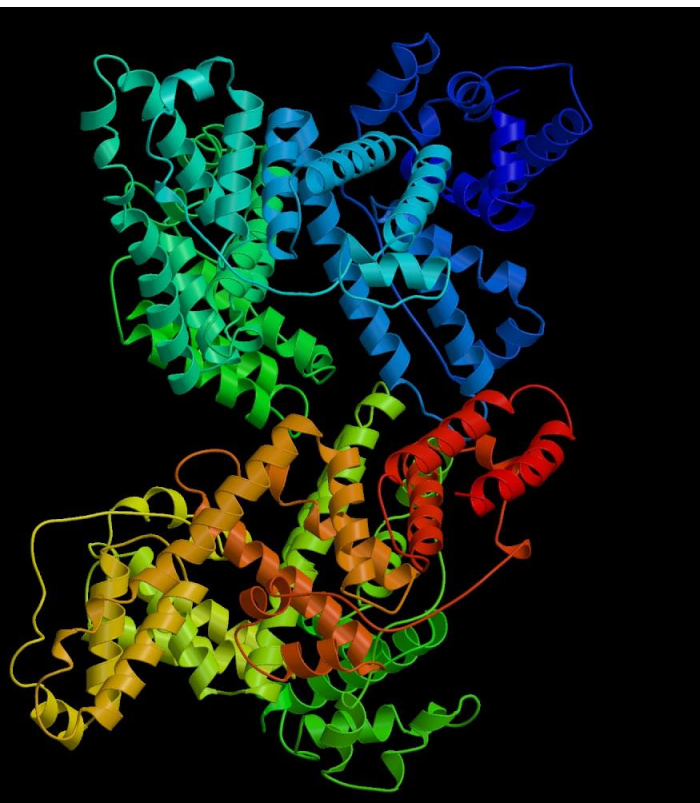


Identificación y Cuantificación de Proteínas mediante LC/MS.

Jornada sobre **Posibilidades** de la **Espectrometría de Masas** en Laboratorios de Investigación. “El poder” del análisis comparativo de muestras en Alimentación, Proteómica y Metabolómica.

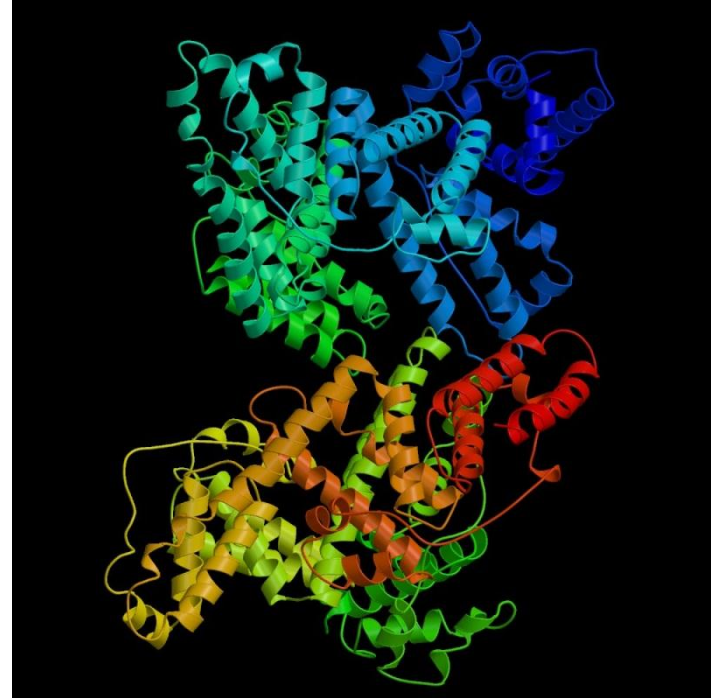


Organizado por:
Miguel Angel Martínez
e Inmaculada Álvarez
ICTAN-CSIC
Madrid,
5 de Julio del 2012
10:30-11:15

PCiTAL - UDL

Isidro Masana
Especialista Productos LC/MS
Agilent Technologies

Identificación y Cuantificación de Proteínas mediante LC/MS.



Programa:

- 1.- **Introducción** a la Proteómica.
- 2.- **Identificación de Proteínas** mediante espectrometría de masas.
- 3.- **Cuantificación de Proteínas** mediante LC/MS.
- 4.- Conclusiones.

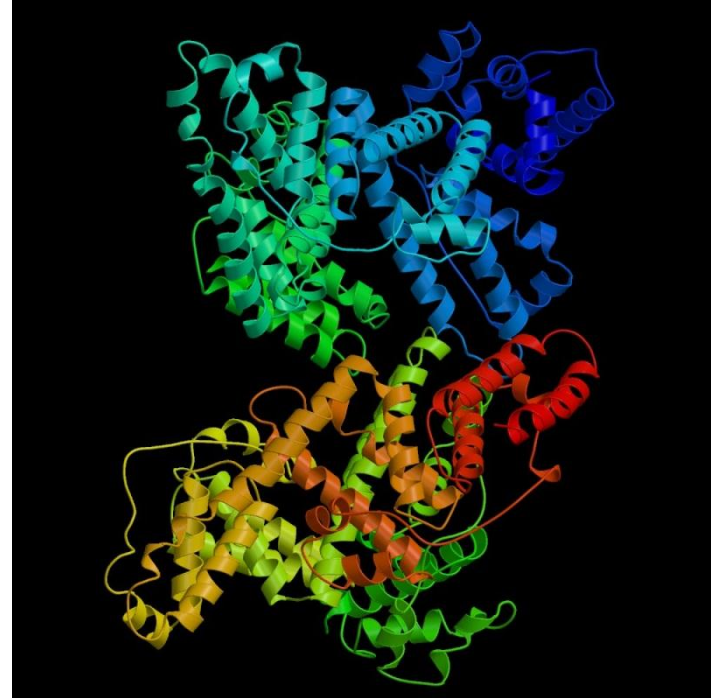


Identificación y Cuantificación de Proteínas mediante LC/MS.



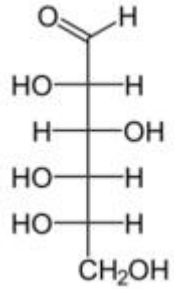
Programa:

- 1.- **Introducción** a la Proteómica.
- 2.- Identificación de Proteínas mediante espectrometría de masas.
- 3.- Cuantificación de Proteínas mediante LC/MS.
- 4.- Conclusiones.



Introducción a la PROTEÓMICA

Metabolitos “versus” Proteínas

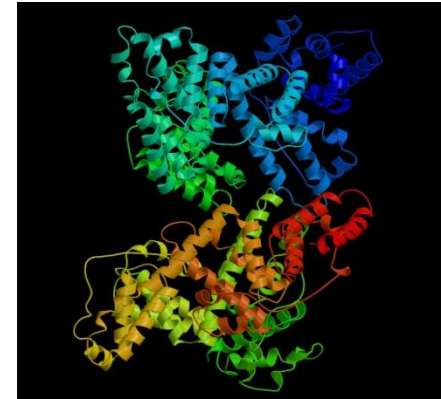


Metabolitos:

- Moléculas de pequeño tamaño (<1500 Dalton), subproducto de la actividad enzimática del organismo; presentan una gran variedad de estructuras y propiedades.
- Moléculas en general relativamente estables: aminoácidos, azúcares, ácidos orgánicos, lípidos,
- En LC/MS-ESI: proporcionan espectros de masas simples (mayoritariamente iones con **1 sola carga**).

Proteínas:

- **Moléculas de gran tamaño y de gran complejidad** múltiples isoformas (“variantes”).
 - Su actividad biológica puede variar enormemente según sus isoformas/modificaciones post-traduccionales (PMT’s).
- Moléculas “delicadas” (muy influenciadas por el entorno).
- En LC/MS-ESI: proporcionan complejos espectros de masas (iones con **múltiples cargas**).
- Mayoritariamente suele trabajarse con las **proteínas digeridas enzimáticamente**.



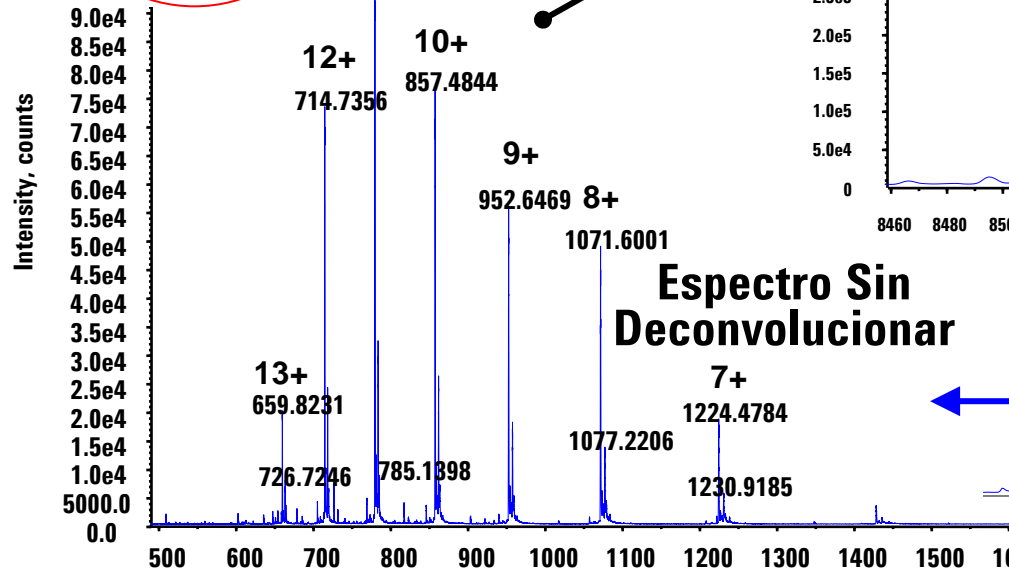
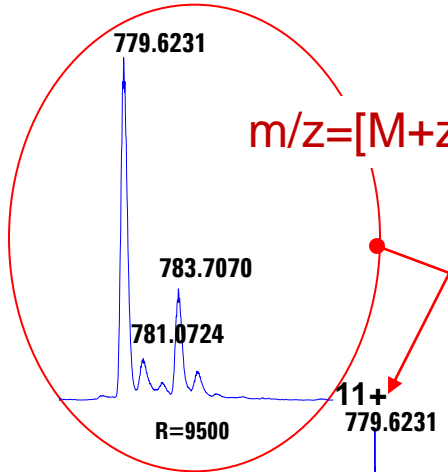
HSA

LC/MS(ESI)-TOF: Detección de Modificaciones Post-traduccionales de la Proteína Ubiquitina : Nativa, Oxidada y Nitrada

Nativa

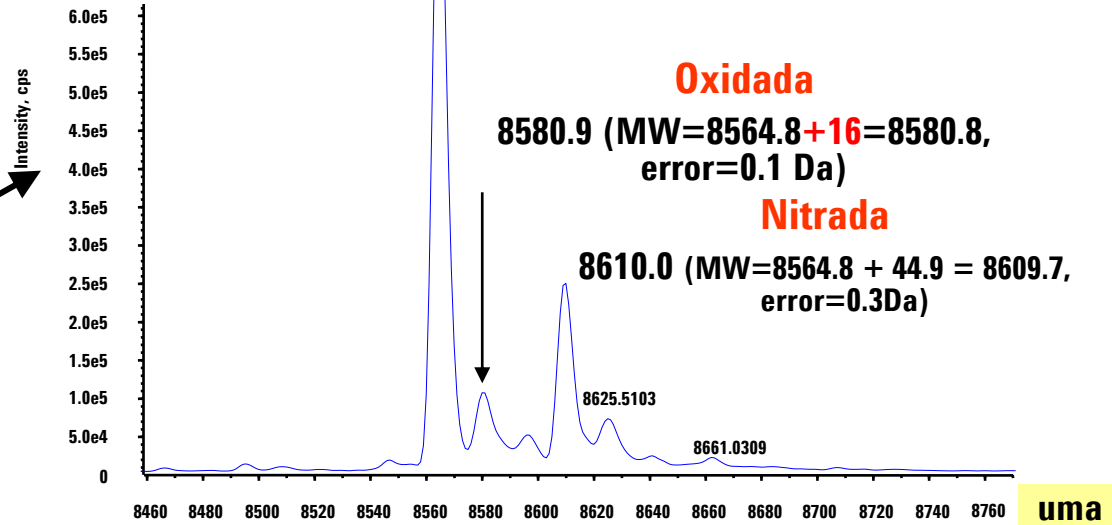
LC/MS TOF/QTOF proporciona **mayor exactitud de masa** que MALDI/TOF TOF-TOF

$$m/z = [M + z(H^+)] / z$$



8565.0 (MW=8564.8, error=0.2Da)

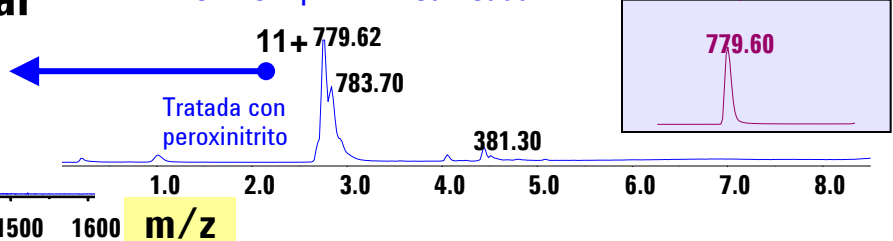
Espectro Deconvolucionado



Masa, u.m.a.

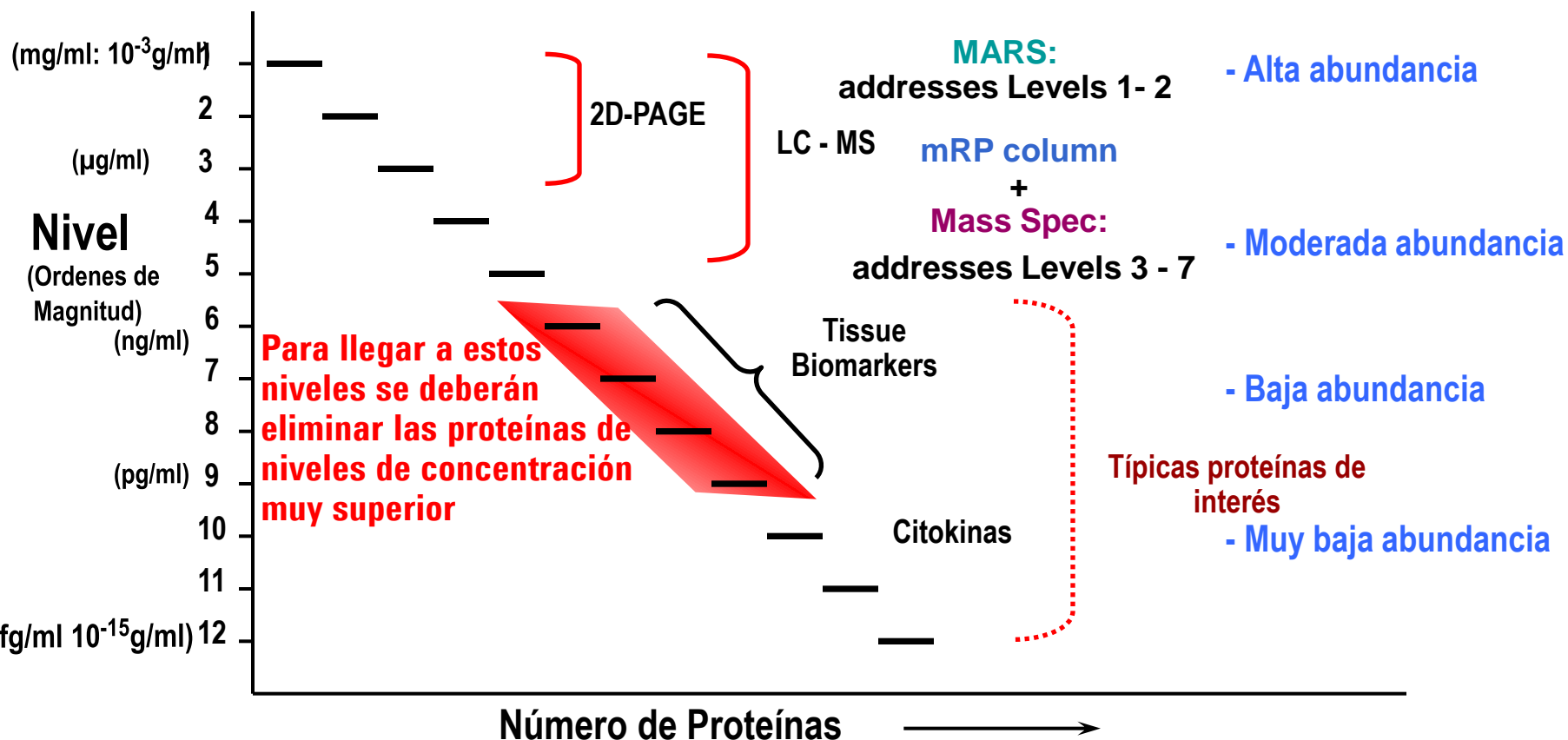
TIC of Ubiquitina **Modificada**

TIC de Ubiquitina **Nativa**



El Reto de la Proteómica: Proteínas Minoritarias

En suero y plasma humano las concentraciones de proteínas se estiman en un **rango de 12 ordenes de magnitud**. El n° distintas proteínas se estima en **> 4 millones**. Rango típico detectable hoy en día rutinariamente para proteínas poco abundantes: 100pg/ml ~ 1-2 femto (10^{-15}) mol

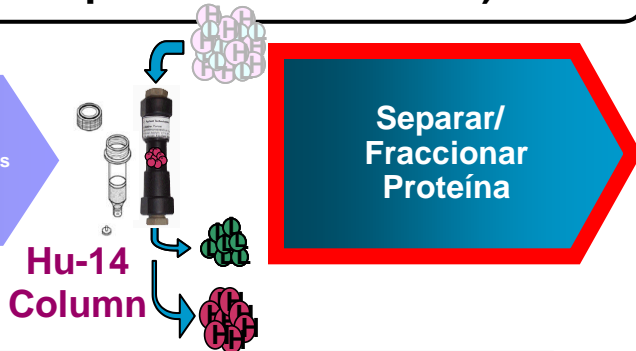


Para la identificación de proteínas minoritarias será **clave eliminar previamente las de mayor concentración** y poder separar la enorme cantidad de péptidos/ proteínas presentes en una muestra

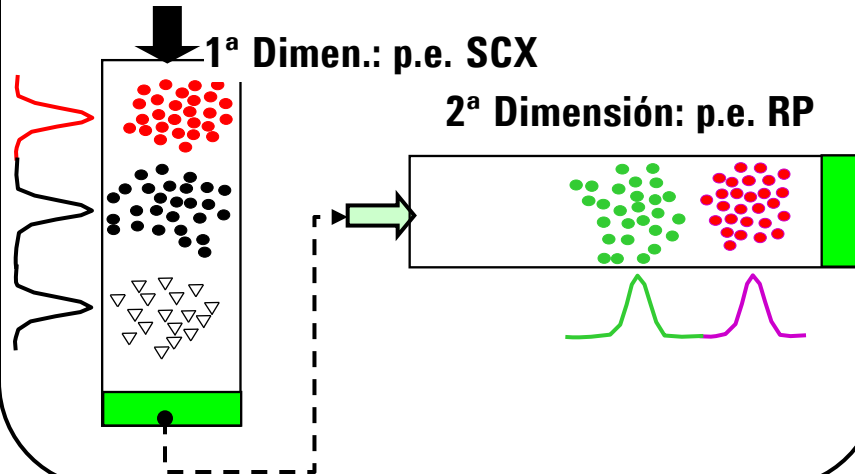
Típicas Estrategias para Fraccionar y Separar Proteínas

1.- Separar Proteínas Mayoritarias (típico por Inmunoadinidad)

- Extracción Muestra
- Células
 - Medios acondicionados
 - Tejidos
 - Fluidos biológicos



3.- Separar Proteínas Digeridas (->péptidos) por CROMATOGRAFIA MONO o MULTIDIMENSIONAL



2A.- Fraccionar Proteínas por ELECTROFORESIS

1-D Slab Gel

1D SDS-PAGE

2-D Slab Gel

2D SDS-PAGE

MW (KDa)

MW (KDa)

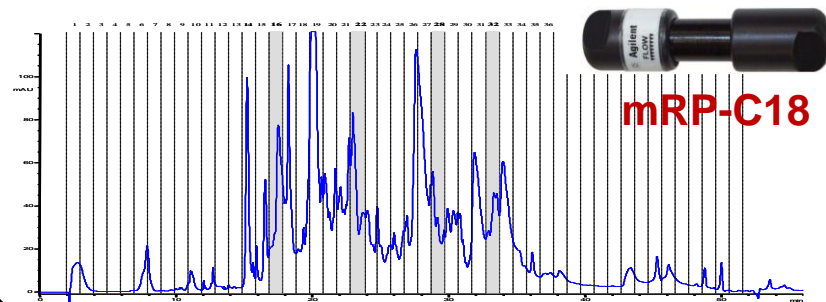
pl

pl

Agilent
Off-Gel Electroforesis

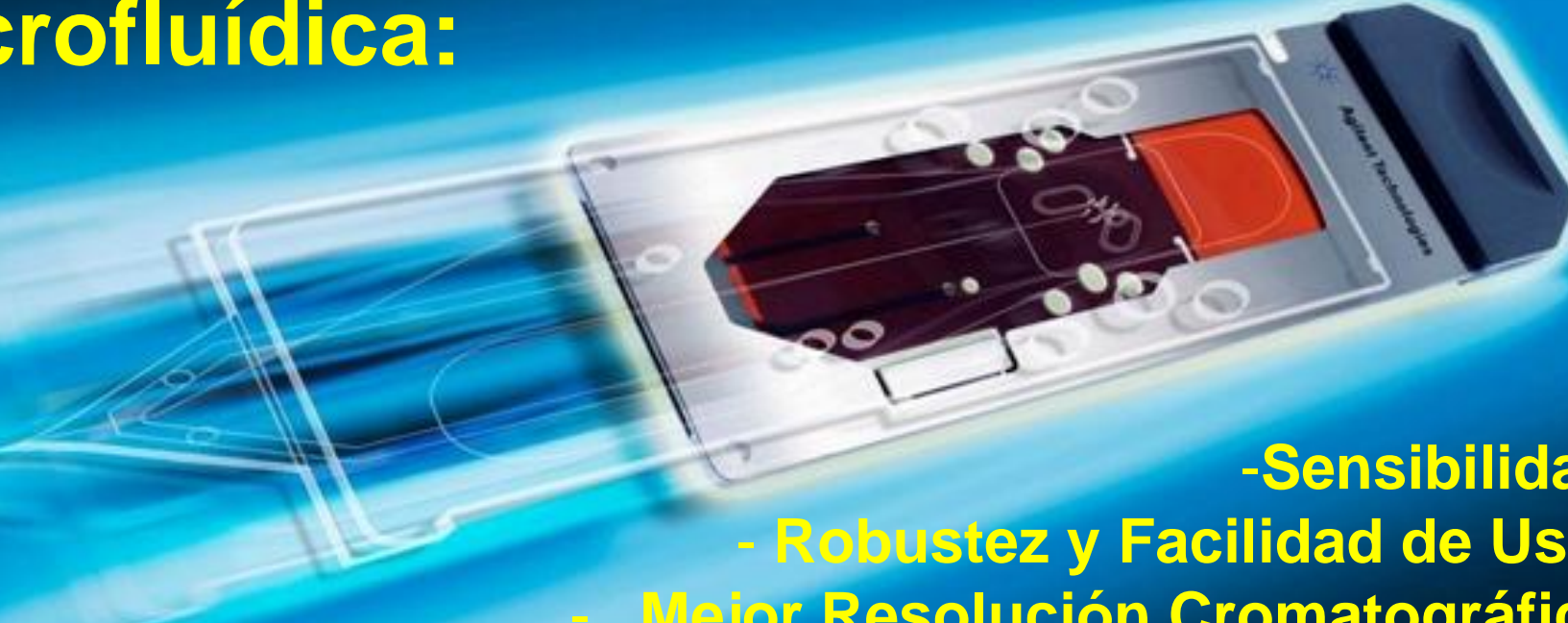


2B.- Fraccionar Proteínas por CROMATOGRAFIA

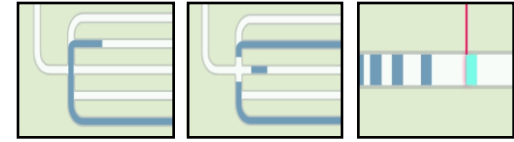


Análisis de Proteínas Minoritarias suele utilizar: nano-LC/MS

HPLC-Chip/MS: Tecnología Microfluídica:

- 
- **Sensibilidad**
 - **Robustez y Facilidad de Uso.**
 - **Mejor Resolución Cromatográfica**
 - **Capacidad de Automatización:**
 - **Preconcentración selectiva Fosfopéptidos.**
 - **Caracterización N-glicosilaciones en mAB's o proteínas glicosiladas**

Alternativa a Escala Analítica Geles 1D: **Bioanalizador** **Agilent "Lab-on-a-Chip"** para Análisis de **Proteínas** "Mayoritarias", ADN y Contaje Células



Típico 10-150 muestras/día 14-200kDa; 10% resol. tam.; **40-4000ng/μl**

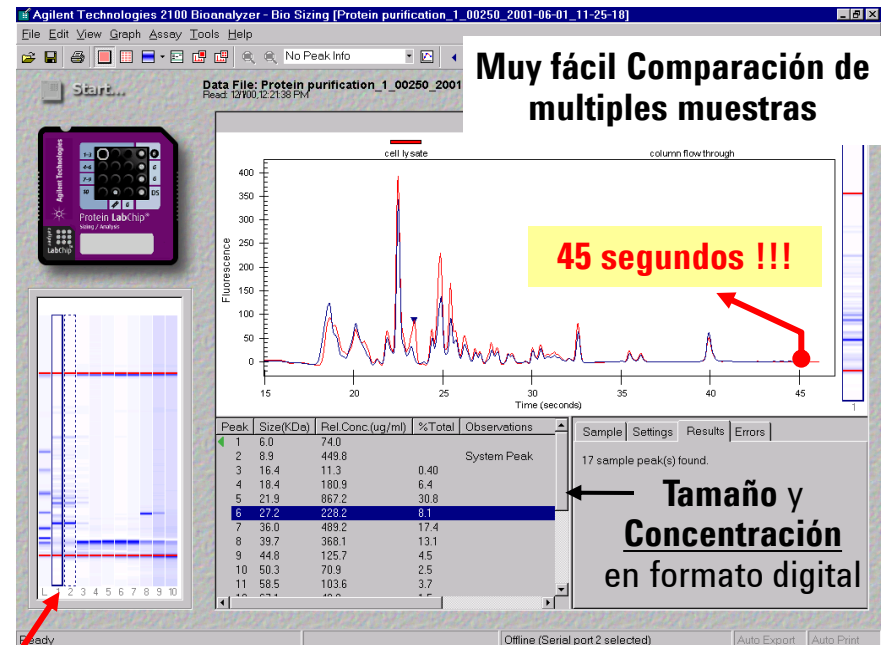
1. Load sample



2. Run analysis



3. See data



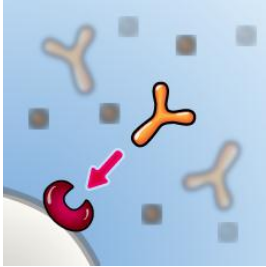
- 1.- 6 μl muestra (desnaturalizada)
- 2.- 6 μl "ladder" (desnaturalizado)
- 3.- 12 μl Mezcla gel/tinte
- 4.- 12 μl solución de destinción

10 muestras/Chip / 30min

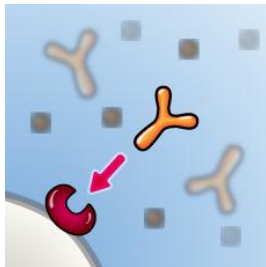
Bioanalizador reemplaza a 1D-SDS-PAGE
Determina tamaño y nivel de expresión

Automatización Preparación Muestra: Agilent Bravo

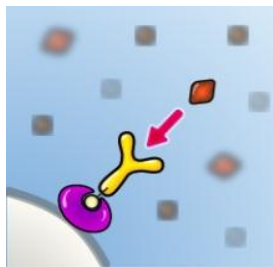
General Ab Capture
Protein A



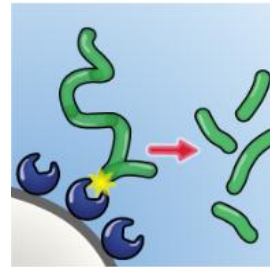
Immunoprecipitation
Protein A



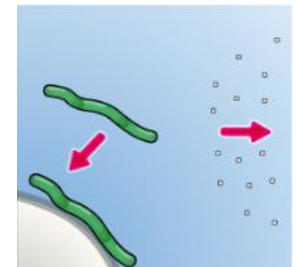
DIY Captures
Streptavidin



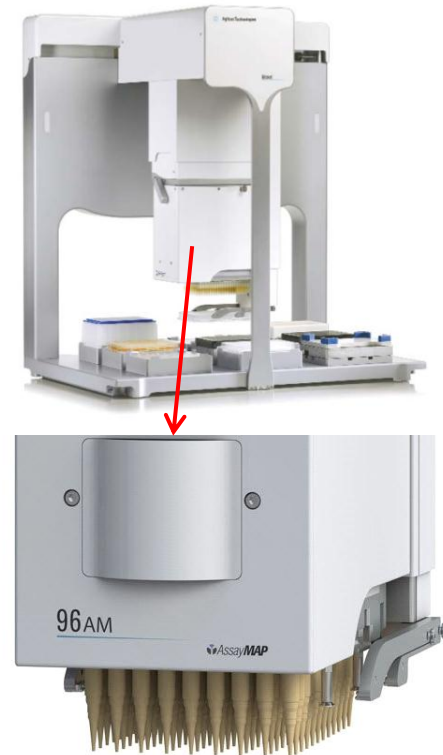
Protein Digestion
Trypsin



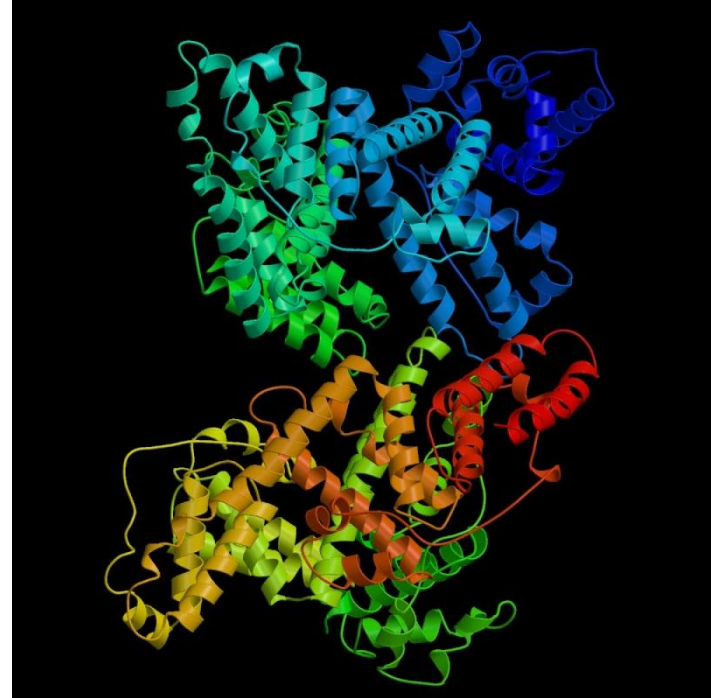
Sample Clean Up
Reverse Phase



- **Protein A for general Ab capture and Immunoprecipitation**
 - Used in all of the targeted workflows – **protein purification and characterization.**
- **Streptavidin for Ab, antigen, protein/peptide, small molecule capture**
 - Anything that can be **biotinylated can be immobilized**
- **Trypsin for rapid, on-column digestion**
 - Protein characterization workflows – Peptide mapping, Oxidation analysis.
- **Reverse Phase for sample clean up before LCMS**
 - Protein characterization workflows – Peptide mapping, Oxidation analysis.



Identificación y Cuantificación de Proteínas mediante LC/MS.



Programa:

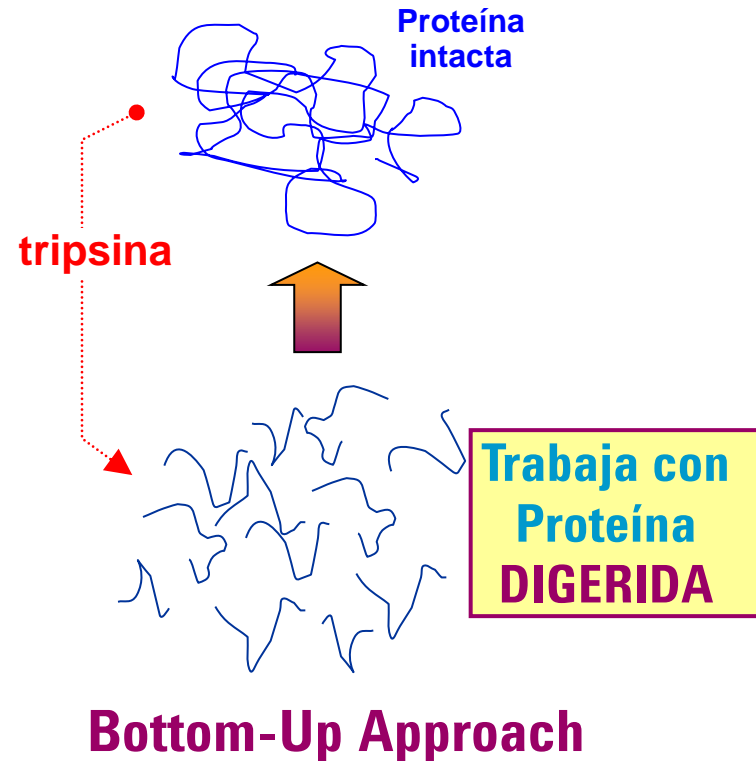
- 1.- Introducción a la Proteómica.
- 2.- **Identificación de Proteínas** mediante espectrometría de masas.
- 3.- Cuantificación de Proteínas mediante LC/MS.
- 4.- Conclusiones.



Estrategias de Identificación de Proteínas: “Bottom-Up Approach”

Se digieren enzimáticamente las proteínas y se determina el peso molecular y la secuencia de sus fragmentos peptídicos

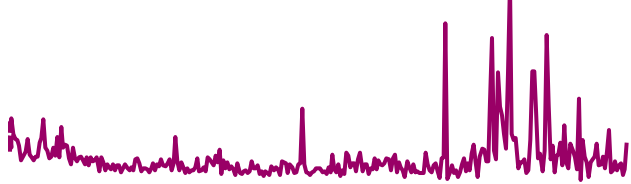
- Búsquedas de los datos de MS (m/z iones) frente a **Bases de Datos de Proteínas**.



Identificación mediante Bases de Datos de Proteínas.

Mezcla Proteínas Digerida
Cromatograma 100 amol Péptidos

BPC (cromatograma no selectivo)



Motor Búsqueda ← Masa Exacta
 ← Masa+Fragmentos

Nivel Expresión sin marcaje isotópico (diferencial de SPMill)

Group (#)	Spectra (#)	Distinct Peptides (#)	Summed MS/MS Search Score	% AA Coverage	Mean Peptide Spectral Intensity	Protein MW (Da)	Database Accession #	Protein Name
1	68	21	371.14	63	4.01e+007	46914.4	6321968	ENOLASE 2 (2-PHOSPHOGLYCERATE DEHYDRATASE) (2-PHOSPHO-D-GLYCERATE HYDRO-LYASE)
2	48	21	323.91	59	3.94e+007	44738.6	10383781	Phosphoglycerate kinase
3	39	12	223.06	48	1.00e+008	39621.0	6322790	FRUCTOSE-BISPHOSPHATE ALDOLASE
4	59	15	220.72	62	3.74e+007	35746.8	6321631	GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE 3 (GAPDH 3)

m/z del péptido: da información de los **AAS** presentes (no de su secuencia)

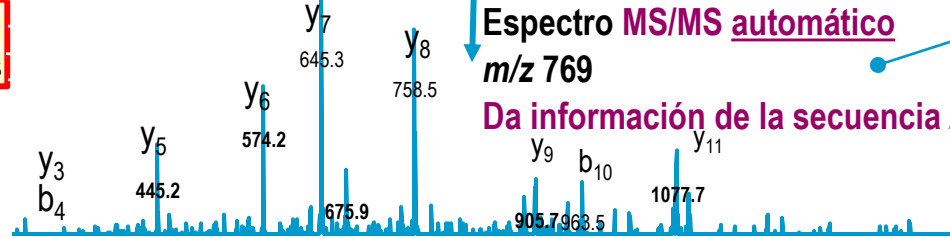
[Glu] Fibrinopéptido B
ADSGEGDFLAEGGVR

769.0

MS¹

MS: TOF o Quad

Espectro de Masas



Espectro MS/MS automático
 m/z 769

Da información de la secuencia AAS

Auto-MS/MS: Q-TOF, TRAP o QqQ

Proteínas identificadas

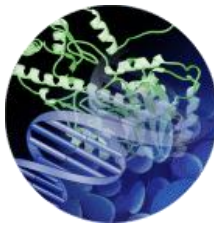
Agilent Spectrum Mill

The matched peptides cover **63%** (279/437 AA's) of the protein.

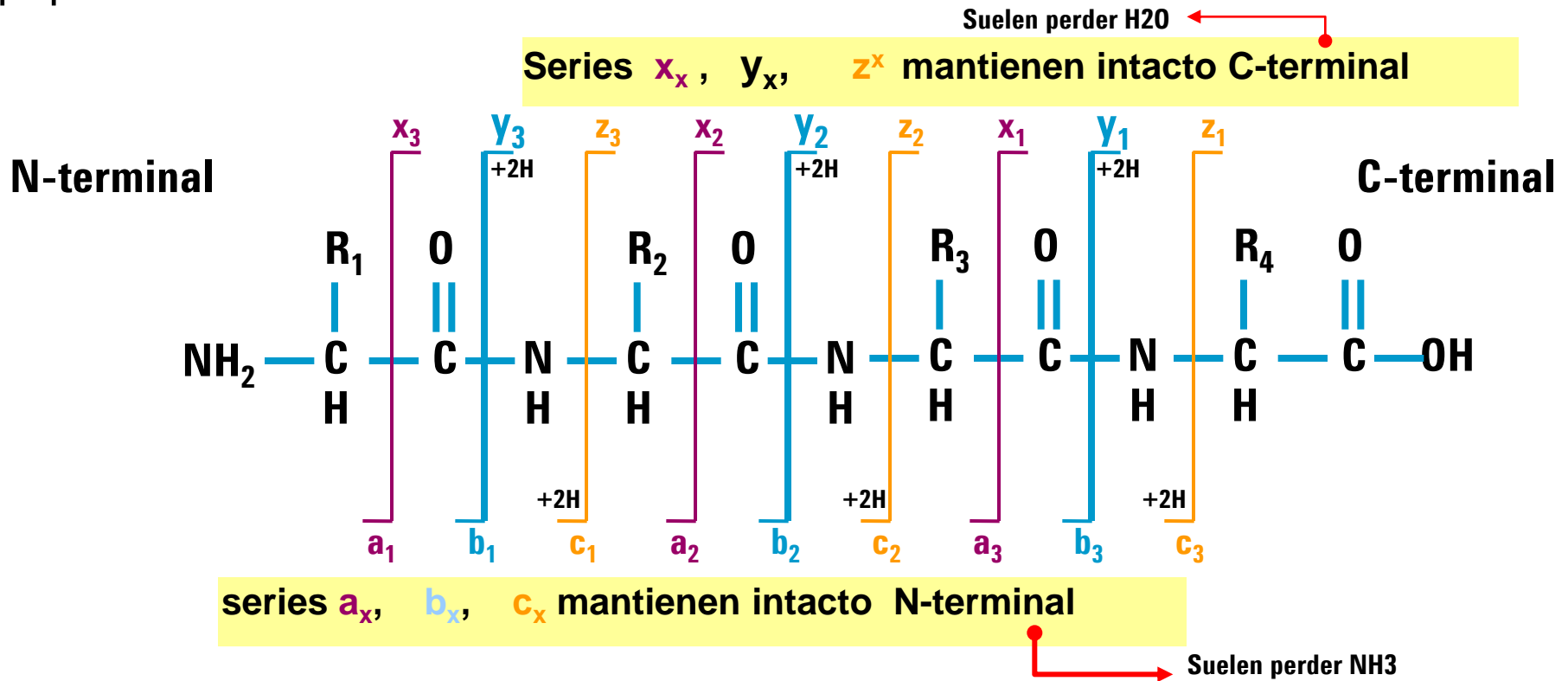
Protein Name: **ENOLASE 2 (2-PHOSPHOGLYCERATE DEHYDRATASE) (2-PHOSPHO-D-GLYCERATE HYDRO-LYASE)**
 Species: **YEAST**
 NCBI nr.yeast Accession # **6321968**
 MS-Digest Index # **5069**
 pl of Protein: **5.67**
 Protein MW: **46914.4 Da**
 Amino Acid Composition: **A58 C1 D30 E28 F15 G35 H10 I20 K35 L38 M10 N21 P13 Q9 R14 S30 T20 V35 W5 Y10**

Digest Used	Max. # Missed Cleavages	Cysteines Modified by	Peptide N terminus	Peptide C terminus
Trypsin	2	carbamidomethyl	Hydrogen (H)	Free Acid (FA)

Secuenciación de Péptidos mediante MS/MS:



Los espectros de MS/MS de iones con 2 o más cargas proporcionan una excelente información estructural para la secuenciación de un péptido



- series y_x^- , b_x^- corresponden a una rotura del enlace péptidico (CO-N). **La más probable CID**
- series a_x^- , x_x^- corresponden a una rotura del enlace péptidico (C-CO)
- series c_x^- , z_x^- corresponden a una rotura del enlace péptidico (N-C). **La más probable ETD**

Bases de Datos de Proteínas

	U	C	A	G
UU	UUU <i>Phenylalanine</i>	UUC <i>Phenylalanine</i>	UUA <i>Leucine</i>	UUG <i>Leucine</i>
UC	UCU <i>Serine</i>	UCC <i>Serine</i>	UCA <i>Serine</i>	UCG <i>Serine</i>
UA	UAU <i>Tyrosine</i>	UAC <i>Tyrosine</i>	UAA STOP	UAG STOP
UG	UGU <i>Cysteine</i>	UGC <i>Cysteine</i>	UGA STOP	UGG <i>Tryptophan</i>
CU	CUU <i>Leucine</i>	CUC <i>Leucine</i>	CUA <i>Leucine</i>	CUG <i>Leucine</i>
CC	CCU <i>Proline</i>	CCC <i>Proline</i>	CCA <i>Proline</i>	CCG <i>Proline</i>
CA	CAU <i>Histidine</i>	CAC <i>Histidine</i>	CAA <i>Glutamine</i>	CAG <i>Glutamine</i>
CG	CGU <i>Arginine</i>	CGC <i>Arginine</i>	CGA <i>Arginine</i>	CGG <i>Arginine</i>
AU	AUU <i>Isoleucine</i>	AUC <i>Isoleucine</i>	AUA <i>Isoleucine</i>	AUG <i>Methionine</i>
AC	ACU <i>Threonine</i>	ACC <i>Threonine</i>	ACA <i>Threonine</i>	ACG <i>Threonine</i>
AA	AAU <i>Asparagine</i>	AAC <i>Asparagine</i>	AAA <i>Lysine</i>	AAG <i>Lysine</i>
AG	AGU <i>Serine</i>	AGC <i>Serine</i>	AGA <i>Arginine</i>	AGG <i>Arginine</i>
GU	GUU <i>Valine</i>	GUC <i>Valine</i>	GUA <i>Valine</i>	GUG <i>Valine</i>
GC	GCU <i>Alanine</i>	GCC <i>Alanine</i>	GCA <i>Alanine</i>	GCG <i>Alanine</i>
GA	GAU <i>Aspartic Acid</i>	GAC <i>Aspartic Acid</i>	GAA <i>Glutamic Acid</i>	GAG <i>Glutamic Acid</i>
GG	GGU <i>Glycine</i>	GGC <i>Glycine</i>	GGA <i>Glycine</i>	GGG <i>Glycine</i>

A: Adenina, U: Uracilo, G: Guanina C: Citosina

- Se basan en las proteínas que **pueden ser codificadas** por la **secuencia del genoma** del organismo estudiado. Se complementan con la adición de secuencias complementarias.
- En los ribosomas se leen los nucleótidos del mRNA en secuencias de 3 bases (tripleto denominado codón) que definen el aminoácido que se adicionará a la cadena de la proteína. Hay 64 codones diferentes, 1 de ellos (AUG generará metionina) define el inicio de la síntesis de una proteína, y 3 de ellos (UAA - UGA - UAG) definen el fin de su síntesis.
- **Contienen la secuencia de aminoácidos** de las proteínas (p.e.: MTEYKLVVVGAGGVGK.....)
- Bases de Datos (BD) /webs de dominio público:
 - **Swiss-Prot** : <http://www.expasy.org/sprot/> (Creada en 1986 por Amos Bairoch en su tesis doctoral y desarrollada por el **Instituto Suizo de Bioinformática** y el **Instituto Europeo de Bioinformática**. La característica principal de Swiss-Prot es que las proteínas que se encuentran almacenadas en esta base de datos tienen un alto nivel de anotación. Esto significa que se conoce su estructura tridimensional, la función, las modificaciones post-traduccionales, variantes, etc)
 - **NCBI nr**: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/proteins/> (National Center for Biotechnology Information (NCBI) es parte de la Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos)
 - Web European Bioinformatics Institute (EBI): <http://www.ebi.ac.uk/Databases/>
 - Otras BD Proteínas: dbEST, OWL, MSDB, IPI,.....

Motores de Búsqueda para Identificación Proteínas

- Se encargarán de **“comparar” datos** (valores de m/z) procedentes del **Espectros de Masas** experimentales con los datos contenidos en la **BD Proteínas**.
- EN MS/MS Aplicará **fragmentación “in silico”** (/teóricamente) a las **secuencias de la BD** los tratamientos a los que ha sido sometida la muestra en el laboratorio:
 - **Reducción** (DTT) de los puentes disulfuro (romperlos) y **alquilación** (IAA) para prevenir su re-formación.
 - Digestión enzimática; habitualmente con **TRIPSINA**. Proteasa que corta a la proteína en los residuos /K-,/R-,\P de Lisina (K) y Arginina (R), excepto si están seguidos de Prolina (P) en la dirección del C terminal. **Suele proporcionar péptidos entre 6 y 20 AAS** (ideales para secuenciación por MS).
 -
- **Contrasta las masas teóricas con las experimentales** (m/z) procedentes de los espectros de MS o MS/MS.
- Ejemplos: **Spectrum Mill**, Mascot , Sequest, Profound,

The screenshot shows a search parameters form with the following fields and values:

- Search Parameters** (Section Header)
- Validation filter:** spectrum-not-marked-sequence-not-validated
- Batch size:** 100
- Search previous hits** Max reported hits: 5
- Database:** NCBInr.20070224.fasta.ecoli
- Digest:** Trypsin
- Species:** All
- Maximum # missed cleavages:** 2
- Protein pI:** from 3.0 to 10.0 All
- Required AAs:** [] **Disallowed AAs:** []
- Modifications** (Section Header)
- Fixed:** Carbamidomethylation (C)

Tipos y Modos de Búsqueda de Proteínas

Tipos de Búsqueda:

- **PMF Search** (Peptide Mass Fingerprint).
 - Trabaja en modo MS. Disponer de “masa exacta” es casi imprescindible.
 - Comparará las masas monoisotópicas de los péptidos con las de la BD.
 - Se requieren al menos 5-6 péptidos para poder identificar una proteína.
- **MS/MS Search**
 - Trabaja en modo MS/MS. La “masa exacta” ayuda mucho pero no es imprescindible.
 - El motor realiza una fragmentación “in silico” de los péptidos de la BD
 - Comparará la masa monoisotópica del péptido (calculado a partir de la masa y carga ión precursor) y la de los fragmentos (residuos) obtenidos del espectro de MS/MS.
 - Con 2-3 péptidos suele ser suficiente para identificar una proteína por MS/MS.

Modos de Búsqueda

- **Modo Identidad:** se compara con las secuencias de proteínas nativas (sin PMT's - no modificadas).
- **Modo Homología:** se compara con las secuencias de posibles modificaciones o mutaciones de las proteínas nativas (PMT's – modificadas/ isoformas).



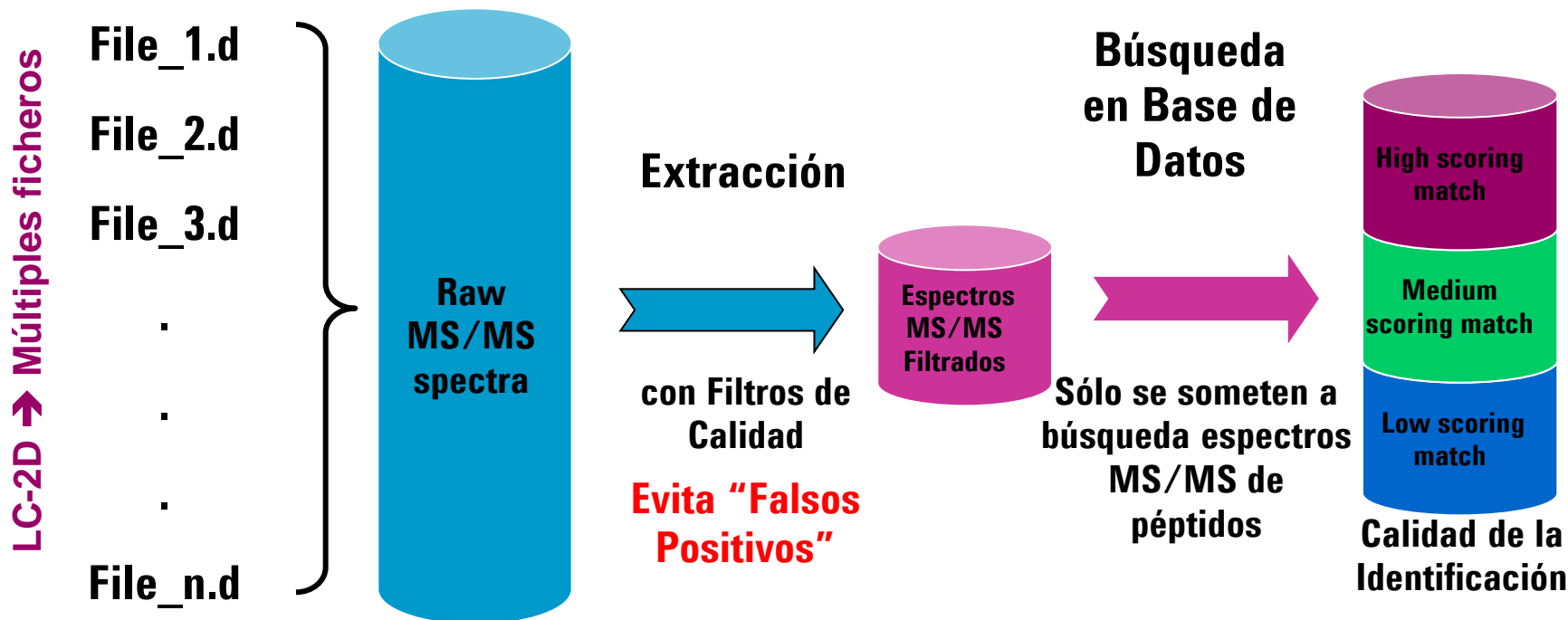
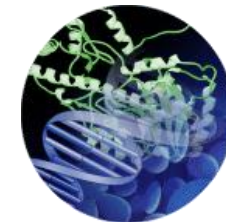
Truncated sequence:



Deletion sequence:

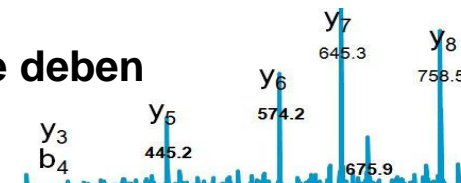


Agilent Spectrum Mill: Extracción de Datos “Inteligente” y Validación Automática de Resultados

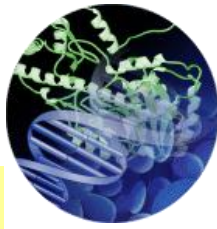


Filtrado Espectros:

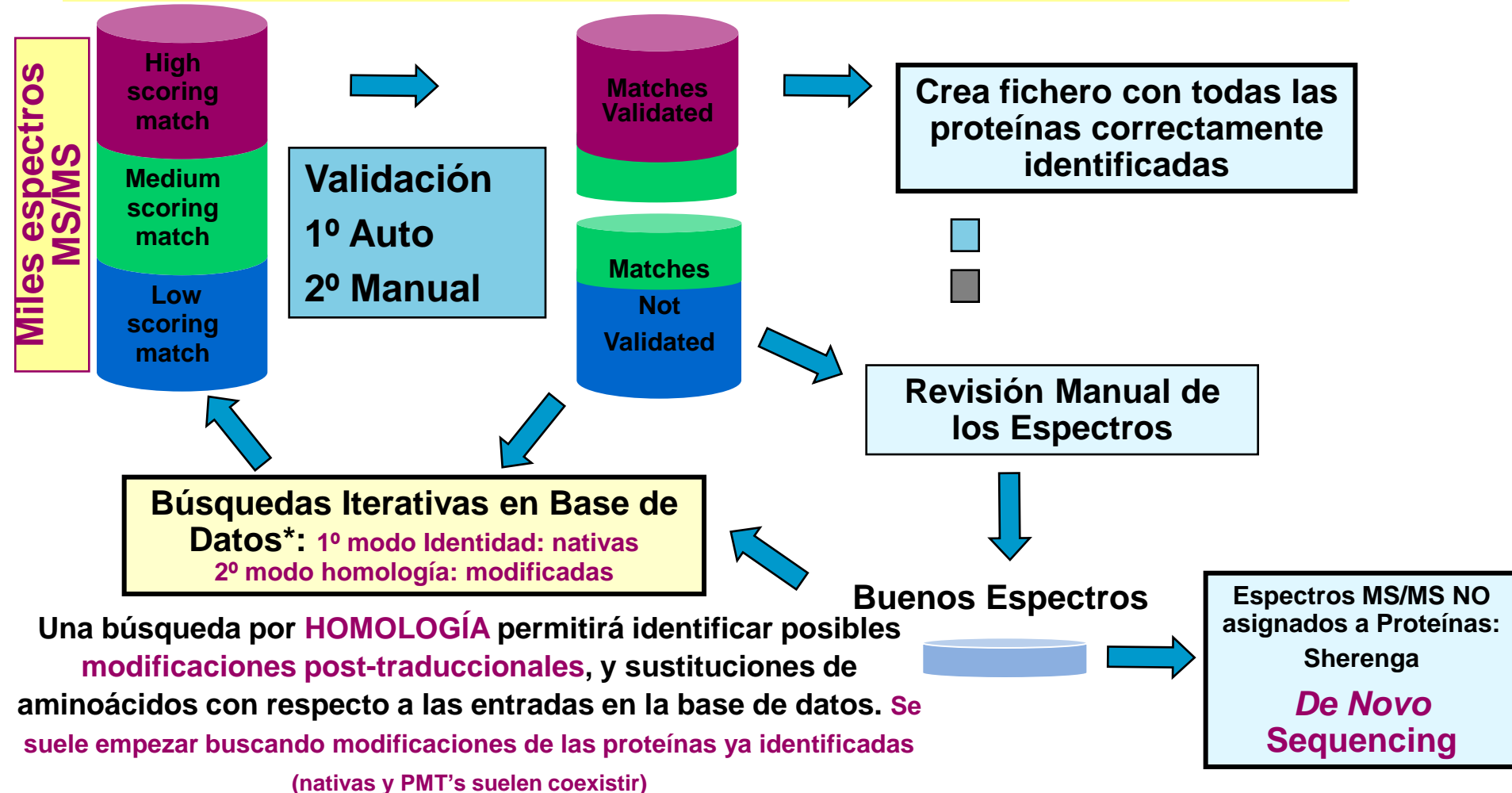
- **Relación S/N** (en MS y MS/MS)
- **“Sequence Tag Length”** en espectros de MS/MS: se deben detectar las **pérdidas de al menos 2 residuos (AAS)**



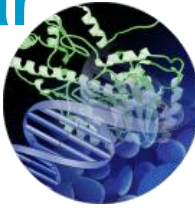
Spectrum Mill: Búsquedas en Modos Identidad y Homología mediante proceso Iterativo



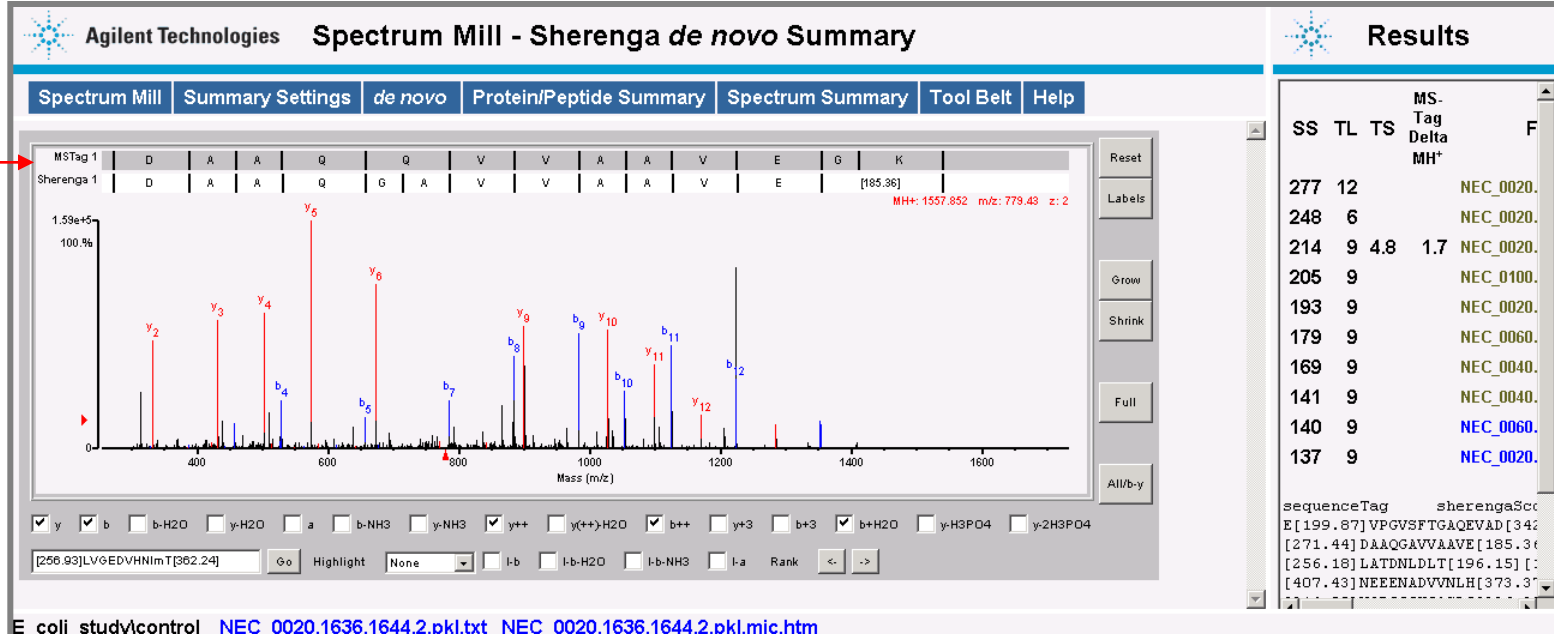
Revisión Datos y Búsquedas adicionales iterativas para **asignar el mayor n° posible de espectros MS/MS de péptidos a proteínas (nativas o modificadas)**



“Sherenga De Novo Sequencing” para Secuenciar Péptidos por su espectro de MS/MS



● Secuencia del Péptido



E_coli_study/control NEC_0020.1636.1644.2.pkl.txt NEC_0020.1636.1644.2.pkl.mic.htm

Rank	Orig. Score	Score	MS-Tag Sequence	Sherenga Sequence Tag	Matched Parent MH ⁺	Delta Parent MH ⁺	Measured Parent m/z
		20.31	GLTDAAQQVVAAVEGK	[271.44]DAAQGAVVAAVE[185.36]	1556.8284	1.0238	779.4300
1.	248.3	248.3	G L T D A A Q Q V V A A V E G K	[271.44] D A A Q G A V V A A V E [185.36]	1557.85		779.43
2.	245.3	245.3	[271.44] V S A A Q G A V V A A V E [185.36]	[271.44] D A A Q G A V V A A V E [185.36]			
3.	243.1	243.1	[271.44] D A A Q G V A V A A V E [185.36]	[271.44] D A A Q G A V V A A V E [185.36]			
4.	241.9	241.9	[386.42] A A Q G A V V A A V E [185.36]	[271.44] D A A Q G A V V A A V E [185.36]			
5.	240.6	240.6	[271.44] D A A Q G A V V A A V E [185.36]	[271.44] D A A Q G A V V A A V E [185.36]			
6.	238.9	238.9	[370.15] A S A Q G A V V A A V E [185.36]	[271.44] D A A Q G A V V A A V E [185.36]			
7.	238.3	238.3	[271.44] A D A A Q G A V V A A V E [185.36]	[271.44] D A A Q G A V V A A V E [185.36]			
8.	238.3	238.3	[271.44] V S A A Q G V A V A A V E [185.36]	[271.44] D A A Q G A V V A A V E [185.36]			
9.	238.2	238.2	[271.44] w A A Q G A V V A A V E [185.36]	[271.44] D A A Q G A V V A A V E [185.36]			
10.	237.7	237.7	[356.17] T A A Q G A V V A A V E [185.36]	[271.44] D A A Q G A V V A A V E [185.36]			

● Secuencia propuesta y alternativas

Poderosa “Secuenciación de Novo” para secuenciar los péptidos trípticos no asignados a ninguna proteína de la base de datos

Ejemplo Resumen de Proteínas Identificadas

Protein/Peptide Summary - Agilent Spectrum Mill - Microsoft Internet Explorer provided by Agilent Technologies, Inc.

Address: http://smbm/millhtml/summaryframe.htm

Agilent Spectrum Mill - Protein/Peptide Summary

Spectrum Mill | Summary Settings | Autovalidation | Build TIC | MS/MS Search | Spectrum Summary | Tool Belt | Help

Results Shown Filtered by Validation Category: all
 Data Directory: msdataSM\FE-lab\Group4\Comparison_data
 hit table read - SpecFeatures read Files: 123 Hits: 164
 beginning to assemble proteins ... proteins assembled
 proteins filtered by unique peptides
 proteins filtered by score
 proteins rolled up into groups
 protein groups ready for display 11 Proteins listed

Promedio Intensidad Espectral Péptidos Identificados

El color proporciona información del nivel de expresión (semi-cuantificación)
 (-expres.) Blanco – Amarillo – Naranja – Rojo – Granate - Marrón (+expresada)

Group (#)	Spectra (#)	Distinct Peptides (#)	Distinct Summed MS/MS Search * Score	% AA Coverage	Mean Peptide Spectral Intensity	Database Accession #	Protein Name
1	3	3	35.65	7	6.90e+007	P06733	Alpha enolase (EC 4.2.1.11) (2-phospho-D-glycerate
2	2	2	33.37	5	3.10e+007	P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein.
3	2	2	32.24	3	1.25e+008	P34058	Heat shock protein HSP 90-beta (HSP 84).

Proteínas Identificadas

Summarize Results for Review
 Summarize | Save Settings | Reset
 Mode: Protein Summary

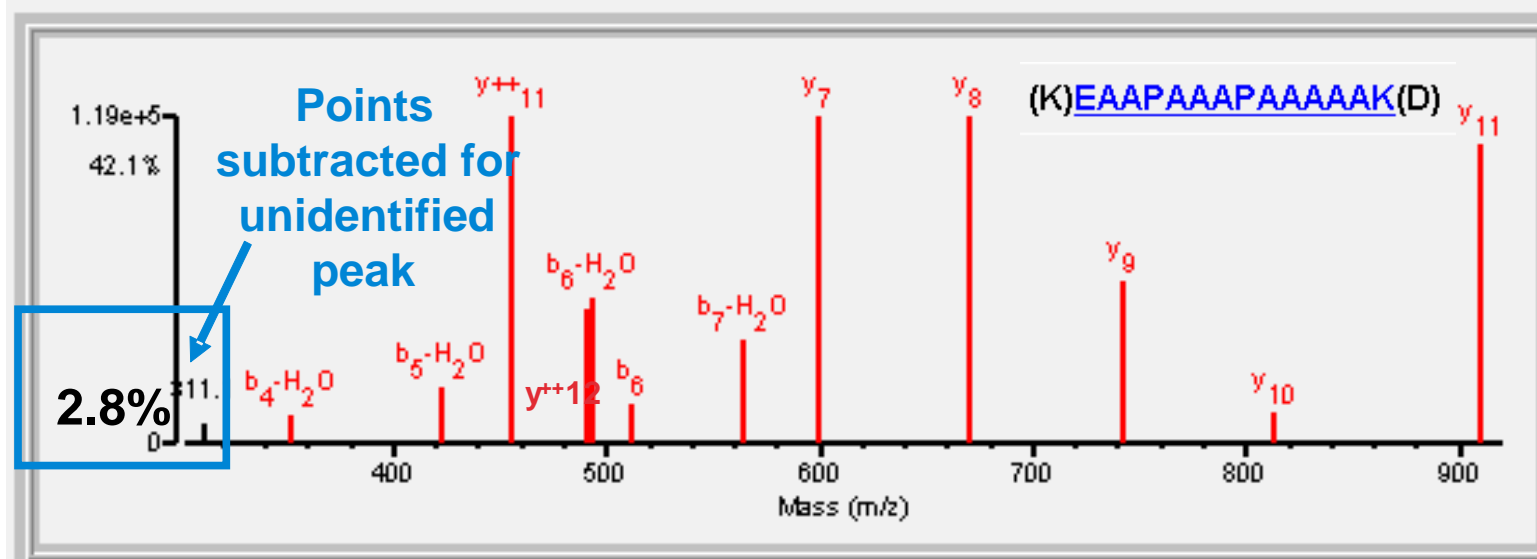
Validation and Sorting
 Filter results by: all
 Validation preset: none
 Sort proteins by: Score
 Filter by protein score: > 9
 Filter peptides by: Score: > 9 % SPI: > 70

Review Fields
 Filename Protein MW Excel export
 Score Protein pI L/H Cys
 Mean Intensity Species Category
 Accession #
 Protein name

Parámetros para Filtrar y Clasificar los resultados mostrados
 (0 para mostrarlo todo)

* "Scores" > 20 indican identificación con buena calidad

Ejemplo de Spectrum Mill “Scoring Overview”



Y ⁺⁺ , y ⁺⁺⁺ , y	1.50	7 x 1.50 = 10.50
b ions	0.50	1 x .50 = 0.50
a ions	0.25	0 x 0.25 = 0.00
b-NH ₃ , y- NH ₃	0.25	0 x 0.25 = 0.00
b-H ₂ O, y-H ₂ O	0.25	4 x 0.25 = 1.00
	Total positive	12.00

Score

$$12.00 - .028 = 11.97$$

- Note: Not all counted ion types shown in table.
- El valor de las asignaciones depende del tipo de instrumento.
- Se calcula con los 25 iones más intensos.

Otros motores de búsqueda utilizan “scores” puramente estadísticos (p value).

Posibilidad de Contrastar Fiabilidad Identificación por Comparación con Búsquedas MS/MS en Modo Reverso

Agilent Spectrum Mill - MS/MS Search

Spectrum Mill Easy MS/MS Autovalidation Protein/Peptide Summary Extractor Databases Tool Be

Search

Start Search Save Settings Reset Remove all prior MS/MS Search results

Data Directory

Select... DemoIQTOF

Search Parameters

Validation filter: spectrum-not-marked-sequence-not-validated Batch size: 100

Search previous hits Max reported hits: 5

Database: NCBInr.20070224.fasta.ecoli Digest: Trypsin

Species: All Maximum # missed cleavages: 2

Protein pI: from 3.0 to 10.0 All Required AAs: Disallowed AAs:

Modifications

Choose... Fixed: Carbamidomethylation (C)

Search Criteria

Matching Tolerances

Disable match filtering (SPI, STL, S/N filter)

Minimum scored peak intensity: 50 %

Instrument: Agilent ESI Q-TOF

Masses are: Monoisotopic

Precursor mass tolerance: +/- 20 ppm

Product mass tolerance: +/- 50

Maximum ambiguous precursor charge: 4

Spectral Quality

Sequence tag length: > 3

Minimum detected peaks: 4

Search mode

Calculate reversed database scores

Proton mobility scoring

Dynamic peak thresholding

Search mode: Identity

Data Files

Spectrum files (./cpick_in):

*.pk1
*.dta

- Para valorar la fiabilidad de la Identificación, para todos los candidatos que pasen el filtro del ión precursor se calcula también el factor de similitud con respecto de la búsqueda frente al reverso de la “secuencia interna de aminoácidos” del péptido candidato.
- Por ejemplo:

Candidato: **SAMPLER**

Busq. Reversa: **SELPMAR**

Cuanto mayor sea la diferencia entre ambas búsquedas más fiable será la identificación.

Localización de PMT's con Agilent Spectrum Mill: representación

Asignación de Iones a Fragmentos de la Secuencia del Péptido y sus Modificaciones con respecto a la proteína identificada en la base de datos

#	Score	Spectrum Intensity	Modification	Sequence Map	m/z Measured (Da)
1	14.54	1.83e+008	T15t S12s S13s	(K)Y S A W L R/L P C N I s s E \ t \ K(S)	722.66

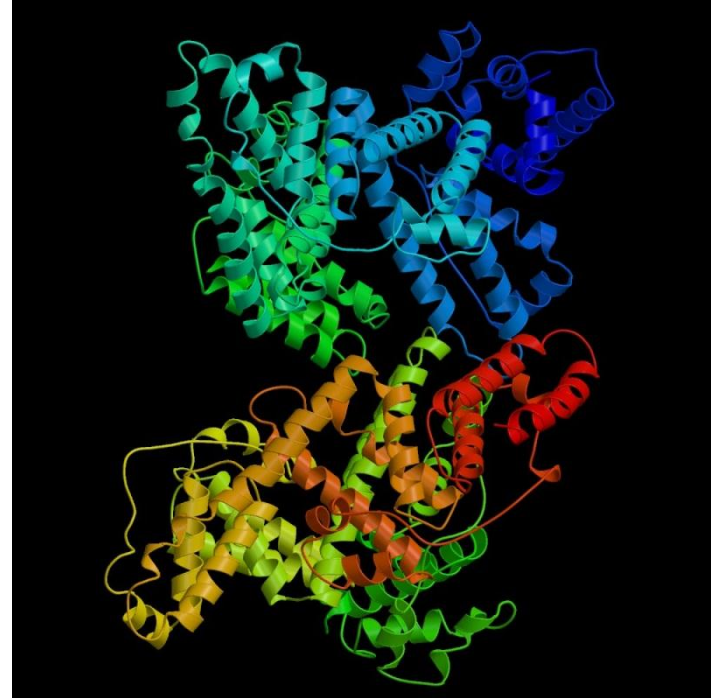
modificaciones

- Los símbolos: / | \ indican los fragmentos que se han identificado en el masas.
- Sus colores indican a que tipo de residuo corresponde:
 - Rojo: iones y (carga en grupo amino – fragmento lado C-terminal)
 - Azul: iones b (carga en grupo CO – fragmento lado N-terminal)
- "Modification": indica las puntos de modificación del péptido. Los AAS modificados se indican con su letra en minúscula
 - p.e. puntos de fosforilación: t en Thr / s: en Ser / y: en Tyr

- Para evitar identificaciones duplicadas SpectrumMill agrupa todas las proteínas homologas (modificadas –mutadas-...) como 1 sola proteína (la forma nativa y sus modificaciones - PMT's- suelen coexistir).

Intensity	Build TIC	MS/MS Search	Spectrum Summary	Tool Belt	Help
6.90e+007		P06733	Alpha enolase (EC 4.2.1.11) (2-phospho-D-glycerate		
3.10e+007		P11142	Alpha enolase (EC 4.2.1.11) (2-phospho-D-glycerate		
1.25e+008		P34058	Alpha enolase (EC 4.2.1.11) (2-phospho-D-glycerate		
1.71e+008		Q9Y702	Enolase (EC 4.2.1.11) (2-phosphoglycerate dehydrat		
3.58e+006		P52209	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating		

Identificación y Cuantificación de Proteínas mediante LC/MS.

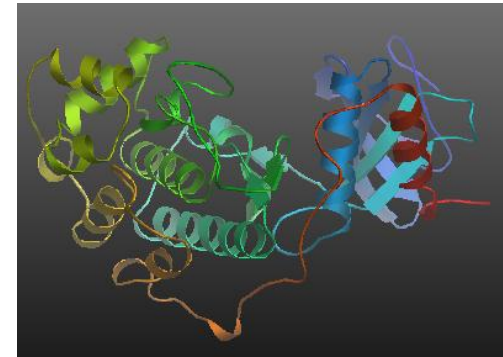


Programa:

- 1.- Introducción a la Proteómica.
- 2.- Identificación de Proteínas mediante espectrometría de masas.
- 3.- **Cuantificación de Proteínas** mediante LC/MS.
- 4.- Conclusiones.



Cuantificación Relativa Multiplexada de Proteínas mediante LC/MS con Etiquetado Isotópico



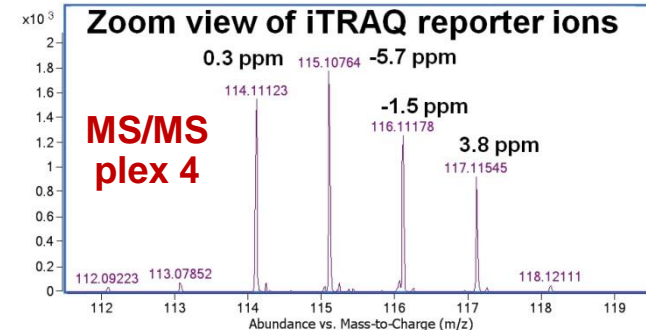
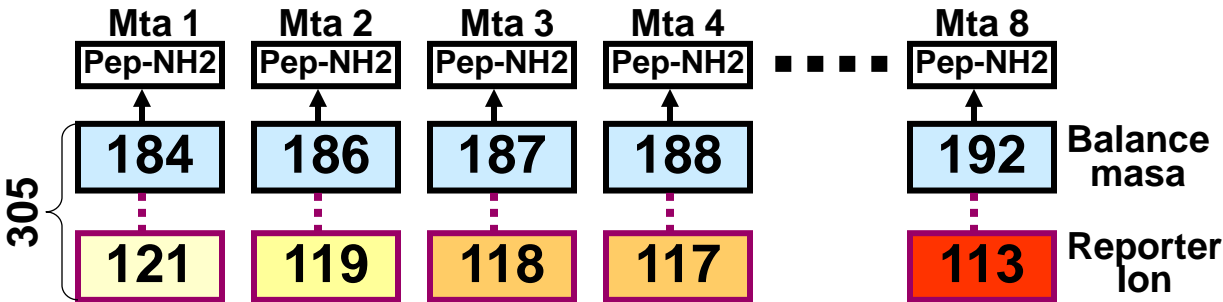
La **estructura semejante** de los péptidos permite etiquetar **X muestras con distintas etiquetas isotópicas** para poder **analizarlas conjuntamente** y cuantificarlas relativamente con 1 solo análisis (multiplexado).

Técnicas de cuantificación relativa:

- Por **metabolización SILAC**
- Etiquetado **antes digestión**: **ICAT** (C13, D) (MS) (ver ejemplo en aptdo. 3)
- **Después de la digestión**: **iTRAQ** (MS/MS), **O 16/18** (MS),.....

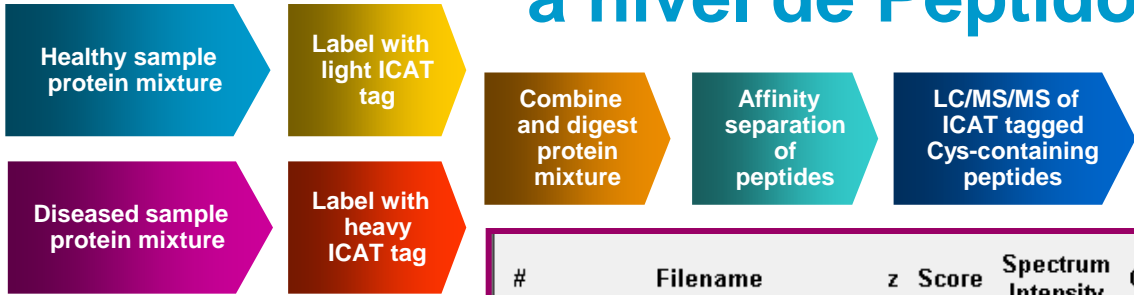
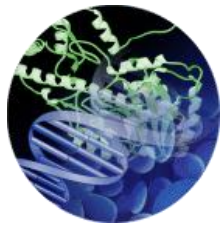


iTRAQ –plex8:



* Agilent Spectrum Mill software. Permite cuantificar relativamente con cualquier tipo de etiquetado

Expresión Diferencial mediante Etiquetado ICAT a nivel de Péptidos y Proteínas



Modo Péptido

#	Filename	z	Score	Spectrum Intensity	Cysteines	light / heavy	Accession #	Protein Name
1	ICATtop4_020219.1064.1064.0	2	13.77	1.45e+007	ICAT-D0	0.590	115114	Aprotinin
2	ICATtop4_020219.1089.1093.2	2	13.37	6.39e+007	ICAT-D8	1.014	129293	ovalbumin
3	ICATtop4_020219.1094.1097.2	2	13.73	6.54e+007	ICAT-D0	1.031	129293	ovalbumin
4	ICATtop4_020219.0725.0725.2	2	12.10	1.09e+007	ICAT-D0	1.384	1351907	bovine serum albumin
5	ICATtop4_020219.1067.1072.0	3	10.95	7.98e+007	ICAT-D8	0.763	1351907	bovine serum albumin
6	ICATtop4_020219.1068.1073.0	3	15.40	6.24e+007	ICAT-D0	0.849	1351907	bovine serum albumin
7	ICATtop4_020219.0963.0963.2	2	14.43	4.21e+007	ICAT-D8	0.666	1351907	bovine serum albumin
8	ICATtop4_020219.0722.0722.2	2	12.64	7.89e+006	ICAT-D8	1.314	1351907	bovine serum albumin
9	ICATtop4_020219.1202.1202.2	2	11.57	8.58e+006	ICAT-D8	0.813	1351907	bovine serum albumin

Modo Proteína

Group (#)	Spectra (#)	Distinct Peptides (#)	Distinct Summed MS/MS Search Score	% AA Coverage	Mean Peptide Spectral Intensity	ICAT light/heavy (mean)	ICAT light/heavy (std dev)	ICAT light/heavy (# pairs)	Database Accession #	Protein Name
1	14	8	130.27	15	5.61e+007	0.70	0.15	6	4557871	transferrin
2	6	4	54.04	9	3.53e+007	0.95	0.31	3	1351907	bovine serum albumin
3	1	1	20.75	9	1.15e+007	0.00	0.00	0	70561	Myoglobin
4	2	1	15.70	2	5.37e+007	0.81	0.00	1	71826	fibrinogen beta chain
5	1	1	13.77	13	1.45e+007	0.59	0.00	1	115114	Aprotinin
6	2	1	13.73	3	6.47e+007	1.02	0.00	1	129293	ovalbumin
Totals:	26	16								

Spectrum Mill: Comparación “Label Free” de Expresión de Proteínas Identificadas: Líquido Synovial de 33 Candidatos

Artritis Reumatoide Erosiva

No-Erosiva

Para facilitar su lectura aquí sólo se muestran 10 de los 33 candidatos

E_51_Br38 #spectra intensity	E_59_Br26 #spectra intensity	E_63_Br35 #spectra intensity	E_67_Br42 #spectra intensity	E_70_Br43 #spectra intensity	N_52_Br29 #spectra intensity	N_54_Br28 #spectra intensity	N_58_Br34 #spectra intensity	N_65_Br36 #spectra intensity	N_66_Br39 #spectra intensity	Protein Name
56 4.92e+008	28 2.68e+008	96 3.42e+008	20 1.49e+009	36 4.87e+008	11 1.81e+008	20 9.35e+008	0 0.00e+000	2 3.83e+007	1 3.40e+007	CALGRANULIN A(MIGRATION INHIBIT
0 0.00e+000	42 6.39e+008	23 2.48e+008	136 1.31e+009	25 4.98e+008	21 1.80e+008	0 0.00e+000	0 0.00e+000	4 4.19e+007	12 7.89e+007	C-REACTIVE PROTEIN PRECURSOR
8 6.26e+008	9 3.18e+008	31 7.34e+008	4 1.09e+009	6 6.34e+008	0 0.00e+000	0 0.00e+000	0 0.00e+000	1 4.01e+007	0 0.00e+000	RHO GDP-DISSOCIATION INHIBITOR 2
44 5.22e+008	35 1.17e+009	40 3.76e+008	10 1.06e+009	6 4.18e+008	6 1.96e+008	18 2.43e+008	4 7.43e+008	11 7.22e+007	6 2.03e+008	PROFILIN I
9 2.25e+008	104 6.89e+008	45 3.25e+008	22 5.05e+008	0 0.00e+000	2 3.72e+007	24 1.43e+008	110 1.83e+009	0 0.00e+000	57 9.70e+008	HEMOGLOBIN ALPHA CHAIN
24 7.04e+008	13 5.22e+008	14 5.01e+008	28 1.11e+009	12 1.08e+009	75 9.28e+008	10 7.72e+008	23 3.81e+009	128 3.19e+008	34 1.47e+009	IMMUNOGLOBULIN J CHAIN
3 7.96e+008	0 0.00e+000	3 4.50e+008	0 0.00e+000	4 7.64e+008	21 8.45e+008	13 2.69e+008	8 1.48e+009	56 5.02e+008	4 1.22e+009	APOLIPOPROTEIN D PRECURSOR
5 1.74e+008	4 4.37e+008	6 2.54e+008	3 1.54e+009	3 1.61e+008	12 8.55e+008	5 1.66e+007	6 6.44e+008	5 5.58e+007	0 0.00e+000	inter-alpha-trypsin inhibitor family heavy
3 5.80e+007	4 8.31e+008	14 3.73e+008	3 4.56e+008	0 0.00e+000	0 0.00e+000	1 2.76e+007	0 0.00e+000	1 6.04e+007	1 4.31e+008	14-3-3 PROTEIN BETA/ALPHA (PROTEIN
0 0.00e+000	12 1.16e+008	10 1.98e+008	14 2.50e+008	6 1.09e+008	0 0.00e+000	0 0.00e+000	0 0.00e+000	0 0.00e+000	0 0.00e+000	Ig G1 H Nie
0 0.00e+000	10 4.64e+008	21 4.46e+008	0 0.00e+000	0 0.00e+000	0 0.00e+000	0 0.00e+000	0 0.00e+000	0 0.00e+000	0 0.00e+000	OSTEOPONTIN PRECURSOR (BONE SI
3 5.42e+008	4 1.03e+009	13 5.30e+008	0 0.00e+000	3 7.20e+008	0 0.00e+000	0 0.00e+000	0 0.00e+000	0 0.00e+000	0 0.00e+000	TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE (TIM)

Posibles candidatos a Biomarcadores



Cuantificación Absoluta de Proteínas mediante: LC-ICP/MS

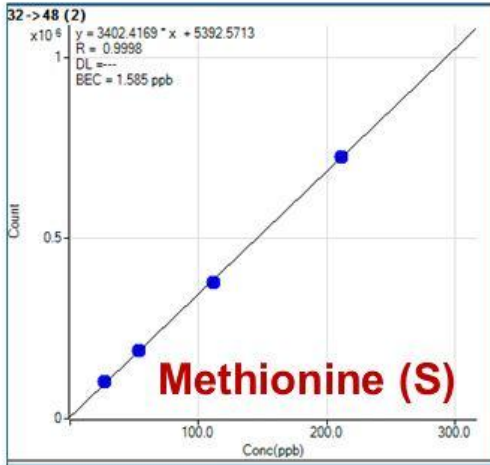


- Al cuantificar a nivel “atómico”, la técnica de ICP/MS (ICP/Q & ICP/QqQ) permite la **cuantificación absoluta** a partir de átomos procedentes de patrones de **moléculas/péptidos distintos a los de interés** para cuantificar.
- Cuantificación de **Métalo-proteínas** mediante LC-ICP/MS:
 - **Ejemplo:** “Determination of Ceruloplasmin in Human Serum by Immunoaffinity Chromatography and Size-Exclusion Chromatography-ICP-MS”. Nota Aplicación 5989-5304EN
- Cuantificación de **proteínas** mediante LC-**ICP/QqQ** a partir de péptidos con **P o S**.
 - La elevada sensibilidad de la técnica ICP/QqQ permite cuantificar bajos niveles de fosfopéptidos y péptidos con azufre.

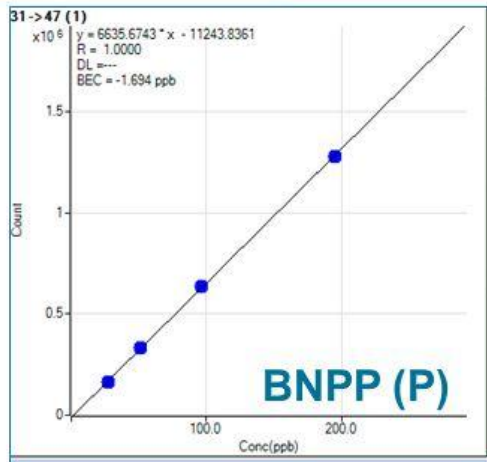
Life Sciences Applications with Cap-LC Coupled to ICP-QQQ



Accurate low-level quantitative analysis of S and P (as SO⁺ and PO⁺)

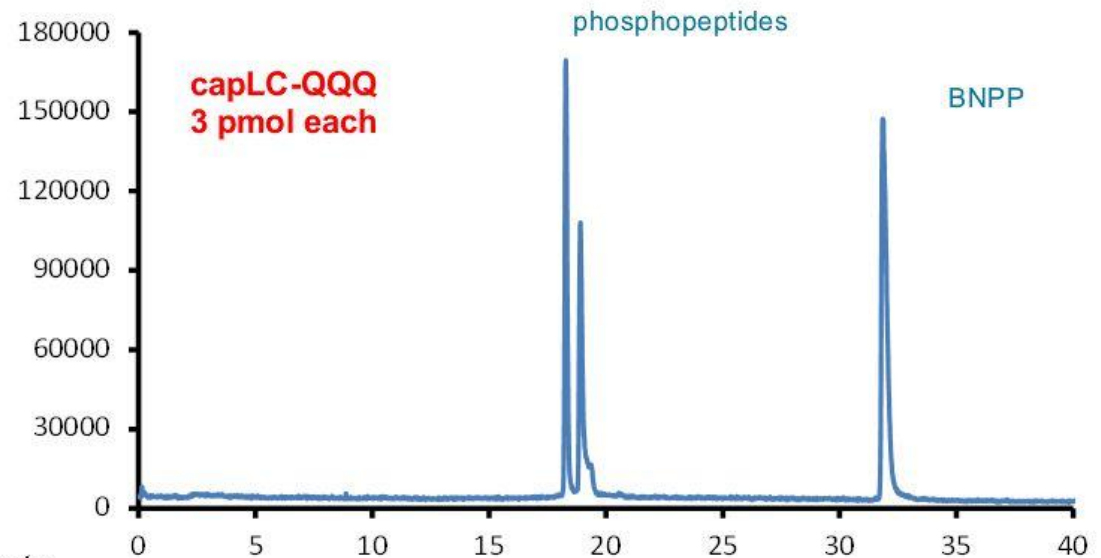


Cap-LC ICP-QQQ gives quantitative analysis of proteins/peptides, based on S/P response.



BNPP – bis (4-nitrophenyl) phosphate

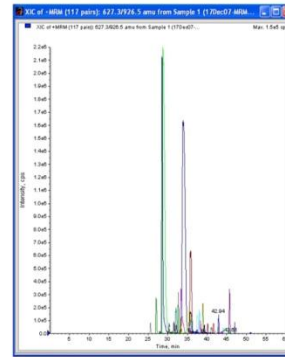
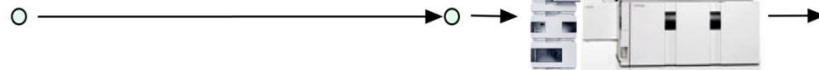
Cap-LC with ICP-QQQ for phosphopeptide analysis



Cuantificación Específica con SISCAPA*: Pre-concentración de Péptidos “Target” y Simplificación de la Muestra

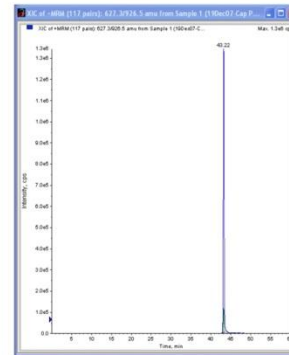
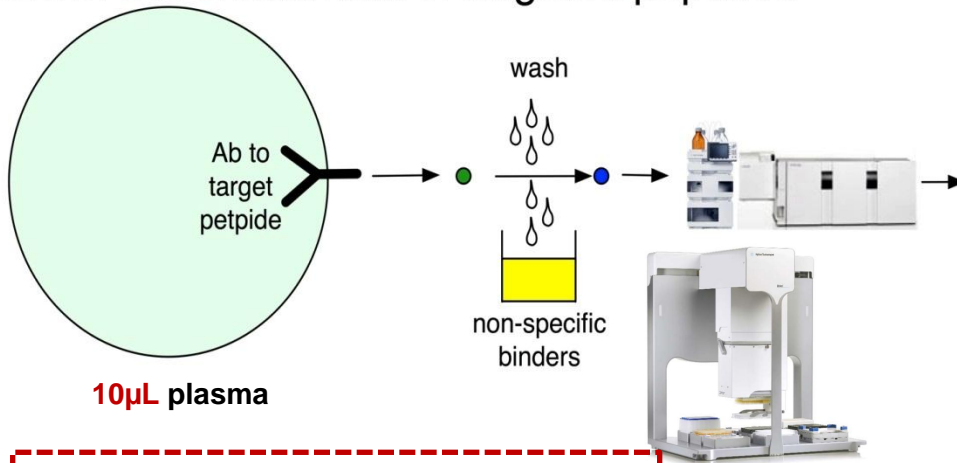
Direct injection of unfractionated plasma digest

10nL plasma



An automated protocol has been developed implementing **SISCAPA immunoaffinity enrichment of biomarker peptides** prior to quantitation by mass spectrometry. In this protocol, **magnetic beads coated with anti-peptide antibodies** bind specific target peptides from tryptic digests of samples such as **plasma and serum**, after which the beads are washed to remove unbound peptides, and the bound, purified peptides are eluted in small volumes for injection into an LC/MS/MS system. Internal standards (stable isotope-labeled versions of the same peptides) allow accurate quantitation. The **Agilent Bravo implementation allows SISCAPA processing of 96 samples in less than 30 minutes.**

SISCAPA enrichment of targeted peptides



1000x larger digest input volume

Reduced ion suppression

Same LC-MS/MS

= >1,000-fold increased MRM assay sensitivity

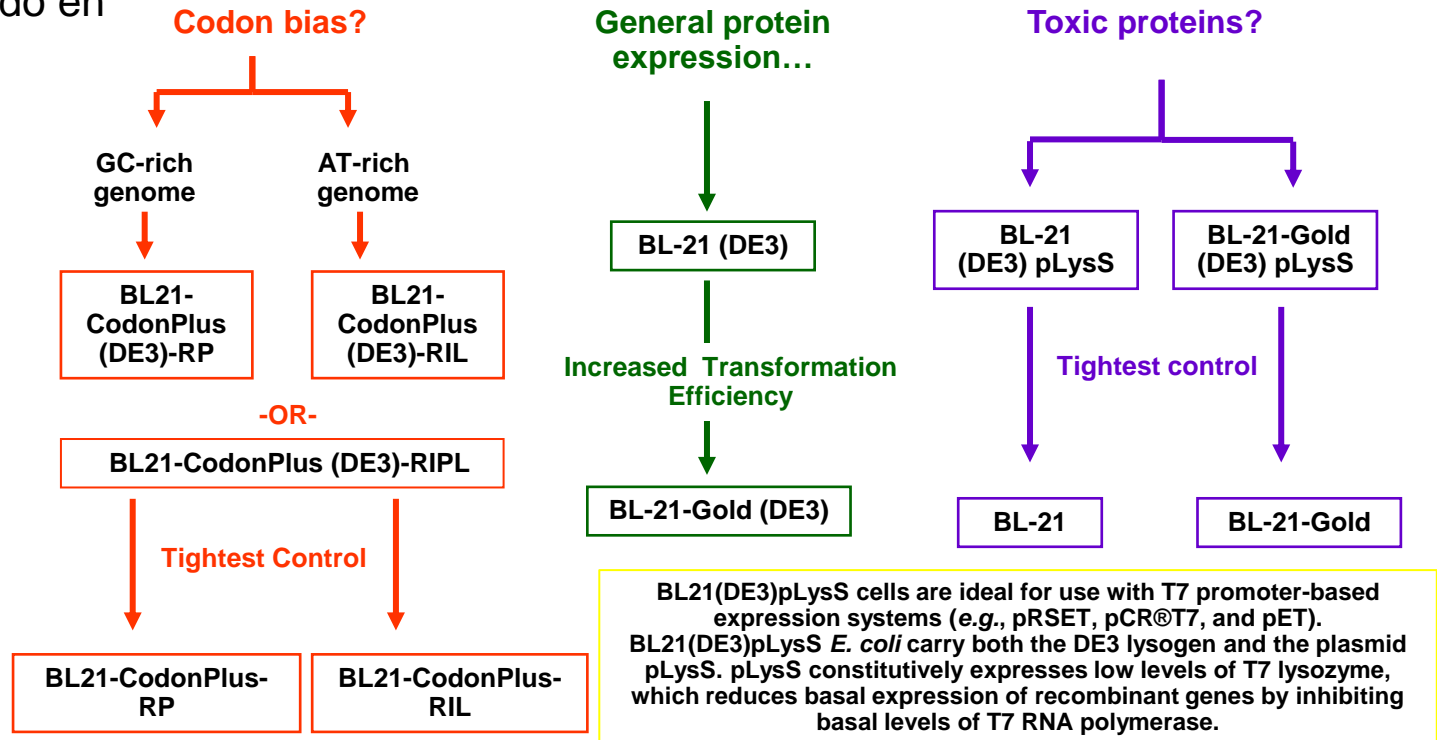
* **SISCAPA: Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies**

Leigh Anderson -Leigh Anderson Anderson Forschung Group –Washington. (“Padre SISCAPA” trabaja con Agilent QqQ’s)

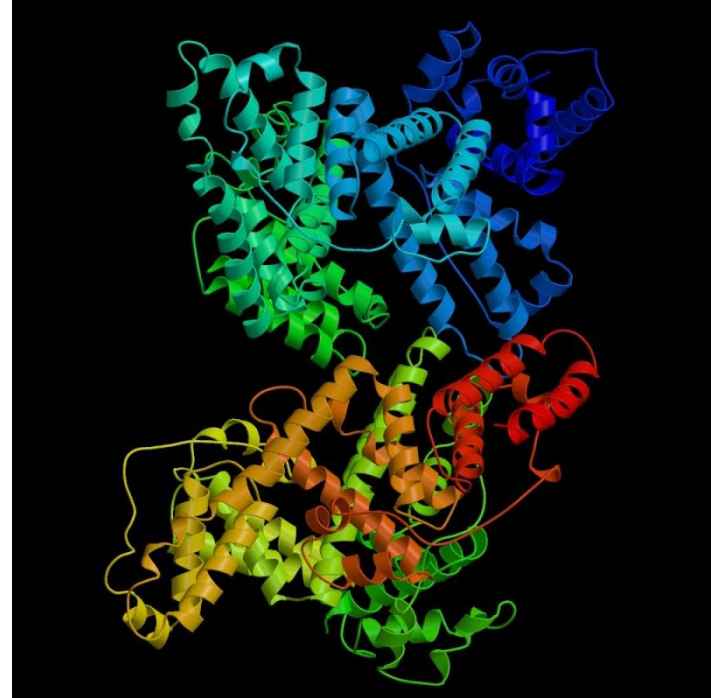
¿Patrones para Cuantificación Absoluta?: Síntesis de Proteínas mediante Células Competentes para Expresión de Proteínas.

Agilent ofrece:

- kits para hacer mutagénesis y clonaje para la previa síntesis de la misma.
- Vectores y células para expresión de proteínas dependiendo de la naturaleza de la mismas (tóxicas, con alto contenido en GC o AT...).



Identificación y Cuantificación de Proteínas mediante LC/MS.



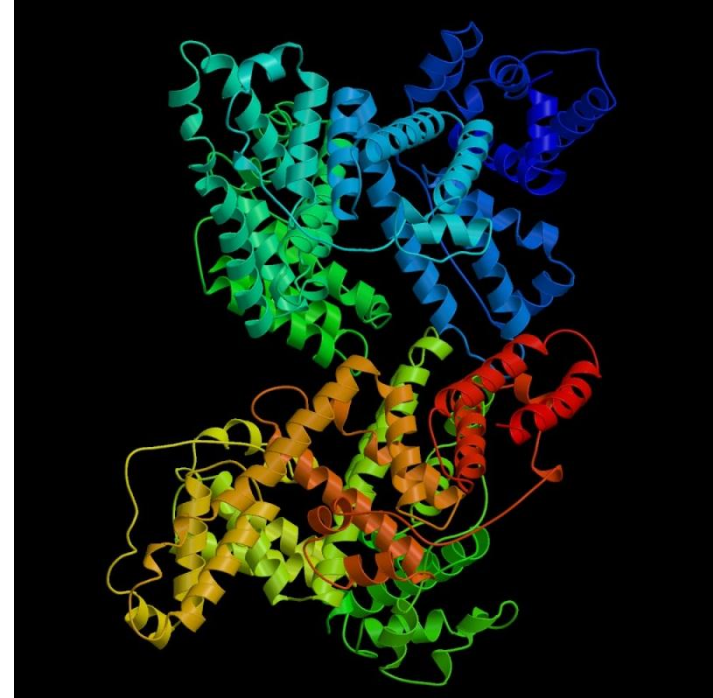
Programa:

- 1.- Introducción a la Proteómica.
- 2.- Identificación de Proteínas mediante espectrometría de masas.
- 3.- Cuantificación de Proteínas mediante LC/MS.
- 4.- Conclusiones.



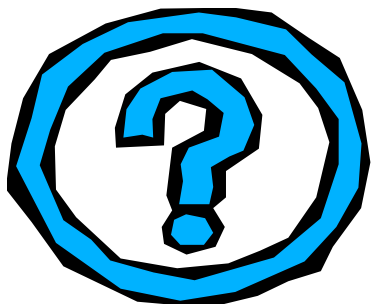
Conclusiones

- Una adecuada preparación y **simplificación de la muestra** mediante adecuadas estrategias de **“eliminar” proteínas mayoritarias** y una **buena separación de las minoritarias** es clave para el éxito del análisis de proteomas.
- **LC/MS/MS** (y a poder ser con masa exacta), combinado con **potentes motores de búsqueda**, permitirá **identificar proteínas** en muestras complejas, a partir de los **espectros de MS/MS de péptidos** procedentes de su digestión enzimática (habitualmente con tripsina).
- El **etiquetado isotópico multiplexado**, permitirá a partir de **1 única inyección**, **cuantificar relativamente diversas muestras simultáneamente** (de 2 a 8), mediante LC/MS o LC/MS/MS.





¿Preguntas?



www.metabolomics-lab.com

www.proteomics-lab.com

Estamos a su disposición en:

http://www.chem.agilent.com/es/customer-care_spain@agilent.com

Tel. 901.11.6890

Isidro Masana
Especialista de Productos LC-CE/MS
AGILENT TECHNOLOGIES 901.11.68.90
isidre_masana@agilent.com



Mass Spec/tacular

