

IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA “TOP DOWN” PARA
IDENTIFICAR PROTEÍNAS INTACTAS MEDIANTE
ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF Y DECAIMIENTO EN
LA FUENTE (MALDI-ISD)

LUCÍA CRISTINA NOVOA GUARACAO

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2013

IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA “TOP DOWN” PARA
IDENTIFICAR PROTEÍNAS INTACTAS MEDIANTE
ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF Y DECAIMIENTO EN
LA FUENTE (MALDI-ISD)

LUCÍA CRISTINA NOVOA GUARACAO

Trabajo de grado para optar al título de:

Químico

Director:

ENRIQUE MEJÍA OSPINO

Químico, Ph.D.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2013

*A mi inspiración y fortaleza
Quien, con su amor me mantuvo de pie en cada batalla
y me ayudó a llegar hasta el final de esta etapa
Sin quien nada soy y nada puedo hacer
Mi Dios, mi fiel amigo y máximo amor
Jesucristo*

*A quienes con amor y paciencia han esperado tanto este momento
Jorge H y Elsa E, mis padres*

*A ti, que siempre creíste en mí
Y me animabas inspirándome con ideas innovadoras
Tía Luz, te extraño*

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, especialmente a mis padres Jorge y Elsa, por su esfuerzo, paciencia, comprensión y apoyo que se traduce en amor.

Al profesor Enrique Mejía, por su dirección y acompañamiento durante el desarrollo de este proyecto.

Al Laboratorio de Espectroscopia Atómica y Molecular LEAM y su director Rafael Cabanzo por permitirme ser parte del grupo de investigación y llevar a cabo este proyecto.

A mi *Piki*, por soportarme y ayudarme siempre.

A mis compañeras y amigas de laboratorio, por hacer ciencia conmigo y compartir su experiencia y conocimiento.

A Fany, por sus sabios y prácticos consejos.

A Dennise, por motivarme y ayudarme a recordar mis sueños.

A Pilita, por esperarme para llegar juntas a esta etapa.

A todos aquellos que se alegran y comparten este triunfo conmigo y de alguna manera fueron un apoyo en algún momento, familiares, amigos y compañeros...

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	13
1 MARCO TEÓRICO	15
1.1 MALDI-TOF	15
1.2 MALDI- ISD	18
1.3 IDENTIFICACIÓN	19
1.3.1 Herramientas bioinformáticas	20
2 SECCIÓN EXPERIMENTAL	22
2.1 PRUEBAS PRELIMINARES	23
2.1.1 Selección del método de preparación de muestras	23
2.1.2 Selección de parámetros de adquisición	24
2.2 PREPARACIÓN DE MUESTRAS	25
2.3 TOMA DE ESPECTROS Y PROCESAMIENTO DE DATOS	25
2.3.1 Equipo	25
2.3.2 Adquisición	26
2.3.3 Procesamiento en flexAnalysis	27
2.3.4 Procesamiento en BioTools	29
2.4 IDENTIFICACIÓN	32
3 RESULTADOS Y ANÁLISIS	35
3.1 PRUEBAS PRELIMINARES	35
3.2 PREPARACIÓN DE MUESTRAS	46
3.3 TOMA DE ESPECTROS Y PROCESAMIENTO DE DATOS	46
3.4 IDENTIFICACIÓN	48
4 CONCLUSIONES	53
5 RECOMENDACIONES	54
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	55
BIBLIOGRAFÍA	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Proceso de ionización MALDI	16
Figura 2.	Imagen de un analizador TOF lineal	17
Figura 3.	Nomenclatura de iones fragmento observados en ISD	18
Figura 4.	Esquema general de la metodología TOP DOWN	22
Figura 5.	Parámetros de adquisición del espectrómetro	26
Figura 6.	Parámetros de adquisición del detector	26
Figura 7.	Parámetros del espectrómetro	27
Figura 8.	Ventana para la selección de parámetros de procesamiento de espectros o métodos automáticos en flexAnalysis	29
Figura 9.	Registro de un espectro tipo ISD en BioTools	29
Figura 10.	Selección de iones	30
Figura 11.	Selección de la región espectral para búsqueda en MASCOT	31
Figura 12.	Lista de picos seleccionados para enviar a MASCOT como iones precursores	32
Figura 13.	Ventana de selección de parámetros para una búsqueda tipo TDS en MASCOT	33
Figura 14.	Espectros ISD de BSA preparado con los diferentes protocolos. De arriba hacia abajo: a) P1, b) P2, c) P3, d) P4 y e) P5	36
Figura 15.	Imágenes de la visualización de los spots preparados con los diferentes protocolos	39
Figura 16.	Espectros ISD de BSA variando la fluencia del láser. a)40%, b)50%, c) 60% y d) 70%	41
Figura 17.	Ampliación de los espectros ISD de BSA en el rango de masas entre 3300- 4000 Da, tomados a diferentes fluencias, mostrando la identificación de (PEG) en la muestra. a)BSA preparado según P2 a 50%, b) BSA preparado según P2 a 60%, c) BSA preparado según P2 a 70% y d)BSA preparado según P1 a 80%	43

Figura 18.	Ampliación de los espectros ISD de BSA en el rango de masas entre 3860- 3930 Da, variando la fluencia del láser. a) 40%, b) 50%, c) 60% y d) 70%	45
Figura 19.	Spots del patrón y del CC preparados según el Protocolo 2	46
Figura 20.	Espectro ISD de BSA tomado con los parámetros establecidos (fluencia a 60%) y procesado siguiendo los pasos descritos en la sección 2.3.3	47
Figura 21.	Espectro ISD de CC tomado con los parámetros establecidos (fluencia a 60%) y procesado siguiendo los pasos descritos en la sección 2.3.3	48
Figura 22.	Reporte de resultados de búsqueda de MASCOT para el patrón (BSA)	49
Figura 23.	Reporte de resultados de la búsqueda en MASCOT para CC	52

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Programas de identificación de proteínas disponibles en la red

21

Tabla 2. Especificaciones del equipo

25

RESÚMEN

TÍTULO:IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA “TOP DOWN” PARA IDENTIFICAR PROTEÍNAS INTACTAS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF Y DECAIMIENTO EN LA FUENTE (MALDI-ISD)*

AUTOR:LUCIA CRISTINA NOVOA GUARACAO**

PALABRAS CLAVE:MALDI-ISD, TOP DOWN, MALDI, Espectrometría de Masas, Proteínas Intactas, Fragmentación, Decaimiento en la Fuente.

Con el fin de implementar la metodología TOP DOWN, para el análisis de proteínas intactas por medio de espectrometría de masas MALDI-ISD; se realizaron pruebas preliminares para establecer un protocolo óptimo de preparación de muestras. Utilizando albúmina sérica bobina (BSA) como patrón, se probaron dos matrices: ácido 2,5 dihidroxibenzóico (DHB) y ácido sinapínico (SA), las cuales se aplicaron con los métodos de preparación *drieddroplet* y *doublelayer*. Se observó que la matriz más adecuada para este tipo de análisis fue DHB, por su mayor efectividad para producir fragmentación en la estructura primaria de las proteínas, y se aplicó siguiendo el método de preparación *drieddroplet*. También se observó que el método de preparación, así como la matriz, son de gran importancia en este tipo de análisis, pues tienen un marcado efecto sobre la aparición de las señales ISD y en la resolución de las mismas; factores de gran importancia para la identificación de la proteína en estudio.

Por medio de un análisis espectral, para establecer los parámetros instrumentales más adecuados, se pudo establecer como fluencia óptima para este estudio un valor del 60% de la fluencia total del laser. Además se observó una relación directamente proporcional entre este parámetro y la cantidad de señales, la intensidad, la relación señal/ruido (S/R) y la resolución de las mismas.

Finalmente, se establecieron los pasos, desde preparación de muestras hasta identificación, para analizar proteínas intactas por espectrometría de masas MALDI-ISD.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Enrique Mejía Ospino, PhD.

ABSTRACT

TITLE:IMPLEMENTATION OF A "TOP DOWN" METHODOLOGY TO IDENTIFY INTACT PROTEINS BY MASS SPECTROMETRY MALDI-TOF AND IN SOURCE DECAY (MALDI-ISD)*

AUTHOR:LUCIA CRISTINA NOVOA GUARACAO**

KEYWORDS:MALDI-ISD, TOP DOWN, MALDI, Mass Spectrometry, Intact Proteins, Fragmentation, In Source Decay.

With the objective of implementing the top-down methodology for the analysis of intact proteins by MALDI-ISD, preliminary tests were conducted in order to establish a protocol for optimal sample preparation. Using bovine serum albumin (BSA) as a standard, two matrices, 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) and sinapinic acid (SA), were tested while applied with the double layer and dried droplet preparation methods. It was observed that the more suitable matrix for this type of analysis was DHB due to greater effectiveness in producing fragmentation in the primary structure of proteins. DHB was applied following the dried droplet preparation method. It was also observed that both the preparation method and the matrix are of great importance in this type of analysis since they have a marked effect on the appearance of the expected signals in the ISD spectra and its resolution. This is of great importance because the proper identification of the protein depends on the quality of the data.

Through spectral analysis, conducted in order to establish the most suitable instrumental parameters, it was established as optimal for this study yield a value of 60% of the total fluence of the laser. In addition a direct relationship was observed between this parameter and the number of signals, the intensity, the signal to noise ratio (S/N) and the resolution of same.

Finally the steps for the analysis of intact proteins by mass spectrometry, from sample preparation to identification, were established.

* Degree project

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Tutor: Enrique Mejía Ospino, PhD.

INTRODUCCIÓN

La espectrometría de masas (EM) utilizada en conjunto con una amplia variedad de métodos de separación es la principal metodología para la proteómica. Actualmente son empleados dos enfoques fundamentales para la identificación y caracterización de proteínas por espectrometría de masas en dichos estudios. El enfoque clásico "*bottom up*" y el novedoso enfoque "*top-down*".

En enfoques "*bottom up*" las proteínas purificadas, o mezclas complejas de proteínas, se someten a escisión proteolítica, y luego los productos peptídicos son analizados por EM.

Los métodos más comunes de enfoque clásico, *huella peptídica* y *etiquetado de secuencia*, aunque han sido ampliamente utilizados, no son muy eficientes pues son costosos y consumen mucho tiempo en digestión, etapa de cromatografía líquida y etapa de desalinización. Otro inconveniente que presentan es que la información N- (o C-) terminal a menudo es incompleta y las modificaciones post-traduccionales (PTMs, post translational modifications) difícilmente se pueden observar⁽¹⁾.

Contrario al enfoque clásico, en el enfoque "*top-down*", las proteínas intactas, es decir, sin digestión previa, son directamente analizadas por EM, lo cual es ventajoso ya que evita, en buena parte, la manipulación de la muestra y su modificación por métodos químicos o bioquímicos.

Esta metodología es exclusiva para el método de ionización MALDI, siendo el único que produce fragmentación en la fuente, debido a la excitación excesiva del analito. Este fenómeno es conocido como *decaimiento en la fuente* (ISD, In Source Decay).

En contraste con los métodos de secuenciación clásicos, MALDI-ISD puede ser utilizado para el análisis de proteínas con N-terminales modificados⁽¹⁾⁽²⁾.

Por otra parte, las crecientes mejoras en los instrumentos MALDI-TOF y en la preparación de la muestra, permiten la generación de espectros altamente resueltos alcanzando una precisión de hasta ~10 ppm y fragmentos de hasta 8 kDa resueltos monoisotópicamente. Adicionalmente, desarrollos de software y herramientas bioinformáticas, como motores de búsqueda, dedicados al análisis "*top-down*" están facilitando y acelerando la interpretación de datos para la identificación de proteínas, en este tipo de metodologías⁽³⁾.

Es por esto que la implementación de la metodología TOP DOWN en laboratorios de investigaciones biomédicas o bioquímicas, sería de gran utilidad ya que agilizaría los análisis de proteínas, que típicamente consumen mucho tiempo y son costosos, además de permitir un análisis más preciso de la secuencia de las proteínas y sus PTMs sin pérdida del grupo modificado⁽⁴⁾, superando así las limitaciones de los métodos clásicos anteriormente mencionados.

1 MARCO TEÓRICO

1.1 MALDI-TOF

MALDI se logra en dos pasos. En la primera etapa, el analito es co-cristalizado con un gran exceso molar de un compuesto matriz, por lo general un ácido orgánico débil pero con una fuerte absorción en la longitud de onda del láser. El resultado es un depósito de una "solución sólida" de cristales de matriz-analito dopados. Las moléculas de analito quedan embebidas en la matriz, de manera que están completamente aisladas una de otra⁽⁵⁾.

El segundo paso se produce en condiciones de vacío dentro de la fuente del espectrómetro de masas. Este paso implica la desorción láser de las porciones a granel de esta solución sólida por pulsos intensos de una corta duración. El mecanismo exacto del proceso de MALDI no se aclara completamente. Sin embargo, la irradiación con el láser induce un rápido calentamiento de los cristales por la acumulación de una gran cantidad de energía en la fase condensada a través de la excitación de las moléculas de la matriz. El rápido calentamiento provoca la sublimación localizada de los cristales de la matriz, la ablación de una porción de la superficie del cristal y la expansión de la matriz en la fase de gas, incorporando analito intacto en el penacho de la matriz en expansión⁽⁵⁾.

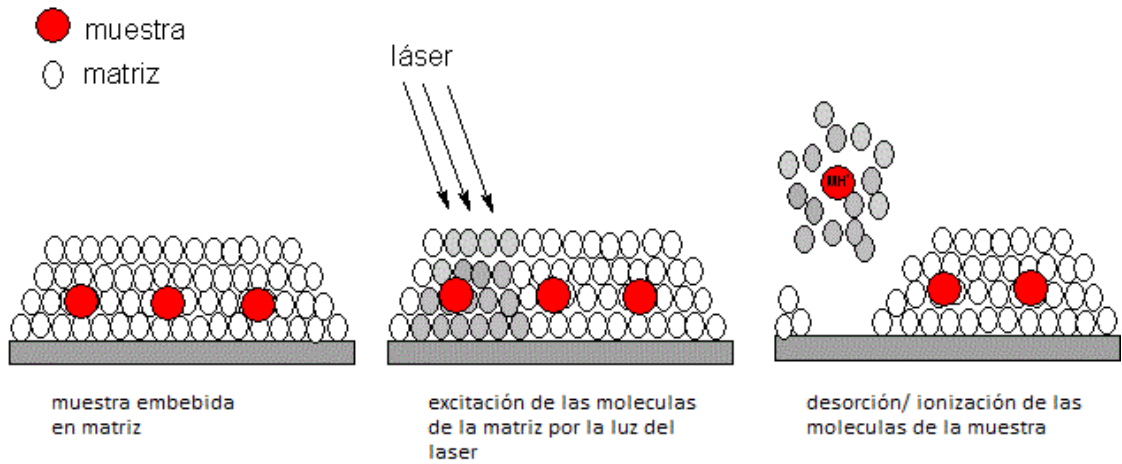


Figura 1. Proceso de ionización MALDI

Fuente: Daltonics, Bruker. MALDI-TOF/TOF Mass Spectrometry; An introduction

Las reacciones de ionización pueden ocurrir bajo condiciones de vacío en cualquier momento durante este proceso. Los mecanismos de formación de iones más ampliamente aceptados implican la transferencia de protones en la fase sólida antes de la desorción o la transferencia de protones en el penacho de expansión de la matriz en fase gaseosa⁽⁷⁾. Seguido de esto, los iones son expulsados de la fuente por una aplicación transitoria de los potenciales adecuados en los lentes de enfoque de la fuente. Estos iones son acelerados a continuación hacia el tubo de tiempo vuelo por una diferencia de potencial aplicado entre un electrodo y la rejilla de extracción. Como todos los iones adquieren la misma energía cinética, los iones que se caracterizan por una distribución de sus masas presentan una distribución de sus velocidades. Al salir de la región de aceleración, entran en una región libre de campo en la que se separan de acuerdo con sus velocidades, antes de alcanzar el detector colocado en el otro extremo del tubo de vuelo⁽⁸⁾.

Mediante la medición del tiempo que tardan los iones en llegar al detector, se determina la relación masa-carga (m/z) de cada ion. La relación del tiempo de vuelo de un ion con su masa está dada por la siguiente ecuación⁽⁸⁾:

$$(m/z)^{1/2} = \left(\frac{\sqrt{2eV_s}}{L} \right) t \quad \text{Ecuación 1}$$

La distancia L y la aceleración potencial V_s son constantes para un espectrómetro dado. Los términos entre paréntesis se pueden sustituir con la constante A . La relación entre $m^{1/2}$ y t es lineal. Se añade una constante B para producir una ecuación simple para una línea recta. Esta constante B permite la corrección del tiempo cero medido que puede no corresponder exactamente con el verdadero tiempo cero. En efecto, la calibración debe tener en cuenta otros efectos. El efecto más básico es la incertidumbre de la hora de inicio de un ion. Este efecto puede ser causado por retardos de tiempo finitos en los cables, etc. Por lo tanto, la *ecuación 1* queda de la siguiente manera⁽⁸⁾:

$$(m/z)^{1/2} = At + B \quad \text{Ecuación 2}$$

A continuación se ilustra un esquema de un espectrómetro de masas MALDI-TOF lineal.

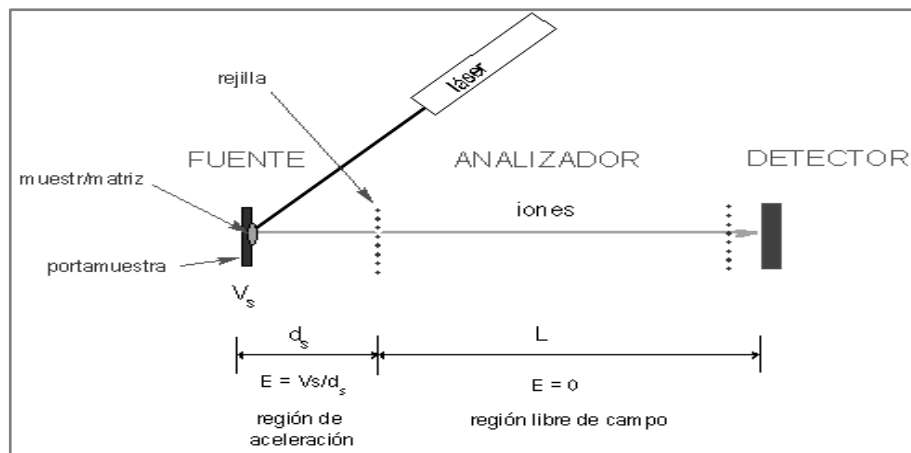


Figura 2. Imagen de un analizador TOF lineal⁽⁸⁾

Fuente: Mass spectrometry: principles and applications, p 127.

1.2 MALDI- ISD

ISD es un proceso de fragmentación rápido que ocurre en la escala de tiempo de nanosegundos^(9; 10), dentro de la fuente de iones, siguiendo rápidamente el disparo del láser⁽¹¹⁾. Esta formación tan rápida de iones ISD (o iones fragmento), es la característica que hace tan útil a esta técnica, pues los iones fragmento tienen la misma energía cinética que los iones de la proteína o del péptido original, en el punto de partida, antes de su separación en el analizador TOF. Como consecuencia de ello, los iones fragmento son enfocados y resueltos, y su separación dependiente del tiempo puede ser calibrada por la misma curva de calibración usada para los iones de la proteína o péptidos intactos⁽¹²⁾. Esta técnica de fragmentación es exclusiva para el método de ionización MALDI.

La fragmentación ocurre a mayores fluencias del láser que las utilizadas en los análisis MALDI clásicos. La fluencia se refiere a la energía aplicada por el pulso láser sobre la muestra (J/cm^2)⁽¹³⁾. Mayor fluencia del láser provee energía interna al analito que favorece la fragmentación del eje principal de la proteína⁽¹⁾.

En ISD, las proteínas se rompen principalmente en el enlace $N\text{-C}\alpha$ ^(1; 14; 12) del esqueleto del péptido, dando típicamente iones fragmento de tipo c_n , y_n y (z_n+2) ^(1; 14; 12), como se muestra en la figura 3.

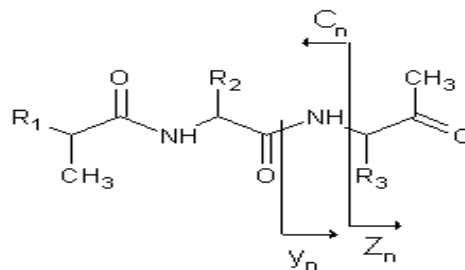


Figura 3. Nomenclatura de iones fragmento observados en ISD

Fuente: Mass spectrometry: principles and applications, p 313.

Según el modelo de Takayama, la formación específica de este tipo de iones en los espectros ISD surge de la transferencia de hidrógeno radical⁽⁷⁾ a partir de la matriz hacia el analito, induciendo así la fragmentación en la posición donde se produce la transferencia. Es por esto que la fragmentación ISD no muestra ninguna preferencia por enlaces lábiles y se produce de manera uniforme a lo largo de la secuencia de la proteína. Esto resulta ventajoso debido a la generación de espectros de iones fragmento relativamente simples incluso de grandes proteínas. Los radicales de hidrógeno en MALDI-ISD, son producidos a partir de los hidrógenos activos (-OH y NH₂) de las matrices, tales como 2,5 DHB y 1,5 diaminonaftaleno (1,5 DAN), entre otras, que son activados por la irradiación de los fotones del láser⁽⁴⁾.

Los espectros ISD proporcionan la relación m/z y abundancia de los fragmentos de la proteína ionizada originalmente, conocidos como iones fragmento. Es a partir de estos datos que se puede obtener la información estructural de la proteína, la cual permitirá la identificación de la misma, mediante un proceso de búsqueda en bases de datos, como se indica en la siguiente sección.

1.3 IDENTIFICACIÓN

Después de obtenidos y procesados los espectros ISD, se seleccionan los iones fragmento que se van a enviar al motor de búsqueda como precursores, para la identificación de la proteína.

El procedimiento de búsqueda TDS (Top down sequencing) intenta identificar la proteína realizando una búsqueda MSMS basada en "Precursores virtuales" que se calculan sobre la suposición de que un pico en el espectro es un cierto tipo de fragmento de MSMS. Por ejemplo, un pico de masa de 1000 Da correspondería a una masa precursora de $1.000 + \text{Masa del } (-\text{NH}^+ \text{ O})$ si el pico era un ion tipo c-, o a una masa precursora de $1000 - \text{Masa del } (\text{NH})$ si era un ion tipo (z+1).

De esta manera, la misma lista de picos MSMS se remite múltiples veces con diferentes precursores como parte de una búsqueda MSMS combinada (cuando

se usa escisión no específica), que cubre todos los tipos de iones esperados. Como la mayoría de los fragmentos MSMS en un espectro ISD tienen masas por debajo de 16.000 Da, la identificación de la proteína se puede hacer en un servidor de MASCOT(motor de búsqueda para proteínas) estándar. La asignación correcta de las modificaciones que concuerden con la masa precursora deconvolucionada se puede hacer en BioTools(software para análisis de proteínas), si está disponible, como una etapa posterior después de que la secuencia de la proteína ha sido descargada de MASCOT⁽¹⁵⁾.

1.3.1 Herramientas bioinformáticas

Los motores de búsqueda para identificación de proteínas son recursos computacionales que utilizan diferentes algoritmos, dependiendo del tipo de búsqueda que se va a realizar.

Estas herramientas proporcionan funciones para el cálculo de la masa molecular de la proteína intacta a partir de los iones fragmento enviados como precursores y hacen la alineación de la secuencia de los precursores con la secuencia de la proteína afín encontrada en las bases de datos consultadas⁽¹⁶⁾. En la siguiente tabla se referencian algunas herramientas bioinformáticas para espectrometría de masas de proteínas disponibles en la red.

Tabla 1. Programas de identificación de proteínas disponibles en la red

NOMBRE	URL
ExPASy	www.expasy.org
EBI	www.ebi.ac.uk
NCBI	www.ncbi.nih.gov
GPMAW	www.gpmaw.com
Mascot	www.matrixscience.com
X! Tandem /	www.thegpm.org/TANDEM/
Phenyx	www.phenyx-ms.com/
VEMS	yass.sdu.dk
MSQuant	msquant.sourceforge.net
Protein- Prospector	prospector.ucsf.edu/
ProteinCenter	www.proxeon.com
NetPhos	Cbs.dtu.dk/services/NetPhos

Fuente: MALDI MS. A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications, p 102.

El motor de búsqueda identifica las proteínas que tienen coincidencias con los valores de los iones enviados como precursores y las califica asignándoles un puntaje (score) en función al número de coincidencias encontradas. Este resultado se muestra en un histograma en el reporte de resultados de búsqueda de MASCOT.

En este reporte también se encuentra un registro individual para cada proteína identificada, donde se listan las masas observadas y calculadas de cada ion que coincidió con la secuencia consultada, además de la secuencia y el puntaje asignado a dicho ion. Este registro, además, tiene un enlace que conduce a la vista de la proteína donde se puede observar la secuencia completa resaltando en letras rojas la secuencia identificada por el motor de búsqueda.

2 SECCIÓN EXPERIMENTAL

En esta sección se describe detalladamente cada paso ejecutado en este estudio, para implementar la metodología TOP DOWN^(17; 18).

Primero se realizaron unas pruebas preliminares sobre el patrón, para escoger el método de preparación de muestras y los parámetros del espectrómetro más adecuados. Después se ejecutó la metodología completa, optimizando los parámetros de cada paso, para la identificación de la proteína patrón (BSA, albúmina sérica bovina) y finalmente se siguió todo el procedimiento para la identificación de una proteína intacta y pura, conocida (Citocromo C, CC), bajo las condiciones establecidas con el patrón. De esta manera se comprobó la validez del método.



Figura 4. Esquema general de la metodología TOP DOWN

Fuente: Autor del proyecto

2.1 PRUEBAS PRELIMINARES

2.1.1 Selección del método de preparación de muestras

Cantidad mínima de muestra de 10 a 100 pmol / μ L diluida en TFA al 0,1% en agua.
Procedimiento para proteínas puras individuales e intactas.

2.1.1.1 Materiales

Matrices	SA	(ácido sinapínico)
	2,5-DHB	(ácido 2,5 dihidroxibenzóico)
Solventes	TFA	(ácido trifluoroacético)
	TA30	30:70 (v/v) Acetonitrilo: TFA 0.1% en agua
	EtOH	etanol

Todos los materiales utilizados en este trabajo son de grado HPLC y se utilizó agua desionizada tipo I.

2.1.1.2 Sistemas de matrices

Sistema I	Matriz 1.	SA saturado en EtOH
	Matriz 2.	SA saturado en TA30
Sistema II	DHB saturado en TA30	

2.1.1.3 Método de preparación de la muestra

Se probaron dos de los métodos más comunes de preparación de muestras para MALDI-MS: *Dried Droplet (DD)* y *Double Layer (DL)*.

Dried Droplet: se hace una premezcla de matriz- muestra. La relación de mezcla (v/v) puede variarse. Se aplica 1- 2 μ L sobre el target y se deja secar.

Double Layer: Se aplica una capa delgada de Matriz 1 y se deja secar. Sobre esta capa se aplica 0,5 μ L de una premezcla de Matriz 2 con muestra en volúmenes iguales y se deja secar.

Con estos dos métodos y los diferentes sistemas de matrices se implementaron los siguientes protocolos para preparación de muestras:

Protocolo 1	<i>DL</i>	SA
Protocolo 2	<i>DD</i>	2,5 DHB relación 1:1
Protocolo 3	<i>DD</i>	2,5 DHBrelación 2:1
Protocolo 4	<i>DD</i>	SArelación 1:1
Protocolo 5	<i>DD</i>	SArelación 2:1

Los protocolos 1 y 2 son protocolos establecidos por Bruker⁽¹⁹⁾ y los protocolos 3, 4 y 5 son modificaciones del protocolo 2.

Las pruebas para escoger el protocolo más adecuado consistieron en tomar un espectro ISD del patrón preparado según cada uno de los protocolos anteriores, optimizando los parámetros instrumentales (como se describe en la siguiente sección), para comprobar la fragmentación, y se realizó la búsqueda por MASCOT para confirmar que el patrón de fragmentación era el esperado.

2.1.2 Selección de parámetros de adquisición

Los parámetros de adquisición a optimizar son: porcentaje de fluencia del láser y número de acumulaciones por disparo.

Con el patrón preparado según el protocolo escogido en la sección de preparación de muestras, se inició la adquisición de espectros acumulando de 100 a 500 disparos cada vez y se fue aumentando la fluencia del láser hasta que aparecieron los picos en el rango de masas de péptidos. Para obtener suficiente relación S/R, se acumularon varios cientos de miles de disparos. Con la fluencia óptima ya establecida, se ajustó el número de acumulaciones por disparo a 5000.

También se compararon espectros tomados a diferentes valores de fluencia para analizar el efecto de este parámetro sobre la abundancia, resolución y relación S/R, con el fin de confirmar que el porcentaje de fluencia escogido con estas pruebas era el adecuado.

2.2 PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Con el método de preparación de muestras escogido se preparó el patrón y la muestra.

2.3 TOMA DE ESPECTROS Y PROCESAMIENTO DE DATOS

2.3.1 Equipo

Tabla 2. Especificaciones del equipo

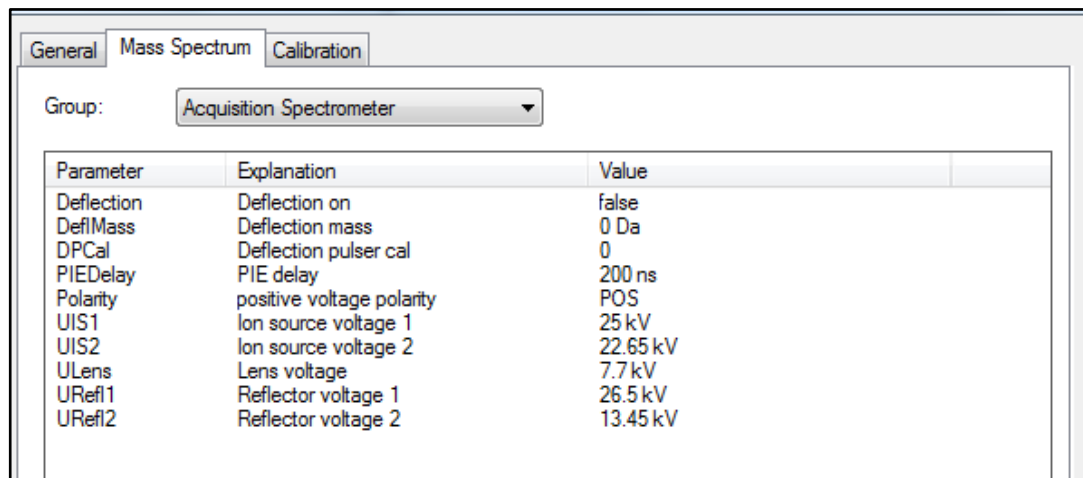
ESPECTRÓMETRO DE MASAS (MALDI / TOF/TOF)	
Modelo	Ultraflexreme de BrukerDaltonics
Software	Flexcontrol
Fuente de iones	MALDI
Analizador	Time of Flight – TOF
Láser	UV con longitud de onda de 355nm
Rango de masas	Hasta 500.000 Da
Resolución	Hasta 40.000
Precisión	1 parte por millón (ppm)
Modos de operación	<ul style="list-style-type: none">· Modo lineal (positivo/negativo)· Modo reflectron (positivo/negativo)· LIFT (positivo/negativo)· reISD

Fuente: Autor del proyecto

2.3.2 Adquisición

Método de adquisición para flexControl 1.3. "RP_ISD_1-8_kDa.par".

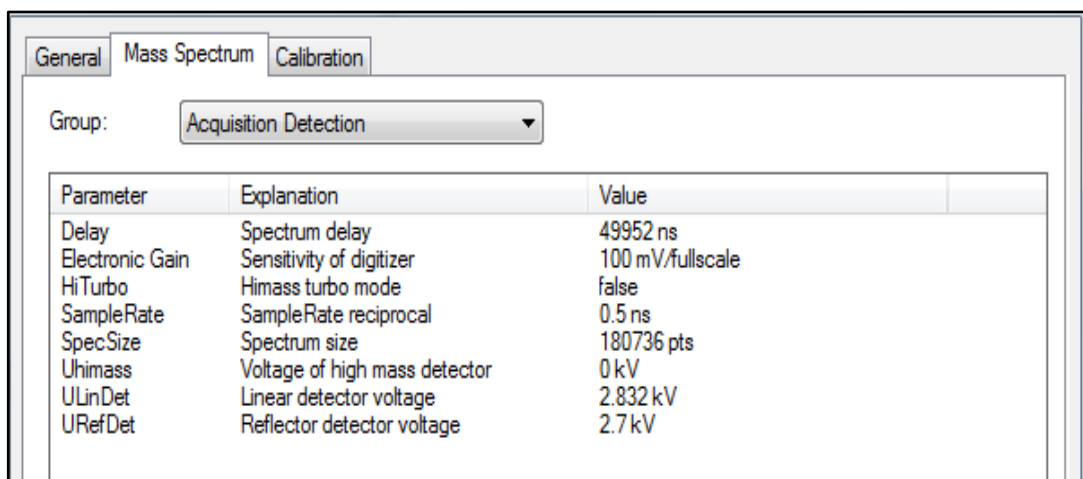
A continuación se muestran los parámetros del espectrómetro y del detector preestablecidos en el método seleccionado para la adquisición.



Parameter	Explanation	Value
Deflection	Deflection on	false
DeflMass	Deflection mass	0 Da
DPCal	Deflection pulser cal	0
PIEDelay	PIE delay	200 ns
Polarity	positive voltage polarity	POS
UIS1	Ion source voltage 1	25 kV
UIS2	Ion source voltage 2	22.65 kV
ULens	Lens voltage	7.7 kV
URef1	Reflector voltage 1	26.5 kV
URef2	Reflector voltage 2	13.45 kV

Figura 5. Parámetros de adquisición del espectrómetro

Fuente: flexAnalysis



Parameter	Explanation	Value
Delay	Spectrum delay	49952 ns
Electronic Gain	Sensitivity of digitizer	100 mV/fullscale
HiTurbo	Himass turbo mode	false
SampleRate	SampleRate reciprocal	0.5 ns
SpecSize	Spectrum size	180736 pts
Uhimass	Voltage of high mass detector	0 kV
ULinDet	Linear detector voltage	2.832 kV
URefDet	Reflector detector voltage	2.7 kV

Figura 6. Parámetros de adquisición del detector

Fuente: flexAnalysis

Nota: en la pestaña *Spectrometer*, la opción *Lowmassdeflection* debe estar establecida a 800Da, ganancia a 20x o más y rango de masas por encima de 6000Da.

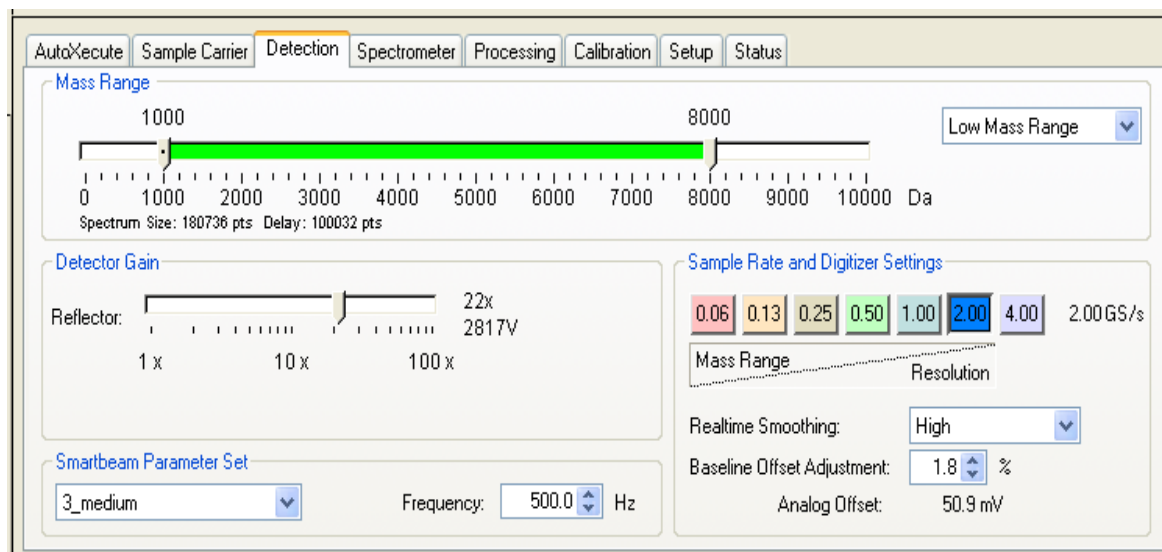


Figura 7. Parámetros del espectrómetro

Fuente: flexControl

Antes de iniciar la adquisición, lo primero que se hace es la calibración. Para esto se tomó un espectro ISD del patrón con los parámetros de adquisición ya establecidos y se utilizó la lista control de pesos "ISD_BSA_mono.mcl", de flexSeries 1.3, que contiene masas de fragmentos ISD para calibración.

El patrón para la calibración debe prepararse de la misma manera que se prepararon las muestras, de lo contrario, la calibración no sirve.

2.3.3 Procesamiento en flexAnalysis

flexAnalysis 3.3 es un software de post-procesamiento para espectros adquiridos con espectrómetros de masas de tiempo de vuelo de la serie flex de Bruker. Este software proporciona herramientas de fácil manejo de algoritmos altamente sofisticados para arreglo de línea base, suavizado, detección

automatizada, auténtica e interactiva de picos (*SNAP*, *Centroid* y *Sum peakfinder*), recalibración de espectros (*linear*, *quadratic*, *quadraticenhanced*, *High PrecisionCalibration*, *statistical* and *iCalsupport*), entre muchas otras mas, que facilitan el análisis de los espectros y su visualización.

Los espectros adquiridos se abrieron en flexAnalysis 3.3 de Bruker y se procesaron con los métodos automáticos preestablecidos en el software: "PMF.FAMSMMethod" y "calibrate_BSA_reISD.FAMethod". El primer método anota un rango de masas de 800-4000 Da utilizando el algoritmo de recolección de picos "SNAP" (*SophisticatedNumericalAnnotationProcedure*). Este algoritmo busca patrones conocidos en el espectro y realiza su propia corrección de línea base y la determinación del ruido. Es el más conveniente para análisis proteómicos, pues sirve para la identificación de patrones isotópicos y el cálculo exacto de las masas monoisotópicas, que son la base de las búsquedas en bases de datos para elucidar la estructura y la secuencia de un péptido o proteína particular.

El segundo método es para la calibración interna del espectro ISD de BSA, arreglo de línea base, suavizado e identificación de la lista de picos. Este procesamiento también se puede hacer manualmente estableciendo los parámetros de procesamiento según la preferencia. En este análisis no fue necesario hacer ninguna modificación. Los parámetros de procesamiento de espectros son: algoritmo de detección de picos, umbral de relación S/R, máximo número de picos, etc. Estos se encuentran en la pestaña *Method*, opción *Editprocessingparameters*, como se muestra en la figura 8.

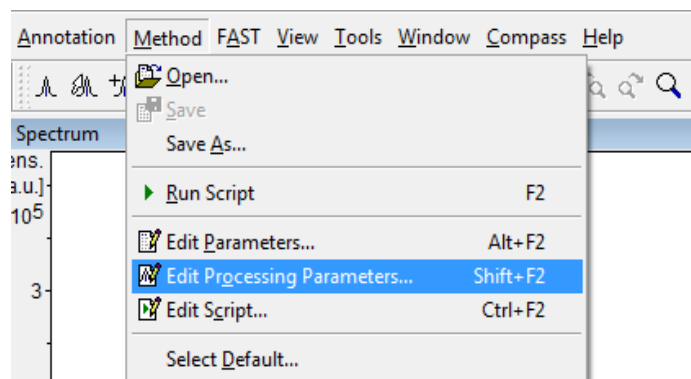


Figura 8. Ventana para la selección de parámetros de procesamiento de espectros o métodos automáticos en flexAnalysis

Fuente: flexAnalysis

2.3.4 Procesamiento en BioTools

BioTools es un software de análisis de proteínas donde se establece el tipo de búsqueda que se quiere realizar con espectros tipo MS y MS/MS y listas de picos, adquiridos con instrumentos MALDI y ESI MS de BrukerDaltonics, los cuales fueron previamente procesados con flexAnalysis o DataAnalysis.

Lo primero que se hace al abrir un espectro ISD en BioTools es registrarlo como un espectro tipo ISD, esto se hace en la pestaña *Analysis* opción *Permanently assign as ISD-type* (figura 9).

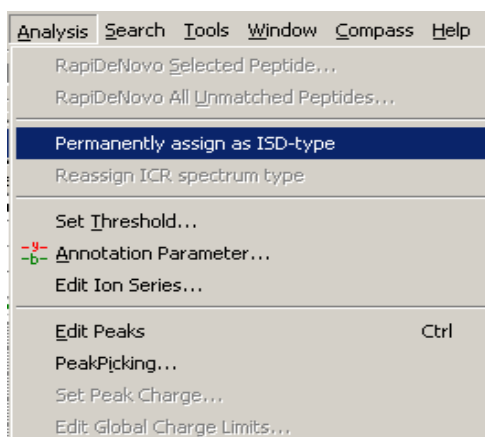


Figura 9. Registro de un espectro tipo ISD en BioTools

Fuente: BioTools

Después de registrar el espectro como ISD, se selecciona la opción *ISD-TOF extended* entre las opciones de *ion list dentro de Annotation Options*, de la pestaña *Analysis*. Esto se hace para seleccionar lista de tipos de iones en función de la técnica del instrumento y la fragmentación (baja energía /alta energía, CID, LID, ISD, etc) consideradas para los cálculos de iones fragmento.

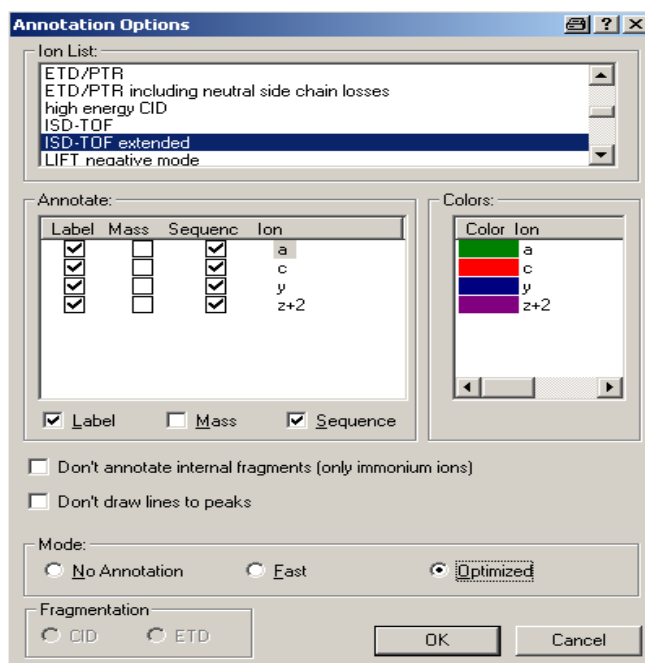


Figura 10. Selección de iones

Fuente: BioTools

Después de esto, se hace zoom sobre una región más pequeña del espectro, de alto peso molecular (en lo posible, menos compleja), que incluya una serie de picos distribuidos uniformemente y con etiqueta, como se ilustra en la figura 11. En seguida se selecciona el botón *TDS MascotSearch* de la pestaña *MSMS Analysis*. A continuación aparecerá una ventana emergente donde se muestra la lista de picos seleccionados en la región ampliada, junto con sus masas, el tipo de ion fragmento (no para todos los picos) y sus intensidades correspondientes (figura 12). Esta lista de picos, son los picos seleccionados como iones precursores.

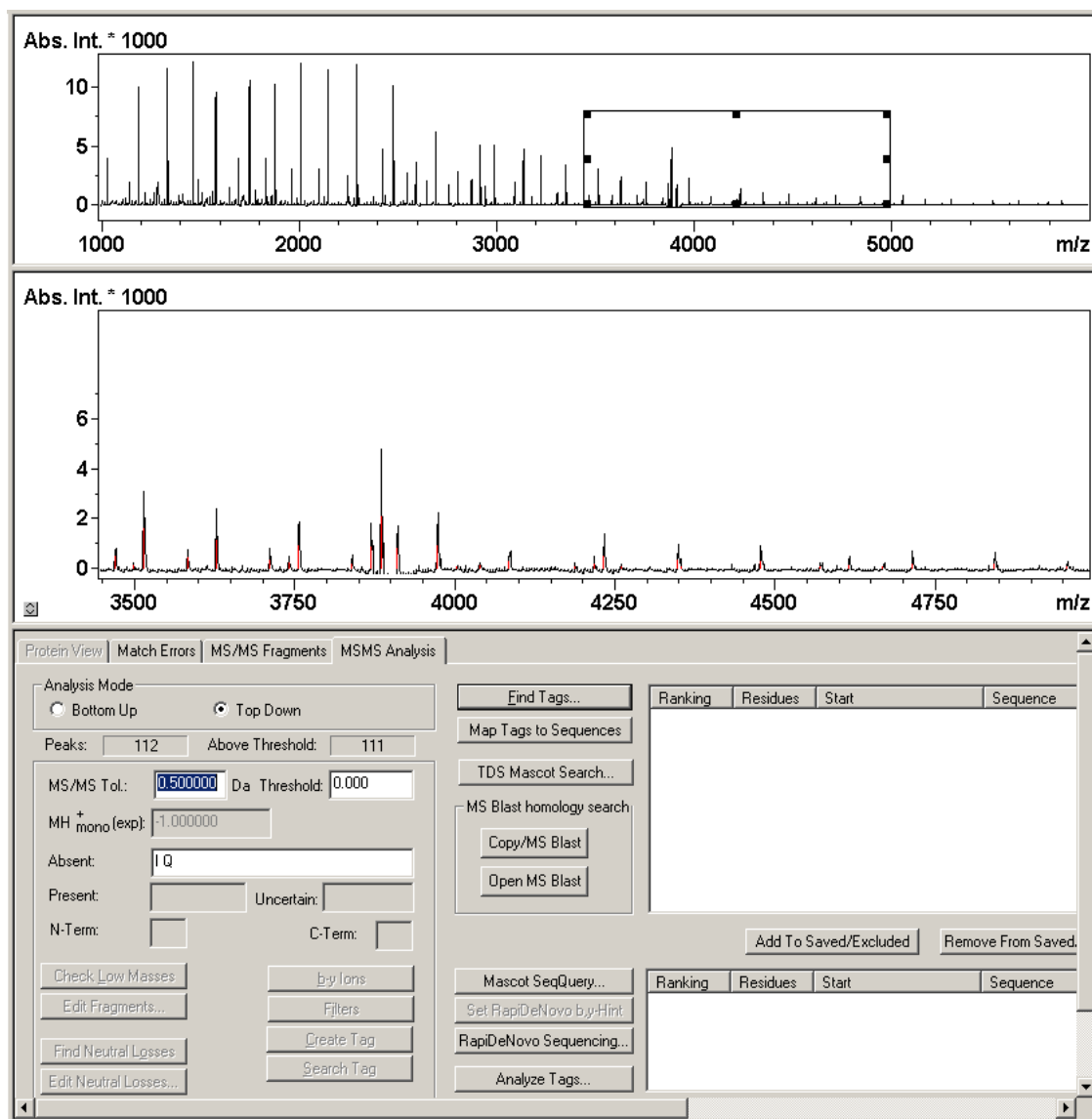


Figura 11. Selección de la región espectral para búsqueda en MASCOT

Fuente BioTools

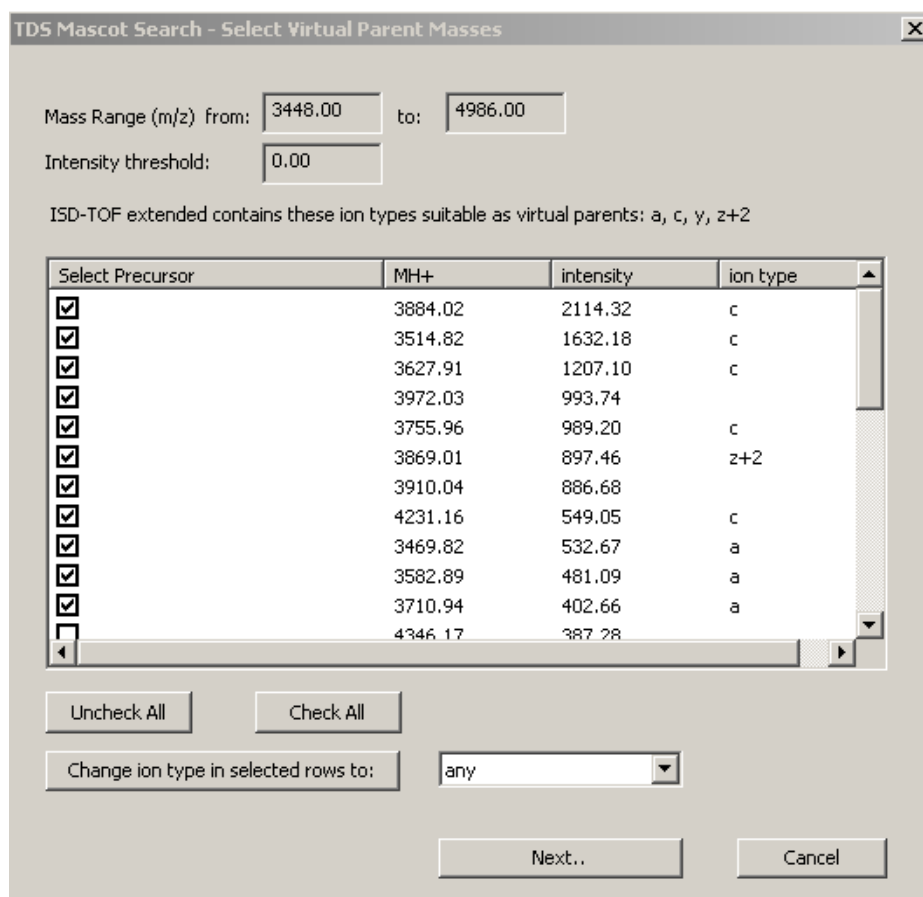


Figura 12. Lista de picos seleccionados para enviar a MASCOT como iones precursores

Fuente BioTools

En esta ventanase pueden seleccionar o deseleccionar los iones y cambiar o remover por completo el tipo de iones manualmente. Cuando ya se tiene la lista como se quiere, se hace click sobre el botón *Next* para enviarla a MASCOT.

2.4 IDENTIFICACIÓN

Después de enviar la lista de iones precursores, se seleccionan los parámetros de búsqueda en la siguiente ventana, que aparece automáticamente (figura 13).

Enzyme: None, Instrument: MALDI-ISD. Estos dos parámetros son invariables para este tipo de análisis, los demás se pueden variar.

TDS Mascot Search

URL:
[Matrix Science home page](#)

User Name: Email:
 Search Title:

Taxonomy:

Database:
 MSIP1_human
 MSIP1_mouse
 NCBIInr

 UniRef100

Enzyme:
 Partial <=:
 Quantitation:
 Show Hidden Modifications

Global Modifications:
 Acetyl (N-term)
 Acetyl (Protein N-term)
 Amidated (C-term)
 Amidated (Protein C-term)
 Ammonia-loss (N-term C)

Variable Modifications:
 Acetyl (N-term)
 Acetyl (Protein N-term)
 Amidated (C-term)
 Amidated (Protein C-term)
 Ammonia-loss (N-term C)

Protein MW >=: kDa #C¹³:
 Mass Tol. MS: ppm MS/MS Tol: Da

Charge state: Monoisotopic Average

Data file:

Query Data:

Search unmatched peaks only

Instrument:

Decoy Error Tolerant

Results: Overview Report top hits
 On Import check matching MSMS only

Fragmentation: CID ETD CID ETD combined (Mascot 2.2 or later)

Figura 13. Ventana de selección de parámetros para una búsqueda tipo TDS en MASCOT

Fuente: MASCOT

En la ventana anterior se seleccionó la opción de mamíferos en la taxonomía, en el campo de modificaciones globales y variables no se seleccionó ninguna ya que es un análisis de proteínas intactas, la opción de *Partials* se refiere a la posibilidad de tener fragmentos parciales, en el caso de que se tratara de una proteína escindida, pero aun para el caso de proteínas intactas se recomienda dejar el valor de 1. Sólo en el caso de estar 100% seguros de que la digestión fue perfecta y que no hay fragmentos parciales, se seleccionaría el valor cero. Valores mayores a 2 no son recomendables en ningún caso, a menos que haya una muy buena razón para esto. El campo de *Protein MW* únicamente se usa para búsquedas de análisis de *huella peptídica* (PMF, peptidemassfingerprint), este parámetro no es un muy útil, por lo que es recomendable dejarlo en blanco aunque el valor sea conocido, ya que hace la búsqueda más lenta. Finalmente, en las opciones para tipo de masase selecciona *monoisotopic*.

En cuanto a las bases de datos, hay algunas recomendaciones dependiendo del tipo de búsqueda⁽²⁰⁾:

<i>SwissProt</i>	para PMF y MS/MS
<i>NCBI nr o UniRef 100</i>	para MS/MS
<i>ESTs</i>	para MS/MS, si las anteriores no funcionan.

Con los parámetros ya establecidos, se inició la búsqueda en MASCOT, haciendo click en el botón *Start*. Dependiendo de la cantidad de datos enviados y de la calidad de la conexión a la red, será necesario esperar desde unos 20 segundos hasta algunos minutos para obtener los resultados de la búsqueda.

3 RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 PRUEBAS PRELIMINARES

3.1.1.1 *Selección del método de preparación de muestras*

Análisis espectrométrico

En la figura 14 se muestran los espectros del patrón preparado como se indica en cada uno de los protocolos mencionados en la sección 2.1.1.3 y se analiza el efecto de la matriz y del método de preparación de la muestra, sobre la aparición de señales y su abundancia, que implicaría la fragmentación de la proteína.

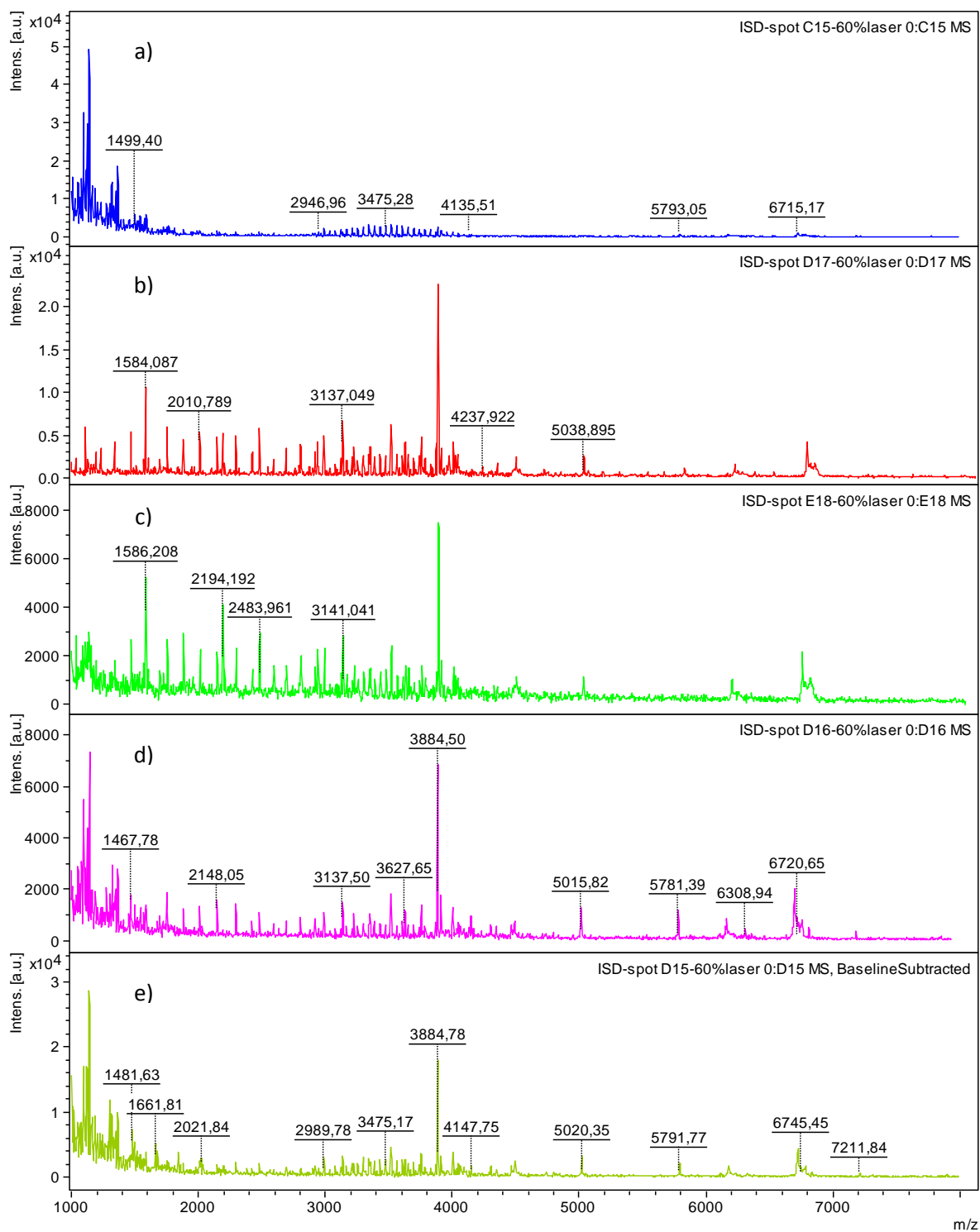


Figura 14. Espectros ISD de BSA preparado con los diferentes protocolos. De arriba hacia abajo: a) P1, b) P2, c) P3, d) P4 y e) P5

Después de procesar los espectros según lo descrito en la sección 2.3.3, se confirmó lo observado a simple vista:

- El *Protocolo 1* no es adecuado para generar fragmentación de la proteína, aunque se aumentó considerablemente la fluencia del láser para garantizar una transferencia de energía suficiente para la fragmentación, por lo que no fue posible identificar la proteína mediante la búsqueda en MASCOT, después de realizar todo el procedimiento para el análisis TOP DOWN.
- El espectro del *Protocolo 2* muestra buena fragmentación, lo cual se confirmó al lograr la identificación de la proteína en MASCOT.
- Los espectros de la muestra según los *Protocolos 2 y 3* muestran un patrón de fragmentación similar, así como los espectros de los *Protocolos 4 y 5*, sin embargo los dos últimos no dieron identificación positiva después de la búsqueda en MASCOT, lo cual indica que la fragmentación no es comparable a la almacenada en las bases de datos consultadas. Esto también indica que la matriz no es eficiente en el proceso de fragmentación, aún después de suministrarle una cantidad de energía por encima de los valores típicos para esta clase de análisis, casi hasta el 100% de fluencia del láser.
- Como el *P2 y P3* dieron resultados similares, se decidió establecer el *P2* como método de preparación de muestras ya que no hay mayor diferencia entre usar una relación de mezcla mayor a la relación 1:1.

Los protocolos que resultaron favorables para este estudio fueron los preparados con la matriz 2,5 DHB, lo cual es congruente con lo registrado en la literatura^(22; 21; 7), que indica que esta es una matriz particularmente apropiada para análisis de proteínas intactas por dos razones⁽²¹⁾: 1) su “suavidad”, que evita fuertes pérdidas de pequeños neutros y la aparición de colas en los picos; y 2) porque los cristales

incorporan a las proteínas, pero no incluyen a la mayoría de los contaminantes comunes.

Las matrices han sido clasificadas por su capacidad para donar protones, calificándolas en una escala de “*duras a suaves*”, o de “*frías a calientes*” que indica su efectividad para la fragmentación, de la siguiente manera: 1,5-DAN* > 5-ASA† > 2,5-DHB > SA = CHCA‡, siendo 1,5-DAN el extremo “*duro*” o “*frío*”, es decir, con mayor capacidad para donar protones^(22; 21; 7), y por lo tanto mayor efectividad para la fragmentación. Esto explica el resultado desfavorable obtenido con la matriz de SA y el resultado favorable con la matriz de 2,5-DHB.

Análisis cualitativo

A continuación se presentan las imágenes de la visualización de los *spots* dentro de la cámara de ionización. En estas imágenes se puede observar la forma de decristalización, que varía dependiendo de la matriz utilizada e incluso del método de preparación.

* 1,5- Diaminonaftaleno

† Ácido 5- Aminosalicílico

‡ Ácido α -Ciano-4-hidroxicinámico

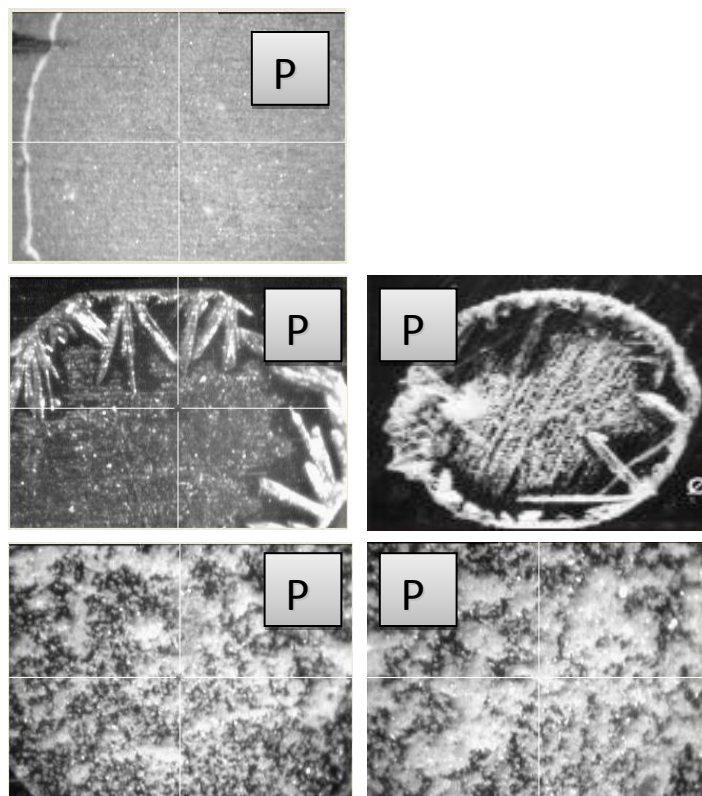


Figura 15. Imágenes de la visualización de los spots preparados con los diferentes protocolos

En estas imágenes se puede observar cómo varía la distribución de los cristales sobre la superficie del *spot*, el grosor y la forma:

En las imágenes del *P1* se observan *mini-* cristales con una distribución muy homogénea, además de ser una capa delgada y pareja en toda su extensión. Esta forma de cristalización es ideal, ya que por su homogeneidad en el grosor, los iones de una misma relación m/z viajarán en un paquete mucho más compacto alcanzando así el detector en un intervalo de tiempo más corto, lo que se traduce en una mejor resolución del espectro. Sin embargo este protocolo fue descartado con el análisis espectrométrico debido a que no se produjo fragmentación.

En los *spots* de los protocolos 2 y 3 se observa la formación de cristales alargados y distribuidos hacia los bordes del *spot*, quedando prácticamente vacío en el centro. Este tipo de cristalización dificulta un poco la adquisición (aunque no mucho) de los espectros debido a que se hace necesario apuntar de forma muy precisa sobre los cristales, de manera que se tiene que hacer manualmente. La cristalización observada en los *spots* de *P2* y *P3* no muestra diferencias significativas. Este mismo resultado se observó en los espectros 12.b) y 12.c) correspondientes a estos *spots*. Aunque la forma de los cristales de DHB no es la más homogénea, no afecta significativamente la resolución de las señales ya que la adquisición se hace sobre un mismo punto.

Finalmente en los *spots* de *P4* y *P5* se observa una distribución de los cristales poco homogénea y una superficie rugosa. Esto afecta la resolución de las señales y el ancho de las bandas. En el *spot* del *P5* se observa una mayor saturación con respecto al *P4*. Este resultado es coherente con lo observado en los espectros correspondientes a estos *spots*.

3.1.1.2 Selección de parámetros de adquisición

A continuación se analiza el efecto de la fluencia del láser sobre las señales del espectro. Para esto se presentan los espectros del patrón preparado según el *P2* tomados a diferentes fluencias del láser.

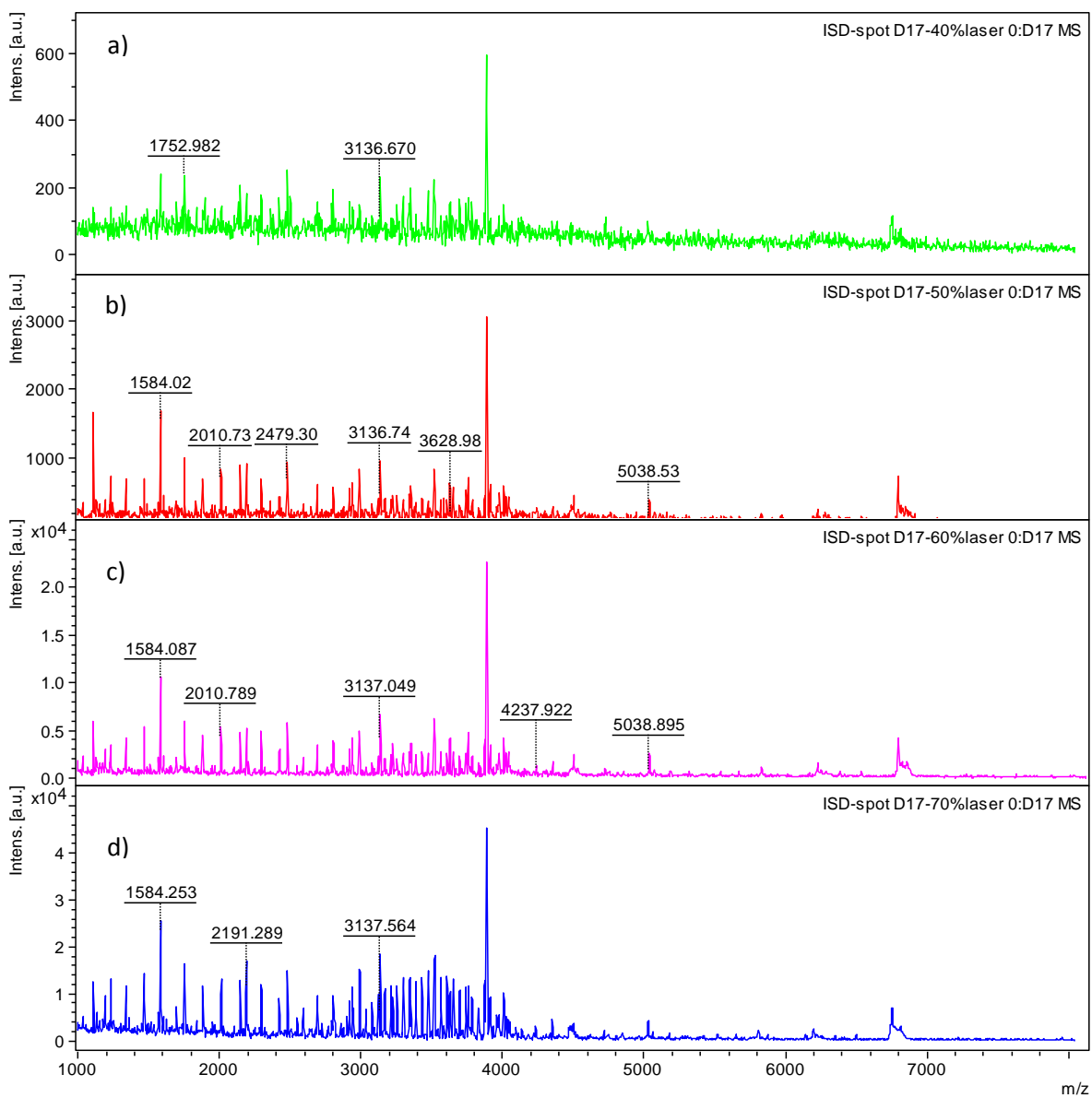


Figura 16. Espectros ISD de BSA variando la fluencia del láser. a) 40%, b) 50%, c) 60% y d) 70%

En la *Figura 16* se puede observar cómo a medida que se aumenta la fluencia del láser, aparecen más señales y aumenta la intensidad. La intensificación de los picos es buena, sin embargo, el hecho de que aparezcan más señales, no es necesariamente favorable.

En el espectro 16.d) se alcanza a observar la aparición de un patrón de señales en forma de campana, en la región de masas entre 3000- 4000 Da. Por la forma y el rango de masas en que aparecen estas señales, se puede pensar que son generadas por un polímero. La aparición de esta especie en la muestra, se puede atribuir al material de los implementos utilizados para la preparación de la muestra o incluso del recipiente de almacenamiento de las mismas.

Con la ayuda de las herramientas del software para anotar picos (*annotate*), es posible conocer la identidad de la especie que genera dichas señales, como se muestra a continuación.

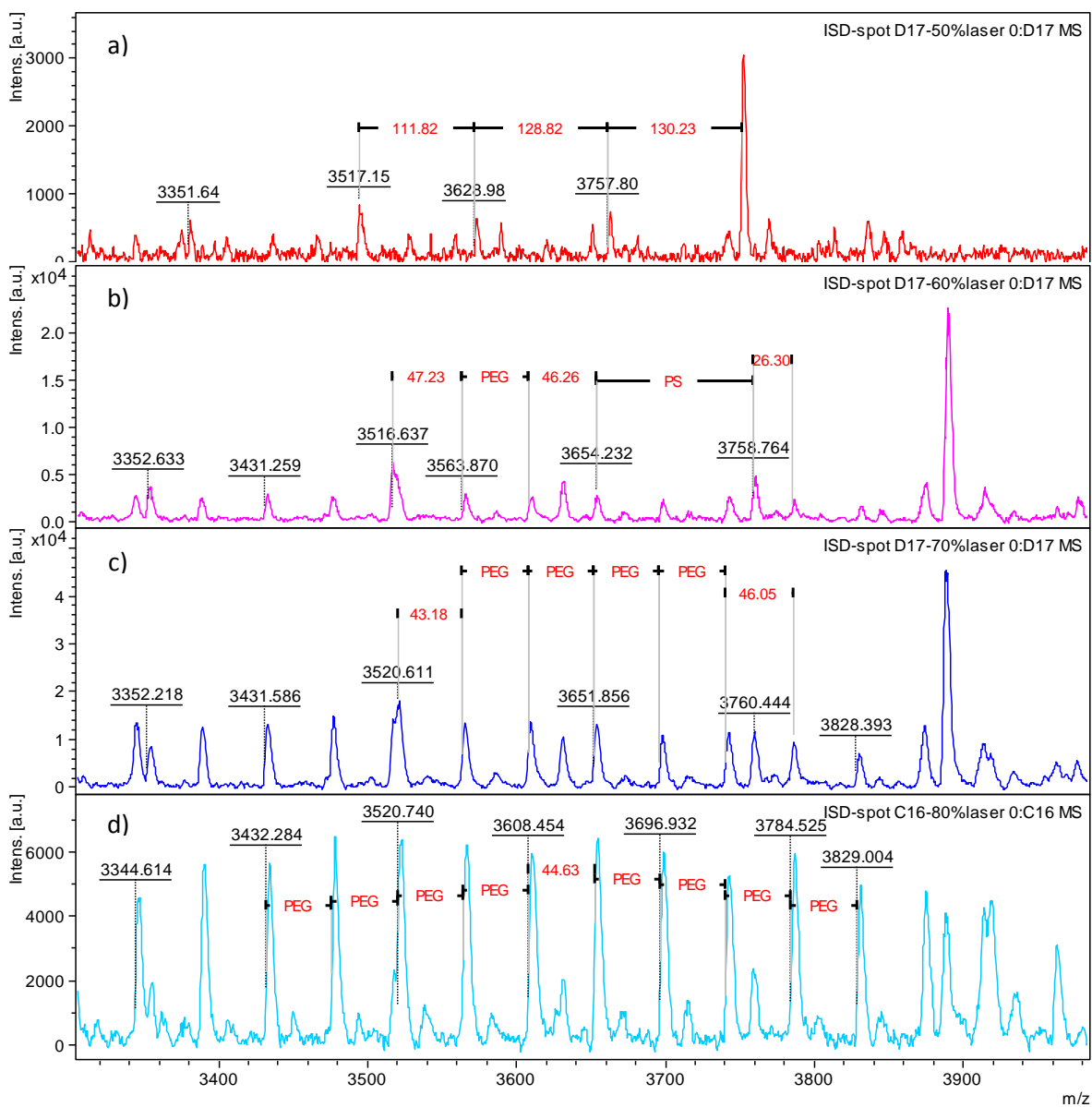


Figura 17.Ampliación de los espectros ISD de BSA en el rango de masas entre 3300- 4000 Da, tomados a diferentes fluencias, mostrando la identificación de (PEG) en la muestra. a)BSA preparado según P2 a 50%,b) BSA preparado según P2 a 60%,c) BSA preparado según P2 a 70% yd)BSA preparado según P1 a 80%

En el espectro 17.d) se observa con claridad la identificación de la especie que generó las señales indeseadas, mencionadas anteriormente. La especie identificada fue el polímero polietilenglicol, señalada en los espectros como PEG. Este espectro, proveniente del patrón preparado según el *P1*, fue el que no mostró fragmentación de la proteína, pero se observó la aparición de unas señales entre 3000- 4000 Da.

En los espectros 17.a), 17.b) y 17.c), provenientes de un mismo spot pero con diferente fluencia, se observa cómo cambia la aparición de las señales del PEG, dependiendo de la fluencia utilizada. A menores fluencias del láser, es menos observable el patrón del PEG.

En el espectro 17.a) ya no se observan las señales del PEG, por lo que no es posible identificarlas con la ayuda del software.

Esto confirma que es posible descartar el valor fluencia de 70% debido a que no ayuda a mejorar las señales de interés y sí aumenta las señales del PEG.

A continuación muestra la ampliación de los espectros ISD de BSA en el rango de masas entre 3860- 3930 Da, variando la fluencia del láser, para analizar el efecto de la fluencia sobre la resolución de las señales.

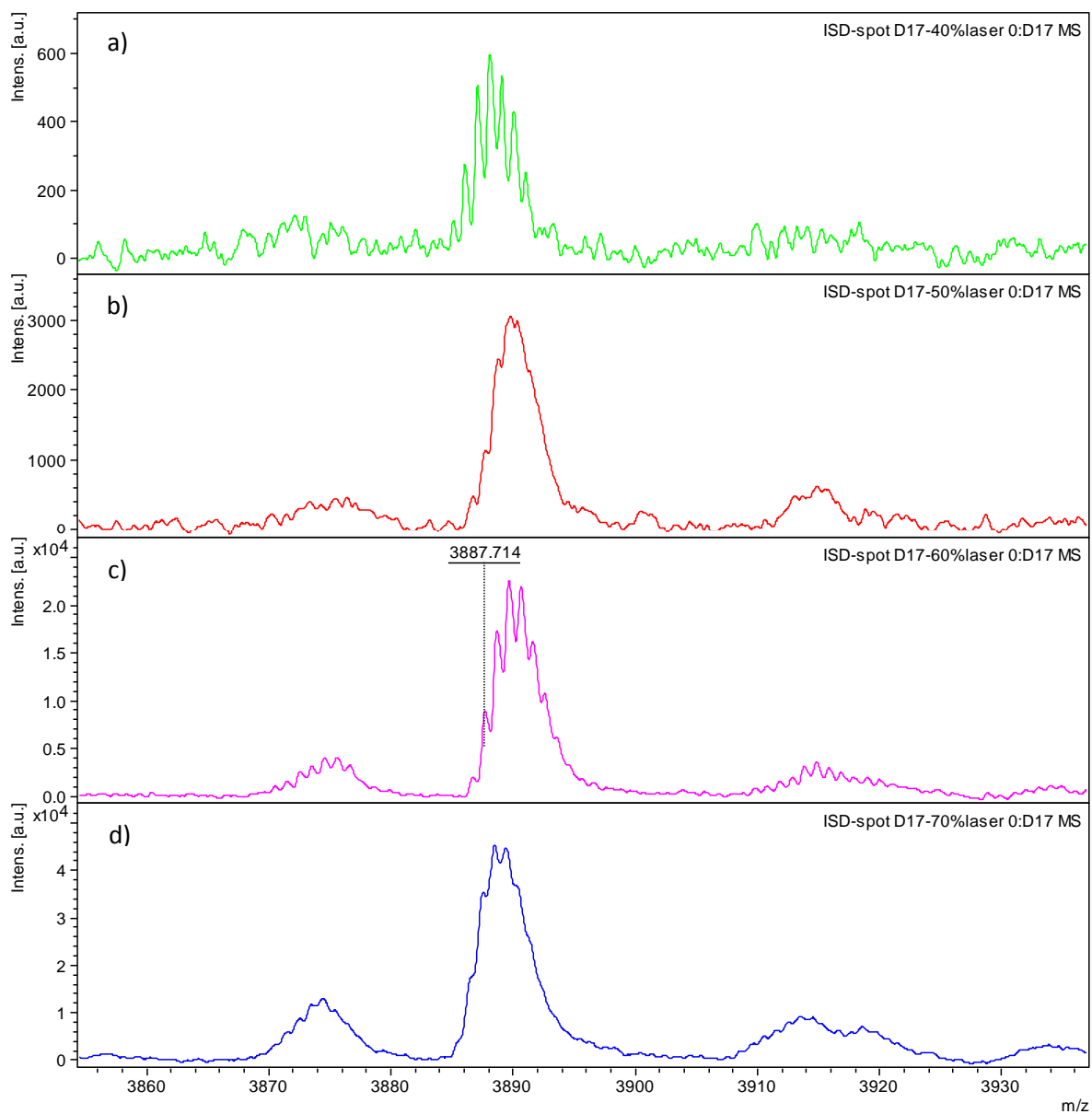


Figura 18. Ampliación de los espectros ISD de BSA en el rango de masas entre 3860-3930 Da, variando la fluencia del láser. a) 40%, b) 50%, c) 60% y d) 70%

En la *Figura 18* se observa que la señal con mejor resolución y una línea base aceptable, con suficiente relación S/R es la del espectro 15.c).

De acuerdo con lo anterior, se establece que la mejor fluencia está entre 50 y 60% ya que a menores fluencias no se observa con claridad el patrón de fragmentación de la proteína y a mayores fluencias se observa la aparición de fragmentos no pertenecientes a la muestra en estudio.

Para los propósitos de este estudio se decidió trabajar con la fluencia del láser al 60%.

3.2 PREPARACIÓN DE MUESTRAS

A continuación se muestran las imágenes de los *spots* correspondientes al patrón y a la muestra.

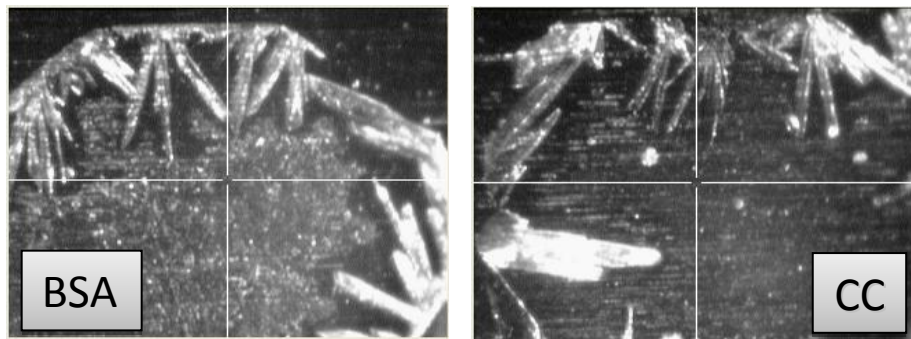


Figura 19. Spots del patrón y del CC preparados según el Protocolo 2

3.3 TOMA DE ESPECTROS Y PROCESAMIENTO DE DATOS

A continuación se presentan los espectros de las dos muestras analizadas en este estudio, bajo las condiciones de adquisición y procesamiento establecidas en las secciones anteriores.

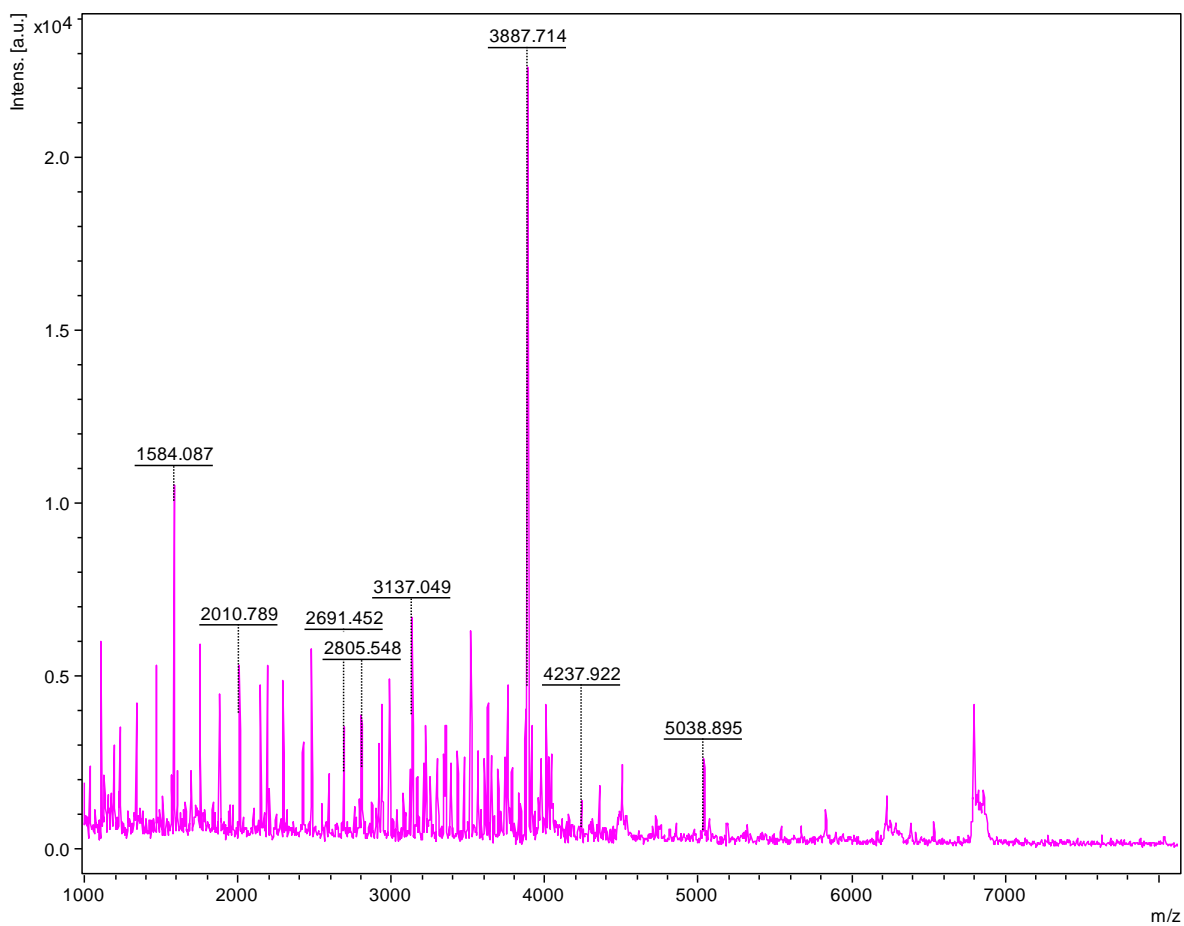


Figura 20. Espectro ISD de BSA tomado con los parámetros establecidos (fluencia a 60%) y procesado siguiendo los pasos descritos en la sección 2.3.3

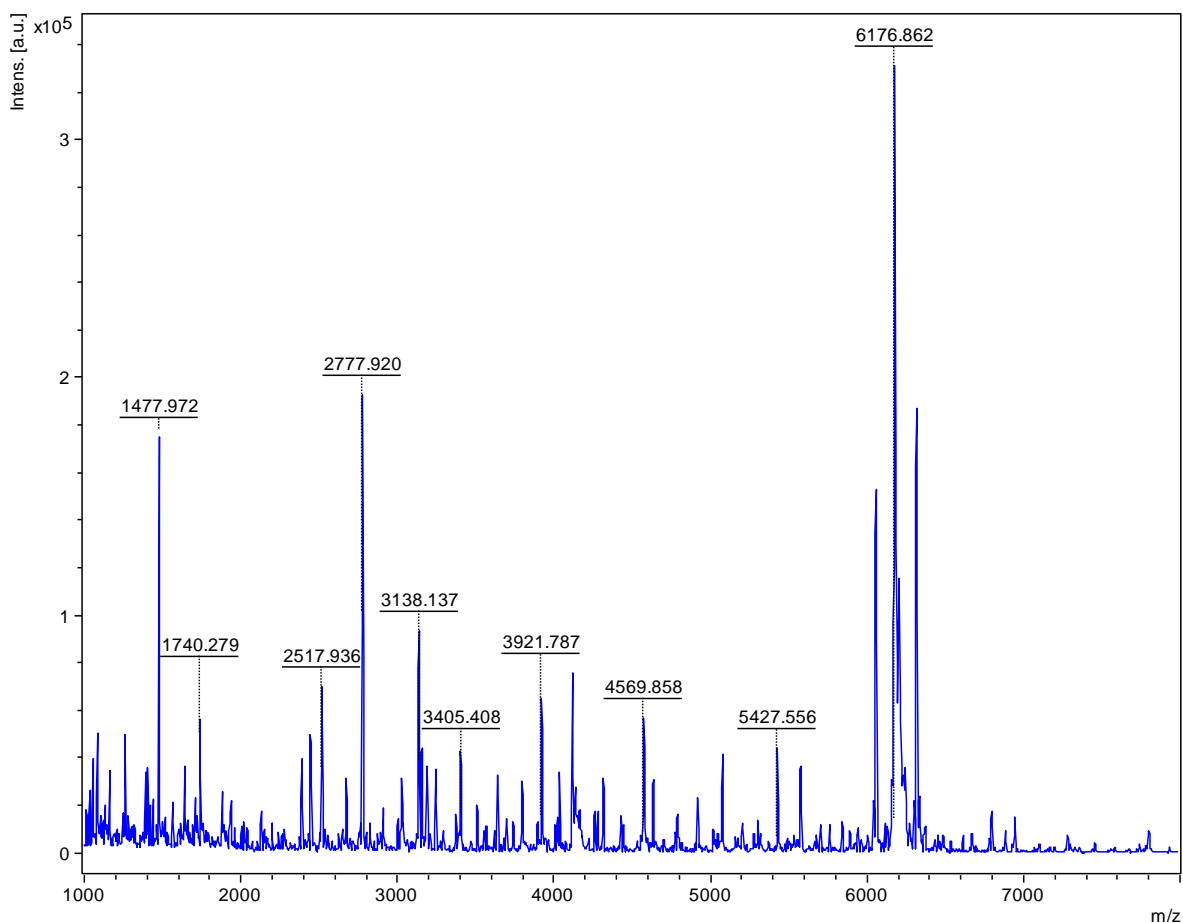


Figura 21. Espectro ISD de CC tomado con los parámetros establecidos (fluencia a 60%) y procesado siguiendo los pasos descritos en la sección 2.3.3

3.4 IDENTIFICACIÓN

Después de procesar los *Espectros 20y21* en BioTools de acuerdo a lo descrito en la *Sección 2.3.4*, se envió la lista de iones precursores al motor de búsqueda para la identificación de las proteínas analizadas. A continuación, los resultados de la búsqueda en MASCOT.

Resultados de la búsqueda para BSA

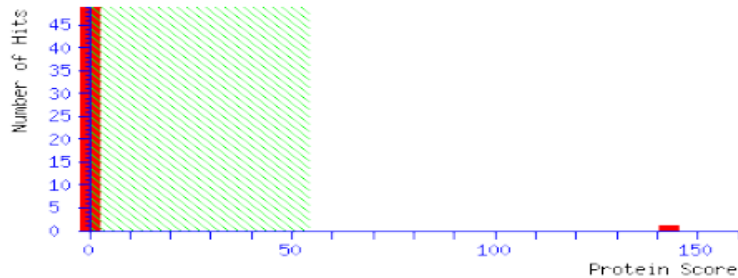
{MATRIX} Mascot Search Results

User : enrique
 Email : emejia@uis.edu.co
 Search title : BSA ISD PRUEBA
 MS data file : DATA.TXT
 Database : SwissProt 2011_08 (531473 sequences; 188463640 residues)
 Taxonomy : Mammalia (mammals) (65434 sequences)
 Timestamp : 15 Oct 2013 at 15:40:44 GMT
 Protein hits : [ALBU_BOVIN](#) Serum albumin OS=Bos taurus GN=ALB PE=1 SV=4

Mascot Score Histogram

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.

Individual ions scores > 54 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



1. [ALBU_BOVIN](#) Mass: 69248 Score: 143 Matches: 3(3) Sequences: 3(3)
 Serum albumin OS=Bos taurus GN=ALB PE=1 SV=4

Query	Observed	Mr (exp)	Mr (cal)	ppm	Miss	Score	Expect	Rank	Uniq	Peptide
<u>2</u>	3138.0	3137.0	3136.6	121	0	61	0.008	9	1	R.DTHKSEIAHRFKDLGEEHFKGL VLIAF.S
<u>8</u>	3224.5	3223.5	3223.6	40.8	0	70	0.001	3	1	R.DTHKSEIAHRFKDLGEEHFKGL VLIAF.S.Q
<u>17</u>	3352.6	3351.6	3351.7	34.0	0	75	0.000	47	1	R.DTHKSEIAHRFKDLGEEHFKGL VLIAF.S.Q.Y

Search Parameters

Type of search : MS/MS Ion Search
 Enzyme : None
 Mass values : Monoisotopic
 Protein Mass : Unrestricted
 Peptide Mass Tolerance : ± 150 ppm
 Fragment Mass Tolerance : ± 0.5 Da
 Max Missed Cleavages : 1
 Instrument type : MALDI-MSD
 Number of queries : 72

Figura 22. Reporte de resultados de búsqueda de MASCOT para el patrón (BSA)

Fuente: MASCOT, registro de resultados

En el reporte de la *Figura 20* se observa la identificación de la proteína BSA con un puntaje muy bueno, de 143, y además como única coincidencia.

Resultados de la búsqueda para el *Citocromo C*

{MATRIX} Mascot Search Results

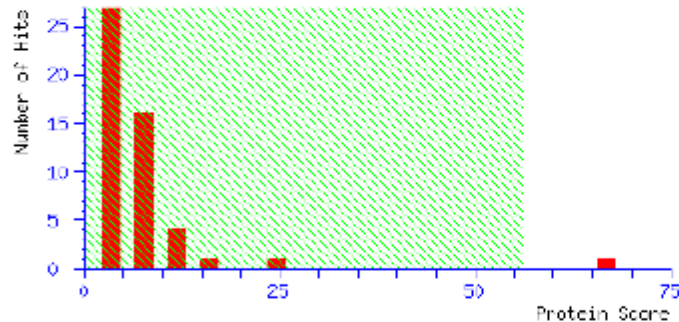
User : enrique
 Email : emejia@uis.edu.co
 Search title : ISD prueba
 MS data file : DATA.TXT
 Database : SwissProt 2011_08 (531473 sequences; 188463640 residues)
 Taxonomy : Mammalia (mammals) (65434 sequences)
 Timestamp : 17 Oct 2013 at 20:38:53 GMT
 Protein : [CYC_AT](#) Cytochrome c OS=Ateles sp. GN=CYCS PE=1 SV=3
 hits : [ESP](#)
 [PRUNE_](#) Protein prune homolog OS=Rattus norvegicus GN=Prune
 [RAT](#) PE=2 SV=1
 [SIRT6_](#) NAD-dependent deacetylase sirtuin-6 OS=Mus musculus
 [MOUSE](#) GN=Sirt6 PE=1 SV=1
 [ACHA6_](#) Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-6
 [PANTR](#) OS=Pan troglodytes GN=CHRNA6 PE=2 SV=1
 [EPN2_R](#)
 [AT](#) Epsin-2 OS=Rattus norvegicus GN=Epn2 PE=1 SV=1

Mascot Score Histogram

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.

Individual ions scores > 56 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).

Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



1. [CYC ATESP](#) Mass: 11815 Score: 67 Matches: 7(0) Sequence
 s: 6(0)
 Cytochrome c OS=Ateles sp. GN=CYCS PE=1 SV=3
 Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	Miss	Score	Expect	Rank	UniProt	Peptide
<u>1</u>	3921	3920	3920	140	0	10	1.5e-2	U	N	PKKYIPGTKMIFVGIKKKEERADLI

	7895	7822	2324					+003		AYLKKATNE.-
<u>5</u>	4035. 7494	4034. 7422	4034. 2754	116	0	9	2.2e +003	4	U	E.NPKKYIPGTKMIFVGIKKKEERADL IAYLKKATNE.-
<u>12</u>	4164. 0449	4163. 0377	4163. 3179	67.	0	12	8.1e +002	1	U	L.ENPKKYIPGTKMIFVGIKKKEERAD LIAYLKKATNE.-
<u>13</u>	4569. 8594	4568. 8522	4568. 5079	75.	0	12	1.6e +003	2	U	M.EYLENPKKYIPGTKMIFVGIKKKEE RADLIAYLKKATNE.-
<u>29</u>	6055. 6695	6054. 6622	6054. 2729	64.	0	14	1e+0 03	1	U	N.KNKGIIWGEDTLMEYLENPKKYIPG TKMIFVGIKKKEERADLIAYLKKATNE. -
<u>33</u>	6169. 0795	6168. 0722	6168. 3158	39.	0	(13.4e 8)	+002	1	U	A.NKNKGIIWGEDTLMEYLENPKKYIP GTKMIFVGIKKKEERADLIAYLKKATNE .-
<u>34</u>	6170. 0635	6169. 0562	6168. 3158	120	0	18	3.5e +002	1	U	A.NKNKGIIWGEDTLMEYLENPKKYIP GTKMIFVGIKKKEERADLIAYLKKATNE .-

Proteins matching the same set of peptides:

<u>CYC_GORGO</u>	Mass: 11741	Score: 63	Matches: 7(0)	Sequence s: 6(0)
Cytochrome c OS=Gorilla gorilla gorilla GN=CYCS PE=3 SV=3				
<u>CYC_HUMAN</u>	Mass: 11741	Score: 63	Matches: 7(0)	Sequence s: 6(0)
Cytochrome c OS=Homo sapiens GN=CYCS PE=1 SV=2				
<u>CYC_PANTR</u>	Mass: 11741	Score: 63	Matches: 7(0)	Sequence s: 6(0)
Cytochrome c OS=Pan troglodytes GN=CYCS PE=1 SV=2				
<u>CYC_PONAB</u>	Mass: 11741	Score: 63	Matches: 7(0)	Sequence s: 6(0)
Cytochrome c OS=Pongo abelii GN=CYCS PE=3 SV=3				

Figura 23. Reporte de resultados de búsqueda de MASCOT para CC

Fuente: MASCOT, registro de resultados

En este reporte se observa la identificación de más de una proteína que coincidió con algunos de los precursores enviados, sin embargo el puntaje asignado no es confiable. Esto se puede observar en el histograma. La región sombreada en verde, es una región donde los puntajes aún no se pueden asumir como probabilidades confiables. El único resultado confiable en este caso fue para el Citocromo C, con un puntaje de 67. Aunque no es un puntaje muy alto, es mayor que 56, por lo que se puede establecer la identidad, y además es el único resultado que se encuentra fuera la de región de incertidumbre.

4 CONCLUSIONES

La metodología TOP DOWN, definitivamente permite la identificación y caracterización de proteínas puras, sin necesidad de digestión previa al análisis por EM. Además es mucho más eficiente por su bajo costo y rapidez ya que simplifica la preparación de la muestra.

La calidad de los espectros está relacionada directamente con el método de preparación de la muestra. El método de preparación *drieddroplet* con la matriz de 2,5 DHB mostró un resultado favorable para la técnica ISD en este trabajo.

El valor de la fluencia del láser, optimizado en este trabajo, permite la obtención de espectros de muy buena calidad, lo cual influye en el éxito y la confiabilidad de los resultados obtenidos mediante el motor de búsqueda.

Los avances en el desarrollo de herramientas bioinformáticas, como softwares de interpretación y procesamiento de datos, motores de búsqueda, entre otros; se hacen cada vez más importantes y necesarios para la agilización y simplificación de procesos de búsqueda y comparación de datos.

5 RECOMENDACIONES

Para próximos análisis de proteínas por espectrometría de masas basados en la técnica MALDI ISD, se recomienda:

Analizar otros parámetros instrumentales que pueden influir en la resolución de las señales, tales como el tiempo de retardo (*delay time*) y el campo de extracción (*extractionfield*).

Analizar cómo influye la capacidad de fragmentación de las matrices en los puntajes de los resultados de identificación, realizando pruebas con otras matrices, más *frías*, tales como 1,5-DAN o 5-ASA.

Crear métodos de adquisición y de procesamiento aprovechando que se pueden modificar y guardar de manera que la adquisición se ejecute automáticamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **HARDOUIN, Julie.** *Protein sequence information by matrix-assisted laser desorption/ionization in-source decay mass spectrometry.* 2007. Mass Spectrometry Reviews, Vols. 26, No.5. Disponible en Wiley Online Library.
2. **HOFFMAN, Edmon de y STROOBANT, Vincent.** Analysis of biomolecules. [aut. libro] Edmond de y STROOBANT, Vincent HOFFMANN. *Mass spectrometry: principles and applications.* Tercera. Chichester : Wiley, 2007, 8.1, págs. 305- 402.
3. **RESEMANN, Anja y SUCKAU, Detlev.** *Automated Acquisition of MALDI-ISD Spectra for the N- and C-terminal Sequence Determination of Intact Proteins.* [prod.] Bruker Daltonik. Bremen , Germany : Bruker Daltonics, 2009. Technical Notes, Vol. 11. #267187.
4. **TAKAYAMA, Mitsuo y SAKAKURA, Motoshi.** *In-Source Decay and Fragmentation Characteristics of Peptides Using 5-Aminosalicylic Acid as a Matrix in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry.* [ed.] Elsevier Inc. Yokohama, Japan : s.n., 2010. American Society for Mass Spectrometry, Vols. 21, 979–988.
5. **LEWIS, J. Kathleen y WEI, Jing y SIUZDAK, Gary.** *Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in peptide and protein analysis.* Septiembre de 2006. Encyclopedia of Analytical Chemistry, Vols. p.5880–5894. Disponible en Wiley Online Library.
6. **Daltonics, Bruker.** MALDI-TOF/TOF Mass Spectrometry; An introduction. 101115 *Introduction Maldi-Tof/Tof.* [Presentacion de power point]. 2013.
7. **HILLENKAMP, Franz y KARAS, Michael.** Fragmentation of MALDI Ions. [aut. libro] Franz HILLENKAMP y Jasna Peter KATALINIC´. [ed.] Franz Hillenkamp and Jasna Peter-Katalinic. *MALDI MS. A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications.* Münster : Wiley, 2007, 1.6, págs. 14-16.
8. **HOFFMAN, Edmon de y STROOBANT, Vincent.** Mass Analysers: Time-of-Flight Analysers. [aut. libro] Edmon de HOFFMANN y Vincent STROOBANT. *Mass spectrometry: principles and applications.* Tercera. Chichester : Wiley, 2007, 2.4, págs. 126-129.
9. **MUSCAT, Dirk.** *In-source decay of hyperbranched polyesteramides in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.* Marzo de 2000. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, Vol. 11 No. 3. Disponible en Elsevier.
10. **CHUL, Yoo, y otros.** *Toward Top-Down Determination of PEGylation Site Using MALDI In-Source Decay MS Analysis.* [ed.] Elsevier Inc. California, USA : s.n., 2009. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, Vol. 20.

11. **DEMUERE, Kevin, VALÉRIE, Gabelica y DE PAUW, Edwin Andre.** *New Advances in the Understanding of the In-Source Decay Fragmentation of Peptides in MALDI-TOF-MS.* [ed.] Elsevier Inc. Liege, Belgium : s.n., 2010. American Society for Mass Spectrometry, Vol. 21.
12. **KOCHER, Thomas, ENGSTRO, Ake y ZUBAREV, Roman A.** *Fragmentation of Peptides in MALDI In-Source Decay Mediated by Hydrogen Radicals.* Uppsala, Sweden : s.n., Enero de 2005. Analytical Chemistry, Vols. 77, No. 1.
13. **WESTMACOTT, G, y otros.** *The influence of laser fluence on ion yield in matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry.* 2002. International Journal of Mass Spectrometry, Vol. 221.
14. **HOFFMAN, Edmon de y STROOBANT, Vincent.** Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization: Principles of MALDI. *Mass spectrometry: principles and applications.* Tercera. Chichester : Wiley, 2007, 1.8, págs. 33- 36.
15. **GmbH, Bruker Daltonik.** Using Mascot as a Top-Down Search Engine with BT 32. *Tutorials for BioTools.* 2010. págs. 1-7.
16. **HJERNO, Karin y JENSEN, Ole N.** MALDI-MS in Protein Chemistry and Proteomics: Computational Tools for Protein Analysis by MALDI-MS. [aut. libro] Franz HILLENKAMP y Jasna Peter KATALINIC´. *MALDI MS. A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications.* Münster : Wiley, 2007, 3.5.
17. **Daltonics, Bruker.** Protein Identification by Top Down Sequencing (In-Source Decay) FLEX Series Software. *FLEX series MALDI TOF Training.* 2010.
18. **GmbH, Bruker Daltonik.** Top-Down Sequencing. 3.2 *Tutorials for BioTools.* [Manual manejo de software]. 2010. Vol. 5, págs. 1-14.
19. **Daltonics, Bruker.** MALDI preparation protocols (peptides, proteins, glycans, oligonucleotides). 100623 *MALDI prep protocols lifescience.* [Presentacion de Power Point]. 2013.
20. **Science, Matrix.** Mascot search parameters. *Protein identification software for mass spct data.* [En línea] http://www.matrixscience.com/help/search_field_help.html.
21. **HILLENKAMP, Franz y KARAS, Michael.** The Correct Choice of Matrix: Sample Preparation. [aut. libro] Franz HILLENKAMP y Jasna Peter KATALINIC. *MALDI MS: A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications.* Münster : Wiley, 2007, 1.8, pág. 18.
22. **LIU, Zhaoyang y SCHEY, Kevin L.** *Optimization of a MALDI TOF-TOF Mass Spectrometer for Intact Protein Analysis.* [ed.] Elsevier Inc. Charleston, USA : s.n., 2005. American Society for Mass Spectrometry, Vol. 16.

BIBLIOGRAFÍA

CHUL, Yoo, y otros. *Toward Top-Down Determination of PEGylation Site Using MALDI In-Source Decay MS Analysis*. [ed.] Elsevier Inc. California, USA : s.n., 2009. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, Vol. 20.

Daltonics, Bruker. MALDI preparation protocols (peptides, proteins, glycans, oligonucleotides). 100623 *MALDI prep protocols lifescience*. [Presentacion de Power Point]. 2013.

Daltonics, Bruker. MALDI-TOF/TOF Mass Spectrometry; An introduction. 101115 *Introduction Maldi-Tof/Tof*. [Presentacion de power point]. 2013.

Daltonics, Bruker. Protein Identification by Top Down Sequencing (In-Source Decay) FLEX Series Software. *FLEX series MALDI TOF Training*. 2010.

DEMUERE, Kevin, VALÉRIE, Gabelica y DE PAUW, Edwin Andre. *New Advances in the Understanding of the In-Source Decay Fragmentation of Peptides in MALDI-TOF-MS*. [ed.] Elsevier Inc. Liege, Belgium : s.n., 2010. *American Society for Mass Spectrometry*, Vol. 21.

GmbH, Bruker Daltonik. Using Mascot as a Top-Down Search Engine with BT 32. *Tutorials for BioTools*. 2010. págs. 1-7.

HARDOUIN, Julie. *Protein sequence information by matrix-assisted laser desorption/ionization in-source decay mass spectrometry*. 2007. *Mass Spectrometry Reviews*, Vols. 26, No.5. Disponible en Wiley Online Library.

HILLENKAMP, Franz y KARAS, Michael. The Correct Choice of Matrix: Sample Preparation. [aut. libro] Franz HILLENKAMP y Jasna Peter KATALINIC. *MALDI MS: A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications*. Münster : Wiley, 2007, 1.8, pág. 18.

HJERNO, Karin y JENSEN, Ole N. MALDI-MS in Protein Chemistry and Proteomics: Computational Tools for Protein Analysis by MALDI-MS. [aut. libro] Franz HILLENKAMP y Jasna Peter KATALINIC. *MALDI MS. A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications*. Münster : Wiley, 2007, 3.5.

HOFFMAN, Edmon de y STROOBANT, Vincent. Analysis of biomolecules. [aut. libro] Edmond de y STROOBANT, Vincent HOFFMANN. *Mass spectrometry: principles and applications*. Tercera. Chichester : Wiley, 2007, 8.1, págs. 305- 402.

KOCHER, Thomas, ENGSTRO, Ake y ZUBAREV, Roman A. *Fragmentation of Peptides in MALDI In-Source Decay Mediated by Hydrogen Radicals*. Uppsala, Sweden : s.n., Enero de 2005. *Analytical Chemistry*, Vols. 77, No. 1.

LEWIS, J. Kathleen y WEI, Jing y SIUZDAK, Gary.*Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in peptide and protein analysis.* Septiembre de 2006. Encyclopedia of Analytical Chemistry, Vols. p.5880–5894. Disponible en Wiley Online Library.

LIU, Zhaoyang y SCHEY, Kevin L.*Optimization of a MALDI TOF-TOF Mass Spectrometer for Intact Protein Analysis.* [ed.] Elsevier Inc. Charleston, USA : s.n., 2005. American Society for Mass Spectrometry, Vol. 16.

MUSCAT, Dirk.*In-source decay of hyperbranched polyesteramides in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.* Marzo de 2000. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, Vol. 11 No. 3. Disponible en Elsevier.

RESEMANN, Anja y SUCKAU, Detlev.*Automated Acquisition of MALDI-MS Spectra for the N- and C-terminal Sequence Determination of Intact Proteins.* [prod.] Bruker Daltonik. Bremen , Germany : Bruker Daltonics, 2009. Technical Notes, Vol. 11. #267187.

Science, Matrix. Mascot search parameters. *Protein identification software for mass spect data.* [En línea] http://www.matrixscience.com/help/search_field_help.html.

TAKAYAMA, Mitsuo y SAKAKURA, Motoshi.*In-Source Decay and Fragmentation Characteristics of Peptides Using 5-Aminosalicylic Acid as a Matrix in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry.* [ed.] Elsevier Inc. Yokohama, Japan : s.n., 2010. American Society for Mass Spectrometry, Vols. 21, 979–988.

WESTMACOTT, G, y otros.*The influence of laser fluence on ion yield in matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry.* 2002. International Journal of Mass Spectrometry, Vol. 221.