

PROTEOMIKA

Darula Zsuzsa, Gulyás Éva, Klement Éva és Medzihradszky-Fölkl Katalin¹

Napjainkig a tudományos kutatás általában úgy folyt, hogy a kutatók felállítottak egy hipotézist, ennek alapján kísérleteket terveztek, amelyek eredményei a hipotézis bizonyítékát vagy cáfolatát szolgáltatták. Manapság gyakrabban folytatunk ún. rendszer-biológiai vagy az angol kifejezés tükörfordításával élve “felfedezések-hajtotta” kutatást. Persze ilyesmi régebben is létezett, hiszen a hipotézisek kialakításához szükség volt előzetes megfigyelésekre, adatokra. A különbség az, hogy most tudatosan próbálunk nagy mennyiségű kvalitatív és kvantitatív adatot gyűjteni egy adott rendszerről alapállapotban (kontroll) és különböző egyéb helyzetekben – pl. stimulánsok hatása után, vagy stressz helyzetben, vagy “meghibásodás esetén” azaz betegségek során stb., továbbá, hogy az adatok feldolgozása nem csupán egy jó megfigyelő-képességű egyén agyában zajlik, hanem megfelelő informatikai infrastruktúra (hardver és szoftver) segítségével.

A humán genom szekvenálása volt a legjelentősebb az úttörő-jellegű nagy volumenű és nem hipotézisen alapuló projektek közül. Hatalmas elvárásokkal indult ez az akkor éveket igénybevevő, nemzetközi összefogást igénylő munka. Joggal (és naivan) hittük, hogy a teljes genom szekvenciával kezünkbe kapjuk a kulcsot az emberiség sokszínűségéhez, megértjük majd a különbséget egészség és betegség között stb. Bizonyos csalódással kellett tudomásul vennünk, hogy nem így van, hogy nem ennyire egyszerű a dolog. A kutatás azóta is folyik, hogy minél több információt kicsikarjunk az összegyűjtött genetikai adatokból, de közben más területeken is megindult a hasonló, nagy volumenű “eredeti adatfelhalmozás”.

A genom-szekvenálás egyik hatalmas eredményeképp a fehérje-adatbázisok “feldagadtak”. Fehérjéink szekvenciája ott rejlik genetikai kódunkban. A lefordítás nem teljesen egyértelmű – de ennek magyarázata túlmutat ezen a fejezeten – a lényeg annyi, a genom szekvenálás eredményeképp rengeteg “lehetséges fehérje” szekvenciája jelent meg az adatbázisokban. Csak éppen azt nem lehetett tudni ezekből az adatokból, megszintetizálja-e szervezetünk valaha is ezeket a fehérjéket. És ha igen, mikor, mennyit és milyen formában.

¹ MTA SzBK Proteomikai Kutatócsoport
http://www.brc.hu/cent_proteomics_research_group.php?change_lang=hu

Mindenekelőtt tisztázzuk az alapfogalmakat. (<http://hu.wikipedia.org/wiki/Fehérje>; <http://hu.wikipedia.org/wiki/Aminosavak>) A fehérjék többnyire húszféle, ún. fehérje-alkotó aminosavból épülnek fel. Egy aminosav általános képlete $\text{NH}_2\text{-CH(R)-COOH}$. Precízebben L α -aminosavokról van szó. A görög betű azt jelzi, hogy az aminocsoport a főfunkciónak tekintett karboxil-csoporthoz közvetlenül kapcsolódó szénatomon van. Ugyanehhez a szénatomhoz kapcsolódik az aminosavat azonosító oldallánc (R). Miután egy szénatomhoz négyféle különböző csoport kapcsolódik (a glicin kivételével), és ez az elhelyezkedés tetraédes, ennek az a következménye, hogy ezen vegyületek két változatban léteznek, egymás tükörképi párjaként. Úgy mondjuk, hogy optikai izomerek. Szervezetünk a két variációból csak az egyiket hasznosítja, ezt jelzi az 'L' betű. A fehérjékben az aminosavak ún. peptidkötéssel kapcsolódnak egymáshoz: $\text{NH}_2\text{-CHR}_1\text{-CO-NH-CHR}_2\text{-CO-...NH-CHR}_n\text{-COOH}$. Konvenció szerint mindig a szabad aminocsoport, azaz az amino- vagy N-terminus felől kezdjük leírni az aminosavak sorrendjét, azaz szekvenciáját. A jobb oldalon lévő véget, karboxi- vagy C-terminálisnak nevezzük. Az aminosavak megfelelő (hírvivő azaz „messenger” RNS által közvetített) sorrendben való összekapcsolása az ún. transláció. Már az aminosav-lánc kiépítése közben, de főképp utána, kémiai változások történhetnek a fehérjékkel: pl. a láncot egy másik fehérje (enzim) darabokra hasíthatja, vagy egy kémiai aktív oldalláncra valami módosító csoportot pakolhat. Ezek az ún. poszt-transzlációs módosítások. Szerepük sokféle lehet – bizonyos enzimek, hormonok aktivitásához az kell, hogy elveszítsék szekvenciájuk egy részét; a jelátvitelhez foszfát-csoportokat kell egy fehérje adott oldalláncára helyezni, majd amikor betöltötte funkcióját, el kell távolítani; vannak fehérjék, amiket oldallánc-módosító zsírsav-„horgony” rögzít a sejtmembránhoz stb.

Tehát az analitikus feladata az, határozza meg, milyen fehérjék vannak jelen egy fehérje-komplexben, vagy egy sejt organellumban, vagy akár egy teljes sejtben. Aztán, ha ezt kiderítette, mondja meg azt is, milyen módosítások estek meg ezzel a fehérjével, és lehetőleg kvantitatív választ is adjon mindezekre a kérdésekre.

Igen ám, de hogyan?

Fehérjéket régen is analizáltunk. Ha az aminosav sorrendre voltunk kíváncsiak, kémiai reakcióhoz folyamodtunk, pontosabban olyan reakció-sorozathoz, ami megjelölte az N-terminális aminosavat, aztán lehasította, azonosította, és utána kezdte a folyamatot előlről az immáron új terminális aminosavval. Ezt hívják Edman-degradációnak, vagy Edman szekvenálásnak. Elég sok (>10 pmól) és egységes anyag kell hozzá, nem működik olyan fehérjékre, ahol az N-terminális módosítva van (a “blokkolt” vég

meglehetősen gyakori). (http://en.wikipedia.org/wiki/Protein_sequencing#Edman_degradation; <http://www.biotech.iastate.edu/facilities/protein/nsequence494.html>) Immunreakción alapuló detektálással (ún. Western blot; http://en.wikipedia.org/wiki/Western_blot) szintén azonosíthatunk fehérjéket. Ez többnyire nagyon specifikus, és rendkívül kevés fehérjét is detektál. Csak az a bibi, hogy előre tudnunk kell, mit keresünk.

A megoldást a modern tömegspektrometria szolgáltatta.

(http://en.wikipedia.org/wiki/Protein_mass_spectrometry)

A cél: molekulák szerkezetének meghatározása tömegmérés alapján. Ehhez először meg kell határozni a teljes molekula tömegét minél pontosabban. Aztán valahogy darabokra kell törni a molekulát, és a darabok tömegét is meg kell mérni. Ha ismert szerkezetű molekulákkal kezdünk, kitalálhatjuk a “fragmentálódás” szabályait, és a tanultakat alkalmazhatjuk ismeretlen molekulákra.

Mérleg híján egyéb fizikai eszközöket kell alkalmaznunk. Ionok jól terelgethetőek elektromos és mágneses térben – tehát szortírozhatóak és mérhetőek. Tehát a mérendő molekulákat ionizálni kell (nagy vákuumban, hogy ne veszítsük el az ionokat a levegő alkotóival való ütközések során).

Nem térhetek ki a technikai részletekre, ez megint egy külön fejezet lenne (http://en.wikipedia.org/wiki/Mass_spectrometry).

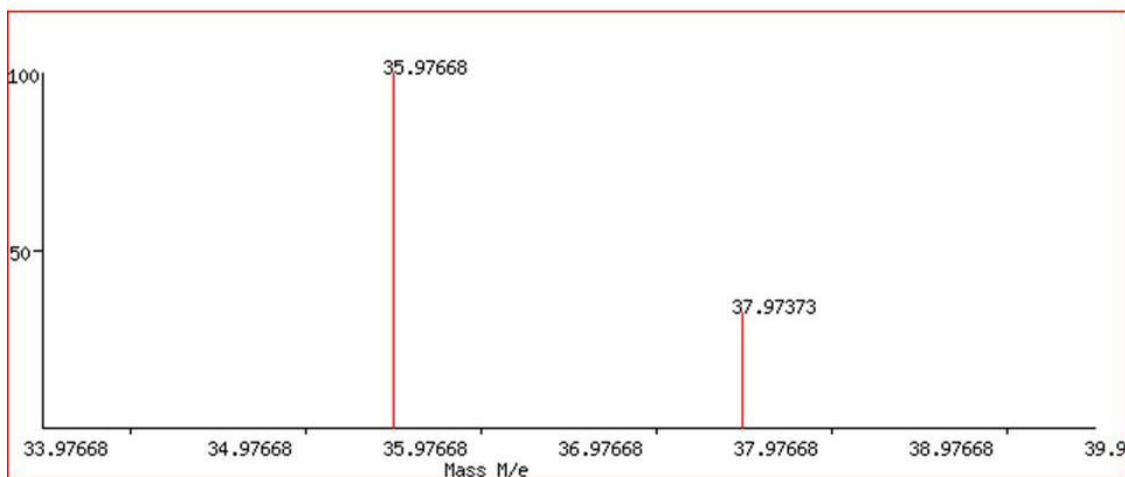
A lényeg az, hogy fehérjék, vagy fehérje-darabkák, ún. peptidok ionizációjára az ún. “electrospray” (elektro-porlasztás) a legalkalmasabb. Nobel díjas feltalálójának, John Fenn-nek a régóta használt festékszóró adta az ötletet: szűk kapillárisban áramlik a vizsgálandó oldat, a kapillárison néhány kV feszültség, a tömegspektrométer bemeneti nyílása pár milliméterre van, leföldelve, a potenciálkülönbségnek hála többszörösen töltött cseppecskék képződnek, amikről a rövid úton (amíg eléri az “ajtót”) “lehámozódnak” az oldószer-molekulák, és a készülékbe már a többszörösen töltött peptid-ionok lépnek. A fehérjékben bőven akad bázikus csoport, a használt oldószer rendszerint tartalmaz egy kevés savat, így rendszerint egyszeresen vagy többszörösen protonált ionokat tanulmányozunk.

A tömegspektrométer megfelelő fizikai megoldásokkal tömeg/töltés (m/z) arány alapján válogatja szét az ionokat. A legegyszerűbben megmagyarázható megoldás a repülési idő mérése. A belépő ionokat egy elektród az eredeti repülési irányra merőlegesen kilöki és a repülési cső végén detektáljuk a beérkező ionokat. Miután minden ion ugyanakkora feszültséggel lökünk ki, minél nehezebb egy ion, annál kisebb sebességre tesz szert, azaz lassabban repül. Minél több töltés van egy adott tömegű ionon, annál sebesebben ér célba. Az óra abban a pillanatban indul, amikor az ionokat meglöki az elektród. Modern

technikával már pár nanosecundum (10^{-9} másodperc) időkülönbséget is detektálni tudunk. Az ionok útja elég kurta (mondjuk 1-2 m), és általában m/z 2000 a méréshatár. Miután m/z alapján “szortírozunk”, ha elég sok protont képes egy molekula felvenni, akkor akár egy 100 kDa-os molekula is belefér ebbe a mérés-tartományba (Da = Dalton, a tömegmérés egysége. A szén 12-es izotópjának a tömege 12.000 Da vagy amu, azaz atomi tömeg-egység).

Hogy is néz ki egy tömegspektrum?

Míg kémiai reakciókban az izotópok keverékével dolgozunk és számolunk, addig a tömegspektrometriában ezek az izotópok láthatóvá lesznek. Tegyük fel, hogy sósavat mérnénk tömegspektrometriával. Mindenki tudja, a hidrogén-klorid összetétele HCl, molekulatömege 36.46. De ilyen tömegű iont hiába is keresnénk a tömegspektrumában! Két csúcsot fogunk látni:

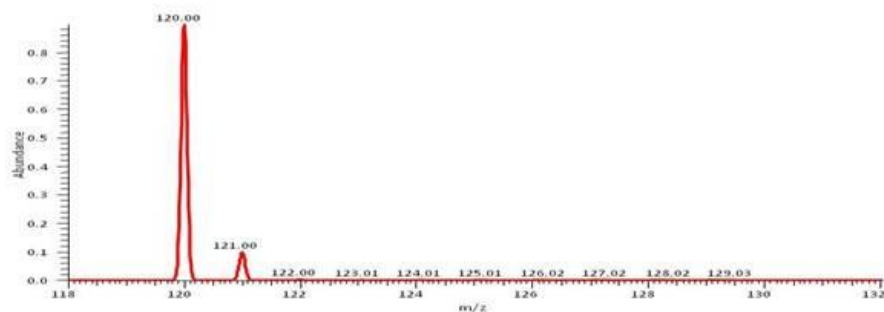


1. ábra. Hidrogén-klorid izotóp-eloszlása (elméleti tömegspektruma)

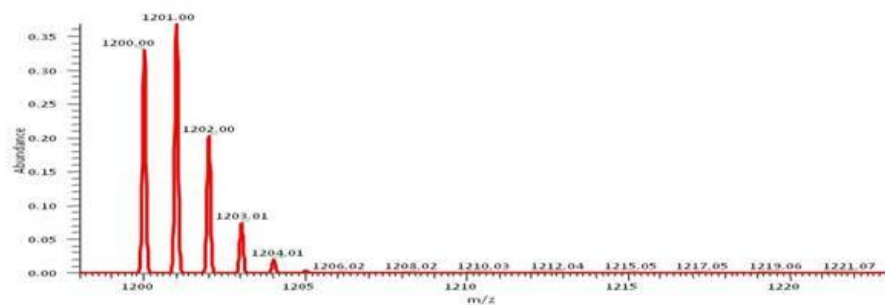
Ugyanis a klórnak van egy 35-ös és egy 37-es izotópja, és ezek előfordulási aránya 3:1.

A fehérjéket alkotó elemek, C, H, N, O, S, közül csak a kénnek van “jelentős” mennyiségű természetes izotópja, a ^{34}S kb.4 %-ban fordul elő. Úgy gondolná tehát az ember, hogy nemigen kell figyelmet fordítanunk az izotópokra, hiszen csak két kén-tartalmú fehérje-alkotó aminosav létezik (metionin, cisztein) és ezek sem olyan gyakoriak, a következő leggyakoribb fehérje-alkotó izotóp pedig a ^{13}C 1.1%-os előfordulási aránnyal. Mit számít az? Hát bizony sokat! Miért is? Hát szénből bizony bőven akad egy peptidben vagy fehérjében, és minél több szénatomunk van, annál bizonyosabb, hogy akad közöttük a nehezebb izotópból – egy fehérjében eltörpül a csupán ^{12}C -t tartalmazó csúcs:

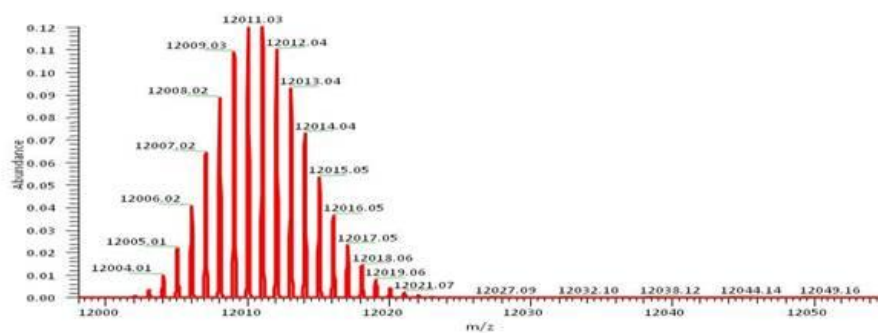
Elméleti izotóp-eloszlás, C_{10}



Elméleti izotóp-eloszlás, C_{100}



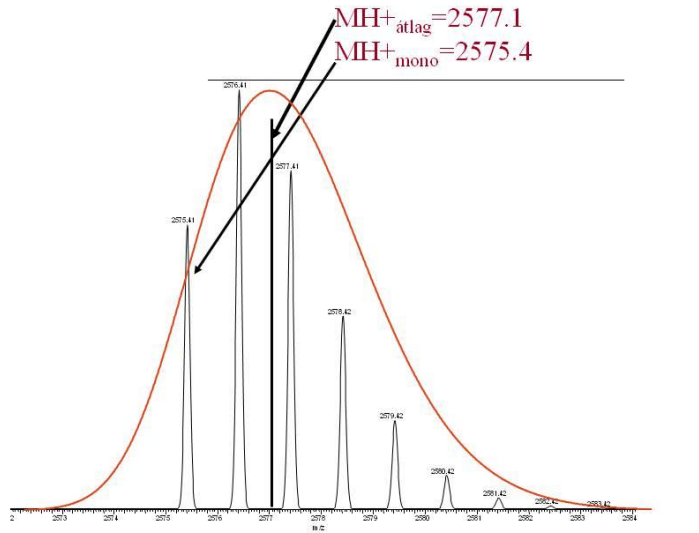
Elméleti izotóp-eloszlás, C_{1000}



2. ábra. Elméleti izotóp-eloszlás

A többi fehérje-alkotó elem stabil izotópjainak előfordulási aránya sokkal alacsonyabb: ^2H - 0.02%, ^{15}N - 0.37%, ^{17}O - 0.04%, ^{18}O - 0.2%. Tehát, amikor egy peptid spektrumában detektáljuk az izotóp-csúcsokat, azokért elsősorban a jelenlevő nagyszámú szénatom a felelős, de azért hozzájárulnak

egy kicsit a többiek is. Mi ennek a következménye? Először is, a csúcs-sorozatban csak a legeslegelső (nem a legintenzívebb!) ion homogén, azaz minden elemből csak egyfajta izotóp lehet jelen, ezért is nevezzük monoizotópos ionnak. Amennyiben az izotópokat el tudjuk a mérés során különíteni (úgy mondjuk, elegendő a felbontás), akkor mindig a monoizotópos tömeget határozzuk meg, mert ezt tudjuk a legpontosabban mérni, hiszen az összes többi ion keverék, és a különböző izotóp-csúcsok a felbontás függvényében átfedve, de kissé esetleg már szétválva nem annyira pontosan mérhetőek).

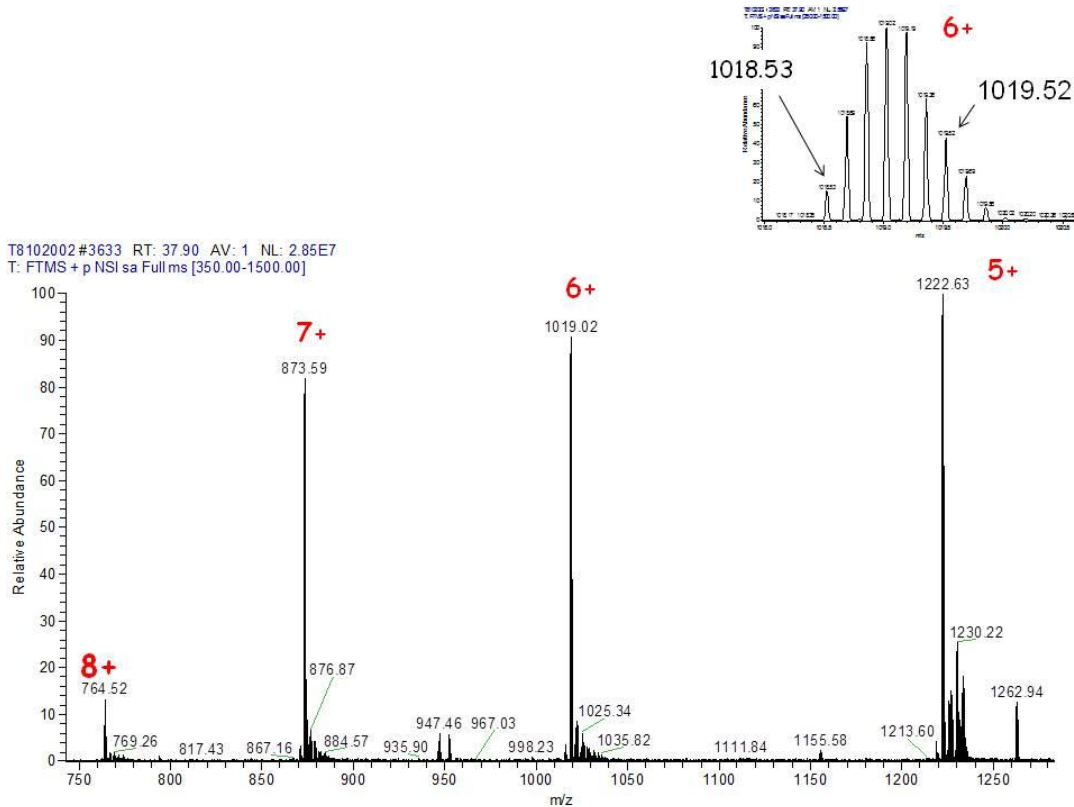


3. ábra. Peptid molekula-ionja, nagy és kis felbontással “mérve”. Monoizotópos és átlagtömeg.

A másik következmény az, hogy az izotópcsúcsok közötti tömegkülönbségből meg tudjuk mondani, hány töltés volt az ionon. Hogy is van ez? Az egyszeresen töltött ion (MH^+) izotópjai között kb. 1 Da különbség van. A kétszeresen töltött ion (MH_2^{2+}) izotópjai egymástól már csak 0.5 Da-ra vannak (ne feledjük, m/z alapján szortírozunk!), a háromszorosan töltött ionoknál a különbség 0.33 Da-ra csökken és így tovább. Tehát tulajdonképp csak le kell számolnunk, hány izotópcsúcs jut 1 Da-ra, és megvan a töltésszám! Egy molekula többféle töltésállapotban is megjelenhet. Alacsony felbontású tömegspektrometriánál (amikor az izotópcsúcsok összeszorulnak, és csak egy befoglaló csúcsot látunk), saccolnunk kell a mért tömeg-sorozatból, ha ilyesmire gyanakszunk, vagy meg kell oldanunk egy kétismeretlenes egyenletrendszer. Mondjuk, hogy a spektrumban két csúcs jelent meg és arra gyanakszunk, hogy ezek összetartoznak. Ha az alábbi spektrumban nem lennének a piros számok, akkor csak annyit tudhatnánk, hogy ha az m/z 1222.6 ‘n’ töltést visel, akkor m/z 1019 ‘n+1’ töltéssel kell, hogy rendelkezzen. Miután a töltések száma a begyűjtött protonokat is jelenti, a következő egyenletrendszerrel

kell dolgoznunk, ha a töltések számát és a semleges molekulatömeget is szeretnénk “kitalálni”: $1019 \times (n+1) - (n+1) = MW$ illetve $1222.6 \times n - n = MW$. Innen már egyszerű, ugye?

Ez a spektrum viszont nagy felbontással készült, a jobb felső sarokban látható az egyik ion klaszter “közelebbről”. Abból az ábráskából nyilvánvaló, hogy az m/z 1019 ion 6 töltést visel, és a peptid monoizotópos semleges tömege: 6105.13 (amikor ezt számoltam már nem a kerekített proton-tömeget használtam, hanem a pontosat: 1.007825 - a pontos tömegméréseknél így dukál).



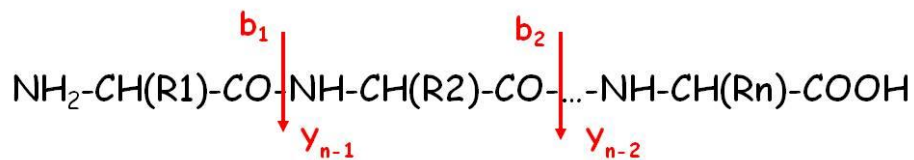
4. ábra. Egy nagyobb peptid ESI spektruma. A jobb felső sarokban egy szűkebb tömegtartományt mutatunk be.

Mint a fenti példából is látható, nagobbacska peptidek monoizotópos tömegét is meg tudjuk határozni. Milyen pontosan? A titok: a felbontáson kívül a készülék stabilitásán (rezgés - lásd közeli főút erős kamionforgalma, vagy hőmérséklet-változás - minden tömegspektrometriás laboratórium klimatizált) és a kalibráción múlik a dolog. Jól kiválasztott ismert tömegű mintával állítjuk be a masinát. Ha ezt a mintát külön mérjük, külső kalibrációról beszélünk. Ha a kalibráló anyag (standard) jelen van minden éles minta mérésekor, akkor belső kalibrációt alkalmazunk. A mérések pontosságát pedig a mérendő tömeghez viszonyítva adjuk meg, nem százalékban, hanem milliomod részekben. A legjobb készülékek belső kalibrációval már csupán 1 milliomodrészt tévednek! Azaz a mérés hibája 1 ppm (parts per million).

Ha egy relatíve kis molekulának mérjük a tömegét ilyen pontosan, akkor elemi összetételét is meghatározhatjuk. De egy adott képlet több kémiai szerkezetet írhat le. Ráadásul az aminosavak elemi összetétele eléggé hasonló. Tegyük fel, hogy a mért MH^+ 1260.5992, és 0.3 ppm pontossággal sikerült meghatároznunk. Még így is 5 különböző elemi összetétele lehet a peptidnek, ami 497 különböző aminosav összetételnek felel meg, és a lehetséges permutációk száma: 853571872. (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=mscomp>). Tehát további információra van szükség, ha szeretnénk egy peptidet azonosítani. Ezt az információt pedig ún. fragmentációs analízissel, vagyis MS/MS kísérlettel szerezhetjük meg. Technikai oldalról az akció tandem tömegspektrometriával valósítható meg. Az első tömeg-analizátor segítségével kiválasztjuk az elegyből a bennünket érdeklő iont, azután a molekulát az ún. ütközési cellában nitrogénnel vagy argonnal ütköztetve (ütközéses aktiválás, collision-induced dissociation = CID) darabokra törjük, és azok a darabok, amelyeken van töltés, mérhetők a második tömeg-analizátorral. Az ütközés(ek) során begyűjtött energia egy része vibrációs energiává alakul, és különböző kötések hasadhatnak, nyilván a gyengébbek előbb szállnak el. Az egyszerűség kedvéért tekintsük úgy, hogy peptidok esetében csak maga a peptid-kötés hasad. Ha a töltés az N-terminális darabon marad, 'b' ionok képződnek, amiket a terminális felől számoznak. Amikor a töltés a C-terminális darabon marad, akkor 'y' fragmensekről beszélünk, ezeket is a megfelelő terminálistól számozzuk.

MS/MS, ütközéses aktiválás

Collision-induced dissociation, CID



5. ábra. MS/MS ütközéses aktiválás

A peptidok fragmentációja nyilván szekvencia-függő, azonkívül még befolyásolja a folyamatot egy csomó dolog, többek között az is, hogy milyen készüléket használunk, de ebbe talán most ne menjünk

bele. A lényeg, hogy az aminosav-sorrend alapján egy peptid MS/MS fragmenseinek tömegét kiszámíthatjuk: <http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msproduct>

(azt nem tudjuk megjósolni, mind megjelennek-e, és ha igen, milyen intenzitással, de hát semmi sem tökéletes.)

Mire jó ez az egész?

Ideális esetben megmérhetjük egy teljes fehérje tömegét. Ha a mért tömeg és a szekvencia alapján számított tömeg stimmel, minden rendben van. Ha különbözik, akkor a különbségből lehet arra következtetni, mi is történt. Mondjuk, ha a tömeg 16 Da-nal nagyobb, könnyen lehet, hogy valamelyik metionin ($\text{NH}_2\text{-CH}(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CH}_3)\text{-COOH}$) oxidálódott. Persze az ilyen gyanút igazolni is kell. Egy fehérjét nem olyan könnyű MS/MS kísérletben megfelelően darabokra törni. Más módszerhez kell folyamodni.

Vannak olyan enzimek, amiknek az a dolguk, hogy más fehérjéket feldaraboljanak. Az ilyen ún. proteolitikus enzimek gyakran válogatósak, és csak egy adott aminosav mellett hajlandóak hasítani, és annak is csak egyik oldalán. A leggyakrabban használt enzim, a tripszin a két bázikus aminosav, az arginin (Arg, $\text{NH}_2\text{-CH}(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NHCNH}(\text{NH}_2))\text{-COOH}$) és a lizin (Lys, $\text{NH}_2\text{-CH}(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2)\text{-COOH}$) C-terminálisánál hasít. Tehát, ha egy fehérje aminosav sorrendjét ismerjük, megjósolhatjuk mekkora darabokat kapunk egy triptikus emésztés során. Aztán végre is hajthatjuk az emésztést, és megmérhetjük a darabokat. Egy nagy fehérje sokféle darabot produkálhat, ezért a komponenseket igyekszünk szétválasztani. Peptidekre rendszerint ún. fordított fázisú kromatográfiát használunk. A peptidek vizes oldatát egy olyan oszlopra injektáljuk, amely hosszú szénláncokkal borított “gyöngyökkel” van töltve. A peptidek “ragadnak” ezekhez a láncokhoz. Egy darabig mosogatjuk a gyöngyöket vízzel, hogy megszabaduljunk az emésztés során használt sóktól. Aztán lassan, egyenletesen szerves oldószert keverünk az oldatba, amely átfolyik az oszlopon, és a peptidek lassan “eleresztik” az oszlopot. A poláros peptidek jönnek le először.

Könnyen belátható, hogy ez a szeparálás remekül kapcsolható a tömegspektrometriával. Az oszlopról lejutó oldatot vezetjük be az “electrospray” kapillárisba, és szépen megmérjük az érkező peptideket.

Tudjuk, milyen tömegeket várunk. Amelyik nem található a megjósolt peptid-sorozatban, ott történt valami. Hogy a fenti példánál maradjunk, ha valóban egy metionin oxidáció történt, akkor egy metionint tartalmazó peptid tömege 16 Da-nal magasabb lesz. Persze, az is előfordulhat, hogy több ilyen aminosav van a fehérjében, és mindegyik oxidálódott egy kicsit. Akkor detektáljuk ezen peptideket módosítatlanul, meg oxidálva is. Aztán előfordulhat, hogy egy triptikus peptidben két metionin lapul, és

hol az egyik, hol a másik oxidálódik. Egyszerre két egyforma peptid-tömegünk van. Fragmentációs analízis, azaz MS/MS fedni majd fel, melyik aminosavval történt a változás.

Hogyan is lehetne egy ilyen módszert hasznosítani mondjuk annak kiderítésére, milyen fehérjék vannak egy komplexben? Egyszerű! Izoláljuk a fehérje-komplexet. Megemésztjük a fehérje-elegyet tripszinnel. Az így kapott peptideket elválasztjuk az előbb leírt kromatográfiával, és tömegspektrometriával analizáljuk az „eluátumot”, azaz az oszlopról lejövő peptideket. Ha csak egyetlen fehérjénk lenne, akkor könnyű dolgunk lenne. Van egy mért peptid-tömeg listánk. Ezt a listát összevetjük az adatbázisban levő fehérjékhez tartozó, szekvenciájukon és a tripszin specificitásán alapuló „jósolt” peptid-sorozatokkal. Ez az ún. LC/MS analízis. Amelyikhez a legjobban stimmel, az az igazi. Sajnos, a peptidek összetétele nagyon hasonló, így a tömegük is gyakran egyezik, az adatbázisban sok fehérje van, időnként az aminosav-sorrendjük hasonló, azonkívül itt keverékekkel van dolgunk tehát simán peptid-tömegek alapján nem tudjuk a fehérjéket megbízhatóan azonosítani. Nyilván megbízhatóbb lenne a dolog, ha a peptidek szekvenciáját is meg tudnánk határozni. Mi sem egyszerűbb! Az új készülékek képesek arra, hogy tömeget mérjenek, aztán automatikusan kiválasszák az 'n' legintenzívebb komponenst a mérés során detektált ionok közül, és MS/MS analízist végezzenek rajta, aztán folytassák ezt az alternáló adatgyűjtést a kromatográfiás szeparálás végéig. Az adatgyűjtés végén lesz egy csomó triptikus peptid-tömegünk, és a peptid-tömegek mellé ott vannak az MS/MS fragmens tömegek is. Ebből egy ügyes programmal olyan dokumentumot kreálunk, ami megjelenési sorrendben listázza a peptid-tömegeket, és minden peptid-tömeg fejléce alatt a hozzátartozó fragmenseket. Ez az ún. csúcslista.

Na most, ahogy egy fehérjéhez rendelhetünk egy proteolitikus emésztéssel produkálható peptid-tömeg sorozatot, így minden egyes peptidhez rendelhetünk egy a szekvencia alapján kiszámítható MS/MS fragmens sorozatot. És ezt hasznosítjuk az ún. adatbázis lekeresések során.

Az adatbázis-lekereső szoftver (angolul search engine-nek hívják) „megemészt” in-silico az összes fehérjét az adatbázisban tripszinnel, azaz minden egyes szekvencia mellé felsorakoztatja a várható triptikus peptidek tömegeit. A szoftver utána veszi az első peptid-tömeget a csúcslistáról. Kikeresi az „in-silico” listából az összes olyan megjósolt peptidet, aminek ugyanaz a tömege. Ezek a jelöltek. Ezeket mind „fragmentálja” in-silico, azaz produkál egy csomó fragmens-listát. Amelyik a legjobban passzol a mért listához, az az igazi. A szoftver így végigmegy az összes peptiden/spektrumon a csúcslistából – a végeredmény egy csomó azonosított fehérje-darab. Utána a program összecsoportosítja azokat a peptideket, amik egy fehérjéhez tartoznak, és a végeredmény egy fehérje-lista.

A fentebb leírt analízis egy leegyszerűsített kvalitatív kísérlet. Meglepően jól működik, ahhoz képest, hogy mennyi akadályt kell legyőznie. Mik ezek? Először is, a lekereső program számára a kezdeti feltételek szentek. A fehérjék azonban biológiai és kémiai is aktív “teremtmények”. Így egy enzim

időnként ott is hasít, ahol nem “illene”, vagy kifelejt legitim hasító helyeket. Továbbá a minta-előkészítés során mindenféle vegyszereket használunk, amik reagálhatnak a fehérjénkkel. A fehérjén lehetnek továbbá poszt-transzlációs módosítások, amiket a sejt pakol különböző oldalláncokra, esetleg a terminusokra a fehérje-szintézis alatt, után, permanensen vagy időszakosan stb. Mindezeket a módosított, nem előre “betervezett” darabokat sokkal trükkösebb azonosítani.

Ráadásul a fehérjéket a darabkáikból azonosítjuk, de nem minden fehérje hasítható kedvenc enzimünkkel előnyösen ionizálható, fragmentálható (és így “szekvenálható”) darabokra. Aztán a triptikus peptidekből meglehetősen nehéz következtetéseket levonni az egész fehérjéről. Mi van akkor, mondjuk, ha a fehérjét a sejt egy hosszú láncként szintetizálja, utána kettévágva tárolja, és az aktív formához még eltávolít egy darabot? Ha olyan szekvenciát találunk az elegyünkben, amely mind a három formában megtalálható, bizony nem tudhatjuk, melyikből is származik.

És akkor még a mennyiségi analízisről nem is beszéltünk...

De hát ettől szép és izgalmas a tudomány!