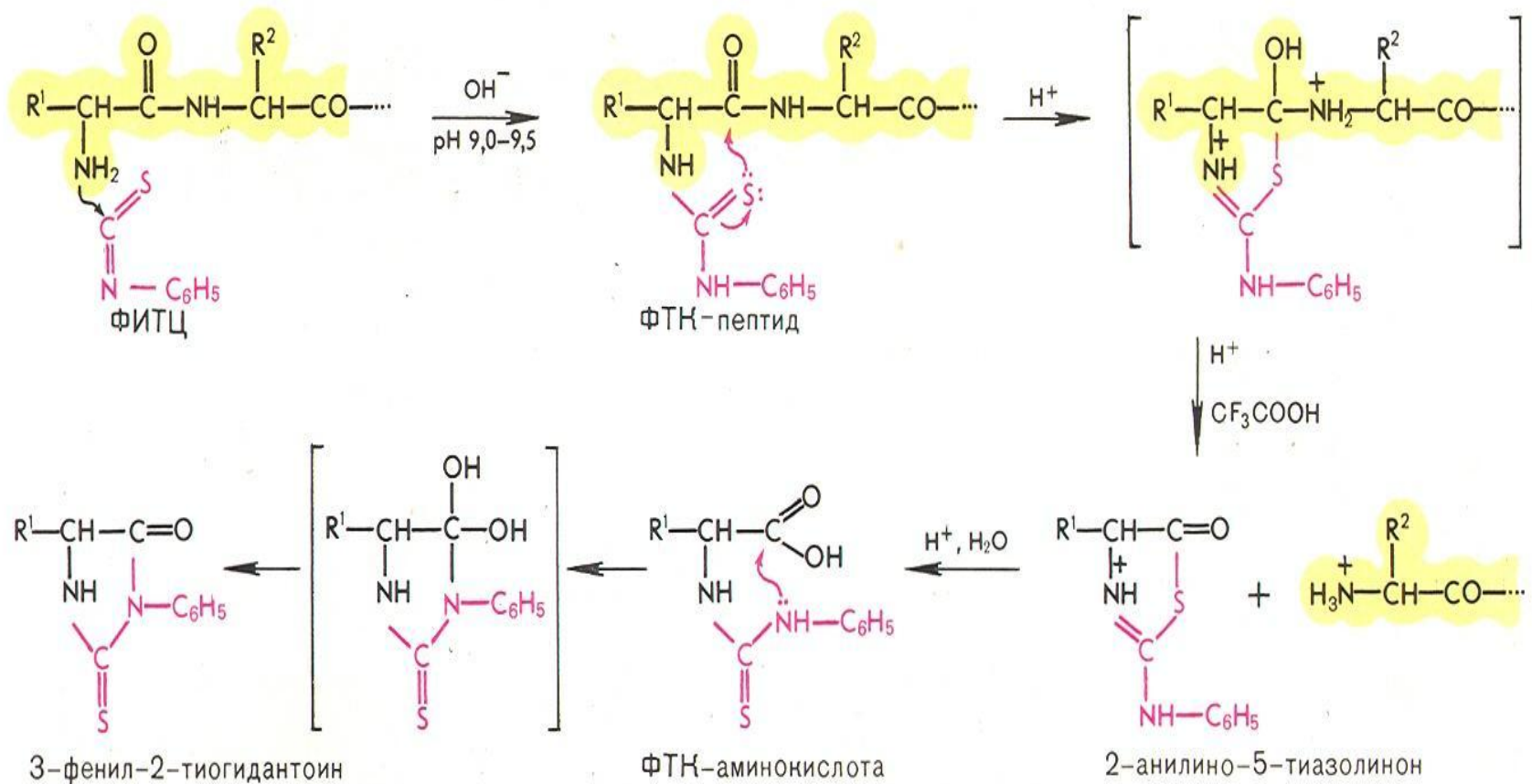
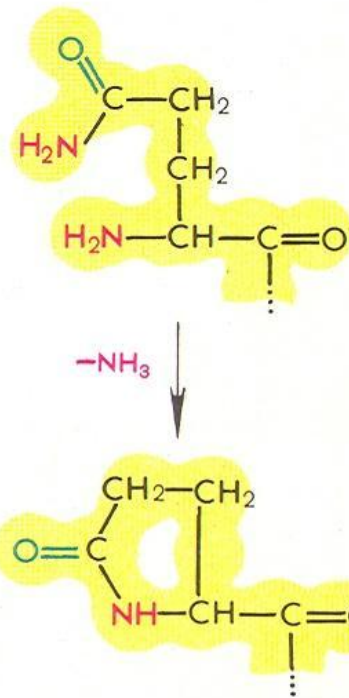


ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПО МЕТОДУ ЭДМАНА



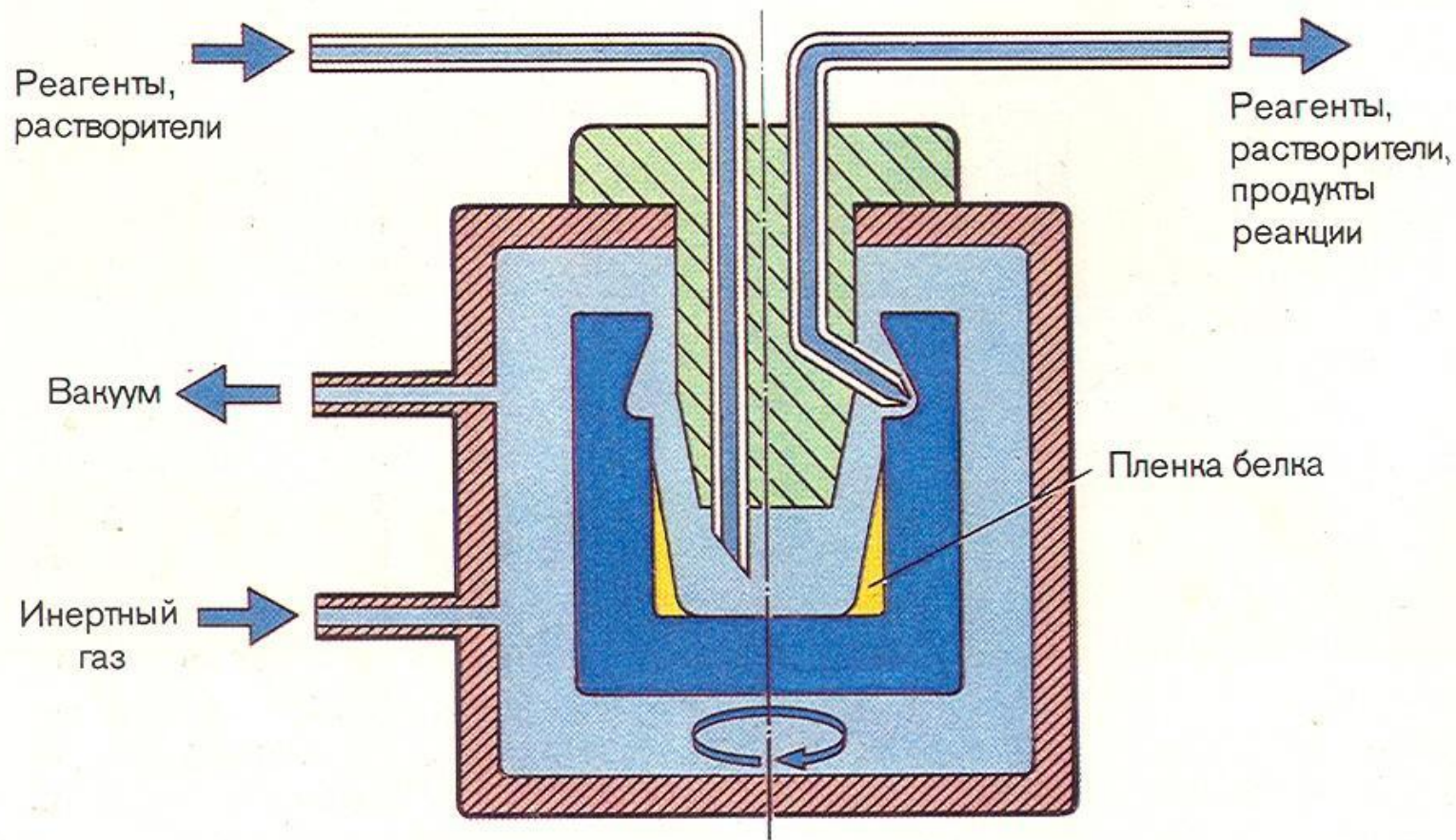
ГЛУТАМИН

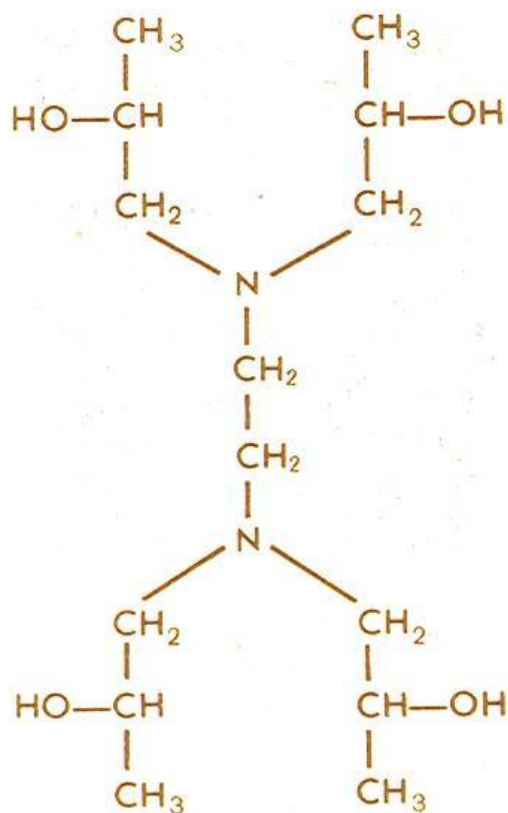


ПИРОГЛУТАМИНОВАЯ КИСЛОТА (pGlu, Glp)

АВТОМАТИЧЕСКОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ ПО МЕТОДУ ЭДМАНА

П. ЭДМАН, Дж. БЭГГ, 1967 г.

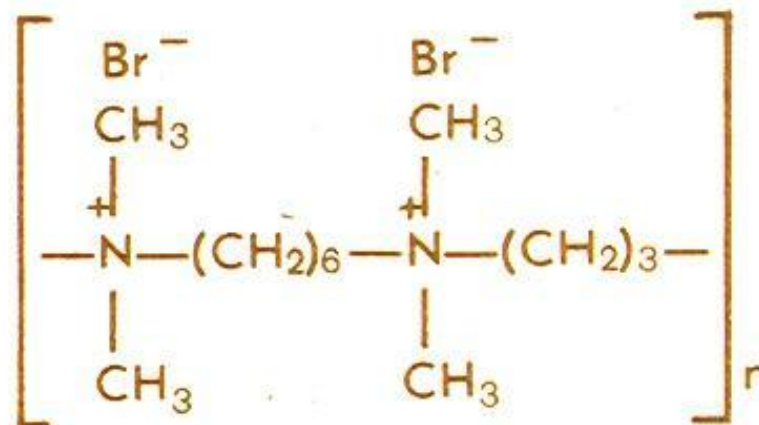




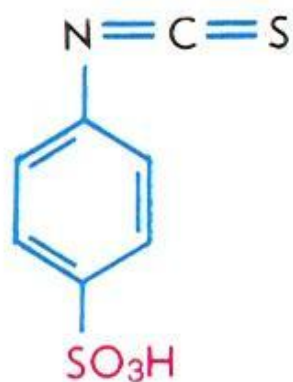
Квадрол



Гептафтормасляная кислота



Полибрен



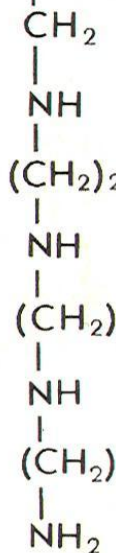
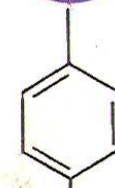
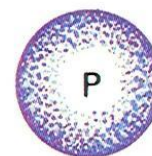
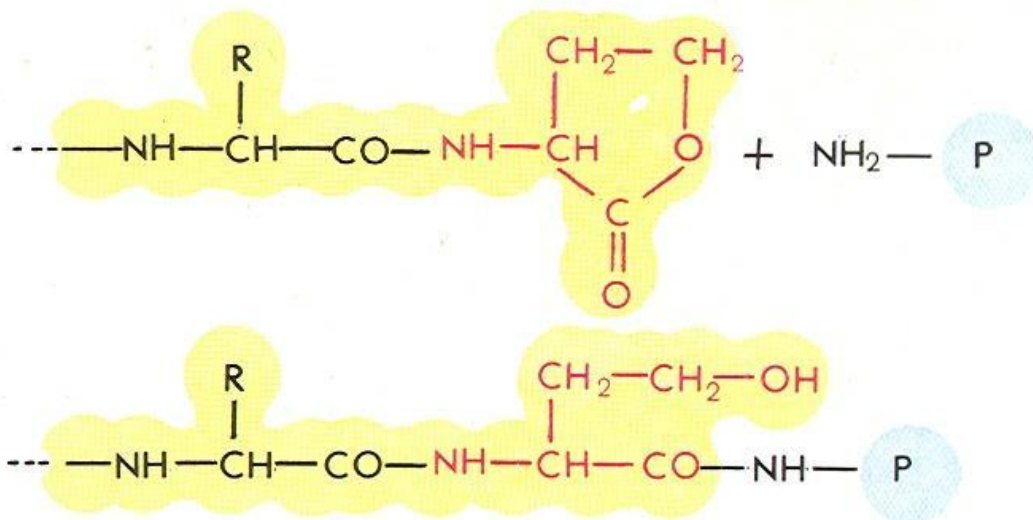
Реагент Браунцера I



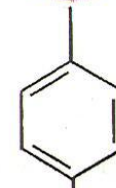
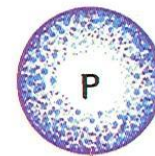
Реагент Браунцера III

ПРИНЦИП РАБОТЫ ТВЕРДОФАЗНОГО СЕКВЕНАТОРА

Р.А. ЛАРСЕН, 1968 г.

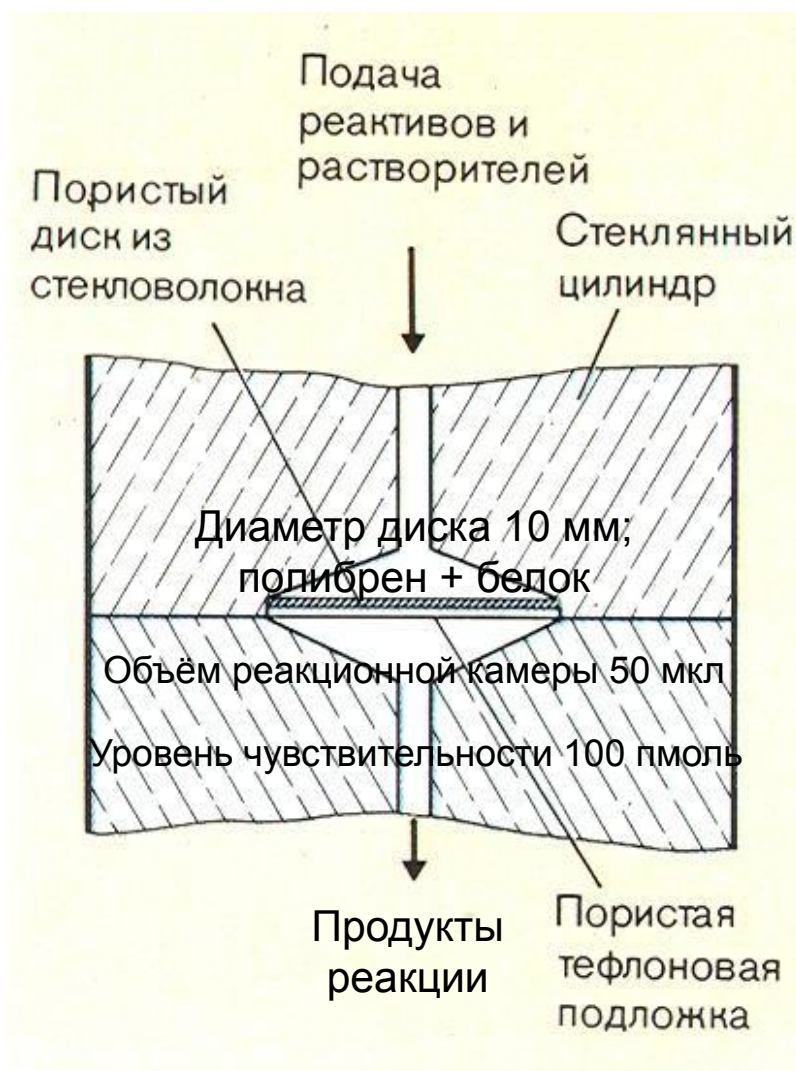


Триэтилен-тетрааминополистирол

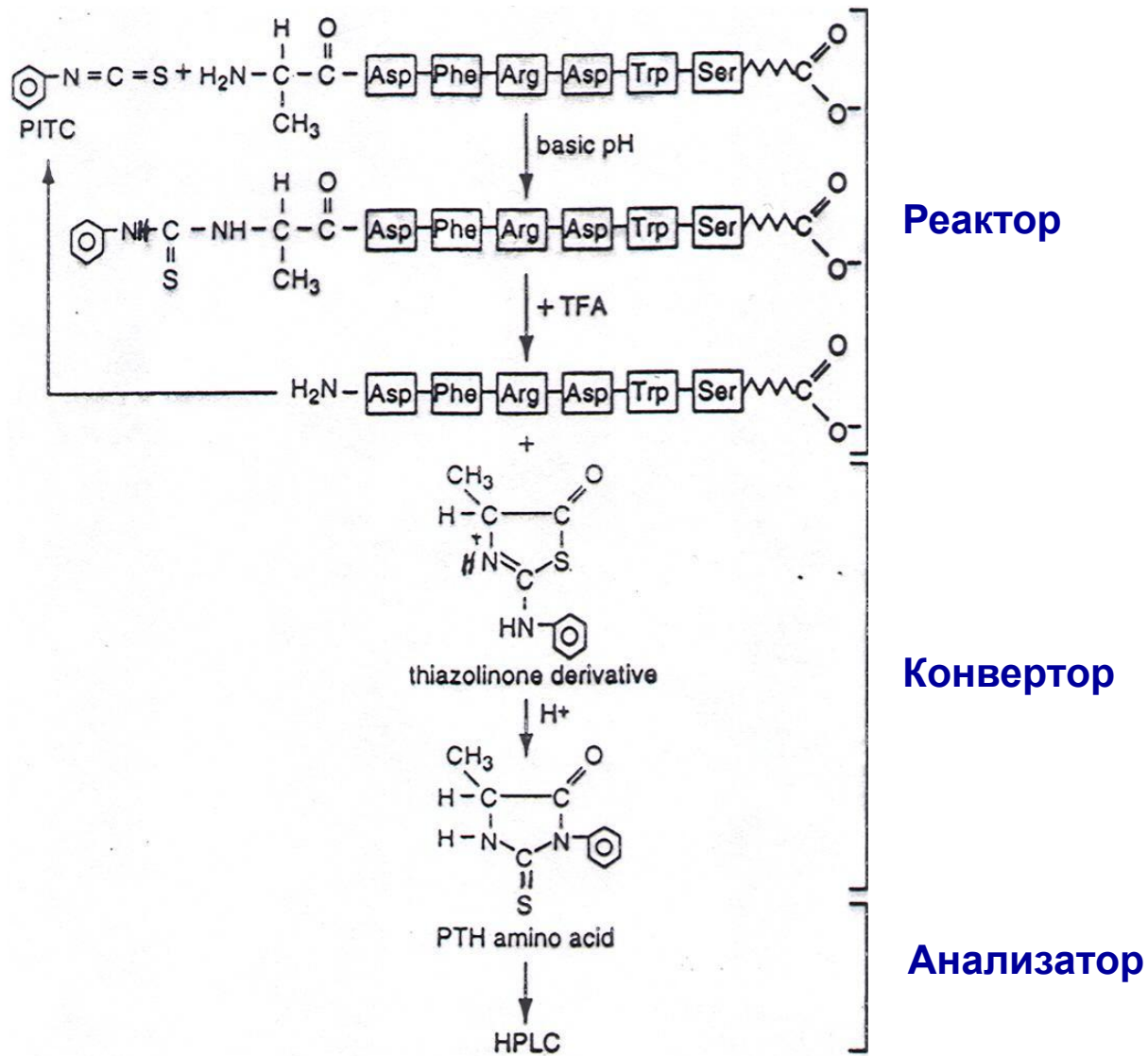


Аминополистирол

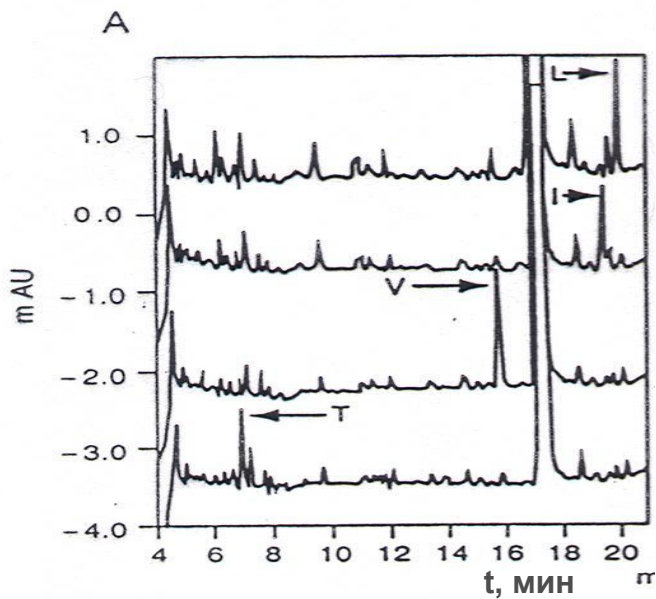
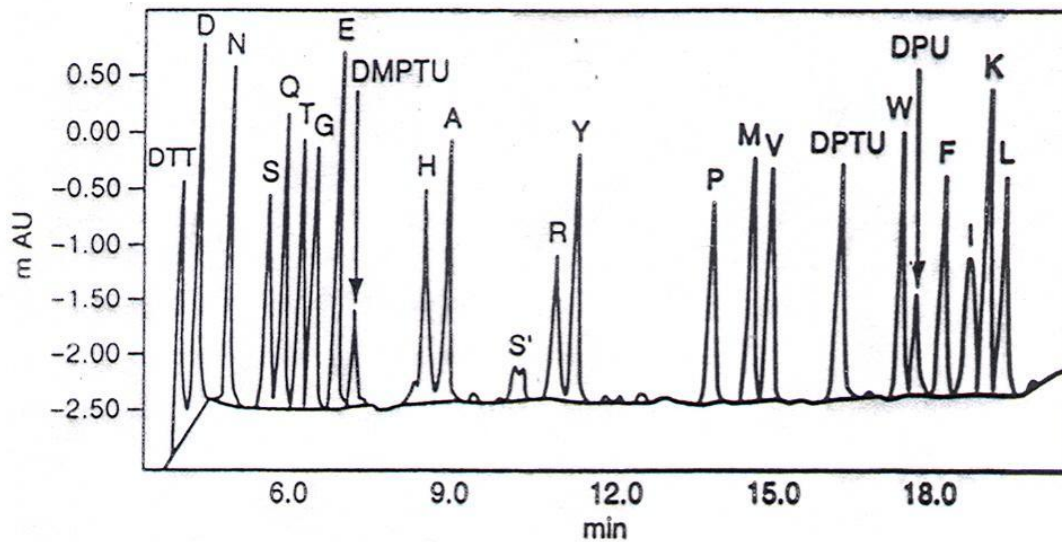
ПРИНЦИП РАБОТЫ ГАЗОЖИДКОФАЗНОГО СЕКВЕНАТОРА Л.ХУД, М.ХАНКЕПИЛЛЕР, 1981 г.



Белково-пептидный секвенатор

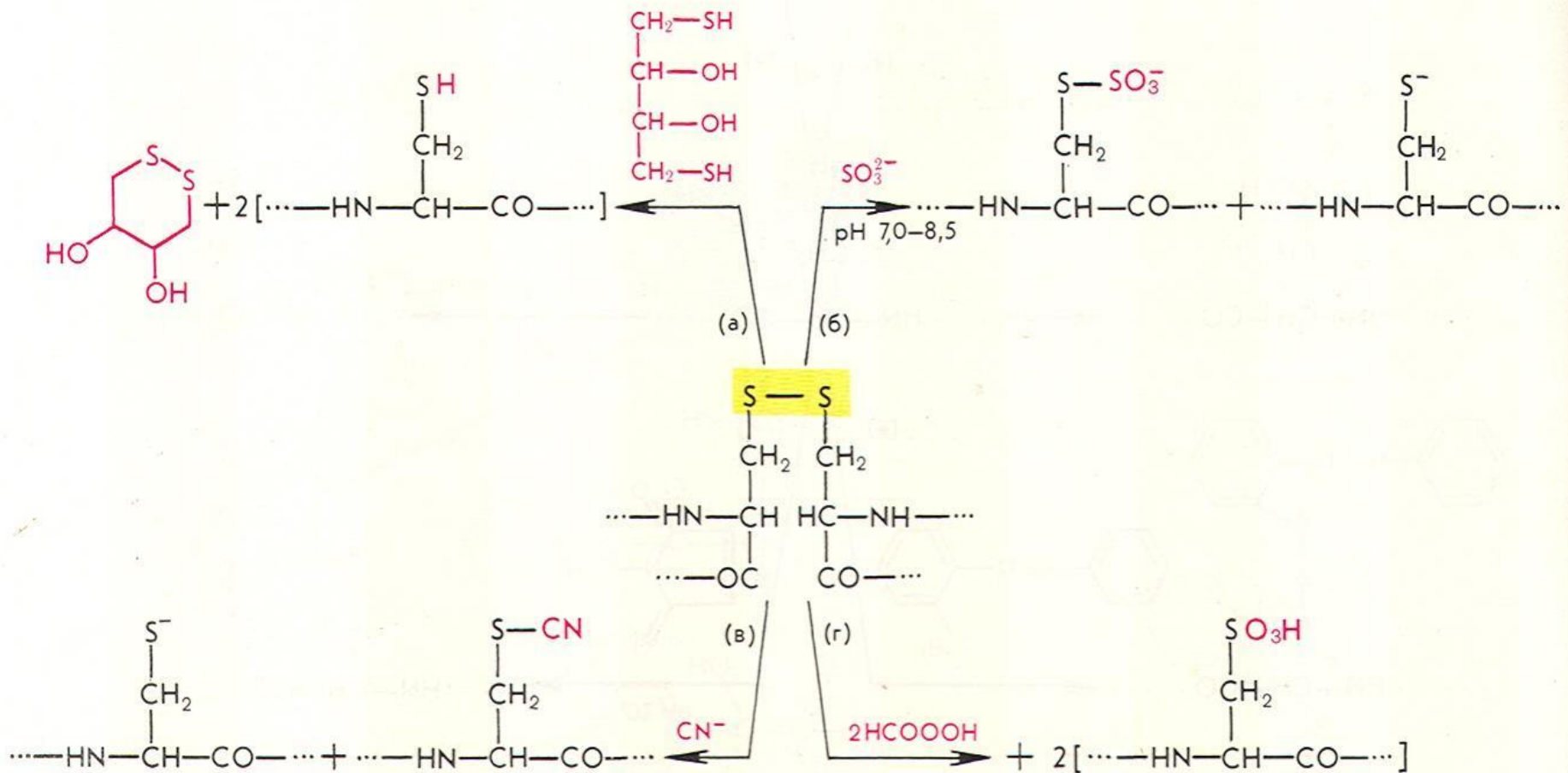


ХРОМАТОГРАММА СТАНДАРТНОЙ СМЕСИ ФТГ-АМИНОКИСЛОТ



**ХРОМАТОГРАММЫ ПЕРВЫХ 4
ЦИКЛОВ СЕКВЕНИРОВАНИЯ
ЛАКТОГЛОБУЛИНА, 10 пмоль**

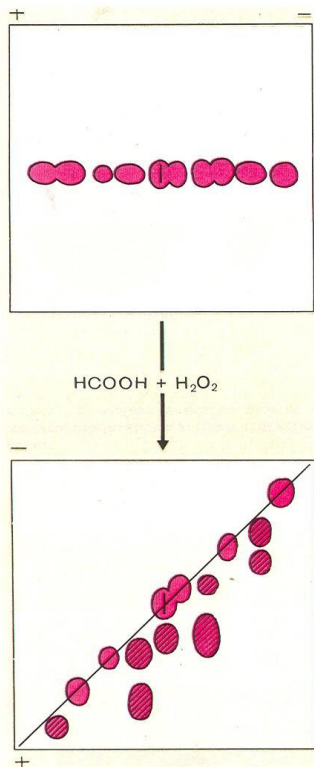
Модификация дисульфидных групп цистина



- а) восстановление дитиотреитолом, меркаптоэтанолам или другими тиолами;
 б) окислительный сульфитолиз;
 в) расщепление цианидами;
 г) окисление надмуравьиной кислотой.

АНАЛИЗ РАСПОЛОЖЕНИЯ SH-ГРУПП И ДИСУЛЬФИДНЫХ СВЯЗЕЙ

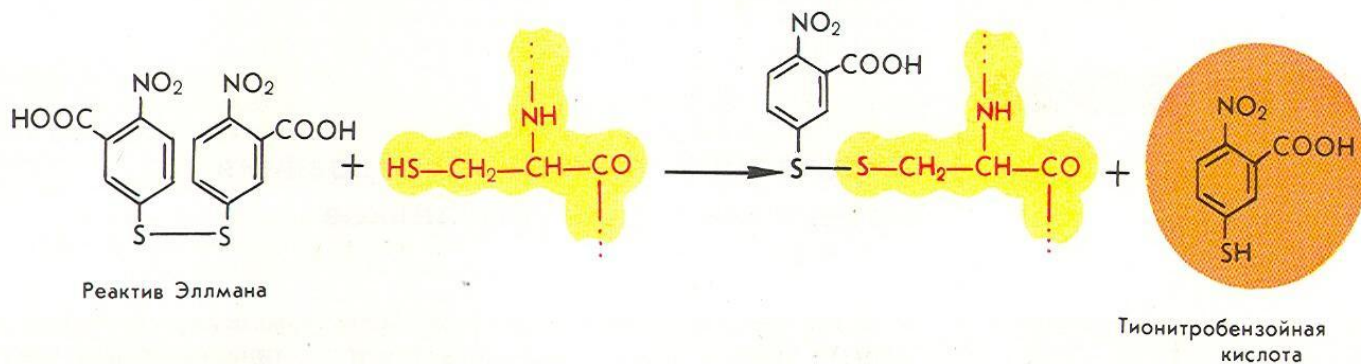
pH < 7,0



Дисульфидный обмен при pH > 7,0

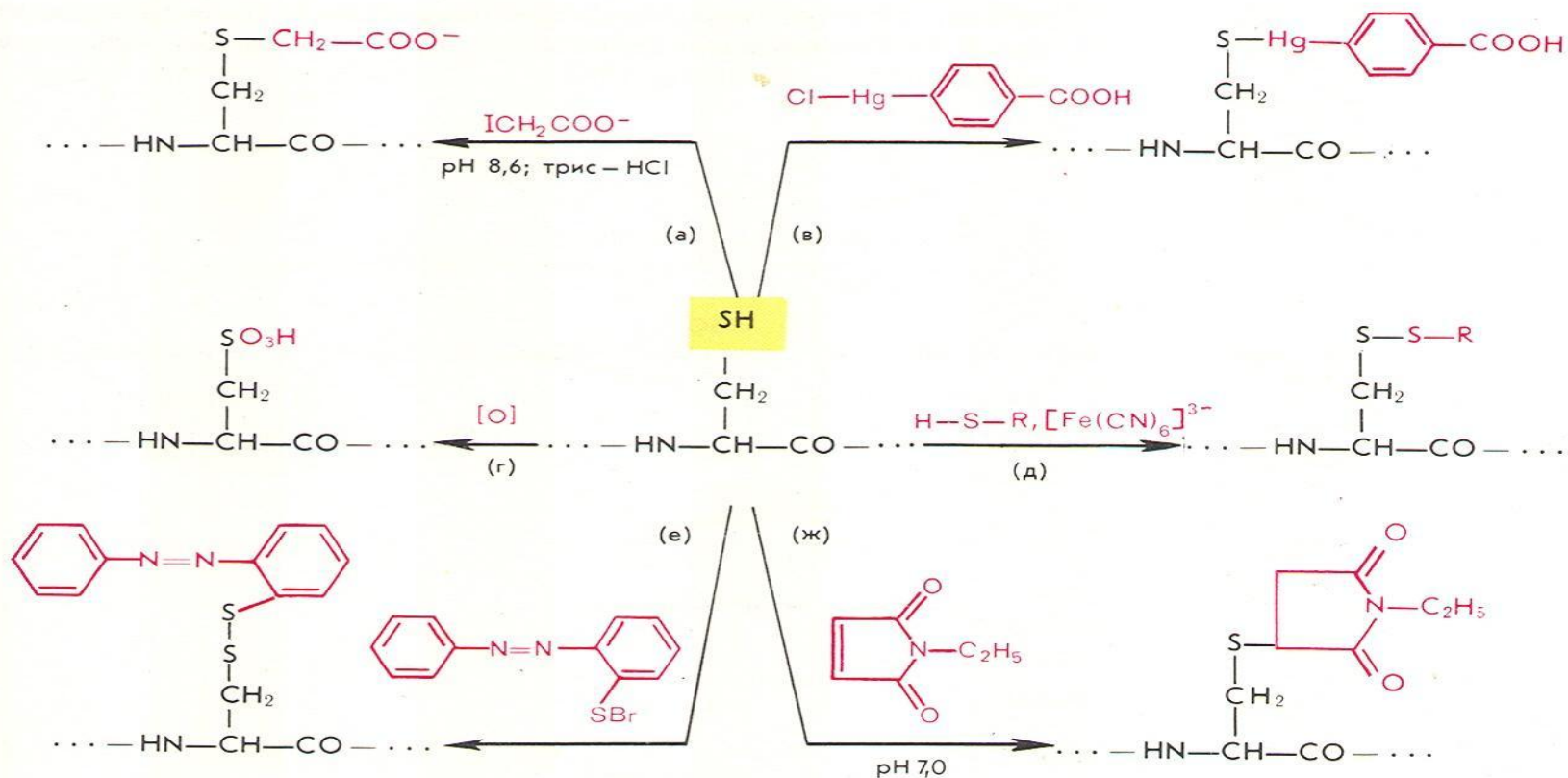


Титрование белка реактивом Элмана -
5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойной кислотой)



Тионитробензойная кислота обладает сильным поглощением при 412 нм и определяется количественно спектрофотометрически.

Модификация сульфгидрильных групп цистеина



- а) алкилирование иодуксусной кислотой или иодацетамидом;
- б) аминоэтилирование этиленимином (не показана);
- в) реакция с п-хлормеркуриобензойной кислотой;
- г) окисление с помощью O_2 до цистеиновой кислоты;
- д) окисление с образованием дисульфидных связей в присутствии феррицианида;
- е) реакция с азобензол-2-сульфенилбромидом;
- ж) реакция с N-этилмалеимидом;
- з) пиридилэтилирование 4-винилпиридином (не показана).

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ

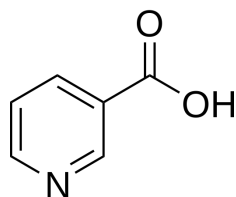
1. ИОНИЗАЦИЯ ОБРАЗЦА.
2. РАЗДЕЛЕНИЕ ОБРАЗОВАВШИХСЯ ИОНОВ В ЭЛЕКТРОМАГНИТНОМ ПОЛЕ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ОТНОШЕНИЯ МАССЫ К ЗАРЯДУ (m/z).
3. РЕГИСТРАЦИЯ МАСС-СПЕКТРА.

МЕТОДЫ ИОНИЗАЦИИ

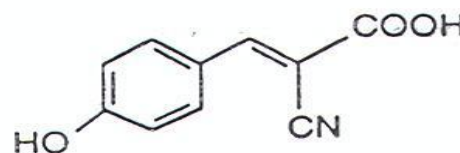
- **MALDI** (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) – матрично активированная лазерная десорбционная ионизация
- **ESI** (ElectroSpray Ionization) – электрораспылительная ионизация при атмосферном давлении
- **EI** (Electron Ionization) – электронная ионизация (ионизация электронным ударом)
- **CI** (Chemical Ionization) – химическая ионизация в вакууме за счет столкновения с ионизированными газами CH_4 , $(\text{CH}_3)_3\text{CH}$, NH_3 и др.
- **APCI** (Atmosphere Pressure Chemical Ionization) – химическая ионизация при атмосферном давлении
- **PI** (Photo Ionization) – фотоионизация в вакууме (ионизация за счет поглощения фотонов при облучении УФ-светом)
- **APPI** (Atmosphere Pressure Photo Ionization) – фотоионизация при атмосферном давлении
- **FAB** (Fast Atom Bombardment) – ионизация бомбардировкой ускоренными атомами Ar или Xe
- **DI** (Desorption Ionization) – десорбционная ионизация продуктами распада радиоактивного изотопа калифорния ^{252}Cf
- **DIOS** (Desorption Ionization on Silicon) – десорбционная ионизация на силиконе (для малых молекул)
- **ESCI** (ElectroSpray & Chemical Ionization) – комбинированная электрораспылительно-химическая ионизация

Масс-спектрометрия MALDI: матрицы

Nicotinic acid

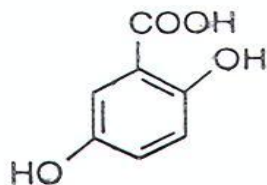


α -cyano-4-hydroxy-*trans*-cinnamic acid
(α CN, CCA)



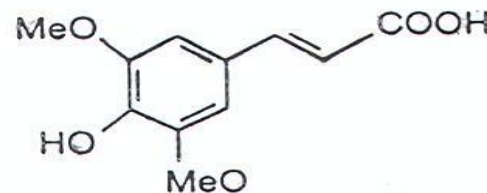
Никотиновая кислота, 266 нм α -циано-4-гидрокси-*транс*-коричная кислота

2,5-dihydroxybenzoic acid
(DHB, gentisic acid)



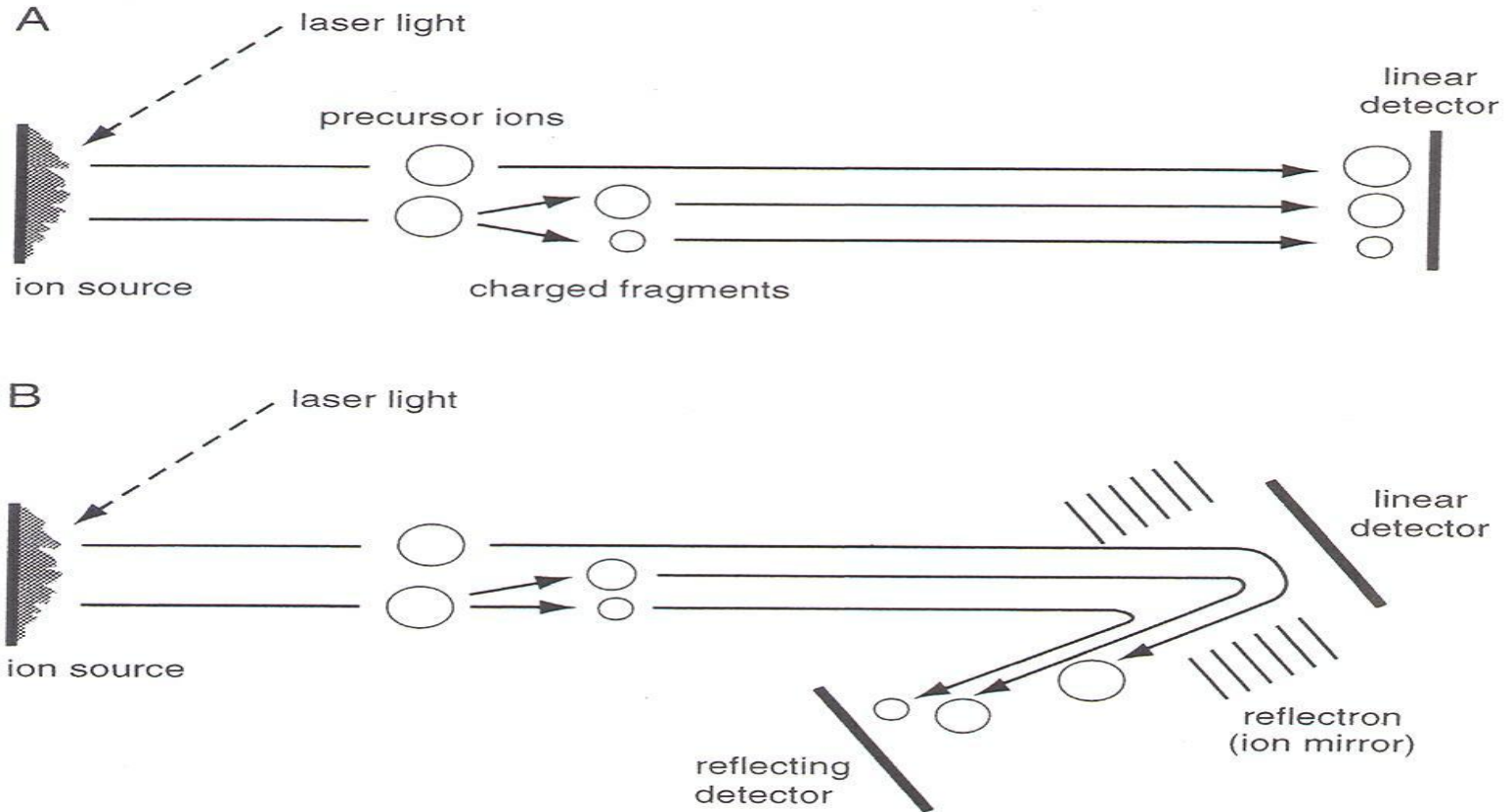
Гентизиновая кислота, 337 нм

3,5-dimethoxy-4-hydroxy-*trans*-cinnamic-acid
(sinapinic acid, SA)



Синапиновая кислота, 337 нм

Масс-спектрометрия МАЛДИ



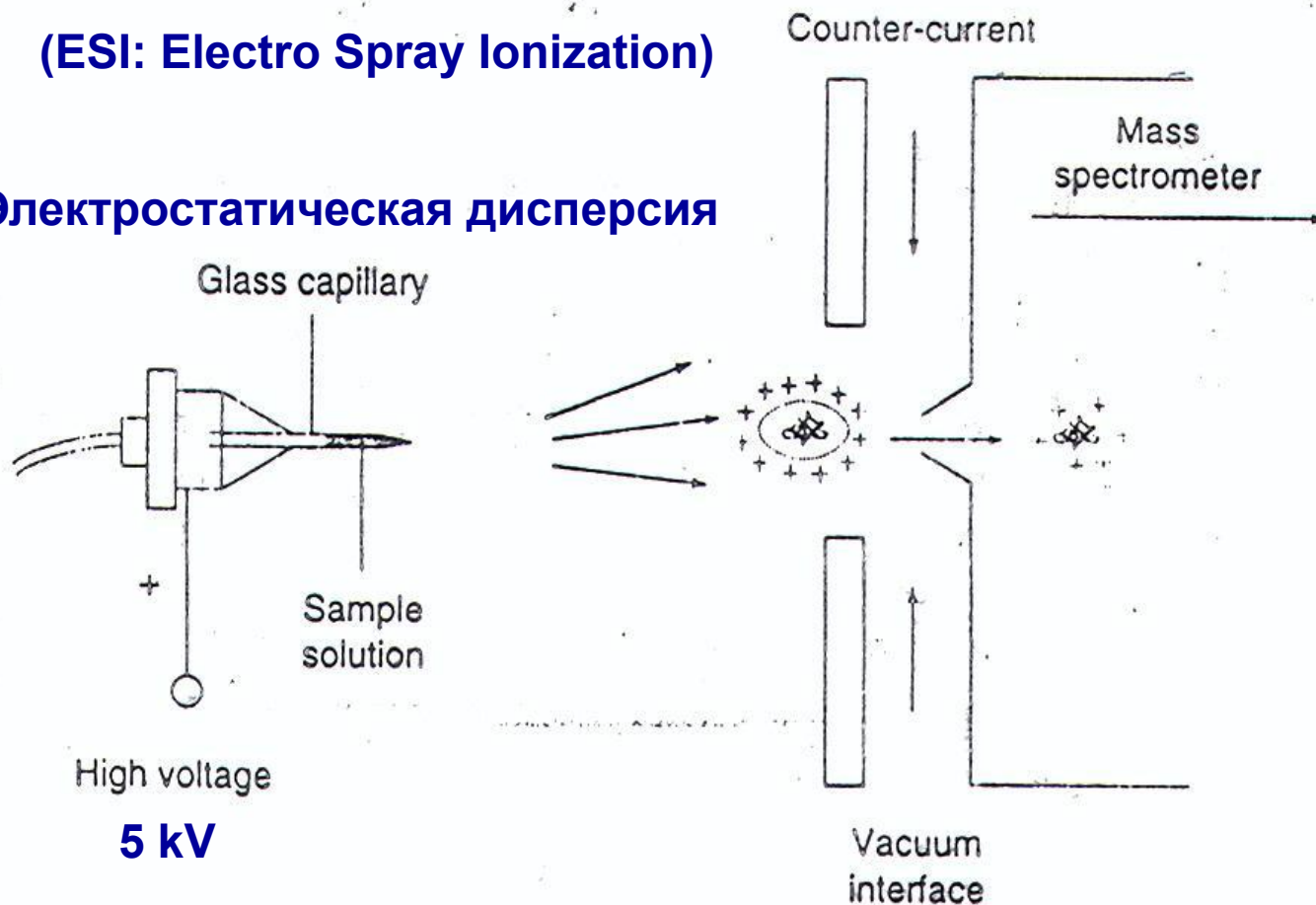
Ионы могут разделяться в линейном режиме или с помощью рефлектрона (ионного зеркала), повышающего разрешающую способность прибора.

Масс-спектрометрия с электрораспылительной ионизацией

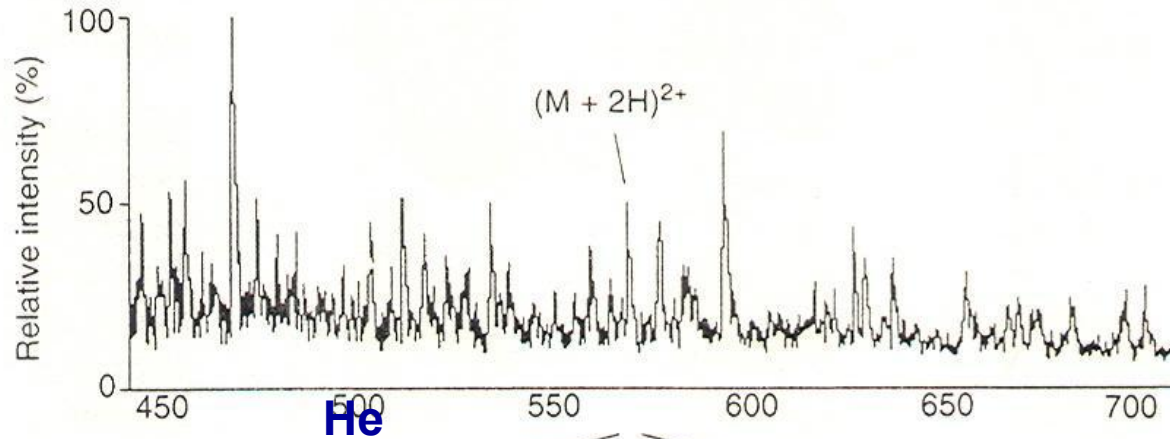
Матиас МАНН, 1990 г.

(ESI: Electro Spray Ionization)

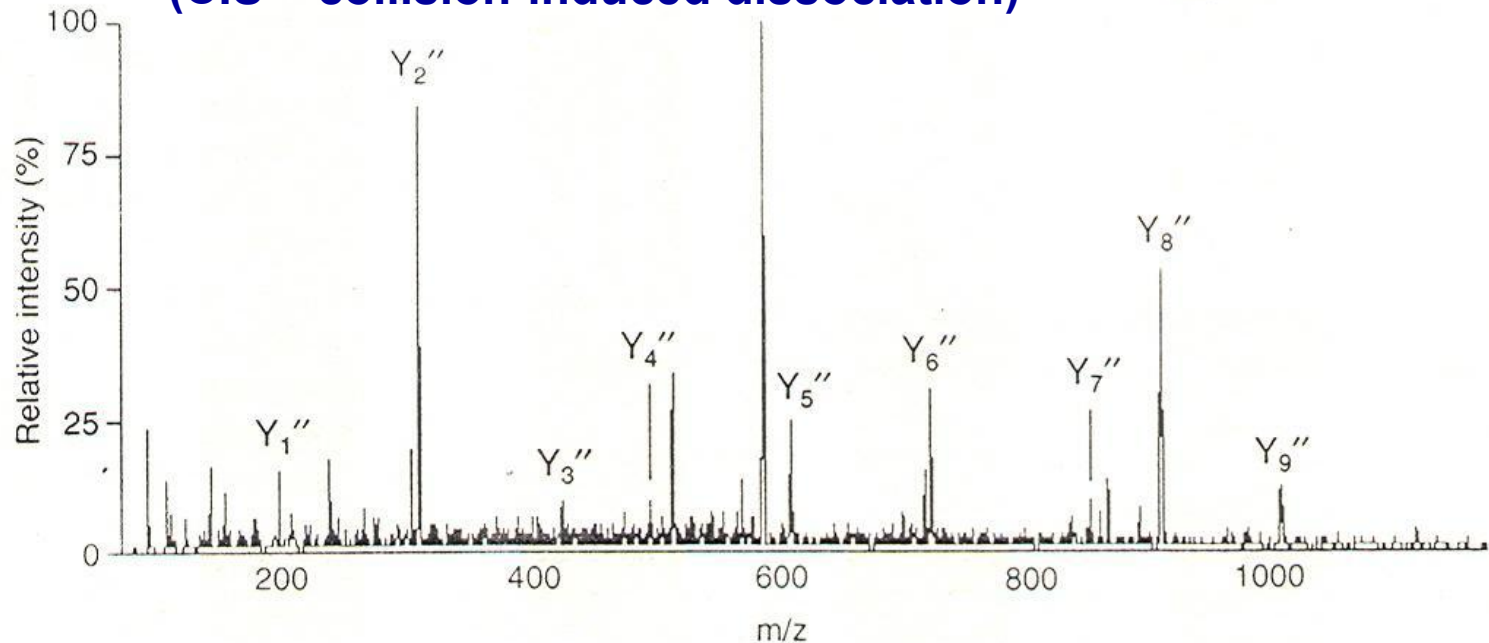
Электростатическая дисперсия



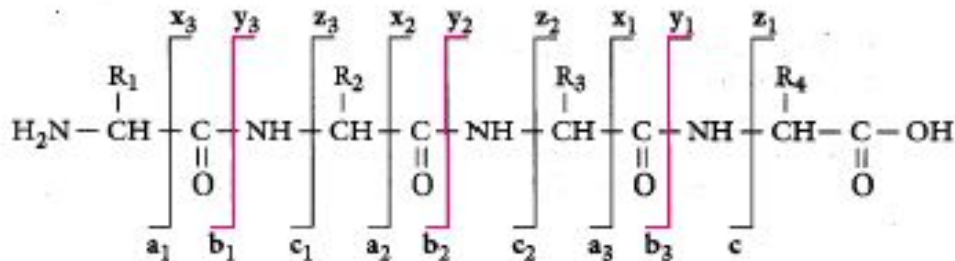
ТАНДЕМНАЯ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ ESI MS/MS



ДАС – диссоциация, активированная соударениями (CID – collision-induced dissociation)



Способы фрагментации пептидов



LID – фрагментация, индуцированная лазером

Пептид поглощает энергию лазера, захваченная энергия перераспределяется по молекуле, разрушается ближайшая слабая связь. Может происходить отщепление модификаций.

CID – фрагментация, индуцированная столкновениями

Пептид приобретает энергию от столкновений, захваченная энергия перераспределяется по молекуле, разрушается ближайшая слабая связь. Часто происходит отщепление модификаций.

ECD – фрагментация, индуцированная захватом медленных электронов

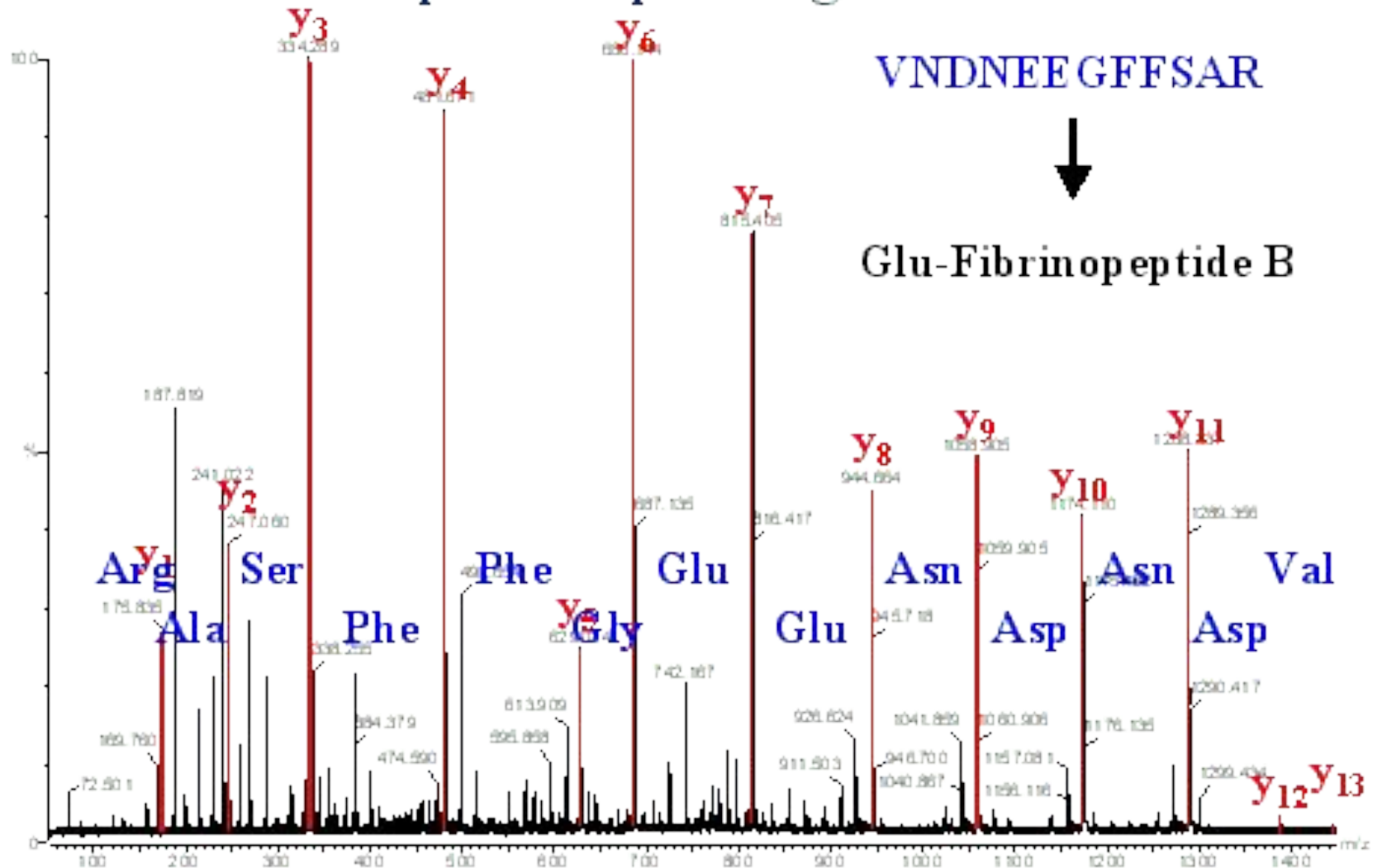
Точный механизм неизвестен. Пептид захватывает медленные электроны на азот пептидной связи, происходит мгновенный разрыв пептидной цепи. Не происходит отщепления модификаций.

Peptide sequencing

VNDNEEGFFSAR



Glu-Fibrinopeptide B



ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫЕ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ

Ацилирование

- N-концевой остаток
- Lys

Фосфорилирование

- Ser
- Thr
- Tyr

Гликозилирование

- O-связывание (Ser, Thr, Tyr)
- N-связывание (Asn, Arg)

Протеомика – наука, занимающаяся инвентаризацией белков в клетке

- 1975 г. – Патрик О'Фаррелл опубликовал методику двумерного электрофореза высокого разрешения для разделения сложных смесей белков
- 1982 г. – Лейф Андерсон предложил создать белковый атлас человека
- 1995 г. – Ян Хемпрли-Смит ввёл термин **«протеом»**
- 2001 г. - создана международная организация HUPO (Human Proteom Organization)

Геном -

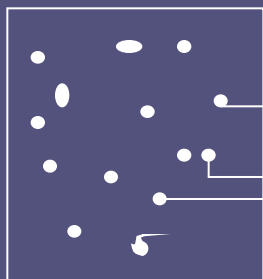
совокупность всех генов организма

- Одинаков для всех клеток данного организма

Протеом -

совокупность всех белков клетки

- Индивидуален для каждого типа клеток
- Изменяется в зависимости от состояния клетки
- Характерен для данного времени



2D ПААГ

1. Извлечение из геля.
2. Солюбилизация.
3. Триптический гидролиз.



Смесь пептидов



1. ВЭЖХ
2. ESI-MS/MS
3. Обработка данных



1. MALDI-MS
2. Обработка данных

Базы данных по аминокислотным последовательностям

ЯМ

Сиквенс пептида

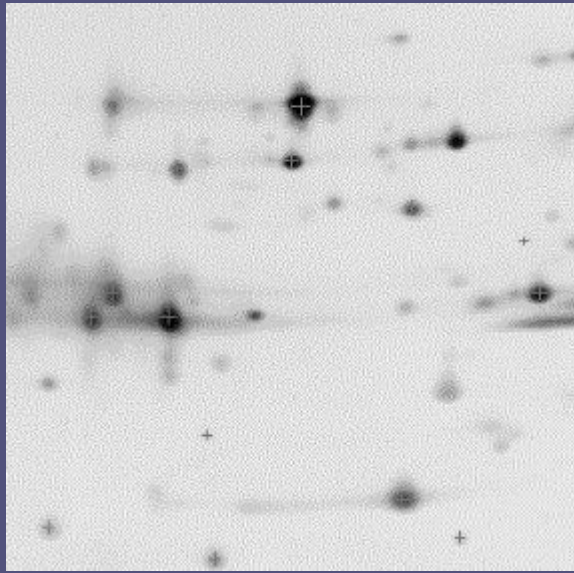
М.м. пептида

Базы данных по молекулярным массам

Идентификация белка



Стратегия анализа: 2DE + MALDI-MS



2D электрофорез белков

Компьютерный анализ изображений гелей

Вырезание и трипсинолиз белков в фрагментах геля

Экстракция пептидов и получение MALDI масс-спектра суммарного гидролизата

Поиск в базе данных измеренных масс пептидов (пептидный фингерпринт)

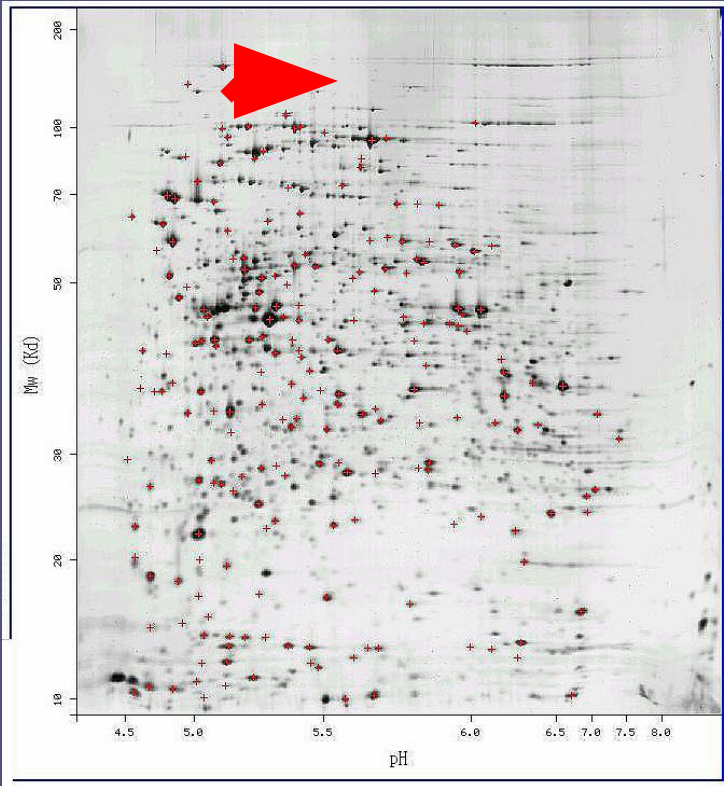
Post Source Decay-MS, TOF-TOF фрагментация отдельных пептидов

Поиск в базе данных измеренных масс фрагментов



Map Selection: E.coli

SWISS-2DPAGE: P00575 1 protein has been found



Name and origin of the protein	
Description	DNA-DIRECTED RNA POLYMERASE BETA CHAIN (EC 2.7.7.6) (TRANSCRIPTASE BETA CHAIN) (RNA POLYMERASE BETA SUBUNIT).
From	Escherichia coli.
Taxonomy	Bacteria; Proteobacteria; gamma subdivision; Enterobacteriaceae; Escherichia.
References	
1) MAPPING ON GEL. MEDLINE; 96314059. [NCBI, ExPASy, Israel, Japan] Pasquali C., Frutiger S., Wilkins M.R., Hughes G.J., Appel R.D. "Two-dimensional gel electrophoresis of Escherichia coli homogenates: the Escherichia coli SWISS-2DPAGE database."; Electrophoresis 17:547-555(1996).	
Comments:	
SUBUNIT: THE ENZYME CONSISTS OF THE SIGMA CHAIN AND THE CORE ENZYME WHICH IS COMPOSED OF 5 CHAINS	
<i>Escherichia coli</i>	MAP LOCATIONS: · SPOT 2D-000K6X; pI=5.12, Mw=151314 the clicked spot ·
Cross-references:	
SWISS-PROT	P))%&%, RPOB, ECOLI
ECO2DBASE	D157.0; 5TH

Количественная масс-спектрометрия с использованием технологии **SWATH** (**S**equential **W**indow **A**cquisition of all **T**heoretical Fragments) - последовательной периодической регистрации всех теоретических фрагментов.

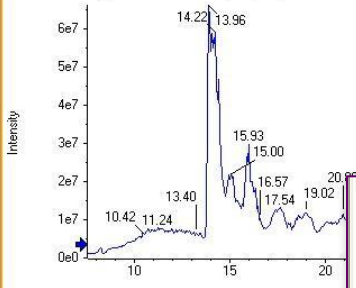
Принцип метода состоит в использовании широких (20-25 а.е.) последовательных окон пропускания квадруполем Q1 ионов-предшественников в ячейку столкновений и сохранением MS/MS спектров всех ионов-предшественников. Последовательные окна пропускания перекрывают в циклическом режиме весь диапазон значений m/z . Используя библиотеки тандемных MS/MS спектров предварительно идентифицированных пептидов и полученный с помощью SWATH массив MS-данных можно оценить относительное **количественное** содержание любого пептида.



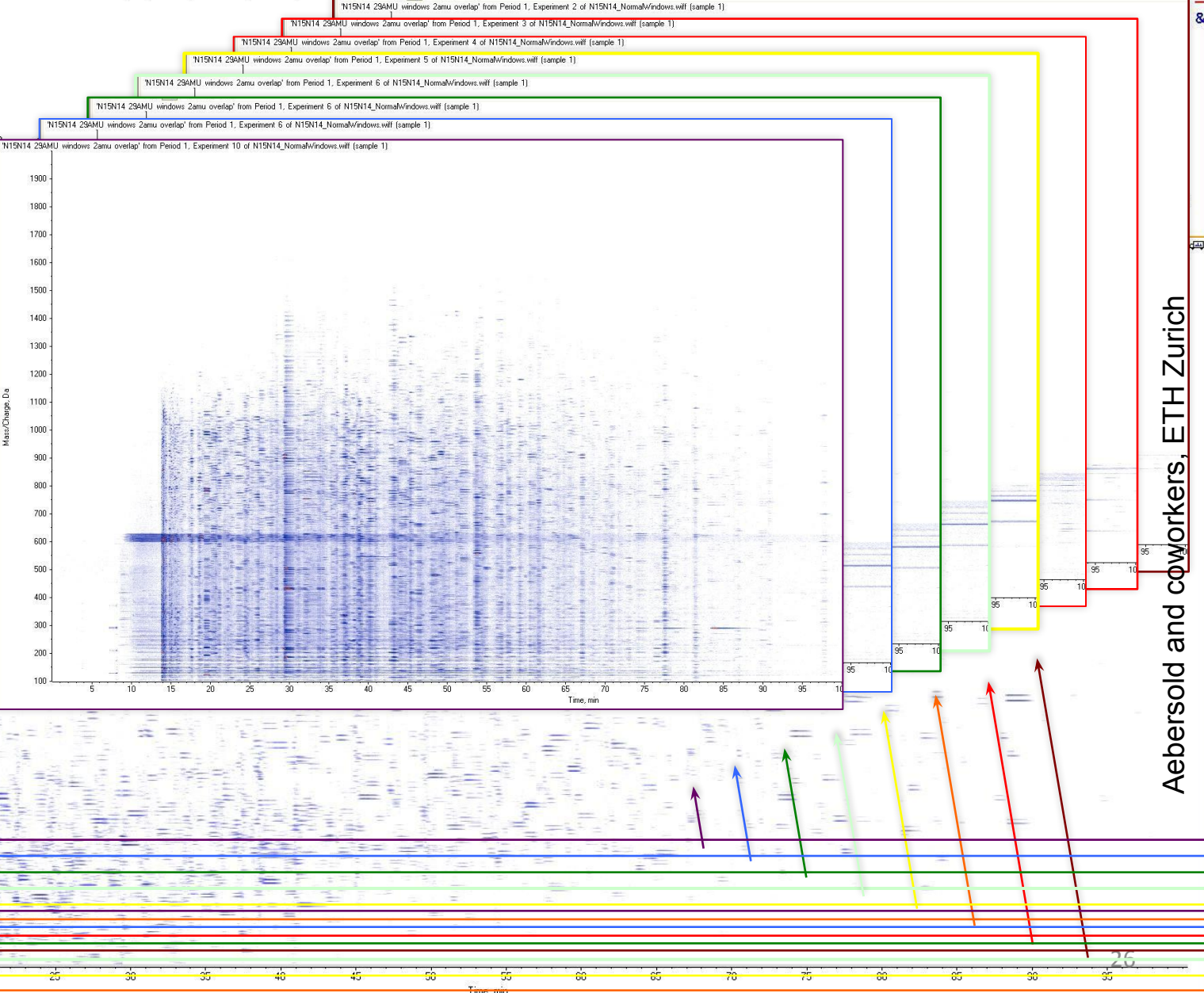
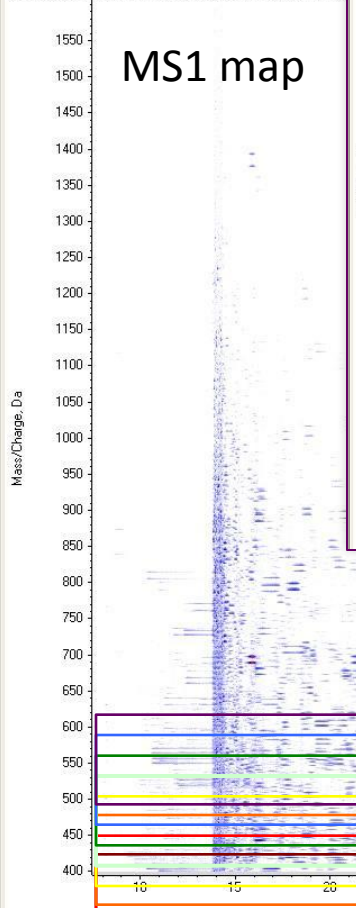
Conceived at Ruedi Aebersold's lab, ETH Zürich
Implemented on SCIEX TripleToF™ systems



TIC from N15N14_NormalWindows.wiff (sample 1) - N15N14 29AMU windows 2amu overlap, Experiment 1, +TOF MS (400 - 2000)



'N15N14 29AMU windows 2amu overlap' from Period 1, Exp



Aebersold and coworkers, ETH Zurich

Использование протеомики в ранней диагностике заболеваний человека

