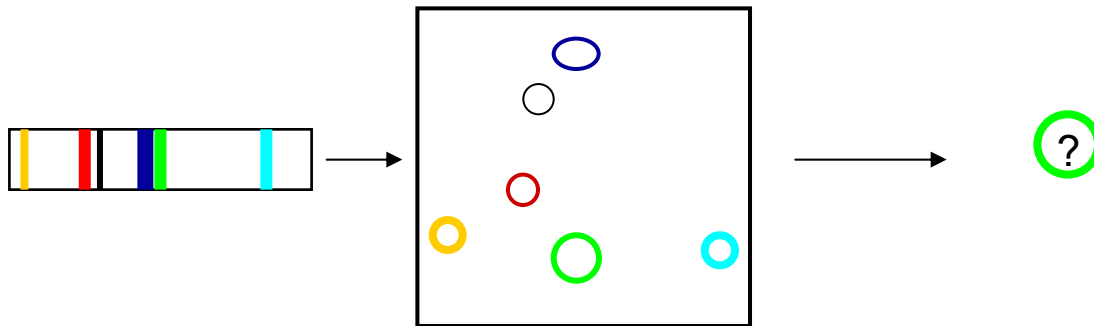
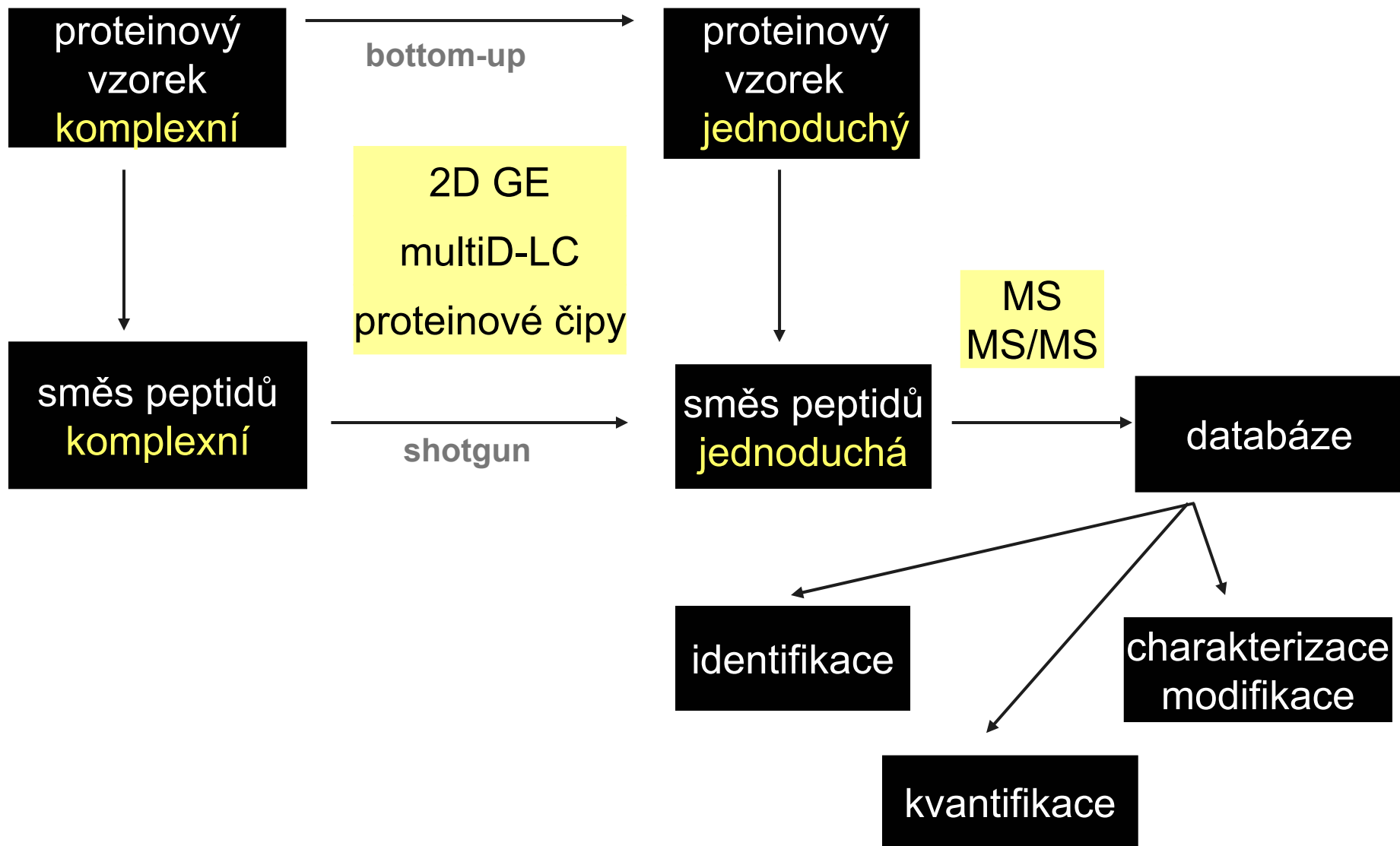


Středoevropský technologický institut CEITEC  
Centrální laboratoř - Proteomika

# Dvoudimenzionální elektroforéza 2-DE

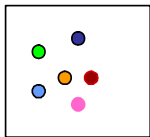
Hana Konečná





# Proteomický experiment

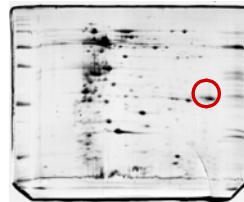
**extrakce**



**fokusace**



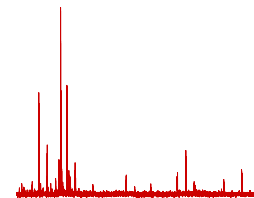
**SDS-PAGE**



**digest**



**MS**

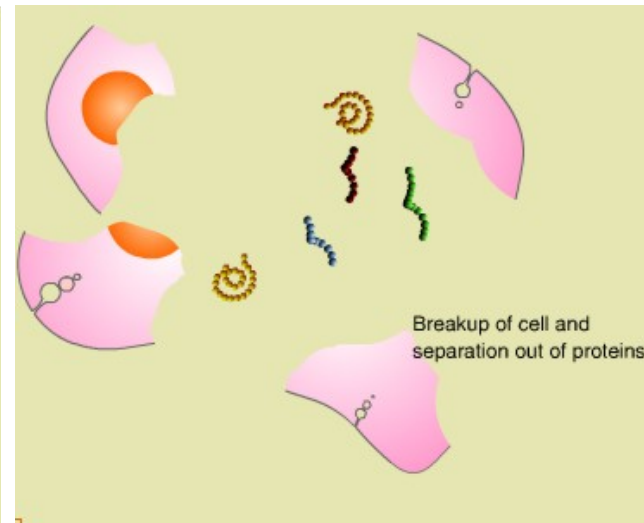
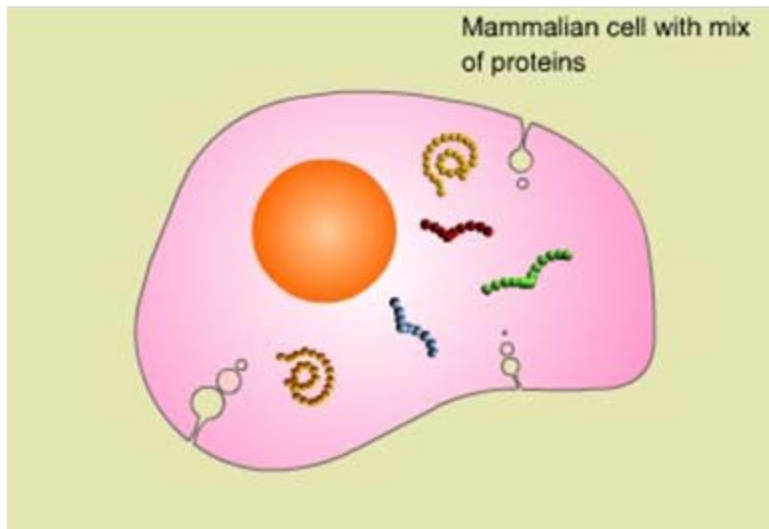


**identifikace**

**neznámý protein**

## HOMOGENIZACE

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



## PŘÍPRAVA VZORKU

**solubilizace** močovina, thiomčovina, detergenty

**redukce** DTT, TBP

**inhibice** proteáz, fosfatáz, glykosyláz

**odstranění kontaminant**

## DETERGENTY

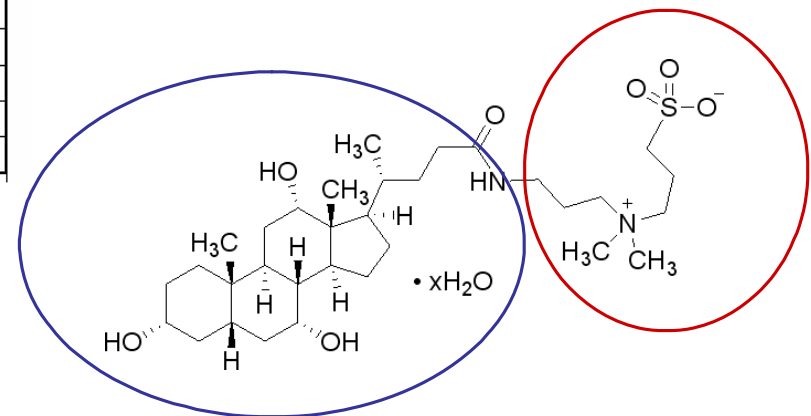
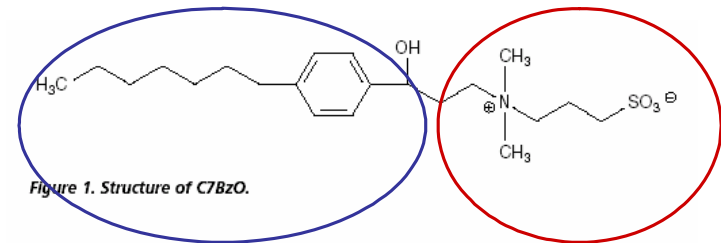
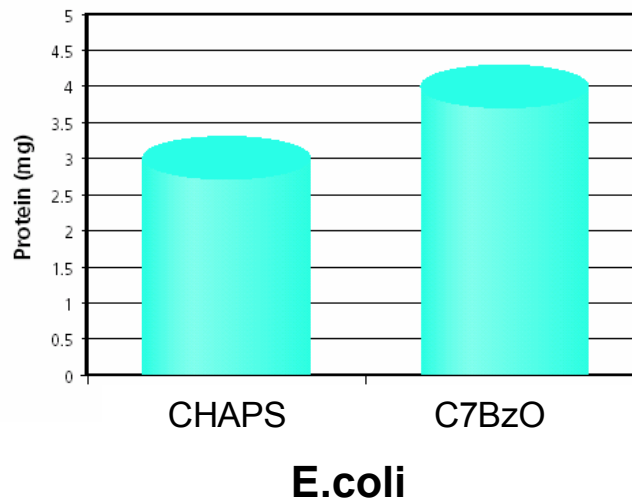
- žádný celkový náboj
- 0.5 - 4%
- použitelné ve vysokých koncentracích močoviny
- neionogenní
- zwitterointové
- SDS jen v nízkých koncentracích (do 0.25%)

**C7BzO**

3-(4-Heptyl)phenyl-3-hydroxypropyl)dimethylammoniopropanesulfonate

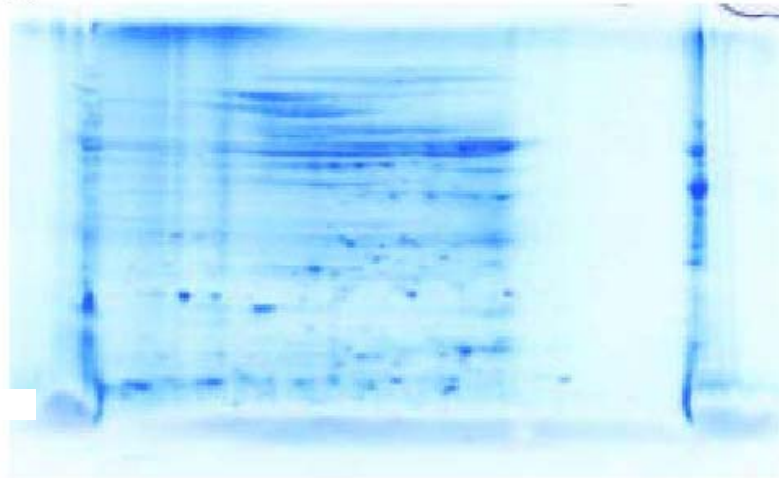
**CHAPS**

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



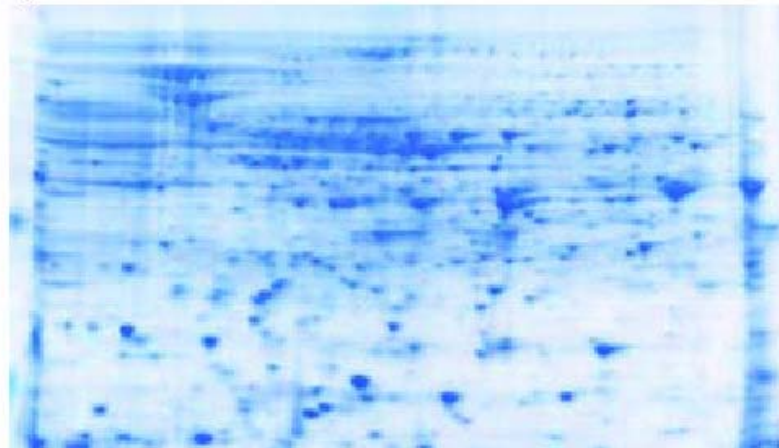
E.coli

A)



CHAPS

B)



C7BzO





## ZÁKLADNÍ PRAVIDLA

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

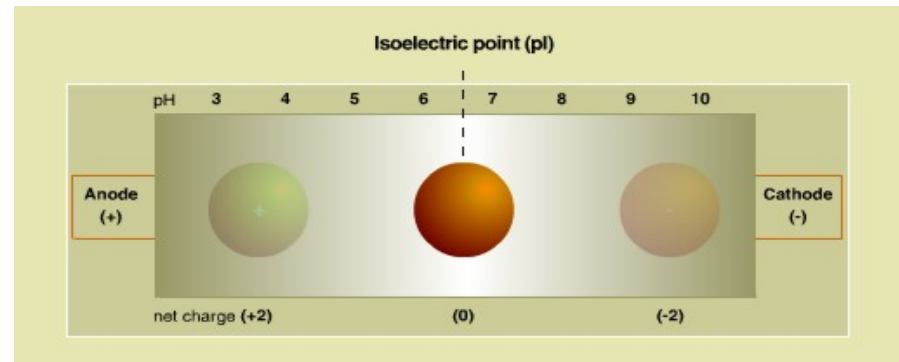
# KONTAMINANTY

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

## 2-DE

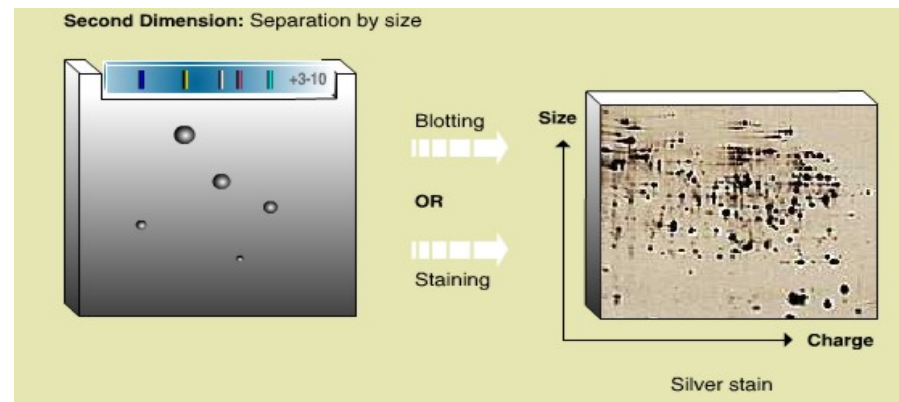
- první rozměr

### IEF



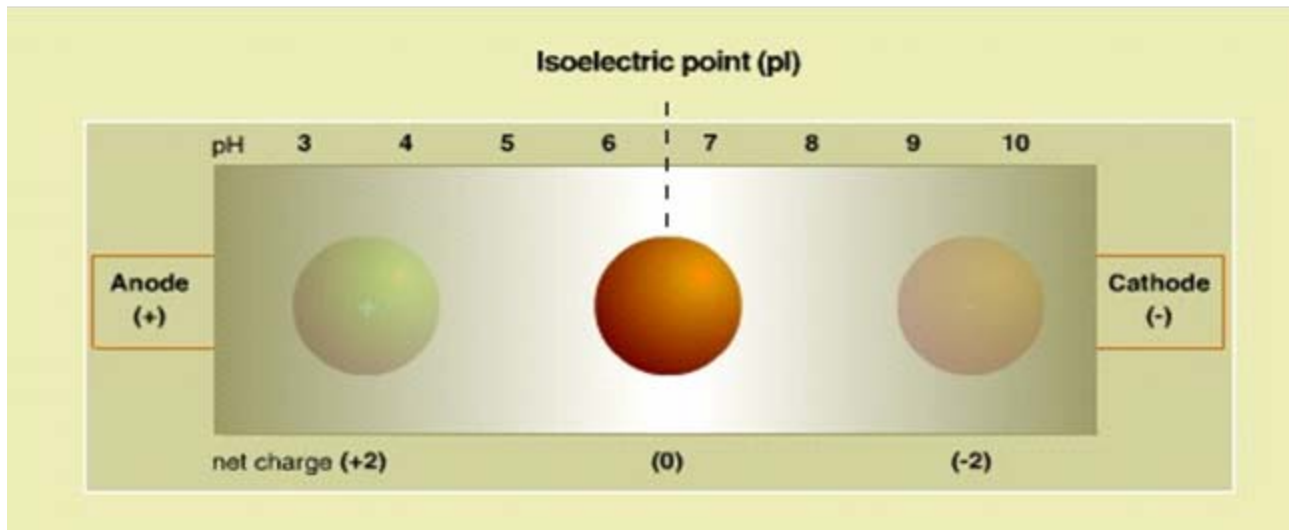
- druhý rozměr

### SDS-PAGE



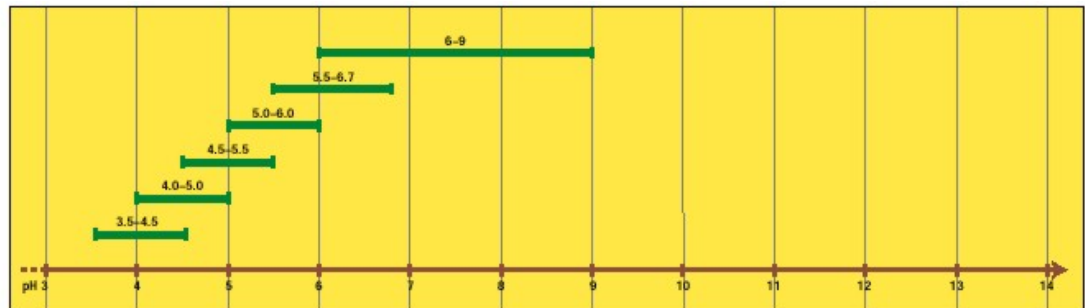
# 1. ROZMĚR **IZOELEKTRICKÁ FOKUSACE**

migrace nabitých částic v gradientu pH v elektrickém poli





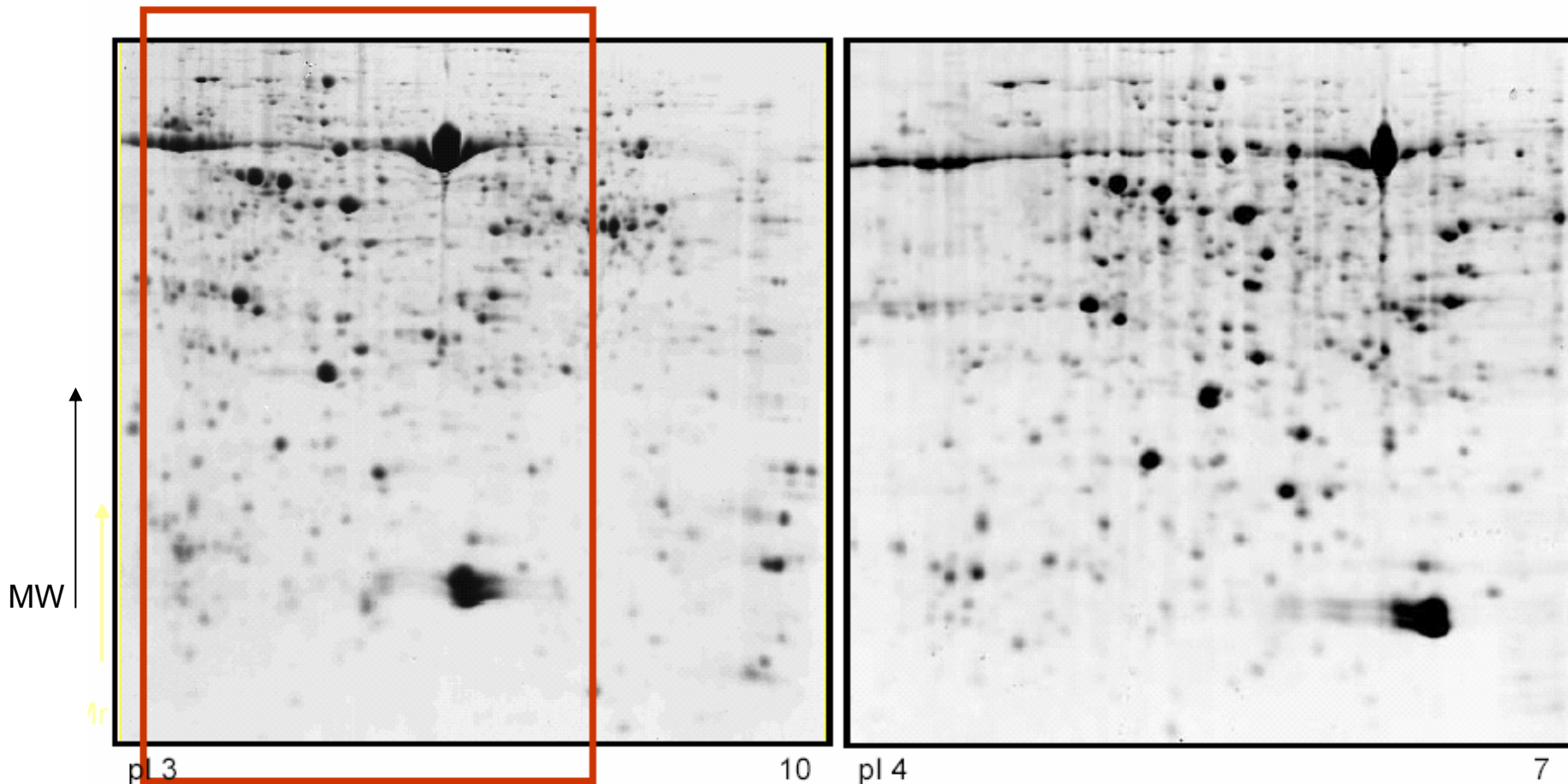
# ROZSAH STRIPU ROZMĚR STRIPU

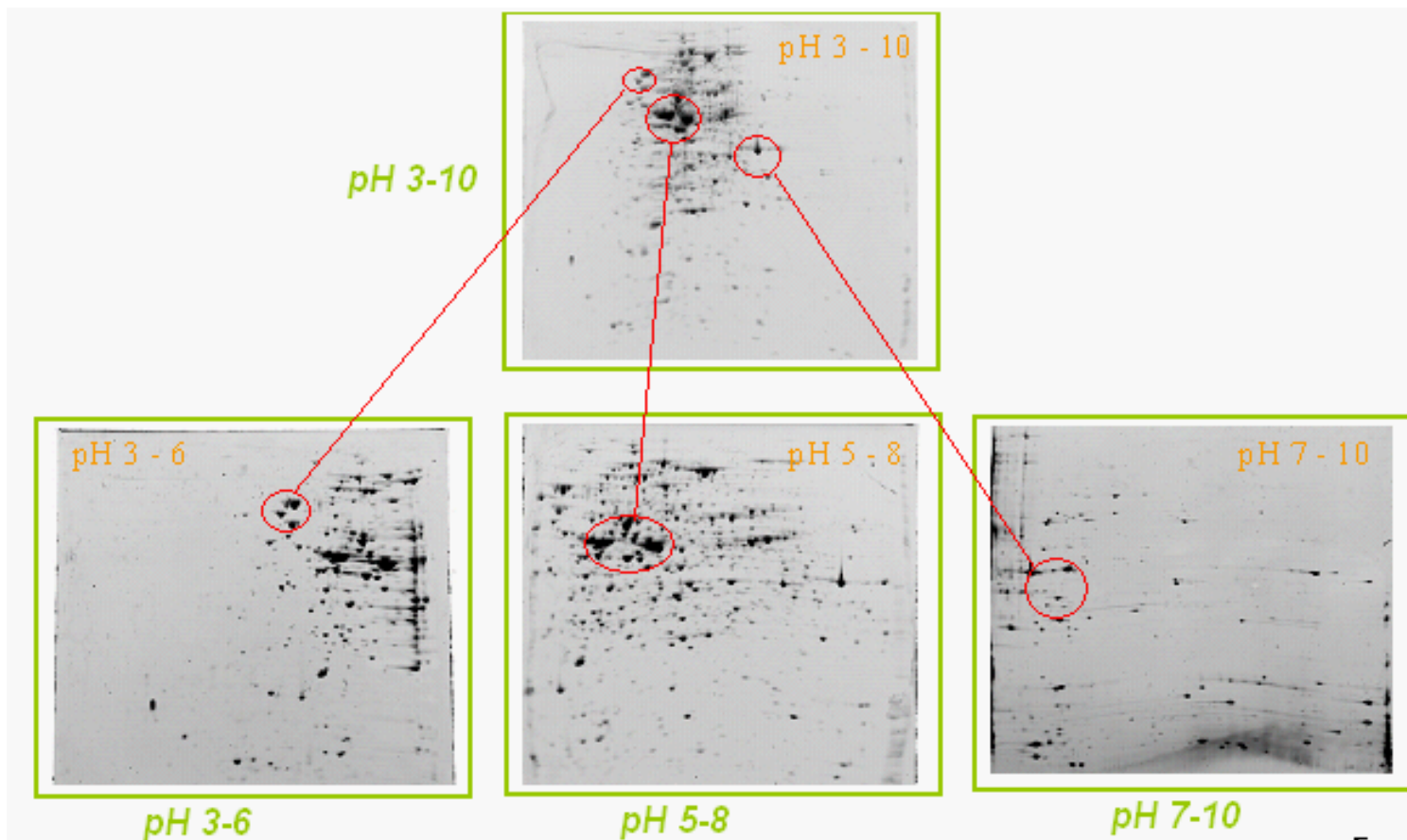


# ROZSAH STRIPU

pl 3 - 10 NL

pl 4 - 7

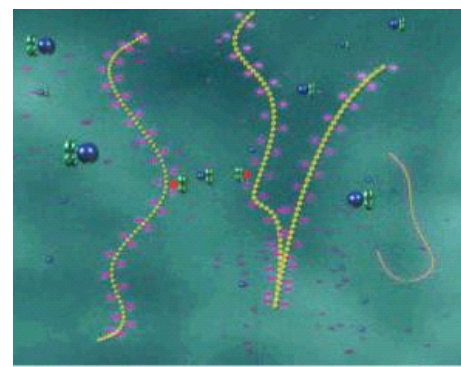
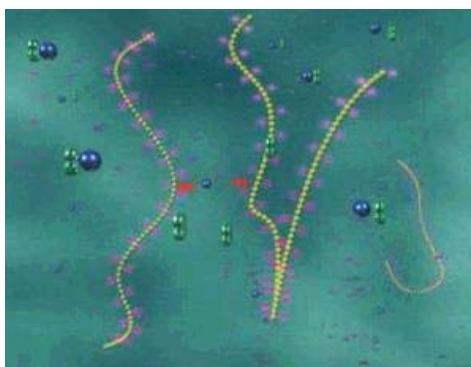
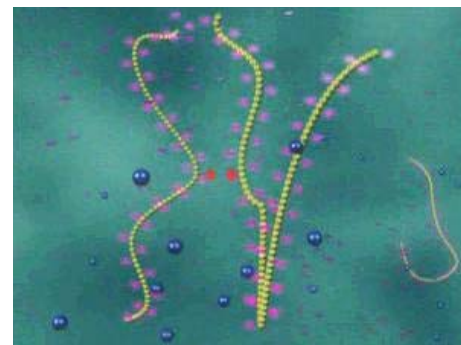
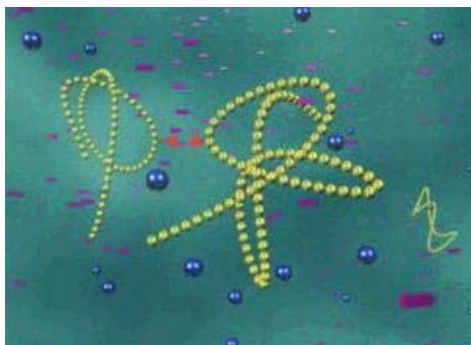






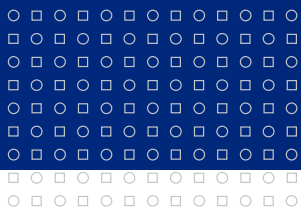
# EKVILIBRACE STRIPU

denaturace **SDS** ●



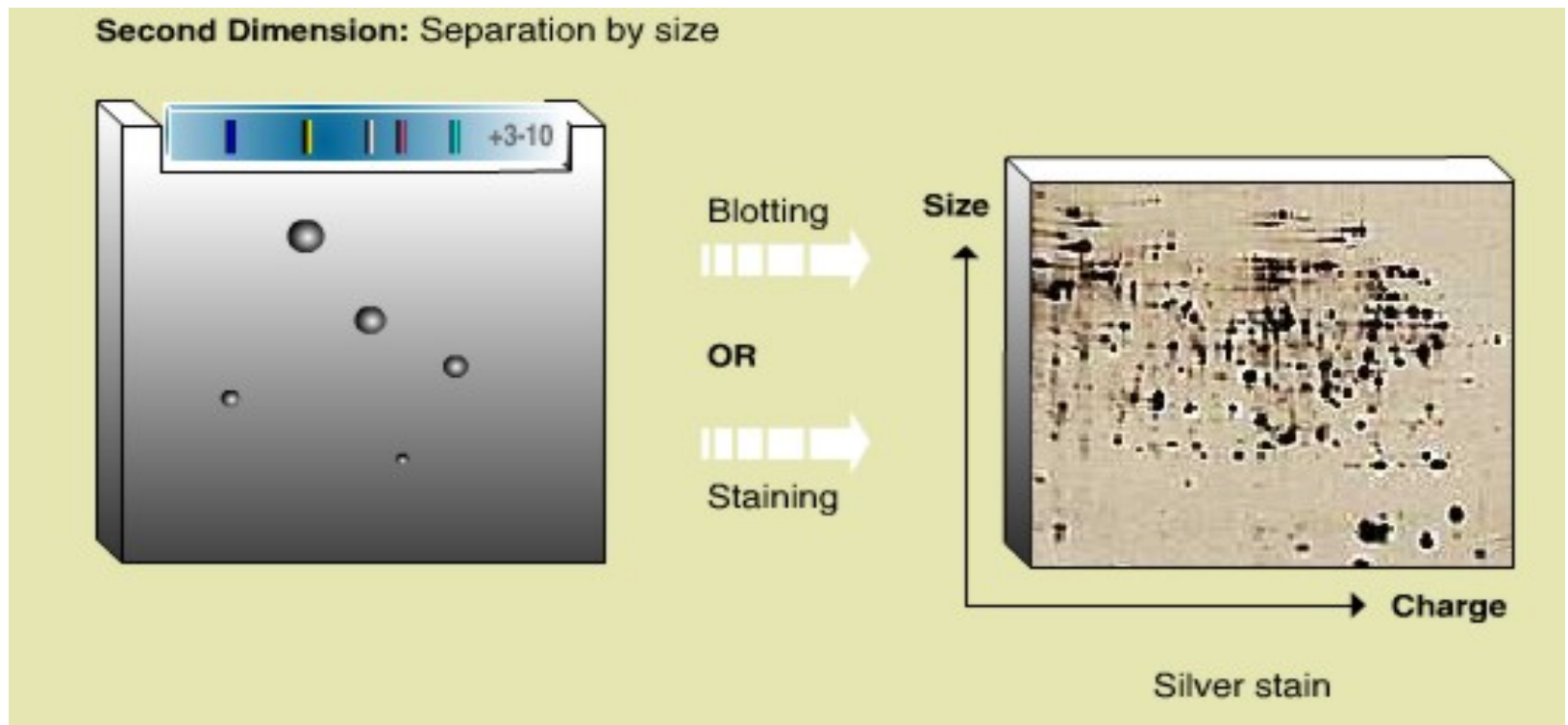
redukce **DTT** ●

alkylace **IAA** ●

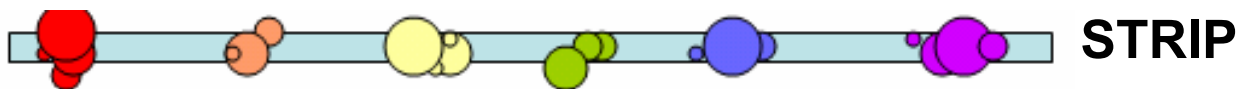


## 2. ROZMĚR **SDS-PAGE**

### migrace aniontů v elektrickém poli podle MW



**FOCUSATION**



**STRIP**

**EQUILIBRATION**

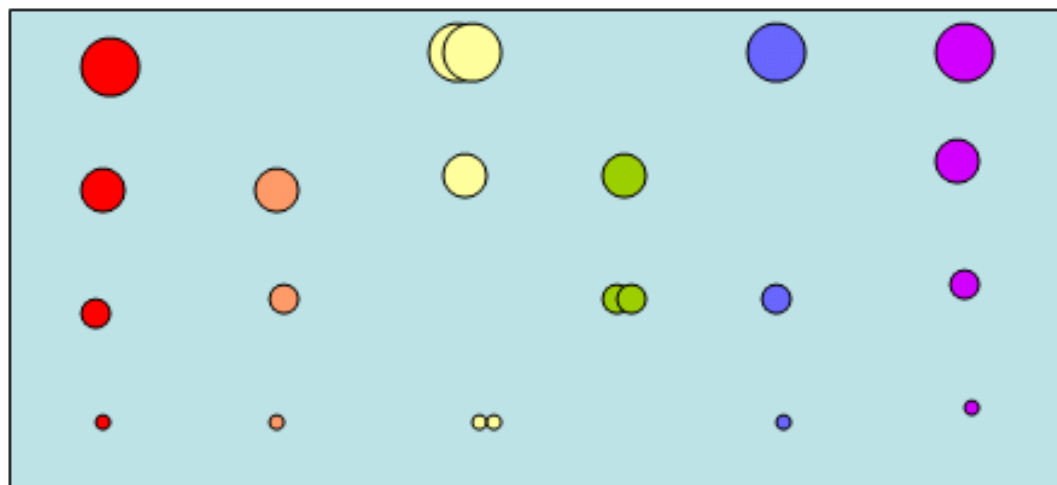
**SDS-PAGE**



MW

high

low



**GEL**

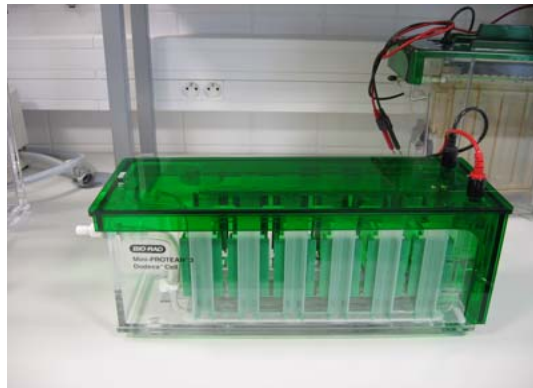


## 2-DE INSTRUMENTACE

- Protean IEF
  - Protean Dodeca Cell
  - Densitometer GS-800
  - FLA-7000, STORM
- PDQuest, Quantity One*



Protean Plus Dodeca Cell



Mini-Protean 3 Dodeca Cell

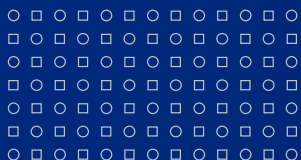


Protean II xi Cell



## 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

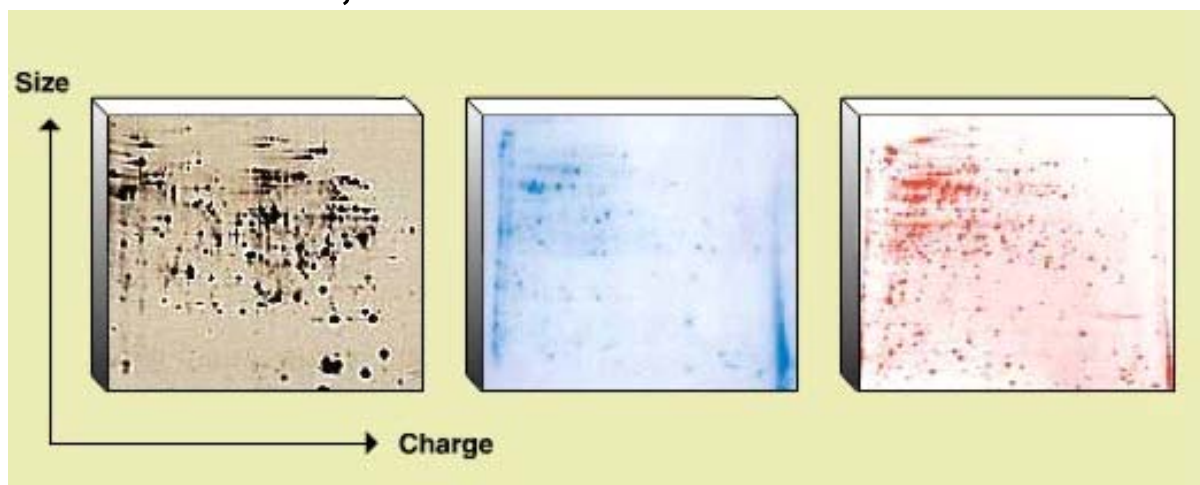
Coomassie Blue R-250, Coomassie Blue G-250

Stříbro: kompatibilní s MS

nekompatibilní s MS

Sypro Ruby, Flamingo Pink, Lucy, Deep Purple

Pro-Q Diamond, Pro-Q Emerald

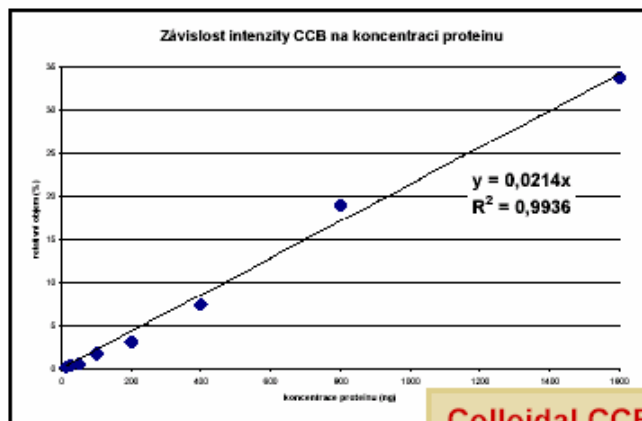


**Stříbro**  
**0.6 ng**

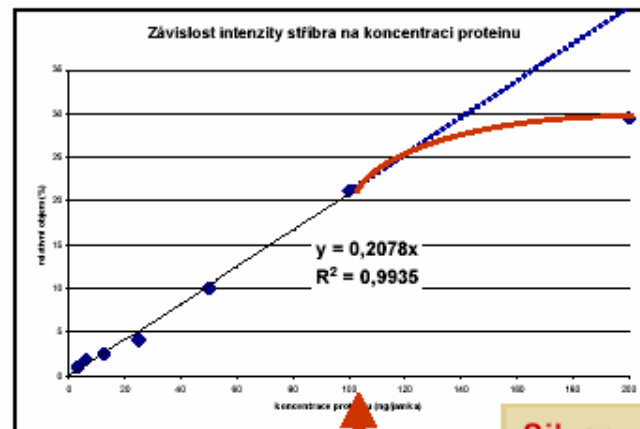
**Coomassie**  
**(8 ng) 36 ng**

**Sypro Ruby**  
**1 - 4 ng**

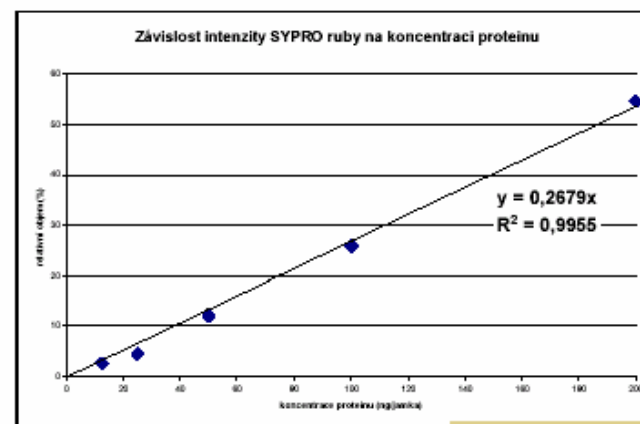
## BARVENÍ PROTEINU LINEARITA



Colloidal CCB



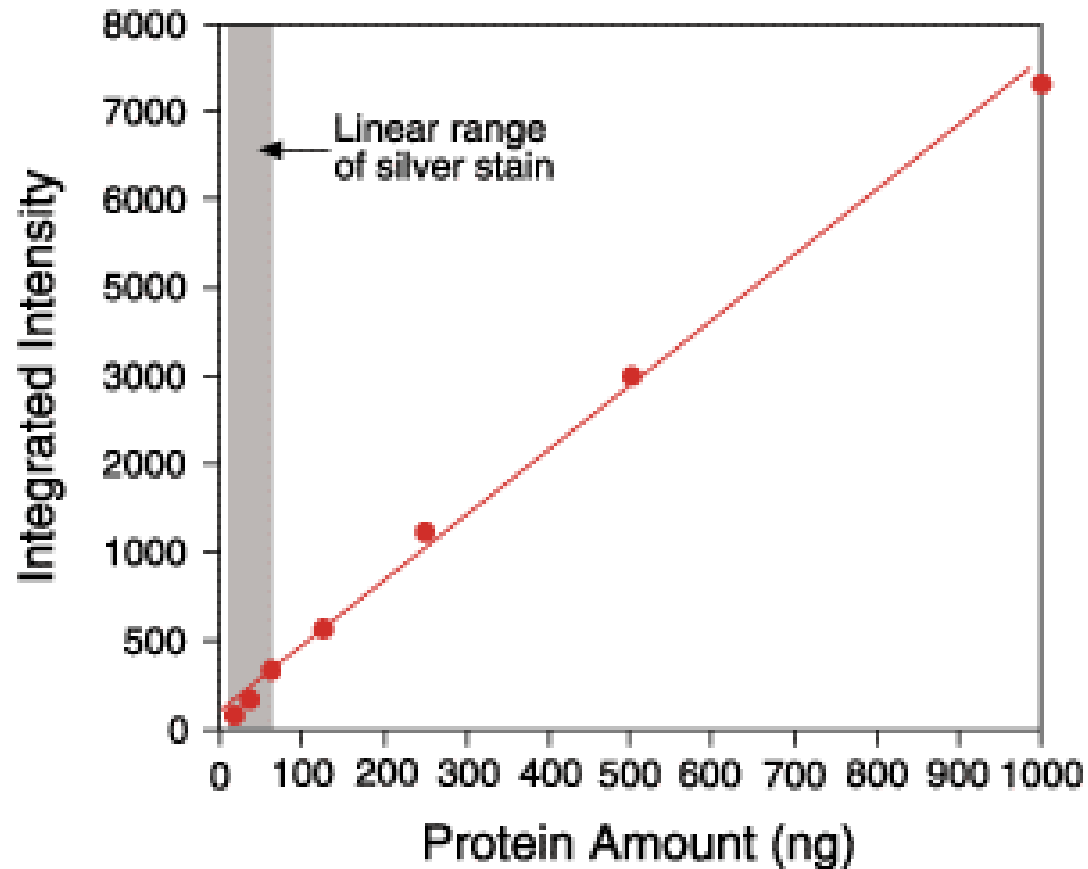
Silver



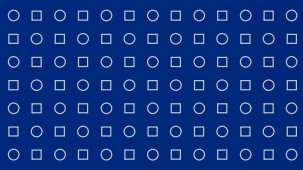
SYPRO Ruby

# BARVENÍ PROTEINU – LINEARITA

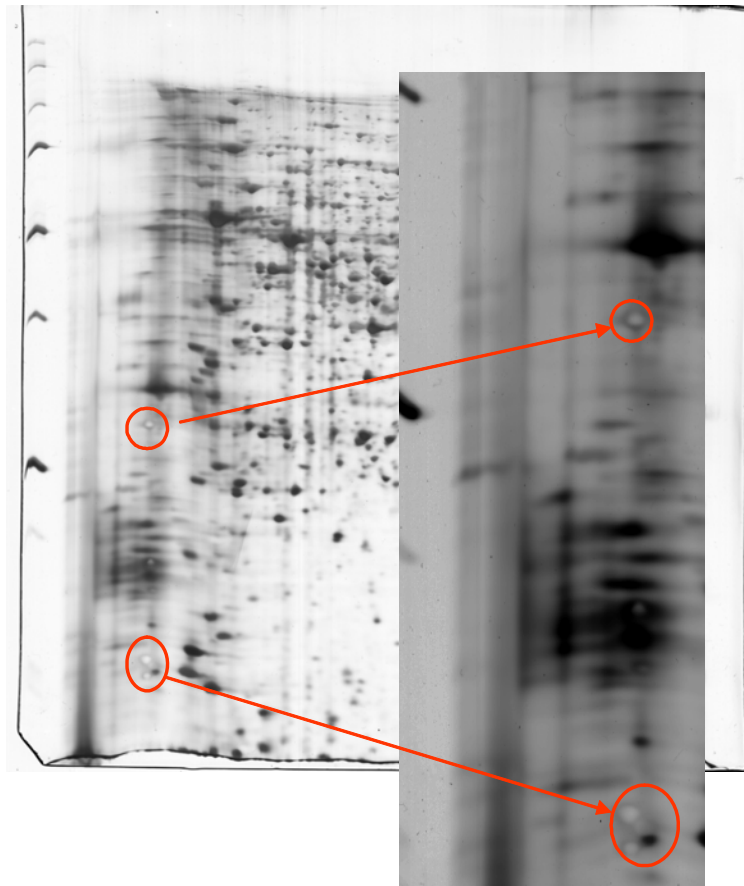
## Sypro Ruby



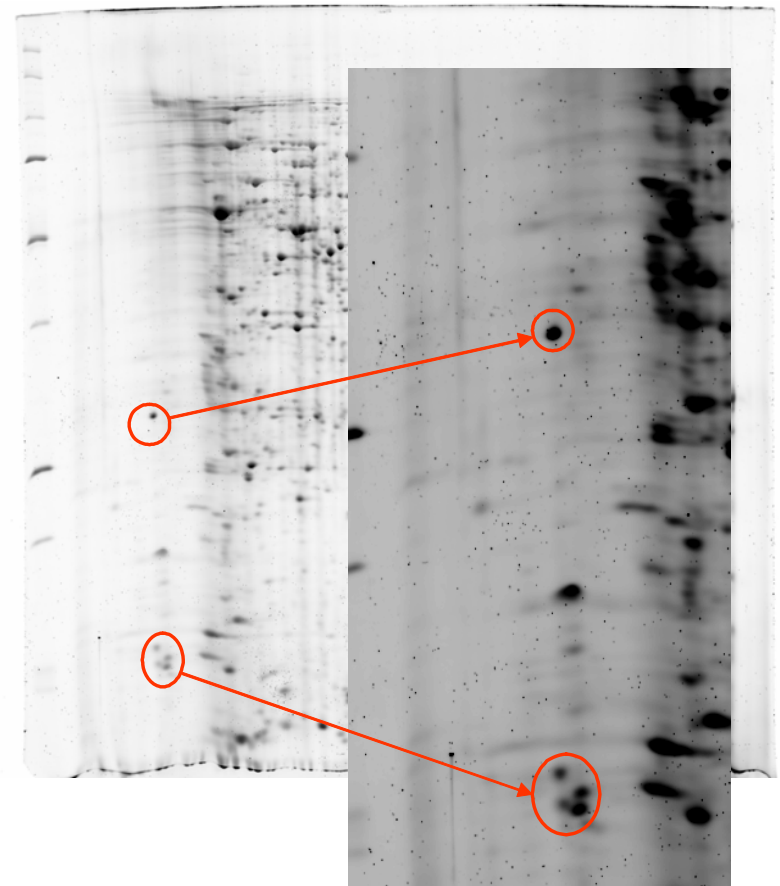




## Ag

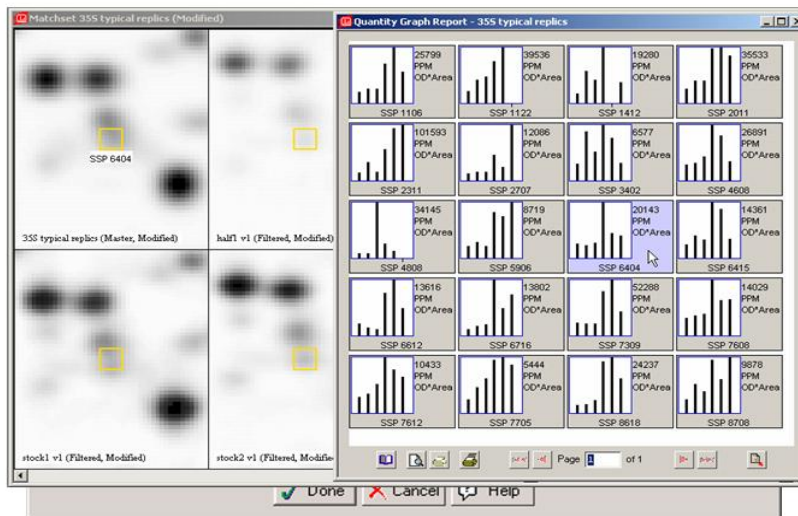
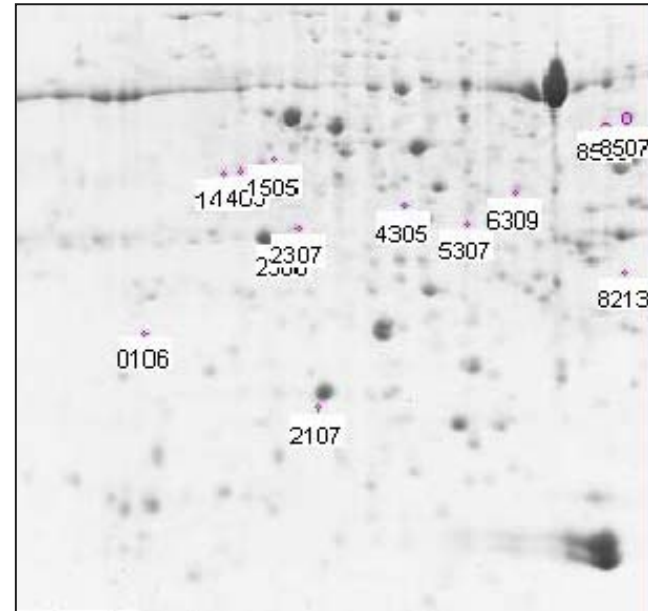


## Sypro Ruby

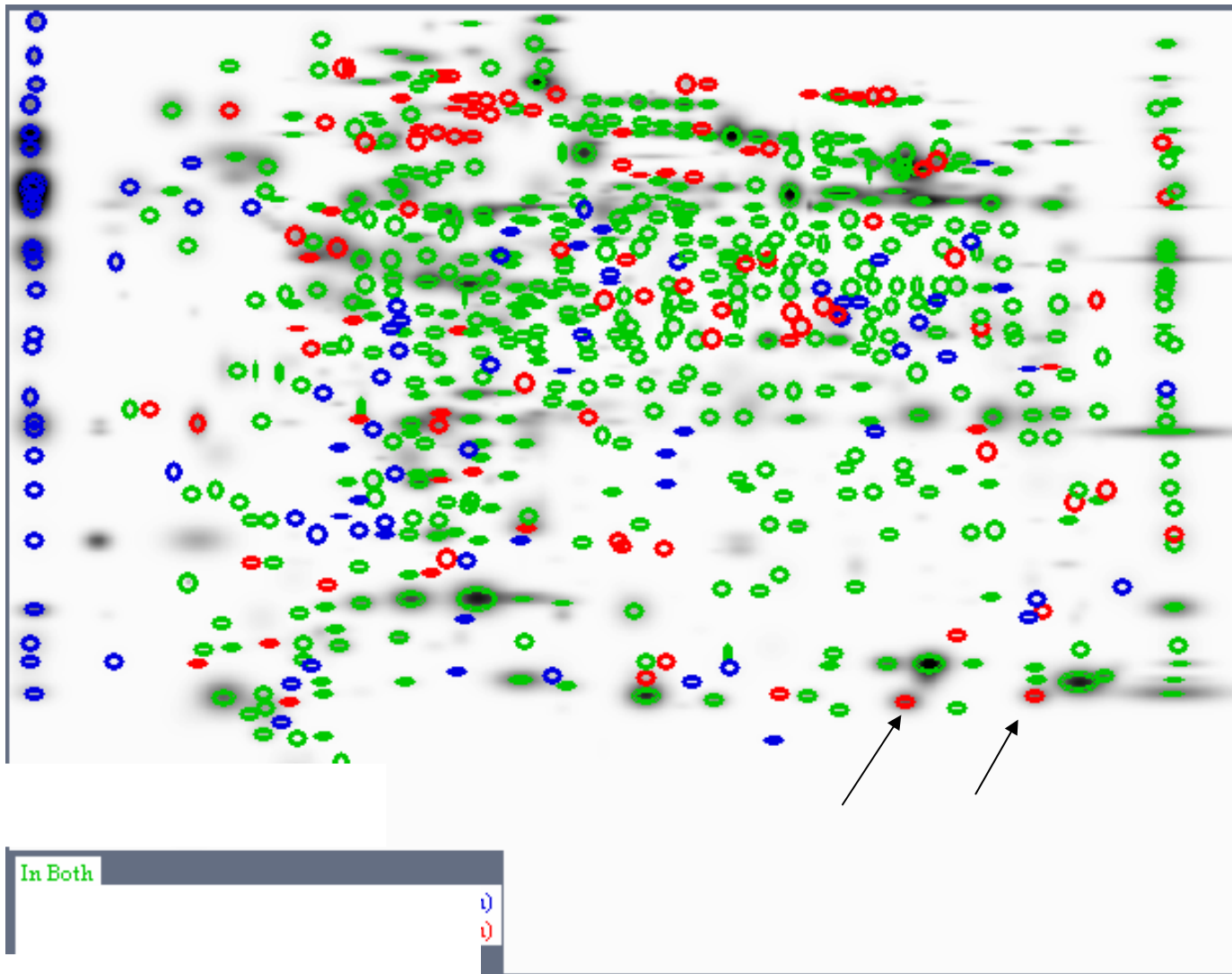


# ANALÝZA OBRAZU

- kvalitativní
- kvantitativní



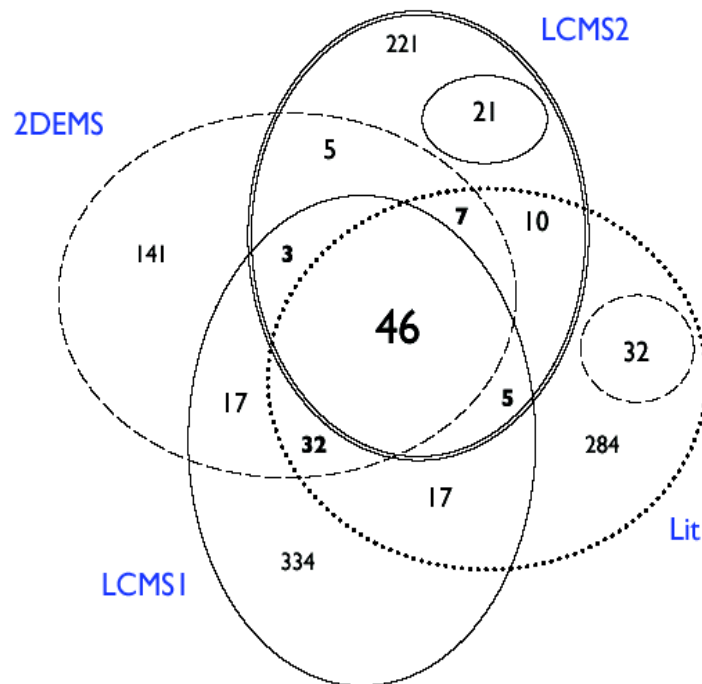
PDQuest



## 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

# MULTIDIMENZIONÁLNÍ CHROMATOGRRAFIE

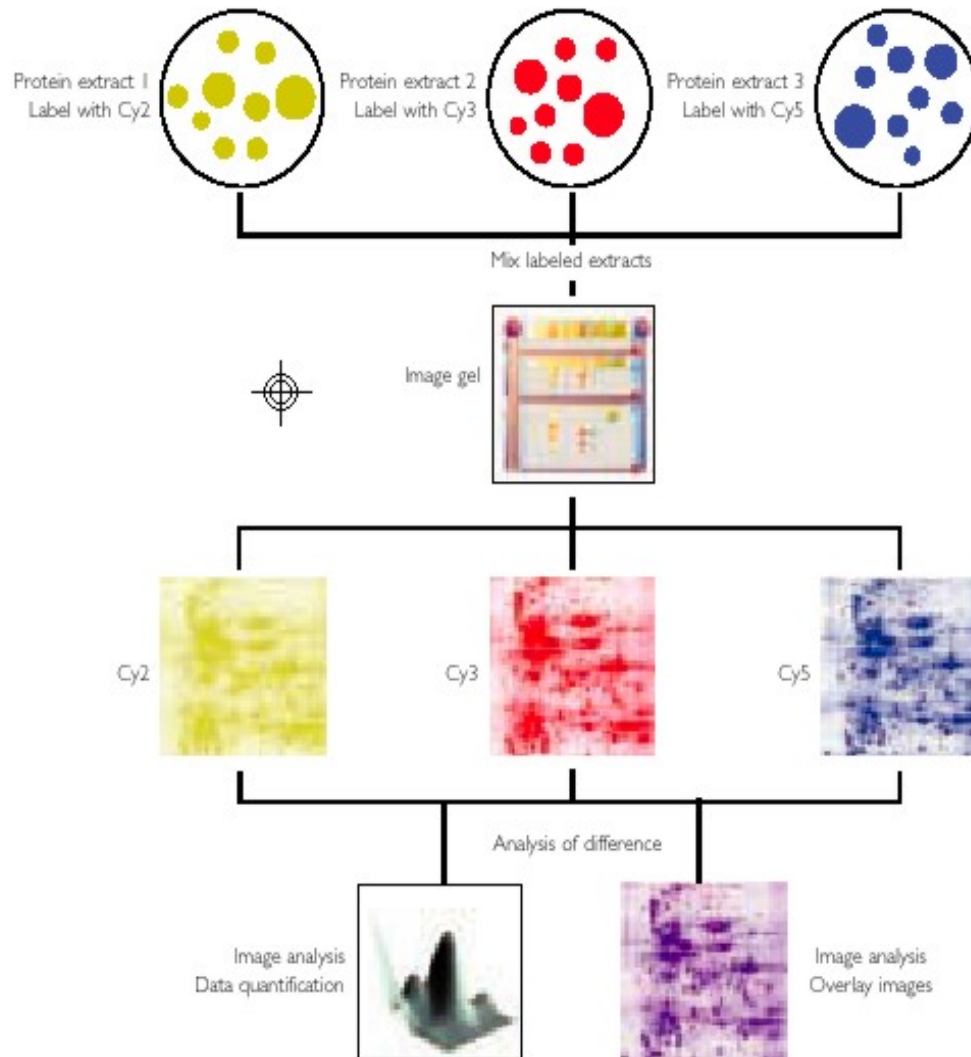
## PRO

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

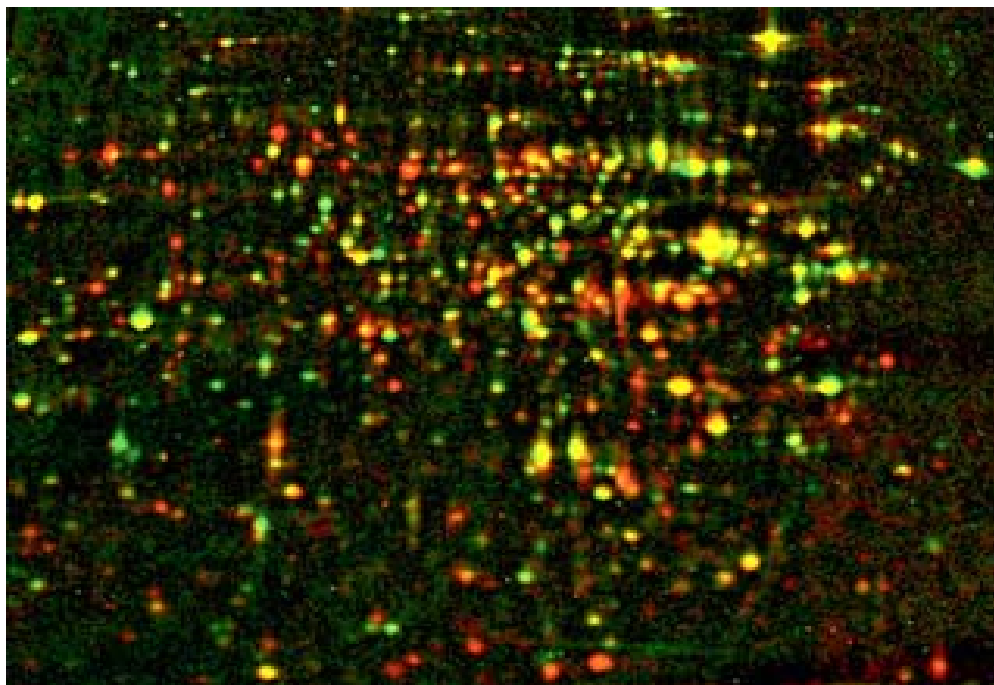
## PROTI

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

# Difference Gel Electrophoresis DIGE



# DIGE





# BIOMARKERY

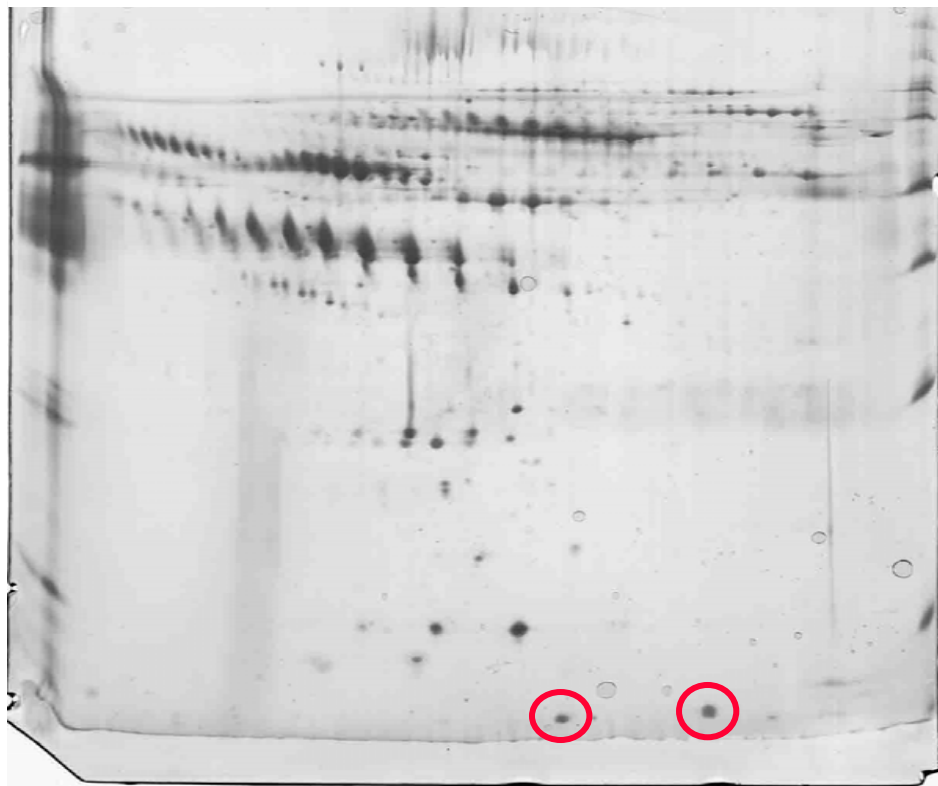
## ... jehly v kupce sena

prefrakcionace   separace   identifikace   srovnání kontrola vs.vzorek

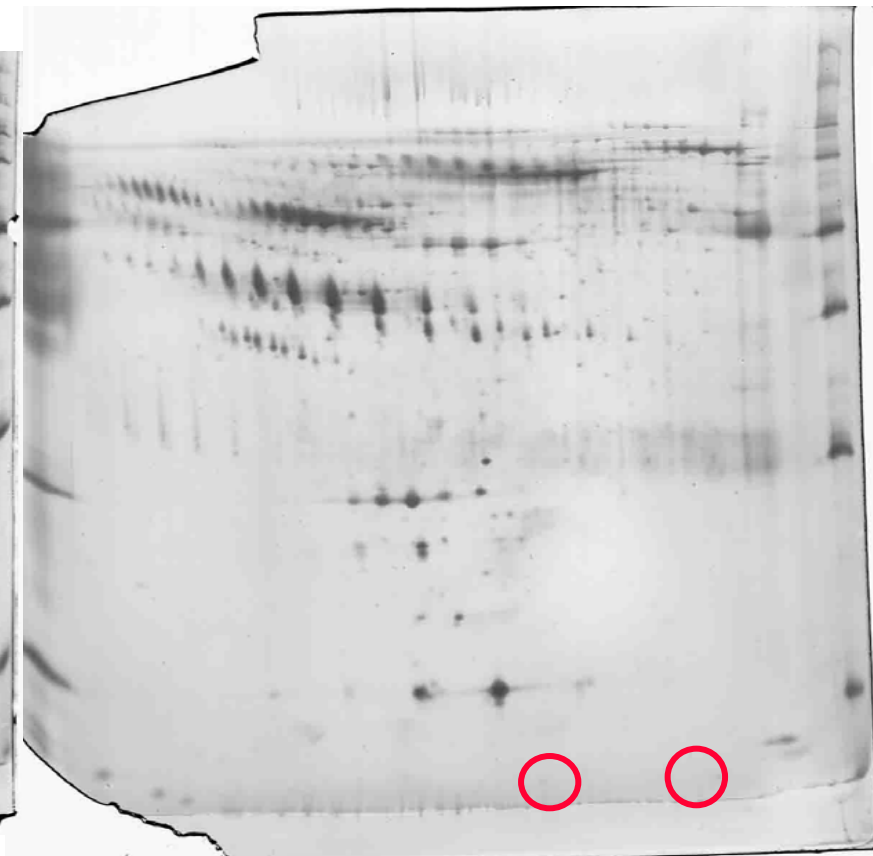
- **seno** - proteiny bez vztahu k onemocnění (pozadí)
- **jehly** - specifické proteiny pro onemocnění
- potenciální jehly jsou **obtížně validovatelné**
- nejsou pravidla, které jehly dále zkoumat
- jehly často **PTM**, nejsou identifikovány MS
  
- hledání biomarkerů obtížné a neefektivní

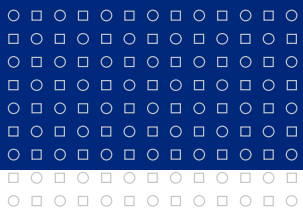
# Biomarkery v lidské plasmě

Den 21 – před klinickým projevem



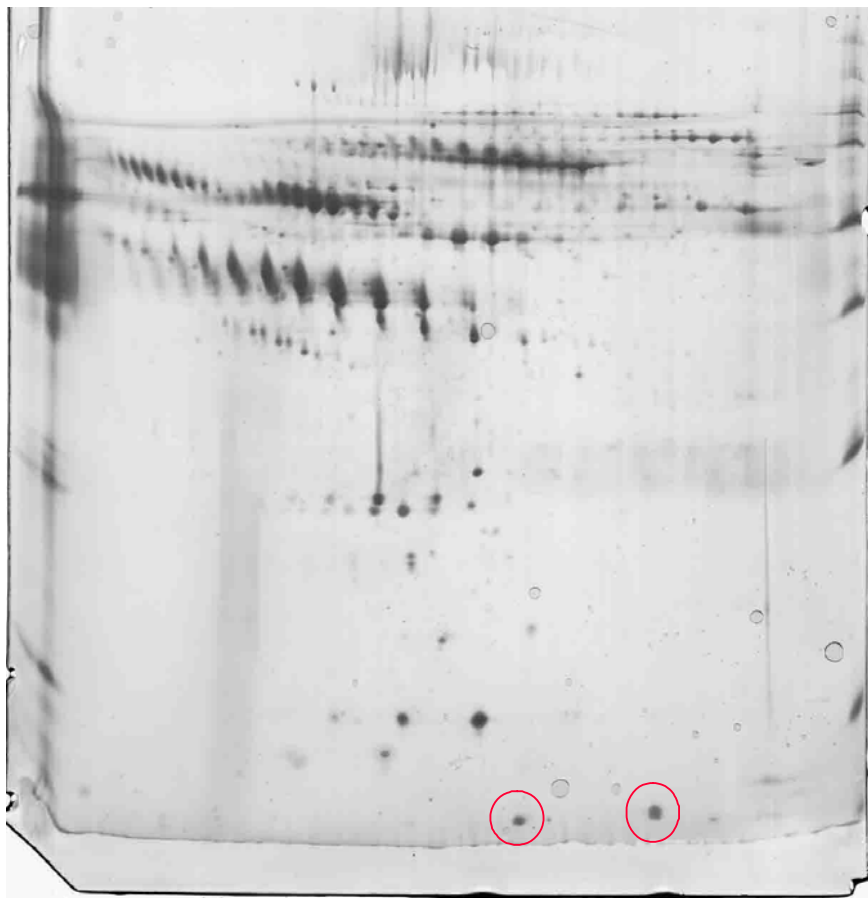
Den 44 – po klinickém projevu





# separace

depletovaná plasma



# identifikace

vesikly kmenových buněk



↓ **DIGESCE**

trypsin    Glu-C    Asp-N    thermolysin

MAVEPFRRPITRPHASIEVDTS GTGG SAGSSE  
 KVFLIGQAEGGEPNTVYELR NYAQA KRLFR  
 SGELLD AIELAWGSNP NYTAGRILAMRIEDAK  
 PASAEIGGLKITSKIYGNVANNIQV GLEKNTLS  
 DSLRLR VIFQDDRFNEVYDNIGNIFTIKYKGEE  
 ANATFSVEHDEETQKASRLVLKVGDQEVKSY  
 DLTGGAYDYTNAITDINQLPDFEAKLSPFGD  
 KNLESSKLDKIENANIKDKAVYVKA VFGDLE  
 KQTAYNGIVSFEQLNAEGEVPSNVEVEAGEES  
 ATVTATSPIKTIEPFELTKLKGGTNGEPPATWA  
 DKLDKFAHEGGYYIVPLSSKQSVHAEVASFV  
 KERSDAGEPMRAIVGGGFNESKEQLFGRQAS  
 LSNPRVSLVANS GTFVMDDGRKNHVPAYMV  
 AVALGGLASGLEIGESITFKPLRVSSLDQIYESI  
 DLDELNENGIISIEFVRNRTNTFFRIVDDVTTFN  
 DKSDPVKAEMA VGEANDFLVSELKVQLEDQF  
 IGTRTINTSASI KDFIQSYLGRKKRDNEIQDFP  
 AEDVQVIVEGNEARISMTVYPIRSFKKISVSLV  
 YKQQT LQA

- IN-GEL
- IN-SOLUTION

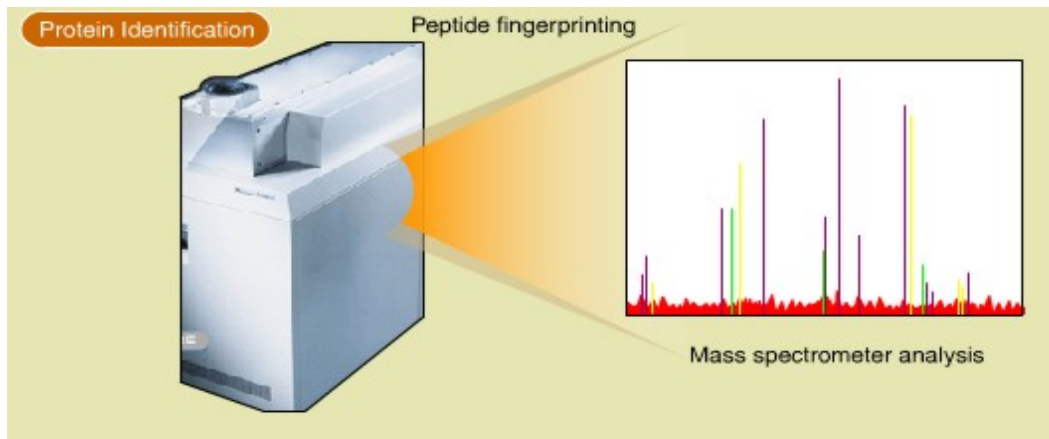


MS

## IDENTIFIKACE

### HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

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

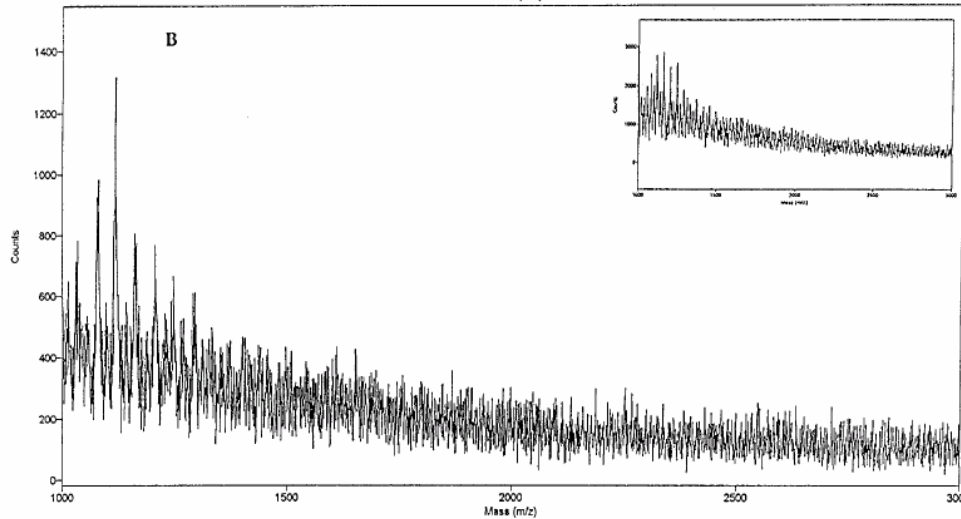
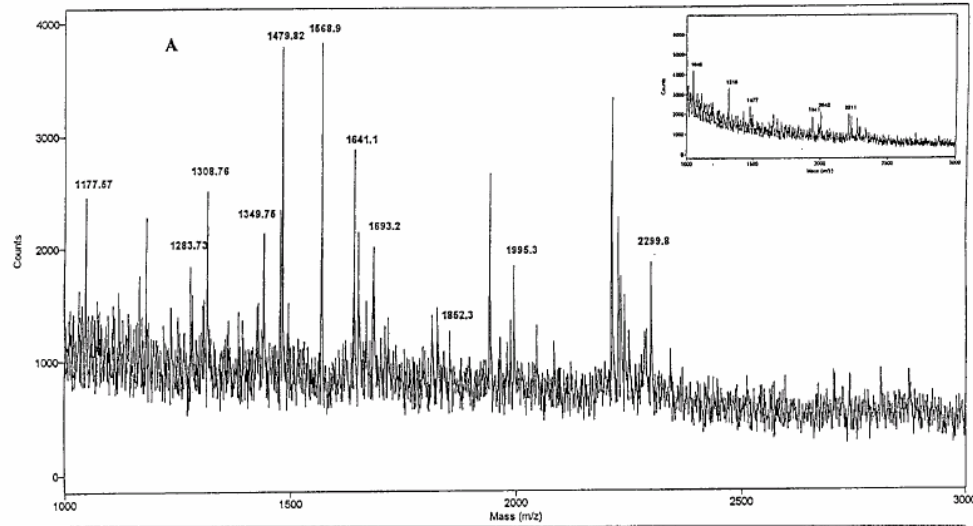


databáze



identifikace





**DIGEST**

**BSA**

v gelu

kompatibilní stříbro

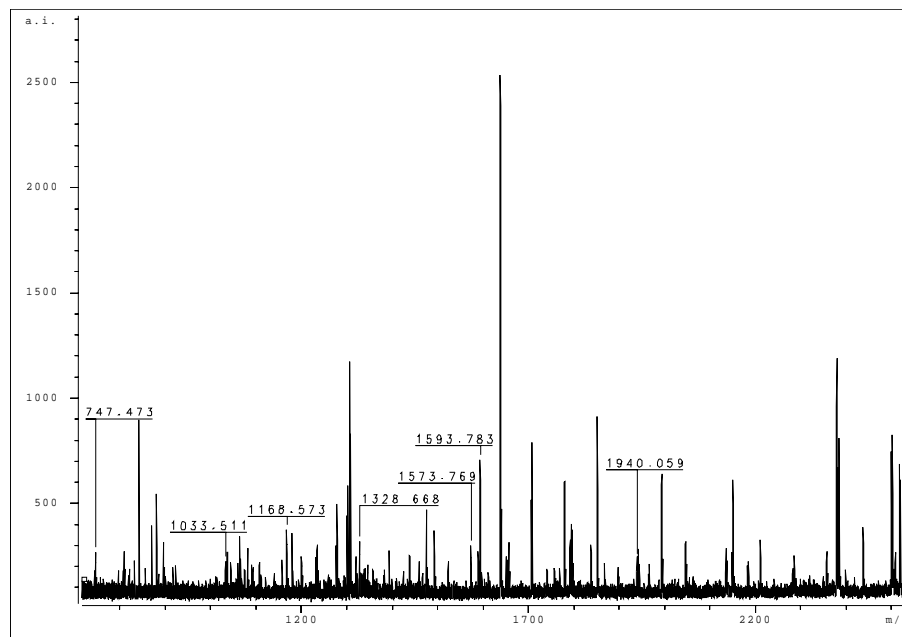
**odbarvený gel**

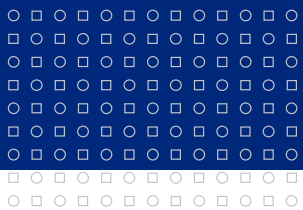
**gel bez odbarvení**



# KERATINY !!! Potlačení ionizace

alpha-1-antitrypsin, antitrypsin      Score 83  
potvrzeno na MALDI-TOF/TOF MS      Score 239  
Neoznačené píky: **keratiny** nebo autolýza trypsinu

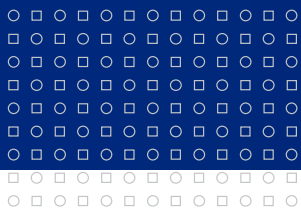




**G I G O**







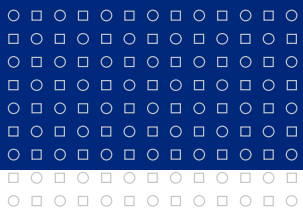
**G I G O**

**GARBAGE IN - GARBAGE OUT**



# LITERATURA

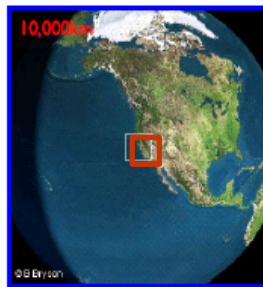
- R.M. Twyman: Principles of Proteomics
- R.Westermeier, T.Naven, H-R Höpker: Proteomics in Practice
- A.J.Link: 2D Proteome Analysis Protocols
- Current Protocols in Protein Science
- R.J.Simpson: Proteins and Proteomics
- T.Rabilloud: Proteome Research: Two-dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods
- A. Görg, W. Weiss, M.J.Dunn: Proteomics 2004, 4, 3665, rev.
- I. Miller, J. Crawford, E. Gianazza: Proteomics 2006, 6, rev.
- F.Chevalier: Proteome Science 2010, 8:23, review
- R. Burgess, M. Deutscher: Guide to Protein Purification



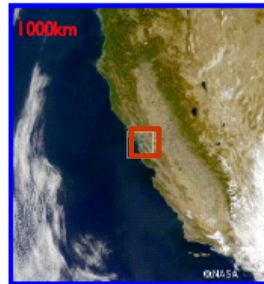
# II. PREFRAKCIONACE



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



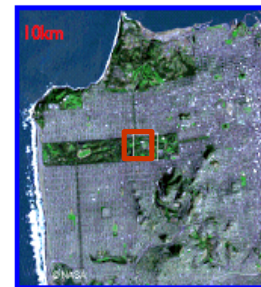
10 10 000km



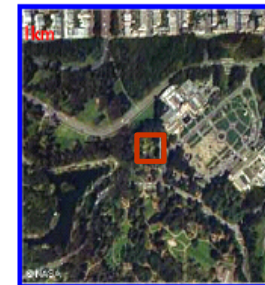
9 1 000km



8 100km



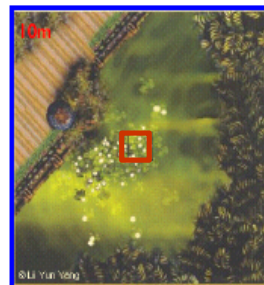
7 10km



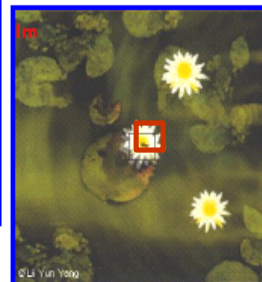
6 1km



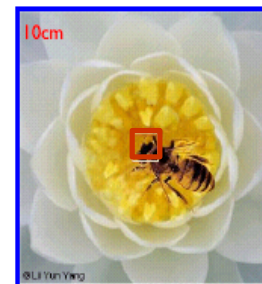
5 100m



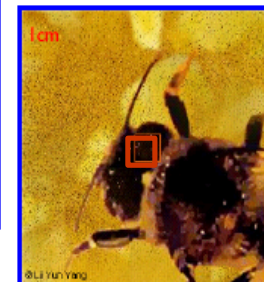
4 10m



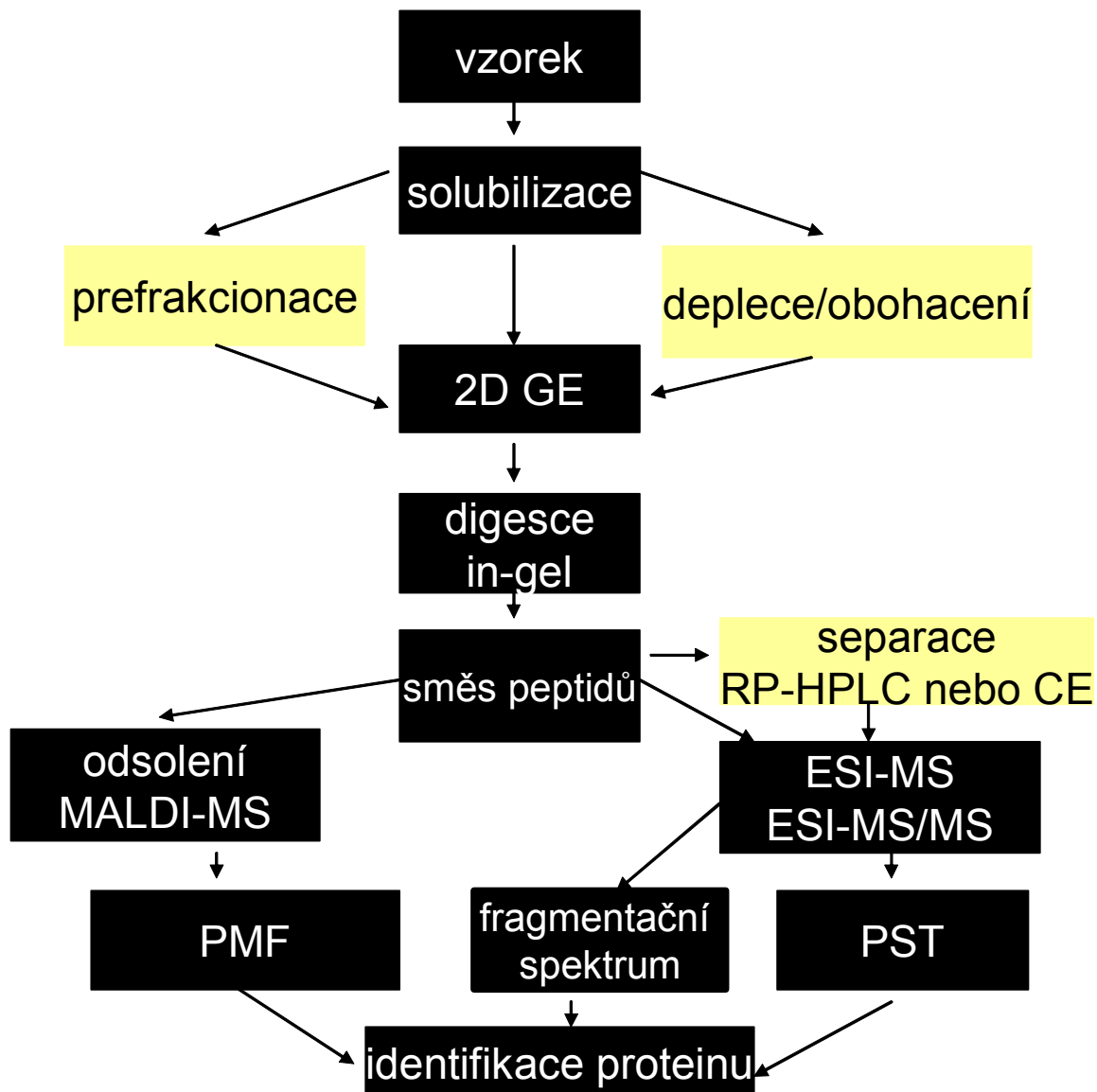
3 1m



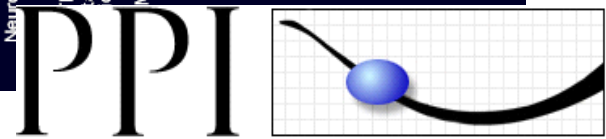
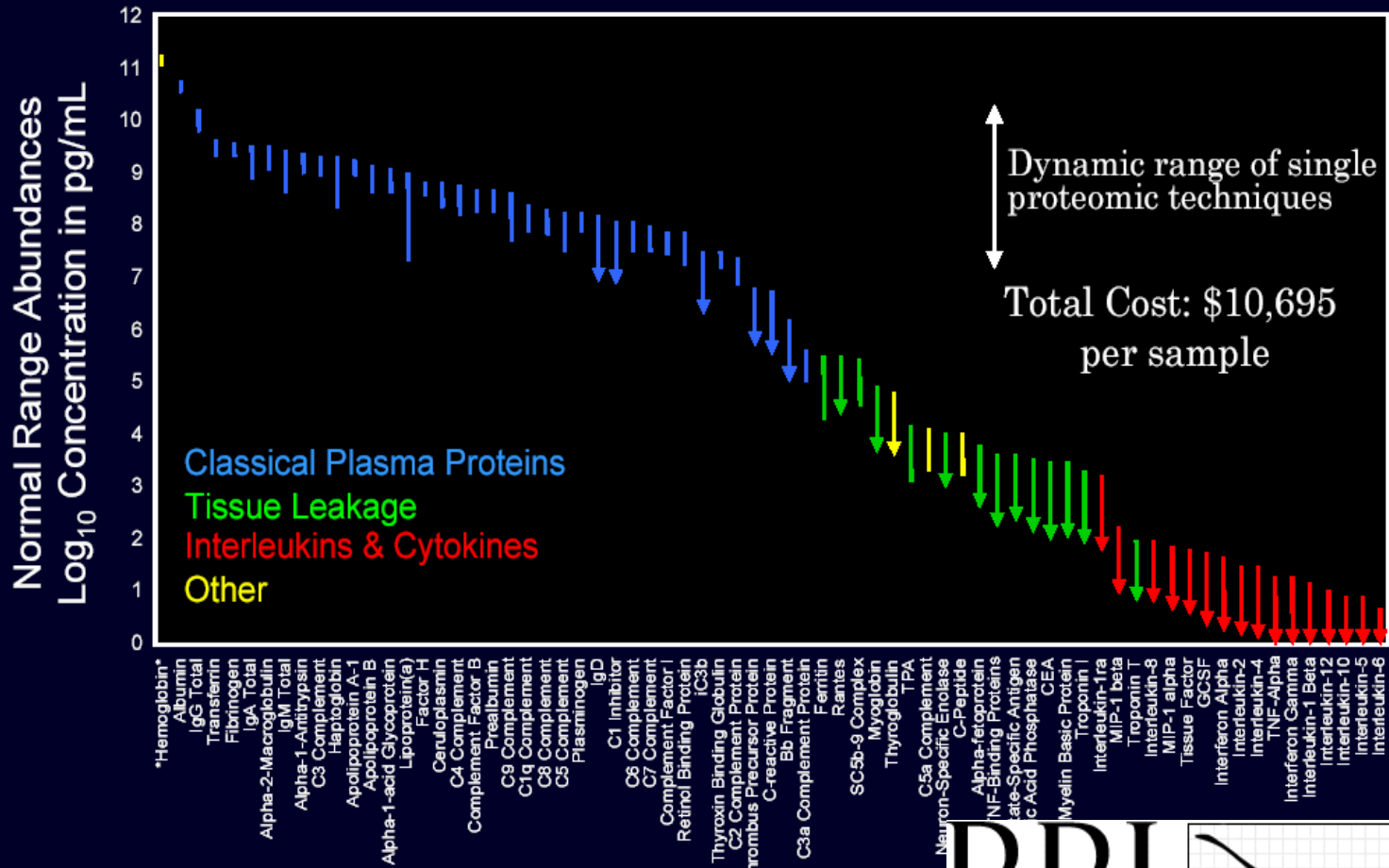
2 10cm

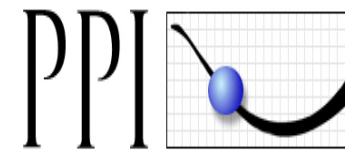


1 1cm

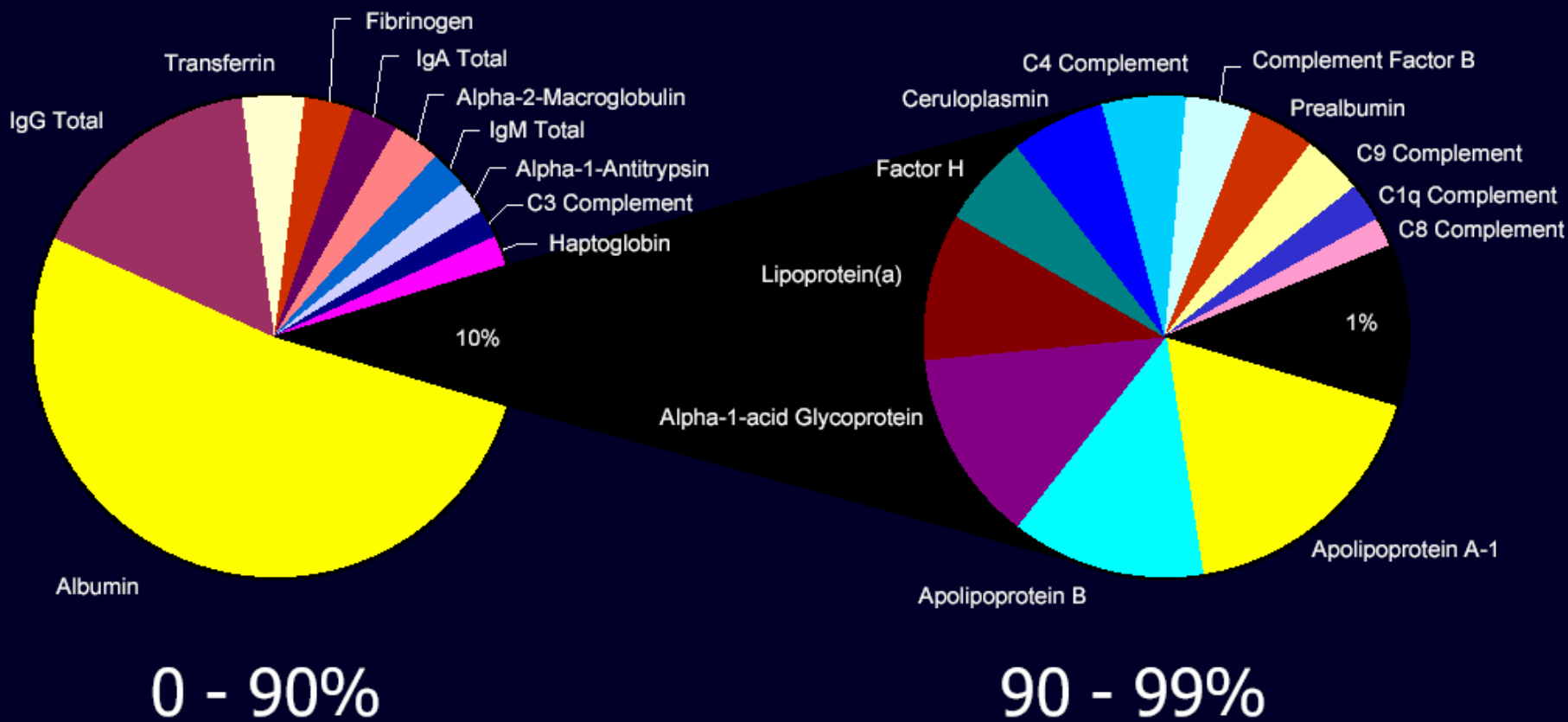


# Proteins Measured Clinically in Plasma Span > 10 Orders of Magnitude in Abundance





The Plasma Proteome Institute

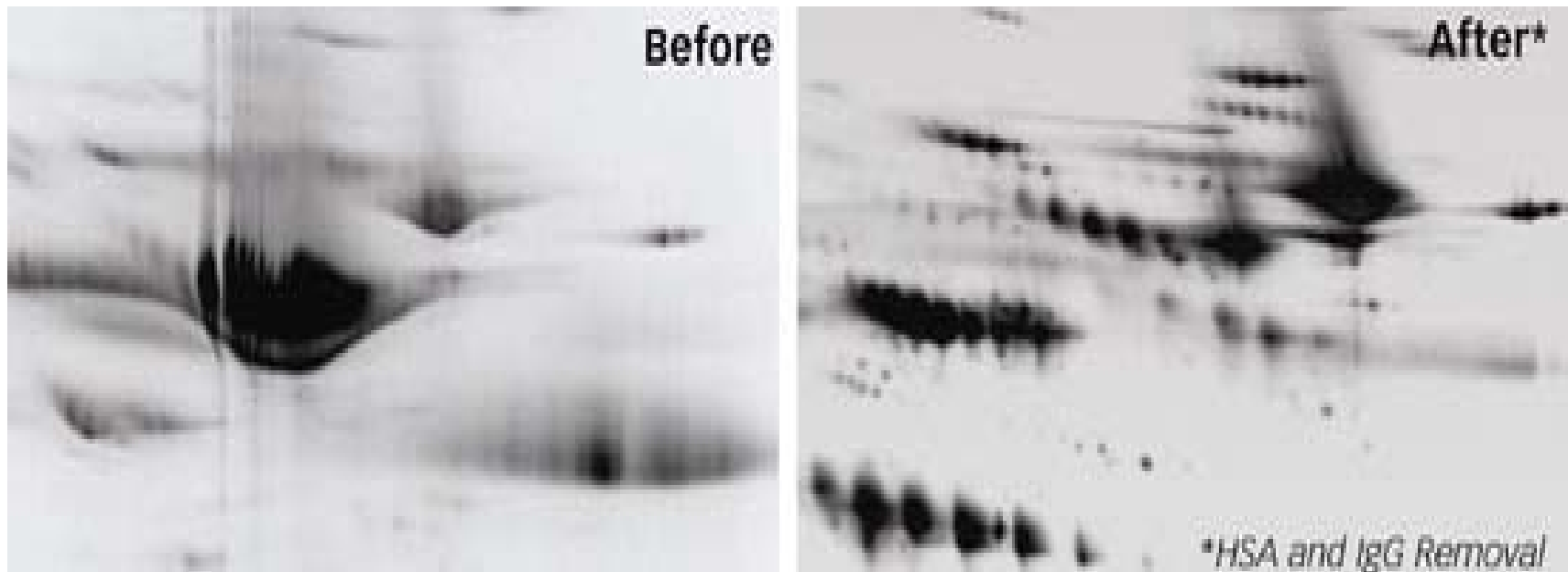


## AFINITNÍ DEPLECE

odstranění abundantních proteinů afinitní chromatografií

**HSA**

**IgG**





## Lidská plazma - vázaná frakce po afinitní depleci

ALBUMIN

IgG

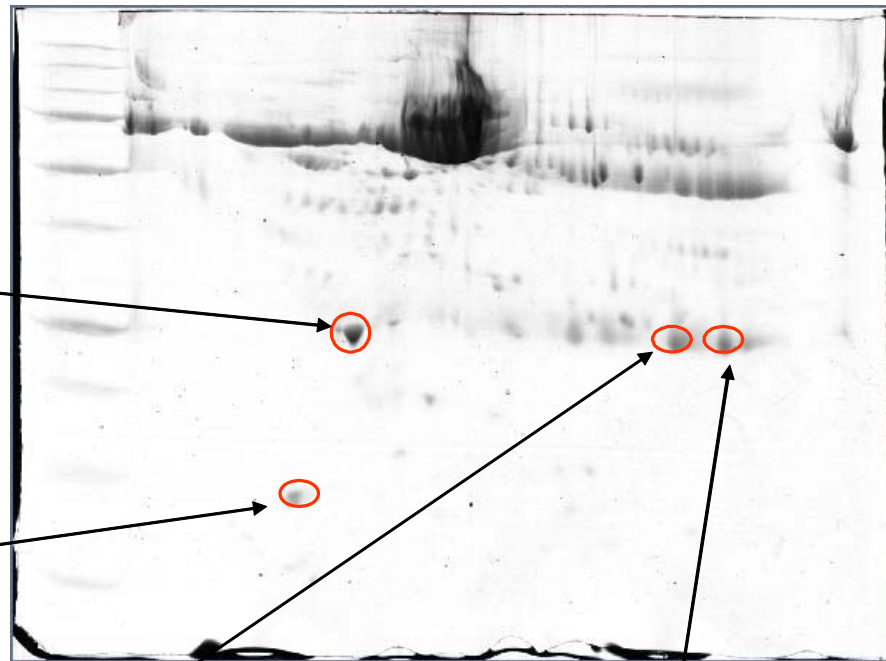
Barvení: CB G-250

Apolipoprotein

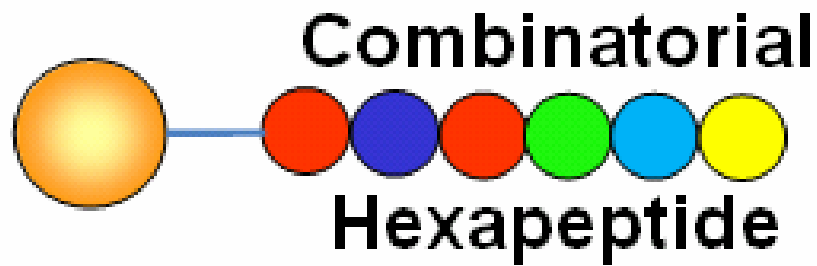
albumin

Immunoglobulin kappa light chain

Immunoglobulin light chain

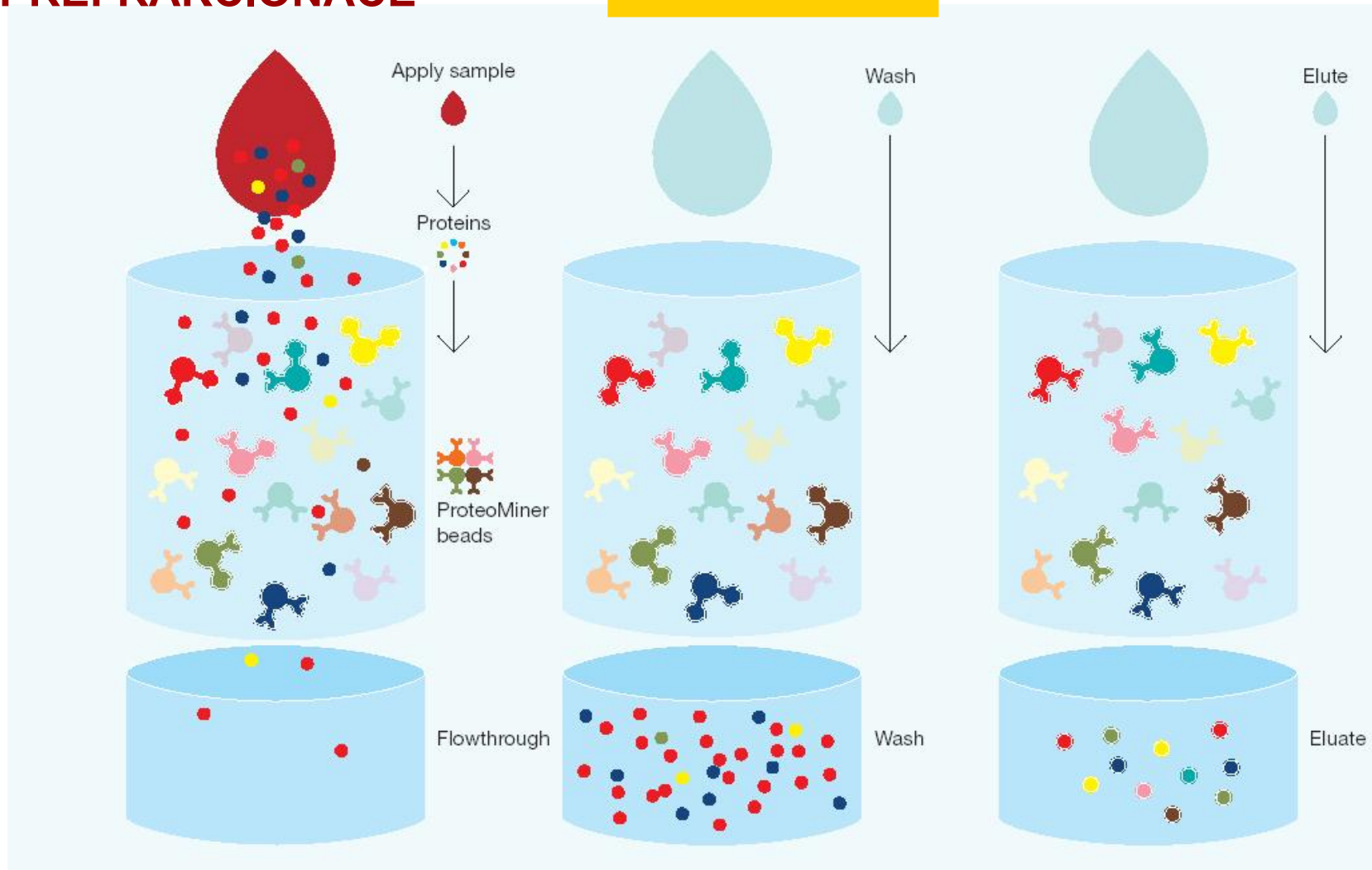


# CPPL Combinatorial Peptide Ligand Library



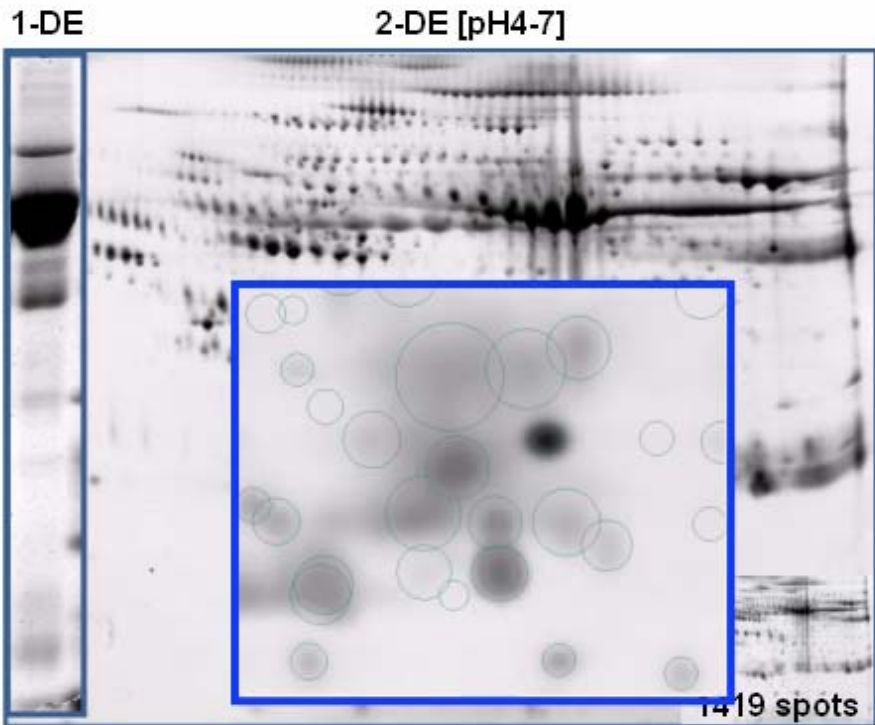
**PREFRAKCIONACE**

**PROTEOMINER**

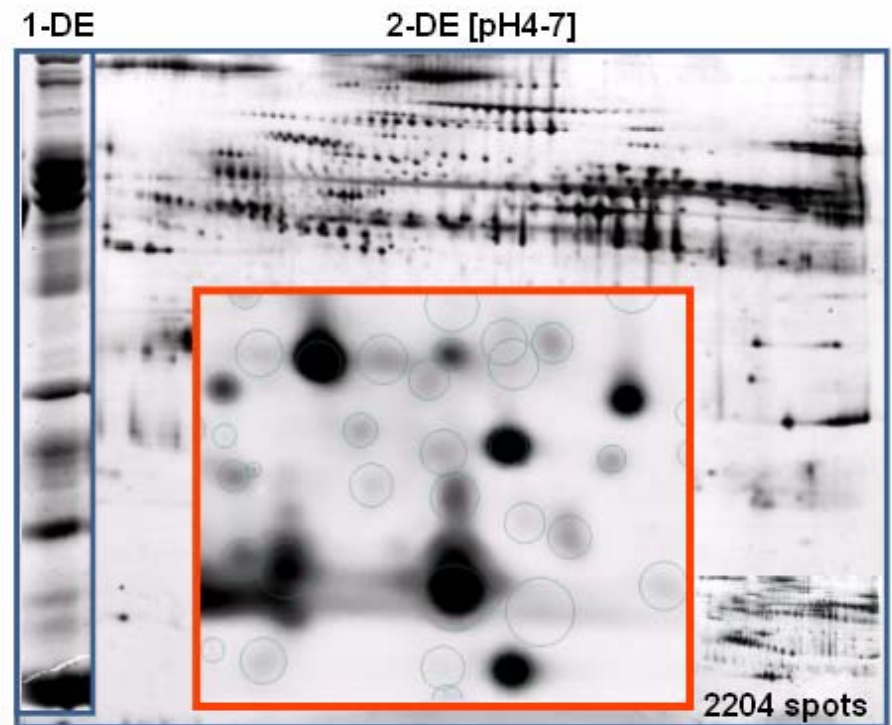


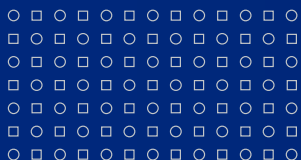
PROTEOMINER

Native Human Serum



Human Serum Fractionated by ProteoMiner





**IEF** PREFRAKCIONACE



MicroRotor

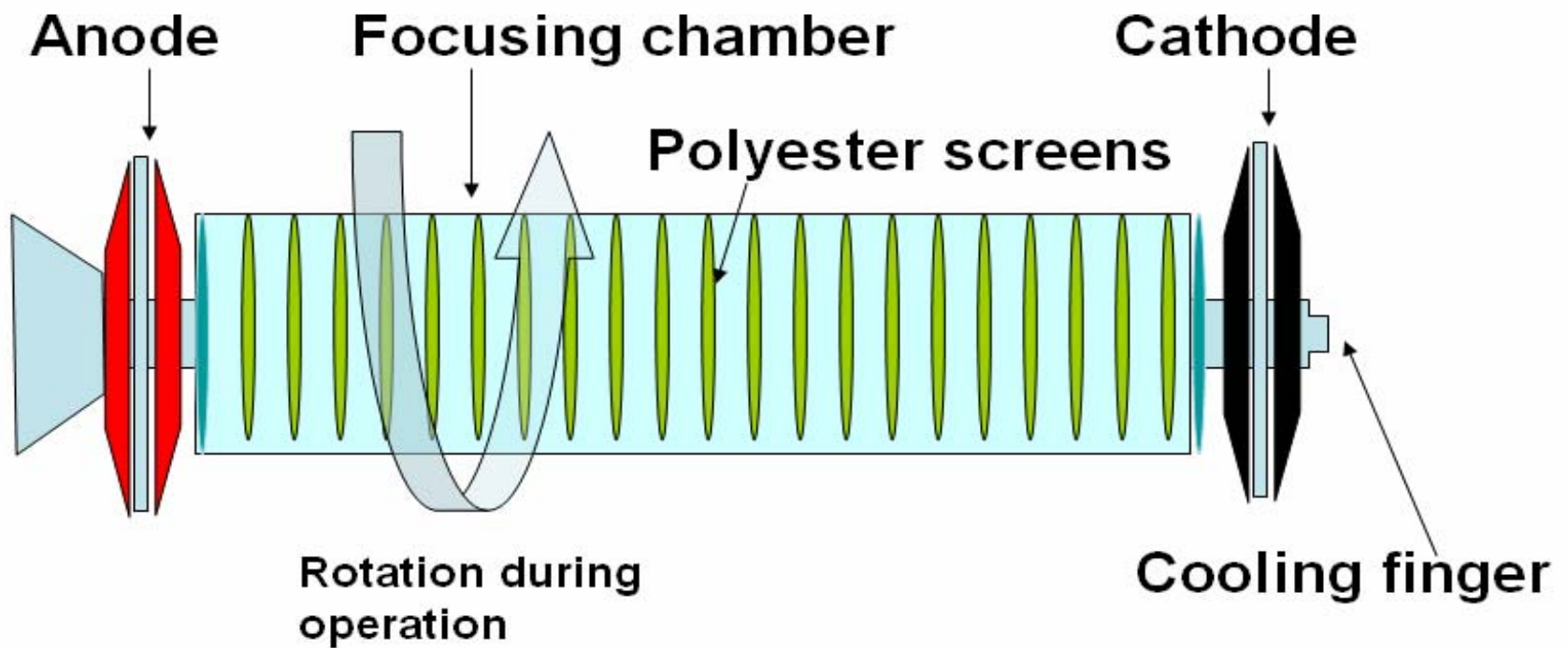
- prefrakcionace v roztoku

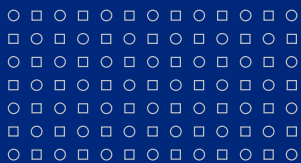


OffGel Fractionator

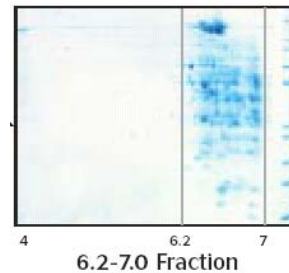
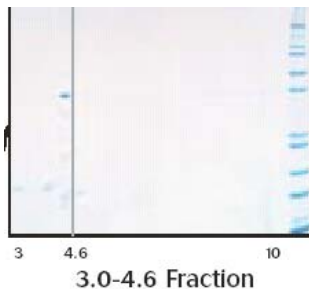
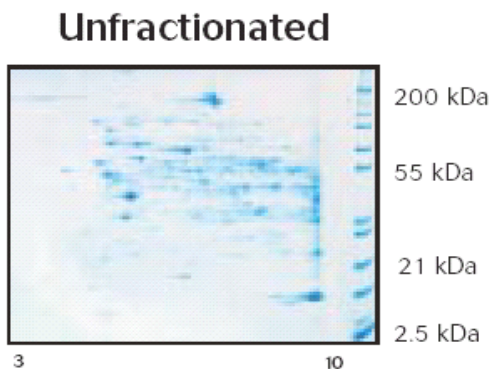
- prefrakcionace na IPG stripu



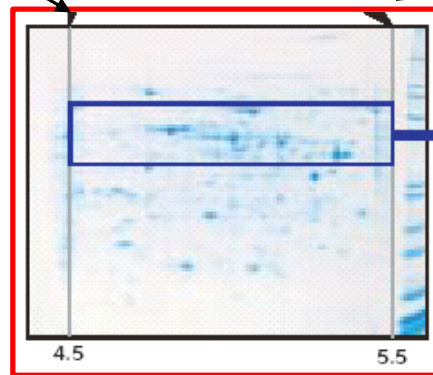
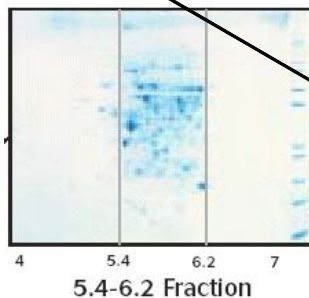
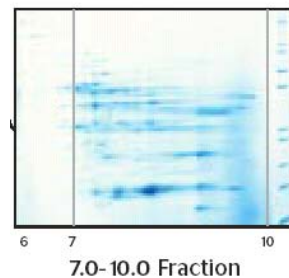
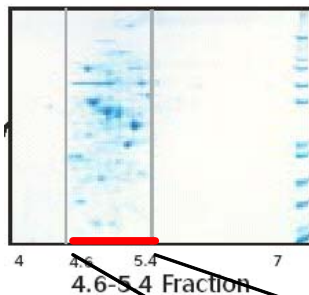
**MICROROTOFOR**



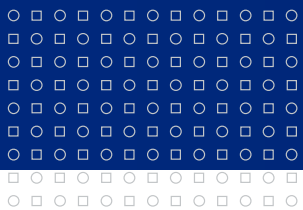
# PREFRAKCIONACE MIKRO ROZSAHY



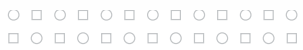
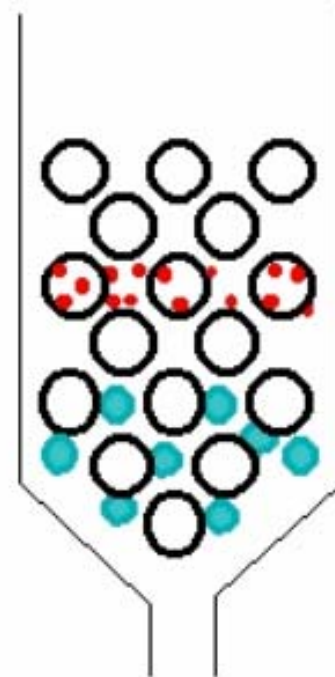
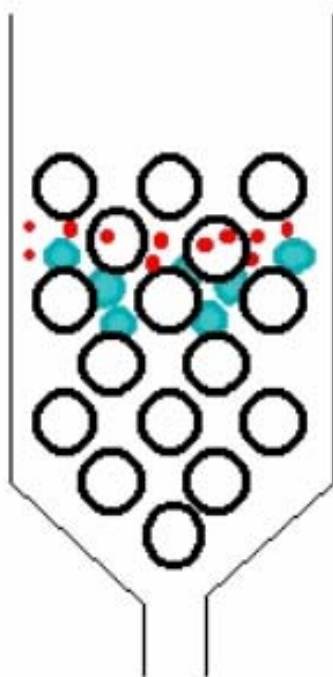
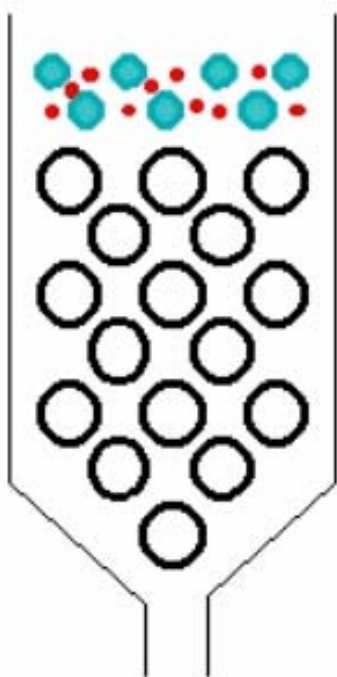
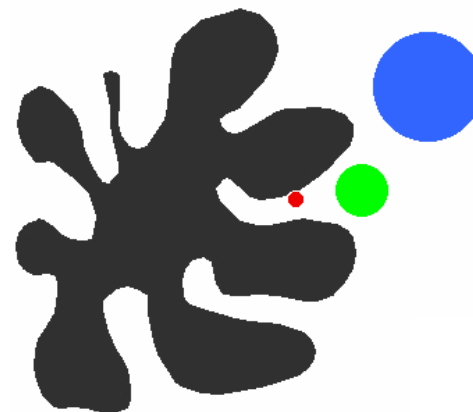
pl







# GELOVÁ CHROMATOGRRAFIE



## INSPIRATIVNÍ LITERATURA PRO MÍRNĚ POKROČILÉ

### **Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial**

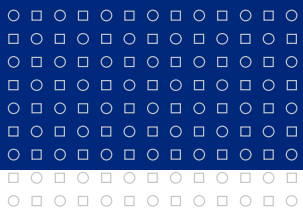
Thierry Rabilloud et al. *Journal of Proteomics* 2011

### **Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: past, present and future**

Thierry Rabilloud et al. *Journal of Proteomics* 2010

### **Proteomic biomarker discovery: It's more than just mass spectrometry**

Josip Blonder et al. *Electrophoresis* 2011



# III. CENTRÁLNÍ LABORATOŘ - PROTEOMIKA



## 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

- kapalinová chromatografie
  - gelová elektroforéza
  - analýza obrazu
  - digesce proteinů
  - hmotnostní spektrometrie
- syntéza a purifikace oligonukleotidů
  - minisklad reagensí pro molekulární biologii


# http://www.sci.muni.cz/FGP

Soubor Úpravy Zobrazit Přejít Zložky Nástroje Nápoje

file:///c:/Documents%20and%20Settings/lmfr/Dokumenty/DOCUMENTS/zaloha/CL/FGP.htm Přejít

Mozilla Firefox Přehled zpráv Startovní stránka M... Startovní stránka M... Bio-Chem Valve Inc. ... labelling miniprotein leaking -... idos.cz - Vyhledat G... Vivascience : Protein... Ústav imunologie Pet...











English

 **Oddělení funkční genomiky a proteomiky**  
Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta  
Brno, Česká republika

ABVMK CL LMFR

Vyhledávání  OK

DFGP

-  D NÁS
-  VÝZKUM
-  VÝUKA
-  PUBLIKACE
-  SPOLUPRÁCE
-  NOVINKY
-  VOLNÁ MÍSTA
- SLUŽBY**
  - proteomické techniky
  - genomické techniky
  - syntéza oligonukleotidů
  - minisklad
  - další
-  TECHNICKÉ ZÁZEMÍ
-  ODKAZY
-  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 abundančních proteinů, prefračníci, 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 digesci (in-gel nebo in-solution) a MS analýzu (MALDI-TOF MS a LCMSMS).

Kontaktní osoby

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

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

Tato prezentace vznikla s podporou projektu **OP VK**  
„Rozvoj týmu pro výuku, výzkum a aplikace v oblasti funkční genomiky a proteomiky“  
(CZ.1.07/2.3.00/09.0132)

For all the complex problems and difficult questions  
there is always one simple, easily comprehensible  
**w r o n g** answer.

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

