



MASARYKOVA UNIVERZITA

Středoevropský technologický institut CEITEC

CL - proteomika

Charakterizace proteinů hmotnostní spektrometrií

Bi 7050

**PŘÍPRAVA PROTEINOVÉHO VZORKU PRO MS ANALÝZU**

Hana Konečná

# PROTEOM

---

- komplexita       $10^6$  ?
- dynamika
- sekvence
- struktura
- abundance
- lokalizace
- modifikace
- interakce
- biochemická funkce

**geny** - nositelé instrukce

**proteiny** - vykonavatelé instrukce

# ALTERNATIVY SEPARACE

- 2D gelová elektroforéza

IEF + SDS

- 1D gelová elektroforéza

SDS PAGE

BN PAGE...

- multidimenzionální LC

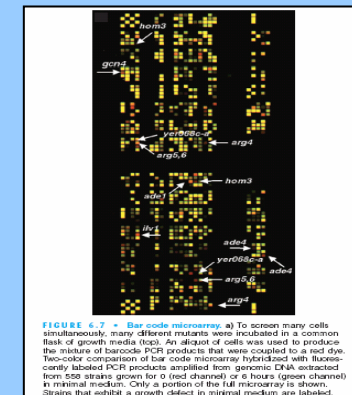
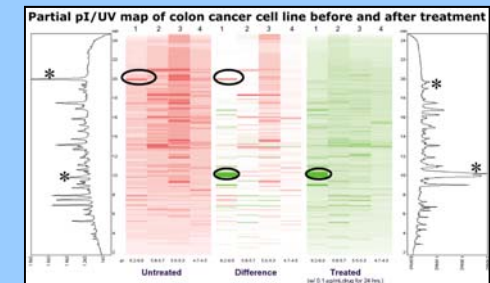
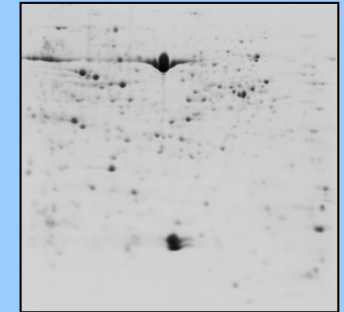
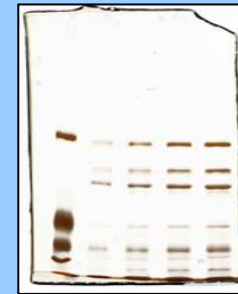
MudPIT

ICAT...

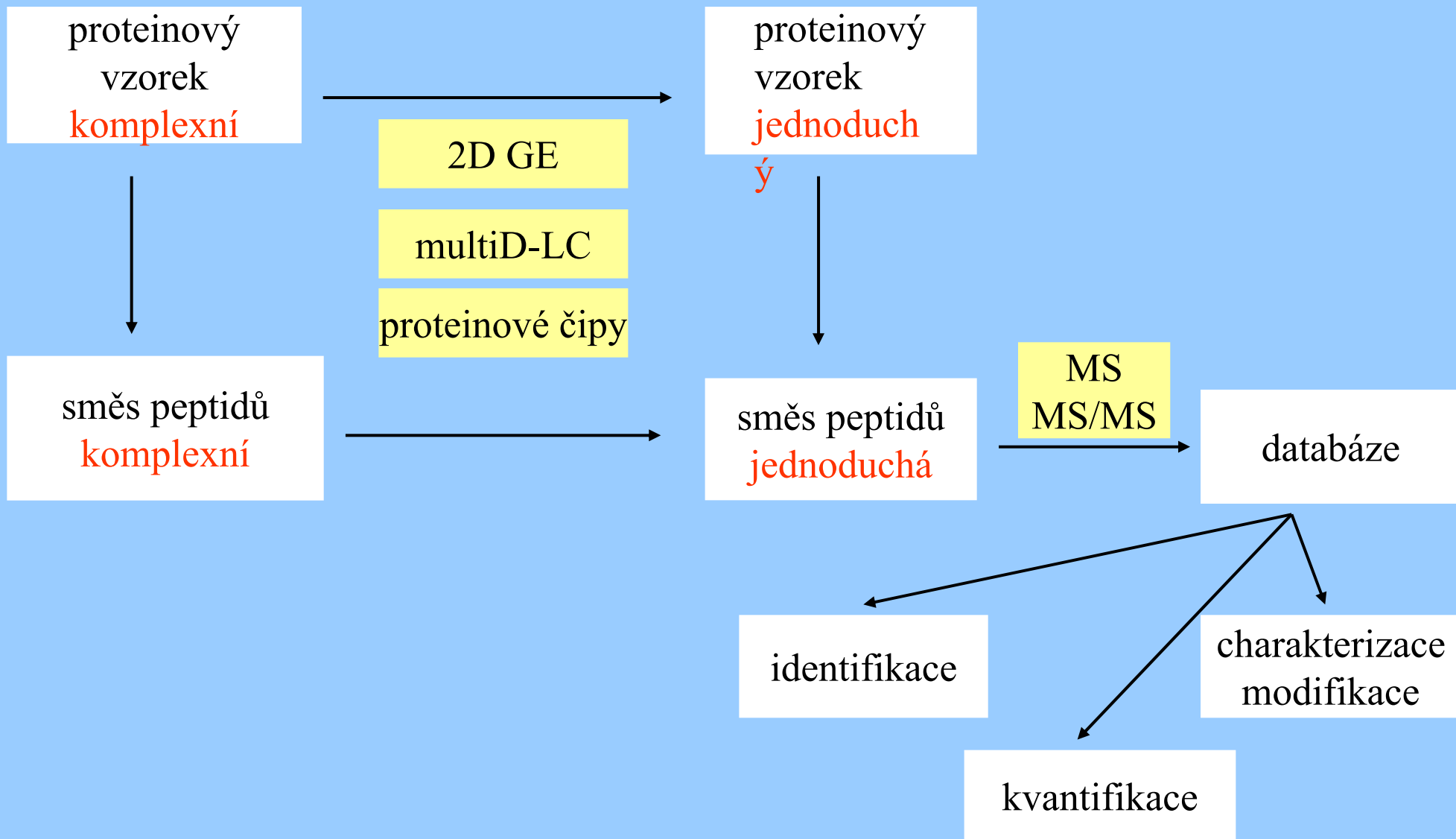
- proteinové čipy

Functional protein arrays (protein-proteinové interakce)

Affinity arrays



**FIGURE 6.7** • Bar code microarray. a) To screen many cells simultaneously, many different mutants were incubated in a common flask of growth media (top). An aliquot of cells was used to produce the mixture of barcode PCR products that were coupled to a red dye. Two-color comparison of bar code microarray hybridized with fluorescently labeled PCR products amplified from genomic DNA extracted from 500 strains grown for 0 (red channel) or 6 hours (green channel) in minimal medium. Only a portion of the full microarray is shown. Strains that exhibit a growth defect in minimal medium are labeled.



**I.** → dvourozměrná gelová elektroforéza 2D GE

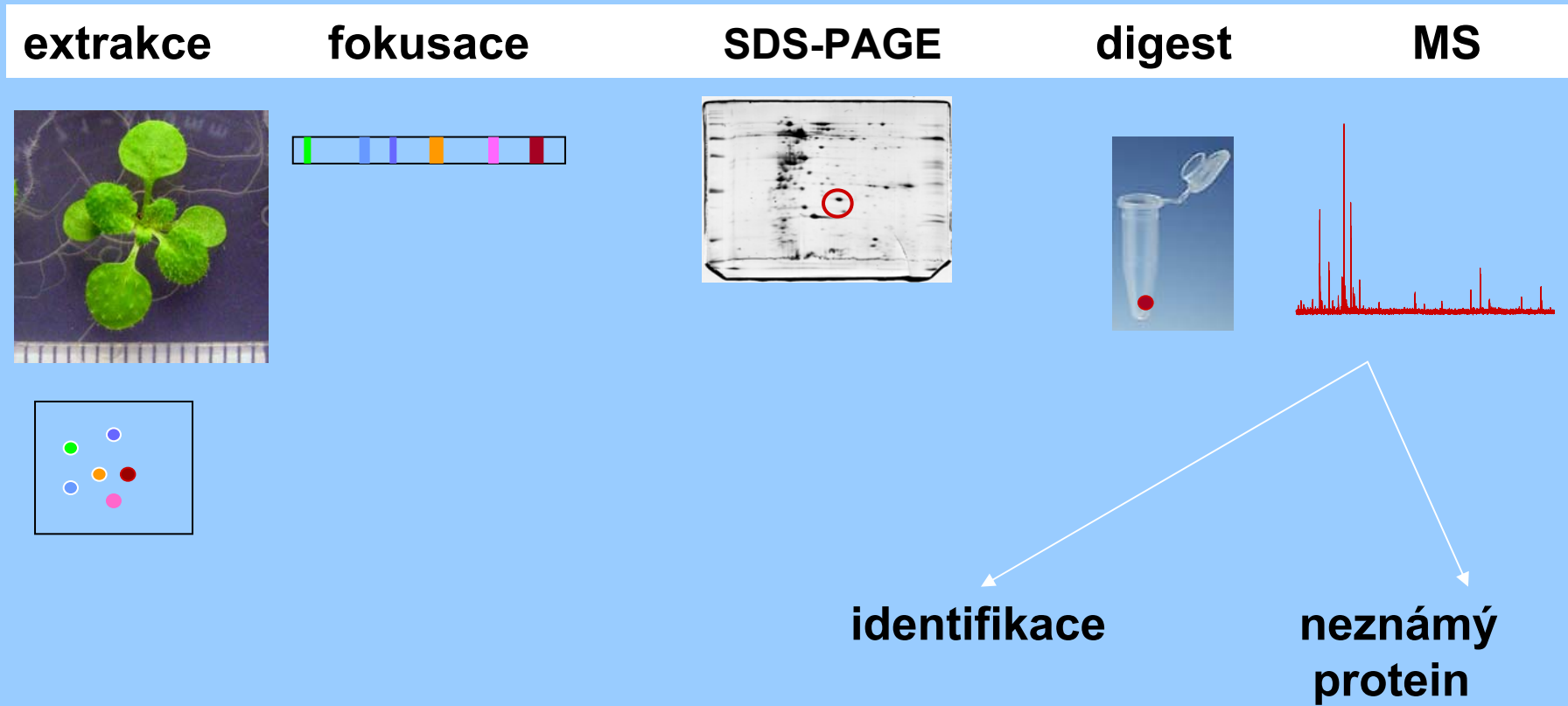
**II.** → (multidimenzionální) kapalinová chromatografie

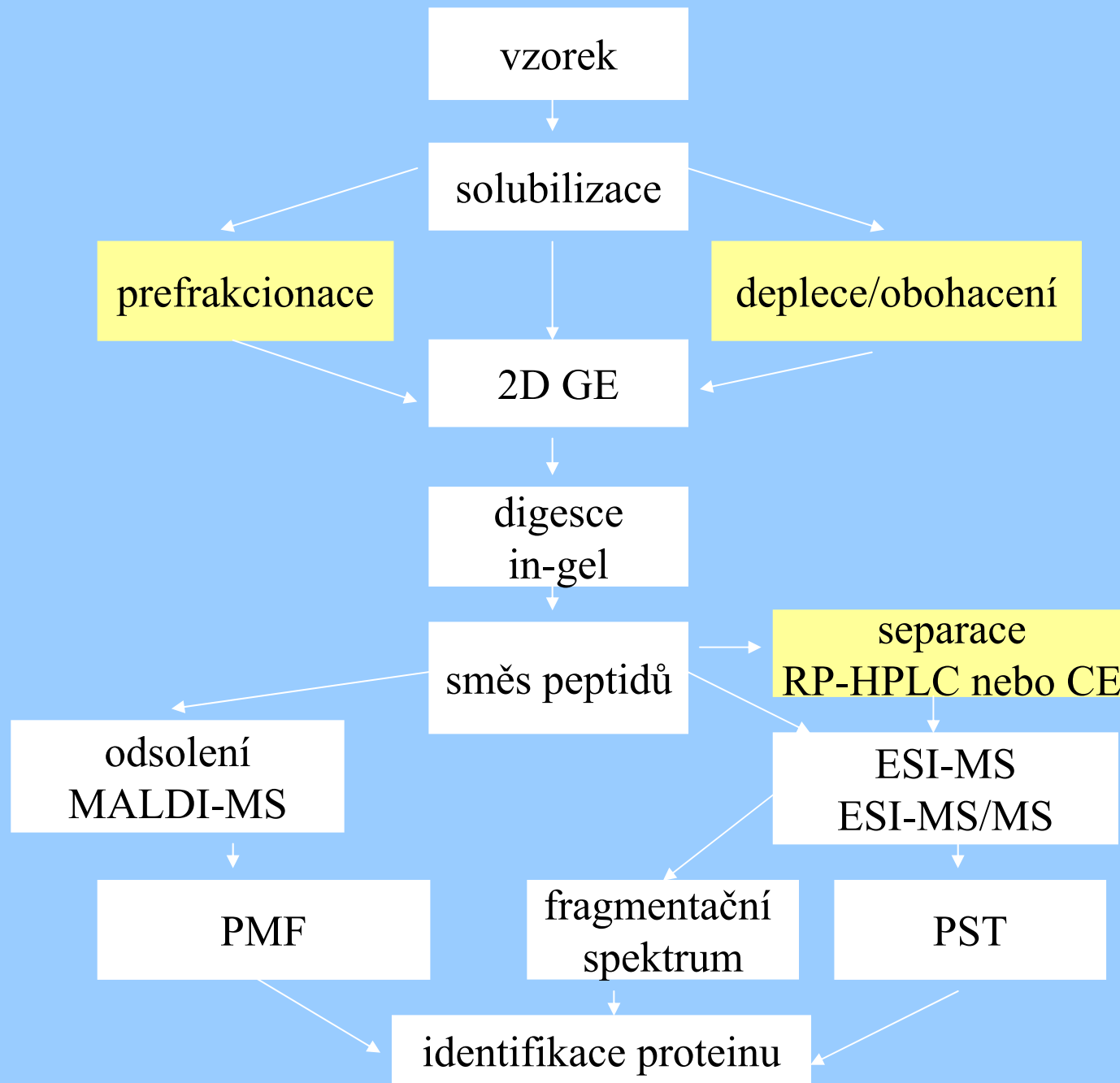
# I. DVOUROZMĚRNÁ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA 2D GE

---



# Proteomický experiment



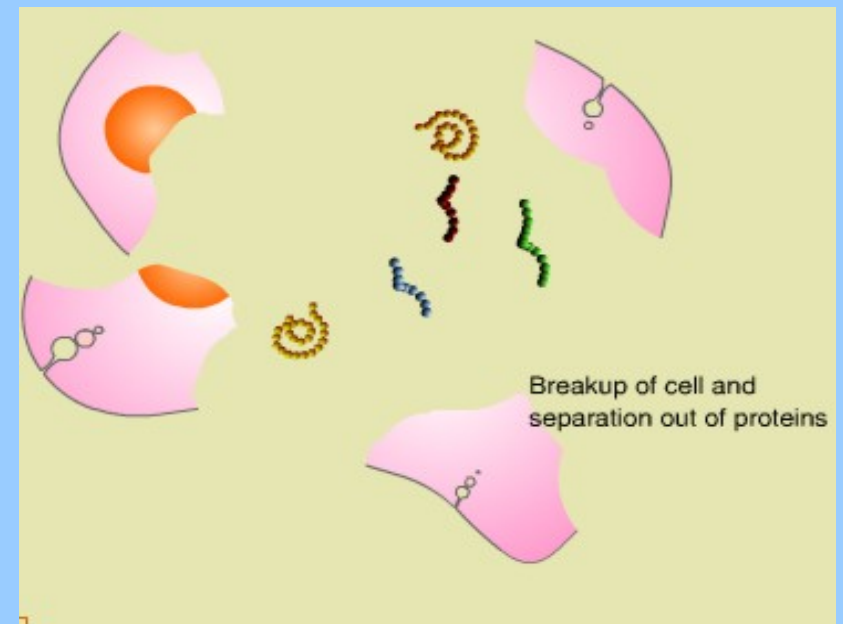
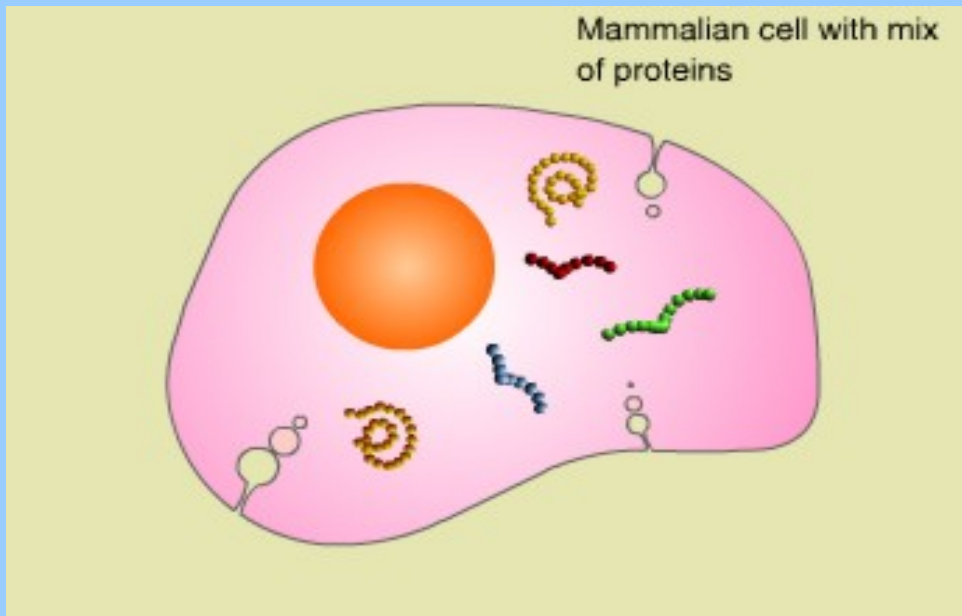




## ANALYZOVANÝ VZOREK - HOMOGENIZACE

---

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



## SOLUBILIZACE VZORKU

---

- nekovalentní interakce – denaturace **detergenty**  
CHAPS, Triton, Nonidet
- **chaotropy**  
močovina, thiomočovina
- disulfidické můstky – redukce
- inhibice proteáz, fosfatáz, glykozidáz
- odstranění solí, lipidů, polysacharidů, NA

# DETERGENTY

žádný celkový náboj

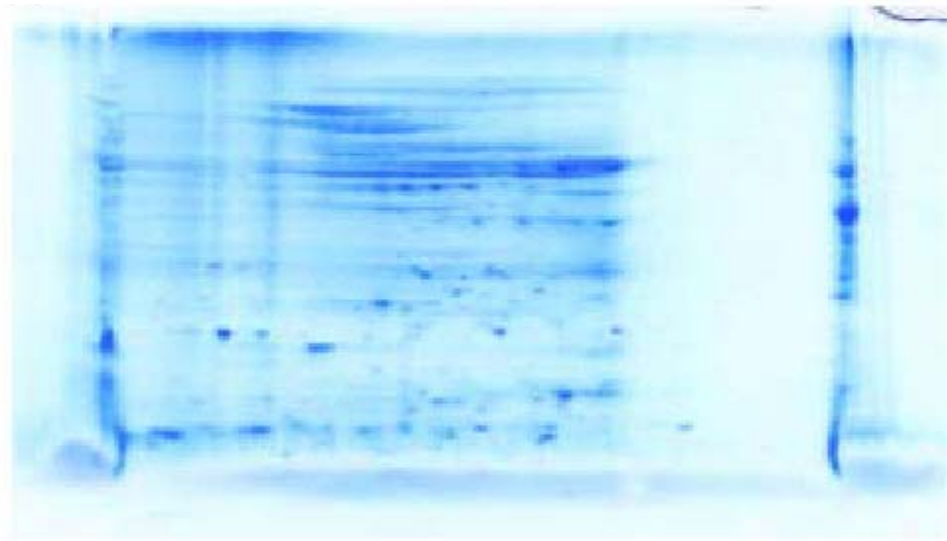
0.5 – 4%

použitelné ve vysokých koncentracích močoviny

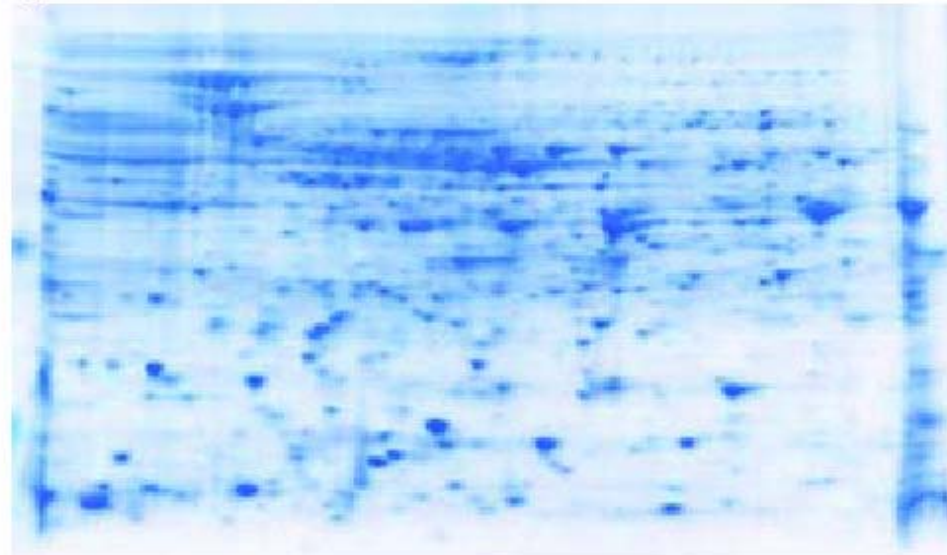
- neionogenní
- zwitterointové

SDS jen v nízkých koncentracích (do 0.25%)

E.coli



CHAPS



C7BzO

## ZÁKLADNÍ PRAVIDLA

---

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

## KONTAMINANTY

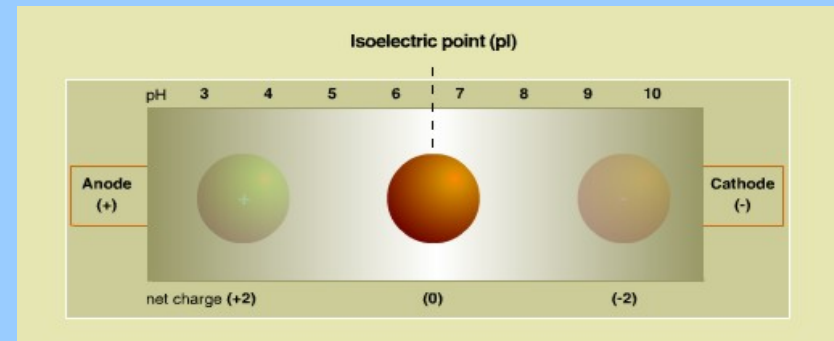
---

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

# 2D GE

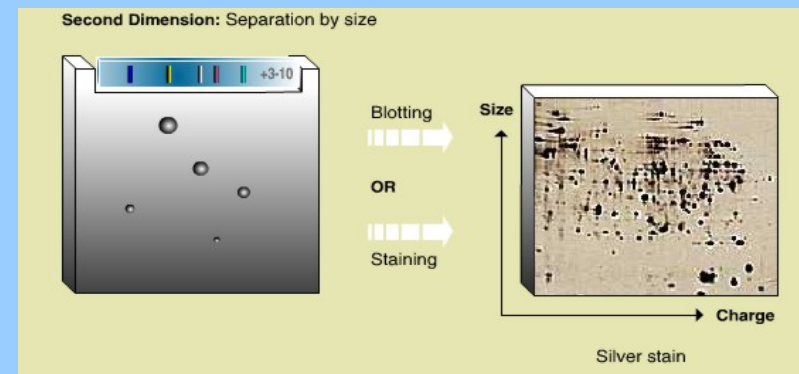
- první rozměr

## IEF



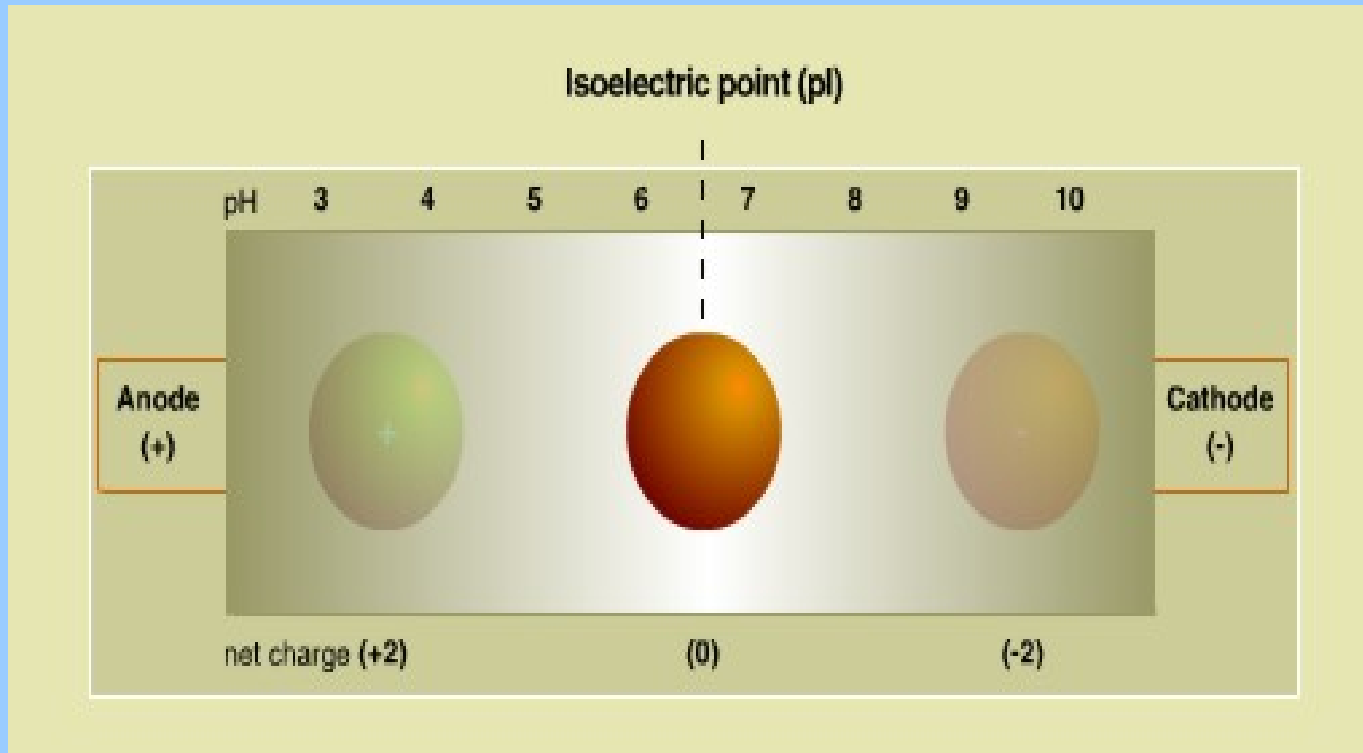
- druhý rozměr

## SDS-PAGE

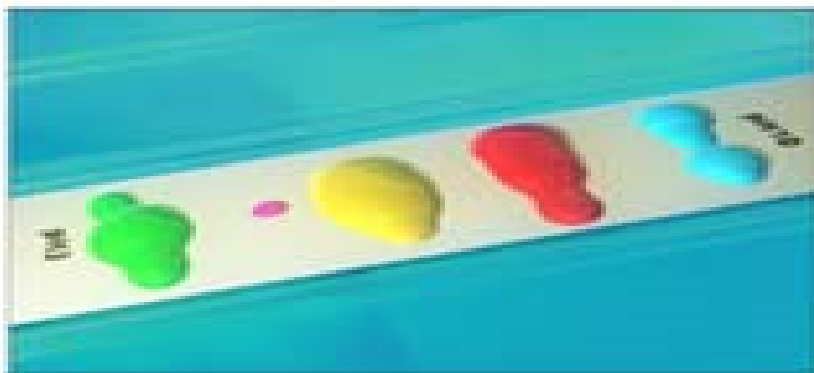
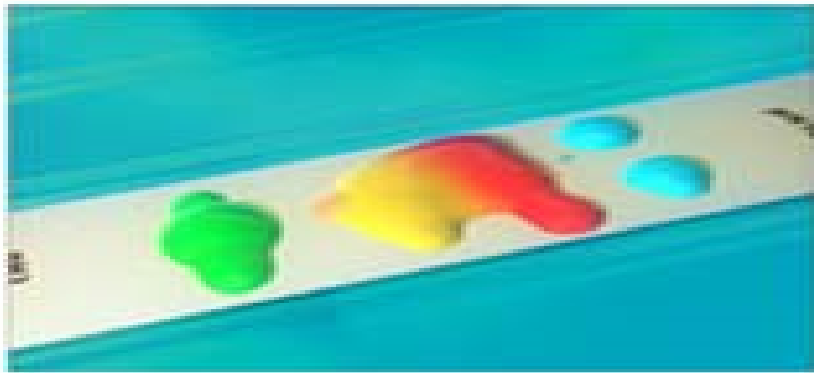
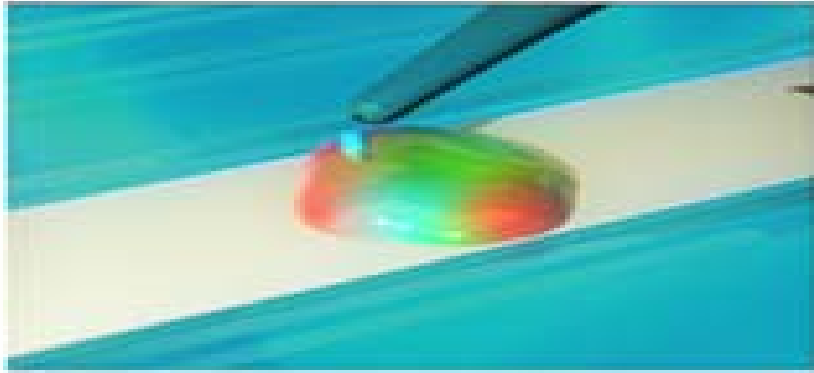


# ISOELEKTRICKÝ BOD

---







## IZOELEKTRICKÁ FOKUSACE

- imobilizovaný pH gradient
- amfolyty

www.nature.com

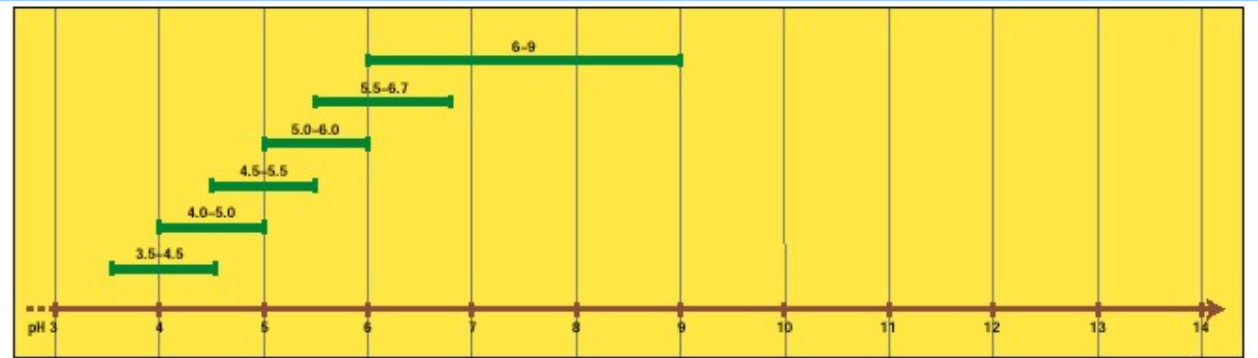
www.nature.com

www.nature.com

# IPG STRIPY

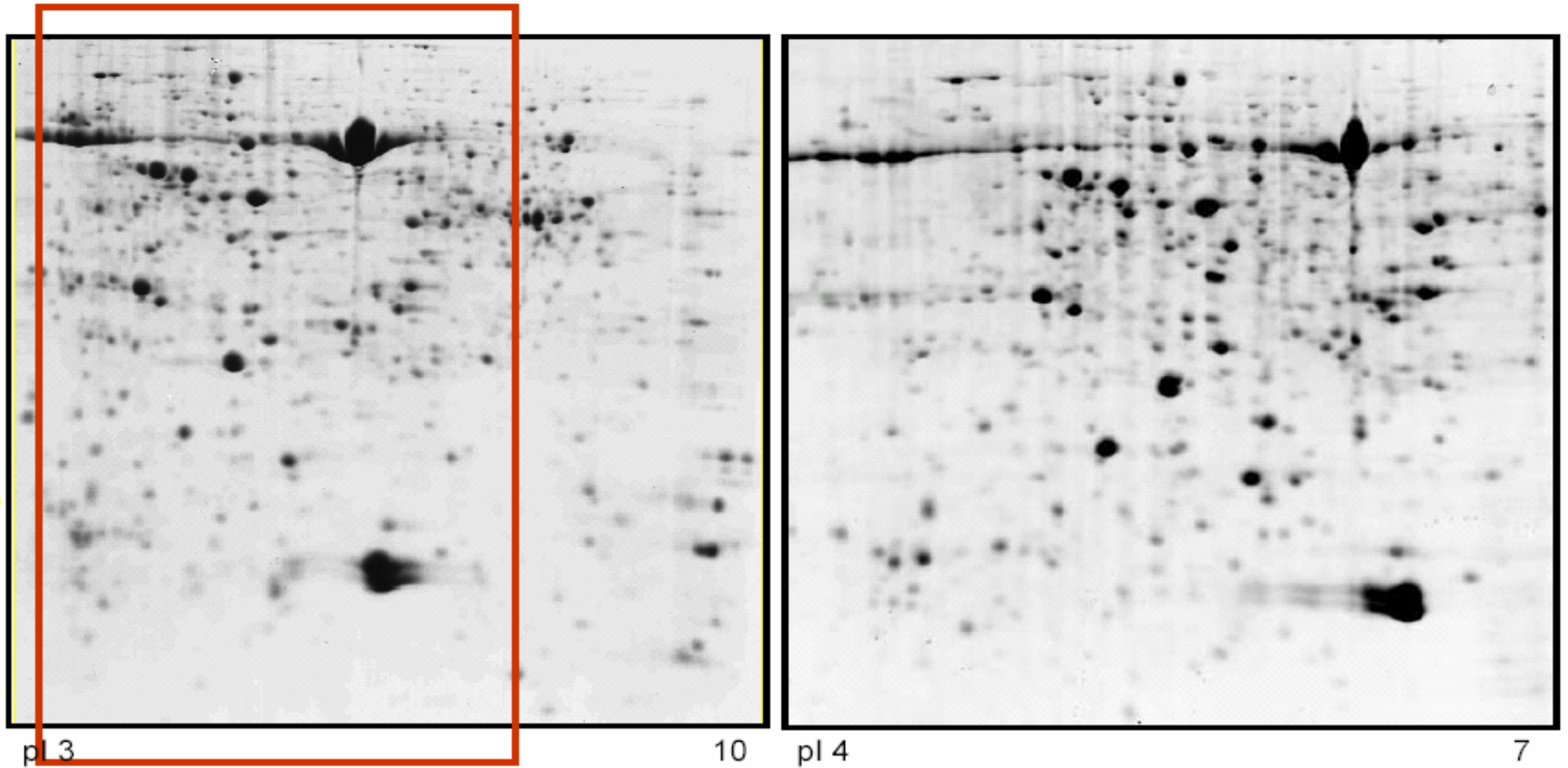


- široký rozsah 3-10, 3-10NL
- úzký rozsah
- mikro rozsah



překrývající se rozsahy

# ROZSAH STRIPU



**pI 3 - 10 NL**

**pI 4 - 7**

# FOKUSAČNÍ PARAMETRY

---

- rehydratace
- aplikace vzorku
- ochrana cysteinu
- fokusační podmínky

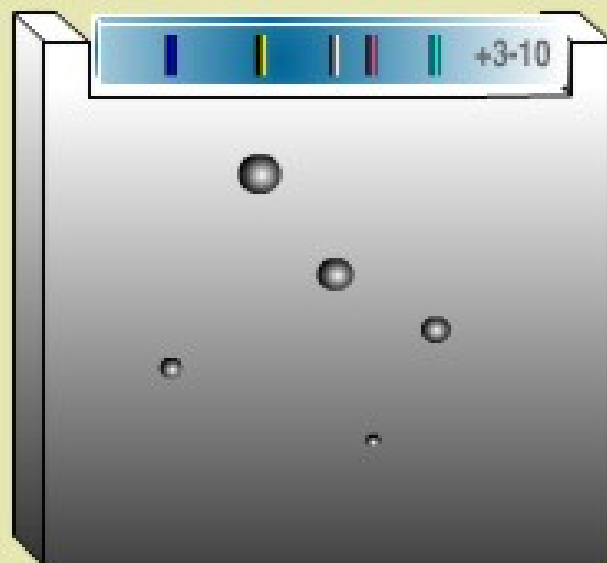


Protean IEF Cell

# DRUHÝ ROZMĚR 2 DE GE

## SDS-PAGE ELEKTROFORÉZA

Second Dimension: Separation by size



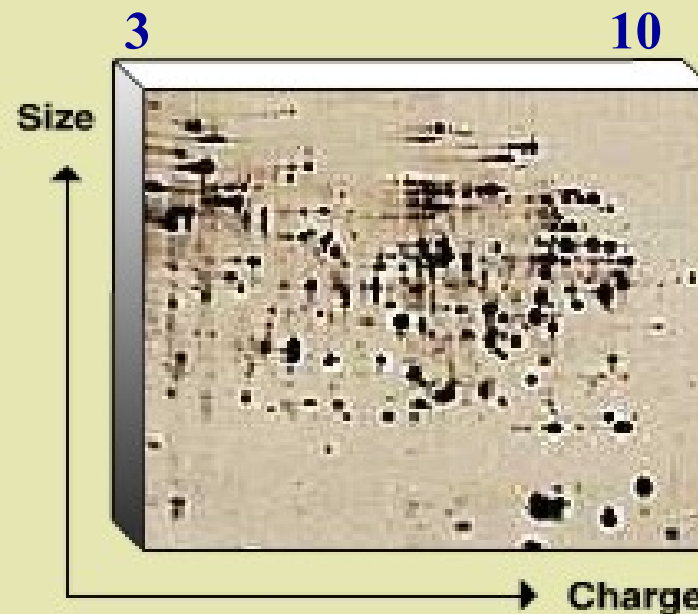
Blotting



OR



Staining



Silver stain

# 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

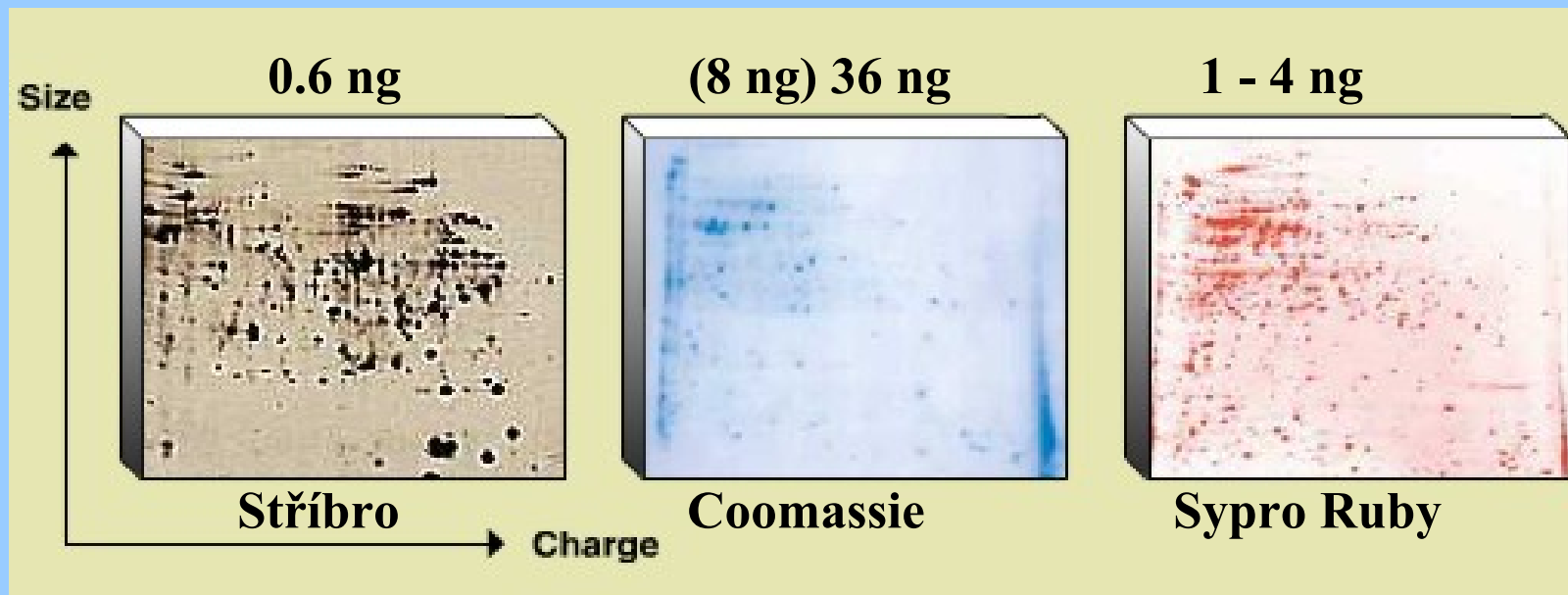
nekompatibilní s MS

Sypro Ruby

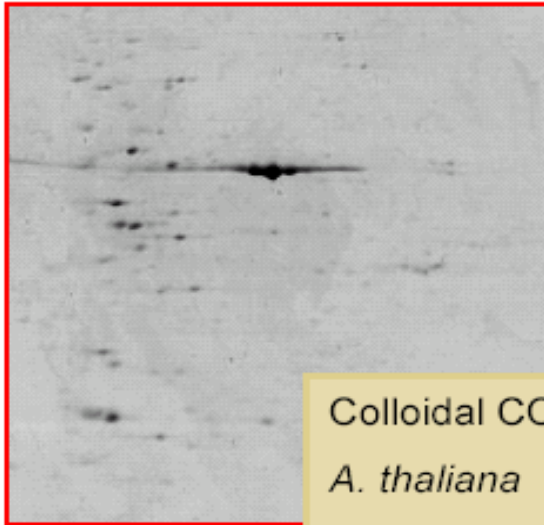
Flamingo Pink

Pro-Q Diamond

Pro-Q Emerald



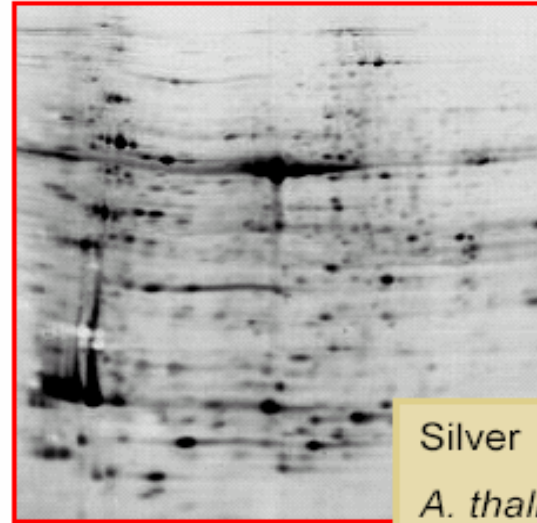
# CITLIVOST BARVENÍ PROTEINU



Colloidal CCB

*A. thaliana*

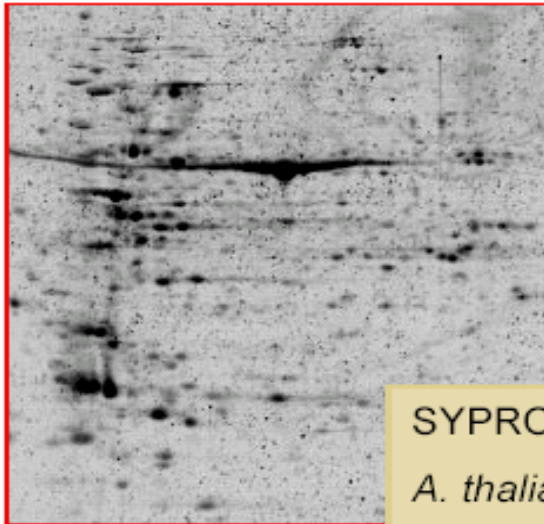
množství proteinu: 100  $\mu\text{g/gel}$



Silver

*A. thaliana*

množství proteinu: 20  $\mu\text{g/gel}$



SYPRO Ruby

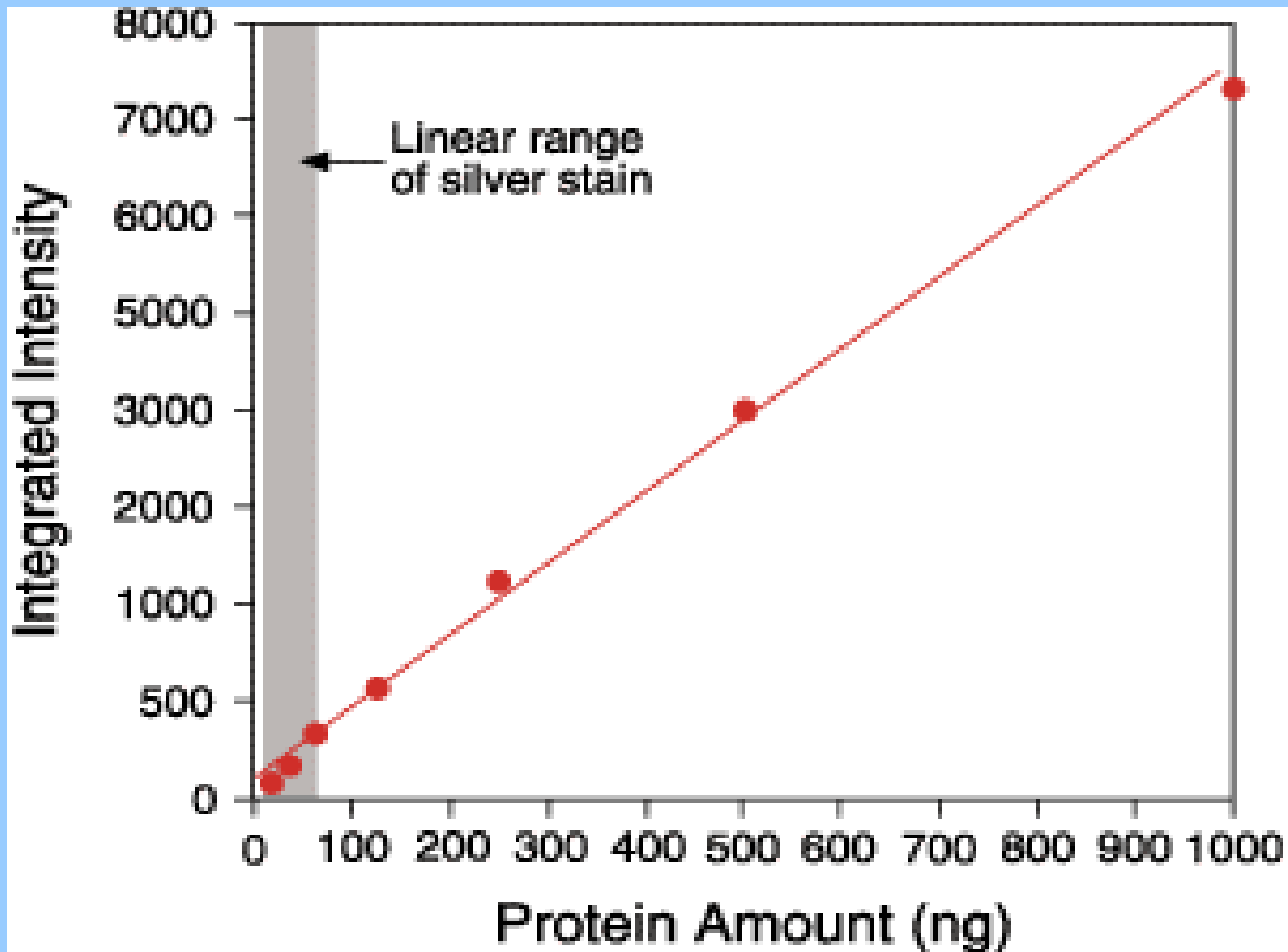
*A. thaliana*

množství proteinu: 20  $\mu\text{g/gel}$

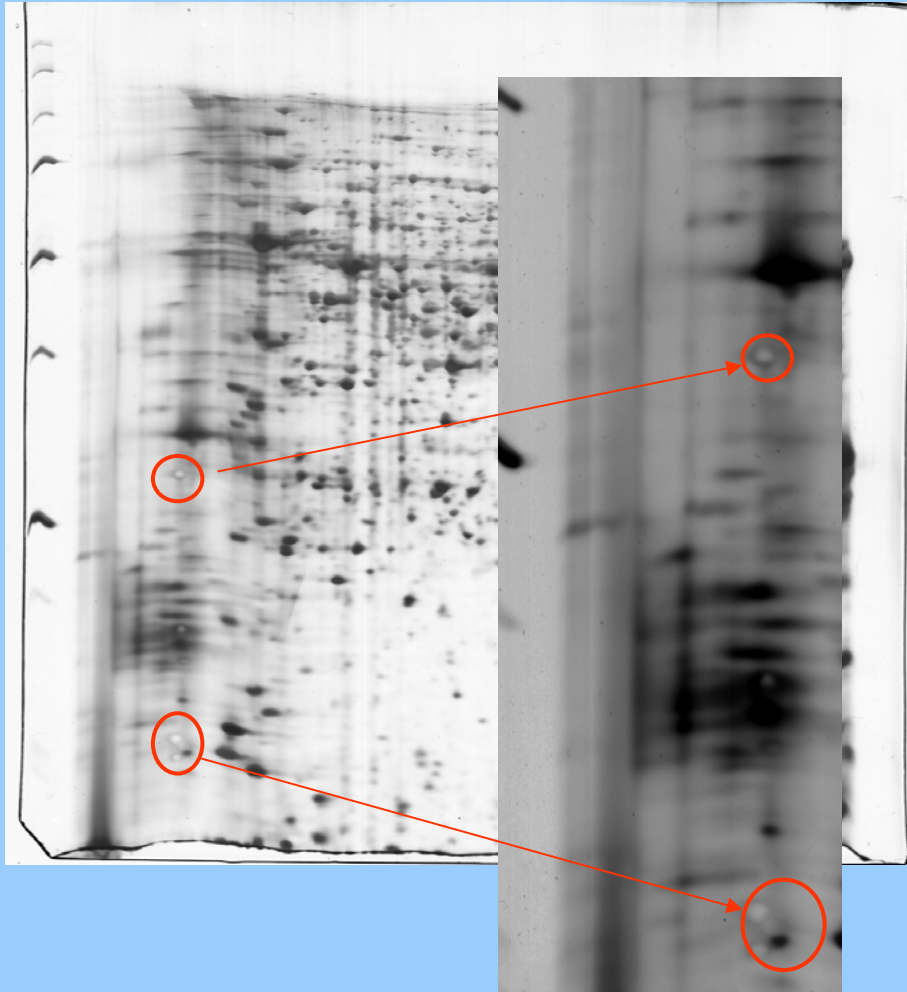


# BARVENÍ PROTEINU – LINEARITA

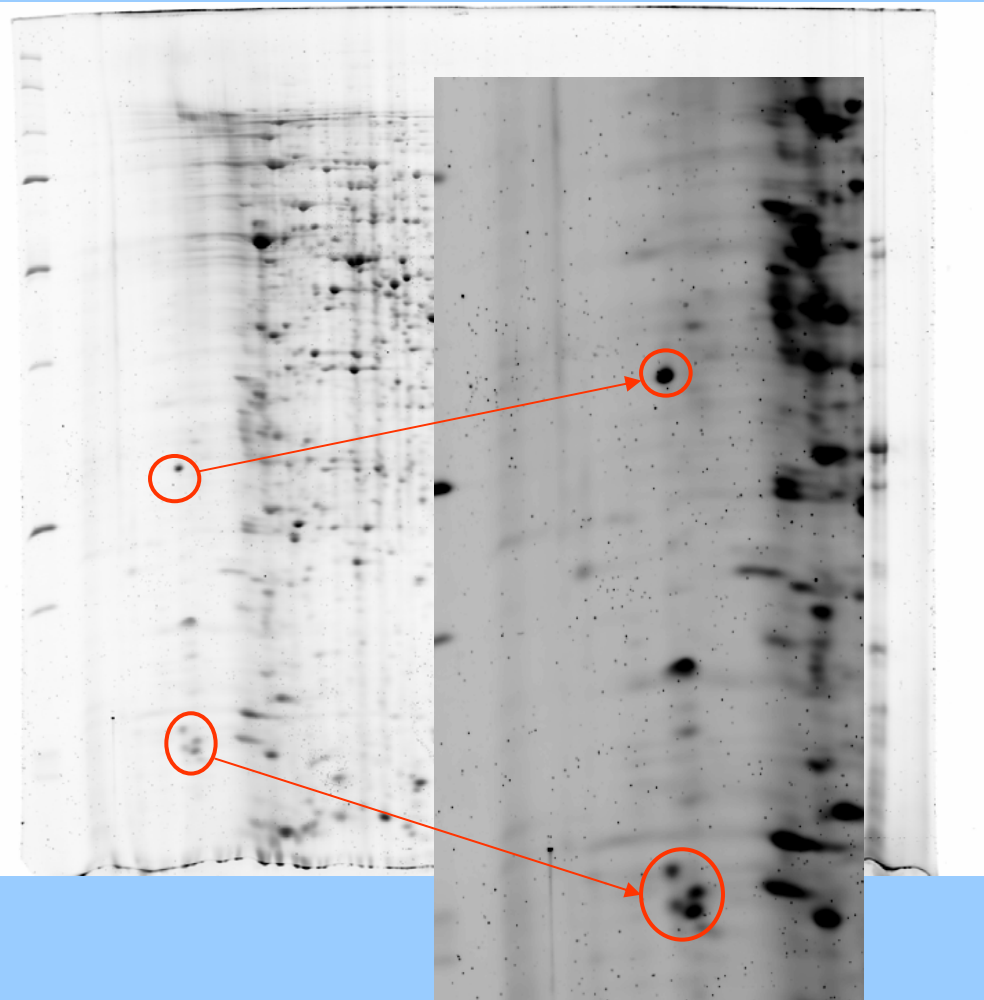
Sypro Ruby



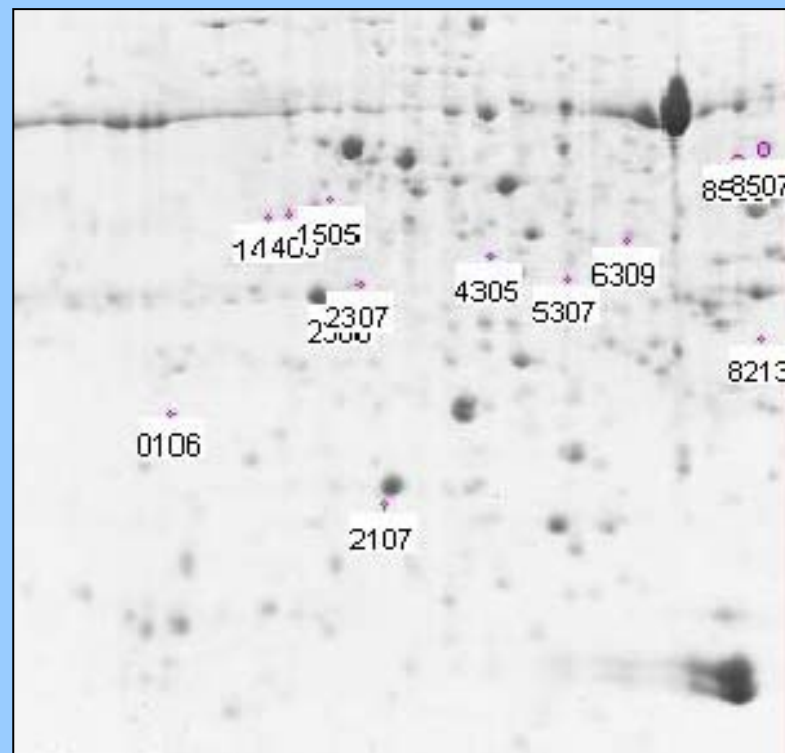
**Ag**



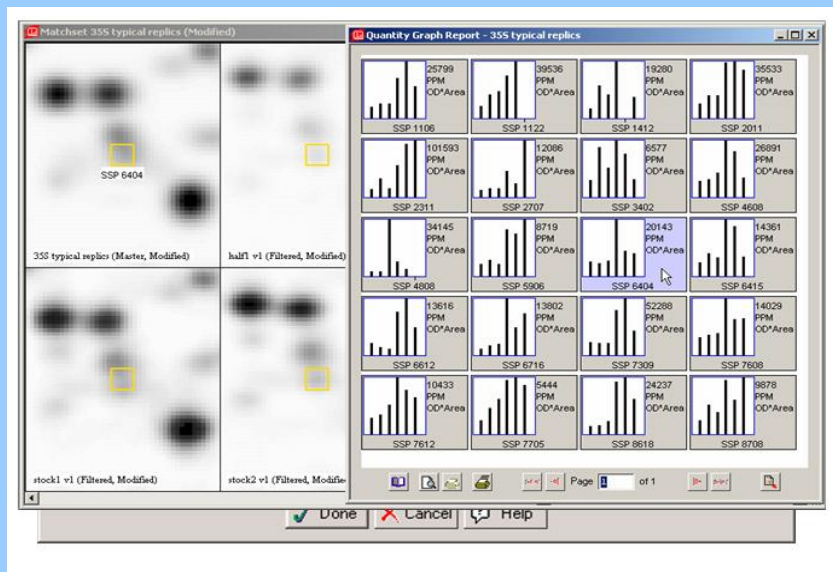
**Sypro Ruby**



# ANALÝZA OBRAZU

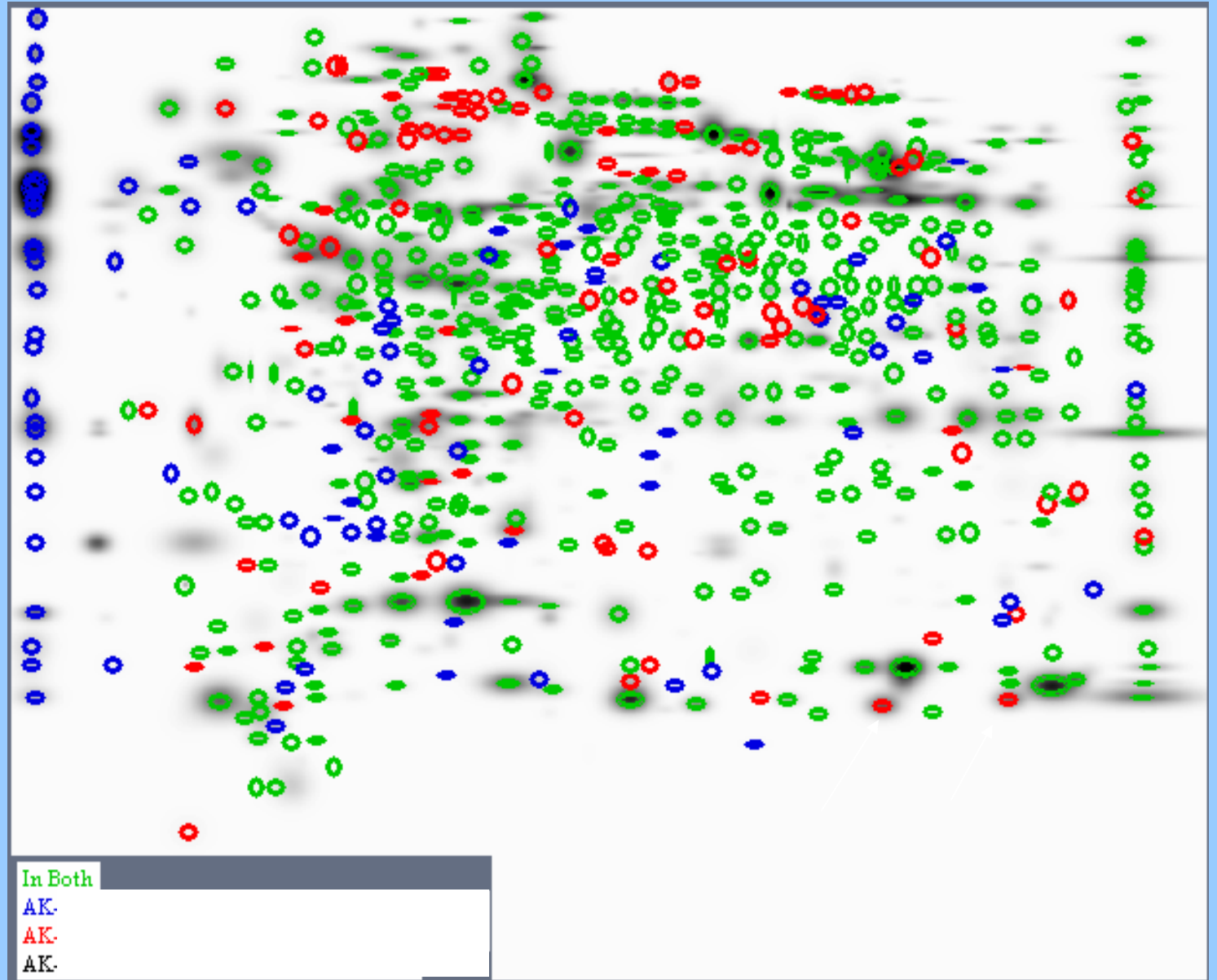


referenční mapa



paralelní vzorky • průměrný gel • kvalita • kvantita • porovnání referenčních map

# PDQuest



## BIOMARKER

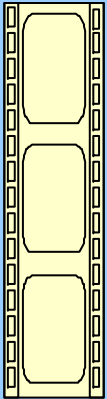
---

- detekuje přítomnost onemocnění
- přispívá k zvládnutí nemoci - předpověď a potvrzení účinku léku

staré Řecko – sladká moč  
dnes asi 150 proteinů klinicky relevantních

## VALIDACE

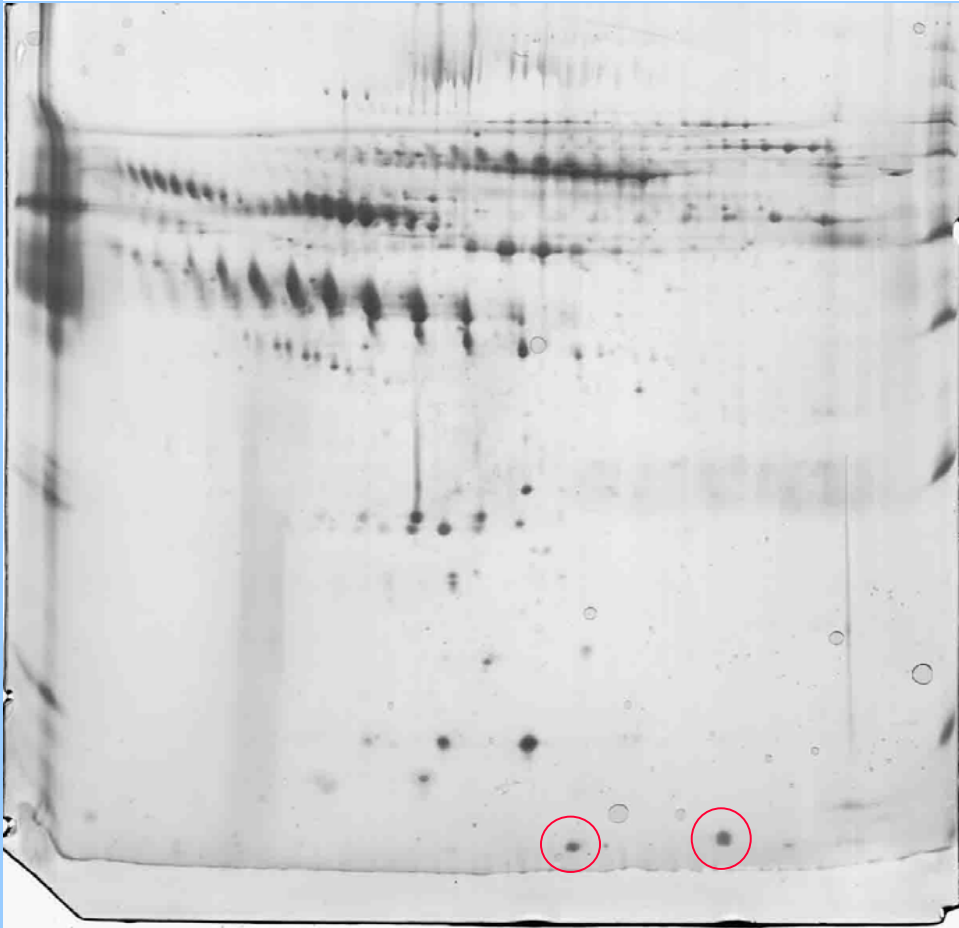
- **analytická** stabilní robustní metoda
- **biologická** biochemické dráhy a jejich změny, biologická variabilita u zdravých
- **klinická** prediktivní předpověď klinické změny, > než biologická variabilita



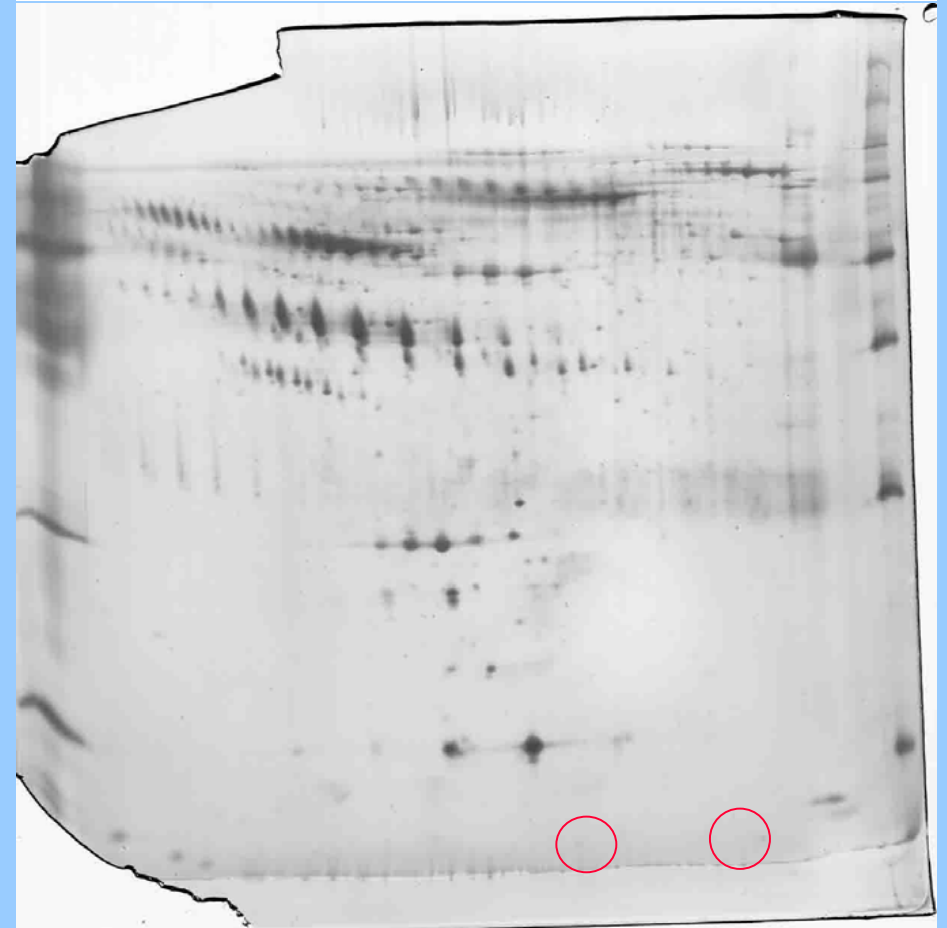
personalizovaná medicína  
vlastní kontroly  
etické problémy  
kupka sena

# Biomarkery onemocnění GvHD v lidské plasmě

Den 21 – před klinickým projevem GvHD



Den 44 – po klinickém projevu GvHD



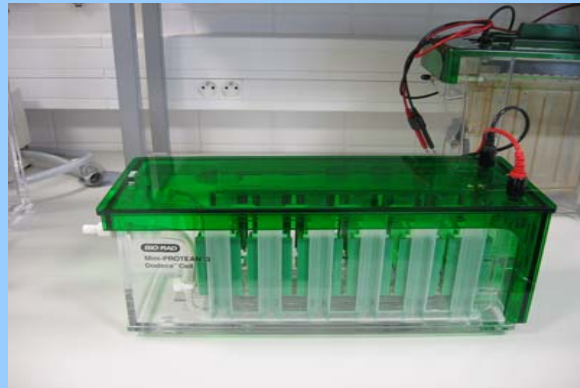


## 2D GE INSTRUMENTACE

- 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

## 2D or not 2D ?

---

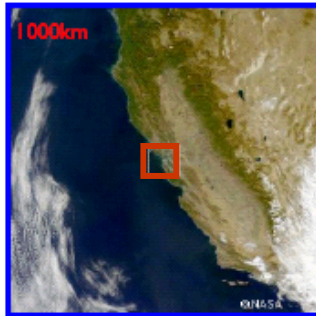
- rozlišení
- vizuální aspekty
- multigelové jednotky
- dynamický rozsah
- extrémní proteiny (membránové, basické...)
- reprodukovatelnost, image analýza
- citlivost barvení
- pracnost
- nesnadná automatizace
- postdigesční extrakce



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



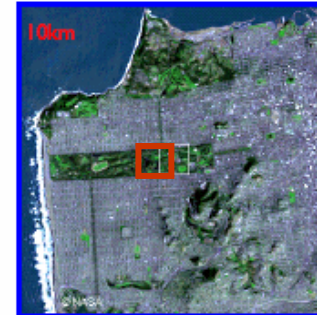
10 10 000km



9 1 000km



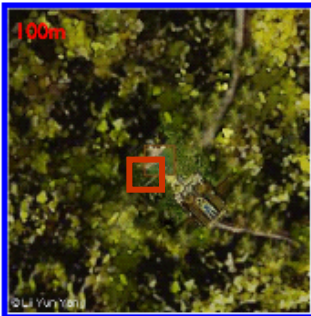
8 100km



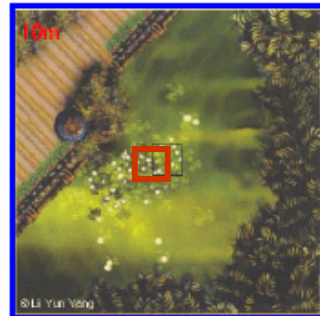
7 10km



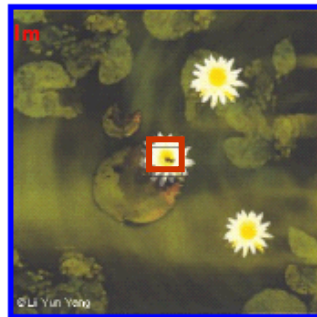
6 1km



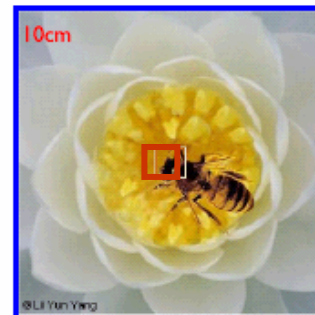
5 100m



4 10m



3 1m

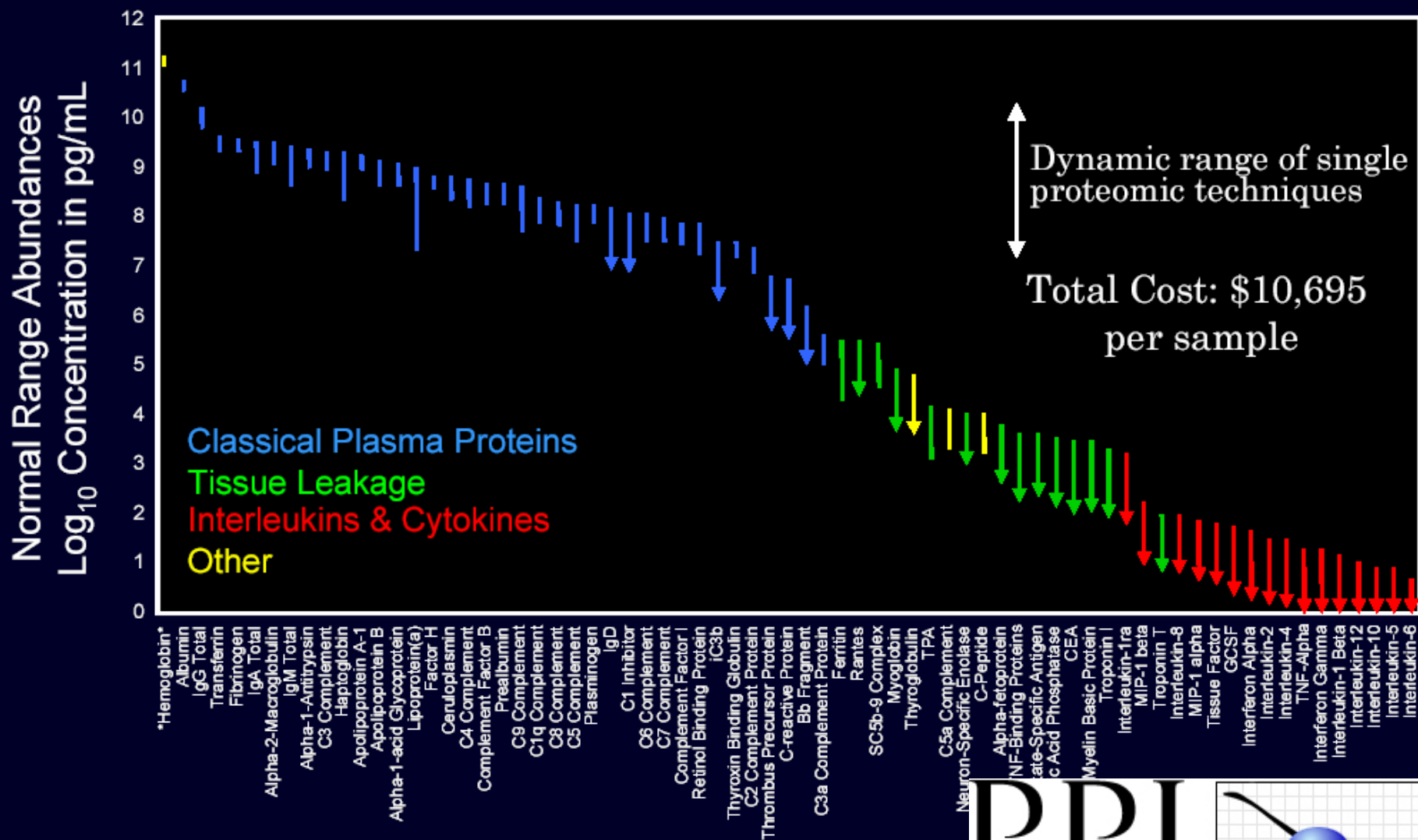


2 10cm

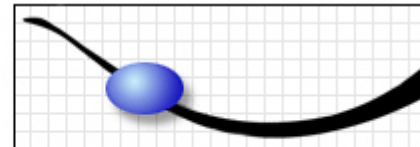


1 1cm

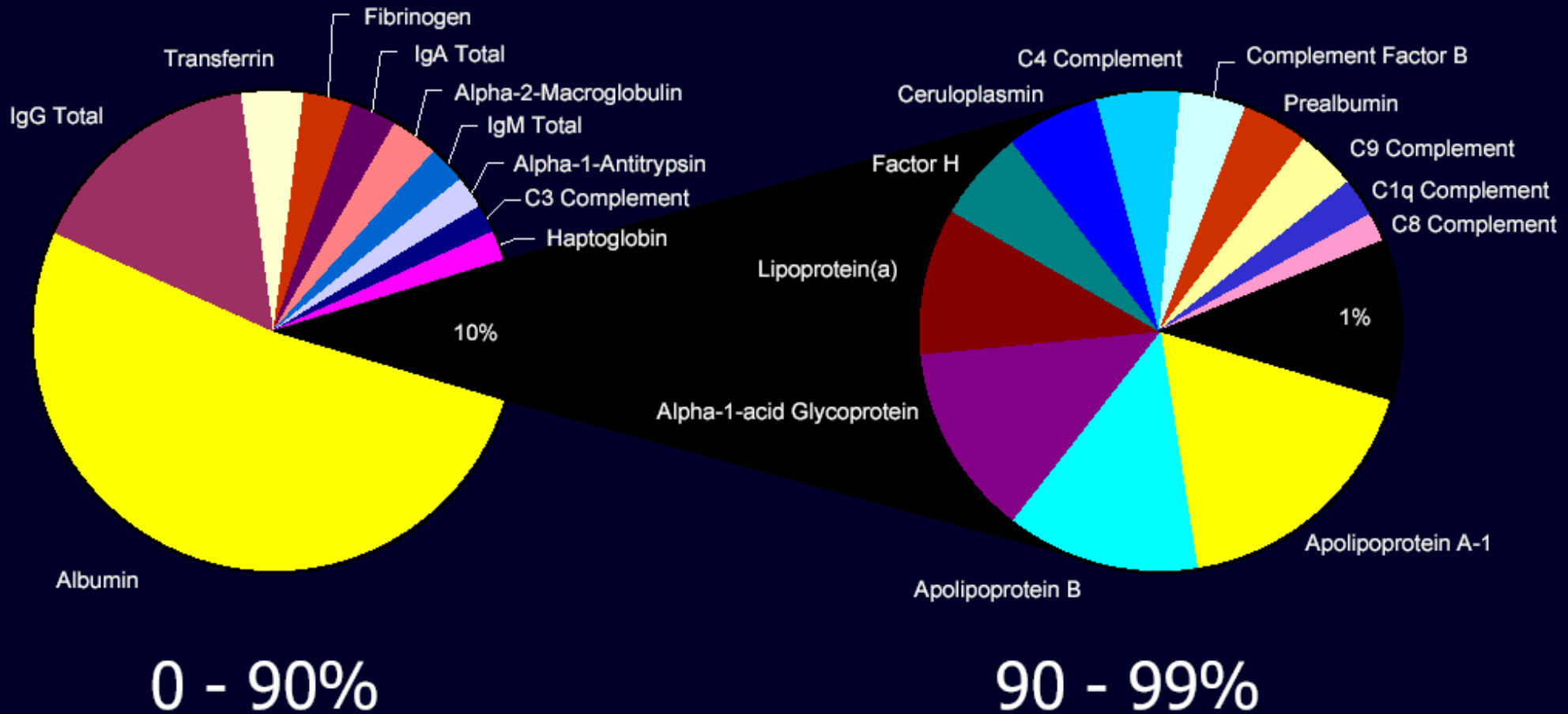
# Proteins Measured Clinically in Plasma Span > 10 Orders of Magnitude in Abundance



PPI



The Plasma Proteome Institute



# DEPLECE

---

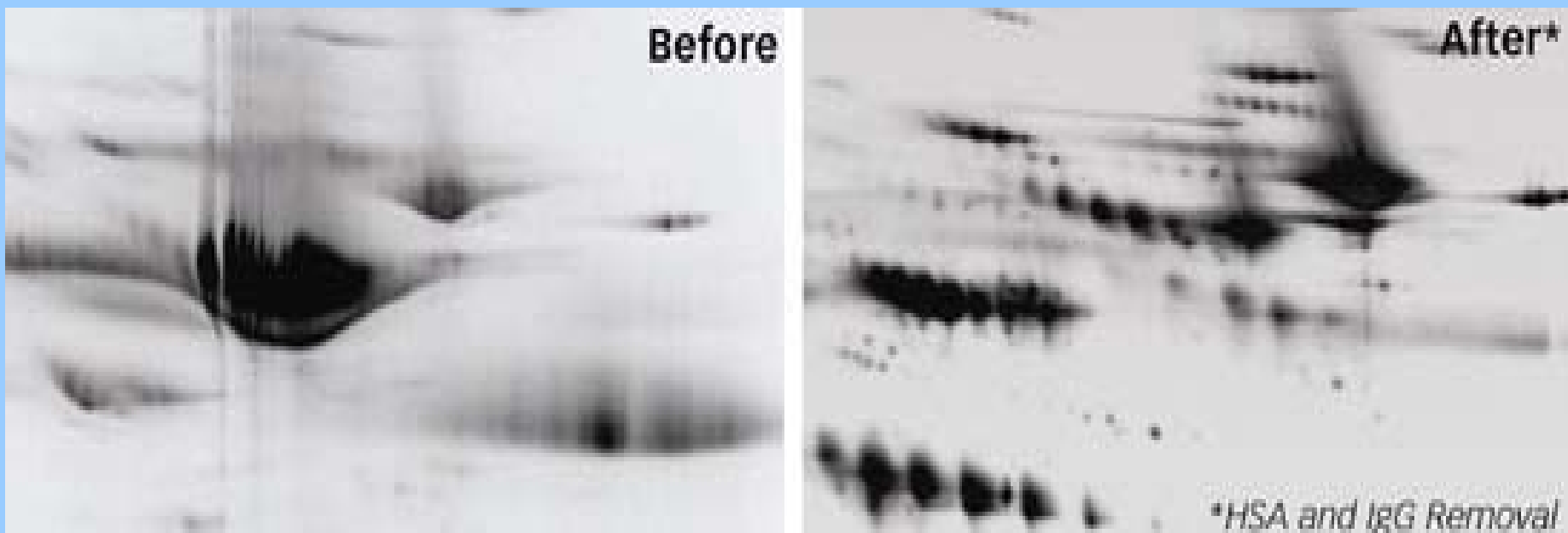
odstranění abundantních proteinů

HSA

VivaPure

PROT20

...



Vivapure Kit

# Lidská plazma - vázaná frakce po afinitní depleci

ALBUMIN

IgG

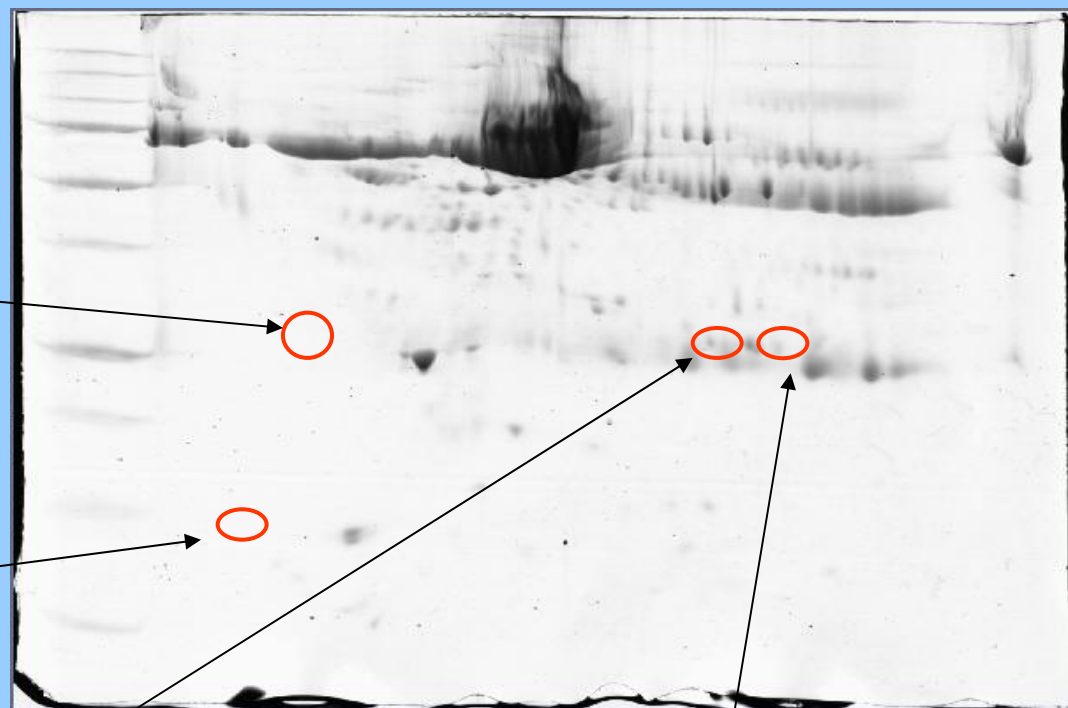
Barvení: CB G-250

Apolipoprotein

albumin

Immunoglobulin kappa light chain

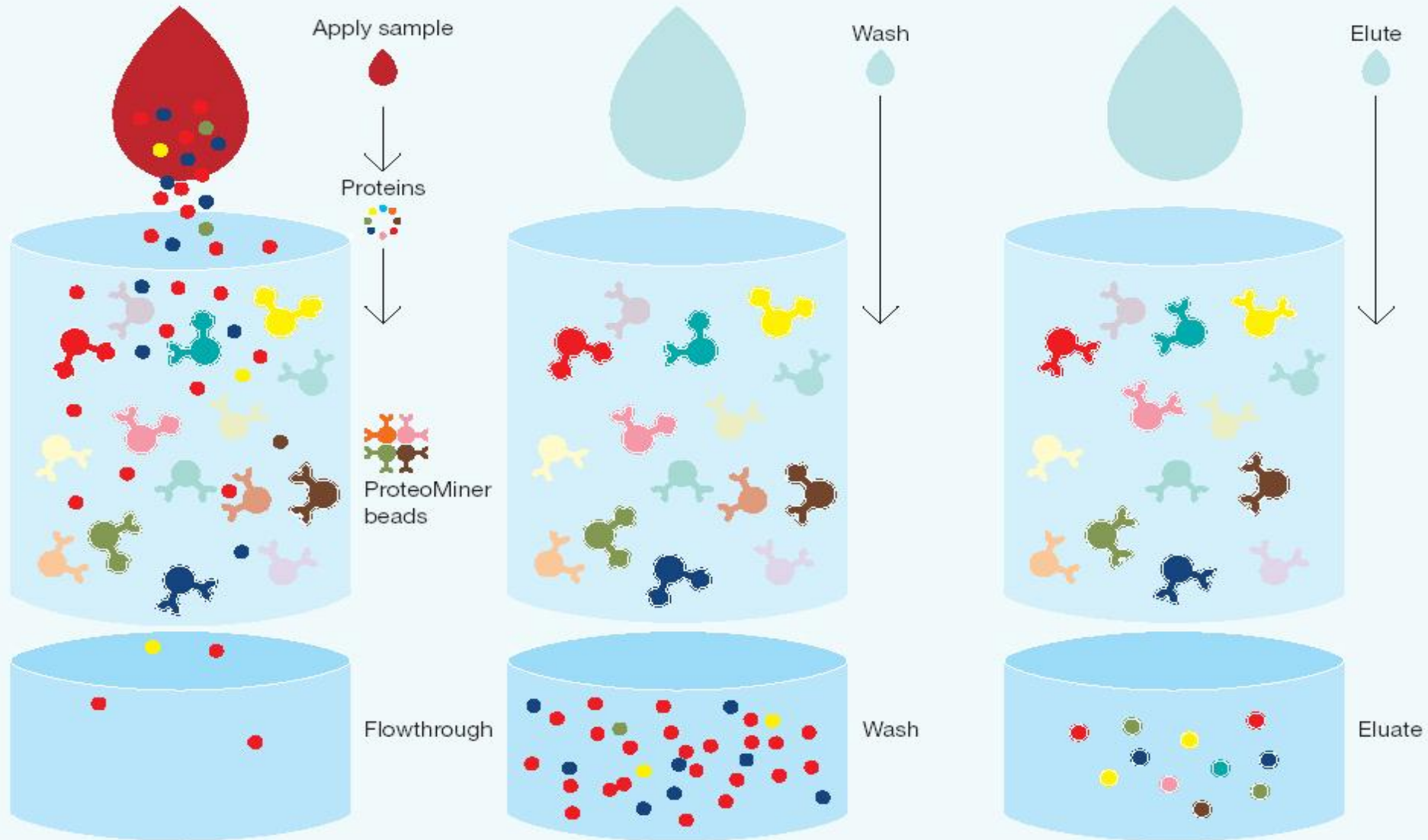
Immunoglobulin light chain





# PREFRAKCIÓNACE

# PROTEOMINER



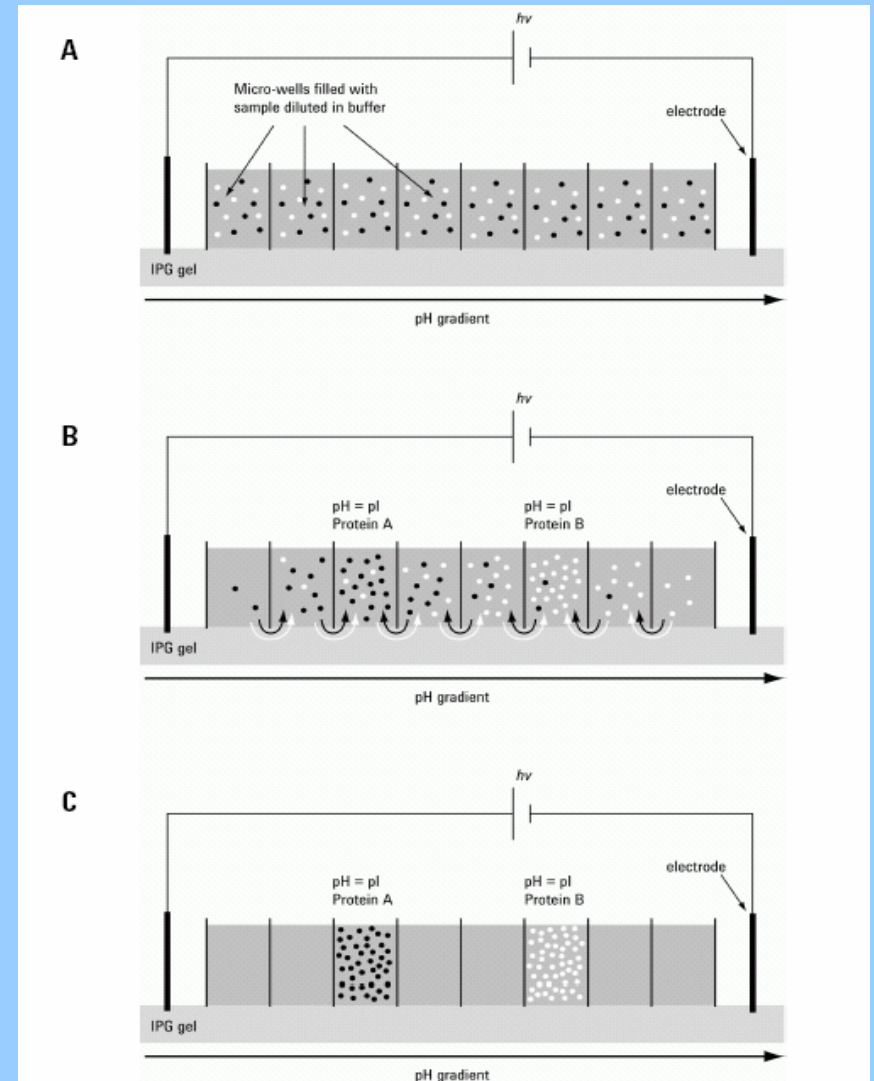
# PREFRAKIONACE



MicroRotor



OffGel Fractionator

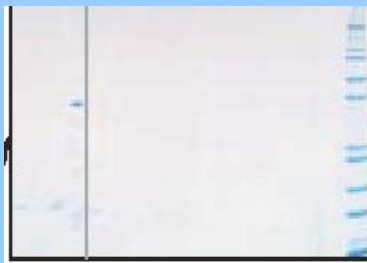


PREFRAKCIONACE

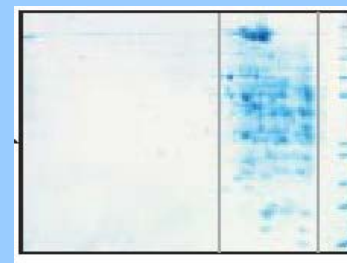
pI

MIKRO ROZSAH

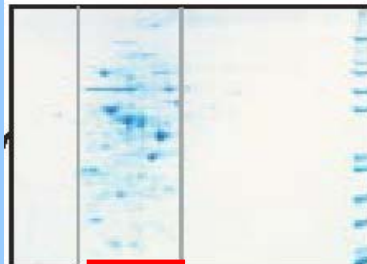
pI



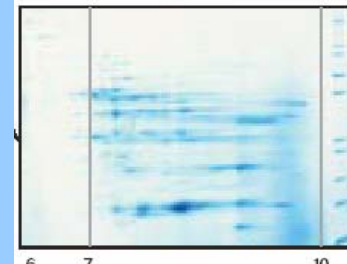
3.0-4.6 Fraction



6.2-7.0 Fraction

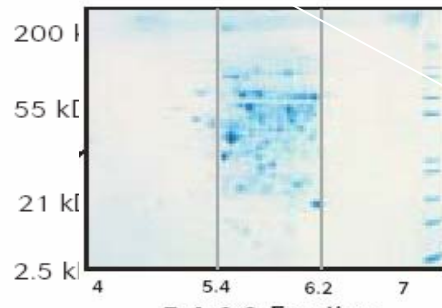
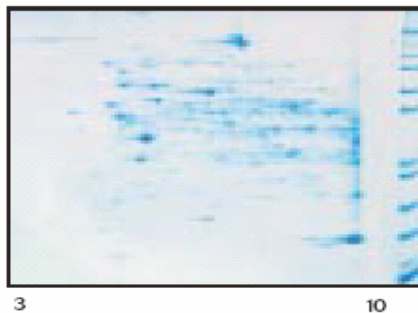


4.6-5.4 Fraction

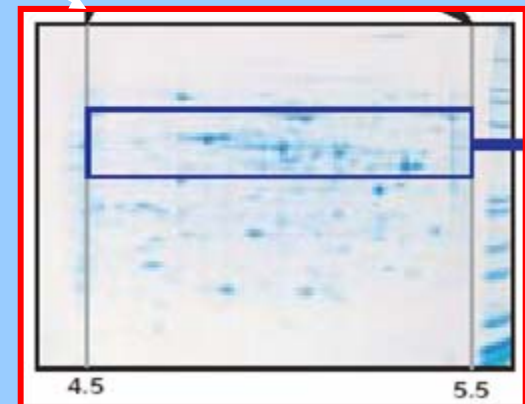


7.0-10.0 Fraction

Unfractionated



5.4-6.2 Fraction

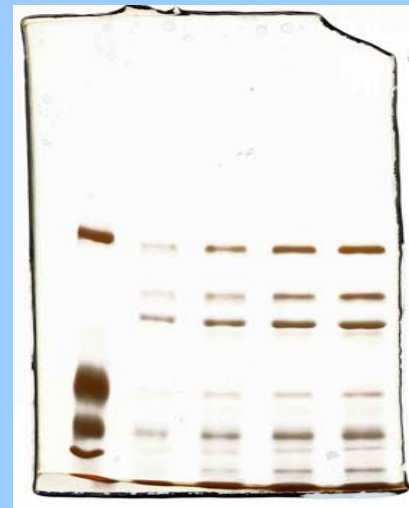




# SDS PAGE

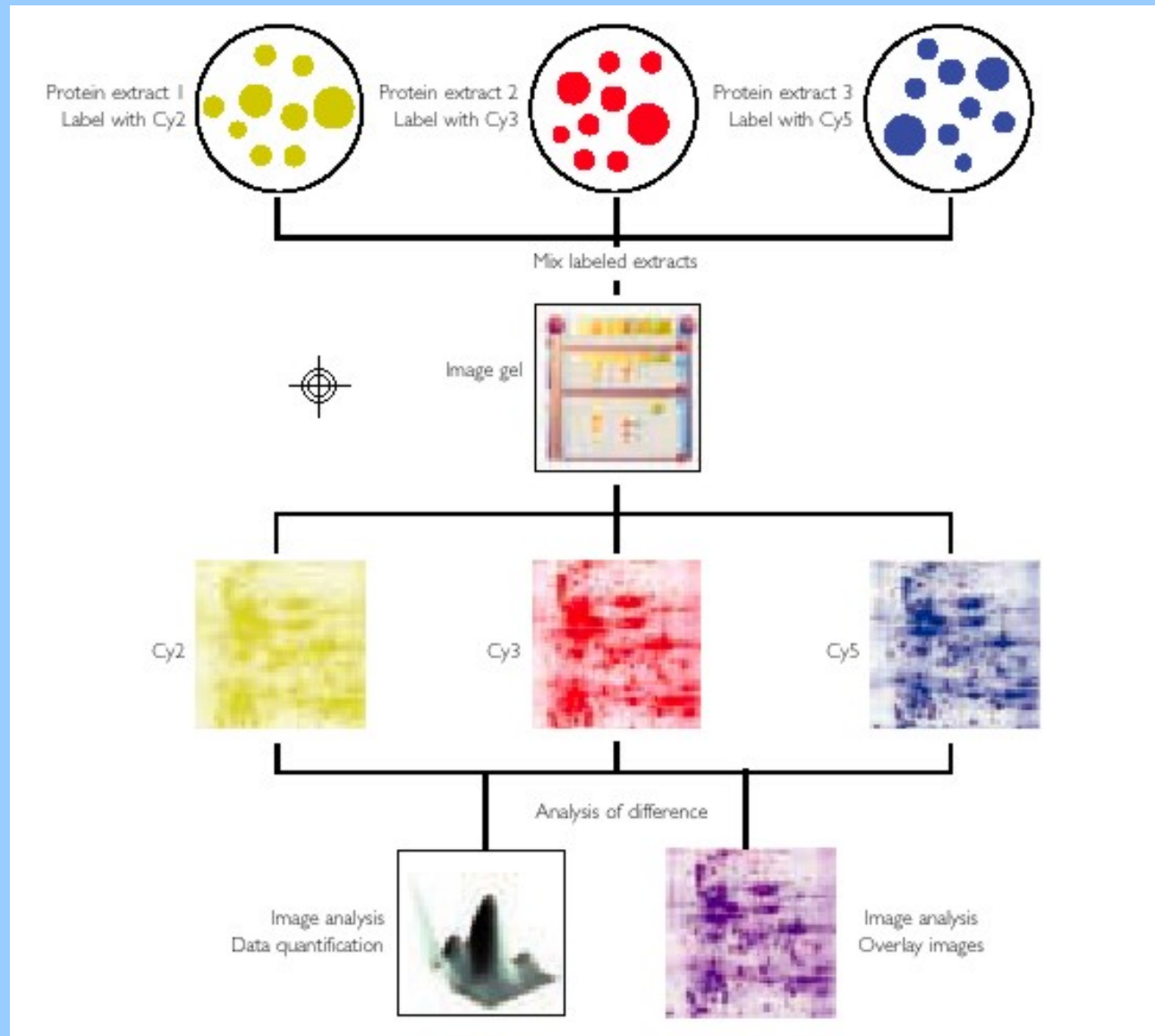


Protean II  
Mini-Protean 3  
Mini-Protean 3 Dodeca Cell



bakteriofág 812

# Difference Gel Electrophoresis DIGE

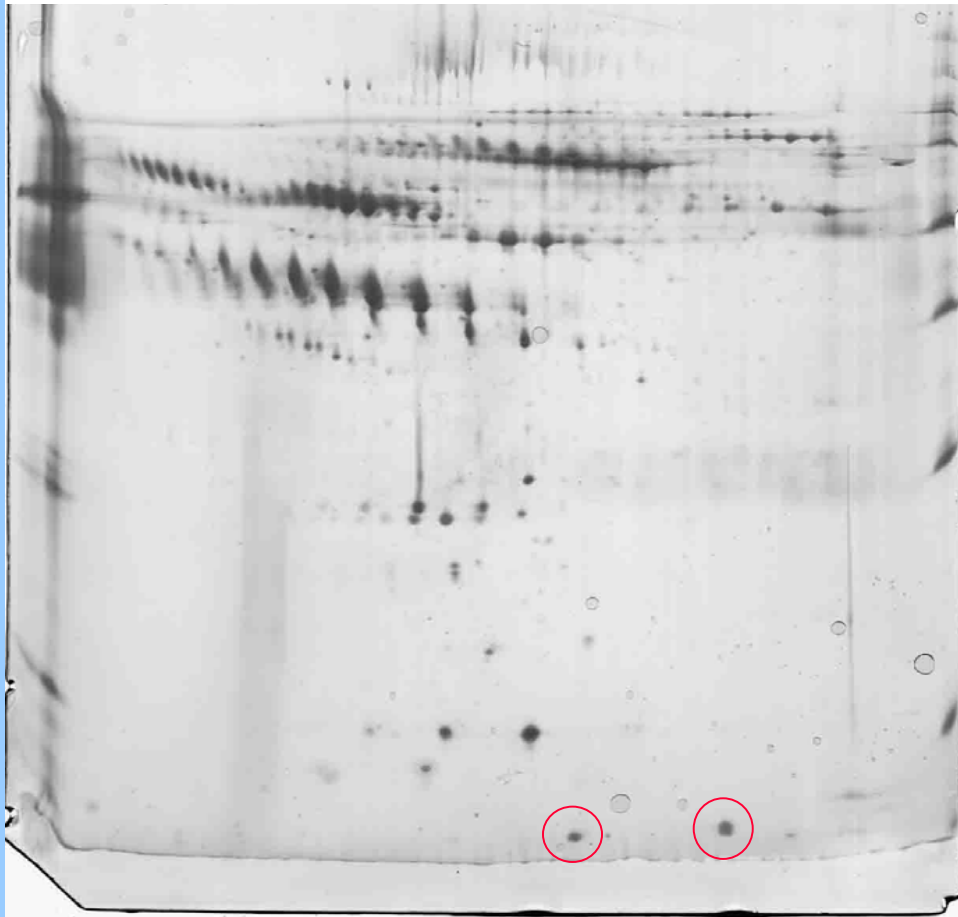


**separace**



**identifikace**

**depletovaná plasma**



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

**vesikly kmenových buněk**



BSA

# DIGESCE

trypsin    Glu-C    Asp-N    thermolysin

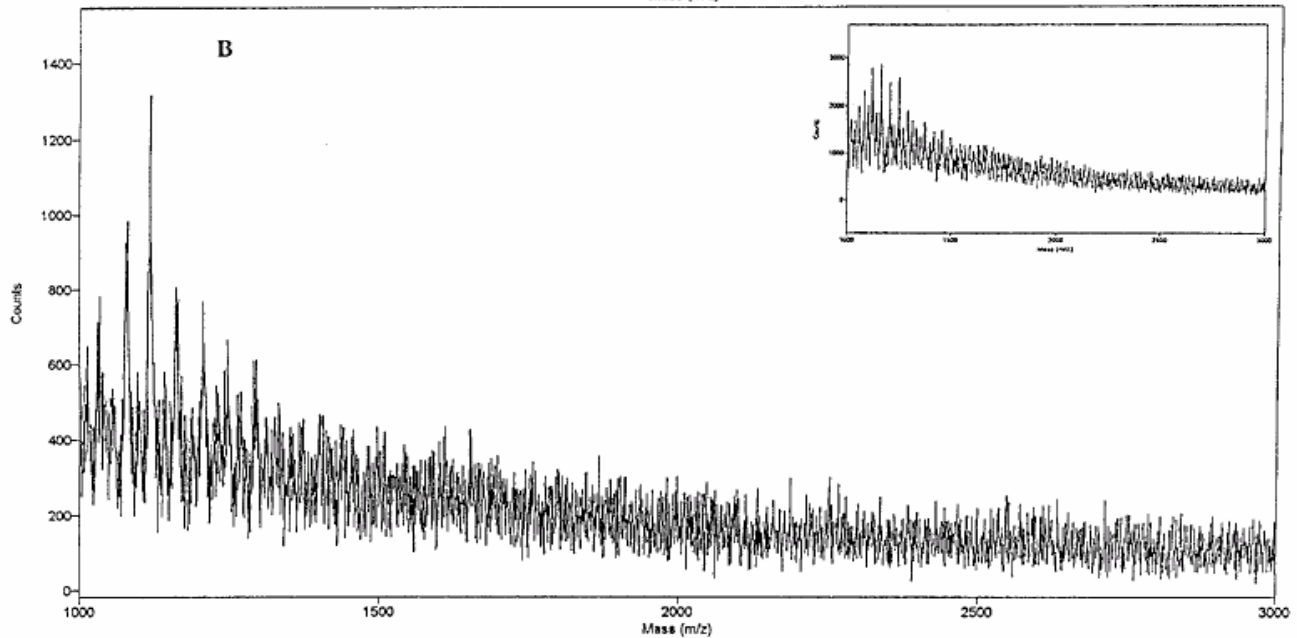
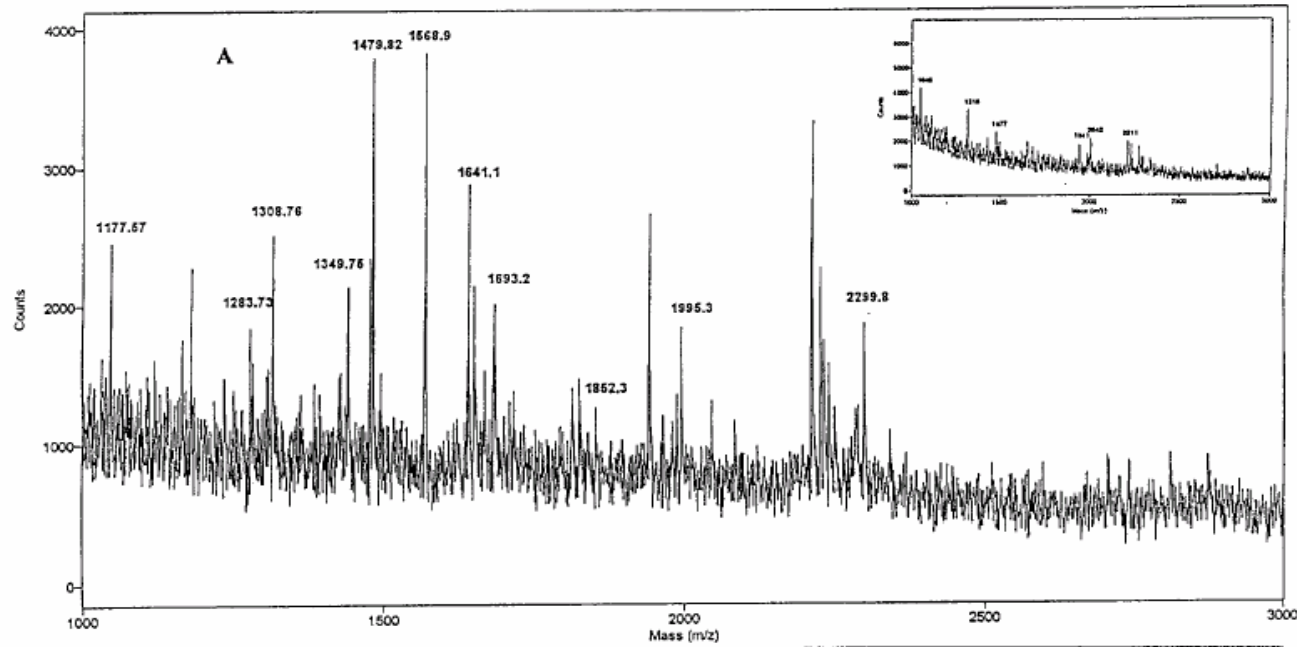


MAVEPFRRPITRPHASIEVDTSGTGGGSAGSSEKVF  
CLIGQAEGGEPNTVYELRNYAQAKRLFRSGELLD  
AIELAWGSPNYTAGRILAMRIEDAKPASAEIGGL  
KITSKIYGNVANNIQVBLEKNTLSDSLRLRVIFQD  
DRFNEVDNIGNIFTIKYKGEEANATFSVEHDEET  
QKASRLVLKVGDEVKSYDLTGGAYDYTNAIITD  
INQLPDFEAKLSPFGDKNLESSKLDKIENANIKDK  
AVYVKA VFGDLEKQTAYNGIVSFEQLNAEGEVPS  
NVEVEAGEESATVTATSPIKTIEPFELTKLKGSTN  
GEPPATWADKLDKFAHEGGYYIVPLSSKQSVHAE  
VASFVKERSDAGEPMRAIVGGGFNESKEQLFGRQ  
ASLSNPRVSLVANSGETFVMDDGRKNHVPAYMVA  
VALGGLASGLEIGESITFKPLRVSSLDQIYESIDLDE  
LNENGIISIEFVRNRTNTFFRIVDDVTTFNDKSDPV  
KAEMAVGEANDFLVSELKVQLEDQFIGTRTINTS  
ASIIKDFIQSYLGRKKRDNEIQDFPAEDVQVIVEGN  
EARISMTVYPIRSFKKISVSLVYKQQTLLQA

- IN-GEL
- IN-SOLUTION



MS



**DIGEST**

**BSA**

v gelu

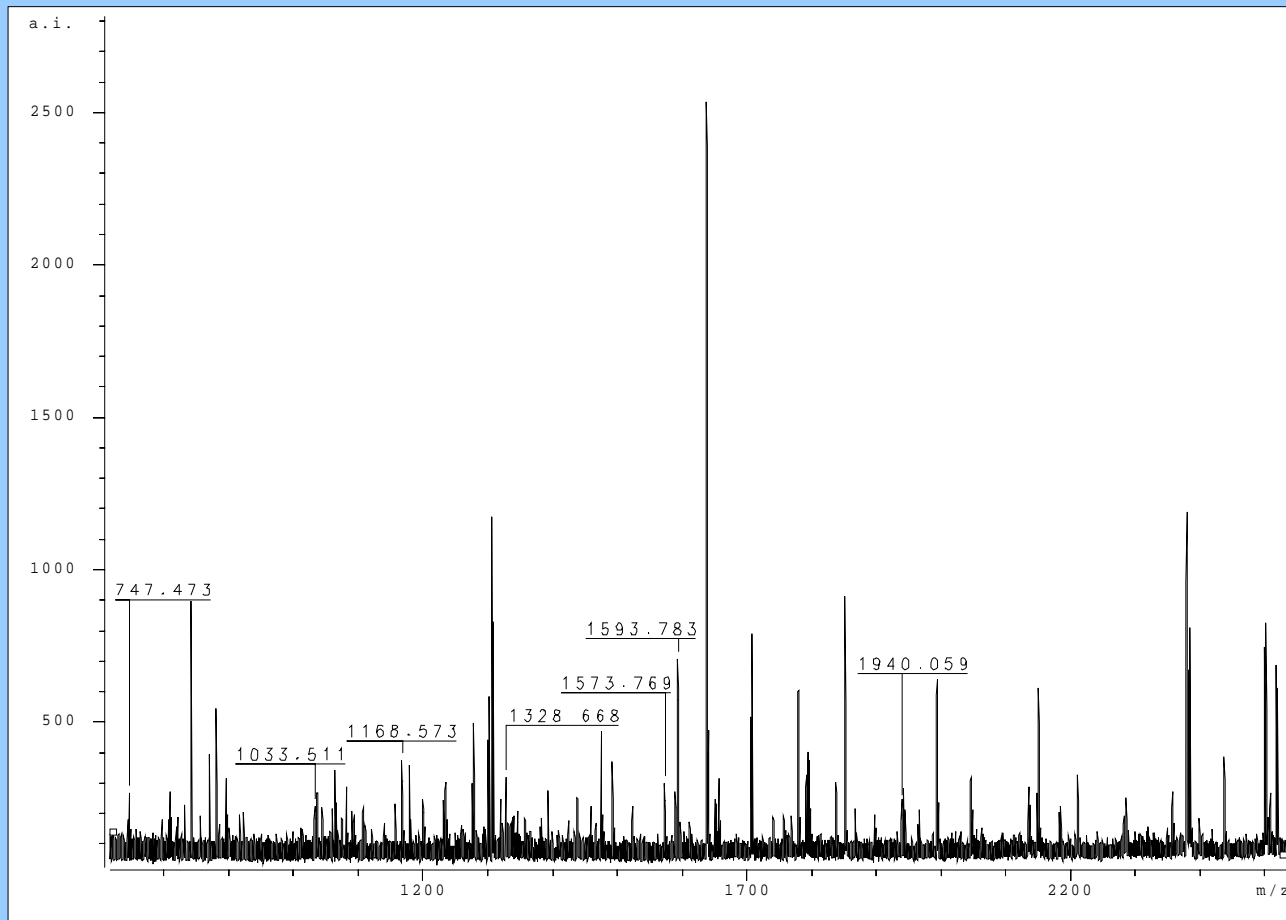
kompatibilní stříbro

**odbarvený gel**

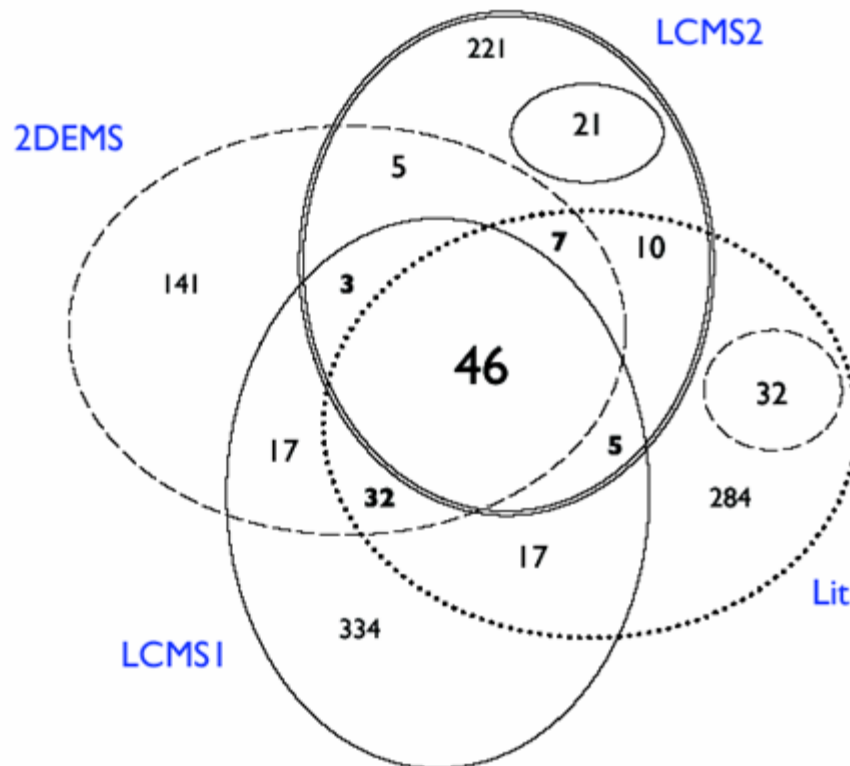
**gel bez odbarvení**

# KERATINY !!! Potlačení ionizace

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



# 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

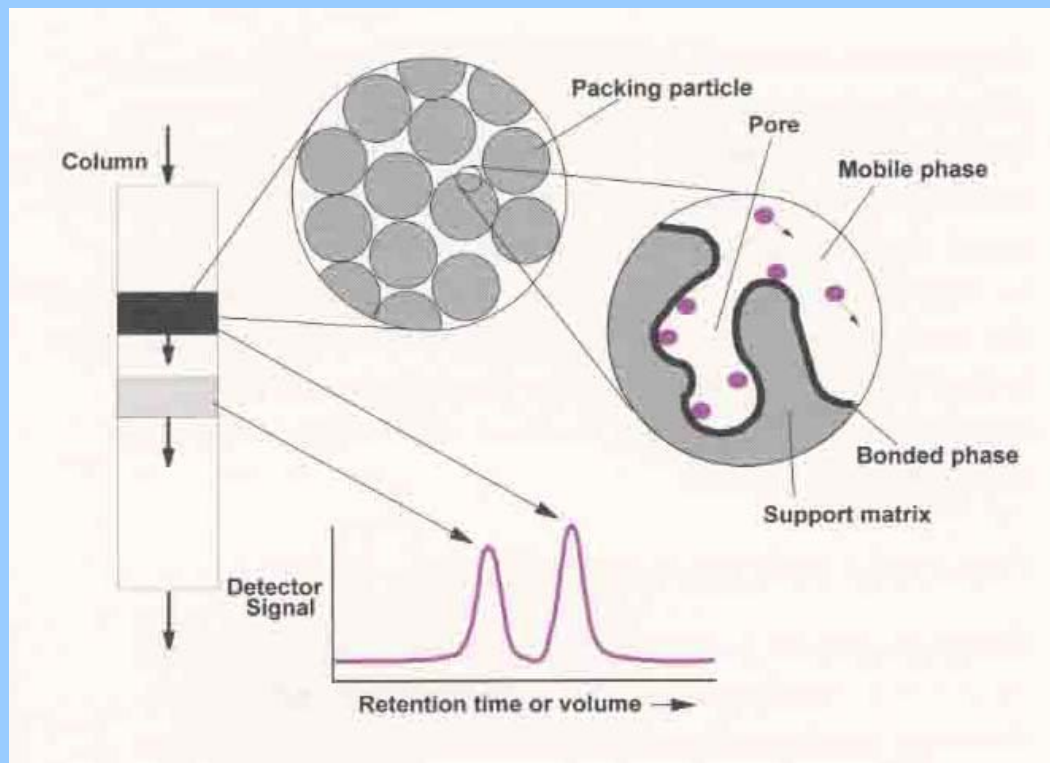
ALTERNATIVA 2D GE

---

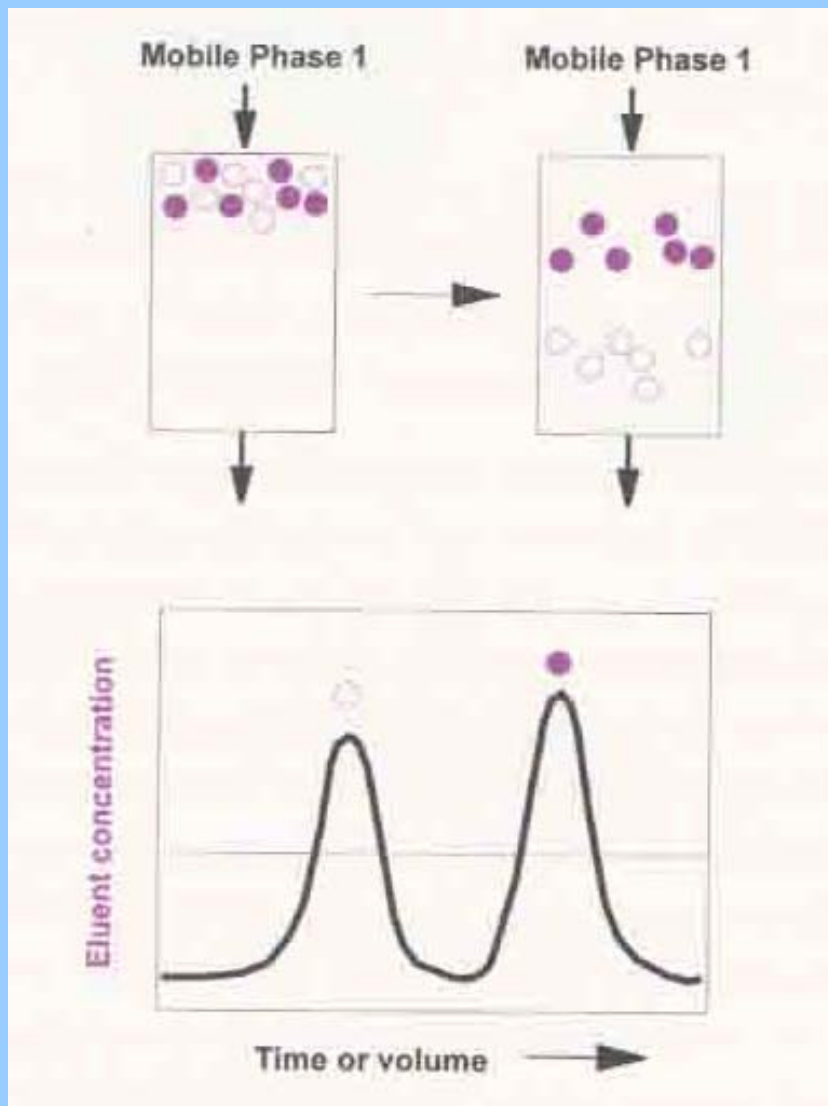
## II. MULTIDIMENZIONÁLNÍ CHROMATOGRRAFIE



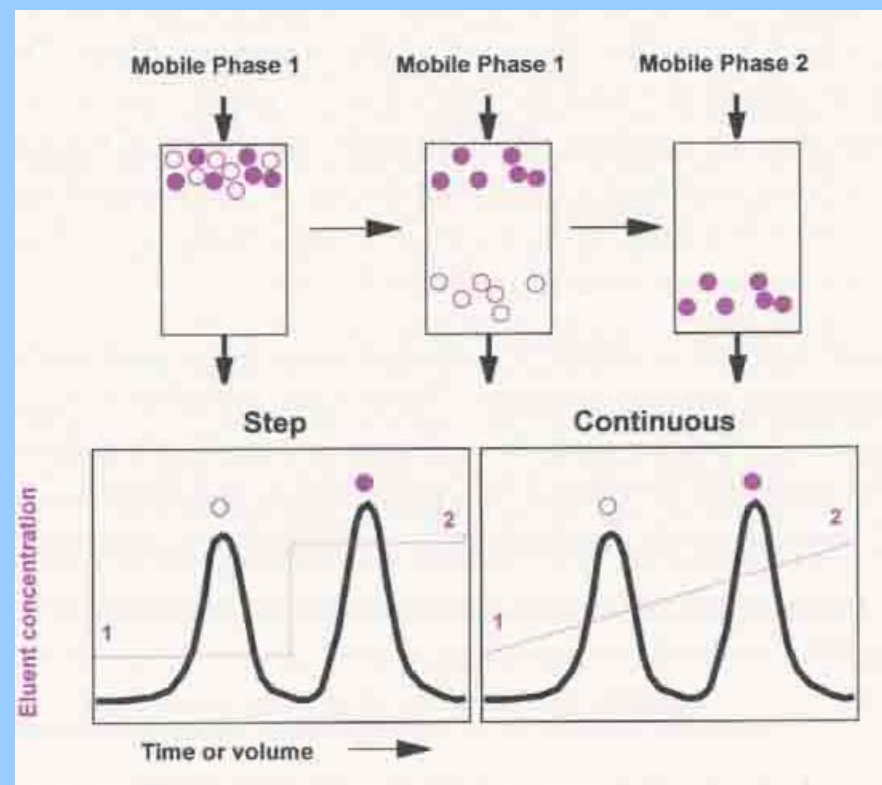
# PROTEINY A PEPTIDY PRINCIPY SEPARACE KAPALINOVOU CHROMATOGRAFIÍ



# Isokratická eluce



# Gradientová eluce



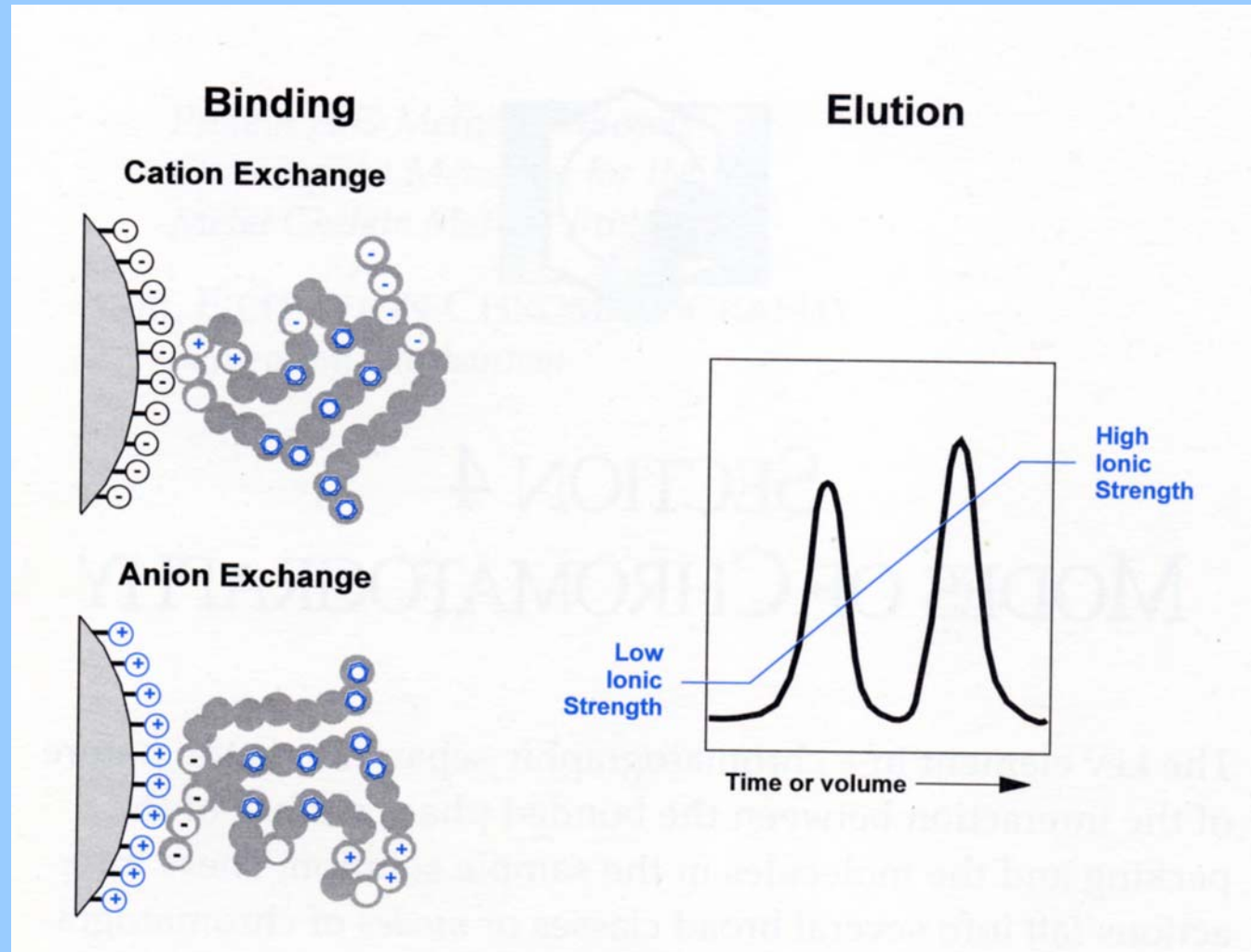
# TYPY LC SEPARACE

---

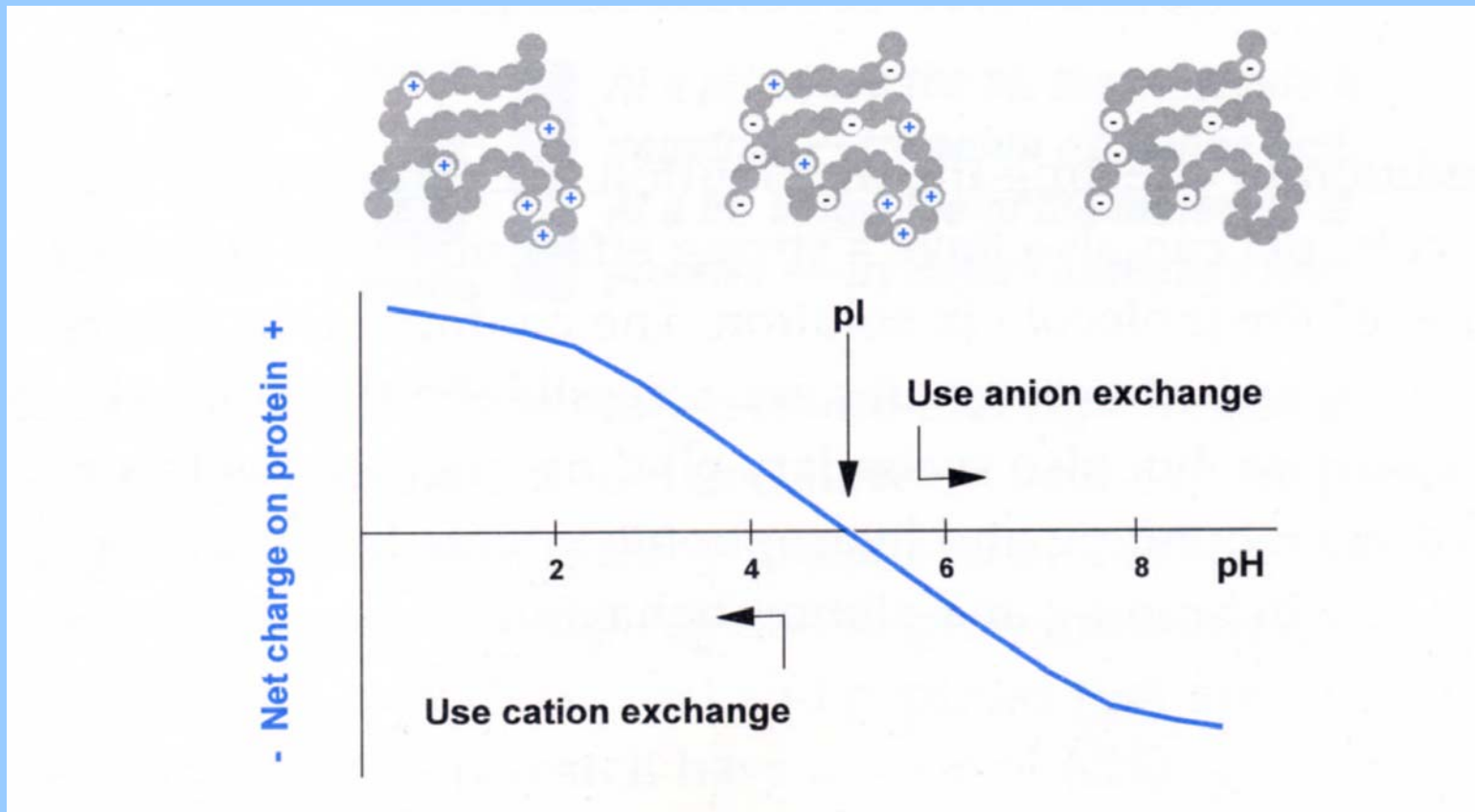
CO ROZHODUJE  KOLONA

- |                         |               |
|-------------------------|---------------|
| ▪ náboj                 | ionex         |
| ▪ hydrofobicita         | reverzní fáze |
| ▪ biospecifická afinita | afinitní      |
| ▪ velikost molekuly     | gelová        |

# IONEXOVÁ CHROMATOGRAFIE



# Isoelektrický bod

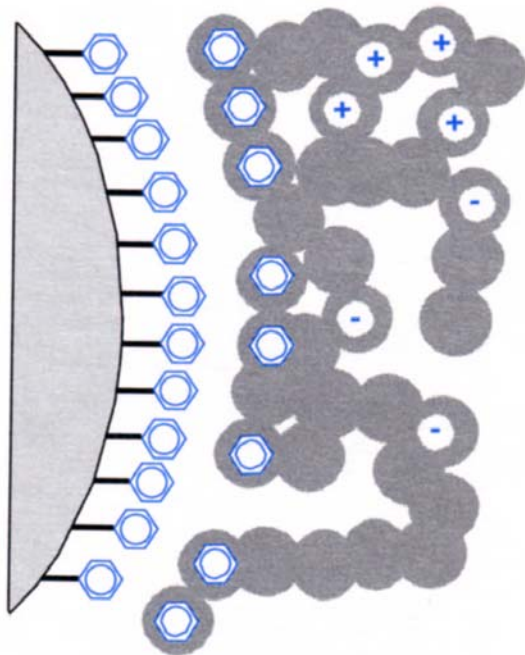


# RP CHROMATOGRAFIE

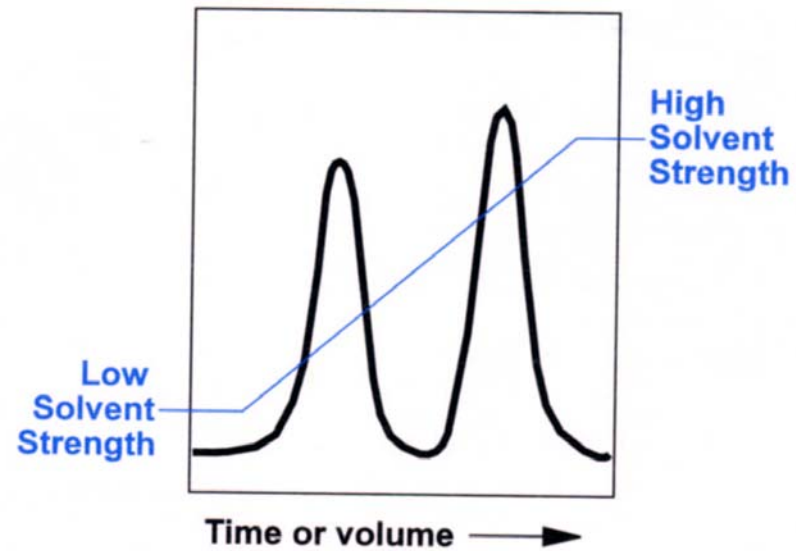
reversed-phase chromatography

---

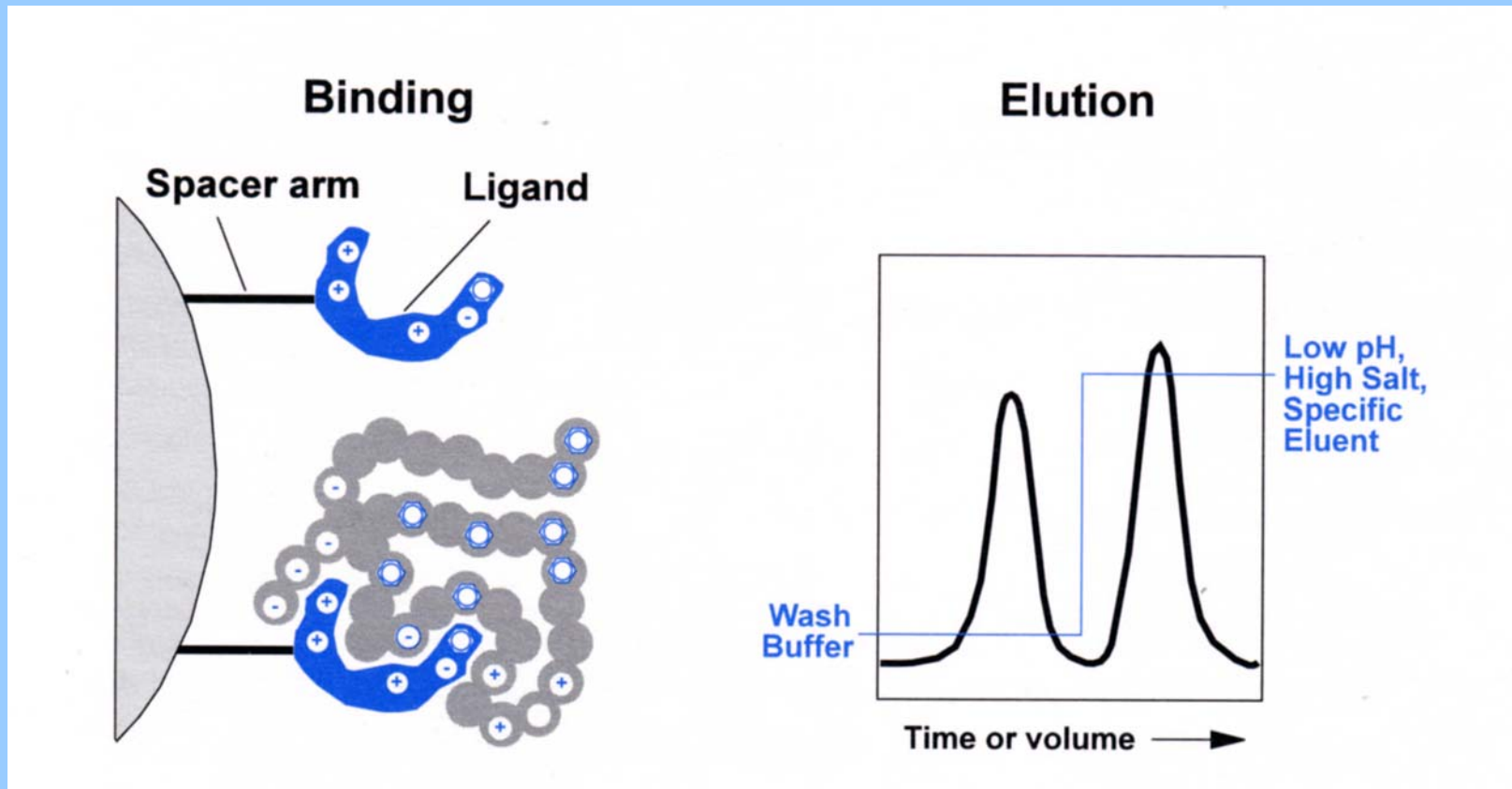
**Binding**



**Elution**



# AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE

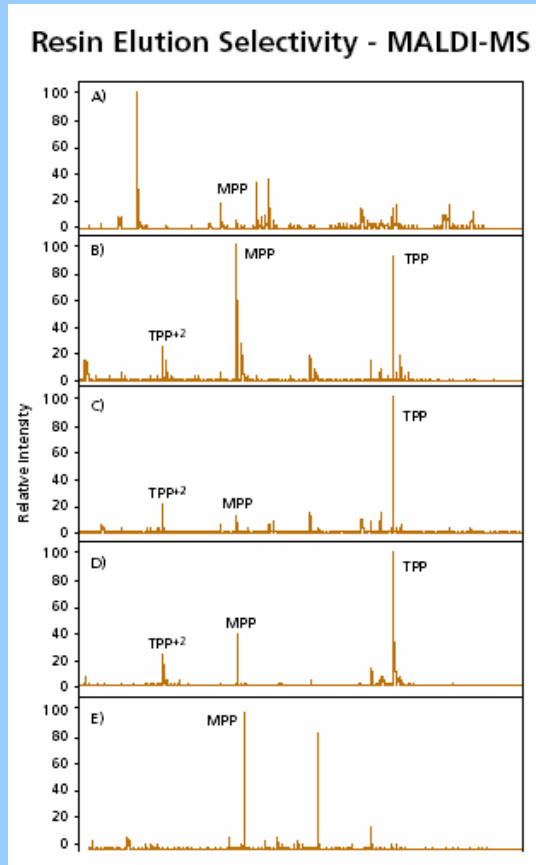


# IMAC

## Immobilized Metal Affinity Chromatography

PHOS Select Iron Affinity gel

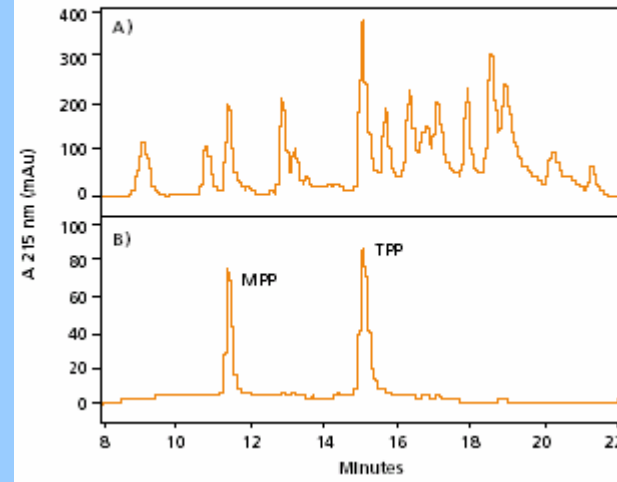
Surový



Po aplikaci

Kasein tryptic digest

### Resin Enrichment - HPLC



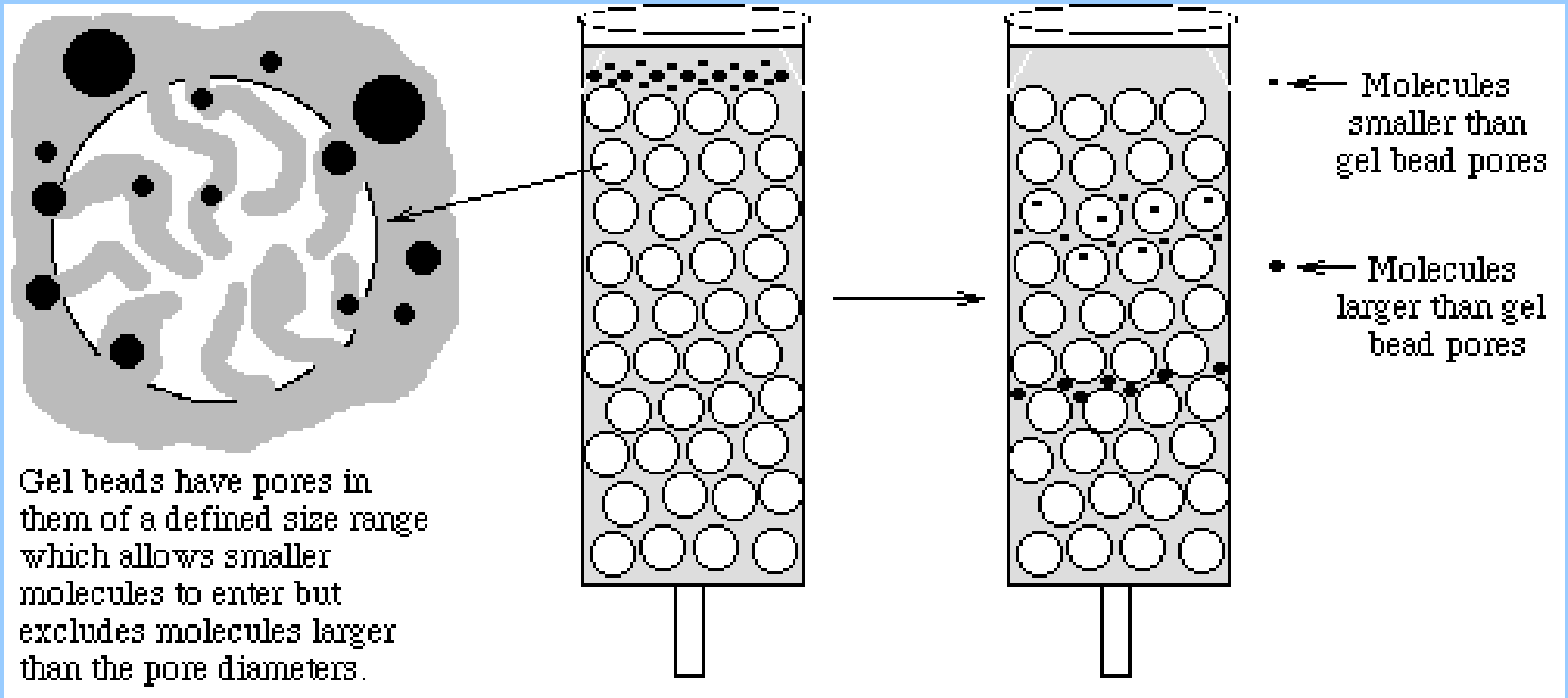
Surový

Po aplikaci

Kasein



# GELOVÁ CHROMATOGRAFIE



# KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

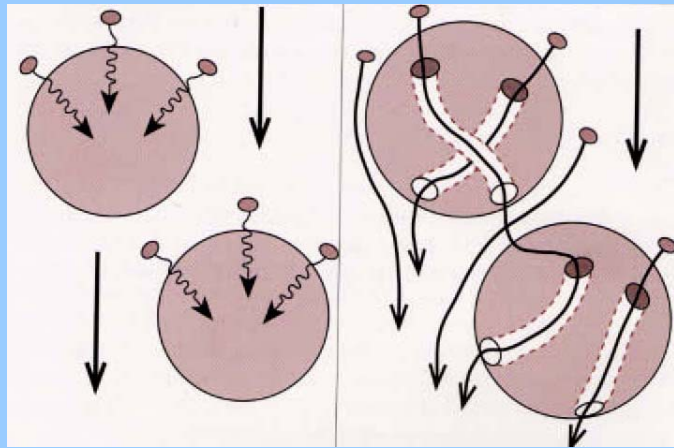
---

→ HPLC

→ LC

→ PERFÚZNÍ

# POROS



klasický sorbent

POROS

- RP
- SAX
- WAX
- SCX
- WCX
- HIC

Activated Affinity

Affinity

Application-Specific RP

## Choose the POROS Chemistry

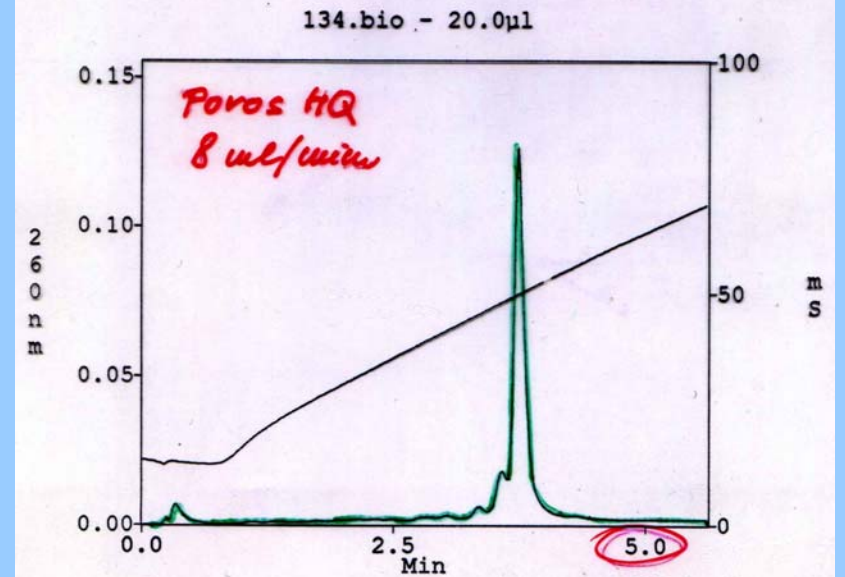
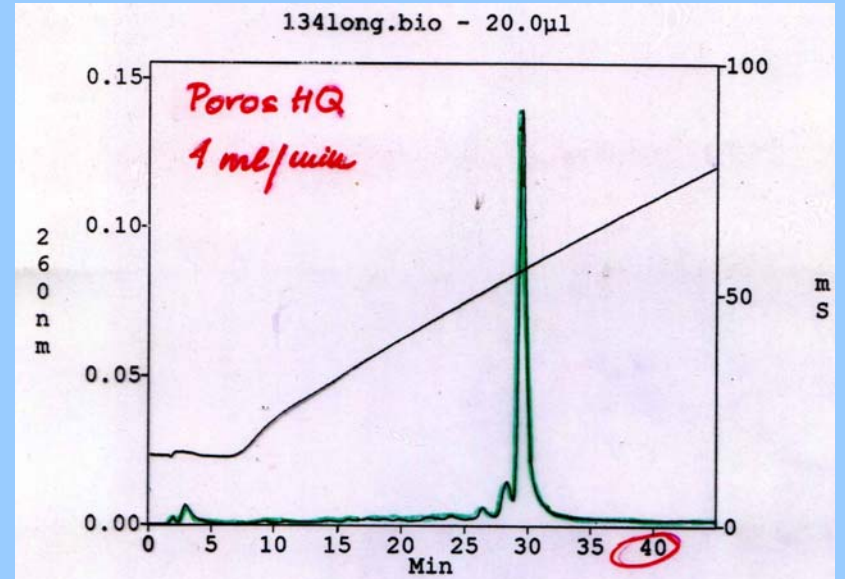
Once you've selected a particular mode of chromatography, you will have a range of POROS surface chemistries, resulting from differences in functional group and/or functional group density. While it may be advantageous to explore alternatives. With the range of POROS chemistries and their dynamic capacities, it becomes a powerful new variable to exploit when optimizing your separation.

	PRODUCT	FUNCTIONAL GROUP	FUNCTIONAL GROUP DENSITY	DYNAMIC CAPACITY*	
<b>REVERSED-PHASE CHROMATOGRAPHY</b>					
	<b>R1</b>	Base Poly(styrene-divinyl benzene)	Low phase ratio, providing low retentivity	5 mg/mL	Fo R1
	<b>R2</b>	Base Poly(styrene-divinyl benzene)	High phase ratio, providing higher binding strength and retentivity	10 mg/mL	Ge of
<b>ION-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY</b>					
<b>STRONG ANION EXCHANGERS</b>	<b>HQ</b>	Quaternized polyethyleneimine	High	55 mg/mL	Fo th
	<b>QE</b>	Quaternized polyethyleneimine	Medium	30 mg/mL	Al
<b>WEAK ANION EXCHANGERS</b>	<b>DEAE</b>	Diethylaminoethyl	Medium	55 mg/mL	Ar
	<b>PI</b>	Polyethyleneimine	Medium	45 mg/mL	Ar
<b>STRONG CATION EXCHANGERS</b>	<b>HS</b>	Sulphopropyl	High	75 mg/mL (POROS 50 60 mg/mL)	Fo bl
	<b>SP</b>	Sulphopropyl	Medium	45 mg/mL	Al
	<b>S</b>	Sulphoethyl	Low	10 mg/mL	Sg bl
<b>WEAK CATION EXCHANGERS</b>	<b>CM</b>	Carboxymethyl	High	70 mg/mL	Co
<b>HYDROPHOBIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY</b>					
	<b>HP2</b>	High density phenyl	High	12 mg/mL	Fo pc
	<b>PE</b>	Phenyl ether	Medium	8 mg/mL	Ge m
	<b>ET</b>	Ethyl ether	Medium	4 mg/mL	Pe 50
<b>ACTIVATED AFFINITY CHROMATOGRAPHY</b>					
<b>FOR ACTIVATION</b>	<b>OH</b>	Hydroxyl			Al di
	<b>AL</b>	Aldehyde			Co
<b>PRE-ACTIVATED</b>	<b>EP</b>	Epoxide			Co hy
	<b>NH</b>	Primary amine			Fo wt
	<b>HY</b>	Hydrazide			Fo m
<b>AFFINITY CHROMATOGRAPHY</b>					
	<b>A</b>	Recombinant Protein A		30 mg/mL	De co R1
	<b>G</b>	Recombinant Protein G		15 mg/mL	Fo Br
	<b>HE</b>	Heparin		15 mg/mL	Fo ic
	<b>MC</b>	Imido-diacetate		15 mg/mL	Be co
<b>APPLICATION-SPECIFIC REVERSED-PHASE MEDIA</b>					
	<b>Oligo R3</b>	Poly(styrene-divinyl benzene)	Very high phase ratio	30 mg/mL	Sg pl pr
	<b>PepMap C18</b>	Silica C18, end-capped	7% carbon loading		Pe ap

\*Test protein



BioCAD 700E



Kolona může vypadat různě . . .

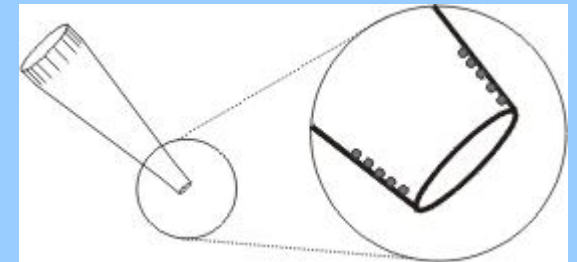
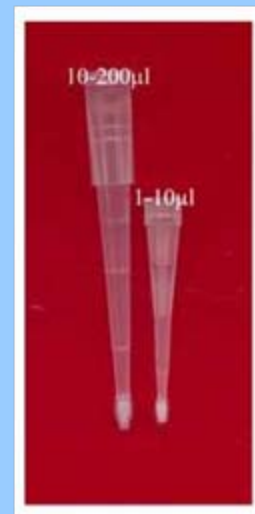


Glygen

TopTip

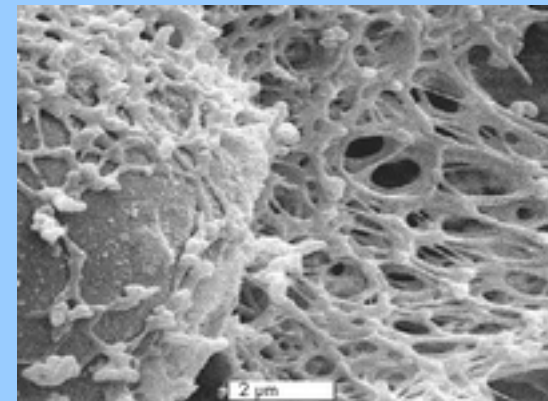


NuTip



Zip Tip  
Millipore

C18  
C4  
MC  
SCX



# MULTIDIMENZIONÁLNÍ CHROMATOGRAFIE

---

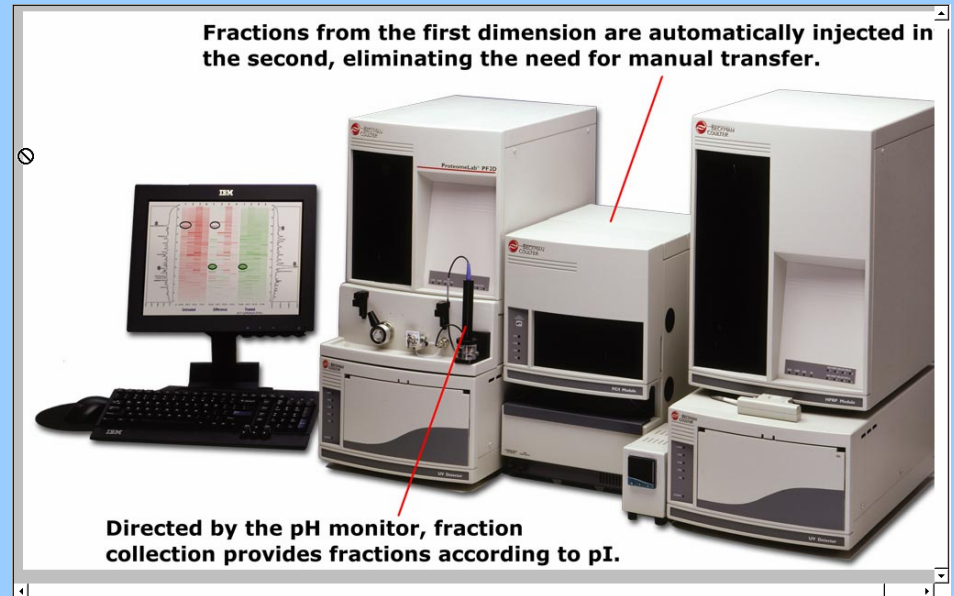
kombinace odlišných fyzikálních a chemických separačních principů

- diskontinuální
- kontinuální
- dvoufázová kolona

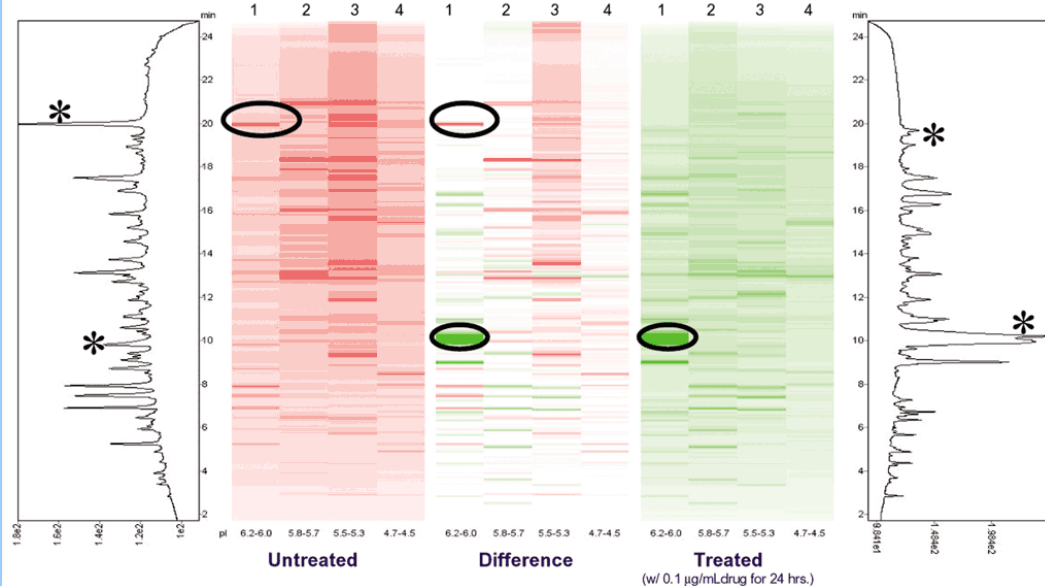


# ProteomeLab PF 2D

- chromatofokusace
- RP



Partial pI/UV map of colon cancer cell line before and after treatment





# MULTIDIMENZIONÁLNÍ CHROMATOGRRAFIE

---

## PRO

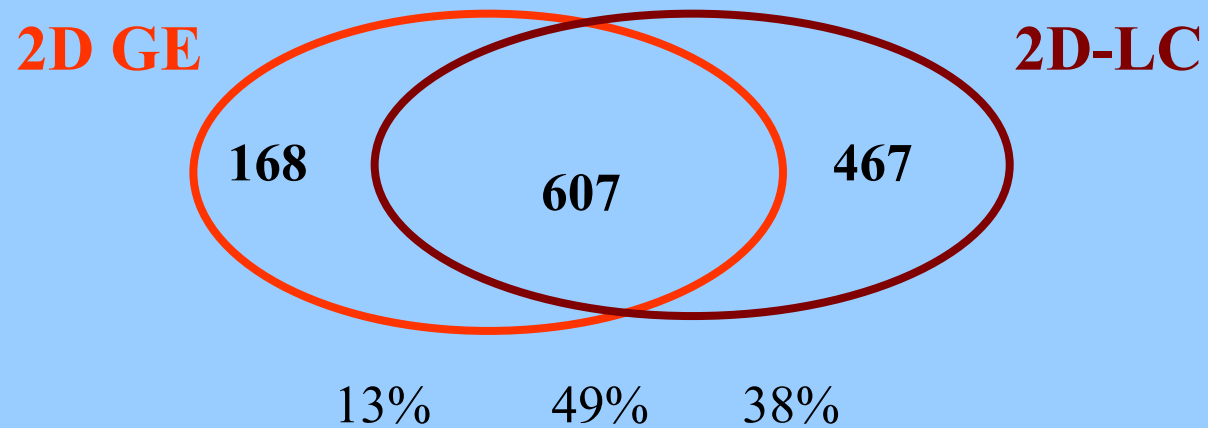
- velké objemy vzorku
- možnost koncentrace na koloně
- membránové proteiny, basické proteiny
- není nutno barvit
- peptidy – přímé napojení na MS
- automatizace

## PROTI

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

## KOMPLEMENTARITA METOD

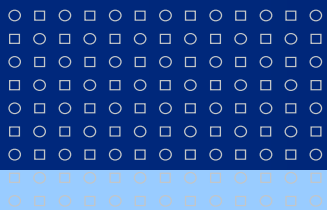
---



## LITERATURA

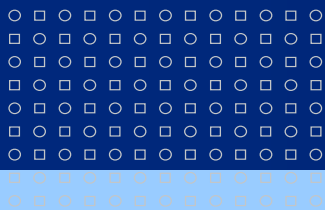
---

- 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
- Busy Researcher's Guide to Biomolecule Chromatography
- Current Protocols in Protein Science



**G I G O**





**G I G O**

**GARBAGE IN - GARBAGE OUT**



# 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 **Association of Biomolecular Resource Facilities**

## 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



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



Oddělení funkční genomiky a proteomiky

Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta  
Brno, Česká republika

ABVMK

CL

LMFR

Vyhledávání

OK

OFGP

- O 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, 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 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 Zdráhal 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**

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

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

**Objednávkový formulář** pro sekvenaci DNA.