserem se ručně posouvá destičkou tak, že se myší kliká na různé body na kameře. Po „nastřílení“ celého předem nadefinovaného počtu spekter se zprůměrované spektrum uloží kliknutím na *Save As* (kliknutím na *Save* se přepíše soubor se stejným názvem) a popíše se soubor.
10. V položce *Calibration* se klikne na *Automatic Assign*. Tím se přiřadí hmotnosti naměřených píků standardů peptidů k jejich referenčním hmotnostem z načteného seznamu. Zkontroluje se spektrum, zda píky odpovídají referenčním hmotnostem (v co nejmenším rozsahu $\frac{m}{z}$) a klikne se na *Apply*. Tím se přístroj nakalibruje. V tabulce je vidět jak moc se liší naměřená hodnota od hodnoty referenční a vypočtená chyba. Klikne se na *Save* a spektrum se znovu uloží.
11. Změří se spektra digestů proteinu a uloží se.
12. Pro měření proteinů se vybere metoda v režimu *Linear Positive* (LP) a provede se kalibrace pomocí nanesené směsi standardů proteinů.
13. Změří se spektra jednotlivých proteinů a uloží se.

IDENTIFIKACE PROTEINU Z TRYPTICKÝCH ŠTĚPŮ



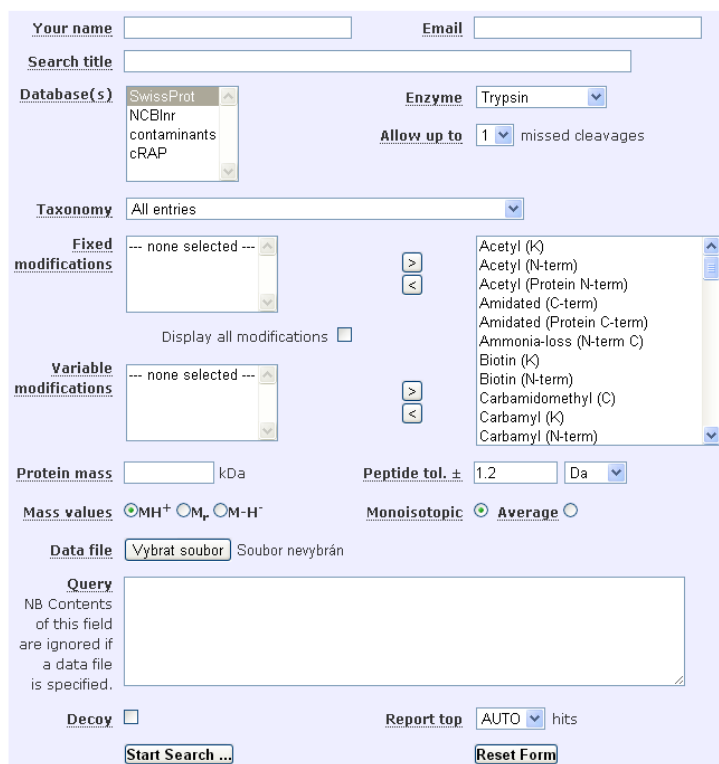
Search this site 

Home Mascot database search Products Technical support Training News Blog Contact

Access Mascot Server | Database search help

Mascot database search > Access Mascot Server > Peptide Mass Fingerprint

MASCOT Peptide Mass Fingerprint



The screenshot shows the MASCOT Peptide Mass Fingerprint search interface. It includes fields for 'Your name', 'Email', and 'Search title'. The 'Database(s)' dropdown is set to 'SwissProt', and the 'Enzyme' is set to 'Trypsin'. The 'Allow up to' dropdown is set to '1 missed cleavages'. The 'Taxonomy' dropdown is set to 'All entries'. There are sections for 'Fixed modifications' and 'Variable modifications', both currently set to '--- none selected ---'. A list of modifications is visible on the right, including Acetyl (K), Acetyl (N-term), Acetyl (Protein N-term), Amidated (C-term), Amidated (Protein C-term), Ammonia-loss (N-term C), Biotin (K), Biotin (N-term), Carbamidomethyl (C), Carbamyl (K), and Carbamyl (N-term). The 'Protein mass' field is empty, and the 'Peptide tol. ±' is set to '1.2 Da'. The 'Mass values' section has radio buttons for 'MH+', 'M+', and 'M-H+', with 'MH+' selected. The 'Monoisotopic' section has radio buttons for 'Average' and 'Monoisotopic', with 'Average' selected. There is a 'Data file' dropdown set to 'Vybrat soubor' and a 'Query' text area. At the bottom, there are 'Start Search ...' and 'Reset Form' buttons, and a 'Report top' dropdown set to 'AUTO hits'.

Obr. 9: Stránky MASCOT PMF (dostupné z <http://www.matrixscience.com>)

1. Vyplní se jméno, email, popis vzorku, vybere se databáze SwissProt, enzym trypsin, povolí se pouze 1 místo nerozštěpené enzymem.
2. Taxonomie se doplní, pokud je původ vzorku znám.
3. Zadá se hodnota molekulové hmotnosti hledaného proteinu.
4. Jako předpokládaná modifikace se vybere oxidace methioninu.
5. Tolerance se nastaví podle kalibrace. Většinou přibližně 500 ppm.
6. Do pole *Query* se postupně napíšu monoizotopické hmotnosti všech naměřených peptidů (vypíšu se hmotnosti ze spekter digestů). Čím více hodnot se vloží, tím přesnější bude hledání v databázi. Místo pole *Query* je také možné nahrát datovou tabulku, pokud je k dispozici.
7. Hledání se zahájí kliknutím na *Start Search*.
8. Výsledky se prodiskutují s vedoucím workshopu.



Doporučená literatura

- [1] <http://bart.chemi.muni.cz/courses/MS%20Bio%20CZ%202012.pdf> (cit. 21.6.2013)
- [2] <http://prescottbiochem09.wikispaces.com/How+does+MALDI-TOF+work%3F> (cit. 21.6.2013)
- [3] GURÁŇ, Roman. Nanášení vzorků pro desorpční analytické metody (online). 2010 (cit. 21.6.2013). Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Jan Preisler. Dostupné z: <http://is.muni.cz/th/270205/prif_b/>.
- [4] <http://bart.chemi.muni.cz/courses/Lab%20Cv%20MALDI%202008%20CZ.doc> (cit. 21.6.2013)
- [5] http://www2.bdal.de/data/care-online_data/206195/PI_206195_Peptide%20Cal%20Stand_V2.pdf (cit. 21.6.2013)
- [6] http://www2.bdal.de/data/care-online_data/206355/PI_206355_Protein%20Cal%20Stand%20I_V3.pdf (cit. 21.6.2013)
- [7] http://www2.bdal.de/data/care-online_data/207234/PI_207234_Protein%20Stand%20II_V5.pdf (cit. 21.6.2013)



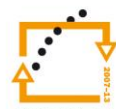
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost