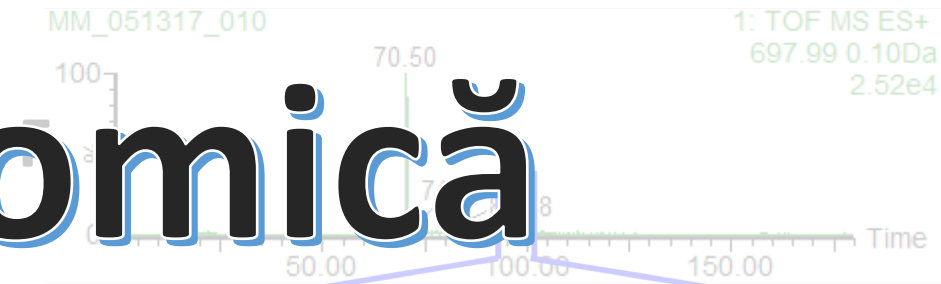
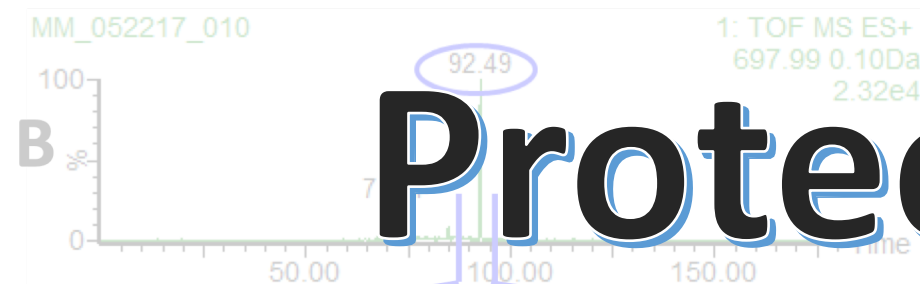
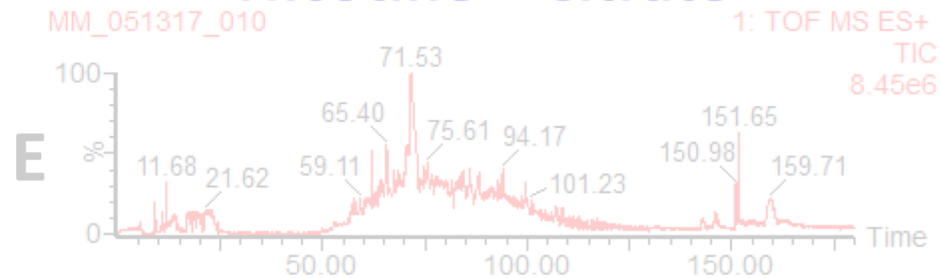
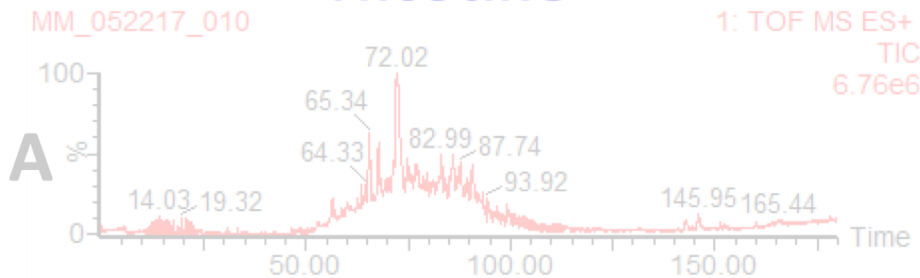
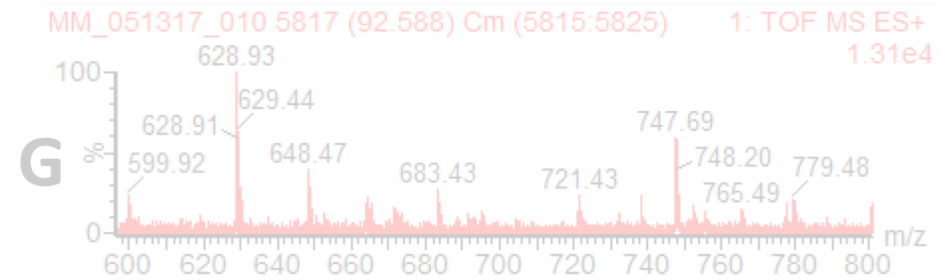
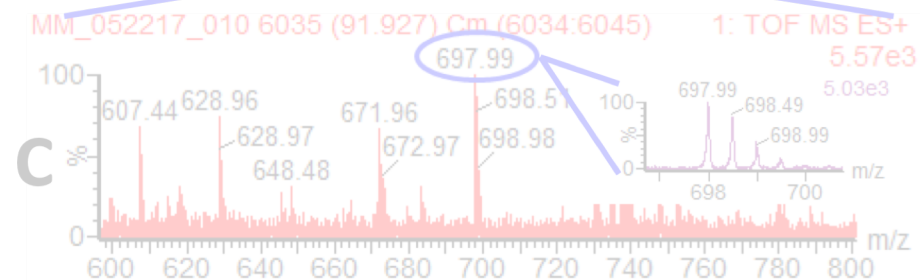


Nicotine

Nicotine + Citrate



Proteomică



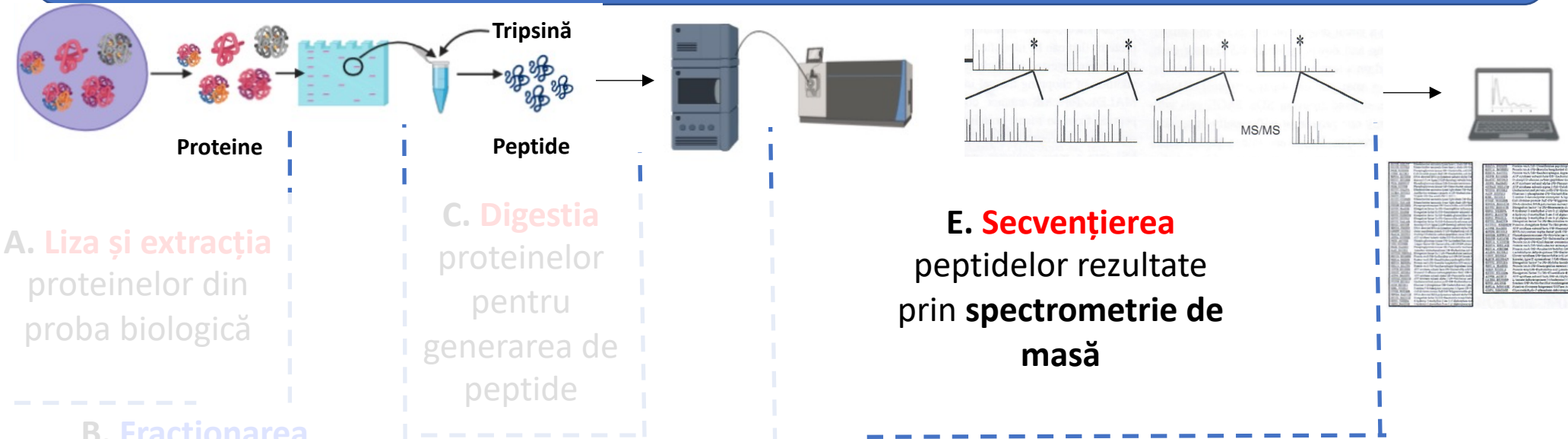
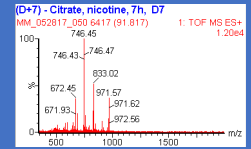
FLVVTPSFTQQK

3.03.2023

Curs 5 – Identificare proteinelor prin spectrometrie de masă

Amprenta masică vs secvențierea peptidelor

II. 2. Identificarea proteinelor prin spectrometrie de masă



A. Liza și extracția
proteinelor din
proba biologică

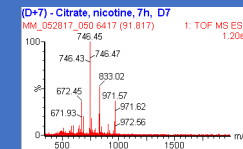
C. Digestia
proteinelor
pentru
generarea de
peptide

E. Secvențierea
peptidelor rezultate
prin spectrometrie de
masă

Toate metodele de proteomică presupun fracționarea proteinelor din probă și digestia lor pentru a se genera un amestec de peptide. Funcție de tipul de instrument de spectrometrie de masă utilizat, informațiile obținute prin analiza peptidelor pot fi utilizate pentru identificarea peptidelor din proba. Au fost descrise 2 abordări distincte pentru identificarea proteinelor:

- A. Amprentarea masică** – metode ce utilizează spectrometre de masă ce funcționează în modul scanare completă și identifică m/z -ul peptidelor din amestec; valorile obținute sunt apoi utilizate pentru a identifica proteinele din care aceste peptide provin;
- B. Secvențierea peptidelor** - metode ce utilizează spectrometre de masă în tandem, care identifică m/z -ul peptidelor din amestec pe care mai apoi le fragmentează pentru a identifica secvența de aminoacid a fiecărei peptide; secvențele de aminoacizi sunt apoi utilizate pentru a identifica proteinele din amestecul inițial

II. 2. Identificarea proteinelor prin spectrometrie de masă



A. Amprentarea masică (peptide mass fingerprinting, PMF)

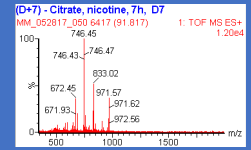
Această metodă de identificare pleacă de la ideea că, având la dispoziție genomul complet al unui organism s-ar putea în principiu genera cu ajutorul calculatorului o listă cu toate proteinele din organismul respectiv. Cunoscând modul în care acționează proteazele (**tripsina hidrolizează legătura peptidică 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 mass**
1530.2332
1530.4567
1531.0003
1531.0107
1531.3004
1531.5656
. :
.

II. 2. Identificarea proteinelor prin spectrometrie de masă



Prin identificare potrivirilor dintre masele peptidelor măsurate cu ajutorul unui spectrometru de masă și masele peptidelor teoretice posibil a exista în organismul respectiv se pot 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 omoloage, foarte similare ca secvență, 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.

JOURNAL OF FOOD AND DRUG ANALYSIS 7 (2019) 474–478

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Journal homepage: www.jfda-online.com

FDA

JF
DA

Review Article

Clinical status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology

Tsung-Yun Hou ^{a,b,c}, Chuan Chiang-Ni ^{d,e,f}, Shih-Hua Teng ^{g,*}

^a Division of Rheumatology/Immunology/Allergy, Department of Internal Medicine, Wan Fang Hospital, Taipei Medical University, Taipei, Taiwan

^b Division of Allergy, Immunology and Rheumatology, Department of Internal Medicine, School of Medicine, College of Medicine, Taipei Medical University, Taipei, Taiwan

^c Division of Rheumatology/Immunology/Allergy, Department of Internal Medicine, Tri-Service General Hospital, National Defense Medical Center, Taipei, Taiwan

^d Department of Microbiology and Immunology, College of Medicine, Chang Gung University, Taoyuan, Taiwan

^e Graduate Institute of Biomedical Sciences, College of Medicine, Chang Gung University, Taoyuan, Taiwan

^f Molecular Infectious Disease Research Center, Chang Gung Memorial Hospital, Taoyuan, Taiwan

^g Bruker Taiwan Co., Ltd., Taipei, Taiwan

ARTICLE INFO

Article history:
Received 28 June 2018
Received in revised form
31 January 2019
Accepted 18 January 2019
Available online 31 January 2019

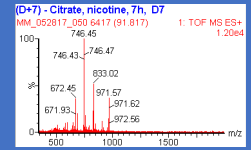
Keywords:
Antibiotic susceptibility testing
MALDI-TOF MS
Mass spectrometry
Microbiology
Microorganism identification

ABSTRACT

Mass spectrometry (MS) is a type of analysis used to determine what molecules make up a sample, based on the mass spectrum that are created by the ions. Mass spectrometers are able to perform traditional target analyte identification and quantitation; however, they may also be used within a clinical setting for the rapid identification of bacteria. The causative agent in sepsis is changed over time, and clinical decisions affecting the management of infections are often based on the outcomes of bacterial identification. Therefore, it is essential that such identifications are performed quickly and interpreted correctly. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometer is one of the most popular MS instruments used in biology, due to its rapid and precise identification of genus and species of an extensive range of Gram-negative and positive bacteria. Microorganism identification by Mass spectrometry is based on identifying a characteristic spectrum of each species and then matched with a large database within the instrument. The present review gives a contemporary perspective on the challenges and opportunities for bacterial identification as well as a written report of how technological innovation has advanced MS. Future clinical applications will also be addressed, particularly the use of MALDI-TOF MS in the field of microbiology for the identification and the analysis of antibiotic resistance.

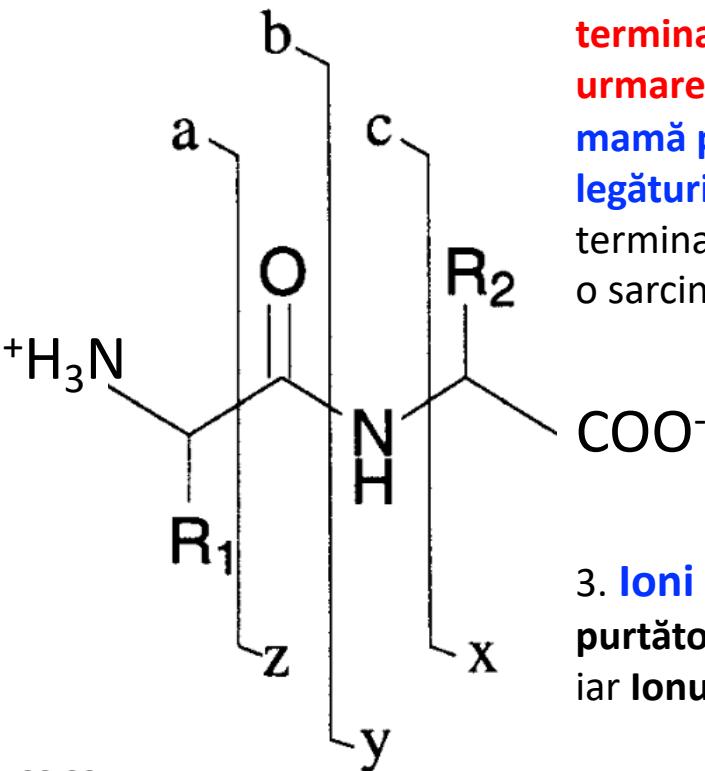
Copyright © 2019, Food and Drug Administration, Taiwan. Published by Elsevier Taiwan LLC. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

II. 2. Identificarea proteinelor prin spectrometrie de masă



B. Secvențierea peptidelor prin spectrometrie de masă în tandem (MS/MS) încearcă să elimine limitările PMF prin fragmentarea peptidelor într-o celulă de coliziune, analiza fragmentelor formate în scopul identificării ordinii aminoacizilor. Secvența de aminoacizi calculată este apoi utilizată pentru a identifica proteinele existente în probă.

Secvențierea peptidelor prin MS/MS pleacă de la observația prin interacțiunea dintre gazul inert și peptidele în celula de coliziune, catena peptidică se fragmentează într-o manieră predictibilă prin ruperea legăturilor covalente și formează un set limitat de ioni:

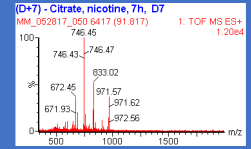


1. **Ionii b și y** – se formează prin ruperea legăturii peptidice dintre carbonul carbonilic și N amidic. **Ionul b este purtător al grupării amino din capătul N terminal al peptidei mamă precursoră și a unei sarcini pozitive pe C carbonilic ca urmare a ruperii legăturii peptidice. Ionul y conține capătul C terminal al peptidei mamă precursoră și o sarcină pozitivă pe gruparea NH2 rezultate din ruperea legăturii peptidice.** Dacă peptida a fost obținută prin hidroliza cu tripsină, capătul C-terminal conține aminoacizii Arg sau Lys – aminoacizi di-aminici, deci ionii Y pot purta o sarcină pozitivă suplimentară.

2. **Ioni a și z** – se formează prin ruperea legăturii dintre C carbonilic și C α ; **ionul a este purtător al grupării amino din capătul N terminal al peptidei mamă precursoră, iar ionul z conține capătul C terminal al peptidei mamă precursoră.**

3. **Ioni c și x** – se formează prin ruperea legăturii dintre N amidic și C α ; **ionul c este purtător al grupării amino din capătul N terminal al peptidei mamă precursoră, iar ionul x conține capătul c terminal al peptidei mamă precursoră.**

II. 2. Identificarea proteinelor prin spectrometrie de masă

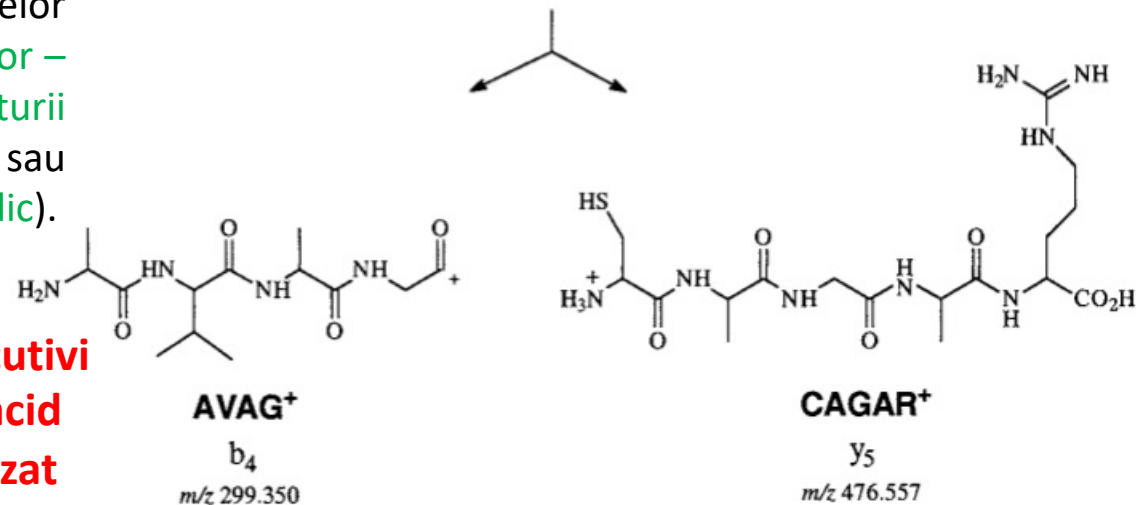
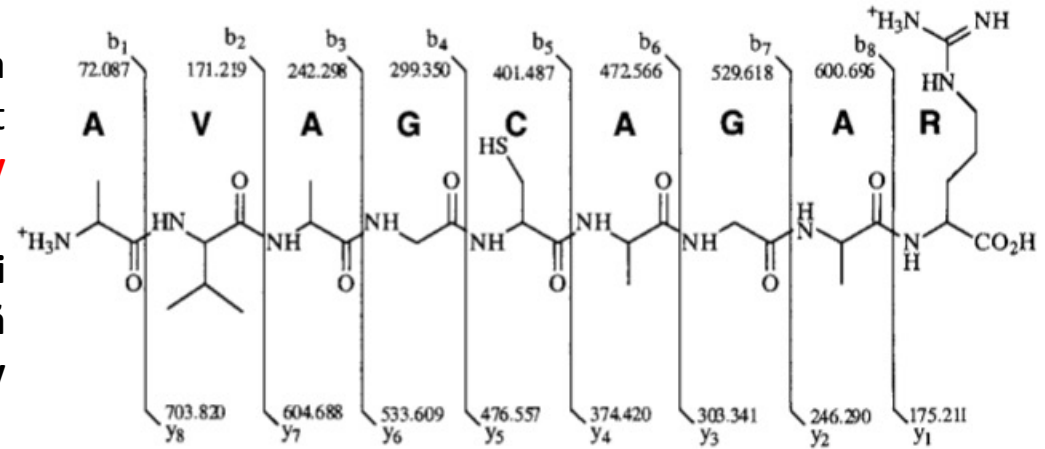


În celulele de coliziune ale spectrometrelor MS/MS folosite în proteomică – triplu-quad, capcană de ioni sau Q-TOF – **cel mai frecvent se rup legăturile peptidice ceea ce duce la formarea cu precădere a ionilor y și b**. Nu există însă nici o preferință legată de care dintre legăturile peptidice, dintre care aminoacizi se vor rupe.

De exemplu, în cazul unei peptide cu secvența AVAGCAGAR, oricare dintre legăturile peptidice se pot rupe ceea ce duce la formarea **unei serii de ioni y și b** reprezentați în figură.

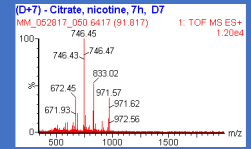
Numerele ionilor dintre-o serie corespund poziției legăturii peptide care se rupe și în consecință numărului de aminoacizi pe care fragmentul respectiv îl conține.

Masa fiecărui ion y sau b dintre-o este suma maselor resturilor de aminoacizi conținuți (**Mw a aminoacizilor – 18 Da (masa H₂O eliminată în formarea legăturii peptidice)**) + 1 Da pentru b (**H de la NH₂ terminal**) sau +19 Da pt y (**OH de la COOH terminal + 2H⁺ la N amidic**).



Diferența de masă dintre 2 ioni y sau b consecutivi va reprezenta așadar masa restului de aminoacid prin care aceștia diferă și este parametrul utilizat pentru secvențierea proteinelor.

II. 2. Identificarea proteinelor prin spectrometrie de masă



Spectrul MS/MS al peptidei AVAGCAGAR cu evidențierea semnalelor pentru seriile de ioni y și b

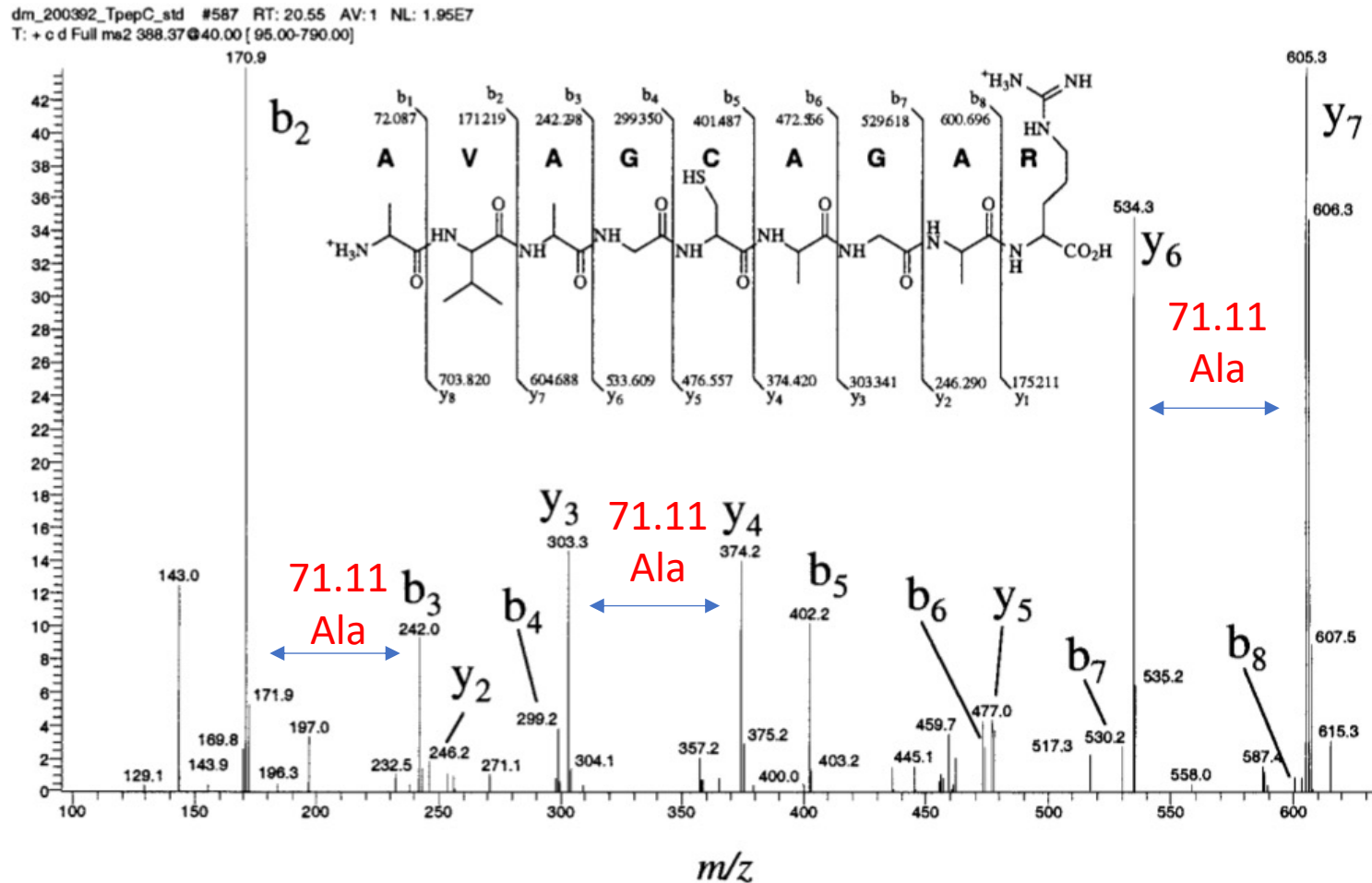
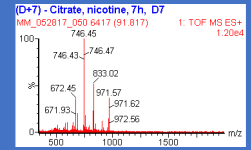


Fig. 4. Annotated MS-MS spectrum of the $[M+2H]^{2+}$ ion of AVAGCAGAR showing b- and y-ions.

II. 2. Identificarea proteinelor prin spectrometrie de masă



Secvențierea peptidelor prin spectrometrie de masă în tandem (MS/MS) **presupune deci înregistrarea spectrului de masă rezultat prin fragmentarea controlată prin CID** a fiecărei peptide urmată apoi **de identificarea seriei de ioni y și b pe baze semnalelor dominante. Diferențele de m/z între ionii aceleiași serii de ioni indică aminoacizi conținuți, iar ordinea ionilor – secvența în care acești ioni sunt legați în structura peptidei analizate.** În general, identificarea unei serii de ioni (y sau b) este suficientă pentru a stabili secvența unei peptide, însă este de preferat stabilirea ambelor serii pentru verificare (seria y completează seria b).

Interpretarea manuală a unui spectru MS/MS al unei peptide poartă numele de secvențiere *de novo* și, funcție de complexitatea spectrului și pregătirea utilizatorului poate dura de la 15 minute până la câteva ore. De aceea se preferă **interpretarea computerizată a spectrelor MS/MS ce presupune compararea spectrelor MS/MS reale cu spectre MS/MS teoretice.** Acest lucru presupune parcurgerea următoarelor etape:

1. Generarea, plecând de la secvențe de aminoacizi sau de baze azotate cunoscute a unei baze de date cu peptide teoretice;
2. Fragmentarea acestor peptide și stabilirea tuturor spectrelor de masă posibile a se genera și înregistra; realizarea unei noi baze de date cu m/z –uri posibile a fi înregistrate pentru toate seriile de ioni teoretice;
3. Înregistrarea spectrului de masă real al unei peptide și identificarea valorilor m/z predominante ;
4. Identificarea seriei de ioni teoretice ce corespunde cel mai bine cu seria de ioni reală.

II. 2. Identificarea proteinelor prin spectrometrie de masă

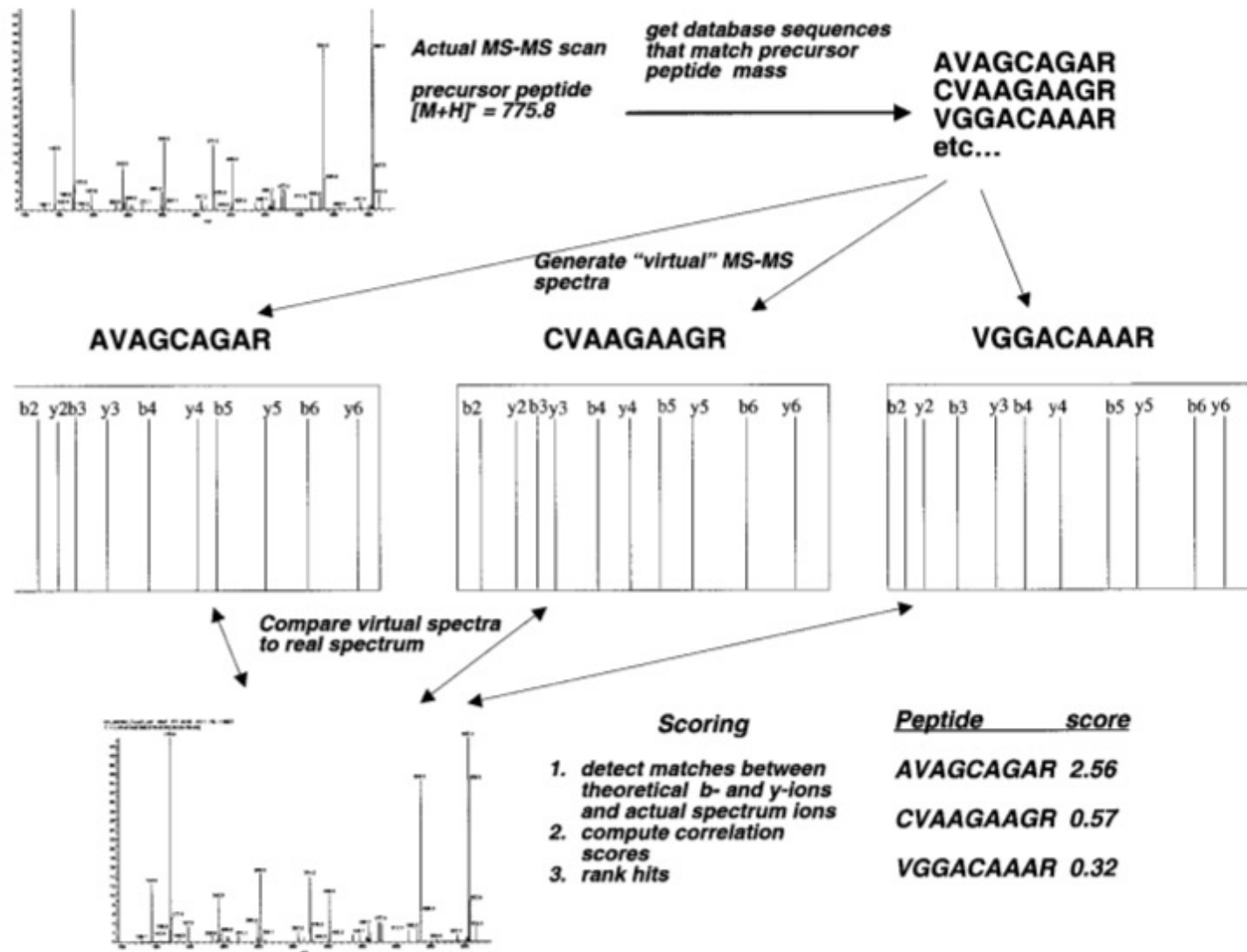
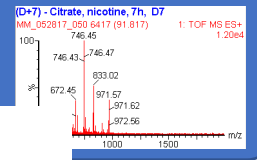


Fig. 1. Schematic representation of operation of Sequest algorithm for correlation of MS-MS spectra with peptide sequences from databases.