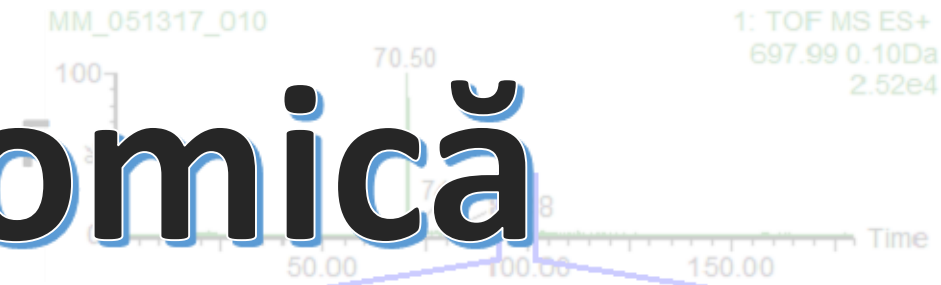
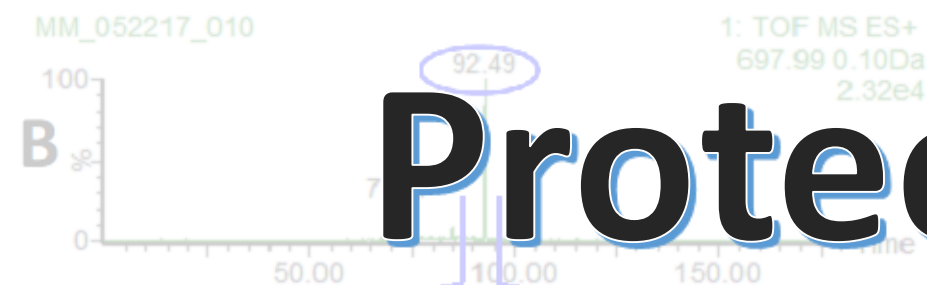
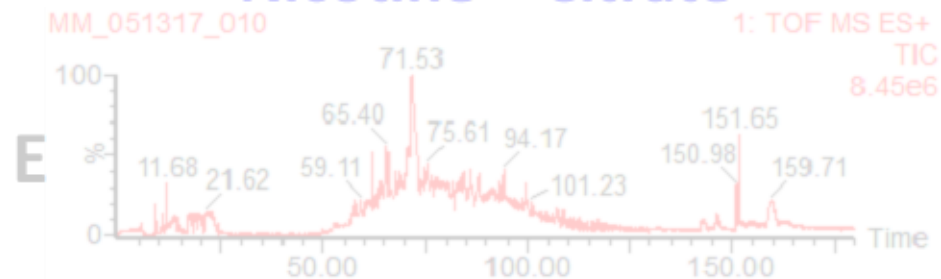
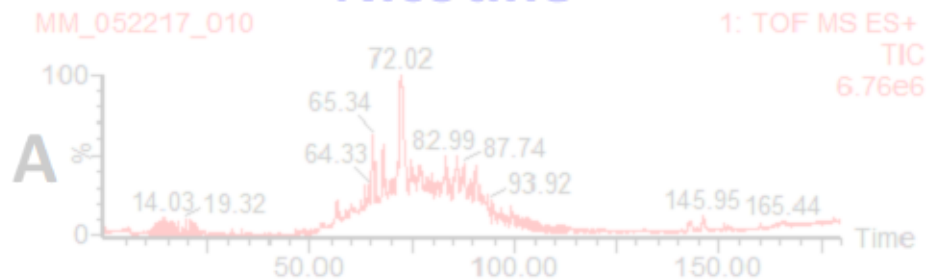
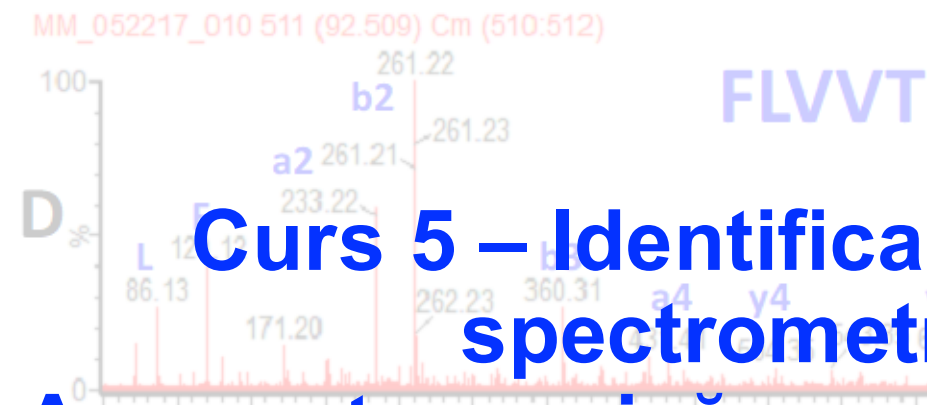
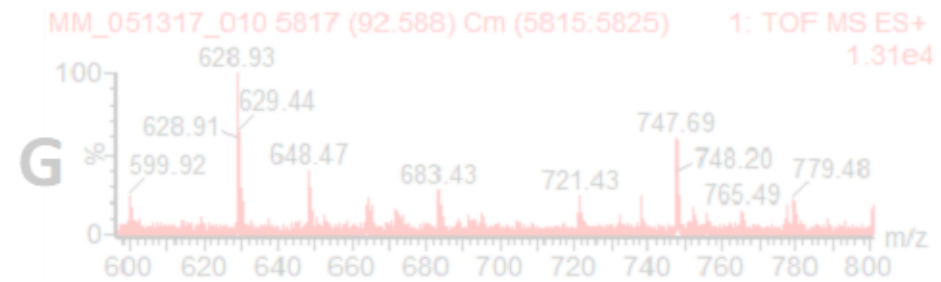


Nicotine

Nicotine + Citrate



Proteomică

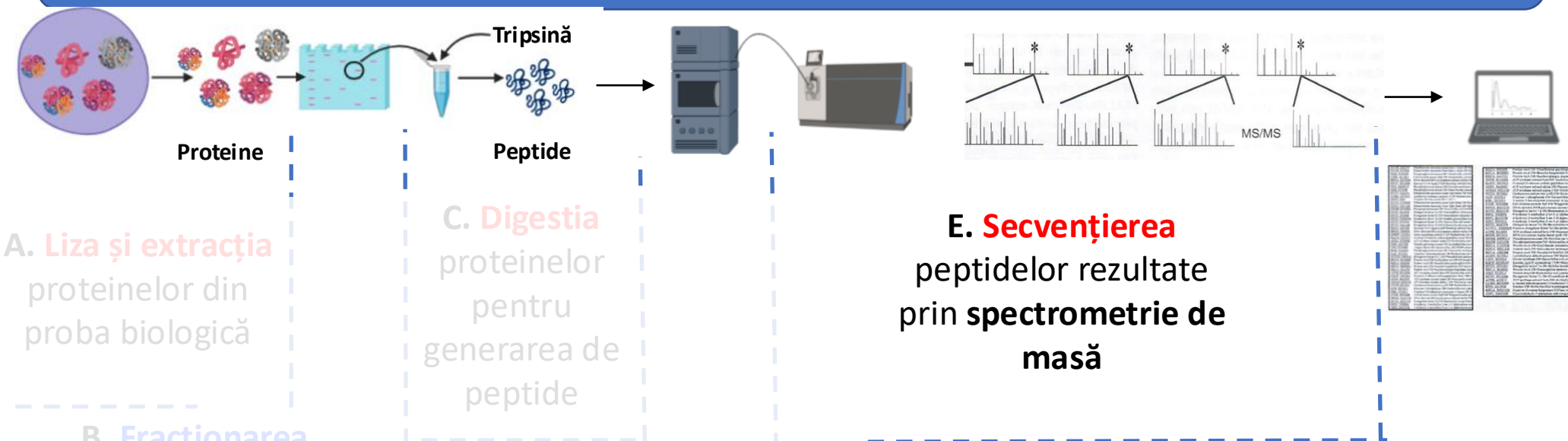
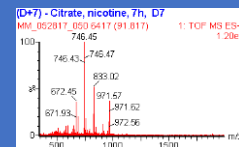


Curs 5 – Identificare proteinelor prin spectrometrie de masă

14.03.2026

Amprenta masică vs secvențierea peptidelor

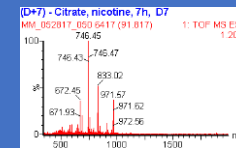
II. 2. Identificarea proteinelor prin spectrometrie de masă



Toate metodele de proteomică presupun fracționarea proteinelor din probă și digestia lor pentru a se genera un amestec de peptide. Funcție de tipul de instrument de spectrometrie de masă utilizat, informațiile obținute prin analiza peptidelor pot fi utilizate pentru identificarea peptidelor din proba. Au fost descrise 2 abordări distincte pentru identificarea proteinelor:

- A. Amprentarea masică** – metode ce utilizează spectrometre de masă ce funcționează în mod scanare completă și identifică m/z -ul peptidelor din amestec; valorile obținute sunt apoi utilizate pentru a identifica proteinele din care aceste peptide provin;
- B. Secvențierea peptidelor** – metode ce utilizează spectrometre de masă în tandem, care identifică m/z -ul peptidelor din amestec pe care mai apoi le fragmentează pentru a identifica secvența de aminoacid a fiecărei peptide; secvențele de aminoacizi sunt apoi utilizate pentru a identifica proteinele din amestecul inițial

II. 2. Identificarea proteinelor prin spectrometrie de masă



A. Amprentarea masică (peptide mass fingerprinting, PMF)

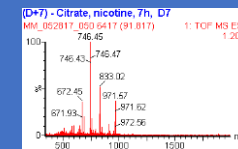
Această metodă de identificare pleacă de la ideea că, având la dispoziție genomul complet al unui organism s-ar putea în principiu genera cu ajutorul calculatorului o listă cu toate proteinele din organismul respectiv. Cunoscând modul în care acționează proteazele (**tripsina hidrolizează legătura peptidică la un rest de K sau R, dacă nu este urmat de P**) tot cu ajutorul calculatorului s-ar putea genera o listă cu toate peptidele posibil a rezulta prin digestia fiecărei proteine ce alcătuiește proteomul speciei respective. Pentru peptidele teoretice generate s-ar cunoaște originea (**proteina din care provine**), lungimea, secvența și deci i s-ar putea calcula masa. În acest fel ar fi posibilă realizarea **unor liste extinse cu masele teoretice ale peptidelor obținute prin digestii virtuale, fiecărei peptide fiindu-i asociată proteina din care provine**. Unele dintre **aceste peptide**, cu precădere cele de peste 6 aminoacizi **au mase unice**, ceea ce înseamnă că **fiecărei proteine îi sunt asociate un număr variabil de valori masice unice – o amprentă masică a proteinei**, realizate pe baza maselor peptidelor.

Prin procesarea în laborator a unei probe provenite din organismul de interes, proteinele existente în probă vor fi hidrolizate, iar peptidele generate analizate cel mai frecvent print-un spectrometru de masă **MALDI-TOF (sursă de tip MALDI cuplată cu analizor de masa TOF)**. Instrumentul va identifica valorile m/z pentru fiecare peptidă din probă pe baza cărora se poate **calcula masa reală a peptidelor existente** în proba de analizat. Dacă **masa reală măsurată este unică** și se regăsește în lista **extinsă cu masele teoretice ale peptidelor obținute prin digestii virtuale, atunci este foarte probabil ca peptida reală să fie identică cu cea teoretică**, indicând așadar prezența proteinei parentale în probă. Cu cât se identifică mai multe peptide reale cu corespund ca masă cu peptidele virtuale aparținând aceleiași proteine, cu atât nivelul de încredere că proteina respectivă este în probă este mai mare.

Peptide Mass list

.
. .
1528.7685
1528.7989
1529.0002
1529.2001
1529.2454
1529.5006
1529.6997
1529.7348 ← **1529.7348**
1529.9978 **measured mass**
1530.2332
1530.4567
1531.0003
1531.0107
1531.3004
1531.5656
.
.

II. 2. Identificarea proteinelor prin spectrometrie de masă

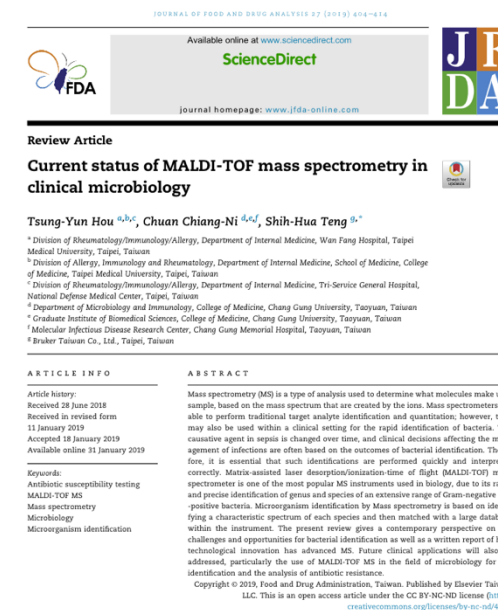


Prin identificare potrivirilor dintre masele peptidelor măsurate cu ajutorul unui spectrometru de masă și masele peptidelor teoretice posibil a exista în organismul respectiv se pot identifica proteinele existente într-o probă necunoscută. **Succesul amprentării masice pentru identificarea proteinelor depinde de 2 factori cheie:**

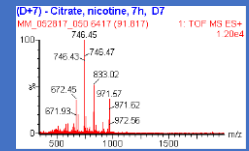
- **Precizia** cu care se măsoară m/z -urile și deci cu care se calculează masele peptidelor reale. **Din acest motiv instrumentele utilizate sunt cel mai frecvent MALDI-TOF;**
- **Acuratețea** datelor genomice pe baza cărora se creează lista de mase teoretice.

Limitările principale în aplicarea metodelor de amprentare masică se referă la:

1. deși bazele de date cu secvențe sunt deosebit de mari, nu conțin decât rar genomul complet și anotat (poziția genelor este descrisă, codonii start și stop sunt identificați) al unei specii;
2. în organisme superioare există numeroase proteine omoloage, foarte similare ca secvență, al căror amprentă masică este foarte similară sau chiar identică;
3. bazele de date cu secvențe conțin rar date despre modificările post-traducere ale proteinelor. În cazul unei proteine ce suferă PTM, amprenta masică teoretică este semnificativ diferită de cea reală și nu mai poate fi identificată prin această metodă.

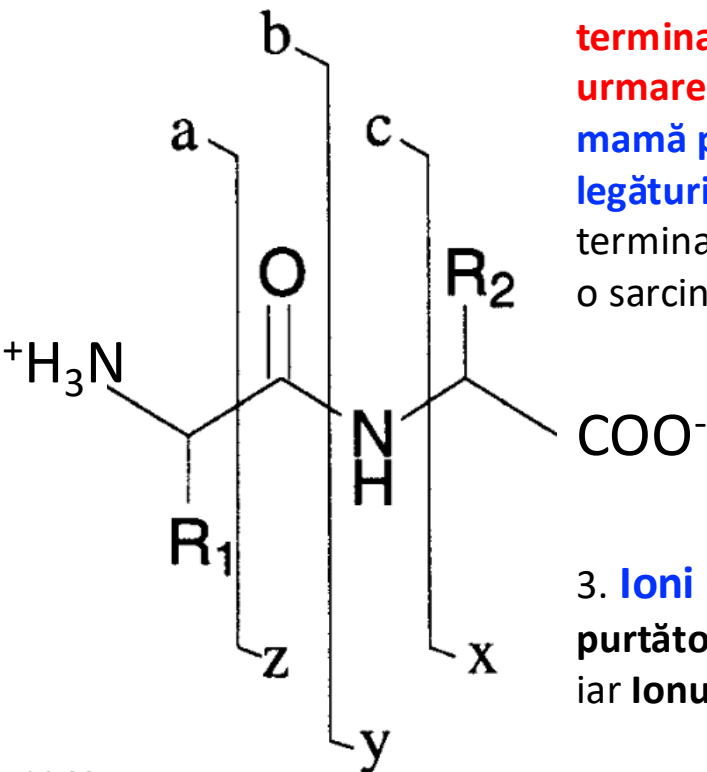


II. 2. Identificarea proteinelor prin spectrometrie de masă



B. Secvențierea peptidelor prin spectrometrie de masă în tandem (MS/MS) încearcă să elimine limitările PMF **prin fragmentarea peptidelor într-o celulă de coliziune, analiza fragmentelor formate în scopul identificării ordinii aminoacizilor**. Secvența de aminoacizi calculată este apoi utilizată pentru a identifica proteinele existente în probă.

Secvențierea peptidelor prin MS/MS pleacă de la observația prin interacțiunea dintre gazul inert și **peptidele** în celula de coliziune, catena peptidică **se fragmentează într-o manieră predictibilă prin ruperea legăturilor covalente și formează un set limitat de ioni**:

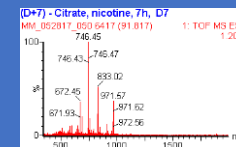


1. **Ionii b și y** – se formează prin ruperea legăturii peptidice dintre carbonul carbonilic și N amidic. **Ionul b este purtător al grupării amino din capătul N terminal al peptidei mamă precursoră și a unei sarcini pozitive pe C carbonilic ca urmare a ruperii legăturii peptidice. Ionul y conține capătul C terminal al peptidei mamă precursoră și o sarcină pozitivă pe gruparea NH2 rezultate din ruperea legăturii peptidice.** Dacă peptida a fost obținută prin hidroliza cu tripsină, capătul C-terminal conține aminoacizii Arg sau Lys – aminacizi di-aminici, deci ionii Y pot purta o sarcină pozitivă suplimentară.

2. **Ioni a și z** – se formează prin ruperea legăturii dintre C carbonilic și Cα; **ionul a este purtător al grupării amino din capătul N terminal al peptidei mamă precursoră, iar ionul z conține capătul C terminal al peptidei mamă precursoră.**

3. **Ioni c și x** – se formează prin ruperea legăturii dintre N amidic și Cα; **ionul c este purtător al grupării amino din capătul N terminal al peptidei mamă precursoră, iar ionul x conține capătul c terminal al peptidei mamă precursoră.**

II. 2. Identificarea proteinelor prin spectrometrie de masă

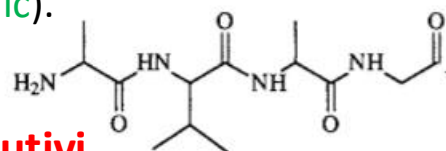
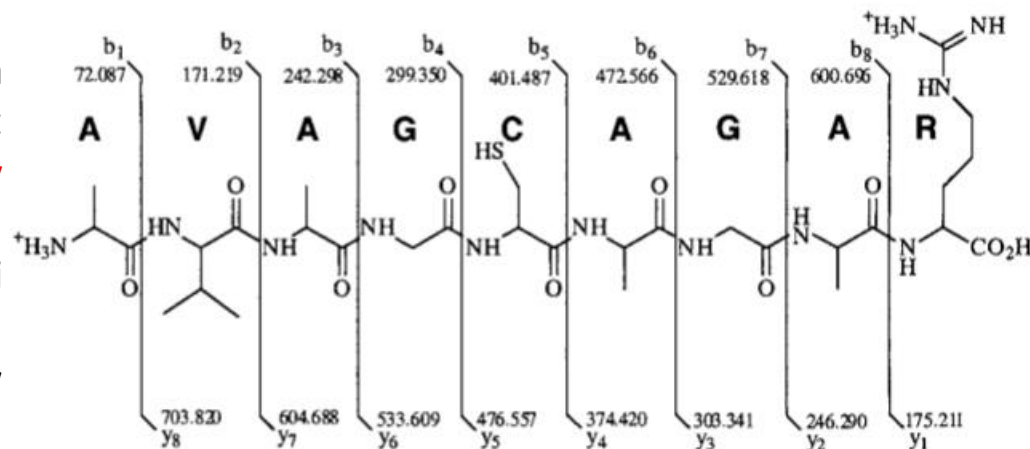


În celulele de coliziune ale spectrometrelor MS/MS folosite în proteomică – triplu-quad, capcană de ioni sau Q-TOF – **cel mai frecvent se rup legăturile peptidice ceea ce duce la formarea cu precădere a ionilor y și b**. Nu există însă nici o preferință legată de care dintre legăturile peptidice, dintre care aminoacizi se vor rupe.

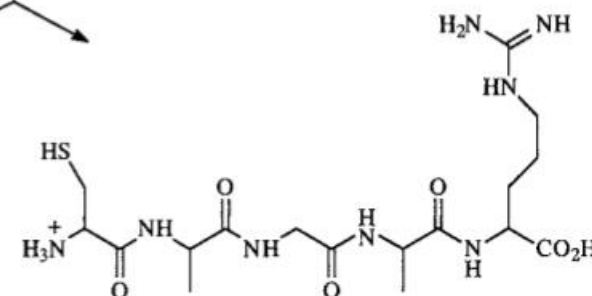
De exemplu, în cazul unei peptide cu secvența AVAGCAGAR, oricare dintre legăturile peptidice se pot rupe ceea ce duce la formarea **unei serii de ioni y și b** reprezentați în figură.

Numerele ionilor dintre-o serie corespund poziției legăturii peptide care se rupe și în consecință numărului de aminoacizi pe care fragmentul respectiv îl conține.

Masa fiecărui ion y sau b dintre-o este suma maselor resturilor de aminoacizi conținuți (**Mw a aminoacizilor – 18 Da (masa H₂O eliminată în formarea legăturii peptidice)**) + 1 Da pentru b (**H de la NH₂ terminal**) sau +19 Da pt y (**OH de la COOH terminal + 2H⁺ la N amidic**).



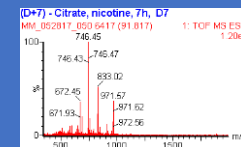
AVAG⁺
b₄
m/z 299.350



CAGAR⁺
y₅
m/z 476.557

Diferența de masă dintre 2 ioni y sau b consecutivi va reprezenta așadar masa restului de aminoacid prin care aceștia diferă și este parametrul utilizat pentru secvențierea proteinelor.

II. 2. Identificarea proteinelor prin spectrometrie de masă



Spectrul MS/MS al peptidei AVAGCAGAR cu evidențierea semnalelor pentru seriile de ioni y și b

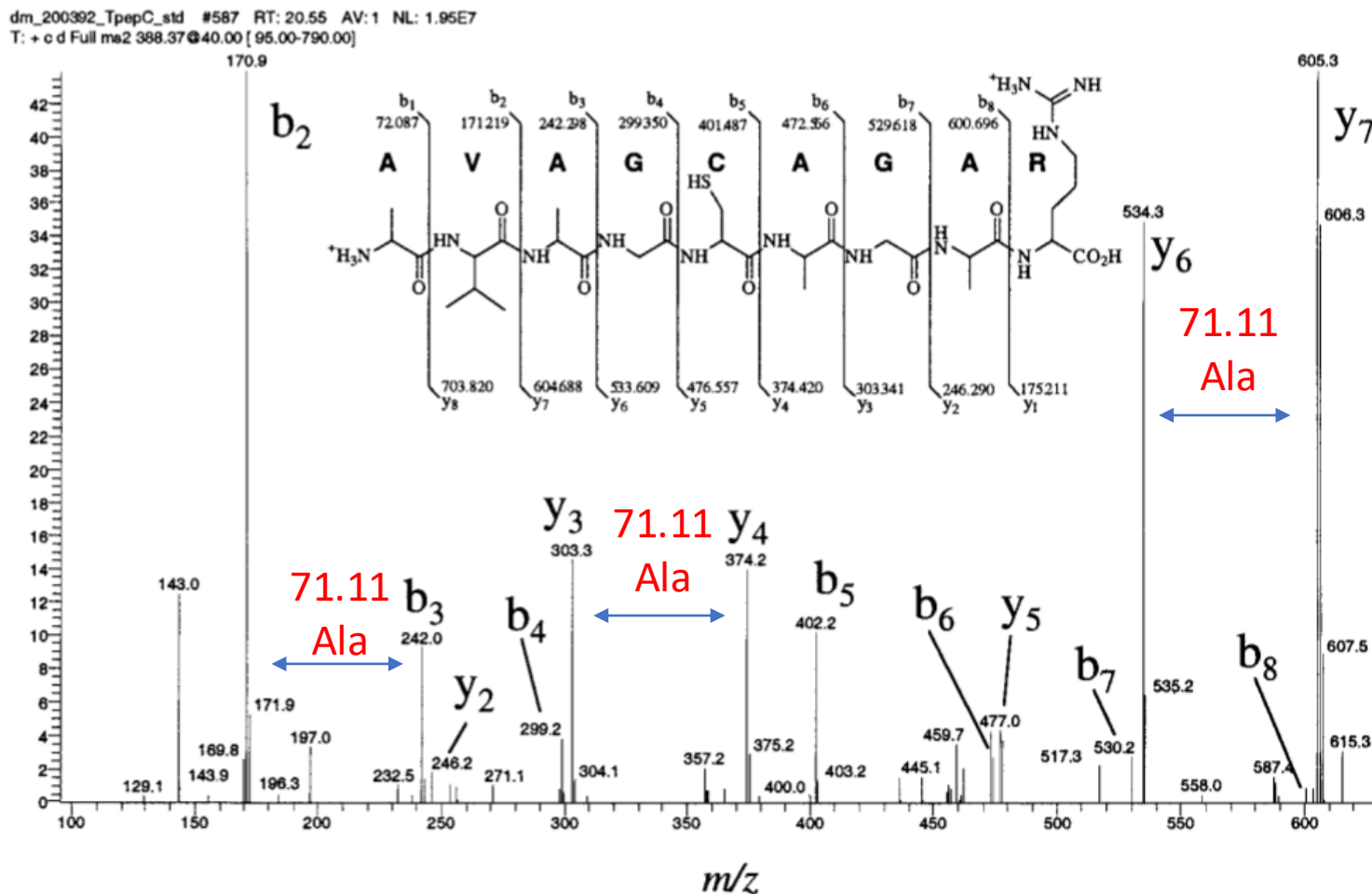
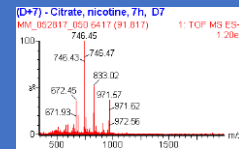


Fig. 4. Annotated MS-MS spectrum of the $[M+2H]^{2+}$ ion of AVAGCAGAR showing b- and y-ions.

II. 2. Identificarea proteinelor prin spectrometrie de masă



Secvențierea peptidelor prin spectrometrie de masă în tandem (MS/Ms) **presupune deci înregistrarea spectrului de masă rezultat prin fragmentarea controlată prin CID** a fiecărei peptide urmată apoi **de identificarea seriei de ioni y și b pe baze semnalelor dominante. Diferențele de m/z între ionii aceleiași serii de ioni indică aminoacizi conținuți, iar ordinea ionilor – secvența în care acești ioni sunt legați în structura peptidei analizate.** În general, identificarea unei serii de ioni (y sau b) este suficientă pentru a stabili secvența unei peptide, însă este de preferat stabilirea ambelor serii pentru verificare (seria y completează seria b).

Interpretarea manuală a unui spectru MS/MS al unei peptide poartă numele de secvențiere *de novo* și, funcție de complexitatea spectrului și pregătirea utilizatorului poate dura de la 15 minute până la câteva ore. De aceea se preferă **interpretarea computerizată a spectrelor MS/MS ce presupune compararea spectrelor MS/MS reale cu spectre MS/MS teoretice.** Acest lucru presupune parcurgerea următoarelor etape:

1. Generarea, plecând de la secvențe de aminoacizi sau de baze azotate cunoscute a unei baze de date cu peptide teoretice;
2. Fragmentarea acestor peptide și stabilirea tuturor spectrelor de masă posibile a se genera și înregistra; realizarea unei noi baze de date cu m/z –uri posibile a fi înregistrate pentru toate seriile de ioni teoretice;
3. Înregistrarea spectrului de masă real al unei peptide și identificarea valorilor m/z predominante ;
4. Identificarea seriei de ioni teoretice ce corespunde cel mai bine cu seria de ioni reală.

II. 2. Identificarea proteinelor prin spectrometrie de masă

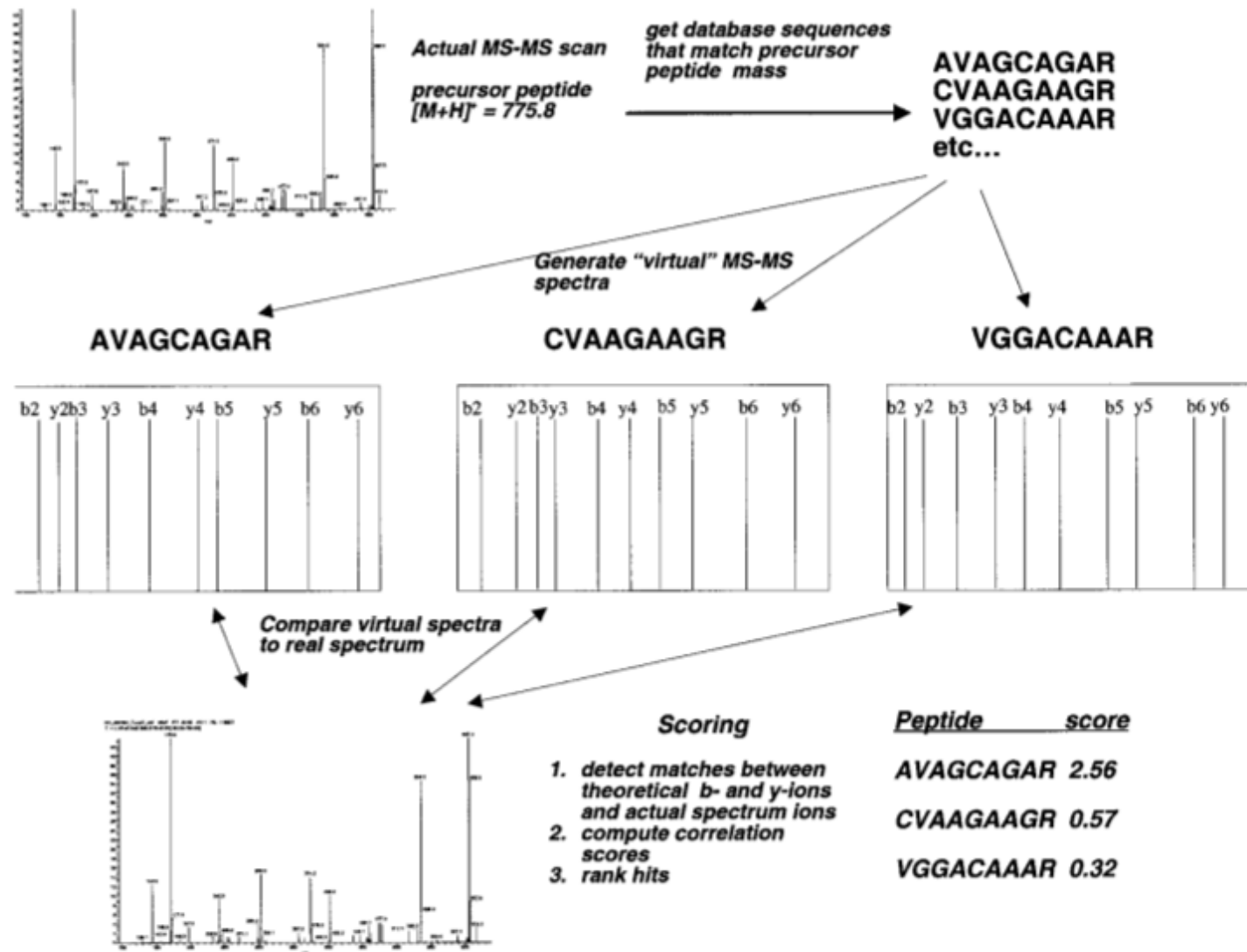
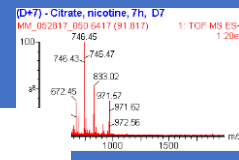


Fig. 1. Schematic representation of operation of Sequest algorithm for correlation of MS-MS spectra with peptide sequences from databases.