

Fehérjék analitikája

8-11. előadás
Dr. Kecskeméti Ádám

Irodalom:

Gerhardus de Jong
Capillary Electrophoresis - Mass Spectrometry: Principles and Applications (2017)

Pradip K. Ghosh – Introduction to Protein Mass Spectrometry, 4. és 6. fejezet

John R. Griffiths, Richard D. Unwin - Analysis of Protein Post-Translational
Modifications by Mass Spectrometry - Introduction

John Cottrell - Database Searching for Protein Identification and Characterization
(előadás) (http://www.matrixscience.com/pdf/asms_tutorial_2005.pdf)

CE-MS alapok

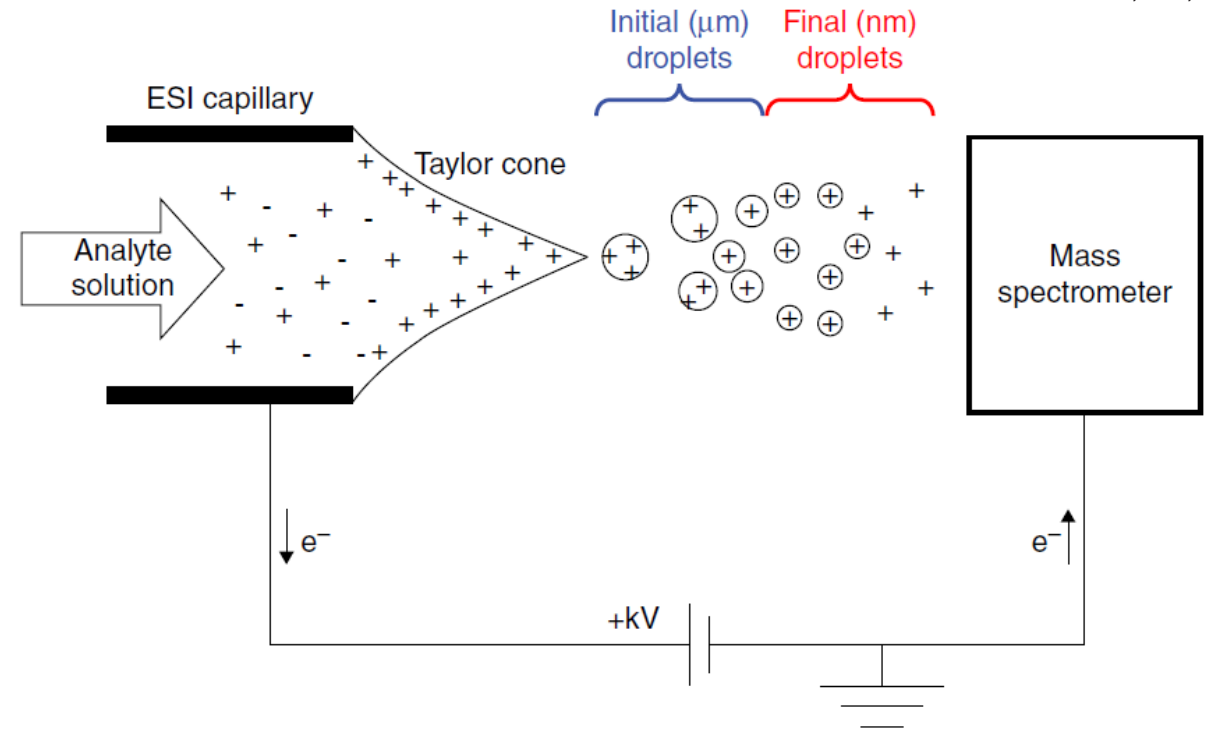
CE detektálás - érzékenység

- UV
- Fluoreszcencia (CE-LIF)
 - Egysejt analízis
 - Származékképzés: online vs offline
 - Xe-lámpák, lézerek, LED-ek
- Vezetőképesség
 - Érintkezésmentes (CCD)
- (ESI-)MS

CE kapcsolása MS-hez

- CE – atmoszférikus nyomás;
MS – vákuum
- CE és MS feszültségek kombinálása
- Alacsony áramlási sebesség CE-nél (nL/min)
- MS kompatibilis pufferek
 - Ionnyomás nem illékony, tömény puffernél
 - + mód: alacsony pH
- mód: magas pH
 - 20-30% szerves módosító

Konermann, L., et al. (2013) Unraveling the mechanism of electrospray ionization. *Anal. Chem.*, **85**, 2–9.



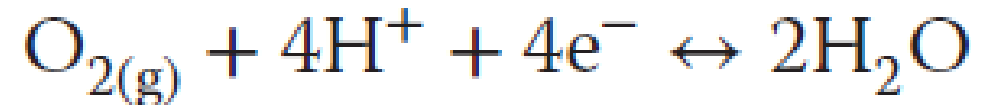
1. Töltött csepp képződés (0,1-10 $\mu\text{L}/\text{min}$; $\pm 2\text{-}5\text{ kV}$)
2. Csepp párolgás (Rayleigh-határ, Coulomb erők)
3. Gázfázisú ionok keletkezése
 - 1 analit/csepp, örökli a csepp töltését)
 - vagy ha Coulomb-erő > felületi fesz., gázfázisú ionok „robbannak” ki a cseppből

CE kapcsolása MS-hez

- 3 elektród, két külön áramkörként viselkedik
 - CE inlet
 - CE outlet/ESI porlasztó
 - MS inlet

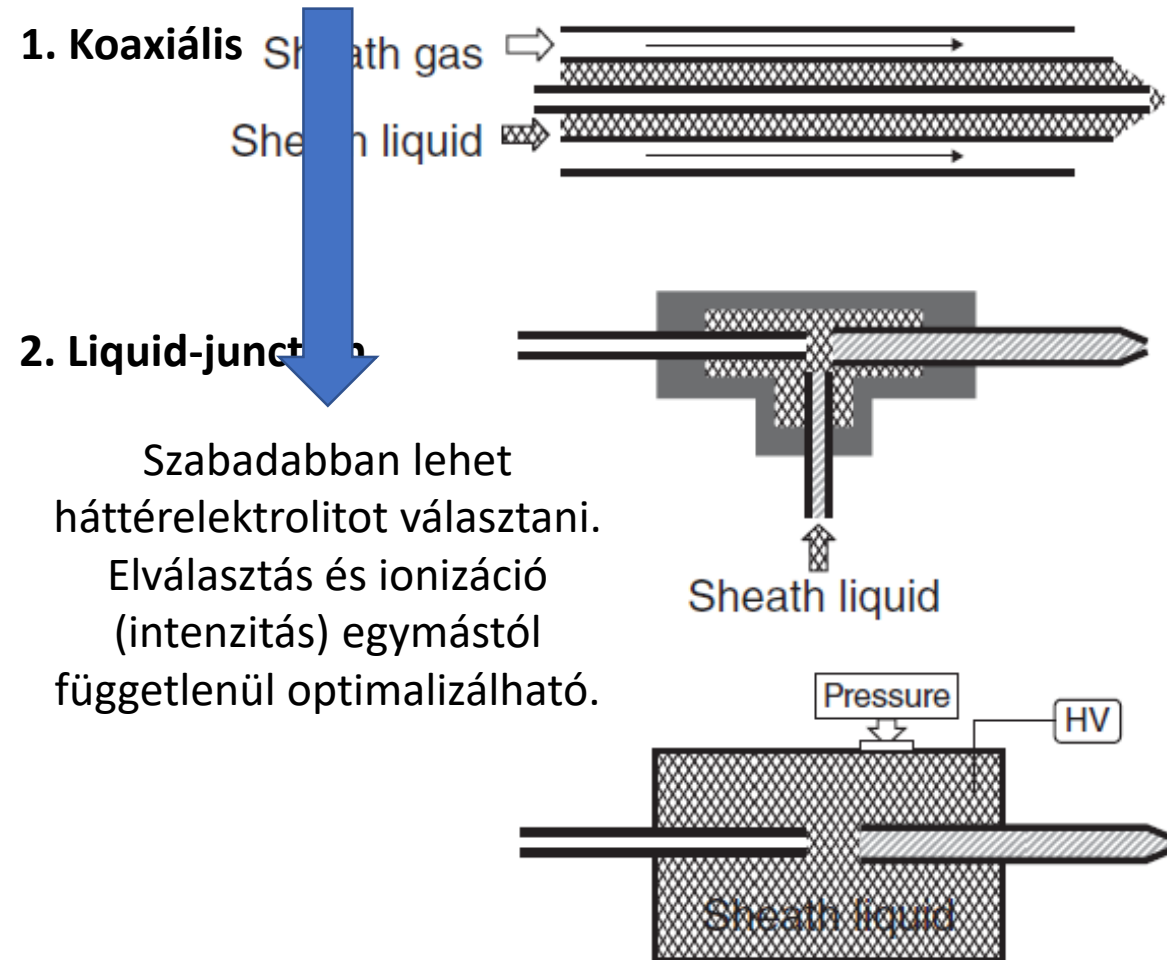
- Elektródfolyamatok

- Anód: oxidáció
- Katód: redukció
- Fordított polaritás: Fe/Ni elektród oxidáció, korrózió

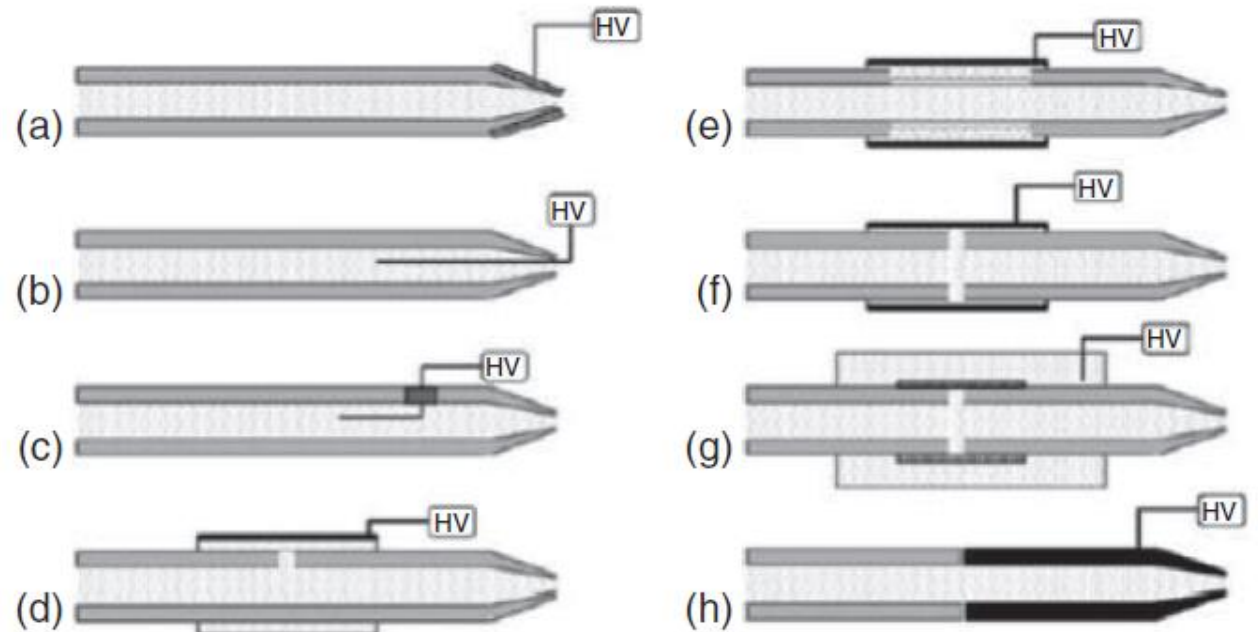


CE kapcsolása MS-hez

Segéd folyadékárammal (sheath liquid)



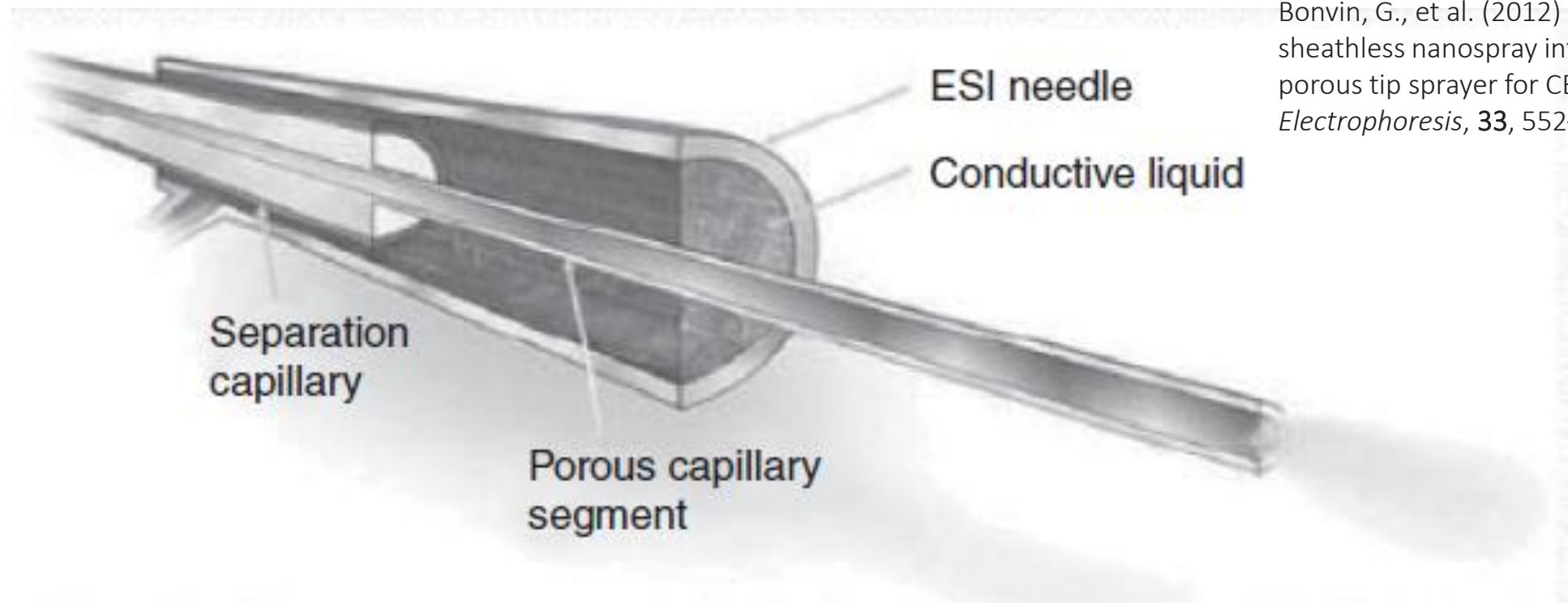
Segéd folyadékáram nélkül (sheathless)



Maxwell, E.J., Chen, D.D.Y. (2008) Twenty years of interface development for ⁶ capillary electrophoresis–electrospray ionization–mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, **627**, 25–33.

Sheathless interface I. – porózus hegy nanospray (CESI 8000)

- Kapilláris hegye porózus (HF maratás), amin keresztül biztosítják a zárt áramkört
- Vezető folyadék csere 3-4 óránként



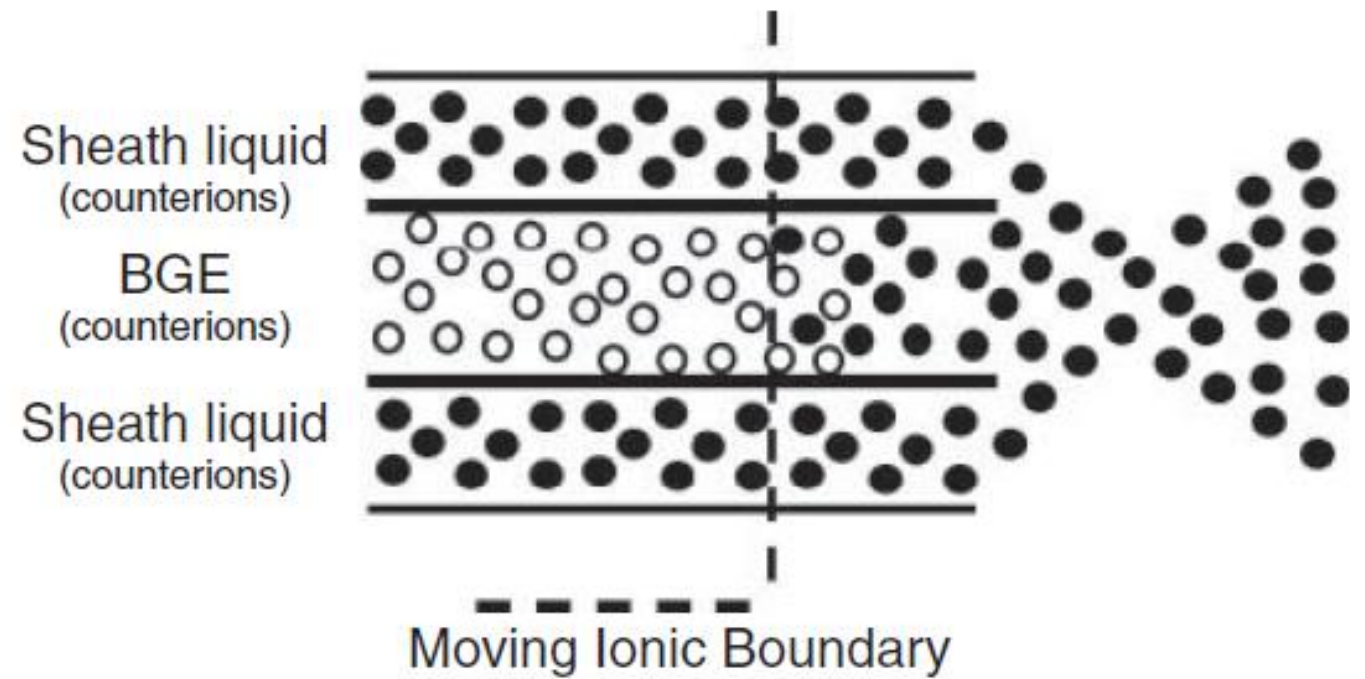
Bonvin, G., et al. (2012) Evaluation of a sheathless nanospray interface based on a porous tip sprayer for CE-ESI-MS coupling. *Electrophoresis*, **33**, 552–562.

Segéd folyadékok

- Minta hígítás: nem feltétlenül jelent kisebb intenzitást
 - Nem illékony pufferek használata lehetséges
- Ált. kevés elektrolitot (illékony só) tartalmaznak – nem muszáj
 - Elektromos vezetés megteremtés
- Ionizáció elősegítése
 - Kis sótartalom – ideális lenne a kicsi alifás alkoholok (tiszt MeOH)
- Leggyakrabban: szerves oldószer (pl. iPr-OH, MeOH) + 20-80% víz
- Adalékok
 - hangyasav/ecetsav, alkil-amin/ammónia
 - Ammónium-formiát/acetát/karbonát

Ionok visszaáramlása

- Kis/ellentétes EOF esetén
- Áramerősség ingadozás



Foret, F., et al. (1994) Liquid sheath effects on the separation of proteins in capillary electrophoresis/electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **66**, 4450–4458.

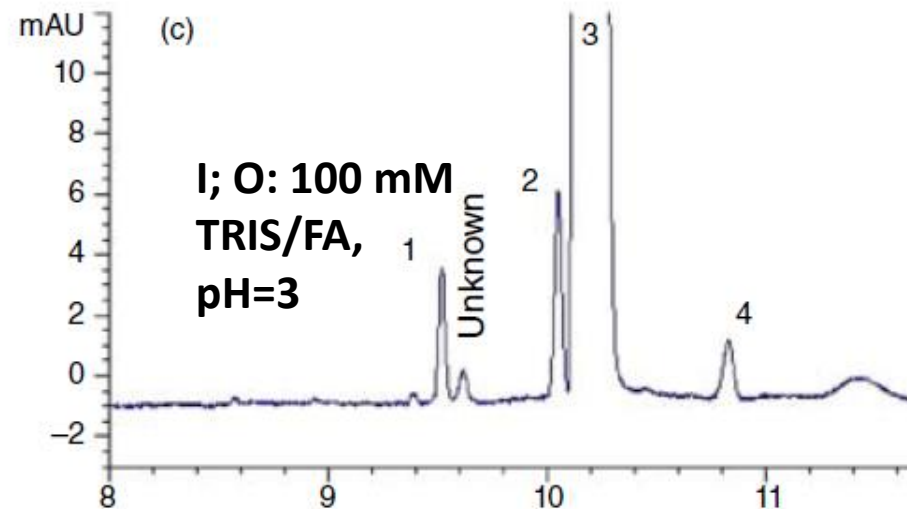
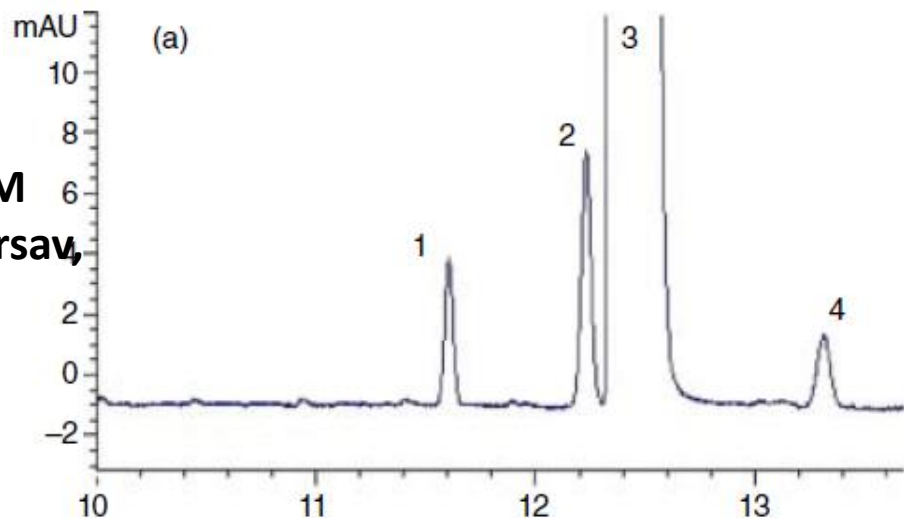
Eltérő ellenion hatása a SL-ben

A, C,: *Eltérő ion miatt változik a szelektivitás*

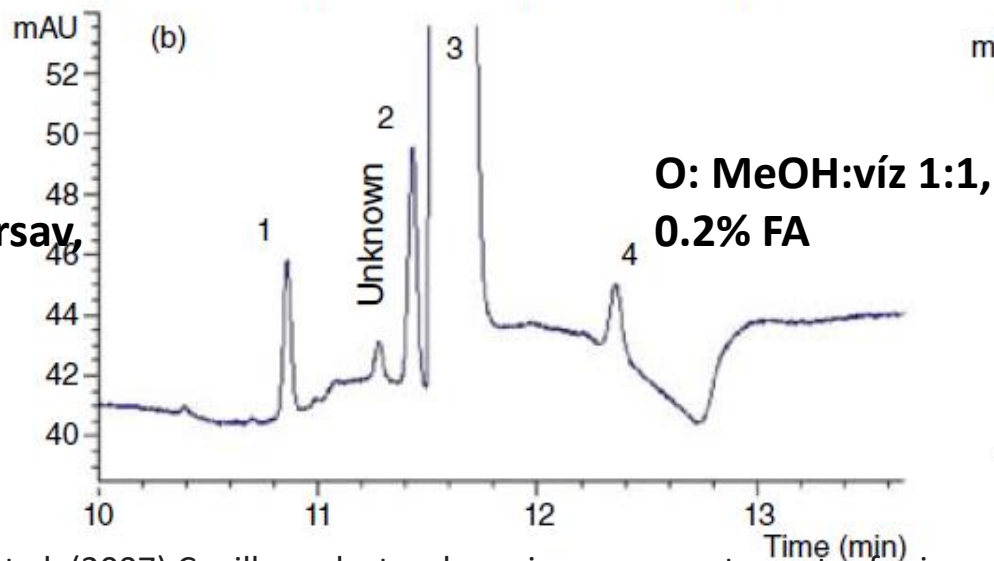
A, B,: *formiátion beáramlik, ami befolyásolja a szelektivitást*

C,: *beáramló formiát UV-elnyelése nagyobb: alapvolan „nő”*

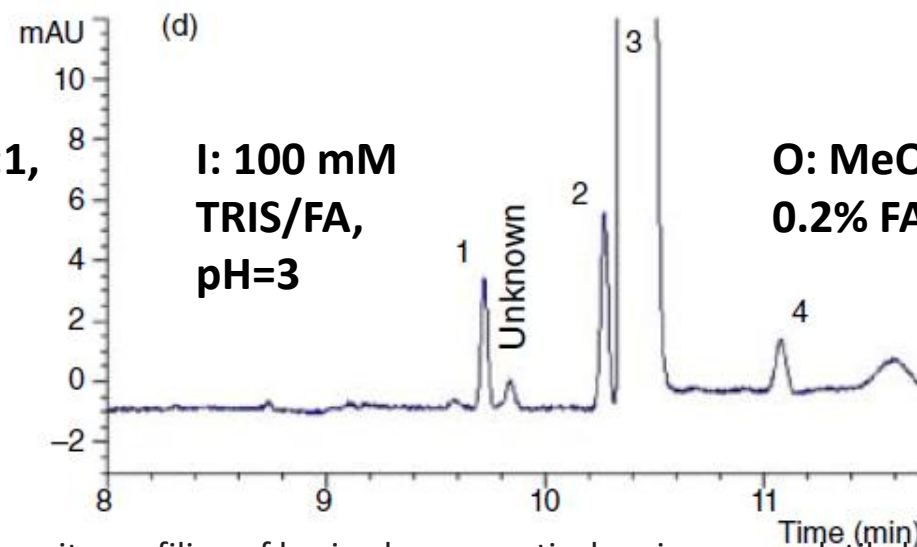
I; O: 100 mM
TRIS/foszforsav,
pH=2.5



I: 100 mM
TRIS/foszforsav,
pH=2.5



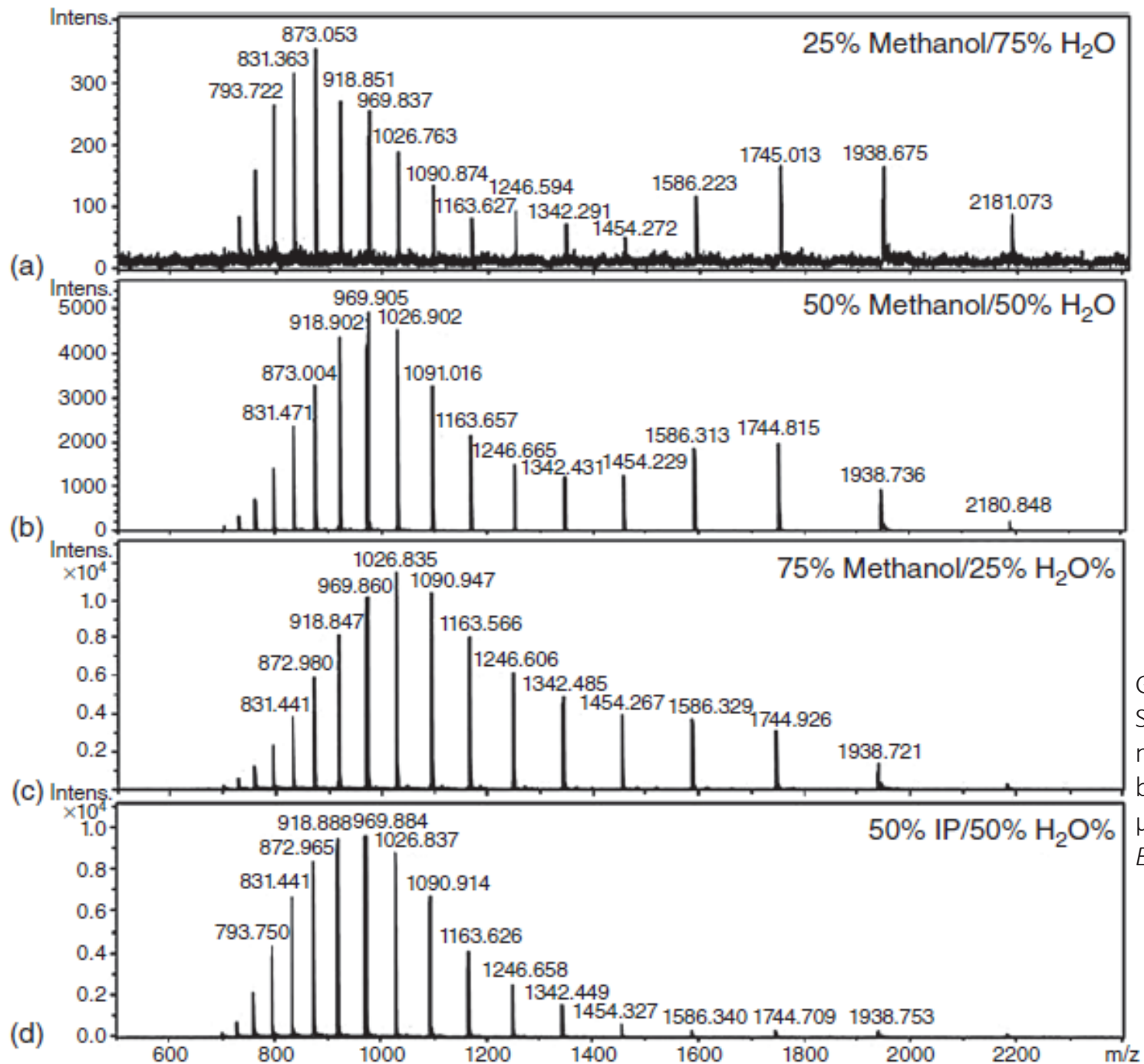
I: 100 mM
TRIS/FA,
pH=3



O: MeOH:víz 1:1,
0.2% FA

SL hatása fehérjék szerkezetére

- A fehérje közege befolyásolja annak terciér szerkezetét
- A közeg az elemzés során = SL
- Pl. eltérés MeOH vs. iPrOH a töltéseloszlásban
- 0.1% FA – protonálódást elősegíti
- Nagyobb mennyiségben (>0.1%): ionizáció elnyomás (szupresszió)



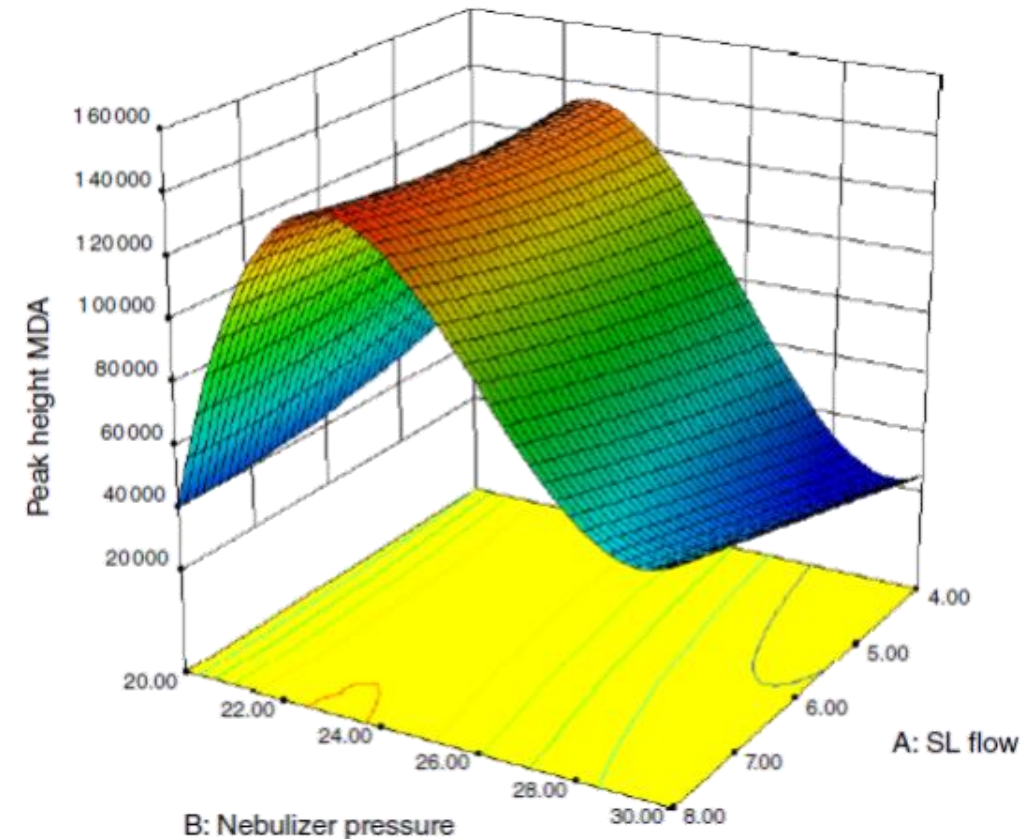
Gusenkov, S., et al. (2013)
 Separation and characterization of
 nitrated variants of the major
 birch pollen allergen by CZE-ESI-
 μ TOF MS.
Electrophoresis, **34**, 2695–2704.

És iPrOH esetén nem
 függ a töltéeloszlás az
 iPrOH mennyiségétől

SL áramlási sebesség

- Interfész típus meghatározó
- Növeléséhez általában a porlasztógáz növelése is kell (stabil spray képződés)
- Több paraméter együttes hatásának kemometriai vizsgálata*:
 - Design-Expert optimalizáló szoftver
 - Szárítógáz T és sebesség: nincs hatása a csúcsalak/magasságra
 - SL áramlási sebesség: kis hatása van, főleg ha alacsony a porlasztó nyomás
 - Porlasztó nyomás: legfontosabb paraméter a négy közül

- *Schmid, et al. (2015) Investigation of photochemical reactions of saccharides during direct ultraviolet absorbancedetection in capillary electrophoresis. J. Chromatogr. A, 1388, 259–266.

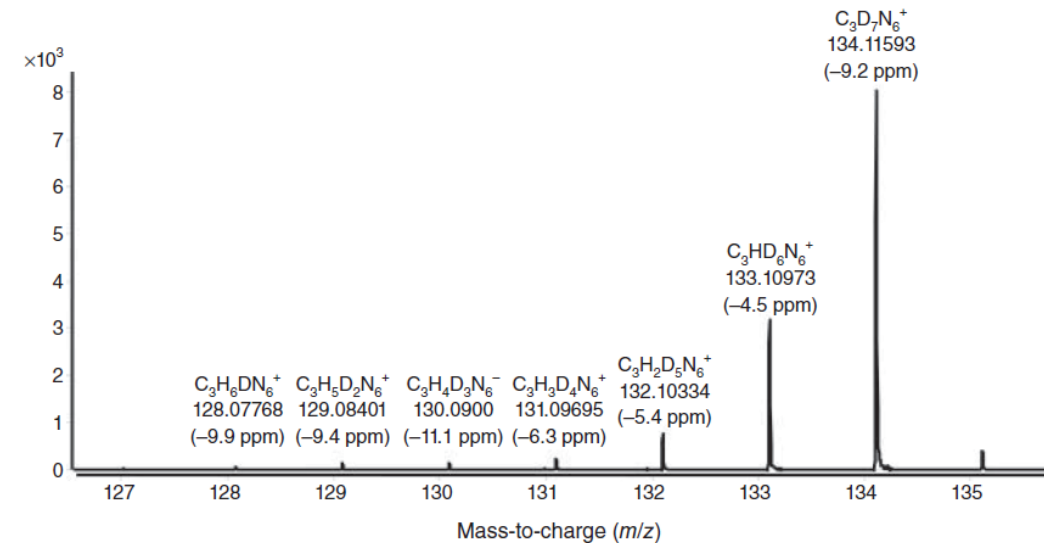


Más (nem ESI) ionforrások

- **APPI**: atmospheric pressure photoionization
- 2 mód: Dopant-tal vagy nélküle
- Dopant: az ionizációs folyamatban az ionok keletkezését elősegítő anyag (pl. aceton, toluol) – SL-hez történhet a hozzáasása
- FA adalékként nem segít a dopant helyett
- Nagyobb (15-50 $\mu\text{L}/\text{min}$) áramlási sebességek
 - MEKC (50 mM SDS) lehetséges a nagyobb hígítás miatt

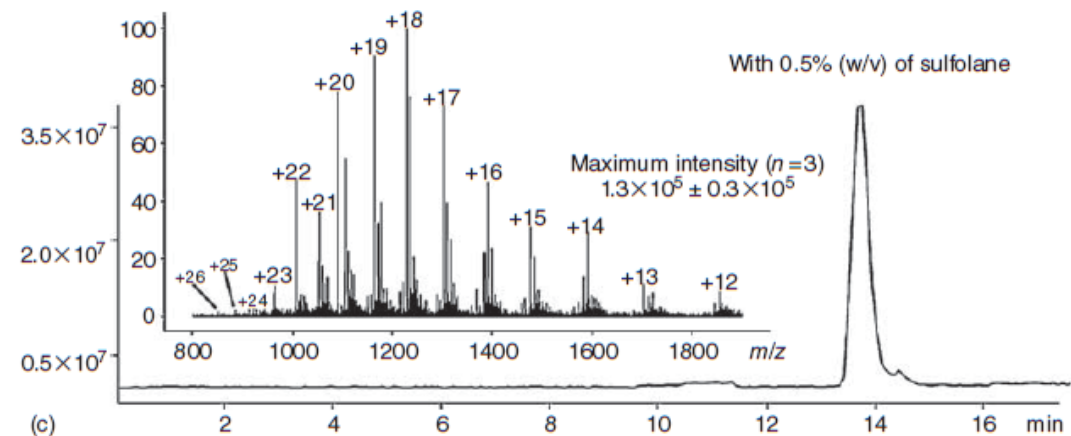
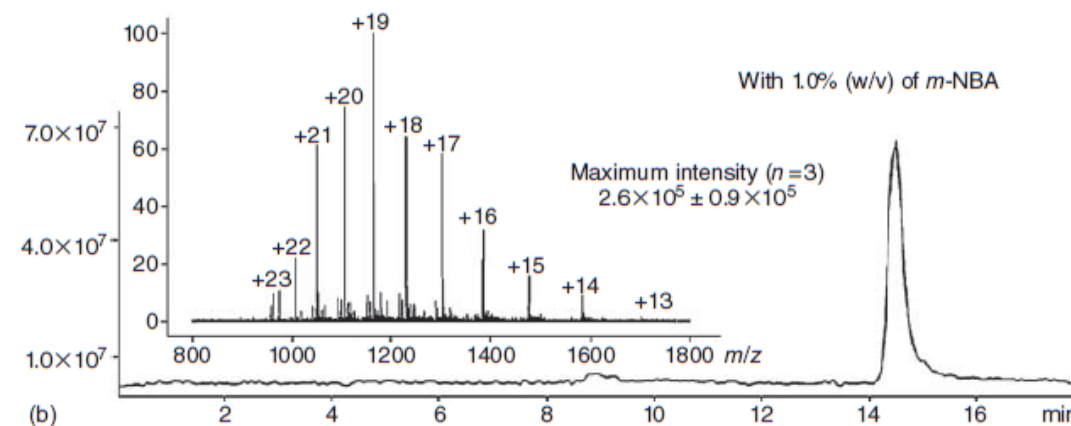
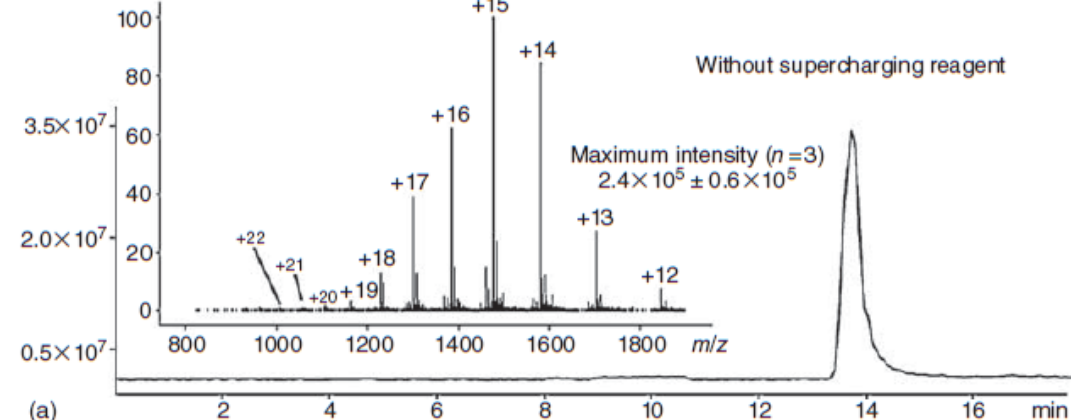
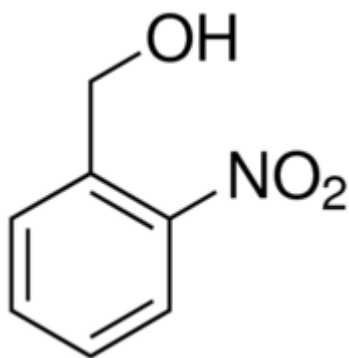
SL kémia

- SL-hez reagensek hozzáadása
- Pl. coordination ionspray: SL-ben Ag^+ -ionok, telítetlen zsírsav észterekkel, D-vitaminokkal, ösztrogénnel komplexet képeztek (+)
- BF_3 , H_3BO_3 – negatív mód
- H/D csere a SL-ben (deuterált oldószerek)
 - Melamin analízis anyatejben ($\text{D}_2\text{O}/\text{MeOD}$)
 - Nagyon gyors csere reakció szükséges



SL kémia – fehérjék töltése

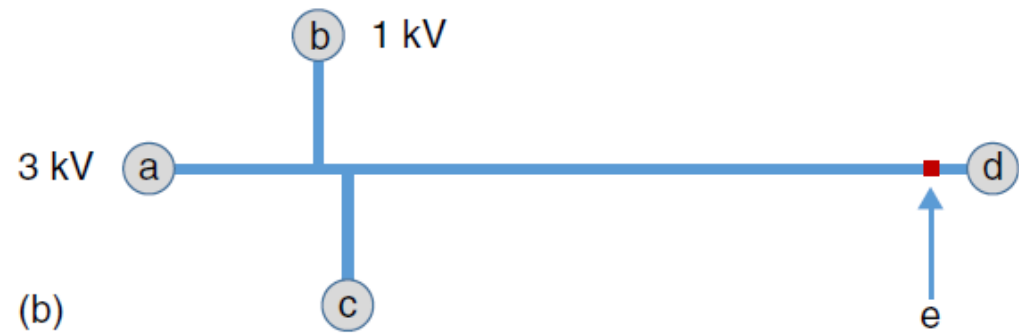
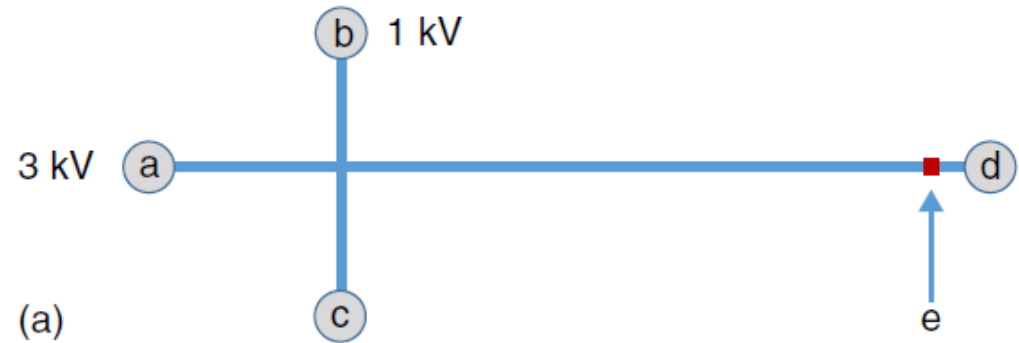
- 0.25-1% o-, m-, p-nitrobenzil alkohol vagy szulfolán
- iPrOH/víz/FA
- Fehérje: emberi növekedési hormon



Mikrochip CE-MS

Mikrochip CE(-MS) – MCE

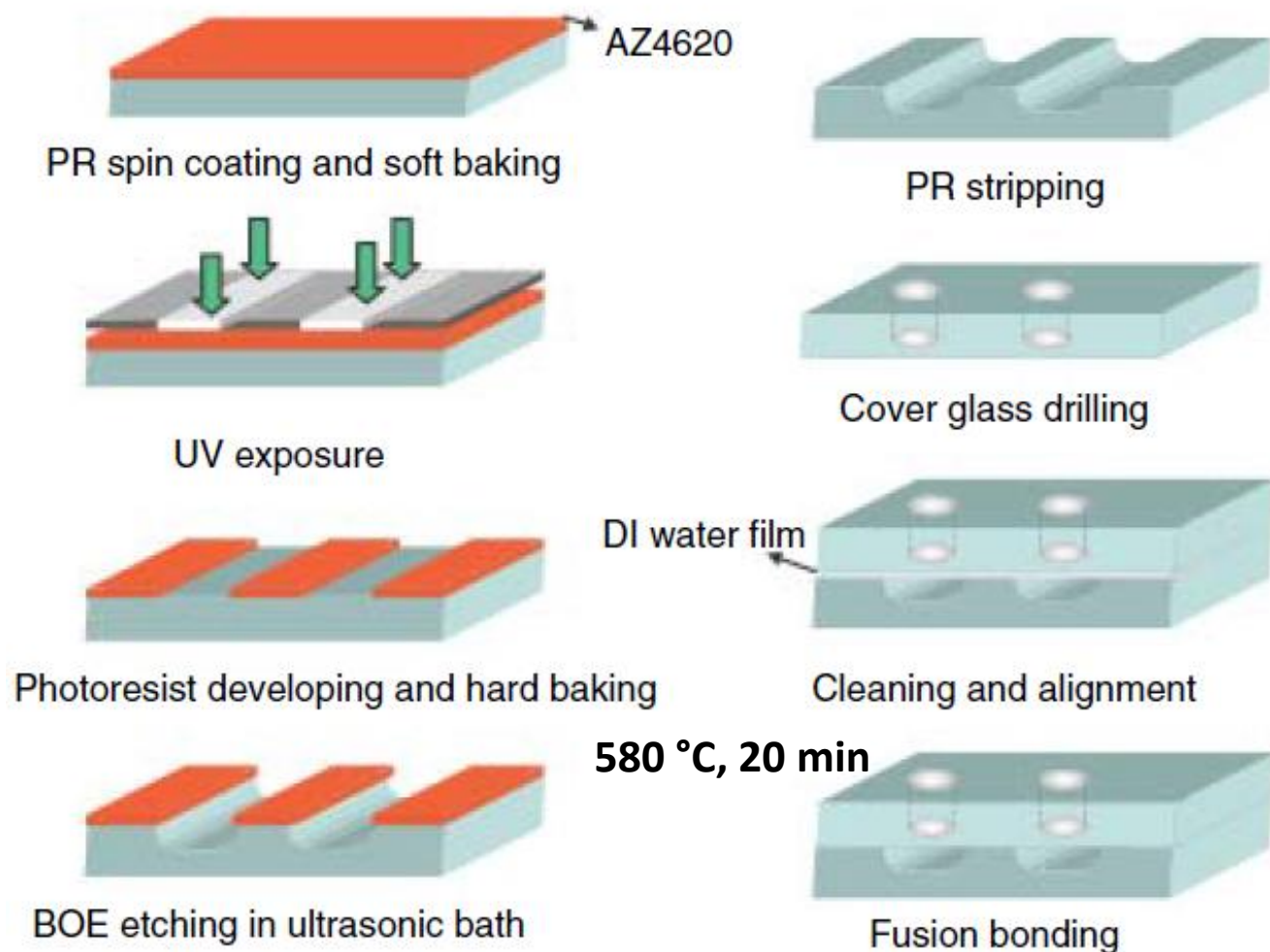
- H: 10-50 μm
- W: 50-100 μm
- Csatorna forma: négyszögletű, négyzet, háromszög, fél-ellipszoid
- Injektálás: 1 kV
- Elválasztás: 3 kV
- Optikai detektálás: fluoreszcencia



Chipek előállítása

- Alapanyag:

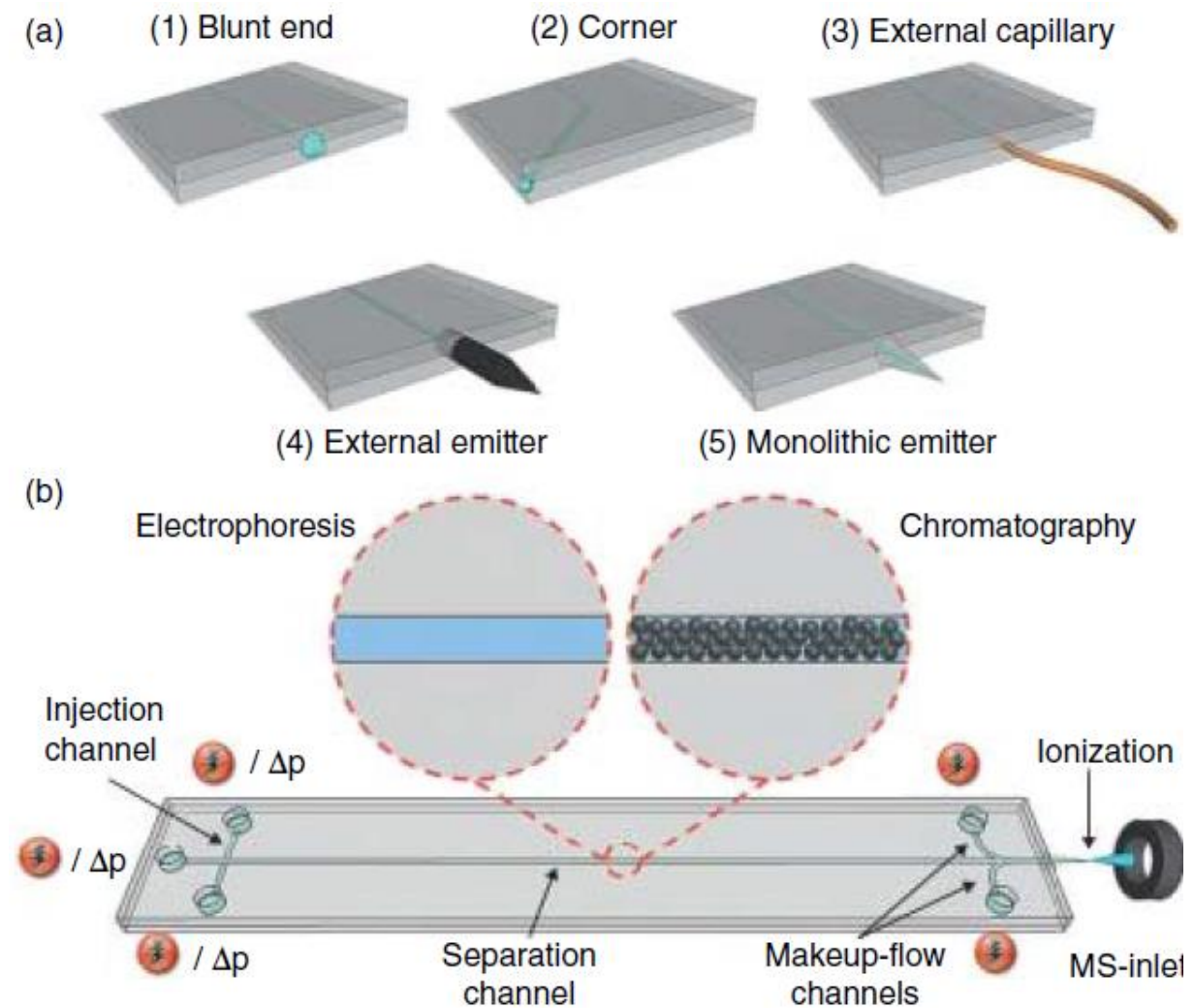
- Üveg
- Kvarc
- PDMS (polidimetilsziloxán)
- PMMA (polimetilmetakrilát)
- PI (poliimid)
- PC (polikarbonát)
- Ciklikus olefin polimer (COP)



BOE: buffered oxide etch (pl. $\text{NH}_4\text{F}/\text{HF}$)

MCE-MS

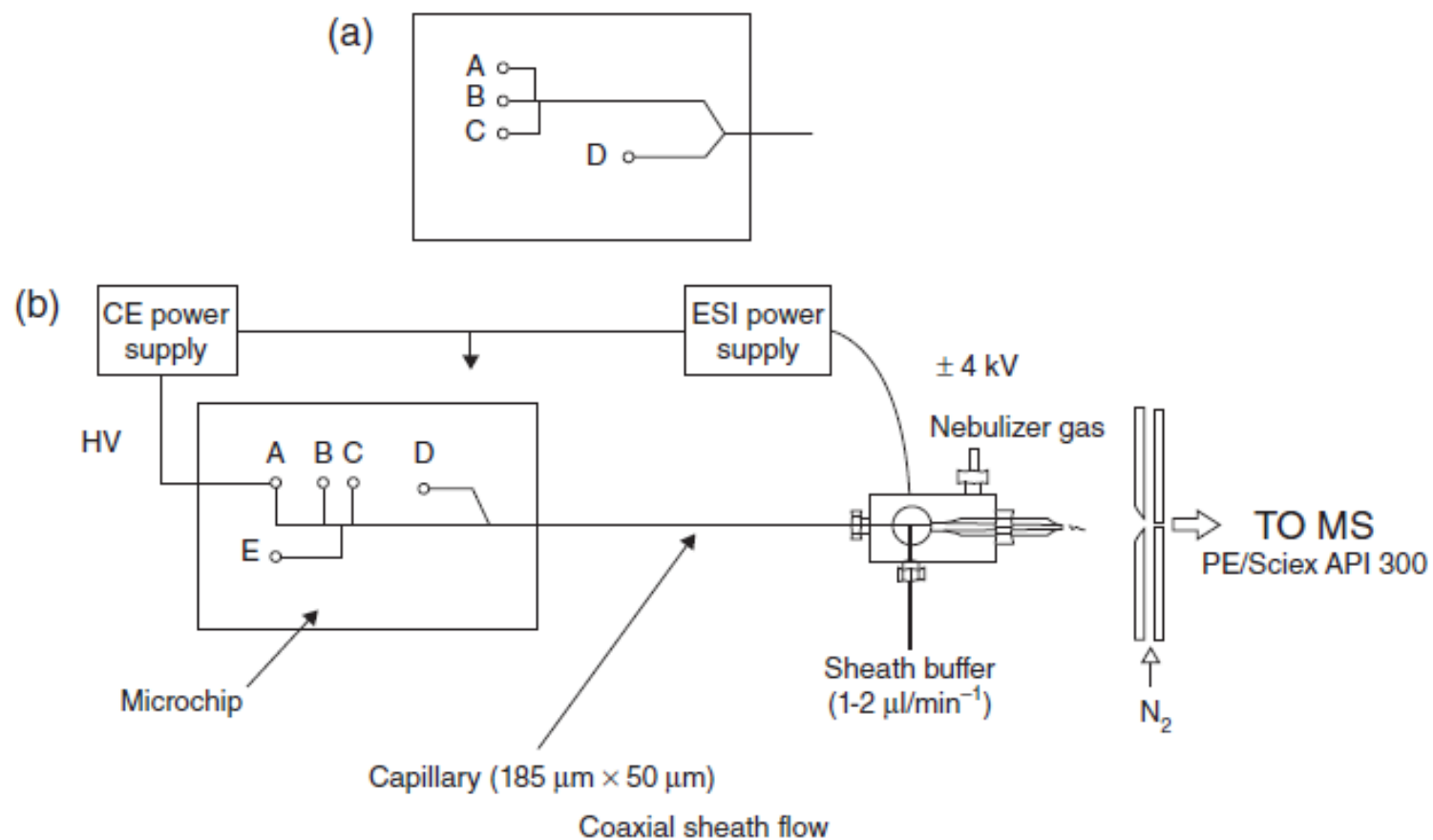
- Folyadék kiáramlás: szűk „kijáraton” keresztül (pl. tű)
- Make-up flow: segéd folyadék adagolás, elektromos csatlakozások



Ohla, S. and Belder, D. (2012) Chip-based separation devices coupled to mass spectrometry. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **16**, 453–459.

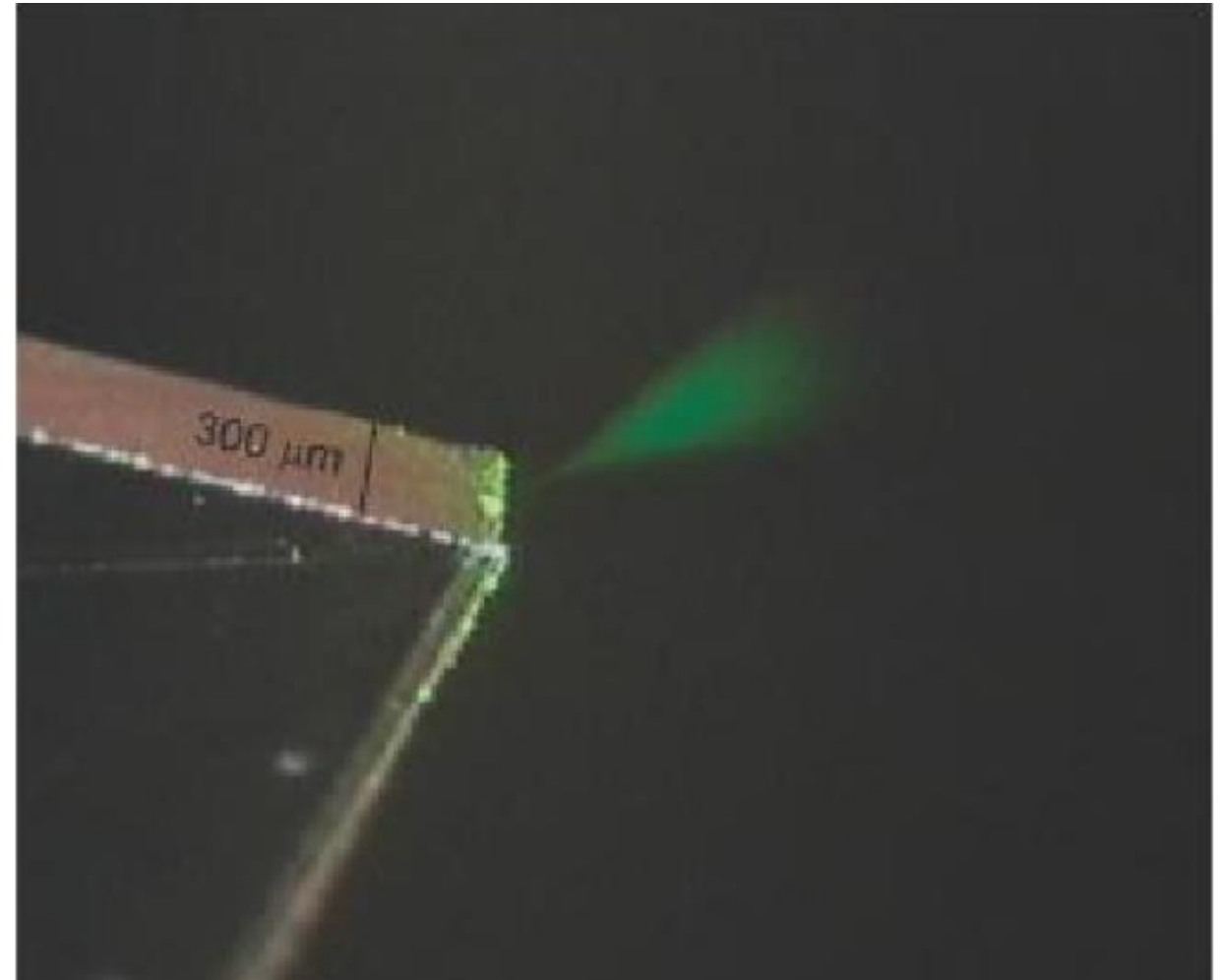
CE-MS átalakítása MCE-MS-sé

- CE tápegység használata chip tápegységként



Sprayer kialakítása chip sarkán

- Oldalt a folyadék szétterül az üvegen (felületi feszültség)
- Nyilak: folyadék áramlását jelölik
- S: minta
- B: puffer
- SW: minta ki
- SC: oldalcsatorna (elektród)
- Spray: ~40 nL/min
- Monoklonális antitestek (mAbs) vizsgálata



CIEF chipen – MS detektálással

Chip anyaga: SU-8 – speciális EOF, magas pH-n katód (-) irányú, alacsony pH-n anód (+) irányú

Nettó EOF ~ 0 (fókuszálás alatt)

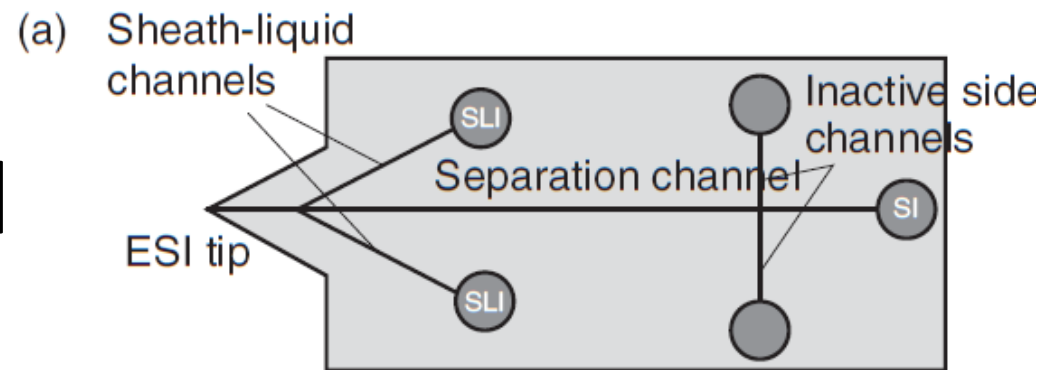
(a): minta: peptidek

2% amfolit (pH=3-10)

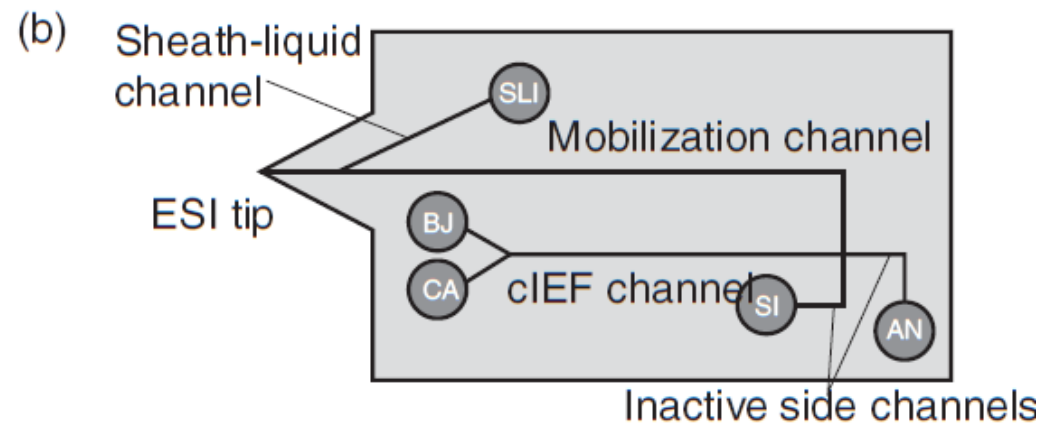
Oldalcsat.: MeOH/víz/1% AcOH (anolit)

Injektálás után inlet megtöltése 1% NH_4OH -val (katolit)

Fókuszálás után inleten oldatcsere BGE-ra - mobilizálás



Steps	SI	SLI	SLI
Focusing (60 s)	Ground	6.0 kV	6.0 kV
Mobilization	4.0 kV	2.0 kV	2.0 kV

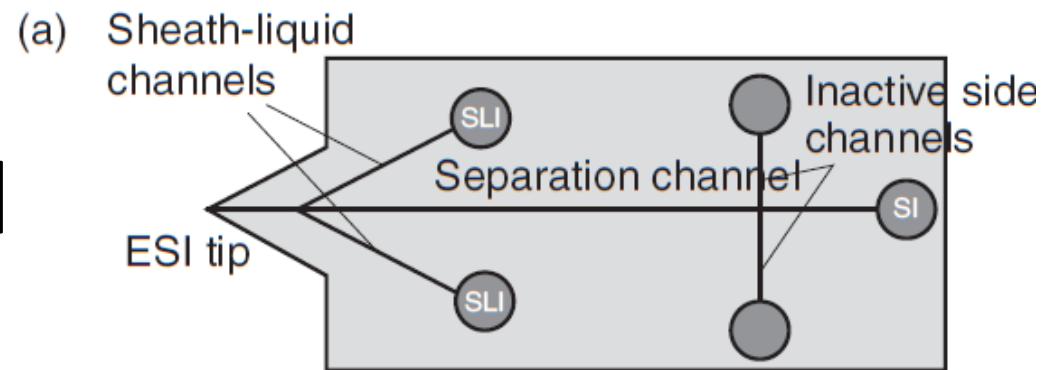


Steps	BI	CA	SI	AN	SLI
Loading (100–120 s)	Ground	Float	1.5–3 kV	Float	Float
eIEF (200–270 S)	Float	Ground	Float	1.5–6 kV	Float
Mobilization	6 kV	Float	Float	Float	3.5 kV

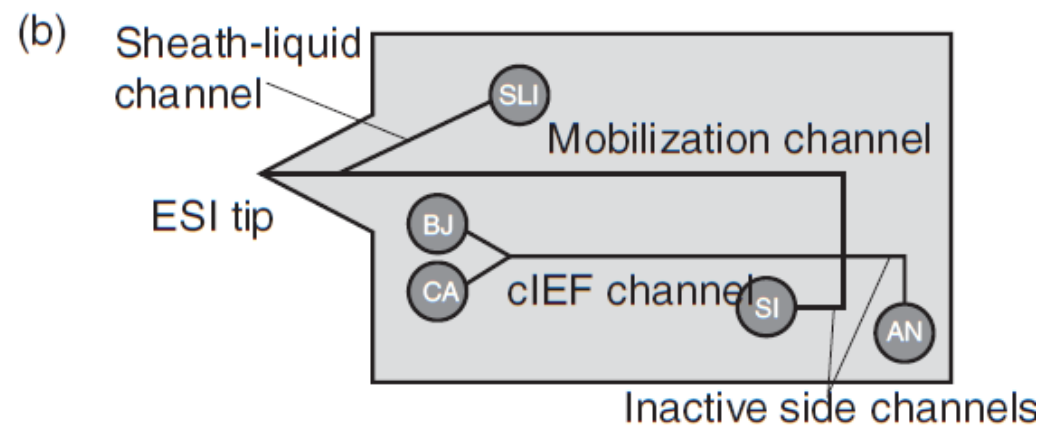
Nordman, N., et al. (2015) Interfacing microchip isoelectric focusing with on-chip electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, **1398**, 121–126.

CIEF chipen – MS detektálással

(b) Külön csatornában van az IEF és a mobilizálás, így nem kell cserélgetni az inlet tartóban a puffert



Steps	SI	SLI	SLI
Focusing (60 s)	Ground	6.0 kV	6.0 kV
Mobilization	4.0 kV	2.0 kV	2.0 kV

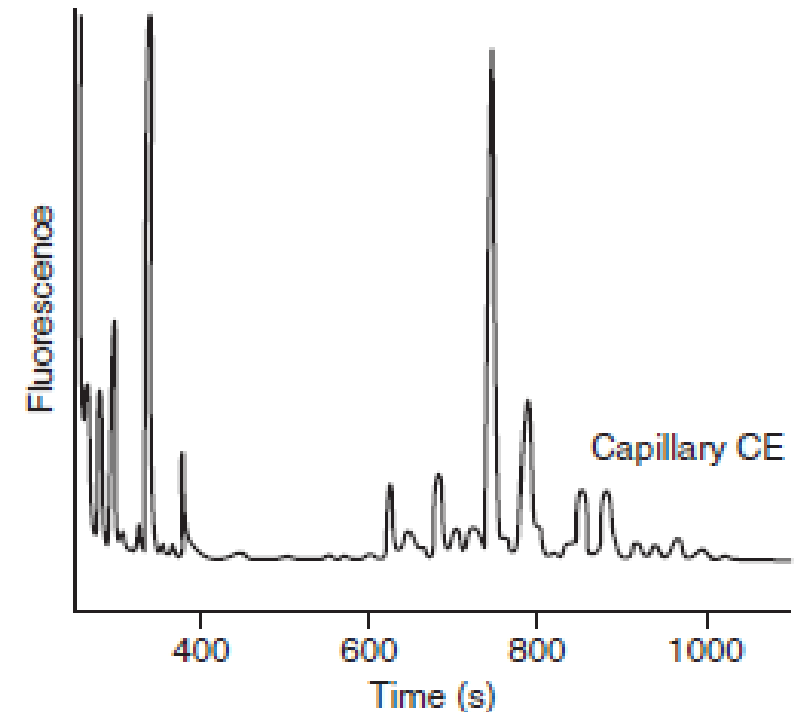
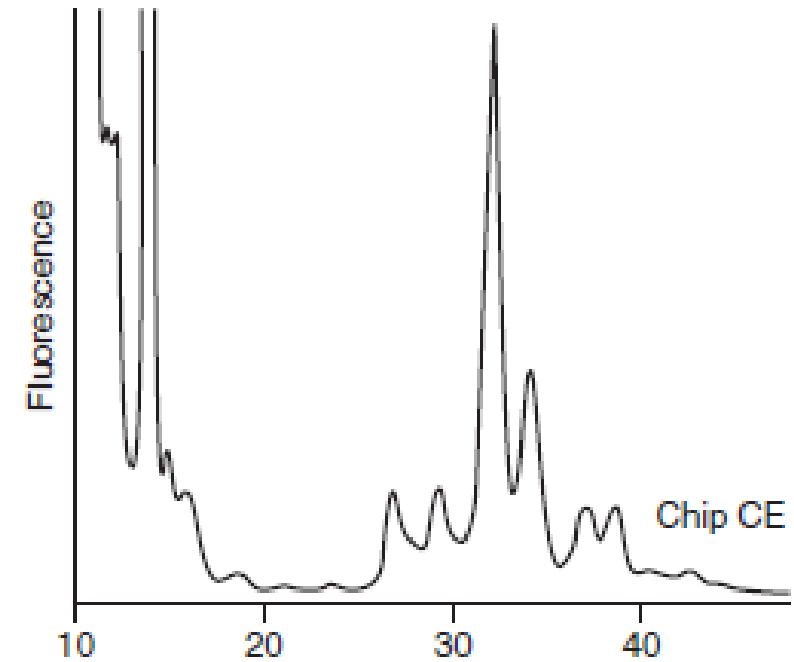


Steps	BI	CA	SI	AN	SLI
Loading (100–120 s)	Ground	Float	1.5–3 kV	Float	Float
eIEF (200–270 S)	Float	Ground	Float	1.5–6 kV	Float
Mobilization	6 kV	Float	Float	Float	3.5 kV

Nordman, N., et al. (2015) Interfacing microchip isoelectric focusing with on-chip electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, **1398**, 121–126.

Konklúzió – MCE(-MS)

- Kevésbé elterjedt
- Rövidebb csatorna hosszak (CE-hez képest), emiatt rosszabb elválasztás
- (lásd APTS-jelölt glikánok elválasztása CE készüléken – L=35 cm és az Agilent Bioanalyzer készüléken – L=1,4 cm)
- MCE: nehéz automatizálni
- Detektálási problémák (kivételet az MS – ez hozhat áttörést)
- Kereskedelmi készülékek 1-1 speciális analitikai feladatot látnak el



Mintadúsítási technikák

Online mintadúsítás

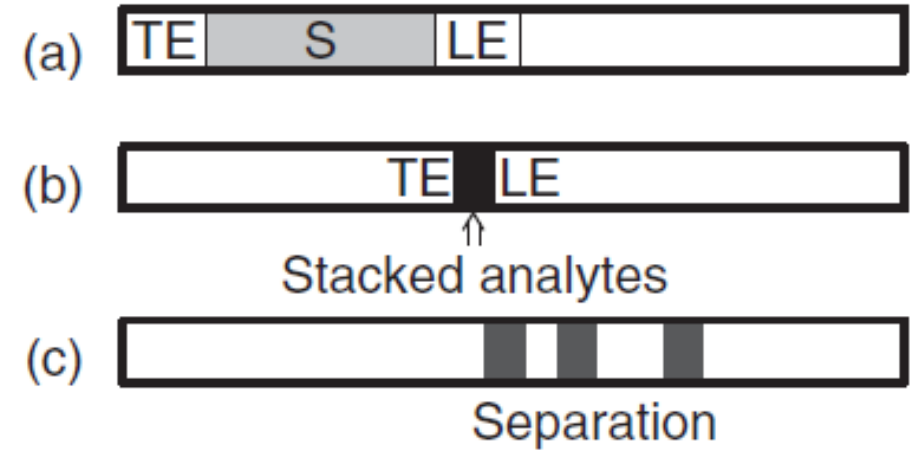
- Injektált minta nL-es nagyságrendű – relatíve rossz érzékenység
- Offline mintadúsítás: pl. folyadék-folyadék extrakció, SPME
- Online mintadúsítás
 - Injektált mennyiség min. 10-szerese a szokásosnak
 - Elektrokinetikus dúsítás: a mintazónák sebessége eltérő a mintamátrixban és az elválasztó pufferben, amiért pl. a két közeg ionerőssége/vezetőképessége (ill. azok különbözősége) felel
 - Kromatográfiás dúsítás: SPE oszlop online integrációja a CE kapillárisba

Technikák

- Tranziens ITP (tITP)
- Erősített elektromos terű dúsítás (field-enhanced/field amplified stacking)
- Erősített elektromos terű mintainjektálás (FESI)
- Dinamikus pH-csatlakozás (pH-junction)
- cIEF
- Elektrokromatográfiás dúsítások:
 - Sweeping
 - Micella megszüntetésen alapuló (micelle collapse)
 - Micelle-to-solvent-stacking
 - Online/Inline SPE

Elektroforetikus dúsítás – tranziens izotachoforézis (t-ITP)

- Akár 100x dúsítási faktor elérhető
- Ionos és ionizálható komponensek
- Leading és terminating elektrolitok (LE és TE)
- LE: nagy mobilitású ion
- TE: kis mobilitású ion
- Minta komponensei mobilitás szerinti csökkenő sorrendbe helyezkednek feszültség hatására
- Tranziens: az ITP effektus csak rövid ideig tart. Dúsítás után azonnal megindul a zónák elválasztása



CE-MS kompatibelis ionok

Table 5.1 Ionic species suitable for CE-MS and their pK_a values and ionic mobilities.

	$u^a)$	pK
H^+	362.5	–
NH_4^+	76.2	9.25
Imid ⁺	52.0	7.15
OH^-	–202.5	–
$Form^-$	–56.6	3.75
Ac^-	–42.4	4.76
HCO_3^-	–46.1	6.35
CO_3^{2-}	–71.8	10.33
$EACA^-$	–28.8	10.8
MES^-	–28	6.1
Asn^-	–31.6	9.03

a) $\ln 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

t-ITP példa 1. – peptidek detektálása

- Fehérjék koncentrációviszonyai 6 nagyságrendben váltakoznak emlős sejtekben
- 100 μm kapilláris
- Hidroxipropil-cellulóz bevonatú kapilláris
- BGE: 10 mM ecetsav, pH=3.0
- Leading el.: mintamátrix, 30 mM NH_4Ac
- Kis koncentrációjú peptidek szelektív dúsítása

An, Y., et al. (2006) Selective enrichment and ultrasensitive identification of trace peptides in proteome analysis using transient capillary isotachopheresis/zone electrophoresis coupled with nano-ESI-MS. *Electrophoresis*, 27 (18), 3599–3608.

t-ITP példa 1. – peptidek detektálása

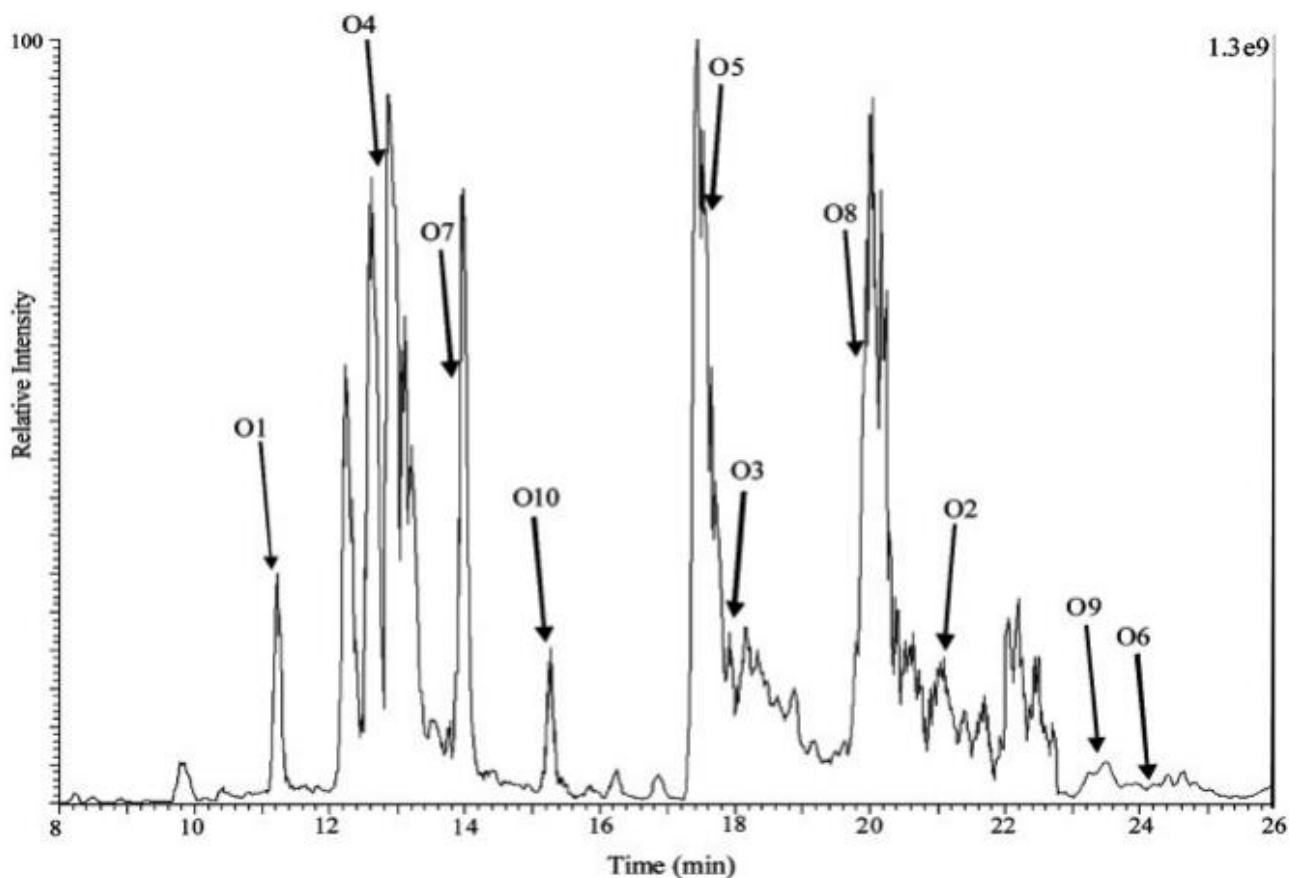


Figure 4. Base peak electropherogram for transient C1TP/CZE-nano-ESI-MS analysis of digest sample containing ovalbumin (0.1 nM) and cytochrome c (50 μ M) tryptic peptides at a concentration ratio of 1:500 000. Labeled ovalbumin peptides are summarized in Table 1.

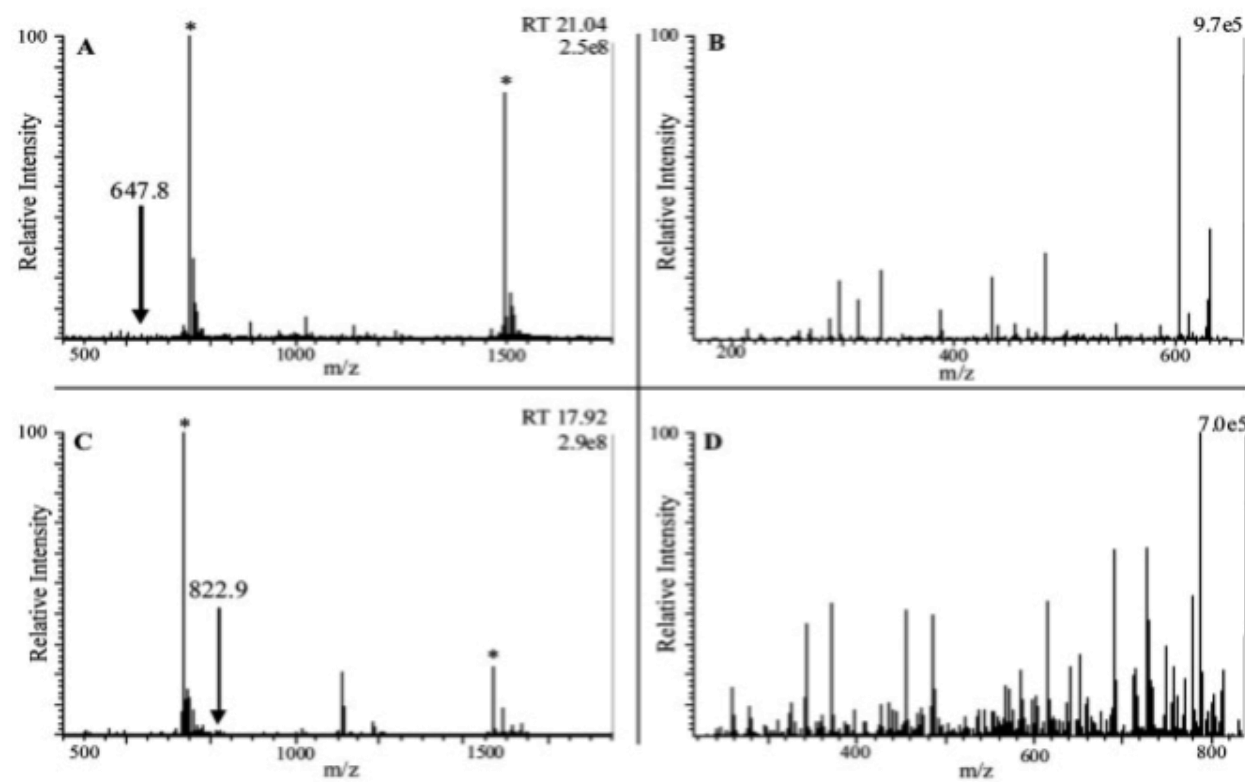


Figure 5. Positive ESI mass spectra taken from the average scans under the peaks with the migration times of (A) 21.04 min and (C) 17.92 min in transient C1TP/CZE-nano-ESI-MS (Fig. 4). The comigrating cytochrome c peptides, including the fragment 61–72 (m/z 748.6 and 1495.7) and fragments 40–53 (m/z 736.1 and 1470.6) are marked by *. (B) MS/MS on the ovalbumin fragment 281–285 with m/z 647.8. (D) MS/MS on the ovalbumin fragment 220–227 with m/z 822.9.

t-ITP példa 2. – peptidek detektálása

- Sima kvarckapilláris
- Leading electrolyte-ot 60 s 50 mbar-ral a minta elé injektálták
- LE: 50 mM NH₄Ac (pH=4.8)
- BGE: 50 mM HAc (pH=3.1)
- Mintamátrix: 25 mM Hac
- c: β-alanint használtak TE-ként

Xia, S., et al. (2008) On-line preconcentration and quantitative analysis of peptide hormone of brain and intestine using on-column transient isotachopheresis coupled with capillary electrophoresis/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **22** (23), 3719–3726.

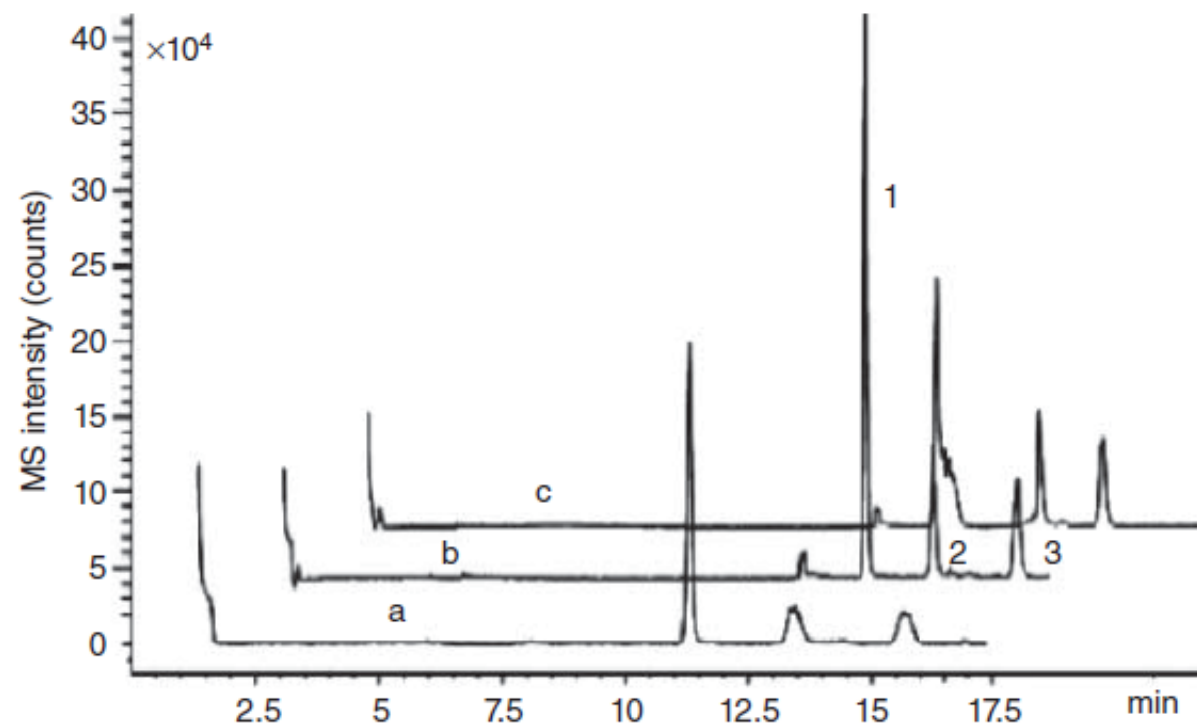
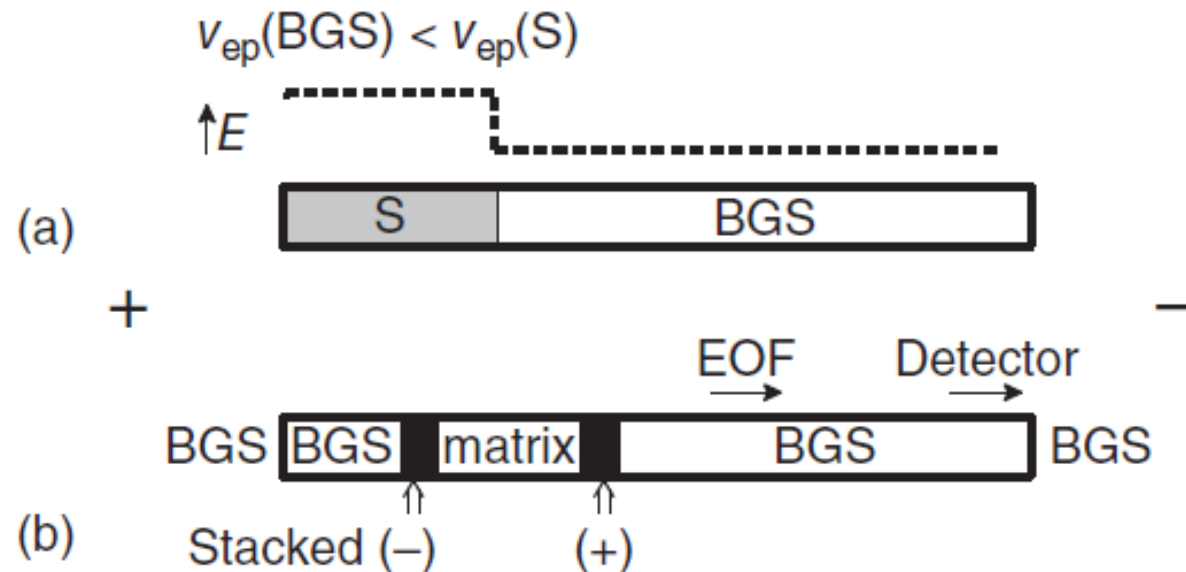


Figure 5.2 t-ITP CE-MS of cationic peptides. Conditions: Bare fused-silica capillary 104 cm × 50 mm; Separation voltage, 25.0 kV; LE, 50 mM ammonium acetate (pH 4.8); Separation electrolyte, 50 mM acetic acid (pH 3.1); Sample, the three peptides mixture in 25 mM acetic acid; Sample injection, 28 kV for 40 s; (a) Without t-ITP; (b) t-ITP with H⁺ as terminating ion where 50 mM ammonium acetate

(pH 4.8) was injected (50 mbar for 60 s) prior to sample injection; (c) t-ITP with β-alanine as terminating ion where 50 mM ammonium acetate (pH 4.8) was injected (60 s at 50 mbar) prior to sample injection, 40 mM β-alanine (pH 3.6 with acetic acid) was then injected (50 mbar for 20 s). Reproduced from Xia *et al.* [17] with permission of Wiley.

Field-enhanced („elektromos térrel segített”) dúsítás

- Mintamátrix vezetőképessége jóval kisebb, mint a BGE-é
- Vezetőképességi inhomogenitás (=elektromos tér inhomogenitás) a kapillárisban
- A mintazóna két végén dúsulnak a minták
- A dúsítási faktor kb. a vezetőképességek aránya (max. 10, az EOF inhomogenitása miatt, ami csúcshéledést okoz.)



Field-enhanced sample injection

- Elektrokinetikus injektálás
- Jóval kevesebb megy be az alacsony vezetőképességű mátrixból
- >100x dúsítás érhető el

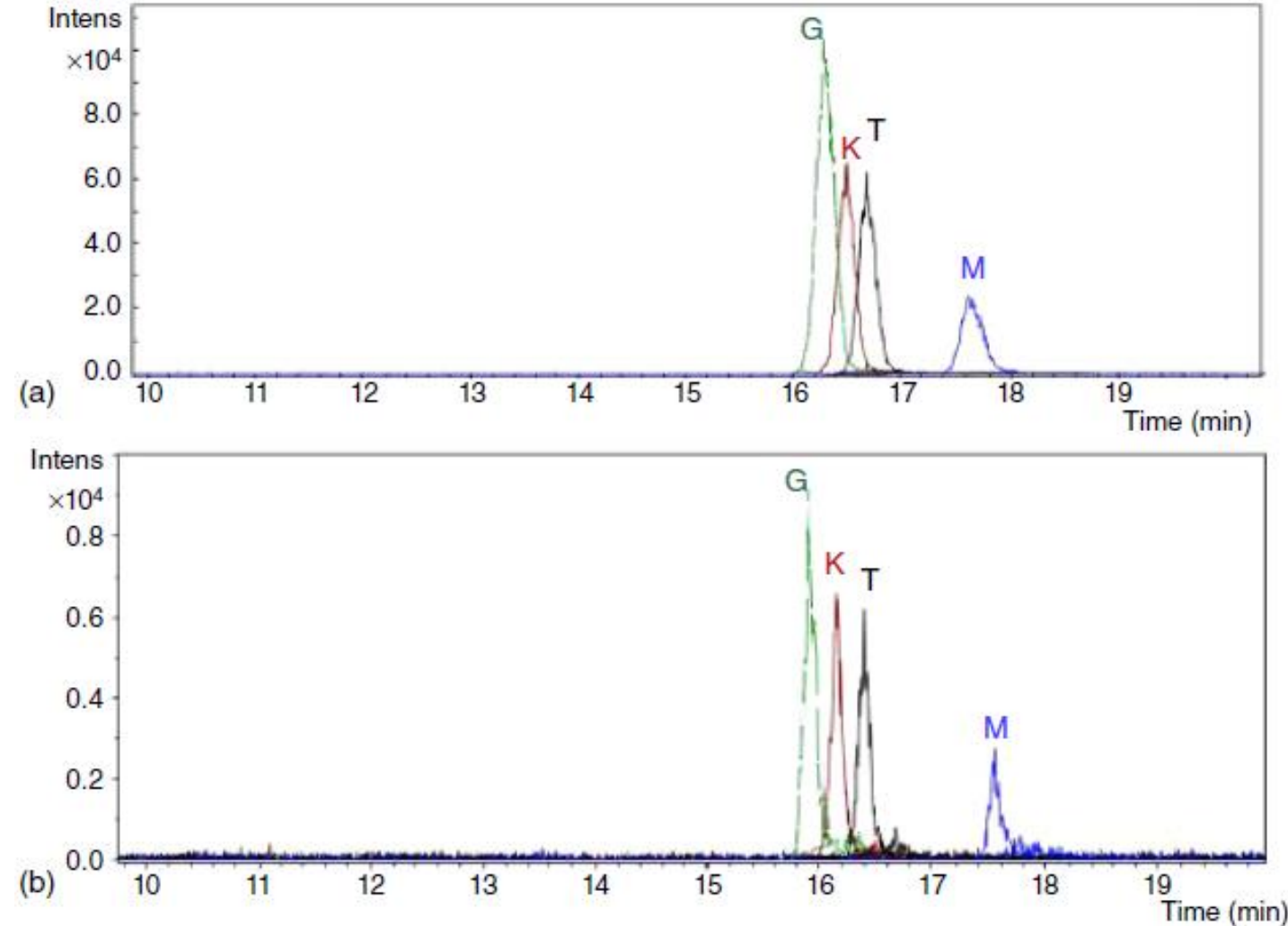


Figure 5.5 Overlaid extracted ion electropherograms of 50 mg kg^{-1} butyl 1-(pyridinyl-4yl) piperidine 4-carboxylate derivative test mixture of potentially genotoxic alkyl halides (G, K, T, and M) using FESI at 10 kV for 150 s

(a) of 500 mg kg^{-1} BPPC derivative test mix using typical hydrodynamic injection (b). Reproduced from van Wijk *et al.* [34] with permission of Elsevier.

Dinamikus pH-csatlakozás (pH-junction)

- Izoelektromos fókuszáláshoz hasonló elv
- Mintazóna és BGE határán nagy pH ugrás
- Pl. enyhén savas komponensek elválasztása (következő oldali példa ellentettje)
 - BGE lúgos; Mintamátrix: enyhén savas (analit semleges)
 - BGE „elkezdni titrálni” a mintamátrixot a katód felőli végén, ami miatt a határon nő a pH
 - Ionizálódik a komponens (-), ami „visszafelé” áramlik a savas mátrixba, ahol újra semleges lesz
 - Ez addig folytatódik, míg az OH^- teljesen semlegesíti a mátrixban lévő H^+ -t
 - A dúsult zónából elindul a CZE elválasztás

pH-junction példa 1.

- Gyengén bázikus komponensek t-ITP dúsítása
- BGE: 25 mM NH_4Ac /30% MeOH (pH=9)
- Minta: triciklusos antidepresszánsok, 1,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Sav: 3,6% w/v (pH=2)
- Injektálás (minta, sav): 50 mbar x 60 s
- Dúsítás/elválaszthatóság függ az injektált sav c-től, V_{inj} -től

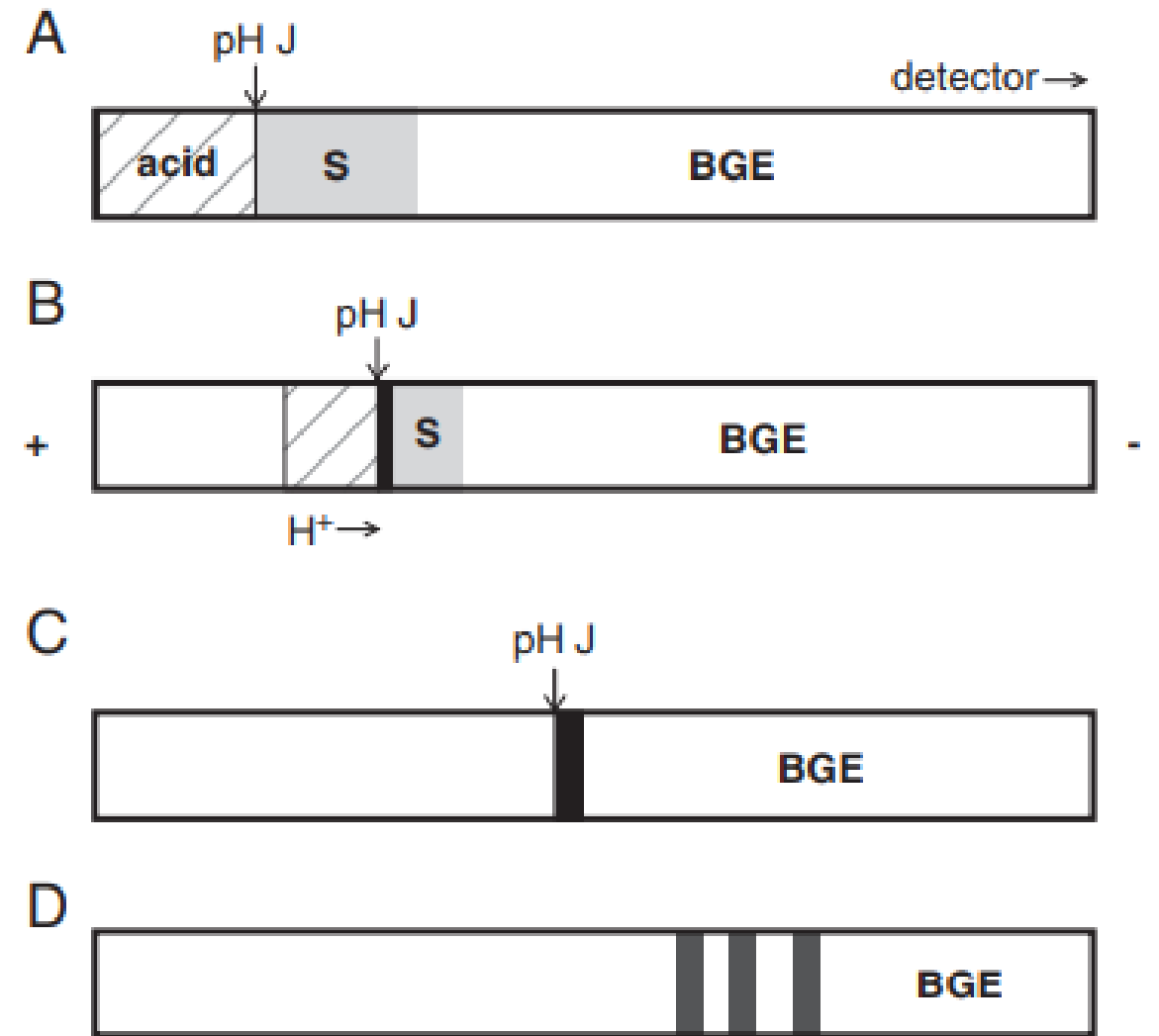
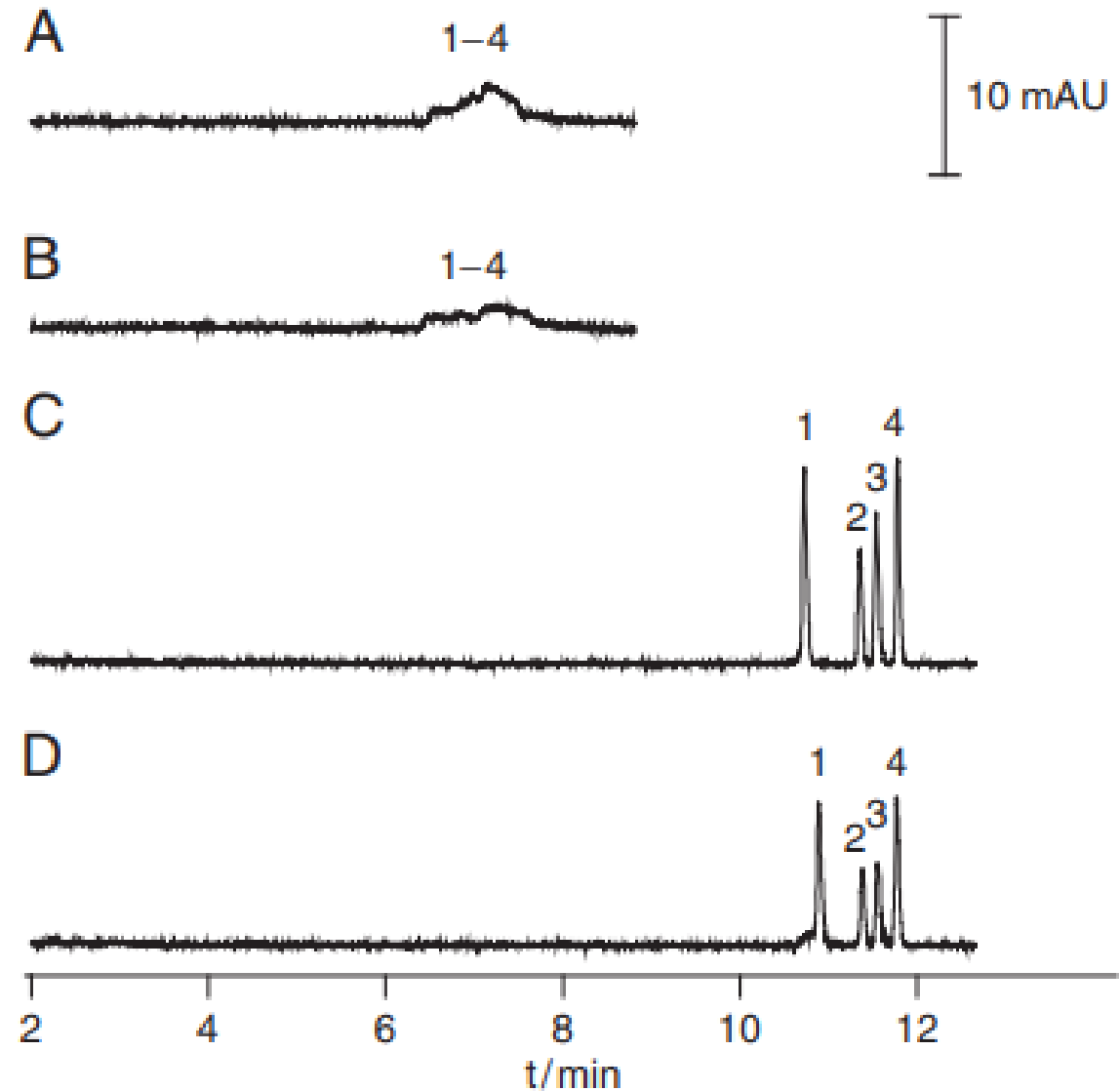


Figure 1. Acid induced or enforced [34–35] t-ITP stacking of weak bases in co-EOF CZE.

pH-junction példa 1.

- Gyengén bázikus komponensek t-ITP dúsítása
- BGE: 25 mM NH₄Ac/30% MeOH (pH=9)
- Minta: triciklusos antidepresszánsok, 1,2 µg/mL
- Sav: 3,6% w/v (pH=2)
- Injektálás (minta, sav): 50 mbar x 60 s
- Dúsítás/elválaszthatóság függ az injektált sav c-től, V_{inj}-től



Mintamátrix:

A, C: 25 mM NH₄Ac, pH=7

B, D: 25 mM NH₄Ac, pH=9

pH-junction példa 2.

- BGE: 0.5 M FA (pH=2.5)
 - Mintamátrix: 50 mM NH₄Ac (pH=7.5)
 - Inj.: 50 mbar x 300 s
 - Minta: 5 peptid, hasonló pI értékkel
 - LOD: 0,2-2 nM
-
- Minél nagyobb a pH különbség a BGE és mintamátrix között, ill. minél nagyobb a mátrix koncentrációja, annál jobb dúsulás!

pH-junction példa 2.

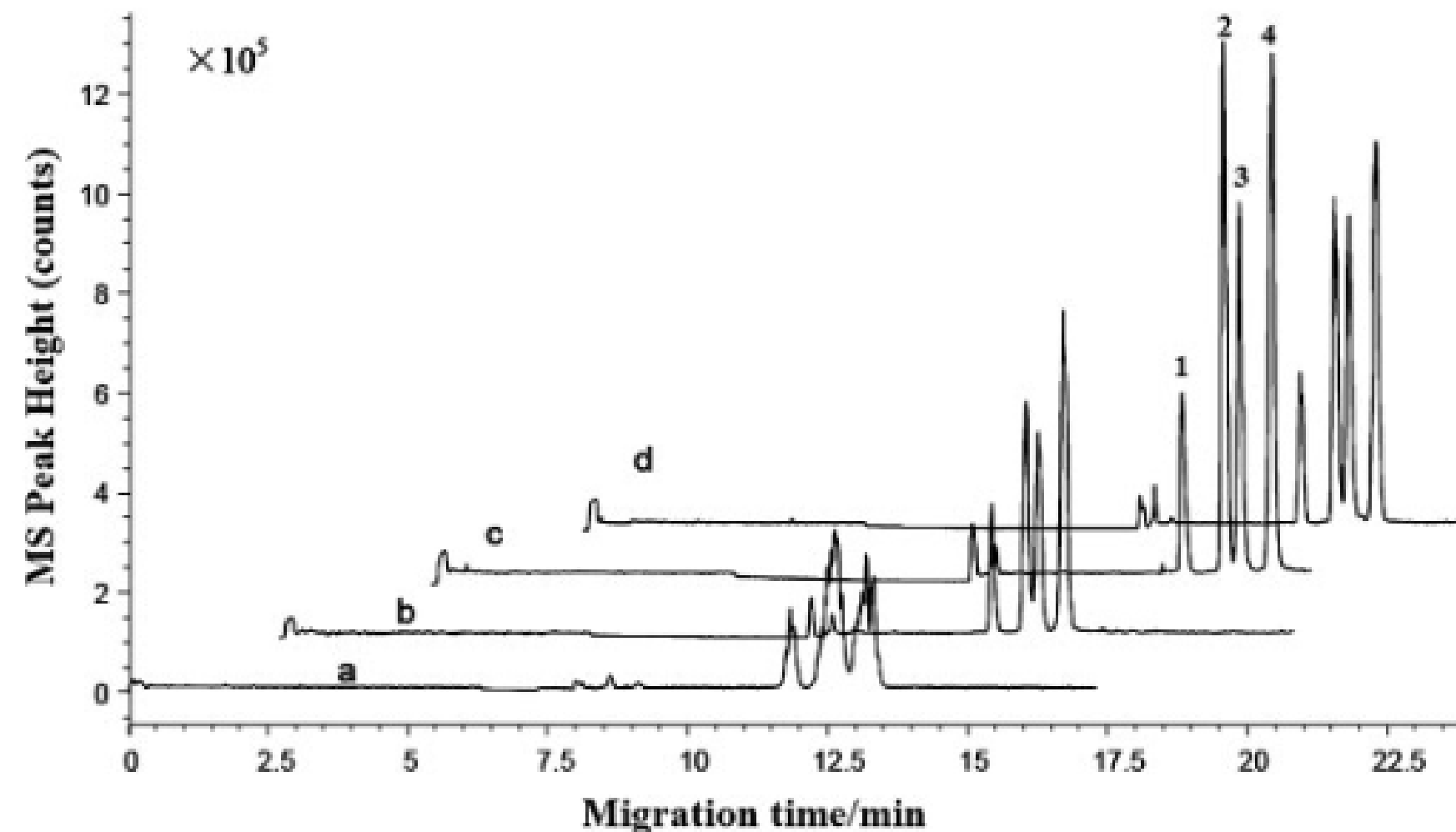


Figure 1. Effect of sample matrix pH on focusing conditions: Bare fused silica capillary 90 cm–50 μ m; BGE, 0.5 M formic acid (pH 2.15); sample matrix: ammonium acetate with pH varied as shown; injection, 30 s of a mixture containing 1 μ mol/L of each peptide, sheath liquid: 7.5 mM acetic acid in 50% methanol–water v/v, 4 μ L/min. Nebulizing gas pressure: 41.4 kPa; drying gas flow rate: 6 L/min, drying gas temperature: 300°C; (a) pH 4.0; (b) pH 6.0; (c) pH 7.5; (d) pH 9.0; (1) L-Ala-L-Ala; (2) L-Leu-D-Leu; (3) Gly-D-Phe; (4) Gly-Gly-L-Leu.

pH-junction példa 2.

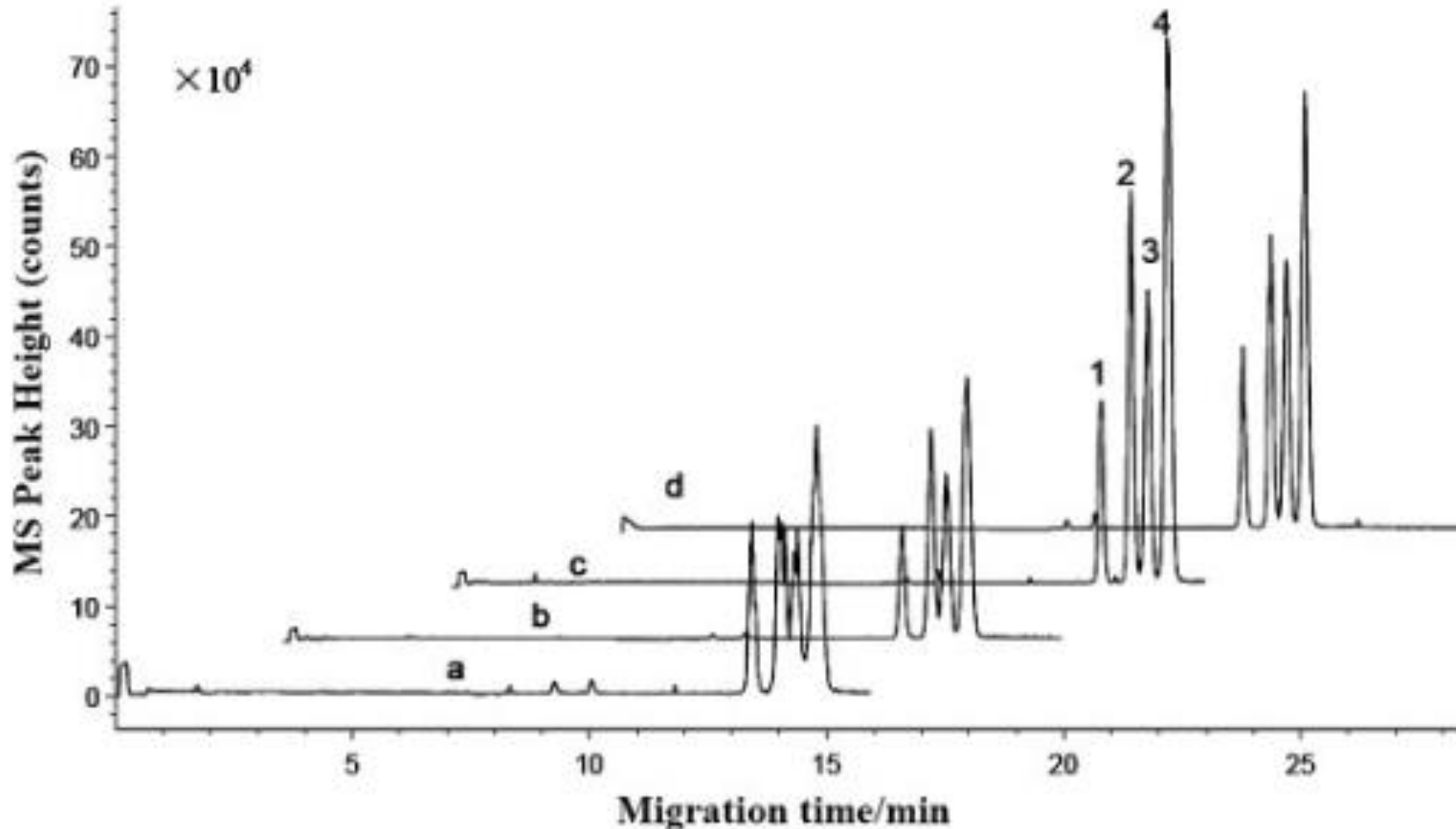
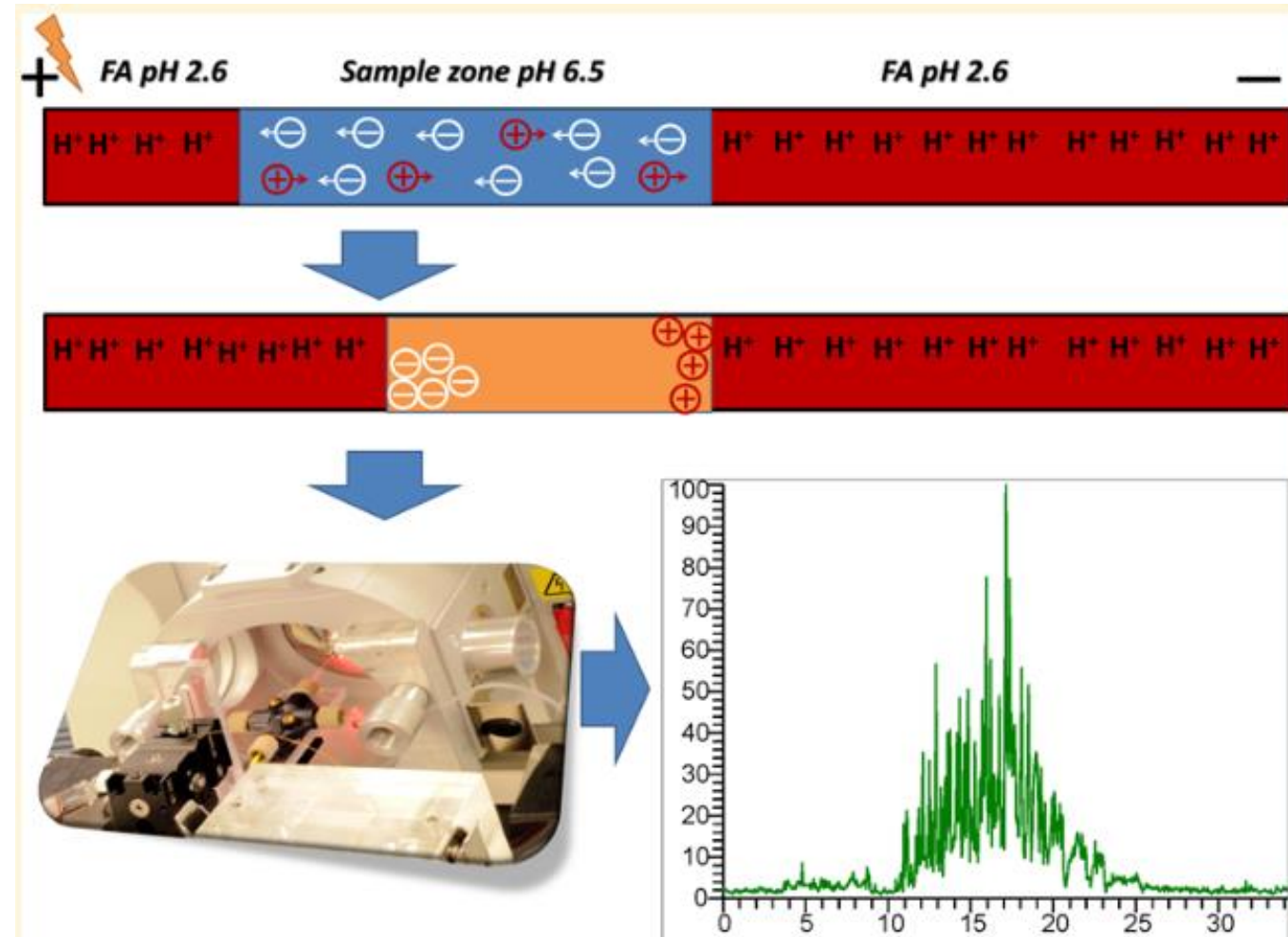


Figure 2. Effect of sample matrix concentration on focusing. Conditions were as in Fig. 1; sample matrix: ammonium acetate (pH 7.5) with concentration varied as shown; (a) 10 mM; (b) 25 mM; (c) 50 mM; (d) 75 mM; (1) L-Ala-L-Ala; (2) L-Leu-D-Leu; (3) Gly-D-Phe; (4) Gly-Gly-L-Leu.

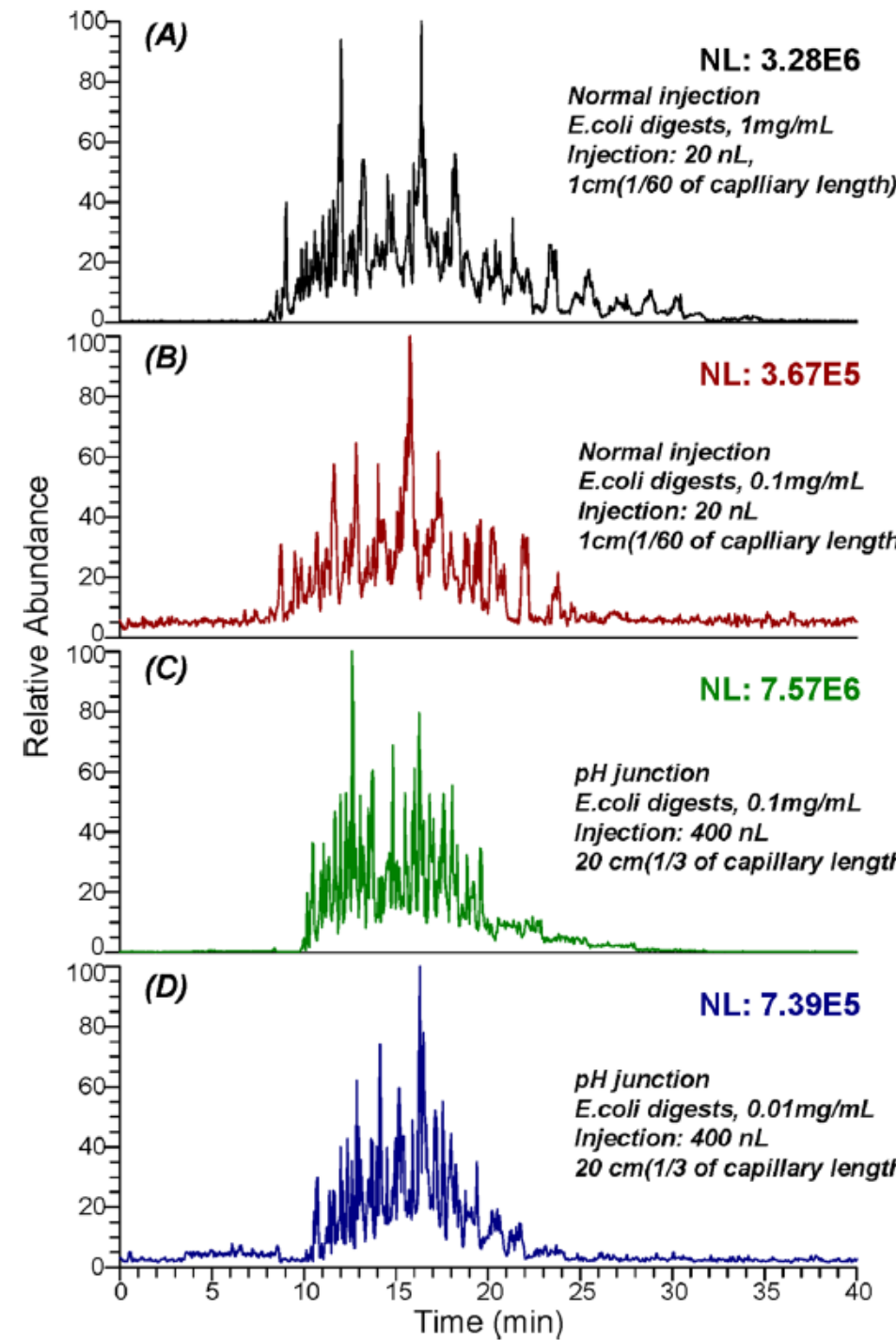
pH-junction példa 3.

- E. coli emésztmény
 - Átlag inj. (20 nL, 1 mg/mL):
508 peptid, 199 fehérje
 - pH junct. (400 nL, 0,1 mg/mL):
527 peptid, 179 fehérje
- Natív fehérjékre is
használható



pH-junction példa 3.

- Lineáris poliakrilamid bevonatú kapilláris
- BGE: 0.1% FA
- Mintamátrix:
 - A (hagyományos): 0.1% FA
 - B (pH junct): 10 mM NH₄Ac (pH=6.5)



pH-junction példa 3.

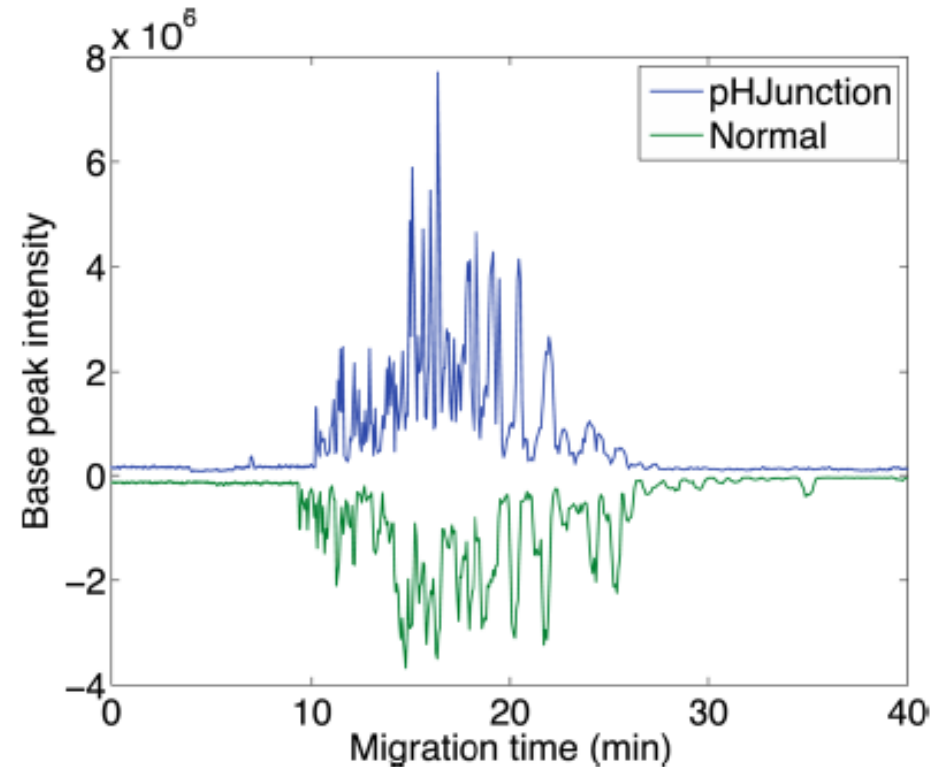
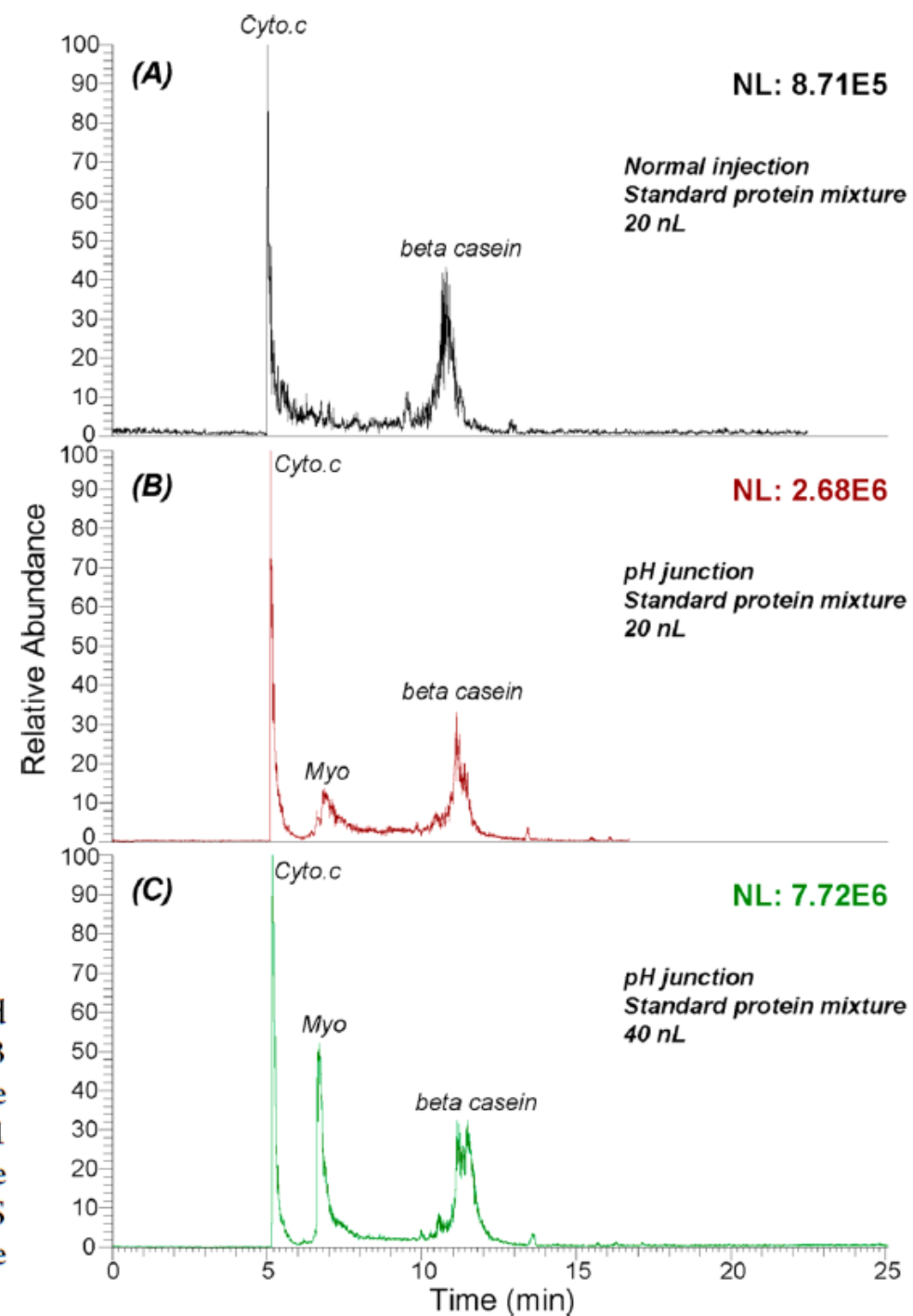


Figure 4. Base peak electropherograms for a 20 nL (1 cm) injection of a 0.1 mg/mL *E. coli* tryptic digest. The electropherogram generated with a pH junction injection is shown in blue (top), and the electropherogram generated using normal injection is inverted and shown in green (bottom).

pH-junction példa 3.

Alkalmazás natív fehérjékre

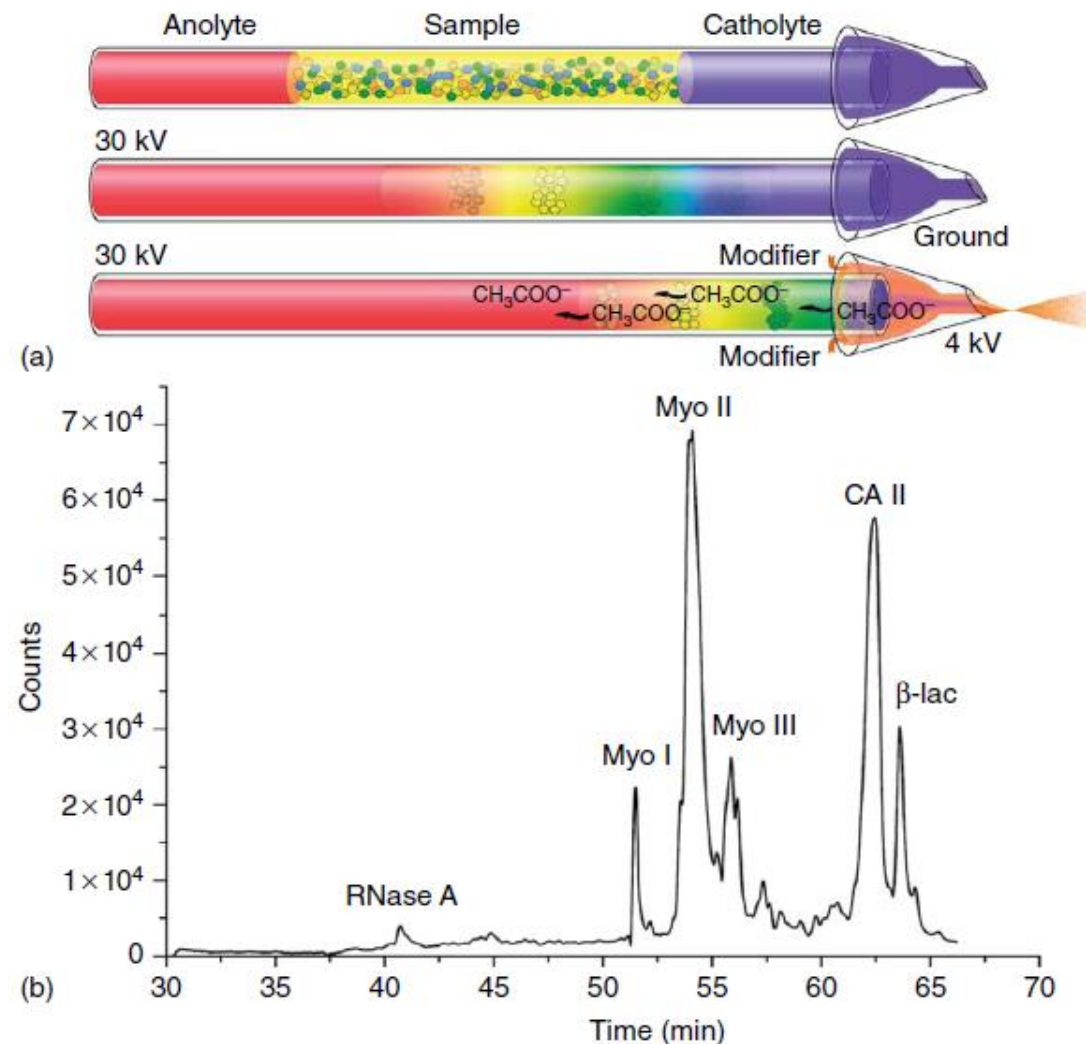
Figure 6. Base peak electropherograms of a mixture of three standard proteins analyzed by normal (A) and dynamic pH junction based (B and C) CZE-MS using an LTQ mass spectrometer. A protein mixture containing cytochrome C (Cyto.c, 0.1 mg/mL), myoglobin (Myo, 0.1 mg/mL), and beta casein (0.5 mg/mL) was used as the sample. The sample was dissolved in 0.1% (v/v) FA for the normal CZE-MS experiment and in 10 mM ammonium acetate (pH ~6.5) for the dynamic pH junction experiments. NL, normalized level.



cIEF alkalmazása fehérjék elválasztására

- pH gradiens kialakítása katolit beinjektálásával
- Minta injektálás
- Inlet edényben anolit
- Fehérjék elválasztása pI szerint
- Detektálás MS-rel

Zhong, X., et al. (2011) Flow-through microvial facilitating interface of capillary isoelectric focusing and electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **83**, 8748–8755.



Elektrokromatográfiás dúsítás 1.

- Sweeping
 - Pl. SDS-zóna a mintával (neutrális endogén szteroid hormon) szomszédosan. Áthalad a mintán és kh-ba lép vele. Rövid zónába tömöríti a mintát

Elektrokromatográfiás dúsítás 2.

- Micellák megszüntetésével (összeomlásával – micelle collapse)
 - Pl. mintamátrix 10 mM SDS
 - 30% AcCN dugószerűen a minta után
 - (-) töltésű micellák az AcCN felé áramlanak
 - Azt elérve a CMC érték megnő (12 mM SDS-re), a micellák szétesnek, az egyes komponensek dúsulnak az ACN-es zónában

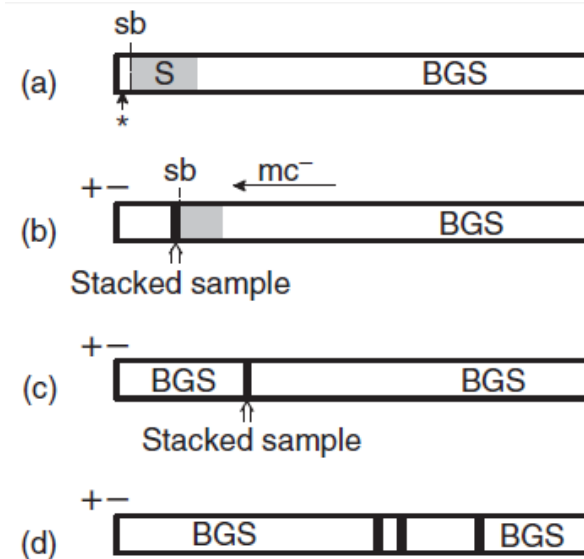


Figure 5.7 Simplified schematic of analyte focusing by micelle collapse or AFMC in PF-EKC with a cathodic EOF. (a) The S of neutral analytes prepared in a micellar solution is injected after conditioning the capillary with BGS (nonmicellar) and injection of micellar solution for separation. The symbol * represents a low-conductivity electrolyte or organic-solvent-rich solution for micelle

collapse. (b) Application of voltage caused the analytes to accumulate at the sb. (c) A final AFMC zone is formed when all the analytes are transported and released into the sb. (d) The micelles from the micellar solution penetrated the AFMC formed zone and caused them to separate by EKC principles. Note that the EOF is to the cathode where the detector is also located.

Elektrokromatográfiás dúsítás 3.

- Micelle to solvent stacking
 - Micella összeomlással analóg
 - Minta és felületaktív anyag töltése ellentétes legyen
 - Micelladús közegben a micella töltése szabja meg az áramlást, míg a szerves oldószeres közegben az ellentétes töltésű minta komponens töltése
 - co-EOF körülmény kell
 - A minta mátrixa micella vagy szerves oldószerdús közeg
 - FESI-vel kombinálható
- Micelle collapse-hez képest különbség: nem feltétlenül szűnik meg a micella, ellentétes töltésű mintakomponens, nem kell külön beinjektálni a szerves oldószerdús sávot

Elektrokromatográfiás dúsítás 3.

- BGE tartalmaz 20% AcCN-t
- Amint kilép a mintazónából az ellentétes töltésű komponenssel képzett micella, a + töltése miatt a határfelületen dúsul

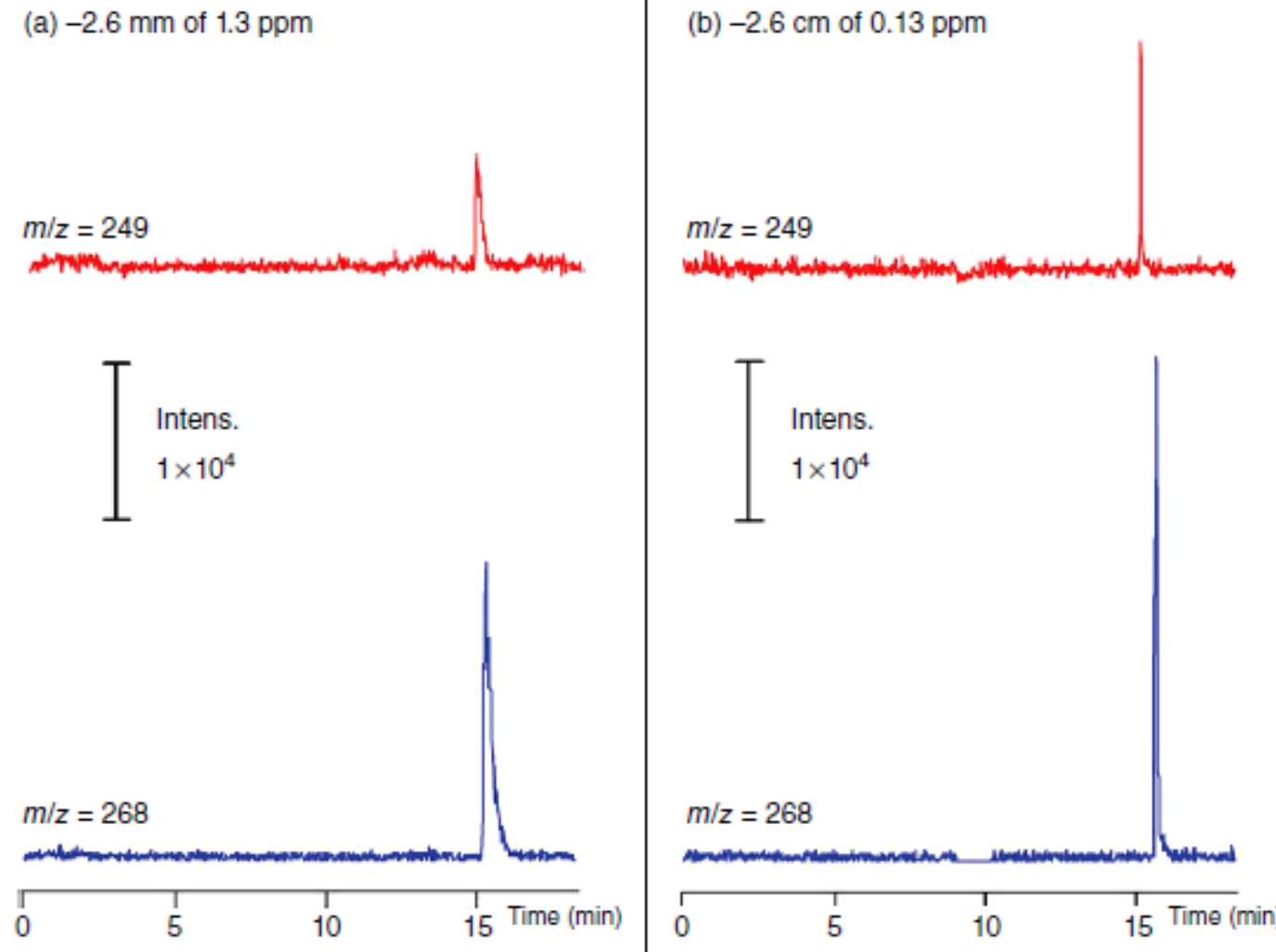


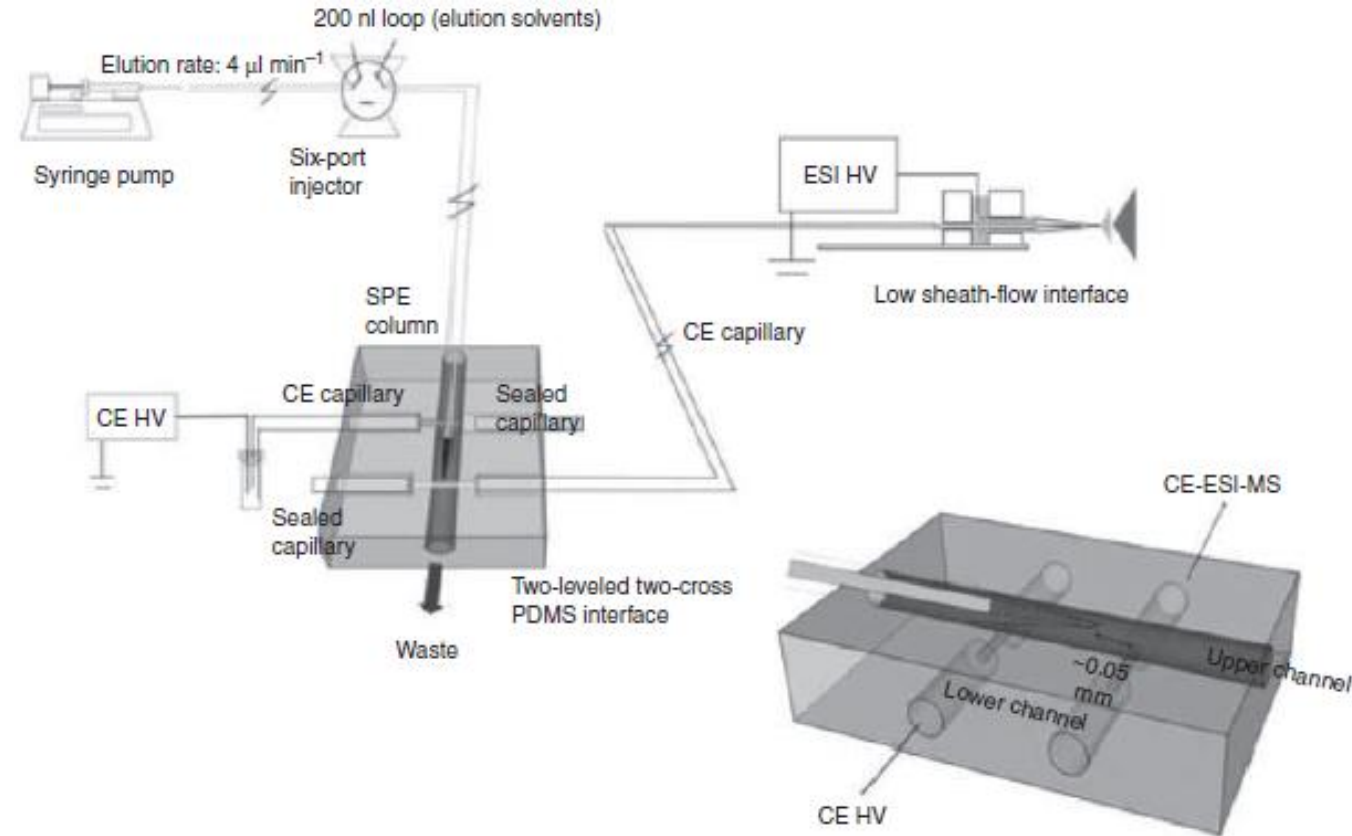
Figure 5.8 Extracted base peak electropherograms for pindolol ($m/z = 249$) and metoprolol ($m/z = 268$) analyzed by CZE-ESI-MS (a) and MSS-CZE-ESI-MS (b). BGS = 30 mM ammonium acetate, pH 5 with 20% acetonitrile; sample matrix = BGS (a) and 10 mM SDS with 13 mM ammonium acetate, pH 5 (b);

$S = 1.3 \mu\text{g ml}^{-1}$ (a) and $0.13 \mu\text{g ml}^{-1}$ (b) of pindolol and metoprolol; injection scheme: 2.6 mm (6 s at 50 mbar) of sample solution (a) and 0.6 cm (15 s at 50 mbar) of sample matrix followed by 2.6 cm (60 s at 50 mbar) of sample solution (b). Reproduced from Quirino [54] with permission of Elsevier.

On-line SPE

- Az SPE töltet nem a CE(-MS) kapillárisban van, de hozzá van kapcsolva valamilyen módon
- Nagy térfogatú (50 μL) peptid minta átáramoltatása az SPE tölteten, amit utána kis (200 nL) térfogatba eluálnak

Lee, W.H., et al. (2011) Staggered multistep elution solid-phase extraction capillary electrophoresis/tandem mass spectrometry: A high-throughput approach in protein analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **25** (15), 2124–2130.

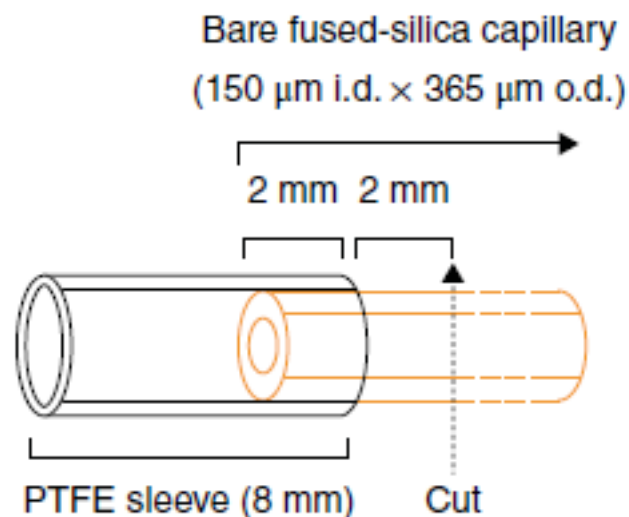


In-line SPE

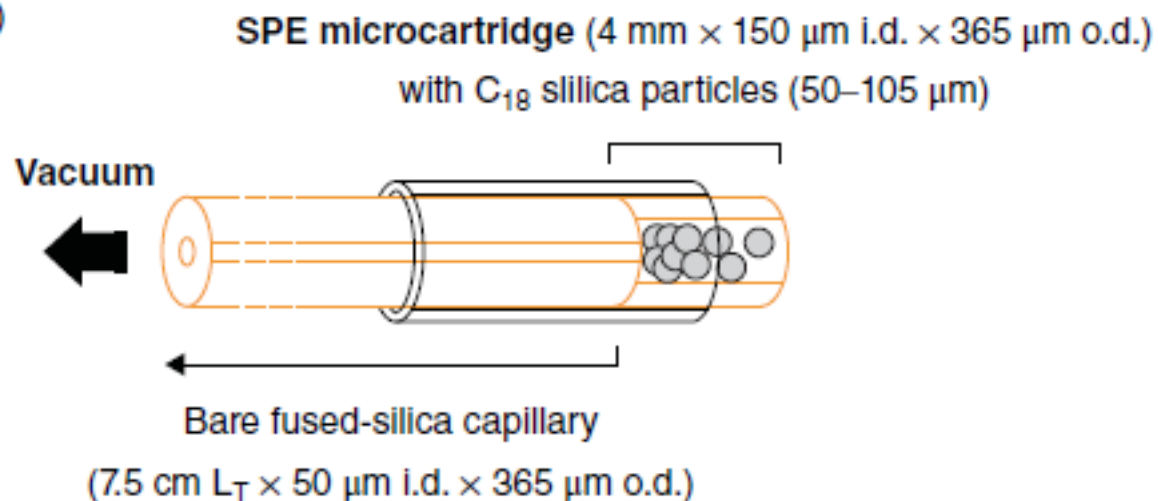
- Kapilláris része az SPE töltet
- A teljes oldattérfogat keresztülhalad a megkötés során a CE-MS rendszeren

In-line SPE - töltéskészítés

(a)



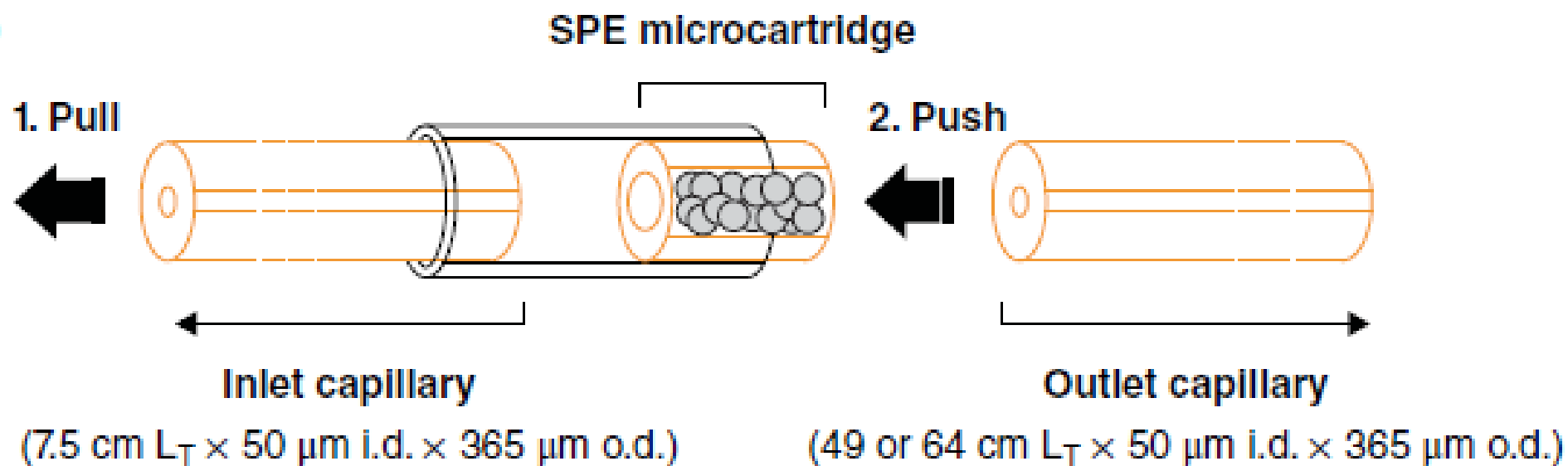
(b)



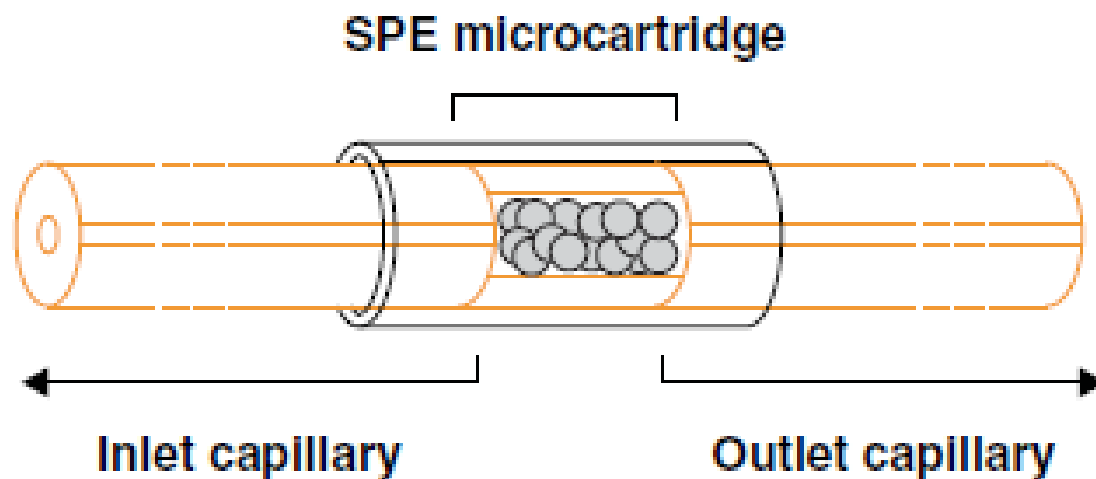
Medina-Casanellas, S., et al. (2014) Evaluation of fritless solid-phase extraction coupled on-line with capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of opioid peptides in cerebrospinal fluid. *Electrophoresis*, **35** (20), 2996–3002.

In-line SPE - töltetkészítés

(c)



(d)



Intakt fehérjék vizsgálata CE-MS-sel

Fehérjeanalízis - bevezetés

- Bottom-up: emésztés utáni peptidek azonosítása
 - Ismeretlen összetételű mintában lehet megadni a fehérjét
- Intakt fehérje vizsgálata
 - Pl. ha a fehérje melletti szennyezőket
 - Vagy a fehérje stabilitását/bomlását vizsgáljuk
 - Információ a konformációjáról, komplexképzéséről
 - Kevesebb mintaelőkészítés, mely elszennyezi/befolyásolja a mintát
 - 2D fehérje gélelektroforézis
 - Hosszú analízis
 - „fehérjebontásra” alkalmasak a modern MS készülékek

Fehérjeadszorpció leküzdése

- Szélsőséges pH
 - Alacsony: fal semleges
 - Magas: fal és fehérje is negatív
- Ionerősség növelése
- Szerves oldószer adagolása a BGE-hoz
- Kapilláris bevonat használata

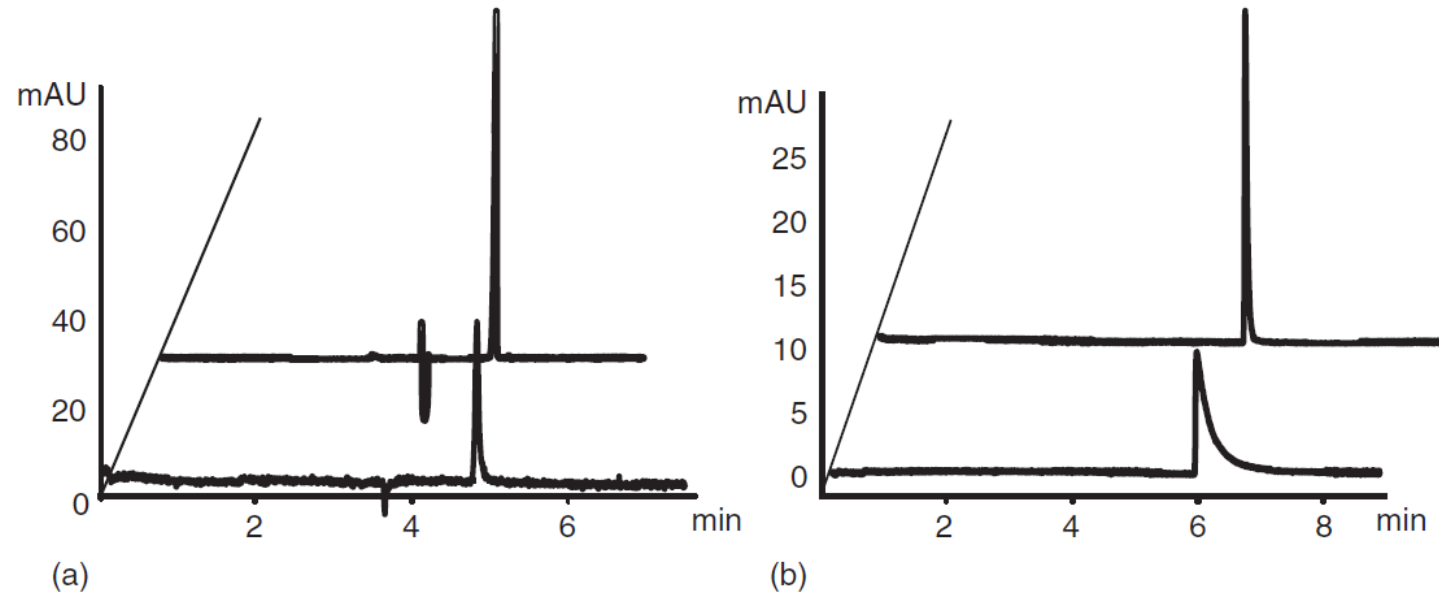


Figure 7.1 CE-UV electropherogram of insulin obtained with (a) alkaline BGE and (b) acidic BGE. Upper trace: BGE containing 10% ACN. Lower trace: BGE without the addition of ACN. (Reproduced from [24] with permission from Wiley.)

Staub, A., et al. (2010) *Electrophoresis*, **31**, 3326.

Kapilláris bevonat kialakítása

- Cél megakadályozni a töltött fallal való kh-át a fehérjének (elektrosztatikus adszorpció)
- Semleges, ill. töltött bevonatok
- BGE adalékként (dinamikus coating) – nem MS kompatibilis
- Kovalens bevonatok
 - Reaktív szilánként viszik fel
- Nemkovalens borítások
 - Fizikailag adszorbeált rétegek

Kapilláris bevonat kialakítása

- Cél megakadályozni a töltött fa (elektrosztatikus adszorpció)
- BGE adalékként (dinamikus co)
- Kovalens bevonatok
 - Reaktív szilánként viszik fel
- Nemkovalens borítások
 - Fizikailag adszorbeált rétegek

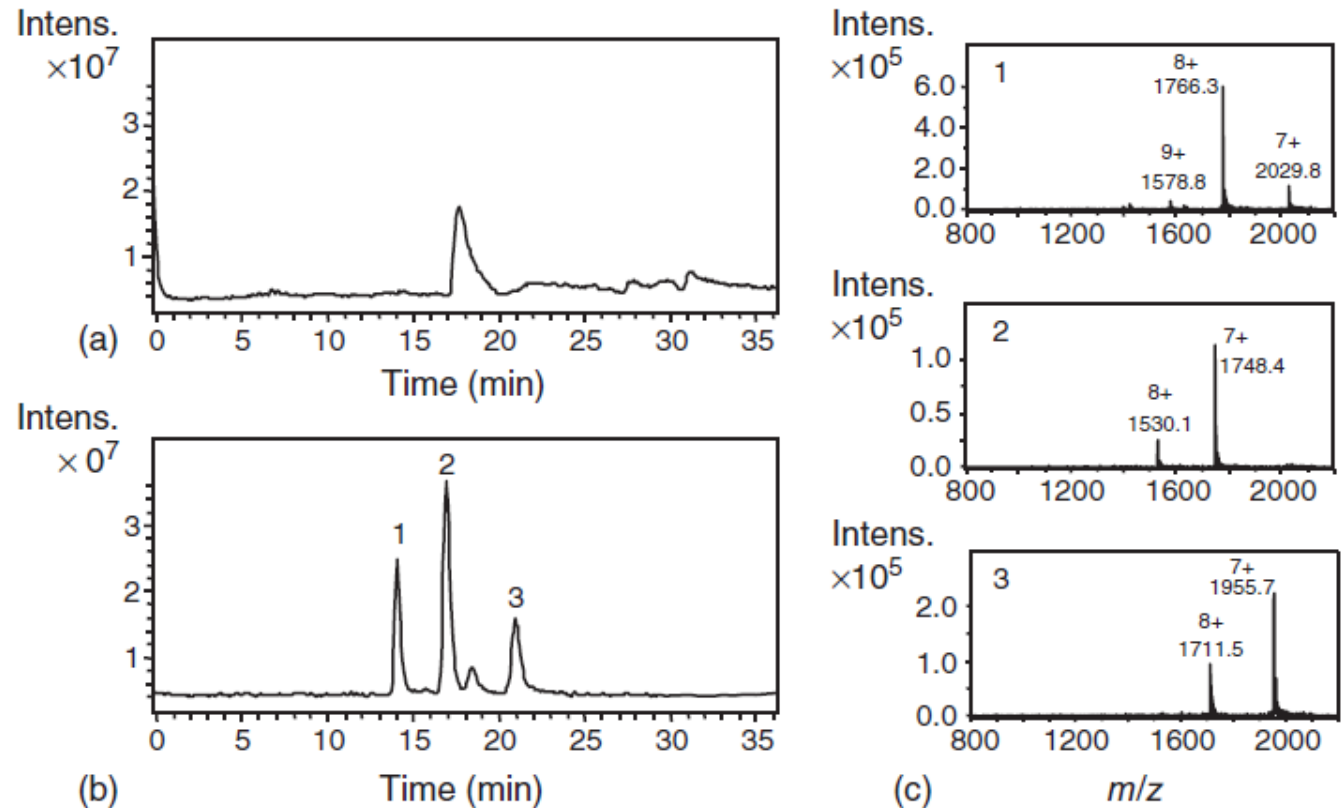


Figure 7.2 Total ion electropherograms obtained using CZE-ESI-MS of a mixture of the basic proteins lysozyme (1), cytochrome c (2), and ribonuclease A (3) using a BGE of ammonium acetate buffer at pH 5.5 and

(a) a bare fused-silica capillary or (b) an coated capillary. (c) Mass spectra of the main peaks obtained with the coated capillary. (Reproduced from [31] with permission from Wiley.)

(Nem ESI) ionforrások (MALDI, ICP) – intakt fehérjékhez

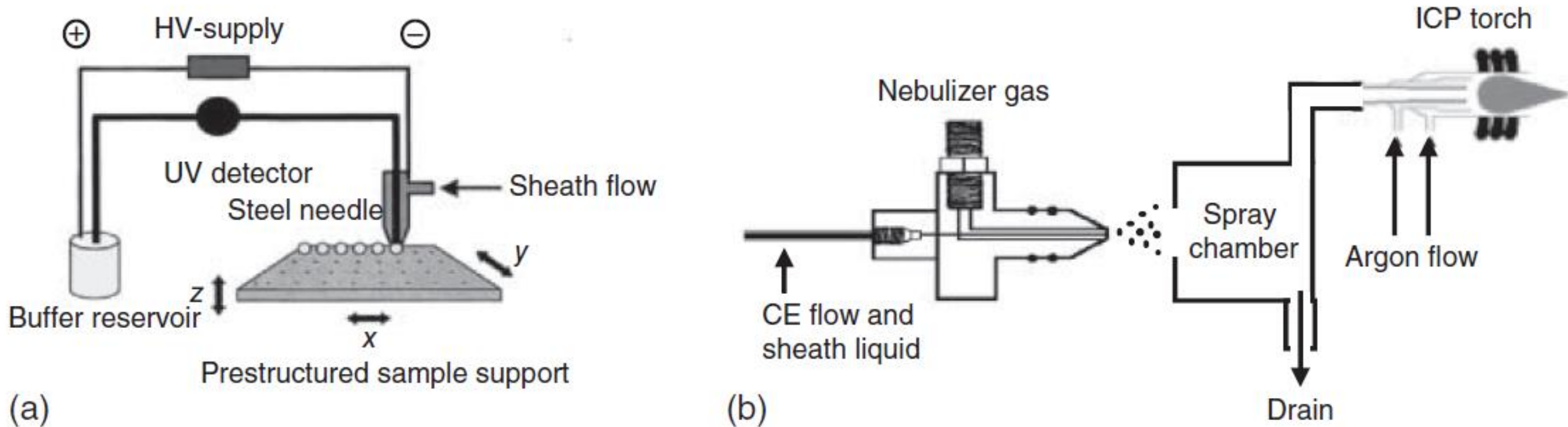


Figure 7.3 Schematic representation for the most commonly used interfaces for (a) CE-MALDI-MS and (b) CE-ICP-MS.

Hemoglobin-alapú oxigénhordozók analízise

- 75 mM NH₄-formiát (pH=9.5)
- Bevonatmentes kapilláris
- 56 cm effektív hossz
- 12 s 25 mbar injektálás

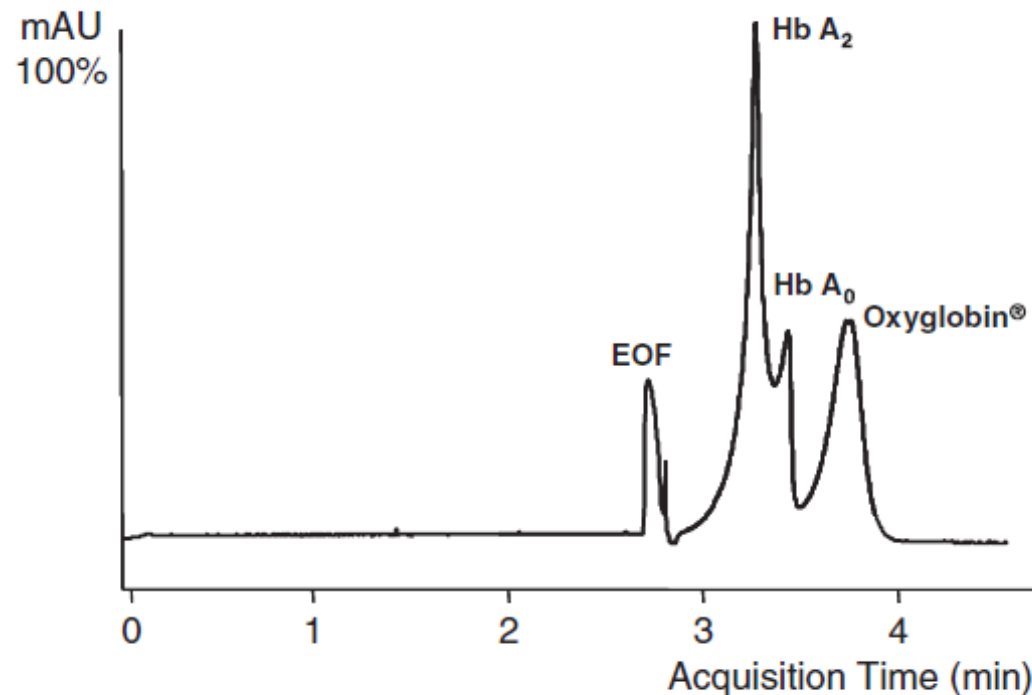
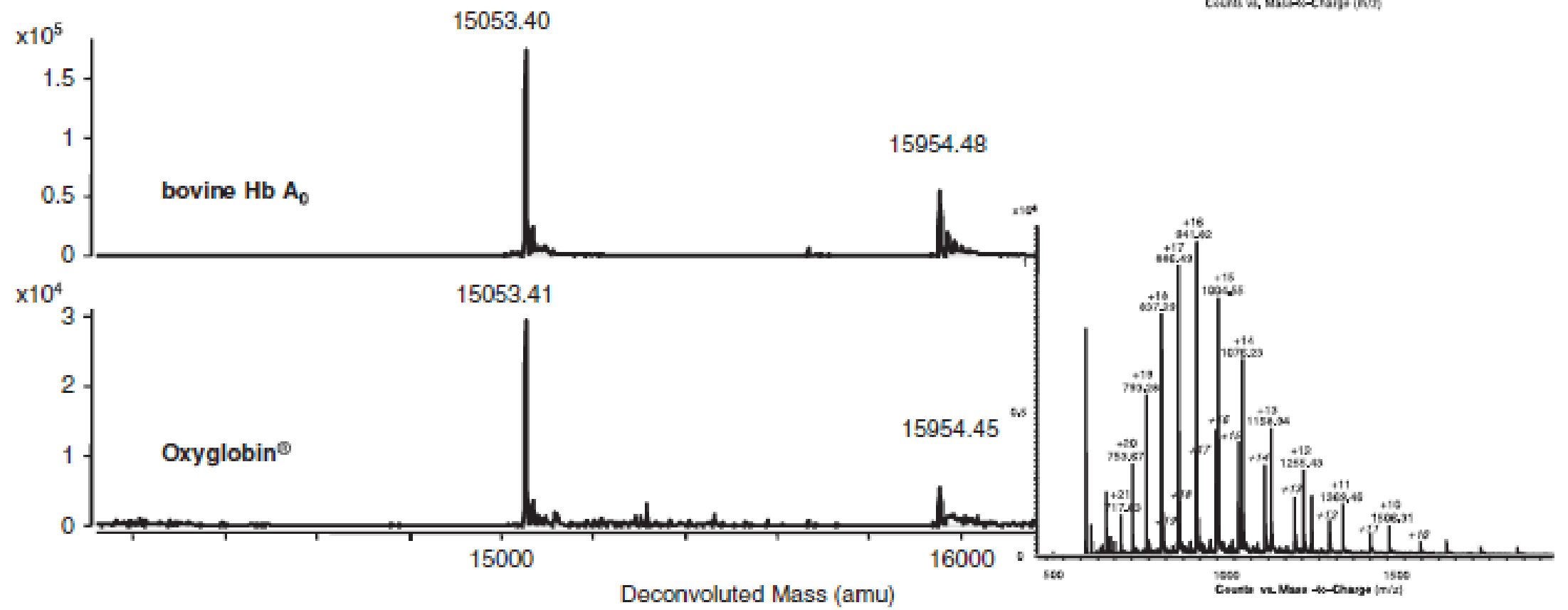
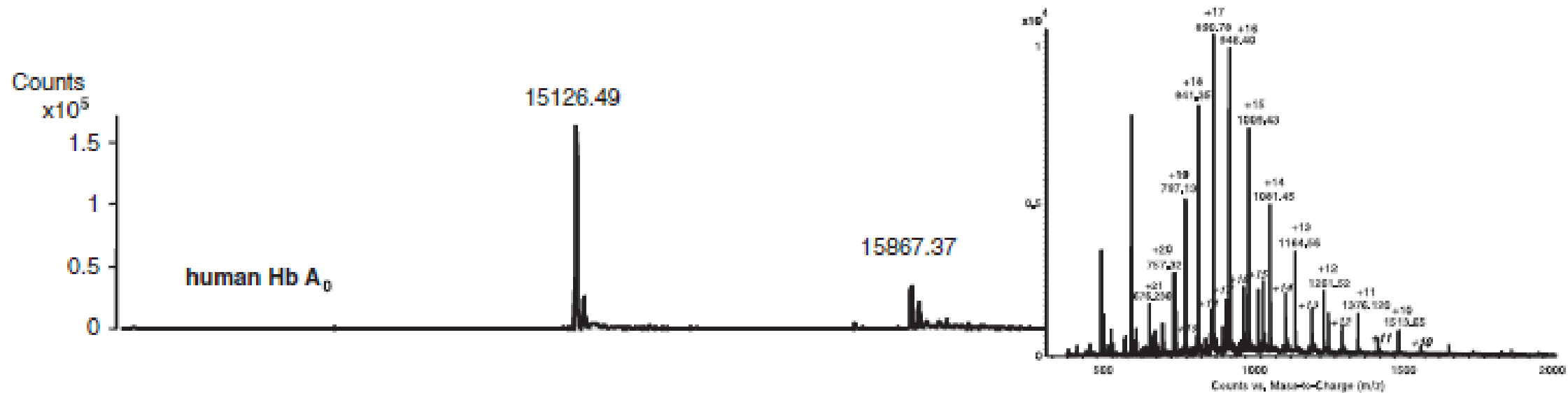


Figure 2. CE-UV electropherogram obtained by injecting a mixture of Hb A₂ (0.1 g/dL), Hb A₀ (0.1 g/dL), and Oxyglobin[®] (0.2 g/dL). UV/Vis 415 nm online. See text for experimental conditions.



Glikoproteinek

- Glikánrészek szerkezete fontos a biológiai aktivitás szempontjából
- EPO: eritropoetin
 - 1-1 sziálsav különbség a fehérjék közt, sziálsavegységenként ~2 perc migrációs idő változás
 - Hexóz-N-acetil-hexózamin tartalmabani különbség részleges elválasztást eredményezett
 - Akár 250 izoforma is megkülönböztethető

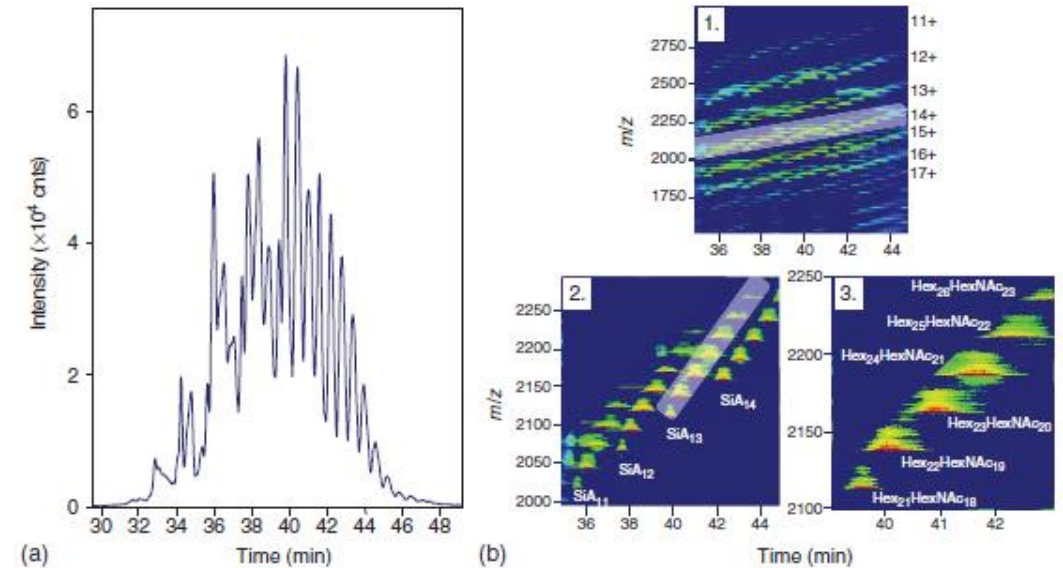
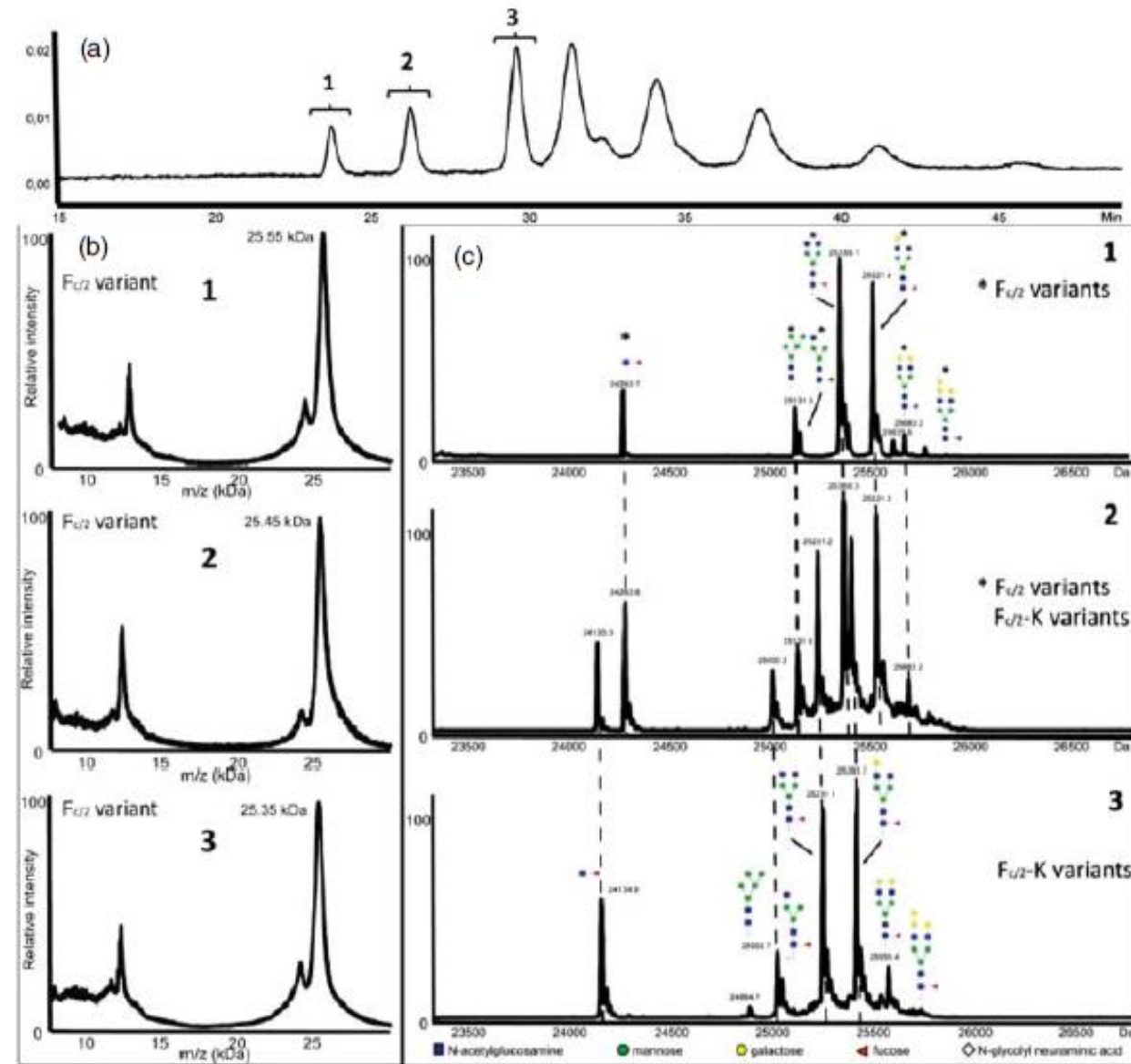


Figure 7.5 CZE-ESI-MS of recombinant human erythropoietin employing a sheathless interface in combination with a neutrally coated capillary. (a) Base peak electropherogram; (b1) contour plot with zooms of (b2)

the 14⁺ charge state of the glycoforms and (b3) the SiA₁₃ sialoforms of the 14⁺ glycoforms. (Reproduced from [40] with permission from American Chemical Society.)

mAbs CZE-MS elválasztása

- Antitestet részlegesen emésztették (Ig degrading enzyme)
- Fragmensek: $F(ab')_2$ (100 kDa), $Fc/2$ (25 kDa)



Biacchi, M., Gahoual, R., Said, N., Beck, A., Leize-Wagner, E., and Francois, Y.-N. (2015) *Anal. Chem.*, **87**, 6240.

Figure 7.6 CZE analysis with off-line MS detection of partially digested antibody. (a) CZE-UV electropherogram showing the charge variants of the $Fc/2$ (peak 1–3) and $F(ab')_2$ (peaks between 30 and 45 min) fragments. (b) MALDI-TOF-MS and (c) ESI-TOF-MS

mass spectra obtained for the three separated and off-line collected $Fc/2$ charge variants. Identified glycoforms are annotated in panel (c). (Reproduced from [60] with permission from American Chemical Society.)

Metalloproteinek

- Metallotioneinek
 - Kis molekulatömegű fehérjék nagy cisztein és fémtartalommal
 - CZE-ICP-MS-sel jól vizsgálhatóak, borítatlan kvarckapillárisal
 - ICP-nél a mátrixkomponensek nem zavarják

Metalloproteinek

- Metallotioneinek
 - Cd, Cu és Zn mérése ICP-vel

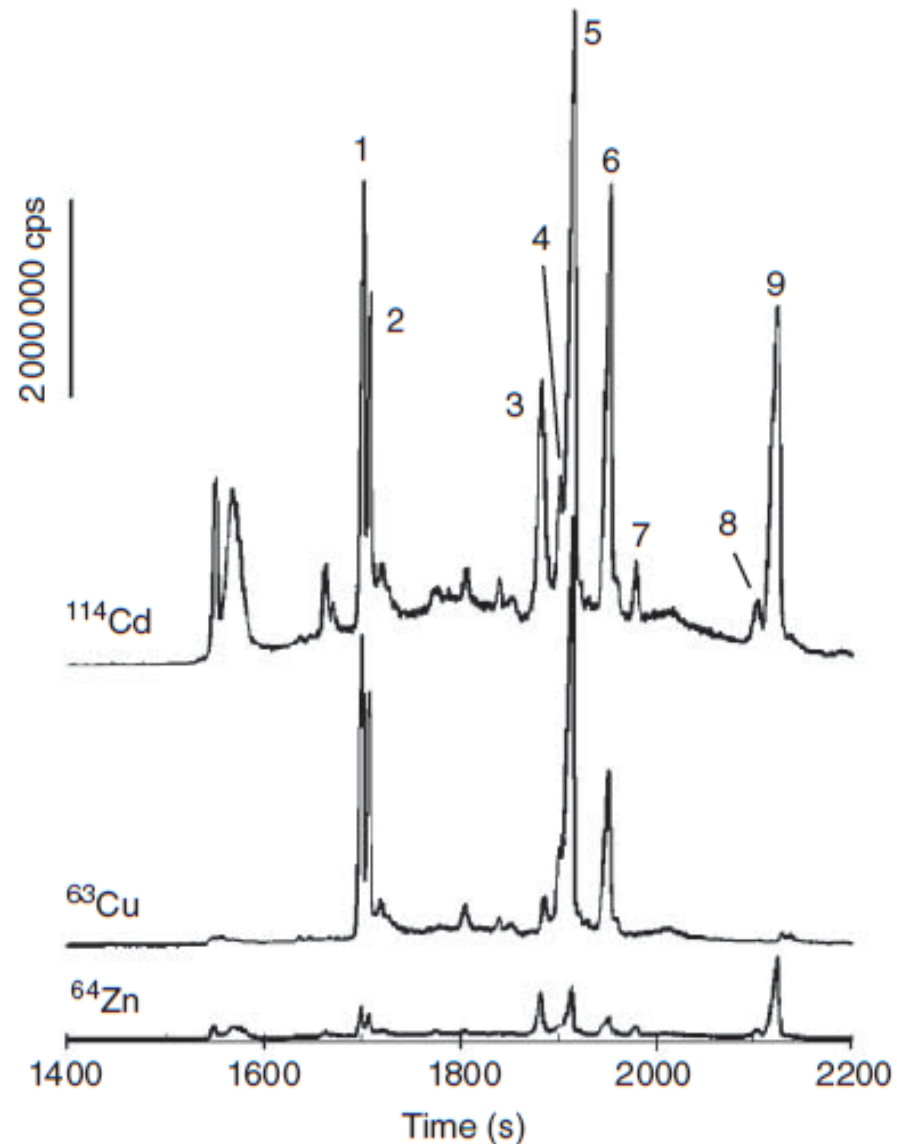


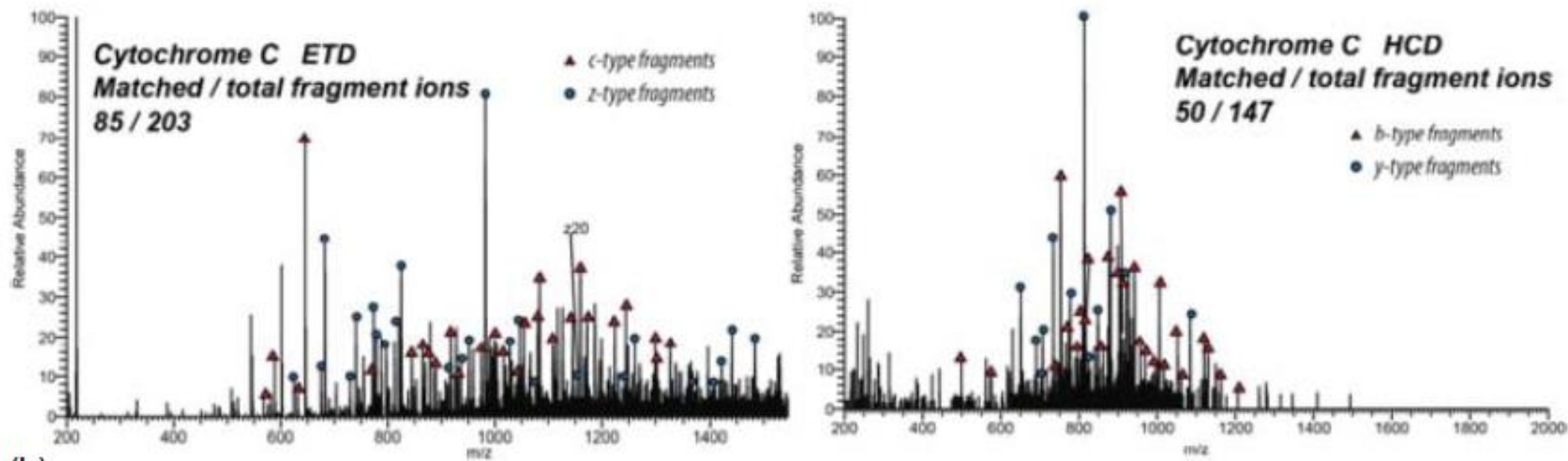
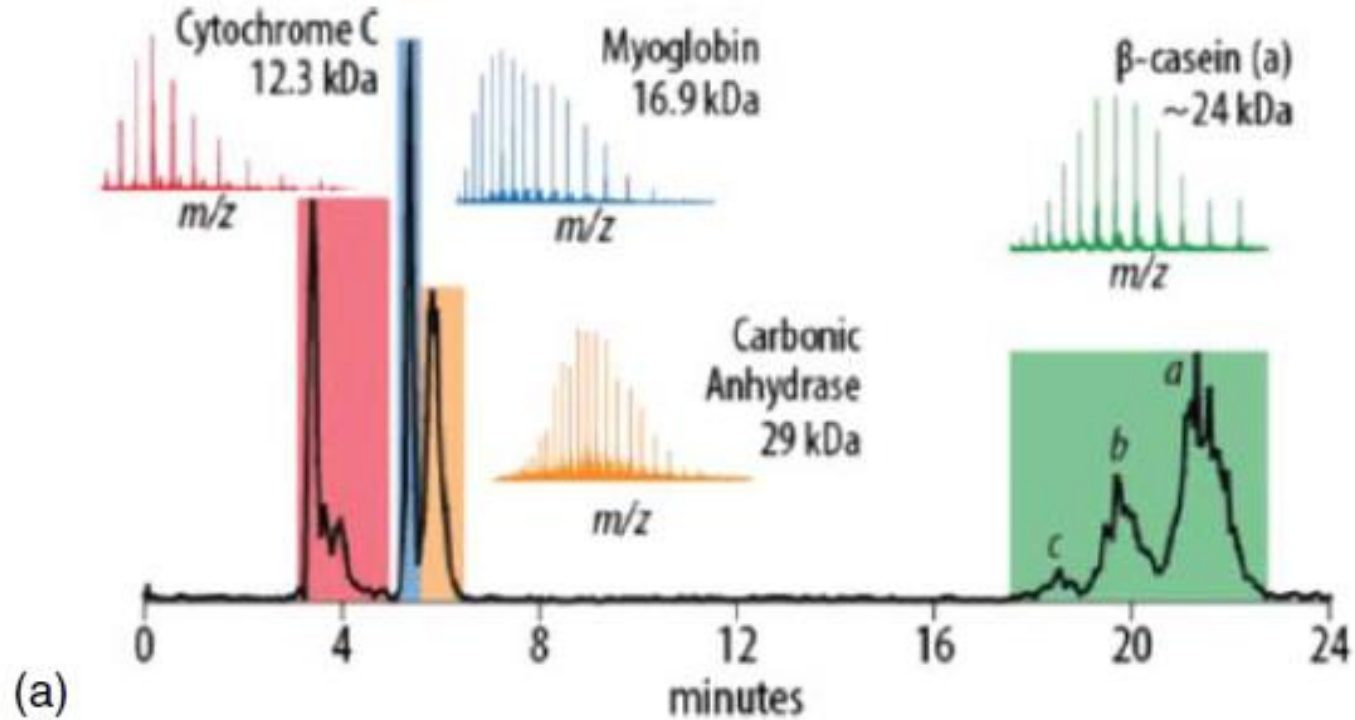
Figure 7.8 CZE-ICP-MS analysis of a rabbit liver MT sample using a 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid coated capillary. The proteins are detected by their cadmium, copper, and zinc content as

monitored with ICP-MS. Numbers indicate the MT isoforms that were identified. (Reproduced from [109] with permission from American Chemical Society.)

Top-down proteomika

- Intakt fehérje fragmentálása
 - ETD fragmentációval (elektron transzfer disszociáció)
 - HCD fragmentációval (higher energy collision dissociation)
- Hátulütő: oldallánc specifikus módosítások meghatározása nehézkes
- Általában kisebb SC% értékek
 - Kiküszöbölés: ETD és HCD kombinálásával

Zhao, Y. et al. (2015)
Anal. Chem., **87**, 5422.



Cytochrome c

ETD / HCD

Number of fragmentation sites: 66/20*

MGDVEKG|K|KI|F|V|QKCAQCHTVEKGG|K|H|K|IT|GPN|L
|H|G|L|F|G|RKT|G|Q|A|P|G|F|S|Y|T|D|A|N|K|N|K|G|I
TW|G|E|E|TL|ME|Y|L|E|NP|K|Y|I|P|G|T|K|M|I|F|A|G|I
|K|K|K|G|E|R|E|D|L|I|A|Y|L|K|K|A|T|N|E

Carbonic anhydrase

ETD / HCD

Number of fragmentation sites: 81/11*

MSHH|W|G|Y|G|K|H|N|G|P|E|H|W|H|K|D|F|P|I|A|N|G|E|R|Q
|S|P|V|D|I|D|T|K|A|V|V|Q|D|P|A|L|K|P|L|A|L|V|Y|G|E|A|T|S|R|R|M|V|N
N|G|H|S|F|N|V|E|Y|D|D|S|Q|D|K|A|V|L|K|D|G|P|L|T|G|T|Y|R|L|V|Q|F|H|F|H|W|G|S|S
D|D|Q|G|S|E|H|T|V|D|R|K|K|Y|A|E|L|H|L|V|H|W|N|T|K|Y|G|D|F|G|T|A|A|Q|Q|P|D|G|L
A|V|V|G|V|F|L|K|V|G|D|A|N|P|A|L|Q|K|V|L|D|A|L|D|S|I|K|T|K|G|K|S|T|D|F|P|N|F|D|P
G|S|L|L|P|N|V|L|D|Y|W|T|Y|P|G|S|L|T|T|P|P|L|L|E|S|V|T|W|I|V|L|K|E|P|I
|S|V|S|S|Q|Q|M|L|K|F|R|T|L|N|F|N|A|E|G|E|P|E|L|L|L|M|L|A|N|W
R|P|A|Q|P|L|K|N|R|Q|V|R|G|F|P|K

β -casein

ETD / HCD

Number of fragmentation sites: 58/2*

MKVLILACLVALALARELEELNVPGEIVESLSSESSEESITRINK
KIEKFCSEEQQQTEDELQDKIHPPFAQTQISLVYPIFFGPI
PNSLPQNIIPPLTQTPVVVPPFLOPEVMGVSKVKEAMAP
KHKEIMPFPKY|PVE|PF|T|E|S|Q|S|L|T|L|T|D|V|E|N|L|H|L|P|L
P|L|Q|S|W|M|H|Q|P|H|Q|P|L|P|P|T|V|M|F|P|P|Q|S|V|L|S|L|S|Q|S|K|V|L|P
|V|P|Q|K|A|V|P|Y|P|Q|R|D|M|P|I|Q|A|F|L|L|Y|Q|E|P|V|L|G|P|V|R|G|P|F|P|I|V

Myoglobin

ETD / HCD

Number of fragmentation sites: 63/8*

MGLSDG|E|W|Q|Q|V|L|N|V|W|G|K|V|E|A|D|I|A|G|H|G|Q|E|V|L|R|L
F|T|G|H|P|E|T|L|E|K|F|D|K|F|K|H|L|K|T|E|A|E|M|K|A|S|E|D|L|K|K
H|G|T|V|V|L|T|A|L|G|G|I|L|K|K|K|G|H|H|E|A|E|L|K|P|L|A|Q|S|H|A|T|K|H|L
K|I|P|I|K|Y|L|E|F|I|S|D|A|I|H|V|L|H|S|K|H|P|G|D|F|G|A|D|A|Q|L
G|L|A|M|T|K|L|A|L|E|L|L|F|R|N|D|I|A|A|K|Y|K|E|L|G|F|Q|G

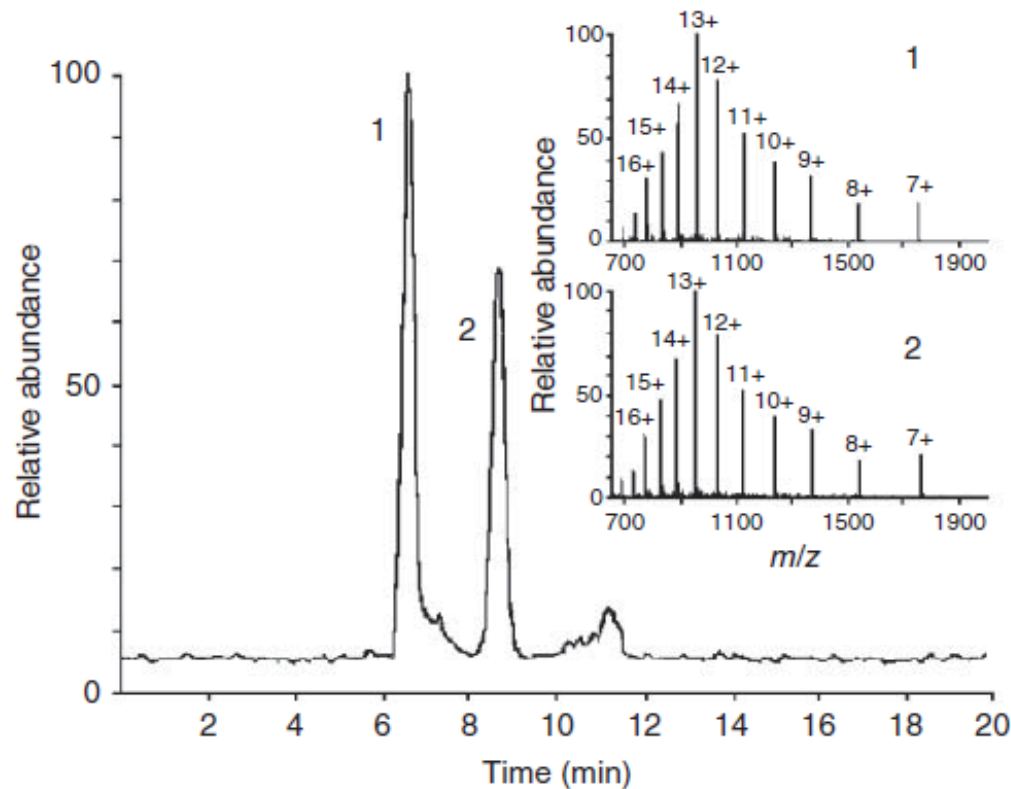
(c)

Figure 7.9 CZE-ESI-MS analysis of four standard proteins. (a) Base peak electropherogram. Colored MS spectra correspond to migration profiles of the designated proteins. (b) ETD and HCD fragmentation spectra of cytochrome c with the identified fragment ions. (c) Sequence maps show

combined fragmentation patterns of ETD and HCD for the four standard proteins. *Number of fragmentation sites: total fragmentation sites/overlapped fragmentation sites. (Reproduced from [142] with permission from American Chemical Society.)

CytC elválasztása

- Oxidált (Fe^{3+}) és redukált (Fe^{2+}) CytC elválasztása CZE-vel



He, T., et al. (1999) *Anal. Biochem.*, **271**, 189.

Figure 7.10 CZE-ESI-MS analysis of cytochrome c incubated with Bcl-X_L peptide, showing both the oxidized (1) and reduced cytochrome c (2). Insets show the ESI mass spectra of the peaks. (Reproduced from [143] with permission from Elsevier.)

CGE-MALDI-TOF-MS

- CGE-vel elválasztott fehérjéket egy mozgó poli(tetrafluoroetilén) (PTFE) membránra viszik fel
- erről SDS leoldható
- MALDI-TOF-MS-sel azonosíthatók a fehérjék

Bontott fehérjék vizsgálata CE-MS-sel

Klinikai proteomika

Klinikai proteomika – CE-MS

- A közlemények többsége az újfajta interfészek kifejlesztésére törekszik, amelyekkel jobb érzékenység érhető el (több azonosított fehérje)

Mintaelőkészítés

- (Klinikai) mátrixkomponensektől meg kell szabadulni
- Pl. vizeletben lévő natív peptidek vizsgálatára:
 - 2 M karbamidot, 10 mM NH_4OH -ot és 0,05% SDS-t tartalmazó vizes oldatban lett „elkészítve” a vizeletminta
 - Ultracentrifugálás (20 kDa MWCO filter) – nagy fehérjék eltávolítása
 - RP C2 oszlop – karbamid és sók eltávolítása
 - Peptidek eluálása 50% AcCN + 0,5% FA-val, majd hígítás 50 μL vízben
- Fehérjék: kvarckapillárisra tapadnának
- Sók: ionszupressziót eredményeznének

Proteolízis

- Tripszin: Arg és Lys
 - Kimotripszin: Tyr, Phe és Trp, de Leu, Met, Ala, Asp, Glu is (lassabban)
 - Endoproteináz Arg-C, Lys-C, Asp-N, Glu-C, K (alifás/aromás)
 - Karboxipeptidáz A, B, Y, M
 - Papain (nemspecifikus)
 - Pepszin (nemspecifikus)
-
- Az emésztés jellege a keletkező peptidek méretét befolyásolja
 - Top-down; middle-down; bottom-up proteomika

Peptidek vizsgálata sheathless CE-MS-sel

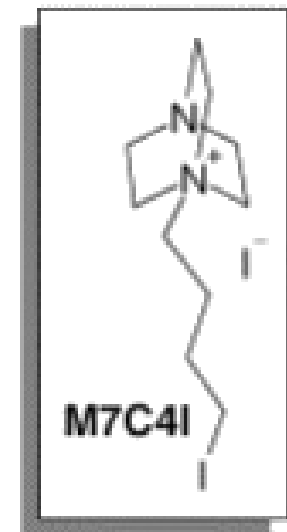
- Eredményt befolyásoló paraméterek optimalizálása
 - Emitter és MS inlet távolsága
 - Spray feszültség
 - Áramlási sebesség
 - Kapilláris bevonatok
- Fehérjeemésztés: endoproteináz Arg-C
- Tripszines emésztés sok 3 vagy 4-tagú peptidet eredményezne, hisztonokban sok Arg és Lys található
- K. Faserl et al.; Optimization and Evaluation of a Sheathless Capillary ElectrophoresisElectrospray Ionization Mass Spectrometry Platform for Peptide Analysis: Comparison to Liquid ChromatographyElectrospray Ionization Mass Spectrometry, Anal. Chem. 2011, 83, 7297-7305.

Peptidek vizsgálata sheathless CE-MS-sel

- Kapilláris bevonatok
 - M7C4I
 - PolyE-323
 - PEI (ennél van a legnagyobb EOF)
- + bevonatok alkalmazásával az EOF megfordul, fordított (negatív) polaritással erős EOF az MS inlet (kapilláris outlet) felé



Fig. 3. PolyE-323 polymer synthesis scheme. The polymer is schematically depicted and the charge of the polymer is dependent on pH. PolyE-323 has a low degree of branching, which is not indicated in the schematic structure.



Peptidek vizsgálata sheathless CE-MS-sel

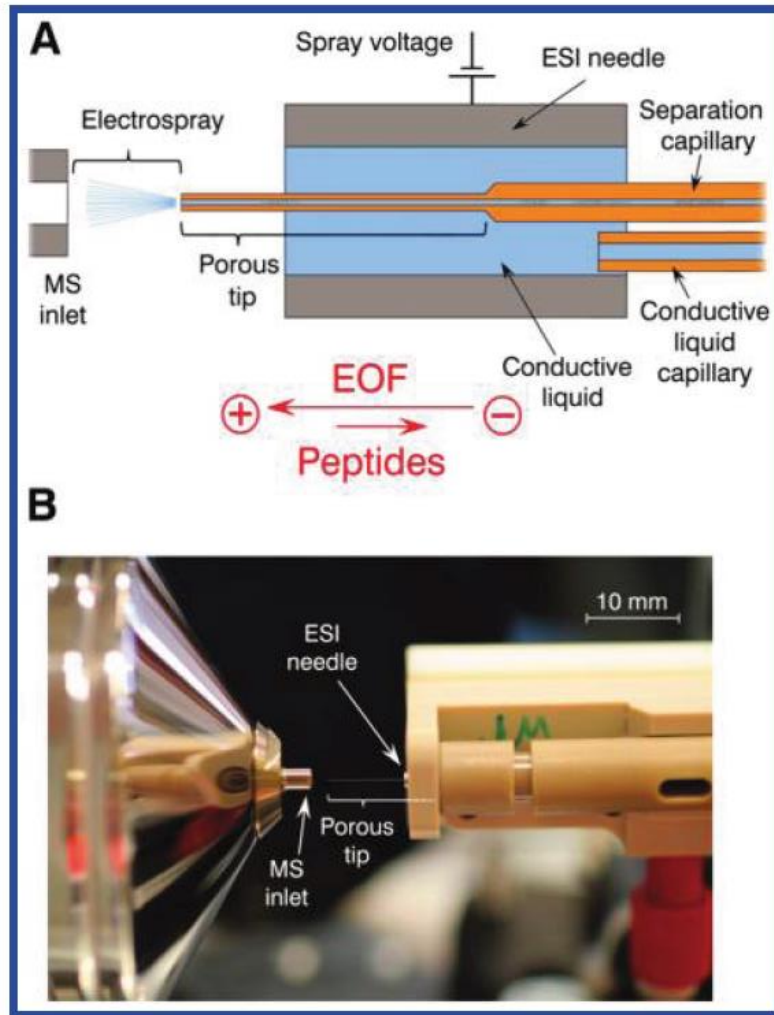


Figure 1. The high-sensitivity porous sprayer interface (A) schematic and (B) photograph of the prototype interface.

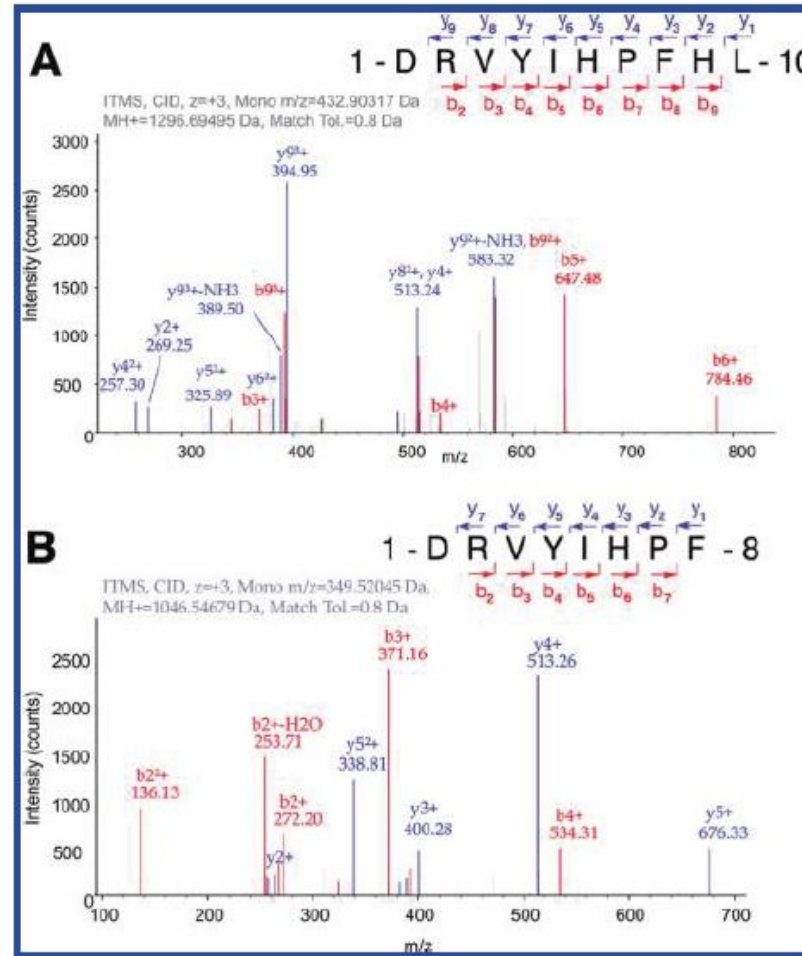


Figure 4. MS/MS spectra obtained from (A) 35.9 amol of angiotensin I and (B) 28.9 amol of angiotensin II. Sample concentration, 95.6 and 77 fmol/ μ L; injected volume, 0.38 nL; other conditions were as in Figure 2. Full scans were recorded in the LTQ Orbitrap XL; MS/MS spectra were recorded in the LTQ ion trap.

Peptidek (hisztonból) vizsgálata sheathless CE-MS-sel vs. nanoLC-MS

- Kisméretű peptidek jobban detektálhatók CE-vel elválasztva, mert LC-n kicsi a retenciójuk (hidrofilek)

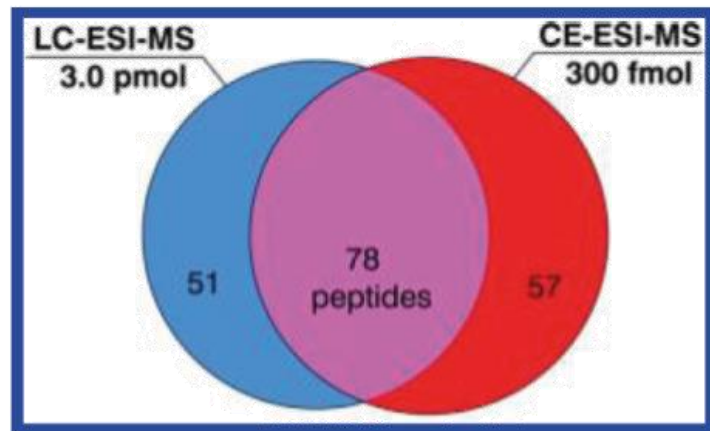


Figure 8. Venn diagram showing the overlap of histone H1 peptides identified by CE-ESI-MS and LC-ESI-MS. Data originate from Figure 6.

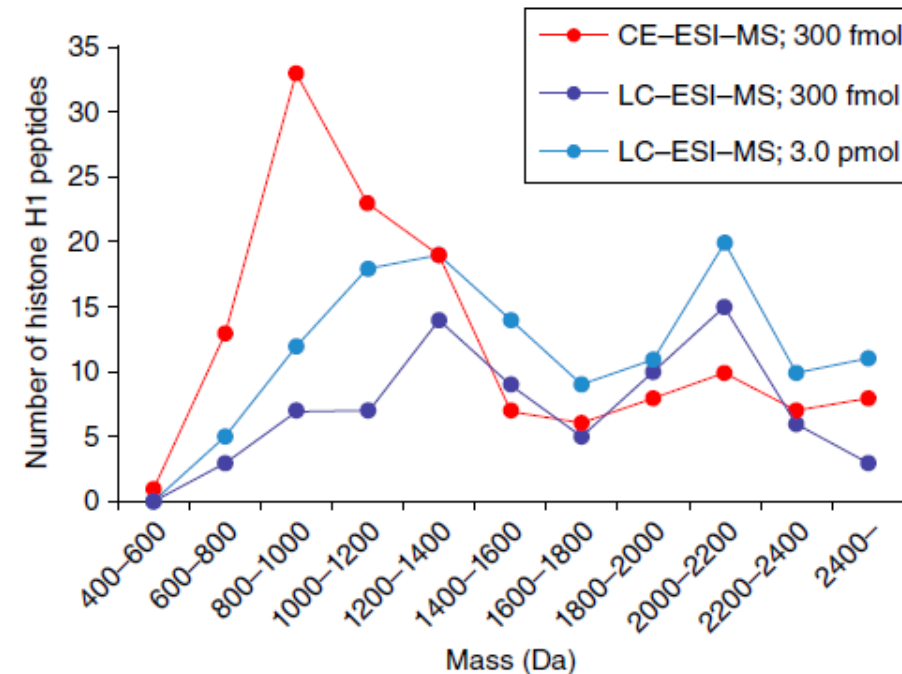


Figure 11.4 Mass distribution of histone H1 peptides identified from perchloric acid extracted from rat testis digest using CE-MS and nano-RPLC-MS. CE conditions: M7C4I-coated capillary (length, 100 cm with porous tip; i.d., 30 μm); BGE, 0.1% (v/v) formic acid; separation voltage, -25 kV; nano-RPLC-MS was performed with a homemade fritless column: packed 10 cm with 3 μm

reversed-phase C18 (Reprosil). The gradient (solvent A, 0.1% formic acid; solvent B, 0.1% formic acid in 85% acetonitrile) started at 4% B. The concentration of solvent B was increased linearly from 4% to 50% during 50 min and from 50% to 100% during 5 min. A flow rate of 250 nl min^{-1} was applied. (Reproduced from [34] with permission from American Chemical Society.)

Proteomika alapok

Intakt fehérje tömegspektrometriája

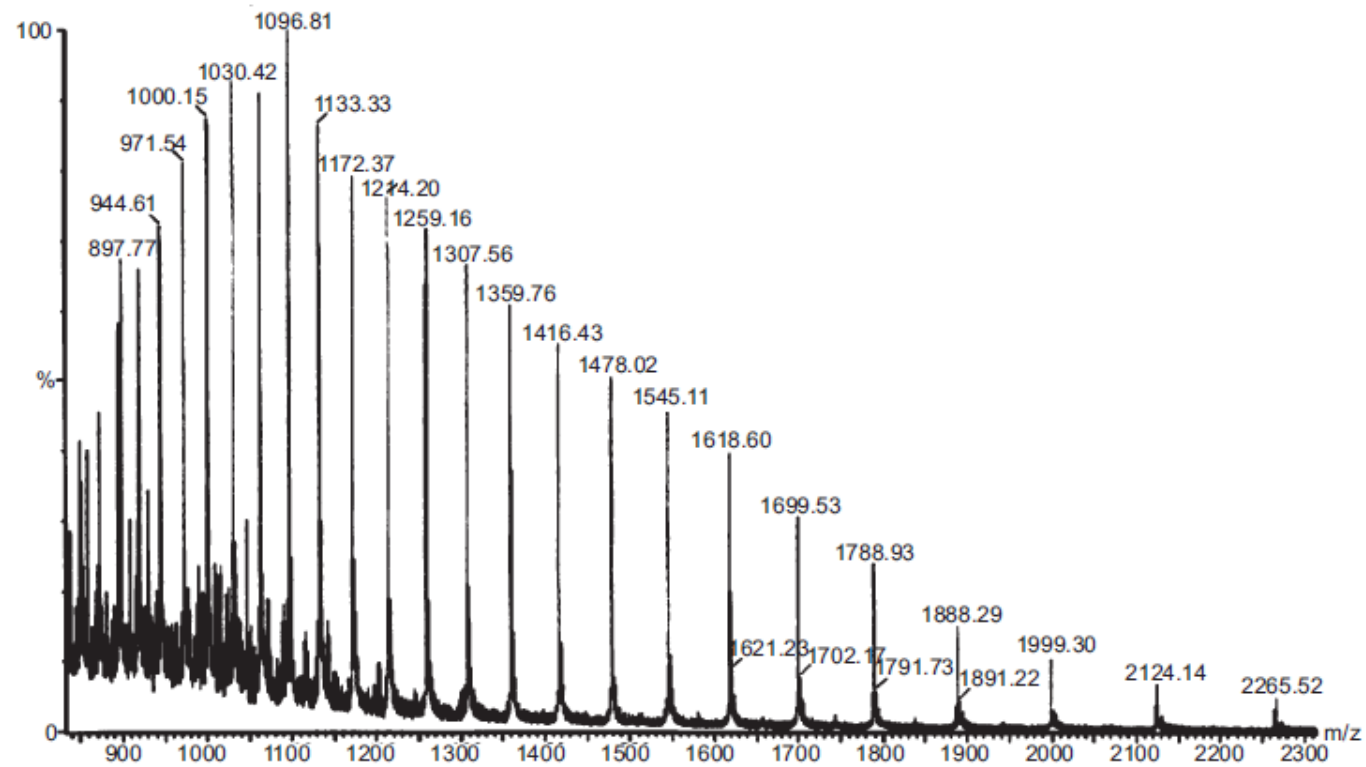


Figure 4.13: ESI spectrum of an intact protein. Courtesy: Kevin Blackburn, Molecular and Structural Biochemistry, North Carolina State University. Reproduced by permission.

Töltés és molekulatömeg kiszámítása

- Két szomszédos m/z értékére kell felírni az egyenletet (töltéskülönbségük 1), ami alapján töltés és molekulatömeg számítható

- $M(H^+) = 1,0079 \text{ Da}$

- Kisebb m/z -re: $\frac{m + (z + 1)M_{H^+}}{z + 1} = \left(\frac{m}{z}\right)_{z+1}$

- Nagyobb m/z -re: $\frac{m + zM_{H^+}}{z} = \left(\frac{m}{z}\right)_z$

$$z = \frac{\left(\frac{m}{z}\right)_{z+1} - M_{H^+}}{\left(\frac{m}{z}\right)_z - \left(\frac{m}{z}\right)_{z+1}}$$

$$m = \frac{\left[\left(\frac{m}{z}\right)_z - M_{H^+} \right] \cdot \left[\left(\frac{m}{z}\right)_{z+1} - M_{H^+} \right]}{\left(\frac{m}{z}\right)_z - \left(\frac{m}{z}\right)_{z+1}}$$

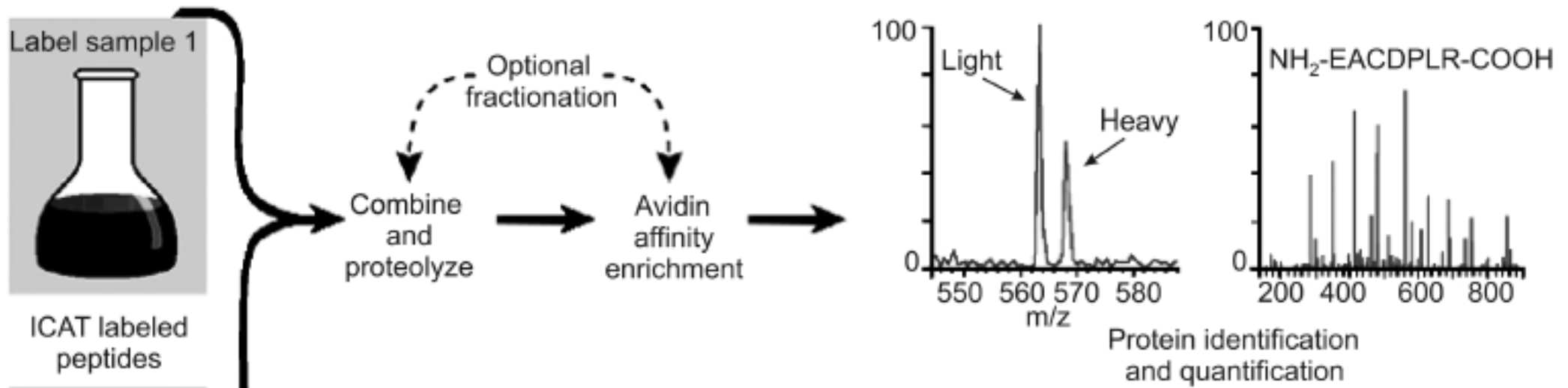
Kvantitatív proteomika – ICAT

- Isotope-coded affinity tags
- 2 elv:
 - Szomszédos aminosavak rövid szekvenciájának ismerete (5-25 aminosav) lehetővé teszi egyedi fehérjék azonosítását
 - Ha két kémiaiailag azonos, de eltérő izotópot tartalmazó jelölést alkalmazunk, akkor a jelölt molekulák elektroforetikus/kromatográfiás viselkedése megegyezik, míg az eltérő izotópok jelenléte miatt más tömegnél kaphatunk tömegcsúcsot. Ez pedig pontos kvantitálást tesz lehetővé.

ICAT lépései

- ICAT reagensek felépítése
 - Affinitás jelölő (pl. biotin) - affinitás dúsítást/izolálást tesz lehetővé jelölés után
 - Linker: stabil izotópot tartalmazza
 - Könnyű reagens (^1H -eket tartalmaz)
 - Nehéz reagens (8db ^2D -t tartalmaz)
 - Reaktív csoport –SH csoportok iránti specificitással

Könnyű
ICAT



Nehéz
ICAT

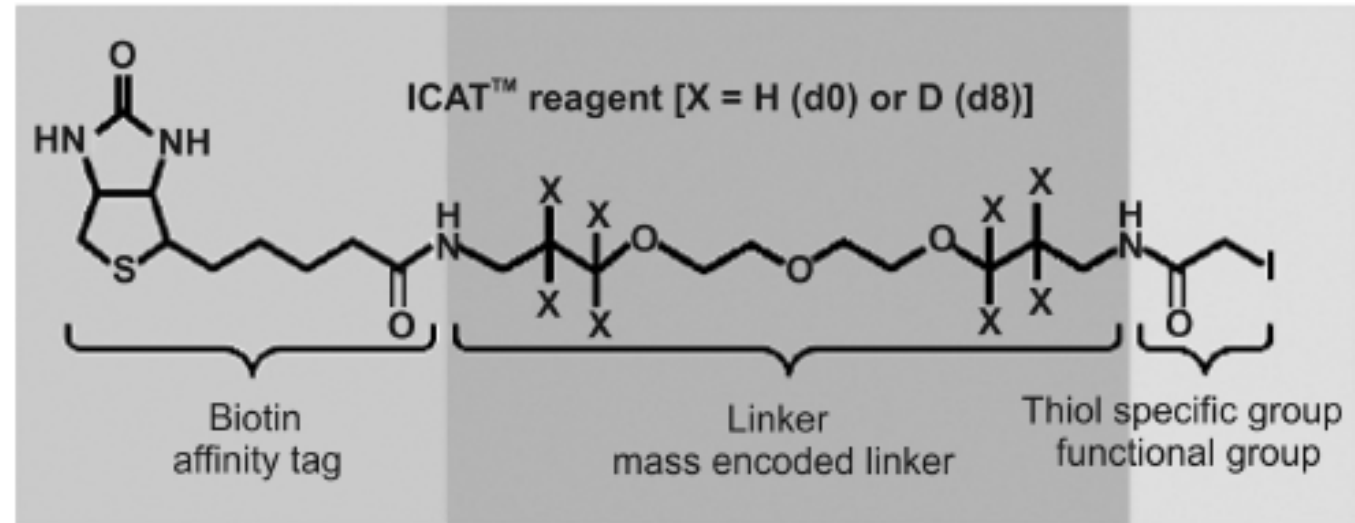


Figure 4.14: Quantitative proteomics with ICAT reagents. Source: www.imsb.ethz.ch/researchgroup/rudolfa/research. Courtesy: Ruedi Aebersold, Institute of Molecular Systems Biology, ETH Zürich. Reproduced by permission.

Kvantitatív proteomika – SILAC

- Stable isotope labeling by amino acids in cell culture
- Emlős sejtvonalak tenyésztése nem „hagyományos” aminosavakból zajlik, hanem stabil izotóp jelölésű (nem radioaktív) aminosavakból
- Pl. deuterált Leu, de ^{13}C és ^{15}N izotópok beépítése is lehetséges
- Az izotópjelölt aminosavakat tartalmazó közeg nem befolyásolja a sejtvonal növekedését
- Ezen fehérjepopulációkat kontrolhoz lehet hozzáadni, mert a jelölés „az aminosavakba van kódolva”, a jelölt/nem jelölt fehérjék aránya állandó marad
- A Leu-d0 – Leu-d3 tömegeltolódást kell követni, a csúcsok arányából lehet kvantizni

Munkafolyamat - SILAC

SILAC jelölés: sejtkultúrában, aminosavakból történő stabil izotóp jelölés

Stable isotope labeling of amino acids in cell culture (SILAC)

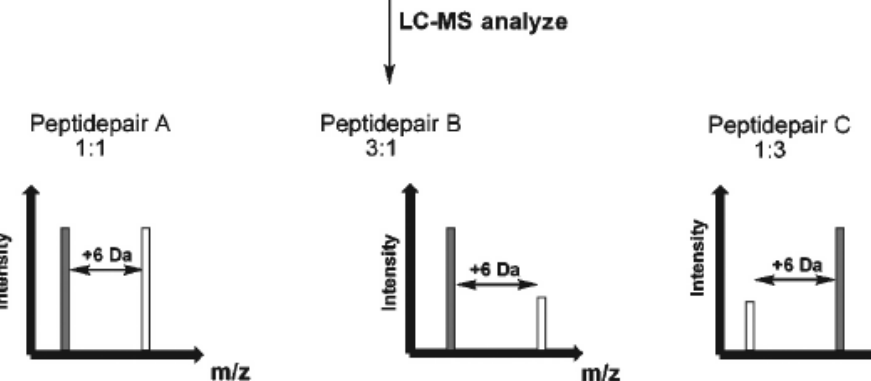
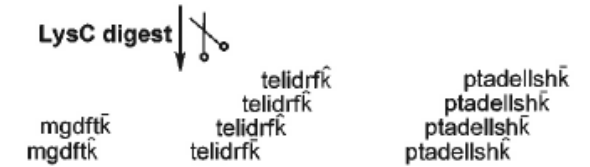
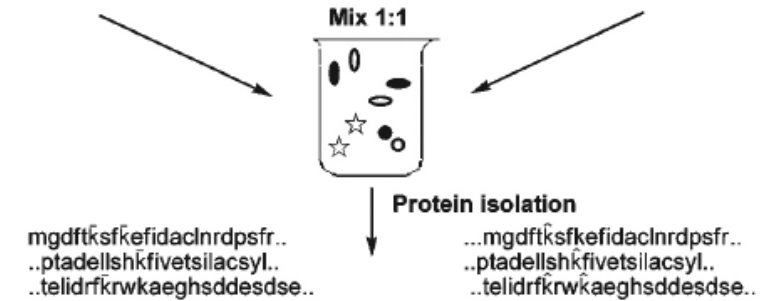
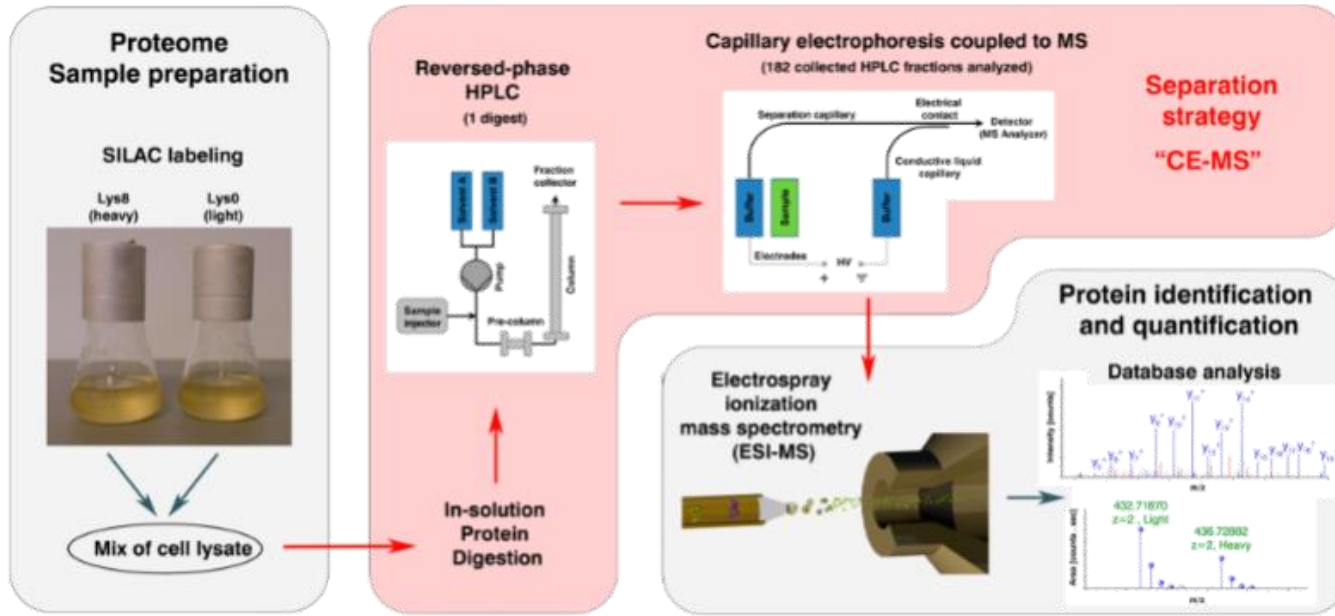
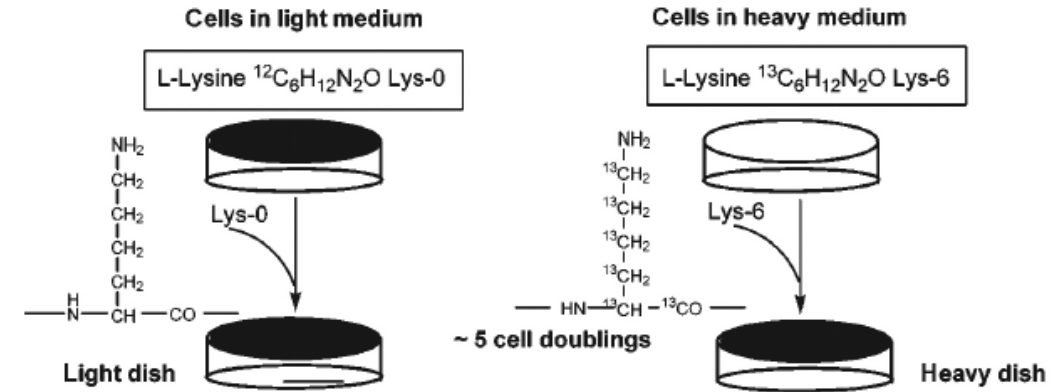


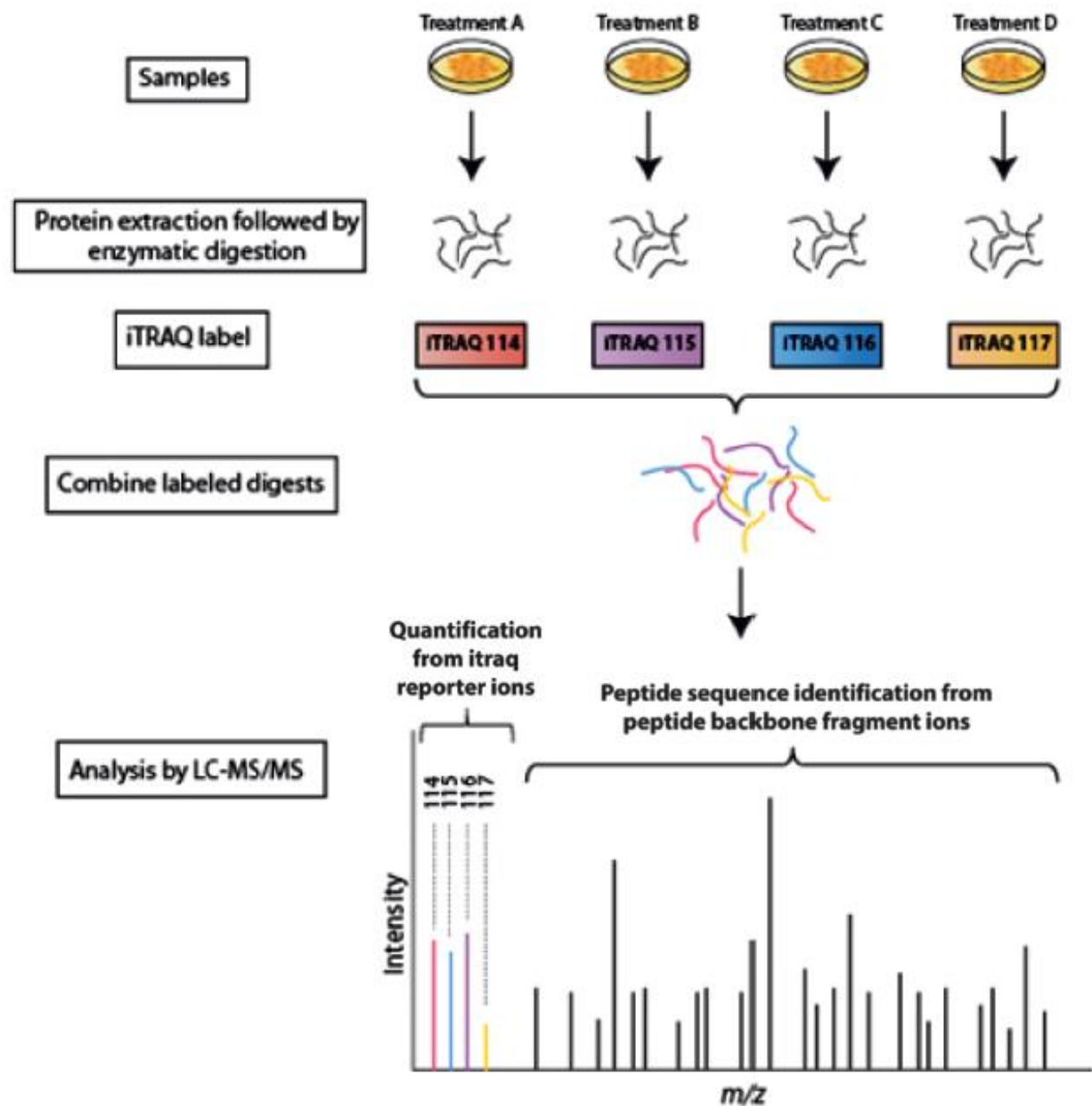
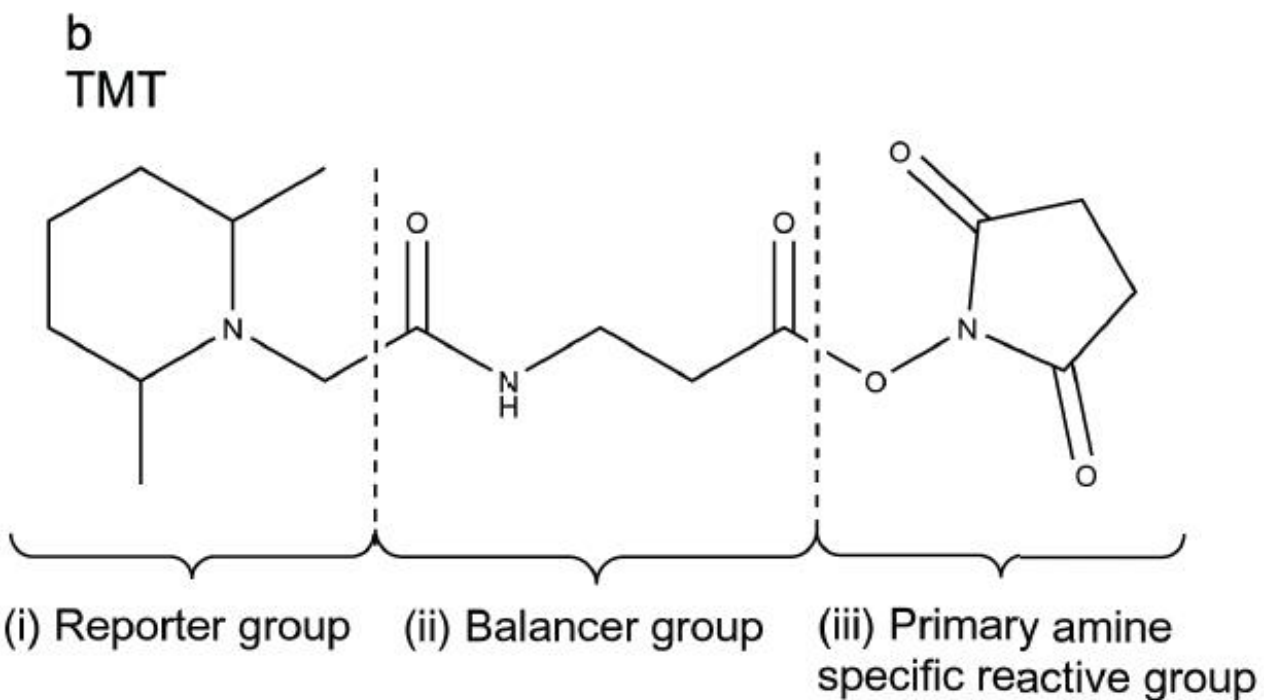
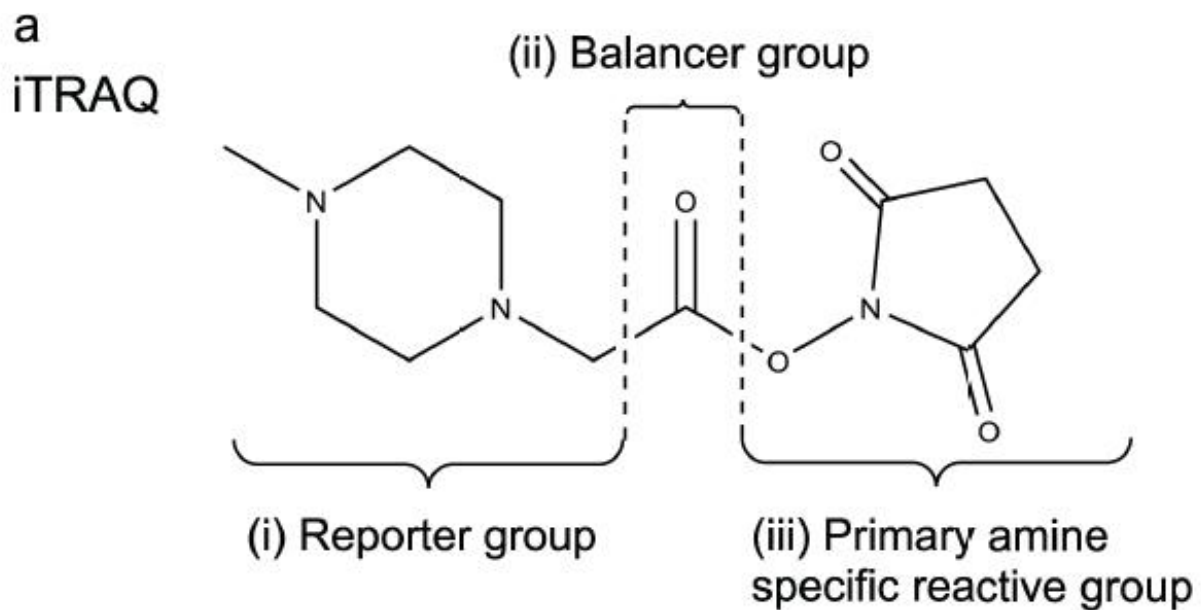
Figure 1. Proteomic workflow used to characterize SILAC labeled yeast strains. Protein extracts of two yeast strains, one heavy-lysine labeled and one normal strain, were mixed. The protein extracts were digested enzymatically, fractionated by RP-HPLC, and analyzed by capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry. This approach is referred to as "CE-MS".

Kvantitatív proteomika – iTRAQ

- Isobaric tag for relative and absolute quantitation
- Nagyszámú mintához jobb
- Munkafolyamat
 - Sejt lizálás + összfehérje meghatározás
 - redukálás – alkilálás – enzimés emésztés (puffer aminmentes – primer és szekunder aminok kvencselik az iTRAQ jelölési reakciót)
 - 70% szerves oldószerre (alkohol) való beállítás
 - **Jelölés izobár iTRAQ reagenssel** (minden mintát külön)
- CID fragmentálás: ajánlott 10-15%-kal növelni a fragmentációs energiákon a natív peptideknél alkalmazotthoz képest

iTRAQ

- Reagens felépítése
 - Reporter csoport (riporter) (pl. N-Me-piperazin, M=114, 115, 116 és 117)
 - Balance csoport (kiegyensúlyozó) (pl. M=31, 30, 29, 28)
 - Reaktív csoport (pl. N-hidroxiszukcinimid)
- Minták jelölése után összekeverik őket, majd (LC)-MS/MS analízisnek teszik ki őket
- Relatív intenzitások megkaphatók a reporter ion relatív intenzitásaiból, az MS/MS spektrumban
- Max 8 minta kombinálható a megfelelő reagenssel (8-plex iTRAQ)



Kvantitatív proteomika – TMT

- Tandem mass tag
- Hasonló az iTRAQ-hez
- Tandem: a jelölő tag-ek vizsgálata kizárólag MS/MS-sel történik
- Nincs a mintában jelöletlen peptid
- Jelölő felépítése:
 - Érzékenységnövelő csoport (sensitization group)
 - Tömegkülönbséget okozó csoport (mass differentiation group)
 - Tömeg normalizációs csoport (mass normalization group)
 - Reaktív csoport

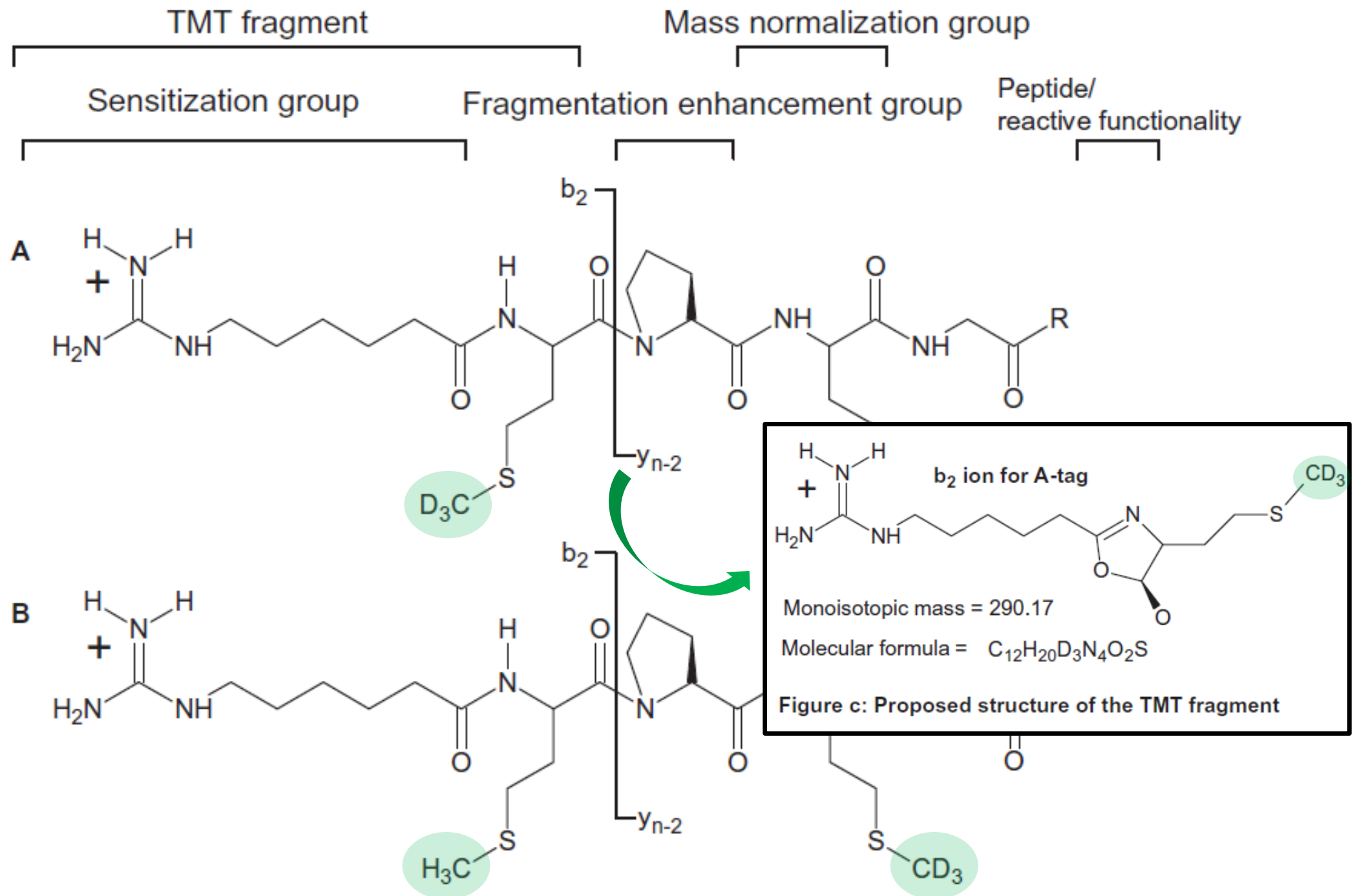


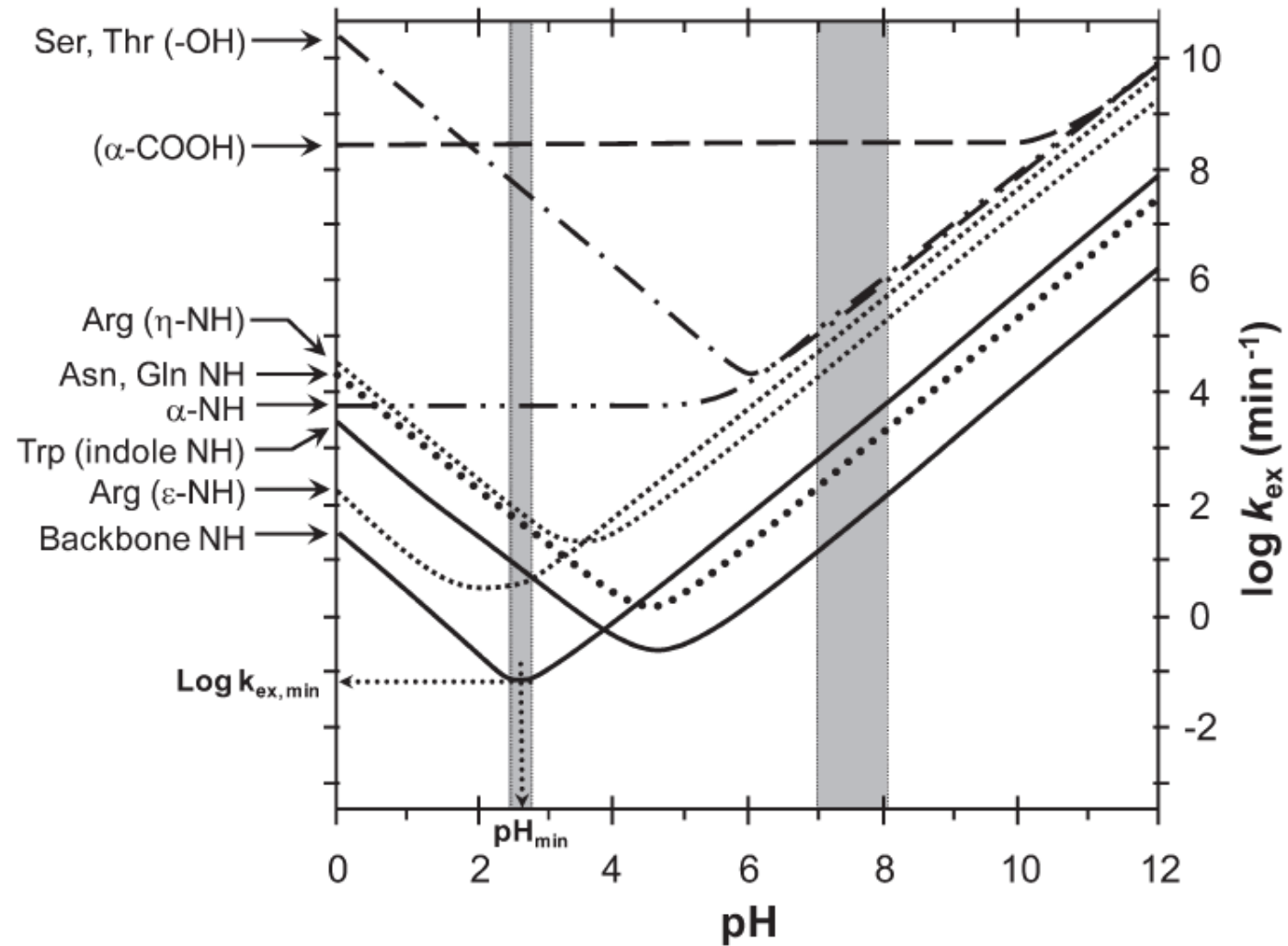
Figure b: Second generation TMT

H-D csere

- Fehérjék konformációjára lehet ezáltal következtetni
- Minél kitékertebb a fehérje szerkezete, annál több labilis proton tud lecserélődni (partner pl. D_2O , CH_3COOD vagy CH_3OD)
- A cserefolyamat visszafelé is gyors – kvencselés szükséges (savanyítás és lehűtés $0\text{ }^\circ\text{C}$ -ra)
- Emésztés ilyen körülmények között
 - Tripszin nem jöhet szóba
 - Általában pepszinnel (nem specifikus)
 - Online reaktorok, redukáló és alkilezőszerek használata elterjedtebb a jó emésztési hatékonyság végett
 - Általában időben (és eltérő T-eken) vizsgálják a H-D csere lefolyását

H-D csere

- H-D csere sebessége a pH függvényében.
- Szürke régió: az a pH, ahol a H-D csere, ill. a kvencselés történik



Poszttranszlációs módosítások

- Azonosításuk nehezebb az egyszerű peptidszekvencia megfejtésénél
- Míg egy-egy peptid nagy mennyiségben van jelen egy mintában, addig a módosított peptidek abundanciája alacsony. Fontos, hogy az MS/MS tömegspektrum minősége jó legyen
- Eltávolítandó a mintából azon enzimek, melyek PTM-t bontják vagy létrehoznak
- Legjobb a tripszin erre a célra
- Néhány PTM hidrofillé teszi a peptideket
 - C18 sómentesítés nem használható
 - Eltérő specificitású enzim használata megoldás (kimotripszin, Lys-N, endoproteináz Glu-C)

Poszttranszlációs módosítások

- PTM módosított peptidek dúsítása fontos
- De, általános dúsítási technikák nincsenek kifejlesztve. Kivétel a foszforiláció
- Nagy felbontású készülékek és minőségi fragmentáció (pl. HCD, ETD) fontos
- Kevés jól tanulmányozott proteom létezik (pl. hisztonok), de ez esetben is probléma a megfelelően hosszú peptidek generálása az emésztés során
- Legfontosabb - gyakran előforduló - PTM-ok: foszforilezés, ubikitilezés, glikozilezés, acetilezés

Peptid fragmentáció – MS/MS módszerek

- **CID**

- Ütközési cellában
 - alacsony ütközésszám, N₂ vagy Ar
 - 20-100 eV energia
- Csapdában
 - magas ütközésszám (10^4), He
 - 20-100 eV energia

- **ECD** (electron capture dissociation – elektronbefogás dissz.)

- Szabad elektronokkal kölcsönhatás – fragmentáció

- **EDD** (electron detachment dissociation)

- A kölcsönható elektron lelök e⁻-okat az ionokról

- **ETD** (electron transfer dissociation)

- Reagens aniont abszorbeálja a prekursorion, amit fragmentáció követ
- Negative ETD (NETD)

Peptidhasadás MS/MS-ben

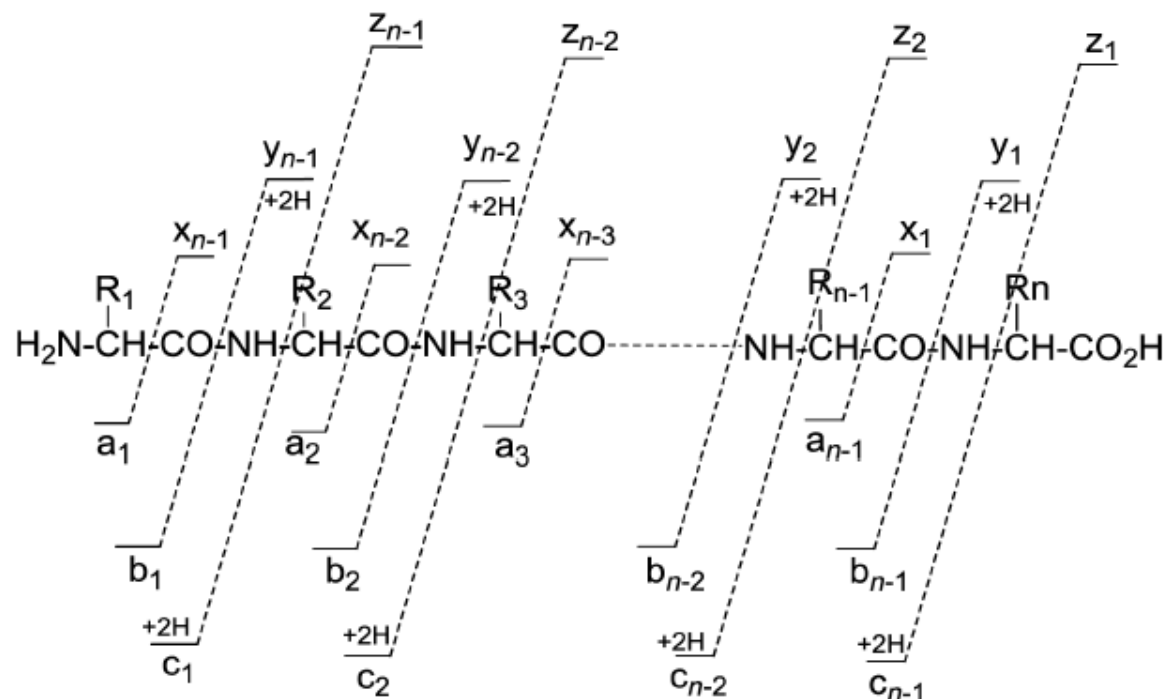
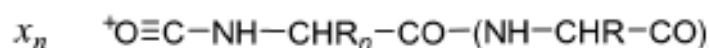
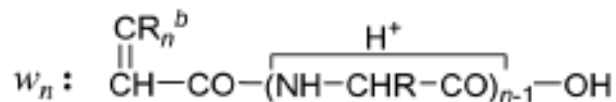
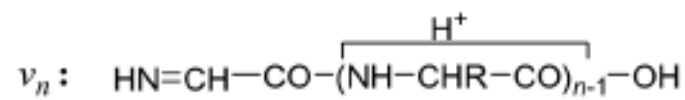
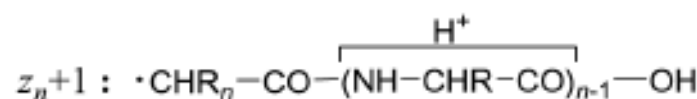
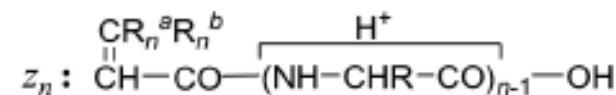
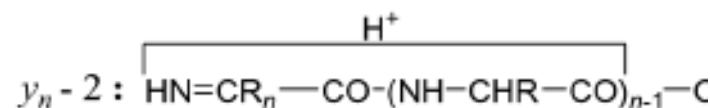
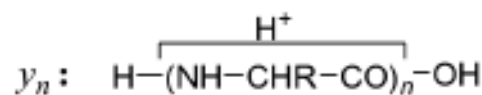
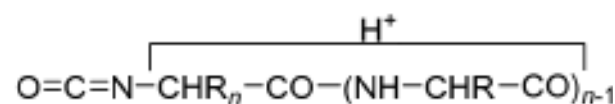


Figure 4.6: Nomenclature for peptide CID fragment ions (first proposed by Roepstorff and Fohlman,¹⁹⁶ later modified by Biemann¹⁹⁷). Typically, all of the above fragment ion types are observed in high-energy CID tandem mass spectra (although usually not in the same spectrum), but only *b*, *y*, and, less frequently, *a* and *z* fragments are observed in low-energy CID spectra.¹⁹⁹ Reproduced by permission of John Wiley & Sons, Inc. from *Mass Spectrom. Rev.*, Vol. 14, 49–73 (1995).

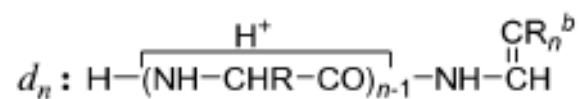
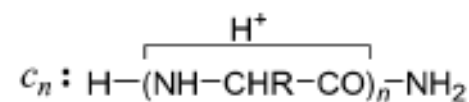
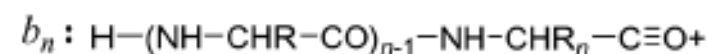
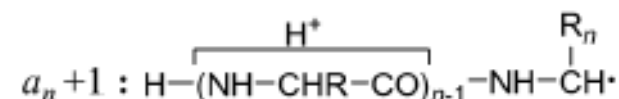
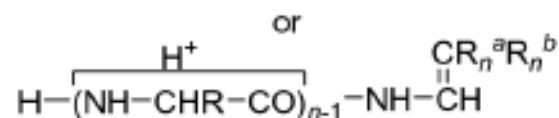
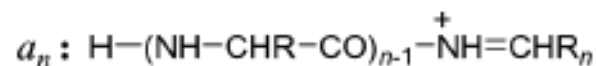
C-terminal ion types



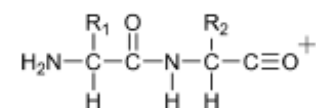
or



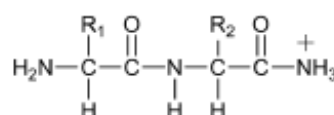
N-terminal ions



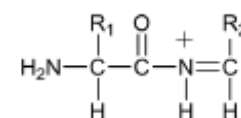
Sequence ions



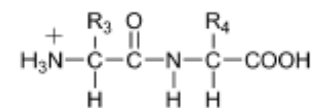
b₂



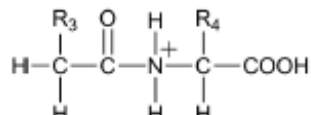
c₂



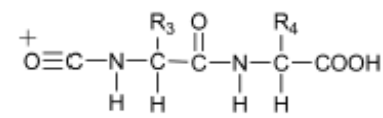
a₂



y₂

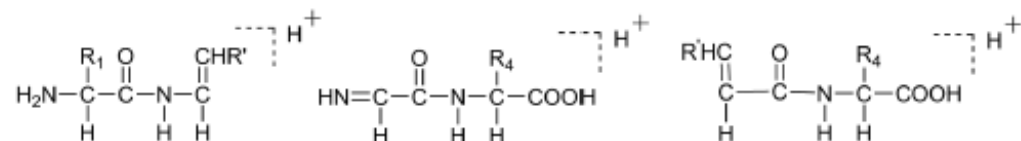


z₂



x₂

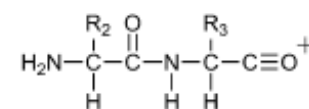
Satellite ions



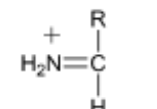
d₂

v₂

w₂



Internal ion



Immonium ion

Figure 4.7: Left: N-terminus ions; right: C-terminus ions. (R represents the chains of the amino acids; R_n^a and R_n^b are the beta substituents of the n th acid.) Reproduced by permission of Elsevier Limited from *Methods in Enzymology*, Vol. 193, Appendix 5. 1990.

Figure 4.9: Some fragment ions from a tetrapeptide. Ion types: $a \rightarrow [\text{N}]+[\text{M}]-\text{CHO}$; $b \rightarrow [\text{N}]+[\text{M}]-\text{H}$; $c \rightarrow [\text{N}]+[\text{M}]+\text{NH}_2$; $x \rightarrow [\text{C}]+[\text{M}]+\text{CO}-\text{H}$; $y \rightarrow [\text{C}]+[\text{M}]+\text{H}$; $z \rightarrow [\text{C}]+[\text{M}]-\text{NH}_2$; $a^* \rightarrow a-\text{NH}_3$; $b^* \rightarrow b-\text{NH}_3$; $y^* \rightarrow y-\text{NH}_3$; $a^\circ \rightarrow a-\text{H}_2\text{O}$; $b^\circ \rightarrow b-\text{H}_2\text{O}$; $y^\circ \rightarrow y-\text{H}_2\text{O}$; $d \rightarrow a$ -partial side chain; $v \rightarrow y$ -complete side chain; $w \rightarrow z$ -partial side chain.

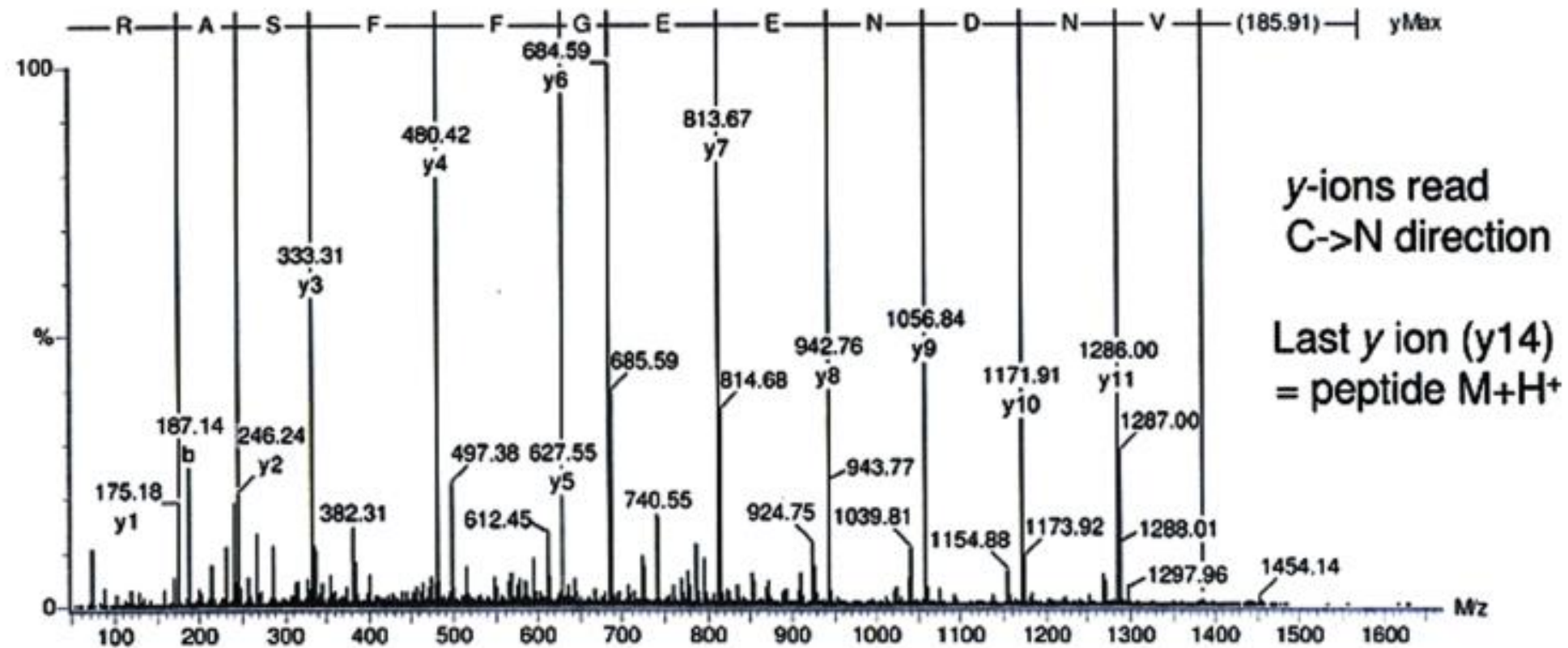
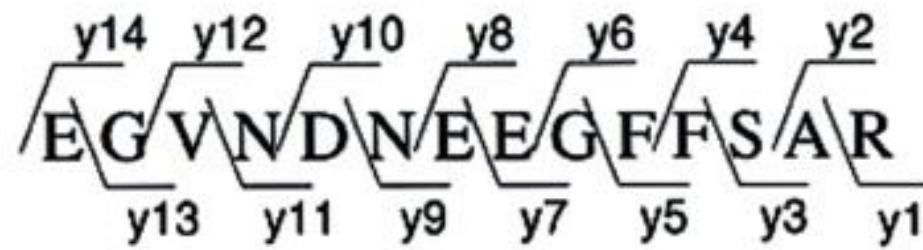


Figure 4.10: Low energy CID (Q-TOF) of doubly charged Glu-fibrinopeptide: *y*-series ions. Courtesy: Kevin Blackburn, Molecular and Structural Biochemistry, North Carolina State University. Reproduced by permission.

Manuális *de novo* szekvenálás

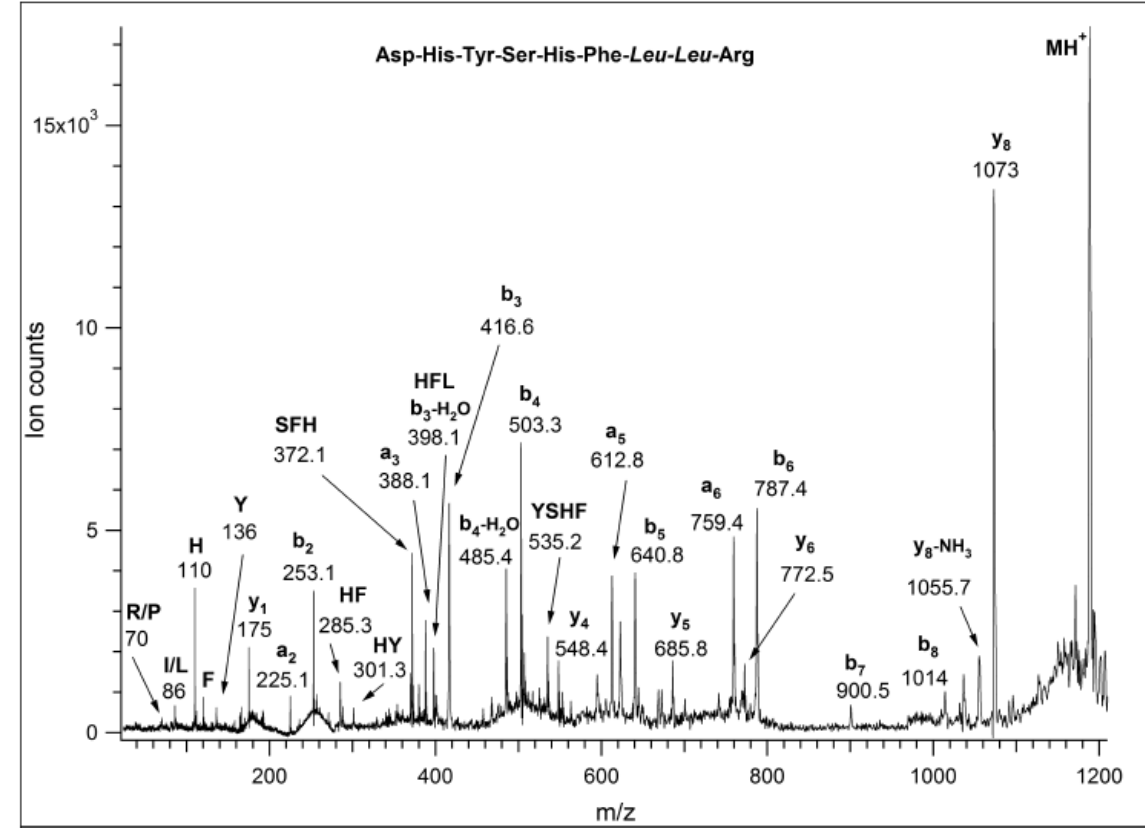
- A folyamat során a fragmentációs spektrumokból megfejtjük a fragmentált peptid aminosavsorrendjét
- CID, HCD: ált. b-, γ - és a-ionok
- ETD, ECD: ált. c-, z- és a-ionok

Manuális *de novo* szekvenálás

- Kiindulási lehetőségek:
 - Alacsony tömegnél immóniumionokat vizsgálni - milyen aminosavakból áll a peptid?
 - Tripszin - C-terminális mindig Lys vagy Arg
 - y_1 ion m/z (1^+ töltésnél) = maradékion + 19 - utalhat a C-terminális minőségére az alábbi ionok jelenléte
 - Lizin: $128,09 + 19 = 147,09$; Arginin: $156 + 19 = 175$
 - y_1 ismeretéből számítható a b_{n-1} ion tömege: $y_i + b_{n-i} = MH^+ + 1$
 - b_{n-1} ion tömege: prekursorion $(M+H)^+ - (128 \text{ vagy } 156) - 18 (H_2O)$
 - tripszines hasításnál a C-terminális bázikusabb, emiatt a b ionsorozat kevésbé abundáns, míg az y ionsorozat az
 - addig kell az y-ionok közti különbségeket keresni, míg megtaláljuk az összeset
 - végén ellenőrizendő, hogy a b-ionokkal egybevágnak-e az eredmény
 - PTM-ok befolyásolják a tömegeket (pl. karbamidometilezés Cys-eken)

Példa 1.

- $MH^+ = 1187,6$ Da (egyszeresen töltött)

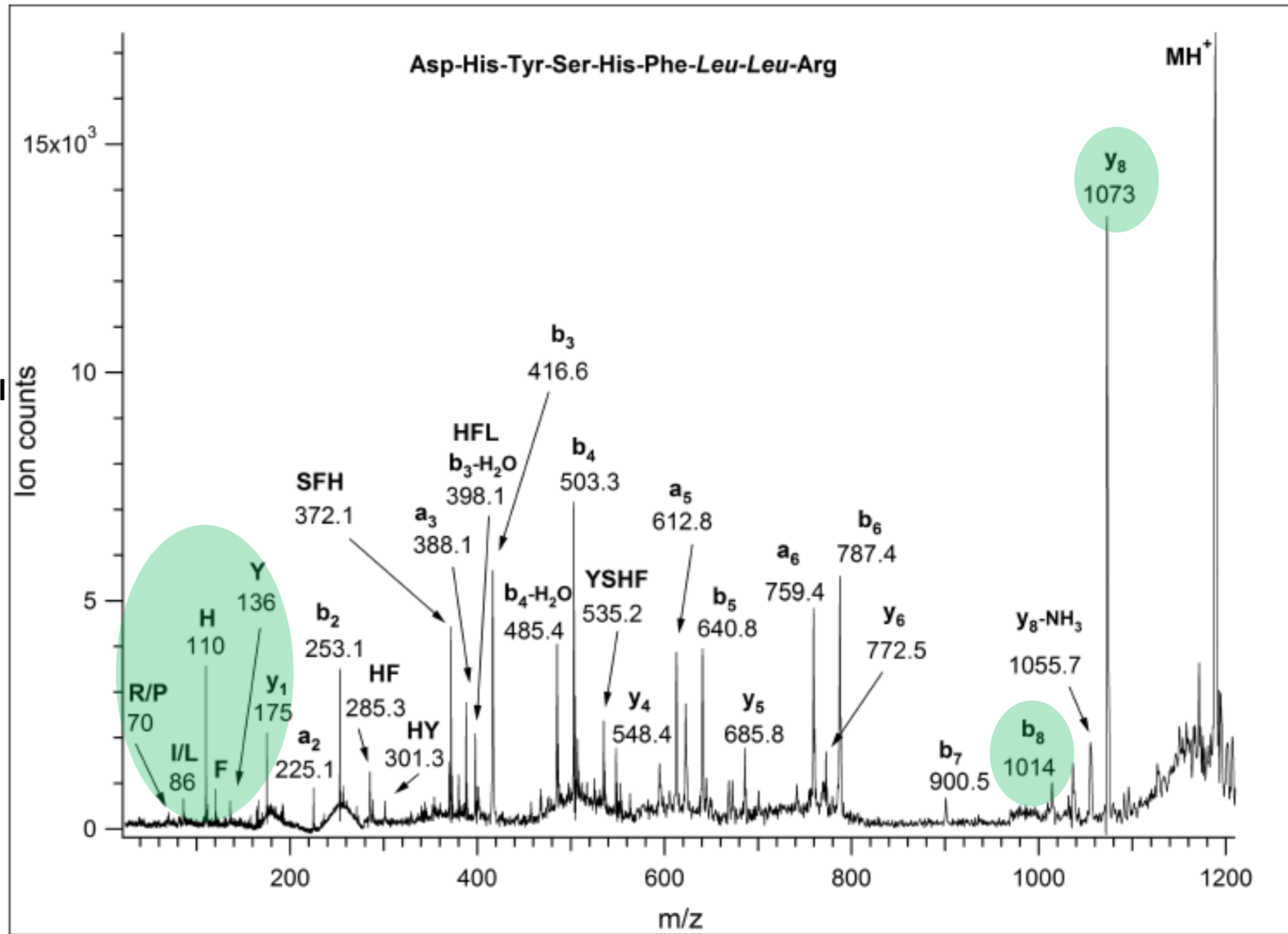


Immónium ionok
 y_1 C-terminális Arg

b_{n-1} ion: 1014

1073-nál y_{n-1} ion
115 Da vesztés a MH^+ -ból
(116 Da b_1 tömeg)
= Asp N-terminális

(Asp- -Arg)



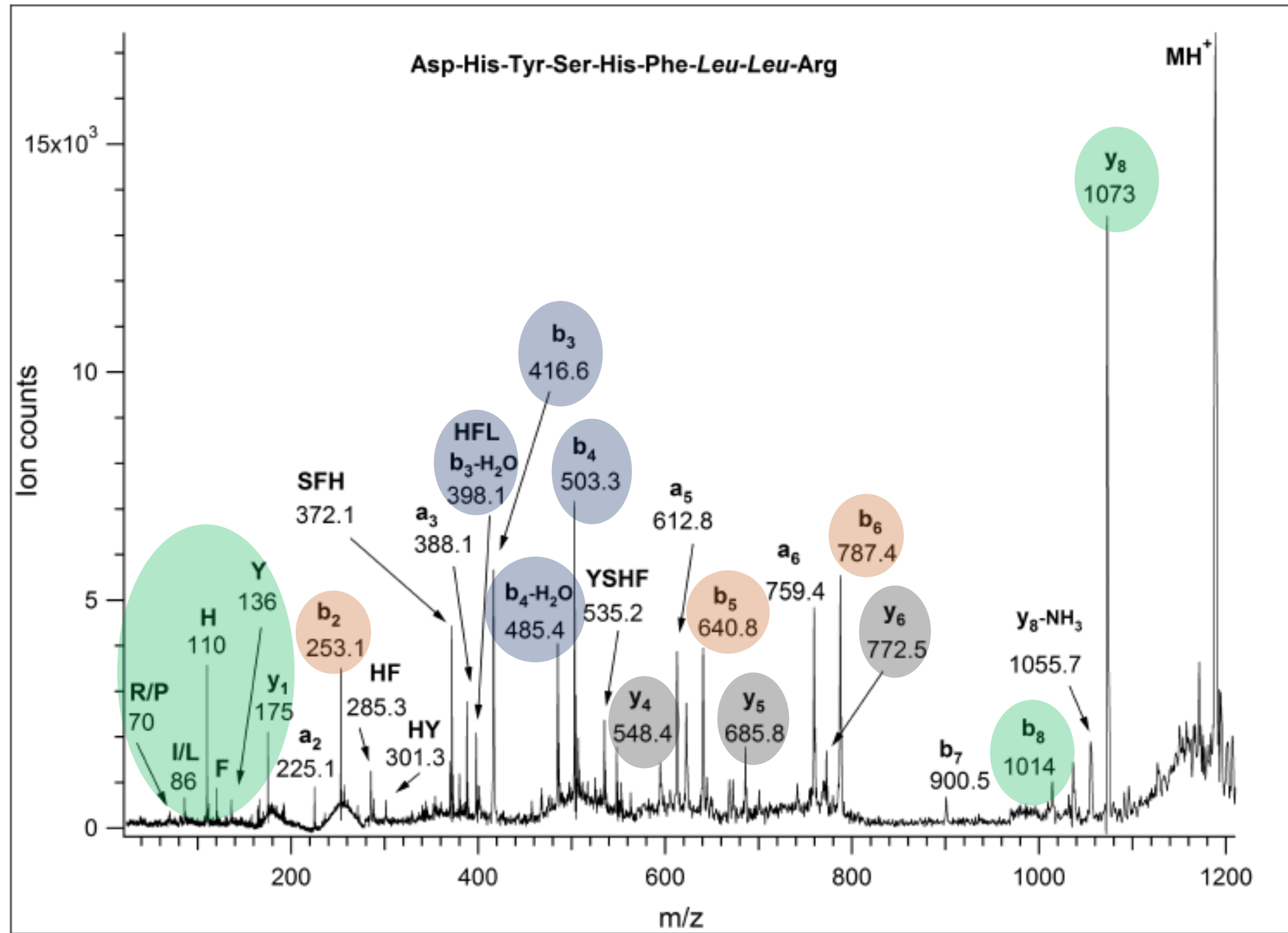
b-ionok azonosítása:
 ha H₂O-t (18) vagy CO-t (28) vesztenek

b-ionok azonosítása:
 H₂O-t (18): 503,3; 416,6
 CO-t (28): 787,4; 640,8; 253

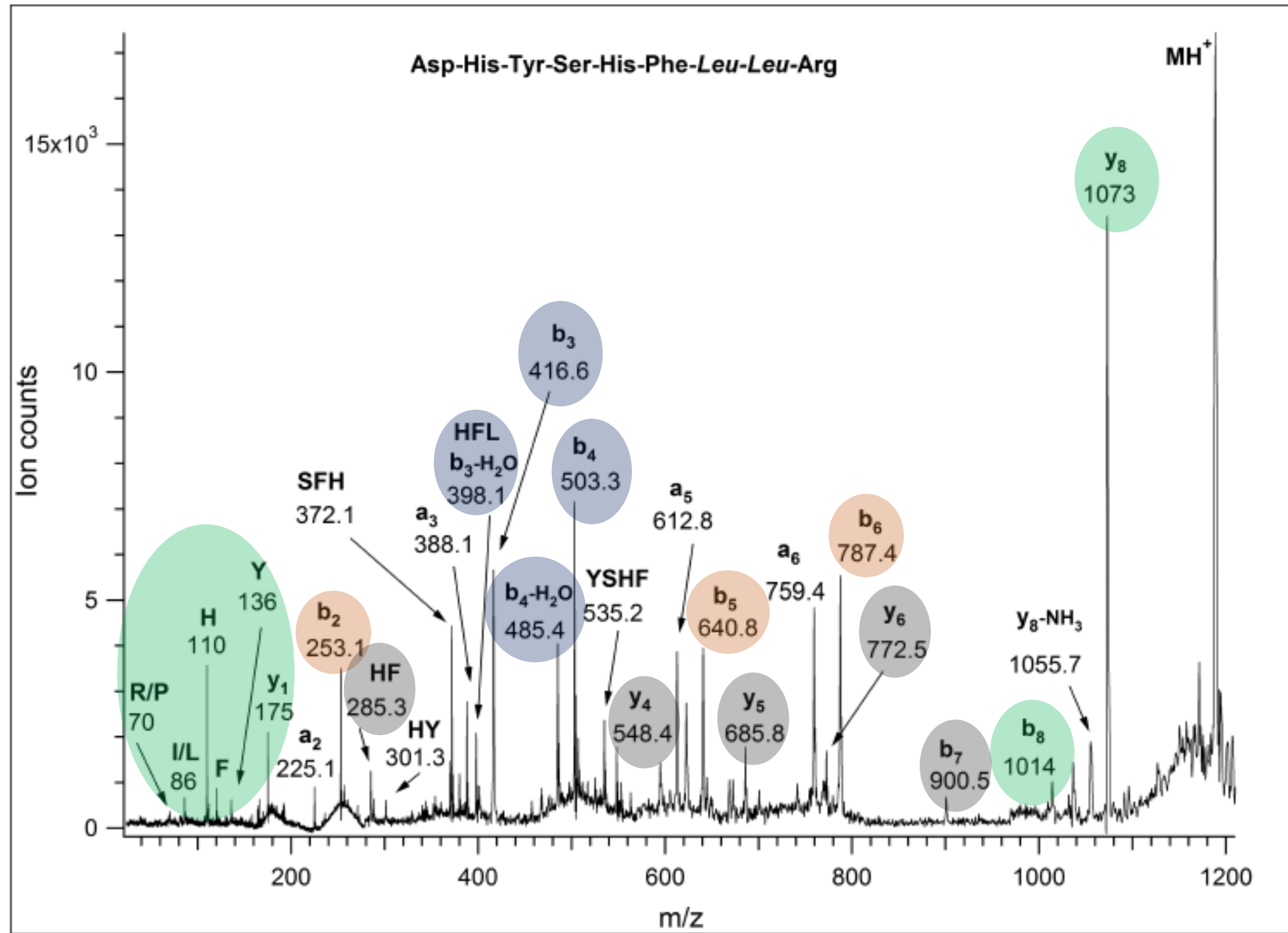
787 és 640 közti
 kül. 147 Da: Phe
 640 y párja (MH-ból) az
 548-as
 (Asp - - Phe - - Arg)

640,8 és 503,3 közti
 kül. 137 Da: Hys
 503 y párja (MH-ból) az
 685-ös
 (Asp - - Hys - Phe - - Arg)

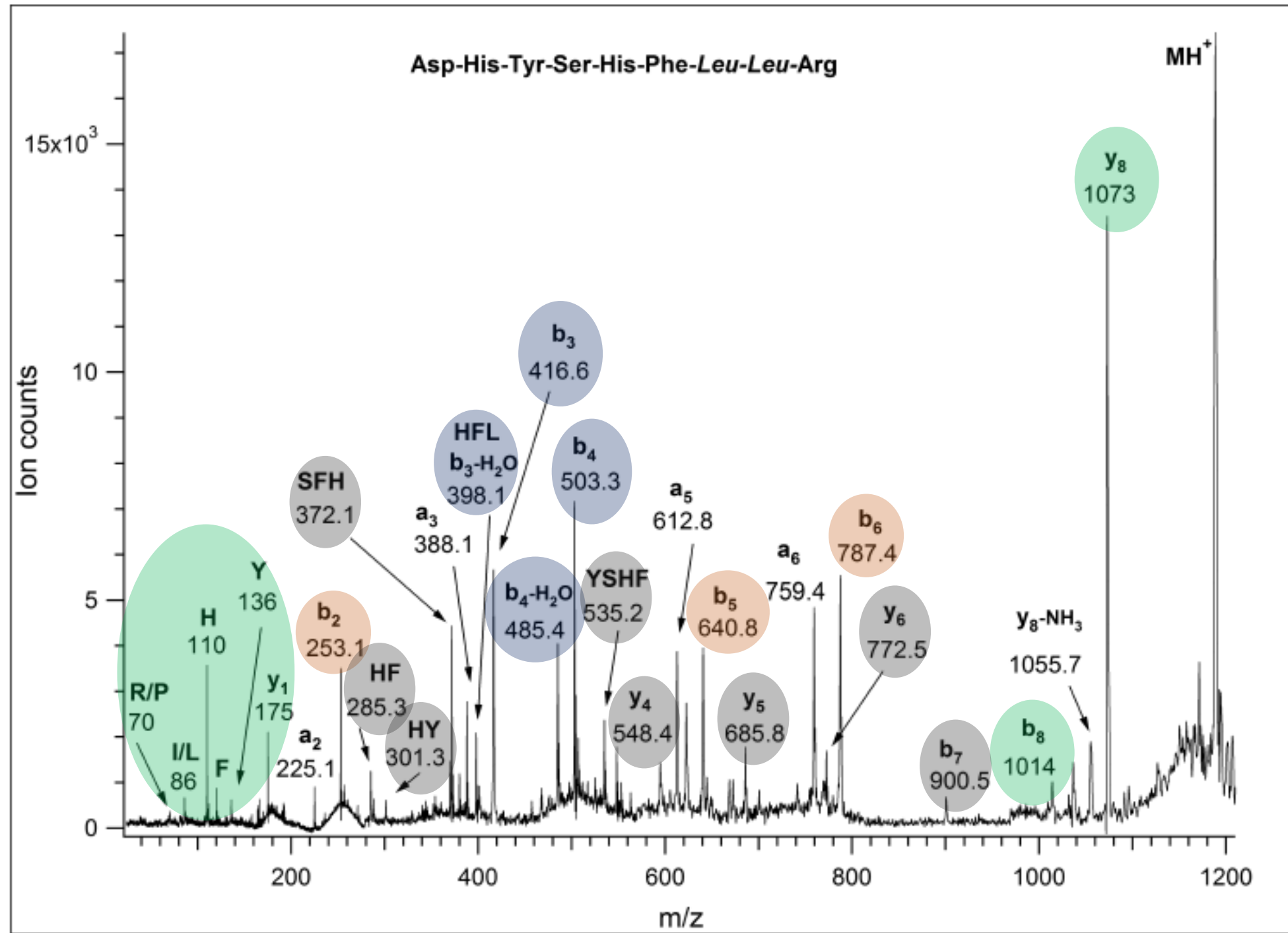
503,3 és 416,6 közti
 kül. 87 Da: Ser
 416,6 y párja (MH-ból) a
 772,3-ös
 (Asp - - Ser - Hys - Phe -
 - Arg)



416,6-ból következő lépés:
 285,3 - 131 Da kül: Met, de ez nem jelenik meg immóniumionként, ill. nincs 18 vagy 28 vesztett „párja”
 285,3 belső fragmens: Hys-Phe
 416,6-ból 253:
 163 Da kül: Tyr (Asp - - Tyr - Ser - Hys - Phe - - Arg)
 N-term: Asp, így 253 - 116 (b_1) = 137 (Hys) (Asp - Hys - Tyr - Ser - Hys - Phe - - Arg)
 MH^+ : 1187,6 - megfejtett aminosavak: 226 Da Leu/Ile-t tartalmaz (immóniumion): 113. Innen adódik, hogy a másik is 113, azaz Leu/Ile.



372,1; 301,3; 285; 535,2;
672: belső fragmensek



Manuális *de novo* szekvenálás

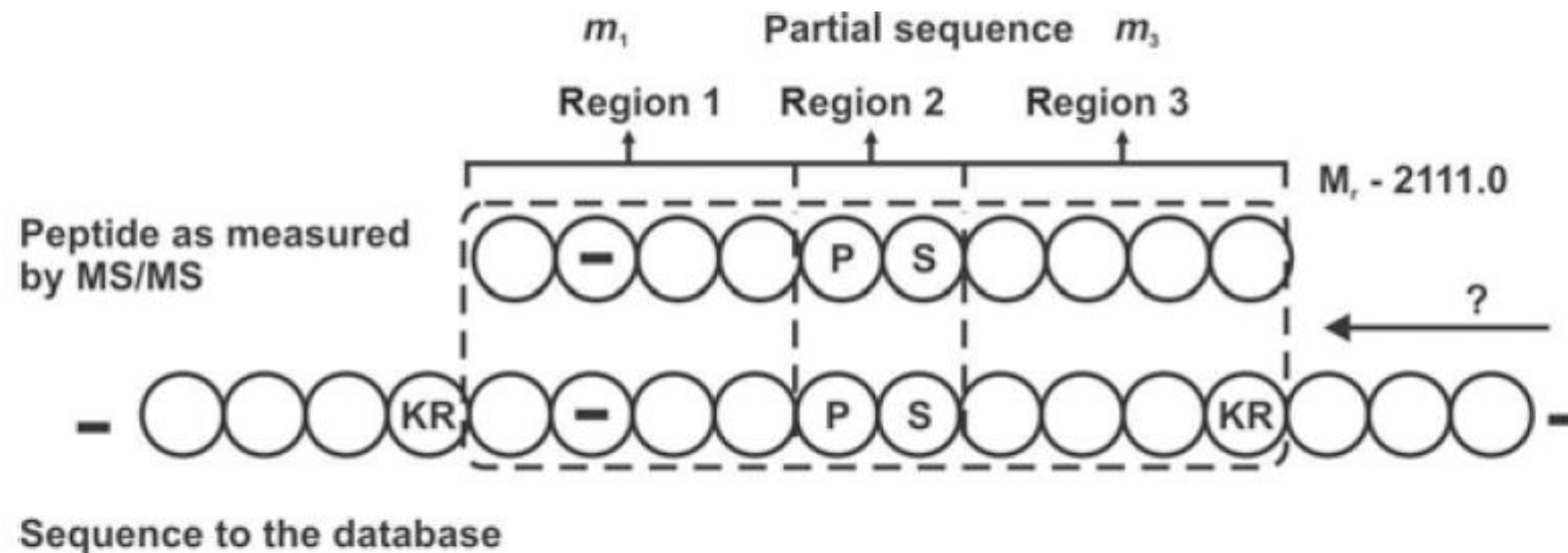
- CID: b-ionok nem jelennek meg ennyire (inkább csak kisebb tömegeknél), y-ionok abundánsabbak
- y-ionok különbségei a residue (maradék) tömegek, ezek sorban meg is adhatják a szekvencia egy részletét

MS-alapú bioinformatika - Peptid térkép vizsgálat

- Peptide mass fingerprinting - 1993 - 5 független csoport
 - nincs fragmentáció, csak a peptid tömegei kellenek az azonosításhoz
 - összes tömeget meg kell adni hozzá - ált. MALDI
 - tiszta fehérjék vagy nagyon egyszerű keverékek vizsgálatára

MS-alapú bioinformatika- Peptide sequence tag

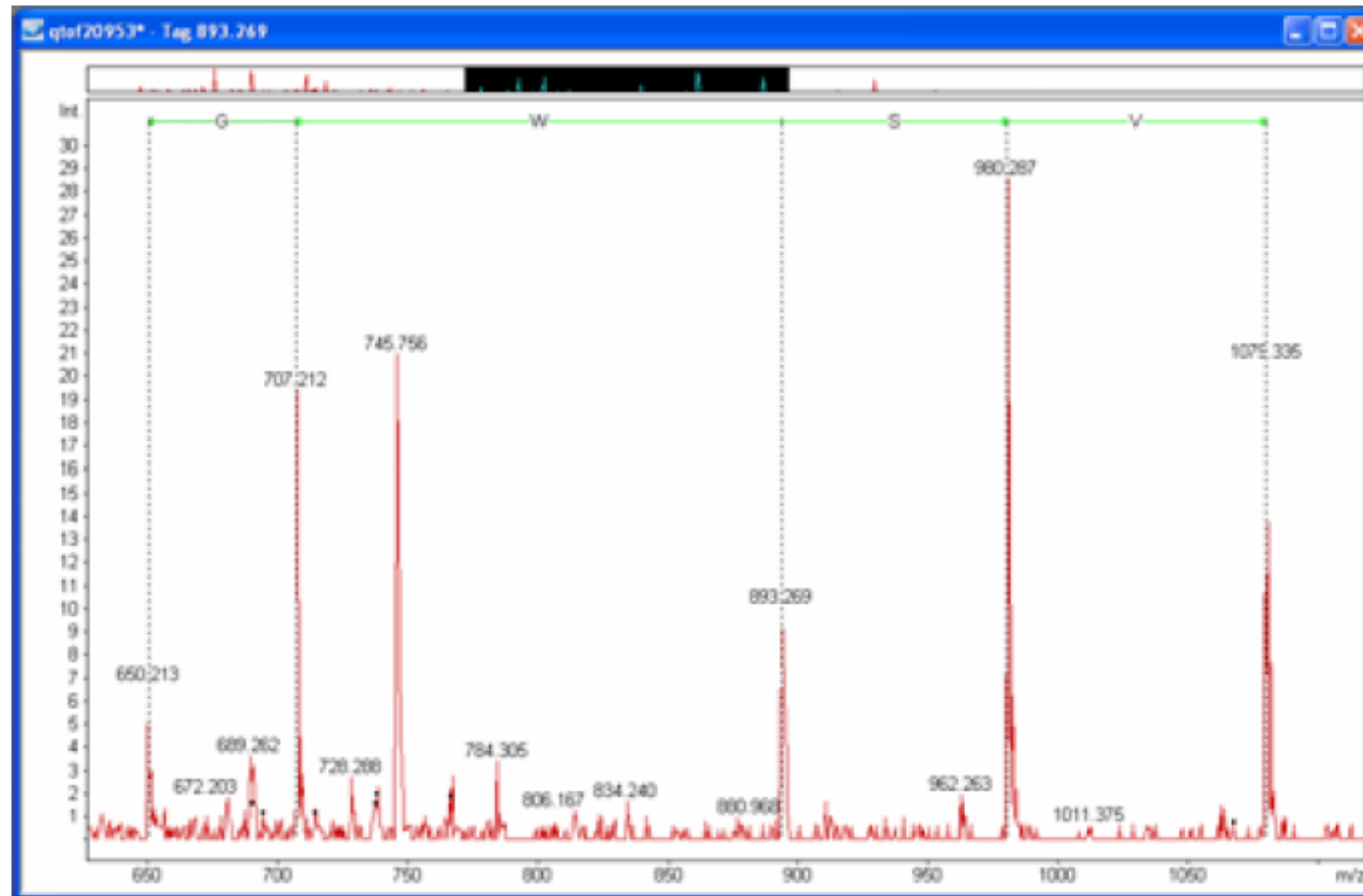
- Peptide sequence tag - Mann (EMBL Heidelberg)
 - néhány aminosavból álló szekvencia azonosítva a peptid közepén (m_2)
 - m_1 és m_3 : peptid maradéka, a szekvencia „tag” előtt és után
 - $M = m_1 + m_2 + m_3$



MS-alapú bioinformatika - Peptide sequence tag

- Peptide sequence tag
 - Feltéve, hogy b-ionokat detektálunk:
 - M-ből, ill. a mért „köztes” tömegekből kiszámítható egyszerűen m_1 és m_3
 - N- és C-terminális a tripszin hasítóhelyei legyenek
 - γ -ionok esetén hasonlóan járunk el. Az m_1 és m_3 tömegek 2 Da-nal nagyobbak, ill. kisebbek lesznek
 - PeptideSearch szoftverrel kereshető
 - InsPecT: poszttranszlációs módosítások keresése
 - Minél hosszabb a részleges szekvencia, annál specifikusabb a keresés
 - Általában a spektrumok értékelése (tag-keresés) manuálisan megy, nem alkalmas sok peptid azonosítására nagyszámú fehérjékből
 - Gyors keresés (tag egyfajta szűrő), jó tag esetén elég valószínű a jó találat

MS-alapú bioinformatika



1489.430 tag(650.213,GWSV,1079.335)

MS-alapú bioinformatika - MS/MS ion keresés

- MS/MS tömegspektrumokat kell hozzárendelni egy peptidszekvenciához a lehető legrövidebb idő alatt
- Lassú lehet - pl. no enzyme, több variábilis módosítás, nagyméretű adatbázis/adatfájl
- Valójában peptideket azonosít, nem fehérjéket
- Ez a módszer alkalmas PTM keresésre

MS-alapú bioinformatika - MS/MS ion keresés

- SEQUEST - Yates group
 - az algoritmus egy MS/MS tömegspektrumhoz rendel egy peptidszekvenciát
- MASCOT
 - online server: ingyenes keresés
 - MASCOT Server: licenszhez kötött
 - Distiller: egyszerűsített felületen kereshetők a nyers (LC)-MS/MS adatfájlok
- PEAKS DB
 - de novo szekvenálást alkalmaz

MS-alapú bioinformatika - MS/MS ion keresés

- X! Tandem
 - automatikus PTM keresés, de csak olyan peptideken, amiket már korábban azonosított
- OMSSA, OMSSAPercolator
 - az MS/MS csúcsokat összeveti egy adatbázis *in silico* emésztett csúcsaival
- Scaffold
 - találati valószínűségek pontosabb megadása
- Fizetős: Mascot, Sequest, Phenyx, SpectrumMill, IdentityE, Byonic
- Ingyenes: X!Tandem, OMSSA, MS-Amanda, MS-GF+, MaxQuant

MS-alapú bioinformatika - DDA vs DIA

- Data dependent acquisition (DDA) vs. Data independent acquisition (DIA)
 - DIA: adott m/z tartomány összes ionja fragmentálódik és detektálódik egy második fázisban
 - nem kell tudni tömegeket, nincs előre kiválasztás
 - pl. MS^E, ARM (all reaction monitoring), AIF (all ion fragmentation), SWATH-MS
 - DDA: egy rögzített számú prekursorion fragmentálódik csak és detektálódik a második fázisban
 - pl. AutoMS, SRM, MRM
 - Az MS/MS spektrumokat a mérés után *de novo* szekvenálással, vagy újabban algoritmusokkal (pl. MASCOT, SEQUEST, Andromeda) végzik
 - Kis koncentrációjú (pl. PT módosított) peptidek detektálása nem feltétlenül valósul meg

MS-alapú bioinformatika

- Targeted (célzott) analízis
 - specifikus ion átmenetek monitorozása
 - Pl. precursor ion scanning (PIS)
 - QqQ készülék 3. kvandrupól egy adott semleges vesztesre van állítva - 79 Da foszforiláció vizsgálatánál
 - Ha ez a fragmens megjelenik, akkor tuti, hogy a fragmentált peptid amiből származott foszfopeptid
- MRM/SRM
 - MRMAid vagy Skyline szoftverek segíthetnek kiválasztani a mérésekhez használható MRM átmeneteket adott fehérjék vizsgálatához

PTM vizsgálat

- Leggyakoribbak: foszforilezés, metilezés, ubikvitinálás, glikozilálás
- összesen több mint 200 fajta PTM
- bottom-up megközelítéssel szokás vizsgálni
- Számítási nehézségek: legtöbb program (kivéve pl. Byonic) maximálja a variábilis PTM-ok számát 3-ban
- UNIMOD: PTM-ok adatbázisa

PTM vizsgálat

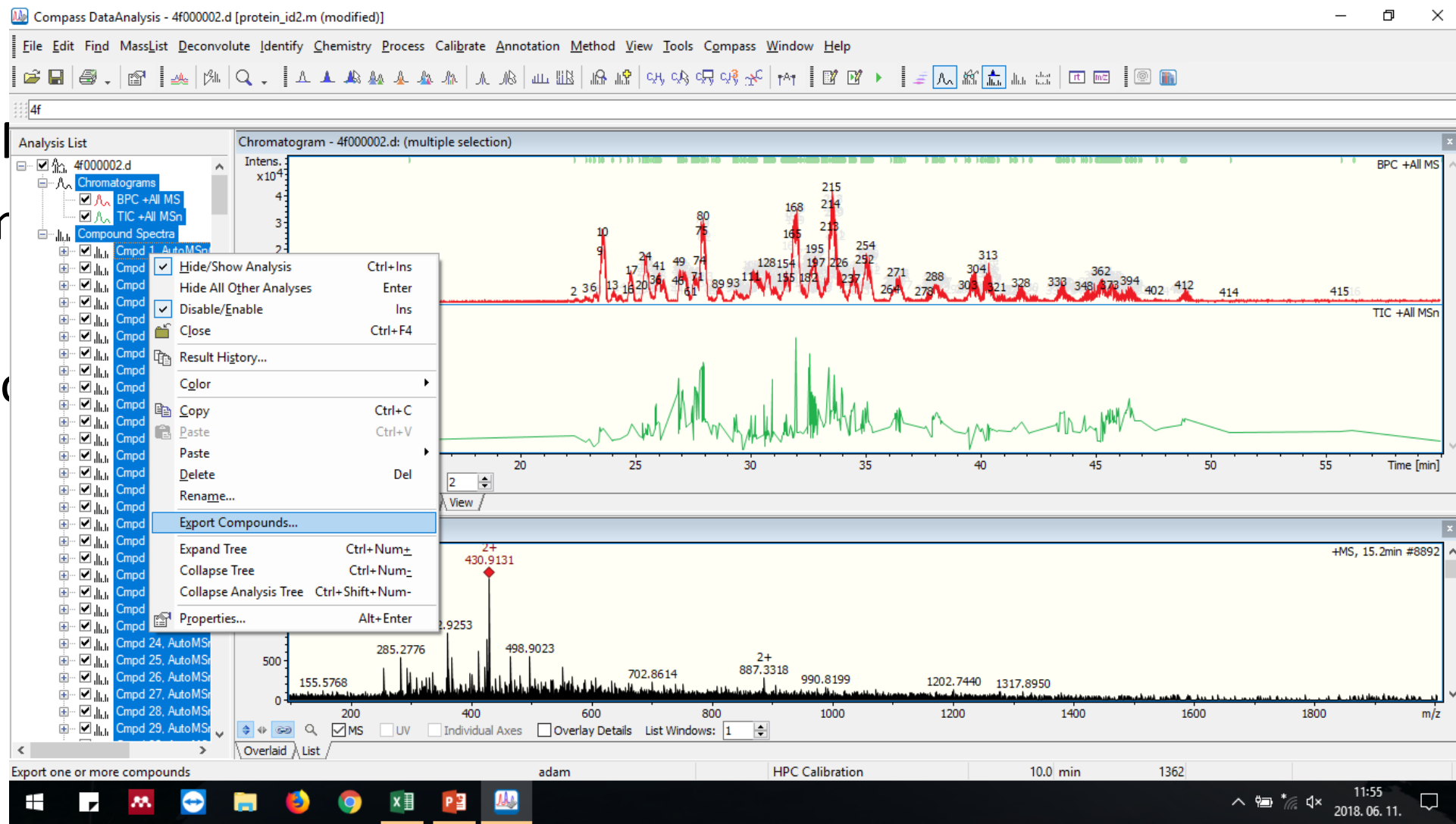
- MS detektálásuk:
 - globális módszer vagy célzott (targeted) módszer
 - első körben tisztázni kell milyen PTM-t akarunk vizsgálni
 - ez egy tömegkülönbséget/eltolódást okozhat a tömegspektrumokban
 - Pl. ubikvitinált fehérjék - tripszines emésztés - ubikvitinezett lizinhez 2 Gly fog kapcsolódni (K-GG), ami MS/MS-sel azonosítható
 - Pl. foszforilezett fehérjék - dúsítás SCX/IMAC oszlopokon (immobilizált fém-affinitás oszlop)
- Mivel a sok variábilis PTM a keresés időtartamát növeli jelentősen, emiatt egy általános - gyors - keresés után érdemes az adott fehérjetalálattal lefuttatni újra a keresést sok PTM-mel.

Gyakorlati megvalósítás - Peak picking

- Csúcslista fájl generálása (100 kB - néhány MB) akár több GB méretű LC- vagy CE-MS/MS analízisből
- Adatok hatékony redukálása fontos
 - részben mérési paraméterekkel szabályozható,
 - ill. peak picking paraméterekkel
 - Pl. kidobhatóak a 700 Da (nem m/z) alatti prekurzorokból származó, vagy kevés csúcsot (<10) tartalmazó MS/MS spektrumok
 - Csúcsok időtartományában érdemes a keresést futtatni

Peak picking - DataAnalysis

- Calibration
- Finding Auto
- Generating m
- Deconvolute
- Export compo



M00111

Too many peptide masses in your data file. Mascot has no limit, but this system has been configured to have a limit of [number] for [number] searches

Further help:

There is a limit to the number of peptide masses allowed. Are you entering ms-ms data into a pmf form? The maximum number of queries is set by adding a value 'MaxQueries' into the options section of the mascot.dat file. If no value is specified, then the default of 10,000 is used. On the Matrix Science public web site, the limit is **1200**

Actions:

- Show message to end user
- Terminate search
- Message put into errorlog.txt file
- Message not put into monitor.log file
- Message not emailed to the Mascot administrator
- Message not put into the search results file

Keresés - MASCOT

- Fix módosítások - nem növelik a számítási időt
- Variábilis (lehetséges) módosítások - drasztikusan növelik a számítási időt. PTM-ok keresésének elterjedt módja
- Tömeghiba megadása pontosan
- Enzim megadása: ált. tripszin - no enzim növeli a keresés idejét
- Adatbázisok:
 - legjobbak: NCBI nr, UniRef100, MSDB
 - legjobban annotált: SwissProt - de ez kevésbé alkalmas adatbáziskeresésekre (non-redundant - pontosan a benne szereplő szekvenciának kell megjelennie)
 - legnagyobb: EST



Access Mascot Server

You are welcome to submit searches to this free Mascot Server. Searches of MS/MS data are limited to 1200 spectra and some functions, such as no enzyme searches, are unavailable. Automated searching of batches of files is not permitted. If you want to automate search submission, perform large searches, search additional sequence databases, or customise the modifications, quantitation methods, etc., you'll need to license your own, in-house copy of Mascot Server.

Peptide Mass Fingerprint

The experimental data are a list of peptide mass values from the digestion of a protein by a specific enzyme such as trypsin.

[Perform search](#) | [Example of results report](#) | [Tutorial](#)

Sequence Query

One or more peptide mass values associated with information such as partial or ambiguous sequence strings, amino acid composition information, MS/MS fragment ion masses, etc. A super-set of a sequence tag query.

[Perform search](#) | [Example of results report](#) | [More information](#)

MS/MS Ions Search

Identification based on raw MS/MS data from one or more peptides.

[Perform search](#) | [Example of results report](#) | [Tutorial](#)

More info

- > [Mascot overview](#)
- > [Search parameter reference](#)
- > [Data file format](#)
- > [Results report overview](#)



MASCOT MS/MS Ions Search

Your name	<input type="text" value="Adam Kecskemeti"/>	Email	<input type="text" value="toprongyos@gmail.com"/>
Search title	<input type="text"/>		
Database(s)	<input type="text" value="SwissProt (AA)"/>	<input type="button" value="v"/>	<input type="button" value="^"/>
			<ul style="list-style-type: none">Amino acid (AA)contaminantscRAPNCBIprotNucleic acid (NA)Environmental_ESTFungi_ESTHuman_ESTInvertebrates_ESTMammals_EST
Taxonomy	<input type="text" value="All entries"/>		
Enzyme	<input type="text" value="Trypsin"/>	Allow up to	<input type="text" value="1"/> missed cleavages
Quantitation	<input type="text" value="None"/>		
Fixed modifications	<input type="text" value="-- none selected --"/>	<input type="button" value="v"/>	<input type="button" value="^"/>
			<ul style="list-style-type: none">Acetyl (K)Acetyl (N-term)Acetyl (Protein N-term)Amidated (C-term)Amidated (Protein C-term)Ammonia-loss (N-term C)Carbamidomethyl (N-term)Carbamyl (K)Carbamyl (N-term)Carboxymethyl (C)Cation:Na (C-term)
	<input type="checkbox"/> Display all modifications		
Variable modifications	<input type="text" value="Carbamidomethyl (C)"/>	<input type="button" value="v"/>	<input type="button" value="^"/>
Peptide tol.	<input type="text" value="0.3"/> Da	<input type="text" value="# 13C 0"/>	MS/MS tol. <input type="text" value="0.3"/> Da
Peptide charge	<input type="text" value="1+, 2+ and 3+"/>		Monoisotopic <input checked="" type="radio"/> Average <input type="radio"/>
Data file	<input type="text" value="Fájl kiválasztása"/> p4.mgf		
Data format	<input type="text" value="Mascot generic"/>		
Instrument	<input type="text" value="ESI-QUAD-TOF"/>		
Decoy	<input type="checkbox"/>		
	<input type="button" value="Start Search ..."/>		<input type="button" value="Reset Form"/>

Validálás

- Decoy adatbázis: minden más keresési paraméter megegyezik, a szekvenciák meg vannak fordítva vagy össze vannak keverve benne
- Decoy adatbázisból arra számítasz, hogy nem lesz találat

Keresés megghiúsulásának okai

- Gyenge minőségű adatok
- Prekurzor töltésének rossz meghatározása
- Proton helyett Na-mal repül
- Alulbecsült tömeghiba
- Szekvencia nincs benne az adatbázisban
- Meg nem adott PTM
- Enzim specificitás nem stimmel - szennyező proteázok jelenléte