



**Laboratoř funkční genomiky a proteomiky**

Národní centrum pro výzkum biomolekul

Přírodovědecká fakulta MU

CEITEC-MU



**CEITEC**

**Metody v genomice a proteomice, CG080**

# **HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE V PROTEOMICE**

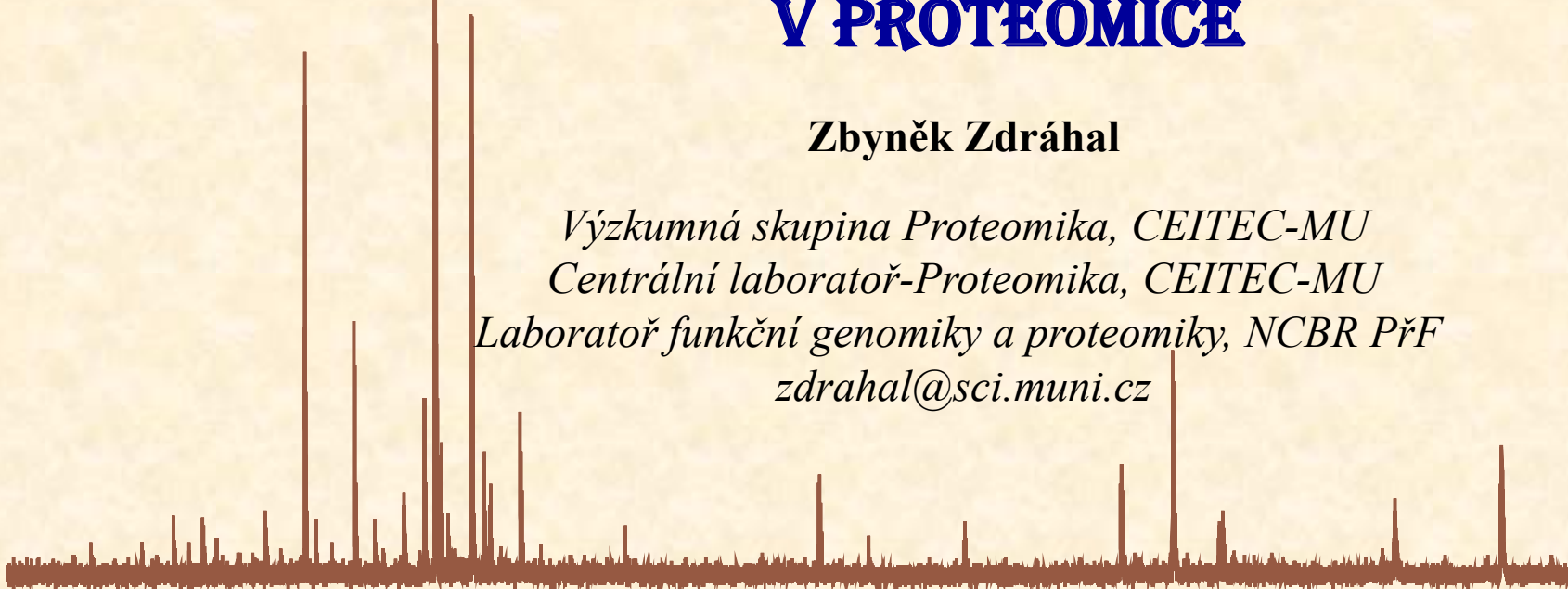
**Zbyněk Zdráhal**

*Výzkumná skupina Proteomika, CEITEC-MU*

*Centrální laboratoř-Proteomika, CEITEC-MU*

*Laboratoř funkční genomiky a proteomiky, NCBR PŘF*

*[zdrahal@sci.muni.cz](mailto:zdrahal@sci.muni.cz)*



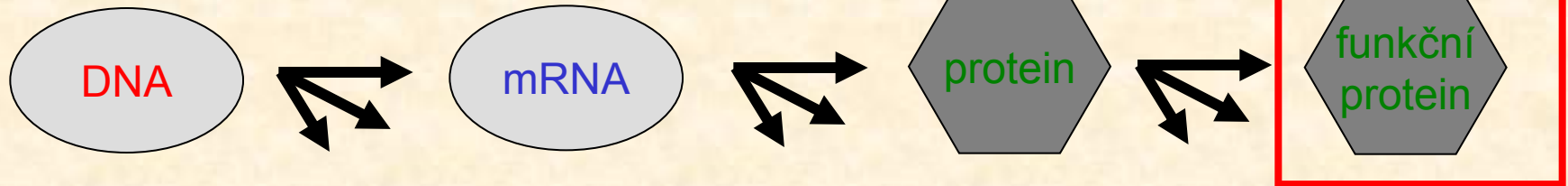
Úvod



# Proteomika – disciplína zabývající se analýzou proteomu

*co se může stát*

*co se opravdu děje*



**transkripce**  
posttranskripční úpravy  
(alternativní sestřih aj.)

**translace**

**Posttranslační úpravy**  
posttranslační modifikace  
(fosforylace, glykosylace aj.)

**Proteinové komplexy**

- z každého genu může vzniknout několik proteinů, resp. jejich forem, které nelze indikovat na základě analýzy DNA resp. mRNA
- neexistuje přímá korelace mezi obsahem mRNA a výsledným obsahem proteinů

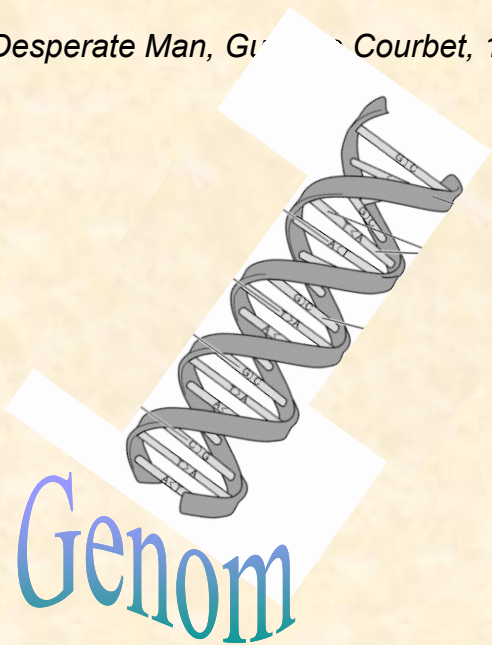
**Metabolomika**



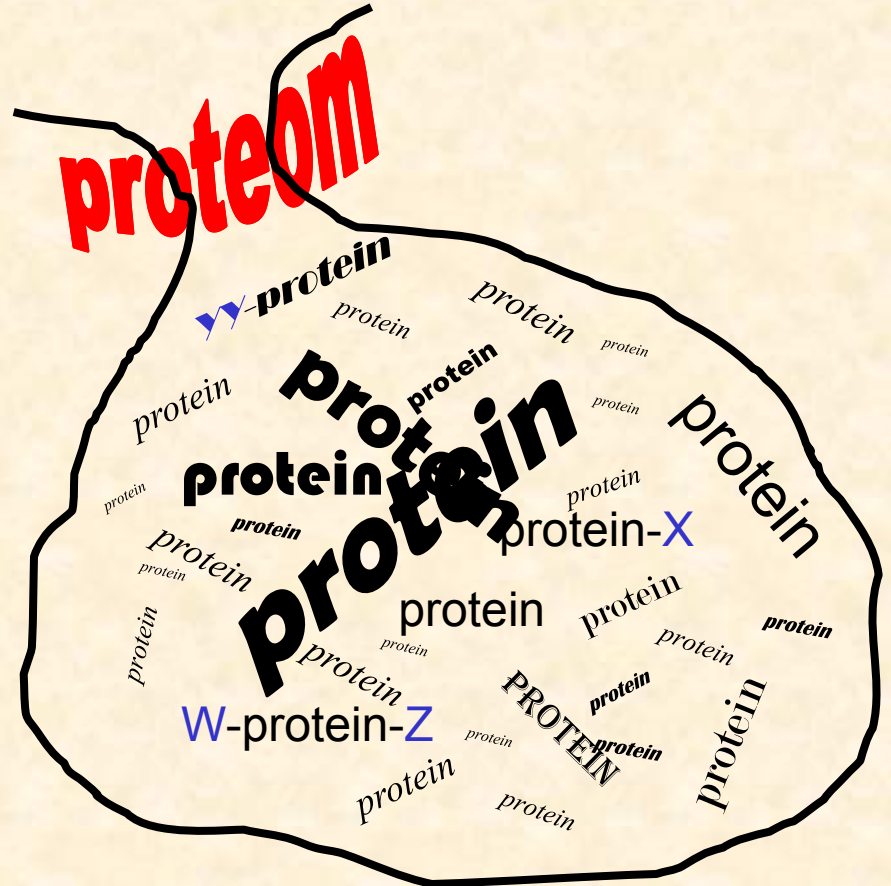
The Desperate Man, Gustave Courbet, 1844-45

## Analýza proteomu

charakterizace všech proteinů včetně všech jejich forem v buňce (tkáni, organismu) v daném čase za daných podmínek



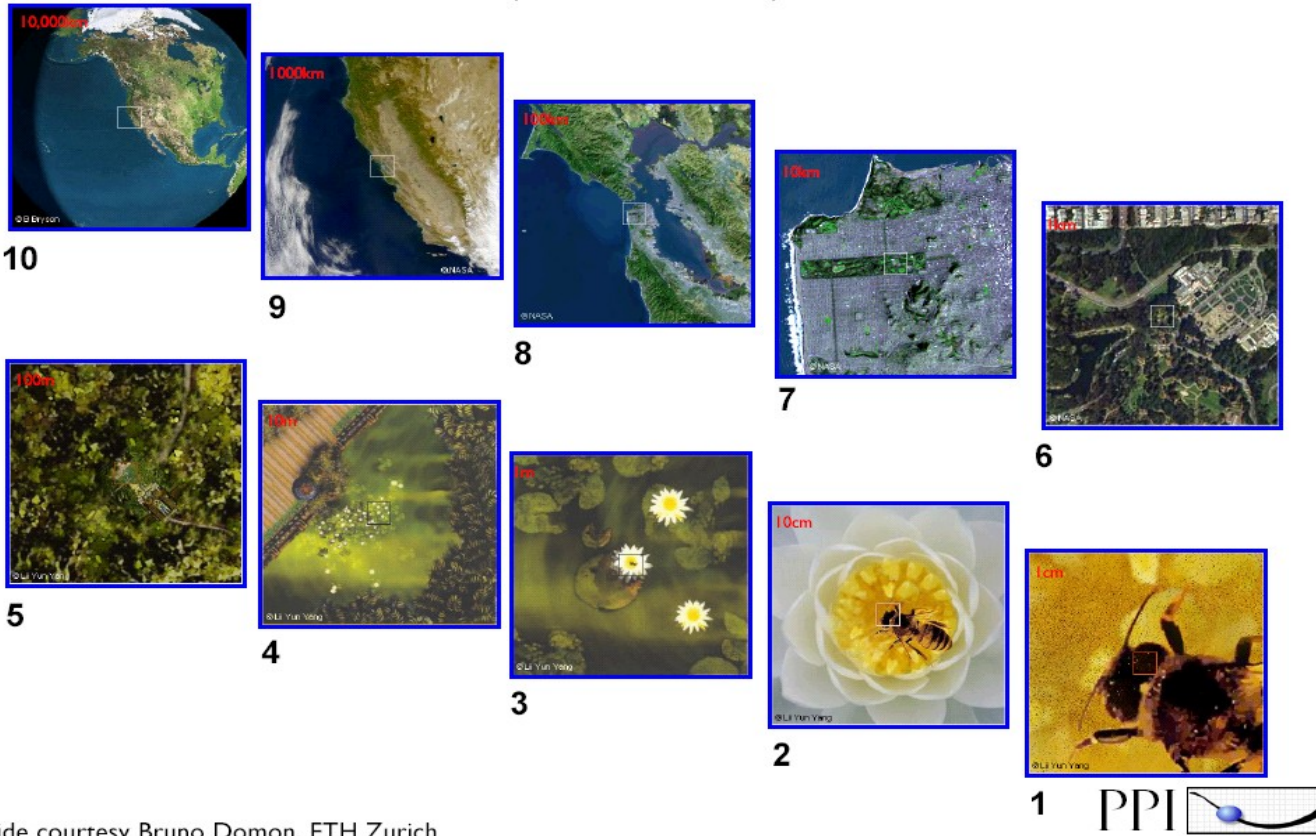
X



# Úskalí analýzy proteomu



$10^{10}$  Really Is Wide Dynamic Range  
(Here on a linear scale)



Slide courtesy Bruno Domon, ETH Zurich

● kon  
lidsi

● šir  
nuti  
rea

● širo

● ana  
pro  
prot

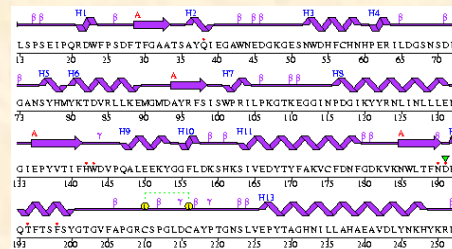
ml)

šch

# Struktura proteinů

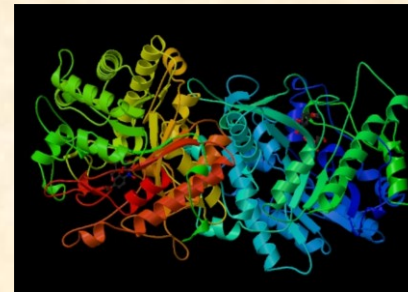
## Primární struktura (pořadí aminokyselin):

...ALEEKYGGFLDKSHKSI VEDYTYFAKVCDFNFGDKVKNWLT FNEPQTFTSFSYGTGVFAP  
GRCSPLDCAYP TGN SLVEPYTAGHNI LLAHAEAVDLYN...

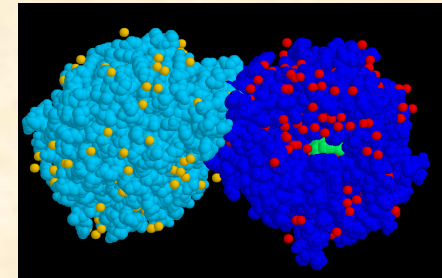


## Sekundární struktura (vodíkové můstky)

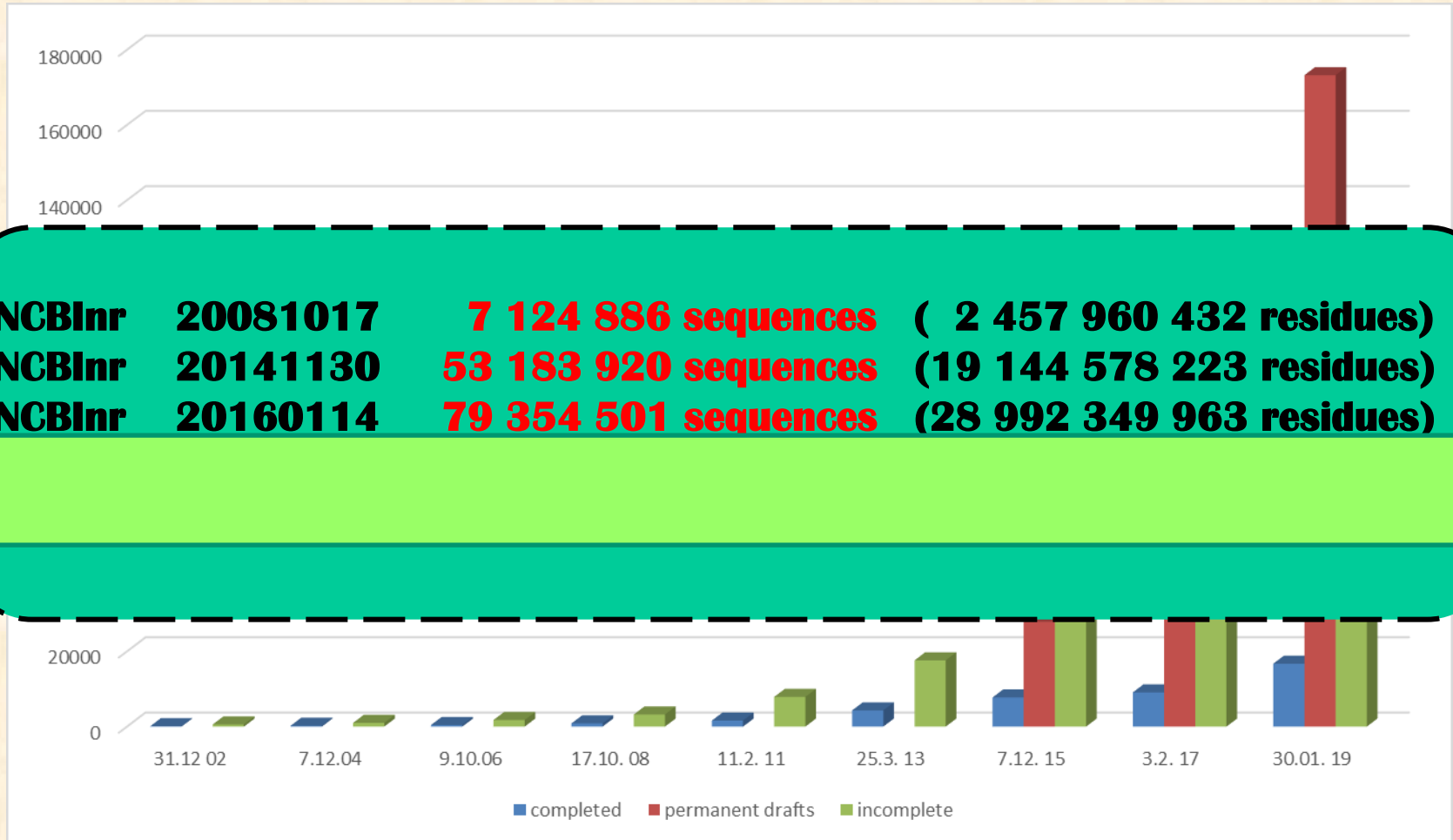
## Terciární struktura (skládání)



## Kvarterní struktura (asociace podjednotek)



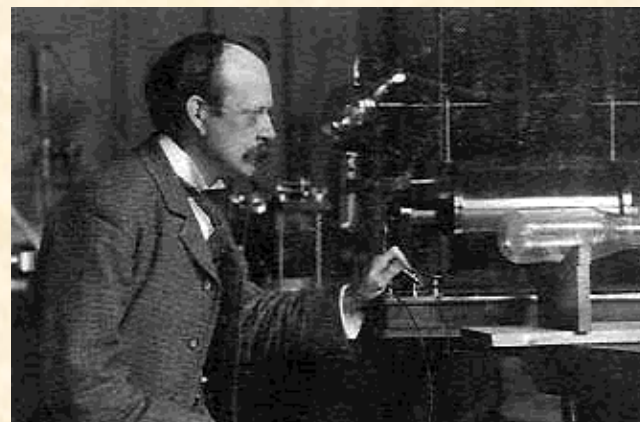
# Nárůst znalosti genomů



# Možnosti hmotnostní spektrometrie

*Základní úkoly MS v analýze proteinů:*

- **Určení hmotnosti intaktních proteinů**
- **Identifikace proteinů (proteinové komplexy)**
- **Určení druhu a místa posttranslační modifikace**
- **Kvantifikace proteinů**
- **MS imaging**
- **Studium prostorové struktury (komplementární k NMR)**



*Otec hmotnostní spektrometrie J.J. Thomson,  
Nobelova cena za fyziku, 1906*



***GIGO***

*garbage in* → *garbage out*

# Základy hmotnostní spektrometrie



# Hmotnostní spektrometrie (MS)

*Princip metody:*

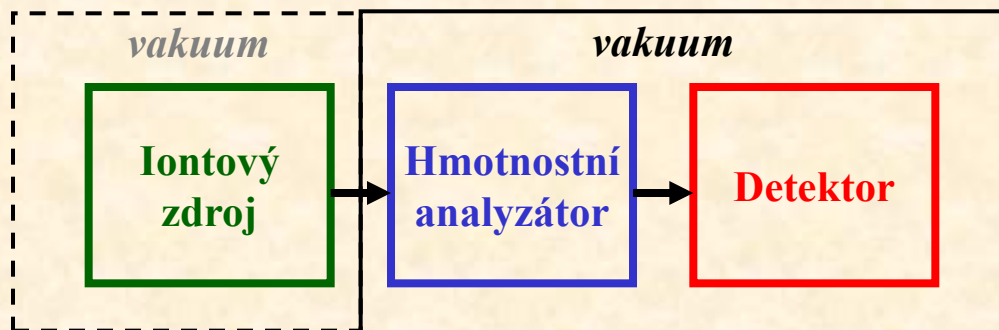
- měření poměru  $m/z$  iontů analyzované látky

$m$  - hmotnost iontu

$z$  - počet nábojů

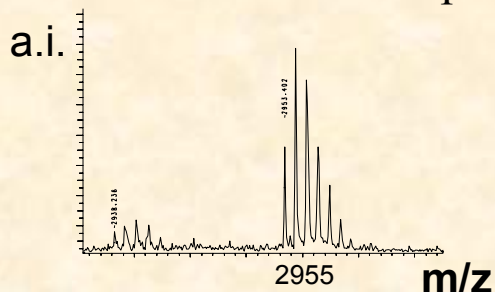
*Základní operace:*

- ionizace molekul analyzované látky
- separace iontů podle jejich  $m/z$
- detekce iontů



*Výsledek:*

- hmotnostní spektrum - závislost intenzity iontů na jejich  $m/z$



takto **určení hmotnosti iontů**,  
v případě molekulárního iontu

**hmotnost celé molekuly**

*Pozn. Kromě vybraných typů ionizace, všechny kroky MS analýzy probíhají ve vakuu, aby bylo zamezeno nechtěným srážkám analyzovaných iontů po cestě ze zdroje do detektoru (střední volná dráha molekul)*

## Průlom v MS proteinů

Nové „šetrné“ ionizační techniky (polovina 80. let 20. století)

základní předpoklad pro široké využití MS pro analýzu biomolekul  
(Nobelova cena 2002)



**Koichi Tanaka**  
Shimadzu Corp., Kyoto, Japan

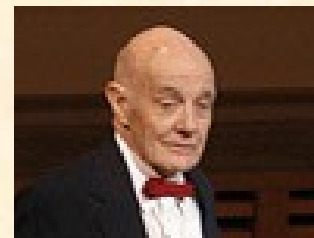
### MALDI

ionizace laserovou desorpcí za účasti matrice

**KARAS M., HILLENKAMP F.**

*Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses  
Exceeding 10000 Daltons*

Anal. Chem., 60 (20): 2299-2301 (1988)



**John B. Fenn**  
Virginia Commonwealth University,  
Richmond, USA

### ESI

ionizace elektrosprejem

# Hmotnostní spektrometrie proteinů

v současnosti nejrozšířenější technika pro charakterizaci proteinů

## MALDI

nejčastěji v kombinaci s průletovým hmotnostním analyzátozem – **TOF**  
(*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*)

**MALDI - TOF MS**

**MALDI – TOF/TOF MS**

## ESI

standardně v kombinaci s iontovou pastí – **IT**  
(*electrospray ion trap mass spectrometry*)

**ESI - IT MS**

**QQQ, Q-TOF, Q-LIT, ICR, Orbitrap ....**

# MALDI-TOF MS analýza

**matrice** je nízkomolekulární látka schopná absorpce laserového záření

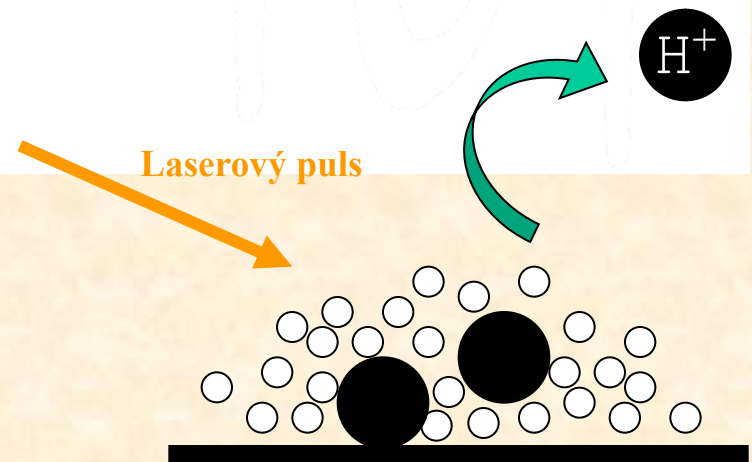
*např. kyselina dihydroxybenzoová (pro UV laser)*

## ***Příprava vzorku:***

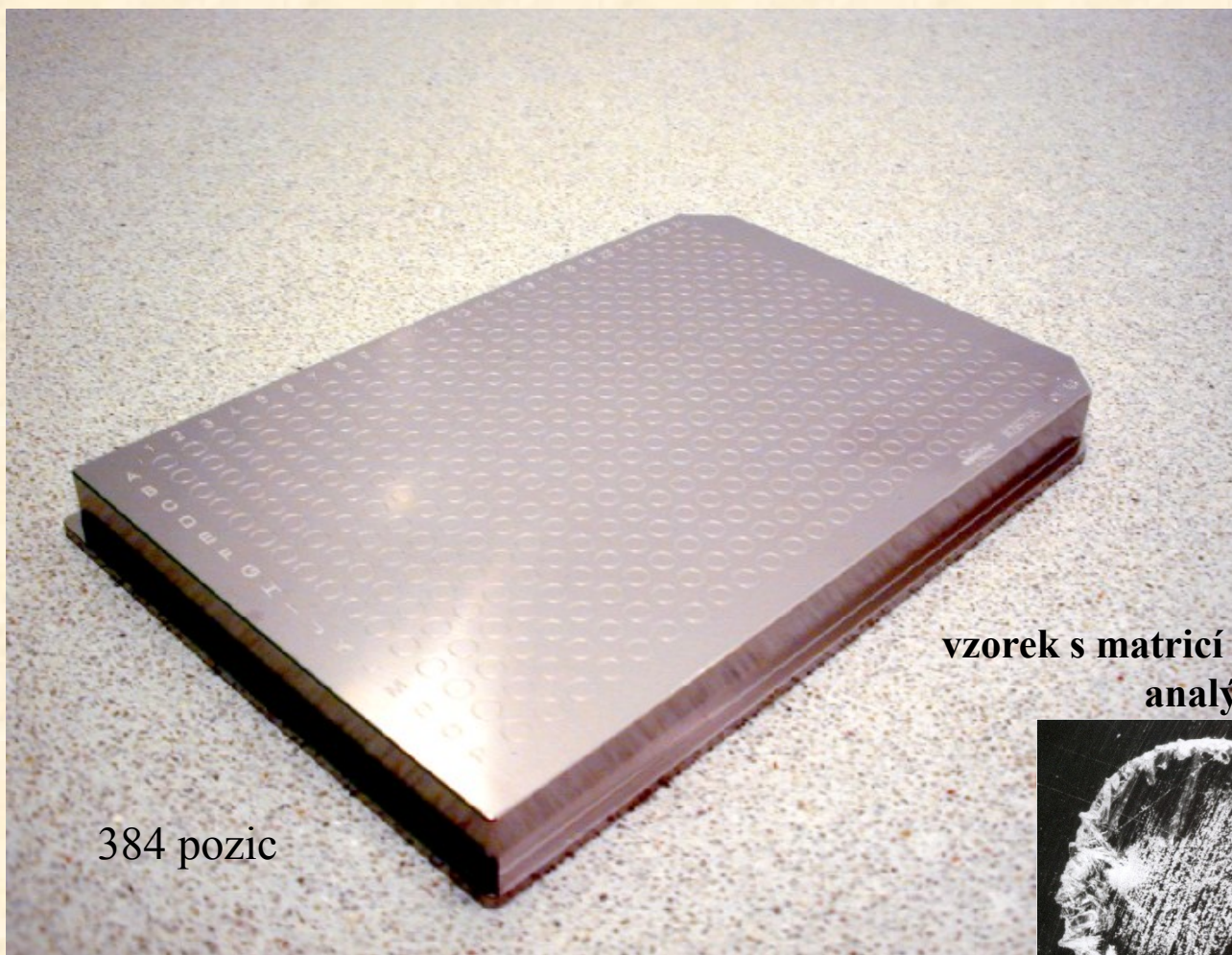
- ▶ vzorek proteinu je smíchán s nadbytkem matrice
- ▶ směs je nanesena na vzorkovací destičku a nechá se zaschnout
- ▶ vzniknou směsné krystaly matrice se vzorkem
- ▶ vlastní MS analýza

## ***Výsledek:***

- Šetrná ionizace bez fragmentace
- Jednoduchá spektra
- Uchování vzorku na vzorkovací desce

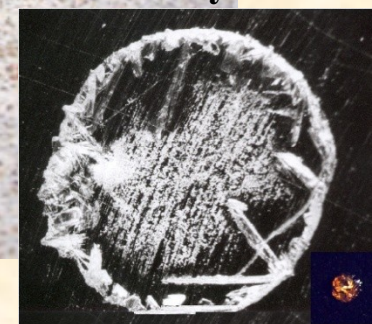


## Vzorkovací destička pro MALDI-MS



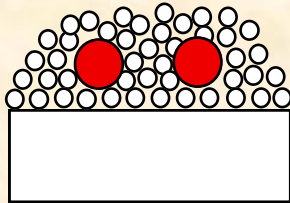
384 pozic

vzorek s matricí připravený na  
analýzu

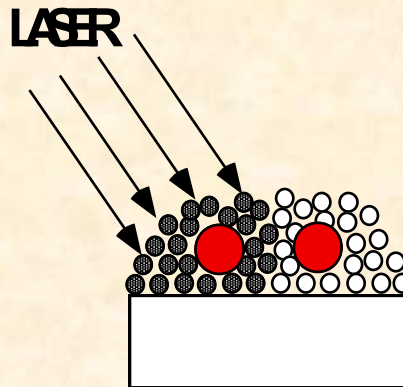


# Desorption-ionization process

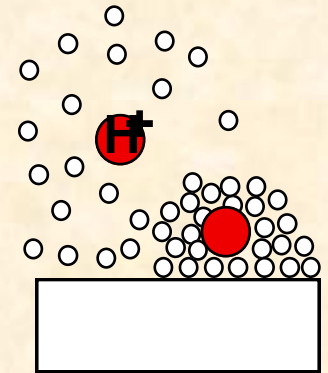
Sample embedded in  
light-absorbing matrix



Laser excitation of  
matrix molecules



Sample desorption and  
protonation





# Průletový analyzátor (Time-of-Flight, TOF)

Separuje ionty dle doby letu analyzátořem, čas je pak přepočten na hmotnost

$$E = \frac{1}{2} m v^2$$

$$V = s/t$$

*E* – energie iontu

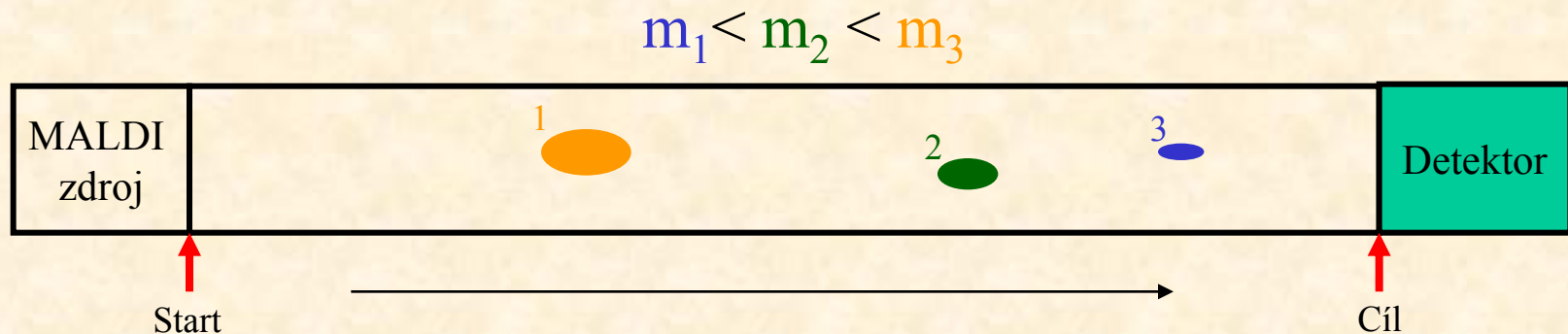
*m* – hmotnost iontu

*v* – rychlost iontu

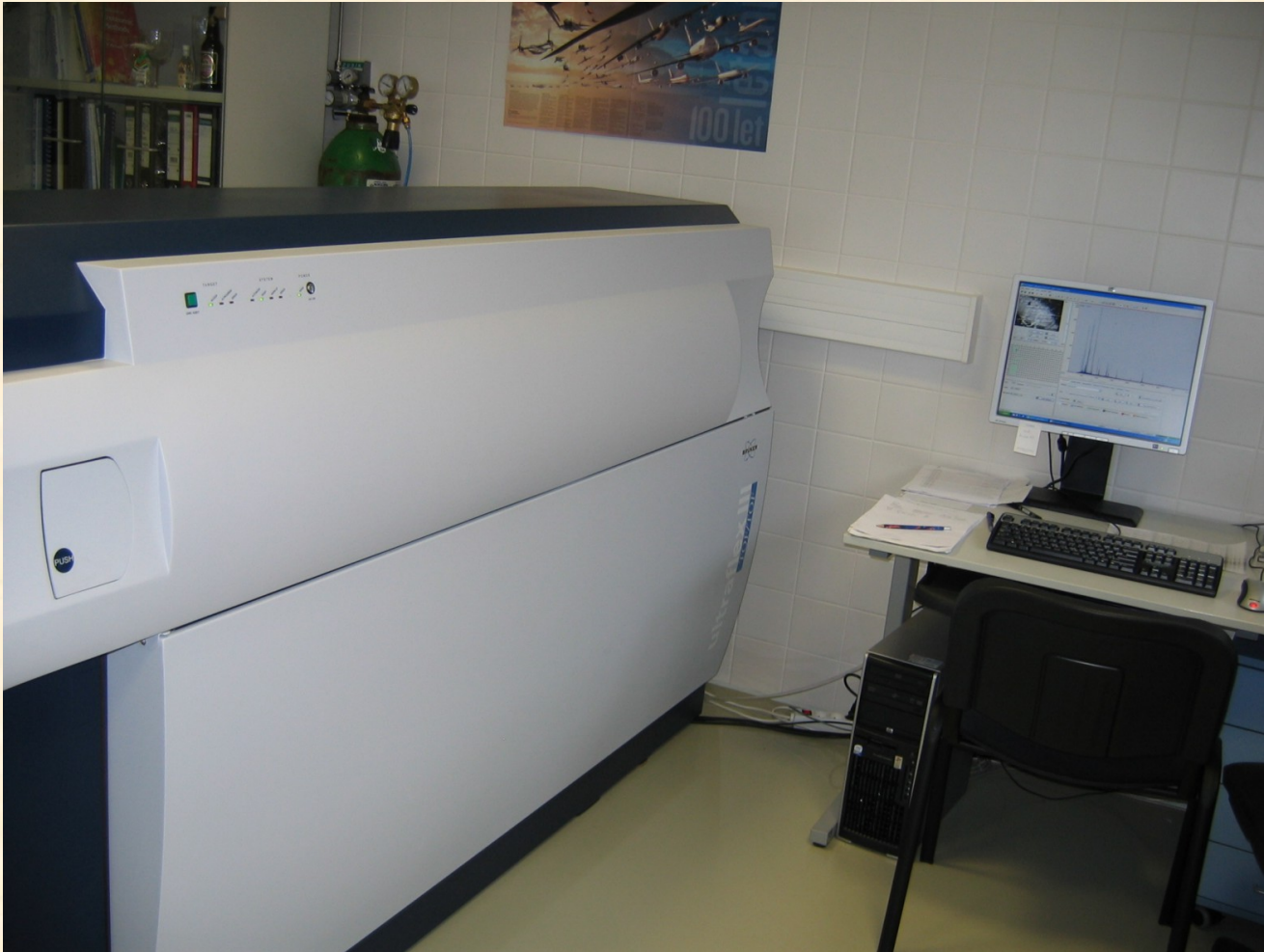
*s* – dráha letu

*t* – doba letu iontu

Ionťům je po ionizaci udělena stejná kinetická energie; současně vstupují do trubice analyzátořu a měří se jejich čas dopadu na detektor

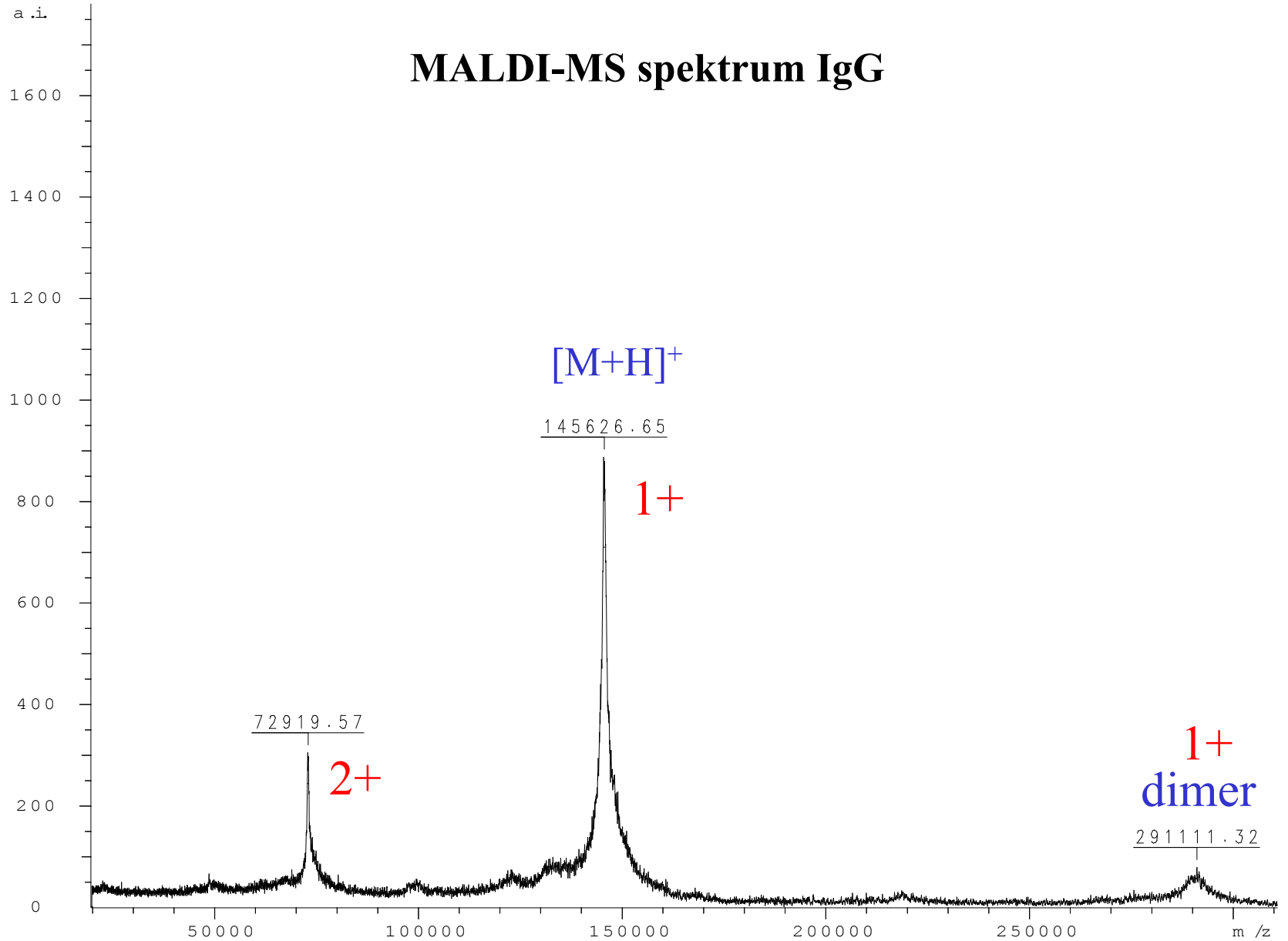


## MALDI - MS/MS

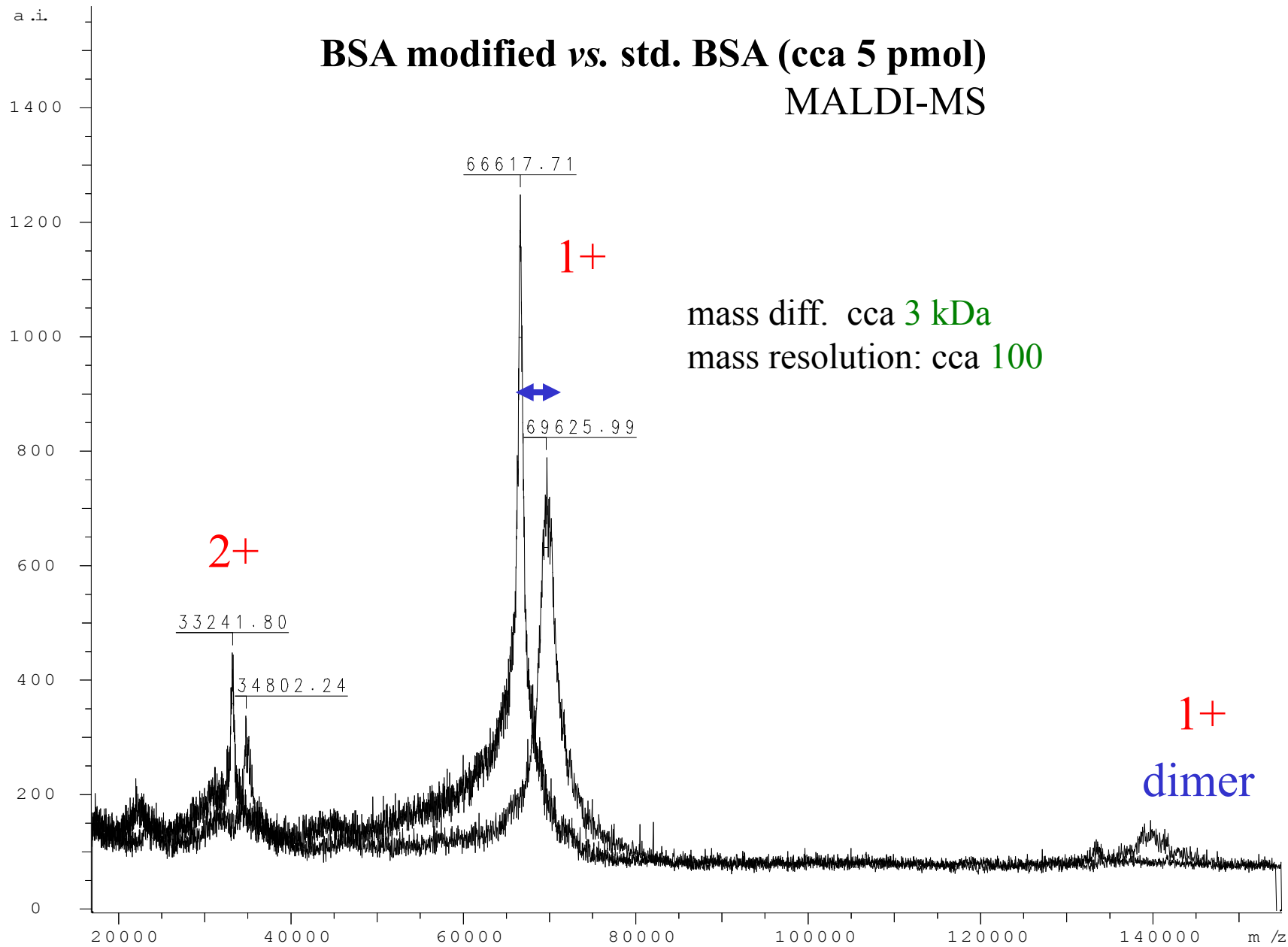


MALDI-TOF/TOF hmotnostní spektrometr Ultraflex III (Bruker)

# MALDI-MS spektrum IgG

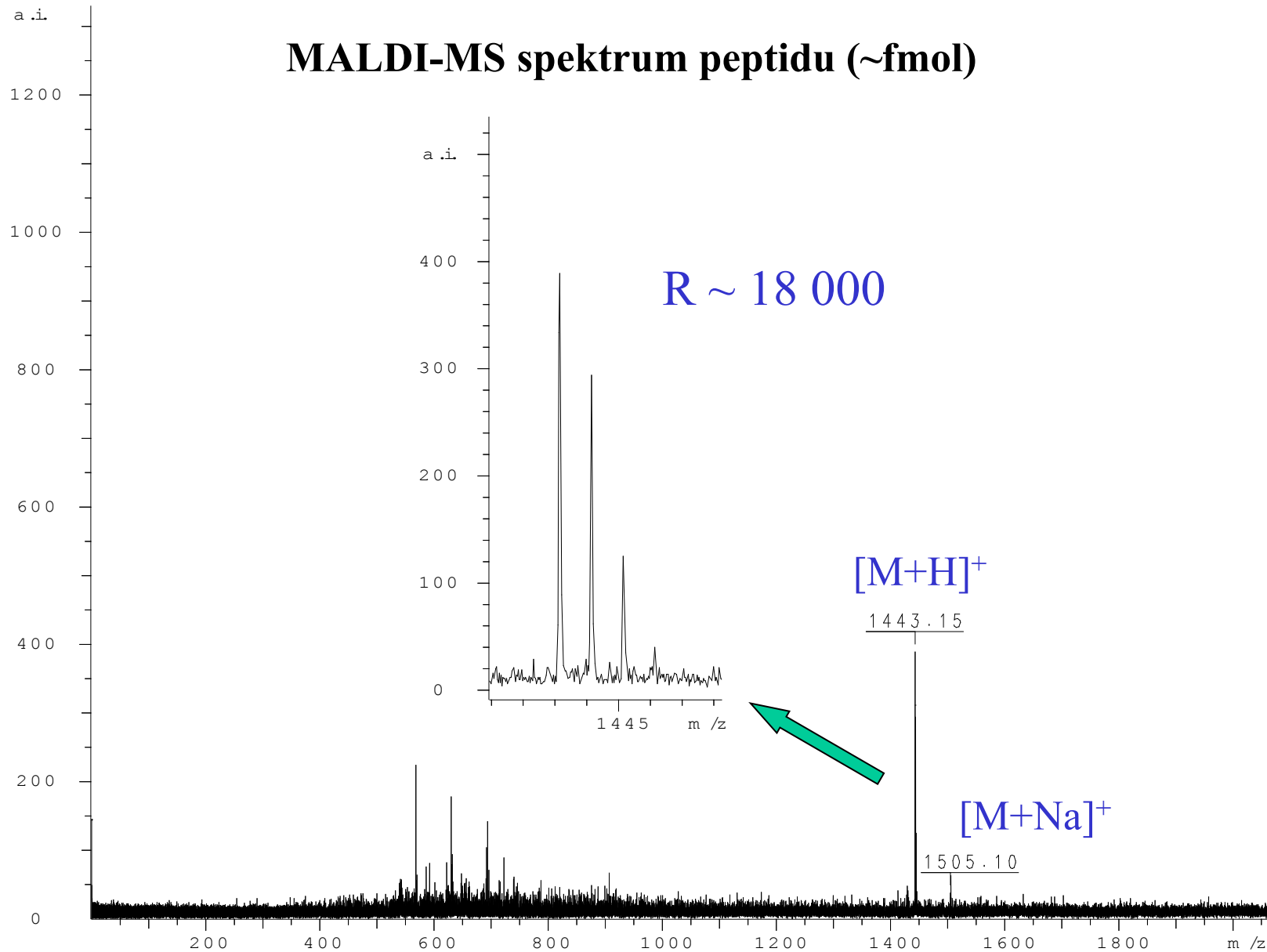


# BSA modified vs. std. BSA (cca 5 pmol) MALDI-MS



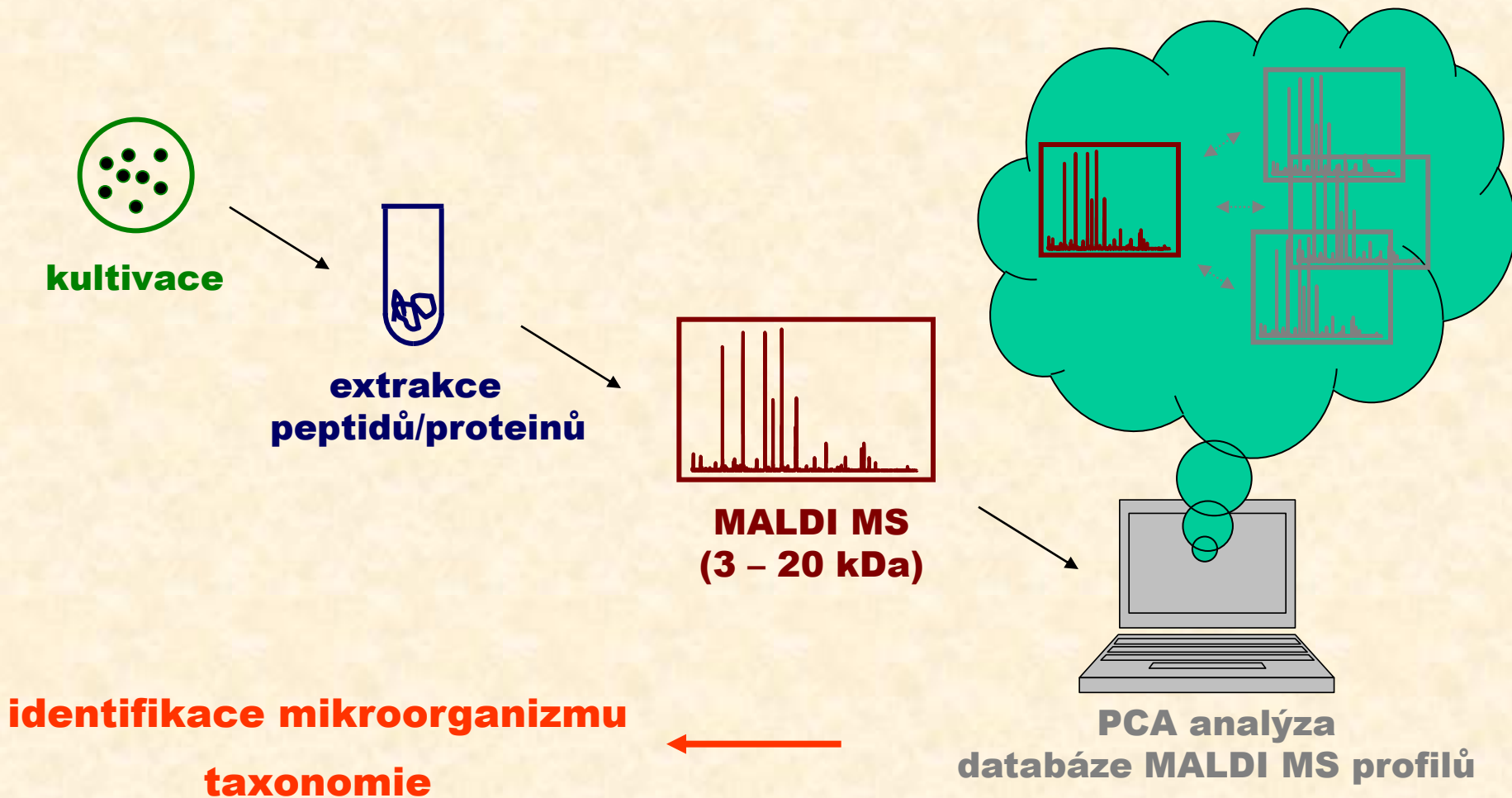
mass diff. cca 3 kDa  
mass resolution: cca 100

# MALDI-MS spektrum peptidu (~fmol)



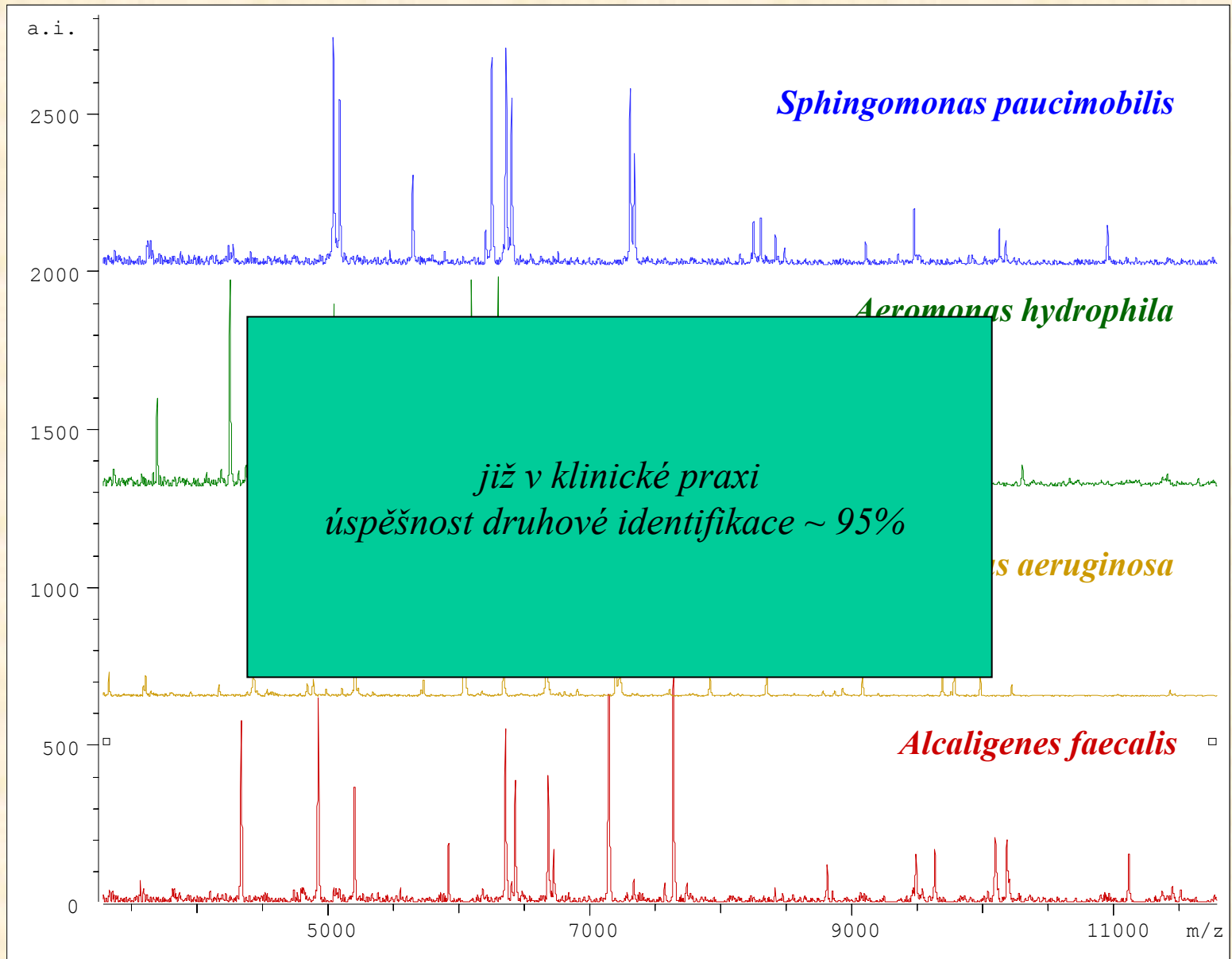
# MALDI-MS profilování

## Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-MS



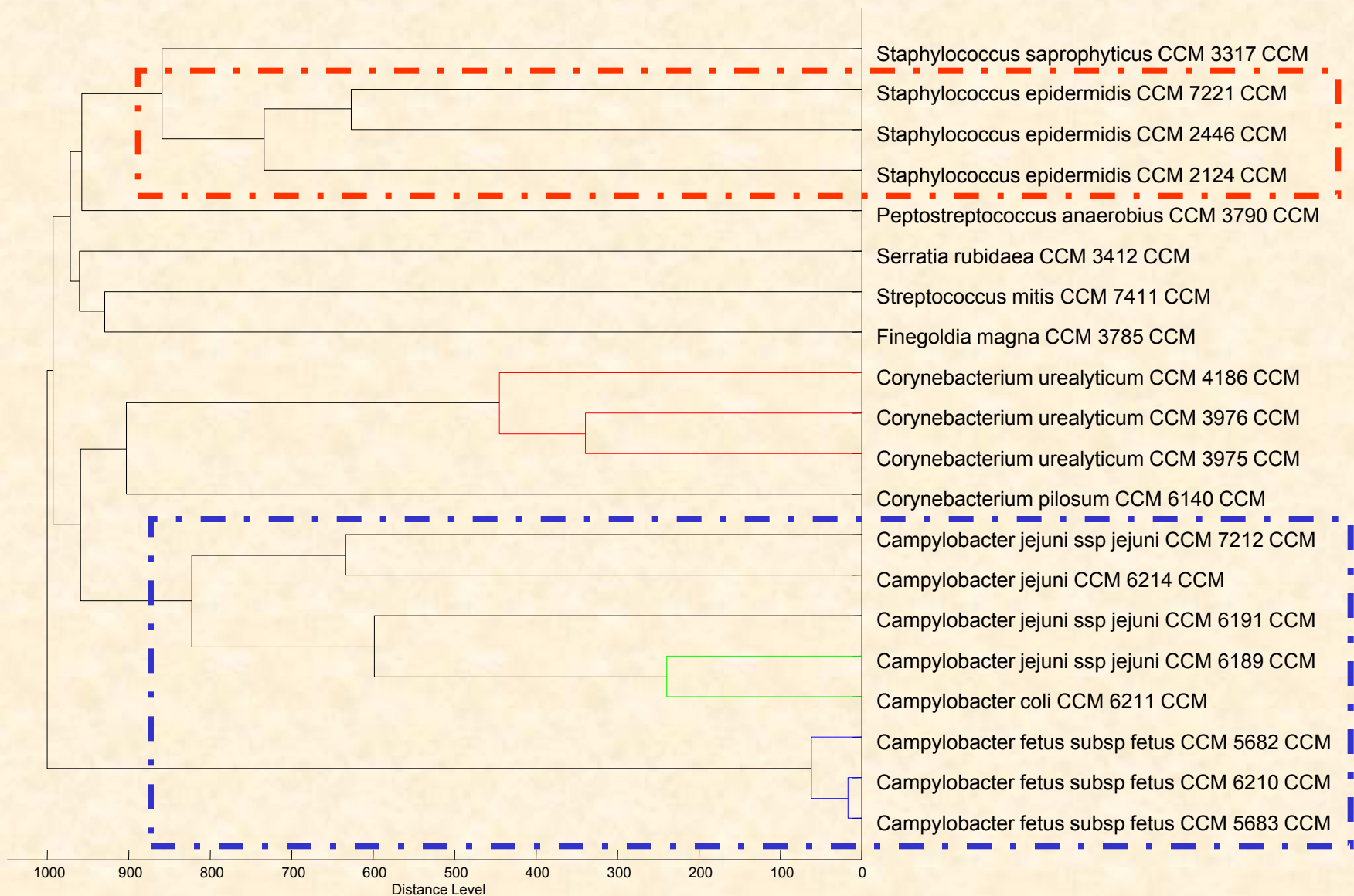
# MALDI-MS profilování

## MALDI-MS spektra (profily) vybraných bakterií



# MALDI-MS profilování

## Grafické vyjádření podobnosti MALDI-MS profilů bakterií





# ESI ionizace

## *Příprava vzorku:*

- ▶ vzorek je v roztoku
- ▶ roztok je pak dávkován přes vstupní kapiláru do iontového zdroje

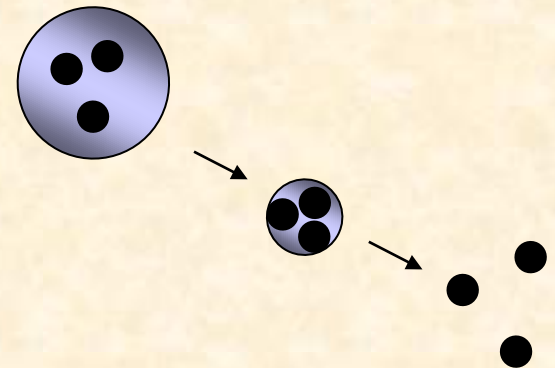
## *Ionizace vzorku:*

- ✚ roztok vzorku je vstupní kapilárou zmlžován v komoře iontového zdroje **za atmosferického tlaku**
- ✚ ionizace probíhá ve spreji působením vloženého elektrického napětí
- ✚ vznikají nabité kapičky kapaliny, které během odpařování přechází na vícenásobně nabité ionty
- ✚ ionty jsou pak vtaženy do vakuové části spektrometru přechodovou kapilárou a dále analyzovány

## *Výsledek:*

- Šetrná ionizace bez fragmentace
- vícenásobně nabité ionty
- Snadné spojení se separačními technikami (LC, CE)

LC - kapalinová chromatografie; CE - kapilární elektroforéza

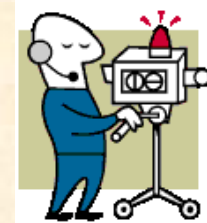


# Iontová past

## *MS scan*

### **Měření hmotností resp. $m/z$ analyzovaných iontů**

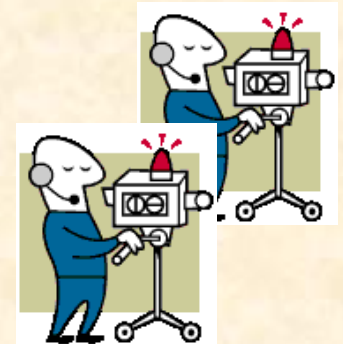
- zachycení iontů
- postupné vypuzování iontů z pasti podle  $m/z$
- detekce iontů



## *MS/MS scan*

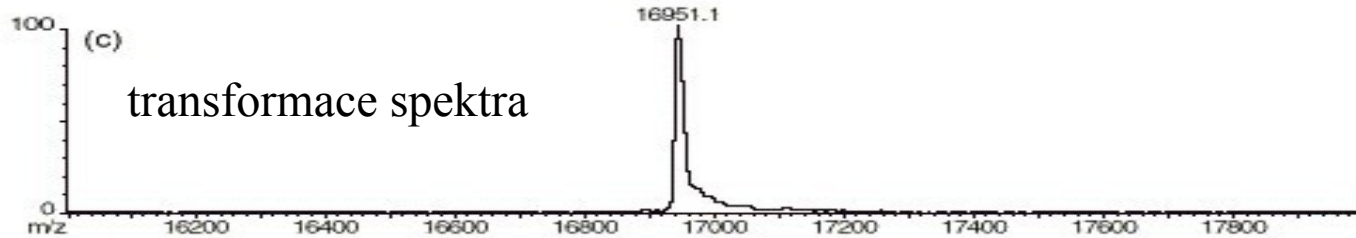
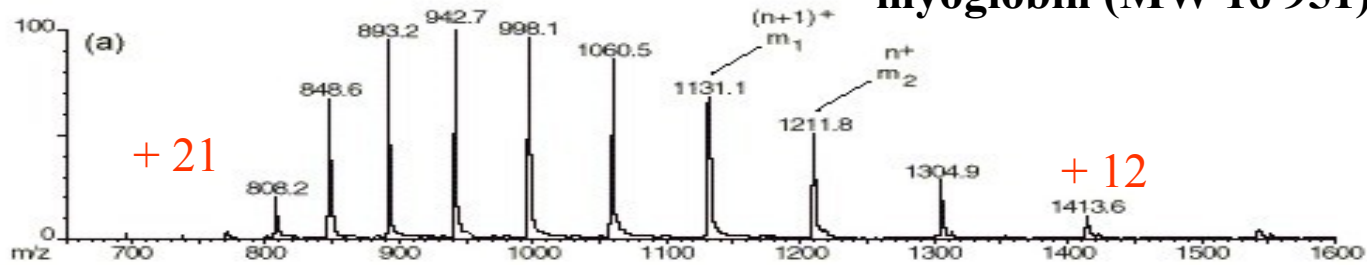
### **Analýza fragmentů vybraných iontů**

- zachycení iontů
- vypuzení všech iontů z pasti mimo iontů s požadovaným  $m/z$
- excitace a fragmentace vybraných iontů
- detekce fragmentů (dceřinných iontů)



# ESI-MS spektrum proteinu

myoglobin (MW 16 951)

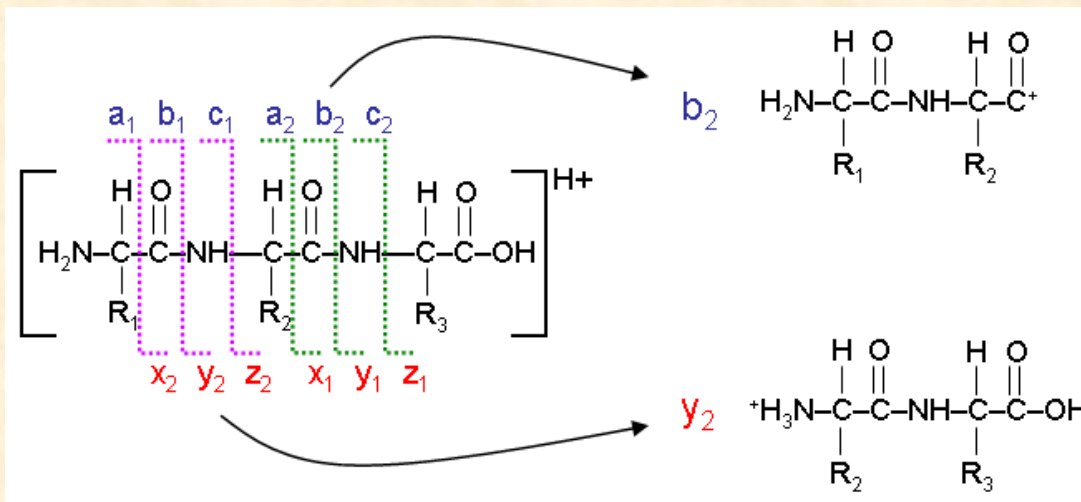


(b)

| Mass to Charge Ratio (m/z) | No. of charges (n) | Molecular Mass (RMM) |
|----------------------------|--------------------|----------------------|
| 1542.04                    | 11                 | 16951.40             |
| 1413.59                    | 12                 | 16950.95             |
| 1304.93                    | 13                 | 16950.94             |
| 1211.80                    | 14                 | 16951.11             |
| 1131.12                    | 15                 | 16951.62             |
| 1060.46                    | 16                 | 16951.26             |
| 998.11                     | 17                 | 16950.67             |
| 942.75                     | 18                 | 16951.30             |
| 893.15                     | 19                 | 16950.71             |
| 848.57                     | 20                 | 16951.25             |
| 808.21                     | 21                 | 16951.14             |
| 771.49                     | 22                 | 16950.72             |
|                            | Mean               | 16951.09             |
|                            | S.D.               | ±0.30                |

## MS/MS peptidů

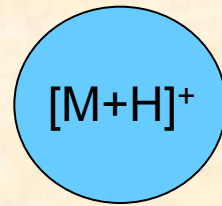
- ❖ peptidy jako polymerní látky jsou spojeny peptidovou vazbou
- ❖ při fragmentaci je peptid štěpen přednostně na peptidové vazbě a to tak, že v ideálním případě dojde k rozštěpení všech peptidových vazeb, takže vznikne soubor fragmentů s jednou, dvěma, třemi ... aminokyselinami, z rozdílů v  $m/z$  (resp. hmotnosti) „sousedních fragmentů“ lze odvodit druh aminokyseliny
- ❖ vznikají predikovatelné serie iontů ( $b - y$ ,  $a - x$ ,  $c - z$ ), které lze snadno ze známé sekvence peptidu odvodit



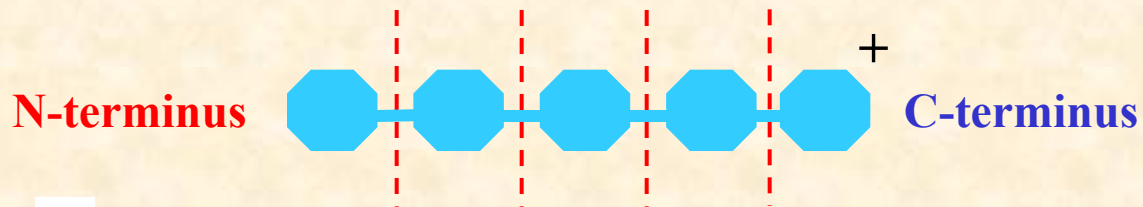
Schema fragmentace tripeptidu

# MS vs MS/MS

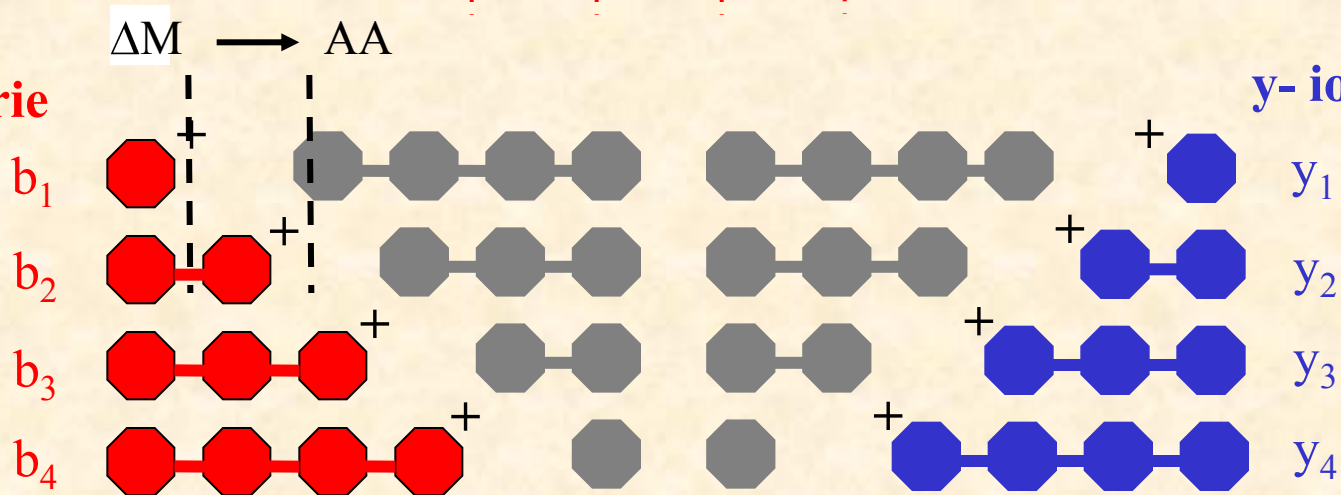
MS peptidů



MS/MS peptidů

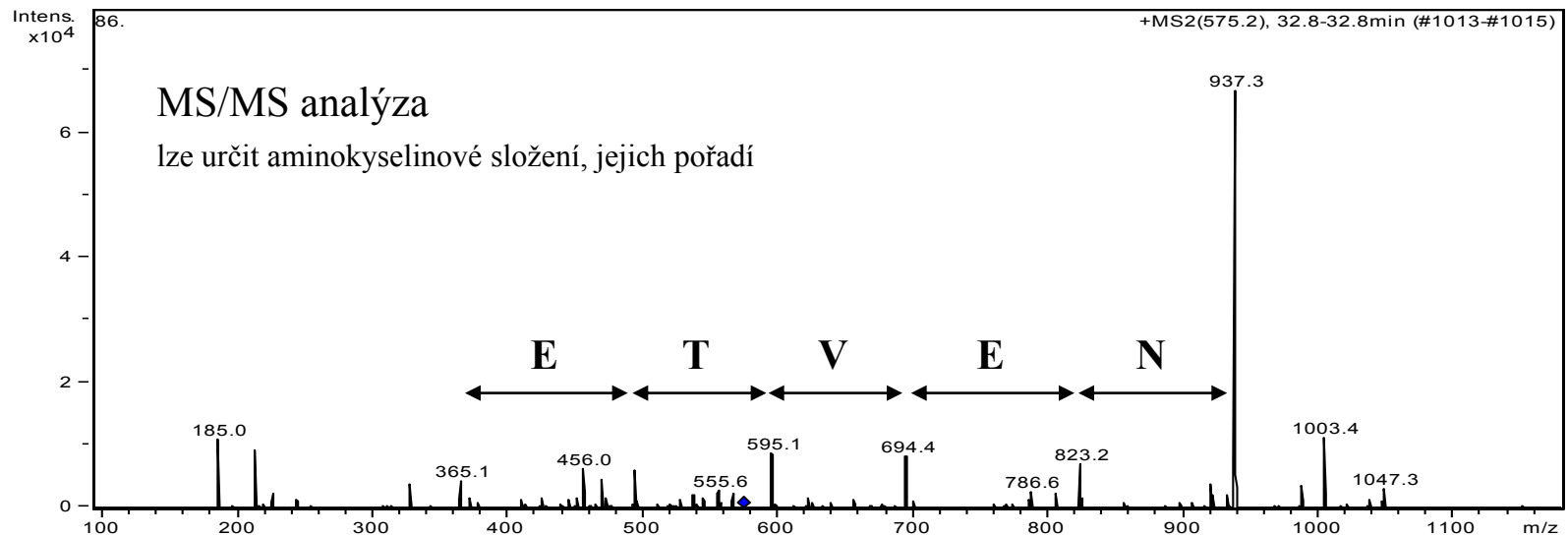
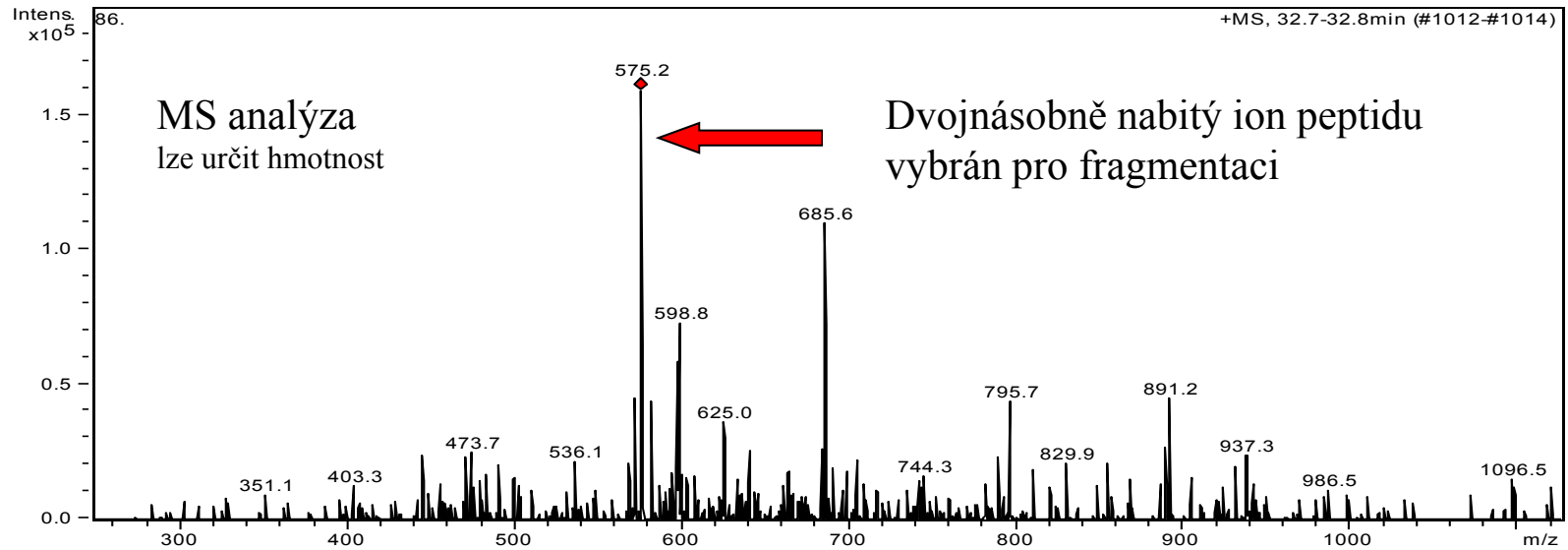


b- ion serie



fragmentační mapy pro jednotlivé peptidy

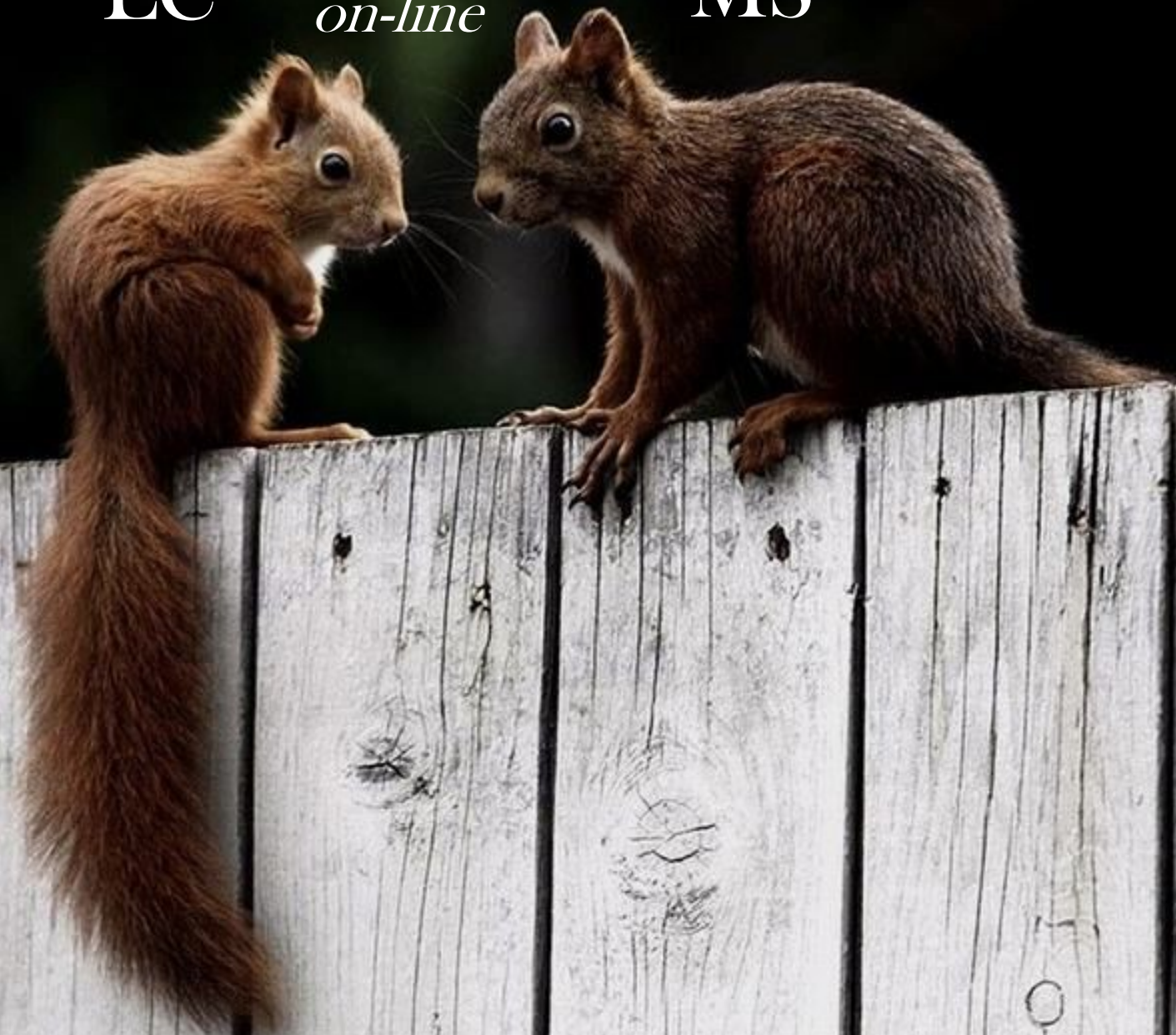
# ESI-MS a MS/MS peptidu (MW 1148.5)



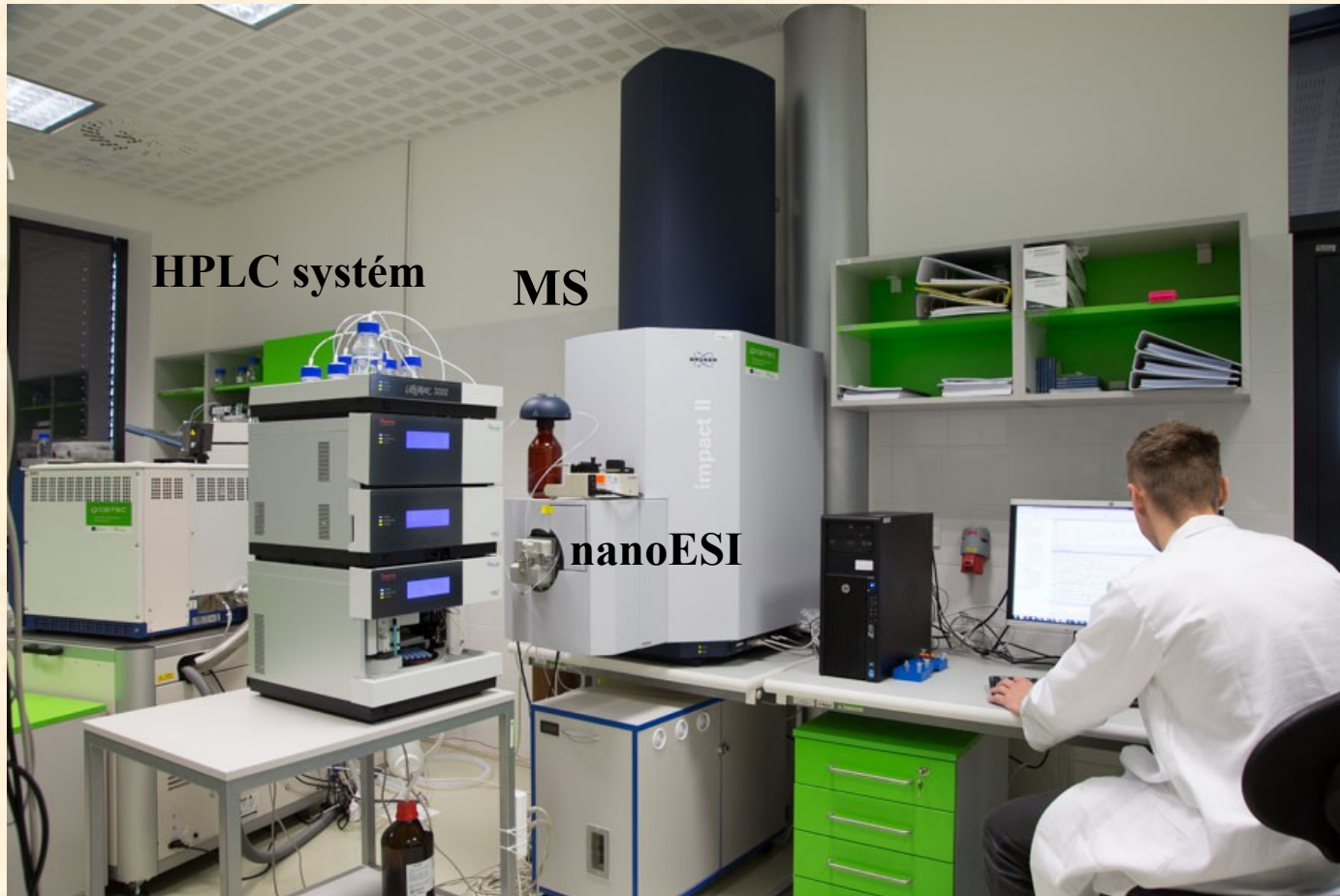
LC

*on-line*

MS

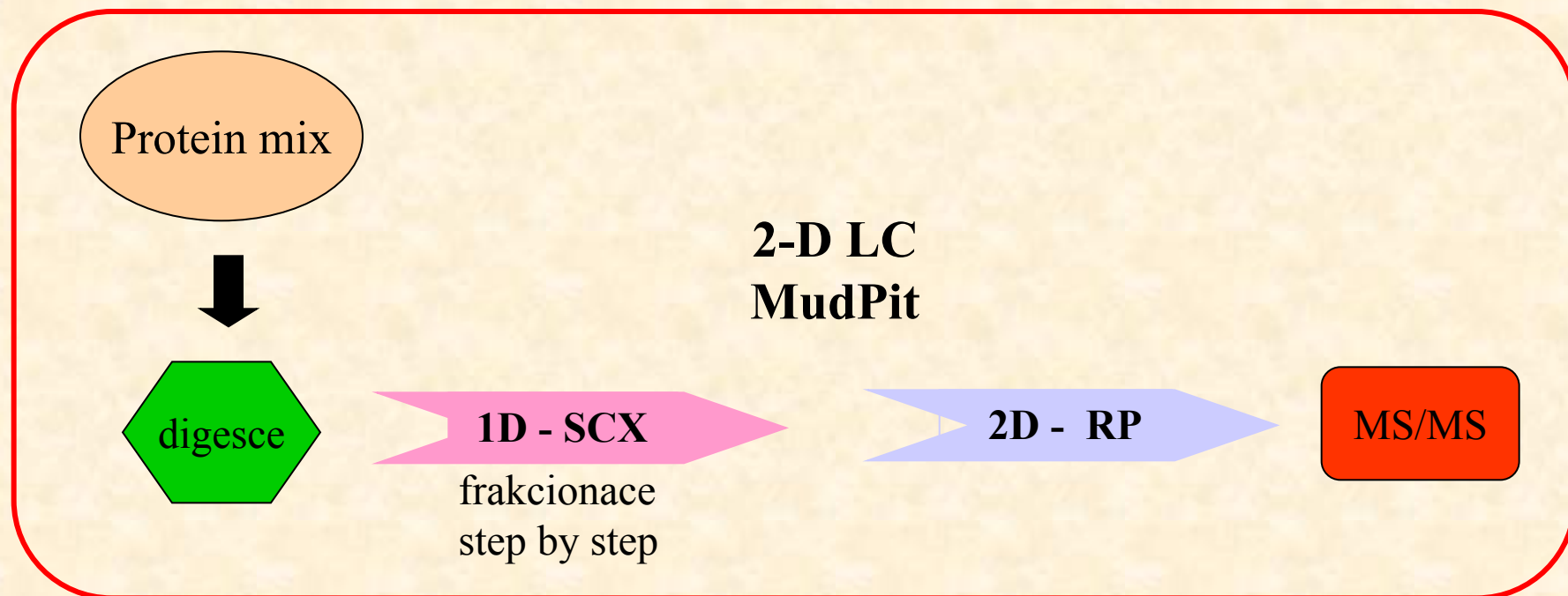
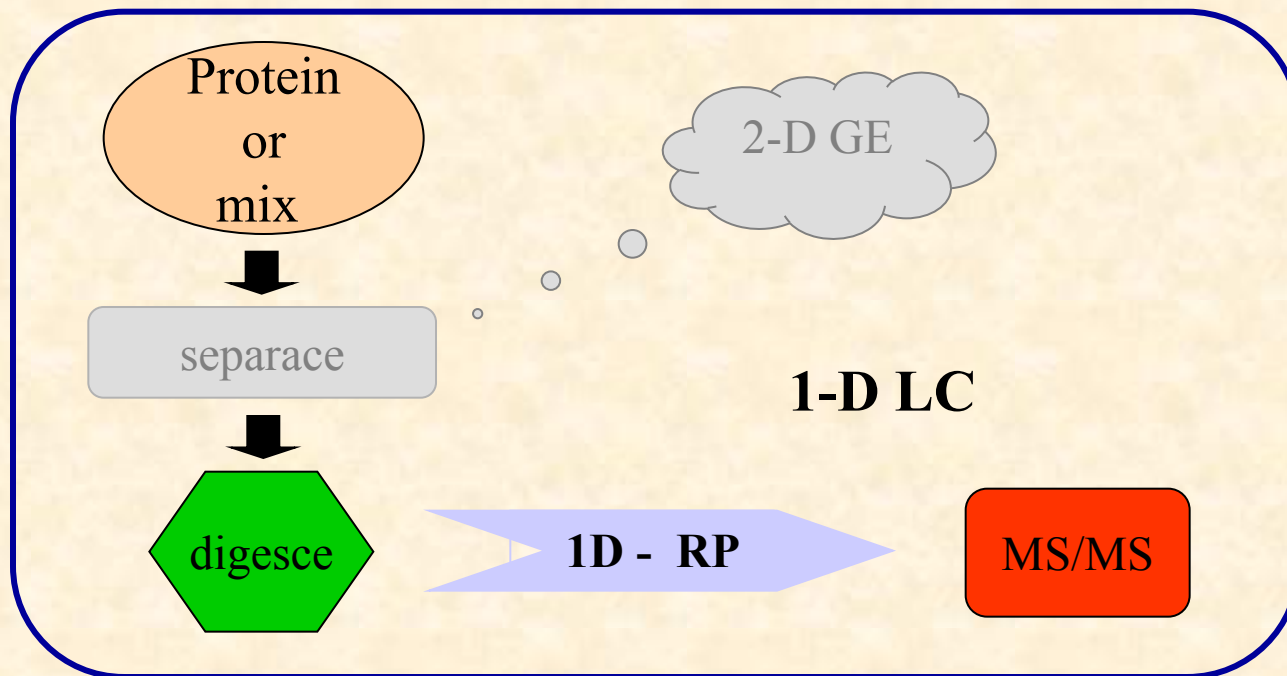


# LC-MS/MS



ESI-QTOF hmotnostní spektrometr Impact II (Bruker) spojený s kapalinovým chromatografem Ultimate 3000 RSLCnano (Dionex)





# Krevní plazma (3500 – 9000 proteinů ??)

**deplece**



**2 frakce**

**0. rozměr**

**IEF (liq)**



**20 frakcí**

**1. rozměr**

**LC (RP)**



**1600 frakcí**

**2. rozměr**

**GE (1D/2D)**



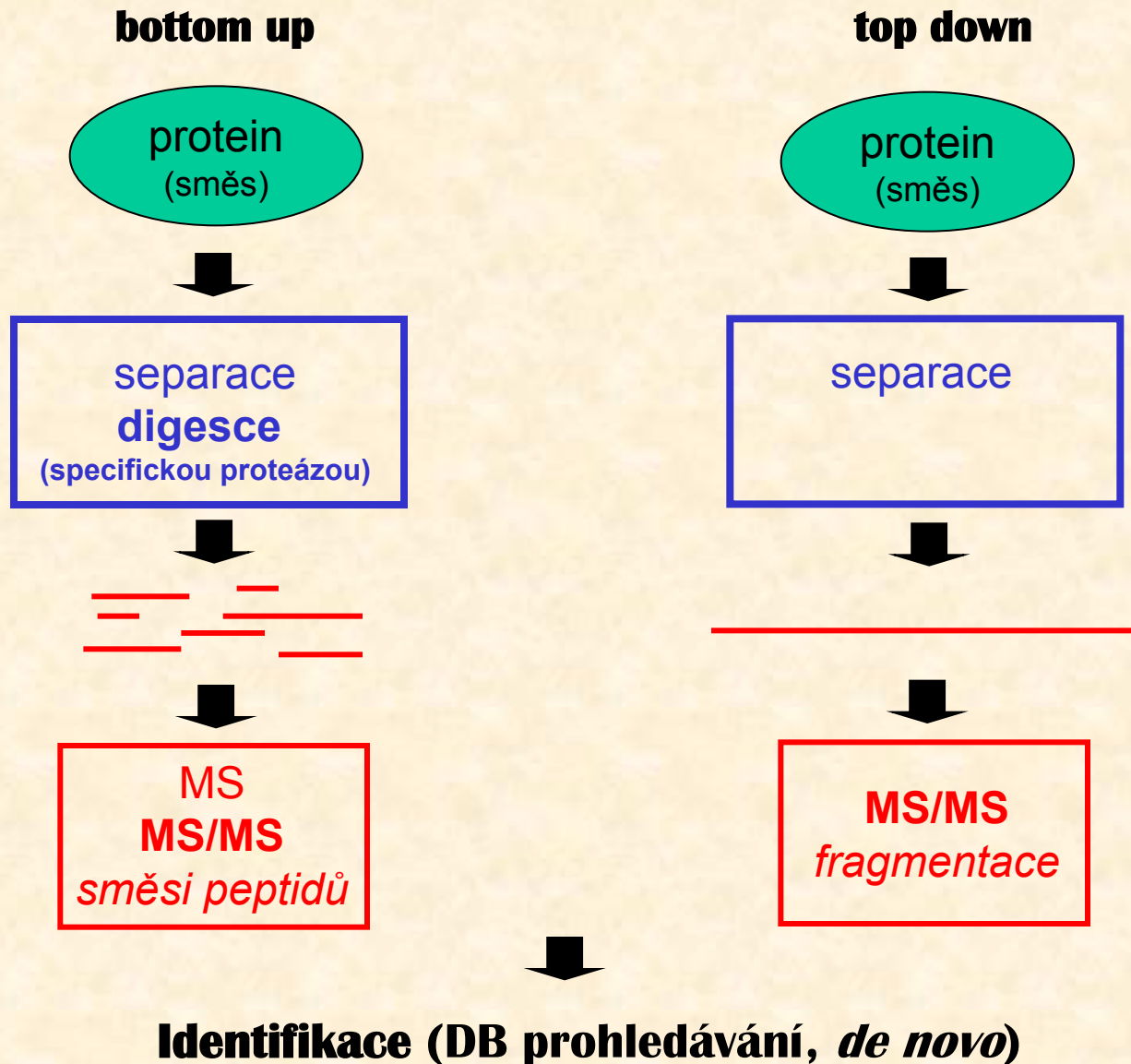
**∞ frakcí**

**3/4. rozměr**

# Metody identifikace proteinů pomocí MS



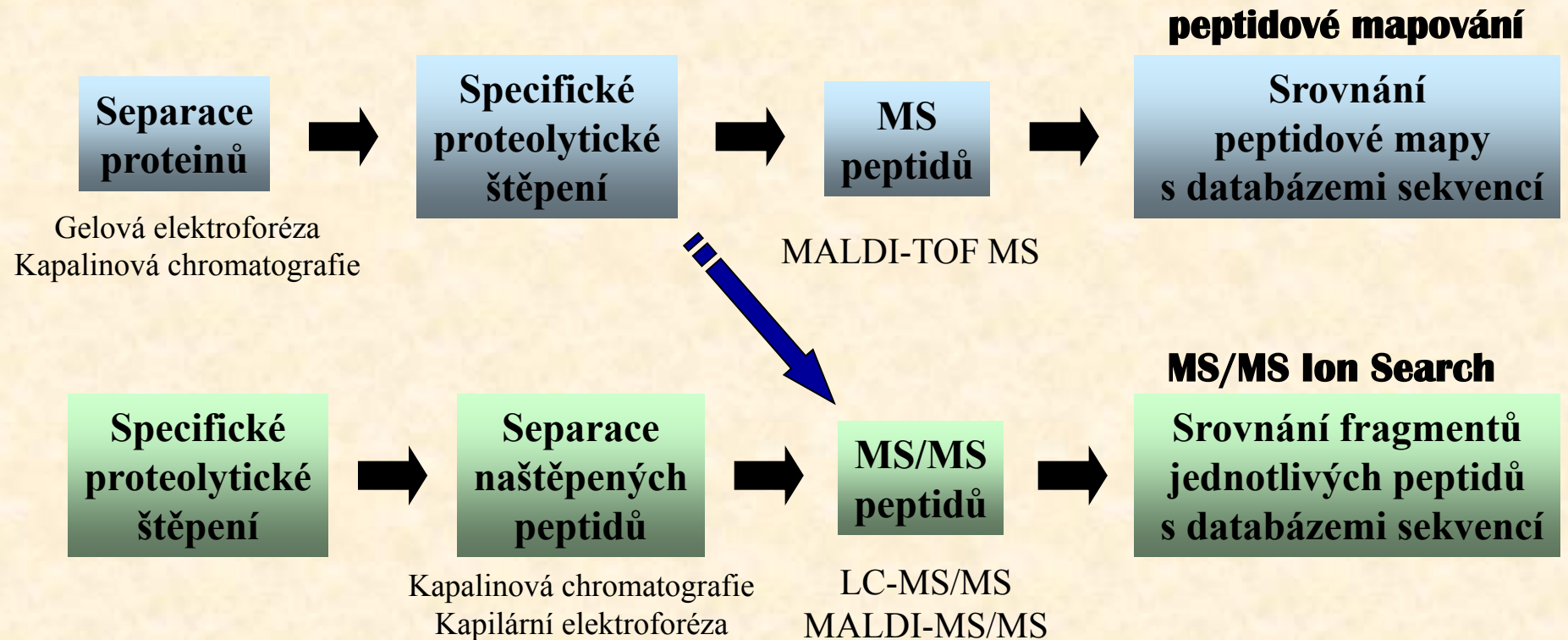
# Identifikace proteinů hmotnostní spektrometrií



# Identifikace proteinů pomocí MS

## bottom up

Standardní postupy:



# **Příklad identifikace proteinu pomocí peptidového mapování**

(peptide mass fingerprinting, peptide mapping)

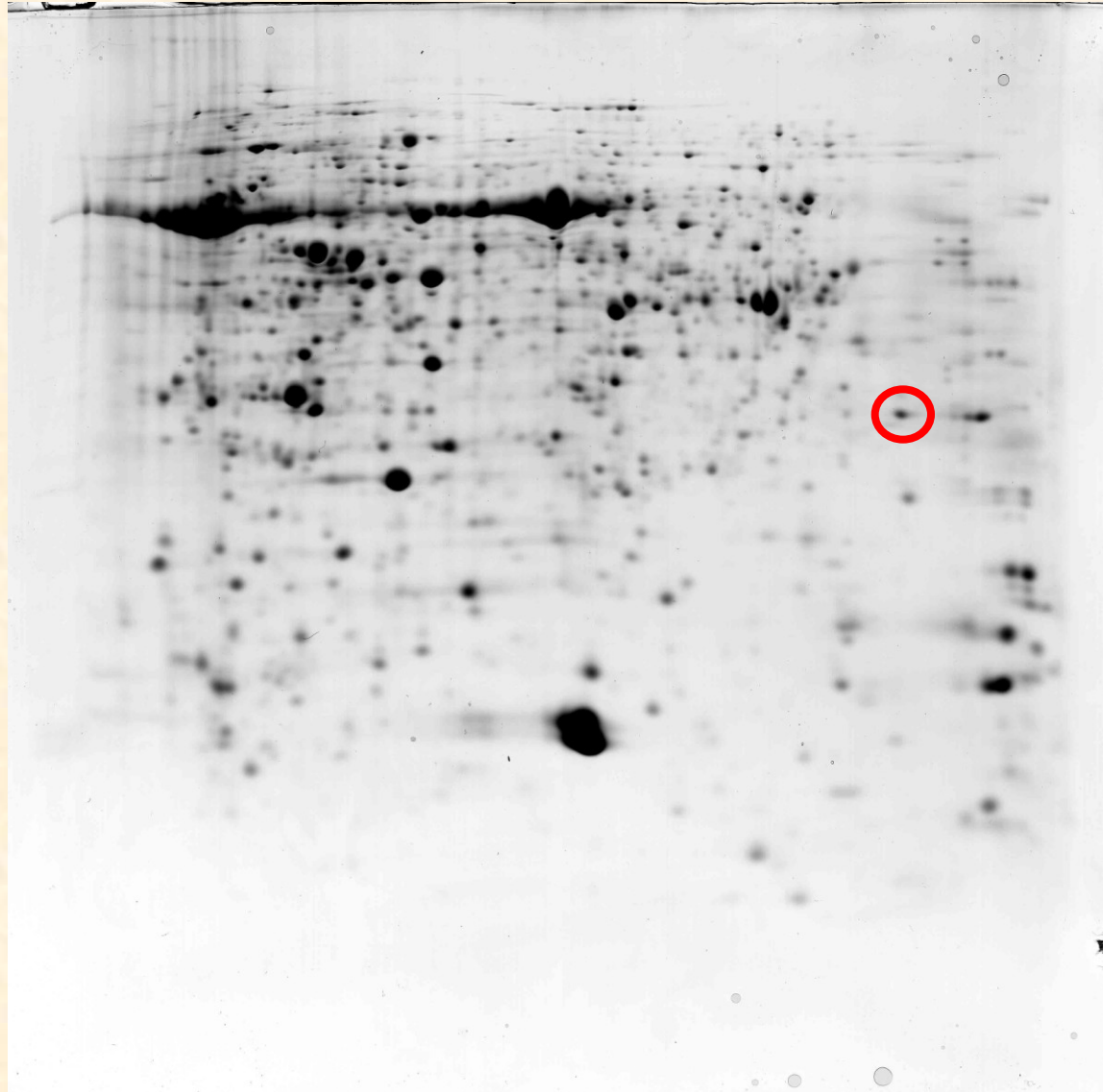
**Modrá varianta**

# Separace proteinové směsi pomocí dvojrozměrné gelové elektroforézy

1. rozměr Isoelektrický bod



2, rozměr Hmotnost



Separace proteinů

# Proteolytické štěpení (digestce)

enzymatické štěpení proteinu na soubor peptidů specifickou proteázou

## Trypsin

štěpí vždy za **lysinem (K)** a **argininem (R)**, pokud není následující aminokyselina prolin

QNGVQMLSPSEI**PQR**DWFPSDFTFGAATSAYQIEGAWNED**GK**GESNWDHFCHNH**PER**ILD  
GSNSDIGANSYHMY**K**TDV**R**LL**K**EMGMDAY**R**FSISW**R**IL**P****K**GT**K**EGGINPDGI**K**YY**R**NLI  
NLLLENGIEP

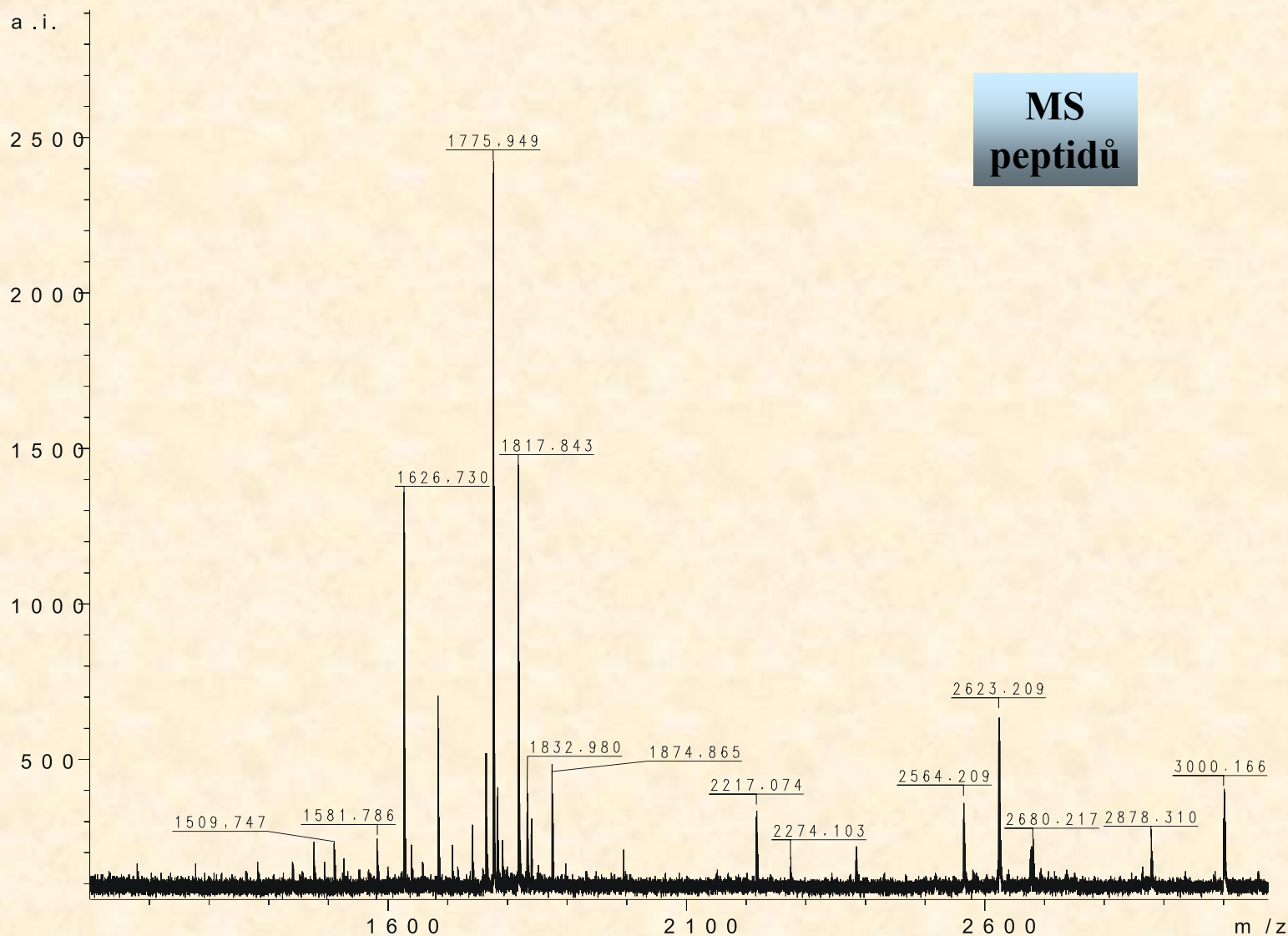
|                                     |       |          |    |
|-------------------------------------|-------|----------|----|
| QNGVQMLSPSEI <b>PQR</b>             | 1-15  | 1683.848 | Da |
| DWFPSDFTFGAATSAYQIEGAWNED <b>GK</b> | 16-42 | 3010.317 | Da |
| GESNWDHFCHNH <b>PER</b>             | 43-57 | 1864.757 | Da |
| ILDGSNSDIGANSYHMY <b>K</b>          | 58-75 | 1984.907 | Da |
| TDV <b>R</b>                        | 76-79 | 490.262  | Da |
| ...                                 |       |          |    |

**Specifické  
proteolytické  
štěpení**

Soubor hmotností takto vzniklých peptidů (peptidová mapa) je charakteristický pro daný protein podobně jako otisk palce pro člověka



# MALDI - TOF MS peptidů po digesti proteinu



MS spektrum obsahuje hmotnosti peptidů vzniklých digesti vybraného proteinu

# Identifikace proteinu – peptidové mapování databázové prohledávání

Naměřená peptidová mapa (soubor hmotností peptidů vzniklých digescí analyzovaného proteinu) je prohledávána proti databázi proteinových sekvencí.

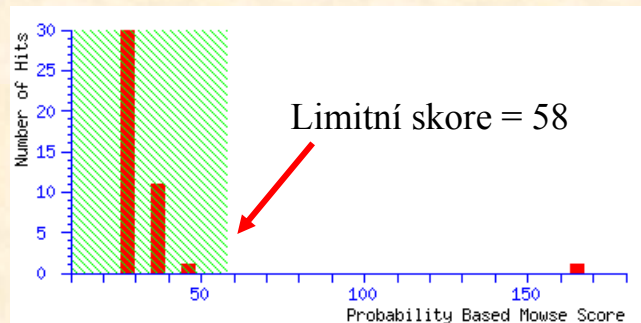
Prohledávací program si vytváří teoretickou peptidovou mapu od každé proteinové sekvence v databázi (dle použité proteázy) a postupně je srovnává s experimentálně naměřenou peptidovou mapou našeho analyzovaného proteinu.

Výsledkem prohledávání je žebříček proteinů s nejpodobnějšími peptidovými mapami. Míra shodnosti je vyjádřena tvz. skore, všechny proteiny s hodnotou skore vyšší než limitní jsou programem považovány za identifikované.

**Srovnání  
peptidové mapy  
s databázemi sekvencí**

# Výsledek databázového prohledávání peptidové mapování

## Mascot Search Results



Database : MSDB 20021127 (1019653 sequences)

Timestamp : 26 Jan 2003 at 10:36:50 GMT

Top Score : 165 for **S18600**, glutamate-ammonia ligase ...

- |  |                         |                      |
|--|-------------------------|----------------------|
| 1. <b>S18600</b> Mass: 47780   | Total score: <b>165</b> | Peptides matched: 12 |
| glutamate-ammonia ligase (EC 6.3.1.2) precursor, chloroplast (clone lambdaAtgsl1) - Arabidopsis thaliana |                         |                      |
| 2. <b>S32228</b> Mass: 47714   | Total score: <b>76</b>  | Peptides matched: 7  |
| glutamate-ammonia ligase (EC 6.3.1.2) precursor - rape - Brassica napus                                  |                         |                      |

**Skóre**

Sequence Coverage: 44%

Srovnání  
peptidové mapy  
s databázemi sekvencí

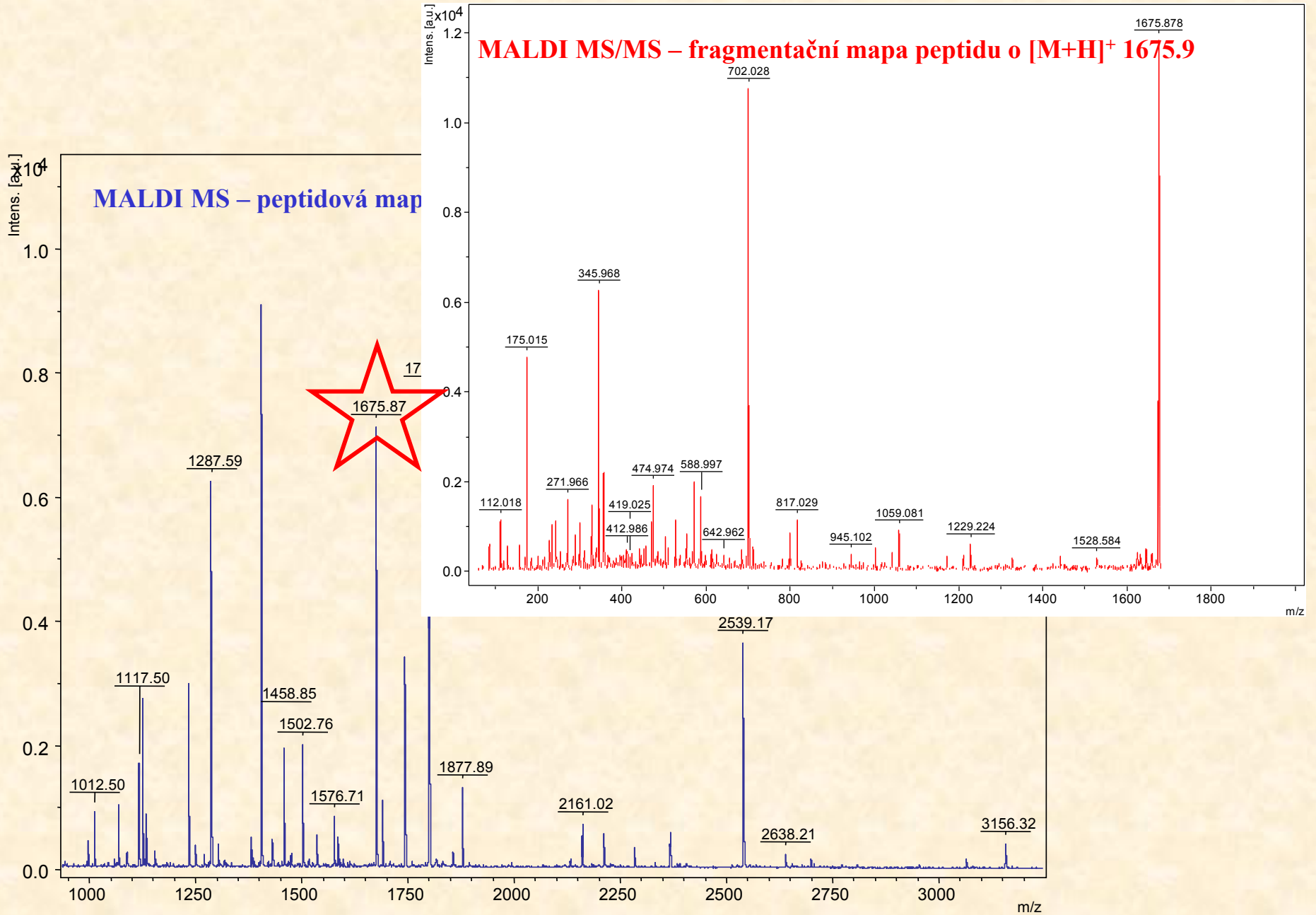
```

1   MAQILAASPT CQMRVPKHSS VIASSSKLWS SVVLKQKKQS NNKVRGFRVL
51  ALQSDNSTVN RVETLLNLDT KPYSDRIIAE YIWIGGSGID LRSKSRTIEK
101 PVEDPSELPK WNYDGSSTGQ APGEDSEVIL YPQAI FRDPF RGGNNILVIC
151 DTWTPAGEPI PTNKRAKAAE IFSNKKVSGE VPWFGIEQEY TLLQONVKWP
201 LGWPVGAFPG PQGPYYCGVG ADKIWGRDIS DAHYKACLYA GINISGTNGE
251 VMPGQWEFQV GPSVGIDAGD HVWCARYLLE RITEQAGVVL TLDPKPIEGD
301 WNGAGCHTNY STKSMREEGG FEVIKKA ILN LSLRHKEHIS AYGEGNERRL
351 TGKHETASID QFSWGVANRG CSIRVGRDTE AKGKGYLEDR RPASNMDPYI
401 VTSLLAETTL LWEPTLEAEA LAAQKLSLNV
    
```

[www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)

Červeně jsou vyznačeny úseky sekvence odpovídající přiřazeným peptidům z naměřené peptidové mapy

# Identifikace na základě MS dat vs MS/MS



# **Příklad identifikace proteinu pomocí LC-MS/MS**

**Zelená varianta**

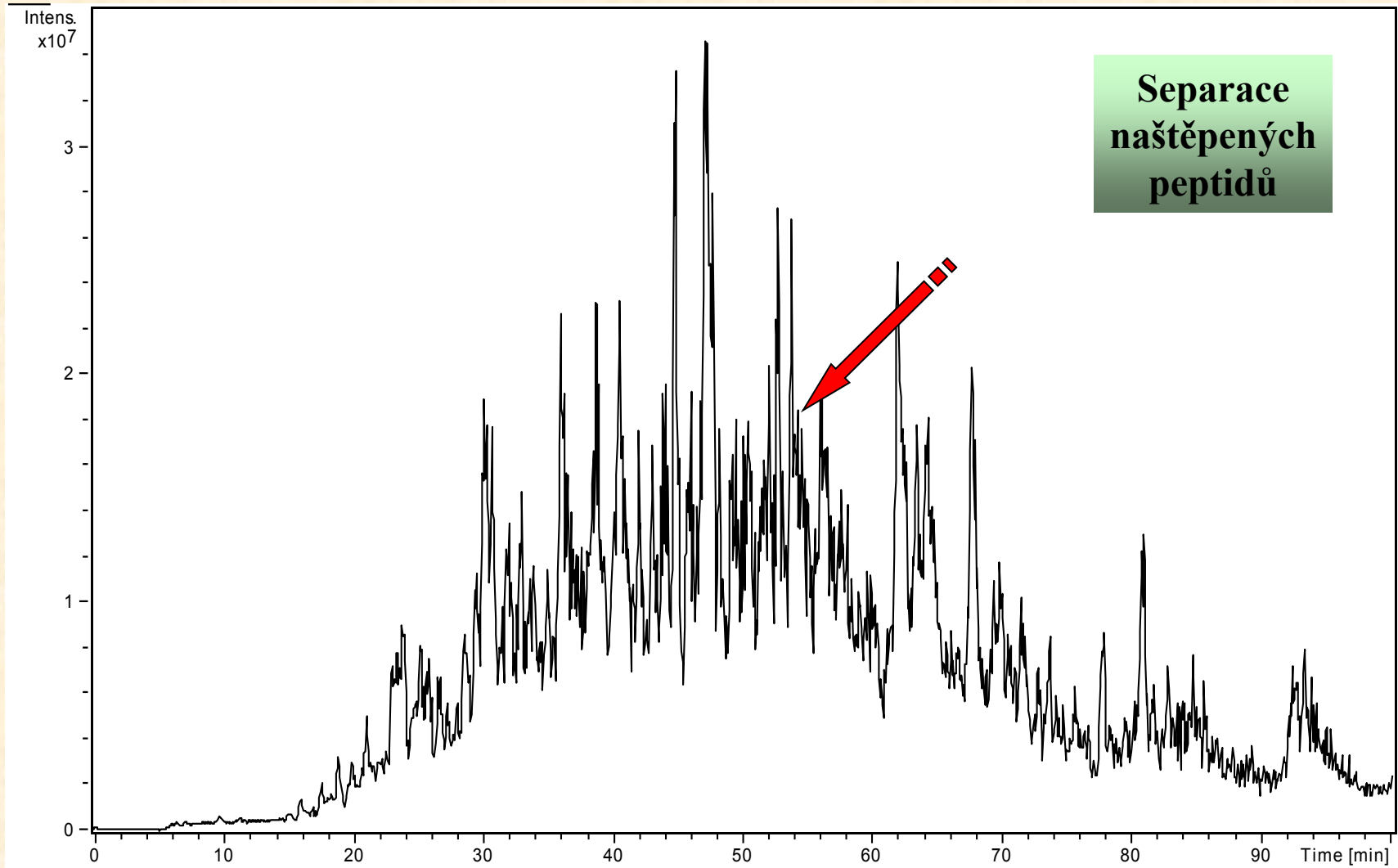
# Proteolytické štěpení

**Specifické  
proteolytické  
štěpení**

**Na rozdíl od „modré varianty“ tentokrát je enzymaticky štěpena celá směs proteinů najednou, opět za použití specifické proteázy (obvykle trypsin).**

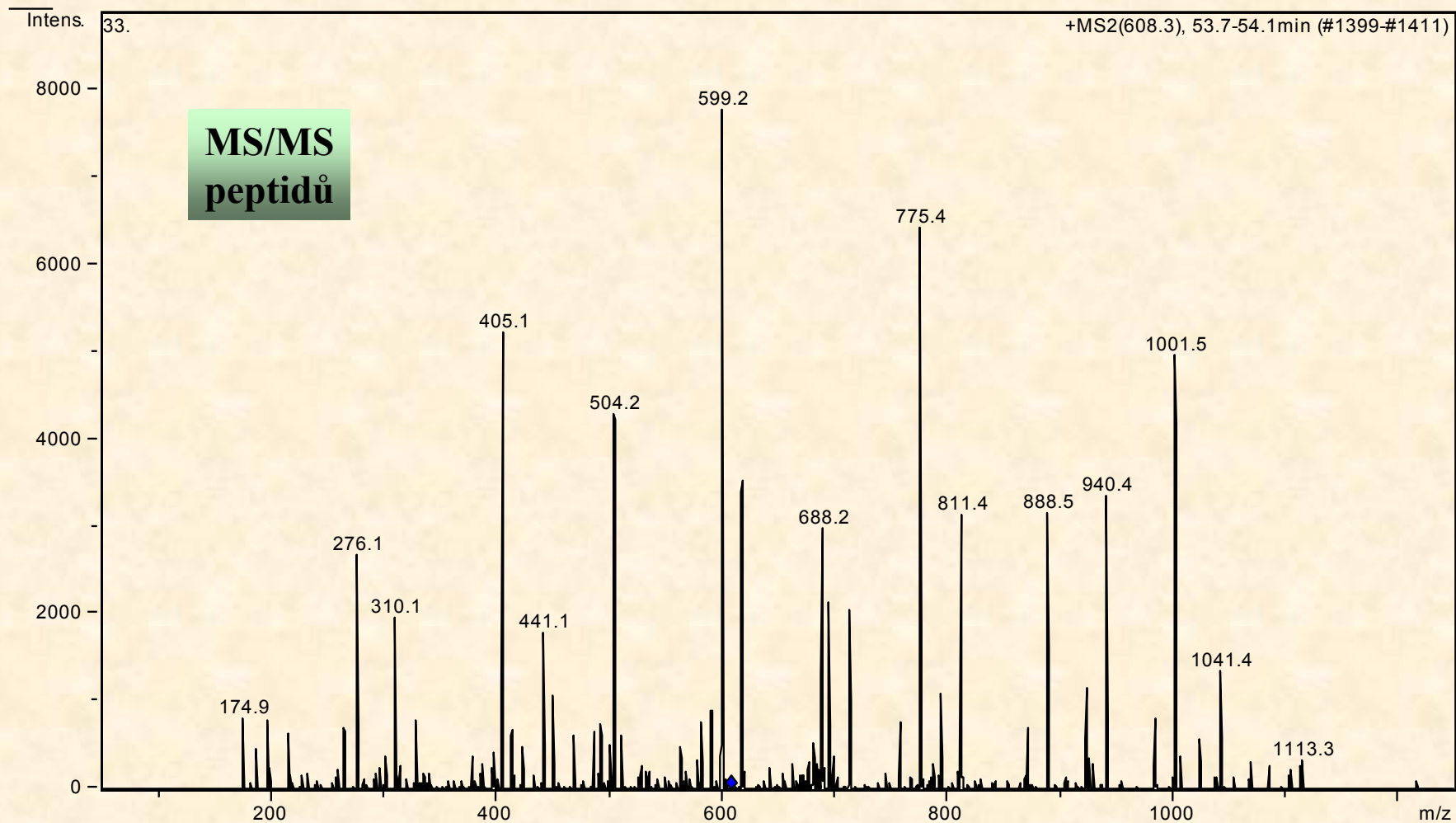
**Takto vzniklá směs peptidů je pak separována a podrobena MS/MS analýze.**

# Separace peptidů tryptického digestu směsi proteinů



Digest vzorku lidské plazmy separovaný kapalinovou chromatografií spojenou s hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS)

## MS/MS spektrum tryptického peptidu (m/z 608.3, 2+)



MS/MS spektrum obsahuje fragmenty peptidu vzniklé kolizní disociací v iontové pasti. Fragmenty nesou specifickou informaci o sekvenci peptidu.



# Identifikace proteinu – MS/MS databázové prohledávání

Naměřené fragmentační mapy (soubory hmotností fragmentů vzniklých při kolizní disociaci jednotlivých peptidů) jsou prohledávány proti databázi proteinových sekvencí.

Prohledávací program si vytváří teoretickou peptidovou mapu proteinové sekvence v databázi, po té si od každého peptidu příslušné peptidové mapy připraví teoretickou fragmentační mapu a postupně je srovnává s experimentálně naměřenými fragmentačními mapami analyzovaných peptidů. Takto to provede pro každou proteinovou sekvenci v databázi.

Pro každý přiřazený peptid (MS/MS spektrum) je spočítáno individuální skóre, hodnota skóre vyšší než limitní určuje signifikantní shodu mezi teoretickou a naměřenou fragmentační mapou. Míra shodnosti proteinu je vyjádřena celkovým skóre, které je odvozeno z individuálních skóre peptidů přiřazených danému proteinu.

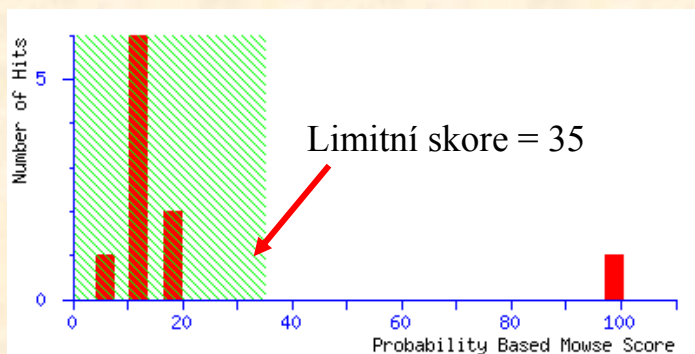
**Srovnání fragmentů  
jednotlivých peptidů  
s databázemi sekvencí**

## Mascot Search Results

# Výsledek databázového prohledávání

## MS/MS

Database : SwissProt 51.2 (243975 sequences; 89639744 residues)  
Taxonomy : Homo sapiens (human) (15175 sequences)  
Timestamp : 16 Dec 2006 at 16:05:59 GMT  
Significant hits: **AACT\_HUMAN** Alpha-1-antichymotrypsin precursor (ACT) –  
Homo sapiens



Srovnání fragmentů jednotlivých peptidů s databázemi sekvencí

### Peptide Summary Report

1. **AACT\_HUMAN** Mass: 47621 Score: **99** Queries matched: 1  
Alpha-1-antichymotrypsin precursor (ACT) Homo sapiens (Human)

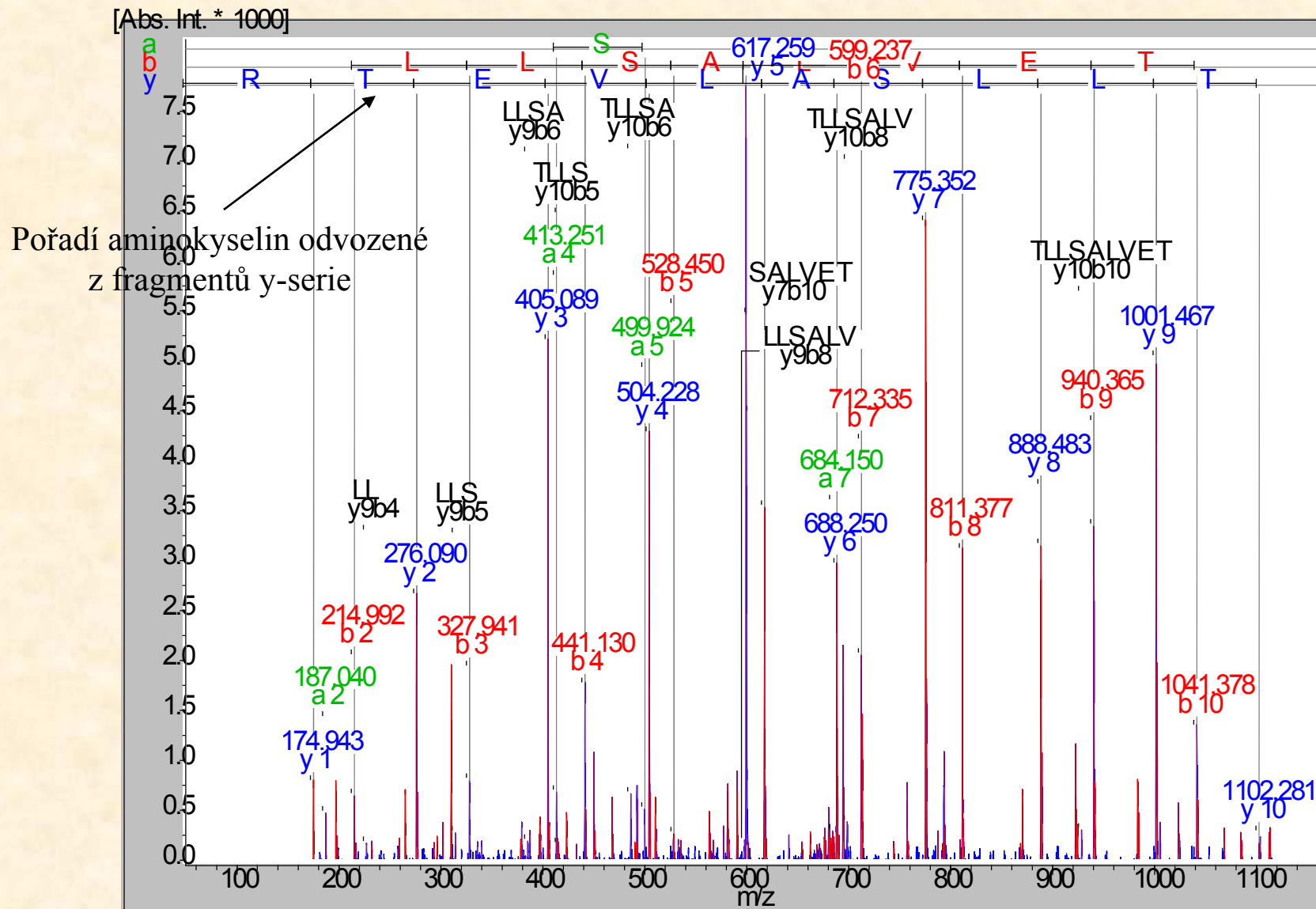
| Query | Observed | Mr(expt)  | Mr(calc)  | Delta   | Miss | Score     | Expect  | Rank | Peptide                |
|-------|----------|-----------|-----------|---------|------|-----------|---------|------|------------------------|
| 1     | 608.3000 | 1214.5854 | 1214.7234 | -0.1380 | 0    | <b>99</b> | 2.2e-08 | 1    | <b>K.ITLLSALVETR.T</b> |

Celkové skóre

Individuální skóre peptidu

Díky variabilitě primární struktury proteinů lze určit jejich "identitu" na základě fragmentace (MS/MS spektra) jediného peptidu.

# Vyhodnocené MS/MS spektrum

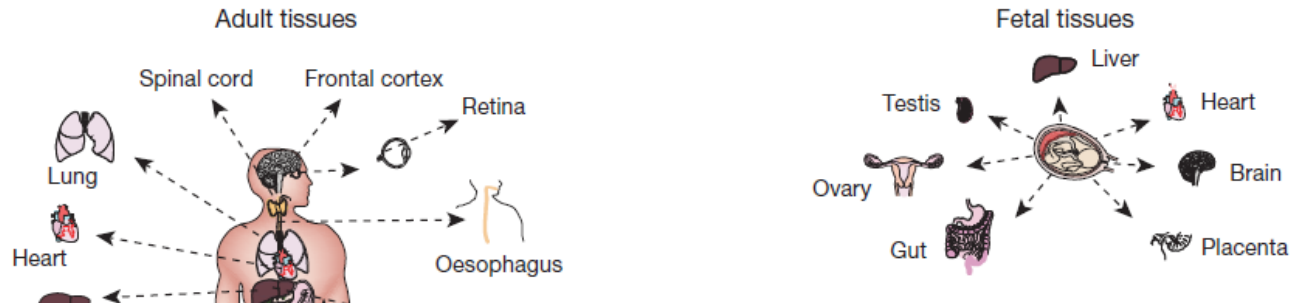


Z rozdílů  $m/z$  (resp. hmotnosti) mezi sousedními ionty příslušné serie (b, y) lze zjistit identitu jednotlivých aminokyselin i jejich pořadí.

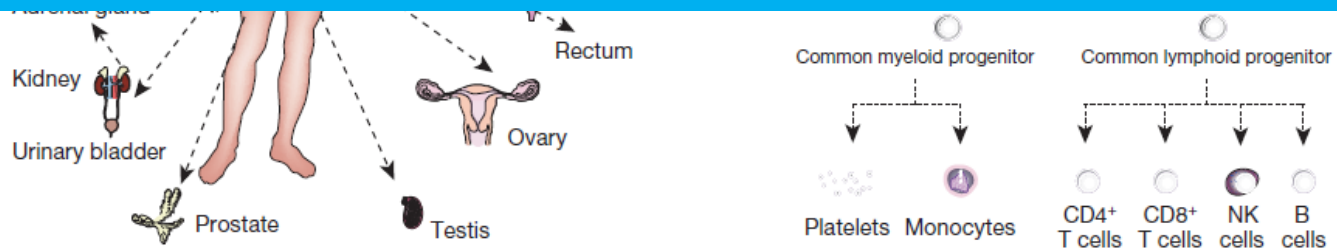
# A draft map of the human proteome

Min-Sik Kim et al., Nature 509, 575-581 doi:10.1038/nature13302

**a**



**293 000 non redundant peptides  
corresponding to proteins encoded by 17294 genes**






# Charakterizace posttranslačních modifikací



# Charakterizace modifikací proteinů

## *Druhy modifikací:*



-  **mutace** (izoformy proteinů)
-  **chemické** (oxidace, adukty farmak aj.)
-  **posttranslační** (fosforylace, glykosylace aj.)

## Možnosti MS při analýze modifikací proteinů

 **druh modifikace**

 **vazebné místo**

 **úroveň**

-  úprava vzorků (frakcionace, enzym. odbourávání aj.)
-  speciální MS/MS techniky

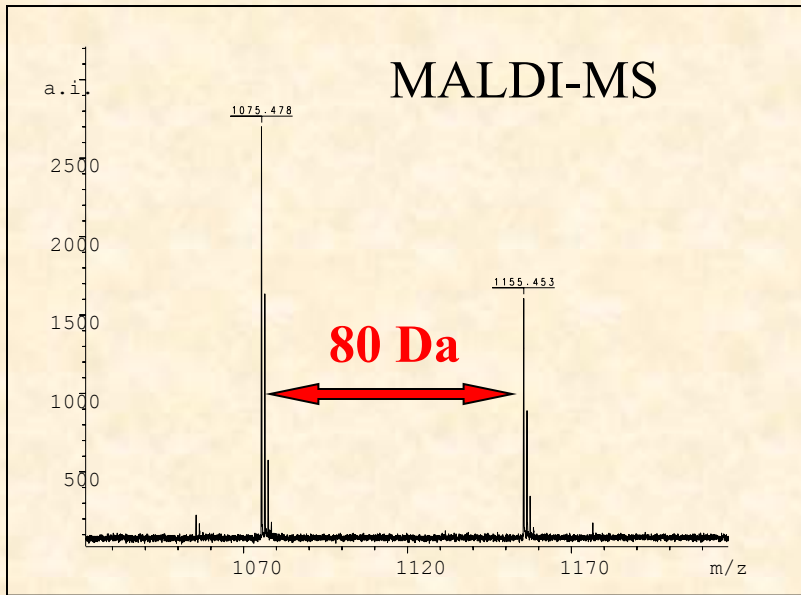
## *Užitečný přehled modifikací:*

**DeltaMass** <http://www.abrf.org/index.cfm/dm.home>

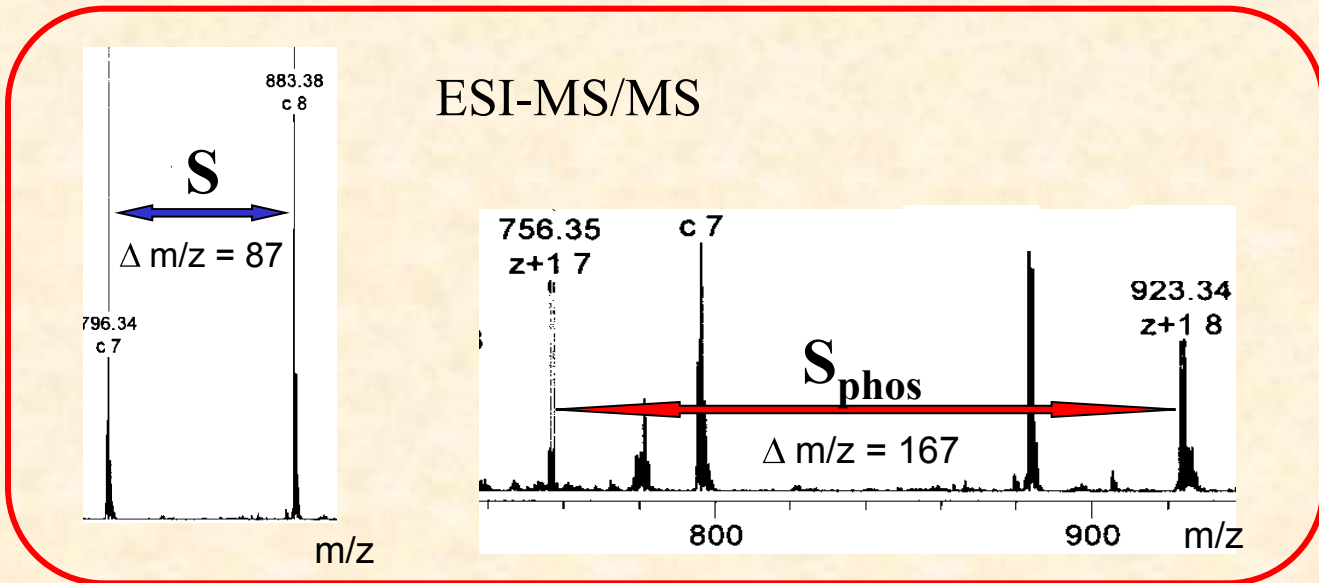
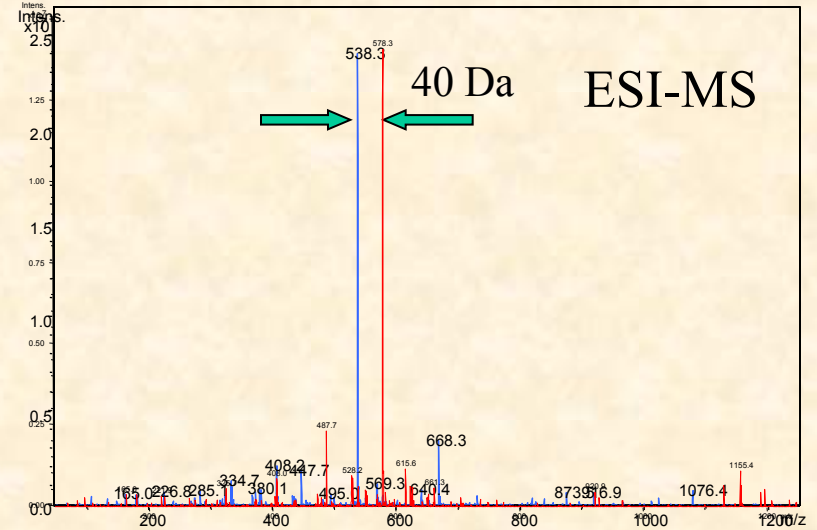
**ExpASy** - <http://www.expasy.ch/>

## Hlavní faktory ovlivňující analýzu PTMs

- většina PTMs je v **minoritním množství** (ve srovnání s nemodifikovanou složkou)
- některé PTMs jsou nestálé během přípravy vzorku či během MS analýzy
- obvykle nelze analyzovat více typů PTMs současně (v rámci jedné analýzy)



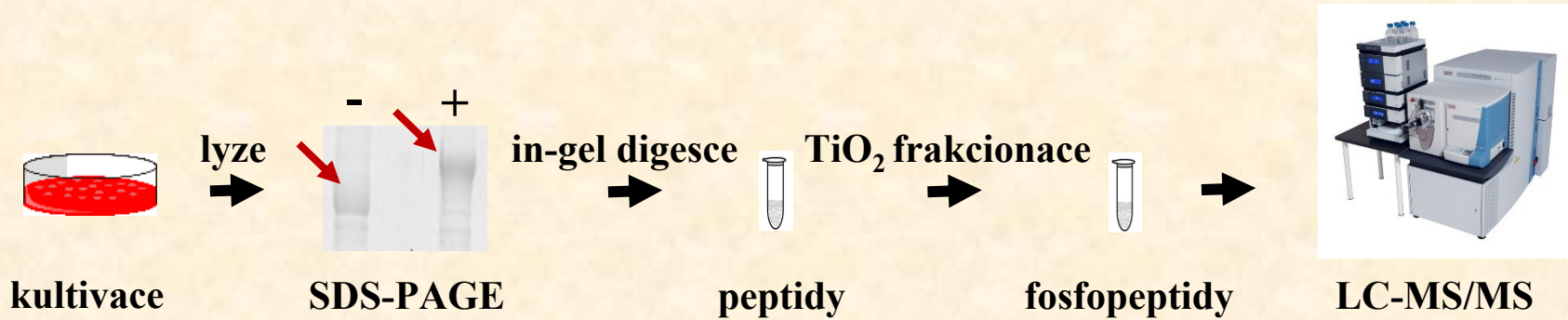
## Fosforylace



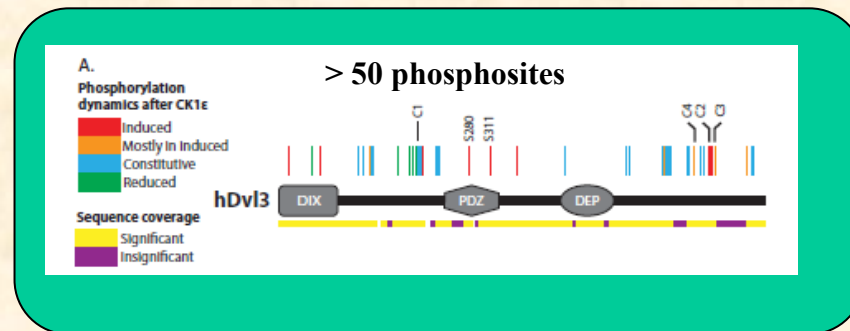


# Charakterizace fosforylací Dishevelled proteinů

(V. Bryja, FS, MU)



Zpracování dat



# Globální analýza fosfoproteomu

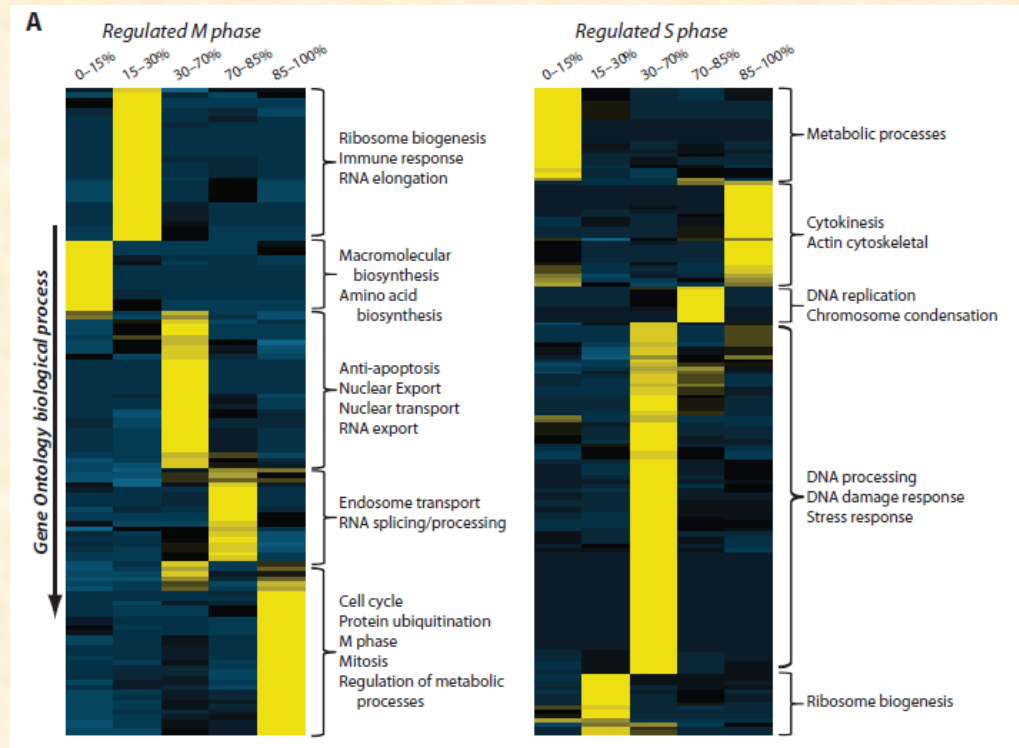
změny během buněčného cyklu

Olsen J.V. et al., *Sci. Signal.*, 3 (104) ra3 (2010)

 quantified 6027 proteins

 quantified 20,443 unique phosphorylation sites

- HELA buňky
- SILAC značení
- TiO<sub>2</sub> frakcionace
- LC-MS/MS (Orbitrap)



The panels show the phenotypic phosphoproteome comparison organized by GO biological process for mitotic (left) and S phase (right) cells. Proteins involved in metabolic processes have high-occupancy phosphorylation sites during mitosis, but low-occupancy sites during S phase (color scale: yellow, high overrepresentation; dark blue, high underrepresentation).

# Kvantifikace proteinů

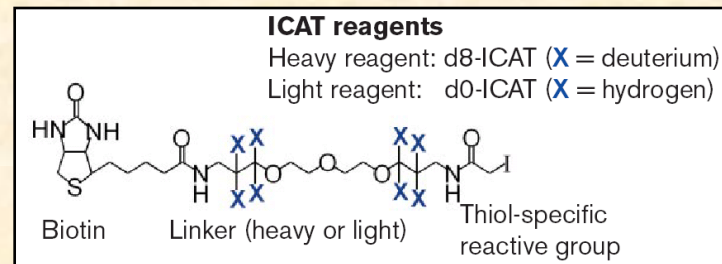


# Kvantifikace proteinů pomocí MS

## *metody s využitím izotopicky značených sloučenin*

- absolutní kvantifikace  
*(přídavek interního standardu o známé koncentraci)*
- relativní kvantifikace  
*(porovnání změny exprese proteinu ve dvou či více vzorcích pomocí značek o různé hmotnosti)*

Značky jsou většinou izotopicky značené sloučeniny, které jsou navázány na analyzované proteiny, resp. digestované peptidy nebo jsou do proteinů zabudovány během buněčného růstu.



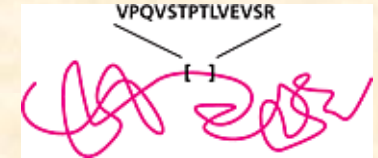
## *metody založené na statistickém zpracování dat* *(label free)*

žádná limitace v počtu srovnávaných vzorků

# Schéma kvantifikačního experimentu *absolutní kvantifikace*

## ➤ AQUA Peptide Selection

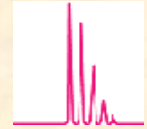
Select an optimal tryptic peptide and stable isotope amino acid from the sequence of your protein of interest



## ➤ Order selected peptide labeled ( $^{15}\text{N}$ , $^{13}\text{C}$ )

Price!!!

Optimize LC-MS/MS separation protocol for quantitation

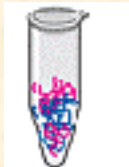


## ➤ Adding labeled peptide to protein mix

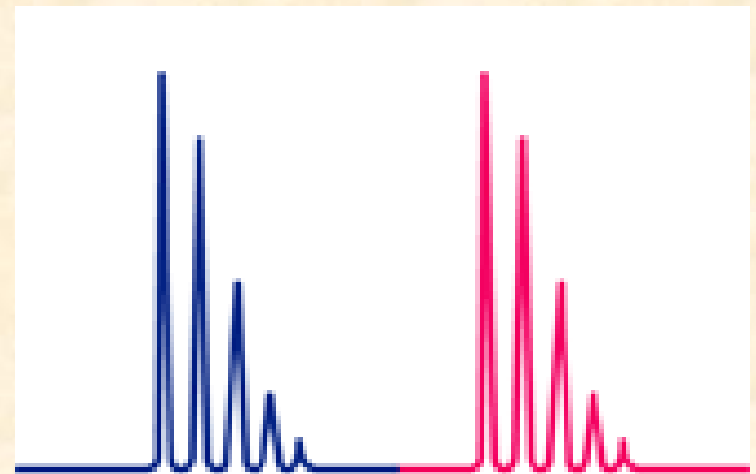


AQUA

## ➤ Digest



## ➤ Analyze by LC-MS/MS to quantitate protein of interest

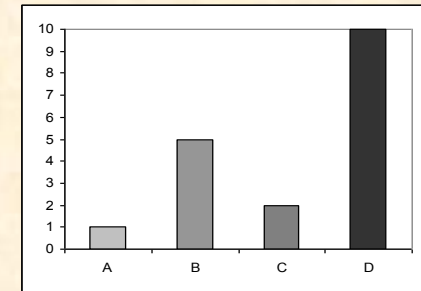


jen pro vybraný protein

# Schéma kvantifikačního experimentu *metody relativní kvantifikace*

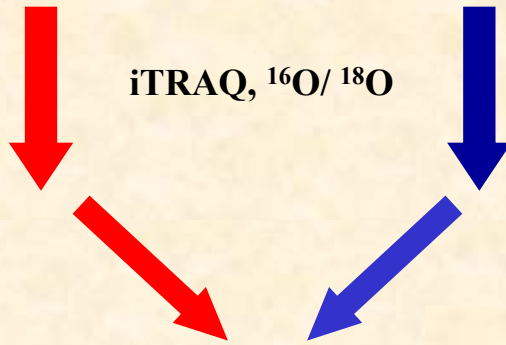
Proteinový vzorek A

Proteinový vzorek B



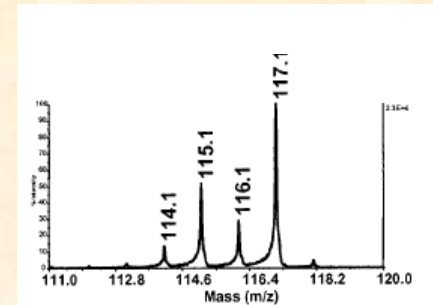
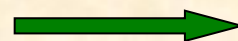
Oddělená digesce vzorků

iTRAQ,  $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$

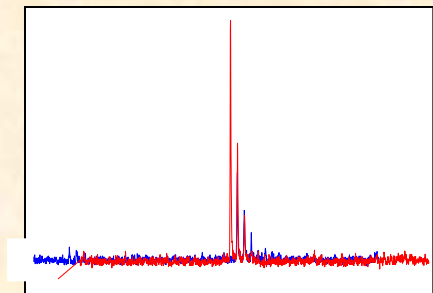


LC-MS

LC-MS/MS (iTRAQ)

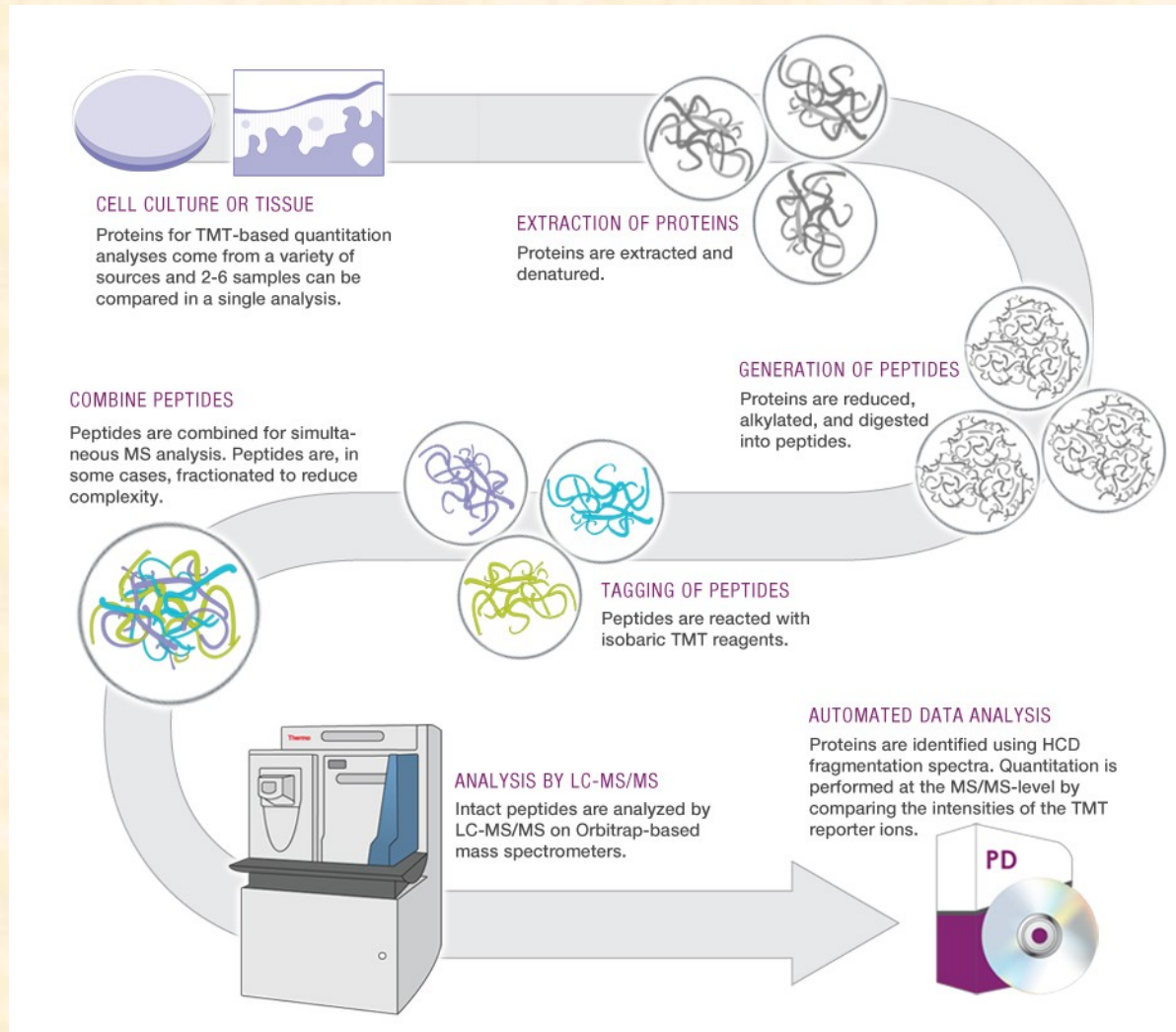


MS/MS



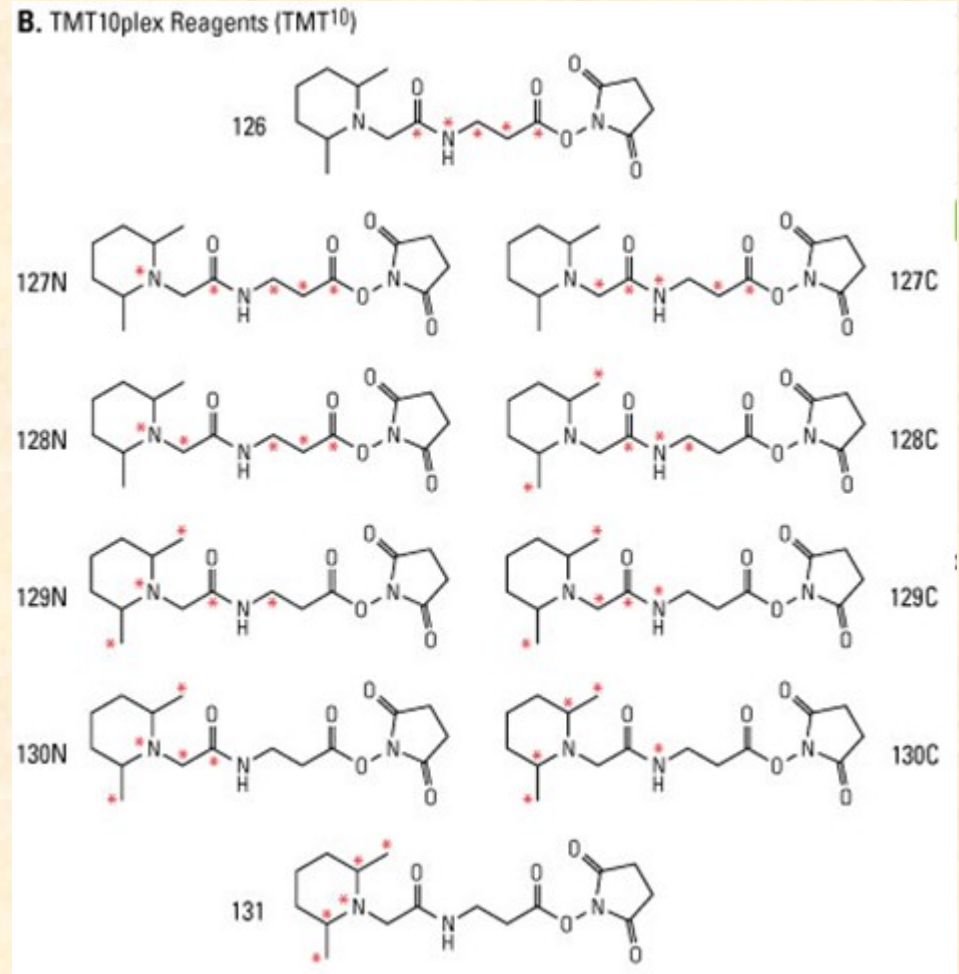
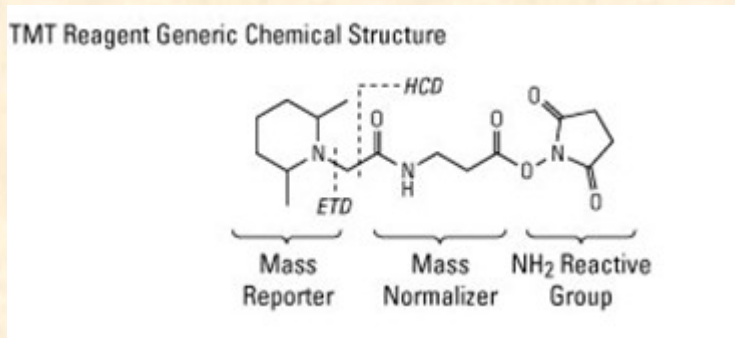
Stejné peptidy v MS modu neodlišeny

# TMT značky



# TMT

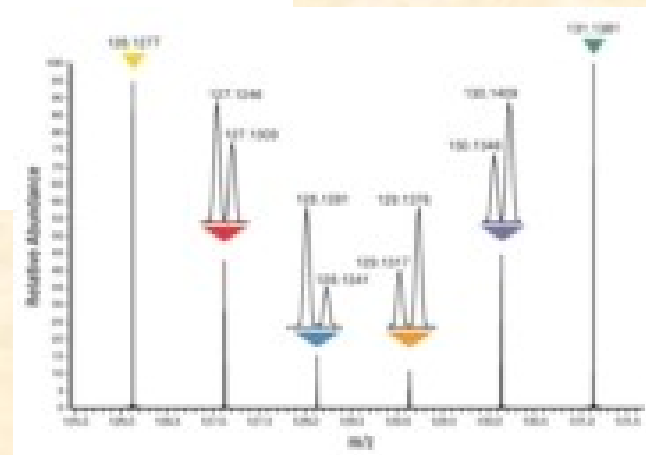
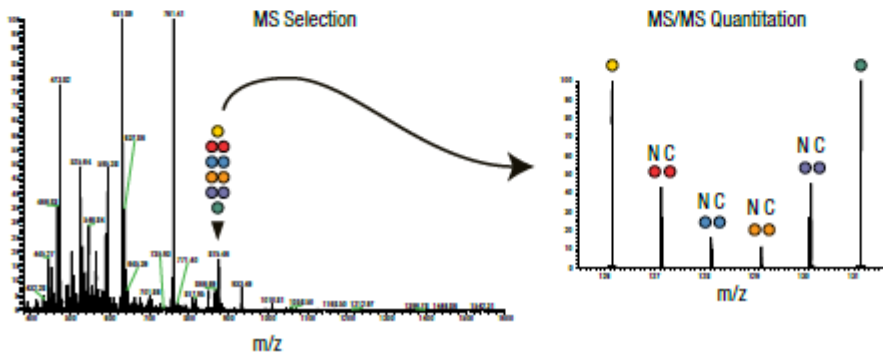
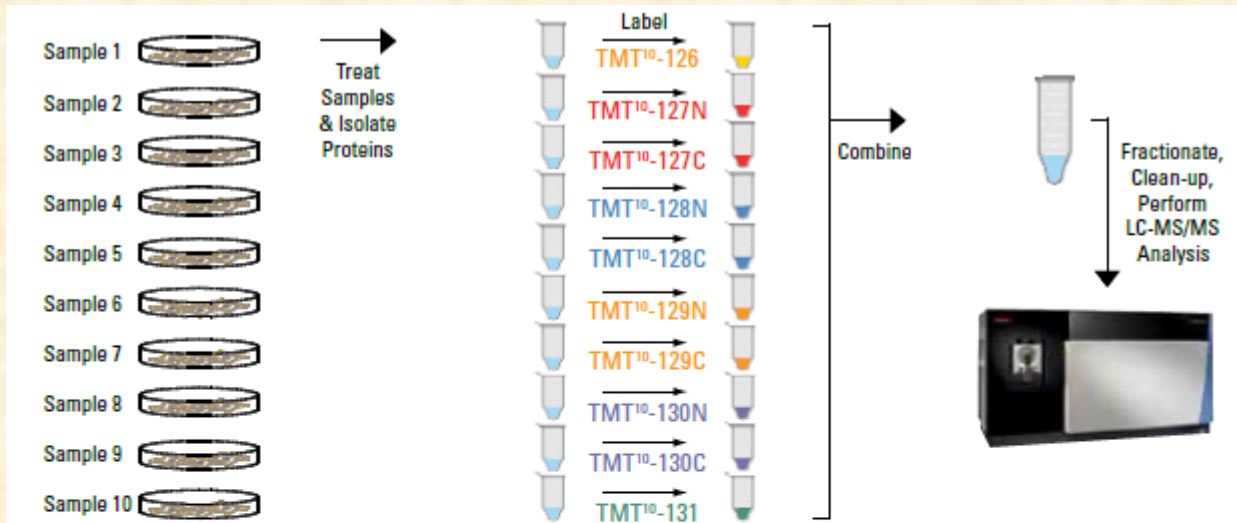
- Isobarické značky (až 11-plex)
- vyžaduje MS/MS



- Cysteine-reactive mass tags (6-plex)  
*quantitation of the relative abundance of cysteine modifications, such as S-nitrosylation, oxidation and disulfide bonds*
- Carbonyl-reactive mass tags (6-plex)  
*glycan, steroids, or oxidized proteins quantification*



# TMT značky



A TO JE KONEC

