Vocabulaire

PTM post traductionnel Modifications

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

PSM spectre assimilé à un peptide (Peptid Spectrum Match)

Informations générales :

* À chaque cycle, les 20 ions les plus intenses sont fragmentés et analysés en MS/MS.
* Paramètres de l’orbitrape :
  + Résolution :
    - Full scan (ou MS) à 20 000
    - MS/MS (les 20 ions avec la plus haute intensité) à 15 000

# Logiciel

* Tune
* X Calibur le lanceur des
* Outils de traitement des donnés de MS :
  + Discover Proteom (algorithme utilisé Sequest).
  + Peaks séquençage de novo.

## X calibur

Freestyle : retraitement des données.

Instrument : méthodes de traitement des échantillons.

### Lancer une campagne d’analyse

NB : La solution de la

est positionnée de préférence en position E8.

Dans X calibur :

1. Instrument > Méthodes de traitement :
   * HeLa 150 QC gradient
   * Vitesse de traitement des échantillons
2. 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
3. Lancer sélectionner l’ensemble et « Run sequence ». Attention vérifier, le volume prélevé, la méthode et la position.

### 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

### Traitement des données de MS

Nommage de l’étude : Nouvelle études + \_AAMMJJ

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

# Préparation de l’échantillon

Deux étapes :

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

## Purification et dénaturation des protéines sur gel SDS-Page

Ingrédients :

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

Important :

* Éviter les puits aux extrémités (effet de bord).
* Noter la position de chaque échantillon avant de les déposer.
* Les puits vides sont comblés avec du Laemmli.

Par puit :

* Poids moléculaire : 3uL.
* Échantillon d’intérêt : 10ug de protéines avec Laemmli : 10uL.

Configuration de la cuve :

* 200V à voltage constant.
* La migration est arrêtée lorsque à presque atteint le bas du gel.

Démoulage du gel :

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

## Transformation en peptides

La transformation des protéines en peptides se fait en deux étapes :

1. Réduction des ponts disulfure.
2. Digestion par la trypsine.

### Réduction des ponts disulfures

1. Lavage des morceaux de gels
   1. 2x lavages à 50% eau – 50% acétonitrile
   2. 1x Lavage à 100% acétonitrile.
2. Réduction des ponts disulfures. Le tampon de dilution est l’acétate d’ammonium à 100mM.
   1. DTT à 10mM à 56 C° pendant 30 minutes (aliquot à 1M de volume 10uL) entre 50 et 70uL. L’important est de recouvrir les gels.
   2. Vortexer et centrifuger.
   3. Iodoacétamide à 55mM. Attention photo et thermo sensible. Même volume que pour le DTT.
3. Lavage comme à l’étape 1.

### Digestion par la trypsine.

1. Remplacer le milieu de lavage avec un milieu d’iodoacétamide à 50mM durant 15 minutes.
2. Ajouter la trypsine, elle atteint une activité optimale à 1ng/uL :
   1. La trypsine présente dans des aliquots de 10uL à 1ug/uL. (les aliquots sont faits à partir de 100ug de trypsine dans100uL d’acide acétique).
   2. Diluer 100x la trypsine dans de la solution tampon d’iodoacétamide à 50mM.
3. Laisser durant une nuit à 37°C sous agitation.
4. Évaporation des échantillons.
5. Récupérer le surnageant qui contient les peptides et la trypsine.
6. Extraction des peptides par lavage des blocs de gels :
   1. Solution d’acide formique à 1%. Il faut juste recouvrir les blocs de gel.
   2. Solution 100% d’acétonitrile.
7. Évaporation des solvants par centrifugation à vide.

## Reprise des échantillons pour la MS

Les échantillons sont repris dans une solution à 0.1% d’acide formique. En fonction de la quantité de protéines, il faut en général entre 15uL à 20uL par échantillon.

# 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.

Seule 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 |

Vérifier que :

* le TIC statuts variation du courant moyenne ne varie pas de plus de 7%.
* Temps d’injection des ions :
* Temps entre chaque cycle : <1ms
* Accumulation éjecte et autre ions :

## Validation des paramètres de MS

Le contrôle se fait à partir de protéines de HeLa lyophilisée. Avant toute campagne d’analyse.

Préparation de deux échantillons :

* Lavage de 200uL d’acide formique à 0.1%.
* 200 ng/uL de protéines cellules HeLa. Volume final de 12,5uL.

Préparation des aliquots :

1. Lyophiliser à mettre 30 minutes à température ambiante.
2. Reprendre la poudre lyophilisée dans 40uL d’une solution à 0,1% d’acide formique.
3. Distribuer 5uL dans des aliquots à reprendre avec 7,5uL de 0,1% acide formique.

## Maintenance chromatographie

Solution :

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Nom | Composition | Information |
| A’ noté 412 | 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.

L’acide formique permet de charger les protéines en protons (H+).

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