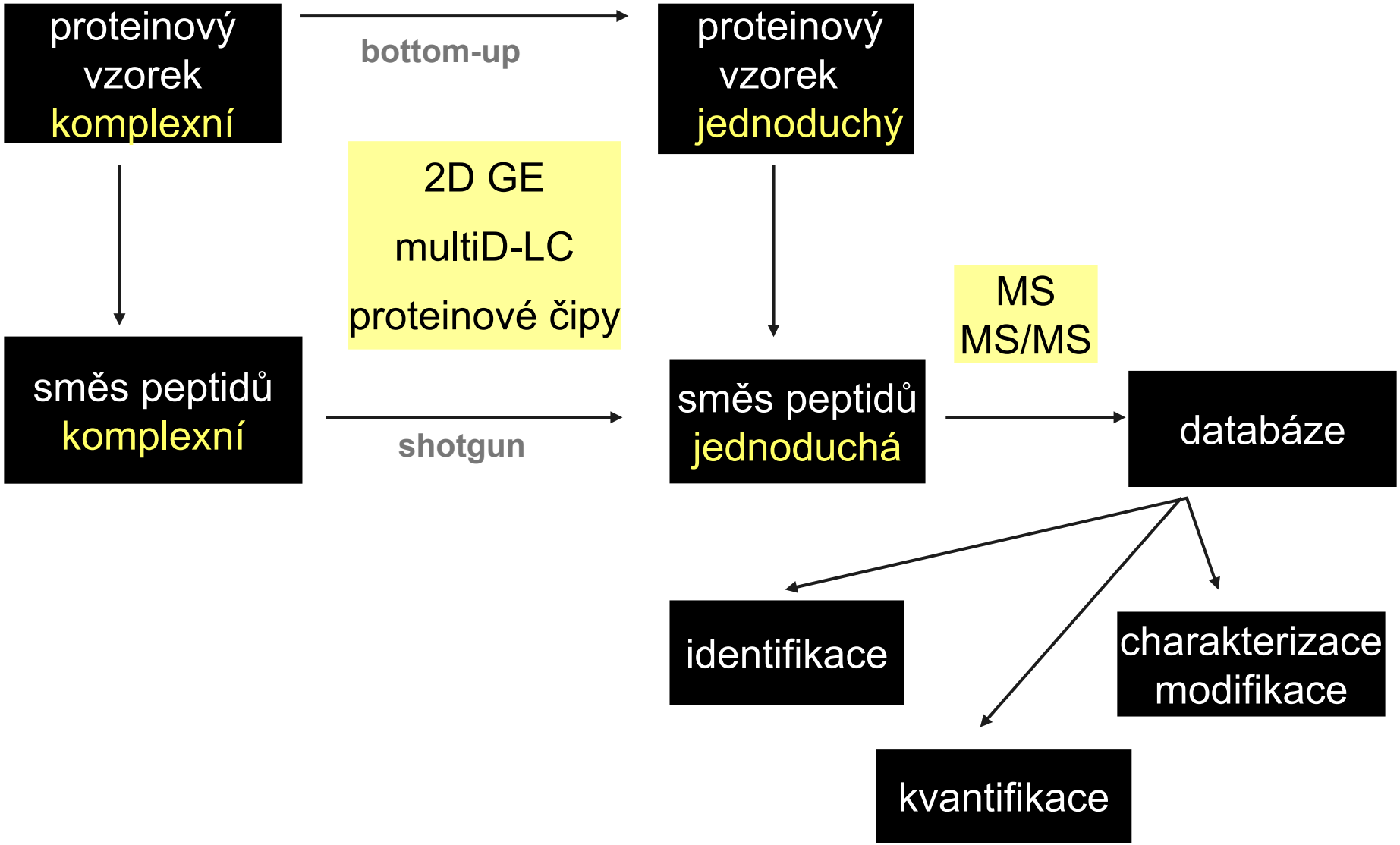
MASARYKOVA UNIVERZITA

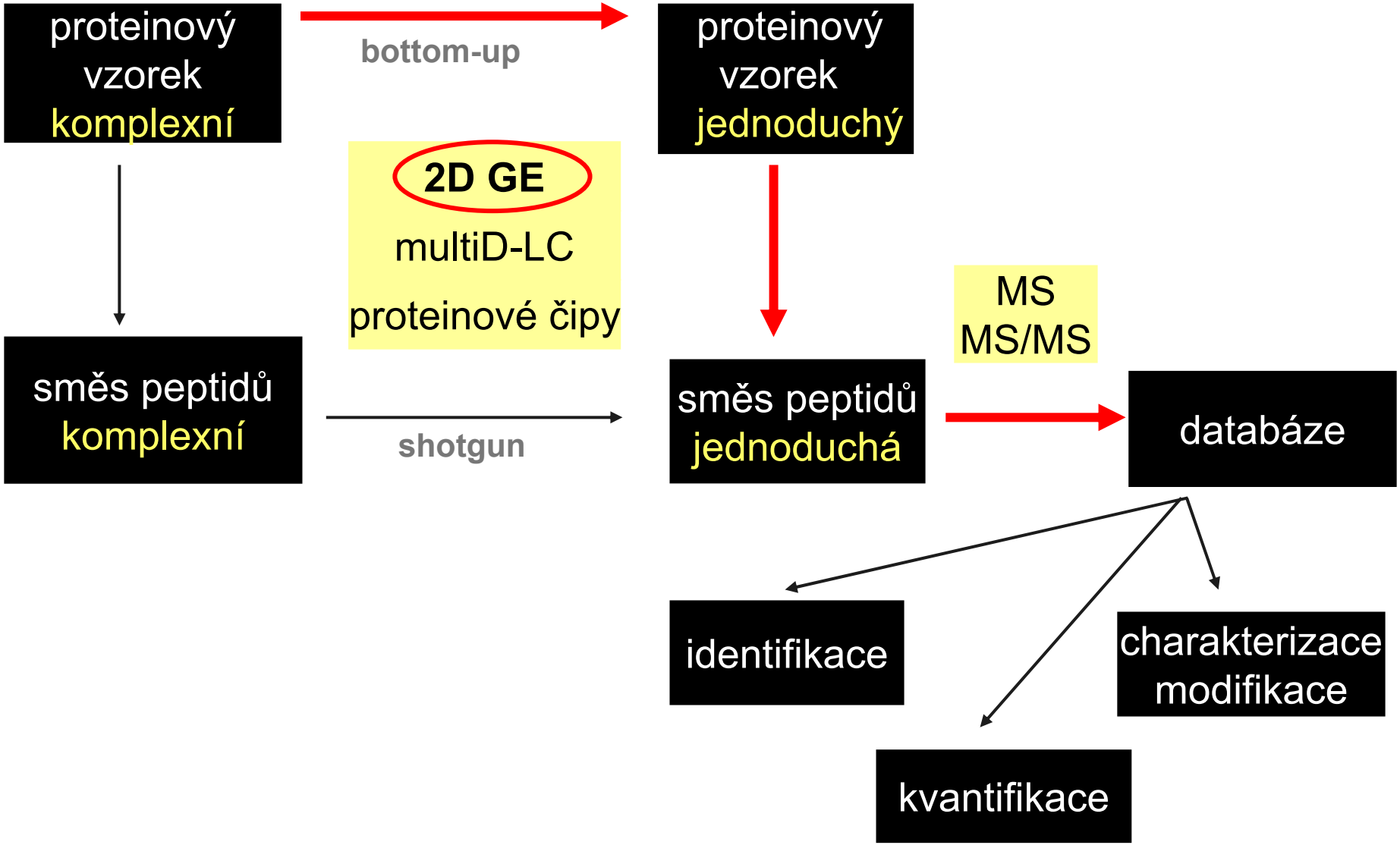
Dvoudimenzionální elektroforéza

Hana Konečná

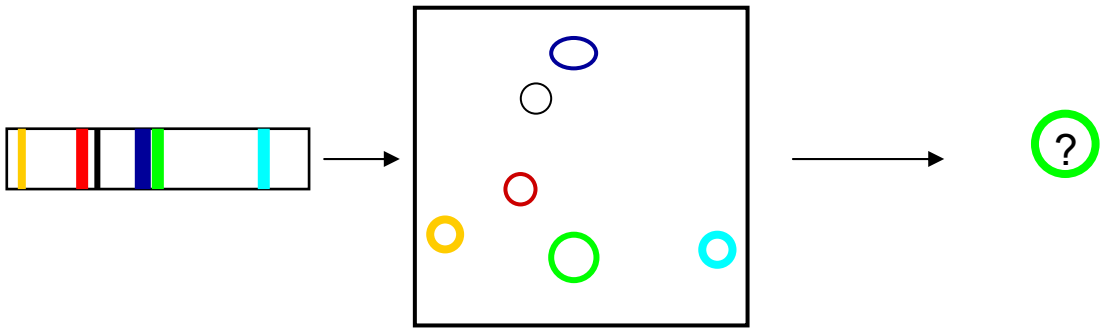
CENTRÁLNÍ LABORATOŘ - PROTEOMIKA
CEITEC – Středoevropský technologický institut
NCBR – Národní centrum pro výzkum biomolekul PřF

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ


proteinový vzorek komplexní
bottom-up
proteinový vzorek jednoduchý
2D GE
multiD-LC
proteinové čipy
směs peptidů komplexní
shotgun
směs peptidů jednoduchá
MS
MS/MS
databáze
identifikace
charakterizace modifikace
kvantifikace


proteinový vzorek komplexní
bottom-up
proteinový vzorek jednoduchý
2D GE
multiD-LC
proteinové čipy
směs peptidů komplexní
shotgun
směs peptidů jednoduchá
MS
MS/MS
databáze
identifikace
charakterizace modifikace
kvantifikace

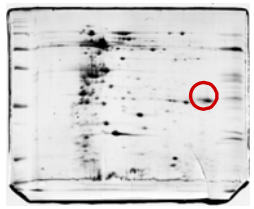
Dvoudimenzionální elektroforéza
2-DE

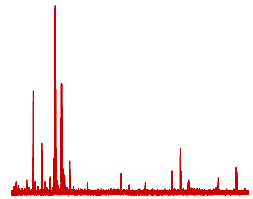
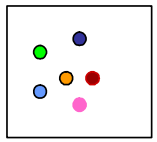


Proteomický experiment

extrakce **fokusace** **SDS-PAGE** **digest** **MS**





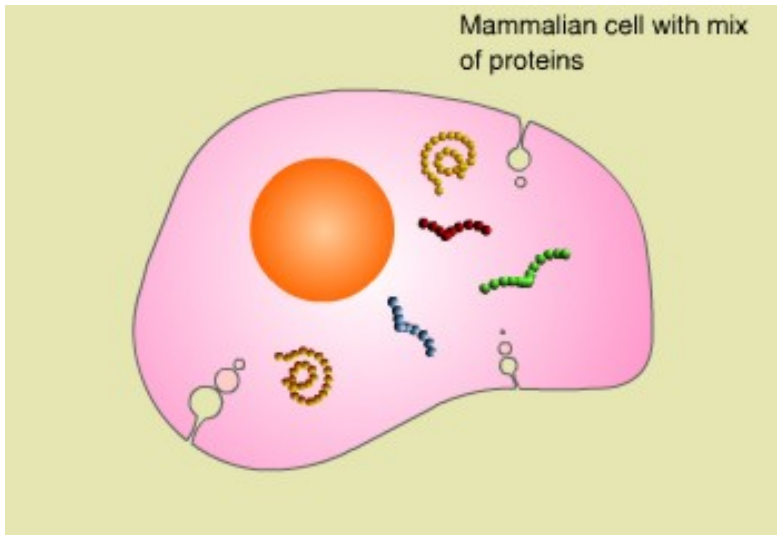



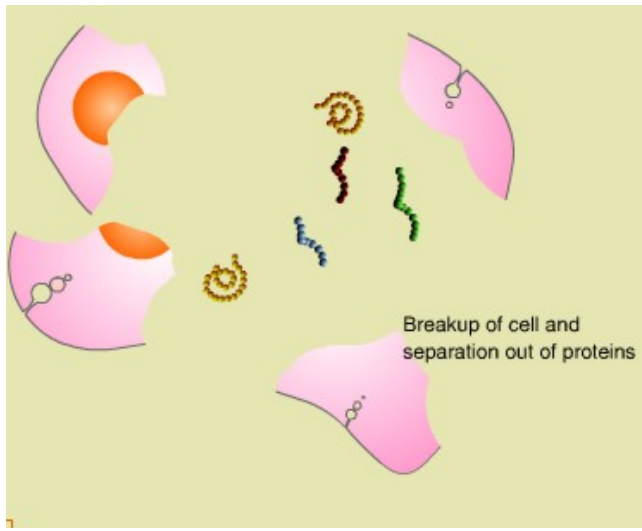
identifikace

neznámý protein

HOMOGENIZACE

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





PŘÍPRAVA VZORKU

solubilizace močovina, thiomočovina, detergenty

redukce DTT, TBP

inhibice proteáz, fosfatáz, glykosyláz

odstranění kontaminant

MĚŘENÍ KONCENTRACE PROTEINU

DETERGENTY

- žádný celkový náboj
- 0.5 – 4%
- použitelné ve vysokých koncentracích močoviny

- neionogenní
- zwitterointové

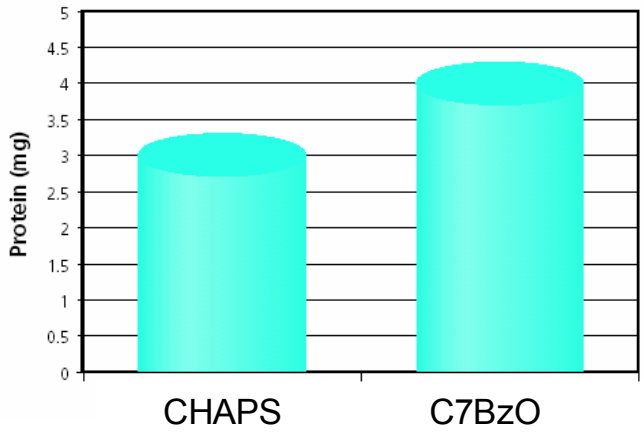
- SDS jen v nízkých koncentracích (do 0.25%)

C7BzO

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

CHAPS

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



E.coli

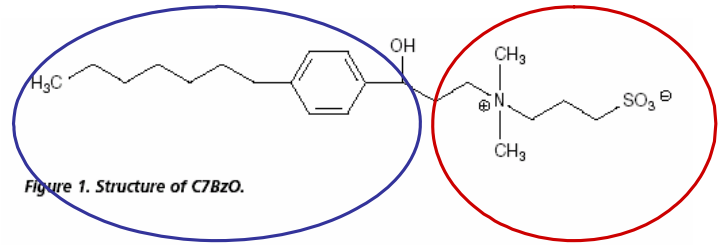
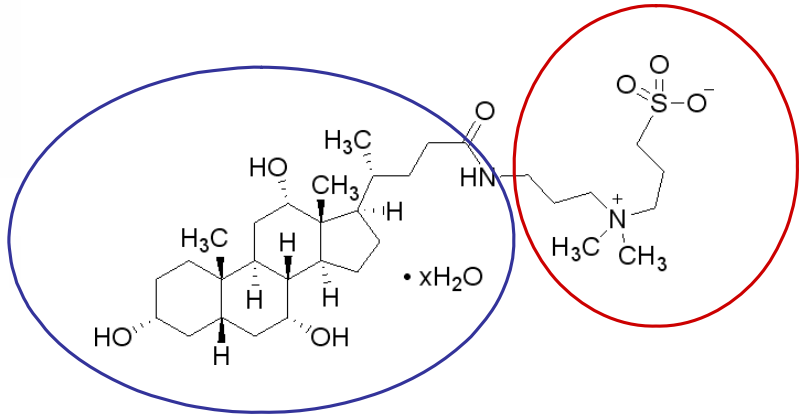


Figure 1. Structure of C7BzO.



ZÁKLADNÍ PRAVIDLA

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

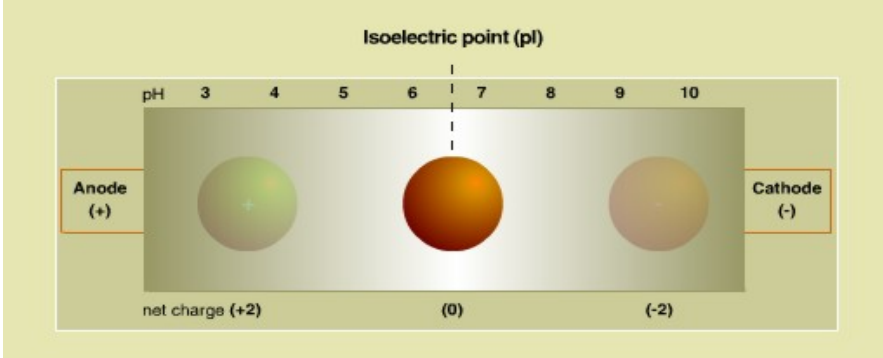
KONTAMINANTY

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

2-DE

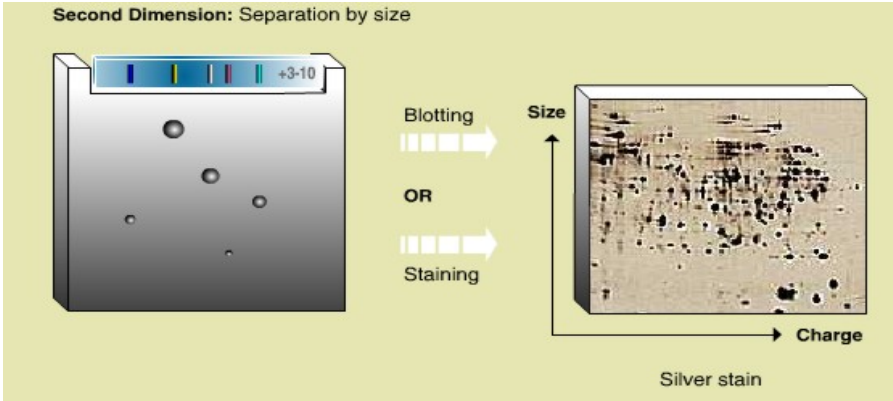
- první rozměr

IEF



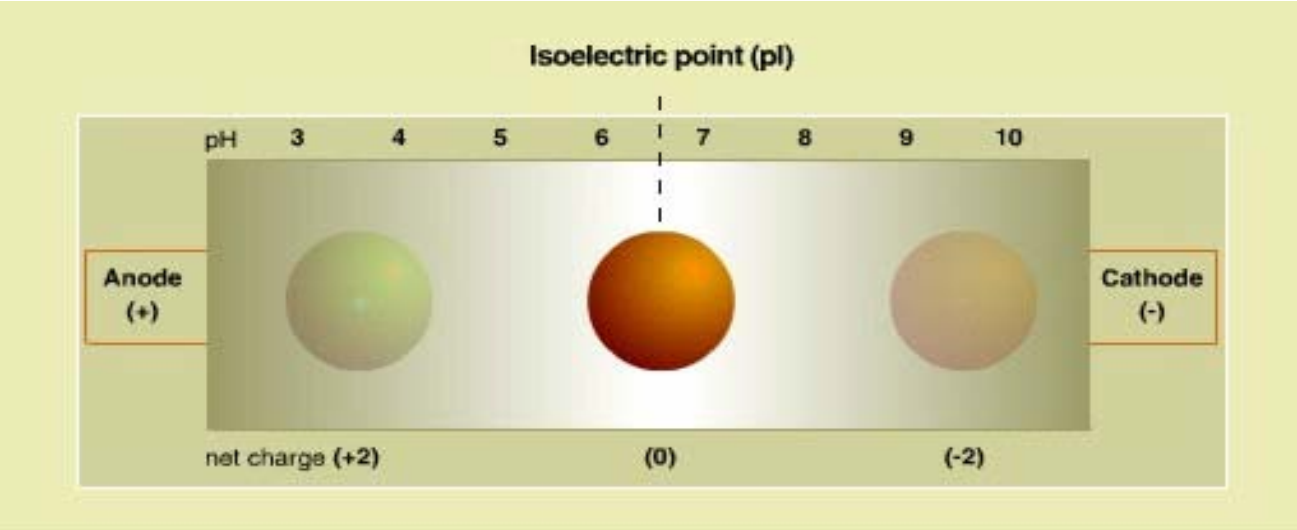
- druhý rozměr

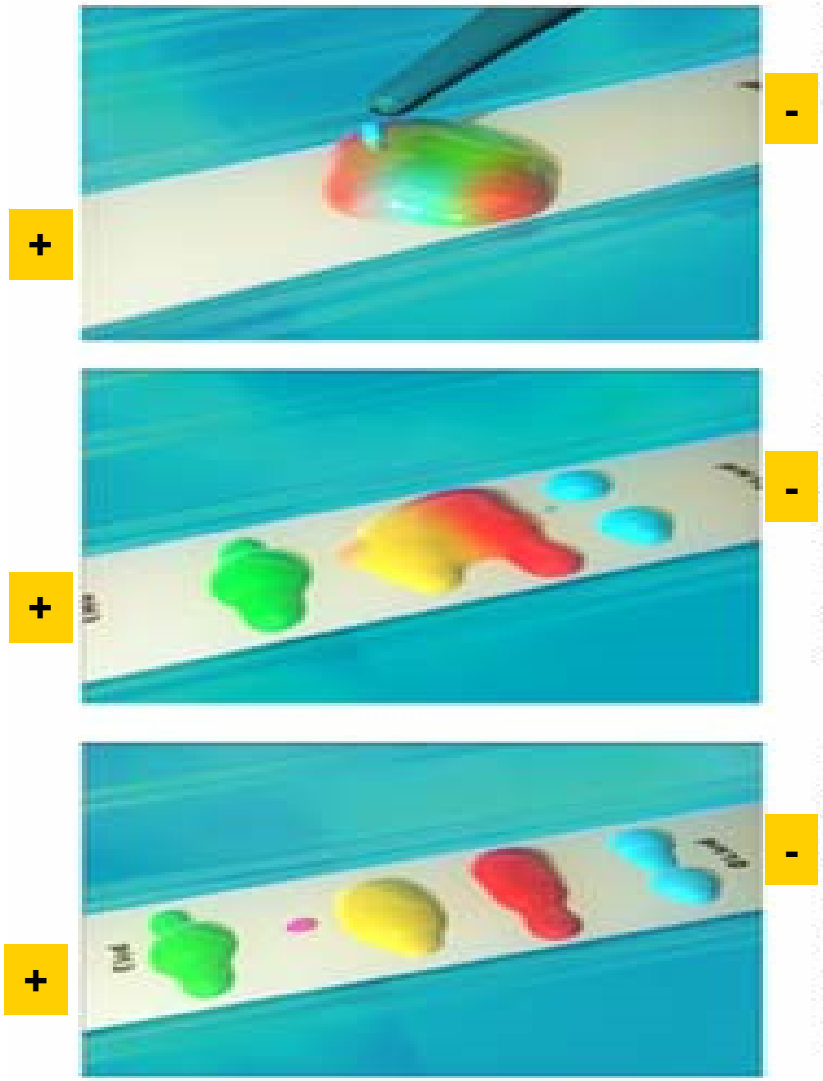
SDS-PAGE



1. ROZMĚR IZOELEKTRICKÁ FOKUSACE

migrace nabitých částic v gradientu pH v elektrickém poli

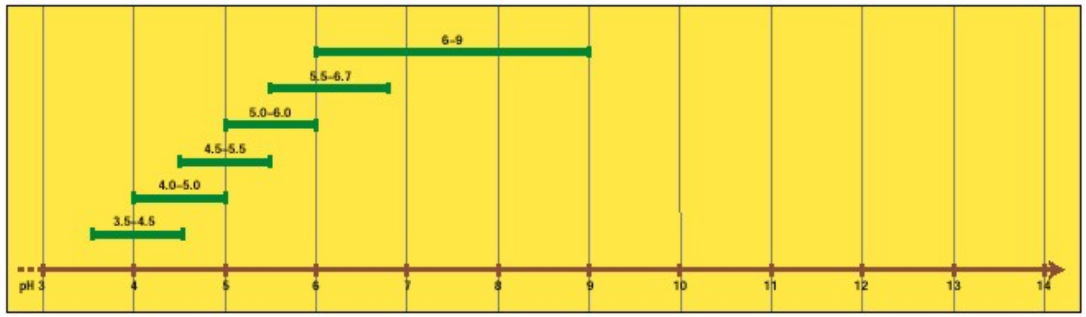




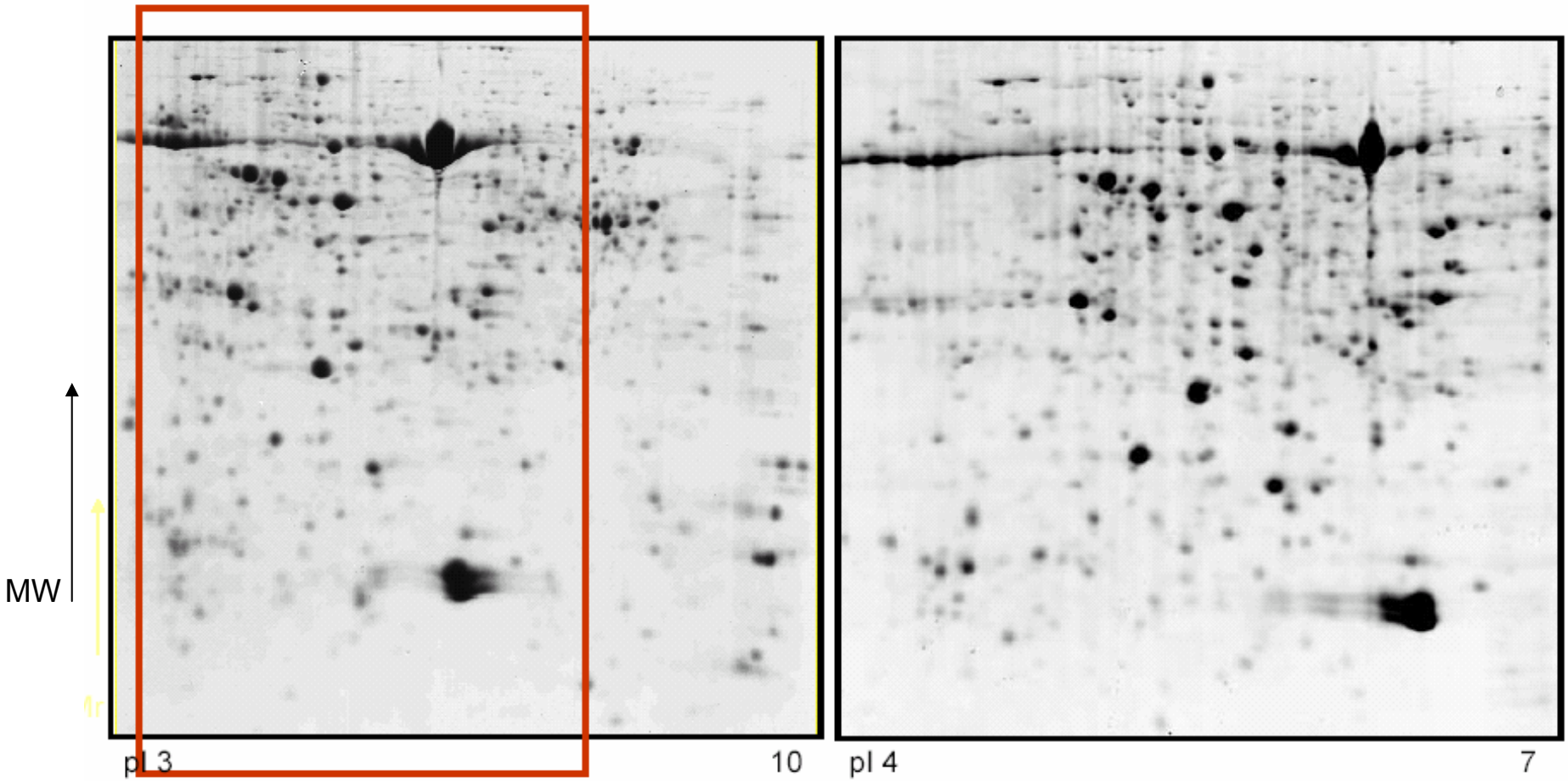
IZOELEKTRICKÁ FOKUSACE

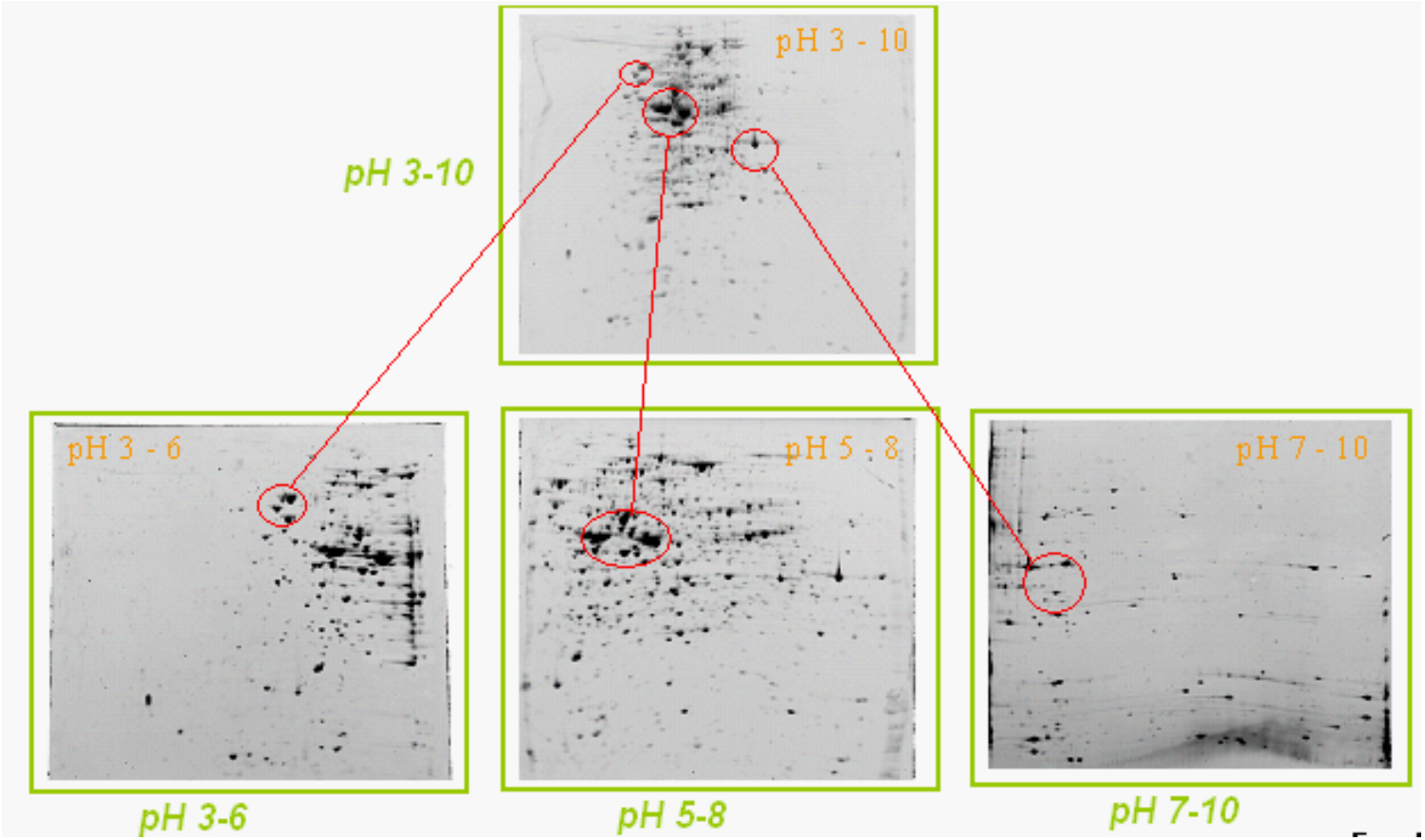
- imobilizovaný pH gradient
- amfolyty

ROZSAH STRIPU
ROZMĚR STRIPU



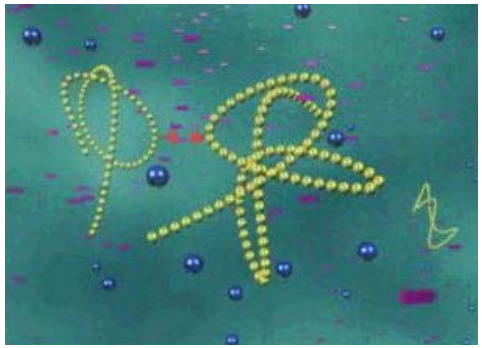
ROZSAH STRIPU

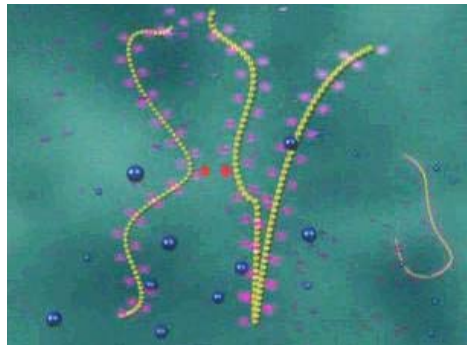


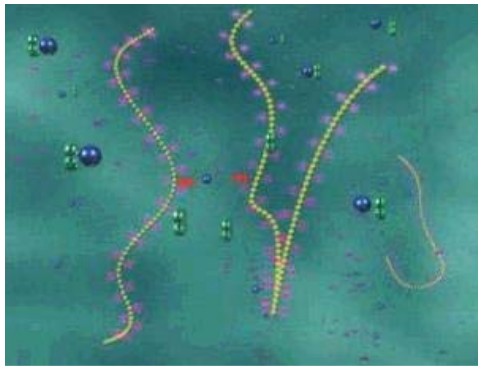

pH 3-10
pH 3 - 10
pH 3 - 6
pH 5 - 8
pH 7 - 10
pH 3-6
pH 5-8
pH 7-10

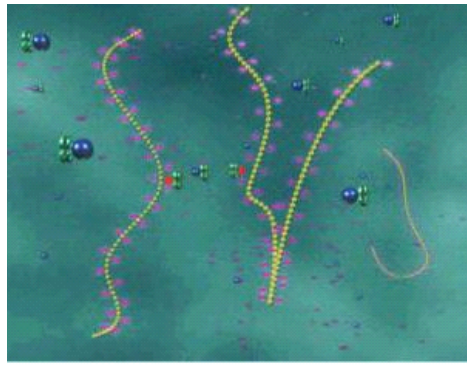
EKVILIBRACE STRIPU

denaturace **SDS** ●





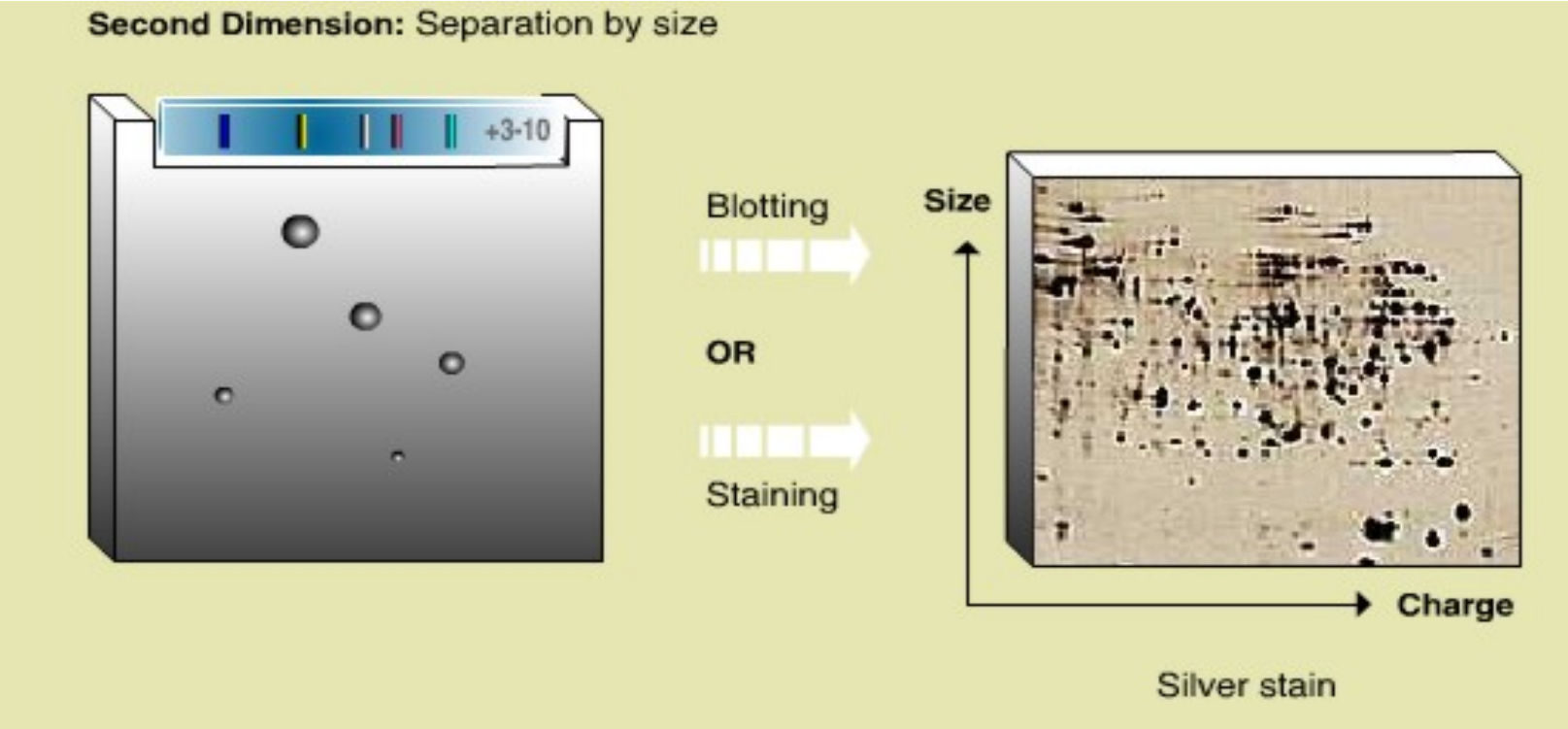




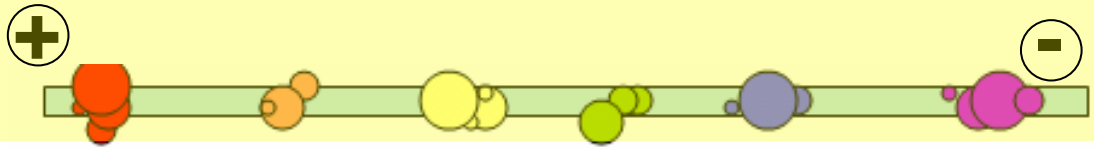
redukce **DTT** ● alkylace **IAA** ●

2. ROZMĚR SDS-PAGE

migrace aniontů v elektrickém poli podle MW



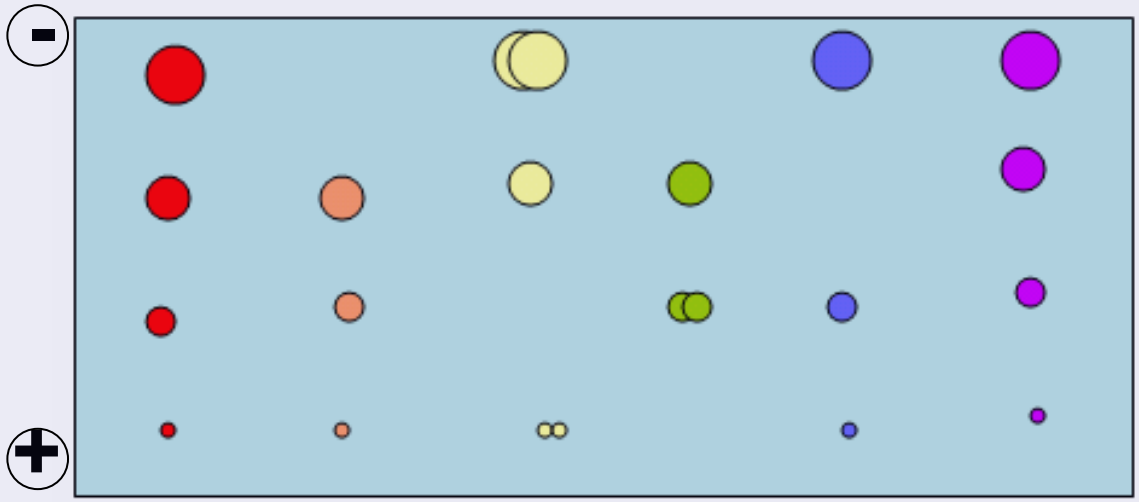
FOKUSACE



STRIP

ekvilibrace

SDS-PAGE



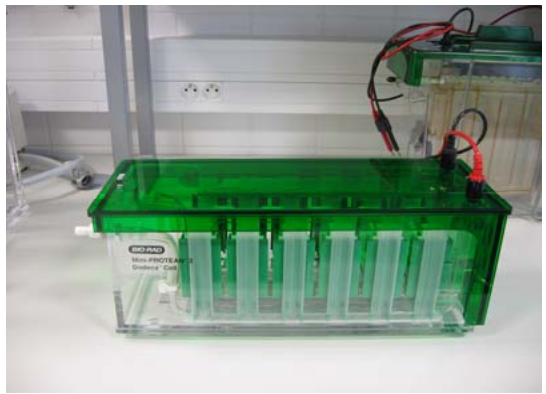
GEL

2-DE INSTRUMENTACE

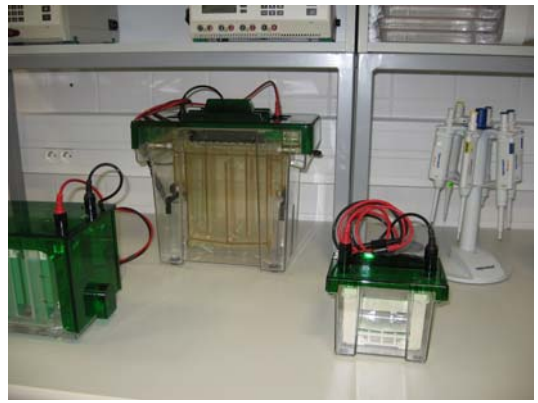
- Protean IEF
- Protean Dodeca Cell
- Densitometer GS-800
- FLA-7000, STORM

PDQuest, Quantity One

Protean Plus Dodeca Cell



Mini-Protean 3 Dodeca Cell



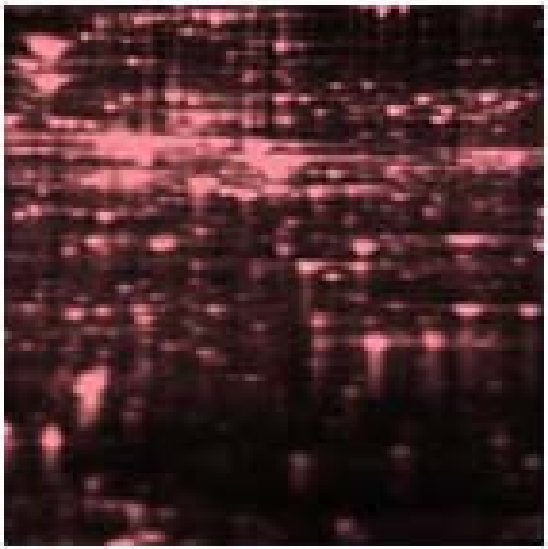
Protean II xi Cell

DETEKCE PROTEINU

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

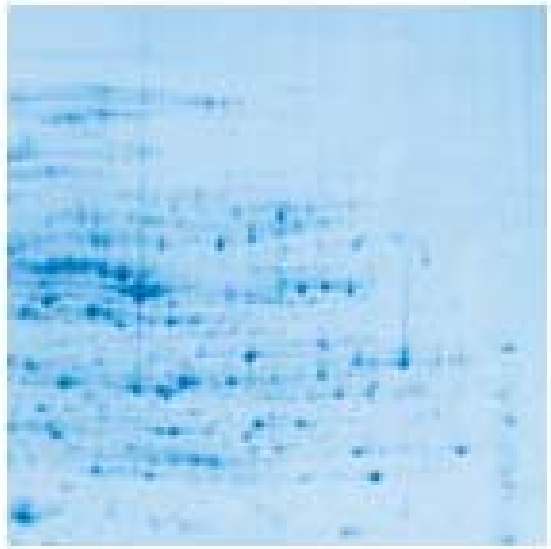
- barvení v gelu
  - po elektroforéze
  - před elektroforézou
  - specifické pro protein
  - specifické pro PTM
  - viditelné spektrum
  - fluorescence

DETEKCE PROTEINU V GELU



Sypro Ruby

1.4 ng



Coomassie

36 ng

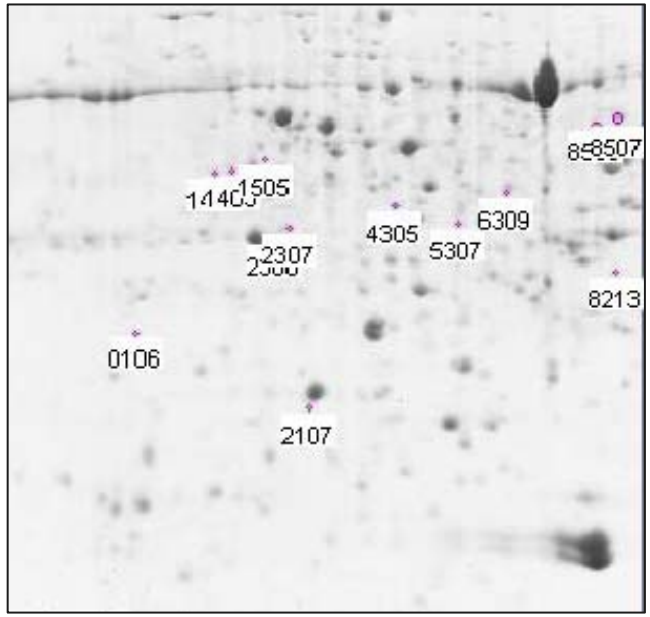
silver

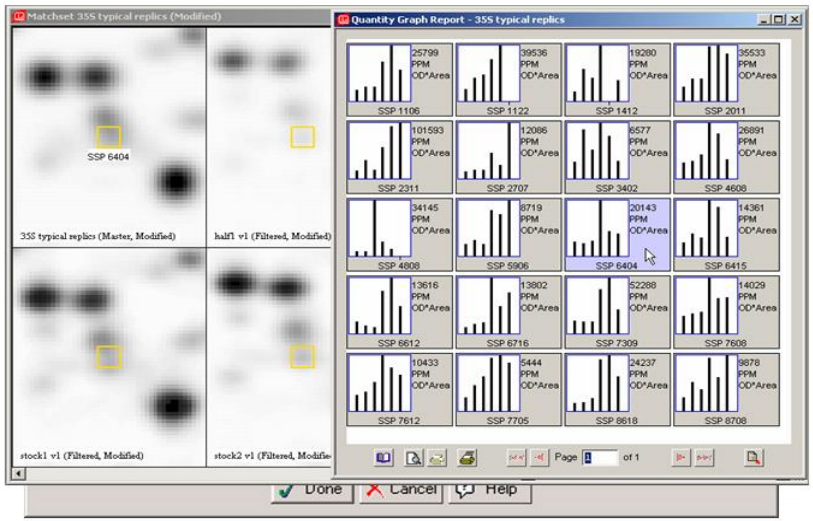
0.6 ng

PTM specifická barvení

ANALÝZA OBRAZU

- kvalitativní
- kvantitativní



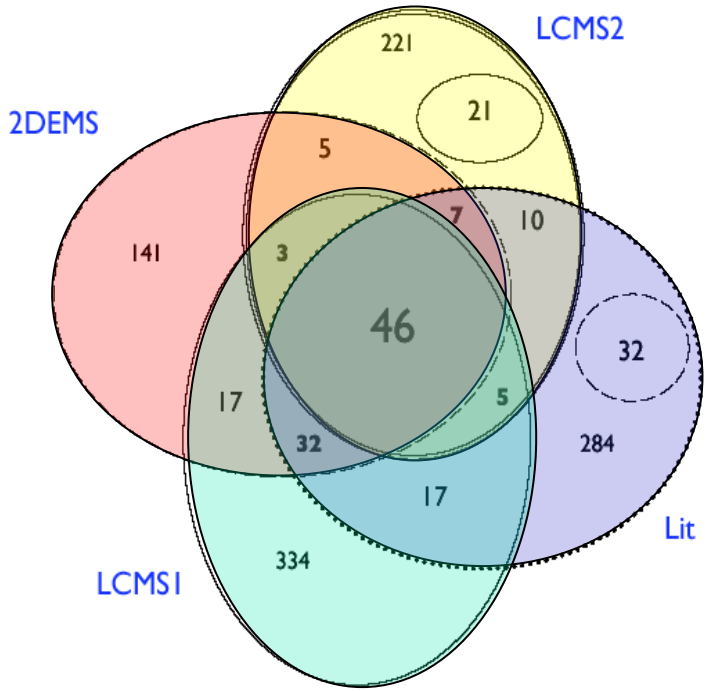


2D or not 2D ?

- vizuální aspekty
- reprodukovatelnost
- dynamický rozsah
- extrémní proteiny (membránové,basické...)
- 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).

PPI

MULTIDIMENZIONÁLNÍ CHROMATOGRAFIE

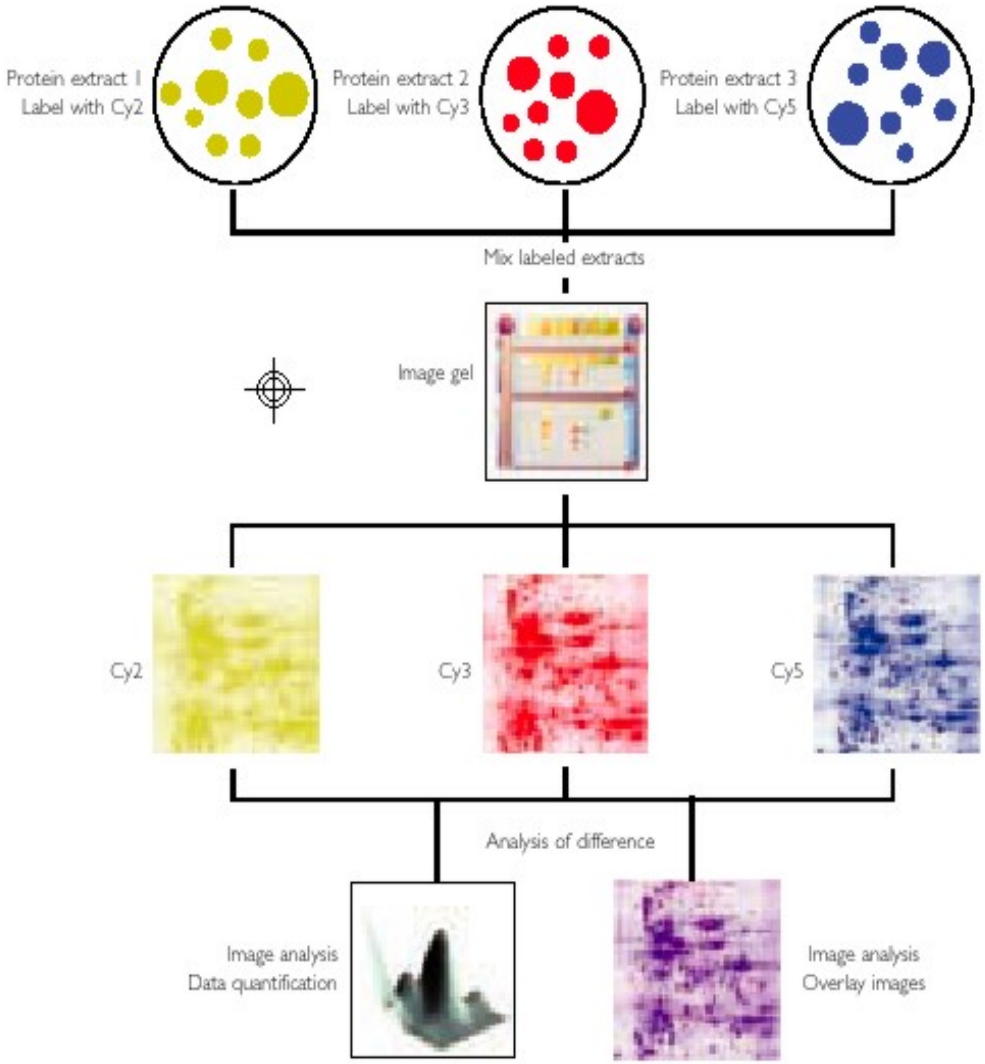
PRO

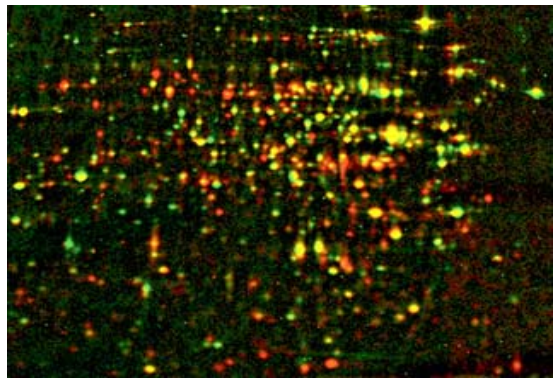
- velké objemy vzorku
- možnost koncentrace na koloně
- membránové proteiny, basické proteiny
- není nutno barvit
- peptidy – přímo na MS
- automatizace

PROTI

- vizuální aspekty ztraceny: pI a Mr
- LC - sériová analýza
- GE současně pro více vzorků

Difference Gel Electrophoresis DIGE





BIOMARKERY

… jehly v kupce sena

prefrakcionace separace identifikace srovnání kontrola vs.vzorek

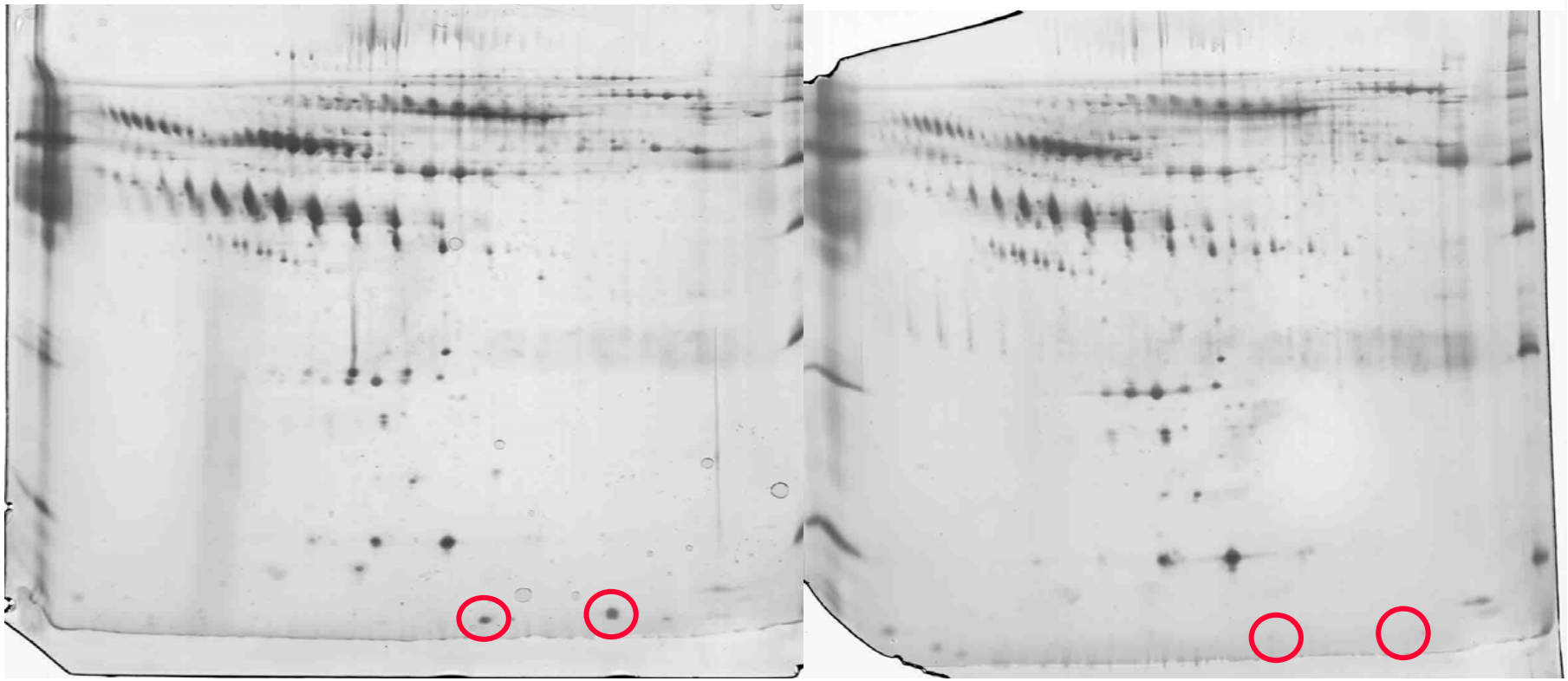
- **seno** - proteiny bez vztahu k onemocnění
- **jehly** - specifické proteiny pro onemocnění
- potenciální jehly **obtížně validovatelné**
- které jehly dále zkoumat?
- často **PTM,** neidentifikovány MS

- hledání obtížné a neefektivní

Biomarkery v lidské plasmě

Den 21 – před klinickým projevem

Den 44 – po klinickém projevu



separace → identifikace

DIGESCE

trypsin Glu-C Asp-N thermolysin

MAVEPFPRRPITRPHASIEVDTSGTGGSAGSSE
KVFCLIGQAEGGEPNTVYELRNYAQAKRLFR
SGELLDAIELAWGSNPNYTAGRILAMRIEDAK
PASAEIGGLKITSKIYGNVANNIQVGLEKNTLS
DSLRLRVIFQDDRFNEVYDNIGNIFTIKYKGEE
ANATFSVEHDEETQKASRLVLKVGDQEVKSY
DLTGGAYDYTNAIITDINQLPDFEAKLSPFGD
KNLESSKLDKIENANIKDKAVYVKAVFGDLE
KQTAYNGIVSFEQLNAEGEVPSNVEVEAGEES
ATVTATSPIKTIEPFELTKLKGGTNGEPPATWA
DKLDKFAHEGGYYIVPLSSKQSVHAEVASFV
KERSDAGEPMRAIVGGGFNESKEQLFGRQAS
LSNPRVSLVANSGTFVMDDGRKNHVPAYMV
AVALGGLASGLEIGESITFKPLRVSSLDQIYESI
DLDELNENGIISIEFVRNRTNTFFRIVDDVTTFN
DKSDPVKAEMAVGEANDFLVSELKVQLEDQF
IGTRTINTSASIIKDFIQSYLGRKKRDNEIQDFP
AEDVQVIVEGNEARISMTVYPIRSFKKISVSLV
YKQQTLQA

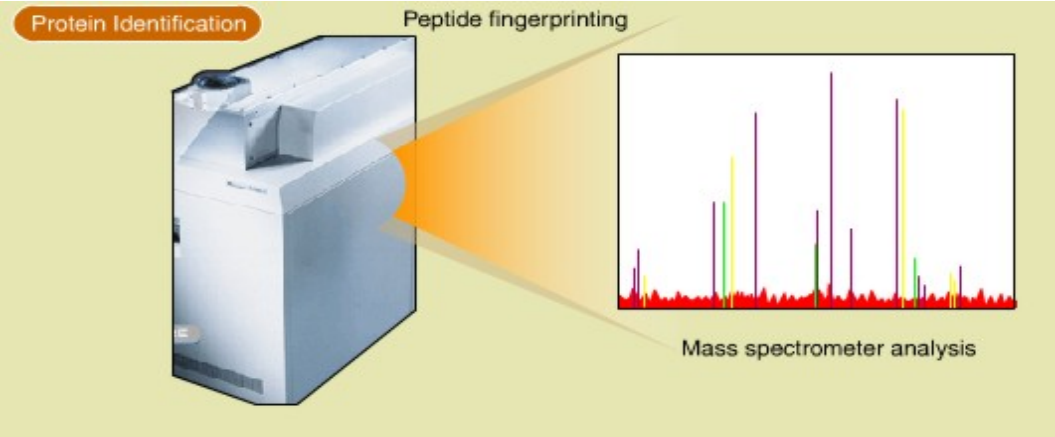
- IN-GEL
- IN-SOLUTION

MS

IDENTIFIKACE

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

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



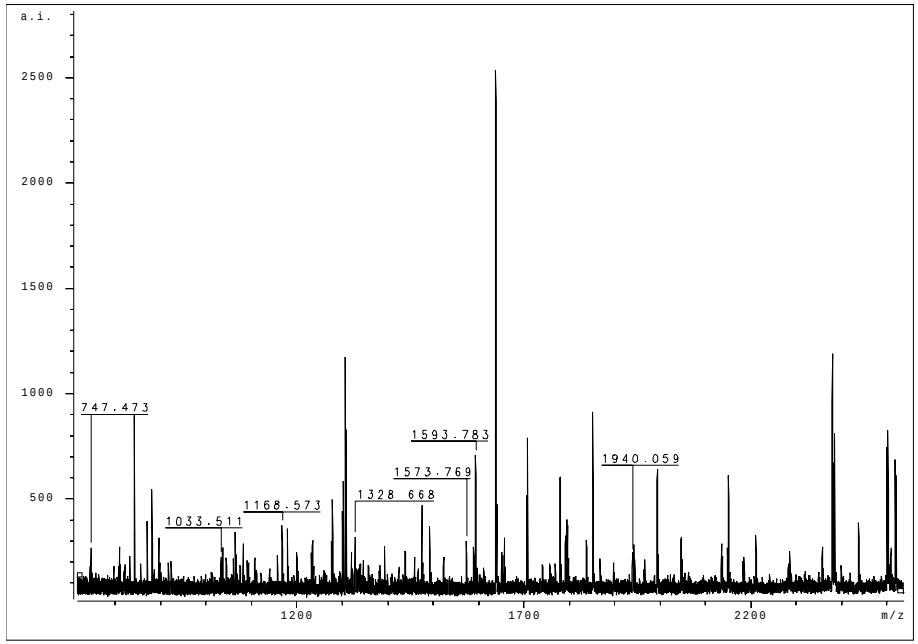
→ databáze

↓

identifikace

KERATINY ! ! ! Potlačení ionizace

alpha-1-antiproteinase, 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

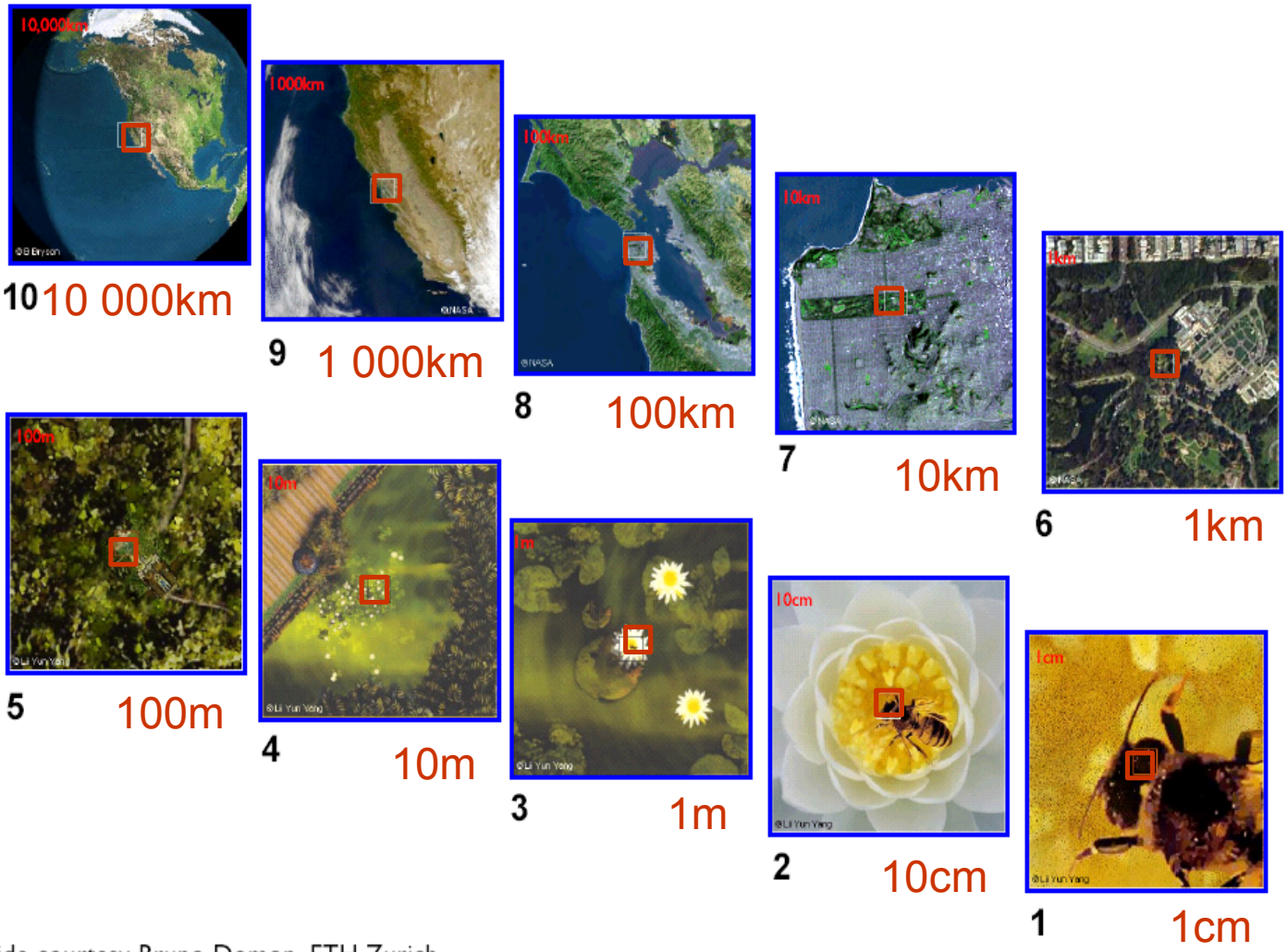
GARBAGE IN - GARBAGE OUT

LITERATURA

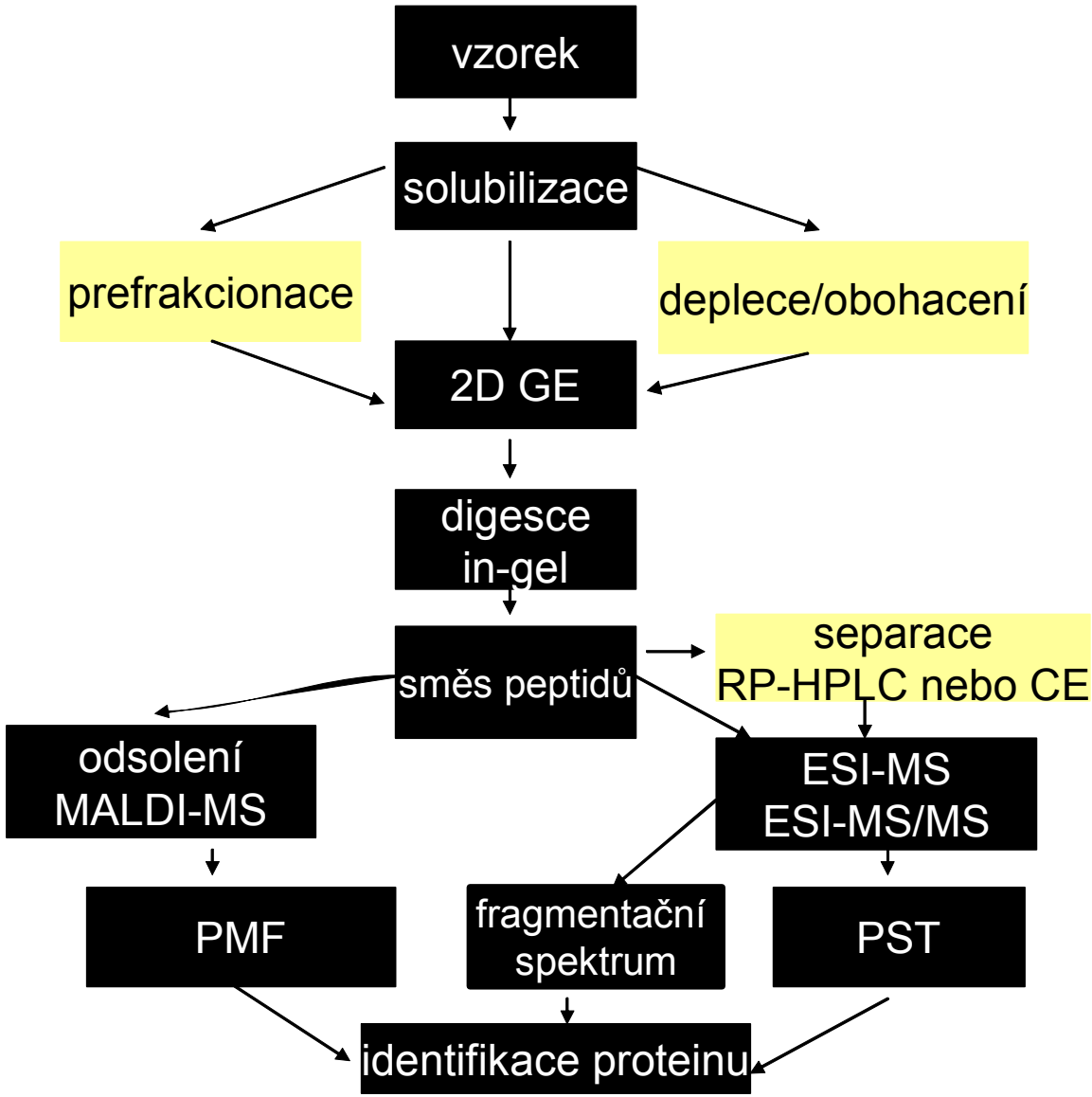
- R.M. Twyman: Principles of Proteomics
- R.Westermeier, T.Naven, H-R Höpker: Proteomics in Practice
- A.J.Link: 2D Proteome Analysis Protocols
- Current Protocols in Protein Science
- R.J.Simpson: Proteins and Proteomics
- T.Rabilloud: Proteome Research: Two-dimensional Gel
- Electrophoresis and Identification 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

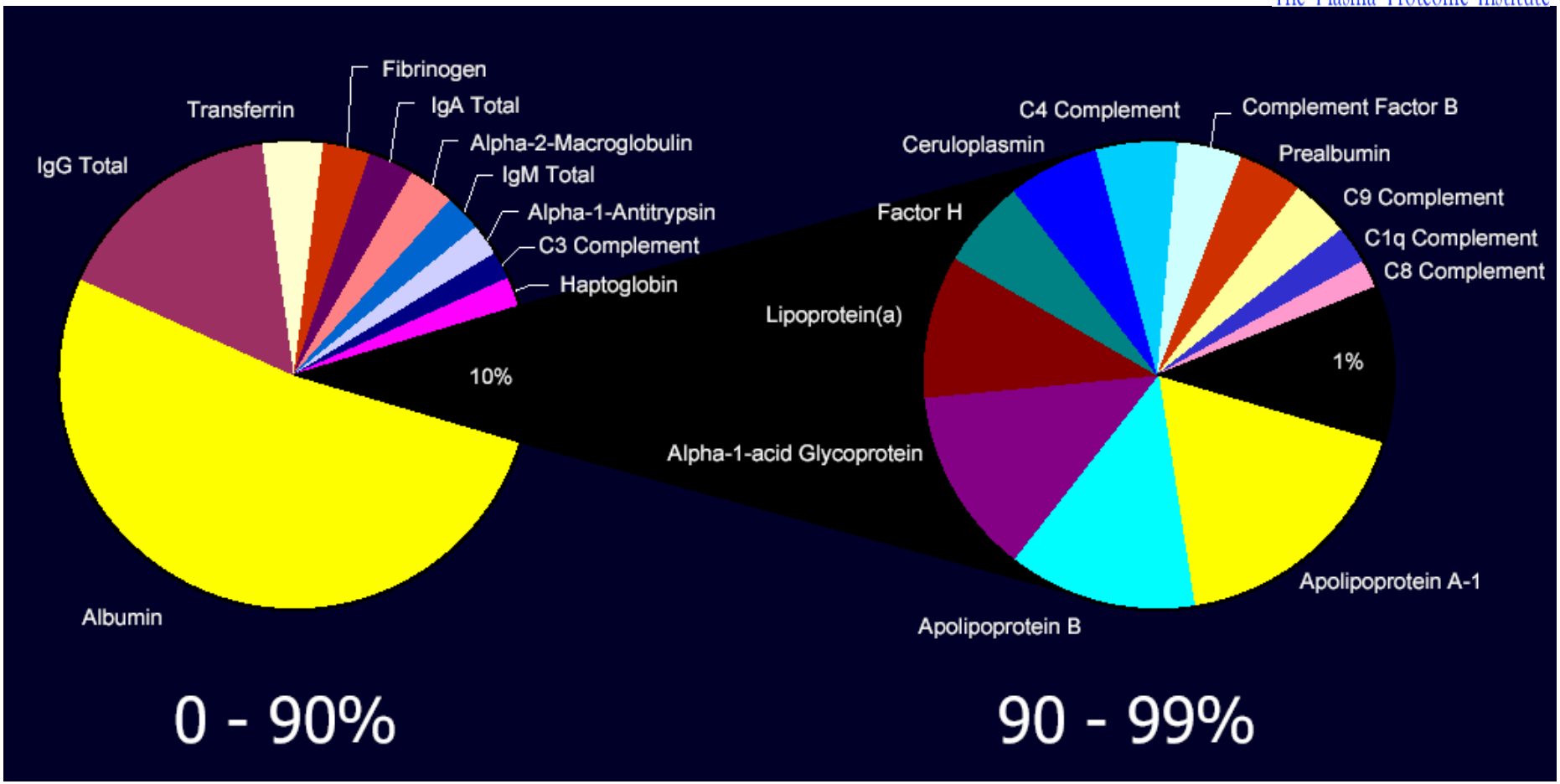
10^{10} Really Is Wide Dynamic Range



Slide courtesy Bruno Domon, ETH Zurich


vzorek
solubilizace
prefrakcionace
deplece/obohacení
2D GE
digesce
in-gel
směs peptidů
separace
RP-HPLC nebo CE
odsolení
MALDI-MS
ESI-MS
ESI-MS/MS
PMF
fragmentační
spektrum
PST
identifikace proteinu

PPI
The Plasma Proteome Institute

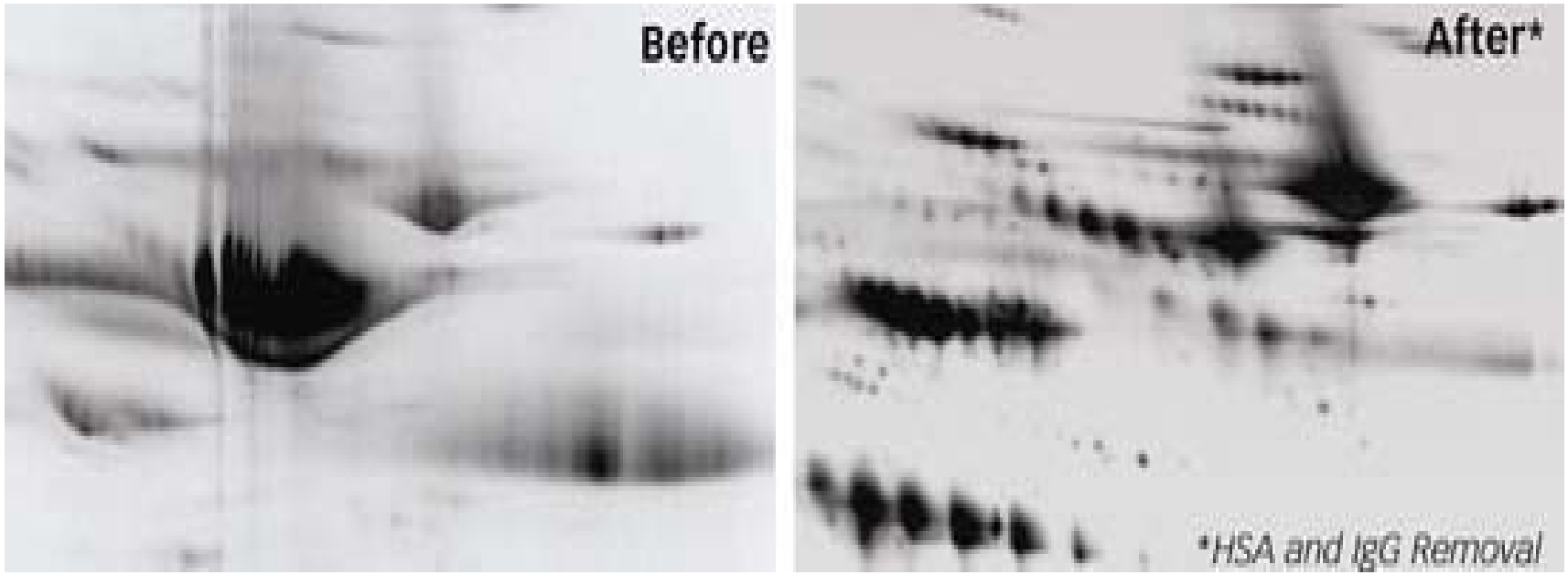


AFINITNÍ DEPLECE

odstranění abundantních proteinů afinitní chromatografií

HSA

IgG

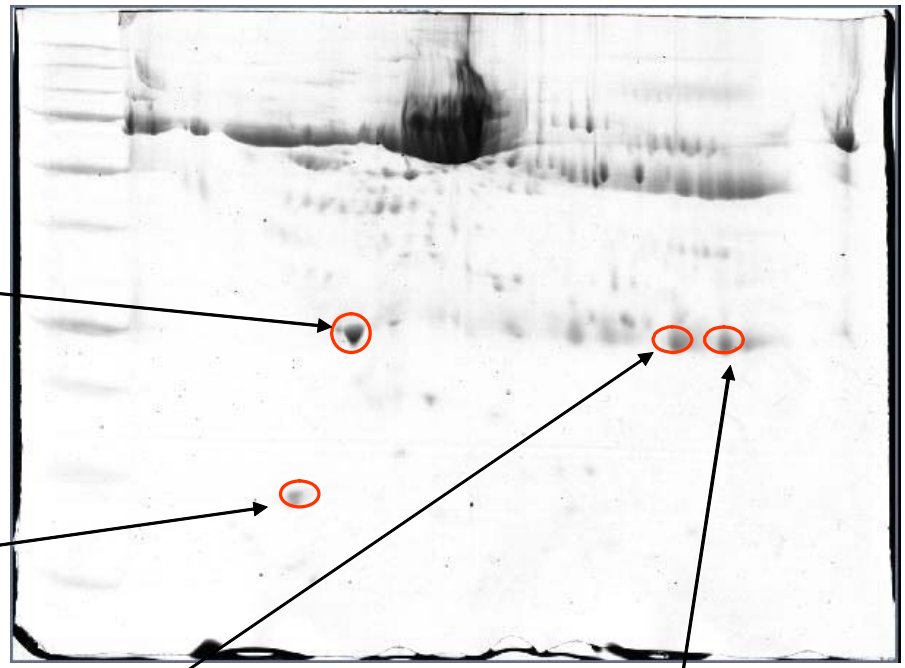


Lidská plazma - vázaná frakce po afinitní depleci

ALBUMIN

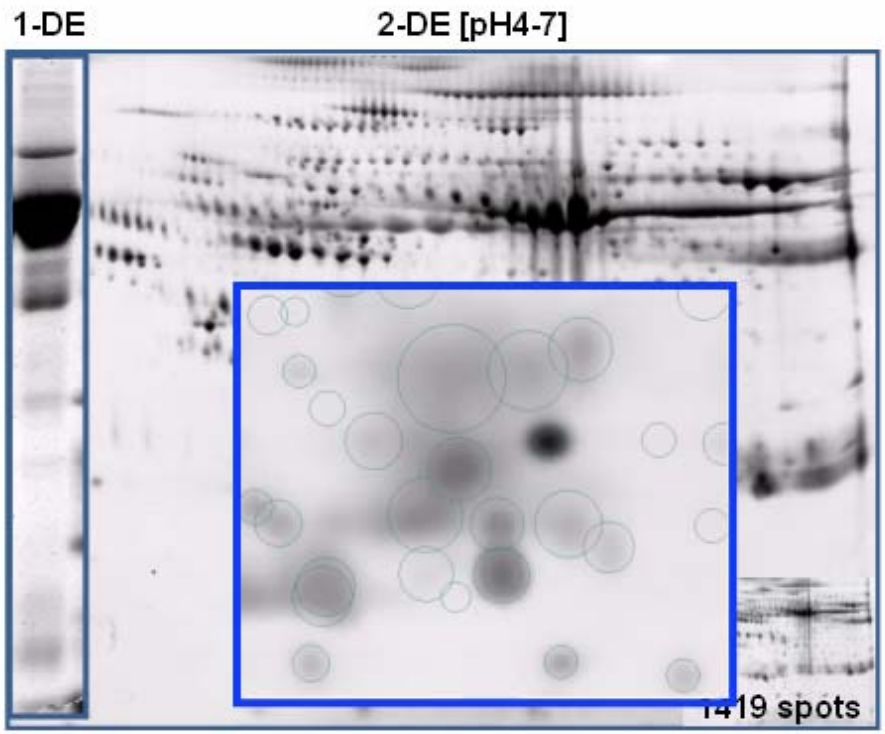
IgG

Barvení: CB G-250

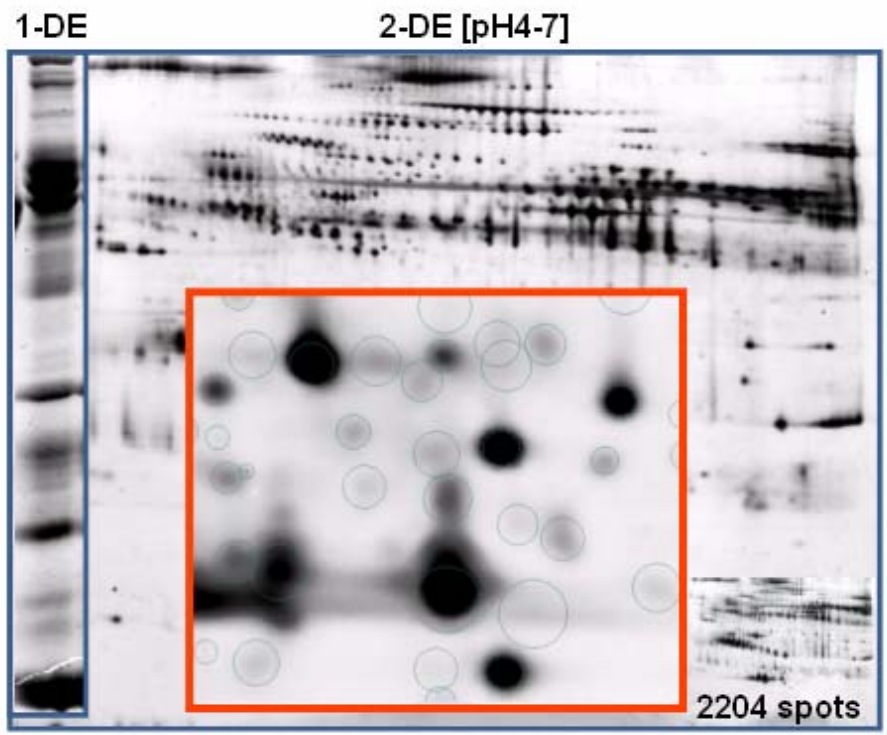


CPPL
Combinatorial Peptide Ligand Library

Native Human Serum

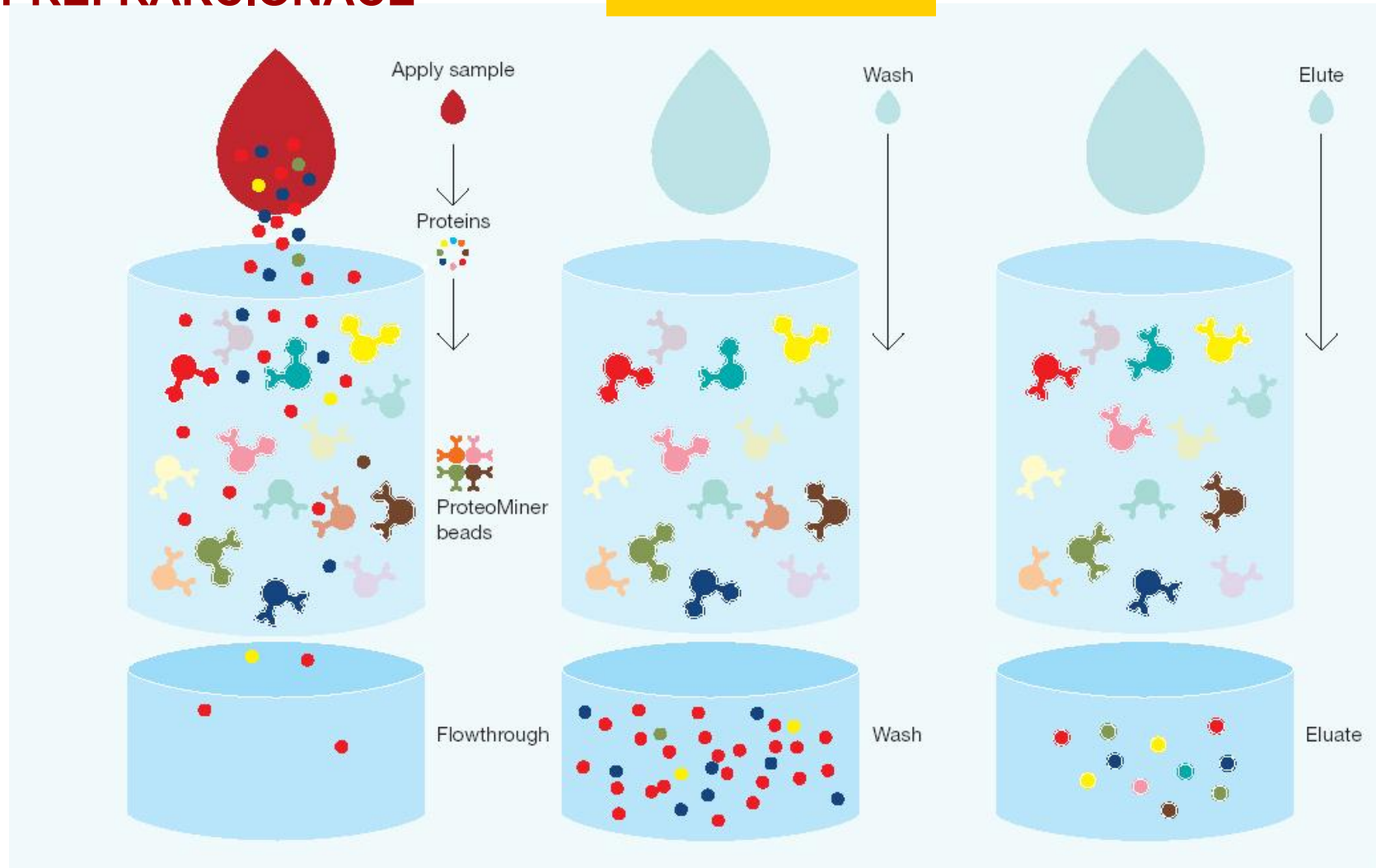


Human Serum Fractionated by ProteoMiner



PREFRAKCIONACE

PROTEOMINER



IEF PREFRAKCIONACE

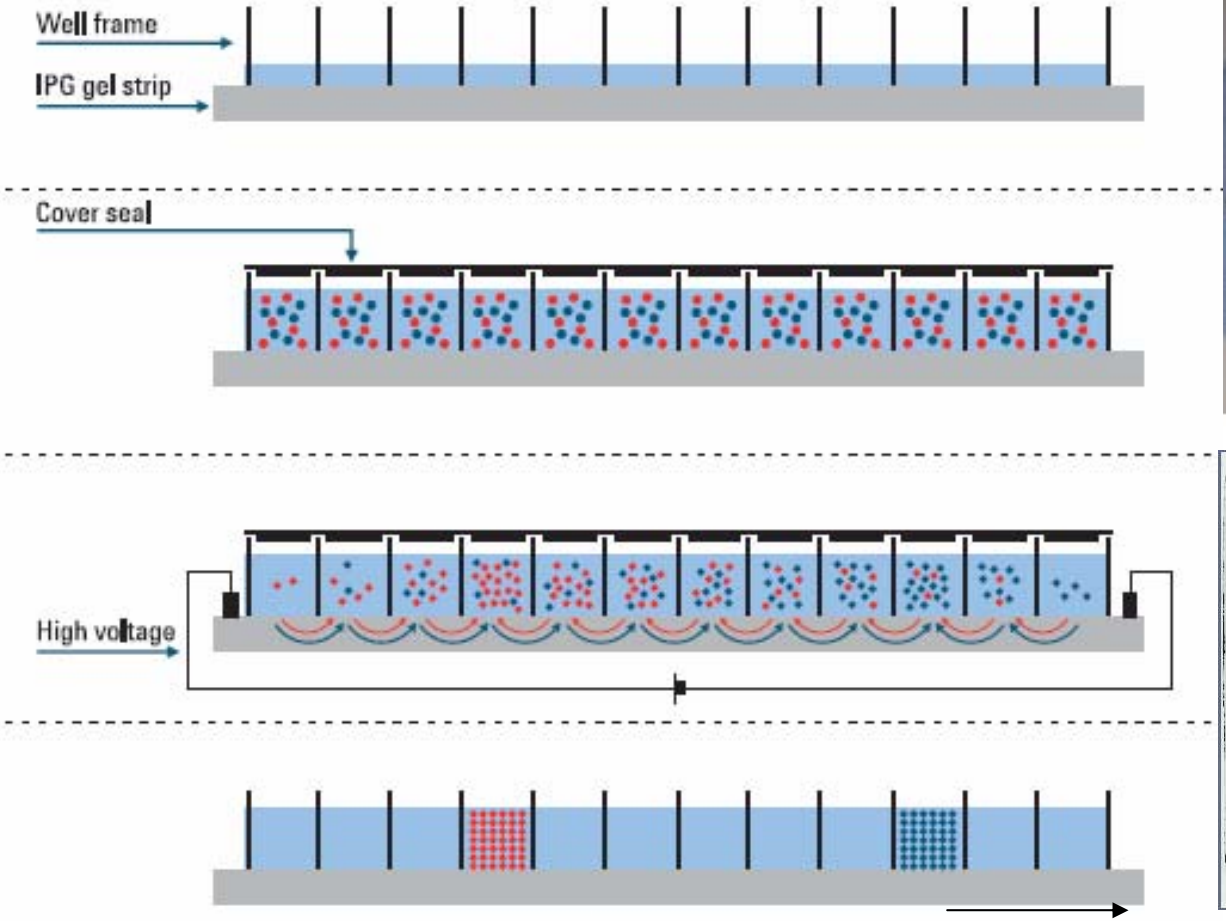
MicroRotofor

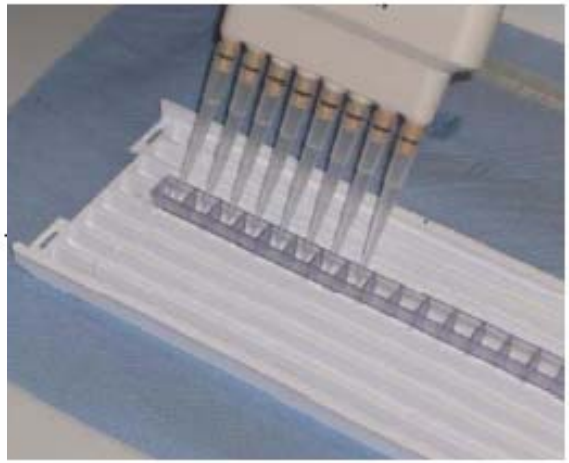
- prefrakcionace v roztoku

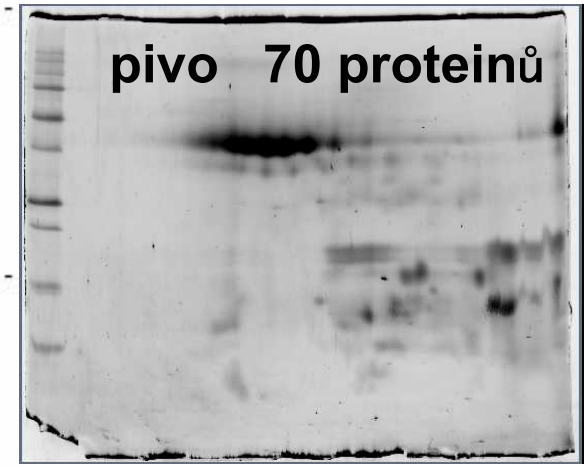
OffGel Fractionator

- prefrakcionace v roztoku na IPG stripu

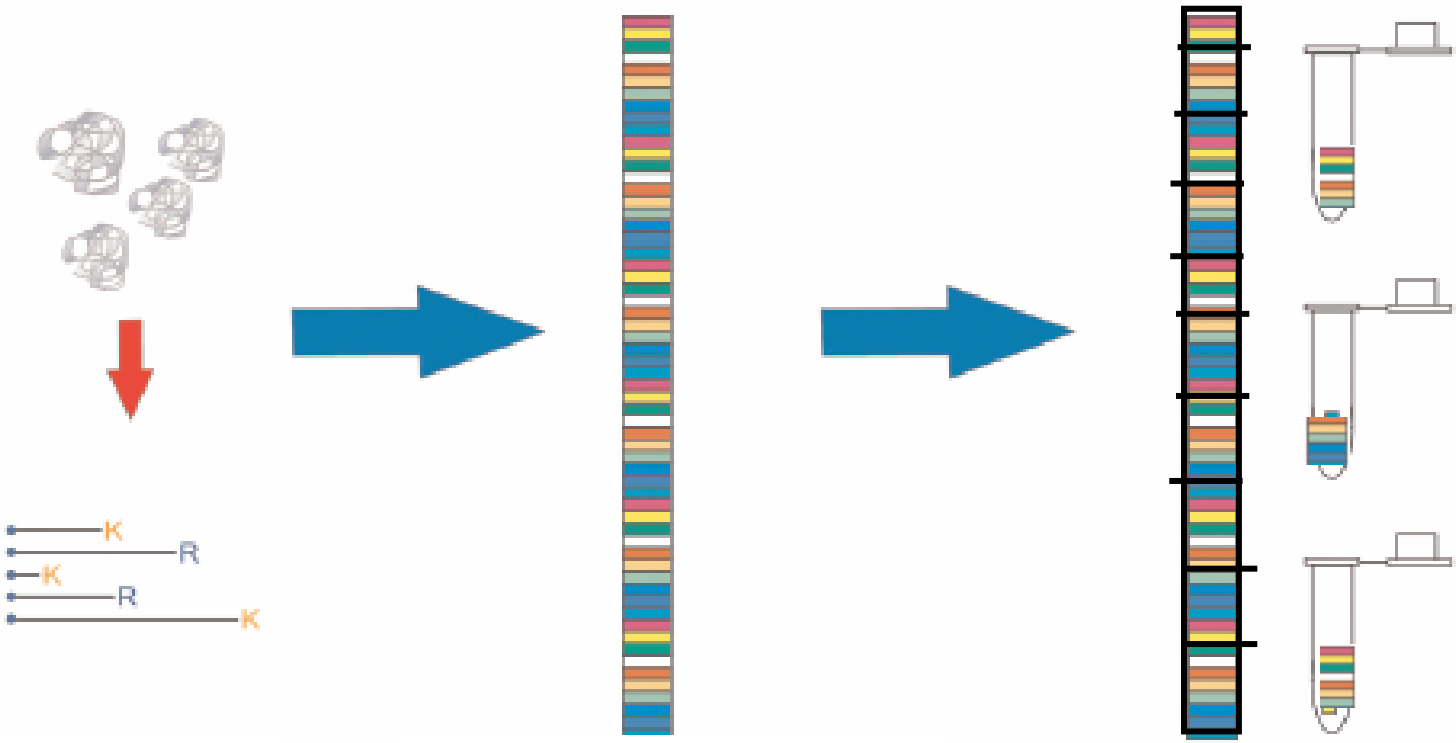
OFFGEL IEF prefrakcionace proteinů nebo peptidů







IPG-IEF



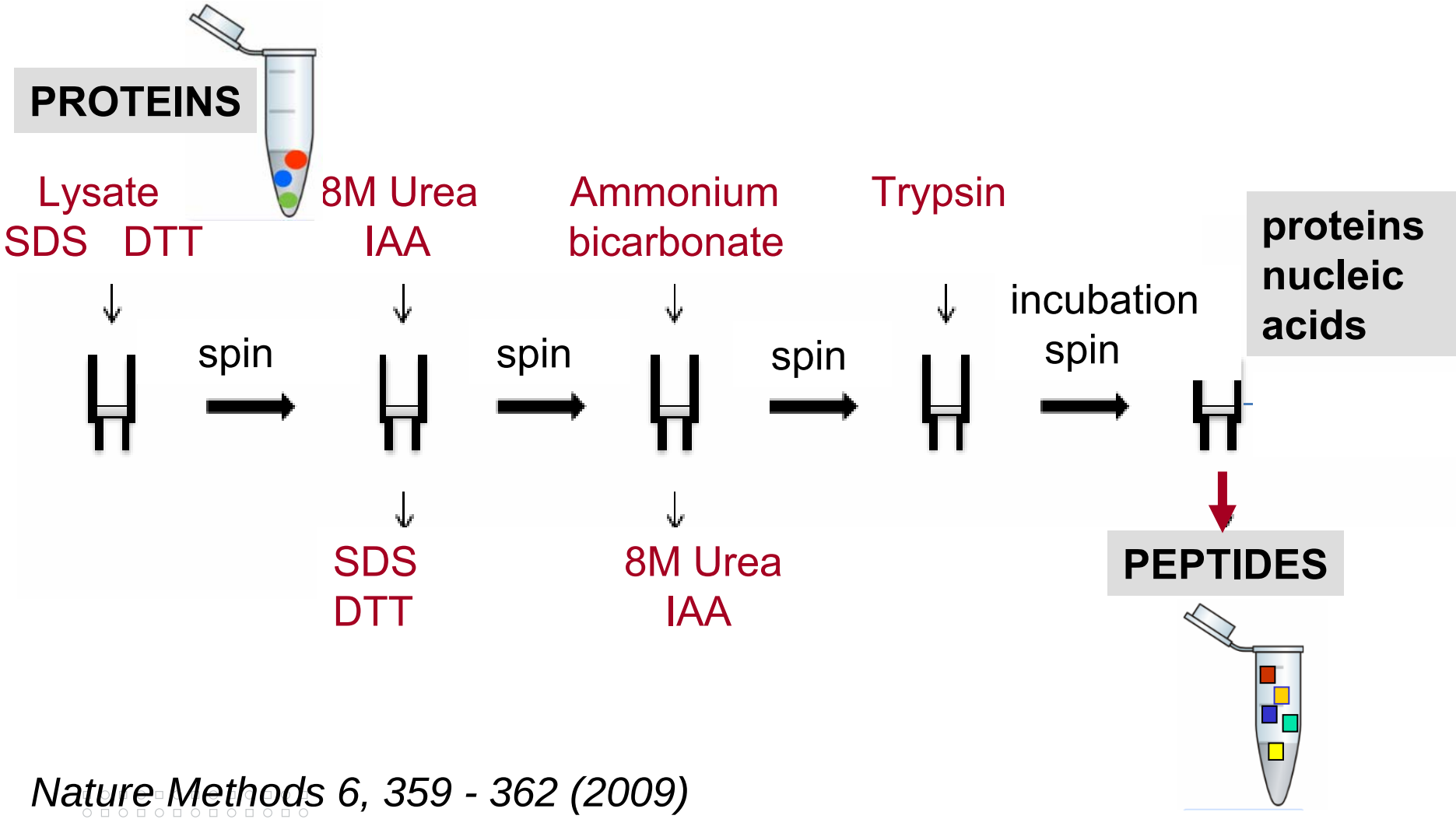
digest směsi proteinů

IEF směsi peptidů na IPG stripu

frakce stripu

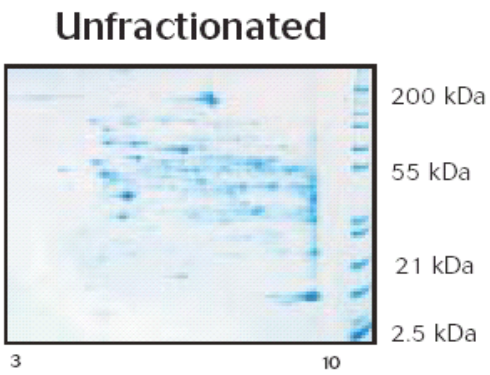
JOURNAL OF BIOMOLECULAR TECHNIQUES, VOLUME 16, ISSUE 3, SEPTEMBER 2005

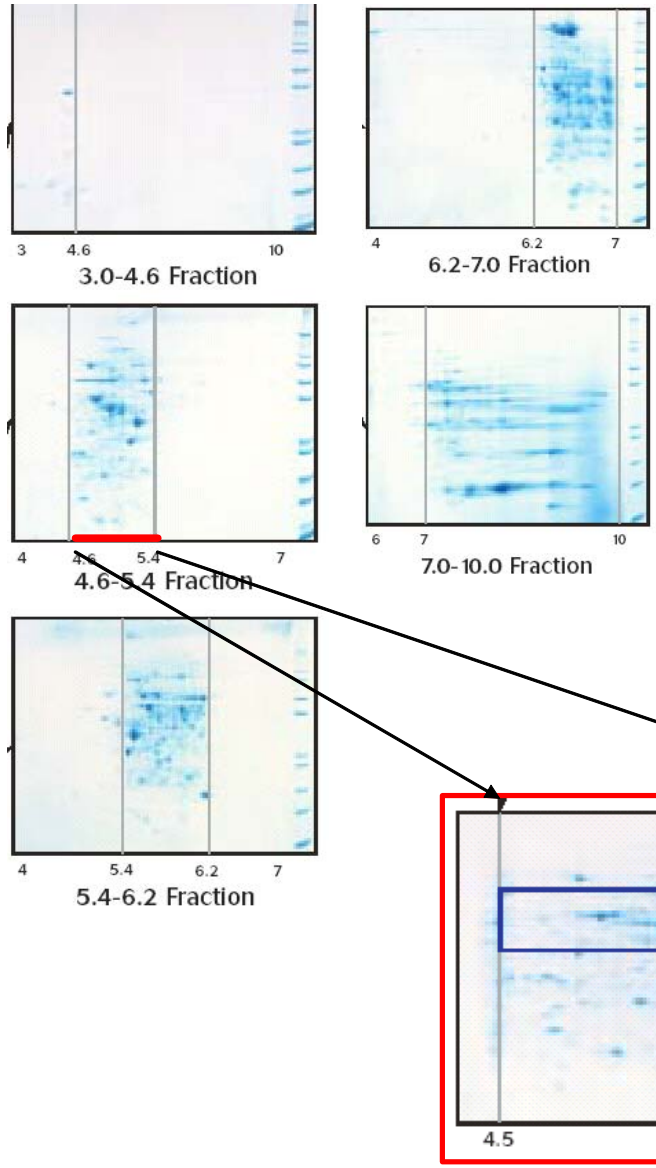
FASP Filter aided sample preparation



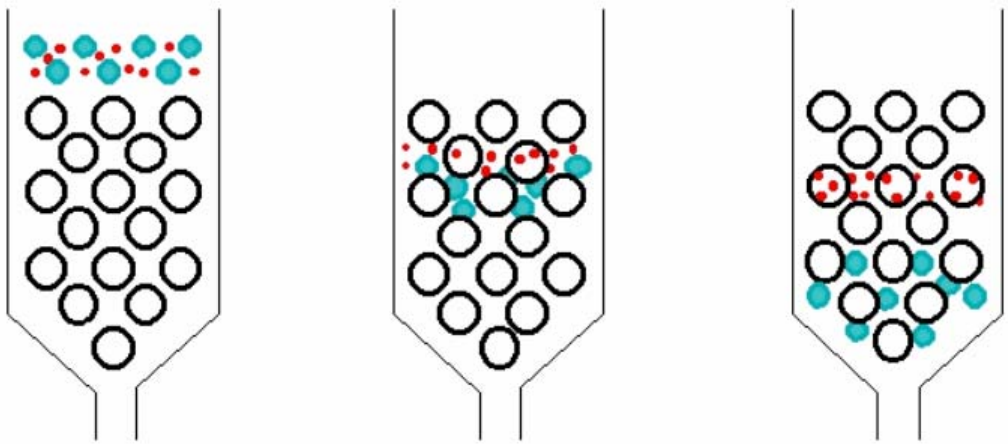
Nature Methods 6, 359 - 362 (2009)

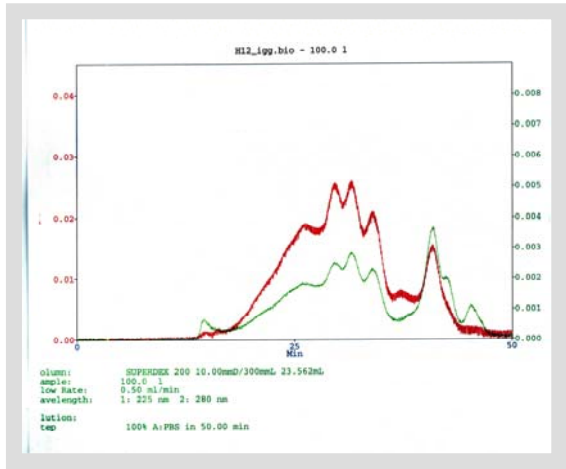
PREFRAKCIONACE MIKRO ROZSAHY





GELOVÁ CHROMATOGRAFIE





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**

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

esf evropský sociální fond v ČR
EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ