

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMJSKI FAKULTET

Tatjana M. Tripković

**ANALIZA PROTEINSKIH VEZIVA
U UMETNIČKIM DELIMA
METODAMA MASENE
SPEKTROMETRIJE**

doktorska disertacija

Beograd, 2017

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Tatjana M. Tripković

**ANALYSIS OF PROTEINACEOUS
BINDERS IN ART OBJECTS
BY MASS SPECTROMETRY
METHODS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

KOMISIJA ZA PREGLED, OCENU I ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

Mentori:

dr Snežana Nikolić-Mandić, redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Rada Baošić, vanredni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

dr Ivanka Karadžić, redovni profesor
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Danijela Apostolović, naučni saradnik
Department of Medicine Solna, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

U Beogradu, _____

ZAHVALNICA

Ova teza je urađena na Katedri za analitičku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu pod rukovodstvom prof. dr Snežane Nikolić-Mandić i prof. dr Rade Baošić. Eksperimentalni deo teze urađen je u Laboratoriju za stukturnu organsku hemiju i biohemiju Univerziteta Pjer i Marija Kiri u Parizu, Francuska u grupi prof. emeritus dr Žan-Klod Tabea.

Zahvaljujem se mentorima prof. dr Snežani Nikolić-Mandić i prof. dr Radi Baošić za strpljenje, pomoć i podršku, kako tokom eksperimentalnog rada, tako i tokom pisanja ove disertacije.

Neizmerno sam zahvalna prof. Tabeu na ljubaznom pozivu da budem gostujući istraživač u njegovoj laboratoriji, na svemu što me je naučio o masenoj spektrometriji i na mudrom vođenju tokom eksperimentalnog rada. Takođe, zahvalnost dugujem i mojoj prijateljici Klod Šarvi za entuzijazam i pomoć tokom eksperimentalnog rada, ali i za sve ostalo što je učinila za mene tokom boravka u Parizu. Veliko hvala i dr Sandri Alveš i prof. dr Karlosu Afonso.

Zahvalna sam prof. Ivanki Karadžić koja mi je dala dragocene smernice i praktične savete pre početka eksperimentalnog rada, ali i sugestije i korekcije tokom pisanja disertacije. Dr Danijeli Apostolović se zahvaljujem na pažljivom čitanju i analizi ove teze.

Zahvaljujem se svojim kolegama iz Republičkog zavoda za zaštitu spomenika kulture - Beograd, posebno Slikarsko-konzervatorskom odeljenju i Vojinu Nikoliću i Aleksi Jelikiću na podršci. Veliko hvala i Saši, Ani, Denisu, Besemu, Mari i svima koji su mi pomagali tokom doktorskih studija.

Na kraju, najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima i svojoj porodici, Srđanu i Irini, koji su imali strpljenja za mene i pružali mi ljubav uvek kada je to bilo potrebno.

Analiza proteinskih veziva u umetničkim delima metodama masene spektrometrije

Izvod

Cilj ove doktorske disertacije bio je razvoj metodologije za identifikaciju proteina u uzorcima kulturnog nasleđa koja uključuje primenu masene spektrometrije i bioinformatike. Predloženi postupak je veoma jednostavan i ne zahteva celovitost molekula proteina radi pouzdane identifikacije. Nakon hidrolize tripsinom, peptidi su analizirani primenom MALDI-TOF masene spektrometrije uz podršku MALDI-TOF/TOF, kao i ESI tandem masene spektrometrije na LTQ-Orbitrap XL instrumentu. Proteini su identifikovani na osnovu generisanih spektara uz pomoć bioinformatičkih alata.

U prvom delu disertacije primenjen je PMF pristup baziran na MALDI-TOF masenoj spektrometriji, ali snimljeni su i tandem maseni spektri najintenzivnijih pikova peptida primenom MALDI-TOF/TOF analizatora, na osnovu kojih su identifikovane sekvence aminokiselina u peptidima. Tandem masena spektrometrija pruža uvid ne samo u odnos mase i naelektrisanja peptida, već i u njegovu fragmentaciju koja je visoko specifična. Na taj način moguća je nedvosmislena identifikacija proteina u kompleksnim smešama, čak i iz neočekivanih izvora – pod uslovom da su ti proteini sekvencirani i da se nalaze u bazi podataka. Analiziran je set referentnih proteinskih materijala koji su tradicionalno korišćeni za slikanje tehnikom tempera. Pre primene postupka na analizu uzoraka starih slika, analizirani su i model uzorci kako bi se procenio uticaj pigmenata na uspešnost analize. U analiziranim uzorcima pravoslavnih ikona identifikovani su peptidi kolagena, najverovatnije iz slikarske podloge, koja se tradicionalno pravi od krede ili gipsa i tutkala.

Primena tandem masene spektrometrije u analizi proteina, ipak, najčešće podrazumeva primenu tačne hromatografije kuplovane sa jednim ili više masenih analizatora. U drugom delu ove doktorske disertacije uzorci su analizirani pomoću LTQ-Orbitrap XL masenog spektrometra uz prethodno reversno-fazno hromatografsko razdvajanje. Metoda je optimizovana na referentnim i model uzorcima, nakon čega su analizirane mikro količine uzoraka sa starih slika. Superiore performanse LC/MS pristupa i LTQ-Orbitrap masenog spektrometra, pored peptida kolagena, omogućili su identifikaciju peptida iz žumanceta u dva uzorka bojenog sloja ikona iz XIX veka. Na osnovu toga zaključeno je da je tehnika slikanja jajčana tempera. U poređenju sa rezultatima dobijenim primenom MALDI-TOF MS/MS,

postignuti su viši skorovi jona i proteina, bolja pokrivenost sekvenci i identifikovan je veći broj proteina.

Kombinacija dve tehnike meke jonizacije, ESI i MALDI, dala je preklapljene, ali i komplementarne rezultate što je takođe doprinelo povećanju pouzdanosti rezultata obe metode. Komplementarnosti dva seta rezultata značajno je doprineo različit afinitet dve jonizacione tehnike prema peptidima različitih fizičko-hemijskih osobina.

Ključne reči: proteinska veziva, tempera, analiza proteina, MALDI-TOF, ESI- LTQ-Orbitrap XL, mapiranje masa peptida, tandem masena spektrometrija, bioinformatika

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Analitička hemija

UDK broj: 543

Analysis of proteinaceous binders in art objects by mass spectrometry

Abstract

The aim of this doctoral dissertation was development of a methodology for identification of proteins in cultural heritage samples, that includes application of mass spectrometry and bioinformatics. The suggested protocol is very simple and the integrity of the protein molecule is not required for the reliable identification. After trypsin hydrolysis, the peptides are analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry, supported by MALDI-TOF/TOF, as well as ESI tandem mass spectrometry on LTQ-Orbitrap XL instrument. Proteins are identified with the help of bioinformatic tools, on the basis of the spectra generated.

In the first part of this dissertation the PMF approach is applied, based on MALDI-TOF mass spectrometry, but also, tandem mass spectra of the most intense peptide peaks are collected on MALDI-TOF/TOF mass analyzer, that enabled identification of peptide sequences. Tandem mass spectrometry provides insight not only in the m/z ratio of peptides, but also in the specific pattern of peptide fragmentation. That way is enabled undoubted protein identification in complex mixtures, even from unexpected sources, if given proteins are sequenced and present in a sequence database. A set of reference proteinaceous materials, traditionally used in tempera technique of painting, are analyzed here. Before applying the procedure for analysis of historical paintings, a number of mock samples are analyzed in order to estimate the influence of pigments on the analysis outcome. Peptides of different collagen chains are identified in analyzed samples of orthodox icons. The collagen is usually present in the ground layer of paintings, that is traditionally made of chalk or gypsum and animal glue.

Application of tandem mass spectrometry in protein analysis usually involves combination of liquid chromatography and one or more mass analyzers. In the second part of this dissertation samples are analyzed on LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer after chromatographic separation on a reverse phase column. The method is optimized on reference and mock samples before the analysis of micro samples from historical paintings. Superior performances of LC/MS approach and LTQ-Orbitrap mass spectrometer, along with collagen peptides, enabled identification of peptides from egg yolk in two samples from 19th century orthodox icons. Based on that finding it was concluded that the technique of painting was tempera. Comparing to MALDI-TOF MS/MS results, the higher peptide ion scores and protein

scores are achieved, as well as better sequences coverage and higher number of identified proteins.

The combination of two soft ionization techniques, ESI and MALDI, provided overlapped, but complementary results, which lead to more reliable results of both methods. Different affinities of two ionization techniques towards peptides of different physical and chemical properties significantly contributed to the complementarity of two data sets.

Keywords: proteinaceous binders, tempera, pritein analysis, MALDI-TOF, ESI-LTQ-Orbitrap XL, peptide mass fingerprint, tandem mass spectrometry, bioinformatics

Scientific field: Chemistry

Field of Academic Expertise: Analytical chemistry

UDC number: 543

SPISAK SKRAĆENICA

AAA	Amino Acid Analysis
AGC	Automatic Gain Control
CCD	Charge-Coupled Device
CE	Capillary Electrophoresis
CID	Collision Induced Dissociation
CZE	Capillary Electrophoresis
DE	Delayed Extraction
DHB	2,5-Dihydroxybenzoic Acid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay Technique
ESI	Electro Spray Ionization
FA	Formic Acid
FT-ICR	Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance
FWHM	Full Width at Half Maximum
GC-FID	Gas Chromatography with Flame Ionization Detector
GC-MS	Gas Chromatography Mass Spectrometry
HDL	High-density lipoprotein
HILIC	Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography
HLB	Hydrophilic-Lipophilic Balance
HPC	High Precision Calibration
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
IAA	Iodoacetic acid
IFM	Immunofluorescence Microscopy
IR	Infra-Red
IT	Ion Trap
iTRAQ	Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation
LDA	Linear Discriminant Analysis
LDL	Low-Density Lipoprotein

LDMS	Laser Desorption Mass Spectrometry
LID	Laser-Induced Dissociation
LTQ	Linear Trap Quadrupole
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization
MGF	Mascot Generic Files
MOWSE	MOlecular Weight SEarch
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCIS	Precursor Ion Selector
PD	Plasma Desorption
PLMS	PostLiftMetastableSuppressor
PLS	Partial Least Squares
PMF	Peptide Mass Fingerprint
ppm	Parts per million
PTM	Post-Translational Modification
Py-GC-MS	Pyrolysis-Gas Chromatography-Mass Spectrometry
RF	Radio frequency
RP-HPLC	Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography
SCX	Strong Cation eXchanger
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SEM-EDX	Scanning Electron Microscopy with Energy Dispersive X-Ray Analysis
SERS	Surface-Enhanced Raman Spectroscopy
SIMS	Secondary Ion Mass Spectrometry
SNAP	Sophisticated Numerical Annotation Procedure
TFA	Trifluoroacetic Acid
TIS	Time Ion Selector
TOF	Time Of Flight
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
UV	Ultra Violet
Vis	Visible

Sadržaj

1 UVOD	1
2 OPŠTI DEO	4
2.1 PROTEINSKA VEZIVA U UMETNIČKIM DELIMA	4
2.1.1 Izvori proteina u umetničkim delima	4
2.1.2 Promene do kojih dolazi tokom starenja proteinskih veziva	13
2.2 ANALIZA PROTEINSKIH VEZIVA – OPŠTI PREGLED ANALITIČKIH TEHNIKA	17
2.2.1 Bojenje poprečnih preseka vidljivim i fluorescentnim bojama	20
2.2.2 Spektroskopske metode	21
2.2.3 TOF-SIMS	24
2.2.4 Kapilarna zonska elektroforeza	25
2.2.5 Analiza amino kiselina (AAA) hromatografskim metodama	26
2.2.6 Imunološke metode	30
2.3 ANALIZA PROTEINA MASENOM SPEKTROMETRIJOM	32
2.3.1 Proteomika – opšti principi i pojmovi	32
2.3.2 MS tehnike primenjene tokom izrade ove doktorske disertacije	40
2.3.3 Proteomika u identifikaciji proteinskih veziva u umetničkim i arheološkim predmetima	55
3 EKSPERIMENTALNI DEO	70
3.1 HEMIKALIJE I REAGENSI	70
3.2 UZORCI PROTEINSKIH VEZIVA	71
3.2.1 Priprema proteinskih veziva	72
3.2.2 Priprema model uzoraka	72
3.2.3 Uzorci istorijskih slika	73
3.3 ENZIMSKA HIDROLIZA	76
3.4 UKLANJANJE SOLI I PREČIŠĆAVANJE UZORAKA	77

3.5 INSTRUMENTI I APARATURE.....	78
3.5.1 MALDI-TOF/TOF.....	78
3.5.2 LC-ESI-LTQ-Orbitrap.....	79
3.6 OBRADA REZULTATA.....	81
3.6.1 Parametri pretrage baze podataka za MALDI-TOF/TOF podatke	81
3.6.2 Parametri pretraga baze podataka za LC-MS/MS podatke	84
4 REZULTATI I DISKUSIJA.....	85
4.1 ANALIZA PROTEINSKIH VEZIVA MALDI-TOF MASENOM SPEKTROMETRIJOM.....	85
4.1.1 Analiza referentnih uzoraka MALDI-TOF masenom spektromerijom.....	89
4.1.2 Analiza model uzoraka MALDI-TOF masenom spektromerijom	92
4.1.3 Analiza uzoraka pravoslavnih ikona MALDI-TOF masenom spektromerijom.....	105
4.2 ANALIZA PROTEINSKIH VEZIVA POMOĆU LC-ESI-ORBITRAPA	110
4.2.1 Analiza referentnih materijala pomoću LC-ESI-LTQ-Orbitrapa	111
4.2.2 Analiza model uzoraka pomoću LC-ESI-LTQ-Orbitrapa.....	113
4.2.3 Analiza uzoraka pravoslavnih ikona pomoću LC-ESI-LTQ-Orbitrapa	115
4.3 POREĐENJE REZULTATA DOBIJENIH POMOĆU DVE TEHNIKE MASENE SPEKTROMETRIJE	122
5 ZAKLJUČAK.....	126
6 LITERATURA	130
7 PRILOZI.....	153

1 UVOD

Savremene metode proučavanja kompleksnih proteinskih smeša podrazumevaju integraciju tehnika masene spektrometrije visoke osetljivosti i bioinformatičkih alata za obradu i analizu generisanih podataka [1]. Proteini iz različitih prirodnih izvora često su prisutni kao veziva u umetničkim slikama i drugim umetničkim predmetima. Cilj ove doktorske disertacije je razvijanje analitičkog protokola za identifikaciju proteinskih veziva u slikama, analizom peptida, dobijenih hidrolizom tripsinom, metodama masene spektrometrije i bioinformatike. Analize su urađene primenom MALDI-TOF masene spektrometrije uz podršku MALDI-TOF/TOF (LIFT metoda), kao i ESI tandem masene spektrometrije na LTQ-Orbitrap instrumentu uz preciznost određivanja masa peptida od nekoliko ppm. Navedene tehnike masene spektrometrije u kombinaciji sa bioinformatičkim metodama su, u okviru ove disertacije, prvi put primenjene u analizi uzoraka kulturnog nasleđa.

Tokom izrade ove disertacije analiziran je set referentnih proteinskih materijala koji su tradicionalno korišćeni za slikanje tehnikom tempera. Proteini iz proteinskih veziva su pomoću tripsina enzimski hidrolizovani do peptida, pri čemu svaki od proteina daje specifični set peptida tzv. otisak prsta masa peptida (engl. *peptide mass fingerprint*, PMF), čiji su spektri snimljeni MALDI-TOF masenom spektrometrijom i analizirani bioinformatičkim metodama. PMF spektri sadrže samo informaciju o m/z vrednostima peptida u smeši, a identifikacija se postiže poređenjem snimljenih spektara sa teorijskim spektrima u bazi podataka primenom bioinformatike. Nakon PMF analize, snimljeni su tandem maseni spektri najintenzivnijih pikova peptida primenom MALDI-TOF/TOF analizatora. Naknadnom pretragom baze podataka identifikovane su sekvence aminokiselina u peptidima. Tandem masena spektrometrija omogućava da svaki peptid bude okarakterisan ne samo svojom masom i naelektrisanjem, već i visoko specifičnim

načinom fragmentacije, tj. fragmentacionim spektrom. Algoritam poredi snimljene tandem masene spektre sa teorijskim ili realnim fragmentacionim spektrima poznatih sekvenci peptida. Na ovaj način konzervatorima je omogućena nedvosmislena identifikacija proteina u kompleksnim smešama, čak i iz neočekivanih izvora – pod uslovom da su ti proteini sekvencirani i da se nalaze u bazi podataka.

Pre nego što je postupak primenjen na analizu uzoraka starih slika, proveren je i optimizovan na nekoliko model uzoraka pripremljenih mešanjem referentnih veziva sa istorijskim pigmentima. Prilikom pripreme uzoraka za analizu, procedura je maksimalno pojednostavljena kako bi se smanjio gubitak analita. Pošto je primenjena procedura omogućila identifikaciju proteinskih veziva u model uzorcima, MALDI-TOF/TOF tehnika je primenjena za analizu proteinskih veziva u uzorcima starih slika. U većini analiziranih uzoraka identifikovano je prisustvo peptida kolagena, najverovatnije iz slikarske podloge, koja se tradicionalno pravi od krede ili gipsa i tutkala.

MALDI-TOF/TOF tandem masena spektrometrija do sada nije primenjivana za analizu proteinskih veziva u umetničkim delima. Primena tandem masene spektrometrije u *large scale* (engl.) analizi proteina najčešće podrazumeva primenu tačne hromatografije kuplovane sa jednim ili više masenih analizatora. U drugom delu ove doktorske disertacije uzorci su analizirani pomoću hibridnog masenog spektrometra LTQ-Orbitrap-a uz prethodno reversno-fazno hromatografsko razdvajanje. Metoda je optimizovana na referentnim i model uzorcima, nakon čega su mikro količine uzoraka sa starih slika po prvi put analizirane ovom tehnikom. Superiorne performanse LC/MS pristupa korišćenjem LTQ-Orbitrap-a omogućile su identifikaciju peptida iz žumanceta u dva uzorka pravoslavnih ikona iz XIX veka, ukazujući na jajčanu temperu kao tehniku slikanja. Precizne mase prekursor jona, u opsegu od ± 2 ppm, i retenciona vremena peptida, dobijenih nakon hidrolize tripsinom (tzv. „tripsinskih peptida“), doprineli su pouzdanijoj identifikaciji proteina. Dodatno, u svim istorijskim uzorcima prisustvo peptida kolagena iz tutkala ukazuje na činjenicu da je podloga najverovatnije vezana korišćenjem goveđeg kolagena. U poređenju sa rezultatima dobijenim primenom MALDI-TOF MS/MS, postignuti su viši skorovi jona i proteina, bolja pokrivenost sekvenci i identifikovan je veći broj proteina. Zapravo, kombinacija dve tehnike masene

spektrometrije omogućila je rezultate koji se preklapaju, ali i dopunjuju, usled mogućnosti detekcije peptida koji imaju različite fizičko-hemijske osobine.

Određivanje porekla kolagenskih veziva veoma je teško. Iako se male mutacije u sekvenci proteina između dve životinjske vrste reflektuju na tandem masene spektre njihovih tripsinskih peptida, prisutni su ozbiljni problemi prilikom identifikacije životinjskih vrsta od kojih potiču kolagenska veziva. Prvi otežavajući faktor je evolutivna očuvanost i ponavljajuća sekvenca kolagena. Takođe, iako se rapidno proširuju, biblioteke sekvenci ne pokrivaju sve varijetete istog proteina u različitim vrstama. Interesi konzervatora u pogledu životinjskih vrsta i proteina razlikuju se u odnosu na interese biohemičara. Dodatno, teorijska fragmentacija ne poklapa se potpuno sa dobijenim podacima.

Ova doktorska disertacija nema za cilj da reši sve probleme vezane za analizu proteinskih veziva, već je fokusirana na razvoj nove, pouzdanije tehnike za njihovu identifikaciju zasnovane na savremenoj proteomici, uz smanjenu potrošnju uzorka. Krajnja instanca primene proteomike u analizi kulturnog nasleđa nije samo identifikacija proteinskih veziva u slikama. Proteini su prisutni i u mnogim drugim oblastima kulturnog nasleđa: tekstilnim vlaknima, koži, pergamentima i arheološkim ostacima. Da bi ovaj koncept imao još bolje rezultate neophodno je značajno proširenje trenutnih baza sekvenci, kao i sekvenciranje nepoznatih peptida na osnovu njihovih tandem masenih spektara. Velike mogućnosti otvaraju se i za razumevanje procesa degradacije proteina u starim umetničkim predmetima, jer još uvek nije sprovedeno dovoljno sistematskih istraživanja koja bi objasnila mehanizme starenja proteina. Na kraju, da bi se uspešno odgovorilo na kompleksna pitanja i probleme u konzervaciji, izuzetno je značajna strategija kombinovanja različitih analitičkih tehnika.

2 OPŠTI DEO

2.1 PROTEINSKA VEZIVA U UMETNIČKIM DELIMA

2.1.1 Izvori proteina u umetničkim delima

Kulturno nasleđe obuhvata različite predmete, od umetničkih dela do monumentalnih lokaliteta, koji oslikavaju ne samo umetnički razvoj već i moć, politički uticaj i trgovinu. Oni su kombinacija materijala i kulturnih uticaja koji variraju tokom vremena i u skladu sa stilom, ukusom, regionom i umetnikom ili radionicom. Pažljivo proučavanje materijala od kojih je sačinjeno umetničko delo od izuzetnog je značaja za njegovo očuvanje. Identifikacija materijala može biti vodilja konzervatorima tokom tretmana, ali i smernica kustosima i konzervatorima u strategiji izlaganja i deponovanja. Ona može pomoći u otkrivanju načina rada umetnika, ateljea ili gilde. Na primer, korišćenje jajčane tempere, jajeta u smeši sa uljem (*tempera grassa*, ital.) ili samo ulja kao veziva, označava jasne promene u načinu slikanja u Italiji od polovine do kraja XV veka [2,3]. Dodatno, identifikacija materijala može pružiti uvid u trgovačke običaje grada ili regiona i, u nekim slučajevima, olakšati autentifikaciju, datovanje i određivanje geografskog porekla objekta. Primer su pigmenti korišćeni samo u određenom, ranijem, vremenskom periodu ili su počeli da se koriste tek u XIX veku. Njihovo prisustvo, zajedno sa drugim dokazima koji to potkrepljuju, može pomoći pri određivanju verovatne starosti ili porekla dela. Naučno ispitivanje je neophodno za identifikaciju materijala od kojih se sastoji umetničko delo i nezaobilazan je deo modernih tehničkih studija kulturnog nasleđa.

Slikarstvo, kao oblik humanog izražavanja, jedno je od najstarijih otkrića čoveka, o čemu svedoče praiistorijske pećinske slike. Tokom godina, tehnologija i sastav slika su evoluirali. Umetničke slike imaju komplikovanu slojevitou strukturu. Fizički

nosilac je obično čvrsti malter ili drvo, nategnuto platno, papir ili pergament. Na nosilac se nanosi sloj podloge ili grunda (npr. kreda i tutkalo) koji ga priprema za bojene slojeve koji slede. Da bi se dobila boja koja može formirati film i prijanjati na sloj podloge, pigmenti se disperguju u organskom vezivu. Boja se nanosi u jednom ili više slojeva. Često se nanosi i površinski sloj laka radi zaštite boje i boljeg vizuelnog efekta.

U vekovima pre industrijske revolucije i proizvodnje boja, slikar nije bio samo umetnik, već i zanatlija koji je pravio boje eksperimentišući tako sa različitim materijalima. Osnovne komponente bojenog sloja su pigmenti dispergovani u vezivima [4,5]. Organska slikarska veziva obično su bila adhezivi za sloj grunda i matriks za suspendovanje pigmenata. Veziva su prisutna u bojanim slojevima i podlozi štafelajnih slika u malom procentu, ali daju značajnu informaciju o slikarskoj tehnici [6,7]. Da bi se dobili stabilni filmovi zadovoljavajućih vizuelnih osobina korišćena su specifična veziva. U evropskoj umetnosti najčešće su korišćena proteinska veziva, polisaharidne gume i sušiva ulja [8]. Osobine boje zavise od određenih kvaliteta i pigmenta i veziva, njihova interakcija je veoma značajna, ali neke osobine koje umetnici žele da postignu, kao sjaj, bogatstvo i prozirnost, zavise isključivo od veziva. Tokom vekova, umetnici su eksperimentisali sa različitim slikarskim vezivima, koja su pretežno bila proteinski materijali, sušiva ulja ili njihove smeše [9-11]. Neizbežno, ovi materijali se menjaju i degradiraju sa godinama, pri čemu je neke osobine umetničkog rada teže prepoznati. Da bi se postiglo dublje razumevanje slikarske tehnike nekog umetnika i njegove vizije, ali i da bi se dobile informacije korisne za restauraciju, od primarnog značaja je karakterizacija organskih veziva, zajedno sa njihovim produktima degradacije i specifičnim markerima koji opisuju procese starenja.

Tokom istorije korišćena su različita proteinska veziva za slikanje, podlogu i kao dodaci malterima. Izbor je zavisio od slikarske tehnike i dostupnosti u okruženju. U tehnici koja se naziva tempera, razvijenoj iz *fresco* tehnike u Evropi u periodu romanike krajem X veka, umetnici su najčešće koristili proteinska veziva dobijena od lako dostupnih proteinskih materijala - jajeta, mleka ili kolagenskih materijala ekstrahovanih iz životinjskih tkiva, zbog njihovih karakterističnih adhezivnih osobina [4,11]. Proteinska veziva korišćena su pojedinačno, pomešana ili u kompleksnim smešama sa sušivim uljima (kao kod tehnike *tempera grassa*) ili biljnim uljima. Tempera kao slikarska tehnika

nije uniformna i varirala je tokom vremena u različitim zemljama. Bila je najrasprostranjenija tehnika pre pojave ulja u XV veku. Korišćeni materijali (jaje, mleko, sir ili tutkalo) sami su po sebi složene smeše proteina [12]. Oni formiraju prionive dugotrajne elastične filmove, kompatibilni su sa pigmentima i relativno stabilni tokom vremena [11]. Ulje je, kao glavni medijum u slikarstvu, zamenilo temperu tokom XV veka. Ipak su u jugoistočnoj Evropi, na tlu bivše Vizantije, proteinska veziva ostala nezamenljiva kod slika na panelu i svetih rukopisa. U Grčkoj i Rusiji koriste se i danas za izradu pravoslavnih ikona [4].

Proteini su makromolekuli koji se sastoje od jednog ili više nerazgranatih lanaca aminokiselina međusobno spojenih peptidnim vezama. Broj i vrsta aminokiselina i njihova sekvenca određuju molekulsku konfiguraciju proteina, njegov površinski napon i jedinstvene hemijske i fizičke osobine. Funkcija proteina zavisi od njegove trodimenzionalne strukture. Brojni faktori, kao što su promena pH, temperature, koncentracije soli i prisustvo oksidujućih ili redukujućih supstanci mogu narušiti više strukturne nivoe, pri čemu dolazi do denaturacije proteina. Proteini se, takođe, denaturišu i starenjem, jer zbog gubitka vode, oksidacije i drugih činilaca iz okruženja, može doći do promene tercijarne i kvaternerne strukture, dok, najčešće, sastav aminokiselina većim delom ostaje nepromenjen.

Proteini su glavne ili sporedne komponente u mnogim drugim prirodnim proizvodima koji se koriste u slikarstvu kao podloga (platno, pergament), prilikom konzervatorskih tretmana, a mogu se uneti i kontaminacijom. Većina publikacija o proteinskim vezivima ograničena je na životinjska tutkala i veziva na bazi mleka ili jaja, i zato će ta veziva biti glavni fokus i ove doktorske disertacije. Međutim, metodama razvijenim u okviru ove doktorske disertacije moći će da se identifikuju i proteini iz neočekivanih ili minornih izvora.

Tutkalo

Razblaženo tutkalo bilo je u širokoj primeni kao vezivo za pripremu grunda (sa gipsom ili kredom), ali i kao vezivo za pigmente [9]. U Egiptu su tutkala dodavana u maltere još pre 4000 godina, a koristila su se, u kombinaciji sa drugim vezivima, i za

nanošenje slika na suvi malter [13,14]. Našla su primenu u stolarstvu, knjigovestvu, kao premaz za lakiranje, za konsolidaciju izljudspanih slika i dubliranje platna [15].

Postoje različite vrste životinjskih tutkala čiji kvalitet zavisi od porekla i vrste tkiva od kog su dobijeni. Priprema tutkala je relativno jednostavna i sastoji se od ekstrakcije vezivnih tkiva sisara i riba koja sadrže kolagen (koža, mišići, kosti, hrskavica) vrelom vodom. U suvom stanju tutkalo je blede žute boje, transparentno i amorfno. Relativno je rastvorno u vodi u poređenju sa drugim proteinskim vezivima, čak i nakon starenja. Pretežno sadrži denaturisani hidrolizovani kolagen. Tutkala i želatini dobro bubre u vodi, dajući koloidni rastvor, ali kada se osuše postaju prilično nerastvorni, jer funkcionalne grupe bočnih lanaca međusobno interaguju formirajući polimernu mrežu.

Kolagen je ekstracelularni fibrozni glikoprotein koji čine veoma duga tanka vlakna. Ovaj strukturni protein predstavlja 30-35% ukupnih proteina sisara, nalazi se u svim organima, pri čemu su koža, hrskavica i kosti najbogatiji i sadrži velike količine glicina, prolina i njegovog posttranslacionog derivata hidroksiprolina. Postoje različiti tipovi kolagena, ali se svi sastoje od molekula koji sadrže tri polipeptidna alfa-lanca koji formiraju kvaternarnu strukturu u obliku desnog trostrukog heliksa. Ova struktura stabilizovana je brojnim vodoničnim vezama između hidroksilnih grupa hidroksiprolina i vodonika amino grupa susednih jedinica glicina [16-21].

Kolageni su velika familija proteina prisutnih u životinjskim organizmima i do sada je opisano bar 28 različitih tipova kolagena koji se genetski, hemijski i imunološki razlikuju [22]. Varijacije se ogledaju u različitom sastavu osnovnih polipeptidnih lanaca, različitoj dužini trostrukog heliksa, njegovim prekidima i terminusima helikoidnih domena. Tipovi I do IV čine oko 90% ukupnog kolagena. Tipovi I do III nalaze se u vezivnim tkivima koja se koriste za pripremu tutkala. Kolagen tipa I je najzastupljeniji kolagen i prisutan je u vezivnim tkivima, uključujući kožu, kosti i hrskavicu. Sastoji se od dva alfa-1(I) lanca i jednog alfa-2(I) lanca. Kolagen tipa II je glavna komponenta hrskavice i sastoji se od 3 jednaka alfa-1(II) lanca. Kolagen tipa III nalazi se zajedno sa kolagenom tipa I u većini vezivnih tkiva i sačinjen je od tri ista alfa-1(III) lanca [23,24]. Ovi tropokolageni se dalje udružuju u fibrozne desne navoje i veće fibrilarne strukture [25]. Tokom ekstrakcije raskidaju se veze (uglavnom vodonične) u trostrukom heliksu pa se on razdvaja na jednostruke namotaje pojedinačnih lanaca kompletirajući tako prelaz u

želatin [26]. Iako je proces denaturacije molekula proteina, uz gubitak strukture trostrukog heliksa, ireverzibilan, neke helikoidne strukture mogu se povratiti tokom geliranja i sušenja. Prilikom geliranja pojedinačni nasumični navoj proteina podleže delimičnoj renaturaciji u trostruki heliks [17,27-29]. Međutim, zbog neusklađenosti pojedinačnih lanaca renaturacija dovodi do čvorova i uključuje samo delove određenih niti, dok ostatak tih niti može formirati dalje čvorove tako da se dobija kontinuirana trodimenzionalna mreža.

Svaki alfa-lanac kolagena ima aminokiselinsku sekvencu u kojoj se pretežno ponavlja obrazac Gly-X-Y trijada, gde X i Y mogu biti bilo koja aminokiselina, mada je X često prolin, a Y hidrokisprolin. Pošto je glicin svaka treća aminokiselina u nizu, on čini oko 26% ukupnog sadržaja aminokiselina. Prolin i hidrokisprolin zajedno čine oko 1/7 ukupne sekvence, koja je tako okarakterisana regularnim ponavljanjem Gly-Pro-Y i Gly-X-Hyp trijada. Hidrokisprolin je prisutan samo u malom broju drugih životinjskih proteina, pa se smatra markerom kolagena kada se identifikuje u uzorcima analizom aminokiselina. Karakteristika kolagena su i male količine esencijalnih aminokiselina, poput valina, fenilalanina i leucina, zbog čega ima nisku hranljivu vrednost [25].

Razlikovanje kolagena različitih životinjskih vrsta predstavlja izuzetno složen analitički problem zbog veoma slične hemijske strukture, aminokiselinskog sastava, pa čak i primarne strukture njihovih proteina i peptida. Kolagen se u životinjskom carstvu malo menjao tokom evolucije, pa je nemoguće identifikovati životinjsko poreklo tutkla na osnovu sastava aminokiselina [15]. Očekivalo bi se da je analiza peptida znatno uspešnija na ovom polju, ali veliki problem predstavljaju nepotpune baze sekvenci proteina i teško je sa velikom preciznošću utvrditi poreklo kolagena.

Jaje

Jaje se koristi kao vezivo u tehnici tempera, celo ili razdvojeno na belance i žumance, ali i u emulziji sa uljem. Jajčano vezivo je korišćeno u mnogim kulturama od antike do pojave uljanih boja [30]. Belance se takođe koristilo i kao lepak za pozlatu, lak, premaz za malter ili vezivo za retuš [9,31], jer formira posebno otporne i elastične filmove. Permeabilnost i rastvorljivost belanceta opada sa starenjem zbog denaturacije hidrofilnih proteina.

Belance i žumance imaju veoma kompleksan sastav u smislu individualnih proteina (Tabela 2.1). Proteini su, pored vode, najzastupljenija komponenta belanceta, oko 15% ukupne mase [32,33]. Ostatak belanceta čine soli, lecitin i ugljeni hidrati. U smislu aminokiselinskog sastava, belance karakterišu relativno visoke količine asparaginske i glutaminske kiseline, najčešće u istoj količini.

Tabela 2.1. Glavni proteini belanceta

Protein	Procentualni udeo (%)	Molekulska masa (kDa)
Ovalbumin	54	42.9
Ovotransferin	13	77.8
Ovomukoid	11	22.6
Lizozim	3.5	16.2
Ovomucin	1.5	233.6
Flavoprotein	0.8	72.9
Ovoinhibitor	0.1	51.9
Avidin	0.05	16.8

Žumance se značajno razlikuje od belanceta. Može se opisati kao rastvor masti u vodi koji sadrži veliku koncentraciju lipida (31% ukupnog sadržaja) i proteina (16.2%). Žumance je značajan izvor holesterola, vitamina rastvornih u lipidima i lecitina. Zbog sredine bogate lipidima u kojoj je odnos lipida i proteina je 2:1, interakcije među njima dovode do formiranja posebnih struktura poznatih kao lipoproteini. Proteini u obliku kompleksnih lipoproteina odgovori su za emulgovanje kompletne lipidne frakcije, koja je prisutna u obliku triglicerida i fosfolipida. Žumance sadrži fosvitin (fosfoprotein), alfa- i beta-lipoviteline (lipoproteine koji sadrže fosfolipide), alfa-, beta- i gama-livetine. LDL ili lipovitelineni su sferne čestice poput micela, prečnika 17-60 nm, sa lipidnim jezgrom okružene monoslojem fosfolipida i apoproteina, koji doprinose oko 25% ukupnoj masi LDL. Postoji 6 glavnih LDL apoproteina (apovitelineni) i svi su glikozilovani [34,35]. HDL ili lipovitelini su manje strukture, prečnika 7-20 nm, koje imaju više molekulske formu i manje emulgujuće osobine. Svaki monomer HDL sastavljen je od oko 5 glikozilovanih apoproteina (vitelini), koji potiču od prekursorskih vitelogenin lanaca.

Vitelogenini su dimerni proteini koji se sintetizuju u jetri. Tokom transfera u oocit podležu proteolitičkom cepanju dajući, između ostalog, viteline [34]. Fosvitin je fosfoglikoprotein koji sadrži skoro 50% aminokiseline serin, od kojih je 90% fosforilovano. Postoje dva različita fosvitina: alfa- (160 kDa) i beta-oblik (190 kDa). Oba su agregati nekoliko subjedinica koje nastaju od istih vitelogenin prekursora koji uključuje HDL viteline [34]. Livetini su mala grupa različitih proteina rastvornih u vodi koji odgovaraju serum proteinima kokošije krvi: alfa-livetin odgovara serum albuminu (70 kDa), beta-livetin je alfa-2-glikoprotein (45 kDa), dok je gama-livetin imunoglobulin Y (170 kDa). Svi su prisutni u serumu krvi [34]. Glavni proteini prisutni u žumancetu navedeni su u Tabeli 2.2.

Tabela 2.2. Glavni proteini prisutni u žumancetu

Protein	Procentualni udeo (%)	Molekulska masa (kDa)
<i>Lipovitelini</i>		
Alfa-lipovitelin	58	195
Beta-lipovitelin	11	110
<i>Livetini</i>		
Alfa-livetin	4	67
Beta-livetin	5	36
Gama-livetin	2	180
Fosvitini	7	37-45
Lipovitelenin	12	varira

Iako su sastavljeni od potpuno različitih proteina, belance i žumance imaju skoro identičan aminokiselinski sastav. Zbog tih veoma malih razlika, tehnike zasnovane na AAA su retko u stanju da ih razlikuju [11,15]. Aminokiseline karakteristične za jajčano vezivo su leucin, prolin, alanin, glutaminska i asparaginska kiselina [36]. Takođe, njihovi aminokiselinski profili slični su i nekim drugim proteinima, kao što je npr. serum albumin prisutan u krvi [15]. Zbog svega navedenog, proteomika je nezaobilazna prilikom identifikacije proteina jajeta.

Mleko

Mleko je često korišćeno kao tempera vezivo umesto jajeta, posebno u kombinaciji sa plavim pigmentima [31]. Kazeinska tempera, napravljena od mleka i kreča, od davnina je korišćena kao vezivo za zidne slike zbog svojih dobrih adhezivnih osobina [8].

Mleko je emulgovani koloid lipida u vodi koji sadrži proteine kao i jedinjenja niske molekulske mase. Koncentracija proteina u mleku je relativno niska, obično između 3.0 i 4.0%. Kravlje mleko sadrži 6 glavnih proteina (kapa-, alfa-S1-, alfa-S2- i beta-kazeine, alfa- i beta-laktalbumine), ali i druge proteine kao što su globularni glikoproteini, makroglobulin i serum albumin [8]. Kazeini čine oko 80% ukupnih proteina, dok su proteini surutke, beta-laktoglobulin i alfa-laktalbumin zastupljeni sa 20% (Tabela 2.3).

Tabela 2.3. Glavni proteini mleka

Protein	Procentualni udeo (%)	Molekulska masa (kDa)*
Alfa-S1-kazein	30.6	22.9
Alfa-S2-kazein	8.0	24.3
Beta-kazein	28.4	23.6
Kapa-kazein	10.1	19.0
Alfa-laktalbumin	3.7	14.1
Beta-laktoglobulin	9.8	18.3
Goveđi serum albumin	1.2	66.0
Imunoglobulini	2.1	150.0
Ostali	6.1	

*Molekulska masa se odnosi na čiste proteine. Molekulska masa kazeina može biti i veća, kao posledica stepena fosforilacije.

Kazeini nisu rastvoreni, već suspendovani u mleku u obliku micelarnih struktura koje učestvuju u emulgovanju lipidne frakcije. Predloženo je nekoliko micelarnih modela, ali nijedan nije univerzalno prihvaćen [37]. U svim modelima, kapa-kazein se smatra ključnom komponentom u formiranju spoljašnje granice micela, dok su ostali kazeini i mnoge fosfatne grupe (tzv. koloidni kalcijum-fosfat) u unutrašnjosti micela odgovorni za

mnoge značajne karakteristike kazeina, posebno sposobnost da veže relativno velike količine kalcijuma [38]. Glavni proteini surutke su beta-laktoglobulin (koji čini 50% proteina surutke), laktalbumin (20%), serum albumin krvi (10%), nekoliko imunoglobulina G1, G2, M i A (20% ukupno, IgG1, IgG2, IgM, IgA) [39].

Kazein se izoluje nakon grejanja obranog mleka i taloženja kiselinom. Ova tehnologija je poznata od davnina i omogućava razdvajanje mleka na dve komponente – sir i surutku. Dobijeni kazeinati koriste se kao vezivo nakon rastvaranja u vodenom rastvoru kalcijum-hidroksida, natrijum-fosfata ili boraksa. Visok sadržaj fosfata u kazeinima omogućava im da vezuju kalcijum, kao i da interaguju sa više katjona.

Ostali izvori proteina u umetničkim delima

Postoji nekoliko opširnih pregleda analitičkih metoda primenjenih za određivanje proteinskih komponenata u slikarskim bojama koje uzimaju u obzir raznovrsnost izvora proteina, ne samo iz najčešćih veziva, već i minorne frakcije proteina drugih prirodnih komponenata ili proteine unete konzervatorskim tretmanima i kontaminacijom. Sastojci boja koji sadrže proteine kao glavne ili minorne komponente, pored prethodno opisanih, uključuju i krv, brašno, beli luk i biljne gume [39]. Oko 60% proteina prisutnih u krvi su serum albumini, dok imunoglobulini zajedno čine 18%. Ponekad je u slikarstvu korišćeno pšenično brašno (*Triticum spp*), ali i druge vrste brašna, koje sadrže oko 10% proteina. Gliadin i glutenin čine oko 80% proteina koji se nalaze u semenu pšenice. Beli luk (*Alium sativum*) korišćen je kao adheziv za pozlatu i sadrži 15-17% (w/w suve materije) proteina [40]. Gume dobijene od izlučevina biljaka, najvećim delom su sastavljene od polisaharida, ali sadrže manji deo glikoproteina. Gumi arabika, najčešća i najrasprostranjenija guma (*Acacia spp*) korišćena kao adheziv i medijum za boje i mastilo, ima visok sadržaj hidroksiprolina (do 29%) [39].

Proteini prisutni u umetničkim delima mogu biti uneti i kontaminacijom, kao pljuvačka, koža ili fragmenti dlake, ali i kao posledica aktivnosti bakterija ili gljivica. Pljuvačka se ranije često koristila kao sredstvo za čišćenje površine slike ili je korišćena za kvašenje četke. Ona sadrži malu količinu antimikrobnih enzima i enzima varenja. Keratini su glavni proteini epidermisa i dlake. Izbeći kontaminaciju slike keratinom, kao i uzoraka bojenog sloja tokom pripreme za analizu skoro je nemoguće. Takođe, u ne-

idealnim uslovima čuvanja, razvoj mikroorganizama može konaminirati bojeni sloj proteinima.

2.1.2 Promene do kojih dolazi tokom starenja proteinskih veziva

Rezultati hemijskih analiza daju informaciju o trenutnom sastavu uzorka slike. Važno je imati na umu da slike nisu statični objekti, već podležu mnogim hemijskim i fizičkim promenama tokom vremena. Originalne komponente međusobno reaguju i formiraju nova jedinjenja. U prošlosti, uslovi čuvanja slika nisu uvek bili optimalni. Neke su bile izložene promenama temperature, direktnom sunčevom svetlu ili ekstremnoj vlazi, što je moglo uticati i ubrzati hemijsko starenje i degradacione reakcije. Pored toga, različiti postupci restauracije mogu uticati na hemijske i fizičke uslove u slikama.

Organski materijali korišćeni u umetnosti obično zahtevaju specijalnu pažnju tokom konzervacije, zbog veće sklonosti degradaciji, promenama i oksidacionim procesima u odnosu na neorganske komponente umetničkih dela. Stoga, glavni problem organskih veziva korišćenih u predmetima kulturnog nasleđa je njihov kratak životni vek zbog podložnosti različitim degradacionim procesima. Posebno, u umetničkim slikama, diskoloracija, pukotine i degradacija su rezultat hemijskih i fizičko-hemijskih procesa čiji je najčešći uzrok kiseonik iz vazduha i izloženost UV zračenju [11]. Ipak, stabilnost proteina u različitim atmosferskim uslovima znatno je bolja u poređenju sa uljima i smolama koji starenjem žute i postaju krti [41]. To je možda razlog zašto su procesi starenja ulja i smola opsežno proučavani [42-44], dok je starenje proteina korišćenih u slikarstvu ređe razmatrano [41]. Sa gledišta stanja očuvanosti važno je znati da li procesi starenja dovode do značajnih fizičkih i hemijskih promena proteinskih materijala.

Struktura, a time i funkcija proteina ekstremno je podložna varijacijama relativne vlage, temperature, pH i drugih parametara okruženja. Pored toga, od posebnog su značaja i enzimski procesi uzrokovani mikroorganizmima, ali i višim organizmima koji dovode do biodegradacije u bojenom sloju slika. Degradacija veziva dovodi do različitih hemijskih promena, kao što je umrežavanje lanaca polimera, njihovo skraćivanje, oksidacija glavnih lanaca ili sporednih grupa i cepanje molekula, koje su često praćene

formiranjem visoko oksidovanih produkata. Pri tome nastaju slobodni radikali i sporedni hemijski proizvodi kondenzacionih, oksidacionih i reakcija umrežavanja između proteina i glicerolipida [45]. Ove strukturne promene dovode do povećanja nerastvorljivosti i polarnosti materijala, kao i promene bojenih površina. Poželjno je imati opšti uvid u procese koji se prirodno dešavaju, kao i u procese do kojih može doći tokom postupka pripreme uzorka, jer mogu uticati na identifikaciju proteina.

Faktori okruženja, kao što su povećanje temperature, oscilacije vlage, pH i izloženost UV zračenju takođe utiču na stabilnost proteina, dovodeći do promena njihove strukture i smanjujući otpornost na biodegradaciju. Aromatične aminokiseline (fenilalanin, triptofan i tirozin) apsorbuju UV svetlost pri čemu može doći do njihove oksidacije. Takođe, aminokiseline se mogu ocepiti od proteinskog lanca pod dejstvom svetlosti, jer i sama peptidna veza apsorbuje u UV oblasti [46].

Denaturacija i rastvorljivost proteina u starim uzorcima

U svom prirodnom stanju proteini formiraju kompleksne trodimenzionalne strukture. Delikatna ravnoteža hidrofobnih i elektrostatičkih interakcija kao i vodoničnih veza između bočnih ostataka aminokiselina dovode do formiranja trodimenzionalne strukture proteina koja je visoko korelisana sa njihovom jedinstvenom funkcijom. Denaturacija odgovara razvijanju nativne strukture, pri čemu se gube sekundarna i tercijarna struktura proteina. Pored fizičkih promena koje dovode do denaturacije i hemijski procesi su takođe ozbiljan problem. Proteini imaju izraženu tendenciju da se kompleksiraju sa katjonima metala i mogu biti veoma fotosenzitivni. Dobro je poznato formiranje kompleksa između Cu^{2+} jona i peptidnih veza proteina što je i osnova metode za detekciju i kvantitativno određivanje proteina u različitim uzorcima (biuretska reakcija). Oksidi metala i soli, prisutni u pigmentima, imaju značajan uticaj na veziva, jer pomažu oksidacione reakcije indukovane svetlošću. Nasuprot tome, neki pigmenti, poput ugljene crne imaju zaštitni uticaj na vezivo, jer sprečavaju prodiranje svetlosti u bojeni sloj. Neka jedinjenja prisutna u vezivima u malim količinama mogu delovati kao senzitizeri, apsorbovanjem svetlosti i prenošenjem energije na molekule supstrata.

Smanjena rastvorljivost proteina u starim uzorcima povezana je sa denaturacijom i procesima umrežavanja tokom starenja. Promena pH i prisustvo vlage

dovode do hidrolize peptidnih veza, što za posledicu ima promenu molekulske mase. Takođe može doći i do dehidracije nekih aminokiselina, kao što su serin i treonin. Alkalni tretmani, koji se često primenjuju u restauraciji, mogu delimično hidrolizovati proteine i stvoriti dehidroalanin iz fosforilovanih hidroksi aminokiselina (serin, treonin) i cisteina ili cistina [41]. Dalja alkalna hidroliza dovodi do cepanja peptidnih veza ili umrežavanja dehidroalanina sa bočnim lancima lizina. Primećeno je i formiranje oksalata na površinama slika, što ukazuje na neku vrstu fotooksidacije [46]. U uzorcima slika utvrđeno je prisustvo amino malon-aldehida kao proizvoda oksidativne degradacije serina, fenilalanina i cisteina [48]. Njegova dalja oksidacija dovodi do formiranja amino malonske kiseline, čija koncentracija u uzorcima slika raste tokom godina.

Interakcije proteina sa pigmentima u bojenom sloju

Uticaj katjona na degradacione procese ogleda se, pre svega, kroz veliki kapacitet proteina da vežu jone metala. Trenutno u literaturi nema dovoljno informacija koje se odnose na interakcije između aminokiselina i katjona metala unutar bojenog sloja. Međutim, postoje indicije da su pigmenti veoma reaktivni u slikarskim vezivima, pretežno usled formiranja stabilnih kompleksa. Katalitička oksidacija obuhvata većinu aminokiselina sa funkcionalnim grupama koje sadrže O, N i S, kao što su histidin, prolin, arginin, lizin, metionin, cistein i serin, i koje mogu da reaguju sa katjonima metala gradeći koordinaciona jedinjenja. Na isti način deluju i katjoni prisutni u podlozi i sikativima. Kompleksi koje formiraju prelazni metali kao što su bakar, cink, živa i srebro su veoma stabilni. Neki aminokiselinski ostaci su podložniji interakcijama sa metalima, a proteini reaguju na različite načine zavisno od prisutnih pigmenata. U literaturi je objavljeno da se, nakon reakcija sa metalima, mogu formirati karbonilne grupe na lateralnim lancima takvih aminokiselina [49]. Ove interakcije takođe mogu dovesti do promene relativnih procenata aminokiselina prisutnih u uzorku, što može da ometa identifikaciju proteinskih veziva primenom AAA metoda (*amino acid analysis*) [50-52]. Schilling i saradnici [50] pokazali su da pigmenti smanjuju koncentraciju aminokiselina koje imaju određene funkcionalne grupe na bočnim lancima: karboksilnu (asparaginska i glutaminska kiselina), hidroksil (serin, treonin), amino (lizin), sulfidnu (metionin) i aromatičnu (fenilalanin). Navedene aminokiseline označili su kao „reaktivne“ i naglasili da su asparaginska i glutaminska kiselina, serin i treonin veoma osetljivi na prisustvo hematita,

okera, umbre, azurita i malahita. Takođe su pokazali da neki pigmenti ometaju oporavak norleucina koji je korišćen kao interni standard u AAA analizama. Smanjenje ukupnog oporavka proteina iz slojeva tempere, korelisano sa prisustvom neorganskih katjona, potvrđeno je u više studija [39,53-58], prevashodno zbog ometanja derivatizacije aminokiselina usled formiranja kompleksa sa katjonima metala tokom hidrolize [59,60].

Mikrobiološka degradacija bojenog sloja

Poznato je da mikroorganizmi mogu izazvati oštećenja bojenog sloja. Step en oštećenja zavisi od vrste mikroorganizama, materijala i stanja njihove očuvanosti, kao i uslova okruženja, mikro klime i količine i vrste zagađivača vazduha [61]. Prisustvo i rast mikroorganizama na slikama dovodi do estetskih i strukturnih oštećenja i promene u hemijskom sastavu, utičući direktno na originalni sadržaj proteina. Nakon inicijalnog perioda rasta, mikroflora može prerasti u biofilm koji živi i pri ekstremno niskim nivoima metaboličke aktivnosti. Hemijska, fizička i biološka aktivnost mikroorganizama mogu biti vidljive ili prikrivene tokom veoma dugog perioda. Takođe, kada se organska supstanca izloži nekim vrstama mikroorganizama, može doći do fermentacije. Fermentacija menja osobine organskog materijala i uzrokuje ireverzibilne promene. Dejstvo enzima, prisutnih u samom organskom supstratu ili izlučenih aktivnošću mikroorganizama takođe se smatra delom fermentacionih procesa. Tokom fermentacije dolazi do hidrolize peptidnih veza i dalje razgradnje aminokiselina, kao i razgradnje šećera. Anaerobna degradacija proteina od strane mikroorganizama dovodi i do formiranja molekula kao što su piperidon, benzoeva kiselina i p-hidroksifenilacetat [62]. Metabolički produkti mikroorganizama kao što su ekstracelularni enzimi, neorganske i organske kiseline mogu rastvarati minerale u bojenom sloju i podlozi [63].

Problemi u identifikaciji proteinskih veziva u umetničkim delima

Ipak, u odnosu na druge organske komponente koje se nalaze u umetničkim delima, proteini su relativno stabilni prema oksidaciji i većina promena može se pripisati uticaju vlage i agresivne restauratorske prakse. Zbog svih navedenih razloga, identifikacija proteinskih veziva i uopšte organskih sastojaka bojenog sloja umetničkih dela, još uvek je veliki izazov za hemičare. Neophodno je uzeti u obzir sledeće:

- uzorak boje je po strukturi heterogen i proteinska veziva mogu biti prisutna u smeši sa više prirodnih i sintetičkih organskih supstanci;
- u malom uzorku bojenog sloja (<1 mg) sadržaj proteina obično je nizak i iznosi najviše 10% (w/w);
- stari proteini su denaturisani i zbog toga su slabo rastvorni u vodi;
- proteini ulaze u interakcije sa drugim neorganskim i organskim materijalima prisutnim u slikama;
- proteini mogu biti osetljivi na uslove okruženja i čuvanja (mikrobiološka degradacija kao i degradacija usled svetlosti i vlage);
- u uzorku mogu biti prisutni produkti degradacije proteina, restauratorskih tretmana i zagađenja.

2.2 ANALIZA PROTEINSKIH VEZIVA – OPŠTI PREGLED ANALITIČKIH TEHNIKA

Očuvanje kulturnih dobara važan je zadatak modernog društva, jer su ona vitalni izvor inspiracije i reflektuju kulturu i istoriju prošlosti i sadašnjosti. Ova vredna imovina je osnova buduće kulture, i stoga, jedan od glavnih legata koji treba preneti na buduće generacije. Za ovu svrhu, konzervatori, kustosi, istoričari umetnosti i naučnici udružuju znanje i napore, praveći novu multidisciplinarnu oblast. Kulturna dobra su sačinjena od veoma raznolikih materijala i veoma su različitih veličina - od arheoloških ili istorijskih lokaliteta, do spomenika i umetničkih i zanatskih predmeta. Iako njihov značaj proističe iz istorijskih, kulturnih ili likovnih poruka koje emituju, njihova konzervacija i trajanje u vremenu zavisi od materijala od kojih se sastoji. Iz tog razloga, razvijena je i nauka o konzervaciji posvećena naučnom ispitivanju kulturnih dobara i postupaka koji osiguravaju njihovo očuvanje. Primena fizike i hemije u rešavanju problema i pitanja arheologije, istorije i konzervacije nasleđa datira još iz XVIII veka, a prva laboratorija specijalizovana za ovu vrstu analiza osnovana je 1888. godine u Berlinu.

Ispravna identifikacija materijala korišćenih u stvaranju umetničkog dela od izuzetne je pomoći u otkrivanju načina izrade, autentifikaciji i konzervaciji [64]. Napor analitičara posebno je opravdan, kao deo anamneze objekta, kada istorija umetničkog dela nije potpuno poznata ili su prisutne ranije konzervatorske intervencije. Saznanja

dobijena proučavanjem umetničkih materijala i tehnika doprinose razumevanju istorije umetnosti, olakšavaju konzervatorima donošenje odluka i otkrivaju promene u sastavu slikarskih materijala usled starenja, vremenskih faktora i okruženja [12,65-67]. Često se od konzervatora traži pomoć vezana za autentifikaciju umetničkih dela identifikacijom sastavnih materijala i njihovog stepena degradacije [12,68-70]. Zato je identifikacija i kvantifikacija organskih veziva često prvi korak u proučavanju dela, i presudna je za razumevanje i prepoznavanje postojećih istorijskih, umetničkih i tehničkih informacija. Identifikacija komponenata omogućava, takođe, primenu kompatibilnih materijala ili materijala identičnih originalnim tokom konzervatorskih zahvata, ali i pronalaženje najboljih uslova za prezentovanje i čuvanje.

Pretpostavka da je svako kulturno dobro jedinstveno i nezamenljivo, i da zbog toga mora biti sačuvano u originalnom stanju, što je moguće više, ograničava uslove za primenu analitičkih postupaka. Analitičke tehnike koje se primenjuju u konzervaciji moraju biti nedestruktivne ili mikrodestruktivne. Nedestruktivne metode pružaju analitičke informacije bez izazivanja oštećenja na analiziranom objektu, dok mikrodestruktivne tehnike ne uzrokuju vidljiva oštećenja i predmet ostaje estetski netaknut. Iako su analitičke tehnike koje ne zahtevaju uzorkovanje poželjnije prilikom analiza predmeta kulturnog nasleđa, one ne obezbeđuju uvek neophodne ili potpune informacije o sastavu objekta.

Prilikom identifikacije organskih materijala, spektroskopske tehnike, koje su u suštini nedestruktivne ako se ne vrši uzorkovanje, daju opštu informaciju o strukturi, ali nemaju mogućnost da razlikuju dve organske supstance čiji je hemijski sastav veoma blizak. Takođe, ako je količina prisutnog organskog materijala veoma mala, što je čest slučaj kod predmeta kulturnog nasleđa koji su pretrpeli degradacione procese, analiza je veoma otežana. Zbog ovih ograničenja, za analizu organskih molekula u umetničkim delima potrebno je razviti nove pogodnije analitičke postupke. Trenutno ne postoji neinvazivna analitička tehnika koja može identifikovati proteinska veziva prisutna u umetničkim delima, pa uzorkovanje ostaje kao jedina mogućnost. Trend u ovoj oblasti postala je primena visoko-osetljivih tehnika za koje su potrebne male, sub-miligramske količine uzoraka. Zbog toga je masena spektrometrija poslednjih godina vodeća

analitička instrumentacija u proučavanju umetničkih dela, zahvaljujući kombinaciji visoke preciznosti i osetljivosti.

Različite analitičke tehnike i dijagnostičke metode, primenjivane za proučavanje kulturnih dobara, detaljno su opisane u pregledu Doménech-Carbó [12]. U ovom poglavlju će biti navedene samo metode pomoću kojih su identifikovana proteinska veziva u predmetima kulturnog nasleđa.

Precizna hemijska analiza proteinskih veziva i njihovog porekla nije lak zadatak zbog više razloga koji su ovde već napomenuti, ali i opisani u literaturi:

(a) Proteini su prirodni proizvodi i umetnici su ih koristili na način opisan u starim procedurama, obično bez bilo kakvog prethodnog prečišćavanja [71,72];

(b) Iako se može reći da su bojenim slojevima umetničkih dela, posebno u slikama, proteinska veziva zastupljena sa relativnim udelom do 10% (w/w), njihova identifikacija često je otežana malom količinom uzorka dostupnog za analizu (najčešće nekoliko desetina do nekoliko stotina mikrograma) [49,73];

(c) Proteini, kao i svi organski materijali skloni su degradaciji, hemijskim transformacijama i procesima oksidacije usled kompleksnog okruženja (pigmenata i drugih supstanci) što može promeniti njihov inicijalni hemijski sastav [41,74,75]. Degradacija slikarskih veziva rezultat je oksidacionih procesa koji uključuju slobodne radikale i/ili hidrolitičke procese [11,40,76-78]. Svetlost izaziva raskidanje peptidnih veza, dok vlaga i mikroorganizmi mogu uzrokovati hidrolizu, ali i strukturne modifikacije proteina u bojenom sloju slika. Takođe, može doći do hemijskih reakcija između organskih i neorganskih supstanci [40];

(d) Teškoće prilikom identifikacije proteina ponekad su pogoršane činjenicom da su umetnici koristili smeše više tipova organskih materijala, kao i nedokumentovane formulacije, u potrazi za umetničkim efektima i mehaničkim osobinama kako bi uobličili svoje ideje [71,72].

2.2.1 Bojenje poprečnih preseka vidljivim i fluorescentnim bojama

Početak XX veka, hemičari poput Ostvalda i Loriga počeli su da proučavaju komponente slikarskih boja [79-81]. Lorig je bio inicijator pionirskih naučnih eksperimenata vezanih za proteine u umetničkim delima baziranih na metodama bojenja. Prve predložene metode osmišljene su sa ciljem da lociraju proteine u stratigrafskim presecima uzoraka slika [82]. Ova dva naučnika primenila su optičko uvećanje kako bi uočili različite slojeve u uzorku i efekat bojenja na njima. Na taj način je po prvi put bilo moguće razlikovati pojedina veziva. Kazein i tutkalo se, na primer, boje pomoću boje *Acid green*, dok se samo tutkalo boji amonijačnim rastvorom *Iodesin-a*. Za bojenje proteina u poprečnim presecima Plesters je 1956. godine predložila primenu kiselog fuksina [83].

Međutim, tek 1970ih godina preduzeta su dalja istraživanja mehanizama bojenja proteina u slikarskim vezivima. Detekcija proteina u uzorcima bojenog sloja uspešno je izvedena pomoću niza kolorimetrijskih reakcija – ninhidrinske (u kojoj reaguju amino grupe proteina), biuretske (detektuje prisustvo peptidnih veza, tj. amidnih grupa), Milonove (detektuje tirozin) i Sakagučijeve reakcije (detektuje arginin) [84]. U to vreme predložena je primena crvene organske boje *Culvert*, kojom se proteini žumanceta boje crveno-narandžasto, a proteini tutkala ružičasto. Međutim, za primenu ove boje je potrebno rastvaranje uzorka u kiselim rastvorima što može dovesti do njegovog razaranja [85]. Pored toga, korišćene su i različite boje poput *Ponceau S* i *Coomassie Brilliant Blue R-250* [85]. Nekoliko godina kasnije princip bojenja unapređen je primenom boje *Amido black 10B*, koja efikasno identifikuje proteinska veziva čak i u uljanim emulzijama [86]. Novija istraživanja ove boje pokazala su da zavisno od pH pokazuje specifičnu reakciju [87-88]. Specifičnost bojenja *Amido black 10B* se zasniva na aminokiselinskom sastavu proteina (npr. na visokom sadržaju aminokiselina sa kiselinskim bočnim nastavcima). *Amido black 10B* neselektivno boji sve proteine na pH 3.6, na pH 2 boji samo proteine jajeta, dok na pH 7 samo kolagen, na osnovu čega se mogu razlikovati vrste proteinskih veziva.

Navedenim metodama nije moguća precizna identifikaciju proteina, niti dobijanje informacije o stepenu njihove degradiranosti. Ove metode imaju ograničenu

osetljivost, a dodatni problem, prilikom posmatranja obojenja, predstavlja prisustvo pigmenata koji su i sami obojeni, pa mogu otežati ili onemogućiti razlikovanje boja.

Krajem 1980ih predložena je primena fluorescentnih boja za određivanje proteina u uzorcima bojenog sloja [89]. Od nedavno je počela da se primenjuje nova boja za mapiranje proteina u uzorcima kulturnog nasleđa, komercijalnog naziva *SYPRO Ruby*, bazirana na kompleksu rutenijuma [90-93]. Ova boja se inače primenjivala za detekciju proteina nakon razdvajanja gel elektroforezom, ali je i na stratigrafskim presecima uzoraka umetničkih dela dala veoma dobre rezultate [94].

2.2.2 Spektroskopske metode

IR spektroskopija

Od samih početaka analitičkog proučavanja kulturnog nasleđa, vibracione spektroskopske tehnike poput IR i Ramanske spektroskopije bile su relevantne metode za prikupljanje informacija o mineralnoj i organskoj fazi u isto vreme. Prva primena IR spektroskopije u oblasti kulturnog nasleđa sredinom 1950ih bila je fokusirana na proučavanje i identifikaciju smola u slikama [95], da bi krajem 1960ih godina počela da se primenjuje i za karakterizaciju proteina [96].

IR spektroskopija omogućava detekciju peptidne veze na osnovu C=O i N-H istezanja na 1640 i 1540 cm^{-1} . Transmisiona IR spektroskopija je primenjivana na veoma malim uzorcima (mase reda veličine mikrograma), usitnjenim i tabletiranim u anhidrovanom kalijum-bromidu [97]. Sa pojavom IR mikroskopa postalo je moguće analizirati poprečne preseke i na taj način dobiti informacije o hemijskom sastavu pojedinačnih slojeva uzorka [98]. Početkom 2000ih, predložena je refleksiona mikro-FTIR tehnika za mapiranje poprečnih preseka uzoraka bojenog sloja, a prvi eksperimenti su izvedeni na uzorcima Rembrandtovih slika [99]. Da bi se povećala prostorna rezolucija, sa IR mikroskopom kuplovan je i ATR objektiv. Time je omogućena analiza još manjih površina uz istu aperturu IR zraka usled faktora uvećanja koji ima kristal germanijuma u kontaktu sa površinom uzorka [100]. Ova tehnika dala je veoma dobre

rezultate prilikom analize uzoraka koji sadrže jako male količine organskog materijala [101].

U postupku ispitivanja organskih supstanci u slikama sa uspehom je korišćena i sinhrotron emisija u IR oblasti kao izvor za FTIR mikroskopiju [102,103]. Upotrebom ovog izvora zračenja poboljšana je prostorna rezolucija, ali i odnos signal/šum, što je dovelo do preciznije identifikacije jedinjenja prisutnih na poprečnom preseku, posebno u oblasti istezanja C=O veze. Time je omogućeno razlikovanje estara, kiselina, amida, karboksilata, karbonata i oksalata. Ovom tehnikom je u uzorcima starih muzičkih instrumenata utvrđeno prisustvo proteinskih materijala u podlozi, što je potvrđeno i GC-MS analizama [104].

Mapiranje i identifikacija proteinskih veziva u umetničkim delima pomoću NIR reflektujuće spektroskopije (opseg 800-2500 nm; 4000-14000 cm^{-1}) opisano je u nekoliko publikacija [105-107]. Vibracione trake u NIR spektrima proteina povezane su pretežno sa C=O, NH i CH₂ grupama. Intenzitet tih traka je niži i manje su specifične od odgovarajućih spektralnih karakteristika u srednjoj IR oblasti (mid IR, 2500-25000 nm, 400-4000 cm^{-1}), ali na njih manje utiču interferencije usled prisustva pigmenata. Prilikom analize uzoraka slika iz XV veka ovom tehnikom dokazano je prisustvo različitih proteinskih veziva (tutkalo, žumance ili njihova smeša) u različitim slojevima boje, što je potvrđeno HPLC analizom aminokiselina [106].

Osim karakterizacije proteinskih veziva i njihove prostorne raspodele u uzorku, FTIR spektroskopija omogućila je bolje razumevanje interakcija između komponenata boje (npr. pigmenata i veziva), ali i uticaja starenja ili okruženja na proteine. Tokom jedne od ovih studija FTIR spektri proteinskih veziva, pomešanih sa pigmentima i izloženih veštačkom starenju, ukazali su na razgradnju peptidnih veza u uslovima povišene vlažnosti i izloženosti UV zračenju [108]. Pokazano je takođe da UV-starenje utiče na FTIR spektre proteinskih veziva u oblasti amidnih traka (2900 i 3600 cm^{-1}) [75]. Spektralni region na koji najviše utiče starenje je amidna I traka proteina, ali mehanizmi odgovorni za ovu promenu nisu do kraja objašnjeni. Takođe, postoje i dokazi da neki pigmenti, kao azurit, svojim prisustvom umanjuju uticaj UV zračenja na kolagensko vezivo [109]. Proučavane su i protein-pigment interakcije u različitim formulacijama model uzoraka [78,110]. Utvrđeno je da ove interakcije i starenje dovode

do promena odnosa intenziteta traka amid II/amid I, što ukazuje na formiranje β -ploča, oksidaciju proteina i protein-metal interakcije. Pored toga, dolazi do različitih degradacija proteina, poput agregacije, oksidacije bočnih nastavaka aminokiselina i hidrolize polipeptidnog lanca, kako u čistim vezivima, tako i u uzorcima koji sadrže pigmente. U jednoj od studija utvrđeno je i pomeranje maksimuma vibracione amidne trake I ka višim talasnim brojevima, što se pripisuje promeni sekundarne strukture proteina [111].

Pored navedenog, jedan od glavnih ciljeva istraživanja u ovoj oblasti su *in situ* merenja [112,113]. Od nedavno se primenjuju prenosni FTIR instrumenti koji funkcionišu u opsegu $7000-900\text{ cm}^{-1}$ (mid-IR) ili $12500-4000\text{ cm}^{-1}$ (NIR) sa optičkim vlaknima. Publikovana je njihova primena na zidnim slikama iz XV veka, gde su analizirani kako neorganski pigmenti, tako i organska veziva [112,114]. Snimljeni spektri podvrgnuti su PCA analizi, a poređenje sa spektralnim karakteristikama model uzoraka ukazalo je na prisustvo kazeina i kolagena. Dobijanje informacija iz FTIR spektara hemometrijskim metodama je komplikovan zadatak usled varijabilnosti i kompleksnosti IR refleksionih spektara, gde su česte distorzije oblika i položaja traka, što je uočeno primenom ove metode na renesansnim zidnim slikama [115].

Ramanska spektroskopija

Ramanska spektroskopija je analitička tehnika komplementarna IR spektroskopiji. U kombinaciji sa mikroskopijom ova metoda postala je nezamenljiva u oblasti kulturnog nasleđa. Omogućava analizu veoma malih uzoraka (površine oko $5\text{ }\mu\text{m}^2$) čime se postiže bolja osetljivost zbog smanjenja interferencija okruženja. U početku, primena ove metode bila je usmerena ka identifikaciji pigmenata, a prve primene u analizi proteinskih materijala objavljene su početkom 2000ih [116,117]. Ramanski spektri proteinskih veziva sadrže elemente koji mogu dovesti do njihove identifikacije [75]. Analizu proteinskih veziva otežava fluorescencija proteina, pa se primenjuju različite matematičke metode za eliminaciju pozadinske fluorescencije [118-120]. Ovom metodom proučavan je uticaj procesa starenja i prisustva pigmenata na proteinska veziva i pokazano je da može doći do nestanka vibracionih traka, pojave novih ili promene intenziteta postojećih [70,121,122]. Jedan od primera je nestanak trake koja

se pripisuje triptofanu nakon izlaganja uzorka belanceta UV zračenju [121]. Primećene su, takođe, i promene na C-S vezama koje su pripisane fotooksidacionim reakcijama.

Fluorescentna spektroskopija

Fluorescentnom spektroskopijom proučava se zračenje koje emituje molekul nakon pobuđivanja radijacionim izvorom. Ova analitička metoda primenjena je za neinvazivnu karakterizaciju umetničkih materijala – pigmenata, bojila i veziva [123,124]. Na osnovu fluorescencije koju emituju aromatične aminokiseline, moguće je analizirati proteinska veziva korišćena u slikarstvu (žumance i belance, kazein i različita životinjska tutkala) [125,126]. Na fluorescentne spektre proteina utiču struktura i okruženje proteina. Proučavan je i uticaj svetlosti i nekih pigmenata na fluorescentne spektre više proteinskih veziva [70]. Autori su primetili da izlaganje svetlosti rezultuje povećanjem intenziteta emitovanog fluorescentnog signala na 435 nm, što je pripisano degradacionim proizvodima proteina, posebno usled oksidacije triptofana. Međutim, proučavani su samo filmovi čistih proteina. Radi potvrde rezultata, trebalo bi sprovesti dodatno ispitivanje model uzoraka i uzoraka slika kako bi se razumeli procesi do kojih dolazi u takvim složenim sistemima.

2.2.3 TOF-SIMS

TOF-SIMS je nedestruktivna tehnika kojom je moguća istovremena identifikacija neorganskih i organskih komponenata u uzorku. Ova tehnika se primenjuje u proučavanju kulturnog nasleđa prevashodno zbog mogućnosti dobijanja informacija o prirodi i prostornoj distribuciji pigmenata i organskih veziva u uzorku tokom jednog analitičkog eksperimenta, o čemu svedoči veliki broj publikacija [127-133]. Princip metode zasniva se na analizi sekundarnih jona koji se emituju nakon ozračivanja površine snopom primarnih jona. TOF-SIMS mapiranje omogućava dobijanje mape rasprostranjenosti elemenata u pigmentima i molekulskih signatura veziva [127]. TOF-SIMS metoda primenjivana je pretežno na uzorcima uljanih slika radi utvrđivanja vrste veziva i hemijskih modifikacija do kojih dolazi tokom procesa starenja ulja [40,131].

Primenom TOF-SIMS u kombinaciji sa PCA pokušana je identifikacija proteinskih veziva u uzorcima oslikanog drvenog raspeća iz XV veka [134]. Pokazalo se da prisustvo neorganskih jedinjenja utiče na masene spektre proteinskih veziva, pa je bilo teško razlikovati veziva poput kazeina i tutkala. Identifikacija proteinskih veziva pomoću TOF-SIMS otežana je činjenicom da se svi proteini sastoje od istih aminokiselina, pa se ne mogu lako razlikovati na osnovu prisustva ili odsustva karakterističnih pikova u masenim spektrima [135]. Ipak, relativni intenziteti pikova aminokiselina u masenim spektrima proteina mogu doprineti razlikovanju proteina. Metode multivarijantne analize, posebno PCA, neophodne su kako bi se ekstrahovale informacije iz kompleksnih masenih spektara proteina koji sadrže mnoštvo pikova. Wagner i saradnici pokazali su da se pomoću TOF-SIMS i PCA mogu razlikovati pojedinačni proteini [136]. Nedavno su na uzorcima bojenog sloja jedne od Rembrandtovih slika na ovaj način, pored pigmenta i veziva, identifikovani i različiti karboksilati olova, skrob i fragmenti aminokiselina [132].

2.2.4 Kapilarna zonska elektroforeza

Kapilarna zonska elektroforeza (CZE) je analitička metoda za razdvajanje analita na osnovu elektroforetske pokretljivosti. Karakterizacija proteinskih veziva ovom metodom prvi put je objavljena pre desetak godina [137]. Nakon potpune hidrolize, različite vrste proteinskih veziva podvrgnute su CZE-CCD analizi bez prethodne derivatizacije. Karakterizacija proteina se zasniva na njihovom aminokiselinskom sastavu i suština je slična kao kod analize aminokiselina drugim metodama. Ovom metodom identifikovano je prisustvo kolagenskih materijala tokom analize polihromne skulpture iz XVIII veka [137]. CZE u kombinaciji sa masenom spektrometrijom, kao načinom detekcije, takođe je korišćena za identifikaciju proteinskih veziva u uzorcima slika [138].

2.2.5 Analiza aminokiselina (AAA) hromatografskim metodama

Metodom analize aminokiselina (AAA) karakterizacija proteina postiže se na osnovu aminokiselinskog profila. Kao što je već naglašeno, aminokiseline su retko karakteristične za protein, jer većina proteina sadrži sve standardne aminokiseline. Izuzetak je hidrokisiprolin, kao ne-standardna aminokiselina, koja se jedino javlja u kolagenu i u nekim glikoproteinima nađenim u ćelijskom zidu biljaka. Relativni odnosi koncentracija aminokiselina mogu poslužiti za identifikaciju proteina. Predloženo je nekoliko pristupa za primenu analize aminokiselina na mikro uzorcima slika koje sadrže proteinska veziva koji su bazirani na istim principima i uključuju slične postupke koji se sastoje od hidrolize, derivatizacije, razdvajanja i detekcije.

Jedan od prvih pokušaja analize proteinskih veziva u umetničkim delima bilo je hromatografsko razdvajanje aminokiselina na papiru pedesetih godina prošlog veka. Analizirano je više uzoraka štafelajnih i zidnih slika iz različitih perioda (XIII do XVIII vek) [139]. Nakon potpune hidrolize proteina u uzorcima, aminokiseline su razdvojene na papiru, obojene ninhidrinskim reagensom i na osnovu prisustva ili odsustva specifičnih aminokiselina identifikovana su veziva na bazi jajeta ili kolagena. Nakon ove prve primene, metoda se razvijala uvođenjem različitih reagenasa za bojenje, ali i stacionarnih faza [140,141]. Zbog nedostataka papirne i tankoslojne hromatografije u to vreme, poput loše rezolucije i nedostatka kvantitativnosti, dalji eksperimenti išli su u smeru primene jonoizmenjivačke hromatografije i merenja optičke gustine ninhidrinskih derivata. Primenom jonoizmenjivačke hromatografije uspešno su identifikovana veziva na bazi kazeina, kolagena i jajeta na osnovu različitog kvantitativnog sastava prisutnih aminokiselina [142,143].

Početakom 1990ih u ovoj oblasti počela je primena reversno-fazne HPLC (C18 stacionarna faza) povezane sa UV-Vis spektrofotometrijom [144-146]. Radi bolje selektivnosti i nižih granica detekcije većina laboratorija koje primenjuju AAA uz razdvajanje pomoću HPLC, derivatizuju aminokiseline pre detekcije. Pored toga, može se primeniti i pre-kolonska derivatizacija fluorescentnim reagensom, kakav je 6-aminohinolit-N-hidroksisukcinimidil karbamat (AccQ) u sprezi sa fluorescentnom detekcijom [57,147]. Dalji eksperimenti i primene ove metode bavili su se različitom pripremom uzoraka, kao što je ekstrakcija, uklanjanje soli i derivatizacija aminokiselina

[145-148], kao i statističkom obradom podataka [69]. Tehnološka unapređenja i pojava UPLC instrumenata doveli su do velikog napretka u pogledu manje količine potrebnog uzorka, kraćeg vremena analize i bolje reproduktivnosti [149-151]. Prilikom primene AAA metoda treba imati na umu da su proteinska veziva smeša različitih proteina. Na primer, glavni protein belanceta je ovalbumin, ali on čini samo 54% ukupnih proteina. Ostali proteini belanceta (ovotransferin, ovomukoid, ovomucin, ovoglobulini, lizozim) imaju značajan uticaj na aminokiselinski profil belanceta kao veziva. Isto važi i za ostala veziva. Njihovu karakterizaciju pomoću AAA treba bazirati na aminokiselinskim profilima seta referentnih uzoraka celovitih veziva, a ne čistih pojedinačnih proteina kako se najčešće objavljuje u radovima. Zato se često javljaju problemi prilikom identifikacije proteinskih veziva u smeši, kao što je slučaj sa uzorcima bojenog sloja.

Kuplovanje HPLC razdvajanja sa MS detekcijom omogućilo je da prethodna derivatizacija aminokiselina ne bude uslov za njihovu identifikaciju i određivanje. Na ovaj način aminokiseline mogu biti veoma precizno kvantifikovane, čime je unapređena i pouzdanost identifikacije veziva. Tako je, u modernim slikama rađenim tehnikom tempere, AAA analizom i poređenjem rezultata sa model uzorcima uspešno identifikovano tutkalo na osnovu prisustva visokih koncentracija prolina, 4-hidroksiprolina, glutaminske i asparaginske kiseline [152]. Sličan protokol primenjen je na uzorke zidnih slika crkve u Etiopiji iz XIII veka gde je utvrđeno prisustvo kazeinskog i jajčanog veziva [153]. Za razdvajanje i detekciju aminokiselina iz proteinskih veziva primenjena je i HPLC metoda povezana sa fluorescentnom detekcijom [147,148].

Gasno-hromatografska (GC) analiza primenjena na uzorcima kulturnog nasleđa omogućava identifikaciju različitih vrsta molekula u jednom uzorku (proteina, lipida, terpena) [6,154]. Zbog toga je, do nedavno, bila jedna je od najčešće primenjivanih tehnika u analizi proteinskih veziva [74]. Gasnom hromatografijom mogu se analizirati molekuli niskih molekulskih masa, dok postoje određeni problemi prilikom analize velikih biomolekula kakvi su proteini. Makromolekulska priroda proteinskih materijala uslovljava dugotrajnu i komplikovanu pripremu uzoraka. Nakon potpune hidrolize proteina, kao i za HPLC analizu, sledi prečišćavanje radi eliminacije interferencija pigmentata, a zatim i derivatizacija aminokiselina. Da bi se analizirale pomoću GC-MS, aminokiseline iz proteina moraju biti derivativizovane kako bi im se povećala isparljivost.

Korišćeni su različiti reagensi za derivatizaciju koja se zasniva na silanizaciji (N-terc-butilmetilsilil-N-metiltrifluoroacetamid, MTBSTFA [155]) ili alkilovanju (etil hloroformat, ECF [38]). Zbog složenosti postupka, priprema uzoraka mora se izvesti pažljivo kako bi se smanjio rizik od gubitka i/ili kontaminacije uzorka.

Jedna od prvih publikacija primene GC u oblasti kulturnih dobara objavljena je krajem 1960ih i u njoj je, između ostalih tehnika za karakterizaciju različitih vrsta veziva, opisana primena GC-FID [96]. Modifikovani postupak, koji uključuje drugačije uslove hidrolize i derivatizacije, sredinom 1980ih primenjen je na uzorcima slike Đovanija Belinija iz XV veka, gde je uspešno identifikovan kolagen prisutan u podlozi na osnovu odnosa koncentracija specifičnih aminokiselina [71]. Pored toga, objavljeno je više studija u kojima su optimizovani uslovi pripreme uzoraka, kako bi se smanjio gubitak analita i unapredila pouzdanost i reproduktivnost rezultata [39,41,58,71,156,157].

Primenom gasne hromatografije takođe je utvrđeno da starenje i prisustvo pigmenata imaju značajan uticaj na sadržaj aminokiselina u uzorku. Nađeno je da na serin, treonin, asparaginsku i glutaminsku kiselinu utiču azurit, malahit i pigmenti na bazi gvožđa [50], dok je na aminokiseline koje sadrže alkil- i imino-grupe ovaj uticaj slabije izražen [58].

Uvođenje masene spektrometrije kao načina detekcije (jonska zamka ili kvadrupol maseni detektor) učinilo je gasnu hromatografiju informativnijom tehnikom i omogućilo dobijanje preciznih informacija o molekulskim masama aminokiselina što, u kombinaciji sa retencionim vremenima, dopinosa pouzdanosti identifikacije. MS može pružiti i strukturne informacije o analiziranim jedinjenjima, pa je moguća identifikacija nepoznatih ili jedinjenja koja ne očekujemo u uzorku. Zbog toga se pomoću GC–MS i pirolitičke GC–MS mogu proučavati kompleksne smeše sastavljene od proteinskih i drugih tipova veziva u isto vreme. To je demonstrirano na srednjovekovnim slikama vizantijskih majstora u Parmi iz XIII veka. Na osnovu visokih koncentracija glicina i prolina, zaključeno je da je kao vezivo korišćeno tutkalo, dok je na osnovu visokog sadržaja glutaminske i miristinske kiseline utvrđeno da je na nekim delovima korišćen i kazein [158].

Pirolitička GC-MS (Py-GC-MS) korišćena je za utvrđivanje pirolitičkih markera karakterističnih za različita veziva [159, 160]. Primenjena je za određivanje tutkala i kazeina u zidnim slikama [161]. Uspešno određivanje klasa proteinskih veziva pomoću Py-GC-MS publikovalo je više autora [162-164]. *Curie point* pirolizom sa GC-MS takođe su okarakterisana proteinska veziva korišćena u umetničkim delima [162].

Predložene su različite modifikacije pripreme uzorka za GC-MS vezane za prečišćavanje i/ili derivatizaciju aminokiselina [40,45,51,53,73,165]. Bilo je i pokušaja da se uticaj jona pigmenata na analizu pomoću GC-FID eliminiše dodatkom Na₂EDTA [166] ili primenom jonoizmenjivačke hromatografije na katjonskim smolama [167].

Kao što je već naglašeno, analitičkim metodama zasnovanim na gasnoj hromatografiji moguća je identifikacija proteinskih veziva koja se najčešće sreću u uzorcima kulturnog nasleđa na osnovu poređenja sadržaja aminokiselina u analiziranim uzorcima sa hromatografskim profilima referentnih uzoraka [58]. Tehnika je primenjena na različite vrste uzoraka kao što su zidne sike [47,168-170], slike na platnu [171], na drvenim panelima [172], polihromne skulpture i pozlaćene dekoracije [173,174], ikone [175,176] i muzički instrumenti [177].

Dostupnost HPLC i GC-MS instrumenata, kao i njihova visoka osetljivost doveli su do česte primene AAA u mnogim konzervatorskim laboratorijama. Međutim, ovaj koncept ima i neke nedostatke. Bilo kakva distorzija pika jedne aminokiseline ima ogroman uticaj na relativne količine svih ostalih aminokiselina, usled čega identifikacija veziva može biti pogrešna ili nemoguća. Do odstupanja rezultata mogu dovesti različiti uzroci: koeluirajuće komponente, selektivno degradirane aminokiseline, pigmenti na bazi bakra ili drugih metala koji reaguju sa aminokiselinama ili proteinska veziva u smeši [53]. Na identifikaciju mogu uticati i proizvodi za impregnaciju na bazi proteina (npr. originalni izolacioni slojevi ili naneti tokom konzervacije) [178], uzorci koji sadrže više slojeva, neočekivani proteini i proizvodi starenja usled izloženosti UV zračenju i zagađivačima [179], kao i biološka kontaminacija [73].

Zbog svega navedenog, identifikacija zasnovana na odnosima pojedinih aminokiselina nije pouzdana u ovako kompleksnim uzorcima. Još jedan nedostatak analize aminokiselina je neophodnost kompletne hidrolize proteina čime se gube podaci o sekvenci aminokiselina u proteinu. Na taj način brišu se informacije o poreklu i

strukturi proteina, pa primena GC i HPLC tehnika nije poželjna kada je neophodno razumevanje mehanizama interakcija ili degradacija proteinskih veziva. Primenom različitih GC i HPLC tehnika moguće je identifikovati samo opšte grupe proteinskih veziva, dok se pojedinačne vrste tutkala, na primer, ne mogu razlikovati zbog sličnih aminokiselinskih profila. Ipak, ove metode se i dalje primenjuju, ali sve češće u kombinaciji sa komplementarnim analitičkim tehnikama, kako bi se potvrdili rezultati, postigla kompletnija karakterizacija umetničkog dela i procenilo njegovo stanje degradiranosti/očuvanosti na molekulskom nivou.

2.2.6 Imunološke metode

Imunološke metode zasnovane su na visoko-specifičnim interakcijama antigen/antitelo i zahvaljujući tome su veoma osetljive. Imunološke metode obuhvataju više tehnika kojima se vizuelizuje prisustvo proteina. Visoko specifična antitela mogu se proizvesti tako da se vezuju samo za određeni ciljani protein (antigen) prisutan u proteinskim vezivima. Antitela se mogu obeležiti funkcionalnom grupom čime se omogućava njihova detekcija. Kada se rastvor ovih antitela nanese na uzorak bojenog sloja, dolazi do vezivanja antitela samo ukoliko je u uzorku prisutan odgovarajući protein. Danas se sve više primenjuje pristup dvostrukih antitela: u prvom koraku neoznačena primarna antitela vezuju se za antigen, dok se u drugom koraku označena sekundarna antitela vezuju za očuvani region primarnog antitela. Primarno antitelo je antigen za sekundarno antitelo. Ovaj postupak omogućava veću raznolikost: isto označeno sekundarno antitelo može se koristiti za različita primarna antitela (kultivisana u istim vrstama). Kao dodatna prednost, u nekim slučajevima, primarna antitela mogu se uklopiti sa višestrukim sekundarnim antitelima što dovodi do pojačavanja signala i bolje osetljivosti. [180,181]. Za eksperimente se mogu primeniti različite podloge (gelovi za elektroforezu, hromatografske faze i sl.) uz različite metode detekcije kao što su izotopsko i fluorescentno obeležavanje ili enzimske reakcije.

Početak primene imunoloških metoda u proučavanju proteina na polju kulturnog nasleđa vezuje se za početak 1960ih [182-185]. Dalja primena ovih metoda na proteinska veziva 1971. godine bila je zasnovana na imunofluorescentnoj mikroskopiji

(IFM) [85]. Ova tehnika koristi antitela obeležena fluoroforom i može se primeniti na poprečne preseke uzoraka bojenog sloja. Nakon direktnog nanošenja rastvora antitela na poprečni presek stratigrafska raspodela fluoresceirajućih antitela, a na taj način i proteinskog veziva, vizuelizuje se fluorescentnom mikroskopijom. Primena je ograničena na tamne boje koje ne pokazuju autofluorescenciju, a signal je generalno slab i često daje lažne rezultate. Zbog ovih nedostataka, tokom narednih dekada objavljen je veoma mali broj naučnih radova koji se bave primenom imunoloških metoda u analizi proteinskih veziva [90,180,181,186]. Tek nedavno je Cartechini primenila IFM za identifikaciju kazeina i kolagena u poprečnim presecima uzoraka bojenog sloja [72].

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay Technique) je jedna od najčešćih testova u imunobiohemiji. Enzimaska reakcija podstiče pojačavanje odgovora u poređenju sa IFM, čime se objašnjava odlična osetljivost ove tehnike [181,187,188], ali neophodno je uzorkovanje i ekstrakcija pojedinačnih slojeva uzoraka boje.

ELISA je od 2000. godine primenjivana za analizu proteinskih veziva u različitim vrstama uzoraka [72,181,189-192]. Faktori koji otežavaju analizu su složeni matriks u kome se nalaze proteini, jer dolazi do interakcija između proteina i drugih komponenata, kao što su pigmenti, degradacije proteina, kao i mala količina uzorka dostupna za analizu [72,191]. Najčešće se primenjuje indirektni ELISA postupak. Primarna antitela koja se koriste za detekciju proteina su monoklonalna ili poliklonalna, najčešće usmerena protiv kolagena, kazeina ili ovalbumina koji su glavni proteini u vezivima i adhezivima korišćenim u umetničkim delima [72,193]. Ovom metodom, između ostalog, uspešno je detektovano prisustvo belanceta u uzorku sa skulpturalnog elementa francuskoga kabineta iz XVII veka [181], kao i kolagen i ovalbumin u uzorcima polihromne skulpture iz XIII veka [191].

Ispitivan je i uticaj starenja i prisustvo pigmenata na imunološku detekciju proteina [72]. Uspešno su detektovani kazein i proteini jajeta u svim uzorcima podvrgnutim starenju, dok je u uzorcima koji sadrže kolagen došlo do gubitka signala. Takođe, za razliku od svežih uzoraka pripremljenih sa različitim pigmentima, u uzorcima podvrgnutim veštačkom starenju bilo je poteškoća u detekciji, posebno u pojedinim uzorcima baziranim na kazeinu i ovalbuminu [194].

ELISA eksperimenti najčešće se primenjuju kao metoda za praćenje prisustva ciljanih proteina u uzorku (skrining), ali i kao komplementarna tehnika, radi dopune ili potvrde rezultata drugih analitičkih tehnika poput GC-MS ili LC-ESI-MS. Ove tehnike zajedno sa fluoresencijom primenjene su u nedavno objavljenoj studiji rimsko-egipatskih panela sa kraja II veka, gde je u slojevima podloge detektovano kolagensko vezivo pomoću ELISA metode, a rezultati potvrđeni masenom spektrometrijom [195].

Dot-ELISA predložena je kao semikvantitativna metoda za proučavanje slikarskih veziva na bazi jajeta [150]. Spektrofotometrijska detekcija sa integracionom sferom omogućila je prikupljanje rasejanog svetla sa cele površine uzorka, na osnovu čega je u dva uzorka boje uspešno identifikovan ovalbumin. Na isti način je identifikovan ovalbumin i u uzorcima zidnih slika Crkve Svetog Franje u Lodi [196]. Još jedna imunološka tehnika zasnovana je na SERS: antitela označena SERS-aktivnim grupama omogućavaju veoma specifičnu analizu poprečnih preseka mikro-Ramanskim spektrometrom [197].

Imunofluorescencija je takođe predložena kao *in situ* metoda detekcije [198]. Sekundarna antitela označena fluorescentnim molekulom vezuju se za protein-antitelo kompleks, omogućavajući njegovu detekciju u UV oblasti. Međutim, da bi se koristilo specifično antitelo za protein prisutan u uzorku, mora se pretpostaviti njegov identitet, što čini primenu ove metode prilično komplikovanom. Najnovija unapređenja tehnike pretežno imaju za cilj uzorke koji sadrže kazein i/ili albumin [199-201]. Navedenim metodama detekcije mogu se mapirati proteini u uzorku. Međutim, imunofluorescentnom detekcijom se za sada mogu odrediti samo jajčano vezivo ili kazein.

2.3 ANALIZA PROTEINA MASENOM SPEKTROMETRIJOM

2.3.1 Proteomika – opšti principi i pojmovi

Proteini su najsloženije molekulske strukture prisutne u biosferi. Sa analitičkog stanovišta, njihova identifikacija predstavlja jedan od najizazovnijih zadataka za hemičara. Njihov skelet je linearni polipeptidni lanac načinjen od aminokiselina. Dužina

lanaca kreće se od 100 do 2000 aminokiselinskih ostataka, povezanih amidnim (peptidnim) vezama. Ne postoje pravila u kombinovanju ili isključivanju bilo koje aminokiselinske sekvence u lancu. Redosled aminokiselinskih ostataka, koji je određen redosledom nukleotida u odgovarajućem segmentu DNA, naziva se primarna struktura proteina.

Nakon biosinteze polipeptidnog niza u procesu translacije, dolazi do njegove posttranslacione modifikacije (PTM). Peptidni lanac se u toku modifikacije može skratiti dirigovanom proteolizom, neke od aminokiselina mogu se kovalentno modifikovati (hidroksilacija, fosforilacija, dehidrogenizacija, amidovanje itd.) ili za molekul proteina mogu biti vezane različite prostetične grupe kao što su hem, joni metala ili (oligo)saharidni lanci. Jedan molekul proteina može biti modifikovan na više načina. Zato proteini, a posebno njihove smeše koje se sreću u prirodi, mogu imati širok opseg različitih fizičkih i hemijskih osobina kao posledicu opisane varijabilnosti njihove hemijske strukture.

Termin „proteom“ formiran je po analogiji sa terminom „genom“ 1995. godine kako bi se označio set proteina koji je prisutan u ćeliji, tkivu ili čak celom organizmu u određenim fiziološkim ili patološkim uslovima i u tačno definisanom okruženju [202-204]. Proteom je rezultat translacije genoma u proteine preko mRNA u definisanim životnim uslovima. Stoga, jedan genom može dovesti do različitih proteoma na osnovu stupnjeva u ćelijskom ciklusu, diferencijacije, odgovora na različite biološke i fizičke signale ili patofiziološkog stanja. Dok je genom ćelije konstantan, proteom je dinamičan, jer odražava uticaj različitih ćelijskih procesa [205]. Dodatno, protein može biti hemijski modifikovan nakon sinteze ili tokom njegovog života u ćeliji. Obično su te modifikacije indukovane enzimima, ali postoje i promene koje nisu enzimski indukovane i javljaju se nakon izlaganja spoljašnjim faktorima (UV zračenju). To povećava složenost proteoma i studije pokazuju da je zbog toga moguće samo opšte razumevanje datog biološkog sistema u specifičnoj situaciji.

Stoga, reč „proteomika“ (engl. *proteomics*) označava granu biohemije koja proučava proteine, uključujući njihovu identifikaciju, kvantifikaciju i modifikacije (posttranslacione i hemijske) [205-207]. Proteomika je opsežna studija proteina, njihove strukture i funkcije. Ovo polje nauke je značajno razvijeno poslednjih godina pojavom

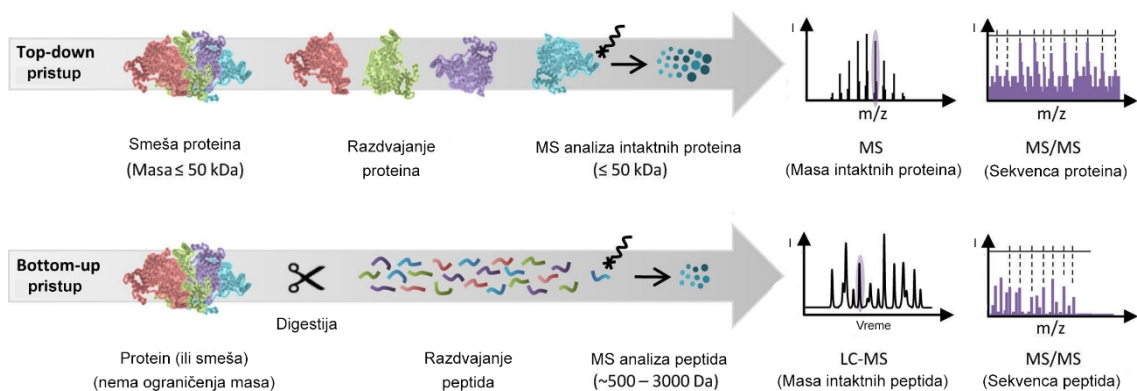
large scale (engl.) i *high throughput* (engl.) proteomike, zahvaljujući eksponencijalnom porastu broja dostupnih sekvenci genoma, kao i napretku na polju masene spektrometrije [208].

Analiza peptida, koja se primenjuje u proteomici, specifičnija je i uspešnija u analizi smeša proteina u poređenju sa analizom aminokiselina. Koncept analize peptida zasnovan je na specifičnoj enzimskoj hidrolizi proteina na peptide. Peptidi su dovoljno mali da bi bili precizno mereni, ali i dovoljno veliki da zadrže neophodnu specifičnost kako bi se nedvosmisleno identifikovali proteini od kojih potiču. Potencijalno se čak najmanje mutacije između analogih proteina u različitim životinjskim i biljnim vrstama mogu razlikovati na ovaj način. Kao rezultat ove visoke specifičnosti, nije teško identifikovati pojedinačne proteine i u najkompleksnijim smešama.

***Top-down* i *Bottom-up* pristupi u proteomici**

Proteomika najčešće uključuje tehnike razdvajanja proteina elektroforezu ili hromatografiju zajedno sa masenom spektrometrijom i bioinformatikom, koja integriše genomske i proteinske baze podataka radi identifikacije proteina. Na osnovu ove tri analitičke celine – razdvajanje proteina, MS analiza i pretraživanje baze podataka – razvijene su dve strategije identifikacije proteina: *top-down* i *bottom-up* (Slika 2.1) [209-213].

Top-down pristup je razvijen krajem 1990ih godina. Omogućio je analizu proteina bez prethodne hemijske ili enzimske hidrolize [209,211,214]. Zasniva se na merenju masa intaktnih proteina i direktnoj fragmentaciji njihovih katjona u masenom spektrometru. Precizna molekulska masa proteina meri se pomoću masenog analizatora visoke rezolucije, kao što je FT-ICR ili Orbitrap, a zatim se protein fragmentiše u izvoru ili analizatoru masenog spektrometra bez prethodne hemijske ili enzimske hidrolize. *Top-down* pristup nije korišćen tokom izrade ove teze, pa ovde neće biti detaljnije razmatran.



Slika 2.1. Šematski predstavljene strategije analiza *top-down* i *bottom-up* koje se primenjuju u proteomici (prilagođeno iz [215])

Bottom-up pristup je trenutno znatno zastupljeniji. Suština pristupa je identifikacija proteina preko smeše peptida dobijene nakon hidrolize enzimima. Proteini uzorka mogu biti prethodno razdvojeni elektroforezom na gelu prema molekulskim masama i/ili naelektrisanju. Zatim se primenjuje enzimska hidroliza proteina u gelu ili u rastvoru, proteazom koja raskida peptidne veze na tačno definisanim mestima, pri čemu se dobija set peptida, karakterističan za dati protein. Na kraju, masenom spektrometrijom precizno se mere mase tih peptida. Identifikacija proteina postiže se uz pomoć bioinformatičkih alata, poređenjem izmerenih masa sa teorijskim vrednostima izračunatim na osnovu baza sekvenci proteina ili gena [216].

Identifikacija proteina – mapiranje peptida i tandem masena spektrometrija

Peptidi dobijeni proteolitičkim cepanjem proteina visoko su specifični i grupa vrednosti njihovih molekulskih masa predstavlja „otisak prsta“ tog proteina. Zato se ovaj postupak identifikacije proteina naziva mapiranje peptida (engl. *peptide mass fingerprinting*, PMF). Za snimanje PMF spektara najčešće se primenjuje MALDI-TOF masena spektrometrija. Snimljeni spektri se pretražuju u odnosu na javno dostupne baze podataka proteinskih sekvenci kako bi se utvrdilo poklapanje izmerenih masa peptida (m/z) sa teorijskim masama [217]. Broj poklopljenih pikova (u granicama izabrane tolerancije, npr. ± 0.2 Da), odnosno broj eksperimentalno dobijenih masa peptida koje odgovaraju teorijskim masama u bazi proteina, izražen je tzv. skorom, pri čemu viši skor odražava veću pouzdanost identifikacije proteina. Ovaj postupak je brz i pouzdan, u

slučajevima kada je postignuta precizna detekcija m/z vrednosti peptida, jer se zasniva na višestrukom pripisivanju pikova peptida radi nedvosmislene identifikacije proteina. Glavna ograničenja metode javljaju u analizama kompleksnih smeša proteina usled povećanog rizika pogrešnog pripisivanja pikova peptida nekom proteinu.

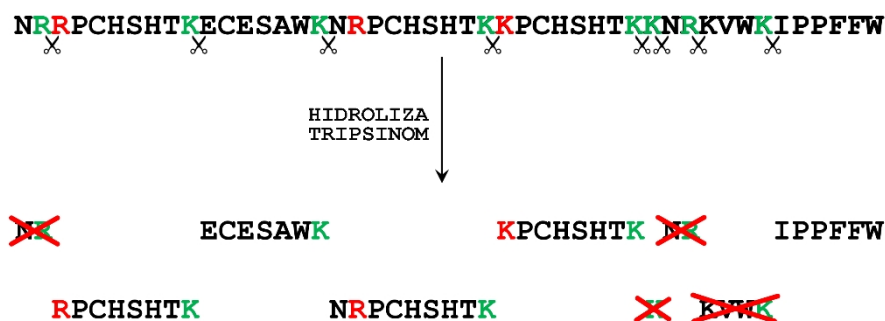
Peptidi se mogu sekvencirati i identifikovati i tandem masenom spektrometrijom (MS/MS) na osnovu fragmentacije [218]. Peptidi dobijeni nakon hidrolize tripsinom razdvajaju se najčešće pomoću RP-HPLC povezane *on-line* sa ESI joinizacionim izvorom i masenim spektrometrom. Tandem masenom spektrometrijom selektuje se prekursor jon čijom fragmentacijom se dobijaju fragment joni koji se precizno mere i analiziraju. Za analizu je potrebno duže vreme zbog hromatografskog razdvajanja, ali dobijaju se detaljne informacije o komponentama prisutnim u niskim koncentracijama iz nekoliko mikrograma uzoraka, zbog izuzetno selektivne i osetljive detekcije [219].

U analizi proteoma tandem masena spektrometrija postala je tehnika izbora za sekvenciranje peptida i za određivanje njihovih posttranslacionih modifikacija. Ova metoda je obično pouzdanija od PMF, jer se i u kompleksnim smešama proteina dobijaju visoki skorovi, tj. pojedinačni proteini identifikuju se sa velikom pouzdanošću. Takođe, ako su u smeši prisutni nepoznati proteini, sekvence njihovih peptida se mogu odrediti na osnovu fragmentacionih spektara. Mase jona fragmenata u kombinaciji sa poznavanjem mehanizama fragmentacije omogućavaju identifikaciju molekulske strukture prekursor jona [220]. Određivanje sekvence peptida na osnovu MS/MS spektra naziva se *de novo* sekvenciranje [221]. Ovaj postupak posebno se koristi kada proučavani proteom nije sekvenciran. Tandem maseni spektri mogu se porediti i sa eksperimentalnim ili teorijskim fragmentacionim spektrima koji se nalaze u bazama podataka [222].

Tandem masena spektrometrija omogućava i određivanje prirode promena na proteinu i njihove lokacije. Ove promene znače promenu strukture proteina koja dovodi do varijacije u njegovoj masi. Svaka aminokiselina poseduje jedinstvenu masu, osim leucina i izoleucina, pa se fragmentacioni spektar peptida može predvideti. Ako je peptid modifikovan, aminokiselina na kojoj se nalazi modifikacija imaće masu koja se razlikuje od očekivane, što je lako utvrditi. Na osnovu razlika u masi identifikuje se priroda i vrsta modifikacije.

Enzimska hidroliza proteina

Tripsin je serin endopeptidaza sa visokom specifičnošću za peptidne veze koje se nalaze iza pozitivno naelektrisanih (baznih) aminokiselina – lizina i arginina, ako se iza njih ne nalazi prolin (Slika 2.2). Komercijalno dostupni tripsin sadrži tragove himotripsina, pa se isporučuje sa inhibitorom himotripsina L-1-tosilamido-2-feniletihlorometilketonom (TPCK). Tripsin raskida peptidne veze u opsegu pH 7-9 (izoelektrična tačka 7.8) i deaktivira se na pH>11. Reverzibilno se inaktivira u kiseloj sredini, pa osnovni rastvori moraju imati pH~3. Tripsin gubi aktivnost u uslovima denaturacije u 1 M guanidin-hidrohloridu ili 30% etanolu.



Slika 2.2. Proteolitičko dejstvo tripsina na arginin i lizin (prilagođeno iz [223])

Kao rezultat autokatalize tripsina, pikovi njegovih jednostruko naelektrisanih peptida na m/z 842 i 2211 često se nalaze u masenim spektrima i mogu se koristiti za internu kalibraciju spektara.

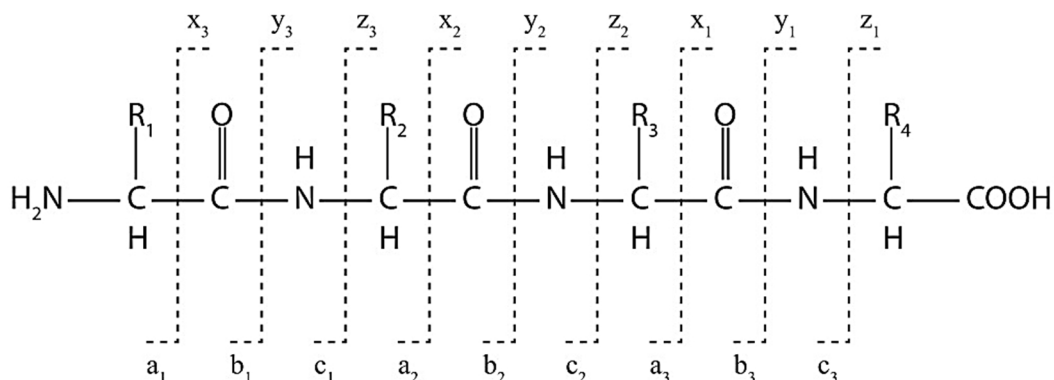
Od proteaza koje se najčešće koriste za hidrolizu proteina, tripsin je skoro uvek prvi izbor, jer zadovoljava zahteve proteomike. Peptidi proteina dobijeni tripsinskom hidrolizom imaju dužinu koja odgovara svim masenim analizatorima, jer se u proteinima arginin i lizin javljaju sa prosečnom udaljenošću od oko 11 aminokiselina i mala je verovatnoća da se između njih nalazi prolin. Primenljiv je u većini eksperimentalnih postupaka i može se koristiti za hidrolizu proteina u rastvoru, gelu, pa čak i proteina adsorbovanih na površinama. Tripsin je posebno pogodan za masenu spektrometriju u pozitivnom modu. Ako se peptidi analiziraju masenom spektrometrijom, oni moraju biti jonizovani primanjem protona. Pošto su i arginin i lizin bazne aminokiseline, hidrolizom nakon svakog arginina i lizina, tripsin osigurava da svaki peptid ima u sebi mesto koje

može vezati proton. Tripsinskom proteolizom dobija se kompleksna smeša tripsinskih peptida rastvorna u vodi, svih proteina prisutnih u uzorku.

Masena spektrometrija u *large scale* analizi proteina

Sa istorijskog stanovišta, interesantan je uticaj tehničkog i teorijskog razvoja masene spektrometrije na pojavu proteomike. Iako je metoda sekvenciranja proteina razvijena sredinom XX veka, dramatični razvoj masene spektrometrije krajem prošlog i pocetkom ovog veka omogućio je identifikaciju malih količina proteina u biološkim uzorcima, „čitanjem“ sekvence iz masenog spektra.

Primena masene spektrometrije na biomolekule kakvi su proteini ili peptidi postala je moguća zahvaljujući razvoju tehnika meke (*soft*) jonizacije - ESI [224] i MALDI [225,226]. One omogućavaju stvaranje intaktnih jona proteina ili peptida, tj. bez fragmentacije. Tako dobijeni joni peptida se mogu dalje fragmentisati različitim tehnikama. Najčešće korišćena tehnika fragmentacije je CID (*Collision-Induced Dissociation*). Dobijeni fragmentacioni spektar zavisi od različitih parametara, kao što je aminokiselinski sastav, veličina peptida, naelektrisanje, primenjena tehnika jonizacije. Uopšteno, do CID fragmentacija dolazi usled kolizija pri niskim energijama, što uzrokuje cepanje amidnih veza [227] pri čemu se pretežno formiraju b- (cepanjem N-terminalne strane) i y-joni (cepanjem C-terminalne strane) [218, 228], kao što je prikazano na Slici 2.3. Sekvenca aminokiselina u peptidu određuje se na osnovu razlika u masama dva uzastopna jona iste serije (npr. b_n i b_{n+1}).



Slika 2.3. Nomenkultura jona koji se formiraju fragmentacijom peptida

Različite metode masene spektrometrije mogu se koristiti za merenje molekularnih masa peptida dobijenih enzimskom hidrolizom i određivanje njihove strukture. Danas je MALDI-TOF MS verovatno najpopularnija, jer ne zahteva hromatografsko razdvajanje peptida, pa je relativno brza i ima potencijal za primenu na velikim serijama uzoraka [229]. Sve češće se u ovoj analitičkoj oblasti koriste i sofisticiranije metode MS zasnovane na ESI jonizaciji i masenim analizatorima visoke rezolucije. Ove metode su sporije i zahtevnije, ali pružaju više informacija o prisutnim proteinima. Kod tandem masene spektrometrije manji broj peptida potreban je za pouzdanu identifikaciju proteina, jer se sekvence pojedinačnih peptida porede sa bazom proteina. U takve metode spadaju LC-ESI-LTQ-Orbitrap MS/MS i MALDI-TOF MS/MS koje su primenjene za dobijanje podataka prezentovanih u narednim odeljcima, pa će o njima biti više reči.

Bioinformatički alati u proteomici

Bioinformatika je disciplina koja analizira biološke informacije koje se nalaze u sekvencama nukleotida i aminokiselina. Njen razvoj počeo je 1980ih sa pojavom prvih baza podataka (*GenBank* i *EMBL*). Na polju proteomike, bioinformatika omogućava identifikaciju proteina kao i njihovih PTM, ali i modelovanje strukture i predviđanje funkcije proteina.

U izradi ove doktorske disertacije, bioinformatika je primenjivana u cilju identifikacije proteina i njihovih modifikacija. Korišćena je baza proteinskih sekvenci *Swiss-Prot* kojoj se pristupa *on-line* preko *Mascot* interfejsa [230,231]. Pretraga se može vršiti na dva načina: pretragom PMF spektara ili MS/MS spektara. Identifikacija pomoću PMF postiže se poređenjem eksperimentalnih masa peptida (dobijenih očitavanjem liste m/z vrednosti iz MS spektra uzorka) sa teorijskim masama peptida nakon *in silico* enzimske hidrolize proteina čije su sekvence prisutne u bazi. Međutim, čak i kada PMF omogući identifikaciju proteina, informacije o posttranslacionim modifikacijama najčešće nisu dostupne. Da bi se dobile potpunije informacije, neophodna je primena tandem masene spektrometrije. Prilikom pretraživanja baza tandem masenih spektara (*MS/MS ion search*) eksperimentalne vrednosti m/z iz fragmentacionih spektara porede se sa teorijskim vrednostima u bazi podataka izračunatim na osnovu poznatih mehanizama fragmentacije peptida. Kako bi se skratilo vreme pretrage podešavaju se

različiti parametri, kao što je enzim korišćen za digestiju, taksonomija, maseni analizator, maksimalno dozvoljeno odstupanje masa prekursora i fragmentacionih jona itd. Za identifikacije PTM prisutnih na proteinu, u *Mascot* softveru postoji opcija unosa varijabilnih modifikacija, kako bi bile uzete u obzir prilikom računanja teorijskih fragmentacionih spektara, ali je neophodno predznanje o mogućim modifikacijama. Druga dostupna opcija u *Mascot*-u je funkcija „*error tolerant*“ (pretraživanje tolerantno na greške) koja može pružiti uvid u modifikacije koje su prisutne u uzorku. Kada je „*error tolerant*“ funkcija omogućena, softver predlaže korekcije, tako da izračunate vrednosti odgovaraju eksperimentalnim. Međutim, dobijene informacije su samo sugestije i provera spektra uvek je neophodna.

Identifikacija proteina koji još uvek nisu sekvencirani postiže se preko homologije njihove sekvence sa sekvencama genetski bliskih vrsta. Teorijski, moguće je naći i tačnu sekvencu proteina iz fragmentacionih spektara. Zahvaljujući opciji „*error tolerant*“ u *Mascot* softveru, mogu se dobiti informacije o mogućim supstitucijama aminokiselina koje odgovaraju razlikama u masi između teorijskih i izmerenih fragmenata. Međutim, kao i kod identifikacije PTM, neophodna je provera spektara.

2.3.2 MS tehnike primenjene tokom izrade ove doktorske disertacije

Masena spektrometrija se zasniva na stvaranju jona u gasnoj fazi i njihovom razdvajanju prema odnosu mase i naelektrisanja (m/z). Pojavila se krajem XIX veka i dugo vremena služila je samo za proučavanje elementarnih čestica u fizici. Tokom 1940ih, MS je našla primenu u hemiji za karakterizaciju smeša ugljovodonika što je bilo značajno u industriji nafte. Međutim, zbog nedostatka separacionih metoda, rezultate je bilo teško interpretirati. U narednim dekadama uloženo je mnogo napora da se otkrije odnos između masenog spektra i molekulske strukture kako bi se identifikovale različite klase molekula. Zahvaljujući tehnološkim inovacijama i napretku instrumentacije, maseni spektrometri postali su sofisticiranija i prilagodljivija sredstva za različite primene u hemiji. Krajem 1970ih, različite klase isparljivih organskih molekula, niskih do srednjih molekulskih masa, mogle su se analizirati ovom metodologijom.

Uvođenje tehnika meke jonizacije, kao što je desorpcija plazme (*plasma desorption*, PD) [232], desorpcija u polju (*field desorption*, FD) [233] i bombardovanje brzim atomima (*fast atom bombardment*, FAB) [234], označili su početak nove ere u masenoj spektrometriji. Izraz meka jonizacija je suprotan od tvrda, a oba termina koriste se da označe količinu energije koja se prenosi molekulu tokom procesa jonizacije. Kod metoda meke jonizacije višak energije deponovan na jonizovanom molekulu je mali i formiraju se stabilni joni sa parnim brojem elektrona. To omogućava lako određivanje molekulske mase analita, ali pošto nema fragmentacije ili do nje dolazi u malom obimu, u spektru nedostaju informacije o strukturi. Međutim, informacije o strukturi se mogu dobiti izazivanjem fragmentacije jona izvan izvora pomoću tandem masenih eksperimenata. Zahvaljujući blagim uslovima jonizacije, u masenim spektrima dobijenim na ovaj način prisutni su i pikovi adukt jona, koji su jonske vrste formirane slabim interakcijama između jona i drugih hemijskih vrsta. Metode meke jonizacije dele se na:

- (a) one koje se javljaju u gasnoj fazi,
- (b) sprej jonizacione tehnike i
- (c) desorptivne jonizacione tehnike.

Ove jonizacione tehnike omogućile su da se primena masene spektrometrije proširi na različite klase neisparljivih, polarnih, termički nestabilnih i jedinjenja visokih molekularnih masa. To je dovelo do primene MS u biologiji, medicini i biotehnologiji, što ranije nije bilo moguće. Rastući interes za analizu i identifikaciju polarnih i velikih jedinjenja doveo je do pojave ESI [224,235] i MALDI [225,226] tehnika jonizacije, omogućavajući na taj način nove pristupe zasnovane na MS u proučavanju polimera i biopolimera, kao što su proteini, ugljeni hidrati i nukleinske kiseline [224,225]. Paralelno sa razvojem MS instrumentacije i metodologija, napredak separacionih tehnika kao što su gasna hromatografija (GC), tečna hromatografija visokih performansi (HPLC) i kapilarna elektroforeza (CE), i njihovog povezivanja sa MS omogućilo je proučavanje kompleksnih smeša.

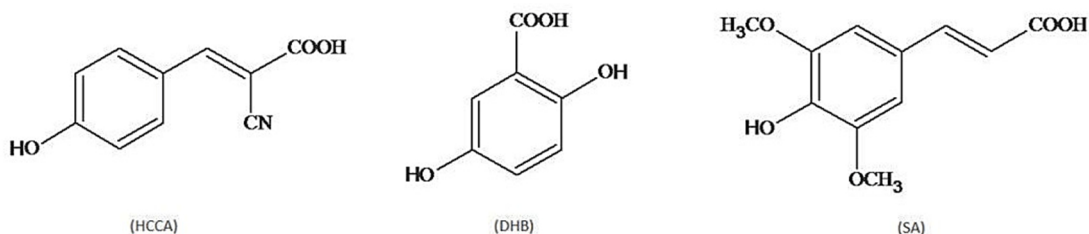
Prilikom izrade ove doktorske disertacije primenjena je MALDI-TOF/TOF i LC-ESI-LTQ-Orbitrap masena spektrometrija, i zato će u nastavku biti objašnjen princip na kome se zasnivaju ove tehnike.

MALDI-TOF/TOF masena spektrometrija

Laserska desorptivna masena spektrometrija (LDMS), razvijena 1960ih, može se smatrati začetkom metoda meke jonizacije baziranih na laserskim snopovima. Izraz „desorptivna jonizacija“ označava sve tehnike jonizacije u kojima se procesima desorpcije stvaraju joni. Zasniva se na brzom dovođenju energije uzorku u kondenzovanoj fazi (tečnoj ili čvrstoj) uz naknadno formiranje i emisiju stabilnih jona u gasnoj fazi. To su obično jonske vrste sa parnim brojem elektrona koje se delimično fragmentišu.

Kao rezultat velikog broja studija posvećenih primeni lasera kao izvora energije za jonizaciju molekula, sredinom 1980ih pojavila se MALDI tehnika jonizacije [225] i vrlo brzo je primenjena na proučavanje velikih molekula [226]. Karas i Hillenkamp prvi su snimili spektar biomolekula molekulske masa iznad 10 kDa u smeši uzorka sa matriksom [225]. Za proučavanje velikih biomolekula pomoću MALDI jonizacione tehnike Koichi Tanaka je dobio Nobelovu nagradu za hemiju 2002. godine.

MALDI je desorptivna tehnika jonizacije, izazvana laserskim snopom i potpomognuta matriksom. Matriks je jedinjenje koje pokazuje jaku apsorpciju na talasnoj dužini korišćenog lasera, meša se sa analitom u molarnom odnosu 1000:1 ili većem i nanosi na ravnu metalnu ploču (engl. MALDI *target*), gde dolazi do zajedničke kristalizacije. Nikotinska, sinapinska (SA), 2,5-dihidroksibenzoeva (2,5-DHB) i α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina (HCCA) su neki od MALDI matriksa koji se najčešće primenjuju (Slika 2.4).

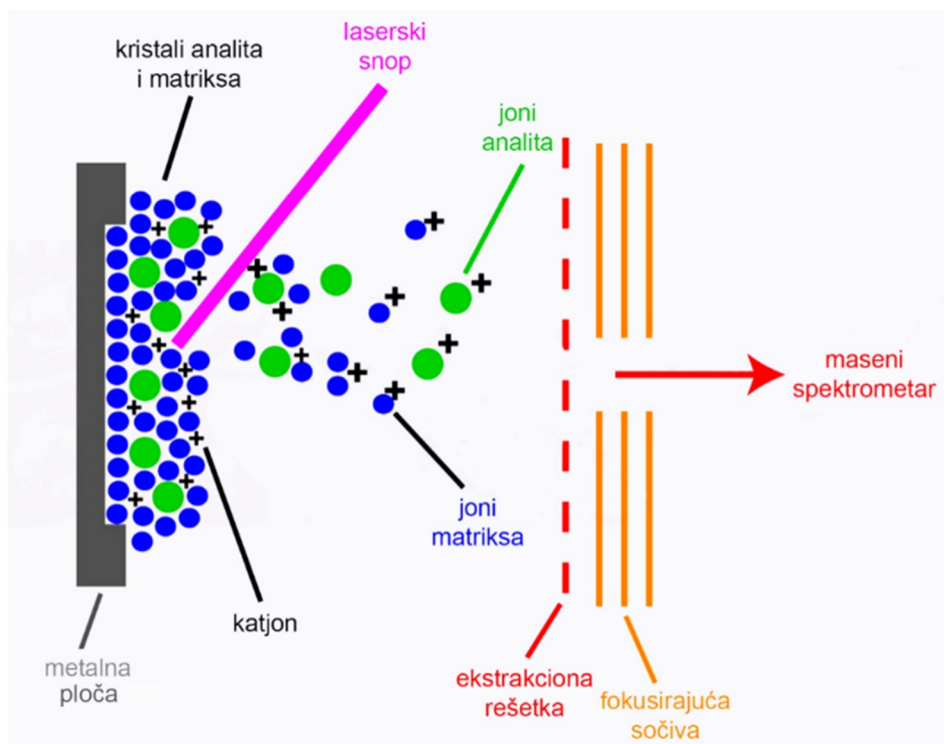


Slika 2.4. Hemijska struktura najčešće primenjivanih MALDI matriksa

Za velike peptide i proteine se koristi SA, za peptide i nukleinske kiseline DHB, a za male molekule i peptide HCCA. Postoji više načina za mešanje matriksa sa uzorkom,

ali najčešće se primenjuje metoda osušene kapi, gde se rastvori matriksa i uzorka pomešaju, a zatim se jedna kap nanese na MALDI ploču (engl. *target*) i ostavi da se osuši. Pored toga, primenjuju se dvoslojna i „sendvič“ metoda.

Kratkim pulsevima lasera (1-20 ns) bombarduju se kristali matriksa i uzorka što dovodi do njihove desorpcije (Slika 2.5).



Slika 2.5. Šematski prikaz MALDI izvora (prilagođeno iz [236])

Matriks isparava putem prenosa energije povlačeći sa sobom molekule uzorka u gasnu fazu (fenomen desorpcije). Uloga matriksa je dvostruka: on omogućava jonizaciju molekula analita i štiti ih od laserskog zraka. Veliki višak matriksa i njegova jaka apsorpcija u oblasti talasne dužine lasera, omogućavaju da matriks apsorbuje energiju pulsa lasera, čime se izbegava raspadanje analita, a zatim da deo te energije prenese na analit. Svi matriksi imaju osobine kiselina, tj. poseduju kiseli proton. U gasnoj fazi dolazi do hemijske jonizacije analita, tj. do transfera protona sa jonizovanih molekula matriksa na molekule analita. Formiraju se jednostruko naelektrisani (protonovani ili deprotonovani) molekuli analita, veličine od nekoliko stotina do nekoliko stotina hiljada Daltona. Zbog toga, za proučavanje ogromnih molekula uz pomoć MALDI jonizacije,

neophodni su analizatori sa velikim opsegom m/z vrednosti. Jedini analizator koji zadovoljava ovaj uslov je TOF analizator, pa se zbog toga MALDI izvor najčešće kupluje sa tim analizatorom.

MALDI izvor funkcioniše pod visokim vakuumom, ali i na atmosferskom pritisku. Jonizaciju pomoću ovog izvora ometa prisustvo soli, jer milimolarne koncentracije pufera ili soli imaju supresivno dejstvo na jonizaciju, pa se dobijaju spektri lošijeg kvaliteta. Stoga se uzorci moraju prečistiti uklanjanjem soli pre nanošenja na ploču.

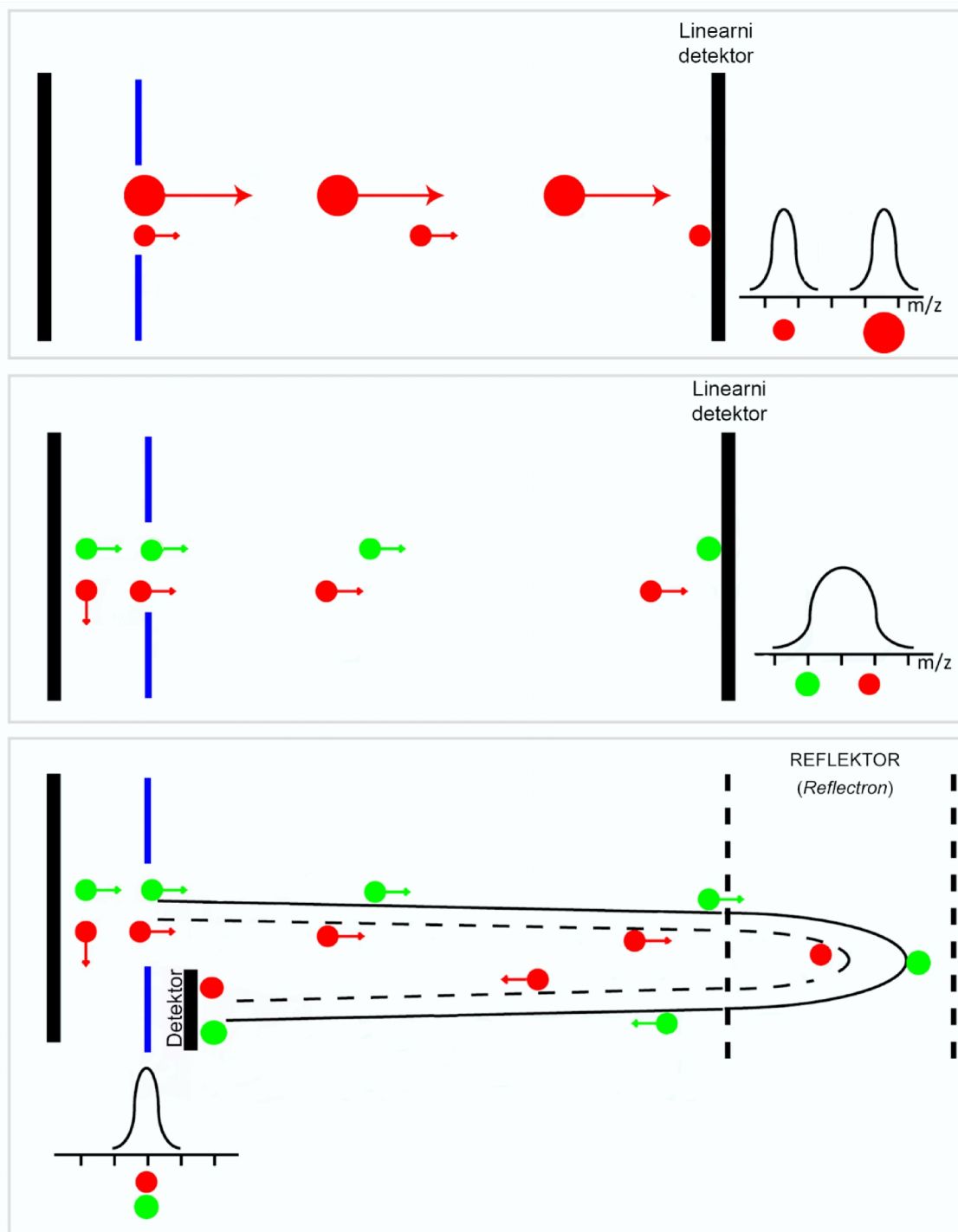
Princip TOF analizatora, razvijenog 1955. godine, je merenje vremena preleta prethodno ubrzanog jona kroz zonu slobodnog polja pre dolaska na detektor [237]. TOF maseni spektrometar je zasnovan na ubrzavanju grupe jona u cevi u uslovima vakuuma (Slika 2.6).

Postoje dva načina analize jona, pa time i dve vrste TOF analizatora: linearni i refleksioni. Analit kristalizovan u odgovarajućem matriksu jonizuje se pod dejstvom lasera. Nakon formiranja u jonskom izvoru, joni se ubrzavaju u električnom polju (oko 30 kV) i dospevaju u zonu prelaska (ili preleta) bez električnog polja, gde nastavljaju svoju putanju brzinom koju su ranije stekli. Napon ubrzanja daje svim jonima istu kinetičku energiju, a time i različite brzine u skladu sa njihovim odnosima m/z . Lakši joni putuju većim brzinama preko zone preleta pre nego što dospeju u detektor, koji beleži „vreme preleta“ svakog pojedinačnog jona. Iz vremena preleta pojedinačnih jona, koje beleži detektor, dobijaju se m/z odnosi i određuje masa jona. Dužina zone leta definiše rezoluciju instrumenta.

Linearni analizator ima veoma dobru osetljivost, ali lošiju rezoluciju. Glavni faktori koji utiču na rezoluciju signala su vremenska i prostorna raspodela, kao i raspodela početnih kinetičkih energija jona.

Pre pojave odložene ekstrakcije (*delayed extraction*, DE), rezolucija TOF analizatora bila je veoma niska, jer su joni ubrzavani izvan izvora jonizacije, neposredno nakon formiranja i imali su širok opseg kinetičkih energija. Odložena ekstrakcija omogućava jonima da se „ohlade“ nekoliko nanosekundi (da im se izjednači energija) pre

ubrzanja, čime se postiže uža distribucija kinetičkih energija jona, manje vremensko širenje i povećava rezolucija.



Slika 2.6. Šematski prikaz TOF-MS koji radi u linearnom i refleksionom modu (prilagođeno iz [236])

Još jedan način da se poboljša rezolucija TOF analizatora je primena elektrostatičkog reflektora (engl. *reflectron*). Kada se ubrzaju u izvoru, joni koji imaju isti odnos m/z nemaju potpuno istu kinetičku energiju. Zbog toga stižu na detektor u različito vreme, pa se pikovi šire i rezolucija smanjuje. Elektrostatički reflektor sastoji se od serije prstenova ili rešetki rastućeg potencijala koji služe kao elektrostatičko ogledalo, uvedeno kako bi se produžila putanja i fokusirala kinetička energija jona. Joni sa višom kinetičkom energijom mogu dublje da prođu u električno polje koje stvaraju sočiva i zbog toga prelaze duže distance, dok joni sa istim odnosom m/z , ali nižom kinetičkom energijom manje prodiru u elektrostatičko polje i prelaze kraća rastojanja. Zahvaljujući tome, joni istog odnosa m/z stižu u isto vreme na dinodni detektor zbog čega se dobijaju uži pikovi i poboljšava rezolucija [208]. Iako fokusiranje jona povećava rezoluciju, ono smanjuje osetljivost i uvodi ograničenje opsega masa. Refleksioni mod koristi se kod analize peptida i malih molekula uz rezoluciju do 10000 (na 1000 uma), a linearni za proteine srednjih i visokih molekulskih masa.

Pored neograničenog opsega m/z vrednosti, prednosti TOF analizatora su i brzina skeniranja, visoka rezolucija i preciznost merenja mase jona. Zbog toga se TOF trenutno kupuje sa skoro svim jonizacionim tehnikama.

Kada se ne primenjuje prethodno hromatografsko razdvajanje, sve komponente uzorka, uključujući i kontaminante, mere se u isto vreme. Na taj način se dobijaju složeni maseni spektri koji imaju veliki šum. Svaki peptid predstavljen je serijom pikova njegove izotopske raspodele. Informacije koje se dobijaju iz MALDI-TOF masenog spektra su izmereni odnos mase i naelektrisanja peptida (m/z) i intenzitet pika. Pošto se u MALDI izvoru pretežno formiraju jednostruko naelektrisani joni ($z=1$), odnos m/z je najčešće jednak $[M+H]^+$ [208,238]. U MALDI-TOF spektrima mogu se naći i neki adukt joni, ali zbog blagih uslova jonizacije veoma malo ili nimalo jona nastalih fragmentacijom. To znači da je lako odrediti molekulsku masu analita koji se ispituje, ali bez informacija o strukturi.

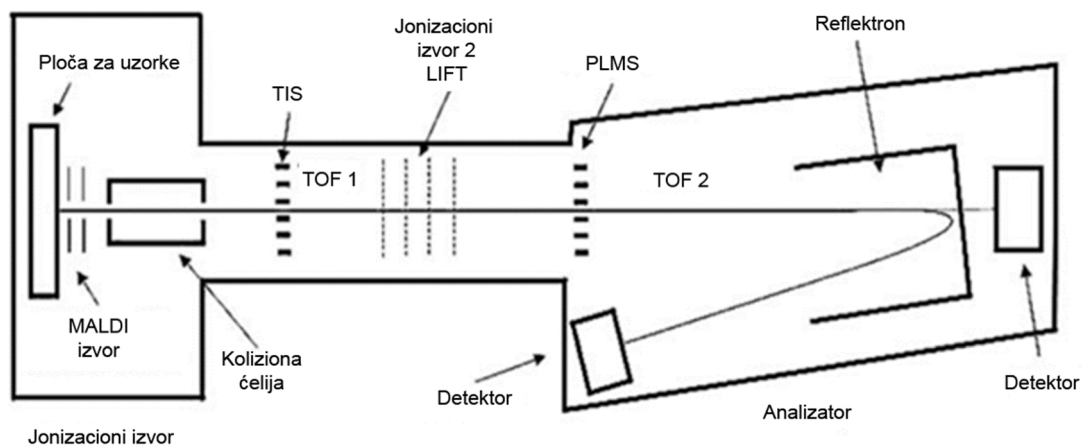
Određivanje monoizotopske mase peptida samo po sebi nije dovoljno za identifikaciju, jer različite komponente uzorka, tj. peptidi mogu imati istu masu. Međutim, skup peptida koji potiču od određenog proteina ili smeše proteina, kao u slučaju veziva, je karakterističan. Kao što je ranije navedeno, PMF je tehnika kojom se

eksperimentalno dobijene mase peptida porede sa teorijskim masama peptida nekog proteina. U proteomici, teorijske mase peptida računaju se na osnovu poznate sekvence proteina i njegove teorijske proteolize tripsinom. Poređenje se vrši pomoću algoritama, kao što je *Mascot PMF search (Matrix Science)*. Ovaj pristup daje pouzdane rezultate za čiste proteine ili jednostavne smeše. Proteinska veziva su kompleksna smeša različitih proteina, pa identifikacija PMF pristupom može biti otežana ili onemogućena. Tandem maseni spektri pružaju i informaciju o strukturi analiziranog peptida, tj. njegovoj sekvenci, pa je ovaj pristup daleko pouzdaniji i potrebno je samo nekoliko identifikovanih peptida za nedvosmisleni identifikaciju proteina. To je posebno značajno kod analize proteinskih materijala u uzorcima kulturnog nasleđa gde je najčešće došlo do narušavanja integriteta velikih molekula proteina, zbog čega nije moguće dobiti informacije o sekvencama velikog broja peptida koji potiču iz datog proteina, već samo o nekoliko najočuvanijih. Na osnovu njih ipak je moguća precizna identifikacija proteina.

Pomoću MALDI-TOF masenog spektrometra u MS/MS modu mogu se izvoditi fragmentacioni eksperimenti u cilju sekvenciranja peptida ili proteina. Analizatori za tandem masenu spektrometriju imaju mogućnost dvostruke analize: prva je selektovanje željenog opsega m/z vrednosti, a druga merenje m/z vrednosti i intenziteta fragmentacionih jona. Ove dve analize mogu biti izvedene u dva analizatora (*tandem in space* konfiguracija), ili u istom analizatoru, ali u različito vreme (*tandem in time* konfiguracija). Kako bi se mogle izvoditi MS i MS/MS analize, analizatori moraju funkcionisati u dva različita moda, *full-scan* (svi joni peptida nastali u izvoru analiziraju se uz snimanje masenog spektra) i MS/MS (analizator zadržava samo jone koji su u specifičnom opsegu m/z , a nakon njihove fragmentacije snima se spektar nastalih fragmenata u *full-scan* modu). Maseni spektrometri često imaju mogućnost kontinualnog prebacivanja sa jednog na drugi režim rada.

Brukerov MALDI-TOF/TOF Autoflex Smartbeam III instrument, korišćen tokom izrade ove doktorske disertacije, je *tandem in space* maseni spektrometar čija je karakteristika kolinearni raspored dva TOF masena analizatora, od kojih svaki ima jonski izvor kojim je moguće ubrzavati i fokusirati jone. U TOF1 analizatoru joni analita se ubrzavaju, selektuju prekursor joni i fragmentišu. Fragment joni zatim dolaze do izvora

u TOF2 analizatoru, gde se ubrzavaju i analiziraju po masama. Šematski dijagram korišćenog LIFT-TOF/TOF masenog spektrometra prikazan je na Slici 2.7.



Slika 2.7 Šematski dijagram LIFT-TOF/TOF masenog spektrometra (prilagođeno iz [239])

On se sastoji od MALDI jonizacionog izvora bez rešetke sa mogućnošću odložene ekstrakcije (*delayed extraction*, DE), vremenskog jonskog selektora visoke rezolucije (*timed ion selector*, TIS), LIFT uređaja za povećanje („dizanje“) potencijalne energije jona, zatim platforme za fokusiranje po brzinama uz naknadno ubrzanje (izvor 2), PLMS (*post lift metastable suppressor*), zakošenog reflektora bez rešetke za energetska fokusiranje i detektora jona za linearni i refleksioni režim rada [239].

Ovim instrumentom snimaju se MS i MS/MS spektri istog uzorka, čime se doprinosi pouzdanosti identifikacije proteina. Tandem maseni spektar može se snimiti za nekoliko sekundi i na istom uzorku moguće je snimiti veliki broj spektara. Fragmentacija peptida postiže se disocijacijom izazvanom laserom (*laser induced dissociation*, LID) ili disocijacijom izazvanom sudarima (*collision induced dissociation*, CID). Spektri dobijeni putem LID i CID fragmentacije imaju dosta sličnosti u pogledu vrste fragmentacionih jona i njihovog intenziteta [240]. Glavne razlike primetne su u regionima niskih i visokih masa (imonomijum joni, b-joni niskih masa i b-joni visokih masa). LID spektri sadrže manje jona nastalih odvajanjem neutralnih molekula, zbog čega su lakši za interpretaciju. LID je pogodniji način fragmentacija za potrebe identifikacije proteina, usled veće zastupljenosti fragmenata kostura peptida, bitnih za određivanje sekvence, u odnosu na fragmente koji

se ne mogu pripisati sekvenci. CID se, kao visoko energetska fragmentacija, primenjuje kada je potrebno *de novo* sekvenciranje ili diferencijacija bočnih nastavaka leucina i izoleucina.

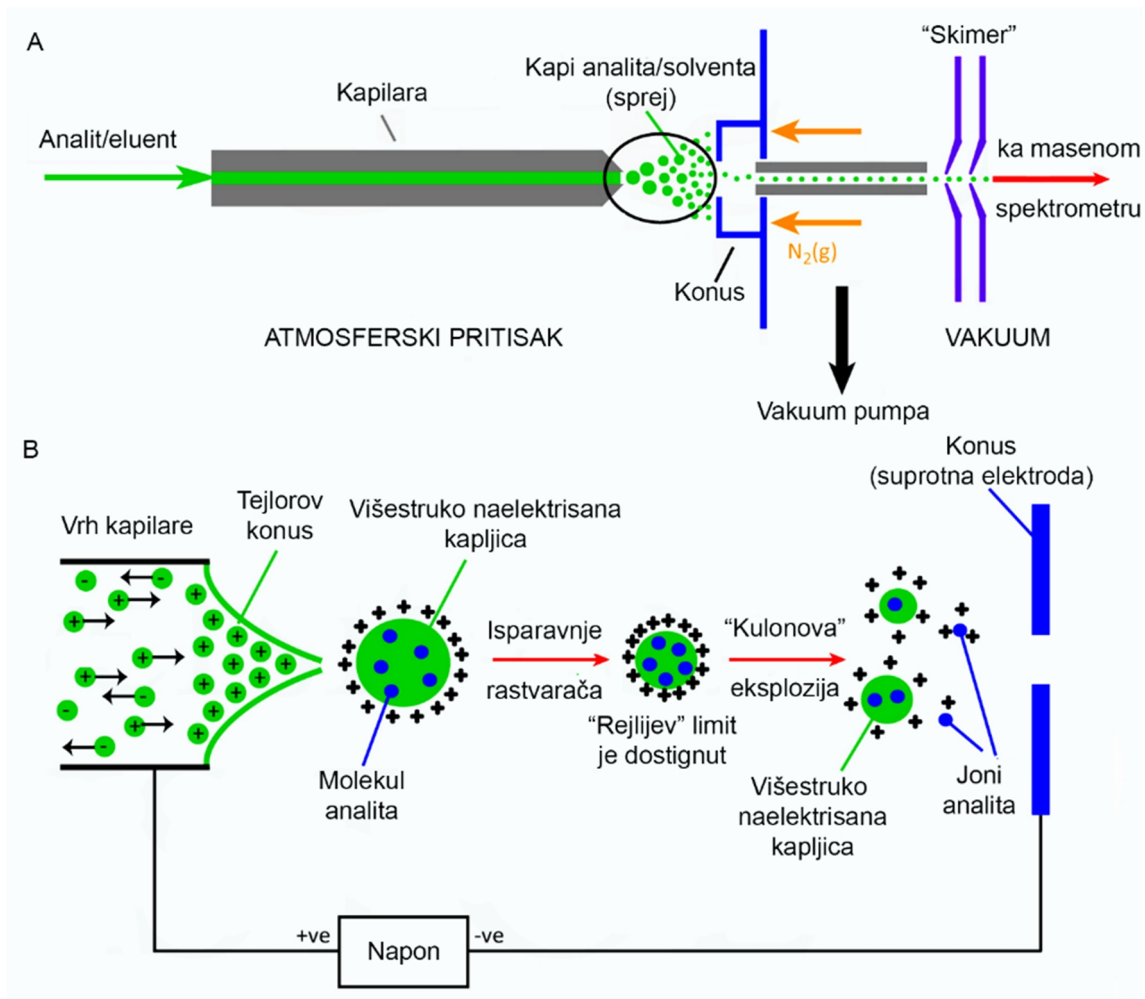
LID fragmentacija podrazumeva nizak početni napon ubrzanja (8 kV) kojim se omogućava dugo vreme preleta jona (10-20 μ s) tokom koga dolazi do fragmentacije. Fragmenti zadržavaju brzinu odgovarajućeg prekursora i zajedno sa prekursorom stižu na vremenski jonski selektor (TIS). Selektor jona ima mogućnost odbijanja svih prekursor jona i njihovih fragmenata, osim izabranih, isključivanjem napona izlaza na nekoliko nanosekundi tokom prolaska odabranih jona. Prekursor od interesa i nastali fragmenti nakon izlaska iz TIS ulaze u LIFT uređaj gde se naknadno ubrzavaju dodatnim naponom. Suština LIFT uređaja je postepeno podizanje napona u tri stepena između četiri rešetke [239]. Prvi stepen je stvarno povećanje napona, drugi predstavlja ćeliju za fokusiranje gde se modulira brzina jona, a treći je post-akceleraciona ćelija gde se joni ubrzavaju do pune brzine i vremenski fokusiraju na detektoru. Dvostepeni reflektoron takođe prostorno fokusira rasuti jonski snop na maloj površini detektora, a većina jona nastalih metastabilnim raspadom u reflektoronu ne dospeva do detektora. Time se postiže visoka osetljivost i visok odnos signala i šuma. Pomoću PLMS uređaja, koji se nalazi između LIFT uređaja i reflektрона odbijaju se preostali prekursor joni čime se sprečava njihova fragmentacija, nakon prolaska kroz LIFT, u drugom TOF analizatoru i reflektoru i obezbeđuje bolji kvalitet LIFT spektara. Za tipičan maseni spektar sa odgovarajućim odnosom signala i šuma i dobrim dinamičkim odnosom mora biti akumulirano oko 50-200 pulseva lasera uz frekvenciju od 50 Hz. U tandem modu obično treba dodati 300-600 pulseva lasera, posebno kada se analiziraju niske femtomolarne koncentracije proteina u realnim uzorcima.

LC-ESI-LTQ-Orbitrap

ESI je blaga jonizaciona tehnika kojom se, za razliku od MALDI stvaraju višestruko pozitivno naelektrisani joni. Takođe, dok je kod MALDI jonizacije neophodan kristalisani uzorak, ESI jonizuje analite u rastvoru što čini ovu tehniku pogodnom za povezivanje sa HPLC sistemima, čime je omogućeno razdvajanje smeša peptida. MALDI je pogodna tehnika za analizu relativno jednostavnih smeša peptida (npr. pojedinačnih proteina), dok se HPLC-ESI-MS sistemi koriste za kompleksne uzorke.

Iako je fenomen elektrospreja poznat od početka XX veka, a prvi opis principa objavljen 1968. godine [241], do razvoja ESI došlo je sredinom 1980ih nakon radova koje su objavili John Fenn [235] i grupa ruskih istraživača [242]. Za ovaj doprinos nauci, Fenn je dobio Nobelovu nagradu za hemiju 2002. godine.

Najvažnija osobina ESI procesa je da do jonizacije dolazi u spreju (Slika 2.8 A). Sprej se stvara potiskivanjem tečnosti kroz kapilaru prekrivenu provodničkom legurom (najčešće od zlata ili paladijuma) na koju je primenjeno električno polje (3–5 kV) i koje dovodi do jonizacije. Formiranje malih naelektrisanih kapljica tečnosti dešava se na atmosferskom pritisku. Na izlazu iz kapilare, tečnost zauzima karakterističan oblik koji se naziva Tejlorov konus [243]. Tokom puta od izlaza iz kapilare do ulaza u područje visokog vakuuma, koji su razdvojeni 1–3 cm, naelektrisane kapljice, od kojih svaka sadrži jone analita i molekule rastvarača, podležu isparavanju rastvarača uz konsekvantno smanjivanje veličine i povećanje gustine naelektrisanja na njihovoj površini. Usled velike gustine naelektrisanja, to dovodi do „Kulonovih eksplozija“ i do iskakanja jona. Ovi ciklusi isparavanja i cepanja kapljica ponavljaju se dok na kraju ne ostanu potpuno desolvatisani joni [244]. Navedeni mehanizam jonizacije prikazan je na Slici 2.8 B. Tako dobijeni joni mogu biti jednostruko ili višestruko naelektrisani zavisno od broja mesta u molekulu koja se mogu jonizovati.



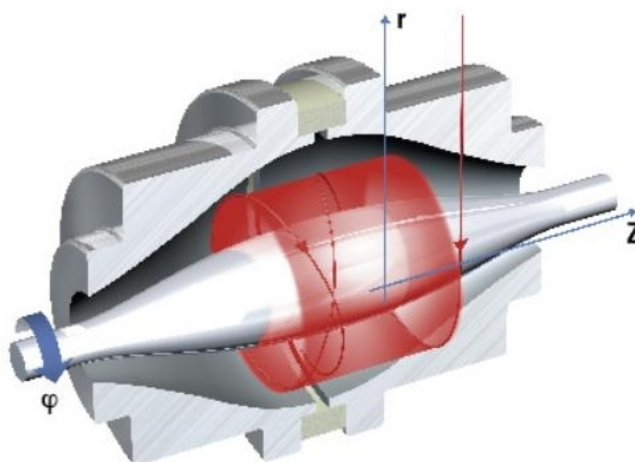
Slika 2.8. Šematski prikaz elektrosprej jonizacije: (A) opšti izgled interfejsa, (B) mehanizam formiranja jona. (prilagođeno iz [236])

ESI interfejs može se kombinovati sa skoro svim tipovima masenih spektrometara. Dobijeni joni usmeravaju se u region visokog vakuuma masenog analizatora gde se razdvajaju po odnosima mase i naelektrisanja. ESI se može koristiti za protonovanje i deprotonovanje analiziranih molekula, odnosno u pozitivnom i negativnom modu. Napolarna jedinjenja se ne mogu jonizovati ovom tehnikom. ESI je metoda jonizacije pogodna za neisparljiva, polarna i jedinjenja veoma velikih masa. U ESI masenim spektrima prisutni su pikovi protonovanih/deprotonovanih molekula i jona adukta, kao što su $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+HCOO]^-$. Molekul obično dobija jedno naelektrisanje na svakih 1000 jedinica molekulske mase što omogućava merenje veoma visokih molekulske mase na niskim vrednostima m/z .

Orbitrap analizator je izum naučnika Aleksandra Makarova baziran na konceptu jonske zamke [245]. Privukao je veliku pažnju zbog svojih analitičkih performansi u smislu rezolucije, preciznosti određivanja masa, kapaciteta prostornog naelektrisanja (*space charge*), linearnog dinamičkog opsega, relativno male veličine i cene. Od 2005. godine komercijalizovan je kao deo *tandem-in-space* (engl.) masenog spektrometra u kombinaciji sa LTQ analizatorom i pokazao se kao značajno analitičko oruđe sa širokim poljem primene.

Princip rada orbitrapa zasniva se na elektrostatičkom polju koje stvaraju dve elektrode, centralna vretenasta i spoljašnja u obliku bureta, u kome su orbitalno zarobljeni joni. Ubrzani joni injektiraju se u orbitrap kroz uski injekcioni kanal pod pravim uglom u odnosu na z-osu i na određenom rastojanju od ekvatora (tj. $z=0$). Prostor između unutrašnje i spoljašnje elektrode čini komoru za merenje i povezan je sa sistemom vakuum pumpi koji omogućava uslove visokog vakuuma (oko 10^{-6} Pa).

Kada se nađu u električnom polju orbitrapa, svaki od paketa jona određenog odnosa m/z počinje da osciluje koherentno bez dodatne ekscitacije. Joni kruže po harmonijskim, kompleksnim putanjama u obliku spirale oko centralne elektrode i u isto vreme osciluju duž centralne ose (Slika 2.9).



Slika 2.9. Poprečni presek orbitrap masenog analizatora (preuzeto [245])

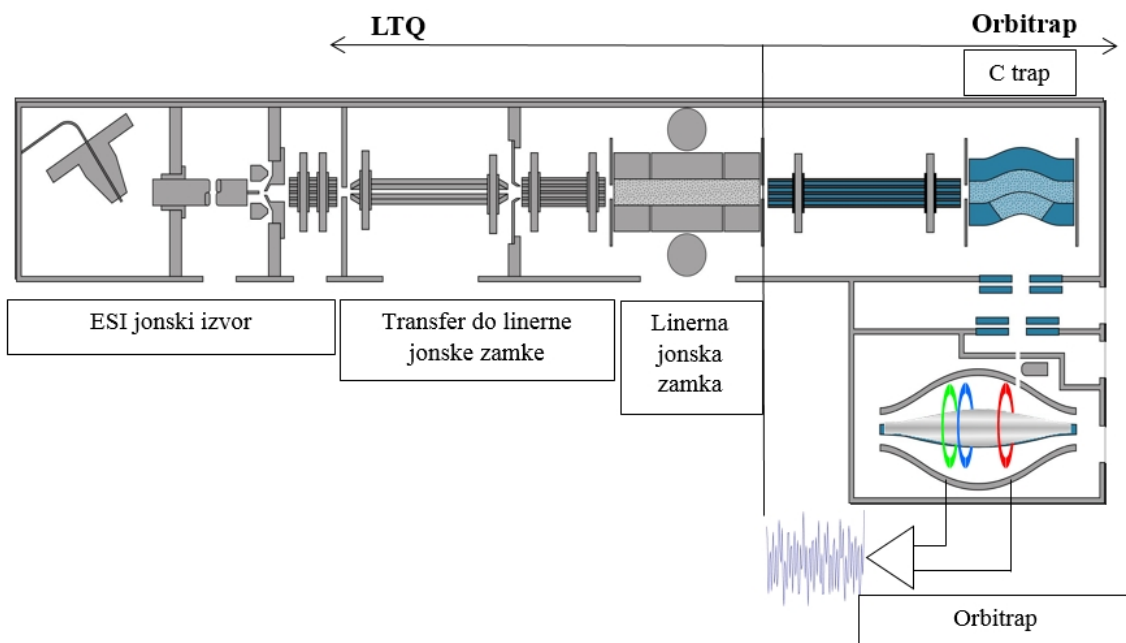
Svi joni imaju istu amplitudu, ali osciluju različitim frekvencijama. Joni osciluju na tri različite frekvencije duž tri polarne koordinate, r , φ , i z , i to su frekvencija radijalnog

oscilovanja ω_r , frekvencija rotacije ω_ϕ , i frekvencija aksijalnog oscilovanja ω . Samo aksijalna frekvencija, data jednačinom:

$$\omega = \sqrt{\frac{z}{m}}$$

koristi se za analizu masa, jer ne zavisi od energije i prostorne distribucije jona. Ona je obrnuto proporcionalna odnosu mase i naelektrisanja jona i može se konvertovati u maseni spektar Furijeovom transformacijom signala. Orbitrap koristi statično elektrostatičko polje za održavanje jonske zamke praćeno dinamičkim injeksionim pulsom. Za postizanje visoke rezolucije, glavni zahtev koji mora biti ispunjen prilikom injektiranja jona u orbitrap je da paketi jona imaju usku prostornu (<nekoliko mm) i vremensku distribuciju (<100–200 ns), da bi se obezbedila stabilnost i koherencija zarobljenog paketa jona tokom merenja signala.

Za razliku od drugih analizatora koji funkcionišu na principu jonske zamke, ne koristi se ni RF ni magnetno polje. Zbog toga je orbitrap jednostavan za korišćenje i lak za održavanje. Međutim, zbog pulsne tehnike rada bilo je teško povezati ga sa bilo kojim spoljašnjim kontinualnim izvorom jona. To je postignuto uvođenjem uređaja za skladištenje jona čime su poboljšane performanse instrumenta. Pre injektiranja u orbitrap, joni koji nastaju u ESI izvoru sprovode se, uz pomoć dva kvadrupola, kroz nekoliko stupnjeva diferencijalnih vakuum pumpi do linearne jonske zamke (LTQ) i uređaja za skladištenje jona (Slika 2.10).



Slika 2.10. Šematski prikaz LTQ-Orbitrap hibridnog masenog spektrometra (prilagođeno iz [246])

Uređaj za skladištenje, C-trap (*curved ion trap*), je zakrivljeni RF kvadrupol u kome se joni koliziono hlade usled prisustva azota na niskom pritisku, a zatim pod pravim uglom injektiraju u orbitrap u kratkotrajnim pulsevima. Na taj način se kontroliše i broj jona koji ulaze u orbitrap u cilju smanjenja efekta prostornog naelektrisanja (*space charge*). LTQ ima nisku rezoluciju, ali visoku osetljivost i brzinu, dok je orbitrap vikokorezolutivni, ali manje osetljiv maseni analizator.

Orbitrap ima nekoliko osobina koje ga čine moćnim masenim analizatorom: rezolucija do 150000, opseg m/z do 6000, preciznost m/z pri visokim masama od 2-5 ppm (u određenim uslovima i do 0.2 ppm) i dinamički opseg 10^3 [245,246]. Visoku rezoluciju omogućava činjenica da je m/z vrednost jona funkcija frekvencije, parametra koji se može meriti sa veoma visokom preciznošću postojećom tehnologijom. Kod komercijalnih LTQ-Orbitrap instrumenata rezolucija se može kontrolisati variranjem prolaznog vremena akvizicije (koje menja ukupno vreme ciklusa skeniranja) kako bi se postigle nominalne vrednosti rezolucije na m/z 400 od 100,000 (vreme skeniranja 1.9 s), 60000 (1 s), kao i 30000, 15000 i 7500 (0.25–0.3 s). Međutim, od svih masenih analizatora, orbitrap zahteva najveći vakuum.

Prilikom eksperimentalnog rada na ovoj doktorskoj disertaciji MS/MS eksperimenti tj. fragmentacija peptida ostvareni su pomoću koliziono indukovane disocijacije. Iako se CID može postići i u linearnoj zamci, C-trapu ili orbitrapu, orbitrap ne može funkcionisati kao efikasna visokoenergetska CID komora. U orbitrapu se ne mogu efikasno zarobiti joni nastali fragmentacijom, koji se kreću nestabilnim eliptičnim putanjama, jer imaju istu brzinu kao prekursor joni. Preporuka je da se CID izvodi u linearnoj zamci ili C-trapu, a masena analiza fragment jona u orbitrapu [246]. U ovom radu svi tandem maseni spektri snimljeni su fragmentacijom u linearnoj zamci i analizom fragmentacionih jona u orbitrapu.

CID je najčešće korišćena tehnika fragmentacije i može se smatrati bimolekulskim raspadom, jer zavisi od kolizije dva molekula. Koliziona ćelija sadrži inertni kolizioni gas, najčešće argon ili azot. Prekursor jonima raste potencijalna energija usled ponovljenih sudara sa molekulima gasa i oni koji pređu energetski minimum neophodan za fragmentaciju, cepaju se na fragmentacione jone i/ili neutralne gubitke (H_2O , NH_3). Stopa raspada zavisi od učestalosti sudara prekursor jona i molekula kolizionog gasa, odnosno, proporcionalna je njihovoj koncentraciji u kolizionoj ćeliji. Koji će tačno fragmentacioni joni i neutralni gubici nastati zavisi od prekursora i njegove energije. Obično se koriste dva stepena kolizione energije, niska (<100 eV) i visoka (>1000 eV) energija. Visoko energetska CID fragmentacija pogodna je za prekursora većih masa i daje više tipova jona fragmenta, ali su spektri teži za interpretaciju. Za fragmentaciju peptida obično se koristi niža energija, najčešće u opsegu 25–70 eV, zavisno od očekivane veličine peptida i njihovog naelektrisanja.

2.3.3 Proteomika u identifikaciji proteinskih veziva u umetničkim i arheološkim predmetima

Identifikacija proteinskih veziva u umetničkim delima primenom PMF metodologije

Očigledna je potreba za analitičkom tehnikom vrhunskih performansi kojom se mogu analizirati veoma male količine proteinskih veziva u uzorcima umetničkih dela i

kulturnog nasleđa i koja daje tačne i precizne rezultate. *State of the art* tehnike koje se danas primenjuju u proteomici imaju brojne prednosti u odnosu na tehnike koje su se do 2000ih koristile za analizu proteinskih veziva [208,247,248]. Prethodnih godina proteomika je postala veoma popularna u ovoj oblasti zbog svoje multidisciplinarne prirode, koja je dokazana primenom u forenzici, analizi hrane, kliničkoj medicini i proučavanju porekla života na Zemlji [249]. Protokoli koji se rutinski primenjuju za analizu bioloških uzoraka morali su se prilagoditi kako bi se uzela u obzir mala količina proteina u uzorcima kulturnog nasleđa, heterogenost, specifično fizičko stanje i stepen njihove degradiranosti. Primena proteomike za identifikaciju proteinskih materijala u umetničkim delima prvi put se pominje 2000. godine [250]. Iako su metode kojima se proteomika služi invazivne same po sebi, uz pomoć moderne masene spektrometrije moguća je analiza proteina uz ekstremnu osetljivost u veoma malim količinama uzoraka (oko 10 µg), što je veoma značajno za primenu u oblasti kulturnog nasleđa [249].

Ubrzo nakon prve primene objavljeno je više radova koji su različite metode proteomike prilagodili specifičnoj primeni u ovoj oblasti [251-255]. PMF pristup sastoji se od koraka koji uključuju ekstrakciju proteina, enzimsku hidrolizu pod definisanim uslovima, analizu dobijenih peptida masenom spektrometrijom i dalju analizu rezultata bioinformatičkim alatima. Peptidi dobijeni enzimskom hidrolizom analiziraju se pomoću MALDI-TOF masene spektrometrije koju odlikuje brzina, jednostavnost, visoka osetljivost i širok opseg detekcije masa. MALDI-TOF MS je tolerantna na manje količine kontaminanata, soli i surfaktanata, čime zadovoljava zahteve analize uz minimalnu pripremu uzoraka. Ova metodologija je prvi put razvijena i optimizovana na model uzorcima bojenog sloja sastavljenim od ovalbumina, lanenog ulja i belog olovnog pigmenta, baznog karbonata olova ($2\text{PbCO}_3 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2$).

Glavne poteškoće pojavile su se prilikom odabira rastvora za ekstrakciju proteina iz uzoraka bez njihove hidrolize na aminokiseline, ali i prilikom optimizacije analitičkog postupka za analizu veoma male količine uzoraka. Tokarski *et al.* su, u jednom od pionirskih radova u ovoj oblasti, ekstrahovane proteine analizirali u nativnom obliku pomoću MALDI-TOF MS, radi verifikacije efikasnosti primenjenog postupka ekstrakcije [252]. Najefikasnija ekstrakciju postignuta je 1% vodenim rastvorom TFA uz upotrebu komercijalne smole za fino usitnjavanje uzorka. Radi precizne identifikacije

proteina na model uzorcima, primenjen je i optimizovan *bottom-up* pristup. Peptidi su analizirani MALDI-TOF masenom spektrometrijom uz DHB kao matriks. Bioinformatičkom analizom snimljenih PMF spekara u model uzorcima su identifikovani proteini belanceta: ovotransferin sa pokrivenošću sekvence od 17%, ovalbumin sa pokrivenošću sekvence od 10%, ovomukoid sa pokrivenošću sekvence od 19% i protein žumanceta vitelogenin-2 uz pokrivenost sekvence od 7%. Na isti način, ali u kombinaciji sa tandem masenom spektrometrijom radi potvrde rezultata, po prvi put je demonstrirana mogućnost PMF pristupa da identifikuje proteine jajeta iz nekoliko mikrograma uzoraka slika koje datiraju iz XIV-XV veka [251,255] U istorijskim uzorcima identifikovano je prisustvo ovalbumina, lizozima, ovotransferina i ovomukoida iz belanceta, kao i najzastupljenijeg proteina žumanceta, vitelogenina.

Ubrzo nakon toga, Kuckova i saradnici publikovali su nekoliko radova koji se bave identifikacijm proteinskih veziva u slikama različitih umetnika pomoću PMF pristupa i MALDI-TOF masene spektrometrije [229,253,254]. Formirali su i sopstvenu bazu PMF spektara proteinskih veziva radi poređenja sa spektrima uzoraka uzetih sa umetničkih dela [229]. Ona sadrži molekulske mase peptida dobijenih tripsinskom hidrolizom proteinskih veziva (žumance, belance, kazein, mleko, sir, želatin, zečije, koštano, kožno i riblje tutkalo) i može se koristiti za identifikaciju smeša proteina. Poređenjem PMF spektara smeša proteina dobija se vrednost skora koji ukazuje na pouzdanost identifikacije smeše proteina, jer predstavlja odnos broja pikova koji se poklapaju i ukupnog broja pikova u snimljenom spektru.

Nekoliko alternativnih postupaka, koji se odnose na pripremu uzoraka ili analitički pristup, razvijeno je i primenjeno na različitim uzorcima umetničkih dela [40,256]. Predložena je, na primer, direktna enzimaska hidroliza uzoraka pomoću tripsina, bez prethodne ekstrakcije [253,254]. Primenom ove procedure u analizi uzoraka slika iz XIX veka, u snimljenom PMF spektru 12 pikova pripisano je peptidima kolagena, na osnovu čega je zaključeno da je u uzorcima prisutno vezivo na bazi kolagena [253]. PMF pristup korišćen je i za proučavanje proteinskih aditiva u starim malterima [257,258]. Analizirano je više uzoraka sa rotonde crkve Sv. Katarine (Znojmo, Češka Republika) iz XII veka i pokazalo se da se na osnovu PMF spektara mogu razlikovati glavne grupe proteinskih aditiva. U tri uzorka uočena je veza sa proteinima mleka, u dva sa kolagenima,

dok u dva uzorka nije bila moguća identifikacija proteina [257]. Da bi se olakšala obrada rezultata i identifikacija, predložena je upotreba liste pikova peptida žumanceta, belanceta, tutkala i mleka, koji su najčešće identifikovani pomoću PMF analiza različitih model uzoraka, uključujući i smeše proteina [256]. Na osnovu dobijenih informacija predložena je prva rutinska primena PMF u muzejskoj laboratoriji - *Harvard Art Museum* u Kembriđu (Masačusets, SAD) [256]. Protokol prilagođen rutinskoj primeni sastojao se iz standardnih koraka: ekstrakcija i denaturacija proteina, redukcija disulfidnih veza i alkilovanje proteina i hidroliza tripsinom. Prečišćavanje uzoraka, zasnovano na reversno-faznoj hromatografiji uz upotrebu ZipTip nastavaka, primenjeno je radi eliminacije interferencija i poboljšanja kvaliteta spektara. Metoda je efikasno primenjena na velikom broju uzoraka koji obuhvataju slike i muzejske predmete [256,259]. Na primer, analizom nekoliko italijanskih oltarskih kipova iz XIV veka, koji se nalaze u muzejskoj zbirci, sa uspehom je identifikovano kolagensko vezivo samo, ili u smeši sa jajčanim vezivom [256]. Validacija rezultata postignuta je primenom komplementarnih tehnika kao što je tandem masena spektrometrija, GC-MS, FTIR i ELISA.

Radi lakše diferencijacije proteinskih veziva u umetničkim delima primenjene su i hemometrijske metode, PCA i SIMCA, za obradu podataka dobijenih PMF analizama [260]. Snimljeni su PMF spektri seta od 44 uzoraka, koji uključuje kombinacije 10 pigmenta i četiri veziva, i podvrgnuti hemometrijskim metodama. Pomoću PCA selektovani su pikovi peptida u MALDI-TOF spektrima koji su najznačajniji za razlikovanje veziva, dok je SIMCA korišćena za kreiranje modela baziranog na relativnoj udaljenosti nepoznatih uzoraka od različitih grupa u setu model uzoraka (*supervised pattern recognition*). Sa uspehom su razlikovana veziva na bazi belanceta, žumanceta, kazeina i kolagena, a u okviru kolagenskih veziva bila je moguća diskriminacija između kolagena jesetre i sisara. Postupak je primenjen na nekoliko uzoraka sa oltarskog kipa iz XVI veka. Usled procesa starenja u bojenom sloju, odnos signala i šuma u snimljenim spektrima bio je nizak, ali je, ipak, uspešno identifikovan kolagen sisara. PCA analiza MALDI-TOF spektara primenjena je i radi razumevanja degradacionih procesa u kolagenskim vezivima usled izloženosti UV zračenju i interakcije sa pigmentima [261]. Ispostavilo se da ponašanje proteina prilikom starenja zavisi od prirode prisutnih pigmenta. Na primer, formiranje kompleksa između proteina i bakra sugerisano je kao objašnjenje fotostabilizacije tutkala u uzorcima koji sadrže azurit. To je potvrđeno i na

osnovu FTIR spektara koji su ukazali na konformacione promene sekundarne strukture kolagena nakon postupka veštačkog starenja.

Uticaj prirodnog starenja takođe je proučavan na model uzorcima maltera [262]. PMF spektri uzoraka maltera iz dubljih slojeva, nakon enzimske hidrolize, imali su bolji odnos signala i šuma u poređenju sa uzorcima površinskih slojeva. Poređenje je vršeno na osnovu pikova istih peptida u MALDI-TOF spektrima u svežim i uzorcima podvrgnutim starenju. PMF analiza primenjena je i za proučavanje efekata biorestauracije [263], tehnike čišćenja umetničkih dela zasnovane na aktivnosti enzima u okviru ćelija bakterija ili izvan njih [264-266]. Klasičnom PMF metodologijom pomoću MALDI-TOF MS eksperimentalno su praćeni peptidi koji nastaju tokom konzervatorskih tretmana enzimima i nakon čišćenja ostaju na pamučnim tupferima. Za hidrolizu je primenjen pepsin koji ima afinitet prema peptidnim vezama između hidrofobnih/aromatičnih aminokiselina. Na osnovu raznolikosti i zastupljenosti detektovanih peptida u opsegu masa 900-3200 Da došlo se do formulacija koje su najbezbednije za dalju restauraciju.

U literaturi je predložena i analitička procedura za simultano određivanje proteina i lipida, poput triacilglicerola i fosfolipida, u istom uzorku umetničkog dela zasnovana na *Bligh-Dyer* ekstrakciji smešom metanol/hloroform, kojom je, nakon tretmana ultrazvukom i centrifugiranja, moguće razdvojiti lipide i proteine [267,268]. MALDI-TOF masenom spektrometrijom analizirane su i lipidna i proteinska frakcija, nakon tripsinske hidrolize proteinskog ekstrakta. Analizom više mikro uzoraka slika na panelima sa kraja XV veka identifikovani su peptidi jajeta, kolagena (u podlozi) i kazeina (u dekoracijama), ali i triacilgliceroli, fosfolipidi i produkti njihove degradacije, što je ukazalo na prisustvo smeše sušivih ulja i jajeta [268]. Predložena je i direktna MALDI-TOF analiza malih fragmenata bojenog sloja za identifikaciju proteina i lipida [269]. Metodologija podrazumeva nanošenje usitnjenog uzorka na provodni grafitni polimer kojim je prethodno prevučena MALDI ploča za nanošenje uzoraka, a zatim i rastvora tripsina radi hidrolize proteina u uzorku. U model uzorcima jajčane tempere ovom metodom identifikovani su različiti lipidi, ali i peptidi vitelogenina iz žumanceta, kao i avidina i ovalbumina iz belanceta. Metoda je primenjena i za analizu uzoraka poliptiha iz XV veka i tom prilikom identifikovano je 7 peptida kolagena, 9 peptida vitelogenina-1 i

viteogenina-2, dok je na osnovu 7 pikova pripisanih lipidnoj frakciji potvrđeno prisustvo fosfolipida i njihovih proizvoda degradacije koji takođe ukazuju na prisustvo žumanceta.

Radi potpunije karakterizacije, kako organskih, tako i neorganskih komponenata umetničkog dela predložene su analize koje uključuju PMF kao komplementarnu metodologiju drugim tehnikama, poput optičke mikroskopije, SEM-EDX, mikro-Raman spektroskopije, GC-MS, ELISA i bojenja pomoću boje *SYPRO Ruby* [92,256,267,270,271].

Analiza proteina u uzorcima kulturnog nasleđa tandem masenom spektrometrijom

U analizi proteina, tandem masena spektrometrija predstavlja moćnu tehniku komplementarnu ili alternativnu PMF pristupu, jer daje potpuniji uvid u strukturne informacije i omogućava preciznu identifikaciju sekvence aminokiselina u peptidima i njihovih modifikacija. Na taj način protein se može identifikovati na osnovu sekvenci nekoliko peptida, a može se doći i do informacija o biološkom poreklu proteina ili stepenu degradiranosti uzorka.

Preciznu identifikaciju proteina u umetničkim delima tandem masenom spektrometrijom prva je predložila Tokarski *et al.* 2002. godine na 7. Internacionalnoj konferenciji pod nazivom "*Non-destructive analysis and microanalysis for the conservation of cultural and environmental heritage*" održanoj u Antverpenu (Belgija) [248]. Njena grupa ubrzo je objavila više radova koji opisuju primenu ove metodologije na različitim vrstama uzoraka kulturnog nasleđa [251,255]. Korišćena je nanoLC hromatografija povezana sa nanoESI-Qq-TOF MS/MS masenim spektrometrom, a postupak je optimizovan za veoma male količine uzoraka. Suština metodologije je određivanje tačnih sekvenci aminokiselina u peptidima dobijenim enzimskom hidrolizom proteina, a time i tačne identifikacije proteina, pomoću CID fragmentacije peptida [218]. Ovom metodom mogu se identifikovati i modifikacije proteina. Postupak je razvijen i optimizovan na model uzorcima pripremljenim u laboratoriji koji su po sastavu oponašali stare slike. Priprema uzoraka za analizu veoma je slična pripremi kod PMF metode, a moguća je primena različitih masenih analizatora, modova snimanja masenih spektara i integracija prethodnog hromatografskog razdvajanja analita. Ova metodologija uspešno

je primenjena na dva uzorka sa slike iz perioda renesanse izložene u *Musée du Petit Palais* u Avinjonu. U uzorcima triptiha „*Bogorodica sa detetom. Sveti Jovan Krstitelj. Sveti Sebastijan*“ (*Benedetto Bonfigli*, 1420-1496), nakon analize masenom spektrometrijom, na osnovu više identifikovanih sekvenci peptida, utvrđeno je prisustvo 4 proteina: ovotransferina, ovalbumina i lizozima iz belanceta i vitelogenina iz žumanceta. Analiza slike „*Madona sa detetom*“ (*Niccolo di Pietro Gerini*, 1368-1415), dovela je do identifikacije dva proteina belanceta (ovotransferina i ovalbumina) i jednog proteina žumanceta (vitelogenina) [254]. Proteomika je omogućila identifikaciju prirode proteinskog veziva i pokazalo se da je za izradu ove dve renesansne slike korišćena kompleksnija formulacija od obične tempere (koja sadrži samo žumance), jer je nađena smeša belanceta, žumanceta i ulja, koja se često naziva „*tempera grassa*” i ima specifične hromatske efekte. Takođe, analizom dva mikro-uzorka sa radova „*Propoved Svetog Jovana Krstitelja*“ i „*Raspeće*“, izloženih u *Groeninge museum* u Brižu i *Museum of Applied Arts* u Budimpešti otkriveno je da je umetnik, Brojgel mlađi (1565-1636), u izradi svojih dela koristio tutkalo [272].

Navedeni eksperimenti pokazali su potencijal proteomike i tandem masene spektrometrije u oblasti konzervacije, pa su usledili drugi radovi, bazirani na ovim početnim rezultatima, kojima je predloženo više alternativnih analitičkih procedura. U jednom od njih, uzorci bojenog sloja suspendovani su u amonijum-bikarbonatnom puferu i nakon tretiranja u ultrazvučnom kupatilu pripremani za analizu na uobicajeni način (redukcija, alkilovanje, hidroliza) [273]. Efikasnost ovog postupka pripreme uzorka demonstrirana je analizom zidnih slika sa početka XX veka iz Katedrale Svetog Dimitra u Vidinu (Bugarska), gde je dokazano prisustvo proteina lizozima, ovalbumina i ovotransferina iz belanceta, vitelogenina iz žumanceta i alfa-S1- i beta-kazeina iz mleka. U drugom radu predložena je enzimaska digestija potpomognuta mikro-talasima, kojom je skraćeno vreme hidrolize sa nekoliko sati na svega 15 minuta [274]. Analizirani su model uzorci koji su sastavljeni od pigmenata hematita i malahita i veziva na bazi jajeta, mleka i tutkala. Uzorci su tretirani Paraloidom B72, akrilnom smolom koja se često koristila u konzervaciji. U njima su uspešno identifikovani proteini. Međutim, poteškoće u identifikaciji proteina javile su se primenom digestije proteina bez prethodne ekstrakcije na fragmentima otpalim sa zidova bazilike Svetog Franje Asiškog. Ispitivano je i optimalno vreme trajanja tripsinske hidrolize [258]. Model uzorci maltera koji sadrže

mleko, sir ili surutku hidrolizovani su tripsinom u rastvoru i utvrđeno je, na osnovu najvećeg broja detektovanih pikova peptida u spektru, da je optimalno trajanje hidrolize 2h. Primenom tog protokola, MS/MS eksperimenti doveli su do identifikacije više proteina mleka, kao što su alfa-laktalbumin, beta-laktoglobulin, alfa- i kapa-kazein. Uticaj pripreme uzoraka i postupka prečišćavanja pre analize masenom spektrometrijom takođe je ispitivan i optimizovan tokom analize model uzoraka koji su pripremljeni mešanjem različitih proteinskih veziva i pigmenata [272]. Korišćeni su reagensi za denaturaciju, poput uree i tiouree, i detergent natrijum-dodecilsulfat za rastvaranje i denaturaciju proteina pre redukcije i alkilovanja. Smeše peptida dobijene nakon enzimske hidrolize prečišćavane su hromatografijom na tri različite stacionarne faze, *HLB*, *SCX* i *HILIC*. Najbolji rezultati, na osnovu kriterijuma pokrivenosti sekvence, dobijeni su pomoću hromatografije na *HILIC* stacionarnoj fazi. Analizom uzoraka umetničkih predmeta koji datiraju od XV do XVII veka, uspešno su identifikovani peptidi kolagena koji su ukazali na korišćenje tutkala kao veziva.

Pored precizne identifikacije proteinskih materijala, tandem masena spektrometrija, uz podršku bioinformatičkih alata, korišćena je i za određivanje biološkog porekla proteina u umetničkim delima [272,273,275-277]. Informacija o biološkom poreklu veoma je važna za razumevanje tehnologije pripreme boja, tehnike slikanja ili planiranje restauratorskih postupka i tretmana, poštujući tehniku i materijale koje je koristio umetnik. Ispitivano je biološko poreklo mleka u uzorcima na osnovu prisustva peptida alfa-S1-kazeina specifičnih za različite životinjske vrste [273]. Primenom specijalnog bioinformatičkog softvera poređene su sekvence peptida kazeina određene na osnovu snimljenih MS/MS spektara sa sekvencama dostupnim u bazama podataka za različite vrste sisara. Na osnovu sekvence dva diskriminantna peptida utvrđeno je da je kao vezivo korišćeno ovčije mleko. Identifikovano je i nekoliko peptida koji omogućavaju razlikovanje ovčijeg i kozijeg od goveđeg mleka. Sličan analitički pristup korišćen je kako bi se identifikovao alfa-S1-kazein iz mleka bivolice prisutan u zidnim slikama na arheološkom nalazištu iz I veka u Italiji [276].

Publikovana je i studija utvrđivanja biološkog porekla tutkala korišćenih u izradi umetničkih dela koja je ukazala na neke dodatne poteškoće [277]. Kolageni su proteini velike molekulske mase (150–400 kDa) koji daju kompleksne masene spektre uz slabu

pokrivenost sekvence, pa se analitički postupak mora prilagoditi kako bi se dobili maseni spektri koji daju najviše informacija. Zato je primenjeno nanohromatografsko razdvajanje povezano sa MS analizom. Ozbiljan problem je nedostatak sekvenciranih kolagenskih proteina mnogih životinjskih vrsta u bazi sekvenci, a proteomika veoma zavisi od baza sekvenci koje se konstantno razvijaju. Kada se u uzorku nađu peptidi nesekvenciranih životinjskih vrsta, može se pribeći *de novo* sekvenciranju na osnovu snimljenih tandem masenih spektara. Na taj način se dobijaju precizne informacije o aminokiselinskom lancu peptida. Ponekad se nove sekvence porede na osnovu sličnosti i razlika, tj. homologije sa postojećim sekvencama u bazi. U navedenom radu predložen je postupak određivanja biološkog porekla kolagena nađenog u uzorcima iz XV-XVII veka uz upotrebu softvera za poređenje sekvenci (*alignment*). Na osnovu peptida identifikovanih pretraživanjem SwissProt baze podataka i provere prisustva tih sekvenci kod više životinjskih vrsta, autori su, na osnovu dva specifična peptida, došli do zaključka da je korišćeno goveđe tutkalo.

Precizna identifikacija biološkog porekla tutkala pokazala se uspešnom primenom nanohromatografije povezane sa masenom spektrometrijom visoke rezolucije i bioinformatičkim alatom za poređenje sekvenci, specijalno napravljenim za tu namenu [274,276]. Autori su uspeali da razlikuju goveđe, zečije i riblje tutkalo u nekoliko mikrograma uzoraka komercijalnog lepka, 100 godina starog uzorka tutkala i uzorka pozlate iz XVIII veka. U uzorku tutkala identifikovani su kolageni alfa1 tip I, II i III i kolagen alfa2 tip I. Nedavno je *bottom-up* pristupom, zasnovanim na tandem masenoj spektrometriji, uspešno identifikovan goveđi kolagen korišćen kao adheziv na koštanoj skulpturi ugrađenoj u drveni predmet na *Xiaohe* groblju u Kini [278]. Identifikovana su dva specifična peptida iz alfa1(I) i alfa2(I) goveđeg kolagena. Uspešnost proteomike u identifikaciji kolagenskih peptida pokazana je i na primeru analize rimsko-egipatskog panela iz II veka naše ere, gde su, u kombinaciji sa drugim metodama, identifikovani peptidi alfa1(III) kolagena kojima je dokazano prisustvo goveđeg kožnog tutkala [195].

Proteomika u analizi arheoloških i paleontoloških predmeta

Primena proteomike u oblasti kulturnog nasleđa nije ograničena samo na analizu umetničkih dela, već je često korišćena i za identifikaciju proteina u arheološkim i paleontološkim nalazima, kao što su fosili i stare kosti, antičke posude, tekstil, ljuske

jajeta ili koža mumija. Proučavanje proteina u fosilima počelo je 2000ih godina primenom PMF i sekvenciranja peptida [250,279-281]. Prvi eksperimenti bili su fokusirani na protein osteokalcin zbog njegovog afiniteta ka hidroksiapatitu u kostima, ali i velikog udela u ukupnim proteinima kostiju [282]. Sekvenciranju peptida pomoću MALDI-TOF masene spektrometrije i PSD eksperimenata pristupilo se nakon digestije osteokalcina tripsinom [250]. Identifikovane su razlike u sekvencama osteokalcina neandertalaca i nekoliko vrsta majmuna, kao i prisustvo posttranslacionih hidroksilacija prolina na određenim pozicijama u molekulu. Na osnovu tih podataka došlo se do zaključaka o njihovom načinu ishrane i unosu namirnica koje sadrže vitamin C. Sekvence proteina u fosilima poređene su sa savremenim životinjskim vrstama kako bi se, komplementarno sa DNK analizom, proučavala molekularna filogenija tokom dugačkog vremenskog razdoblja [279,280]. Zbog podložnosti osteokalcina degradaciji u određenim uslovima okruženja [283], predloženo je proučavanje kolagena, jer je kolagen tipa I zapravo najzastupljeniji protein u kostima [284-287]. Pokazalo se da kolagen može opstati u arheološkim uzorcima veoma dugo i može se dokazati na osnovu konstitutivnih peptida [288,289]. Peptidi kolagena uspešno su identifikovani u kostima iz holocena i pleistocena (pre oko 11000 godina do 1.5 miliona godina) [290], u uzorcima kostiju dinosaurus starim oko 65 miliona godina [291] i kostima hadrosaurus starim 80 miliona godina [292]. Osim identifikacije peptida kolagena, pokazana je i mogućnost identifikacije bioloških vrsta na osnovu peptida markera [293]. Daljim istraživanjima identifikovana su 92 peptida markera kolagena studijom 32 savremene životinjske vrste [294]. Na taj način omogućeno je da se, pomoću proteomike kolagena iz fosilnih ostataka, dobiju evolutivno značajne informacije na molekulskom nivou. Nakon toga sprovedene su sistematske studije različitih vrsta, iz različitih istorijskih perioda, zasnovane na PMF i ispitivanju sekvenci kolagenskih peptida [295-298]. Analize su omogućile jasno razlikovanje proučavanih vrsta pomoću karakterističnih peptida i statističkih metoda, kao što je PLS u kombinaciji sa LDA.

PMF metodologijom dokazan je opstanak proteinskih jedinjenja u fosilima starijim od milion godina, pružajući tako novi uvid na polju evolutivne biologije [289,299]. Opstanak kolagena dokazan je analizom fosila *Tyrannosaurus rex* starih 68 miliona godina i fosila mastodona starih 160-600 hiljada godina [291,300]. Sekvencirani peptidi korišćeni su za konstruisanje filogenetskog stabla poređenja sekvenci. Na osnovu

toga primećena je velika sličnost između peptida kolagena *Tyrannosaurus rex* i ptica (*Gallus gallus*), kao i između mastodona (*Mammot americanum*) i drugih sisara, uključujući slona [301].

Osim proučavanja osteokalcina i kolagena u fosilima, proteomika je dovela i do uspešne identifikacije 126 proteina iz femura 43000 godina starog Sibirskog mamuta [302]. Identifikovani su proteini plazme, kao i membranski i intracelularni proteini (moezin, miozin), citoskeletni keratini, kolageni i proteini povezani sa kalcijumom i fibrilima. Funkcionalne mreže koje se formiraju interakcijom proteina u proučavanom proteomu pretraživane su pomoću posebnog algoritma (STRING), a kao rezultat istraživanja utvrđena je funkcija čak 99 proteina. Proteomika, na način komplementaran DNK analizi i drugim tehnikama, kao što je imunologija, pokazala se esencijalnim analitičkim alatom za proučavanje sekvenci proteina nađenih u fosilima [303,304]. Osim filogenetskih studija, koje sugerišu nove poglede na istoriju evolucije, proteomika pruža dodatne informacije o fosilnim uzorcima [292,295,305]. Na primer, proteinski biomarkeri osteosarkoma detektovani su u kostima starim 2000 godina [306], a proteini imunog odgovora u 500 godina staroj Inka mumiji [307].

Paralelno sa proučavanjem proteina u fosilima, proteomika je adaptirana i za proučavanje različitih arheoloških uzoraka, u cilju boljeg razumevanja upotrebe nađenih predmeta i ljudske tradicije. Primenjeni postupci uglavnom se razlikuju u pogledu ekstrakcije proteina, koja najviše zavisi od prirode uzorka. Primena proteomike u analizi arheoloških uzoraka prvi put je opisana 2008. godine u studiji proteinskih ostataka u fragmentima antičkih posuda [308]. Ovakve analize često su otežane „curenjem“ proteina iz posude tokom perioda provedenog u zemlji, usled njihove hidrofilitnosti. U pomenutoj studiji identifikovani su tragovi proteina u posudama iz XIII-XIV veka nađenim na Aljasci, u Arktičkom okruženju koje pogoduje očuvanju organskih supstanci. Postupak je optimizovan na model uzorcima fragmenata keramike impregnirane proteinima različitih vrsta foka i kitova, kao glavnih izvora hrane Eskima. Život naroda *Iñupiat* sa Aljaske zasnivao se na lovu i ribolovu, posebno kitova, pa su u arheološkim nalazima keramike nađeni ostaci mišića i sala kitova i foka. Većina proteina identifikovana je na osnovu homologije sa drugim životinjskim vrstama. Proteomika primenjena na ovim

arheološkim uzorcima omogućila je uspešnu identifikaciju 4 peptida mioglobina zalivske foke, čime je dokazano da su Eskimi konzumirali ove životinje u svakodnevnoj ishrani.

Identifikacija ribljih rezidua na fragmentima keramičkih posuda pomoću proteomike razvijena je na model uzorcima keramike impregniranim različitim vrstama ribe [309]. Uspešno je identifikovano više od 200 proteina u replikama arheoloških uzoraka impregniranim sardelom i palamidom, pri čemu je identifikovano 73 peptida specifičnih za ribe. Nađeno je i nekoliko peptida koji do tada nisu bili opisani i koji se, u odnosu na sekvence proteina drugih vrsta riba prisutnih u bazi podataka, razlikuju po supstituisanim aminokiselinama. Različite modifikacije postupka pripreme uzoraka su predložene za analizu proteinskih rezidua u model uzorcima ili arheološkim uzorcima, kao što je primena enzimske digestije potpomognute mikro-talasima [310], rastvora za ekstrakciju proteina koji sadrži SDS ili fluorovodoničnu kiselinu [311] ili alternativnog reagensa za ekstrakciju, PBS [312].

Kolagen je zanimljiv izvor informacija o arheološkim predmetima, slično kao kod proučavanja umetničkih dela ili fosilnih ostataka. Pošto su kolageni najzastupljeniji proteini kod sisara, materijali koji sadrže kolagen korišćeni su u prošlosti u najrazličitije svrhe [313,314]. Kirbi je sa saradnicima predložio PMF metodu zasnovanu na identifikaciji peptidnih markera različitih životinjskih vrsta u arheološkim materijalima i različitim muzejskim predmetima [256,259]. Tom metodom utvrđeno je da je pergament iz IX veka, na kome je ispisan Kuran, ovčijeg porekla, dok su kajaci sa Aljaske iz XIX veka napravljeni od kombinacije koža foke i irvasa.

Pored analize istorijskih materijala koji sadrže kolagen, i keratinski materijali su analizirani metodama koje se primenjuju u proteomici. Tako su, prilikom proučavanja različitih keratinskih materijala, predloženi peptidni markeri α -keratina [315-319]. Kako je keratin glavna komponenta životinjskog krzna i ljudske kose, ova metoda je primenjena za analizu odeće i krzna Tirolske mumije stare 5300 godina [316,320]. Radi identifikacije bioloških vrsta na osnovu peptida keratina, snimljeni PMF i tandem maseni spektri poređeni su sa referentnim spektrima u postojećoj bazi podataka (NCBIInr). Klusterskom analizom identifikovano je biološko poreklo različitih delova odeće mumije. PMF i MS/MS analizama proučavan je i alfa-keratin rožnatih tkiva kita, pera bodljikavog praseta, rogova i kopita, čime su dobijeni novi podaci kojih nema u dostupnim bazama i

identifikovani novi peptidni markeri pojedinih životinjskih vrsta [317,321]. PMF analizom uspešno je identifikovano biološko poreklo uzoraka krzna i tekstila datiranih od III veka pre nove ere do X veka naše ere, i u keratinskim i u kolagenskim materijalima [322]. Analiza kožne odeće iz X veka pre nove ere do VIII veka nove ere omogućila je identifikaciju kolagena i keratina, kao i životinjskih vrsta od kojih potiču [319]. Interesantan je i primer analize moždanog tkiva „ledenog čoveka“ (*Iceman*) pomoću dve različite strategije koje se primenjuju u proteomici [323]. Prva strategija je podrazumevala razdvajanje proteina pomoću SDS-PAGE elektroforeze i hidrolizu proteina u gelu, a druga hidrolizu u rastvoru i direktnu analizu peptida (engl. *shotgun*) pomoću nanoLC-LTQ-Orbitrap tandem masene spektrometrije. Spektri su analizirani pomoću 4 platforme za pretragu baza (SEQUEST - Proteome Discoverer, Matrix Science, OMSSA i X!Tandem), čime je identifikovano više od 500 različitih proteina. Među njima je bilo dosta keratina i drugih proteina koji su deo ćelijskih struktura, veliki broj proteina specifičan za moždane ćelije i neurološke procese, proteini krvi i dr.

Arheološki materijal koji se analizira pomoću proteomike sve je raznovrsniji. Nedavno su objavljene publikacije koje opisuju primenu na arheobotaničkim uzorcima, kao što su srednjovekovne semenke grožđa [324] i cerealije stare 2500 godina [325]. Cilj ovih proučavanja bila je identifikacija organskih supstanci u semenkama, proučavanje uticaja dugotrajnih degradacionih procesa na proteine, ali i utvrđivanje genetske distance između savremenih i istorijskih biljnih vrsta. Proteomika je potpomognuta i drugim tehnikama, poput Py-GC-MS i genetskim analizama. Dodatni iTRAQ MS/MS eksperimenti, koji služe za kvantifikaciju proteina na osnovu označenih peptida, omogućili su uvid u količinu očuvanih proteina u arheološkim uzorcima u odnosu na savremene vrste. Analizama su dobijene informacije o načinu pripreme hleba u drevnoj Kini i sastavu korišćenog brašna.

Još jedna interesantna vrsta arheoloških uzoraka analiziranih putem proteomike su ljuske jajeta koje se najčešće mogu naći u arheološkom zemljištu koje nije kiselo [326]. Analiza ovih uzoraka je informativna iz više razloga: od ljuski jajeta pravljen su različite rukotvorine, jaja imaju simbolički značaj u mnogim kulturama, a i značajna su komponenta ljudske ishrane. Zato je u više studija proteomika prilagođena za

identifikaciju proteina u nađenim ljuskama jajeta i određivanje njihovog biološkog porekla [326-328].

Pored opšte prihvaćenog pristupa analize proteina nakon specifične enzimske hidrolize, pomoću proteomike proteini u uzorcima kulturnog nasleđa mogu se analizirati i *top-down* pristupom u nativnom obliku. Iako je *bottom-up* proteomika bila uspešna u mnogim primenama i dala odgovore na različita pitanja, imala je i izvesnih nedostataka. Da bi se dobila bolja pokrivenost sekvence, na primer, potreban je nešto drugačiji pristup koji se ne može uvek prilagoditi veoma malim količinama uzoraka kulturnog nasleđa dostupnim za analizu (koncentrovanje analiziranih proteina u uzorku, određivanje prisustva glikozilacija ili fosforilacija, primena više enzima paralelno). Takođe, primena *bottom-up* proteomike tokom pripreme uzorka dovodi do pojave indukovanih modifikacija, kao što je deamidacija asparagina i glutamina [329]. Prvi eksperimenti koji su omogućili određivanje molekularskih masa nativnih proteina ekstrahovanih iz fosila izvedeni su pomoću gel elektroforeze krajem 1980ih godina [330,331]. MALDI-TOF masena spektrometrija počela je da se primenjuje 2000ih godina kada su analizirani nativni proteini u ekstraktima slika [251,252,255] i fosila [250,279]. Spektri nativnih proteina sadrže izotopsku raspodelu na osnovu koje se izračunava prosečna molekularska masa proteina i identifikuje protein. U navedenim radovima, nađeni proteini precizno su identifikovani i pomoću *bottom-up* proteomike. Analiza nativnih proteina u istorijskim materijalima takođe ima mogućnost utvrđivanja prisustva modifikacija na osnovu izotopske raspodele i defekta mase. To je pokazano na primeru model uzoraka sačinjenih od lizozima i baznog karbonata olova, gde je *top-down* pristupom utvrđeno da je u uzorcima podvrgnutim prirodnom starenju prisutna deamidacija na jednoj aminokiselini [332,333]. Na isti način moguće je detektovati i druge promene u strukturi proteina, kao što je raskidanje disulfidnih veza [334] ili skraćivanje proteina usled degradacionih mehanizama [335-337]. *Top-down* eksperimentima utvrđena je i precizna sekvenca aminokiselina u lizozimu, kao i skraćivanje njegovog lanca gubitkom aminokiselina sa N- i C-terminala u 5 godina starim model uzorcima načinjenim od jajčanog veziva, olovne bele i lanenog ulja [335].

Proučavanje modifikacija i cepanja aminokiselinskog lanca analizom nativnih proteina, dopunjeno *top-down* eksperimentima radi lokalizovanja prisutnih modifikacija,

pokazalo se uspešnim i pružilo je nove mogućnosti na polju kulturnog nasleđa. Na ovaj način precizno se može pratiti uticaj restauratorskih tretmana na molekulskom nivou (modifikacije ili raskidanje peptidnih veza), uticaj spoljašnjih faktora (npr. dejstvo mikroflore) ili međusobna interakciju komponenata boje. U fosilima se može pratiti deamidacija asparagina i glutamina, kao i potencijalna veza ove modifikacije sa starenjem ili datovanjem analiziranog materijala, uzimajući u obzir okruženje datog uzorka i njegovo stanje očuvanosti. Prilagođenim analitičkim metodama koje se zasnivaju na *top-down* proteomici proučavaju se i interakcije proteina i biominerala.

Tokom prethodnih godina značajno je smanjena količina uzorka potrebna za analizu, dok su se količina i kvalitet dobijenih informacija povećali. Prve analize, pre skoro 80 godina, ukazale su na mogućnost detekcije proteina u istorijskim uzorcima, a danas je moguća i njihova precizna lokalizacija, uz ekstremnu osetljivost, i određivanje precizne sekvence aminokiselina. U okviru sekvence istog proteina, poređenjem se može dobiti dovoljno informacija kako bi se precizno identifikovalo i biološko poreklo. Sve ovo pomaže otkrivanje evolutivnih veza, načina života, razumevanje tehnologije nastanka umetničkih dela ili rešavanje konzervatorskih problema i pitanja. Danas je sve češće kombinovanje analitičkih tehnika. Savremene analitičke metode prilagođavaju se primeni u oblasti kulturnog nasleđa, a razvijaju se i prenosni instrumenti kojima su moguća merenja *in situ*. Nove tehnike, pored identifikacije proteina, pružaju odgovore i na druga pitanja posmatrajući uzorke u kontekstu njihovog dinamičkog okruženja i istorije.

3 EKSPERIMENTALNI DEO

3.1 HEMIKALIJE I REAGENSI

Svi rastvori korišćeni tokom izrade ove disertacije pripremani su sa ultra čistom vodom dobijenom uz pomoć sistema Milli-Q, (Millipore, Bedford, MA, USA), čiji je specifični otpor bio $\geq 10 \text{ M}\Omega/\text{cm}$ (25°C). Za pripremu uzoraka korišćeni su amonijum-hidrojenkarbonat (AMBIC), ditiotreitol (DTT), jodsirćetna kiselina (IAA) (svi Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany), trifluorosirćetna kiselina (TFA, Acros Organics, Noisy-Le-Grand, France), mravlja kiselina (FA, Merck KgaA, Darmstadt, Germany) i urea (Biorad, Marnes la Coquette, France). Od rastvarača korišćeni su acetonitril i metanol HPLC čistoće (VWR International, Fontenay sous Bois, France). Proteini su enzimski hidrolizovani pomoću tripsina koji je nabavljen u obliku *Trypsin Singles Proteomics Grade Kit* (T7575, Sigma-Aldrich Chemie GmbH).

MALDI-TOF instrument eksterno je kalibrisan uz pomoć ProteoMass™ Peptide MALDI-MS Calibration Kit (MSCAL2, Sigma-Aldrich Chemie GmbH), koji sadrži sledeće peptide za kalibraciju: bradikinin (757.39916 ostaci 1–7 $[\text{M-H}]^+$ mono), angiotensin II (1046.54180 $[\text{M-H}]^+$ mono), P14R (1533.85765 $[\text{M-H}]^+$ mono), ACTH (2465.19830 odsečak 18–39 $[\text{M-H}]^+$ mono) i insulin (oksidovani lanac B 3494.65130 $[\text{M-H}]^+$ mono). Kao matrkas za MALDI-TOF masenu spektrometriju korišćena je 2,5-dihidroksi benzoeva kiselina (DHB, 85707, Sigma-Aldrich Chemie GmbH).

Pre analize masenom spektrometrijom uzorci su prečišćavani pomoću reversno-faznih ZipTip mikrokolona (Millipore, Bedford, MA, USA). Za pripremu model uzoraka upotrebljeni su pigmenti oker i cink-oksidi (40020 i 46300, Kremer Pigments GmbH & Co, Aichstetten, Germany).

3.2 UZORCI PROTEINSKIH VEZIVA

Kolekcija prirodnih proteinskih veziva korišćena je za optimizaciju MALDI–TOF i LC–MS/MS postupaka i prikupljanje informacija o prisutnim proteinima. Uzorci za ovu studiju odabrani su na osnovu tri grupe proteinskih veziva koja su najčešće korišćena kao slikarski medijumi tokom istorije. To su belance i žumance kokošijeg jajeta, goveđi sir i kazein u prahu i kolageni različitih životinjskih vrsta – zečiji, goveđi, svinjski i kolagen sibirske jesetre. Kolagenski materijali i kazein u prahu nabavljeni su od Kremer Pigments GmbH & Co (Aichstetten, Germany), a jaja i sir kupljeni na lokalnoj pijaci. Pregled analiziranih referentnih uzoraka dat je u Tabeli 3.1.

Tabela 3.1. Proteinska veziva analizirana kao referentni uzorci

Uzorak	Oznaka	Identif. br. proizvoda	Životinjski delovi korišćeni u proizvodnji
Goveđe koštano tutkalo	BGB	63000	Kosti, vezivno tkivo
Goveđe kožno tutkalo	HGB	63010	Koža, vezivno tkivo
Zečije kožno tutkalo, prečišćeno	RSG	63025	Zečija koža, vezivno tkivo
Zečije kožno tutkalo, sirovo	RSC	63028	Zečija koža, vezivno tkivo
Tehnički želatin, svinjski	TGP	63040	Koža, vezivno tkivo
Salianski isinglass	SFG	63110	Vazdušni mehur jesetre
Kazein u prahu	CAS	63200	Kravlje mleko
Kravlji sir, mladi	CHE	/	Kravlje mleko
Belance	EW	/	Kokošije jaje
Žumance	EY	/	Kokošije jaje

Analiza referentnih uzoraka imala je za cilj da pruži informacije o proteinima koji se mogu identifikovati primenjenim metodologijama i da ukaže na peptidne markere prisutne u proteinima različitih životinjskih vrsta.

3.2.1 Priprema proteinskih veziva

Standardi proteina pripremljeni su prema starim recepturama u skladu sa *Il Libro dell'Arte Cennino Cennini* [9]. Tutkala su potopljena da nabubre, a zatim i rastvorena u toploj dejonizovanoj vodi kako bi se dobili rastvori koncentracije 8% (w/v). Osušen riblji mehur jesetre isečen je na fine trake i ostavljen u vodi 24h (originalna koncentracija bila je 8% (w/v)); rastvor je zatim zagrevan 6 h na 90°C i dekantovan, kako bi se uklonio nerastvorni ostatak. Belance je odvojeno od žumanceta i blago umućeno da se napravi pena. Nakon nekog vremena, pena je uklonjena sa površine, a bistri ostatak razblažen dejonizovanom vodom kako bi se dobio rastvor belanceta 50% v/v. Žumancetu je probušena opna čime je omogućeno da tečnost izađe iz membrane koja je okružuje. Tečni deo žumanceta razblažen je dejonizovanom vodom da bi se dobila emulzija 50% (v/v). Veziva od sira i kazeina pripremljena su uz dodatak boraksa, u skladu sa procedurom koju je objavio Fremout [338]. Odmerena je količina od 25 g svežeg mladog sira, odnosno 10 g kazeina u prahu i suspendovana u 10 mL dejonizovane vode. Dodat je boraks (1 g) i smeša je mešana 40 min dok nije formiran gusti sirupast rastvor, koji je razblažen vodom u odnosu 1:4 i dalje tretiran kao ostala veziva.

3.2.2 Priprema model uzoraka

Kako bi se procenio uticaj prisustva pigmenata na identifikaciju proteinskih veziva analizirani su model uzorci pripremljeni mešanjem referentnih materijala (veziva) i odabranih pigmenata. Od pigmenata koji su bili dostupni izabrani su cink-oksidi (ZnO) i oker (Fe_2O_3). Cink-oksidi su odabrani jer su njihove interakcije sa proteinskim materijalima retko proučavane, a oker zbog svoje rasprostranjenosti i široke upotrebe od antičkih vremena do danas. Model uzorci bojenog sloja napravljeni su mešanjem veziva pripremljenih na način opisan u prethodnom odeljku sa navedenim pigmentima u odnosu 1:1 (w:w). Dobijene homogene smeše nanete su na mikroskopske staklene pločice i ostavljene da se osuše. Uzorci su prirodno starili u laboratorijskim uslovima nekoliko meseci. Neposredno pre analize, površina model uzoraka je sastrugana sa staklene pločice spatulom i izmerena. Oko 0,1 mg uzoraka suspendovano je u 100 μL pufera i dalje tretirano.

3.2.3 Uzorci istorijskih slika

Uzimanje uzoraka je prvi i najvažniji korak u analitičkoj proceduri. Ovaj korak je izuzetno značajan prilikom analize materijala u umetničkim delima. Da bi se sačuvalo integritet umetničkog dela, broj i veličina uzoraka moraju biti minimalni. Izuzetno je važno planiranje postupka uzorkovanja u saradnji sa restauratorima i konzervatorima kako bi se smanjila oštećenja i u isto vreme uzeli mikro-uzorci koji sadrže dovoljno informacija o prisutnim materijalima i njihovom stanju očuvanosti. [31,45]. Neinvazivne tehnike (koje ne zahtevaju uklanjanje originalnog materijala) mogu biti koristan alat za dobijanje preliminarnih informacija „skeniranjem“ površine slike. Na taj način se identifikuju površine najbogatije organskim supstancama, što je veoma važno ukoliko se analiziraju veziva i lakovi.

Uzorak bojenog sloja je veoma mali, često višeslojni fragment (manji od 0.5 mg), kompleksnog sastava i strukture. Organsko vezivo prisutno je u količini od 10 % ili manje [12,339,340]. U literaturi se malo informacija može naći o količini uzorka koja je potrebna za analizu proteinskih veziva, zbog poteškoća prilikom merenja ekstremno malih uzoraka. Generalno, smatra se da je 100 µg bojenog sloja dovoljno za analizu [149], ali neki autori [272] tvrde da je 5 µg uzorka bojenog sloja minimalna količina uzorka neophodna za pouzdanu identifikaciju proteinskih veziva sa dovoljnim brojem značajnih peptida. Masa uzoraka istorijskih slika koji su analizirani tokom izrade ove doktorske disertacije bila je od 100 – 500 µg, što znači da količina proteinskih veziva u uzorcima nije bila veća od 10 – 50 µg. Uzorci su bili previše mali da bi mogli biti precizno izmereni pomoću analitičke vage.

Tokom rada na ovoj doktorskoj disertaciji analizirani su uzorci pravoslavnih ikona iz XIX veka prikupljeni tokom ispitivačkih radova na ikonostasu crkve Pokrova Presvete Bogorodice u Bariču i ikonostasu crkve Blagovesti Presvete Bogorodice u Idvoru, kako bi se potvrdila uspešnost predložene metode za identifikaciju proteinskih veziva.

Ikonostas crkve Pokrova Presvete Bogorodice u Bariču (Slika 3.1) ukrašen je ikonama koje su prenete iz crkve Svetog Petra i Pavla u Topčideru, nastalim u periodu od 1834. do 1838. godine. Ikone su radovi trojice vrhunskih slikara iz vremena vladavine

kneza Miloša Obrenovića. Konstantin Lekić autor je prestonih ikona Hrista i Bogorodice, izvedenih u maniru baroka. Praznične i apostolske ikone naslikao je Janja Stergević Moler, kao i dve ikone iz sokla: Pranje nogu i Judin poljubac. On je pripadnik poznog zografskog slikarstva, prepoznatljivog pod uticajem nastupajućeg baroka. Carske dveri na kojima je predstava Blagovesti i severne i južne dveri sa Arhidakonom Stefanom i Arhanđelom Mihailom naslikao je Dimitrije Jakšić. On je autor i Raspeća sa Svetim Jovanom Bogoslovom i Bogorodicom. Slikarstvo Dimitrija Jakšića obiluje baroknim i klasicističkim uticajima [341].



Slika 3.1. Ikonostas crkve Pokrova Presvete Bogorodice u Bariču

Ikonostas crkve Blagovesti Presvete Bogorodice u Idvoru (Slika 3.2) je razvijenog tipa, izveden u duhu neoklasicizma, raskošno rezbaren, sa ikonama iz 1877. godine čiji je autor Steva Todorović, jedan od najznačajnijih predstavnika srpskog romantizma. Idvorski ikonostas u Todorovićevom opusu predstavlja religioznu celinu koja se ikonografski i likovno nadovezuje na njegovo ogromno iskustvo i neizmeran

slikarski talenat, dok su predstave istorijskih ličnosti i scena, nastale pod uticajima austrijskih i nemačkih slikarskih radionica tog žanra. Prilikom oslikavanja ovog ikonostasa, pomagala mu je supruga Poleksija [342].



Slika 3.2. Ikonostas crkve Svetih Blagovesti u Idvoru

Opis analiziranih uzoraka dat je u Tabeli 3.2. Sa ikonostasa Baričke crkve analizirano je sedam uzoraka (uzorci sa oznakom B), a sa ikonostasa crkve u Idvoru jedan (uzorak I1). Slojevi boje bili su veoma tanki i lomljivi. Ljuspice bojenog sloja uzorkovane su sa ivica već oštećenih regija uz pomoć skalpela, pre bilo kakvih konzervatorskih tretmana. Uzorci su smešteni u čiste posudice, označeni i sačuvani za analizu.

Tabela 3.2. Opis analiziranih uzoraka uzetih sa starih slika

Uzorak	Opis	
B4	Prestona ikona Isus Hrist	Bojeni sloj, siva pozadina
B8	Sveti Teodor Tiron	Bojeni sloj, oker pozadina
B15	Prestona ikona Bogorodica sa Hristom	Bojeni sloj, siva pozadina
B16	Sveti Jovan Krstitelj	Bojeni sloj, zelena pozadina
B17	Tri Srpska svetitelja – Sveti Arsenije, Sveti Arhiepiskop Sava i Sveti Simeon	Bojeni sloj, zelena pozadina
B18	Tri Srpska svetitelja – Sveti Arsenije, Sveti Arhiepiskop Sava i Sveti Simeon	Bojeni sloj, crvena bordura
B19	Tri Srpska svetitelja – Sveti Arsenije, Sveti Arhiepiskop Sava i Sveti Simeon	Bojeni sloj, bela sa pozlatom
II	Prestona ikona Isus Hrist crkva Svetih Blagovesti u Idvoru	Bojeni sloj, braon pozadina

3.3 ENZIMSKA HIDROLIZA

Rastvaranje vekovima starih, degradiranih i umreženih proteinskih veziva može predstavljati veoma izazovan zadatak prilikom primene standardnih metoda proteomike za identifikaciju proteina u umetničkim delima. Tokom izrade ove doktorske disertacije, za pripremu referentnih uzoraka za analizu primenjen je tipičan postupak hidrolize proteina koji se primenjuje u proteomici. Taj postupak uključuje tretiranje proteina jakim denaturacionim sredstvima, raskidanje disulfidnih veza i alkilovanje cisteinskih nastavaka. Redukcija disulfidnih veza pomoću DTT (45 mM, konačna koncentracija 9 mM) u prisustvu uree (8 M) u AMBIC puferu (40 mM, pH 8.2) uz inkubaciju 30 min na 50 °C, praćena je karboksimetilovanjem jodsirćetnom kiselinom (100 mM, konačna koncentracija 16.7 mM) u mraku, na sobnoj temperaturi tokom 30 min. Polazne koncentracije proteina bile su 1 mg/mL. Nakon razblaživanja uzoraka, kako bi se postigla koncentracija uree niža od 2 M, AMBIC puferom, u alikvot uzoraka od 100 µL dodat je tripsin (10 µg/mL) i uzorci su inkubirani na 37°C tokom 16 sati. Svi uzorci su podeljeni na dva dela. Reakcija je zaustavljena snižavanjem pH na oko 2 dodavanjem mravlje kiseline, delu uzorka koji će biti analizirani putem LC-MS/MS, odnosno TFA delu uzorka

koji je analiziran pomoću MALDI-TOF MS. Nakon uklanjanja soli ZipTip mikro nastavcima, uzorci su adekvatno razblaženi i analizirani.

Opisani postupak pokazao se kao suviše komplikovan za primenu na uzorcima starih slika, jer nosi rizik od gubitka materijala i prevelikog razblaženja usled dodatka uree. Na početku postupka dodaje se urea u koncentraciji od 8 mol/L, ali neposredno pre dodatka tripsina njena koncentracija mora biti manja od 2 mol/L, kako ne bi došlo do denaturacije enzima. Kako je koncentracija proteinskog materijala u uzorcima starih slika veoma mala, postojala je realna opasnost da, primenom ovog postupka, proteini neće biti uspešno identifikovani. Zato je skraćena i pojednostavljena procedura, slična postupcima već objavljivanim u literaturi [64,229,273,274] i testirana na model uzorcima. Hidroliza je izvedena u heterogenoj fazi, bez prethodne ekstrakcije proteina, inkubacijom čvrstog uzorka na 37°C tokom 16 sati, u 100 µL AMBIC pufera (40 mM, pH 8.2), koji sadrži tripsin u koncentraciji 10 µg/mL. Supernatant je odvojen nakon 15 minuta centrifugiranja, a digestija zaustavljena zakišeljavanjem uzoraka mravljom kiselinom ili TFA, zavisno od daljeg postupka analize. Svi koraci pripreme uzorka izvedeni su u istoj Ependorf tubi čime je smanjen rizik gubitka materijala. Pošto je ovaj postupak pripreme uzoraka omogućio identifikaciju proteina u model uzorcima, primenjen je i na uzorke bojenog sloja sa pravoslavnih ikona ikonostasa crkve u Bariču i Idvoru.

3.4 UKLANJANJE SOLI I PREČIŠĆAVANJE UZORAKA

Pre analiziranja primenom masene spektrometrije, rastvori hidrolizovanih proteina, koji sadrže slobodne peptide koncentrovani su i prečišćeni pomoću ZipTip mikro nastavaka za automatsku pipetu (Millipore, Bedford, MA, USA) koji sadrže C18 reversnu stacionarnu fazu. Peptidi iz rastvora vezuju se za punjenje mikro kolone, dok se mali molekuli poput soli i sredstava za denaturaciju ispiraju. Prečišćavanje rastvora peptida pre analiziranja izuzetno je važno i kod MALDI-TOF i kod LC-MS metodologije. Soli i mali molekuli prisutni u rastvorima peptida sprečavaju formiranje kristala peptida i matriksa prilikom nanošenja rastvora na MALDI ploču i na taj način ometaju analizu. Takođe, u spektru se mogu pojaviti pikovi adukata peptida i natrijumovih ili amonijum jona, što znatno otežava njihovo tumačenje i identifikaciju peptida. Kod LC-MS tehnike

ove nečistoće ometaju proces jonizacije, prljaju kolonu i znatno usložnjavaju spektre. Još jedna prednost primene postupka prečišćavanja je mogućnost koncentrovanja peptida ispiranjem sa kolone minimalnim zapreminama rastvarača. Prečišćavanjem uzoraka ZipTip nastavcima odstranjuju se i suspendovane čestice eventualno prisutne u rastvoru, što je veoma značajno kod tečno-masene hromatografije. Glavni nedostatak je ograničeni kapacitet mikrokolone, koja može vezati ukupno 5 µg peptida.

Sam postupak prečišćavanja počinje kondicioniranjem mikro kolone čistim acetonitrilom i ekvibracijom 0.1% mravljom kiselinom ili TFA kako bi peptidi mogli da se vežu za stacionarnu fazu. Nakon vezivanja peptida na koloni uvlačenjem rastvora uzorka nekoliko puta, kolone se ispiraju 0.1% mravljom kiselinom (uzorci koji se analiziraju pomoću LC-MS) ili TFA (uzorci koji se analiziraju pomoću MALDI-TOF). Peptidi se eluiraju sa kolone u dva koraka, 0.1% mravljom kiselinom u acetonitrilu (1:1, v:v) i čistim acetonitrilom. Eluat je sakupljen u istu Ependorf kivetu, a uzorci predviđeni za analizu na LTQ-Orbitrapu razblaženi 10 puta dejonizovanom vodom (referentni materijali i model uzorci razblaženi su 50 puta) i injektovani na kolonu. Uzorci analizirani MALDI-TOF, prečišćeni su na isti način, pomešani sa rastvorom matriksa, 2,5-dihidroksibenzojeve kiseline u odnosu 1:2 i naneti na MALDI ploču. Koncentracija matriksa u smeši acetonitrila i 1%TFA (u odnosu 1:2, v/v) bila je 15 mg/mL. Kada se uzorci osuše i kristališu na ploči, stabilni su nekoliko nedelja, ako se čuvaju u suvim uslovima i van domašaja svetlosti, tako da se isti uzorak po potrebi može više puta analizirati.

3.5 INSTRUMENTI I APARATURE

3.5.1 MALDI-TOF/TOF

Uzorci su analizirani na Autoflex III Smartbeam MALDI-TOF masenom spektrometru (Bruker Daltonics, Germany), kojim se upravlja preko softvera FlexControl v3.3. Maseni spektrometar opremljen je 355 nm azotnim laserom za jonizaciju uzoraka. Spektri su snimljeni pomoću tehnologije odložene ekstrakcije (*delayed extraction*) u pozitivnom refleksionom modu. Svaki spektar je prosek 200 impulsa lasera (*laser shots*)

kako bi se poboljšao odnos signala i šuma (S/N). Parametri napona podešeni su na način dat u Tabeli 3.3. Vreme odložene ekstrakcije podešeno je na 10 ns, a opseg m/z vrednosti 500-4000 Th. Eksterna kalibracija visoke preciznosti (HPC) rađena je svakoga dana pomoću komercijalne smeše peptida.

Tabela 3.3. Parametri napona MALDI-TOF masenog spektrometra

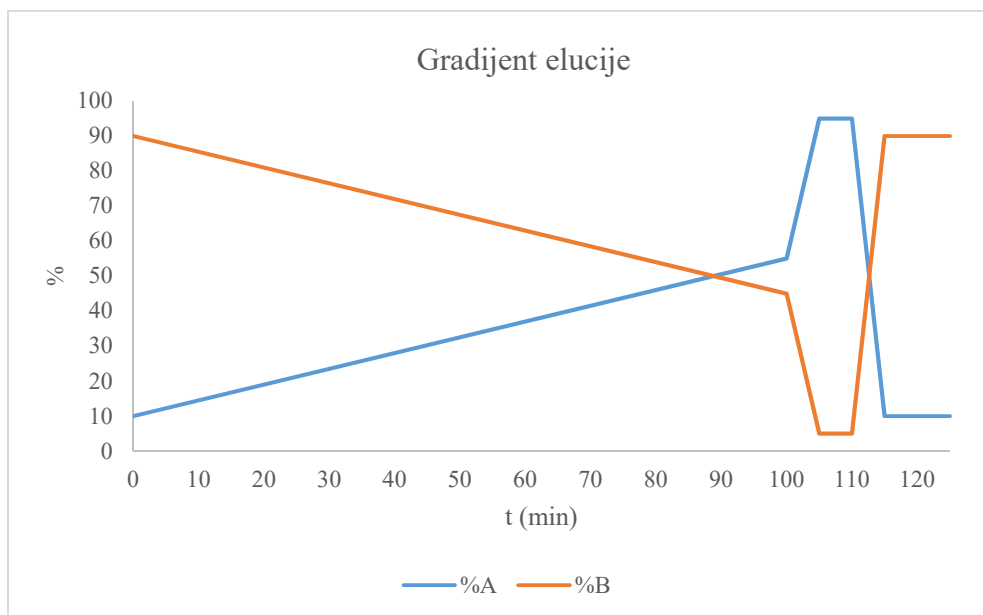
PMF		LIFT (MS/MS)	
Jonski izvor 1	19.0 kV	Jonski izvor 1	6.0 kV
Jonski izvor 2	16.7 kV	Jonski izvor 2	5.3 kV
Sočivo (<i>Lens</i>)	8.5 kV	Sočivo (<i>Lens</i>)	3.0 kV
Reflektor 1	21.0 kV	Reflektor 1	27.0 kV
Reflektor 2	9.7 kV	Reflektor 2	11.45 kV
		LIFT 1	19.0 kV
		LIFT 2	4.4 kV

Prvo su snimani PMF spektri uzoraka, a zatim su sa iste MALDI ploče snimani i LIFT tandem maseni spektri najintenzivnijih jona koji se javljaju u PMF spektrima. Analize su izvedene u pozitivnom LIFT modu. Opseg selekcije prekursor jona (PCIS) bio je 0.65% zadate mase jona. Parametri napona prikazani su u Tabeli 3.3. Za prekursor jone akumulirano je 200 pulseva lasera, dok je 500 pulseva akumulirano za fragmentaciju.

3.5.2 LC-ESI-LTQ-Orbitrap

Hromatografsko razdvajanje izvedeno je pomoću Surveyor sistema za tečnu hromatografiju (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA) spojenog sa ESI izvorom masenog spektrometra. Autosemplerom je naneto 20 μ L rastvora uzoraka na komercijalnu reversno-faznu C18 kolonu (Zorbax 300 SB C18 USP1 narrow bore 2.1 \times 150 mm, 5 μ m; Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Rastvarač A (0.1% mravlja kiselina u acetonitrilu) i rastvarač B (0.1% mravlja kiselina u vodi) korišćeni su kao mobilna faza. Tokom preliminarnih testova optimizovan je gradijent elucije, kako bi se postiglo zadovoljavajuće razdvajanje peptida uz razumno trajanje analize. Primenjen je

sledeći gradijent uz konstantan protok mobilne faze od 200 $\mu\text{L}/\text{min}$: 10-55% rastvarača A (tokom 100 min), 55-95% A (od 101 do 105 min), 95% A (od 106 do 110 min). Kao priprema za sledeću analizu, gradijent od 95% do 10% rastvarača A primenjen je tokom 5 min i kolona je ekvilibrisana 10 min sa 10% rastvarača A (Slika 3.3).



Slika 3.3. Gradijent primenjen za eluiranje peptida sa kolone

Eluirani peptidi putem elektrospreja ulaze u maseni spektrometar ultra-visoke rezolucije LTQ-Orbitrap XL (hibrid, 2D ion trap-Orbitrap) (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) gde su analizirani u pozitivnom ESI modu [245]. Parametri rada instrumenta i snimanja spektara kontrolisani su pomoću Xcalibur 2.0.7 i Tune 2.4 softvera (Thermo Fisher Scientific). Opšti maseno spektrometrijski uslovi bili su podešeni na sledeći način: napon elektrospreja 3.8 kV, *tube lens offset* 100 V, temperatura kapilare 275 °C, napon kapilare 40 V, protok zaštitnog i pomoćnog gasa (u oba slučaja azot) 45 i 15 arbitrarnih jedinica. Maseni spektri snimljeni su u *data-dependent* modu koji automatski prebacuje između Orbitrap-MS i LTQ-MS/MS skeniranja. Maseni spektri celog opsega (*full scan*, m/z 180–2000) snimani su pomoću Orbitrap analizatora uz teorijsku rezoluciju od 60000 pri odnosu m/z 400. Dva najintenzivnija dvostruko ili trostruko naelektrisana jona, čiji je intenzitet bio iznad 500, izolovana su uz toleranciju mase od ± 2 Da i fragmentisana koliziono indukovanom disocijacijom (CID). Fragmentacija je izazvana u jonskoj zamci (LTQ) sa helijumom kao kolizionim gasom i

normalizovanom kolizionom energijom od 35%, aktivacijom $q = 0.25$ i aktivacionim vremenom od 30 ms. Dobijeni fragment joni snimljeni su u centroid modu sa jednim mikro-skenom na LTQ uređaju uz rezoluciju mase od 7500 (FWHM). Maksimalno vreme injektovanja jona podešeno je na 200000 ms. AGC (engl. *automatic gain control*) podešen je na 300000 i u MS i u MS/MS modu snimanja da bi se sprečilo da se jonske zamke prepune. Za internu kalibraciju u realnom vremenu korišćen je signal pozadinskog jona m/z 214,089625 koji odgovara protonizovanom N-butilbenzen sulfonamidu $C_{10}H_{16}O_2NS^+$, kao *lock mass* (engl.) i u MS i u MS/MS modu [343].

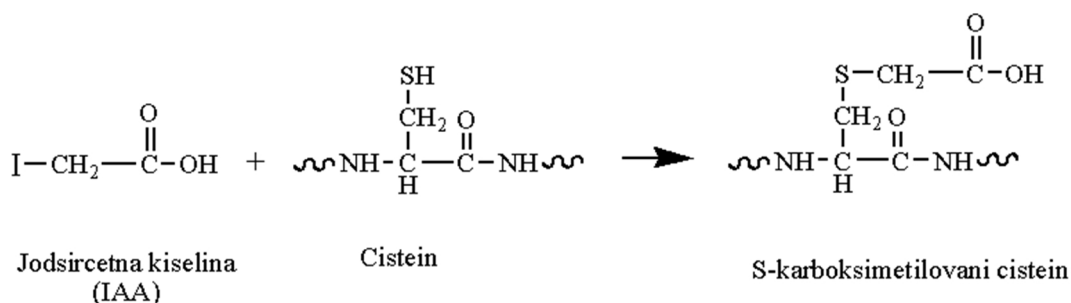
3.6 OBRADA REZULTATA

3.6.1 Parametri pretrage baze podataka za MALDI-TOF/TOF podatke

Sirovi maseni spektri snimljeni na MALDI-TOF instrumentu obrađeni su pomoću softvera FlexAnalysis v3.3 (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany). PMF spektri i TOF/TOF tandem maseni spektri su prečišćeni i korigovana im je bazna linija pomoću opcija *smooth* i *baseline-subtract*. SNAP algoritam primenjen je za detekciju monoizotopskih pikova, uz faktor praga kvaliteta (*quality factor threshold*) 30. Prag odnosa signala i šuma (*S/N threshold*) podešen je na 6 za MS i 3 za MS/MS spektre. BioTools 3.2 softver (Bruker Daltonics GmbH), povezan sa Mascot pretraživačem (*Mascot Search engine*), korišćen je za pretragu SwissProt baze podataka (verzija SwissProt_2012_03; 428650 sekvenci) [231]. PMF spektri pretraživani su pojedinačno i zajedno sa pripadajućim LIFT tandem masenim spektrima. Parametri pretrage optimizovani su iteracijom. Dozvoljena je tolerancija mase 50-150 ppm za PMF, odnosno 50-150 ppm i 0.6-0.8 Da za MS/MS pretraživanje baze, zavisno od preciznosti snimljenih spektara. Svi tandem maseni spektri pretraživani su u odnosu na seriju jona karakterističnih za MALDI-TOF/TOF koje podrazumeva Mascot (a, a-17, a-18, b, b-17, b-18, y, y-17, y-18, imonijum i interni yb i ya joni ispod 700 Da). Uzeto je da je naelektrisanje jona +1, biološke vrste su ograničene na *Metazoa*, a u pogledu izoelektrične tačke i mase proteina nisu postavljena ograničenja, jer proteini nisu prethodno elektroforetski razdvajani. Broj preskočenih mesta enzimskog cepanja podešen je na 1, u modu tolerantnom na greške (engl. *error tolerant mode*).

Važno je napomenuti da su proteinska veziva podložna procesima starenja koji su ubrzani prisustvom nekih katalitičkih pigmenata [261,344,345]. Zato su česte post-translacione modifikacije aminokiselinskih ostataka u proteinskim vezivima. Najčešće dolazi do oksidacije, deamidacije, gubitka vode i, u nekim slučajevima, hidrolitičke degradacije koja vodi skraćivanju lanca proteina. Na primer, deamidacija je spontana neenzimatska modifikacija proteina koja rezultuje promenom mase peptida od +0.984 Da. Leo *et al.* utvrdili su da je deamidacija asparagina i glutamina glavna modifikacija usled propadanja/starenja kazeina i kolagena u zidnim slikama i sugerisali da ova modifikacija može služiti kao merilo starosti umetničkog dela [65]. U sličnoj studiji starost muzejskih tekstila od ovčije vune (*Ovis Aries*) procenjena je na osnovu stepena deamidacije, koji je određen putem MALDI-TOF-MS [346].

Da bi peptidi bili adekvatno identifikovani, moraju se definisati fiksne i varijabilne modifikacije u procesu pretraživanja baze podataka. Varijabilne modifikacije, koje mogu, ali ne moraju biti prisutne u analiziranim peptidima, su najčešće prirodne, poput oksidacije metionina ili hidroksilacije prolina. One znatno opterećuju proces pretraživanja baze proteina i produžavaju vreme trajanja pretrage, pa moraju biti pažljivo odabrane. Fiksne modifikacije, su modifikacije za koje se smatra da su prisutne na svim ostacima pojedinih aminokiselina, u svim peptidima, usled primene određenih reagenasa prilikom pripreme uzoraka. One se definišu kao parametar pretrage kada su peptidi modifikovani u toku pripreme uzoraka i ne produžavaju vreme pretrage. Primer je karbamidometilovanje ili karboksimetilovanje cisteina, kada program za pretraživanje automatski dodaje masu +57 odnosno +58 za svaki cisteinski ostatak u peptidu, zbog razlike u masi koja se javlja nakon modifikacije (Slika 3.5).



Slika 3.4. Karboksimetilovanje aminokiselinskog ostatka cisteina pomoću jodsirćetne kiseline

Prilikom pretrage baze podataka za setove podataka snimljene tokom izrade ove doktorske disertacije, razmatrane su različite moguće PTM. Kao varijabilne modifikacije uzete su u obzir oksidacija metionina, lizina i prolina, N-terminalno acetilovanje, fosforilacija serina i treonina i deamidacija asparagina, dok je karboksimetilovanje cistena smatrano fiksnom modifikacijom samo u setovima podataka referentnih materijala. Takođe, kada je kod PMF spektara bilo moguće, poređene su m/z vrednosti tripsinskih peptida referentnih i uzoraka pravoslavnih ikona, kako bi se potvrdilo prisustvo nekih modifikacija dobijenih pretragom baze sekvenci.

MOWSE skor verovatnoće, koji pokazuje da je dobijeno poklapanje između eksperimentalnog seta podataka i svakog unosa sekvence u bazi podataka slučajni događaj na nivou verovatnoće $p = 0.05$, korišćen je kao kriterijum uspešne identifikacije [343]. Skorovi su prikazani kao $-10\log_{10}(P)$, gde je P verovatnoća da je poklapanje slučajno. Najviši skor ukazuje na poklapanje sa najnižom verovatnoćom. Prag identifikacije je obično MOWSE skor oko 70 za PMF i 30–40 za MS/MS identifikaciju. Da li je najbolje poklapanje statistički značajno zavisi od kvaliteta snimljenog spektra i veličine baze koja se pretražuje. Ponekad, ako je kvalitet snimljenog spektra loš, poklapanje može imati relativno visok skor, koji ipak ne prelazi prag značajnosti. To se prepoznaje po dobroj odvojenosti skora poklapanja od raspodele slučajnih skorova. Ovaj relativno visoki prag naziva se prag homologije (*homology threshold*), dok se viši prag naziva prag identifikacije (*identity threshold*). Prag homologije, ali ne i identifikacije, može biti zadovoljen i u slučajevima kada u bazi podataka nedostaju sekvence proteina tražene biološke vrste, već se identifikacija postiže na osnovu sličnosti sa sekvencama srodnih bioloških vrsta koje se nalaze u bazi proteina. Primer su kolageni i o tome će više biti reči kasnije.

Kada je više od jednog peptida pripisano istom proteinu, čak i sa nižim MOWSE skorovima, verovatnoća na osnovu koje se skor računa opada, pa dobijeni rezultat postaje pouzdaniji. U idealnom slučaju, ispravan rezultat je u isto vreme i najbolje i značajno poklapanje [231].

3.6.2 Parametri pretraga baze podataka za LC-MS/MS podatke

LC-MS/MS datoteke sadrže i po nekoliko hiljada pojedinačnih MS/MS spektara od kojih većina odgovara po jednoj eluiranoj komponenti. Spektri koji odgovaraju istoj komponenti su česti, a javljaju se i spektri koji nisu posledica fragmentacije peptida. Datoteke snimljene za referentne i model uzorke, analizirane tokom izrade ove doktorske disertacije, imale su u proseku oko 2500 tandem masenih spektara. Datoteke analiziranih uzoraka ikona bile su nešto manje, zbog male koncentracije proteina u uzorcima, i sastojale su se od oko 1000 MS/MS spektara.

Maseni spektari snimljeni pomoću ESI-LTQ-Orbitrap instrumenta obrađeni su korišćenjem Mascot Distiller v2.5.1.0 (64-bit) softvera (Matrix Science Ltd; London) i konvertovani u MGF (*Mascot Generic Files*) kako bi mogli biti pretraživani u odnosu na bazu proteina. Za pretraživanje SwissProt baze sekvenci (SwissProt 2014_01; 542258 sekvenci) korišćen je isti softver, povezan sa Mascot serverom [231]. Dozvoljena je tolerancija mase od 2 ppm za prekursor jone i 0.1 Da za fragmentacione jone. Svi tandem maseni spektari su pretraživani u odnosu na set jonskih serija karakterističnih za ESI-IonTrap u Mascot-u. Dozvoljena su neelektrisanja jona +2, +3 i +4, biološke vrste su ograničene na *Metazoa* i nisu postavljana ograničenja izoelektrčne tačke i mase proteina. Broj mogućih preskočenih mesta raskidanja peptidne veze podešen je na 1, dok su oksidacija lizina i prolina, acilovanje N-terminalnog kraja proteina, fosforilacija serina i treonina i deamidacija asparagina i glutamina razmatrane kao varijabilne modifikacije. Karboksimetilovanje cisteina uzeto je kao fiksna modifikacija u spektrima referentnih materijala. Prva pretraga uvek je rađena uz izbor opcije “*error-tolerant*”, kako bi se identifikovale i druge moguće modifikacije ili degradacije peptida. Zavisno od rezultata, u drugoj pretrazi uključivane su eventualno i ređe PTM kao varijabilne, ukoliko su rezultati prve pretrage na to ukazivali.

4 REZULTATI I DISKUSIJA

4.1 ANALIZA PROTEINSKIH VEZIVA MALDI-TOF MASENOM SPEKTROMETRIJOM

U toku izrade ove doktorske disertacije primenjena su dva pristupa za identifikaciju proteina: otisak prsta proteina na osnovu masa peptida (*peptide mass fingerprint*, PMF), kojom se izmerene mase peptida porede sa teorijskim masama peptida izračunatim na osnovu *in silico* digestije proteina, i pretraživanje baze teorijskih fragmentacionih (MS/MS) spektara peptida.

PMF spektri proučavanih veziva snimljeni su pomoću MALDI-TOF masene spektrometrije. Mase peptida detektovane u PMF spektrima pretraživane su pomoću Mascot pretraživača u odnosu na SwissProt bazu sekvenci i na osnovu toga rezultatima su dodeljeni skorovi. Pored vrednosti masa, za pretragu su korišćeni i intenziteti pikova, kako bi se poboljšala specifičnost identifikacije. Liste pikova ograničene su na opseg 800-3000 Da, jer se veliki broj pikova koji potiču od soli i klastera matriksa DHB nalaze u regionu niskih masa, dok su pikovi iznad 3000 Da tipični za peptide koji imaju preskočena mesta enzimskog cepanja.

PMF metoda ima mnoge prednosti, kao što je visoka osetljivost (granica detekcije reda femtomola), mala količina uzorka potrebna za analizu (0.5 µg - 0.5 g), piprema uzoraka je jednostavna i relativno brza i moguća je identifikacija tipova proteinskih veziva u smešama [229,253,258,348,349]. Ipak, prisutne su i neke mane [229, 255, 349]:

- neophodna je sofisticirana postavka instrumenta;
- poželjno je formirati bazu referentnih proteinskih veziva;
- usled interakcije sa pigmentima dejstvo tripsina može biti inhibirano;

- peptidi su okarakterisani jedino masom i intenzitetom pika, pa se identifikacija zasniva samo na njihovom poređenju sa teorijskim masama peptida.

Najbolje rezultate PMF analiza daje u slučaju pojedinačnih proteina ili jednostavnih smeša, dok kompleksni i kontaminirani uzorci, kakvi su proteinska veziva mogu predstavljati problem. PMF analiza nekih uzoraka u ovoj studiji nije imala najbolji učinak i u takvim slučajevima MS/MS pristup bio je od izuzetne pomoći. MALDI-TOF/TOF omogućava snimanje tandem masenih spektara u istoj tački na MALDI ploči gde je snimljen i PMF spektar. Snimanjem tandem masenih spektara povećava se količina informacija dostupna za dati peptid. Oni sadrže specifičan šablon fragmentacije peptida na osnovu koga se može utvrditi njegova tačna sekvenca. Jednostruko naelektrisani peptidi u MALDI izvoru skloni su fragmentaciji na specifičnim mestima. Joni dobijeni fragmentacijom ovih peptida su najčešće y-, b- i a-joni, praćeni jonima nastalim usled gubitka neutralnog molekula amonijaka ili vode. Dobijeni fragmenti imaju različite intenzitete u skladu sa afinitetom određenih peptidnih veza prema fragmentaciji i mestom na kome se nalazi naelektrisanje. Joni dobijeni preferencijalnim cepanjima peptidnih veza su dominantni u MS/MS spektrima. U MALDI izvoru jednostruko naelektrisani peptidi imaju posebnu sklonost ka cepanju peptidne veze na C-terminalnom kraju asparaginske i glutaminske kiseline i N-terminalu prolina [350]. Preferencijalna cepanja smanjuju količinu informacija u tandem masenim spektrima usled čega se obično ne mogu detektovati kompletne serije y-iona, pa neke informacije o sekvenci mogu izostati. Pretraga masa fragment jona povećava verovatnoću identifikacije proteina uz manji broj detektovanih peptida. To je od posebne važnosti kod identifikacije proteinskih veziva u starim slikama gde procesi starenja i degradacije značajno smanjuju mogućnost nalaženja nakon hidrolize velikog broja nepromenjenih peptida, što je preduslov uspešne PMF analize.

LC-MS/MS podaci mogu sadržavati stotine i hiljade fragmentacionih spektara u jednoj datoteci i vreme snimanja može biti veoma dugo, kao i filtriranje podataka i uklanjanje neželjenih fragmentacionih spektara. U poređenju sa tim, MALDI-TOF MS i MS/MS spektri snimaju se pojedinačno, a mogu kombinovati u jedinstvenu datoteku, čime je olakšana obrada spektara i pretraga baze proteina. Fragmentacioni spektri mogu

se snimati i nekoliko puta dok se ne postigne željeni kvalitet spektra. Identifikacija proteina može se postići za veoma kratko vreme snimanjem fragmentacionih spektara i pretragom baze za mali broj karakterističnih peptida utvrđenih na osnovu PMF analize. PMF analiza bez MS/MS potvrde može ponekad biti nesigurna ili dovesti do pogrešnih zaključaka, kao što se može videti iz nekih primera u okviru ovog istraživanja (kompletni podaci dati su u Prilogu 1), ali i iz literature [229,253,258,260].

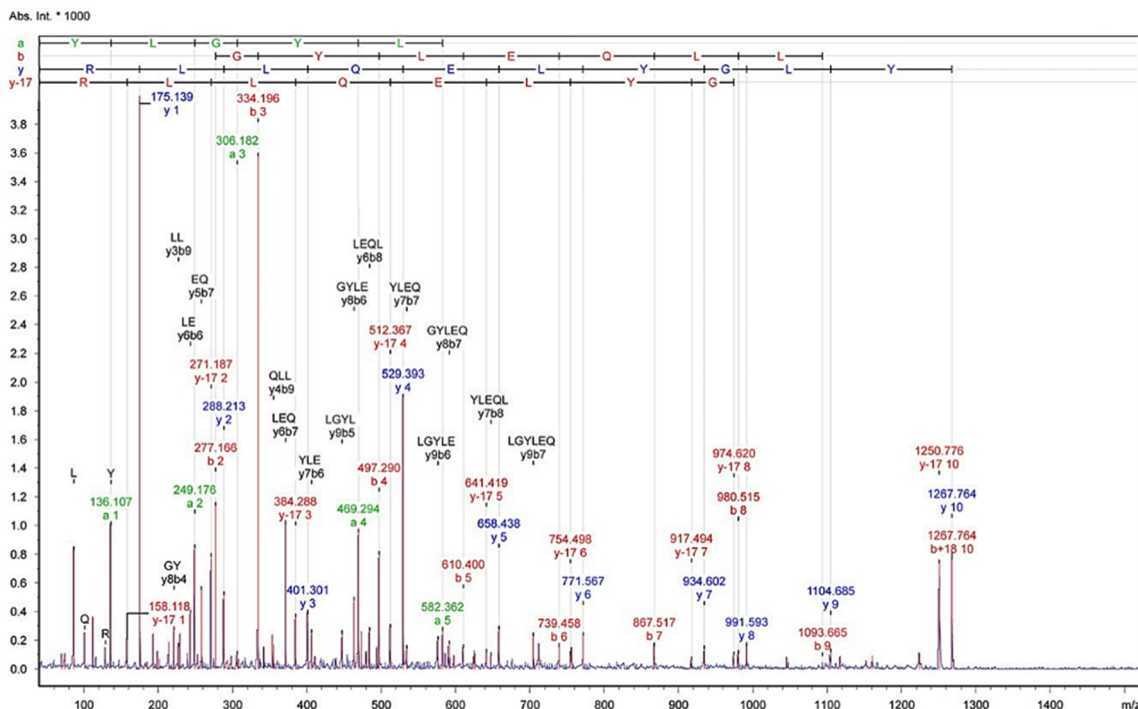
Tandem maseni spektri snimljeni tokom izrade ove doktorske disertacije pomoću MALDI-TOF/TOF masene spektrometrije podvrgnuti su pretrazi baze podataka kao kombinovane datoteke koje se sastoje od PMF spektra uzorka i pripadajućih LIFT-MS/MS spektara. U obzir su uzeti samo fragmentacioni spektri dobrog kvaliteta, čiji je odnos signala i šuma zadovoljavao zadate kriterijume, kako bi se izbegli lažno pozitivni rezultati. Kao povratna informacija dobijeni su ukupni skorovi identifikovanih proteina, kao i skorovi pojedinačnih jona podvrgnutih fragmentaciji. Pojedinačni PMF ili LIFT spektar mogu imati nizak MOWSE skor verovatnoće koji ukazuje da je dobijeno poklapanje možda slučajni događaj. Ipak, pretragom kombinovanih spektara u odnosu na bazu sekvenci proteina dobijeni su značajniji skorovi, jer se ukupni skorovi proteina računaju na osnovu skorova peptida. Oni su suma najviših skorova svake pojedinačne sekvence, isključujući višestruka poklapanja. Prilikom izračunavanja ukupnih skorova proteina primenjuje se mala korekcija, kako bi se umanjio uticaj slučajnih poklapanja koja imaju niske skorove [231]. Na osnovu dobijenih rezultata formira se lista proteina rangiranih prema skorovima. Što je skor proteina veći, verovatnoća da je poklapanje slučajno je manja. Ako više tandem masenih spektara identifikuje peptide iz istog proteina, ali su individualni skorovi peptida ispod zadatog praga verovatnoće, ukupni skor i dalje može rangirati protein visoko na listi. Ovde je kao kriterijum identifikacije peptida uzeto da pojedinačni skor jona mora biti viši od granične vrednosti koju Mascot smatra pokazateljem identiteta ili ekstenzivne homologije (oko 30-40).

U referentnim materijalima nisu nađene sve sekvence peptida koji su identifikovani u model uzorcima i obrnuto. Brojni razlozi doprineli su tome, od kojih su najčešći prisustvo posttranslacionih modifikacija i degradacije, kao i promene strukture usled starenja, što može imati za posledicu izostanak pojedinih peptida ili promenu

njihovih odnosa m/z . U spektrima mogu biti prisutni pozadinski pikovi i kontaminacije (npr. pikovi od keratina).

Najčešće posttranslacione modifikacije koje su se javljale u rezultatima model uzoraka i uzoraka analiziranog bojenog sloja su: oksidacija u vezivima na bazi kolagena (promena mase +16 Da), fosforilacija (+80 Da) u proteinima mleka i acilovanje N-terminala peptida. U pojedinim peptidima identifikovana je i deamidacija glutamina i asparagina, PTM koja izaziva malu promenu mase (+0.984 Da) i može se poklopiti sa izotopskom raspodelom. Neočekivane ili manje frekventne modifikacije uključene su u rezultate Mascot pretrage izborom opcije *error tolerant*. U slučaju nekih modifikacija, kakva je fosforilacije serina i treonina u proteinima mleka, nema mnogo mesta u peptidu gde se može naći, pa je, uz dobre podatke, bilo moguće utvrditi tačan položaj modifikovanih ostataka. Suprotno tome, peptidi kolagena bogati su prolinom koji je podložan hidroksilaciji. Zato pretraživač najčešće predlaže više varijanti takvih peptida, u kojima se PTM nalaze na različitim pozicijama. Utvrđivanje tačnog rasporeda PTM veoma je teško ili čak nemoguće.

Na Slici 4.1 prikazan je primer fragmentacionog spektra snimljenog za model uzorak koji sadrži vezivo na bazi kravljeg sira i cink-oksida (7M11).



Slika 4.1. MS/MS spektar jona peptida m/z 1267.764

Utvrđeno je da navedeni fragmentacioni spektar jona m/z 1267.764 odgovara peptidu YLGYLEQLLR iz alfa-S1-kazeina (CASA1_BOVIN). U ovom spektru identifikovana je kompletna serija y-jona, kao i b₂–b₉ i a₁–a₅ fragment joni. Skor jona od 81 (granična vrednost identifikacije u ovom slučaju bila je veća od 39) dobijen je zahvaljujući poklapanju 46 od 133 fragment jona korišćenjem 42 najintenzivnija pika. To znači da je na osnovu 42 najintenzivnija pika dobijena najniža verovatnoća da je poklapanje slučajan događaj, odnosno najviši skor jona. Ostali pikovi u spektru nisu uzeti u obzir. Tokom fragmentacije peptida u MALDI izvoru mogu se javiti sekundarni gubici, na primer gubitak molekula amonijaka i vode [351]. U slučaju peptida YLGYLEQLLR utvrđena je skoro kompletna serija y-17 fragmentacionih jona (uz izuzetak jona y-17 9), koji nastaju odvajanjem neutralnog molekula amonijaka od y-jona.

4.1.1 Analiza referentnih uzoraka MALDI-TOF masenom spektromerijom

Rezultati pretrage baze sekvenci za PMF spektre uzorka belanceta ukazuju na prisustvo 4 proteina – ovalbumin, ovotransferin, lizozim C i protein Y povezan sa

ovalbuminom, pri čemu prva imaju visoke MOWSE skorove i dobre pokrivenosti sekvence (redom 71%, 32%, 39% i 11%). Analizom tandem masenih spektara identifikovano je 15 peptida ovalbumina, od kojih 11 ima skorove iznad 38 (pokazatelj identiteta ili ekstenzivne homologije na nivou verovatnoće $p > 0.05$). Ukupan dobijeni skor za ovalbumin na osnovu tandem masenih spektara je 961, dok je za PMF spektar 149. Prisustvo ovotransferina je potvrđeno na osnovu 9 identifikovanih peptida i skora proteina 177. Lizozim i protein Y povezan sa ovalbuminom nisu identifikovani na osnovu tandem masenih spektara, verovatno usled niskih koncentracija tih proteina u belancetu.

Analiza PMF spektara žumanceta ukazuje na prisustvo dva proteina, vitelogenina-2 i ovalbumina koji su identifikovani uz pokrivenost sekvence od 23% i 32%, dok su analizom tandem masenih spektara, osim pomenutih proteina, identifikovani i apovitelenin-1 i lizozim C, sa ne tako visokim ukupnim skorovima proteina, ali sa bar jednim značajnim skorom peptida koji ukazuje na identitet ili ekstenzivnu homologiju. Vitelogenin-2 je protein velike mase (205 kDa) koji se sastoji od 1850 aminokiselina i očekivalo bi se da će nakon hidrolize tripsinom u PMF spektrima biti prisutan veliki broj peptida. Međutim, u odnosu na njegovu masu, detektovano je malo pikova i identifikovan je mali broj peptida. U najboljem slučaju, pokrivenost sekvence kod PMF analiza je 23%, dok je broj peptida identifikovanih putem tandem masene spektrometrije niži, pa je, sa zadovoljavajućim skorovima, identifikovano samo 7 od nađenih 27 sekvenci peptida. Ipak, ukupni skor vitelogenina-2 je 305, uprkos niskim skorovima pojedinačnih peptida. Tandem maseni spektri peptida čije su vrednosti m/z 1445.6 (VGATGEIFVVNSPR) i 1560.7 (SPQVEEYNGVWPR) imaju najviše skorove, čime je omogućena nedvosmislena identifikacija vitelogenina-2. Ovakav rezultat posledica je činjenice da su proteini u žumancetu upakovani u lipidne čestice i njihov najveći deo nije dostupan enzimu tokom hidrolize zbog hidrofobnosti.

U PMF spektru uzorka kazeinskog veziva alfa-S1-kazein i alfa-S2-kazein zastupljeni su sa skoro jednakim brojem pikova. Analiza tandem masenih spektara daje nešto drugačije rezultate u kojima alfa-S1-kazein dominira sa 7 identifikovanih peptida i ukupnim skorom 463, dok je iz alfa-S2-kazeina identifikovan samo jedan peptid sa nešto nižim skorom. Na prisustvo beta-kazeina u uzorku ukazuje peptid m/z 2186.2 identifikovan kao peptid DMPIQAFLLYQEPVLPVR sa veoma visokim skorom od

124. U uzorku veziva na bazi kravljeg sira, pored ova tri proteina, analizom PMF spektara je identifikovano prisustvo beta-laktoglobulina iz surutke, ali jedino alfa-S2-kazein, od svih proteina, ima značajan skor od 463. Analizom kombinovanih MS/MS spektara uzorka veziva na bazi sira potvrđena je identifikacija alfa-S1-kazeina, beta-laktoglobulina, alfa-S2-kazeina i beta-kazeina, a identifikovan je i peptid YIPIQYVLSR, m/z 1251.7 iz kapa-kazeina.

U PMF spektrima uzoraka tutkala različitog biološkog porekla utvrđeno je da su pikovi m/z 1105.6, 1427.7, 1435.7, 1453.7, 1560.8, 1586.8, 2056.1 i 2131.1 karakteristični za prisustvo kolagena. Ipak, tačno poreklo kolagena ne može se odrediti pouzdano čak ni MS/MS eksperimentima. U bazama sekvenci najviše informacija dostupno je za goveđi kolagen, koji je, do sada, najopsežnije proučavan, dok je količina strukturnih podataka za kolagene drugih organizama veoma oskudna. Zato su, pretragom baze sekvenci za PMF i fragmentacione spektre kolagenskih veziva tokom izrade ove doktorske disertacije, najčešće identifikovani goveđi kolagen alfa-1(I) lanac (CO1A1_BOVIN) i alfa-2(I) lanac (CO1A2_BOVIN), čak i u uzorcima kolagena koji potiču od drugih životinjskih vrsta. Goveđi kolageni identifikovani su u svim refrentnim uzorcima goveđeg (63000 i 63010) i zečijeg tutkala (63025 i 63028). U uzorku tehničkog želatina, ekstrahovanog iz svinjske kože (63040), najbolje skorove imaju dve sekvence koje odgovaraju kolagenu psa, lancu alfa-2(I) (*Canis familiaris*). Salianski isinglass (63110) je vazdušni mehur jesetre, a rezultati dobijeni PMF i MS/MS pristupom veoma su dispergovani. Rezultati ovog uzorka poklapaju se sa više lanaca kolagena različitog porekla, od Kalifornijske pastrmke (*Oncorhynchus mykiss*) i Japanskog mramoljka plamenog trbuha (*Cynops pyrrhogaster*) do čoveka (*Homo sapiens*). Ne treba posebno naglašavati da kolagen sibirske jesetre (*Acipenser baerii*), od koje se najčešće dobija *Salianski isinglass*, takođe nije sekvenciran.

Specifična struktura kolagena ni malo ne olakšava njegovu identifikaciju. Naime, kolagen je protein velike molekulske mase čijom se digestijom dobija veliki broj peptida. Jedna od karakteristika kolagena je redosled u nizu aminokiselina, gde se ponavlja triplet (Gly - X - Y)_n, pa je svaka treća aminokiselina glicin. Relativno često se u sekvenci javlja niz Gly-Pro-Hyp. Zato je homologija među kolagenima različitih bioloških vrsta veoma velika, tako da često samo nekoliko peptida predstavlja razliku

među njima. Zbog svega navedenog, pretraga baze podataka kao rezultat često ima više mogućih identifikacija sa sličnim skorovima.

Pretragom MS/MS spektara u odnosu na SwissProt bazu sekvenci u toku izrade ove disertacije, identifikovano je nekoliko sekvenci peptida karakterističnih za kolagenska veziva. Utvrđeno je da peptidi GIPGEFGLPGPAGAR + 32 Da (m/z 1427.6), GLPGEFGLPGPAGPR + 32 Da (m/z 1453.6), EGPVGLPGIDGRPGPIGPAGAR + 16 Da (m/z 2055.9), GLPGVAGSVGEPGPLGIAGPPGAR + 48 Da (m/z 2131.0) pripadaju kolagenu alfa-2 (I) lanac *Bos Taurus* i *Canis Familiaris*, dok su GPAGPQGPR (m/z 836.4) i GFSGLQGPPGPPGSPGEGQPSGASGPAGPR + 48 Da (m/z 2705.3) identifikovani kao kolagen alfa-1(I) lanac *Bos Taurus*. Što je veća homologija proteina među biološkim vrstama, manje je potencijalnih peptidnih markera.

Kompletni rezultati analize referentnih materijala MALDI-TOF masenom spektrometrijom dati su u Prilogu 1.

4.1.2 Analiza model uzoraka MALDI-TOF masenom spektrometrijom

Uticaj pigmenata i pojednostavljenog postupka pripreme uzoraka na identifikaciju proteinskih veziva procenjen je na osnovu analize model uzoraka koji su pripremljeni od proučavanih referentnih proteinskih veziva i pigmenata cink-oksida i gvožđe(III)-oksida. Visoka koncentracija neorganskih pigmenata može ometati identifikaciju proteina [50]. Pigmenti podstiču umrežavanje i hidrolizu polipeptidnih lanaca, i u manjoj meri, oksidaciju bočnih lanaca aminokiselina [78]. Proteini bogati metioninom i cisteinom su najlabilniji i najviše skloni umrežavanju i oksidaciji. Pretpostavlja se da pojedini katjoni, kao što su Hg(II), Fe(III), Cu(II), Pb(II), Cd(II), Zn(II) i Ca(II) dovode do stvaranja nekovalentnih kompleksa sa proteinima [73].

Postupak prečišćavanja uzoraka pomoću C18 mikro nastavaka za pipete, koji predlaže proizvođač, modifikovan je za potrebe ovog istraživanja. Ovim postupkom se prečišćavaju i koncentruju peptidi nakon hidrolize tripsinom i eliminiše se supresija signala koju izazivaju soli i neorganska jedinjenja. Iako rezultati pretrage baze podataka dobijeni za model uzorke sadrže manje identifikovanih peptida (Tabela 4.1) i niže Mascot

skorove u poređenju sa referentnim materijalima, identifikacija proteina MS/MS analizom i dalje je uspešna.

Uporedni prikaz rezultata identifikacije proteina na osnovu PMF i MS/MS setova podataka za model uzorke dat je u Tabeli 4.2. Podaci dobijeni MALDI-TOF/TOF eksperimentima omogućili su identifikaciju više proteina uz veću pouzdanost nego PMF analiza kod svih model uzoraka.

Iz rezultata datih u tabeli 4.2 vidi se da je PMF pristup omogućio identifikaciju proteina u 3 od 8 model uzoraka. Od toga su samo tri proteina identifikovana sa statistički značajnim MOWSE skorovima iznad 63. Sličnost rezultata dobijenih za referentne materijale, nakon karboksimetilovanja, i model uzorke hidrolizovane skraćenim i pojednostavljenim postupkom, ide u prilog pretpostavci da izostavljanje derivatizacije cisteina u protokolu pripreme uzoraka nema veliki uticaj na uspešnost identifikacije proteina.

Tabela 4.1. Peptidi u model uzorcima identifikovani Mascot pretragom MALDI-TOF/TOF spektara

Model uzorak	Identifikovani protein	Ukupni skor	Broj peptida	Izmeren odnos m/z	Skor jona	Sekvenca
Zečije tutkalo + cink-oksidi 3M11	Kolagen alfa-2(I) lanac Bos taurus CO1A2_BOVIN	144	4	1427.7	70 (38)*	GIPGEFGLPGPAGAR + 2 Oksidacije (P)
				2056.0	41 (38)	EGPVGLPGIDGRPGPIGPAGAR + Oksidacija (P)
Zečije tutkalo + Oker 3M21	Kolagen alfa-2(I) lanac Bos taurus CO1A2_BOVIN	63	4	1427.7	38 (37)	GIPGEFGLPGPAGAR + 2 Oksidacije (P)
				Kolagen alfa-1(I) lanac Bos taurus CO1A1_BOVIN	53	3
Kravlji sir + cink-oksidi 7M11	Alfa-S1-kazein Bos taurus CASA1_BOVIN	595	7		1267.8	81 (39)
				1384.8	70 (39)	FFVAPFPEVFGK
				1660.9	80 (39)	VPQLEIVPNSAEER 10: Fosforilacija (ST)
				1760.0	131 (39)	HQGLPQEVLENENLLR
				1952.0	66 (39)	YKVPQLEIVPNSAEER 12: Fosforilacija (ST)
2316.3	145 (39)	EPMIGVNQELAYFYPELFR				
Kravlji sir + Oker 7M21	Alfa-S1-kazein Bos taurus CASA1_BOVIN	412	6	1267.7	83 (36)	YLGYLEQLLR
				1759.9	127 (36)	HQGLPQEVLENENLLR
				1952.0	40 (36)	YKVPQLEIVPNSAEER 12: Fosforilacija (ST)
				2316.1	124 (36)	EPMIGVNQELAYFYPELFR

Model uzorak	Identifikovani protein	Ukupni skor	Broj peptida	Izmeren odnos m/z	Skor jona	Sekvenca
Belance + cink-oksid 9M11	Ovalbumin Gallus gallus OVAL_CHICK	584	9	1345.8	101 (40)	HIATNAVLFFGR
				1555.8	70 (40)	AFKDEDTQAMPFR
				1581.8	75 (40)	LTEWTSSNVMEER
				1687.7	102 (40)	GGLEPINFQTAADQAR
				2089.0	90 (40)	EVVGSAGVDAASVSEEF 5: Fosforilacija (ST)
				2281.3	90 (40)	DILNQITKPNDVYSFSLASR
Belance + Oker 9M21	Ovalbumin Gallus gallus OVAL_CHICK	490	9	1209.5	41 (40)	DEDTQAMPFR
				1345.8	75 (40)	HIATNAVLFFGR
				1555.7	61 (40)	AFKDEDTQAMPFR
				1581.7	78 (40)	LTEWTSSNVMEER
				1859.1	42 (40)	ELINSWVESQTNGIIR
				2089.1	108 (40)	EVVGSAGVDAASVSEEF 5: Fosforilacija (ST)
Žumance + cink-oksid 10M11	Vitelogenin-2 Gallus gallus VIT2_CHICK	149	5	1445.8	48 (41)	VGATGEIFVNSPR
				1560.8	53 (41)	SPQVEEYNGVWPR
	Ovalbumin Gallus gallus OVAL_CHICK	86	2	1687.9	59 (41)	GGLEPINFQTAADQAR

Model uzorak	Identifikovani protein	Ukupni skor	Broj peptida	Izmeren odnos m/z	Skor jona	Sekvenca
	Apovitelenin-1 Gallus gallus APOV1_CHICK	78	2	1891.0	50 (41)	AGQFLLDVVSQTTVVSGIR
Žumance + Oker 10M21	Vitelogenin-2 Gallus gallus VIT2_CHICK	247	10	1342.7	39 (38)	NIPFAEYPTYK
				1560.8	60 (38)	SPQVEEYNGVWPR
	Ovalbumin Gallus gallus OVAL_CHICK	91	2	1687.7	39 (38)	GGLEPINFQTAADQAR
				1860.0	52 (38)	ELINSWVESQTNGIIR 12: Deamidacija (NQ)
	Apovitelenin-1 Gallus gallus APOV1_CHICK	60	2	1891.0	43 (38)	AGQFLLDVVSQTTVVSGIR

*prag identiteta ili ekstenzivne homologije, $p > 0.05$ (u zagradi).

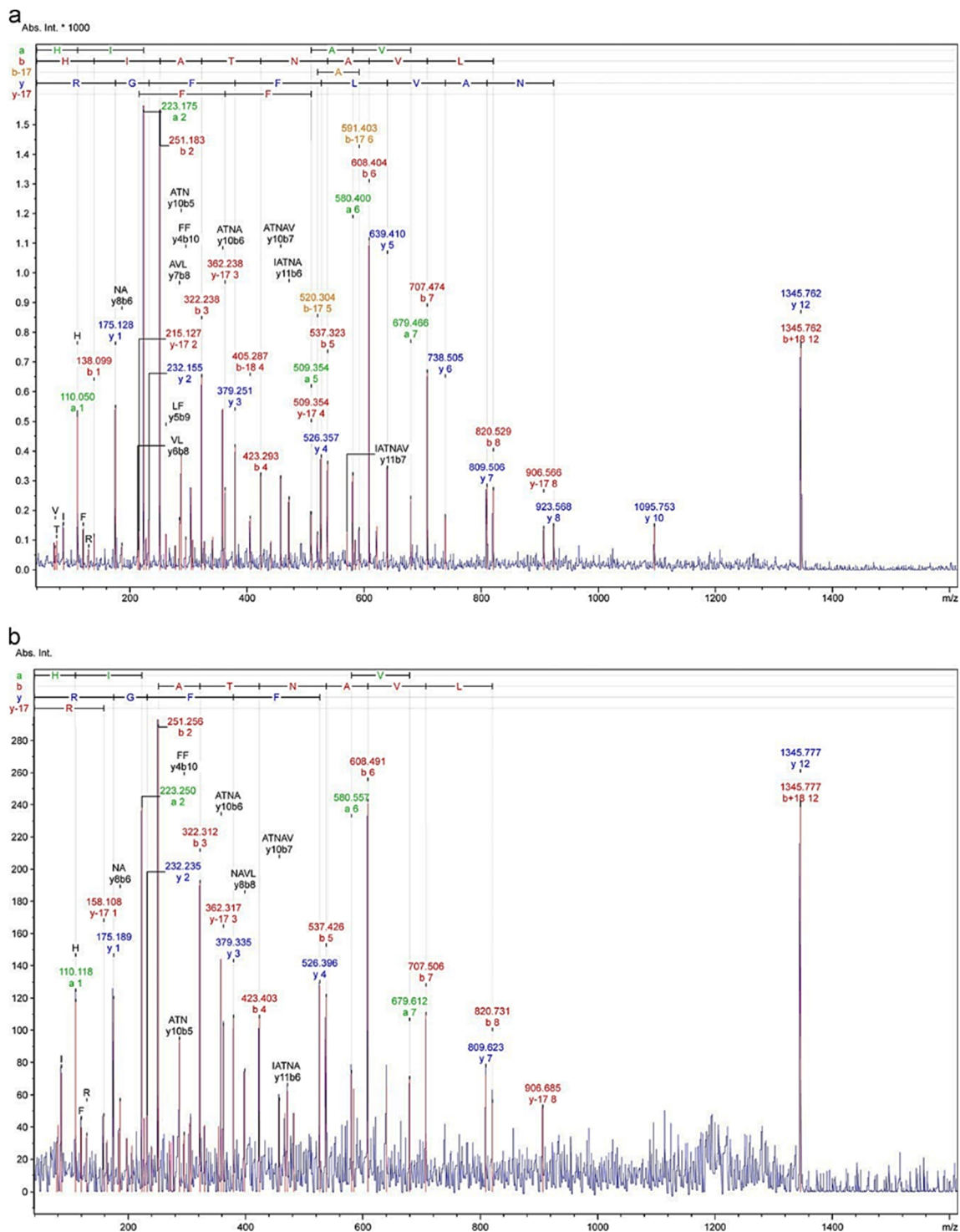
Tabela 4.2. Poređenje rezultata identifikacije proteina pomoću PMF i MS/MS pretrage baze podataka za model uzorke.

Model uzorak	Proteini identifikovani pomoću PMF	Broj peptida	Skor proteina PMF	Proteini identifikovani pomoću MS/MS	Broj peptida	Skor proteina MS/MS
Zečije tutkalo + cink-oksidi 3M11	/	/	/	Kolagen alfa-2(I) Bos taurus	4	144
				Kolagen alfa-2(I) Gallus gallus	2	37
Zečije tutkalo + Oker 3M21	/	/	/	Kolagen alfa-2(I) Bos taurus	4	163
				Kolagen alfa-1(I) Bos taurus	3	53
				Kolagen alfa-2(I) Gallus gallus	2	43
Kravlji sir + cink-oksidi 7M11	Alfa-S1-kazein Bos taurus	7	68	Alfa-S1-kazein Bos taurus	7	595
	Beta-laktoglobulin Bos taurus	4	34	Alfa-S2-kazein Bos taurus	2	64
				Beta-kazein Bos taurus	3	57
				Beta-laktoglobulin Bos taurus	2	39
				Kapa-kazein Bos taurus	1	33
Kravlji sir + Oker 7M21	Alfa-S1-kazein Bos taurus	5	46	Alfa-S1-kazein Bos taurus	6	412
	Beta-laktoglobulin Bos taurus	4	35	Alfa-S2-kazein Bos tauru	1	21
				Kapa-kazein Bos taurus	1	19
Belance + cink-oksidi 9M11	Ovalbumin Gallus gallus	11	72	Ovalbumin Gallus gallus	9	584
	Ovalbumin Gallus gallus	12	73	Ovalbumin Gallus gallus	9	490
Belance + Oker 9M21				Ovotransferin Gallus gallus	2	38
				Lizozim Gallus gallus	1	21

Model uzorak	Proteini identifikovani pomoću PMF	Broj peptida	Skor proteina PMF	Proteini identifikovani pomoću MS/MS	Broj peptida	Skor proteina MS/MS
Žumance + cink-oksidi 10M11	/	/	/	Vitelogenin-2 Gallus gallus	5	149
				Ovalbumin Gallus gallus	2	86
				Apovitelenin-1 Gallus gallus	2	78
Žumance + Oker 10M21	Vitelogenin-2 Gallus gallus	9	59	Vitelogenin-2 Gallus gallus	10	247
				Ovalbumin Gallus gallus	2	91
				Apovitelenin-1 Gallus gallus	2	60

Nasuprot tome, pojednostavljivanje tretmana pripreme uzoraka sprečava gubitak analita i njegovo razblaživanje. Peptidi koji su identifikovani MS/MS pristupom u referentnim materijalima u najvećem broju slučajeva ne sadrže karboksimetil grupu. Izuzetak su peptidi m/z 1248.6 i 1523.8 u ovalbuminu, 2551.9 i 2049.0 u ovotransferinu i 1716.8 u beta-laktoglobulinu. U svim analiziranim proteinskim materijalima cistein je prisutan u niskim koncentracijama, osim u vitelogeninu-2, koji sadrži 36 cisteinskih nastavaka [352]. Kod vitelogenina-2 u referentnim materijalima MS/MS pristupom je identifikovan mali broj peptida u odnosu na veličinu proteina, od kojih samo tri peptida sadrže karboksimetil grupu.

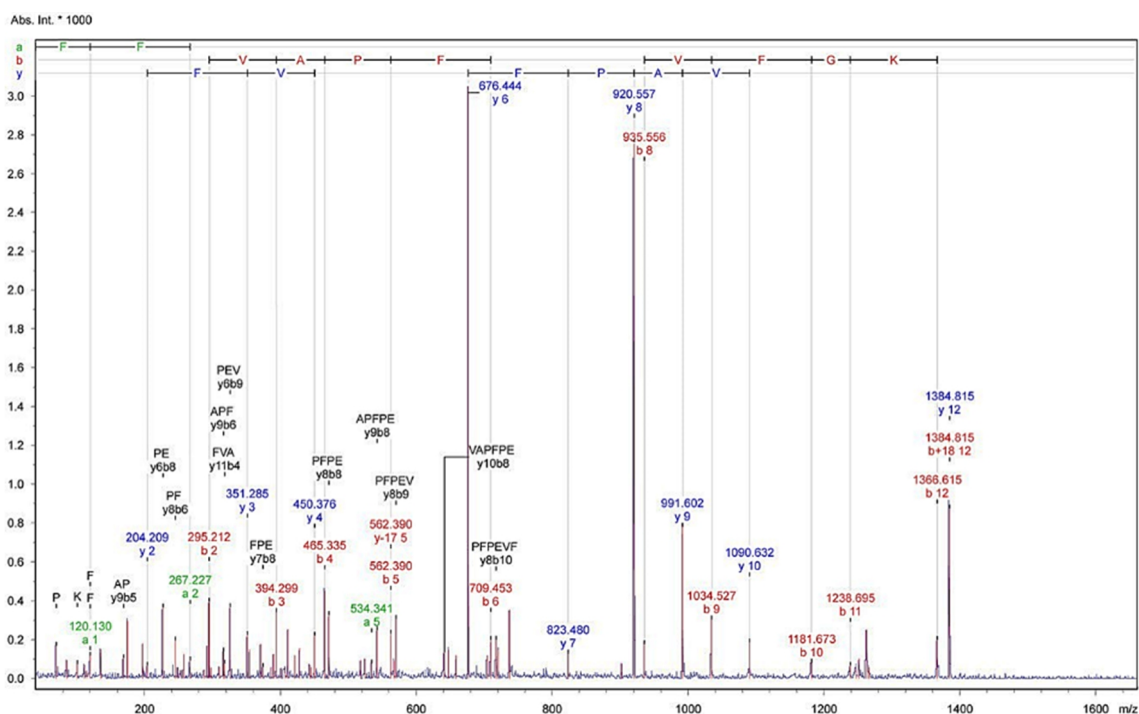
Fragmentacioni spektri jona m/z 1345.8 nađenog u oba model uzorka belanceta, sa cink-oksidom i sa gvožđe(III)-oksidom, prikazani su na Slici 4.2. Oba spektra omogućila su identifikaciju sekvence HIATNAVLFFGR iz kokošijeg Ovalbumina (OVAL_CHICK). Jasno definisana fragmentacija dala je ekstenzivnu seriju y-jona u uzorku sa cink-oksidom i dobru pokrivenost sekvence a- i b-fragment jonima, što je omogućilo nedvosmisleno pripisivanje sekvence peptida. Iako je u uzorku koji sadrži oker, niži intenzitet jona peptida doveo do niskog odnosa signala i šuma u fragmentacionom spektru, identifikovana je ista sekvenca sa nešto nižim skorom peptida (75 umesto 101). To pokazuje da, kod peptida koji lako podležu fragmentaciji i kod kojih je fragmentacija jasno definisana, čak i spektri nižeg intenziteta mogu dovesti do pouzdane identifikacije sekvence.



Slika 4.2. MS/MS spektri peptida m/z 1345.8 u model uzorcima sa belancetom i (a) cink-oksidadom (9M11) ili (b) okerom (9M21).

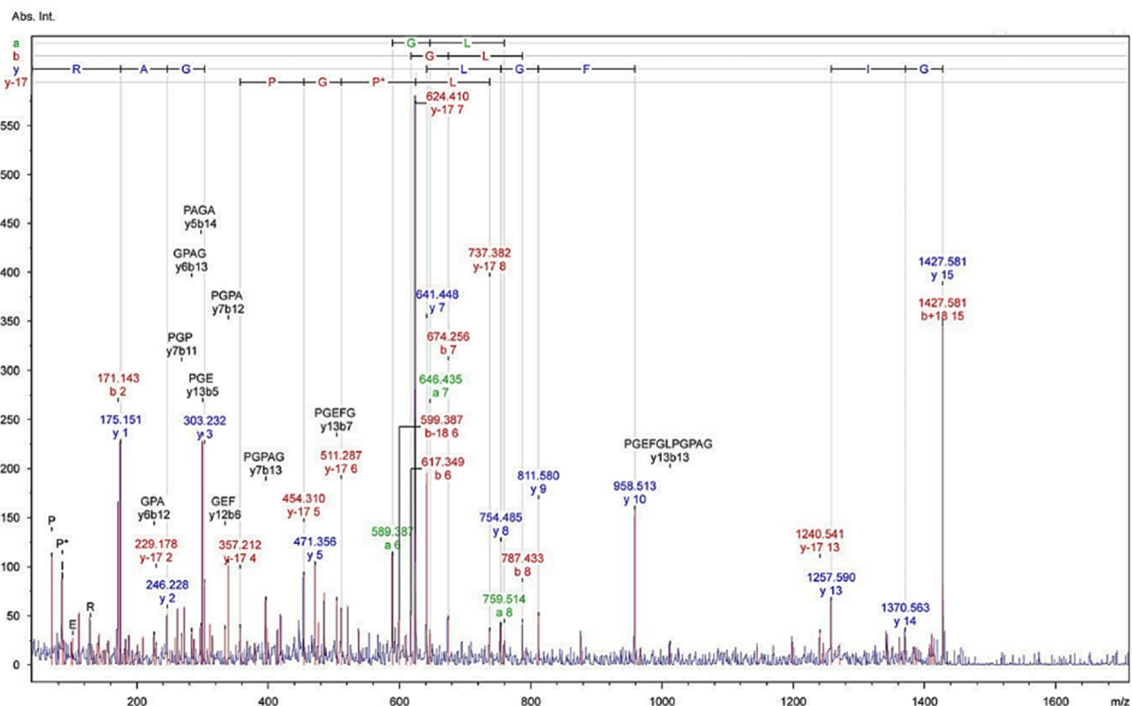
U MS/MS spektru peptida FFVAPFPEVFGK iz govedeg alfa-S1-kazeina (CASA1_BOVIN) u uzorcima kravljeg sira sa cink-oksidadom (Slika 4.3), nađeni su

jednostruko naelektrisani fragmenti y2–y4, y6–y10, b2-b6, b8–b12. Neki od pikova koji se nalaze u spektru mogu se pripisati a-fragmentima (a1, a2 i a5). U ovom konkretnom slučaju, tandem maseni spektar omogućio je veoma pouzdanu identifikaciju sekvence sa skorom jona 70, bez obzira što je broj identifikovanih pikova bio samo 31 od 73 ukupno selektovanih pikova.



Slika 4.3. MS/MS spektar peptida m/z 1384.815 u model uzorku koji sadrži kravljji sir i cink-oksidiom (7M11).

Analizom model uzoraka koji sadrže zečije tutkalo (63025) nedvosmisleno je potvrđeno samo prisustvo lanca alfa-2(I) goveđeg kolagena. Peptidi GIPGEFGLPGPAGAR + 32 Da (m/z 1427.7), EGPVGLPGIDGRPGPIGPAGAR + 16 Da (m/z 2056.0) i GLPGVAGSVGEPGPLGIAGPPGAR + 48 Da (m/z 2131.0), identifikovani su sa najvišim skorovima. Tandem maseni spektar peptida GIPGEFGLPGPAGAR + 32 Da (m/z 1427.7) iz lanca goveđeg kolagena alfa-2 (I) (CO1A2_BOVIN) prikazan je na Slici 4.4. U model uzorku goveđeg tutkala koji sadrži oker, pored peptida goveđeg kolagena alfa-2(I), nađena su i tri peptida lanca alfa-1(I), od kojih je SGRGETGPAGPAGPIGPVGAR, m/z 1975.9, identifikovan sa skorom 40.



Slika 4.4. MS/MS spektar jona m/z 1427.749 u model uzorku koji se sastoji od zečijeg tutkala i cink-oksida (3M11).

U nekim slučajevima identifikacija isključivo putem PMF analize može dovesti do pogrešnih zaključaka, kao što se vidi iz Tabele 4.3. U njoj su prikazane razlike koje su se pojavile nakon poređenja rezultata dobijenih analizom referentnih i model uzoraka PMF i MS/MS pristupom. Takođe, identifikacija peptida putem PMF pristupa publikovana u sličnim radovima ne poklapa se uvek sa identifikacijom peptida postignutom tokom izrade ove doktorske disertacije primenom MS/MS pristupa [229,253,254,258,260]. Nedoslednosti se javljaju među peptidima istog proteina, a česti su i slučajevi da su peptidi jednog proteina, na osnovu samo odnosa m/z , pripisani drugom proteinu.

Tabela 4.3. Nedoslednosti u identifikaciji peptida pomoću PMF i MS/MS analiza primenom MALDI-TOF MS utvrđene tokom izrade ove doktorske disertacije

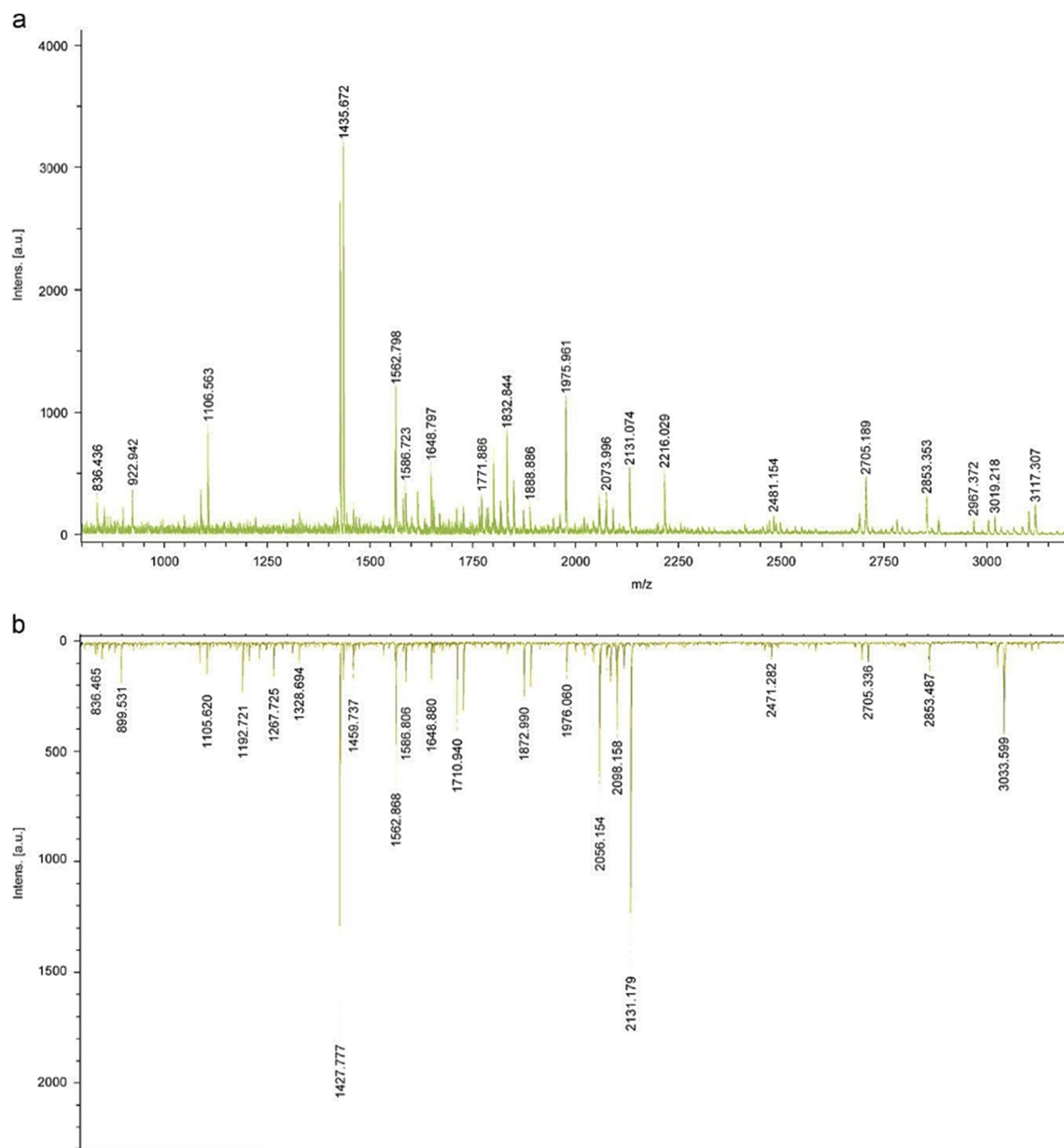
Uzorak	Identifikovani protein	Sekvence identifikovane PMF analizom			Sekvence identifikovane MS/MS analizom		
		Peptid	Teor. MH ⁺	Eksp. m/z	Peptid	Teor. MH ⁺	Eksp. m/z
Žumance	Vitelogenin-2 VIT2_CHICK	ADTYFDNYR	1164.496	1164.479	FLEVVQLCR 8: Carboksimetil (C)	1164.608	1164.576
		NAVSEFGHSWILEEAPCR 16: Karboksimetil (C)	1973.917	1973.776	NSIAGQWTQPVWMGELR 6: Deamidacija (NQ)	1973.954	1973.776
Kravljji sir	Alfa-S2-kazein CASA2_BOVIN	LTEEEKNR 2: Fosforilacija (ST)	1098.483	1098.518	AMKPWIQPK	1098.613	1098.518
Goveđe tutkalo (63000)	Kolagen alfa-(I) CO1A1_BOVIN	GPAGPQGPR	836.437	836.449	GPPGPQGAR	836.437	836.449
Goveđe tutkalo (63010)	Kolagen alfa-(I) CO1A1_BOVIN	GEGGPQGPR 2 Oksidacije (P)	886.401	886.352	GSEGPQGVR	886.438	886.352
		GAAGEPGKAGER	1099.549	1099.429	GADGAPGKDGVR	1099.549	1099.429

Uzorak	Identifikovani protein	Sekvence identifikovane PMF analizom	Sekvence identifikovane MS/MS analizom				
Zečije tutkalo (63025)	Kolagen alfa-(I) CO1A2_BOVIN	KAVILQGSNDVELVAEGNSR Oksidacija (P)	2115.104	2115.094	GLPGVAGSVGEPGLGIAGPPGAR 2 Oksidacije (P)	2115.119	2115.094
Balance + ZnO (9M11)	Ovalbumin OVAL_CHICK	VTEQESKPVMYQIGLFR Deamidacija (NQ)	2285.130	2285.087	VTEQESKPVMYQIGLFR 2 Deamidacije (NQ)	2286.114	2286.242
Žumance + Fe2O3 (10M21)	Vitrogenin-2 VIT2_CHICK	TVDLNNCQEK Deamidacija (NQ)	1164.520	1164.518	ADTYFDNYR	1164.496	1164.518
		ILGIDSMFKVANK 12: Deamidacija (NQ)	1436.782	1436.766	DASFIQNTYLHK	1436.717	1436.766
		TVDLNNCQEKVQK N-Term: Acetil	1560.769	1560.791	SPQVEEYNGVWPR	1560.744	1560.791
Uzorak B4	Kolagen alfa-(I) CO1A2_BOVIN	GEPGAVGQPGPPGPSGEEGKR ⁿ 6: Oksidacija (P)	2055.921	2055.922	EGPVGLPGIDGRPGPIGPAGAR Oksidacija (P)	2056.093	2056.169

ⁿ Sekvenca identifikovana PMF analizom u uzorku goveđeg koštanog tutkala (63000)

4.1.3 Analiza uzoraka pravoslavnih ikona MALDI-TOF masenom spektrometrijom

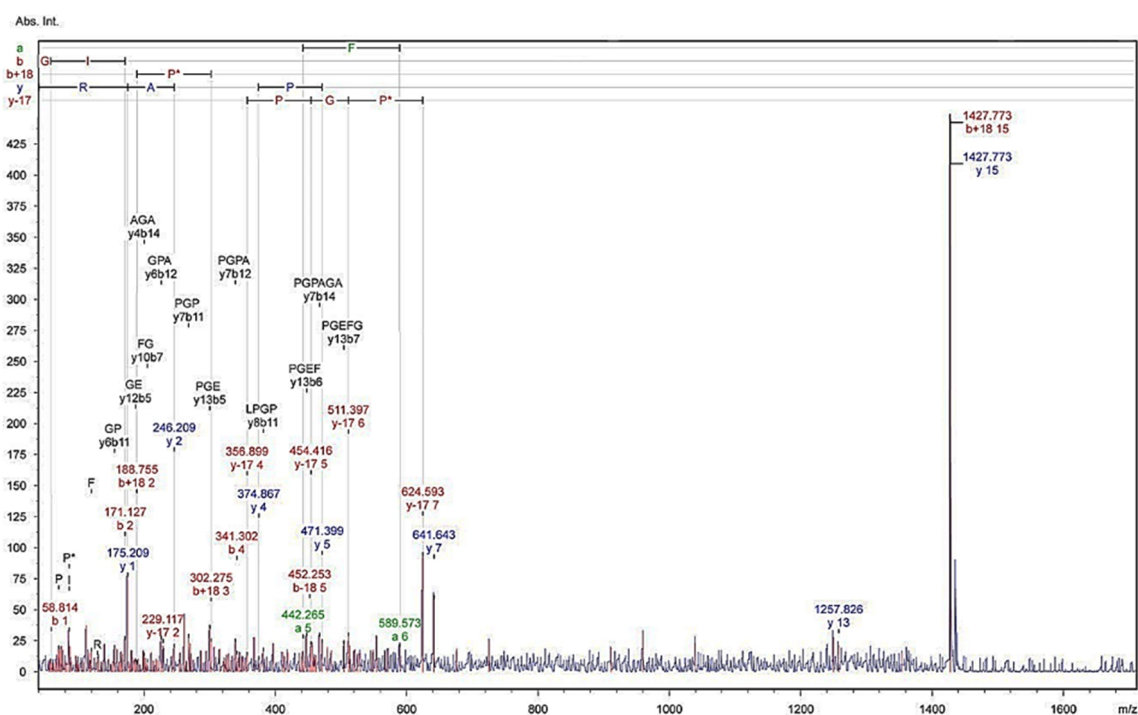
Analizirajući uzorke sa ikona srpskih umetnika XIX veka PMF pristupom, primenom istog postupka kao kod model uzoraka, utvrđeno je prisustvo kolagena u svim uzorcima. Rezultat pretrage baze podataka na osnovu snimljenog PMF spektra za uzorak B16 daje kao najbolji rezultat alfa-1(I) lanac goveđeg kolagena sa skorom 70. PMF spektri drugih analiziranih uzoraka sadrže pikove za koje je prethodno utvrđeno da su karakteristični za različite lance kolagena (m/z 1105.6, 1427.7, 1435.7, 1459.7, 1560.8, 1586.8, 1975.9, 2056.1, 2131.1 i 2705.1). U nekim slučajevima PMF spektri bili su lošeg kvaliteta, pa identifikacija proteina nije bila moguća. U većini pretraga identifikacija proteina nije bila nedvosmislena, zbog niskih MOWSE skorova, a kod nekih uzoraka potpuno je izostala. Primer je PMF spektar uzorka B15 sa ikone Bogorodice, koji je prikazan na Slici 4.5 uporedo sa spektrom zečijeg tutkala. Najbolji rezultat za PMF spektar uzorka B15 dobijen pretragom baze sekvenci je goveđi kolagen alfa-1(I) sa skorom 34, iako se na osnovu uporednog prikaza na Slici 4.5. vidi da su mnogi pikovi peptida zečijeg kolagena prisutni u spektru B15.



Slika 4.5. Uporedni prikaz PMF MALDI-TOF spektara (a) uzorak sa ikonostasa crkve Presvete Bogorodica u Bariču (B15), (b) referentni uzorak zečijeg tutkala (63025).

Analiza tandem masenom spektrometrijom potvrdila je prisustvo tutkala u svim analiziranim uzorcima, sa višim ili nižim skorovima jona, zavisno od koncentracije veziva u uzorcima i količine uzorka. Identifikovane su i neke od sekvenci na koje je prethodno ukazano da su karakteristične za kolagen. Na Slici 4.6 predstavljen je spektar dobijen fragmentacijom jona m/z 1427.7 u uzorku B4. Identifikovana je sekvenca GIPGEFGLPGAGAR + 32 Da iz lanca kolagena alfa-2(I) *Bos Taurus*. Na osnovu baze podataka pretpostavljeno je prisustvo dve hidroksilacije prolina kao PTM na pozicijama

3 i 9. Isti peptid identifikovan je i u model uzorcima i referentnim materijalima. To je zapravo jedna od sekvenci koje se najčešće javljaju u analiziranim uzorcima starih slika, zajedno sa GLPGVAGSVGEPGPLGIAGPPGAR + 48 Da (m/z 2131.2) iz kolagen alfa-2(I) (CO1A2_BOVIN) *Bos Taurus*, GEPGPAGLPGPPGER + 48 Da (m/z 1435.7) i GSAGPPGATGFPGAAGR + 32 Da (m/z 1459.7) iz kolagen alfa-1 (I) *Bos Taurus*, kao i GEPGPAGSVGPVGA VGPR (m/z 1560.8) iz kolagen alfa-2(I) *Canis familiaris*. Kompletni podaci dati su u Prilogu 1.



Slika 4.6. Tandem maseni spektar jona m/z 1427.733 u uzorku sa ikonostasa crkve Presvete Bogorodice u Bariču (B4).

Nekoliko grupa naučnika koji se bave identifikacijom proteinskih veziva u uzorcima kulturnog nasleđa u svojim radovima došli su do sličnih rezultata [253,254,260,272]. Identifikovali su životinjska tutkala u analiziranim uzorcima različitih umetničkih dela, ali nisu razmatrali mogućnost prisustva drugih veziva, poput žumanceta. Proteini žumanceta, koji imaju niži udeo stabilnih aminokiselina i veće koncentracije reaktivnih aminokiselina (metionin i cistein), podložniji su uticaju starenja i procesima foto-oksidacije u odnosu na životinjska tutkala [41,50,144]. Osim toga, tutkalo se nalazi u sloju podloge, pa je samim tim zaštićenije od površinskog bojenog sloja i lakova, zbog toga je često dobro očuvano [297]. Primenom MALDI-TOF masene spektrometrije,

tokom izrade ove doktorske disertacije, u uzorcima starih ikona nisu nađeni dokazi prisustva proteina jajeta, ali to ne mora da znači da je vezivo u bojenom sloju isključivo tutkalo. Verovatnija je pretpostavka da je identifikovan kolagen iz podloge, jer je zečije tutkalo bilo u širokoj upotrebi u ikonopisu za pripremu grunda [4].

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je PMF pristup manje uspešan ukoliko se primeni na uzorcima u kojima su proteini veoma degradirani ili se nalaze u kompleksnim smešama, što otežava interpretaciju rezultata, pa identifikacija proteina može izostati ili biti pogrešna. Pokazano je da se mnogo više informacija iz peptida dobijenih enzimskom hidrolizom može dobiti primenom tandem masene spektrometrije. Fragmentacioni spektar jednog peptida može biti dovoljan da se na osnovu njega identifikuje protein od koga peptid potiče. Prisustvo pigmenata u uzorcima bojenog sloja može ometati pripremu uzoraka ili uticati na rezultate analize. Zbog toga su primenom navedene metode analizirani referentni i model uzorci, kako bi se procenio uticaj pigmenata na ishod analize. Određivanje veziva PMF pristupom bilo je uspešno u svim, osim u tri model uzorka.

Prilikom analiza tandem masenom spektrometrijom tokom izrade ove doktorske disertacije, ako su bar dva peptida u uzorku identifikovana sa visokim skorovima koji ukazuju na identitet ili ekstenzivnu homologiju, smatrano je da je vezivo u uzorku identifikovano [353]. Broj identifikovanih peptida u analiziranim uzorcima varirao je usled više faktora kao što su različita masa uzoraka, različita koncentracija proteina u uzorcima, promena u eksperimentalnim uslovima i sama osetljivost instrumenta. Stoga, tačan razlog za nizak broj identifikovanih peptida u pojedinim uzorcima pre se može pripisati problemu osetljivosti nego uticaju pigmenata i može se zaključiti da pigmenti ne utiču na ishod analize do te mere da identifikacija proteina postane nemoguća.

U velikom broju identifikovanih peptida utvrđeno je prisustvo posttranslacionih modifikacija. Do većine modifikacija dolazi usled procesa *in vivo* ili eksperimentalnih postupaka, osim karboksimetilacije cisteina u referentnim uzorcima. Najčešće identifikovane varijabilne modifikacije su N-terminalna karbamilacija, deamidacija asparagina i glutamina, fosforilacija serina i treonina i oksidacija prolina. N-terminalna karbamilacija je rezultat reakcije peptida ili proteina sa izocijanskom kiselinom koja je u uzorcima prisutna kao proizvod raspadanja uree. Oksidacija prolina kao PTM pojavljuje

se u lancima kolagena u kojima su neki od bočnih nastavaka prolina konvertovani u hidrokisprolin pomoću enzima prolil-hidroksilaze, što ima ključnu ulogu u stvaranju kolagena i njegovoj stabilnosti. Do oksidacije metionina može doći i *in vivo* i *in vitro* procesima [354]. Neočekivane ili manje česte modifikacije uključene su u Mascot pretragu izborom opcije *error-tolerant*.

Određivanje bioloških vrsta od kojih proteini potiču zavisi od mutacija proteinskih lanaca između homologih proteina različitih životinja. Baze sekvenci proteina u njihovom trenutnom obliku, posebno SwissProt baza proteina koja je pretraživana tokom izrade ove doktorske disertacije, nisu kompletne: čak i ako sadrže skoro sve proteine, to nikako nije slučaj sa svim biološkim vrstama. Kolageni zeca, na primer, jedino su delimično sekvencirani (manje od 4% COL1A1 lanca i 39% COL1A2, dok ostale sekvence zečijeg kolagena nedostaju u SwissProt bazi). Nedvosmislena identifikacija zečijeg kolagena zato zavisi od detekcije i identifikacije nekih od peptida u ovim poznatim regionima dok se ostali peptidi ne mogu koristiti u ovu svrhu. U rezultatima Mascot pretrage se zato pojavljuju, ne samo peptidi zečijeg kolagena, već i širok opseg peptida kolagena zajedničkih ili veoma sličnih sa drugim vrstama. Određivanje porekla kolagena dodatno komplikuje relativno dobro očuvana sekvenca kolagena tokom evolucije, kao i njegov repetitivni šablon. Zbog toga se identifikacija peptida koji isključivo pripadaju fragmentima zečijeg kolagena, može smatrati dokazom prisustva zečijeg tutkala u uzorku. Sa druge strane, ukoliko zečiji kolagen nije identifikovan, zečije tutkalo se ne može isključiti kao opcija. Kompletnije baze sekvenci zečijih kolagena i drugih kolagena, od interesa za konzervaciju i instrumenti bolje masene rezolucije, verovatno mogu dati više mogućnosti za određivanje porekla proteina. Identifikacija bioloških vrsta od kojih potiču proteini jajeta ili mleka nije tako kompleksna, ali nije ni od velikog značaja, jer su retko korišćena jaja ili mleko drugih vrsta osim kokošnjih jaja i goveđeg mleka.

4.2 ANALIZA PROTEINSKIH VEZIVA PRIMENOM LC-ESI-ORBITRAPA

Tandem masena spektrometrija je osnova moderne proteomike. U kombinaciji sa HPLC ona omogućava identifikaciju pojedinačnih tripsinskih peptida preko njihovih jedinstvenih fragmentacionih spektara. U ovom poglavlju biće opisana primena LC-ESI-LTQ-Orbitrap masenog spektrometra visoke rezolucije za identifikaciju proteinskih veziva u ikonama iz XIX veka na osnovu tandem masenih spektara. Analiziran je isti set uzoraka kao u prethodnom poglavlju, radi boljeg poređenja rezultata dobijenih primenom dve tehnike masene spektrometrije. Razdvajanjem peptida postiže se visok dinamički opseg u okviru unapređenih mogućnosti za identifikaciju proteinskih veziva u umetničkim delima, gde su proteini obično prisutni u veoma složenim smešama.

U elektrosprej izvoru, tripsinski peptidi obično su jonizovani kao dvostruko ili trostruko naelektrisani joni. Višestruko naelektrisani joni mogu se efikasno fragmentisati pri nižim kolizionim energijama dajući intenzivne y- i b-jone [355]. Koliziono-aktivirana fragmentacija višestruko naelektrisanih prekursor jona javlja se na hemijski najlabilnijim vezama (*charge-directed* mehanizam) [356]. Programi pomoću kojih se pretražuju baze podataka porede svaki snimljeni CID spektar sa teorijskim spektrima mogućih sekvenci peptida prisutnih u bazi proteina i, zavisno od broja pikova koji se poklapaju, dodeljuju im skorove radi rangiranja sekvenci na osnovu verovatnoće [357]. Prednost ove metodologije, kao i kod MALDI-TOF/TOF pristupa, je veća pouzdanost, jer se identifikacija proteina oslanja na više vrlo specifičnih informacija, tj. sekvenci peptida koje su nezavisno ukazale na isti protein. Sekvence peptida se određuju nezavisno od integriteta celog proteina i predstavljaju specifični „otisak prsta“ proteina, tako da nekoliko peptida može biti dovoljno za pouzdanu identifikaciju proteina [353].

Preciznost sa kojom se mere m/z vrednosti može veoma uticati na pouzdanost određivanja sekvenci peptida. Ipak, Mascot algoritam, prilikom izračunavanja skorova verovatnoće da poklapanje tandem masenog spektra sa nekom sekvencom nije slučajan događaj, ne uzima u obzir preciznost sa kojom je izmerena masa prekursor jona [347]. Ako je greška merenja mase prekursora mala, identifikacija peptida je sigurno pouzdanija. Kod Orbitrap instrumenta joni peptida detektuju se sa visokom preciznošću mase od nekoliko ppm uz pomoć interne kalibracije [343]. Ova izuzetna preciznost

ograničava broj mogućih poklapanja sa sekvencama u bazi i u velikoj meri smanjuje broj lažno pozitivnih rezultata, pa stoga može poslužiti kao dodatni filter za tačnu identifikaciju peptida [358].

4.2.1 Analiza referentnih materijala primenom LC-ESI-LTQ-Orbitrapa

Referentni materijali analizirani pomoću LC-ESI-LTQ-Orbitrapa tokom rada na ovoj doktorskoj disertaciji bili su belance i žumance kokošijeg jajeta, kravlji sir, kazein i kolagenska veziva (goveđe, zečije i svinjsko titkalo i vazdušni mehur jesetre). U uzorku belanceta identifikovano je sedam, a u žumancetu osam proteina (kompletni rezultati dati su u Prilogu 2). Od proteina belanceta najbolji skor dobijen je za ovalbumin koji ima i najbolju pokrivenost sekvence. Što se tiče žumanceta, najbolji skor od 893 ima vitelogenin-2, čija je pokrivenost sekvence 28% uz 48 identifikovanih peptida. Relativno niska pokrivenost sekvence koju ima vitelogenin-2, može se objasniti postojanjem lipoproteinskih tela u žumancetu koja su veoma hidrofobna i mogu ometati proteolizu [262].

Detaljna analiza rezultata dobijenih za kolagenske referentne materijale pokazala je da su najčešće identifikovani proteini u svim uzorcima lanci goveđeg kolagena alfa-1(I), alfa-2(I) i alfa-1(III). Oni su najčešće bili zastupljeni sa sličnim setom peptida u uzorcima tutkala, jer postoji velika sličnost (homologija) sekvenci među kolagenima različitih vrsta. Kao što je već napomenuto, u SwissProt biblioteci dostupne su kompletne sekvence goveđeg kolagena, dok su sekvence kolagena drugih životinjskih vrsta veoma slabo zastupljene. Zečiji kolageni su samo delimično sekvencirani, iako su se nedavno u bazi pojavile neke kompletne, ali još uvek neproverene sekvence [359]. Na primer, na osnovu poređenja sekvenci pomoću UniProt BLAST alata, lanac zečijeg kolagena alfa-2(I) (*Oryctolagus cuniculus*) je 94% identičan kao isti protein psa (*Canis familiaris*) i čoveka (*Homo sapiens*), dok je sličnost u odnosu na goveđi kolagen (*Bos taurus*) 93% [352,359]. Zato, Mascot algoritam u uzorku zečijeg tutkala identifikuje, ne samo karakteristične peptide zečijeg kolagena, već i veliki broj peptida koji se poklapaju sa drugim životinjskim vrstama. Fragment GLPGVAGALGEPGLGIAGPPGAR koji pripada lancu zečijeg kolagena alfa-2(I) identifikovan je u uzorku sirovog zečijeg tutkala

i može se smatrati potvrdom da nađeni kolagen u uzorku potiče od zeca. Međutim, ukoliko u uzorku nisu identifikovani peptidi karakteristični isključivo za zečiji kolagen, zečije tutkalo se ne može isključiti kao opcija. Isto važi i za svinjski kolagen, jer je samo nekoliko sekvenci dostupno u SwissProt bazi, a te sekvence su većinom nekompletne i neproverene. Na osnovu sličnosti sa drugim vrstama, u referentnom uzorku koji sadrži kolagen svinje, identifikovani su lanci goveđeg kolagena alfa-1(I) i alfa-1(III), kao i alfa-2(I) lanac kolagena psa (*Canis familiaris*).

Poređenjem rezultata dobijenih nakon pretrage baze podataka za uzorke goveđeg koštanog i kožnog tutkala (63000 i 63010), kao i zečijeg kožnog tutkala, sirovog i prečišćenog (63025 i 63028), utvrđeno je da su rezultati veoma slični za sve uzorke u smislu identifikovanih proteina i broja identifikovanih sekvenci. Najveći broj peptida i najveće skorove imali su goveđi kolagen alfa-1(I), alfa-2(I) i alpha-1(III). Od toga, u sva četiri poređena materijala identifikovan je set od 17 identičnih peptida lanca goveđeg kolagena alpha-1(I), dok je 11 peptida istog proteina prisutno u tri od četiri ispitivana materijala. Kolagen alfa-2(I) imao je 13 peptida identifikovanih u sva četiri referentna materijala, dok je još 10 sekvenci nađeno u tri materijala. Kolagen alfa-1(III) identifikovan je sa pet sekvenci prisutnih u tri materijala (u goveđem koštanom tutkalu ovaj protein nije identifikovan) dok je 9 peptida bilo zajedničko za dva uzorka. Peptidi nađeni u svim materijalima mogu se smatrati proteotipičnim, jer je njihova identifikacija preferencijalna usled različitih faktora [356]. Identifikovane su i sekvence koje se razlikuju samo za jednu PTM, kao što je, na primer, deamidacija glutamina i asparagina. U uzorku tehničkog želatina svinjskog porekla (63040) takođe su identifikovni lanci goveđeg kolagena alfa-1(I), i alpha-1(III), kao i lanac alfa-2(I) kolagena psa, ali sa nižim ukupnim skorovima i manjim pokrivenostima sekvenci u odnosu na četiri uzorka koji su prethodno poređeni. Razlog tome je što je kolagen u ovom uzorku bio već delimično hidrolizovan pre enzimske hidrolize, tokom ekstrakcije iz tkiva.

Rezultati dobijeni za uzorak kolagena jesetre (*Salianski isinglass*, 63110) razlikuju se u odnosu na druge kolagenske materijale, jer postoje značajne evolutivne razlike između kolagena sisara i riba. Međutim, i sekvence kolagena različitih vrsta riba su slabo zastupljene u bazama i to otežava tačnu identifikaciju proteina. U SwissProt bazi nema sekvenci kolagena jesetre (*Acipenser baerii*), pa su u uzorku *Salianski isinglass*

identifikovani različiti lanci kolagena koji pripadaju japanskom mramoljku plamenog trbuha (*Cynops Pyrrhogaster*), mišu (*Mus Musculus*), kalifornijskoj pastrmci (*Oncorhynchus Mykiss*) ili domaćem govečetu (*Bos Taurus*), ali sa niskim skorovima i pokrivenostima sekvenci.

U uzorku mladog kravljeg sira najbolji skor od 253 ima beta-laktoglobulin *Bos taurus*, uz pokrivenost sekvence od 48% i 10 identifikovanih peptida, dok alfa-S1-kazein, alfa-S2-kazein i kapa-kazein imaju nešto niže skorove i pokrivenost sekvence u rasponu od 30-35%. Identifikovan je i goveđi beta-kazein na osnovu 3 sekvence, kao i alfa-laktalbumin i serum-albumin sa po dve sekvence. Uzorak kazeina u prahu (63200) ima nešto drugačiji sadržaj proteina, pa su alfa-S1 i alfa-S2-kazein (*Bos taurus*) najzastupljeniji sa po 7 identifikovanih peptida i pokrivenostima sekvence od 42% i 28%. U ovom uzorku identifikovano je i po 5 peptida kapa-kazeina (pokrivenost sekvence 43%) i beta-laktoglobulina (32%), 3 peptida beta-kazeina i jedan peptid alfa-laktalbumina.

4.2.2 Analiza model uzoraka pomoću LC-ESI-LTQ-Orbitrapa

Kao i u prvom delu ove doktorske disertacije, da bi se procenio uticaj pigmenata na identifikaciju proteinskih veziva LC/MS pristupom, na instrumentu baziranom na Orbitrap analizatoru masa, testirani su različiti model uzorci koji sadrže kombinacije cink-oksida ili okera sa proteinskim vezivima koja su najčešće korišćena tokom istorije, poput žumanceta i belanceta, kravljeg sira i goveđeg tutkala. U nekim od studija koje se bave interakcijama proteinskih veziva sa pigmentima u bojenom sloju, postoje indicije da određeni pigmenti mogu štititi proteinsko vezivo od uticaja UV zračenja [78,109], dok neke kombinacije pigmenata i veziva dovode do još evidentnije degradacije [78]. Poznato je da neki metali mogu formirati komplekse sa aminokiselinama [6,11,58]. Procesi starenja proteina u slikama uključuju i oksidacione reakcije na bočnim nastavcima aminokiselina, umrežavanje i hidrolizu polipeptida koje mogu katalizovati katjoni metala prisutni u pigmentima [78]. Zato je bilo važno utvrditi koliki je uticaj pigmenata, izabranih u ovoj doktorskoj disertaciji za izradu model uzoraka, na pouzdanu identifikaciju proteina primenom proteomike i LC-ESI-LTQ-Orbitrap masenog

spektrometra, kako bi se procenilo da li je primenjena metoda adekvatna za analizu uzoraka bojenog sloja starih slika.

Lista proteina i peptida koji su identifikovani u analiziranim model uzorcima primenom LC-ESI-LTQ-Orbitrapa data je u Prilogu 2. Broj identifikovanih peptida i pokrivenost sekvenci kod većine nađenih proteina dvostruko je manji u poređenju sa analiziranim referentnim materijalima. U model uzorcima koji sadrže belance evidentan je negativan uticaj pigmenata na identifikaciju ovotransferina i ovalbumina, dok lizozim uopšte nije identifikovan. Ostali proteini identifikovani su sa nižim skorovima u odnosu na referentne materijale, dok je pokrivenost sekvenci ostala skoro nepromenjena. To ukazuje da prisustvo pigmenata u uzorcima ne utiče na identifikaciju peptida tih proteina, već samo na kvalitet spektara, pa su zato ostvareni skorovi peptida kod model uzoraka nešto niži. U uzorku žumanceta uticaj pigmenata takođe je najizraženiji na peptide ovalbumina. Dodatno, apovitelenin-1 u uzorku koji sadrži žumance u kombinaciji sa okerom ima znatno smanjenu pokrivenost sekvence (8%) u poređenju sa uzorkom čistog žumanceta (51%).

Iz dobijenih rezultata se ne može izvesti zaključak o opštem uticaju cink-oksida ili okera na identifikaciju proteina u model uzorcima. Interakcije između pigmenata i veziva zavise i od strukture proteina, jer aminokiseline imaju različite afinitete prema formiranju kompleksa sa metalima. Proteini tokom procesa starenja različito reaguju, zavisno od vrste prisutnih pigmenata. U model uzorcima pripremljenim od belanceta ili žumanceta primećeno je da prisustvo okera nepovoljnije utiče na rezultate od prisustva cink-oksida. Kod model uzoraka koji sadrže vezivo na bazi kravljeg sira ili goveđeg tutkala, primećen je suprotan efekat. Tu je identifikovano više peptida iz lanaca goveđeg kolagena alfa-2(I) i alfa-1(I) u uzorku koji sadrži oker (3M21, Prilog 2) u odnosu na uzorak koji sadrži cink-oksid (3M11). Broj identifikovanih peptida goveđeg kolagena alfa-1(III) sličan je u oba uzorka. U uzorku koji sadrži kravlji sir i oker (7M21), više peptida identifikovano je za alfa-S1 kazein u poređenju sa uzorkom čistog veziva baziranog na kravljem siru ili uzorkom koji sadrži cink-oksid (7M11). Broj identifikovanih peptida u oba uzorka za ostale proteine sira je veoma sličan.

Opšti zaključak je da ispitivani pigmenti imaju negativan uticaj na skorove većine proteina u model uzorcima, ali da ipak ne utiču na ishod analize u toj meri da bi

sprečili identifikaciju proteina. Neophodna su dodatna istraživanja i analize koje bi obuhvatile uticaj više istorijskih pigmenata na identifikaciju proteinskih veziva u umetničkim delima.

4.2.3 Analiza uzoraka pravoslavnih ikona pomoću LC-ESI-LTQ-Orbitrapa

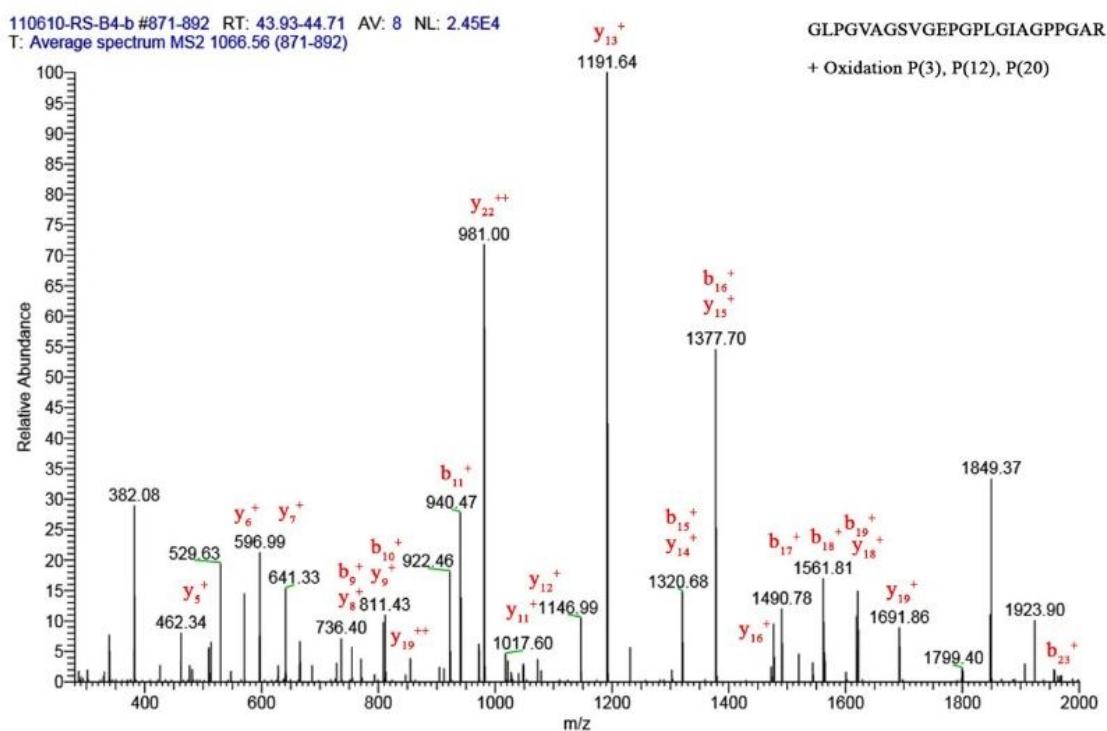
Svi mikro uzorci pravoslavnih ikona iz XIX veka (Tabela 3.2) podvrgnuti su skraćenom postupku pripreme uzoraka kako bi se sprečio gubitak analita. U Tabeli 4.4 navedene su sekvence peptida na osnovu kojih su identifikovani proteini prisutni u analiziranim uzorcima pravoslavnih ikona (kompletni rezultati dati su u Prilogu 2). Uzorci sa ikona bili su ekstremno mali, mase manje od 0.1 mg, a proteini u njima degradirani, pa je zbog toga bilo moguće identifikovati samo po nekoliko peptida u svakom uzorku. Na osnovu prethodnih rezultata, dobijenih pomoću MALDI-TOF masene spektrometrije za isti set uzoraka, bilo je poznao je da je kolagen prisutan u svim uzorcima. Rezultati pretrage baze sekvenci za LC-MS/MS podatke potvrdili su prisustvo tutkala identifikacijom ukupno 9 peptida iz lanaca alfa-1(I), alfa-2(I) i alfa-1(III) govedeg kolagena. Proteini žumanceta vitelogenin-2 i apovitelenin-1 identifikovani su u nekoliko uzoraka ikona iz Bariča, vitelogenin-2 na osnovu četiri, a apovitelenin-1 na osnovu jednog prisutnog peptida. Zanimljivo je da su proteini jajeta identifikovani jedino LC/MS pristupom u MS/MS modu, što može biti posledica različitog afiniteta dve jonizacione tehnike prema peptidima koji imaju različite fizičko-hemijske osobine, kao i znatno bolje osetljivosti LC-ESI-LTQ-Orbitrap masenog spektrometra u odnosu na MALDI-TOF/TOF [361].

Tabela 4.4. Sekvence peptida koje su omogućile identifikaciju tutkala i žumanceta kao proteinskih veziva u uzorcima istorijskih slika

Uzorak	Protein	m/z	Mr (eksperim.)	ppm	Skor	Peptid	
B4	Kolagen alfa-2(I) Bos taurus P02465	1066.0615	2130.1084	0.70	64	GLPGVAGSVGEPGPLGIAGPPGAR + 3 Oksidacija(P)	
	Kolagen alfa-1(I) Bos taurus P02453	781.8958	1561.7771	2.24	18	DGLNGLPGPIGPPGPR + Deamidacija(NQ); 3 Oksidacija(P)	
B8	Vitelogenin-2 Gallus gallus P02845	524.8296	1047.6447	0.62	18	LPLSLPVGPR	
		543.3198	1084.6251	0.93	22	QQLTLVEVR	
		701.3605	1400.7064	1.17	57	IANADNLESIWR	
		723.3919	1444.7693	1.29	28	VGATGEIFVVNSPR	
	Kolagen alfa-2(I) Bos taurus P02465	714.3692	1426.7238	2.31	19	GIPGEFGLPGPAGAR + 2 Oksidacija(P)	
		686.0351	2055.0836	-1.25	20	EGPVGLPGIDGRPGPIGPAGAR + Oksidacija(P)	
		1066.0594	2130.1042	-1.28	65	GLPGVAGSVGEPGPLGIAGPPGAR + 3 Oksidacija(P)	
		Apovitelin-1 Gallus gallus P02659	946.0188	1890.0230	0.99	42	AGQFLLDVSQTTVVSGIR
			946.5107	1891.0068	0.92	29	AGQFLLDVSQTTVVSGIR + Deamidacija(NQ)
		Kolagen alfa-1(I) Bos taurus P02453	780.9111	1559.8077	1.33	19	GETGPAGPAGPIGPVGAR
Kolagen alfa-1(III) Bos taurus P04258	826.9238	1651.8331	-1.26	15	GEMGPAGIPGAPGLIGAR + 2 Oksidacija(P)		
B15	Kolagen alfa-2(I) Bos taurus P02465	714.3683	1426.722	1.09	29	GIPGEFGLPGPAGAR + 2 Oksidacija(P)	
		686.0364	2055.0875	0.67	17	EGPVGLPGIDGRPGPIGPAGAR + Oksidacija(P)	
		1066.0618	2130.1090	0.98	57	GLPGVAGSVGEPGPLGIAGPPGAR + 3 Oksidacija(P)	
		1224.5992	2447.1838	0.90	24	GEVGLPGLSGPVGPPGNPGANGLPGAK + 2 Deamidacija(NQ); Oksidacija (K); 4 Oksidacija(P)	

		780.9109	1559.8072	1.03	26	GETGPAGPAGPIGPVGAR
	Kolagen alfa-1(I) Bos taurus P02453	793.8824	1585.7503	1.12	15	GANGAPGIAGAPGFPGAR + Deamidacija(NQ); 3 Oksidacija(P)
		659.3369	1974.9889	0.89	22	SGDRGETGPAGPAGPIGPVGAR
	Kolagen alfa-2(I) Bos taurus P02465	1066.0595	2130.1044	-1.18	52	GLPGVAGSVGEPGPLGIAGPPGAR + 3 Oksidacija(P)
B16	Vitelogenin-2 Gallus gallus P02845	701.3590	1400.7034	-0.96	28	IANADNLESIWR
	Kolagen alfa-1(I) Bos taurus P02453	780.9090	1559.8034	-1.39	22	GETGPAGPAGPIGPVGAR
	Apovitelenin-1 Gallus gallus P02659	946.0166	1890.0186	-1.30	18	AGQFLLDVVSQTTVVSGIR
B17	Kolagen alfa-2(I) Bos taurus P02465	1066.0594	2130.1042	-1.28	36	GLPGVAGSVGEPGPLGIAGPPGAR + 3 Oksidacija(P)
		714.3684	1426.7222	1.22	26	GIPGEFGLPGPAGAR + 2 Oksidacija(P)
I1	Kolagen alfa-2(I) Bos taurus P02465	1058.0629	2114.1112	-0.38	26	GLPGVAGSVGEPGPLGIAGPPGAR + 2 Oksidacija(P)
		1066.0617	2130.1088	0.88	65	GLPGVAGSVGEPGPLGIAGPPGAR + 3 Oksidacija(P)
	Kolagen alfa-1(I) Bos taurus P02453	659.3369	1974.9890	0.92	17	SGDRGETGPAGPAGPIGPVGAR

Peptid GLPGVAGSVGEPGPLGIAGPPGAR (881-904, Mr 2130.107) iz lanca goveđeg kolagena alfa-2(I) (CO1A2 BOVIN) identifikovan je u svim analiziranim uzorcima bojenog sloja sa značajnim MOWSE skorovima, kao i u referentnim materijalima i model uzorcima. Na slici 4.7 predstavljen je CID spektar dvostruko naelektrisanog prekursor jona m/z 1066.56 (t_R 43.93–44.71) u uzorku B4. Na osnovu spektra identifikovan je peptid GLPGVAGSVGEPGPLGIAGPPGAR sa skorom 64, zahvaljujući seriji y (y_5^+ - y_9^+ , y_{11}^+ - y_{16}^+ , y_{18}^+ , y_{19}^+) i b (b_9^+ - b_{11}^+ , b_{15}^+ - b_{19}^+ , b_{23}^+) jona fragmenata. Peptid sadrži tri oksidovana prolina na pozicijama P3 i P12, kao i P20 ili P21 sa jednakom verovatnoćom, i javlja se u kolagenu alfa-2(I) nekoliko bioloških vrsta, *Bos Taurus*, *Canis Familiaris* i *Sus Scrofa*. Oblik peptida koji sadrži dva oksidovana prolina (Mr 2114.1070), prisutan u uzorku I1, nije identifikovan u referentnim materijalima i model uzorcima.



Slika 4.7. CID spektar dvostruko naelektrisanog prekursor jona m/z 1066.56 (t_R 43.93–44.71) u uzorku B4

Svi peptidi kolagena koji su identifikovani u uzorcima ikona zajednički su za različite životinjske vrste, najčešće *Bos Taurus*, *Canis Familiaris*, *Sus Scrofa*, *Mus Musculus*, *Homo sapiens*, *Ovis Aries* i *Felis Catus*, što je utvrđeno poređenjem sekvenci

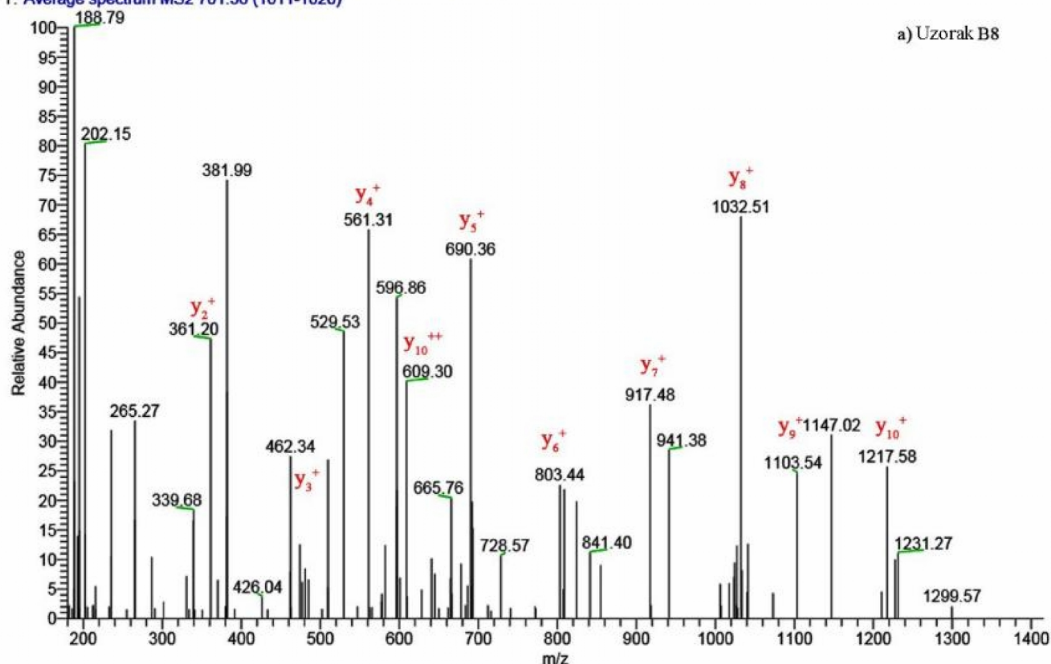
pomoću UniProt Blast algoritma [352]. Na osnovu takvih rezultata veoma je teško pouzdano određivanje biološkog porekla. *Bos Taurus* je jedina zajednička životinjska vrsta za sve identifikovane peptide. Nije identifikovan ni jedan peptid kolagena koji ne pripada *Bos Taurus*. Na osnovu toga, može se pretpostaviti da je u sloju podloge analiziranih slika najverovatnije prisutno tutkalo goveđeg porekla kao vezivo. Ipak, dispergovani rezultati poput ovde dobijenih mogu ukazivati i na životinjsku vrstu čiji kolagen nije prisutan u bazi sekvenci ili je samo delimično poznat, kao što je, na primer zec. Jedan od najčešće korišćenih izvora životinjskih lepkova bila je upravo zečija koža. Osim zanemarljive frakcije COL1A1, u *SwissProt* bazi nema drugih sekvenci kolagena zeca, što praktično onemogućava njegovu identifikaciju. Sekvence kolagena miša i pacova često su se pojavljivale kao rezultat pretrage baze, na osnovu ekstenzivne homologije sa sekvencama peptida u uzorcima, a to se može interpretirati kao pokazatelj biološkog porekla bliskog zečijem kolagenu, usled relativno bliskih evolutivnih odnosa. Ova premissa, međutim nije naučno podržana.

U dva uzorka, B8 i B16, prisustvo žumanceta kao veziva utvrđeno je na osnovu identifikovanih peptida proteina vitelogenin-2 i apovitelenin-1. Primer fragmentacionog spektra koji je omogućio identifikaciju žumanceta prikazan je na Slici 4.8. U poređeno su prikazani CID spektri dvostruko neelektrisanog prekursor jona m/z 701.36 iz vitelogenina-2 *Gallus Gallus* (VIT2 CHICK) u uzorku B8 i model uzorku 10M21. Na osnovu spektara identifikovana je sekvenca IANADNLESIWR. U oba slučaja identifikacija je postignuta sa značajnim jonskim skorovima, 57 za uzorak B8 i 88 za uzorak 10M21, uz poklapanje 10 od 23, odnosno 10 od 12 najintenzivnijih jona fragmenata. Značajno je napomenuti da je u oba spektra nađena serija jednostruko naelektrisanih y -jona od y_2 do y_{10} .

U uzorku B8 identifikovano je još tri peptida koji pripadaju proteinu vitelogenin-2, a to su LPLSLPVGPR (m/z 524.8296, t_R 45.97-46.42), QQLTLVEVR (m/z 543.3198, t_R 38.06-38.18) i VGATGEIFVVNSPR (m/z 723.3919, t_R 41.24-41.44), sa skorovima koji ukazuju na homologiju i molekulskim masama u opsegu ± 2 ppm u poređenju sa teorijskim masama peptida. Ukupno je identifikovano 11 peptida iz pet proteina u uzorku B8.

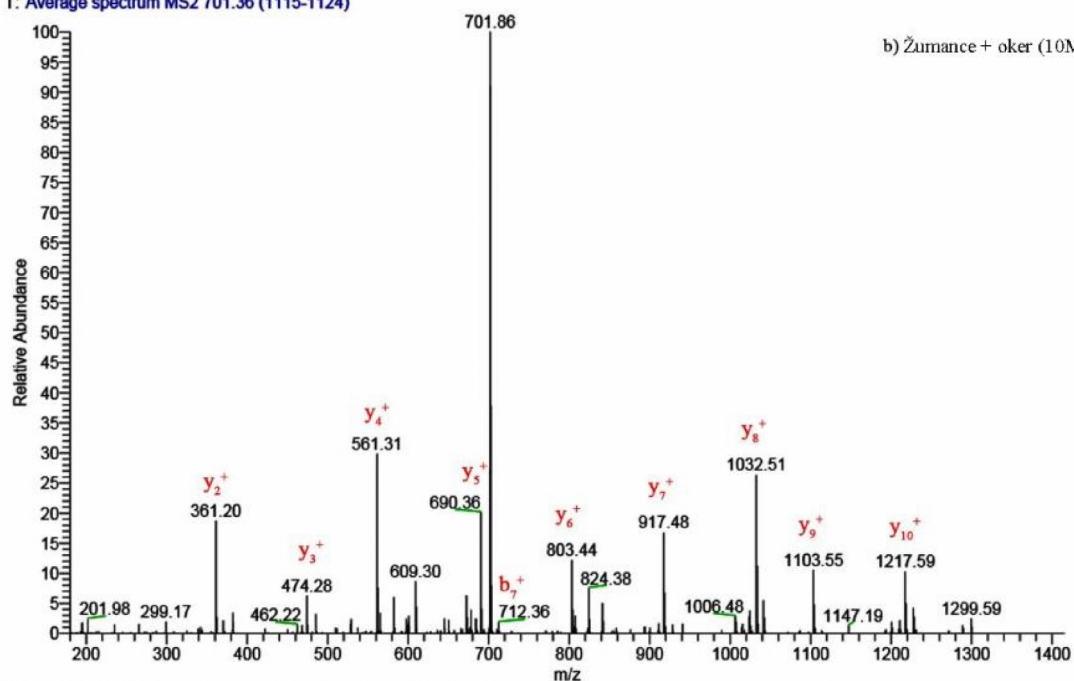
110610-RS-B8-b #1011-1020 RT: 49.24-49.58 AV: 5 NL: 5.98E3
T: Average spectrum MS2 701.36 (1011-1020)

IANADNLESIWR



110602-10M21b #1115-1124 RT: 49.33-49.62 AV: 4 NL: 1.78E5
T: Average spectrum MS2 701.36 (1115-1124)

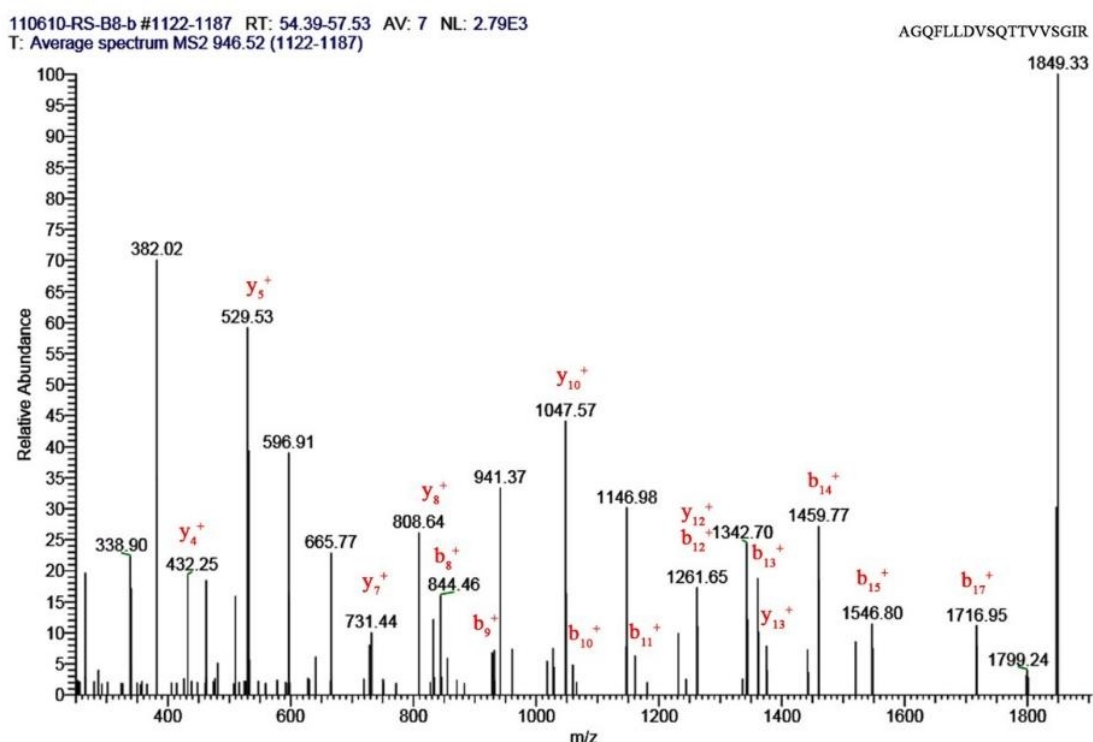
b) Žumance + oker (10M21)



Slika 4.8. CID spektri dvostruko naelektrisanog prekursor jona m/z 701.36 (tR 49.24-49.62) u (a) uzorku B8 i (b) model uzorku koji sadži žumance i oker (10M21)

Na Slici 4.9 predstavljen je CID spektar dvostruko naelektrisanog prekursor jona m/z 946.02 u uzorku B8, identifikovanog kao AGQFLLDVSTTVVSGIR iz apovitelein-1 *Gallus Gallus* (APOV CHICK). Identifikacija je ostvarena na osnovu

poklapanja 20 od 40 najintenzivnijih pikova, većinom jednostruko naelektrisanih y- i b-jona. Identifikacija ovog peptida, sa značajnim skorom od 42, dodatna je potvrda prisustva proteina žumanceta u uzorku. U uzorku B8 ovaj peptid prisutan je i sa deamidacijom glutamina kao PTM, koja je posledica starenja proteinskih veziva [64]. Peptid AGQFLLDVVSQTTVVSGIR iz proteina apovitelenin-1 pominje se u studiji Leo *et al.* kao jedini peptid na osnovu koga je identifikovano jajčano vezivo u istorijskim uzorcima bojenog sloja [274].



Slika 4.9. CID spektar dvostruko naelektrisanog prekursor jona m/z 946.02 (tr 54.39-57.53) u uzorku B8

U nekim uzorcima, kao što je B19, nije identifikovano jajčano vezivo. Kao što je već rečeno, proteinska veziva u starim slikama podležu procesima starenja, poput oksidacije, polimerizacije i hidrolize koji, u kombinaciji sa malom količinom uzorka i niskom koncentracijom proteina u bojenim slojevima, otežavaju njihovu identifikaciju [6,11,58,78,109]. Zato, neki peptidi koji su identifikovani u pojedinim uzorcima ikona (LPLSLPVGPR, QQLTLVEVR i IANADNLESIWR iz vitelogenina-2, i NFLINETAR iz apovitelenina-1), nisu mogli biti identifikovani pretragom baze sekvenci u više

uzoraka, iako u snimljenim datotekama postoje indikacije njihovog prisustva. Zbog niskih intenziteta jona fragmenata u CID spektru, identifikacija pretragom baze podataka nije bila moguća, ali su masa prekursor jona i retenciono vreme peptida NFLINETAR (m/z 539.288, t_R 37.46-37.72) u uzorcima B8, B16 i B19 u korelaciji sa referentnim i model uzorcima. Fragmentacioni spektri peptida LPLSLPVGPR, QQLTLVEVR i IANADNLESIWR prisutni su u datotekama snimljenim za uzorak B19, ali preklapanje na osnovu pretrage baze proteina takođe nije bilo moguće, iako su mase prekursor jona bile unutar granica greške od ± 2 ppm i retenciona vremena odgovarala istim sekvencama u model uzorcima i referentnim materijalima. Na osnovu toga može se zaključiti da su male količine uzoraka i promene usled procesa starenja sprečili identifikaciju peptida žumanceta u više uzoraka ikona, iako retenciona vremena i precizno izmerene molekulske mase ukazuju na njihovo prisustvo.

4.3 POREĐENJE REZULTATA DOBIJENIH POMOĆU DVE TEHNIKE MASENE SPEKTROMETRIJE

Tehnikama meke jonizacije, ESI i MALDI, omogućen je lakši transfer peptida i proteina u gasnu fazu i zbog toga se često primenjuju u proteomici. Tokom izrade ove doktorske disertacije analiziran je identičan set referentnih materijala, model uzoraka i uzoraka bojenog sloja pravoslavnih ikona iz XIX veka primenom dve maseno spektrometrijske tehnike – MALDI-TOF [362] i HPLC-ESI-LTQ-Orbitrap [363], koje se zasnivaju na tehnikama meke jonizacije. Karakteristika elektrosprej jonizacije je da proizvodi višestruko naelektrisane jone koji se mnogo lakše fragmentišu u poređenju sa jednostruko naelektrisanim jonima koji nastaju u MALDI izvoru [364-366]. Rezultati dobijeni primenom LC-MS/MS pristupa pokazali su da su najbolji skorovi jona ostvareni za dvostruko naelektrisane jone peptida mase ispod 2500 Da i trostruko naelektrisane jone peptida iznad 2500 Da, jer je fragmentacija ovih jona lakša i šablon fragmentacije je predvidljiviji.

Uopšteno, MALDI i ESI MS/MS eksperimenti kao rezultat daju veoma različite fragmentacione spektre [350]. Ranije je primećeno da su ESI i MALDI komplementarne jonizacione tehnike koje zajedno dovode do identifikacije više peptida nego svaka od njih

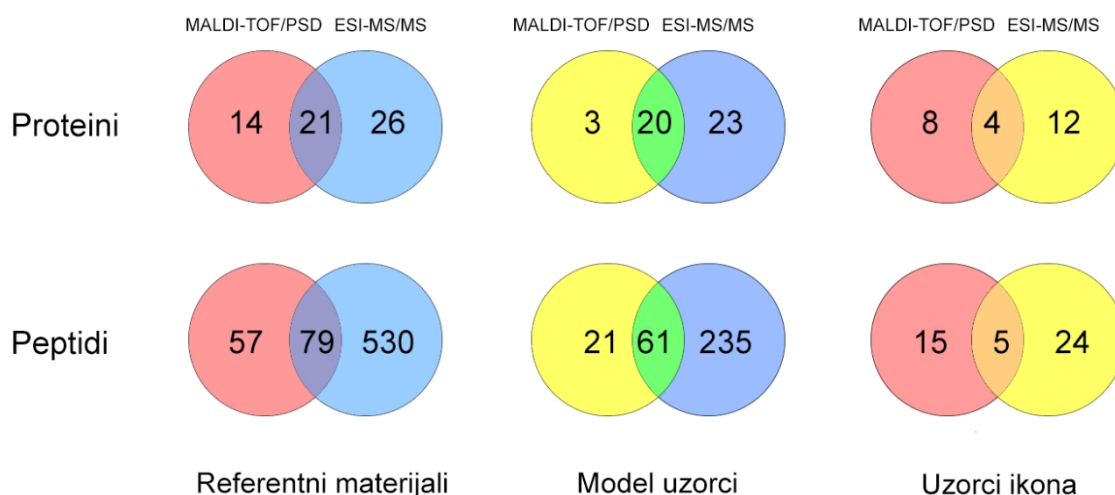
pojedinačno [364-366]. Primenom ESI jonizacije olakšana je identifikacija hidrofobnih peptida kakvi su peptidi koji potiču iz proteina žumanceta, posebno vitelogenin-2, i peptida koji sadrže aminokiseline sa hidroksilnim grupama [367,368]. MALDI favorizuje identifikaciju peptida koji sadrže bazne i aromatične aminokiseline, jer se ovi peptidi lakše jonizuju u uslovima koji vladaju u MALDI izvoru [361,368,369].

U prvom delu ove doktorske disertacije, primena MALDI-TOF MS/MS omogućila je uvid u proteine prisutne u referentnim materijalima i model uzorcima, kao i u tip veziva koji se nalazi u uzorcima analiziranih pravoslavnih ikona. Na osnovu spektara dobijenih pomoću LC-ESI-LTQ-Orbitrap masene spektrometrije ovi rezultati su dopunjeni i prošireni. Dokazano je da se, pored kolagena, u bojenom sloju ikona nalaze i proteini žumanceta. Rezultati dobijeni dvema jonizacionim tehnikama (ESI i MALDI) i različitim masenim detektorima su slični, ali ne i identični. U uzorcima su nađena ista veziva, ali se pojedinačni proteini i peptidi identifikovani primenom dve tehnike razlikuju.

Komplementarnost podataka predstavljena je u Tabeli 4.5, a celokupni rezultati dati su u Prilogu 2. Prisutno je značajno preklapanje dva seta podataka. Jedinstveni peptidi, i na osnovu njih identifikovani proteini, prisutni su u rezultatima obe metode. Najizraženije razlike uočene su kod referentnih materijala, jer je i najveći broj peptida i proteina identifikovan u tom setu uzoraka.

Tabela 4.5. Poređenje identifikacije proteina i peptida u tri seta uzoraka primenom ESI-MS/MS i MALDI-TOF/PSD metodologije

Uzorci	ESI-MS/MS		MALDI-TOF/PSD		Ukupno peptida	Proteini identif. pomoću obe tehnike	Peptidi identif. pomoću obe tehnike
	Identif. proteini	Identif. peptidi	Identif. proteini	Identif. peptidi			
Referentni materijali	47	609	35	136	668	21	79
Model uzorci	43	296	23	82	317	20	61
Uzorci ikona	16	29	12	20	43	4	5



Slika 4.10. Grafičko poređenje identifikacije proteina i peptida u tri seta uzoraka primenom ESI-MS/MS i MALDI-TOF/PSD metodologije

Pomoću ESI-MS ukupno je identifikovano 47 proteina i 609 peptida, dok je pomoću MALDI-MS identifikovano 35 proteina i 136 peptida. Od toga, 25 istih proteina i 79 identičnih peptida nađeno je u oba seta podataka. Većina proteina u analiziranim uzorcima ikona, 11 od 17, detektovano je primenom obe tehnike, 5 proteina detektovano je samo pomoću ESI, a jedan specifično pomoću MALDI. U ovom setu uzoraka samo 5, od ukupno 43 peptida, identifikovano je primenom obe tehnike. U sve tri grupe uzoraka, ukupna pokrivenost sekvenci identifikovanih proteina, povećana je korišćenjem različitih jonizacionih tehnika, ali i zahvaljujući izuzetnoj osetljivosti LTQ-Orbitrap masenog analizatora, kao i HPLC razdvajanja, koje je primenjeno pre analize peptida.

Korišćene zajedno, ove komplementarne tehnike masene spektrometrije omogućile su identifikaciju više peptida u odnosu na svaku od tehnika pojedinačno, usled različitog načina jonizacije, kriterijuma snimanja podataka i procesa fragmentacije u ESI-MS/MS i MALDI-MS/MS [361,369]. Takođe, superiorne performanse ESI-LTQ-Orbitrap masenog spektrometra dovele su do identifikacije žumanceta u analiziranim uzorcima bojenog sloja sa pravoslavnih ikona iz XIX veka.

Obe metodologije primenjene tokom izrade ove doktorske disertacije pokazale su se efikasnim u identifikaciji proteinskih veziva u uzorcima bojenog sloja umetničkih dela. Pomoću LC-MS/MS metodologije na ESI-LTQ-Orbitrap instrumentu detektovani

su proteini prisutni u uzorcima u nižim koncentracijama, u poređenju sa MALDI-TOF MS/MS metodologijom. Hromatografsko razdvajanje pre ESI izvora takođe je doprinelo identifikaciji većeg broja proteina i peptida, jer se samo nekoliko peptida eluira u isto vreme sa kolone i dospeva u jonizacioni izvor. Prednost MALDI-TOF MS/MS je mogućnost većeg broja analiza u kraćem vremenskom periodu, dok HPLC-ESI-LTQ-Orbitrap pruža detaljnije informacije i detektuje proteine u nižim koncentracijama zahvaljujući izuzetnoj osetljivosti. Kombinacija ovih tehnika masene spektrometrije dala je rezultate koji se delimično preklapaju, ali se i međusobno dopunjavaju, čime je postignuta bolja pouzdanost u identifikaciji proteina.

5 ZAKLJUČAK

Analiza uzoraka kulturnog nasleđa pruža informacije koje pomažu u razumevanju tehnike i esencijalne su za konzervaciju i restauraciju. Međutim, uzorci kulturnog nasleđa su malobrojni i dragoceni i za analizu je dostupna samo mala količina materijala. To zahteva razvoj novih i optimizaciju postojećih analitičkih metoda. Poželjno je razviti i optimizovati metode na model uzorcima, pre njihove primene na uzorcima kulturnog nasleđa. Identifikacija proteina u uzorcima sa umetničkih dela često je samo mali korak u celom analitičkom lancu, ali veoma važan, jer bitno utiče na strategiju konzervacije umetničkog dela. Prethodnih godina je proteomika, u kombinaciji sa masenom spektrometrijom, pokazala veliki potencijal u identifikaciji proteinskih materijala u umetničkim delima kao i značajne prednosti u odnosu na metode koje su se ranije koristile. Analiza proteina primenom masene spektrometrije nametnula se kao jedna od najpouzdanijih metoda zahvaljujući svojoj ekstremnoj specifičnosti, pa se zato sve više koristi prilikom rešavanja praktičnih pitanja u konzervaciji.

Glavni cilj ove doktorske disertacije bio je razvoj pouzdane metodologije za analizu proteina u uzorcima kulturnog nasleđa primenom masene spektrometrije i bioinformatike. Proteini su relativno nestabilni prirodni biomolekuli, koji su u ovoj vrsti uzoraka denaturisani i najčešće veoma degradirani. U starim slikama i različitim umetničkim predmetima prisustvo drugih jedinjenja kao što su pigmenti, ulja, lakovi, kao i starenje ili zagađenje vazduha dovode do nepovratnih promena na proteinima, što njihovo proučavanje čini još težim.

Postupak predložen u ovoj doktorskoj disertaciji, veoma je jednostavan i ne zahteva celovitost molekula proteina radi pouzdane identifikacije. Hidrolizom tripsinom

može se ekstrahovati samo nekoliko peptida iz materijala. Njihova identifikacija na osnovu tandem masenih spektara dovoljna u cilju pouzdane identifikacije proteina od kojih potiču. Ipak, kompleksnost ovih uzoraka može ozbiljno ugroziti dobijanje jasnih i nedvosmislenih rezultata primenom MALDI-TOF masene spektrometrije i PMF pristupom, što je i prikazano u prvom delu ove doktorske disertacije.

Tandem masena spektrometrija (TOF/TOF) i PMF rezultati, omogućili su zajedno, u svim model uzorcima, uspešnu identifikaciju proteinskih veziva. Broj sekvenci peptida dovoljan za identifikaciju proteina u literaturi nije precizno definisan, ali postoje sugestije da je za pouzdanu identifikaciju proteina neophodno identifikovati najmanje dva peptida. Poređenjem rezultata dobijenih PMF pristupom i MS/MS analizama uočava se da je manji broj peptida identifikovan na osnovu spektara snimljenih tandem masenom spektrometrijom, ali je identifikacija proteina na ovaj način pouzdanija. Uspeh PMF pristupa u velikoj meri zavisi od broja pikova prisutnih u spektru. Međutim, previše pikova može dovesti i do lažno pozitivnih rezultata. U slučajevima kada je u uzorcima prisutan manji broj peptida, identifikacija na osnovu MS/MS eksperimenata svakako je verodostojnija, a može biti i jedina mogućnost. Dodatne specifične informacije sadržane u fragmentacionim spektrima, pored m/z vrednosti, značajno doprinose pouzdanosti rezultata.

U uzorcima bojenog sloja pravoslavnih ikona, kombinacijom PMF pristupa TOF/PSD eksperimenata, uprkos niskim koncentracijama proteinskih materijala, promenama usled starenja i visokim koncentracijama pigmenata, uspešno je identifikovano prisustvo veziva na bazi kolagena. U ovim uzorcima nađeno je nekoliko sekvenci peptida iz različitih lanaca kolagena. To je bilo dovoljno da se zaključi da uzorci sadrže tutkalo, najverovatnije u sloju podloge, ali precizno poreklo kolagena nije moglo biti određeno na osnovu prikupljenih informacija. Glavni uzroci koji su sprečili određivanje biološkog porekla kolagena bili su nedostatak sekvenci kolagena većine životinja u bazama proteina i ekstenzivna homologija koja postoji među kolagenima sisara, zbog veoma malih evolutivnih razlika.

Rezultati istraživanja predstavljani u prvom delu ove doktorske disertacije ilustruju činjenicu da je moguća uspešna identifikacija proteina koji su prisutni kao veziva u bojenim slojevima starih slika i drugih umetničkih dela primenom proteomike i

MALDI-TOF/TOF masene spektrometrije, što do sada nije objavljeno u literaturi. Glavna svrha TOF/TOF eksperimenata nije bila da se samo potvrde rezultati dobijeni PMF analizom, već i da se uoči i naglasi razlika između rezultata dobijenih ovim različitim pristupima. Pokazano je da se putem MS/MS fragmentacije, na osnovu nekoliko peptida degradiranog proteinskog veziva, može postići identifikacija proteina, za razliku od PMF pristupa gde je neophodan veći broj peptida. Tandem masena spektrometrija povećava šansu da se precizno identifikuju proteini u vezivima zahvaljujući većoj specifičnosti fragmentacionih spektara.

U drugom delu ove doktorske disertacije opisana je primena ESI-LTQ-Orbitrap XL masenog spektrometra za analizu proteina u uzorcima kulturnog nasleđa. Ovaj maseni spektrometar ima preciznost određivanja masa peptida reda veličine ppm. Analiziran je isti set istorijskih uzoraka, zajedno sa referentnim materijalima i model uzorcima kao u prvom delu ove disertacije. Analizom snimljenih spektara dobijene su detaljne informacije o proteinima prisutnim u uzorcima. U poređenju sa rezultatima MALDI-TOF masene spektrometrije, identifikovan je veći broj proteina, sa višim skorovima i pojedinačnih jona i proteina, uz bolju pokrivenost sekvenci. Treba naglasiti pouzdaniju identifikaciju proteina postignutu kod model uzoraka i uzoraka analiziranih pravoslavnih ikona iz XIX veka. U uzorcima ikona, prisustvo kolagenskih materijala, utvrđeno pomoću MALDI-TOF MS/MS, potvrđeno je uz mnogo više informacija. Rezultati su ukazali da se kao vezivo u sloju podloge najverovatnije nalazi goveđi kolagen. Različiti peptidi ovog proteina identifikovani su pomoću dve metode, što je dodatno potvrdilo dobijene rezultate. Najvažniji rezultat svakako je detekcija proteina žumanceta u uzorcima starih ikona samo primenom LC-MS/MS pristupa. U dva uzorka ikona sa ikonostasa crkve u Bariču identifikovani su peptidi dva proteina žumanceta, vitelogenin-2 i apovitelenin-1, što ukazuje na jajčanu temperu kao tehniku slikanja ikona.

Tokom eksperimentalnog rada na ovoj doktorskoj disertaciji utvrđeno je da su za identifikaciju proteinskih veziva u starim slikama rađenim tehnikom tempere efikasne obe korišćene metode. Glavne prednosti LC-ESI-LTQ-Orbitrap u odnosu na MALDI-TOF MS/MS su hromatografsko razdvajanje peptida pre ulaska u maseni spektrometar i visoka preciznost u određivanju mase prekursor jona. Kombinacija dve tehnike meke jonizacije, ESI i MALDI, dala je preklapljene, ali i komplementarne rezultate što je

takođe doprinelo povećanju pouzdanosti rezultata obe metode. Komplementarnosti dva seta rezultata značajno je doprineo različit afinitet dve jonizacione tehnike prema peptidima različitih fizičko-hemijskih osobina.

Sve je veći broj istraživačkih grupa koje primenjuju različite metode proteomike u analizi proteina i peptida u umetničkim i arheološkim predmetima. Postoji još mnogo nerešenih pitanja, ali i mogućnosti. Nepotpuno poznavanje sekvenci proteina često ometa interpretaciju rezultata. Ipak, zahvaljujući konstantnom i brzom rastu biblioteka sekvenci, očekuje se da će problem nedostatka sekvenci proteina biti prevaziđen. Takođe, ogromne mogućnosti leže i u formiranju zajedničke baze znanja koja bi obuhvatala specifične podatke korisne za proučavanje umetničkih i arheoloških predmeta, kao što su vrste i sekvence proteina, mase peptida markera, PMF i tandem masene spektre, zajedno sa alatima pretrage i interpretacije prikupljenih podataka. Trebalo bi posvetiti više pažnje i proučavanju promena u sekvencama proteina usled degradacije proteinskih veziva.

Osim već poznatih izvora proteina u umetničkim i arheološkim predmetima, kao što su slike, lepkovi, malteri sa proteinskim aditivima, kosa, koža i ostaci hrane na arheološkoj keramici, bile bi interesantne i druge primene proteomike, na primer za identifikaciju različitih tipova istorijskih tekstila koji imaju proteine u svom sastavu, kao što su vuna (keratin) i svila (sericin i fibroin). Osim tripsina, koji je do sada isključivo korišćen za hidrolizu proteina u uzorcima kulturnog nasleđa, trebalo bi isprobati i druge enzime (npr. himotripsin) u cilju poboljšanja rezultata. Sigurno je da će proteomika postati vodeća analitička metodologija za rešavanje pitanja koja se tiču proteina u konzervaciji, sa sve većim brojem i sve raznovrsnijim primenama.

6 LITERATURA

1. R.J. Simpson, *Proteins and Proteomics - A Laboratory Manual*, 1st Ed., Cold Spring Harbor, New York (2003)
2. J. Dunkerton, *Natl. Gallery Tech. Bull.*, 17 (1996) 20-31
3. C. Higgit, R. White, *Natl. Gallery Tech. Bull.*, 26 (2005) 88-104
4. M. Medić, *Stari slikarski priručnici*, Republički zavod za zaštitu spomenika kulture, Beograd (1999)
5. R. Mayer, *The Artist's Handbook of Materials and Techniques*, 1st Ed., Faber and Faber, London (1951)
6. A. Andreotti, I. Bonaduce, M.P. Colombini, G. Gautier, F. Modugno, E. Ribechini, *Anal. Chem.*, 78 (2006) 4490-4500
7. R. Checa Moreno, E. Manzano, G. Miron, L.F. Capitan Vallvey, *J. Sep. Sci.*, 31 (2008) 3817-3828
8. R.J. Gettens, G.L. Stout, *Painting Materials – A Short Encyclopaedia*, Dover Publications, Inc., New York (1966)
9. C. Cennini, *Il Libro dell'Arte (XIV) sec.*, edited by R. Simi, R. Carabba, Editore, Lanciano (1932)
10. A. Roy, P. Smith (Eds), *Painting Techniques History, Materials and Studio Practice*, Proceedings of IIC Congress, Dublin, September 1998
11. J.S. Mills, R. White, *The Organic Chemistry of Museum Objects*, 2nd Ed., Butterworth-Heinemann, London (2000)
12. M.T. Doménech-Carbó, *Anal. Chim. Acta*, 621(2) (2008) 109-139
13. F. Pacheco, *El arte de la pintura*, 1st Ed., Cátedra, Madrid (1990)

14. P. Mora, L. Mora, P. Philippot, *La conservation des peintures murales*, Editrice Compositori, Bologna (1977)
15. S.M. Halpine, *Conservation Res.* 51 (1995) 29–69
16. G.N. Ramachandran, 'Modification of collagen and gelatin by chemical reagents', in *Recent Advances in Gelatin and Glue Research*, ed. G. Stainsby, Pergamon Press, London/ New York (1957) p.32
17. D.W. von Endt, M.T. Baker, 'The chemistry of filled animal glue systems', in *Gilded Wood Conservation and History*, ed. D. Bigelow, Sound View Press (1991) p.155–162
18. M.D. Fernández-Díaz, P. Montero, M.C. Gómez-Guillén, *Food Chem.*, 74 (2001) 161–167
19. T. Burjanadze, *Biopolymers*, 32(8) (1992) 941– 949
20. S.K. Holmgren, K.M. Taylor, L.E. Bretscher, *Nature*, 392(6677) (1998) 666–667
21. D. Hickman, T.J. Sims, C.A. Miles, A.J. Bailey, M. de Mari, M. Koopmans, *J. Biotechnol.*, 79 (2000) 245–257
22. S. Jain, H. Kaur, G. Pandav, A. Dewan, D. Saxena, *Univ. Res. J. Dent.*, 4 (2014) 1-9
23. P. Fratzl, *Collagen: Structure and Mechanics*, Springer, New York (2008)
24. M. J. Buehler, *PNAS* 103(33) (2006) 12285–12290
25. D.L. Nelson, M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th Ed., W. H. Freeman, New York (2004)
26. P.L. Privalov, *Adv. Protein Chem.*, 33 (1979) 167–241
27. A. Simon, Y. Grohens, L. Vandanjon, P. Bouseau, E. Balnois, G. Levesque, *Macromol. Symp.*, 203 (2003) 331– 338
28. M.C. Gómez-Guillén, J. Turnay, M.D. Fernández-Díaz, N. Ulmo, M.A. Lizarbe, P. Montero, *Food Hydrocoll.*, 16 (2002) 25–34
29. H. Hörmann, H. Schlebusch, *Biochemistry*, 10 (6) (1971) 932–937
30. P. Cok, B. De Bernard, O. Radillo, M.P. Francescato, *Synoptic Food Composition Tables*, Piccini Ed., Padova (1987)
31. F. Casadio, I. Giangualano, F. Piqué, *Reviews in Conservation*, 5 (2004) 63–80

32. E.C.Y. Li-Chan, H.-O. Kim, *Structure and Chemical Compositions of Eggs*, in: Y. Mine (Ed.), *Egg Bioscience and Biotechnology*, Wiley-Interscience, Hoboken, New Jersey (2008) p. 1–96.
33. P.C. Painter, J.L. Koenig, *Biopolymers*, 15 (1976) 2155-2166
34. R. Huopalahti, R. López-Fandiño, M. Anton, R. Schade, eds., *Bioactive egg compounds*, Springer-Verlag, Heidelberg (2007)
35. Encyclopedia Britannica: *Low-density lipoprotein (physiology)*, <http://www.britannica.com/EBchecked/media/92254/Cutaway-view-of-a-low-density-lipoprotein-complex-The-LDL> [accessed: 23. 10. 2012.]
36. A. Casoli, P. Musini, G. Palla, *J. Chromatogr. A*, 731 (1996), 237–246
37. D.S. Horne, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 11 (2006) 148–153
38. P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, *Dairy chemistry and biochemistry*, Springer, London (1998)
39. M.R. Schilling, H.P. Khanjian, L.A.C. Souza, *J. Am. Inst. Conserv.*, 35 (1996) 45–59
40. M.P. Colombini, F. Modugno, *Organic Mass Spectrometry in Art and Archaeology*, John Wiley & Sons, Chichester (2009)
41. A. Karpowicz, *Stud. Conserv.*, 26 (1981) 153–160
42. J. Mallegol, L. Gonon, J. Lemaire, J.-L. Gardenette, *Polym. Degrad. Stab.*, 72 (2001) 191-197
43. J. Mallegol, J.-L. Gardenette, J. Lemaire, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76 (1999) 967-976
44. S. Boyatzis, E. Ioakimoglou, P. Argitis, *J. Appl. Polym. Sci.*, 84 (2002) 936-949
45. M.P. Colombini, F. Modugno, *J. Sep. Sci.*, 27 (2004) 147–160
46. P. Messier, *Topics in Photographic Preservation*, 4 (1991) 124–135
47. L. Rampazzi, F. Cariati, G. Tanda, M.P. Colombini, *J. Cult. Herit*, 3 (2002) 237–240
48. M.P. Colombini, F. Modugno, R. Fuoco, A. Tognazzi, *Microchem. J.*, 73 (2002) 175–185
49. J.J. Boon, S. Peulvé, O.F. van den Brink, M.C. Duursma, D. Rainford, *Molecular Aspects of Mobile and Stationary Phases in Ageing Tempera and*

- Oil Paint Films, in Early Italian Paintings, Techniques and Analysis*, edited by T. Bakkenist, R. Hoppenbrouwers, H. Dubois, Limburg Conservation Institute, Maastricht (1996) p.35–56
50. M.R. Schilling, H.P. Khanjian, *J. Am. Inst. Conserv.*, 35 (1996) 123–144
 51. M.P. Colombini, F. Modugno, A. Giacomelli, *J. Chromatogr., A*, 846 (1999) 101–111
 52. J. de la Cruz-Cañizares, M.T. Doménech-Carbó, J.V. Gimeno-Adelantado, R. Mateo-Castro, F. Bosch-Reig, *J. Chromatogr., A*, 1025 (2004) 277–285
 53. G. Gautier, M.P. Colombini, *Talanta*, 73 (2007) 95–102
 54. S.L. Vallance, *Analyst*, 122 (1997) 75R–81R
 55. M.P. Colombini, R. Fuoco, A. Giacomelli, B. Muscatello, N. Fanelli, *Science and Technology for Cultural Heritage*, 7(1), 49–58 (1998)
 56. A. Andreotti, M.P. Colombini, G. Gautier, *Proceedings of the Organic Materials in Wall Paintings Project Workshop*, Prato/Florence (Italy), 17 June (2003)
 57. J. Wouters, M. Van Bos, K. Lamens, *Stud. Conserv.*, 45 (2000) 106–116
 58. E. Kenndler, K. Schmidt-Beiwl, F. Mairinger, M. Pöhm, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 342 (1992) 135–141
 59. R. Aruga, P. Mirti, A. Casoli, G. Palla, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 365(6) (1999) 559-566
 60. R. Mateo, M.T. Doménech, V. Peris, J.V. Gimeno, F. Bosch, *J. Chromatogr. A*, 778 (1997) 373-381
 61. B.M. Feilden, *Insects and Other Pests as Causes of Decay, in Conservation of Historic Buildings*, Butterworth Scientific, London (2003) p. 139–156
 62. C. Hecht, S. Bieler, C. Griehl, *J. Chromatogr. A*, 1088 (2005) 121–125
 63. P. Tiano, *Science and Technology for Cultural Heritage*, 7 (1998) 19–38
 64. G. Leo, I. Bonaduce, A. Andreotti, G. Marino, P. Pucci, M.P. Colombini, L. Birolo, *Anal. Chem.*, 83 (2011) 2056-2064
 65. M. Matteini, A.M. Moles, *La Chimica nel Restauro. I materiali dell'arte pittorica*, Ed. Nardini, Firenze (2002)
 66. H. Kühn, *Conservation and Restoration of Works of Art and Antiquities*, vol. 1, Butterworths, London (1986) p. 157-167

67. C. V. Horie, *Materials for Conservation. Organic consolidants, adhesives and coatings*, Butterworths, London, (1987)
68. I.C.A. Sandu, S. Bracci, I. Sandu, M. Lobefaro, *Microsc. Res. Tech.*, 72 (2009) 755-765
69. R. Checa-Moreno, E. Manzano, G. Mirón, L.F. Capitan-Vallvey, *Talanta*, 75(3) (2008) 697-704
70. A. Nevin, I. Osticioli, D. Anglos, A. Burnostck, S. Cather, E. Castellucci, *J. Raman Spectrosc.*, 39 (2008) 993-1000
71. R. White, *Natl. Gallery Tech. Bull.*, 8 (1984) 5-14
72. L. Cartechini, M. Vagnini, M. Palmieri, L. Pitzurra, T. Mello, J. Mazurek, G. Chiari, *Acc. Chem. Res.*, 43 (2010) 867-876
73. M.P. Colombini, A. Andreotti, I. Bonaduce, F. Modugno, E. Ribechini, *Acc. Chem. Res.*, 43 (2010) 715-727
74. E. Manzano, N. Navas, R. Checa-Moreno, L.R. Simón, L.F. Capitan-Vallvey, *Talanta* 77(5) (2009) 1724–1731
75. A. Nevin, I. Osticioli, D. Anglos, A. Burnstock, S. Cather, E. Castellucci, *Anal. Chem.*, 79(16) (2007) 6143–6151
76. L. Monico, G. Van der Snickt, K. Janssens, W. De Nolf, C. Miliani, J. Verbeeck, H. Tian, H. Tan, J. Dik, M. Radepont, M. Cotte, *Anal. Chem.* 83(4) (2011) 1214-1223
77. I. Bonaduce, L. Carlyle, M.P. Colombini, C. Duce, C. Ferrari, E. Ribechini, P. Selleri, M.R. Tiné, *PLoS ONE*, 7 (2012) e49333
78. C. Duce, L. Ghezzi, M. Onor, I. Bonaduce, M. Colombini, M. Tiné, E. Bramanti, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 2183-2193
79. W. Ostwald, *Letters to a Painter*, H. W. Morse, Boston, New York, Chicago, London, (1904) p. 160
80. A.P. Laurie, *The Materials of the Painter's Craft in Europe and Egypt from Earliest Times to the End of the Xviiith Century, with Some Account of Their Preparation and Use*, T. N. Foulis, London, Edinburgh (1910) p. 447
81. A. P. Laurie, *Greek and Roman Methods of Painting. Some Comments on the Statements Made by Pliny and Vitruvius About Wall and Panel Paintin*, University Press, Cambridge (1910) p. 124

82. W. Ostwald, *Technol. Stud. Field F. A.*, 4 (1936) 135–144
83. J. Plesters, *Stud. Conserv.*, 2 (1956) 110-157
84. M. C. Gay, *Annales du Laboratoire de Recherche des Musées de France* (1970) 8–24
85. M. Johnson, E. Packard, *Stud. Conserv.* 16 (1971) 145–164
86. E. Martin, *Stud. Conserv.* 22 (1977) 63–67
87. C. Cren-Olivé, E. Martin, C. Rolando, C. Vieillescazes, In *Proceedings of 6th International Conference on Non-Destructive Testing and Microanalysis for the Diagnostics and Conservation of the Cultural and Environmental Heritage*, C. Parisi, S. Gagliardi, G.M. Parisi, G. Torcinaro, G., Eds., Rome (1999) p. 1193-1206
88. C. Cren-Olivé, E. Martin, C. Vieillescazes, C. Rolando, *Art et Chimie, la couleur. Actes du congrès*. Paris, 16-18 septembre 1998, CNRS Editions (1998) p. 111-114
89. R. Wolbers, G. Landrey, *G. Am. Inst. Conserv.* Washington DC (1987) 168–202
90. I.C.A. Sandu, A.C.A. Roque, P. Matteini, S. Schäfer, G. Agati, C.R. Correia, J.F.F.P. Viana, *Microsc. Res. Tech.*, 75 (2012) 316–324
91. S. Kuckova, I.C.A. Sandu, M. Crhova, R. Hynek, I. Fogas, S.J. Schafer, *Cult. Her.*, 14 (2013) 31–37
92. I.C.A. Sandu, E. Murta, R. Veiga, V.S.F. Muralha, M. Pereira, S. Kuckova, T. Busani, *Microsc. Res. Tech.*, 76 (2013) 733–743
93. D. Magrini, S. Bracci, I.C.A. Sandu, *Procedia Chem.*, 8 (2013) 194–201
94. T. Rabilloud, J.-M. Strub, S. Luche, A.v. Dorselaer, J. Lunardi, *Proteomics*, 1 (2001) 699–704
95. R. L. Feller, *Science* 120 (1954) 1069–1070
96. L. Masschelein-Kleiner, J. Heylen, F. Tricot-Marckx, *Stud. Conserv.*, 13 (1968) 105–121
97. R.J. Meilunas, J.G. Bentsen, A. Steinberg, *Stud. Conserv.*, 35 (1990) 33–51
98. J. Pilc, R. White, *Natl. Gallery Tech. Bull.*, 16 (1995) 73–84
99. J. Van Der Weerd, H. Brammer, J.J. Boon, R.M.A. Heeren, *Appl. Spectrosc.*, 56 (2002) 275–283

100. S. Prati, E. Joseph, G. Sciutto, R. Mazzeo, *Acc. Chem. Res.*, 43 (2010) 792–801
101. C. Martin de Fonjaudran, A. Nevin, F. Piqué, S. Cather, *Anal. Bioanal. Chem.* 392 (2008) 77–86
102. N. Salvado, S. Buti, M.J. Tobin, E. Pantos, E.J.N.W. Prag, T. Pradell, *Anal. Chem.*, 77 (2005) 3444–3451
103. M. Cotte, J. Susini, V.A. Solé, Y. Taniguchi, J. Chillida, E. Checroun, P.J. Walter, *Anal. At. Spectrom.*, 23 (2008) 820–828
104. L. Bertrand, L. Robinet, S. Cohen, C. Sandt, A.-S. Hô, B. Soulier, A. Lattuati-Derieux, J.-P. Echard, *Anal. Bioanal. Chem.*, 399 (2011) 3025–3032
105. P. Ricciardi, J.K. Delaney, M. Facini, J.G. Zeibel, M. Picollo, S. Lomax, M. Loew, *Angew. Chem., Int. Ed.* 51 (2012) 5607–5610
106. K.A. Dooley, S. Lomax, J.G. Zeibel, C. Miliani, P. Ricciardi, A. Hoenigswald, M. Loew, J.K. Delaney, *Analyst*, 138 (2013) 4838–4848
107. G. Sciutto, S. Prati, I. Bonacini, P. Oliveri, R. Mazzeo, *Microchem. J.*, 112 (2014) 87–96
108. P. Ropret, R. Zoubek, A. Skapin, M. Bukovec, *Mater. Charact.*, 58 (2007) 1148–1159
109. E. Manzano, J. Romero-Pastor, N. Navas, L.R. Rodríguez-Simón, S. Cardell, *Vib. Spectrosc.* 53 (2010) 260–268
110. C. Duce, E. Bramanti, L. Ghezzi, L. Bernazzani, I. Bonaduce, M.P. Colombini, A. Spepi, S. Biagi, M.R. Tine, *Dalton Trans.*, 42 (2013) 5975–5984
111. S. A. Centeno, M.I. Guzman, A. Yamazakikleps C.O. Della Vedova, *J. Am. Inst. Conserv.*, 43 (2004) 139–150
112. C Miliani, F. Rosi, B.G. Brunetti, A. Sgamellotti, *Acc. Chem. Res.*, 43 (2010) 728–738
113. P. Walter, *New Portable Instruments for a Non-Invasive Analysis of Paintings*. In *Technological Innovation Liliane Bettencourt; Chemical Analysis: History and Innovations*, Philippe Walter; S. Haroche, Ed., Collège de France, Paris (2014)

114. C. Rosi, F. Borgia, I. Benedetti, P. Brunetti, B.G. Sgamellotti, *A. Appl. Spectrosc.*, 61 (2007) 293–299
115. F. Rosi, A. Daveri, C. Miliani, G. Verri, P. Benedetti, F. Piqué, B. Brunetti, A. Sgamellotti, *Anal. Bioanal. Chem.* 395 (2009) 2097–2106
116. P. Vandenberghe, B. Wehling, L. Moens, H. Edwards, M. De Reu, G. Van Hooydonk, *Anal. Chim. Acta*, 407 (2000) 261–274
117. G. Burrafato, M. Calabrese, A. Cosentino, A.M. Gueli, S.O. Troja, J. Zuccarello, *Raman Spectrosc.*, 35 (2004) 879–886
118. A. Nevin, S. Cather, C. Fotakis, *Anal. Chim. Acta*, 573-574 (2006) 341-346
119. A. O’Grady, A.C. Dennis, D. Denvir, J.J. McGarvey, S.E. Bell, *J. Anal. Chem.*, 73 (2001) 2058–2065
120. I. Osticioli, A. Zoppi, E.M. Castellucci, *J. Raman Spectrosc.*, 37 (2006) 974–980
121. I. Osticioli, A. Nevin, D. Anglos, A. Burnstock, S. Cather, M. Becucci, C. Fotakis, E. Castellucci, *J. Raman Spectrosc.*, 39 (2008) 307–313
122. J. Romero-Pastor, C. Cardell, E. Manzano, Á. Yebra-Rodríguez, N.J. Navas, *Raman Spectrosc.*, 42 (2011) 2137–2142
123. A. Romani, C. Clementi, C. Miliani, G. Favaro, *Acc. Chem. Res.*, 43 (2010) 837–846
124. A. Nevin, A. Cesaratto, S. Bellei, C. D’Andrea, L.V.G Toniolo, D. Comelli, *Sensors* 14 (2014) 6338–6355
125. A. Nevin, D. Comelli, G. Valentini, D. Anglos, A. Burnstock, S. Cather, R. Cubeddu, *Anal. Bioanal. Chem.*, 388 (2007) 1897-1905
126. A. Nevin, S. Cather, A. Burnstock, D. Anglos, *Appl. Spectrosc.* 62 (2008) 481-489
127. K. Keune, J.J. Boon, *Anal. Chem.*, 76 (2004) 1374–1385
128. R. Van Ham, L. Van Vaeck, F. Adams, A. Adriaens, *Anal. Bioanal. Chem.*, 383 (2005) 991–997
129. A. Adriaens, M.G. Dowsett, *Appl. Surf. Sci.*, 252 (2006) 7096–7101
130. V. Mazel, P. Richardin, D. Touboul, A. Brunelle, P. Walter, O. Laprèvote, *Anal. Chim. Acta*, 570 (2006) 34–40

131. K. Keune, F. Hoogland, J.J. Boon, D. Peggie, C. Higgitt, *Int. J. Mass Spectrom.*, 289 (2009) 22–34
132. J. Sanyova, S. Cersoy, P. Richardin, O. Lapr evote, P. Walter, A. Brunelle, *Anal. Chem.*, 83 (2011) 753–760
133. A. Atrei, F. Benetti, S. Bracci, D. Magrini, N. Marchettini, *J. Cult. Herit.* 15(1) (2014) 80-84
134. A. Atrei, F. Benetti, E. Gliozzo, G. Perra, N. Marchettini, *Int. J. Mass Spectrom.*, 369 (2014) 9–15
135. M.S. Wagner, D.G. Castner, *Langmuir*, 17 (2001) 4649–4660
136. I. Kaml, K. Vcelakova, E. Kenndler, *J. Sep. Sci.*, 27 (2004) 161–166
137. S.M. Harrison, I. Kaml, V. Prokoratova, M. Mazanek, E. Kenndler, *Anal. Bioanal. Chem.*, 382 (2005) 1520–1526
138. I. Gluch, A. Urbanska, I. Zadrozna, K. Pawlak, M. Jarosz, *Chem. Analit.*, 51 (2006) 195–210
139. M. Hey, *Stud. Conserv.*, 3 (1958) 183–193
140. L. Masschelein-Kleiner, *Stud. Conserv.*, 19 (1974) 207–211
141. J. Tomek, D. Pechova, *Stud. Conserv.*, 37 (1992) 39–41
142. S. Moore, D.H. Spackman, W.H. Stein, *Anal. Chem.*, 30 (1958) 1185–1190
143. S. Keck, T.J. Peters, *Stud. Conserv.*, 14 (1969) 75–82
144. S.M. Halpine, *Stud. Conserv.*, 37 (1992) 22–38
145. C.M. Grzywacz, *J. Chromatogr. A*, 676 (1994) 177–183
146. F. Ronca, *Stud. Conserv.*, 39 (1994) 107–120
147. P. Prikryl, L. Havlickova, V. Pacakova, J. Hradilova, K. Štulık, P. Hofta, *J. Sep. Sci.*, 29 (2006) 2653-2663
148. J. Peris-Vicente, J.V. Gimeno Adelantado, J. V.; M.T. Domenech-Carbo, R.M. Castro, F.B. Reig, *Talanta*, 68 (2006) 1648–1654
149. R. Checa-Moreno, E. Manzano, G. Miron, L.F. Capitan-Vallvey, *J. Sep. Sci.*, 31 (2008) 3817–3828
150. M. Potenza, G. Sabatino, F. Giambi, L. Rosi, A. Papini, L. Dei, *Anal. Bioanal. Chem.*, 405 (2013) 1–11
151. M.E. Swartz, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 28 (2005) 1253–1263

152. R. Zangrando, R. Piazza, W.R.L. Cairns, F.C. Izzo, A. Vianello, E. Zendri, A. Gambaro, *Anal. Chim. Acta*, 675 (2010) 1–7
153. B. Witkowski, M. Biesaga, T. Gierczak, *Anal. Methods*, 4 (2012) 1221–1228
154. B. Singer, R. McGuigan, *Annali di Chimica*, 97 (2007) 405–417
155. D.A. Scott, N. Khandekar, M.R. Schilling, N. Turner, Y. Taniguchi, H. Khanjian, *Stud. Conserv.*, 46 (2001) 93–108
156. W. Nowik, *Stud. Conserv.*, 40 (1995) 120–126
157. R. Mateo-Castro, M.T. Doménech-Carbo, V. Peris Martinez, J.V. Gimeno Adelantado, F. Bosch Reig, *J. Chromatogr., A*, 778 (1997) 373–381
158. A. Casoli, P. Mirti, G. Palla, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 352 (1995) 372–379
159. G. Chiavari, N. Gandini, P. Russo, D. Fabbri, *Chromatographia*, 47 (1998) 420–426
160. G. Chiavari, G. Lanterna, C. Luca, M. Matteini, I.C.A. Sandu, *Chromatographia*, 57 (2003) 645–648
161. I. Bonaduce, M.P. Colombini, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 17 (2003) 2523–2527
162. M. Carbinì, R. Stevanato, M. Rovea, P. Traldi, D. Favretto, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 10 (1996) 1240–1242
163. S.A. Buckley, A.W. Stott, R.P. Evershed, *Analyst*, 124 (1999) 443–452
164. G. Chiavari, D. Fabbri, S. Prati, *J. Chromatogr., A*, 922 (2001) 235–241
165. A. Lluveras, I. Bonaduce, A. Andreotti, M.P. Colombini, *Anal. Chem.*, 82 (2010) 376–386
166. O. Ciferri, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(3) (1999) 879–885
167. E. Bock, W. Sand, *J. Appl. Bacteriol.*, 74 (1993) 503–514
168. L. Rampazzi, L. Campo, F. Cariati, G. Tanda, M.P. Colombini, *Archaeometry*, 49 (2007) 559–569
169. F. Ospitali, A. Rattazzi, M.P. Colombini, A. Andreotti, G. di Lonardo, *J. Cult. Her.*, 8 (2007) 323–327
170. R. Mateo-Castro, J.V. Gimeno-Adelantado, F. Bosch-Reig, A. Doménech-Carbó, M.J. Casas-Catalán, L. Osete-Cortina, J. De la Cruz-Cañizares, M.T. Doménech-Carbó, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 369 (2001) 642–646

171. K.B. Kalinina, I. Bonaduce, M.P. Colombini, I.S. Artemieva, *J. Cult. Her.*, 13 (2012) 259–274
172. V. Pitthard, M. Griesser, S. Stanek, T. Bayerova, *Macromol. Symp.*, 238 (2006) 37–45
173. A. Andreotti, I. Bonaduce, V. Castelvetro, M.P. Colombini, A. Lluveras-Tenorio, M. Raihane, M. Ibnoussina, A. Boujamid, *J. Cult. Herit.*, 15 (2014) 300–307
174. A. Casoli, P.C. Musini, G. Palla, *Chromatographia*, 42(7) (1996) 421–430
175. A. Casoli, G. Palla, J. Tavlaridis, *Stud. Conserv.*, 43 (1998) 150–158
176. E. Kouloumpi, G. Lawson, V. Pavlidis, *Anal. Bioanal. Chem.*, 387 (2007) 803–812
177. F. Caruso, S. Orecchio, M.G. Cicero, C. Di Stefano, *J. Chromatogr., A*, 1147 (2007) 206–212
178. L. Castellani, P. Ferrantelli, M. Sinibaldi, G. Vigliano, *J. Cult. Her.*, 2 (2001) 209–215
179. M.P. Colombini, F. Modugno, E. Menicagli, R. Fuoco, A. Giacomelli, *Microchem. J.*, 67 (2000) 291–300
180. B. Ramirez-Barat, S. de la Vina, *Stud. Conserv.*, 46 (2001) 282–288
181. A. Heginbotham, V. Millay, M. Quick, *J. Am. Inst. Conserv.*, 45 (2006) 89–105
182. M. Smith, *Science*, 131 (1960) 699–702.
183. P.L. Jones, *Stud. Conserv.*, 7 (1962) 10–16
184. M.J. Allison, A.A. Hossaini, N. Castro, J. Munizaga, *A. Pezzia, Am. J. Phys. Anthropol.*, 44 (1976) 55–61
185. A.M. Child, A.M. Pollard, *J. Archaeol. Sci.*, 19 (1992) 39–47
186. L. Kockaert, P. Gausset, M. Dubi-Rucquoy, *Stud. Conserv.*, 34 (1989) 183–188
187. P.A. Klausmeyer, R.P. Albertson, M.R. Schmidt, R.T. Woodland, M. Blewett, *e-Preserv. Sci*, 6 (2009) 151–162
188. J. Mazurek, M.R. Schilling, G. Chiari, A. Heginbotham, *Antibody assay to characterize binding media in paint*, in: J. Bridgland (Ed.), *Preprints of*

- ICOM-CC, 15th Triennial Meeting, New Delhi, 2008, ICOM Committee for Conservation, New Delhi (2008) p. 849–856
189. G. Hodgins, R. Hedges, *Art et Chimie, la couleur*, Actes du congress, CNRS, Ed., Paris (2000)
 190. J. Mazurek, *Antibody Assay to Characterize Binding Media in Paint*, California State University Northridge, California (2007) p. 86
 191. J. Arslanoglu, J. Schultz, J. Loike, K. Peterson, *J. Biosci.*, 35 (2010) 3–10
 192. J. Schultz, J. Arslanoglu, K. Petersen, *Conservation and the Eastern Mediterranean*, IIC Congress, Istanbul (2010) p. 269
 193. H.Y. Lee, N. Atlasevich, C. Granzotto, J. Schultz, J. Loike, J. Arslanoglu, *Anal. Methods*, 7 (2015) 187–196
 194. M. Palmieri, M. Vagnini, L. Pitzurra, P. Rocchi, B. Brunetti, A. Sgamellotti, L. Cartechini, *Anal. Bioanal. Chem.*, 399 (2011) 3011–3023
 195. J. Mazurek, M. Svoboda, J. Maish, K. Kawahara, S. Fukakusa, T. Nakazawa, Y. Taniguchi, *e-Preserv. Sci.*, 11 (2014) 76–83
 196. M. Gambino, F. Cappitelli, C. Cattò, A. Carpen, P. Principi, L. Ghezzi, I. Bonaduce, E. Galano, P. Pucci, L. Birolo, F. Villa, F. Forlani, *J. Biosci.*, 38 (2013) 397–408
 197. J. Arslanoglu, S. Zaleski, J. Loike, *Anal. Bioanal. Chem.*, 399 (2011) 2997–3010
 198. L. Kockaert, P. Gausset, M. Dubi-Rucquoy, *Stud. Conserv.*, 34 (1989) 183–188;
 199. M. Vagnini, L. Pitzurra, L. Cartechini, C. Miliani, B. Brunetti, A. Sgamellotti, *Anal. Bioanal. Chem.*, 392 (2008) 57–64
 200. L. Dolci, G. Sciutto, M. Guardigli, M. Rizzoli, S. Prati, R. Mazzeo, A. Roda, *Anal. Bioanal. Chem.*, 392 (2008) 29–35
 201. G. Sciutto, L. Dolci, A. Buragina, S. Prati, M. Guardigli, R. Mazzeo, A. Roda, *Anal. Bioanal. Chem.*, 399 (2010) 2889–2897
 202. P. Kahn, *Science*, 270 (1995) 369–370
 203. M.R. Wilkins, C. Pasquali, R.D. Appel, K. Ou, O. Golaz, J.C. Sanchez, J.X. Yan, A.A. Gooley, G. Hughes, I. Humphery-Smith, K.L. Williams, D.F. Hochstrasser, *Bio/Technology*, 14 (1996) 61–65

204. J.R. Yates, A.L. Osterman, *Chem. Rev.*, 107 (2007) 3363–336
205. N.L. Anderson, N.G. Anderson, *Electrophoresis*, 19 (1998) 1853–1861
206. P.Q. James, *Rev. Biophys.*, 30 (1997) 279–331
207. W.P. Blackstock, M.P. Weir, *Trends Biotechnol.*, 17 (1999) 121–127
208. R. Aebersold, M. Mann, *Nature*, 422 (2003) 198–207
209. N.L. Kelleher, H.Y. Lin, G.A. Valaskovic, D.J. Aaserud, E.K. Fridriksson, F.W. McLafferty, *J. Am. Chem. Soc.*, 121 (1999) 806–812
210. B. Bogdanov, R.D. Smith, *Mass Spectrom. Rev.*, 24 (2005) 168–200
211. N.L. Kelleher, *Anal. Chem.*, 76 (2004) 196A–203A
212. G.E. Reid, S.A. McLuckey, *J. Mass Spectrom.*, 37 (2002) 663–675
213. B.T. Chait, *Science*, 314 (2006) 65–66
214. A.D. Catherman, O.S. Skinner, N.L. Kelleher, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 445 (2014) 683–693
215. L. Switzar, M. Giera, W. M. A. Niessen, *Journal of Proteome Research* 12(3) (2013) 1067–1077
216. D.J.C. Pappin, P. Hojrup, A.J. Bleasby, *Curr. Biol.*, 3 (1993) 327–332
217. J.R. Yates, S. Speicher, P.R. Griffin, T. Hunkapiller, *Anal. Biochem.*, 214(2) (1993) 397–408
218. P. Roepstorff, J. Fohlman, *Biomed. Mass Spectrom.*, 11 (1984) 601–601
219. Y. Ma, Y. Lu, H. Zeng, D. Ron, W. Mo, T.A. Neubert, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 15(18) (2001) 1693–1700
220. F.W. McLafferty, *Tandem mass spectrometry* edited by F.W. McLafferty ed., New York (1983)
221. J.A. Taylor, R.S. Johnson, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 2594–2604
222. M. Mann, M. Wilm, *Anal. Chem.*, 66(24) (1994) 4390–4399
223. <http://unipept.ugent.be/clidocs/casestudies/tpa> [accessed: 01. 02. 2017.]
224. J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse, *Science*, 246 (1989) 64–71
225. M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, 60 (1988) 2299–2301
226. K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida and T. Matsuo, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2 (1988) 151–153
227. I.A. Papayannopoulos, *Mass Spectrom. Rev.*, 14 (1995) 49–73

228. K. Biemann, *Biol. Mass Spectrom.*, 16 (1988) 99-111
229. S. Kuckova, R. Hynek, M. Kodicek, *Anal. Bioanal. Chem.*, 388 (2007) 201–206
230. <http://web.expasy.org/docs/relnotes/relstat.html> [accessed: 23. 12. 2015.]
231. <http://www.matrixscience.com/> [accessed: 23. 12. 2015.]
232. D.F. Torgerson, R.P. Skowronski, R.D. Macfarlane, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 60 (1974) 616–621
233. H.D. Beckey, *Res. Dev.*, 20 (1969) 26–31
234. M. Barber, R.S. Bordoli, R.D. Sedgwick, A.N. Tyler, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 7 (1981) 325–327
235. M. Yamashita, J.B. Fenn, *J. Phys. Chem.*, 88 (1984) 4451–4459
236. P. Gates, *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI)*, <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/maldi-ionisation.xhtml> [accessed: 24. 12. 2015.]
237. W.C. Wiley, I.H. McLaren, *Rev. Sci. Instrum.*, 26 (1955) 1150-1157
238. P. Gates, Mass Spectrometry Theory Index, <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/theory.html> [accessed: 24. 12. 2015.]
239. D. Suckau, A. Resemann, M. Schuerenberg, P. Hufnagel, J. Franzen, A. Holle, *Anal. Bioanal. Chem.*, 376(7) (2003) 952-965
240. N. Shenar, N. Sommerer, J. Martinez, C. Enjalbal, *J. Mass Spectrom.*, 44 (2009) 621–632
241. M. Dole, L.L. Mack, R.L. Hines, R.C. Mobley, L.D. Ferguson, M.B. Alice, *J. Chem. Phys.*, 49 (1968) 2240–2249
242. M.L. Aleksandrov, L.N. Gall, V.N. Krasnov, V.I. Nikolaev, V.A. Pavlenko, V.A. Shkurov, *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, 277 (1984) 379–383 (in Russian)
243. M.S. Wilm, M. Mann, *Int. J. Mass Spectrom.*, 136 (1994) 167–180
244. S.J. Gaskell, *J. Mass Spectrom.*, 32 (1998) 677–688
245. Q. Hu, R. J. Noll, H. Li, A. Makarov, M. Hardman, R.G. Cooks, *J. Mass Spectrom.*, 40 (2005) 430–443
246. R.H. Perry, R.G. Cooks, R.J. Noll, *Mass Spectrom. Rev.*, 27 (2008) 661–699
247. S.P. Gygi, R. Aebersold, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4 (2000) 489–494
248. K. Gevaert, J. Vandekerckhove, *Electrophoresis*, 21 (2000) 1145–1154

249. R. Vinciguerra, A. De Chiaro, P. Pucci, G. Marino, L. Birolo, *Microchem. J.*, 126 (2016) 341–348
250. P.H. Ostrom, M. Schall, H. Gandhi, T.-L. Shen, P.V. Hauschka, J.R. Strahler, et al., *Geochim. Cosmochim. Acta*, 64 (2000) 1043–1050,
251. C. Tokarski, E. Martin, C. Cren-Olivé, C. Rolando, In *Proceedings of the International Congress on Molecular Biology and Cultural Heritage*, Sevilla, C. Saiz-Jimenez, Ed.; A.A. Balkema, Spain (2003) p. 119–130
252. Tokarski, C.; Cren-Olive, C.; Martin, E.; Rolando, C. In *Non-Destructive Testing and Microanalysis for the Diagnostics and Conservation of the Cultural and Environmental Heritage*; R. Van Grieken, L. Van't dack, G. Meersman, eds., University of Antwerp, Belgium (2002)
253. R. Hynek, S. Kuckova, J. Hradilova, M. Kodicek, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 18 (2004) 1896–1900
254. S. Kuckova, I. Nemeč, R. Hynek, J. Hradilova, T. Grygar, *Anal. Bioanal. Chem.*, 382 (2005) 275–282
255. C. Tokarski, E. Martin, C. Rolando, C. Cren-Olivé, *Anal. Chem.*, 78 (2006) 1494–1502
256. D.P. Kirby, N. Khandekar, J. Arslanoglu, K. Sutherland, in *Preprints of the 16th Triennial Conference, ICOM-CC, Paper 1610*, Lisbon (2011)
257. Kuckova, S.; Hynek, R.; Kodicek, M. *J. Cult. Her.*, 10 (2009) 244–247
258. Kuckova, S.; Crhova, M.; Vankova, L.; Hnizda, A.; Hynek, R.; Kodicek, M., *Int. J. Mass Spectrom.*, 284 (2009) 42–46
259. D.P. Kirby, M. Buckley, E. Promise, S.A. Trauger, T.R. Holdcraft, *Analyst*, 138 (2013) 4849–4858
260. W. Fremout, S. Kuckova, M. Crhova, J. Sanyova, S. Saverwyns, R. Hynek, M. Kodicek, P. Vandenabeele, L. Moens, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 25 (2011) 1631–1640
261. J. Romero-Pastor, N. Navas, S. Kuckova, A. Rodríguez-Navarro, C. Cardell, *J. Mass Spectrom.*, 47 (2012) 322–330
262. M.C. Krizkova, S.H. Kuckova, J. Santrucek, R. Hynek, *Constr. Build. Mater.*, 50 (2014) 219–225

263. G. Ranalli, G. Alfano, C. Belli, G. Lustrato, M.P. Colombini, I. Bonaduce, E. Zanardini, P. Abbruscato, F. Cappitelli, C. Sorlini, *J. Appl. Microbiol.*, 98 (2005) 73–83
264. P. Antonioli, G. Zapparoli, P. Abbruscato, C. Sorlini, G. Ranalli, P.G. Righetti, *Proteomics*, 5 (2005) 2453–2459
265. S.H. Kuckova, M. Crhova Krizkova, C.L.C. Pereira, R. Hynek, O. Lavrova, T. Busani, L.C. Branco, I.C.A. Sandu, *Microsc. Res. Tech.*, 77 (2014) 574–585
266. J. Hill Stoner, R. Rushfield, *Conservation of Easel Paintings*; Routledge, Taylor & Francis Group, London and New York (2012)
267. I.D. van der Werf, C.D. Calvano, R. Laviano, A. Simonetti, L. Sabbatini, *Microchem. J.*, 106 (2013) 87–94
268. I.D. van der Werf, C.D. Calvano, F. Palmisano, L. Sabbatini, *Anal. Chim. Acta*, 718 (2012) 1–10
269. C.D. Calvano, I.D. van der Werf, F. Palmisano, L. Sabbatini, *Anal. Bioanal. Chem.*, 407 (2015) 1–8
270. S. Kuckova, I.C.A. Sandu, M. Crhova, R. Hynek, I. Fogas, V.S. Muralha, A.V. Sandu, *Microchem. J.*, 110 (2013) 538–544
271. S. Kuckova, I.C.A. Sandu, S. Schafere, M. Crhova, R. Hynek, I. Fogas, *J. Cult. Herit.*, 14 (2013) 31–37
272. W. Fremout, M. Dhaenens, S. Saverwyns, J. Sanyova, P. Vandenabeele, D. Deforce, L. Moens, *Anal. Chim. Acta*, 658 (2010) 156–162
273. A. Chambery, A. Di Maro, C. Sanges, V. Severino, M. Tarantino, A. Lamberti, A. Parente, P. Arcari, *Anal. Bioanal. Chem.*, 395 (2009) 2281–2291
274. G. Leo, L. Cartechini, P. Pucci, A. Sgamellotti, G. Marino, L. Birolo, *Anal. Bioanal. Chem.*, 395 (2009) 2269–2280
275. S. Dallongeville, M. Richter, S. Schafer, M. Kuhlenthal, N. Garnier, C. Rolando, C. Tokarski, *Analyst*, 138 (2013) 5357–5364
276. G. Corso, M. Gelzo, A. Chambery, V. Severino, A.D. Maro, F.S. Lomoriello, O. D'Apollito, A.D. Russo, P. Gargiulo, C. Piccioli, P. Arcari, *J. Sep. Sci.*, 35 (2012) 2986–2993

277. S. Dallongeville, M. Koperska, N. Garnier, G. Reille-Taillefert, C. Rolando, C. Tokarski, *Anal. Chem.*, 83 (2011) 9431–9437
278. H. Rao, Y. Yang, I. Abuduresule, W. Li, X. Hu, C. Wang, *J. Archaeol. Sci.*, 53 (2015) 148–155
279. C.M. Nielsen-Marsh, P.H. Ostrom, H. Gandhi, B. Shapiro, A. Cooper, P.V. Hauschka, M.J. Collins, *Geology*, 30(12) (2002) 1099–1102
280. C.M. Nielsen-Marsh, M.P. Richards, P.V. Hauschka, J.E. Thomas-Oates, E. Trinkaus, P.B. Pettitt, I. Karavanic, H. Poinar, M.J. Collins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102 (2005) 4409–4413
281. P.H. Ostrom, H. Gandhi, J.R. Strahler, A.K. Walker, P.C. Andrews, J. Leykam, T.W. Stafford, R.L. Kelly, D.N. Walker, M. Buckley, J. Humpala, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 70 (2006) 2034–2044
282. M.J. Collins, C.M. Nielsen-Marsh, J. Hiller, C.I. Smith, J.P. Roberts, R.V. Prigodich, T.J. Wess, J. Csapò, A.R. Millard, G. Turner-Walker, *Archaeometry*, 44 (2002) 383–394
283. M. Buckley, C. Anderung, K. Penkman, B.J. Raney, A. Götherström, J. Thomas-Oates, M.J. Collins, *J. Archaeol. Sci.*, 35 (2008) 1756–1764
284. C.M. Nielsen-Marsh, R.E.M. Hedges, T. Mann, M.J. Collins, *Thermochim. Acta*, 365 (2000) 129–139
285. C.I. Smith, C.M. Nielsen-Marsh, M.M.E. Jans, M.J. Collins, *J. Archaeol. Sci.*, 34 (2007) 1485–1493
286. C.M. Nielsen-Marsh, C.I. Smith, M.M.E. Jans, A. Nord, H. Kars, M.J. Collins, *J. Archaeol. Sci.*, 34 (2007) 1523–1531
287. R.C. Dobberstein, M.J. Collins, O.E. Craig, G. Taylor, K.E.H. Penkman, S. Ritz-Timme, *Archaeol. Anthropol. Sci.*, 1 (2009) 31–42
288. M. Hofreiter, M. Collins, J.R. Stewart, *Quat. Sci. Rev.*, 33 (2012) 1–13
289. M.H. Schweitzer, E.R. Schroeter, M.B. Goshe, *Anal. Chem.*, 86 (2014) 6731–6740
290. M. Buckley, M.J. Collins, *Antiqua*, 1 (2011) 1–7
291. J.M. Asara, M.H. Schweitzer, L.M. Freimark, M. Phillips, L.C. Cantley, *Science*, 316 (2007) 280–285

292. M.H. Schweitzer, W. Zheng, C.L. Organ, R. Avci, Z. Suo, L.M. Freimark, V.S. Lebleu, M.B. Duncan, M.G. Vander Heiden, J.M. Neveu, W.S. Lane, J.S. Cottrell, J.R. Horner, L.C. Cantley, R. Kalluri, J.M. Asara, *Science*, 324 (2009) 626–631
293. M. Buckley, M. Collins, J. Thomas-Oates, *Anal. Biochem.*, 374 (2008) 325–334
294. M. Buckley, M. Collins, J. Thomas-Oates, J.C. Wilson, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 23 (2009) 3843–3854
295. M. Buckley, N. Larkin, M. Collins, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 75 (2011) 2007–2016
296. T.-N.-N. Tran, G. Aboudharam, A. Gardeisen, B. Davoust, J.-P. Bocquet-Appel, C. Flaudrops, M. Belghazi, D. Raoult, M. Drancourt, *PLoS One* 6 (2011) e17319
297. M. Buckley, S. Kansa, *Archaeol. Anthropol. Sci.*, 3 (2011) 271–280
298. K.K. Richter, J. Wilson, A.K.G. Jones, M. Buckley, N. van Doorn, M.J. Collins, *J. Archaeol. Sci.*, 38 (2011) 1502–1510
299. G.B. Smejkal, M.H. Schweitzer, *Proteomics*, 4 (2007) 695–699
300. J.M. Asara, J.S. Garavelli, D.A. Slatter, M.H. Schweitzer, L.M. Freimark, M. Phillips, L.C. Cantley, *Science*, 317 (2007) 1324–1325
301. C.L. Organ, M.H. Schweitzer, W. Zheng, L.M. Freimark, L.C. Cantley, J.M. Asara, *Science*, 320 (2008) 499–499
302. E. Cappellini, L.J. Jensen, D. Szklarczyk, A. Ginolhac, R.A.R. da Fonseca, T.W. Stafford, S.R. Holen, M.J. Collins, L. Orlando, E. Willerslev, M.T.P. Gilbert, J.V. Olsen, *J. Proteome Res.*, 11 (2012) 917–926
303. M.T.P. Gilbert, L.P. Tomsho, S. Rendulic, M. Packard, D.I. Drautz, A. Sher, A. Tikhonov, L. Dalén, T. Kuznetsova, P. Kosintsev, P.F. Campos, T. Higham, M.J. Collins, A.S. Wilson, F. Shidlovskiy, B. Buigues, P.G.P. Ericson, M. Germonpré, A. Götherström, P. Iacumin, V. Nikolaev, M. Nowak-Kemp, E. Willerslev, J.R. Knight, G.P. Irzyk, C.S. Perbost, K.M. Fredrikson, T.T. Harkins, S. Sheridan, W. Miller, S.C. Schuster, *Science*, 317 (2007) 1927–1930

304. L. Orlando, A. Ginolhac, G. Zhang, D. Froese, A. Albrechtsen, M. Stiller, M. Schubert, E. Cappellini, B. Petersen, I. Moltke, P.L.F. Johnson, M. Fumagalli, J.T. Vilstrup, M. Raghavan, T. Korneliussen, A.-S. Malaspinas, J. Vogt, D. Szklarczyk, C.D. Kelstrup, J. Vinther, A. Dolocan, J. Stenderup, A.M.V. Velazquez, J. Cahill, M. Rasmussen, X. Wang, J. Min, G.D. Zazula, A. Seguin-Orlando, C. Mortensen, K. Magnussen, J.F. Thompson, J. Weinstock, K. Gregersen, K.H. Røed, V. Eisenmann, C.J. Rubin, D.C. Miller, D.F. Antczak, M.F. Bertelsen, S. Brunak, K.A.S. Al-Rasheid, O. Ryder, L. Andersson, J. Mundy, A. Krogh, M.T.P. Gilbert, K. Kjær, T. Sicheritz-Ponten, L.J. Jensen, J.V. Olsen, M. Hofreiter, R. Nielsen, B. Shapiro, J. Wang, E. Willerslev, *Nature*, 499 (2013) 74–78
305. N. Rybczynski, J.C. Gosse, C. Richard Harington, R.A. Wogelius, A.J. Hidy, M. Buckley, *Nat. Commun.*, 4 (2013) Paper 1550
306. A. Bona, Z. Papai, G. Maasz, G.A. Toth, E. Jambor, J. Schmidt, C. Toth, C. Farkas, L. Mark, *PLoS One*, 9 (2014) e87215
307. A. Corthals, A. Koller, D.W. Martin, R. Rieger, E.I. Chen, M. Bernaski, G. Recagno, L.M. Dávalos, *PLoS One*, 7 (2012) e41244
308. C. Solazzo, W.W. Fitzhugh, C. Rolando, C. Tokarski, *Anal. Chem.*, 80 (2008) 4590–4597
309. S. Dallongeville, N. Garnier, D. Casasola, M. Bonifay, C. Rolando, C. Tokarski, *Anal. Bioanal. Chem.*, 399 (2011) 3053–3063
310. S. Stevens, S. Wolverton, B. Venables, A. Barker, K. Seeley, P. Adhikari, *Anal. Bioanal. Chem.*, 396 (2010) 1491–1499
311. A. Barker, B. Venables, S. Stevens, K. Seeley, P. Wang, S. Wolverton, *J. Archaeol. Method Theory*, 19(3) (2012) 407–439
312. C. Hong, H. Jiang, E. Lü, Y. Wu, L. Guo, Y. Xie, C. Wang, Y. Yang, *PLoS One*, 7 (2012) e37053
313. K.E. Kadler, C. Baldock, J. Bella, R.P. Boot-Handford, *J. Cell Sci.*, 120 (2007) 1955–1958
314. S. Ricard-Blum, *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.*, 3 (2011) a004978
315. K. Hollemeyer, W. Altmeyer, E. Heinzle, *Anal. Chem.*, 74 (2002) 5960–5968

316. K. Hollemeyer, W. Altmeyer, E. Heinzle, C. Pitra, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 22 (2008) 2751–2767
317. C. Solazzo, M. Wadsley, J.M. Dyer, S. Clerens, M.J. Collins, J. Plowman, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 27 (2013) 2685–2698
318. C. Solazzo, J. Wilson, J.M. Dyer, S. Clerens, J.E. Plowman, I. von Holstein, P. Walton Rogers, E.E. Peacock, M.J. Collins, *Anal. Chem.*, 86 (2014) 567–575
319. L.Ø. Brandt, A.L. Schmidt, U. Mannering, M. Sarret, C.D. Kelstrup, J.V. Olsen, E. Cappellini, *PLoS One*, 9 (2014) e106875
320. K. Hollemeyer, W. Altmeyer, E. Heinzle, C. Pitra, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 26 (2012) 1735–1745
321. S. O'Connor, C. Solazzo, M. Collins, *Stud. Conserv.*, 60(6) (2015) 393–417
322. S. Solazzo, P.W. Rogers, L. Weber, H.F. Beaubien, J. Wilson, M. Collins, *J. Archaeol. Sci.*, 49 (2014) 524–535
323. F. Maixner, T. Overath, D. Linke, M. Janko, G. Guerriero, B.J. Berg, B. Stade, P. Leidinger, C. Backes, B. Kneissl, B. Meder, A. Franke, E. Egarter-Vigl, E. Meese, A. Schwarz, A. Tholey, A. Zink, A. Keller, *Cell. Mol. Life Sci.*, 70 (2013) 1–14
324. E. Cappellini, M.T. Gilbert, F. Geuna, G. Fiorentino, A. Hall, J. Thomas-Oates, P. Ashton, D. Ashford, P. Arthur, P. Campos, J. Kool, E. Willerslev, M. Collins, *A Naturwissenschaften*, 97 (2010) 205–217
325. A. Shevchenko, Y. Yang, A. Knaust, H. Thomas, H. Jiang, E. Lu, C. Wang, J. Shevchenko, *Proteomics*, 105 (2014) 363–371
326. J.R.M. Stewart, R.B. Allen, A.K.G. Jones, K.E.H. Penkman, M.J. Collins, *J. Archaeol. Sci.*, 40 (2013) 1797–1804
327. J.R.M. Stewart, R.B. Allen, A.K.G. Jones, T. Kendall, K.E.H. Penkman, B. Demarchi, T. O'Connor, M.J. Collins, *Int. J. Osteoarchaeol.*, 24 (2014) 247–255
328. S. Portugal, H. Cooper, C. Zampronio, L. Wallace, P. Cassey, *Proteome Sci.*, 8(1) (2010) 40 – 44
329. X. Li, J.J. Cournoyer, C. Lin, P.B. O'Connor, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 19 (2008) 855–864

330. N. Tuross, *Appl. Geochem.*, 4 (1989) 255–259
331. G. Grupe, *J. Archaeol. Sci.*, 22 (1995) 193–199
332. N.E. Robinson, V. Zabrouskov, J. Zhang, K.J. Lampi, A.B. Robinson, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 20 (2006) 3535–3541
333. N.E. Robinson, M.L. Robinson, S.E.S. Schulze, B.T. Lai, H.B. Gray, *Protein Sci.*, 18 (2009) 1766–1773
334. B. Legendre, C. Tokarski, Y. Chang, N. De Freitas Caires, H. Lortat-Jacob, P.D. Nadaï, C. Rolando, C. Duez, A. Tsicopoulos, P. Lassalle, *Cytokine*, 64 (2013) 463–470
335. C. Tokarski, In *Technological Innovation Liliane Bettencourt; Chemical Analysis: History and Innovations*, Philippe Walter; S. Haroche, Ed.; Collège de France, Paris (2014) <http://www.college-de-france.fr/site/en-philippe-walter/symposium-2014-06-27-16h00.htm>
336. M. Zhou, C.V. Robinson, *Trends Biochem. Sci.*, 35 (2010) 522–529
337. A.J.R. Heck, *Nat. Methods* 5(11) (2008) 927–933
338. W. Fremout, J. Sanyova, S. Saverwyns, P. Vandenabeele, L. Moens, *Anal. Bioanal. Chem.*, 393(8) (2009) 1991–1999
339. F. Pique, in *Atti del IV Congresso Nazionale IGIIC – Lo stato dell’Arte*, Siena (2006)
340. G. Lanterna, in *OPD-Restauero*, Centro Di, Firenze (1999) p. 142–148
341. B. Popović, I. Prodanović-Ranković, *Ikone oltarske pregrade dvorske kapele u crkvi Pokrova Presvete Bogorodice u Bariču*
342. B. Popović, I. Prodanović Ranković, *Istorijska analiza ikonostasa crkve Svetih Blagovesti u Idvoru*
343. J.V. Olsen, L.F. de Godov, G. Li, B. Macek, P. Mortensen, R. Pesch, A. Makarov, O. Lange, S. Horning, M. Mann, *Mol. Cell. Proteomics*, 4 (2005) 2010 – 2021
344. A. Nevin, D. Anglos, S. Cather, A. Burnstock, *Appl. Phys. A-Mater.*, 92 (2008) 692012-05-04
345. C. Duce, L. Ghezzi, M. Onor, I. Bonaduce, M.P. Colombini, M.R. Tinè, E. Bramanti, *Anal. Bioanal. Chem.*, 402 (2012) 2183–2193
346. A. Naoko, M. Moini, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 25 (2011) 3396–3400

347. D.N. Perkins, D.J. Pappin, D.M. Creasy, J.S. Cottrell, *Electrophoresis*, 20 (1999) 3551-3567
348. S. Kuckova, R. Hynek, M. Kodicek, in *9th International Conference on NDT of Art*, Jerusalem, Israel (2008)
349. I.C.A. Sandu, A.C.A. Roque, S. Kuckova, R.J. Carreira, L. Fernandes, S. Schaefer, E.R. Neves, S. Bracci, in *Chemistry Solutions, 42nd IUPAC Congress*, poster, Glasgow (2009)
350. A. Wattenberg, A. Organ, K. Schneider, R. Tyldesley, R. Bordoli, R. Bateman, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 13 (2002) 772-783
351. J. Qin, D. Fenyó, Y. Zhao, W.W. Hall, D.M. Chao, C.J. Wilson, R.A. Young, B.T. Chait, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 3995–4001
352. <http://www.uniprot.org> [accessed: 23. 12. 2015.]
353. S. Carr, R. Aebersold, M. Baldwin, A. Burlingame, K. Clauser, A. Nesvizhskii, *Mol. Cell. Proteomics*, 3 (2004) 531-533
354. J.M. Froelich, G.E. Reid, *Proteomics*, 8 (2008) 1334–1345
355. A. Shevchenko, I. Chernushevich, A. Shevchenko, M. Wilm, M. Mann, *Mol. Biotechnol.*, 20(1) (2002) 107 – 118
356. G. Tsapralis, H. Nair, W. Zhong, K. Kuppannan, J.H. Futrell, V.H. Wysocki, *Anal. Chem.*, 76(7) (2004) 2083 – 2094
357. J.K. Eng, A.L. McCormack, J.R. Yates III, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 5(11) (1994) 976 – 989
358. K.R. Clauser, P. Baker, A.L. Burlingame, *Anal. Chem.*, 71(14) (1999) 2871 – 2882
359. K. Lindblad-Toh, M. Garber, O. Zuk, M.F. Lin, B.J. Parker, et al., *Nature*, 478(7370) (2011) 476 – 482
360. P. Mallick, M. Schirle, S.S. Chen, M.R. Flory, H. Lee, D. Martin, J. Ranish, B. Raught, R. Schmitt, T. Werner, B. Kuster, R. Aebersold, *Nat. Biotech.*, 25 (2007) 125 – 131
361. J. Zhang, M. Gao, J. Tang, P. Yang, Y. Liu, X. Zhang, *Anal. Chim. Acta.*, 566(2) (2006) 147 – 156
362. T. Tripković, C. Charvy, S. Alves, A.Đ. Lolić, R.M. Baošić, S.D. Nikolić Mandić, J.C. Tabet, *Talanta*, 113 (2013) 49 – 61

363. T. Tripkovic, C. Charvy, S. Alves, A. Lolic, R. Baosic, S. Nikolic-Mandic, J.C. Tabet, *Eur. J. Mass Spectrom.*, 21 (2015) 679 – 692
364. D. Lin, D.L. Tabb, J.R. Yates III, *Biochim. Biophys. Acta*, 1646 (2003) 1 – 10
365. K.F. Medzihradzsky, H. Leffler, M.A. Baldwin, A.L. Burlingame, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 12 (2001) 215 – 221
366. R. Cramer, S. Corless, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 15 (2001) 2058 – 2066
367. N.B. Cech, C. Enke, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 2717 – 2723
368. M.D. Stapels, D.F. Barofsky, *Anal. Chem.*, 76 (2004) 5423 – 5430
369. Y. Yang, S. Zhang, K. Howe, D.B. Wilson, F. Moser, D. Irwin, T.W. Thannhauser, *J. Biomol. Tech.*, 18(4) (2007) 226 – 237

7 PRILOZI

PRLOG I

KOMPLETNI REZULTATI ANALIZE PROTEINSKIH VEZIVA MALDI-TOF MASENOM SPEKTROMETRIJOM

Ovaj prilog sadrži kompletne rezultate dobijene pretragom PMF i MS/MS spektara uzoraka analiziranih tokom izrade ove doktorske disertacije u odnosu na SwissProt bazu sekvenci pomoću Mascot pretraživača. Informacije o parametrima pretrage date su u tekstu, u delu 3.6 Obrada rezultata.

BELANCE

Proteini identifikovani PMF analizom, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonomija	Skor	Pokriv. sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Ovalbumin OVAL_CHICK P01012	Gallus gallus	149	71%	LYAEER	106 - 111	780.389	780.404	20	0	
				DEDTQAMPFR	191 - 200	1209.520	1209.518	-2	0	
				ADHPFLFCIK	361 - 370	1248.608	1248.608	0	0	8: Carboxymethyl (C)
				HIATNAVLFFGR	371 - 382	1345.738	1345.732	-4	0	
				YPILPEYLQCVK	112 - 123	1523.781	1523.806	16	0	10: Carboxymethyl (C)
				AFKDEDTQAMPFR	188 - 200	1555.721	1555.717	-2	1	
				LTEWTSSNVMEER	265 - 277	1581.721	1581.721	0	0	
				GGLEPINFQTAADQAR	128 - 143	1687.840	1687.830	-6	0	
				ISQAVHAAHAEINEAGR	324 - 340	1773.899	1773.898	-1	0	
				GSIGAASMEFCFDVFK	2 - 17	1808.787	1808.778	-5	0	N-Term: Acetyl 11: Carboxymethyl (C)
				ELINSWVESQTNGIIR	144 - 159	1858.966	1858.953	-7	0	
				ELINSWVESQTNGIIR	144 - 159	1859.950	1859.941	-5	0	Deamidated (NQ)
				EVVGSAEAGVDAASVSEEFR	341 - 360	2008.946	2009.000	27	0	
				DILNQITKPNDVYSFSLASR	86 - 105	2281.182	2281.199	7	0	
				VTEQESKPVQMMYQIGLFR	201 - 219	2284.146	2284.153	3	0	
				NVLQPSSVDSQTAMVLVNAIVFK	160 - 182	2460.317	2460.303	-5	0	
FDKLPFGFDSIEAQCGTSVNVHSSLR	60 - 85	2822.341	2822.356	5	1	15: Carboxymethyl (C)				
VHHANENIFYCPIAIMSALAMVYLGAK	21 - 47	3034.499	3034.525	9	0	11: Carboxymethyl (C)				
ILELPFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLES IINFEK	230 - 264	3863.011	3863.011	0	0					
Ovotransferin TRFE_CHICK P02789	Gallus gallus	64	32%	TCNWAR	260 - 265	808.341	808.371	37	0	2: Carboxymethyl (C)
				CLFKVR	662 - 667	823.449	823.431	-23	1	1: Carboxymethyl (C)
				VAAHAVVAR	266 - 274	893.532	893.551	22	0	
				RFGVNGSEK	633 - 641	994.495	994.401	-95	1	5: Deamidated (NQ)
				YFGYTALR	540 - 548	1047.526	1047.535	8	0	
				FYTVISSLK	680 - 688	1057.593	1057.595	2	0	
				SDFHLFGPPGK	299 - 309	1201.600	1201.602	1	0	
				KDSNVNWNLLK	458 - 468	1331.670	1331.676	5	1	
				IQWCAVGKDEK	364 - 374	1334.641	1334.642	1	1	4: Carboxymethyl (C)
				DSNVNWNLLKGGK	459 - 470	1391.644	1391.680	26	1	3 Deamidations (NQ)
				ENRIQWCAVGK	361 - 371	1403.674	1403.726	38	1	N-Term: Acetyl 7: Carboxymethyl (C)
SAGWNIPIGTLHR	141 - 154	1534.849	1534.840	-6	0					

				TDERPASYFAVAVAR	443 - 457	1652.839	1652.833	-4	0	
				DDNKVEDIWSFLSK	275 - 288	1695.822	1695.824	1	1	
				GAIEWEGIESGSVEQAVAK	155 - 173	1959.966	1959.956	-5	0	
				ECNLAEVPTHAVVVRPEK	602 - 619	2049.043	2049.040	-2	0	2: Carboxymethyl (C)
				TGTCNFDEYFSEGCAPGSPNSR	494 - 516	2551.998	2552.028	12	0	4: Carboxymethyl (C) 14: Carboxymethyl (C)
				GEADAVALDGGGLVYTAGVCGLVPVMAER	406 - 433	2791.364	2791.374	4	0	19: Carboxymethyl (C)
Lizozim C LYSC_CHICK P00698	Gallus gallus	35	39%	WWCNDGR	80 - 86	994.384	994.390	7	0	3: Carboxymethyl (C)
				GTDVQAWIR	135 - 143	1045.543	1045.544	1	0	
				GYSLGNWVCAAK	40 - 51	1326.615	1326.593	-17	0	9: Carboxymethyl (C)
				CKGTDVQAWIR	133 - 143	1334.652	1334.652	0	1	1: Carboxymethyl (C)
				FESNFNTQATNR	52 - 63	1428.650	1428.655	4	0	
				IVSDGNMNAWVAWR	116 - 130	1676.785	1676.776	-6	0	Deamidated (NQ)
Protin Y povezan sa Ovalbuminom OVALY_CHICK P01014	Gallus gallus	26	11%	HSLELEEFR	354 - 362	1159.574	1159.569	-4	0	
				ADHPFLFFIR	363 - 372	1262.668	1262.663	-4	0	
				YNPTNAILFFGR	373 - 384	1412.732	1412.731	-1	0	11: Carboxymethyl (C)
				TFSVLPEYLSGAR	111 - 123	1543.746	1543.756	6	0	

Proteini identifikovani MS/MS analizama, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonomija	Skor	Pokrivenost sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Ovalbumin OVAL_CHICK P01012	Gallus gallus	961	45%	LYAEER	106 - 111	780.389	780.340	-62	0	
				MYQIGLFR	212 - 219	1027.539	1027.544	4	0	
				DEDTQAMPFR	191 - 200	1209.520	1209.514	-6	0	
				ADHPFLFCIK	361 - 370	1248.608	1248.599	-7	0	8: Carboxymethyl (C)
				HIATNAVLFFGR	371 - 382	1345.738	1345.738	0	0	
				YPILPEYLQCVK	112 - 123	1523.781	1523.782	1	0	10: Carboxymethyl (C)
				AFKDEDTQAMPFR	188 - 200	1555.721	1555.721	0	1	
				LTEWTSSNVMEER	265 - 277	1581.721	1581.721	0	0	
				GGLEPINFQTAADQAR	128 - 143	1687.840	1687.842	1	0	
				GGLEPINFQTAADQAR	128 - 143	1709.822	1709.810	-7	0	4: Cation:Naili Mg[II](DE)
				ISQAVHAAHAEINEAGR	324 - 340	1773.899	1773.896	-2	0	
				ELINSWVESQTNGHIR	144 - 159	1858.966	1858.967	1	0	
				EVVGSAAEAGVDAASVSEEFR	341 - 360	2008.946	2008.941	-2	0	
				DILNQITKPNQVYVYSLASR	86 - 105	2281.182	2281.182	0	0	
VTEQESKPVQMMYQIGLFR	201 - 219	2284.146	2284.127	-8	0					
NVLQPSSVDSQTAMVLVNAIVFK	160 - 182	2460.317	2460.329	5	0					
Ovotransferin TRFE_CHICK P02789	Gallus gallus	177	18%	DLTQQERI	44 - 51	1045.516	1045.544	27	1	N-Term: Acetyl 4: Deamidated (NQ)
				YFGYTGALR	540 - 548	1047.526	1047.505	-20	0	

			FMMFESQNK	644 - 652	1161.507	1161.503	-3	0	
			SAGWNIPIGTLLHR	141 - 154	1534.849	1534.826	-15	0	
			TDERPASYFAVAVAR	443 - 457	1652.839	1652.780	-36	0	
			GAIEWEGIESGSVEQAVAK	155 - 173	1959.966	1960.028	32	0	
			ECNLAEVPTHAVVVRPEK	602 - 619	2049.043	2049.010	-16	0	2: Carboxymethyl (C)
			TGTCNFDEYFSEGCAPGSPNSR	494 - 516	2551.998	2551.925	-28	0	4: Carboxymethyl (C) 14: Carboxymethyl (C)
			GEADAVALDGLVYTAGVCGLVPVMAER	406 - 433	2791.364	2791.160	-73	0	19: Carboxymethyl (C)

ŽUMANCE

Proteini identifikovani PMF analizom, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonomija	Skor	Pokrivenost sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Vitelogenin-2 VIT2_CHICK P02845	Gallus gallus	110	23%	TKNPEQR	303 - 309	914.469	914.460	-10	1	N-Term: Acetyl
				ARCSVSYNK	1579 - 1587	1085.504	1085.498	-6	1	3: Carboxymethyl (C)
				ADTYFDNYR	633 - 641	1164.496	1164.479	-15	0	
				WKLCADASVR	1424 - 1433	1248.604	1248.488	-93	1	N-Term: Acetyl 4: Carboxymethyl (C)
				FDIDPGFNSRR	18 - 28	1365.655	1365.610	-33	1	N-Term: Acetyl
				IANADNLESIWR	342 - 353	1401.712	1401.573	-99	0	
				DASFIQNTYLHK	1008 - 1019	1436.717	1436.584	-93	0	
				VGATGEIFVVNSPR	642 - 655	1445.775	1445.637	-95	0	
				AVAYVKWGWDCR	1438 - 1449	1511.710	1511.656	-36	1	11: Carboxymethyl (C)
				MHHIGCQLCFSR	993 - 1004	1547.655	1547.517	-89	0	6: Carboxymethyl (C) 9: Carboxymethyl (C)
				SPQVEEYNGVWPR	74 - 86	1560.744	1560.622	-78	0	
				IVLMPVHTDADIDK	1028 - 1041	1566.820	1566.684	-87	0	
				GSAPDVPMQNYGSLR	272 - 286	1591.753	1591.631	-77	0	
				EALQPIHDLADEAISR	456 - 471	1777.908	1777.745	-92	0	
				LMANSAGSVADLVEVGIR	666 - 683	1801.948	1801.783	-91	0	
				LPFMYNISSACNIALK	599 - 614	1842.913	1842.819	-51	0	11: Carboxymethyl (C)
				VRSPQVEEYNGVWPR	72 - 86	1857.924	1857.823	-55	1	N-Term: Acetyl
				IETNPCREETEIVVGR	895 - 910	1902.923	1902.775	-78	1	6: Carboxymethyl (C)
				TGGLQLVVYADTDSVRPR	1393 - 1410	1947.029	1946.876	-79	0	
				NAVSFGHSWILEEAPCR	1740 - 1756	1973.917	1973.776	-72	0	16: Carboxymethyl (C)
NPVLQQVACLGYSSVVNR	428 - 445	2005.017	2004.864	-76	0	9: Carboxymethyl (C)				
SYLYNYEGSMLNGLQDR	29 - 45	2022.923	2022.772	-74	0					
SQNVYELQEAGIGGICHAR	147 - 165	2102.992	2102.832	-76	0	16: Carboxymethyl (C)				

				QVYQISPFNEPTGVAVMEAR	240 - 259	2236.107	2235.926	-81	0	
				QVYQISPFNEPTGVAVMEAR	240 - 259	2278.117	2277.985	-58	0	N-Term: Acetyl
				YVVVPSCLGLPLEYGSYTTALAR	791 - 812	2431.221	2430.993	-94	0	6: Carboxymethyl (C)
				IVLMPVHTDADIDKIQLEIQAGSR	1028 - 1051	2662.423	2662.176	-93	1	
Ovalbumin OVAL_CHICK P01012	Gallus gallus	56	32%	DSTRTQINK	48 - 56	1104.564	1104.558	-5	1	N-Term: Acetyl
				ADHPFLFCIK	361 - 370	1248.608	1248.602	-5	0	8: Carboxymethyl (C)
				HIATNAVLFVGR	371 - 382	1345.738	1345.758	15	0	
				AFKDEDQAMPFR	188 - 200	1555.721	1555.736	10	1	
				LTEWTSSNVMEER	265 - 277	1581.721	1581.752	19	0	
				GGLEPINFQTAADQAR	128 - 143	1687.840	1687.882	25	0	
				ISQAVHAAHAEINEAGR	324 - 340	1773.899	1773.954	31	0	
				ELINSWVESQTNGHIR	144 - 159	1858.966	1858.979	7	0	
				DILNQITKPNVYFSLASR	86 - 105	2281.182	2281.205	10	0	
				VTEQESKPVQMMYQIGLFR	201 - 219	2284.146	2284.115	-14	0	

Proteini identifikovani MS/MS analizama, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonomija	Skor	Pokrivenost sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Vitelogenin-2 VIT2_CHICK P02845	Gallus gallus	305	10%	LPLSLPVGPR	1543 - 1552	1048.651	1048.612	-38	0	
				FLEVVQLCR	333 - 341	1164.608	1164.576	-28	0	8: Carboxymethyl (C)
				FDIDPGFNRS	18 - 27	1167.543	1167.526	-14	0	
				IANADNLESIWR	342 - 353	1401.712	1401.650	-45	0	
				LSQLESTMQIR	831 - 842	1418.767	1418.710	-40	0	
				VGATGEIFVVNSPR	642 - 655	1445.775	1445.637	-95	0	
				SPQVEEYNGVWPR	74 - 86	1560.744	1560.683	-39	0	
				SPQVEEYNGVWPR	74 - 86	1561.728	1561.585	-92	0	8: Deamidated (NQ)
				LMANSAGSVADLVEVGIR	666 - 683	1801.948	1801.783	-91	0	
				ELLQQVMKTVVEPADR	746 - 761	1899.973	1899.805	-89	1	N-Term: Acetyl (N-term) 4: Deamidated (NQ) 5: Deamidated (NQ)
				NSIAGQWTQPVWMGELR	774 - 790	1972.970	1972.910	-30	0	
				NSIAGQWTQPVWMGELR	774 - 790	1973.954	1973.776	-90	0	6: Deamidated (NQ)
				IGNIYAPEDCPDLCVNIVR	116 - 134	2220.031	2219.855	-79	0	10: Carboxymethyl (C) 14: Carboxymethyl (C)
				QVYQISPFNEPTGVAVMEAR	240 - 259	2236.107	2235.926	-81	0	
YVVVPSCLGLPLEYGSYTTALAR	791 - 812	2431.221	2430.993	-94	0	6: Carboxymethyl (C)				
Apovitelin-1 APOV1_CHICK P02659	Gallus gallus	88	44%	NFLINETAR	75 - 83	1077.569	1077.446	-114	0	
				AGQFLLDVVSQTTVVSGIR	57 - 74	1891.028	1890.878	-80	0	
				RDWLVIPDAAAAYIYEAVNK	33 - 52	2278.187	2277.985	-88	1	
Lizozim C LYSC_CHICK P00698	Gallus gallus	75	14%	GTDVQAWIR	135 - 143	1045.543	1045.552	9	0	
				FESNFNTQATNR	52 - 63	1428.650	1428.600	-35	0	
Ovalbumin	Gallus gallus	74	11%	HIATNAVLFVGR	371 - 382	1345.738	1345.600	-102	0	

OVAL_CHICK P01012				GGLEPINFQTAADQAR	128 - 143	1687.840	1687.686	-91	0	
				ELINSWVESQTNGIIR	144 - 159	1858.966	1858.979	7	0	
				ELINSWVESQTNGIIR	144-159	1859.950	1859.806	-77	0	12: Deamidated (NQ)

KAZEIN U PRAHU (63200)

Proteini identifikovani PMF analizom, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonomija	Skor	Pokriv. sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Alfa-S2-kazein CASA2_BOVIN P02663	Bos taurus	60	39%	TVYQHQQ	197 - 203	903.468	903.504	40	0	
				FALPQYLK	189 - 196	979.561	979.584	24	0	
				LTEEEKNR	168 - 175	1018.516	1018.534	17	1	
				AMKPWIQPK	204 - 212	1098.613	1098.617	4	0	
				NAVPIPTLNR	130 - 140	1195.679	1195.665	-12	0	
				ITVDDKHYQK	86 - 95	1246.643	1246.636	-6	1	
				EQLSTSEENSK	141 - 151	1251.570	1251.695	100	0	
Alfa-S1-kazein CASA1_BOVIN P02662	Bos taurus	59	42%	FPQYLQYLYQGPIVLNPWDQVK	107 - 128	2709.408	2709.572	61	0	
				EGIHAQQK	140 - 147	910.474	910.502	30	0	
				YLGYLEQLLR	106 - 115	1267.704	1267.717	10	0	
				HIQKEDVPSEER	95 - 105	1337.681	1337.672	-7	1	
				FFVAPFPEVFGK	38 - 49	1384.730	1384.725	-4	0	
				HQGLPQEVLNENLLR	23 - 37	1759.945	1759.931	-8	0	
				YKVPQLEIVPNSAEER	119 - 134	1951.952	1951.917	-18	1	12: Phospho (ST)
EPMIGVNQELAYFYPELFR	148 - 166	2316.137	2316.171	15	0					

Proteini identifikovani MS/MS analizama, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonomija	Skor	Pokriv. sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Alfa-S1-kazein CASA1_BOVIN P02662	Bos taurus	463	46%	YLGYLEQLLR	106 - 115	1267.704	1267.695	-7	0	
				HIQKEDVPSEER	95 - 105	1337.681	1337.672	-7	1	
				FFVAPFPEVFGK	38 - 49	1384.730	1384.722	-6	0	
				HQGLPQEVLNENLLR	23 - 37	1759.945	1759.932	-7	0	
				YKVPQLEIVPNSAEER	119 - 134	1951.952	1951.743	-107	1	12: Phospho (ST)
				IGVNQELAYFYPELFR	151 - 166	1959.001	1958.787	-109	0	
EPMIGVNQELAYFYPELFR	148 - 166	2316.137	2316.134	-1	0					

Beta-kazein CASB_BOVIN P02666	Bos taurus	124	8%	DMPIQAFLLYQEPVLGPVR	199 - 217	2186.168	2186.181	6	0	
Alfa-S2-kazein CASA2_BOVIN P02663	Bos taurus	23	3%	TVYQHQK	197 - 203	903.468	903.504	40	0	

MLADI KRAVLJI SIR

Proteini identifikovani PMF analizom, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonom.	Skor	Pokriv. sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Alfa-S2-kazein CASA2_BOVIN P02663	Bos taurus	76	40%	VIPYVR	215 - 220	746.456	746.442	-19	0	
				LTEEEK	168 - 173	748.372	748.345	-36	0	
				ITVDDK	86 - 91	770.333	770.346	17	0	2: Phospho (ST)
				TVYQHQK	197 - 203	903.468	903.515	51	0	
				FALPQYLK	189 - 196	979.561	979.478	-85	0	
				LTEEEKNR	168 - 175	1098.483	1098.518	32	1	2: Phospho (ST)
				TKLTEEEK	166 - 173	1137.448	1137.476	25	1	1: Phospho (ST) 4: Phospho (ST)
				NAVPIPTLNR	130 - 140	1195.679	1195.608	-60	0	
				EQLSTSEENSK	141 - 151	1251.570	1251.641	57	0	
				ALNEINQFYQK	96 - 106	1367.695	1367.669	-19	0	7: Phospho (ST)
Alfa-S1-kazein CASA1_BOVIN P02662	Bos taurus	60	41%	NMAINPSKENLCSTFCK	40 - 56	1979.842	1979.843	0	1	
				TTMPLW	209 - 214	748.370	748.371	2	0	
				EDVPSEK	99 - 105	831.384	831.382	-3	0	
				YLGYLEQLLR	106 - 115	1267.704	1267.694	-8	0	
				HIQKEDVPSEK	95 - 105	1337.681	1337.689	6	1	
				FFVAPFPEVFGK	38 - 49	1384.730	1384.748	13	0	
				VPQLEIVPNSAEER	121 - 134	1660.794	1660.762	-19	0	10: Phospho (ST)
				HQGLPQEVLENLNR	23 - 37	1759.945	1759.950	3	0	
				YKVPQLEIVPNSAEER	119 - 134	1951.952	1951.969	8	1	12: Phospho (ST)
Beta-laktoglobulin LACB_BOVIN P02754	Bos taurus	48	57%	EPMIGVNQELAYFYPELFR	148 - 166	2316.137	2316.133	-2	0	
				ALPMHIR	158 - 164	837.476	837.438	-46	0	
				TKIPAVFK	92 - 99	903.566	903.515	-57	1	
				VLVLDTDYKK	108 - 117	1193.678	1193.603	-63	1	
				TPEVDDEALEK	141 - 151	1325.551	1325.671	91	0	1: Phospho (ST)
TPEVDDEALEK	141 - 151	1367.561	1367.675	83	0	N-Term: Acetyl (N-term) 1: Phospho (ST)				

				TPEVDDEALEKFDK	141 - 154	1635.775	1635.808	20	1	
				LSFNPTQLEEQCHI	165 - 178	1716.790	1716.816	15	0	12: Carboxymethyl (C)
				YLLFCMENSAPAEQSLACQLVR	118 - 140	2843.180	2842.916	-93	0	5: Carboxymethyl (C) 18: Carboxymethyl (C); 18:Phospho (ST)
				VAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLR	31 - 56	2707.376	2707.319	-21	0	
Beta-kazein CASB_BOVIN P02666	Bos taurus	30	17%	AVPYPQR	192 - 198	830.452	830.433	-23	0	
				DMPIQAFLLYQEPVLPVVR	199 - 217	2186.168	2186.177	4	0	

Proteini identifikovani MS/MS analizama, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonom.	Skor	Pokriv. sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Alfa-S1-kazein CASA2_BOVIN P02662	Bos taurus	433	43%	EGIHAQQK	140 - 147	910.474	910.493	21	0	
				YLGYLEQLLR	106 - 115	1267.704	1267.694	-8	0	
				HIQKEDVPSEK	95 - 105	1337.681	1337.689	6	1	
				FFVAPFPEVFGK	38 - 49	1384.730	1384.748	13	0	
				HQGLPQEVNENLLR	23 - 37	1759.945	1759.950	3	0	
				YKVPQLEIVPNSAEER)	119 - 134	1951.952	1951.969	8	1	12: Phospho (ST)
Beta-laktoglobulin LACB_BOVIN P02754	Bos taurus	205	26%	EPMIGVNQELAYFYPELFR	148 - 166	2316.137	2316.133	-2	0	
				ALPMHIR	158 - 164	837.476	837.487	13	0	
				LSFNPTQLEEQCHI	165 - 178	1716.790	1716.780	-6	0	12: Carboxymethyl (C)
Alfa-S2-kazein CASA2_BOVIN P02663	Bos taurus	93	18%	VAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLR	31 - 56	2707.376	2707.470	35	0	
				FALPQYLK	189 - 196	979.561	979.529	-32	0	
				AMKPWIQPK	204 - 212	1098.613	1098.518	-87	0	
				NAVPIPTLNR	130 - 140	1195.679	1195.658	-18	0	
Beta-kazein CASB_BOVIN P02666	Bos taurus	63	12%	ALNEINQFYQK	96 - 106	1367.695	1367.675	-15	0	
				GPFPIIV	218 - 224	742.450	742.426	-32	0	
Kapa-kazein CASK_BOVIN P02668	Bos taurus	41	5%	DMPIQAFLLYQEPVLPVVR	199 - 217	2186.168	2186.177	4	0	
				YIPIQYVLSR	46 - 55	1251.710	1251.668	-33	0	

P02465				GFPGTPGLPGFK	164 - 175	1222.610	1222.519	-75	0	3 Oxidation (P)
				GIPGEFGLPGPAGAR	572 - 586	1427.728	1427.641	-61	0	2 Oxidation (P)
				GAAGLPGVAGAPGLPGPR	308 - 325	1562.829	1562.716	-72	0	3 Oxidation (P)
				HGNRGEPPAGAVGPAGAVGPR	973 - 994	2028.996	2028.910	-42	1	3 Oxidation (P)
				GEPGAVGQPPGPPGSGEKGK	359 - 379	2055.921	2055.922	0	1	6 Oxidation (P)
				GLPGVAGSVGEPGLGIAGPPGAR	881 - 904	2131.114	2130.950	-77	0	3 Oxidation (P)
				GPPGESGAAGPTGPIGSRGPSPPGPDGNK	590 - 619	2705.240	2705.016	-83	1	5 Oxidation (P)
			GPPGASGAPGQGFQGGPEPGEPTGPAGAR	98 - 130	3033.357	3033.131	-74	0	6 Oxidation (P)	

Proteini identifikovani MS/MS analizama, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonomija	Skor	Pokriv. sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Kolagen alfa-2(I) lanac CO1A2_CANFA O46392	Canis familiaris	209	4%	GLPGEFGLPGPAGPR	574 - 588	1453.743	1453.644	-68	0	2 Oxidation (P)
				GAAGLPGVAGAPGLPGPR	310 - 327	1562.829	1562.716	-72	0	3 Oxidation (P)
				GLPGVAGSVGEPGLGIAGPPGAR	883 - 906	2131.114	2130.950	-77	0	3 Oxidation (P)
Kolagen alfa-2(I) lanac CO1A2_BOVIN P02465	Bos taurus	178	6%	GIPGEFGLPGPAGAR	572 - 586	1427.728	1427.641	-61	0	2 Oxidation (P)
				GAAGLPGVAGAPGLPGPR	308 - 325	1562.829	1562.716	-72	0	3 Oxidation (P)
				EGPVGLPGIDGRPGPIGPAGAR	463 - 484	2056.093	2055.922	-83	0	Oxidation (P)
				GLPGVAGSVGEPGLGIAGPPGAR	881 - 904	2131.114	2130.950	-77	0	3 Oxidation (P)
Kolagen alfa-1(I) lanac CO1A1_BOVIN P02453	Bos taurus	96	5%	GPAGPQGPR	1084 - 1092	836.437	836.449	14	0	
				GEGGPQGPR	352 - 360	854.412	854.408	-4	0	
				GEPGSPGENGAPQMGPR	286 - 303	1726.745	1726.882	79	0	2 Oxidation (P)
				GFSGLQGPPGPPGSPGEGQGPSGASGPAGPR	1111 - 1140	2705.255	2705.335	30	0	3 Oxidation (P)
Kolagen alfa-1(III) lanac CO3A1_MOUSE P08121	Mus musculus	49	2%	GPAGPQGPR	1082 - 1090	836.437	836.449	14	0	
				GLPGPPGNNGNPGLPGSPGAPGK	878 - 900	2056.968	2057.032	31	0	4 Oxidation (P)
Kolagen alfa-1(II) lanac CO2A1_BOVIN P02459	Bos taurus	32	1%	GPPGPQGAR	267 - 275	836.437	836.449	14	0	

GOVEDE KOŽNO TUTKALO (63010)

Proteini identifikovani PMF analizom, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonomija	Skor	Pokriv. sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Kolagen alfa-1(I) lanac CO1A1_BOVIN P02453	Bos taurus	87	22%	NPARTCR	1253 - 1259	817.410	817.430	25	1	
				GPAGPQGPR	1084 - 1092	836.437	836.358	-95	0	
				GFSGLDGAK	268 - 276	851.426	851.346	-93	0	
				GPAGPQGPR	1084 - 1092	852.432	852.347	-101	0	Oxidation (P)

				GEGGPQGPR	352 - 360	854.412	854.334	-91	0	
				GPAGPQGPR	1084 - 1092	868.427	868.380	-54	0	2 Oxidation (P)
				GDRGDAGPK	742 - 750	872.422	872.331	-104	1	
				GVVGLPGQR	958 - 966	882.516	882.580	73	0	
				GEGGPQGPR	352 - 360	886.401	886.352	-56	0	2Oxidation (P)
				GVVGLPGQR	958 - 966	898.511	898.427	-93	0	Oxidation (P)
				QGPSGASGER	984 - 993	945.438	945.346	-97	0	
				GFPGADGVAGPK	493 - 504	1088.537	1088.427	-101	0	Oxidation (P)
				GRPGAPGPAGAR	310 - 321	1095.565	1095.465	-92	0	2 Oxidation (P)
				GAAGEPGKAGER	586 - 597	1099.549	1099.429	-109	1	
				GNSGEPGAPGSK	430 - 441	1105.476	1105.452	-21	0	3 Oxidation
				GQAGVMGFPGPK	574 - 585	1177.567	1177.441	-107	0	2 Oxidation (P)
				GVPGPPGAVGPAGK	598 - 611	1192.632	1192.710	65	0	2 Oxidation (P)
				GHRGFSGLDGAK	265 - 276	1201.607	1201.468	-116	1	
				GVPGPPGAVGPAGK	598 - 611	1208.627	1208.548	-65	0	3 Oxidation (P)
				GDKGETGEQGDR	1093 - 1104	1264.540	1264.422	-94	1	Oxidation (K)
				GPSGPQGPSPPGPK	415 - 429	1332.654	1332.521	-100	0	Oxidation (P)
				GSAGPPGATGFPGAAGR	865 - 881	1427.703	1427.612	-63	0	
				GEPGAPGLGPPGER	472 - 486	1435.681	1435.561	-84	0	3 Oxidation (P)
				GSAGPPGATGFPGAAGR	865 - 881	1459.692	1459.577	-79	0	2 Oxidation (P)
				GNSGEPGAPGSKGDTGAK	430 - 447	1586.741	1586.646	-60	1	
				GSPGEAGRPGEAGLPGAK	520 - 537	1655.798	1655.684	-69	0	3 Oxidation (P)
				GEPGSPGENGAPGQMGR	286 - 303	1710.750	1710.756	4	0	Oxidation (P)
				GEPGSPGENGAPGQMGR	286 - 303	1726.745	1726.754	5	0	2 Oxidation (P)
				SGDRGETGPAGPAGPIGPVGR	1062 - 1083	1975.994	1975.980	-7	1	
				TGPPGPAGQDGRPGPPPPGAR	552 - 573	2056.980	2056.922	-28	0	4 Oxidation (P)
				GVQPPGPAGPRGANGAPGNDGAK	685 - 708	2131.028	2131.013	-7	1	2 Oxidation (P)
				GETGPAGRPGEVGGPPPPPAGEK	910 - 933	2216.058	2215.909	-67	0	3 Oxidation (P)

Proteini identifikovani MS/MS analizama, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonom.	Skor	Pokriv. sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Kolagen alfa-2(I) lanac CO1A2_BOVIN P02465	Bos taurus	323	12%	GHAGLAGAR	509 - 517	809.438	809.366	-89	0	
				NPARTCR	1156 - 1162	817.410	817.430	25	1	
				GPSGPQGIR	995 - 1003	868.464	868.380	-96	0	
				GPSGPPGPDGK	608 - 619	1095.507	1095.465	-38	0	Oxidation (P)
				IGQPGAVGPAGIR	1066 - 1078	1192.680	1192.585	-79	0	
				GIPGEFGLPGPAGAR	572 - 586	1427.728	1427.590	-97	0	2 Oxidation (P)
				GAAGLPGVAGAPGLPGPR	308 - 325	1562.829	1562.700	-82	0	3 Oxidation (P)
				EGPVGLPGIDGRPGPIGPAGAR	463 - 484	2056.093	2055.924	-83	0	Oxidation (P)
				GLPGVAGSVGEPGLGIAGPPGAR	881 - 904	2099.124	2098.920	-97	0	Oxidation (P)
				GLPGVAGSVGEPGLGIAGPPGAR	881 - 904	2131.114	2130.937	-83	0	3 Oxidation (P)
				GPSGEPGTAGPPGTPGQGLLAPGFLGLPGSR	845 - 877	3017.496	3017.146	-116	0	4 Oxidation (P)

Kolagen alfa-1(I) lanac CO1A1_BOVIN P02453	Bos taurus	137	6%	NPARTCR	1253 - 1259	817.410	817.430	25	1	
				GPAGPQGPR	1084 - 1092	836.437	836.358	-95	0	
				GPAGPQGPR	1084 - 1092	852.432	852.347	-101	0	Oxidation (P)
				GEGGPQGPR	352 - 360	854.412	854.334	-91	0	
				GPAGPQGPR	1084 - 1092	868.427	868.380	-54	0	2 Oxidation (P)
				GSEGPQGVV	361 - 369	886.438	886.352	-97	0	
				GVVGLPGQR	958 - 966	898.511	898.427	-93	0	6: Oxidation (P)
				GRPGAPGPAGAR	310 - 321	1095.565	1095.465	-92	0	2Oxidation (P)
				GADGAPGKDGVR	751 - 762	1099.549	1099.429	-109	1	
Kolagen alfa-2(I) lanac (Fragment) CO1A2_RABIT Q28668	Oryctolagus cuniculus	38	8%	TGPPGPAGQDGRPGPPPGAR	552 - 573	2056.980	2056.922	-28	0	4 Oxidation (P)
				GEPGAPAGSIPVGAAGPR	139 - 156	1562.792	1562.700	-59	0	Oxidation (P)
				GLPGVAGALGEPGLGIAGPPGAR	43 - 66	2097.145	2096.917	-109	0	Oxidation (P)

ZEČIJE KOŽNO TUTKALO, PREČIŠČENO (63025)

Proteini identifikovani PMF analizom, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonom.	Skor	Pokriv. sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Kolagen alfa-1(I) lanac CO1A1_BOVIN P02453	Bos taurus	50	20%	GPAGPQGPR	1084 - 1092	836.437	836.465	33	0	
				GFSGLDGAK	268 - 276	851.426	851.464	45	0	
				GPAGPQGPR	1084 - 1092	868.427	868.491	74	0	2 Oxidation (P)
				GVVGLPGQR	958 - 966	898.511	898.549	42	0	Oxidation (P)
				GFPGADGVAGPK	493 - 504	1088.537	1088.584	43	0	Oxidation (P)
				GVQGGPPGAPGR	685 - 696	1105.575	1105.620	41	0	Oxidation (P)
				GVPGGPPGAVGPAGK	598 - 611	1192.632	1192.721	74	0	2 Oxidation (P)
				GVPGGPPGAVGPAGK	598 - 611	1208.627	1208.711	70	0	3 Oxidation (P)
				GFPGLPGPSGEPGK	970 - 983	1312.653	1312.686	25	0	Oxidation (P)
				GFPGLPGPSGEPGK	970 - 983	1328.648	1328.694	34	0	2 Oxidation (P)
				GSAGPPGATGFPGAAGR	865 - 881	1427.703	1427.777	52	0	
				GEPGAPGLPGPPGER	472 - 486	1435.681	1435.737	39	0	3 Oxidation (P)
				GSAGPPGATGFPGAAGR	865 - 881	1459.692	1459.737	30	0	2 Oxidation (P)
				GETGPAGPAGPIGPVGAR	1066 - 1083	1560.813	1560.876	40	0	
				GNSGEPGAPGSKGDTGAK	430 - 447	1586.741	1586.806	41	1	
				DGLNGLPGPIGPPGPRGR	1152 - 1169	1726.935	1726.932	-1	1	
				SGDRGETGPAGPAGPIGPVGAR	1062 - 1083	1975.994	1976.060	33	1	
				DGVRGLTGPIGPPGAPAGPDK	759 - 780	2082.010	2082.156	70	1	6 Oxidation
GVQGGPPGAPPRGANGAPGNDGAK	685 - 708	2131.028	2131.179	71	1	2 Oxidation (P)				
GFSGLQGGPPGPPGSPGEGQGPSGASGPAGPR	1111 - 1140	2689.260	2689.322	23	0	2 Oxidation (P)				

				GFSGLQGPPPPGSPGEGQGPSGASGPAGPR	1111 - 1140	2705.255	2705.336	30	0	3 Oxidation (P)
				GLTGPVGGPPGAPAGDKGEAGSPGAGPTGAR	763 - 795	2853.413	2853.487	26	1	2 Oxidation (P)
				GNDGATGAAGPPGPTGPAGPPGFPVAVGAKGEG GPQGPR	322 - 360	3383.600	3383.794	57	1	3 Oxidation (P)
Kolagen alfa-2(I) lanac CO1A2_BOVIN P02465	Bos taurus	44	18%	IGQPGAVGPAGIR	1066 - 1078	1192.680	1192.681	1	0	
				GIPGPVGAAGATGAR	326 - 340	1267.675	1267.666	-7	0	Oxidation (P)
				GIPGEFGLPGPAGAR	572 - 586	1427.728	1427.733	4	0	2 Oxidation (P)
				GAAGLPGVAGAPGLPGPR	308 - 325	1562.829	1562.831	2	0	3 Oxidation (P)
				GSTGEIGPAGPPGPPGLR	380 - 397	1648.829	1648.831	1	0	2 Oxidation (P)
				GEPGAVGQPPGPPSGEEGKR	359 - 379	1975.947	1975.987	21	1	Oxidation (P)
				EGPVGLPGIDGRPGPIGPAGAR	463 - 484	2056.093	2056.090	-2	0	Oxidation (P)
				EGPVGLPGIDGRPGPIGPAGAR	463 - 484	2072.088	2072.064	-12	0	2 Oxidation (P)
				KAVILQGSNDVELVAEGNSR	1286 - 1305	2115.104	2115.094	-5	1	Oxidation
				GLPGVAGSVGEPGLGIAGPPGAR	881 - 904	2131.114	2131.106	-4	0	3 Oxidation (P)
				GPPGESGAAGPTGPIGSRGPSPPGPDGDK	590 - 619	2705.240	2705.238	-1	1	5 Oxidation (P)
				GPSGEPGTAGPPGTPGQGLLGAPGFLGLPGSR	845 - 877	3033.491	3033.510	6	0	5 Oxidation (P)

Proteini identifikovani MS/MS analizama, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonom.	Skor	Pokriv. sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Kolagen alfa-2(I) lanac CO1A2_BOVIN P02465	Bos taurus	233	7%	GIPGEFGLPGPAGAR	572 - 586	1427.728	1427.606	-85	0	2 Oxidation (P)
				GAAGLPGVAGAPGLPGPR	308 - 325	1562.829	1562.699	-83	0	3 Oxidation (P)
				GSTGEIGPAGPPGPPGLR	380 - 397	1648.829	1648.720	-66	0	2 Oxidation (P)
				EGPVGLPGIDGRPGPIGPAGAR	463 - 484	2056.093	2056.114	10	0	Oxidation (P)
				GLPGVAGSVGEPGLGIAGPPGAR	881 - 904	2115.119	2115.094	-12	0	2 Oxidation (P)
				GLPGVAGSVGEPGLGIAGPPGAR	881 - 904	2131.114	2131.179	30	0	3 Oxidation (P)
Kolagen alfa-1(I) lanac CO1A1_BOVIN P02453	Bos taurus	38	2%	GFSGLQGPPPPGSPGEGQGPSGASGPAGPR	1111 - 1140	2705.255	2705.238	-6	0	3 Oxidation (P)
Kolagen alfa-1(III) lanac CO3A1_MOUSE P08121	Mus musculus	35	3%	DGTSGHPPGPIGPPGPR	1150 - 1165	1562.719	1562.699	-13	0	4 Oxidation (P)
				GPPGAQPPGSPGLGIAGLTGAR	932 - 955	2098.104	2098.210	51	0	Oxidation (P)

ZEČIJE KOŽNO TUTKALO, SIROVO (63028)

Proteini identifikovani PMF analizom, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonom.	Skor	Pokriv. sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Kolagen alfa-1(I) lanac CO1A1_BOVIN P02453	Bos taurus	46	19%	GVVGLPGQR	958 - 966	898.511	898.468	-47	0	Oxidation (P)
				GVQGGPGPAGPR	685 - 696	1105.575	1105.530	-41	0	Oxidation (P)
				GVPGGPGAVGPAGK	598 - 611	1192.632	1192.593	-33	0	2 Oxidation (P)
				GVPGGPGAVGPAGK	598 - 611	1208.627	1208.628	1	0	3 Oxidation (P)
				GSAGPPGATGPFGAAGR	865 - 881	1427.703	1427.660	-30	0	
				GEPGPAGLPGPPGER	472 - 486	1435.681	1435.606	-52	0	3 Oxidation (P)
				ALLLQGSNEIEIR	1386 - 1398	1455.817	1455.692	-86	0	
				STGISVPGMPGSPGR	171 - 186	1560.732	1560.727	-3	0	4 Oxidation (P)
				GNSGEPGAPGSKGDTGAK	430 - 447	1586.741	1586.684	-36	1	
				GEPGSPGENGAPQMGPR	286 - 303	1710.750	1710.789	23	0	Oxidation (P)
				GEPGSPGENGAPQMGPR	286 - 303	1726.745	1726.787	25	0	2 Oxidation (P)
				GPPGMPGPPGLAGPPGESGR	994 - 1013	1816.865	1816.758	-59	0	2 Oxidation (P)
				SGDRGETGPAGPAGPIGPVGAR	1062 - 1083	1975.994	1975.890	-53	1	
				DGVRGLTGPISPPGAPAGPGDK	759 - 780	2082.010	2081.998	-6	1	6 Oxidation
				FTYSVTYDGTSTHTGAWGK	1405 - 1423	2096.902	2097.020	57	0	Oxidation (K)
				GVQGGPGPAGPRGANGAPGNDGAK	685 - 708	2131.028	2130.995	-16	1	2 Oxidation (P)
				GFSGLQGGPPGSPGEGQPSGASGPAGPR	1111 - 1140	2705.255	2705.079	-65	0	3 Oxidation (P)
GLPGPPGAPGPQGFQGGPPGEPGEPGASGPMGPR	187 - 219	3084.412	3084.237	-57	0	5 Oxidation (P)				
GLPGPPGAPGPQGFQGGPPGEPGEPGASGPMGPR	187 - 219	3100.407	3100.233	-56	0	6 Oxidation (P)				

Proteini identifikovani MS/MS analizama, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonomija	Skor	Pokriv. sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Kolagen alfa-2(I) lanac CO1A2_BOVIN P02465	Bos taurus	216	4%	GIPGEFGLPGPAGAR	572 - 586	1427.728	1427.668	-42	0	2 Oxidation (P)
				EGPVGLPGIDGRPGPIGPAGAR	463 - 484	2056.093	2056.044	-24	0	Oxidation (P)
				GLPGVAGSVGEPGLGIAGPPGAR	881 - 904	2131.114	2130.995	-56	0	3 Oxidation (P)
Kolagen alfa-2(I) lanac (Fragmenti) CO1A2_CHICK P02467	Gallus gallus	37	2%	GLPGIAGATGEPGLGVSGPPGAR	881 - 904	2133.094	2133.074	-9	0	3 Oxidation (P)

TEHNIČKI ŽELATIN, SVINJSKI (63040)

Proteini identifikovani MS/MS analizama, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonom.	Skor	Pokriv. sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Kolagen alfa-2(I) lanac CO1A2_CANFA O46392	Canis familiaris	193	3%	GLPGEFGLPGPAGPR	574 - 588	1453.743	1453.609	-92	0	2 Oxidation (P)
				GLPGVAGSVGEPGPLGIAGPPGAR	883 - 906	2131.114	2130.984	-61	0	3 Oxidation (P)
Kolagen alfa-1(I) lanac CO1A1_BOVIN P02453	Bos taurus	37	4%	GFSGLQGPSPGSPGEGQPSGASGPAGPR	1111 - 1140	2689.260	2689.395	50	0	2 Oxidation (P)
				GLPGPPGAPGPQGFQGPPEGEPGASGPMGPR	187 - 219	3084.412	3084.580	54	0	5 Oxidation (P)
Kolagen alfa-2(I) lanac CO1A2_BOVIN P02465	Bos taurus	34	4%	GLPGVAGSVGEPGPLGIAGPPGAR	881 - 904	2131.114	2131.212	46	0	3 Oxidation (P)
				GPSGEPGTAGPPGTPGPQGLLGAPGFLGLPGSR	845 - 877	3017.496	3017.630	44	0	4 Oxidation (P)

SALIANSKI ISINGLASS (63110)

Proteini identifikovani MS/MS analizama, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonom.	Skor	Pokriv. sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Kolagen alfa-1(I) lanac CO1A1_CYNPY Q9YIB4	Cynops pyrrhogaster	103	2%	GAAGPPGATGFPGAAGR	852 - 868	1443.698	1443.702	3	0	2 Oxidation (P)
				GFPGSDGASGPKGAPGER	480 - 497	1691.762	1691.770	5	1	3 Oxidation
Kolagen alfa-1(I) lanac CO1A1_BOVIN P02453	Bos taurus	64	1%	GSAGPPGATGFPGAAGR	865 - 881	1443.698	1443.702	3	0	Oxidation (P)
Kolagen alfa-2(I) lanac CO1A2_ONCMY O93484	Oncorhynchus mykiss	51	2%	GQPGNIGFPGPK	481 - 492	1200.601	1200.594	-6	0	2 Oxidation (P)
				GAAGLPGVAGAPGFPGPR	304 - 321	1612.808	1612.603	-127	0	3 Oxidation (P)
Kolagen alfa-1(II) lanac CO2A1_HUMAN P02458	Homo sapiens	50	1%	GIVGLPGQR	981 - 989	912.526	912.515	-12	0	Oxidation (P)
Kolagen alfa-1(II) lanac CO2A1_BOVIN P02459	Bos taurus	12	1%	GEPGGAGPAGPPGER	495 - 509	1353.603	1353.518	-63	12	3 Oxidation (P)

BELANCE + ZnO (9M11)

Proteini identifikovani PMF analizom, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonomija	Skor	Pokriv. sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Ovalbumin OVAL_CHICK P01012	Gallus gallus	72	32%	LYAEER	106-111	780.389	780.392	4	0	
				DEDTQAMPFR	191 - 200	1209.520	1209.467	-44	0	
				ADHPFLFCIK	361-370	1248.608	1248.595	-10	0	
				HIATNAVLFVGR	371 - 382	1345.738	1345.822	63	0	
				YPILPEYLQCVK	112-123	1523.781	1523.874	61	0	
				AFKDEDTQAMPFR	188 - 200	1555.721	1555.799	50	1	
				LTEWTSSNVMEER	265 - 277	1581.721	1581.765	28	0	
				GGLEPINFQTAADQAR	128 - 143	1687.840	1687.713	-75	0	
				LTEWTSSNVMEERK	265 - 278	1709.816	1709.640	-103	1	
DILNQITKPNVYVYSLASR	86-105	2281.182	2281.276	41	0					
VTEQESKPVQMMYQIGLFR	201 - 219	2285.130	2285.087	-19	0	Deamidated (NQ)				

Proteini identifikovani MS/MS analizama, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonomija	Skor	Pokriv. sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Ovalbumin OVAL_CHICK P01012	Gallus gallus	584	33%	LYAEER	106-111	780.389	780.392	4	0	
				DEDTQAMPFR	191-200	1209.52	1209.467	-44	0	
				HIATNAVLFVGR	371-382	1345.738	1345.822	63	0	
				AFKDEDTQAMPFR	188 - 200	1555.721	1555.799	50	1	
				LTEWTSSNVMEER	265 - 277	1581.721	1581.765	28	0	
				GGLEPINFQTAADQAR	128 - 143	1687.840	1687.713	-75	0	
				EVVGSAAEAGVDAASVSEEFR	341 - 360	2088.912	2089.021	52	0	5: Phospho (ST)
				DILNQITKPNVYVYSLASR	86 - 105	2281.182	2281.276	41	0	
				VTEQESKPVQMMYQIGLFR	201-219	2286.114	2286.242	56	0	2 Deamidated (NQ)

BELANCE + OKER (9M21)

Proteini identifikovani PMF analizom, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonomija	Skor	Pokriv. sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Ovalbumin OVAL_CHICK P01012	Gallus gallus	73	31%	LYAEER	106-111	780.389	780.392	4	0	
				DEDTQAMPFR	191 - 200	1209.520	1209.463	-47	0	
				HIATNAVLFFGR	371 - 382	1345.738	1345.796	43	0	
				AFKDEDTQAMPFR	188 - 200	1555.721	1555.695	-16	1	
				AFKDEDTQAMPFR)	188 - 200	1571.716	1571.659	-36	1	10: Oxidation (M)
				LTEWTSSNVMEER	265 - 277	1581.721	1581.659	-40	0	
				LTEWTSSNVMEER	265 - 277	1597.716	1597.614	-64	0	10: Oxidation (M)
				ELINSWVESQTNGIIR	144 - 159	1858.966	1859.134	90	0	
				EVVGSAAEAGVDAASVSEEF	341-360	2008.946	2009.046	50	0	
				DILNQITKPNVYFSFLASR	86 - 105	2281.182	2281.307	55	0	
DILNQITKPNVYFSFLASR	86 - 105	2283.150	2283.095	-24	0	4, 5: Deamidated (NQ)				
VTEQESKPVQMMYQIGLFR	201-219	2281.146	2284.263	51	0					

Proteini identifikovani MS/MS analizama, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonomija	Skor	Pokriv. sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Ovalbumin OVAL_CHICK P01012	Gallus gallus	490	26%	LYAEER	106 - 111	780.389	780.392	4	0	
				DEDTQAMPFR	191 - 200	1209.520	1209.463	-47	0	
				HIATNAVLFFGR	371 - 382	1345.738	1345.796	43	0	
				AFKDEDTQAMPFR	188 - 200	1555.721	1555.695	-16	1	
				LTEWTSSNVMEER	265 - 277	1581.721	1581.659	-40	0	
				ELINSWVESQTNGIIR	144 - 159	1858.966	1859.134	90	0	
				EVVGSAAEAGVDAASVSEEF	341 - 360	2008.946	2009.046	50	0	
				EVVGSAAEAGVDAASVSEEF	341 - 360	2088.912	2089.053	67	0	5: Phospho (ST)
Ovotransferin TRFE_CHICK P02789	Gallus gallus	38	4%	SAGWNIPIGTLHR	141-154	1534.849	1534.834	-10	0	
				TDERPASYFAVAVAR	443-457	1652.839	1652.605	-142	0	
Lzozim C LYSC_CHICK P00698	Gallus gallus	21	8%	FESNFNTQATNR	52-63	1427.643	1428.731	56	0	

ŽUMANCE + ZnO (10M11)

Proteini identifikovani MS/MS analizama, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonomija	Skor	Pokriv. sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Vitelogenin-2 VIT2_CHICK P02845	Gallus gallus	149	3%	LPLSLPVGPR	1543 - 1552	1048.651	1048.665	13	0	
				NIPFAEYPTYK	695 - 705	1342.668	1342.719	38	0	
				DASFIQNTYLHK	1008 - 1019	1436.717	1436.765	34	0	
				VGATGEIFVVNSPR	642 - 655	1445.775	1445.823	33	0	
				SPQVEEYNGVWPR	74 - 86	1560.744	1560.790	29	0	
Ovalbumin OVAL_CHICK P01012	Gallus gallus	86	8%	GGLEPINFQTAADQAR	128 - 143	1687.840	1687.892	31	0	
				ELINSWVESQTNGIIR	144 - 159	1859.950	1860.003	28	0	12: Deamidated (NQ)
Apovitelenin-1 APOV1_CHICK P02659	Gallus gallus	78	25%	NFLINETAR	75 - 83	1077.569	1077.577	7	0	
				AGQFLLDVVSQTTVVSGIR	57 - 74	1891.028	1891.003	-13	0	

ŽUMANCE + OKER (10M21)

Proteini identifikovani PMF analizom, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonomija	Skor	Pokriv. sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Vitelogenin-2 VIT2_CHICK P02845	Gallus gallus	59	11%	LPLSLPVGPR	1543 - 1552	1048.651	1048.646	-5	0	
				QQLTLVEVR	260 - 268	1085.631	1085.641	9	0	
				MTPPLTGDFR	821-830	1150.556	1150.543	-11	0	1: Oxidation (M)
				TVDLNNCQEK	182 - 191	1164.520	1164.518	-2	0	Deamidated (NQ)
				LEWPKVPSNVR	1472 - 1482	1324.737	1324.723	-11	1	
				NIPFAEYPTYK	695 - 705	1342.668	1342.708	30	0	
				IANADNLESIWR	342 - 353	1401.712	1401.709	-2	0	
				LSQLESTMQIR	831-842	1418.767	1418.782	10	0	
				LSQLESTMQIR	831 - 842	1434.762	1434.817	38	0	9: Oxidation (M)
				ILGIDSMFKVANK	1083 - 1095	1436.782	1436.766	-11	1	12: Deamidated (NQ)
				VGATGEIFVVNSPR	642 - 655	1445.775	1445.737	-26	0	
				TVDLNNCQEKVQK	182 - 194	1560.769	1560.791	15	1	N-Term: Acetyl
				TVDLNNCQEKVQK	182 - 194	1561.753	1561.756	2	1	N-Term: Acetyl + Deamidated (NQ)
LALKCIGNMGEPASLK	479-494	1687.876	1687.892	10	1	N-term: Acetyl 8: Deamidated (NQ)				
EALQPIHDLADEAISR	456 - 471	1777.908	1777.912	2	0					

				LMANSAGSVADLVEVGIR	666 - 683	1859.953	1859.997	24	0	N-Term: Acetyl 2: Oxidation (M)
				NSIAGQWTQPVWMGELR	774 - 790	1988.965	1988.936	-14	0	13: Oxidation (M)
				SYLYNYEGSMLNGLQDR	29 - 45	2022.923	2022.926	2	0	
				QVYQISPFNEPTGVAVMEAR	240 - 259	2236.107	2236.093	-6	0	

Proteini identifikovani MS/MS analizama, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonomija	Skor	Pokriv. sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Vitelogenin-2 VIT2_CHICK P02845	Gallus gallus	247	6%	LPLSLPVGPR	1543 - 1552	1048.651	1048.646	-5	0	
				QQLTLVEVR	260 - 268	1085.631	1085.641	9	0	
				MTPPLTGDFR	821 - 830	1150.556	1150.543	-11	0	1: Oxidation (M)
				ADTYFDNYR	633 - 641	1164.496	1164.518	19	0	
				NIPFAEYPTYK	695 - 705	1342.668	1342.708	30	0	
				IANADNLESIWR	342 - 353	1401.712	1401.709	-2	0	
				DASFIQNTYLHK	1008 - 1019	1436.717	1436.766	34	0	
				SPQVEEYNGVWPR	74 - 86	1560.744	1560.791	30	0	
				EALQPIHDLADEAISR	456 - 471	1777.908	1777.912	2	0	
Ovalbumin OVAL_CHICK P01012	Gallus gallus	91	8%	QVYQISPFNEPTGVAVMEAR	240 - 259	2236.107	2236.093	-6	0	
				GGLEPINFQTAADQAR	128 - 143	1687.840	1687.734	-63	0	
Apovitelenin-1 APOV1_CHICK P02659	Gallus gallus	60	25%	ELINSWVESQTNGIIR	144 - 159	1859.950	1859.997	25	0	12: Deamidated (NQ)
				NFLINETAR	75 - 83	1077.569	1077.554	-14	0	
				AGQFLLDVVSQTTVVGIR	57 - 74	1891.028	1890.944	-45	0	

KRAVLJI SIR + ZnO (7M11)

Proteini identifikovani PMF analizom, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonomija	Skor	Pokriv. sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Alpha-S1-casein CASA1_BOVIN P02662	Bos taurus	68	41%	YLGYLEQLLR	106 - 115	1267.704	1267.764	47	0	
				FFVAPFPEVFGK	38 - 49	1384.730	1384.815	62	0	
				VPQLEIVPNSAEER	121 - 134	1660.794	1660.888	57	0	10: Phospho (ST)
				HQGLPQEVLENLLR	23 - 37	1759.945	1760.039	54	0	
				DIGSESTEDQAMEDIK	58 - 73	1927.692	1927.790	51	0	4, 6: Phospho (ST)
				YKVPQLEIVPNSAEER	119 - 134	1951.952	1952.047	48	1	12: Phospho (ST)
				EPMIGVNQELAYFYPELFR	148 - 166	2316.137	2316.310	75	0	

Beta-lactoglobulin LACB_BOVIN P02754	Bos taurus	34	17%	ALPMHIR	158 - 164	837.476	837.494	21	0	
				VLVLDTDYKK	108 - 117	1193.678	1193.706	24	1	
				TPEVDDEALEK	141 - 151	1245.584	1245.628	35	0	
				TPEVDDEALEKFDK	141 - 154	1635.775	1635.864	54	1	

Proteini identifikovani MS/MS analizama, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonomija	Skor	Pokriv. sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Alfa-S1-kazein CASA1_BOVIN P02662	Bos taurus	595	41%	YLGYLEQLLR	106 - 115	1267.704	1267.764	47	0	
				FFVAPFPEVFGK	38 - 49	1384.730	1384.815	62	0	
				VPQLEIVPNSAEER	121 - 134	1660.794	1660.888	57	0	10: Phospho (ST)
				HQGLPQEVLENLLR	23 - 37	1759.945	1760.039	54	0	
				DIGSESTEDQAMEDIK	58-73	1927.692	1927.790	51	0	4, 6: Phospho (ST)
				YKVPQLEIVPNSAEER	119 - 134	1951.952	1952.047	48	1	12: Phospho (ST)
Alfa-S2-kazein CASA2_BOVIN P02663	Bos taurus	64	8%	EPMIGVNQELAYFYPELFR	148 - 166	2316.137	2316.310	75	0	
				FALPQYLK	189 - 196	979.561	979.604	43	0	
Beta-kazein CASB_BOVIN P02666	Bos taurus	57	14%	NAVPIPTLNR	130 - 140	1195.679	1195.730	43	0	
				GPFPIIV	218 - 224	742.450	742.486	49	0	
Beta-laktoglobulin LACB_BOVIN P02754	Bos taurus	39	10%	VLPVPQK	185 - 191	780.498	780.517	25	0	
				DMPIQAFLLYQEPVLGPVR	199 - 217	2186.168	2186.312	70	0	
				ALPMHIR	158 - 164	837.476	837.494	21	0	
Kapa-kazein CASK_BOVIN P02668	Bos taurus	33	5%	VLVLDTDYKK	108 - 117	1193.678	1193.706	24	1	
				YIPIQYVLSR	46-55	1251.709	1251.750	32	0	

KRAVLJI SIR + OKER (7M21)

Proteini identifikovani PMF analizom, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonomija	Skor	Pokriv. sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Alfa-S1-kazein CASA1_BOVIN P02662	Bos taurus	46	34%	YLGYLEQLLR	106 - 115	1267.704	1267.704	0	0	
				FFVAPFPEVFGK	38 - 49	1384.730	1384.730	0	0	
				HQGLPQEVLENLLR	23 - 37	1759.945	1759.945	0	0	
				YKVPQLEIVPNSAEER	119 - 134	1951.952	1951.952	0	1	12: Phospho (ST)
				EPMIGVNQELAYFYPELFR	148 - 166	2316.137	2316.137	0	0	

Beta-laktoglobulin LACB_BOVIN P02754	Bos taurus	35	38%	VLVLDTDYKK	108 - 117	1193.678	1193.651	-22	1	
				TPEVDDEALEK	141 - 151	1325.551	1325.682	99	0	1: Phospho (ST)
				VYVEELKPTPEGDLEILLQK	57 - 76	2313.259	2313.240	-8	0	
				VAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLR	31 - 56	2707.376	2707.265	-41	0	

Proteini identifikovani MS/MS analizama, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonomija	Skor	Pokriv. sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Alfa-S1-kazein CASA1_BOVIN P02662	Bos taurus	412	36%	TTMPLW	209-214	748.370	748.391	28	0	
				YLGYLEQLLR	106 - 115	1267.704	1267.704	0	0	
				FFVAPFPEVFGK	38 - 49	1384.730	1384.730	0	0	
				HQGLPQEVLNENLLR	23 - 37	1759.945	1759.945	0	0	
				YKVPQLEIVPNSAEER	119 - 134	1951.952	1951.952	0	1	12: Phospho (ST)
EPMIGVNQELAYFYPELFR	148 - 166	2316.137	2316.137	0	0					
Alfa-S2-kazein CASA2_BOVIN P02663	Bos taurus	21	4%	ALNEINQFYQK	96-106	1367.695	1367.629	-48	0	
Kapa-kazein CASK_BOVIN P02668	Bos taurus	33	5%	YIPIQYVLSR	46-55	1251.709	1251.686	-19	0	

ZEČIJE KOŽNO TUTKALO, PREČIŠĆENO (63025) + ZnO (3M11)

Proteini identifikovani PMF analizom, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonomija	Skor	Pokriv. sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Kolagen alfa-2(I) lanac CO1A2_BOVIN P02465	Bos taurus	144	6%	GIPGEFGLPGPAGAR	572 - 586	1427.728	1427.749	15	0	2 Oxidation (P)
				GAAGLPGVAGAPGLPGPR	308 - 325	1562.829	1562.799	-19	0	3 Oxidation (P)
				EGPVGLPGIDGRPGPIGPAGAR	463 - 484	2056.093	2056.027	-32	0	Oxidation (P)
				GLPGVAGSVGEPGPLGIAGPPGAR	881 - 904	2099.124	2099.076	-23	0	Oxidation (P)
Kolagen alfa-2(I) lanac (Fragmenti) CO1A2_CHICK P02467	Gallus gallus	37	3%	GAAGLPGVAGAPGLPGPR	308 - 325	1562.829	1562.799	-19	0	3 Oxidation (P)
				GLPGIAGATGEPGLGVSGPPGAR	881-904	2133.094	2133.063	-14	0	3 Oxidation (P)

ZEČIJE KOŽNO TUTKALO, PREČIŠČENO (63025) + OKER (3M21)

Proteini identifikovani MS/MS analizama, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonomija	Skor	Pokriv. sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Kolagen alfa-2(I) lanac CO1A2_BOVIN P02465	Bos taurus	163	6%	GIPGEFGLPGPAGAR	572 - 586	1427.728	1427.681	-33	0	2 Oxidation (P)
				GAAGLPGVAGAPGLPGPR	308 - 325	1562.829	1562.760	-44	0	3 Oxidation (P)
				EGPVGLPGIDGRPGPIGPAGAR	463 - 484	2056.093	2056.047	-22	0	Oxidation (P)
				GLPGVAGSVGEPGLGIAGPPGAR	881 - 904	2131.114	2130.958	-73	0	3 Oxidation (P)
Kolagen alfa-1(I) lanac CO1A1_BOVIN P02453	Bos taurus	53	4%	GEPGPAGLPGPPGER	472-486	1435.681	1435.520	-112	0	3 Oxidation (P)
				SGDRGETGPAGPAGPIGPVGAR	1062 - 1083	1975.994	1975.920	-38	1	
				GEPGPTGIQGPVPAGEEGKR	448-468	2019.973	2019.800	-86	1	2 Oxidation (P)
Kolagen alfa-2(I) lanac (Fragmenti) CO1A2_CHICK P02467	Gallus gallus	43	3%	GAAGLPGVAGAPGLPGPR	308-325	1562.829	1562.760	-44	0	3 Oxidation (P)
				GLPGIAGATGEPGLGVSGPPGAR	881-904	2133.093	2133.081	-6	0	3 Oxidation (P)

UZORCI SA IKONOSTASA CRKVE PRESVETE BOGORODICE U BARIČU

UZORAK B4 sa prestone ikone sa predstavom Isusa Hrista

Proteini identifikovani MS/MS analizama, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonomija	Skor	Pokriv. sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Kolagen alfa-1(I) lanac CO1A1_BOVIN P02453	Bos taurus	24	2%	GSAGPPGATGFPGAAGR	865-881	1459.692	1459.678	-10	0	2 Oxidation (P)
				GPPGPMGPPGLAGPPGESGR	994-1013	1832.860	1832.907	26	0	3 Oxidation (P)
Kolagen alfa-2(I) lanac CO1A2_BOVIN P02465	Bos taurus	23	3%	GIPGEFGLPGPAGAR	572-586	1427.728	1427.733	4	0	2 Oxidation (P)
				EGPVGLPGIDGRPGPIGPAGAR	463-484	2056.093	2056.169	37	0	Oxidation (P)

UZORAK B8 sa ikone sa predstavom Svetog Teodora Tirona

Proteini identifikovani PMF analizom, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonomija	Skor	Pokriv. sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Kolagen alfa-1(I) lanac CO1A1_BOVIN P02453	Bos taurus	44	21%	GPAGPQGPR	1084 - 1092	836.437	836.482	54	0	
				GPAGPQGPR	1084 - 1092	852.432	852.477	52	0	Oxidation (P)
				GEGGPQGPR	352 - 360	854.412	854.478	78	0	
				GPAGPQGPR	1084 - 1092	868.427	868.498	82	0	2 Oxidation (P)
				GSEGPQGVV	361 - 369	886.438	886.479	47	0	
				GVVGLPGQR	958 - 966	898.511	898.553	48	0	Oxidation (P)
				GERGFPGER	676 - 684	1020.486	1020.542	55	1	Oxidation (P)
				GAAGLPGPKGDR	733 - 744	1095.591	1095.615	23	1	
				GVQPPGPAGPR	685 - 696	1105.575	1105.624	44	0	Oxidation (P)
				GDAGPKGADGAPGK	745 - 758	1261.566	1261.678	89	1	4 Oxidation (P)
				GSAGPPGATGFPGAAGR	865 - 881	1427.703	1427.790	62	0	
				GEPGAPGLPMPGER	472 - 486	1435.681	1435.746	45	0	3 Oxidation (P)
				GSAGPPGATGFPGAAGR	865 - 881	1459.692	1459.753	42	0	2 Oxidation (P)
				GETGPAGPAGPIGPVGAR	1066 - 1083	1560.813	1560.862	31	0	
				GNSGEPGAPGSKGDTGAK	430 - 447	1586.741	1586.815	47	1	
				GPPGADGVAGPKGPAGER	493 - 510	1655.814	1655.864	31	1	Oxidation (P)
				DGEAGAQQPPGPAGPAGER	612 - 630	1706.773	1706.850	45	0	Oxidation (P)
				GPPGPMGPPGLAGPPGESGR	994 - 1013	1832.860	1832.952	50	0	3 Oxidation (P)
				GPPGPMGPPGLAGPPGESGR	994 - 1013	1848.855	1848.933	43	0	4 Oxidation (P)
				GEPGPTGIQPPGPAGEEGKR	448 - 468	2019.973	2020.070	48	1	2 Oxidation (P)
GVQPPGPAGPRGANGAPGNDGAK	685 - 708	2131.028	2131.201	81	1	2 Oxidation (P)				
GETGPAGRPGEVGGPPPPGAGEK	910 - 933	2216.058	2216.157	45	0	3 Oxidation (P)				
GFSLQGPMPGPPGSPGEGQPSGASGPAGPR	1111 - 1140	2705.255	2705.376	45	0	3 Oxidation (P)				
GDAGAPGAPGSQGAPGLQGMPPGERGAAGLPGPK	709 - 741	2883.417	2883.536	41	1					

Proteini identifikovani MS/MS analizama, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonomija	Skor	Pokriv. sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Kolagen alfa-2(I) lanac CO1A2_BOVIN P02465	Bos taurus	42	3%	GIPGEFGLPGPAGAR	572 - 586	1427.728	1427.791	44	0	2 Oxidation (P)
				GLPGVAGSVGEPGLGIAGPPGAR	881 - 904	2131.114	2131.201	41	0	3 Oxidation (P)
Kolagen alfa-2(I) lanac CO1A2_CANFA O46392	Canis familiaris	24	3%	GEPGPAGSVGPGVAVGPR	979-996	1560.813	1560.862	31	0	
				GLPGVAGSVGEPGLGIAGPPGAR	883-906	2131.114	2131.201	41	0	3 Oxidation (P)
Kolagen alfa-1(I) lanac CO1A1_BOVIN P02453	Bos taurus	16	1%	GSAGPPGATGFPGAAGR	865-881	1459.692	1459.753	42	0	2 Oxidation (P)

UZORAK B15 sa prestone ikone sa predstavom Bogorodice

Proteini identifikovani PMF analizom, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonomija	Skor	Pokriv. sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Kolagen alfa-1(I) lanac CO1A1_BOVIN P02453	Bos taurus	34	20%	GPAGPQGPR	1084 - 1092	836.437	836.436	-1	0	
				GFPGADGVAGPK	493 - 504	1088.537	1088.545	7	0	Oxidation (P)
				GNSGEPGAPGSK	430 - 441	1105.476	1105.476	0	0	3 Oxidation
				GSAGPPGATGFPGAAGR	865 - 881	1427.703	1427.696	-5	0	
				GEPGPAGLPGPPGER	472 - 486	1435.681	1435.672	-6	0	3 Oxidation (P)
				GETGPAGPAGPIGPVGAR	1066 - 1083	1560.813	1560.784	-18	0	
				GNSGEPGAPGSKGDTGAK	430 - 447	1586.741	1586.723	-11	1	
				GGPGRGFPAGDGVAGPK	487 - 504	1615.782	1615.763	-12	1	2 Oxidation (P)
				GFPGERGVQPPGPAGPR	679 - 696	1796.867	1796.854	-8	1	4 Oxidation (P)
				GPPGPMGPPGLAGPPGESGR	994 - 1013	1816.865	1816.841	-13	0	2 Oxidation (P)
				GPPGPMGPPGLAGPPGESGR	994 - 1013	1832.860	1832.844	-9	0	3 Oxidation (P)
				GPPGPMGPPGLAGPPGESGR	994 - 1013	1848.855	1848.841	-7	0	4 Oxidation (P)
				SGDRGETGPAGPAGPIGPVGAR	1062 - 1083	1975.994	1975.961	-17	1	
				GAPGADGPAGAPGTPGPQGIAGQR	934 - 957	2057.016	2057.015	0	0	
				GVQPPGPAGPRGANGAPGNDGAK	685 - 708	2131.028	2131.074	22	1	2 Oxidation (P)
				GETGPAGRPEVGPVGPAGEK	910 - 933	2216.058	2216.029	-13	0	3 Oxidation (P)
				GDRGETGPAGPPGAPGAPGAPVGPAGK	1033 - 1061	2481.212	2481.154	-23	1	2 Oxidation (P)
				GFSGLQGPPGPPGSPGEGQGPSGASGPAGPR	1111 - 1140	2689.260	2689.183	-29	0	2 Oxidation (P)
GFSGLQGPPGPPGSPGEGQGPSGASGPAGPR	1111 - 1140	2705.255	2705.189	-24	0	3 Oxidation (P)				
GLTGPIGPPGAPGAPGDKGEAGSPGAPGPTGAR	763 - 795	2853.413	2853.353	-21	1	2 Oxidation (P)				
GPPGPMGPPGLAGPPGESGREGAPGAEGSPGR	994 - 1025	2882.349	2882.342	-2	1	2 Oxidation (P)				

Proteini identifikovani MS/MS analizama, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonomija	Skor	Pokriv. sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Kolagen alfa-2(I) lanac CO1A2_BOVIN P02465	Bos taurus	25	3%	GIPGEFGLPGAGAR	572 - 586	1427.728	1427.696	-23	0	2 Oxidation (P)
				GPPGESGAAGPTGPIGSRGSPGPPGPDGDK	590 - 619	2705.240	2705.189	-19	1	5 Oxidation
Kolagen alfa-1(I) lanac CO1A1_BOVIN P02453	Bos taurus	24	1%	GEPGPAGLPGPPGER	472 - 486	1435.681	1435.672	-6	0	3 Oxidation (P)

UZORAK B16 sa ikone sa predstavom Svetog Jovana

Proteini identifikovani PMF analizom, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonomija	Skor	Pokriv. sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Kolagen alfa-1(I) lanac CO1A1_BOVIN P02453	Bos taurus	70	17%	GPAGPQGPR	1084 - 1092	836.437	836.430	-9	0	
				GPAGPQGPR	1084 - 1092	852.432	852.422	-12	0	Oxidation (P)
				GPAGPQGPR	1084 - 1092	868.427	868.449	25	0	2 Oxidation (P)
				GVQGGPPGAGPR	685 - 696	1105.575	1105.541	-31	0	Oxidation (P)
				GSAGPPGATGFPGAAGR	865 - 881	1427.703	1427.689	-10	0	
				GEPGPAGLPGPPGER	472 - 486	1435.681	1435.630	-36	0	3 Oxidation (P)
				GSAGPPGATGFPGAAGR	865 - 881	1459.692	1459.650	-29	0	2 Oxidation (P)
				STGISVPGPMGSPGPR	171 - 186	1560.732	1560.762	19	0	4 Oxidation (P)
				DGLNGLPGPIGPPGPR	1152 - 1167	1561.797	1561.761	-23	0	3 Oxidation (P)
				GNSGEPGAPGSKGDTGAK	430 - 447	1586.741	1586.709	-20	1	
				GPPGPMGPPGLAGPPGESGR	994 - 1013	1832.860	1832.800	-33	0	3 Oxidation (P)
				GPPGPMGPPGLAGPPGESGR	994 - 1013	1848.855	1848.800	-30	0	4 Oxidation (P)
				SGDRGETGPAGPAGPIGPVGAR	1062 - 1083	1975.994	1975.935	-30	1	
				GEPGPTGIQGGPPGAGEEGKR	448 - 468	2019.973	2019.912	-30	1	2 Oxidation (P)
				TGPPGPAGQDGRPGPPGPPGAR	552 - 573	2056.980	2056.957	-11	0	4 Oxidation (P)
				GVQGGPPGAGPRGANGAPGNDGAK	685 - 708	2131.028	2131.045	8	1	2 Oxidation (P)
GETGPAGRPGEVGGPPGPPGAGEK	910 - 933	2216.058	2215.987	-32	0	3 Oxidation (P)				
GFSLQGPPGPPGSPGEGQGGPSGASGPAGPR	1111 - 1140	2705.255	2705.134	-45	0	3 Oxidation (P)				

Proteini identifikovani MS/MS analizama, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonomija	Skor	Pokriv. sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Kolagen alfa-1(I) lanac CO1A1_BOVIN P02453	Bos taurus	69	4%	GVQGGPPGAGPR	685 - 696	1105.575	1105.541	-31	0	Oxidation (P)
				GEPGPAGLPGPPGER	472 - 486	1435.681	1435.630	-36	0	3 Oxidation (P)
				DGLNGLPGPIGPPGPR	1152 - 1167	1561.797	1561.761	-23	0	3 Oxidation (P)
				TGPPGPAGQDGRPGPPGPPGAR	552 - 573	2056.980	2056.957	-11	0	4 Oxidation (P)
Kolagen alfa-2(I) lanac CO1A2_BOVIN P02465	Bos taurus	20	2%	GIPGEFGLPGPAGAR	572 - 586	1427.728	1427.689	-27	0	2 Oxidation (P)
				GLPGVAGSVGEPGLGIAGPPGAR	881 - 904	2131.114	2131.045	-32	0	3 Oxidation (P)

UZORAK B17 sa ikone sa predstavom Tri srpska svetitelja – Svetog Arsenija, Svetog Asrhiepiskopa Save i Svetog Simeona

Proteini identifikovani MS/MS analizama, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonomija	Skor	Pokriv. sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Kolagen alfa-2(I) lanac P02465	Bos taurus	15	1%	GIPGEFGLPGPAGAR	572 - 586	1427.728	1427.565	-114	0	2 Oxidation (P)

UZORAK SA IKONOSTASA CRKVE SVETIH BLAGOVESTI U IDVORU

UZORAK II

Proteini identifikovani PMF analizom, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonomija	Skor	Pokriv. sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Kolagen alfa-1(I) lanac CO1A1_BOVIN P02453	Bos taurus	54	7%	GPAGPQGPR	1084 - 1092	836.437	836.433	-5	0	
				GPAGPQGPR	1084 - 1092	852.432	852.422	-12	0	Oxidation (P)
				GPAGPQGPR	1084 - 1092	868.427	868.449	25	0	2 Oxidation (P)
				GVVGLPGQR	958 - 966	898.511	898.505	-6	0	Oxidation (P)
				GVQPPGPAGPR	685 - 696	1105.575	1105.572	-3	0	Oxidation (P)
				GSAGPPGATGFPGAAGR	865 - 881	1427.703	1427.707	3	0	
				GEPGPAGLPGPPGER	472 - 486	1435.681	1435.682	0	0	3 Oxidation (P)
				GSAGPPGATGFPGAAGR	865 - 881	1459.692	1459.690	-1	0	2 Oxidation (P)
				GETGPAGPAGPIGPVGAR	1066 - 1083	1560.813	1560.812	-1	0	
GNSGEPGAPGSKGDTGAK	430 - 447	1586.741	1586.662	-50	1					

Proteini identifikovani MS/MS analizama, odgovarajuće m/z vrednosti i sekvence peptida

Identifikovani proteini	Taksonomija	Skor	Pokriv. sekvence	Identifikovani peptidi	Opseg	Teor. MH+	Izmer. m/z	Dev. (ppm)	Miss	Modifikacije
Kolagen alfa-2(I) lanac CO1A2_BOVIN P02465	Bos taurus	23	1%	GIPGEFGLPGPAGAR	572 - 586	1427.728	1427.707	-15	0	2 Oxidation (P)
Kolagen alfa-1(I) lanac CO1A1_BOVIN P02453	Bos taurus	12	1%	GEPGPAGLPGPPGER	472 - 486	1435.681	1435.682	0	0	3 Oxidation (P)

PRLOG II

KOMPLETNI REZULTATI ANALIZE PROTEINSKIH VEZIVA NA LC-ESI-LTQ-ORBITRAP MASENOM SPEKTROMETRU

Rezultati dobijeni za referentne materijale

GOVE E KOŠTANO TUTKALO (63000)

P02453 (CO1A1_BOVIN)

[37 peptide matches \(35 non-duplicate, 2 duplicate\)](#)

Skor 797

Kolagen alfa-1(I) lanac OS=Bos taurus GN=COL1A1 PE=1 SV=3

Pokrivenost sekvence: 32%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U	Peptid
10	733	741	392,222	782,4294	782,4286	0,97	0	27	0,024	1	R	R.GAAGLPGPK.G + Oxidation (K)
20	1084	1092	418,7226	835,4307	835,4301	0,76	0	40	0,0063	1	R	R.GPAGPQGP.R
23	268	276	426,2169	850,4192	850,4185	0,82	0	33	0,0072	1	R	R.GFSGLDGAK.G
24	268	276	426,2169	850,4193	850,4185	1,01	0	33	0,0065	1	R	R.GFSGLDGAK.G
25	244	252	426,7195	851,4245	851,425	-0,55	0	17	0,026	1	R	R.GPPGPQGAR.G + Oxidation (P)
26	244	252	426,7197	851,4249	851,425	-0,053	0	18	0,02	1	R	R.GPPGPQGAR.G + Oxidation (P)
32	361	369	443,7225	885,4305	885,4304	0,088	0	49	0,00031	1	R	R.GSEGPQV.R
36	958	966	449,7594	897,5043	897,5032	1,2	0	36	0,0056	1	R	R.GVVGLPGQR.G + Oxidation (P)
47	493	504	544,7723	1087,5301	1087,5298	0,26	0	45	6,10E-05	1	R	R.GFPGADGVAGPK.G + Oxidation (P)
51	685	696	553,2908	1104,567	1104,5676	-0,52	0	36	0,00067	1	R	R.GVQGGPPGAPGR.G + Oxidation (P)
52	685	696	553,7833	1105,552	1105,5516	0,37	0	34	0,011	1	R	R.GVQGGPPGAPGR.G + Deamidated (NQ); Oxidation (P)
59	574	585	581,2897	1160,5649	1160,5648	0,016	0	56	0,00019	1	R	R.GQAGVMGFPGPK.G + Oxidation (P)
60	598	611	596,8198	1191,6251	1191,6248	0,26	0	30	0,041	1	R	R.GVPPGAVGAPGK.D + 2 Oxidation (P)
71	538	551	629,7993	1257,5841	1257,5837	0,26	0	72	2,60E-06	1	K	K.GLTGSPGSPGPDGK.T + 2 Oxidation (P)
81	970	983	664,828	1327,6414	1327,6409	0,45	0	48	0,00057	1	R	R.GFPGLPGSGEPGK.Q + 2 Oxidation (P)
82	415	429	666,8309	1331,6471	1331,647	0,11	0	85	1,70E-07	1	U	U.R.GPSGPQGSPPGPK.G + Oxidation (P)
83	415	429	667,3229	1332,6312	1332,631	0,12	0	31	0,012	1	U	U.R.GPSGPQGSPPGPK.G + Deamidated (NQ); Oxidation (K)
84	970	983	672,8255	1343,6364	1343,6358	0,5	0	44	0,0003	1	R	R.GFPGLPGSGEPGK.Q + Oxidation (K); 2 Oxidation (P)
87	472	486	718,3451	1434,6756	1434,6739	1,14	0	42	0,0033	1	U	U.R.GEPGAPLPGPPGER.G + 3 Oxidation (P)
90	865	881	730,3502	1458,6858	1458,6852	0,4	0	89	5,90E-08	1	R	R.GSAGPPGATGFPGAAGR.V + 2 Oxidation (P)
97	1066	1083	780,9102	1559,8058	1559,8056	0,11	0	44	0,00016	1	U	U.R.GETGPAGPAGPVGAR.G
101	397	414	793,8821	1585,7496	1585,7485	0,72	0	40	0,00023	1	K	K.GANGAPGIAGAPGPPGAR.G + Deamidated (NQ); 3 Oxidation (P)
105	520	537	552,6045	1654,7917	1654,7911	0,36	1	23	0,0098	1	K	K.GSPGEAGRPEAGLPGAK.G + Oxidation (K); 2 Oxidation (P)
109	612	630	853,8904	1705,7662	1705,7656	0,34	0	56	1,10E-05	1	K	K.DGEAQAQPPGAPGAGER.G + Oxidation (P)
111	286	303	872,3664	1742,7183	1742,7166	0,97	0	28	0,0028	1	K	K.GEPGSPGENGAPGQMGPR.G + Deamidated (NQ); 3 Oxidation (P)
119	882	902	906,9457	1811,8768	1811,8803	-1,91	0	34	0,0033	1	R	R.VGPPGPGNAGPPGPPGAGK.E + Oxidation (K); 2 Oxidation (P)
121	882	902	907,4406	1812,8666	1812,8643	1,29	0	27	0,014	1	R	R.VGPPGPGNAGPPGPPGAGK.E + Deamidated (NQ); Oxidation (K); 2 Oxidation (P)
122	994	1013	908,9363	1815,8581	1815,8574	0,36	0	65	1,30E-06	1	R	R.GPPGMPGPPLAGPPGESGR.E + 2 Oxidation (P)
125	994	1013	916,9332	1831,8519	1831,8523	-0,23	0	45	0,0013	2	R	R.GPPGMPGPPLAGPPGESGR.E + 3 Oxidation (P)
134	1062	1083	659,3363	1974,987	1974,9872	-0,063	1	52	4,40E-05	1	U	U.K.SGDRGETGPAGPAGPVGAR.G
137	448	468	673,9961	2018,9665	2018,9658	0,35	1	50	0,00048	1	U	U.K.GEPGPTGIQGGPPGAGEGKR.G + 2 Oxidation (P)
141	552	573	686,3317	2055,9732	2055,9723	0,47	1	44	8,20E-05	1	K	K.TGPPGAPGQDRPDPGPPGAR.G + 4 Oxidation (P)
150	709	732	1099,9898	2197,965	2197,9659	-0,37	0	49	2,30E-05	1	K	K.GDAGAPGAPGSQAPGLQMPGER.G + 4 Oxidation (P)
168	1033	1061	838,4058	2512,1954	2512,1943	0,45	1	86	1,20E-07	1	K	K.GDRGETGPAGPPGAPGAPGPPVGPAGK.S + 4 Oxidation (P)
179	796	825	901,7517	2702,2332	2702,2321	0,39	1	26	0,04	1	R	R.GAPGDRGEPGPPGAPGAPGPPGADGQPGAK.G + Oxidation (K); 3 Oxidation (P)
190	763	795	951,811	2852,4113	2852,4053	2,08	1	42	0,0026	1	U	U.R.GLTGPIGPPGAPGAPGDKGEAGPSGAPGPTGAR.G + 2 Oxidation (P)
192	598	630	960,8003	2879,379	2879,3799	-0,29	1	59	6,20E-05	1	R	R.GVPPGAVGAPGKDGEGAQGGPPGAPGAGER.G + 3 Oxidation (P)

P02465 (CO1A2_BOVIN)

[26 peptide matches \(26 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 494

Kolagen alfa-2(I) lanac OS=Bos taurus GN=COL1A2 PE=1 SV=2

Pokrivenost sekvence: 23%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U	Peptid
12	821	828	393,1988	784,3831	784,3828	0,44	0	22	0,031	1		R.GDQGPVGR.S
16	509	517	405,2227	808,4308	808,4304	0,59	0	30	0,0049	1		K.GHAGLAGAR.G
21	155	163	420,7382	839,4619	839,4614	0,6	0	35	0,016	1		R.GVVGPQGAR.G
28	223	232	434,7356	867,4566	867,4563	0,42	0	38	0,0052	1		R.VGAPGPAGAR.G + Oxidation (P)
29	995	1003	434,7356	867,4567	867,4563	0,53	0	44	0,0013	1		R.GPSGPQGIR.G
34	1052	1062	448,2354	894,4562	894,4559	0,33	0	34	0,017	1		R.GPAGSPGAGK.D
46	341	352	542,7854	1083,5563	1083,556	0,2	0	47	0,00085	1		R.GLVGEPGPAGSK.G + Oxidation (P)
46	485	496	601,2964	1200,5783	1200,5775	0,66	0	49	0,0006	1		R.GEPGNIGFPGPK.G + Oxidation (K); Oxidation (P)
64	1066	1078	604,8411	1207,6676	1207,6673	0,26	0	28	0,016	1	U	R.IGQPGAVGPAGIR.G + Oxidation (P)
73	326	340	634,3414	1266,6682	1266,6681	0,085	0	19	0,015	1		R.GIPGPVGAAGATGAR.G + Oxidation (P)
78	449	462	644,32	1286,6255	1286,6255	-0,02	0	59	4,80E-05	1	U	R.GFPSPGNIGPAGK.E + 2 Oxidation (P)
86	572	586	714,3682	1426,7217	1426,7205	0,88	0	45	0,0001	1	U	R.GIPGEFGLPGPAGAR.G + 2 Oxidation (P)
92	776	792	737,3392	1472,6638	1472,6645	-0,43	0	59	7,30E-06	1		R.GDGGPPGATFPGAAGR.T + 2 Oxidation (P)
100	590	607	790,8864	1579,7583	1579,7591	-0,45	0	100	4,60E-09	1	U	R.GPPGESGAAGPTPIGSR.G + Oxidation (P)
102	263	280	808,4135	1614,8123	1614,8114	0,57	0	83	3,10E-07	1		K.GELGPVGNPAGPAGPR.G + Oxidation (P)
104	380	397	824,9184	1647,8221	1647,8217	0,29	0	40	0,00099	1	U	R.GSTGEIGPAGPPPPGLR.G + 2 Oxidation (P)
114	431	448	595,2722	1782,7947	1782,7955	-0,45	1	33	0,0072	1		R.GPNDGSRGPEGLMGPR.G + Deamidated (NQ); 2 Oxidation (P)
116	431	448	600,6042	1798,7907	1798,7904	0,15	1	27	0,007	1		R.GPNDGSRGPEGLMGPR.G + Deamidated (NQ); 3 Oxidation (P)
140	463	484	686,0358	2055,0857	2055,0862	-0,22	1	19	0,027	1	U	K.EGPVGLPGIDGRPGIPAGAR.G + Oxidation (P)
142	463	484	691,3676	2071,081	2071,0811	-0,047	1	28	0,0023	1	U	K.EGPVGLPGIDGRPGIPAGAR.G + 2 Oxidation (P)
145	881	904	1066,0608	2130,107	2130,107	0,039	0	70	2,80E-06	1		R.GLPVAGSVGEPGLGIAGPPGAR.G + 3 Oxidation (P)
146	881	904	711,0437	2130,1093	2130,107	1,08	0	43	0,002	1		R.GLPVAGSVGEPGLGIAGPPGAR.G + 3 Oxidation (P)
157	713	739	804,0503	2409,1289	2409,1309	-0,83	1	33	0,00074	1		R.GEVGPAGNPFAGPAGAAGQPGAKGER.G + Deamidated (NQ); Oxidation (K); Oxidation (P)
158	713	739	804,0509	2409,1309	2409,1309	-0,02	1	22	0,0088	1		R.GEVGPAGNPFAGPAGAAGQPGAKGER.G + Deamidated (NQ); 2 Oxidation (P)
161	281	307	1224,1065	2446,1984	2446,1976	0,33	0	29	0,0019	1	U	R.GEVGLPGLSGPVPPNPGANGLPGAK.G + Deamidated (NQ); Oxidation (K); 4 Oxidation

GOVE E KOŽNO TUTKALO (63010)

P02453 (CO1A1_BOVIN)

[38 peptide matches \(37 non-duplicate, 1 duplicate\)](#)

Skor 743

Kolagen alfa-1(I) lanac OS=Bos taurus GN=COL1A1 PE=1 SV=3

Pokrivenost sekvence: 31%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U	Peptid
29	1084	1092	418,7225	835,4305	835,4301	0,57	0	40	0,0064	1		R.GPAGPQGPR.G
33	268	276	426,2168	850,419	850,4185	0,56	0	24	0,011	1		R.GFSGLDGAK.G
34	268	276	426,2169	850,4192	850,4185	0,89	0	39	0,0022	1		R.GFSGLDGAK.G
37	352	360	427,7096	853,4046	853,4042	0,46	0	33	0,00082	1	U	K.GEGGPQGPR.G
42	361	369	443,7225	885,4305	885,4304	0,043	0	44	0,0011	1		R.GSEGPQGV.R
46	958	966	449,7593	897,504	897,5032	0,84	0	35	0,0057	1		R.GVVGLPGQR.G + Oxidation (P)
47	958	966	450,2512	898,4878	898,4872	0,63	0	36	0,015	1		R.GVVGLPGQR.G + Deamidated (NQ); Oxidation (P)
52	984	993	473,2229	944,4313	944,4312	0,17	0	31	0,002	1		K.QGSPGASGER.G
62	493	504	544,7724	1087,5303	1087,5298	0,41	0	40	0,00037	1		R.GFPGADGVAGPK.G + Oxidation (P)
63	430	441	545,7363	1089,458	1089,4574	0,56	0	15	0,041	1		K.GNSGEPGAPGSK.G + Deamidated (NQ); Oxidation (K); Oxidation (P)

64	310	-	321	548,2857	1094,5568	1094,5581	-1,22	1	27	0,031	1	R.GRPGAPGPAGAR.G + 2 Oxidation (P)
69	685	-	696	553,2908	1104,567	1104,5676	-0,58	0	43	0,00015	1	R.GVQGGPPGAGPR.G + Oxidation (P)
70	685	-	696	553,7832	1105,5518	1105,5516	0,14	0	38	0,00036	1	R.GVQGGPPGAGPR.G + Deamidated (NQ); Oxidation (P)
83	538	-	551	621,8018	1241,5891	1241,5888	0,26	0	41	0,00029	1	K.GLTGSPGSPGPDGK.T + Oxidation (P)
84	538	-	551	629,7993	1257,584	1257,5837	0,18	0	69	5,20E-06	1	K.GLTGSPGSPGPDGK.T + 2 Oxidation (P)
92	970	-	983	656,8305	1311,6464	1311,6459	0,36	0	44	0,0017	1	R.GFPGLPGSPGEPGK.Q + Oxidation (P)
94	970	-	983	664,828	1327,6415	1327,6409	0,49	0	44	0,0016	1	R.GFPGLPGSPGEPGK.Q + 2 Oxidation (P)
95	415	-	429	666,8302	1331,6459	1331,647	-0,85	0	32	0,00097	1	U R.GPSGPGSPGPPGPK.G + Oxidation (K)
96	415	-	429	667,3228	1332,6311	1332,631	0,057	0	43	0,0006	1	U R.GPSGPGSPGPPGPK.G + Deamidated (NQ); Oxidation (K)
97	970	-	983	672,8255	1343,6364	1343,6358	0,46	0	47	0,00037	1	R.GFPGLPGSPGEPGK.Q + Oxidation (K); 2 Oxidation (P)
101	472	-	486	718,345	1434,6755	1434,6739	1,1	0	72	3,60E-06	1	U R.GEPGPAGLPGPPGER.G + 3 Oxidation (P)
103	865	-	881	730,3501	1458,6856	1458,6852	0,32	0	89	6,20E-08	1	R.GSAGPPGATGFPGAAGR.V + 2 Oxidation (P)
104	918	-	933	745,8599	1489,7053	1489,7049	0,27	0	27	0,0036	1	R.PGEVGGPPGPPGAGEK.G + Oxidation (K); 2 Oxidation (P)
107	1066	-	1083	780,9104	1559,8062	1559,8056	0,38	0	77	2,10E-07	1	U R.GETGPAGPAGPIGPVGAR.G
116	520	-	537	552,6044	1654,7915	1654,7911	0,23	1	22	0,038	1	K.GSPGEAGRPEAGLPGAK.G + Oxidation (K); 2 Oxidation (P)
125	286	-	303	880,8555	1759,6964	1759,6955	0,51	0	18	0,019	1	K.GEPGSPGENGAPGQMGR.G + 2 Deamidated (NQ); 4 Oxidation (P)
128	882	-	902	907,4405	1812,8664	1812,8643	1,19	0	40	0,0004	1	R.VGPPGSPGNAGPPGPPGAGK.E + Deamidated (NQ); Oxidation (K); 2 Oxidation (P)
130	994	-	1013	611,6249	1831,8529	1831,8523	0,31	0	37	0,0086	1	R.GPPGPMGPPGLAGPPGESGR.E + 3 Oxidation (P)
134	1062	-	1083	659,3366	1974,9879	1974,9872	0,39	1	35	0,00073	1	U K.SGDRGETGPAGPAGPIGPVGAR.G
136	448	-	468	673,9961	2018,9665	2018,9658	0,37	1	26	0,037	1	U K.GEPGPTGIQGGPPGAGEGKR.G + Oxidation (K); Oxidation (P)
140	552	-	573	686,3311	2055,9715	2055,9723	-0,38	1	42	0,00011	1	K.TGPPGPAGQDRPGPPGPPGAR.G + 4 Oxidation (P)
163	910	-	933	739,3574	2215,0503	2215,0506	-0,14	1	48	0,00013	1	R.GETGPAGRPEVGGPPGPPGAGEK.G + Oxidation (K); 2 Oxidation (P)
178	1141	-	1167	824,4108	2470,2106	2470,2089	0,7	1	40	0,0047	2	U R.GPPGSAGSPGKDLNGLPGPIGPPGPR.G + Deamidated (NQ); 4 Oxidation (P)
179	1033	-	1061	827,7424	2480,2054	2480,2045	0,37	1	46	0,0012	1	K.GDRGETGPAGPPGAPGAPGPPVGPAGK.S + 2 Oxidation (P)
180	1141	-	1167	829,7421	2486,2045	2486,2038	0,3	1	47	0,00091	1	U R.GPPGSAGSPGKDLNGLPGPIGPPGPR.G + Deamidated (NQ); 5 Oxidation (P)
183	1033	-	1061	838,4056	2512,1951	2512,1943	0,32	1	60	4,90E-05	1	K.GDRGETGPAGPPGAPGAPGPPVGPAGK.S + 4 Oxidation (P)
190	1111	-	1140	902,4231	2704,2476	2704,2478	-0,061	0	26	0,0037	1	R.GFSLQGGPPGPPGSPGQGPSGASGPAGPR.G + 3 Oxidation (P)
199	763	-	795	951,8089	2852,405	2852,4053	-0,12	1	81	4,20E-07	1	U R.GLTGPIPPGAPAGPDKGEAGPSGPAGPTGAR.G + 2 Oxidation (P)

P02465 (CO1A2_BOVIN)

30 peptide matches (30 non-duplicate, 0 duplicate)

Skor 672

Kolagen alpha-2(I) lanac OS=Bos taurus GN=COL1A2 PE=1 SV=2

Pokrivenost sekvence: 29%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U	Peptid
25	422	-	430	393,2172	784,4199	784,4192	0,98	0	48	0,00086	1	U R.GATGPAGVR.G
27	509	-	517	405,2226	808,4307	808,4304	0,44	0	32	0,0049	1	U K.GHAGLAGAR.G
31	155	-	163	420,7383	839,462	839,4614	0,81	0	31	0,045	1	U R.GVVGPQGAR.G
38	223	-	232	434,7357	867,4568	867,4563	0,62	0	36	0,0082	1	U R.VGAPGPAGAR.G + Oxidation (P)
39	995	-	1003	434,7358	867,457	867,4563	0,83	0	45	0,001	1	U R.GPSGPGGIR.G
45	1052	-	1062	448,2354	894,4563	894,4559	0,37	0	37	0,0073	1	U R.GPAGPSGPAGK.D
61	341	-	352	542,7854	1083,5562	1083,556	0,13	0	39	0,005	1	U R.GLVGEPGAGSK.G + Oxidation (P)
80	485	-	496	601,7883	1201,562	1201,5615	0,44	0	38	0,00082	1	U R.GEPGNIGFPGPK.G + Deamidated (NQ); Oxidation (K); Oxidation (P)
81	1066	-	1078	605,3327	1208,6508	1208,6513	-0,4	0	41	0,00038	1	U R.IGQPGAVGPAGIR.G + Deamidated (NQ); Oxidation (P)
86	326	-	340	634,3416	1266,6687	1266,6681	0,54	0	72	5,10E-07	1	U R.GIPGPVGAAGATGAR.G + Oxidation (P)
89	449	-	462	644,8122	1287,6098	1287,6095	0,24	0	38	0,0058	1	U R.GFPGSPGNIGPAGK.E + Deamidated (NQ); 2 Oxidation (P)
100	572	-	586	714,3681	1426,7217	1426,7205	0,87	0	56	1,30E-05	1	U R.GIPGEFGLPGPAGAR.G + 2 Oxidation (P)
105	829	-	844	746,8497	1491,6848	1491,6842	0,4	0	62	2,40E-05	1	U R.SGETGASGPPGFVGEK.G + Oxidation (P)
109	590	-	607	790,8872	1579,7598	1579,7591	0,48	0	104	2,10E-09	1	U R.GPPGESGAAGPTGPIGR.G + Oxidation (P)
114	380	-	397	824,9181	1647,8216	1647,8217	-0,063	0	69	6,40E-06	1	U R.GSTGEIGPAGPPGPPGLR.G + 2 Oxidation (P)

126	431	-	448	600,6039	1798,79	1798,7904	-0,26	1	30	0,0048	1	U	R.GPNGDSGRPGEPGLMGPR.G + Deamidated (NQ); 3 Oxidation (P)
133	587	-	607	641,6488	1921,9246	1921,9242	0,21	1	39	0,0029	1	U	R.GERGGPPGESGAAGPTGPIGSR.G + Oxidation (P)
139	463	-	484	686,036	2055,0863	2055,0862	0,054	1	49	4,80E-05	1	U	K.EGPVGLPGIDGRPGPIGAGAR.G + Oxidation (P)
142	463	-	484	691,3677	2071,0812	2071,0811	0,054	1	43	0,00011	1	U	K.EGPVGLPGIDGRPGPIGAGAR.G + 2 Oxidation (P)
157	881	-	904	1066,0607	2130,1068	2130,107	-0,054	0	74	1,40E-06	1	U	R.GLPGVAGSVGEPGLGIAGPPGAR.G + 3 Oxidation (P)
158	881	-	904	711,0436	2130,1091	2130,107	0,98	0	42	0,0026	1	U	R.GLPGVAGSVGEPGLGIAGPPGAR.G + 3 Oxidation (P)
165	947	-	972	1131,0691	2260,1236	2260,1237	-0,018	0	53	0,00026	1	U	R.GYPGNAGPVGAAAGAPGPQGPVGPVGK.H + 2 Oxidation (P)
166	947	-	972	754,3828	2260,1265	2260,1237	1,22	0	32	0,034	1	U	R.GYPGNAGPVGAAAGAPGPQGPVGPVGK.H + 2 Oxidation (P)
167	947	-	972	1131,5611	2261,1076	2261,1077	-0,022	0	36	0,014	1	U	R.GYPGNAGPVGAAAGAPGPQGPVGPVGK.H + Deamidated (NQ); 2 Oxidation (P)
168	947	-	972	754,711	2261,111	2261,1077	1,47	0	36	0,013	1	U	R.GYPGNAGPVGAAAGAPGPQGPVGPVGK.H + Deamidated (NQ); Oxidation (K); Oxidation (P)
172	713	-	739	804,0501	2409,1285	2409,1309	-1	1	15	0,035	1	U	R.GEVGPAGPNFAGPAGAAGQPGAKGER.G + Deamidated (NQ); Oxidation (K); Oxidation (P)
175	281	-	307	1224,1052	2446,1958	2446,1976	-0,73	0	26	0,0033	1	U	R.GEVGLPGLSGPVPPNPGANGLPGAK.G + Deamidated (NQ); Oxidation (K); 4 Oxidation (P)
192	674	-	706	927,7813	2780,322	2780,3226	-0,23	1	63	1,40E-06	1	U	R.GAPGAIGAPGAPAGANGDRGEAGPAGPAGPAGPR.G + Deamidated (NQ); 2 Oxidation (P)
197	542	-	571	931,4455	2791,3147	2791,3162	-0,54	1	72	3,20E-06	1	U	K.GEQGPAGPPGFQGLPGPAGTAGEAGKPGER.G + Oxidation (K); 2 Oxidation (P)
198	542	-	571	931,7739	2792,2998	2792,3002	-0,13	1	25	0,012	1	U	K.GEQGPAGPPGFQGLPGPAGTAGEAGKPGER.G + Deamidated (NQ); Oxidation (K); 2 Oxidation

P04258 (CO3A1_BOVIN) [16 peptide matches \(16 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 304

Kolagen alfa-1(III) lanac OS=Bos taurus GN=COL3A1 PE=1 SV=1

Pokrivenost sekvence: 19%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U	Peptid	
55	540	-	551	498,7408	995,467	995,4672	-0,23	0	28	0,035	1	R.GGAGPPGPEGGK.G + Oxidation (P)	
57	507	-	518	521,7619	1041,5092	1041,5091	0,09	0	31	0,021	1	U	K.GEAGAPGIPGGK.G + Oxidation (K); Oxidation (P)
58	528	-	539	524,7622	1047,5099	1047,5098	0,083	0	35	0,0033	1	U	R.GPPGAGGPPGPR.G + 2 Oxidation (P)
59	294	-	305	528,7697	1055,5248	1055,5247	0,032	0	42	0,0027	1	U	R.GEAGSPIAGPK.G + Oxidation (P)
60	336	-	347	542,7676	1083,5207	1083,5196	1,01	0	39	0,0061	1	U	R.GPAGANGLPGEK.G + Deamidated (NQ); Oxidation (P)
73	801	-	812	564,7769	1127,5393	1127,5394	-0,074	0	24	0,018	1	U	R.GLAGPPGMPGAR.G + 3 Oxidation (P)
90	708	-	722	645,2972	1288,5798	1288,5797	0,14	0	74	6,80E-07	1	U	R.GSPGGPGAAGFPGGR.G + 3 Oxidation (P)
115	240	-	257	826,9253	1651,836	1651,8352	0,47	0	17	0,024	1	K	GEMGPAGIPGAPGLIGAR.G + 2 Oxidation (P)
121	363	-	380	565,2922	1692,8547	1692,8544	0,19	1	38	0,00097	1	U	R.GVAGEPGRNGLPGGPGLR.G + Deamidated (NQ); 2 Oxidation (P)
144	777	-	800	1041,5582	2081,1018	2081,1018	0,02	0	58	2,70E-05	1	U	R.GAPGPQPPGAPGLGIAGLTGAR.G + Oxidation (P)
145	777	-	800	694,7083	2081,1031	2081,1018	0,64	0	64	1,10E-05	1	U	R.GAPGPQPPGAPGLGIAGLTGAR.G + Oxidation (P)
149	777	-	800	1049,5556	2097,0966	2097,0967	-0,037	0	48	0,00043	1	U	R.GAPGPQPPGAPGLGIAGLTGAR.G + 2 Oxidation (P)
150	777	-	800	700,0399	2097,0979	2097,0967	0,55	0	27	0,014	1	U	R.GAPGPQPPGAPGLGIAGLTGAR.G + 2 Oxidation (P)
153	777	-	800	705,3718	2113,0935	2113,0916	0,87	0	46	0,001	9	U	R.GAPGPQPPGAPGLGIAGLTGAR.G + 3 Oxidation (P)
164	306	-	329	748,6598	2242,9576	2242,9574	0,078	1	35	0,0057	1	K	GEDGKDGSPGEPGANGLPGAAGER.G + Deamidated (NQ); 3 Oxidation (P)
203	606	-	638	989,8195	2966,4366	2966,437	-0,16	1	68	8,60E-06	1	U	R.GPTGPIPPGAPGQPKGSGAPVPGIAGPR.G + Deamidated (NQ); 4 Oxidation (P)

ZE IJE KOŽNO TUTKALO, SIROVO (63028)

P02453 (CO1A1_BOVIN) [38 peptide matches \(37 non-duplicate, 1 duplicate\)](#)

Skor 715

Kolagen alfa-1(I) lanac OS=Bos taurus GN=COL1A1 PE=1 SV=3

Pokrivenost sekvence: 33%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U	Peptid	
11	733	-	741	392,2219	782,4293	782,4286	0,89	0	25	0,026	1	R	GAAGLPGPK.G + Oxidation (K)
17	1084	-	1092	418,7227	835,4309	835,4301	1	0	34	0,024	1	R	GPAGQGP.R

21	268	-	276	426,2169	850,4192	850,4185	0,85	0	37	0,003	1	R.GFSGLDGAK.G
22	268	-	276	426,2169	850,4193	850,4185	1,01	0	37	0,0022	1	R.GFSGLDGAK.G
25	352	-	360	427,7096	853,4047	853,4042	0,53	0	27	0,0028	1	U K.GEGGPQGR.G
30	361	-	369	443,7225	885,4305	885,4304	0,043	0	36	0,006	1	R.GSEGPQVVR.G
34	958	-	966	449,7593	897,504	897,5032	0,82	0	35	0,0057	1	R.GVVGLPQR.G + Oxidation (P)
35	958	-	966	450,2512	898,4878	898,4872	0,63	0	36	0,0068	1	R.GVVGLPQR.G + Deamidated (NQ); Oxidation (P)
43	984	-	993	473,2229	944,4313	944,4312	0,15	0	25	0,0058	1	K.QGSPGASGER.G
54	493	-	504	544,7723	1087,53	1087,5298	0,17	0	47	8,00E-05	1	R.GFPGADGVAGPK.G + Oxidation (P)
55	685	-	696	545,2939	1088,5733	1088,5727	0,55	0	41	0,00043	1	R.GVQGGPPGAPGR.G
61	685	-	696	553,2908	1104,5671	1104,5676	-0,49	0	39	0,00051	1	R.GVQGGPPGAPGR.G + Oxidation (P)
62	685	-	696	553,7831	1105,5516	1105,5516	-0,025	0	39	0,0044	1	R.GVQGGPPGAPGR.G + Deamidated (NQ); Oxidation (P)
66	574	-	585	573,2923	1144,57	1144,5699	0,067	0	24	0,0061	1	R.GQAGVMGFPGPK.G
68	574	-	585	581,2898	1160,5651	1160,5648	0,19	0	37	0,00089	1	R.GQAGVMGFPGPK.G + Oxidation (K)
69	574	-	585	581,782	1161,5494	1161,5489	0,44	0	52	0,00012	1	R.GQAGVMGFPGPK.G + Deamidated (NQ); Oxidation (K)
72	598	-	611	596,8197	1191,6248	1191,6248	-0,041	0	31	0,031	1	R.GVPPGAVGPAGK.D + 2 Oxidation (P)
80	538	-	551	629,7993	1257,584	1257,5837	0,2	0	49	0,00045	1	K.GLTGSPGSPDGGK.T + 2 Oxidation (P)
91	970	-	983	664,8281	1327,6417	1327,6409	0,61	0	46	0,00092	1	R.GFPGLPSPGEPGK.Q + 2 Oxidation (P)
93	415	-	429	667,3227	1332,6309	1332,631	-0,11	0	38	0,0018	1	U R.GPSGPPGSPGPPGPK.G + Deamidated (NQ); Oxidation (P)
94	970	-	983	672,8255	1343,6365	1343,6358	0,52	0	50	9,40E-05	1	R.GFPGLPSPGEPGK.Q + Oxidation (K); 2 Oxidation (P)
98	472	-	486	718,3452	1434,6758	1434,6739	1,29	0	45	0,0015	1	U R.GEPGAPLPGPPGER.G + 3 Oxidation (P)
100	865	-	881	730,35	1458,6855	1458,6852	0,22	0	88	9,40E-08	1	R.GSAGPPGATGFPGAAGR.V + 2 Oxidation (P)
107	1066	-	1083	780,9103	1559,8061	1559,8056	0,29	0	80	1,30E-07	1	U R.GETGPAGPAGPIGPVGR.G
111	397	-	414	793,883	1585,7515	1585,7485	1,88	0	22	0,0093	1	K.GANGAPGIAGAPFPGAR.G + Deamidated (NQ); 3 Oxidation (P)
113	268	-	285	539,934	1616,7802	1616,7795	0,47	1	20	0,014	1	R.GFSGLDGAKGDAGPAGPK.G + Oxidation (K)
117	520	-	537	552,6043	1654,7911	1654,7911	0,033	1	25	0,016	1	K.GSPGEAGRPEAGLPGAK.G + 3 Oxidation (P)
128	882	-	902	906,9455	1811,8764	1811,8803	-2,12	0	29	0,0037	1	R.VGPPGSPGNAGPPGPPGAGK.E + Oxidation (K); 2 Oxidation (P)
130	882	-	902	907,4397	1812,8649	1812,8643	0,33	0	26	0,0078	1	R.VGPPGSPGNAGPPGPPGAGK.E + Deamidated (NQ); Oxidation (K); 2 Oxidation (P)
131	994	-	1013	908,9365	1815,8585	1815,8574	0,6	0	93	2,10E-08	1	R.GPPGPMGPPGLAGPPGESGR.E + 2 Oxidation (P)
141	1062	-	1083	659,3366	1974,9881	1974,9872	0,48	1	37	0,00036	1	U K.SGDRGETGPAGPAGPIGPVGR.G
144	448	-	468	673,9961	2018,9666	2018,9658	0,4	1	35	0,015	1	U K.GEPGPTGIQGGPPGAGEEGRK.G + 2 Oxidation (P)
147	552	-	573	686,3312	2055,9719	2055,9723	-0,17	1	36	0,00046	1	K.TGPPGAGQDGRPPGPPGARG + 4 Oxidation (P)
170	910	-	933	739,358	2215,0523	2215,0506	0,78	1	52	1,60E-05	1	R.GETGPAGRPEVGGPPGPPGAGEK.G + Oxidation (K); 2 Oxidation (P)
182	1141	-	1167	824,4113	2470,212	2470,2089	1,25	1	38	0,0087	2	U R.GPPGSAGSPGKDLNGLPGPIGPPGPR.G + Deamidated (NQ); 4 Oxidation (P)
184	1033	-	1061	833,074	2496,2002	2496,1994	0,34	1	34	0,022	1	K.GDRGETGPAGPPGAPGAPGPPGVPAGK.S + 3 Oxidation (P)
198	1111	-	1140	1353,1317	2704,2488	2704,2478	0,39	0	30	0,043	1	R.GFSGLQGPPGPPGSPGEPGQPSGASGPAGPR.G + 3 Oxidation (P)
204	763	-	795	951,8089	2852,4049	2852,4053	-0,14	1	86	1,10E-07	1	U R.GLTGPIGPPGAPAGPKGEAGPSGAPGTGAR.G + 2 Oxidation (P)

P02465 (CO1A2_BOVIN)

[30 peptide matches \(30 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 488

Kolagen alfa-2(I) lanac OS=Bos taurus GN=COL1A2 PE=1 SV=2

Pokrivenost sekvence: 24%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno	a	Rank	U	Peptid
14	422	-	430	393,2174	784,4202	784,4192	1,39	0	42	0,003	1	U	R.GATGPAGVR.G
15	509	-	517	405,2226	808,4307	808,4304	0,41	0	23	0,011	1	U	K.GHAGLAGAR.G
27	223	-	232	434,7354	867,4563	867,4563	0,069	0	33	0,015	1	U	R.VGAPGAPAGAR.G + Oxidation (P)
28	995	-	1003	434,7357	867,4568	867,4563	0,6	0	43	0,0017	1	R	G.PSPGQIR.G
32	475	-	484	446,7537	891,4929	891,4926	0,25	0	28	0,0022	1	U	R.PGIPGAPAGAR.G
33	1052	-	1062	448,2355	894,4564	894,4559	0,51	0	38	0,006	1	U	R.GPAGPSGAPAGK.D

36	412	-	421	451,7296	901,4446	901,444	0,69	0	34	0,00062	1	U	R.AGVMGPAGSR.G
53	341	-	352	542,7852	1083,5559	1083,556	-0,13	0	32	0,025	1	U	R.GLVGEGPAGSK.G + Oxidation (P)
73	1066	-	1078	596,8438	1191,6731	1191,6724	0,59	0	44	0,0003	1	U	R.IGQPGAVGPAGIR.G
75	485	-	496	601,7881	1201,5616	1201,5615	0,087	0	34	0,002	1	U	R.GEPGNIGFPGPK.G + Deamidated (NQ); Oxidation (K); Oxidation (P)
76	1066	-	1078	604,8405	1207,6665	1207,6673	-0,68	0	30	0,012	1	U	R.IGQPGAVGPAGIR.G + Oxidation (P)
77	1066	-	1078	605,3329	1208,6513	1208,6513	-0,041	0	50	6,60E-05	1	U	R.IGQPGAVGPAGIR.G + Deamidated (NQ); Oxidation (P)
97	572	-	586	714,3682	1426,7218	1426,7205	0,91	0	49	6,40E-05	1	U	R.GIPGEFGLPGPAGAR.G + 2 Oxidation (P)
110	590	-	607	790,8873	1579,7601	1579,7591	0,64	0	22	0,0095	1	U	R.GPPGESGAAGPTGPIGSR.G + Oxidation (P)
115	380	-	397	824,9182	1647,8219	1647,8217	0,12	0	46	0,0002	1	U	R.GSTGEIGPAGPPGGLR.G + 2 Oxidation (P)
124	431	-	448	594,9445	1781,8116	1781,8115	0,042	1	22	0,021	1	U	R.GPNGDSGRPGELMGPR.G + 2 Oxidation (P)
125	431	-	448	595,2722	1782,7949	1782,7955	-0,33	1	29	0,006	1	U	R.GPNGDSGRPGELMGPR.G + Deamidated (NQ); 2 Oxidation (P)
126	431	-	448	600,6041	1798,7903	1798,7904	-0,063	1	15	0,038	1	U	R.GPNGDSGRPGELMGPR.G + Deamidated (NQ); 3 Oxidation (P)
138	587	-	607	641,6486	1921,924	1921,9242	-0,13	1	29	0,0094	1	U	R.GERGPPGESGAAGPTGPIGSR.G + Oxidation (P)
146	463	-	484	686,036	2055,0863	2055,0862	0,069	1	37	0,00058	1	U	K.EGPVGLPGIDGRPGIPGAGAR.G + Oxidation (P)
149	463	-	484	691,3674	2071,0803	2071,0811	-0,38	1	18	0,021	1	U	K.EGPVGLPGIDGRPGIPGAGAR.G + 2 Oxidation (P)
167	881	-	904	1066,0608	2130,107	2130,107	0,039	0	95	1,10E-08	1	U	R.GLPVAGSVGEPGLGIAGPPGAR.G + 3 Oxidation (P)
168	881	-	904	711,0438	2130,1094	2130,107	1,15	0	60	3,60E-05	1	U	R.GLPVAGSVGEPGLGIAGPPGAR.G + 3 Oxidation (P)
171	947	-	972	1131,069	2260,1234	2260,1237	-0,11	0	65	1,50E-05	1	U	R.GYPGNAGPVGAAGAPGPQGPVGPVVK.H + 2 Oxidation (P)
172	947	-	972	754,3828	2260,1265	2260,1237	1,25	0	29	0,015	1	U	R.GYPGNAGPVGAAGAPGPQGPVGPVVK.H + Oxidation (K); Oxidation (P)
173	947	-	972	754,7108	2261,1105	2261,1077	1,24	0	41	0,004	1	U	R.GYPGNAGPVGAAGAPGPQGPVGPVVK.H + Deamidated (NQ); Oxidation (K); Oxidation (P)
177	281	-	307	1216,107	2430,1994	2430,2027	-1,34	0	32	0,034	1	U	R.GEVGLPGLSGPVPNGPNGANLPGAK.G + Deamidated (NQ); 4 Oxidation (P)
179	281	-	307	1224,1059	2446,1972	2446,1976	-0,16	0	18	0,02	1	U	R.GEVGLPGLSGPVPNGPNGANLPGAK.G + Deamidated (NQ); Oxidation (K); 4 Oxidation (P)
200	674	-	706	927,7813	2780,3221	2780,3226	-0,19	1	40	0,00017	1	U	R.GAPGAIAGPAGANGDRGEAGPAGPAGPR.G + Deamidated (NQ); 2 Oxidation (P)
202	542	-	571	931,446	2791,3161	2791,3162	-0,034	1	30	0,003	1	U	K.GEQGPAGPPGFQGLPGAGTAGEAGKPGER.G + Oxidation (K); 2 Oxidation (P)

P04258 (CO3A1_BOVIN)

[11 peptide matches \(11 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 129

Kolagen alfa-1(III) lanac OS=Bos taurus GN=COL3A1 PE=1 SV=1

Pokrivenost sekvence: 9%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U	Peptid	
44	984	-	994	475,2587	948,5029	948,5029	-0,033	0	41	0,00016	1	U	R.GPVGSPGPPGK.D
48	528	-	539	524,7621	1047,5097	1047,5098	-0,07	0	29	0,0088	1	U	R.GPPGAGGPPGPR.G + 2 Oxidation (P)
49	294	-	305	528,7695	1055,5245	1055,5247	-0,25	0	35	0,013	1	U	R.GEAGSPGIAGPK.G + Oxidation (P)
52	336	-	347	542,7677	1083,5209	1083,5196	1,14	0	33	0,025	1	U	R.GPAGANGLPGEK.G + Deamidated (NQ); Oxidation (P)
63	153	-	164	371,204	1110,5901	1110,5894	0,61	1	25	0,031	1	U	R.GRPGLPGAAGAR.G + 2 Oxidation (P)
114	240	-	257	818,928	1635,8415	1635,8403	0,76	0	16	0,033	1	U	K.GEMGPAGIPGAPGLIGAR.G + Oxidation (P)
116	240	-	257	826,9251	1651,8355	1651,8352	0,22	0	16	0,032	1	U	K.GEMGPAGIPGAPGLIGAR.G + 2 Oxidation (P)
150	777	-	800	1041,5583	2081,102	2081,1018	0,12	0	23	0,0066	1	U	R.GAPGPQPPGAPGLGIAGLTGAR.G + Oxidation (P)
151	777	-	800	694,7083	2081,1031	2081,1018	0,62	0	39	0,0035	1	U	R.GAPGPQPPGAPGLGIAGLTGAR.G + Oxidation (P)
156	777	-	800	1049,5558	2097,097	2097,0967	0,15	0	46	0,00079	1	U	R.GAPGPQPPGAPGLGIAGLTGAR.G + 2 Oxidation (P)
161	777	-	800	705,3717	2113,0934	2113,0916	0,83	0	31	0,0012	1	U	R.GAPGPQPPGAPGLGIAGLTGAR.G + 3 Oxidation (P)

Q28668 (CO1A2_RABIT)

Skor 37

Kolagen alfa-2(I) lanac (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=COL1A2 PE=2 SV=1

Pokrivenost sekvence: 6%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U	Peptid
28	157	165	434,7357	867,4568	867,4563	0,6	0	43	0,0017	1		R.GPSGPGQIR.G
165	43	66	1065,0714	2128,1282	2128,1277	0,26	0	15	0,043	1	U	R.GLPGVAGALGEPGLGIAGPPGAR.G + 3 Oxidation (P)

ZE IJE KOŽNO TUTKALO, PRE IŠ ENO (63025)

P02453 (CO1A1_BOVIN)

[38 peptide matches \(37 non-duplicate, 1 duplicate\)](#)

Skor 796

Kolagen alfa-1(I) lanac OS=Bos taurus GN=COL1A1 PE=1 SV=3

Pokrivenost sekvence: 29%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U	Peptid
13	733	741	392,2221	782,4295	782,4286	1,15	0	29	0,015	1		R.GAAGLPGPK.G + Oxidation (K)
20	1084	1092	418,7226	835,4307	835,4301	0,83	0	40	0,0065	1		R.GPAGPQGR.G
24	268	276	426,2168	850,419	850,4185	0,66	0	35	0,0034	1		R.GFSGLDGA.G
25	268	276	426,2169	850,4193	850,4185	1,01	0	31	0,0085	1		R.GFSGLDGA.G
29	352	360	427,7096	853,4047	853,4042	0,51	0	33	0,00081	1	U	K.GEGPQGR.G
35	361	369	443,7228	885,431	885,4304	0,61	0	44	0,001	1		R.GSEGPQVR.G
39	958	966	449,7593	897,5041	897,5032	0,93	0	35	0,0079	1		R.GVVGLPQR.G + Oxidation (P)
40	958	966	450,2513	898,488	898,4872	0,83	0	36	0,015	1		R.GVVGLPQR.G + Deamidated (NQ); Oxidation (P)
46	984	993	473,2229	944,4313	944,4312	0,15	0	36	0,00065	1		K.QGPGASGER.G
56	493	504	544,7723	1087,5301	1087,5298	0,22	0	44	0,00015	1		R.GFPGADGVAGPK.G + Oxidation (P)
57	430	441	545,7362	1089,4579	1089,4574	0,45	0	17	0,024	1		K.GNSGEPGAPGSK.G + Deamidated (NQ); Oxidation (K); Oxidation (P)
63	685	696	553,2908	1104,5671	1104,5676	-0,49	0	37	0,00082	1		R.GVQGGPPGAPGR.G + Oxidation (P)
64	685	696	553,7831	1105,5516	1105,5516	-0,062	0	40	0,0025	1		R.GVQGGPPGAPGR.G + Deamidated (NQ); Oxidation (P)
74	598	611	596,8198	1191,6251	1191,6248	0,21	0	31	0,03	1		R.GVPGPPGAVGAPAGK.D + 2 Oxidation (P)
83	538	551	629,7993	1257,5841	1257,5837	0,31	0	70	4,20E-06	1		K.GLTGSPGSPGPDGK.T + 2 Oxidation (P)
93	970	983	648,8331	1295,6516	1295,651	0,49	0	44	0,00071	1		R.GFPGLPGSPGEPGK.Q
94	970	983	656,8304	1311,6463	1311,6459	0,25	0	15	0,044	1		R.GFPGLPGSPGEPGK.Q + Oxidation (K)
95	970	983	656,8306	1311,6466	1311,6459	0,48	0	45	0,0011	1		R.GFPGLPGSPGEPGK.Q + Oxidation (P)
96	970	983	664,828	1327,6415	1327,6409	0,49	0	48	0,00058	1		R.GFPGLPGSPGEPGK.Q + 2 Oxidation (P)
97	415	429	666,8307	1331,6468	1331,647	-0,13	0	77	1,10E-06	1	U	R.GPSGPGSPGPPGPK.G + Oxidation (P)
102	472	486	718,3451	1434,6757	1434,6739	1,21	0	52	0,00034	1	U	R.GEPGAGLPGPPGER.G + 3 Oxidation (P)
104	865	881	730,3499	1458,6852	1458,6852	0,046	0	88	8,80E-08	1		R.GSAGPPGATGFPGAAGR.V + 2 Oxidation (P)
105	918	933	745,8601	1489,7057	1489,7049	0,56	0	40	0,00088	1		R.PGEVPPGPPGAGEK.G + Oxidation (K); 2 Oxidation (P)
108	1066	1083	780,9102	1559,8058	1559,8056	0,11	0	79	1,80E-07	1	U	R.GETGAPGAPGIPVGAR.G
112	397	414	793,8825	1585,7504	1585,7485	1,24	0	36	0,0005	1		K.GANGAPGIAGAPGPGAR.G + Deamidated (NQ); 3 Oxidation (P)
118	520	537	552,6044	1654,7914	1654,7911	0,21	1	27	0,0081	1		K.GSPGEAGRPEAGLPGAK.G + Oxidation (K); 2 Oxidation (P)
128	882	902	907,44	1812,8655	1812,8643	0,66	0	35	0,00086	1		R.VGPPGPGNAGPPGPPGAGEK.E + Deamidated (NQ); Oxidation (K); 2 Oxidation (P)
138	1062	1083	659,3366	1974,988	1974,9872	0,44	1	42	0,00012	1	U	K.SDRGETGAPGAPGIPVGAR.G
140	448	468	673,9961	2018,9666	2018,9658	0,41	1	43	0,0026	1	U	K.GEPGPTGIQGGPPGAGEGKR.G + 2 Oxidation (P)
148	934	957	1037,5009	2072,9872	2072,9876	-0,15	0	32	0,0015	1	U	K.GAPGADGAPGAPGTPGQIAGQR.G + Deamidated (NQ); Oxidation (P)
169	910	933	739,3564	2215,0473	2215,0506	-1,5	1	61	1,80E-06	1		R.GETGAPRPEVPPGPPGAGEK.G + Oxidation (K); 2 Oxidation (P)
186	1033	1061	822,4108	2464,2107	2464,2095	0,48	1	61	4,00E-05	1		K.GDRGETGAPGAPGAPGVPAGK.S + Oxidation (P)

188	1141	-	1167	824,4109	2470,2109	2470,2089	0,83	1	52	0,00028	2	U	R.GPPGSAGSPGKDGLNGLPGPIGPPGPR.G + Deamidated (NQ); 4 Oxidation (P)
189	1033	-	1061	827,7424	2480,2054	2480,2045	0,39	1	37	0,011	2	K	GDRGETGPAGPPGAPGAPGAPGVPAGK.S + 2 Oxidation (P)
190	1141	-	1167	829,7419	2486,204	2486,2038	0,097	1	53	0,00024	1	U	R.GPPGSAGSPGKDGLNGLPGPIGPPGPR.G + Deamidated (NQ); 5 Oxidation (P)
192	1033	-	1061	838,4055	2512,1947	2512,1943	0,15	1	53	0,00026	1	K	GDRGETGPAGPPGAPGAPGAPGVPAGK.S + 4 Oxidation (P)
213	763	-	795	951,8087	2852,4042	2852,4053	-0,41	1	77	8,90E-07	1	R	GLTGPVGGPAGAPGDKGEAGPSGPAGPTGAR.G + 2 Oxidation (P)

P02465 (CO1A2_BOVIN)

[30 peptide matches \(30 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 693

Kolagen alfa-2(I) lanac OS=Bos taurus GN=COL1A2 PE=1 SV=2

Pokrivenost sekvence: 31%

Broj	Start	-	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U	Peptid
15	821	-	828	393,1988	784,3831	784,3828	0,44	0	22	0,044	1	U	R.GDQGPVGR.S
16	422	-	430	393,2173	784,4201	784,4192	1,21	0	44	0,002	1	U	R.GATGPAGVR.G
17	509	-	517	405,2226	808,4307	808,4304	0,41	0	32	0,0048	1	U	K.GHAGLAGAR.G
31	223	-	232	434,7357	867,4568	867,4563	0,6	0	31	0,024	1	U	R.VGAPGPAGAR.G + Oxidation (P)
32	995	-	1003	434,7357	867,4568	867,4563	0,67	0	45	0,001	1	U	R.GPSGPQGIR.G
38	1052	-	1062	448,2354	894,4563	894,4559	0,37	0	43	0,0021	1	U	R.GPAGPSGPAGK.D
55	341	-	352	542,7854	1083,5562	1083,556	0,19	0	39	0,0048	1	U	R.GLVGEPGPAGSK.G + Oxidation (P)
75	1066	-	1078	596,8439	1191,6733	1191,6724	0,74	0	38	0,0024	1	U	R.IGQPGAVGPAGIR.G
78	485	-	496	601,7883	1201,562	1201,5615	0,37	0	34	0,002	1	U	R.GEPGNIGFPGPK.G + Deamidated (NQ); Oxidation (K); Oxidation (P)
79	1066	-	1078	604,8404	1207,6662	1207,6673	-0,94	0	39	0,0023	1	U	R.IGQPGAVGPAGIR.G + Oxidation (P)
80	1066	-	1078	605,3327	1208,6509	1208,6513	-0,37	0	44	0,00046	1	U	R.IGQPGAVGPAGIR.G + Deamidated (NQ); Oxidation (P)
87	326	-	340	634,3417	1266,6688	1266,6681	0,61	0	81	4,70E-08	1	U	R.GIPGPVGAAGATGAR.G + Oxidation (P)
91	449	-	462	644,8121	1287,6096	1287,6095	0,066	0	44	0,0013	1	U	R.GFPGSPGNIGPAGK.E + Deamidated (NQ); 2 Oxidation (P)
101	572	-	586	714,3682	1426,7218	1426,7205	0,92	0	54	2,30E-05	1	U	R.GIPGEFGLPGPAGAR.G + 2 Oxidation (P)
106	829	-	844	746,8496	1491,6847	1491,6842	0,38	0	64	1,60E-05	1	U	R.SGETGASGPPGFVGEK.G + Oxidation (P)
110	308	-	325	781,9176	1561,8207	1561,8213	-0,39	0	28	0,0056	1	U	K.GAAGLPGVAGAPGLPGPR.G + 3 Oxidation (P)
111	590	-	607	790,8872	1579,7599	1579,7591	0,51	0	41	0,00037	1	U	R.GPPGESGAAGPTGPIGSR.G + Oxidation (P)
116	380	-	397	824,9181	1647,8216	1647,8217	-0,026	0	48	0,00016	1	U	R.GSTGEIGPAGPPGPPGLR.G + 2 Oxidation (P)
125	431	-	448	595,2723	1782,795	1782,7955	-0,27	1	27	0,0086	1	U	R.GPNGDSGRPGEPGLMGPR.G + Deamidated (NQ); 2 Oxidation (P)
127	431	-	448	600,6041	1798,7905	1798,7904	0,02	1	30	0,0072	1	U	R.GPNGDSGRPGEPGLMGPR.G + Deamidated (NQ); 3 Oxidation (P)
143	463	-	484	686,036	2055,0862	2055,0862	0,01	1	41	0,00024	1	U	K.EGVPVGLPGIDGRPGPIGPAGAR.G + Oxidation (P)
146	463	-	484	691,3676	2071,081	2071,0811	-0,047	1	44	9,60E-05	1	U	K.EGVPVGLPGIDGRPGPIGPAGAR.G + 2 Oxidation (P)
161	881	-	904	1066,0611	2130,1076	2130,107	0,32	0	93	1,40E-08	1	U	R.GLPGVAGSVGEPGLGIAGPPGAR.G + 3 Oxidation (P)
171	947	-	972	1131,069	2260,1234	2260,1237	-0,11	0	95	1,60E-08	1	U	R.GYPGNAGPVGAAGAPGPQGPVGPVVK.H + 2 Oxidation (P)
172	947	-	972	754,3827	2260,1263	2260,1237	1,14	0	28	0,012	1	U	R.GYPGNAGPVGAAGAPGPQGPVGPVVK.H + Oxidation (K); Oxidation (P)
173	947	-	972	754,7109	2261,1108	2261,1077	1,38	0	36	0,014	1	U	R.GYPGNAGPVGAAGAPGPQGPVGPVVK.H + Deamidated (NQ); Oxidation (K); Oxidation (P)
184	281	-	307	1224,1035	2446,1924	2446,1976	-2,12	0	22	0,0081	1	U	R.GEVGLPLGLSGPVGPPGNPGANGLPGAK.G + Deamidated (NQ); Oxidation (K); 4 Oxidation (P)
207	674	-	706	927,7815	2780,3226	2780,3226	-0,029	1	48	2,90E-05	1	U	R.GAPGAIGAPGAPAGANGDRGEAGPAGPAGPR.G + Deamidated (NQ); 2 Oxidation (P)
212	542	-	571	931,4456	2791,3149	2791,3162	-0,44	1	89	6,30E-08	1	U	K.GEQGPAGPPGFQGLPGPAGTAGEAGKPGER.G + Oxidation (K); 2 Oxidation (P)
237	608	-	643	1071,1779	3210,5119	3210,5178	-1,85	1	47	0,001	1	U	R.GPSGPPGDGNGKEPVGVPAGPTAGPSGSLPGER.G + 3 Oxidation (P)

P04258 (CO3A1_BOVIN)

[14 peptide matches \(14 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 285

Kolagen alfa-1(III) lanac OS=Bos taurus GN=COL3A1 PE=1 SV=1

Pokrivenost sekvence: 16%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
51	507	518	521,762	1041,5094	1041,5091	0,26	0	38	0,0065	1	U K.GEAGAPGIPGGK.G + 2 Oxidation (P)
52	294	305	528,7697	1055,5249	1055,5247	0,13	0	42	0,003	1	U R.GEAGSPGIAGPK.G + Oxidation (P)
54	336	347	542,7676	1083,5207	1083,5196	0,95	0	33	0,0015	1	U R.GPAGANGLPGEK.G + Deamidated (NQ); Oxidation (K)
68	801	812	564,777	1127,5395	1127,5394	0,1	0	27	0,0099	1	U R.GLAGPPGMPGAR.G + 3 Oxidation (P)
89	708	722	637,2999	1272,5852	1272,5847	0,38	0	58	3,70E-05	1	U R.GSPGGPGAAGFPGGR.G + 2 Oxidation (P)
149	777	800	1041,5581	2081,1016	2081,1018	-0,076	0	58	3,60E-05	1	U R.GAPGPPGPPGAPGLGIAGLTGAR.G + Oxidation (P)
150	777	800	694,7083	2081,1031	2081,1018	0,62	0	60	2,40E-05	1	U R.GAPGPPGPPGAPGLGIAGLTGAR.G + Oxidation (P)
154	777	800	1049,5559	2097,0972	2097,0967	0,25	0	34	0,011	1	U R.GAPGPPGPPGAPGLGIAGLTGAR.G + 2 Oxidation (P)
155	777	800	700,04	2097,0981	2097,0967	0,66	0	49	2,30E-05	1	U R.GAPGPPGPPGAPGLGIAGLTGAR.G + 2 Oxidation (P)
158	777	800	705,3722	2113,0947	2113,0916	1,45	0	27	0,0037	1	U R.GAPGPPGPPGAPGLGIAGLTGAR.G + 3 Oxidation (P)
170	306	329	748,6599	2242,9579	2242,9574	0,22	1	45	0,00054	1	K.GEDGKDGSPGEPGANGLPGAAGER.G + Deamidated (NQ); 3 Oxidation (P)
199	876	904	649,056	2592,1949	2592,1953	-0,17	1	18	0,042	2	U K.GDRGENGSPGAPGAPGHPPGPPVGPAGK.S + Deamidated (NQ); Oxidation (K); 2 Oxidation (P)
221	606	638	989,4895	2965,4466	2965,453	-2,16	1	19	0,032	1	U R.GPTGPIPPGPPGAPGQPGDKGESGAPGVPIAGPR.G + 4 Oxidation (P)
222	606	638	989,8196	2966,437	2966,437	-0,024	1	73	2,70E-06	1	U R.GPTGPIPPGPPGAPGQPGDKGESGAPGVPIAGPR.G + Deamidated (NQ); 4 Oxidation (P)

SALIANSKI ISINGLASS (63110)

Q9YIB4 (CO1A1_CYNPY)

[4 peptide matches \(4 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 192

Kolagen alfa-1(I) lanac OS=Cynops pyrrhogaster GN=COL1A1 PE=2 SV=1

Pokrivenost sekvence: 3%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
18	231	239	413,7121	825,4097	825,4093	0,5	0	28	0,0025	1	U R.GPSGPQGAR.G
76	525	538	629,7993	1257,5841	1257,5837	0,26	0	69	4,70E-06	1	K.GLTGSPGSPGPDGK.T + 2 Oxidation (P)
95	905	920	718,837	1435,6594	1435,6579	1,01	0	64	2,00E-05	1	U R.SGEPGPAGPPGSGEK.G + Oxidation (P)
98	852	868	722,3532	1442,6919	1442,6903	1,13	0	106	1,10E-09	1	R.GAAGPPGATGFPGAAGR.L + 2 Oxidation (P)

P11087 (CO1A1_MOUSE)

[4 peptide matches \(4 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 161

Kolagen alfa-1(I) lanac OS=Mus musculus GN=Col1a1 PE=1 SV=4

Pokrivenost sekvence: 3%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
22	258	266	434,2144	866,4143	866,4134	1,09	0	43	0,0023	1	U R.GFSGLDGAK.G + Oxidation (K)
37	974	983	481,2206	960,4265	960,4261	0,48	0	17	0,026	1	U K.QGSPGSSGER.G
76	528	541	629,7993	1257,5841	1257,5837	0,26	0	69	4,70E-06	1	K.GLTGSPGSPGPDGK.T + 2 Oxidation (P)
98	855	871	722,3532	1442,6919	1442,6903	1,13	0	106	1,10E-09	1	R.GAAGPPGATGFPGAAGR.V + 2 Oxidation (P)

O93484 (CO1A2_ONCMY)

[3 peptide matches \(3 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 61

Kolagen alfa-2(I) lanac OS=Oncorhynchus mykiss GN=col1a2 PE=2 SV=2

Pokrivenost sekvence: 1%

Query	Start	End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Score	Expect	Rank	U Peptide
68	481	- 492	600,8042	1199,5938	1199,5935	0,29	0	34	0,00098	1	U R.GQPGNIGFPGPK.G + Oxidation (K); Oxidation (P)
72	481	- 492	608,8015	1215,5884	1215,5884	0,019	0	36	0,005	1	U R.GQPGNIGFPGPK.G + Oxidation (K); 2 Oxidation (P)
74	160	- 171	611,7925	1221,5704	1221,57	0,31	0	31	0,0029	1	U R.GFPGTGPLPGMK.G + Oxidation (K); 3 Oxidation (P)

P02459 (CO2A1_BOVIN)

[3 peptide matches \(3 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 57

Kolagen alfa-1(II) lanac OS=Bos taurus GN=COL2A1 PE=1 SV=4

Pokrivenost sekvence: 1%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
31	981	- 989	456,7673	911,52	911,5189	1,29	0	35	0,0067	1	U R.GIVGLPGQR.G + Oxidation (P)
69	597	- 608	602,2952	1202,5759	1202,5754	0,37	0	30	0,0044	1	U R.GQPGVMGFPGPK.G + 2 Oxidation (P)
73	597	- 608	610,2925	1218,5704	1218,5703	0,037	0	36	0,0017	1	U R.GQPGVMGFPGPK.G + Oxidation (K); 2 Oxidation (P)

TEHNI KI ŽELATIN, SVINJSKI (63040)

P02453 (CO1A1_BOVIN)

[27 peptide matches \(25 non-duplicate, 2 duplicate\)](#)

Skor 500

Kolagen alfa-1(I) lanac OS=Bos taurus GN=COL1A1 PE=1 SV=3

Pokrivenost sekvence: 19%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
12	733	- 741	392,2219	782,4293	782,4286	0,87	0	27	0,024	1	R.GAAGLPGPK.G + Oxidation (K)
20	1084	- 1092	418,7226	835,4307	835,4301	0,81	0	38	0,01	1	R.GPAGPQGPR.G
24	268	- 276	426,217	850,4194	850,4185	1,03	0	36	0,003	1	R.GFSGLDGAK.G
25	268	- 276	426,217	850,4194	850,4185	1,08	0	34	0,0045	1	R.GFSGLDGAK.G
28	244	- 252	426,7199	851,4252	851,425	0,3	0	17	0,027	1	R.GPPGPQGAR.G + Oxidation (P)
29	244	- 252	426,72	851,4254	851,425	0,46	0	17	0,027	1	R.GPPGPQGAR.G + Oxidation (P)
33	958	- 966	441,7618	881,5089	881,5083	0,72	0	35	0,0027	1	R.GVVGLPGQR.G
34	361	- 369	443,7226	885,4307	885,4304	0,34	0	54	9,80E-05	1	R.GSEGPQVVR.G
38	958	- 966	449,7593	897,5041	897,5032	0,99	0	35	0,0079	1	R.GVVGLPGQR.G + Oxidation (P)
56	493	- 504	544,7724	1087,5302	1087,5298	0,31	0	43	0,00018	1	R.GFPGADGVAGPK.G + Oxidation (P)
57	430	- 441	545,2442	1088,4739	1088,4734	0,42	0	16	0,03	1	K.GNSGEPGAPGSK.G + Oxidation (K); Oxidation (P)
60	685	- 696	553,2909	1104,5672	1104,5676	-0,38	0	38	0,00068	1	R.GVQPPGAPGR.G + Oxidation (P)
77	538	- 551	629,7994	1257,5842	1257,5837	0,4	0	50	0,00037	1	K.GLTGSPGSPGPDGK.T + 2 Oxidation (P)
79	1093	- 1104	632,7731	1263,5317	1263,5327	-0,84	1	65	3,80E-06	1	R.GDKGETGEQDR.G + Oxidation (K)
87	970	- 983	648,8331	1295,6516	1295,651	0,47	0	44	0,001	1	R.GFPGLPGSPGEPGK.Q
88	970	- 983	656,8306	1311,6466	1311,6459	0,53	0	46	0,0011	1	R.GFPGLPGSPGEPGK.Q + Oxidation (P)
89	970	- 983	664,828	1327,6414	1327,6409	0,45	0	34	0,016	1	R.GFPGLPGSPGEPGK.Q + 2 Oxidation (P)
90	415	- 429	666,8309	1331,6473	1331,647	0,21	0	82	2,90E-07	1	U R.GPSGPGSPGPPGPK.G + Oxidation (P)
101	865	- 881	730,3502	1458,6858	1458,6852	0,4	0	84	1,60E-07	1	R.GSAGPPGATGFPGAAGR.V + 2 Oxidation (P)
114	397	- 414	793,3883	1584,7621	1584,7645	-1,47	0	52	4,10E-05	1	K.GANGAPGIAGAPGPGAR.G + 3 Oxidation (P)
115	397	- 414	793,8822	1585,7499	1585,7485	0,91	0	43	0,00013	1	K.GANGAPGIAGAPGPGAR.G + Deamidated (NQ); 3 Oxidation (P)

119	520	-	537	552,6044	1654,7914	1654,7911	0,21	1	25	0,018	1	K.GSPGEAGRPGEAGLPGAK.G + 3 Oxidation (P)
123	612	-	630	853,8904	1705,7663	1705,7656	0,41	0	46	0,00019	1	K.DGEAGAQQPPGAPGAGER.G + Oxidation (P)
136	882	-	902	906,9472	1811,8798	1811,8803	-0,25	0	42	0,00019	1	R.VGPPGPGSNAGPPGPPGPKG.E + Oxidation (K); 2 Oxidation (P)
160	552	-	573	686,3315	2055,9728	2055,9723	0,27	1	16	0,032	1	K.TGPPGAPAGQDRPGPPGPPGAR.G + 4 Oxidation (P)
203	796	-	825	896,4197	2686,2372	2686,2372	-0,00037	1	27	0,0077	1	R.GAPGDRGEPGPPGAPGAGPPGADGQPGAK.G + 3 Oxidation (P)
205	796	-	825	901,7516	2702,2329	2702,2321	0,29	1	35	0,013	1	R.GAPGDRGEPGPPGAPGAGPPGADGQPGAK.G + 4 Oxidation (P)

P046392 (CO1A2_CANFA)

[18 peptide matches \(18 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 358

Kolagen alfa-2(I) lanac OS=Canis familiaris GN=COL1A2 PE=2 SV=2

Pokrivenost sekvence: 16%

Broj	Start	-	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
13	823	-	830	393,1989	784,3832	784,3828	0,57	0	20	0,05	1	R.GDQGPVGR.T
16	511	-	519	405,2227	808,4308	808,4304	0,49	0	30	0,0049	1	U K.GHAGLAGAR.G
21	157	-	165	420,7382	839,4619	839,4614	0,65	0	32	0,033	1	R.GVVGPQGAR.G
31	225	-	234	434,7357	867,4567	867,4563	0,55	0	35	0,0096	1	R.VGAPGPAGAR.G + Oxidation (P)
32	997	-	1005	434,7357	867,4568	867,4563	0,67	0	44	0,0012	1	R.GPSGPQIR.G
35	477	-	486	446,7537	891,4928	891,4926	0,23	0	29	0,002	1	R.PGPIGPAGAR.G
36	1054	-	1064	448,2355	894,4565	894,4559	0,6	0	37	0,007	1	U R.GPAGPSGPAGK.D
55	343	-	354	542,7852	1083,5559	1083,5556	-0,15	0	38	0,0061	1	R.GIVGEPGPAGSK.G + Oxidation (P)
73	487	-	498	601,2962	1200,5779	1200,5775	0,31	0	49	0,00056	1	R.GEPGNIGFPGPK.G + Oxidation (K); Oxidation (P)
100	574	-	588	727,376	1452,7374	1452,7361	0,9	0	64	2,30E-06	1	R.GLPGEFGLPGPAGPR.G + 2 Oxidation (P)
102	574	-	588	735,3734	1468,7322	1468,7311	0,81	0	34	0,0012	1	R.GLPGEFGLPGPAGPR.G + 3 Oxidation (P)
113	310	-	327	781,9169	1561,8192	1561,8213	-1,32	0	48	0,00011	1	K.GAAGLPGVAGAPGLPGPR.G + 3 Oxidation (P)
131	433	-	450	600,2759	1797,806	1797,8064	-0,24	1	26	0,0036	1	U R.GPNGDSGRPGPEGLMGPR.G + 3 Oxidation (P)
132	433	-	450	600,6039	1798,7898	1798,7904	-0,35	1	29	0,0066	1	U R.GPNGDSGRPGPEGLMGPR.G + Deamidated (NQ); 3 Oxidation (P)
164	883	-	906	1066,0609	2130,1072	2130,107	0,13	0	97	6,20E-09	1	U R.GLPGVAGSVGEPGLGIAGPPGAR.G + 3 Oxidation (P)
165	883	-	906	711,0438	2130,1095	2130,107	1,21	0	35	0,0097	1	U R.GLPGVAGSVGEPGLGIAGPPGAR.G + 3 Oxidation (P)
181	715	-	741	804,0507	2409,1302	2409,1309	-0,31	1	28	0,0024	1	U R.GEVGPAGPNGFAGPAGAAGQPGAKGER.G + Deamidated (NQ); Oxidation (K); Oxidation (P)
210	544	-	573	940,7899	2819,3477	2819,3475	0,083	1	77	1,10E-06	1	U K.GEQGPAGPPGFQGLPGPAGTAGEVGKPGER.G + Oxidation (K); 2 Oxidation (P)

P04258 (CO3A1_BOVIN)

[4 peptide matches \(4 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 81

Kolagen alfa-1(III) lanac OS=Bos taurus GN=COL3A1 PE=1 SV=1

Pokrivenost sekvence: 4%

Broj	Start	-	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
41	984	-	994	475,2588	948,5031	948,5029	0,26	0	56	5,70E-06	1	U R.GPVGSPGPPK.D
50	507	-	518	521,7619	1041,5093	1041,5091	0,22	0	27	0,025	1	U K.GEAGAPGIPGGK.G + Oxidation (K); Oxidation (P)
61	153	-	164	371,2042	1110,5907	1110,5894	1,15	1	29	0,04	1	U R.GRPGLPGAAGAR.G + 2 Oxidation (P)
64	801	-	812	564,777	1127,5395	1127,5394	0,1	0	37	0,0025	1	U R.GLAGPPGMPGAR.G + 3 Oxidation (P)

BELANCE

P01012 (OVAL_CHICK)

[36 peptide matches \(32 non-duplicate, 4 duplicate\)](#)

Skor 893

Ovalbumin OS=Gallus gallus GN=SERPINB14 PE=1 SV=2

Pokrivenost sekvence: 65%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
16	106	111	390,6985	779,3825	779,3813	1,48	0	32	0,014	1	U R.LYAEER.Y
27	220	227	411,7053	821,396	821,3953	0,94	0	29	0,016	1	R.VASMASEK.M
142	191	200	605,2643	1208,5141	1208,5132	0,73	0	44	0,00057	1	U K.DEDTQAMPFR.V
146	361	370	624,8073	1247,6001	1247,6009	-0,63	0	45	0,00011	1	U R.ADHPLFCIK.H
147	361	370	416,8749	1247,603	1247,6009	1,7	0	24	0,0091	1	U R.ADHPLFCIK.H
165	371	382	449,2514	1344,7325	1344,7303	1,69	0	23	0,0073	1	U K.HIATNAVLFFGR.C
180	208	219	741,8838	1481,753	1481,7523	0,5	0	68	1,20E-06	1	U K.PVQMMYQIGLFR.V
186	112	123	762,3954	1522,7762	1522,7741	1,37	0	34	0,011	1	U R.YPILPEYLQCVK.E
192	188	200	519,2451	1554,7134	1554,7137	-0,15	1	37	0,0054	1	U K.AFKDEDTQAMPFR.V
193	188	200	778,3643	1554,7141	1554,7137	0,31	1	46	0,00012	1	U K.AFKDEDTQAMPFR.V
211	128	143	844,4243	1686,834	1686,8325	0,86	0	61	3,50E-06	1	U R.GGLEPINFQTAADQAR.E
222	2	17	883,8921	1765,7695	1765,7692	0,23	0	30	0,002	1	U M.GSIGAASMEFCFDVFK.E
223	324	340	591,9706	1772,8899	1772,8918	-1,02	0	70	2,70E-07	1	U K.ISQAVHAAHAEINEAGR.E
224	324	340	444,2309	1772,8945	1772,8918	1,52	0	18	0,025	1	U K.ISQAVHAAHAEINEAGR.E
225	324	340	444,4763	1773,8761	1773,8758	0,17	0	16	0,033	1	U K.ISQAVHAAHAEINEAGR.E + Deamidated (NQ)
229	2	17	904,8978	1807,7811	1807,7797	0,76	0	58	3,60E-06	1	U M.GSIGAASMEFCFDVFK.E + Acetyl (Protein N-term)
240	144	159	929,9861	1857,9576	1857,9585	-0,47	0	104	6,80E-10	1	U R.ELINSWVESQTNGIIR.N
241	144	159	620,3273	1857,9601	1857,9585	0,87	0	45	0,00013	1	U R.ELINSWVESQTNGIIR.N
242	144	159	930,4788	1858,943	1858,9425	0,28	0	15	0,044	1	U R.ELINSWVESQTNGIIR.N + Deamidated (NQ)
244	144	159	620,6554	1858,9445	1858,9425	1,08	0	21	0,011	1	U R.ELINSWVESQTNGIIR.N + Deamidated (NQ)
245	144	159	620,6555	1858,9447	1858,9425	1,22	0	24	0,0059	1	U R.ELINSWVESQTNGIIR.N + Deamidated (NQ)
258	341	360	1004,9764	2007,9382	2007,9385	-0,14	0	117	1,00E-11	1	U R.EVVGSAGVDAASVSEEF.R.A
261	341	360	1044,9592	2087,9038	2087,9048	-0,48	0	90	5,30E-09	1	U R.EVVGSAGVDAASVSEEF.R.A + Phospho (ST)
262	341	360	696,9766	2087,9079	2087,9048	1,48	0	40	0,00031	1	U R.EVVGSAGVDAASVSEEF.R.A + Phospho (ST)
271	86	105	1141,0939	2280,1732	2280,175	-0,76	1	39	0,00021	1	R.DILNQITKPNDEVYFSLASR.L
272	86	105	761,0668	2280,1785	2280,175	1,55	1	59	5,40E-06	1	R.DILNQITKPNDEVYFSLASR.L
298	160	182	820,7779	2459,3118	2459,3094	0,96	0	16	0,032	1	R.NVLQPSVDSQTAMVLVNAIVFK.G
311	63	85	838,0443	2511,111	2511,1101	0,35	0	24	0,0053	1	U K.LPGFGDSIEAQCGTSVNVHSSLR.D + Phospho (ST)
312	63	85	838,0443	2511,1112	2511,1101	0,43	0	57	4,80E-06	1	U K.LPGFGDSIEAQCGTSVNVHSSLR.D + Phospho (ST)
352	60	85	706,3416	2821,3372	2821,3341	1,1	1	36	0,00073	1	U R.FDKLPGFGDSIEAQCGTSVNVHSSLR.D
363	60	85	968,107	2901,2992	2901,3004	-0,42	1	43	0,00015	1	U R.FDKLPGFGDSIEAQCGTSVNVHSSLR.D + Phospho (ST)
366	60	85	726,3325	2901,3007	2901,3004	0,1	1	27	0,0046	1	U R.FDKLPGFGDSIEAQCGTSVNVHSSLR.D + Phospho (ST)
369	60	85	726,3326	2901,3011	2901,3004	0,24	1	32	0,00093	1	U R.FDKLPGFGDSIEAQCGTSVNVHSSLR.D + Phospho (ST)
370	60	85	726,3326	2901,3012	2901,3004	0,25	1	18	0,019	1	U R.FDKLPGFGDSIEAQCGTSVNVHSSLR.D + Phospho (ST)
375	21	47	1012,1714	3033,4924	3033,4914	0,31	0	39	0,00032	1	U K.VHHANENIFYCPIAIMSALAMVYLGA.K.D
379	21	47	759,3807	3033,4937	3033,4914	0,74	0	34	0,0007	1	U K.VHHANENIFYCPIAIMSALAMVYLGA.K.D

P02789 (TRFE_CHICK)

[37 peptide matches \(37 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 635

Ovotransferin OS=Gallus gallus PE=1 SV=2

Pokrivenost sekvence: 48%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U	Peptid
9	222	228	368,2055	734,3965	734,3963	0,23	0	27	0,047	1	U	K.GDVAFVK.H
24	260	265	404,6743	807,334	807,3334	0,83	0	19	0,017	1	U	K.TCNWAR.V
30	634	641	419,209	836,4035	836,4028	0,78	0	22	0,046	1	U	R.FGVNGSEK.S
32	634	641	419,701	837,3874	837,3868	0,65	0	16	0,045	1	U	R.FGVNGSEK.S + Deamidated (NQ)
45	595	601	434,7028	867,3911	867,3909	0,25	0	49	2,30E-05	1	U	R.ANVMDYR.E
59	266	274	298,5153	892,5242	892,5243	-0,13	0	20	0,038	1	U	R.VAAHAVVAR.D
72	51	58	475,2545	948,4945	948,495	-0,55	0	29	0,012	1	U	R.ISLTCVQK.A
79	59	66	492,7399	983,4652	983,4634	1,9	0	20	0,019	1	U	K.ATYLDCIK.A
80	132	140	495,2271	988,4397	988,4396	0,032	0	28	0,0026	1	U	K.TSCHTGLGR.S
81	132	140	330,4874	988,4405	988,4396	0,84	0	14	0,05	1	U	K.TSCHTGLGR.S
96	219	228	345,8542	1034,5408	1034,5397	1,12	1	26	0,0035	1	U	K.DGKGDVAFVK.H
101	540	548	524,2671	1046,5196	1046,5185	1,07	0	32	0,0015	1	U	K.YFGYTGALR.C
103	680	688	529,3002	1056,5858	1056,5855	0,25	0	39	0,00024	1	U	K.FYTVISLKT.T
105	289	298	534,2539	1066,4932	1066,4931	0,1	0	62	4,10E-06	1	U	K.AQSDFGVDTK.S
124	434	442	566,7088	1131,4031	1131,4026	0,43	0	17	0,027	1	U	R.YDDESQCSK.T
131	644	652	581,257	1160,4995	1160,4994	0,028	0	42	0,00044	1	U	K.FMMFESQNK.D
139	299	309	601,3038	1200,593	1200,5928	0,21	0	40	0,00076	1	U	K.SDFHLFGPPGK.K
140	299	309	401,2054	1200,5943	1200,5928	1,26	0	34	0,001	1	U	K.SDFHLFGPPGK.K
141	459	468	602,2913	1202,5681	1202,568	0,14	0	40	0,00034	1	U	K.DSNVNWNNLK.G
155	120	131	654,8252	1307,6358	1307,6358	0,039	0	89	1,90E-08	1	U	K.GTEFTVNDLQGK.T
158	458	468	666,3389	1330,6633	1330,6629	0,28	1	45	0,0003	1	U	R.KDSNVNWNNLK.G
160	364	374	667,8244	1333,6342	1333,6336	0,44	1	49	0,00013	1	U	R.IQWCAVGKDEK.S
161	364	374	445,5523	1333,6351	1333,6336	1,13	1	18	0,027	1	U	R.IQWCAVGKDEK.S
176	119	131	479,5843	1435,731	1435,7307	0,23	1	32	0,0012	1	U	K.KGTEFTVNDLQGK.T
188	141	154	512,2879	1533,8418	1533,8416	0,13	0	39	0,00023	1	U	R.SAGWNIPIGTLHR.G
206	443	457	551,618	1651,8323	1651,8318	0,28	1	33	0,0025	1	U	K.TDERPASYFAVAVAR.K
207	204	218	558,2525	1671,7357	1671,7351	0,35	0	20	0,023	1	U	R.NAPYSGYSGAFHCLK.D
213	275	288	848,4152	1694,8158	1694,8152	0,37	1	63	5,90E-06	1	U	R.DDNKVEDIWSFLSK.A
214	275	288	565,9459	1694,8158	1694,8152	0,41	1	25	0,005	1	U	R.DDNKVEDIWSFLSK.A
219	674	688	582,9822	1745,9247	1745,924	0,42	1	34	0,00068	1	U	K.EFLGDKFYTVISSLK.T
248	554	571	630,306	1887,8961	1887,8963	-0,076	0	49	4,70E-05	1	U	K.GDVAFIQHSTVEENTGGK.N
256	689	705	1001,4333	2000,852	2000,8529	-0,44	0	67	7,90E-07	1	U	K.TCNPSDILQMCSFLEGK.-
257	689	705	667,9583	2000,8532	2000,8529	0,14	0	43	0,00011	1	U	K.TCNPSDILQMCSFLEGK.-
260	602	619	513,0164	2048,0364	2048,0361	0,16	1	19	0,015	1	U	R.ECNLAEVPHAVVVRPEK.A
328	380	402	885,7436	2654,2089	2654,2092	-0,085	1	18	0,029	1	U	R.WSVVNSGDVECTVVDKDCI.K
331	329	351	1349,6486	2697,2826	2697,2818	0,3	0	25	0,005	1	U	R.VPSLMDSQLYLGFEYYSIQSMR.K
346	229	252	702,0717	2804,2577	2804,2559	0,66	1	25	0,0082	1	U	K.HTTVNENAPDQKDEYELLCLDGSR.Q

P00698 (LYSC_CHICK)

[8 peptide matches \(8 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 277

Lizozim C OS=Gallus gallus GN=LYZ PE=1 SV=1

Pokrivenost sekvence: 48%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
47	33	39	437,7123	873,4101	873,4093	0,9	0	38	0,0015	1	U R.HGLDNYR.G
60	24	31	447,7072	893,3997	893,3986	1,24	0	44	8,10E-05	1	U R.CELAAAMK.R
83	80	86	497,6954	993,3763	993,3763	-0,0091	0	21	0,0097	1	U R.WWCNDGR.T
156	40	51	663,8112	1325,6078	1325,6074	0,29	0	54	0,00012	1	U R.GYSLGNWVCAAK.F
162	133	143	445,556	1333,6461	1333,6449	0,89	1	23	0,036	1	U R.CKGTDVQAWIR.G
175	52	63	714,8292	1427,6439	1427,6429	0,66	0	75	9,10E-07	1	U K.FESNFNTQATNR.N
208	116	130	838,4032	1674,7918	1674,7937	-1,11	0	69	3,70E-07	1	U K.IVSDGNGMNAWVAWR.N
209	116	130	838,8966	1675,7786	1675,7777	0,55	0	98	8,60E-10	1	U K.IVSDGNGMNAWVAWR.N + Deamidated (NQ)

P01014 (OVALY_CHICK)

[7 peptide matches \(7 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 215

Protein Y povezan sa Ovalbuminom OS=Gallus gallus GN=SERPIN14B PE=1 SV=1

Pokrivenost sekvence: 15%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
104	187	195	533,7618	1065,5091	1065,5091	0,027	0	52	6,90E-05	1	U K.IAFNTEDTR.E
116	1	10	554,2714	1106,5283	1106,5278	0,52	0	46	8,90E-05	1	U -.MDSISVTNAK.F + Acetyl (Protein N-term)
120	144	152	558,8063	1115,598	1115,5975	0,47	0	37	0,0031	1	U R.QLINSWVEK.E
130	354	362	580,2908	1158,567	1158,5669	0,1	0	44	0,00011	1	U K.HSLELEEFR.A
169	125	136	695,3385	1388,6624	1388,6612	0,87	0	68	6,40E-07	1	U K.FYTGVEEVNFK.T
171	373	384	706,8704	1411,7262	1411,7248	1,01	0	53	3,40E-05	1	U R.YNPTNAILFFGR.Y
183	124	136	506,5929	1516,7568	1516,7562	0,41	1	32	0,0011	1	U R.KFYTGVEEVNFK.T

O42273 (TENP_CHICK)

[4 peptide matches \(4 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 178

Protein TENP OS=Gallus gallus GN=TENP PE=2 SV=1

Pokrivenost sekvence: 21%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
181	154	166	497,5972	1489,7697	1489,7698	-0,083	1	34	0,0036	1	U K.VVDVDKLCLDVSK.L
276	281	301	766,4222	2296,2447	2296,2427	0,89	0	89	4,50E-09	1	U K.ITQVGSLYHEDLPITLSAALR.S
384	16	44	766,6604	3062,6125	3062,611	0,46	1	88	5,90E-09	1	U R.APDCGGILTPLGLSYLAEVSKPHAEEVLR.Q
410	111	140	813,8992	3251,5678	3251,5663	0,45	1	22	0,012	1	U R.ADLHVDMGPDGNLQLLTSACRPTVQAQSTR.E

P01005 (IOVO_CHICK)

[4 peptide matches \(4 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 114

Ovomukoid OS=Gallus gallus PE=1 SV=1

Pokrivenost sekvence: 29%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
58	107	113	446,7231	891,4316	891,4306	1,14	0	32	0,01	1	U K.VMVLNCR.A
109	137	146	544,7878	1087,5611	1087,5622	-0,97	1	19	0,027	1	U K.VEQGASVDKR.H

286	189	-	209	786,3566	2356,048	2356,0464	0,67	0	60	1,10E-05	1	U	K.CNFCNAVVESNGTLTLSHFGK.C
327	114	-	136	882,038	2643,0921	2643,0927	-0,23	0	65	1,70E-06	1	U	R.AFNPCVCGTDGVTYDNECLLCAHK.V

P01013 (OVALX_CHICK) [4 peptide matches \(4 non-duplicate, 0 duplicate\)](#) **Skor 68**

Protein X povezan sa Ovalbuminom (Fragment) OS=Gallus gallus GN=SERPINB14C PE=3 SV=1

Protein sequence coverage: 16%

Broj	Start	-	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U	Peptid
50	125	-	131	439,7441	877,4736	877,4731	0,57	0	17	0,036	1	U	K.VYLPQMK.I
91	31	-	39	512,7384	1023,4623	1023,4621	0,21	0	46	0,00042	1	U	K.TAFNAEDTR.E
138	207	-	216	400,8975	1199,6707	1199,6703	0,33	0	28	0,0057	1	U	R.ADHPFLFLIK.H
177	109	-	120	732,346	1462,6774	1462,6762	0,85	0	33	0,0015	1	U	K.LTEWTNPNTMEK.R

ŽUMANCE

P02845 (VIT2_CHICK) [50 peptide matches \(50 non-duplicate, 0 duplicate\)](#) **Skor 871**

Vitelogenin-2 OS=Gallus gallus GN=VTG2 PE=1 SV=1

Pokrivenost sekvence: 28%

Broj	Start	-	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U	Peptid
3	768	-	773	357,7167	713,4189	713,4184	0,69	0	30	0,02	1	U	R.IANQIR.N
13	1696	-	1701	371,6925	741,3704	741,3697	0,96	0	21	0,02	1	U	K.LYFDGK.T
21	813	-	820	380,7138	759,4131	759,4127	0,54	0	37	0,014	1	U	R.AAVSVEGK.M
44	1524	-	1530	411,2073	820,4001	820,4001	0,022	0	31	0,0061	1	U	R.TCDVVVK.L
61	620	-	626	436,2028	870,3911	870,3905	0,61	0	30	0,018	1	U	K.LDSMSYR.Y
63	216	-	223	437,7192	873,4238	873,4232	0,61	0	21	0,012	1	U	K.GTTAFSYK.L
67	1444	-	1449	440,6744	879,3342	879,3334	0,95	0	19	0,028	1	U	K.WGWDCR.D
72	1624	-	1632	445,7328	889,451	889,4505	0,61	0	40	0,0016	1	U	K.SAGEATNLK.A
73	1426	-	1433	446,7135	891,4125	891,412	0,61	0	39	0,0034	1	U	K.LCADASVR.N
75	1732	-	1739	447,2313	892,448	892,4476	0,38	0	23	0,038	1	U	R.MPNGYLAK.N
102	919	-	927	479,764	957,5134	957,5131	0,29	0	40	0,0034	1	U	R.NIGELGVEK.R
104	1453	-	1461	481,2692	960,5238	960,524	-0,18	0	63	1,20E-05	1	U	K.VSTELVTGR.F
107	1515	-	1523	487,2784	972,5423	972,5426	-0,31	0	63	3,40E-06	1	U	R.MVVALTSPR.T
115	746	-	753	494,7787	987,5427	987,5423	0,47	0	23	0,039	1	U	K.ELLQQVMK.T
126	1771	-	1780	509,2823	1016,5501	1016,5502	-0,12	0	62	8,60E-06	1	U	K.TVQLAGVDSK.C
131	1462	-	1471	342,5226	1024,5459	1024,5454	0,52	0	20	0,036	1	U	R.FAGHPAAQVK.L
136	902	-	910	516,2718	1030,529	1030,5295	-0,46	0	27	0,0086	1	U	R.EETEIVVGR.H
142	1543	-	1552	524,8291	1047,6436	1047,6441	-0,39	0	34	0,0012	1	U	R.LPLSLPVGPR.I
150	684	-	693	537,7967	1073,5789	1073,5791	-0,13	0	60	9,00E-06	1	U	R.VEGLADVIMK.R
155	260	-	268	543,3193	1084,6241	1084,6241	0,013	0	42	0,00045	1	U	R.QQLTLVEVR.S
176	1781	-	1789	563,2658	1124,517	1124,5172	-0,2	0	27	0,013	1	U	K.CYSTEPVLR.C
179	821	-	830	567,7842	1133,5538	1133,5539	-0,099	0	29	0,0019	1	U	K.MTPPLTGDPR.L
190	633	-	641	582,7514	1163,4883	1163,4883	-0,046	0	40	0,0027	1	U	R.ADTYFDNYR.V
191	333	-	341	582,8083	1163,6021	1163,6009	1,02	0	27	0,0029	1	U	R.FLEVVLCCR.I
211	182	-	191	611,2742	1220,5338	1220,5343	-0,37	0	49	5,10E-05	1	U	R.TVDLNNCQEK.V
224	483	-	494	639,2968	1276,5791	1276,5791	-0,034	0	18	0,021	1	U	K.CIGNMGEPASLK.R
233	95	-	105	656,8323	1311,65	1311,6493	0,53	0	15	0,045	1	U	K.ITQVISSCFTRL

244	1722	-	1731	682,2595	1362,5044	1362,5034	0,73	0	65	8,00E-07	1	U	K.YDAECEQEYR.M
248	342	-	353	701,3599	1400,7052	1400,7048	0,29	0	25	0,0046	1	U	R.IANADNLESIWR.Q
255	483	-	495	478,5674	1432,6803	1432,6802	0,052	1	27	0,0032	1	U	K.CIGNMGEPASLKR.I
257	1008	-	1019	479,5775	1435,7108	1435,7096	0,88	0	24	0,0072	1	U	R.DASFIQNTYLHK.L
261	642	-	655	723,3914	1444,7683	1444,7674	0,63	0	39	0,00033	1	U	R.VGATGEIFVVNSPR.T
266	733	-	745	729,9199	1457,8253	1457,8242	0,77	0	22	0,009	1	U	K.ILGQEVAFININK.E
267	226	-	239	733,3604	1464,7062	1464,7056	0,37	0	20	0,04	1	U	K.QSDSGTLITDVSSR.Q
277	563	-	577	763,9527	1525,8908	1525,8902	0,42	0	17	0,048	1	U	R.PALALITTIANVAMK.E
285	993	-	1004	516,5562	1546,6467	1546,6479	-0,82	0	42	0,0015	1	U	K.MHHIGCQLCFSR.R
291	58	-	71	520,6276	1558,8611	1558,8606	0,31	0	14	0,046	1	U	K.LEISGLPENAYLLK.V
299	1377	-	1391	527,963	1580,8673	1580,8675	-0,089	0	57	5,00E-06	1	U	K.TPVLA AFLHGISNNK.K
323	1377	-	1392	428,2481	1708,9632	1708,9624	0,44	1	36	0,00074	1	U	K.TPVLA AFLHGISNNK.T
333	578	-	592	586,6045	1756,7917	1756,7913	0,25	0	19	0,017	1	U	K.ESNMQVASFVYSHMK.S
335	1638	-	1653	587,9575	1760,8507	1760,8516	-0,51	0	23	0,007	1	U	K.IGSHEIDMHPVNGQVK.L + Deamidated (NQ)
336	1638	-	1653	441,2203	1760,8523	1760,8516	0,42	0	16	0,029	1	U	K.IGSHEIDMHPVNGQVK.L + Deamidated (NQ)
341	456	-	471	593,3078	1776,9017	1776,9006	0,6	0	45	5,70E-05	1	U	K.EALQPIHDLADEAISR.G
370	895	-	910	634,9789	1901,9148	1901,9153	-0,22	1	21	0,011	1	U	K.IETNPCREETEIVVGR.H
373	287	-	302	638,7063	1913,0971	1913,0961	0,56	1	40	0,00016	1	U	R.YRFPVLPQMPLQLIK.T
383	428	-	445	1003,0123	2004,01	2004,0099	0,095	0	87	7,60E-09	1	U	K.NPVLQVQVACLGYSSVVNR.Y
384	428	-	445	669,0111	2004,0114	2004,0099	0,78	0	68	4,10E-07	1	U	K.NPVLQVQVACLGYSSVVNR.Y
390	147	-	165	701,6693	2101,9862	2101,9851	0,52	0	27	0,0047	1	U	K.SQNVYELQEAGIGGICHAR.Y
408	240	-	259	746,0408	2235,1006	2235,0994	0,54	0	57	1,50E-05	1	U	R.QVYQISPFNEPTGVAVMEAR.Q
461	499	-	523	869,8181	2606,4325	2606,4319	0,23	0	68	5,60E-07	1	U	K.FLPISSSAADIPVHIQIDAITALK.K

P87498 (VIT1_CHICK)

[23 peptide matches \(23 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 467

Vitelogenin-1 OS=Gallus gallus GN=VTG1 PE=1 SV=1

Pokrivenost sekvence: 14%

Broj	Start	-	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U	Peptid
87	783	-	790	457,7872	913,5599	913,5596	0,26	0	40	0,0017	1	U	K.ALLSEIR.C
99	1767	-	1774	475,2501	948,4856	948,4851	0,51	0	42	0,00021	1	U	K.VTVASWMR.G
114	173	-	181	494,2952	986,5759	986,576	-0,13	1	14	0,049	1	U	K.KANLVDVTK.S
161	514	-	523	549,8023	1097,59	1097,5903	-0,25	0	24	0,0051	1	U	K.VHETAVMALK.S
169	56	-	66	558,3007	1114,5868	1114,587	-0,16	0	38	0,00037	1	U	R.SEVEISIGPK.L
180	768	-	778	572,8378	1143,6611	1143,6612	-0,048	0	65	1,90E-06	1	U	R.LISSLQTGIGR.Q
183	1757	-	1766	574,8009	1147,5873	1147,5873	-0,016	0	31	0,007	1	U	K.NVNFDGEILK.V
186	831	-	840	579,8276	1157,6407	1157,6404	0,22	0	54	8,20E-05	1	U	R.LTELLNSNVR.L
194	1487	-	1497	586,3229	1170,6313	1170,6318	-0,47	0	42	0,00015	1	U	K.ACADAVILPLK.A
204	733	-	742	599,3079	1196,6013	1196,6012	0,097	0	56	1,30E-05	1	U	K.MFGQELLFGR.L
209	135	-	145	606,8819	1211,7493	1211,7489	0,33	0	61	1,80E-06	1	U	R.GILNILELSLK.K
213	472	-	482	614,8613	1227,7081	1227,7074	0,53	0	17	0,03	1	U	K.SNIEEVLLALK.A
215	1789	-	1798	411,545	1231,6132	1231,6131	0,023	0	15	0,038	1	U	K.HNELLMPNHK.L
222	1874	-	1884	637,3489	1272,6832	1272,6826	0,43	0	27	0,0027	1	U	K.ATAVSLEWQR.S
223	1745	-	1756	426,2592	1275,7557	1275,7551	0,51	0	23	0,017	1	U	K.TVIVEAPIHGLK.N
260	365	-	377	480,6051	1438,7936	1438,7932	0,28	0	40	0,00019	1	U	R.YLLDLLPAASHR.S
310	1027	-	1040	547,285	1638,8332	1638,8327	0,28	1	31	0,0015	1	U	R.MSFKPVYSDVPIEK.I
325	874	-	889	573,9904	1718,9495	1718,9502	-0,39	0	16	0,03	1	U	K.VNAHVPPVNVVATIQMK.E
329	1664	-	1678	582,587	1744,7391	1744,7396	-0,3	0	37	0,00055	1	U	K.SCNVVVAQDCTEHPK.F

354	1471	-	1486	614,3441	1840,0105	1840,0095	0,58	0	55	7,00E-06	1	U	K.VDVQLV VVQLAETNWK.A
355	1551	-	1567	615,0011	1841,9816	1841,9788	1,5	0	18	0,02	1	U	R.YVPGVALVLGFSEAHQR.N
397	674	-	693	1072,5564	2143,0982	2143,0983	-0,037	0	41	0,00013	1	U	R.VADPIEVGIAAEGEQEMFVR.G
428	284	-	303	768,7517	2303,2331	2303,2314	0,75	0	48	3,10E-05	1	U	R.GSLQYQFGSELLQLPVHLFK.I

P01012 (OVAL_CHICK) [12 peptide matches \(12 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 339

Ovalbumin OS=Gallus gallus GN=SERPINB14 PE=1 SV=2

Pokrivenost sekvence: 40%

Broj	Start	-	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U	Peptid
30	106	-	111	390,6982	779,3819	779,3813	0,74	0	21	0,023	1	U	R.LYAEER.Y
219	361	-	370	416,8747	1247,6023	1247,6009	1,17	0	25	0,007	1	U	R.ADHPLFCIK.H
241	371	-	382	449,2512	1344,7318	1344,7303	1,17	0	17	0,027	1	U	K.HIATNAVLFFGR.C
290	188	-	200	519,2453	1554,7139	1554,7137	0,16	1	27	0,024	1	U	K.AFKDEDTQAMPFR.V
317	128	-	143	844,424	1686,8335	1686,8325	0,6	0	59	3,80E-06	1	U	R.GGLEPINFQTAADQAR.E
338	324	-	340	591,9708	1772,8906	1772,8918	-0,67	0	70	2,80E-07	1	U	K.ISQAVHAAHAEINEAGR.E
339	324	-	340	444,2308	1772,8943	1772,8918	1,41	0	20	0,02	1	U	K.ISQAVHAAHAEINEAGR.E
358	144	-	159	929,9865	1857,9584	1857,9585	-0,0011	0	104	6,10E-10	1	U	R.ELINSWVESQTNGIIR.N
359	144	-	159	620,3271	1857,9596	1857,9585	0,6	0	35	0,00053	1	U	R.ELINSWVESQTNGIIR.N
423	86	-	105	761,0664	2280,1773	2280,175	0,99	1	62	1,60E-06	1	U	R.DILNQITKPNDVYSFSLASR.L
424	201	-	219	762,0539	2283,1398	2283,1391	0,31	1	74	1,30E-07	1	U	R.VTEQESKPVQMMYQIGLFR.V
510	21	-	47	759,3804	3033,4927	3033,4914	0,42	0	15	0,04	1	U	K.VHHANENIFYCPIAIMSALAMVYLGAK.D

P02659 (APOV1_CHICK) [8 peptide matches \(8 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 287

Apovitelenin-1 OS=Gallus gallus PE=1 SV=1

Pokrivenost sekvence: 51%

Broj	Start	-	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U	Peptid
103	87	-	94	481,255	960,4955	960,495	0,57	0	56	2,70E-05	1	U	K.LAEQLMEKI
151	75	-	83	539,288	1076,5614	1076,5614	-0,0037	0	50	0,00024	1	U	R.NFLINETAR.L
365	57	-	74	946,0181	1890,0217	1890,0211	0,3	0	87	7,40E-09	1	U	R.AGQFLLDVVSQTTVVSGIR.N
366	57	-	74	631,0149	1890,0228	1890,0211	0,89	0	57	4,10E-06	1	U	R.AGQFLLDVVSQTTVVSGIR.N
393	34	-	52	1061,5463	2121,078	2121,0782	-0,08	0	14	0,048	1	U	R.DWLVIPDAAAAYIYEAVNK.V
394	34	-	52	708,0343	2121,0811	2121,0782	1,37	0	24	0,0054	1	U	R.DWLVIPDAAAAYIYEAVNK.V
420	33	-	52	1139,5964	2277,1782	2277,1793	-0,47	1	61	3,00E-06	1	U	R.RDWLVIPDAAAAYIYEAVNK.V
422	33	-	52	760,0681	2277,1825	2277,1793	1,4	1	67	9,70E-07	1	U	R.RDWLVIPDAAAAYIYEAVNK.V

P08250 (APOA1_CHICK) [7 peptide matches \(7 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 147

Apolipoprotein A-I OS=Gallus gallus GN=APOA1 PE=1 SV=2

Pokrivenost sekvence: 26%

Broj	Start	-	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U	Peptid
111	164	-	172	493,2694	984,5242	984,524	0,18	0	25	0,017	1	U	K.LTPVAEEAR.D
156	219	-	227	545,2897	1088,5648	1088,5648	0,022	0	60	2,80E-06	1	U	K.VMEQLSNLR.E
172	230	-	238	560,7948	1119,5751	1119,5747	0,38	0	26	0,0034	1	U	K.MTPLVQEFR.E
196	185	-	194	589,296	1176,5774	1176,5775	-0,018	0	20	0,021	1	U	K.NLAPYSDEL.R.Q

202	208	-	218	596,3037	1190,5929	1190,5931	-0,2	0	38	0,0003	1	U	K.GIPQASEYQAK.V
208	252	-	261	603,3423	1204,6701	1204,6703	-0,16	0	56	3,30E-05	1	U	R.LISFLDELQK.S
235	120	-	130	441,2472	1320,7199	1320,719	0,65	1	24	0,005	1	U	K.IRPFLDQFSAK.W

P19121 (ALBU_CHICK)

[8 peptide matches \(8 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 115

Serum albumin OS=Gallus gallus GN=ALB PE=1 SV=2

Pokrivenost sekvence: 13%

Broj	Start	-	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U	Peptid
47	556	-	562	413,7921	825,5696	825,5687	1	0	30	0,00091	1	U	K.LLINLIK.R
58	254	-	261	432,7273	863,44	863,4389	1,29	0	29	0,014	1	U	K.APFSEVSK.F
137	541	-	549	517,2346	1032,4547	1032,4546	0,13	0	36	0,0047	1	U	K.LCSAPAEER.E
200	337	-	345	395,5217	1183,5433	1183,5431	0,18	1	15	0,047	1	U	K.YIEDKEVCK.S
228	38	-	47	429,5473	1285,62	1285,619	0,74	1	24	0,0057	1	U	R.YNDLKEETF.K.A
270	160	-	172	499,2736	1494,7991	1494,7983	0,52	0	35	0,0016	1	U	R.VSFLGHFIYSVAR.R
276	365	-	376	509,6135	1525,8186	1525,8187	-0,094	1	47	4,20E-05	1	U	R.RHPEFSIQLIMR.I
364	418	-	433	472,2151	1884,8315	1884,8312	0,12	0	19	0,015	1	U	K.TNCDLLHDHGADFLK.S

P11682 (APOB_CHICK)

[2 peptide matches \(2 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 64

Apolipoprotein B (Fragment) OS=Gallus gallus GN=APOB PE=2 SV=1

Pokrivenost sekvence: 4%

Broj	Start	-	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U	Peptid
113	50	-	58	493,2876	984,5607	984,5604	0,33	0	38	0,0019	1	U	R.VPASETILR.G
203	263	-	273	596,7977	1191,5808	1191,5805	0,24	0	47	9,50E-05	1	U	K.VMELSSAAQEKI

P41366 (VMO1_CHICK)

[2 peptide matches \(2 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 63

Protein spoljasnjeg sloja vitelinske membrane 1 OS=Gallus gallus GN=VMO1 PE=1 SV=1

Pokrivenost sekvence: 4%

Broj	Start	-	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U	Peptid
108	66	-	74	487,7486	973,4827	973,4829	-0,18	0	53	0,00014	1	U	R.DDTALNGIR.L
109	66	-	74	488,2407	974,4669	974,4669	-0,0051	0	37	0,0069	1	U	R.DDTALNGIR.L + Deamidated (NQ)

MLADI KRAVLJI SIR

P02754 (LACB_BOVIN)

[13 peptide matches \(12 non-duplicate, 1 duplicate\)](#)

Skor 253

Beta-laktoglobulin OS=Bos taurus GN=LGB PE=1 SV=3

Pokrivenost sekvence: 46%

Broj	Start	-	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U	Peptid
31	158	-	164	419,242	836,4694	836,4691	0,42	0	19	0,024	1	K	ALPMHIR.L
54	100	-	107	458,7406	915,4667	915,4661	0,64	0	37	0,0076	1	K	IDALNENK.V
88	108	-	116	533,295	1064,5755	1064,5754	0,14	0	46	7,60E-05	1	K	VLVLDTDYK.K
97	77	-	85	561,7299	1121,4452	1121,4447	0,41	0	21	0,012	1	K	WENGCAQK.K

109	108	-	117	597,3424	1192,6703	1192,6703	-0,039	1	41	0,00017	1	K.VLVLDTDYKK.Y
110	108	-	117	398,5645	1192,6716	1192,6703	1,02	1	29	0,0043	1	K.VLVLDTDYKK.Y
121	141	-	151	623,296	1244,5775	1244,5772	0,21	0	67	3,20E-06	1	U.R.TPEVDDEALEK.F
190	141	-	154	545,9296	1634,7669	1634,7675	-0,36	1	44	0,00045	1	U.R.TPEVDDEALEKFDK.A
191	141	-	154	545,9297	1634,7673	1634,7675	-0,14	1	16	0,035	1	U.R.TPEVDDEALEKFDK.A
205	165	-	178	572,935	1715,7831	1715,7825	0,36	0	16	0,031	1	U.R.LSFNPTQLEEQCHI.-
206	165	-	178	858,8992	1715,7838	1715,7825	0,77	0	15	0,039	1	U.R.LSFNPTQLEEQCHI.-
275	57	-	76	1157,1331	2312,2516	2312,2515	0,066	1	27	0,003	1	U.R.VYVEELKPTPEGDLEILLQK.W
276	57	-	76	771,7587	2312,2542	2312,2515	1,15	1	87	8,90E-09	1	U.R.VYVEELKPTPEGDLEILLQK.W

P02662 (CASA1_BOVIN) [6 peptide matches \(6 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 136

Alfa-S1-kazein OS=Bos taurus GN=CSN1S1 PE=1 SV=2

Pokrivenost sekvence: 32%

Broj	Start	-	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
137	106	-	115	634,3563	1266,6981	1266,6972	0,69	0	68	1,10E-06	1	U.R.YLGYLEQLLR.L
155	95	-	105	446,5653	1336,6741	1336,6735	0,42	1	37	0,00046	1	U.K.HIQKEDVPSEY.Y
196	121	-	134	830,9014	1659,7882	1659,7869	0,79	0	36	0,00079	1	U.K.VPQLEIVPNSAEER.L + Phospho (ST)
213	23	-	37	587,32	1758,9382	1758,9377	0,31	0	43	0,00066	1	U.K.HQGLPQEVLNENLLR.F
214	23	-	37	880,4764	1758,9383	1758,9377	0,37	0	19	0,042	1	U.K.HQGLPQEVLNENLLR.F
277	148	-	166	1158,5726	2315,1306	2315,1296	0,45	0	25	0,0045	1	U.K.EPMIGVQNQLAYFYPELFR.Q

P02663 (CASA2_BOVIN) [8 peptide matches \(8 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 108

Alfa-S2-kazein OS=Bos taurus GN=CSN1S2 PE=1 SV=2

Pokrivenost sekvence: 30%

Broj	Start	-	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
72	189	-	196	490,2844	978,5542	978,5538	0,36	0	32	0,0022	1	U.K.FALPQYLK.T
93	204	-	212	549,8101	1097,6055	1097,6055	0,0027	1	15	0,043	1	U.K.AMKPWIQPK.T
94	204	-	212	366,8761	1097,6064	1097,6055	0,76	1	20	0,013	1	U.K.AMKPWIQPK.T
105	48	-	56	580,7337	1159,4528	1159,4525	0,23	0	17	0,025	1	U.K.ENLCSTFCK.E
111	130	-	140	598,3433	1194,672	1194,6721	-0,059	0	20	0,013	1	U.R.NAVPITPTLNR.E
156	96	-	106	684,3519	1366,6892	1366,6881	0,84	0	52	0,00017	1	U.K.ALNEINQFYQK.F
173	153	-	164	733,8104	1465,6063	1465,6048	1,03	0	53	4,10E-05	1	U.K.TVDMESTEVFTK.K + Phospho (ST)
244	40	-	56	672,6342	2014,8809	2014,8798	0,55	1	18	0,026	1	U.K.NMAINPSKENLCSTFCK.E

P02668 (CASK_BOVIN) [5 peptide matches \(5 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 98

Kapa-kazein OS=Bos taurus GN=CSN3 PE=1 SV=1

Pokrivenost sekvence: 35%

Broj	Start	-	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
130	108	-	118	626,2766	1250,5387	1250,5383	0,26	0	39	0,0018	1	U.K.SCAQPTTMAR.H
131	46	-	55	626,3589	1250,7032	1250,7023	0,71	0	34	0,0021	1	U.K.YIPIQYVLSR.Y
238	90	-	107	990,5494	1979,0842	1979,084	0,13	0	54	2,00E-05	1	U.R.SPAQLQWQVLSNTVPAK.S
242	68	-	84	1006,0385	2010,0624	2010,0614	0,5	0	14	0,044	1	U.K.PVALINNQFLPYPYAK.P
357	56	-	84	1172,5937	3514,7593	3514,7601	-0,24	1	29	0,0021	1	U.R.YPSYGLNYYQKQPVVALINNQFLPYPYAK.P

P02666 (CASB_BOVIN) [4 peptide matches \(4 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)**Skor 81**

Beta-kazein OS=Bos taurus GN=CSN2 PE=1 SV=2

Pokrivenost sekvence: 18%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
8	218	224	371,7288	741,4431	741,4425	0,77	0	17	0,019	1	U R.GPFPPIIV.-
251	48	63	1031,4183	2060,822	2060,8212	0,43	0	27	0,0032	1	U K.FQSEEQQTEDELQDK.I + Phospho (ST)
264	199	217	1093,5873	2185,16	2185,1605	-0,22	0	37	0,00034	1	U R.DMPIQAFLLYQEPVLPVLR.G
265	199	217	729,3952	2185,1637	2185,1605	1,47	0	43	9,70E-05	1	U R.DMPIQAFLLYQEPVLPVLR.G

P00711 (LALBA_BOVIN) [2 peptide matches \(2 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)**Skor 53**

Alfa-laktalbumin OS=Bos taurus GN=LALBA PE=1 SV=2

Pokrivenost sekvence: 13%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
112	118	127	400,8892	1199,6458	1199,6451	0,55	0	33	0,0025	1	U K.VGINYWLAHK.A
113	134	142	603,2974	1204,5802	1204,5798	0,38	1	37	0,00034	1	U K.LDQWLCEKL.-

P02769 (ALBU_BOVIN) [2 peptide matches \(2 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)**Skor 37**

Serum albumin OS=Bos taurus GN=ALB PE=1 SV=4

Pokrivenost sekvence: 3%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
106	66	75	582,3193	1162,6241	1162,6234	0,65	0	26	0,0038	1	U K.LVNELTEFAK.T
168	360	371	480,6089	1438,8048	1438,8045	0,22	1	25	0,0048	1	U R.RHPEYAVSVLLR.L

KAZEIN U PRAHU**P02662** (CASA1_BOVIN) [15 peptide matches \(14 non-duplicate, 1 duplicate\)](#)**Skor 245**

Alfa-S1-kazein OS=Bos taurus GN=CSN1S1 PE=1 SV=2

Pokrivenost sekvence: 42%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
116	106	115	634,3561	1266,6977	1266,6972	0,39	0	67	1,40E-06	1	U R.YLGYLEQLLR.L
117	106	115	634,8484	1267,6822	1267,6812	0,78	0	21	0,012	1	U R.YLGYLEQLLR.L + Deamidated (NQ)
131	95	105	669,3443	1336,674	1336,6735	0,37	1	33	0,001	1	U K.HIQKEDVPSEY.Y
132	95	105	446,5656	1336,675	1336,6735	1,12	1	38	0,00035	1	U K.HIQKEDVPSEY.Y
133	95	105	446,8933	1337,6582	1337,6575	0,48	1	24	0,019	1	U K.HIQKEDVPSEY.Y + Deamidated (NQ)
146	38	49	692,8694	1383,7242	1383,7227	1,07	0	37	0,00064	1	U R.FFVAPFPEVFGK.E
183	121	134	830,9013	1659,7881	1659,7869	0,76	0	23	0,015	1	U K.VPQLEIVPNSAEER.L + Phospho (ST)
185	121	134	831,3937	1660,7728	1660,7709	1,16	0	24	0,016	1	U K.VPQLEIVPNSAEER.L + Deamidated (NQ); Phospho (ST)
194	23	37	587,3197	1758,9374	1758,9377	-0,17	0	47	0,00027	1	U K.HQGLPQEVLNENLLR.F
195	23	37	587,6481	1759,9223	1759,9217	0,38	0	40	0,00067	1	U K.HQGLPQEVLNENLLR.F + Deamidated (NQ)
196	23	37	880,9686	1759,9226	1759,9217	0,53	0	24	0,0053	1	U K.HQGLPQEVLNENLLR.F + Deamidated (NQ)

198	23	-	37	587,6481	1759,9226	1759,9217	0,55	0	32	0,0049	1	U	K.HQGLPQEVLNENLLR.F + Deamidated (NQ)
218	119	-	134	651,3228	1950,9465	1950,9452	0,71	1	34	0,001	1	U	K.YKVPQLEIVPNSAEER.L + Phospho (ST)
220	119	-	134	651,6513	1951,932	1951,9292	1,46	1	29	0,0048	1	U	K.YKVPQLEIVPNSAEER.L + Deamidated (NQ); Phospho (ST)
341	140	-	166	802,9003	3207,572	3207,5699	0,66	1	20	0,013	1	U	K.EGIHAQQKEPMIGVNQELAYFYPELFR.Q + Deamidated (NQ)

P02663 (CASA2_BOVIN) [15 peptide matches \(13 non-duplicate, 2 duplicate\)](#)

Skor 236

Alfa-S2-kazein OS=Bos taurus GN=CSN1S2 PE=1 SV=2

Pokrivenost sekvence: 28%

Broj	Start	-	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U	Peptid
67	189	-	196	490,2842	978,5539	978,5538	0,077	0	33	0,0021	1	U	K.FALPQYLK.T
81	204	-	212	549,8099	1097,6053	1097,6055	-0,18	1	18	0,022	1	U	K.AMKPWIQPK.T
82	204	-	212	366,8762	1097,6067	1097,6055	1,06	1	23	0,02	1	U	K.AMKPWIQPK.T
97	130	-	140	598,3435	1194,6724	1194,6721	0,28	0	17	0,023	1	U	R.NAVPITPTLNR.E
103	86	-	95	416,2193	1245,6361	1245,6353	0,58	1	24	0,0059	1	U	K.ITVDDKHYQK.A
135	129	-	140	451,5934	1351,7583	1351,7572	0,8	1	18	0,022	1	U	K.RNAVPTPTLNR.E + Deamidated (NQ)
137	96	-	106	684,352	1366,6895	1366,6881	1,03	0	58	4,70E-05	1	U	K.ALNEINQFYQK.F
138	96	-	106	684,8436	1367,6726	1367,6721	0,41	0	22	0,009	1	U	K.ALNEINQFYQK.F + Deamidated (NQ)
139	96	-	106	684,8437	1367,6728	1367,6721	0,53	0	52	6,60E-05	1	U	K.ALNEINQFYQK.F + Deamidated (NQ)
140	96	-	106	684,8438	1367,6729	1367,6721	0,63	0	56	8,10E-06	1	U	K.ALNEINQFYQK.F + Deamidated (NQ)
141	96	-	106	684,8438	1367,6731	1367,6721	0,72	0	47	0,00053	1	U	K.ALNEINQFYQK.F + Deamidated (NQ)
142	96	-	106	685,3357	1368,6568	1368,6561	0,52	0	21	0,032	1	U	K.ALNEINQFYQK.F + 2 Deamidated (NQ)
156	153	-	164	733,8102	1465,6058	1465,6048	0,7	0	41	0,00025	1	U	K.TVDMESTEVFTK.K + Phospho (ST)
168	153	-	165	532,2406	1593,6999	1593,6997	0,09	1	23	0,012	1	U	K.TVDMESTEVFTKK.T + Phospho (ST)
169	153	-	165	797,8577	1593,7009	1593,6997	0,75	1	34	0,0011	1	U	K.TVDMESTEVFTKK.T + Phospho (ST)

P02668 (CASK_BOVIN) [9 peptide matches \(8 non-duplicate, 1 duplicate\)](#)

Skor 217

Kapa-kazein OS=Bos taurus GN=CSN3 PE=1 SV=1

Pokrivenost sekvence: 43%

Broj	Start	-	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U	Peptid
109	108	-	118	626,2767	1250,5389	1250,5383	0,43	0	36	0,0029	1	U	K.SCQAQPTTMR.H
110	46	-	55	626,3589	1250,7032	1250,7023	0,74	0	40	0,00052	1	U	K.YIPIQYVLSR.Y
172	119	-	132	536,9537	1607,8393	1607,8395	-0,091	0	20	0,012	1	U	R.HPHPHLSFMAIPPK.K
225	90	-	107	990,5493	1979,084	1979,084	0,024	0	70	4,40E-07	1	U	R.SPAQILQWQVLSNTVPAK.S
226	90	-	107	660,7029	1979,0869	1979,084	1,45	0	42	0,0003	1	U	R.SPAQILQWQVLSNTVPAK.S
229	90	-	107	991,0422	1980,0698	1980,068	0,91	0	63	1,20E-06	1	U	R.SPAQILQWQVLSNTVPAK.S + Deamidated (NQ)
230	90	-	107	661,0306	1980,07	1980,068	1,01	0	21	0,011	1	U	R.SPAQILQWQVLSNTVPAK.S + Deamidated (NQ)
231	90	-	107	661,0311	1980,0716	1980,068	1,79	0	38	0,00028	1	U	R.SPAQILQWQVLSNTVPAK.S + Deamidated (NQ)
356	56	-	84	1172,9216	3515,743	3515,7441	-0,32	1	22	0,0081	1	U	R.YPSYGLNYYQKQPVALINNQFLPYYPYAK.P + Deamidated (NQ)

P02754 (LACB_BOVIN)[6 peptide matches \(6 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)**Skor 126**

Beta-laktoglobulin OS=Bos taurus GN=LGB PE=1 SV=3

Pokrivenost sekvence: 32%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
95	108	- 117	597,3425	1192,6704	1192,6703	0,045	1	17	0,026	1	K.VLVLDTDYKK.Y
96	108	- 117	398,5643	1192,6711	1192,6703	0,64	1	22	0,02	1	K.VLVLDTDYKK.Y
102	141	- 151	623,296	1244,5775	1244,5772	0,22	0	29	0,0021	1	U R.TPEVDDEALEK.F
178	141	- 154	545,9297	1634,7672	1634,7675	-0,23	1	42	0,00025	1	U R.TPEVDDEALEKFDK.A
189	165	- 178	858,899	1715,7835	1715,7825	0,6	0	27	0,0028	1	U R.LSFNPTQLEEQCHI.-
261	57	- 76	771,7585	2312,2536	2312,2515	0,92	1	70	4,30E-07	1	U R.VYVEELKPTPEGDLEILLQK.W

P02666 (CASB_BOVIN)[3 peptide matches \(3 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)**Skor 83**

Beta-kazein OS=Bos taurus GN=CSN2 PE=1 SV=2

Pokrivenost sekvence: 13%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
5	218	- 224	371,7288	741,4431	741,4425	0,77	0	25	0,0034	1	U R.GPFPPIIV.-
38	113	- 120	437,2469	872,4793	872,4789	0,44	1	28	0,0059	1	U K.VKEAMAPK.H
241	48	- 63	1031,4177	2060,8208	2060,8212	-0,15	0	69	2,80E-06	1	U K.FQSEEQQTEDELQDK.I + Phospho (ST)

P00711 (LALBA_BOVIN)[1 peptide matches \(1 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)**Skor 26**

Alfa-laktalbumin OS=Bos taurus GN=LALBA PE=1 SV=2

Pokrivenost sekvence: 6%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
99	134	- 142	603,2975	1204,5804	1204,5798	0,55	1	26	0,0034	1	U K.LDQWLCEKL.-

Rezultati dobijeni za model uzorke

ZE IJE KOŽNO TUTKALO, PRE IŠ ENO (63025) + ZnO (3M11)

P02465 (CO1A2_BOVIN) [16 peptide matches \(16 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 481

Kolagen alfa-2(I) lanac OS=Bos taurus GN=COL1A2 PE=1 SV=2

Pokrivenost sekvence: 18%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calce)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
63	1066	- 1078	596,8441	1191,6737	1191,6724	1,06	0	36	0,0017	1	U R.IGQPGAVGPAGIR.G
66	1066	- 1078	604,8412	1207,6678	1207,6673	0,43	0	29	0,014	1	U R.IGQPGAVGPAGIR.G + Oxidation (P)
72	326	- 340	634,342	1266,6695	1266,6681	1,14	0	52	1,50E-05	1	U R.GIPGPVGAAGATGAR.G + Oxidation (P)
88	572	- 586	714,3684	1426,7222	1426,7205	1,23	0	52	2,30E-05	1	U R.GIPGEFGLPGPAGAR.G + 2 Oxidation (P)
100	590	- 607	790,8879	1579,7612	1579,7591	1,37	0	43	9,40E-05	1	U R.GPPGESGAAGPTGPIGSR.G + Oxidation (P)
102	380	- 397	824,9186	1647,8226	1647,8217	0,56	0	53	0,00026	1	U R.GSTGEIGPAGPPGGLR.G + 2 Oxidation (P)
133	463	- 484	686,0365	2055,0876	2055,0862	0,73	1	48	6,60E-05	1	U K.EGPVGLPGIDGRPGIPAGAR.G + Oxidation (P)
136	463	- 484	691,3676	2071,081	2071,0811	-0,033	1	48	3,00E-05	1	U K.EGPVGLPGIDGRPGIPAGAR.G + 2 Oxidation (P)
150	881	- 904	1066,0611	2130,1076	2130,107	0,32	0	81	2,70E-07	1	U R.GLPVAGSVGEPGLGIAGPPGAR.G + 3 Oxidation (P)
151	881	- 904	711,0439	2130,11	2130,107	1,42	0	39	0,0054	1	U R.GLPVAGSVGEPGLGIAGPPGAR.G + 3 Oxidation (P)
162	947	- 972	1131,0698	2260,125	2260,1237	0,6	0	49	0,00067	1	U R.GYPGNAGPVGAAGAPGPQGPVGPVGH + 2 Oxidation (P)
163	947	- 972	754,383	2260,1273	2260,1237	1,58	0	50	0,0005	1	U R.GYPGNAGPVGAAGAPGPQGPVGPVGH + 2 Oxidation (P)
165	947	- 972	754,7112	2261,1117	2261,1077	1,78	0	41	0,00058	1	U R.GYPGNAGPVGAAGAPGPQGPVGPVGH + Deamidated (NQ); Oxidation (K); Oxidation (P)
205	674	- 706	927,7823	2780,325	2780,3226	0,85	1	61	1,90E-06	1	U R.GAPGAIGAPGPAGANGDRGEAGPAGPAGPR.G + Deamidated (NQ); 2 Oxidation (P)
209	542	- 571	931,4461	2791,3165	2791,3162	0,11	1	74	2,00E-06	1	U K.GEQGPAGPPFQGLPGPAGTAGEAGKPGER.G + Oxidation (K); 2 Oxidation (P)
215	743	- 775	961,1291	2880,3654	2880,3639	0,54	1	71	3,60E-06	1	U K.GPKGENGPVGPPTGPVGAAGPSGPNPPGAGSR.G + 2 Deamidated (NQ); Oxidation (K); Oxidation (P)

P02453 (CO1A1_BOVIN) [18 peptide matches \(17 non-duplicate, 1 duplicate\)](#)

Skor 359

Kolagen alfa-1(I) lanac OS=Bos taurus GN=COL1A1 PE=1 SV=3

Pokrivenost sekvence: 16%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calce)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
25	958	- 966	449,7593	897,5041	897,5032	0,93	0	22	0,014	1	R.GVVGLPGQR.G + Oxidation (P)
26	958	- 966	450,2513	898,4881	898,4872	0,92	0	21	0,018	1	R.GVVGLPGQR.G + Deamidated (NQ); Oxidation (P)
52	493	- 504	544,7727	1087,5309	1087,5298	0,96	0	23	0,0075	1	R.GFPGADGVAGPK.G + Oxidation (P)
79	970	- 983	656,8309	1311,6472	1311,6459	1	0	43	0,0018	1	R.GFPGLPSPGEPGK.Q + Oxidation (P)
81	970	- 983	664,8283	1327,6421	1327,6409	0,96	0	45	0,0011	1	R.GFPGLPSPGEPGK.Q + 2 Oxidation (P)
89	472	- 486	718,3454	1434,6763	1434,6739	1,64	0	33	0,026	1	U R.GEPGAPGLPGPPGER.G + 3 Oxidation (P)
91	865	- 881	730,3506	1458,6866	1458,6852	1,01	0	46	0,0011	1	R.GSAGPPGATGFPGAAGR.V + 2 Oxidation (P)
97	1066	- 1083	780,911	1559,8074	1559,8056	1,13	0	65	2,40E-06	1	U R.GETGPAGPAGPIGPVGAR.G
101	397	- 414	793,8828	1585,7511	1585,7485	1,68	0	24	0,0058	1	K.GANGAPGIAGAPGPPGAR.G + Deamidated (NQ); 3 Oxidation (P)
128	1062	- 1083	659,3369	1974,9889	1974,9872	0,88	1	14	0,044	1	U K.SGDRGETGPAGPAGPIGPVGAR.G
129	1062	- 1083	659,337	1974,9892	1974,9872	1,02	1	49	6,50E-05	1	U K.SGDRGETGPAGPAGPIGPVGAR.G

138	934	-	957	1037,5018	2072,989	2072,9876	0,72	0	73	9,40E-07	1	U	K.GAPGADGPAGAPGTPGPQGIAGQR.G + Deamidated (NQ); Oxidation (P)
139	934	-	957	692,0042	2072,9908	2072,9876	1,56	0	27	0,0045	1	U	K.GAPGADGPAGAPGTPGPQGIAGQR.G + Deamidated (NQ); Oxidation (P)
156	910	-	933	739,3566	2215,0479	2215,0506	-1,19	1	37	0,00033	1	R	GETGPAGRPGEVPPGPPGAGEK.G + Oxidation (K); 2 Oxidation (P)
174	1033	-	1061	822,4115	2464,2128	2464,2095	1,31	1	63	2,90E-05	1	K	GDRGETGPAGPPGAPGAPGAPGAPGVPAGK.S + Oxidation (P)
176	1141	-	1167	824,4113	2470,2122	2470,2089	1,35	1	45	0,002	2	U	R.GPPGSAGSPGKDLNGLPGPIGPPGPR.G + Deamidated (NQ); 4 Oxidation (P)
178	1141	-	1167	829,7426	2486,2059	2486,2038	0,87	1	35	0,017	1	U	R.GPPGSAGSPGKDLNGLPGPIGPPGPR.G + Deamidated (NQ); 5 Oxidation (P)
211	763	-	795	951,8094	2852,4064	2852,4053	0,38	1	75	1,50E-06	1	U	R.GLTGPIGPPGAPAGPGDKGEAGPSGPAGPTGAR.G + 2 Oxidation (P)

P04258 (CO3A1_BOVIN) [8 peptide matches \(8 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 229

Kolagen alfa-1(III) lanac OS=Bos taurus GN=COL3A1 PE=1 SV=1

Pokrivenost sekvence: 5%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U	Peptid	
140	777	-	800	1041,5587	2081,1028	2081,1018	0,5	0	84	1,10E-07	1	U	R.GAPGPQPPGAPGPLGIAGLTGAR.G + Oxidation (P)
141	777	-	800	694,7087	2081,1043	2081,1018	1,2	0	61	2,10E-05	1	U	R.GAPGPQPPGAPGPLGIAGLTGAR.G + Oxidation (P)
142	777	-	800	1042,0511	2082,0876	2082,0858	0,88	0	54	0,00014	1	U	R.GAPGPQPPGAPGPLGIAGLTGAR.G + Deamidated (NQ); Oxidation (P)
143	777	-	800	695,0368	2082,0886	2082,0858	1,34	0	24	0,014	1	U	R.GAPGPQPPGAPGPLGIAGLTGAR.G + Deamidated (NQ); Oxidation (P)
144	777	-	800	1049,5561	2097,0976	2097,0967	0,44	0	60	3,60E-05	1	U	R.GAPGPQPPGAPGPLGIAGLTGAR.G + 2 Oxidation (P)
146	777	-	800	1050,0498	2098,085	2098,0807	2,06	0	44	0,0015	1	U	R.GAPGPQPPGAPGPLGIAGLTGAR.G + Deamidated (NQ); 2 Oxidation (P)
217	606	-	638	989,4895	2965,4467	2965,453	-2,15	1	19	0,032	1	U	R.GPTGPIGPPGAPGQPGDKGESGAPGVPIAGPR.G + 4 Oxidation (P)
218	606	-	638	989,8201	2966,4385	2966,437	0,49	1	60	5,50E-05	1	U	R.GPTGPIGPPGAPGQPGDKGESGAPGVPIAGPR.G + Deamidated (NQ); 4 Oxidation (P)

ZE IJE KOŽNO TUTKALO, PRE IŠ ENO (63025) + OKER (3M21)

P02465 (CO1A2_BOVIN) [25 peptide matches \(24 non-duplicate, 1 duplicate\)](#)

Skor 564

Kolagen alfa-2(I) lanac OS=Bos taurus GN=COL1A2 PE=1 SV=2

Pokrivenost sekvence: 28%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U	Peptid	
69	1066	-	1078	596,844	1191,6735	1191,6724	0,92	0	33	0,0081	1	U	R.IGQPGAVGPAGIR.G
72	1066	-	1078	604,8412	1207,6678	1207,6673	0,36	0	39	0,0028	1	U	R.IGQPGAVGPAGIR.G + Oxidation (P)
73	1066	-	1078	605,3333	1208,6521	1208,6513	0,6	0	36	0,0011	1	U	R.IGQPGAVGPAGIR.G + Deamidated (NQ); Oxidation (P)
79	326	-	340	634,342	1266,6694	1266,6681	1,08	0	49	6,10E-05	1	U	R.GIPGVPGAAGATGAR.G + Oxidation (P)
80	449	-	462	644,8126	1287,6106	1287,6095	0,81	0	30	0,035	1	U	R.GFPGSPGNIGPAGK.E + Deamidated (NQ); 2 Oxidation (P)
91	572	-	586	714,3685	1426,7224	1426,7205	1,32	0	54	1,60E-05	1	U	R.GIPGEFGLPGPAGAR.G + 2 Oxidation (P)
98	829	-	844	746,8499	1491,6852	1491,6842	0,68	0	36	0,012	1	U	R.SGETGASGPPGFVGEK.G + Oxidation (P)
99	977	-	994	766,8954	1531,7761	1531,7743	1,19	0	22	0,011	1	U	R.GEPGAVGAVGPAGAVGPR.G + Oxidation (P)
102	308	-	325	781,9167	1561,8189	1561,8213	-1,51	0	47	0,00013	1	U	K.GAAGLPGVAGAPGLPGPR.G + 3 Oxidation (P)
103	590	-	607	790,8879	1579,7612	1579,7591	1,37	0	65	1,70E-06	1	U	R.GPPGESGAAGPTGPIGSR.G + Oxidation (P)
107	380	-	397	824,9186	1647,8227	1647,8217	0,63	0	57	7,20E-05	1	U	R.GSTGEIGPAGPPGPPGLR.G + 2 Oxidation (P)
117	431	-	448	600,6045	1798,7916	1798,7904	0,67	1	16	0,031	1	U	R.GPNGDSGRGPEGLMGPR.G + Deamidated (NQ); 3 Oxidation (P)
132	463	-	484	686,0367	2055,0884	2055,0862	1,11	1	42	0,0002	1	U	K.EGPVGLPGIDGRPGIPGAGAR.G + Oxidation (P)
136	463	-	484	691,3682	2071,0827	2071,0811	0,79	1	38	0,00034	1	U	K.EGPVGLPGIDGRPGIPGAGAR.G + 2 Oxidation (P)
148	881	-	904	1066,0614	2130,1082	2130,107	0,6	0	95	1,30E-08	1	U	R.GLPVAGSVGEPGPLGIAGPPGAR.G + 3 Oxidation (P)
149	881	-	904	1066,0618	2130,109	2130,107	0,98	0	50	0,00045	1	U	R.GLPVAGSVGEPGPLGIAGPPGAR.G + 3 Oxidation (P)

150	881	-	904	711,0441	2130,1104	2130,107	1,6	0	51	0,00031	1	U	R.GLPGVAGSVGEPGLGIAGPPGAR.G + 3 Oxidation (P)
159	947	-	972	1131,0702	2260,1258	2260,1237	0,96	0	65	1,60E-05	1	U	R.GYPGNAGPVGAAGAPGPQGPVGPVVK.H + 2 Oxidation (P)
160	947	-	972	754,383	2260,1273	2260,1237	1,59	0	44	0,0022	1	U	R.GYPGNAGPVGAAGAPGPQGPVGPVVK.H + 2 Oxidation (P)
161	947	-	972	754,7112	2261,1117	2261,1077	1,79	0	41	0,00058	1	U	R.GYPGNAGPVGAAGAPGPQGPVGPVVK.H + Deamidated (NQ); Oxidation (K); Oxidation (P)
165	713	-	739	804,0516	2409,133	2409,1309	0,88	1	28	0,0025	1	U	R.GEVGPAGPNGFAGPAGAAGQPGAKGER.G + Deamidated (NQ); Oxidation (K); Oxidation (P)
167	281	-	307	1224,1057	2446,1968	2446,1976	-0,32	0	16	0,035	1	U	R.GEVGLPGLSGPVPPPNGPANGLPAGK.G + Deamidated (NQ); Oxidation (K); 4 Oxidation (P)
188	674	-	706	927,7821	2780,3244	2780,3226	0,62	1	58	3,50E-06	1	U	R.GAPGAIGAPGPAGANGDRGEAGPAGPAGPR.G + Deamidated (NQ); 2 Oxidation (P)
193	542	-	571	931,4462	2791,3169	2791,3162	0,25	1	65	1,80E-05	1	U	K.GEQGPAGPPFQGLPGPAGTAGEAGKPGER.G + Oxidation (K); 2 Oxidation (P)
200	743	-	775	961,1293	2880,3661	2880,3639	0,78	1	30	0,048	1	U	K.GPKGENGPVGTGPVGAAGPSGPNPPGAGSR.G + 2 Deamidated (NQ); Oxidation (K); Oxidation (P)

P02453 (CO1A1_BOVIN) [23 peptide matches \(23 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 413

Kolagen alfa-1(I) lanac OS=Bos taurus GN=COL1A1 PE=1 SV=3

Pokrivenost sekvence: 22%

Broj	Start	-	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U	Peptid
22	958	-	966	449,7593	897,504	897,5032	0,88	0	22	0,015	1	U	R.GVVGLPGQR.G + Oxidation (P)
23	958	-	966	450,2513	898,488	898,4872	0,87	0	28	0,018	1	U	R.GVVGLPGQR.G + Deamidated (NQ); Oxidation (P)
55	493	-	504	544,7727	1087,5309	1087,5298	0,96	0	26	0,0064	1	U	R.GFPGADGVAGPK.G + Oxidation (P)
82	970	-	983	648,8333	1295,6521	1295,651	0,86	0	24	0,012	1	U	R.GFPGPLPGPSGEPGK.Q
84	970	-	983	656,8309	1311,6472	1311,6459	0,97	0	36	0,0075	1	U	R.GFPGPLPGPSGEPGK.Q + Oxidation (P)
85	970	-	983	664,8284	1327,6422	1327,6409	1,05	0	43	0,0015	1	U	R.GFPGPLPGPSGEPGK.Q + 2 Oxidation (P)
88	970	-	983	672,8258	1343,637	1343,6358	0,89	0	30	0,0063	1	U	R.GFPGPLPGPSGEPGK.Q + Oxidation (K); 2 Oxidation (P)
92	472	-	486	718,3454	1434,6763	1434,6739	1,65	0	38	0,0069	1	U	R.GEPGAGLPGPPGER.G + 3 Oxidation (P)
95	865	-	881	730,3506	1458,6866	1458,6852	0,99	0	80	5,20E-07	1	U	R.GSAGPPGATGFPGAAGR.V + 2 Oxidation (P)
100	1066	-	1083	780,911	1559,8074	1559,8056	1,15	0	72	4,80E-07	1	U	R.GETGPAGPAGPIGPVGAR.G
104	397	-	414	793,8828	1585,7511	1585,7485	1,66	0	40	0,00028	1	U	K.GANGAPGIAGAPGFPGAR.G + Deamidated (NQ); 3 Oxidation (P)
120	882	-	902	907,4407	1812,8669	1812,8643	1,43	0	31	0,002	1	U	R.VGPPGPSGNAGPPGPPGAGK.E + Deamidated (NQ); Oxidation (K); 2 Oxidation (P)
121	994	-	1013	916,9339	1831,8532	1831,8523	0,48	0	29	0,015	1	U	R.GPPGPMGPPGLAGPPGESGR.E + 3 Oxidation (P)
127	1062	-	1083	659,3371	1974,9894	1974,9872	1,14	1	56	1,50E-05	1	U	K.SGDRGETGPAGPAGPIGPVGAR.G
129	448	-	468	673,9965	2018,9677	2018,9658	0,95	1	20	0,031	1	U	K.GEPGTGIQGGPPGAGEEGKR.G + Oxidation (K); Oxidation (P)
138	934	-	957	1037,5019	2072,9892	2072,9876	0,81	0	21	0,019	1	U	K.GAPGADGPAGAPGTPGQGIAGQR.G + Deamidated (NQ); Oxidation (P)
157	910	-	933	739,3573	2215,0499	2215,0506	-0,29	1	52	1,40E-05	1	U	R.GETGPAGRPGEVGPVPPGPPGAGEK.G + Oxidation (K); 2 Oxidation (P)
169	1033	-	1061	822,4113	2464,2122	2464,2095	1,07	1	35	0,016	1	U	K.GDRGETGPAGPPGAPGAPGAPVGPAGK.S + Oxidation (P)
171	1141	-	1167	824,4113	2470,2121	2470,2089	1,32	1	48	0,00097	2	U	R.GPPGSAGSPGKDLNGLPGIPGPPGPR.G + Deamidated (NQ); 4 Oxidation (P)
172	1033	-	1061	827,7431	2480,2075	2480,2045	1,23	1	40	0,0064	1	U	K.GDRGETGPAGPPGAPGAPGAPVGPAGK.S + 2 Oxidation (P)
173	1141	-	1167	829,7425	2486,2056	2486,2038	0,72	1	34	0,023	1	U	R.GPPGSAGSPGKDLNGLPGIPGPPGPR.G + Deamidated (NQ); 5 Oxidation (P)
184	1111	-	1140	902,4239	2704,2497	2704,2478	0,72	0	22	0,0086	2	U	R.GFSGLQGGPPGPPGSPGQPSGASGPAGPR.G + 3 Oxidation (P)
195	763	-	795	951,8094	2852,4065	2852,4053	0,4	1	82	3,20E-07	1	U	R.GLTGPIGPPGAPAGPDGKGEAGPSGPAGPTGAR.G + 2 Oxidation (P)

P04258 (CO3A1_BOVIN) [8 peptide matches \(8 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 159

Kolagen alfa-1(III) lanac OS=Bos taurus GN=COL3A1 PE=1 SV=1

Pokrivenost sekvence: 7%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
110	240	257	834,9229	1667,8312	1667,8301	0,67	0	24	0,014	1	K.GEMGPAGIPGAPGLIGAR.G + 3 Oxidation (P)
140	777	800	1041,5584	2081,1022	2081,1018	0,21	0	58	4,70E-05	1	U R.GAPGPQPPGAPGPLGIAGLTGAR.G + Oxidation (P)
141	777	800	694,7086	2081,1041	2081,1018	1,1	0	24	0,031	1	U R.GAPGPQPPGAPGPLGIAGLTGAR.G + Oxidation (P)
142	777	800	1042,0512	2082,0878	2082,0858	0,98	0	26	0,004	1	U R.GAPGPQPPGAPGPLGIAGLTGAR.G + Deamidated (NQ); Oxidation (P)
144	777	800	1049,5558	2097,097	2097,0967	0,15	0	59	4,10E-05	1	U R.GAPGPQPPGAPGPLGIAGLTGAR.G + 2 Oxidation (P)
146	777	800	705,372	2113,0943	2113,0916	1,25	0	38	0,0051	7	U R.GAPGPQPPGAPGPLGIAGLTGAR.G + 3 Oxidation (P)
147	777	800	1057,5546	2113,0946	2113,0916	1,42	0	30	0,035	1	U R.GAPGPQPPGAPGPLGIAGLTGAR.G + 3 Oxidation (P)
202	606	638	989,8205	2966,4395	2966,437	0,84	1	71	4,30E-06	1	U R.GPTGPIGPPGAPGPDGKESGAPGVPIAGPR.G + Deamidated (NQ); 4 Oxidation (P)

KRAVLJI SIR + ZnO (7M11)

P02666 (CASB_BOVIN) [7 peptide matches \(3 non-duplicate, 4 duplicate\)](#)

Skor 240

Beta-kazein OS=Bos taurus GN=CSN2 PE=1 SV=2

Pokrivenost sekvence: 18%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
5	218	224	371,7288	741,4431	741,4425	0,82	0	24	0,0038	1	U R.GPFPPIV.-
6	218	224	371,7289	741,4432	741,4425	0,87	0	25	0,0034	1	U R.GPFPPIV.-
155	48	63	1031,418	2060,8214	2060,8212	0,14	0	85	1,10E-08	1	U K.FQSEEQQTDELQDK.I + Phospho (ST)
156	48	63	1031,4181	2060,8216	2060,8212	0,23	0	96	5,10E-09	1	U K.FQSEEQQTDELQDK.I + Phospho (ST)
157	48	63	687,9488	2060,8244	2060,8212	1,58	0	40	0,00016	1	U K.FQSEEQQTDELQDK.I + Phospho (ST)
166	199	217	729,3951	2185,1636	2185,1605	1,38	0	43	0,0001	1	U R.DMPIQAFLLYQEPVLPVVR.G
167	199	217	729,3958	2185,1656	2185,1605	2,33	0	25	0,0046	1	U R.DMPIQAFLLYQEPVLPVVR.G

P02754 (LACB_BOVIN) [9 peptide matches \(8 non-duplicate, 1 duplicate\)](#)

Skor 233

Beta-laktoglobulin OS=Bos taurus GN=LGB PE=1 SV=3

Pokrivenost sekvence: 33%






Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
32	92	99	301,8607	902,5601	902,5589	1,32	1	19	0,039	1	U K.TKIPAVFK.I
34	100	107	458,7407	915,4669	915,4661	0,88	0	23	0,017	1	U K.IDALNENK.V
58	108	116	533,2955	1064,5765	1064,5754	1,02	0	57	1,50E-05	1	U K.VLVLDTDYK.K
77	108	117	597,3426	1192,6707	1192,6703	0,28	1	45	6,90E-05	1	U K.VLVLDTDYKK.Y
79	108	117	398,5649	1192,6729	1192,6703	2,18	1	24	0,013	1	U K.VLVLDTDYKK.Y
86	141	151	623,2965	1244,5784	1244,5772	0,96	0	49	7,40E-05	1	U R.TPEVDDEALEK.F
120	141	154	545,9299	1634,768	1634,7675	0,26	1	41	0,00075	1	U R.TPEVDDEALEKFDK.A
177	57	76	1157,133	2312,2514	2312,2515	-0,02	1	34	0,00063	1	U R.VYVEELKPTPEGDLEILLQK.W
178	57	76	771,7588	2312,2545	2312,2515	1,29	1	90	4,50E-09	1	U R.VYVEELKPTPEGDLEILLQK.W

P02662 (CASA1_BOVIN) [5 peptide matches \(4 non-duplicate, 1 duplicate\)](#)

Skor 154

Alfa-S1-kazein OS=Bos taurus GN=CSN1S1 PE=1 SV=2

Pokrivenost sekvence: 17%





	Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
	99	106	- 115	634,3564	1266,6983	1266,6972	0,88	0	69	1,00E-06	1	U R.YLGYLEQLLR.L
	109	38	- 49	692,8697	1383,7249	1383,7227	1,57	0	22	0,011	1	U R.FFVAPFPEVFGK.E
	123	121	- 134	830,9017	1659,7889	1659,7869	1,25	0	21	0,019	1	U K.VPQLEIVPNSAEER.L + Phospho (ST)
	146	119	- 134	976,48	1950,9455	1950,9452	0,16	1	67	7,60E-07	1	U K.YKVPQLEIVPNSAEER.L + Phospho (ST)
	147	119	- 134	651,323	1950,9471	1950,9452	1,02	1	44	7,10E-05	1	U K.YKVPQLEIVPNSAEER.L + Phospho (ST)

P02663 (CASA2_BOVIN) [4 peptide matches \(4 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 81

Alfa-S2-kazein OS=Bos taurus GN=CSN1S2 PE=1 SV=2

Pokrivenost sekvence: 18%




	Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
	45	189	- 196	490,2845	978,5545	978,5538	0,69	0	33	0,0019	1	U K.FALPQYLK.T
	80	130	- 140	598,3437	1194,6728	1194,6721	0,63	0	17	0,025	1	U R.NAVPITPTLNR.E
	105	96	- 106	684,3524	1366,6902	1366,6881	1,54	0	58	3,60E-05	1	U K.ALNEINQFYQK.F
	111	153	- 164	733,8107	1465,6069	1465,6048	1,48	0	27	0,0028	1	U K.TVDMESTEVFTK.K + Phospho (ST)

P02668 (CASK_BOVIN) [3 peptide matches \(3 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 59

Kapa-kazein OS=Bos taurus GN=CSN3 PE=1 SV=1

Pokrivenost sekvence: 20%



	Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
	95	46	- 55	626,3592	1250,7039	1250,7023	1,31	0	31	0,0036	1	U K.YIPIQYVLSR.Y
	154	68	- 84	1006,0385	2010,0624	2010,0614	0,5	0	34	0,001	1	U K.PVALINNQLFPYPYAK.P
	246	56	- 84	1172,5938	3514,7596	3514,7601	-0,15	1	27	0,0031	1	U R.YPSYGLNYYQKQPVALINNQLFPYPYAK.P

P02769 (ALBU_BOVIN) [2 peptide matches \(2 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 43

Serum albumin OS=Bos taurus GN=ALB PE=1 SV=4

Pokrivenost sekvence: 3%

	Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
	76	66	- 75	582,3194	1162,6243	1162,6234	0,77	0	28	0,0026	1	U K.LVNELTEFAK.T
	110	360	- 371	480,6091	1438,8053	1438,8045	0,6	1	29	0,0018	1	U R.RHPEYAVSVLLR.L

KRAVLJI SIR + OKER (7M21)

P02662 (CASA1_BOVIN) [18 peptide matches \(14 non-duplicate, 4 duplicate\)](#)

Skor 355

Alfa-S1-kazein OS=Bos taurus GN=CSN1S1 PE=1 SV=2

Pokrivenost sekvence: 46%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(cale)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
7	209	214	374,6889	747,3632	747,3625	0,83	0	16	0,034	1	U K.TTMPLW.-
83	106	115	423,2398	1266,6974	1266,6972	0,18	0	27	0,015	1	U R.YLGYLEQLLR.L
84	106	115	634,3563	1266,6981	1266,6972	0,69	0	21	0,011	1	U R.YLGYLEQLLR.L
90	95	105	446,5653	1336,674	1336,6735	0,35	1	16	0,032	1	U K.HIQKEDVPSER.Y
96	38	49	692,8693	1383,7241	1383,7227	0,99	0	35	0,00099	1	U R.FFVAPFPEVFGK.E
119	38	51	547,9608	1640,8605	1640,8603	0,11	1	14	0,048	1	U R.FFVAPFPEVFGK.V
122	121	134	830,901	1659,7875	1659,7869	0,35	0	19	0,015	1	U K.VPQLEIVPNSAEER.L + Phospho (ST)
128	23	37	880,476	1758,9375	1758,9377	-0,082	0	115	3,80E-11	1	U K.HQGLPQEVLENLLR.F
129	23	37	587,3198	1758,9377	1758,9377	0,039	0	45	0,00041	1	U K.HQGLPQEVLENLLR.F
130	23	37	587,3199	1758,9378	1758,9377	0,073	0	47	0,00029	1	U K.HQGLPQEVLENLLR.F
132	23	37	587,32	1758,9381	1758,9377	0,24	0	37	0,0014	1	U K.HQGLPQEVLENLLR.F
133	23	37	587,32	1758,9382	1758,9377	0,31	0	15	0,038	1	U K.HQGLPQEVLENLLR.F
153	119	134	976,4797	1950,9448	1950,9452	-0,18	1	63	2,20E-06	1	U K.YKVPQLEIVPNSAEER.L + Phospho (ST)
156	119	134	651,3229	1950,947	1950,9452	0,94	1	39	0,00039	1	U K.YKVPQLEIVPNSAEER.L + Phospho (ST)
189	148	166	772,7182	2315,1327	2315,1296	1,33	0	26	0,0046	1	U K.EPMIGVQNQELAYFYPELFR.Q
190	148	166	1159,064	2316,1134	2316,1136	-0,073	0	33	0,0077	1	U K.EPMIGVQNQELAYFYPELFR.Q + Deamidated (NQ)
191	148	166	1159,0645	2316,1144	2316,1136	0,36	0	15	0,042	1	U K.EPMIGVQNQELAYFYPELFR.Q + Deamidated (NQ)
293	140	166	1069,8686	3206,584	3206,5859	-0,59	1	70	2,60E-07	1	U K.EGIHAQQKEPMIGVQNQELAYFYPELFR.Q

P02754 (LACB_BOVIN) [10 peptide matches \(7 non-duplicate, 3 duplicate\)](#)

Skor 281

Beta-laktoglobulin OS=Bos taurus GN=LGB PE=1 SV=3

Pokrivenost sekvence: 24%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(cale)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
57	108	116	533,2951	1064,5756	1064,5754	0,25	0	48	5,40E-05	1	U K.VLVLDTDYK.K
70	108	117	597,3423	1192,67	1192,6703	-0,24	1	38	0,00026	1	U K.VLVLDTDYK.Y
71	108	117	398,5641	1192,6704	1192,6703	0,015	1	24	0,013	1	U K.VLVLDTDYK.Y
72	108	117	398,5646	1192,6721	1192,6703	1,45	1	24	0,012	1	U K.VLVLDTDYK.Y
76	141	151	623,296	1244,5774	1244,5772	0,16	0	38	0,00075	1	U R.TPEVDDEALEK.F
114	141	154	545,9295	1634,7667	1634,7675	-0,49	1	39	0,00056	1	U R.TPEVDDEALEKFDK.A
115	141	154	545,9296	1634,767	1634,7675	-0,31	1	44	0,00018	1	U R.TPEVDDEALEKFDK.A
116	141	154	545,9297	1634,7674	1634,7675	-0,1	1	29	0,0027	1	U R.TPEVDDEALEKFDK.A
117	141	154	818,3913	1634,7681	1634,7675	0,36	1	75	7,00E-07	1	U R.TPEVDDEALEKFDK.A
187	57	76	771,7587	2312,2542	2312,2515	1,15	1	90	5,20E-09	1	U R.VYVEELKPTPEGDLEILLQK.W

P02663 (CASA2_BOVIN) [6 peptide matches \(6 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 129

Alfa-S2-kazein OS=Bos taurus GN=CSN1S2 PE=1 SV=2

Pokrivenost sekvence: 19%

	Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid	
	49	189	-	196	490,2844	978,5543	978,5538	0,46	0	33	0,0015	1	U K.FALPQYLK.T
	73	130	-	140	598,3434	1194,6722	1194,6721	0,16	0	29	0,002	1	U R.NAVPITPTLNR.E
	92	96	-	106	684,3519	1366,6893	1366,6881	0,9	0	59	4,10E-05	1	U K.ALNEINQFYQK.F
	99	153	-	164	733,8105	1465,6065	1465,6048	1,15	0	34	0,00061	1	U K.TVDMESTEVFTK.K + Phospho (ST)
	108	153	-	165	532,2405	1593,6996	1593,6997	-0,06	1	25	0,0078	1	U K.TVDMESTEVFTKK.T + Phospho (ST)
	109	153	-	165	797,8577	1593,7008	1593,6997	0,68	1	39	0,0005	1	U K.TVDMESTEVFTKK.T + Phospho (ST)

P02769 (ALBU_BOVIN) [1 peptide matches \(1 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 69

Serum albumin OS=Bos taurus GN=ALB PE=1 SV=4

Pokrivenost sekvence: 2%

	Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid	
	101	421	-	433	740,4019	1478,7893	1478,7881	0,76	0	69	1,40E-06	1	U K.LGEYGFQNALIVR.Y

P02666 (CASB_BOVIN) [2 peptide matches \(2 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 55

Beta-kazein OS=Bos taurus GN=CSN2 PE=1 SV=2

Pokrivenost sekvence: 11%

	Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid	
	4	218	-	224	371,7287	741,4428	741,4425	0,39	0	25	0,0033	1	U R.GPFPPIV.-
	179	199	-	217	729,3955	2185,1646	2185,1605	1,85	0	44	7,50E-05	1	U R.DMPIQAFLLYQEPVLPVVR.G

P02668 (CASK_BOVIN) [2 peptide matches \(2 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 37

Kapa-kazein OS=Bos taurus GN=CSN3 PE=1 SV=1

Pokrivenost sekvence: 9%

	Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid	
	79	46	-	55	626,3588	1250,7031	1250,7023	0,64	0	19	0,028	1	U K.YIPIQYVLSR.Y
	162	90	-	107	990,5489	1979,0832	1979,084	-0,41	0	35	0,00081	1	U R.SPAQLQWQVLSNTVPAK.S

BELANCE + ZnO (9M11)

P01012 (OVAL_CHICK)

[21 peptide matches \(19 non-duplicate, 2 duplicate\)](#)

Skor 619

Ovalbumin OS=Gallus gallus GN=SERPINB14 PE=1 SV=2

Pokrivenost sekvence: 43%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calce)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
89	191	200	605,2644	1208,5143	1208,5132	0,91	0	26	0,0037	1	U K.DEDTQAMPFR.V
104	371	382	673,3728	1344,7311	1344,7303	0,65	0	76	1,50E-07	1	U K.HIATNAVLFFGR.C
106	371	382	449,2513	1344,7321	1344,7303	1,35	0	18	0,023	1	U K.HIATNAVLFFGR.C
112	208	219	741,8844	1481,7543	1481,7523	1,33	0	43	9,50E-05	1	U K.PVQMMYQIGLFR.V
122	188	200	519,2455	1554,7148	1554,7137	0,74	1	28	0,0022	1	U K.AFKDEDTQAMPFR.V
127	265	277	791,3656	1580,7166	1580,7141	1,59	0	44	0,00011	1	U K.LTEWTSSNVMEER.K
140	128	143	844,4245	1686,8344	1686,8325	1,12	0	37	0,00041	1	U R.GGLEPINFQTAADQAR.E
151	324	340	591,9711	1772,8914	1772,8918	-0,19	0	62	1,60E-06	1	U K.ISQAVHAAHAEINEAGR.E
153	324	340	591,9715	1772,8926	1772,8918	0,47	0	64	1,00E-06	1	U K.ISQAVHAAHAEINEAGR.E
154	324	340	444,2308	1772,8942	1772,8918	1,37	0	18	0,021	1	U K.ISQAVHAAHAEINEAGR.E
170	144	159	929,9869	1857,9593	1857,9585	0,45	0	92	2,70E-09	1	U R.ELINSWVESQTNGIIR.N
171	144	159	620,3276	1857,9609	1857,9585	1,33	0	34	0,0011	1	U R.ELINSWVESQTNGIIR.N
175	144	159	930,4794	1858,9443	1858,9425	0,98	0	60	2,30E-06	1	U R.ELINSWVESQTNGIIR.N + Deamidated (NQ)
177	144	159	930,4797	1858,9449	1858,9425	1,32	0	14	0,047	1	U R.ELINSWVESQTNGIIR.N + Deamidated (NQ)
180	144	159	930,9712	1859,9279	1859,9265	0,75	0	37	0,00038	1	U R.ELINSWVESQTNGIIR.N + 2 Deamidated (NQ)
205	341	360	1044,9608	2087,907	2087,9048	1,05	0	88	6,10E-09	1	U R.EVVGSAGVDAASVSEEFRA + Phospho (ST)
206	341	360	696,9768	2087,9086	2087,9048	1,81	0	19	0,018	1	U R.EVVGSAGVDAASVSEEFRA + Phospho (ST)
221	86	105	761,0671	2280,1794	2280,175	1,93	1	18	0,019	1	U R.DILNQITKPNVDVYSFLASR.L
223	201	219	1142,5773	2283,14	2283,1391	0,4	1	54	1,10E-05	1	U R.VTEQESKPVQMMYQIGLFR.V
224	201	219	762,055	2283,1433	2283,1391	1,8	1	70	2,60E-07	1	U R.VTEQESKPVQMMYQIGLFR.V
250	160	182	820,7782	2459,3128	2459,3094	1,37	0	32	0,00098	1	U R.NVLQPSVDSQTAMVLVNAIVFK.G

P02789 (TRFE_CHICK)

[8 peptide matches \(8 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 85

Ovotransferin OS=Gallus gallus PE=1 SV=2

Pokrivenost sekvence: 14%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calce)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
69	540	548	524,2671	1046,5197	1046,5185	1,15	0	21	0,011	1	U K.YFGYTGALR.C
71	680	688	529,3005	1056,5865	1056,5855	0,88	0	24	0,013	1	U K.FYTVISSLK.T
88	299	309	401,2052	1200,5937	1200,5928	0,81	0	18	0,024	1	U K.SDFHLFGPPGK.K
118	141	154	512,2881	1533,8424	1533,8416	0,56	0	35	0,00049	1	U R.SAGWNIPIGTLHLR.G
136	443	457	551,6183	1651,833	1651,8318	0,75	1	24	0,0052	1	U K.TDERPASYFAVAVAR.K
143	275	288	565,9461	1694,8165	1694,8152	0,79	1	28	0,0028	1	U R.DDNKVEDIWSFLSK.A
148	674	688	582,9823	1745,9252	1745,924	0,69	1	16	0,033	1	U K.EFLGDKFYTVISSLK.T
266	329	351	1349,6491	2697,2836	2697,2818	0,67	0	21	0,011	1	U R.VPSLMDSQLYLGFEYYSIQSMR.K

P02789 (TRFE_CHICK) [7 peptide matches \(7 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 91

Ovotransferin OS=Gallus gallus PE=1 SV=2

Pokrivenost sekvence: 9%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(cale)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
61	540	548	524,2671	1046,5196	1046,5185	1,04	0	26	0,0035	1	U K.YFGYTGALR.C
63	680	688	529,3005	1056,5865	1056,5855	0,92	0	31	0,0025	1	U K.FYTVISSLK.T
87	299	309	401,2052	1200,5937	1200,5928	0,73	0	24	0,0071	1	U K.SDFHLFGPPGK.K
112	119	131	479,5846	1435,7319	1435,7307	0,84	1	14	0,047	1	U K.KGTEFTVNDLQGK.T
126	141	154	512,2881	1533,8424	1533,8416	0,5	0	38	0,00026	1	U R.SAGWNIPIGTLHR.G
143	275	288	565,9461	1694,8165	1694,8152	0,81	1	24	0,0055	1	U R.DDNKVEDIWSFLSK.A
144	275	288	848,4157	1694,8168	1694,8152	0,98	1	22	0,011	1	U R.DDNKVEDIWSFLSK.A

P01014 (OVALY_CHICK) [5 peptide matches \(5 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 86

Protein Y povezan sa Ovalbuminom OS=Gallus gallus GN=SERPINB14B PE=1 SV=1

Pokrivenost sekvence: 13%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(cale)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
64	187	195	533,7623	1065,5101	1065,5091	0,97	0	32	0,0033	1	U K.IAFNTEDTR.E
70	1	10	554,2717	1106,5289	1106,5278	1,04	0	17	0,026	1	U -.MDSISVTNAK.F + Acetyl (Protein N-term)
79	354	362	580,2912	1158,5679	1158,5669	0,83	0	29	0,0051	1	U K.HSLELEEFR.A
110	373	384	706,8707	1411,7268	1411,7248	1,39	0	52	1,80E-05	1	U R.YNPTNAILFFGR.Y
119	124	136	506,5932	1516,7577	1516,7562	0,98	1	23	0,007	1	U R.KFYTGVEEVNFK.T

O42273 (TENP_CHICK) [1 peptide matches \(1 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 62

Protein TENP OS=Gallus gallus GN=TENP PE=2 SV=1

Pokrivenost sekvence: 4%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(cale)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
203	281	301	766,4224	2296,2453	2296,2427	1,12	0	62	1,60E-06	1	U K.ITQVGSLYHEDLPITLSAALR.S

ŽUMANCE + ZnO (10M11)

P02845 (VIT2_CHICK) [25 peptide matches \(24 non-duplicate, 1 duplicate\)](#)

Skor 571

Vitelogenin-2 OS=Gallus gallus GN=VTG2 PE=1 SV=1

Pokrivenost sekvence: 15%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(cale)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
74	1453	1461	481,2696	960,5247	960,524	0,7	0	46	0,00034	1	U K.VSTELVTGR.F
76	1515	1523	487,279	972,5434	972,5426	0,8	0	47	3,90E-05	1	U R.MVVALTSR.T
94	1771	1780	509,2828	1016,551	1016,5502	0,78	0	29	0,0072	1	U K.TVQLAGVDSK.C
106	1543	1552	524,8297	1047,6447	1047,6441	0,66	0	31	0,0023	1	U R.LPLSLPVGPR.I
107	1543	1552	524,8299	1047,6452	1047,6441	1,08	0	24	0,013	1	U R.LPLSLPVGPR.I
120	260	268	543,32	1084,6254	1084,6241	1,29	0	31	0,002	1	U R.QQLTLVEVR.S

129	1042	-	1051	557,8147	1113,6149	1113,6142	0,66	0	22	0,01	1	U	K.IQLEIQAGSR.A
151	633	-	641	582,7522	1163,4899	1163,4883	1,31	0	28	0,0041	1	U	R.ADTYFDNYR.V
196	342	-	353	701,3608	1400,7069	1400,7048	1,54	0	70	3,00E-07	1	U	R.IANADNLESIWR.Q
201	831	-	842	709,8882	1417,7618	1417,7599	1,37	0	29	0,0051	1	U	R.LSQLESTMQIR.S
210	642	-	655	723,3921	1444,7697	1444,7674	1,58	0	81	1,30E-07	1	U	R.VGATGEIFVNSPR.T
212	1702	-	1714	729,4139	1456,8133	1456,8112	1,46	0	14	0,05	1	U	K.TITIQVPLWMAG.T
213	733	-	745	729,9204	1457,8263	1457,8242	1,47	0	56	1,20E-05	1	U	K.ILGQEVAFININK.E
214	226	-	239	733,3611	1464,7077	1464,7056	1,42	0	65	5,30E-06	1	U	K.QSDSGTLITDVSSR.Q
228	58	-	71	780,4387	1558,8629	1558,8606	1,46	0	25	0,005	1	U	K.LEISGLPENAYLLK.V
230	74	-	86	780,8769	1559,7392	1559,7368	1,5	0	37	0,00033	1	U	R.SPQVEEYNGVWPR.D
242	289	-	302	797,9736	1593,9326	1593,9316	0,61	0	30	0,002	1	U	R.FPAVLPQMPLQLIK.T
285	456	-	471	889,4587	1776,9028	1776,9006	1,24	0	21	0,011	1	U	K.EALQPIHDLADEAISR.G
286	456	-	471	593,3083	1776,903	1776,9006	1,33	0	35	0,0005	1	U	K.EALQPIHDLADEAISR.G
316	287	-	302	638,7065	1913,0977	1913,0961	0,85	1	27	0,0036	1	U	R.YRFPVLPQMPLQLIK.T
318	1393	-	1410	649,6818	1946,0237	1946,0222	0,79	1	75	9,10E-08	1	U	K.TGGLQLVVYADTDSVRPR.V
319	774	-	790	986,9894	1971,9642	1971,9625	0,87	0	51	1,80E-05	1	U	R.NSIAGQWTQPVWVGELR.Y
320	774	-	790	658,3289	1971,9648	1971,9625	1,17	0	40	0,00017	1	U	R.NSIAGQWTQPVWVGELR.Y
346	240	-	259	746,0417	2235,1034	2235,0994	1,77	0	44	0,0004	1	U	R.QVYQISPFNEPTGVAVMEAR.Q
348	532	-	551	747,4156	2239,225	2239,2212	1,69	0	29	0,002	1	U	K.TVQGYLIQLADQSLPPEVR.M

P01012 (OVAL_CHICK) [9 peptide matches \(7 non-duplicate, 2 duplicate\)](#)

Skor 191

Ovalbumin OS=Gallus gallus GN=SERPINB14 PE=1 SV=2

Pokrivenost sekvence: 28%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid		
263	128	-	143	844,4248	1686,835	1686,8325	1,45	0	22	0,0078	1	U	R.GGLEPINFQTAADQAR.E
264	128	-	143	844,4248	1686,8351	1686,8325	1,53	0	67	8,30E-07	1	U	R.GGLEPINFQTAADQAR.E
278	324	-	340	591,9712	1772,8917	1772,8918	-0,024	0	15	0,041	1	U	K.ISQAVHAAHAEINEAGR.E
280	324	-	340	591,9714	1772,8924	1772,8918	0,35	0	39	0,00022	1	U	K.ISQAVHAAHAEINEAGR.E
304	144	-	159	930,4793	1858,944	1858,9425	0,85	0	26	0,0037	1	U	R.ELINSWVESQTNGIIR.N + Deamidated (NQ)
356	86	-	105	761,0669	2280,179	2280,175	1,74	1	46	4,50E-05	1	U	R.DILNQITKPNDVYSFSLASR.L
358	201	-	219	762,0546	2283,142	2283,1391	1,24	1	53	9,80E-06	1	U	R.VTEQESKPVQMMYQIGLFR.V
373	160	-	182	1230,6628	2459,311	2459,3094	0,67	0	14	0,048	1	U	R.NVLQPSSVDSQTAMVLVNAIVFK.G
374	160	-	182	820,7781	2459,3124	2459,3094	1,21	0	26	0,0035	1	U	R.NVLQPSSVDSQTAMVLVNAIVFK.G

P02659 (APOV1_CHICK) [6 peptide matches \(6 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 187

Apovitelenin-1 OS=Gallus gallus PE=1 SV=1

Pokrivenost sekvence: 44%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid		
116	75	-	83	539,2884	1076,5623	1076,5614	0,8	0	36	0,0068	1	U	R.NFLINETAR.L
309	57	-	74	946,0187	1890,0229	1890,0211	0,94	0	84	1,30E-08	1	U	R.AGQFLLDVVSQTTVVSGIR.N
310	57	-	74	631,0151	1890,0234	1890,0211	1,22	0	36	0,00046	1	U	R.AGQFLLDVVSQTTVVSGIR.N
336	34	-	52	708,0346	2121,0819	2121,0782	1,76	0	38	0,00032	1	U	R.DWLVIPDAAAAYIYEA VNK.V
353	33	-	52	1139,5979	2277,1812	2277,1793	0,85	1	25	0,0044	1	U	R.RDWLVIPDAAAAYIYEA VNK.V
355	33	-	52	760,0684	2277,1835	2277,1793	1,84	1	56	6,30E-06	1	U	R.RDWLVIPDAAAAYIYEA VNK.V

P87498 (VIT1_CHICK) [8 peptide matches \(8 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 137

Vitelogenin-1 OS=Gallus gallus GN=VTG1 PE=1 SV=1

Pokrivenost sekvence: 5%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(cale)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
142	768	778	572,8385	1143,6624	1143,6612	1,12	0	31	0,0011	1	U R.LISLQQTGIGR.Q
147	831	840	579,8278	1157,641	1157,6404	0,53	0	32	0,0018	1	U R.LTELLNSNVR.L
163	135	145	606,8823	1211,75	1211,7489	0,91	0	50	2,40E-05	1	U R.GILNILELSLK.K
173	1874	1884	637,3492	1272,6839	1272,6826	1,01	0	26	0,0047	1	U K.ATAVSLLEWQR.S
209	365	377	480,6053	1438,794	1438,7932	0,53	0	23	0,0072	1	U R.YLLDLLPAAASHR.S
222	499	513	767,4203	1532,826	1532,8239	1,41	0	21	0,01	1	U K.FLPGYAAGASELPLK.V
298	1471	1486	921,0132	1840,0119	1840,0095	1,31	0	37	0,00033	1	U K.VDVQLVVVQLAETNWK.A
360	284	303	768,752	2303,2343	2303,2314	1,24	0	22	0,009	1	U R.GSLQYQFGSELLQLPVHLFK.I

P08250 (APOA1_CHICK) [2 peptide matches \(2 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 49

Apolipoprotein A-I OS=Gallus gallus GN=APOA1 PE=1 SV=2

Pokrivenost sekvence: 8%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(cale)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
161	252	261	603,343	1204,6714	1204,6703	0,94	0	43	0,00049	1	U R.LISFLDELQK.S
182	51	63	661,8338	1321,6531	1321,6514	1,31	0	24	0,0055	1	U K.DAIAQFESSAVGK.Q

P00698 (LYSC_CHICK) [1 peptide matches \(1 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 41

Lizozim C OS=Gallus gallus GN=LYZ PE=1 SV=1

Pokrivenost sekvence: 10%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(cale)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
276	64	79	877,4222	1752,8299	1752,8278	1,16	0	41	0,00015	1	U R.NTDGSTDYGYLQINSR.W

P11682 (APOB_CHICK) [1 peptide matches \(1 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 29

Apolipoprotein B (Fragment) OS=Gallus gallus GN=APOB PE=2 SV=1

Pokrivenost sekvence: 2%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(cale)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
83	50	58	493,2878	984,5611	984,5604	0,76	0	29	0,0038	1	U R.VPASETILR.G

P19121 (ALBU_CHICK) [1 peptide matches \(1 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 21

Serum albumin OS=Gallus gallus GN=ALB PE=1 SV=2

Pokrivenost sekvence: 1%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(cale)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
34	556	562	413,792	825,5695	825,5687	0,93	0	21	0,0088	1	U K.LLINLIK.R

ŽUMANCE + OKER (10M21)

P02845 (VIT2_CHICK)

[36 peptide matches \(36 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 985

Vitelogenin-2 OS=Gallus gallus GN=VTG2 PE=1 SV=1

Pokrivenost sekvence: 19%

	Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
	39	216	223	437,7191	873,4237	873,4232	0,52	0	18	0,02	1	U K.GTTAFSYK.L
	58	166	172	461,735	921,4553	921,4556	-0,25	0	29	0,046	1	U R.YVIQEDR.K
	64	919	927	479,7638	957,5131	957,5131	-0,0042	0	35	0,0097	1	U R.NIGELGVEK.R
	66	1453	1461	481,2695	960,5244	960,524	0,41	0	63	1,10E-05	1	U K.VSTELVTGR.F
	71	1515	1523	487,2786	972,5426	972,5426	-0,046	0	62	3,90E-06	1	U R.MVVVALTSR.T
	83	1771	1780	509,2823	1016,5501	1016,5502	-0,16	0	53	5,00E-05	1	U K.TVQLAGVDSK.C
	98	1543	1552	524,8292	1047,6438	1047,6441	-0,26	0	35	0,00097	1	U R.LPLSLPVGPR.I
	111	260	268	543,3194	1084,6243	1084,6241	0,25	0	45	0,00023	1	U R.QQLTLVEVR.S
	115	919	928	557,8143	1113,614	1113,6142	-0,19	1	45	0,00076	1	U R.NIGELGVEKR.T
	122	821	830	567,7841	1133,5537	1133,5539	-0,19	0	18	0,044	1	U K.MTPPLTGDFR.L
	135	633	641	582,7517	1163,4889	1163,4883	0,45	0	27	0,018	1	U R.ADTYFDNYR.V
	169	1472	1482	442,2508	1323,7305	1323,7299	0,44	1	22	0,0082	1	U K.LEWPKVPSNVR.S
	183	1540	1552	458,9575	1373,8508	1373,8507	0,072	1	24	0,0041	1	U K.AVRLPLSLPVGPR.I
	185	342	353	701,3605	1400,7064	1400,7048	1,19	0	88	5,20E-09	1	U R.IANADNLESIWR.Q
	190	831	842	473,594	1417,7601	1417,7599	0,17	0	19	0,016	1	U R.LSQLESTMQIR.S
	191	831	842	709,8876	1417,7606	1417,7599	0,49	0	29	0,002	1	U R.LSQLESTMQIR.S
	204	642	655	482,5966	1444,7679	1444,7674	0,28	0	25	0,0046	1	U R.VGATGEIFVVNSPR.T
	205	642	655	723,3915	1444,7684	1444,7674	0,7	0	94	3,20E-09	1	U R.VGATGEIFVVNSPR.T
	208	260	271	486,6071	1456,7995	1456,7998	-0,19	1	22	0,0088	1	U R.QQLTLVEVRSER.G
	209	1702	1714	729,4136	1456,8127	1456,8112	1,05	0	18	0,018	1	U K.TITIQVPLWMAGK.T
	210	733	745	729,9198	1457,825	1457,8242	0,54	0	72	5,50E-07	1	U K.ILGQEVAFININKE
	213	226	239	733,3607	1464,7069	1464,7056	0,86	0	42	0,002	1	U K.QSDSGTLITDVSSR.Q
	228	74	86	780,8761	1559,7377	1559,7368	0,56	0	67	8,70E-07	1	U R.SPQVEEYNGVWPR.D
	252	1006	1019	560,6213	1678,8421	1678,8427	-0,35	1	32	0,0014	1	U R.SRDASFIQNTYLHKL
	253	1006	1019	420,7184	1678,8443	1678,8427	0,98	1	14	0,046	1	U R.SRDASFIQNTYLHKL
	266	1638	1653	587,6296	1759,8671	1759,8676	-0,25	0	27	0,0027	1	U K.IGSHEIDMHPVNGQVK.L
	274	456	471	593,3078	1776,9015	1776,9006	0,54	0	42	0,0001	1	U K.EALQPIHDLADEAISR.G
	284	72	86	605,976	1814,9062	1814,9064	-0,077	1	47	4,10E-05	1	U K.VRSPQVEEYNGVWPR.D
	305	1393	1410	649,6815	1946,0226	1946,0222	0,22	1	85	1,00E-08	1	U K.TGGQLLVVYADTDSVRPR.V
	309	774	790	986,9887	1971,9629	1971,9625	0,18	0	69	1,50E-06	1	U R.NSIAGQWTQPVMGELR.Y
	310	774	790	658,3285	1971,9638	1971,9625	0,65	0	55	7,00E-06	1	U R.NSIAGQWTQPVMGELR.Y
	312	54	71	659,0424	1974,1054	1974,1037	0,87	1	43	0,00018	1	U R.LSSKLEISGLPENAYLLK.V
	324	29	45	1011,9648	2021,915	2021,9153	-0,1	0	91	3,00E-09	1	U R.SYLYNYEGSMLNGLQDR.S
	325	29	45	1012,4571	2022,8996	2022,8993	0,19	0	92	3,60E-09	1	U R.SYLYNYEGSMLNGLQDR.S + Deamidated (NQ)
	351	532	551	747,4151	2239,2235	2239,2212	1,02	0	35	0,0019	1	U K.TVQGYLIQLADQSLPPEVR.M
	352	713	732	748,7479	2243,2218	2243,2201	0,76	1	51	1,80E-05	1	U K.ALQGWKELPTETPLVSAYLK.I

P87498 (VIT1_CHICK) [15 peptide matches \(15 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 312

Vitelogenin-1 OS=Gallus gallus GN=VTG1 PE=1 SV=1

Pokrivenost sekvence: 10%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calce)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
56	263	270	457,2897	912,5648	912,5644	0,43	0	37	0,0018	1	U K.LALIEVQK.Q
65	919	927	480,7536	959,4927	959,4923	0,36	0	48	0,00054	1	U R.NIEDLAASK.M
126	768	778	572,838	1143,6614	1143,6612	0,18	0	63	2,50E-06	1	U R.LISSLQTGIGR.Q
128	1757	1766	574,8011	1147,5876	1147,5873	0,28	0	25	0,0046	1	U K.NVNFGEILK.V
147	135	145	606,8819	1211,7493	1211,7489	0,38	0	58	3,90E-06	1	U R.GILNILESLK.K
162	1874	1884	637,3488	1272,6831	1272,6826	0,35	0	54	5,90E-05	1	U K.ATAVSLLEWQR.S
164	1745	1756	426,2592	1275,7557	1275,7551	0,48	0	21	0,027	1	U K.TVIVEAPIHGLK.N
180	1591	1602	683,3802	1364,7458	1364,7452	0,42	0	21	0,011	1	U K.VPGVTLYYQGLR.V
184	54	66	462,2648	1383,7727	1383,7722	0,37	1	35	0,0039	1	U R.IRSEVEISGIGPK.L
202	365	377	480,6051	1438,7934	1438,7932	0,14	0	37	0,00032	1	U R.YLLDLLPAAASHR.S
246	1027	1040	547,285	1638,8332	1638,8327	0,28	1	44	0,00017	1	U R.MSFKPVYSDVPIEK.I
287	1471	1486	614,344	1840,0101	1840,0095	0,37	0	37	0,00031	1	U K.VDVQLVVVQLAETNWK.A
315	1432	1450	660,7143	1979,1212	1979,1204	0,38	0	25	0,0056	1	U R.NFLGDVIPPGITIVAQA.VR.S
359	72	91	755,7029	2264,0868	2264,0862	0,27	0	40	0,00049	1	U R.IHSIEAAEYNGIWPTSSFSR.S
366	284	303	768,7516	2303,233	2303,2314	0,68	0	24	0,0054	1	U R.GSLQYQFGSELLQLPVHLFK.I

P01012 (OVAL_CHICK) [4 peptide matches \(4 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 105

Ovalbumin OS=Gallus gallus GN=SERPINB14 PE=1 SV=2

Pokrivenost sekvence: 15%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calce)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
176	371	382	449,2509	1344,7307	1344,7303	0,35	0	14	0,044	1	U K.HIATNAVLFGR.C
225	188	200	519,2453	1554,714	1554,7137	0,18	1	22	0,0095	1	U K.AFKDEDTQAMPFR.V
295	144	159	930,4786	1858,9427	1858,9425	0,12	0	47	4,40E-05	1	U R.ELINSWVESQTNGIIR.N + Deamidated (NQ)
362	201	219	762,0542	2283,1407	2283,1391	0,7	1	66	6,00E-07	1	U R.VTEQESKPVQMMYQIGLFR.V

P08250 (APOA1_CHICK) [4 peptide matches \(4 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 76

Apolipoprotein A-I OS=Gallus gallus GN=APOA1 PE=1 SV=2

Pokrivenost sekvence: 17%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(calce)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
143	208	218	596,3041	1190,5936	1190,5931	0,41	0	34	0,0013	1	U K.GIPQASEYQAK.V
146	252	261	603,3426	1204,6707	1204,6703	0,29	0	56	3,40E-05	1	U R.LISFLDELQK.S
167	120	130	441,2471	1320,7193	1320,719	0,24	1	20	0,014	1	U K.IRPFLLDQFSAK.W
168	51	63	661,8333	1321,6521	1321,6514	0,56	0	22	0,025	1	U K.DAIAQFESSAVGK.Q

P02789 (TRFE_CHICK) [3 peptide matches \(3 non-duplicate, 0 duplicate\)](#) **Skor 55**

Ovotransferrin OS=Gallus gallus PE=1 SV=2

Pokrivenost sekvence: 5%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(cale)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
102	289	298	534,2541	1066,4937	1066,4931	0,52	0	26	0,0033	1	U K.AQSDFGVDTK.S
221	141	154	512,2879	1533,842	1533,8416	0,27	0	32	0,0011	1	U R.SAGWNIPIGTLHR.G
258	275	288	565,9457	1694,8154	1694,8152	0,14	1	25	0,0044	1	U R.DDNKVEDIWSFLSK.A

P02659 (APOV1_CHICK) [1 peptide matches \(1 non-duplicate, 0 duplicate\)](#) **Skor 41**

Apovitelenin-1 OS=Gallus gallus PE=1 SV=1

Pokrivenost sekvence: 8%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(cale)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
107	75	83	539,2881	1076,5616	1076,5614	0,2	0	41	0,0025	1	U R.NFLINETAR.L

P41366 (VMO1_CHICK) [1 peptide matches \(1 non-duplicate, 0 duplicate\)](#) **Skor 40**

Protein spoljašnjeg sloja vitelinske membrane 1 OS=Gallus gallus GN=VMO1 PE=1 SV=1

Pokrivenost sekvence: 4%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(cale)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
72	66	74	487,7485	973,4825	973,4829	-0,35	0	40	0,0029	1	U R.DDTALNGIR.L

P00698 (LYSC_CHICK) [1 peptide matches \(1 non-duplicate, 0 duplicate\)](#) **Skor 39**

Lizozim C OS=Gallus gallus GN=LYZ PE=1 SV=1

Pokrivenost sekvence: 6%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(cale)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
95	135	143	523,2749	1044,5351	1044,5352	-0,096	0	39	0,00094	1	U K.GTDVQAWIR.G

P19121 (ALBU_CHICK) [2 peptide matches \(2 non-duplicate, 0 duplicate\)](#) **Skor 34**

Serum albumin OS=Gallus gallus GN=ALB PE=1 SV=2


Pokrivenost sekvence: 2%

Broj	Start	End	Na eno	Mr(expt)	Mr(cale)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
28	556	562	413,7917	825,5689	825,5687	0,25	0	25	0,0035	1	U K.LLINLIK.R
36	254	261	432,727	863,4394	863,4389	0,6	0	28	0,019	1	U K.APFSEVSK.F


Rezultati dobijeni za uzorke pravoslavnih ikona

B4

P02465 (CO1A2_BOVIN) [1 peptide matches \(1 non-duplicate, 0 duplicate\)](#) **Skor 64**
 Kolagen alfa-2(I) lanac OS=Bos taurus GN=COL1A2 PE=1 SV=2
 Pokrivenost sekvence: 1%





Broj	Start	End	RT	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
 104	881	904	43.93-44.71	1066,062	2130,1084	2130,107	0,7	0	64	1,90E-05	1	U R.GLPGVAGSVGEPGPLGIAGPPGAR.G + 3 Oxidation (P)

P02453 (CO1A1_BOVIN) [1 peptide matches \(1 non-duplicate, 0 duplicate\)](#) **Skor 18**
 Kolagen alfa-1(I) lanac OS=Bos taurus GN=COL1A1 PE=1 SV=3
 Pokrivenost sekvence: 1%




Broj	Start	End	RT	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
 79	1152	1167	35.83-36.18	781,8958	1561,7771	1561,7737	2,24	0	18	0,019	1	U K.DGLNGLPGPIGPPGPR.G + Deamidated (NQ); 3 Oxidation (P)

B8

P02845 (VIT2_CHICK) [4 peptide matches \(4 non-duplicate, 0 duplicate\)](#) **Skor 81**
 Vitelogenin-2 OS=Gallus gallus GN=VTG2 PE=1 SV=1
 Pokrivenost sekvence: 2%

Broj	Start	End	RT	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
 44	1543	1552	45.97-46.42	524,8296	1047,6447	1047,6441	0,62	0	18	0,022	1	U R.LPLSLPVGPR.I
 48	260	268	38.06-38.18	543,3198	1084,6251	1084,6241	0,93	0	22	0,0081	1	U R.QQLTLVEVR.S
 71	342	353	49.24-49.58	701,3605	1400,7064	1400,7048	1,17	0	57	5,00E-06	1	U R.IANADNLESIWR.Q
 77	642	655	41.24-41.44	723,3919	1444,7693	1444,7674	1,29	0	28	0,0022	1	U R.VGATGEIFVVNSPR.T

P02465 (CO1A2_BOVIN) [2 peptide matches \(2 non-duplicate, 0 duplicate\)](#) **Skor 63**
 Kolagen alfa-2(I) lanac OS=Bos taurus GN=COL1A2 PE=1 SV=2
 Pokrivenost sekvence: 2%

Broj	Start	End	RT	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
 74	572	586	1.82-2.09	714,3692	1426,7238	1426,7205	2,31	0	19	0,028	1	U R.GIPGEFGLPGPAGAR.G + 2 Oxidation (P)
 113	463	484	40.75-42.35	686,0351	2055,0836	2055,0862	-1,3	1	20	0,018	1	U K.EGPVGLPGIDGRPGPIGAGAR.G + Oxidation (P)
 128	881	904	43.55-44.69	1066,059	2130,1042	2130,107	-1,3	0	65	1,40E-05	1	U R.GLPGVAGSVGEPGPLGIAGPPGAR.G + 3 Oxidation (P)

P02659 (APOV1_CHICK)

[2 peptide matches \(2 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 57

Apoviteletin-1 OS=Gallus gallus PE=1 SV=1

Pokrivenost sekvence: 16%

Broj	Start	End	RT	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
122	57	74	54,47	946,0188	1890,023	1890,0211	0,99	0	42	0,00011	1	U R.AGQFLLDVVSQTTVVSGIR.N
124	57	74	54.39-57.53	946,5107	1891,0068	1891,0051	0,92	0	29	0,0019	1	U R.AGQFLLDVVSQTTVVSGIR.N + Deamidated (NQ)

P02453 (CO1A1_BOVIN)

[1 peptide matches \(1 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 19

Kolagen alfa-1(I) lanac OS=Bos taurus GN=COL1A1 PE=1 SV=3

Pokrivenost sekvence: 1%

Broj	Start	End	RT	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
88	1066	1083	32.01-32.70	780,9111	1559,8077	1559,8056	1,33	0	19	0,018	1	U R.GETGPAGPAGPIGPVGAR.G

P04258 (CO3A1_BOVIN)

[1 peptide matches \(1 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 15

Kolagen alfa-1(III) lanac OS=Bos taurus GN=COL3A1 PE=1 SV=1

Pokrivenost sekvence: 1%

Broj	Start	End	RT	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
87	240	257	41.42-43.69	826,9238	1651,8331	1651,8352	-1,3	0	15	0,046	1	U K.GEMGPAGIPGAPGLIGAR.G + 2 Oxidation (P)

B15

P02465 (CO1A2_BOVIN)

[4 peptide matches \(4 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 66

Kolagen alfa-2(I) lanac OS=Bos taurus GN=COL1A2 PE=1 SV=2

Pokrivenost sekvence: 6%

Broj	Start	End	RT	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
69	572	586	38.48-40.12	714,3683	1426,722	1426,7205	1,09	0	29	0,015	1	U R.GIPGEFGLPGPAGAR.G + 2 Oxidation (P)
112	463	484	40.47-42.09	686,0364	2055,0875	2055,0862	0,67	1	17	0,036	1	U K.EGPVGLPGIDGRPGPIGPAGAR.G + Oxidation (P)
118	881	904	43.61-44.58	1066,062	2130,109	2130,107	0,98	0	57	9,80E-05	1	U R.GLPGVAGSVGEPGLGIAGPPGAR.G + 3 Oxidation (P)
125	281	307	42.98-43.64	1224,599	2447,1838	2447,1816	0,9	0	24	0,0055	1	U R.GEVGLPGLSGVPVPPGNPGANGLPGA.G + 2 Deamidated (NQ); Oxidation (K); 4 Oxidation (P)

P02453 (CO1A1_BOVIN)

[3 peptide matches \(3 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)

Skor 36

Kolagen alfa-1(I) lanac OS=Bos taurus GN=COL1A1 PE=1 SV=3

Pokrivenost sekvence: 2%

Broj	Start	End	RT	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
83	1066	1083	32.23-32.57	780,9109	1559,8072	1559,8056	1,03	0	26	0,0035	1	U R.GETGPAGPAGPIGPVGAR.G
87	397	414	31.36-31.97	793,8824	1585,7503	1585,7485	1,12	0	15	0,038	1	U K.GANGAPGIAGAPGFPGAR.G + Deamidated (NQ); 3 Oxidation (P)
109	1062	1083	30.76-31.24	659,3369	1974,9889	1974,9872	0,89	1	22	0,0088	1	U K.SGDRGETGPAGPAGPIGPVGAR.G

B16**P02465** (CO1A2_BOVIN) [2 peptide matches \(1 non-duplicate, 1 duplicate\)](#)**Skor 55**

Kolagen alfa-2(I) lanac OS=Bos taurus GN=COL1A2 PE=1 SV=2


Pokrivenost sekvence: 1%

Broj	Start	End	RT	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
 112	881	904	1.85-1.97	1066,059	2130,1042	2130,107	-1,3	0	27	0,007	1	U R.GLPGVAGSVGEPGLGIAGPPGAR.G + 3 Oxidation (P)
 113	881	904	43.54-44.87	1066,06	2130,1044	2130,107	-1,2	0	52	0,00029	1	U R.GLPGVAGSVGEPGLGIAGPPGAR.G + 3 Oxidation (P)

P02845 (VIT2_CHICK) [1 peptide matches \(1 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)**Skor 28**

Vitelogenin-2 OS=Gallus gallus GN=VTG2 PE=1 SV=1


Pokrivenost sekvence: 0%

Broj	Start	End	RT	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
 53	342	353	49.16-49.44	701,359	1400,7034	1400,7048	-1	0	28	0,0023	1	U R.IANADNLESIWR.Q

P02453 (CO1A1_BOVIN) [1 peptide matches \(1 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)**Skor 22**

Kolagen alfa-1(I) chain OS=Bos taurus GN=COL1A1 PE=1 SV=3


Pokrivenost sekvence: 1%

Broj	Start	End	RT	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
 68	1066	1083	32.14-32.72	780,909	1559,8034	1559,8056	-1,4	0	22	0,0096	1	U R.GETGPAGPAGPIGPVGAR.G

P02659 (APOV1_CHICK) [1 peptide matches \(1 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)**Skor 18**

Apovitelenin-1 OS=Gallus gallus PE=1 SV=1


Pokrivenost sekvence: 16%

Broj	Start	End	RT	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
 90	57	74	54.63-54.86	946,0166	1890,0186	1890,0211	-1,3	0	18	0,019	1	U R.AGQFLLDVVSQTTVVSGIR.N

B17**P02465** (CO1A2_BOVIN) [1 peptide matches \(1 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)**Skor 36**

Kolagen alfa-2(I) lanac OS=Bos taurus GN=COL1A2 PE=1 SV=2






Pokrivenost sekvence: 1%

Broj	Start	End	RT	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
 56	881	904	43.66-44.18	1066,059	2130,1042	2130,107	-1,3	0	36	0,0025	1	U R.GLPGVAGSVGEPGLGIAGPPGAR.G + 3 Oxidation (P)

II**P02465** (CO1A2_BOVIN) [4 peptide matches \(4 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)**Skor 88**

Kolagen alpha-2(I) chain OS=Bos taurus GN=COL1A2 PE=1 SV=2



Pokrivenost sekvence: 2%

	Broj	Start	End	RT	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
	52	572	586	38.74-40.17	714,3684	1426,7222	1426,7205	1,22	0	26	0,0054	1	U R.GIPGEFGLPGPAGAR.G + 2 Oxidation (P)
	94	881	904	45.64-45.95	1058,063	2114,1112	2114,112	-0,4	0	26	0,0071	1	U R.GLPGVAGSVGEPGLGIAGPPGAR.G + 2 Oxidation (P)
	95	881	904	1.82-2.37	1066,061	2130,1078	2130,107	0,42	0	30	0,0028	1	U R.GLPGVAGSVGEPGLGIAGPPGAR.G + 3 Oxidation (P)
	96	881	904	43.28-44.78	1066,062	2130,1088	2130,107	0,88	0	65	1,50E-05	1	U R.GLPGVAGSVGEPGLGIAGPPGAR.G + 3 Oxidation (P)

P02453 (CO1A1_BOVIN) [1 peptide matches \(1 non-duplicate, 0 duplicate\)](#)**Skor 17**

Kolagen alpha-1(I) lanac OS=Bos taurus GN=COL1A1 PE=1 SV=3

Pokrivenost sekvence: 1%

	Broj	Start	End	RT	Na eno	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Skor	Verovatno a	Rank	U Peptid
	80	1062	1083	30.76-31.14	659,3369	1974,989	1974,9872	0,92	1	17	0,027	1	U K.SGDRGETGPAGPAGPIGPVGAR.G

Pore enje rezultata dobijenih primenom dve tehnike masene spektrometrije

REFERENTNI MATERIJALI

Uzorak	Protein	Pristupni broj	ESI-MS/MS			MALDI-TOF/PSD			Ukupno sekvenci	Broj zajedni kih peptida
			Skor	Pokrivenost sekvence	Broj sekvenci	Skor	Pokrivenost sekvence	Broj sekvenci		
Gove e koštano tutkalo (63000)	Kolagen alfa-1(I) lanac Bos taurus	P02453 (CO1A1_BOVIN)	797	32%	35	96	5%	4	37	2
	Kolagen alfa-2(I) lanac Bos taurus	P02465 (CO1A2_BOVIN)	494	23%	24	178	6%	4	25	3
	Kolagen alfa-2(I) lanac Canis familiaris	O46392 (CO1A2_CANFA)				209	4%	3	3	
	Kolagen alfa-1(III) lanac Mus musculus	P08121 (CO3A1_MOUSE)				49	2%	2	2	
	Kolagen alfa-1(II) lanac Bos taurus	P02459 (CO2A1_BOVIN)				32	1%	1	1	
Gove e kožno tutkalo (63010)	Kolagen alfa-1(I) lanac Bos taurus	P02453 (CO1A1_BOVIN)	743	31%	37	137	6%	10	41	6
	Kolagen alfa-2(I) lanac Bos taurus	P02465 (CO1A2_BOVIN)	672	29%	27	323	12%	11	32	6
	Kolagen alfa-1(III) lanac Bos taurus	P04258 (CO3A1_BOVIN)	304	19%	15				15	
	Kolagen alfa-2(I) lanac (Fragment) Oryctolagus cuniculus	Q28668 (CO1A2_RABIT)				38	8%	2	2	
Ze ije kožno tutkalo, sirovo (63028)	Kolagen alfa-1(I) lanac Bos taurus	P02453 (CO1A1_BOVIN)	715	33%	37				37	
	Kolagen alfa-2(I) lanac Bos taurus	P02465 (CO1A2_BOVIN)	488	24%	28	216	4%	3	28	3
	Kolagen alfa-1(III) lanac Bos taurus	P04258 (CO3A1_BOVIN)	129	9%	10				10	
	Kolagen alfa-2(I) lanac (Fragment) Oryctolagus cuniculus	Q28668 (CO1A2_RABIT)	37	6%	2				2	
	Kolagen alfa-2(I) lanac (Fragment) Gallus Gallus	Q28668 (CO1A2_CHICK)				37	2%	1	1	

Ze ije kožno tutkalo, pre iš eno (63025)	Kolagen alfa-1(I) lanac Bos taurus	P02453 (CO1A1_BOVIN)	796	29%	36	38	2%	1	37	
	Kolagen alfa-2(I) lanac Bos taurus	P02465 (CO1A2_BOVIN)	693	31%	29	233	7%	6	30	5
	Kolagen alfa-1(III) lanac Bos taurus	P04258 (CO3A1_BOVIN)	285	16%	12				12	
	Kolagen alfa-1(III) lanac Mus Musculus	P08121 (CO3A1_MOUSE)				35	3%	2	2	
Salianski isinglass (63110)	Kolagen alfa-1(I) lanac Cynops pyrrhogaster	Q9YIB4 (CO1A1_CYNPY)	192	3%	4	103	2%	2	5	1
	Kolagen alfa-1(I) lanac Mus musculus	P11087 (CO1A1_MOUSE)	161	3%	4				4	
	Kolagen alfa-2(I) lanac Oncorhynchus mykiss	O93484 (CO1A2_ONCMY)	61	1%	3	51	2%	2	4	1
	Kolagen alfa-1(II) lanac Bos taurus	P02459 (CO2A1_BOVIN)	57	1%	3	12	1%	1	4	
	Kolagen alfa-1(I) lanac Bos taurus	P02453 (CO1A1_BOVIN)				64	1%	1	1	1
	Kolagen alfa-1(II) lanac Homo sapiens	P02458 (CO2A1_HUMAN)				50	1%	1	1	1
Tehni ki želatin, svinjski (63040)	Kolagen alfa-1(I) lanac Bos taurus	P02453 (CO1A1_BOVIN)	500	19%	25	37	4%	2	27	
	Kolagen alfa-2(I) lanac Canis familiaris	O46392 (CO1A2_CANFA)	358	16%	17	193	3%	2	19	
	Kolagen alfa-1(III) lanac Bos taurus	P04258 (CO3A1_BOVIN)	81	4%	4				4	
	Kolagen alfa-2(I) lanac Bos taurus	P02465 (CO1A2_BOVIN)				34	4%	2	2	
Belance	Ovalbumin Gallus gallus	P01012 (OVAL_CHICK)	893	65%	23	961	45%	16	28	11
	Ovotransferin Gallus gallus	P02789 (TRFE_CHICK)	635	48%	32	177	18%	8	35	5
	Lizozim Gallus gallus	P00698 (LYSC_CHICK)	277	48%	8				8	
	Ovalbumin-related protein Y Gallus gallus	P01014 (OVALY_CHICK)	215	15%	7				7	
	Protein TENP Gallus gallus	O42273 (TENP_CHICK)	178	21%	4				4	

	Ovomukoid Gallus gallus	P01005 (IOVO_CHICK)	114	29%	4				4	
	Ovalbumin-related protein X (Fragment) Gallus gallus	P01013 (OVALX_CHICK)	68	16%	4				4	
Žumance	Vitelogenin-2 Gallus gallus	P02845 (VIT2_CHICK)	871	28%	48	305	10%	15	53	10
	Vitelogenin-1 Gallus gallus	P87498 (VIT1_CHICK)	467	14%	23				23	
	Ovalbumin Gallus gallus	P01012 (OVAL_CHICK)	339	40%	10	74	11%	3	10	3
	Apovitelenin-1 Gallus gallus	P02659 (APOV1_CHICK)	287	51%	5	88	44%	3	5	3
	Apolipoprotein A-I Gallus gallus	P08250 (APOA1_CHICK)	147	26%	7				7	
	Serum albumin Gallus gallus	P19121 (ALBU_CHICK)	115	13%	8				8	
	Apolipoprotein B (Fragment) Gallus gallus	P11682 (APOB_CHICK)	64	4%	2				2	
	Protein 1 spoljašnjeg sloja vitelnske membrane Gallus gallus	P41366 (VMO1_CHICK)	63	4%	2				2	
	Lizozim Gallus gallus	P00698 (LYSC_CHICK)				75	14%	2	2	
	Mladi kravlji sir	Beta-laktoglobulin Bos taurus	P02754 (LACB_BOVIN)	253	46%	9	205	26%	3	10
Alfa-S1-kazein Bos taurus		P02662 (CASA1_BOVIN)	136	32%	5	433	43%	7	8	4
Alfa-S2-kazein Bos taurus		P02663 (CASA2_BOVIN)	108	30%	7	93	18%	4	7	4
Kapa-kazein Bos taurus		P02668 (CASK_BOVIN)	98	35%	5	41	5%	1	5	1
Beta-kazein Bos taurus		P02666 (CASB_BOVIN)	81	18%	3	63	12%	2	3	2
Alfa-laktalbumin Bos taurus		P00711 (LALBA_BOVIN)	53	13%	2				2	
Serum albumin Bos taurus		P02769 (ALBU_BOVIN)	37	3%	2				2	

Kazein u prahu	Alfa-S1-kazein Bos taurus	P02662 (CASA1_BOVIN)	245	42%	12	463	46%	7	14	5
	Alfa-S2-kazein Bos taurus	P02663 (CASA2_BOVIN)	236	28%	10	23	3%	1	11	
	Kapa-kazein Bos taurus	P02668 (CASK_BOVIN)	217	43%	6				6	
	Beta-laktoglobulin Bos taurus	P02754 (LACB_BOVIN)	126	32%	5				5	
	Beta-kazein Bos taurus	P02666 (CASB_BOVIN)	83	13%	3	124	8%	1	4	
	Alfa-laktalbumin Bos taurus	P00711 (LALBA_BOVIN)	26	6%	1				1	

609

136

668

79

MODEL UZORCI

Uzorak	Protein	Pristupni broj	ESI-MS/MS			MALDI-TOF/PSD			Ukupno sekvenci	Broj zajedni kih peptida
			Skor	Pokrivenost sekvence	Broj sekvenci	Skor	Pokrivenost sekvence	Broj sekvenci		
Ze ije kožno tutkalo + ZnO (3M11)	Kolagen alfa-2(I) lanac Bos taurus	P02465 (CO1A2_BOVIN)	481	18%	14	144	6%	4	15	3
	Kolagen alfa-1(I) lanac Bos taurus	P02453 (CO1A1_BOVIN)	359	16%	16				16	
	Kolagen alfa-1(III) lanac Bos taurus	P04258 (CO3A1_BOVIN)	229	5%	6				6	
	Kolagen alfa-2(I) lanac (Fragmenti) Gallus Gallus	P02467 (CO1A2_CHICK)				37	3%	2	2	
Ze ije kožno tutkalo + Fe2O3 (3M21)	Kolagen alfa-2(I) lanac Bos taurus	P02465 (CO1A2_BOVIN)	564	28%	22	163	6%	4	22	4
	Kolagen alfa-1(I) lanac Bos taurus	P02453 (CO1A1_BOVIN)	413	22%	23	53	4%	3	23	3
	Kolagen alfa-1(III) lanac Bos taurus	P04258 (CO3A1_BOVIN)	159	7%	6				6	
	Kolagen alfa-2(I) lanac (Fragmenti) Gallus Gallus	P02467 (CO1A2_CHICK)				43	3%	2	2	
	Beta-kazein Bos taurus	P02666 (CASB_BOVIN)	240	18%	3	57	14%	3	4	2
	Beta-laktoglobulin Bos taurus	P02754 (LACB_BOVIN)	233	33%	7	39	10%	2	8	1

Mladi sir + ZnO (7M11)	Alfa-S1-kazein Bos taurus	P02662 (CASA1_BOVIN)	154	17%	4	595	41%	7	7	4
	Alfa-S2-kazein Bos taurus	P02663 (CASA2_BOVIN)	81	18%	4	64	8%	2	4	2
	Kapa-kazein Bos taurus	P02668 (CASK_BOVIN)	59	20%	3	33	5%	1	3	1
	Serum albumin Bos taurus	P02769 (ALBU_BOVIN)	43	3%	2				2	
Mladi sir + Fe2O3 (7M21)	Alfa-S1-kazein Bos taurus	P02662 (CASA1_BOVIN)	355	46%	11	412	36%	6	11	6
	Beta-laktoglobulin Bos taurus	P02754 (LACB_BOVIN)	281	24%	5				5	
	Alfa-S2-kazein Bos taurus	P02663 (CASA2_BOVIN)	129	19%	5	21	4%	1	5	1
	Serum albumin Bos taurus	P02769 (ALBU_BOVIN)	69	2%	1				1	
	Beta-kazein Bos taurus	P02666 (CASB_BOVIN)	55	11%	2				2	
	Kapa-kazein Bos taurus	P02668 (CASK_BOVIN)	37	9%	2	33	5%	1	2	1
Belance + ZnO (9M11)	Ovalbumin Gallus gallus	P01012 (OVAL_CHICK)	619	43%	14	584	33%	9	15	8
	Ovotransferin Gallus gallus	P02789 (TRFE_CHICK)	85	14%	8				8	
	Ovalbumin-related protein Y Gallus gallus	P01014 (OVALY_CHICK)	55	10%	4				4	
	Ovalbumin-related protein X (Fragment) Gallus gallus	P01013 (OVALX_CHICK)	18	4%	1				1	
Belance + Fe2O3 (9M21)	Ovalbumin Gallus gallus	P01012 (OVAL_CHICK)	596	33%	13	490	26%	9	14	8
	Ovotransferin Gallus gallus	P02789 (TRFE_CHICK)	91	9%	6	38	4%	2	7	1
	Ovalbumin-related protein Y Gallus gallus	P01014 (OVALY_CHICK)	86	13%	5				5	
	Protein TENP Gallus gallus	O42273 (TENP_CHICK)	62	4%	1				1	
	Lizozim Gallus gallus	P00698 (LYSC_CHICK)				21	8%	1	1	

Žumance + ZnO (10M11)	Vitelogenin-2 Gallus gallus	P02845 (VIT2_CHICK)	571	15%	22	149	3%	5	24	3
	Ovalbumin Gallus gallus	P01012 (OVAL_CHICK)	191	28%	6	86	8%	2	6	2
	Apovitelenin-1 Gallus gallus	P02659 (APOV1_CHICK)	187	44%	4	78	25%	2	4	2
	Vitelogenin-1 Gallus gallus	P87498 (VIT1_CHICK)	137	5%	8				8	
	Apolipoprotein A-I Gallus gallus	P08250 (APOA1_CHICK)	49	8%	2				2	
	Lizozim Gallus gallus	P00698 (LYSC_CHICK)	41	10%	1				1	
	Apolipoprotein B (Fragment) Gallus gallus	P11682 (APOB_CHICK)	29	2%	1				1	
	Serum albumin Gallus gallus	P19121 (ALBU_CHICK)	21	1%	1				1	
	Žumance + Fe2O3 (10M21)	Vitelogenin-2 Gallus gallus	P02845 (VIT2_CHICK)	985	19%	32	247	6%	10	35
Vitelogenin-1 Gallus gallus		P87498 (VIT1_CHICK)	312	10%	15				15	
Ovalbumin Gallus gallus		P01012 (OVAL_CHICK)	105	15%	4	91	8%	2	5	1
Apolipoprotein A-I Gallus gallus		P08250 (APOA1_CHICK)	76	17%	4				4	
Ovotransferin Gallus gallus		P02789 (TRFE_CHICK)	55	5%	3				3	
Apovitelenin-1 Gallus gallus		P02659 (APOV1_CHICK)	41	8%	1	60	25%	2	2	1
Protein 1 spoljašnjeg sloja vitelinske membrane Gallus gallus		P41366 (VMO1_CHICK)	40	4%	1				1	
Lizozim Gallus gallus		P00698 (LYSC_CHICK)	39	6%	1				1	
Serum albumin Gallus gallus		P19121 (ALBU_CHICK)	34	2%	2				2	

296

82

317

61

UZORCI PRAVOSLAVNIH IKONA

Uzorak	Protein	Pristupni broj	ESI-MS/MS			MALDI-TOF/PSD			Ukupno sekvenci	Broj zajedni kih peptida
			Skor	Pokrivenost sekvence	Broj sekvenci	Skor	Pokrivenost sekvence	Broj sekvenci		
B4	Kolagen alfa-2(I) lanac Bos taurus	P02465 (CO1A2_BOVIN)	64	1%	1	23	3%	2	3	
	Kolagen alfa-1(I) lanac Bos taurus	P02453 (CO1A1_BOVIN)	18	1%	1	24	2%	2	3	
B8	Vitelogenin-2 Gallus gallus	P02845 (VIT2_CHICK)	81	2%	4				4	
	Apovitelenin-1 Gallus gallus	P02659 (APOV1_CHICK)	57	16%	2				2	
	Kolagen alfa-2(I) lanac Bos taurus	P02465 (CO1A2_BOVIN)	63	3%	3	42	3%	2	2	2
	Kolagen alfa-1(I) lanac Bos taurus	P02453 (CO1A1_BOVIN)	19	1%	1	16	1%	1	2	
	Kolagen alfa-1(III) lanac Bos taurus	P04258 (CO3A1_BOVIN)	15	1%	1				1	
	Kolagen alfa-2(I) lanac Canis Familiaris	O46392 (CO1A2_CANFA)				24	3%	2	2	
B15	Kolagen alfa-2(I) lanac Bos taurus	P02465 (CO1A2_BOVIN)	66	6%	4	25	3%	2	5	1
	Kolagen alfa-1(I) lanac Bos taurus	P02453 (CO1A1_BOVIN)	36	2%	3	24	1%	1	4	
B16	Kolagen alfa-2(I) lanac Bos taurus	P02465 (CO1A2_BOVIN)	55	1%	1	20	2%	1	1	1
	Vitelogenin-2 Gallus gallus	P02845 (VIT2_CHICK)	28	0%	1				1	
	Kolagen alfa-1(I) lanac Bos taurus	P02453 (CO1A1_BOVIN)	22	1%	1	69	4%	4	5	
	Apovitelenin-1 Gallus gallus	P02659 (APOV1_CHICK)	18	16%	1				1	
B17	Kolagen alfa-2(I) lanac Bos taurus	P02465 (CO1A2_BOVIN)	36	1%	1	15	1%	1	2	
II	Kolagen alfa-2(I) lanac Bos taurus	P02465 (CO1A2_BOVIN)	88	2%	3	23	1%	1	3	1
	Kolagen alfa-1(I) lanac Bos taurus	P02453 (CO1A1_BOVIN)	17	1%	1	12	1%	1	2	

BIOGRAFIJA

Tatjana Tripković je rođena 20. jula 1974. godine u Kraljevu, Republika Srbija, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 1993. godine. Diplomirala je 1999. godine sa prosečnom ocenom 7,80 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Poslediplomske studije na Katedri za analitičku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu upisala je 2008. godine. Master tezu pod naslovom “Određivanje sadržaja metala u pigmentima elektrotermalnom tehnikom atomske apsorpcije” odbranila je 14. septembra 2010. godine i tako stekla zvanje mastera hemijskih nauka sa ukupnom prosečnom ocenom 8,06.

Od aprila 2005. godine je zaposlena u Republičkom zavodu za zaštitu spomenika kulture – Beograd, prvo kao stručni saradnik, a od maja 2014. godine u zvanju savetnika. Pre toga, radila je u Specijalističkom veterinarskom institutu u Kraljevu i MOL, d.o.o. u Beogradu.

Provela je letnji semestar školske 2010/2011. godine u Laboratoriji za strukturnu organsku hemiju i biohemiju Univerziteta Pjer i Marija Kiri u Parizu (Laboratoire de Chimie Biologique Organique et Structurale, Institut Parisien de Chimie Moléculaire UPMC Paris Universitas, UMR-CNRS 7201) gde se bavila primenom masene spektrometrije u analizi proteinskih veziva u umetničkim delima.

Pohađala je, između ostalog, Četvrtu Internacionalnu školu masene spektrometrije na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Nišu, od 25-29. januara 2010. godine. kao i Petu Internacionalnu školu masene spektrometrije koja je održana od 5-9. jula 2010. godine na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Nišu.

Tatjana Tripković je koautor 6 naučnih radova objavljenih u međunarodnim časopisima i 3 naučna saopštenja na međunarodnim konferencijama štampanim u izvodu.

BIBLIOGRAFIJA

M 21 - Radovi objavljeni u istaknutim časopisima međunarodnog značaja:

1. **Tatjana Tripković**, Claude Charvy, Sandra Alves, Aleksandar Lolić, Rada Baošić, Snežana Nikolić-Mandić, Jean-Claude Tabet, Identification of protein binders in artworks by MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometry, *Talanta* **113** (2013) 49-61, DOI: 10.1016/j.talanta.2013.03.071

M 22 - Radovi objavljeni u istaknutim časopisima međunarodnog značaja:

1. Najat Aburas, Aleksandar Lolić, Nikola Stevanović, **Tatjana Tripković**, Snežana Nikolić-Mandić, Rada Baošić, Electrochemical behavior and antioxidant activity of tetradentate Schiff bases and their copper(II) complexes, *Journal of the Iranian Chemical Society*, **9(6)** (2012) 859-64, DOI: 10.1007/s13738-012-0102-7

M 23 - Radovi objavljeni u časopisima međunarodnog značaja:

1. **Tatjana Tripković**, Claude Charvy, Sandra Alves, Aleksandar Lolić, Rada Baošić, Snežana Nikolić-Mandić, Jean-Claude Tabet, ESI-LTQ-Orbitrap in analysis of old tempera paintings: Application to 19th century Orthodox icons, *European Journal of Mass Spectrometry*, **21(4)** (2015). 679 – 692, DOI: 10.1255/ejms.1346
2. Vesna Dragutinović, Svetislav Tatić, Snežana Nikolić-Mandić, **Tatjana Tripković**, Duško Dunderović, Ivan Paunović, Copper as Ancillary Diagnostic Tool in Preoperative Evaluation of Possible Papillary Thyroid Carcinoma in Patients with Benign Thyroid Disease, *Biological Trace Element Research* **160(3)** (2014) 311-15; DOI: 10.1007/s12011-014-0071-z

3. Aleksandar Lolić, **Tatjana Tripković**, Rada Baošić, Snežana Nikolić-Mandić, Bojana Stanimirović, Development of a flow injection method with amperometric detection for the indirect determination of copper in drinking water samples, *Journal of the Serbian Chemical Society* **77(11)** (2012) 1641-47, DOI: 10.2298/JSC120616090L
4. Rada Baošić, Ana Radojević, **Tatjana Tripković**, Najat Aburas, Živoslav Tešić, RP-TLC Quantitative Retention-Property Relationships Studies of Some Schiff Base Ligands and Their Complexes, *Chromatographia* **72** (2010) 545-49, DOI:10.1365/s10337-010-1664-0

M 34 – Radovi saopšteni na skupu međunarodnog značaja štampani u izvodu:

1. **Tatjana Tripković**, Snežana Nikolić-Mandić, Predrag Polić, Aleksandar Lolić, Determination of the heavy metals (Zn, Pb and Cd) in soil, plant material and river water samples by FAAS, 2nd International Conference of the Chemical Societies of the South-Eastern European Countries, Halkidiki, Greece, June 6-9 2000, Abstracts, Vol. I, PO072 (M34)
2. **Tatjana Tripković**, Claude Charvy, Sandra Alves, Aleksandar Lolić, Rada Baošić, Snežana Nikolić-Mandić, Identification of protein binders in artist's paints by matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, EUROanalysis 16, Belgrade, September 11-15 2011, Book of Abstracts, Session B, AH14 (M34)
3. Aleksandar Vatazević, **Tatjana Tripković**, Aleksandar Lolić, Snežana Nikolić-Mandić, Minja Savić, Chemical analysis of mortars from the archaeological site Felix Romuliana in Eastern Serbia, 8th Aegean Analytical Chemistry Days, Izmir, Turkey, 16-20 September 2012, P3-09 (M34)

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора **Татјана Трипковић**

Број индекса **13/2010**

Изјављујем

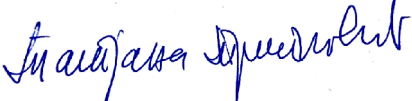
да је докторска дисертација под насловом

Анализа протеинских везива у уметничким делима методама масене спектрометрије

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 23.02.2017.



Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Татјана Трипковић**

Број индекса **13/2010**

Студијски програм **Доктор хемијских наука**

Наслов рада **Анализа протеинских везива у уметничким делима методама
масене спектрометрије**

Ментор **др Снежана Николић Мандић и др Рада Баошић**

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 23.02.2017.



Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Анализа протеинских везива у уметничким делима методама масене спектрометрије

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

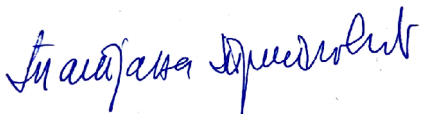
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 23.02.2017.



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.