



Central European Institute of Technology
BRNO | CZECH REPUBLIC

C7250 Charakterizace proteinů hmotnostní spektrometrií

Příprava vzorku pro MS analýzu

Gabriela Lochmanová

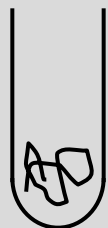


INVESTMENTS IN EDUCATION DEVELOPMENT

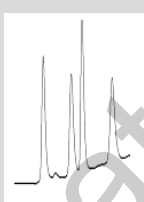
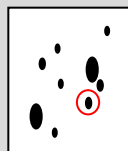


Proteomický experiment

buňky, tkáň

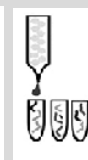
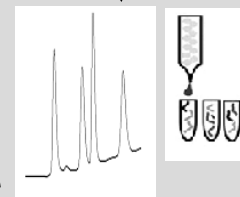


Separace proteinů



Bottom-up

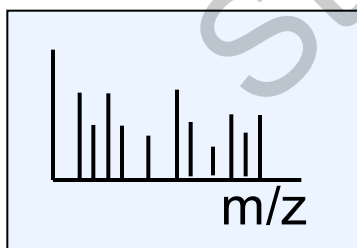
proteolytické
štěpení



Separace peptidů

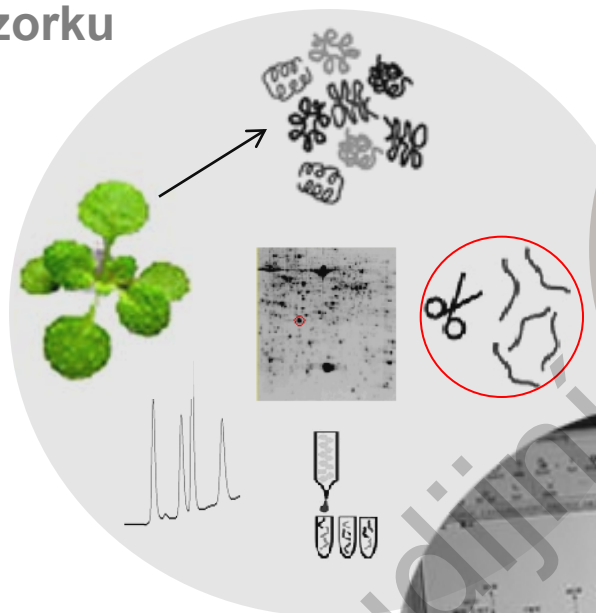


MS



Faktory ovlivňující výsledek MS

Kvalita a reprodukovatelnost
přípravy vzorku



Instrumentace

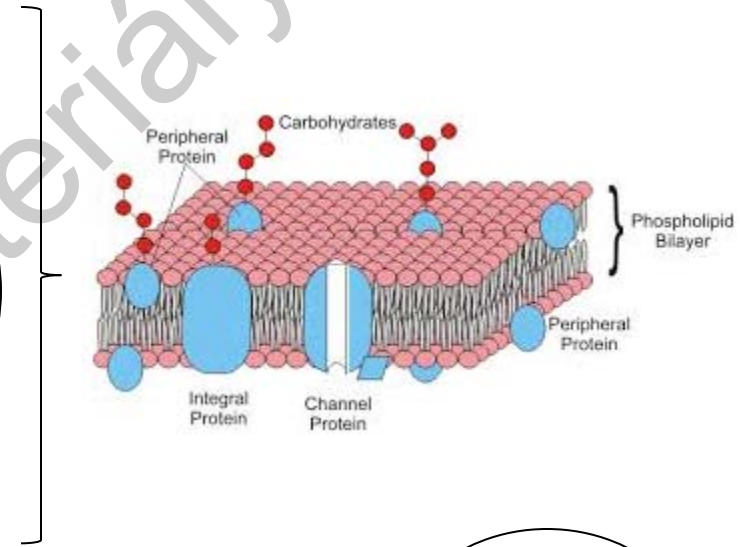


Vyhodnocení dat



Rozmanitost vzorku

Protein extraction = "more of an art than a science"



Obečné principy izolace:

- Rozrušení buněk – lyzační pufry, mechanicky
- Další postup dle povahy cílového proteinu:
 - srážení (např. aceton, TCA)
 - změna pH
 - změna koncentrace soli, imunoprecipitace...



Mechanické přístupy rozbití membrán

Přístup	Nástroj /Pomůcka/Přístroj	Princip
Mechanický	mixér	Rozmělnění buněk/tkáně
Homogenizace v roztoku	 Homogenizátory (Dounce Homogenizer, Potter-Elvehjem Homogenizer) French Press	Buněčná či tkáňová suspenze protlačena úzkým otvorem
Sonikace	 Ultrazvukový homogenizátor	Rozbití buněk pomocí ultrazvukových vln
Zmražení/rozmražení	Mrazák či suchý led s EtOH	Buňky jsou rozbity ledovými krystaly vznikajícími opakovanými cykly zmražování a rozmražování
Manuální rozmělnění	 Miska a tlouček	Rozmělnění rostlinné tkáně v tekutém dusíku

Rozbití membrán pomocí lyzačních roztoků



- Jemnější a jednodušší přístup v porovnání s mechanickým rozbitím buněčných membrán (může být i v kombinaci s homogenizací či mechanickým rozmělněním)
- Rozrušení lipidové vrstvy solubilizací proteinů a narušením interakcí lipid:lipid, protein:lipid a protein:protein
- Složení lyzačního roztoku:
detergent + pufr + další reagensie (specifické dle typu vzorku: chaotropní činidla, soli, inhibitory proteáz a enzymů odstraňujících modifikace, redukční činidla...)

Detergenty – ionogenní (kationtové/aniontové) – silné solubilizační a denaturační účinky

- zwitteriontové
 - neiontové
- } zpravidla jemnější s nižšími denaturačními účinky

- Vliv teploty

Volba lyzačního roztoku s ohledem na kompatibilitu s následným zpracováním vzorku a jeho analýzou

MS analýza proteinového vzorku



Cíl MS:

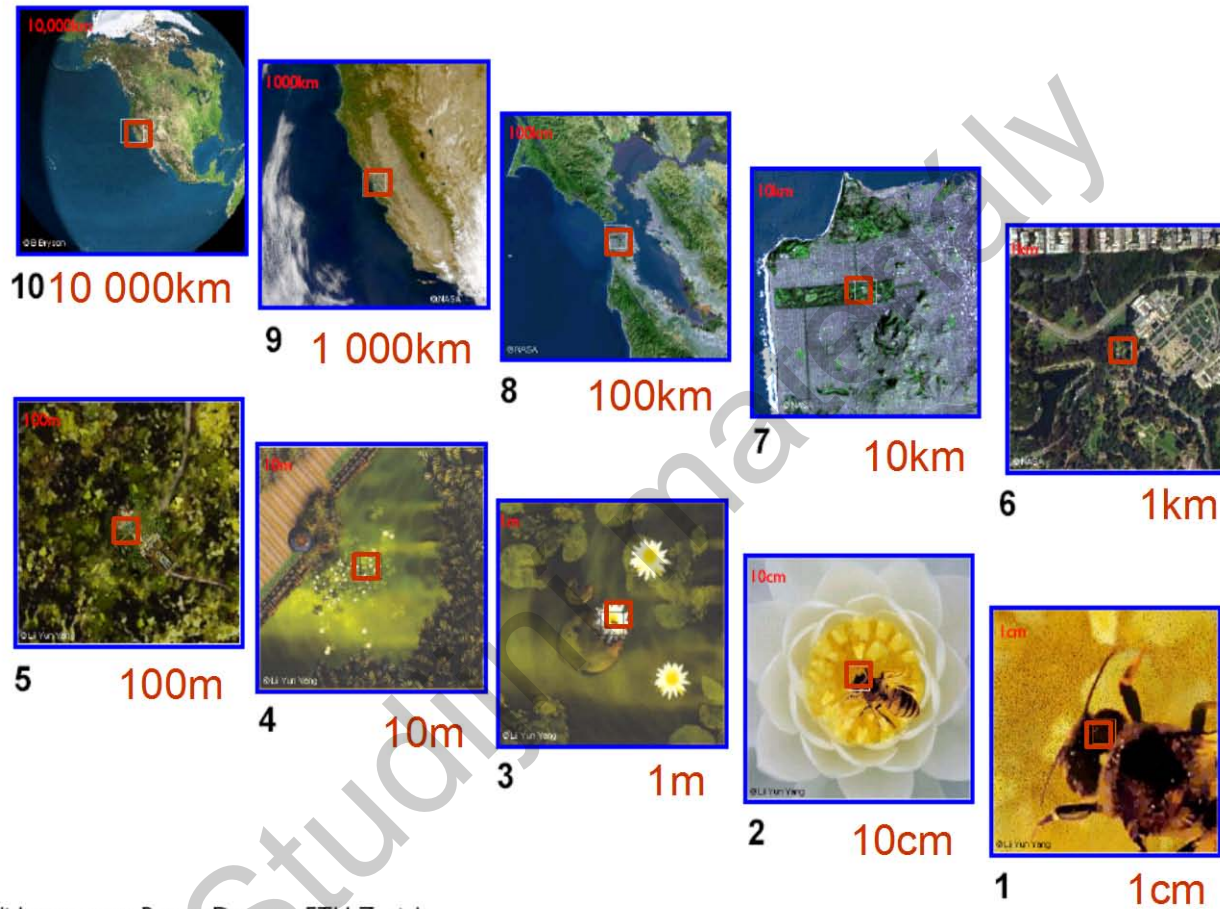
- Analýza proteinů v komplexní směsi
- Analýza cílového proteinu/cílové skupiny proteinů

Cílový protein přítomen v komplexní směsi:

- Abundantní komponenty – potlačení signálů nízkoabundantních
Dynamický rozsah koncentrace proteinů v biologickém vzorku může překročit 10 řádů
- Ionizace velkých molekul probíhá optimálně v přibližně vyvážených množstvích komponent
- MS spektrum z komplexní směsi - překrývání množství komponent

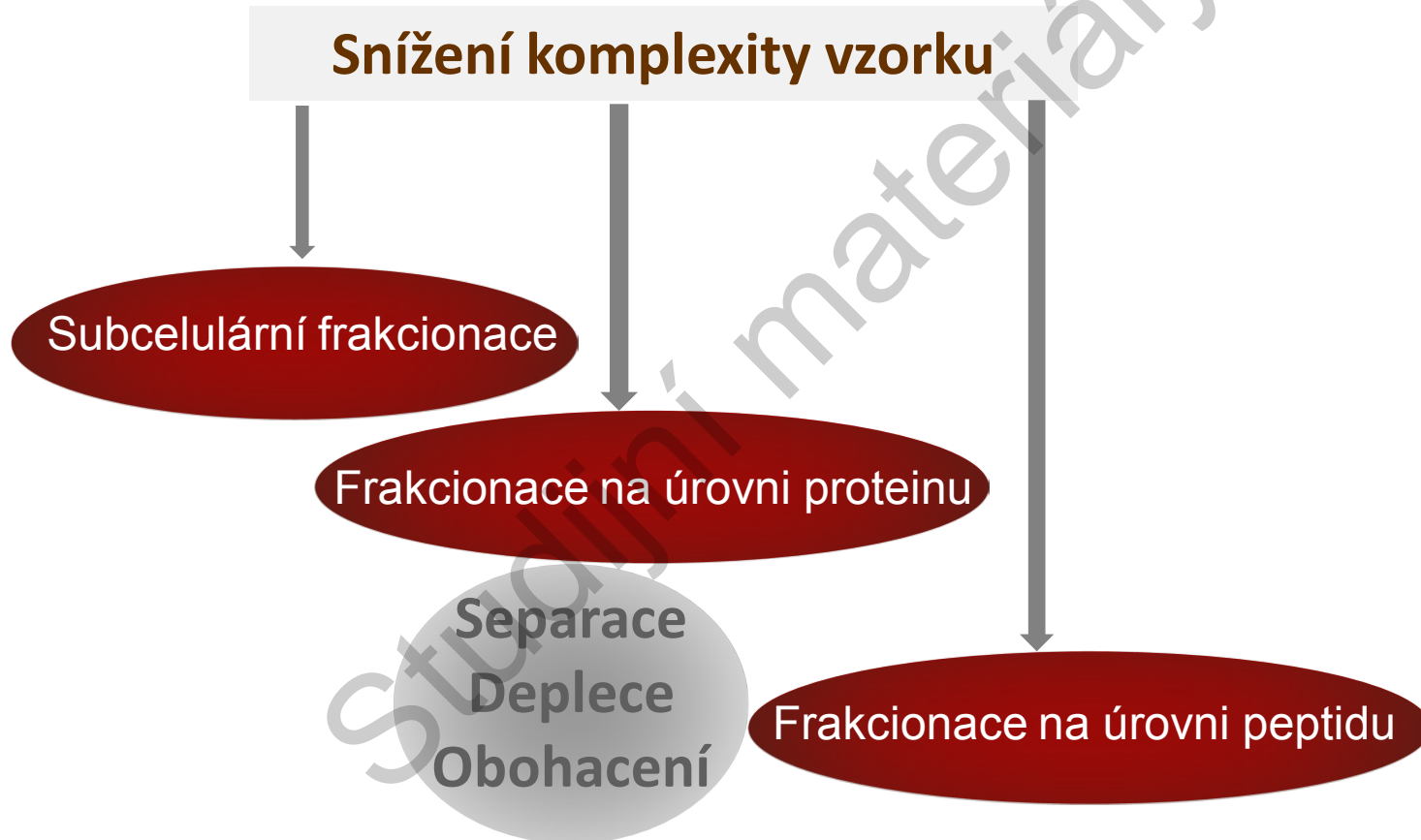
Požadavek: čistý vzorek s omezenou komplexitou

10^{10} Really Is Wide Dynamic Range



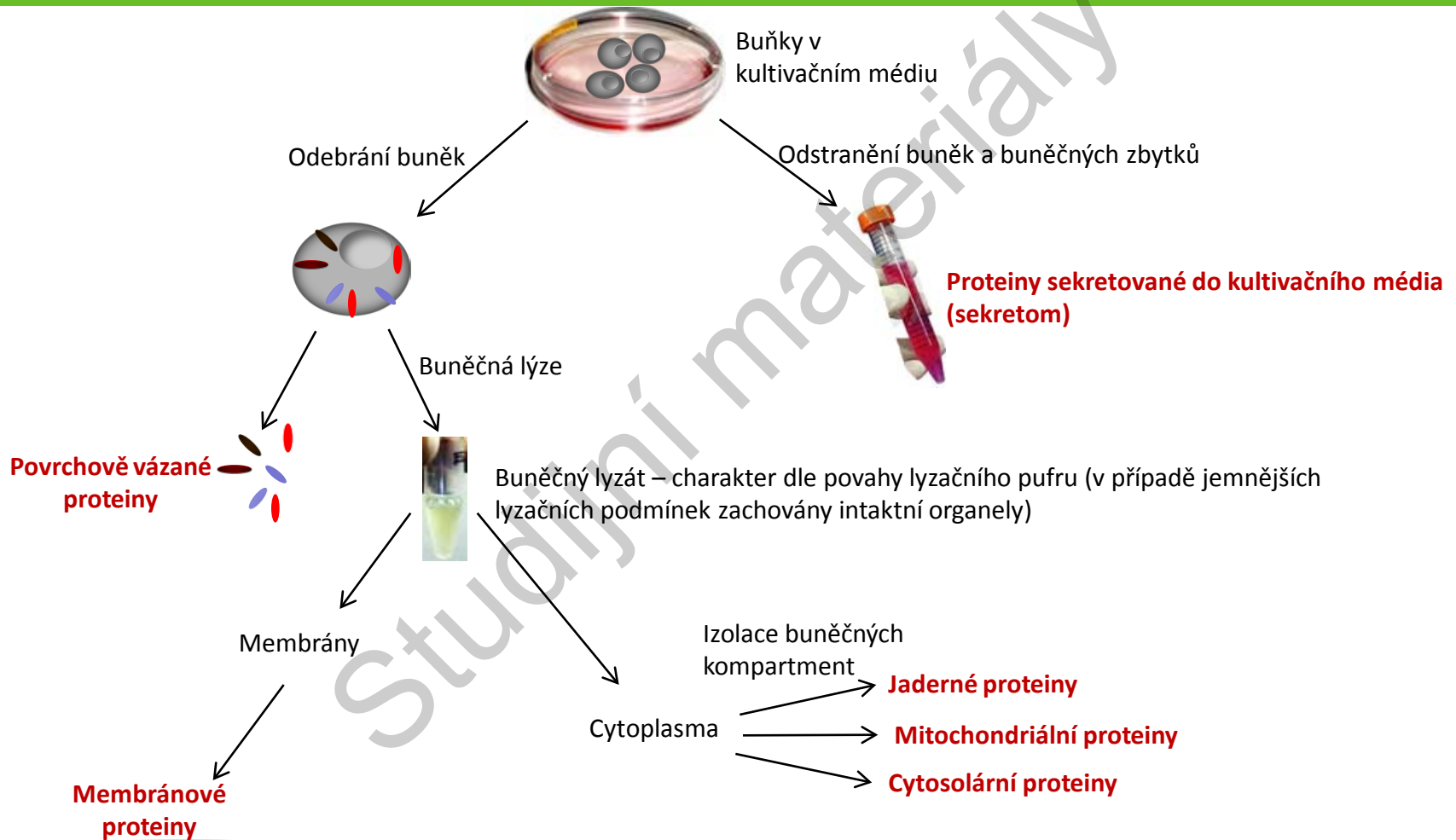
Slide courtesy Bruno Domon, ETH Zurich

Prefrakcionace a obohacení nízkoabundantních proteinů
= efektivnější identifikace a studie cílového proteinu



MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Subcelulární frakcionace

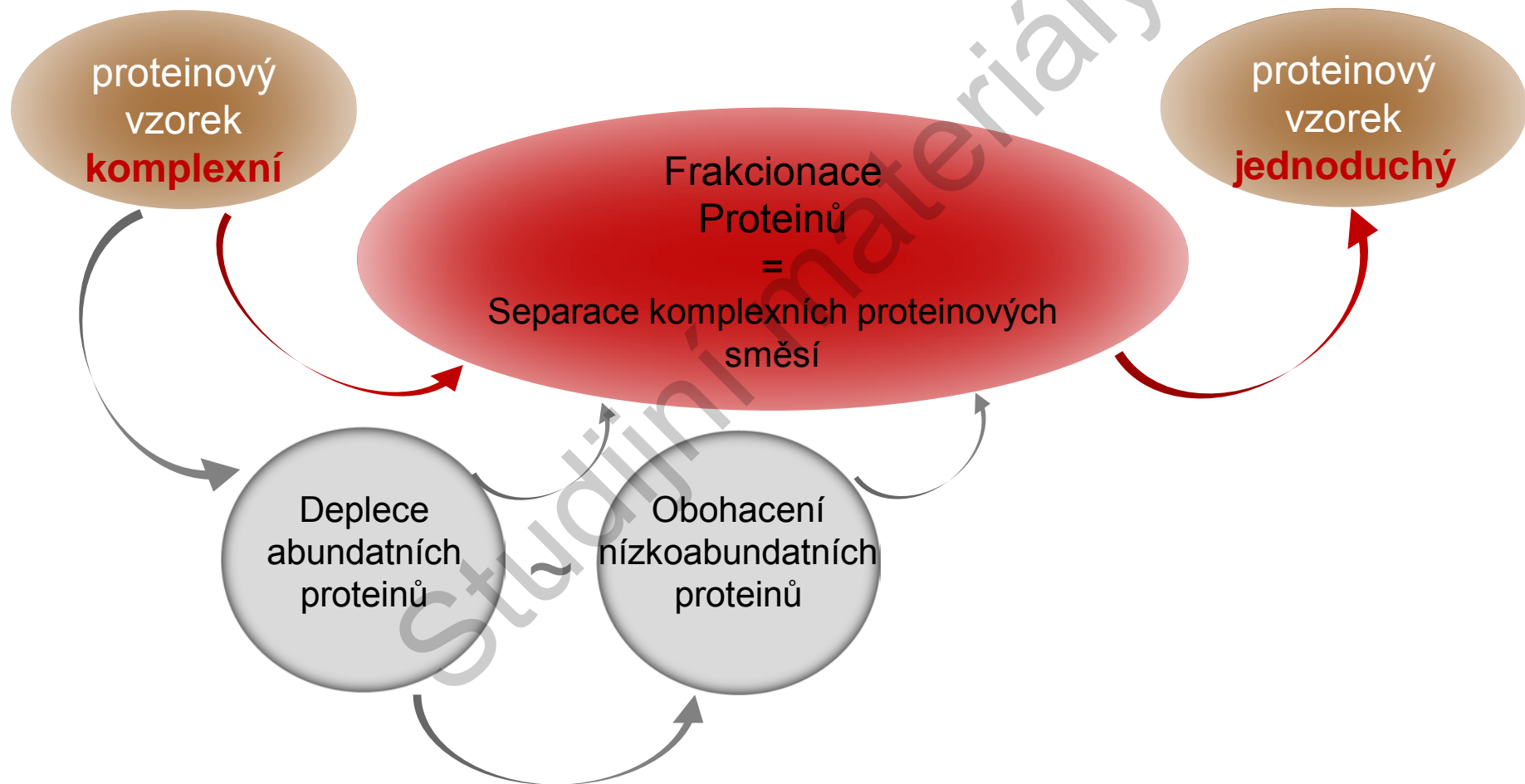


hydrofobicita, bazicita, velikost

Specifické detergenty pro selektivní extrakci membránových proteinů
- separace od cytosolárních hydrofilních proteinů

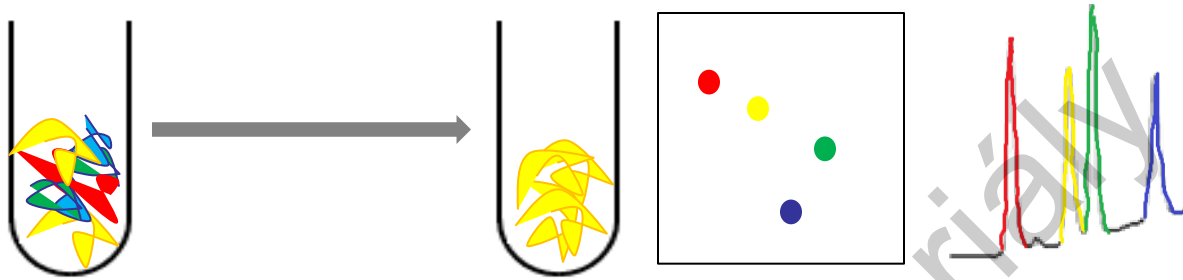
MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů



MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů



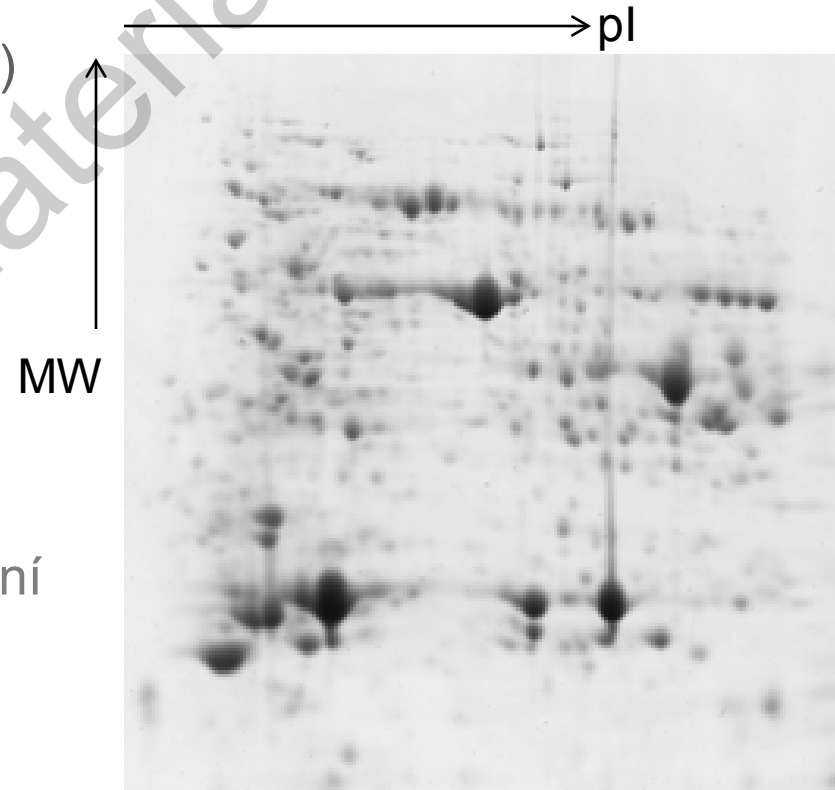
	Frakcionační metoda	Fyzikálně-chemický parametr
Centrifugační metody	Ultracentrifugace	Hustota
Elektroforetické metody	Gelová elektroforéza	Velikost/náboj
	Izoelektrická fokusace	Izoelektrický bod
	Kapilární elektroforéza	Velikost/náboj
Chromatografické metody	Reverzní fázová kapalinová chromatografie	Hydrofobicita
	Iontoměničová chromatografie	Náboj
	Afinitní chromatografie	Specifická biomolekulární interakce
	Gelová chromatografie	Velikost molekul

MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů 2D SDS-PAGE

2D SDS-PAGE:

- 1. rozměr = Izoelektrická fokusace (IEF)
 - elektroforetická metoda
 - separace proteinů dle pI
- 2. rozměr = SDS-PAGE
 - elektroforetická metoda
 - separace proteinů dle MW
 - 1.4g SDS/g protein
 - SDS pro 2D v kontinuálním uspořádání



KONTAMINANTY:

Soli, iontové detergenty, nukleové kyseliny, polysacharidy, lipidy, fenolické látky...

MS analýza proteinového vzorku

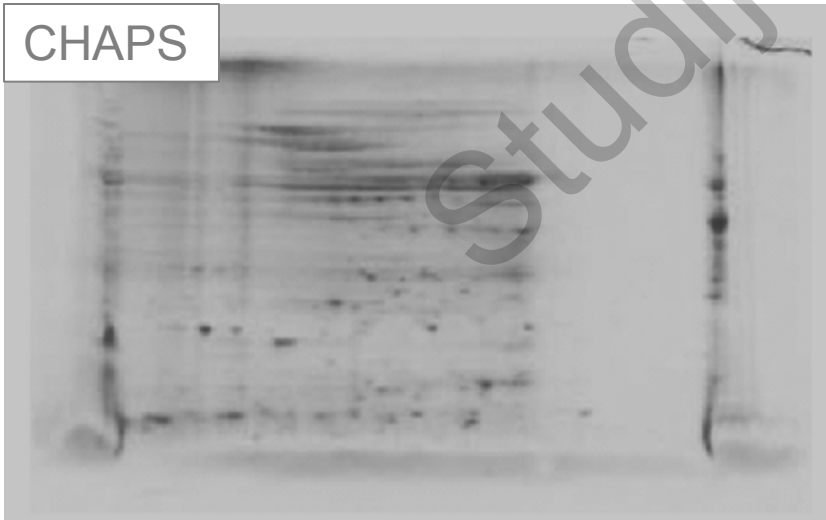
Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů 2D SDS-PAGE – Solubilizace proteinů

Složení solubilizačního roztoku:

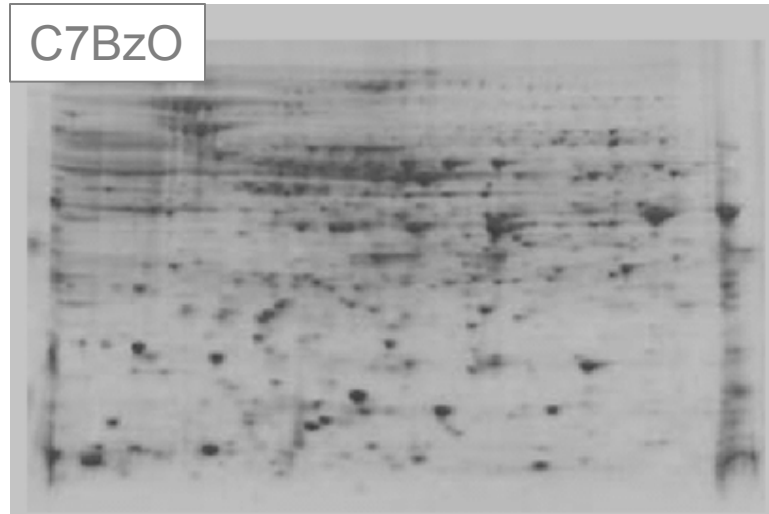
- Chaotropní činidla (močovina, thiomočovina)
- Neionogenní detergent (CHAPS, C7BzO)
- Redukční činidla (DTT, TBP)
- Inhibitory proteáz a enzymů odstraňujících modifikace (např. fosfatáz, deacetyláz, ...)
- Amfolyty

Komponenty kompatibilní s IEF - nesmí zvyšovat iontovou sílu

CHAPS



C7BzO

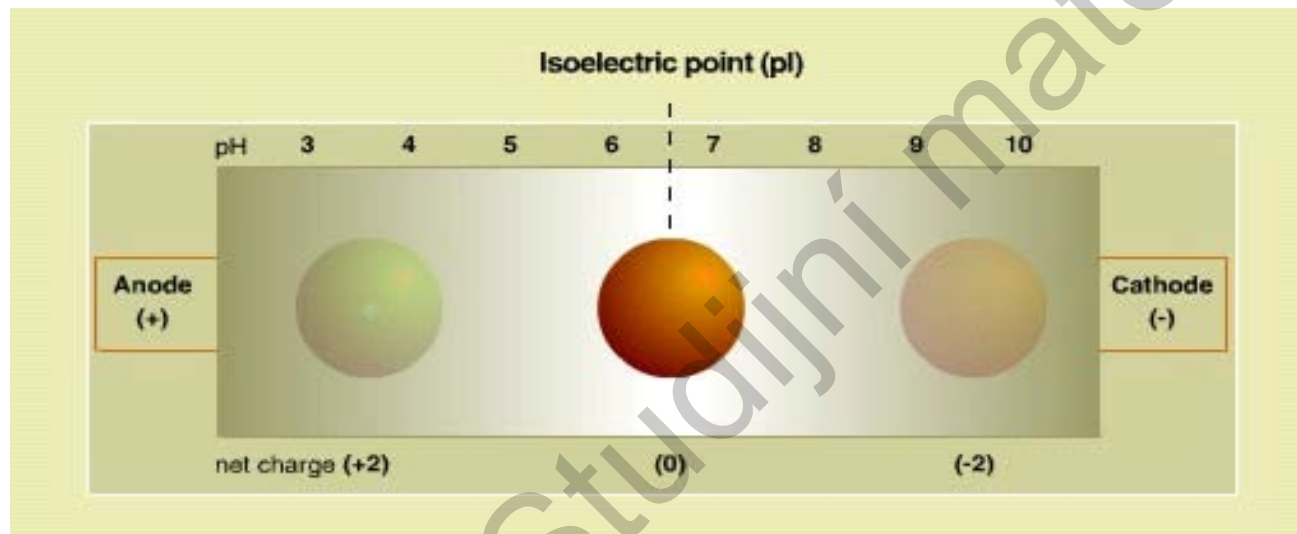


celkem

MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů 2D SDS-PAGE – 1. rozměr

- 1. rozměr = Izoelektrická fokusace (IEF)
- Migrace nabitých částic v gradientu pH v elektrickém poli



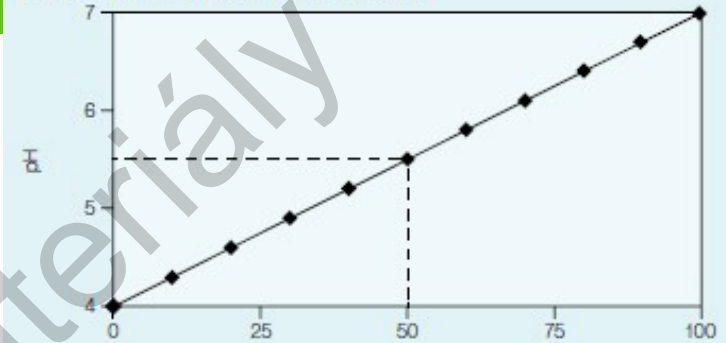
MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů 2D SDS-PAGE – 1. rozměr

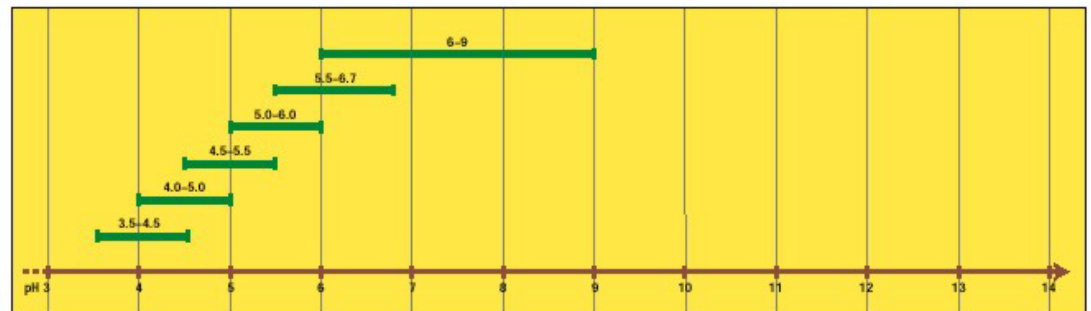
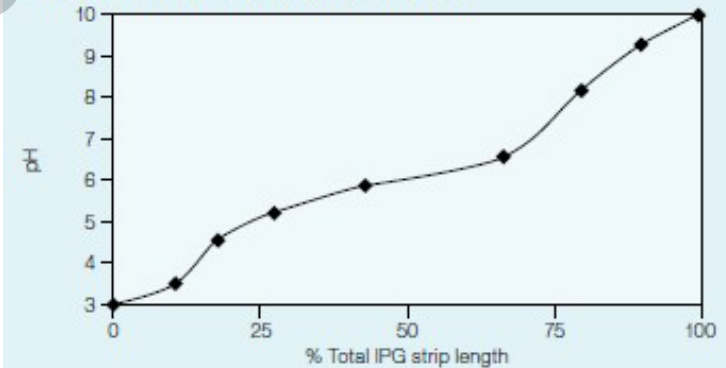
ROZSAH STRIPU
ROZMĚR STRIPU



A. Linear pH 4-7 ReadyStrip IPG strip



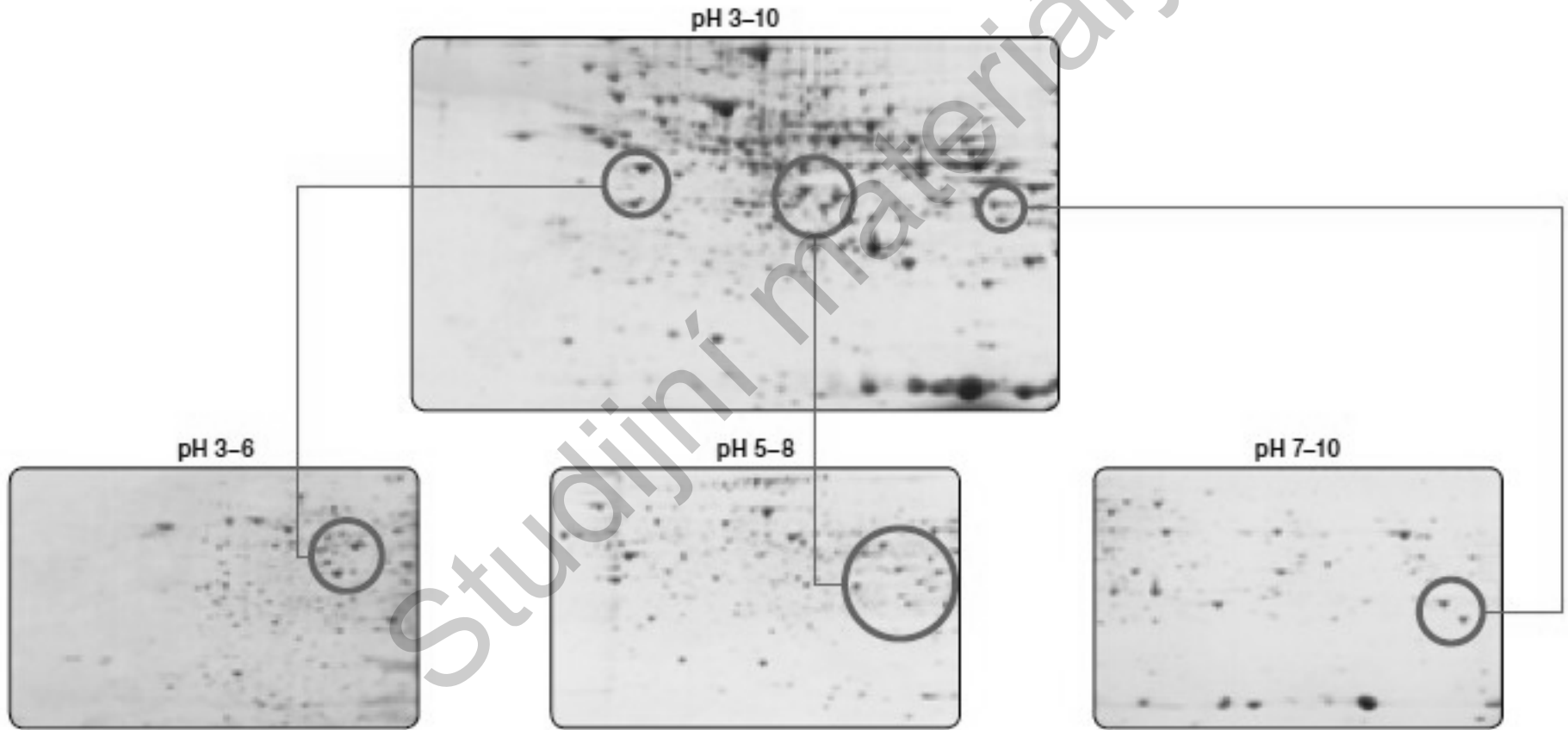
B. Nonlinear pH 3-10 ReadyStrip IPG strip



MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů
2D SDS-PAGE - 1. rozměr

ROZSAH STRIPU



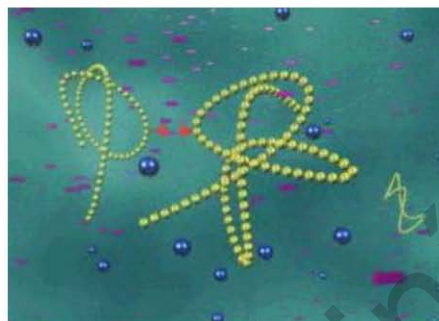
MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů 2D SDS-PAGE - Ekvilibrace

EKVILIBRACE STRIPU



Protein with disulfide bridges



denaturace **SDS** ●



Ekvilibrační pufr:
Tris-HCl (pH 8.8)
SDS
močovina
glycerol
DTT
IAA

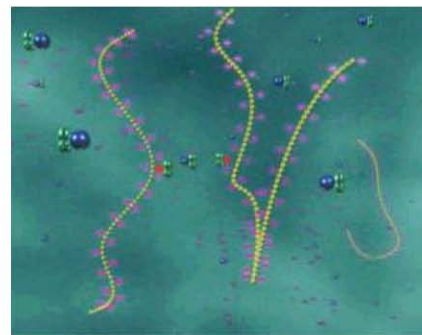


Reduction cleaves disulfide bridges
and allows unfolding



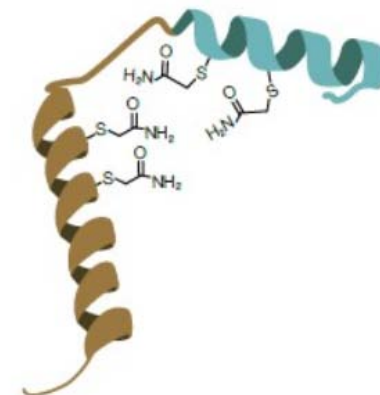
redukce

DTT ●



alkylace

IAA ●

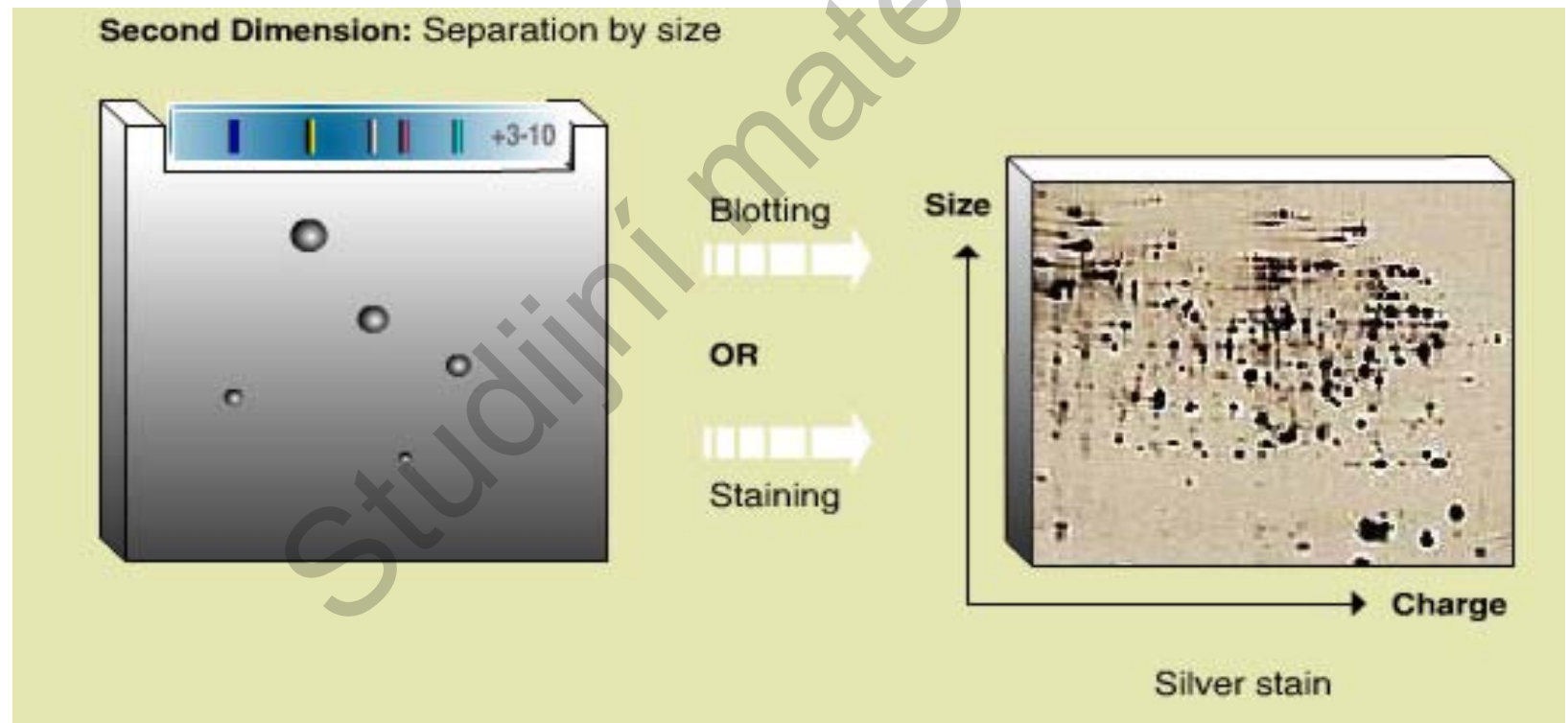


Alkylation with iodoacetamide prevents
disulfide bridges from reforming

MS analýza proteinového vzorku

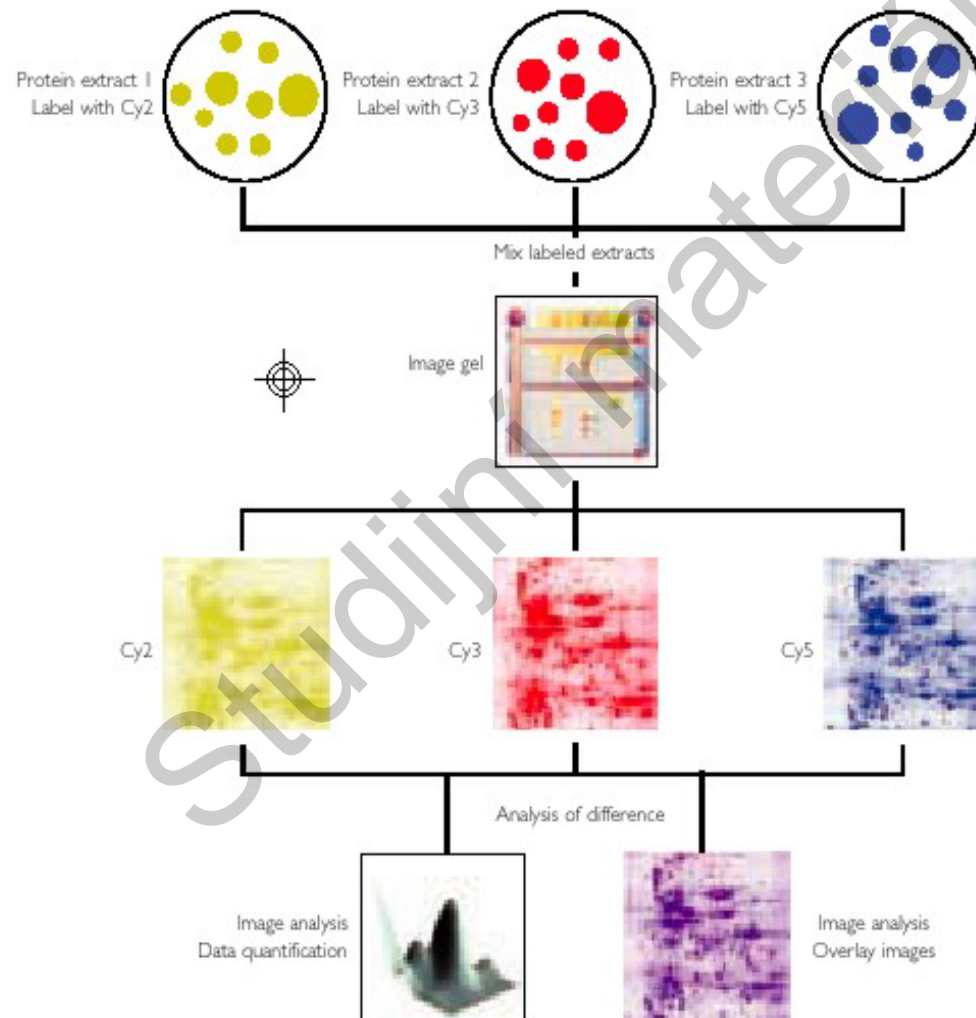
Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů 2D SDS-PAGE - 2. rozměr

- 2. rozměr = SDS-PAGE
- Migrace aniontů v elektrickém poli dle MW



MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů
2D SDS-PAGE – DIGE = Difference gel electrophoresis



MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů 2D SDS-PAGE – Detekce proteinů

Obecné požadavky na vizualizaci proteinů

- vysoká citlivost
- kvantitativní barvení
- široký lineární rozsah závislosti intenzity barvičky na množství proteinu v gelu

Dynamický rozsah

= graf závislosti intenzity barvičky (osa y) na koncentraci proteinu (osa x)

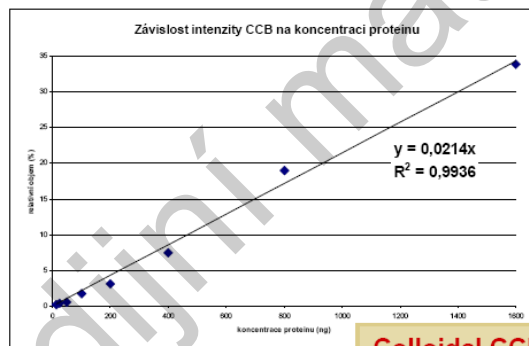
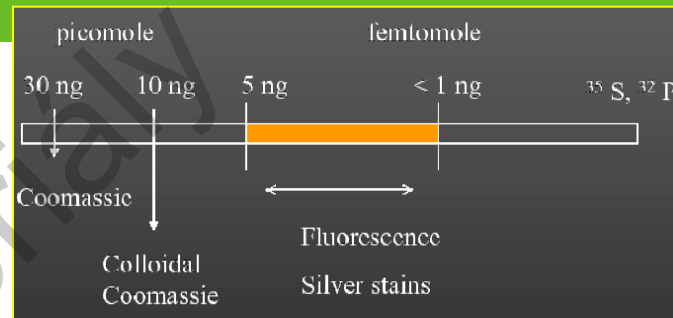
- end-point

- trvanlivost

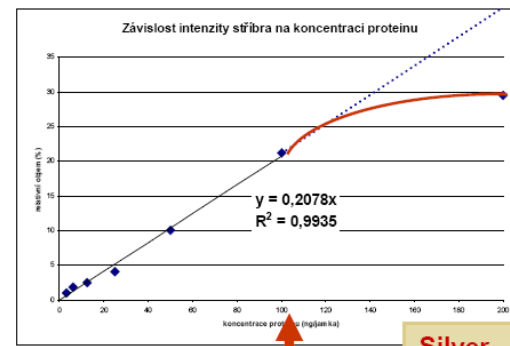
(např. zhášení fluorescenčních barviček!)

- kompatibilita s následnými analýzami

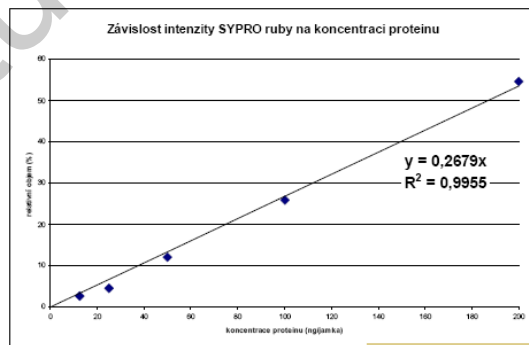
(např. stříbro - glutaraldehyd!)



Colloidal CCB



Silver



SYPRO Ruby

Barvení stříbrem

– lineární závislost pouze v rozmezí do 100 ng proteinu.

Při vyšších množstvích odklon od linearity.

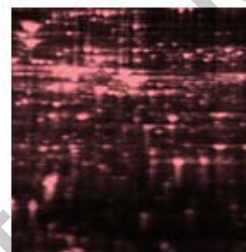
MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů 2D SDS-PAGE – Detekce proteinů

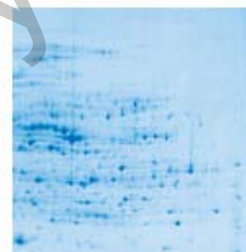
Typy detekce:

Značení před analýzou (DIGE – CyDye, radioaktivní značení)

Barvení po analýze



Sypro Ruby



Coomassie



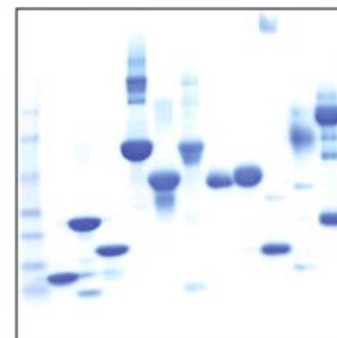
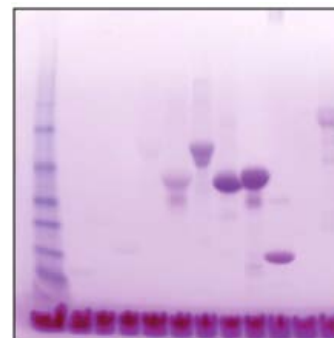
silver

Nespecifické barvení: všechny proteiny

- **Viditelné barvení:** Coomassie brilliant blue (R250, G250), stříbro (kyselá x amoniakální varianta)
- **Fluorescenční barvení:** Sypro Ruby (Ex/Em = 280, 450/610 nm), Lucy (Ex/Em = 506/520 nm), Flamingo Pink (Ex/Em = 512/535 nm), Oriole (Ex/Em = 270/604 nm), Krypton (Ex/Em = 520/580), Deep Purple (Ex/Em = 365, 520/610 nm), Lumitein (Ex/Em = 280, 450/610 nm)

Specifické barvení: post-translační modifikace (PTM)

- fosforylace: Pro-Q Diamond (pSer, pThr, pTyr), Pierce phosphoprotein staining kit (pSer, pThr)
- glykosylace: Pro-Q Emerald, Pierce glycoprotein staining kit
- Radioaktivní značení



MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů 2D SDS-PAGE - 2. rozměr

Instrumentace:

Izoelektrický fokusátor

Elektroforetická aparatura

Denzitometr / Fluorescenční skener

SW pro obrazovou analýzu



Protean Plus Dodeca Cell



Mini-Protean 3 Dodeca Cell



Protean II xi Cell

MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů IEF Frakcionace



MicroRotor

- prefrakcionace v roztoku



OffGel Fractionator

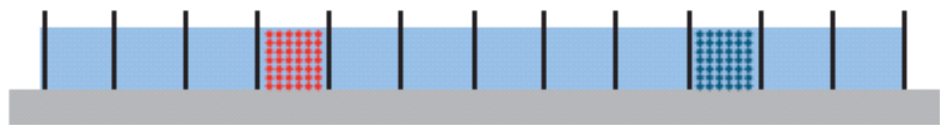
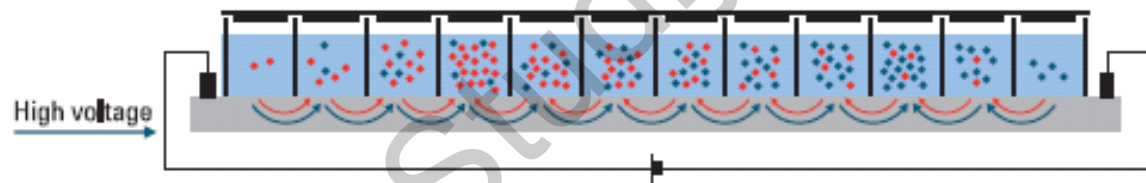
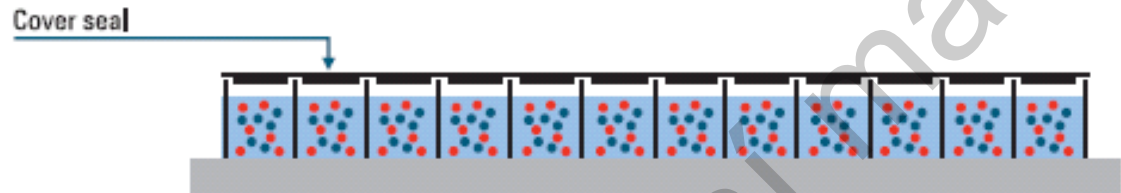
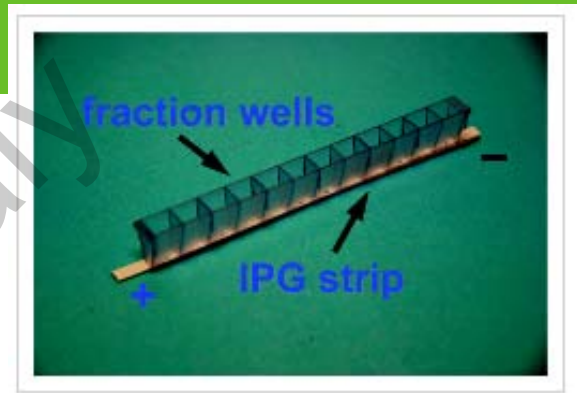
- prefrakcionace na IPG stripu

MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů

IEF Frakcionace

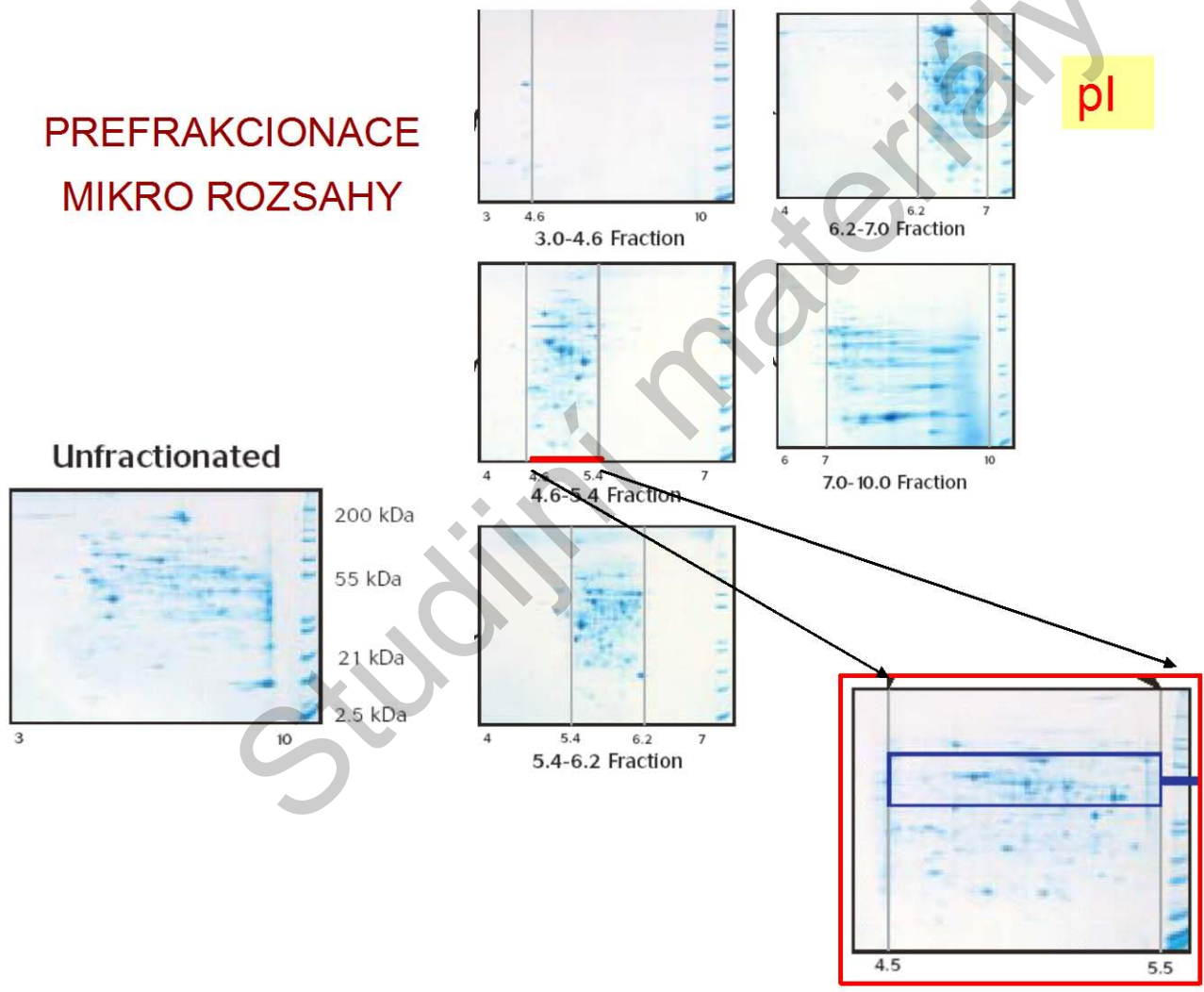
OFFGEL IEF prefrakcionace proteinů nebo peptidů



MS analýza proteinového vzorku

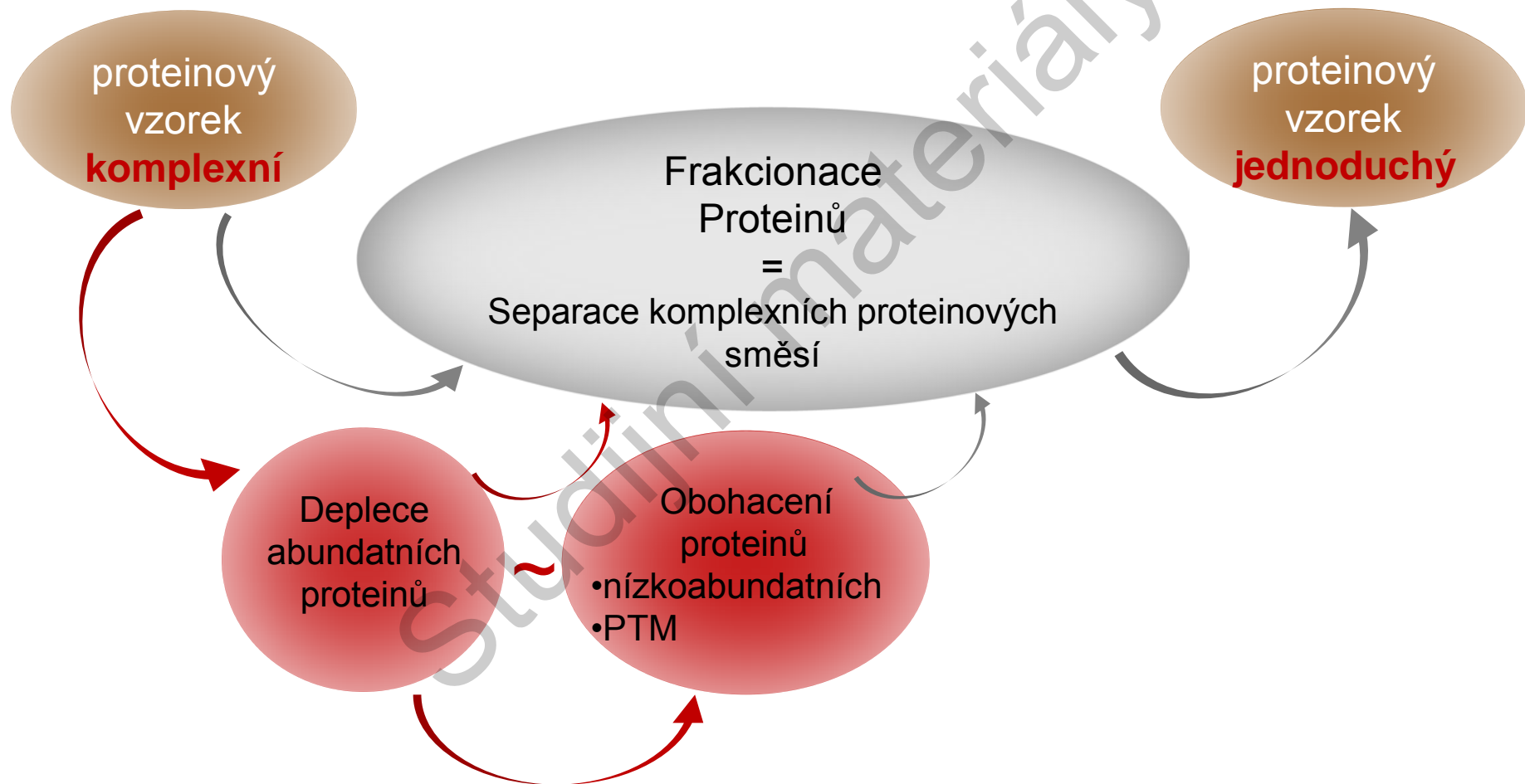
Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů

IEF Frakcionace



MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů



MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů

Deplece abundatních proteinů

Metody

- Precipitace abundantního proteinu
- Gelová chromatografie
- Imunodeplece

Vysoce specifická protilátka proti abundantnímu proteinu imobilizovaná na sorbentu

- komerční kity (př. ProteoPrep 20 Plasma Immunodepletion Kit, Seppro (Sigma-Aldrich); Pierce Top 2/12 Abundant Protein Depletion Spin Columns)



Výhoda:

- Detekce nízkoabundantních proteinů, které byly před deplecí maskovány

Riziko:

- Nespecifická vazba cílového proteinu na depletovaný abundantní protein (např. nízkoabundantní protein krevní plasmy se může vázat na depletovaný protein, který slouží jako jeho transportní protein)

→ cílový protein může být odstraněn společně s abundantním

MS analýza proteinového vzorku

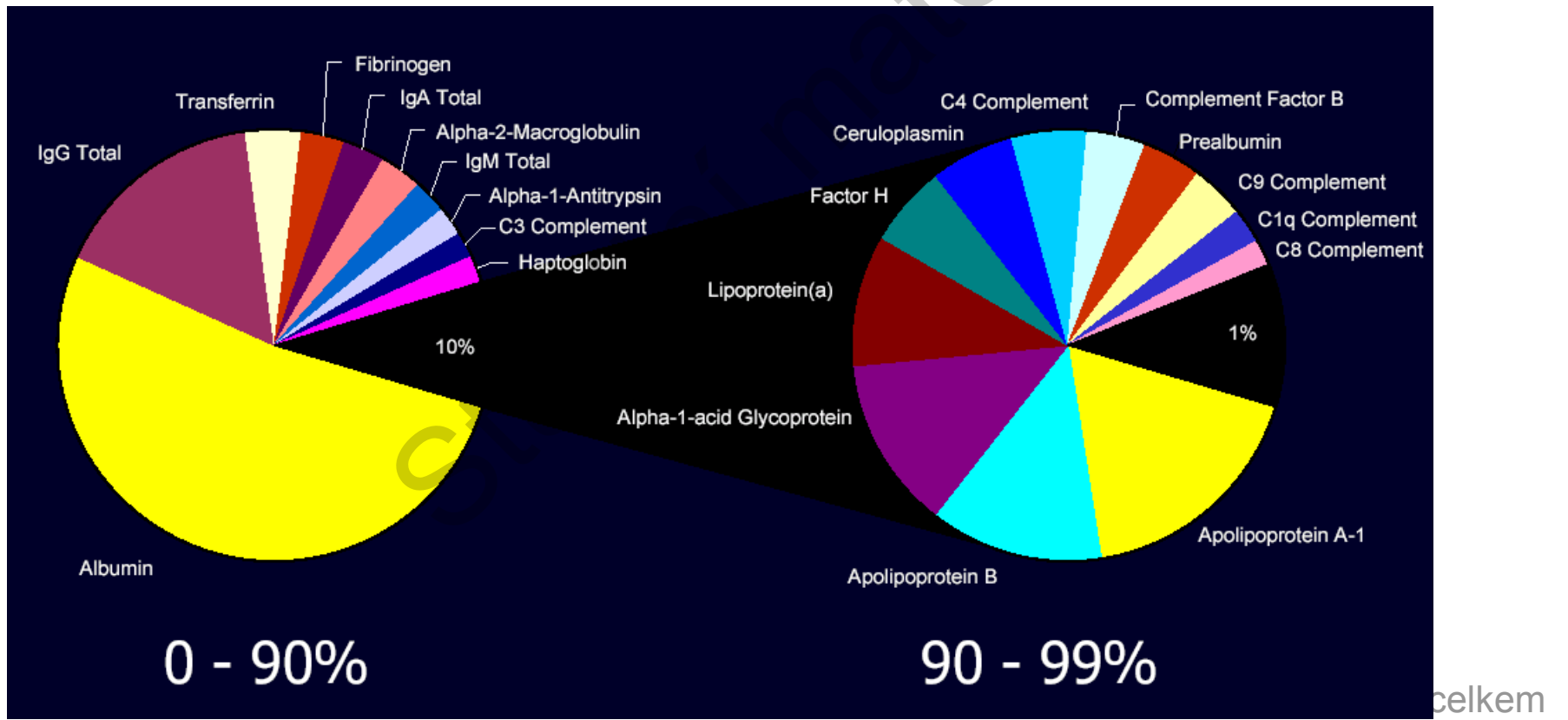
Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů

Deplece abundatních proteinů

Příklad: Proteiny plasmy

Abundantní proteiny: ~ **mg/ml** (Albumin: 30-50 mg/ml, ~ 1/2 proteinů plasmy)

Potenciální biomarkery: ~ **pg/ml**, nízké hladiny zvláště v brzké fázi nemoci



MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů

Deplece abundatních proteinů



MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů

Obohacení nízkoabundantních proteinů

ProteoMiner™ protein enrichment kit

- Redukce dynamického rozsahu koncentrace proteinů v komplexní směsi
Obohacení středně a nízkoabundantních proteinů a snížení množství abundantních proteinů
- Princip: velká, vysoce různorodá knihovna hexapeptidů vázaných na kuličky
Abundantní proteiny saturují afinitní ligandy a nadbytečné proteiny jsou odmyty

X

Středně a nízkoabundantní proteiny jsou zakoncentrovány na specifických ligandech

Výhody: Snížení dynamického rozsahu koncentrací při zachování zástupců všech proteinů původního vzorku

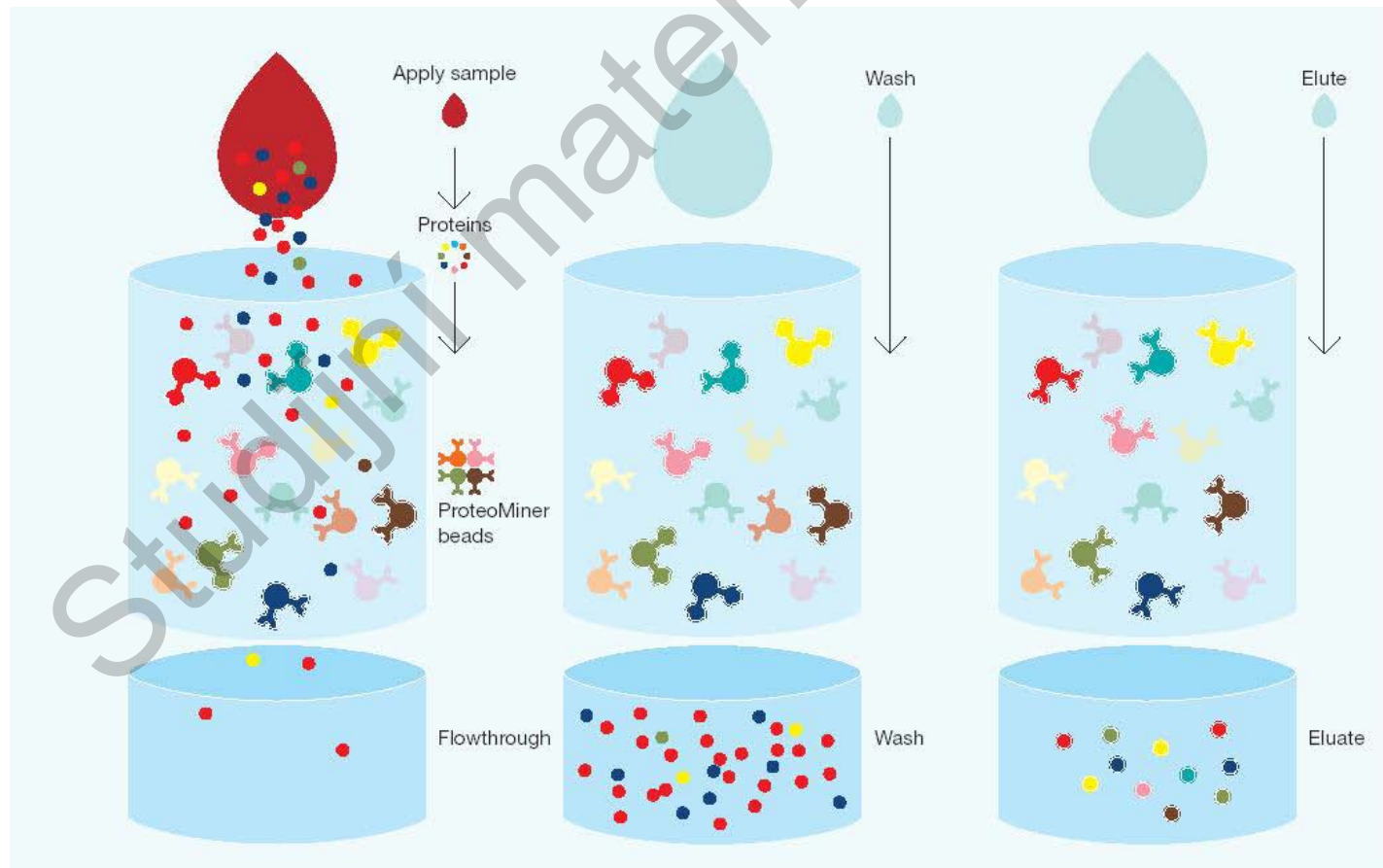
: Metoda vhodná pro rozmanité typy vzorků, nezávislá na dostupnosti protilátek (na rozdíl od imunodeplece)

MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů

Obohacení nízkoabundantních proteinů

ProteoMiner™ protein enrichment kit: CPPL Combinatorial Peptide Ligand Library



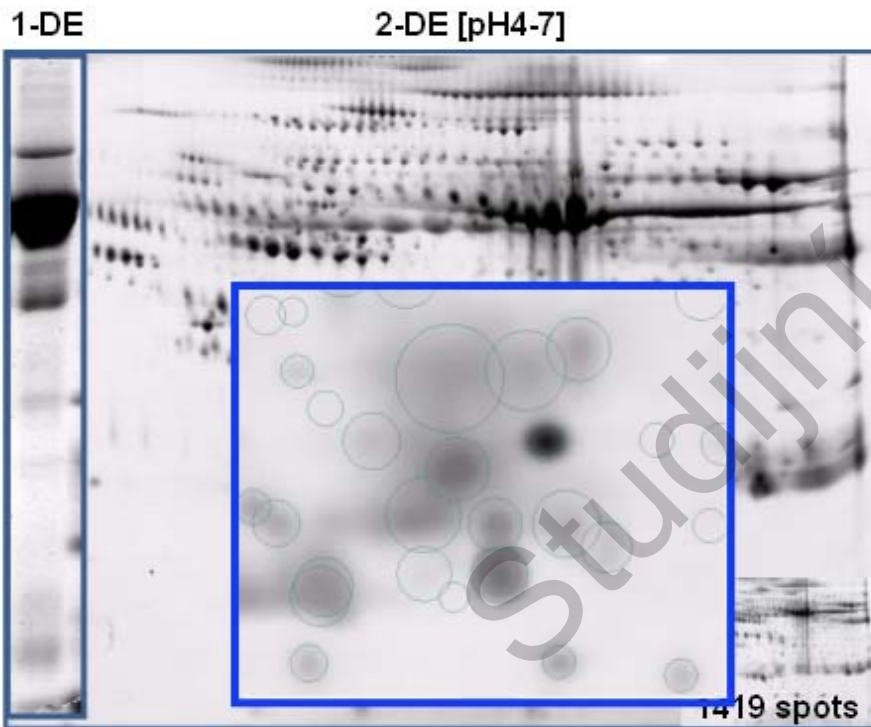
MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů

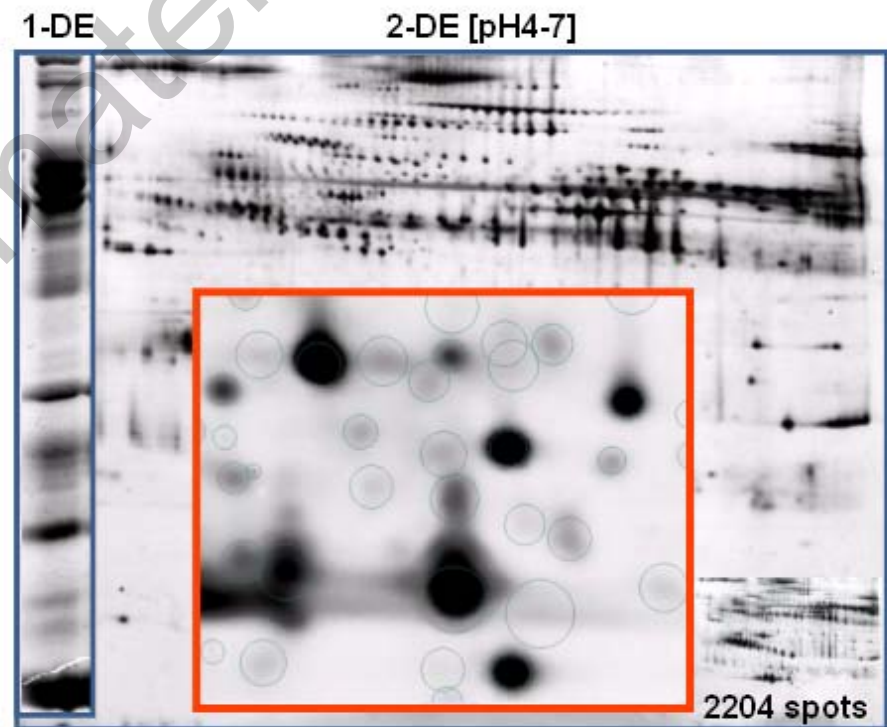
Obohacení nízkoabundantních proteinů

ProteoMiner™ protein enrichment kit

Native Human Serum

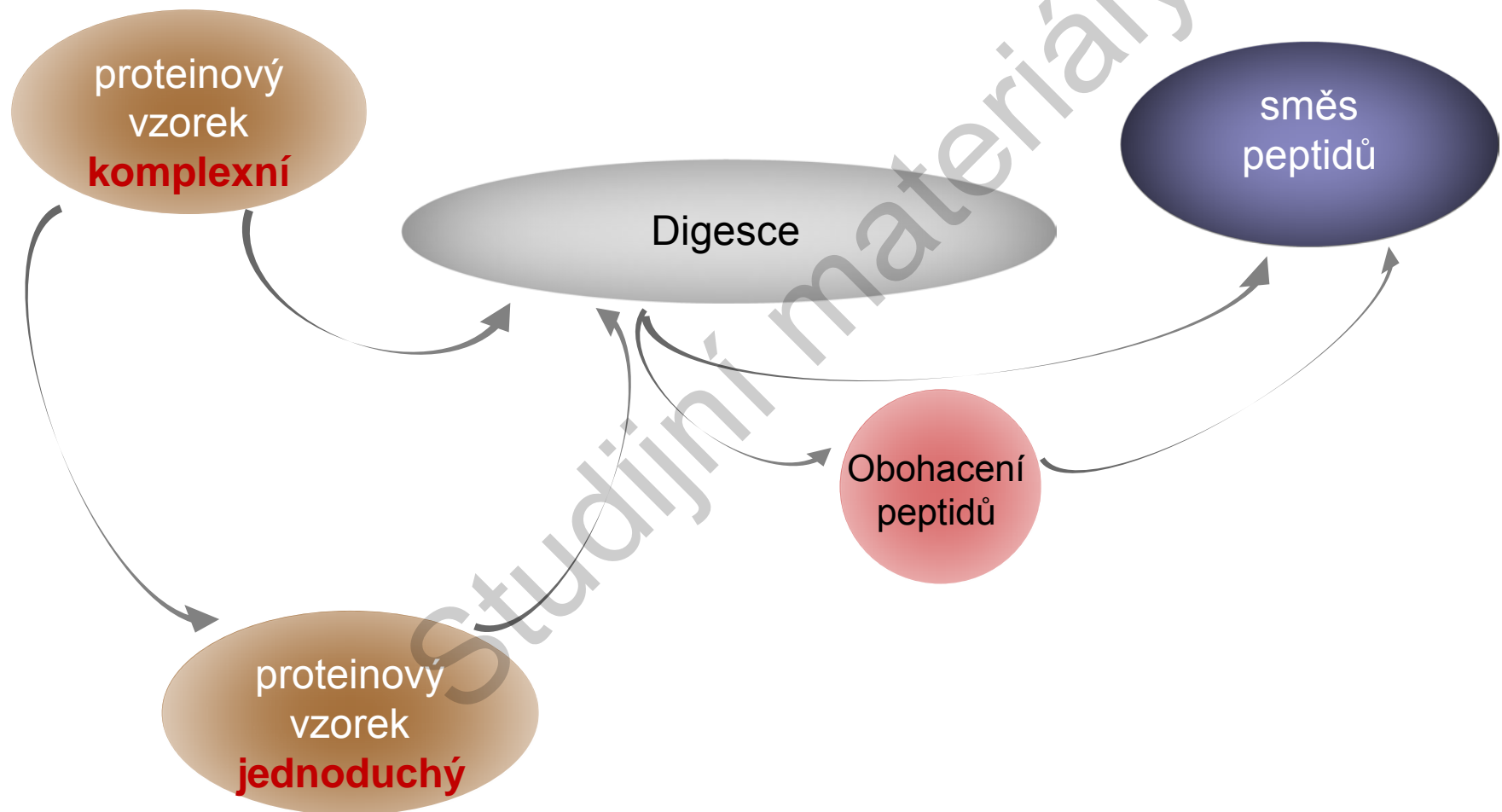


Human Serum Fractionated by ProteoMiner



MS analýza proteinového vzorku

Digestce proteinů



Digestce proteinů

- Výběr vhodné proteinasy (event. kombinace proteinas)
- Redukce a alkylace S-S můstků před digescí
- Digestce ovlivňuje: poměr enzym:substrát, teplota, doba
- Kompatibilita roztoků s následnou MS
 - odstranění kontaminant – např. FASP

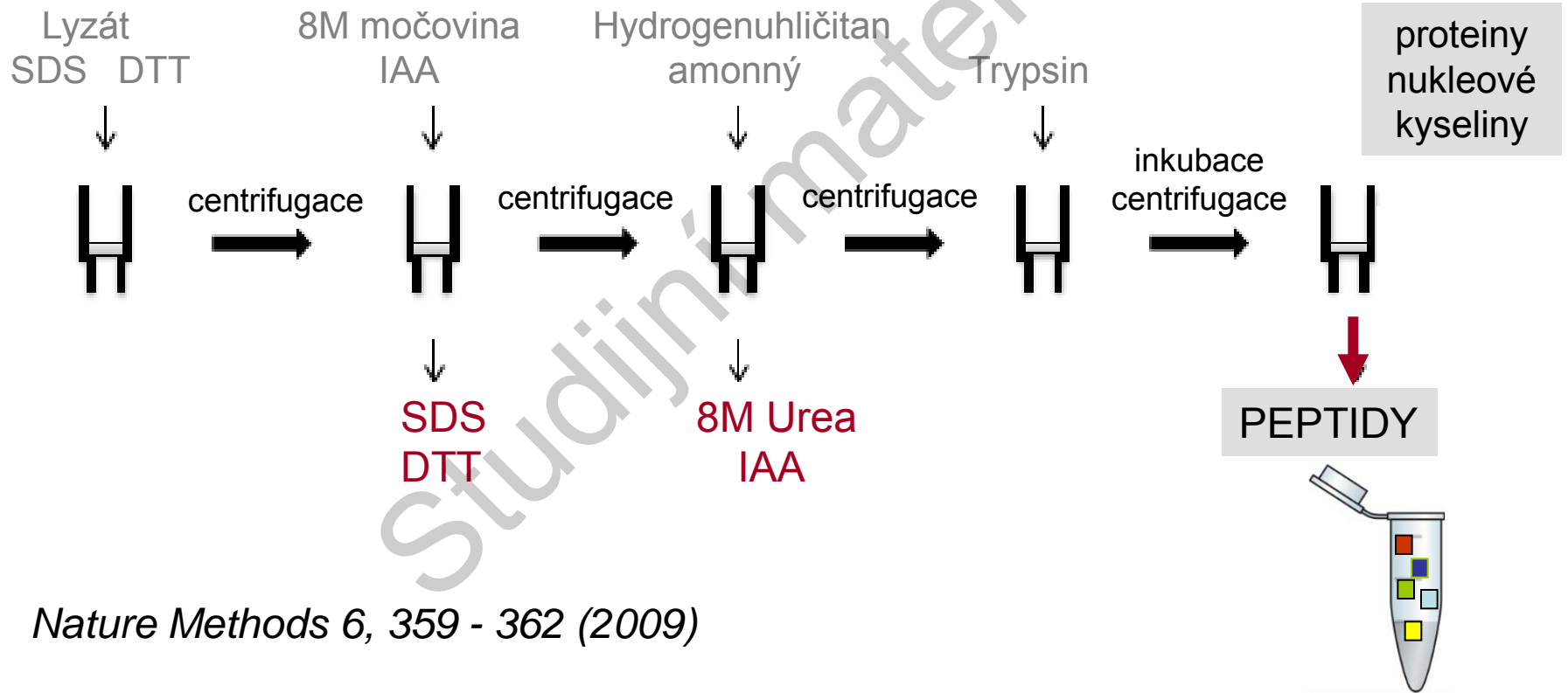


MS analýza proteinového vzorku

Digestce proteinů

FASP = filter aided sample preparation

PROTEINY



Nature Methods 6, 359 - 362 (2009)

MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni peptidů

Frakcionace peptidů v roztoku pomocí LC

Frakcionace:

- off-line: LC (prefrakcionace)
- on-line: LC-MS
- Multidimenzionální chromatografie: LC-(LC)-... v různých provedeních

Základní faktory ovlivňující frakcionaci peptidů:

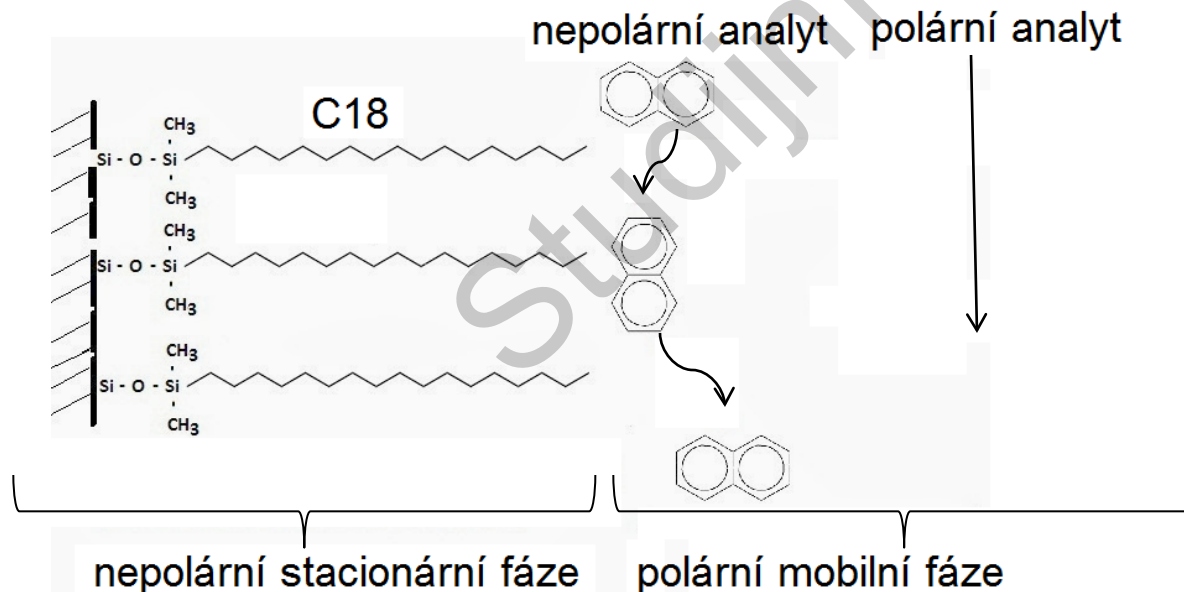
- Charakter kolony
- Složení mobilní fáze
- Fyzikálně-chemická povaha peptidů
(náboj, polarita, hydrofobicita, velikost)

MS analýza proteinového vzorku

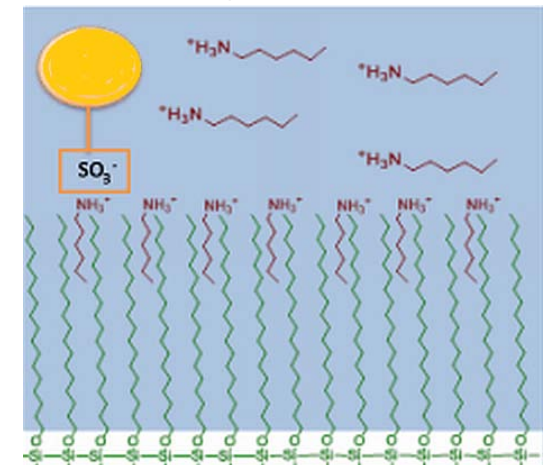
Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni peptidů Frakcionace peptidů v roztoku pomocí LC

Chromatografie na reverzní fázi

- Nejčastěji používaná
- Separace molekul v roztoku na základě hydrofobicity
 - separace na základě rozdělovacího koeficientu mezi polární mobilní a hydrofobní (nepolární) stacionární fázi
- Separaci ovlivňuje: teplota, rozměry kolony, stacionární fáze, velikost částic, iontově-párující činidla, gradient



Iontově párující činidla



MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni peptidů Frakcionace peptidů v roztoku pomocí LC

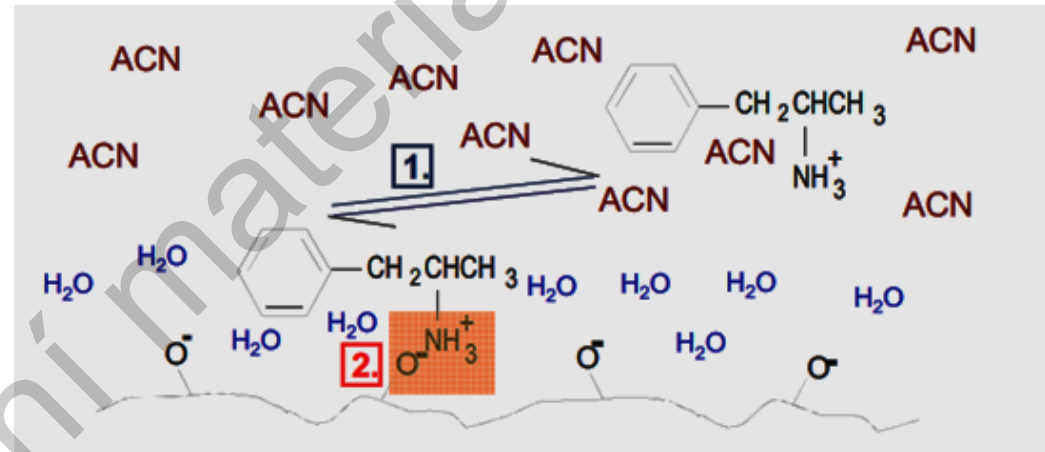
Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC)

- Separace hydrofilních peptidů
- Hydrofobní mobilní fáze a

- voda
- pufr
- pH

- hydrofilní stacionární fáze

- Silica, $\text{Si-OH} \rightleftharpoons \text{Si-O}^{(-)}\text{H}^{(+)}$
- Amine, $-(\text{CH}_2)_3\text{-NH}_2$
- Diol, $-(\text{CH}_2)_3\text{-O-CH}_2\text{-(CHOH)CH}_2\text{OH}$
- Amide, $-(\text{CH}_2)_n\text{-(CO)NH}_2$
- Zwitterionic, $-(\text{CH}_2)_n\text{-N(Me)}_2^{(+)}\text{-(CH}_2)_n\text{-SO}_3^{(-)}$



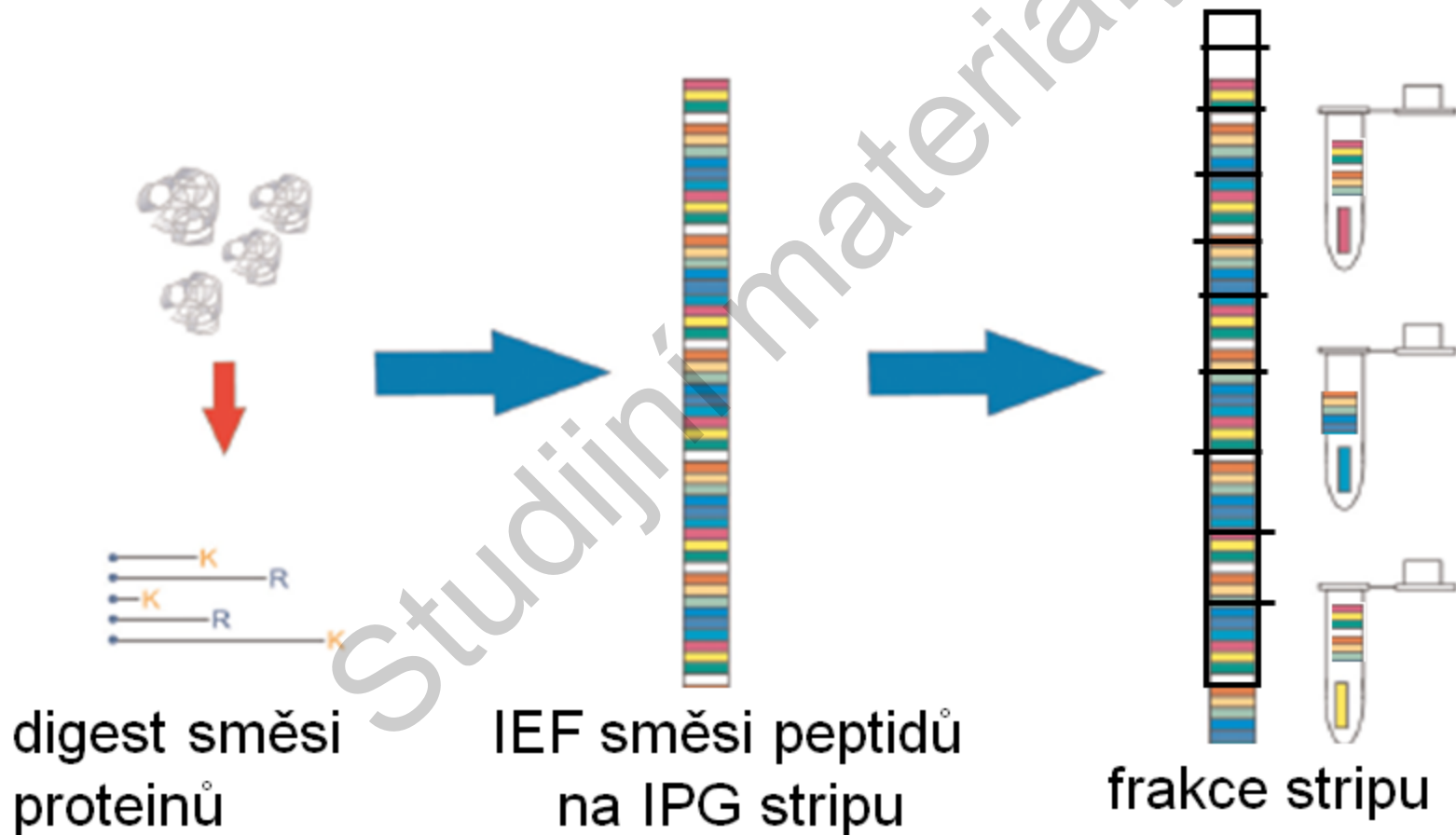
1. Distribuce mezi vodnou a organickou vrstvou
2. Iontoměničová interakce se skupinami stacionární fáze

- Vhodná pro separaci posttranslačně-modifikovaných peptidů

MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni peptidů

Frakcionace peptidů na IPG stripu



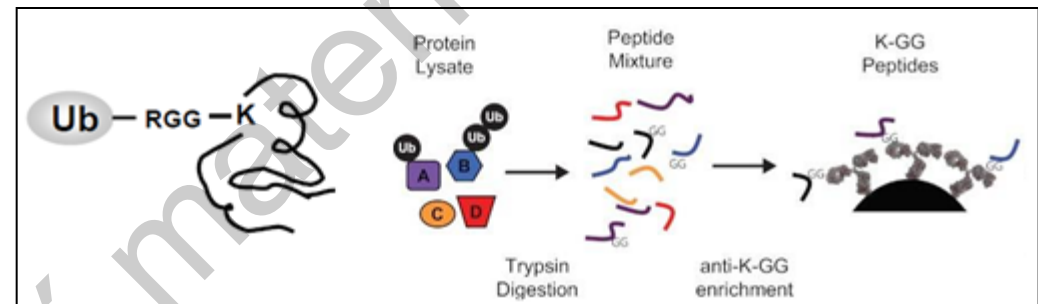
MS analýza proteinového vzorku

Obohacení peptidů



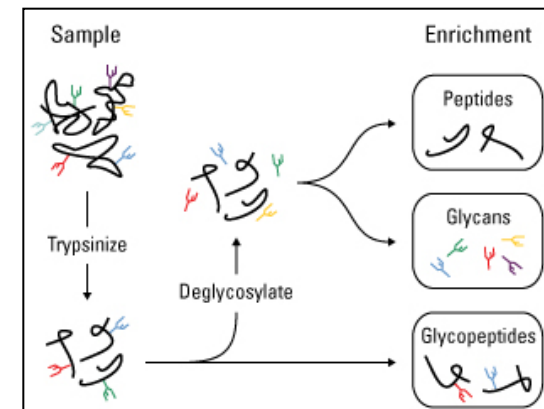
Obohacení specifických postranslačně modifikovaných peptidů

- Fosforylace
- Ubiquitylace
- Glykosylace
- Acetylace



Přístupy:

- Immunoprecipitace (IP)
(specifické protilátky proti PTM)
- Afinity chromatografie
(protilátka nebo ligand – specifita pro PTM)
- Enzymatická modifikace
(specifický enzym pro danou modifikaci)
- Chemická modifikace

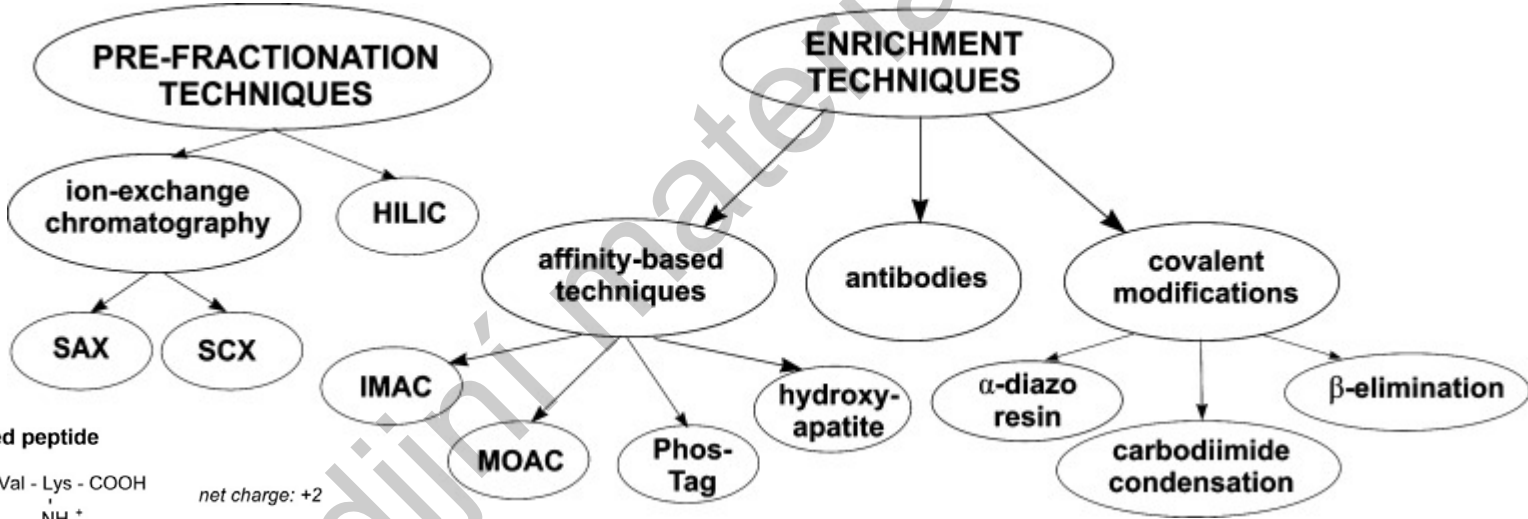


MS analýza proteinového vzorku

Obohacení peptidů

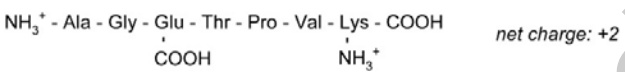


- Přístupy pro obohacení fosfopeptidů

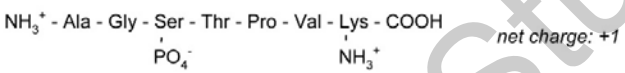


SCX

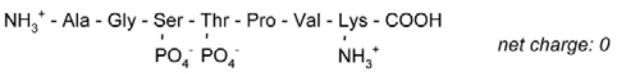
typical non-phosphorylated peptide



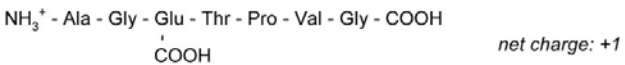
typical phosphorylated peptide



multiply-phosphorylated peptide



C-terminal non-phosphorylated peptide



DOTAZY?



Central European Institute of Technology
c/o Masaryk University
Žerotínovo nám. 9
601 77 Brno, Czech Republic

www.ceitec.eu | info@ceitec.cz



EUROPEAN UNION
EUROPEAN REGIONAL DEVELOPMENT FUND
INVESTING IN YOUR FUTURE



**OP Research and
Development for Innovation**

