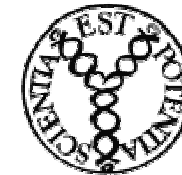




Oddělení funkční genomiky a proteomiky  
Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity

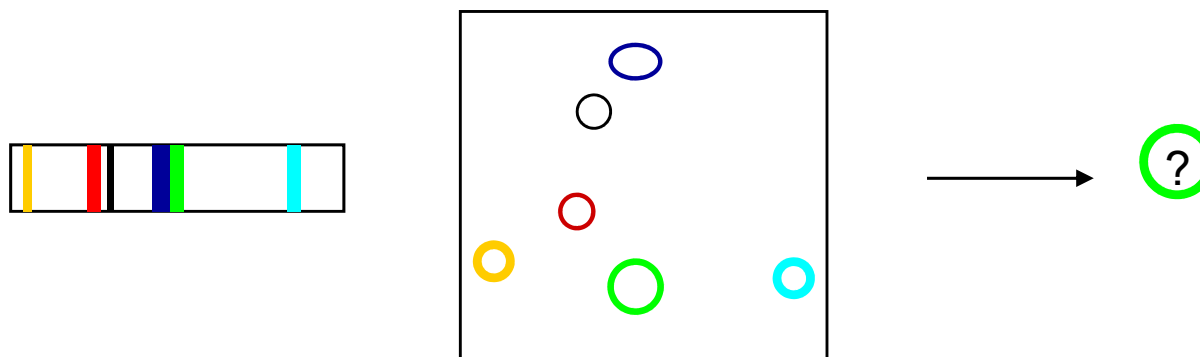


CENTRÁLNÍ LABORATOŘ

# Dvoudimenzionální elektroforéza

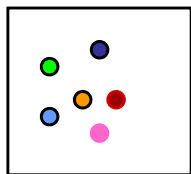
## 2-DE

Hana Konečná



# Proteomický experiment

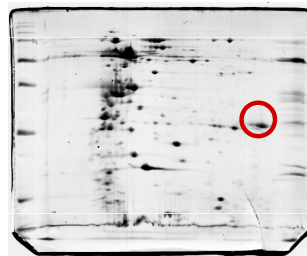
**extrakce**



**fokusace**



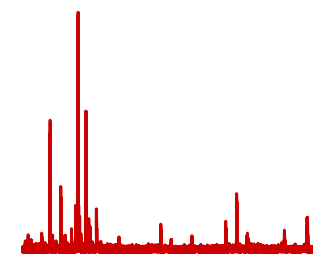
**SDS-PAGE**



**digest**

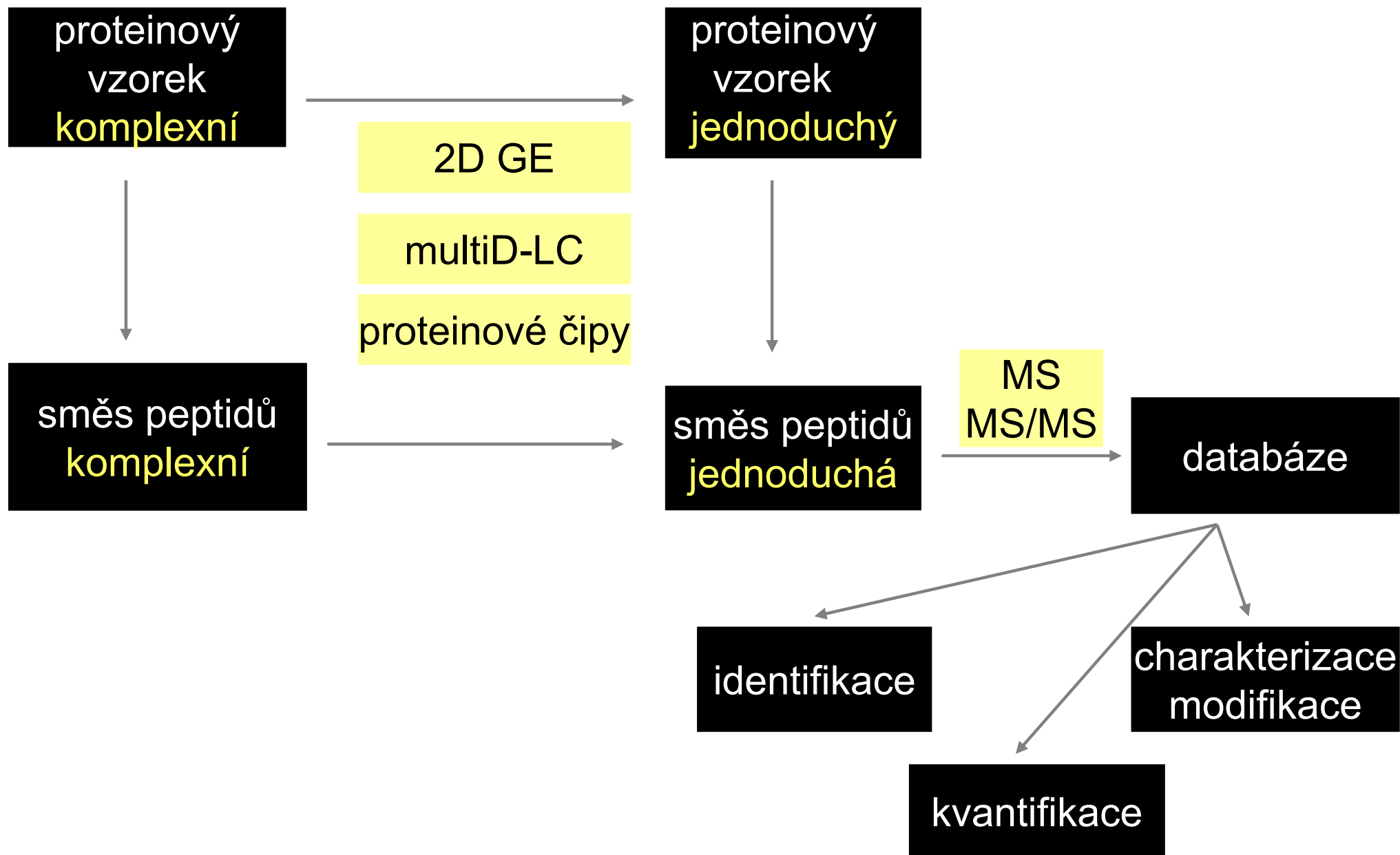


**MS**



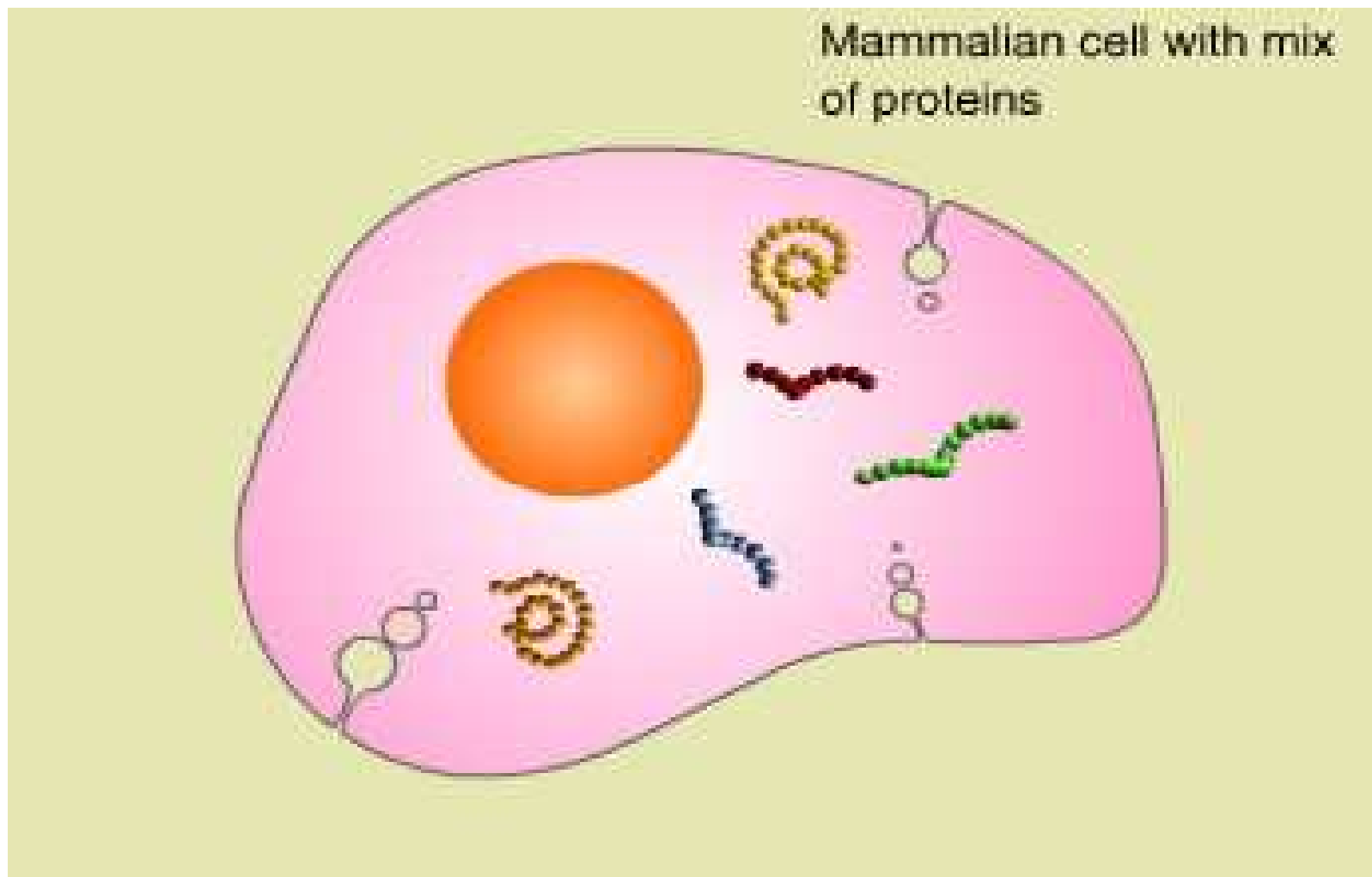
**identifikace**

**neznámý  
protein**



# ANALYZOVANÝ MATERIÁL

příklad



# PŘÍPRAVA VZORKU

**solubilizace**

**redukce**

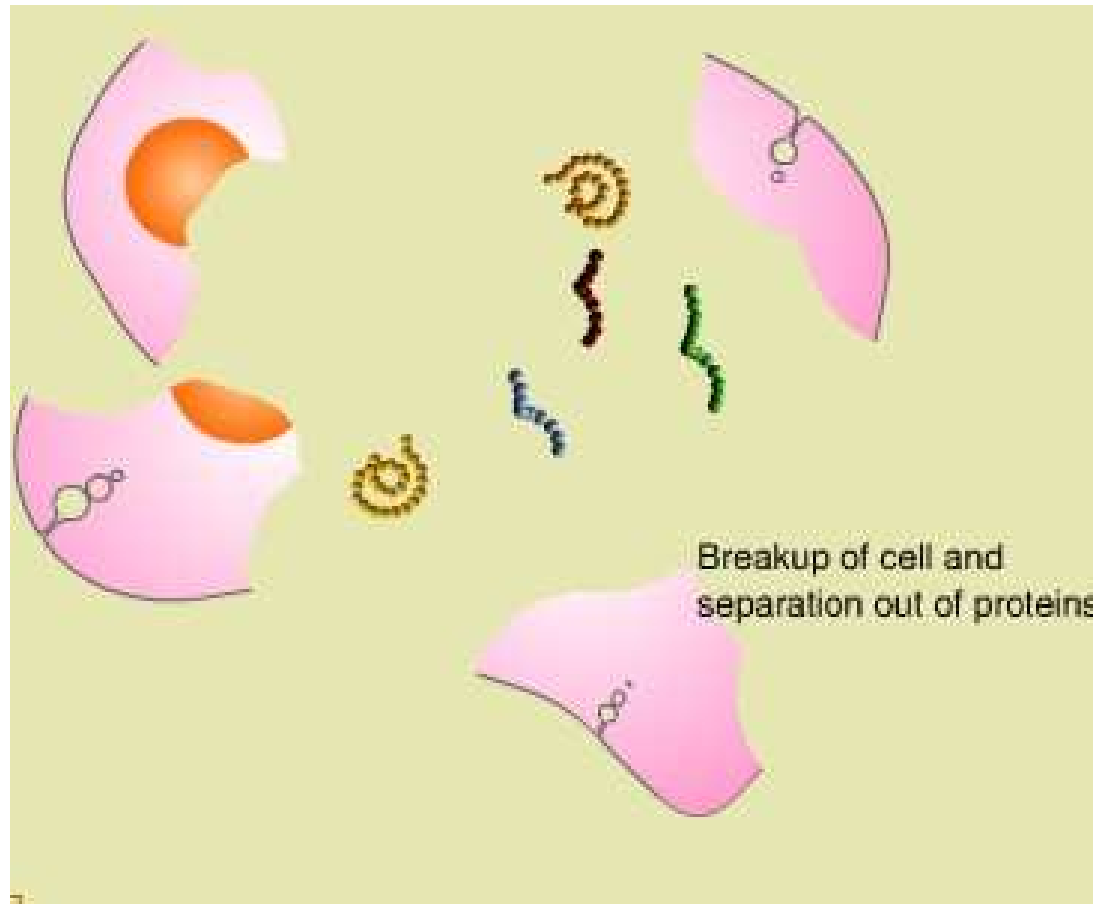
**inhibice**

**odstranění kontaminant**

močovina, thiomčovina, detergenty

DTT, TBP

inhibitory proteáz, fosfatáz, glykosyláz



# DETERGENTY

žádný celkový náboj

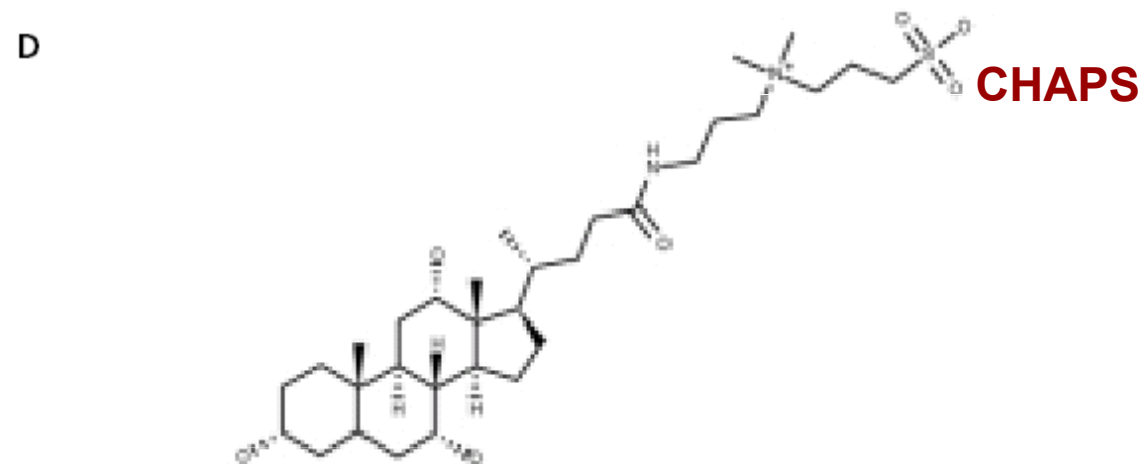
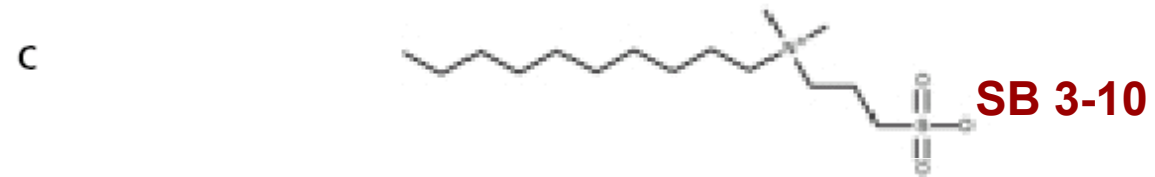
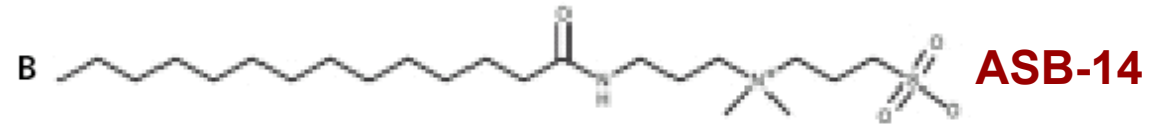
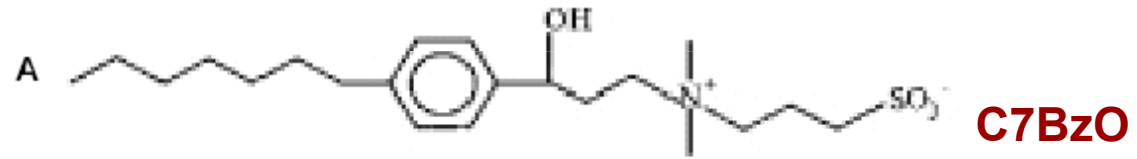
0.5 – 4%

použitelné ve vysokých koncentracích močoviny

- neionogenní
- zwitterointové

SDS jen v nízkých koncentracích (do 0.25%)

# Zwitteriontové detergenty

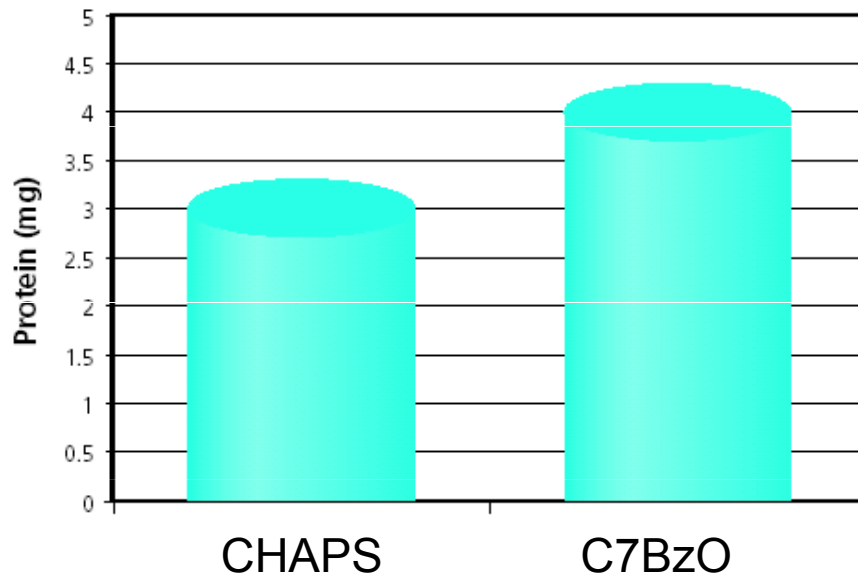


## C7BzO

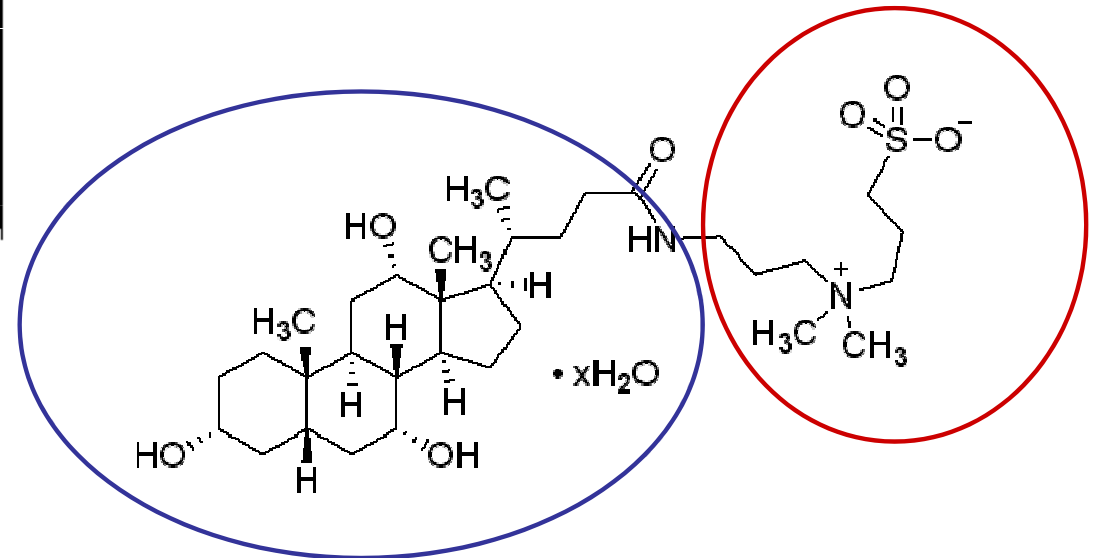
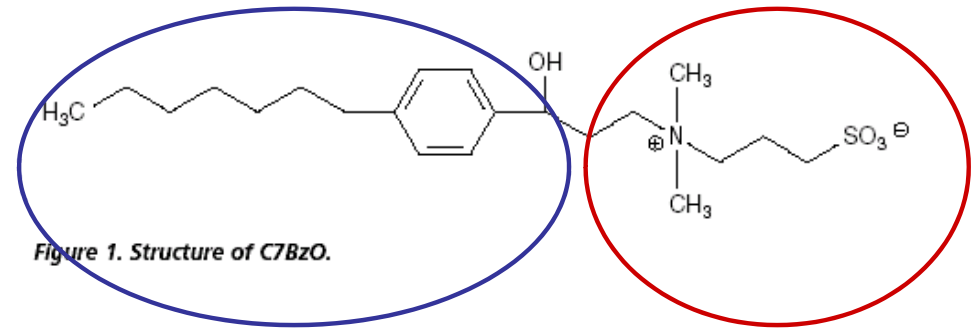
3-(4-Heptyl)phenyl-3-hydroxypropyl)dimethylammonio)propanesulfonate

## CHAPS

3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate

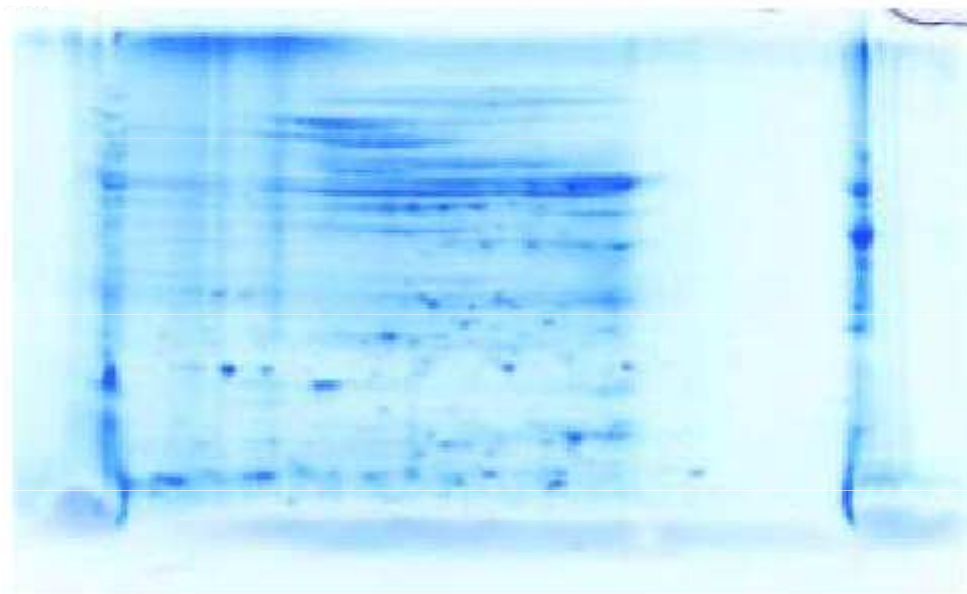


**E.coli**

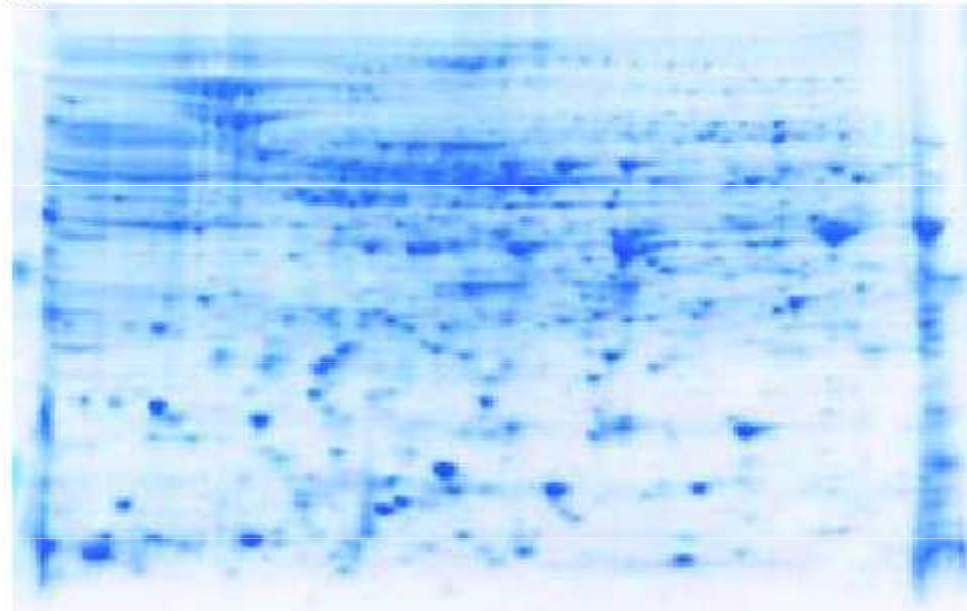




E.coli



CHAPS



C7BzO

## ZÁKLADNÍ PRAVIDLA

- zabránit proteolýze
- jednoduchý postup
- čerstvé reagensie
- čerstvý vzorek
- odstranit pevné částice - centrifugace
- odstranit kontaminanty

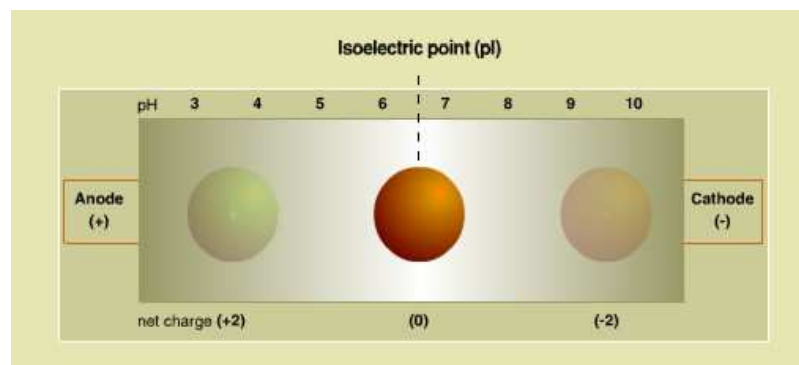
# KONTAMINANTY

- soli, zbytky pufrů
- malé endogenní molekuly
- iontové detergenty
- nukleové kyseliny
- polysacharidy
- lipidy
- fenolické látky

# 2-DE

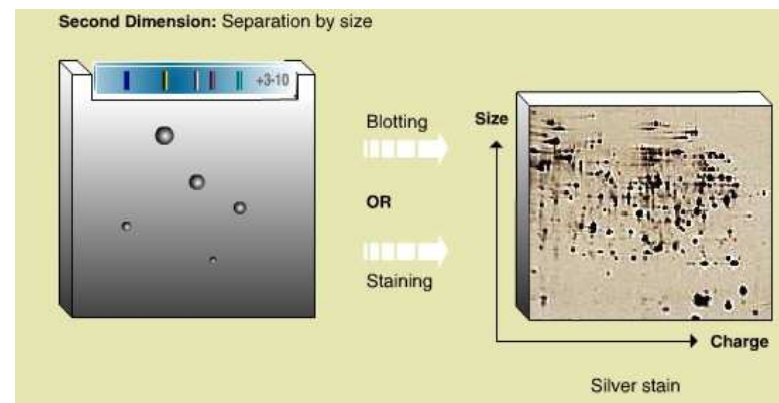
- první rozměr

## IEF

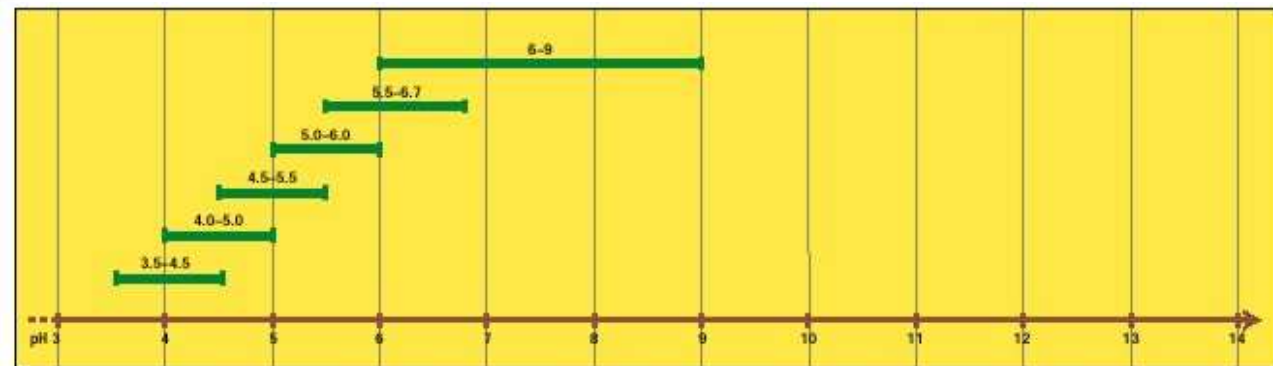


- druhý rozměr

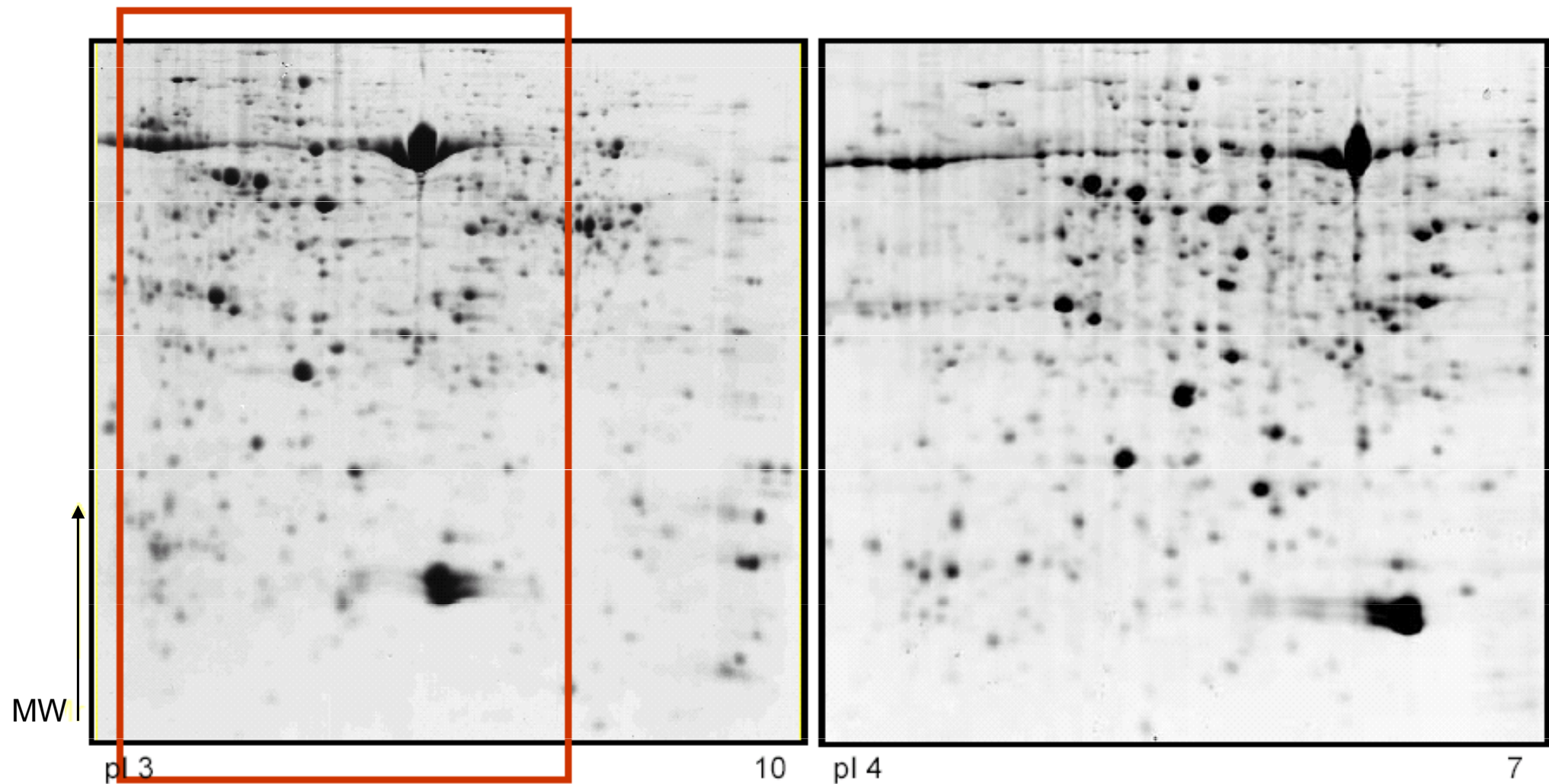
## SDS-PAGE



# ROZSAH STRIPU ROZMĚR STRIPU



# ROZSAH STRIPU

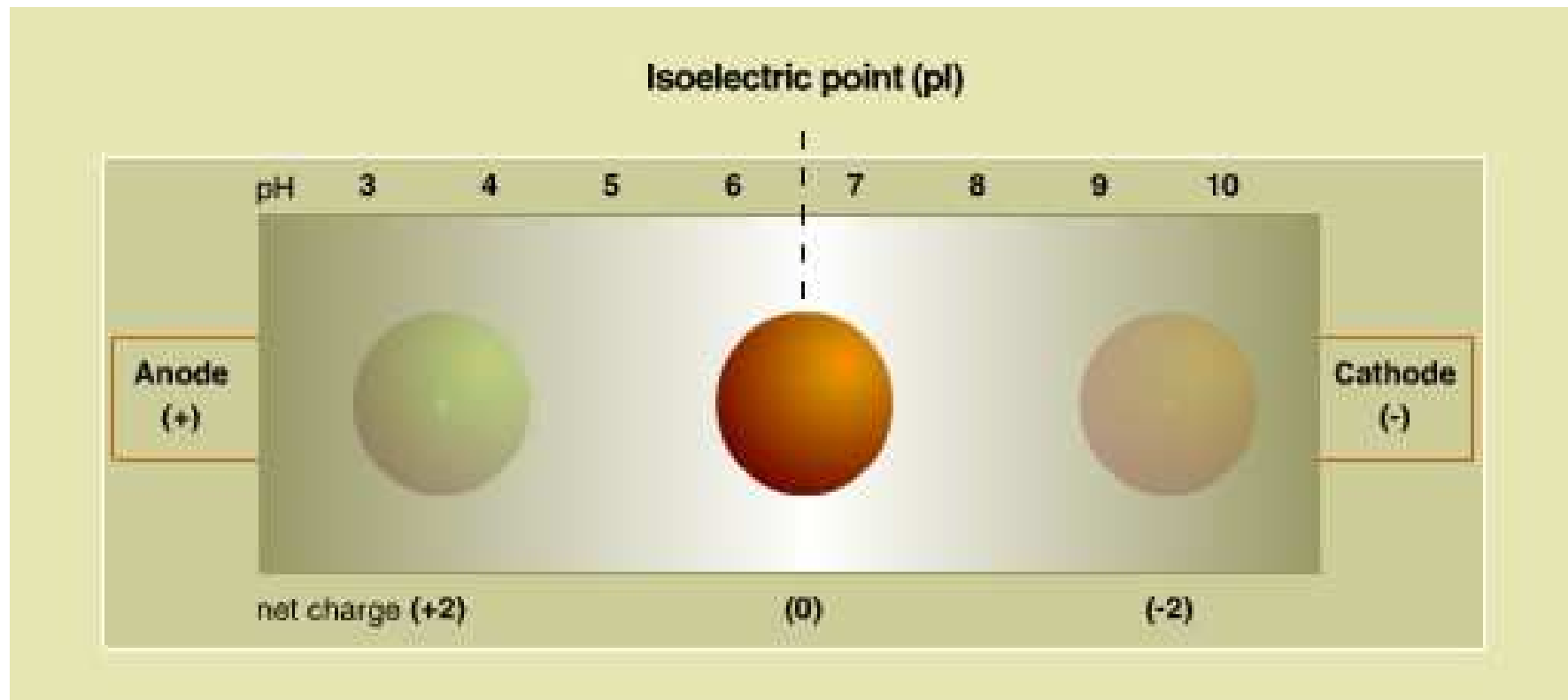


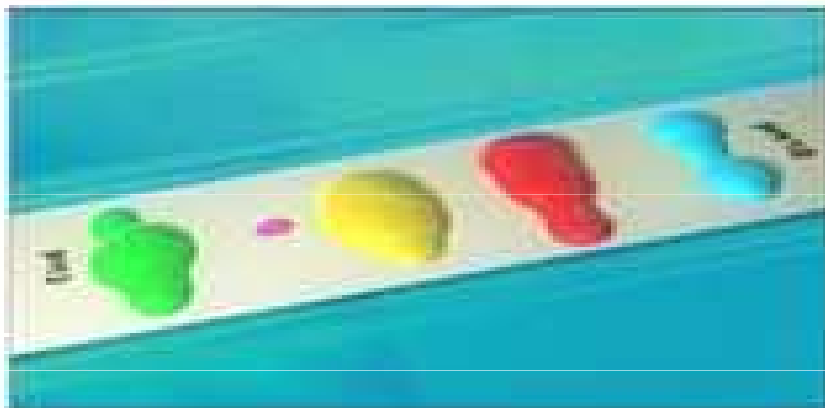
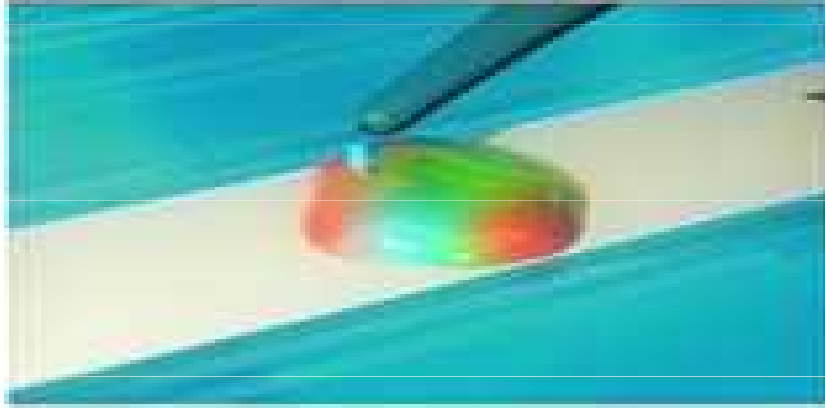
**pl 3 - 10 NL**

**pl 4 - 7**

# 1. ROZMĚR **IZOELEKTRICKÁ FOKUSACE**

migrace nabitých částic v gradientu pH v elektrickém poli

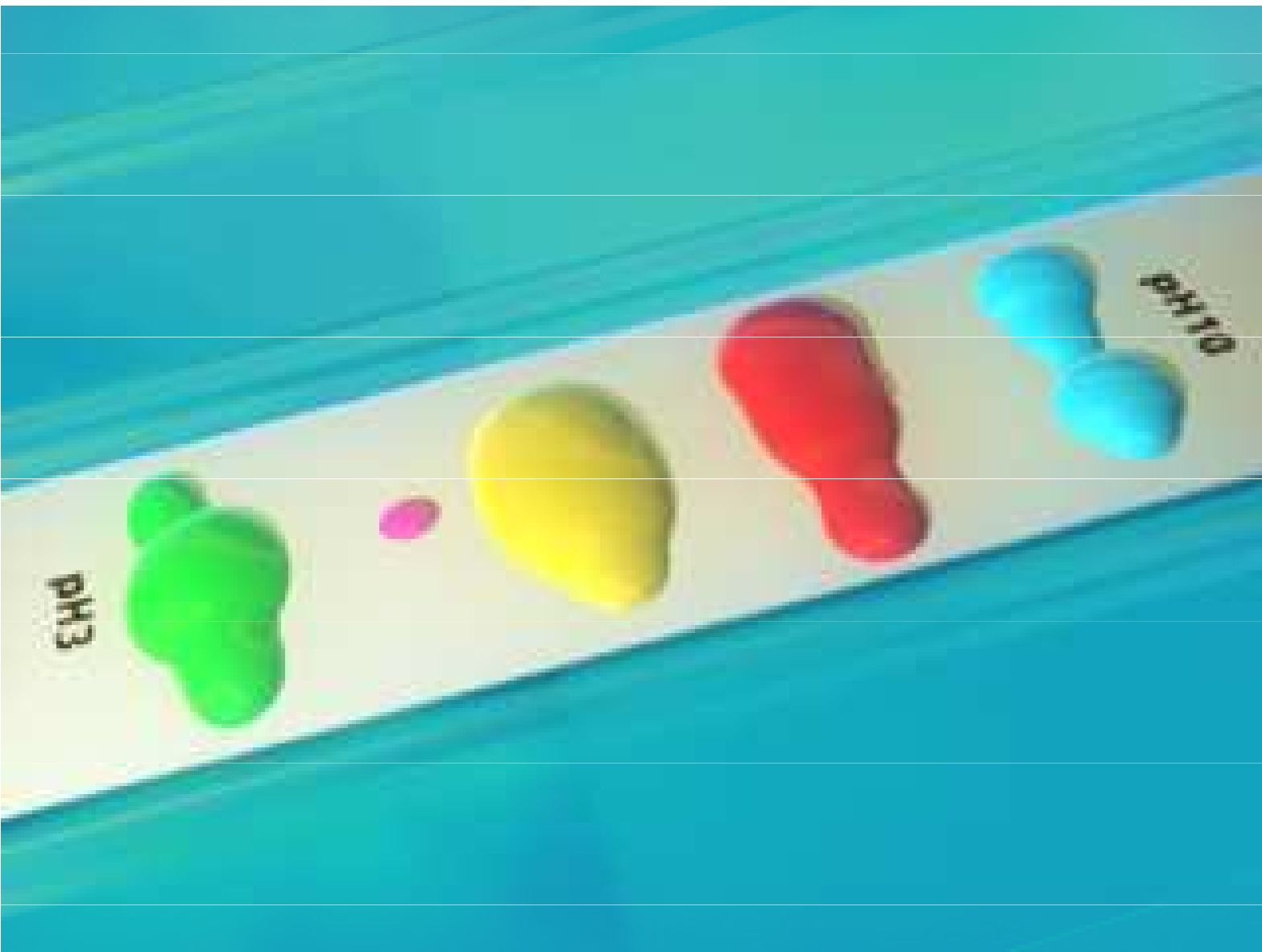




## IZOELEKTRICKÁ FOKUZACE

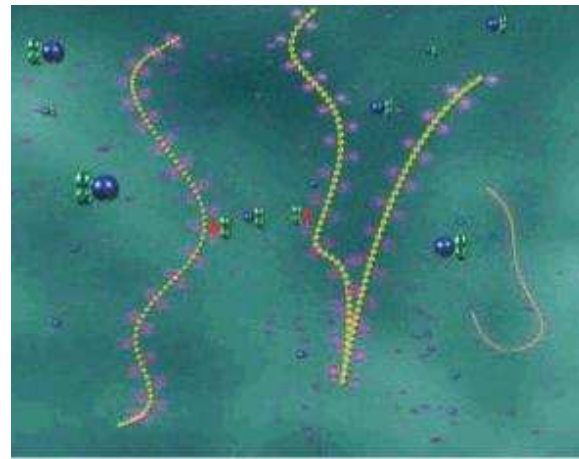
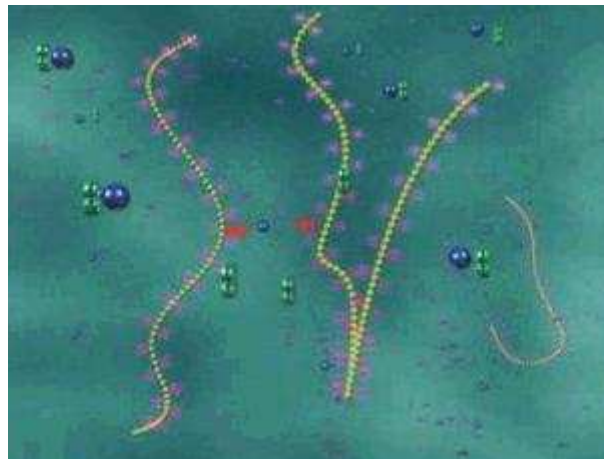
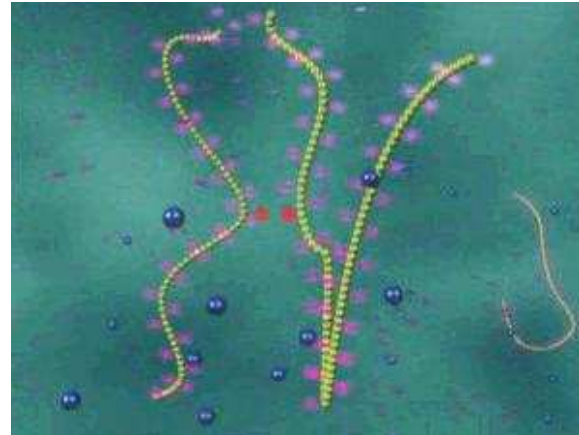
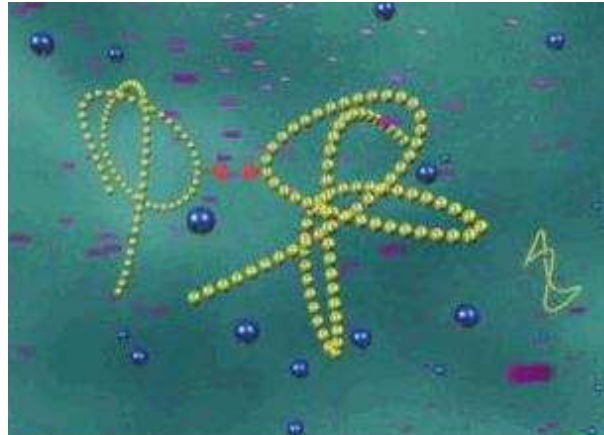
- imobilizovaný pH gradient
- amfolyty





# EKVILIBRACE STRIPU

denaturace **SDS** ●

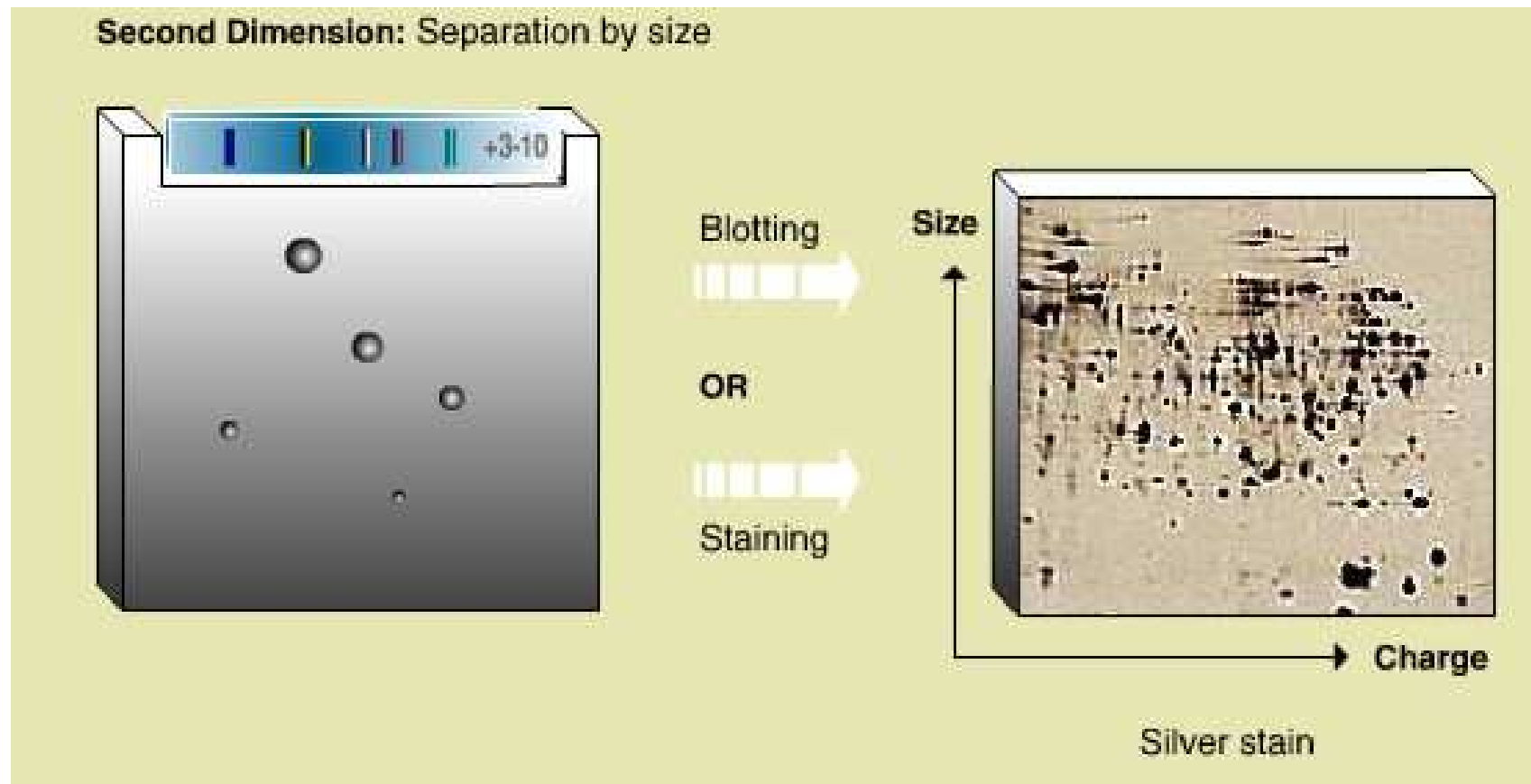


redukce **DTT** ●

alkylace **IAA** ●

## 2. ROZMĚR **SDS-PAGE**

migrace aniontů v elektrickém poli podle MW



# DETEKCE PROTEINU

- gel x blot
- visualizace
  - barvení
  - radioaktivita
  - imunodetekce

- barvení v gelu

po elektroforéze  
před elektroforézou

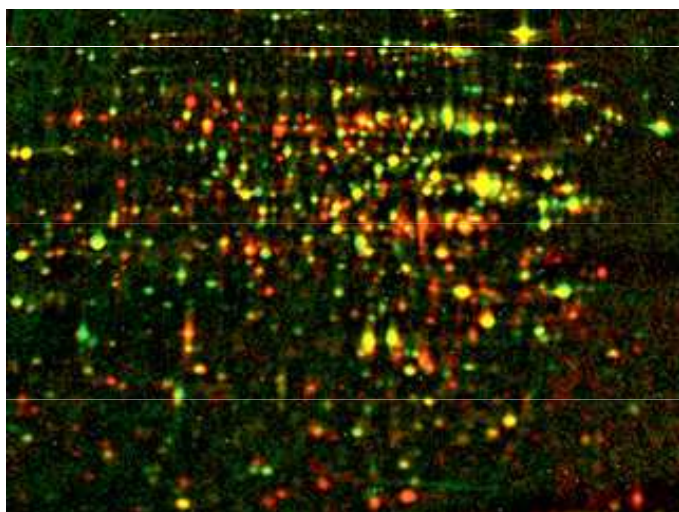
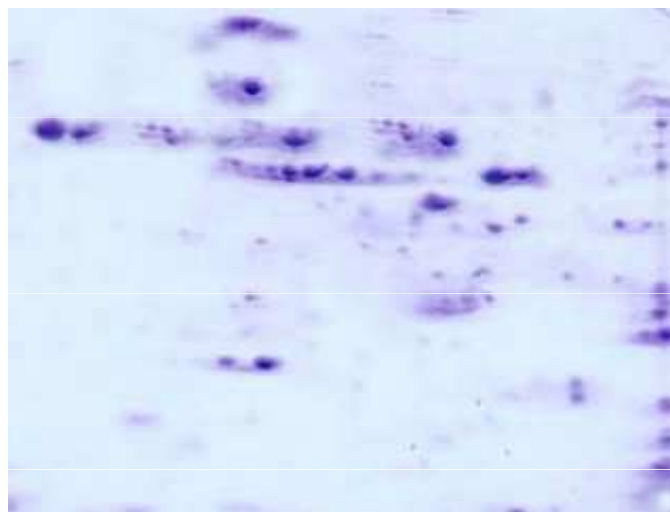
specifické pro protein  
specifické pro PTM

viditelné spektrum  
fluorescence

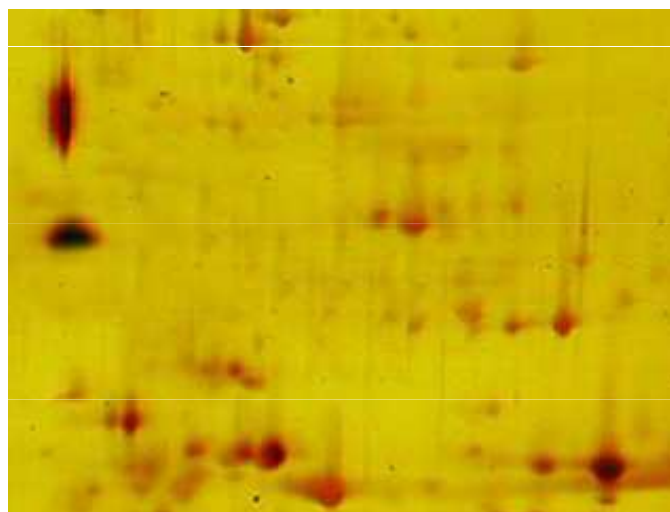
Negativní barvení



CBB



DIGE



Ag

# BARVENÍ PROTEINU V GELU

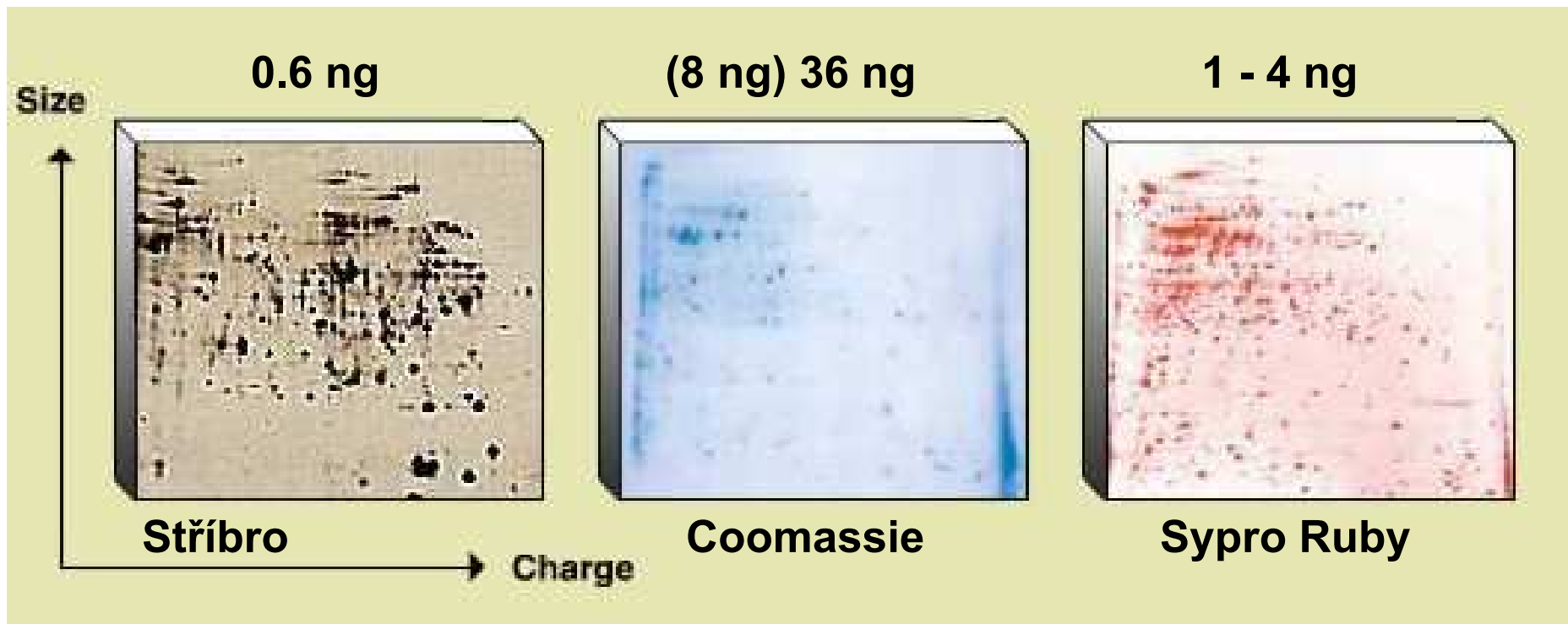
Coomassie Blue R-250, Coomassie Blue G-250

Stříbro: kompatibilní s MS

nekompatibilní s MS

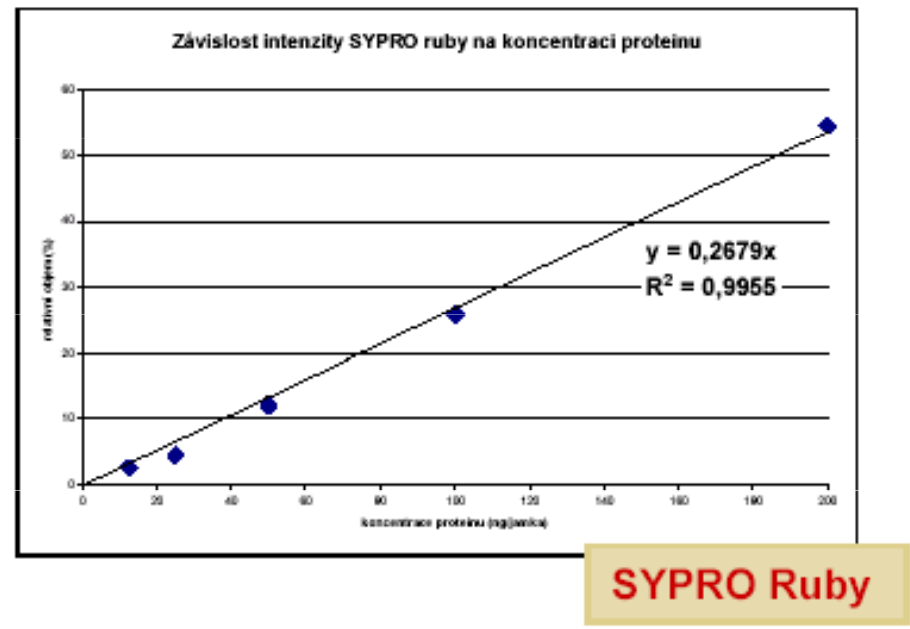
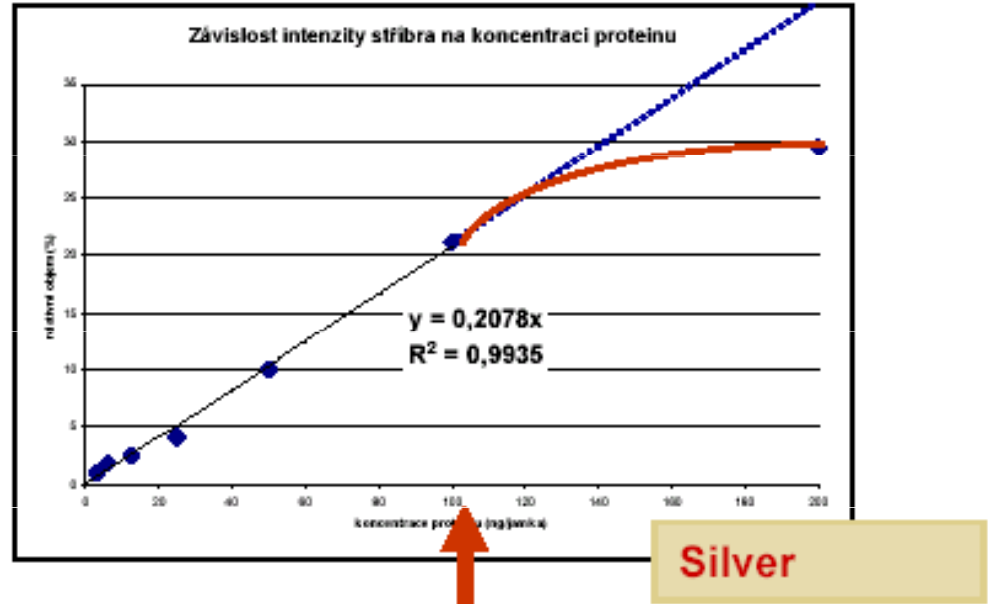
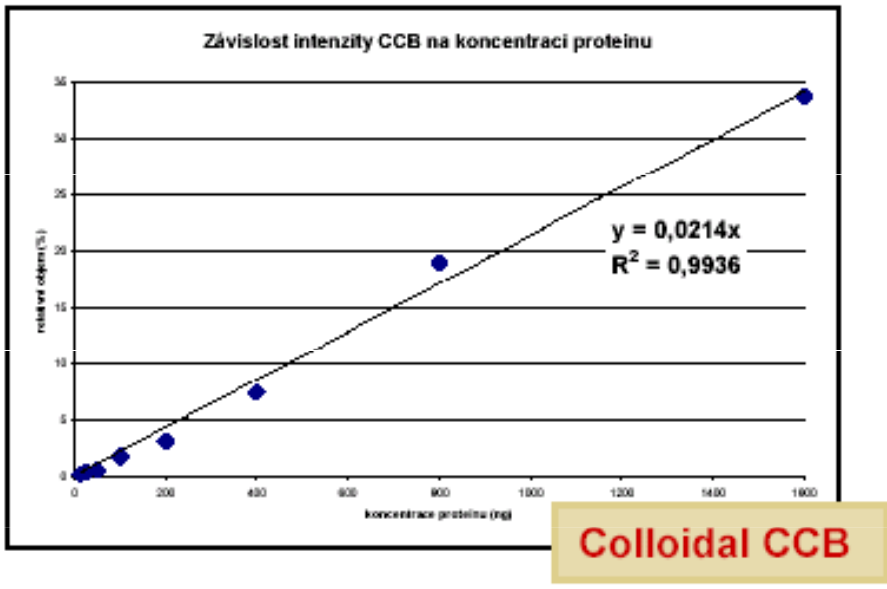
Sypro Ruby, Flamingo Pink, Lucy, Deep Purple

Pro-Q Diamond, Pro-Q Emerald

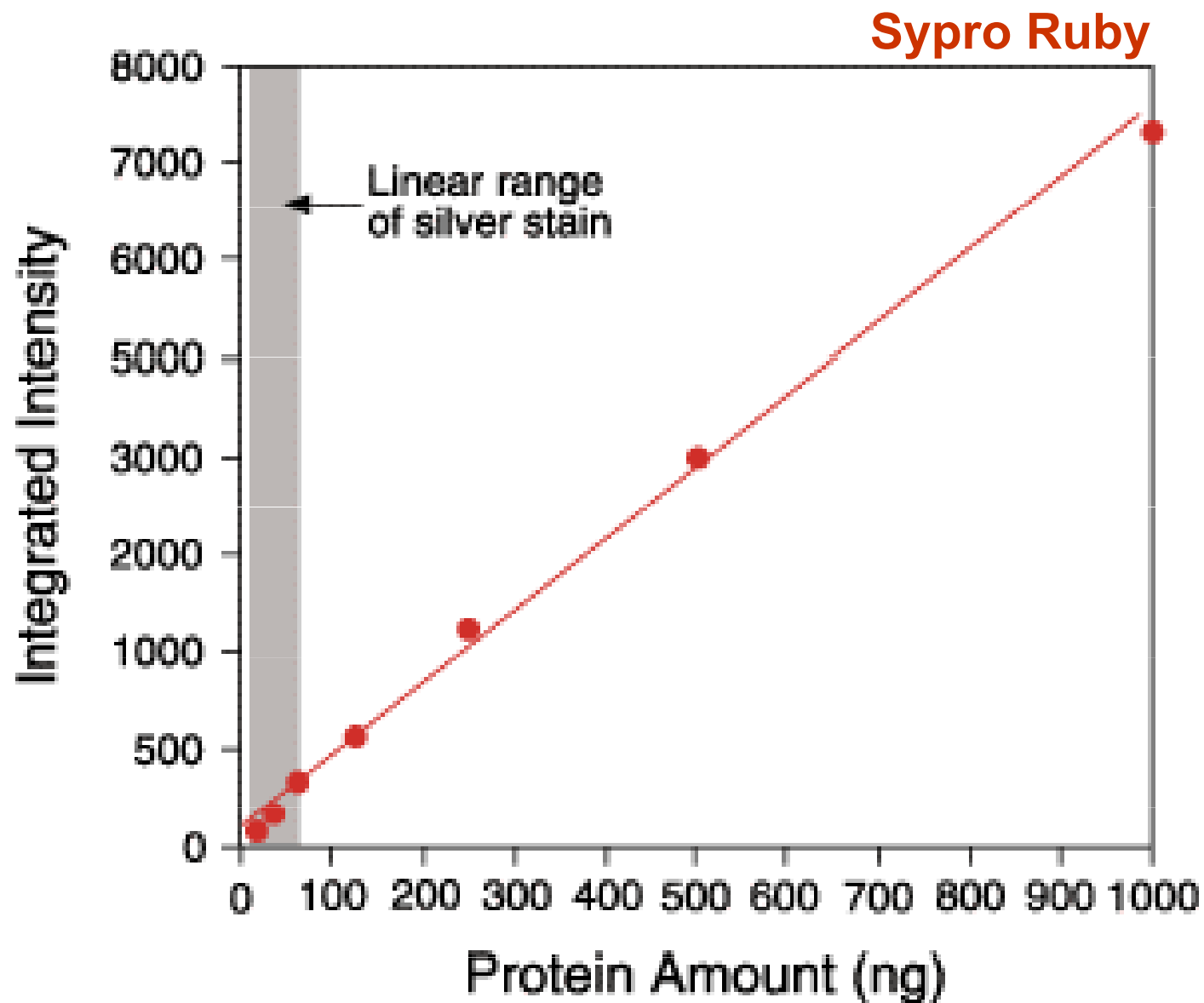


# BARVENÍ PROTEINU

## LINEARITA

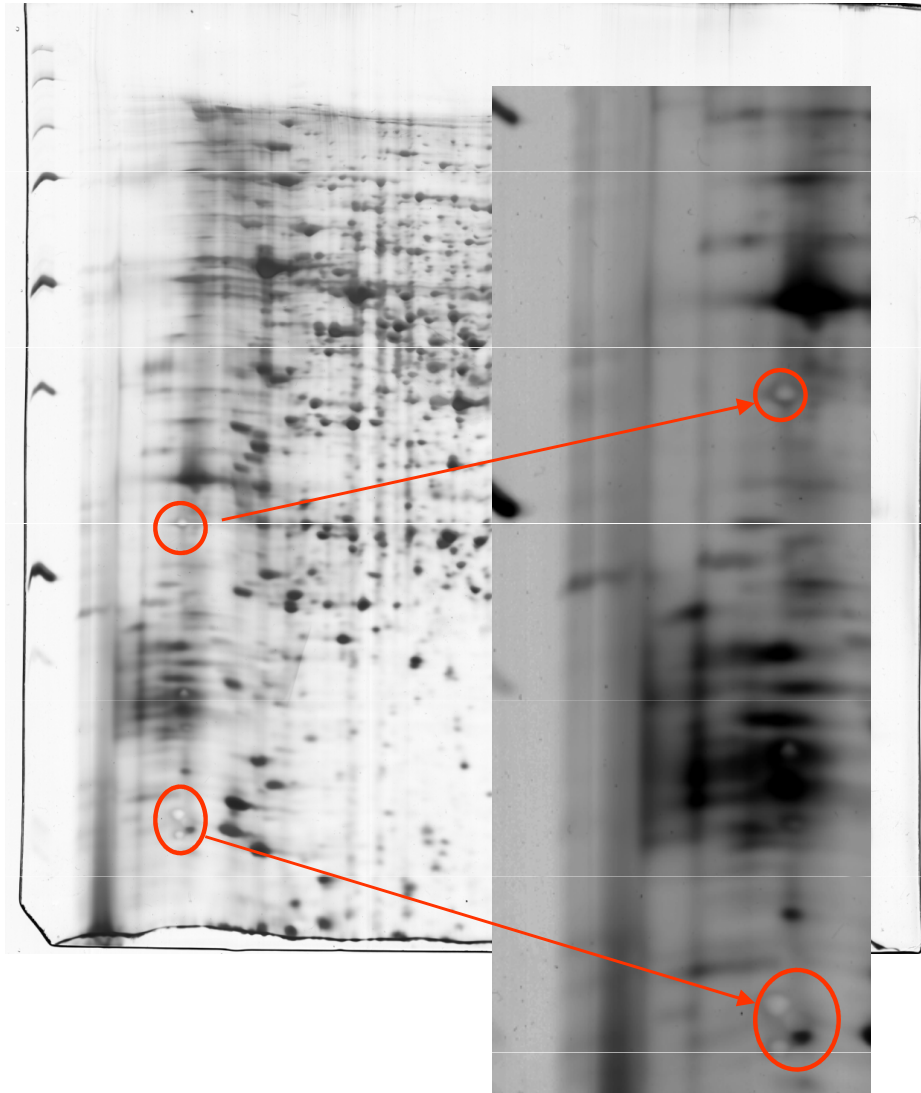


# BARVENÍ PROTEINU – LINEARITA

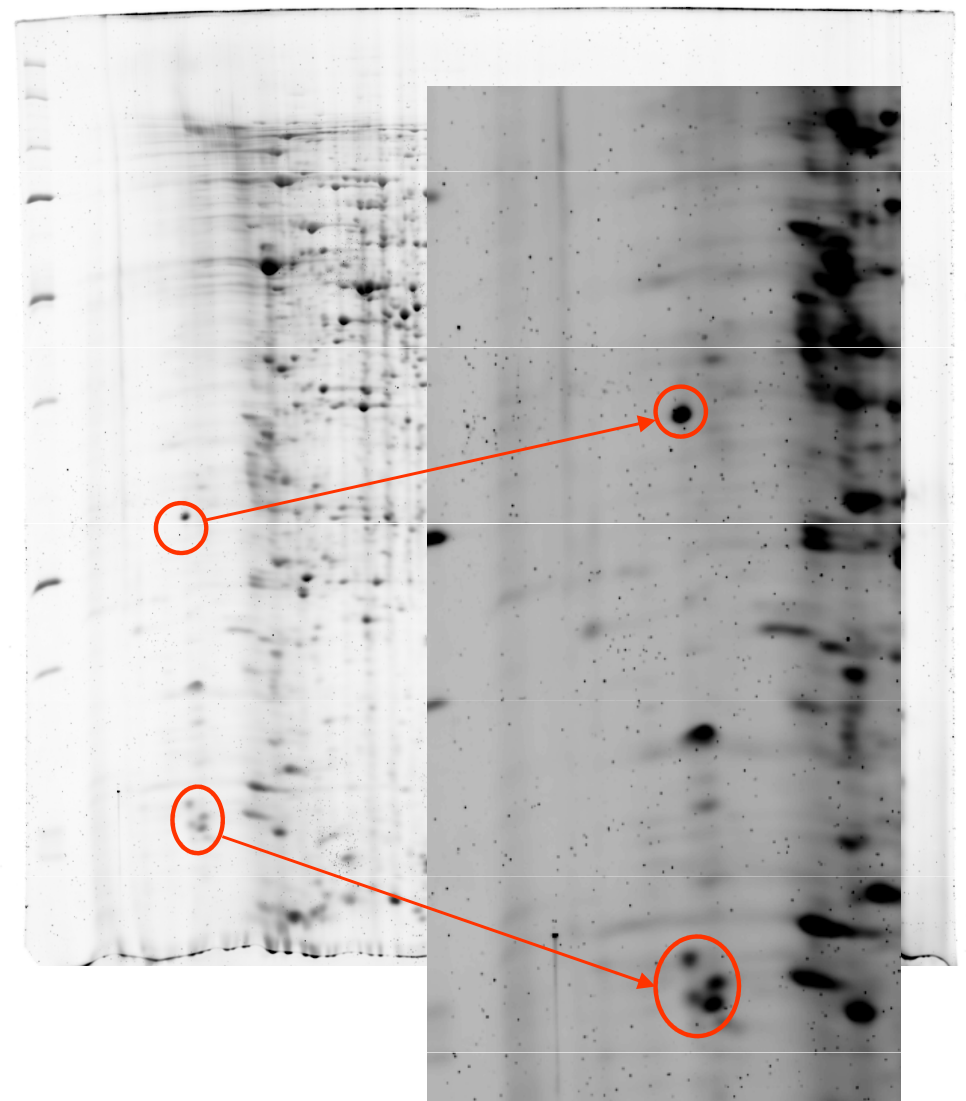




**Ag**



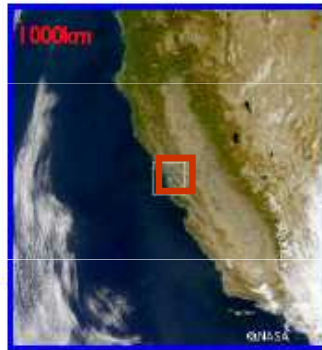
**Sypro Ruby**



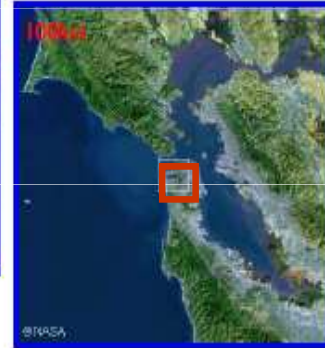
# $10^{10}$ Really Is Wide Dynamic Range



10 10 000km



9 1 000km



8 100km



7 10km



6 1km



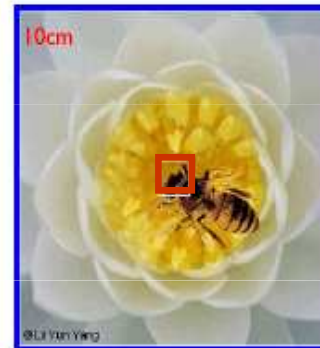
5 100m



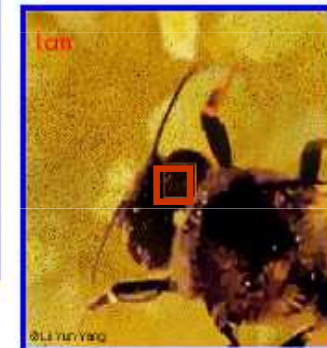
4 10m



3 1m



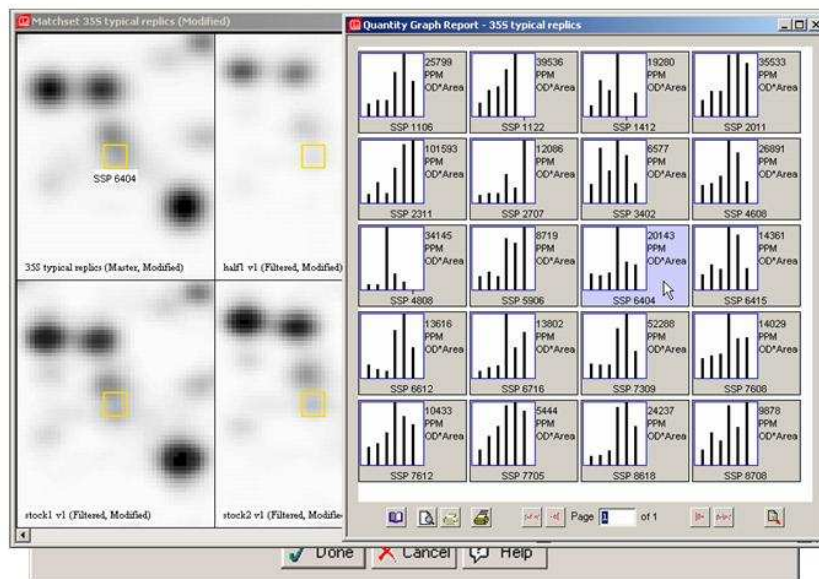
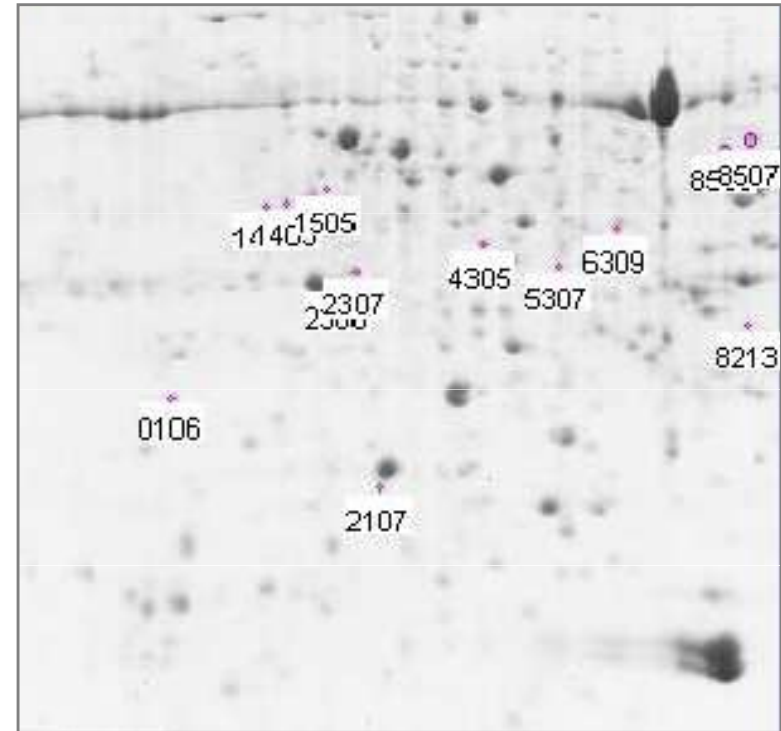
2 10cm

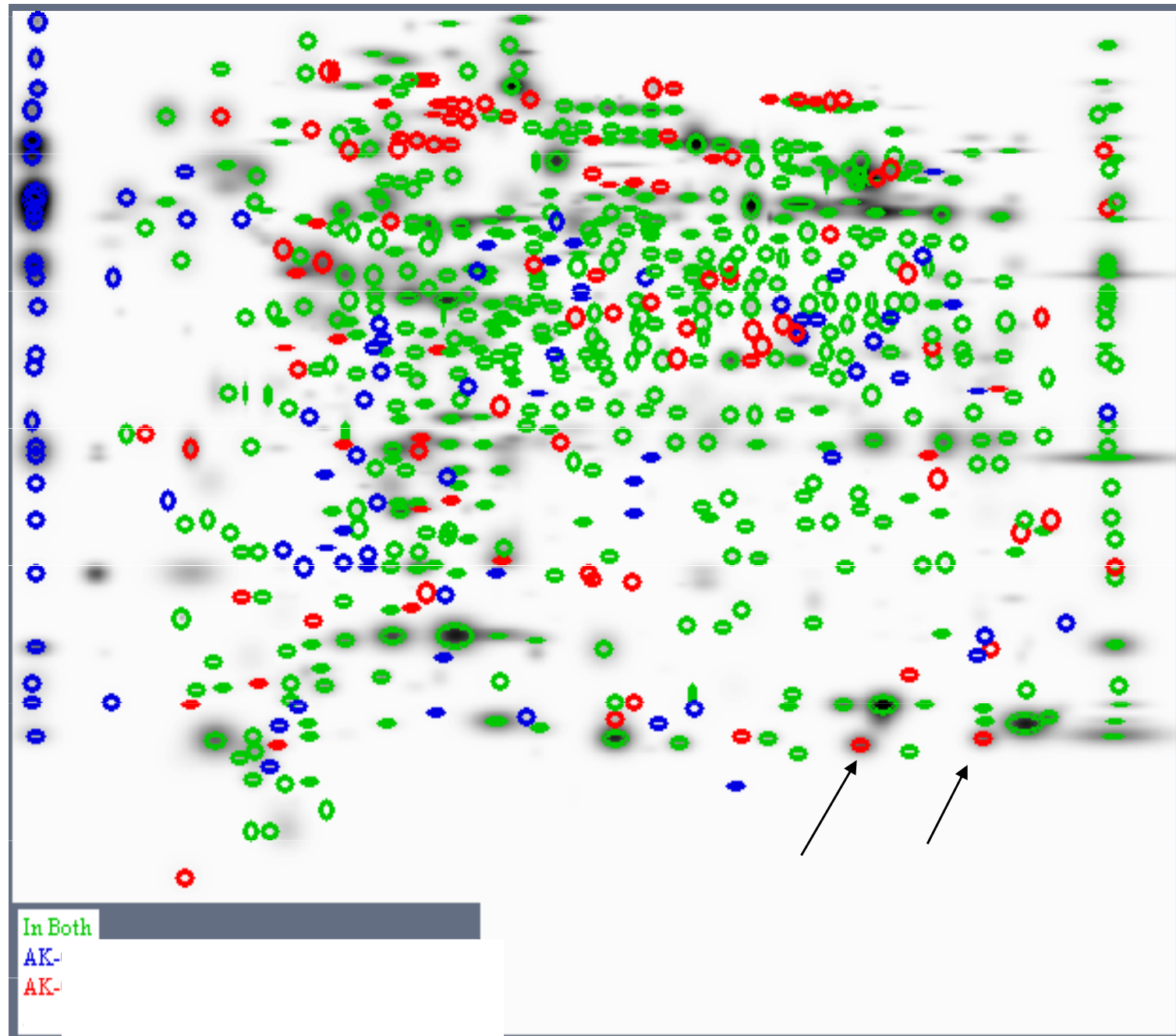


1 1cm

# ANALÝZA OBRAZU

- kvalitativní
- kvantitativní

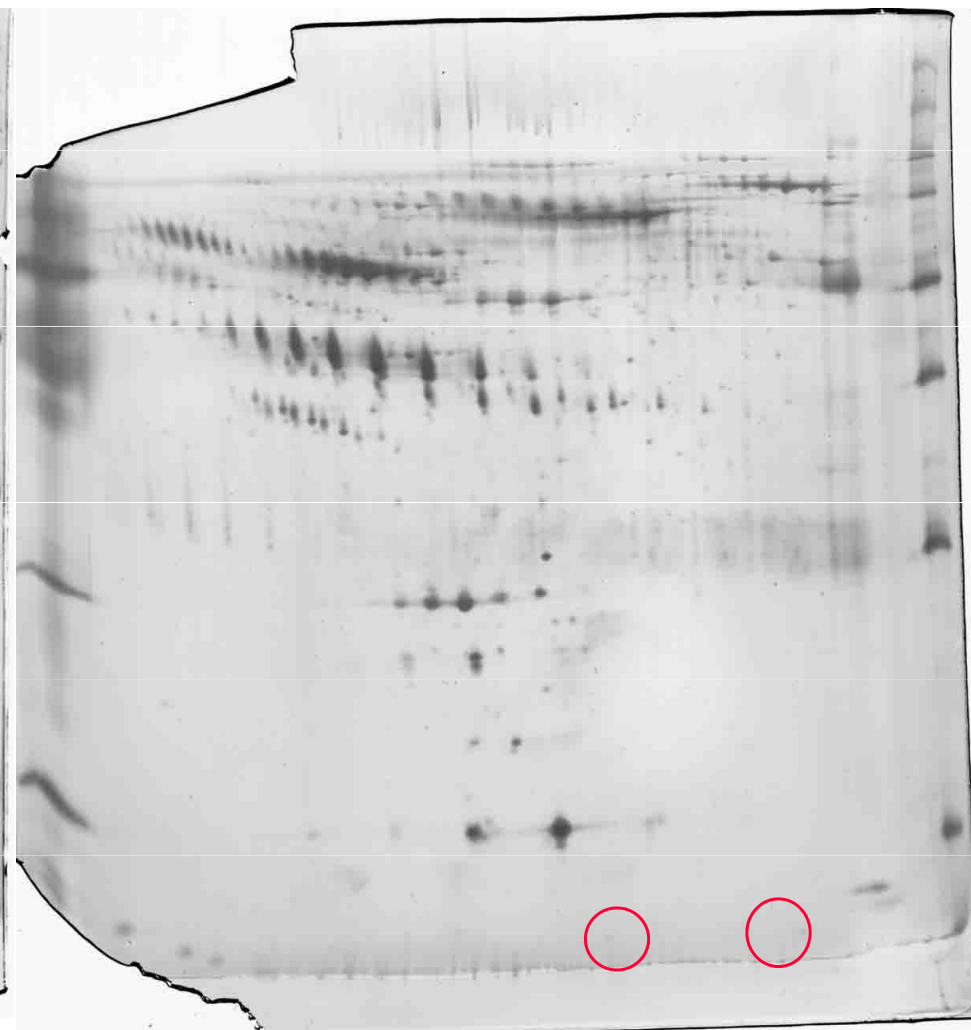
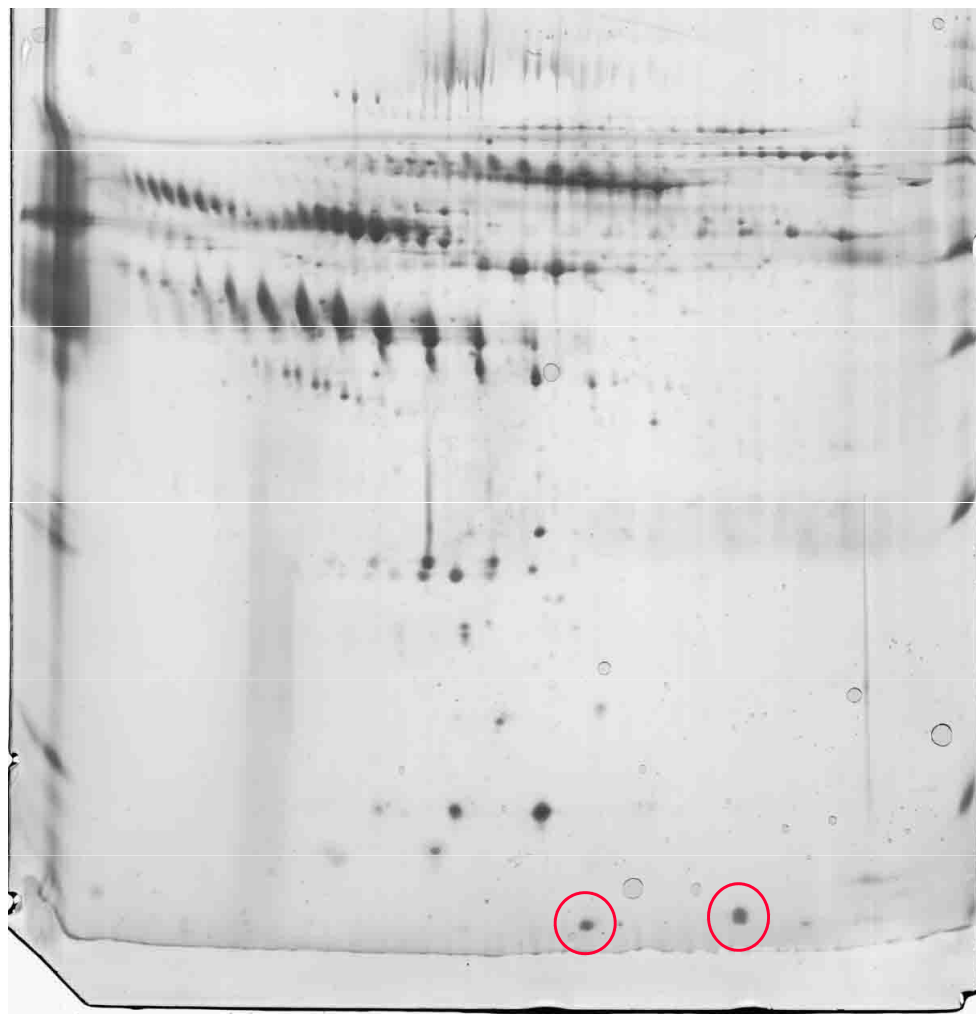




# Biomarkery v lidské plasmě

Den 21 – před klinickým projevem

Den 44 – po klinickém projevu



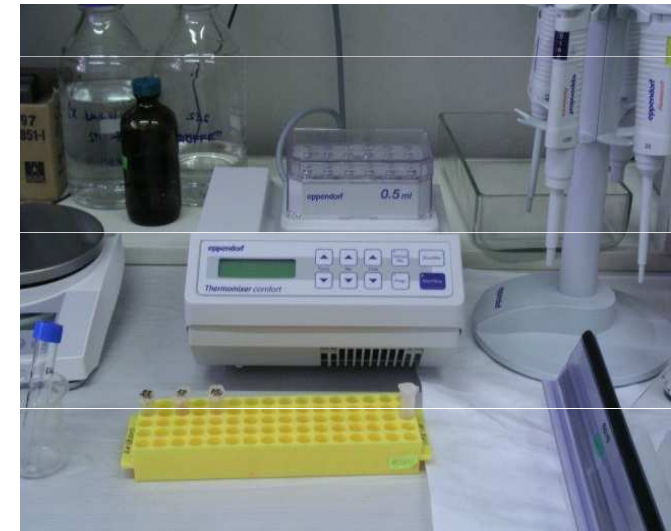
# DIGESCE

trypsin    Glu-C    Asp-N    thermolysin



- IN-GEL
- IN-SOLUTION

MAVEPFRRPITRPHASIEVDTSGTGGGSAGSSE  
KVFLIGQAEGGEPNTVYELRNYAQAKRLFRS  
GELDAIELAWGSPNYTAGRILAMRIEDAKP  
ASAEIGGLKITSKIYGNVANNIQVBLEKNTLSD  
SLRLRVIFQDDRFNEVYDNIGNIFTIKYKGEEA  
NATFSVEHDEETQKASRLVLKVG DQEVKSYD  
LTGGAYDYTNAIITDINQLPDFEAKLSPFGDKN  
LESSKLDKIENANIKDKAVYVKAVFGDLEKQT  
AYNGIVSFEQLNAEGEVPSNVEVEAGEESATV  
TATSPIKTIPEFELTKLKGGTNGEPPATWADKL  
DKFAHEGGYYIVPLSSKQSVHAEVASFVKERS  
DAGEPMRAIVGGGFNESKEQLFGRQASLSNPR  
VSLVANSGETFVMDDGRKNHVPAYMVAVALGG  
LASGLEIGESITFKPLRVSSLDQIYESIDLDELN  
ENGIISIEFVRNRTNTFFRIVDDVTTFNKSDPV  
KAEMAVGEANDFLVSELKVQLEDQFIGTRTIN  
TSASIKDFIQSYLGRKKRDNEIQDFPAEDVQVI  
VEGNEARISMTVYPIRSFKKISVSLVYKQQTLLQ  
A

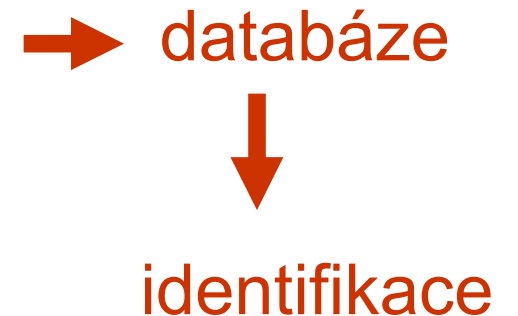
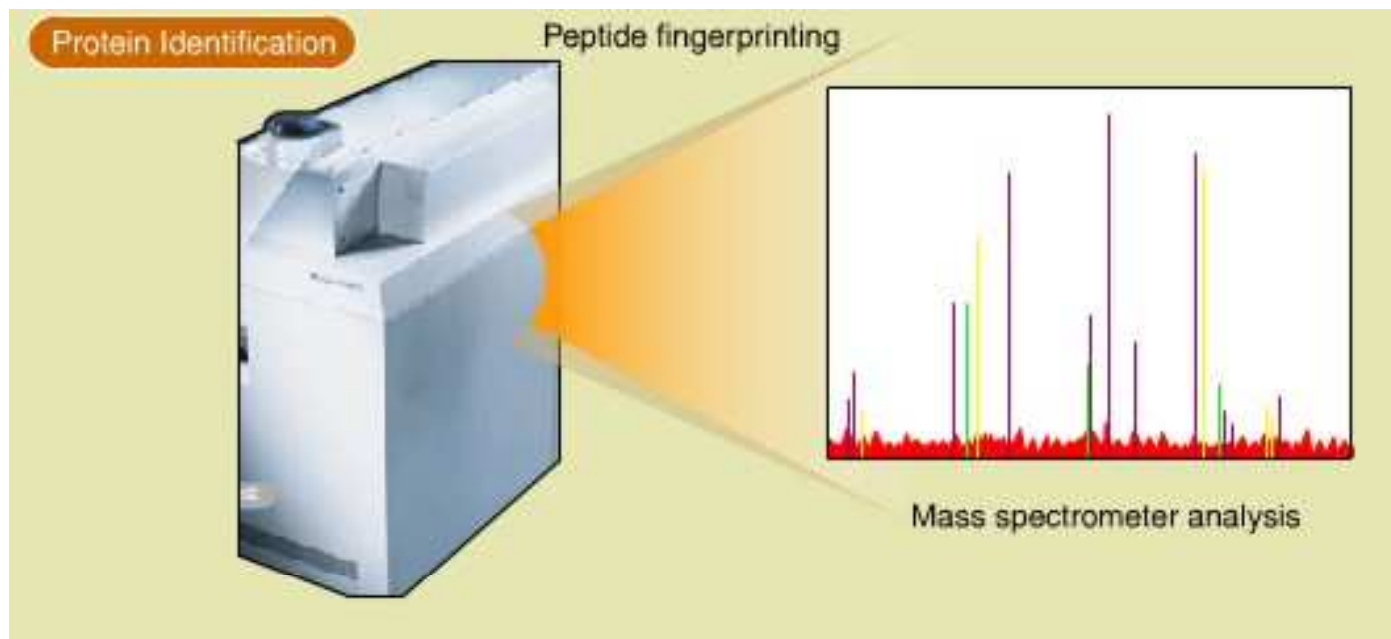


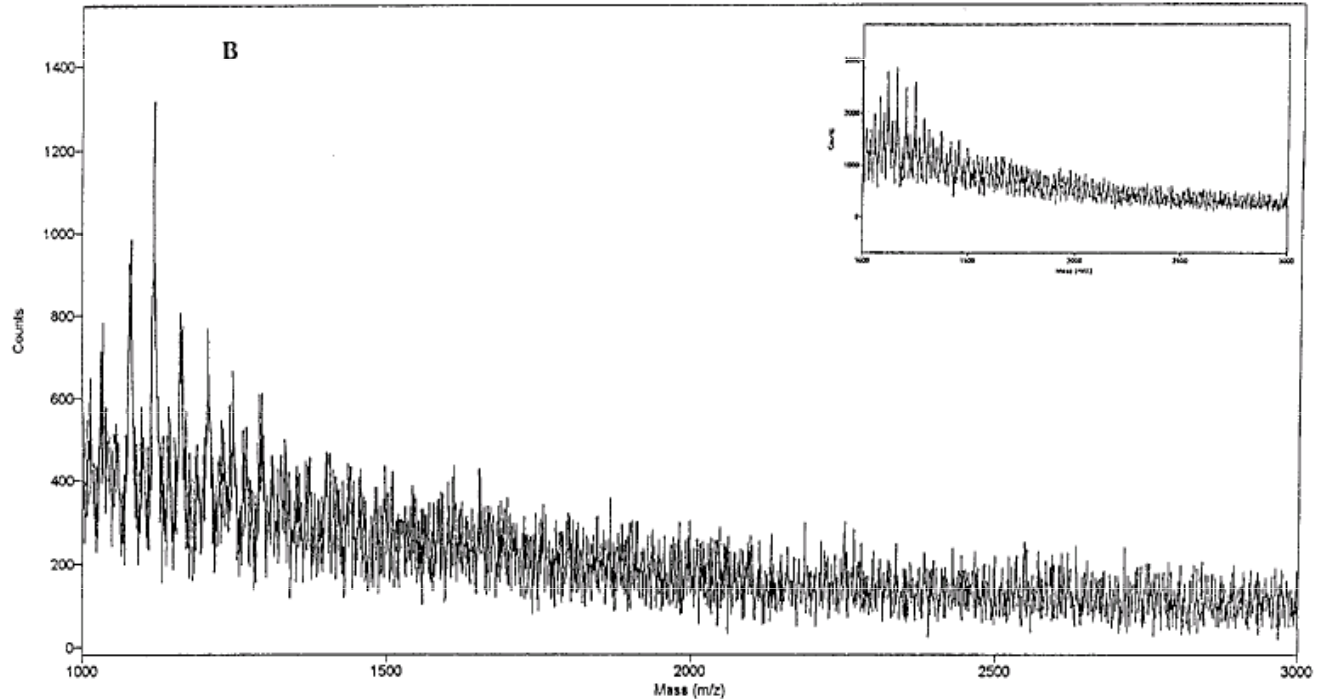
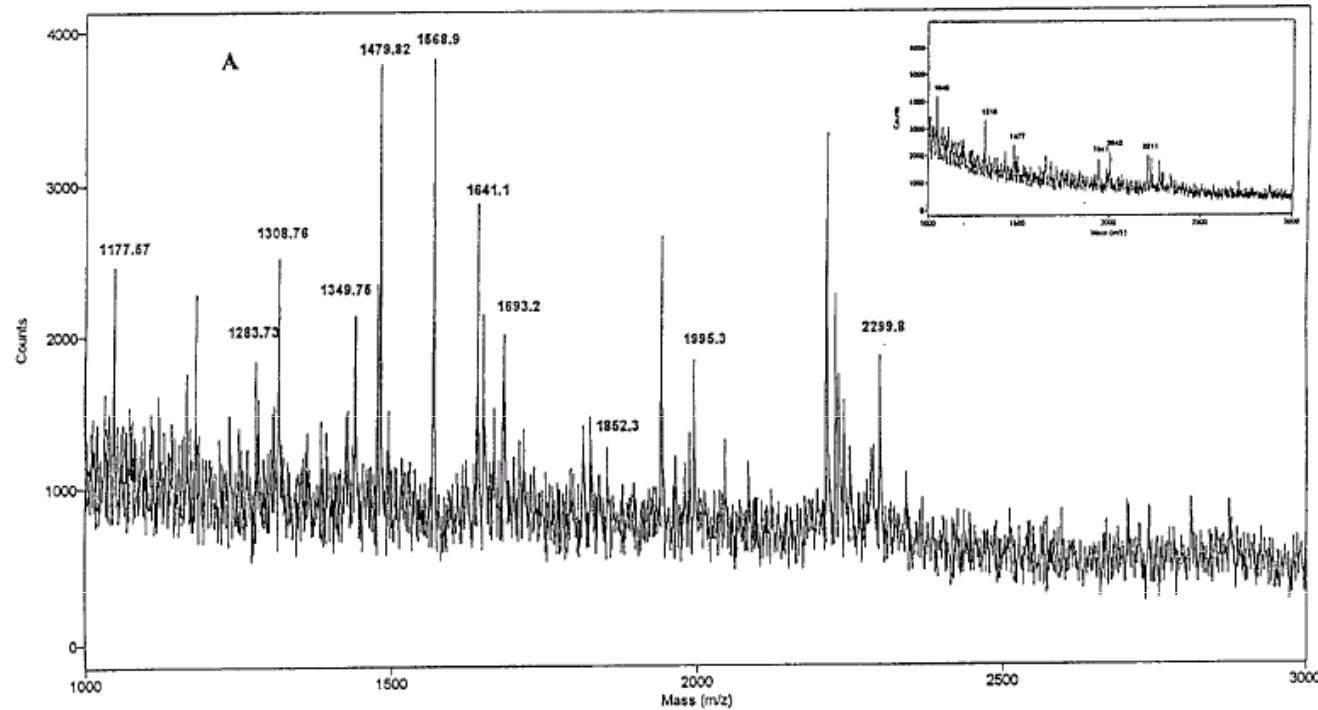
MS

# IDENTIFIKACE

## HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

- ionizátor, analyzátor, detektor
- hmotnost/náboj
- **MALDI** generuje ionty z pevné fáze
- **ESI** generuje ionty z kapalně fáze





**DIGEST**

**BSA**

v gelu

kompatibilní stříbro

**odbarvený gel**

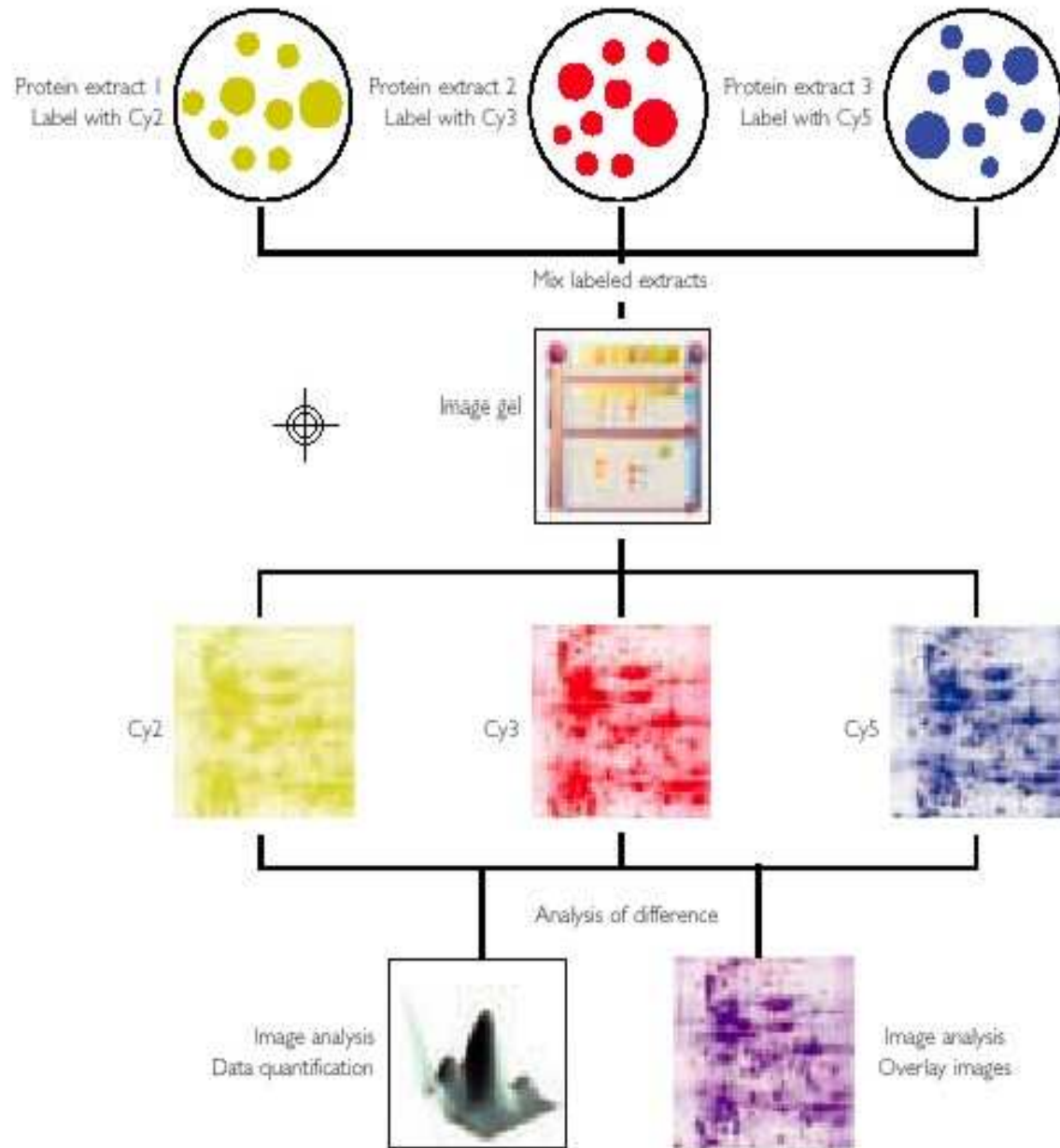
**gel bez odbarvení**



## 2D or not 2D ?

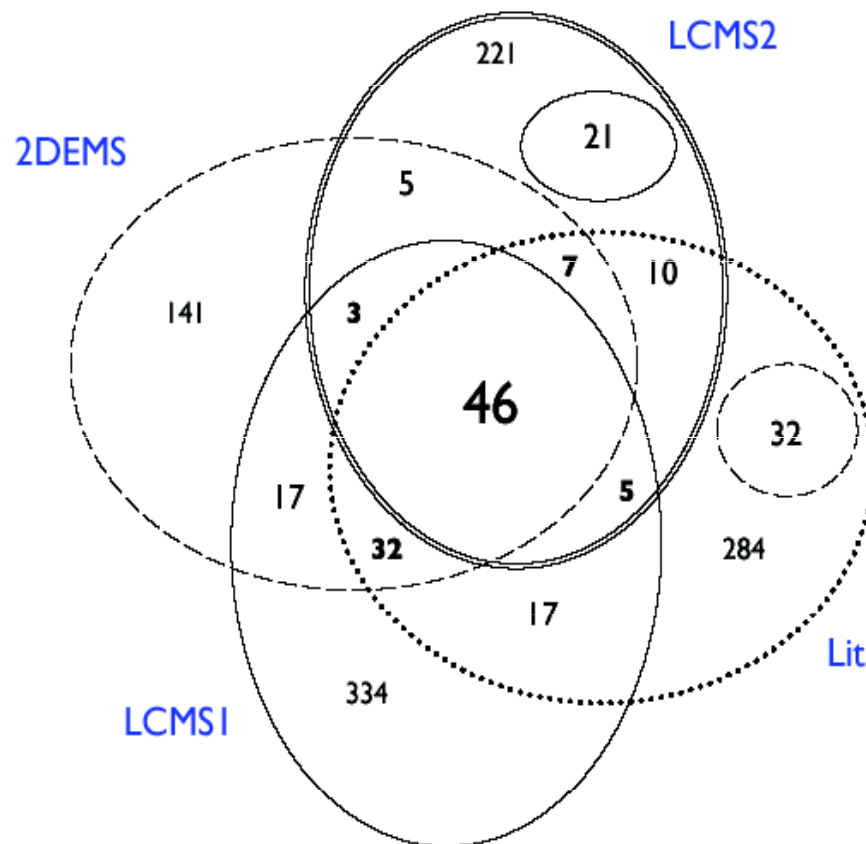
- rozlišení
- vizuální aspekty
- multigelové jednotky
- dynamický rozsah
- extrémní proteiny (membránové, basické...)
- reprodukovatelnost, image analýza
- citlivost barvení
- pracnost
- nesnadná automatizace
- postdigesční extrakce

# Difference Gel Electrophoresis DIGE



# Different Platforms See Different Plasma Proteomes: Small Overlap of Four Plasma Proteome Datasets (Number of NR proteins)

---

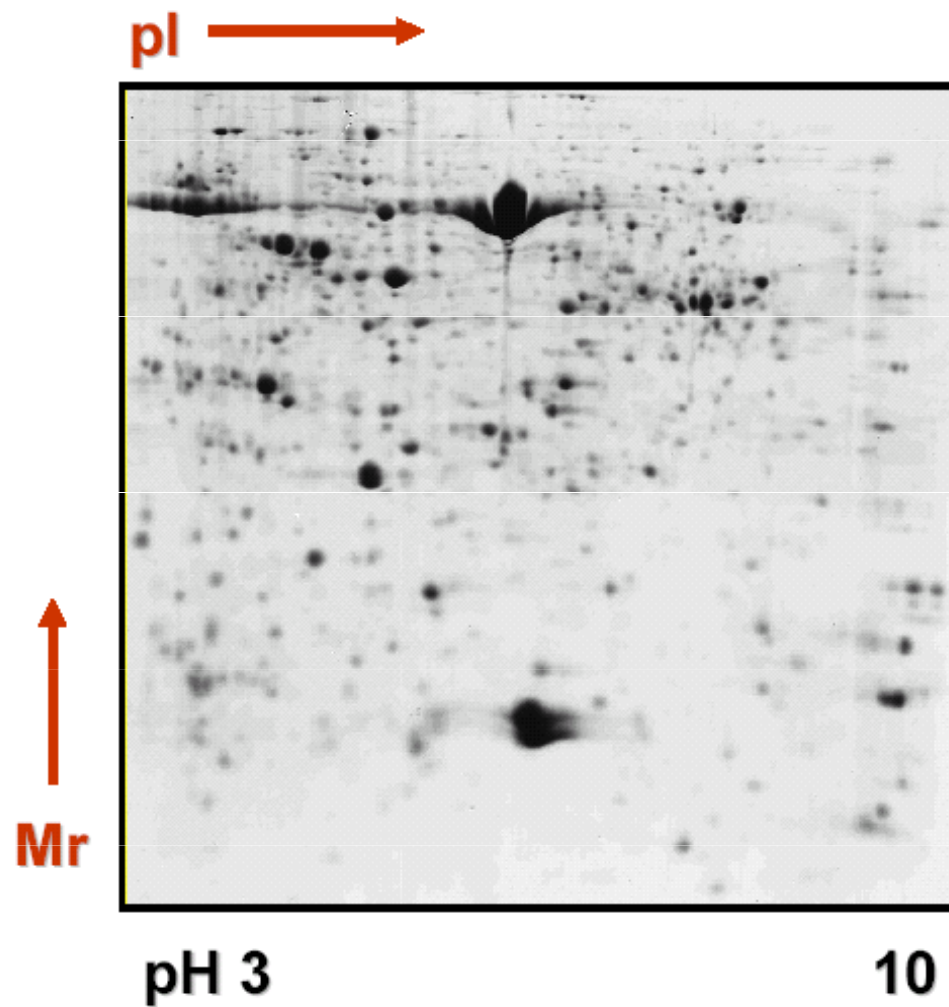


- 46 proteins in all four lists
- 195 proteins in 2 or more lists
- 1175 NR proteins total

# Struktura našeho experimentu

- příprava vzorku
- 1. dimenze: **IEF** rehydratace IPG stripu (pasivní, se vzorkem)  
izoelektrická fokusace
- 2. dimenze: **SDS-PAGE** příprava gelu  
ekvilibrace IPG stripu v SDS pufru  
přenos IPG stripu na povrch gelu  
elektroforéza
- barvení proteinů
- obrazová analýza
- in-gel digesce
- analýza proteolytického digestu hmotnostní spektrometrií
- databáze – určení identity proteinu

Tak by měla vypadat vaše separace...



# KERATINY !!! Potlačení ionizace

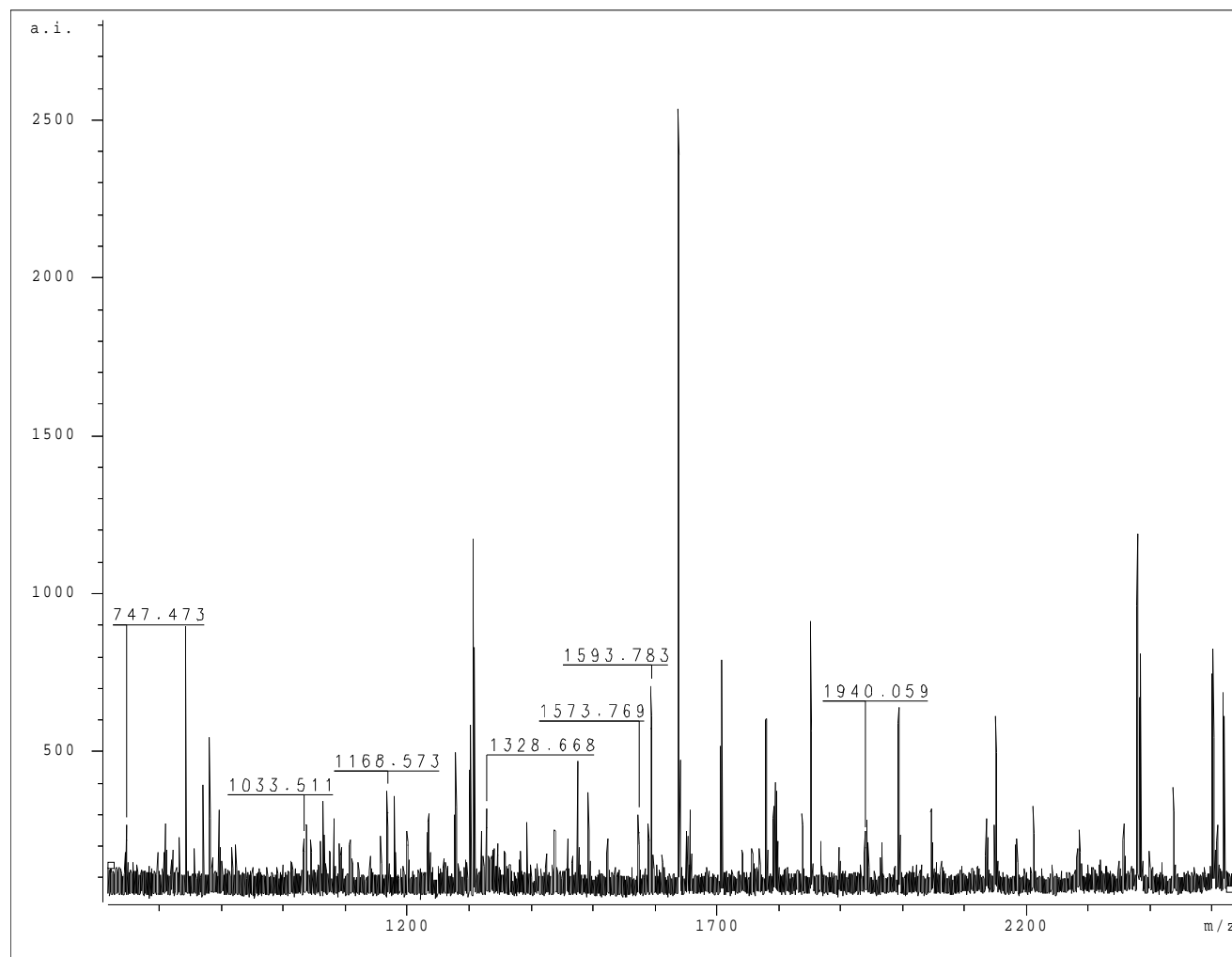
alpha-1-antitrypsin, antitrypsin

Score 83

potvrzeno na MALDI-TOF/TOF MS

Score 239

Neoznačené píky: **keratiny** nebo autolýza trypsinu



G I G O

G I G O

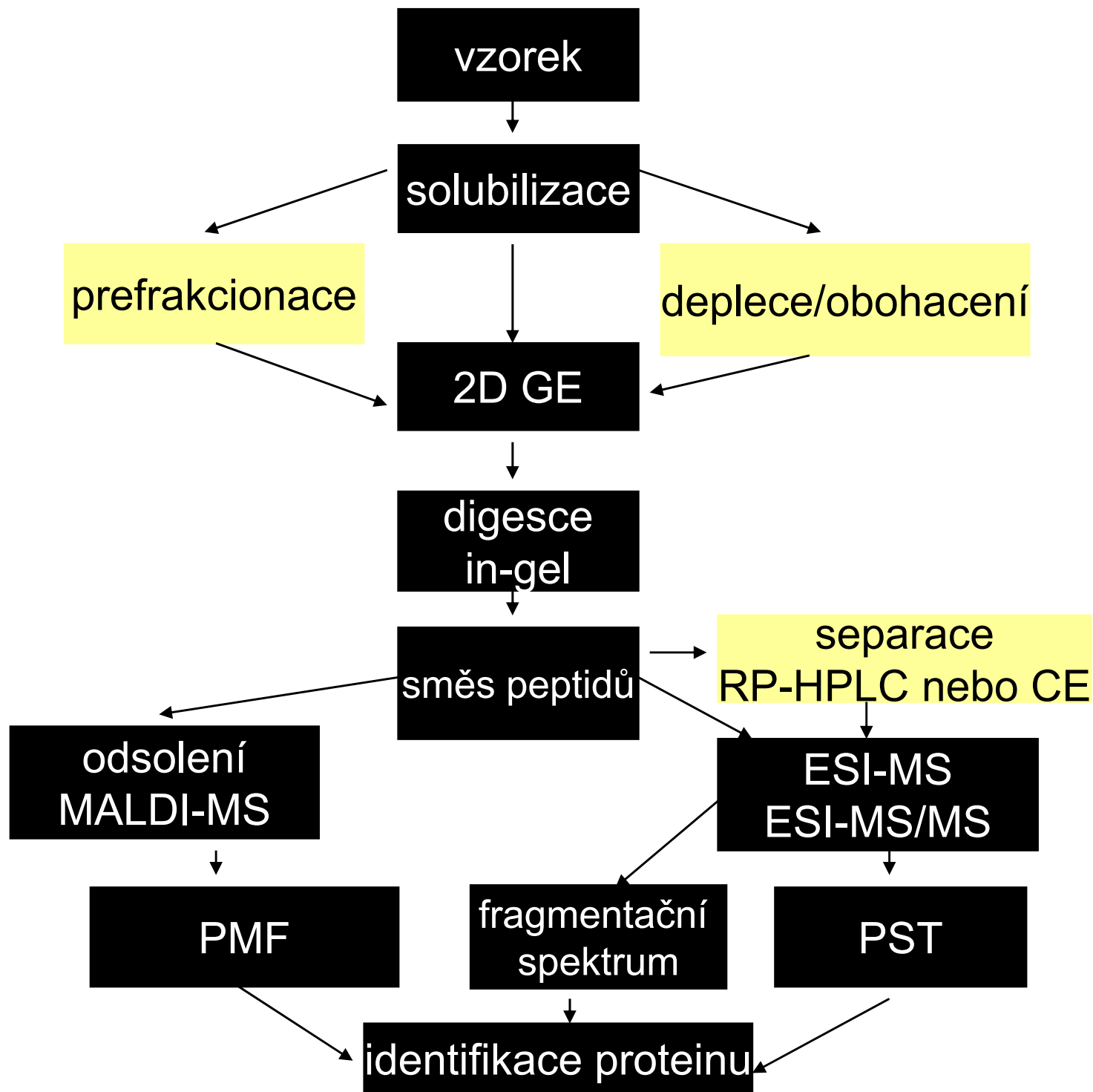
GARBAGE IN - GARBAGE OUT



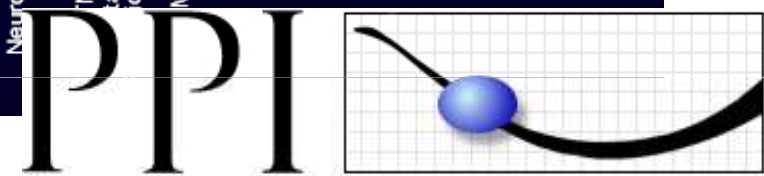
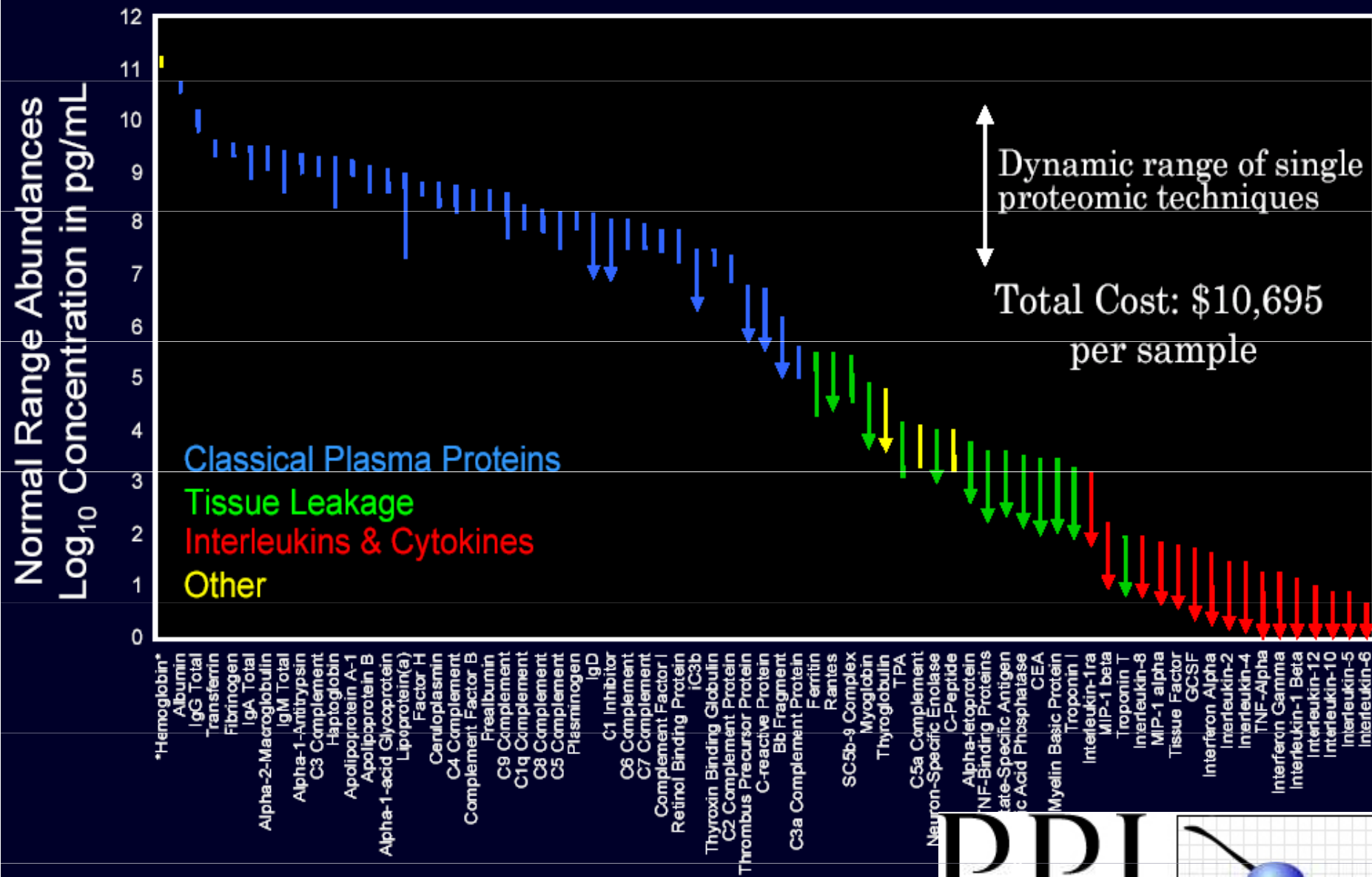
## LITERATURA

- R.M. Twyman: Principles of Proteomics
- R.Westermeier, T.Naven: Proteomics in Practice
- A.J.Link: 2D Proteome Analysis Protocols
- T.Rabilloud: Proteome Research: Two-dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods
- A. Gorg, W. Weiss, M.J.Dunn: Proteomics 2004, 4, 3665, rev.
- I. Miller, J. Crawford, E. Gianazza: Proteomics 2006, 6, rev.
- Current Protocols in Protein Science

## II. PREFRAKCIONACE



# Proteins Measured Clinically in Plasma Span > 10 Orders of Magnitude in Abundance



## PREFRAKCIONACE



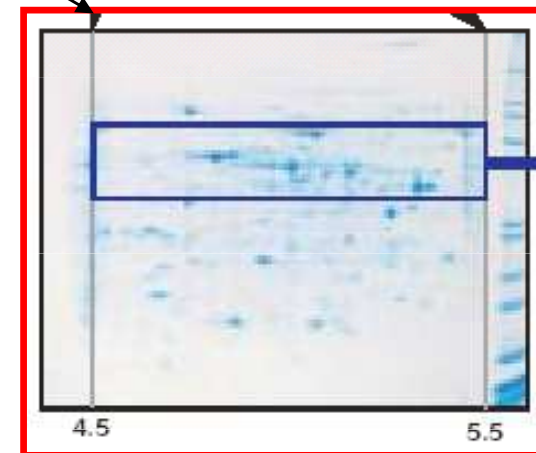
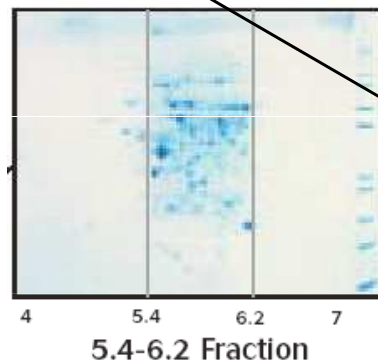
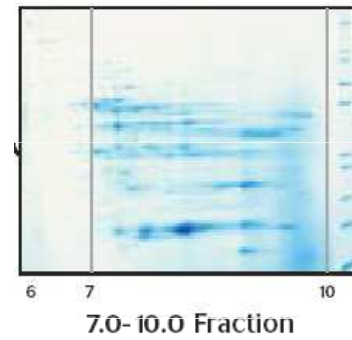
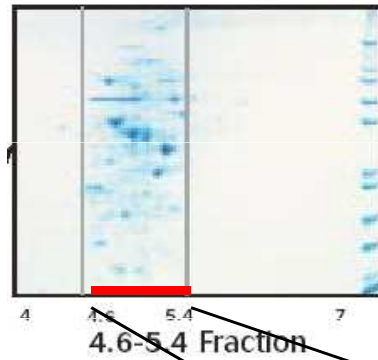
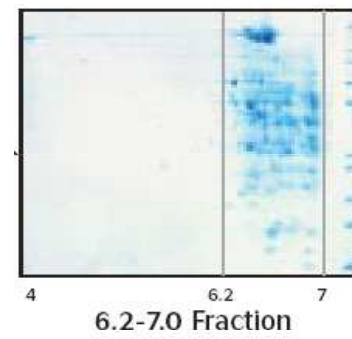
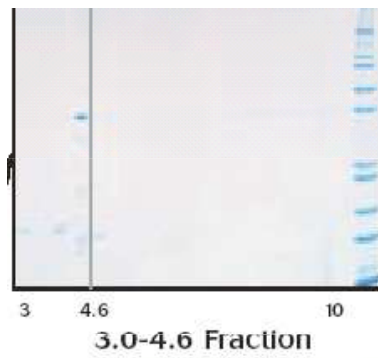
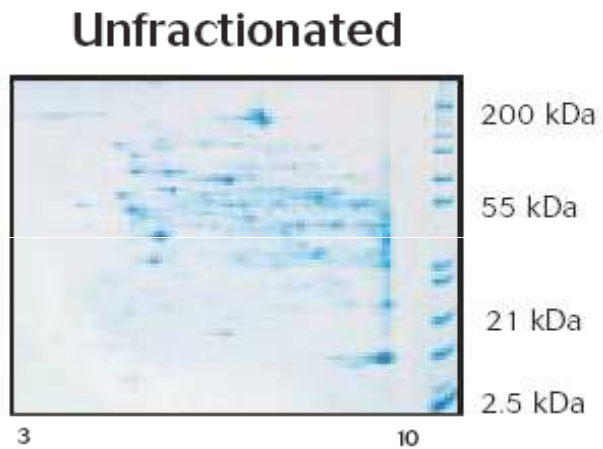
MicroRotorfor



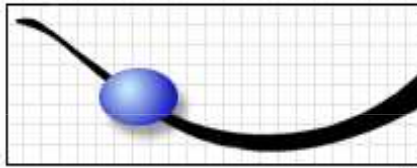
Zoom IEF

# PREFRAKCIÓNACE MIKRO ROZSAHY

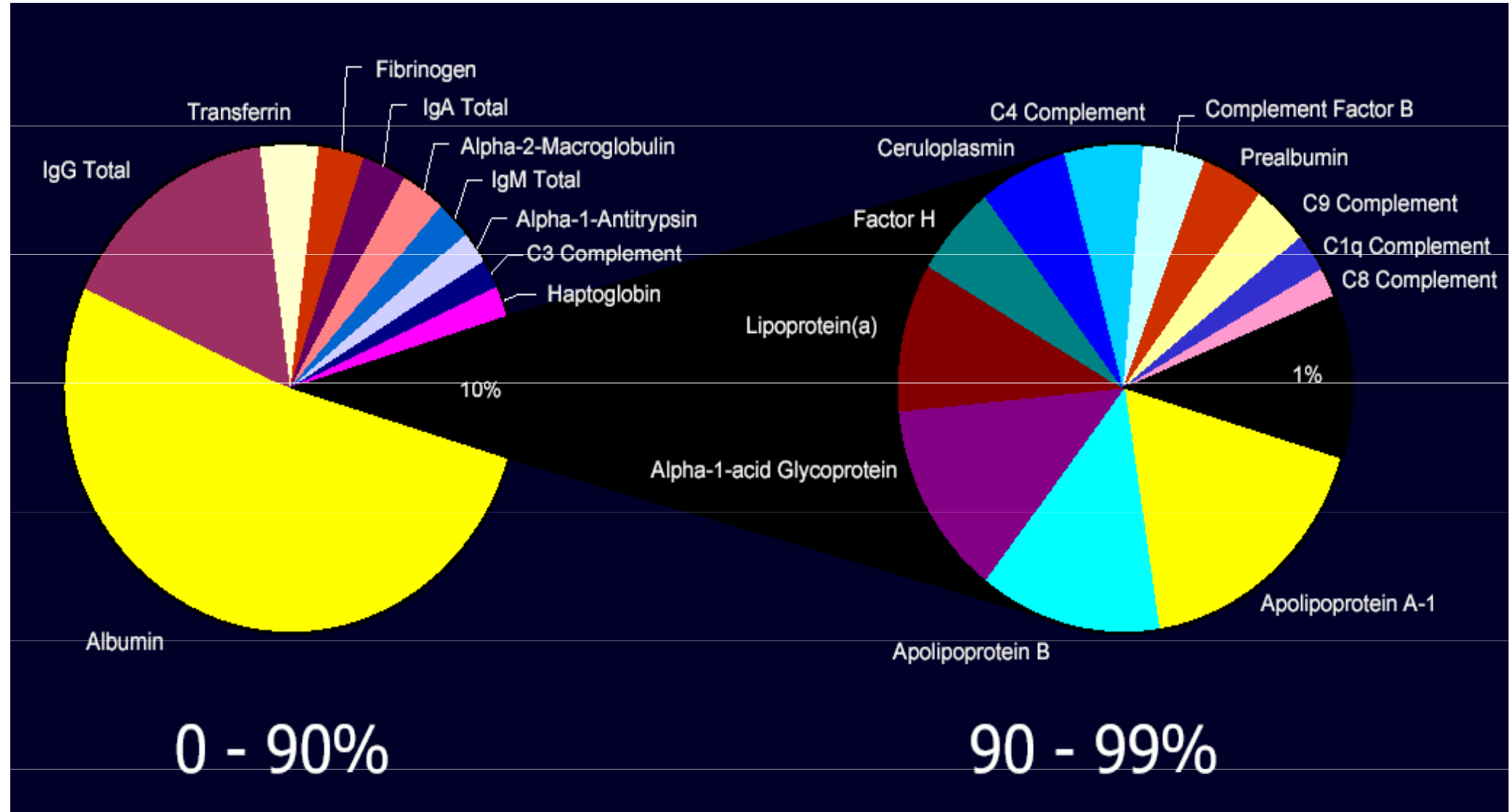
pl



# PPI



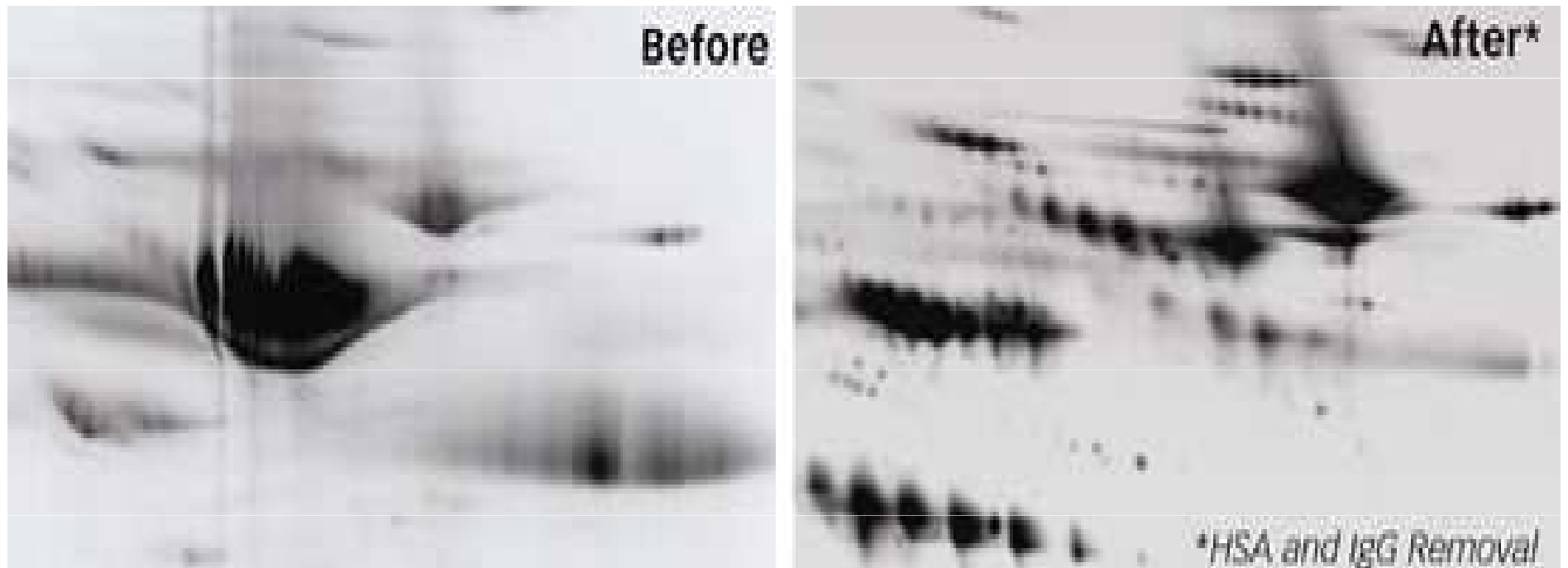
The Plasma Proteome Institute



# DEPLECE

odstranění abundantních proteinů

HSA  
IgG

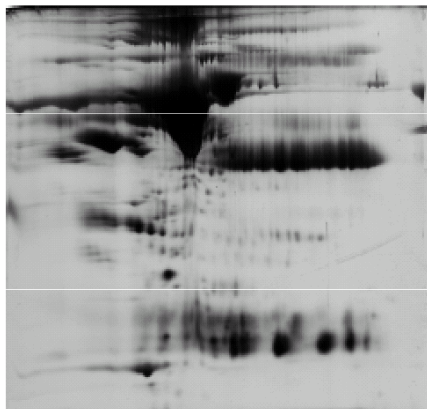


Vivapure Kit



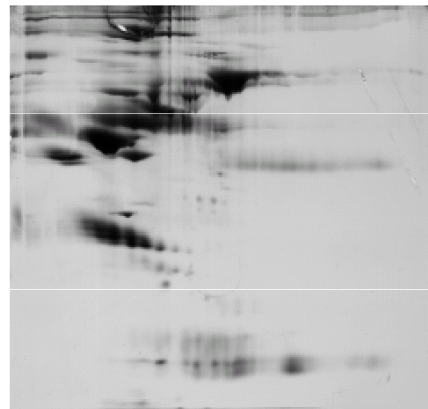
# Deplece

A



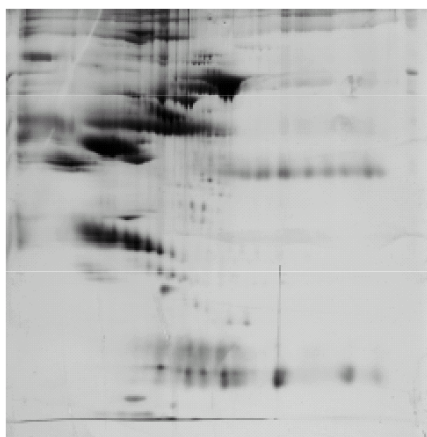
**nedepletované sérum**

B



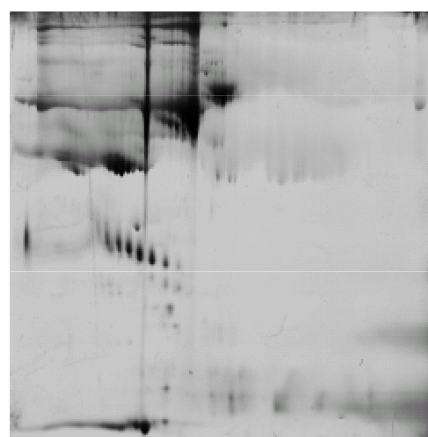
**depletované sérum**

C

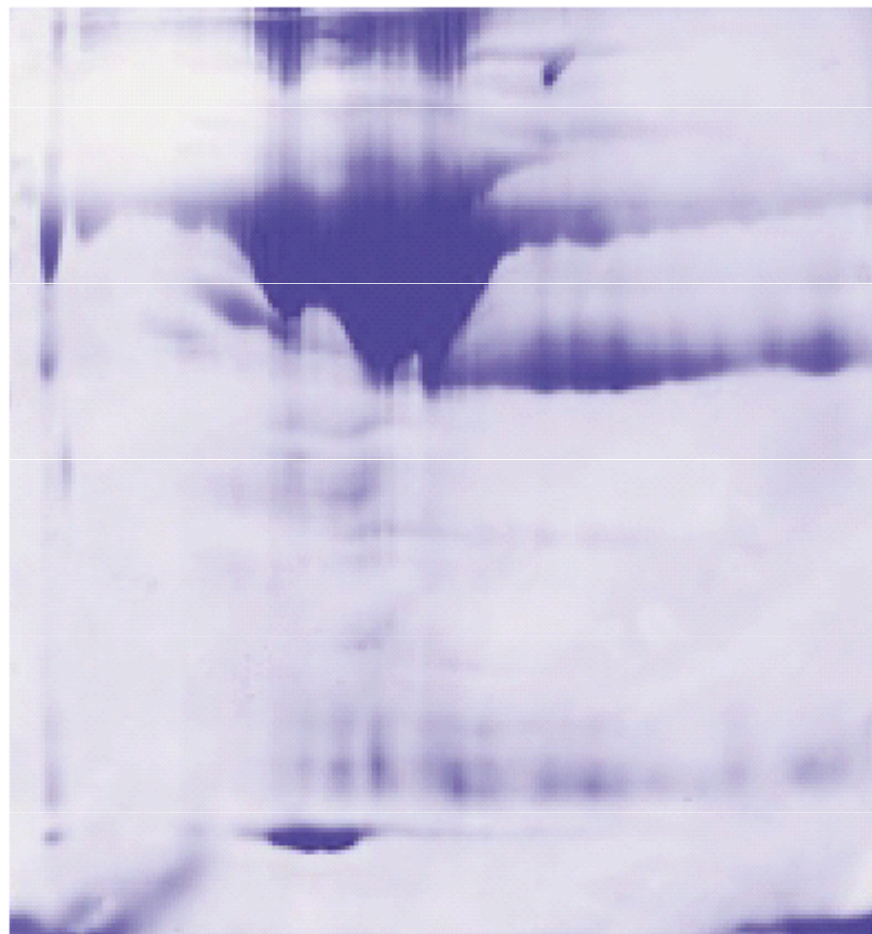


**redukce a alkylace**

D



**vázaná frakce**



**vázaná frakce**

# Lidská plazma - vázaná frakce po afinitní depleci

ALBUMIN

IgG

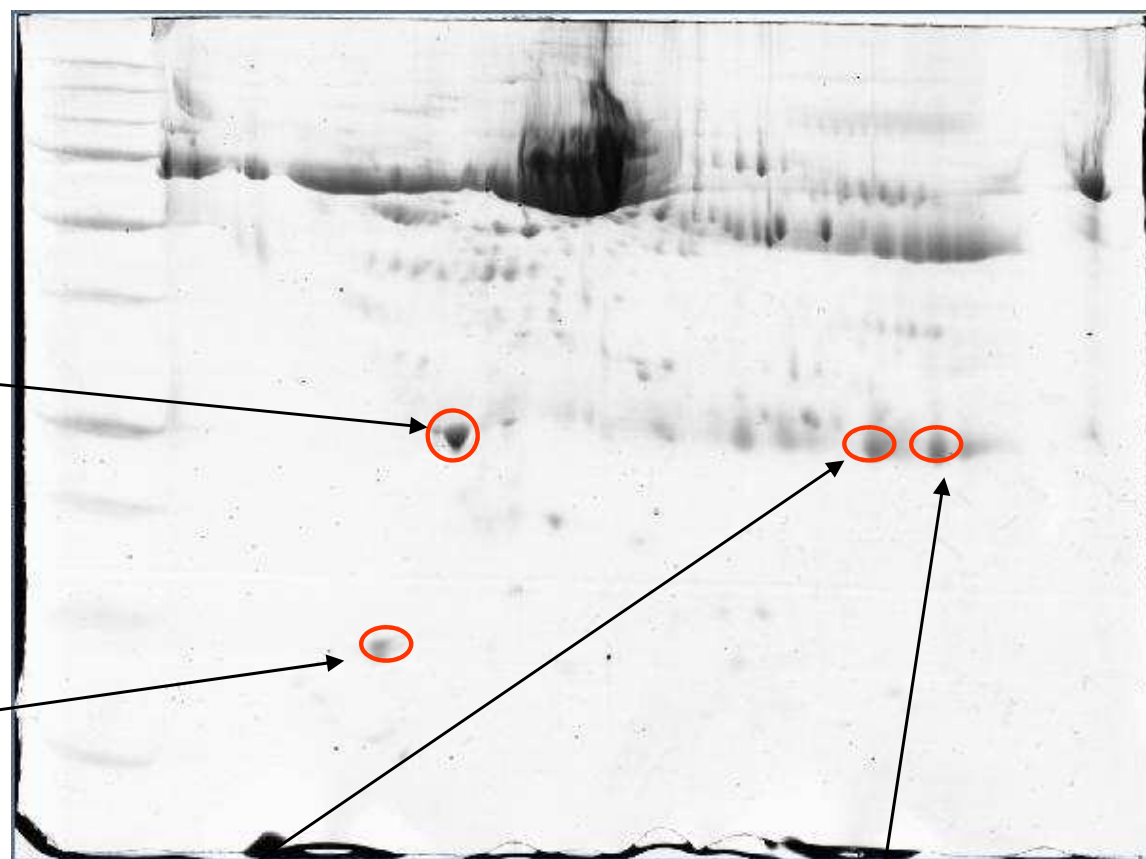
Barvení: CB G-250

Apolipoprotein

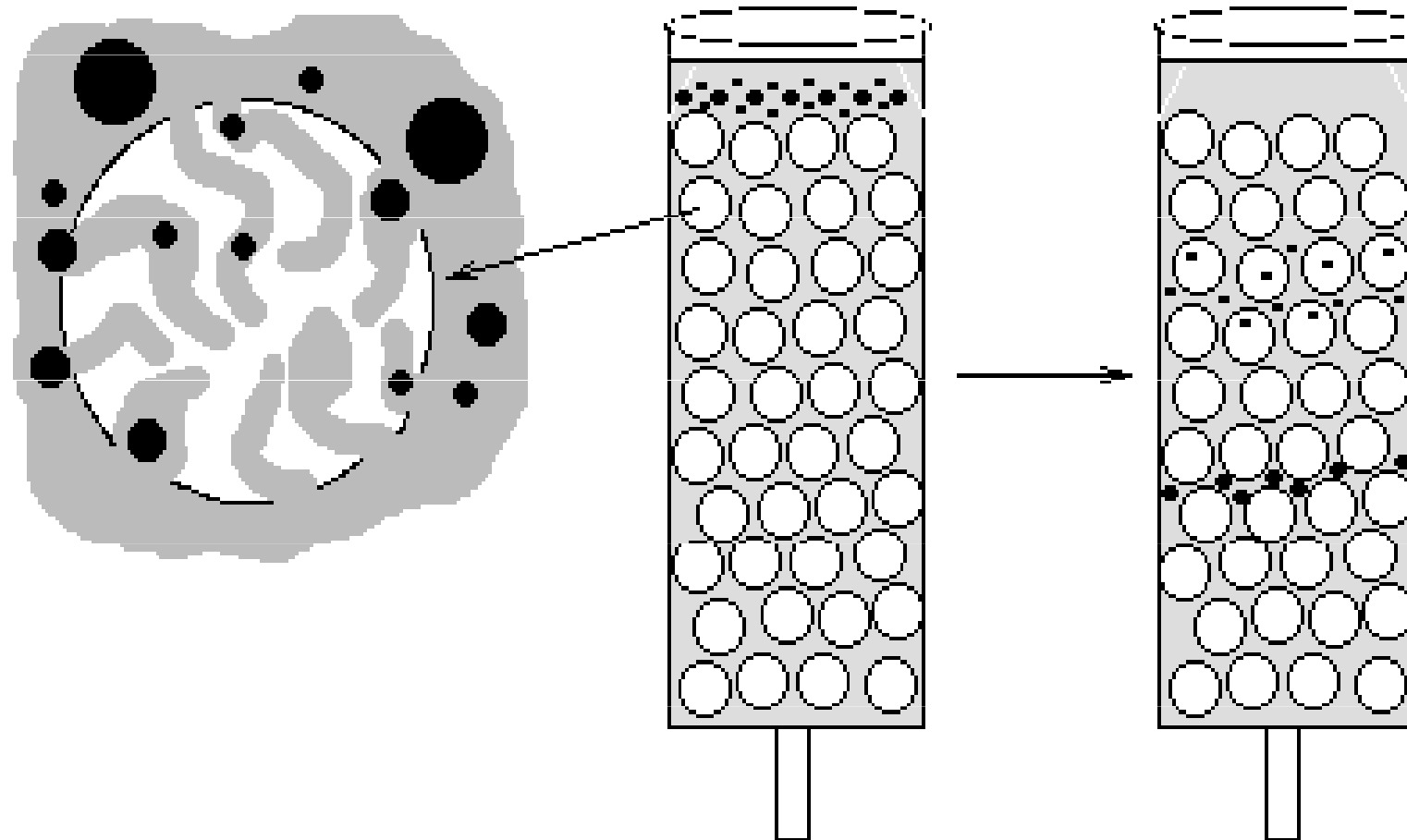
albumin

Immunoglobulin kappa light chain

Immunoglobulin light chain



# GELOVÁ CHROMATOGRAFIE



# III. CENTRÁLNÍ LABORATOŘ

# CENTRÁLNÍ LABORATOŘ

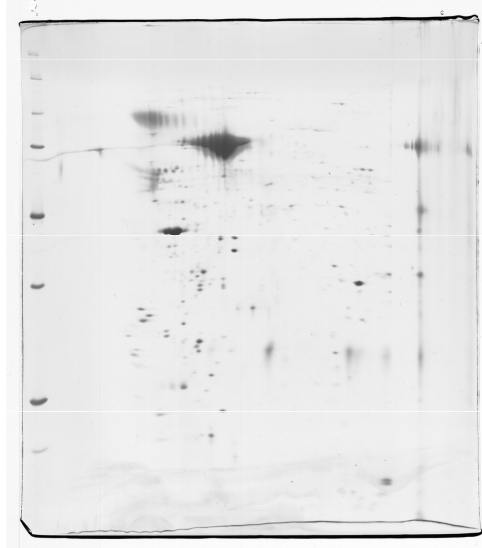
- přístup k pokročilým technologiím na bázi sdílené instrumentace a její kvalifikované obsluhy
  - proteomické techniky
  - genomické techniky
- výuka - přednášky a praktické kurzy
- členství v **A**ssociation of **B**iomolecular **R**esource **F**acilities

## TECHNIKY V CENTRÁLNÍ LABORATOŘI

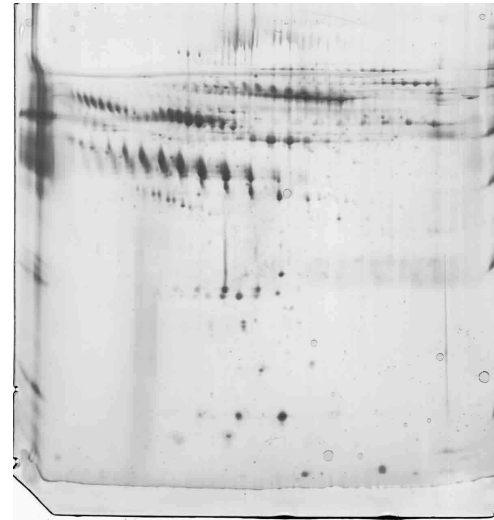
- sekvenování a fragmentační analýza DNA
- syntéza a purifikace oligonukleotidů
- kapalinová chromatografie
- gelová elektroforéza
- analýza obrazu
- digesce proteinů
- hmotnostní spektrometrie
- minisklad reagensů pro molekulární biologii

# ŘEŠENÉ PROJEKTY

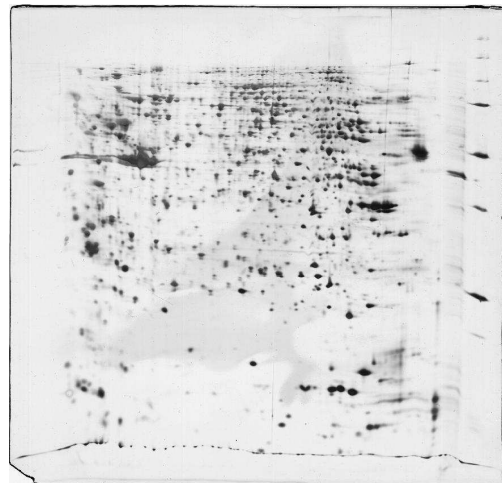
sekretované  
mikrovesikly  
kmenových  
buněk  
signální  
proteiny



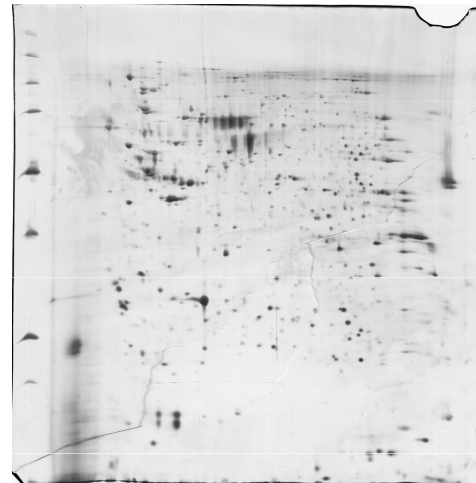
depletovaná  
plazma  
GvHD  
biomarkery



lymfocyty  
biomarkery  
terapie  
GvHD

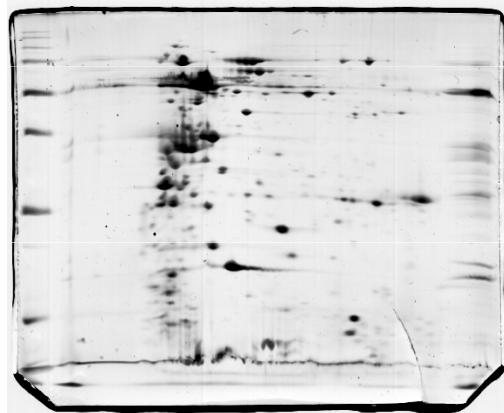


myelomové  
buňky  
biomarkery  
terapie

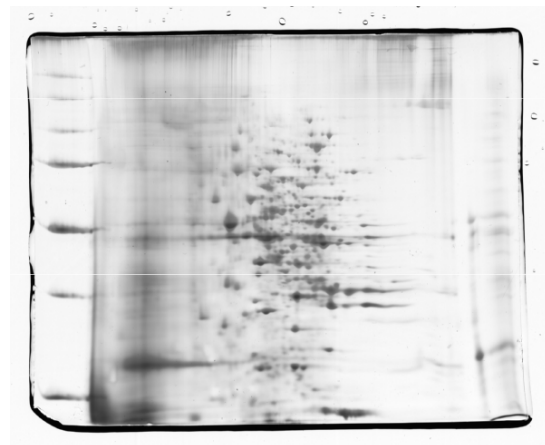


# ŘEŠENÉ PROJEKTY

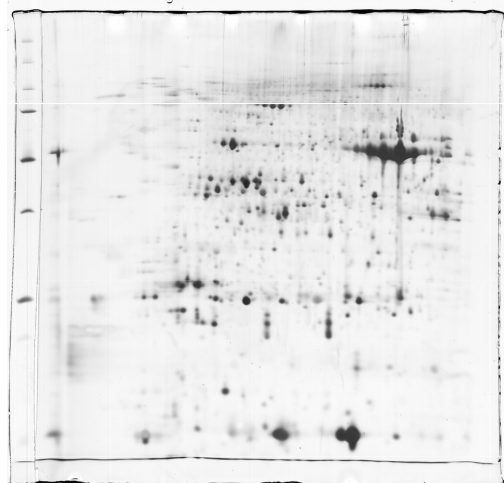
**bakteriofágy**  
potenciální  
terapeutika



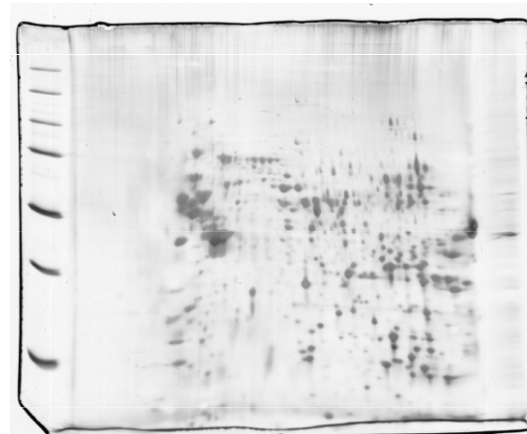
**kvasinky**  
průmyslový  
význam



**Hordeum  
vulgare**  
vliv stresu



**Rattus  
Norvegicus**  
vliv polutantů  
na in-vitro  
modely









Vyhledávání  OK

### OFGP

- o NÁS
- o VÝZKUM
- o VÝUKA
- o PUBLIKACE
- o SPOLUPRÁCE
- o NOVINKY
- o VOLNÁ MÍSTA

### SLUŽBY

- proteomické techniky
- genomické techniky
- syntéza oligonukleotidů
- minisklad
- další

### TECHNICKÉ ZÁZEMÍ

- o ODKAZY
- o KONTAKTY

## SLUŽBY

**Proteomické techniky**  
**Genomické techniky**  
**Syntéza oligonukleotidů**  
**Minisklad pro molekulární biologii**

### PROTEOMICKÉ TECHNIKY

**Jednorozměrná a dvojrozměrná multigelová elektroforéza** (Bio-Rad)  
**Kapalinové chromatografy Ultimate** (Dionex-LC Packings)  
**Hmotnostní spektrometry Reflex IV a Esquire 2000** (Bruker)

Nabízíme všechny kroky nutné ke zpracování vzorku - od izolace proteinů až po jejich charakterizaci a bioinformatické zpracování dat. Provádíme solubilizaci vzorku, depleci abundantních proteinů, prefrakcionaci, isoelektrickou fokusaci na imobilizovaných gradientech pH, separaci polyakrylamidovou gelovou elektroforézou (1-DE, 2-DE), barvení po separaci v gelu, image analýzu, dále pak frakcionaci a separaci kapalinovou chromatografií, proteinovou digesti (in-gel nebo in-solution) a MS analýzu (MALDI-TOF MS a LCMSMS).

#### Kontaktní osoby

<a href="#">Hana Konečná, RNDr.</a>	54949 5050	<a href="mailto:hanak@sci.muni.cz">hanak@sci.muni.cz</a>
	54949 1465	
<a href="#">Zbyněk Zdrahal RNDr., Dr.</a>	54949 1466	<a href="mailto:zdrahal@sci.muni.cz">zdrahal@sci.muni.cz</a>
	54949 8258	

**Objednávkový formulář**  
**Ceník elektroforetických separací**  
**Ceník MS analýz**

### DNA SEKVENOVÁNÍ A FRAGMENTAČNÍ ANALÝZA

**Genetický analyzátor DNA ABI PRISM 310**, Perkin Elmer  
Automatické stanovení sekvence nukleotidů DNA metodou kapilární elektroforézy s laserovým detektorem. Z jednoho stanovení je obvykle čitelných 450 - 600 bází. Výkonnost přístroje: až 4 500 bází/den. Další aplikací je stanovení délek fragmentů DNA, které je základem řady molekulárně-genetických analýz při charakterizaci genomových lokusů nově izolovaných genů, charakterizaci mutací a určování příbuzenských vztahů mezi jedinci. Kapacita až 825 genotypů denně.

Přečtěte si, prosím, **pravidla služby sekvenování**.

#### Kontaktní osoba

<a href="#">Eva Paderová MSc.</a>	54949 6341	<a href="mailto:paderova@sci.muni.cz">paderova@sci.muni.cz</a>
	54949 2517	

**Objednávkový formulář** pro sekvenaci DNA.