



Oddělení funkční genomiky a proteomiky

Národní centrum pro výzkum biomolekul

Přírodovědecká fakulta MU



CEITEC



Charakterizace proteinů hmotnostní spektrometrií

C7250

Část III

Zbyněk Zdráhal

Výzkumná skupina Proteomika, CEITEC-MU

Centrální laboratoř-Proteomika, CEITEC-MU

Funkční genomika a proteomika, NCBR PŘF

zdrahal@sci.muni.cz



Pečlivá příprava vzorku – základní kámen úspěchu



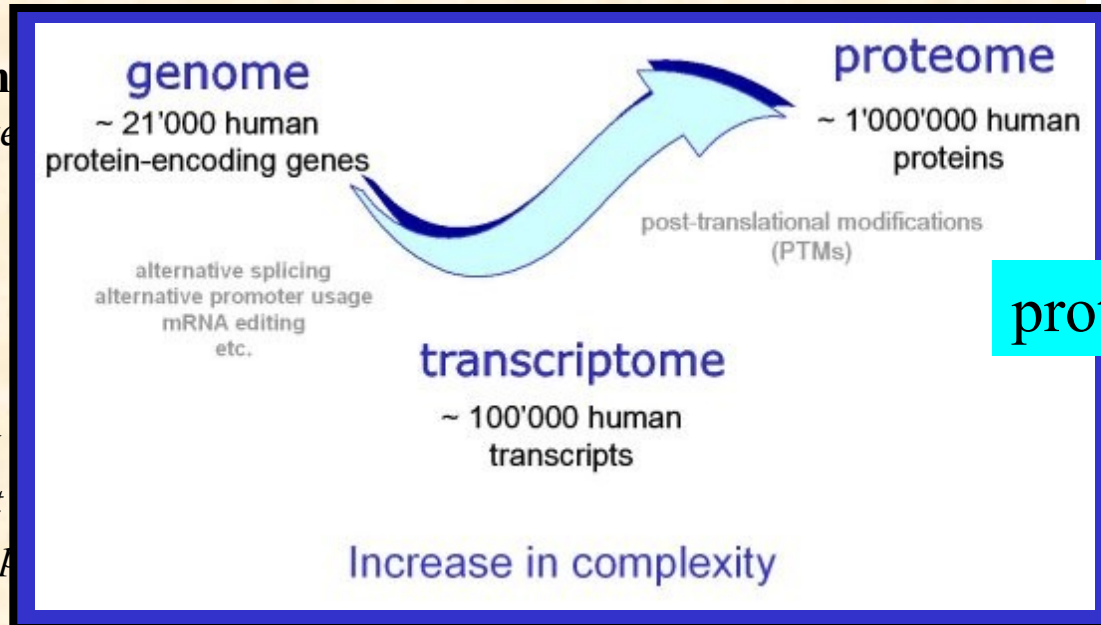
zachování původního proteinového složení
zachování modifikací (např. inhibitory fosfatáz)
odstranění kontaminant rušících koncovou MS
analýzu

...



Analýza proteomu

- **protein**
lidský ge



- **široký**
nutnost reakce p

- **široké spektrum fyzikálně-chemických vlastností**

- **analýza komplexů**

pro úplné pochopení buněčných procesů mnohdy nestačí prostá identifikace jednotlivých proteinů, cca 80% je funkčních jako součást komplexů

oba PCR



Frakcionace/separace

cíl – **zjednodušení extrémně komplexní směsi**
oddělit specifickou skupinu proteinů/peptidů (např. fosfopeptidy)

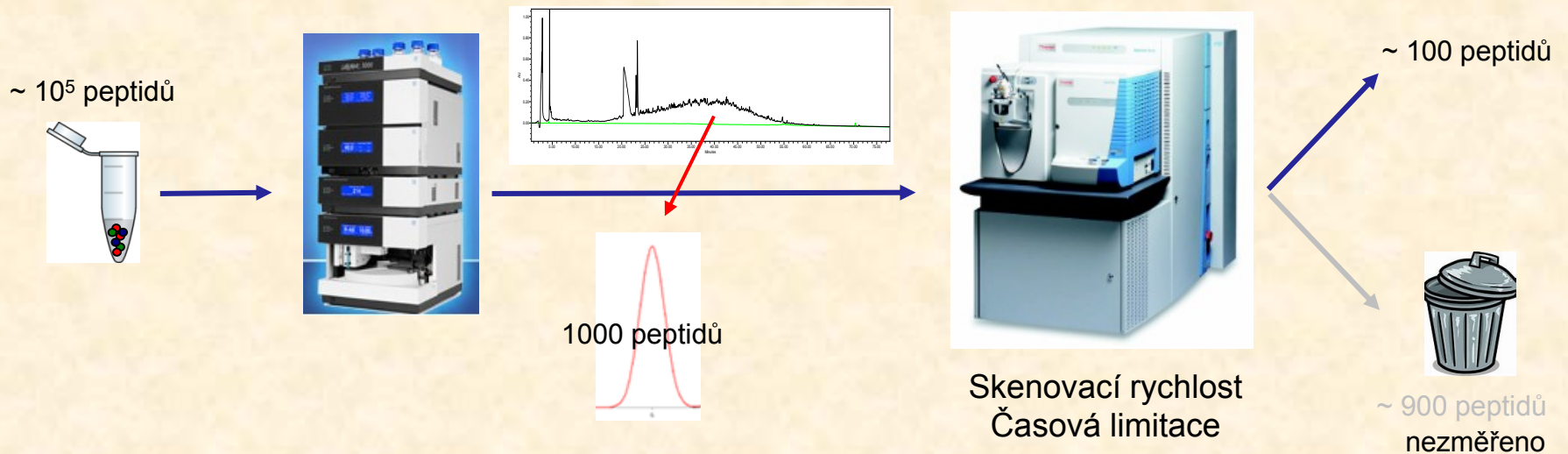
Základní důvod pro zjednodušení směsi – **získání kompletnější informace**

nutnost kombinovat různé techniky – **vícerozměrná separace**

volba vhodné kombinace pro daný experiment

(dalším rozměrem separace může být i zvolená MS koncovka)

Přímá LC-MS/MS analýza



Metody frakcionace/separace

elektroforetické techniky:

- ✿ isoelektrická fokusace (v gelu, v roztoku)
- ✿ SDS PAGE
- ✿ 2D gelová elektroforéza (DIGE)
- ✿ kapilární elektroforéza

imunoprecipitace

chromatografické techniky:

- ✿ kapalinová chromatografie
 - **reverzní fáze**
 - iontoměnič
 - molekulové síto
 - afinitní (IMAC, MOAC, protilátka)
 - HILIC (hydrophilic interaction chromatography)

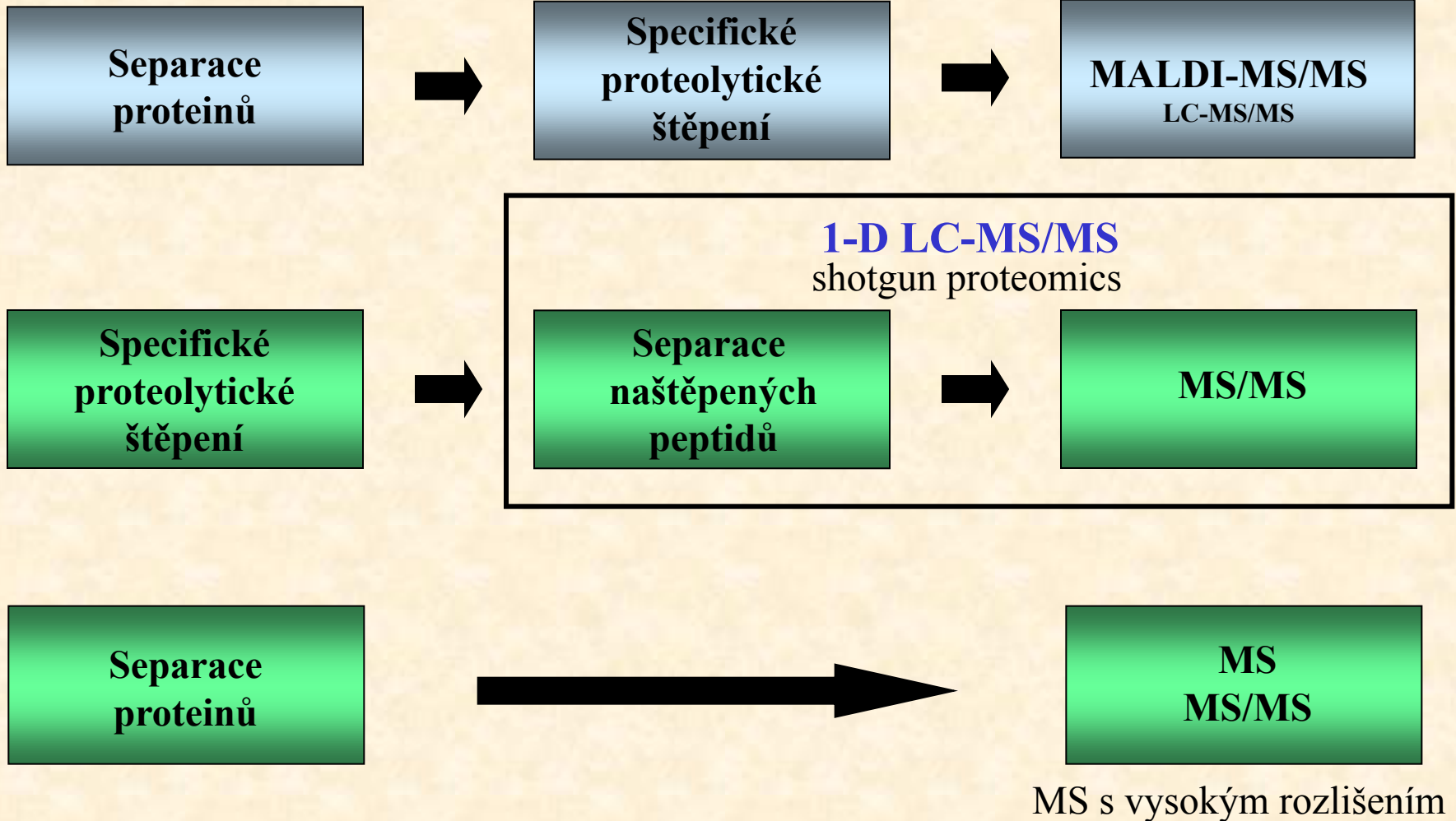
✿ off-line

✿ on-line

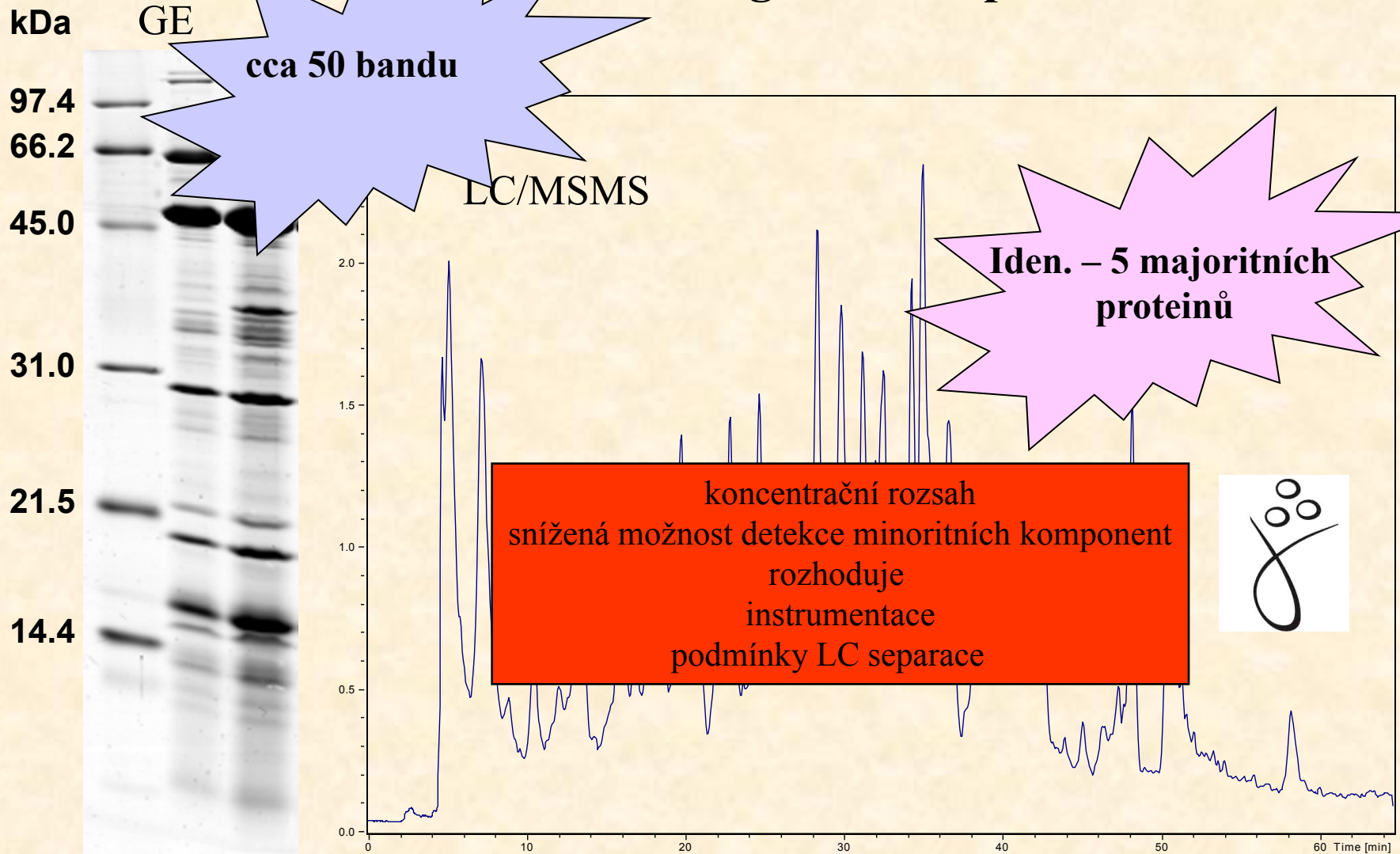
Standardní 1-D postupy

(JEDNODUCHÉ) SMĚSI

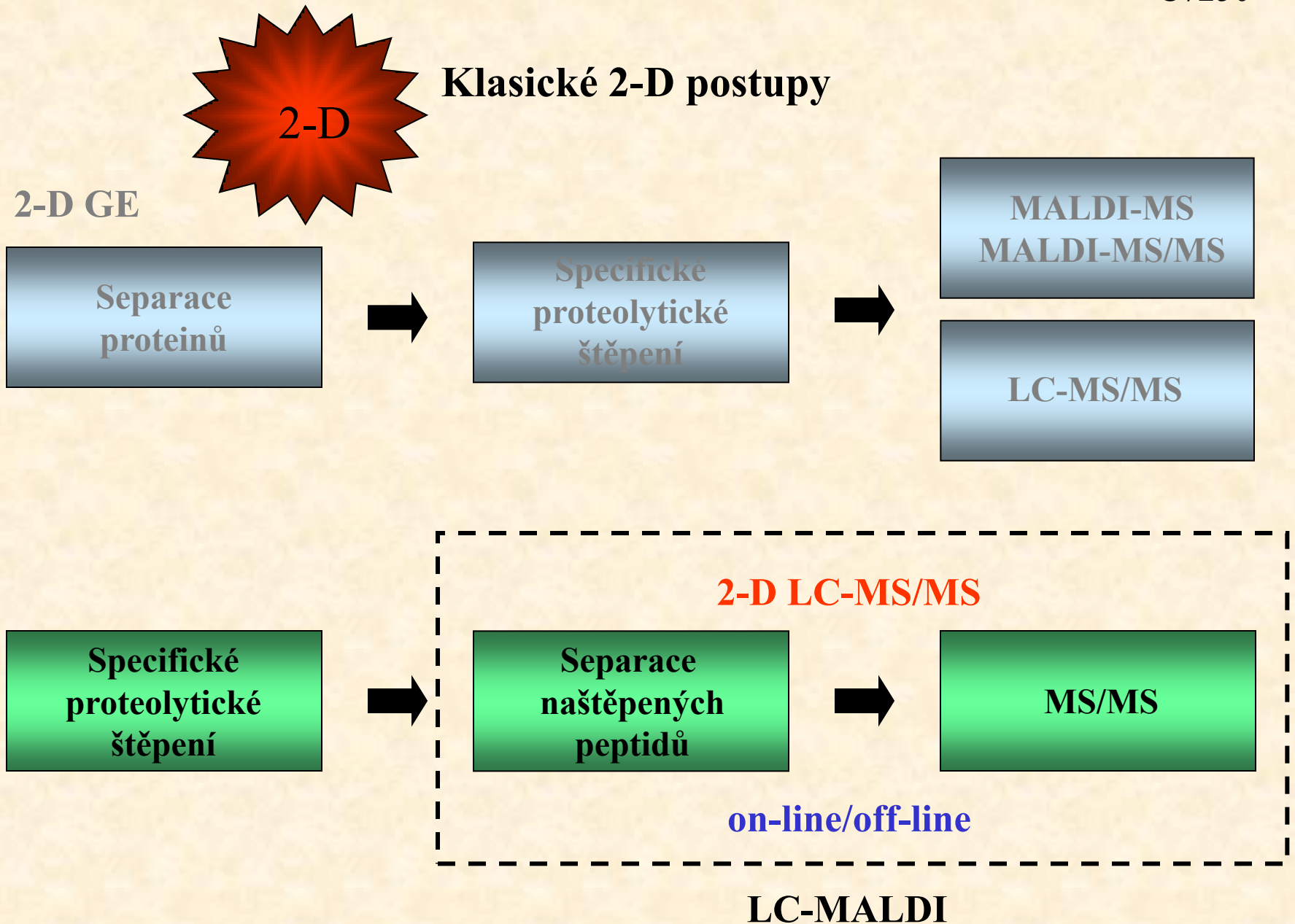
1-D GE



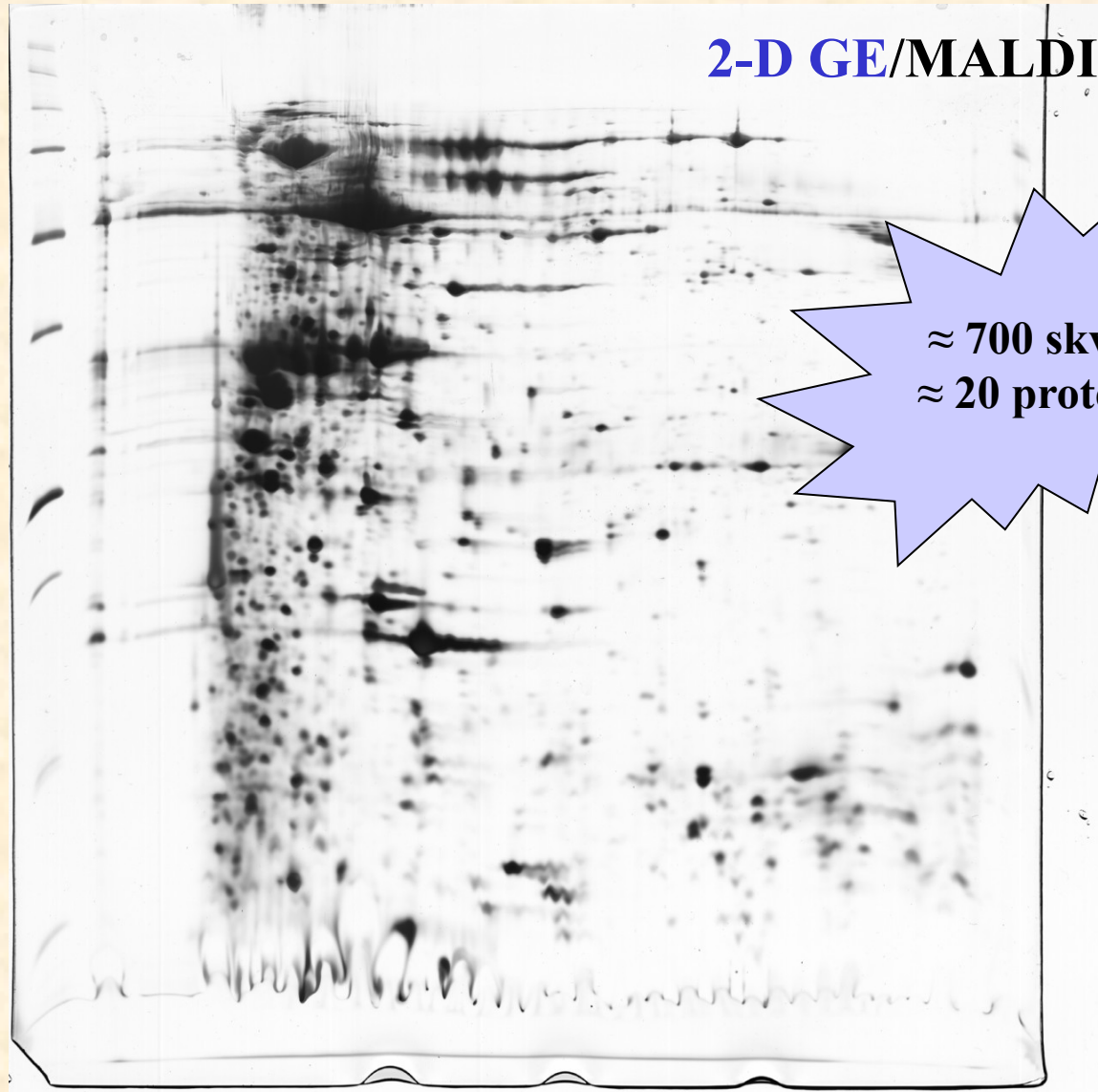
Proteinový extrakt fága – 1-D separace





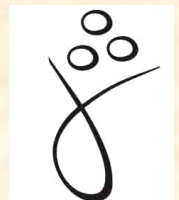


Proteinový extrakt fága – 2-D separace

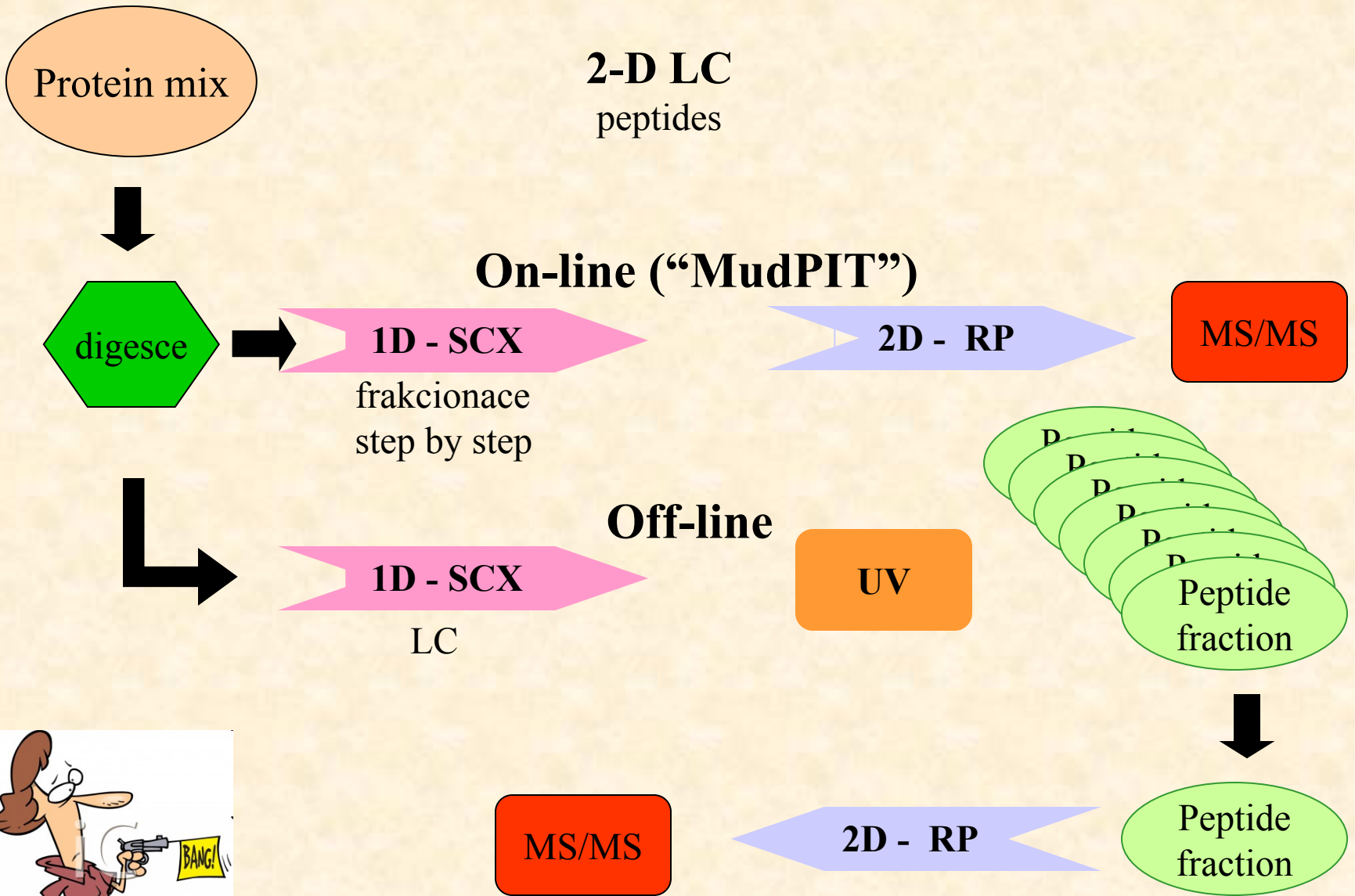


2-D GE/MALDI-MS

**≈ 700 skvrn
≈ 20 proteinů**



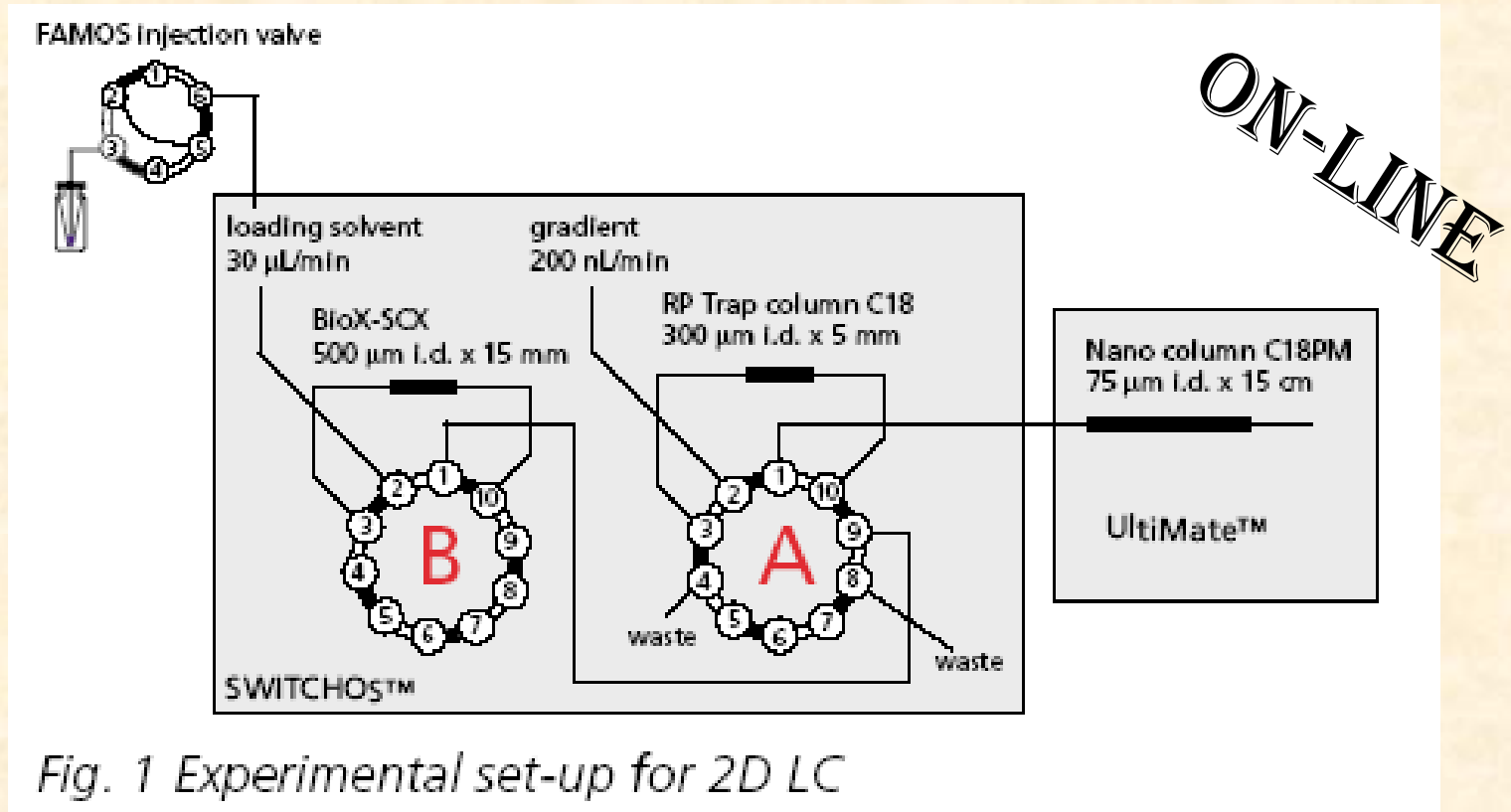
2-D LC peptides



MudPIT (multidimensional protein identification technology)

2-D LC peptides

ionex / RP



2-D LC (peptides)

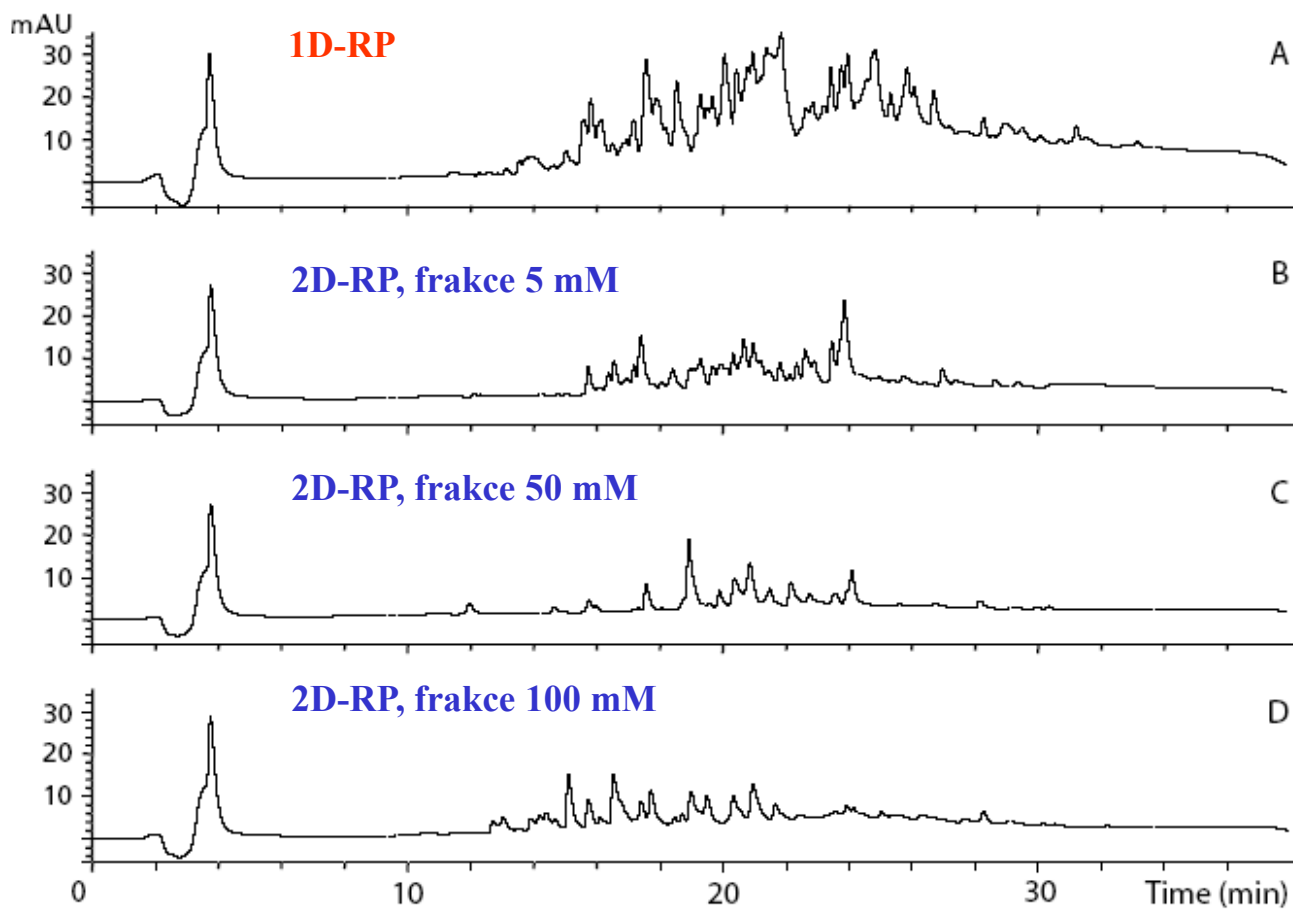


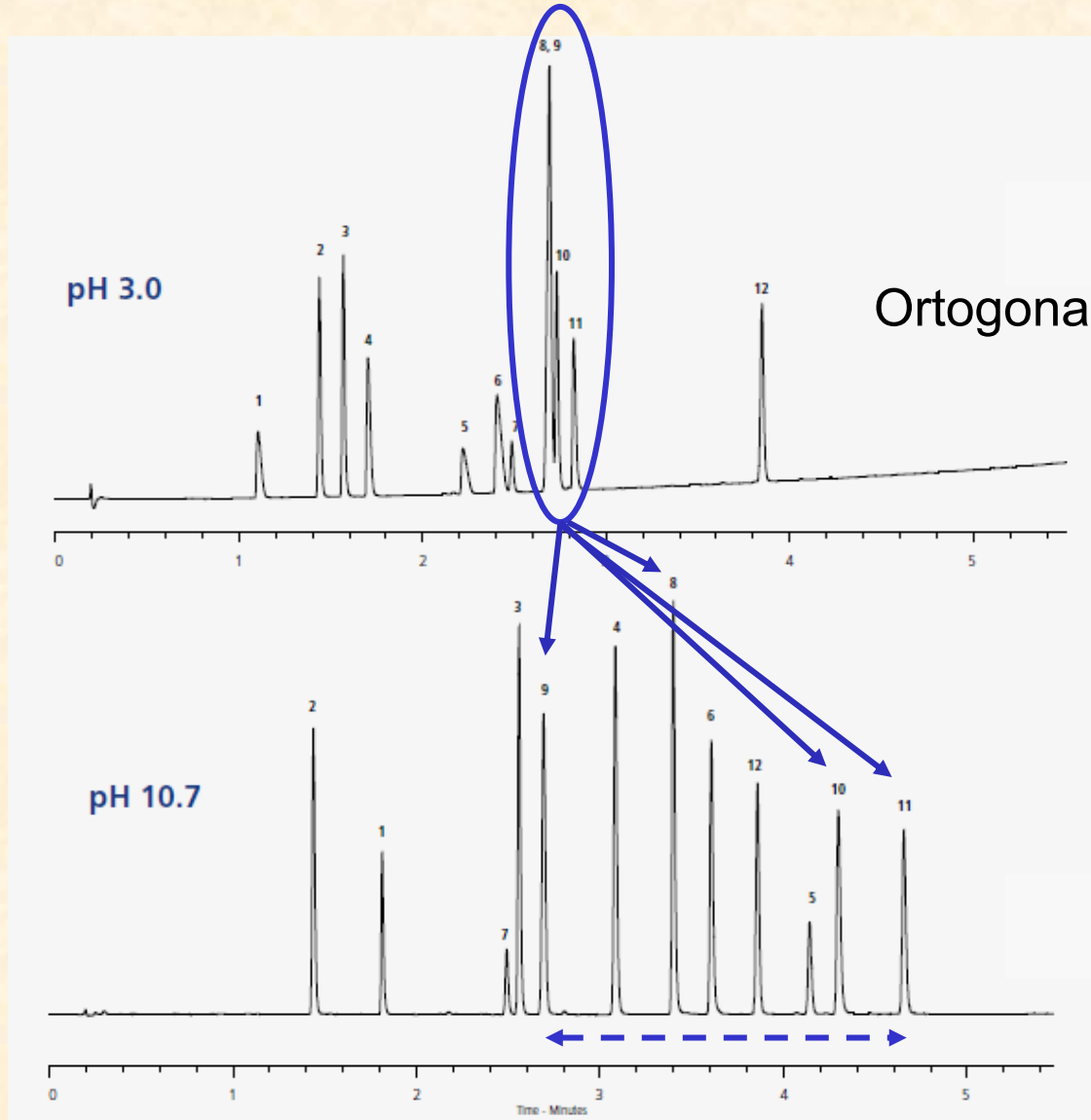
Fig. 2 Chromatograms of the digest mixture. Upper trace is the result of a separation without SCX. The next chromatograms are the result of the 5, 50 and 100 mM fractions. (Not all fractions are shown)

2-D LC (peptides)

C7250

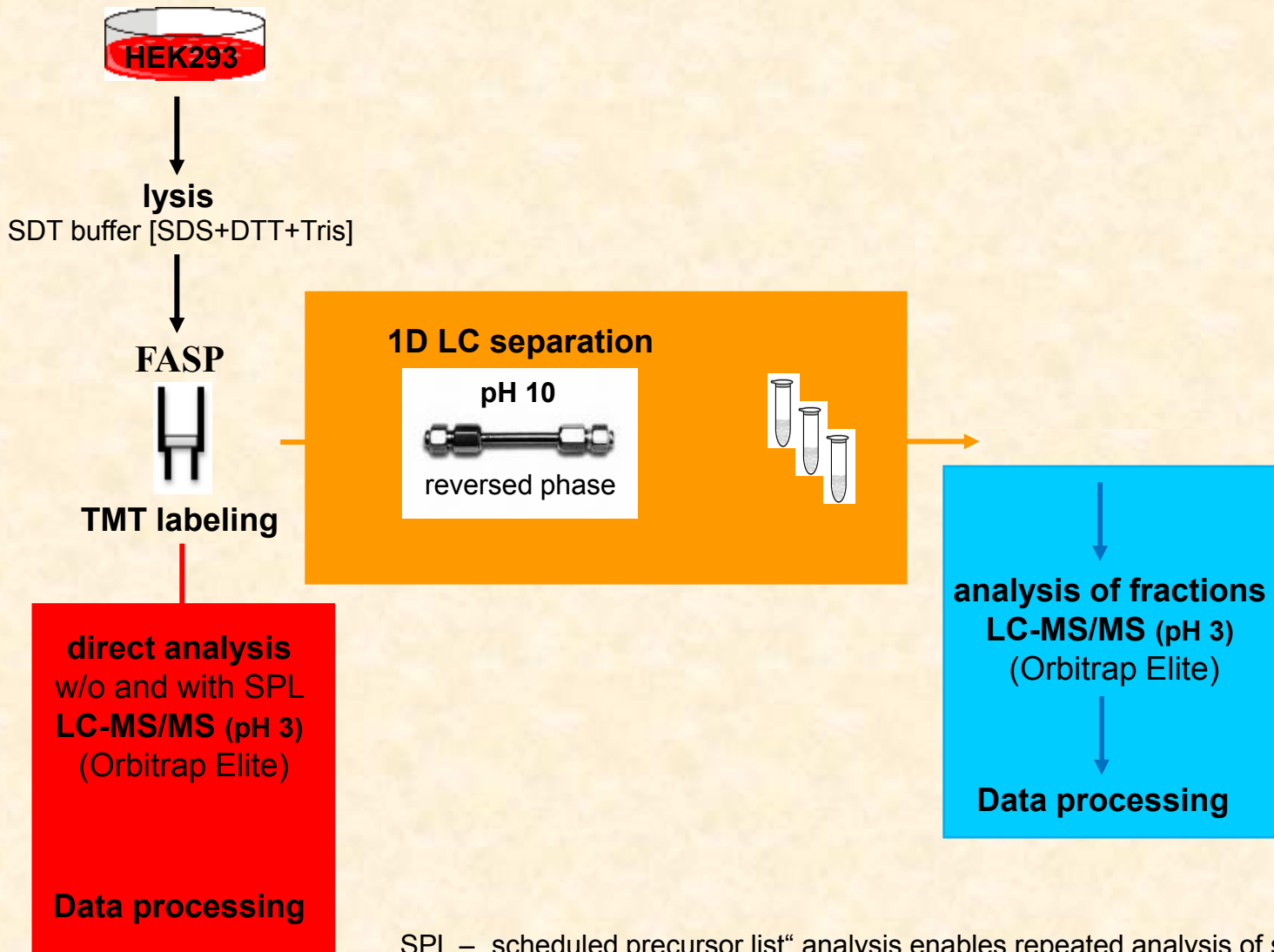
RP-RP

stejná stacionární fáze – jiné pH



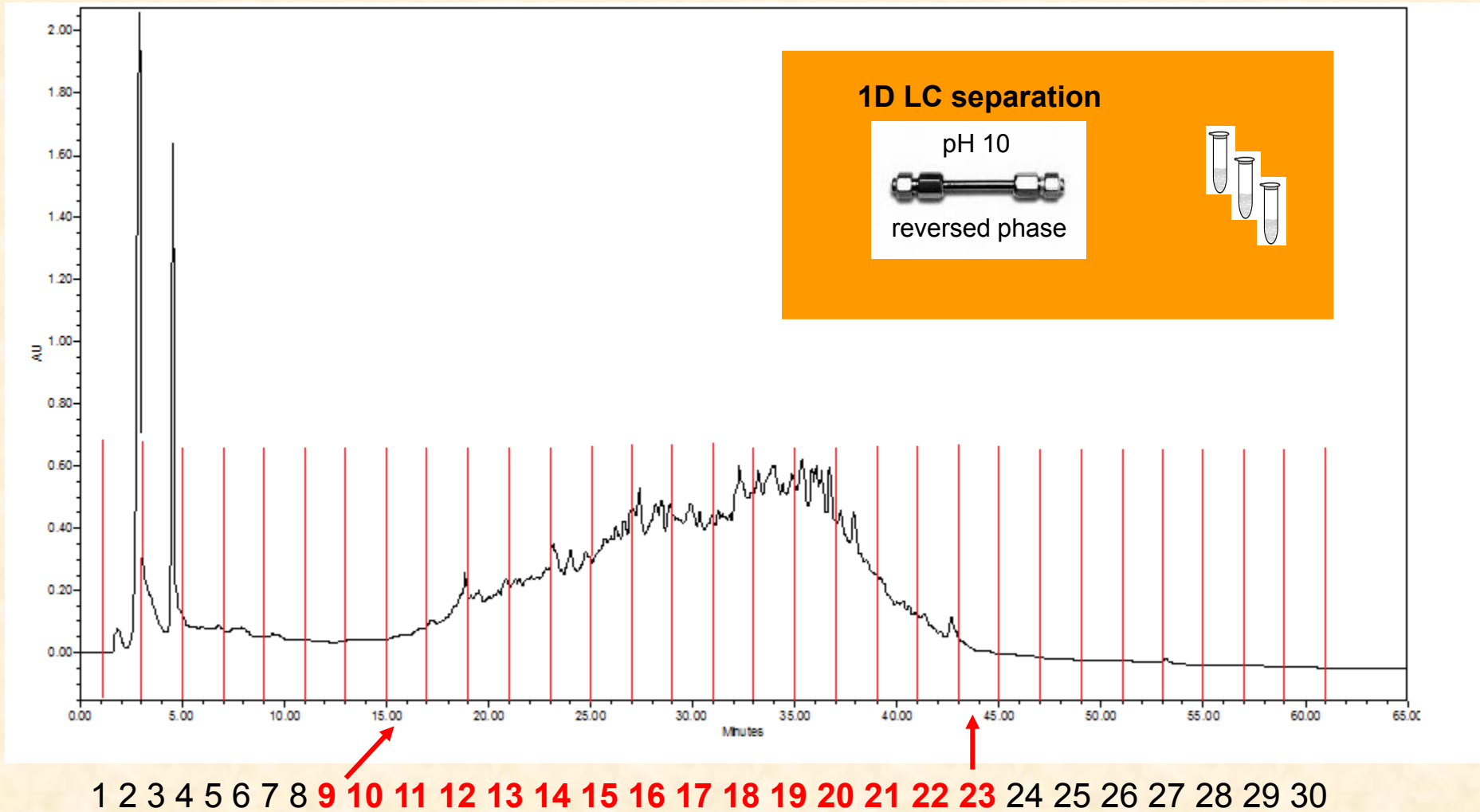
Characterization of proteome and phosphoproteome of HEK293 cells

cooperation with Assoc. Prof. Bryja group, FS MU



SPL – „scheduled precursor list“ analysis enables repeated analysis of sample with exclusion of already identified peptides in previous analysis

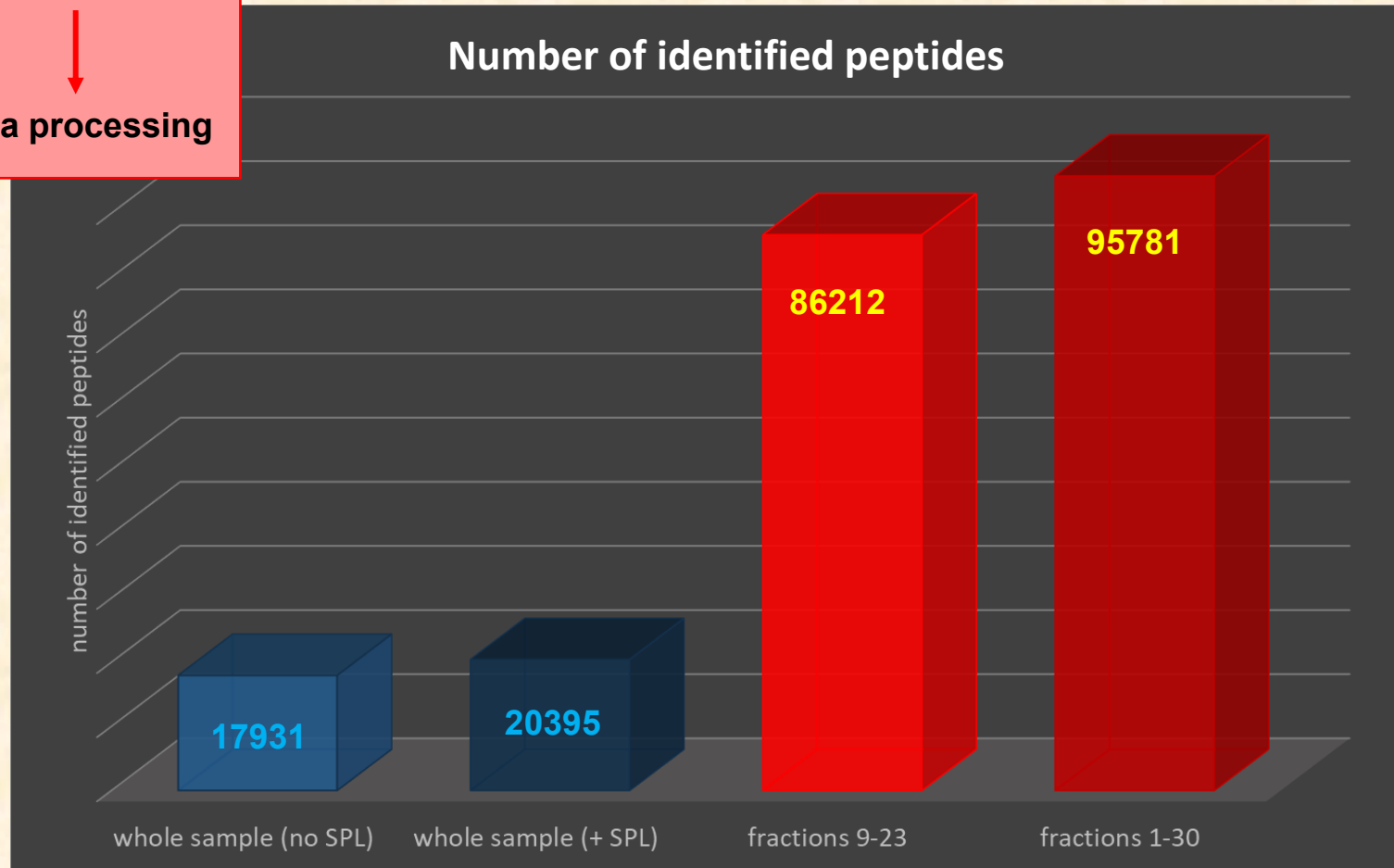
LC-separation of the digested sample in 1D (high pH)



direct analysis
w/o and with SPL
LC-MS/MS (pH 3)
(Orbitrap Elite)



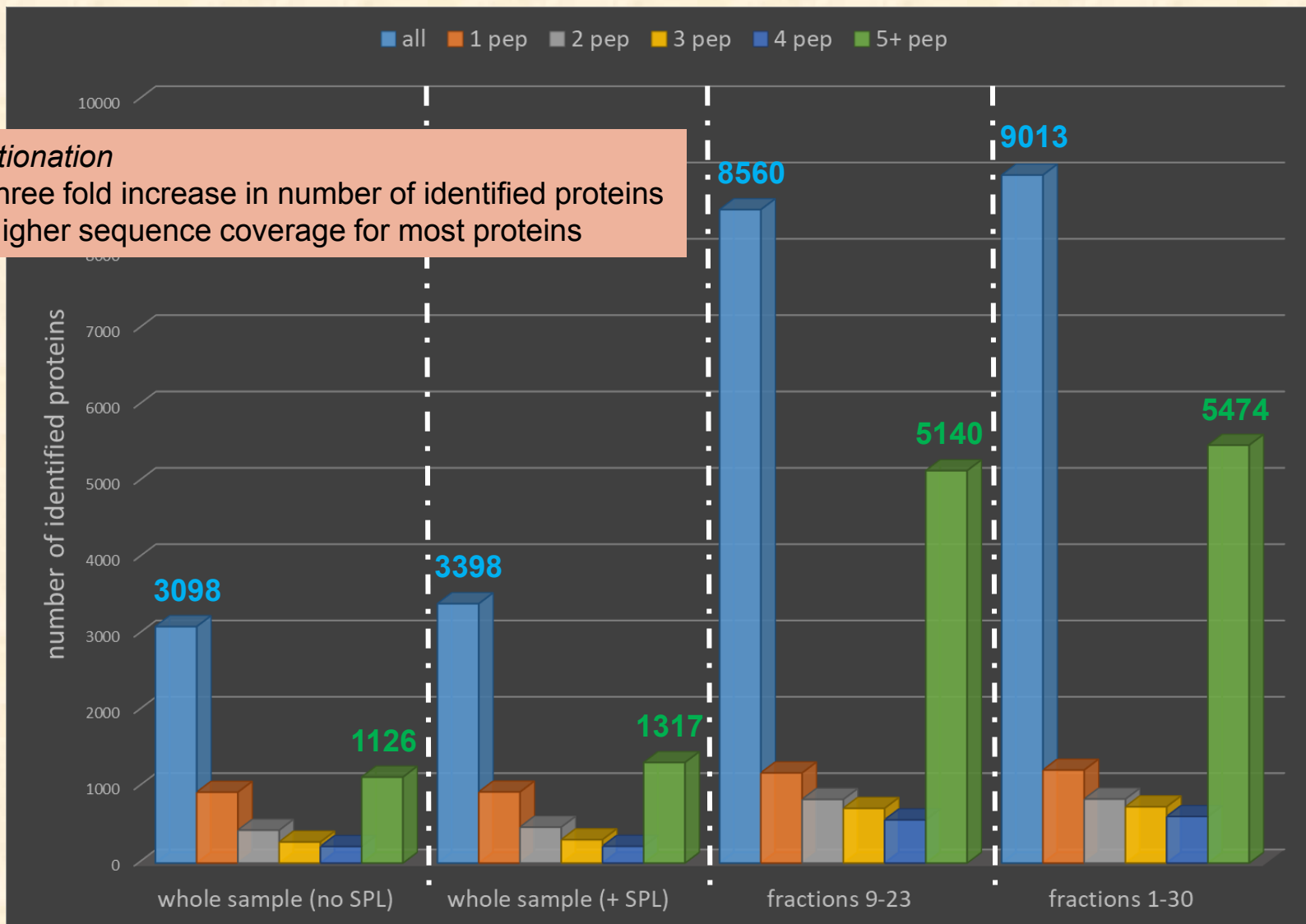
Data processing



Number of identified proteins

Fractionation

- three fold increase in number of identified proteins
- higher sequence coverage for most proteins



Průměr HPLC kolony vs citlivost

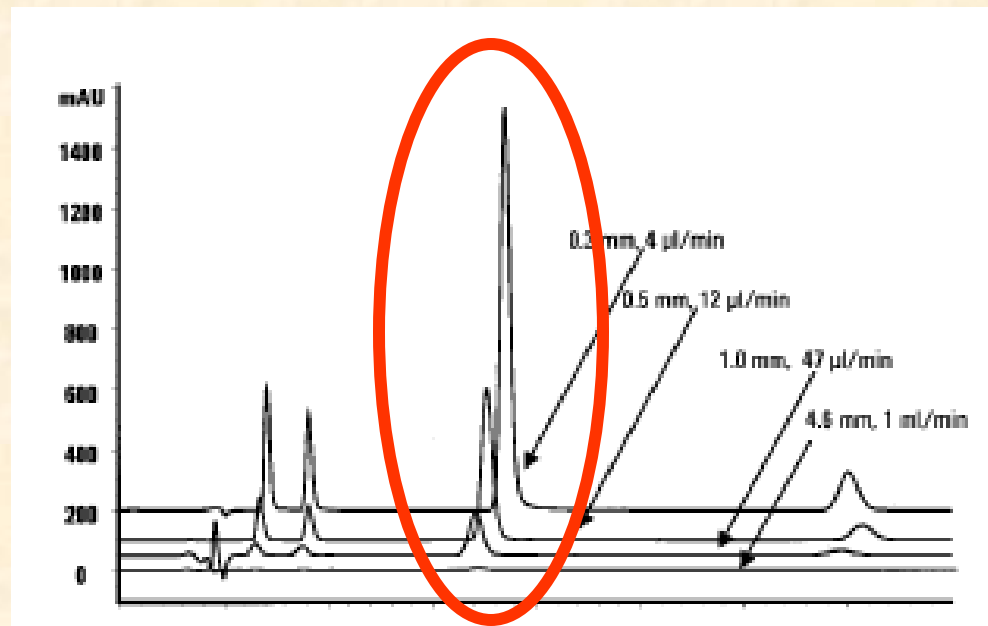


Figure 5 Mass sensitivity benefit. Injection of the same sample amount on HPLC columns with decreasing internal diameter. Stationary phase: ZORBAX® SB-C18; length: 150 mm; solvent: water/acetonitrile, 40/60; flow rate: see diagram; sample: isocratic checkout sample; injection volume: 0.1 µL; third peak: biphenyl, 200 ng; temperature: 25 °C; detection wavelength: 230 nm.

„Sensitivity increases with a decrease in column diameter because the **same sample mass (amount)** is eluted in a smaller volume. Therefore the concentration of the eluting peak is higher and the detection signal is stronger.“

Kapilární a nano kolony

- ✿ Zvýšení citlivosti
- ✿ Limitní množství vzorku
- ✿ Snížení spotřeby rozpouštědel



Table 27. Sensitivity Increase

COLUMN I.D. (mm)	TYPICAL FLOW RATE ($\mu\text{L}/\text{min}$)	THEORETICAL SENSITIVITY INCREASE ¹
4.6	1000	1
1.0	40	21
0.5	10	85
0.3	3	235
0.1	0.5	2100
0.075	0.3	3760

¹For same sample mass

2-D LC peptides

sorbenty

1-D: reverzní fáze (high pH)
ionex
HILIC
IMAC (fosfoproteiny)
affinity (lectin – glyko)

2-D: reverzní fáze

On-line vs Off-line

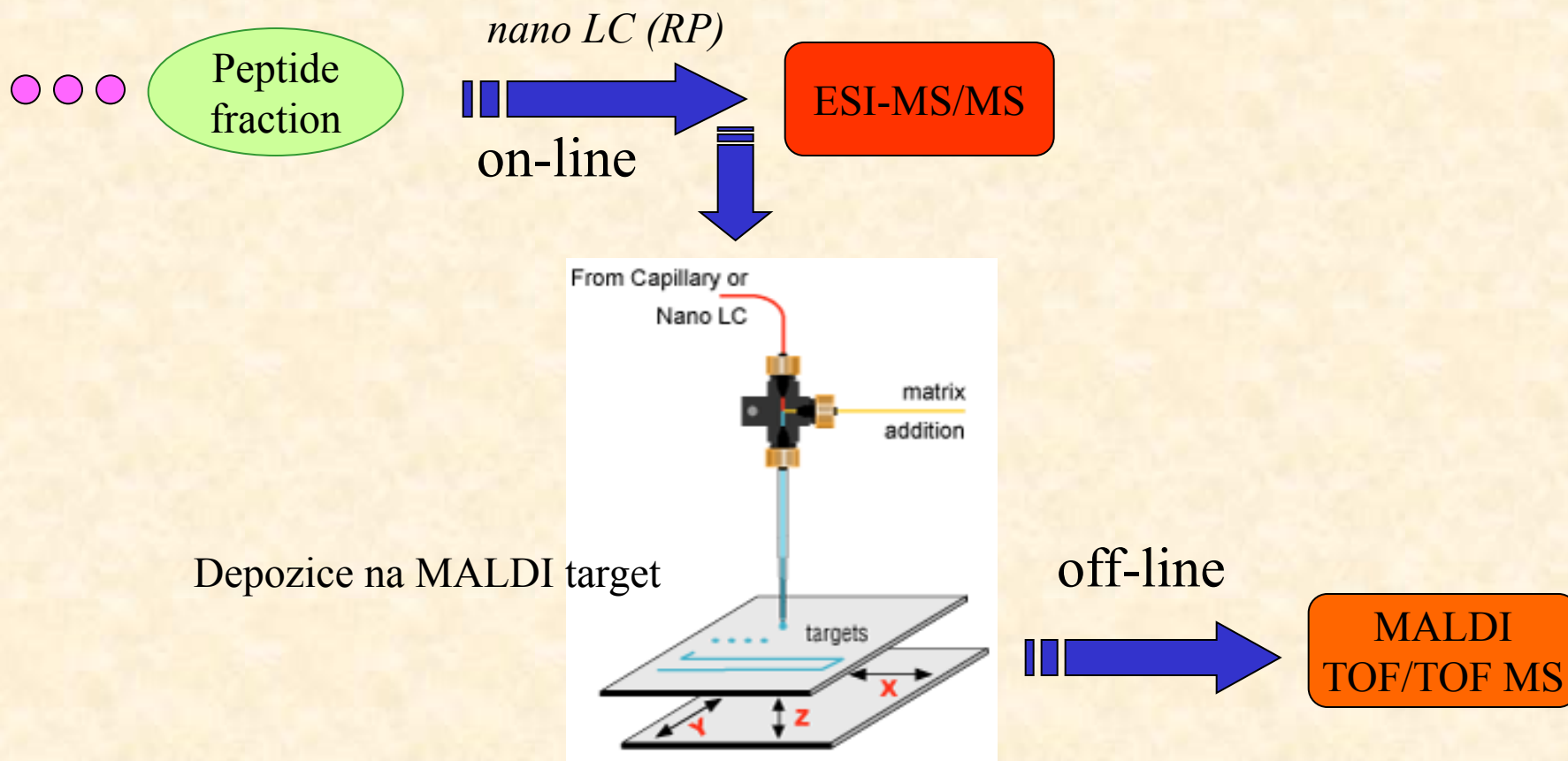
automatizace

flexibilita

optimalizace

kontinuální odběr frakcí

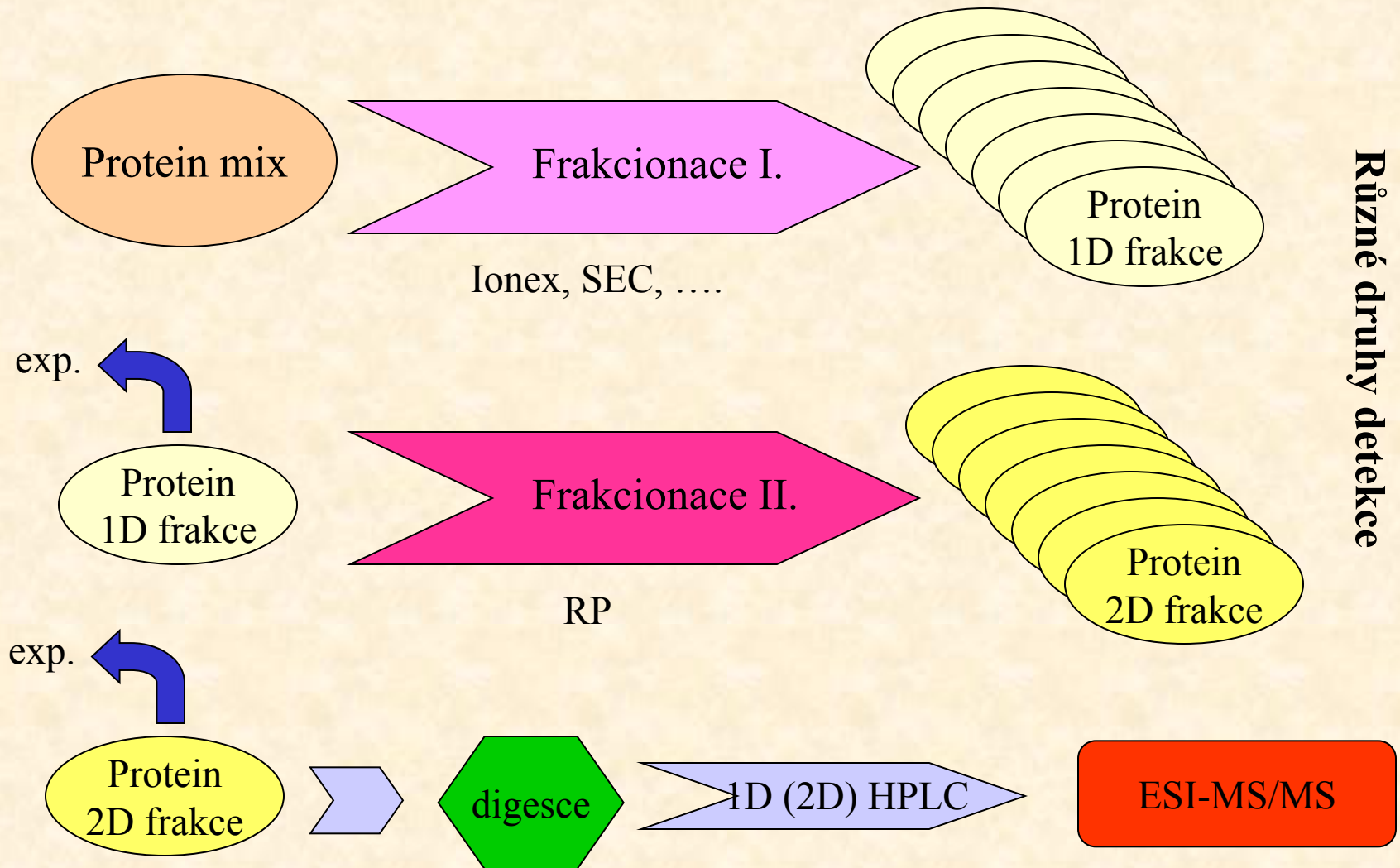
LC –MALDI (peptides)



Archivace



LC separace komplexních proteinových směsí



LC separace komplexních proteinových směsí

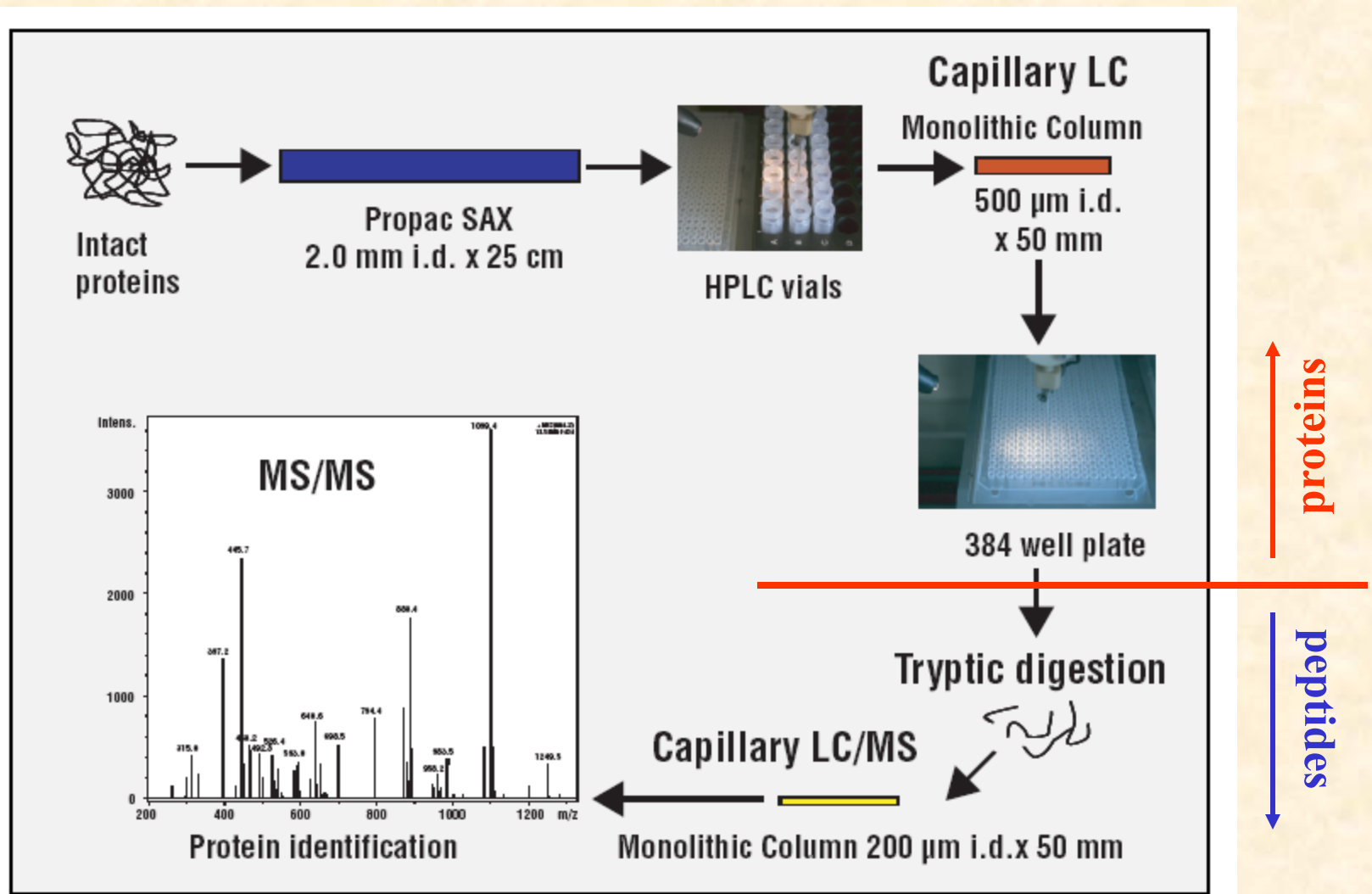
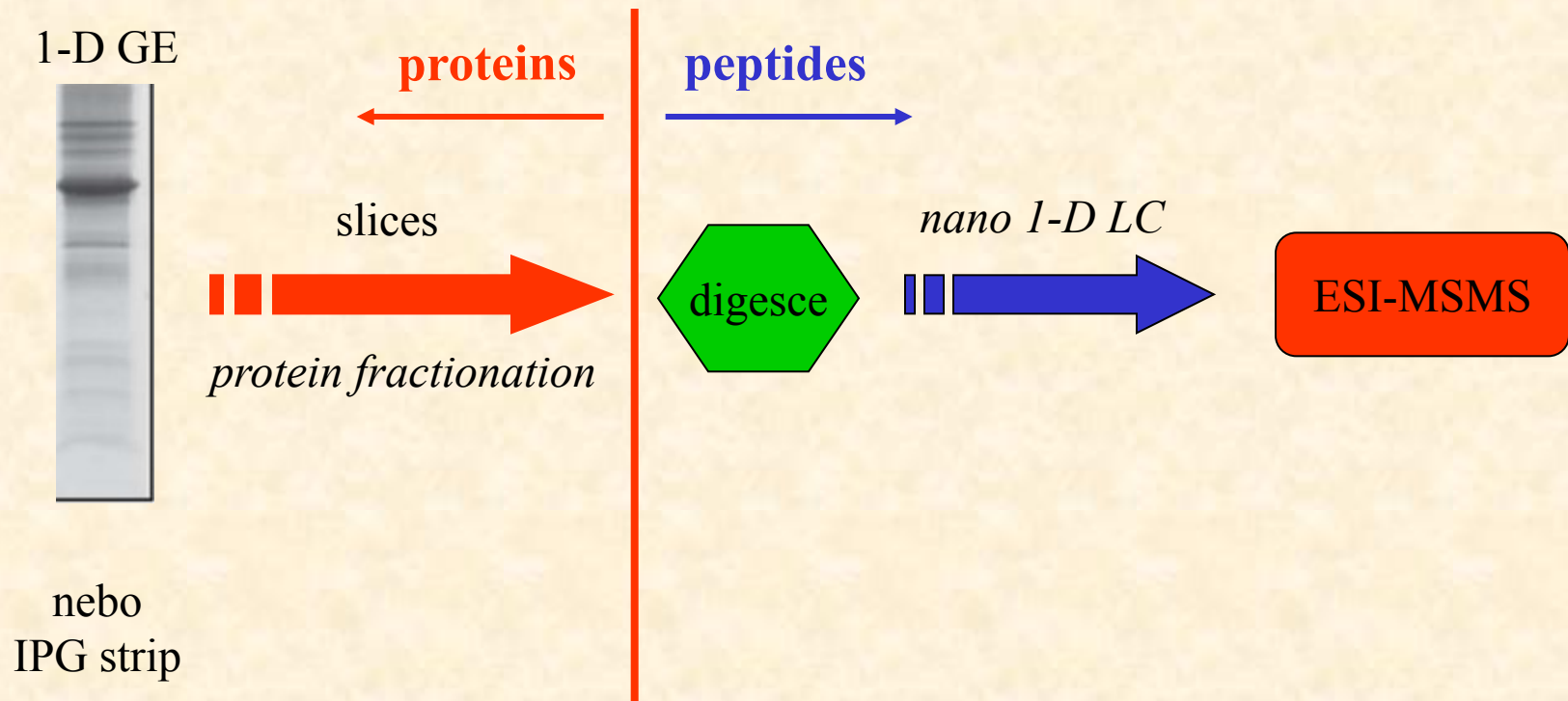
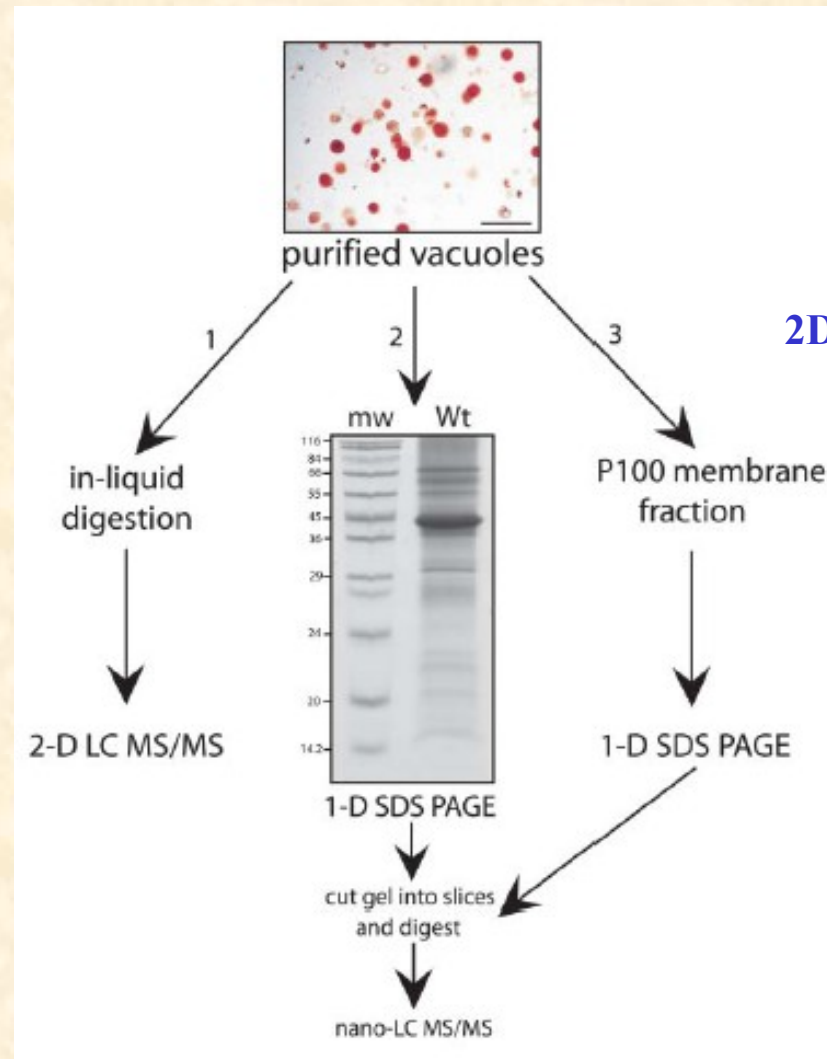


Figure 1: Multidimensional LC work flow.

Kombinace GE a HPLC separace



2D-On-line



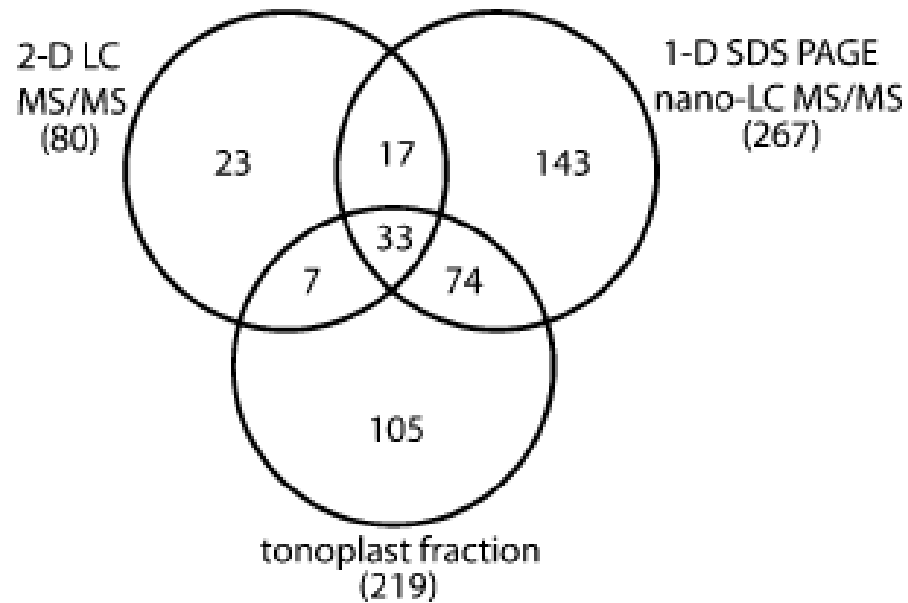


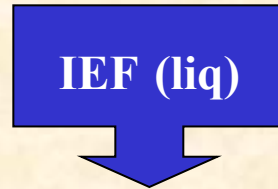
Figure 2. Distribution of Identified Proteins by Different Methods.

Overlap of the different protein sets is shown. Numbers in parentheses indicate the total number of proteins found by a particular method.

Celková analýza proteomu (screening)

Depletovaná plazma
(3500 – 9000 proteinů ??)

0. rozměr



1. rozměr

20 frakcí



2. rozměr

1600 frakcí

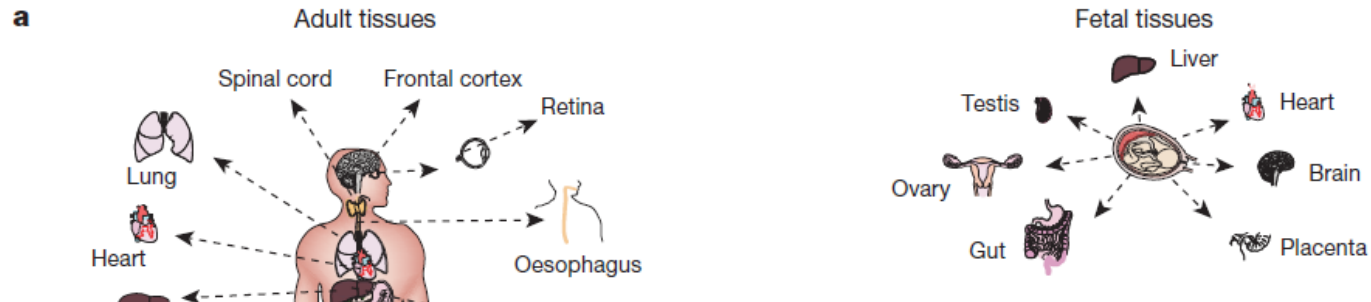


3/4. rozměr

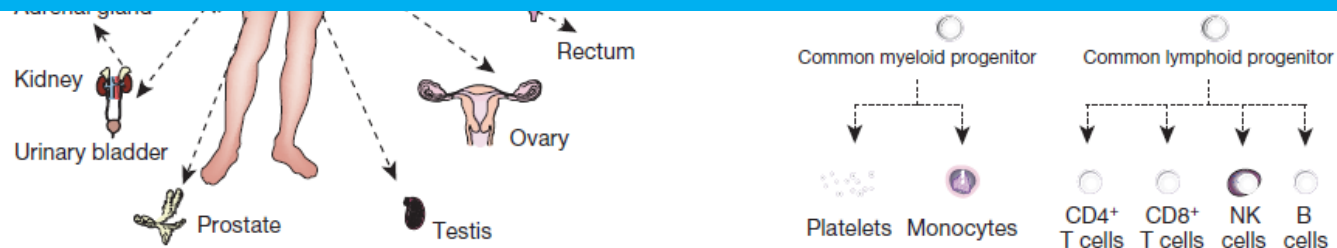
∞ frakcí

A draft map of the human proteome

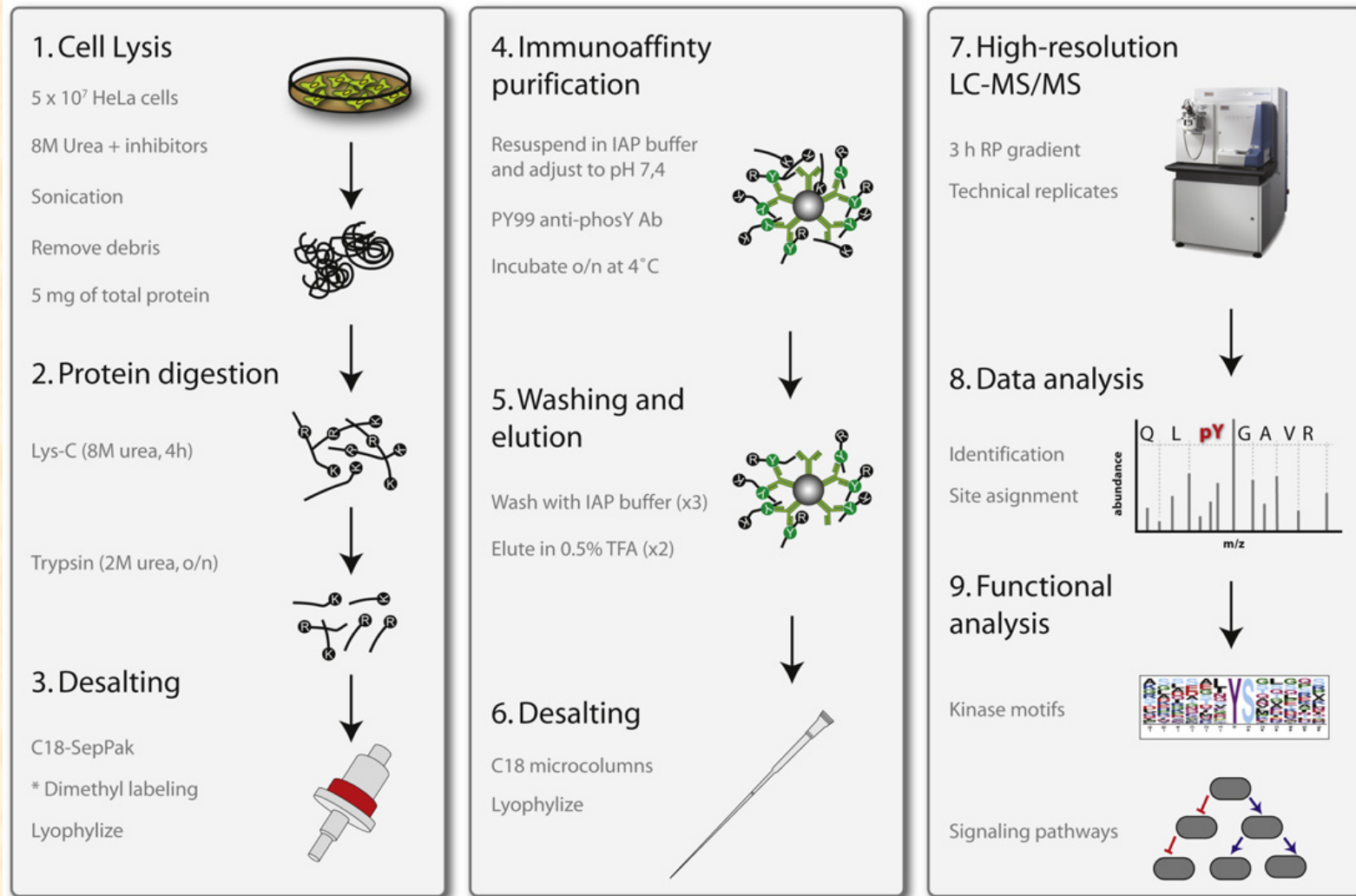
Min-Sik Kim et al., Nature 509, 575-581 (2014) doi:10.1038/nature13302



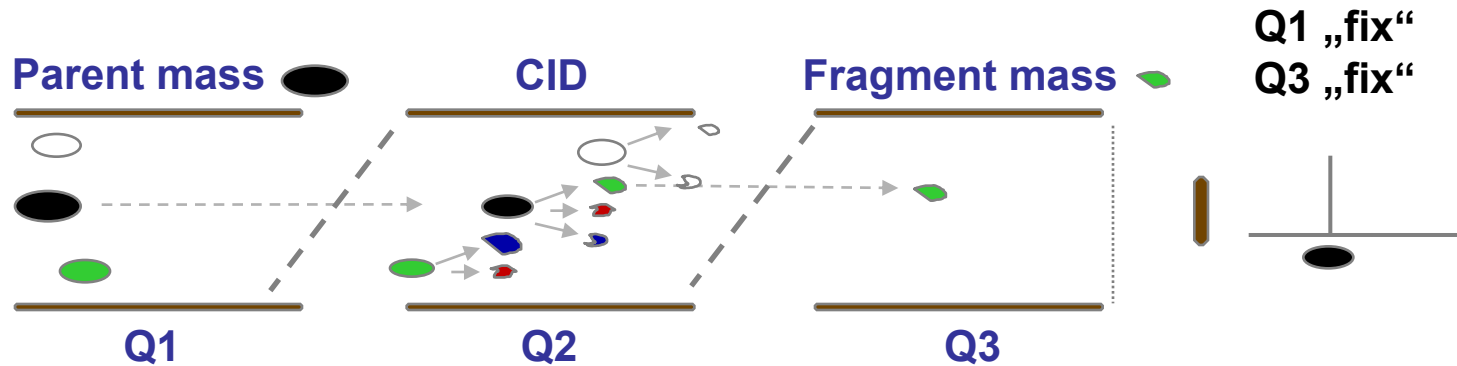
**293 000 non redundant peptides
corresponding to proteins encoded by 17294 genes**



Cílená analýza imunoafinitní frakcionace (Y(phos))



Cílená analýza jednotlivých proteinů



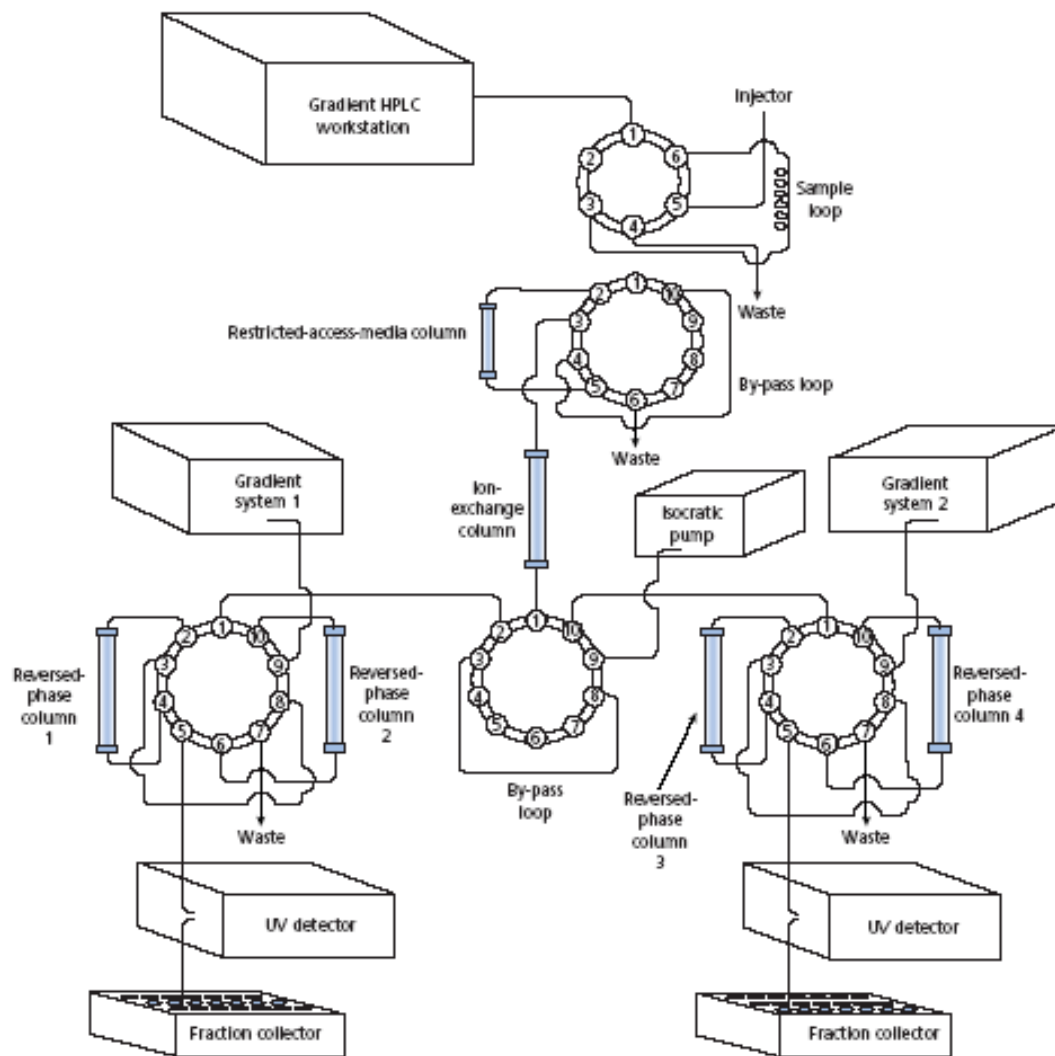
- ✿ kvadrupol **Q1** i **Q3** jsou nastaveny na vybrané hodnoty m/z (prekurzoru a vybraného fragmentu), zaznamenány jsou jen prekurzory, z kterých při fragmentaci v kolizní cele **Q2** vzniká určený fragment
- ✿ během analýzy lze sledovat více reakcí (MRM)



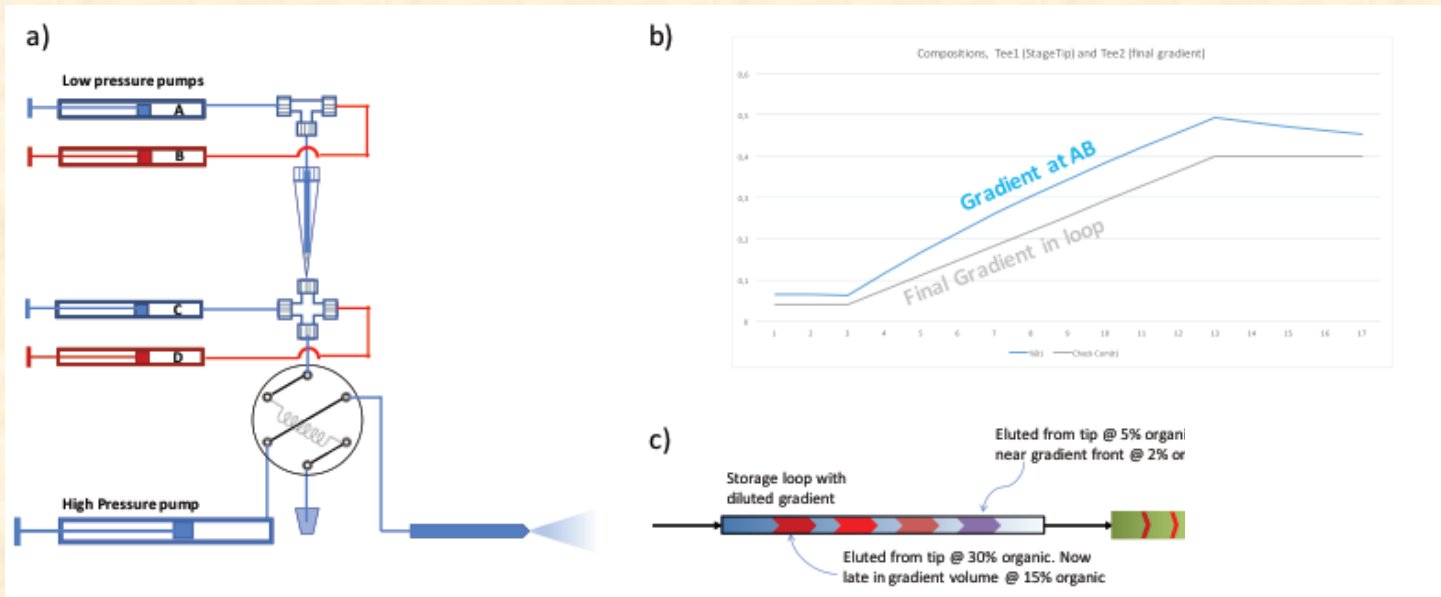
High throughput *Parallel operation*

C7250

Figure 6: Schematic representation of an on-line two-dimensional HPLC system, including an integrated sample preparation step. (Adapted from reference 10 with permission.)

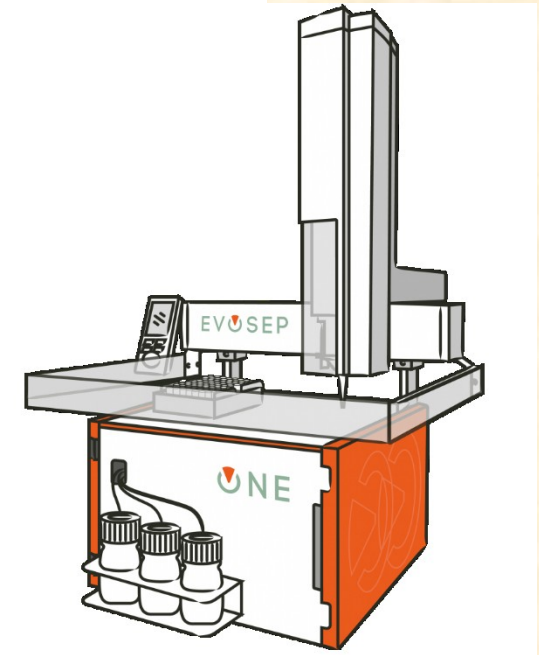


High throughput Reduction of chromatographic run



Gradient Length	Overhead	Flow rate
Minutes	Minutes	µL/min
3	1,8	2,0
5	2,2	1,5
12	2,4	1,2
21	3,0	1,0
45	3,0	0,6

Table 1: Evosep One Methods. *Methods not final



from Evosep technical note

High throughput

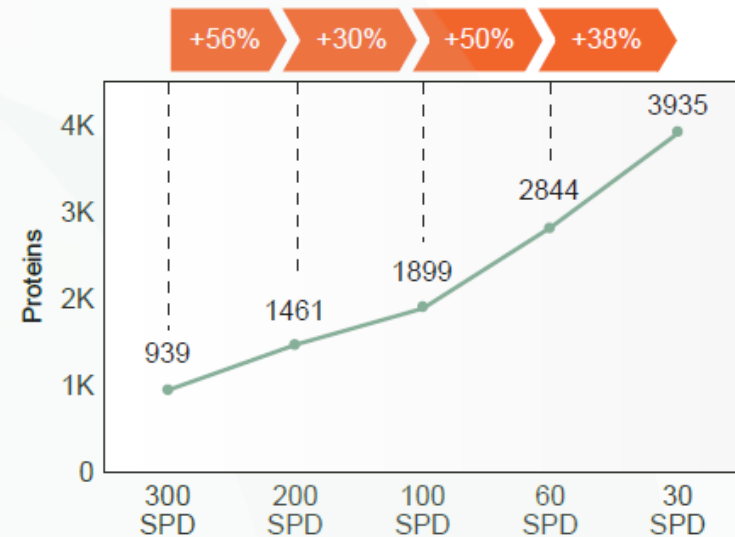
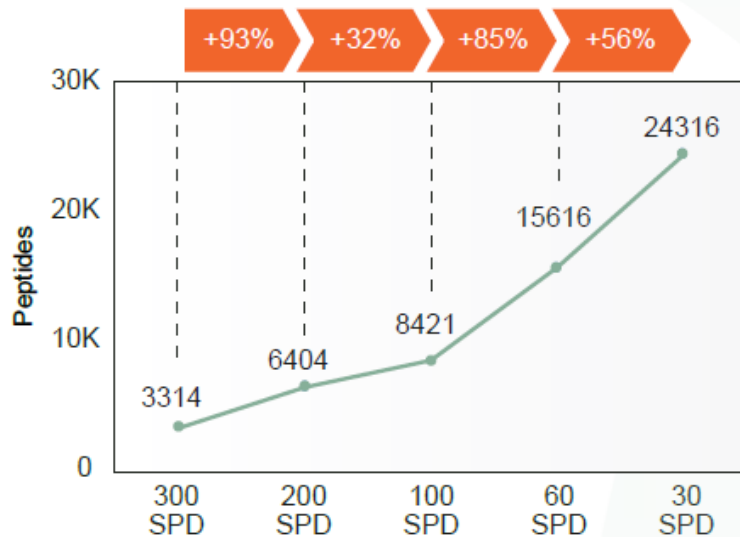
Reduction of chromatographic run

Method details

Evosep One + Exploris 480

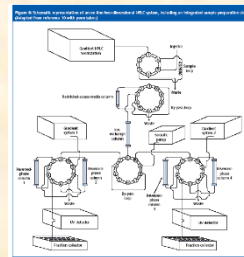
Samples per Day	300	200	100	60	30
Column	4 cm x 150 µm	4 cm x 150 µm	8 cm x 150 µm	8 cm x 150 µm	15 cm x 150 µm
Packing material	1.9 µm beads	1.9 µm beads	1.5 µm beads	1.5 µm beads	1.9 µm beads
MS method length	3.2 min	4.6 min	11.5 min	21 min	44 min
MS2 resolution	7500	7500	15,000	15,000	15,000
MS2 injection time	11 ms	11 ms	22 ms	22 ms	22 ms

Number of identified peptides and proteins per method



from Evosep technical note

+ Miniaturizace - chip technologie





Konec III. části