

INFORME MASAS: REGISTRO 2010_135

ANÁLISIS REALIZADO POR: Dra Luz Valero

DATOS:

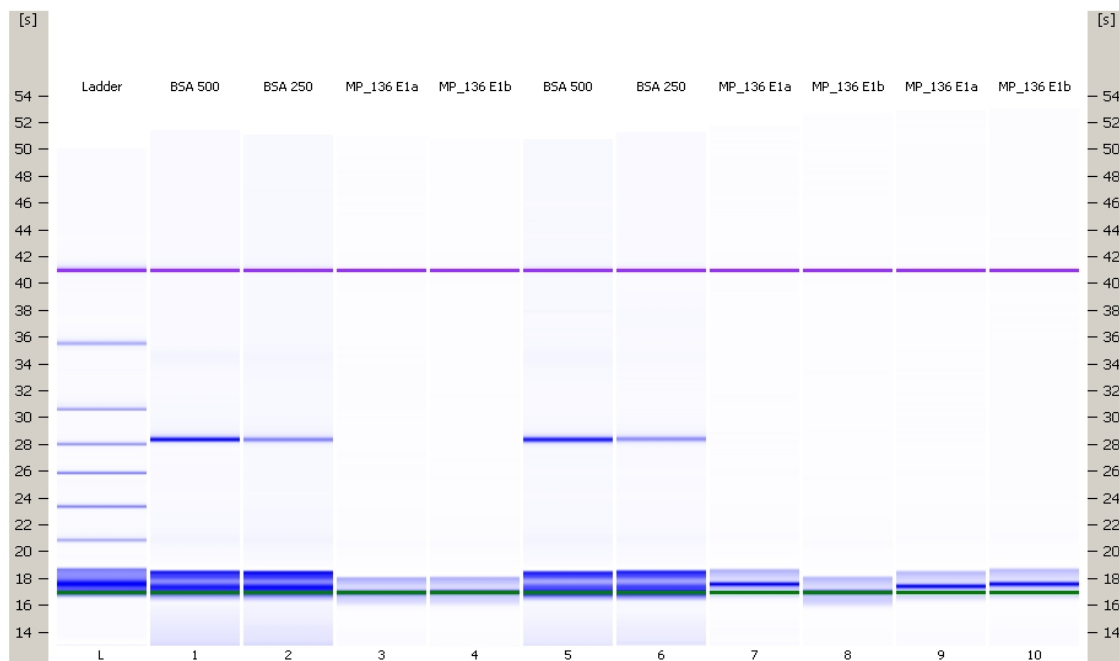
Número de muestras: 1

Disponemos de dos alícuotas en solución con un volumen de aproximadamente 100 uL

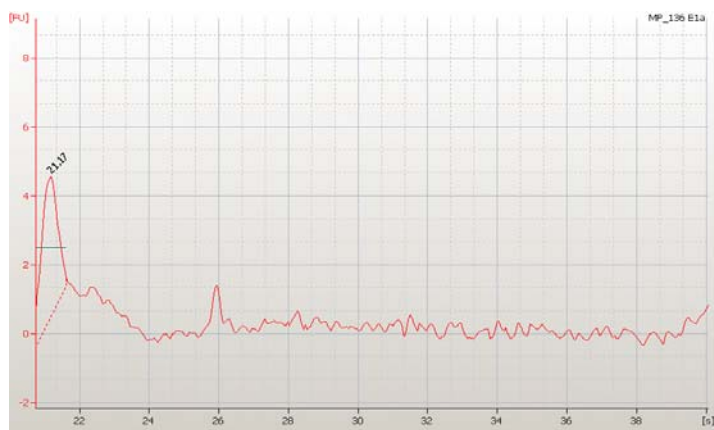
Observaciones: Se incluye en el procesado de las muestras un plug de Mioglobina de 75 ng como control de la digestión y un blanco con los reactivos para determinar el origen de una posible contaminación por queratinas

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA:

Las alícuotas presentan un precipitado marrón. Centrifugamos y tomamos los sobrenadantes
Se cuantifican los sobrenadantes (4 uL) con Bioanalyzer de Agilent.



NO se aprecian bandas de proteína en la muestra por lo que no podemos cauntificarla.



Una ampliación del electroferograma tampoco permite detectar bandas de proteína

DIGESTIÓN:

Tripsina: **100 ng en 50 mM AmBic pH8**

Tiempo de incubación: **37°C on**

Parar la reacción con 10 uL de TFA 10%, medir pH:1

Se combinan los digeridos y se concentran en speed vac a 6 uL

Se digieren igual los pellets de color marrón presentes en los tubos aunque no es posible disolverlos

ESPECTROMETRÍA DE MASAS

MALDI-TOF TOF (4700 PA)

Se analiza el pellet precipitado digerido para detectar la presencia de péptidos tripticos

SPOTEO DIRECTO	
Spot Set: 100727	
Muestra	Posiciones
Control	A4
Blanco	A7
Pellet digerido	F5

run 30/31

Antes del análisis de las muestras se calibra la placa y los métodos de adquisición. Se adquieren los espectros de MALDI TOF MS en modo reflectrón positivo (4700 Proteomica Analyzer, ABI) y se seleccionan automáticamente 5 iones entre aquéllos de mayor intensidad, excluidos los que corresponden a contaminaciones conocidas. Se realiza una calibración interna con los picos de autodigestión de la tripsina. Se obtiene el espectro de fragmentación de cada uno de estos iones (1kV, CID on con air medium pressure). Se realiza una inspección visual de la calidad de los espectros. En caso de no obtener una identificación positiva se concentra la muestra por evaporación y vuelve a analizarse de la misma forma.

NO DETECTAMOS LA PRESENCIA DE PÉPTIDOS TRÍPTICOS EN EL DIGERIDO DEL PELLETT DE LAS MUESTRAS

ANÁLISIS DE RESULTADOS

GPS: **2010_135 (MP)**

La información combinada de MS y MSMS se envía conjuntamente a través del software GPS (Applied Biosystems) a un servidor de MASCOT residente.

http://www.matrixscience.com/search_intro.html

BASES DE DATOS: SwissProt

nanoLC MALDITOF (4700 PA, ABSciex)

Método Cromatográfico: **5a45_120min**

Vinyección: 5 uL

El 50% de la muestra se carga en una trap column (LC Packings PepMap C18, 300 um x 5 mm; Amsterdam The Netherlands)

via un flujo isocratico de 0.1% TFA a 40 uL/min durante 3 min.

De la precolumna los peptidos se influjan en la columna analitica (LC Packings PepMap C18 3 u 100 Å, 75 um x 15 cm; Amsterdam The Netherlands) y se eluyen con un gradiente lineal

5a50%B en una placa para espectrometro de masas MALDITOF.

Simultáneamente se deposita matriz ACH en cada fracción colectada. La matriz contiene 30 fmol/uL de GluFib como calibrante interno. A: 0.1% FA; B: 95% ACN, 0.1% FA

Las fracciones colectadas se analizan como 'wide-job run' en el espectrómetro 4700 PA

Spot Set: LC100803		
Muestra	Posiciones	run
Muestras combinada	1-576	9/10

Antes del análisis de las muestras se calibra la placa y los métodos de adquisición. Se adquieren los espectros de MALDI TOF MS en modo reflectrón positivo (4700 Proteomica Analyzer, ABI) y se seleccionan automáticamente 5 iones entre aquéllos de mayor intensidad, excluidos los que corresponden a contaminaciones conocidas. Se realiza una calibración interna con GluFib. Se obtiene el espectro de fragmentación de cada uno de estos iones (1kV, CID medium pressure).

ANÁLISIS DE RESULTADOS

MASCOT: 2010_135 (MP)

La información combinada de MSMS del analisis se envía conjuntamente a MASCOT (v2.2) a través del software GPS 3.6 (ABI).

BASES DE DATOS: SwissProt

Antes del análisis se calibra el instrumento y se analizan 200 fmol de una mezcla de 6 proteínas digeridas como control del mismo (LC Packings)

Control Sensibilidad nanoLC MALDITOF

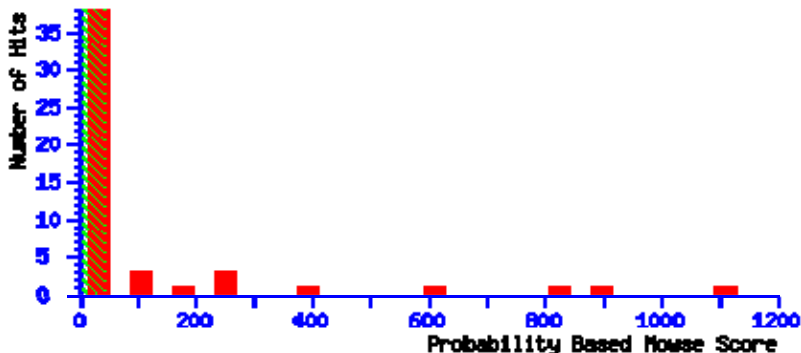
Significant hits:	SCORE
TRFE_BOVIN	1113
ALBU_BOVIN	892
BGAL_ECOLC	613
ADH1_YEAST	413
CYC_BOVIN	247
LYSC_CHICK	245

Probability Based Mowse Score

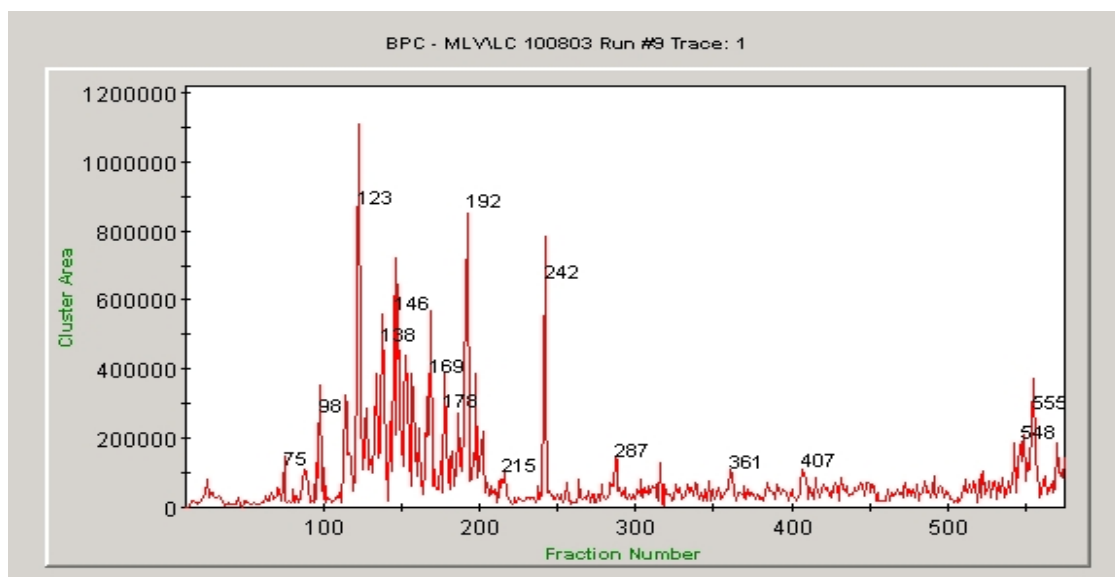
Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.

Individual ions scores > 43 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).

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



Análisis muestra



INFORME MASAS: REGISTRO 2010_135

ANÁLISIS REALIZADO POR: [Dra Luz Valero](#)

IDENTIFICACIONES

CONTROL DIGESTION

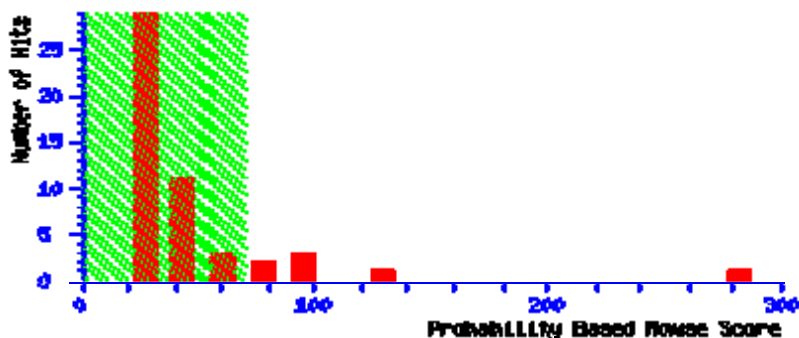
TOP SCORE: 282 for **ALBU_BOVIN**, Serum albumin

Probability Based Mowse Score

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

Protein scores greater than 70 are significant ($p < 0.05$).

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



ANÁLISIS MUESTRAS

ANÁLISIS MASCOT

MS data file : pps_LC 100803_1280933241.txt

Database : Sprot 20100224 (514789 sequences; 181163771 residues)

Taxonomy : Saccharomyces Cerevisiae (baker's yeast) (6552 sequences)

Search Parameters

Type of search : MS/MS Ion Search

Error tolerant search : All significant protein hits

Enzyme : Trypsin

Fixed modifications : Carbamidomethyl (C)

Mass values : Monoisotopic

Protein Mass : Unrestricted

Peptide Mass Tolerance : ± 100 ppm

Fragment Mass Tolerance: ± 0.6 Da

Max Missed Cleavages : 1

Instrument type : MALDI-TOF-TOF

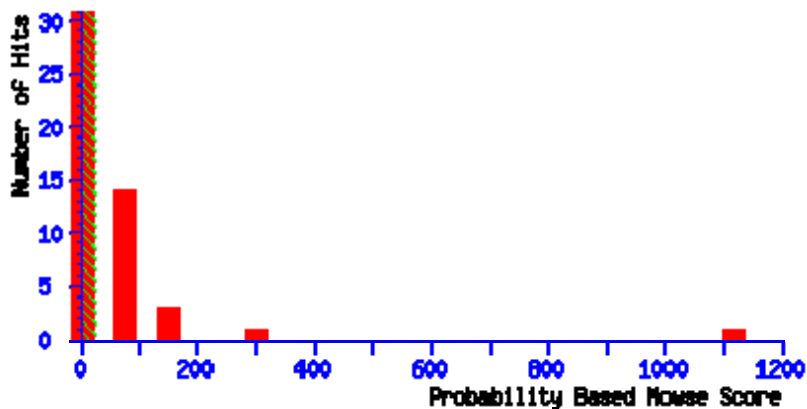
Number of queries : 883

Probability Based Mowse Score

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

Individual ions scores > 21 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).

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



Protein hits :

YL455_YEAST	PWWP domain-containing protein YLR455W OS=Saccharomyces cerevisiae
H2B1_YEAST	Histone H2B.1 OS=Saccharomyces cerevisiae GN=HTB1 PE=1 SV=2
RL13B_YEAST	60S ribosomal protein L13-B OS=Saccharomyces cerevisiae GN=RPL13B PE=1 SV=1
RL4A_YEAST	60S ribosomal protein L4-A OS=Saccharomyces cerevisiae GN=RPL4A PE=1 SV=4
RL19_YEAST	60S ribosomal protein L19 OS=Saccharomyces cerevisiae GN=RPL19A PE=1 SV=5
RL12_YEAST	60S ribosomal protein L12 OS=Saccharomyces cerevisiae GN=RPL12A PE=1 SV=1
TAF14_YEAST	Transcription initiation factor TFIID subunit 14 OS=Saccharomyces cerevisiae
H4_YEAST	Histone H4 OS=Saccharomyces cerevisiae GN=HHF1 PE=1 SV=2
RL33B_YEAST	60S ribosomal protein L33-B OS=Saccharomyces cerevisiae GN=RPL33B PE=1 SV=2
RLA0_YEAST	60S acidic ribosomal protein P0 OS=Saccharomyces cerevisiae GN=RPP0 PE=1 SV=1
RL14A_YEAST	60S ribosomal protein L14-A OS=Saccharomyces cerevisiae GN=RPL14A PE=1 SV=1
RS17A_YEAST	40S ribosomal protein S17-A OS=Saccharomyces cerevisiae GN=RPS17A PE=1 SV=1
RS5_YEAST	40S ribosomal protein S5 OS=Saccharomyces cerevisiae GN=RPS5 PE=1 SV=3
H2A1_YEAST	Histone H2A.1 OS=Saccharomyces cerevisiae GN=HTA1 PE=1 SV=2
RIM1_YEAST	Single-stranded DNA-binding protein RIM1, mitochondrial OS=Saccharomyces cerevisiae
ACT_YEAST	Actin OS=Saccharomyces cerevisiae GN=ACT1 PE=1 SV=1
RL1_YEAST	60S ribosomal protein L1 OS=Saccharomyces cerevisiae GN=RPL1A PE=1 SV=1
RL6A_YEAST	60S ribosomal protein L6-A OS=Saccharomyces cerevisiae GN=RPL6A PE=1 SV=2
RS15_YEAST	40S ribosomal protein S15 OS=Saccharomyces cerevisiae GN=RPS15 PE=1 SV=1
RL7A_YEAST	60S ribosomal protein L7-A OS=Saccharomyces cerevisiae GN=RPL7A PE=1 SV=3
RL33A_YEAST	60S ribosomal protein L33-A OS=Saccharomyces cerevisiae GN=RPL33A PE=1 SV=3
RL30_YEAST	60S ribosomal protein L30 OS=Saccharomyces cerevisiae GN=RPL30 PE=1 SV=3
RL25_YEAST	60S ribosomal protein L25 OS=Saccharomyces cerevisiae GN=RPL25 PE=1 SV=4
H3_YEAST	Histone H3 OS=Saccharomyces cerevisiae GN=HHT1 PE=1 SV=2
RS19A_YEAST	40S ribosomal protein S19-A OS=Saccharomyces cerevisiae GN=RPS19A PE=1 SV=2
RL39_YEAST	60S ribosomal protein L39 OS=Saccharomyces cerevisiae GN=RPL39 PE=1 SV=3
YNG1_YEAST	Protein YNG1 OS=Saccharomyces cerevisiae GN=YNG1 PE=1 SV=1
RL20_YEAST	60S ribosomal protein L20 OS=Saccharomyces cerevisiae GN=RPL20A PE=1 SV=2
RCA1_YEAST	Mitochondrial respiratory chain complexes assembly protein RCA1
RL18_YEAST	60S ribosomal protein L18 OS=Saccharomyces cerevisiae GN=RPL18A PE=1 SV=1
SIN3_YEAST	Transcriptional regulatory protein SIN3 OS=Saccharomyces cerevisiae GN=SIN3
RL27A_YEAST	60S ribosomal protein L27-A OS=Saccharomyces cerevisiae GN=RPL27A PE=1 SV=1

ANÁLISIS PROTEIN PILOT

ANALYSIS PARAMETERS

MS/MS Job Run: (10) 8/3/2010 9:50:08 PM, Chromatogram(s): 1, Parent Job Run: (9) 8/3/2010 6:56:58 PM

Sample Type: Identification
Cys. Alkylation: None
Digestion: Trypsin
Instrument: 4700
Special Factors: NO
Species: Saccharomyces cerevisiae
ID Focus: Biological modifications
Database: Spot_20100224.fasta
Search Effort: Thorough
FDR Analysis: No
User Modified Parar Yes

Protein ID		Spectra			
ID Statistics (Protein-Thresholded): 1701 total spectra, 1701 non-empty spectra; 6553 proteins searched					
Unused (Conf) Cutoff	Proteins Detected	Proteins Before Grouping	Distinct Peptides	Spectra Identified	% Total Spectra
>2.0 (99)	16	25	138	266	15.6
>1.3 (95)	30	41	180	333	19.6
>0.47 (66)	37	50	211	384	22.6
Cutoff Applied: >1.3 (95%)	30	41	180	333	19.6

SE ADJUNTA AL INFORME FICHEROS DE TEXTO CON LAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS Y CON LA ASIGNACIÓN DE LOS DIFERENTES PÉPTIDOS.

[MP 2010_135 2adquisiciones_PeptideSummary.txt](#)

[MP 2010_135 2adquisiciones_ProteinSummary.txt](#)