



# MASARYKOVA UNIVERZITA

Rozvoj týmu pro výuku, výzkum a aplikace v oblasti funkční genomiky a proteomiky  
(CZ.1.07/2.3.00/09.0132)

Středoevropský technologický institut CEITEC  
Centrální laboratoř - Proteomika

## PŘÍPRAVA PROTEINOVÉHO VZORKU PRO MS ANALÝZU

**Hana Konečná**

Oddělení funkční genomiky a proteomiky ÚEB PŘF MU  
[www.sci.muni.cz/pVpKnb/](http://www.sci.muni.cz/pVpKnb/)



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

GENOM



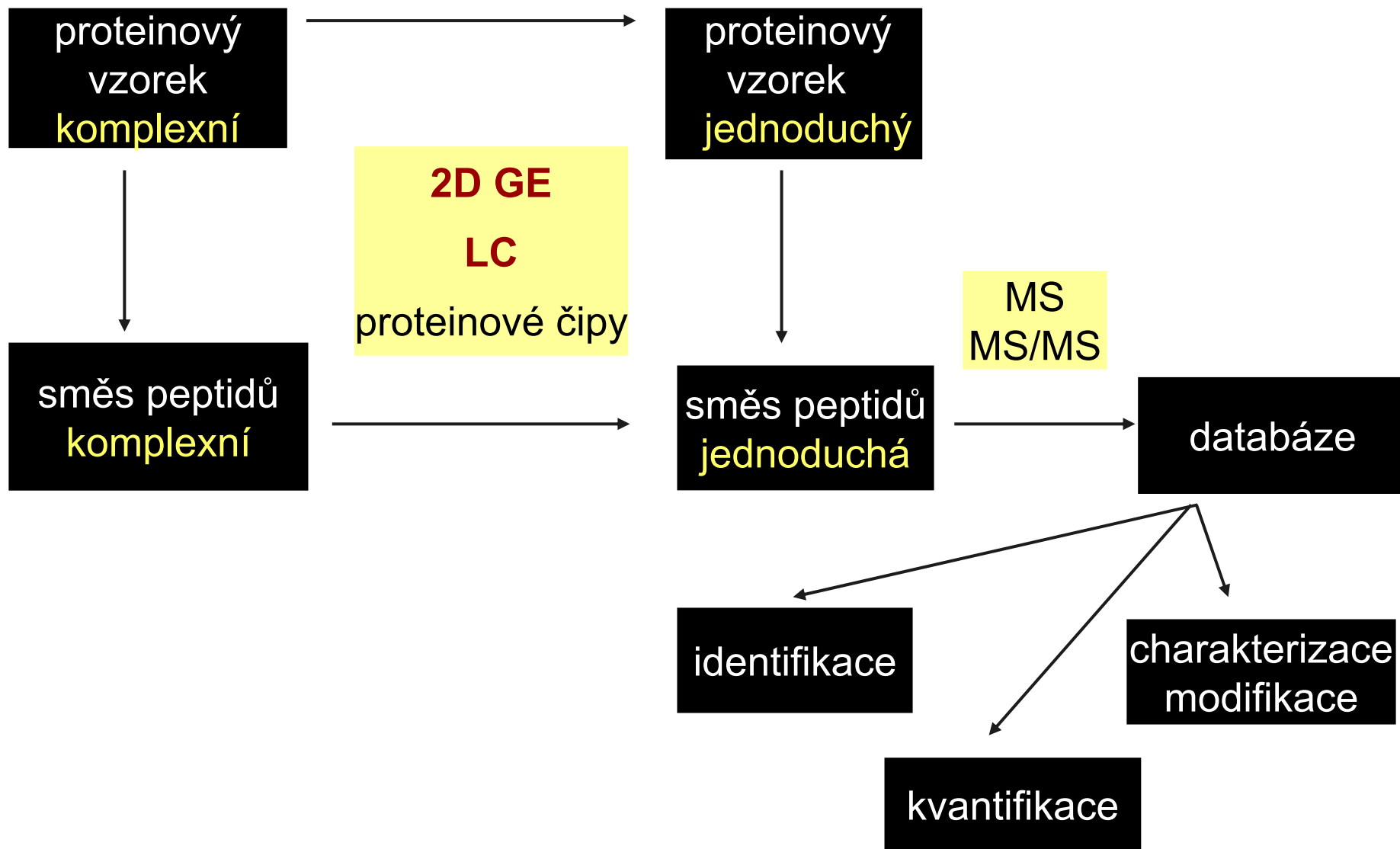
PROTEOM

**PTM** asi 200 typů (fosforylace, glykosylace, acylace, methylace...)

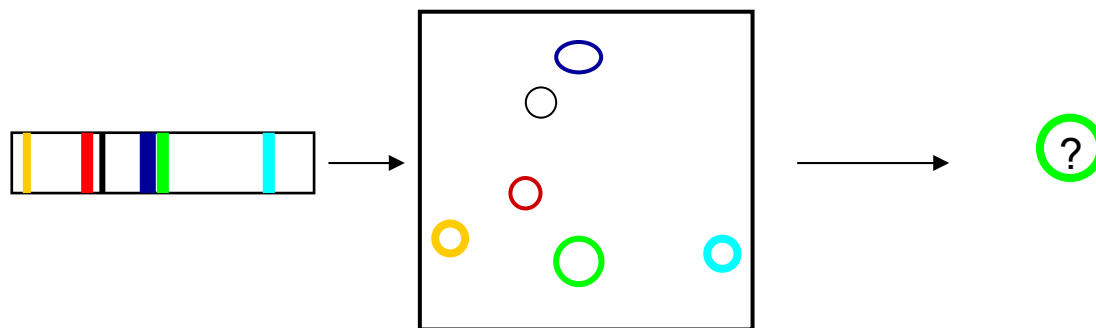
**KONCENTRAČNÍ ROZSAH** asi deset řádů



NUTNÁ **FRAKCIONACE** PŘED MS

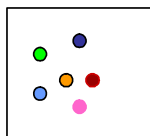


# I. Dvoudimenzionální elektroforéza 2-DGE



# Proteomický experiment

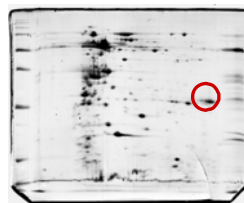
**extrakce**



**fokusace**



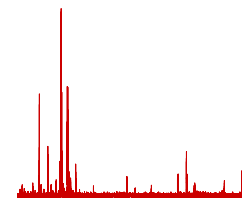
**SDS-PAGE**



**digest**



**MS**

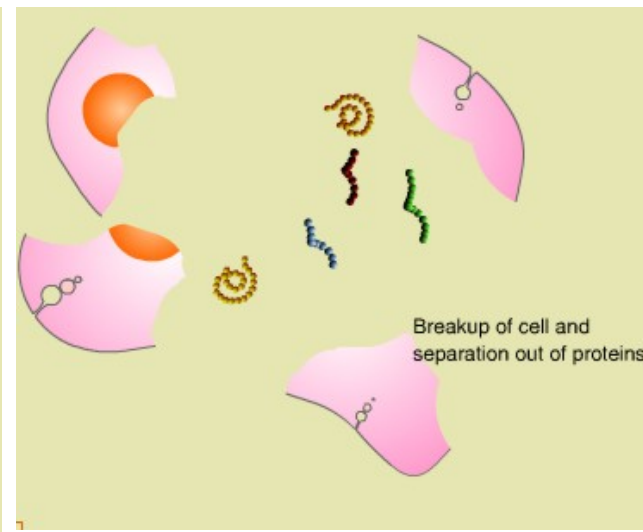
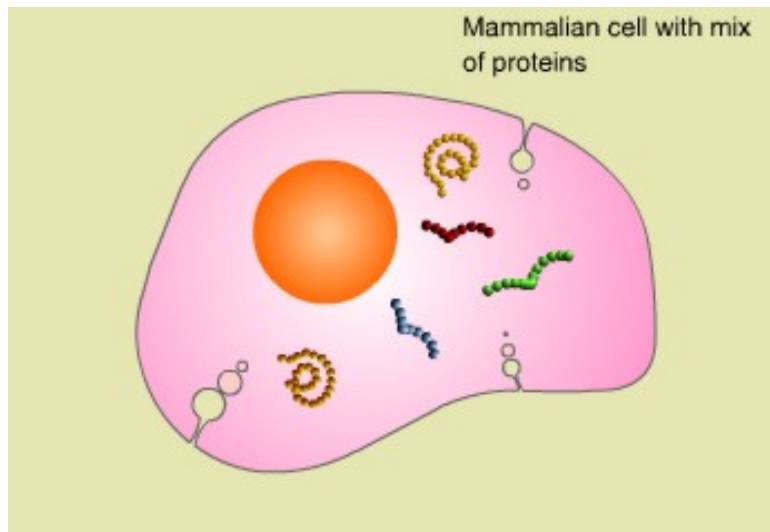


**identifikace**

**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**

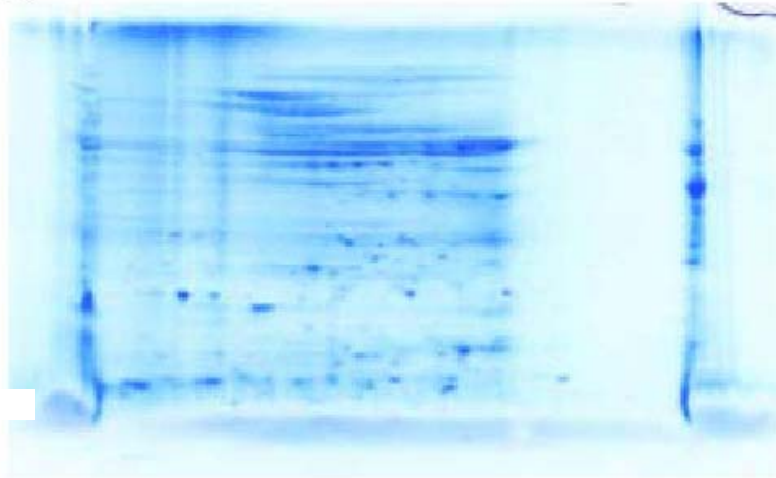
## DETERGENTY

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



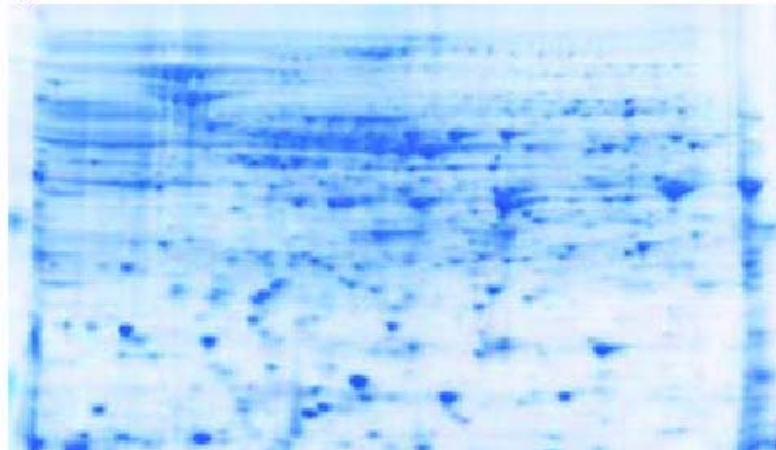
E.coli

A)



CHAPS

B)



C7BzO

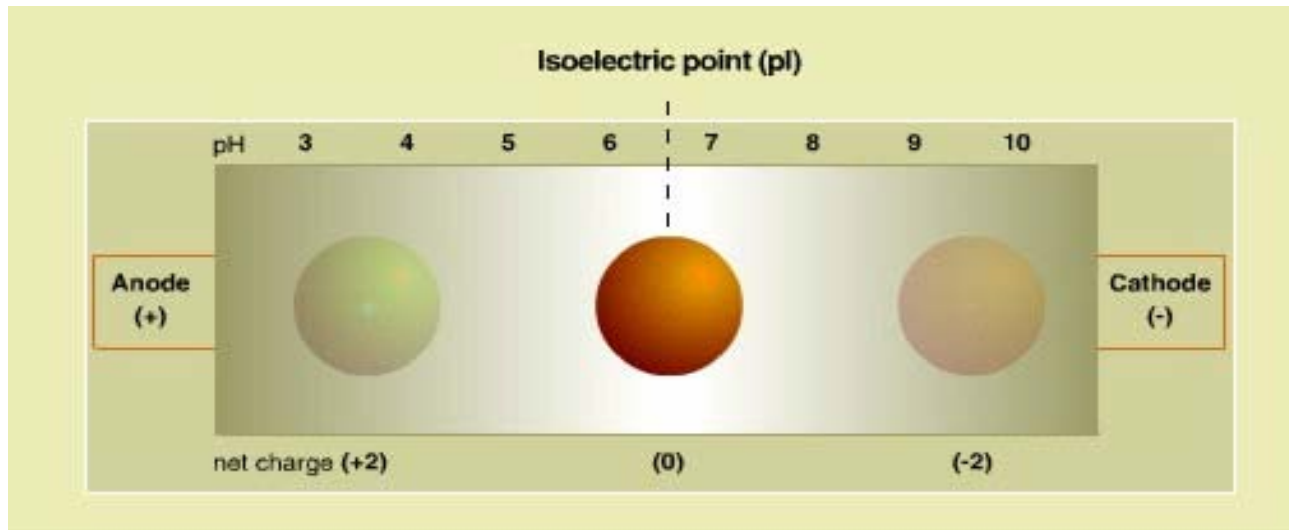


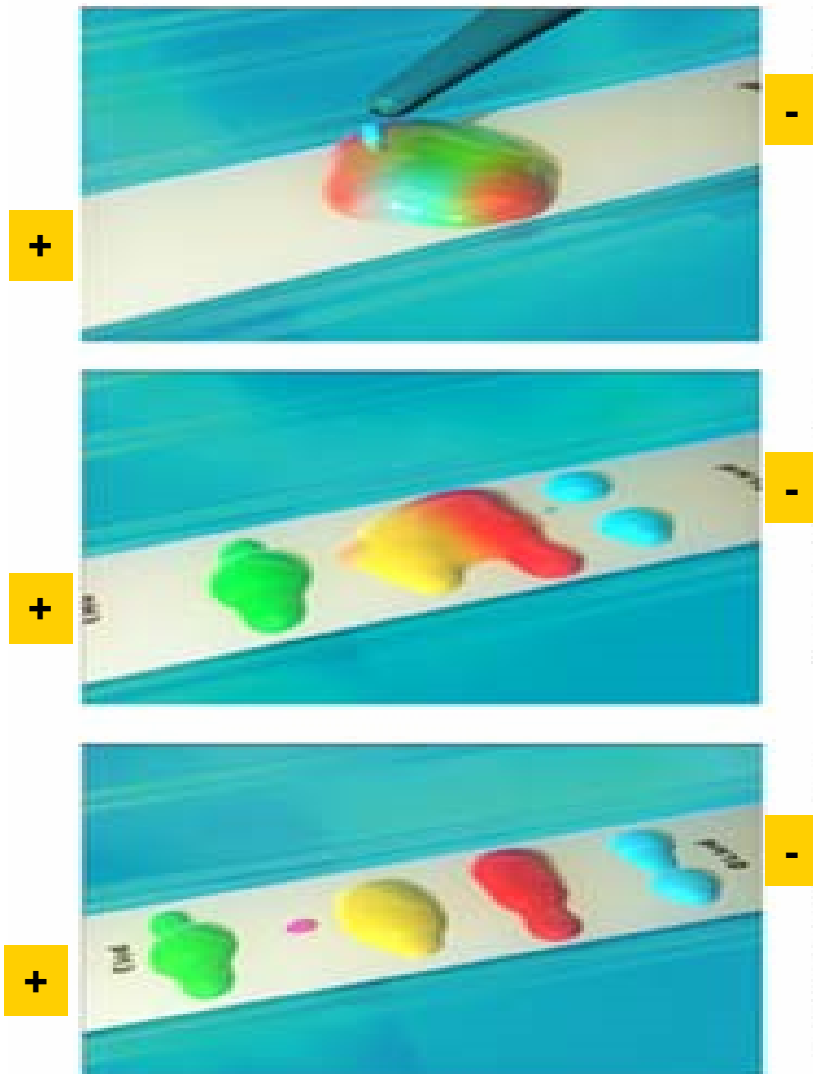
# KONTAMINANTY

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

# 1. ROZMĚR **IZOELEKTRICKÁ FOKUSACE**

migrace nabitých částic v gradientu pH v elektrickém poli

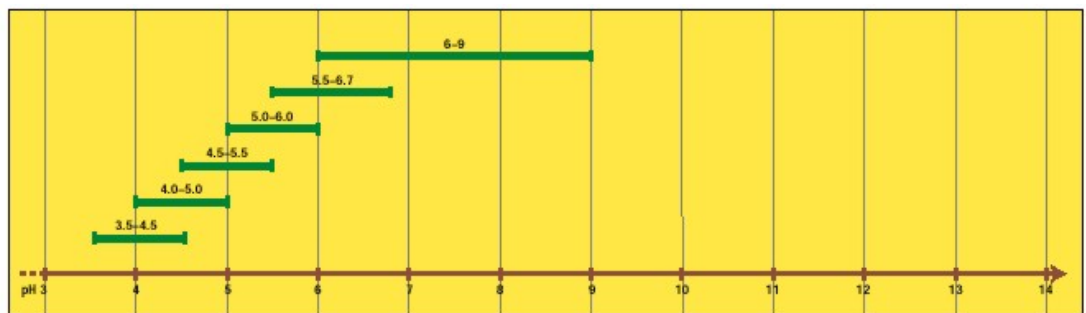




## IZOELEKTRICKÁ FOKUSACE

- imobilizovaný pH gradient
- amfolyty

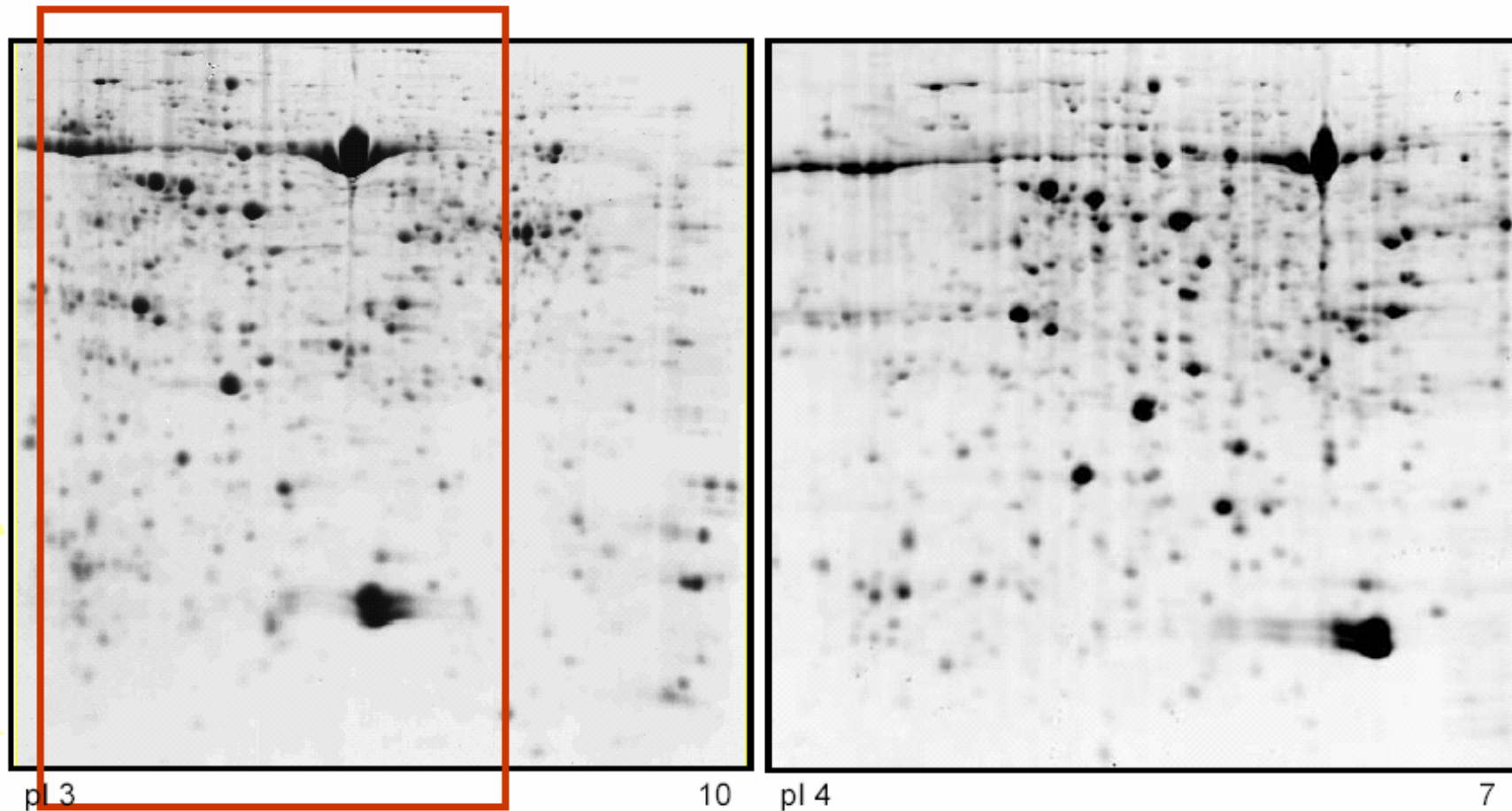
# ROZSAH STRIPU ROZMĚR STRIPU



# ROZSAH STRIPU

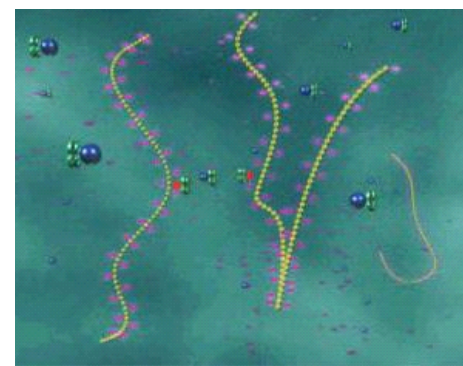
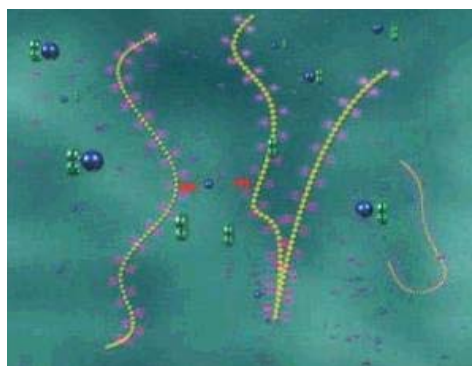
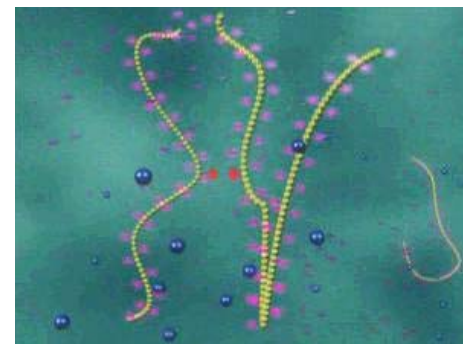
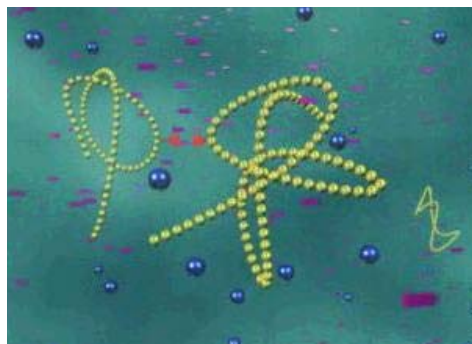
pl 3 - 10 NL

pl 4 - 7



# EKVILIBRACE STRIPU

denaturace **SDS** ●



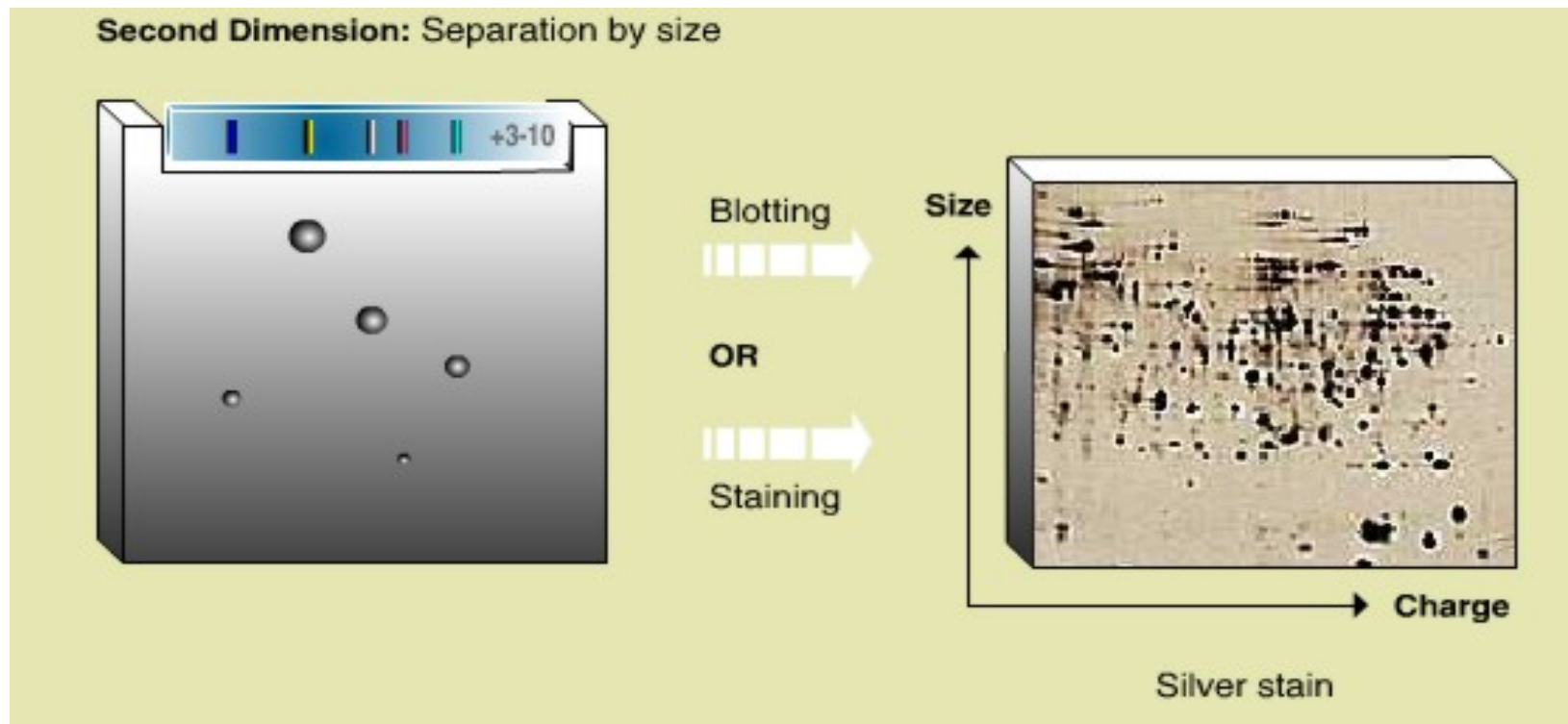
redukce **DTT** ●

alkylace **IAA** ●



## 2. ROZMĚR **SDS-PAGE**

migrace aniontů v elektrickém poli podle MW



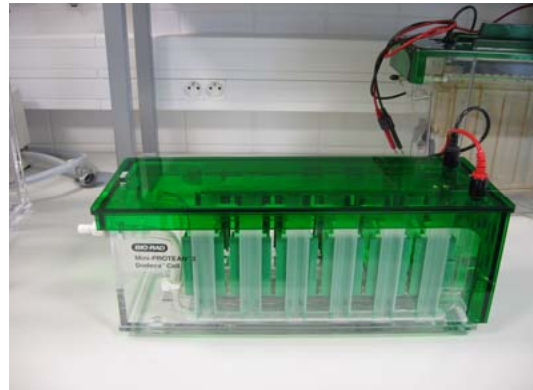


## 2-DGE INSTRUMENTACE

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



Protean Plus Dodeca Cell



Mini-Protean 3 Dodeca Cell

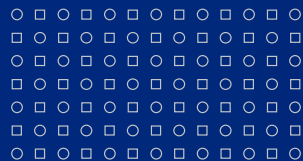


Protean II xi Cell



## DETEKCE PROTEINU

- gel x blot
- vizualizace →
  - barvení
  - radioaktivita
  - imunodetekce
- barvení v gelu
  - po elektroforéze
  - před elektroforézou
- specifické pro protein
- specifické pro PTM
- viditelné spektrum
- fluorescence



## BARVENÍ PROTEINU V GELU

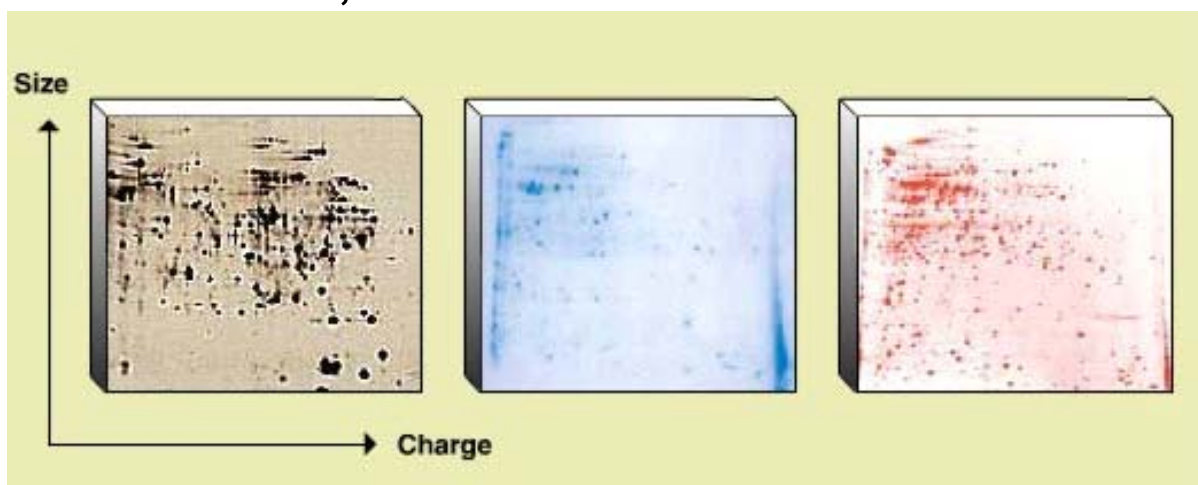
Coomassie Blue R-250, Coomassie Blue G-250

Stříbro: kompatibilní s MS

nekompatibilní s MS

Sypro Ruby, Flamingo Pink, Lucy, Deep Purple

Pro-Q Diamond, Pro-Q Emerald



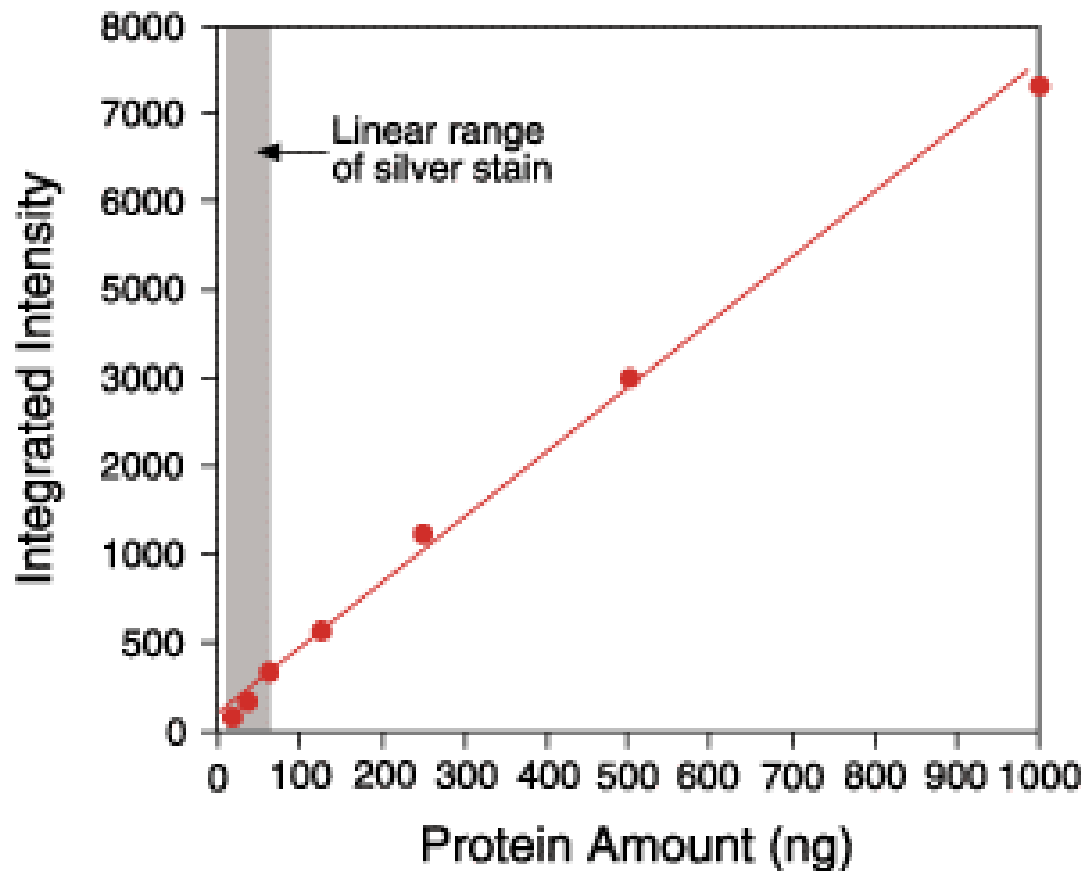
**Stříbro**  
**0.6 ng**

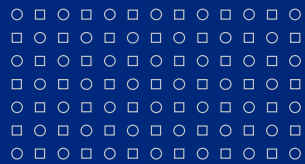
**Coomassie**  
**(8 ng) 36 ng**

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

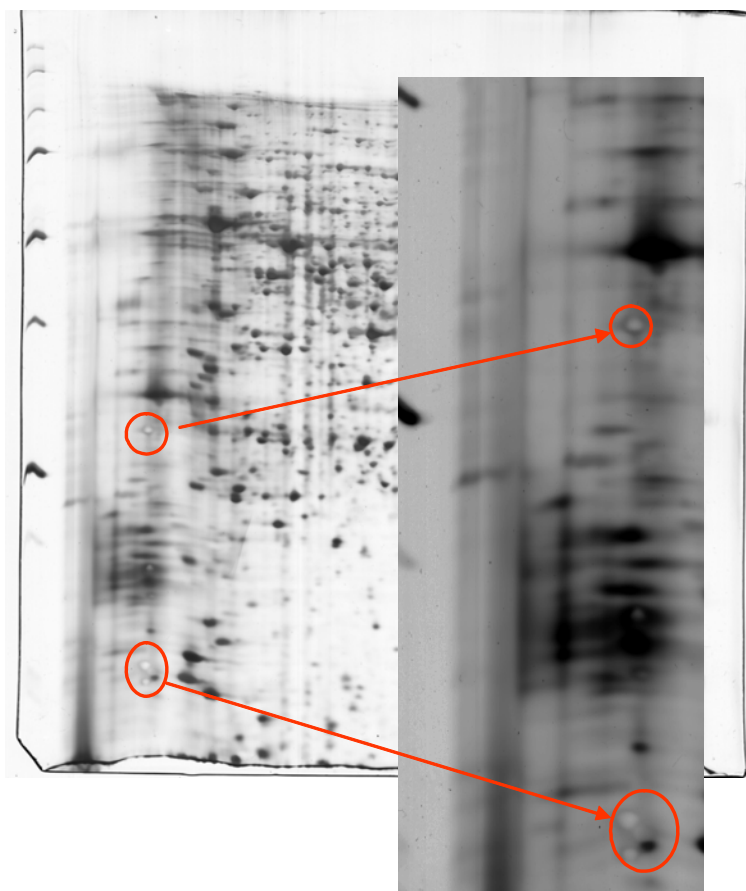
# BARVENÍ PROTEINU – LINEARITA

Sypro Ruby

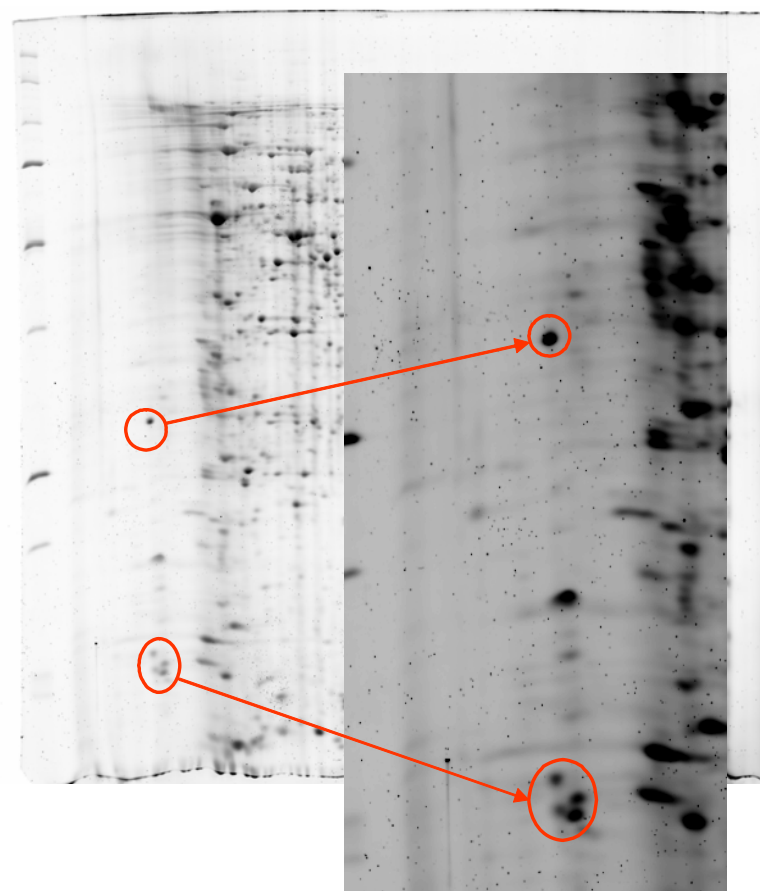




## Ag

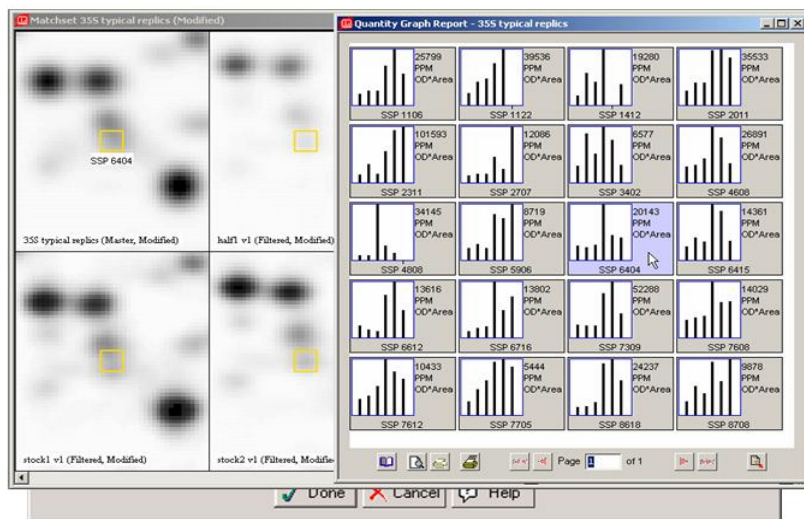
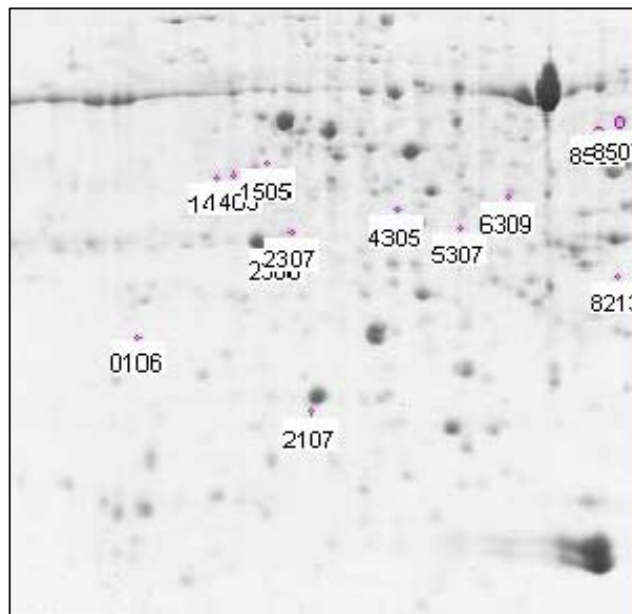


## Sypro Ruby



# ANALÝZA OBRAZU

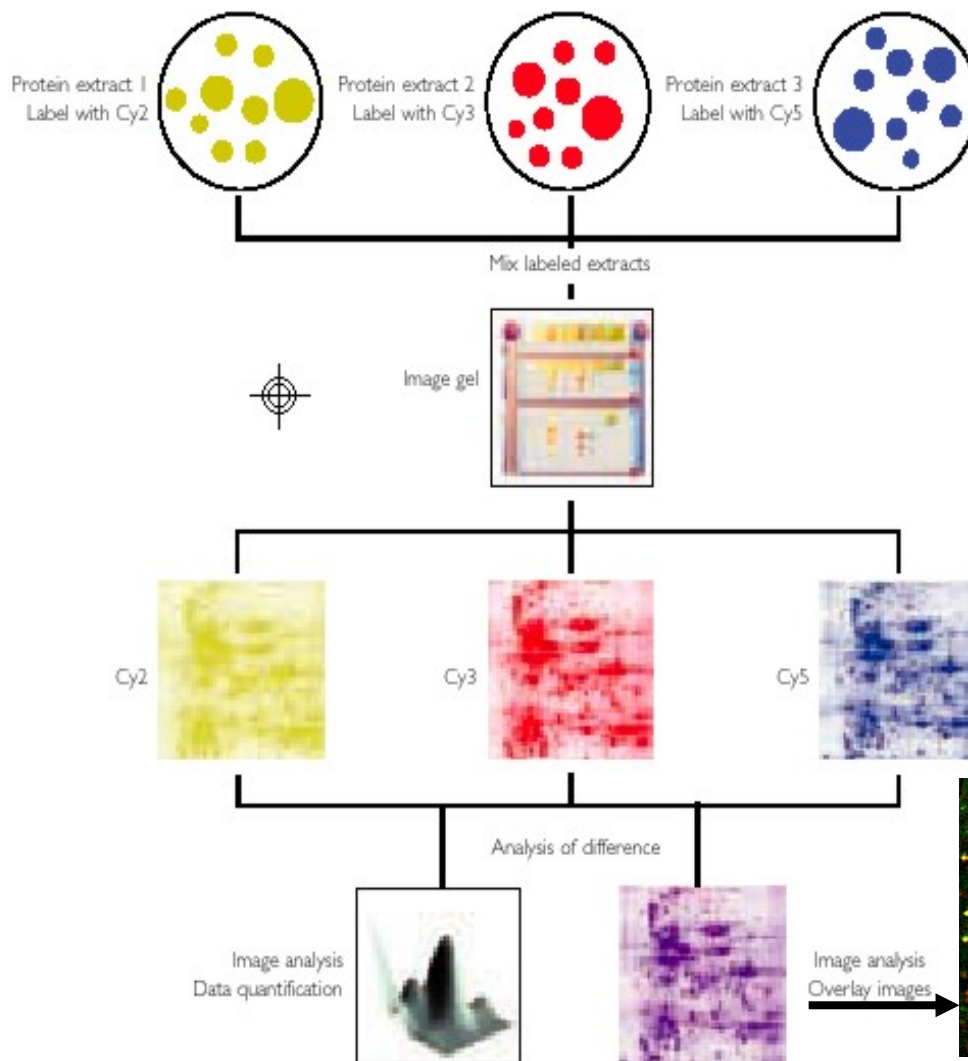
- kvalitativní
- kvantitativní



## 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

# Difference Gel Electrophoresis DIGE





# BIOMARKERY

## ... jehly v kupce sena

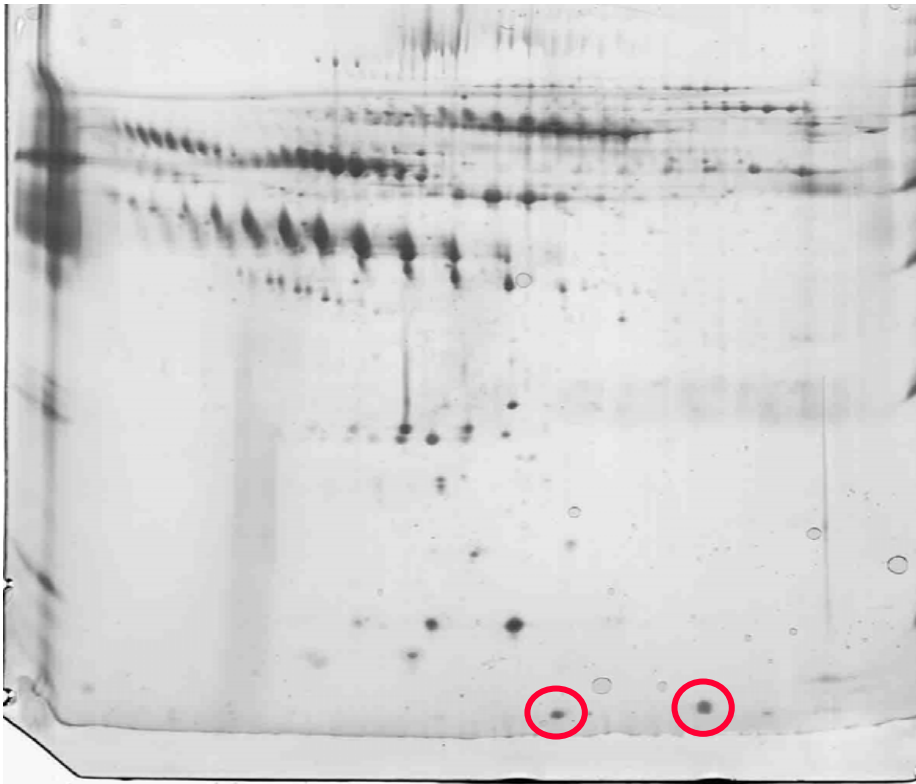
prefrakcionace   separace   identifikace   srovnání kontrola vs.vzorek

- **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

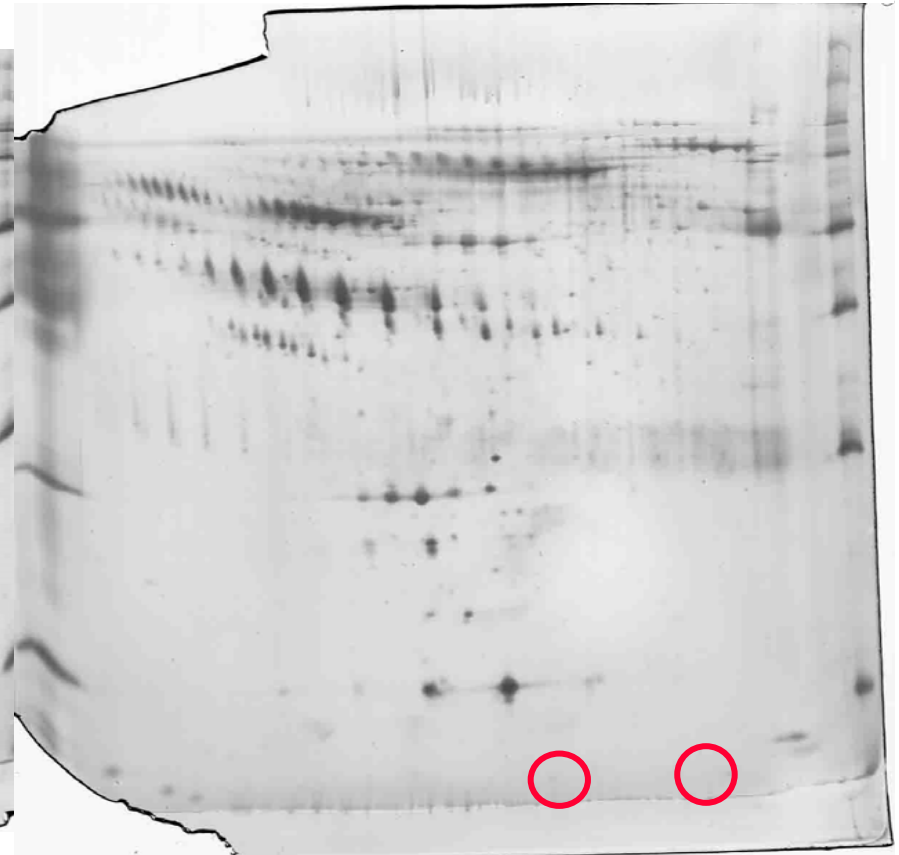
# Biomarkery v lidské plasmě

## SEPARACE → IDENTIFIKACE

Den 21 – před klinickým projevem



Den 44 – po klinickém projevu



↓ **DIGESCE**

trypsin    Glu-C    Asp-N    thermolysin

MAVEPFRRPITRPHASIEVDTS GTGG SAGSSE  
 KVFCLIGQAEGGEPNTVYELRNYAQA KRLFR  
 SGELLD AIELAWGSNP NYTAGRILAMRIEDAK  
 PASAEIGGLKITSKIYGNVANNIQV GLEKNTLS  
 DSLRLRVIFQDDRFNEVYDNIGNIFTIKYKGEE  
 ANATFSVEHDEETQKASRLVLKVGDQEVKSY  
 DLTGGA YDYTNAITDINQLPDFEAKLSPFGD  
 KNLESSKLDKIENANIKDKAVYVKA VFGDLE  
 KQTAYNGIVSFEQLNAEGEVPSNVEVEAGEES  
 ATVTATSPIKTI EPFELTKLKGGTNGEPPATWA  
 DKLDKFAHEGGYYIVPLSSKQSVHAEVASFV  
 KERSDAGEPMRAIVGGGFNESKEQLFGRQAS  
 LSNPRVSLVANSGTFVMDDGRKNHVPAYMV  
 AVALGGLASGLEIGESITFKPLRVSSLDQIYESI  
 DLDELNENGIISIEFVRNRTNTFFRIVDDVTTFN  
 DKSDPVKAEMA VGEANDFLVSELKVQLEDQF  
 IGTRTINTSASI KDFIQSYLGRKKRDNEIQDFP  
 AEDVQVIVEGNEARISMTVYPIRSFKKISVSLV  
 YKQOTLQA

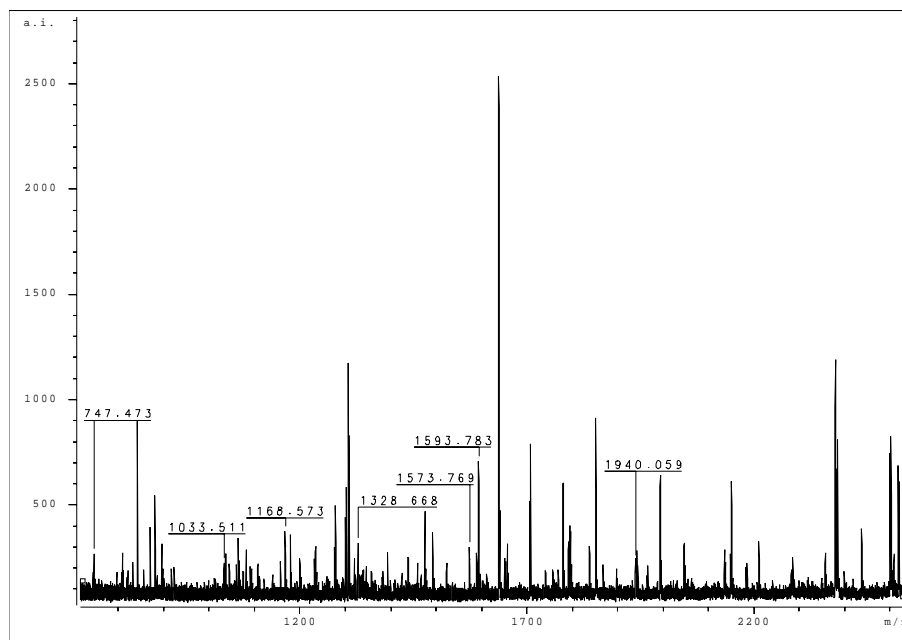
- IN-GEL
- IN-SOLUTION

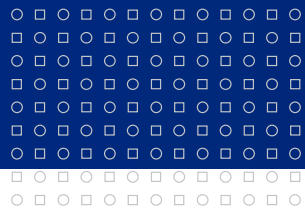


MS

# KERATINY !!! Potlačení ionizace

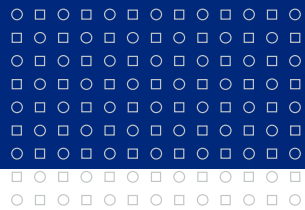
Neoznačené píky: **keratiny** nebo autolýza trypsinu





**G I G O**





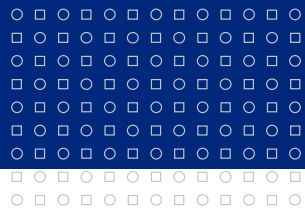
**G I G O**

**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

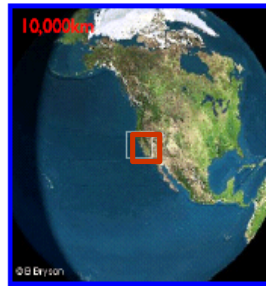


## II. PREFRAKCIONACE

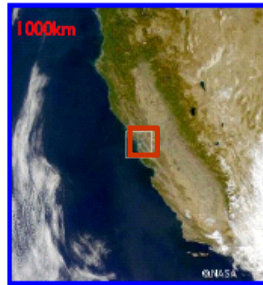




# $10^{10}$ Really Is Wide Dynamic Range



10 10 000km



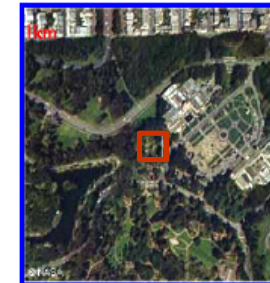
9 1 000km



8 100km



7 10km



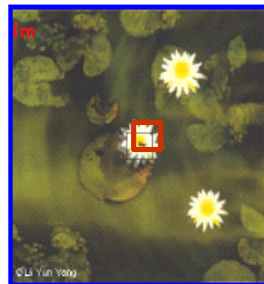
6 1km



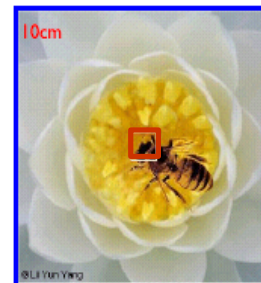
5 100m



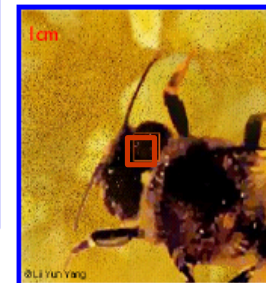
4 10m



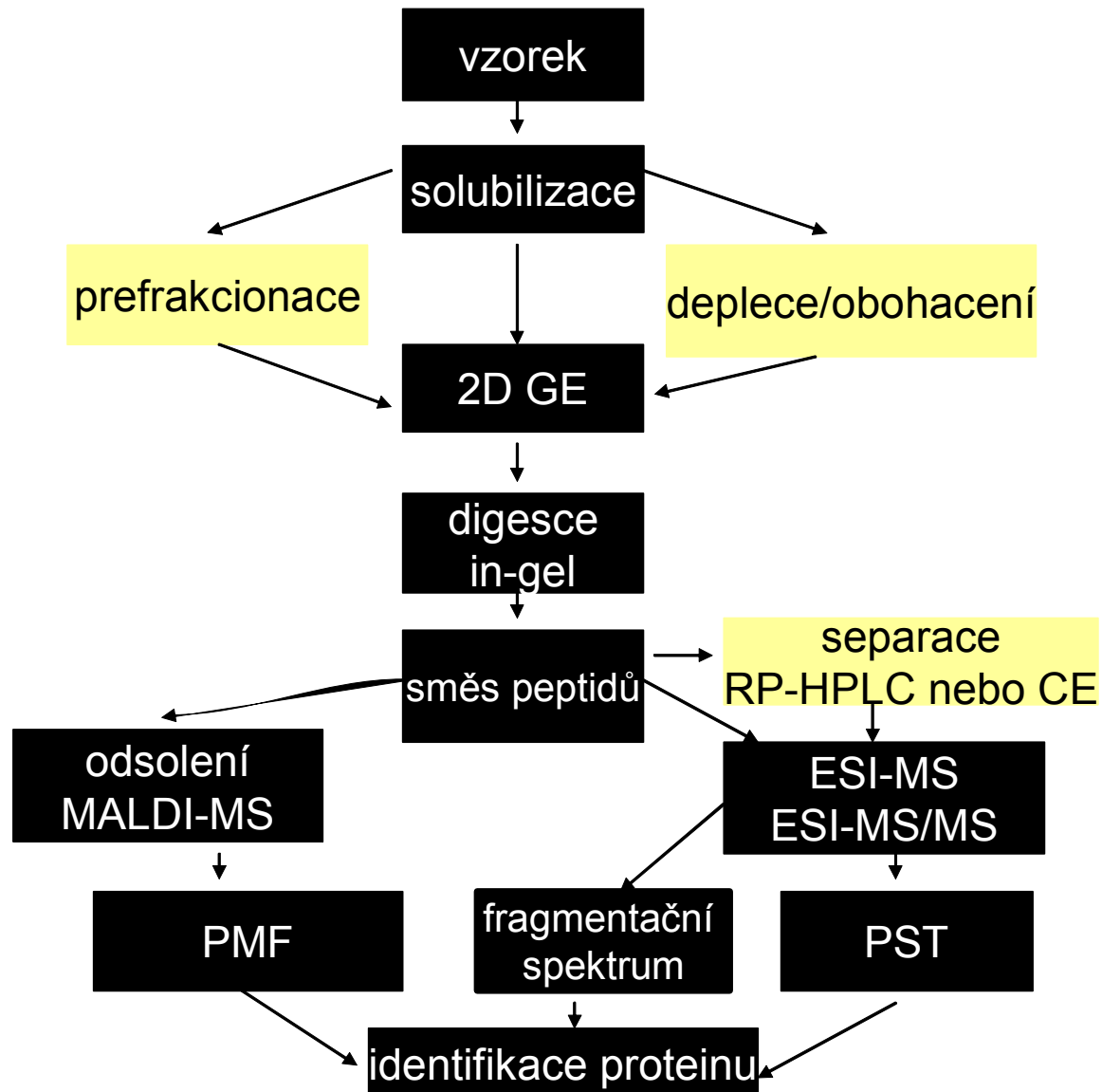
3 1m

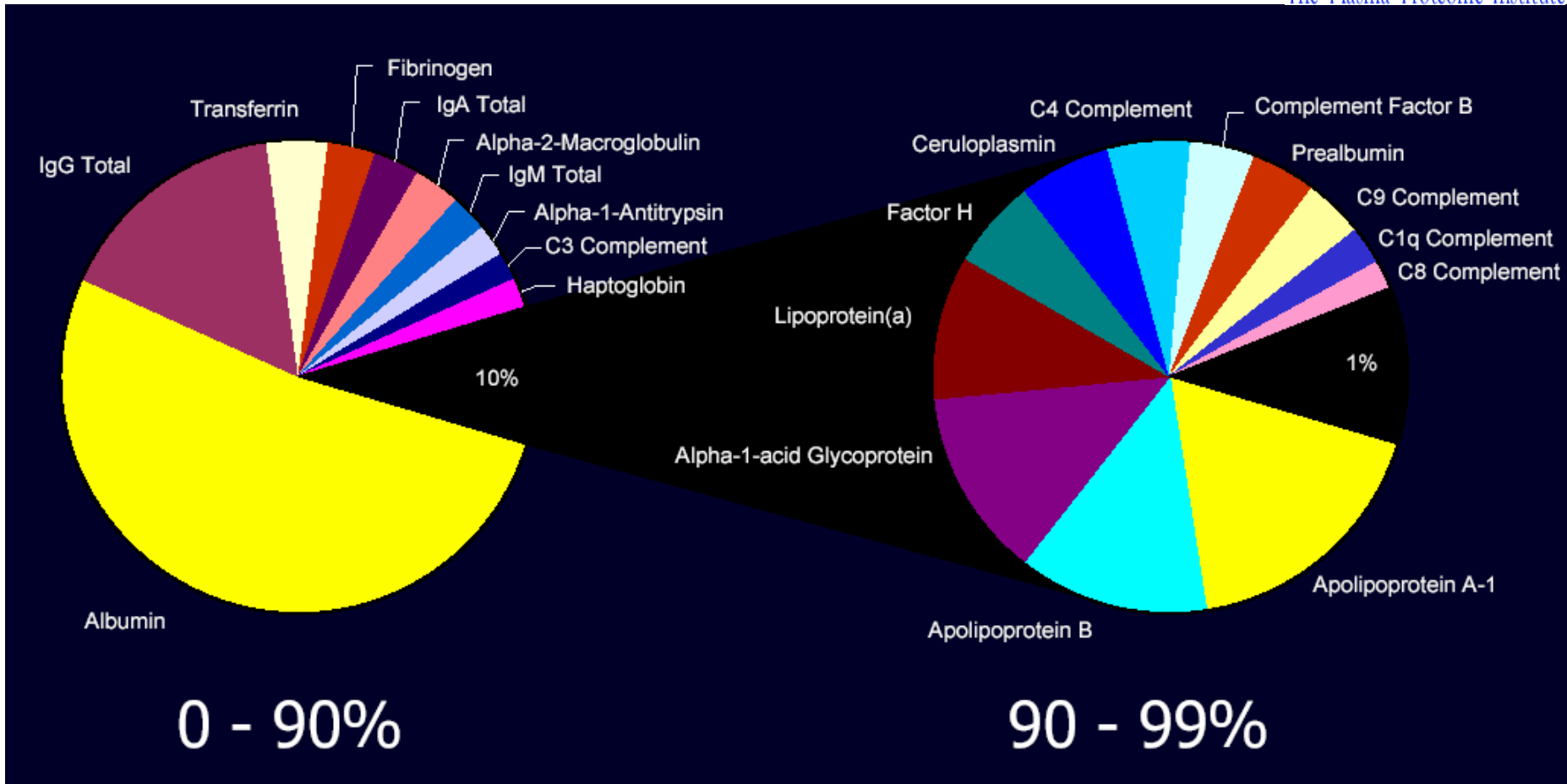


2 10cm



1 1cm



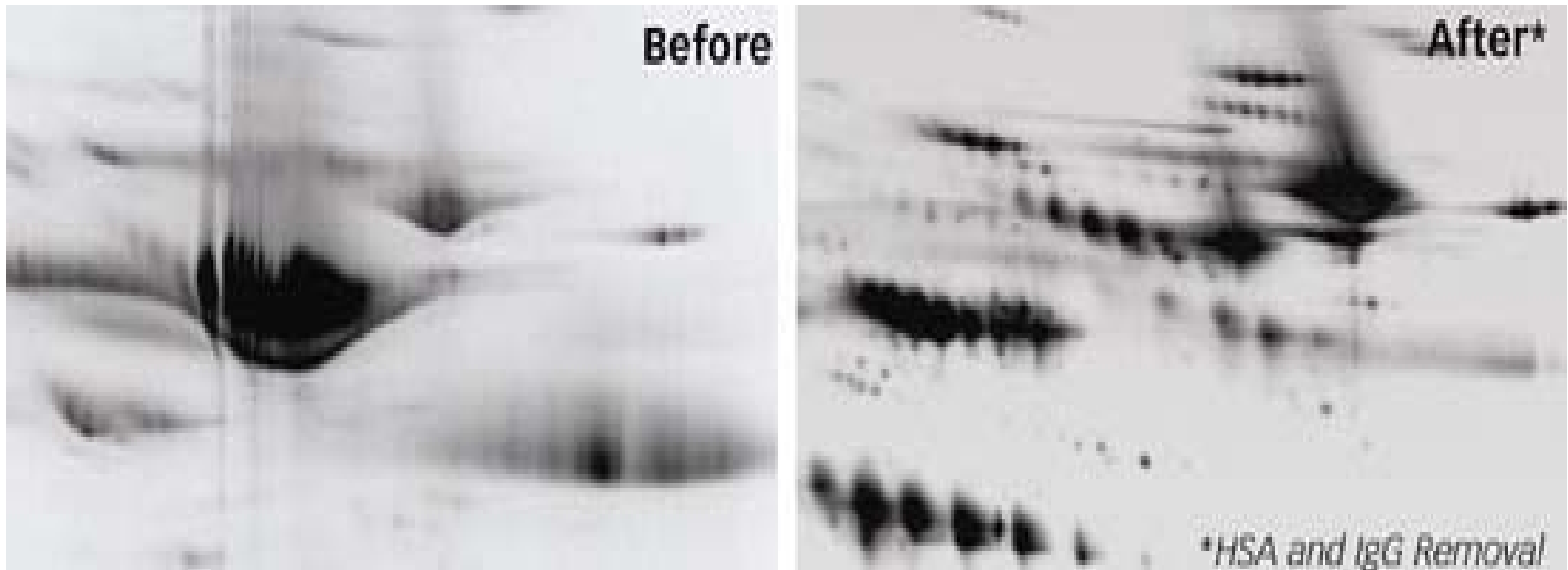


## AFINITNÍ DEPLECE

odstranění abundantních proteinů afinitní chromatografií

**HSA IgG**

?? ? interakce minoritních proteinů s abundantními ?? ?



## Lidská plazma - vázaná frakce po afinitní depleci

ALBUMIN

IgG

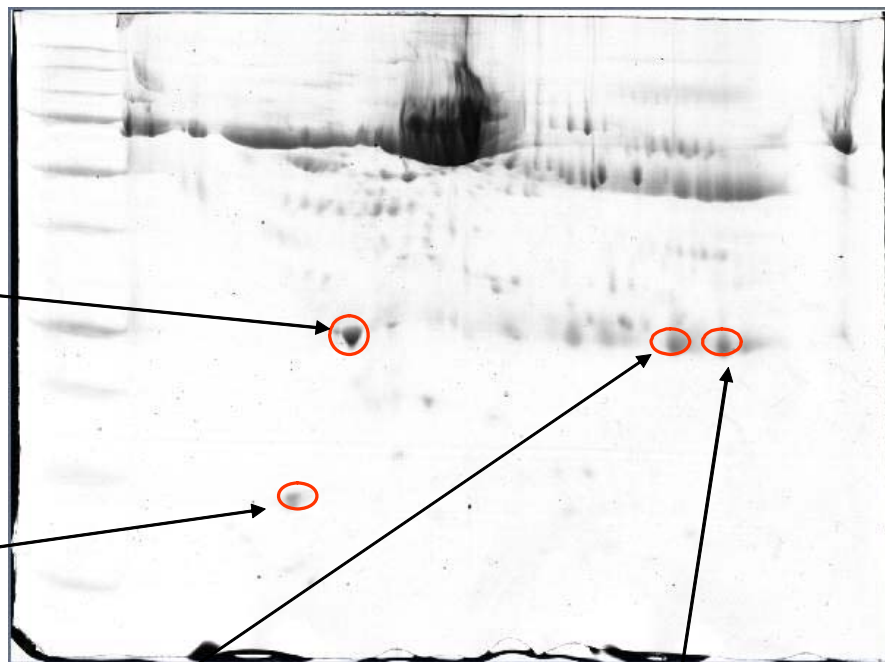
Barvení: CB G-250

Apolipoprotein

albumin

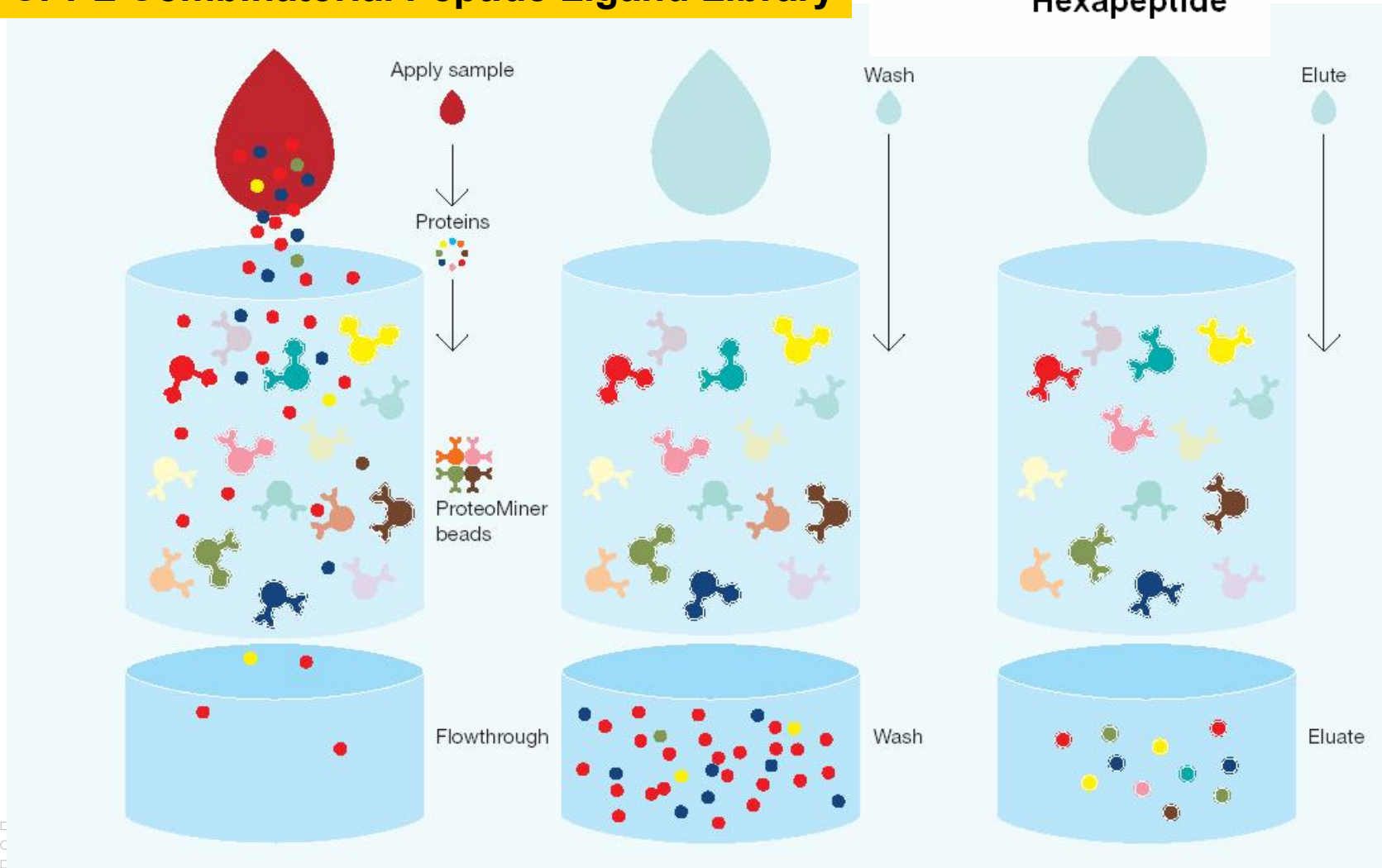
Immunoglobulin kappa light chain

Immunoglobulin light chain



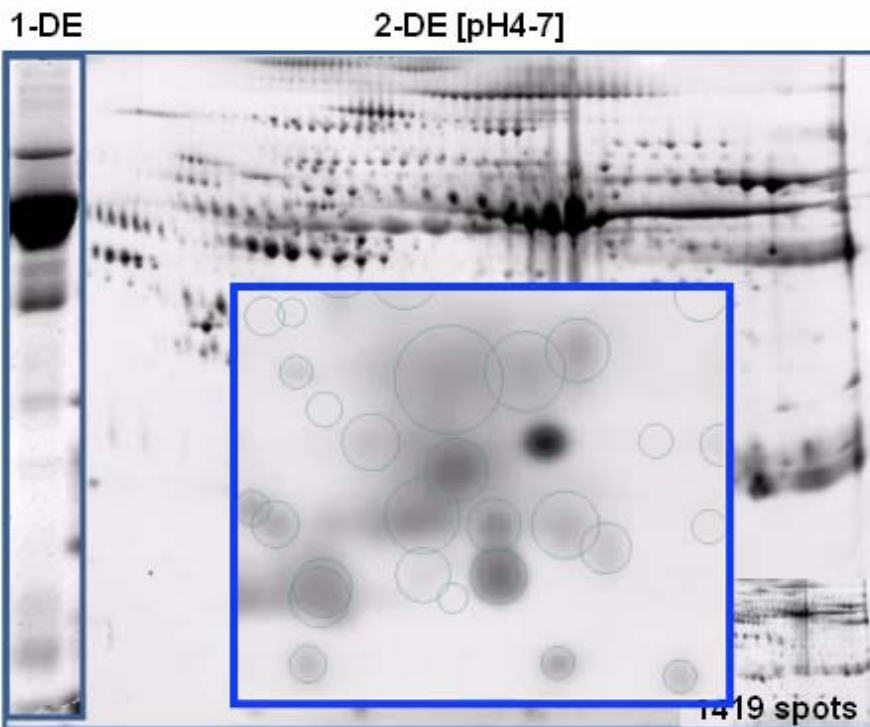
# PREFRAKCIONACE

## CPPL Combinatorial Peptide Ligand Library

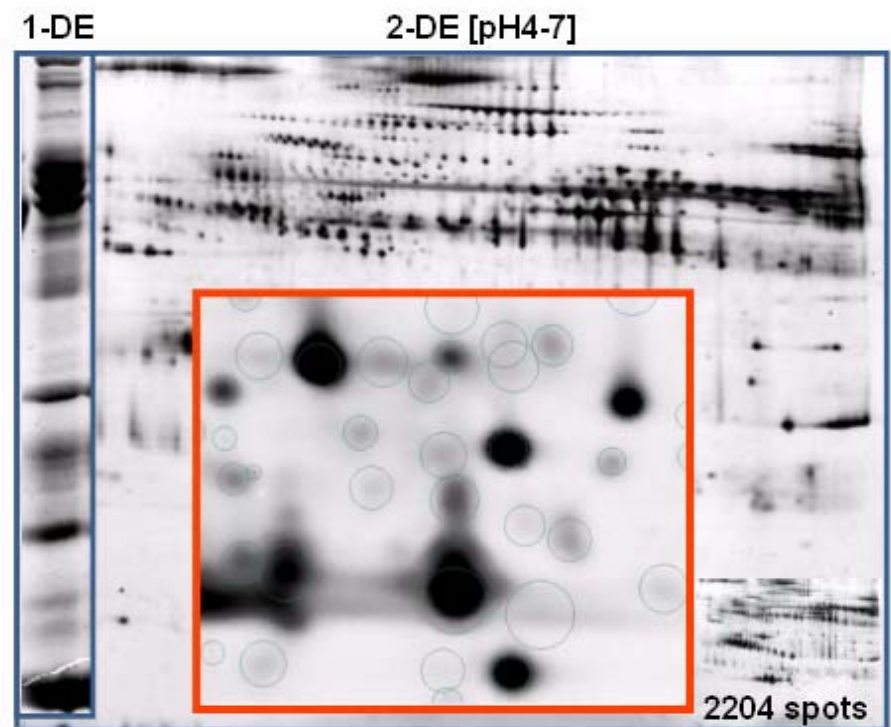


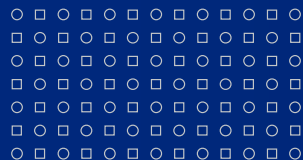
PROTEOMINER

Native Human Serum



Human Serum Fractionated by ProteoMiner





## IEF PREFRAKCIONACE



MicroR otofor

- prefrakcionace v roztoku

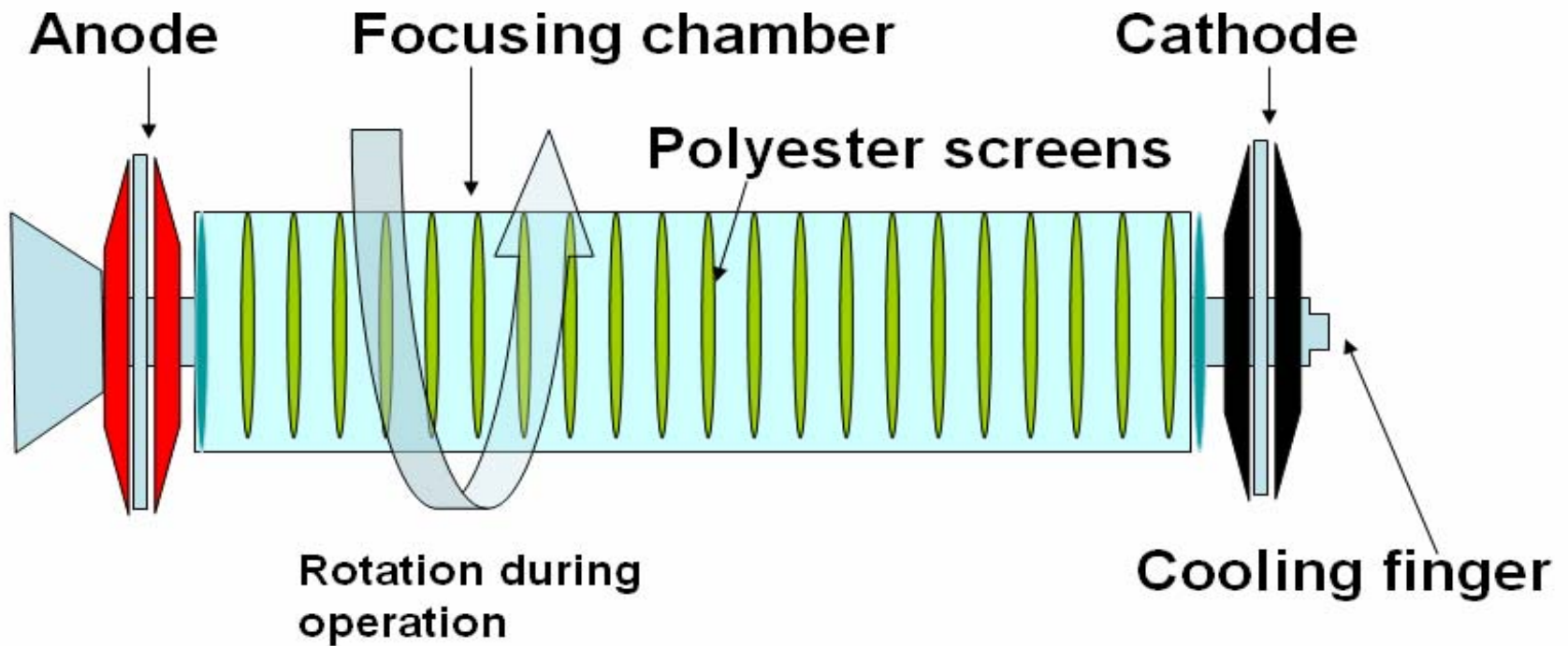


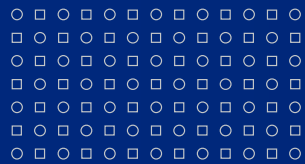
OffGel Fractionator

- prefrakcionace na IPG stripu

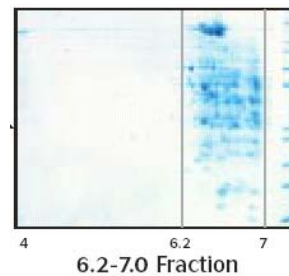
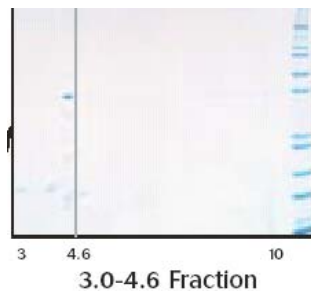
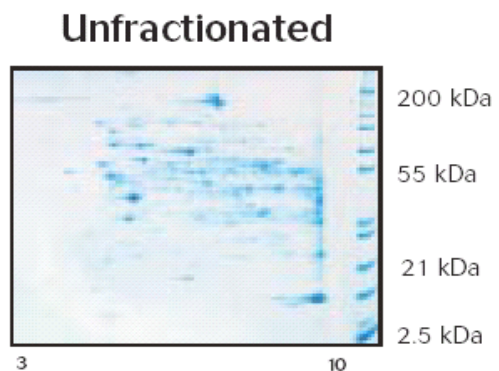




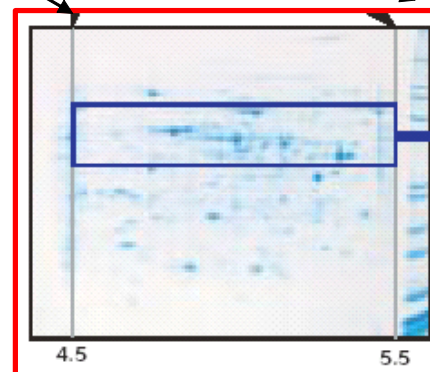
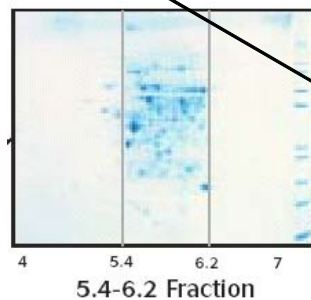
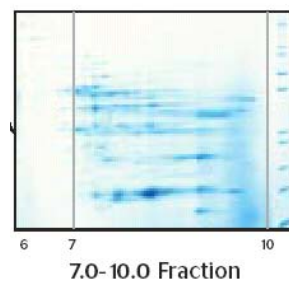
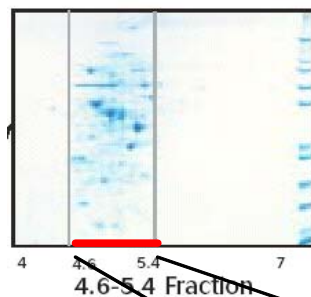
**MICROROTOFOR**



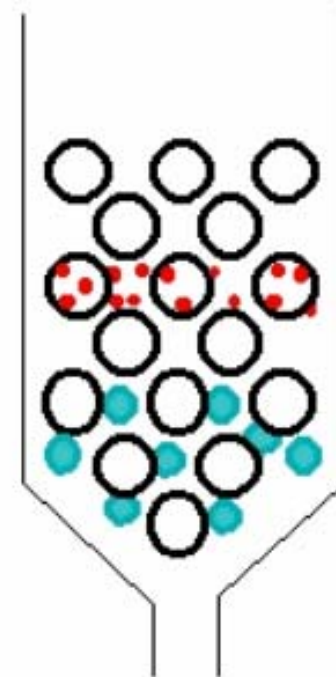
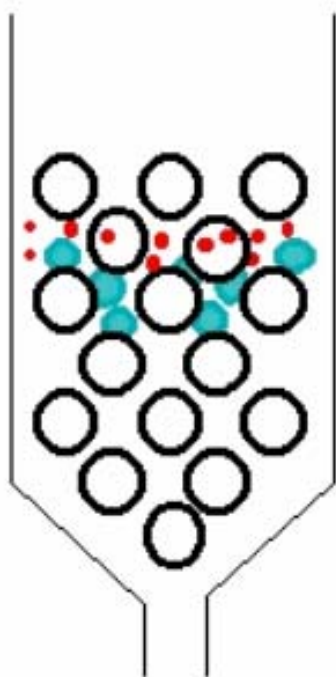
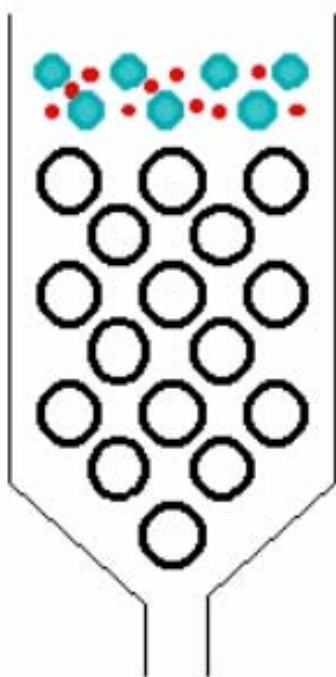
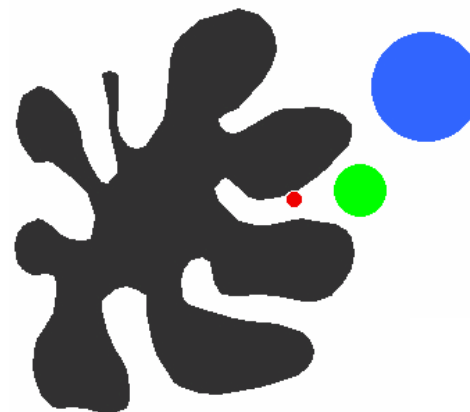
# PREFRAKCIONACE MIKRO ROZSAHY



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. KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE LC

#### MULTIDIMENZIONÁLNÍ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE MDLC

##### SLOVNÍČEK

- hyphenated on-line LC-MS
- multidimensional LC-LC(-LC...)
- shotgun proteomics protein → digest → peptide → **HPLC** → MS

## bottom-up

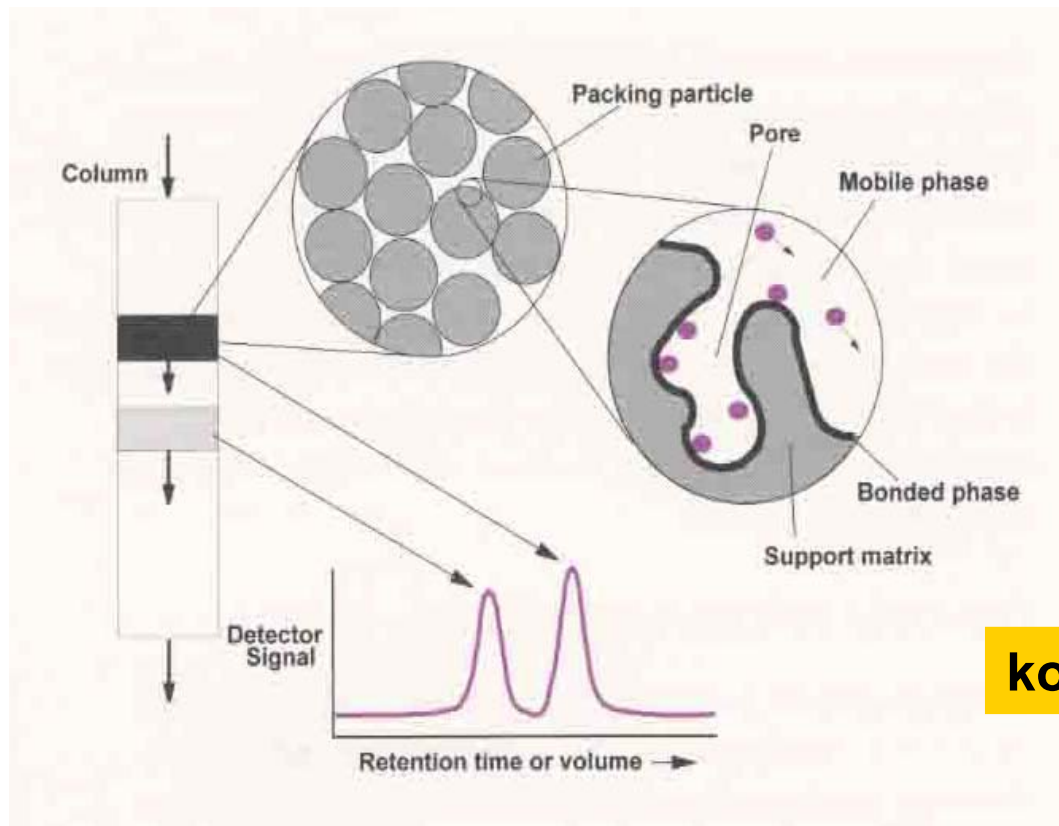
- (příliš) mnoho peptidů
- interference proteinů: stejná peptidová sekvence
- většina systémů MDLC

## top-down

- intaktní proteinový iont
- limit velikosti - asi do 50 kDa

# PROTEINY A PEPTIDY

## PRINCIPY SEPARACE KAPALINOVOU CHROMATOGRAFIÍ



**komplexnost**

**abundance**





## TYPY LC SEPARACE

CO ROZHODUJE

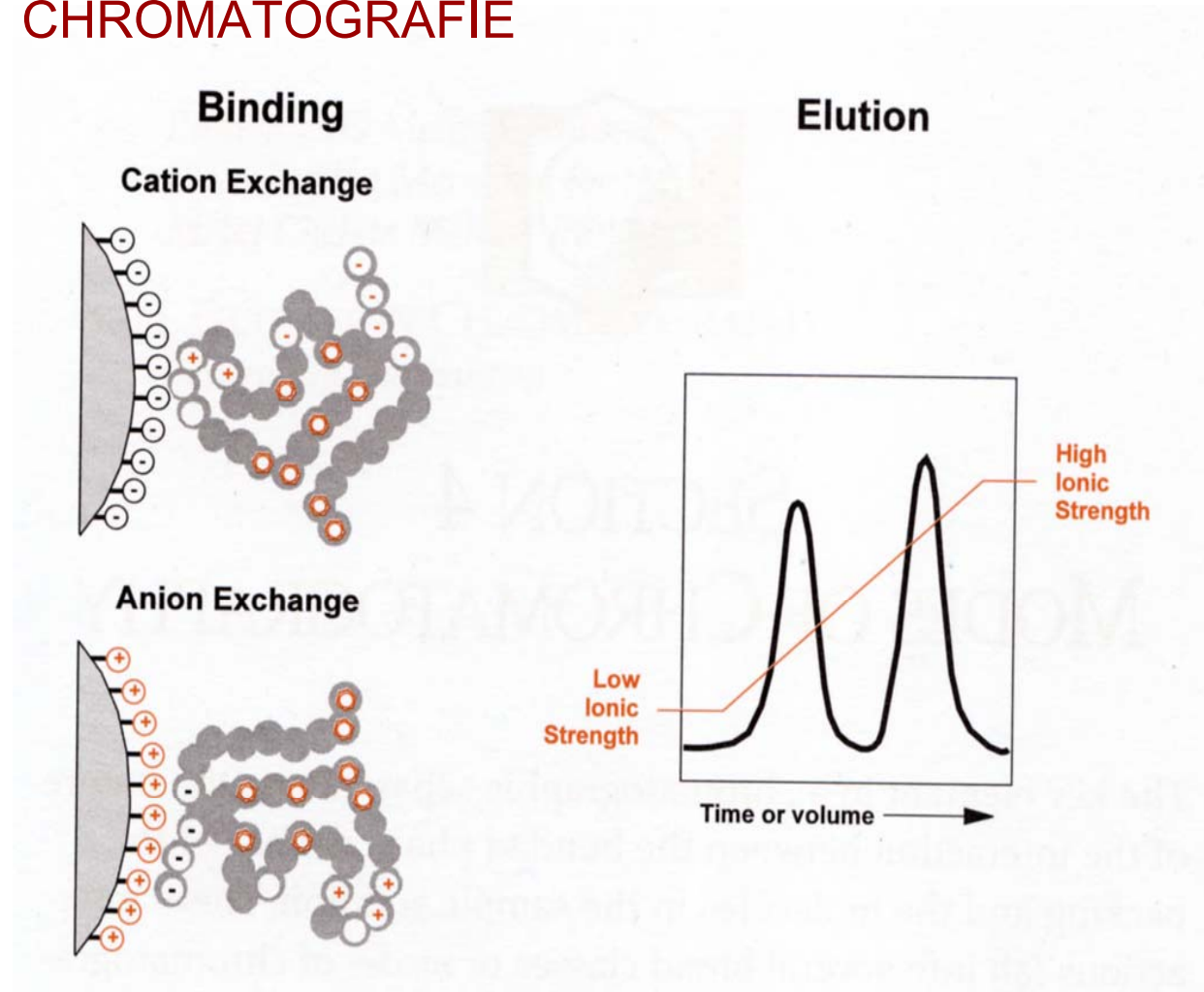


KOLONA

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

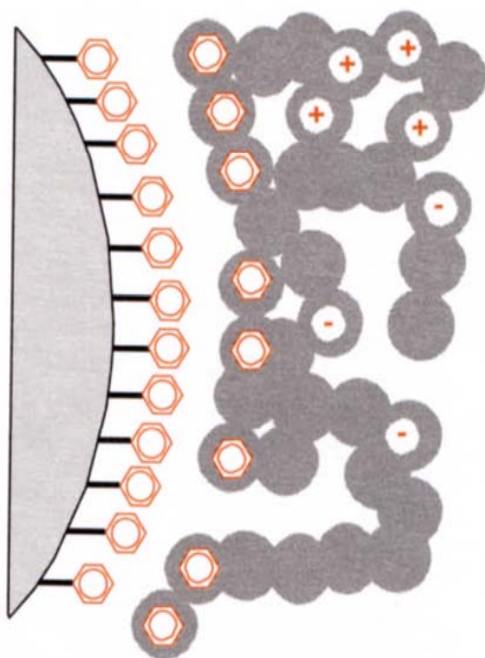
**... a kombinace**

# IONEXOVÁ CHROMATOGRAFIE

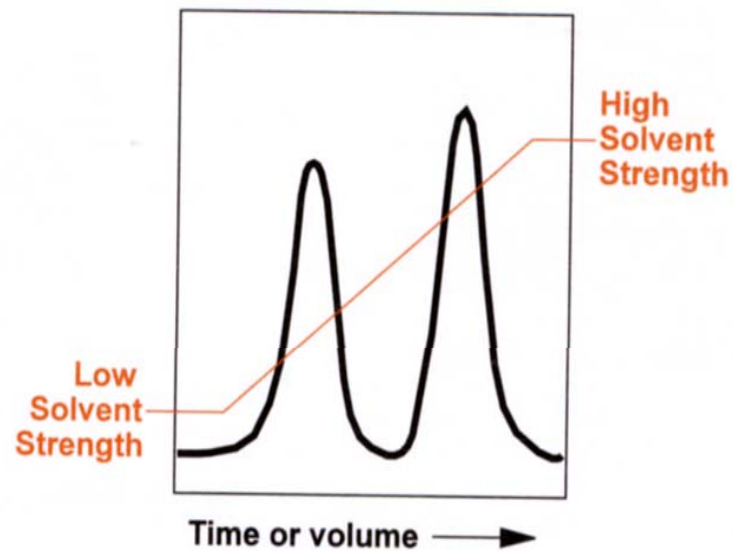


# RP CHROMATOGRAFIE reversed-phase chromatography

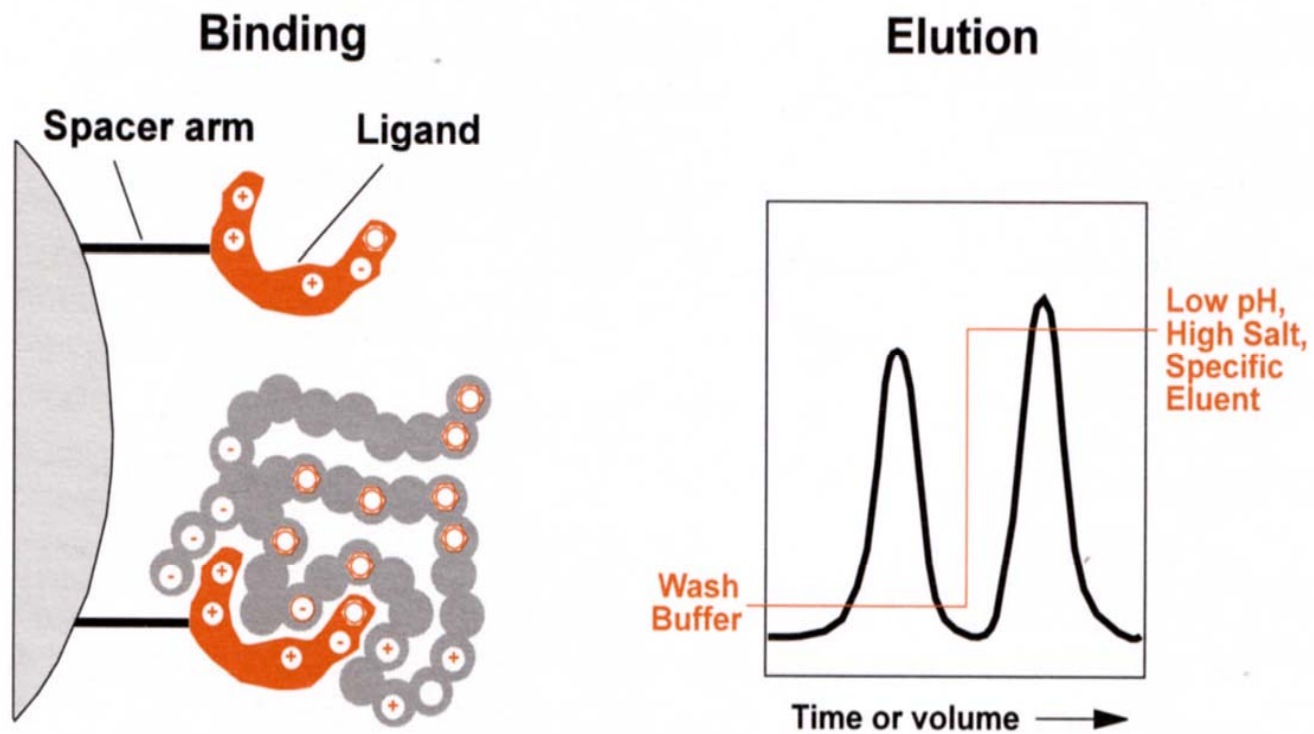
**Binding**



**Elution**



## AFINITNÍ CHROMATOGRAFIE



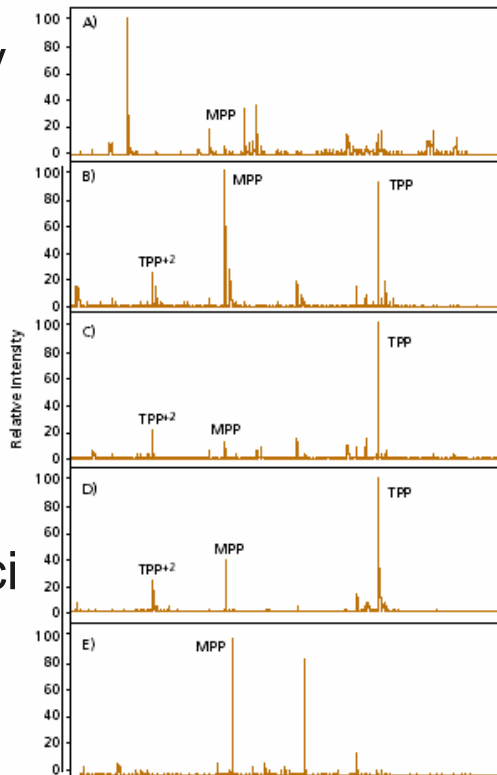
# IMAC

## Immobilized Metal Affinity Chromatography

### PHOS Select Iron Affinity gel

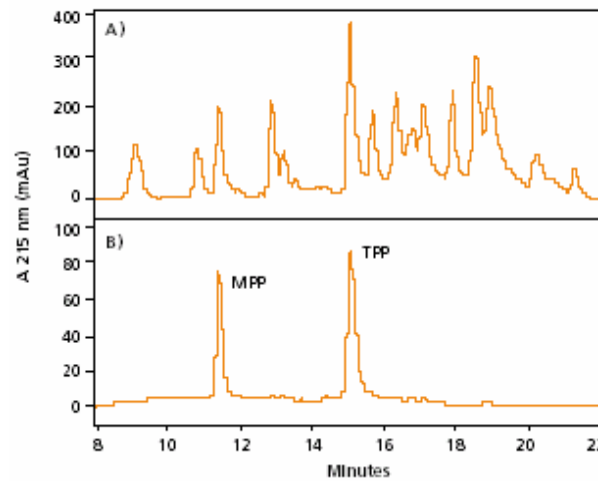
Resin Elution Selectivity - MALDI-MS

Surový



Po aplikaci

Resin Enrichment - HPLC



Surový

Po aplikaci

Kasein

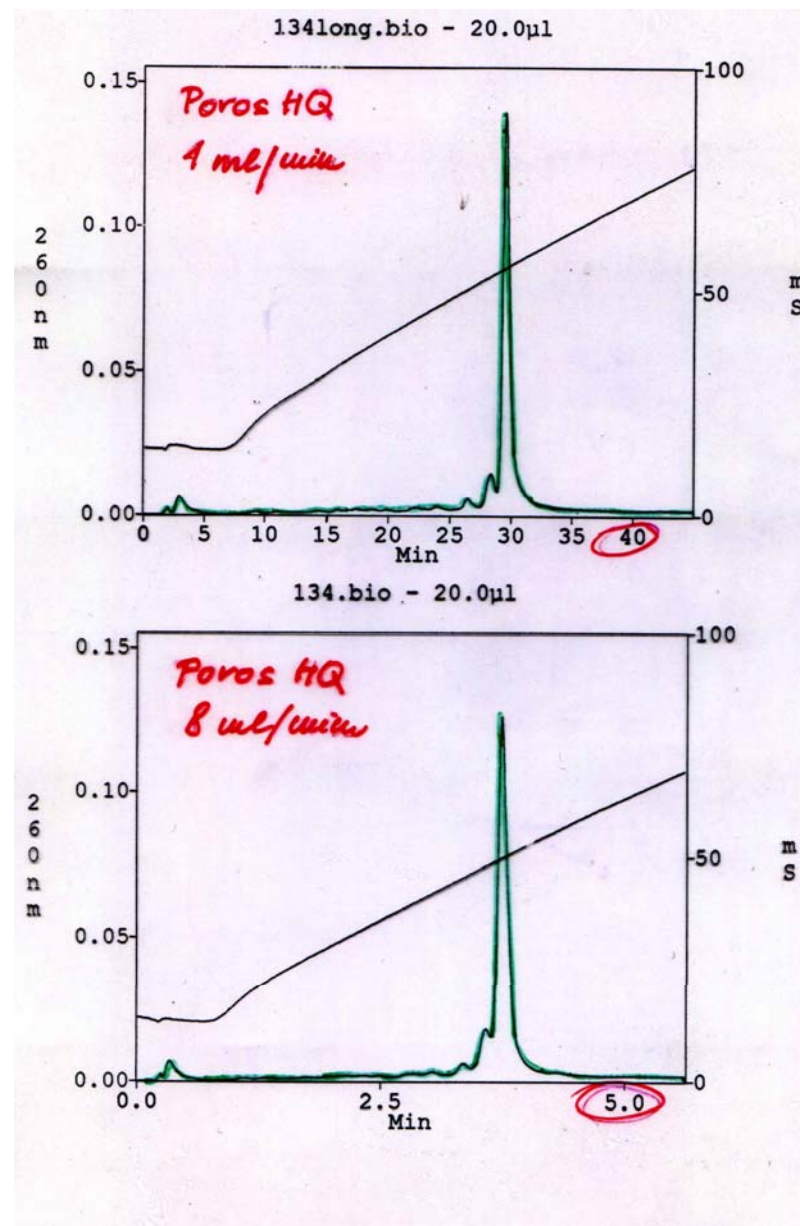
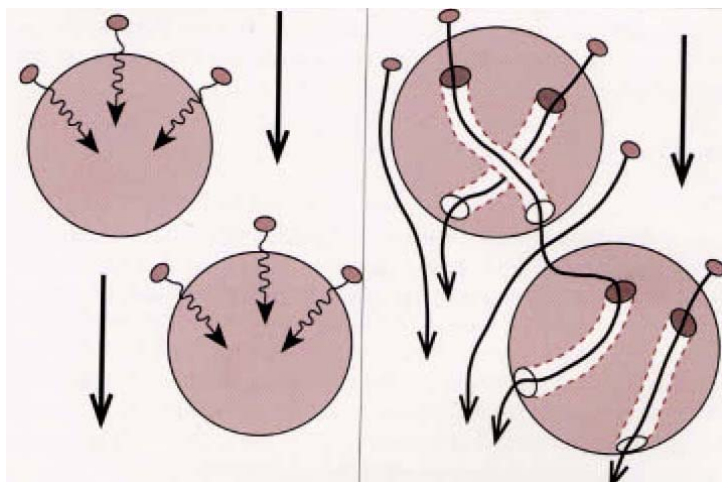
Kasein tryptic digest



HPLC

FPLC

PERFÚZNÍ LC



Kolona může vypadat různě . . .

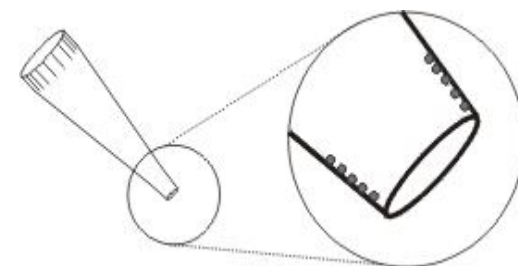


Glygen

TopTip

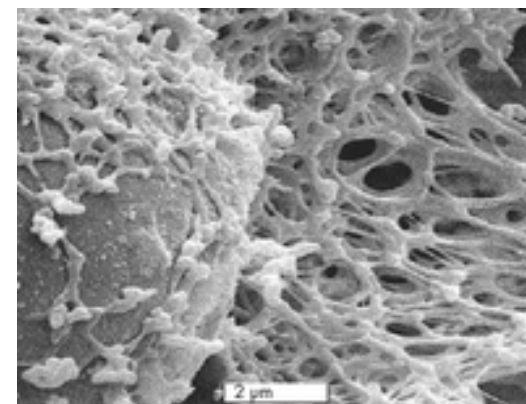


NuTip



Zip Tip  
Millipore

C18  
C4  
MC  
SCX





## RP-MS obvykle poslední krok před MDLC-MS

### optimalizace

- monolitické kolony
- vyšší tlak
- vyšší teplota
- optimalizace gradientu
- značení stabilními izotopy

## MULTIDIMENZIONÁLNÍ CHROMATOGRAFIE

kombinace odlišných fyzikálních a chemických separačních principů

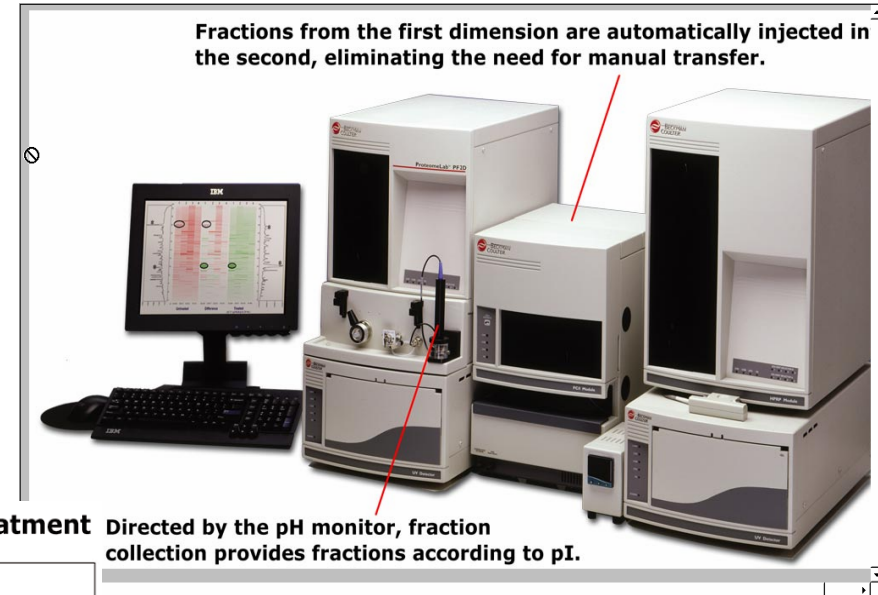
- **SCX/RP**
- **RP/RP**
- **HILIC/RP**
- **AC/MDLC** fosfoproteiny a fosfopeptidy, glykoproteiny a glykopeptidy

- diskontinuální **off-line**
- kontinuální **on-line** 1. kolona → 2.kolona
- dvoufázová kolona

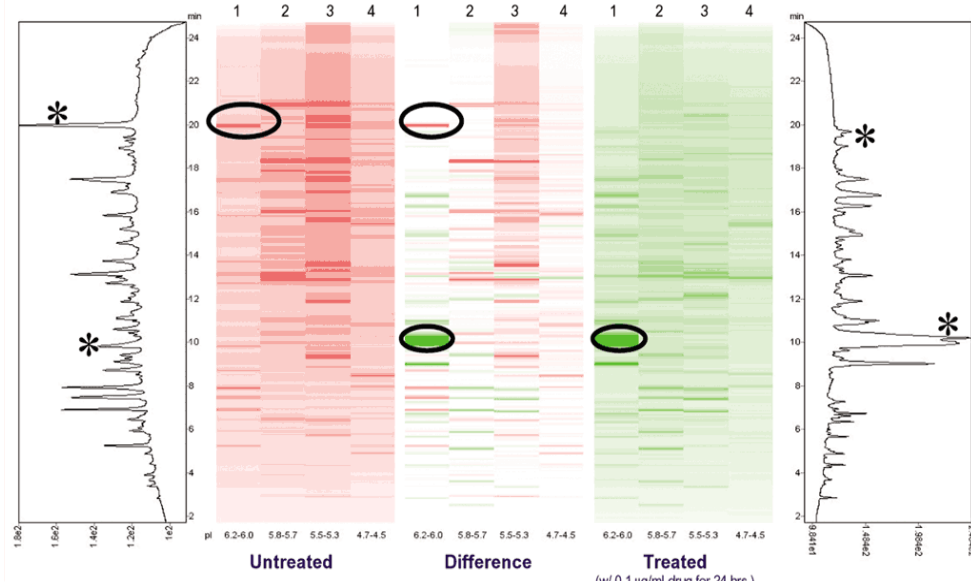
optimalizace parametrů MDLC !

# ProteomeLab PF 2D

- chromatofokusace
- RP



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



## MULTIDIMENZIONÁLNÍ CHROMATOGRAFIE

- 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

## LITERATURA - MULTIDIMENSIONÁLNÍ CHROMATOGRAFIE

### **Hyphenated dimensions in separation science**

P.Q.Tranchida et al. *Journal of Chromatography* 2012

### **Multi-dimensional Liquid Chromatography in Proteomics**

Xiang Zhang et al. *Anal Chim Acta* 2010

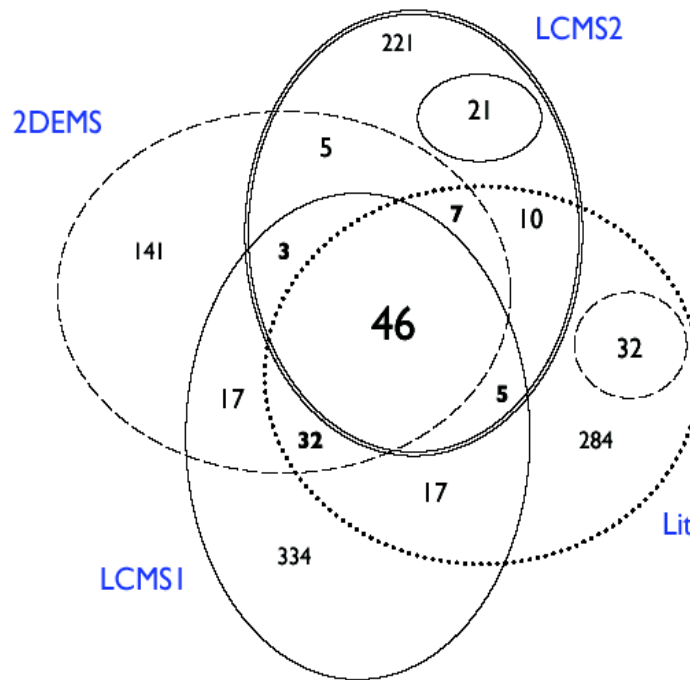
### **Multidimensional separation of peptides for effective proteomic analysis**

H.J.Issaq et al. *Journal of Chromatography* 2005

### **Multi-dimensional liquid phase based separations in proteomics**

Hong Wang, et al. *Journal of Chromatography* 2003

## 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).

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.

