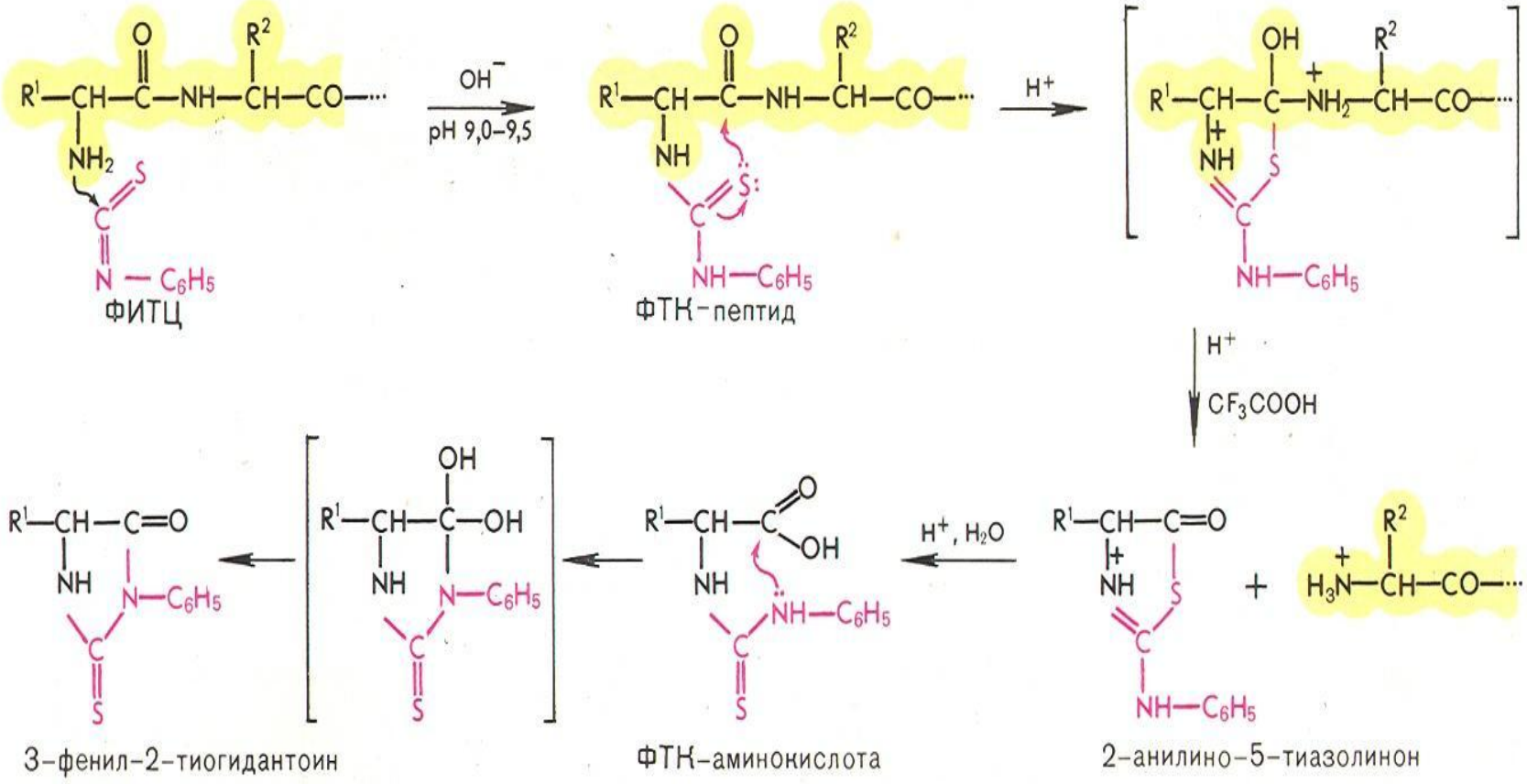
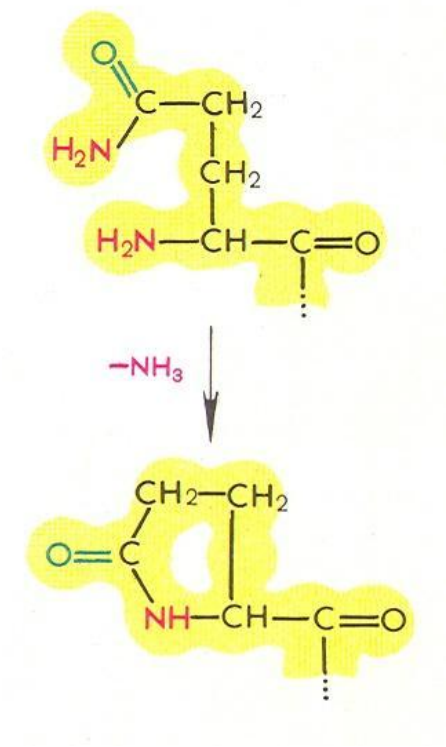
ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПО МЕТОДУ ЭДМАНА



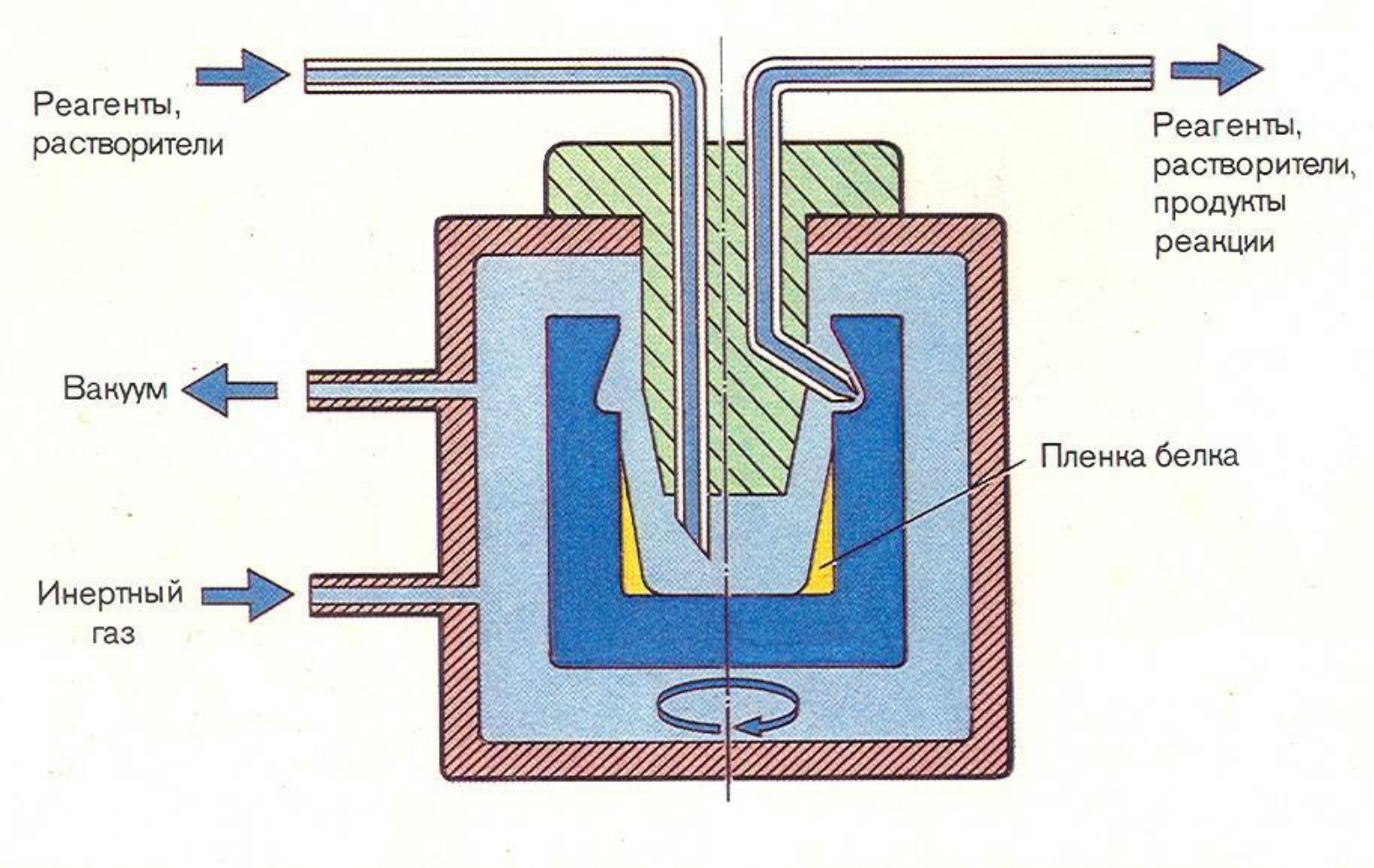
ГЛУТАМИН

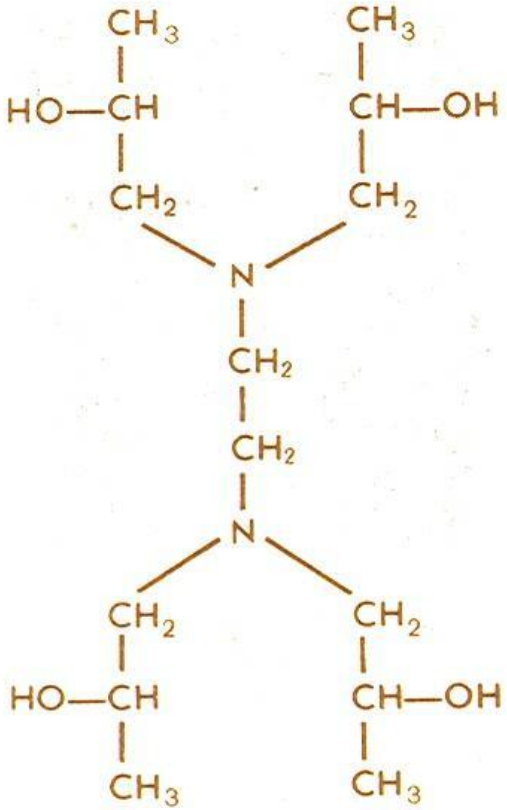


ПИРОГЛУТАМИНОВАЯ КИСЛОТА (pGlu, Glp)

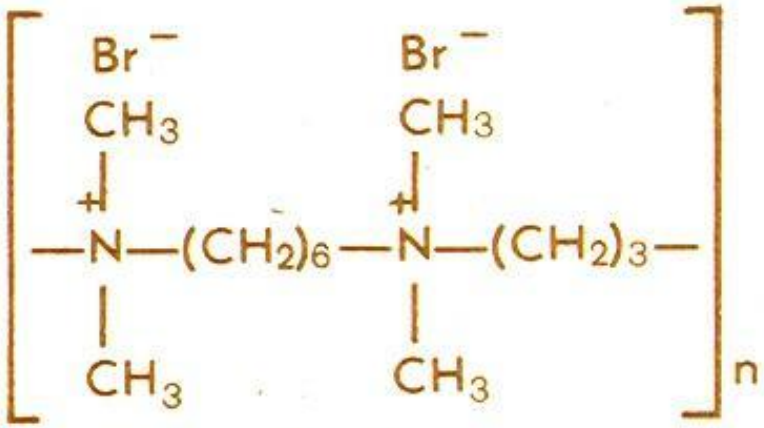
АВТОМАТИЧЕСКОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ ПО МЕТОДУ ЭДМАНА

П. ЭДМАН, Дж. БЭГГ, 1967 г.





Квадрол



Полибрен

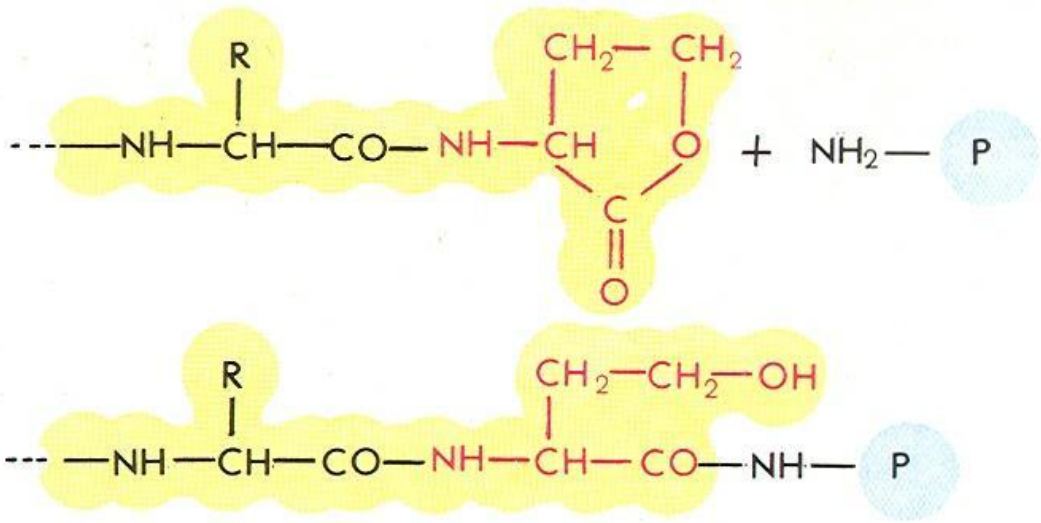
$CF_3 – CF_2 – CF_2 – COOH$

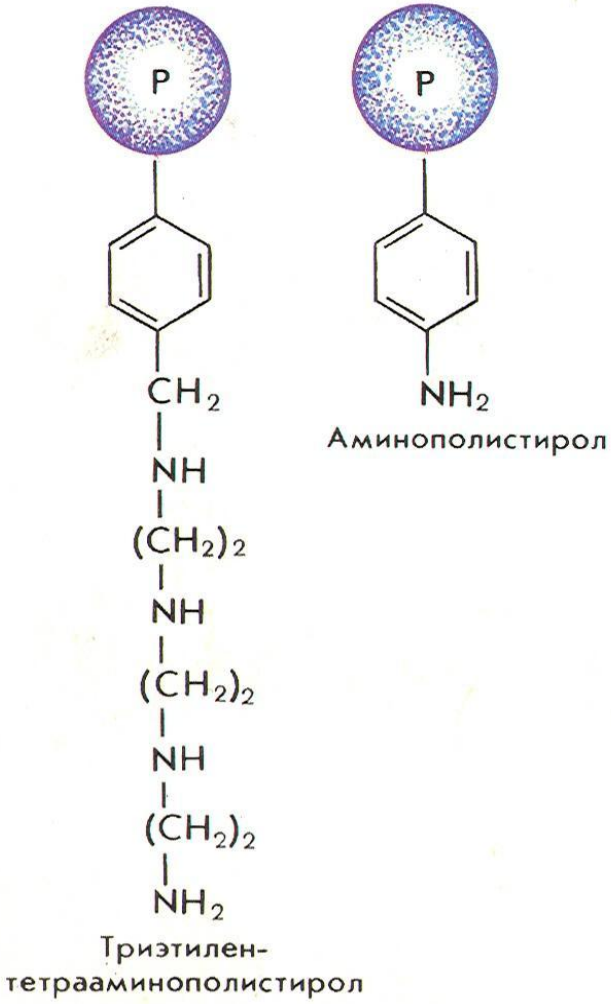
Гептафтормасляная кислота

Реагент Брауницера I

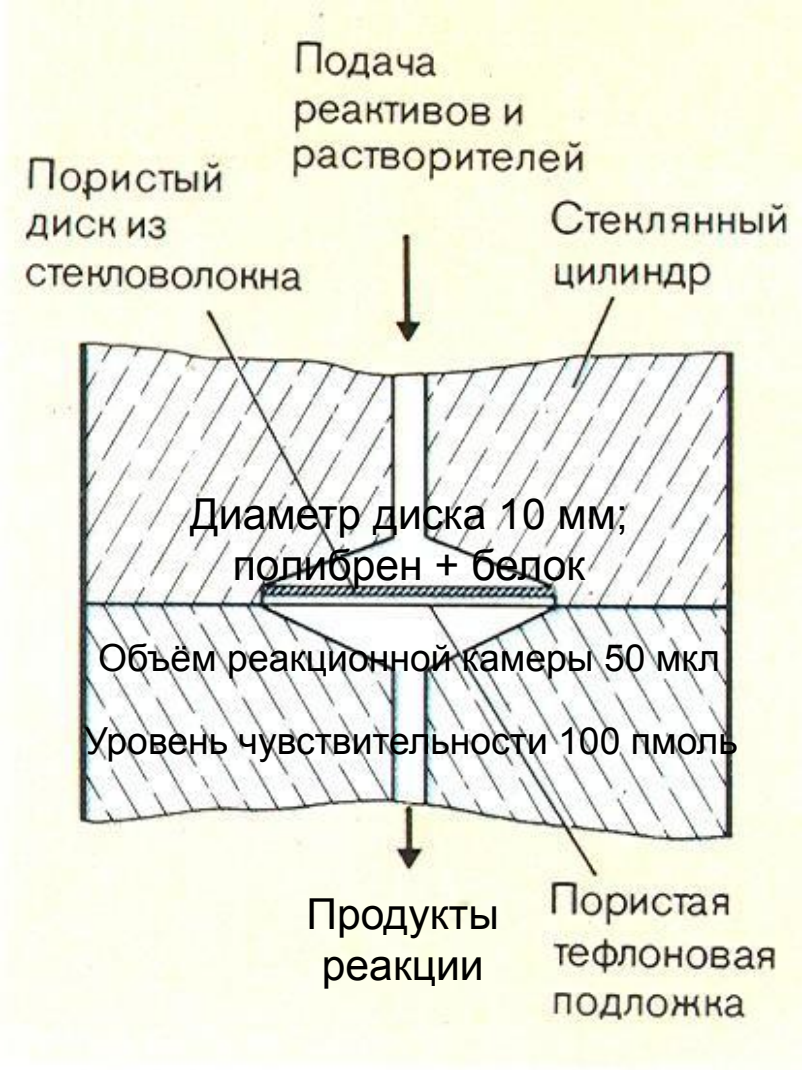
Реагент Брауницера III

ПРИНЦИП РАБОТЫ ТВЕРДОФАЗНОГО СЕКВЕНАТОРА
Р.А. ЛАРСЕН, 1968 г.

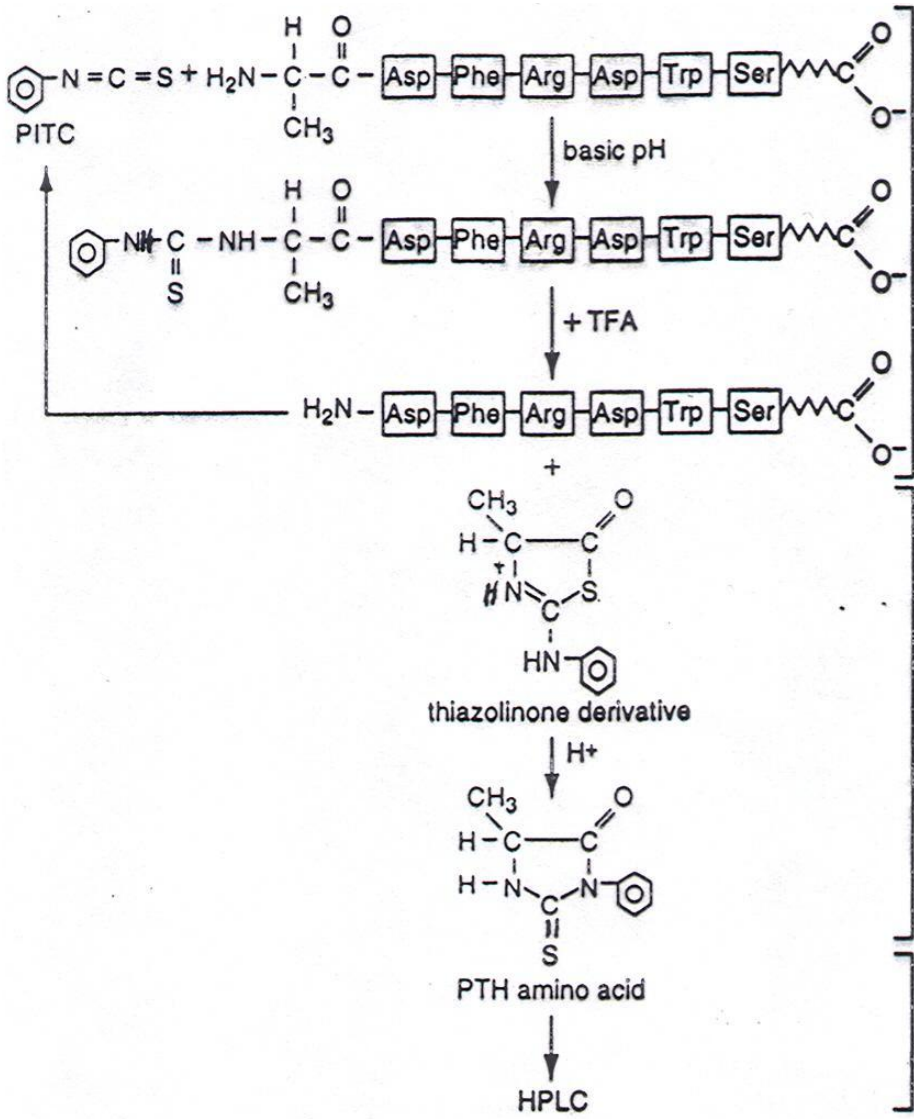




ПРИНЦИП РАБОТЫ ГАЗОЖИДКОФАЗНОГО СЕКВЕНАТОРА Л.ХУД, М.ХАНКЕПИЛЛЕР, 1981 г.



Белково-пептидный секвенатор

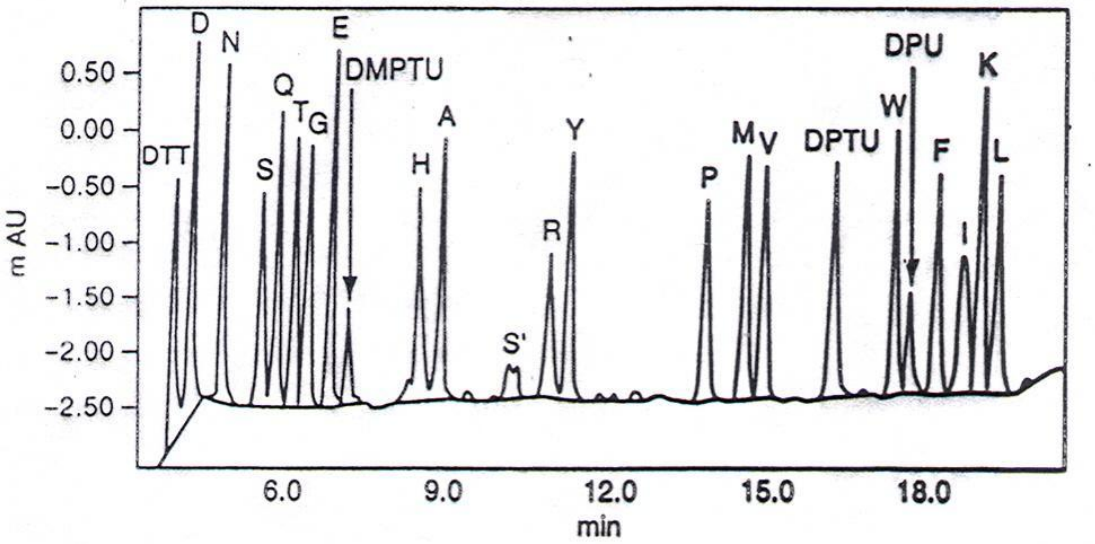


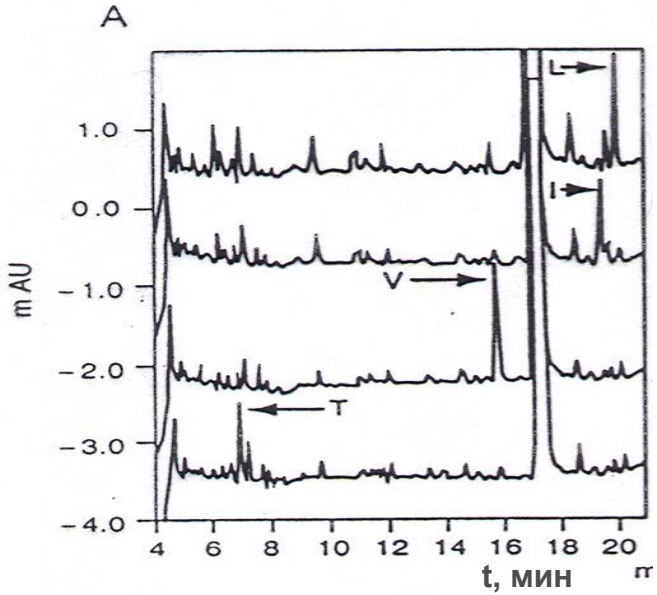
Реактор

Конвертор

Анализатор

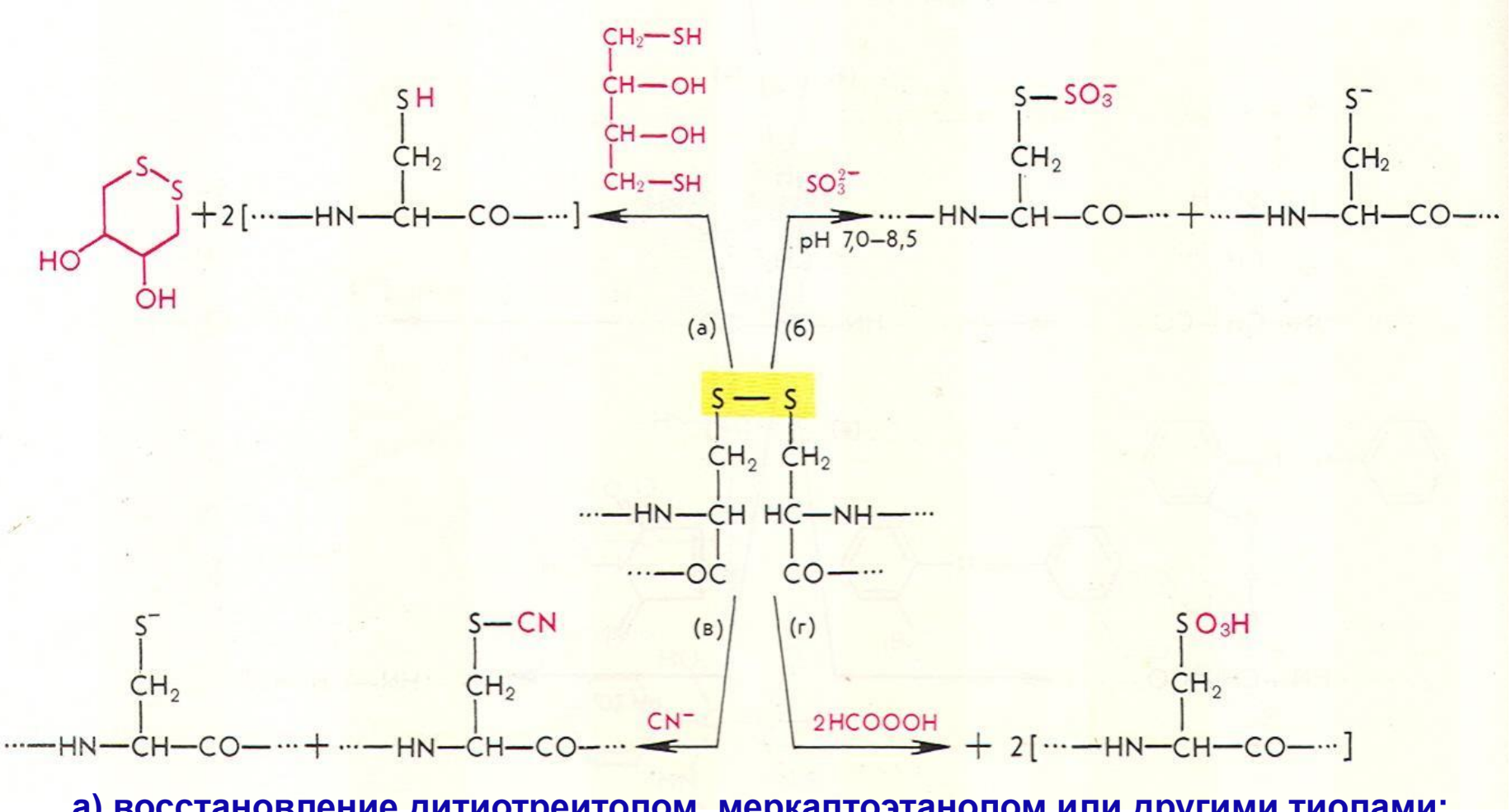
ХРОМАТОГРАММА СТАНДАРТНОЙ СМЕСИ ФТГ-АМИНОКИСЛОТ





ХРОМАТОГРАММЫ ПЕРВЫХ 4 ЦИКЛОВ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ЛАКТОГЛОБУЛИНА, 10 пмоль

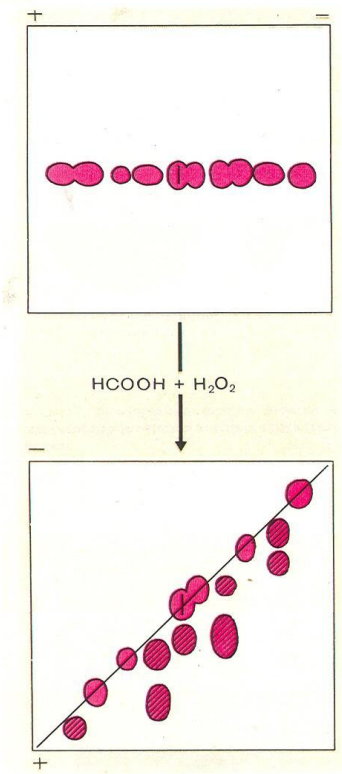
Модификация дисульфидных групп цистина



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

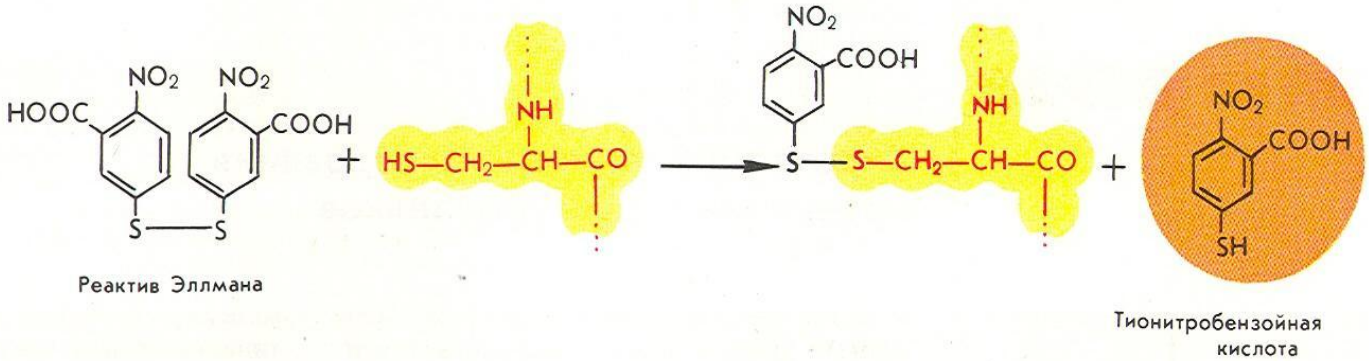
АНАЛИЗ РАСПОЛОЖЕНИЯ SH-ГРУПП И ДИСУЛЬФИДНЫХ СВЯЗЕЙ

pH<7,0



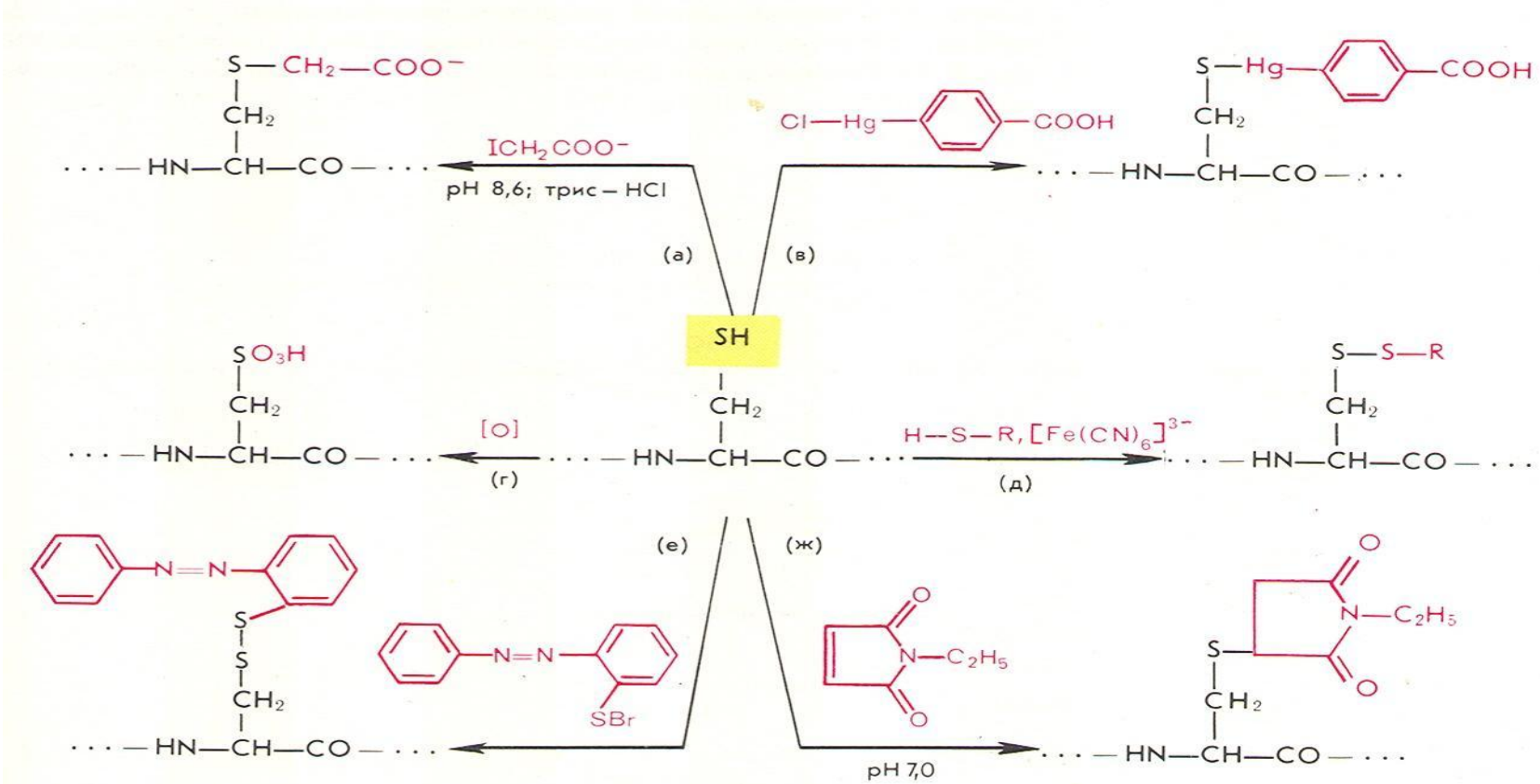
Дисульфидный обмен при pH>7,0

Титрование белка реактивом Эллмана - 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*).

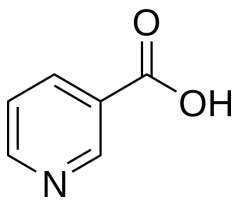
3. РЕГИСТРАЦИЯ МАСС-СПЕКТРА.

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, $(CH_3)_3CH$, 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

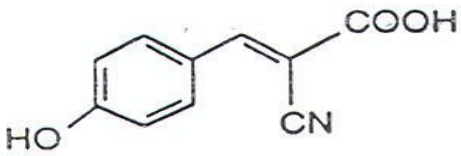
Масс-спектрометрия MALDI: матрицы

Nicotinic acid



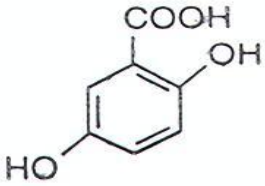
Никотиновая кислота, 266 нм

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



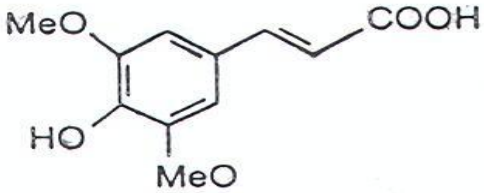
α−циано-4-гидрокси-*транс*-коричная кислота

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



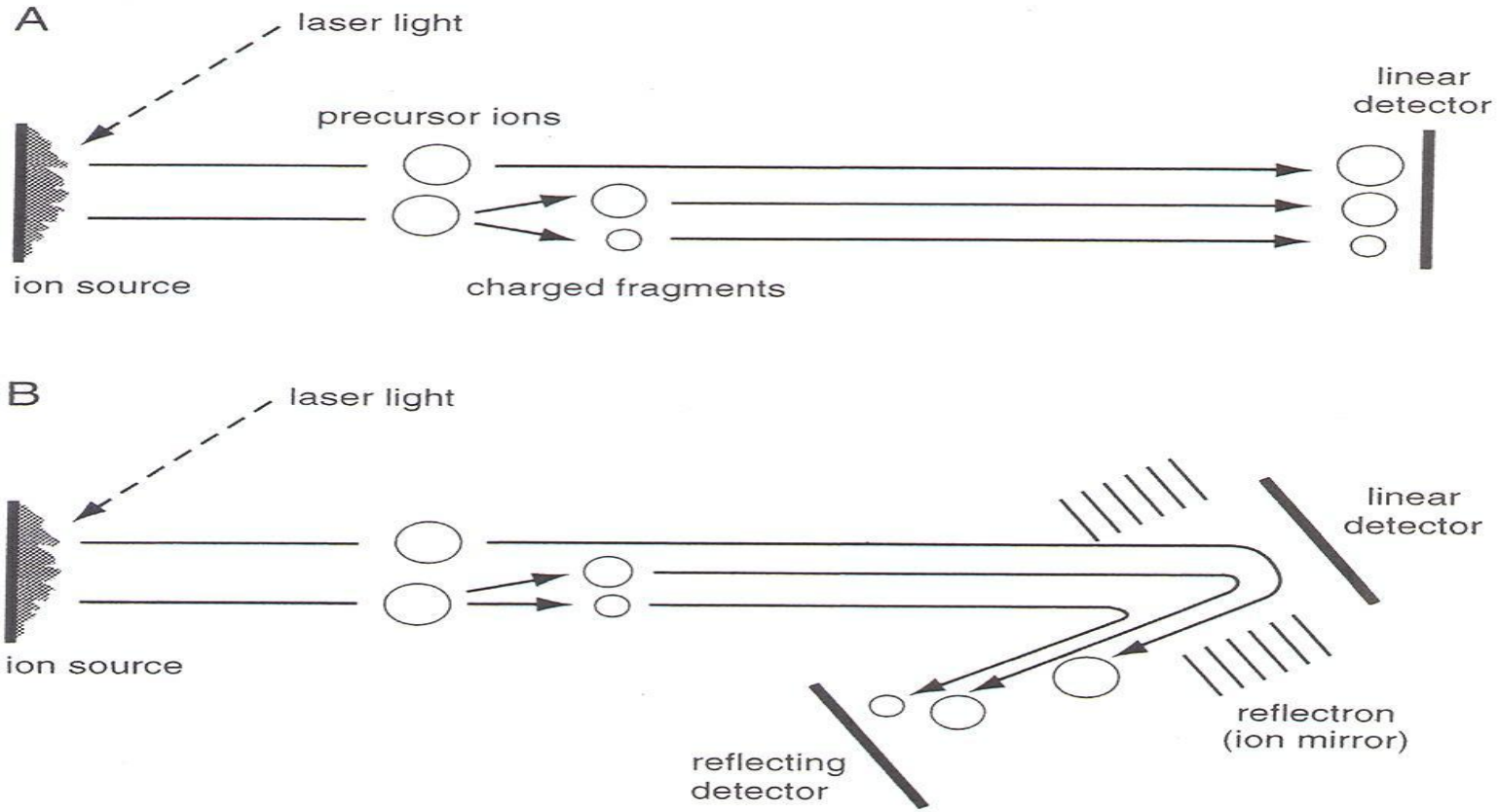
Гентизиновая кислота, 337 нм

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



Синапиновая кислота, 337 нм

Масс-спектрометрия МАЛДИ



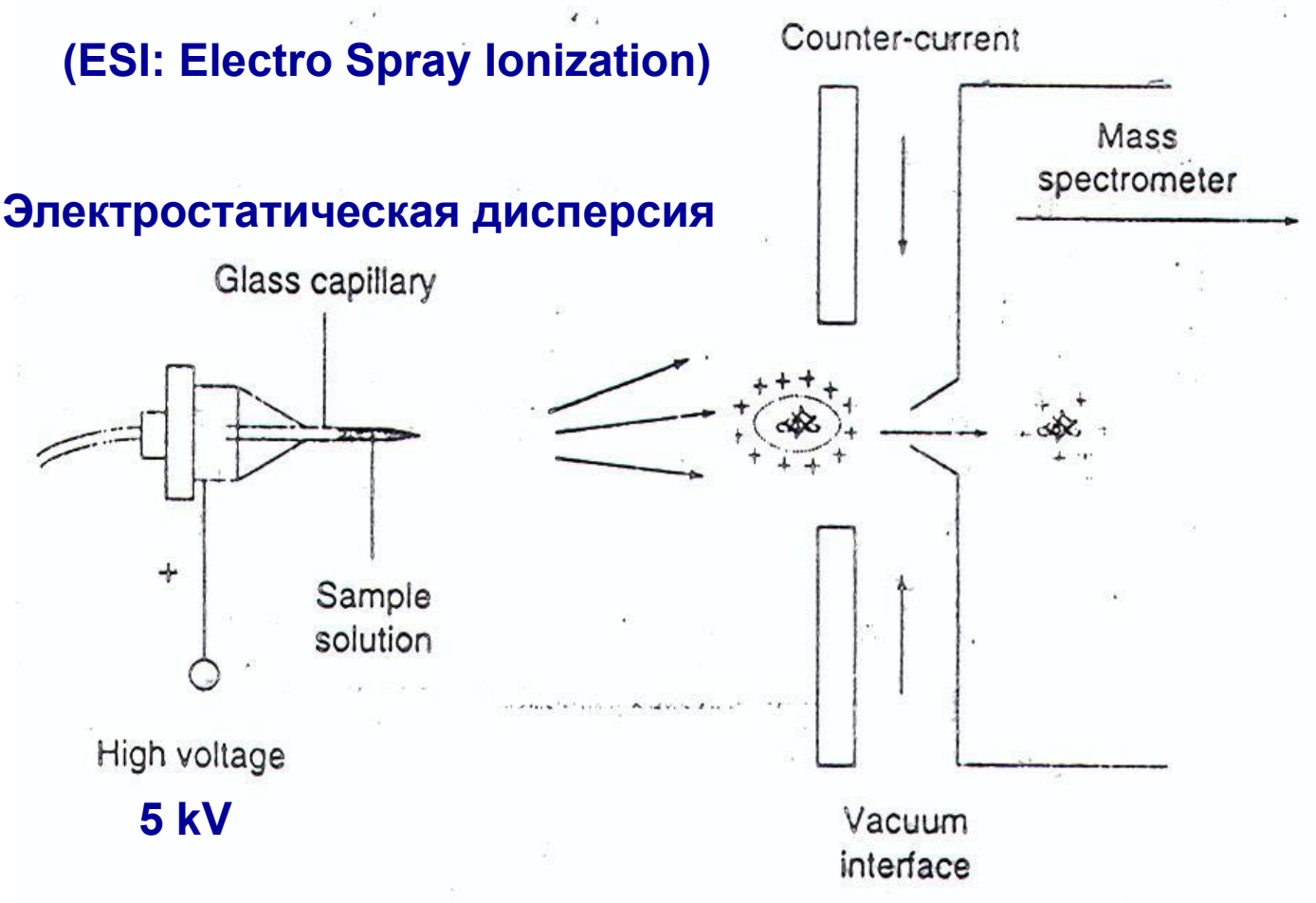
Ионы могут разделяться в линейном режиме или с помощью рефлектрона (ионного зеркала), повышающего разрешающую способность прибора.

Масс-спектрометрия с электрораспылительной ионизацией

Матиас МАНН, 1990 г.

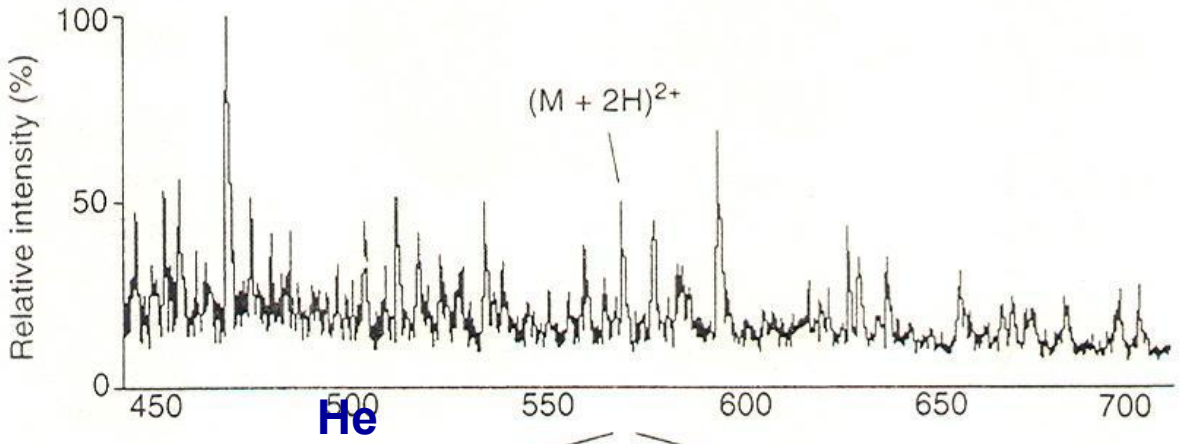
(ESI: Electro Spray Ionization)

Электростатическая дисперсия



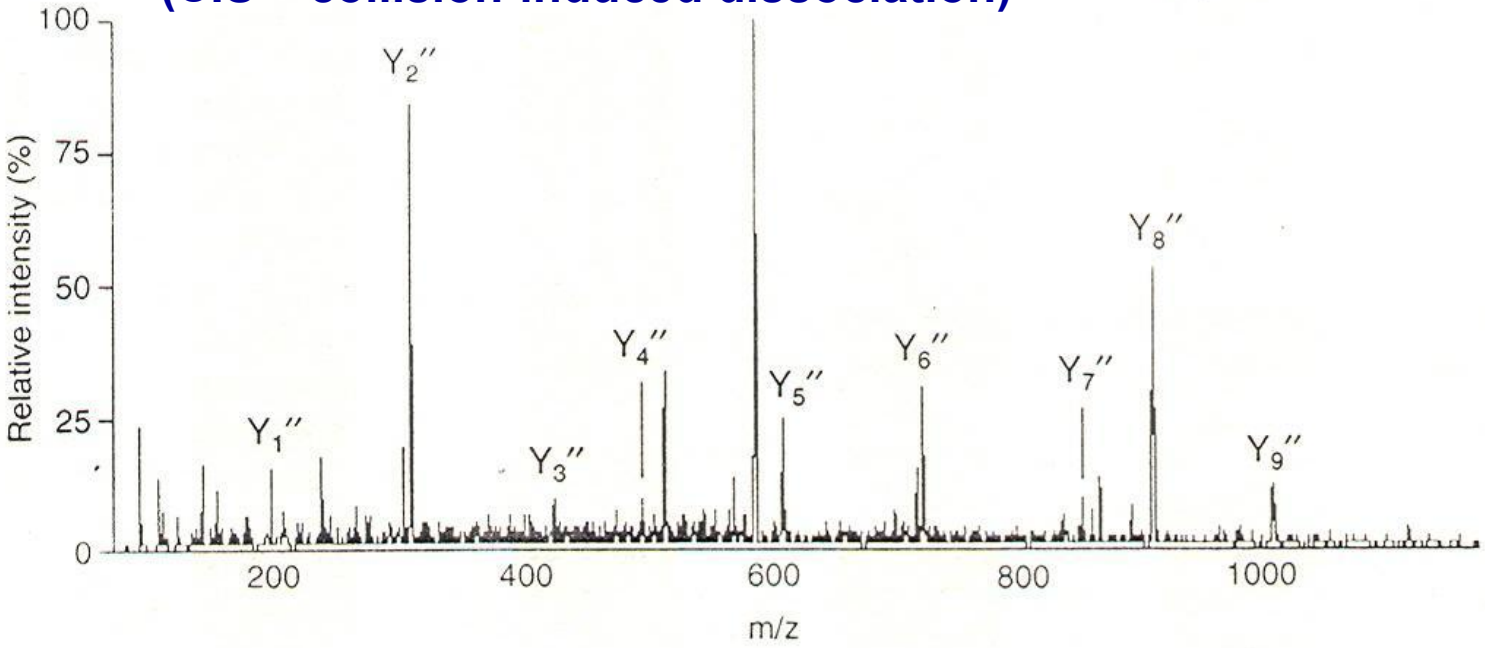
5 kV

ТАНДЕМНАЯ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ ESI MS/MS

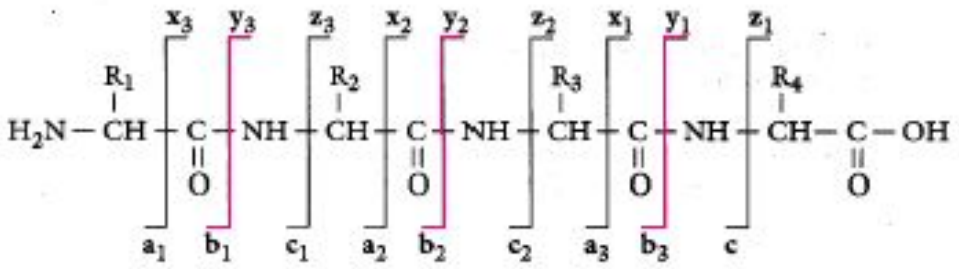


He

ДАС – диссоциация, активированная соударениями
(CIS – 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.

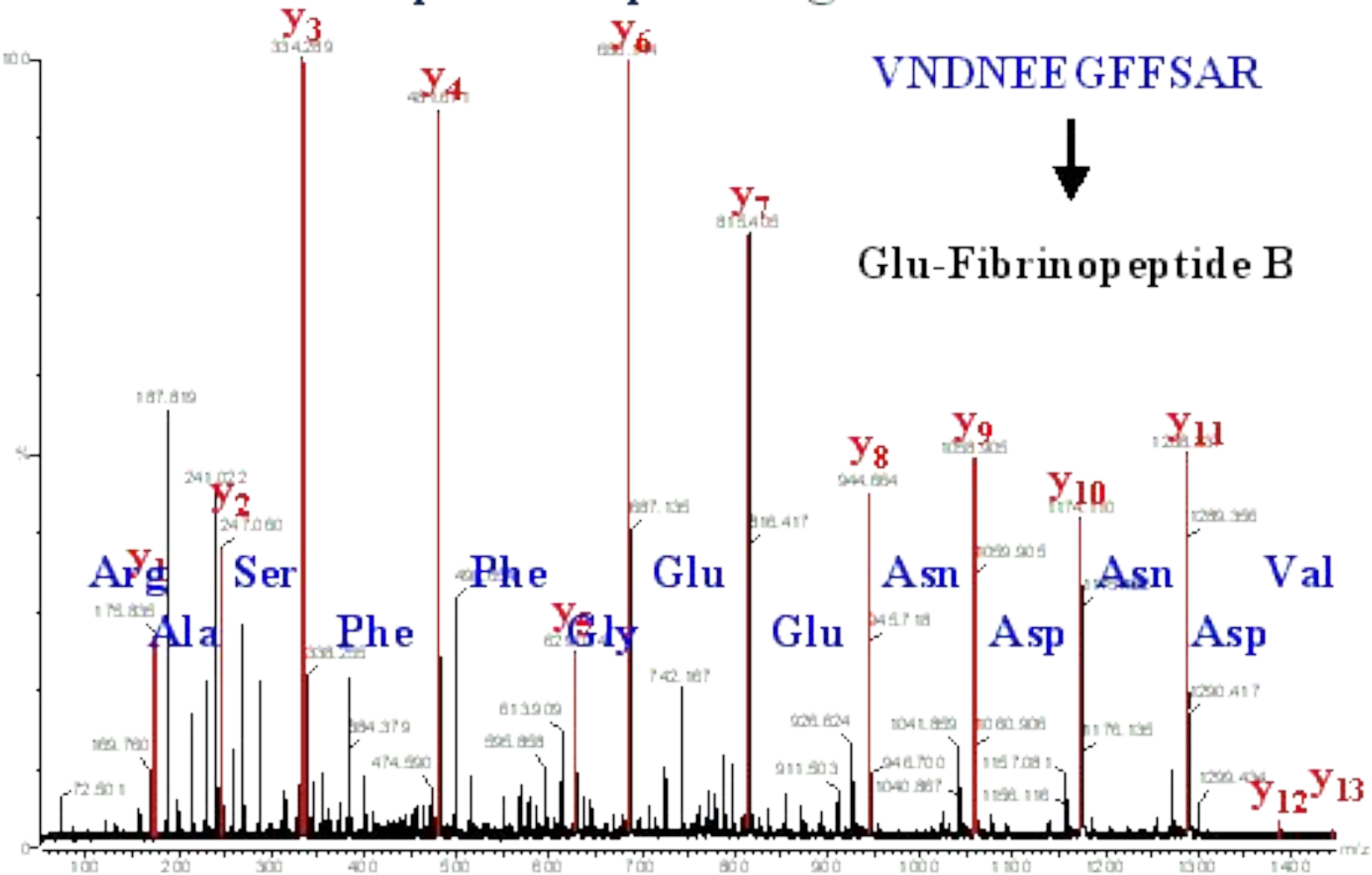
CID – фрагментация, индуцированная столкновениями

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



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 -

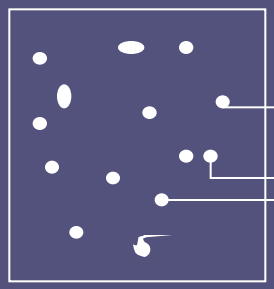
совокупность всех генов организма

- 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

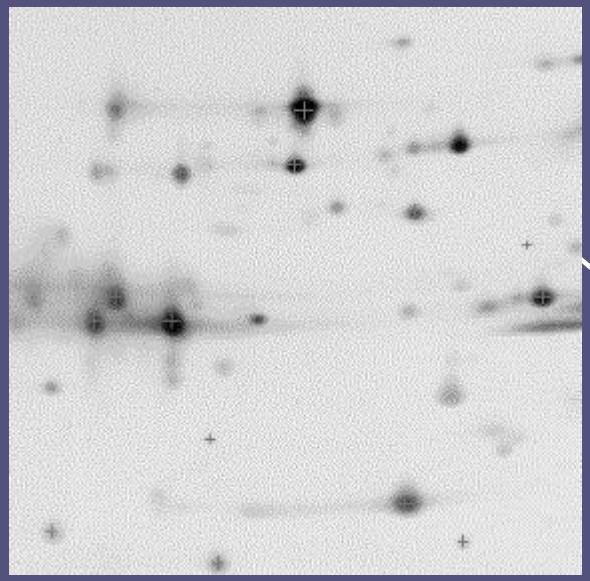
Сиквенс пептида

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)

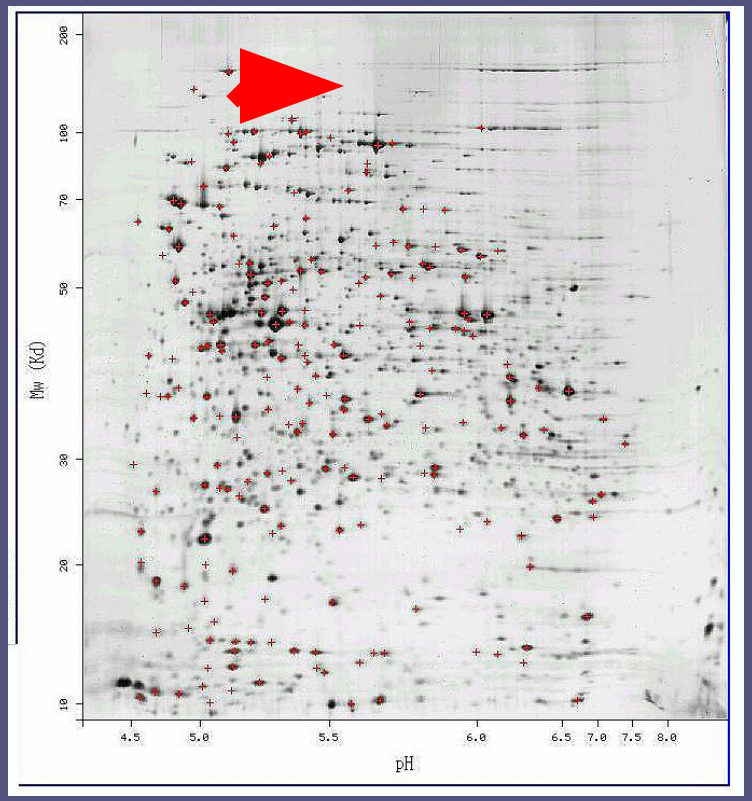
Post Source Decay-MS, TOF-TOF фрагментация отдельных пептидов

Поиск в базе данных измеренных масс фрагментов

Map Selection: E.coli

SWISS-2DPAGE: P00575

1 protein has been found

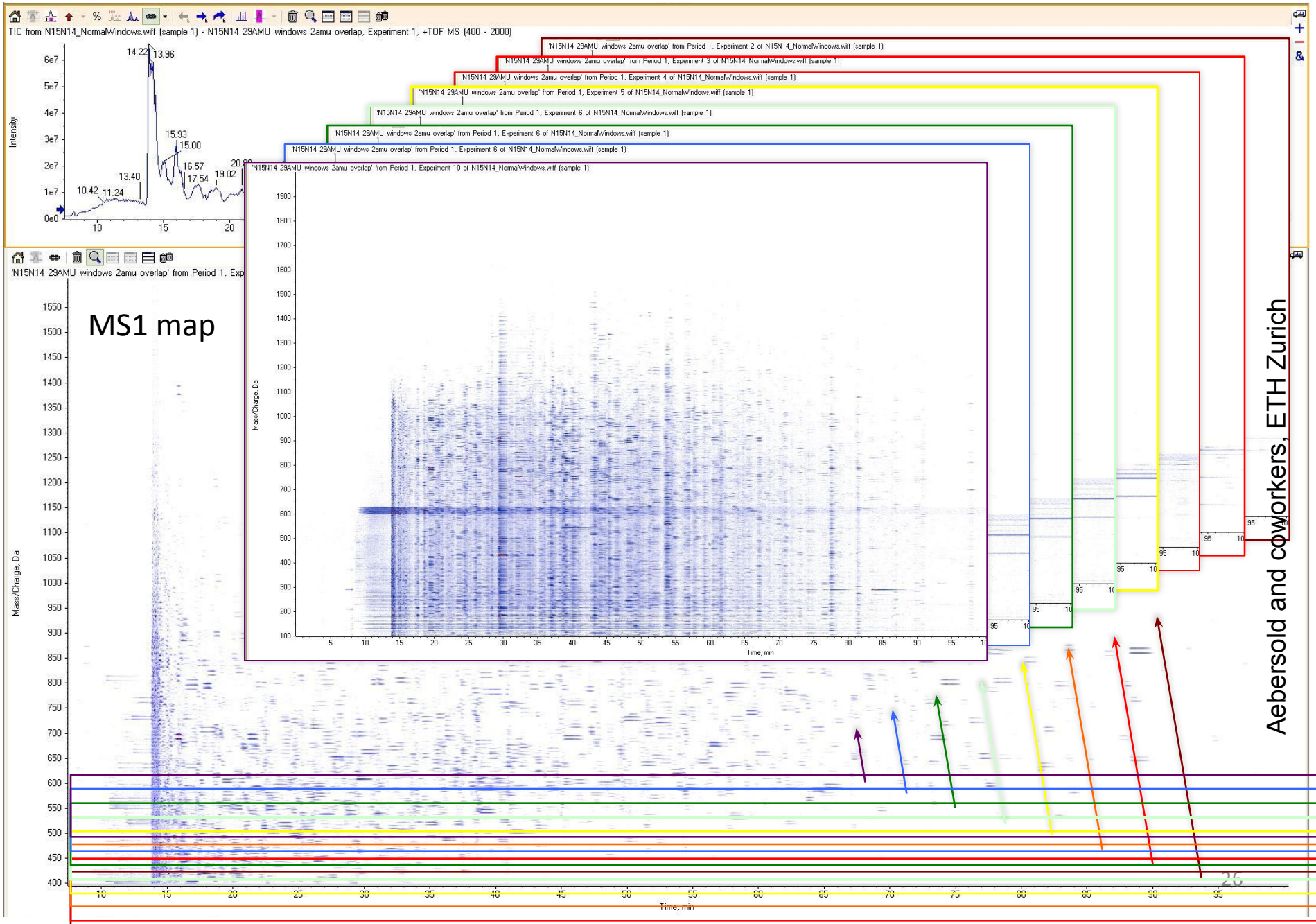


Name and origin of the protein	
Description	DNA-DIRECTED RNA POLYMERASE BETA CHAIN (EC 2.7.7.6) (TRANSCRIPTASE BETA CHAIN) (RNA POLYMERASE BETA SUBUNIT).
From	Escherichia coli.
Taxonomy	Bacteria; Proteobacteria; gamma subdivision; Enterobacteriaceae; Escherichia.
References	
1] MAPPING ON GEL. MEDLINE; 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	
Escherichia coli	**MAP LOCATIONS:** · SPOT 2D-000K6X; pI=5.12, Mw=151314 the clicked spot ·
Cross-references:	
SWISS-PROT	P))%&%, RPOB, ECOLI
ECO2DBASE	D157.0; 5TH

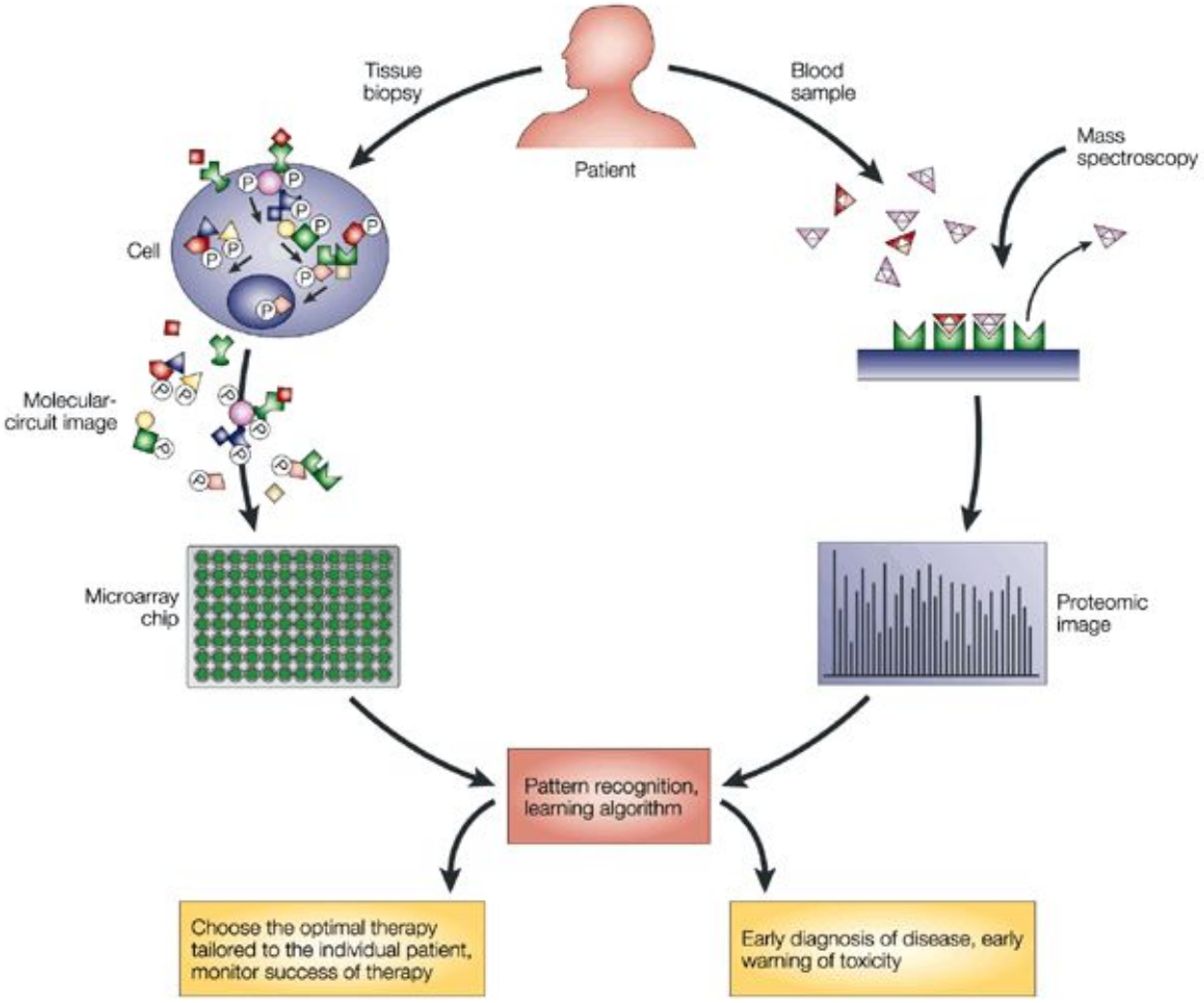
Количественная масс-спектрометрия с использованием технологии SWATH (Sequential Window Acquisition of all Theoretical Fragments) - последовательной периодической регистрации всех теоретических фрагментов.

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 технологии 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)
Intensity
MS1 map
Mass/Charge, Da
Time, min
Aebersold and coworkers, ETH Zurich

Использование протеомики в ранней диагностике заболеваний человека



Nature Reviews | Drug Discovery