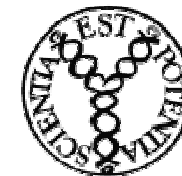




Oddělení funkční genomiky a proteomiky  
Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity

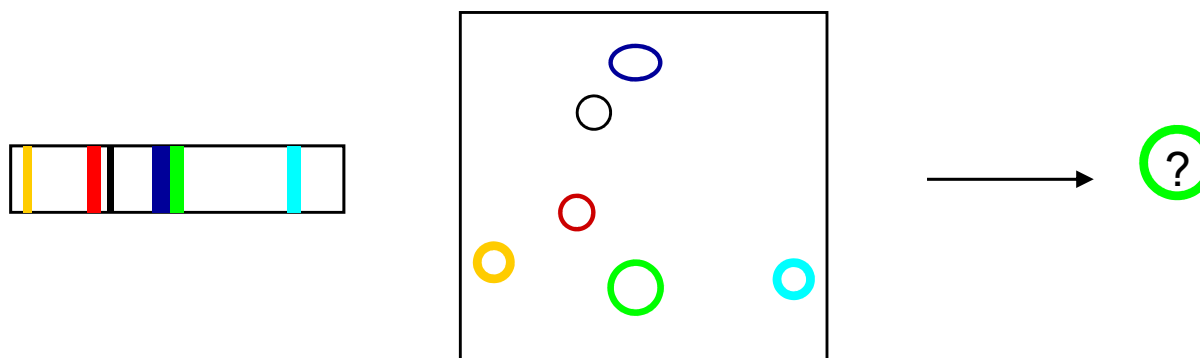


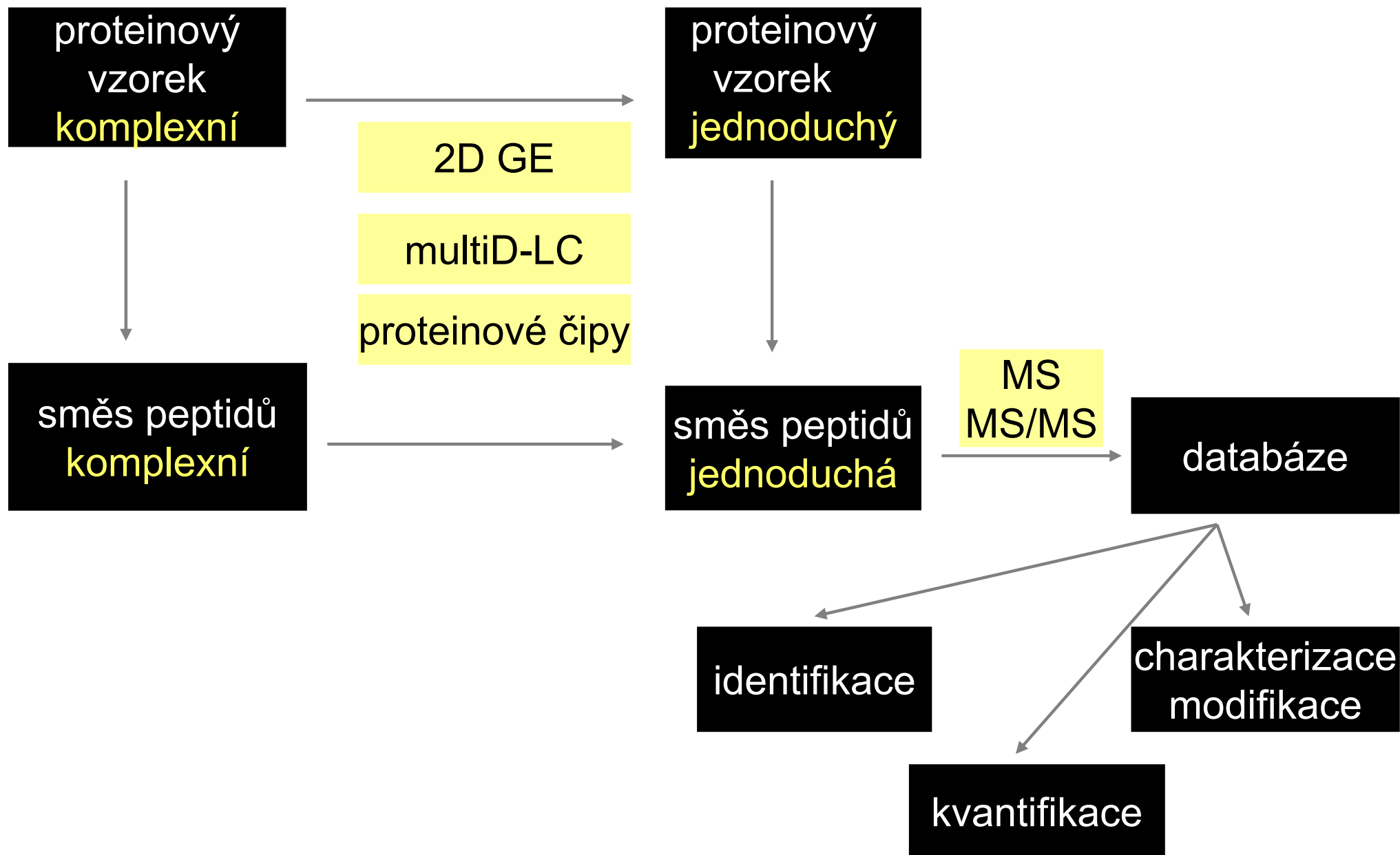
**CENTRÁLNÍ LABORATOŘ**

# Dvoudimenzionální elektroforéza

## 2-DE

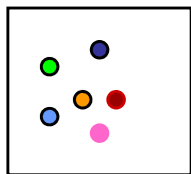
Hana Konečná





# Proteomický experiment

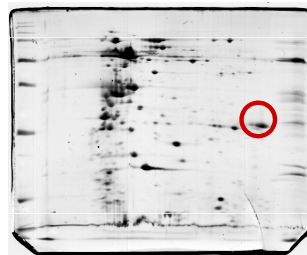
**extrakce**



**fokusace**



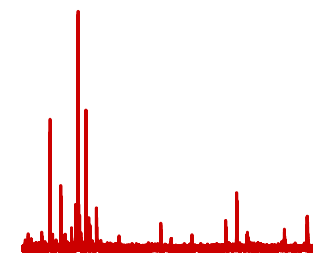
**SDS-PAGE**



**digest**



**MS**

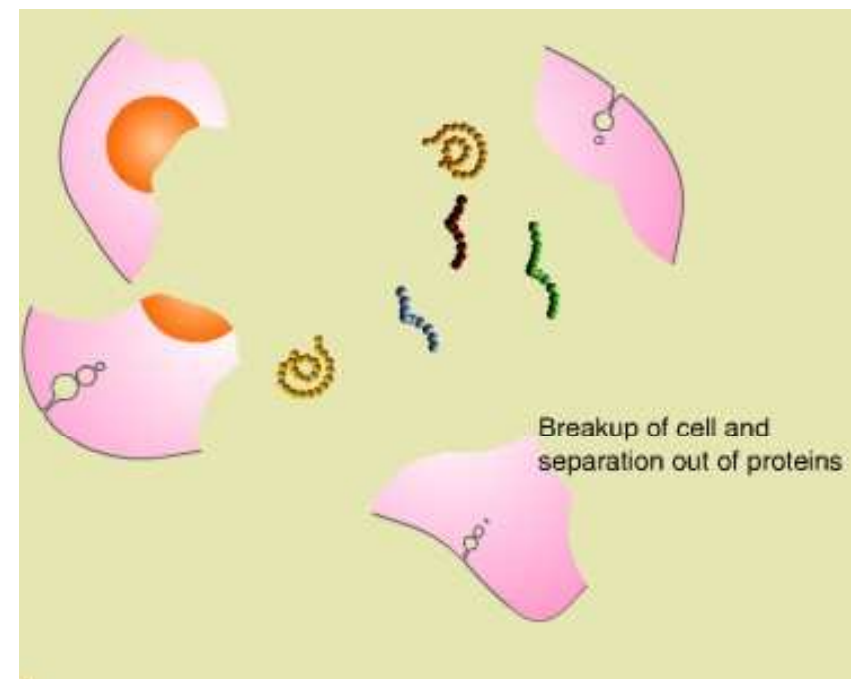
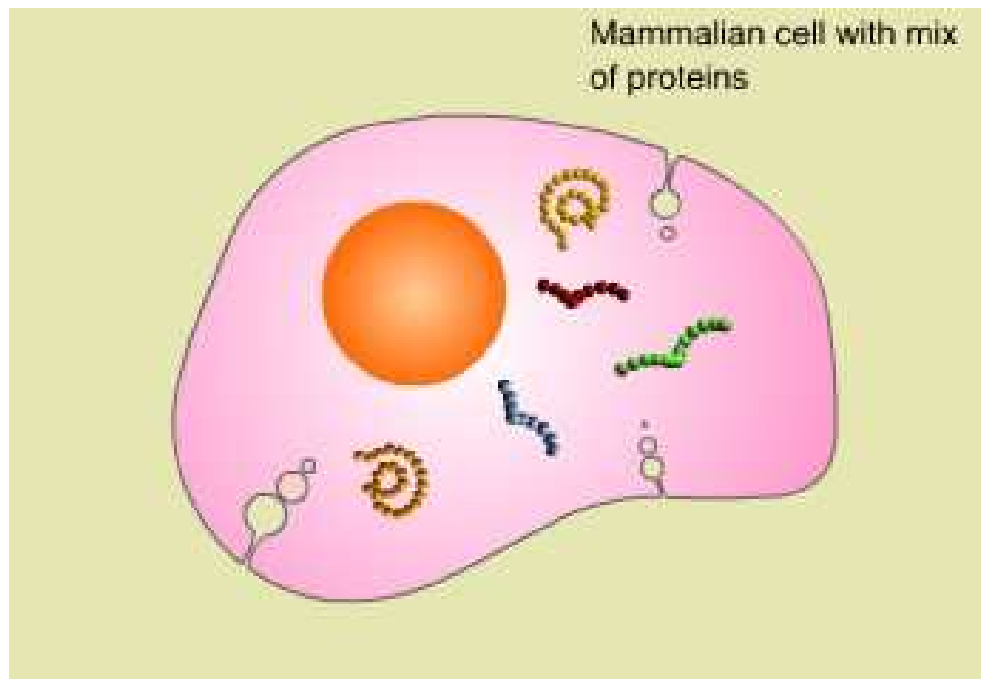


**identifikace**

**neznámý  
protein**

# HOMOGENIZACE

- mechanicky
- ultrazvukem
- tlakem
- zmražením / rozmražením
- detergentovou lyzí



# PŘÍPRAVA VZORKU

**solubilizace** močovina, thiomčovina, detergenty

**redukce** DTT, TBP

**inhibice** proteáz, fosfatáz, gykosyláz

**odstranění kontaminant**

# DETERGENTY

žádný celkový náboj

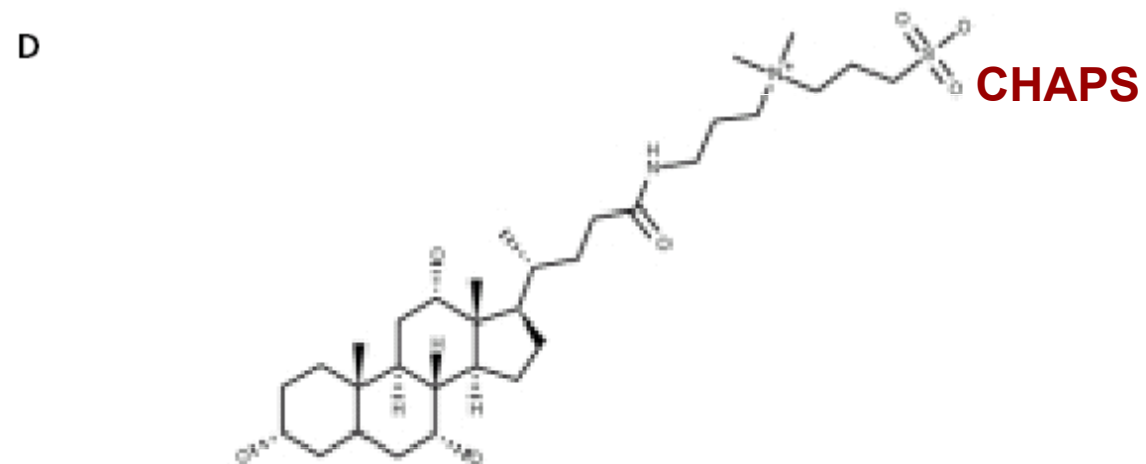
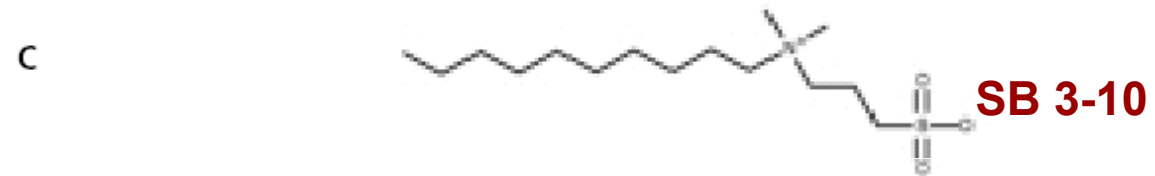
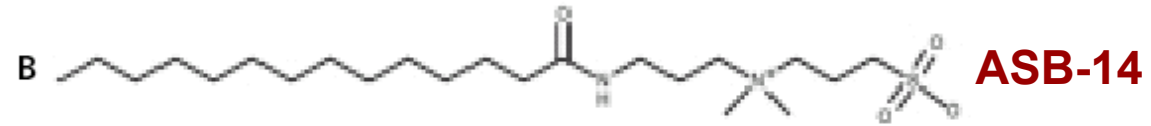
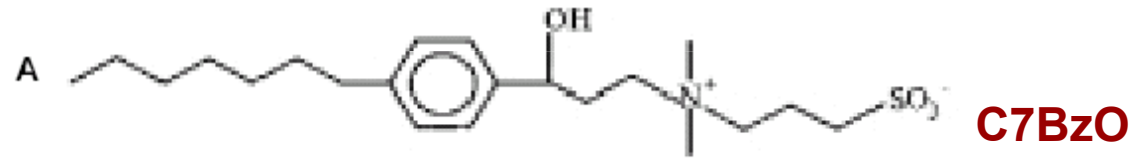
0.5 – 4%

použitelné ve vysokých koncentracích močoviny

- neionogenní
- zwitterointové

SDS jen v nízkých koncentracích (do 0.25%)

# Zwitteriontové detergenty

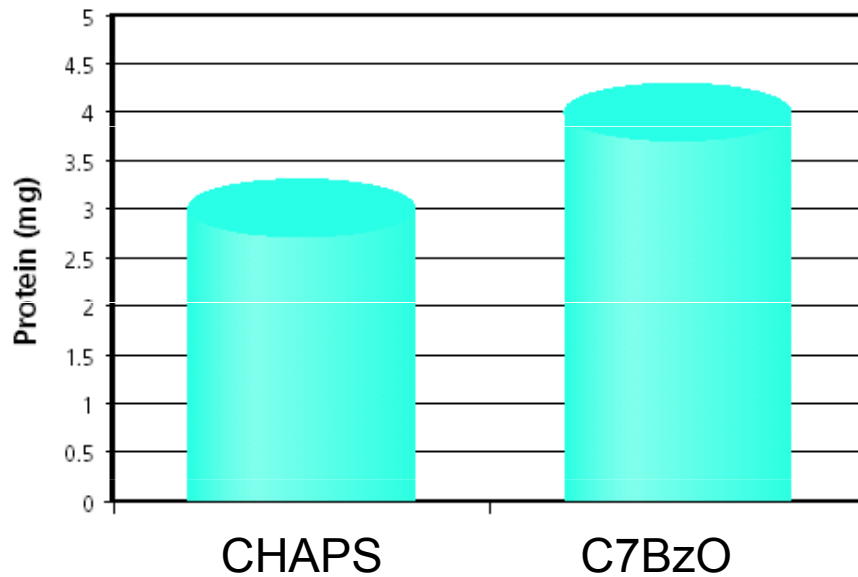


## C7BzO

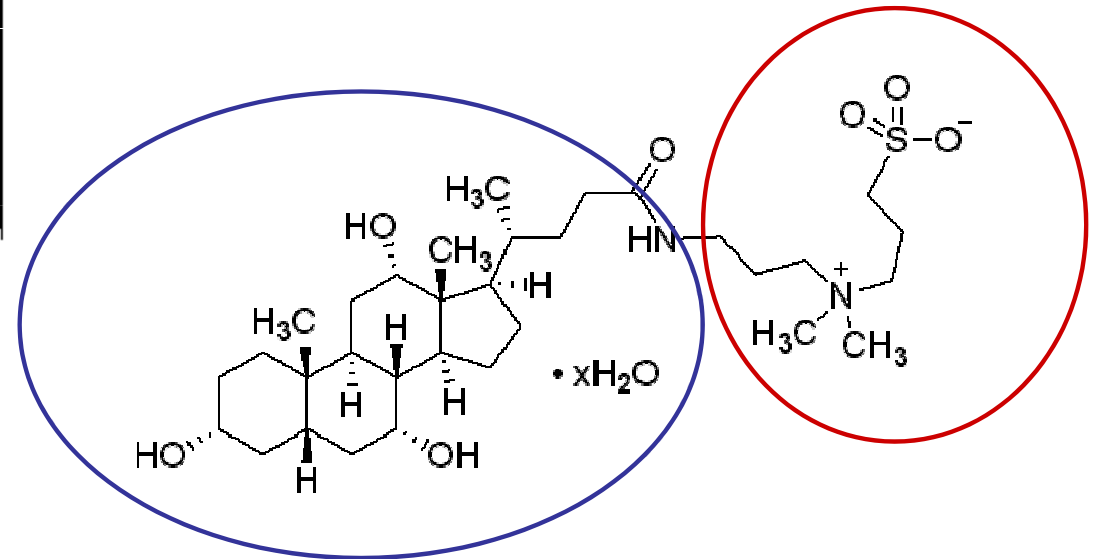
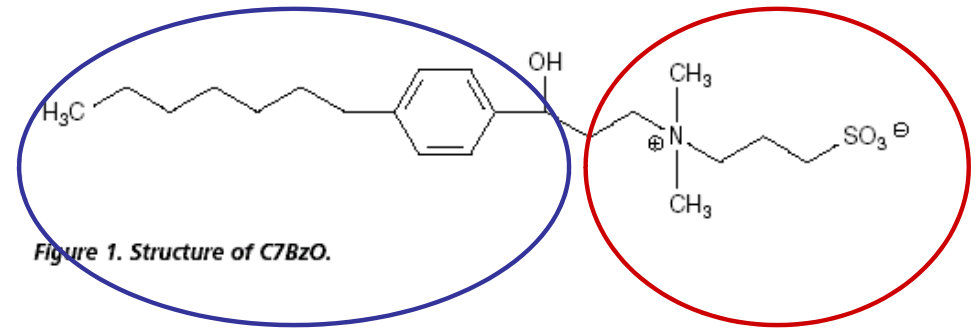
3-(4-Heptyl)phenyl-3-hydroxypropyl)dimethylammonio)propanesulfonate

## CHAPS

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

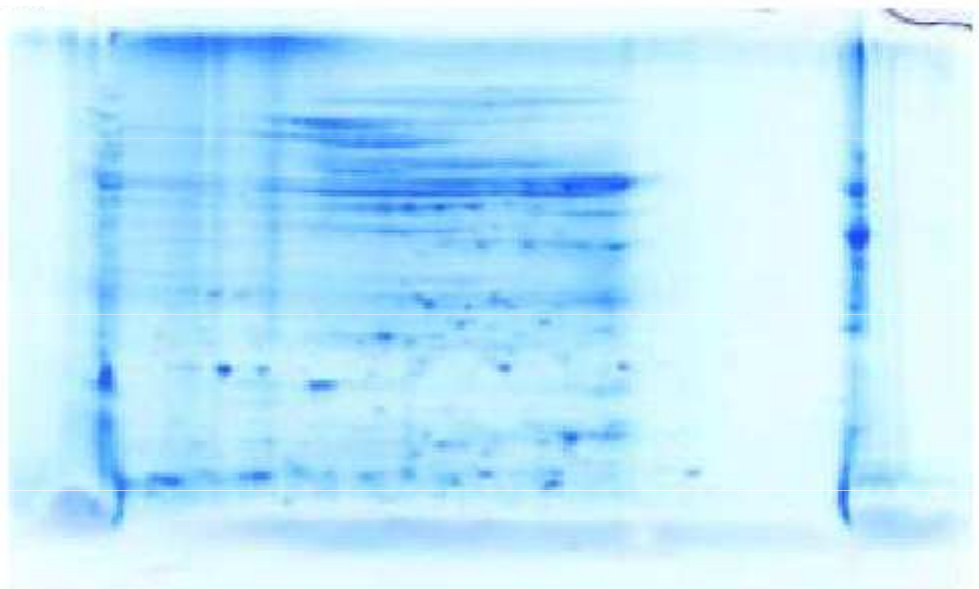


**E.coli**

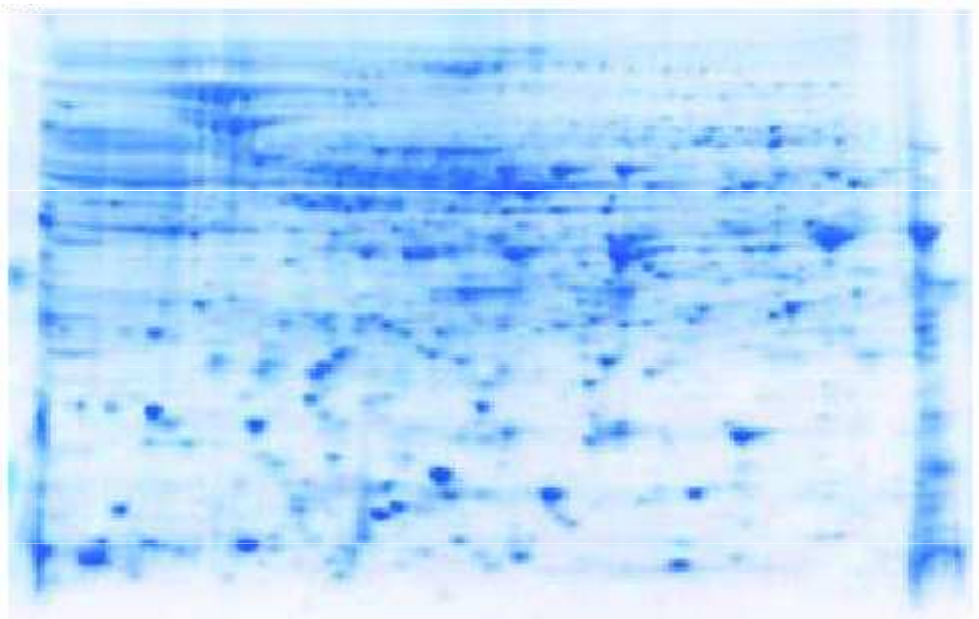




E.coli



CHAPS



C7BzO

## ZÁKLADNÍ PRAVIDLA

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

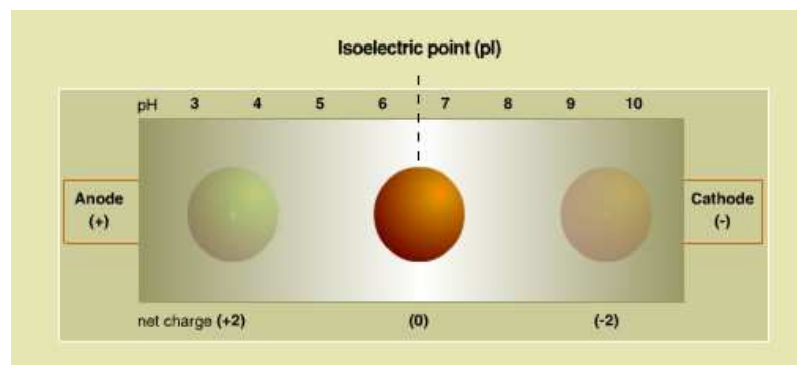
# KONTAMINANTY

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

# 2-DE

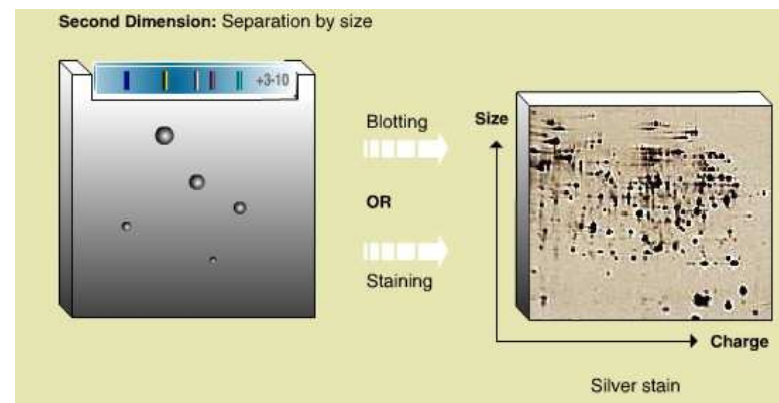
- první rozměr

## IEF



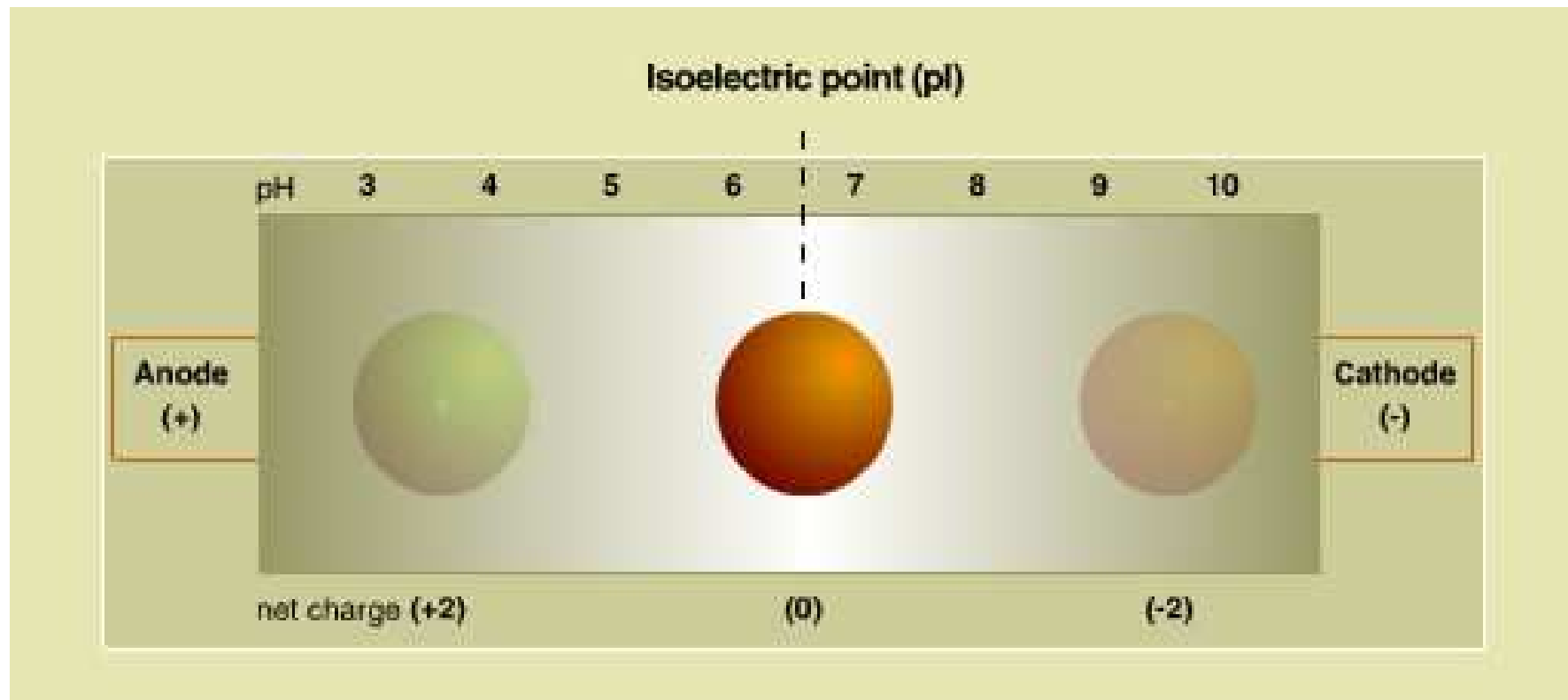
- druhý rozměr

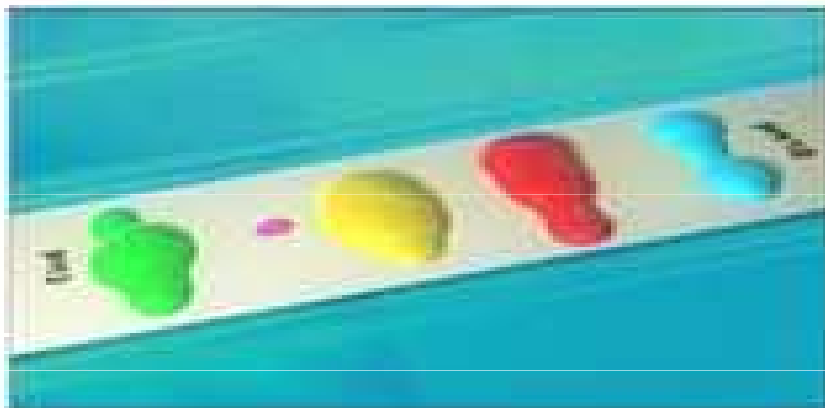
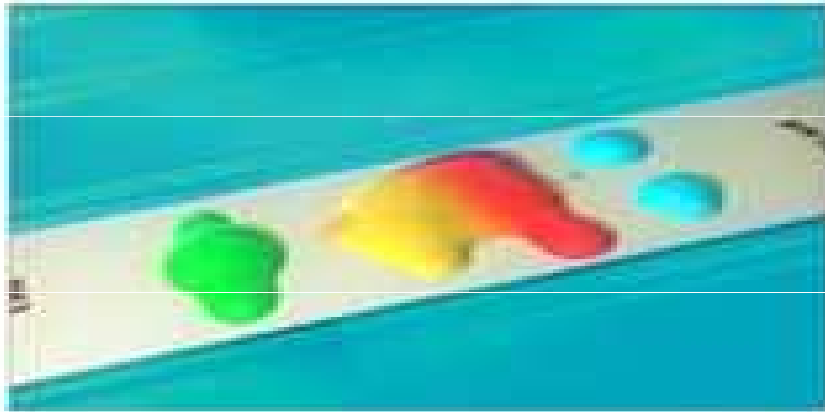
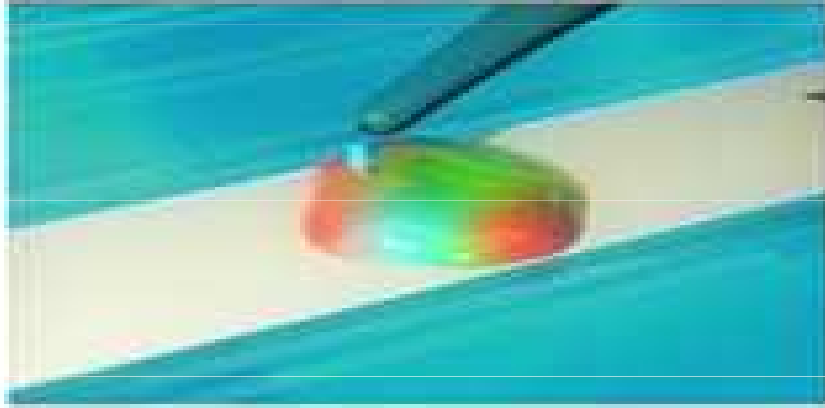
## SDS-PAGE



# 1. ROZMĚR **IZOELEKTRICKÁ FOKUSACE**

migrace nabitých částic v gradientu pH v elektrickém poli

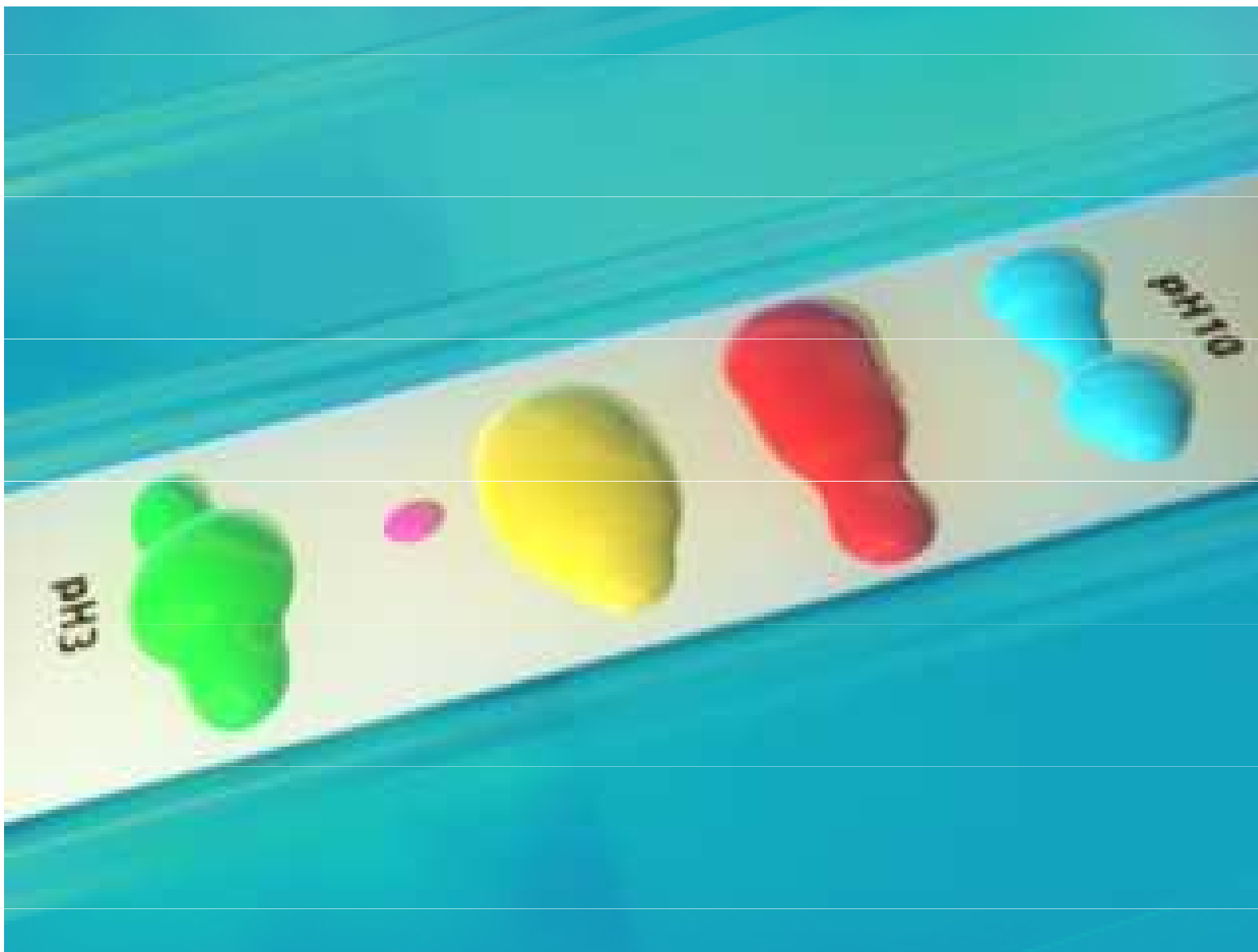




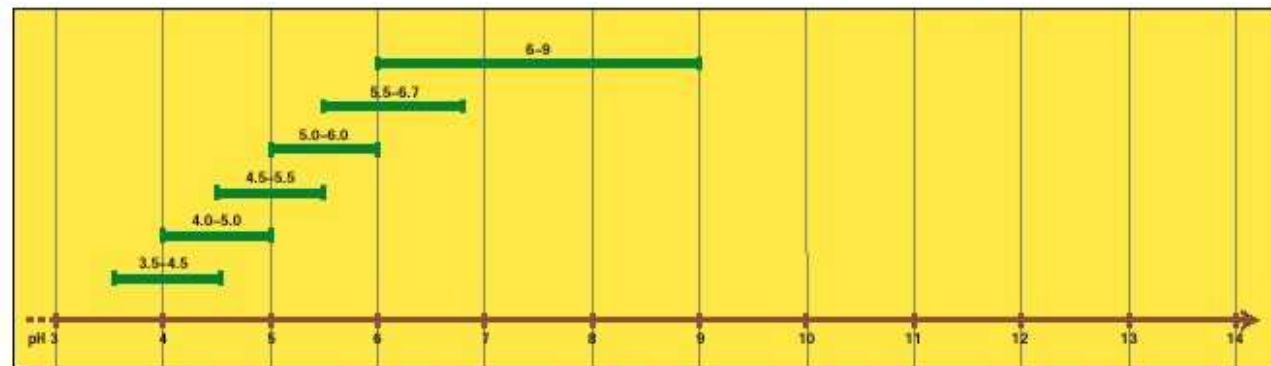
## IZOELEKTRICKÁ FOKUSACE

- imobilizovaný pH gradient
- amfolyty

# FOKUSOVANÉ PROTEINY

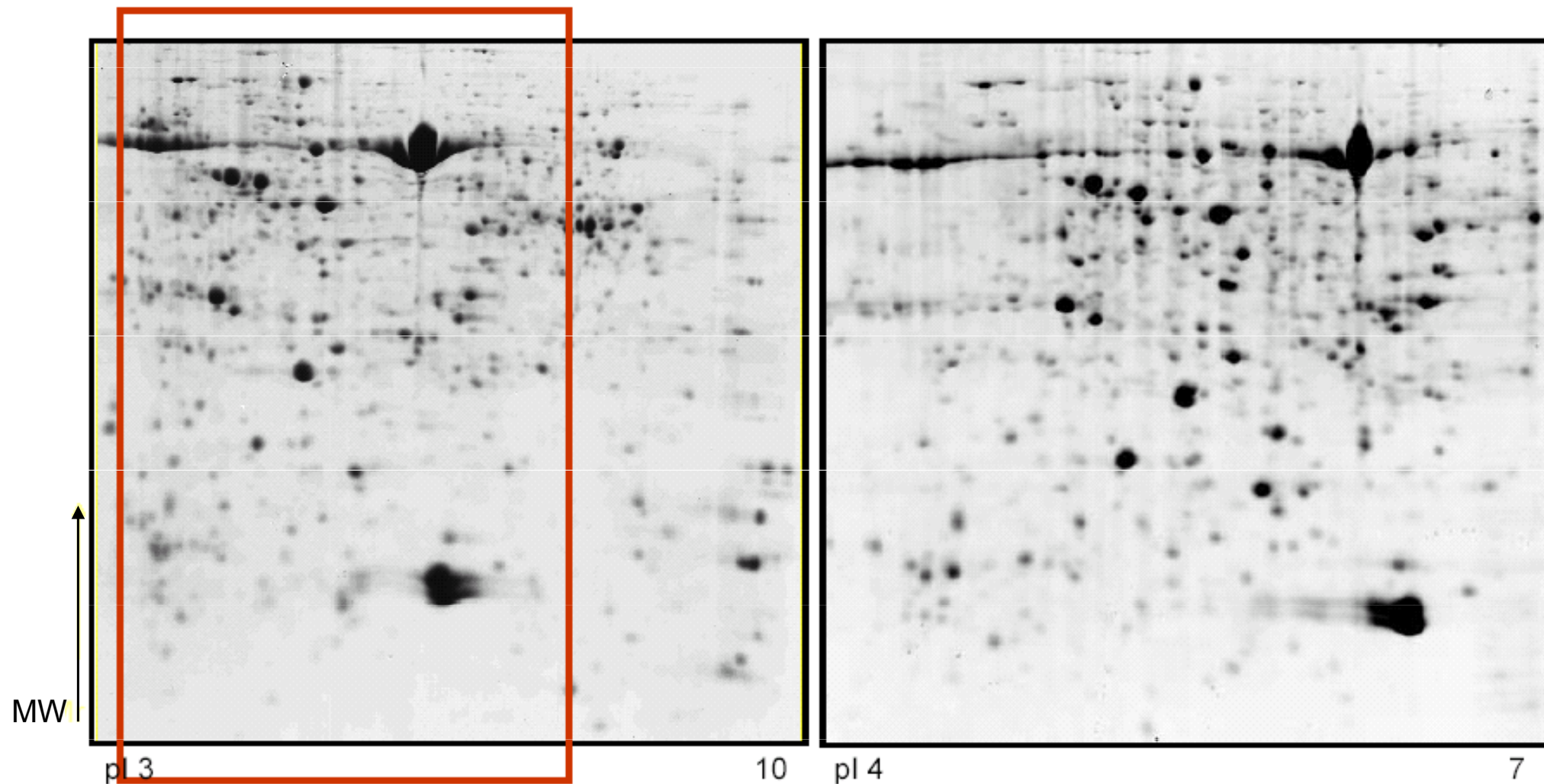


# ROZSAH STRIPU ROZMĚR STRIPU





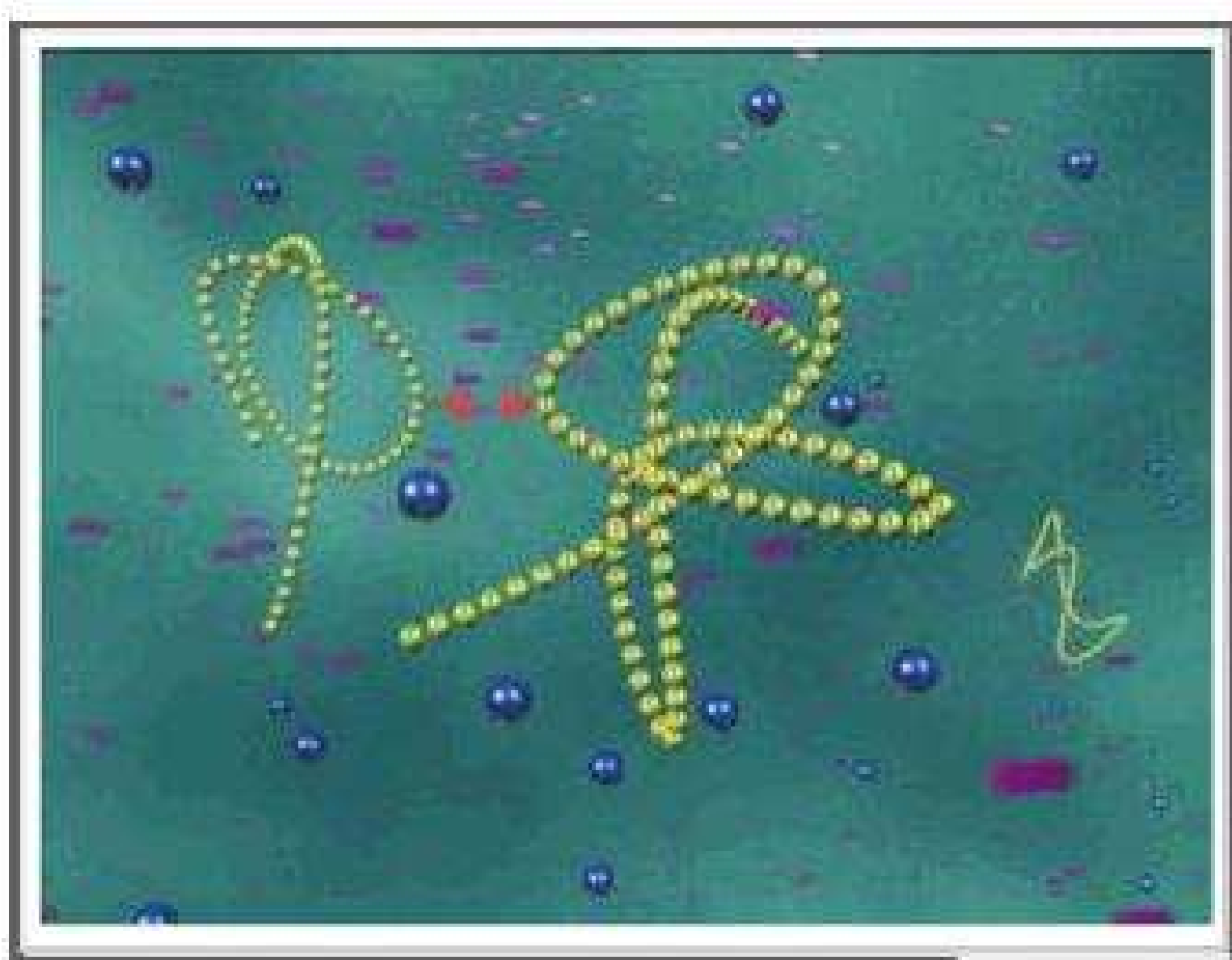
# ROZSAH STRIPU



**pl 3 - 10 NL**

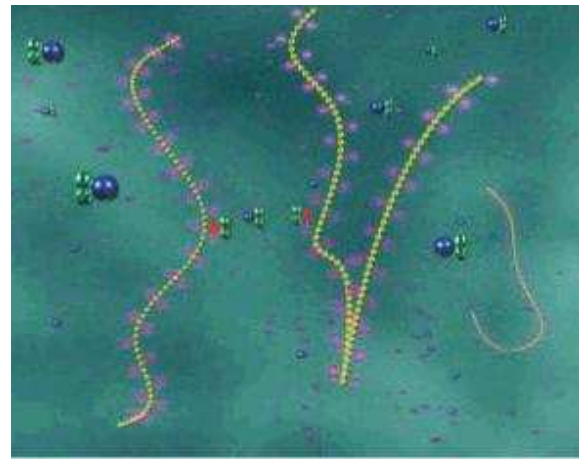
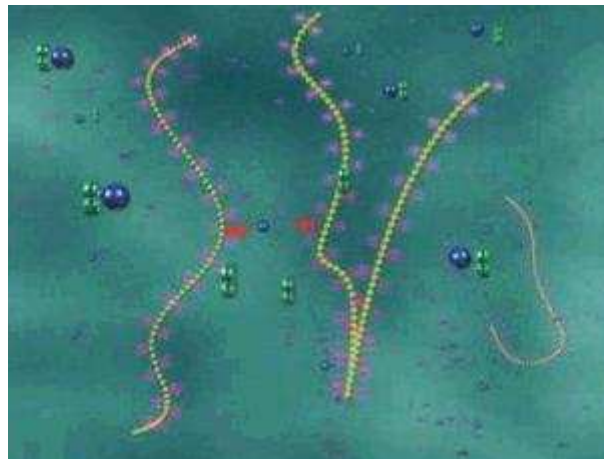
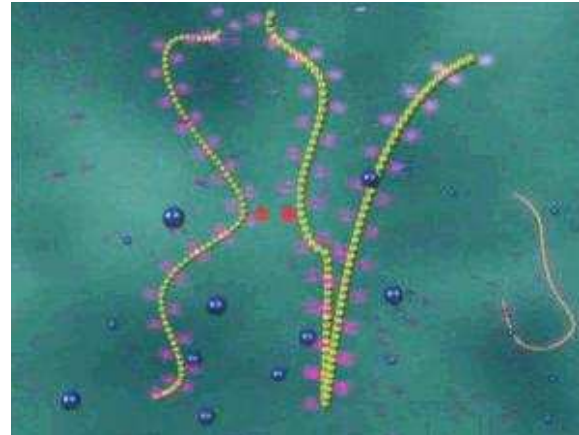
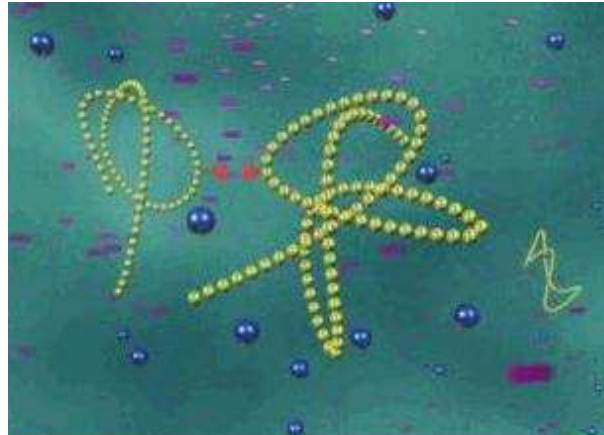
**pl 4 - 7**

# EKVILIBRACE STRIPU



# EKVILIBRACE STRIPU

denaturace **SDS** ●

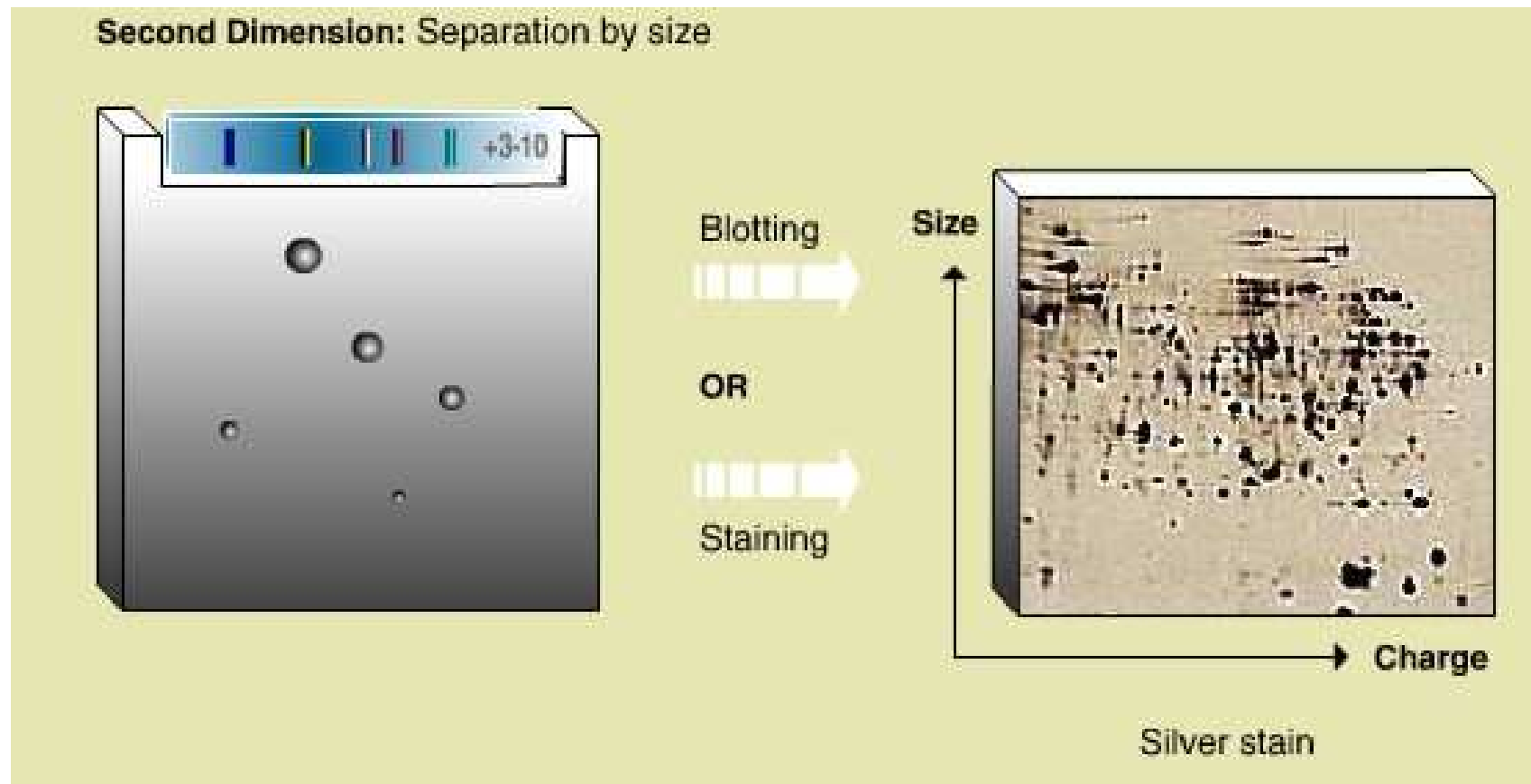


redukce **DTT** ●

alkylace **IAA** ●

## 2. ROZMĚR **SDS-PAGE**

migrace aniontů v elektrickém poli podle MW

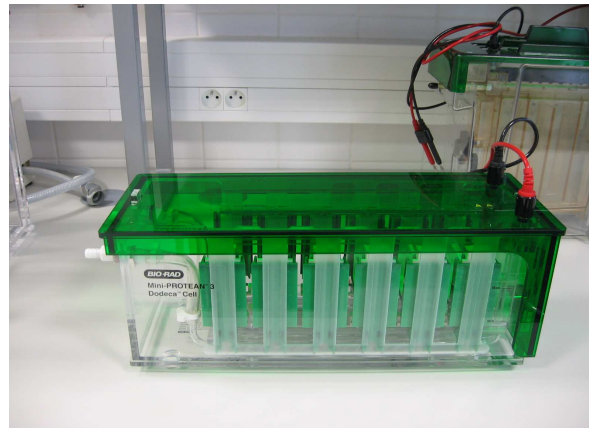


## 2-DE INSTRUMENTACE

- Protean IEF
- Protean Dodeca Cell
- Densitometer GS-800  
*PDQuest, Quantity One*
- STORM



Protean Plus Dodeca Cell



Mini-Protean 3 Dodeca Cell



Protean II xi Cell

# 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

# BARVENÍ PROTEINU V GELU

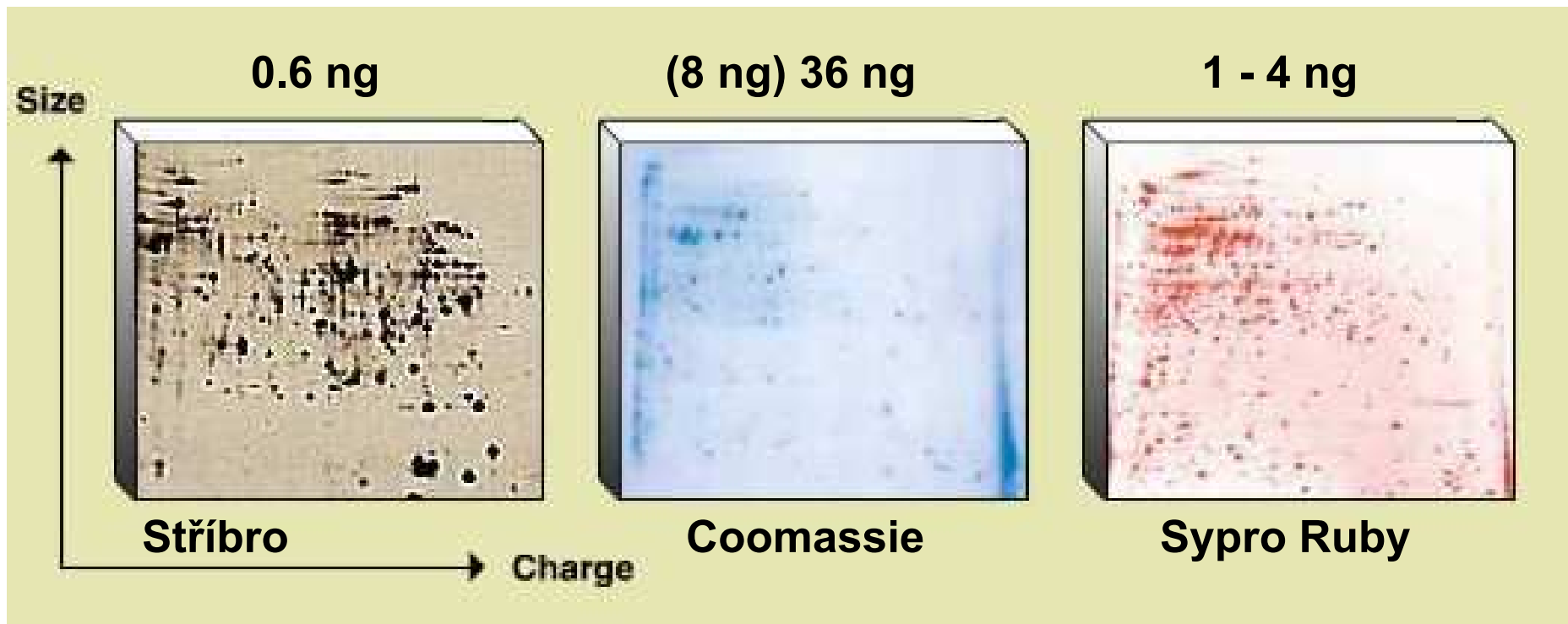
Coomassie Blue R-250, Coomassie Blue G-250

Stříbro: kompatibilní s MS

nekompatibilní s MS

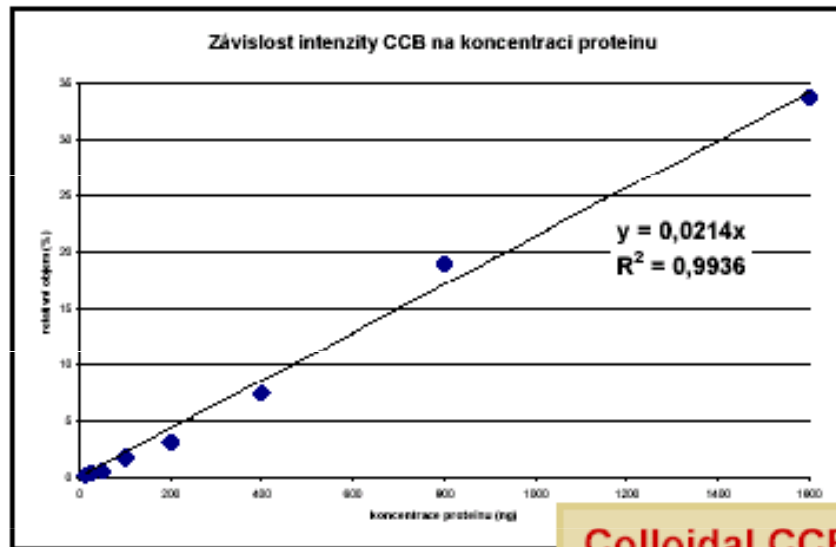
Sypro Ruby, Flamingo Pink, Lucy, Deep Purple

Pro-Q Diamond, Pro-Q Emerald

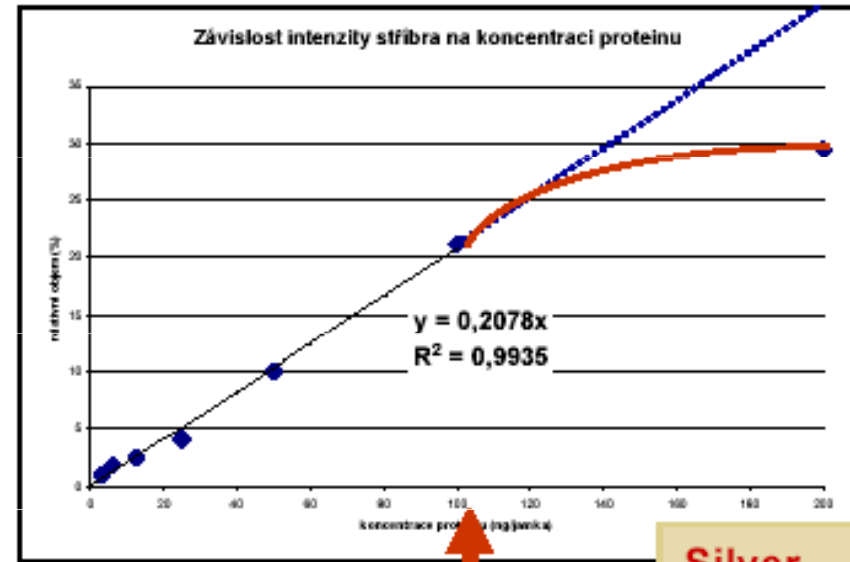


# BARVENÍ PROTEINU

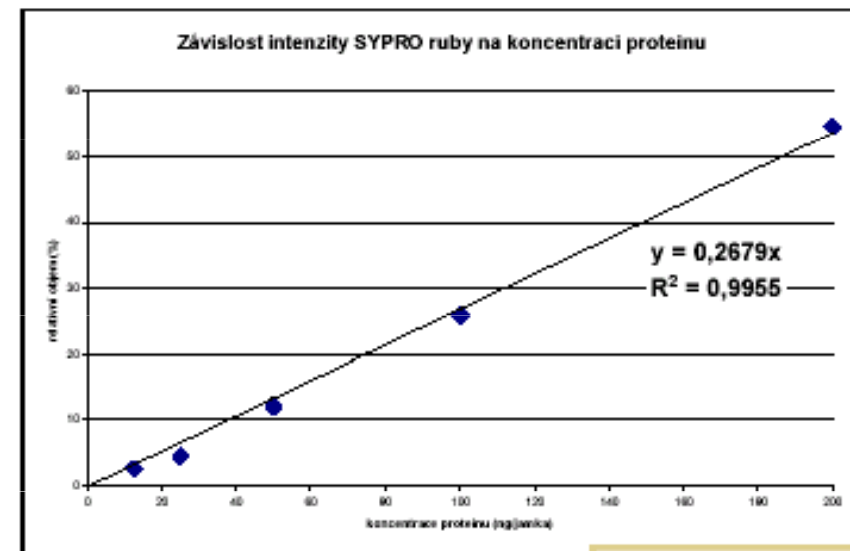
## LINEARITA



Colloidal CCB



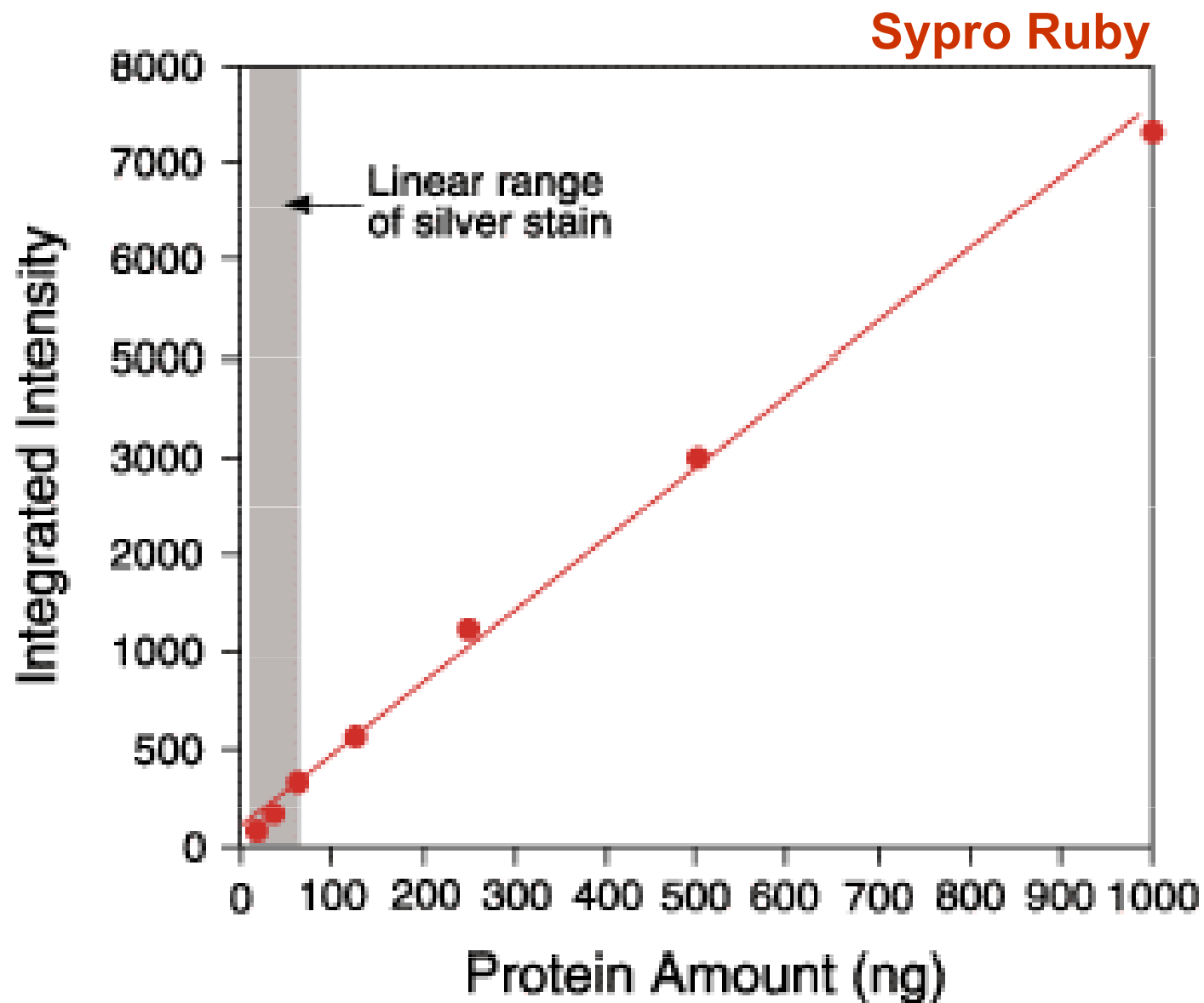
Silver



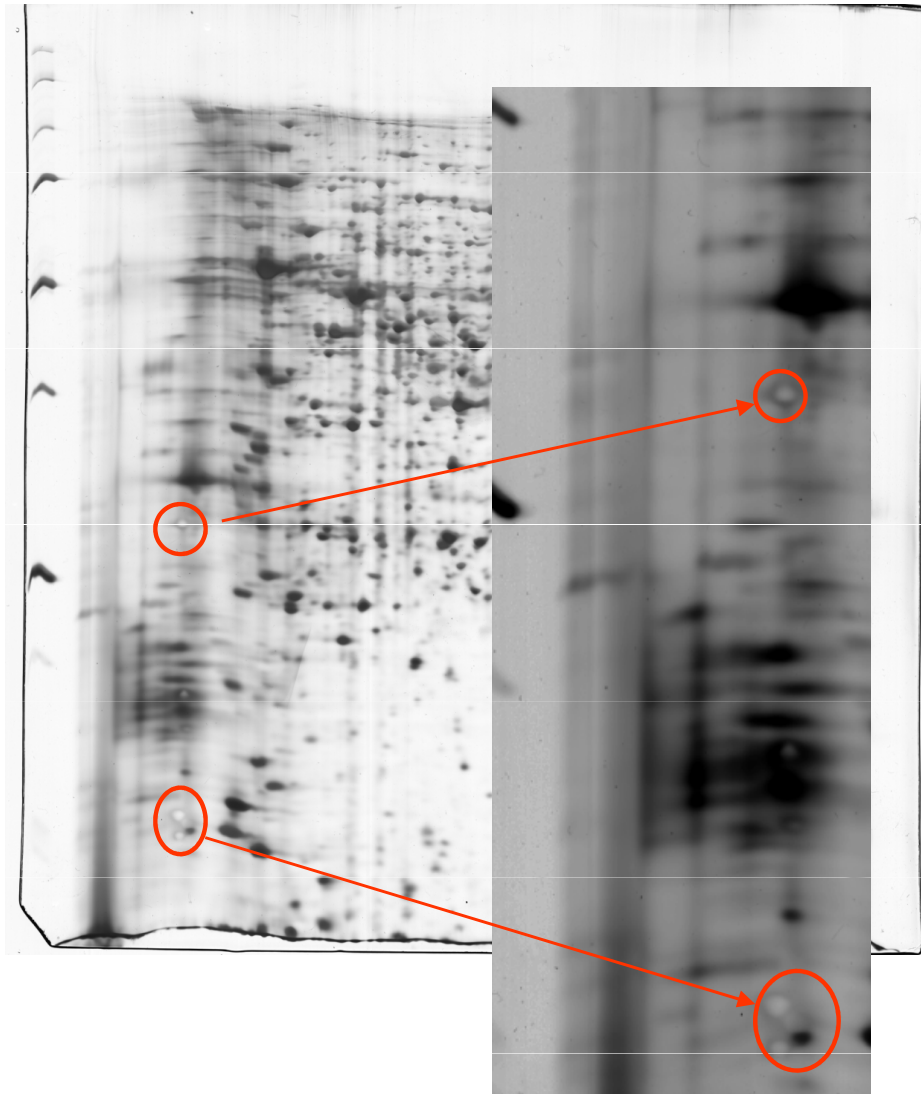
SYPRO Rubý



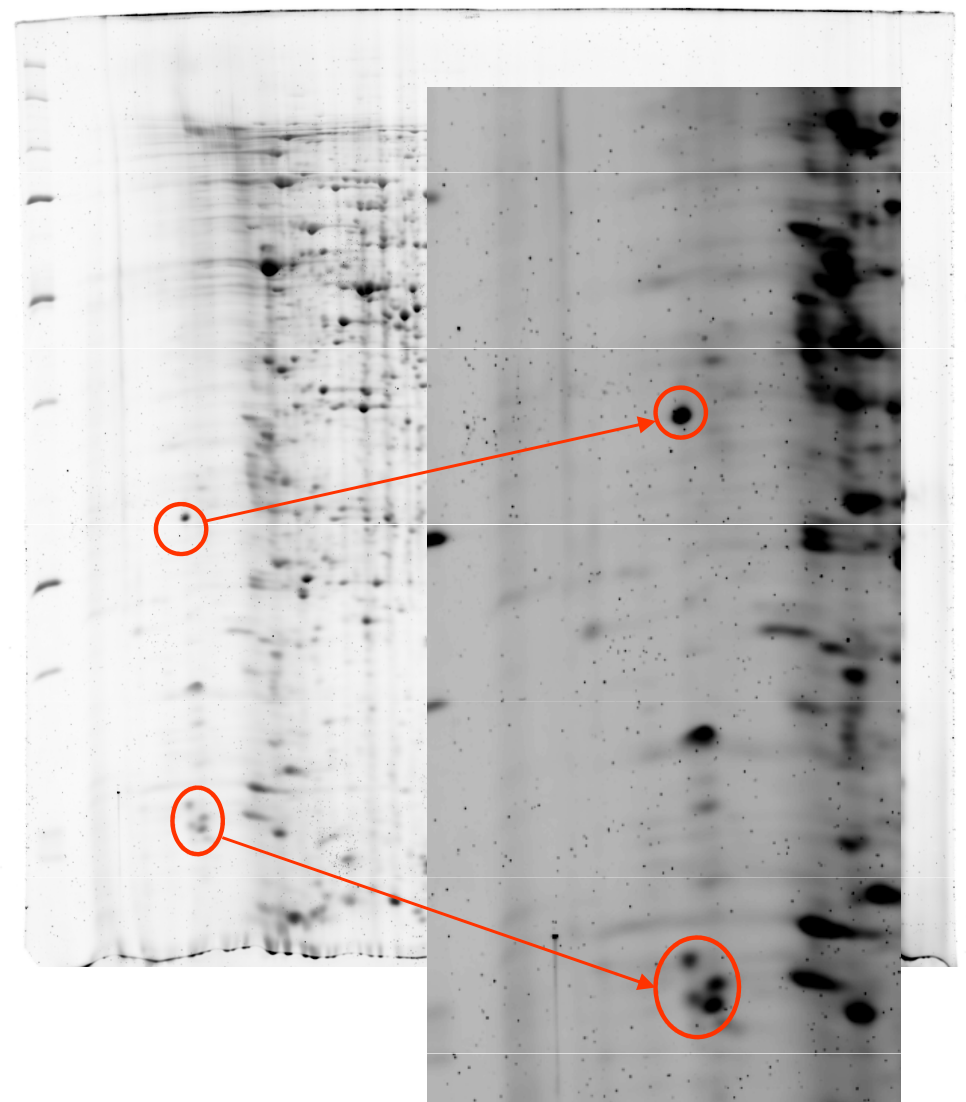
# BARVENÍ PROTEINU – LINEARITA



**Ag**

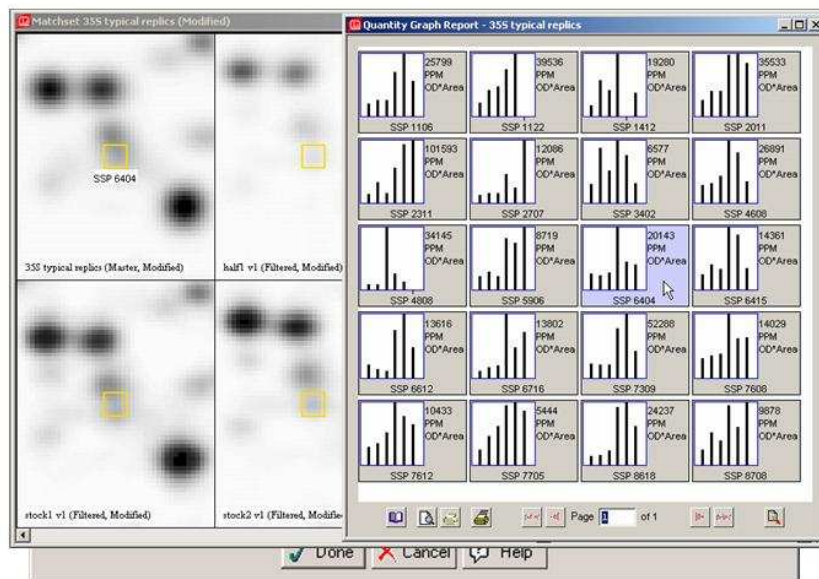
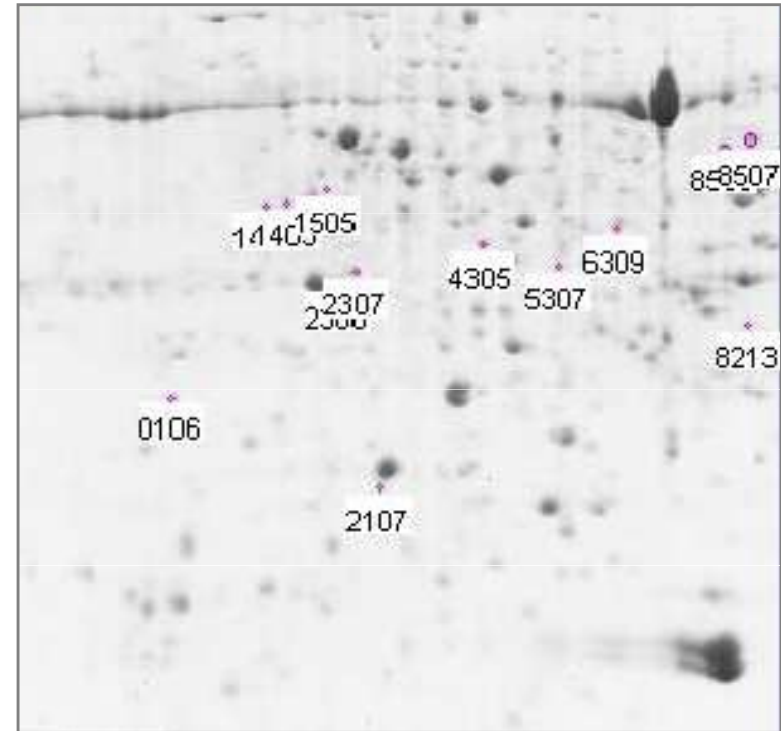


**Sypro Ruby**

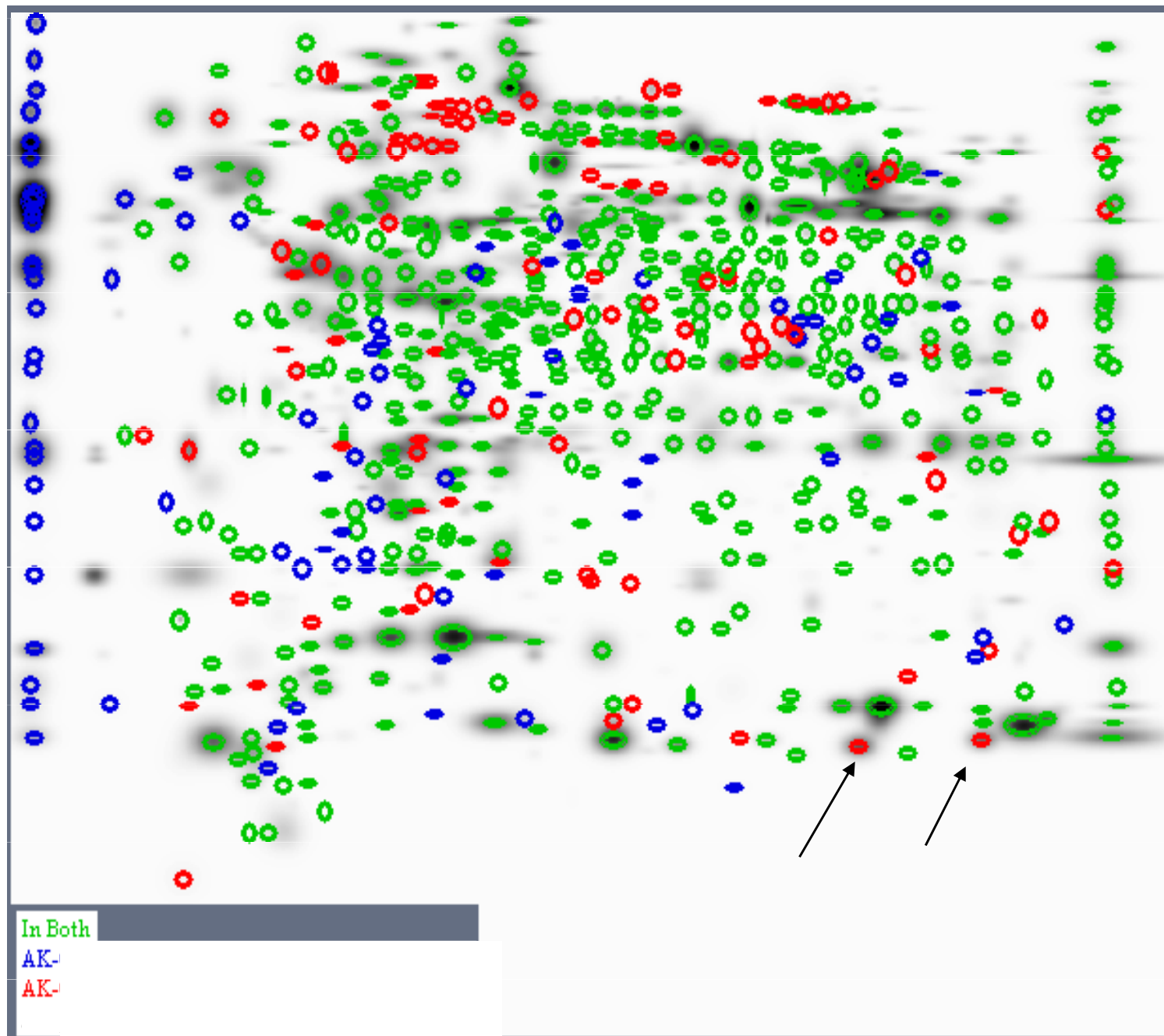


# ANALÝZA OBRAZU

- kvalitativní
- kvantitativní



# PDQuest

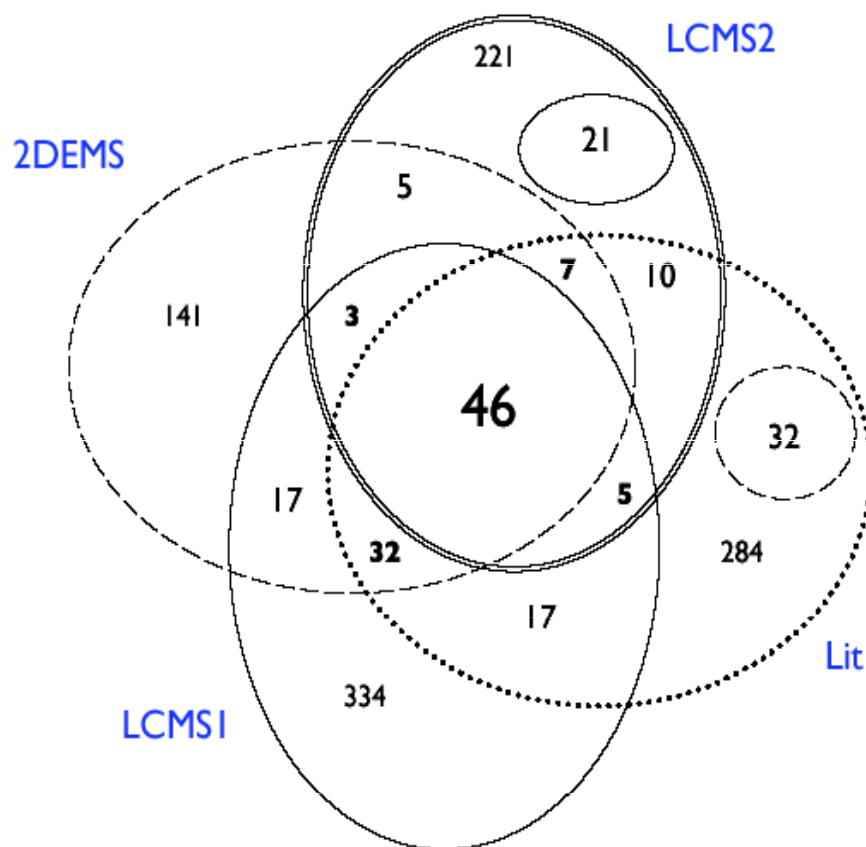


## 2D or not 2D ?

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

# 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

From: The Human Plasma Proteome: A Non-Redundant List Developed by Combination of Four Separate Sources, N. L. Anderson et al, *Molec. Cell Proteomics*, 3: 311-326 (2004).

# MULTIDIMENZIONÁLNÍ CHROMATOGRRAFIE

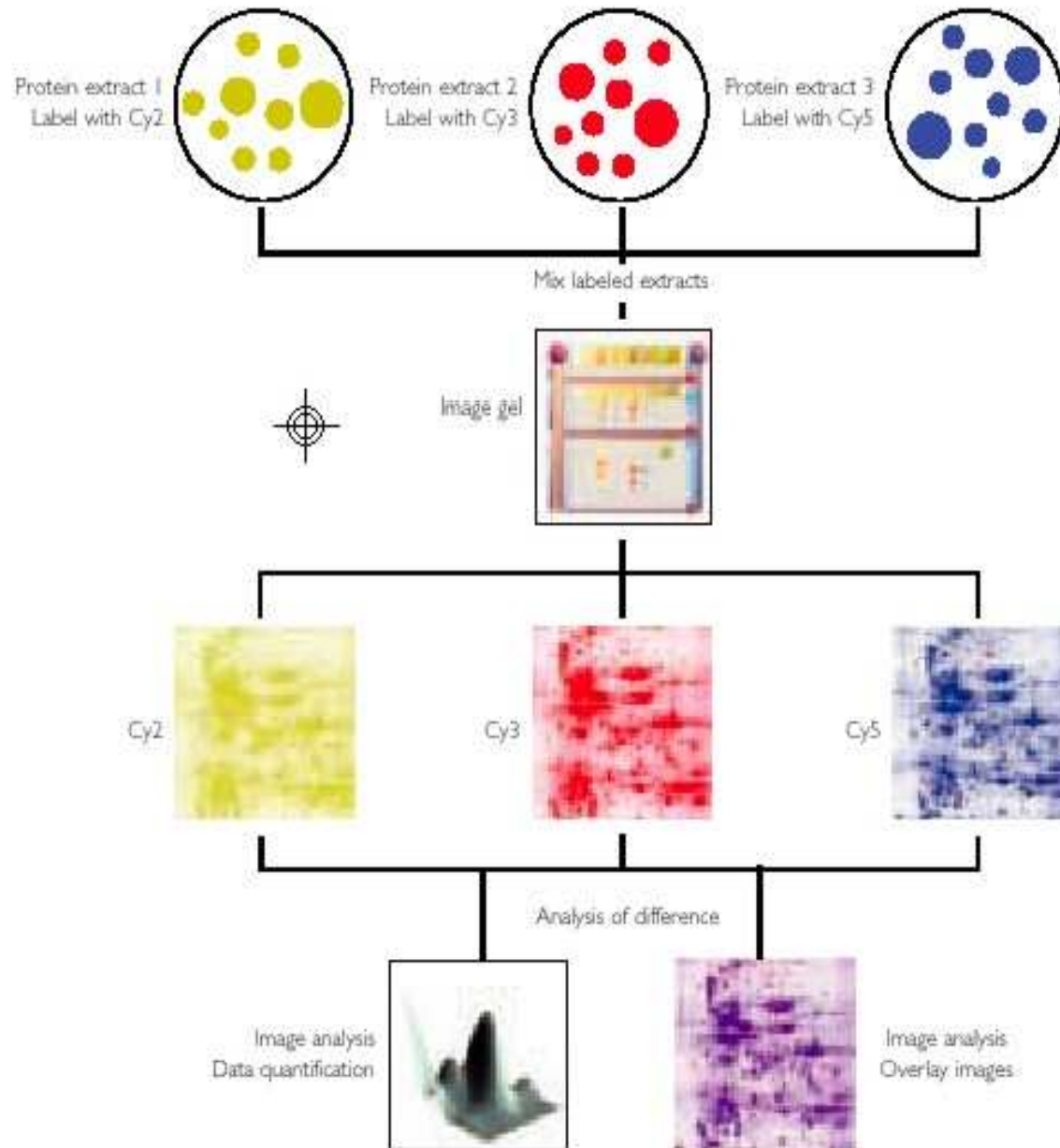
## PRO

- velké objemy vzorku
- možnost koncentrace na koloně
- membránové proteiny, basické proteiny
- není nutno barvit
- peptidy – přímé napojení na MS
- automatizace

## PROTI

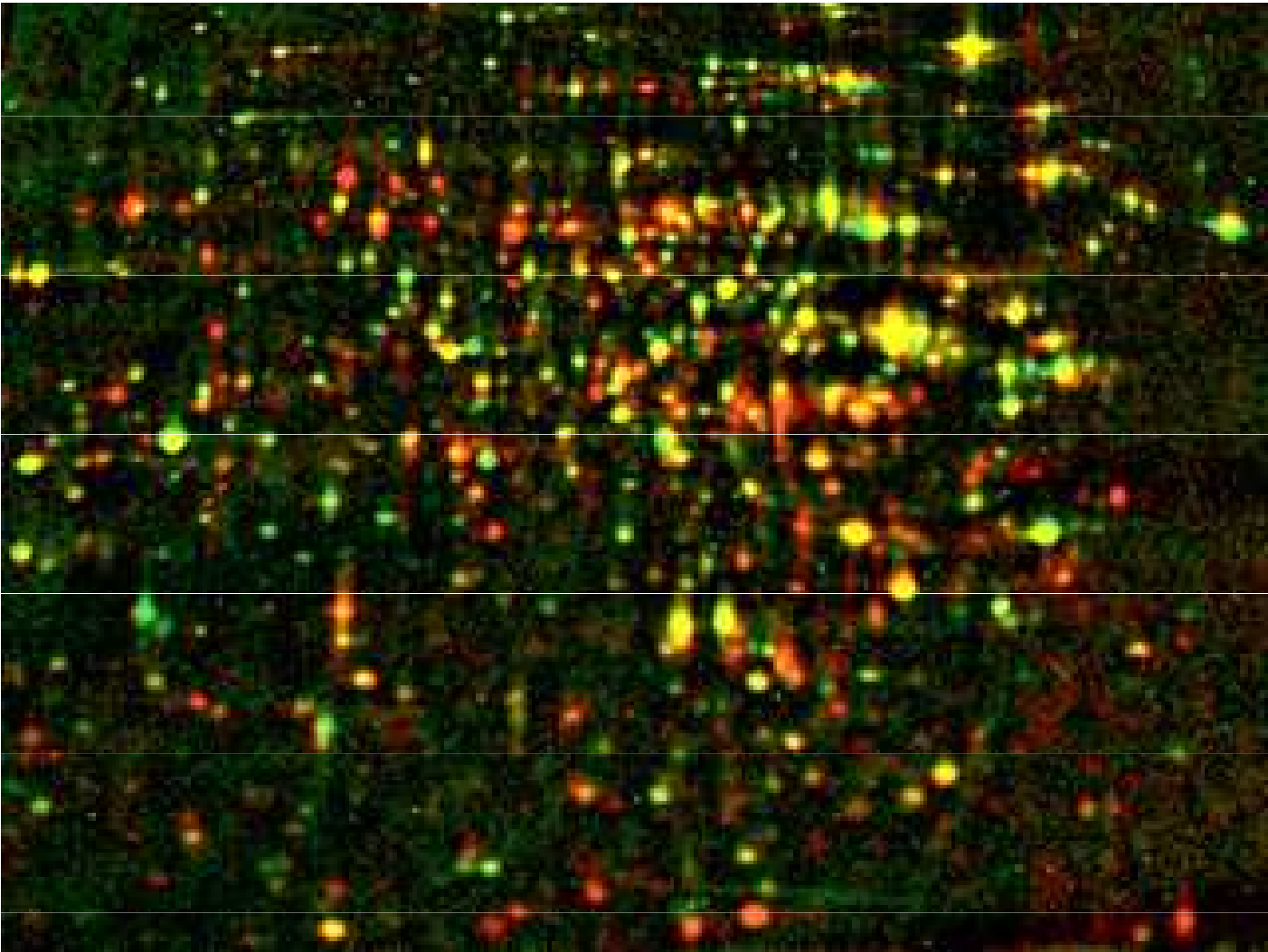
- vizuální aspekty ztraceny:  $pI$  a  $M_r$
- LC je sériová analýza
- GE může běžet současně pro více vzorků

# Difference Gel Electrophoresis DIGE





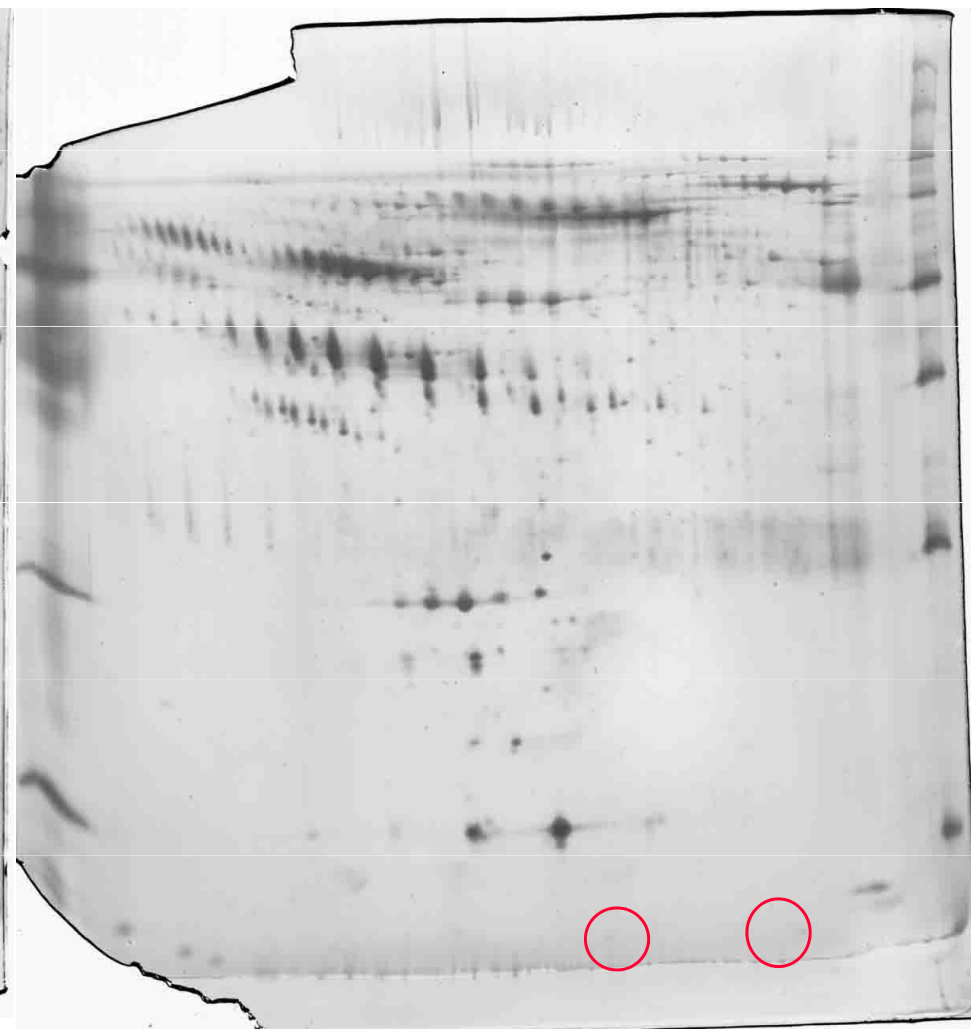
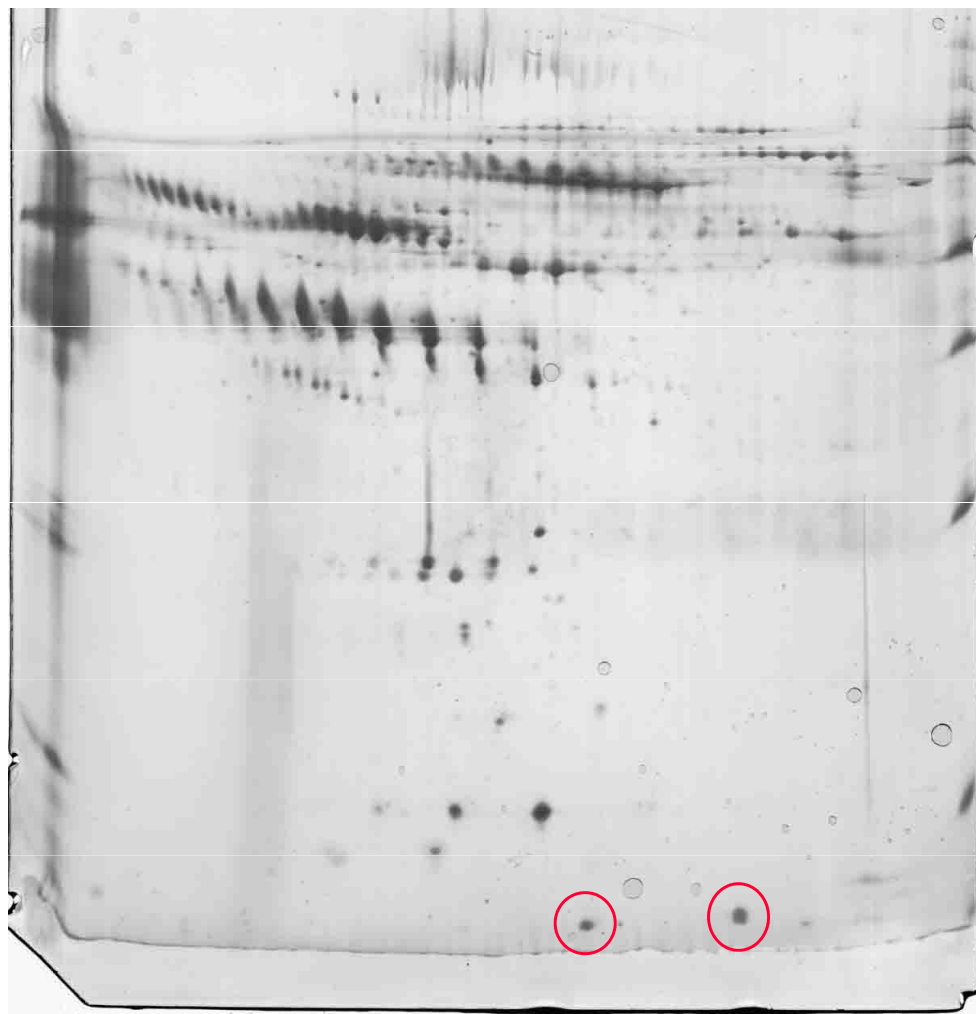
DIGE



# Biomarkery v lidské plasmě

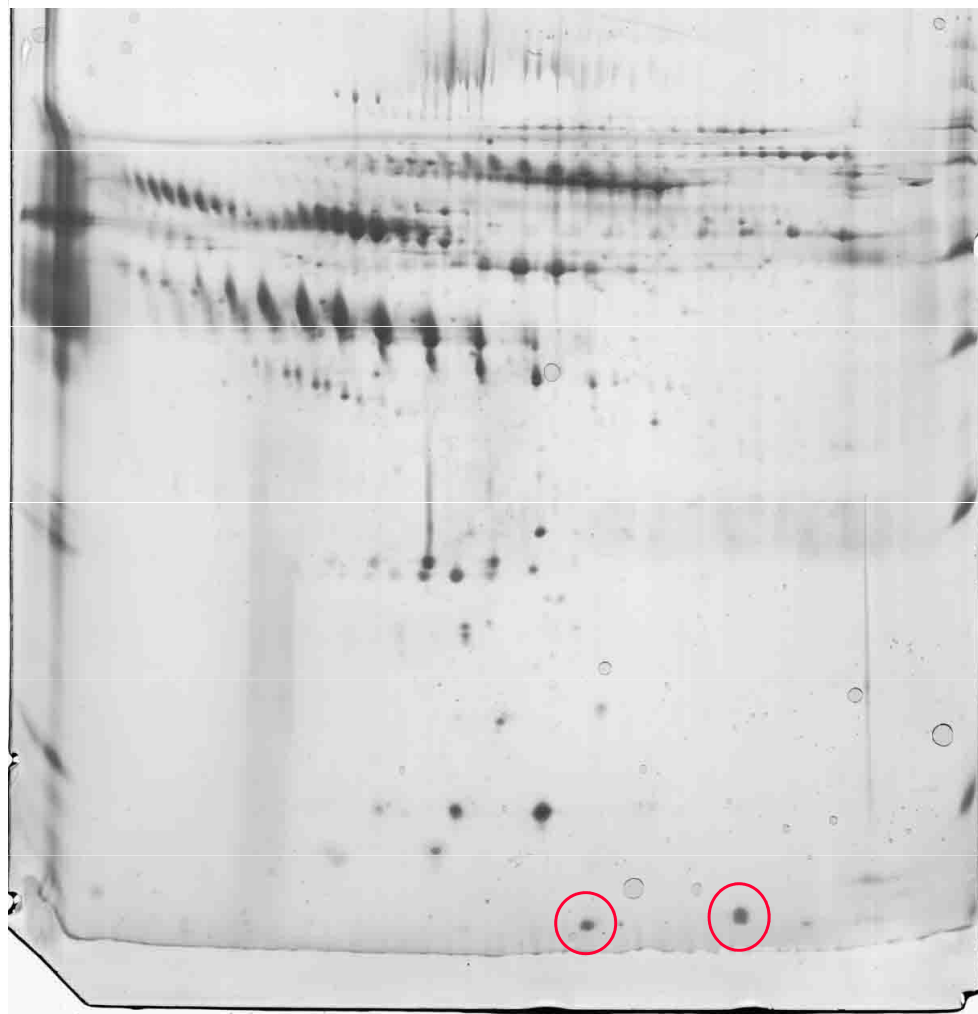
Den 21 – před klinickým projevem

Den 44 – po klinickém projevu



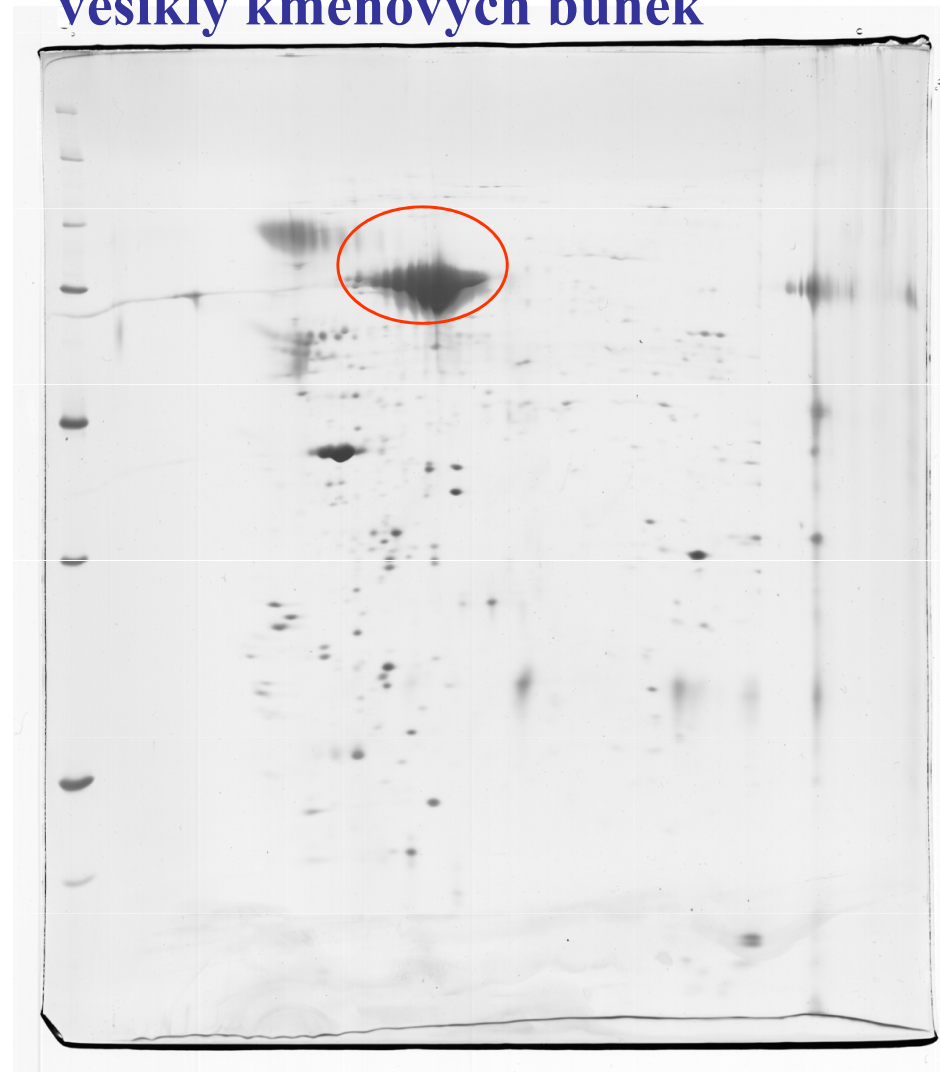
**separace** → **identifikace**

depletovaná plasma



Calcium-Depleted Human C-Reactive Protein  
Amyloid related serum protein

vesikly kmenových buněk



BSA

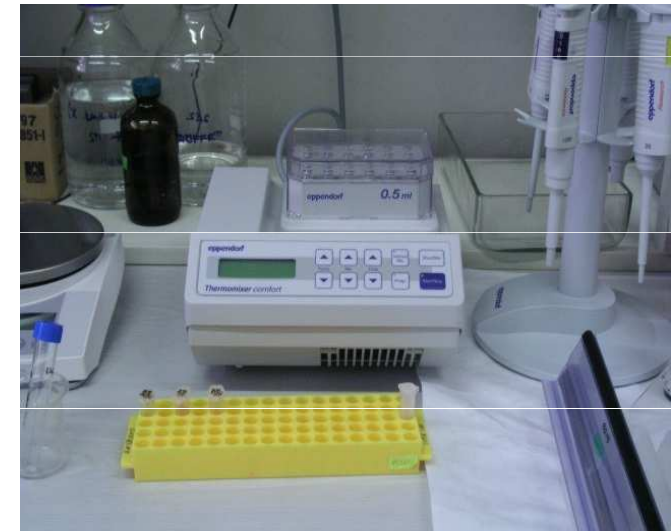
# DIGESCE

trypsin    Glu-C    Asp-N    thermolysin



- IN-GEL
- IN-SOLUTION

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

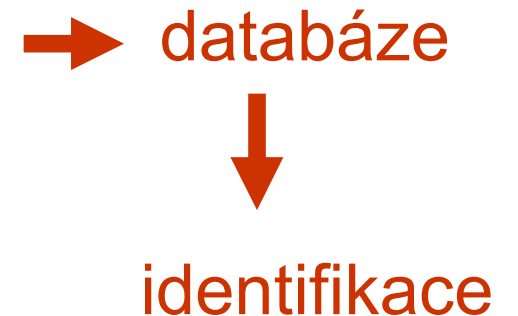
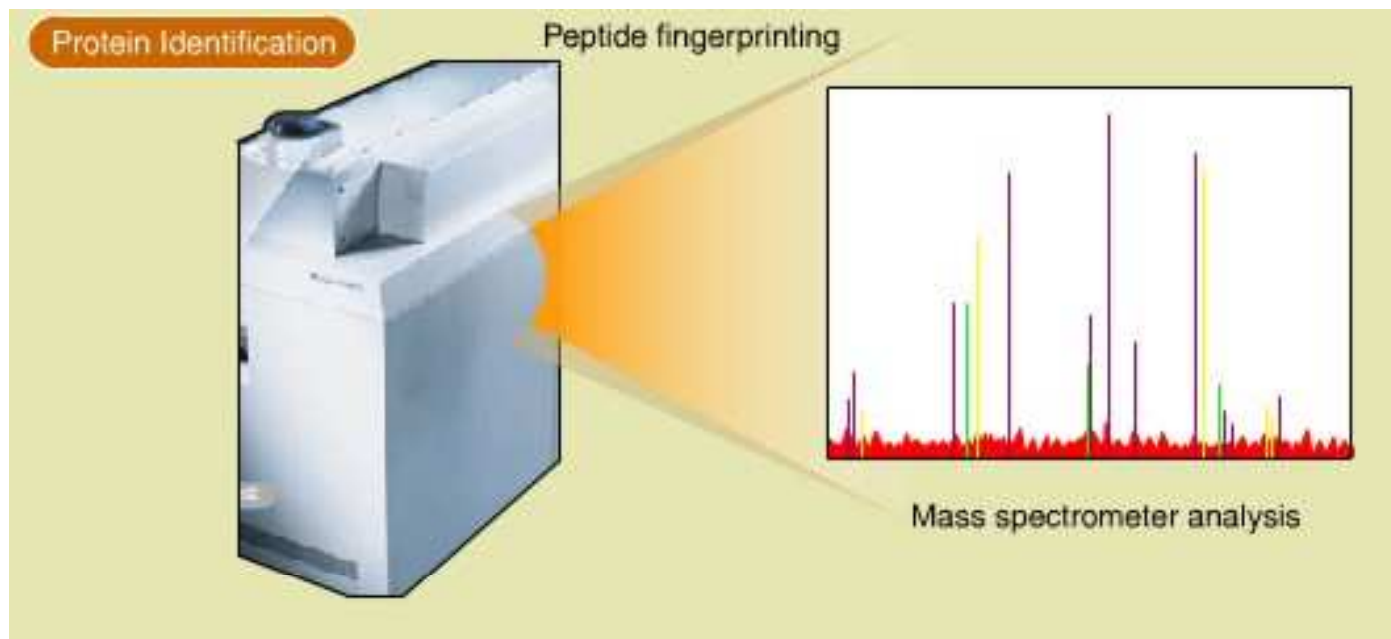


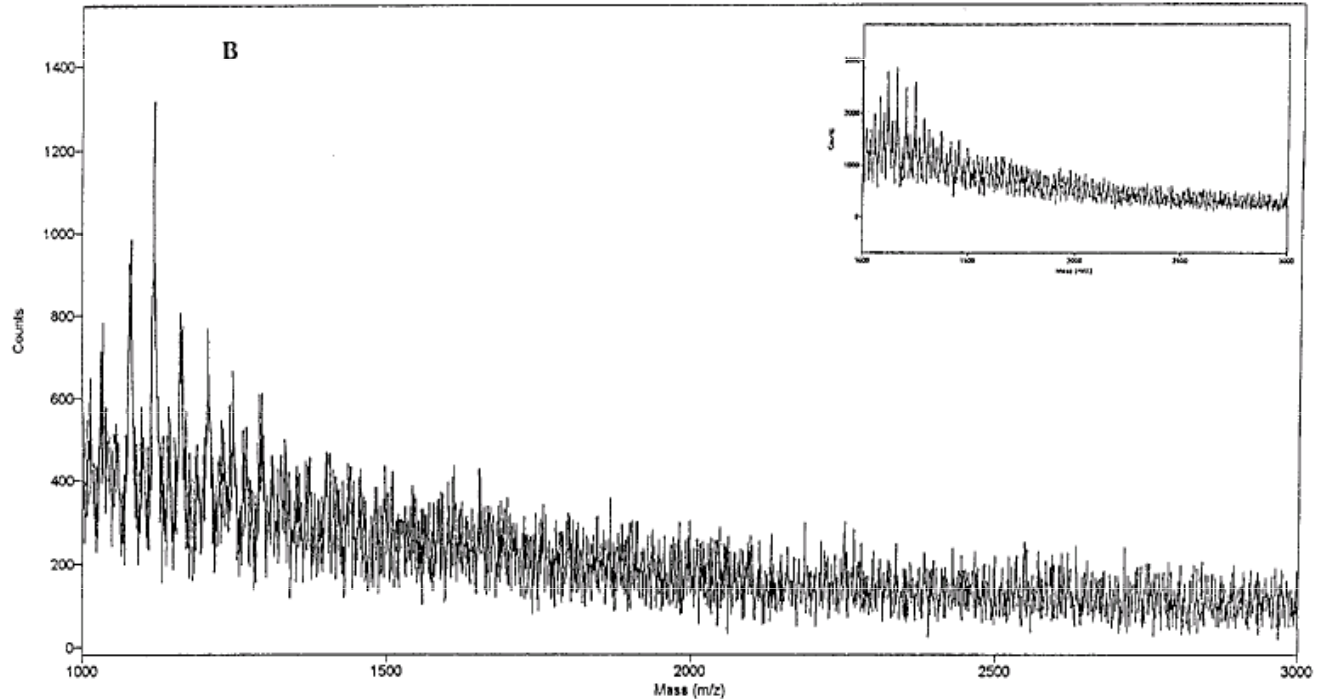
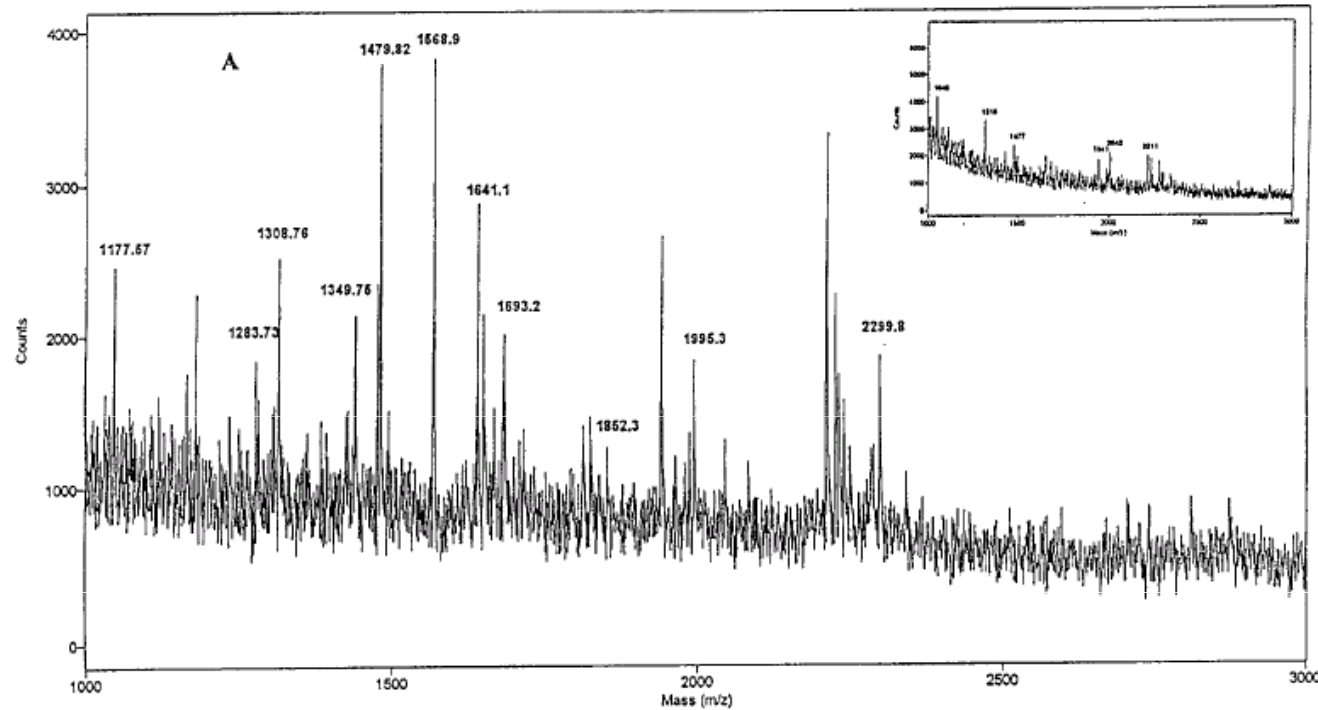
MS

# IDENTIFIKACE

## HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

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





**DIGEST**

**BSA**

v gelu

kompatibilní stříbro

**odbarvený gel**

**gel bez odbarvení**

# KERATINY !!! Potlačení ionizace

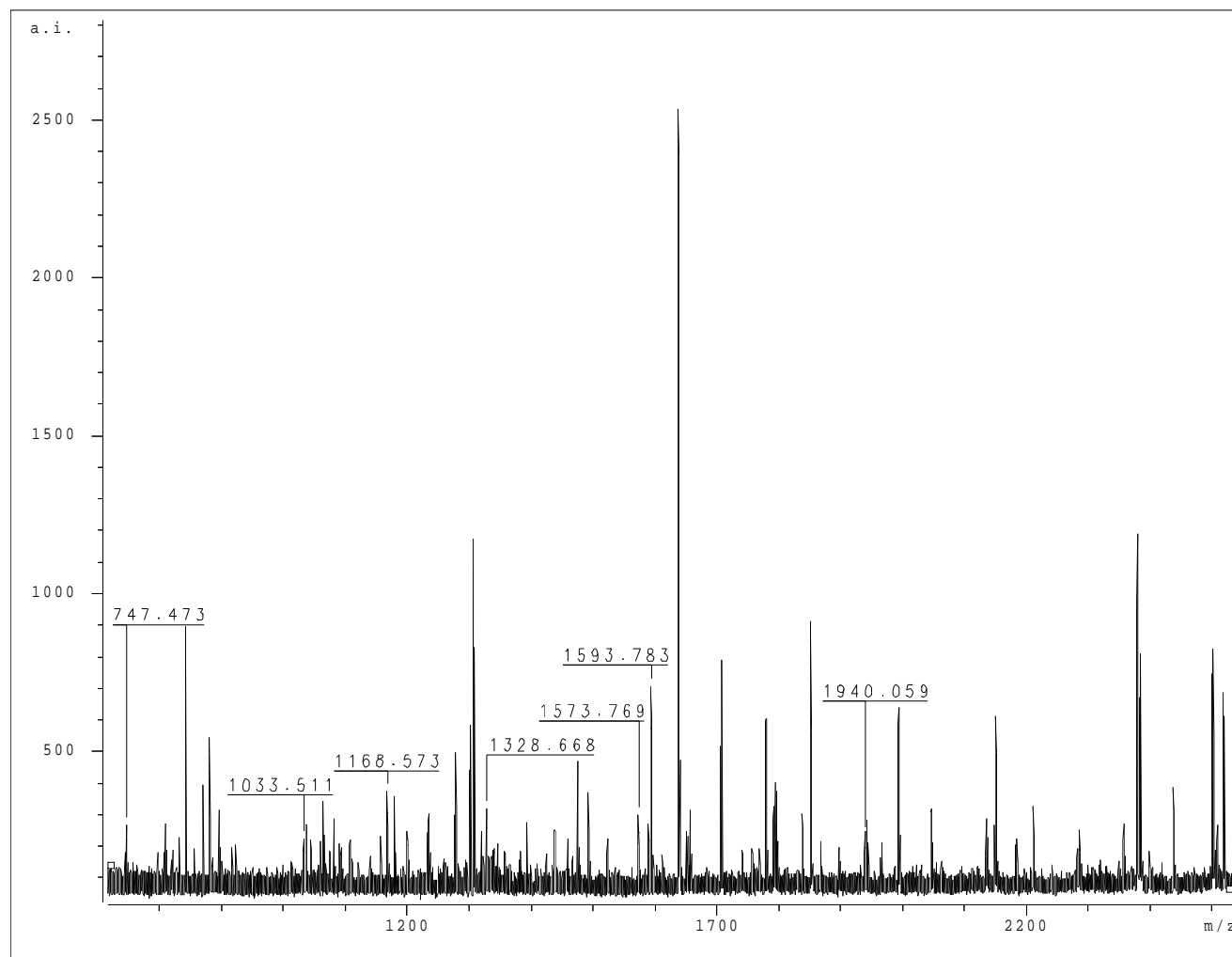
alpha-1-antitrypsin, antitrypsin

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

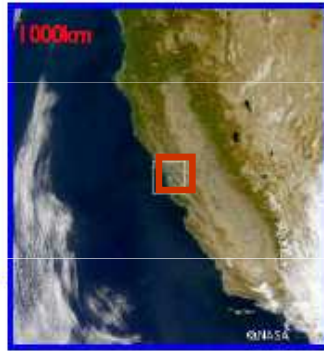
- R.M. Twyman: Principles of Proteomics
- R.Westermeier, T.Naven: Proteomics in Practice
- A.J.Link: 2D Proteome Analysis Protocols
- T.Rabilloud: Proteome Research: Two-dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods
- A. Gorg, W. Weiss, M.J.Dunn: Proteomics 2004, 4, 3665, rev.
- I. Miller,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

## II. PREFRAKCIÓN

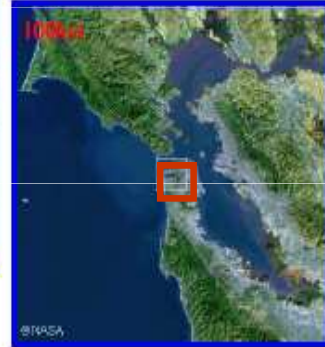
# $10^{10}$ Really Is Wide Dynamic Range



10 10 000km



9 1 000km



8 100km



7 10km



6 1km



5 100m



4 10m



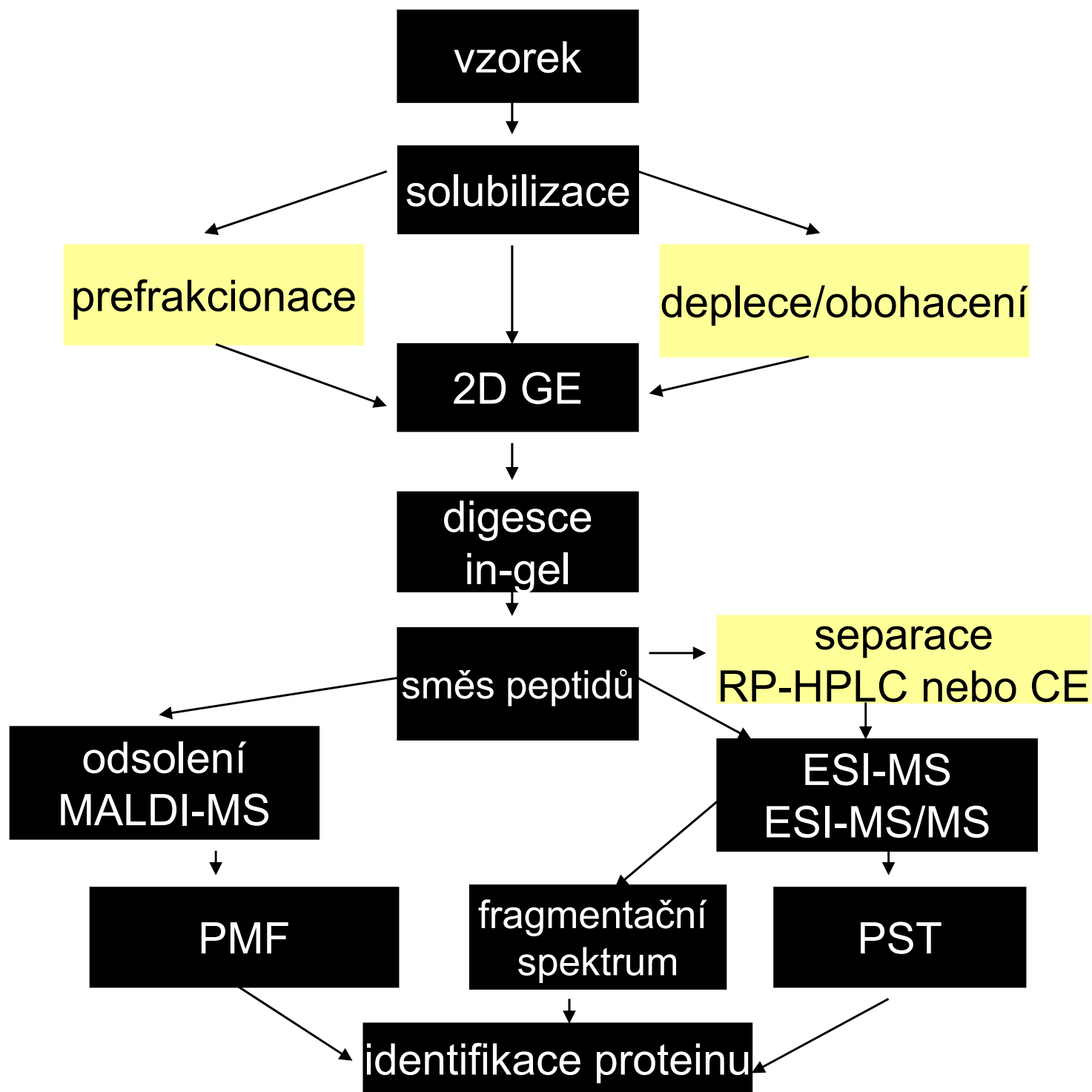
3 1m



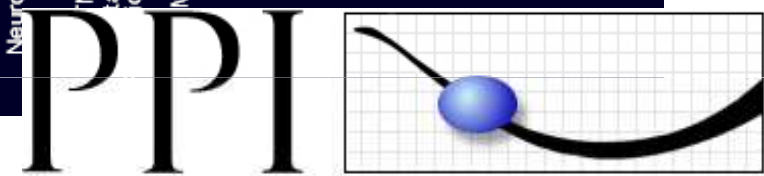
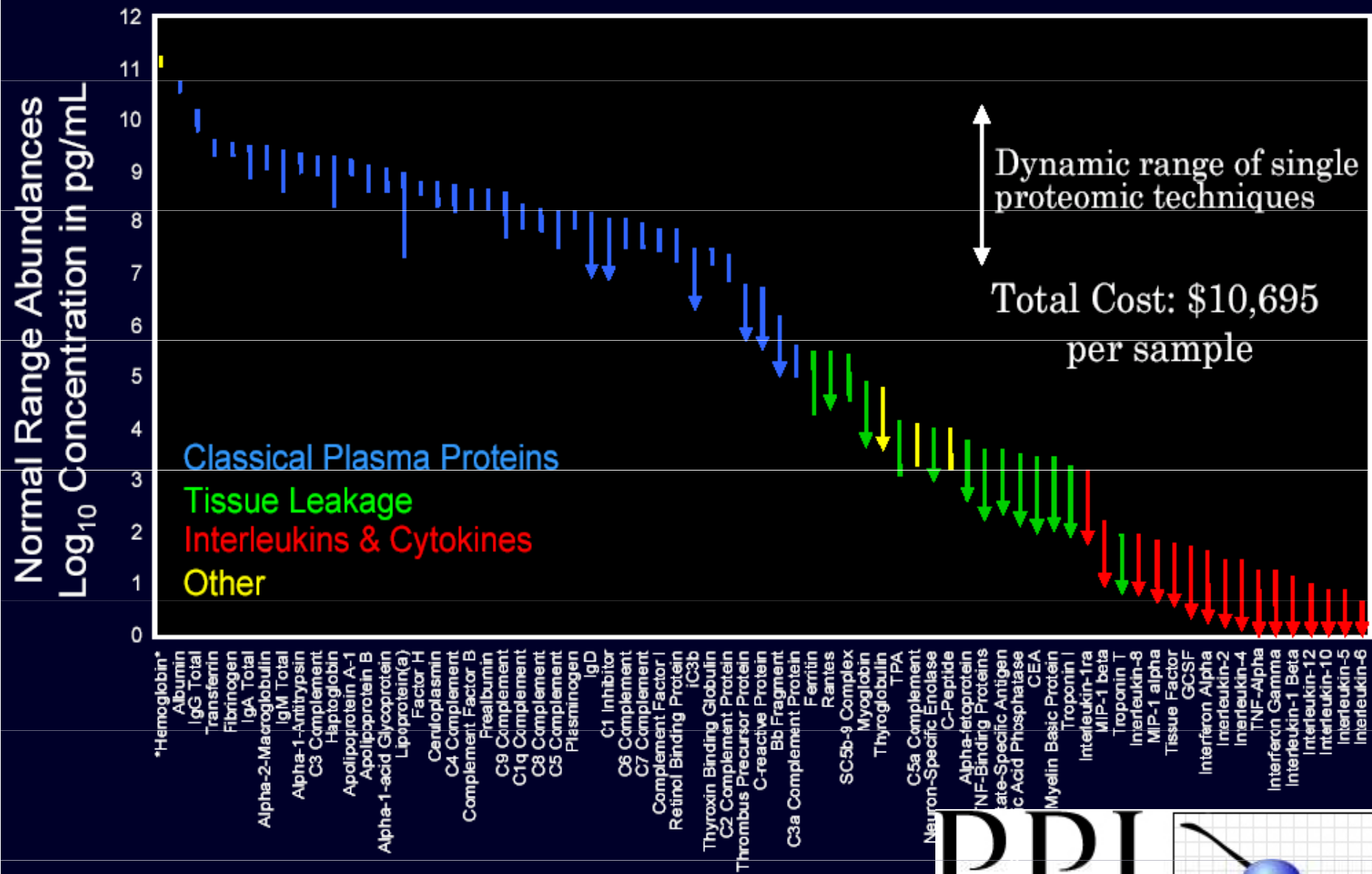
2 10cm

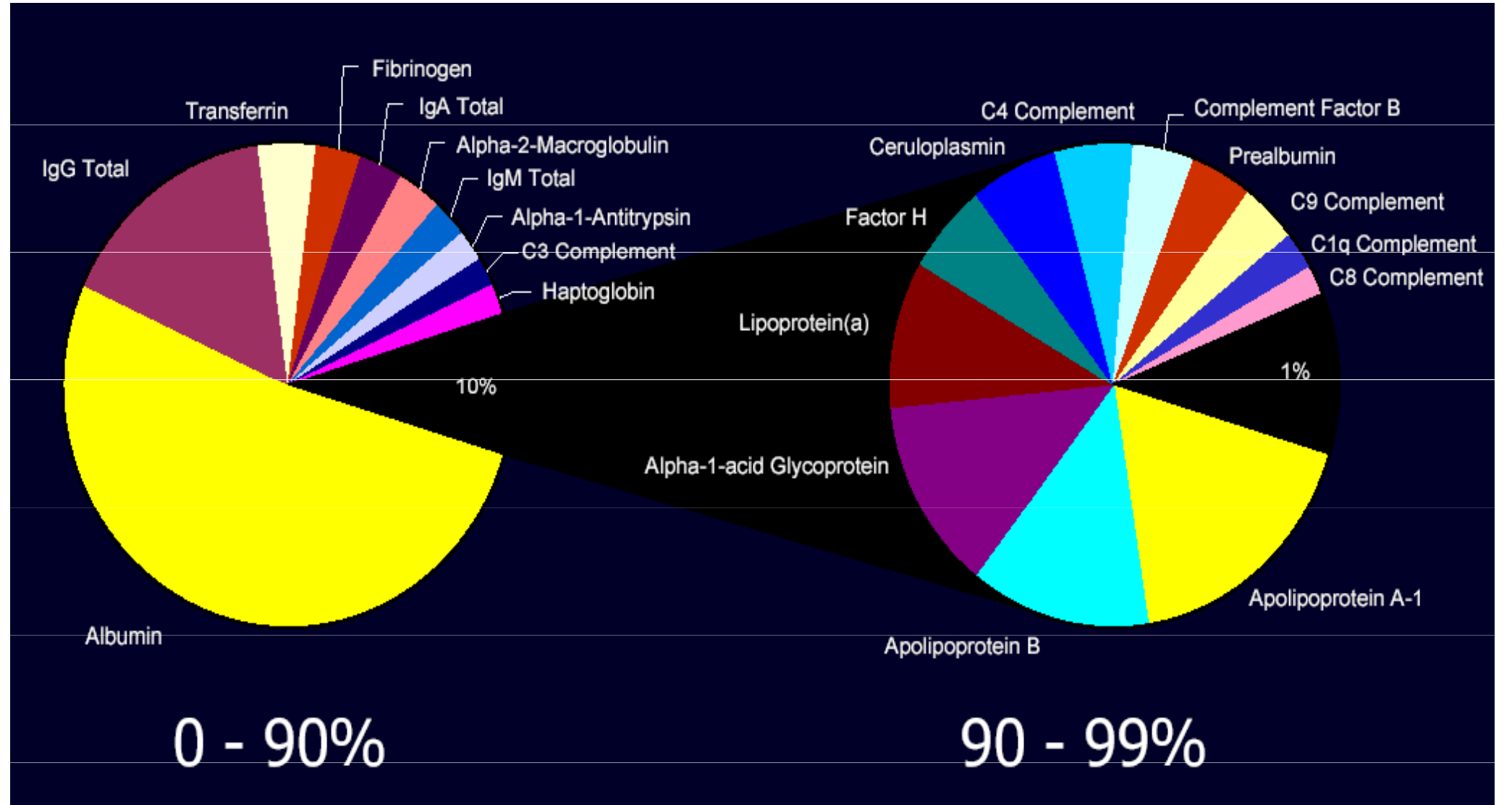
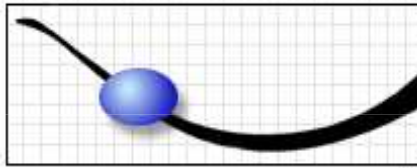


1 1cm



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

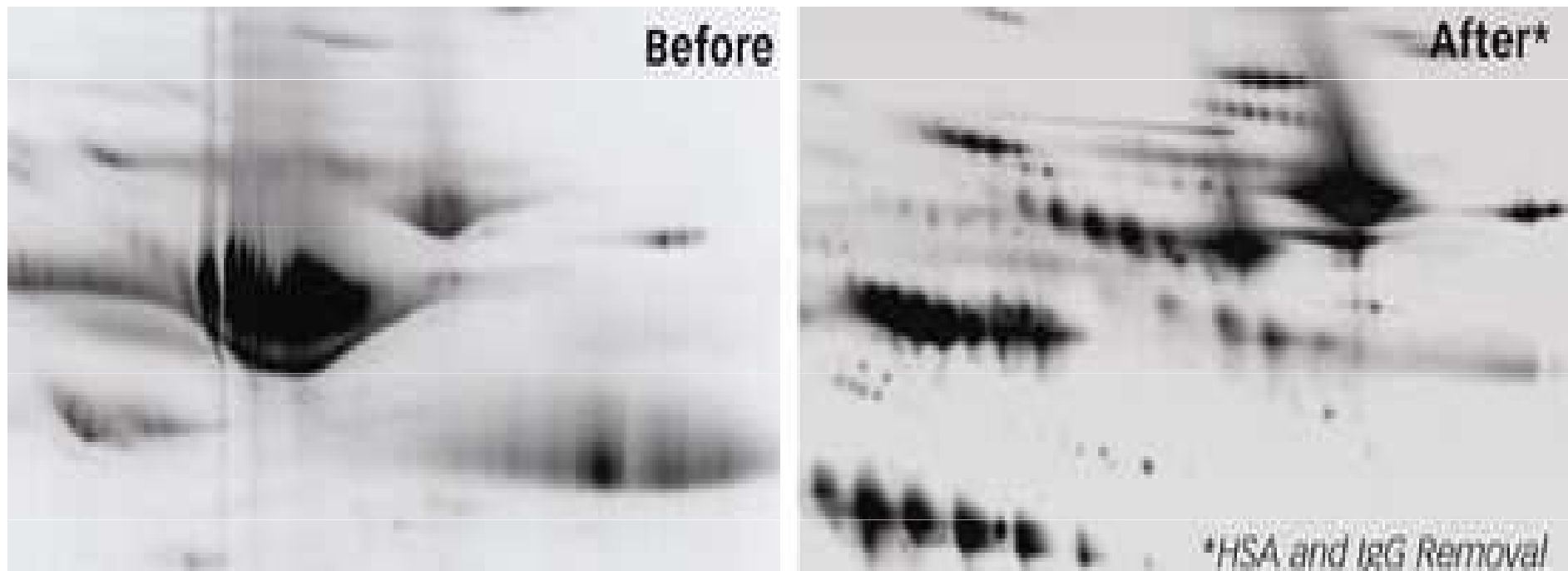




# DEPLECE

odstranění abundantních proteinů

HSA  
IgG



Vivapure Kit



# Lidská plazma - vázaná frakce po afinitní depleci

ALBUMIN

IgG

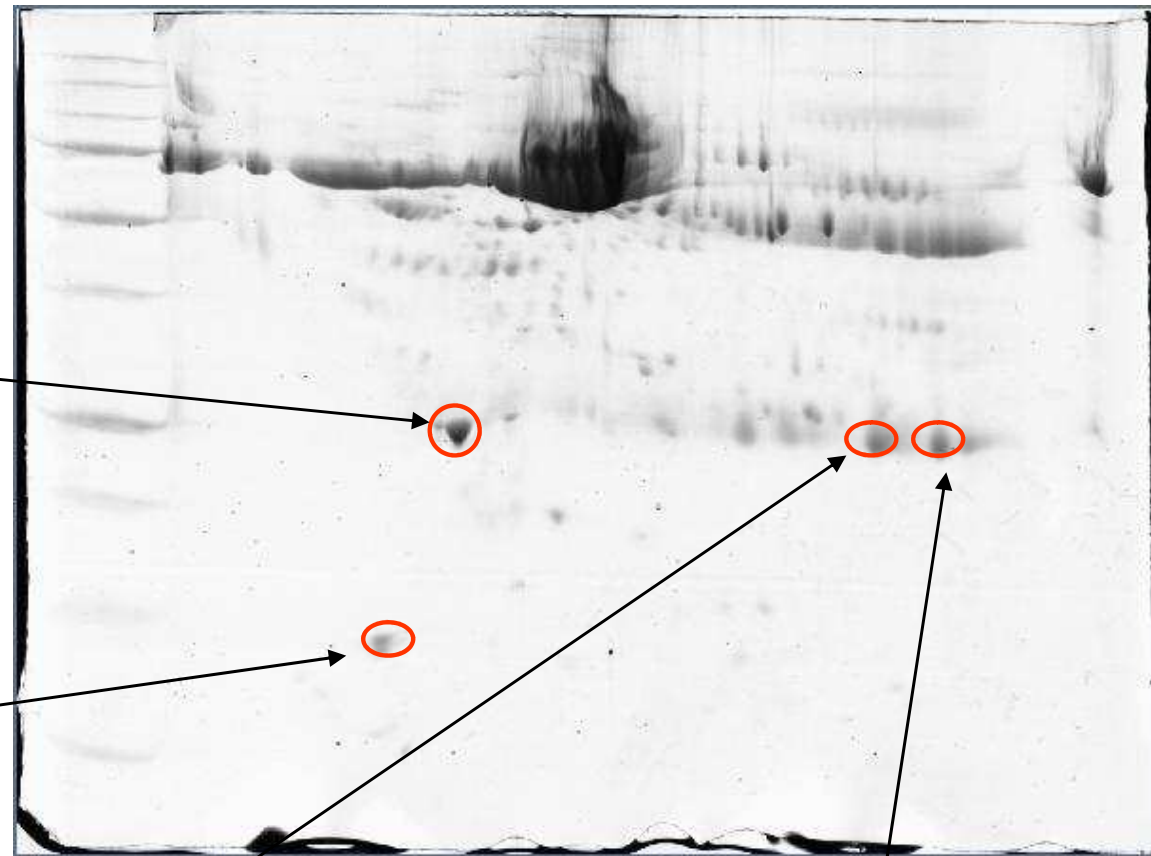
Barvení: CB G-250

Apolipoprotein

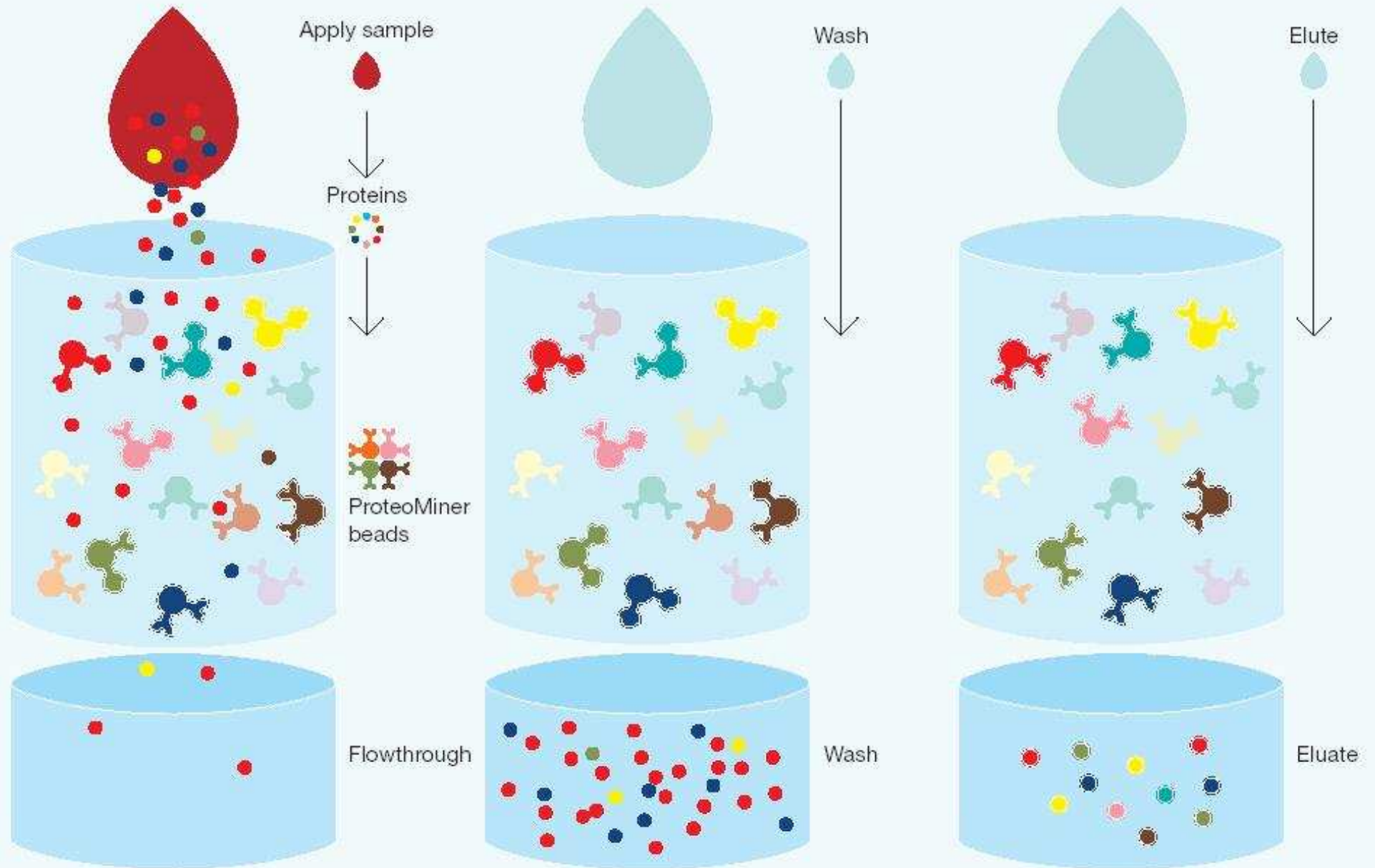
albumin

Immunoglobulin kappa light chain

Immunoglobulin light chain



# PREFRAKCIÓNACE PROTEOMINER



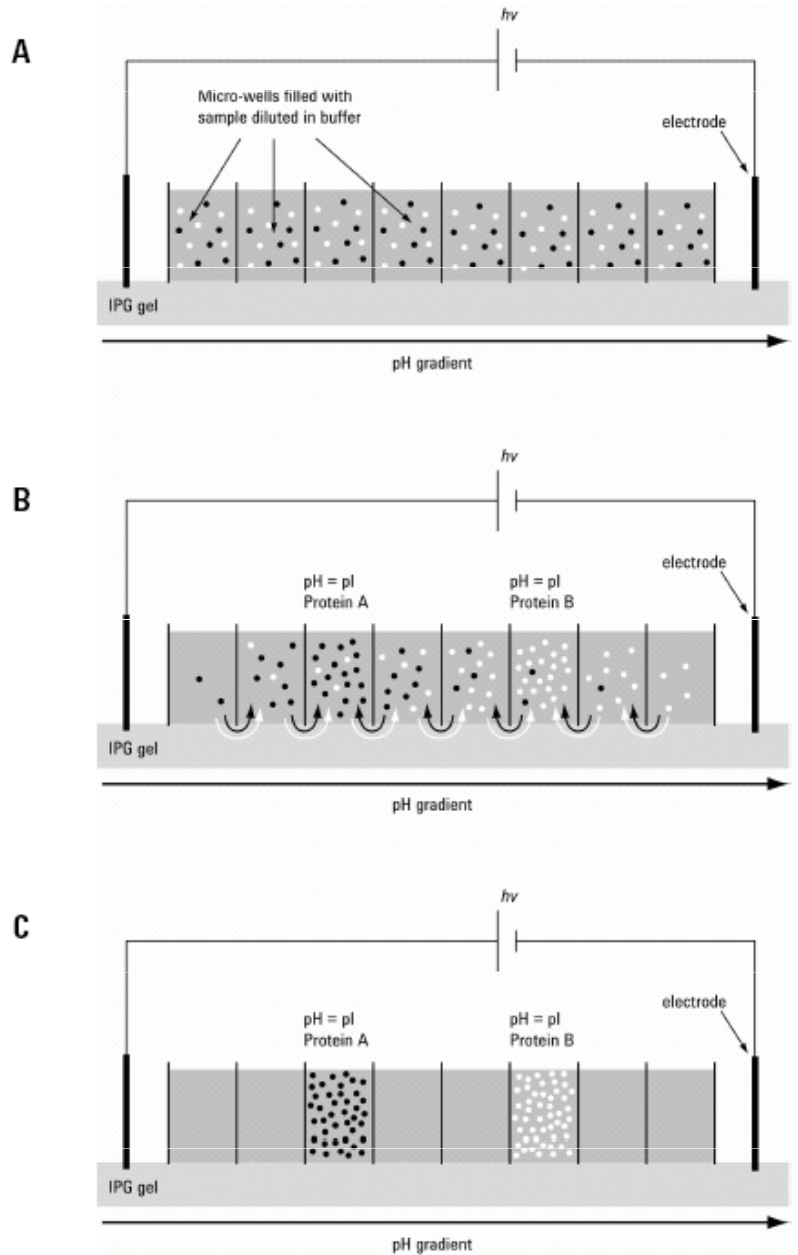
# PREFRAKCIÓNACE



MicroRotorfor

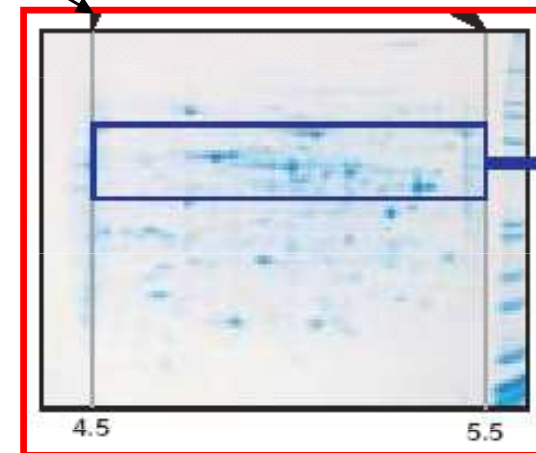
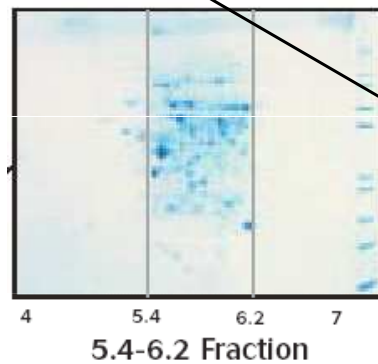
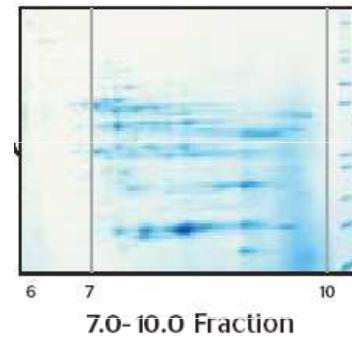
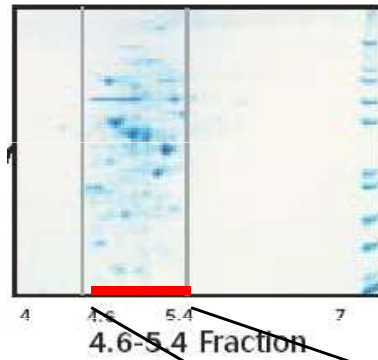
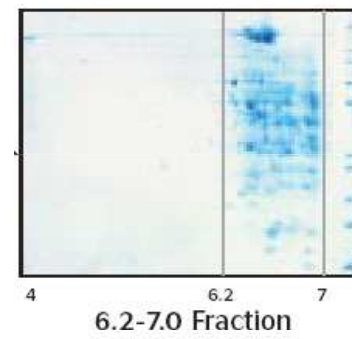
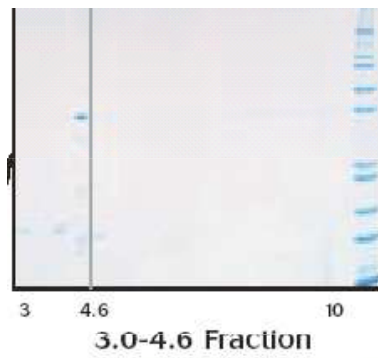
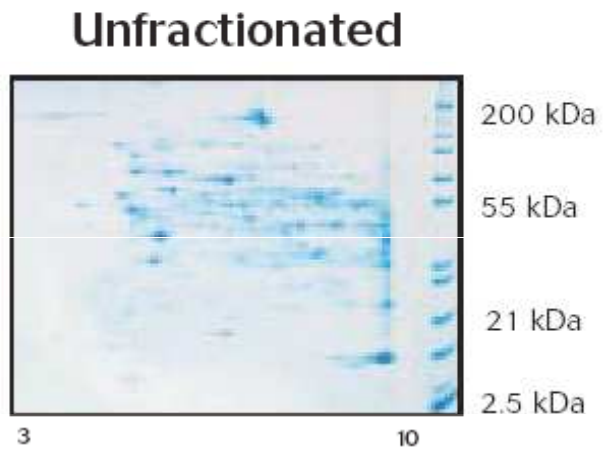


OffGel Fractionator

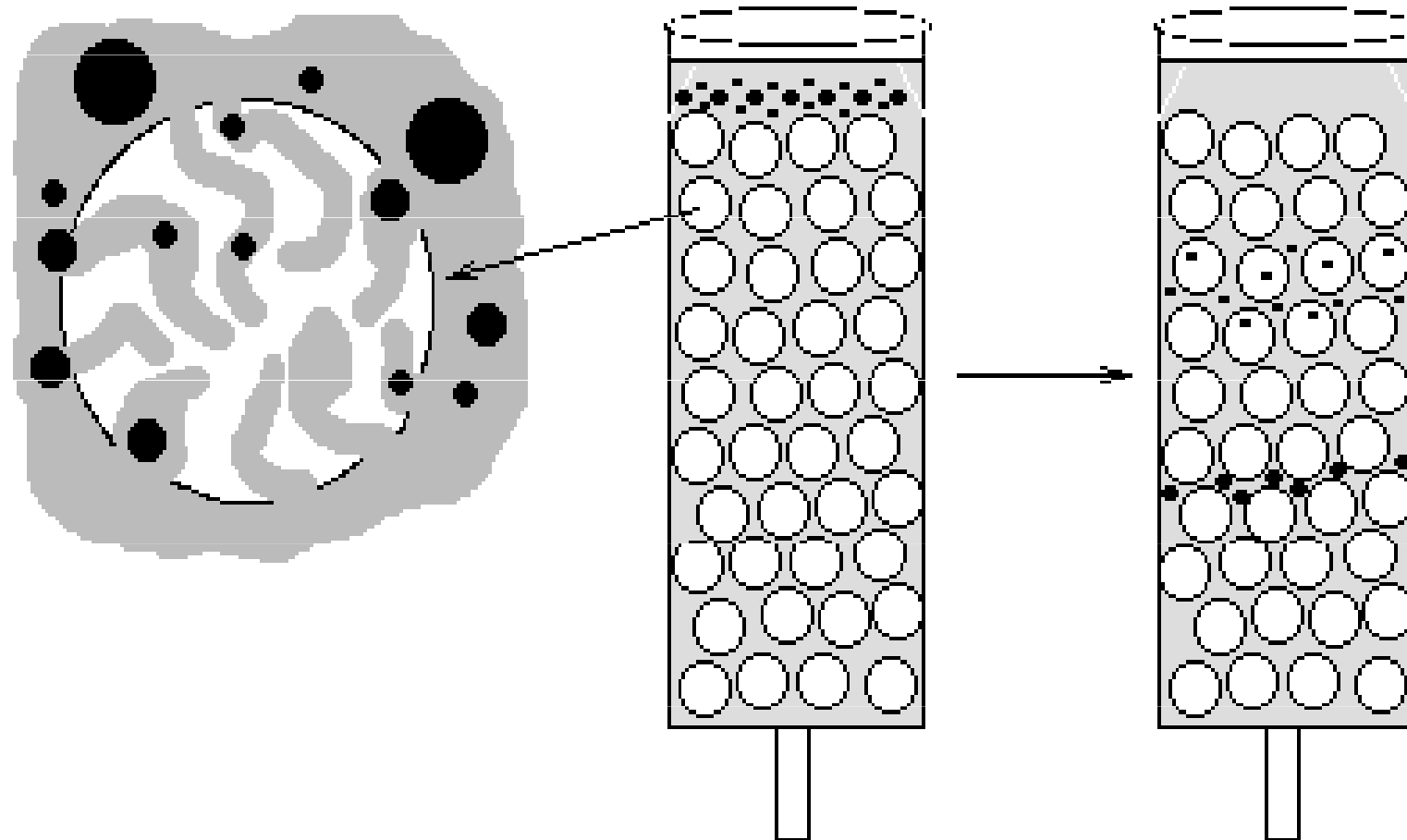


# PREFRAKCIÓNACE MIKRO ROZSAHY

pl



# 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

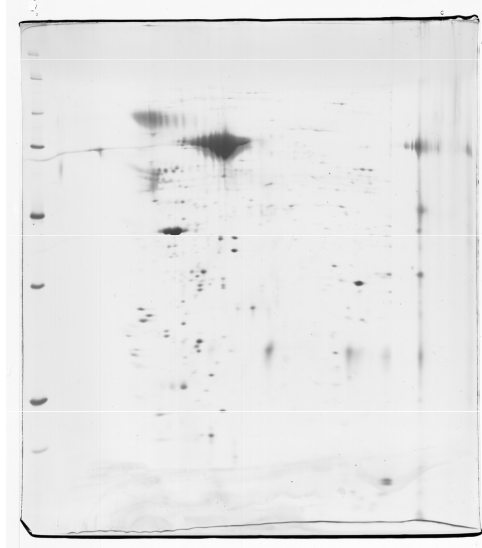
- kapalinová chromatografie
- gelová elektroforéza
- analýza obrazu
- digesce proteinů
- hmotnostní spektrometrie

- minisklad reagensů pro molekulární biologii

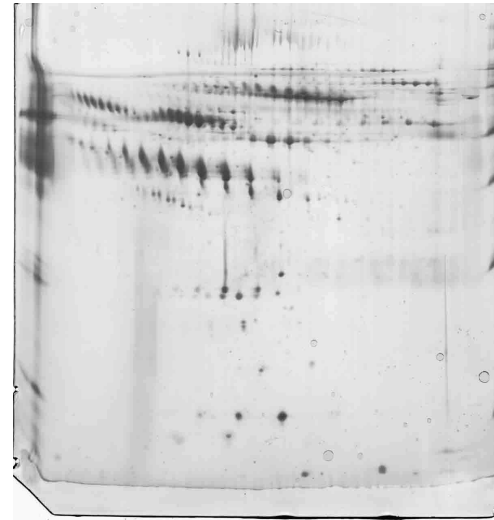


# ŘEŠENÉ PROJEKTY

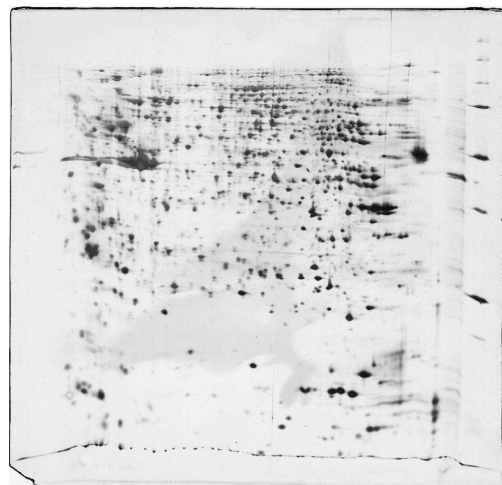
sekretované  
mikrovesikly  
kmenových  
buněk  
signální  
proteiny



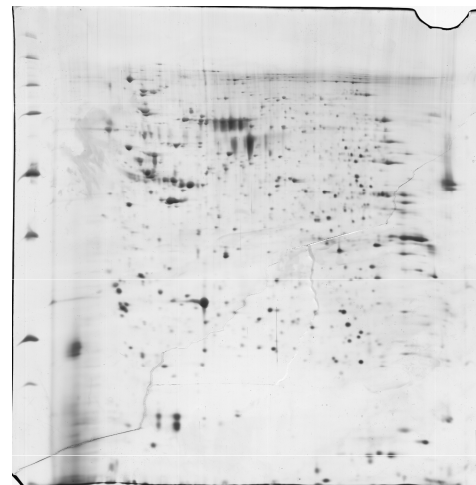
depletovaná  
plazma  
GvHD  
biomarkery



lymfocyty  
biomarkery  
terapie  
GvHD

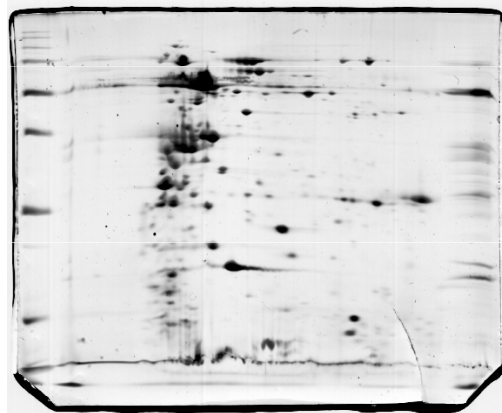


myelomové  
buňky  
biomarkery  
terapie

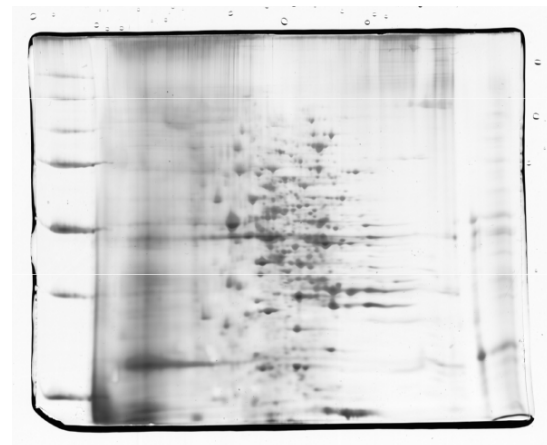


# ŘEŠENÉ PROJEKTY

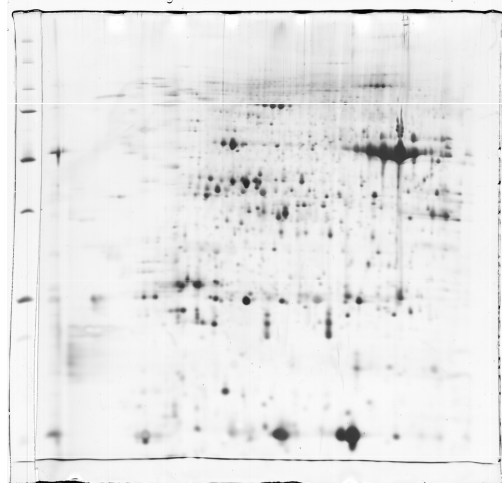
**bakteriofágy**  
potenciální  
terapeutika



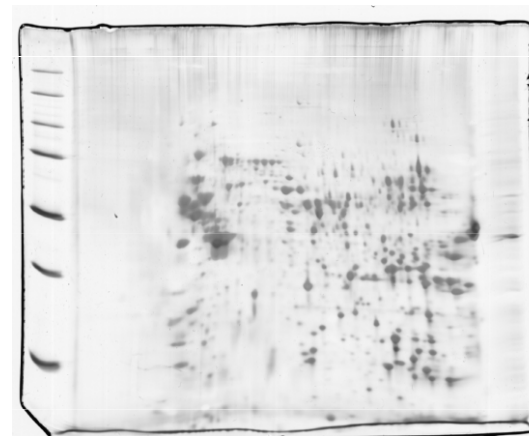
**kvasinky**  
průmyslový  
význam



**Hordeum  
vulgare**  
vliv stresu



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







Vyhledávání

OK

OFGP

o O NÁS

o VÝZKUM

o VÝUKA

o PUBLIKACE

o SPOLUPRÁCE

o NOVINKY

o VOLNÁ MÍSTA

SLUŽBY

proteomické

techniky

genomické

techniky

syntéza

oligonukleotidů

minisklad

další

o 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

Hana Konečná, RNDr.

54949 5050

[hanak@sci.muni.cz](mailto:hanak@sci.muni.cz)

54949 1465

Zbyněk Zdráhal RNDr., Dr.

54949 1466

[zdrahal@sci.muni.cz](mailto:zdrahal@sci.muni.cz)

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

Eva Paderová MSc.

54949 6341

[paderova@sci.muni.cz](mailto:paderova@sci.muni.cz)

54949 2517

**Objednávkový formulář** pro sekvenaci DNA.