

Analyses nanoLC-MS/MS

Quand utiliser la nanoLC-MS/MS ?

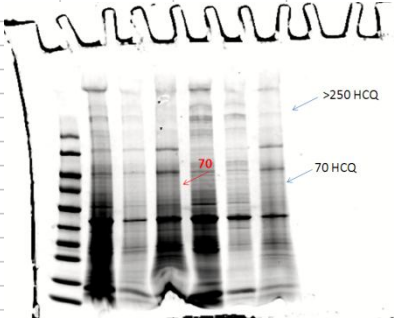
	MALDI - TOF(/TOF)	nanoLC-MS/MS
+	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Instrumentation simple et robuste ▪ Peptides sous forme $[M+H]^+$: spectres simples à interpréter ▪ Coût 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ LC pour décomplexification: idéal pour échantillon complexe (limite = gamme dynamique de l'instrument) ▪ Sensibilité accrue: faible quantité de matériel, couverture maximale, protéine de faible PM ...
-	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Mélange de protéines: identification des protéines majoritaires (max. 1-3) ▪ Compétition à l'ionisation: certains peptides s'ionisent mieux que d'autres ▪ Organisme non-séquencé: obligation d'avoir des séquences en acides aminés 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ LC nano-débit: bouchages fréquents des capillaires (95% des pannes de couplage liés à la nanoLC) ▪ Digestion en solution: attention si la digestion est mal contrôlée (reste de la protéine entière) ▪ Peptides sous forme $[M+2H]^{2+}$ et $[M+3H]^{3+}$: spectres plus difficiles à interpréter ▪ Effet mémoire de la colonne HPLC : relargage de peptides le run suivant → contamination

CONCLUSION: Il faut utiliser la stratégie nanoLC-MS/MS quand :

**l' échantillon est complexe (sup. 3 protéines),
et/ou lorsque la quantité de matériel disponible est faible (coloration à l'argent ou IP par ex.),
et/ou s'il s'agit d'un organisme non-séquencé.**

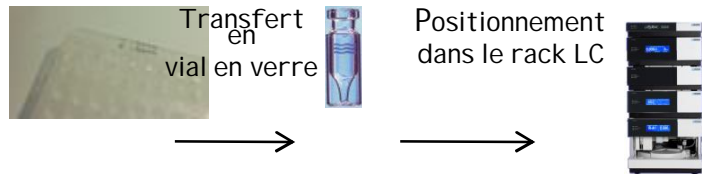
1) Remplir une demande d'analyse

Demande d'analyses proteomiques	
Date	16-May-11
Nom	Eftekhari
Prénom	Pierre
Equipe	Muller
Unité	9021
Echantillons	
Nom	Précisez dans le tableau MS le nom des échantillons et MW/PI expérimentaux
Format de l'échantillon	<input checked="" type="checkbox"/> gel 1D SDS PAGE <input type="checkbox"/> gel2D <input type="checkbox"/> gel1D natif <input type="checkbox"/> autre
Methode de coloration	<input checked="" type="checkbox"/> bleu colloïdal <input type="checkbox"/> bleu R250 <input type="checkbox"/> argent <input type="checkbox"/> sypro ruby <input type="checkbox"/> autre
Type d'analyse	(voir descriptif dans l'onglet facturation)
"haut débit"	<input checked="" type="checkbox"/> Identification à partir de bande 1D et 2D <input type="checkbox"/> Contrôle de protéine recombinante Trypsine <input type="checkbox"/> Contrôle de protéine recombinante autre enzyme <div style="margin-left: 20px;"> <input type="checkbox"/> AspN <input type="checkbox"/> GluC <input type="checkbox"/> LysC </div>
"bas débit"	<input type="checkbox"/> Recherche de site de clivage <input type="checkbox"/> PTM <input type="checkbox"/> autre Copiez toute information utile pour défricher l'analyse Etude de faisabilité préalable + échantillons visibles bleu indispensable.
Identification :	
Séquencé	<input checked="" type="checkbox"/> Précisez : Human, Drosophila, Arabidopsis, etc... <input type="checkbox"/> Non séquencé
	Human



Acquisitions nanoLC-MS/MS

Séparation des peptides par nanoHPLC



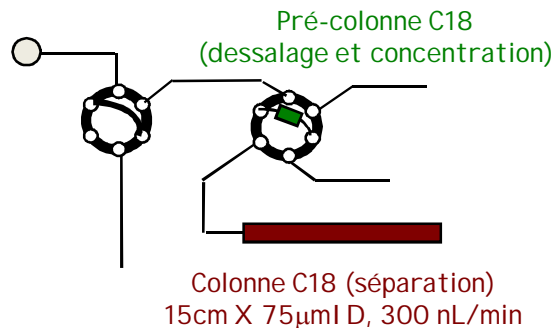
Les peptides sont séparés sur une **colonne chromatographique C18** selon leur degré d'hydrophobicité: ils arriveront donc séquentiellement dans la source d'ionisation du spectromètre de masse qui est de type électrospray.

2 gradients par défaut:

30 min

1h

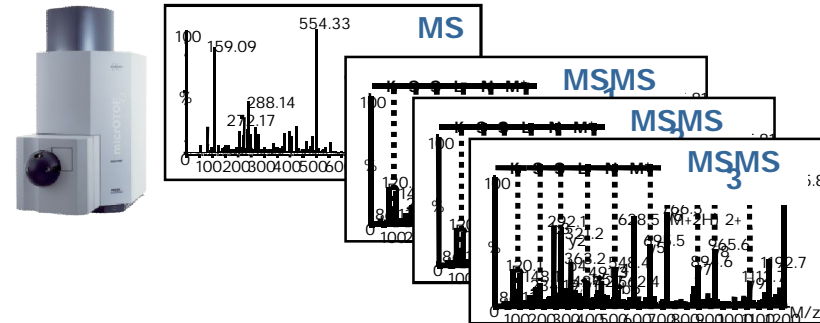
Selon la complexité de l'échantillon



Acquisition



MicroTOF Q
Bruker



Réglages de l'appareil :

1 cycle « MS+3MSMS » dure environ 6 sec.

→ Un peptide de masse identique peut être fragmenter 2 x au maximum.

Etat de charge : principalement (M2H)²⁺ et (M3H)³⁺

→ Un peptide avec des états de charge différents

est fragmenté au maximum 2x, les états de charge favorisés sont 2+ et 3+



Obtention de x spectres MSMS, stockés dans un seul fichier .mgf

X = 50 à 400 composés (tous ne seront pas exploitables)

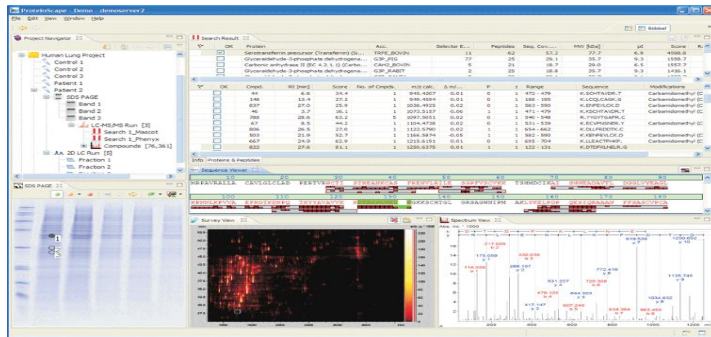
L'information MS n'est pas exploitée.

Chaque spectre MSMS est caractérisé par la masse de l'ion parent, son temps de rétention et les masses des fragments

2) Stratégie d'interrogation dans les banques de données, analyses LC Q TOF

Rentrée des données traitées dans Proteinscape:

Les échantillons et leurs résultats (fichiers mgf) sont rentrés dans le logiciel Proteinscape. Les analyses vont être organisées hiérarchiquement par demandeur et l'arborescence sera sauvegardée dans une base de données de type LIMS (Laboratory Integrated Management System).

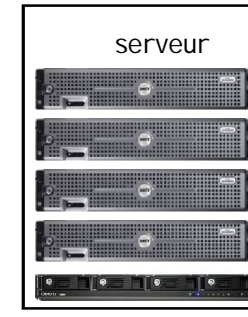


Recherche envers une banque de données protéique:

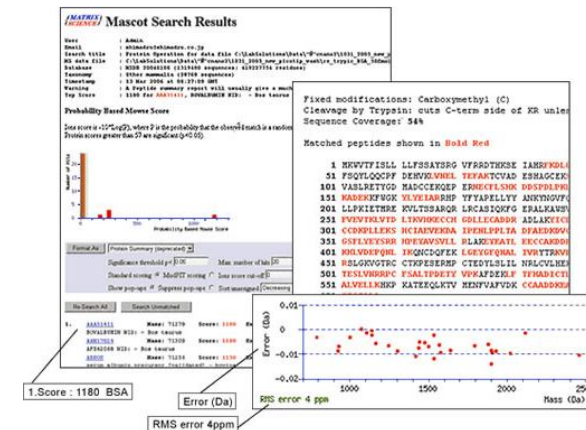
Interrogation Mascot mode ion search ou PFF (idem MALDI MS/MS)

Exceptée : pour un peptide de charge identique fragmenter 2 x, seul le score le plus fort sera pris en compte

Validation selon critère Mascot : valeur seuil au delà de laquelle le hit est significatif à plus de 95%



Proteinscape = LIMS
mascot
NAS 4.5To



Validation par le service à l'aide de proteinscape

Contrôle mascot
Contrôle manuel de la qualité des spectres MS/MS, en particulier pour les protéines identifiées avec 1 ou 2 spectres.

Rapport d'analyse

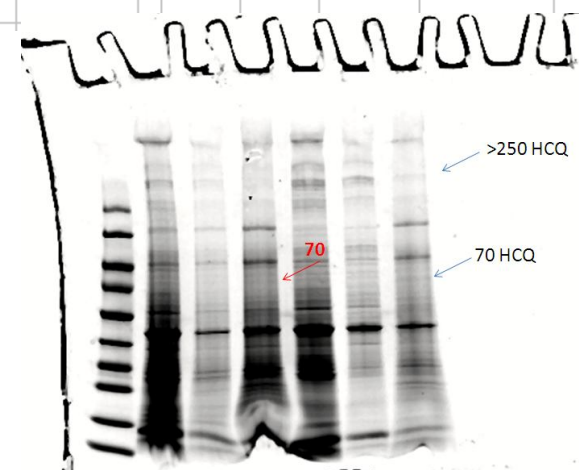
Onglet « nanoLC-MS/MS » du fichier de résultats

RESULTATS nanoLC-MSMS														
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	
	Nom Echantillon	MWPI expérimentaux	Mixt	NB OF MSMS SPECTRA	Identification	Mw (kDa)	pI	N'Access	C	Score Mascot	Erreur (ppm)	% recouvr.	N° analyse LC-MSMS	
1	CTS17-26hoq	17-26 kd	x	1	small GTP binding protein Rab7 [Homo sapiens]	23.44680994	7.201150139	gij1174149	■	60.18	6.76329	19.7047958	3931	
1				myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle, isoform CF	30.21152706	7.681973593	gij119580501	■	86.05	5.97015	19.8139322			
2				ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family,	16.49851559	6.140670131	gij119580554	■	55.38	6.75676	22.5084466			
2				hCG15971, isoform CRA_b [Homo sapiens]	13.84984153	5.140809489	gij119607748	■	82.79	28	47.8969302			
6				actin related protein 2/3 complex, subunit 3, 21kDa, isc	18.93664877	9.358911621	gij119618319	■	221.61	20.4819	19.766169			
1				Chain A, Cyclophilin B Complexed With [d-(Cholonyles	19.64821999	9.745607075	gij1310882	■	73.64	7.30337	17.662453			
2				transmembrane protein 109 precursor [Homo sapiens]	26.19358483	10.90228829	gij13129092	■	67.14	4.93827	17.2973538			
21				myosin regulatory light chain MRCL2 isoform A [Homo	19.76651591	4.537082884	gij15809016	■	630.1	62.2093	22.2456116			
6				glycoprotein IX (platelet) precursor [Homo sapiens]	19.03368732	5.896327641	gij4504077	■	197.25	23.7288	13.7179065			
17				MYL9 [Homo sapiens]	19.83647982	4.773903075	gij48145803	■	490.93	50.5814	21.6423202			
8				actin related protein 2/3 complex subunit 4 isoform a	19.65430375	9.394317519	gij5031595	■	294.02	29.7619	16.1644994			
8				transgelin 2 [Homo sapiens]	21.07253606	9.000551258	gij55960374	■	322.25	33.6898	21.5223066			
1				Chain A, Gppnhp Bound Rab11 Gtpase	20.7087035	7.908895061	gij73535736	■	38.46	5.97826	15.5951837			
7				RAP1B, member of RAS oncogene family precursor	20.81159273	5.513883049	gij7661678	■	319.34	26.087	21.2586296			
2				CTS250-1hoq	250 kd		122	myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle [Homo sapi	226.3915913	5.37658986	gij12667788	■	4378.11	40.2551
3	CTS250-2hoq	250 kd	x	4	filamin A, alpha (actin binding protein 280), isoform C	160.1050598	5.754617556	gij119593153	■	150.81	3.11671	21.6670205	3930	
59				myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle [Homo sapi	226.3915913	5.37658986	gij12667788	■	2194.61	23.2143	21.4726719			
6				beta actin variant [Homo sapiens]	41.69369883	5.179339081	gij62897671	■	318.63	22.6667	23.7428978			
18				talin [Homo sapiens]	269.485965	5.712048972	gij6739602	■	886.64	9.44882	20.3087874			
				2	XTP3TPA-transactivated protein 1 [Homo sapiens]	23.61068518	6.525190519	gij92911770	■	108.38	12.0192	13.9563458		
Number of injections :			3											
A remplir par l'utilisateur														
Banque de données interrogées :														
NCBI nr (all taxonomies puis HUMAN)														

Validation des résultats selon critères mascot

Code de validation du service

- Identification : Qualité publication
- Identification probable, non qualité publication



Onglet « Peptides » du fichier de résultats

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R
OK	Location	Cmpd.	m/z meas.	Mr calc.	z	Δ m/z [ppm]	Rt [min]	Meta Score	Mascot Score	#Cmps.	Rank	Range	Sequence	Modifications	Search Result	Accession	Protein
VRAI	/PEirekhar..._cf	73	576.64542	1726.88498	3	0.0098	20.6	42.07	42.07	1	1	56 - 69	R.IQLVEEELDRAQER.L		PEirekhar..._c	gi 10441386	TPM4-ALK fusion oncprotein type 2 [Homo sapiens]
VRAI	/PEirekhar..._cf	70	600.34738	1198.66699	2	0.0066	20.4	36.1	36.1	2	1	2 - 12	M.AGLNSLE Acetyl: 1		PEirekhar..._c	gi 10441386	TPM4-ALK fusion oncprotein type 2 [Homo sapiens]
VRAI	/PEirekhar..._cf	83	622.33702	1242.64558	2	0.007	20.9	67.35	67.35	1	1	56 - 65	R.IQLVEEELDRA		PEirekhar..._c	gi 10441386	TPM4-ALK fusion oncprotein type 2 [Homo sapiens]
VRAI	/PEirekhar..._df	8	600.35164	1198.66699	2	0.0109	20.4	38.11	38.11	1	1	2 - 12	M.AGLNSLE Acetyl: 1		PEirekhar..._c	gi 10441386	TPM4-ALK fusion oncprotein type 2 [Homo sapiens]
FAUX	/PEirekhar..._cf	75	600.34748	1198.66699	2	0.0067	20.6	32.29	32.29	2	1	2 - 12	M.AGLNSLE Acetyl: 1		PEirekhar..._c	gi 10441386	TPM4-ALK fusion oncprotein type 2 [Homo sapiens]
VRAI	/PEirekhar..._cf	34	600.35264	1198.66699	2	0.0119	20.4	58.13	58.13	1	1	2 - 12	M.AGLNSLE Acetyl: 1		PEirekhar..._c	gi 10441386	TPM4-ALK fusion oncprotein type 2 [Homo sapiens]
VRAI	/PEirekhar..._cf	120	850.9506	1639.84172	2	0.0225	22.2	31.27	31.27	1	1	252 - 266	K.AIDTYQTDFSGIR.N		PEirekhar..._c	gi 116496847	ADAM10 protein [Homo sapiens]
VRAI	/PEirekhar..._cf	142	795.43341	1588.82092	2	0.0157	23.2	60.18	60.18	1	1	158 - 171	K.EAINVEQAFQTIAR.N		PEirekhar..._c	gi 1174119	small GTP binding protein Rab7 [Homo sapiens]
FAUX	/PEirekhar..._cf	175	863.98731	1725.94137	2	0.0093	24.3	35.93	35.93	2	1	210 - 225	R.QLLQANPILEAFGNAK.T		PEirekhar..._c	gi 119580501	myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle, isoform CR2
VRAI	/PEirekhar..._cf	166	863.99508	1725.94137	2	0.0171	24.1	86.05	86.05	1	1	210 - 225	R.QLLQANPILEAFGNAK.T		PEirekhar..._c	gi 119580501	myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle, isoform CR2
VRAI	/PEirekhar..._cf	172	863.99434	1725.94137	2	0.0164	24.2	81.36	81.36	2	1	210 - 225	R.QLLQANPILEAFGNAK.T		PEirekhar..._c	gi 119580501	myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle, isoform CR2
FAUX	/PEirekhar..._cf	29	620.81728	1239.59177	2	0.0141	19.2	44.27	44.27	2	1	133 - 142	K.YLECSAL Carbamidomet		PEirekhar..._c	gi 119580554	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, s
VRAI	/PEirekhar..._cf	27	620.81699	1239.59177	2	0.0138	19.1	55.38	55.38	2	1	133 - 142	K.YLECSAL Carbamidomet		PEirekhar..._c	gi 119580554	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, s
VRAI	/PEirekhar..._df	36	552.31424	1102.60563	2	0.0041	20.3	44.83	44.83	1	1	20 - 30	R.ILMVGLD Oxidation: 3		PEirekhar..._c	gi 119590241	ADP-ribosylation factor 1 isoform CRA_c [Homo sapiens]

Colonne A: FAUX indique qu'un spectre MSMS a été invalidé (séquence sur le spectre incorrect par rapport à la proposition de Mascot)

Colonne D: rapport masse sur charge mesuré pour le peptide en question (masse sélectionnée pour être fragmentée).

Colonne E: masse moléculaire du peptide sous forme monochargé.

Colonne F: charge du peptide (2+ ou 3+ généralement, contrairement à une analyse MALDI où les peptides sont sous forme 1+).

Colonne G: delta de masse en ppm entre les masses théorique et expérimentale du peptide.

Colonne H: temps de rétention du peptide sur le gradient chromatographique utilisé pour l'analyse LC.

Colonne I: score pondéré du peptide si plusieurs moteurs de recherche ont été utilisés (Phenyx en supplément de Mascot par exemple).

Colonne J: score donné par Mascot.

Colonne N: séquence du peptide identifié (peut servir à faire un BLAST par le demandeur pour savoir s'il s'agit d'un peptide unique).

Colonne O: modifications portées par le peptide (oxydation et carbamidométhylation apportées par le traitement de l'échantillon).

Colonne P: numéro de la recherche Mascot dans la base de données sous-jacente à Proteinscape.

Colonne Q: numéro de la protéine pour laquelle ce spectre a le meilleur score.

Colonne R: description de la protéine identifiée dans la banque de données interrogée.

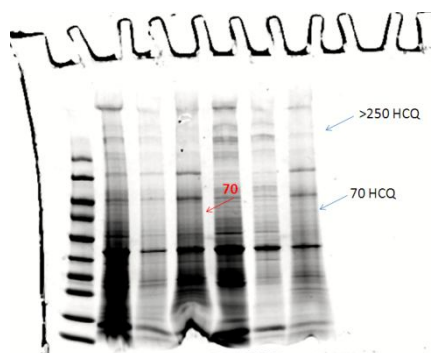
Exemple : Apport de la LC MSMS pour une analyse de bande 1D

RESULTATS MALDI

Nom Echantillon	Mixt	PMF	PFF	NB DE PEPTIDES MSMS MALDI	NANO LC MSMS	Identification	C	Score Mascot
CTS17<26hcq	x	x	x	1	x	platelet glycoprotein IX precursor		62
		x	x	1		actin related protein 2/3 complex subunit 4 isoform a [Homo sapiens]		49
		x	x			myosin, light chain 12A, regulatory, non-sarcomeric [Homo sapiens]		34
CTS>250-1hcq		x			x	myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle [Homo sapiens]		198
CTS50<75					x	Signal mais pas de hits significatifs		
Nombre d'analyses : 3								

RESULTATS nanoLC-MSMS

Injection	Number of MSMS Spectra	Identification	C	Score Mascot
1	21	myosin regulatory light chain MRCL2 isoform A [Homo sapiens]		630.1
2	17	MYL9 [Homo sapiens]		490.93
3	8	actin related protein 2/3 complex subunit 4 isoform a [Homo sapiens]		294.02
4	8	transgelin 2 [Homo sapiens]		322.25
5	7	RAP1B, member of RAS oncogene family precursor [Homo sapiens]		319.34
6	6	actin related protein 2/3 complex, subunit 3, 21kDa, isoform alpha [Homo sapiens]		221.61
7	6	glycoprotein IX (platelet) precursor [Homo sapiens]		197.25
8	2	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, class C, member 3) [Homo sapiens]		55.38
9	2	hCG15371, isoform CRA_b [Homo sapiens]		82.79
10	2	transmembrane protein 109 precursor [Homo sapiens]		67.14
11	1	small GTP binding protein Rab7 [Homo sapiens]		60.18
12	1	myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle, isoform CF [Homo sapiens]		86.05
13	1	Chain A, Cyclophilin B Complexed With [d-Cholines] [Homo sapiens]		73.64
14	1	Chain A, Gppnhp Bound Rab11 Gtpase [Homo sapiens]		38.46
1	122	CTS250-1hcq myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle [Homo sapiens]		4378.11
1	10	CTS50-75 heat shock protein 60 [Homo sapiens]	x	374.7
2	7	beta actin variant [Homo sapiens]		225.07
3	6	WD repeat domain 1, isoform CRA_d [Homo sapiens]		168.69
4	6	pyruvate kinase [Homo sapiens]		296.84
5	5	Keratin 10 [Homo sapiens]		192.9
6	4	TPM4-ALK fusion oncoprotein type 2 [Homo sapiens]		145.52
7	3	ribophorin II isoform 2 precursor [Homo sapiens]		198.07
8	3	Chain A, Molecular Mechanism Of The Regulation Of The Actin Capping Protein [Homo sapiens]		196.69
9	3	myosin regulatory light chain [Homo sapiens]		162.15
10	3	myosin regulatory light chain 9 isoform a [Homo sapiens]		144.85
11	3	filamin A [Homo sapiens]		132.1
12	3	talin 1 [Homo sapiens]		172.21
13	2	myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle, isoform CF [Homo sapiens]		81.36
14	2	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain, isoform alpha [Homo sapiens]		73.88
15	1	ADAM10 protein [Homo sapiens]		31.27
16	1	actin related protein 2/3 complex, subunit 3, 21kDa, isoform alpha [Homo sapiens]		43.25
17	1	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalostein) member 1 [Homo sapiens]		31.52
18	1	Chain B, Crystal Structure Of The Extracellular Segment Of The Integrin Alpha 5 Beta 1 [Homo sapiens]		41.21
19	1	Chain A, Human Rap1a, Residues 1-167, Double Mutant [Homo sapiens]		50.1
20	1	prostaglandin G/H synthase; PGG2/H synthase [Homo sapiens]		33.99
21	1	'SP40,40' [Homo sapiens]		37.98
22	1	serum deprivation response protein [Homo sapiens]		48.46
23	1	RecName: Full=CD226 antigen; AltName: Full=DNAX-1 [Homo sapiens]		47.42
24	1	PCYOXIL protein [Homo sapiens]		80.55
25	1	Chain A, Structural Basis For Allostery In Integrins Alpha 5 Beta 1 [Homo sapiens]		40.19
26	1	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter) member 1 [Homo sapiens]		45.71
27	1	heat shock 70kDa protein 8 isoform 2 variant [Homo sapiens]		60.85
Number of injections :		3		



	Nombre de protéines	
	MALDI	LC MSMS
CTS17<26hcq	1 ok	10 ok
	2 non validées	4 (1 spectre)
CTS>250-1hcq	1	1
CTS50<75	0	14 ok
		13 (1 spectre)

Remarque : Cas extrême
Tendance valable uniquement pour mélange de protéines avec abondances équivalentes