



2001-2003

תקופת המחקר:

417-0433-03

קוד מחקר:

Subject: REDUCTION OF CHEMICAL USED IN
STORED GRAINS CONTROL OF STORAGE INSECTS
WITH BACTERIA ISOLATED FROM TRIBOLIUM
CASTENEUM

Principal investigator: PASTER NACHMAN

Cooperative investigator: MAZAL MENASHEROV, ADA
RAFAELI, NATAN GOLLOP

Institute: Agricultural Research Organization (A.R.O)

שם המחקר: הפחתת השימוש בכימיקלים
בגרעינים מאוסמים: הדברת חרקי מחסן בעזרת
חיידק אשר בודד מחיפושית הקמה
(TRIBOLIUM CASTENEUM)

חוקר ראשי: נחמן פסטר

חוקרים שותפים: מזל מנשרוב, עדה רפאלי,
נתן גולופ

מוסד: מינהל המחקר החקלאי, ת.ד. 6 בית דגן
50250

תקציר

המחקר התמקד בבידוד חיידקים מחרק המחסן הנפוץ חיפושית הקמה [Tribolium castaneum] (ח"ק)) וזאת במטרה לזהות חיידק אשר יהיה פתוגני לחרק. מתוך סך החיידקים אשר בודדו, נמצא כי רק חיידק אחד אשר בודד מגידול מעורב של בוגרי ח"ק (לאחר חיטוי חיצוני) היה פעיל כנגד בוגרים של אותם החרקים והביא לתמותתם המלאה כאשר ניתן בתרבית נוזלית על גבי נייר סינון או בערבוב עם גרעיני חיטה גרוסים. תרבית החיידק היתה יעילה גם בקטילת חרקי מחסן נוספים: Sitophilus oryze, Oryzaephilus surinamensis, Rhizopertha dominica. בהמשך, התמקדו הניסויים באיפיון חומר פעיל אפשרי הגורם לתמותת הבוגרים. לשם כך, סורכזה תרבית החיידק ונבדקה פעילות המקטע העליון (תסנין) והמקטע אשר שקע (והורחף מחדש = תרחיף). נמצא כי הפעילות כנגד בוגרי החרק נשמרה רק בתסנין והיתה זהה לזו אשר נרשמה בתרבית. פעילות התרבית והתסנין הוכחה גם לאחר שאלו עברו חימום ואוטוקלב. הופעלו שיטות לזהוי מרכיבים אנאורגניים וזהוי פפטידים, בניסיון לאפיין את מרכיבי התסנין אשר התקבל לאחר סירכוז תרבית החיידק. זיהוי מרכיבים אנאורגניים לא חלבוניים נעשה לאחר מיצוי בסולוונטים אורגניים (הקסן, כלורופורם או דיכלורומתן) וקריאה בספקטופוטומטר באורכי גל 200 עד 500 נ"מ. במקביל נבחנה הפעילות הביולוגית של החומרים הממצים. בבדיקת עקומת הסריקה של חומרי המיצוי, לא נמצאו כל שיאים (Peak) אשר יעידו על המצאות מרכיבים אנאורגניים פעילים במיצויים. ברם, למיצויים היתה פעילות ביולוגית המעידה כי יתכן ומוצו מרכיבים פעילים ביולוגית בסולוונטים האמורים. זהוי פוליפפטידים פעילים נעשה לאחר השקעת התסנין באמוניום סולפט בגרדיאנט של עד 30%. נמצא פוליפפטיד לאחר השקעה ב-30% אשר הופיע במקביל לפעילותו של התסנין כנגד החרקים. בוצע אפיון הפפטיד. ניתן לסכם ולומר – יש בידנו תכשיר ביולוגי בעל פעילות כנגד חרקי מחסן נבדקים. פעילות החומר מתרכזת בפפטיד אשר אובחן ע"י PAGE-SDS אחרי השקעה ב-30% אמוניום סולפט. יש להמשיך לאפיין פפטיד זה.

הפחתת השימוש בכימיקלים בגרעינים מאוסמים : הדברת חרקי מחסן בעזרת

חיידק אשר בודד מחיפושית הקמח (*Tribolium castaneum*)

Reduction of chemicals in stored grains: Control of storage insects with
bacteria isolated from *Tribolium castaneum*

מוגש לקרן המדע הראשי במשרד החקלאות

ע"י

נחמן פסטר	המחלקה לאיסוס, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן
מזל מנשרוב	" " "
עדה רפאלי	" " "
נתן גולופ	המחלקה למדעי המזון

Nachman Paster, Stored Products, ARO, The Volcani Center, P.O.B. 6, Bet Dagan
50250. E mail: namipaster@yahoo.com

Mazal Menasherov, Stored Products, ARO, The Volcani Center, P.O.B. 6, Bet Dagan
50250. E mail: mazalm@yahoo.com

Ada Refaeli, Stored Products, ARO, The Volcani Center, P.O.B. 6, Bet Dagan 50250.
E mail: vtada@volcani.agri.gov.il

Natan Gollop, Food Science, ARO, The Volcani Center, P.O.B. 6, Bet Dagan 50250.
E mail: ngollop@netvision.net.il

May 2004

סיון תשס"ד

האם הנך מאשר את ציון הפסקה הבאה בדף הפתיחה לדו"ח כן/לא מחקר את המיותר*
הממצאים בדו"ח זה הנם תוצאות ניסויים ואינם מהווים המלצות לחקלאית

* חתימת החוקר

הפחתת השימוש בכימיקלים בגרעינים מאוסמים : הדברת חרקי מחסן בעזרת

חיידק אשר בודד מחיפושית הקמח (*Tribolium castaneum*)

Reduction of chemicals in stored grains: Control of storage insects with
bacteria isolated from *Tribolium castaneum*

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

נחמן פסטר	המחלקה לאיסוס, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן
מזל מנשרוב	" " "
עדה רפאלי	" " "
נתן גולופ	המחלקה למדעי המזון " "

תקציר:

המחקר התמקד בבידוד חיידקים מחרק המחסן הנפוץ חיפושית הקמח [*Tribolium castaneum*] (ח"ק)) וזאת במטרה לזהות חיידק אשר יהיה פתוגני לחרק. מתוך סך החיידקים אשר בודדו, נמצא כי רק חיידק אחד אשר בודד מגידול מעורב של בוגרי ח"ק (לאחר חיטוי חיצוני) היה פעיל כנגד בוגרים של אותם החרקים והביא לתמותתם המלאה כאשר ניתן בתרבות נוזלית על גבי נייר סינון או בערבוב עם גרעיני חיטה גרוסים. תרבות החיידק היתה יעילה גם בקטילת חרקי מחסן נוספים: *Sitophilus oryzae*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Rhizopertha dominica*. בהמשך, התמקדו הניסויים באיפיון חומר פעיל אפשרי הגורם לתמותת הבוגרים. לשם כך, סורכזה תרבות החיידק ונבדקה פעילות המקטע העליון (תסנין) והמקטע אשר שקע (והורחף מחדש = תרחיף). נמצא כי הפעילות כנגד בוגרי החרק נשמרה רק בתסנין והיתה זהה לזו אשר נרשמה בתרבות. פעילות התרבות והתסנין הוכחה גם לאחר שאלו עברו חימום ואוטוקלב.

הופעלו שיטות לזהוי מרכיבים אנאורגניים וזהוי פפטידים, בניסיון לאפיין את מרכיבי התסנין אשר התקבל לאחר סירכוז תרבות החיידק. זיהוי מרכיבים אנאורגניים לא חלבוניים נעשה לאחר מיצוי בסולוונטים אורגניים (הקסן, כלורופורם או דיכלורומתן) וקריאה בספקטופוטומטר באורכי גל 200 עד 500 נ"מ. במקביל נבחנו הפעילות הביולוגית של החומרים הממצים. בבדיקת עקומת הסריקה של חומרי המיצוי, לא נמצאו כל שיאים (Peak) אשר יעידו על המצאות מרכיבים אנאורגניים פעילים במיצויים. ברם, למיצויים היתה פעילות ביולוגית המעידה כי יתכן ומוצו מרכיבים פעילים ביולוגית בסולוונטים האמורים.

זהוי פוליפפטידים פעילים נעשה לאחר השקעת התסנין באמוניום סולפט בגרדיאנט של עד 30%. נמצא פוליפפטיד לאחר השקעה ב-30% אשר הופיע במקביל לפעילותו של התסנין כנגד החרקים. בוצע אפיון הפפטיד.

ניתן לסכם ולאמר – יש בידנו תכשיר ביולוגי בעל פעילות כנגד חרקי מחסן נבדקים. פעילות החומר מתרכזת בפפטיד אשר אובחן ע"י PAGE-SDS אחרי השקעה ב-30% אמוניום סולפט. יש להמשיך לאפיין פפטיד זה.

רשימת פרסומים: טרם ראו אור

הפחתת השימוש בכימיקלים בגרעינים מאוסמים: הדברת חרקי מחסן בעזרת

חיידק אשר בודד מחיפושית הקמח (*Tribolium castaneum*)

Reduction of chemicals in stored grains: Control of storage insects with
bacteria isolated from *Tribolium castaneum*

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

נחמן פסטר	המחלקה לאיסוס, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן
מזל מנשרוב	" " "
עדה רפאלי	" " "
נתן גולופ	המחלקה למדעי המזון " "

מבוא:

הנוק הנגרם לגרעינים מאוסמים כתוצאה מנוקי חרקים מגיע עד לכדי 50% בארצות מתפתחות והנוק הכלכלי, כמו גם התברואתי, בשל כך הוא גבוה. הדברת המזיקים נעשית כיום בעיקר ע"י שימוש במתיל ברומיד אולם חומר זה עומד להפסל לשימוש ויש צורך דחוף למצוא דרכים אלטרנטיביות להדברת המזיקים. עם התגברות המגמה לדחוק משימוש כימיקלים בחקלאות ובמזון, מואצים מאמצים למצוא חלופה לכימיקלים. הדברה ביולוגית מהווה אחת מחלופות אלו. במחקר זה בודד חומר הנוצר ע"י חיידק אותו בודדנו מחיפושית הקמח ובוצעה עבודה לאפיונו וזהווי.

תהליך בידוד החיידקים:

ביצים של חפושיות הקמח (חי"ק) (*Tribolium castaneum*) הוספו ל- 200 גרם חיטה גרוסה דק בתוספת 2 גר' שמרים (אבקה) בתוך צנצנות זכוכית בנפח של 0.5 ליטר אשר הועברו לאחר מכן לאינקובציה בחדר גידול שתנאיו: טמפרטורה - 27 מ"צ, לחות יחסית - 75 אחוזים. בוגרים בגילים שונים (חיים ומתים בנפרד ומעורב) נאספו ממצעי גידול מתאריכי גידול שונים ומגידולים אלו נלקחו דוגמאות (1 גרם כל אחד). חלק מדוגמאות אלו עברו חיטוי חיצוני (2 דקות בתמיסת 2% NaOCl) ואילו בדוגמאות אחרות לא חוטאו החרקים. כל דוגמאות החרקים נכתשו ב- 5 סמ"ק תמיסה מימית שהכילה 0.9% NaCl. דגימות מתמיסות הכתישה הונחו על גבי המצעים PCA ו-LB (מצע עשיר לא מוגדר המכיל פפטון, תמצית שמרים ומלח). מושבות חיידקים אשר התפתחות על המצעים נלקחו בנפרד לריבוי (24 שעי' הדגרה ב- 37 מ"צ) לתוך אותם מצעים (כנוזל) כל מושבה לתוך אותו מצע ממנו בודדה. בדרך זו בודדו ורובו מספר חיידקים שונים אשר נשמרו בתמיסת גליצרין ב- 80 (=תמיסת אס).

הכנת תרבית של חיידקים לבדיקה:

מתמיסת האם של כל חיידק נלקחו 1.0 סמ"ק הורחפו ב- 50 סמ"ק מצע LB בתוך ארלנמיייר (250 סמ"ק) אשר הודג ב- 37 מ"צ תוך טלטול (24 שעות). לבצוע הניסויים השתמשנו בתמיסות בהן

ערכי ה-OD היו בתחום של 1.6-2.2. כבקורת שימשה תמיסת LB בלבד.

בדיקת יעילות התרבית ומרכיביה כנגד חרקים:

פעילותם של החיידקים על בוגרים של חרקי מחסן שונים (*Tribolium castaneum*, *Rhyssopertha dominica*, *Sitophilus oryzae*, *Oryzaephilus surinamensis*) נבדקה בשתי שיטות: על גבי נייר סינון ובגרעיני חיטה גרוסים.

בדיקה על גבי נייר סינון: מהתרבית נלקח מקטע של 1 סמ"ק והוספג על גבי נייר סינון בצלחת פטרי (קוטר 5 ס"מ). מיד לאחר מכן הונחו בצלחת 10 בוגרים מכל חרק מחסן (כל סוג בצלחת נפרדת).

בדיקה בגרעיני חיטה: 1 סמ"ק מקטע מתמיסת ההדגרה עורבב עם 1 גרם גרעיני חיטה גרוסים אליהם הוספו מיד 10 בוגרים מכל חרק בנפרד. לאחר הוספת החרקים, כוסו הצלחות ושמרו בטמפרטורת החדר לפרקי זמן של: 1, 4, ו-48 שעות. בתום כל פרק זמן, הועברו החרקים מכל צלחת בנפרד. לצלחות בהן היתה חיטה גרוסה. צלחות אלו נשמרו בטמפרטורה של 27 מ"צ והתמותה בהן נבדקה בתום 24 ו-72 שעות. כל הניסויים בוצעו גם ב-M9 (מצע מינימלי מוגדר, סינטטי, המכיל מלחים בלבד וגלוקוז) וגם ב-LB (מצע עשיר לא מוגדר המכיל פפטון, תמצית שמרים ומלח) וזאת לשם השוואה בין המצעים וקבלת החלטה לגבי מצע בו נשתמש בעתיד.

הפרדה בין מרכיבי התרבית:

50 סמ"ק תרבית של החיידק סורכזה ב-4 מ"צ למשך 15 דקות במהירות 5000 סל"ד. בתום הסיבוב נאסף המקטע העליון (=תסנין), והמשקע הורחף ב-50 סמ"ק מצע (=תרחיף). פעילותו שכל מקטע כזה נבדקה על בוגרי חי"ק.

זהוי מרכיבים לא חלבוניים:

50 סמ"ק תסנין הועברו למשך מפרד אליו הוספנו 3 פעמים 150 סמ"ק של חומר ממצה (הקסן, כלורופורם או דיכלורומתן). החומר הממצה נאסף לקולבה, יובש ע"י הוספת סודיום סולפט ונודף ברוטופור עד לכמות של 5 מ"ל. 2 מ"ל מזה נאספו לבדיקה בספקטרוטומטר ו-3 סמ"ק נותרים נודפו עד יובש. השארית הומסה ב-4-5 מ"ל מים ושימשה לבדיקות ביולוגיות. כבקורות, אשר עברו תהליכים דומים, שימשו מצע LB (עליו גדל החיידק) ותסנין אשר לא מוצה. הפעילות הביולוגית נבדקה בהתאם למתואר בדו"ח הקודם.

זהוי מרכיבים חלבוניים:

התסנין עבר שיקוע ב-אמוניום סולפט (30%-60%). המשקע עבר הפרדה ב-PAGE-SDS לקבלת פרופיל של פוליפפטידים אופייניים. אותר ובודד מהגיל פוליפפטיד אשר אחראי כנראה לפעילות הביולוגית (רק תסנין אשר הכיל חומר זה היה פעיל ביולוגית) ונשלח לקביעת רצף הנוקלאוטידים.

תוצאות:

מתוך סך החיידקים אשר בודדו, נמצא כי רק חיידק אחד אשר בודד מגידול מעורב של בוגר ח"ק (לאחר חיטוי חיצוני) היה פעיל כנגד בוגרים של אותם החרקים. פעילות החיידק, לאחר גידולו בנפרד על שני המצעים נבדקה הן על גבי נייר סינון והן על חיטה גרוסה (ציור 1) והממצאים מלמדים כי בכל המקרים הושגה קטילה של 90-100% (בהתאם לטיפול). לאור תוצאות אלה המשכנו לבדוק את הפעילות גם על חרקי מחסן נוספים (ציור 2). ניתן לראות כי תרבית החיידקים גרמה לשעור תמותה של 80-100% (בהתאם לסוג החרק) כאשר הניסוי בוצע על גבי חיטה גרוסה. גם כאן הושגו אחוזי הקטילה הגבוהים תוך שימוש בשני המצעים בהם גודל החיידק. במטרה לאפיין מיקומו של חומר פעיל אפשרי בתרבית, היא עברה סירכוז ונבדקה פעילות התסנין והתרחיף. התוצאות לימדו כי לא היתה פעילות בתרחיף אלא רק בתסנין (ציור 3). לפיכך המשכנו לבדוק פעילות התרבית והתסנין לאחר חימום ואוטוקלב. נמצא כי הן התרבית והן התסנין היו יעילים בקטילת ח"ק (ציור 4) ובכל המקרים הושג, לאחר חשיפת הבוגרים לטיפולים השונים, שעור קטילה גבוה (קרוב ל-100%). ניתן איפוא לומר כי חומר פעיל אפשרי נמצא בתסנין התרבית כאשר בכל מקרה חומר זה עמיד לחום. בהמשך נבדק הרכב התסנין לנוכחות חומרים לא חלבוניים.

ציור 5. מתאר עקום בליעה אופייני של מיצוי תסנין. ניתן לראות כי מופיע שיא באורך גל של 260-280 נ"מ האופייני לחלבון. לא נראית בליעה באורכי גל אחרים.

העקומות המופיעות הן כאמור מיצוג את אלו אשר נתקבלו מכל המיצויים בהם השתמשנו כאשר באף מקרה לא קבלנו שיא בליעה המעיד על נוכחות חומר בדוגמא.

בבדיקת פעילות "הממצה" (סולוונט המצוי לאחר נידוף עד יובש והמסה ב- 5 מ"ל מים) ו"הממוצה" (חומר הבדיקה אשר נותר לאחר המיצוי, נידוף והמסה ב- 5 מ"ל מים) הוברר כי שעור קטילת החרקים היו כמעט זהים בשני המקרים (טבלה 1). לעומת זאת בבקורת היו רק 18.8 אחוזי תמותה לעומת 98.6 אחוזי תמותה בתסנין. ממצאים אלה מרמזים על שארית חומר פעיל אשר יתכן ולא מוצה מהתסנין או לחלופין על רעילותם של חומרי המצוי. מכל מקום – העדר תוצאות בספקטרופוטומטר מעיד כנראה על העדר חומר פעיל בשתי הפרקציות והעבודה התמקדה על כן בזהוי מרכיבי פעילות חלבוניים.

ניתן לראות (ציורים 6, 7) כי בתסנין אשר עבור שיקוע ב-אמוניום סולפט 30%, הופיע פוליפפטיד אחד אשר לא הופיע בבקורת. רק בתסנינים אשר היו פעילים ביולוגית כנגד החרק, הופיע פוליפפטיד זה ולכן היה בסיס סביר להניח כי החלק הפעיל גלום בפפטיד זה. החומר נשלח לבצוע קביעת רצף (טבלה 2). לא נמצא חלבון זהה במאגרי המידע ולכן בוצע *de novo sequencing*, דהיינו, זיהוי הרצף מתוך השבירות של הפפטידים (טבלה 3). גם כאן, למרות שזוהה רצף – הוא לא דמה למאגר המידע. יש להמשיך בעובדה בכוון זה לחידוד הממצאים.

מסקנות והשלכותיהן:

יש בידנו תכשיר ביולוגי המסוגל לקטול בוגרים של מספר חרקי מחסן עיקריים. החומר הפעיל מכיל מרכיבים חלבוניים אשר הוחל באפיונם. יש להמשיך במחקר זה לברור מרכיבים אלו אשר יצביעו גם על מנגנון הפעלה. במקביל, מומלץ למסחר את התכשיר אשר הוכח כפעיל.

סיכום עם שאלות מנחות

מטרת המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה

איפיון ובידוד חומר הקוטל חרקי מחסן, מחיידקים אשר בודדו מחרק המחסן Tribolium castaneum.

עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח

הוכחה פעילות החומר *in vivo* כנגד שורה של חרקי מחסן. בודד פוליפפטיד המבטא את פעילות העיכוב. לא פוענח מבנה הפוליפפטיד.

המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו

יש בידנו חומר טבעי, הנוצר מחיידקים מאכלסי חרק מחסן נפוץ, בעל אפקט אינסקטיצידי. יש בהחלט להערכתנו, מקום להמשיך המחקר ולנסות למסחר החומר כבר בשלב זה.

הבעיות שונתרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה

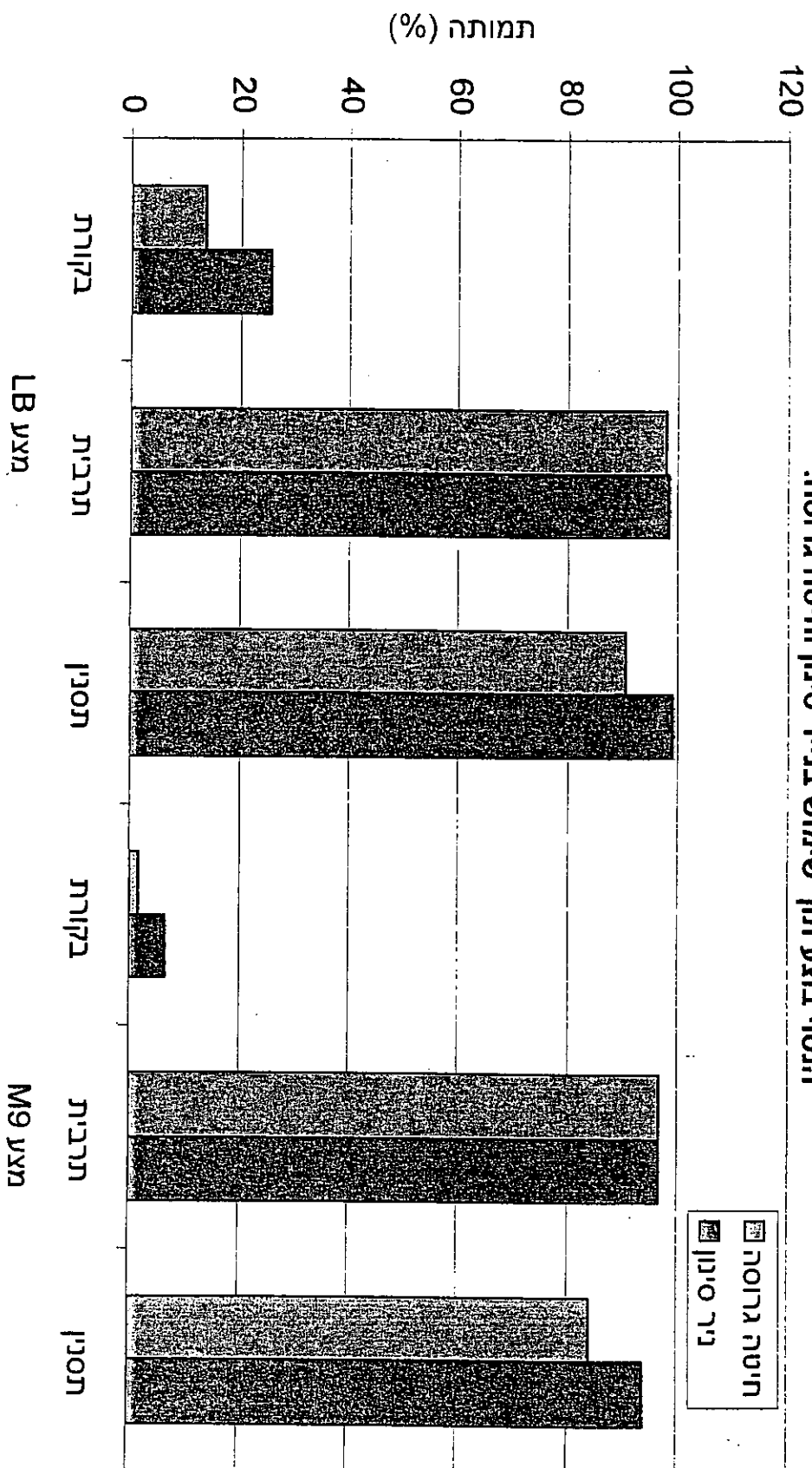
יש להמשיך לנסות ולפענח את מבנה הפוליפפטיד לקראת הבנת מעגון הפעולה. יש לעניין חברות במסחר החומר.

האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח

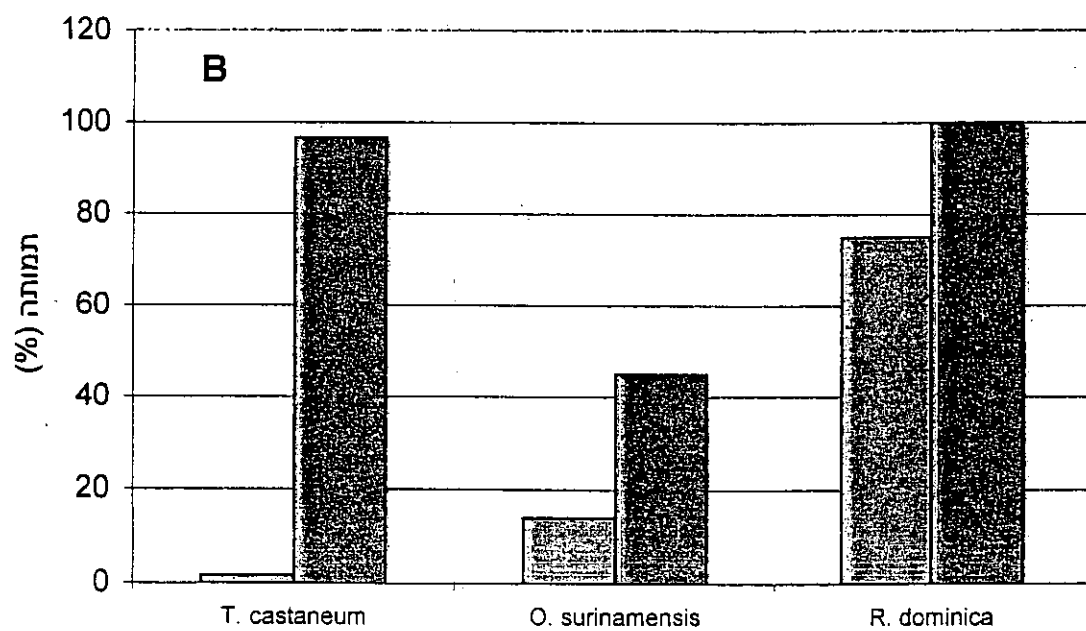
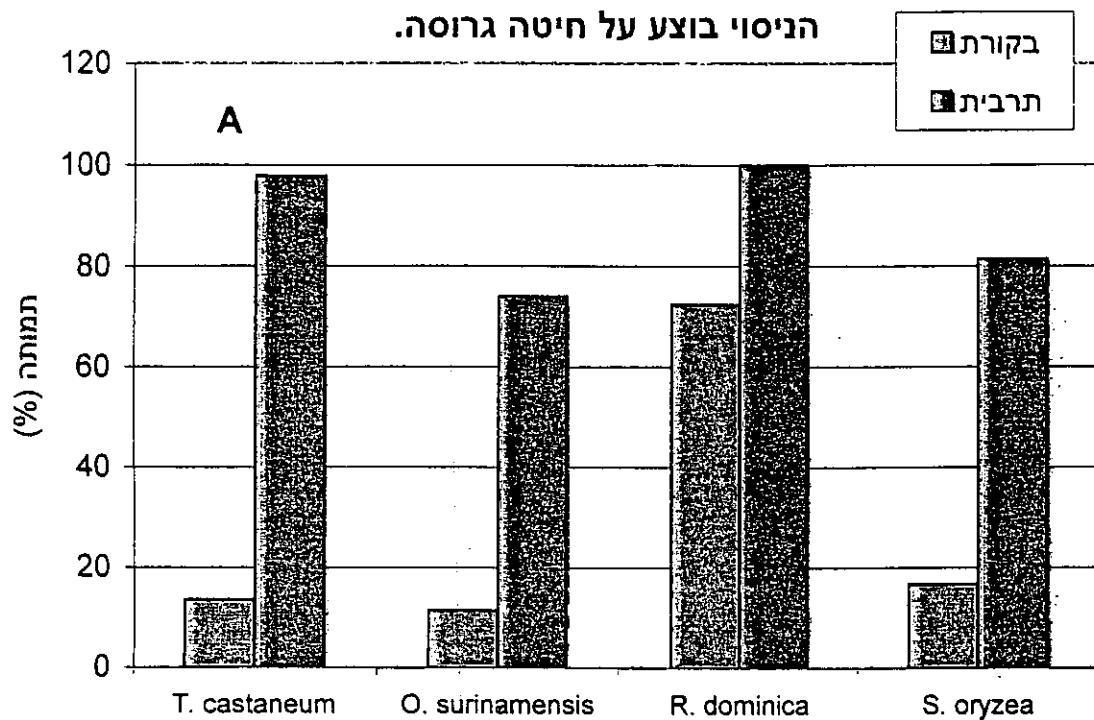
טרם הוחל בהפצת הידע.

ציר 1: תמותת בוגרי חיפושית הקמח לאחר חשיפה לתרבית החיידק אשר גדל בנפרד על שני מצעי מזון.

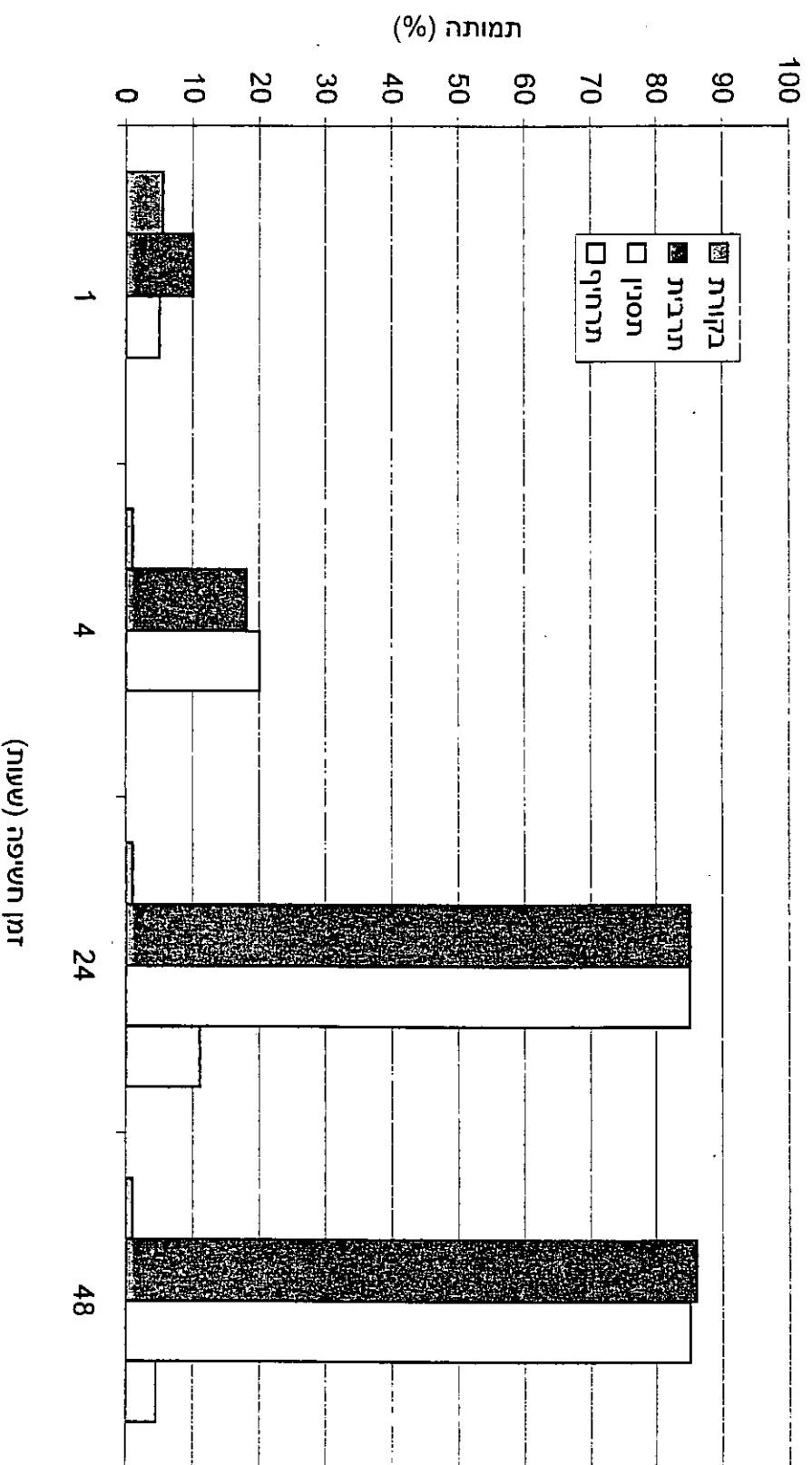
הנסוי בוצע תוך שימוש בנייר סינון וחיטה גרוסה.



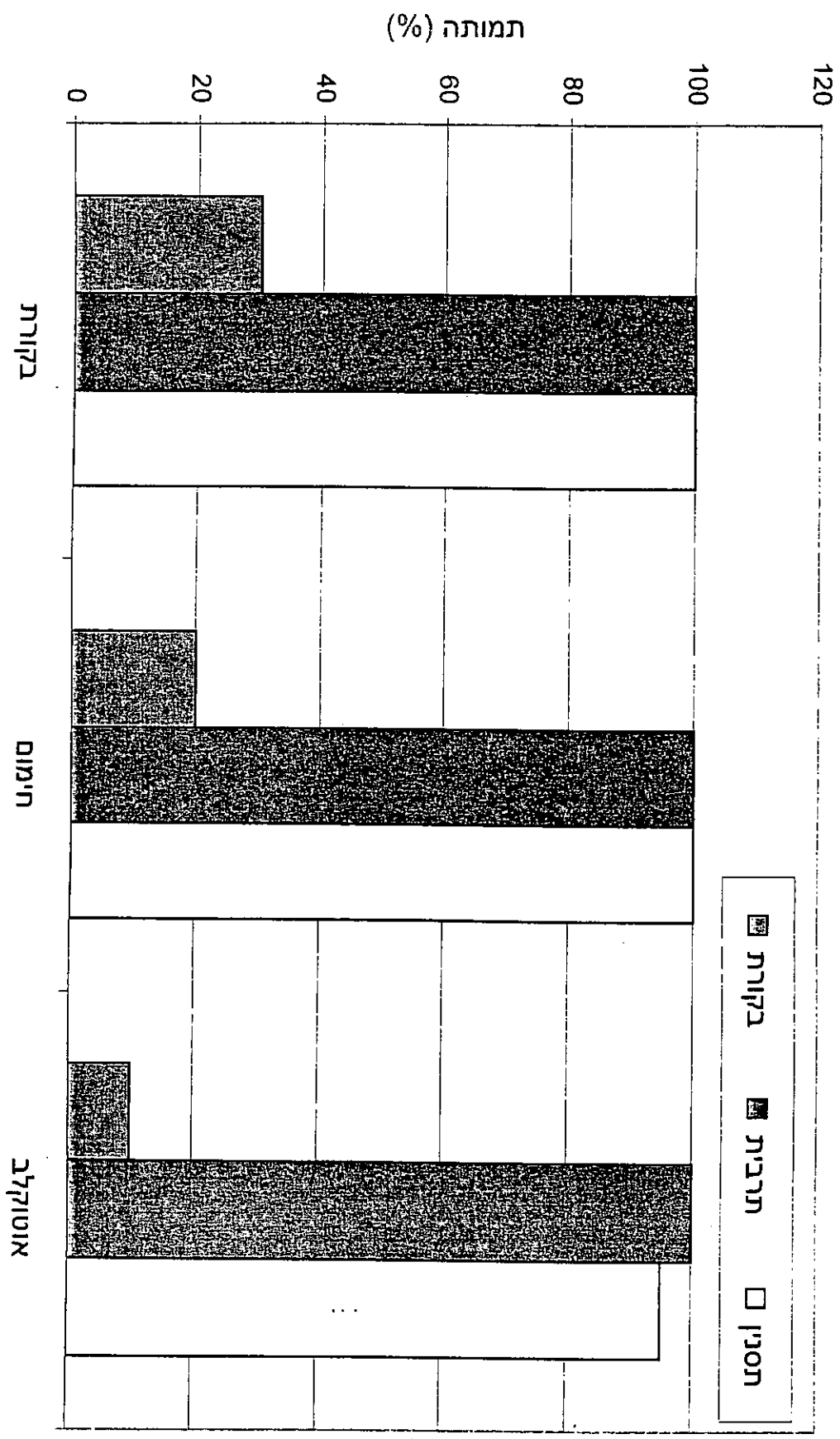
**ציור 2 : תמותת בוגרי חרקי מחסן לאחר חשיפה לתרבית
החידק אשר גודל על מצע LB (A) או M9 (B).
הניסוי בוצע על חיטה גרוסה.**



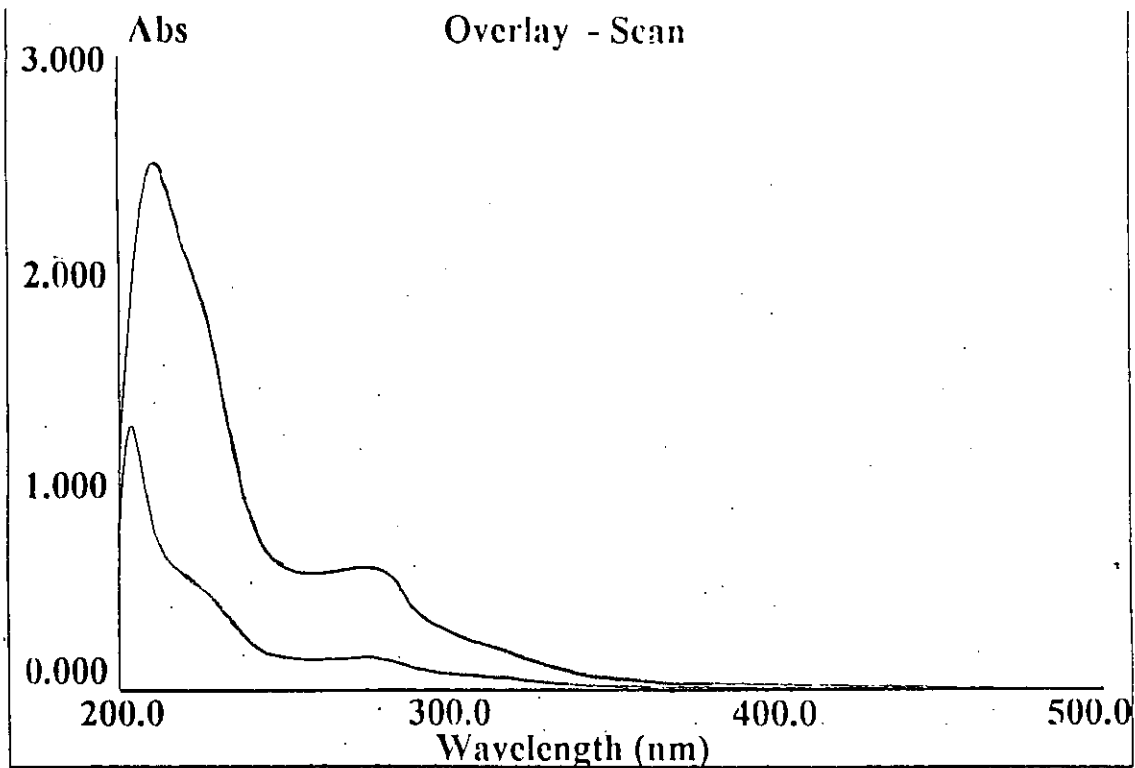
**צור 3: תמותת בוגרי חיפושית הקמח לאחר חשיפה לתרבות החיידק, תסנין ותרחוף.
הנסוי בוצע תוך שימוש בניר סינון.**



צור 4: תמותת בוגרי חיפושית הקמח לאחר חשיפה לתרבית החיידק (מצע LB) והתניין אשר טופלו בחום או באוטוקלב. הניסוי בוצע תוך שימוש בחיטה גרוסה.



ציור 5: עקומות בליעה אופייניות אשר נתקבלו לאחר מיצוי מצע מזון והתסנין. עקום עליון: תסנין (מיצוי מצע עליו גדל החיידק). עקום תחתון: מיצוי המצע בלבד.



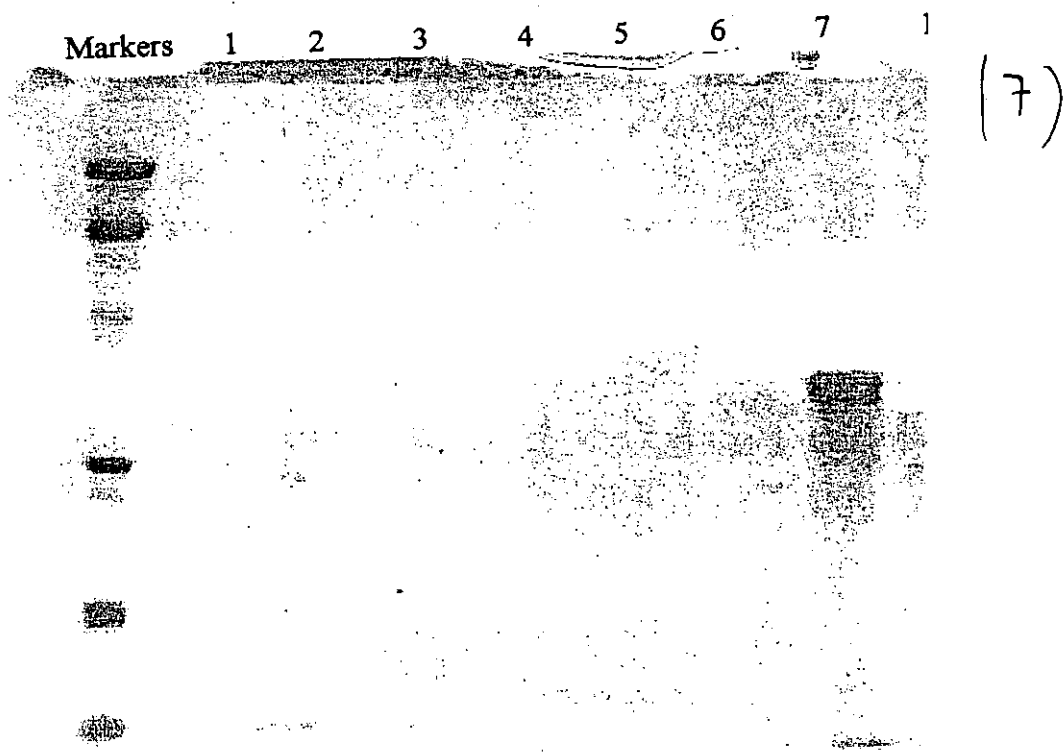
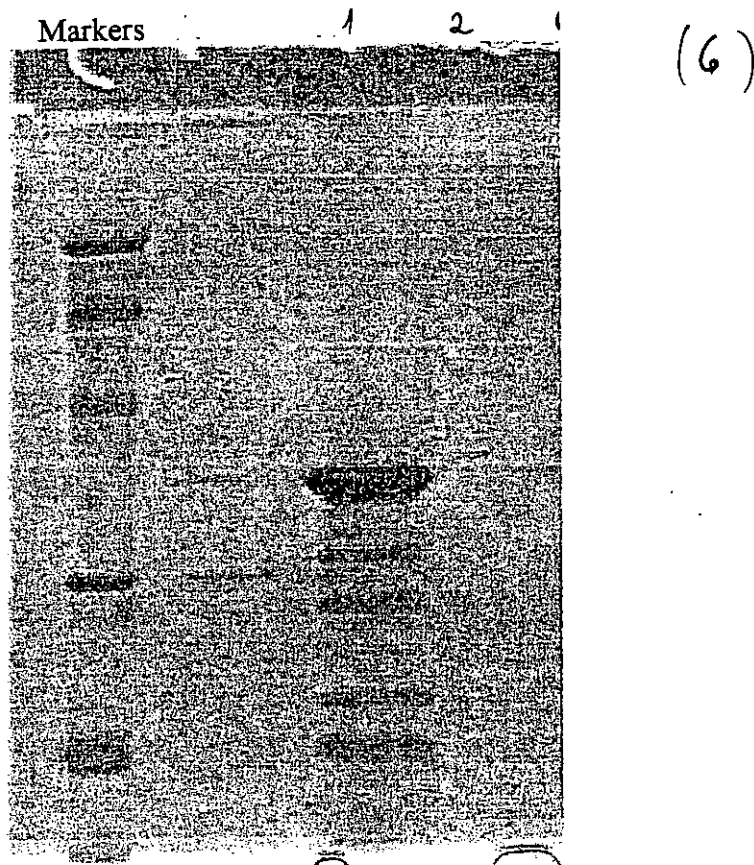
טבלה 1: בדיקת יעילותם של מיצויים (הקסן, דיכלורומתן) מתסנין חיידק כנגד חיפושית הקמח. המספרים בטבלה מבטאים תמותה (%) של בוגרי החרק. לאחר 72 שעות.

בדיקת יעילותם של מיצויים (הקסן, די כלורו מתן) מתסנין חיידק כנגד חיפושית הקמח. המספרים בטבלה מבטאים תמותה (%) של בוגרי החרק לאחר 72 שעות.

חומר הבדיקה	סולונט מיצוי	ממצה	ממוצה	בקורת
LB	-			18.8
	הקסן	24.6	83.4	
	ד.כ.מ.	16.0	70.4	
תסנין LB	-			98.6
	הקסן	91.4	99.2	
	ד.כ.מ.	83.8	94.7	

ממצה: סולונט המיצוי לאחר נידוף עד יובש והמסה ב-5 מ"ל מים
ממוצה: חומר הבדיקה לאחר מיצוי, נידוף והמסה ב-5 מ"ל מים

צ"ע 7 ו 6: פרופיל אלקטרופורטי של תסנין לפני השקעה באמוניום סולפט (6 ערוץ 1, ערוץ 2 - מצע LB בבקורת) ואחרי השקעה בריכוזים שונים של אמוניום סולפט (7). פוליפטיד מופיע בהשקעה של 30% אמוניום סולפט (תמונה 7 ערוץ 7, ערוצים 1-6: השקעה בריכוזים שונים של אמוניום סולפט).



Printed: Tue May 20 18:00:57 2003

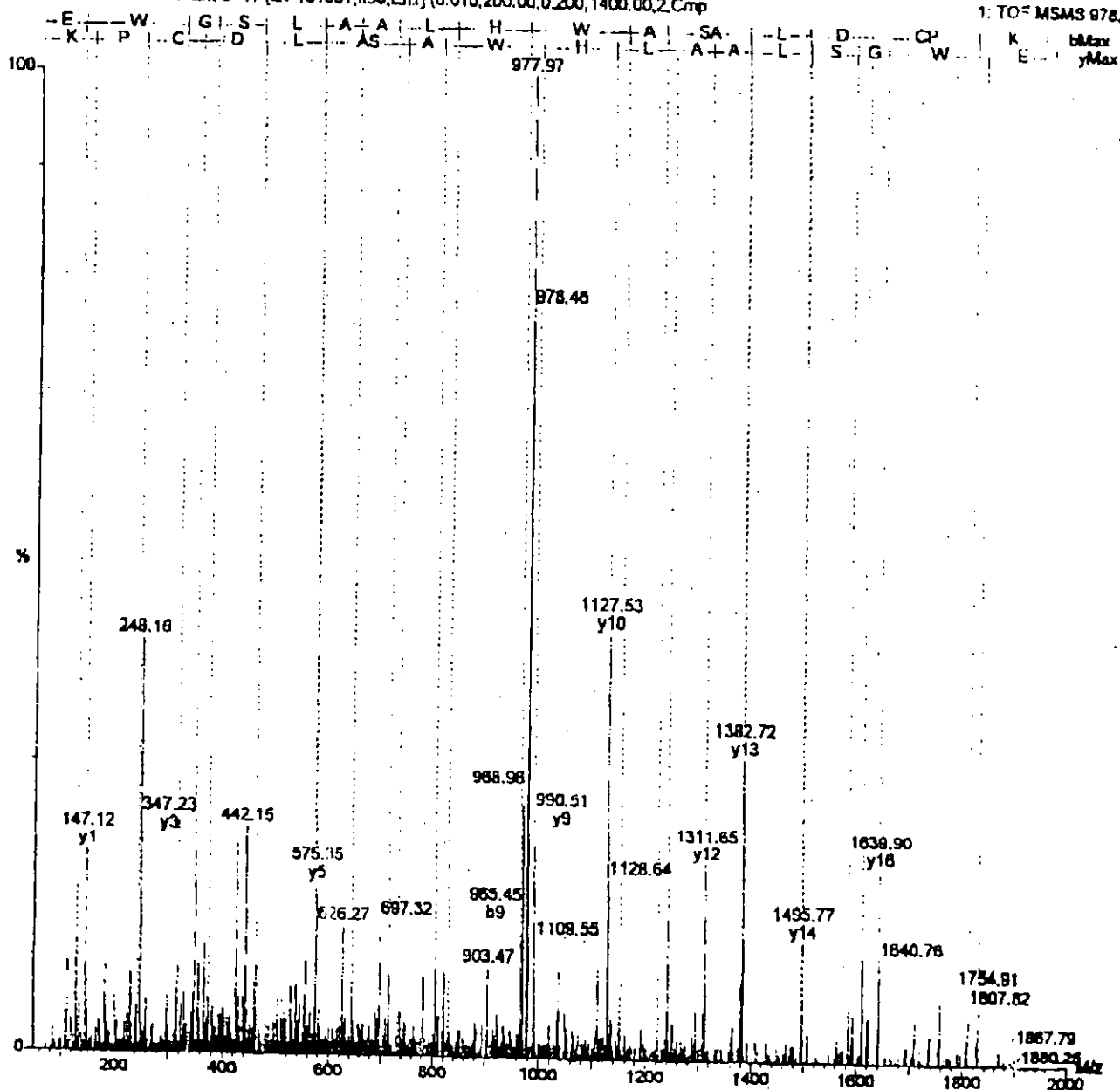
2.56

Observed MW: 1953.9844 Precursor ion charge state: 1
 M/z tolerance: 0.30 Intensity threshold: 10 (0.750%)
 Modifications: Carboxyamidomethylcysteine (+/-) Methionine Sulfoxide (+/-)

a	102.06	288.13	345.16	432.19	545.27	616.31	687.35	800.43	937.49	1123.57	1194.61	1281.64
	0.00	-0.16	-0.01	0.04	0.02	-0.01	0.07	---	0.04	0.04	---	---
b	130.05	316.13	373.15	460.18	573.27	644.30	715.34	828.43	965.48	1151.56	1222.60	1309.63
	-0.03	-0.19	0.02	0.00	0.03	0.01	0.02	0.02	0.03	0.05	0.05	---
	Glu	Trp	Gly	Ser	Leu	Ala	Ala	Leu	His	Trp	Ala	Ser
y	1954.95	1825.91	1639.83	1582.81	1495.77	1382.69	1311.65	1240.61	1127.53	990.47	804.39	733.36
	---	-0.00	-0.07	-0.07	0.00	-0.03	0.00	-0.03	0.00	-0.04	-0.03	0.08
x	1937.92	1808.88	1622.80	1565.77	1478.74	1365.66	1294.62	1223.58	1110.50	973.44	787.36	715.33
	---	-0.19	---	---	---	-0.00	0.02	-0.01	-0.12	---	-0.12	-0.07
a	1352.68	1465.76	1580.79	1683.80	1780.85	1908.94						
	---	0.02	---	---	---	---						
b	1380.67	1493.75	1608.78	1711.79	1808.84	1936.94						
	0.01	0.09	-0.05	---	-0.23	---						
	Ala	Leu	Asp	Cys	Pro	Lys						
y	646.32	575.29	462.20	347.18	244.17	147.11						
	---	-0.06	-0.06	-0.06	0.08	-0.00						
x	629.29	558.26	445.17	330.15	227.14	130.08						
	-0.04	0.01	-0.10	-0.10	0.19	-0.00						

SEQS298-NANOP978 MaxEnt 3 17 [Ev-181581,1150,Ent] (0.010,200.00,0.200,1400.00,2,Cmp)

1: TOF MSMS 978.00ES



WED, 21-MAY-03 7:16

ADMON -PROTEINS

972 4 8293446

P. 02

Printed: Tue May 20 18:00:57 2003

Observed MW: 1953.9844 Precursor ion charge state: 1

M/z tolerance: 0.30 Intensity threshold: 10 (0.750%)

Modifications: Carbamidomethylcysteine (++) Methionine Sulfoxide (+/-)

Predicted sequences:

Sequence	Rank	Score	JointProb	Prob %	Calculated MW	Delta
ENQSLAALHWASALDCPK	1	990	-1	-1.0J	1953.9407	-0.04
ENQSLAALHWASALDCPK	2	990	-1	-1.0J	1953.9043	-0.08
ENQSLAALHWASALDCPK	3	904	-1	-1.0J	1953.9043	-0.08
ENQSLAALHWASALDCPK	4	904	-1	-1.0J	1953.9043	-0.08

Reported as:

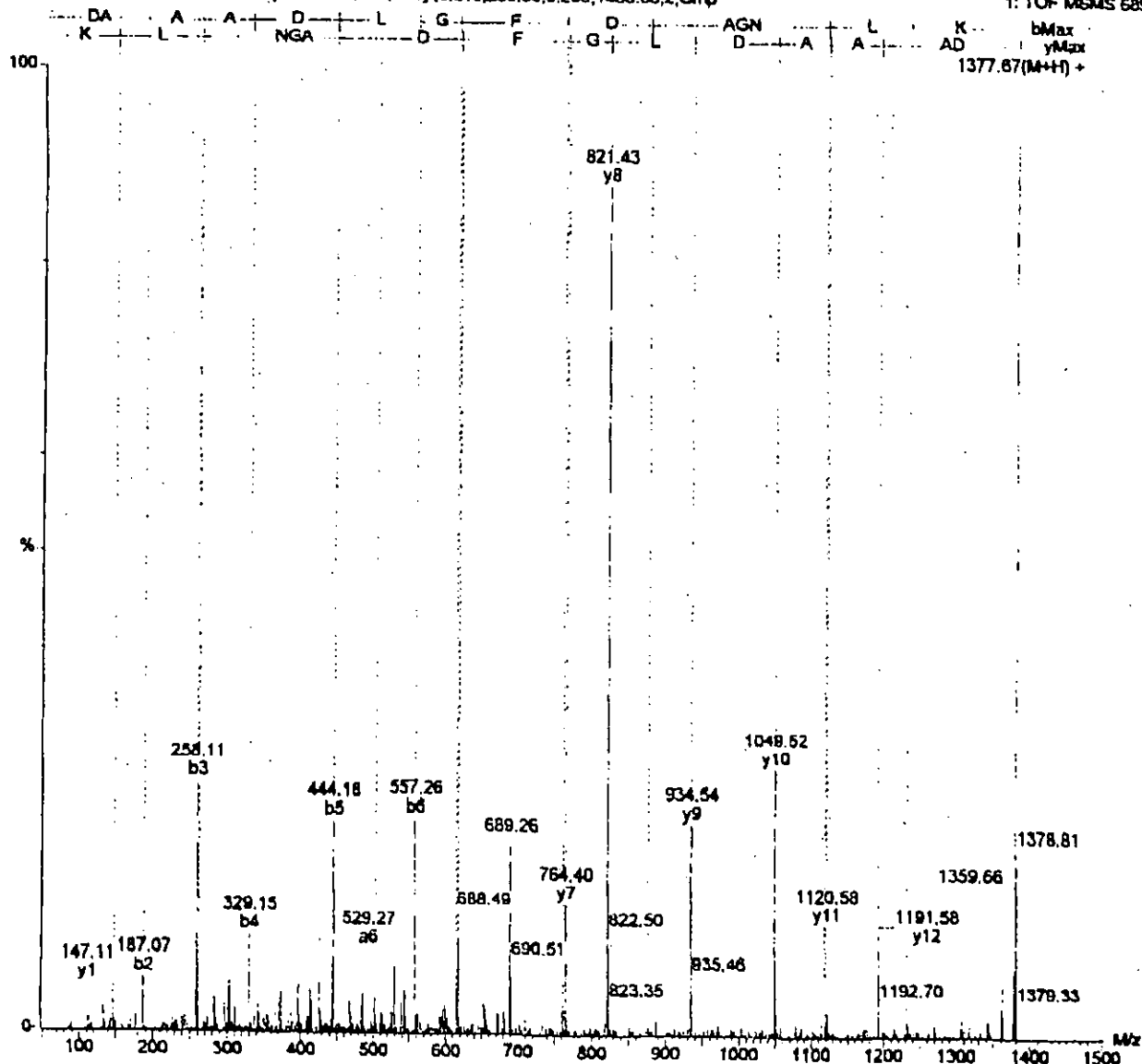
Printed: Tue May 20 15:08:08 2003

Observed MW: 1378.5844 Precursor ion charge state: 1
 M/z tolerance: 0.30 Intensity threshold: 14 (0.750%)
 Modifications: Carbamidomethylcysteine (+/-)

a	88.04	159.08	230.11	301.16	416.18	529.26	586.28	733.35	848.38	919.42	976.44	1090.48
	---	---	-0.00	-0.00	-0.01	-0.00	---	-0.01	---	---	---	---
b	116.03	187.07	258.11	329.15	444.17	557.26	614.28	761.35	876.37	947.41	1004.43	1118.48
	---	-0.00	-0.00	-0.00	-0.01	0.00	-0.01	-0.03	-0.02	---	---	0.03
	Asp 40	Ala 40	Ala 100	Ala 100	Asp 100	Leu 100	Gly 100	Phe 100	Asp 97	Ala 87	Gly 87	Asn 89
y	1377.67	1262.64	1191.60	1120.56	1049.53	934.50	821.42	764.39	617.33	502.30	431.26	374.24
	---	---	0.02	-0.02	0.01	-0.04	-0.01	-0.01	-0.02	-0.02	---	---
x	1360.63	1245.61	1174.57	1103.53	1032.50	917.47	804.39	747.36	600.30	485.27	414.23	357.21
	---	---	0.01	---	-0.02	---	0.07	---	---	0.03	---	0.01
a	1203.56	1331.66										
	---	---										
b	1231.56	1359.65										
	0.05	---										
	Leu 100	Lys 100										
y	260.20	147.11										
	-0.01	0.00										
x	243.17	130.08										
	-0.03	---										

SEQS296-NANOP059 MaxEn(3 28 [Ev-86423,hs0,En1] (0.010,200.00,0.200,1400.00,2,Cmp

1: TOF MSMS 689.30E8



PepSeq file:

Printed: Tue May 20 15:06:06 2003

Observed MW: 1376.5644 Precursor ion charge state: 1

M/z tolerance: 0.30 Intensity threshold: 14 (0.750%)

Modifications: Carboxyamidomethylcysteine (+/-)

Predicted sequences:

Sequence	Rank	Score	JointProb	Prob %	Calculated MW	Delta
DAADLGFDAGTLK	1	180	230	46.21	1376.6572	0.07
EGAADLGFDAGTLK	2	191	230	29.01	1376.6572	0.07
ADAADLGFDAGTLK	3	191	229	17.20	1376.6572	0.07
GEAADLGFDAGTLK	4	191	228	5.41	1376.6572	0.07
EGAADLGFDGQLK	5	223	227	2.17	1376.6572	0.07