

# Metoda identifikace neznámého píku HPLC/UV-VIS pomocí MS

Michal Pohludka

November 10, 2010

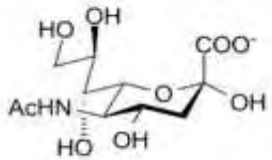




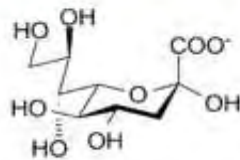
# Transferrin

- železo-transportující protein
- komplexní struktura – polypeptid 679 AA, 2 vazebné místa pro Fe, 2x N-oligosacharid
- formy transferrinu – dle počtu sialových kyselin

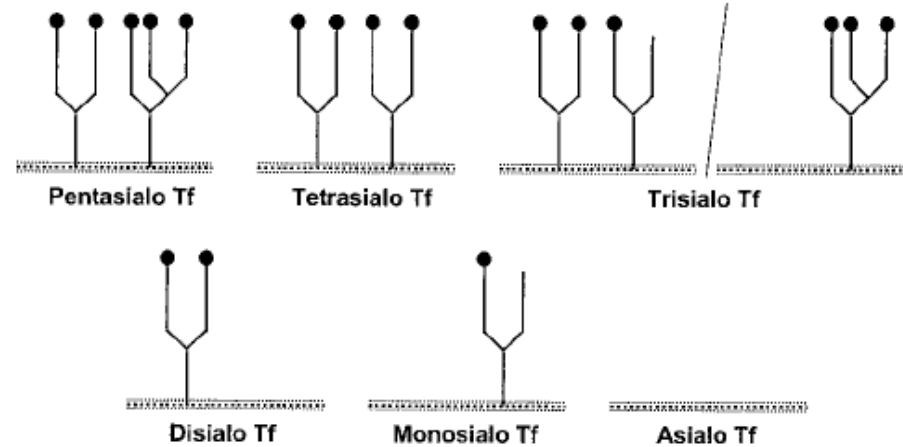
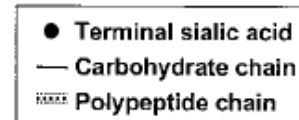
The two most common sialic acid derivatives are Neu5Ac and Kdn.



N-Acetylneuraminic acid  
Neu5Ac



2-Keto-3-deoxynonic acid  
Kdn

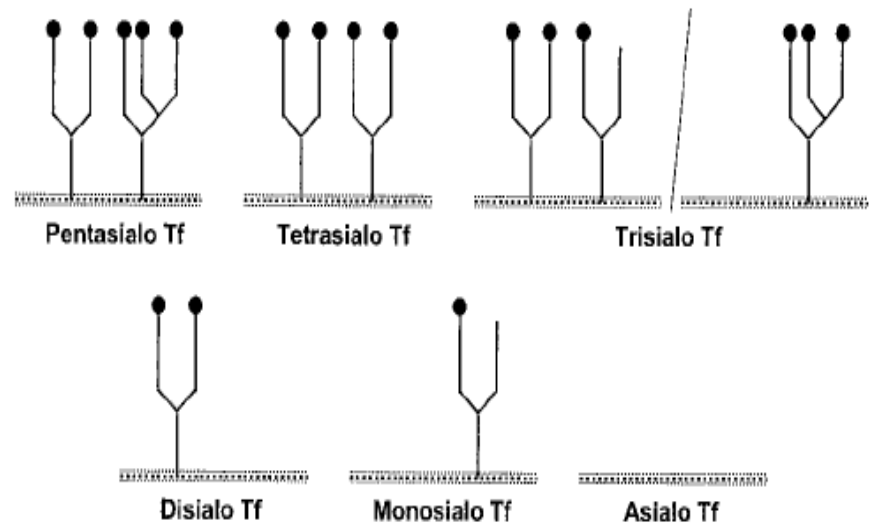


Helander A., et al., *Clin Chem*, 2001  
Schauer R, *Glycoconj. J*, 2000



# Stanovení %CDT v séru

- > 50 – 80 g/den alkoholu po dobu 1-2 týdnů zvyšuje koncentraci disialotransferinu (DST) a asialotransferinu (AST)

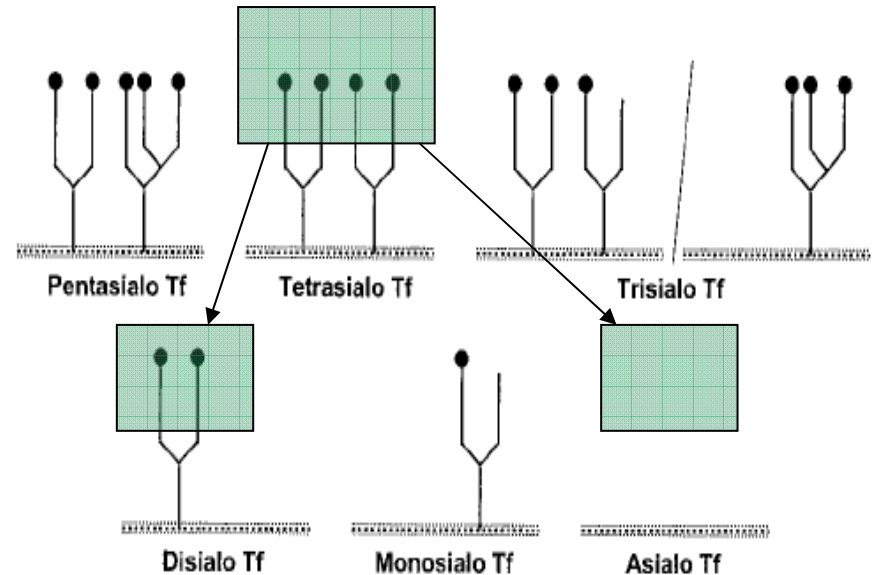




# Stanovení %CDT v séru

- > 50 – 80 g/den po dobu 1-2 týdnů zvyšuje koncentraci disialotransferinu (DST) a asialotransferinu (AST)

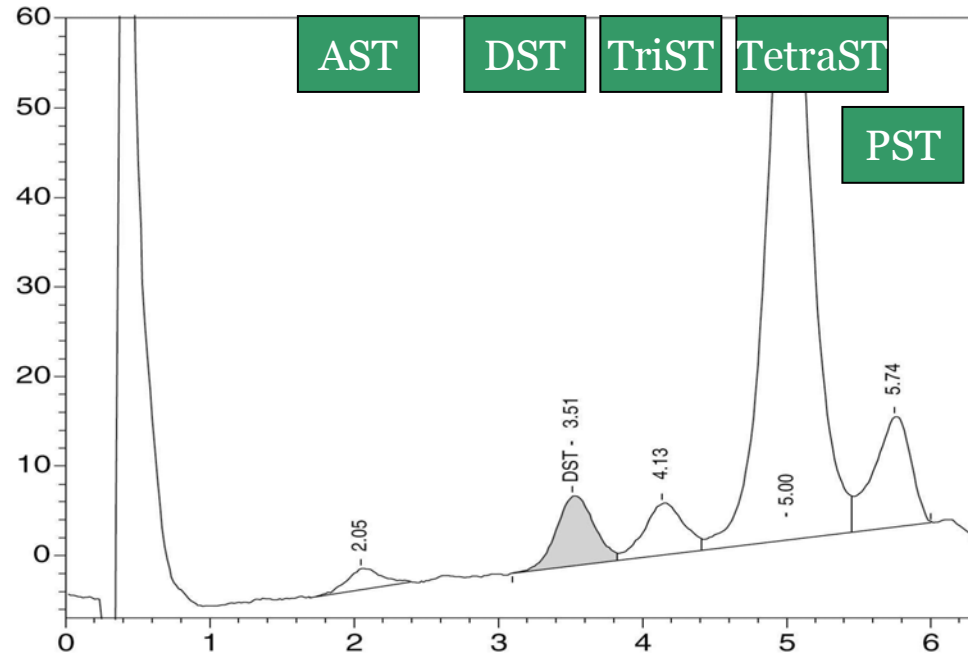
- IEF
- Kapilární elektroforéza
- **HPLC – iontoměničová c-grafie**





# Stanovení %CDT metodou HPLC

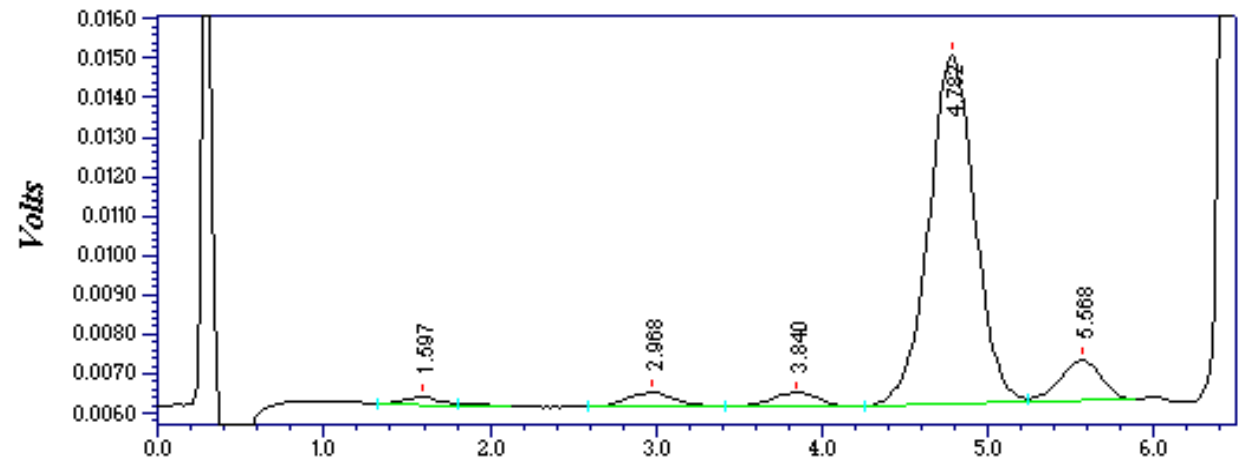
- Gradientová iontoměničová chromatografie
- Příprava vzorků – saturace železem, odstranění lipoproteinů
- **Detekce při 460 nm**
- $t = 35^{\circ}\text{C}$
- Flow rate 1,4 ml/min



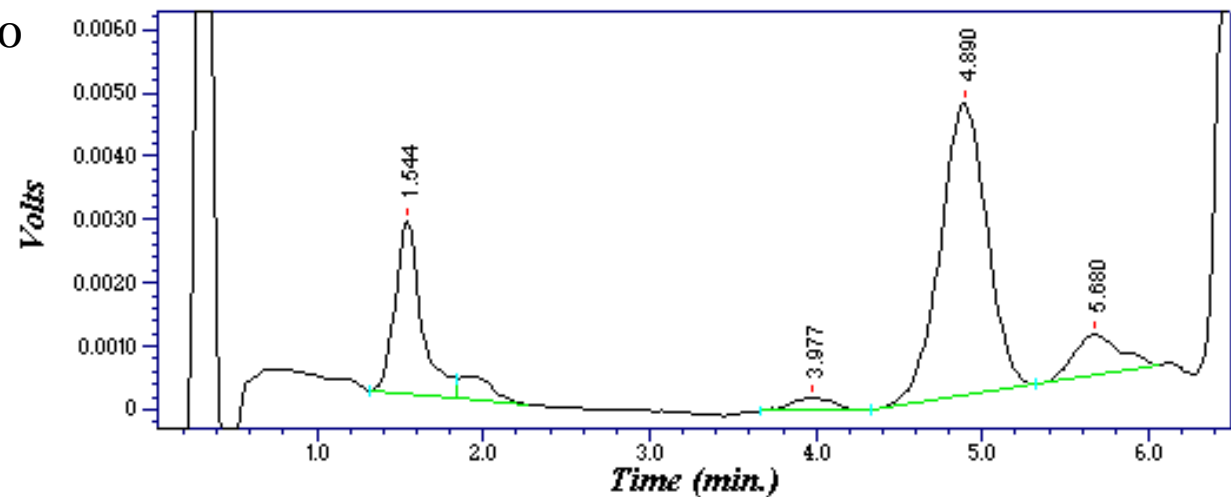


# Stanovení transferinu metodou HPLC

Chromatogram sérového materiálu



Chromatogram likvorového materiálu





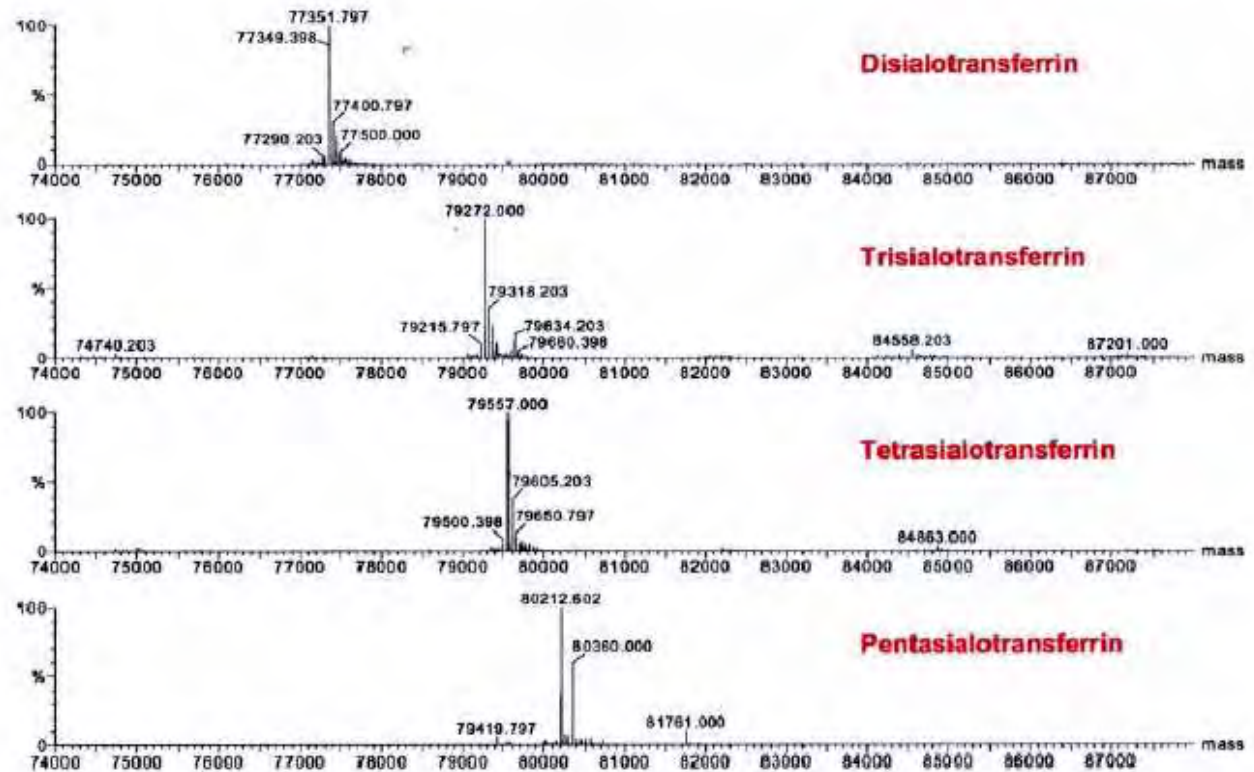
# Porovnání retenčních časů izoformem transferinu ze séra a likvoru

Izoformy transferinu	Retenční čas (min)	
	sérum	CSF
asialotransferin	1,597	1,544
disialotransferin	2,968	-
trisialotransferin	3,840	3,977
tetrasialotransferin	4,782	4,890
pentasialotransferin	5,568	5,680





# Identifikace jednotlivých sérových transferin-peaků



Q-ToF ESI-MS results courtesy of Anders Helander and Ann-Charlotte Bergmann

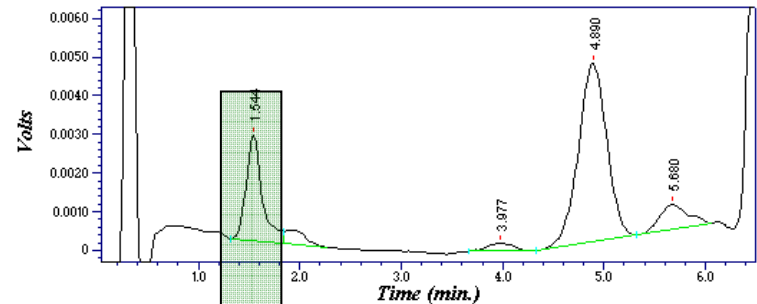
Helander A., et al., *Clin Chem*, 2001





# MS identifikace detekovaného „AST peaku“ z likvorového materiálu

- Kolekce frakce 1,2 – 1,8 min
- Redukce proteinů
- Alkylace proteinů
- Digesce proteinů Trypsinem
- Peptidy čištěny pomocí Omix C18 tips ve standardním protokolu
- MS analýza frakce – MS a tandem MS/MS na přístroji Autoflex II MALDI-TOF/TOF



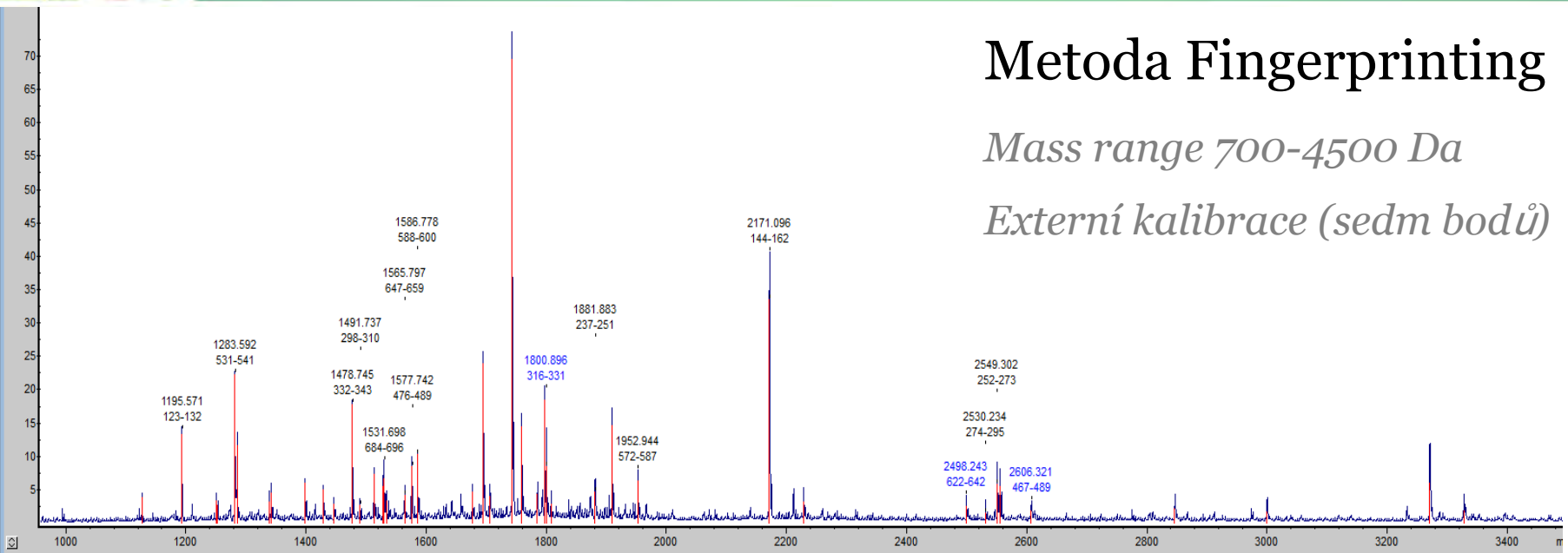


# MS analýza HPLC frakce

## Metoda Fingerprinting

Mass range 700-4500 Da

Externí kalibrace (sedm bodů)



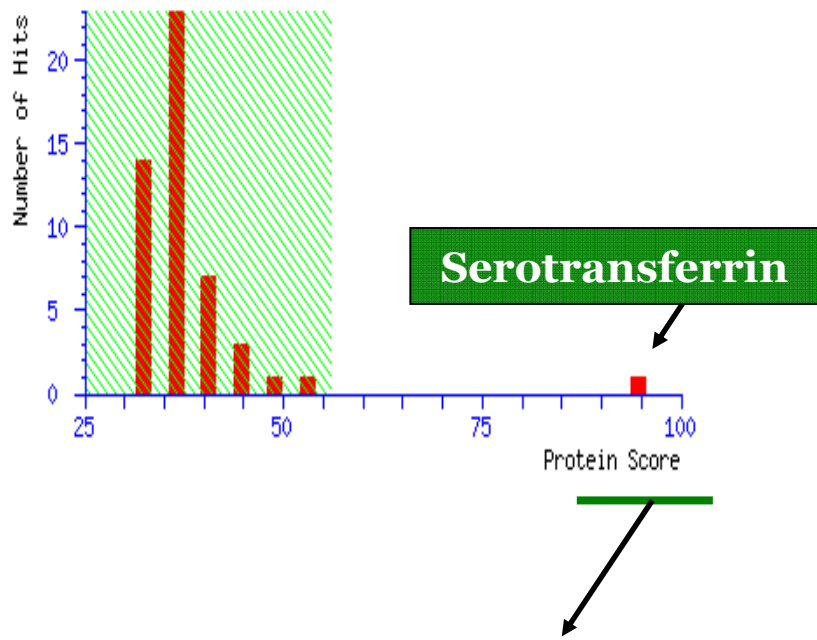
Protein View | Match Errors | MS/MS Fragments | MSMS Analysis

Protein:  Peak threshold:   
 Intensity coverage:  Sequence coverage MS:  Sequence coverage MS/MS:  pI:  MW (kDa):

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160
MRLAVGALLV	CAVLGLCLAV	PKTIVRNCVAV	SEHEATKCQS	FRDHMKSVIP	SDGSPVACVK	KASYLDCIRA	IAANEADAVT	LDAGLVYDAY	LAPNNLKPVV	AEFYGSKEDP	QTFYYAVAVV	KKDSGFQMNQ	LRGKKSCHTG	LGRSAGWNIP	IGLLYCDLPE
170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320
PRKPLEKAVA	NFFSGSCAPC	ADGTDFFQLC	QLCPGCGCST	LNQYFGYSGA	FKCLKDGAGD	VAFVKHSTIF	ENLANKARD	QYELLCLDNT	RKPVDEYKDC	HLAQVPSHTV	VARSMSGKED	LIWELLNQAQ	EHFGKDKSKE	FQLFSSPHGK	DLFLKDSAHG
330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480
FLKVPFRMDA	KMYLGVEYVT	AIRNLRREGTC	PEAPTDECKP	VKWCALSHHE	RLKCDSESVN	SVGKIECVSA	ETTEDCIAKI	MNGEADAMSL	DGGFVYIAGK	CGLVPVLAEN	YNKSDNCEDI	PEAGYFAVAV	VKKSASDLTW	DNLKGGKSKCH	TAVGRTAGWN
490	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640
IPMGLLYNKI	NHCRFDEFFS	EGCAPGSKKD	SSLCKLCMGS	GLNLCEPNNK	EGYYGYTGAF	ROLVEKGDVA	FVKHQIVPQN	TGKNPDPWA	KNLNEKDYEL	LCLDGRKPV	EYANCHLAR	APNHAVVTRK	DKEACVHKIL	RQQQLFGSN	VDCSGNFCL
650	660	670	680	690	700										
FRSETKDLIF	RDDIVCLAKL	HDRNTIEKYL	GEEYKAVGN	LRKCSSTSL	EACTFRFP										



# MS analýza HPLC frakce

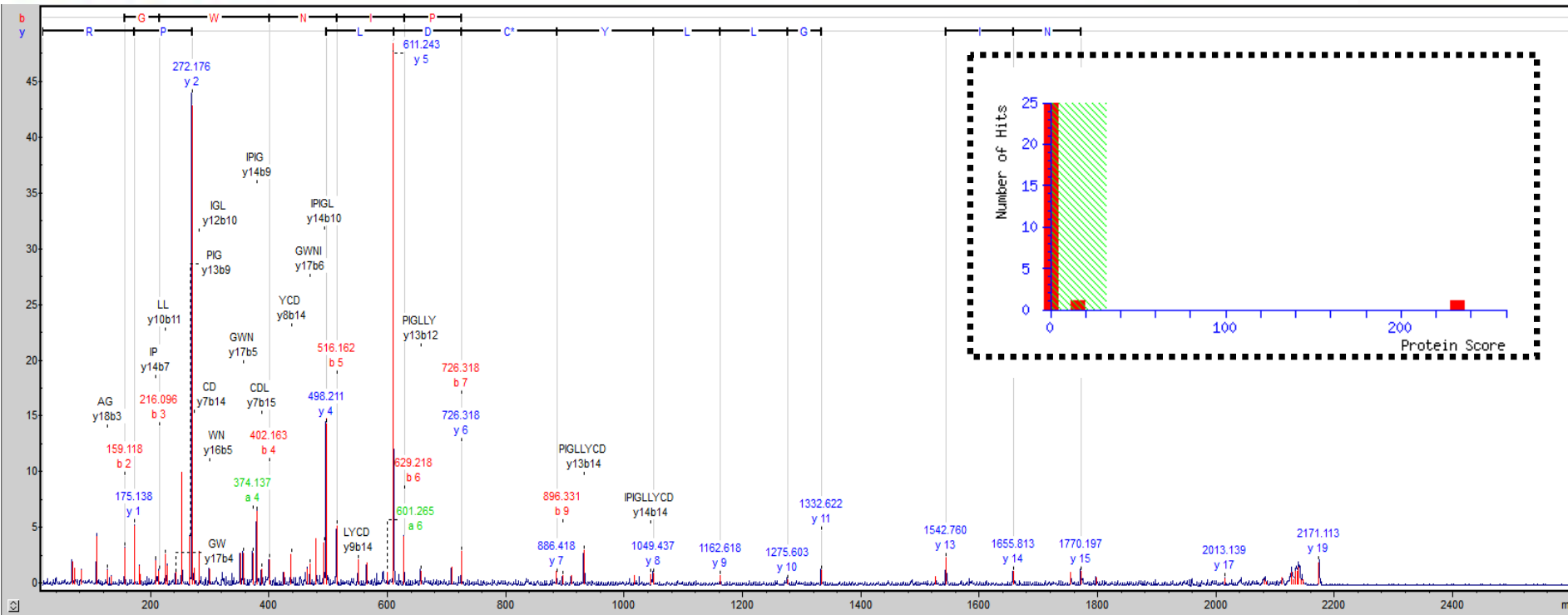


- **MASCOT** search engine
- **Swiss-Prot** nebo **NCBI**nr databáze
  - *Taxonomy (Homo Sapiens)*
  - *Proteolytic enzyme (Trypsin/P]*
  - *Peptide mass tolerance  $\pm 75$  ppm*
  - *Fragment mass tolerance  $\pm 0,5$  Da*
  - *Global modification – Carbamidomethyl(Cys)*
  - *Variable modification – oxidation(Met)*
  - *Peptide charge state (+1)*
  - *Max missed cleavage (1)*

start	End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	Miss	Sequence
123	132	1195.5712	1194.5639	1194.5452	16	0	K.DSGFQMNQLR.G
144	162	2171.0961	2170.0888	2170.0881	0	0	R.SAGWNIPIGLLYCDLPEPR.K
237	251	1881.8835	1880.8762	1880.8687	4	1	K.ADRDQYELLCLDNTR.K
252	273	2549.3025	2548.2952	2548.2856	4	1	R.KPVDQYKDCCHLAQVPSHTVVAR.S
274	295	2530.2339	2529.2266	2529.2322	-2	1	R.SMGGRDLIWEELNQAQEHFGK.D
298	310	1491.7369	1490.7297	1490.7518	-15	1	K.SKEFQLFSSPHGK.D
316	331	1800.8962	1799.8889	1799.8988	-6	2	K.DSAHGFLKVPFRMDAK.M Dioxidation (M)
332	343	1478.7452	1477.7379	1477.7275	7	0	K.MYLGVEYVTAIR.N
467	489	2606.3212	2605.3139	2605.2893	9	2	K.KSCHTAVGRTAGWNI PMGLLYNK.I Dioxidation (M)
476	489	1577.7421	1576.7349	1576.8072	-46	0	R.TAGWNI PMGLLYNK.I
531	541	1283.5919	1282.5846	1282.5618	18	0	K.EGYGYGTGAFR.C
572	587	1952.9441	1951.9368	1951.9309	3	1	K.NLNEKDYELLCLDGTR.K
588	600	1586.7783	1585.7710	1585.7671	2	0	R.KPVEEYANCHLAR.A
622	642	2498.2433	2497.2361	2497.0904	58	0	R.QQHLFGSNVTDGSGNFCLPR.S Gln->pyro-Glu (N-term Q)
647	659	1565.7969	1564.7896	1564.7919	-1	1	K.DLLFRDDTVCLAK.L
684	696	1531.6979	1530.6906	1530.6807	7	0	K.CSTSSLLEACTFR.R



# Tandem MS/MS analýza vybraných fragmentů



Protein View | Match Errors | MS/MS Fragments | MSMS Analysis

Sequence: SAGWNIPIGLLYCDLPEPR ( Mods: 13: Carbamidomethyl (C) )

MH+(mono): 2171.095    MH+(avg): 2172.487    MS/MS To: 0.400    Da    Peaks: 71    Above Threshold: 71    Zoom to m/z for 2+    Zoom +/-: 5    Da

Masses:  Monoisotopic     Average    Calculate: Masses    Threshold: 0.000    Assigned: 24    Not Assigned: 47    1+, m/z: 0.000

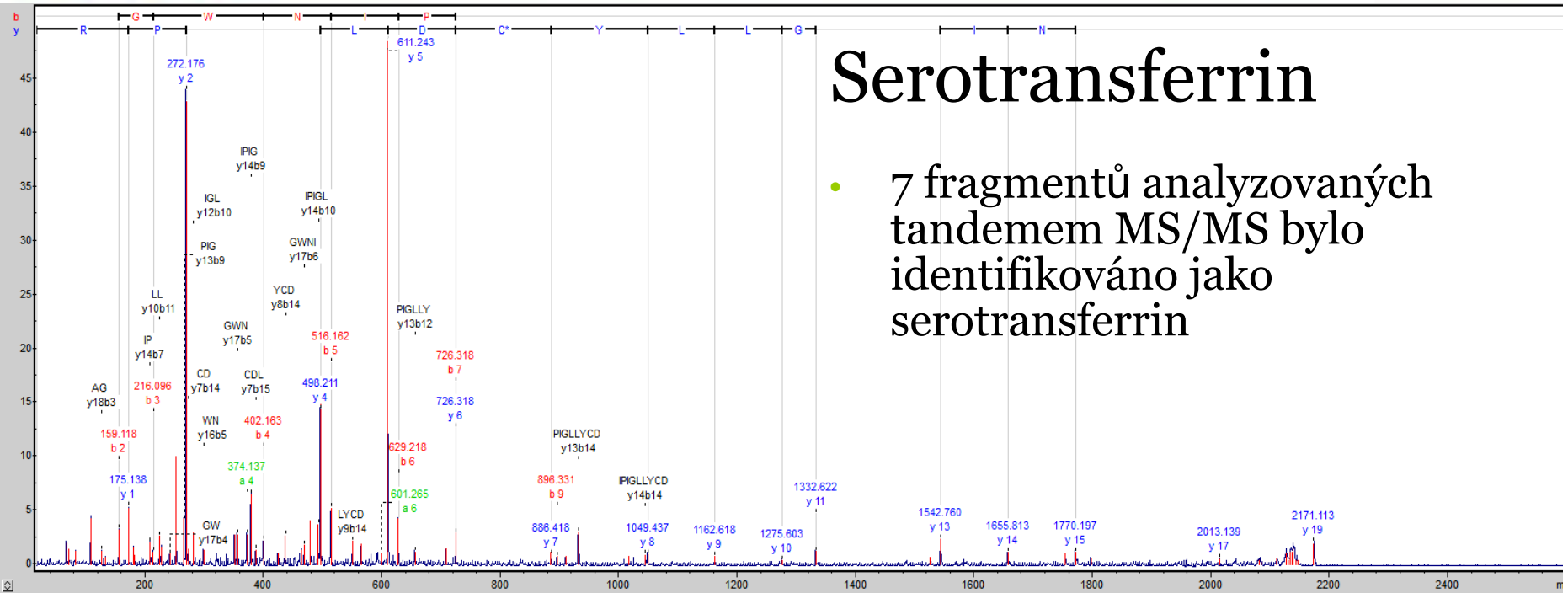
Ion	S	A	G	W	N	I	P	I	G	L	L	Y	C	D	L	P	E	P	R	Ser	Ala	Gly	Trp	Asn	Ile	Pro	Ile	Gly	Leu	Leu	Tyr	Cys	Asp	Leu	Pro	Glu	Pro	Arg
a	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	60.044	131.082	188.103	374.182	488.225	601.309	698.362	811.446	868.468	981.552	1094.636	1257.699	1417.730	1532.757	1645.841	1742.893	1871.936	1968.989	2125.090
b	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	88.039	159.076	216.098	402.177	516.220	629.304	726.357	839.441	896.462	1009.547	1122.631	1285.694	1445.725	1560.752	1673.836	1770.888	1899.931	1996.984	2153.085
y	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	175.119	272.172	401.214	498.267	611.351	726.378	886.409	1049.472	1162.556	1275.640	1332.662	1445.746	1542.798	1655.883	1769.925	1956.005	2013.026	2084.063	2171.095
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	8	7	6	5	4	3	2	1		Arg	Pro	Glu	Pro	Leu	Asp	Cys	Tyr	Leu	Leu	Gly	Ile	Pro	Ile	Asn	Trp	Gly	Ala	Ser



# Tandem MS/MS analýza vybraných fragmentů

## Serotransferrin

- 7 fragmentů analyzovaných tandemem MS/MS bylo identifikováno jako serotransferrin



Protein View | Match Errors | MS/MS Fragments | MSMS Analysis

Sequence: SAGWNIPIGLLYCDLPEPR ( Mods: 13: Carbamidomethyl (C) )

MH+(mono): 2171.095    MH+(avg): 2172.487    MS/MS ToI: 0.400    Da    Peaks: 71    Above Threshold: 71    Zoom to m/z for 2+    Zoom +/-: 5 Da

Masses:  Monoisotopic     Average    Calculate: Masses    Threshold: 0.000    Assigned: 24    Not Assigned: 47    1+, m/z: 0.000

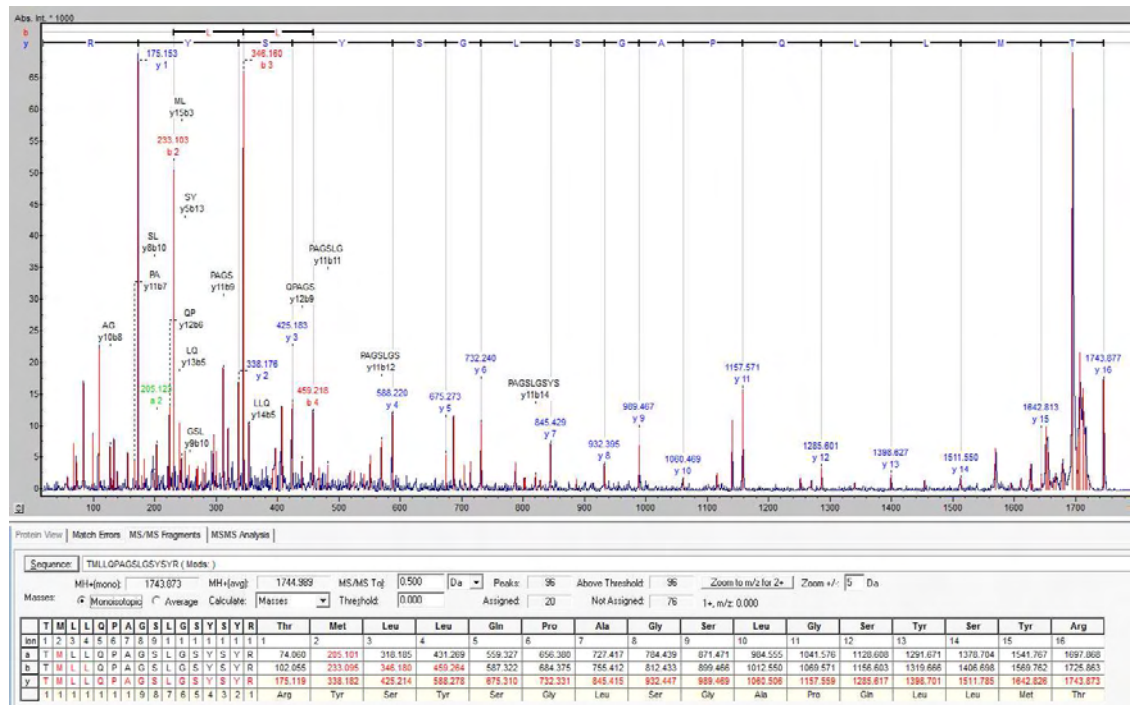
	S	A	G	W	N	I	P	I	G	L	L	Y	C	D	L	P	E	P	R	Ser	Ala	Gly	Trp	Asn	Ile	Pro	Ile	Gly	Leu	Leu	Tyr	Cys	Asp	Leu	Pro	Glu	Pro	Arg
Ion	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
a	S	A	G	W	N	I	P	I	G	L	L	Y	C	D	L	P	E	P	R	60.044	131.082	188.103	374.182	488.225	601.309	698.362	811.446	888.468	981.552	1094.636	1257.699	1417.730	1532.757	1645.841	1742.893	1871.936	1968.989	2125.090
b	S	A	G	W	N	I	P	I	G	L	L	Y	C	D	L	P	E	P	R	88.039	159.076	216.098	402.177	516.220	629.304	726.357	839.441	896.462	1009.547	1122.631	1285.694	1445.725	1560.752	1673.836	1770.888	1899.931	1996.984	2153.085
y	S	A	G	W	N	I	P	I	G	L	L	Y	C	D	L	P	E	P	R	175.119	272.172	401.214	498.267	611.351	726.378	886.409	1049.472	1162.556	1275.640	1332.662	1445.746	1542.798	1655.883	1769.925	1956.005	2013.026	2084.063	2171.095
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	8	7	6	5	4	3	2	1	Arg	Pro	Glu	Pro	Leu	Asp	Cys	Tyr	Leu	Leu	Gly	Ile	Pro	Ile	Asn	Trp	Gly	Ala	Ser



# Tandem MS/MS analýza vybraných fragmentů

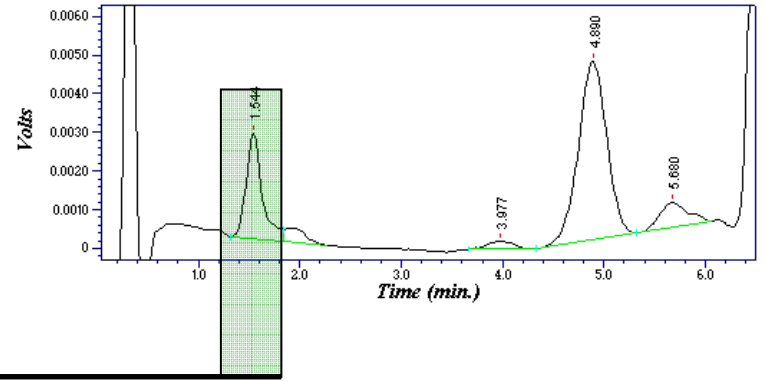
- Druhý protein identifikovaný tandemem MS/MS byl **prostaglandin-H2 D-isomerase**

4 fragmenty analyzovány tandemem MS/MS byly identifikovány jako **prostaglandin-H2 D-isomerase**





- Na základě MS a tandemu MS/MS analýz HPLC frakce obsahuje 2 dominantní proteiny

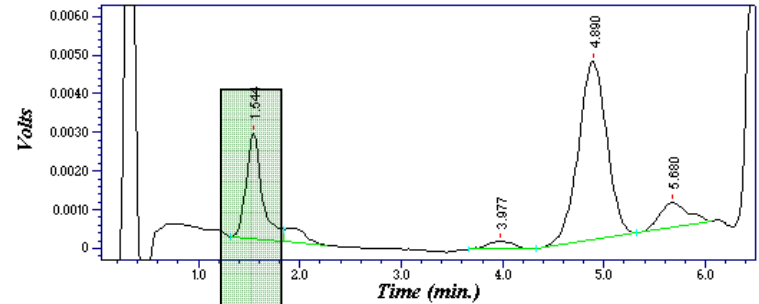


- SEROTRANSFERRIN
- PROSTAGLANDIN-H<sub>2</sub> D-ISOMERASE





- Na základě MS a tandemu MS/MS analýz HPLC frakce obsahuje 2 dominantní proteiny

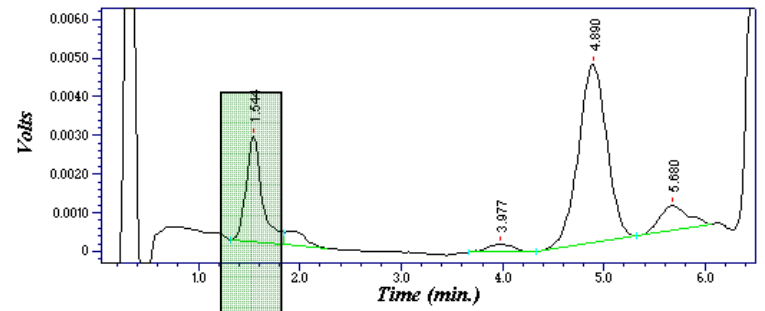


- SEROTRANSFERRIN
- PROSTAGLANDIN-H<sub>2</sub> D-ISOMERASE

**Který protein reprezentuje peak v 1,5 min chromatogramu?**



- Na základě MS a tandemu MS/MS analýz HPLC frakce obsahuje 2 dominantní proteiny



- **SEROTRANSFERRIN**
- PROSTAGLANDIN-H<sub>2</sub> D-ISOMERASE

**Detekce  
460 nm**



# Závěr

- Stanovení relativního zastoupení AST v likvoru je možné stanovovat metodou HPLC
- Spojení HPLC a MS je běžně využíváno ve vědecké, výzkumné, farmaceutické, biotechnologické a jiné praxi a v oblasti klinické diagnostiky má extrémní potenciál



# Poděkování

- Doc. Dastych
- Mgr. Gottwaldová
- Dr. Prikryl
- ...

Vám za pozornost