Studenta vārds/uzvārds\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

**Proteīnu identifikācija ar triptisko peptīdu MALDI-TOF masspektrometriju**

Lai identificētu proteīnu pēc to triptisko peptīdu masām, nepieciešams veikt sekojošas operācijas:

1. Izdzīt analizējamo paraugu elektroforēzē denaturējošajā akrilamīda gēlā
2. Izgriezt identificējamo zonu un veikt tās priekšapstrādi, lai atbrīvotos no krāsvielas un citiem piemaisījumiem
3. Veikt zonas apstrādi ar tripsīnu
4. Iegūto peptīdu maisījumu analizēt masspektrometrā
5. Iegūtās masas salīdzināt ar datubāzi

1.-3. soļa īstenošana aizņem aptuveni 6-8 stundas, tādēļ studentiem tiks izsniegts jau gatavs triptisko peptīdu šķīdums. Tomēr, informatīvos nolūkos, darba gaita ir parādīta visam procesam (izņemot elektroforēzi). Studenti darbu uzsāk no 9. Soļa.

**Zonas izgriešana un priekšapstrāde:**

 

izgrieztā zona

1. No ar coomasie zilo krāsota denaturējošā akrilamīda gēla ar skalpeli izgriež analizējamo zonu, sadala to aptuveni 1x1x1 mm kubiciņos un ievieto 1.5 ml mikromēģenē
2. Gelam pievieno 500 l šķīduma, kurš satur 50% acetonitrilu un 0.2M amonija hidrogēnkarbonātu
3. Inkubē pie 30 grādiem 1 stundu, šķīdumu nosūc
4. Atkārto 2. un 3. soļus vēl vienu reizi. Šajā laikā no gēla izskalojas krāsviela un citi piemaisījumi
5. Gela gabaliņiem pievieno 500 l tīra acetonitrila, inkubē 20 minūtes istabas temperatūrā. Acetonitrils uzsūc ūdeni, tādejādi, dehidratācijas rezultātā gela gabaliņi sarūk izmēros un kļūst balti
6. Nosūc pēc iespējas visu acetonitrilu

**Zonas apstrāde ar tripsīnu:**

1. Gelam pievieno 30 l tripsīna šķīduma. Dehidratētais gels uzsūc tripsīna šķīdumu, rezultātā tripsīns iekļūst gēlā un sāk šķelt tur esošo proteīnu
2. Gelu 3 stundas inkubē pie 30 grādiem. Šajā laikā notiek proteīna šķelšana, kā arī atšķeltie peptīdi difundē ārā no gēla

**Parauga analīze masspektrometrā**

1. 1.5 ml mikromēģenē sajauc 1l parauga, 1l 2% trifluoretiķskābi un 1l matriksa šķīduma ( 15 mg/ml DHAP (dihidroksiacetofenons), 75% etanolā un amonija citrātā). Matriksu pievienot pēdējo!
2. 1 l iegūtā maisījuma uznes uz masspektrometra platītes, ļauj maisījumam nožūt
3. Plati ievieto masspektrometrā un veic analīzi pēc darba vadītāja norādījumiem

**Mājas uzdevums: proteīna identifikācija**

Iegūtos rezultātus (grozā...) izanalizē ar Mascot tīmekļa resursa palīdzību <http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF>

* Jāievada vārds, uzvārds un reāla e-pasta adrese - citādi programma neiet...
* “Query” lauciņā saraksta eksperimentālās masas, vienu zem otras (pirmā kolonna grozā esošajā excel tabulā)
* Molekulsvara kļūdu (Peptide tolerance) var izvēlēties 4Da
* Lai vienkāršotu meklējumu, „Taxonomy” lodziņā var izvēlēties „Homo sapiens” (jo tas ir cilvēka izcelsmes proteīns)
* Pārējos lodziņus var atstāt nemainītus
* **Laboratorijas darba protokolam pievienot MS rezultāta izdruku, Mascot rezultāta izdruku un atbildes uz kontroljautājumiem!**

Kontroljautājumi:

1. Kāds proteīns ir identificēts?
2. Vai identifikācija ir pietiekoši ticama? Kas par to liecina? (Uzmanīgi izlasīt, kas rakstīts rezultāta lapā!)
3. Vai identificētā proteīna molekulmasa atbilst elektroforēzē novērotajai?
4. Kāds ir identificēto peptīdu sekvenču pārklājums proteīnā (%)?
5. Cik peptīdi tika identificēti?
6. Kādi varētu būt iemesli tam, ka nav identificēti visi iespējamie proteīna peptīdi?
7. No kurienes masas spektrā varētu būt radušies pīķi, kuri neatbilst nevienam identificētā proteīna peptīdam?