Vocabulaire

PTM post traductinal Modifications

Nano LC (ou HPLC) nano-chromatographie en phase liquide.

PSM Spectre assimilé à un peptide (peptide spectrum match)

Analyse à chaque instant les 20 ions les plus intense/

Liste d’inclusion

Logiciel

Tune

X Calibur le lanceur et .

Discover Protéom

Outils de traitement des donnés de MS :

* Discover Proteom (algorithme utilisé Sequest
* Peaks

## X calibur

Freestyle : retraitement des données.

Instrument : méthodes de traitement des échantillons.

### Déclarer un nouveau traitement

Enregistrer le traitement dans Data:/par équipe/

Exemple : HELA/AAMMJJ

Position : (B – blue ; G – green ; R – red) Lettre Chiffre

## Discover Proteom

Nouvelle études + \_AAMMJJ

Créer nouveau dossier.

1. Charger les données > Add files.
2. Enregistrer sur le Réseau exploris 48à : D:/
3. New analysis : saisir les paramètres
4. Méthode édit PP2.5
5. Consensus et processing (consensus souvent sans filtre).
6. Charger les échantillons indépendamment les uns des autres.
7. Lancer
8. Les données d’analyse sont visibles dans consensus.

# Préparation de l’échantillon

Deux étapes :

1. Purification des protéines sur gel SDS-Page
2. Digestion enzymatique et transformation en solution.

## Purification sur gel SDS-Page

Il faut préparer :

* Une solution SDS (dénaturant et liquide de migration). Dissoudre la poudre dans de l’eau. Les quantités sont indiquées sur le pot de SDS.
* Poids moléculaire à prendre dans le congélo.
* Les puits vides sont comblés avec du Laemmli (dans le frigo).
* Un gel industriel (standardisation). Pensez à retirer le peigne et la bande en dessous du gel.

La dénaturation des protéines se fait par température et l’utilisation du SDS.

Important :

* Éviter les puits aux extrémités (effet de bord).
* Noter la position de chaque échantillon avant de déposer les échantillons.

Poids moléculaire : 3uL.

Échantillon d’intérêt : 10ug de protéines.

Laemmli : 10uL.

La migration se fait à 200V à voltage constant.

On arrête la migration lorsque à presque atteint le bas du gel.

Rincer la boite où l’on posera le gel et les outils de démoulage à l’eau et l’éthanol.

## Maintenance chromatographie

Solution :

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Nom | Composition |  |
| A’ | 98% H20  2% d’acétonitrile  0,05% TFA | liquide de chargement de l’échantillon |
| A | 100% H20  0,1% acide formique |  |
| B | 100% acétonitrile  0,1% acide formique | éluant |
| Isopropanol | 10% isopropanol |  |

Le TFA pouvoir chroma d’accrochage et de décrochage des sels.

Purge des tuyaux :

* Ouvrir vanne A et B complétement.
* Ouvrir vanne Solvant un petit peu.

Purge du flow :

1. Ajout de l’embout « viper out »
2. Dans Tune : Flow Meter > Purge.
3. Fixer le débit flowload à 10uL/min.
4. Vanne (
   * + Position 1-2 connecté à la pré colonne.
     + Position 6-1 décroche l’échantillon.

Nettoyage après calibration :

* Dans un Falcon de 12 : 50% acétonitrile et 50% d’eau.

Positionnement de l’aiguille du MS :

* Température du bloque à régler à 40°C. Débit à :
  + 300uL à 40°C.
  + 100uL à température ambiante.
* Vérifier la pression. Le débit doit augmenter progressivement.

# Maintenance MS

La calibration du spectromètre de masse se fait en deux étapes :

1. Calibration
2. Validation des paramètres sur un échantillon de lignée HeLa.

## Calibration

Deux types de calibrations :

* Tous les paramètres : Mass & system > Recalibration de tous les paramètres.
* (Petite) calibration uniquement des masses.

Seul la procédure logiciel change (voir précédemment) :

1. Prendre la seringue (anglais : syringe).
2. Prélever 500uL de calibrant.
3. Dans le logiciel Tune
   1. System On
   2. 50uL/min puis au bout d’une minute, passer à 20uL, puis 10 puis 5uL/min

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  | Chaine nano |
| Différence de potentiel | 3 4000 | Entre 1 500 et 2 000 |
| Type mass |  |  |

Vérifier le TIC statuts variation du courant moyenne ne varie pas de plus de 7%.

Temps d’injection des ions :

Temps entre chaque cycle

Accumulation éjecte et autre ions.

+ intensité + NL du signal

Environ

<1ms

## Validation des paramètres de MS

Préparation de deux échantillons :

* Lavage de 200uL
* Cellules HeLa de 12uL

Digestion de cellules HeLa Lyophilisé 20ug

40u acide formique.

NB : La solution de la lavage est positionnée de préférence en position E8.

Dans X calibur :

* Instrument > Méthodes de traitement :
  1. HeLa 150 QC gradient
  2. Vitesse de traitement des échantillons
* Créer un fichier de traitement pour les deux échantillons (voir X Calibur) :
* Lavage de 60 minutes.
* Boucle de 20uL à 5uL.
* 3 lavages.
* 3 à 5 prélèvement de 1uL de HeLa

Attention vérifier, le volume prélevé, la méthode et la position.

Lancer sélectionner l’ensemble et « Run sequence »

Paramètre Orbitrap :

|  |  |
| --- | --- |
|  | Résolution |
| Full scan = MS | 20 000 |
| MS/MS = 20 ions avec la plus haute intensité. | 15 000 |

# Traitement des données de MS

Résultat dans l’étape Consensus.

# Séquençage de peptide

AURE-------------------------------------

Même temps deux filtres pour limiter l’analyse des molécules non protéiques :

* Éliminant les ions mon-chargés.
* FAIM

Quantification absolue gamme étalon avec marquage à l’isotope

Comparaisons avec les échantillons d’intérêts et report sur une courbe étalon.

Attention la quantification relative ne fonctionne que lorsque l’on est dans des conditions comparables.

Radioactif est différent d’isotope non radioactif = stable.