



Central European Institute of Technology
BRNO | CZECH REPUBLIC

C7250 Charakterizace proteinů hmotnostní spektrometrií

Příprava vzorku pro MS analýzu

Gabriela Lochmanová a Hana Konečná



european
social fund in the
czech republic



EUROPEAN UNION



MINISTRY OF EDUCATION,
YOUTH AND SPORTS



OP Education
for Competitiveness

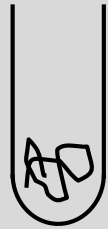


INVESTMENTS IN EDUCATION DEVELOPMENT

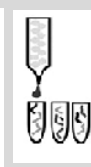
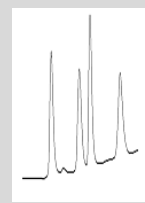
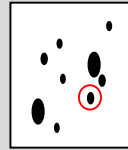


Proteomický experiment

buňky, tkáň



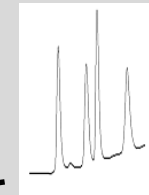
Separace proteinů



Bottom-up



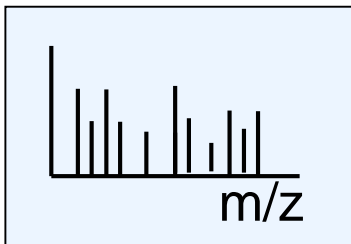
proteolytické
štěpení



Separace peptidů

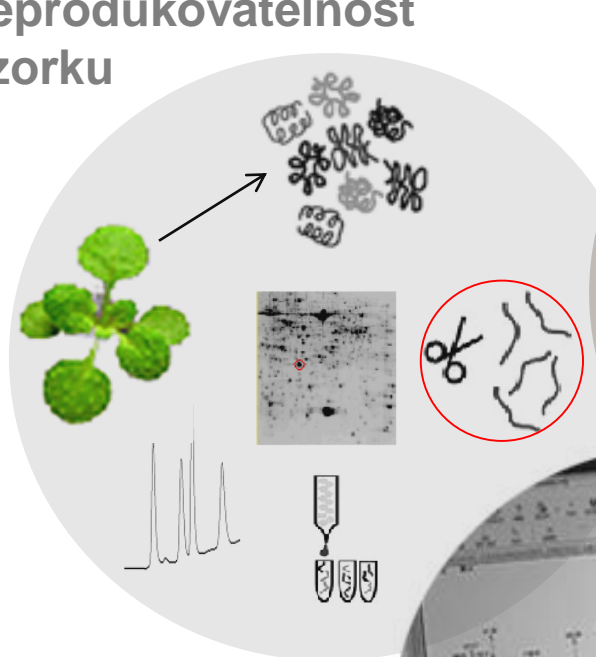


MS

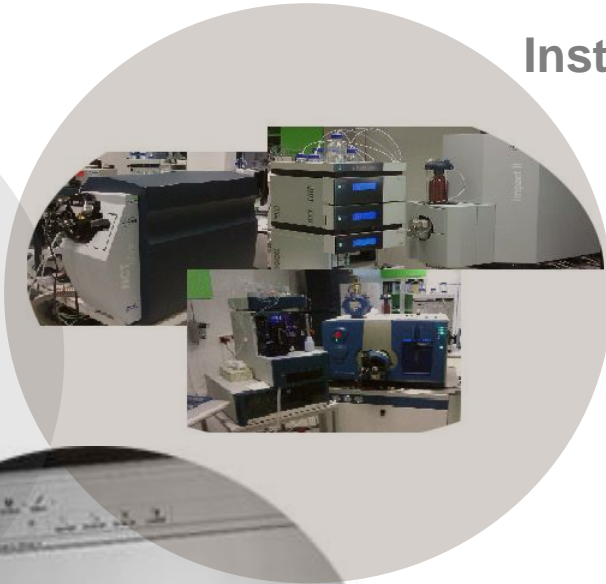


Faktory ovlivňující výsledek MS

Kvalita a reprodukovatelnost
přípravy vzorku



Instrumentace

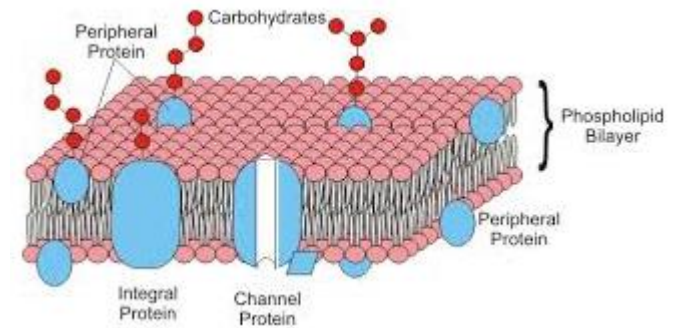


Vyhodnocení dat



Rozmanitost vzorku

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



Obecné principy izolace:

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



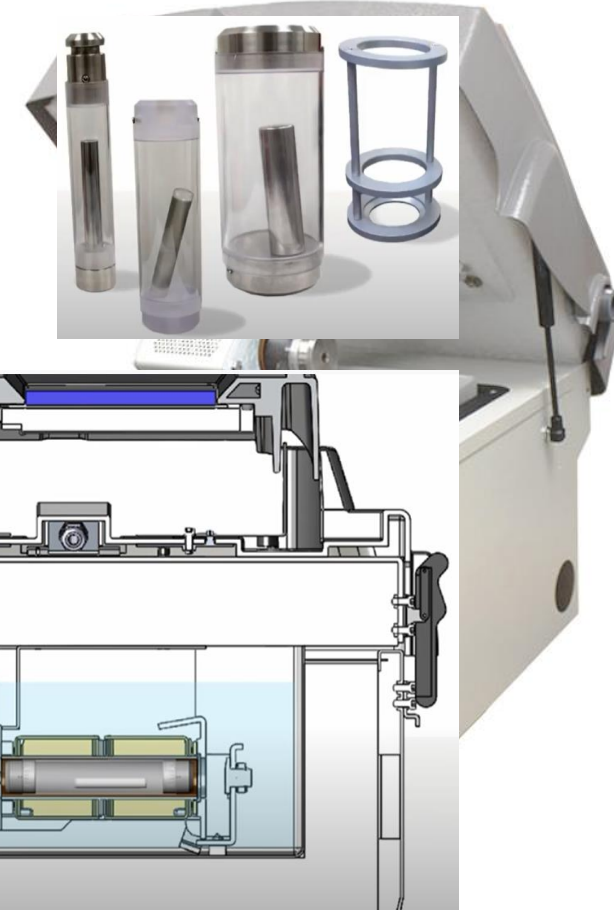
Mechanické přístupy rozbití membrán

Přístup	Nástroj /Pomůcka/Přístroj	Princip
Mechanický	mixér	Rozmělnění buněk/tkáně
Homogenizace v roztoku	 Homogenizátory (Dounce Homogenizer, Potter-Elvehjem Homogenizer) French Press Automatické homogenizátory s využitím skleněných či kovových kuliček	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 tkáně v tekutém dusíku

Automatická homogenizace vzorku



- Homogenizace v roztoku nebo na sucho
- Mikrodestičky nebo 2ml zkušavky



- Homogenizace na sucho
- Zkušavky pro 0.5g – 100g tkáně

<https://www.youtube.com/watch?v=-hKSJLszx98>

https://www.youtube.com/watch?v=fFDc_h11dD4

<https://www.bertin-instruments.com/product/sample-preparation-homogenizers/precellys24-tissue-homogenizer/#precellys24-video>

<https://www.youtube.com/watch?v=zx9oq9dj8Xk>

Fragmentace nukleových kyselin



Ultrasonikační sonda



Bioruptor[®] Pico diagenode



Gentler sonication than
probe and cup horn sonicators...

5 μ l to 2ml

**SIXTEEN
SAMPLES
SIMULTANEOUSLY**



Příklady inhibitorů fosfatáz



fluorid sodný (NaF):

inhibitor serinových i treoninových fosfatáz

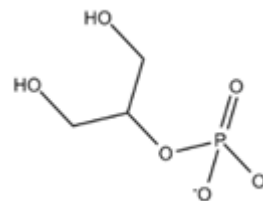
vanadičnan sodný (Na₃VO₄):

inhibitor tyrosinových fosfatáz

!nutná aktivace, tj. depolymerace opakovaným vařením a úpravou pH na 10!

β-glycerofosfát:

inhibitor serinových i treoninových fosfatáz



MS analýza proteinového vzorku



Cíl MS:

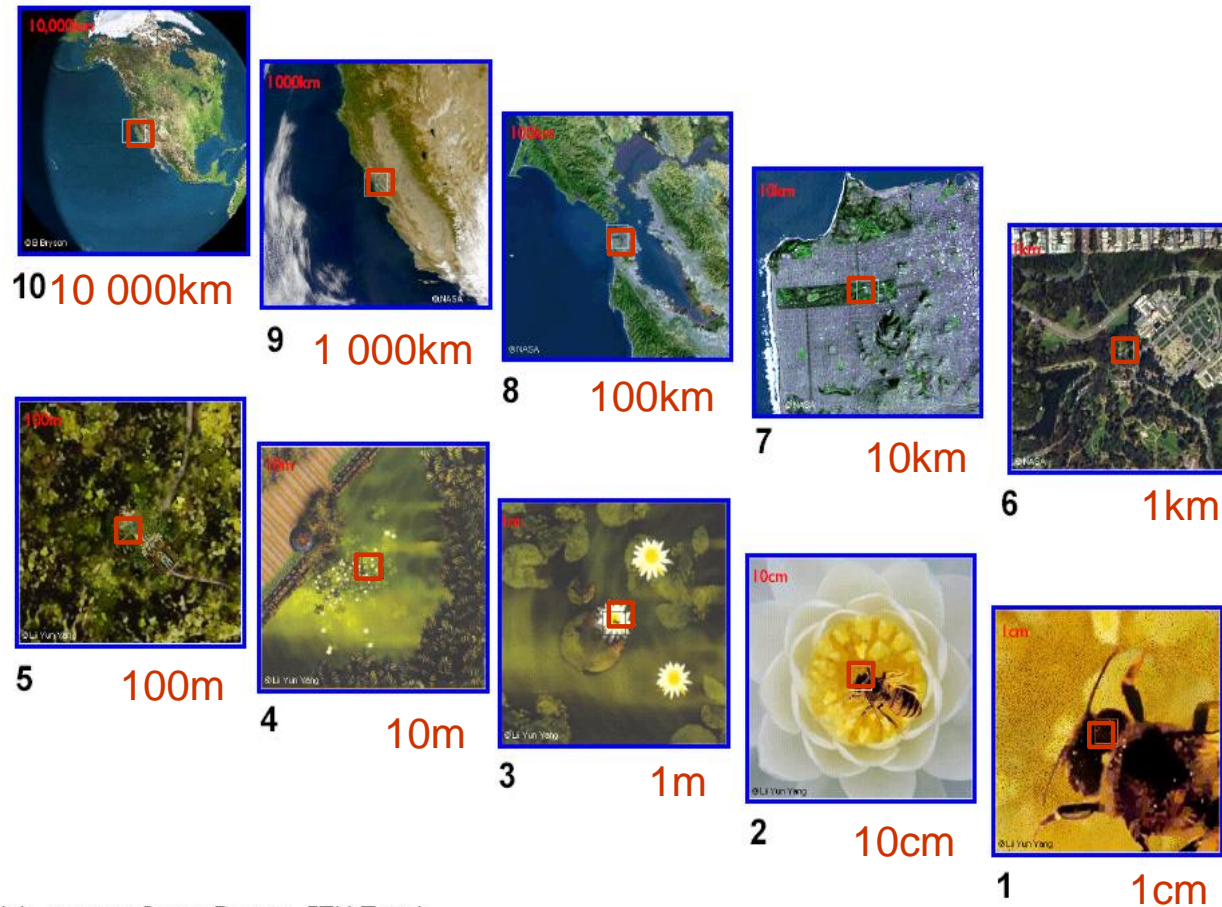
- Analýza proteinů v komplexní směsi
- Analýza cílového proteinu/cílové skupiny proteinů

Cílový protein přítomen v komplexní směsi:

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

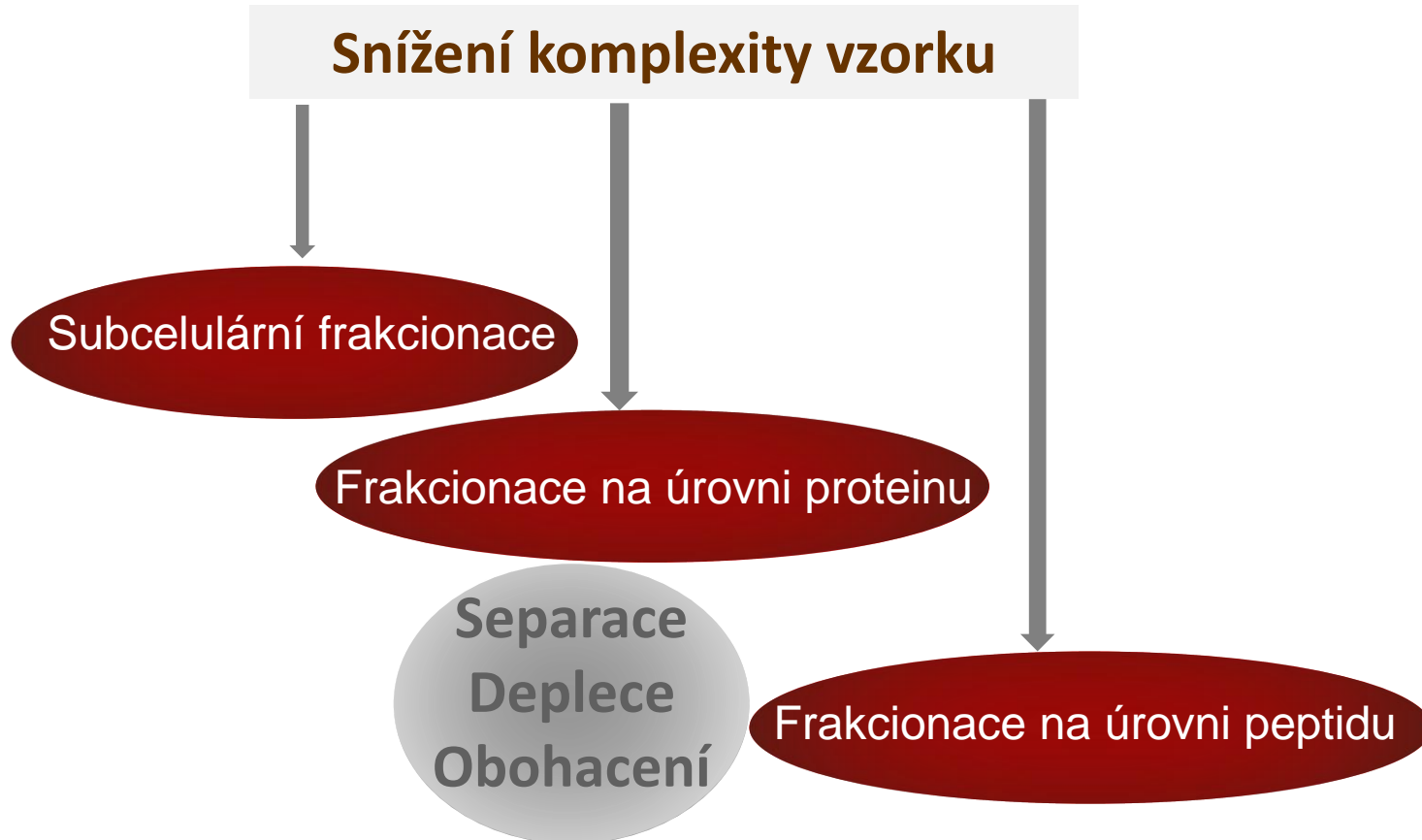
Požadavek: čistý vzorek s omezenou komplexitou

10^{10} Really Is Wide Dynamic Range



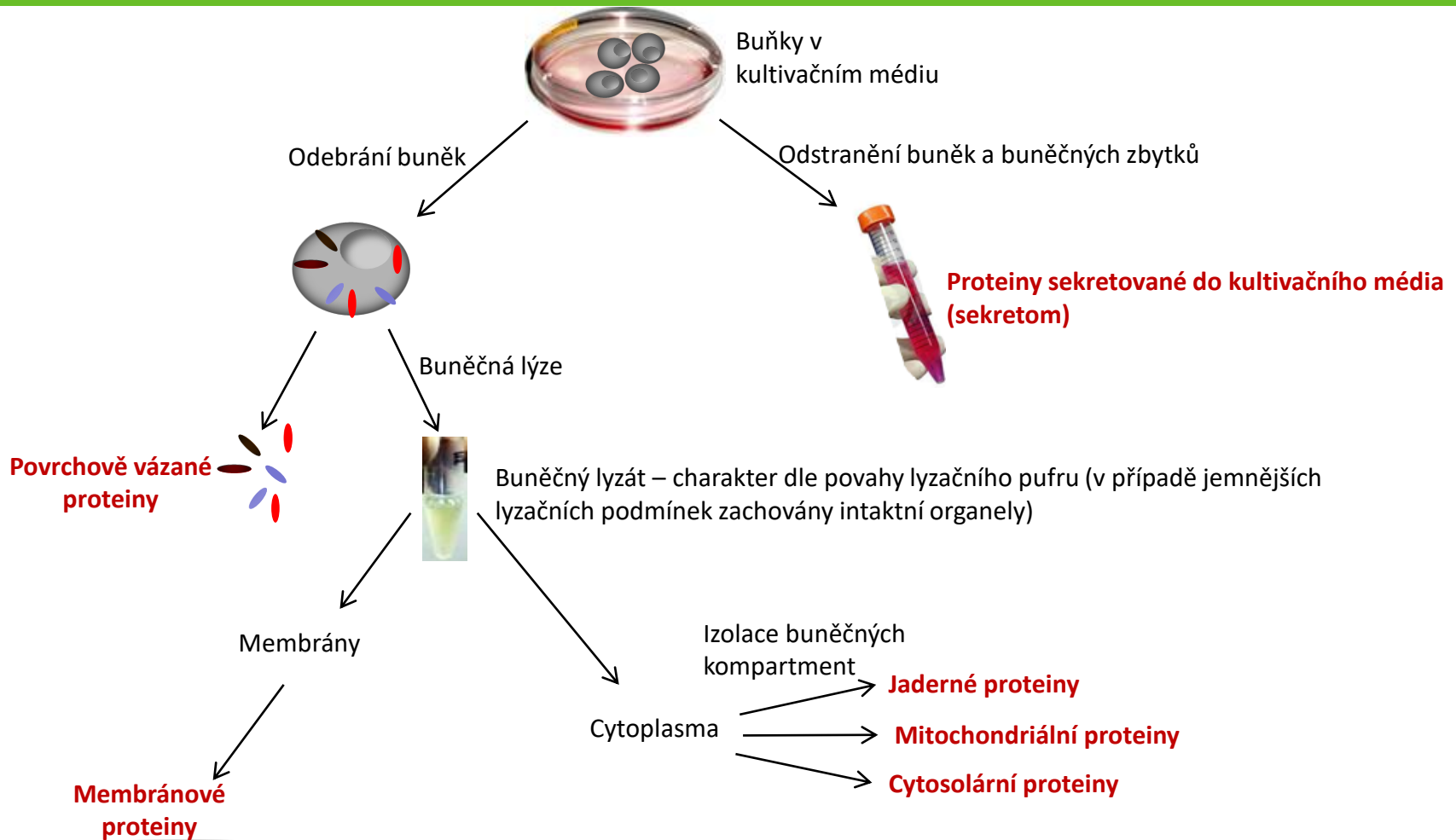
Slide courtesy Bruno Domon, ETH Zurich

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



MS analýza proteinového vzorku

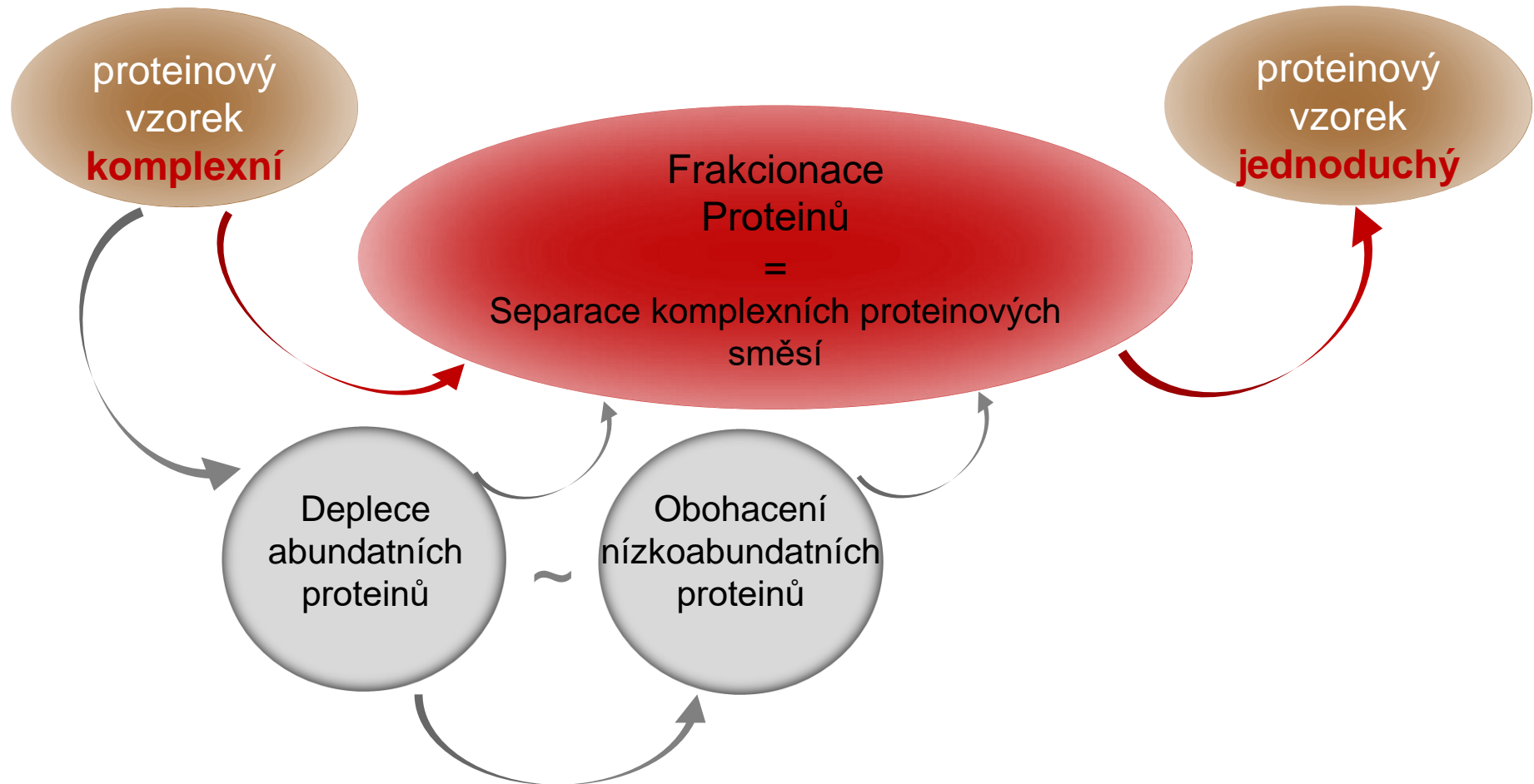
Snížení komplexity: Subcelulární frakcionace



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

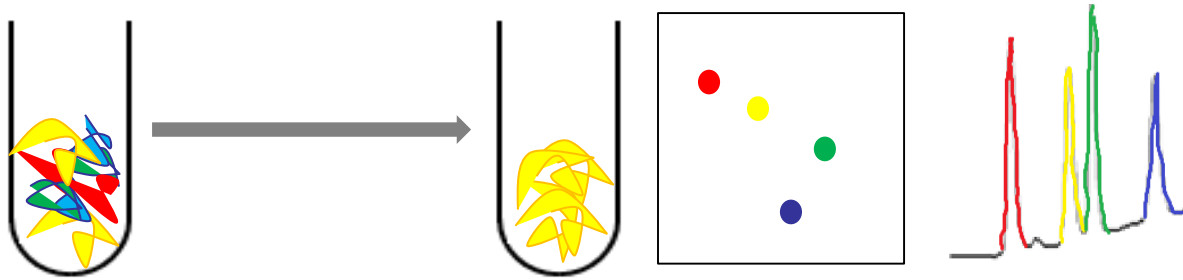
MS analýza proteinového vzorku

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

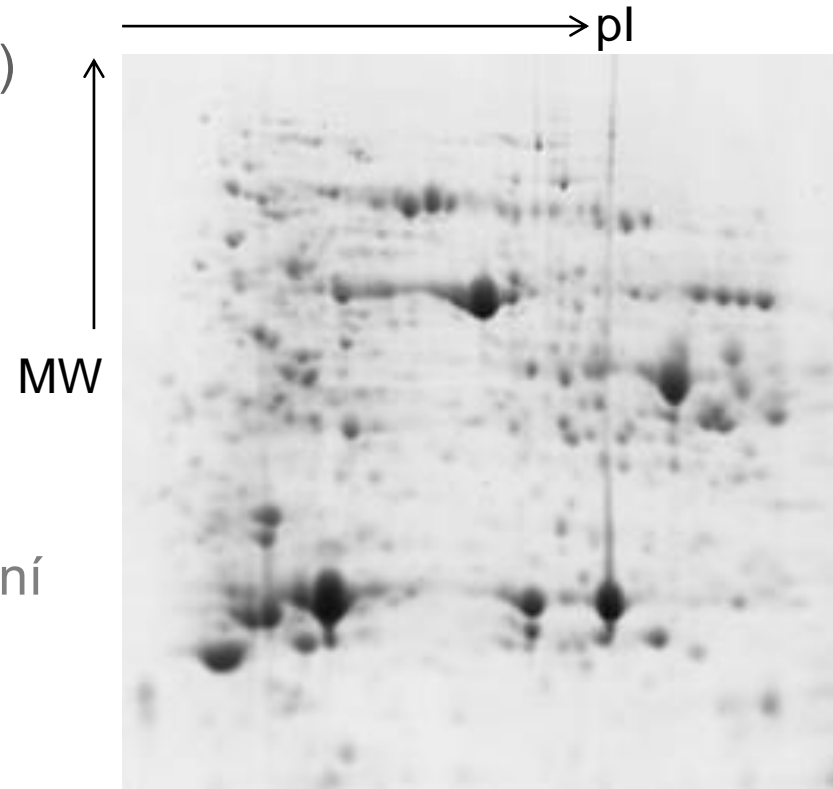
Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů 2D SDS-PAGE

2D SDS-PAGE:

- 1. rozměr = Izoelektrická fokusace (IEF)
 - elektromigrační metoda
 - separace proteinů dle pI
- 2. rozměr = SDS-PAGE
 - elektromigrační 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

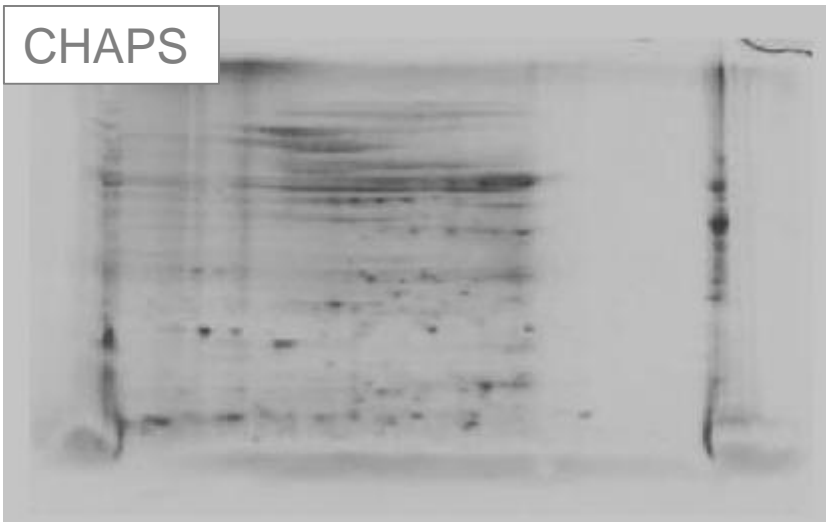
Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů 2D SDS-PAGE – Solubilizace proteinů

Složení solubilizačního roztoku:

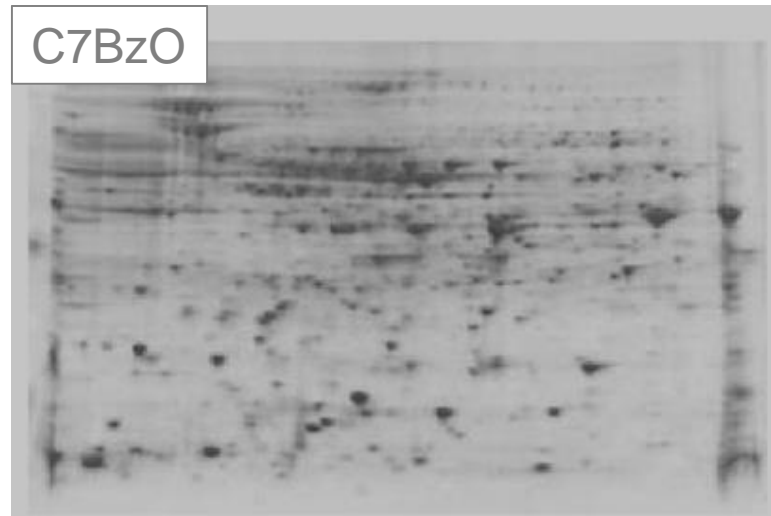
- Chaotropní činidla (močovina, thiomočovina)
- Neionogenní detergent (CHAPS, C7BzO)
- Redukční činidla (DTT, TBP)
- Inhibitory proteáz a enzymů odstraňujících modifikace (např. fosfatáz, deacetyláz, ...)
- Amfolyty

Komponenty kompatibilní s IEF - nesmí zvyšovat iontovou sílu

CHAPS



C7BzO

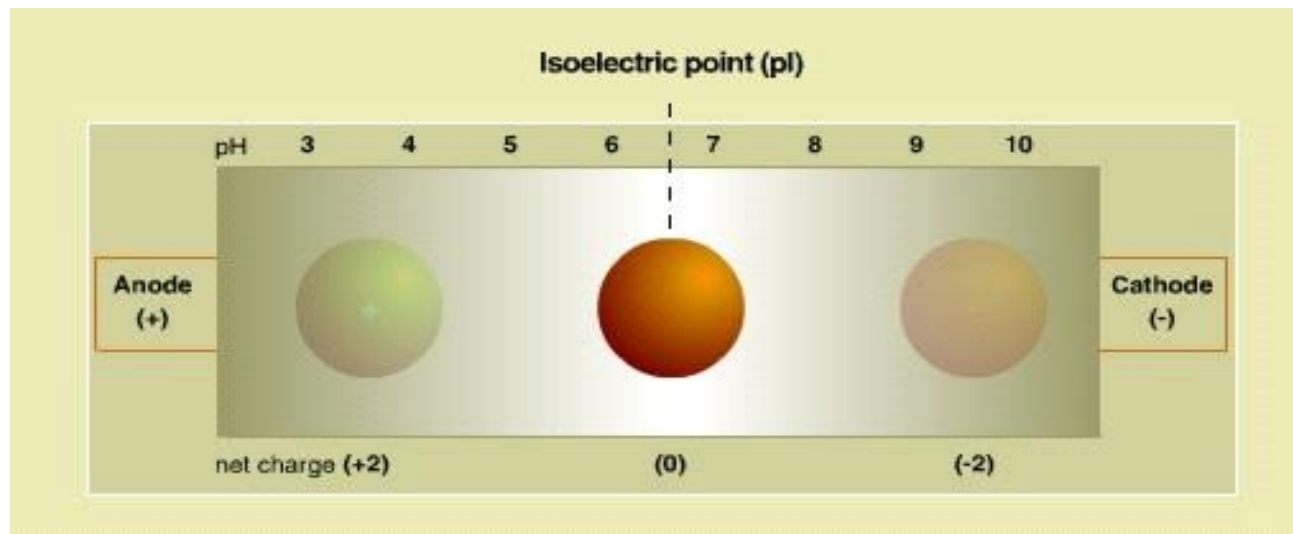


MS analýza proteinového vzorku

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



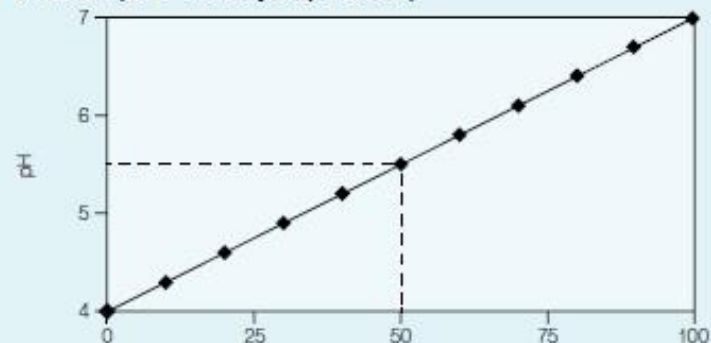
MS analýza proteinového vzorku

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

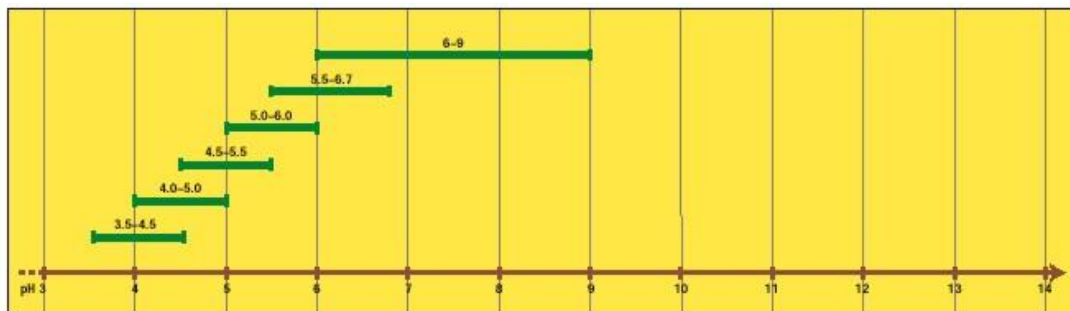
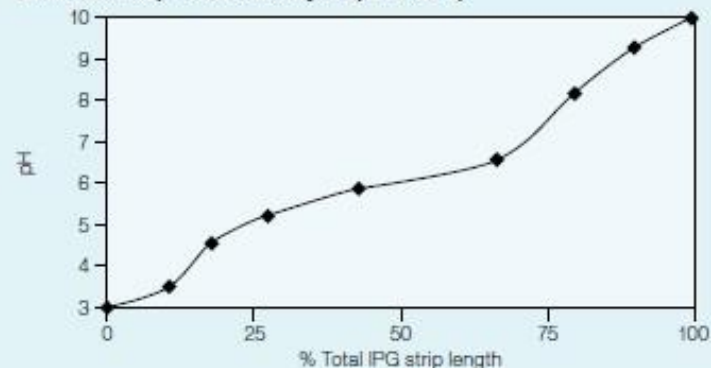
ROZSAH STRIPU
ROZMĚR STRIPU



A. Linear pH 4-7 ReadyStrip IPG strip



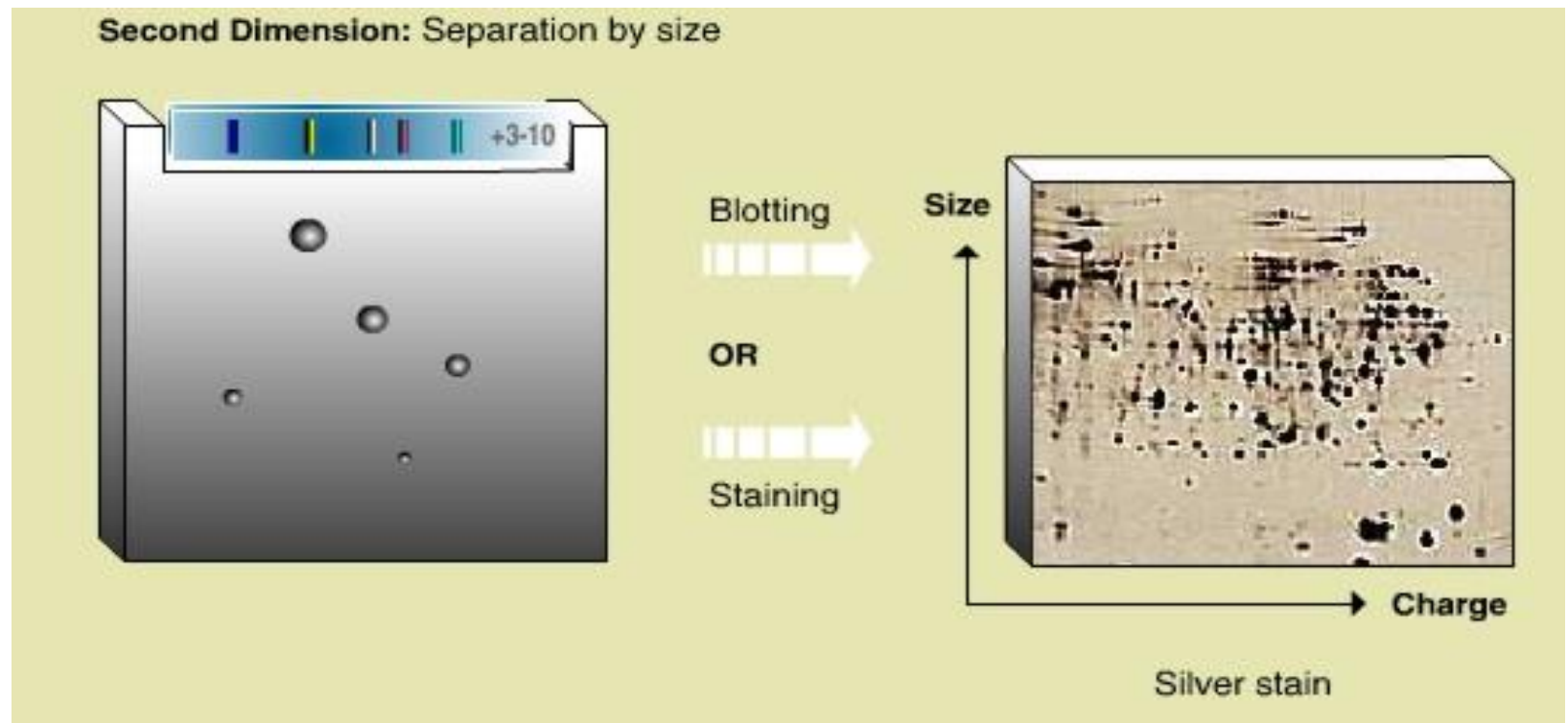
B. Nonlinear pH 3-10 ReadyStrip IPG strip



MS analýza proteinového vzorku

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

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



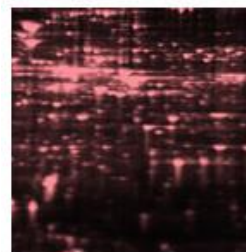
MS analýza proteinového vzorku

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

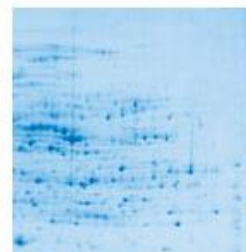
Typy detekce:

Značení před analýzou (DIGE – CyDye, radioaktivní značení)

Barvení po analýze



Sypro Ruby



Coomassie



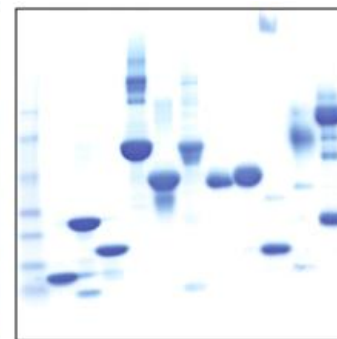
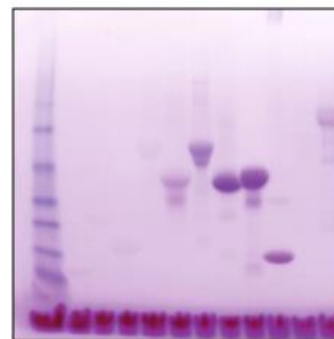
silver

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

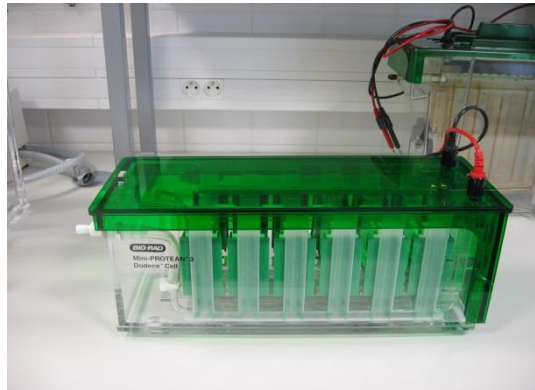
Elektroforetická aparatura

Denzitometr / Fluorescenční skener

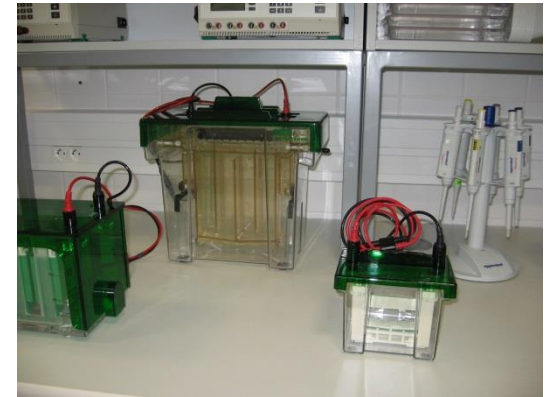
SW pro obrazovou analýzu



Protean Plus Dodeca Cell



Mini-Protean 3 Dodeca Cell



Protean II xi Cell

MS analýza proteinového vzorku

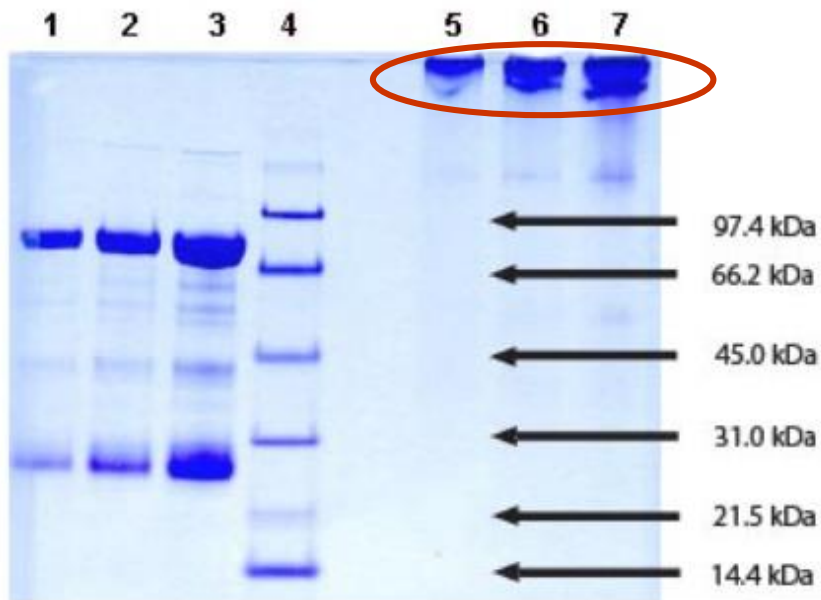
Když SDS-PAGE nefunguje...



velké nativní proteiny

membránové proteiny

Natural Human IgM



reduced

non-reduced

proteins in sample buffer (SDS/DTT/heat)



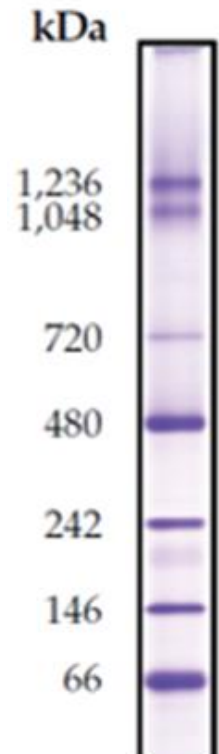
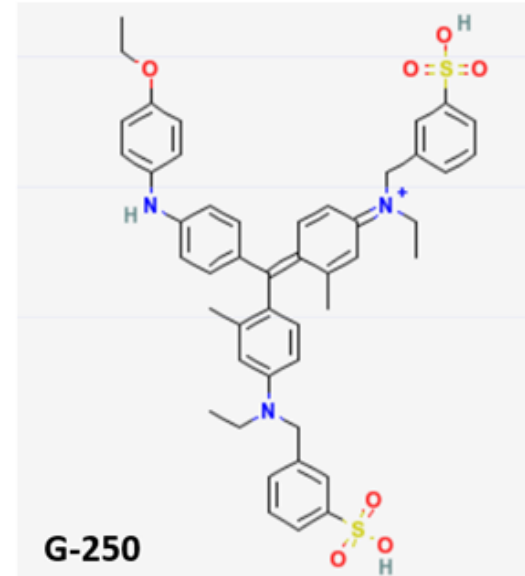
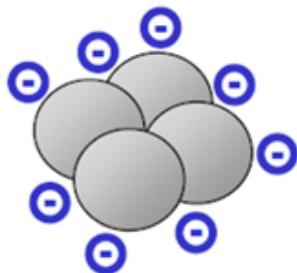
MS analýza proteinového vzorku

Jde to i bez SDS...

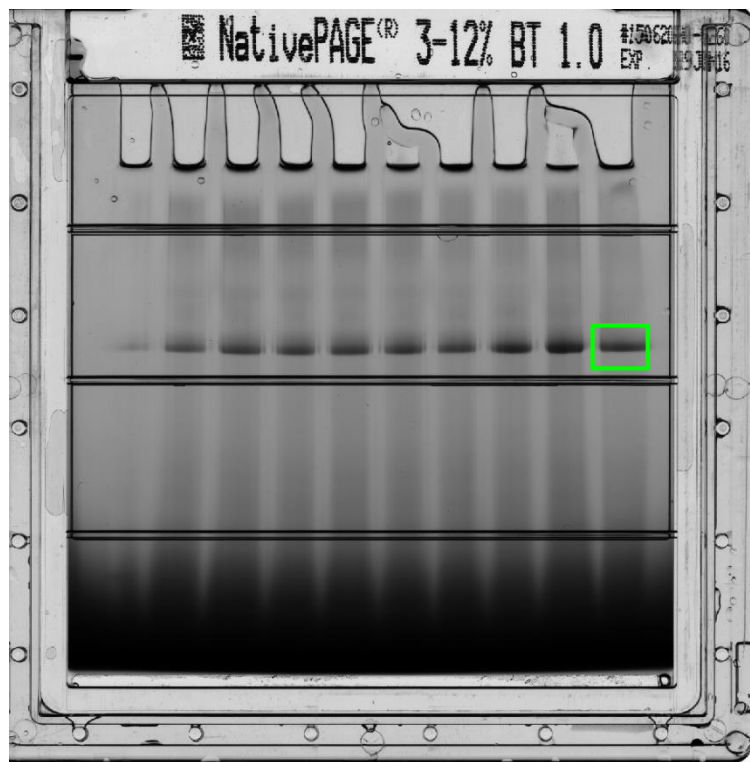
Blue Native Electrophoresis BNE

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

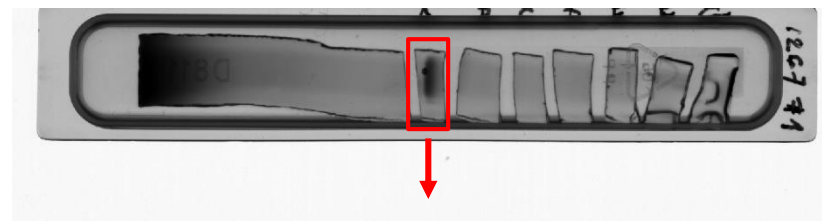


MS analýza proteinového vzorku BNE vs. BNE / SDS-PAGE



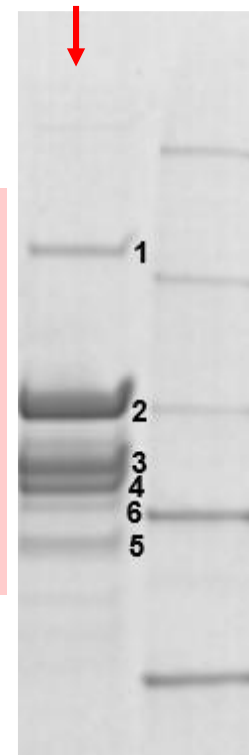
BNE

↓
digest 92 PGs



↓
eluze

digest →
2-3 PGs per band →
→
→
→



MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů IEF Frakcionace



MicroRotor

- prefrakcionace v roztoku
 - IEF v roztoku
 - frakcionace dle pI
 - obohacení proteinů o vybraném rozsahu pI



OffGel Fractionator

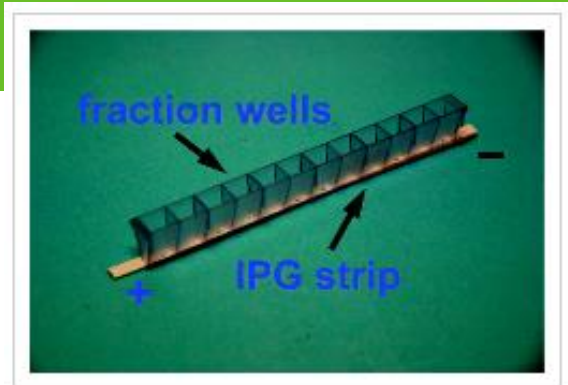
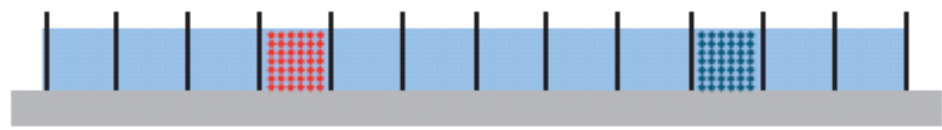
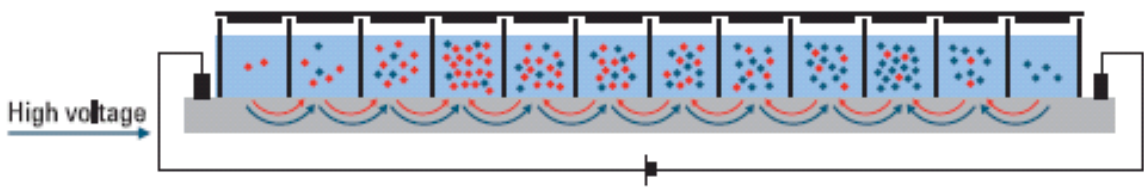
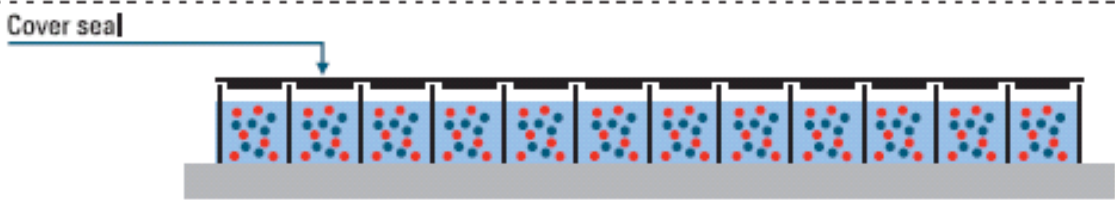
- prefrakcionace na IPG stripu
 - IEF v roztoku s využitím IPG stripu
 - frakcionace dle pI

MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů

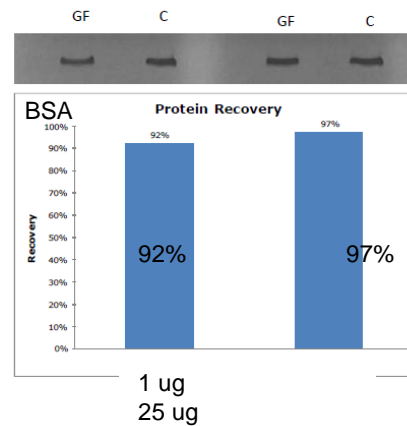
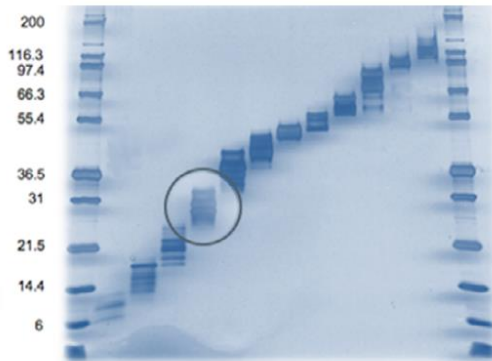
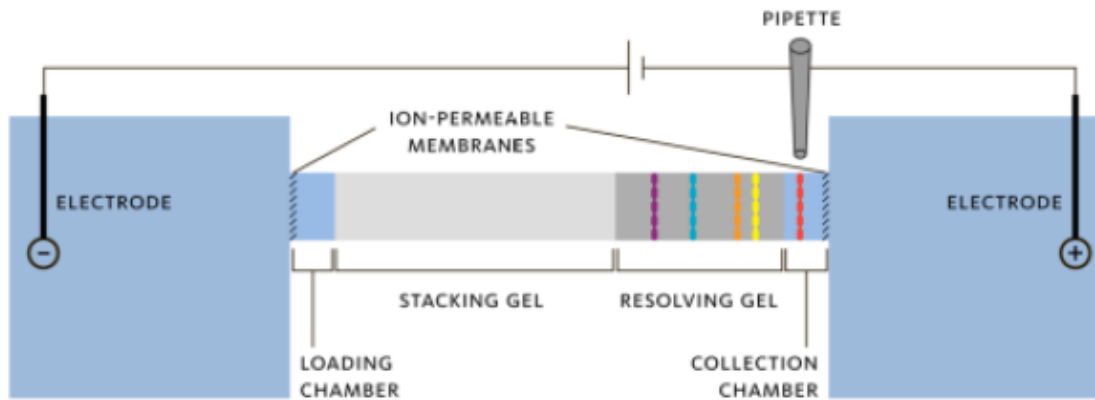
IEF Frakcionace

OFFGEL IEF prefrakcionace proteinů nebo peptidů



Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů

Gel Elution Liquid Fraction Entrapment Electrophoresis

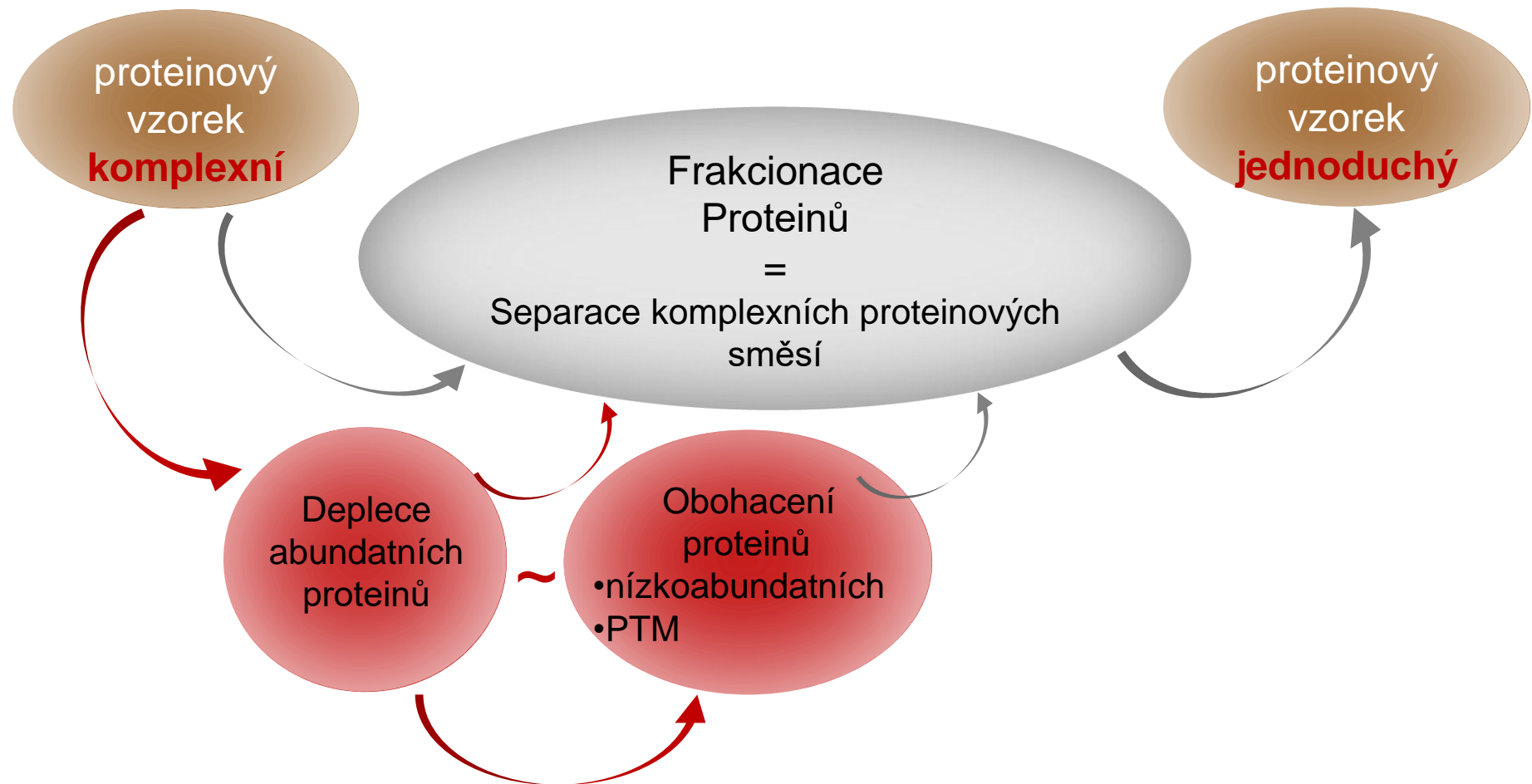


GELFrEE[®]
Fractionation System

expedion

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

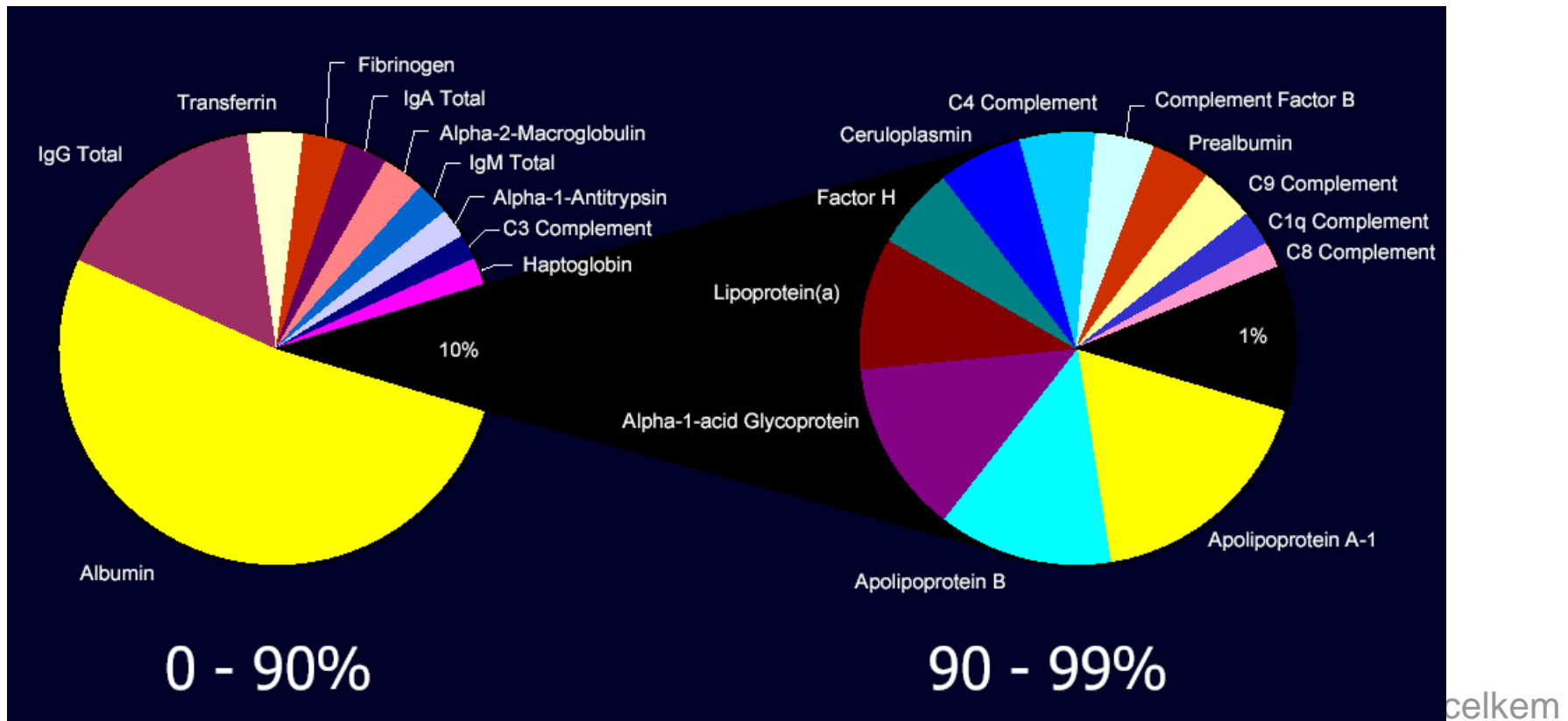
Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů

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

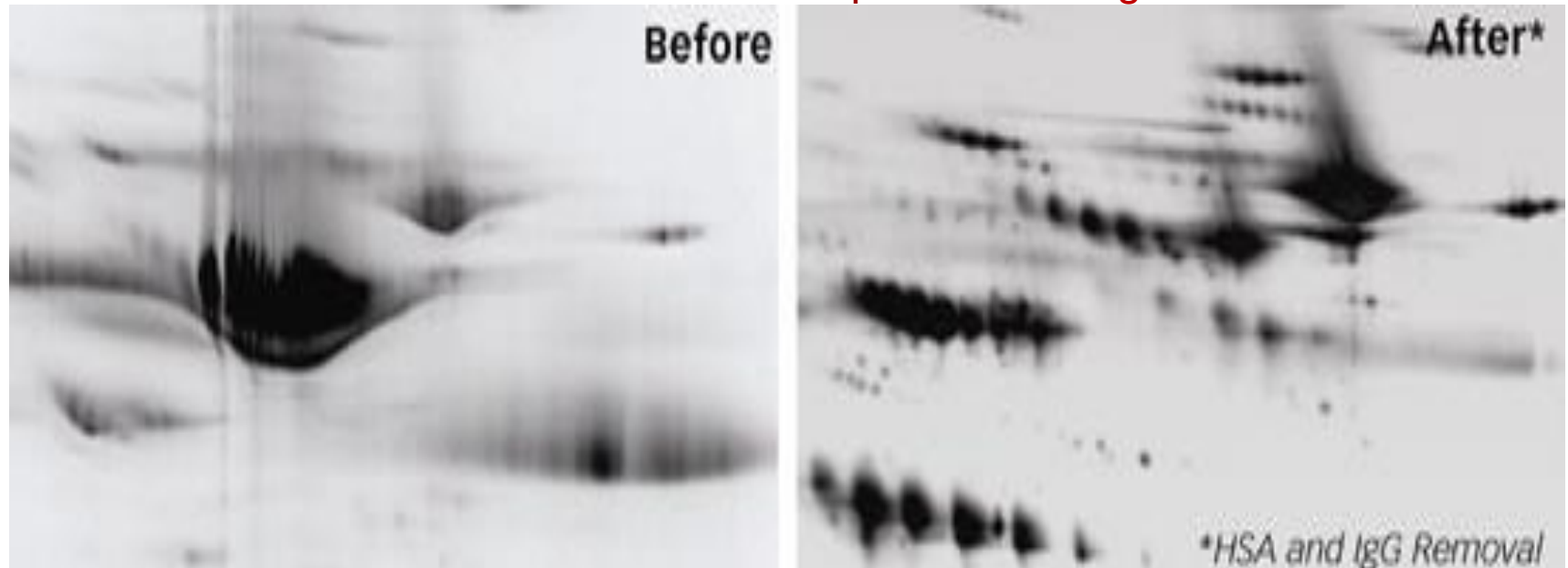


MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů

Deplece abundatních proteinů

Deplete HSA a IgG



MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů

Obohacení nízkoabundantních 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

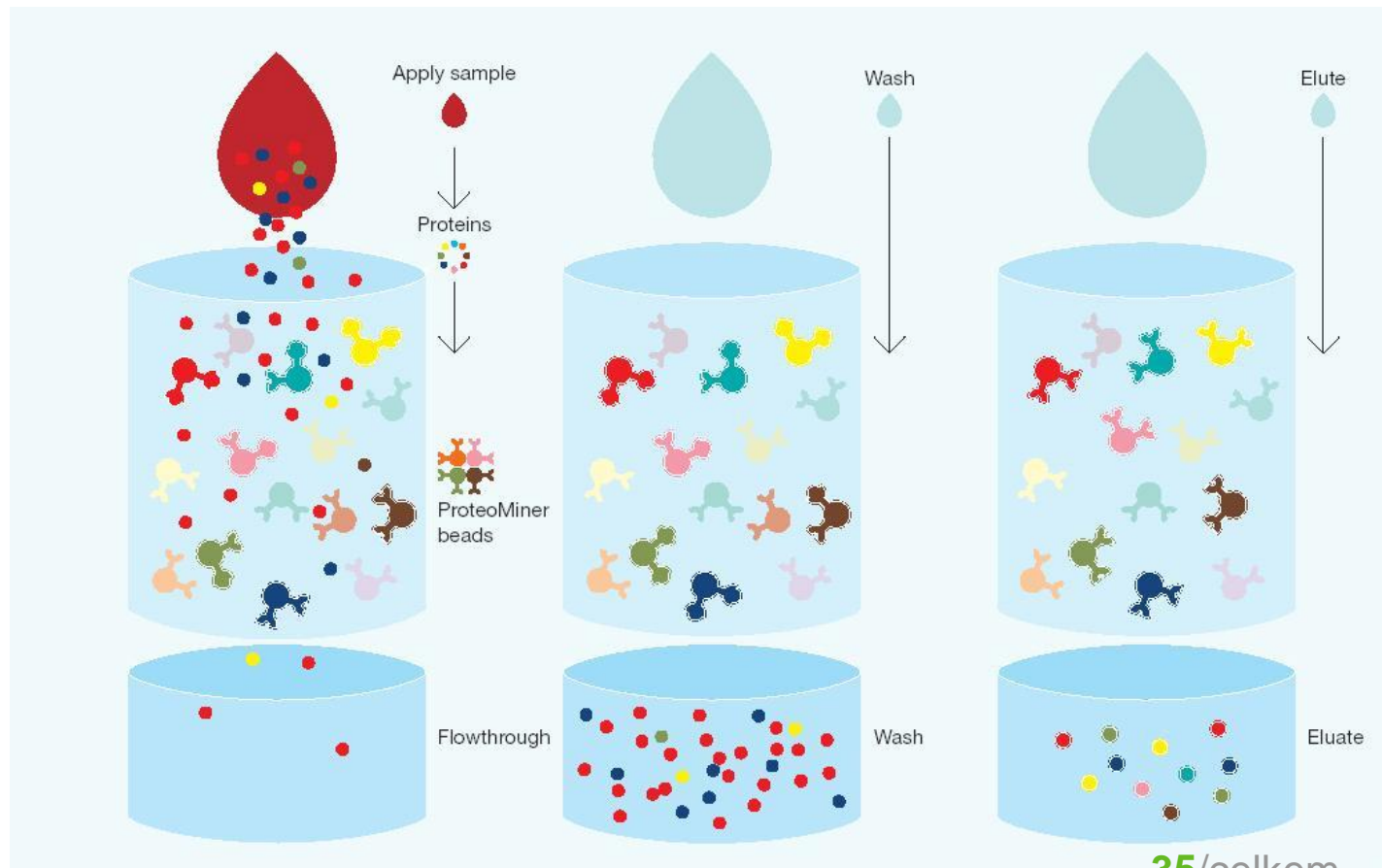
: Metoda vhodná pro rozmanité typy vzorků, nezávislá na dostupnosti protilátek (na rozdíl od imunodeplece)

MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů

Obohacení nízkoabundantních proteinů

ProteoMiner™ protein enrichment kit: CPPL Combinatorial Peptide Ligand Library



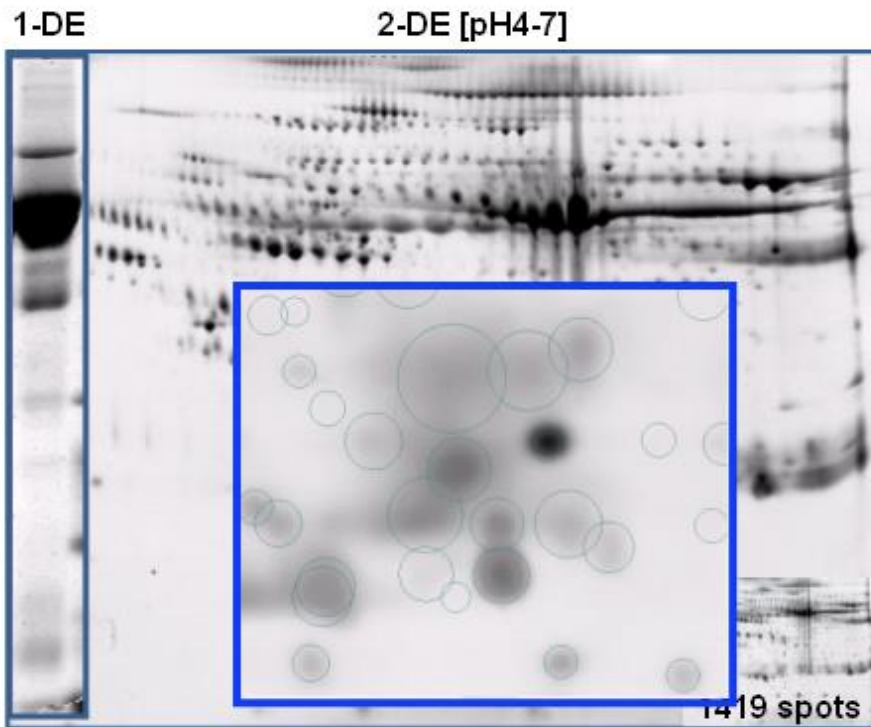
MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů

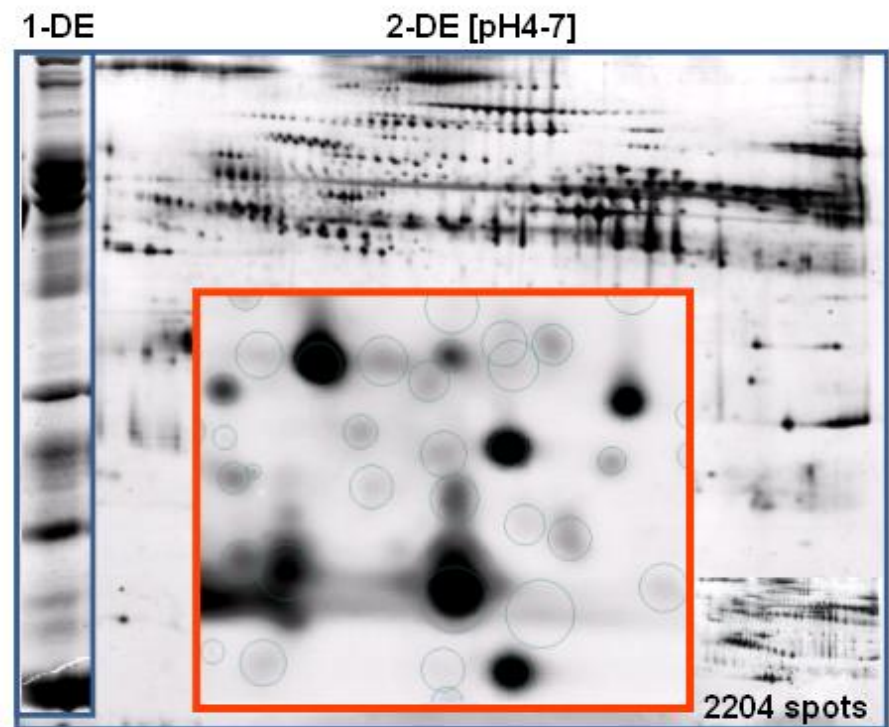
Obohacení nízkoabundantních proteinů

ProteoMiner™ protein enrichment kit

Native Human Serum



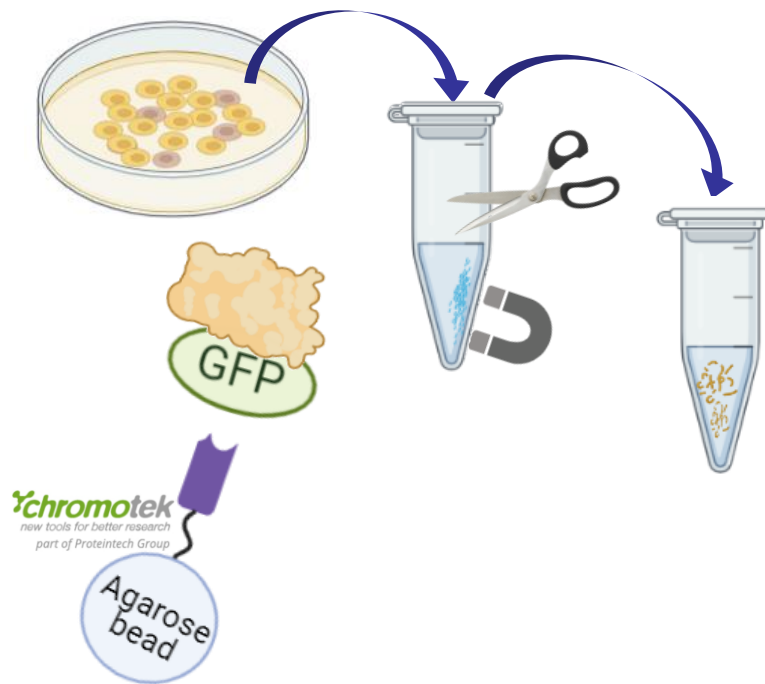
Human Serum Fractionated by ProteoMiner



MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů

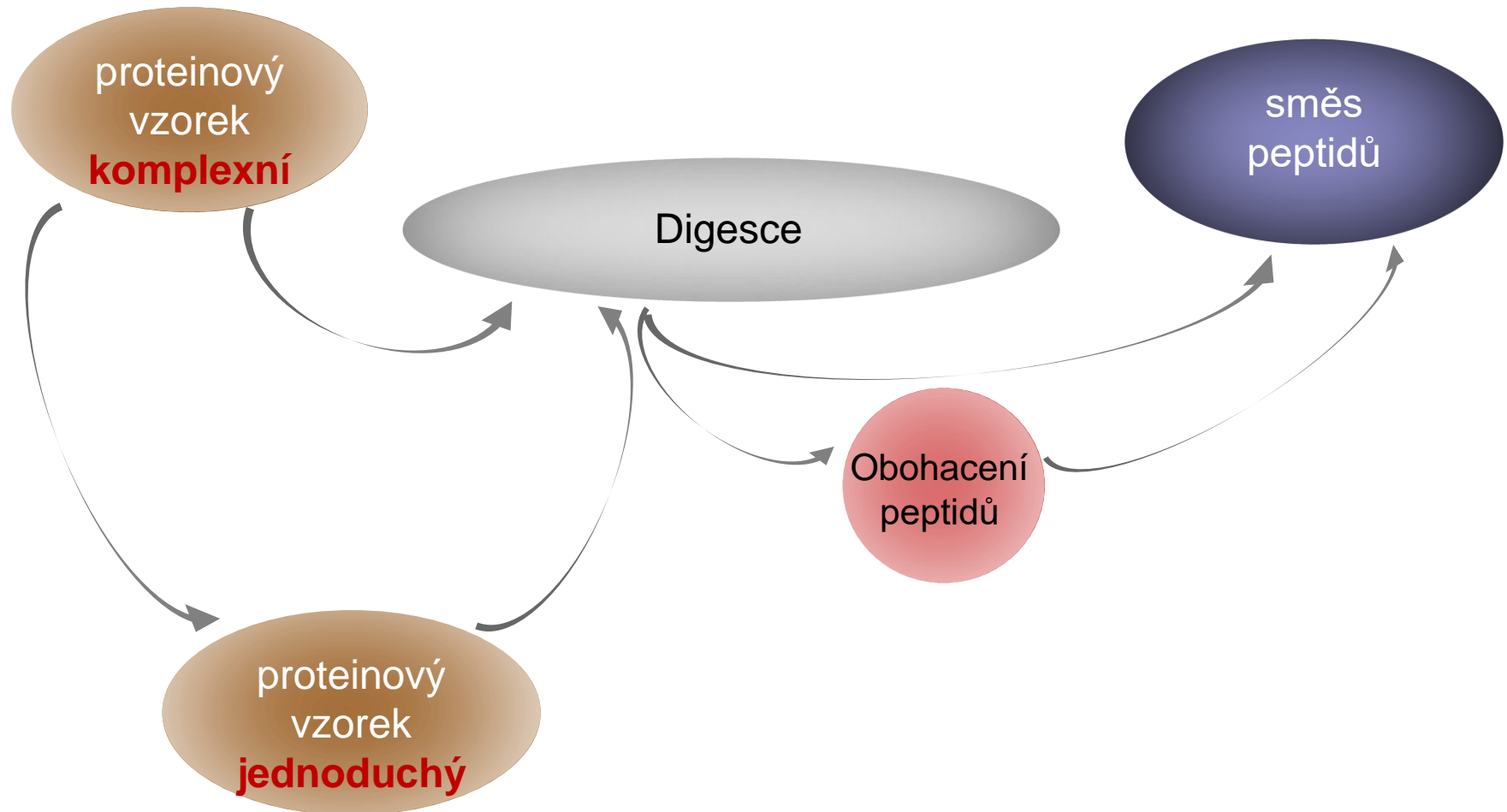
Obohacení nízkoabundantních proteinů



- Transfekované buňky (protein zájmu vázaný s tag)
- Magnetické kuličky s navázanou protilátkou proti tag
- Promytí kuliček s navázaným proteinem
- Digestce proteinu z kuliček

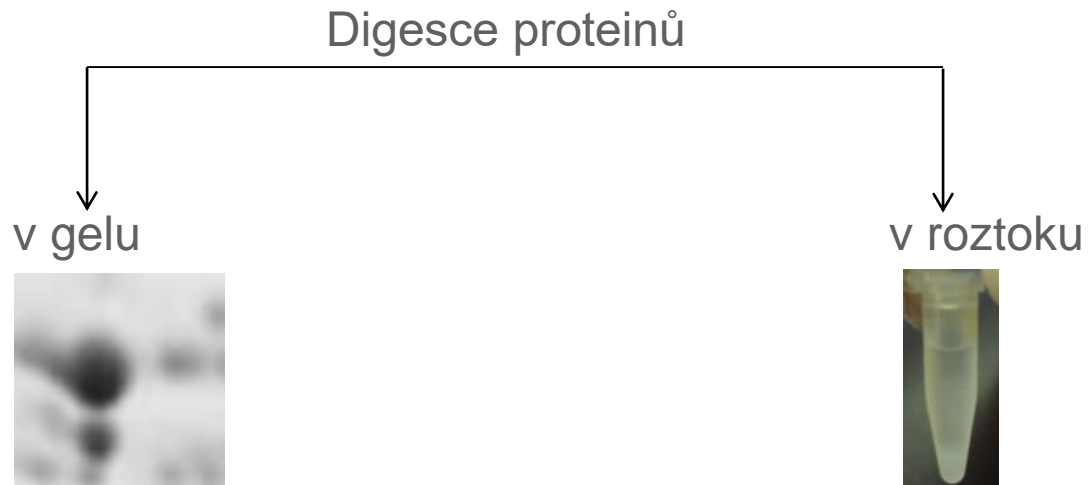
MS analýza proteinového vzorku

Digestce proteinů



Digestce proteinů

- Výběr vhodné proteiny (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, SP3

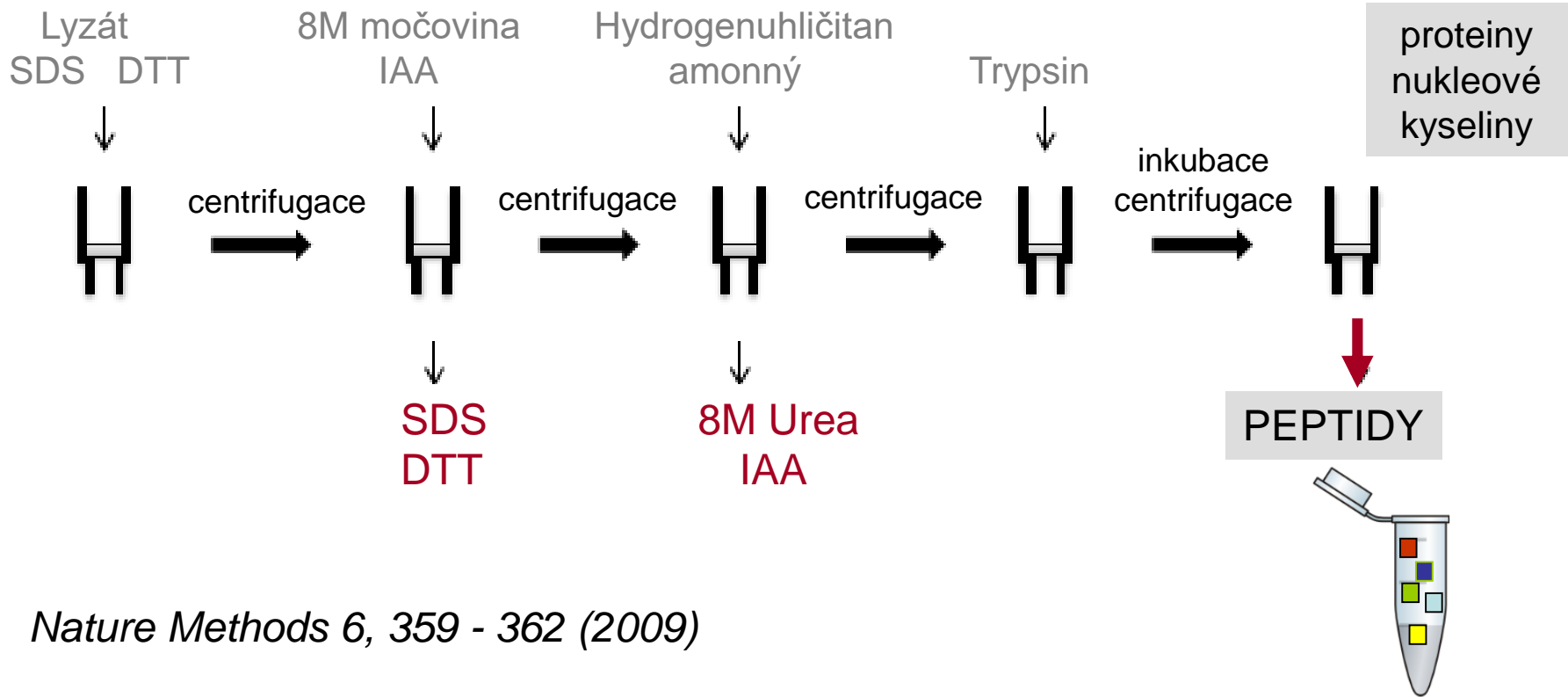


MS analýza proteinového vzorku

Digestce proteinů

FASP = filter aided sample preparation

PROTEINY

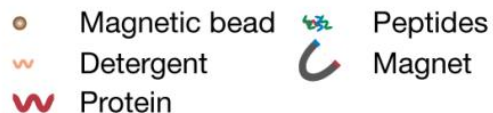
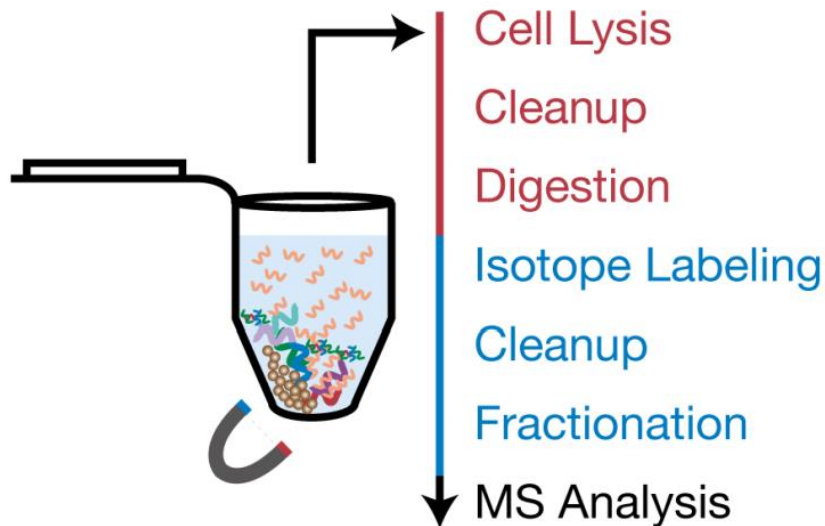


Nature Methods 6, 359 - 362 (2009)

MS analýza proteinového vzorku

Digestce proteinů

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



Examples:

- **Carboxylated** beads
- **HILIC** beads
- **S-trap**

Mol Syst Biol. 2014;10:757

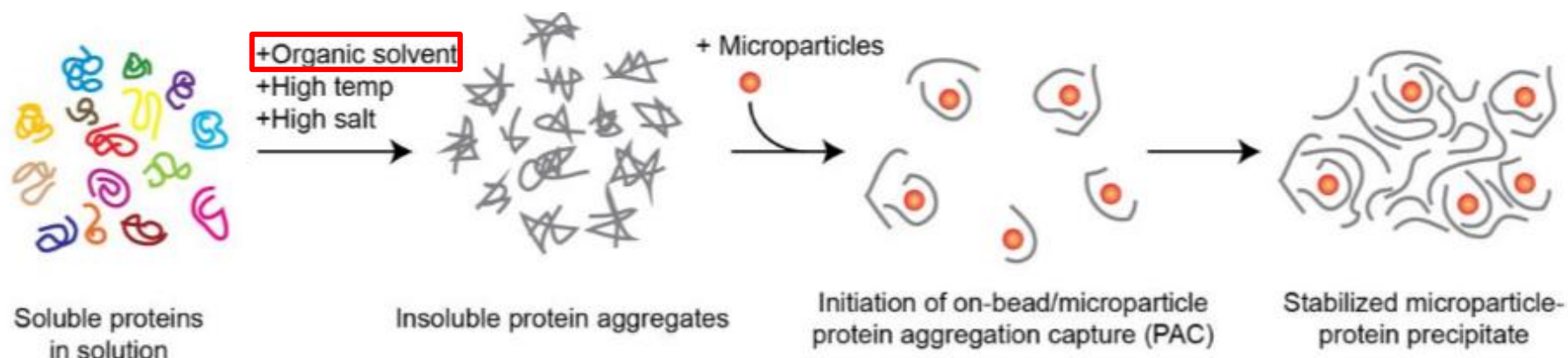
Odstranění kontaminant ze vzorku

Single-Pot Solid-Phase-enhanced Sample Preparation



SP3

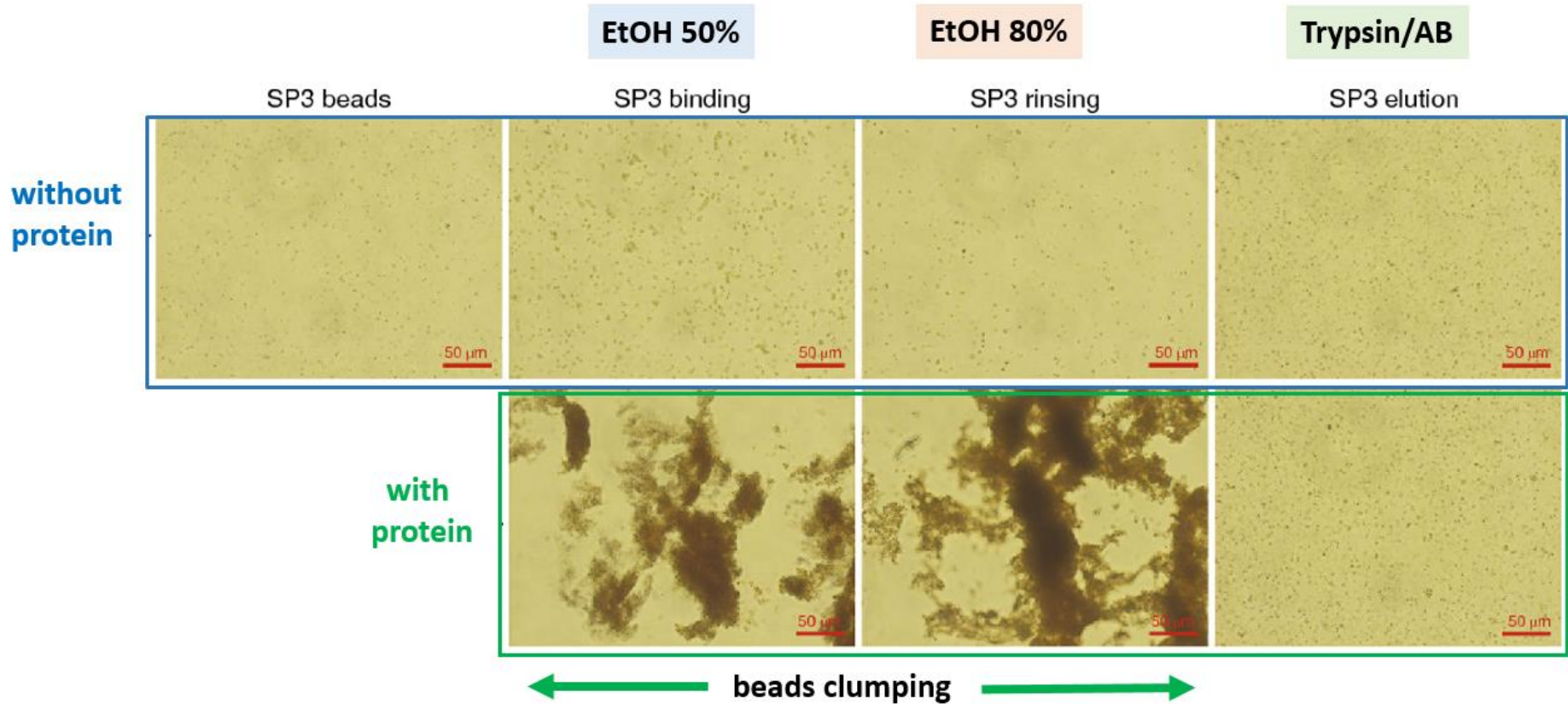
Protein Aggregation Capture on microparticles of various surface chemistry



Modified according to **Batth et al., 2019, Molecular & Cellular Proteomics 18, 1027–1035**

Odstranění kontaminant ze vzorku

Protein Aggregation Capture on microparticles



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)

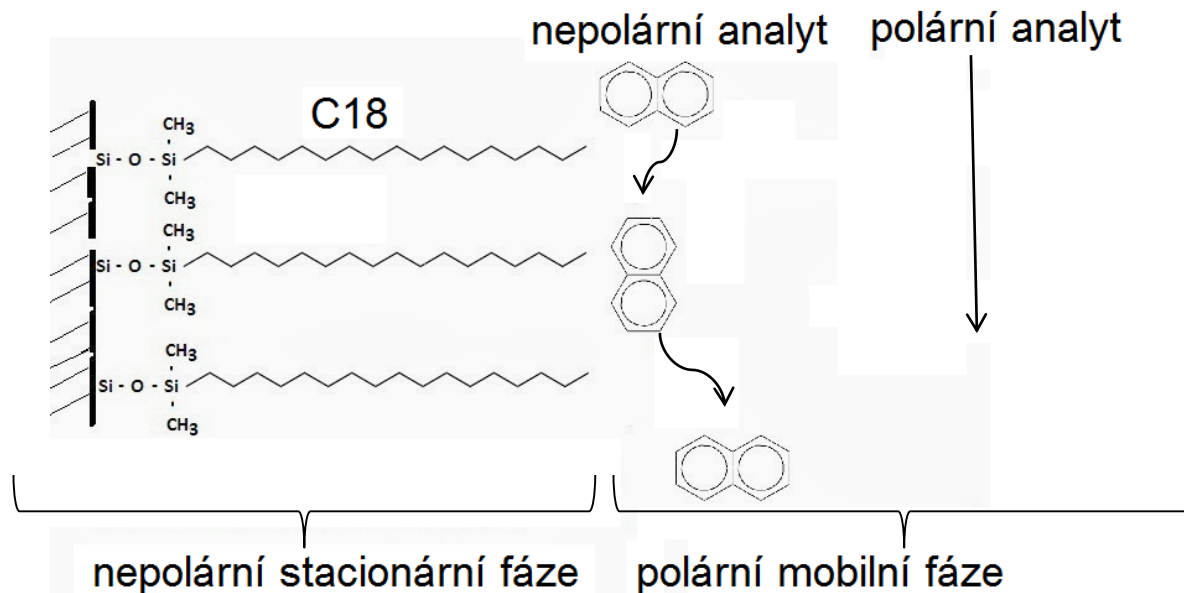
MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni peptidů

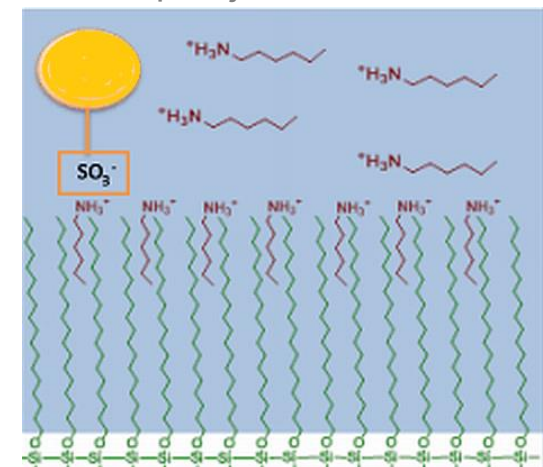
Frakcionace peptidů v roztoku pomocí LC

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

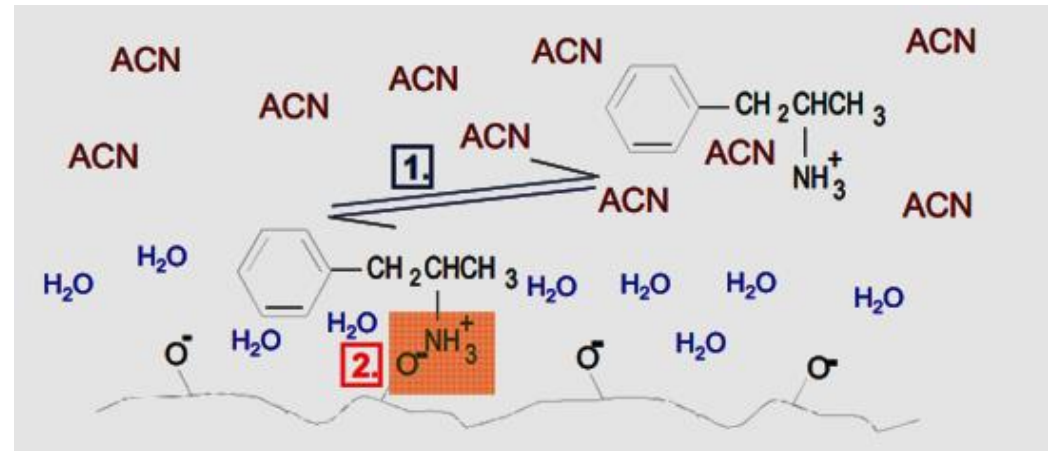
Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC)

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



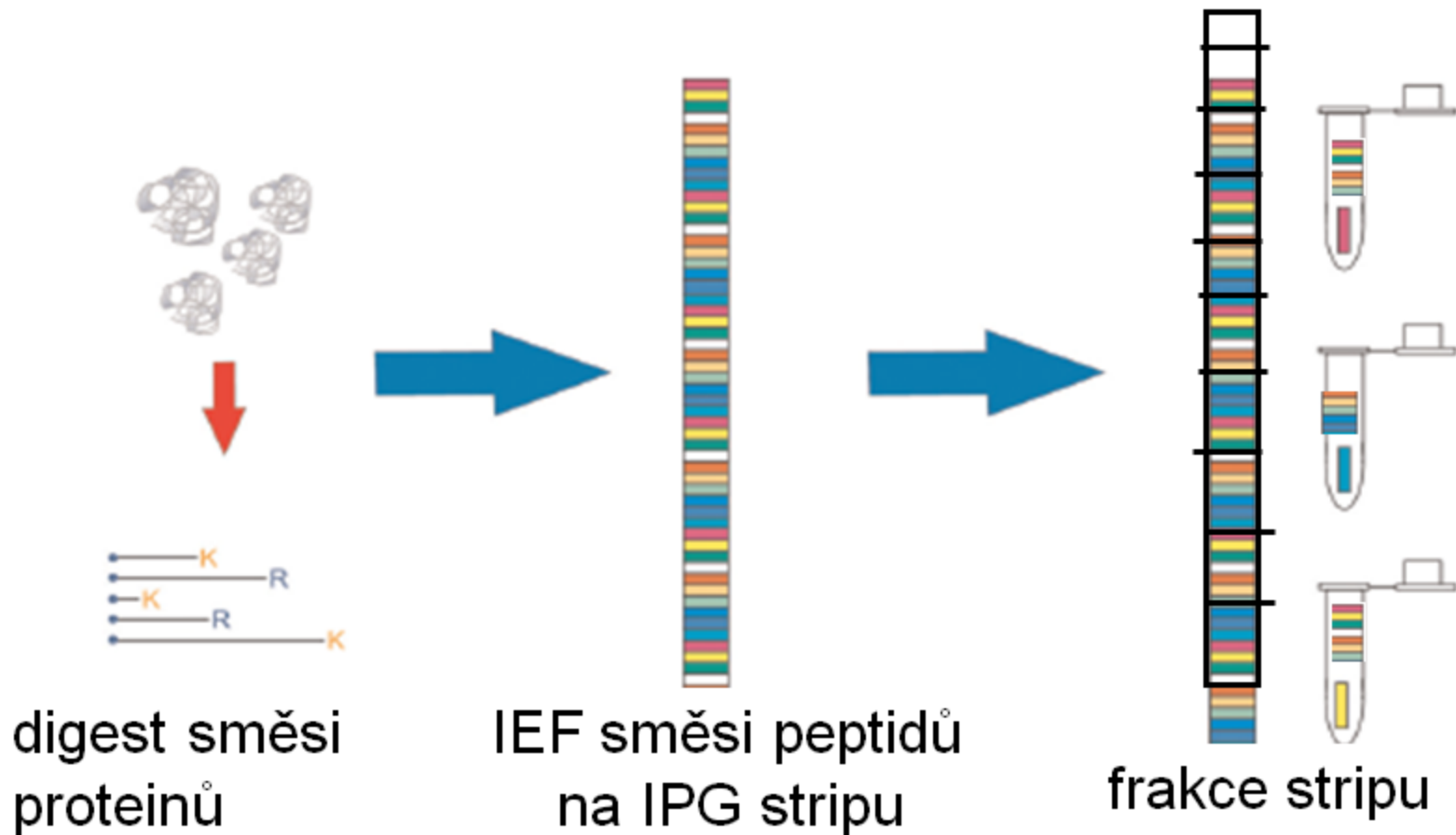
1. Distribuce mezi vodnou a organickou vrstvou
2. Iontoměničová interakce se skupinami stacionární fáze

- Vhodná pro separaci posttranslačně-modifikovaných peptidů

MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni peptidů

Frakcionace peptidů na IPG stripu

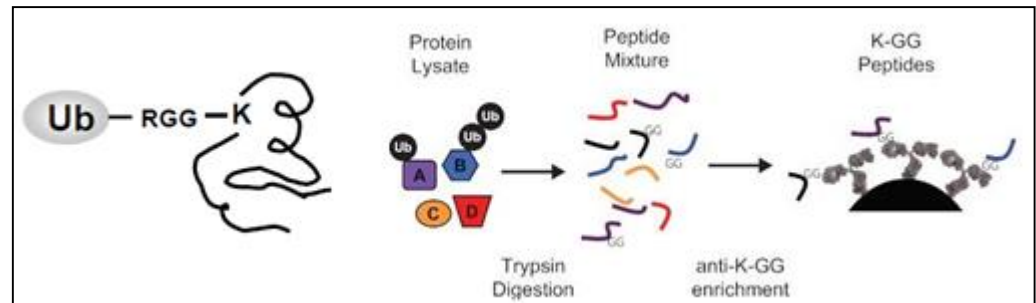


MS analýza proteinového vzorku

Obohacení peptidů

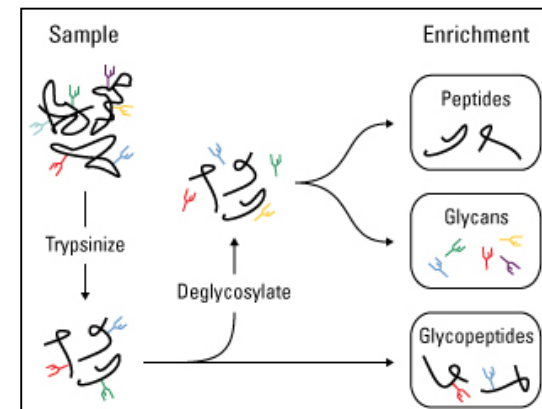
Obohacení specifických postranslačně modifikovaných peptidů

- Fosforylace
- Ubiquitinace
- 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

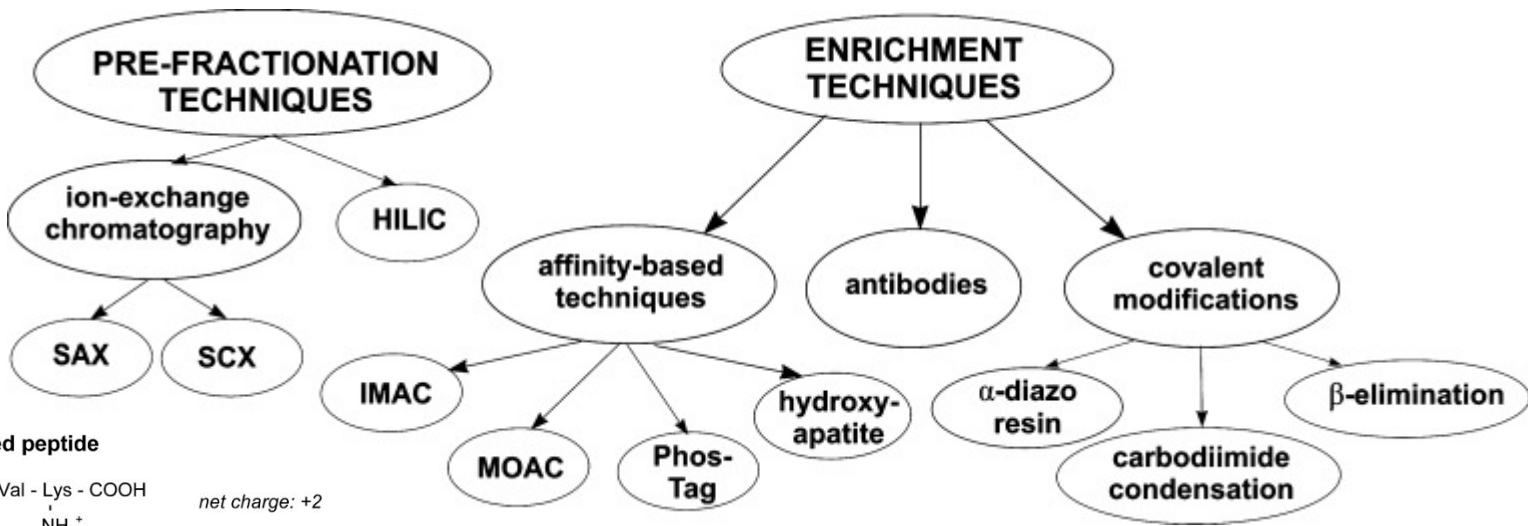


MS analýza proteinového vzorku

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

