



Central European Institute of Technology
BRNO | CZECH REPUBLIC

C7250 Charakterizace proteinů hmotnostní spektrometrií

Příprava vzorku pro MS analýzu

Gabriela Lochmanová

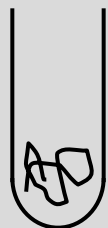


INVESTMENTS IN EDUCATION DEVELOPMENT

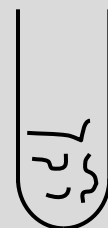
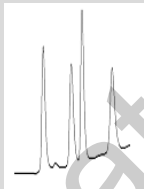
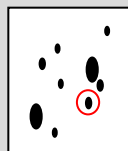


Proteomický experiment

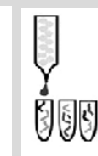
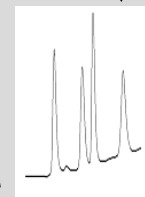
buňky, tkáň



Separace proteinů



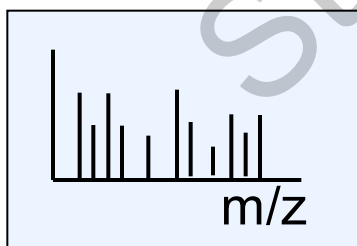
proteolytické
štěpení



Separace peptidů

izolovaný protein

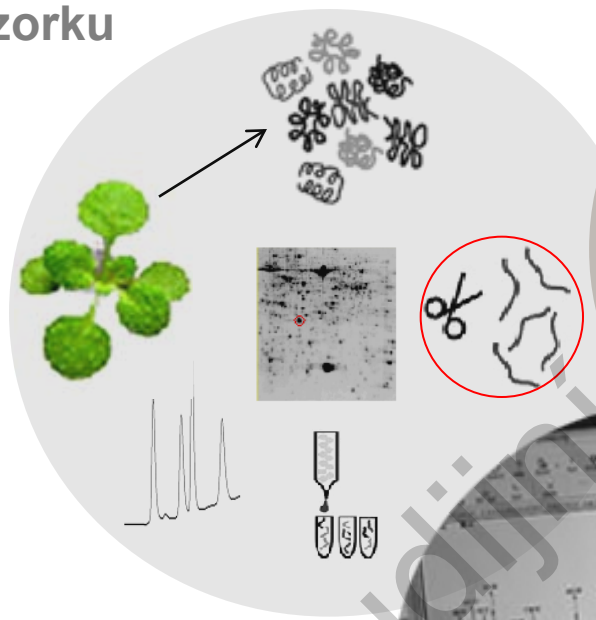
MS



Bottom-up

Faktory ovlivňující výsledek MS

Kvalita a reprodukovatelnost
přípravy vzorku



Instrumentace

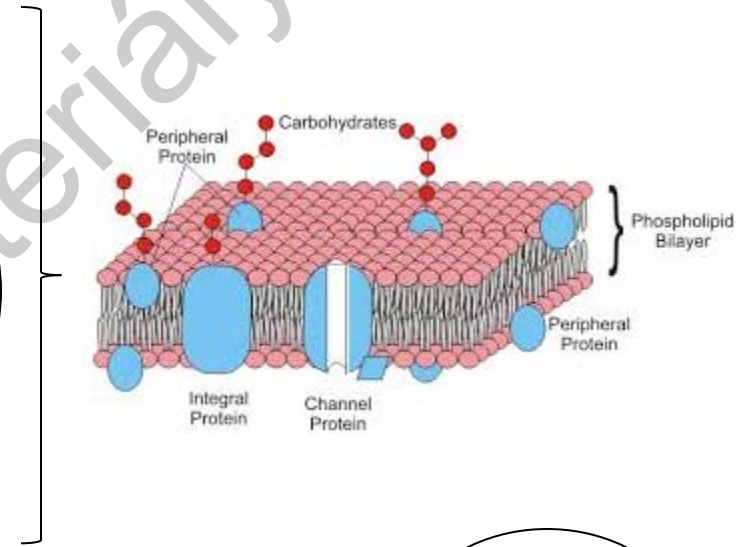


Vyhodnocení dat



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 reagentie (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:

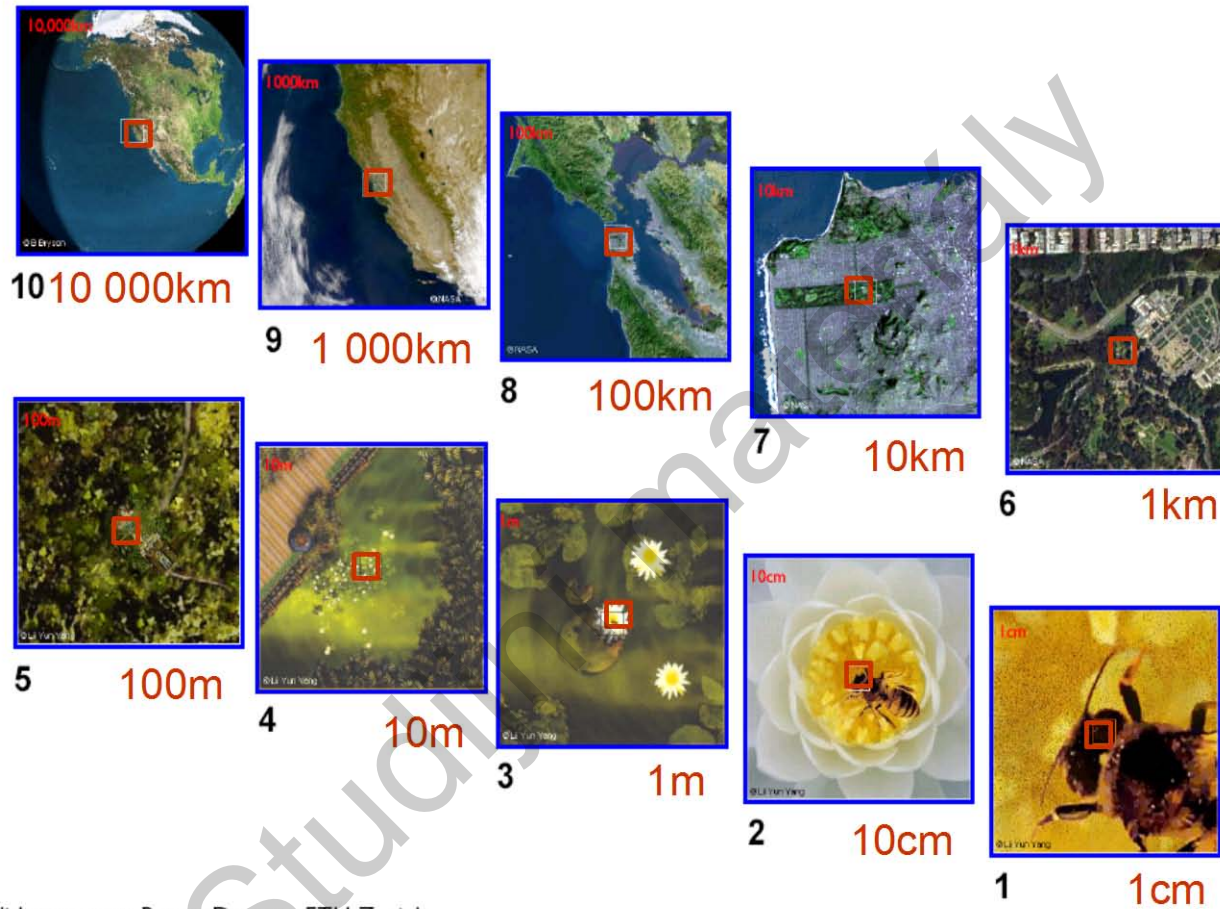
- Analýza proteinů v komplexní směsi
- Analýza cílového proteinu/cílové skupiny proteinů

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

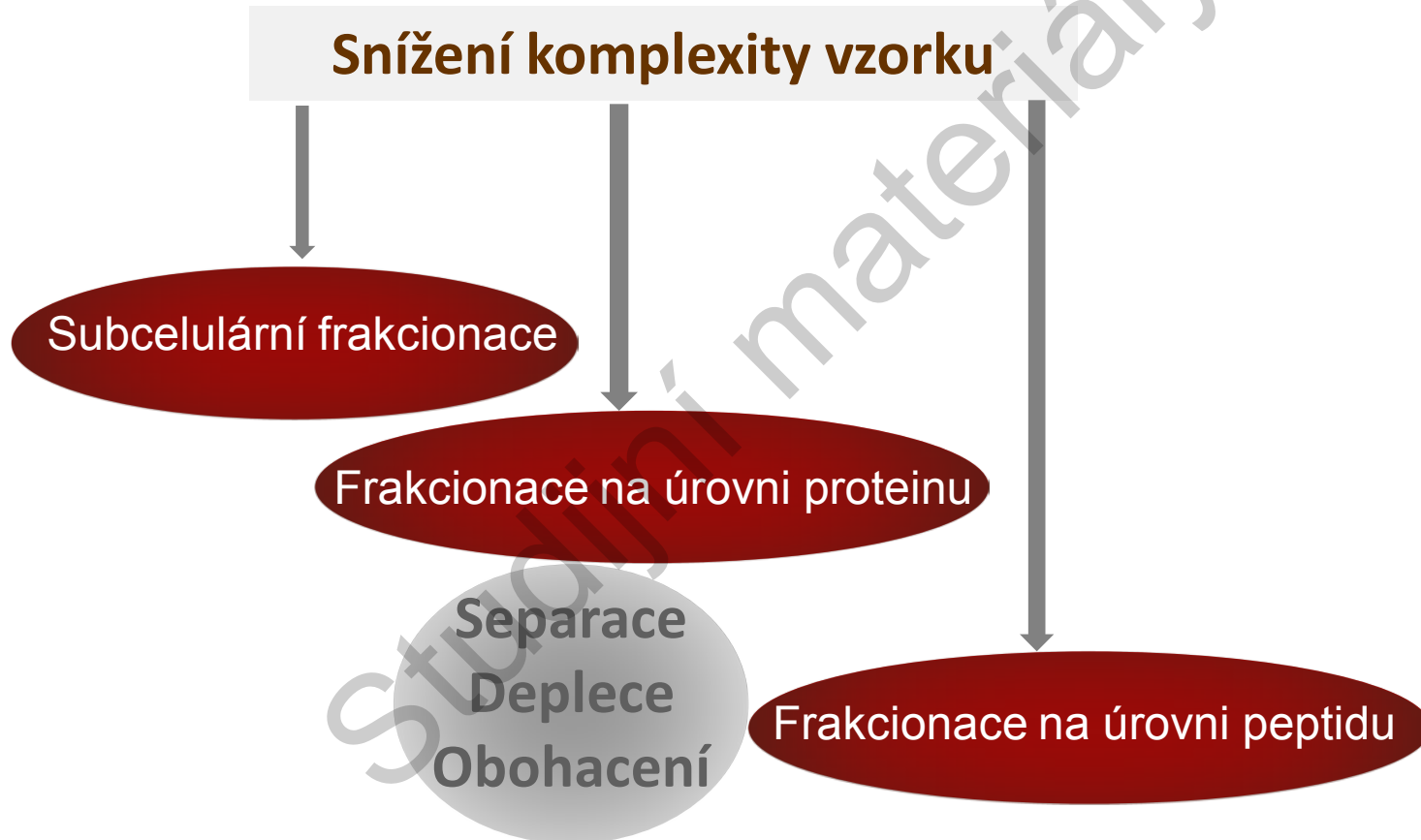
Požadavek: čistý vzorek s omezenou komplexitou

10^{10} Really Is Wide Dynamic Range



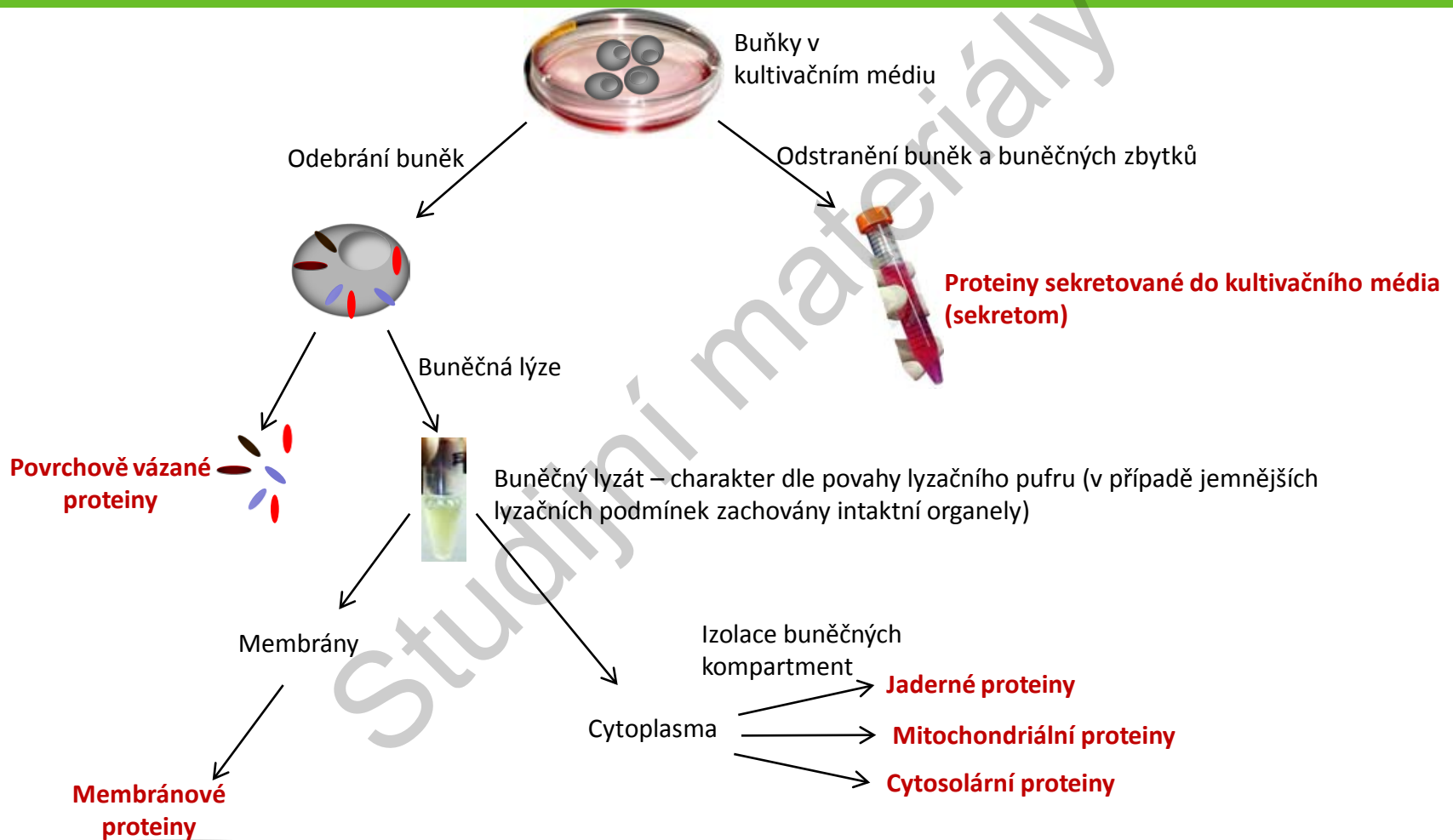
Slide courtesy Bruno Domon, ETH Zurich

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



MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Subcelulární frakcionace

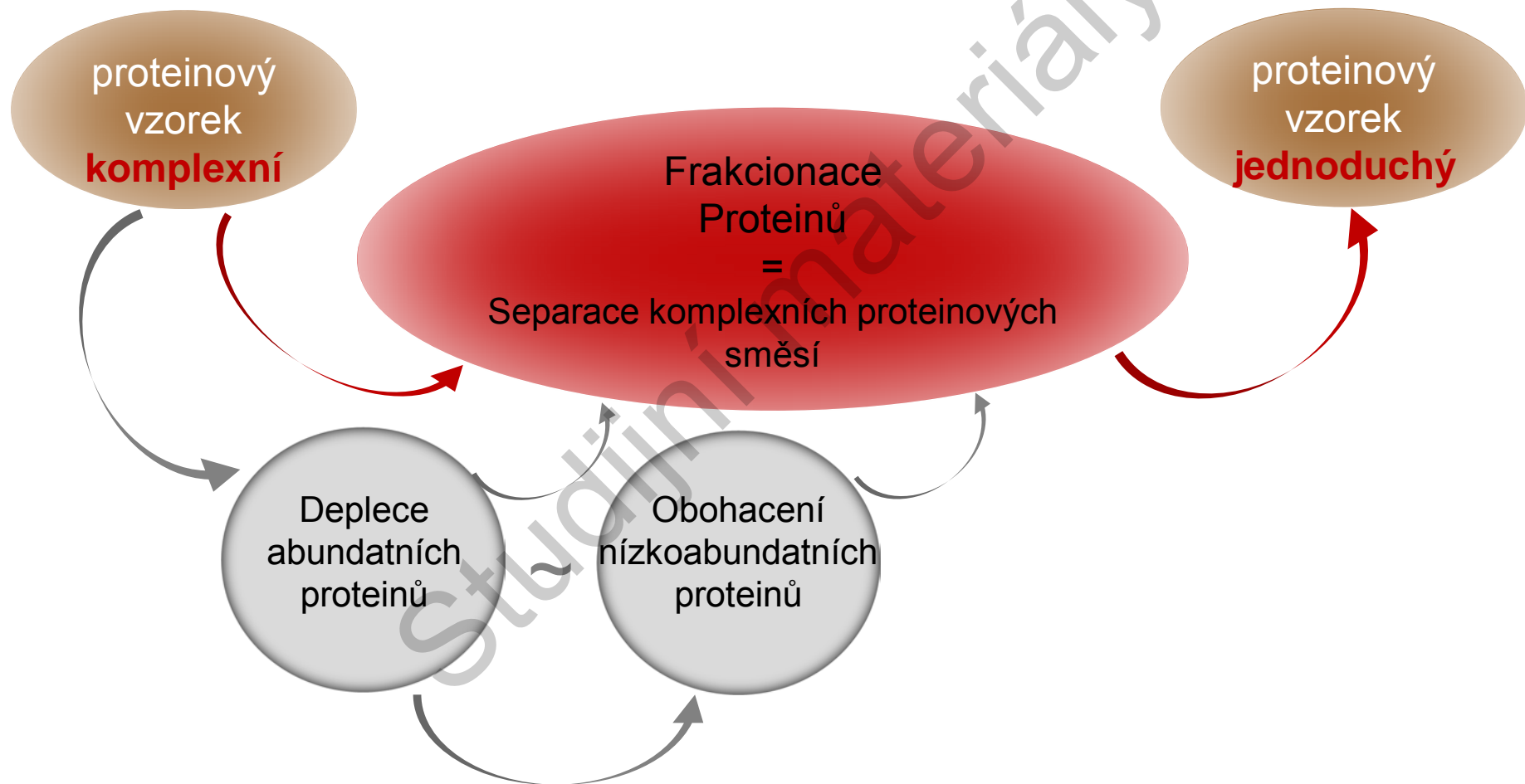


hydrofobicita, bazicita, velikost

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

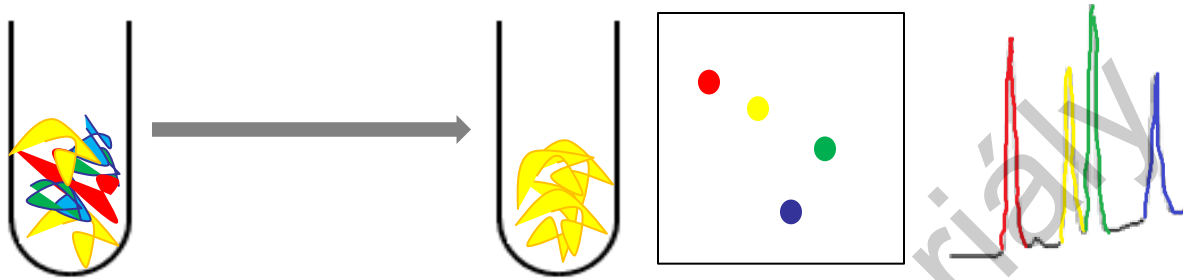
MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů



MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů



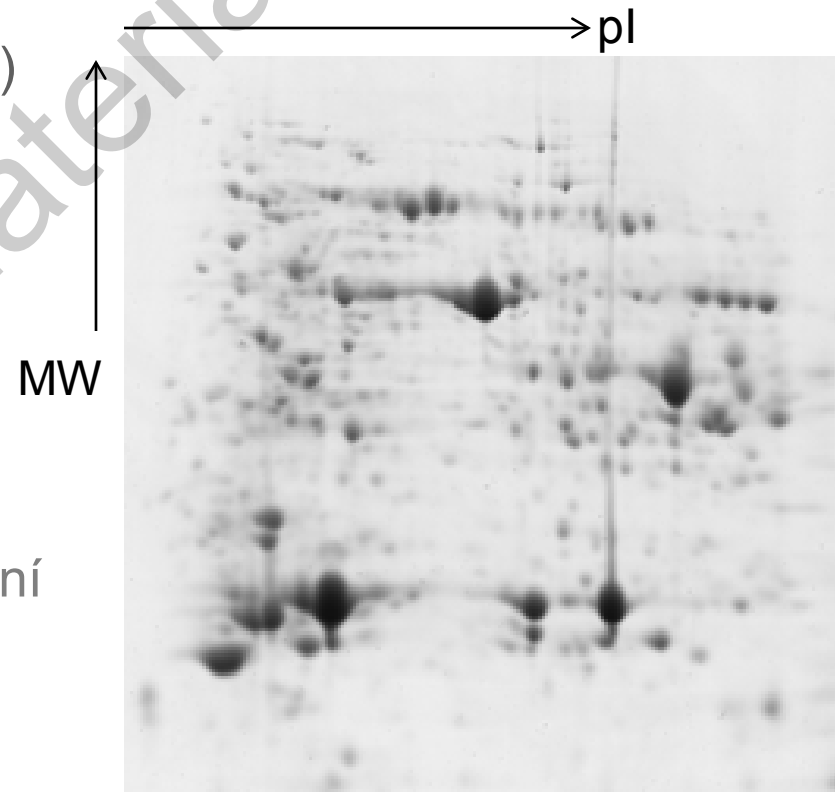
| | Frakcionační metoda | Fyzikálně-chemický parametr |
|-------------------------|---|-------------------------------------|
| Centrifugační metody | Ultracentrifugace | Hustota |
| Elektroforetické metody | Gelová elektroforéza | Velikost/náboj |
| | Izoelektrická fokusace | Izoelektrický bod |
| | 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:

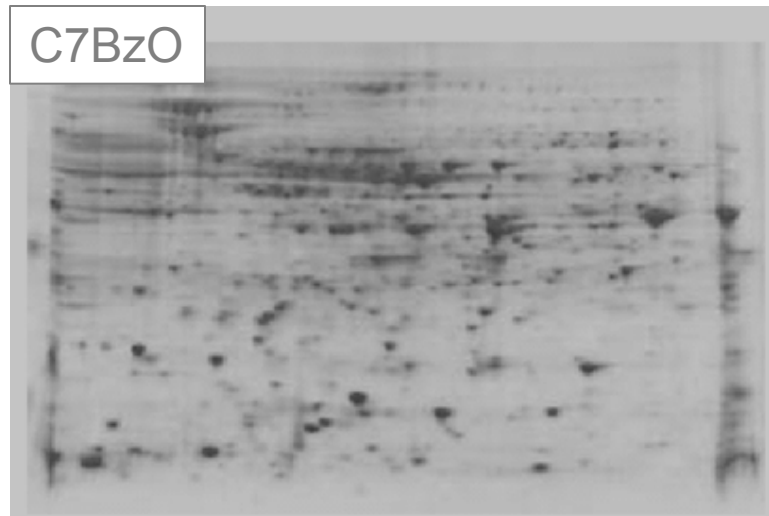
- Chaotropní činidla (močovina, thiomočovina)
- Neionogenní detergent (CHAPS, C7BzO)
- Redukční činidla (DTT, TBP)
- Inhibitory proteáz a enzymů odstraňujících modifikace (např. fosfatáz, deacetyláz, ...)
- Amfolyty

Komponenty kompatibilní s IEF - nesmí zvyšovat iontovou sílu

CHAPS



C7BzO

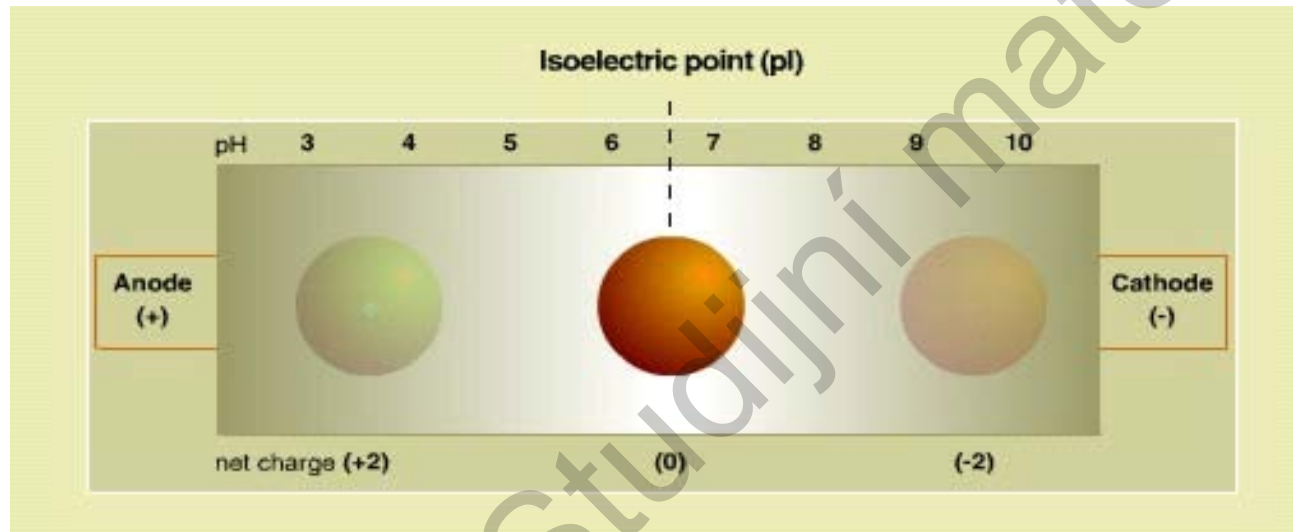


celkem

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



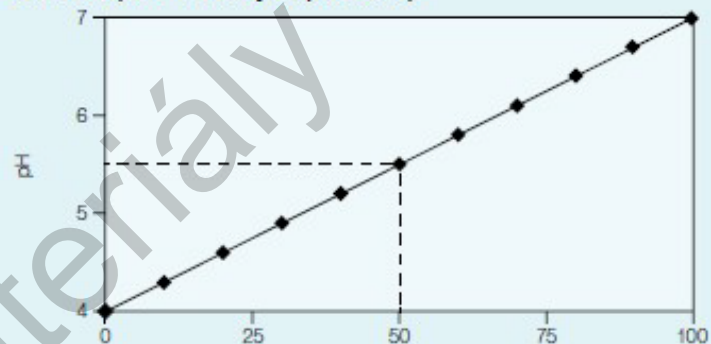
MS analýza proteinového vzorku

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

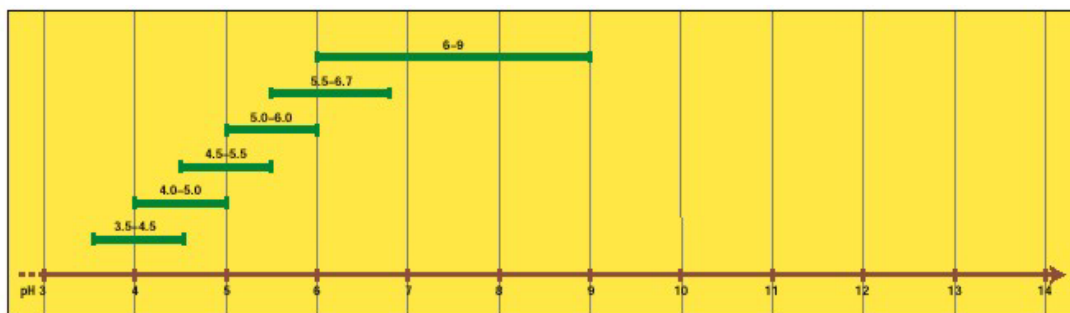
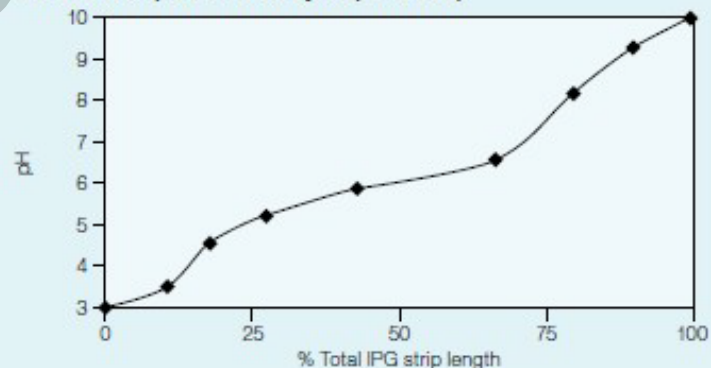
ROZSAH STRIPU
ROZMĚR STRIPU



A. Linear pH 4-7 ReadyStrip IPG strip



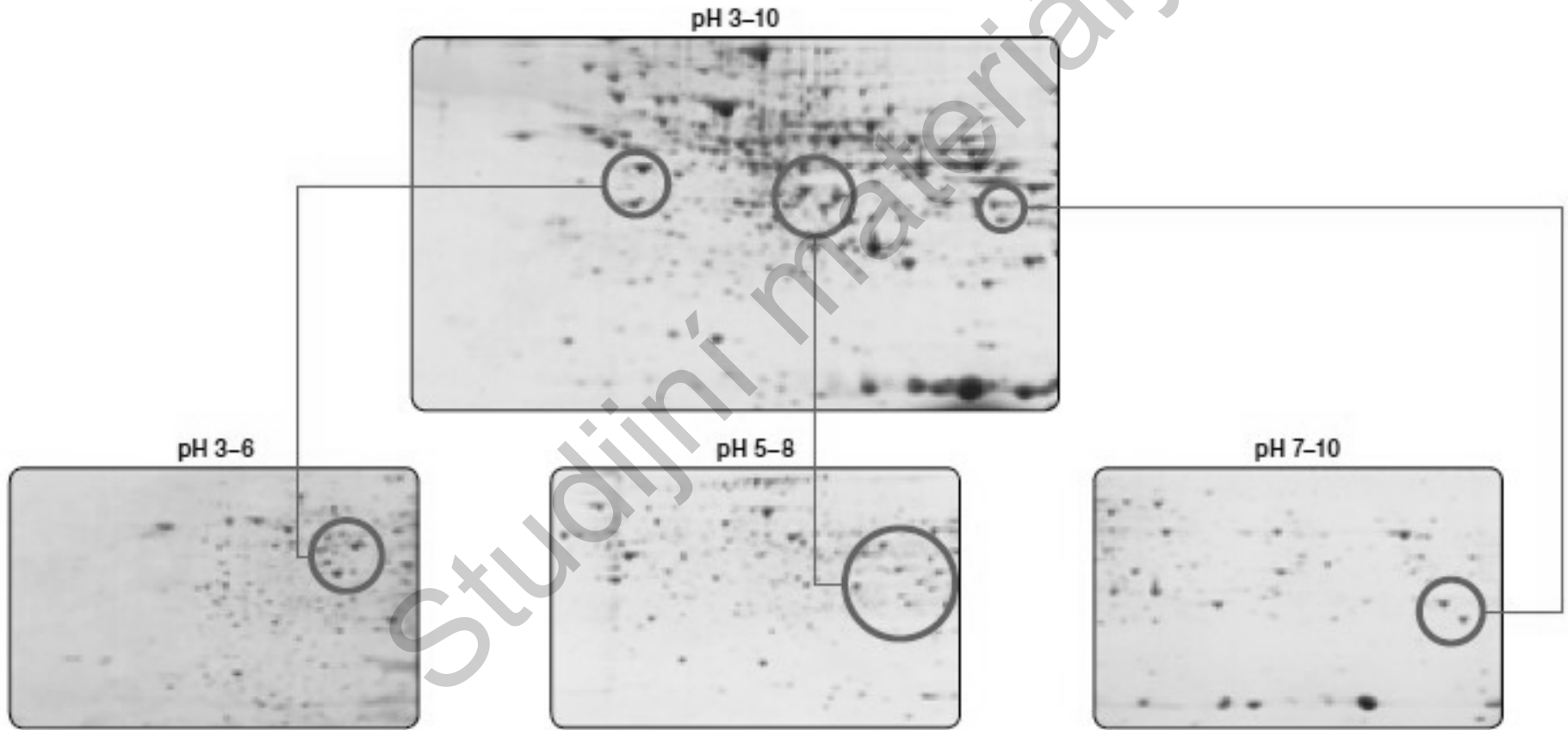
B. Nonlinear pH 3-10 ReadyStrip IPG strip



MS analýza proteinového vzorku

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

ROZSAH STRIPU



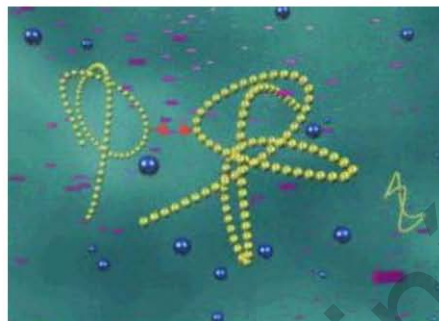
MS analýza proteinového vzorku

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

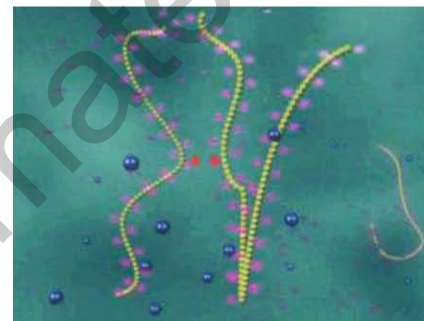
EKVILIBRACE STRIPU



Protein with disulfide bridges



denaturace **SDS** ●

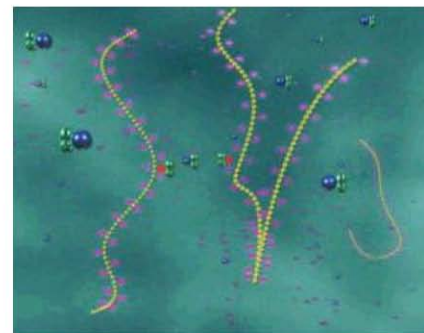


Reduction cleaves disulfide bridges
and allows unfolding



redukce

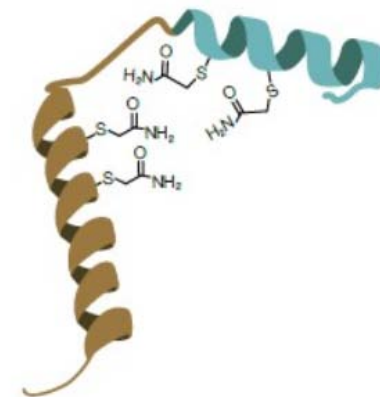
DTT ●



alkylace

IAA ●

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

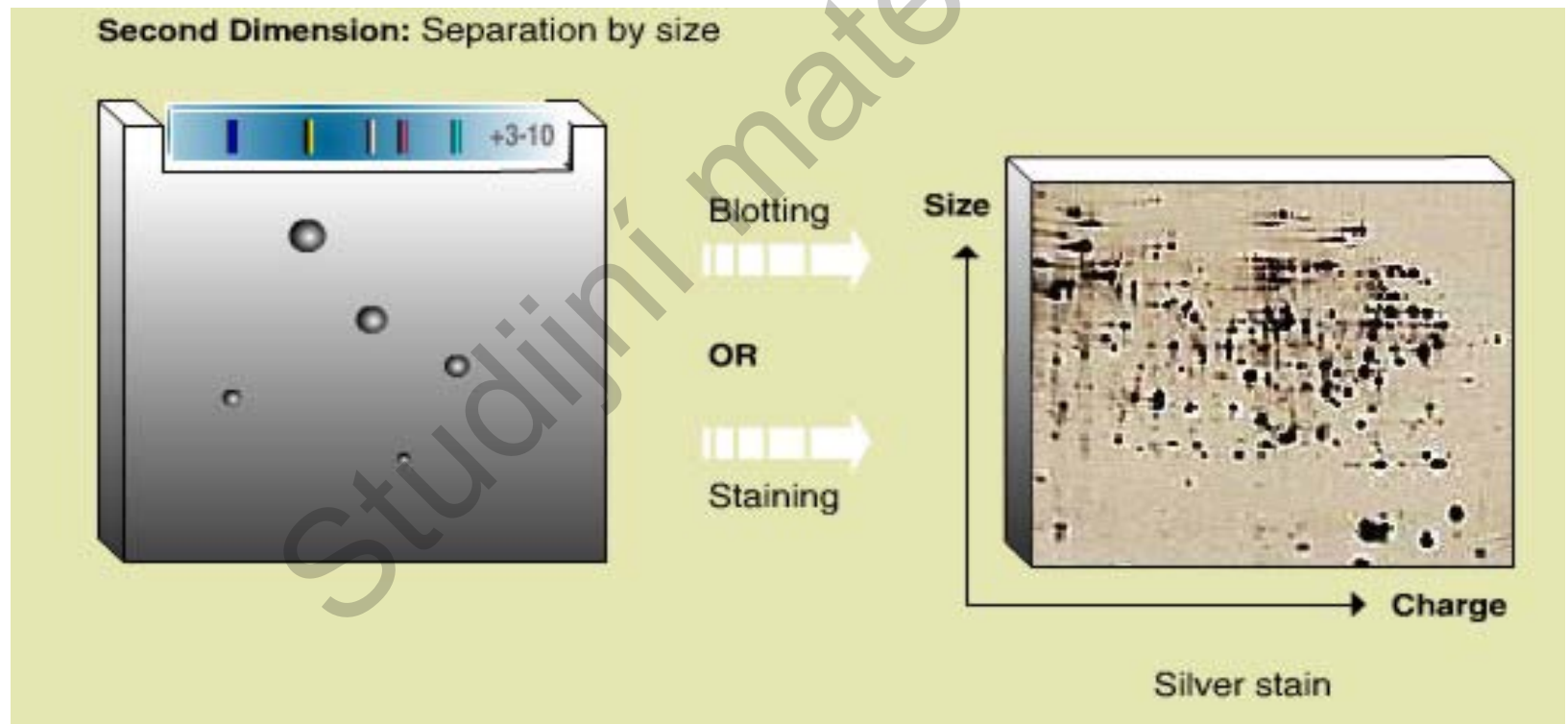


Alkylation with iodoacetamide prevents
disulfide bridges from reforming

MS analýza proteinového vzorku

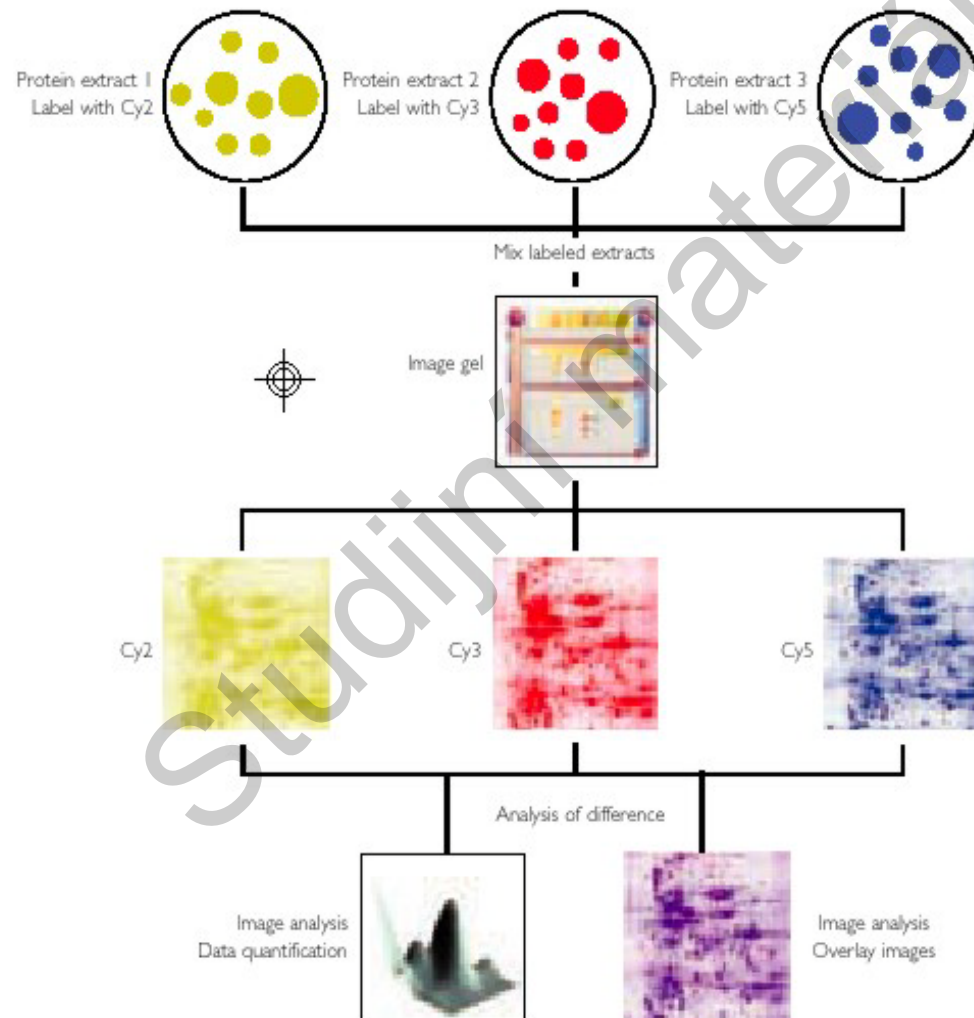
Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů 2D SDS-PAGE - 2. rozměr

- 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)

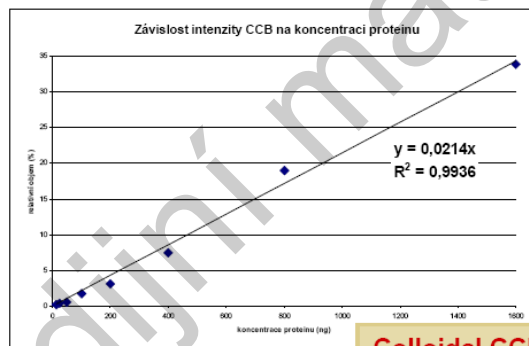
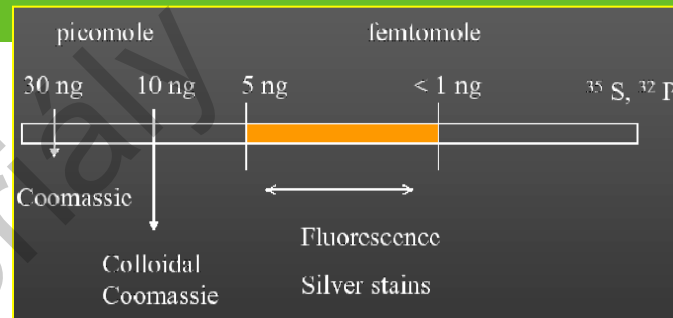
- end-point

- trvanlivost

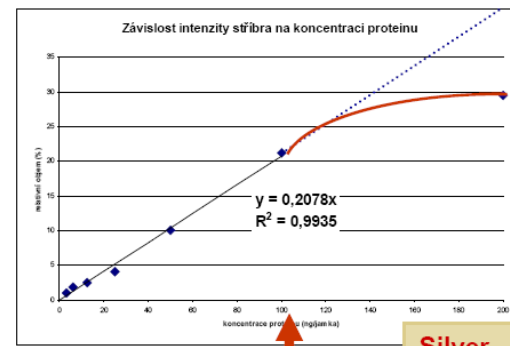
(např. zhášení fluorescenčních barviček!)

- kompatibilita s následnými analýzami

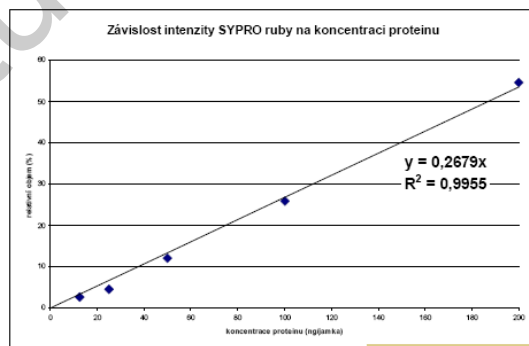
(např. stříbro - glutaraldehyd!)



Colloidal CCB



Silver



SYPRO Rubý

Barvení stříbrem

– lineární závislost pouze v rozmezí do 100 ng proteinu.

Při vyšších množstvích odklon od linearity.

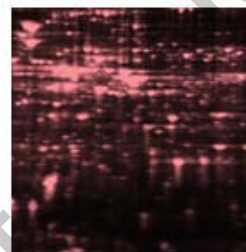
MS analýza proteinového vzorku

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

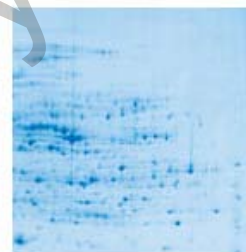
Typy detekce:

Značení před analýzou (DIGE – CyDye, radioaktivní značení)

Barvení po analýze



Sypro Ruby



Coomassie



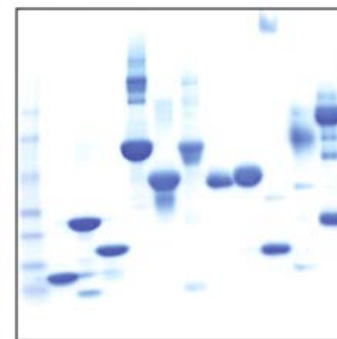
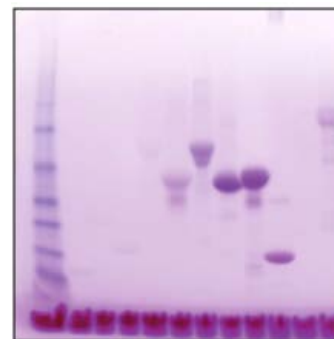
silver

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

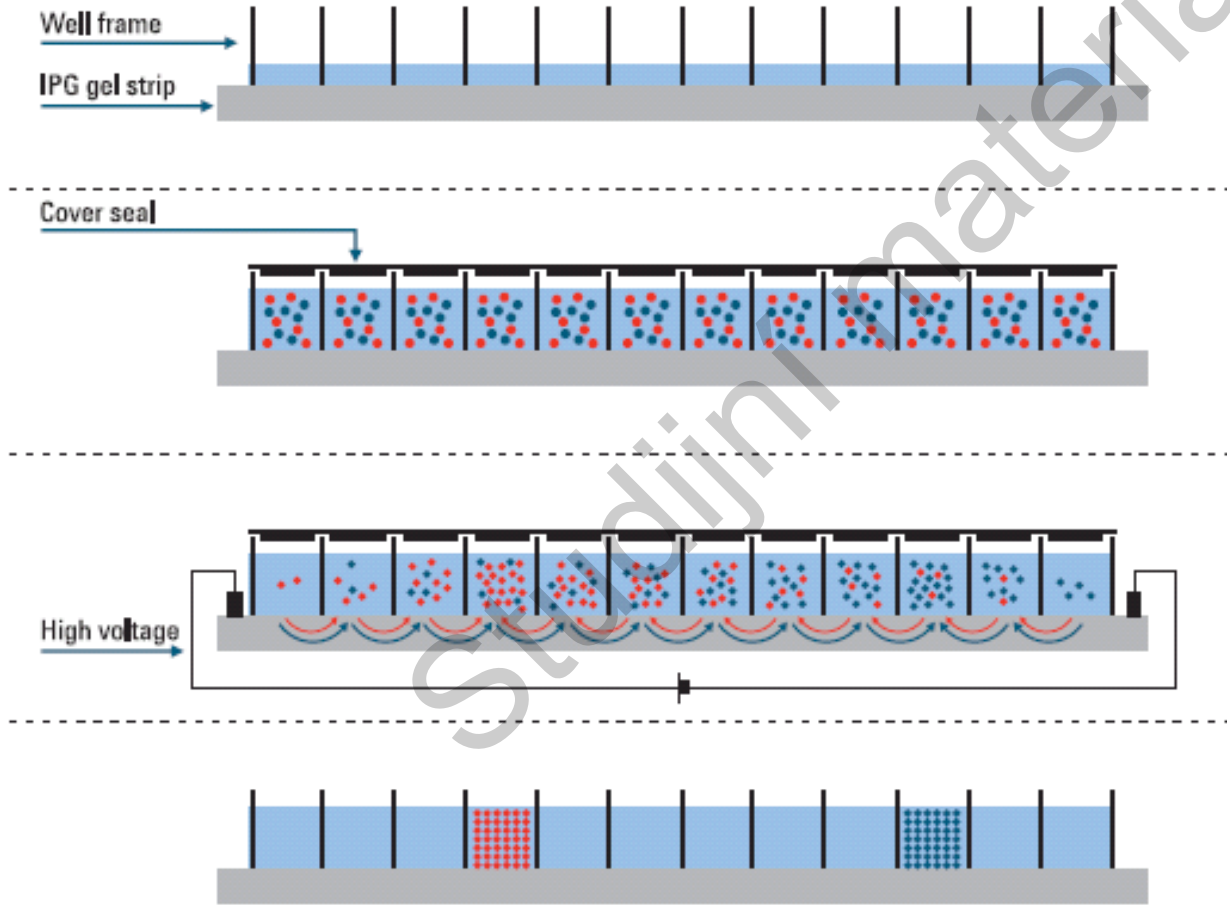
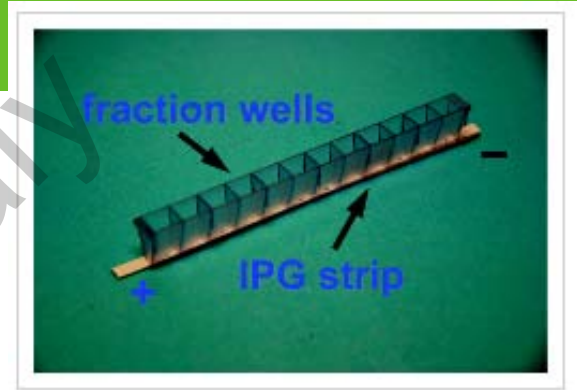
- prefrakcionace na IPG stripu

MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů

IEF Frakcionace

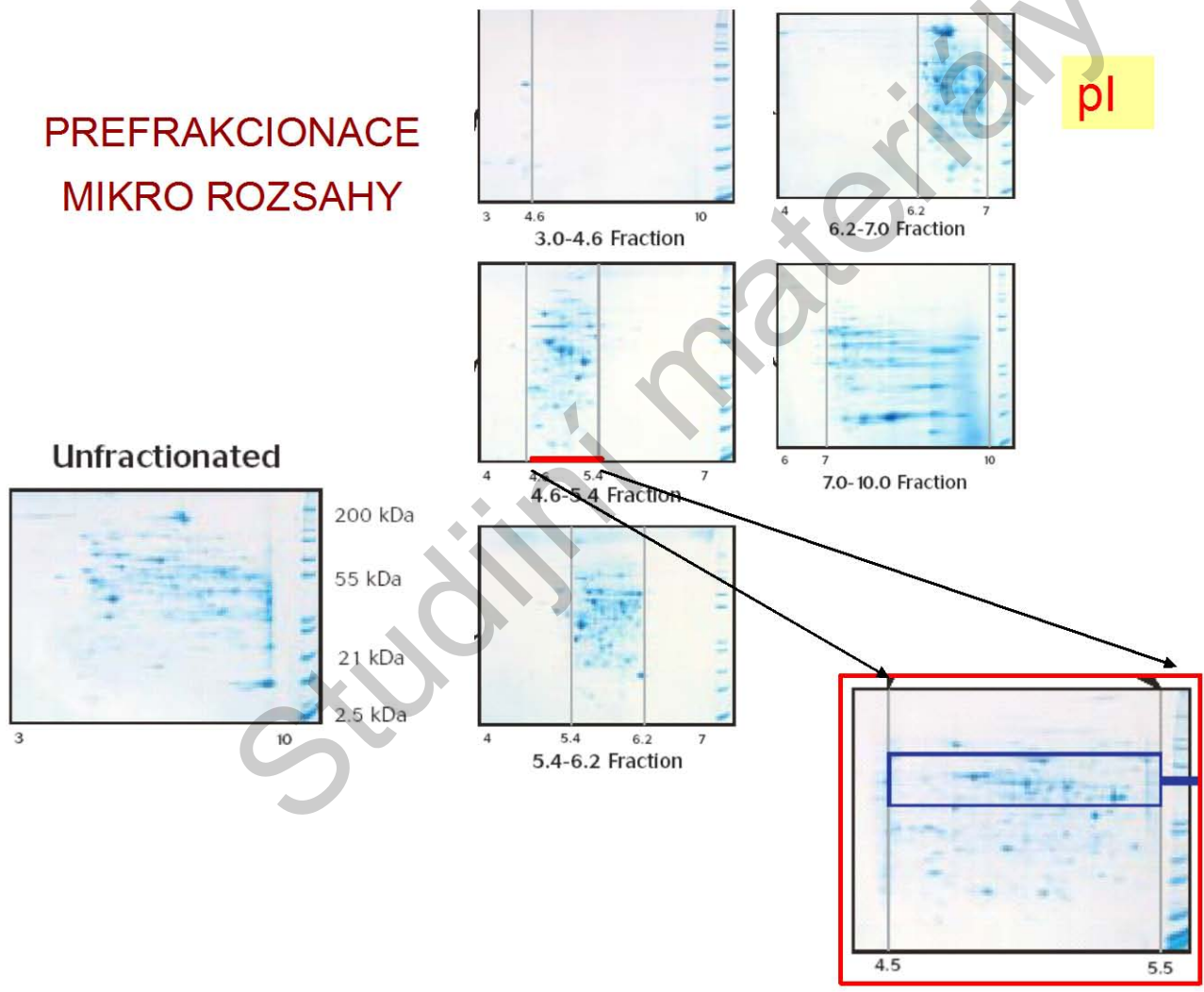
OFFGEL IEF prefrakcionace proteinů nebo peptidů



MS analýza proteinového vzorku

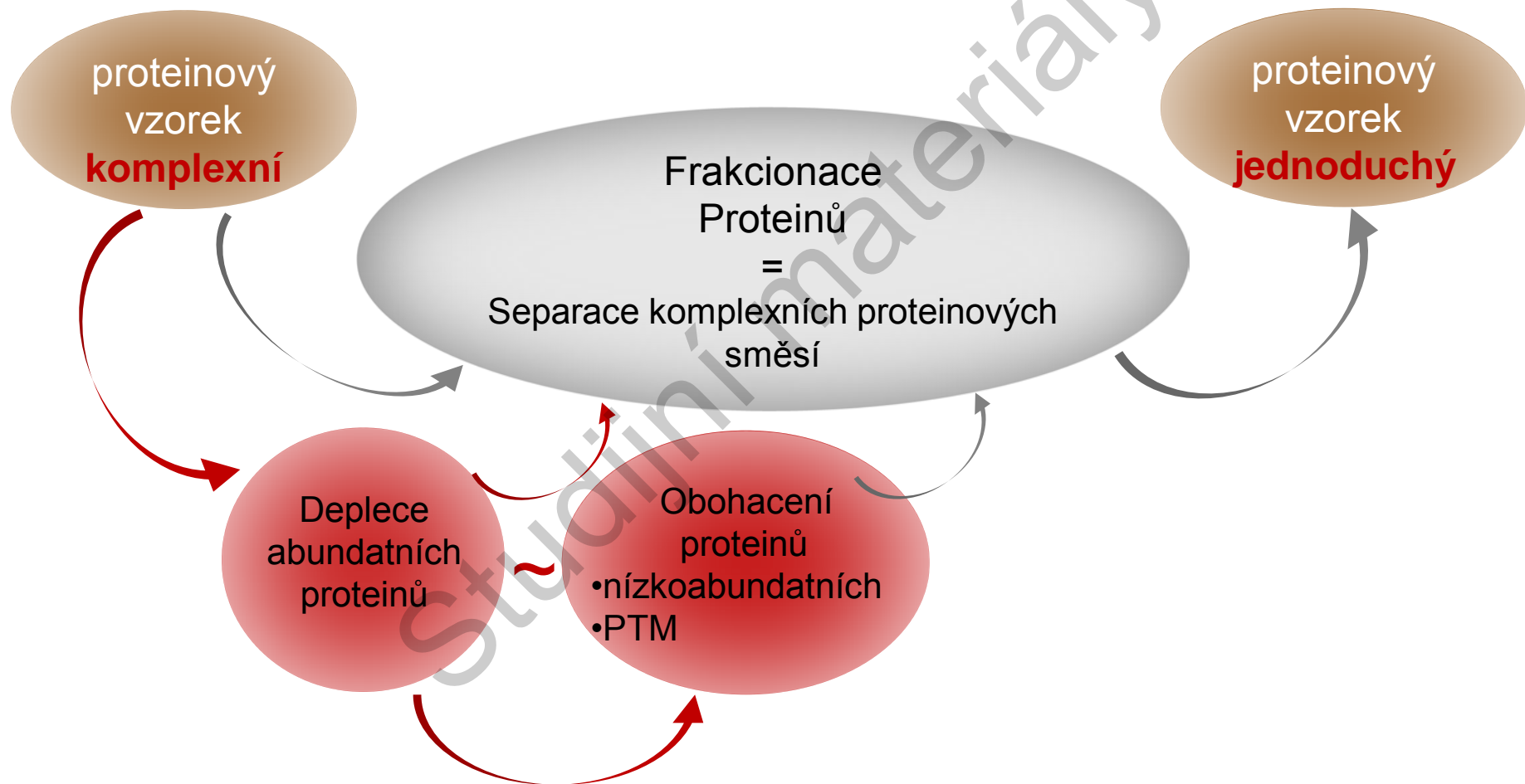
Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů

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

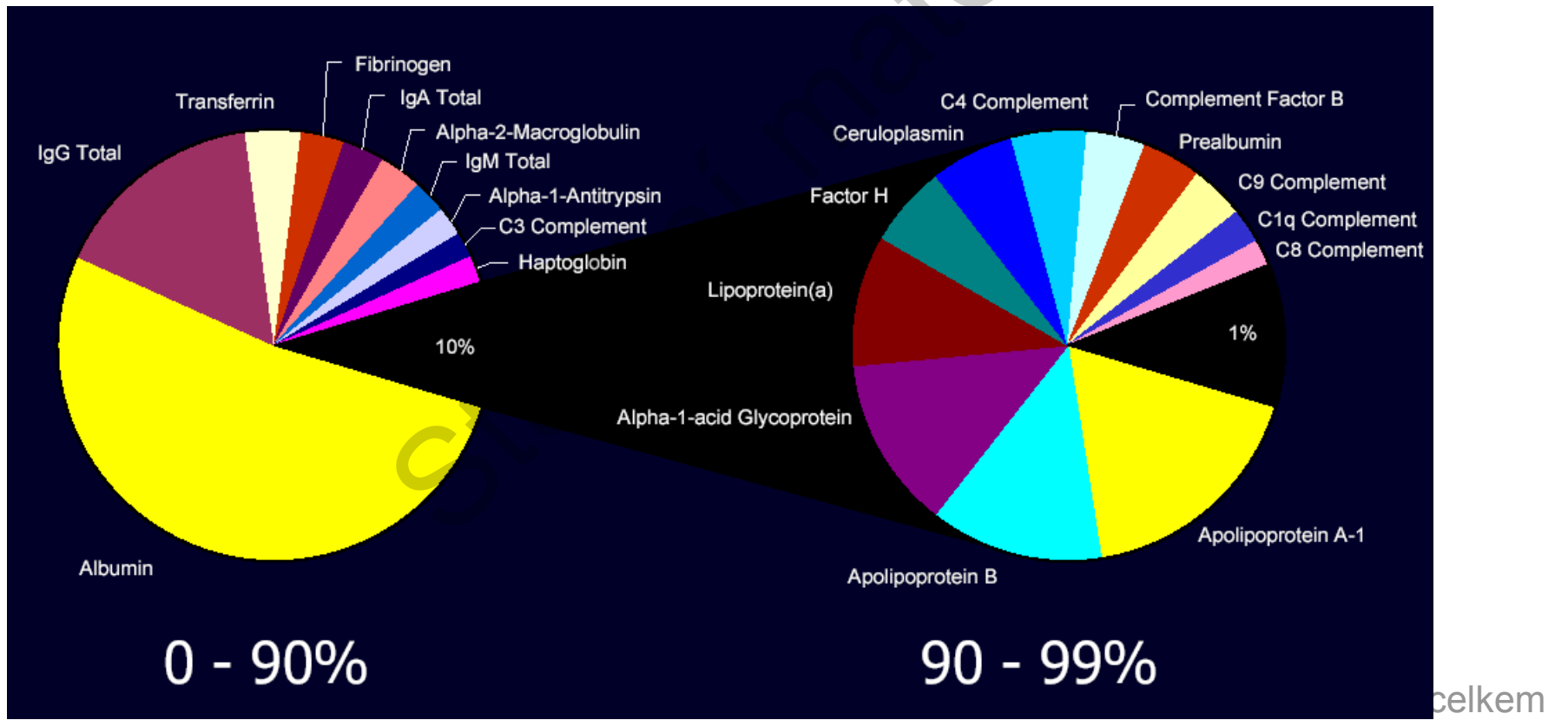
Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů

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

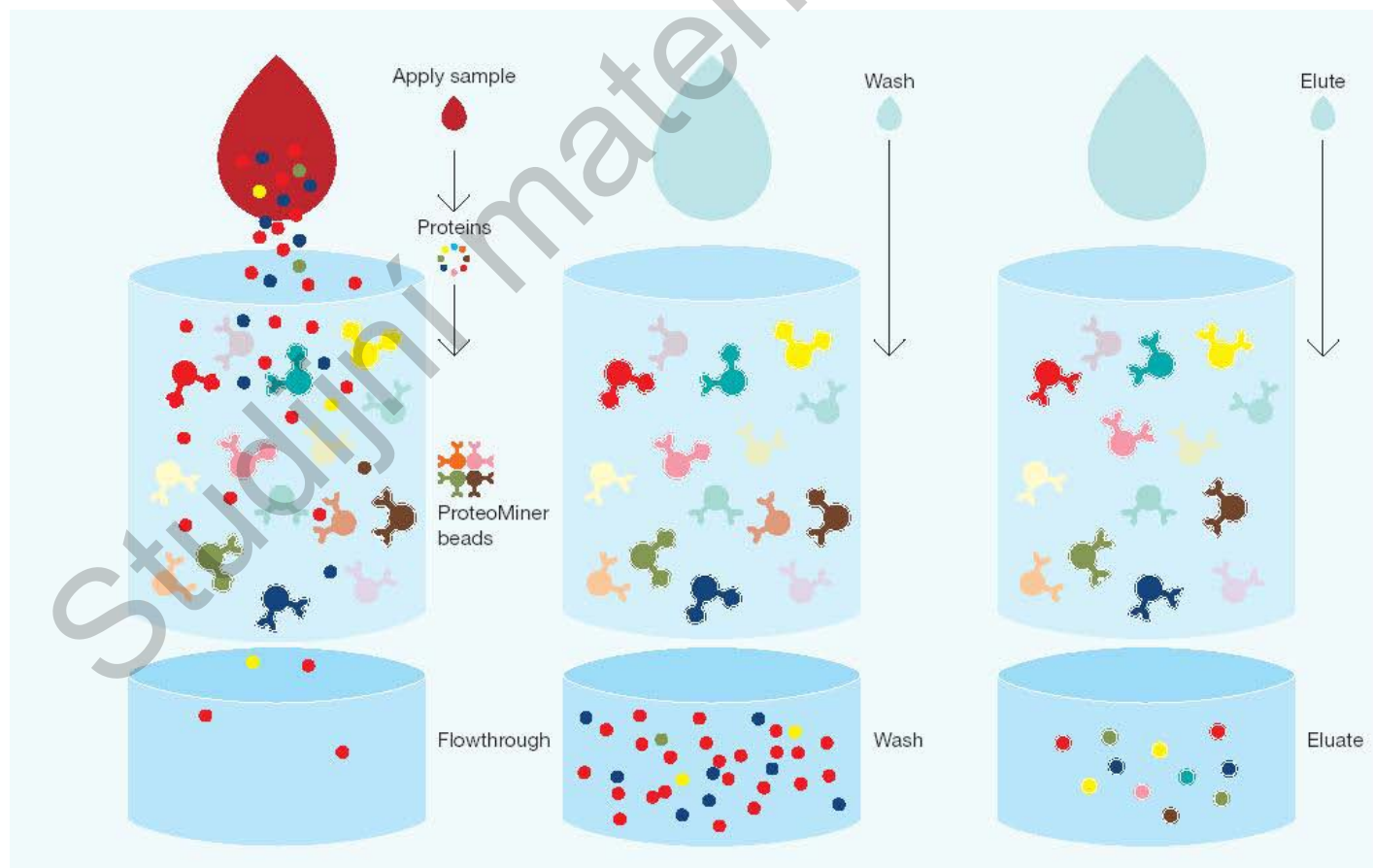
: Metoda vhodná pro rozmanité typy vzorků, nezávislá na dostupnosti protilátek (na rozdíl od imunodeplece)

MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů

Obohacení nízkoabundantních proteinů

ProteoMiner™ protein enrichment kit: CPPL Combinatorial Peptide Ligand Library



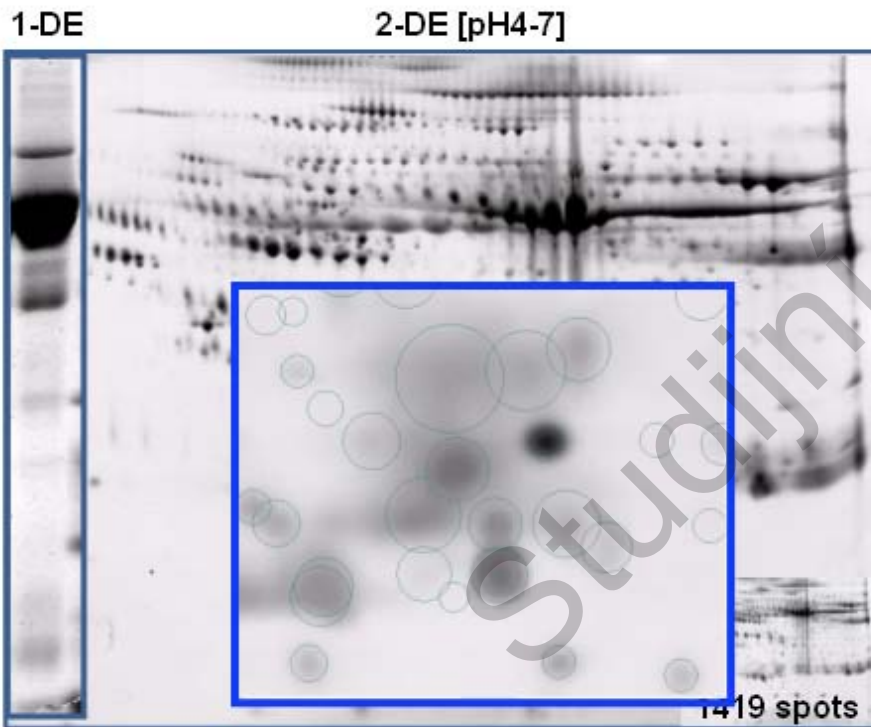
MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů

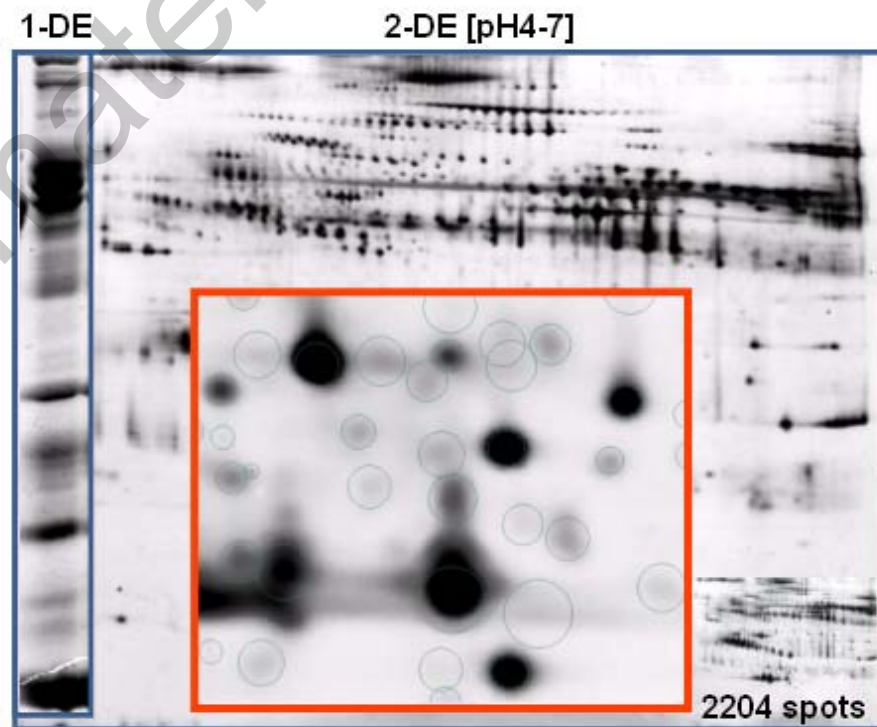
Obohacení nízkoabundantních proteinů

ProteoMiner™ protein enrichment kit

Native Human Serum

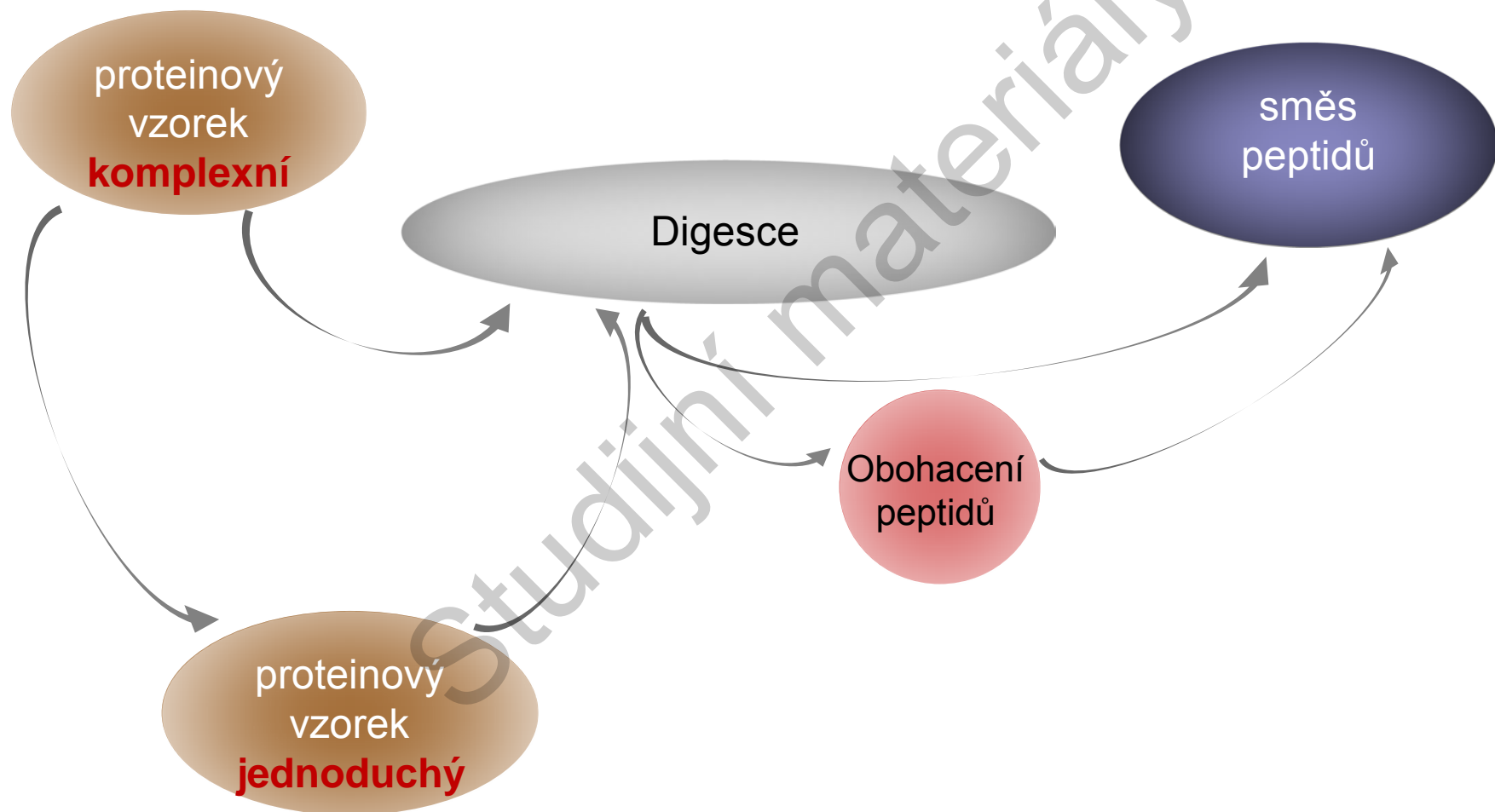


Human Serum Fractionated by ProteoMiner



MS analýza proteinového vzorku

Digestce proteinů



Digestce proteinů

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

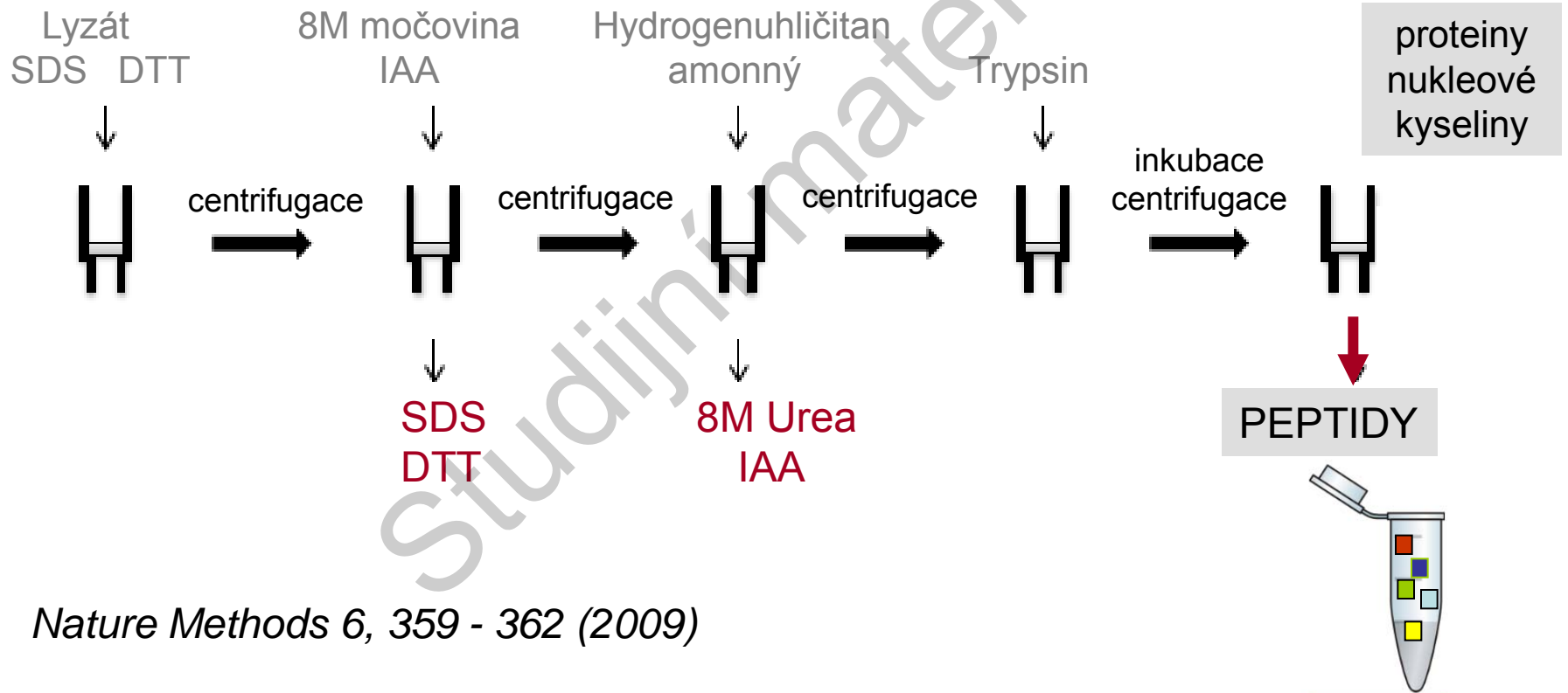


MS analýza proteinového vzorku

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:

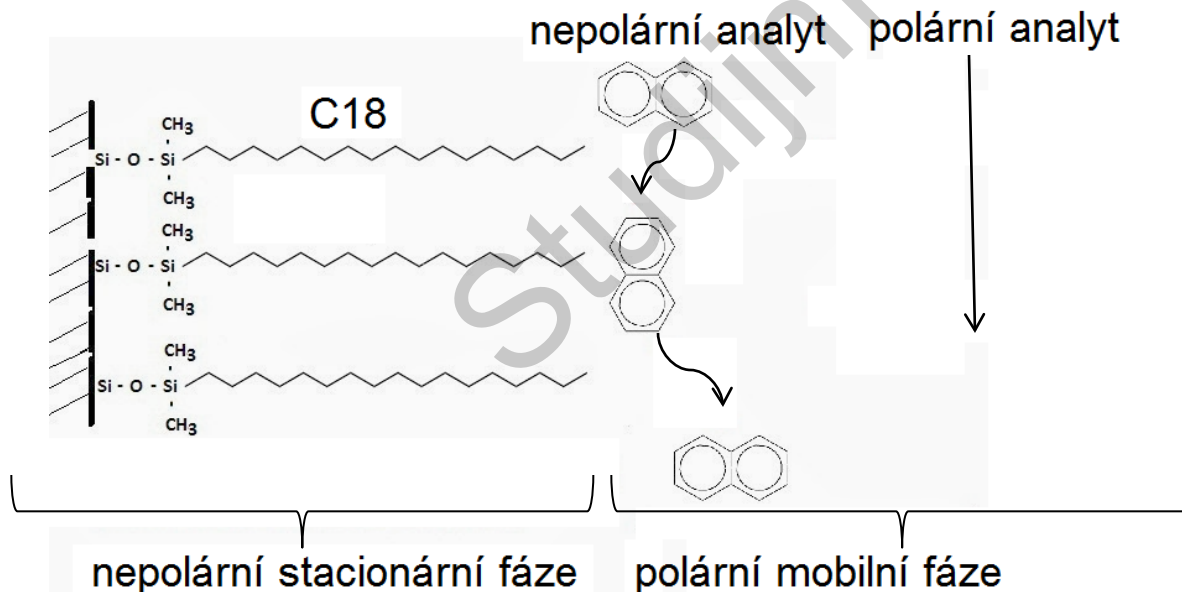
- Charakter kolony
- Složení mobilní fáze
- Fyzikálně-chemická povaha peptidů
(náboj, polarita, hydrofobicita, velikost)

MS analýza proteinového vzorku

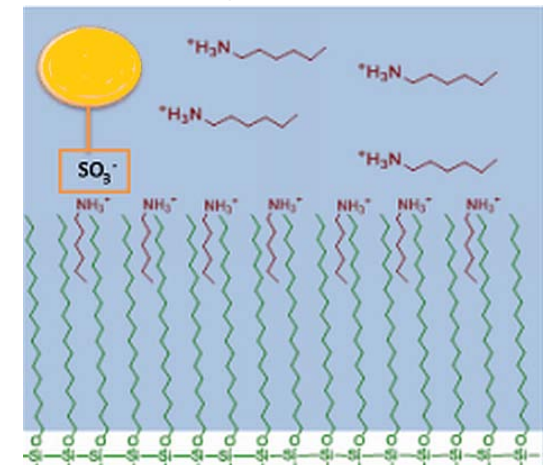
Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni peptidů Frakcionace peptidů v roztoku pomocí LC

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

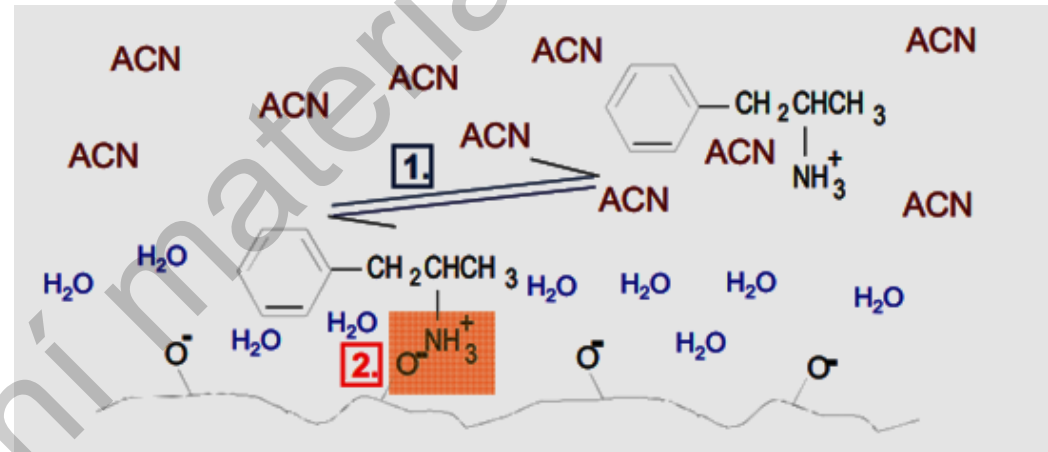
Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni peptidů Frakcionace peptidů v roztoku pomocí LC

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, $-(\text{CH}_2)_n\text{-N(Me)}_2^{(+)}\text{-(CH}_2)_n\text{-SO}_3^{(-)}$



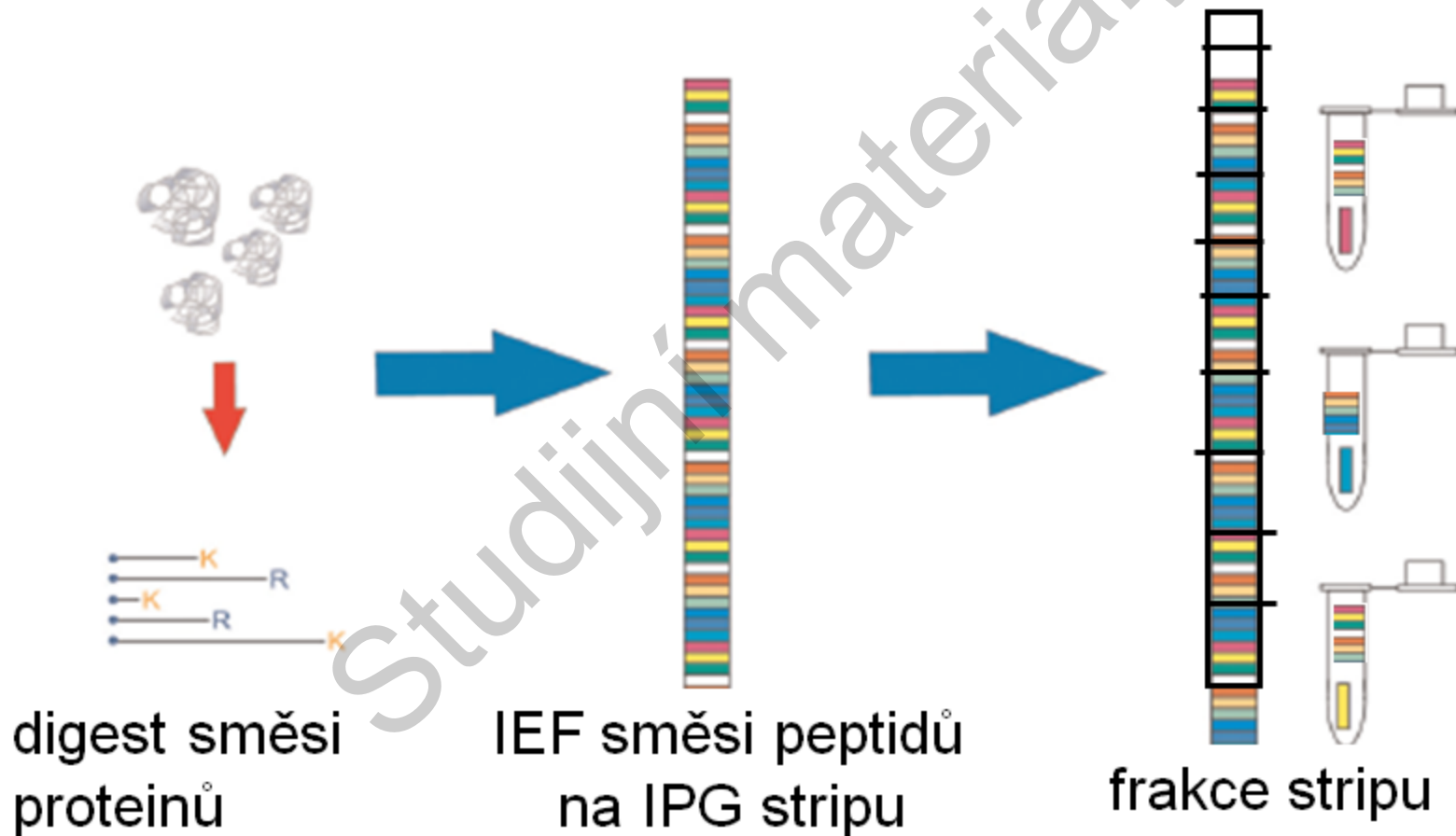
1. Distribuce mezi vodnou a organickou vrstvou
2. Iontoměničová interakce se skupinami stacionární fáze

- Vhodná pro separaci posttranslačně-modifikovaných peptidů

MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni peptidů

Frakcionace peptidů na IPG stripu



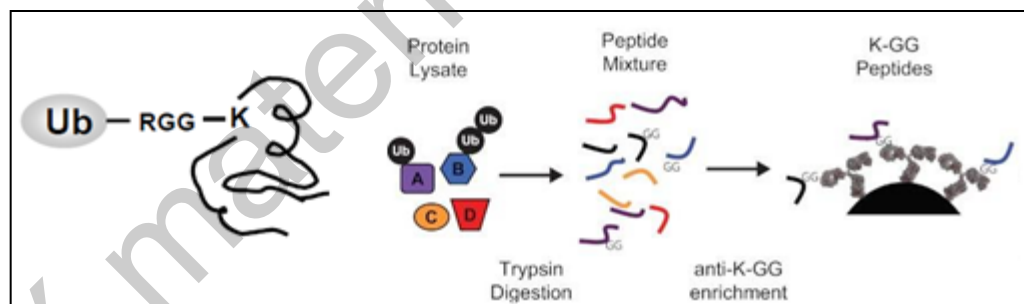
MS analýza proteinového vzorku

Obohacení peptidů



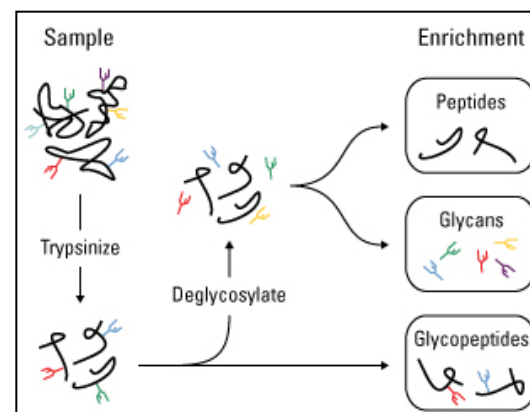
Obohacení specifických postranslačně modifikovaných peptidů

- Fosforylace
- Ubiquitylace
- Glykosylace
- Acetylace



Přístupy:

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

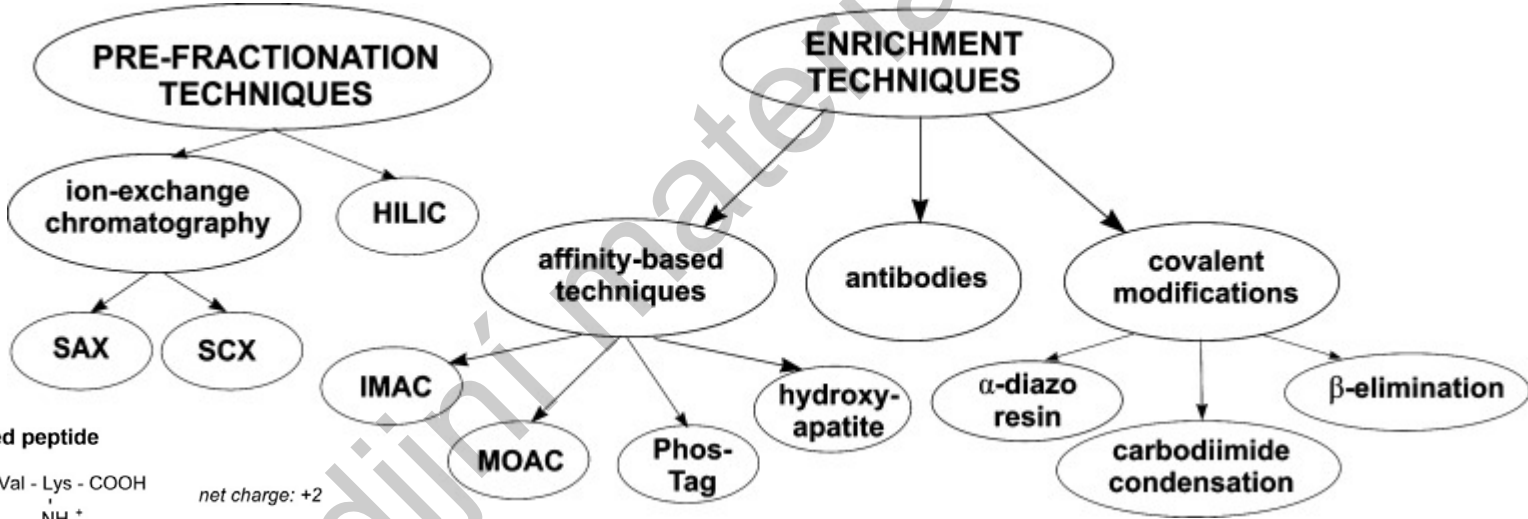


MS analýza proteinového vzorku

Obohacení peptidů

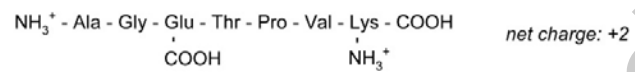


- Přístupy pro obohacení fosfopeptidů

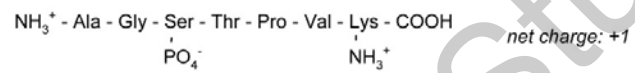


SCX

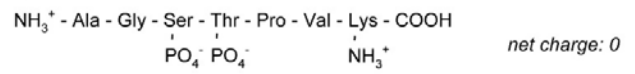
typical non-phosphorylated peptide



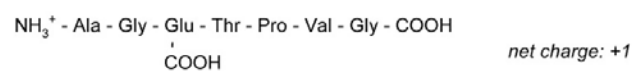
typical phosphorylated peptide



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**

