

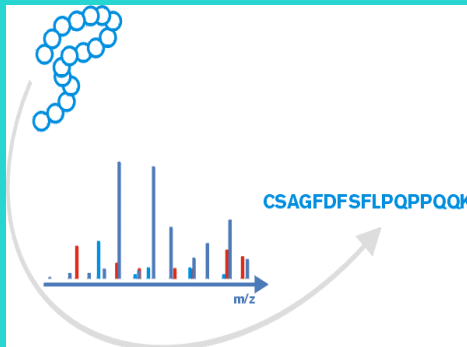
SCSIE - Laboratori de Proteòmica

Digestió i Preparació - dp

Gels 2D “Escaneig” i tallat de gels - sp



Bioinformàtica

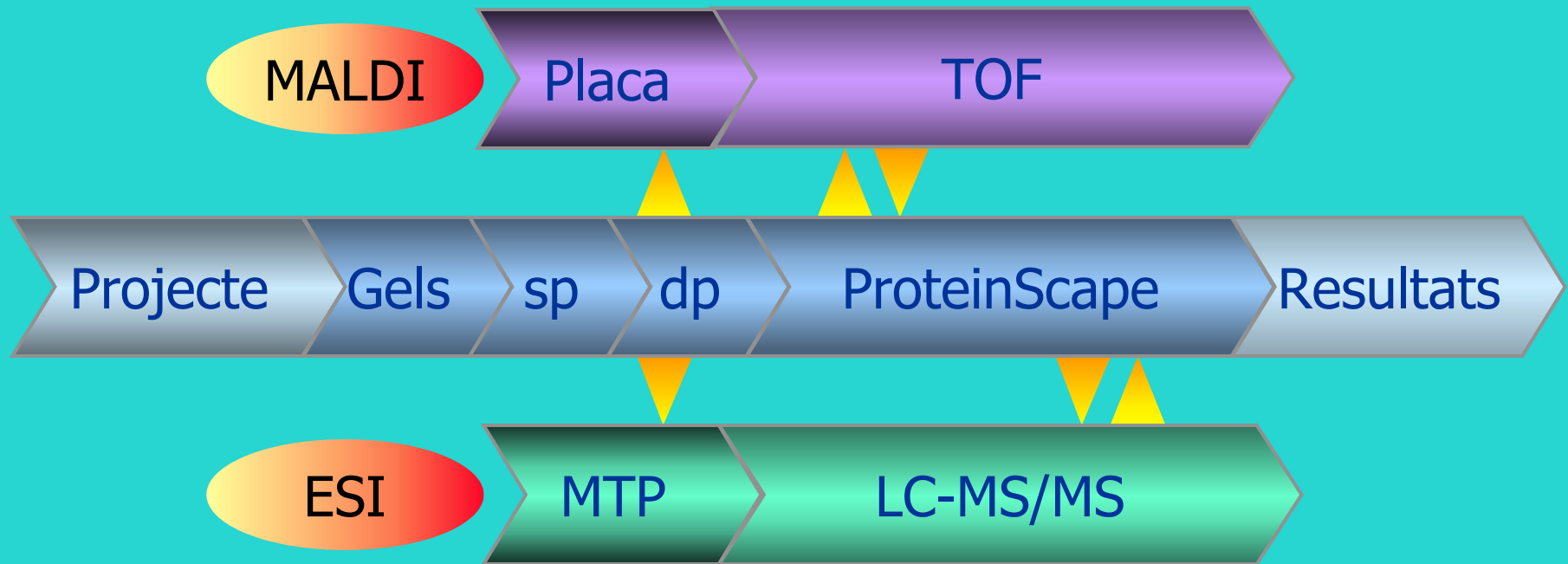


nHPLC-ESI-IT MS/MS

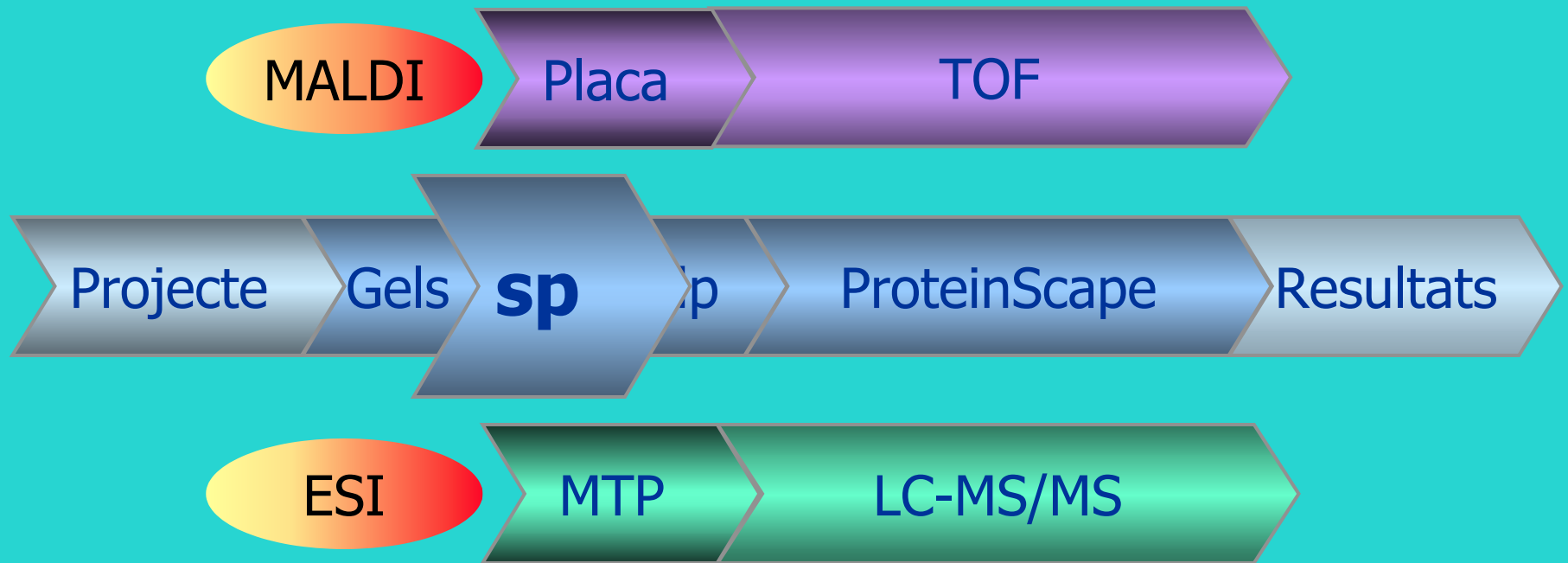


MALDI-TOF

PROTEINEER

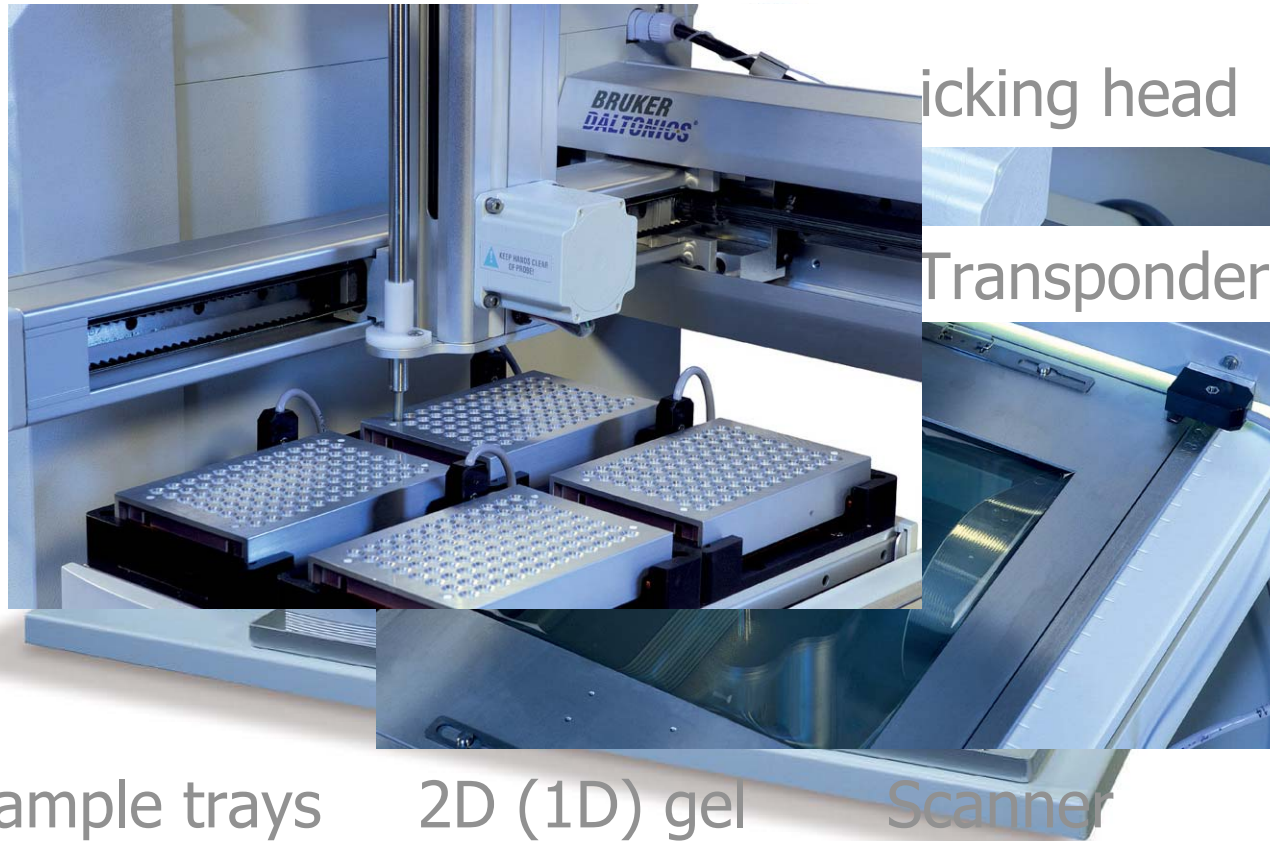


PROTEINEER sp



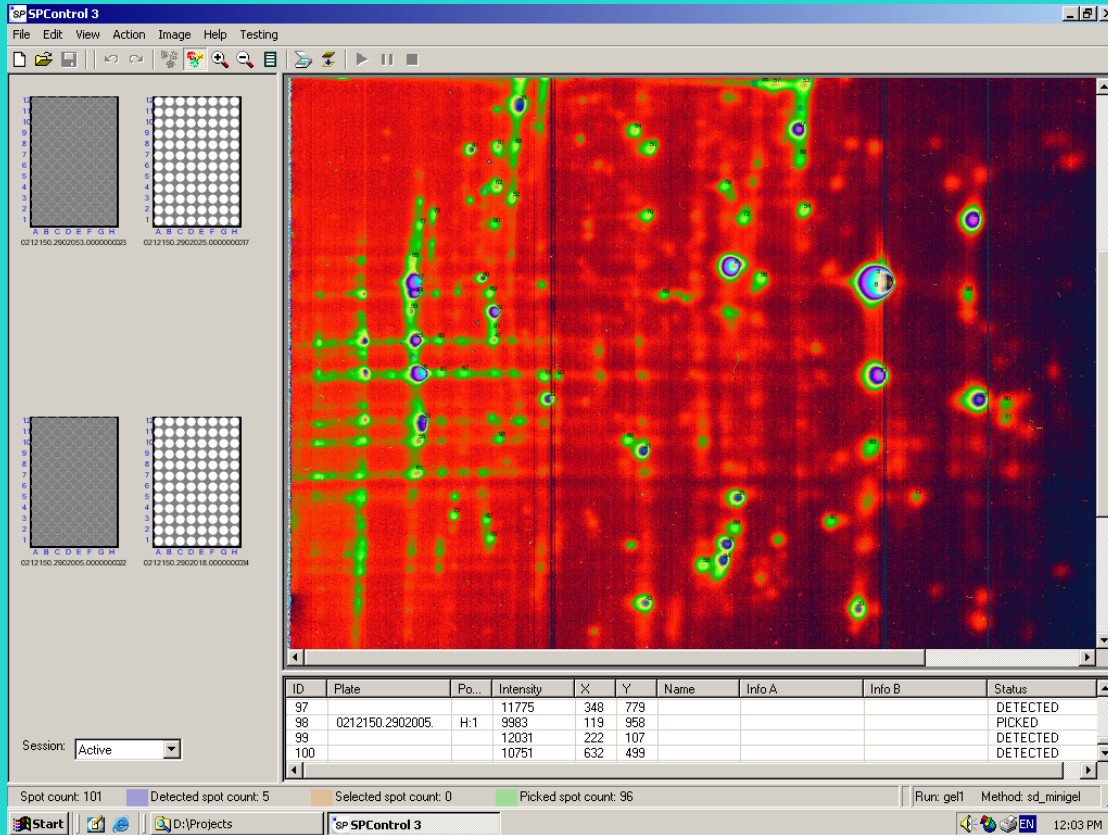
SpotPicker *PROTEINEER* sp

PROTEINEER sp



Tractament de la imatge del gel i posicionament de les taques

Programa SPControl 3.0 de Bruker per a la detecció de taques i control del hardware via software



Tractament de la imatge del gel

Compatible amb software d'anàlisi i tractament d'imatge:

Melanie IV

Delta2D

Phoretix

ProteomeWeaver

PDQuest

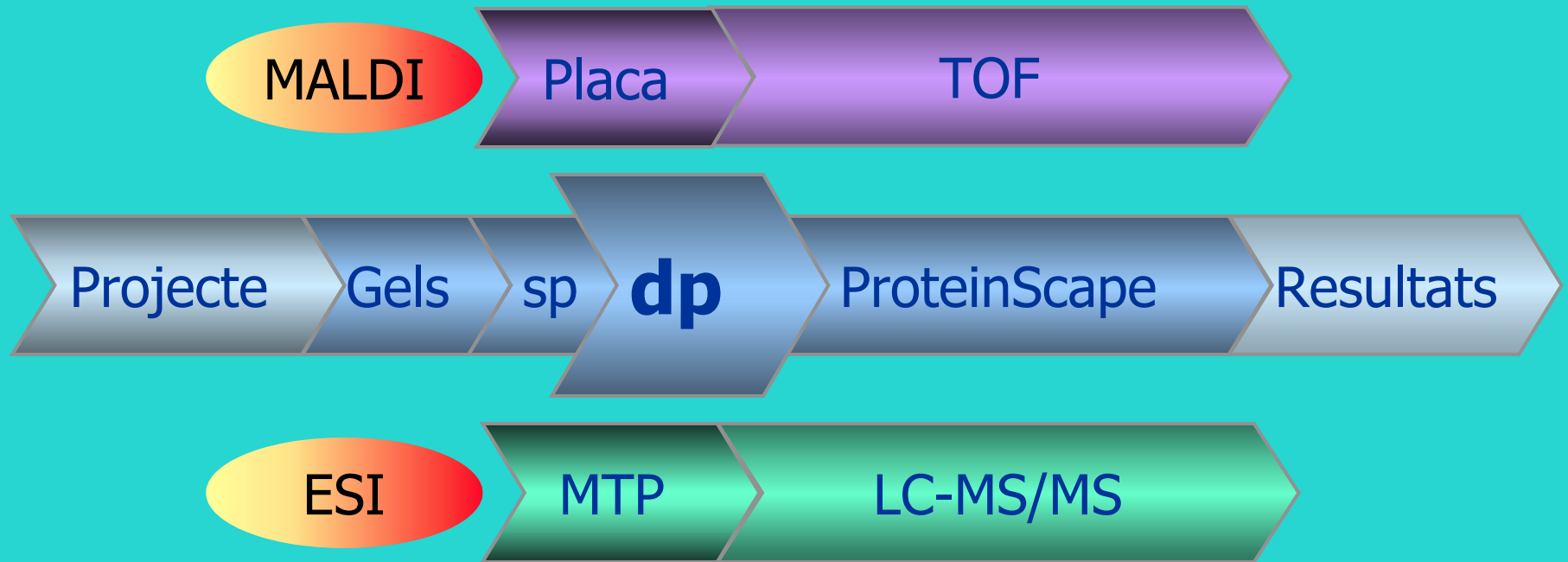
Compatible amb scanners de fluorescència:

Fuji FLA 3000

APB Typhoon

- 12 sec/taca
- 99.6-99.8 % èxit en diferents gels
- Tractament de la imatge del gel i tallat de les taques
- Interface xml per a software extern de tractament de gels (e.g. Melanie, Phoretix)
- compatible amb scanners externs (fluorescència)
- Resolució de tall (gridding capability): D1.5 mm

PROTEINEER dp



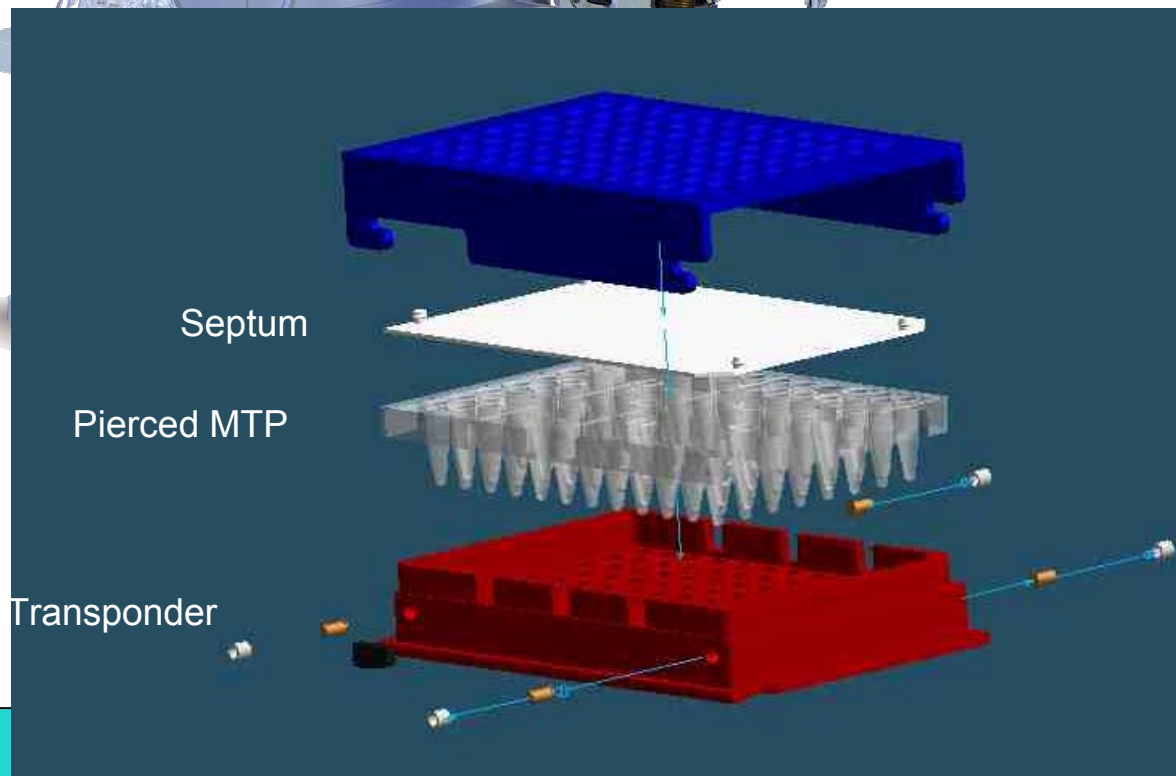
Estació de digestió i preparació de la mostra

PROTEINEER dp

- Sensibilitat fins 200 fmol
- Purificació per μ columna N2
- 80 % reserva de mostra per ESI
- Fins 3*384 mostres/dia

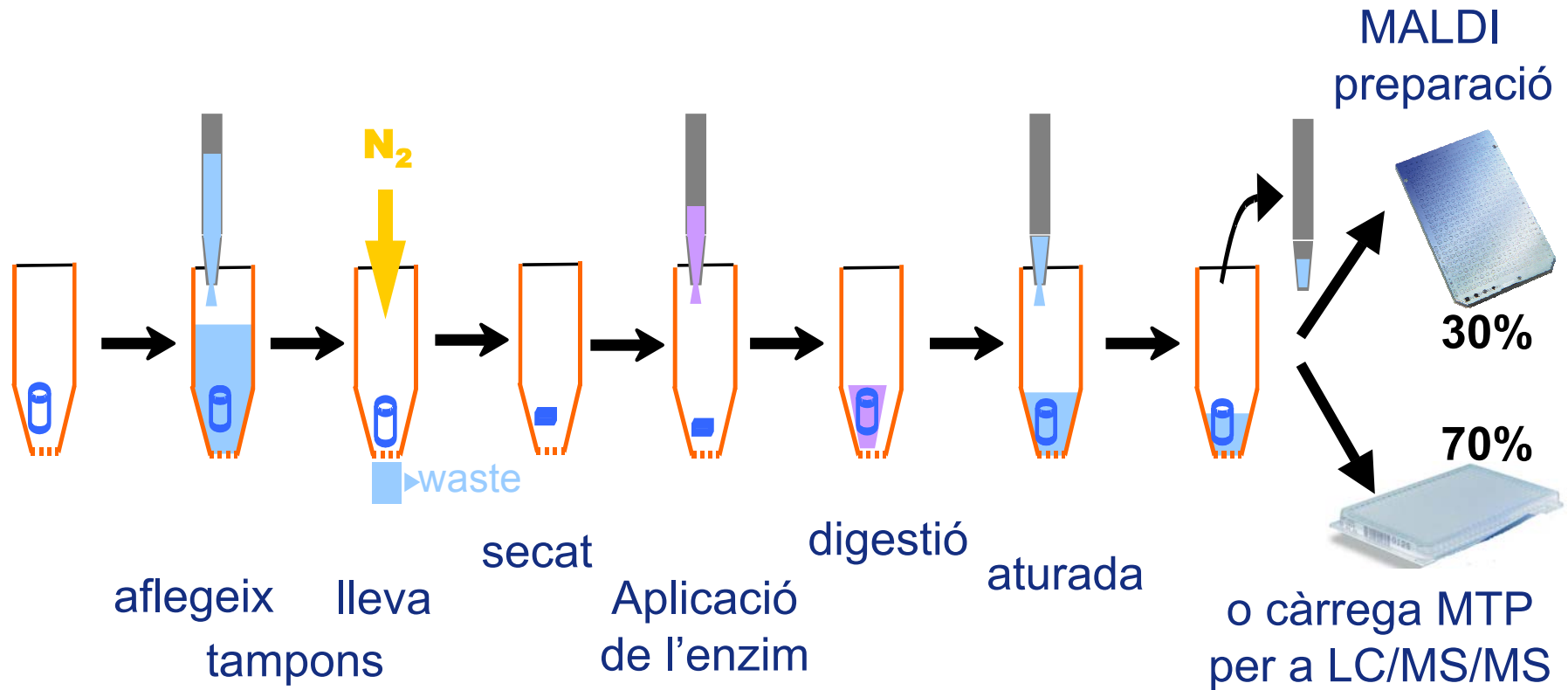
Preparacions de mostra:

- AnchorChip
- Gota seca
- “Capafina”
- purificació amb ZipTip



Esquema de l'estació de digestió i preparació

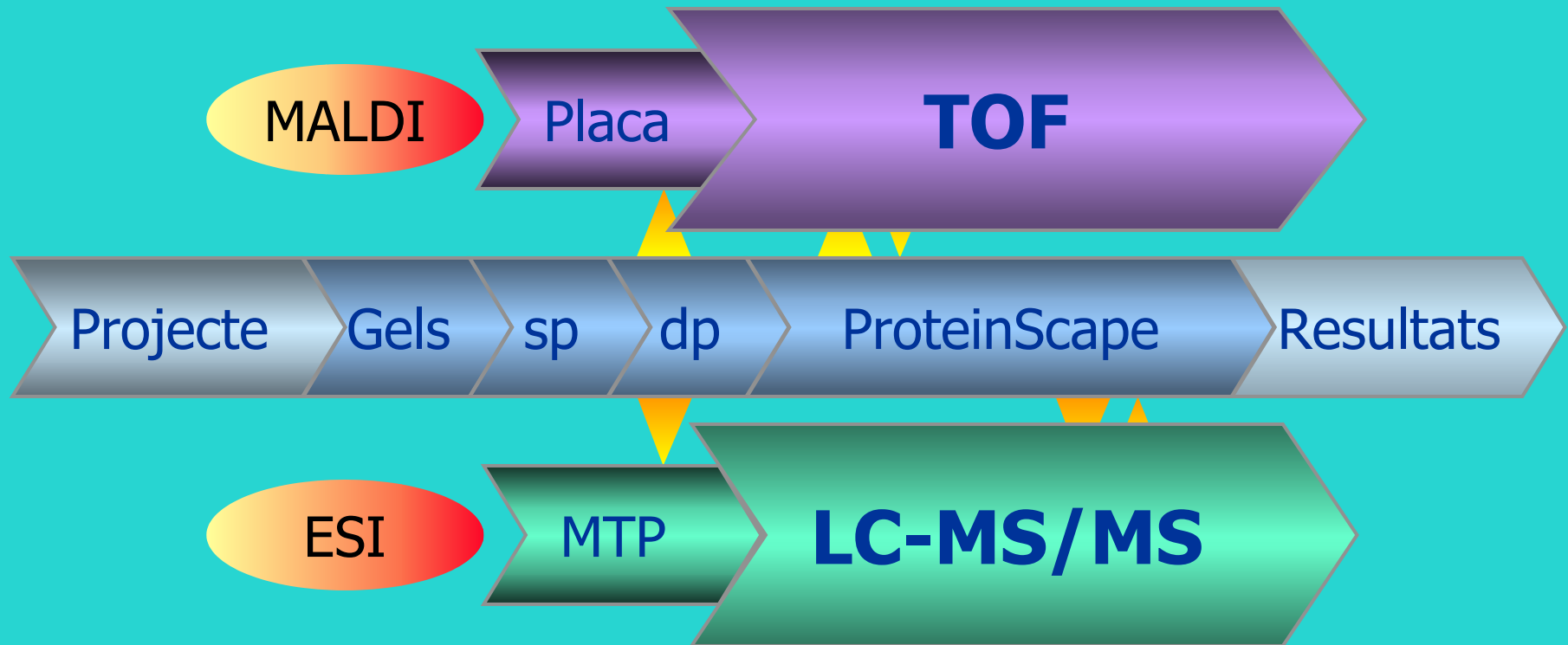
PROTEINEER dp



Opcions d'operació:

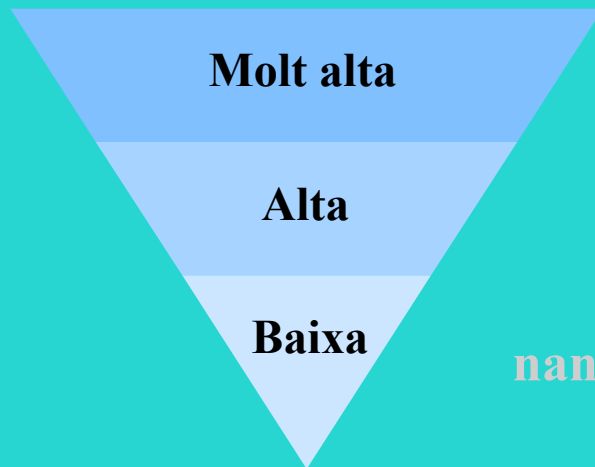
- **Reduició i alquilació**
- **Eliminació de sals (Coomassie i plata)**
- **Digestió**
- **Preparació de la mostra (amb o sense ZipTip, “capafina”, gota seca)**
- **Sense pèrdues de mostra per operacions de transvasaments**

PROTEINEER – Espectrometria de Masses



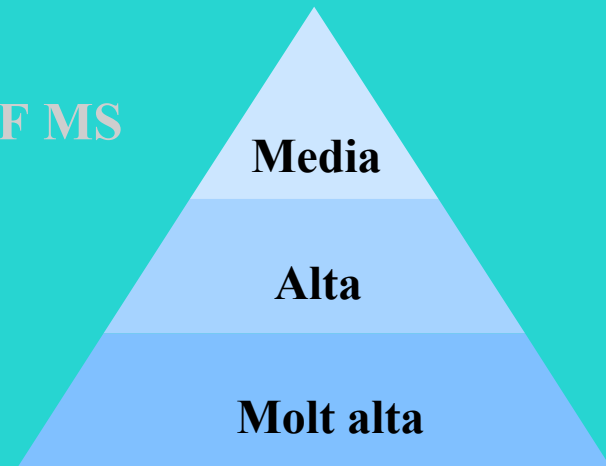
Quan MALDI i quan ESI ?

Concentració de mostra



MALDI-TOF MS

nanoLC-MS/MS



Informació

Reflex IV– MALDI-TOF-MS



Característiques del Reflex IV

- Tecnologia AnchorChip
- Identificació automàtica de placa
- Capacitat de processat automàtic (AutoXecute)
- Capacitat d'anàlisi de fragmentació (FAST) via PSD
- Sensibilitat: 10 fmol amb $S/N \geq 10$ (ACTH 18-39)
- Rang de masses en mode linear: detecta el dímer de BSA

Característiques del Reflex IV

- Resolució en mode linear: ≥ 5000 (ACTH 18-39)
 ≥ 1100 (Cytocrome C)
en mode reflector: > 20000 (Somatostatina 28)
- Exactitud de Massa
 - en mode linear:
 - amb calibració intern $\leq 50\text{ppm}$ (rang 1296'7-1450'0)
 $\leq 100\text{ppm}$ (rang 8565-16952)
 - amb calibració externa $\leq 200\text{ppm}$ (rang 1296'7-1450'0)
 $\leq 200\text{ppm}$ (rang 8565-16952)
 - en mode reflector:
 - amb calibració interna $\leq 10\text{ppm}$ (rang 1296'7-1450'0)
 $\leq 50\text{ppm}$ (rang 8565-16952)
 - amb calibració externa $\leq 50\text{ppm}$ (rang 1296'7-1450'0)
 $\leq 200\text{ppm}$ (rang 8565-16952)

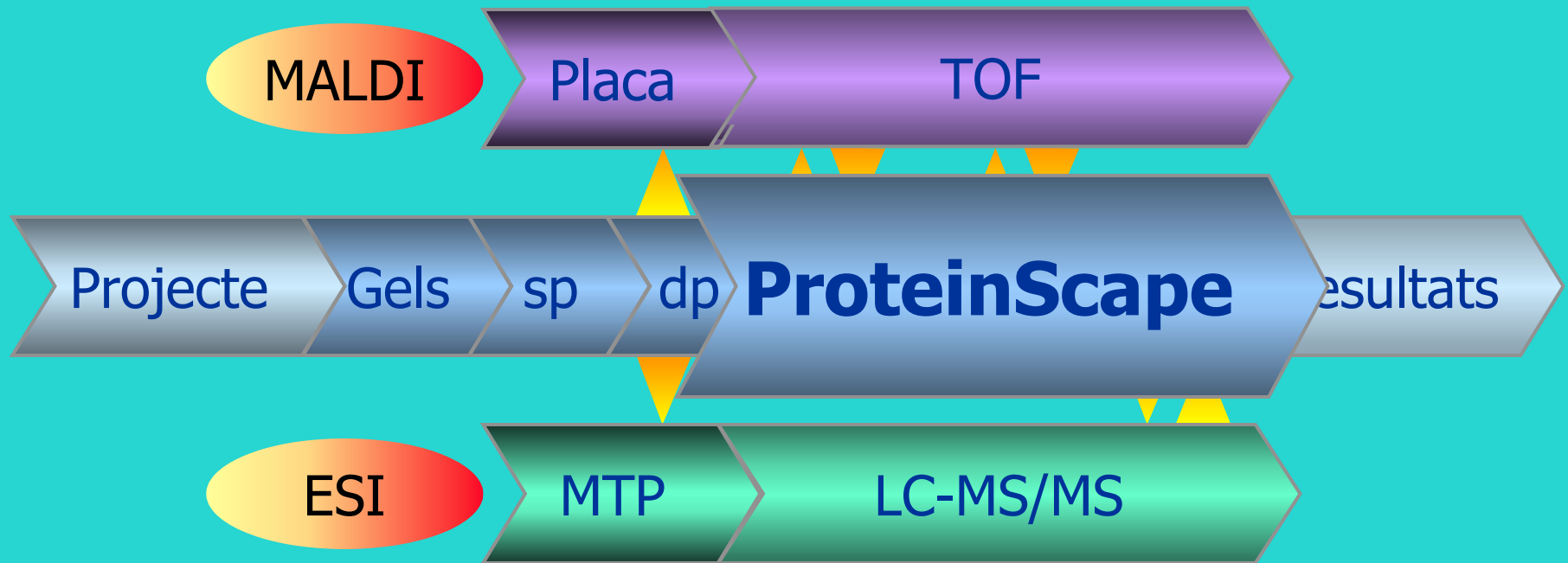
LC-MS/MS: Esquire 3000 plus (trampa d'ions d'alta capacitat) acoblat a un sistema de nHPLC



Característiques del Esquire 3000 plus

- Rang de masses estandar 50-3000 m/z
Mode resolució estandar 2+ ions a 13.000 u/sec
Mode resolució màxima 3+ I 4+ ions a 1650 u/sec
- Rang de masses ampliat 200-6000 m/z a 27.000 u/sec
- Mode Escan:
Escan total MS, MRM i MSⁿ fins n=11
Auto MSⁿ : amb selecció de l'io precursor
- Trampa d'alta capacitat amb S/N millor que 50:1 per a 1 pg Reserpine en MS/MS
- Operable amb nanoLC, 2D-nanoLC, CE i AP-MALDI o
- Compatible amb diferents sistemes d'HPLC

PROTEINEER - ProteinScape



fully web-based data
warehousing and
retrieval software

Recerques en BD altament configurables

Search-Parameters -- Web Page Dialog

Search Parameter Configuration (PMF)

Select Search Method: HUPO

Search method parameters

PMF method name: HUPO

Search Engines:

☒ Mascot
☐ MS-Fit
☒ ProFound

Report top proteins

Search parameters

Fixed modifications

Oxidation (M)
Acrylamide (C)
Iodoacetamide (C)
Iodoacetic acid (C)
4-vinyl-pyridine (C)

Variable modification

Oxidation (M)
Acrylamide (C)
Iodoacetamide (C)
Iodoacetic acid (C)
4-vinyl-pyridine (C)

Cleavage enzyme: Trypsin

Max missed cleavages:

Protonation state: MH+

Mass tolerance: mono: ppm
avg:

MALDI PFF Acquisition -- Web Page Dialog

MALDI PFF Acquisition Configuration

Select MALDI PFF Acquisition Method: Identify

MALDI PFF Acquisition parameters

MALDI PFF Acquisition method name: Identify

☒ **Identification Strategy**

If no protein is identified then suggest masses for PFF Acquisition.

☐ **Further Elucidation Strategy**

If a protein is identified but only if the coverage is below %, then suggest masses **not** assigned to that protein for PFF acquisition.

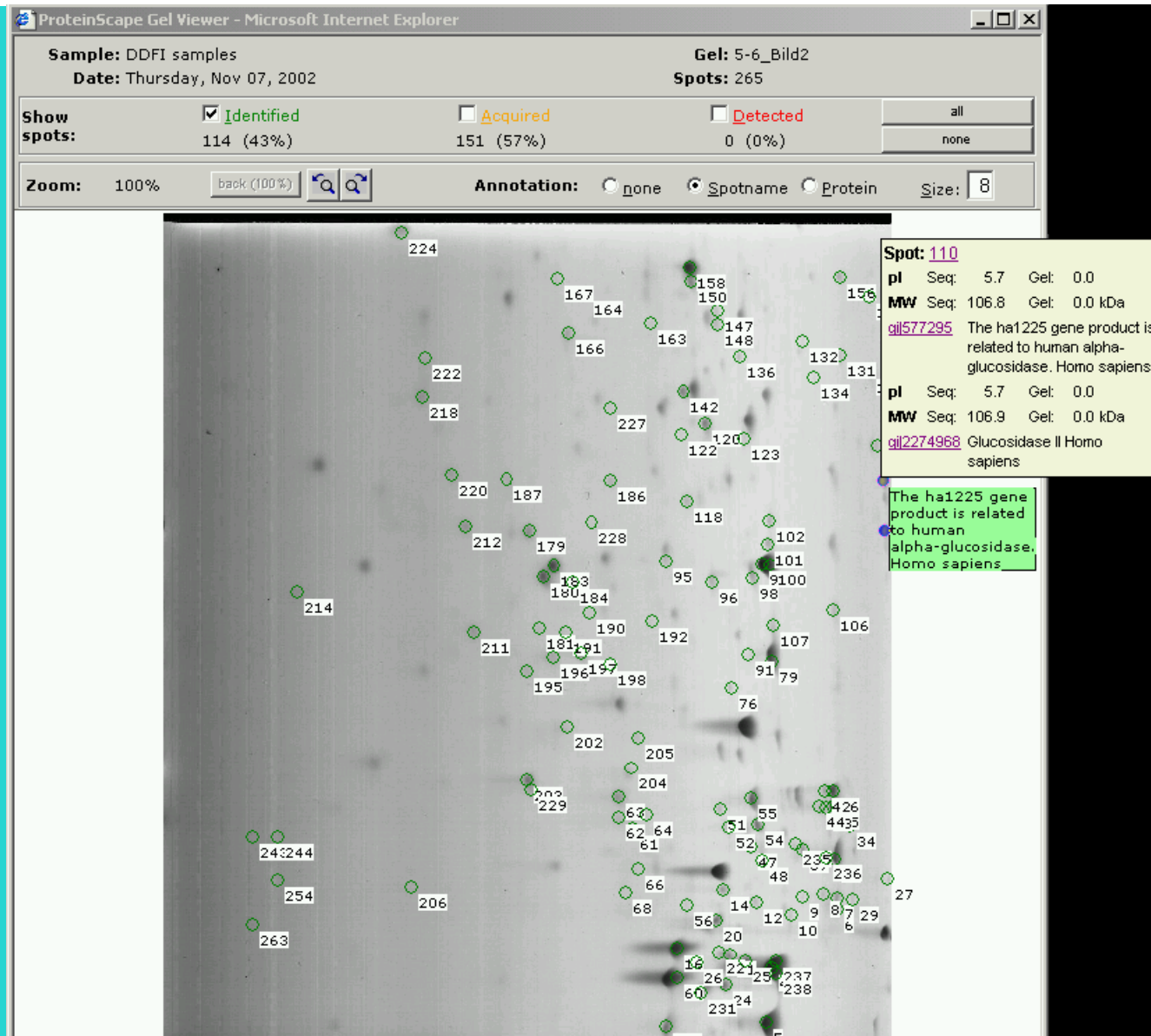
☐ **Verification Strategy**

If a protein is identified then suggest masses assigned to that protein for PFF Acquisition.

Use only masses with 'Goodness for MS/MS' value better than .

i avançades estratègies de recerca

Magatzematge dels resultats en ProteinScape...



Amb accés a la Base de Dades...

... via imatge del gel

The image displays a web-based protein identification workflow. On the left, the 'ProteinScape Gel View' window shows a 2D gel electrophoresis image. A red arrow points from a specific spot (Spot: 10) in the gel to a search query in the 'Library Select Page' window. The search results show various database entries, including MEDLINE, EMBL, and SWISS-PROT.

ProteinScape Gel View - Microsoft Internet Explorer

Sample: Mouse Brain: Cerebral Cortex
Date: Tuesday, Jan 08, 2002
Gel: Cerebral Cort
Spots: 17

Show spots: ☒ Identified 17 (100%) ☐ Acquired 0 (0%) ☐ Detected 0 (0%)

Zoom: 428% back [10] Label: ☐ none ☐ Spotna

Spot: 10
Gel-plt: 5.70
Gel-MW: 30000.00
Proteins:
gil109571
precursor = mouse

Library Select Page - Microsoft Internet Explorer

Address: <http://srs.ebi.ac.uk/srs6bin/cgi-bin/wgetz>

TOP PAGE QUERY RESULTS PROJECTS VIEWS DATABANKS HELP

Reset Quick Search: 418694 All Entries

show all collapse all

Query forms
Standard
Extended

bookmark this link to return to your session

Protein Seq & DNA/RNA Seq

If you find problems or have suggestions please mail the SRS administrator

References
☒ MEDLINE ☐ GO ☐ GOA
References - subsections
☐ MEDLINE (Main Release) ☐ MEDLINE (Updates)

Sequence libraries
☐ EMBL ☐ SWALL (SPTR) ☐ IPI ☒ RemTEmBL ☐ ENSEMBL
☐ PATENT PRT ☐ JPO_PRT ☐ PATENT DNA ☐ USPO_PRT ☐ IMG/THLA
☐ IMG/THLA
Sequence libraries - subsections
☐ EMBL (Release) ☐ EMBL (Updates) ☒ SWISS-PROT ☐ SpTEmBL
☐ TEmBL (Updates)

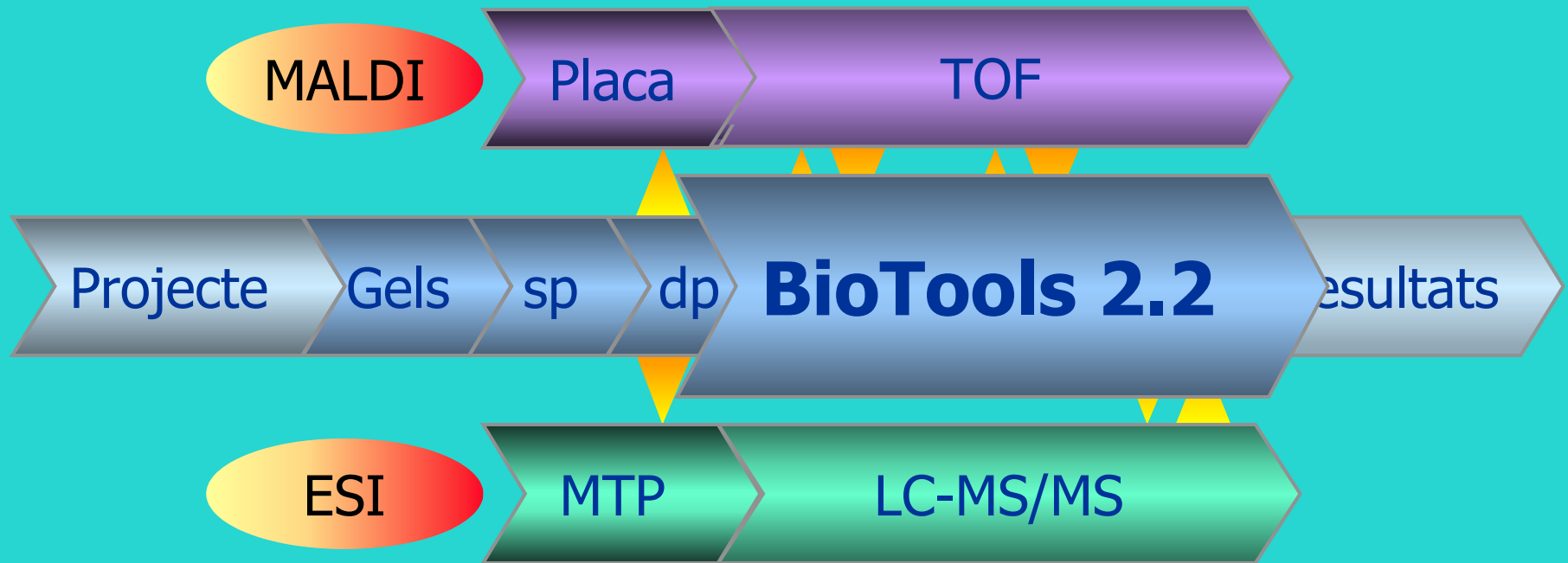
InterPro&Related
☒ SeqRelated
☒ TransFac
☒ User Owned Databanks
☒ Application Results
☒ Protein3DStruct
☐ RESID

Genome
☒ Mutations
☒ Locus Specific Mutations
☒ SNP
☒ Mapping
☒ Metabolic Pathways
☒ Others
☒ EMBOSS DOCS

...links a altres bases de dades

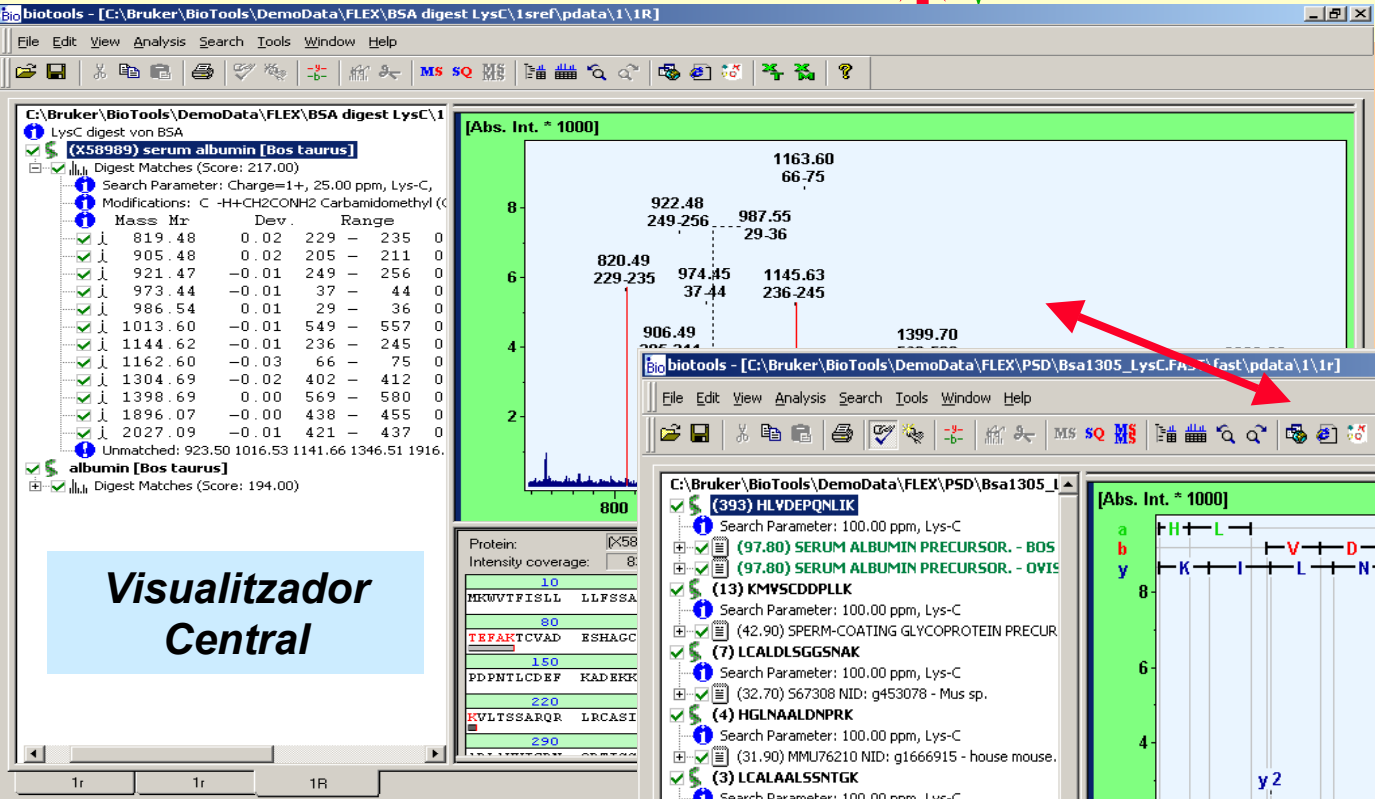
...així com d'estructures relacionades

PROTEINEER - BioTools



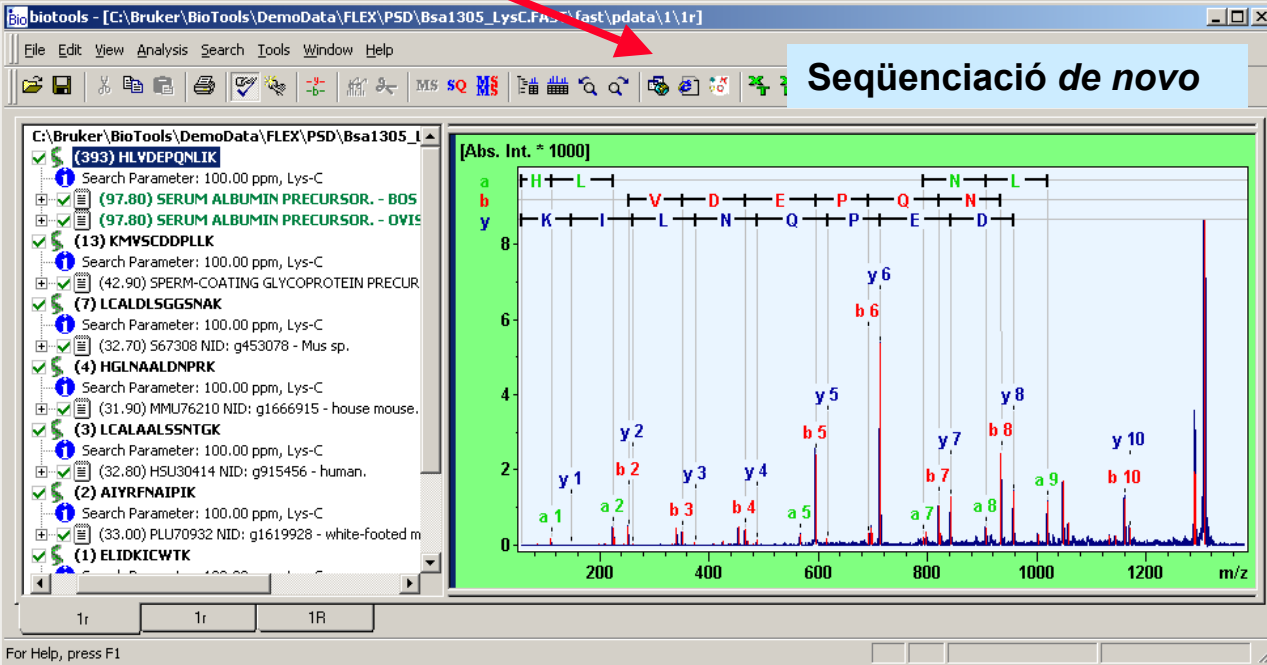
BioTools: Anàlisi de Proteïnes Automatic i Interactiu

Cercadors



Visualitzador Central

Seqüenciació de novo



Laboratori de Proteòmica

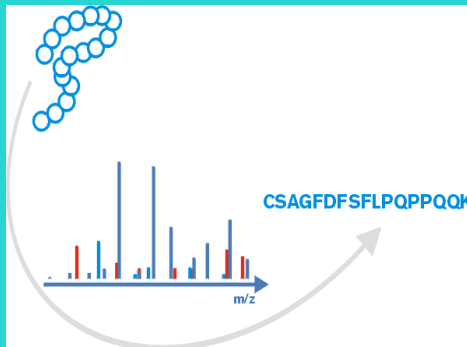
(scsie.proteomica@uv.es)

Digestió i Preparació - dp

Gels 2D “Escaneig” i tallat de gels - sp



Bioinformàtica



nHPLC-ESI-IT MS/MS



MALDI-TOF