



CEITEC

Central European Institute of Technology

BRNO | CZECH REPUBLIC



Research programme 4: Genomics and Proteomics of Plant systems

Research Group Proteomics

Proteomics Core Facility

# Využití hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF nejen v proteomice

**Ondrej Šedo**

**Seminář Biochemie  
Brno, 16. 10. 2014**



EUROPEAN UNION  
EUROPEAN REGIONAL DEVELOPMENT FUND  
INVESTING IN YOUR FUTURE



**OP Research and  
Development for Innovation**



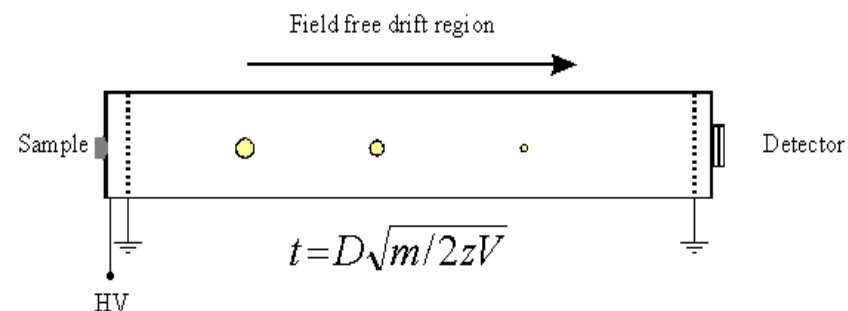
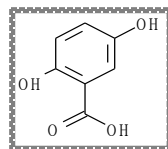
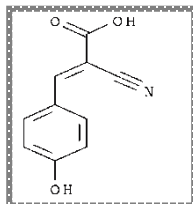
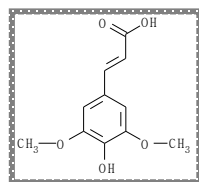
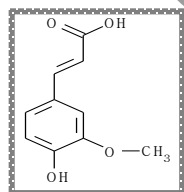
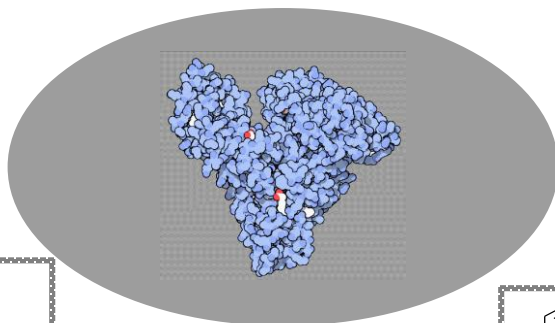
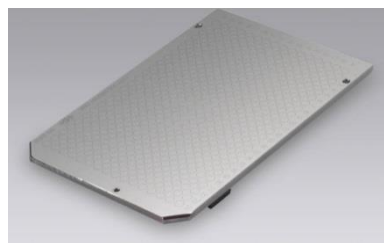
## 1. Historie a princip MALDI-TOF MS

## 2. Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS

## 3. MALDI-TOF MS v klinické diagnostice

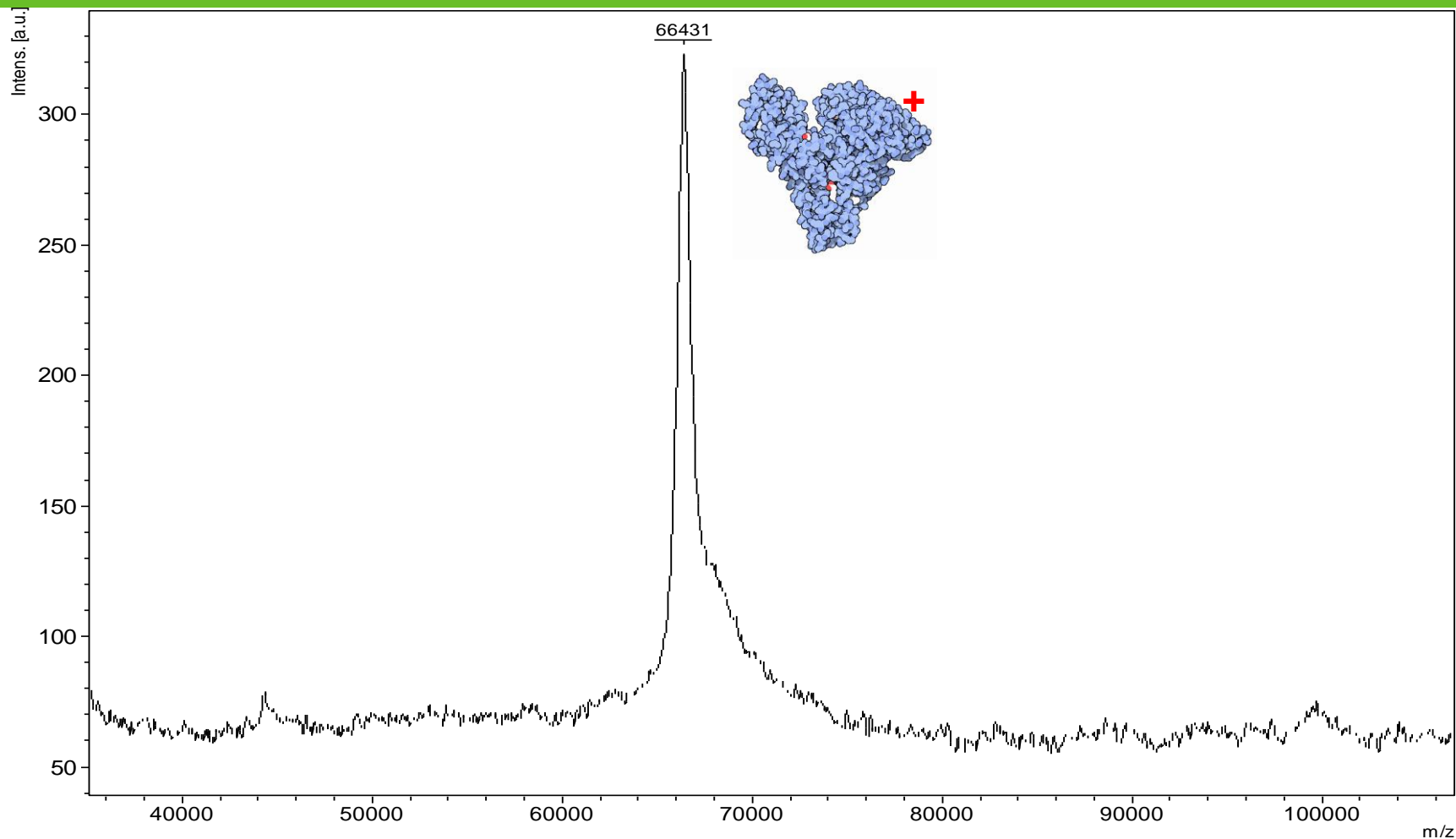
## - MALDI-TOF MS = Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - - Time of Flight Mass Spectrometry

Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací  
s průletovým analyzátozem



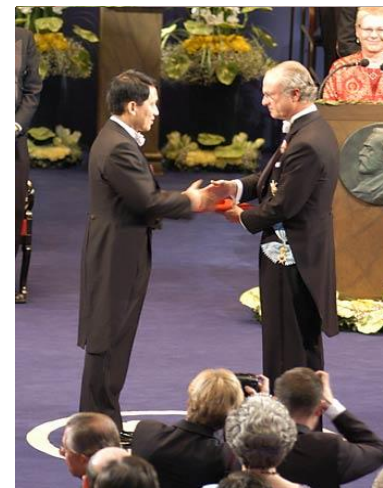
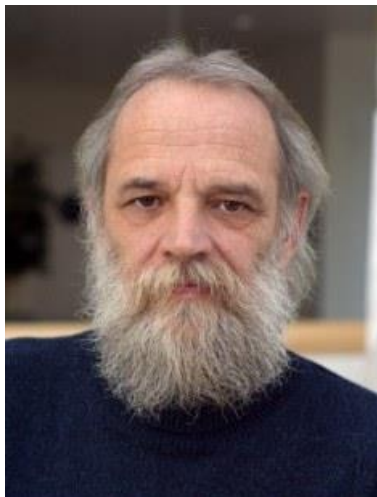
# Princip MALDI-TOF MS

## - MALDI-TOF hmotnostní spektrum proteinu

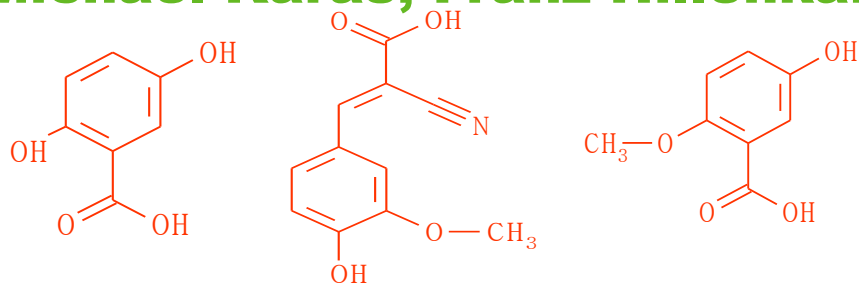


# Historie MALDI-TOF MS

## - Nobelova cena za chemii 2002



### Michael Karas, Franz Hillenkamp



### Koiči Tanaka

*nano-kobalt, glycerol*

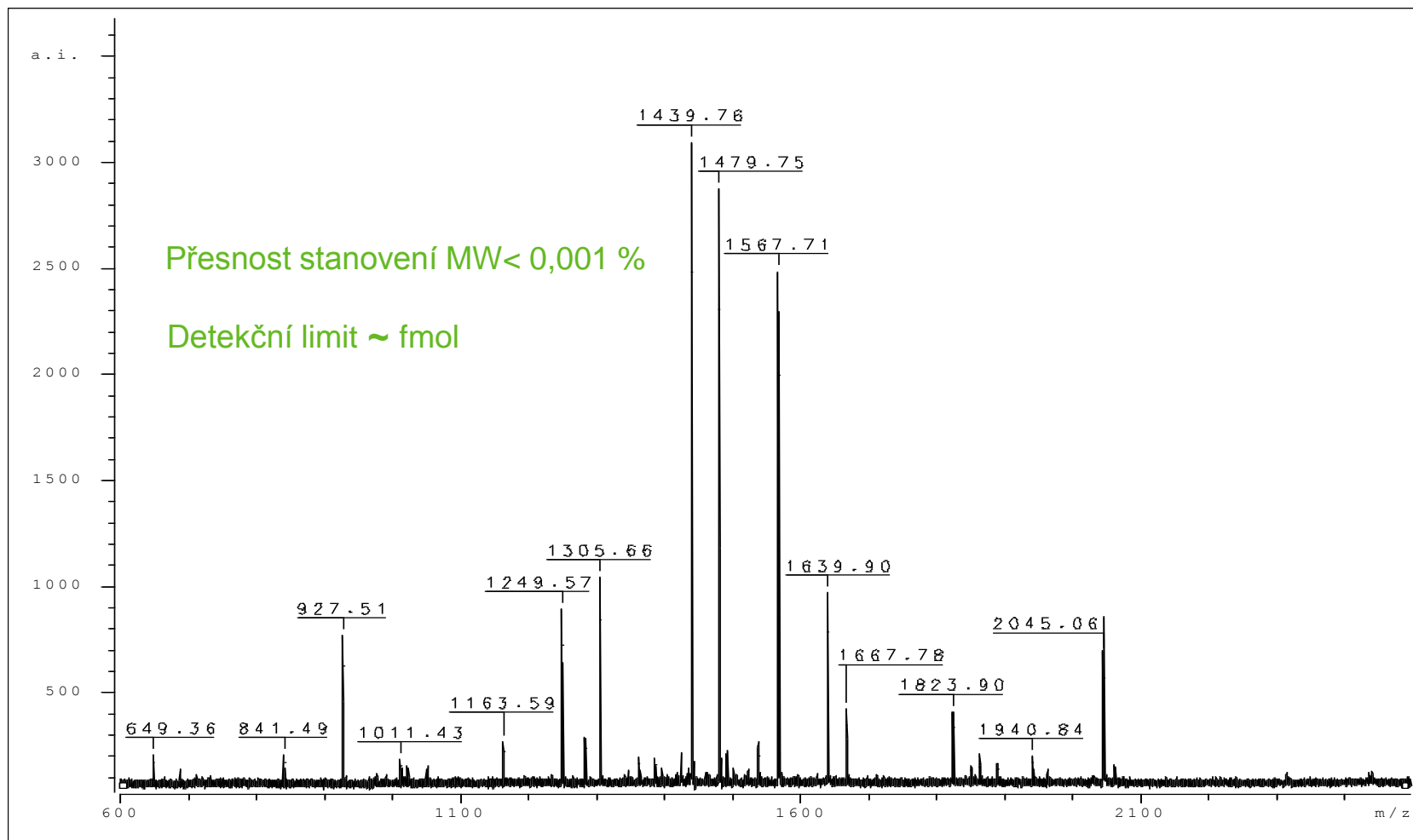
Karas M., Bachmann D., Bahr U., Hillenkamp F., *Int. J. Mass. Spectrom. Ion Proc.* 78 (1987) 53.  
Tanaka K., Waki H. Ido Y., Akita S. Yoshida Y. Yoshida T., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2 (1988) 2.

# Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS - peptidové mapování



# Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS

- MALDI-TOF hmotnostní spektrum směsi peptidů po proteolýze proteinu



# Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS - databázové prohledávání



**Peptide Mass Fingerprint** [?] [X]

URL:    
[Matrix Science home page](http://www.matrixscience.com/cgi/nph-mascot.exe?1)

User Name:  Email:

Search Title:

Taxonomy:

Database:  Enzyme:

Global Modifications:

Variable Modifications:

Protein MW >=:  kDa Missed Cleavages <=:

Mass Tol. MS:  ppm

Mass values:  MH<sup>+</sup>  M<sub>r</sub>  Monoisotopic  Average

Data file:

Query Data:

Search unmatched peaks only

Instrument:

Results:  Overview Report top  hits  
 On Import check matching MSMS only

organismus

databáze

proteáza

modifikace

molekulová  
hmotnost  
peptidů



# Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS - výsledek databázového prohledávání

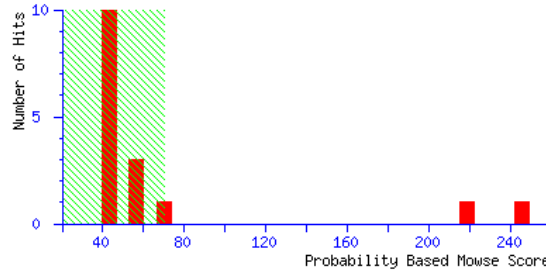


## *{MATRIX}* *{SCIENCE}* Mascot Search Results

User : ondra  
Email : sedo@post.cz  
Search title :  
Database : NCBI nr 20070326 (4761919 sequences; 1643098755 residues)  
Taxonomy : Mammalia (mammals) (572832 sequences)  
Timestamp : 6 Apr 2007 at 14:54:43 GMT  
Top Score : 246 for [gi|30794280](#), albumin [*Bos taurus*]

### Probability Based Mowse Score

Protein score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 70 are significant ( $p < 0.05$ ).



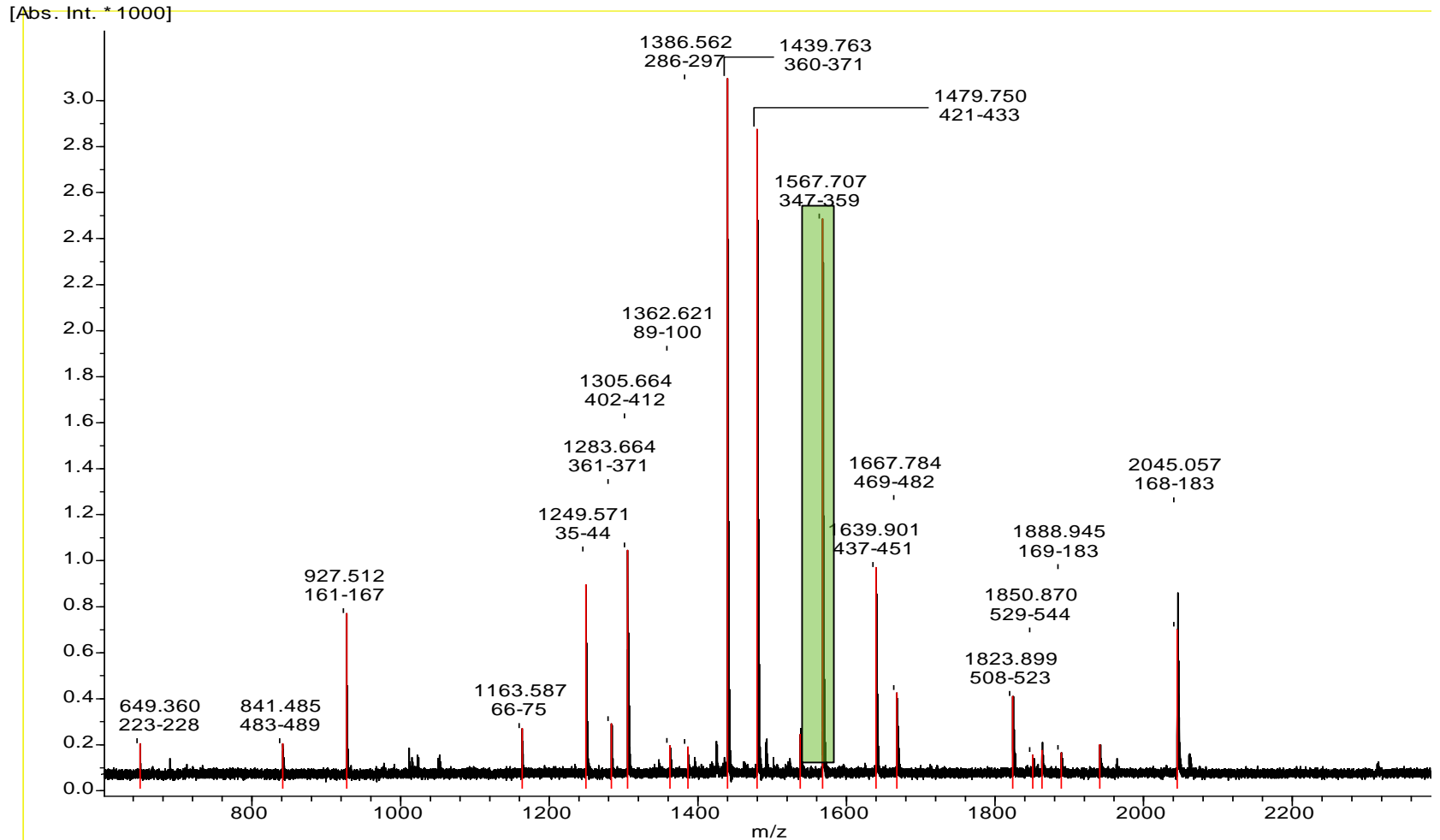
### Concise Protein Summary Report

Format As  [Help](#)

Significance threshold  $p <$   Max. number of hits

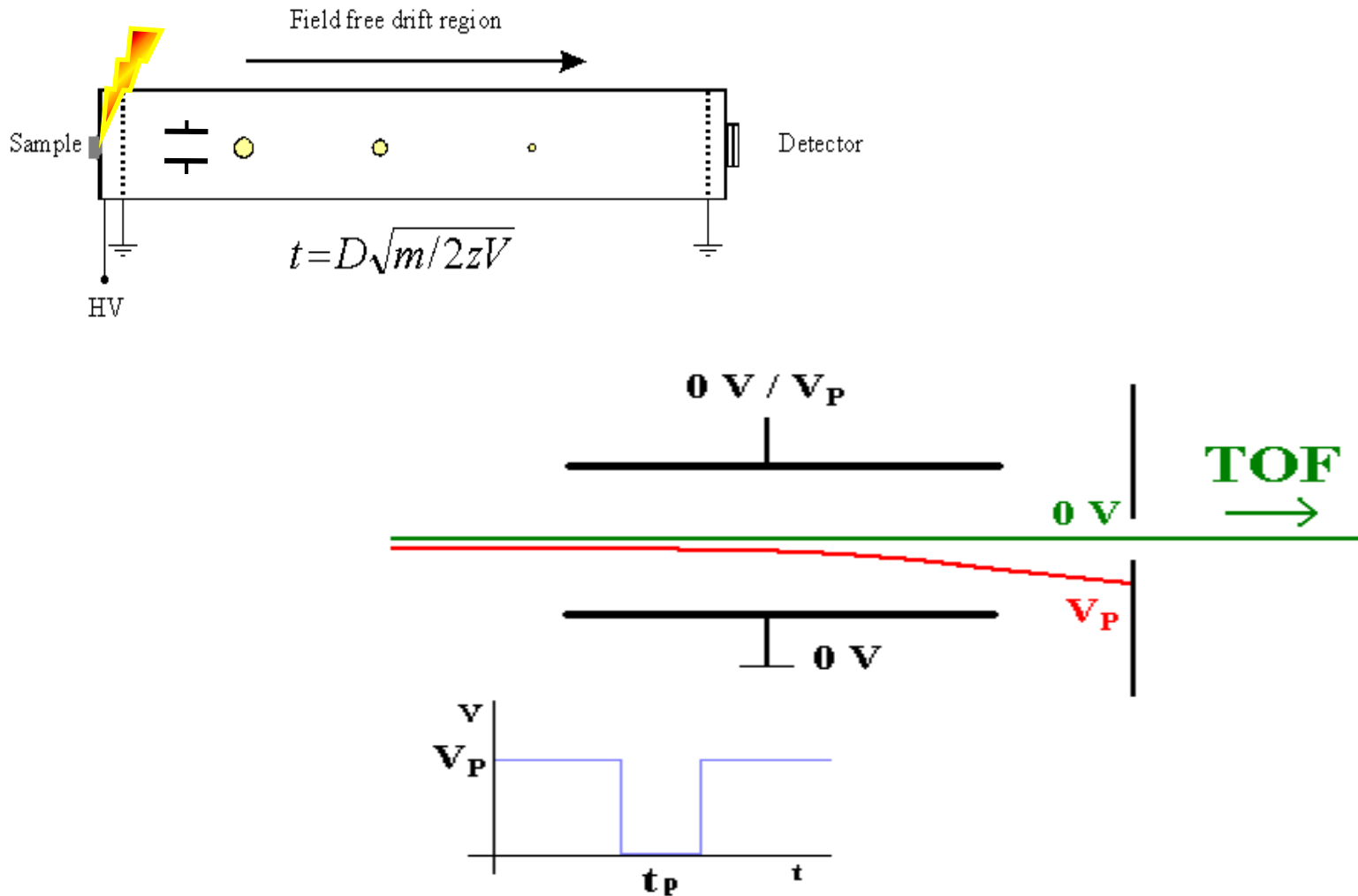
- [gi|30794280](#) Mass: 69278 Score: **246** Expect:  $1.4e-19$  Queries matched: 19  
albumin [*Bos taurus*]  
~~[gi|1351907](#) Mass: 69240 Score: **246** Expect:  $1.4e-19$  Queries matched: 19~~  
Serum albumin precursor (Allergen Bos d 6) (BSA)  
[gi|229552](#) Mass: 66088 Score: **190** Expect:  $5.7e-14$  Queries matched: 16  
albumin

# Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS MS/MS ion search



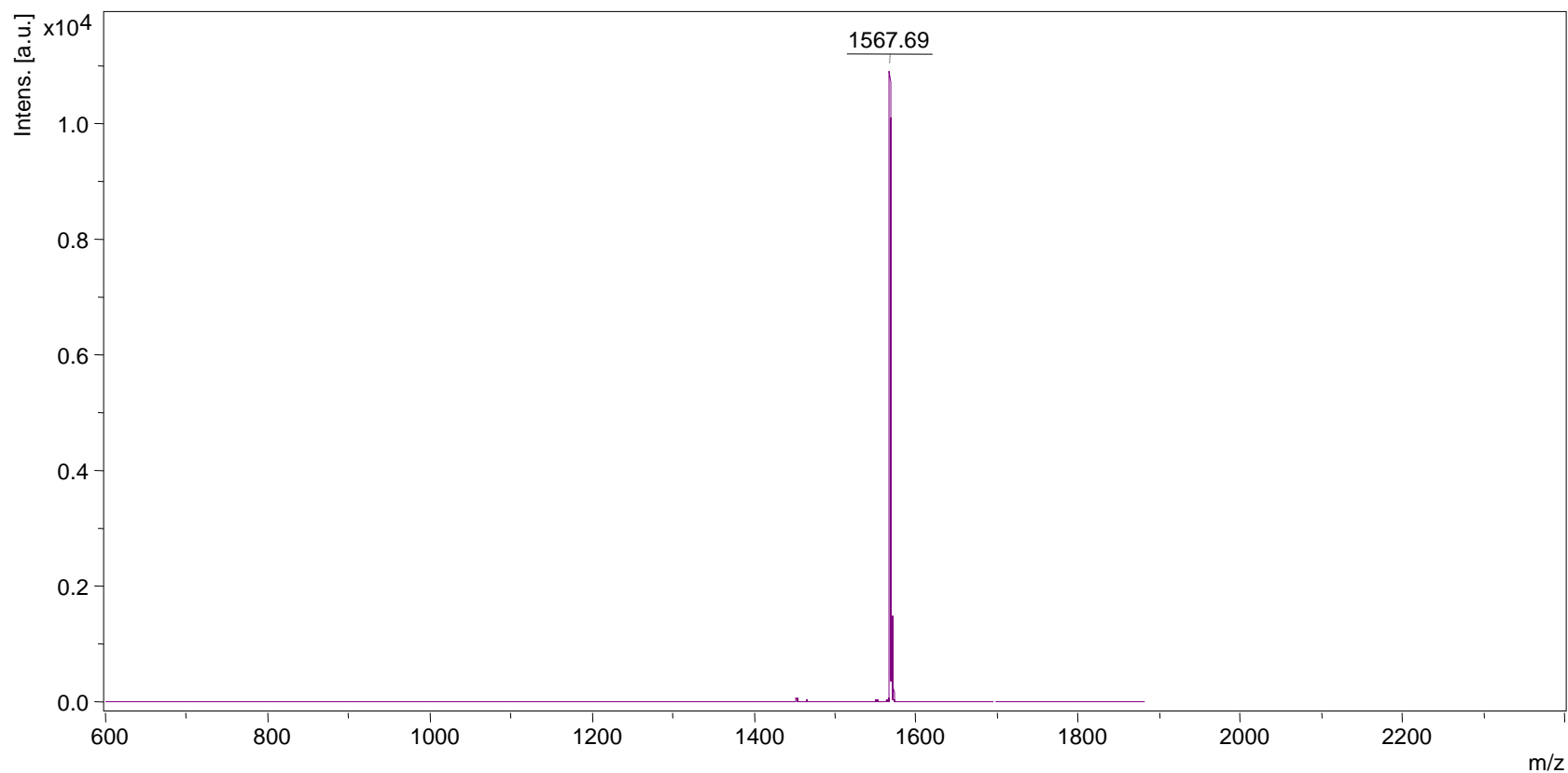
# Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS

## - výběr prekurzorového iontu



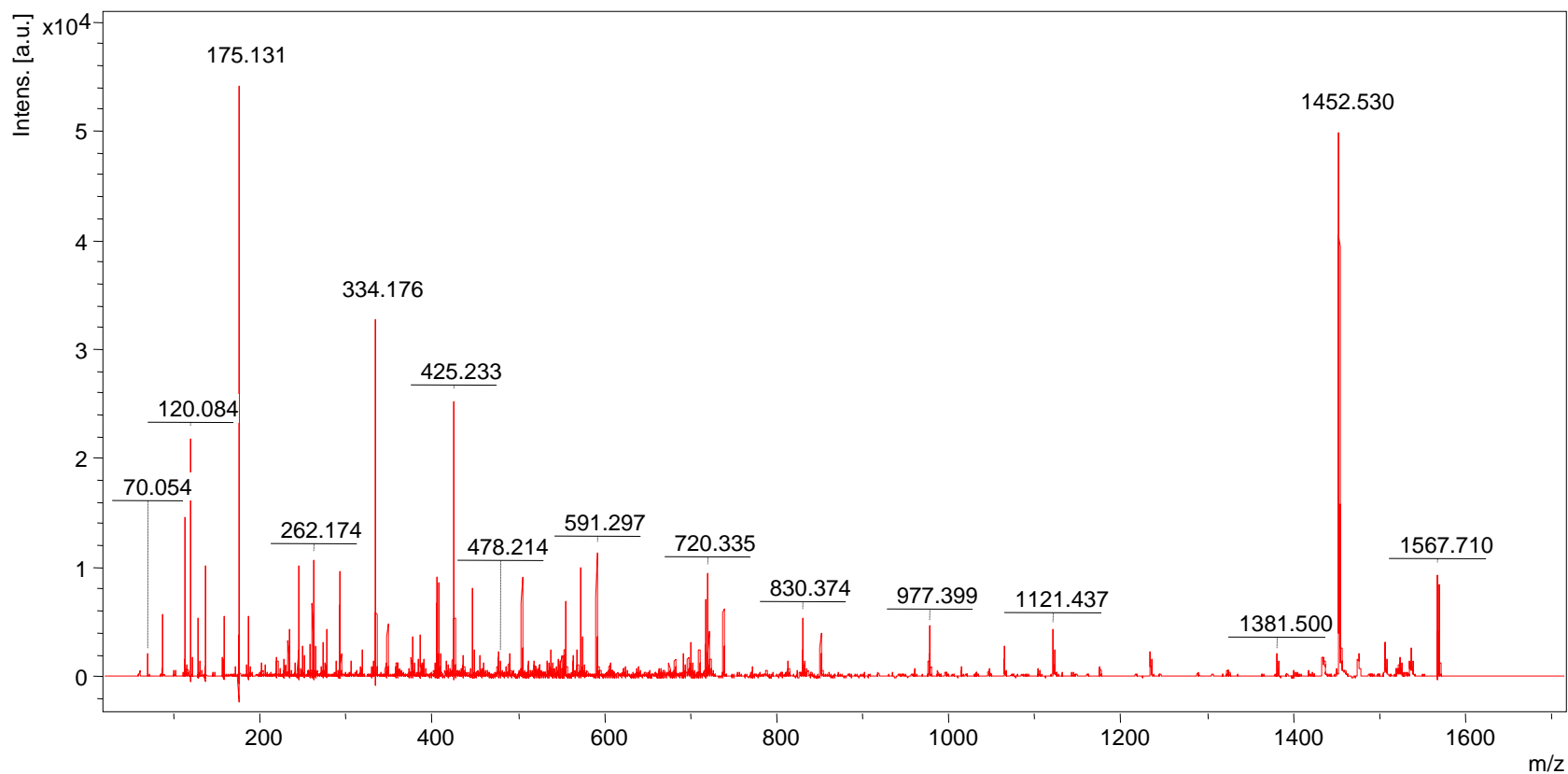
# Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS

## - výběr prekurzorového iontu



# Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS

## - MS/MS data



# Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS

- databázové prohledávání na základě MS/MS dat



**organismus**

**databáze**

**molekulová hmotnost peptidů a jejich MS/MS fragmentů**

**proteáza**

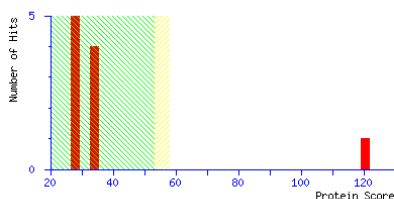
**modifikace**

# Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS - identifikace peptidu na základě MS/MS dat



## Mascot Score Histogram

Ions score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event.  
 Individual ions scores > 53 indicate peptides with significant homology.  
 Individual ions scores > 58 indicate identity or extensive homology ( $p < 0.05$ ).  
 Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



## Peptide Summary Report

Format As	Peptide Summary	<a href="#">Help</a>
Significance threshold p<	0.05	Max. number of hits
Standard scoring	<input type="radio"/> MudPIT scoring <input type="radio"/>	Ions score or expect cut-off
Show pop-ups	<input type="radio"/> Suppress pop-ups <input type="radio"/>	Sort unassigned
Preferred taxonomy	All entries	Require bold red

Select All Select None Search Selected  Error tolerant

- [gi|229552](#) Mass: 66088 Score: 120 Matches: 1(1) Sequences: 1(1)  
albumin

Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">1</a>	1567.7100	1566.7027	1566.7354	-20.88	0	120	3.2e-08	1	U	K.DAFLGSLYEYSR.R

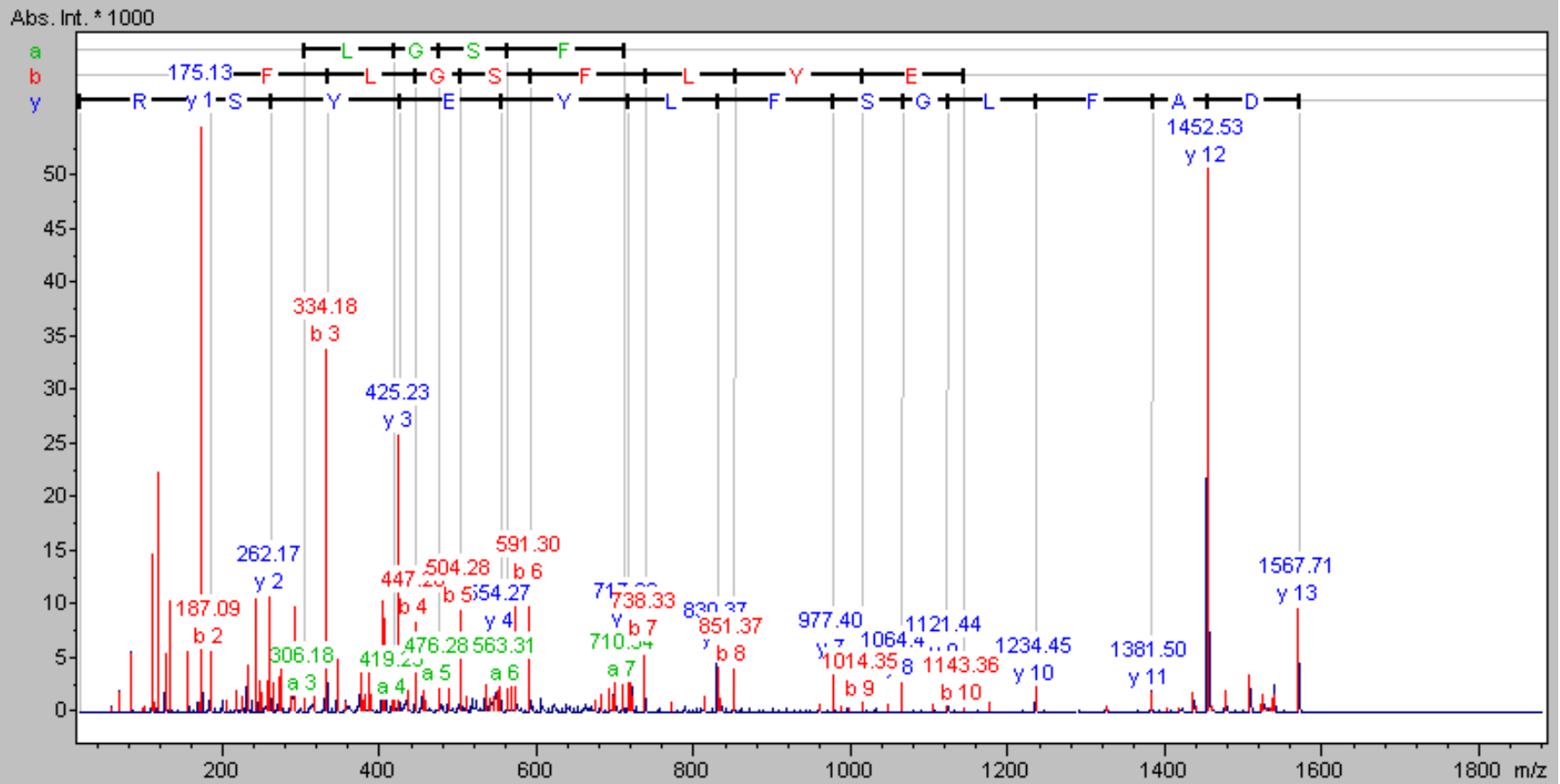
### Proteins matching the same set of peptides:

[gi|1351907](#) Mass: 69248 Score: 120 Matches: 1(1) Sequences: 1(1)  
 RecName: Full=Serum albumin; AltName: Full=BSA; AltName: Allergen=Bos d 6; Flags: Precursor  
[gi|30794280](#) Mass: 69278 Score: 120 Matches: 1(1) Sequences: 1(1)  
 serum albumin precursor [Bos taurus]  
[gi|174267962](#) Mass: 69190 Score: 120 Matches: 1(1) Sequences: 1(1)  
 ALB protein [Bos taurus]  
[gi|76445989](#) Mass: 53890 Score: 120 Matches: 1(1) Sequences: 1(1)  
 serum albumin [Bos indicus]  
[gi|154425704](#) Mass: 69248 Score: 120 Matches: 1(1) Sequences: 1(1)  
 ALB protein [Bos taurus]  
[gi|367460260](#) Mass: 66420 Score: 120 Matches: 1(1) Sequences: 1(1)  
 Chain A, Crystal Structure Of Bovine Serum Albumin  
[gi|440909714](#) Mass: 69292 Score: 120 Matches: 1(1) Sequences: 1(1)  
 Serum albumin [Bos grunniens mutus]

# Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS - identifikace peptidu na základě MS/MS dat



## peptid DAFLGSFLYEYSR

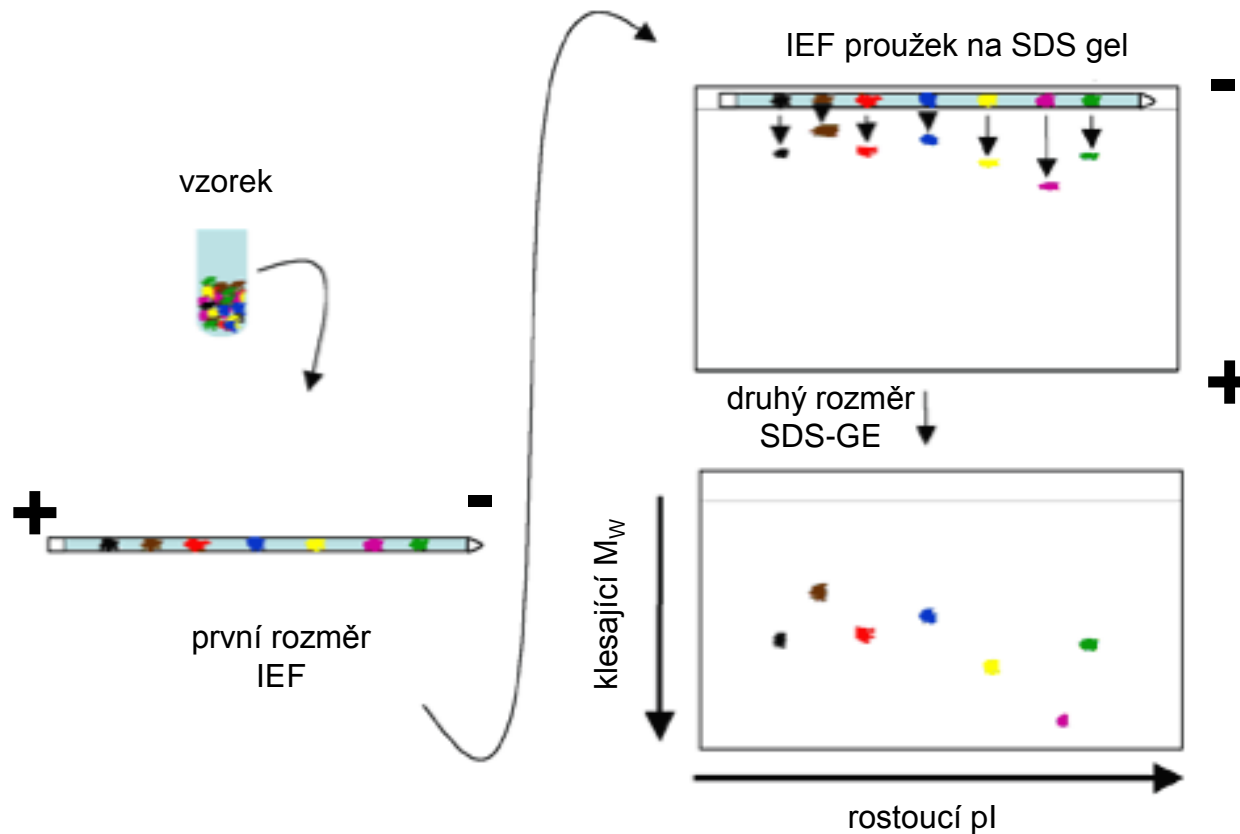




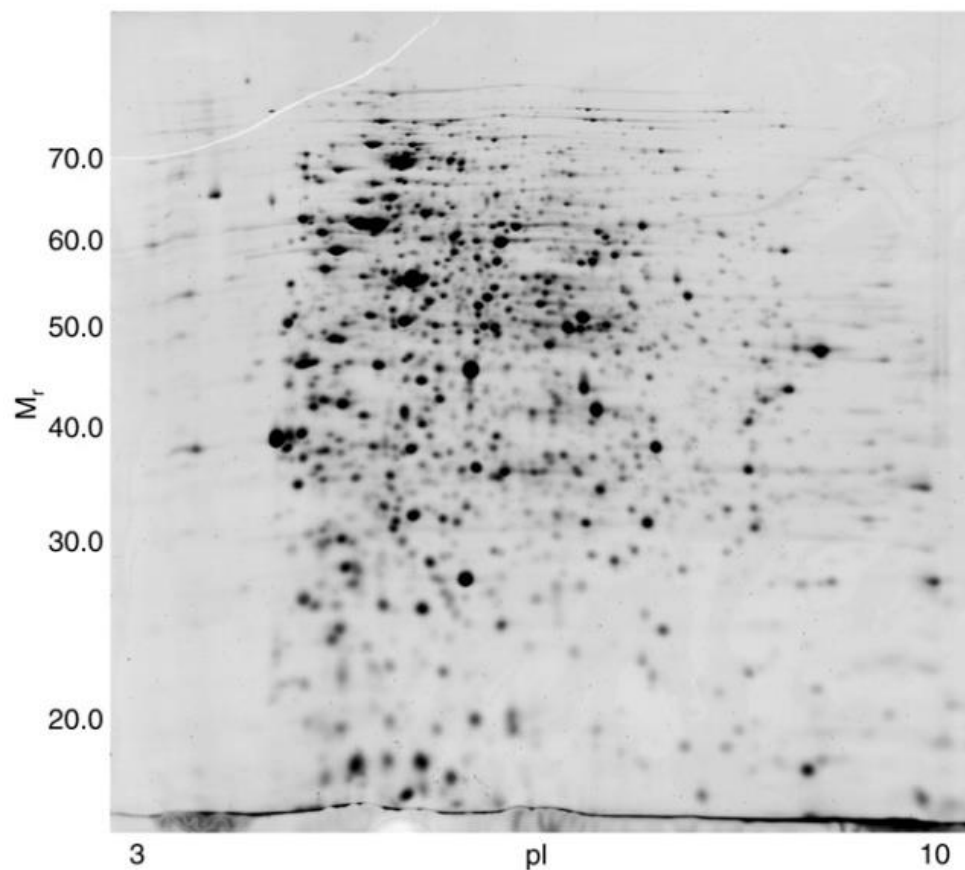
## 2D GE – dvoudimenzionální gelová elektroforéza

### 1) IEF – izoelektrická fokuzace

### 2) SDS-PAGE – denaturující elektroforéza v polyakrylamidovém gelu



# Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS - separace směsi proteinů před MS analýzou



**Bouchal P., Struhárová I., Budinská E., Vyhliđalová T., Zdráhal Z., van Spanning R., Kučera I.**  
*Biochim Biophys. Acta* 6 (2010) 1350.

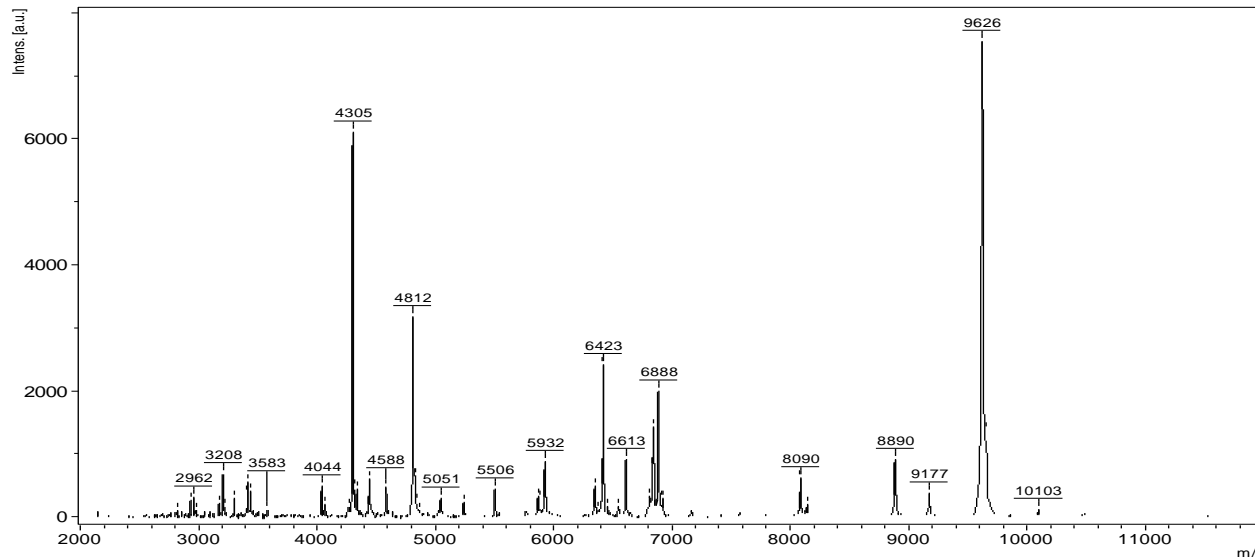
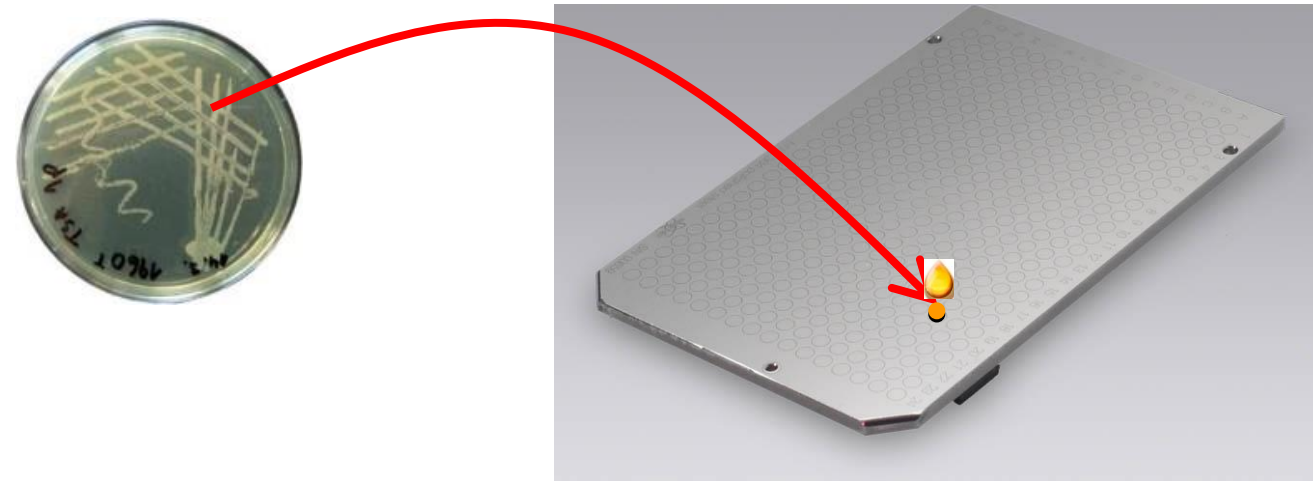
## MALDI-TOF MS v klinické diagnostice

- úskalí při zavádění proteinových markerů do klinické diagnostiky

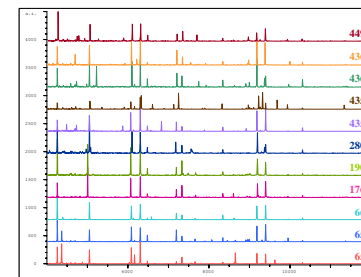


- **preanalytická fáze (vliv věku, rasy, pohlaví, stravy, režimu, léků...)**
- **stabilizace vzorků po odběru (inhibice proteáz, rozpad krvinek)**
- **vhodnost metody analýzy a interpretace výsledků**
- **nižší produkce markerů u asymptomatických malých nádorů**
- **stejné proteiny produkují i zdravé tkáně**
- **ovlivnění hladiny markeru jinými onemocněními**
- **ekonomická/diagnostická výhodnost oproti současným postupům**

# MALDI-TOF MS v klinické diagnostice - identifikace bakterií



### I. MALDI-TOF hmotnostní spektrometr



### II. Databáze referenčních spekter

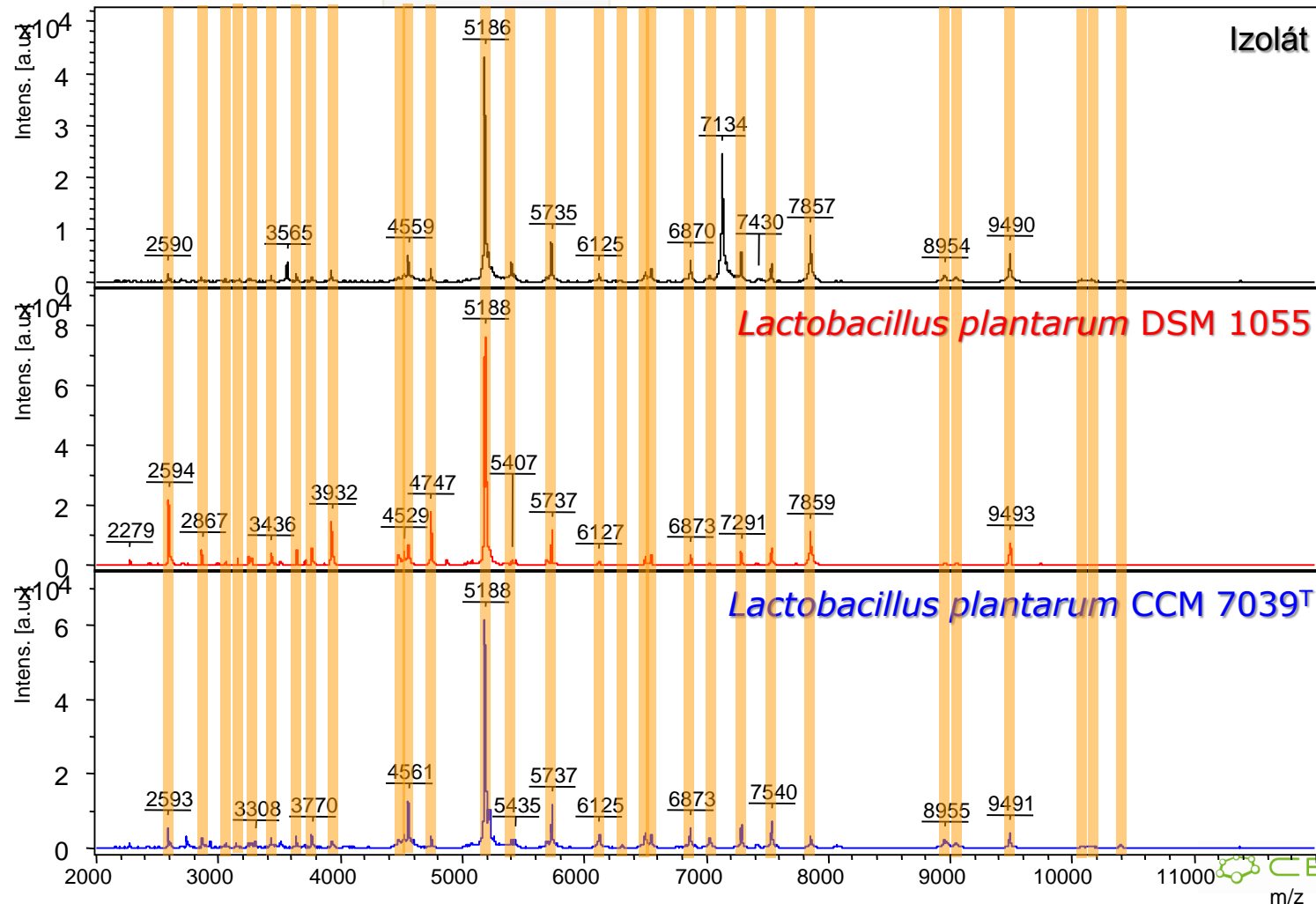
### III. Software pro vyhodnocení dat

Result Overview

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
11 (+++)	ref100	Escherichia coli ATCC 25922	999	Escherichia coli ATCC 25922	999
11 (+++)	Probe 5	Streptococcus pyogenes DSM 9811	999	Streptococcus pyogenes DSM 9811 DSM	999
11 (+++)	Probe 5	Streptococcus pyogenes DSM 9811 DSM	999	Streptococcus pyogenes DSM 9811 DSM	999
11 (+++)	Probe 6	Mycoplasma mycoides var. mycoides SCRB_1_CBE	999	Mycoplasma mycoides var. mycoides SCRB_1_CBE	999
11 (+++)	Probe 6	Mycoplasma mycoides var. mycoides SCRB_1_CBE	999	Mycoplasma mycoides var. mycoides SCRB_1_CBE	999
11 (+++)	Probe 7	Acinetobacter baumannii DSM 13310	999	Acinetobacter baumannii DSM 13310	999
11 (+++)	Probe 7	Acinetobacter baumannii DSM 13310	999	Acinetobacter baumannii DSM 13310	999
11 (+++)	Probe 8	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27053	999	Pseudomonas aeruginosa DSM 21817 DSM	999

Detected Species	Log( Score)
Lactobacillus plantarum DSM 1055_DSM	2.449
Lactobacillus plantarum DSM 2601_DSM	2.440
Lactobacillus plantarum DSM 20246_DSM	2.381
Lactobacillus plantarum DSM 2648_DSM	2.285
Lactobacillus plantarum DSM 13273_DSM	2.279
Lactobacillus plantarum DSM 12028_DSM	2.215
Lactobacillus plantarum ssp argenteratensis DSM 16365_DSM	2.206
Lactobacillus plantarum ssp plantarum DSM 20174T_DSM	2.025
Lactobacillus paraplantarum DSM 10641_DSM	1.992
Lactobacillus pentosus DSM 16366_DSM	1.950

# - srovnání získaných dat s databází referenčních MALDI-TOF hmotnostních spekter známých mikroorganismů

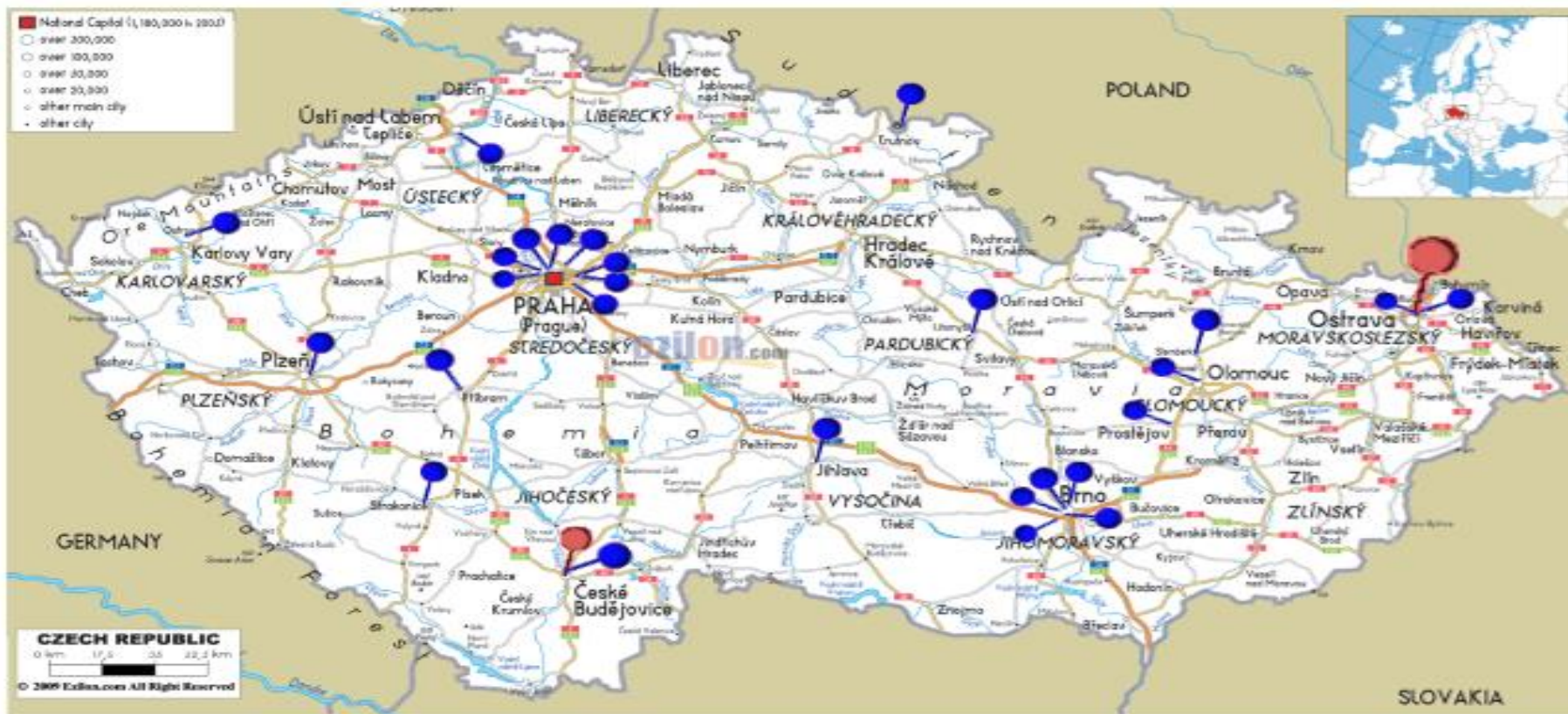


# MALDI-TOF MS v klinické diagnostice - identifikace bakterií



## Czech Republic – Total 27 MBT systems (End of 2013)

21x clinical, 2x public health inst., 3x veterinary inst., 1x pharma uni. (+4x on university MALDI)



### **Výhody:**

- **doba analýzy ~ minuty**
- **identifikace na úrovni druhu, případně i detailnější**
- **minimální náklady na analýzu**
- **identifikace vzorků s abnormálním fenotypem**

### **Nevýhody:**

- **vysoká pořizovací cena**
- **problémy s rozlišením blízce příbuzných druhů**
- **identifikace ze směsných vzorků není možná**





Středoevropský technologický institut  
BRNO | ČESKÁ REPUBLIKA

Research programme 4: Genomics and Proteomics of Plant systems

Research Group Proteomics  
Proteomics Core Facility

**CEITEC (Central European Institute of Technology  
CZ.1.05/1.1.00/02.0068) funded from the European  
Regional Development Fund**

**GAČR P206/12/G151, 13-26693S**

**OP VK Z.1.07/2.3.00/30.0019**



EVROPSKÁ UNIE  
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ  
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI



OP Výzkum a vývoj  
pro inovace

