

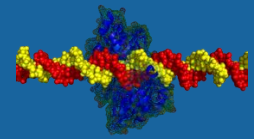
Notă: fata de versiunea folosita la curs, in aceasta a fost inversata ordinea prezentării a 2 secțiuni – tehnicile imunologice si metodele de proteomica. **Informațiile sunt aceleași.**

Tehnici de Biologie Moleculară

18.12.2024

Curs 7 – Identificarea imunologica a proteinelor pe gel.

Spectrometria de masă ca principala tehnică de proteomică



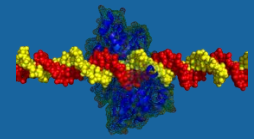
Evidențierea imunologică a proteinelor

Tehnicile imunologice și-au găsit un număr foarte mare de utilizări în biologia moleculară, având aplicații diverse, de la identificarea proteinelor cu ajutorul anticorpilor până la purificarea proteinelor prin imunoprecipitare sau cromatografie de imunoafinitate. În cele ce urmează sunt prezentate tehnicile ce stau la baza metodei cunoscute sub numele general de **Western-blot**, metodă ce are ca scop evidențierea și identificarea specifică a moleculelor proteice transferate pe membrane. Tehnica presupune parcurgerea a 2 etape distincte:

1. **producerea anticorpilor policlonali**
2. **imunobloting-ul.**

Obținerea anticorpilor policlonali. Tehnici de imunizare

Anticorpii sunt proteine serice care apar în organism ca răspuns la pătrunderea antigenelor și au capacitatea de a reacționa specific atât „*in vivo*” cât și „*in vitro*” cu antigenele care le-au indus apariția. **Anticorpii policlonali** sunt molecule de imunoglobuline (Ig) produse de diferite tipuri de limfocite B ca urmare a stimulării cu un antigen specific ce prezintă mai mulți epitopi diferiți. Spre deosebire de **anticorpii monoclonali** produși de un singur tip de limfocit B față de un singur epitop specific, cei policlonali reprezintă un amestec de anticorpi, fiecare fiind determinat și capabil să reacționeze specific cu un anumit epitop din structura antigenului.

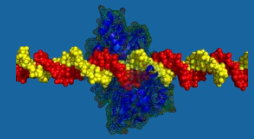


Obținerea anticorpilor policlonali. Tehnici de imunizare

În mod obișnuit anticorpul apar în serul sanguin al indivizilor sau pacienților care au intrat în contact cu antigenele; cu toate acestea, **anticorpul pot fi obținuți și în laborator prin imunizarea unor animale cu antigene purificate sau parțial purificate.** Cele mai utilizate **antigene în acest sens sunt proteinele sau peptidele**, dar se pot folosi și **glucide, acizi nucleici, celule sau țesuturi.**

Obținerea anticorpilor policlonali depinde în mare măsură de calitatea, cantitatea și puritatea antigenului. În cazul utilizării ca antigen a proteinelor, acestea trebuie să fie pure, putând fi folosite atât formele denaturate cât și cele native. De asemenea trebuie să se țină cont de faptul că eventualii contaminanți care se pot administra împreună cu antigenul pot declanșa o reacție imună mult mai puternică, ceea ce duce la sinteza unor anticorpi cu o specificitate mai mare pentru contaminant decât pentru proteina de interes.

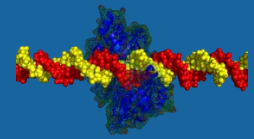
Anticorpul policlonali pot fi obținuți prin metode mai simple și într-un timp mai scurt în comparație cu cei monoclonali. Metodele de obținere necesită echipamente relativ ieftine și disponibile în orice laborator de biologie moleculară. În plus, anticorpul policlonali obținuți prin imunizarea animalelor de laborator oferă și avantajul utilizării directe într-o serie de tehnici ca imunoprecipitarea, imunobloting-ul sau ELISA (engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays).



Obținerea anticorpilor policlonali. Tehnici de imunizare

Alegerea animalelor ce urmează a fi imunizate trebuie să țină cont de câteva criterii:

1. specificitatea anticorpilor ce urmează a fi obținuți: de ex. pentru obținerea anticorpilor cu o înaltă specificitate se preferă utilizarea unor animale transgenice;
2. relația dintre specia donor a antigenului și cea a producătorului de anticorpi: cu cât distanța filogenetică între cele două organisme este mai mare cu atât potențialul de producere al anticorpilor este mai ridicat;
3. cantitatea anticorpilor necesară: în funcție de cantitatea de ser dorită pot fi imunizați șoareci și șobolani de laborator, hamsteri sau iepuri; de pildă imunizarea iepurilor permite obținerea unui volum de 25 ml ser la fiecare sângerare fără a pune în pericol viața acestuia; pentru experimente la scară mai mică sau pentru obținerea unor anticorpi cu o specificitate ridicată se pot utiliza și linii inbred de șoareci; utilizarea șoarecilor are și un alt avantaj: datorită taliei mai mici, volumul suspensiei de antigen necesară pentru imunizare este de asemenea mai mic; în cazul șoarecilor la o singură sângerare se pot obține 0,5 ml ser, dar prin sângeri succesive se poate ajunge până la un volum de aproximativ 5 ml.
4. este extrem de important ca pentru imunizarea animalelor în scopul obținerii de anticorpi să se aleagă metoda potrivită în funcție de natura antigenului ce va fi folosit (3).



Imunobloting-ul

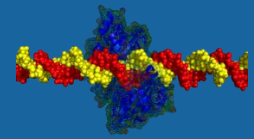
Imunobloting-ul

Tehnicile de imunobloting sau Western bloting-ul se utilizează în scopul identificării unor proteine recunoscute specific de anticorpi monoclonali sau policlonali.

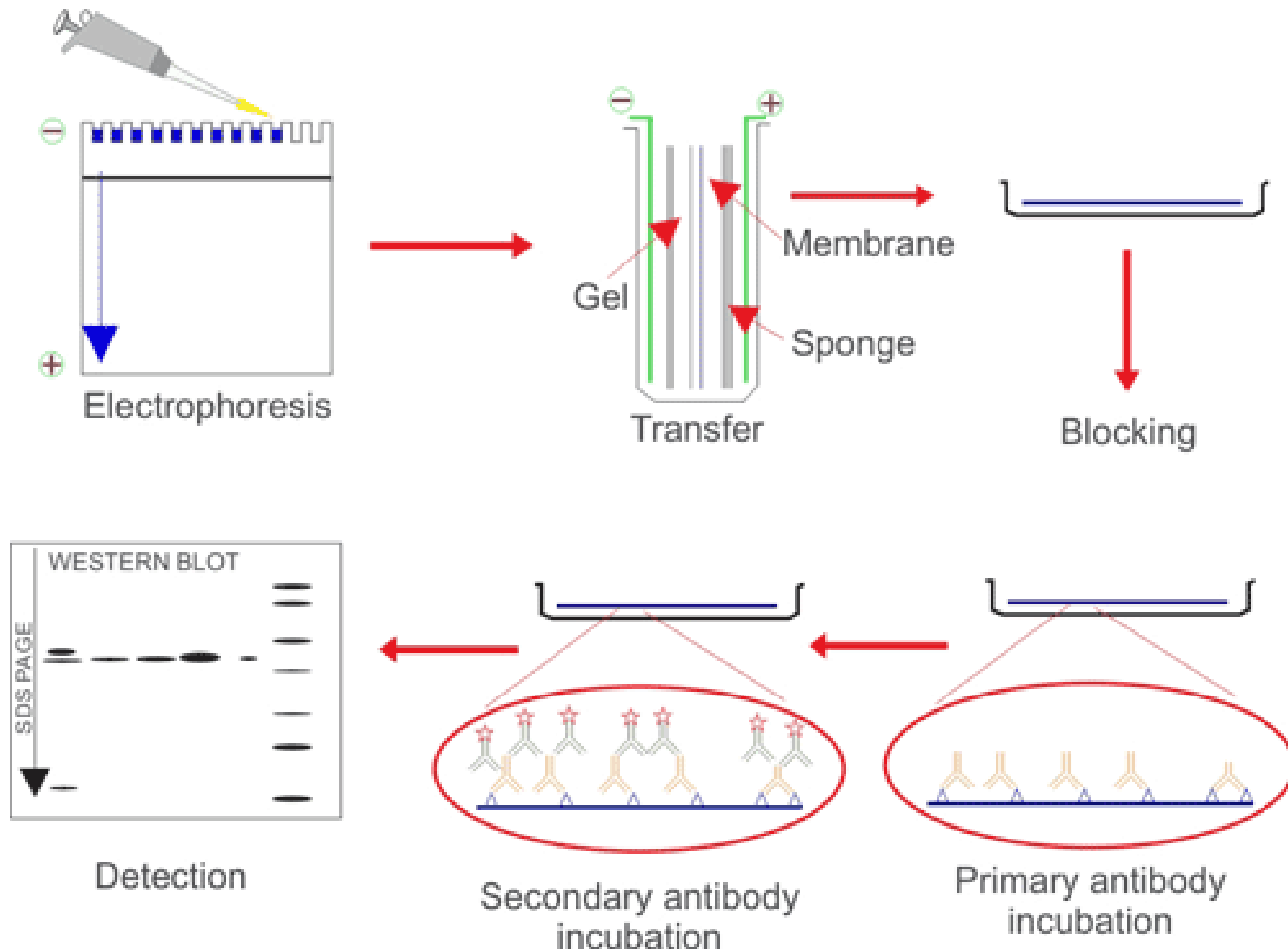
În scopul identificării, **proteinele sunt separate electroforetic folosind SDS-PAGE**, după care sunt **transferate pe membrane de nitroceluloză, nailon sau difluorură de poliviniliden**.

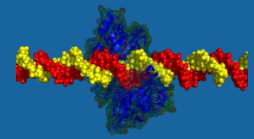
Imuno-deteția propriu-zisă constă în tratarea membranei cu un **anticorp primar** care se leagă specific de proteina de interes. Siturile de legare rămase libere sunt apoi blocate prin imersarea membranei într-o soluție ce conține un agent de blocare (o proteină sau un detergent inert din punct de vedere imunologic). Membrana este spălată și apoi tratată cu un **anticorp secundar anti-IgG** ce se va lega de anticorpul primar. **Anticorpul secundar este modificat în mod specific, în sensul că este cuplat cu o enzimă ce poate genera în prezența unui substrat cromogen, produs colorat ce marchează prezența proteinei de interes.**

O variantă mai simplă de imunobloting este reprezentată de **dot-blot**. În acest caz proteinele de interes nu mai sunt separate electroforetic, ci sunt depuse direct pe membrană sub forma unui punct (**dot, spot**). Dot-blot-ul este o tehnică preliminară folosită pentru a identifica prezența unui antigen specific într-o probă.



Imunobloting-ul



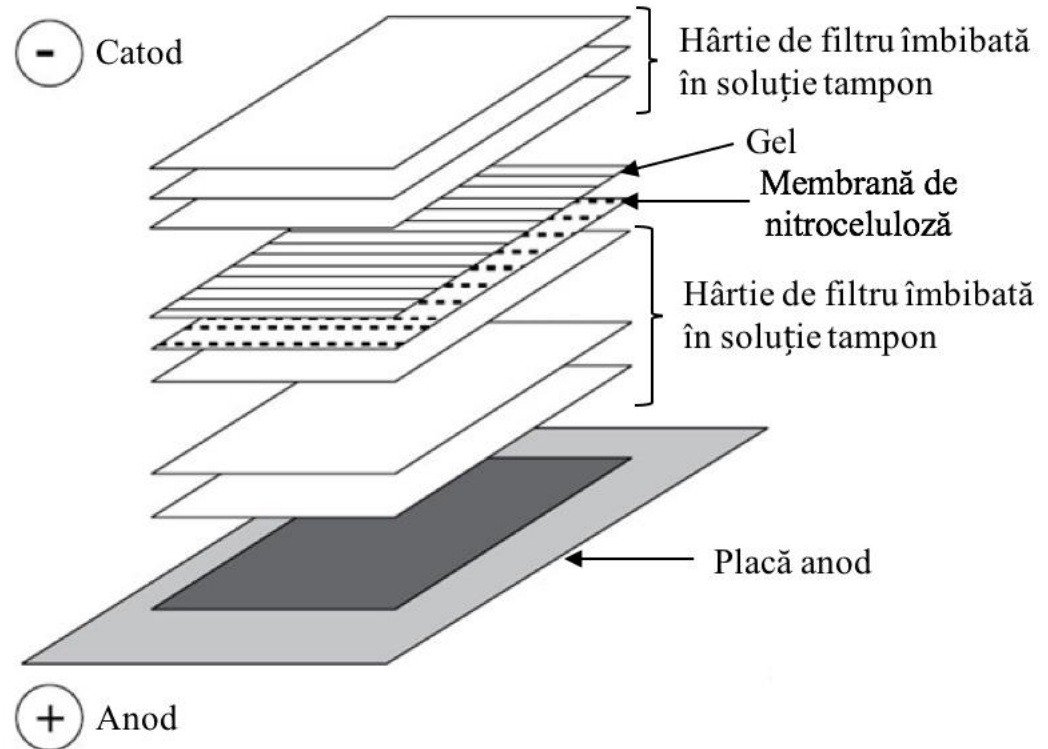


Imunobloting-ul

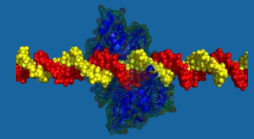
Imunobloting-ul presupune parcurgerea a 2 etape distincte:

a. Electro-transferul proteinelor pe membrane

O metodă eficientă de transfer a majorității proteinelor din gelul de poliacrilamidă pe membrane diverse este reprezentată de **blot-ul semi-uscat**. În acest caz, gelul de poliacrilamidă este plasat orizontal, peste membrană, între foi de hârtie de filtru saturate cu soluție tampon. Electrozii sunt puși în contact direct cu foile de hârtie de filtru, foarte aproape unul de celălalt. Prin aplicarea unui curent de la o sursă de curent standard precum cea utilizată pentru electroforeză, proteinele încărcate negativ vor migra rapid din pe gelul de poliacrilamidă pe membrana.



a. Imunodetecția proteinelor transferate pe membrane de nitroceluloză



Imunobloting-ul

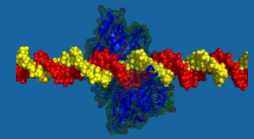
Avantaje:

Tehnicile de imunobloting se utilizează în principal pentru studiul expresiei, purificării și modificărilor proteinelor având numeroase aplicații în cercetare și diagnosticul clinic. Deși inițial a fost folosit doar pentru identificarea unor proteine din amestecuri migrate electroforetic, ulterior imunobloting-ul a fost combinat cu electroforeza bidimensională și spectrometria de masă permițând studiul isoformelor cu reactivitate încrucișată ale aceleași proteine rezultate prin modificări post-tranlaționale sau clivaje proteolitice.

Aplicațiile în diagnosticul de laborator se bazează pe identificarea unor antigene de natură proteică asociate cu diferiți patogeni, alergeni sau tumori, folosind ca sursă de anticorpi primari serul pacientului.

Limitări:

Metoda se bazează pe reacția specifică dintre un anticorp și proteina corespunzătoare. Deoarece pe parcursul electroforezei proteinele suferă un proces de denaturare, recunoașterea acestora de către anticorpii specifici poate avea de suferit. Din acest motiv eficiența unui anumit anticorp de a se lega specific de proteina corespunzătoare trebuie determinată mai întâi empiric. Frecvent anticorpii disponibili comercial sunt caracterizați de producători din punctul de vedere al eficienței lor în diferite aplicații (Western blot, imunoprecipitare).



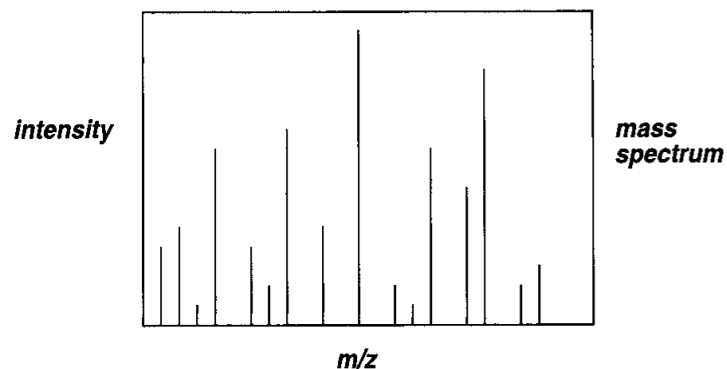
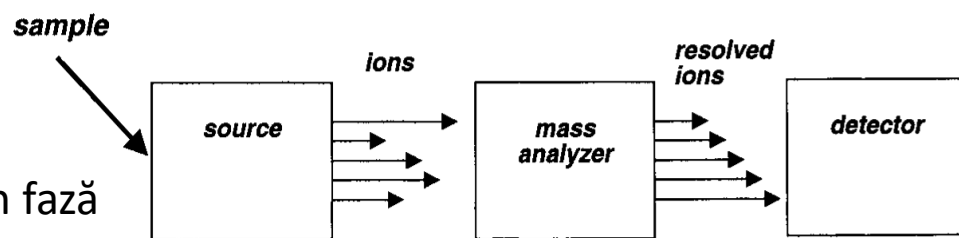
II. 1. Principii generale și particularități legate de măsurarea peptidelor/proteinelor

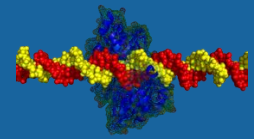
Spectrometria de masă este o tehnică analitică prin care este măsurat raportul masă-sarcină (m/z) al moleculelor încărcate electric. Raportul m/z poate fi mai apoi utilizat pentru a identifica cu precizie masa moleculară (M_w - molecular weight) a moleculelor neutre. Rezultatul unei analize de spectrometrie de masă este **un spectru de masă – un grafic ce are pe axa OX valoarea m/z în Da a ionilor analizați, iar pe OY intensitatea semnalului corespunzătoare ionului analizat.** Instrumentul ce înregistrează spectrul de masă poartă numele de **spectrometru de masă** și este alcătuit din 3 componente principale:

A. O **sursă de ioni** – asigură trecerea probei în fază gazoasă, ionizarea moleculelor din proba de analizat și transferul ionilor către

B. Un **analizor de masă** – în care ionii sunt separați funcție de m/z și sunt transferați către

C. Un **detector** sensibil la prezența ionilor separați de analizor care trimite semnale către un computer ce înregistrează **spectrul de masă**.



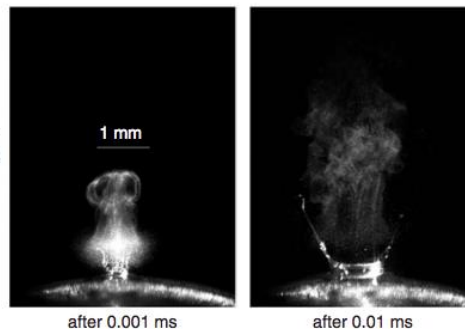
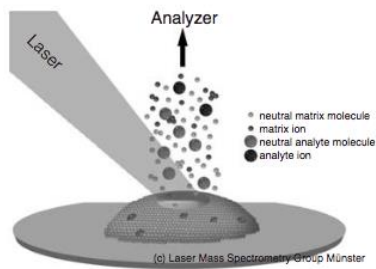


A. Surse de ioni utilizabile în proteomică

Moleculele neutre pot fi convertite în ioni prin diverse mecanisme chimice sau fizice.. Pentru a putea fi preluate de analizorul de masă, ionii generați în sursă trebuie să fie în stare gazoasă. În cazul moleculelor biologice, metodele de ionizare trebuie să fie foarte eficiente, dar să nu distrugă/fragmenteze analitul. Din aceste motive, în studiile de proteomică s-au impus preponderent două tipuri de ionizare:

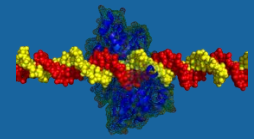
1. MALDI - Matrix assisted LASER desorption ionization - Proba de Compuși frecvent utilizați ca matrice în MALDI

analizat amplasată într-un matrice cu caracter acid este supusă unor pulsuri laser repetate de 50-200 ori. Pulsurile au loc în general în vacum și generează explozii de mici dimensiuni ale probei de analizat, peptidele și proteinele ionizând norul ce apare în urma exploziei. Deoarece mediul este acid, **ionii ce se formează sunt preponderent pozitivi**. Matricea utilizată în MALDI are rolul de a genera protoni, dar de asemenea și de a prelua majoritar energia pulsurilor laser. Moleculele din matrix ionizează și ele, însă masa lor moleculară (100-200 Da) este semnificativ mai mică decât cea a peptidelor sau proteinelor (peste 1000 Da), fiind ușor de ignorat în analizorul de masă.



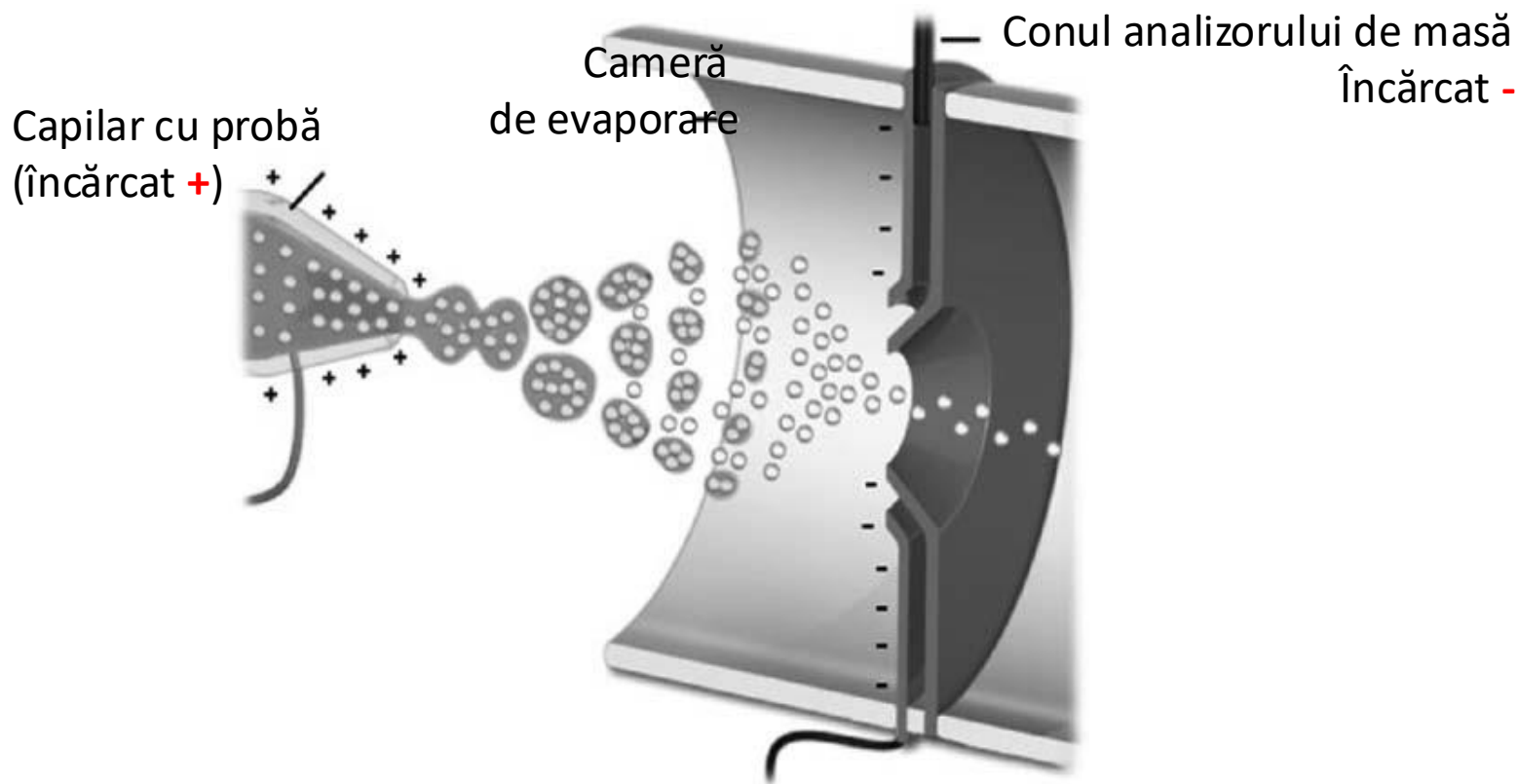
Matrix	Structure	Wavelength	Major applications
Nicotinic acid	<chem>OC(=O)c1cccnc1</chem>	UV 266 nm	Proteins, peptides, adduct formation
2,5-Dihydroxybenzoic acid (plus 10% 2-hydroxy-5-methoxybenzoic acid)	<chem>OC(=O)c1cc(O)cc(O)c1</chem>	UV 337 nm, 353 nm	Proteins, peptides, carbohydrates, synthetic polymers
Sinapinic acid	<chem>OC(=O)C=Cc1cc(OC)c(OC)c1O</chem>	UV 337 nm, 353 nm	Proteins, peptides
α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid	<chem>OC(=O)C=Cc1ccc(O)c(C#N)c1</chem>	UV 337 nm, 353 nm	Peptides, fragmentation
3-Hydroxy-picolinic acid	<chem>OC(=O)c1ccc(O)c(O)c1</chem>	UV 337 nm, 353 nm	Best for nucleic acids
6-Aza-2-thiothymine	<chem>Cc1nc(O)n(C)nc1S</chem>	UV 337 nm, 353 nm	Proteins, peptides, non-covalent complexes; near-neutral pH
k,m,n-Di(tri)hydroxy-acetophenone	<chem>CC(=O)c1c(O)c(O)c(O)c1</chem> X = OH or H	UV 337 nm, 353 nm	Protein, peptides, non-covalent complexes; near-neutral pH
Succinic acid	<chem>OC(=O)CC(=O)O</chem>	IR 2.94 μ m, 2.79 μ m	Proteins, peptides
Glycerol	<chem>OCC(O)CO</chem>	IR 2.94 μ m, 2.79 μ m	Proteins, peptides, liquid matrix

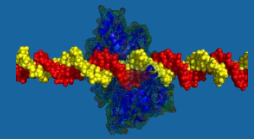
IR = infrared; UV = ultraviolet.



Spectrometria de masă – instrumente

2. **ESI** - **electrospray ionization** – dacă în MALDI proba de analizat trebuie să fie solidă, în ESI aceasta este în soluție. Proba de analizat dizolvată într-un solvent volatil și acid este pulverizată foarte fin printr-un capilar într-o cameră de evaporare ce comunică cu conul analizorului de masă. Solventul este treptat eliminat din picăturile formate în camera de evaporare, analitul devenind astfel gaz. Prin evaporarea solventului acid se generează un exces de protoni, ceea ce face ca analitul să ionizeze. Între capilarul ce pulverizează proba și conul analizorului de masă există o diferență mare de voltaj ce direcționează ionii către conul detectorului de masă.





Particularități ale peptidelor și proteinelor în analiza MS

În cazul peptidelor, sarcina lor netă este variabilă, astfel:

1. În soluție, **gradul de ionizare al peptidelor depinde de pH:**

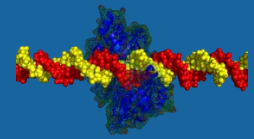
- catenele laterale ale aminoacizilor dicarboxilici sunt ne-ionizate la valori de pH mai mici de 3.0 și ionizate (încărcate negativ) la valori de pH mai mari de 7.0
- capătul N terminal și aminoacizii di-aminici sunt ionizați la pH mai mic de 8.5
- funcție de valoare de pH a mediului, peptidele pot fi așadar încărcate pozitiv ($\text{pH} < 3.5$) sau negativ (la valori bazice de pH). De cele mai multe ori ionizarea peptidelor se face în mediu acid, ionii rezultând prin protonarea resturilor NH_2 și având astfel sarcină pozitivă.

2. În **ESI peptidele nu ionizează uniform**. Orice peptidă obținută prin utilizarea tripsinei în faza de hidroliză va avea cel puțin 2 radicali ionizabili: capătul N terminal și restul de Lys/Arg unde a avut loc hidroliza la capătul C-terminal. Prin ESI, din peptida va produce așadar cel puțin 3 tipuri de molecule:

- **peptida neionizată** – nu poate fi preluată de analizorul de masă și deci nu va apărea în spectrul de masă;
- **peptida ionizată la un capăt** – are o sarcină pozitivă, va apărea în spectrul de masă cu $m/z = M_w + 1A_H/1 = M_w + 1 \text{ Da}$
- **peptida ionizată la ambele capete** – are două sarcini pozitive, va apărea în spectrul de masă cu $m/z = M_w + 2A_H/2 \text{ Da}$.

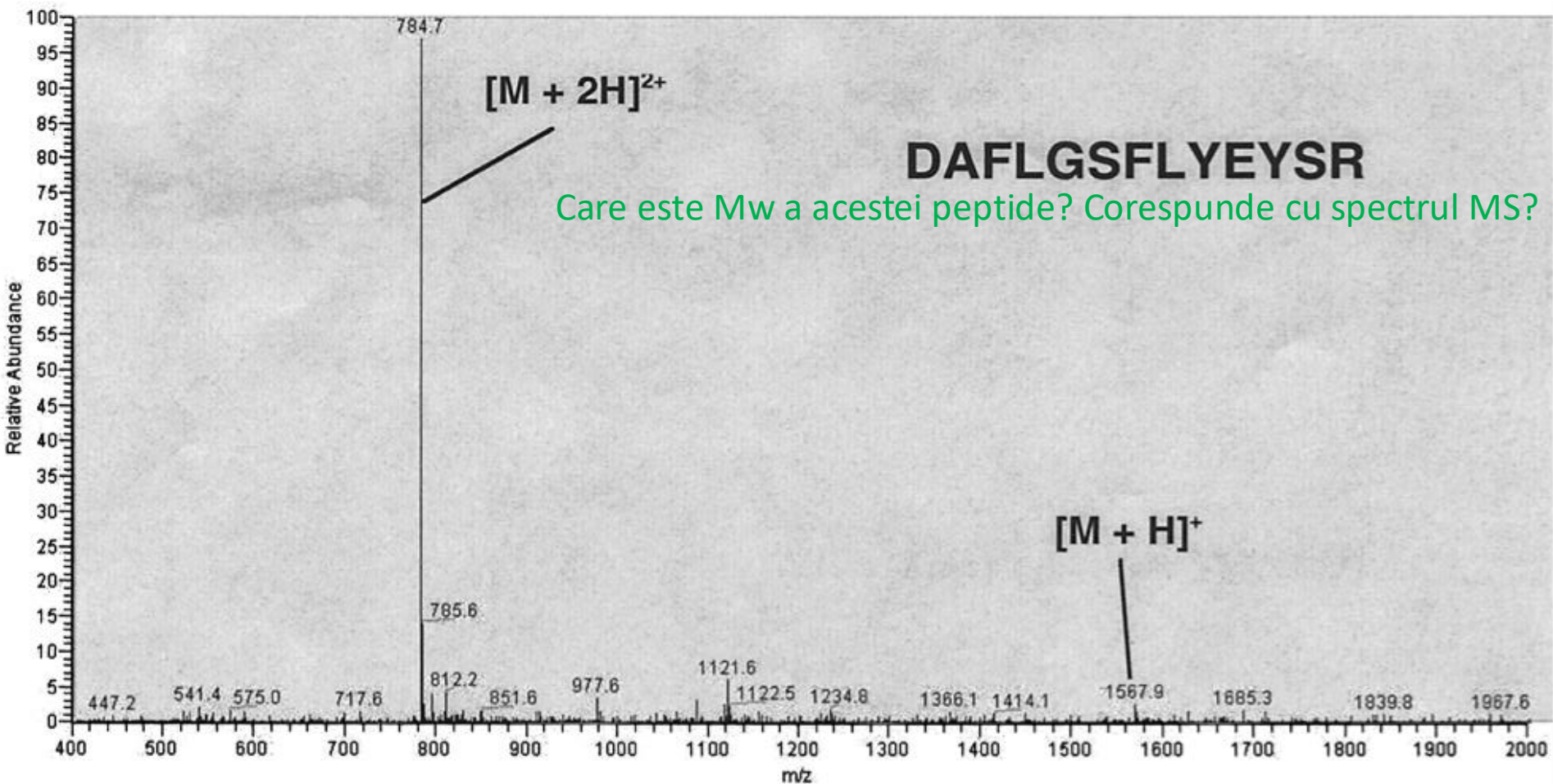
Și proteinele native pot fi ionizate prin ESI. Proteinele prin catenele laterale ale aminoacizilor expuși la exterior pot accepta 10-30 protoni. Similar cu o peptidă, și **o proteină va genera o populație de ioni cu m/z cuprins între $m/10$ $m/30$.**

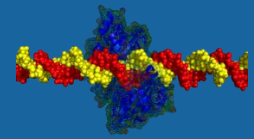
Distribuția populației de ioni proveniți din aceeași moleculă dar având cu m/z diferite poartă numele de anvelopă multi-sarcină. În cazul **peptidelor, anvelopa multi-sarcină conține 2 semnale** în cele mai multe cazuri, **3 semnale dacă în secvență există aminoacizi bazici**. **Anvelopa multi-sarcină a proteinelor conține numeroase semnale** și poate fi utilizată pentru identificarea masei moleculare a proteinei de interes printr-un proces automatizat de deconvoluție a semnalelor.



Particularități ale peptidelor și proteinelor în analiza MS

Spectrul ESI-MS al peptidei cu secvența indicată. Cele două semnale corespunzătoare celor două stări de ionizare sunt evidențiate



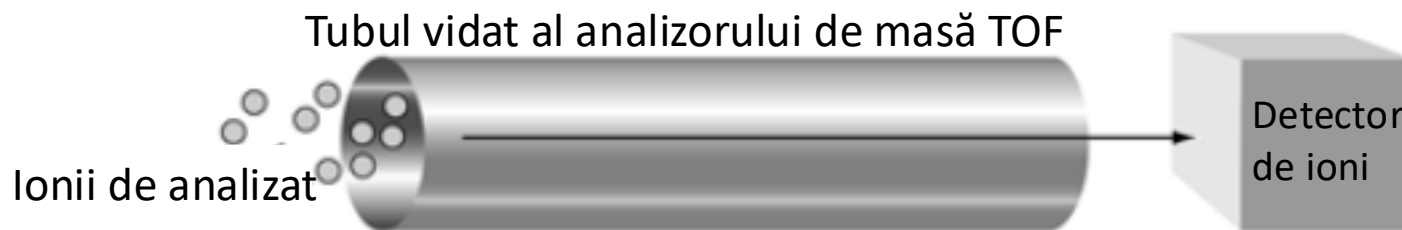


B. Analizoare de masă utilizate în proteomică

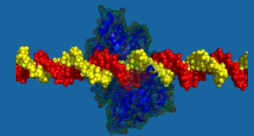
1. **Analizor de masă TOF** – time of flight – ionii generați de sursă sunt transferați într-un tub vidat și accelerați printr-un tub cu ajutorul unui câmp electric constant. Viteza de deplasare a ionilor este dependentă de sarcina acestora – cu cât sarcina este mai mare, cu atât au fost accelerați mai puternic și deci viteza de deplasare va fi mai mare. Pentru ionii cu sarcini egale, viteza de deplasare depinde doar de masa ionilor – ionii mai grei vor avea o viteză mai mică, iar cei mai ușori o viteză mai mare. **Analizorul de masă separă ionii pe baza timpului necesar ca aceștia să parcurgă în zbor o distanță prestabilită – lungimea tubului vidat al detectorului TOF.**



Bendix MA-2
Time-of-Flight
Mass
Spectrometer,
1960s



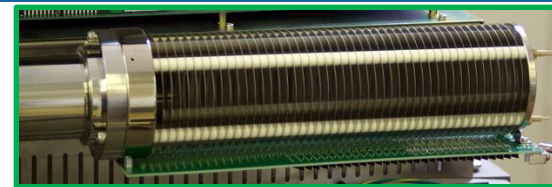
Despre un analizor de masă TOF funcționând după principiile de mai sus se spune că funcționează în **modul liniar**. Indiferent care ar fi sursa de ioni, toate detectoarele TOF funcționând în acest mod au o rezoluție scăzută datorită distribuției spațiale a ionilor cu același m/z (**distribuția în norul ce se formează printr-un puls laser în MALDI a ionilor de aceeași sarcină**). Deoarece ionii cu același m/z nu pleacă simultan din același loc în spațiu, distanța pe care o parcurg până la detector este diferită și deci timpul de zbor înregistrat de detector pentru ioni cu același m/z va varia și se va suprapune cu ioni ce au m/z foarte apropiat => **rezoluție scăzută**.



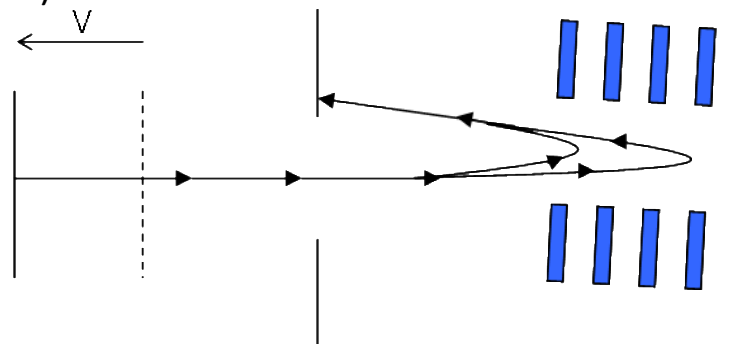
Spectrometria de masă – instrumente

Rezoluția de separare a analizoarelor de masă TOF a fost însă îmbunătățită prin apariția a 2 inovații tehnice:

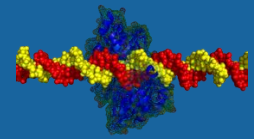
1. Introducerea unui **reflectron** – un dispozitiv ce generează un câmp



electrostatic care acționează asemănător unei oglinzi ionice, reflectând fluxul de ioni înapoi în tubul de zbor, însă pe o traiectorie ușor diferită. Ionii ce au viteză mare vor pătrunde mai adânc în câmpul electrostatic al reflectronului, vor fi astfel frânați mai puternic și reflectați târziu. Ionii mai lenți nu vor avea energia cinetică necesară pentru a pătrunde adânc în câmpul reflectronului, și vor fi reflectați mai repede către detector. În această manieră, pe de o parte, distanța de zbor se dublează pentru aceeași lungime a tubului TOF, iar pe de altă parte ionii de același m/z sunt concentrați în interiorul reflectronului. Astfel, diferențele în timpul de zbor dintre ionii cu m/z foarte apropiate ce pleacă din puncte diferite în spațiu sunt mult amplificate, ei vor sosi la distanțe mai mari de timp pe detector și deci rezoluția instrumentului este semnificativ îmbunătățită. În prezent, analizoarele de masă TOF au o rezoluție de 0.001 amu – separă 2 ioni ce diferă unul de celălalt prin 0.001 Da).

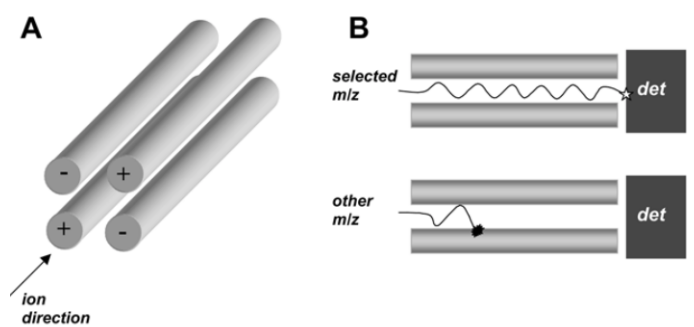


2. Modificare sursei de ioni MALDI prin introducerea unei întârzieri între pulsul laser ce generează explozia matrix-ului cu probă și introducerea propriu-zisă a ionilor în detectorul de masă – **delayed extraction MALDI**. Această întârziere permite o distribuție uniformă a ionilor la începutul tubului de zbor.



Spectrometria de masă – instrumente

2. **Analizor de masă quadrupol** — conține 4 bare metalice dispuse în paralel ce alcătuiesc 4 electrozi pe care se aplică, controlat, în mod repetat, cu o anumită frecvență, curenți de voltaje variabile. În acest fel se generează un câmp magnetic ce forțează ionii să se deplaseze între cele 4 bare pe o traiectorie în spirală spre capătul opus celui în care au intrat în quadrupol. Prin controlul foarte strict al voltajului aplicat și al frecvențelor cu care

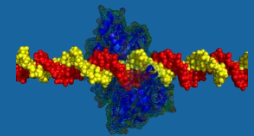


acesta se schimbă, doar ionii de un anumit m/z se vor deplasa spre ieșirea din quadrupol unde este amplasat detectorul. Prin modificarea controlată periodică a voltajului aplicat (**scanare**) și sincronizarea acestor modificări cu informațiile de la detector se poate identifica prezența de ioni cu valori m/z diferite.

În proteomică analizorul quadrupol de sine stătător este mai puțin utilizat. Cel mai frecvent 3 asemenea analizoare sunt grupate și funcționează sincronizat (**in tandem**) pentru a forma un spectrometru de masă numit **triplu-quad**. Într-un triplu-quad, cele **3 detectoare au funcții diferite**:

- două dintre detectoarele quadrupol notate **Q1** și **Q3** ce funcționează după principiile descrise mai sus, separând ionii funcție de m/z – **sunt realmente analizoare de masă**;
- un analizor quadrupol notat **q2** ce funcționează ca o cameră în care ionii, indiferent de m/z , sunt reținuți pentru o perioadă de timp și pot fi eliberați simultan prin modificarea tensiunii aplicate. Frecvent, acest quadrupol este numit **celulă de coliziune** deoarece aici ionii sunt bombardați cu un gaz neutru precum N_2 , He sau Ar. Impactul dintre moleculele gazului și cele ale ionilor duce la fragmentarea ionilor printr-un proces numit disociere indusă prin coliziune – **collision-induced dissociation, CID**.

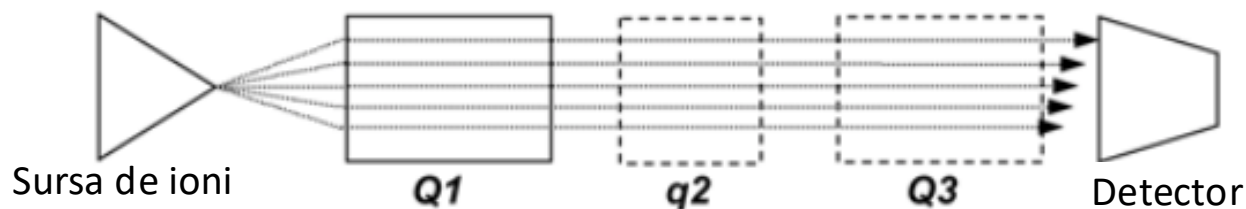
Într-un triplu-quad, cele 3 detectoare quadrupol sunt dispuse unul după celălalt, ionii parcurgându-i în odinea Q1, q2, Q3.



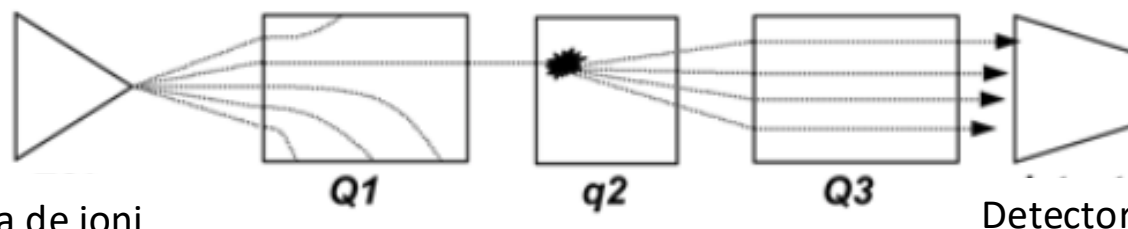
Spectrometria de masă – instrumente

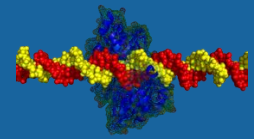
Un detector **triplu-quad** poate funcționa în **două moduri**:

1. **Scanare completă (full-scan, MS¹)** – ionii ce provin de la sursă sunt separați în **Q1** ce **funcționează în acest caz ca un analizor de masă în adevăratul sens al cuvântului**. Ionii separați trec fără să interacționeze cu q2 și Q3 pentru a ajunge la detector. Acest mod este implementat în general timp de 1 s, timp în care spectrometrul de masă identifică toți ionii ce pătrund în Q1. **Aplicat în cazul peptidelor – toate peptidele ce sunt livrate spectrometrului de masă timp de 1s de către un sistem nanoHPLC prin intermediul**



2. **Mod în tandem** sau **MS-MS**, uneori notat și **MS/MS**, sau **MS²** – toți cei 3 cuadrupoli funcționează sincronizat. În acest caz **Q1** joacă rol de **filtru de masă**, permițând doar ionilor cu un anumit m/z să treacă în **q2**. **Ionii ce ajung în camera de coliziune poartă numele de ioni precursori și sunt fragmentați, iar fragmentele rezultate sunt analizate pe bază de m/z în Q3**. În acest mod Q3 joacă rolul de analizor de masă, însă un separator ionii din proba de analizat, ci fragmentele rezultate prin disocierea acestora. Valorile m/z ale fragmentelor generate împreună cu m/z ionului precursor sunt mai apoi utilizate pentru a stabili natura/structura acestuia. **Acesta este modul de funcționare ce permite fragmentarea și secvențiere a peptidelor. În proteomică, un triplu-quad este folosit alternativ, pentru a realiza o scanare completă și identificarea peptidelor din probă, și mai apoi în modul MS/MS pentru a determina secvența acestora din fragmentele generate.**





Spectrometria de masă – instrumente

3. Analizor de masă tip „capcană” pentru ioni – acest tip de analizor de masă nu separă ionii pe măsură ce sunt livrați de către sursă așa cum o fac analizoarele TOF și quadrupol. Ioni se acumulează în interiorul unei camere delimitate de 3 electrozi:

- **un electrod superior** ce alcătuiește plafonul camerei, prevăzut cu un orificiu ce comunică cu sursa. Prin acest orificiu ionii sunt introduși în cameră;

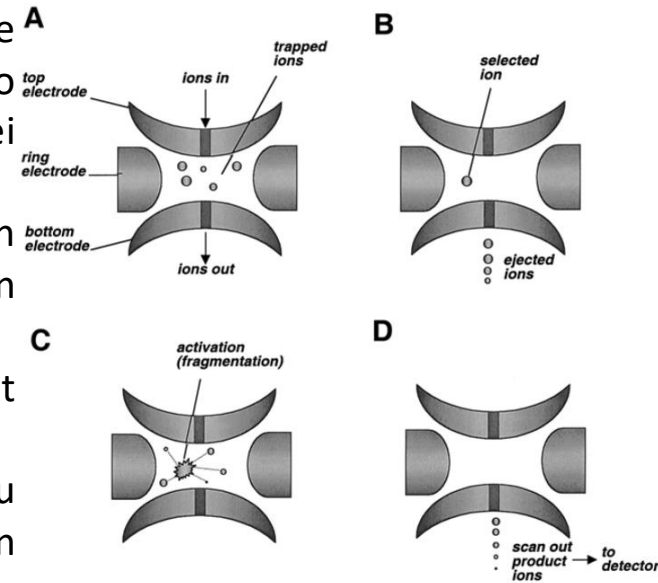
- **un electrod inferior** ce alcătuiește podeaua camerei. Și acest prevăzut cu un orificiu, însă acesta comunică cu detectorul;

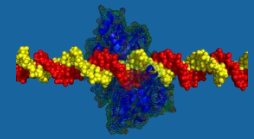
- **un electrod circular** ce corespunde pereților camerei. Prin aplicarea cu o controlată, cu o anumită frecvență a curenților de voltaje variate, în spațiul dintre electrozi se generează un câmp magnetic ce menține în permanență ionii în mișcare în interiorul său – „capcană” pentru ionii.

Similar cu un sistem triplu-quad, și un **detector tip capcană de ioni funcționează în mod alternativ, în două moduri:**

1. Scanare completă (full-scan, A din figură) – ionii sunt introduși în câmpul dintre electrozi. După ce toți ionii sunt în capcană, prin modificare controlată a frecvenței cu care sunt aplicații curenții generatori de câmp (scanare), ionii vor părăsi în mod ordonat incintă, funcție de m/z ;

2. Mod în tandem (A, B, C, D din figură) – un nou set de ioni sunt introduși în capcană (A). Prin modificarea câmpului magnetic, din capcană sunt eliminați ionii ce nu sunt de interes pentru analiză și se selectează un singur ion de analizat (B). Ionul precursor selectat este fragmentat prin CID (C), iar printr-o nouă modificare a câmpului magnetic fragmentele rezultate vor părăsi în mod ordonat incintă, funcție de m/z (D);





Spectrometria de masă – instrumente

Față de un triplu-quad, analizorul de masă tip „capcană” pentru ioni are avantajul că ciclizarea între cele două moduri precum și fragmentarea se realizează în același spațiu fizic (în interiorul capcanei, ionii nu sunt transferați între Q1, q2 și Q3 ca în cazul triplu-quad-ului). Acest lucru permite ca unul dintre ionii rezultați din fragmentare ionului precursor să fie reținut și fragmentat încă o dată, adică realizarea unei analize MS/MS/MS sau **MS³**. În principiu această analiză în tandem ar putea fi repetată la infinit – analize **MSⁿ**, însă în realitate acest tip de abordare este rar utilizată în proteomică deoarece:

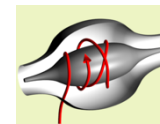
1. în cazul peptidelor în prezent nu se poate anticipa ce fragmente vor rezulta din fragmentarea MS/MS, și, în consecință, nu se poate selecta înainte de analiza propriu-zisă ce fragment va fi păstrat în capcană pentru o nouă fragmentare și o nouă analiză MS;
2. numărul total de ioni disponibili pentru analiză descrește odată cu creșterea ciclurilor MS. După un MS/MS al unei peptide, în general cantitatea de ioni produsă nu este suficientă pentru ca o nouă fragmentare să genereze ioni decelabili de către detector.

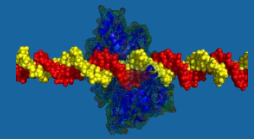
Analizoarele de masă prezentate pot fi combinate sau modificate pentru a obține analizoare în tandem precum:

- **Analizorul de masă Q-TOF** - identic din punct de vedere funcțional cu un triplu-quad, dar Q3 este înlocuit de un analizor TOF. Scanarea completă (MS¹) este deci realizată de Q1, fragmentarea se realizează în q2 dar analiza fragmentelor rezultate se realizează în TOF care are avantajul de a avea o rezoluție semnificativ mai bună decât un analizor quadrupol;

- **Analizorul de masă FT-ICR** - **Fourier transform ion cyclotron resonance MS** – similar ca principii cu o capcană pentru ioni, doar că ionii nu sunt evacuați către un detector, ci prezența lor este identificată pe baza modificărilor produse de aceștia într-un câmpul magnetic de intensitate mare; prezintă o rezoluție foarte bună dar și costuri de achiziție și operare foarte mari;

- **Analizorul Orbitrap** – poate fi considerat ca un tip aparte de FT-ICR cu costuri considerabil mai reduse





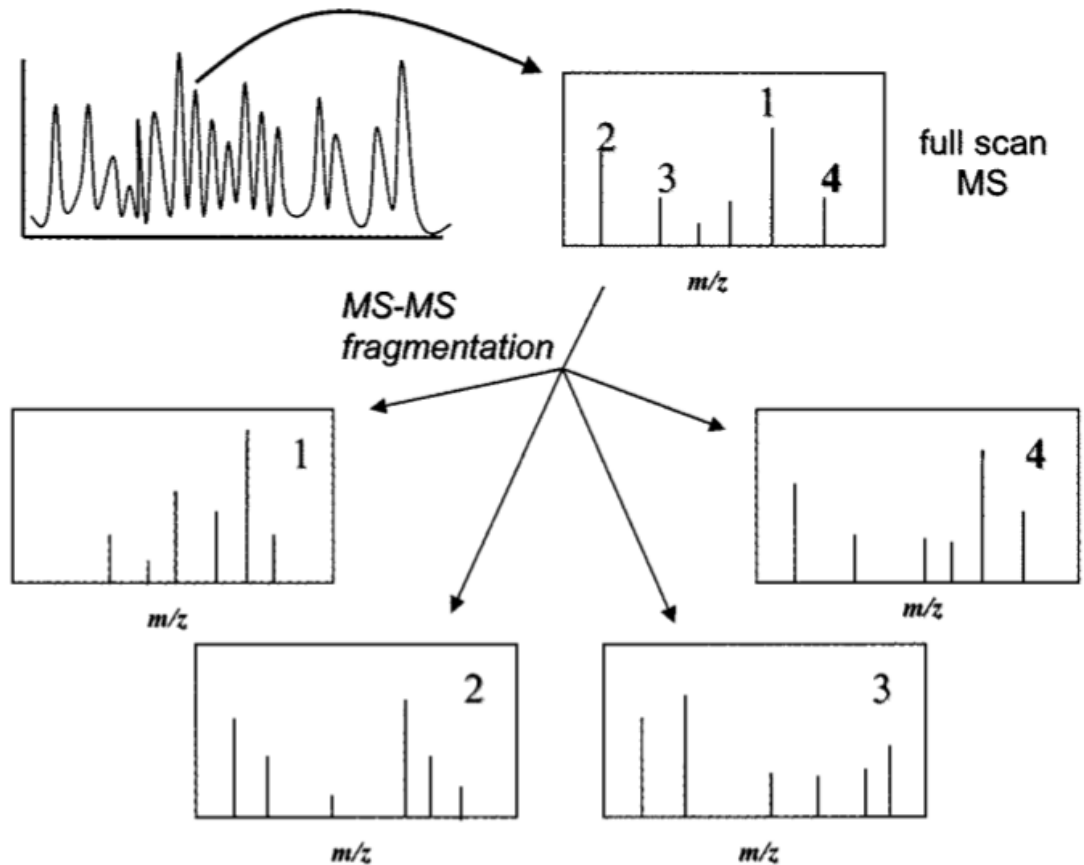
Spectrometria de masă – instrumente

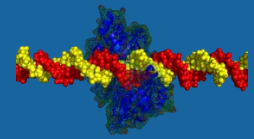
Indiferent de tipul lor, analizoarele de masă capabile să realizeze analize **MS în tandem** pot fi deosebit de utile pentru analiza în masă a unui foarte mare de peptide deoarece pot fi programate pentru realiza în mod automat trecerea de la un mod de măsurare la altul astfel:

A. Instrumentul funcționează în modul scanare completă și identifică ce peptide există în proba furnizată de sursă;

B. Peptidele cele mai abundente sunt selectate pe rând și fragmentate prin CID; spectrele MS/MS sunt înregistrate pentru fiecare peptidă în parte

C. Instrumentul revine la modul scanare completă și ciclul se reia.



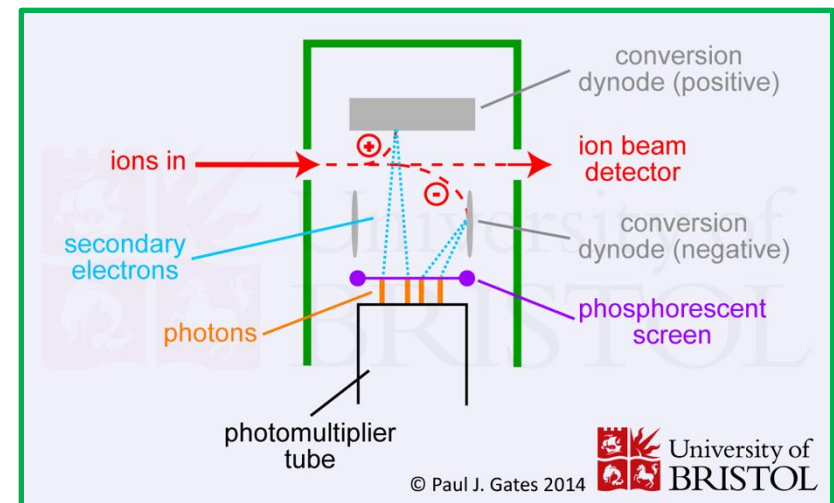


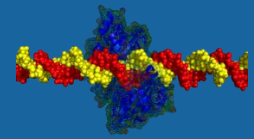
C. Detectoare de ioni utilizate în spectrometria de masă

Detectorii folosiți în spectrometria de masă au rolul de a identifica prezența, la un moment de timp bine precizat, a unui ion. Majoritatea lor au ca principiu de funcționare detectorul numit **cupa lui Faraday**. Aceasta este reprezentată dintr-un electrod cilindric confecționat din materiale ce emit electroni la contact cu ionii, precum GaP sau BeO. Electronii emiși vor genera un curent ce poate fi amplificat și înregistrat.

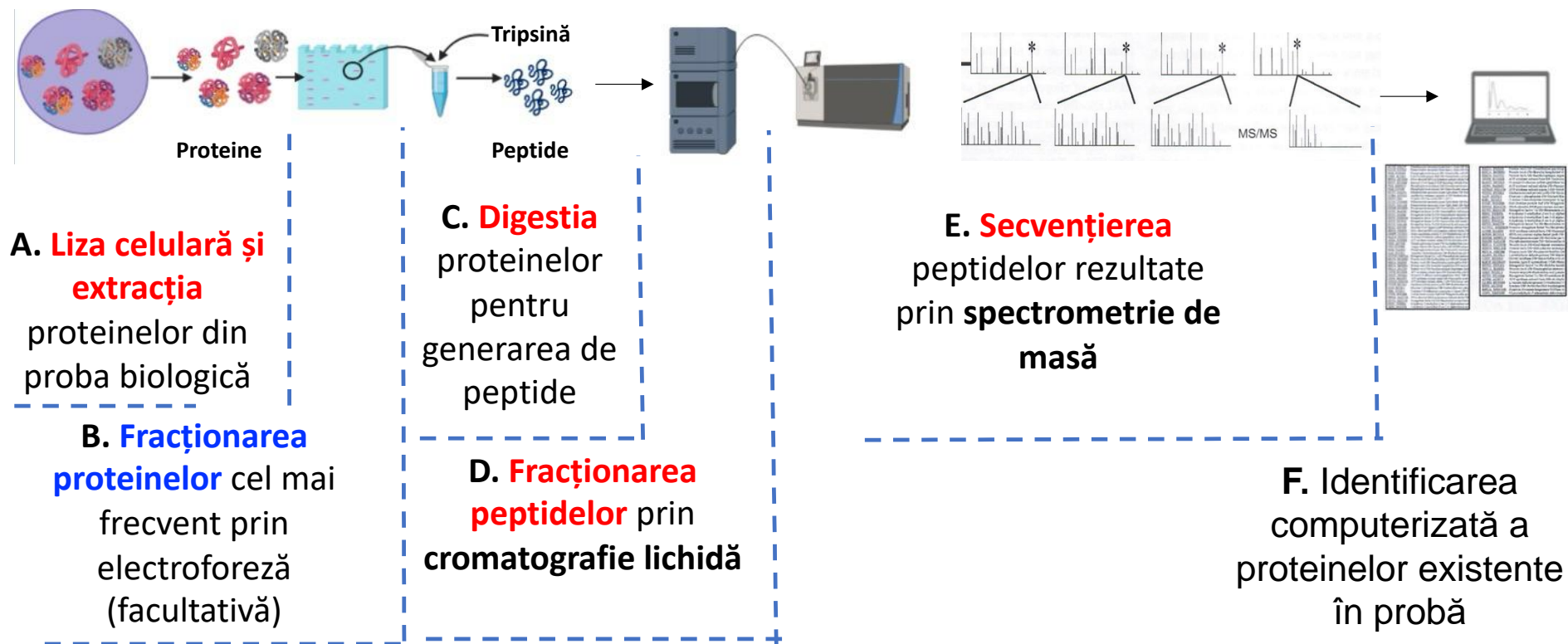
În prezent, principalul detector folosit la spectrometrele de masă cu aplicații în proteomică **este fotomultiplicatorul** ca funcționează după următoarele principii:

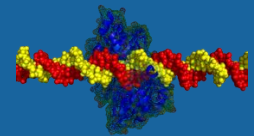
- Ionii din analizorul de masă lovesc o suprafață acoperită cu GaP sau BeO ceea ce duce la emisia unor electroni;
- Electronii sunt captați de un ecran fosforescent ce emite un foton pentru fiecare electron;
- Fotonii sunt apoi captați de un fotomultiplicator ce crește intensitatea semnalului luminos și îl convertește în curent electric ce poate fi apoi înregistrat.





Abordarea generală într-un studiu de proteomică



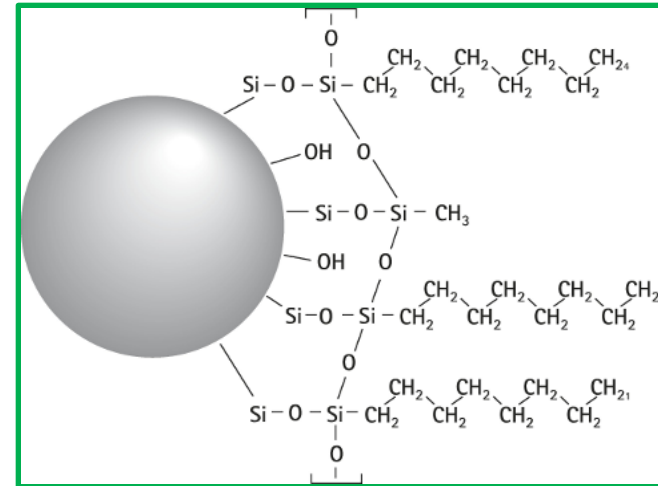


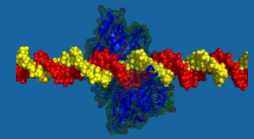
Fracționarea peptidelor

În mod tradițional, **peptidele sunt separate prin cromatografia de fază inversată** folosind coloane cromatografice în care faza staționară este atașată de bile inerte din silica cu dimensiuni de 1.8–5 μm . **Faza mobilă este pompată prin coloana cromatografică cu un debit de 0.1-10 ml/minut și lichidul este forțat să treacă prin spațiile strâmte dintre bile, ceea ce creează presiune în interiorul sistemului cromatografic. Din acest motiv tehnica de separare se numește HPLC – high pressure liquid chromatography.** Deși termenul a devenit aproape sinonim cu separarea peptidelor, HPLC se referă la absolut toate separările cromatografice ce folosesc fază mobilă lichidă (**LC-liquid chromatography, spre deosebire de GC – gaz chromatography**) în care presiunea de lucru este mare.

Principiile separării peptidelor folosind RP-HPLC:

- **Faza staționară** este reprezentată din **molecule hidrofobe – catene alchil** ($-\text{CH}_2-$, **alcani sau hidrocarburi cu diverse grade de nesaturare**) cu lungimea cuprinsă între 2 și 18 atomi de C. Cel mai frecvent sunt notate C2-C18;
- **Faza mobilă** este reprezentată dintr-un **amestec variabil dintr-un solvent polar precum apa (solvent apos) și unul nepolar, organic (acetonitril, ACN sau metanol, MetOH – solvent organic)**. La începutul separării raportul este favorabil apei, faza mobilă fiind preponderent polară, la finalul separării raportul este favorabil solventului nepolar. Modificarea raportului între cei doi solvenți se realizează automatizat de către sistemul cromatografic în două modalități diferite:





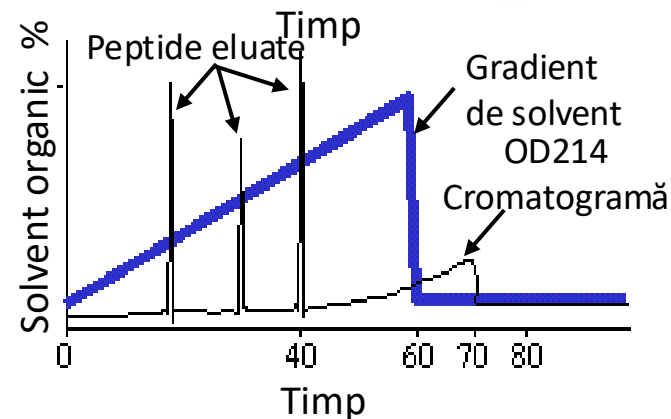
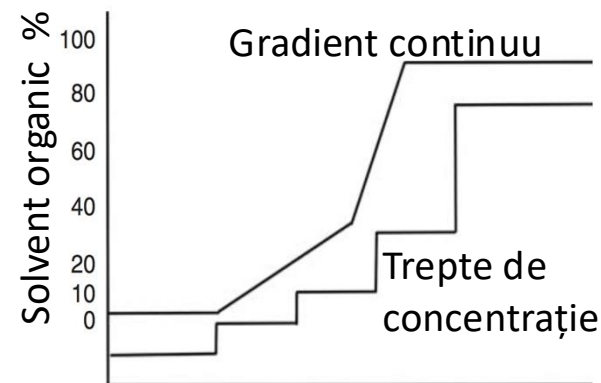
Fracționarea peptidelor

- A. Sub forma unui **gradient de concentrație continuu**;
- B. Sub forma unor modificări **în trepte a concentrației**;

- Amestecul peptidic este injectat în coloană în prezența fazei mobile polare, apoase, ceea ce va face ca aminoacizii hidrofobi din structura peptidelor să interacționeze cu catenele C18 hidrofobe și să fie reținute de către faza staționară;

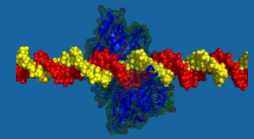
- La creșterea concentrației de solvent organic, interacțiunile hidrofobe dintre peptide și catenele hidrofobe ale fazei staționare scad, iar peptidele se desprind fracționat din coloana cromatografică funcție de secvență: peptidele cu un număr mic de aminoacizi nepolari la concentrații mici de solvent polar, cele cu număr mare de aminoacizi nepolari spre final, la concentrații mari de solvent polar. **Procesul de antrenare a peptidelor de pe coloana cromatografică prin modificarea unui parametru fizico-chimic (în cazul de față polaritatea solventului) poartă numele de eluție.**

- Peptidele eluate din coloana cromatografică sunt înregistrate prin intermediul detectorului sub forma unor semnale sau *peak*-uri.



Cel mai frecvent, în RP-HPLC detectorul este un spectrometru UV-VIS, peptidele fiind detectate la 214nm;

- Timpul scurt de la injecția probei în coloana cromatografică până la eluția unei peptide este înregistrat și se numește **timp de retenție**. Intensitatea semnalului de la detector reprezentat de înălțimea peak-ului este strict proporțională cu concentrația peptidei eluate.



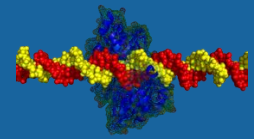
Fracționarea peptidelor

Sistemele HPLC tradiționale funcționează la un debit de 0.1-10 ml/minut și datorită acestui fapt nu pot fi conectate direct la spectrometre de masă – cantitatea de solvent este prea mare, nu poate fi evaporat suficient de repede pentru ca peptidele să ionizeze. De asemenea, coloanele în HPLC tradiționale au diametru mare (**4,6 mm cel mai frecvent**) ceea ce face ca în urma separării proba să fie diluată, devenind nedetectabilă de către instrumentele MS.

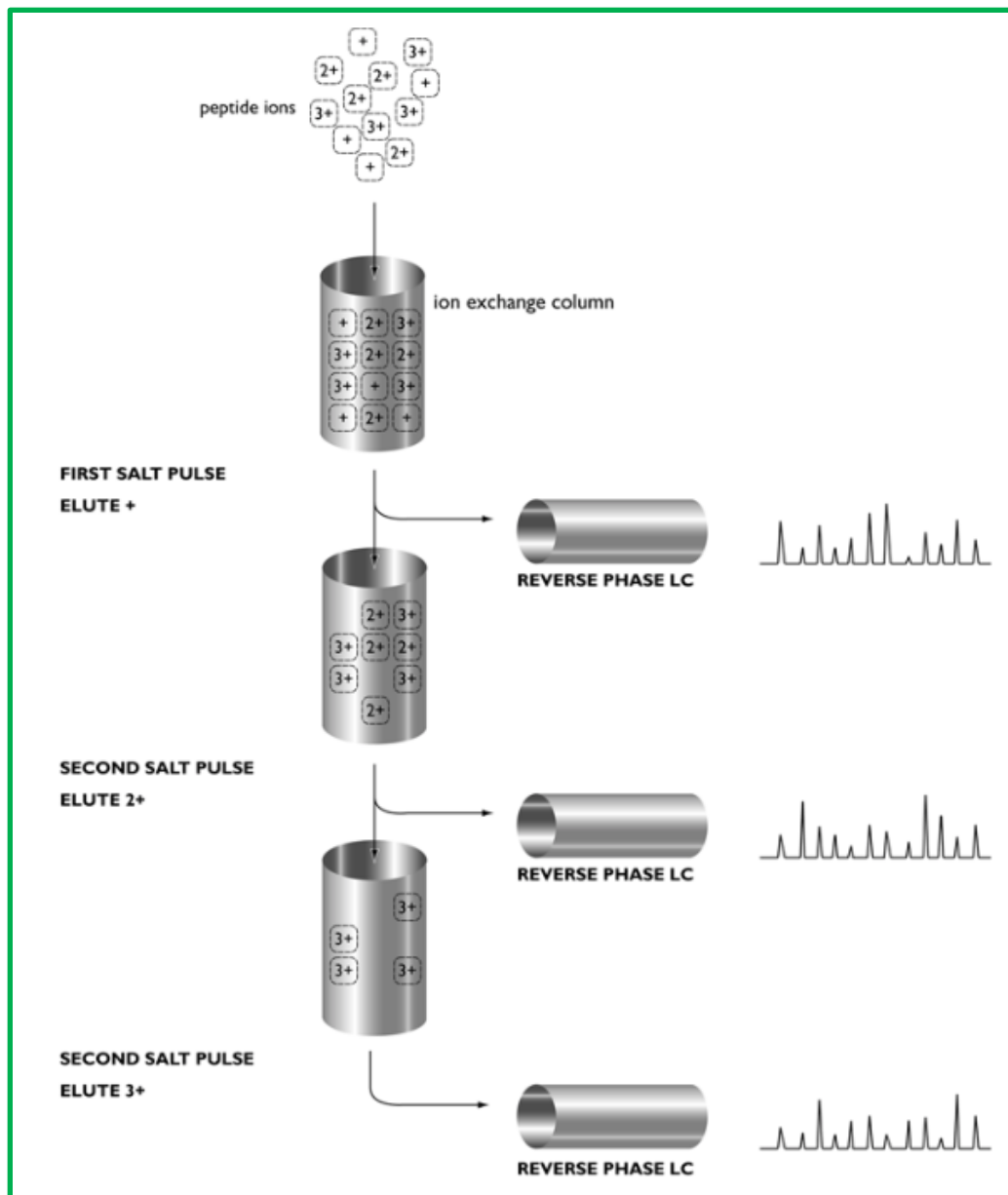
Fracționarea peptidelor în experimentele de proteomică se realizează în sisteme nano-HPLC, ce funcționează după același principii ca sistemele HPLC clasice dar:

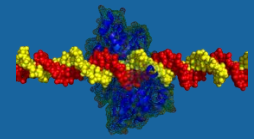
- Debitul utilizat este de ordinul **nano-litrilor, cel mai frecvent 200-350 nanoL/min;**
- Coloanele cromatografice au diametrul de **50 – 75 micrometri;**
- Eluția peak-urilor peptidice are loc într-un volum de aproximativ **100 nL**, volum ce poate fi ușor evaporat pentru a ioniza peptidele conținute;





Fracționarea peptidelor





Identificarea proteinelor prin spectrometrie de masă

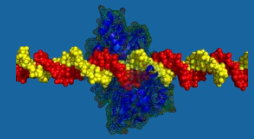
Amprentarea masică (peptide mass fingerprinting, PMF)

Această metodă de identificare pleacă de la ideea că, având la dispoziție genomul complet al unui organism s-ar putea în principiu genera cu ajutorul calculatorului o listă cu toate proteinele din organismul respectiv. Cunoscând modul în care acționează proteazele (**tripsina hidrolizează legătura peptidică la un rest de K sau R, dacă nu este urmat de P**) tot cu ajutorul calculatorului s-ar putea genera o listă cu toate peptidele posibil a rezulta prin digestia fiecărei proteine ce alcătuiește proteomul speciei respective. Pentru peptidele teoretice generate s-ar cunoaște originea (**proteina din care provine**), lungimea, secvența și deci i s-ar putea calcula masa. În acest fel ar fi posibilă realizarea **unor liste extinse cu masele teoretice ale peptidelor obținute prin digestii virtuale, fiecărei peptide fiindu-i asociată proteina din care provine**. Unele dintre **aceste peptide**, cu precădere cele de peste 6 aminoacizi **au mase unice, ceea ce înseamnă că fiecărei proteine îi sunt asociate un număr variabil de valori masice unice – o amprentă masică a proteinei**, realizate pe baza maselor peptidelor.

Prin procesarea în laborator a unei probe provenite din organismul de interes, proteinele existente în probă vor fi hidrolizate, iar peptidele generate analizate cel mai frecvent print-un spectrometru de masă **MALDI-TOF (sursă de tip MALDI cuplată cu analizor de masa TOF)**. Instrumentul va identifica valorile m/z pentru fiecare peptidă din probă pe baza cărora se poate **calcula masa reală a peptidelor existente** în proba de analizat. Dacă **masa reală măsurată este unică** și se regăsește în lista **extinsă cu masele teoretice ale peptidelor obținute prin digestii virtuale, atunci este foarte probabil ca peptida reală să fie identică cu cea teoretică**, indicând așadar prezența proteinei parentale în probă. Cu cât se identifică mai multe peptide reale cu corespund ca masă cu peptidele virtuale aparținând aceleiași proteine, cu atât nivelul de încredere că proteina respectivă este în probă este mai mare.

Peptide Mass list

.	
.	
.	
1528.7685	
1528.7989	
1529.0002	
1529.2001	
1529.2454	
1529.5006	
1529.6997	
1529.7348	← 1529.7348
1529.9978	measured
1530.2332	mass
1530.4567	
1531.0003	
1531.0107	
1531.3004	
1531.5656	
.	
.	



Identificarea proteinelor prin spectrometrie de masă

Prin identificare potrivirilor dintre masele peptidelor măsurate cu ajutorul unui unu spectrometru de masă și masele peptidelor teoretice posibil a exista în organismul respectiv se pot astfel identifica proteinele existente într-o probă necunoscută. **Succesul amprentării masice pentru identificarea proteinelor depinde de 2 factori cheie:**

- **Precizia** cu care se măsoară m/z -urile și deci cu care se calculează masele peptidelor reale. **Din acest motiv instrumentele utilizate sunt cel mai frecvent MALDI-TOF;**
- **Acuratețea** datelor genomice pe baza cărora se creează lista de mase teoretice.

Limitările principale în aplicarea metodelor de amprentare masică se referă la:

1. deși bazele de date cu secvențe sunt deosebit de mari, nu conțin decât rar genomul complet și anotat (poziția genelor este descrisă, codonii start și stop sunt identificați) al unei specii;
2. în organismele superioare există numeroase proteine omologe, foarte similare ca sevență, al căror amprentă masică este foarte similară sau chiar identică;
3. bazele de date cu secvențe conțin rar date despre modificările post-traducere ale proteinelor. În cazul unei proteine ce suferă PTM, amprenta masică teoretică este semnificativ diferită de cea reală și nu mai poate fi identificată prin această metodă.

