CEITEC

Central European Institute of Technology

BRNO | CZECH REPUBLIC

Studijní materiály

C7250 Charakterizace proteinů hmotnostní spektrometrií

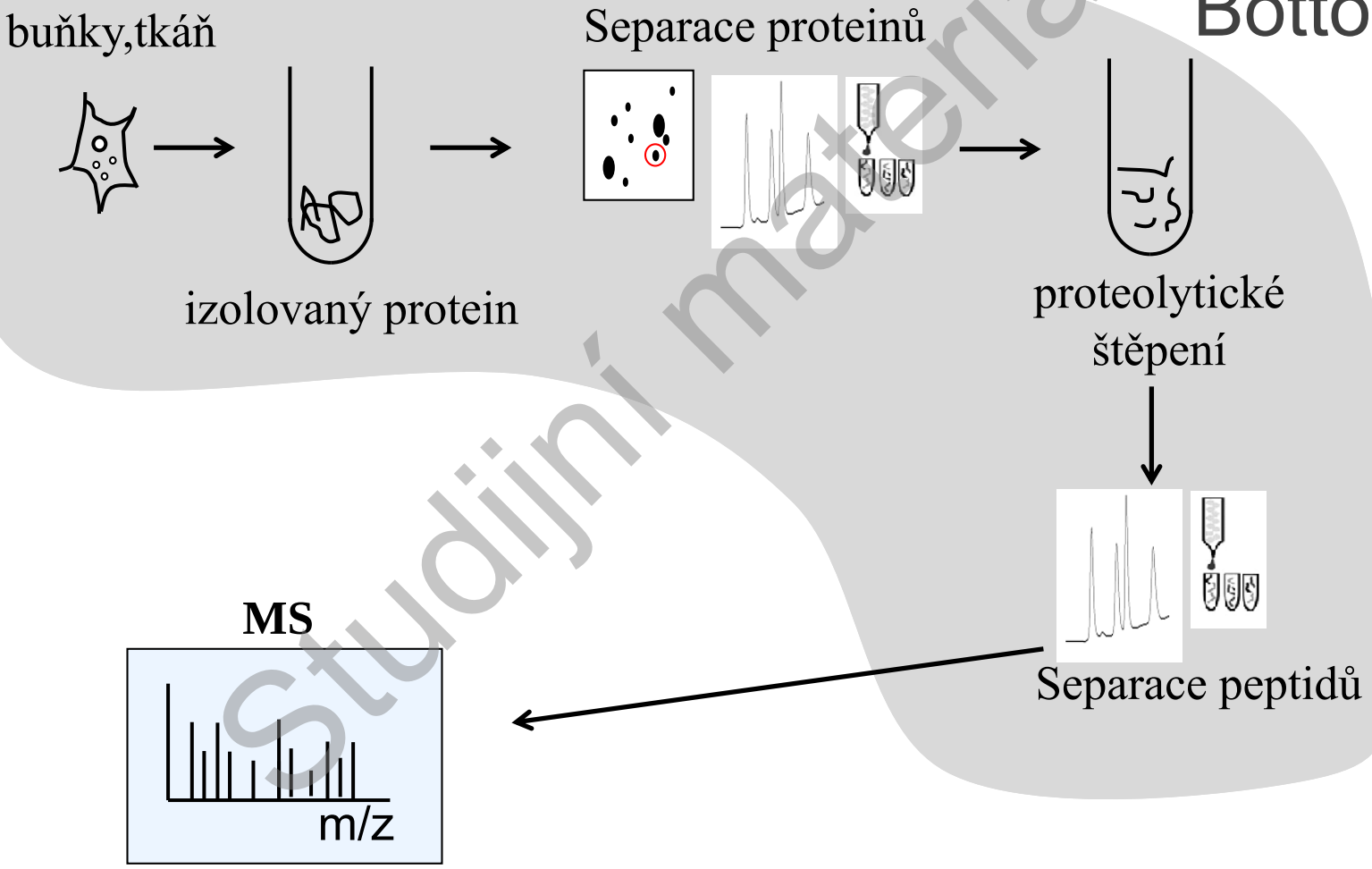
Příprava vzorků pro MS analýzu

Gabriela Lochmanová a Hana Konečná

esf european social fund in the czech republic
EUROPEAN UNION
MINISTRY OF EDUCATION, YOUTH AND SPORTS
OP Education for Competitivness
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTMENTS IN EDUCATION DEVELOPMENT

Proteomický experiment

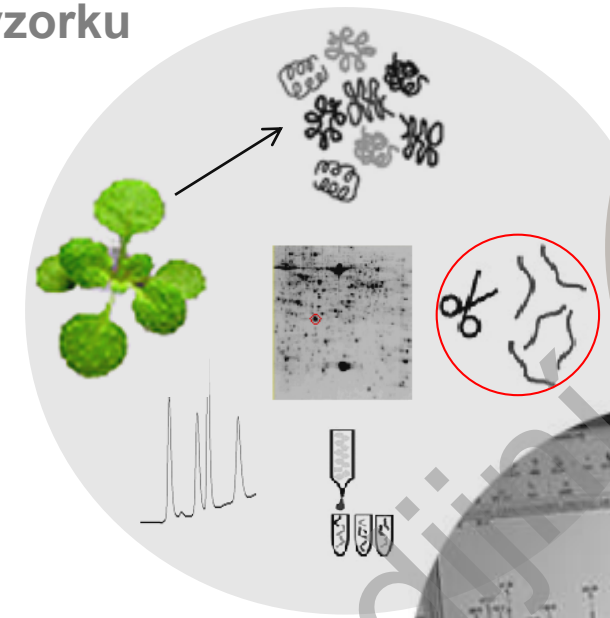
Bottom-up



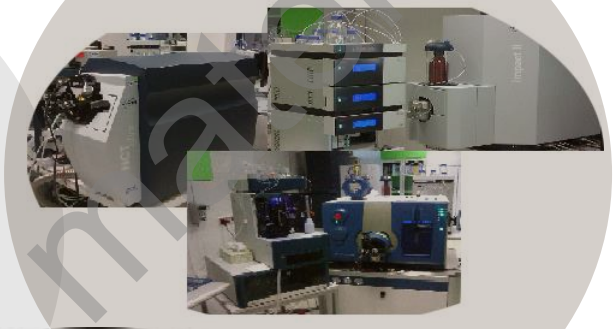
Studijní materiály

Faktory ovlivňující výsledek MS

Kvalita a reprodukovatelnost přípravy vzorku



Instrumentace

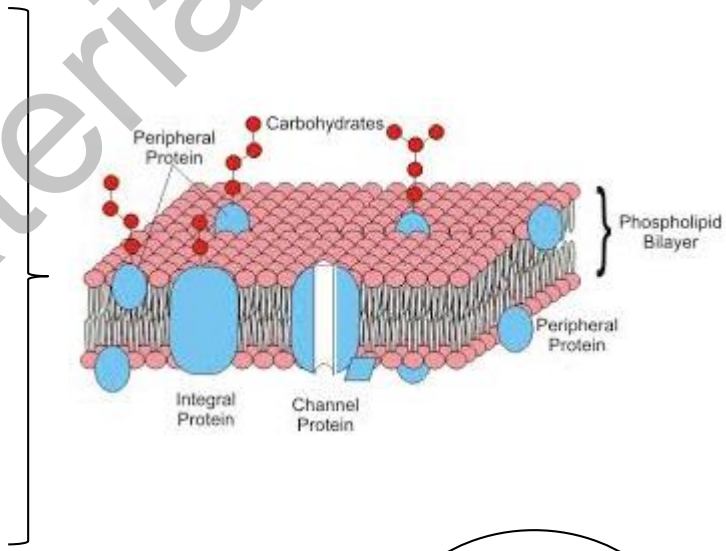


Vyhodnocení dat

Studijní materiály

Rozmanitost vzorku

Protein extraction = “more of an art than a science”



Obecné principy izolace:

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

Studijní materiály

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

Studijní materiály

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 reagencie (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

Studijní materiály

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 nízkoabundatních
Dynamický rozsah koncentrace proteinů v biologickém vzorku může překročit 10 řádů

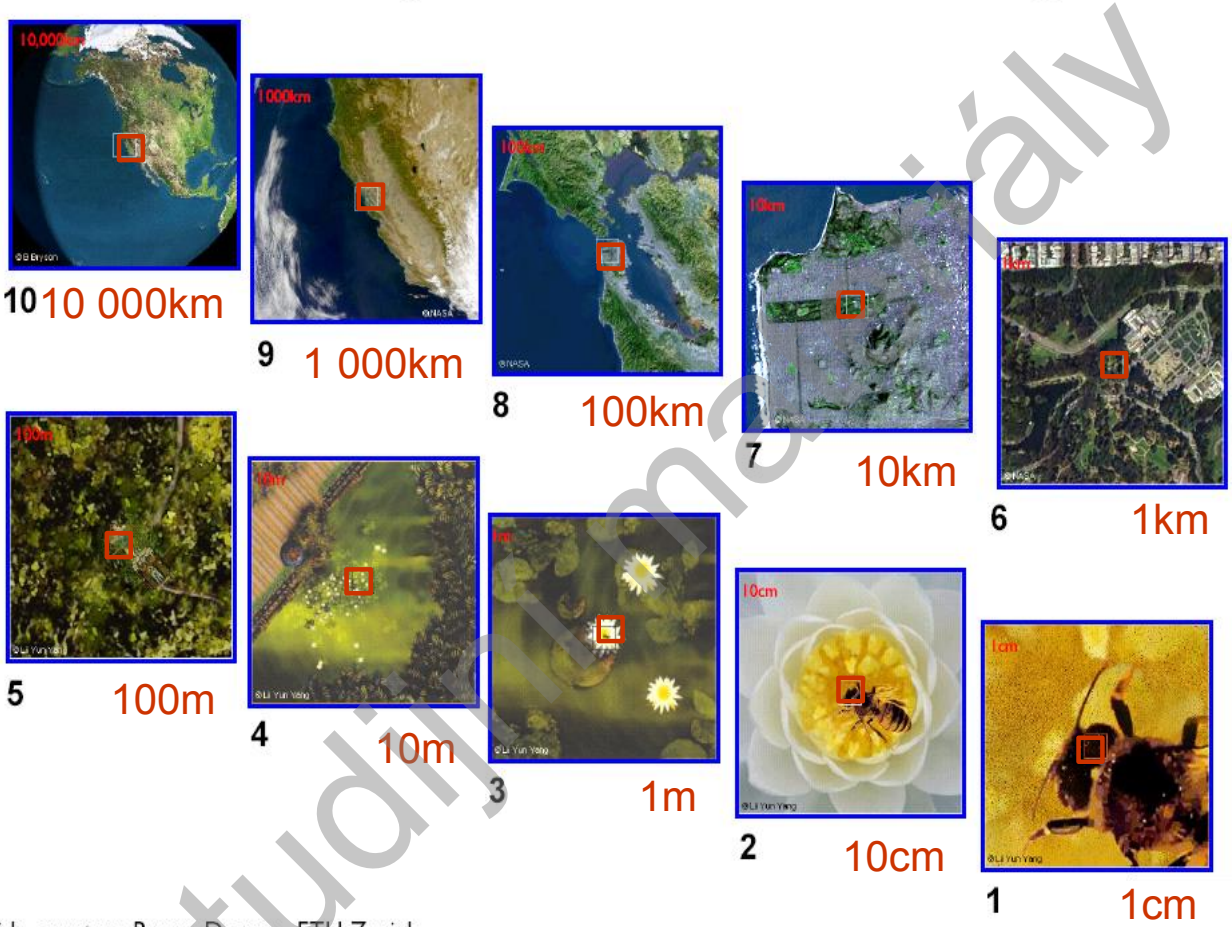
•Ionizace velkých molekul probíhá optimálně v přibližně vyvážených množstvích komponent

•MS spektrum z komplexní směsi - překrývání množství komponent

Požadavek: čistý vzorek s omezenou komplexitou

Studijní materiály

10^{10} Really Is Wide Dynamic Range

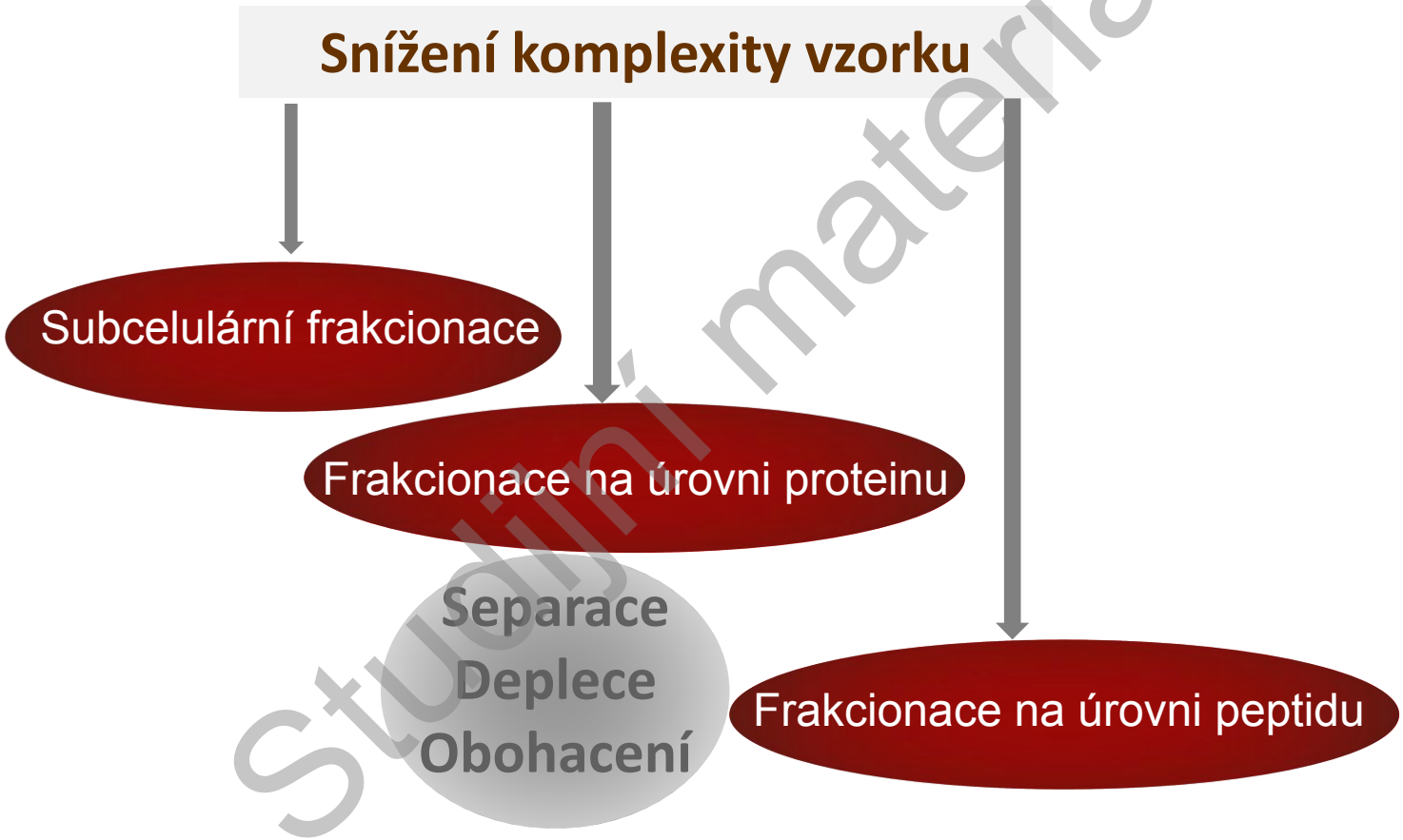


Slide courtesy Bruno Domon, ETH Zurich

Studijní materiály

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

MS analýza proteinového vzorku



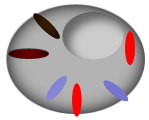
Studijní materiály

MS analýza proteinového vzorku
Snížení komplexity: Subcelulární frakcionace

Buňky v kultivačním médiu

Odebrání buněk

Odstranění buněk a buněčných zbytků



Proteiny sekretované do kultivačního média (sekretom)

Buněčná lýze

Povrchově vázané proteiny

Buněčný lyzát – charakter dle povahy lyzačního pufru (v případě jemnějších lyzačních podmínek zachovány intaktní organely)

Membrány

Izolace buněčných kompartment

Jaderné proteiny

Cytoplasma

Mitochondriální proteiny

Cytosolární proteiny

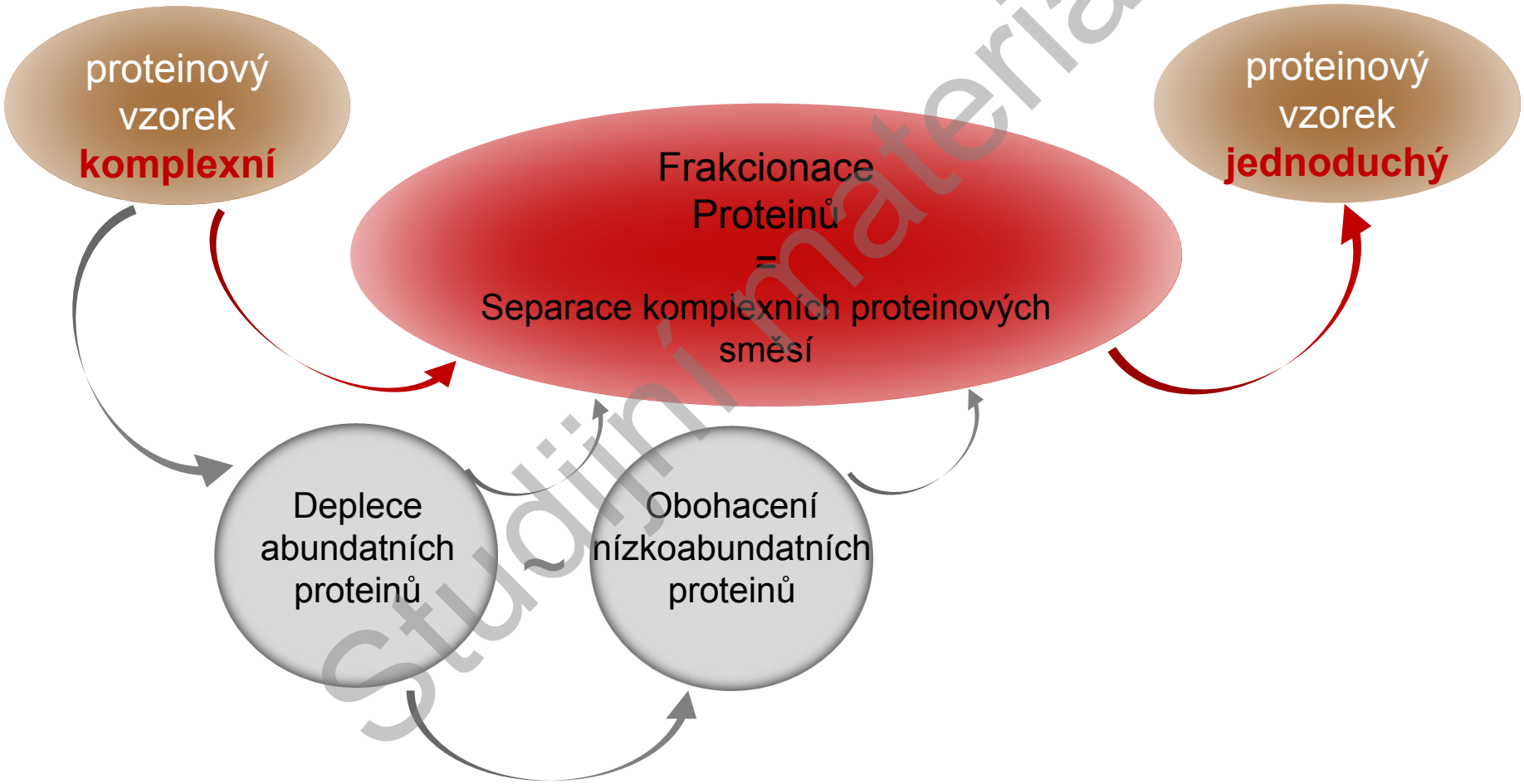
Membránové proteiny

hydrofobicita, bazicita, velikost

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

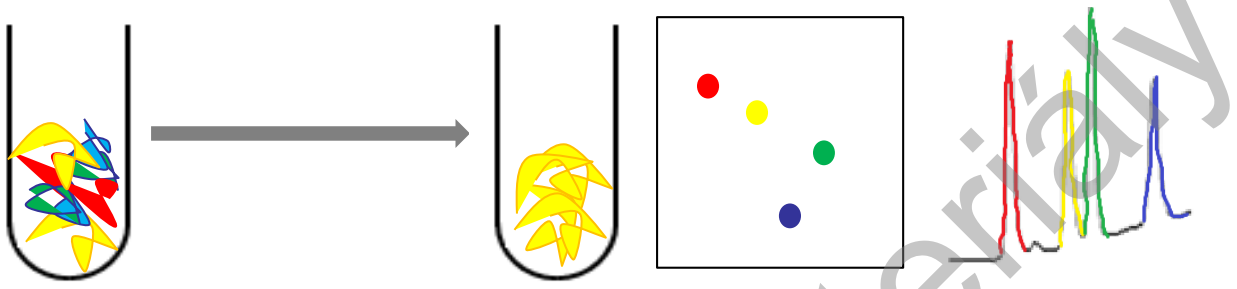
Studijní materiály

MS analýza proteinového vzorku
Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů



Studijní materiály

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

Studijní materiály

MS analýza proteinového vzorku

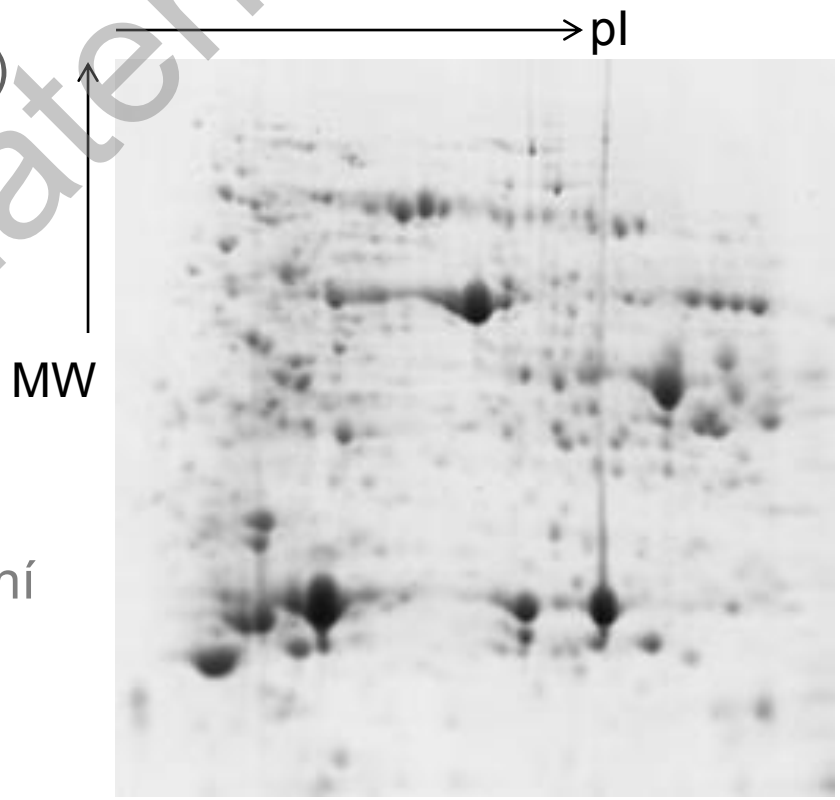
Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů

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…

Studijní materiály

MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů

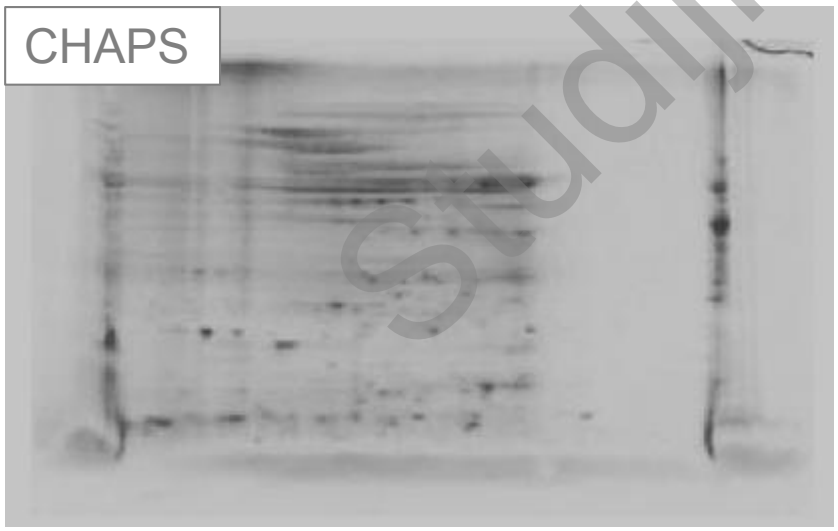
2D SDS-PAGE – Solubilizace proteinů

Složení solubilizačního roztoku:

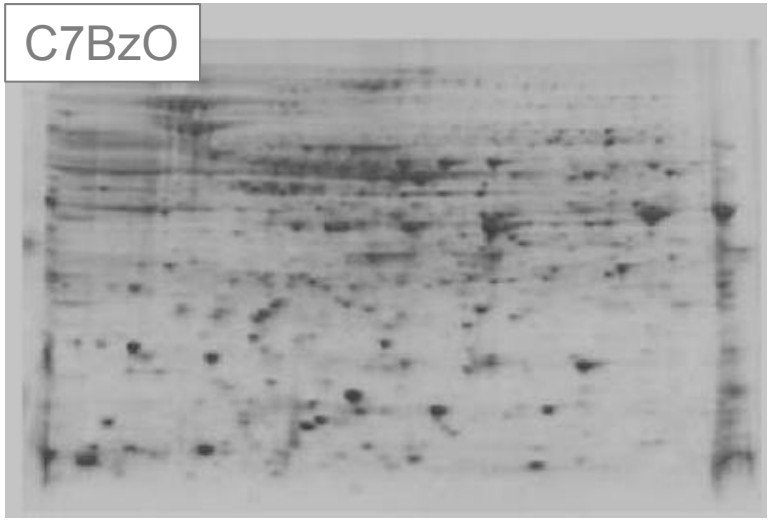
- Chaotropní činidla (močovina, thiomočovina)
- Neionogenní detergent (CHAPS, C7BzO)
- Redukční činidla (DTT, TBP)
- Inhibitory proteáz a enzymů odstraňujících modifikace (např. fosfatáz, deacetyláz, …)
- Amfolyty

Komponenty kompatibilní s IEF - nesmí zvyšovat iontovou sílu

CHAPS



C7BzO



Studijní materiály

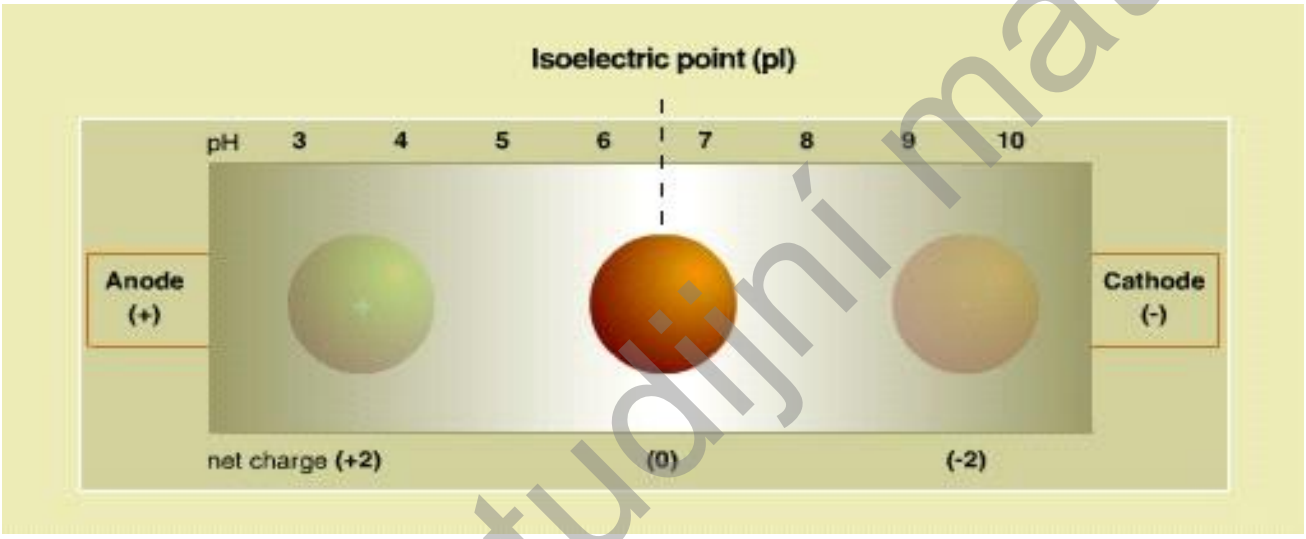
MS analýza proteinového vzorku

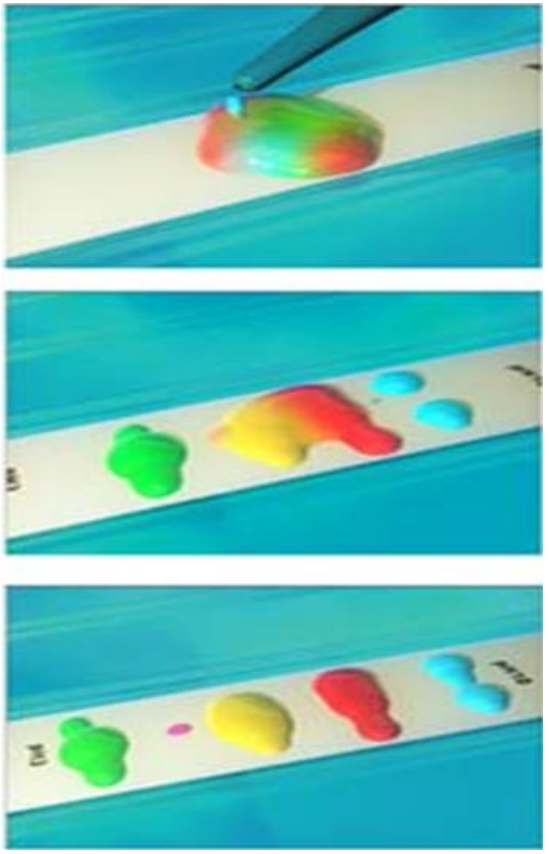
Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů

2D SDS-PAGE – 1. rozměr

- 1. rozměr = Izoelektrická fokusace (IEF)

Migrace nabitých částic v gradientu pH v elektrickém poli





pH 3 10

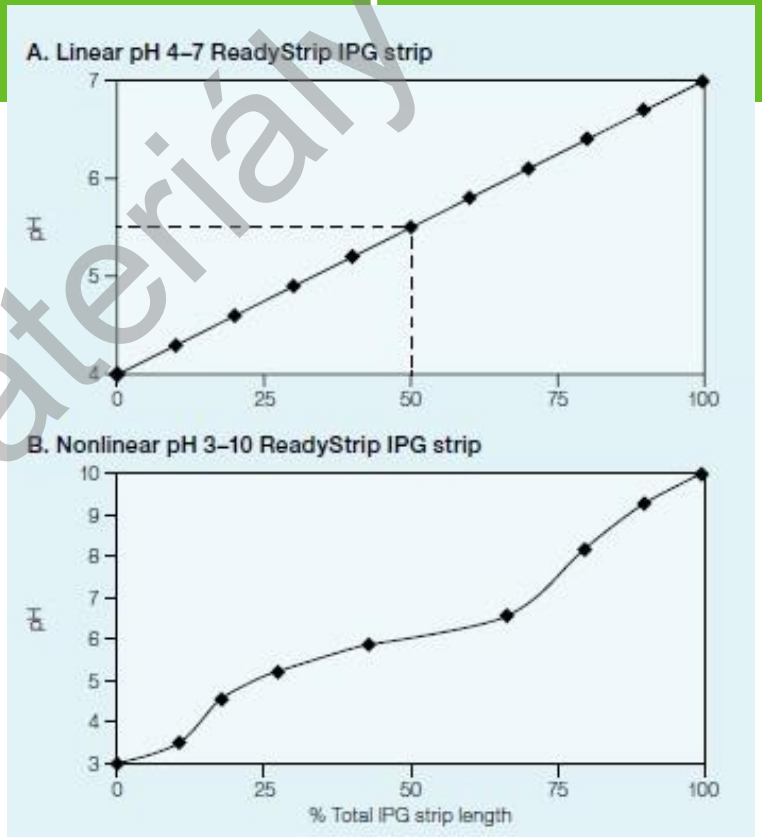
Studijní materiály

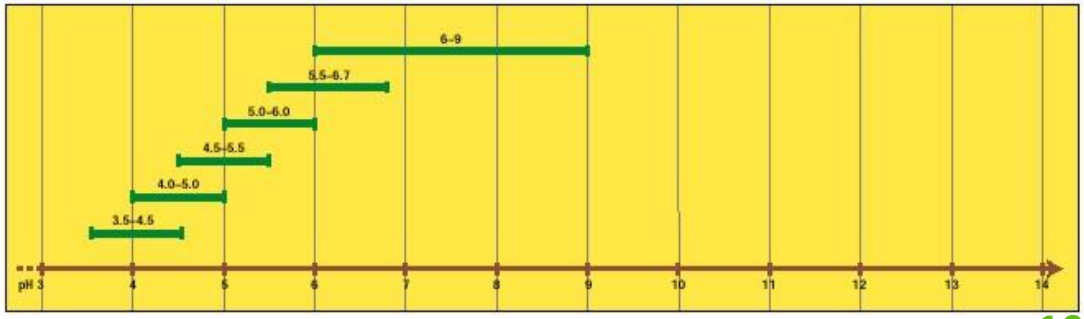
MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů

2D SDS-PAGE – 1. rozměr

ROZSAH STRIPU
ROZMĚR STRIPU





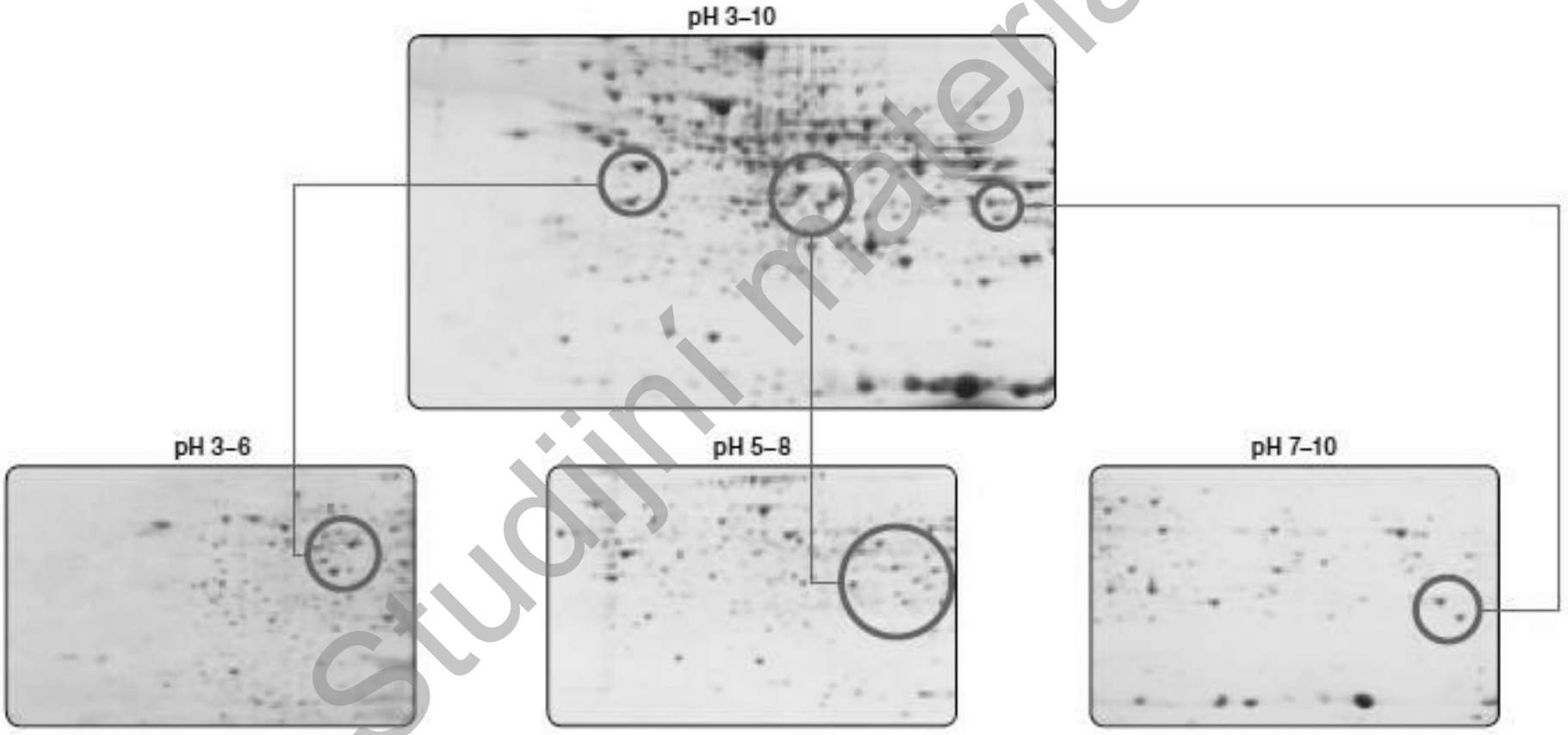
Studijní materiály

MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů

2D SDS-PAGE - 1. rozměr

ROZSAH STRIPU



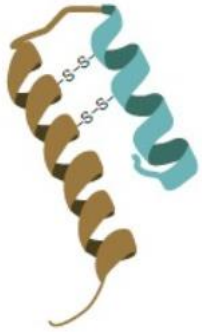
Studijní materiály

MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů

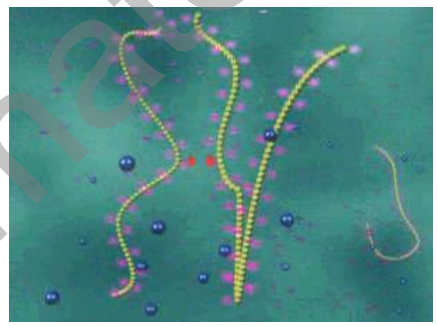
2D SDS-PAGE - Ekvilibrace

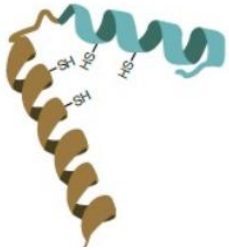
EKVILIBRACE STRIPU



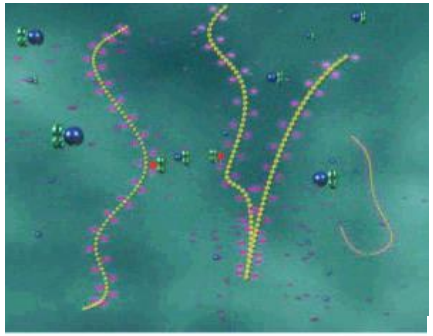
Protein with disulfide bridges

denaturace **SDS** •



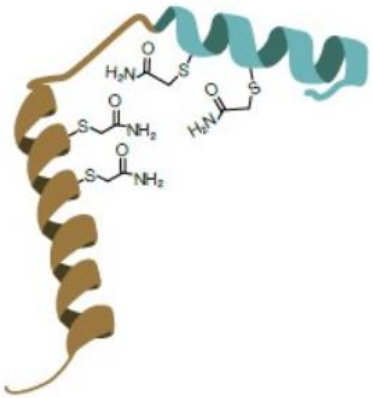


Reduction cleaves disulfide bridges and allows unfolding



redukce **DTT** ● alkylace **IAA** •

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



Alkylation with iodoacetamide prevents disulfide bridges from reforming

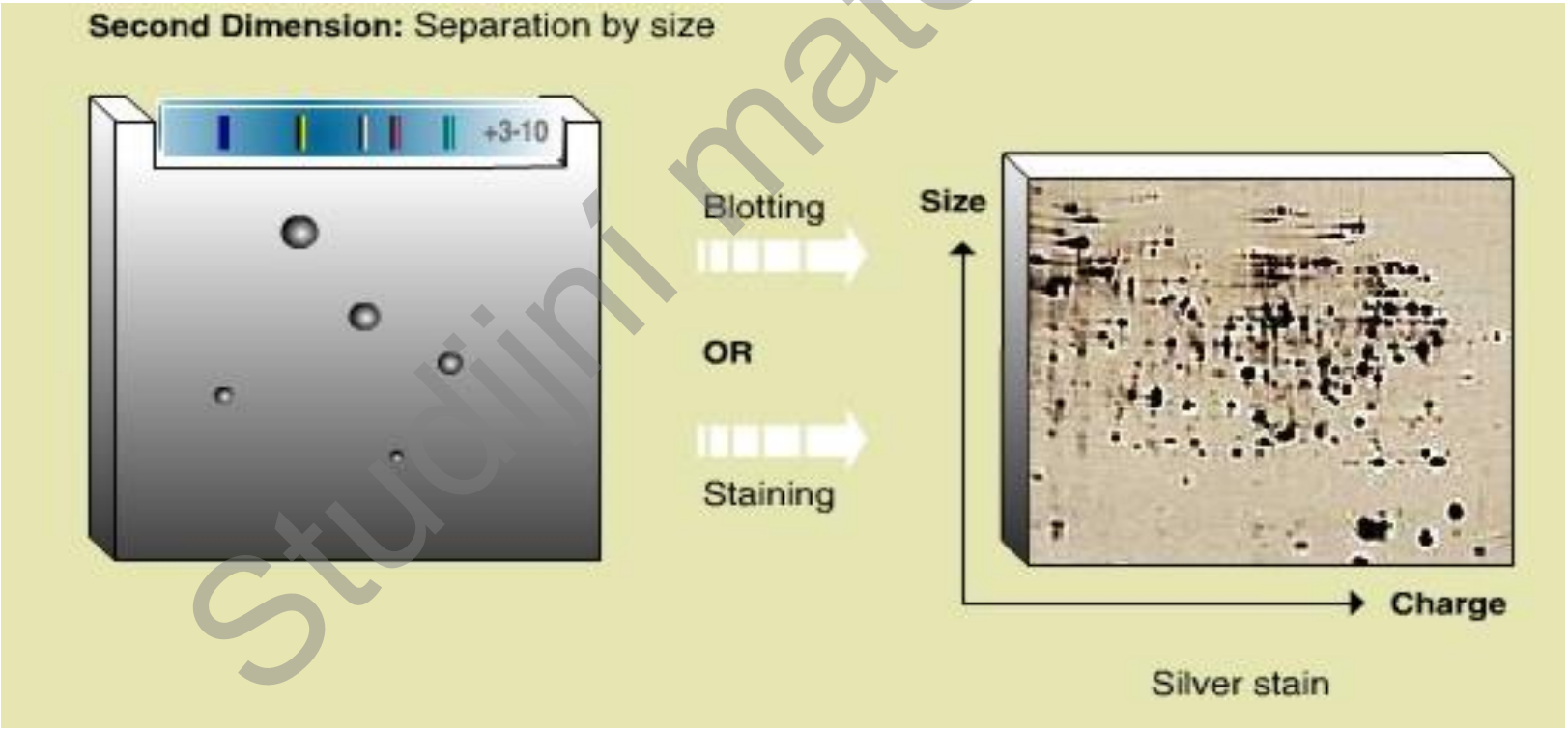
Studijní materiály

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

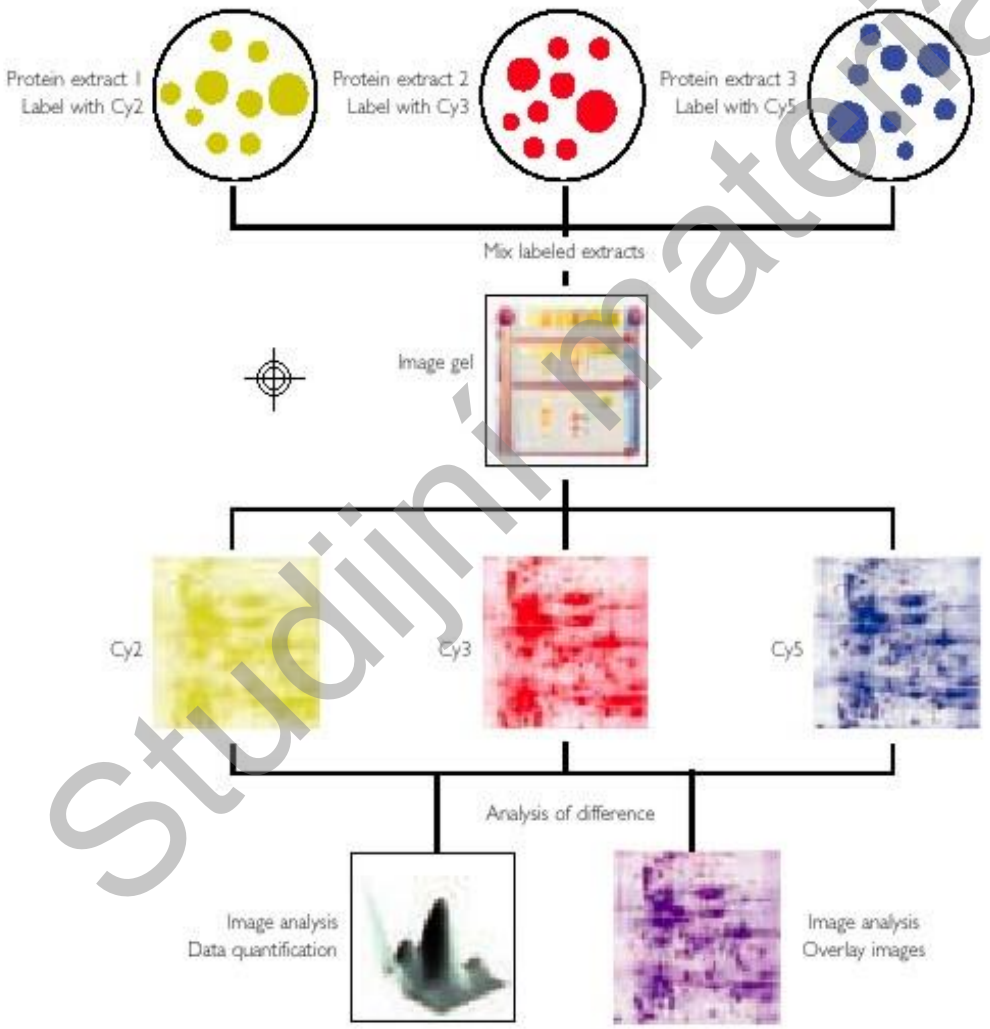


Studijní materiály

MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů

2D SDS-PAGE – DIGE = Difference gel electrophoresis

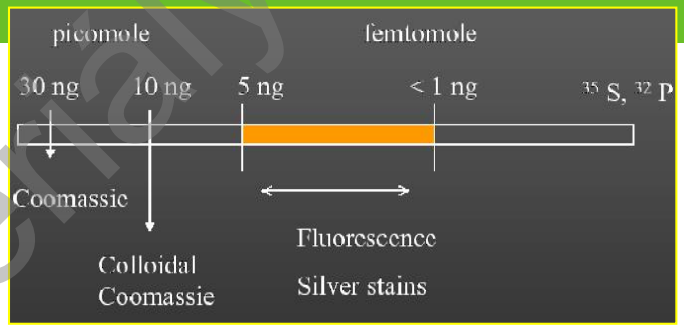


Studijní materiály

MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů

2D SDS-PAGE – Detekce proteinů

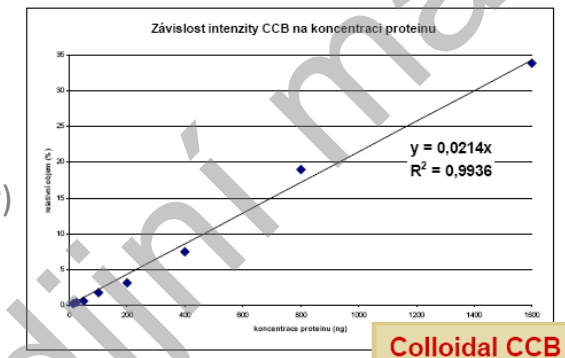


Obecné požadavky na vizualizaci proteinů

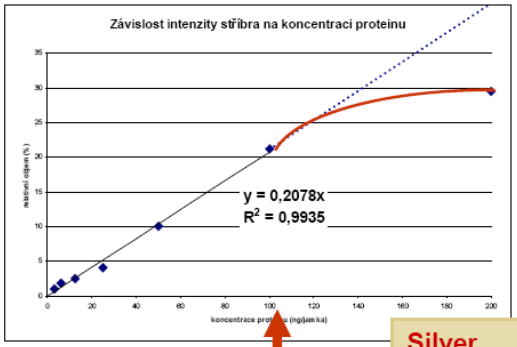
- vysoká citlivost
- kvantitativní barvení
- široký lineární rozsah závislosti intenzity barvičky na množství proteinu v gelu

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

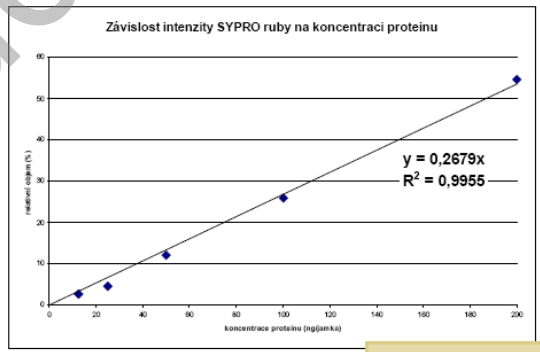
- end-point
- trvanlivost
  (např. zhášení fluorescenčních barviček!)
- kompatibilita s následnými analýzami
  (např. stříbro - glutaraldehyd!)



Colloidal CCB



Silver



SYPRO Ruby

Barvení stříbrem
– lineární závislost pouze v rozmezí do 100 ng proteinu.
Při vyšších množstvích odklon od linearity.

Studijní materiály

MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů

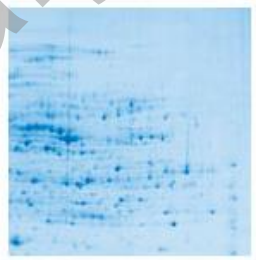
2D SDS-PAGE – Detekce proteinů

Typy detekce:

Značení před analýzou (DIGE – CyDye, radioaktivní značení)

Barvení po analýze

Sypro Ruby



Coomassie

silver

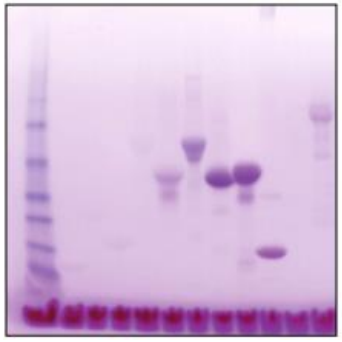
Nespecifické barvení: všechny proteiny

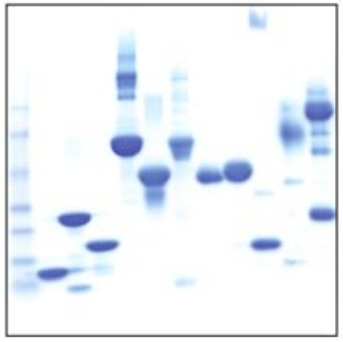
- Viditelné barvení: Coomassie brilliant blue (R250, G250), stříbro (kyselá x amoniakální varianta)
- Fluorescenční barvení: Sypro Ruby (Ex/Em = 280, 450/610 nm), Lucy (Ex/Em = 506/520 nm), Flamingo Pink (Ex/Em = 512/535 nm), Oriole (Ex/Em = 270/604 nm), Krypton (Ex/Em = 520/580), Deep Purple (Ex/Em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





Studijní materiály

MS analýza proteinového vzorku

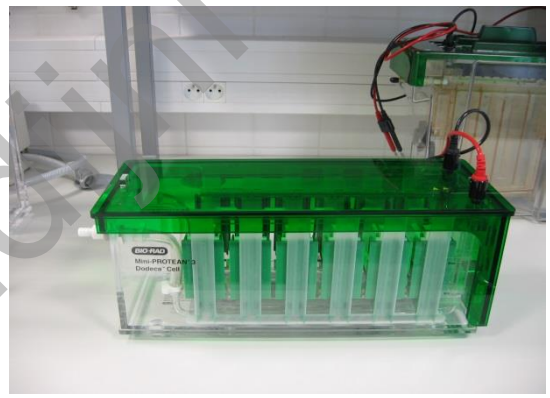
Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů

2D SDS-PAGE - 2. rozměr

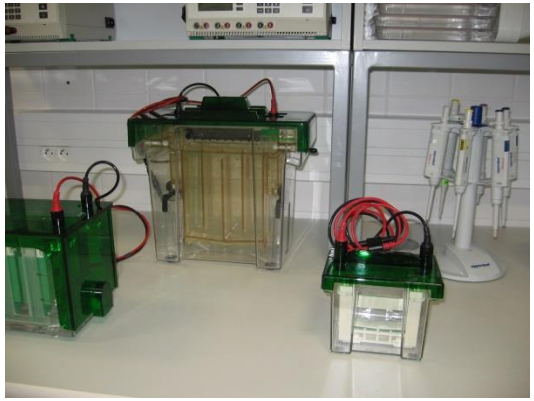
Studijní materiály

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

MicroRotofor

- prefrakcionace v roztoku

OffGel Fractionator

- prefrakcionace na IPG stripu

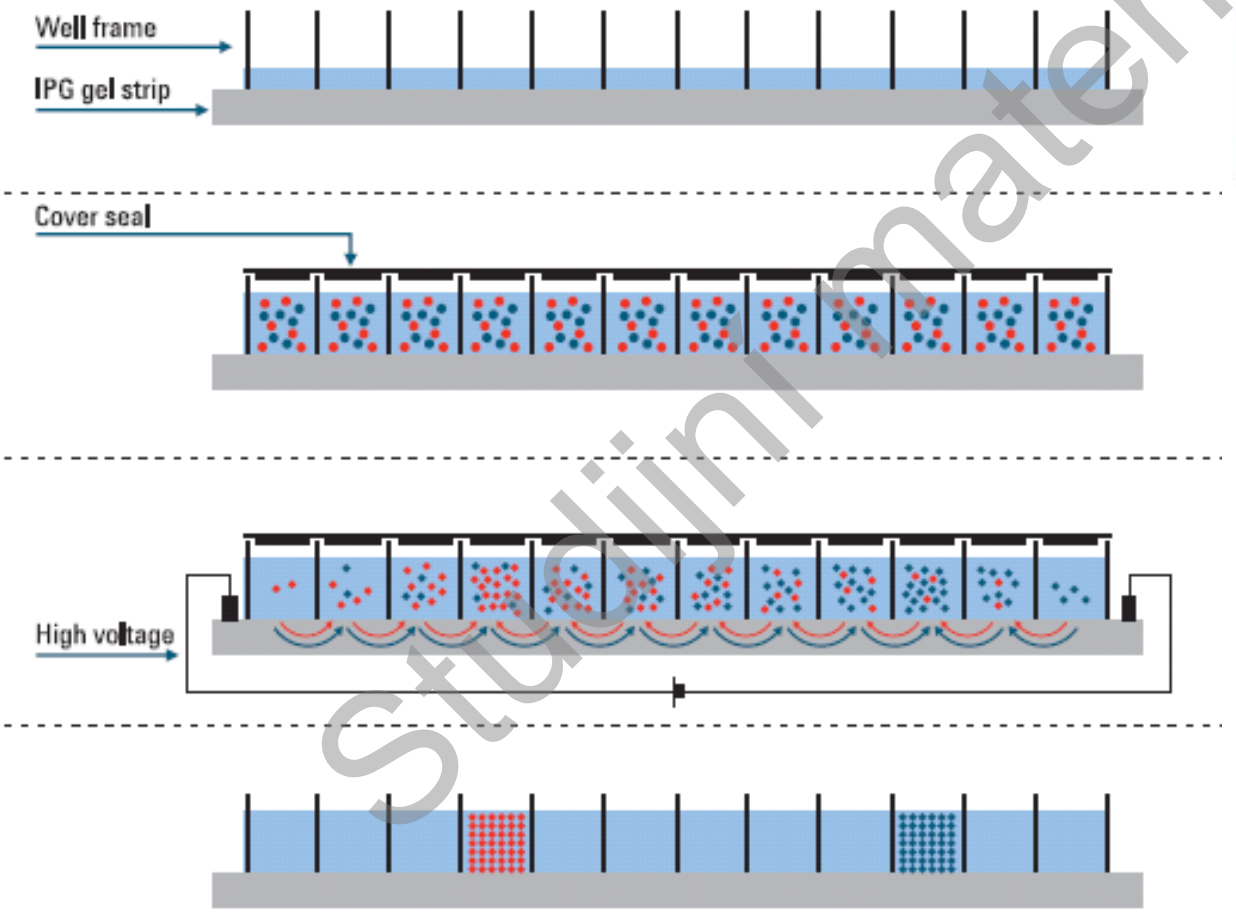
Studijní materiály

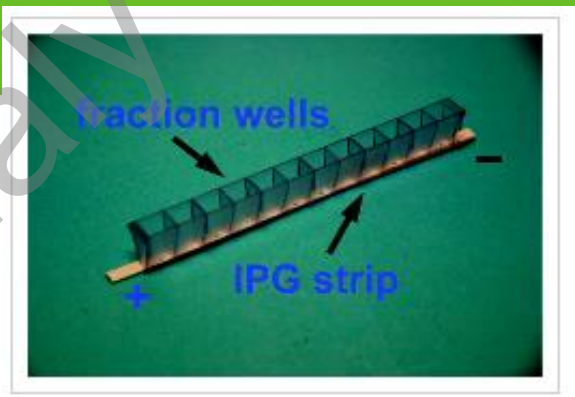
MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů

IEF Frakcionace

OFFGEL IEF prefrakcionace proteinů nebo peptidů



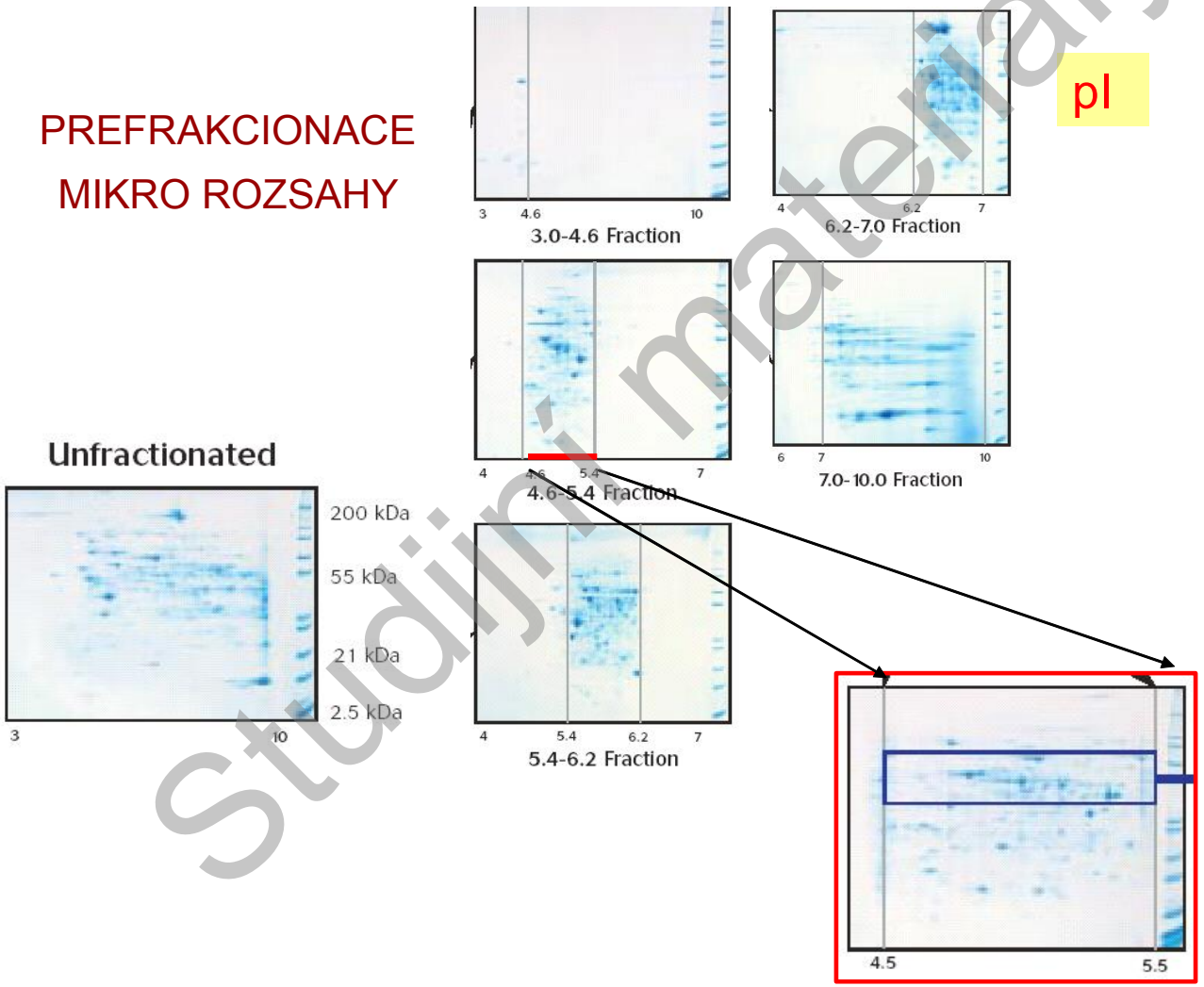


Studijní materiály

MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů

IEF Frakcionace



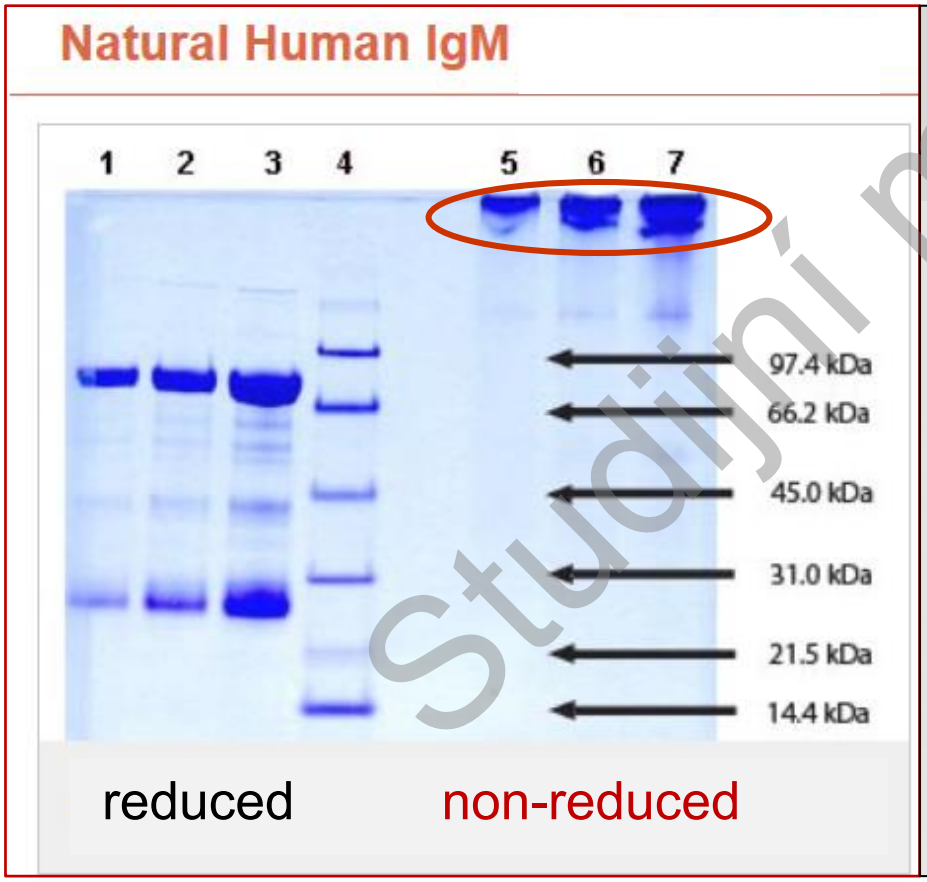
Studijní materiály

Separace proteinů z jiného konce

Studijní materiály

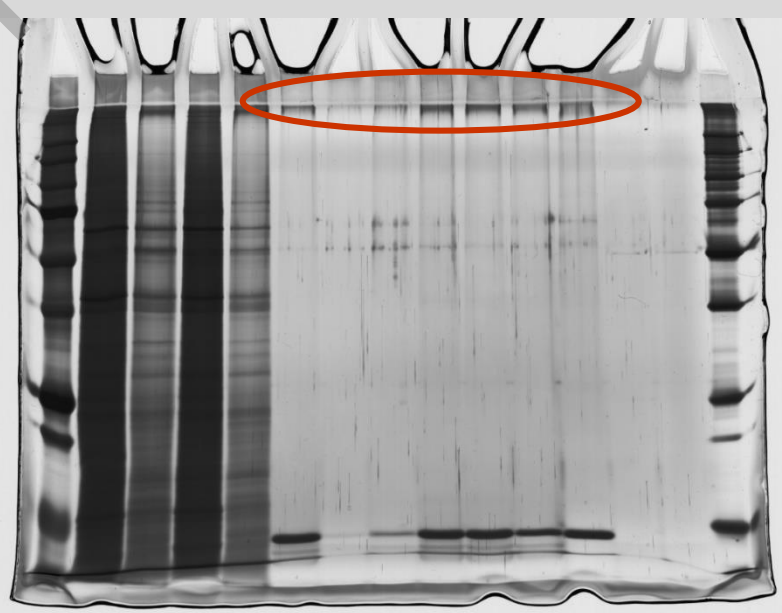
MS analýza proteinového vzorku
Když SDS-PAGE nefunguje…

velké nativní proteiny



membránové proteiny

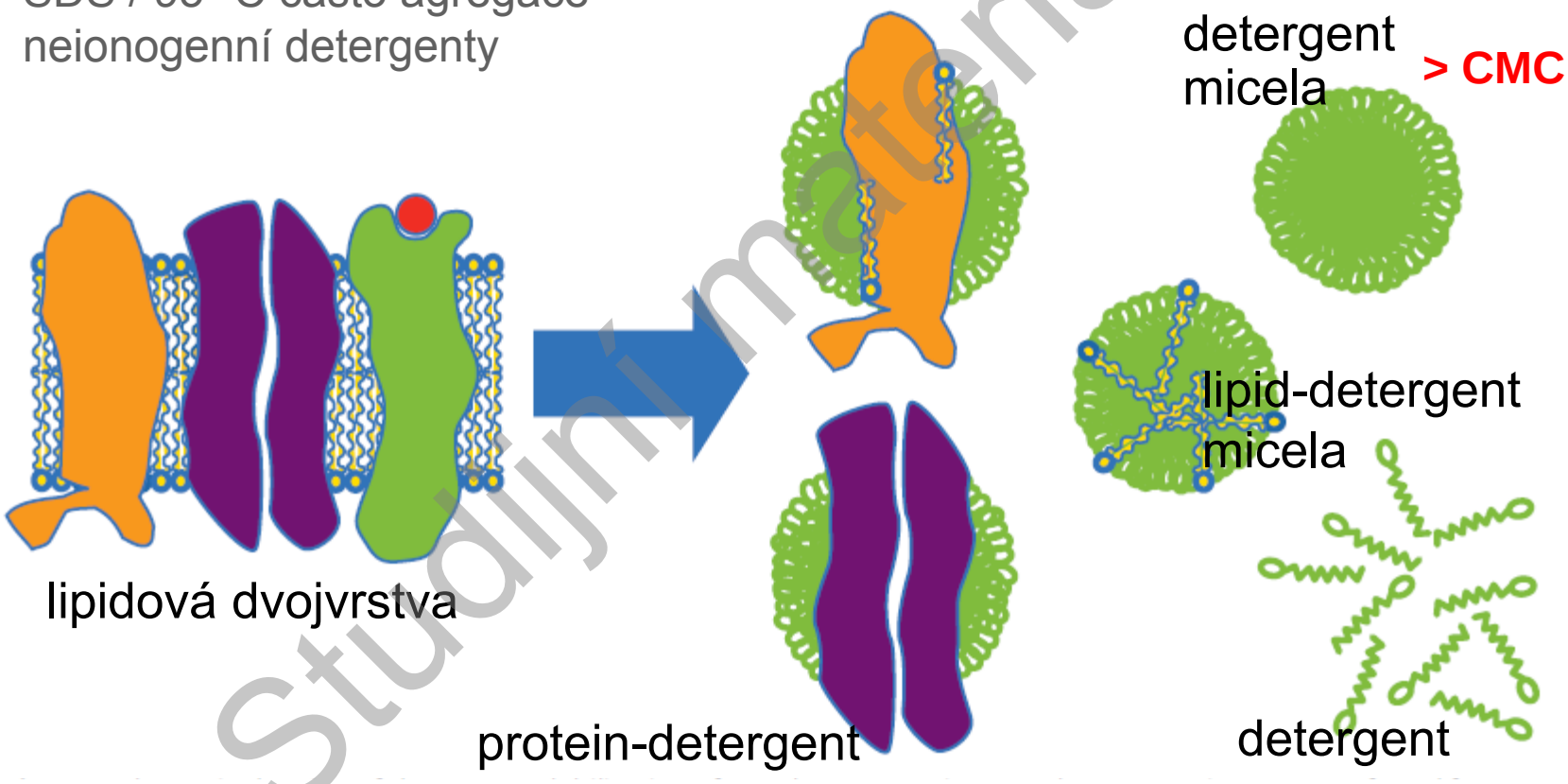
proteins in sample buffer (SDS/DTT/heat)



Studijní materiály

MS analýza proteinového vzorku
Solubilizace membránových proteinů

- SDS / 95º C často agregace
- neionogenní detergenty



Studijní materiály

MS analýza proteinového vzorku
Jde to i bez SDS…

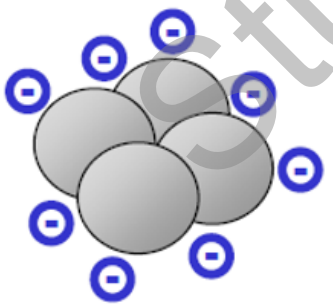
CEITEC

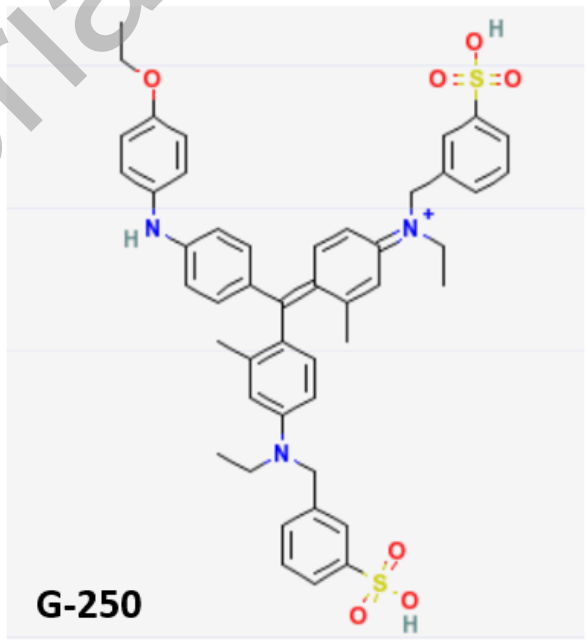
studijní materiály

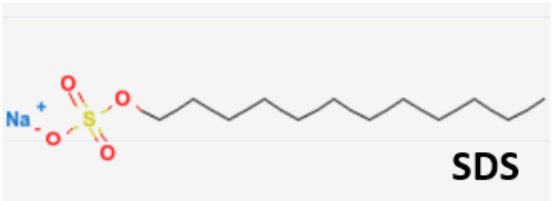
Blue Native Electrophoresis BNE

Schägger & von Jagow, 1991

- separace proteinů v nativním stavu
- separace membránových komplexů 10 - 10 000 kDa
- vzorky solubilizovány neionogenními detergenty
- náboj udělen Coomassie G-250
- BN PAGE gel (strip/band) dále zpracován



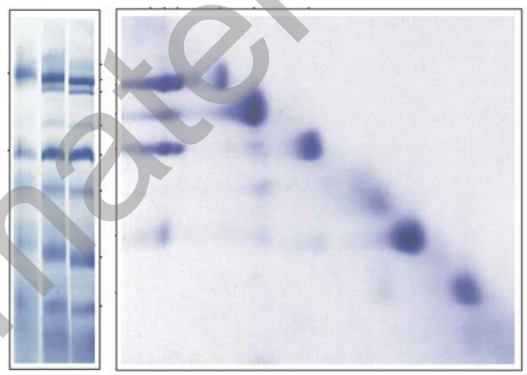




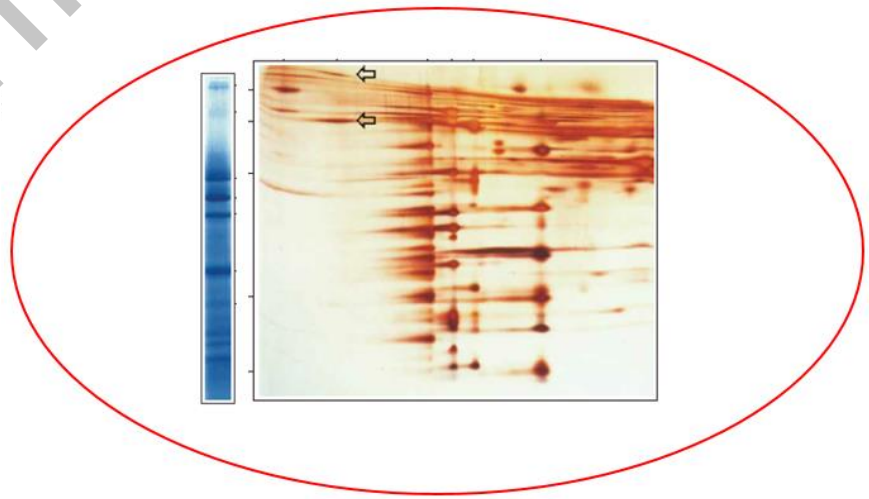
MS analýza proteinového vzorku
2D Blue Native Electrophoresis

Studijní materiály

BN/BN PAGE

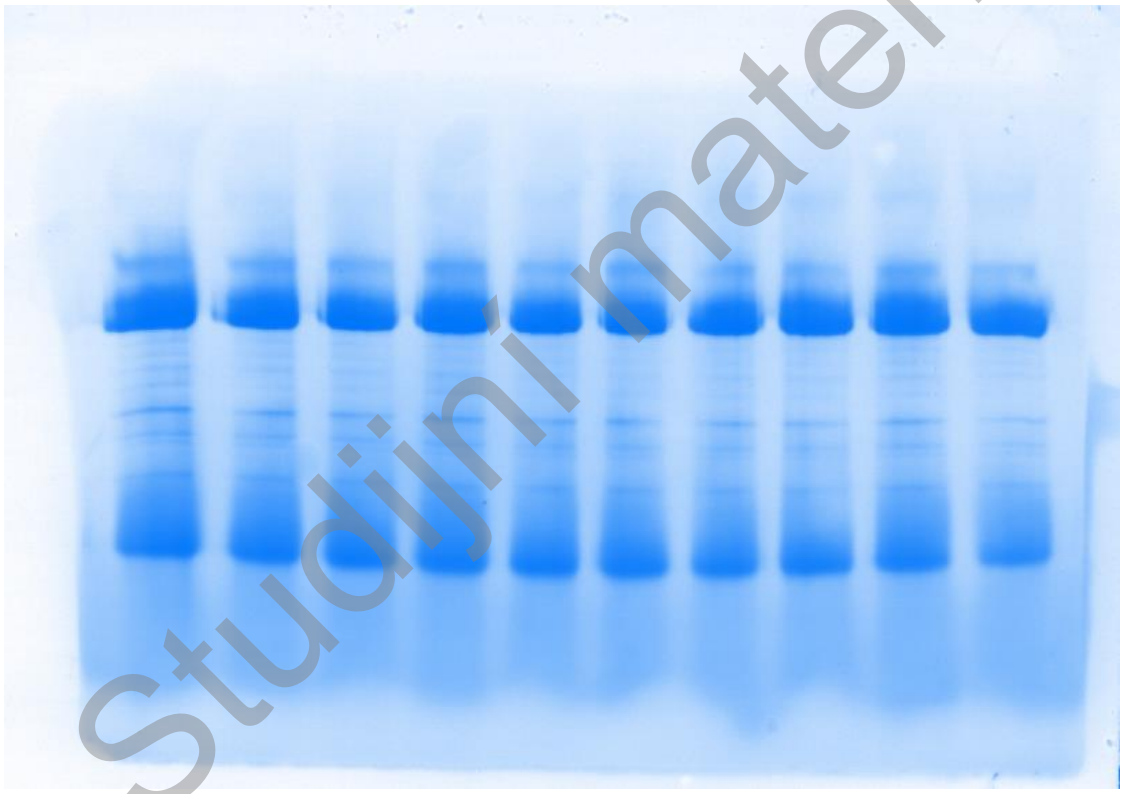


BN/SDS PAGE



MS analýza proteinového vzorku
Membránové proteiny včelích larev

Honey Bee Pupae Membrane Proteins (Pavel Plevka / Liya Mukhamedova)

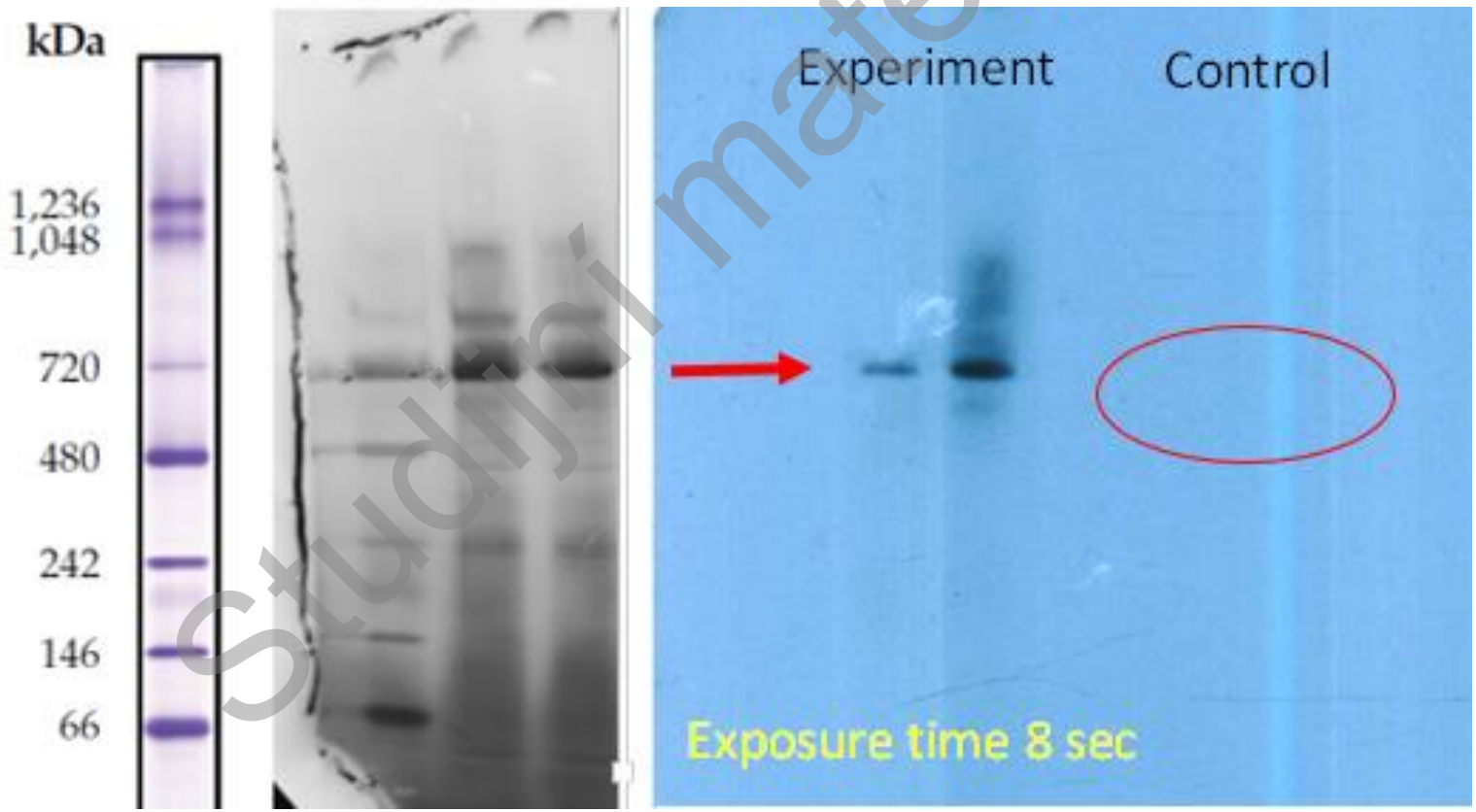


Homogenizace . Ultracentrifugace . Solubilizace Triton X-100

Studijní materiály

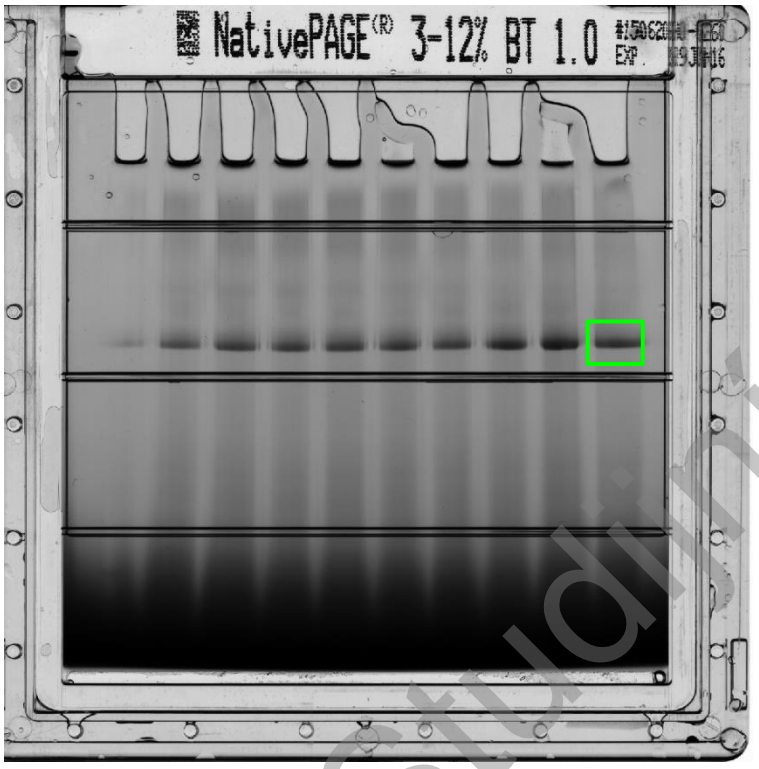
BNE: Imunodetekce

PVDF blot protein + virus + protilátka …detekce ECL



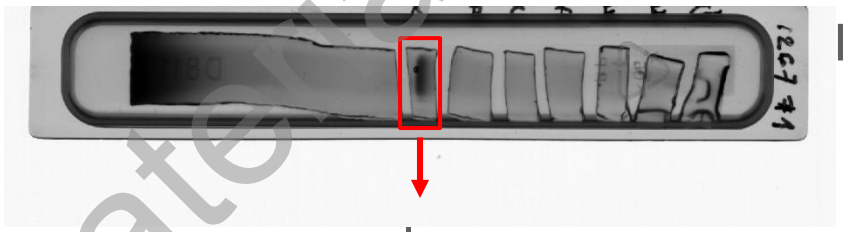
Studijní materiály

MS analýza proteinového vzorku
BNE vs. BNE / SDS-PAGE



BNE

digest 92 PGs



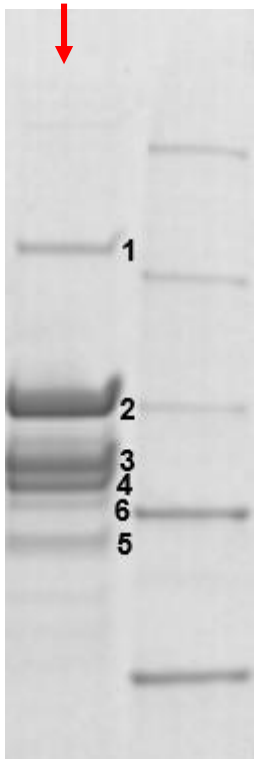
BNE

eluce

SDS-PAGE

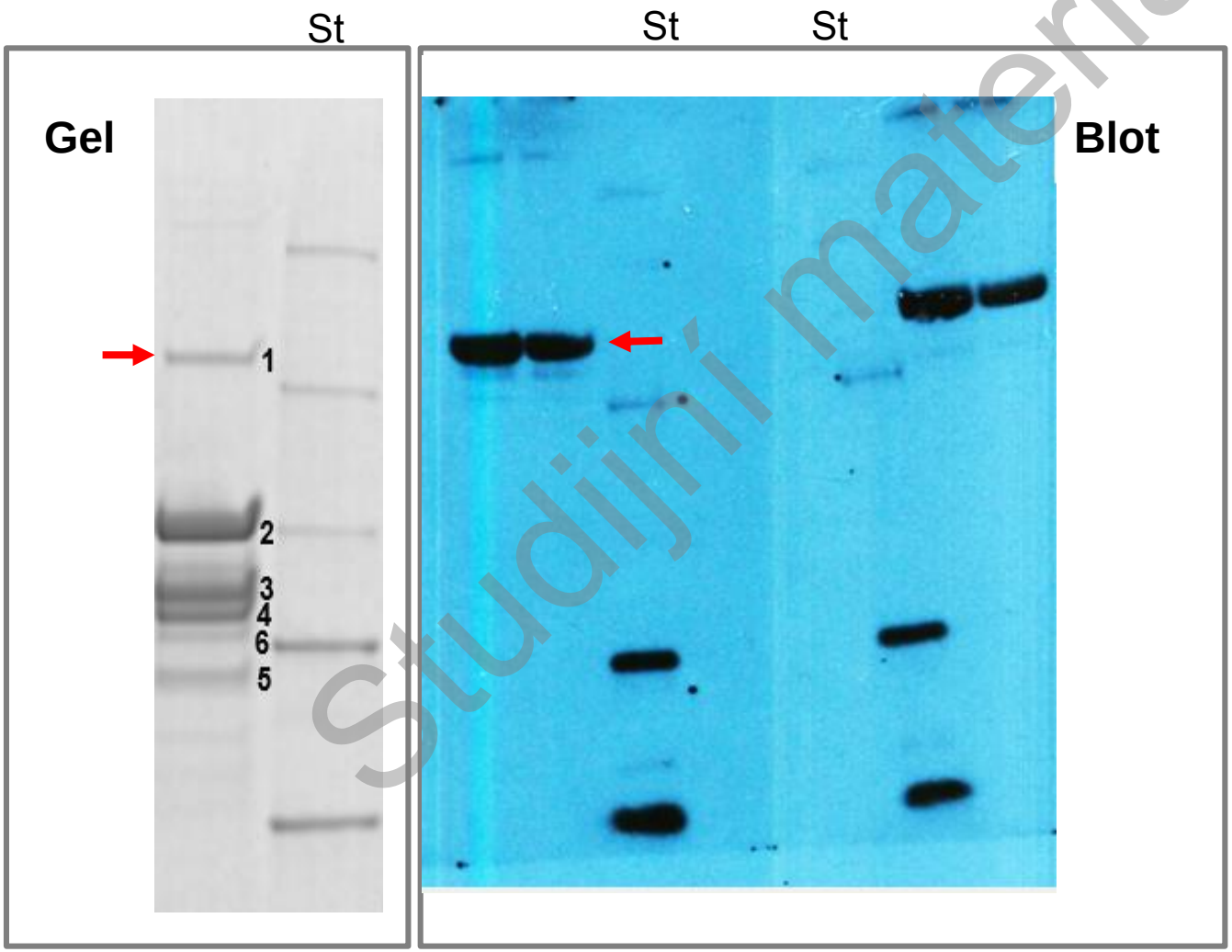
digest

2-3 PGs per band



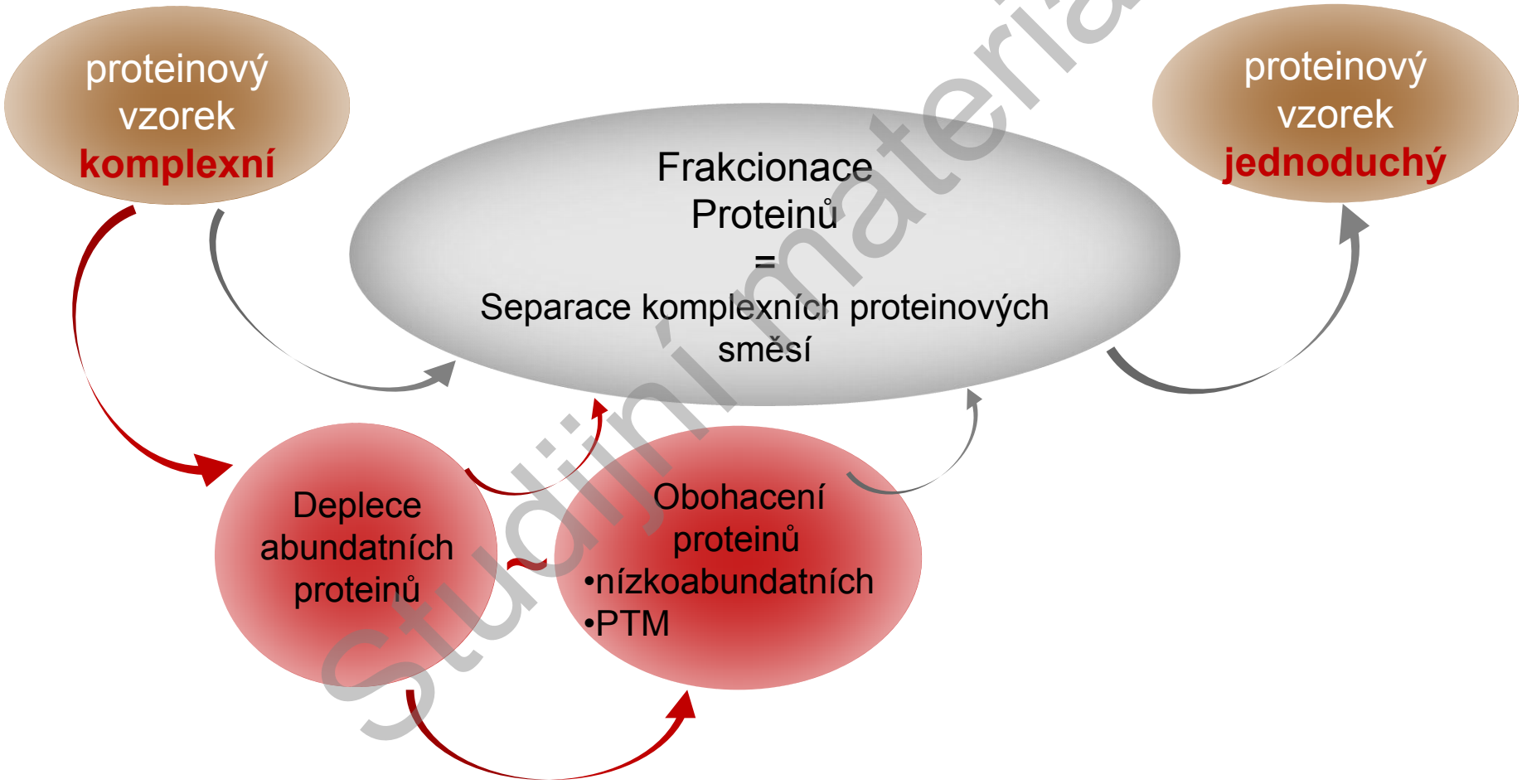
Studijní materiály

MS analýza proteinového vzorku
BNE / SDS-PAGE imunodetekce



Studijní materiály

MS analýza proteinového vzorku
Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů



Studijní materiály

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

Studijní materiály

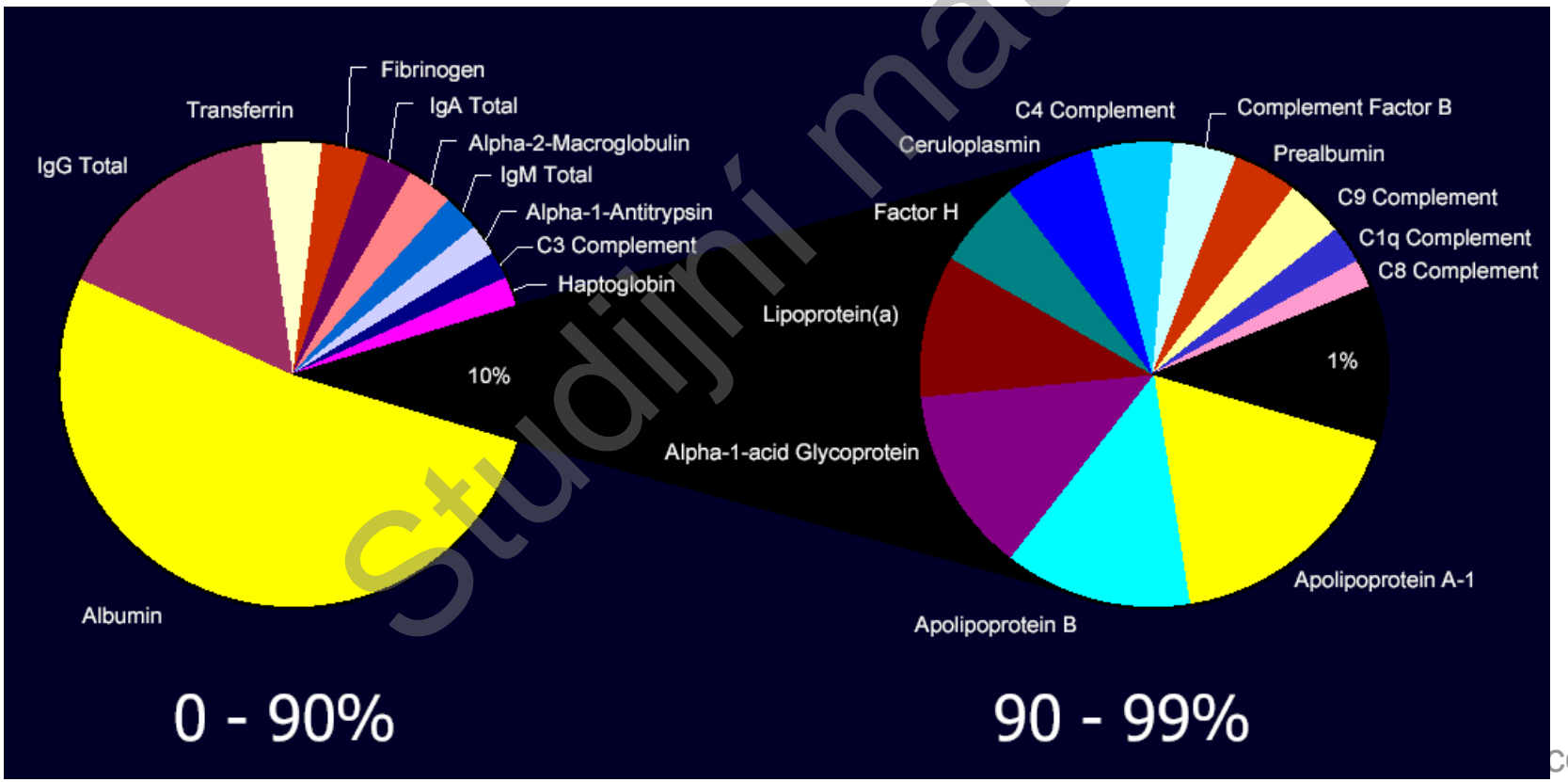
MS analýza proteinového vzorku
Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů

Deplece abundatních proteinů

Příklad: Proteiny plasmy

Abundantní proteiny: **~ mg/ml** (Albumin: 30-50 mg/ml, ~ ½ proteinů plasmy)

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



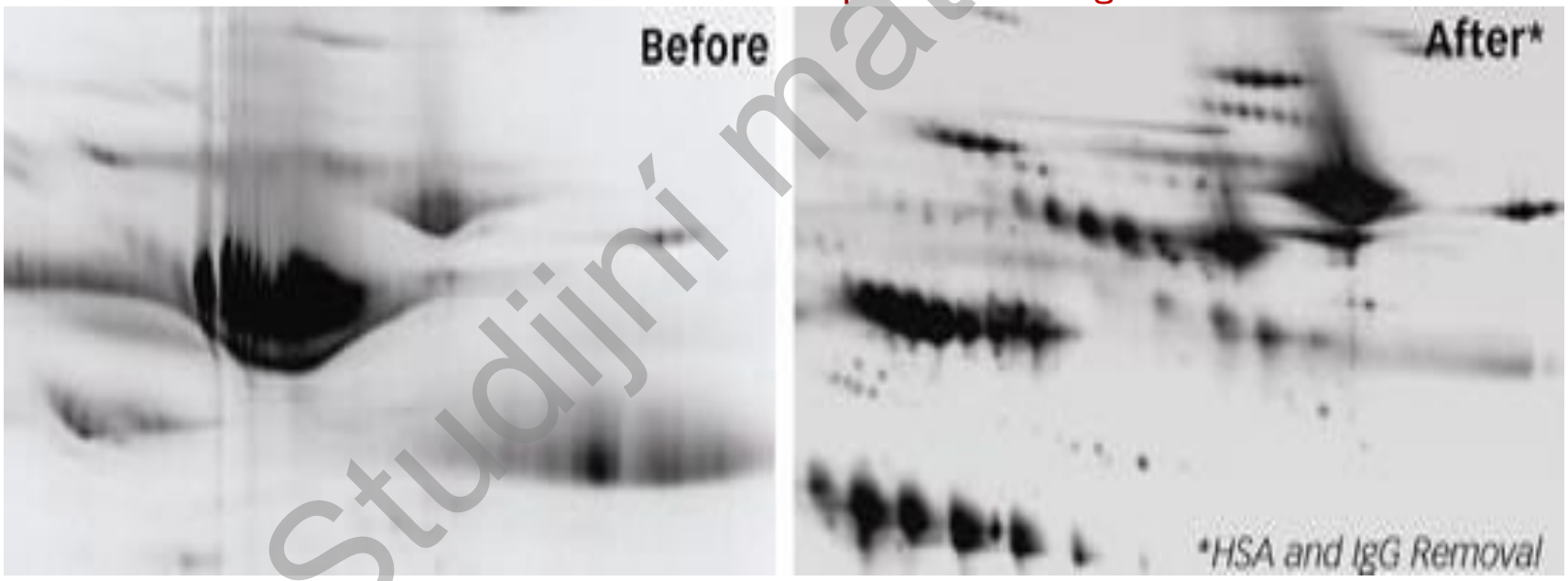
Studijní materiály

celkem

MS analýza proteinového vzorku
Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů
Deplece abundatních proteinů

Studijní materiály

Deplece HSA a IgG



MS analýza proteinového vzorku
Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů
Obohacení nízkoabundatních proteinů

ProteoMiner™ protein enrichment kit

- Redukce dynamického rozsahu koncentrace proteinu 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

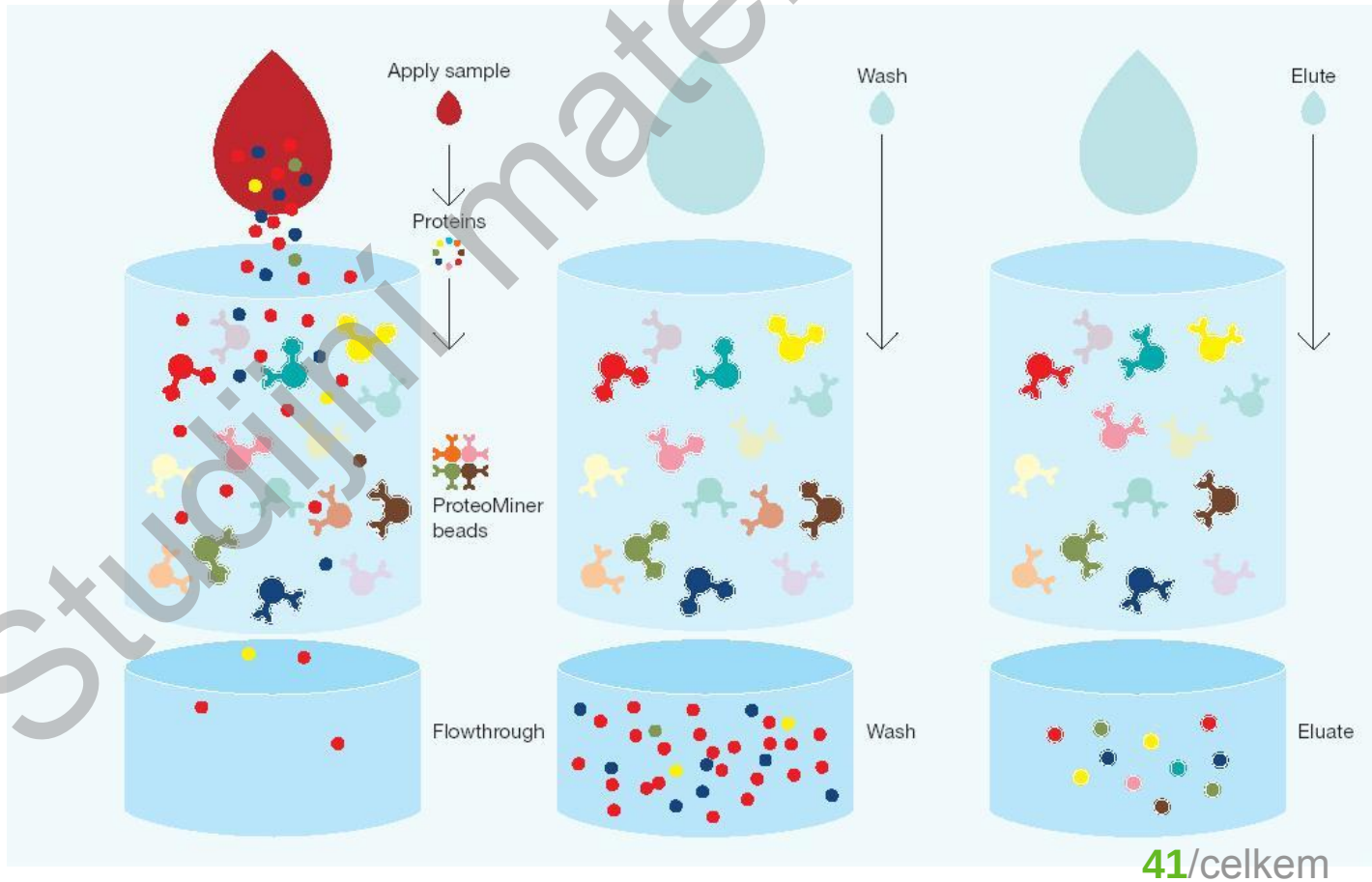
Výhody: Snížení dynamického rozsahu koncentrací při zachování zástupců všech proteinů původního vzorku

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

Studijní materiály

MS analýza proteinového vzorku
Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů
Obohacení nízkoabundatních proteinů

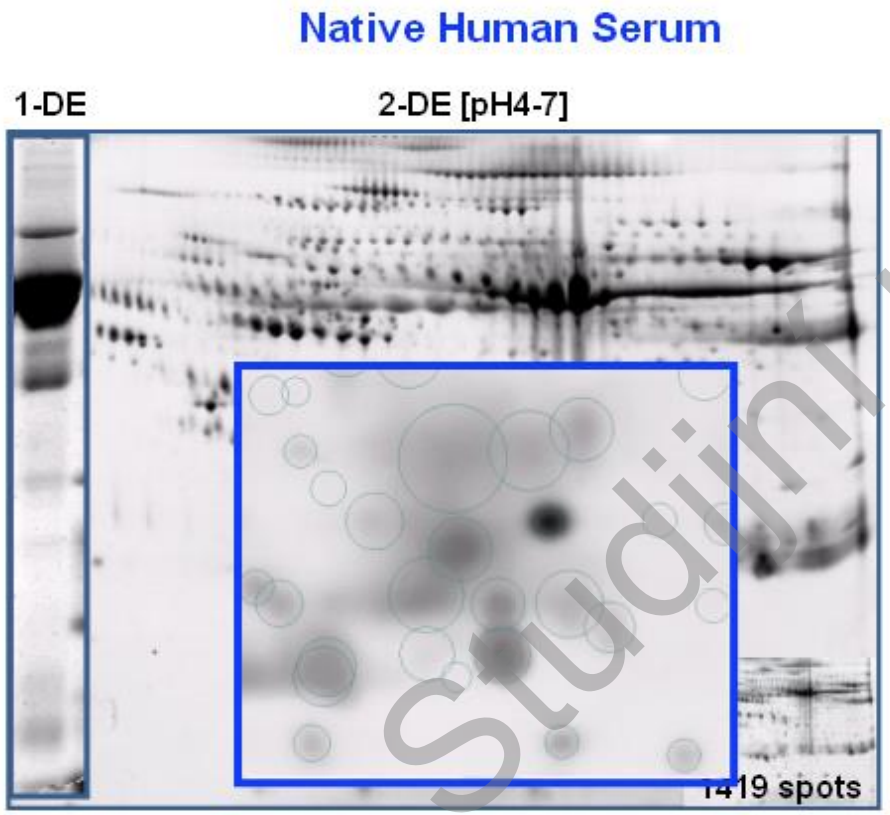
ProteoMiner™ protein enrichment kit: CPPL Combinatorial Peptide Ligand Library

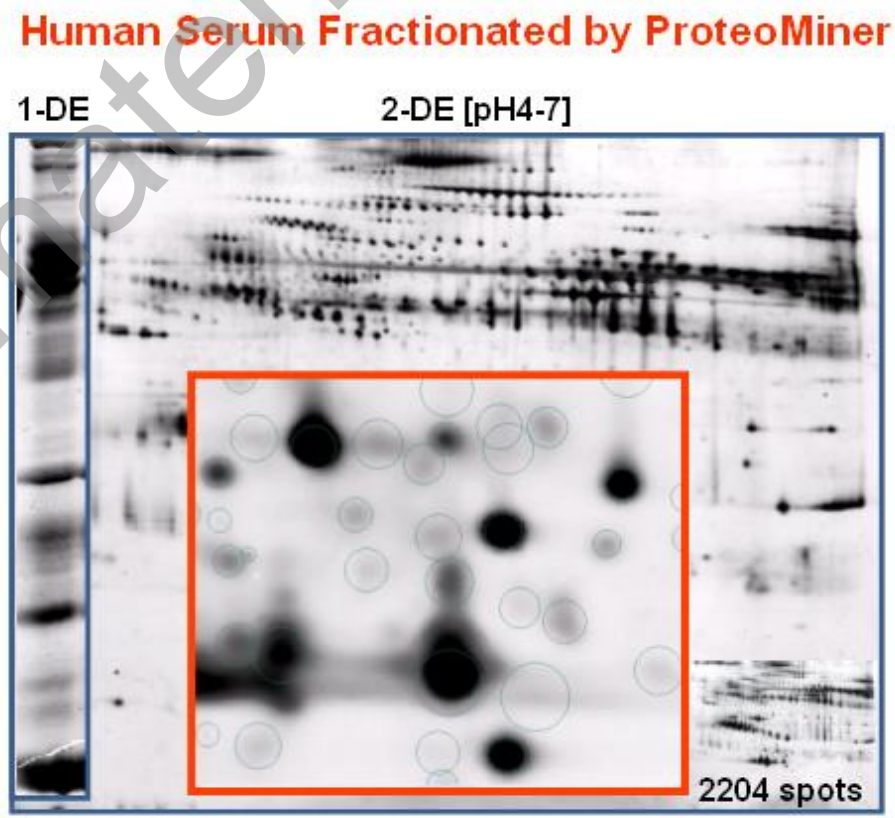


Studijní materiály

MS analýza proteinového vzorku
Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů
Obohacení nízkoabundatních proteinů

ProteoMiner™ protein enrichment kit

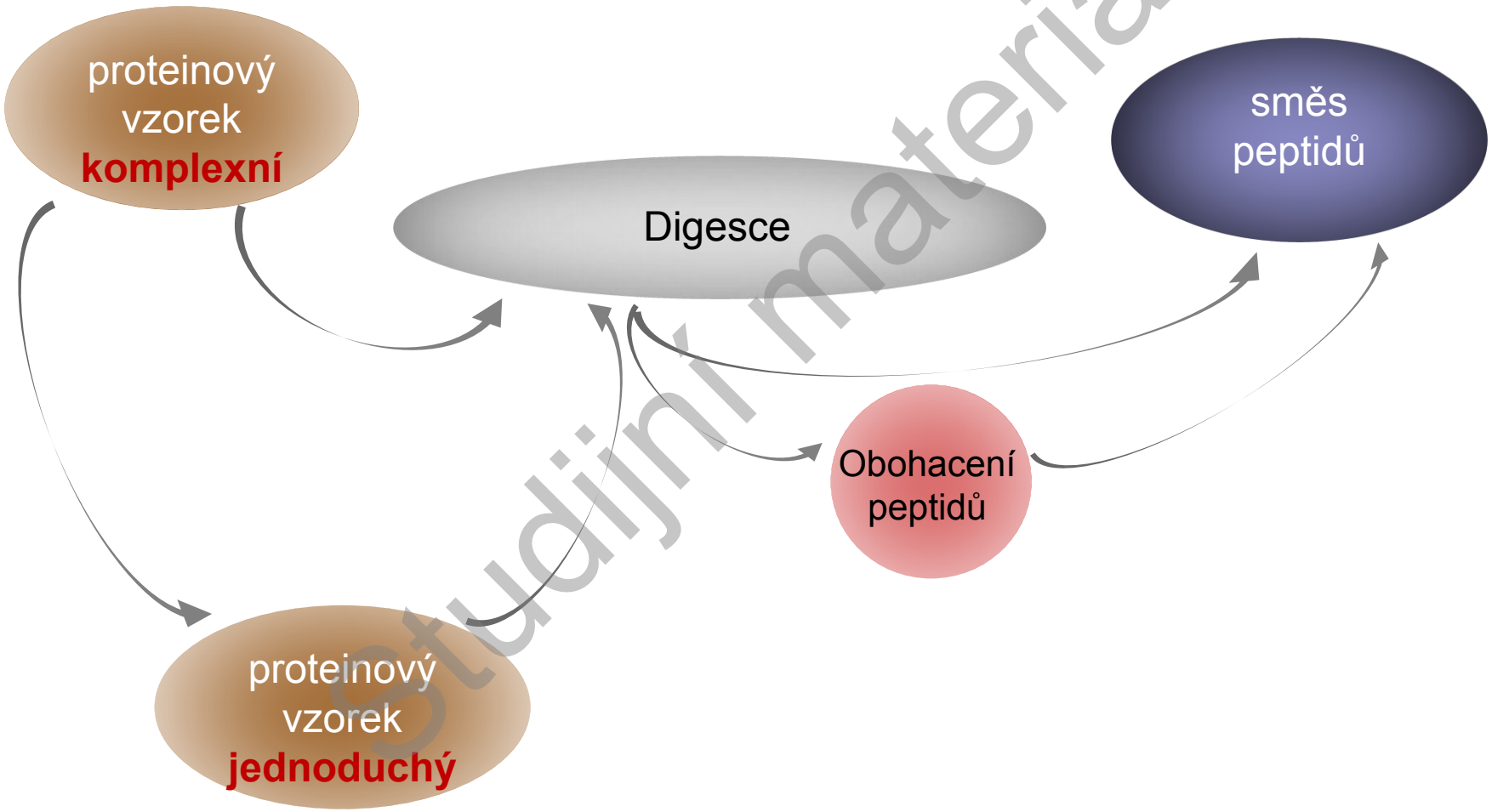




Studijní materiály

MS analýza proteinového vzorku

Digesce proteinů

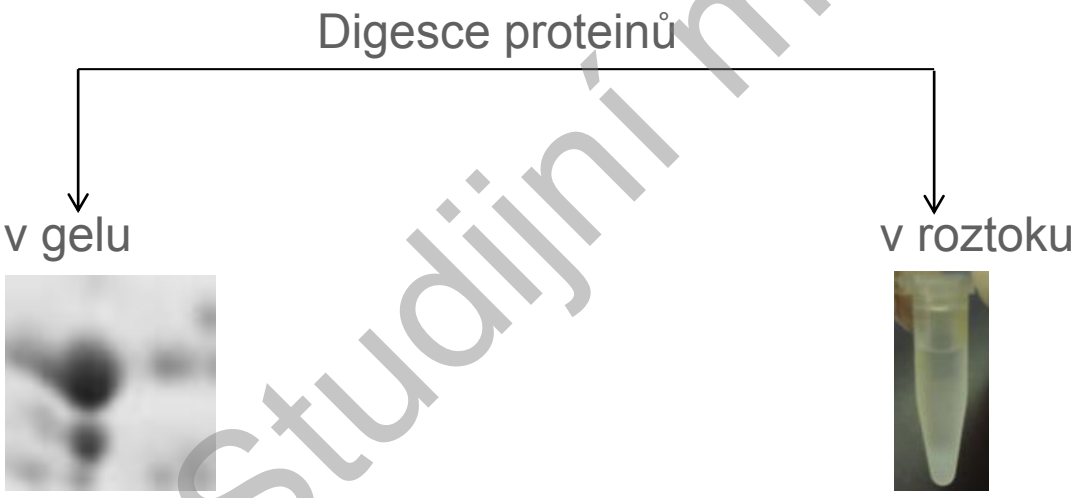


Studijní materiály

MS analýza proteinového vzorku

Digesce proteinů

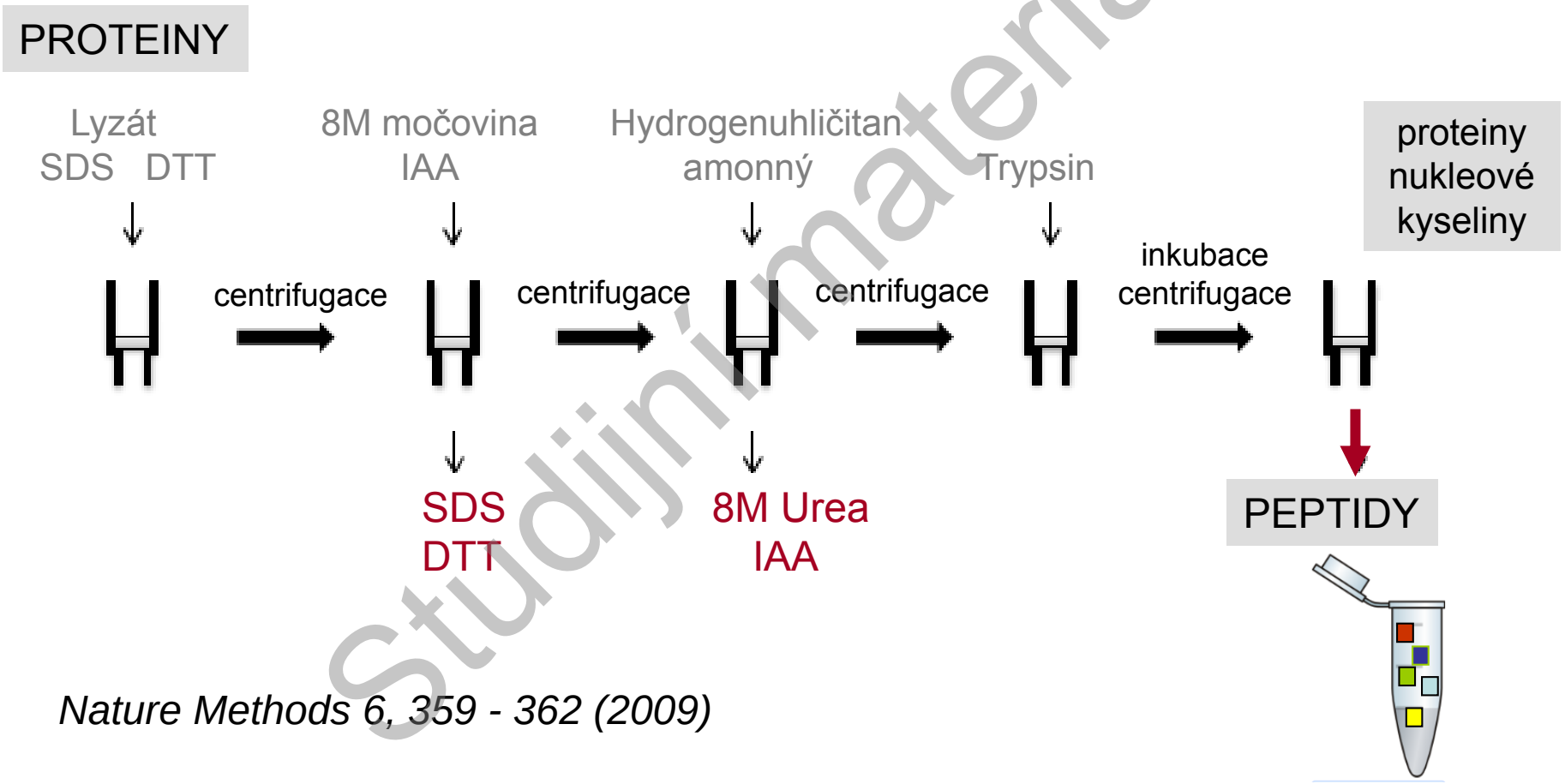
- Výběr vhodné proteinasy (event. kombinace proteinas)
- Redukce a alkylace S-S můstků před digescí
- Digesci ovlivňuje: poměr enzym:substrát, teplota, doba
- Kompatibilita roztoků s následnou MS
  - odstranění kontaminant – např. FASP, SP3



Studijní materiály

MS analýza proteinového vzorku

Digesce proteinů
FASP = filter aided sample preparation

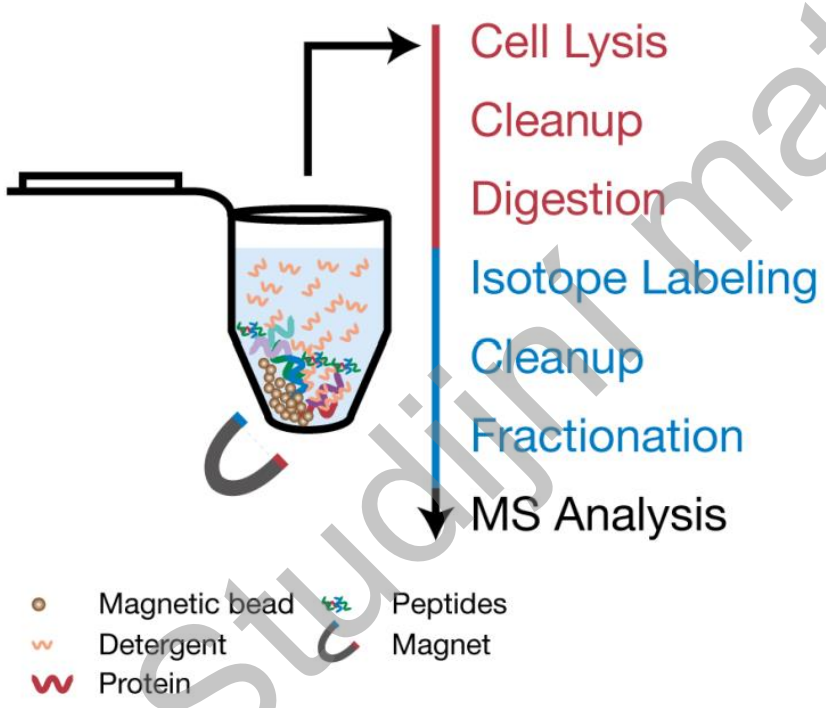


Nature Methods 6, 359 - 362 (2009)

Studijní materiály

MS analýza proteinového vzorku
Digesce proteinů

SP3 = Single-Pot Solid-Phase-enhanced Sample Preparation



Mol Syst Biol. 2014;10:757

Studijní materiály

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:

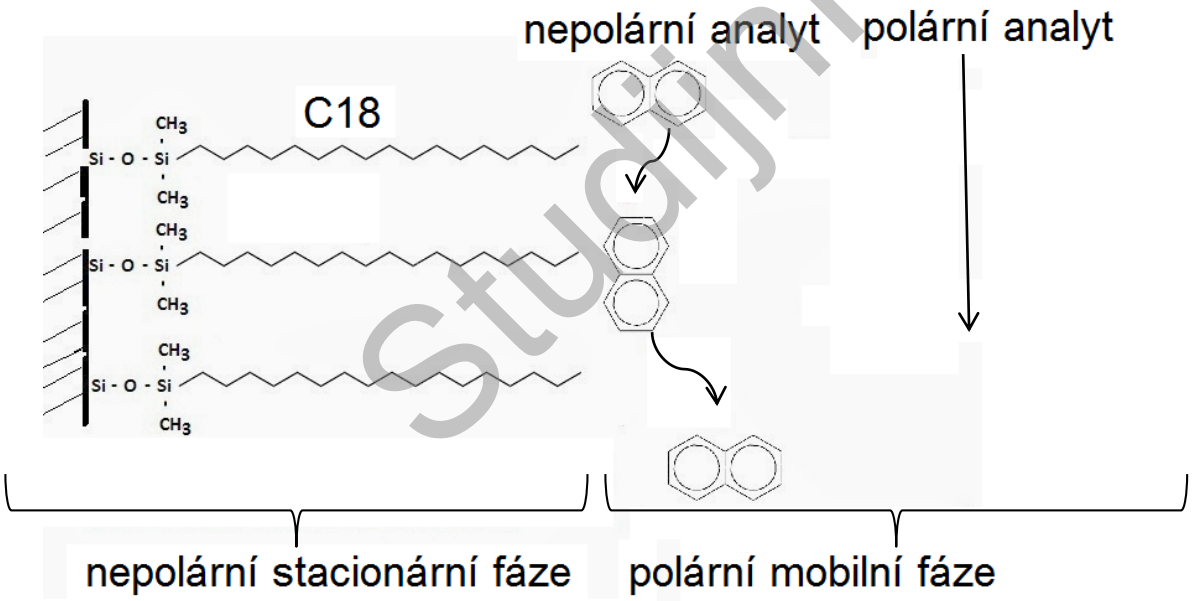
- Charakter kolony
- Složení mobilní fáze
- Fyzikálně-chemická povaha peptidů
  (náboj, polarita, hydrofobicita, velikost)

Studijní materiály

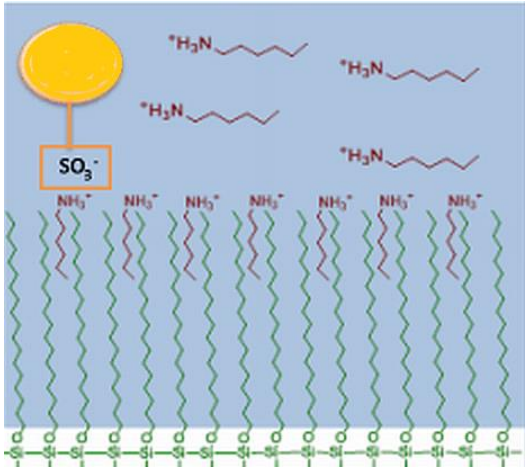
MS analýza proteinového vzorku
Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni peptidů
Frakcionace peptidů v roztoku pomocí LC

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 fází
- Separaci ovlivňuje: teplota, rozměry kolony, stacionární fáze, velikost částic, iontově-párující činidla, gradient



Iontově párující činidla

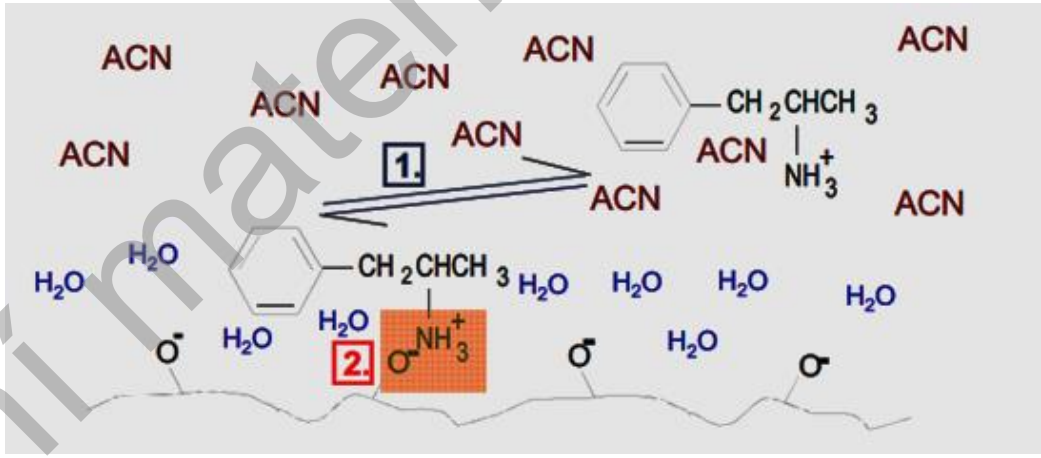


Studijní materiály

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



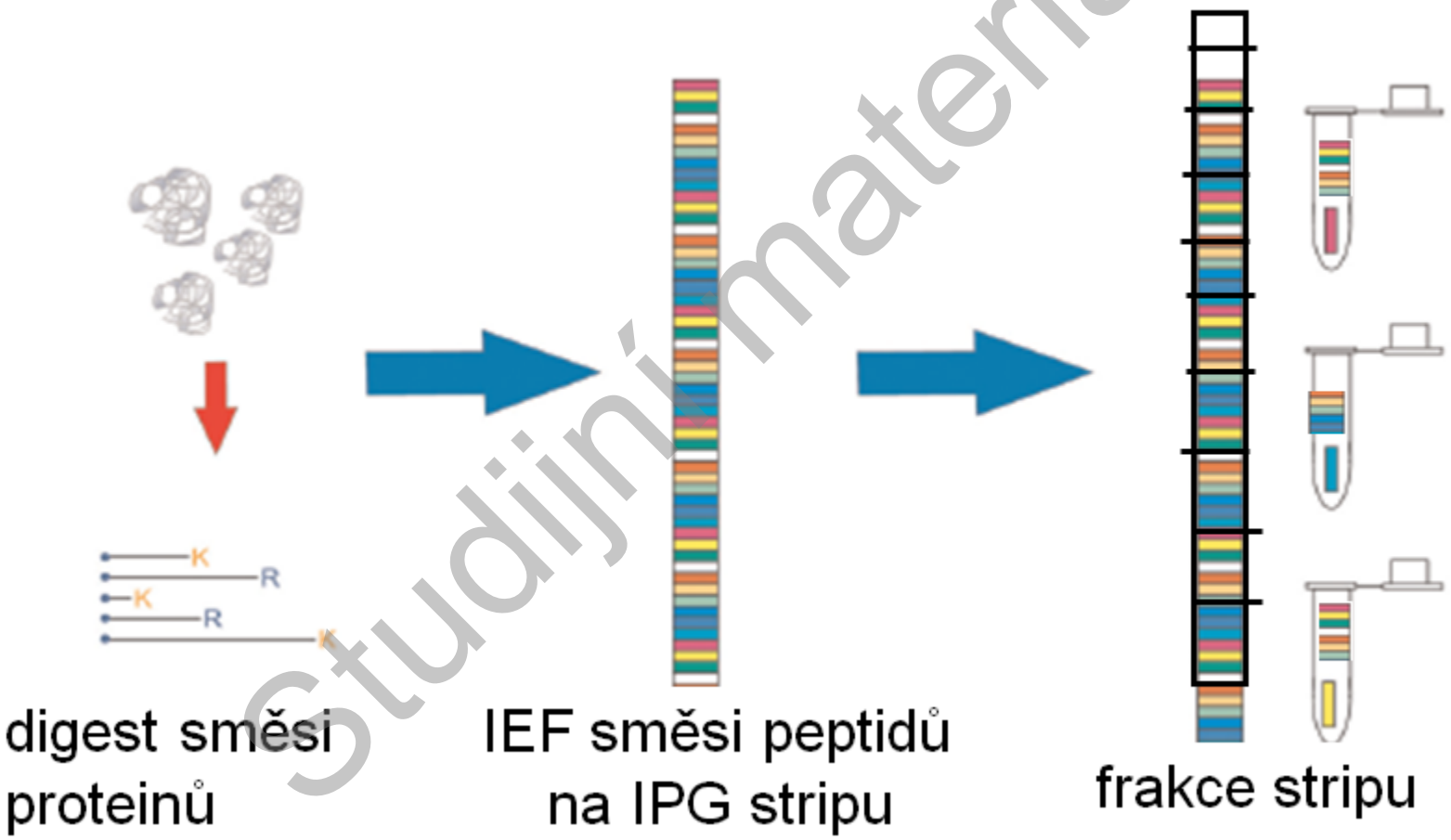
1. Distribuce mezi vodnou a organickou vrstvou
2. Iontoměničová interakce se skupinami stacionární fáze

- hydrofilní stacionární fáze
  - **Silica, Si-OH $\rightleftharpoons$ $Si\text{-}O^{(-)}H^{(+)}$**
  - **Amine, $-(CH_2)_3-NH_2$**
  - **Diol, $-(CH_2)_3-O-CH_2-(CHOH)CH_2OH$**
  - **Amide, $-(CH_2)_n-(CO)NH_2$**
  - **Zwitterionic, $-(CH_2)_n-N(Me)_2^{(+)}-(CH_2)_n-SO_3^{(-)}$**

- Vhodná pro separaci posttranslačně-modifikovaných peptidů

Studijní materiály

MS analýza proteinového vzorku
Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni peptidů
Frakcionace peptidů na IPG stripu



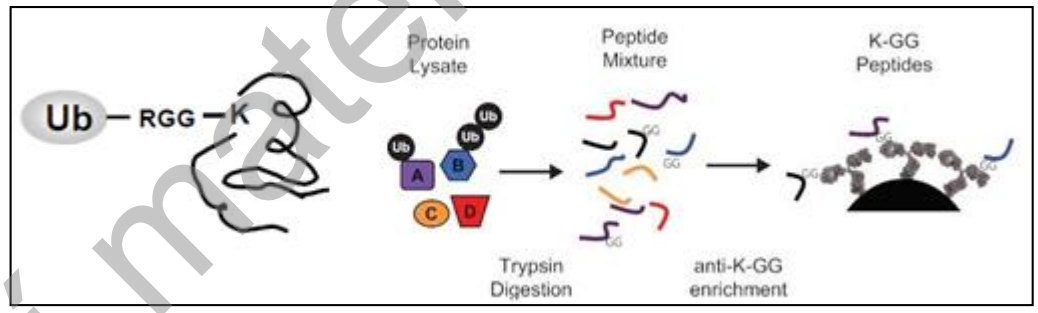
Studijní materiály

MS analýza proteinového vzorku

Obohacení peptidů

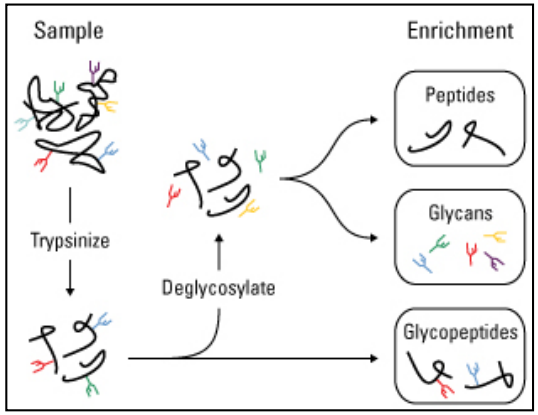
Obohacení specifických posttranslačně modifikovaných peptidů

- Fosforylace
- Ubiquitinylace
- Glykosylace
- Acetylace



Přístupy:

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

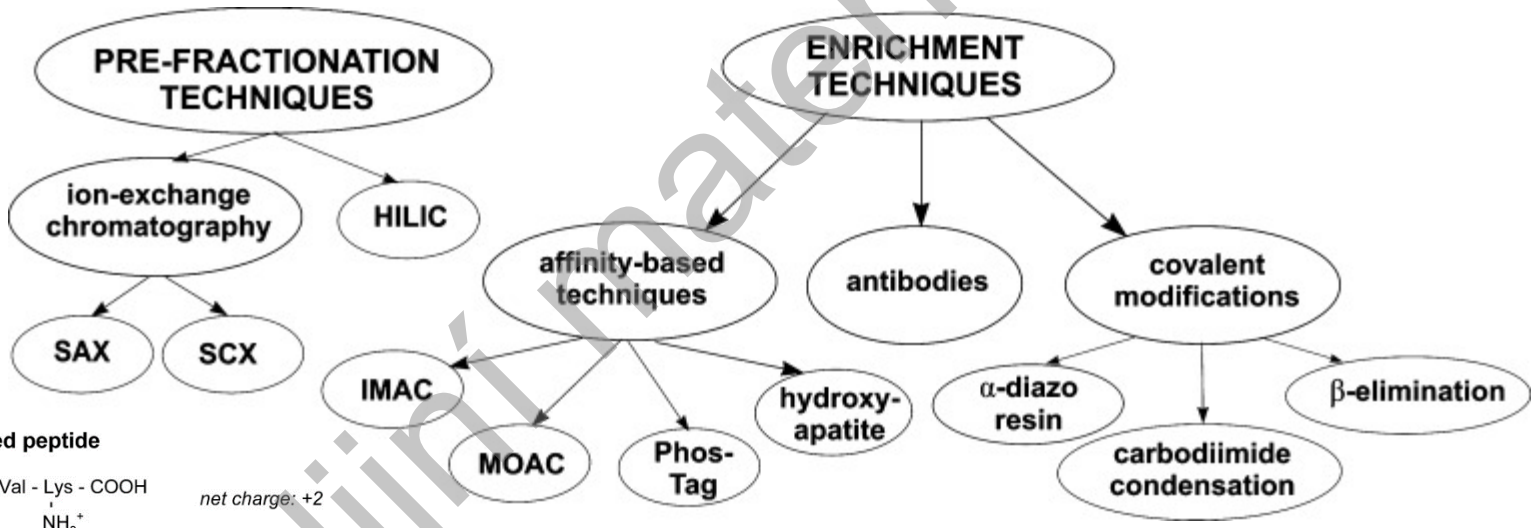


Studijní materiály

MS analýza proteinového vzorku

Obohacení peptidů

- Přístupy pro obohacení fosfopeptidů



SCX

typical non-phosphorylated peptide

NH_3^+ - Ala - Gly - Glu - Thr - Pro - Val - Lys - COOH
COOH NH_3^+

net charge: +2

typical phosphorylated peptide

NH_3^+ - Ala - Gly - Ser - Thr - Pro - Val - Lys - COOH
PO_4^- NH_3^+

net charge: +1

multiply-phosphorylated peptide

NH_3^+ - Ala - Gly - Ser - Thr - Pro - Val - Lys - COOH
PO_4^- PO_4^- NH_3^+

net charge: 0

C-terminal non-phosphorylated peptide

NH_3^+ - Ala - Gly - Glu - Thr - Pro - Val - Gly - COOH
COOH

net charge: +1

Studijní materiály

DOTAZY?

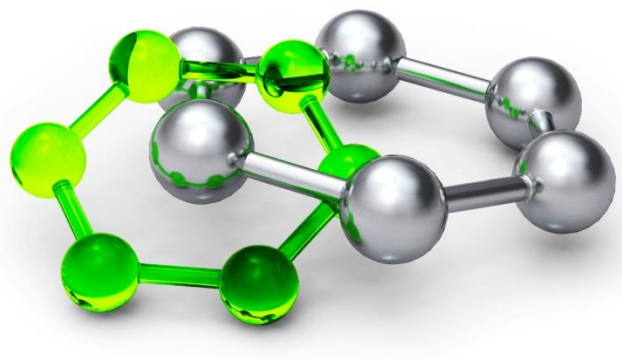
CEITEC

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

2007–13
OP Research and Development for Innovation



Studijní materiály