

M U N I
S C I

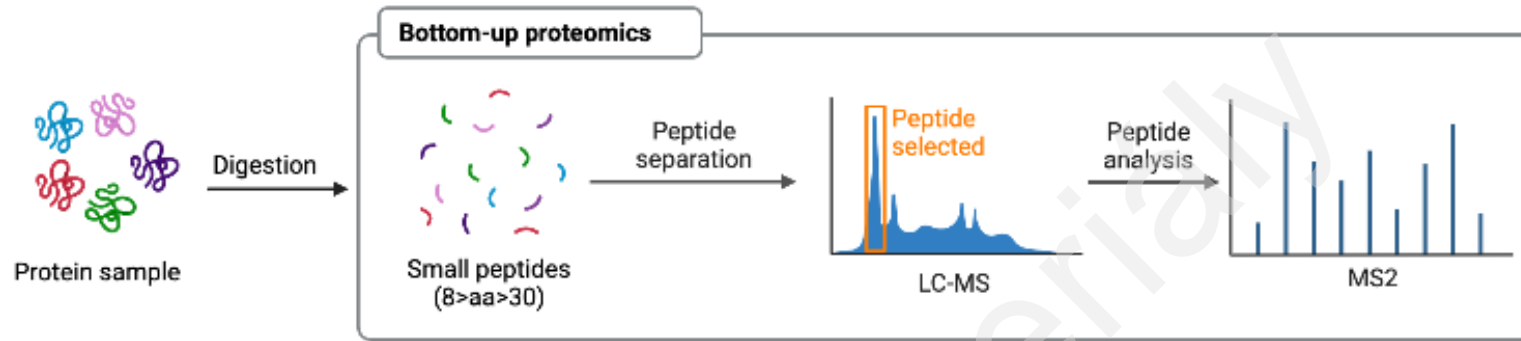
CG090 Metody v proteomice

Příprava vzorku pro proteomiku zdola

Gabriela Lochmanová, Ph.D.

Studijní materiály

Proteomika zdola

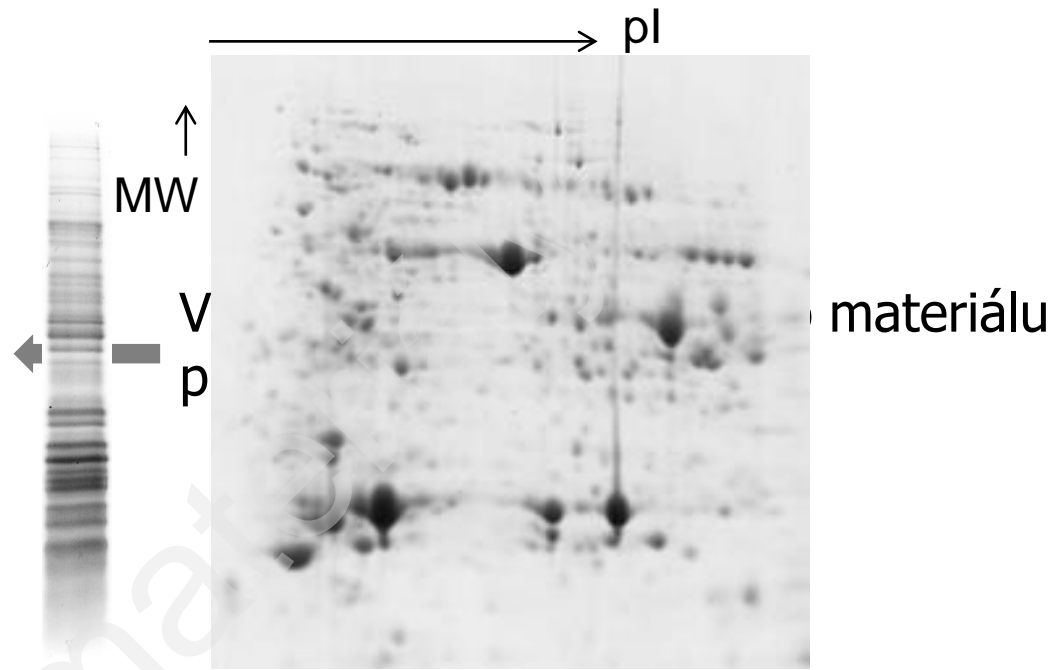
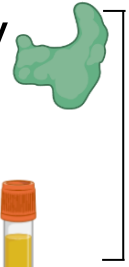


- Peptidy vhodné velikosti pro analýzu běžně dostupnou instrumentací
- Dostupné „open-source“ a komerční programy
- Umožňuje:
 - identifikovat peptidy a z nich odvodit identifikaci proteinů
 - identifikovat a lokalizovat posttranslační modifikace (PTM)
 - určit relativní zastoupení peptidů mezi vzorky
- Identifikace a kvantifikace tisíce proteinů z jednoho vzorku (bez potřeby předchozí znalosti o složení vzorku či dostupnosti protilátek)

Proteomika zdola

- Vstupní materiál: rozmanité typy vzorků

- purifikované proteiny
- buňky
- tkáně
- biologické tekutiny



- Současný trend:

- přístupy v roztoku – časově výhodné, laboratorně jednodušší, minimalizované ztráty vzorku
- přístupy bez precipitace – alternativní metody využívané pro odstranění detergentů a dalších kontaminant (suspension trapping, paramagnetické kuličky)

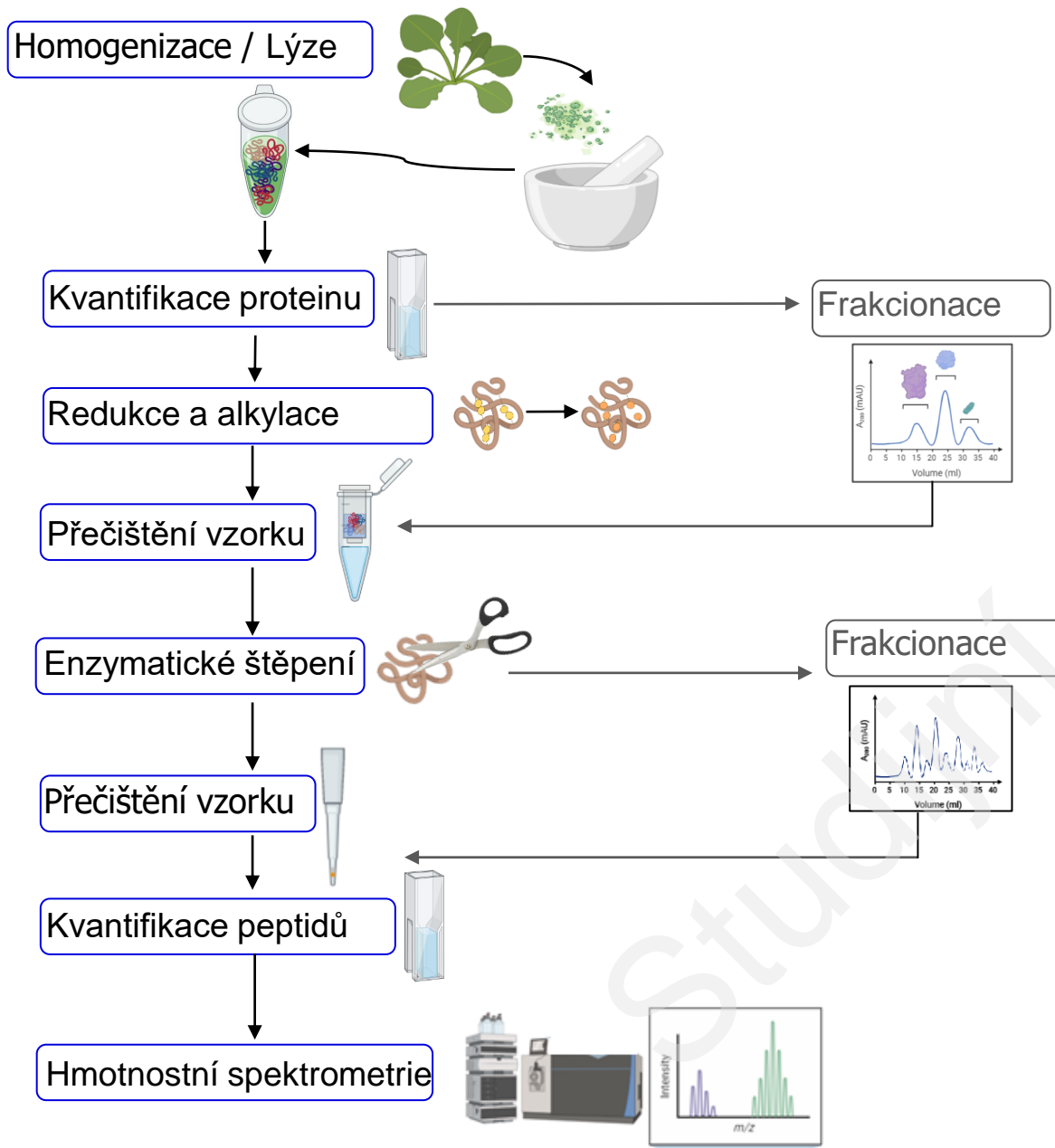


Tradiční přečištění vzorku na reverzně-fázové chromatografii lze využít pro odsolení, ale ne pro odstranění detergentů či polymerů

X

Nové přístupy využívající magnetické kuličky umožňují odstranění detergentů, polymerů i solí

Proteomika zdola – Obecný postup



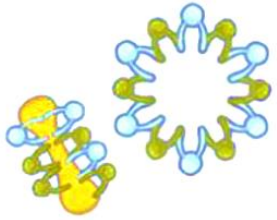
- Sled kroků zahrnující štěpení proteinu na peptidy doprovázené odstraněním kontaminantů ze vzorku

- Výběr postupu se odvíjí od **komplexity vzorku a cíle experimentu.**

*Komplexita vzorku – počet proteinů
– dynamický rozsah koncentrace proteinů*

Homogenizace / Lýze

- Metody založené na reagentiích



- rychlé, jemné, účinné, reprodukovatelné
- extrakce celkového proteinu nebo proteinů subcelulární frakce



- komponenty nekompatibilní s MS musí být následně odstraněny
- vhodné pro buněčné kultury, ale nemusí být účinné pro některé tkáně

- Mechanické přístupy



- lýze široké škály vstupního materiálu
- vysoká lyzační účinnost



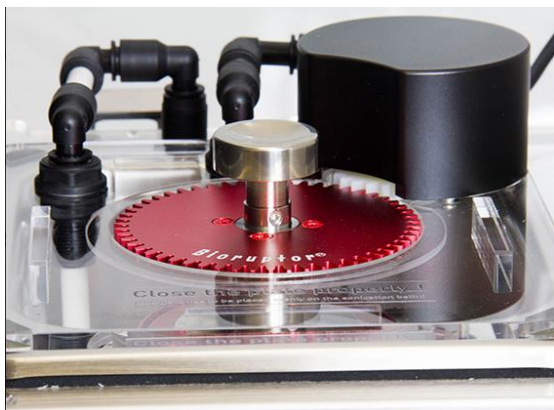
- vyžaduje instrumentaci
- omezená reprodukovatelnost
- denaturace a agregace proteinů kvůli lokálnímu přehřátí
- rozrušení buněk a subcelulárních komponent v různých časech

Homogenizace / Lýze

Bioruptor® Pico

Adaptive cavitation Technology **ACT**

- Rychlé změny tlaku v kapalném vzorku během sonikace
- Vznik bublin při lokálním poklesu tlaku
- Praskání bublin při dosažení kritické velikosti



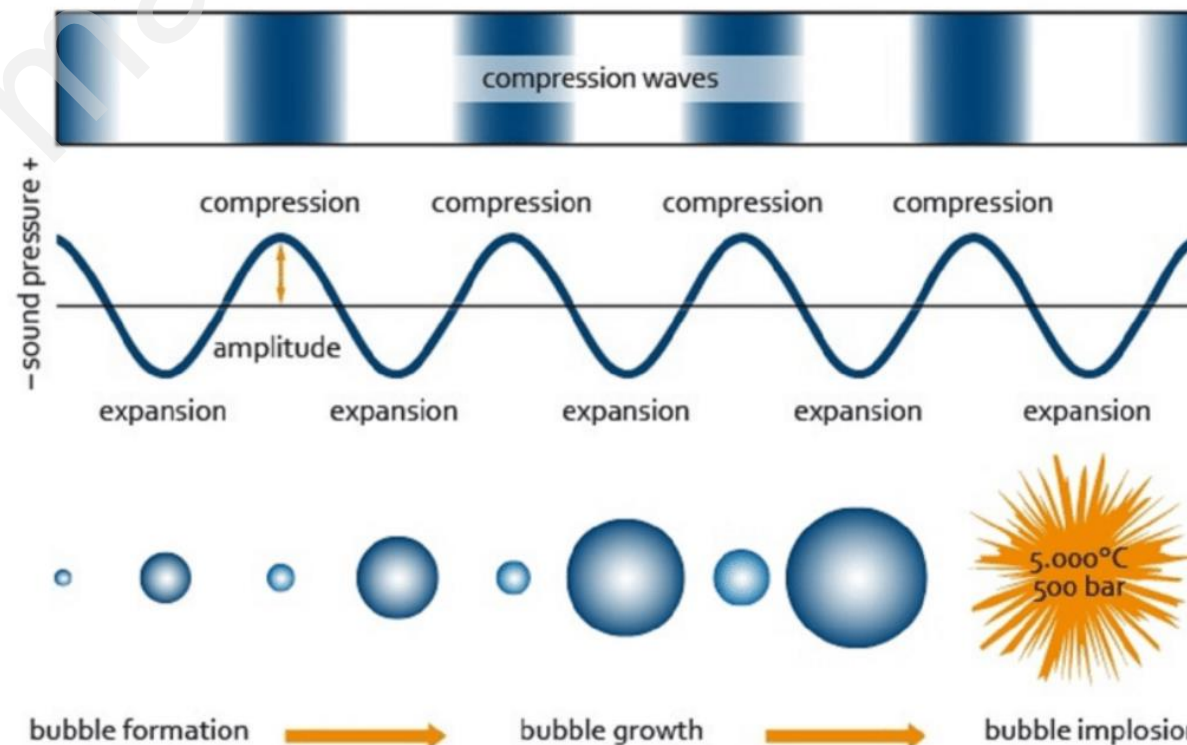
5 mikrolitry až 2 mililitry vzorku
(v závislosti na adaptéru)



Adaptor for 0.2ml tubes for Bioruptor® Pico holder Adaptor for 0.65ml tubes for Bioruptor® Pico holder



Adaptor for 1.5ml tubes for Bioruptor® Pico holder 15 ml sonication accessories



Proteomika zdola – Kvantifikace proteinů / peptidů

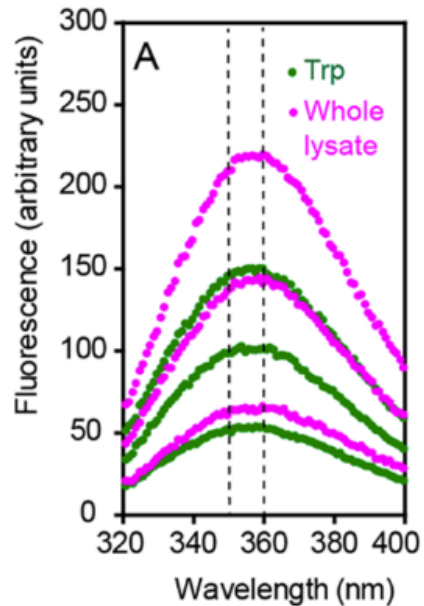
- Kvantifikace proteinů
 - výpočet množství enzymu potřebného pro štěpení proteinů
- Kvantifikace peptidů
 - kontrola výtěžku po štěpení
 - určení objemu vzorku pro nástřik do LC-MS/MS
 - zásadní pro kvantifikační analýzy, kde je třeba přesně nastavit ekvivalentní množství peptidů mezi porovnávanými vzorky
- Kolorimetrická stanovení často interferují s chemikáliemi přítomnými v pufrch potřebných pro lýzi, jako jsou detergenty nebo redukční činidla
 - např. Bradford – nekompatilní s SDS; BCA – nekompatibilní s DTT, β -ME, EDTA.*
- Fluorimetrické metody
 - Proteiny obsahují tři různé aromatické aminokyseliny obsahující benzenové, fenolové či indolové jádro. Každá z těchto skupin může být excitována UV světlem.

Fluorescence tryptofanu

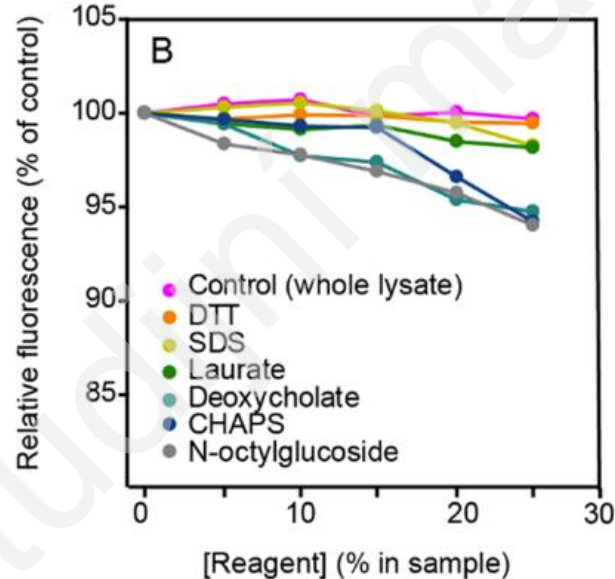
- vysoce citlivá k mikroprostředí, např. polaritě solventu
- zhasena mnoha chemikáliemi přítomnými v pufrch, např. detergenty
- závislá na teplotě a pH

Stanovení koncentrace proteinu / peptidu na základě fluorescence tryptofanu (WF)

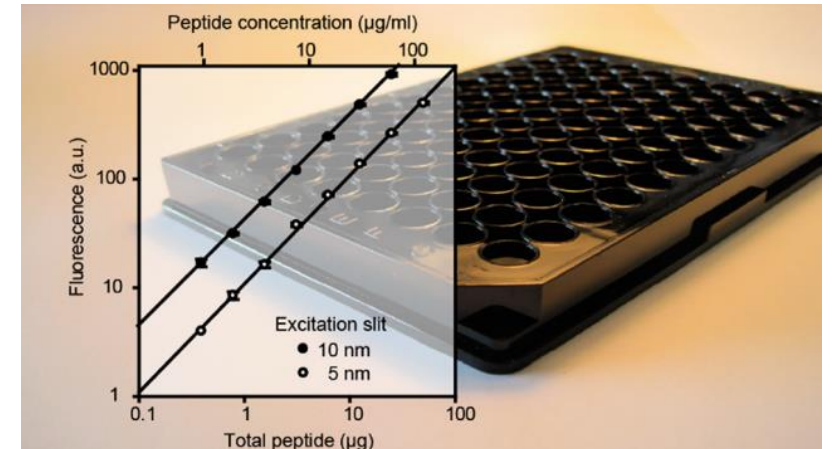
- většina detergentů v koncentraci používaných v solubilizačních pufrch zhasí fluorescenci
- Kvantifikace Trp – nízká interakce detergentů s proteiny v pufru obsahujícím 8 M močovinu, indolová skupina Trp je volně exponována do roztoku; $E_{m_{max}} = 350 \text{ nm}$
- Vhodné pro vysoce komplexní vzorky, méně pro proteinové / peptidové frakce
- pracovní koncentrace 0.05 - 25.0 $\mu\text{g/mL}$



Emisní spektra celobuněčného lyzátu (6, 12, a 18 μg celkového proteinu) a čistého tryptofanu (0.05, 0.1, a 0.15 μg) ve 2 mL 8 M močoviny a 10 mM Tris-HCl, pH 7.8.

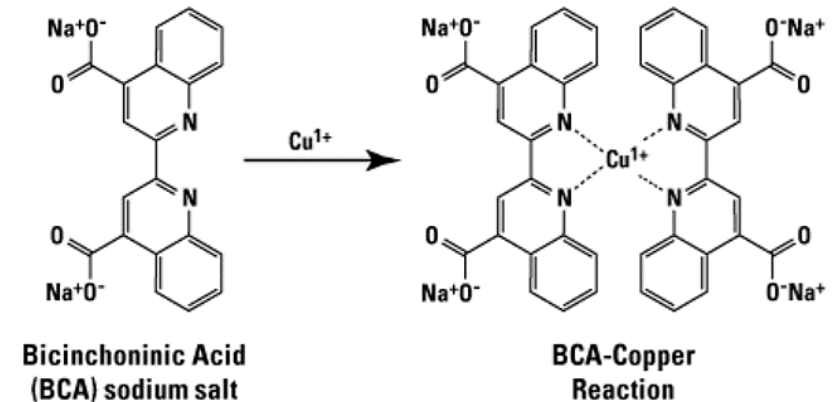
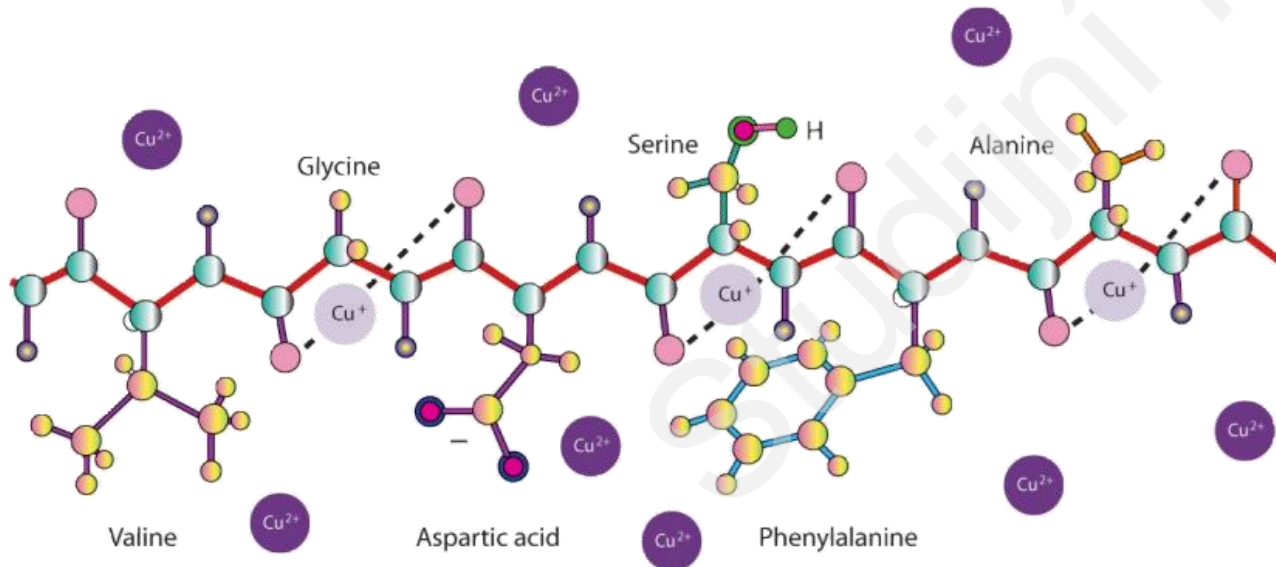


Zhášecí efekt detergentů a DTT. Koncentrace detergentů odpovídá koncentraci v 2 μL roztoku přidaného do 2 mL 8 M močoviny.



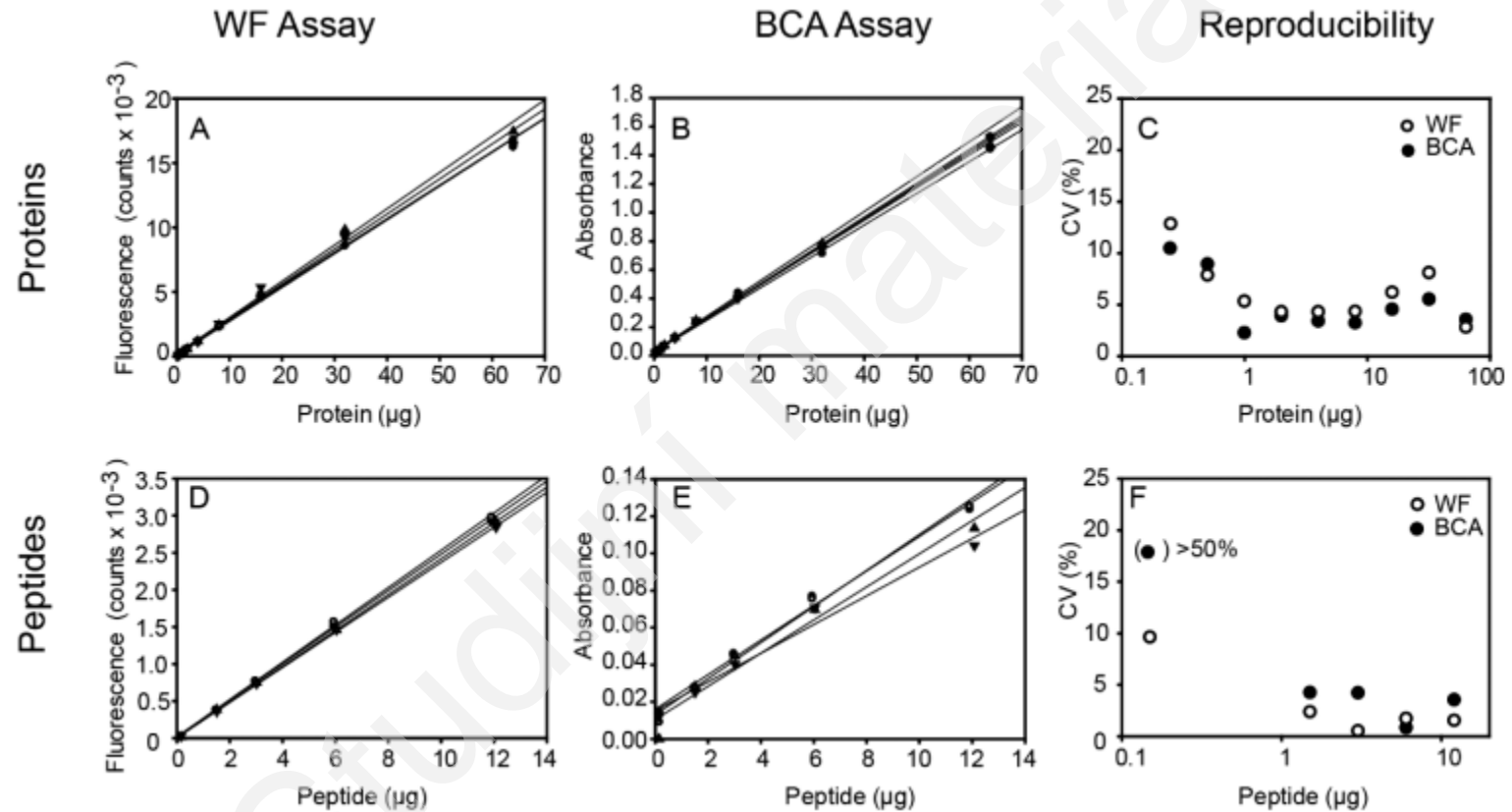
Stanovení koncentrace proteinu / peptidu pomocí MicroBCA kitu

- kolorimetrická detekce a kvantifikace celkového proteinu / peptidu
- vhodné i pro méně komplexní vzorky
- pracovní koncentrace 0.5-20.0 $\mu\text{g/mL}$
- kompatibilní s detergenty
- nekompatibilní s reduktanty a chelatanty (DTT, β -ME, EDTA...)
- Proteinový roztok je smíchán v alkalickém prostředí s ionty Cu^{2+} , které jsou po chelataci peptidickou vazbou redukovány na Cu^{1+} . Cu^{1+} jsou následně chelatovány 2 molekulami BCA za vzniku fialového produktu, který absorbuje při 562nm.



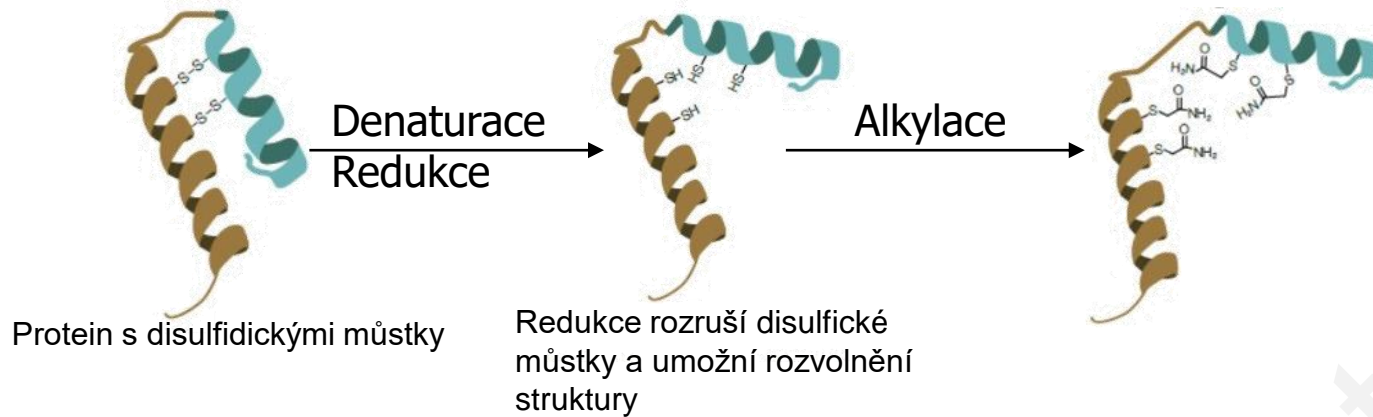
WF vs. MicroBCA

- Obě metody vysoce citlivé se srovnatelnou reprodukovatelností pro stanovení proteinu v lyzátu
- WF lepší reprodukovatelnost při stanovení peptidů, zejména v nižších koncentracích

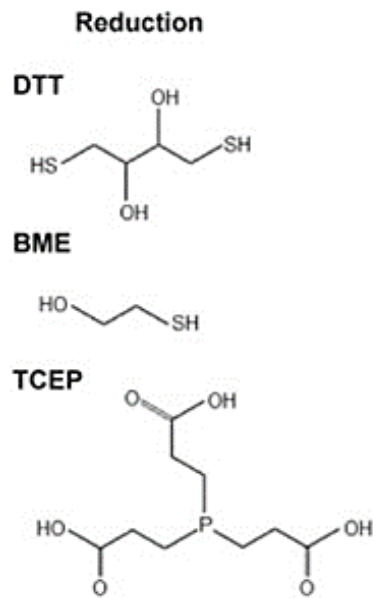


Wisniewski et al., 2015, 87(8):4110-6

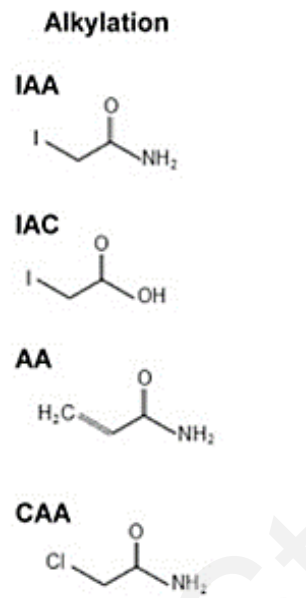
Redukce a alkylace proteinů



- Disulfidické můstky v proteinu jsou ireverzibilně rozrušeny.
- Tato chemická modifikace zlepšuje identifikaci proteinů s vysokým obsahem disulfidických můstků, ale také vyšší výtěžek peptidů a vyšší sekvenční pokrytí.
- Nekompletní redukce / alkylace může ovlivnit kvalitativní i kvantitativní výsledky.
- Nechtěná alkylace "over-alkylation" = alkylace nethiolových skupin
N-terminální ak > k. asparagová > k. glutamová > histidin > asparagin > lysin > tyrosin

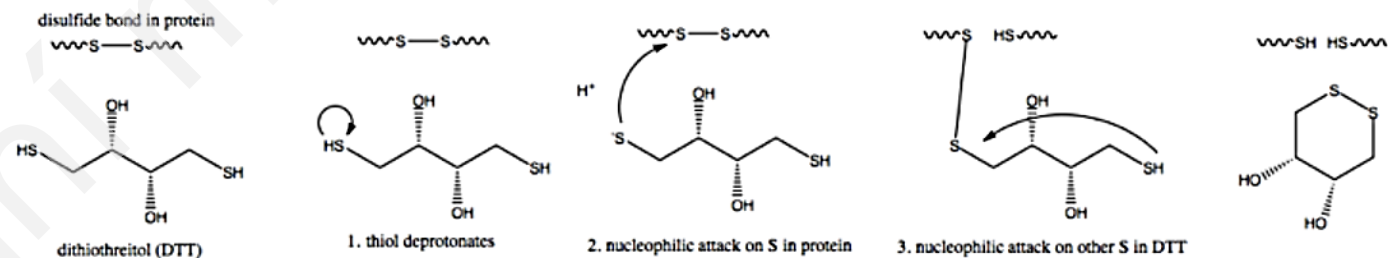


DTT – Dithiothreitol
TCEP – tris-(2-carboxyethyl)-phosphine
BME – β-mercaptoethanol

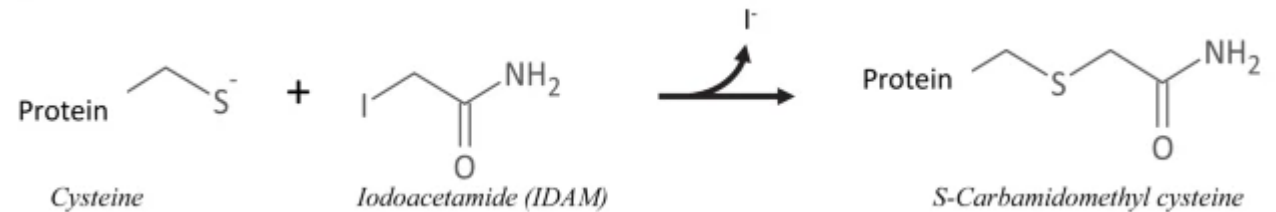


IAA – iodoacetamide
IAC – iodoacetic acid
AA – acrylamide
CAA – chloroacetamide

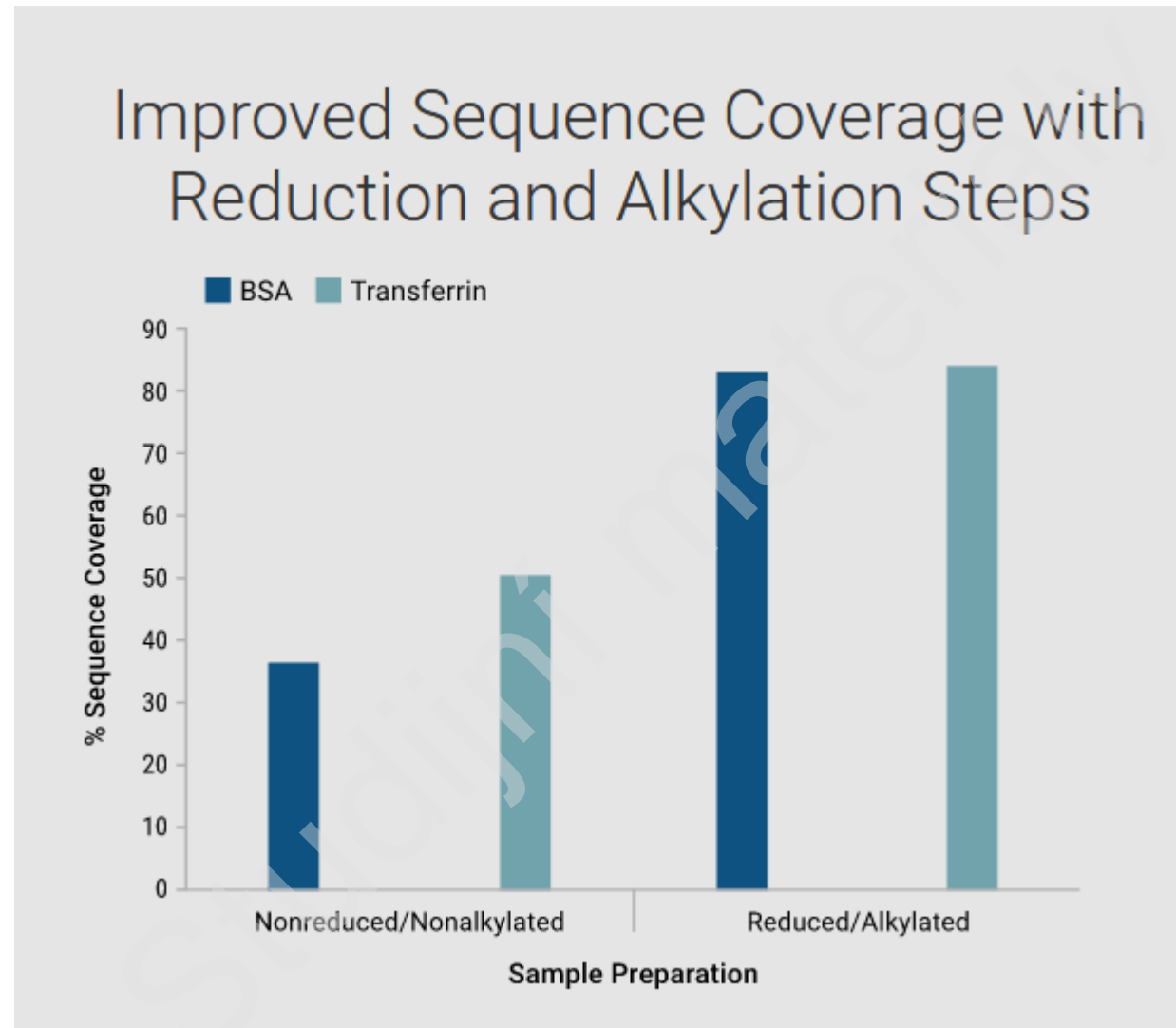
R



A



Redukce a alkylace proteinů



Promega datasheet

Enzymatické štěpení proteinů

TPCK Trypsin: štěpí z karboxy-konce K a R; blokována autolýza

SOLu-Trypsin: dodáván v roztoku, stabilní 1 měsíc při 4°C

SOLu-Trypsin Dimethylated: dodáván v roztoku, stabilní 1 měsíc při 4°C; blokována autolýza

Rapid Digestion Trypsin: štěpení 1 h při 70°C

Platinum Trypsin: bez nespecifické proteolytické aktivity; rezistentní vůči autolýze

LysC: štěpí z karboxy-konce K

Glu-C (V-8 Protease): štěpí z karboxy-konce E (v uhličitanovém či acetátovém pufru)
štěpení může probíhat za E i D (ve fosfátovém pufru)

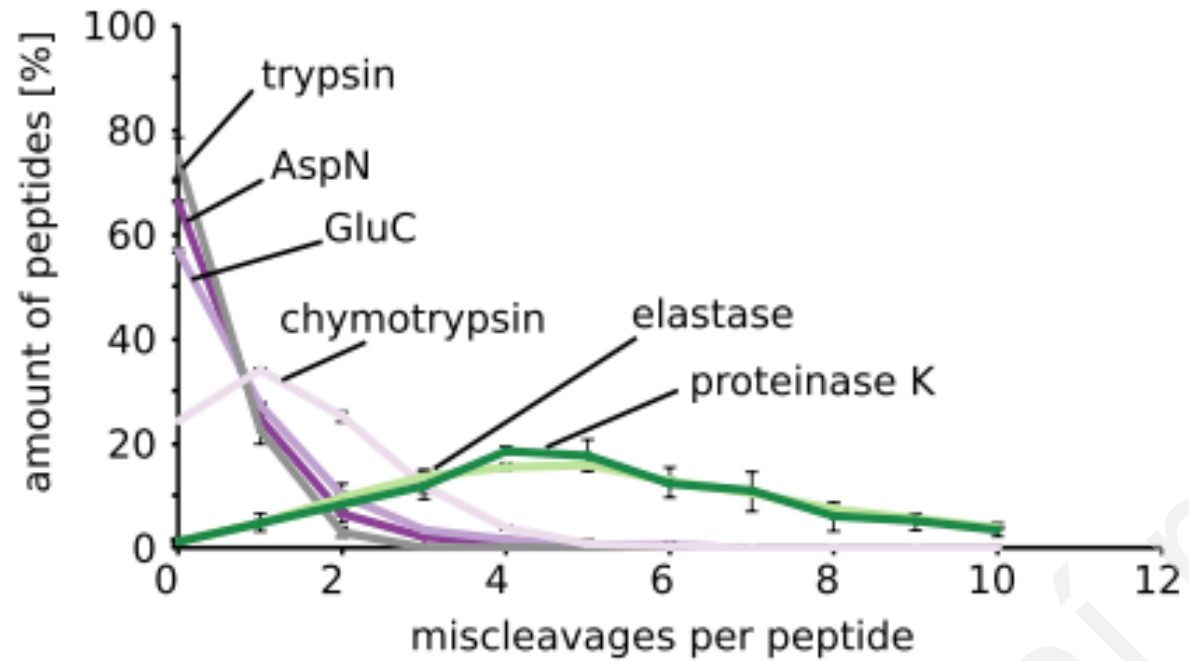
Asp-N: štěpí z N-konce D

Chymotrypsin: štěpí z karboxy-konce aromatických kyselin - Y, F, W a L.

Thermolysin: štěpí z N-konce L, F, V, I, A, M při 65–85°C

ProAlanase: štěpí z karboxy-konce P a A

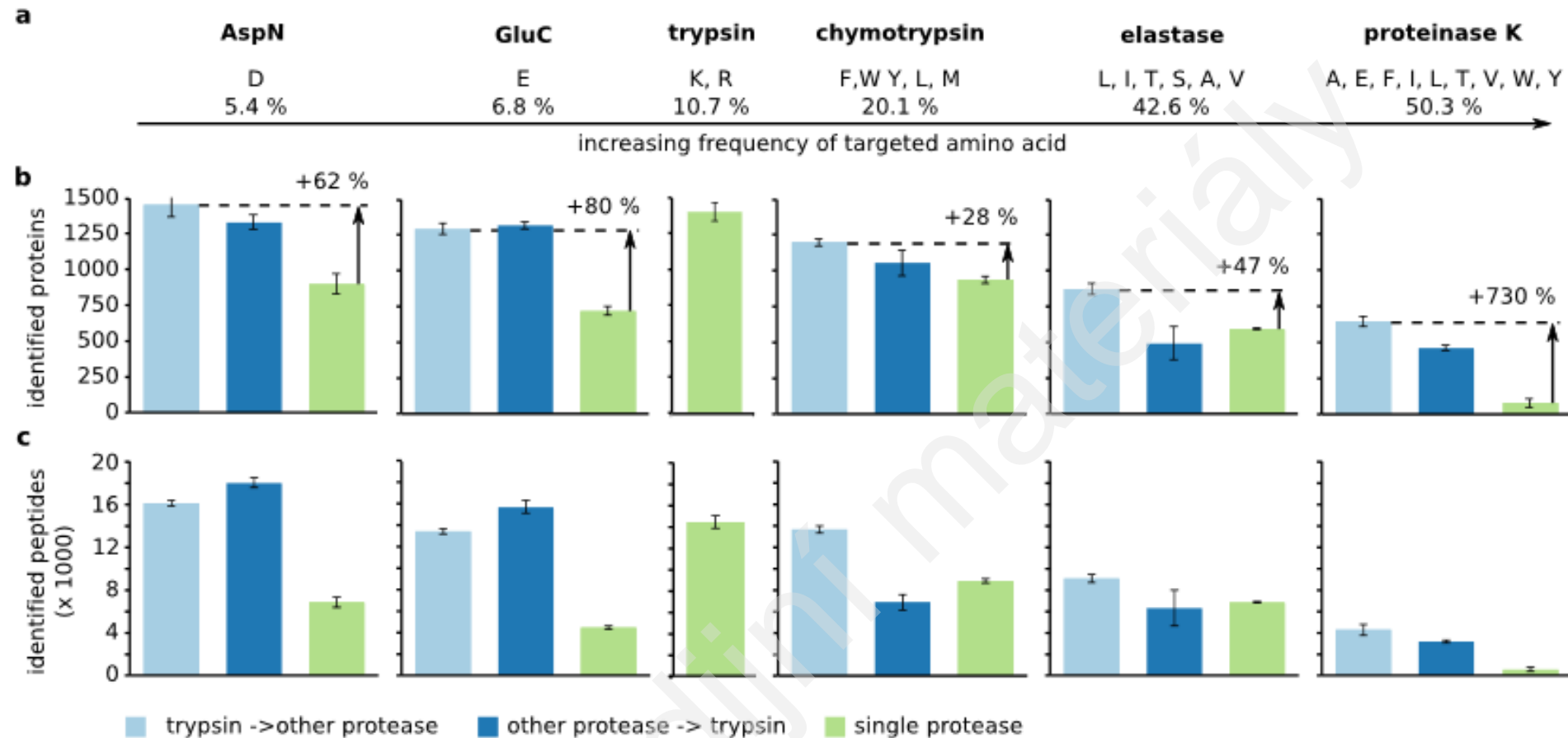
Enzymatické štěpení proteinů – alternativní proteázy



Anal. Chem. 2020, 92, 9523–9527

Studijní materiály

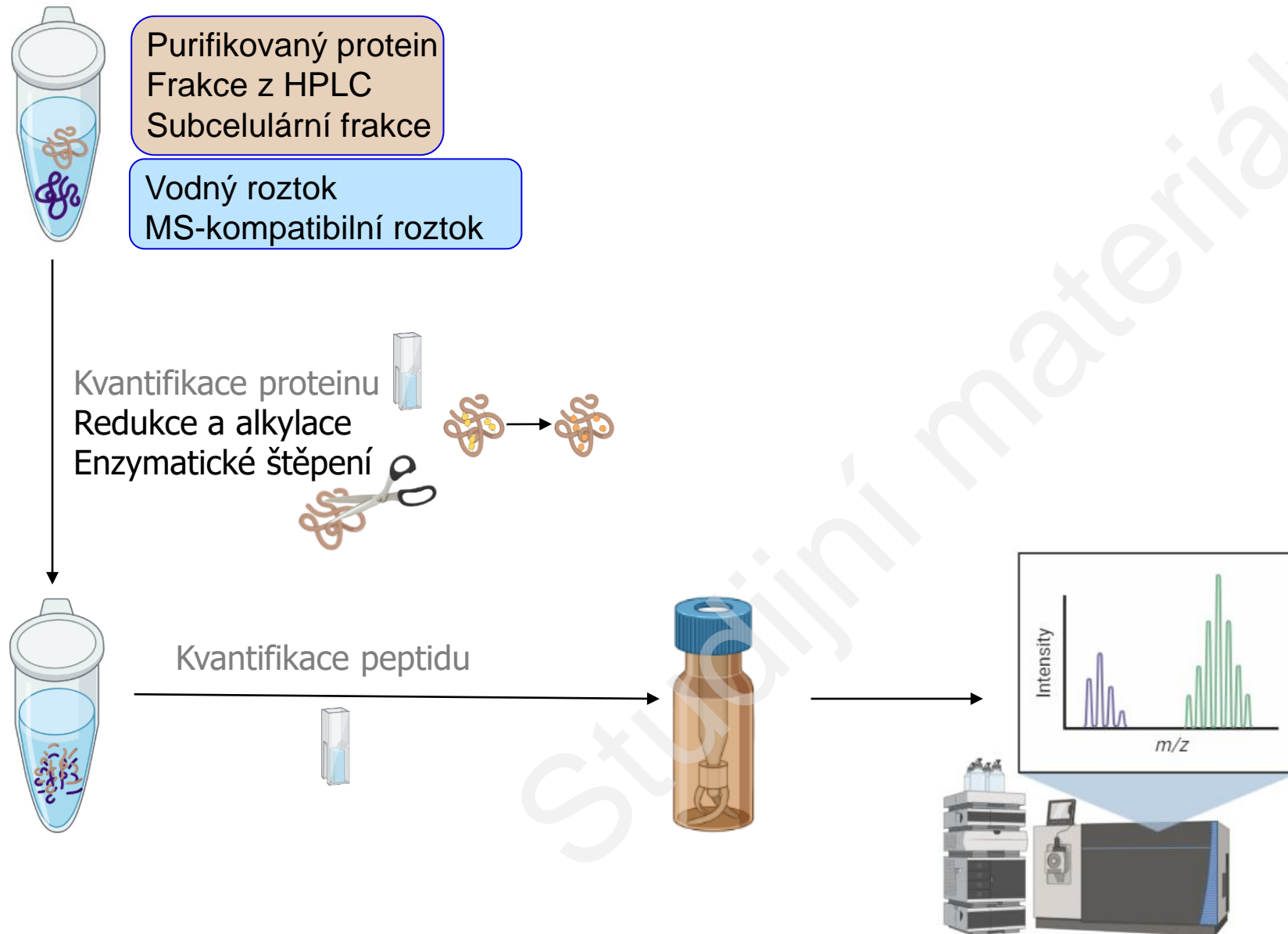
Sekvenční štěpení



Anal. Chem. 2020, 92, 9523–9527

- trypsin – v proteomice proteáza první volby
- specifické studie mohou využít sekvenčního štěpení alternativní proteázy s trypsinem
- specifické studie mohou využít alternativní proteázy

Proteomika zdola– Postup pro jednoduché proteinové vzorky

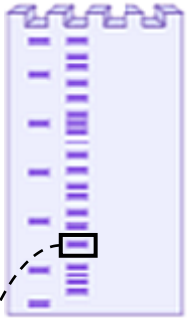


Proteomika zdola – Postup pro štěpení v gelu



Buňky
Tkáně
Biologické tekutiny

Solubilizační pufr obsahující
SDS/DTT



Promytí gelu
Dehydratace

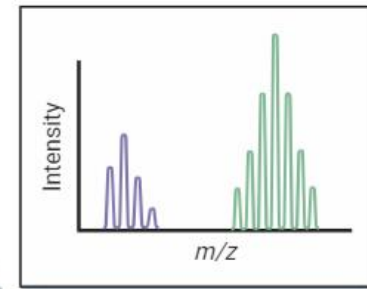
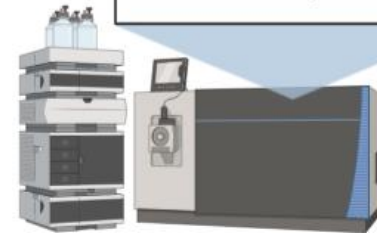


Redukce a alkylace

Hydratace
Enzymatické
štěpení v gelu



Extrakce
peptidů



- 1-D nebo 2-D gel – **MS-kompatibilní** vizualizace
- Vstup enzymu do gelu je usnadněn **dehydratací** acetonitrilem a následnou rehydratací pufrům s proteázou (**difúze**).
- Menší kousky gelu – vyšší účinnost štěpení v gelu
- Relativně vysoká koncentrace enzymu
- **Kyselá extrakce peptidů** (50% acetonitril/2.5% k. mravenčí) v kombinaci se **sonikací**.
- Výhoda: kontaminanty (např. detergenty, soli) odstraněny již během elektroforézy
- Nevýhoda: omezená účinnost vzhledem k nízké přístupnosti proteázy do gelu a málo efektivní extrakce naštěpených peptidů z gelové matrice.

Proteomika zdola – Postup pro komplexní vzorky



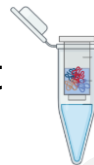
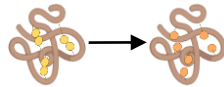
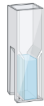
Buňky
Tkáně
Biologické tekutiny

Solubilizační roztok obsahující
detergenty, chaotropní činidla, soli

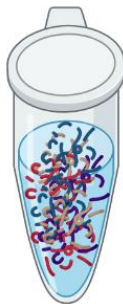
Kvantifikace proteinu

Redukce a alkylace

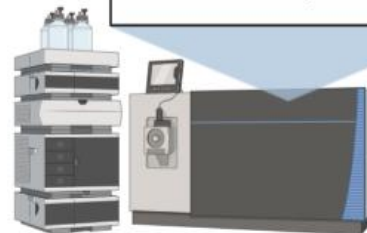
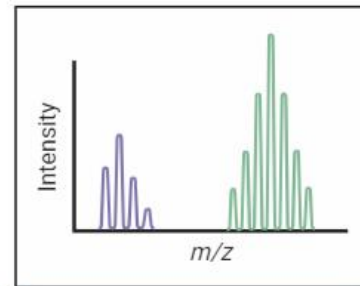
Přečištění proteinu (odstranění kontaminant
nekompatibilních s MS)



Enzymatické
štěpení



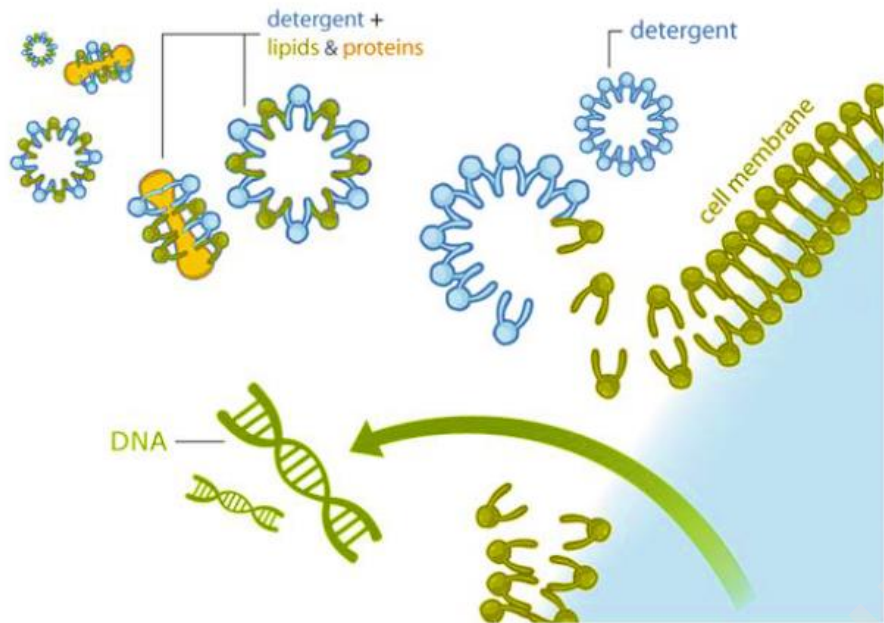
Kvantifikace
peptidu



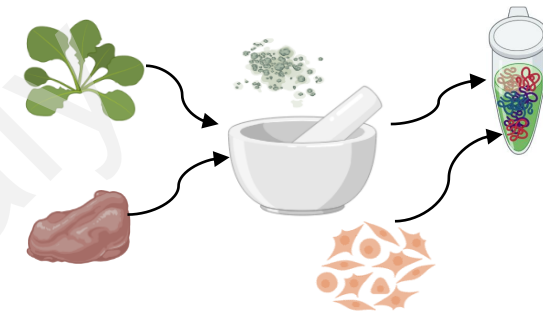
Solubilizace vysoce komplexních vzorků a přečištění

Homogenizace v SDT pufru

4% SDS, 0.1M DTT, 0.1M Tris-HCl pH 7.6



Homogenizace / Lýze



- Proteinový prášek / Buňky přeneseny do zkumavky s horkým **SDT** puftrem.
- Homogenizace podpořena v Bioruptoru, **fragmentace DNA**.
- Kompletní solubilizace proteinů zajištěna inkubací při **95°C, 2h**.
- Přečištění a enzymatické štěpení:
Filter-Aided Sample Preparation (**FASP**)
Single-Pot Solid-Phase-enhanced Sample Preparation (**SP3**)
Suspension Trapping (**S-Trap**)
- Dodatečné přečištění:
Ethylacetate extraction (**EE**)

Kritická micelární koncentrace (CMC)

$c < CMC$ – detergenty se vyskytují jako monomery

$c > CMC$ – molekuly detergentu jsou organizovány do micel, které zajišťují solubilizaci.

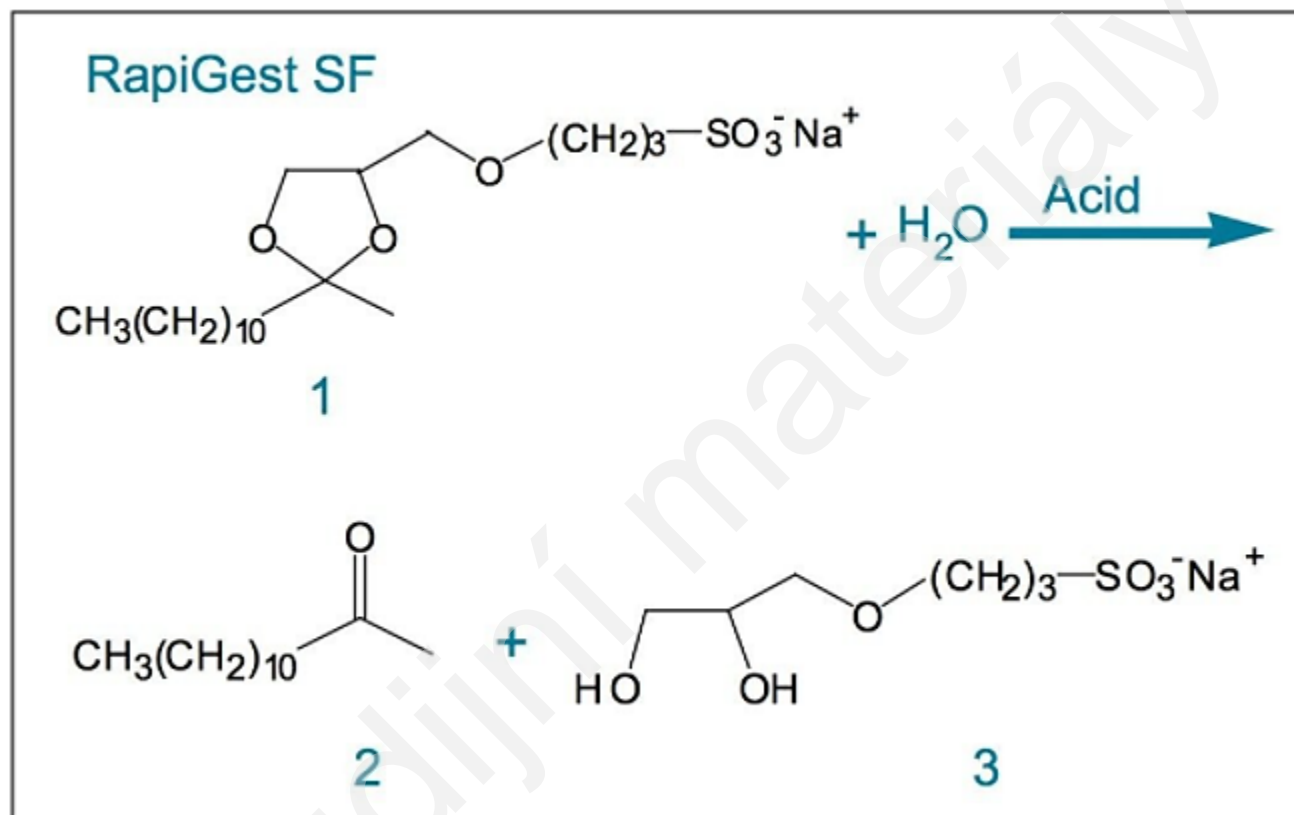
Vzhledem k velikosti, micely SDS a směsné micely s SDS nemůžou být separovány od solubilizovaných proteinů ultrafiltrací. V metodě FASP zajišťuje koncentrovaný roztok močoviny disociaci micel.

Role SDS v proteomických přístupech

- Usnadnění solubilizace
- Přítomnost SDS napomáhá štěpení membránových proteinů
- Potlačení enzymové aktivity během štěpení
- Ovlivnění reverzně-fázové kapalinové chromatografie a její povrchové aktivity – SDS naruší separaci peptidů (posun retenčních časů)
- Potlačení ionizace (MS spektra SDS dominují vzhledem k vysoké schopnosti ionizace, vysoké koncentraci a tvorbě signálů aduktů SDS-peptidy).

Možná řešení:

- Odstranění SDS (precipitace proteinu, kolonové přístupy, dialýza, ...).
- MS-kompatibilní alternativy k SDS (např. štěpitelné surfaktanty: ProteaseMAX, **RapiGest**, PPS Silent Surfactant, octyl β -D-glucopyranosid, n-dodecyl β -D-maltosid, and digitonin)



Přečištění proteinu: Filter-Aided Sample Preparation

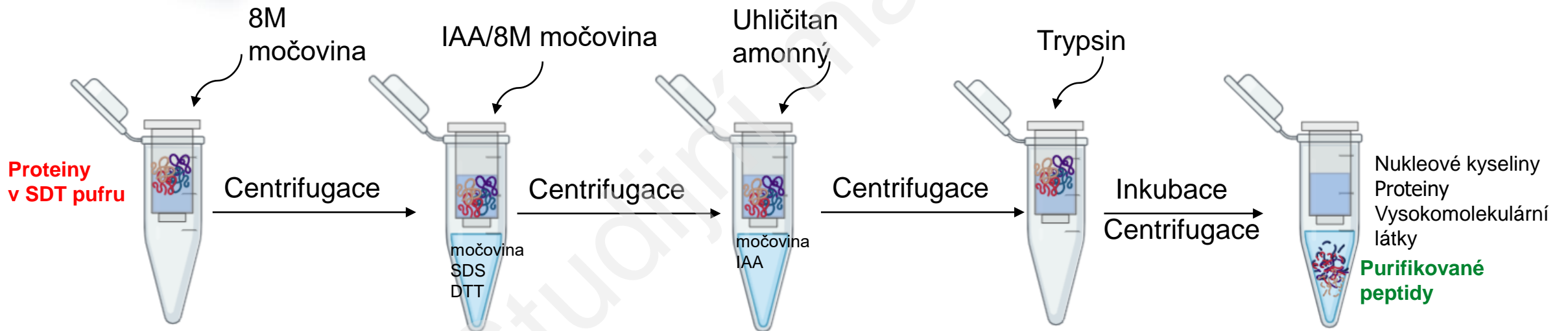
- Vynikající efekt pro vzorky o koncentraci proteinů 25 až 100 µg

MWCO „molecular weight cut-off“

Molekula o dané velikosti (Da) zadržena membránou s 90% účinností



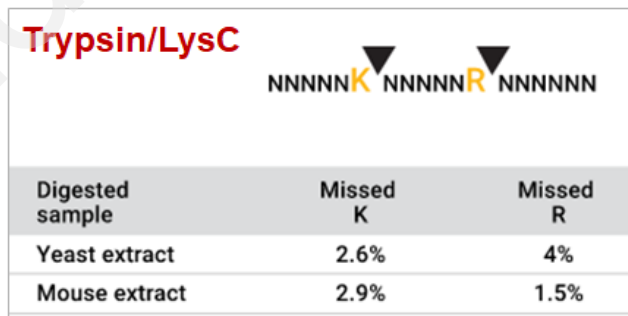
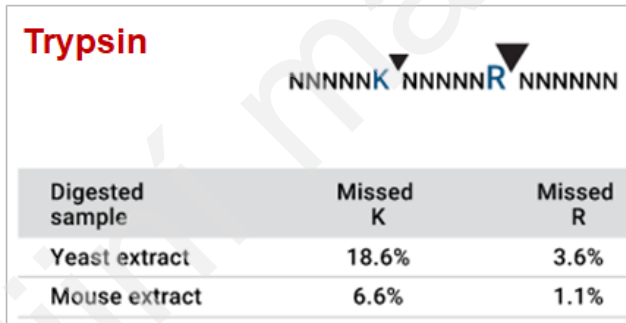
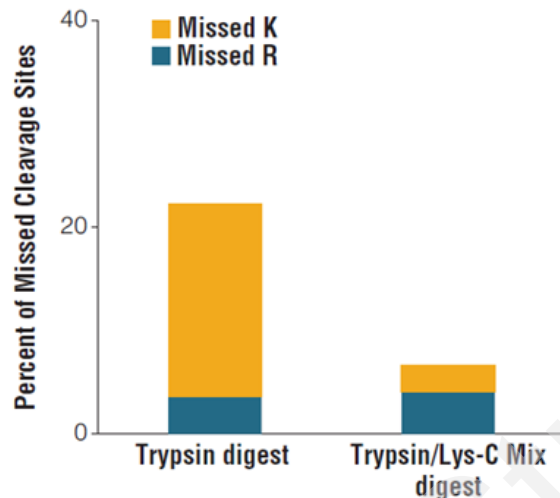
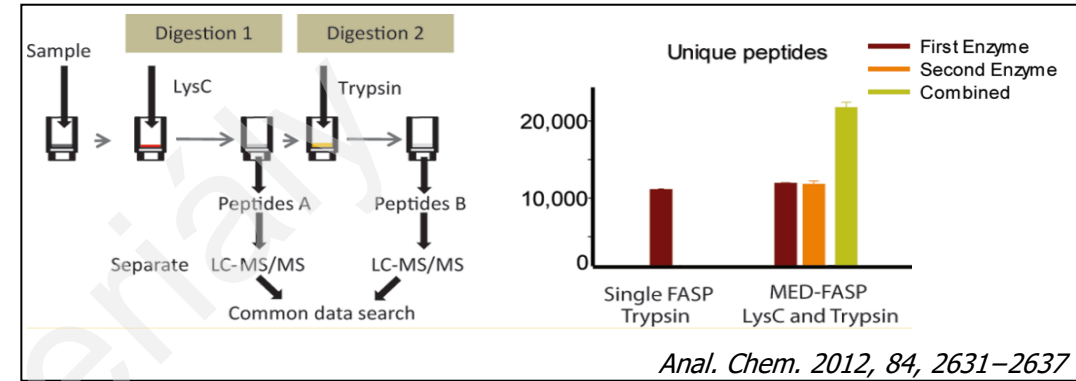
← ultrafiltr



Nature Methods 6, 359 - 362 (2009)

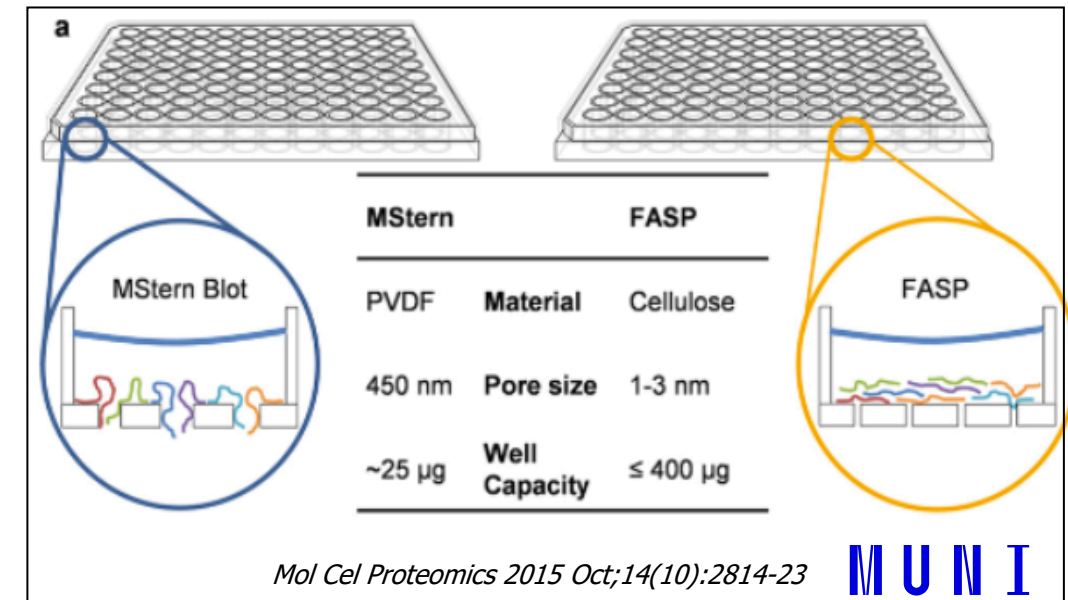
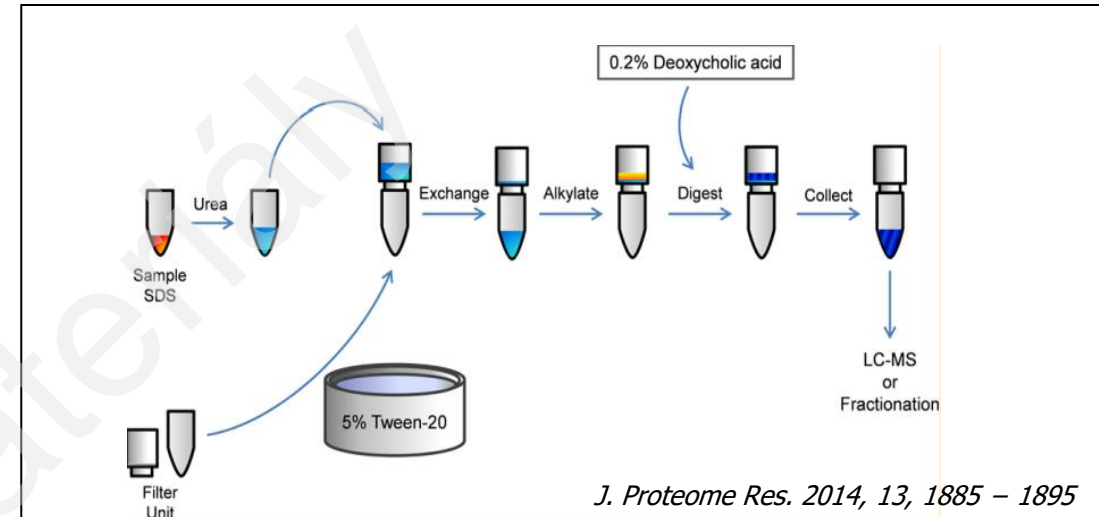
Přečištění proteinu: varianty FASP

- multienzyme digestion (MED) FASP (*Anal. Chem.* 2012, 84, 2631–2637)
 - sekvenční štěpení proteinu více enzymy
 - vyšší počet proteinových identifikací a vyšší pokrytí sekvence
 - vyšší počet identifikovaných fosforylovaných míst

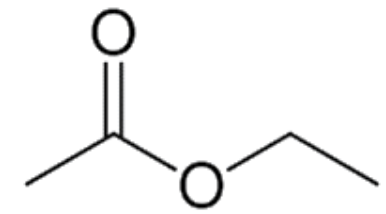


Přečištění proteinu: varianty FASP

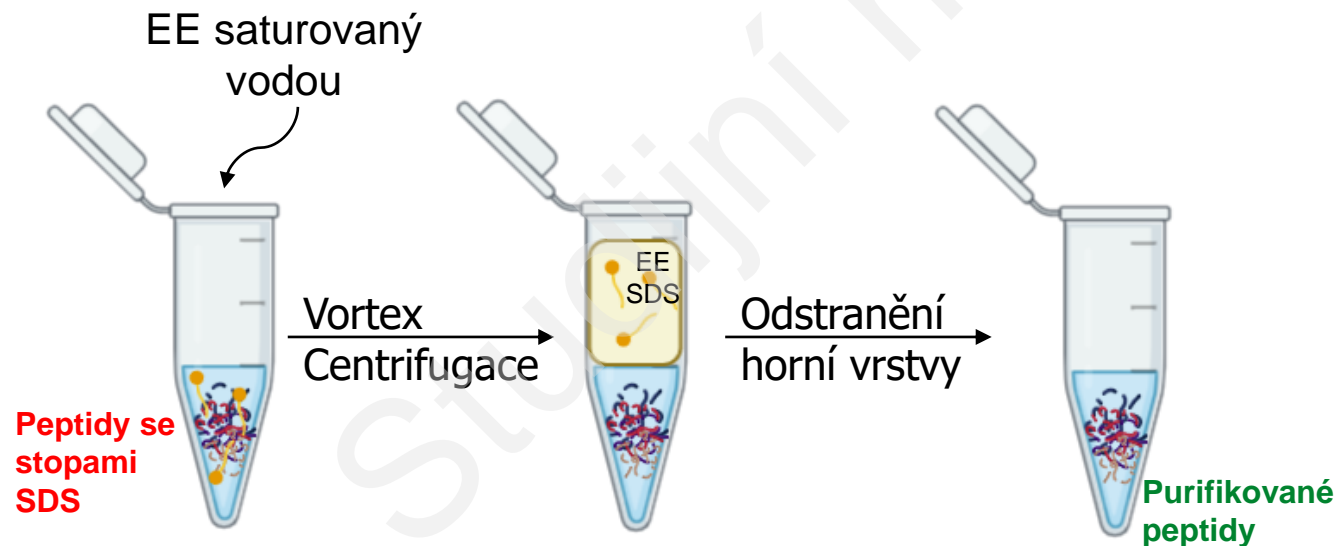
- **enhanced FASP (eFASP)** (*J. Proteome Res. 2014, 13, 1885 – 1895*)
 - pasivace povrchu membrány 5% TWEEN-20 a využití surfaktantu (0.2% k. deoxycholová) během štěpení za účelem zvýšení výtěžku peptidů.
- **96-jamkový formát pro zpracování „high-throughput“**
 - destičky s 10 MWCO membránou; nevýhoda: nízký přenos kapaliny během centrifugace (*Proteomics 2013, 13, 2980–2983*)
 - MStern-blot (MStern) – destičky s polyvinyliden fluoridovou membránou (PVDF) s velkými póry, která efektivně adsorbuje proteiny; rychlý přenos kapaliny přes membránu pomocí vakua. (*Mol Cell Proteomics 2015 Oct;14(10):2814-23*)
 - polyethersulfonová (PES) filtrační membrána umožňuje využití 10% isopropanolu (IPA) jako smáčecího činidla, což vede k 50% redukci času pro výměnu pufru. IPA redukuje povrchové napětí mezi vodnou vrstvou a membránou. Kvůli přítomnému alkoholu dochází ke snížení CMC detergentů, ta je přesto dále ještě snížena přidávkem močoviny. (*PLoS ONE 2017, 12(7): e0175967*)



Přečištění peptidů: Ethylacetátová extrakce (EE)



- Ethylacetát
 - vysoce volatilní
 - málo rozpustný ve vodě
 - účinné rozpouštědlo pro většinu detergentů (octylglucosid, SDS, Triton X-100, NP-40....)
- EE extrakce
 - dvoucestný proces: přechod hydrofobních molekul do organické fáze z vodné fáze, a přechod hydrofilních molekul z organické fáze do vodné fáze
 - extrakční rozpouštědlo musí být vysoce čisté
 - skleněné zkumavky a pipety omyté v kyselině pro uchování EE
 - polypropylenové či polyethylenové zkumavky a pipety mohou být použity pouze krátkodobě pro extrakci
 - pětinasobný objem EE oproti objemu peptidového vzorku
 - selektivní ztráta peptidů (např. větší peptidy)



hustota (g/mL)

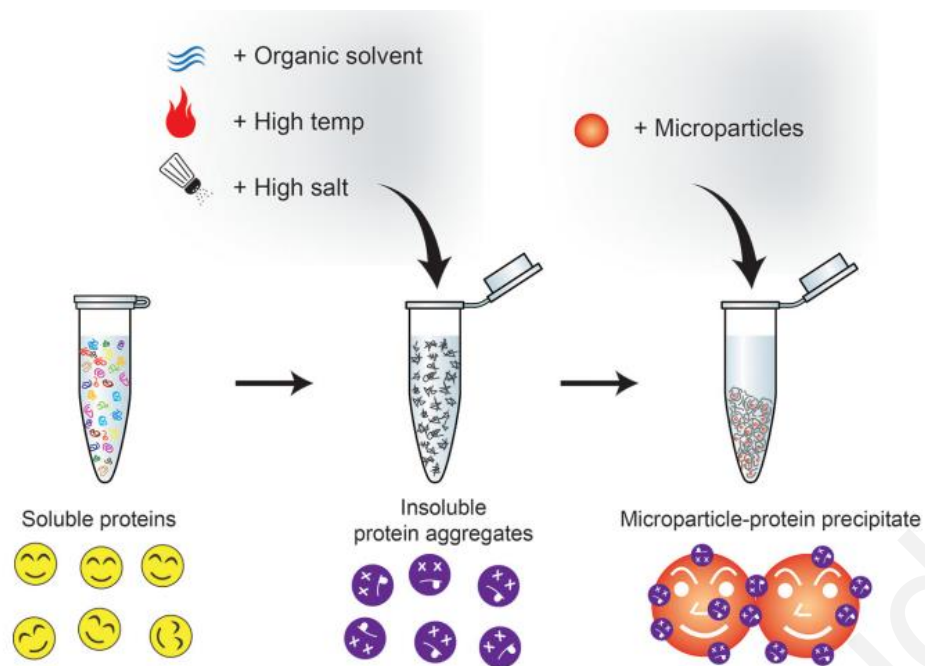
EE	0.902
voda	0.998

Alternativní metody pro štěpení / přečištění

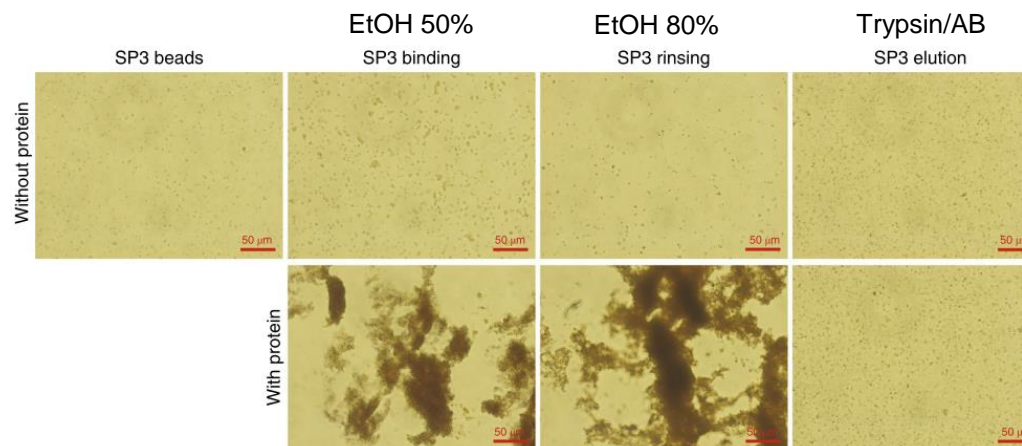
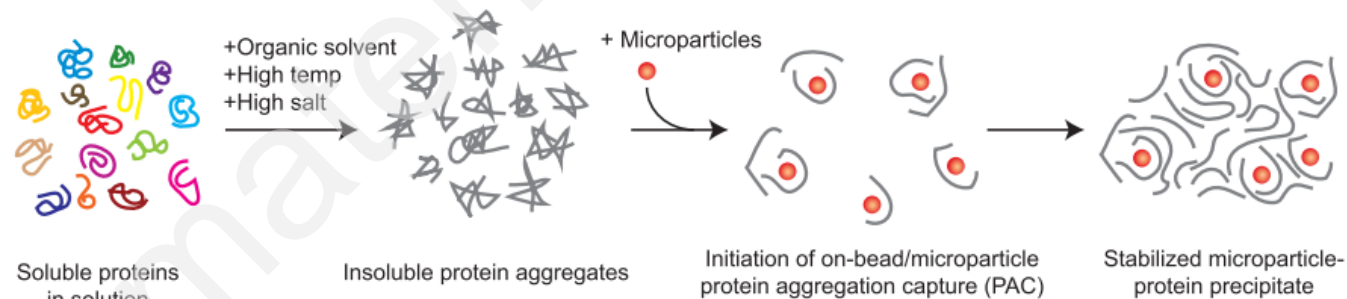
„Protein Aggregation Capture (PAC)“ na mikročasticích s různým chemickým povrchem

– mechanismus využívající nespécifickou immobilizaci precipitovaných a agregovaných proteinů na částicích s různým povrchem

(*Mol Cell Proteomics* 18: 1027–1035, 2019)



(*Mol Cell Proteomics* 18: 1027–1035, 2019)



← Shluknutí kuliček →

Nature protocols JANUARY 2019 | 68 – 85

MUNI
SCI

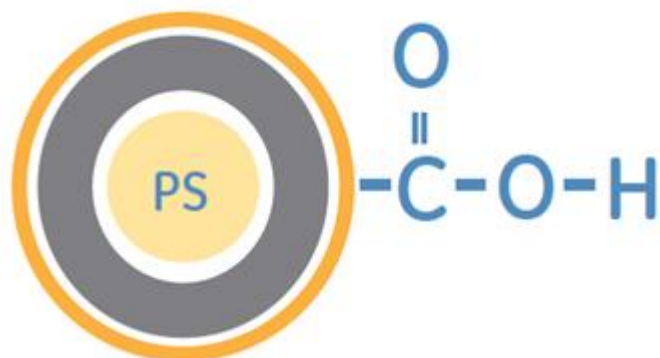
Alternativní metody pro štěpení / přečištění

Single-Pot Solid-Phase-enhanced Sample-Preparation (SP3)

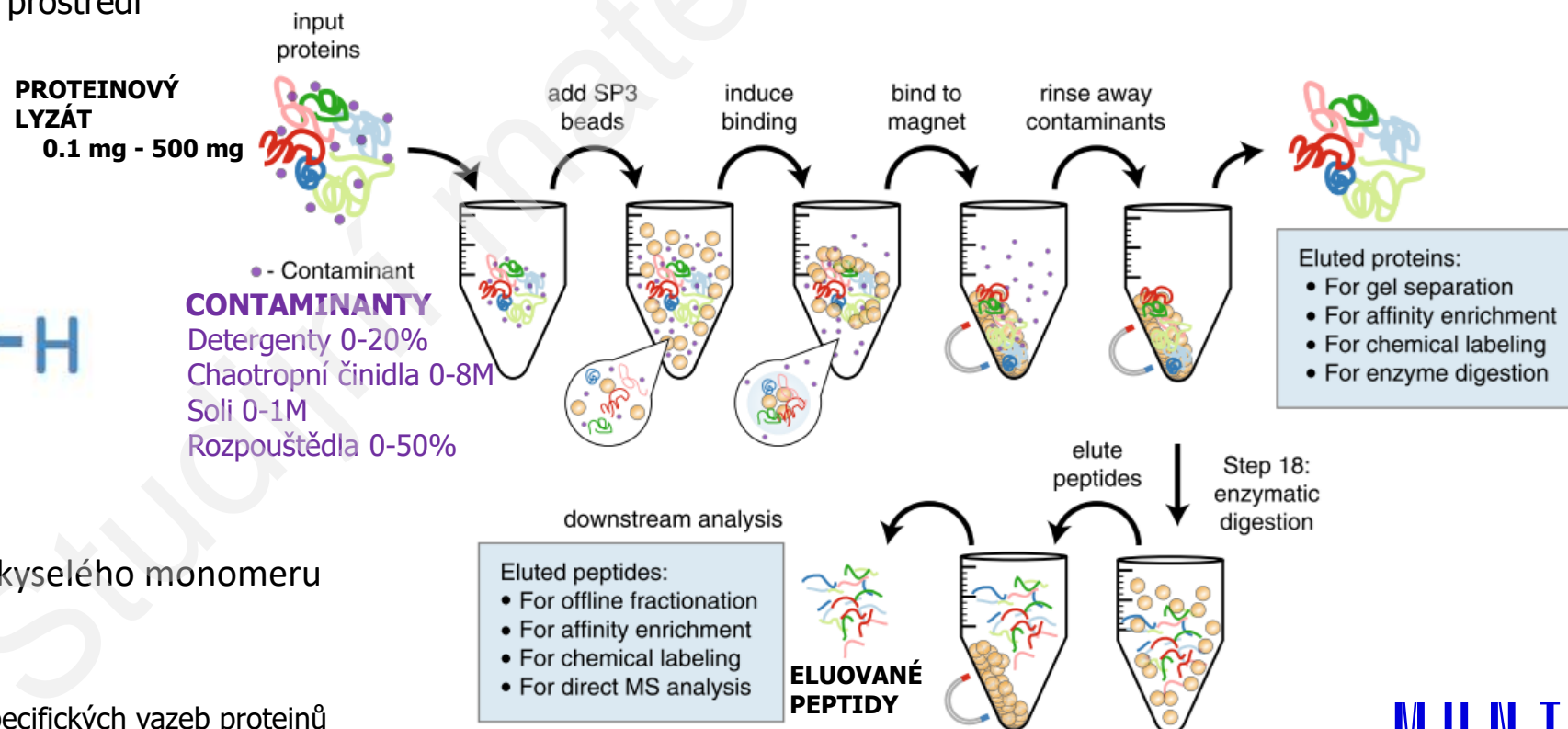
- přístup založený na využití paramagnetických kuliček
- využívá mechanismus PAC pro výměnu nebo odstranění kontaminant (např. detergenty, chaotropní činidla, soli, pufrů, kyseliny, rozpouštědla)
- neselektivní vazba proteinů a promývací kroky, které umožňují využití solvatační vrstvy tvořené rozhraním ethanol-voda na povrchu paramagnetických kuliček
- eluce purifikovaných proteinů ve vodném prostředí



SeraMag beads

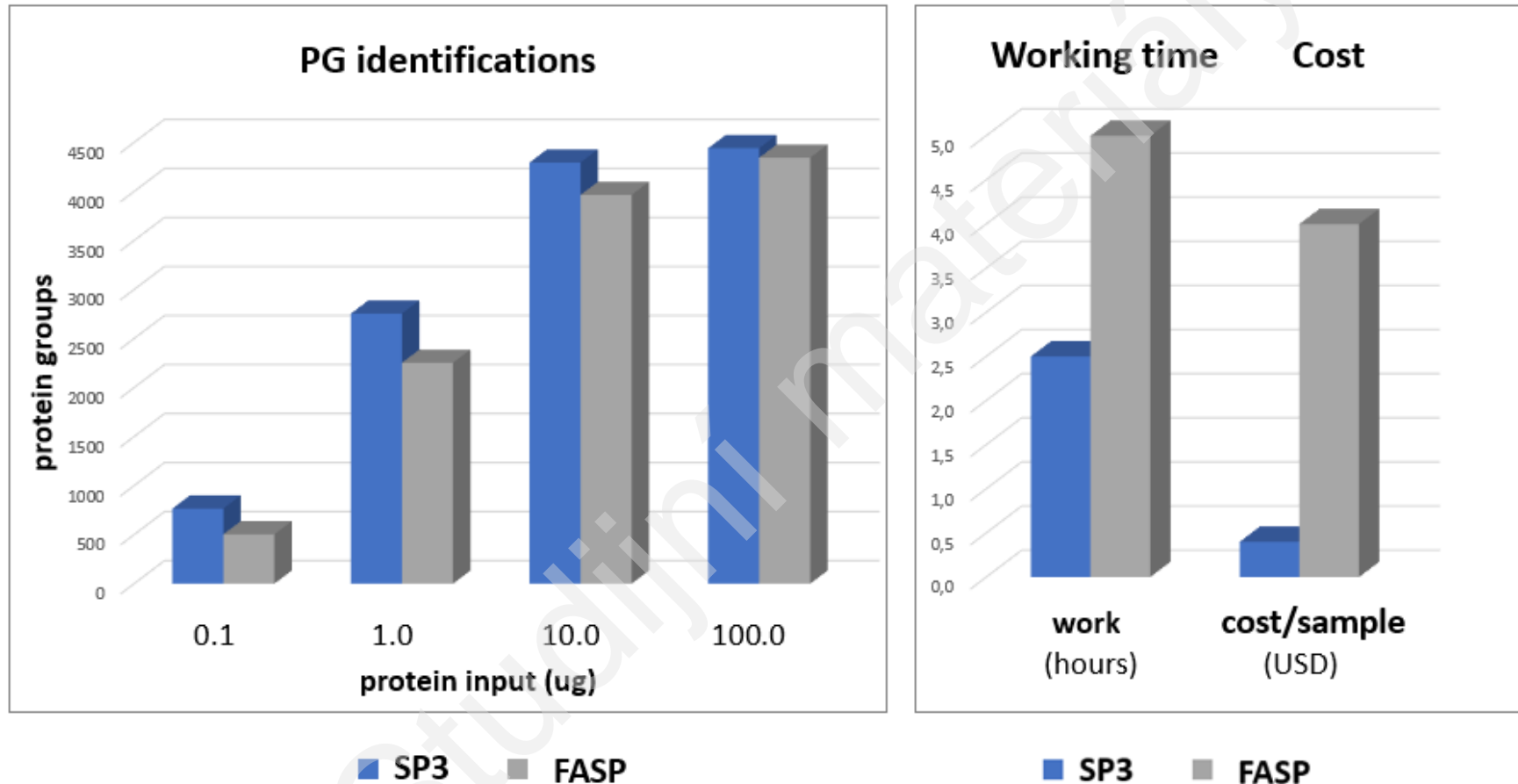


- polystyrenové jádro
polymerace volných radikálů styrenu a kyselého monomeru
- Vrstva magnetitu
- Karboxalovaný povrch polymeru
povrch je modifikován za účelem potlačení nespecifických vazeb proteinů



(Nature protocols JANUARY 2019 | 68 – 85)

SP3 vs. FASP



Přečištění peptidů: SP2

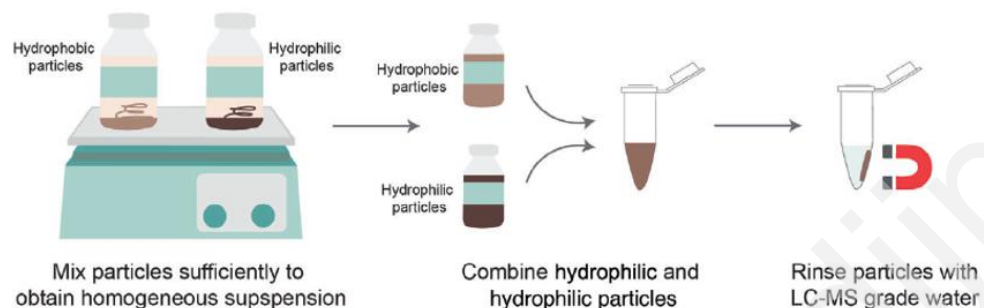
RP-LC C18

- účinný pro odstranění solí a zakoncentrování peptidů
- dostupný v různorodých provedeních (např. Stage-Tips, Sep-Pak Cartridges, Micro SpinColumns)
- nicméně, C18 neodstraní polymerní sloučeniny jako polyethylen glycol (PEG) ani běžné detergenty, (např. NP-40, SDS, Triton X), spíše dojde k jejich zakoncentrování.

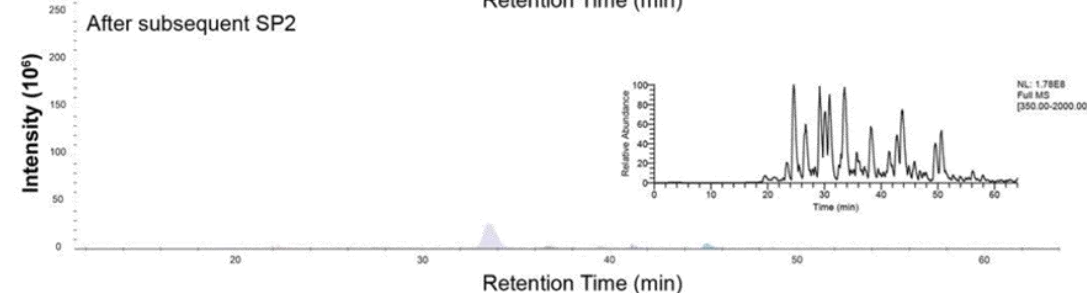
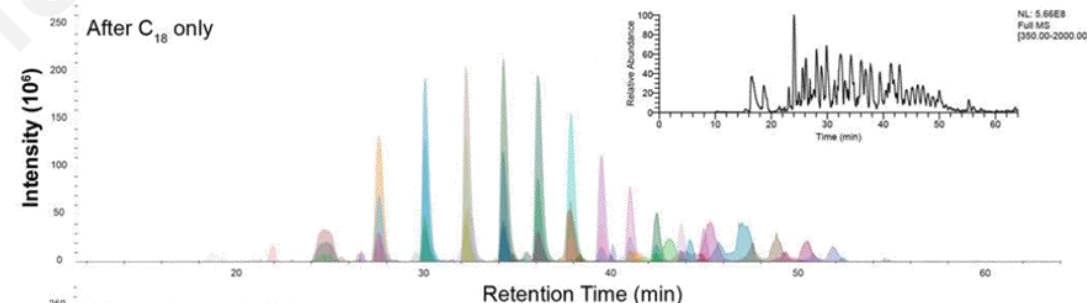
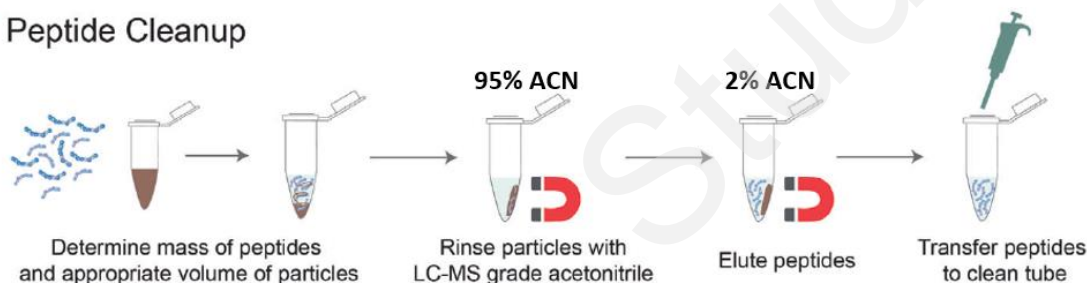
SP2

- nižší vazebná kapacita pro peptidy než pro proteiny:
50 ng jednoduché peptidové směsi/ μg částic, 200 ng komplexní peptidové směsi/ μg částic
X 100 μg proteinové směsi/ μg částic
- vhodná metoda pro odstranění široké škály kontaminant; (nevhodná např. pro odstranění Tris)
- pro dlouhé, hydrofobní peptidy či peptidy s negativní nábojem je SP2 reprodukovatelnější než C18

1 Particle Preparation **Sera-Mag SpeedBeads Carboxylate-Modified Particles**



2 Peptide Cleanup



J Proteome Res. 2019 April 05; 18(4): 1644–1656.

Magnetické stojánky

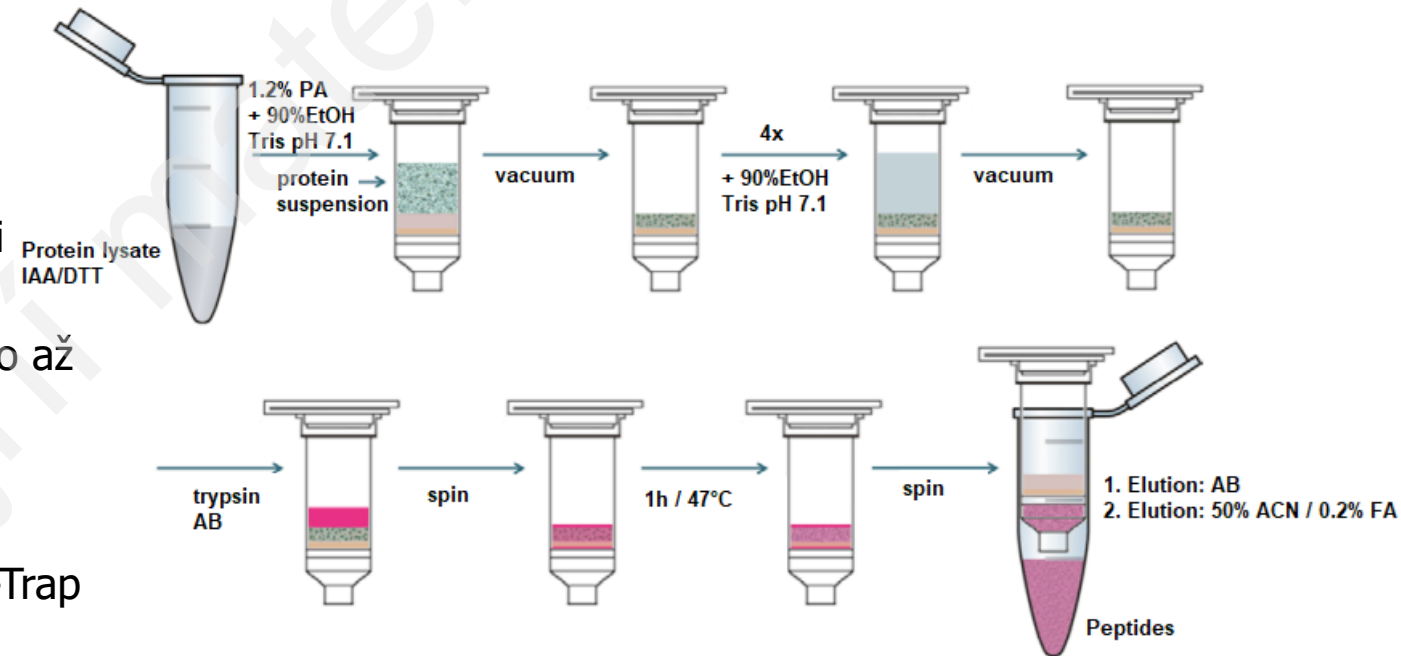


Alternativní metody pro štěpení / přečištění

Suspension trapping (STrap)

- momentální tvorba jemné suspenze proteinů solubilizovaných v SDS, která je zachycena skleněným filtrem
- agregace suspenze minimalizovaná přidávkem směsi protein–SDS do ethanolického roztoku v neutrálním pH
- monomery SDS jsou solubilní v ethanolickém roztoku a filtrovány společně s ostatními kontaminantami

- Lýze a solubilizace v 5% SDS
- Denaturace proteinu okyselením na pH < 1 a následně přidávkem vysoké koncentrace ethanolu
- Tyto tři stupně denaturace zajišťují kompletní inaktivaci enzymů jako jsou proteázy a fosfatázy
- redukce a alkylace může být provedena v 5% SDS nebo až na koloně po denaturaci a záchytu proteinové směsi



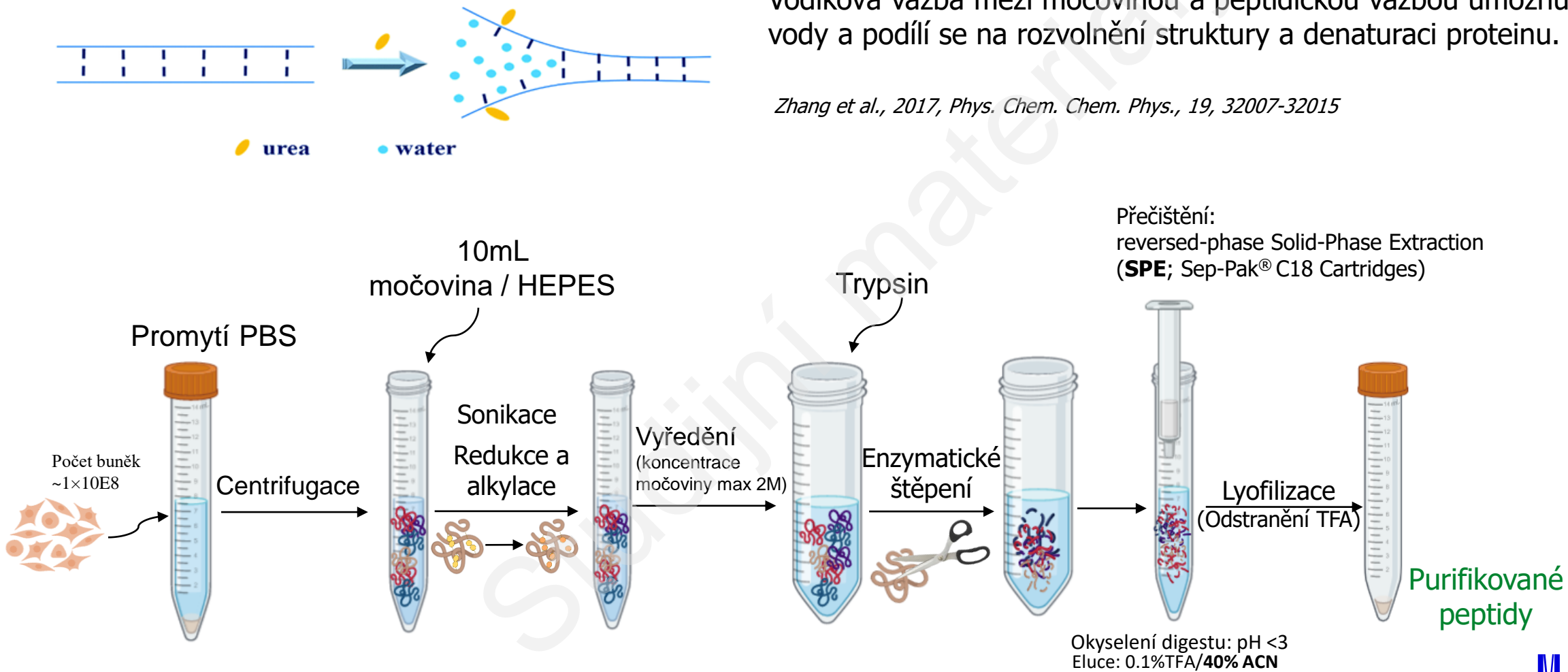
- denaturované, nenaštěpené proteiny jsou vázány na S-Trap pomocí centrifugace či vakua
- Mnohočetné slabé interakce zadržují nenaštěpené proteiny uvnitř pórů upravené siliky S-Trap
- Zachycené proteiny se vyznačují maximální povrchovou plochou, která umožňuje promytí od kontaminant během několika minut: detergenty, PEG, glycerol, soli, Laemmli pufr, etc.

Solubilizace vysoce komplexních vzorků pro obohacení PTM

Homogenizace v pufru s močovinou
9M močovina, 20mM HEPES pH 8.0

Vodíková vazba mezi močovinou a peptidickou vazbou umožňuje vstup vody a podílí se na rozvolnění struktury a denaturaci proteinu.

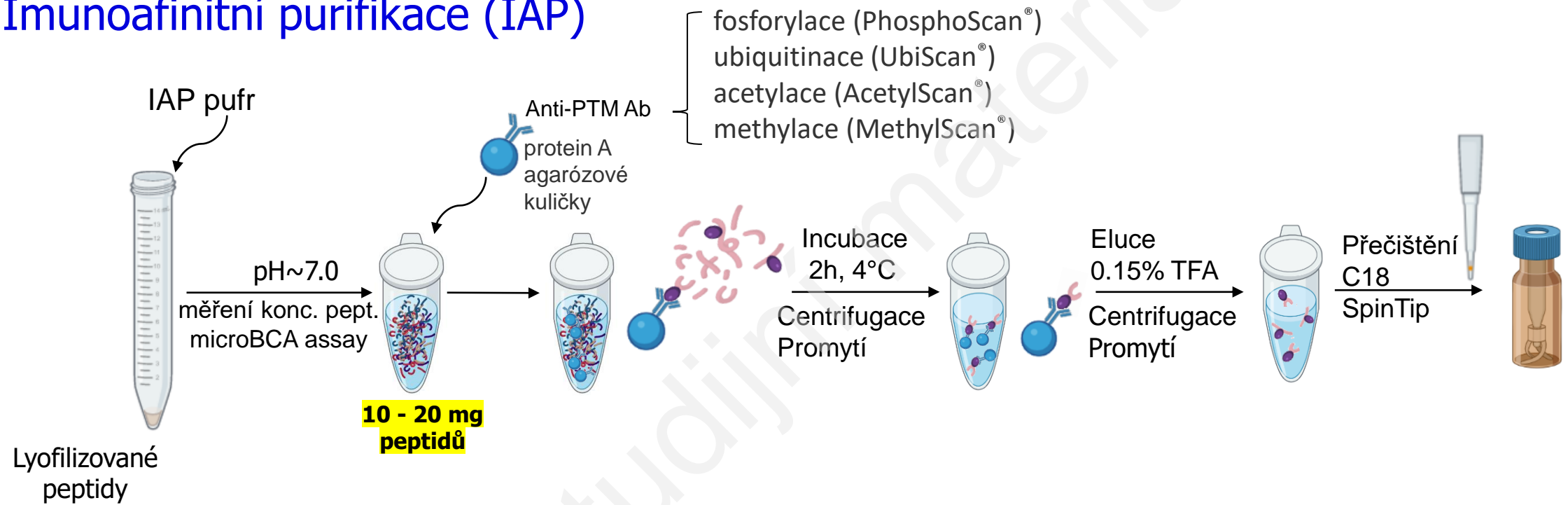
Zhang et al., 2017, Phys. Chem. Chem. Phys., 19, 32007-32015



Obohacení PTM

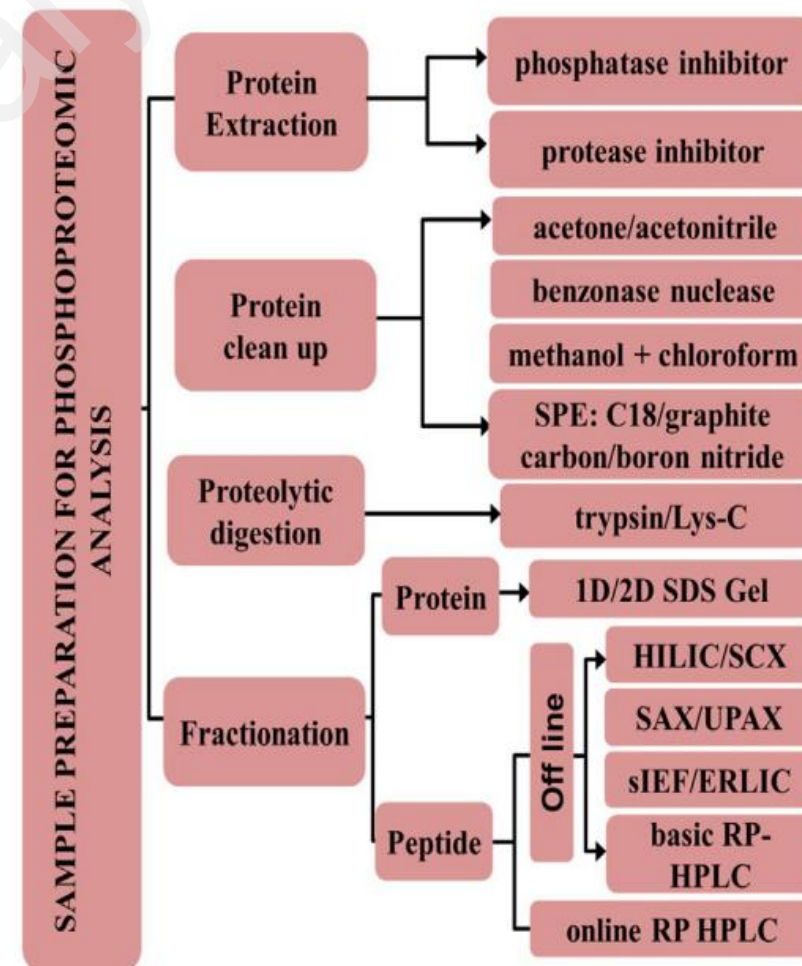
PTMScan® Technology (Cell Signaling Technology) – obohacení posttranslačně modifikovaných peptidů imunoprecipitací s využitím specifické protilátky vázané na kuličky, s návazností na kvantitativní analýzu pomocí LC-MS/MS.

Imunoafinitní purifikace (IAP)



Fosfoproteomika

- převážně založena na proteomice zdola (bottom-up)
- fosforylace probíhá na jednom či více místech a může se vyskytovat společně s dalšími PTM, čímž jsou definovány tzv. proteoformy.
- fosfopeptidy jsou nízkoabundantní relativně vůči svým nefosforylovaným protějškům
- fosfopeptidy mají tendenci k nízké ionizační účinnosti vzhledem k
 - (i) fosfátové skupině, která snadno ztrácí proton a nese negativní náboj
 - (ii) pozadí pocházejícího z nadbytku přítomných nefosforylovaných peptidů
- techniky pro analýzu fosfo-serinových/threoninových míst (pSer/pThr) se významně zdokonalily, ale analýza tyrosinových (pTyr) míst je stále náročná kvůli minoritnímu zastoupení (řádově nižší výskyt oproti pSer/pThr)



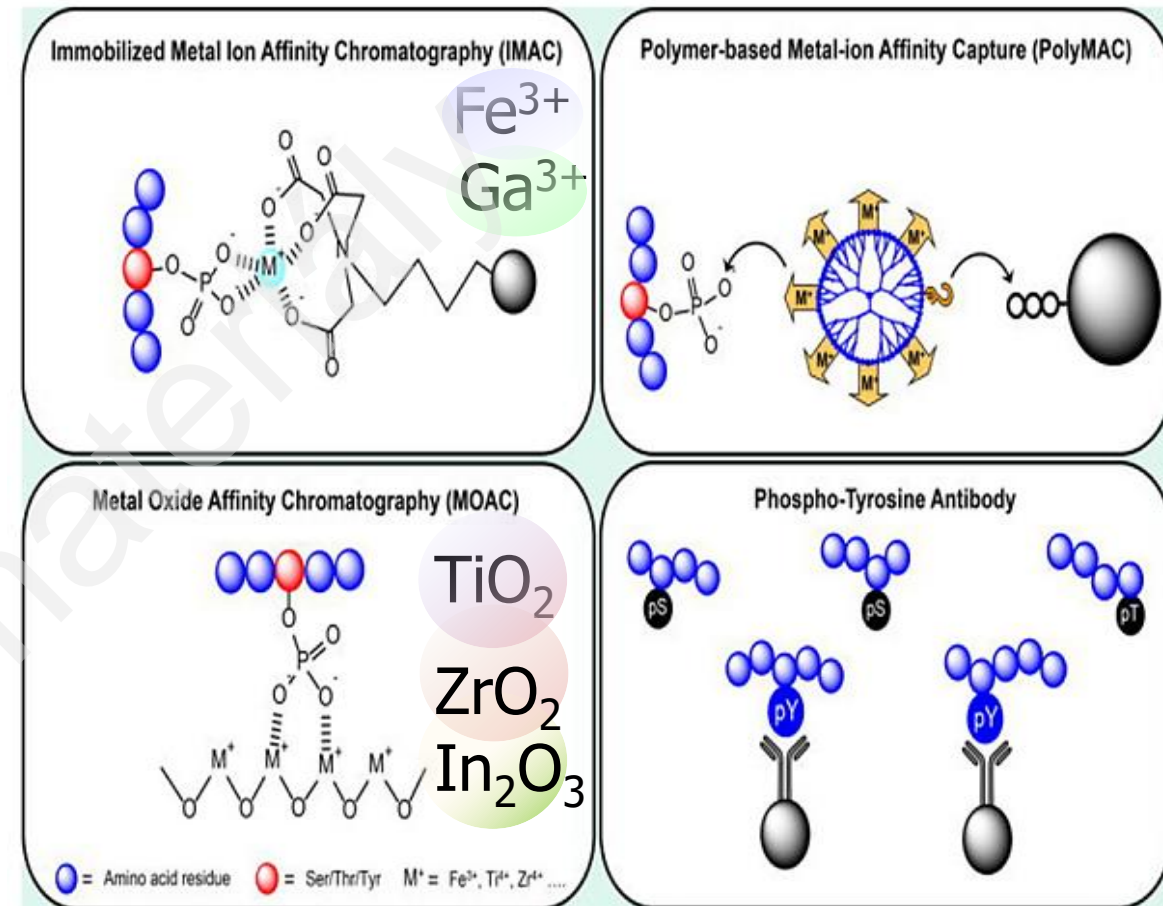
Analytica Chimica Acta 1129 (2020) 158e180

MUNI
SCI

Fosfoproteomika

Afinitní obohacení fosfopeptidů

- selektivní vazba negativně nabitých fosfátových skupin peptidů na ion kovu či oxid kovu nebo s využitím Ab
- Eluce z IMAC či MOAC uvolněním negativně nabitého fosfátu alkalickým puřem
- IMAC vede k lepší detekci multi-p-peptidů, zatímco obohacení na TiO_2 vede k vyššímu počtu identifikací mono-p-peptidů kvůli obtížnější disociaci (nekompletní eluci) multi-p-peptidů
- Obohacení pomocí TiO_2 : vyšší selektivita a specifita, robustnost, amfoterní iontoměničový charakter, tolerance vůči mnoha reagentům (stabilní v širokém rozmezí pH)
- Různá konfigurace MOAC- TiO_2 : spin kolonky, analytické kolony, miniaturní kolony, nanočástice, ma, ...
- pTyr – minoritní frakce p-proteomu; pro selektivní obohacení využívány anti-Tyr Ab (nízká reprodukovatelnost, nízká citlivost, omezená dostupnost, omezená dostupnost velkého množství vstupního materiálu, vysoká cena)

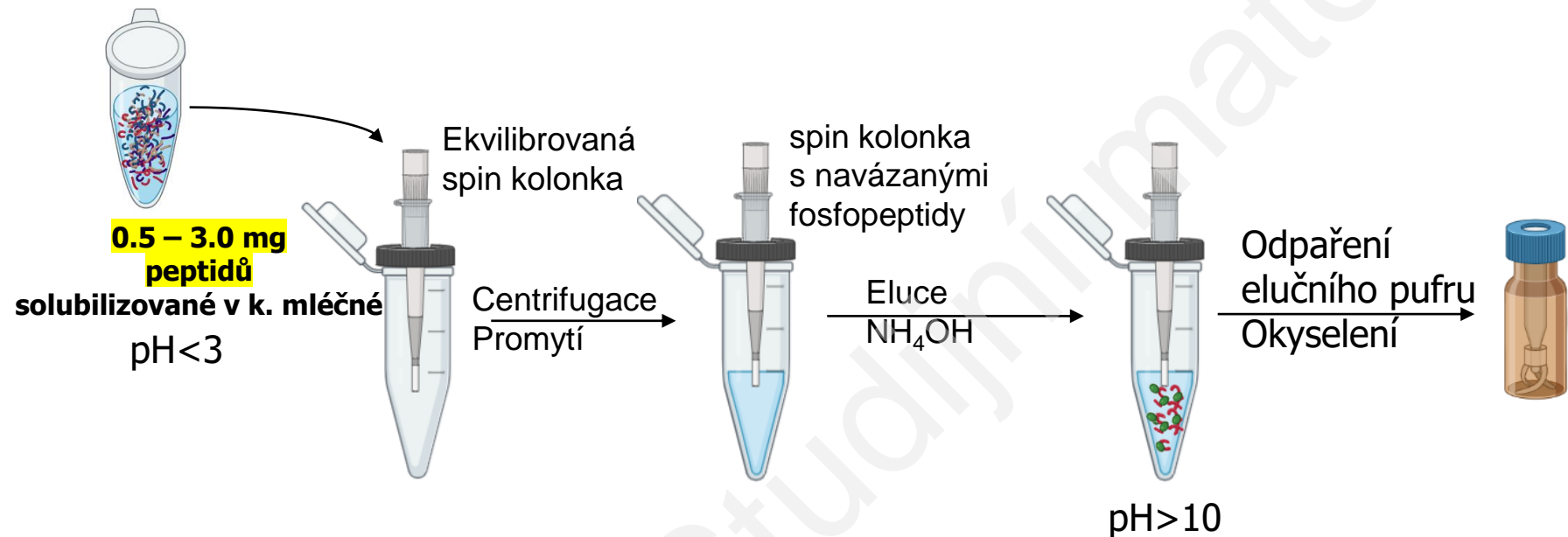


Analytica Chimica Acta 1129 (2020) 158e180

Obohacení fosfopeptidů

High-Select™ TiO₂ Phosphopeptide Enrichment Kit

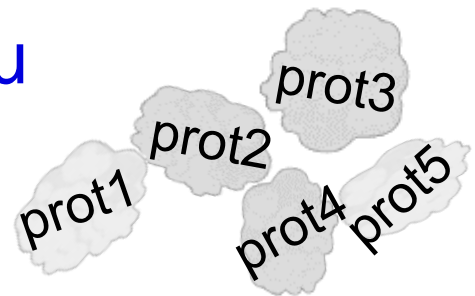
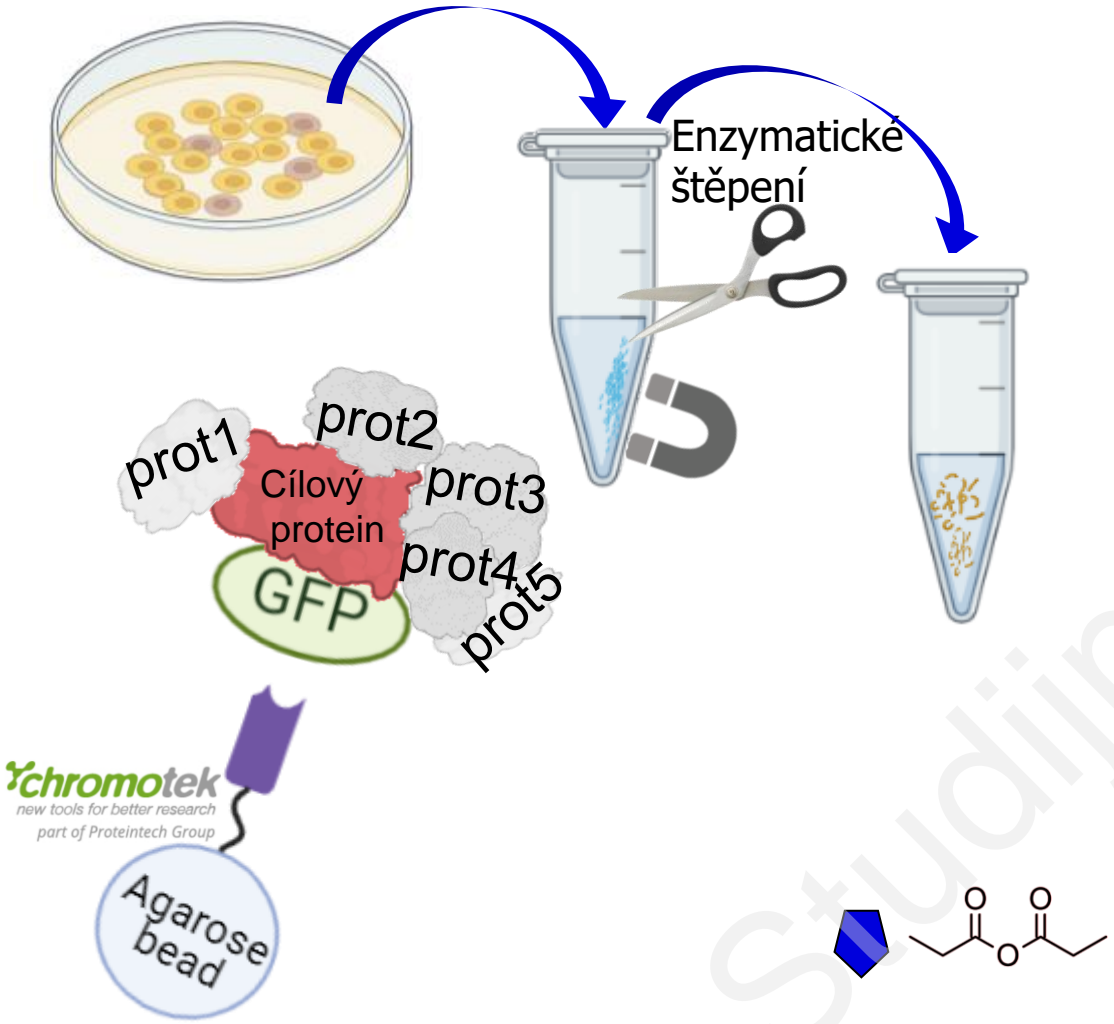
- sférická porózní forma TiO₂, optimalizované pufrы, spin kolonky
- poskytuje efektivní obohacení a navýšení počtu identifikovaných fosfopeptidů s minimalizací nespecifických vazeb
- výtěžek fosfopeptidů je obvykle ~1-3% výchozího množství peptidů
- vstupní materiál: přečištěné lyofilizované peptidy (bez detergentů a solí)



Characterizace obohacených (nízkoabundantních) proteinů

Identifikace / Kvantifikace

- PTM na cílovém proteinu
- Interakčních partnerů



10	20	30	40	50
MGKKQNKKKV	EEVLEEEEE	YVVEKVLDRR	VVKGKVEYLL	KWKGFSDEN
60	70	80	ac ac ph ph	100
TWEPEENLDC	PDLIAEFLQS	QKTAHETDKS	EGGKRKADSD	SEDKGEESKP
110	120	130	140	150
KKKKEESEKP	RGFARGLEPE	RIIGATDSSG	ELMFLMKWKN	SDEADLVPK
160	ph ph	170	ph ph	180
EANVKCPQVV	ISFYEERLW	HSYPSEDDDK	KDDKN	

ac	0	ac	20	30	40	50
MSGRGKGGK	LGKGGAKRHR	KVLRDNIQGI	TKPAIRRLAR	RGGVKRISGL		
70	ac	90	100			
IYEETRGLK	VFLENVIRDA	VTYTEHAKRK	TVTAMDVVYA	LKRQGRITLYG		

FGG

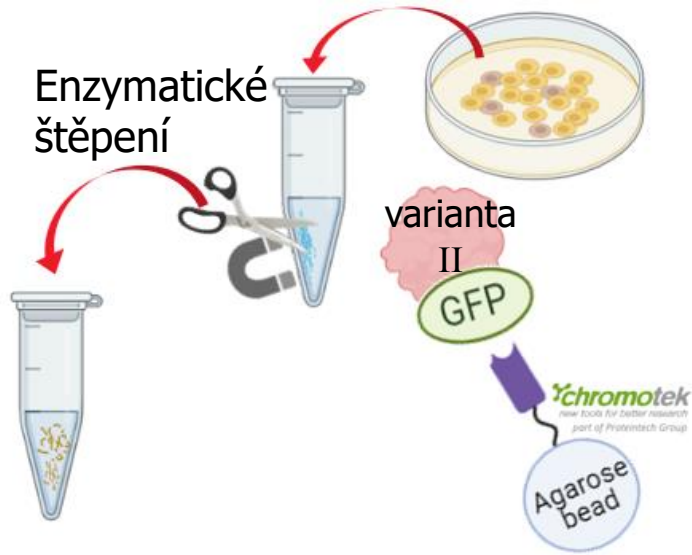
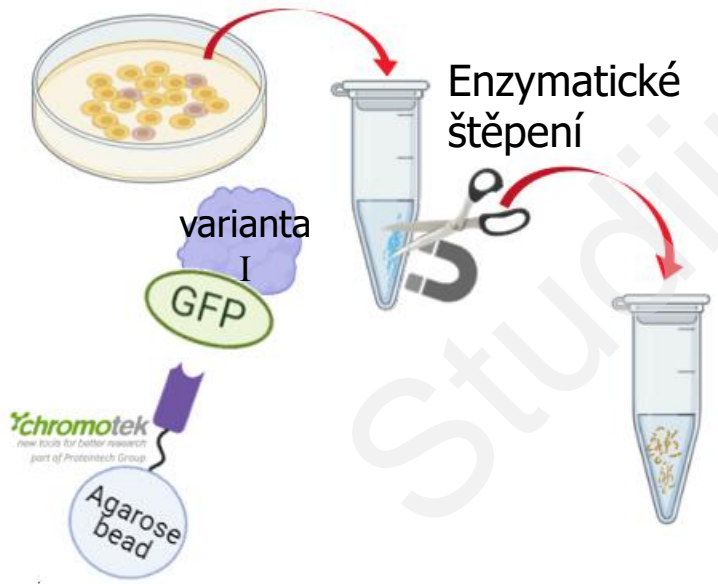
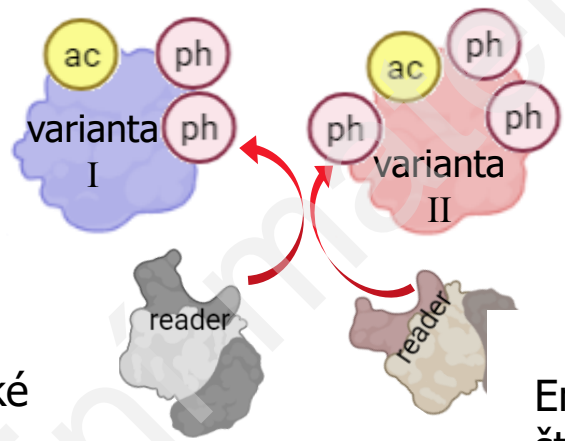
Characterizace obohacených sekvenčních variant

varianta I

10	20	30	40	50
MSSRGGKKKS	TKTSRSKAG	VIFPVGRMLR	YIKK G HPKYR	IGVGAPVYMA
60	70	80	90	100
AVLEYLTAEI	LELAGNAARD	NKKGRVTPRH	ILLAVANDEE	LNQLLKGVTI
110	120	130	140	150
ASGGVLPNIH	PELLAKKRG	KGKLEAIITP	PPAKKAKSPS	QKKPVSKKAG
160	170	180	190	200
GKKGARKSKK	KQGEVSKAAS	ADSTTEGTPA	DGFTVLSTKS	LFLGQKL NLI
210	220	230	240	250
HSEISNLAGF	EVEAIINPTN	ADIDLKDDL	NTLEKKGKKE	FVEAVLELRK
260	270	280	290	300
KNGPLEVAGA	AVSAGHGLPA	KFVIHCNSPV	WGADKCEELL	EKTVKNCAL
310	320	330	340	350
ADDKKLKSIA	FPSIGSGRNG	FPKQTAAQLI	LKAISYFVVS	TMSSSIKTVY
360	370			
FVLFDSSEIG	IYVQEMAKLD	AN		

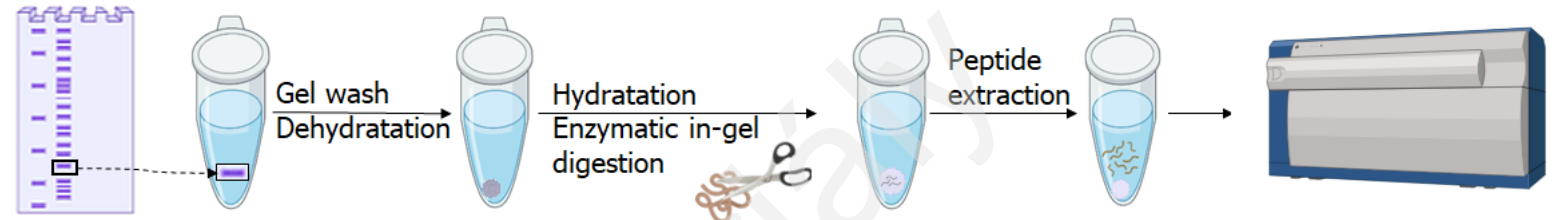
varianta II

10	20	30	40	50
MSSRGG K KS	TKTSRSKAG	VIFPVGRMLR	YIK K GHPKYR	IGVGAPVYMA
60	70	80	90	100
AVLEYLTAEI	LELAGNAARD	NKKGRVTPRH	ILLAVANDEE	LNQLLKGVTI
110	120	130	140	150
ASGGVLPNIH	PELLAKKRG	KGKLEAIITP	PPAKKAKSPS	QKKPVSKKAG
160	170	180	190	200
GKKGARKSKK	KQGEVSKAAS	ADSTTEGTPA	DGFTVLSTKS	LFLGQKL QVV
210	220	230	240	250
QADIASIDSD	AVVHPTNTDF	YIGGEV GNTL	EKKGGKEFVE	AVLELRKKNG
260	270	280	290	300
PLEVAGAAVS	AGHGLPAKFV	IHCNSPVWGA	DKCEELLEKT	VKNCLALADD
310	320	330	340	350
KKLKSIAFPS	IGSGRNGFPK	QTAAQLILKA	ISSYFVSTMS	SSIKTIVYFVL
360	370			
FDSESIGIYV	QEMAKLDAN			

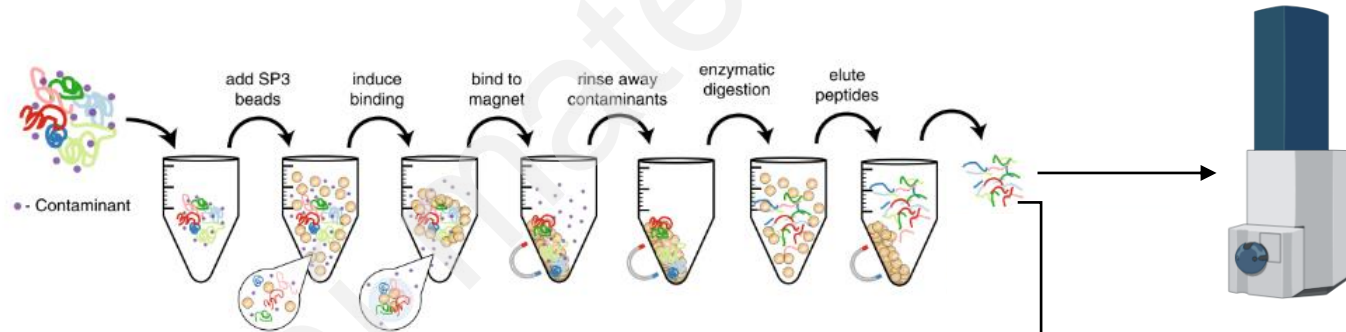


Praktický kurz C8302

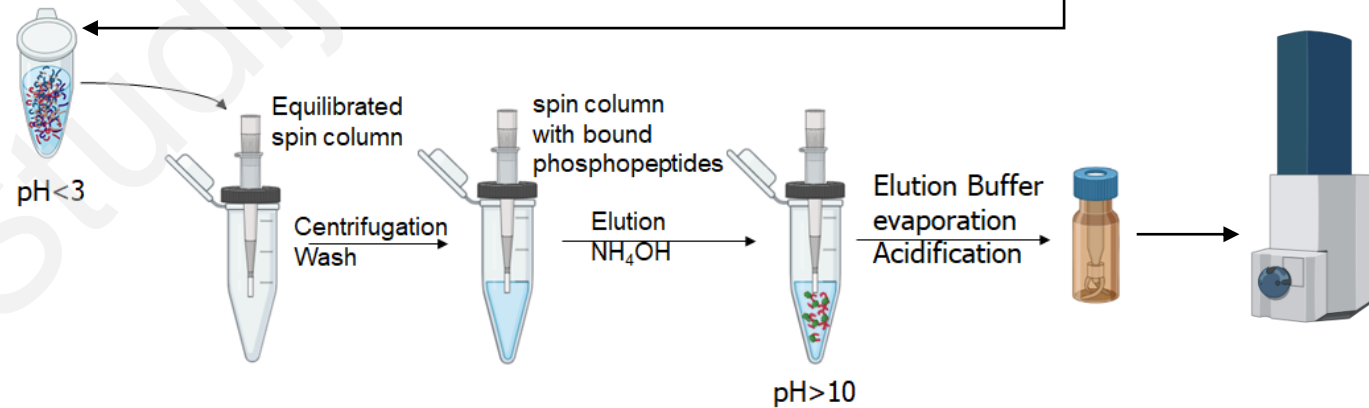
I. Digesce v gelu



II. Digesce a přečištění na SP3



III. Obohacení fosfopeptidů



Děkuji za pozornost!

Gabriela Lochmanová

gabriela.lochmanova@ceitec.muni.cz

Vybrané obrázky byly připraveny v [BioRender.com](https://www.biorender.com).