

Identifizierung von Proteinen mittels LC-MS nach FILK-AA-751.44 (2022-05)

Zur Identifizierung von in der Eierschalen-Membran vorhandenen Proteinen wurde eine Analyse mittels LC-MS durchgeführt. Dazu wurde das Probenmaterial mit Trypsin verdaut. Die entstandenen Peptide wurden anschließend chromatografisch mittels HPLC an einer Reversed Phase Säule aufgetrennt und on-line in einem Ionenfallen-Massenspektrometer (QTRAP 4000, Sciex) analysiert. Die Spektren wurden mit der Analyst Software (Sciex) aufgenommen. Es wurden zwei Produkt-Ionenscans pro vollem MS-Scan durchgeführt. Die aus den Spektren extrahierten Peaklisten wurden mit der Software ProteinPilot (Sciex) ausgewertet. Der Paragon Algorithmus von ProteinPilot wurde mit den folgenden Parametern benutzt:

Software Version:	ProteinPilot™ Software 4.5
Revision Number:	1656
Paragon™ Algorithm:	4.5.0.0, 1654
Sample Type:	Identification
Cys. Alkylation:	None
Digestion:	Trypsin
Instrument:	4000 QTRAP ESI
Special Factors:	-
ID Focus:	Biological modifications
Database:	uniprot-gallus+gallus+domesticus+cont 09_2021
Search Effort:	Thorough
FDR Analysis:	Yes
Detected Protein Threshold [Unused ProtScore (Conf)] >:	3.00 (99.9%)
Competitor Error Margin (ProtScore):	2.00

Die Datenbank *uniprot-gallus+gallus+domesticus+cont.fasta* enthält alle Proteine der NCBI Datenbank vom 23.09.2021, die mit dem Suchbegriff *Gallus gallus* gefunden wurden. Außerdem enthält die Datenbank eine Liste von Kontaminationen die von Sciex zur Verfügung gestellt wird (enthält Swissprot und NCBI Einträge). Nur Proteine, für die mindestens 2 Peptide gefunden wurden, werden als identifiziert angesehen.

Ergebnisse:²⁾

Für die untersuchte Eierschalen-Membran wurde eine zweifache Analyse durchgeführt. Es wurden vier Proteine identifiziert:

- (1) die α_1 -Kette des Typ X Kollagens
- (2) ein zelluläres Glycoprotein mit der D-Domäne des von Willebrand Faktors, das in Säugetieren im Rahmen der Blutgerinnung aktiv ist
- (3) das Enzym Lysyloxidase, das bei der Vernetzung extrazellulärer Matrixproteine eine Rolle spielt
- (4) das Enzym Lysozym, das an der Hydrolyse von Peptidoglycanen mitwirkt

Für die beiden zuerst genannten Proteine wurden mit der LC-MS/MS-Analyse die meisten Peptide identifiziert.

Peptide, die anderen Proteinen zugeordnet werden können, wurden nicht gefunden.

Zusätzlich wurde bovines Trypsin detektiert. Dieses Enzym wurde zum Verdau der Eierschalen-Membran während der Probenvorbereitung eingesetzt und ist daher als Kontamination anzusehen.

Kollagen Typ V ist in der untersuchten Eierschalen-Membran in zu geringer Konzentration vorhanden.

Die Ergebnisse der LC-MS/MS-Analyse sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabellenbeschriftungen:

N:	Rang des Proteins
Unused:	Summe der einzelnen Peptide Confidence Scores (wenn keine Spektren berücksichtigt werden, die für ein Protein mit höherem Rang schon verwendet wurden)
Total:	Summe der einzelnen Peptide Confidence Scores
% Cov (95):	Aminosäure-Sequenzabdeckung für Peptide mit einer Wahrscheinlichkeit (Confidence) höher als 95%
Accession:	Accession Nummer in Uniprot (http://www.uniprot.org/)
Peptides (95 %):	Zahl der identifizierten Peptide mit mindestens 95% Wahrscheinlichkeit

¹⁾ Adresse nach Information des Kunden vom 09.01.2023 korrigiert.

²⁾ Erläuterung der Ergebnisse ergänzt.

Tab. 1: LC-MS/MS-Ergebnisse unter Verwendung der Datenbank uniprot-gallus+gallus+domesticus+cont.fasta

Eierschalen-Membran_1							
N	Unused	Total	% Cov (95)	Accession #	Name	Species	Peptides (95%)
1	8.04	8.04	7.6	tr A0A3Q2UC95 A0A3Q2UC95_CHICK	VWFD domain-containing protein OS=Gallus gallus OX=9031 PE=4 SV=1	CHICK	9
Eierschalen-Membran_2							
N	Unused	Total	% Cov (95)	Accession #	Name	Species	Peptides (95%)
1	31.51	31.51	12.7	tr A0A3Q2UC95 A0A3Q2UC95_CHICK	VWFD domain-containing protein OS=Gallus gallus OX=9031 PE=4 SV=1	CHICK	20
2	25.3	25.3	23.2	sp P08125 COAA1_CHICK	Collagen alpha-1(X) chain OS=Gallus gallus OX=9031 GN=COL10A1 PE=1 SV=4	CHICK	14
3	8.23	8.23	5	tr A0A0A0MQ32 A0A0A0MQ32_CHICK	Lysyl oxidase homolog OS=Gallus gallus OX=9031 GN=LOXL2 PE=3 SV=1	CHICK	4
4	5.1	5.1	19.1	tr B8YK77 B8YK77_GALLA	Lysozyme C OS=Gallus lafayettii OX=9032 GN=LYZ PE=3 SV=1	GALLA	4
5	3.63	3.63	15.6	cont 000137	spt P00760 Cationic trypsin precursor (EC 3.4.21.4) (Beta- trypsin) (Fragment) [Bos taurus (contaminant)]	Bos taurus (contaminant)	3

FILK gGmbH

Dr. Ines Stachel
Stellvertretende Leiterin des Prüflabors