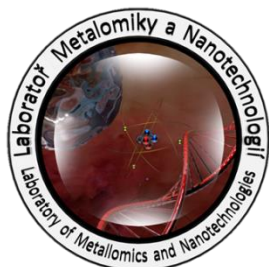




Laboratoř Metalomiky a Nanotechnologií



Hmotnostní detekce biologicky významných sloučenin pro biotechnologie – část 3 - Provedení štěpení proteinů a následné analýzy, vyhodnocení výsledků, diskuse

Anotace

V poslední části kurzu se budeme zabývat jednou z nejčastějších aplikací MALDI TOF/TOF a tou je analýza nebo identifikace proteinů. Analýze pomocí MALDI-TOF/TOF předchází většinou separační krok pomocí 2-D elektroforézy pro izolaci určitého proteinu anebo skupiny proteinů. Tyto proteiny je nutno dále neštěpit na peptidy, které jsou podrobeny vlastní spektrometrické analýze. Vzorek lze pro tyto účely připravit několika způsoby, jako jsou štěpení v gelu nebo v roztoku. Po získání a interpretaci hmotnostních spekter je nutno provést jejich porovnání s knihovnou spekter aby bylo možné identifikovat konkrétní protein.

Pracovní postup

ŠTĚPENÍ



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



ŠTĚPENÍ PROTEINU V ROZTOKU

1. Připraví se roztok proteinu o koncentraci 1 mg/ml v 50 mM NH_4HCO_3
2. Alikvota o objemu 10 μl se umístí do mikrozkušavky.
3. Přidá se 10 μl 0.1 mg/ml trypsinu v 50 mM NH_4HCO_3 .
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 NH_4HCO_3 .
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 ZipTip™:
 - 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 ZipTip™ – 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 ZipTip™ – 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 ZipTip™ a připravené pro měření jsou rozpuštěné v 5 μ l 50% ACN.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



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

Your name Email
 Search title
 Database(s) Enzyme
 NCBInr
 contaminants
 cRAP
 Allow up to missed cleavages
 Taxonomy
 Fixed modifications
 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)
 Carbamyl (N-term)
 Display all modifications
 Variable modifications
 Protein mass kDa Peptide tol. Da
 Mass values MH⁺ OM⁺ OM⁻ OM⁻H⁻ Monoisotopic Average
 Data file Soubor nevybrán
 Query
 NB Contents of this field are ignored if a data file is specified.
 Decoy Report top 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)