



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

Nové směry v bioanalytické chemii  
Brno, 15. 10. 2018



EUROPEAN UNION  
EUROPEAN REGIONAL DEVELOPMENT FUND  
INVESTING IN YOUR FUTURE



OP Research and  
Development for Innovation



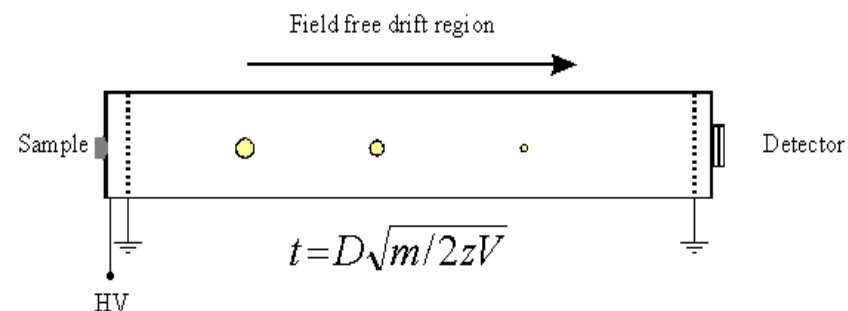
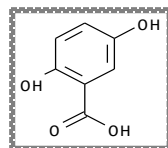
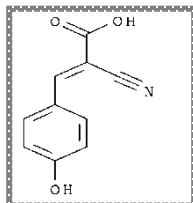
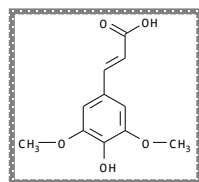
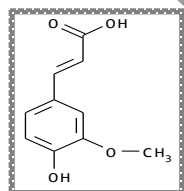
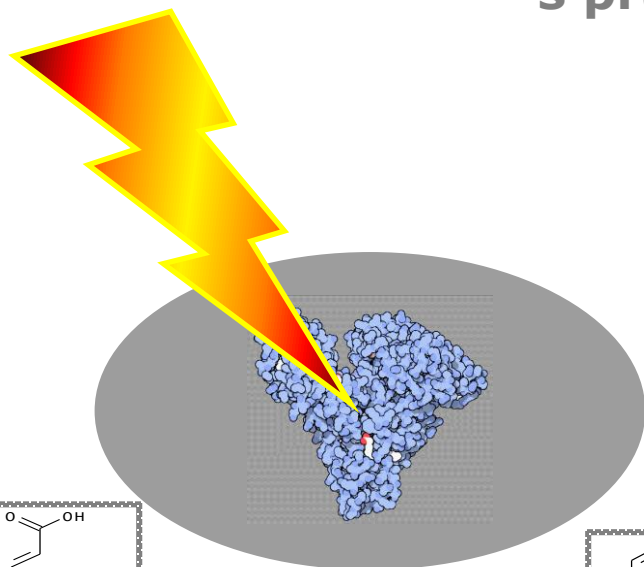
## 1. Historie a princip MALDI-TOF MS

## 2. Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS

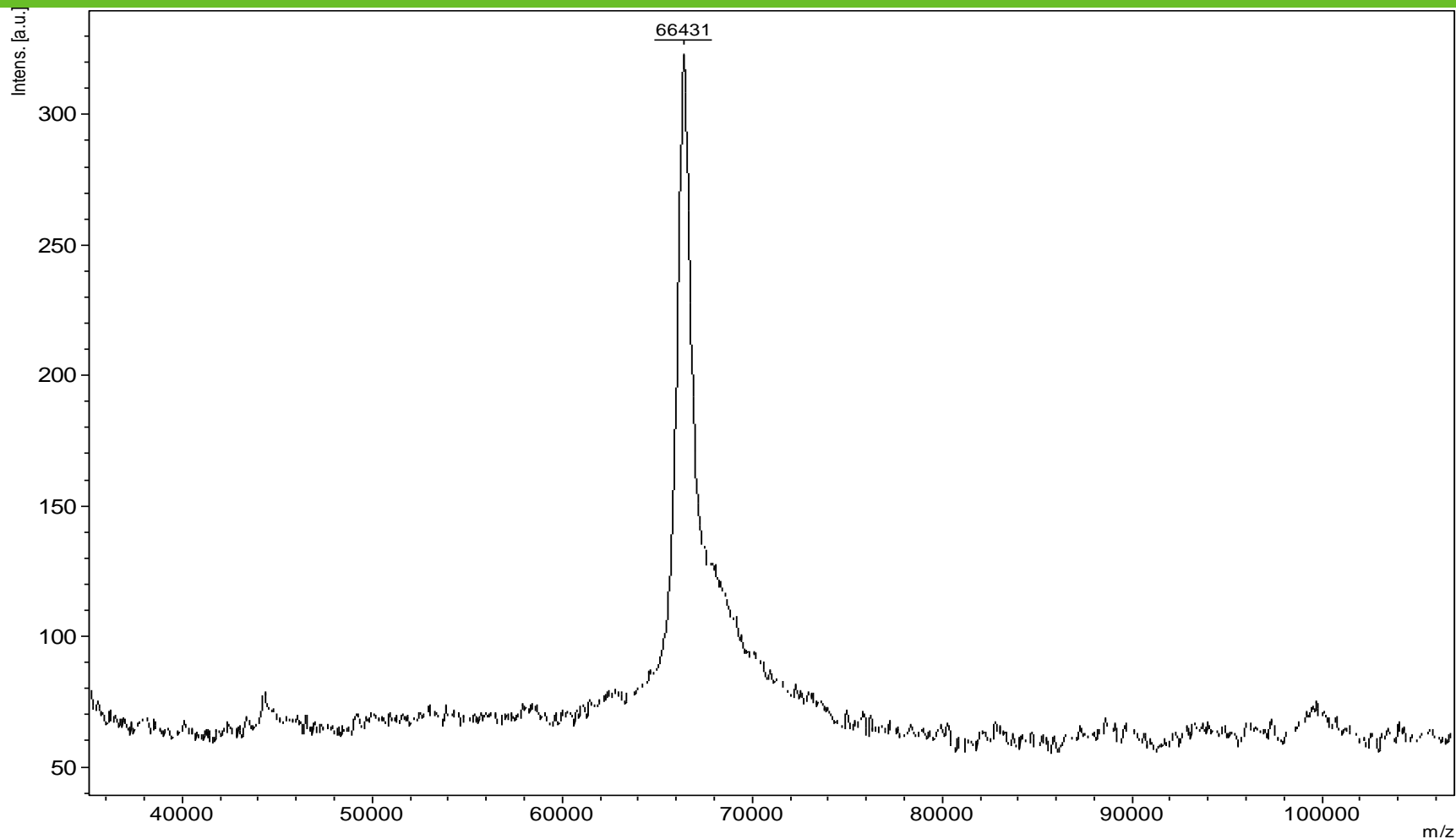
## 3. MALDI-TOF MS v klinické diagnostice

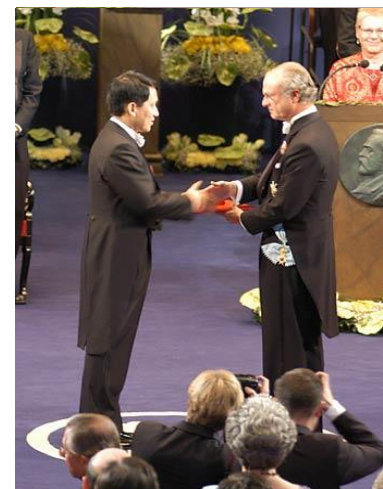
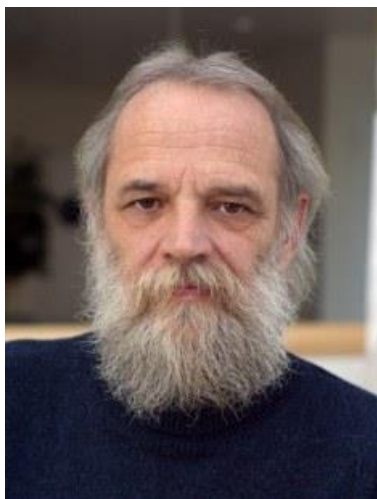
## - MALDI-TOF MS = Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - - Time of Flight Mass Spectrometry

Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací  
s průletovým analyzátozem

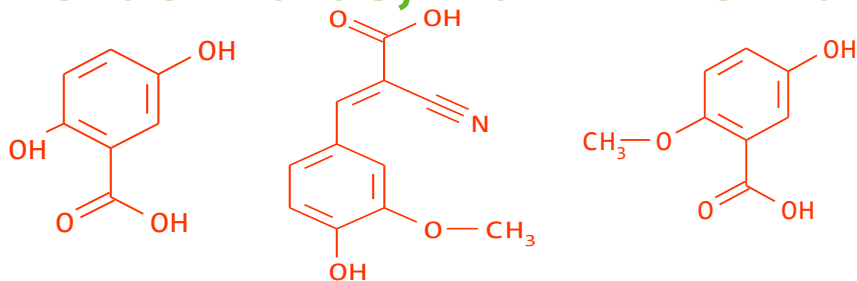


# Princip MALDI-TOF MS: stanovení MW (nedochází k fragmentaci molekul)





## Michael Karas, Franz Hillenkamp

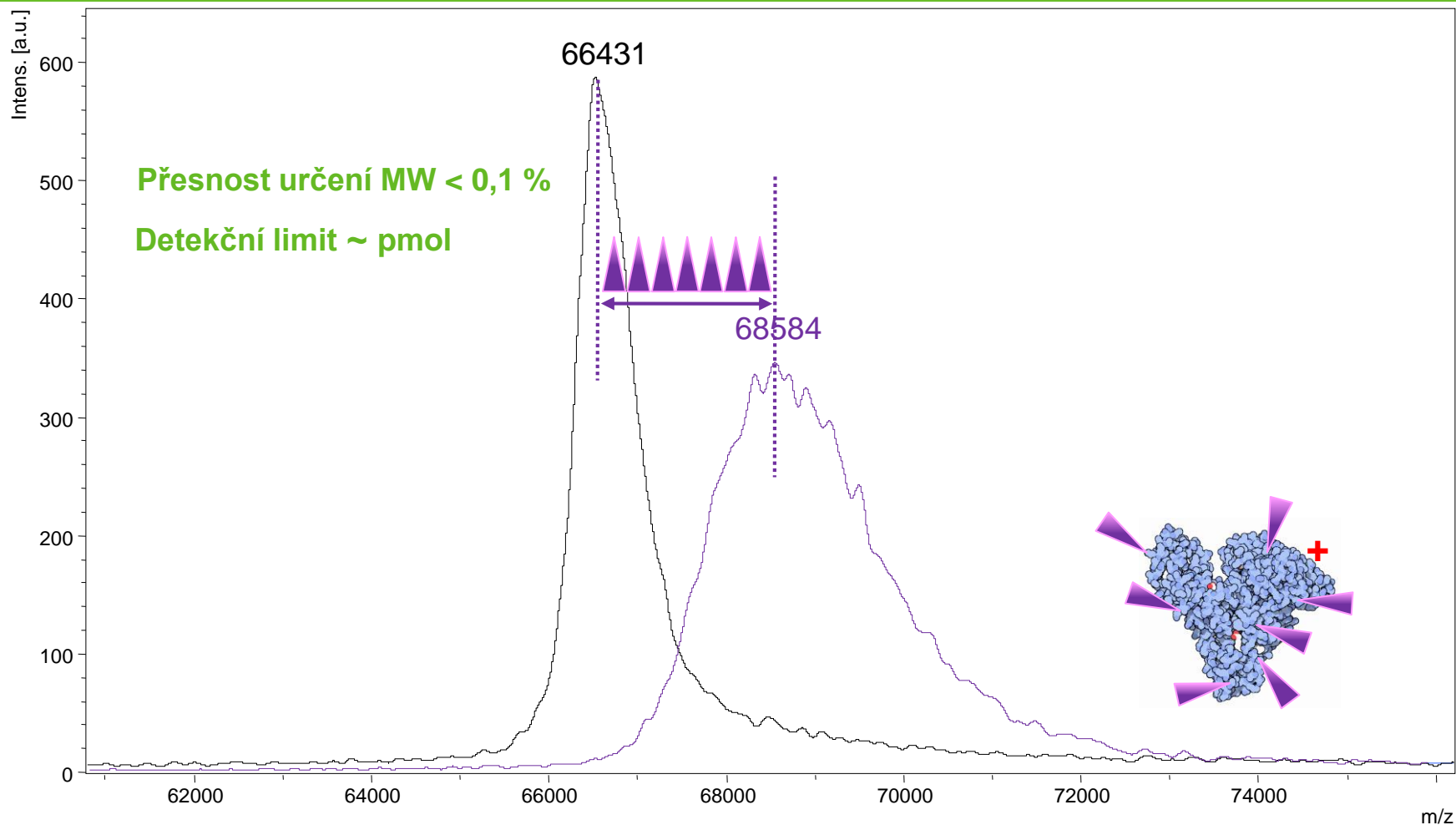


## Koiči Tanaka

*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: Stanovení míry modifikace proteinu



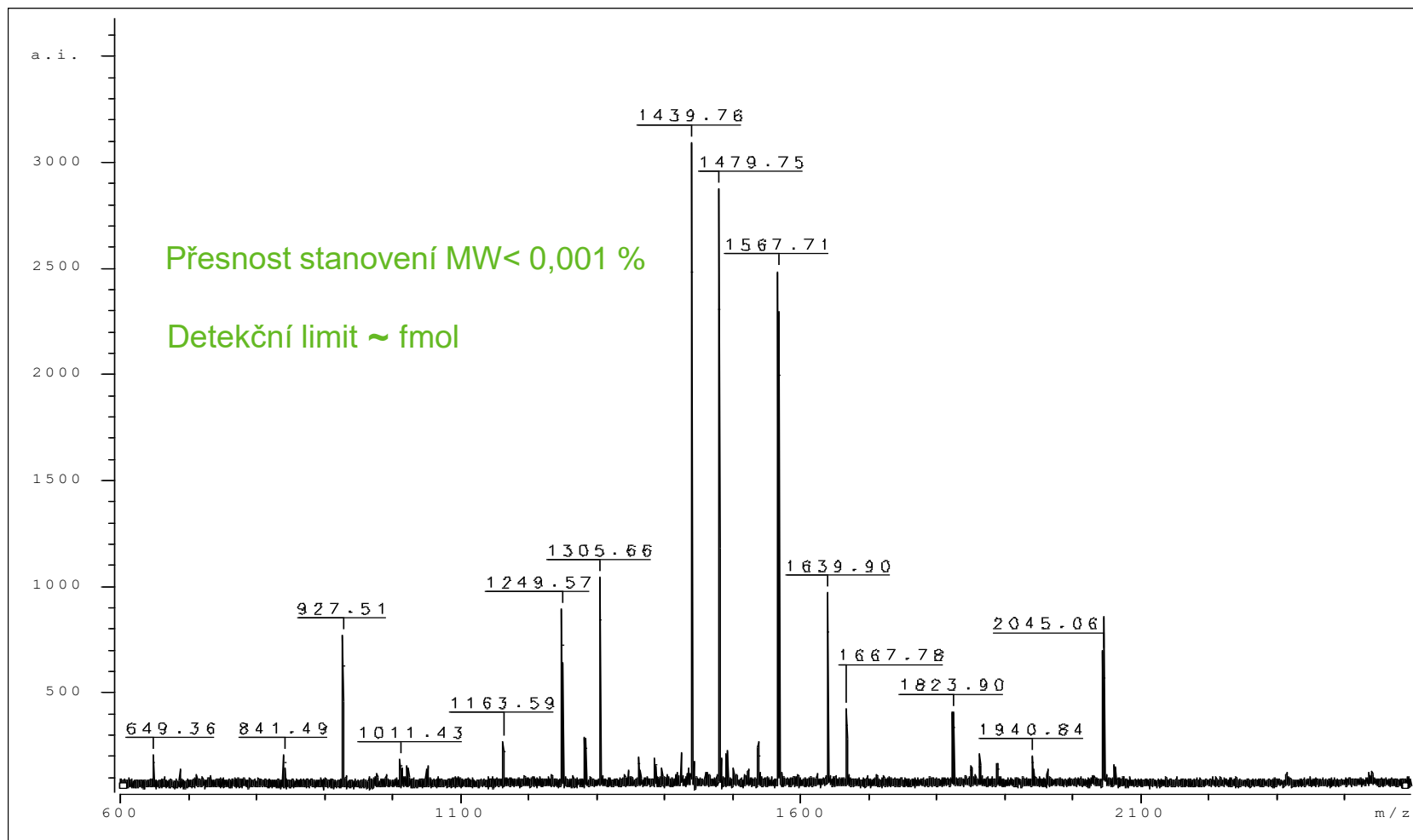
# Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS

## Peptidové mapování - proteolýza



# Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS

## Peptidové mapování – stanovení MW





# Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS

## Peptidové mapování – databázové vyhledávání



**Peptide Mass Fingerprint**

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

User Name:  Email:

Search Title:

Taxonomy:

Database:  Enzyme:

Global Modifications:   
Acetyl (N-term)  
Acetyl (Protein N-term)  
Amidated (C-term)  
Amidated (Protein C-term)

Variable Modifications:   
NIPCAM (C)  
Oxidation (HW)  
**Oxidation (M)**  
Phospho (ST)

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

**databáze**

**proteáza**

**modifikace**

**molekulová  
hmotnost  
peptidů**

# Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS

## Peptidové mapování – databázové vyhledávání

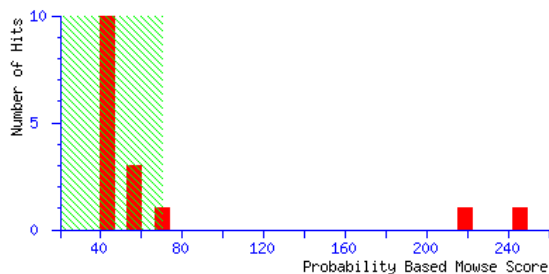


### *{MATRIX}* Mascot Search Results

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

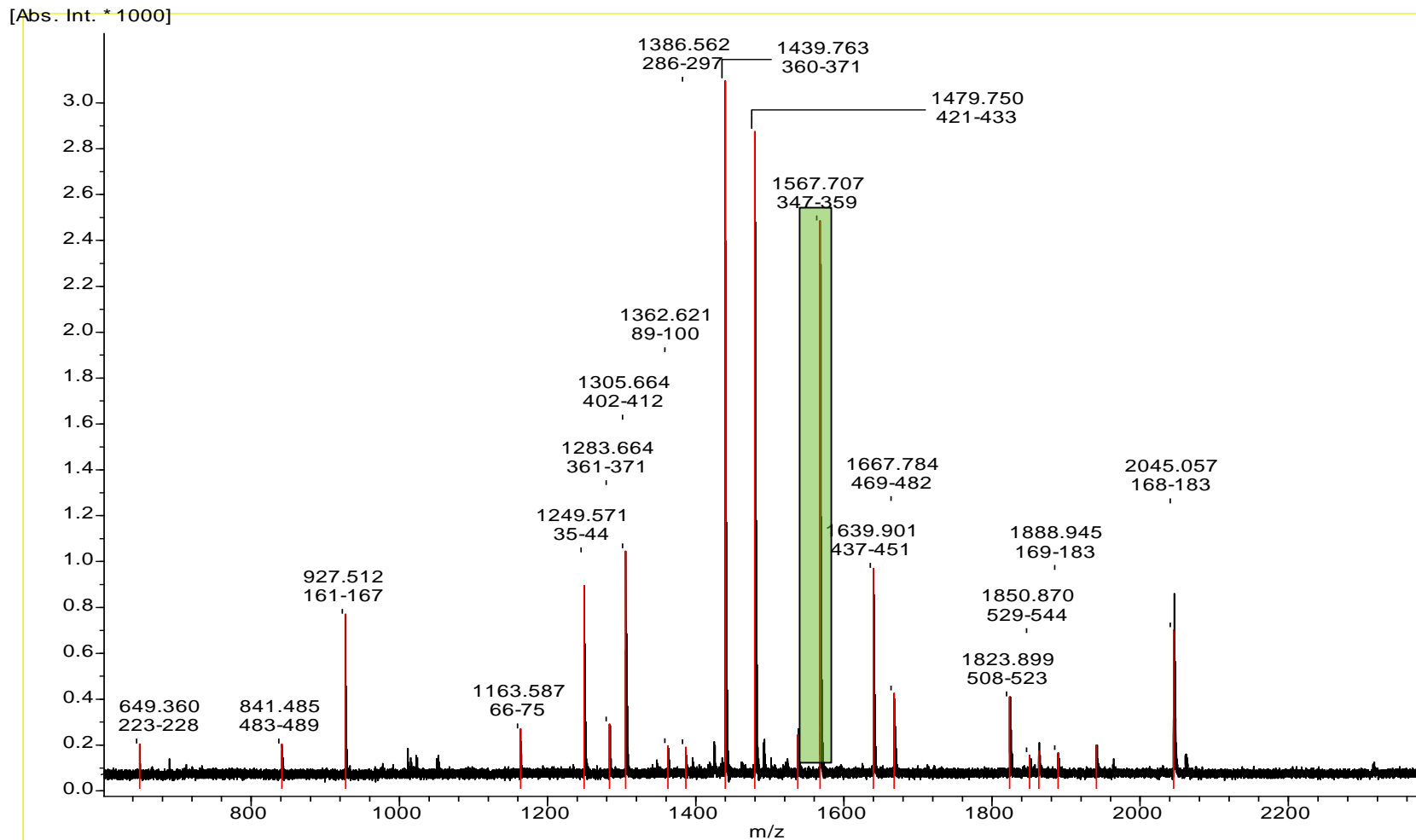
Format As  [Help](#)

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

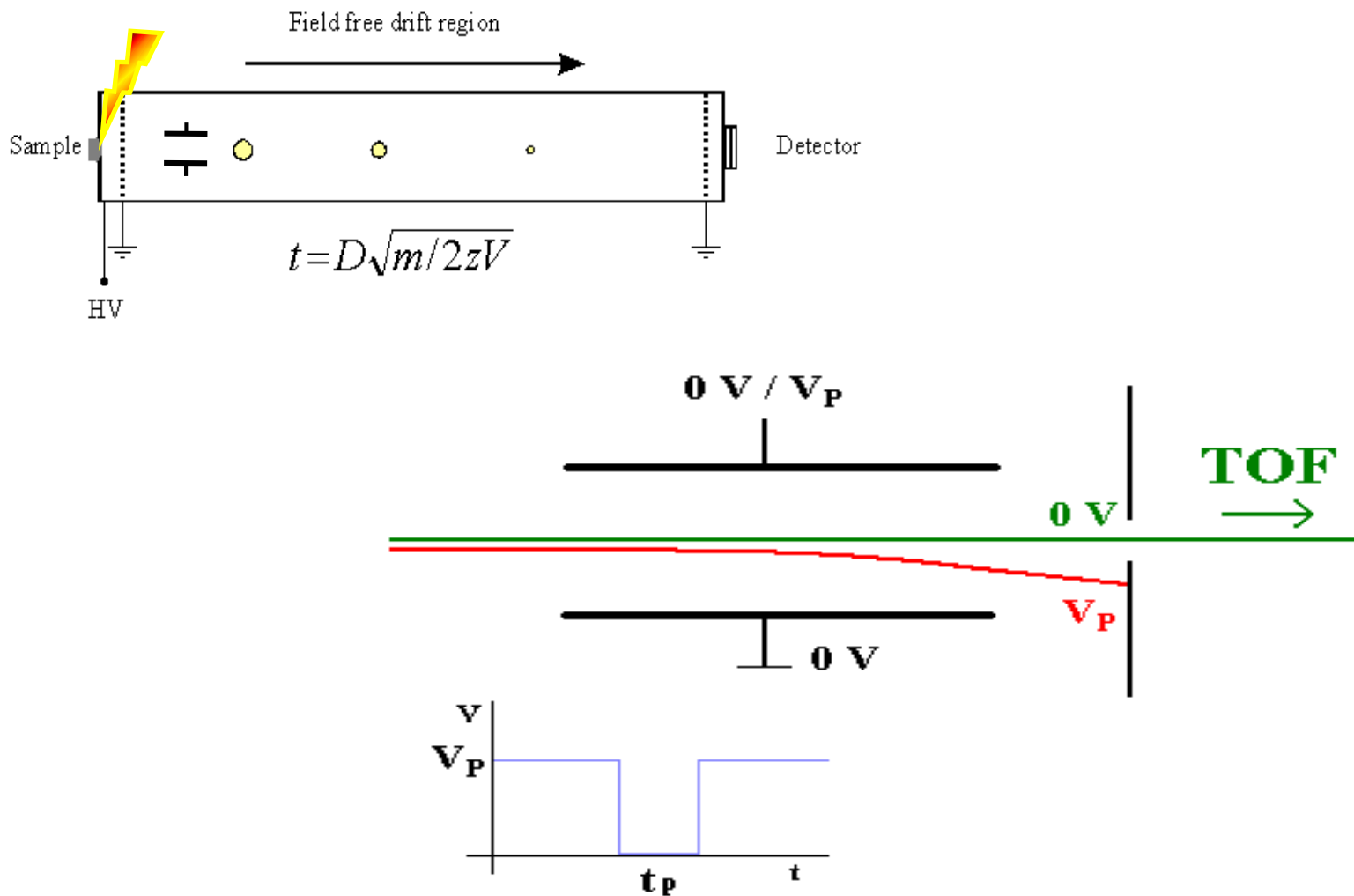
# Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS

## MS/MS ion search – výběr prekurzorového iontu



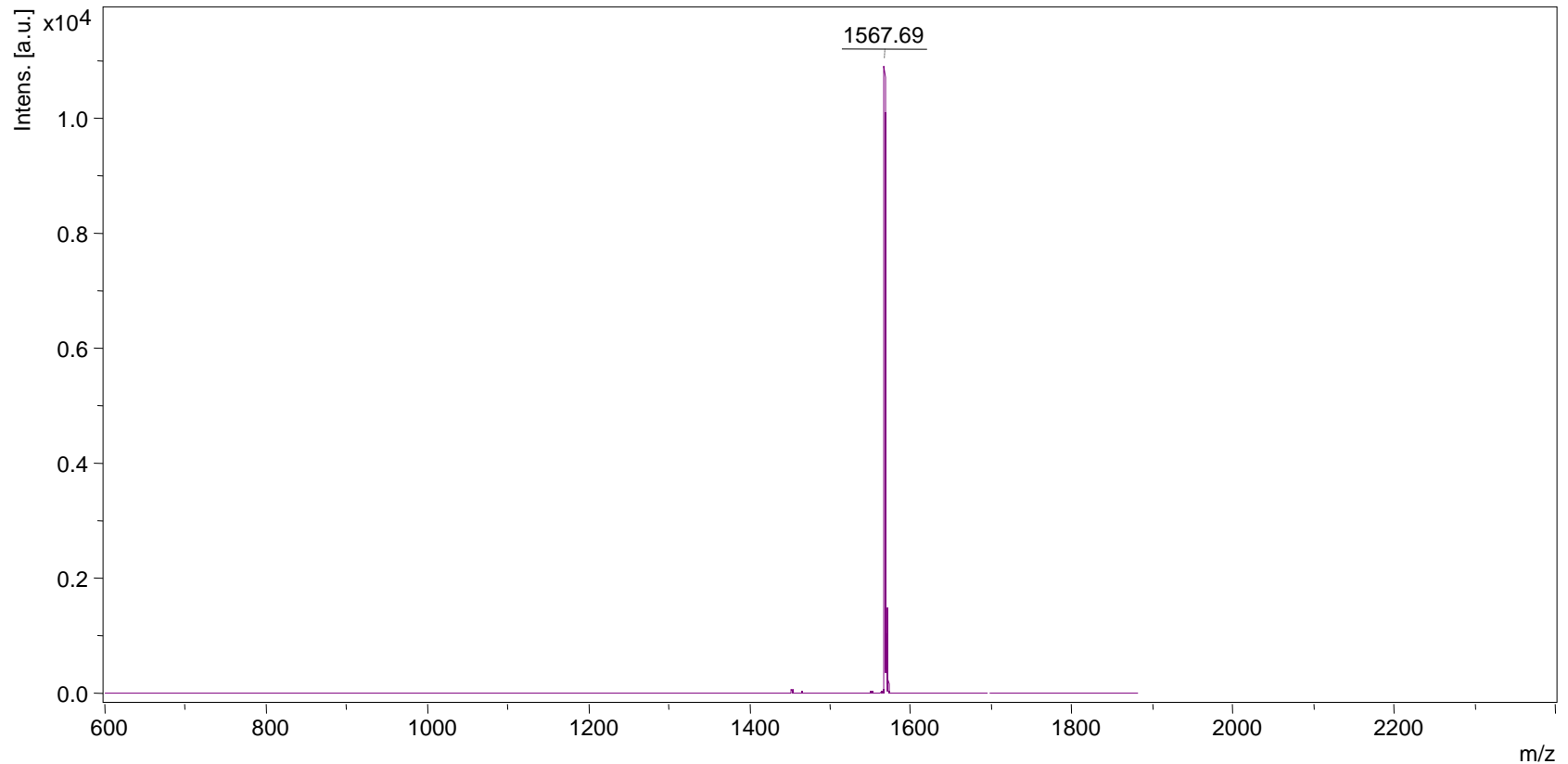
# Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS

## MS/MS ion search – výběr prekurzorového iontu



# Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS

## MS/MS ion search – výběr prekurzorového iontu



# Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS

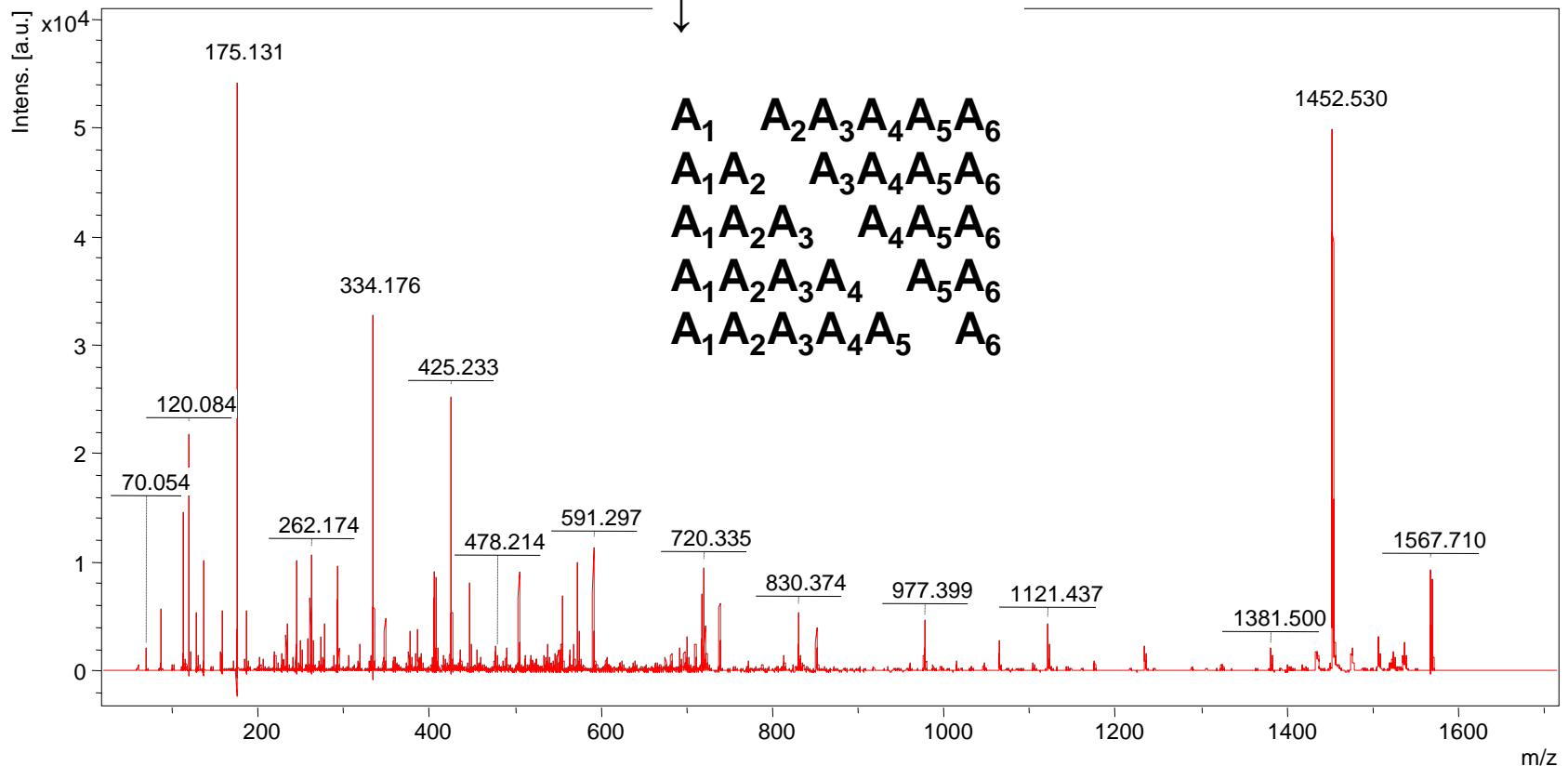
## MS/MS ion search – fragmentace prekurzorového iontu



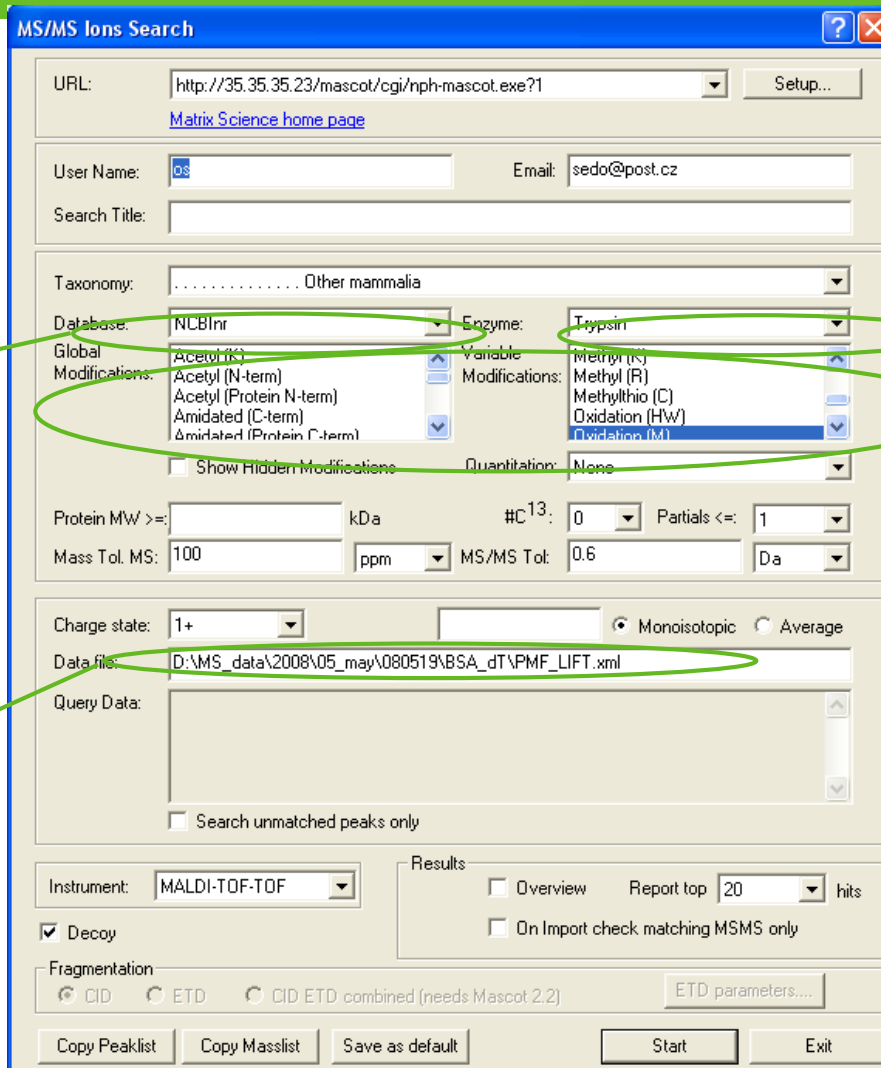
**A<sub>1</sub>A<sub>2</sub>A<sub>3</sub>A<sub>4</sub>A<sub>5</sub>A<sub>6</sub>**



**A<sub>1</sub> A<sub>2</sub>A<sub>3</sub>A<sub>4</sub>A<sub>5</sub>A<sub>6</sub>**  
**A<sub>1</sub>A<sub>2</sub> A<sub>3</sub>A<sub>4</sub>A<sub>5</sub>A<sub>6</sub>**  
**A<sub>1</sub>A<sub>2</sub>A<sub>3</sub> A<sub>4</sub>A<sub>5</sub>A<sub>6</sub>**  
**A<sub>1</sub>A<sub>2</sub>A<sub>3</sub>A<sub>4</sub> A<sub>5</sub>A<sub>6</sub>**  
**A<sub>1</sub>A<sub>2</sub>A<sub>3</sub>A<sub>4</sub>A<sub>5</sub> A<sub>6</sub>**



# Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS MS/MS ion search – databázové vyhledávání



**databáze**

**proteáza**

**modifikace**

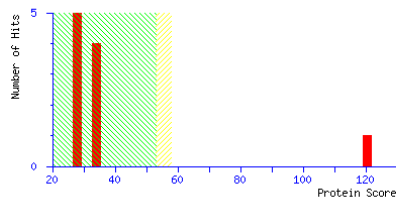
**molekulová  
hmotnost  
peptidů  
a jejich  
MS/MS  
fragmentů**

# Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS MS/MS ion search – databázové vyhledávání



## 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	AUTO		
Standard scoring	<input checked="" type="radio"/> MudPIT scoring <input type="radio"/>	Ions score or expect cut-off	0	Show sub-sets	0
Show pop-ups	<input checked="" type="radio"/> Suppress pop-ups <input type="radio"/>	Sort unassigned	Decreasing Score	Require bold red	<input type="checkbox"/>
Preferred taxonomy	All entries				

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"/> 1	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:

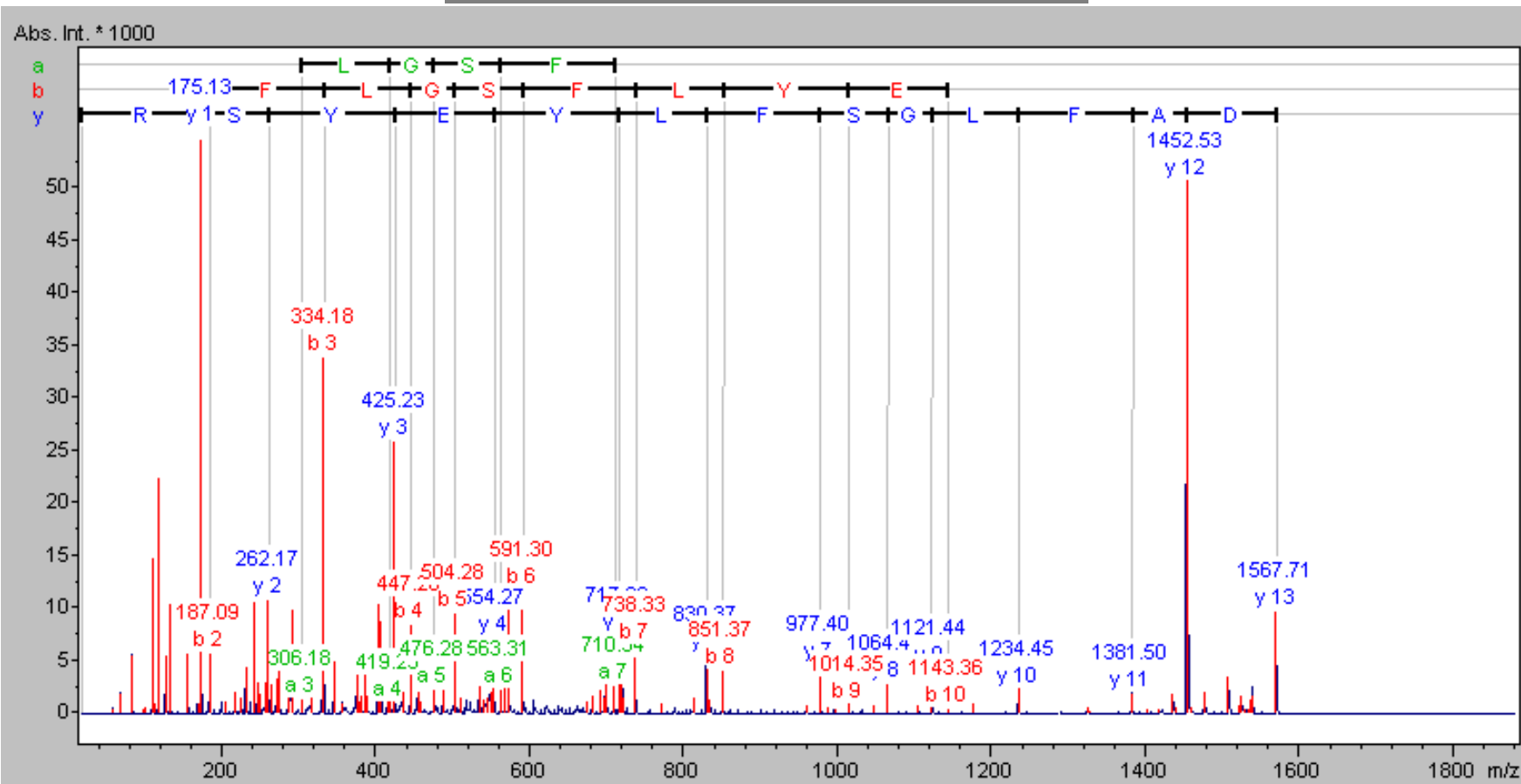
[gi|1351907](#) Mass: 69248 Score: 120 Matches: 1(1) Sequences: 1(1)  
RecName: Full=Serum albumin; AltName: Full=BSA; AltName: Allergen=Bos d 6; Flags: Precursor  
[gi|30794280](#) Mass: 69278 Score: 120 Matches: 1(1) Sequences: 1(1)  
serum albumin precursor [Bos taurus]  
[gi|174267962](#) Mass: 69190 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 MS/MS ion search – databázové vyhledávání



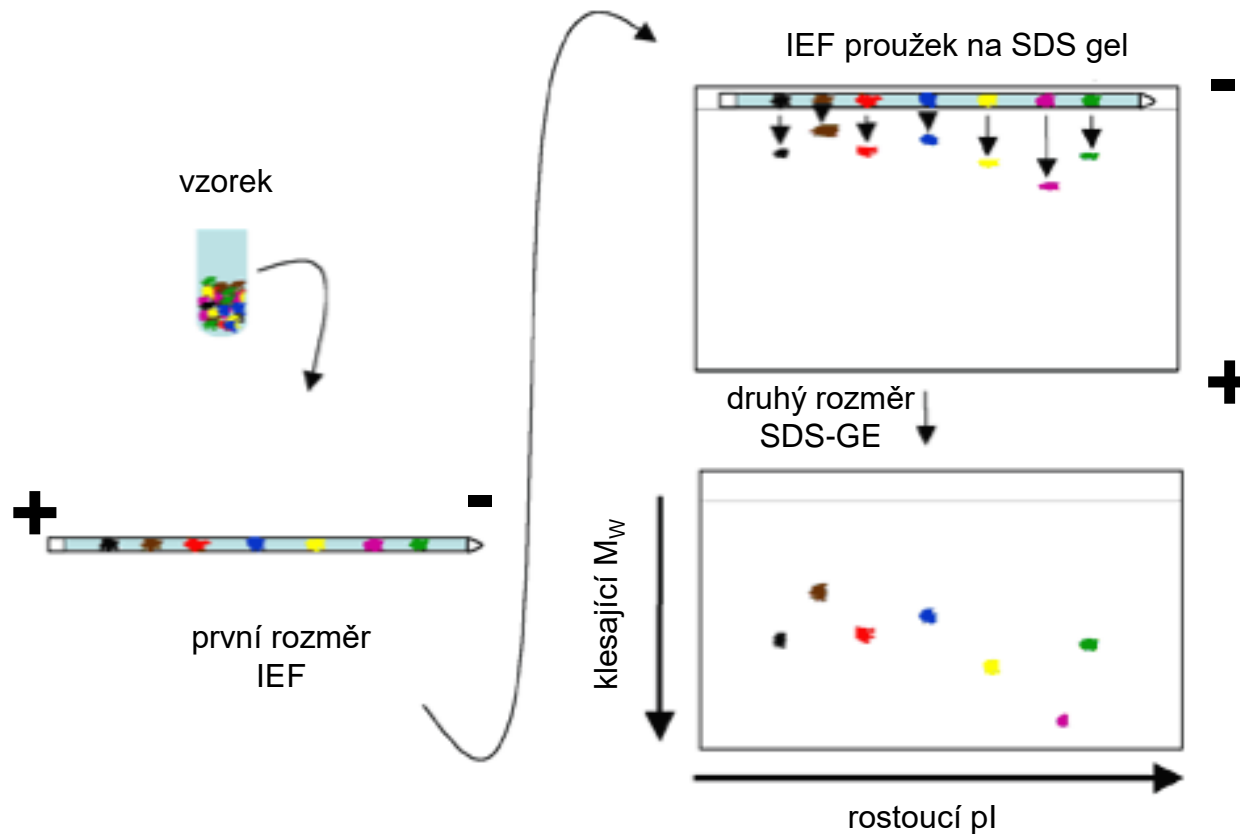
## peptid DAFLGSFLYEYSR



## 2D GE – dvoudimenzionální gelová elektroforéza

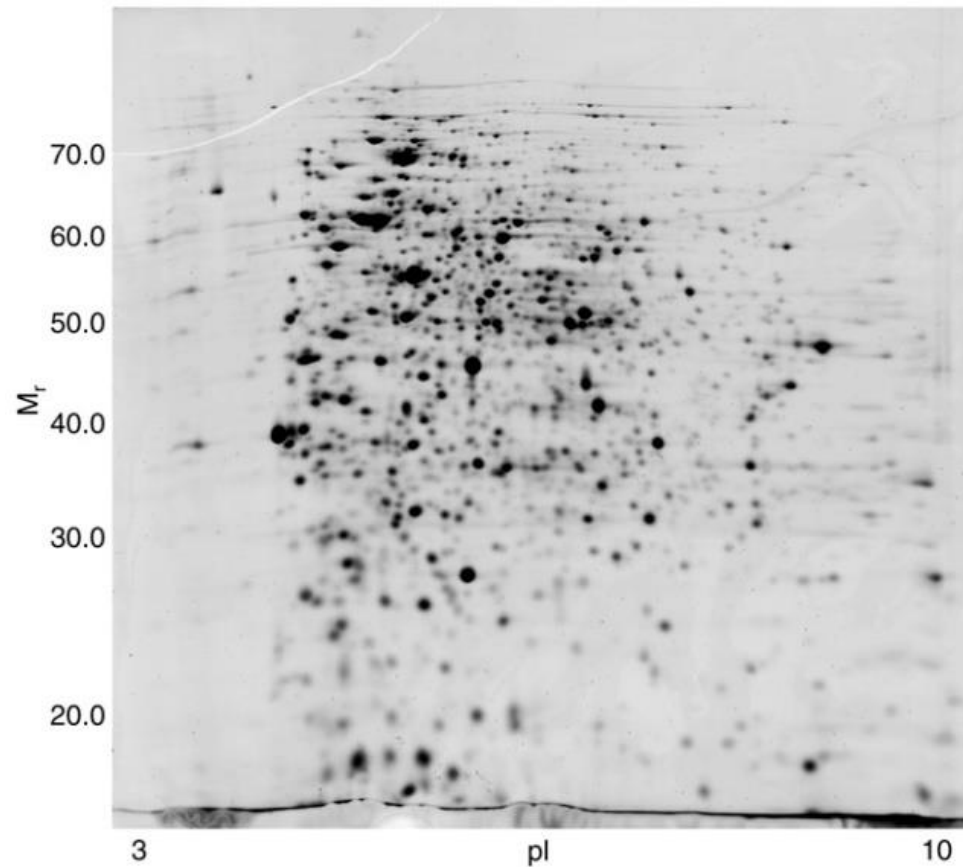
### 1) IEF – izoelektrická fokuzace

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



# Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS

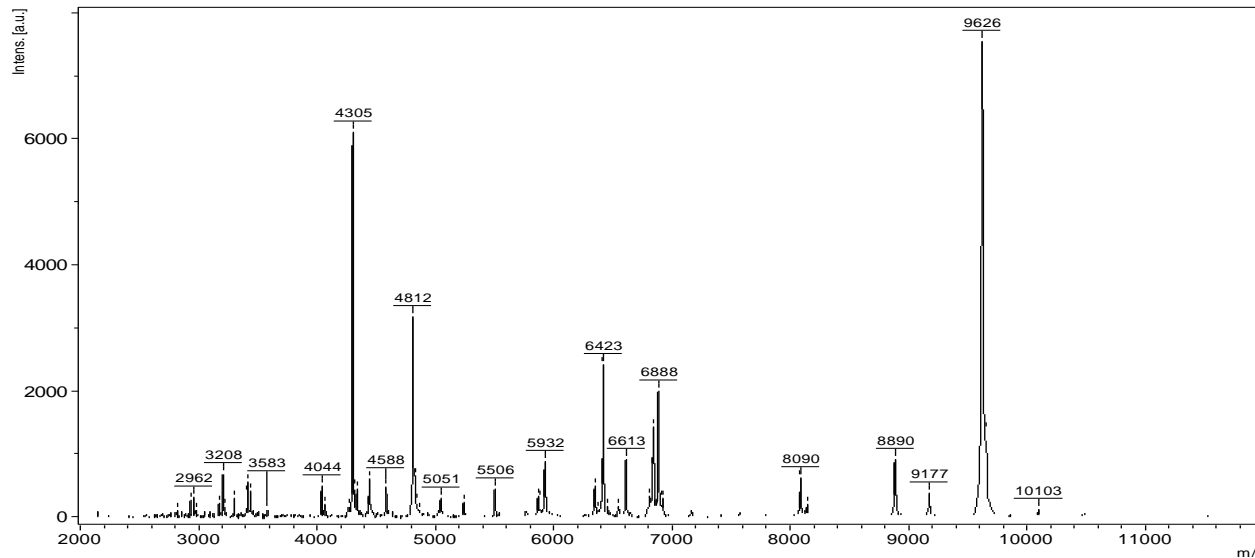
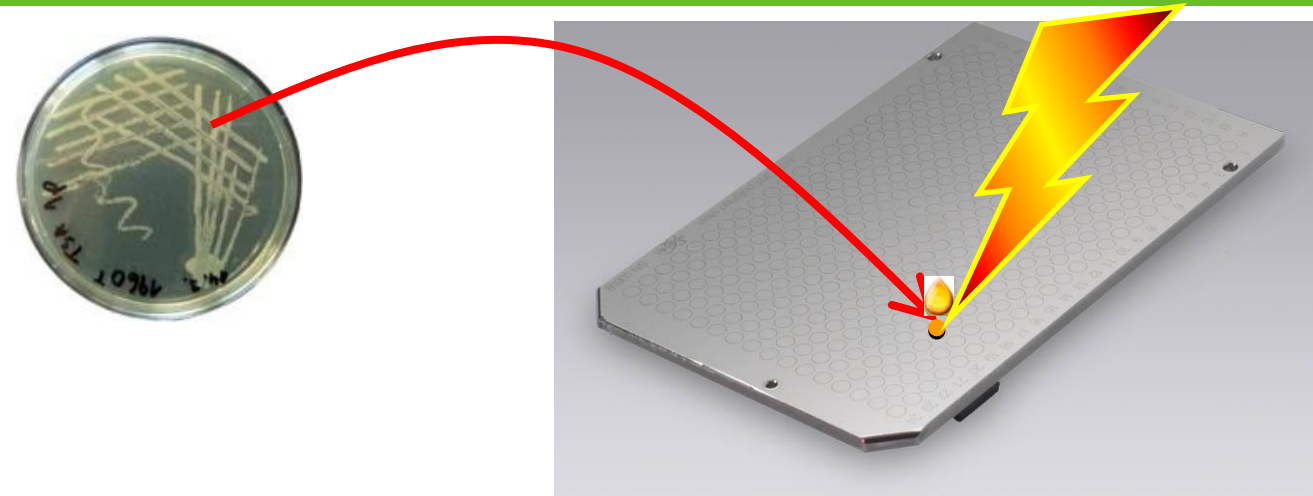
## Aplikace – proteolýza in-gel (z vyřezaných kousků gelu)



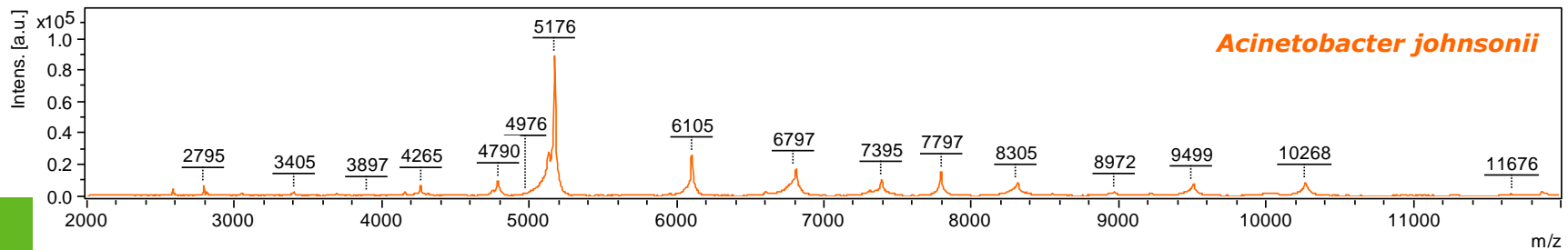
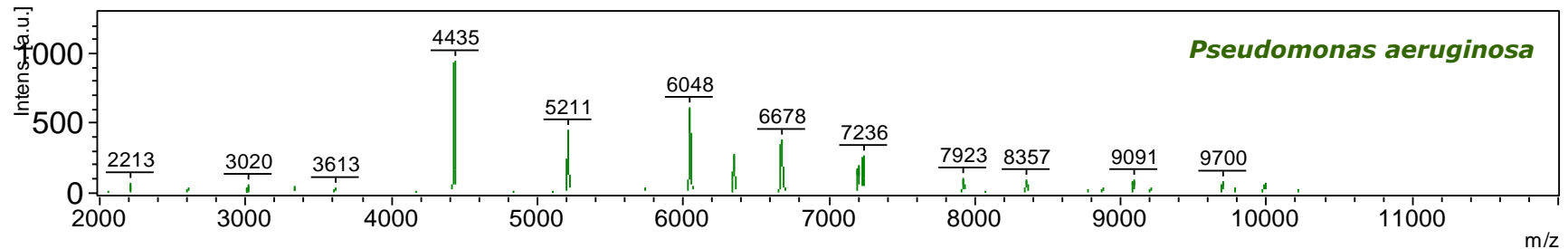
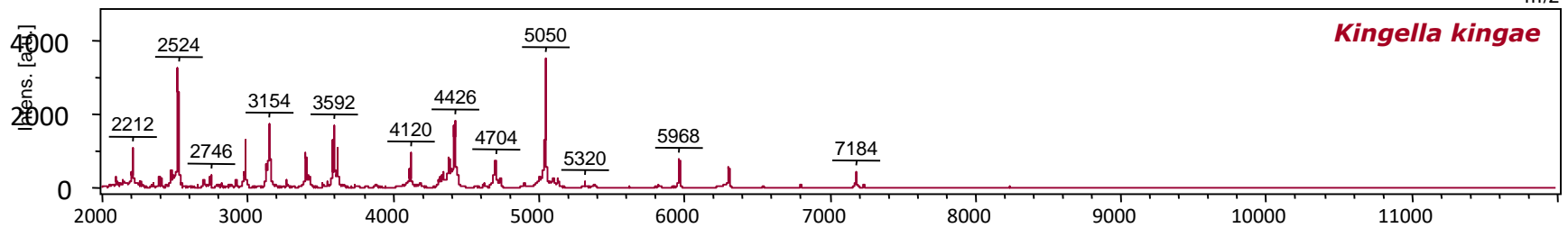
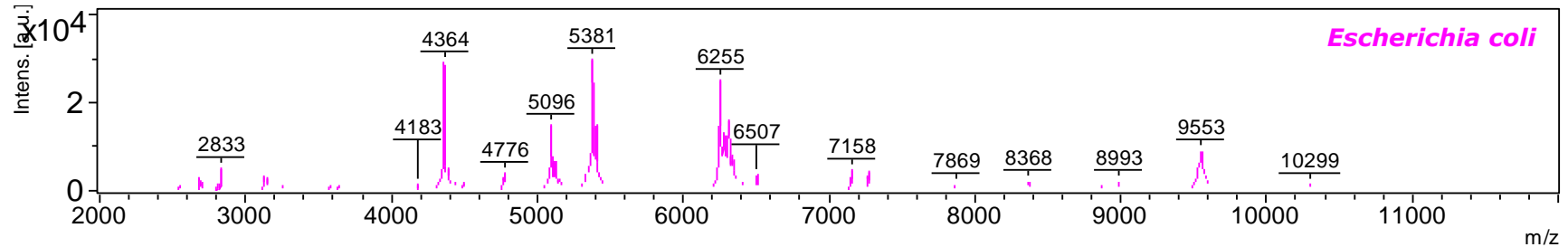
**Bouchal P., Struhárová I., Budinská E., Vyhlídalová T., Zdráhal Z., van Spanning R., Kučera I.**  
*Biochim Biophys. Acta* 6 (2010) 1350.

- **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**
- **stejně proteiny produkují i zdravé tkáně (detekce modifikací)**
- **ovlivnění hladiny markeru jinými onemocněními**
- **ekonomická/diagnostická výhodnost oproti současným postupům**

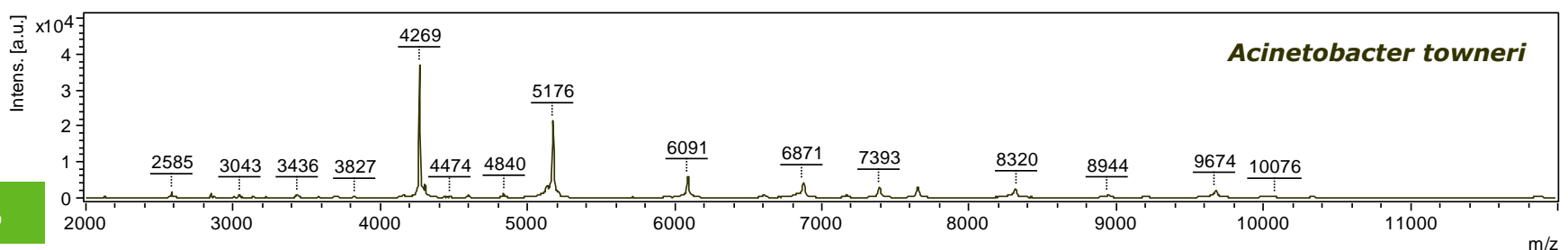
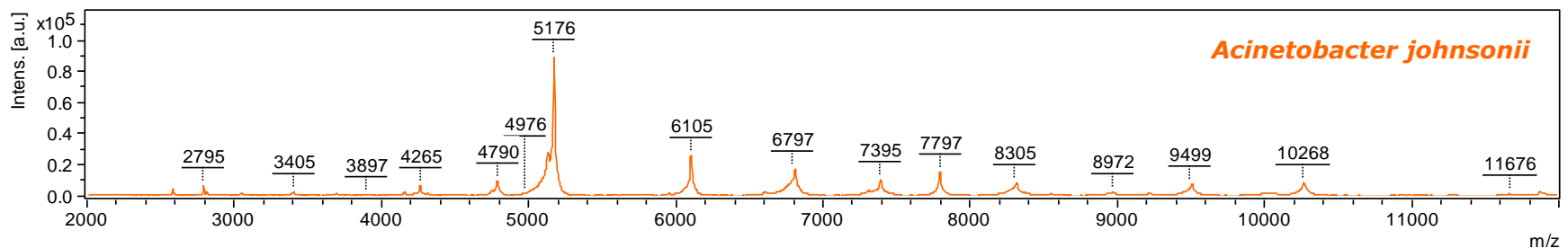
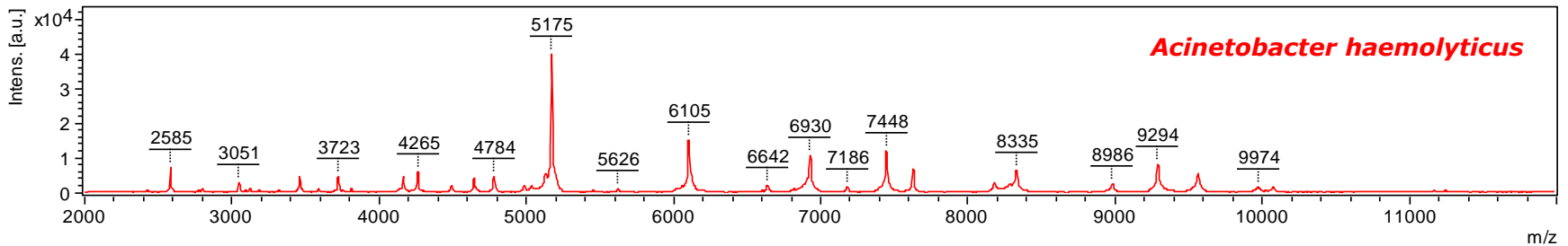
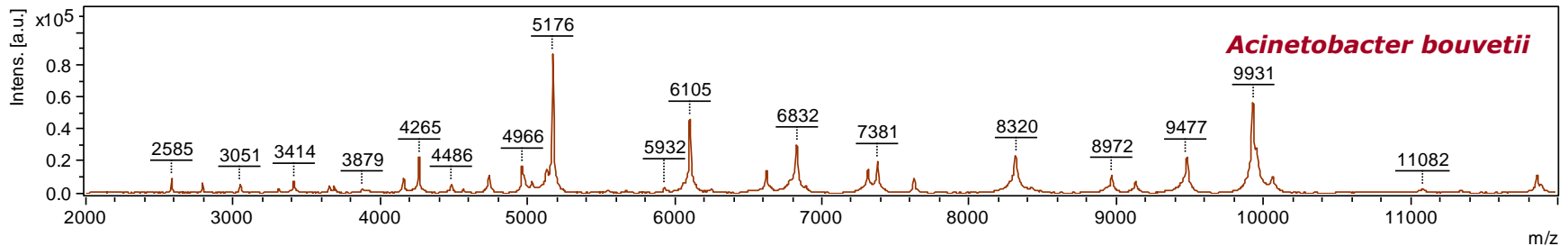
# MALDI-TOF MS v klinické diagnostice: identifikace bakterií



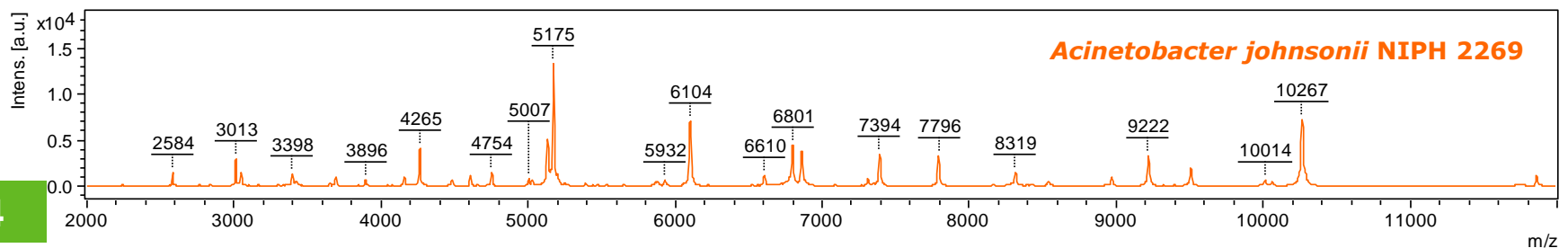
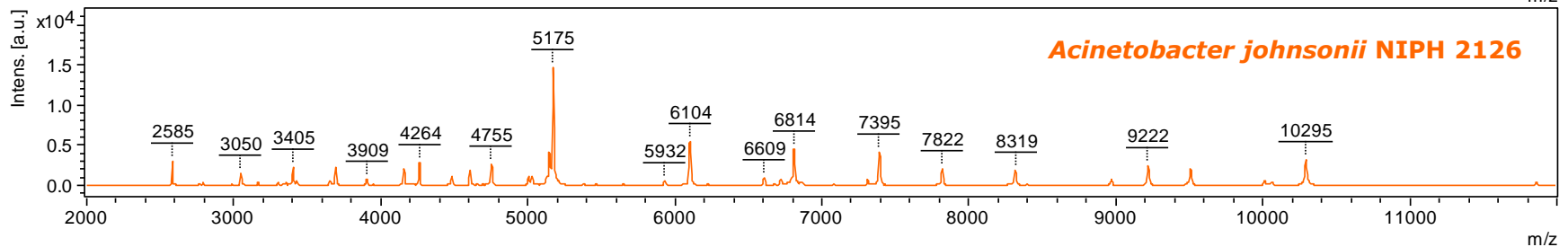
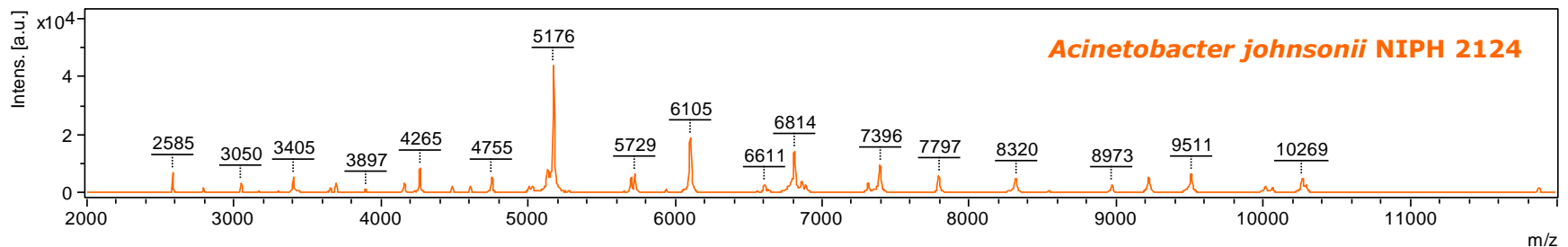
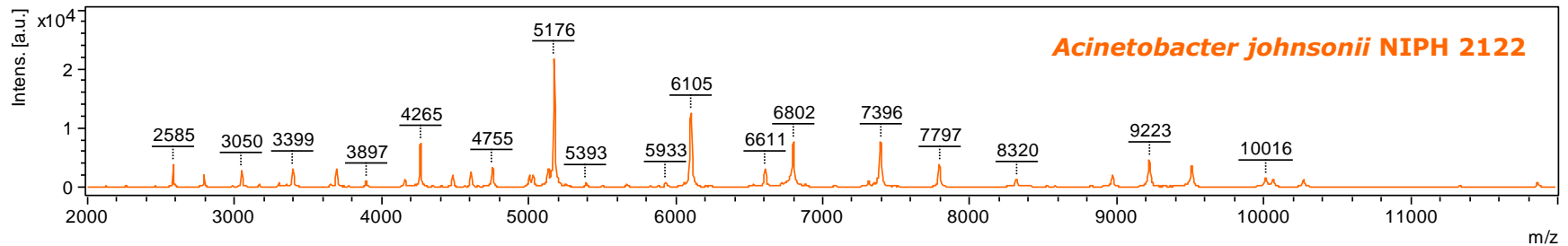
# MALDI-TOF MS v klinické diagnostice: identifikace bakterií



# MALDI-TOF MS v klinické diagnostice: identifikace bakterií

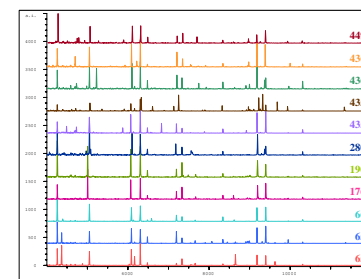


# MALDI-TOF MS v klinické diagnostice: identifikace bakterií





### I. MALDI-TOF hmotnostní spektrometr



### II. Databáze referenčních spekter

### III. Software pro srovnání dat

Result Overview

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
11 (+++)	ref100	Escherichia coli:H5491a:HEL	99.9	Escherichia coli:ATCC 25922:HEL	99.9
11 (+++)	Probe 5	Streptococcus faecalis:DSM 21060:SP_MALDI	99.9	Streptococcus sp:varietas:DSM 98111:DSM	99.9
11 (+++)	Probe 5	Streptococcus sp:varietas:DSM 98111:DSM	99.9	Streptococcus faecalis:DSM 21060:SP_MALDI	99.9
11 (+++)	Probe 6	Mycoplasma mycoides sp:varietas:DSM 11028:1_CBE	99.9	Mycoplasma mycoides 75M:1_CBE	99.9
11 (+++)	Probe 6	Mycoplasma mycoides sp:varietas:DSM 11028:1_CBE	99.9	Mycoplasma mycoides 75M:1_CBE	99.9
11 (+++)	Probe 7	Acetivibrio sp:Genospecies 3:Strain 7:DSM 590	99.9	Acetivibrio sp:Genospecies 3:Strain 13:DSM 592	99.9
11 (+++)	Probe 7	Acetivibrio sp:Genospecies 3:Strain 7:DSM 590	99.9	Acetivibrio sp:Genospecies 3:Strain 13:DSM 592	99.9
11 (+++)	Probe 8	Pseudomonas aeruginosa:ATCC 27053:HEL	99.9	Pseudomonas aeruginosa:DSM 21817:DSM	99.9

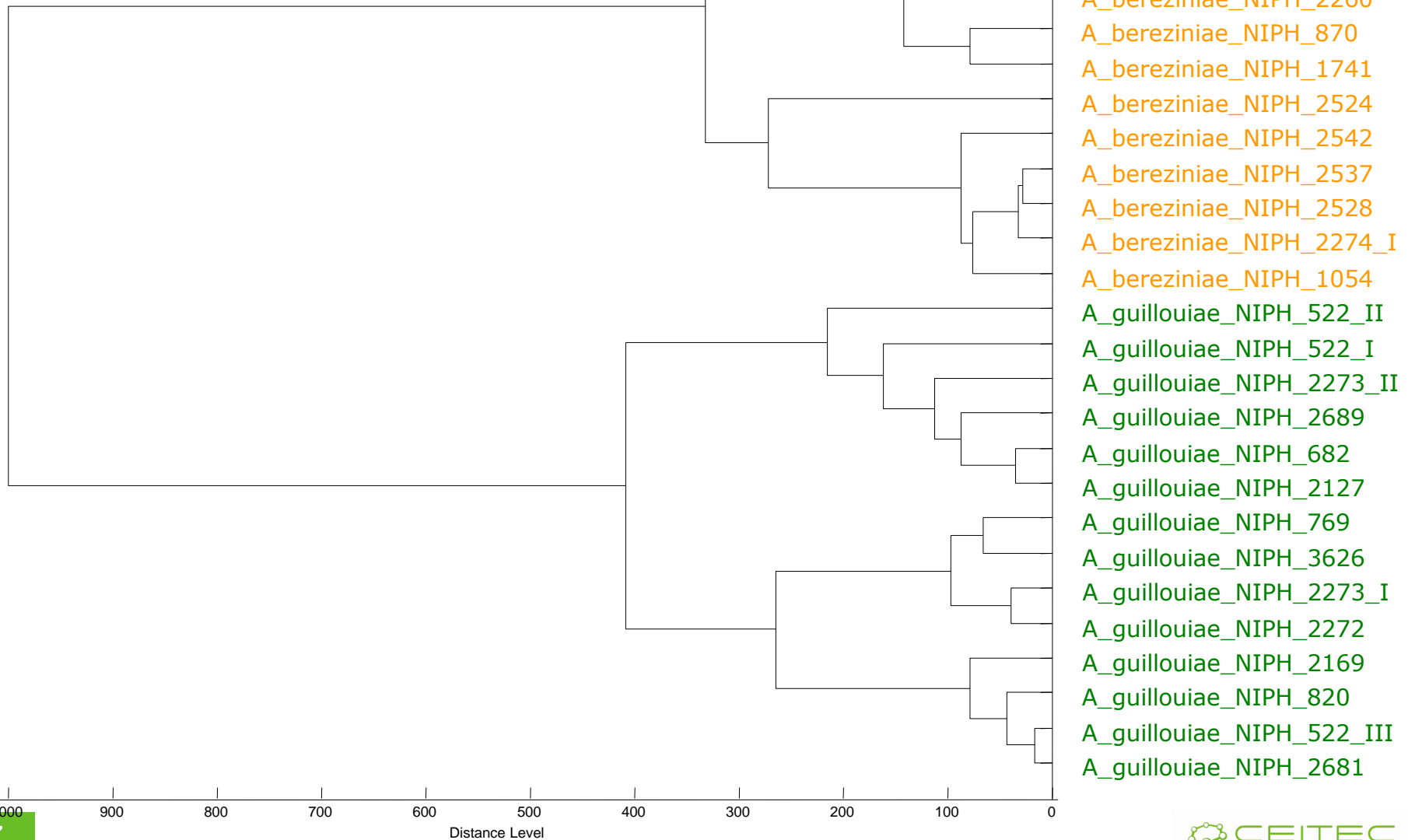
### **Výhody:**

- **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**

# Shluková analýza na základě MALDI MS dat



# Alternativní aplikace MALDI-MS profilování

