

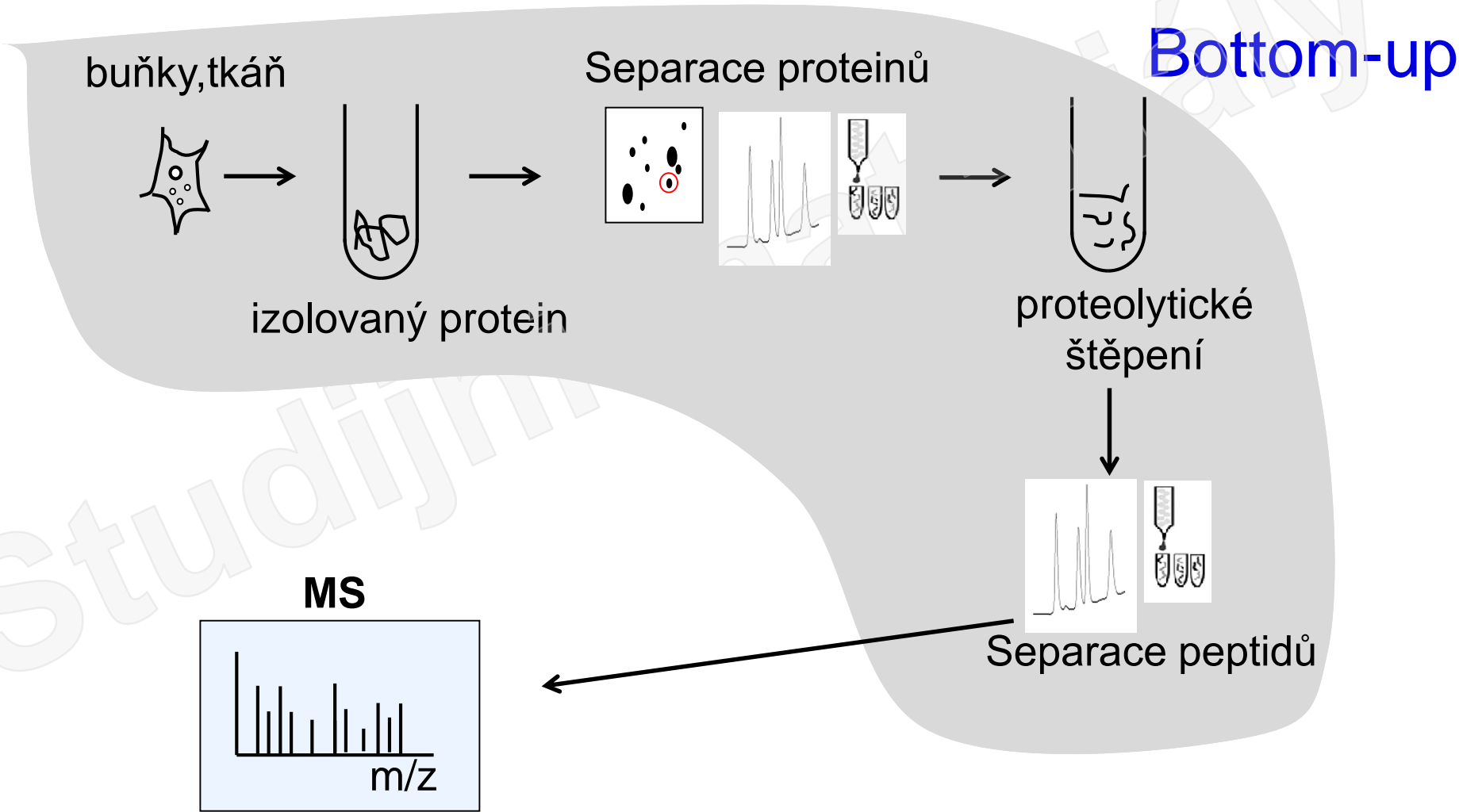
M U N I
S C I

C7250 Charakterizace proteinů hmotnostní spektrometrií

Příprava vzorku pro MS analýzu

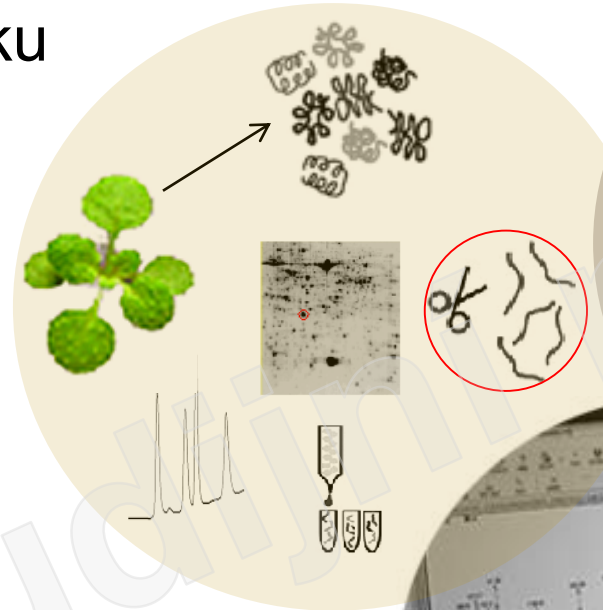
Gabriela Lochmanová, Ph.D.

Proteomický experiment

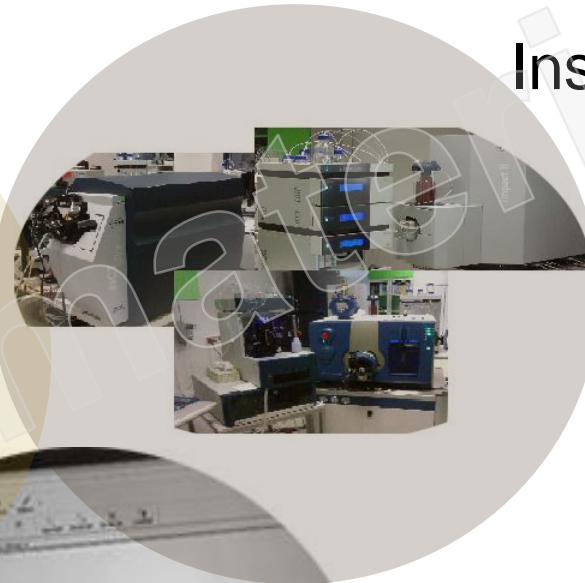


Faktory ovlivňující výsledek MS

Kvalita
a reprodukovatelnost
přípravy vzorku



Instrumentace

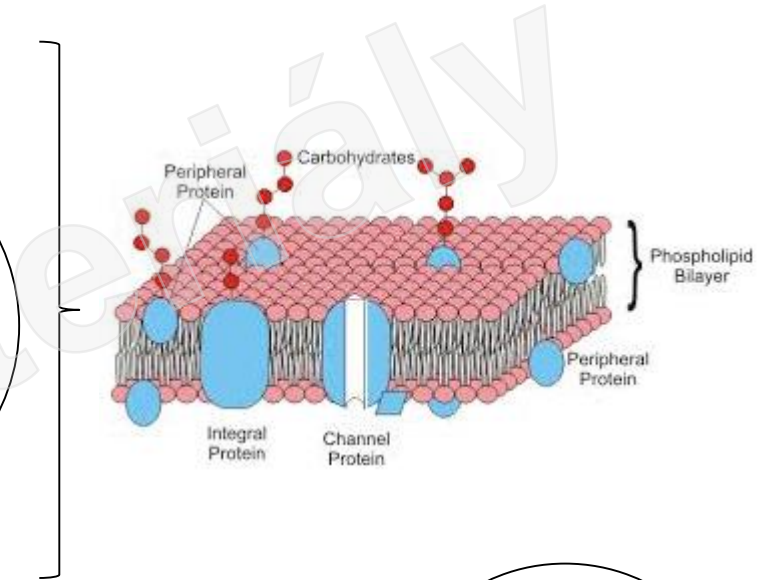


Vyhodnocení dat



Rozmanitost vzorku

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



Obecné principy izolace:

- Rozrušení buněk – lyzační pufr, 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 zmrazování a rozmrazování
Manuální rozmělnění	 Miska a tlouček	Rozmělnění rostlinné tkáně v tekutém dusíku

Ultrasonikační sonda



Bioruptor



Gentler sonication than probe and cup horn sonicators...

5µl to 2ml

**SIXTEEN
SAMPLES
SIMULTANEOUSLY**



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 reagenty (specifické dle typu vzorku: chaotropní činidla, soli, inhibitory proteáz a enzymů odstraňujících modifikace, redukční činidla...)

Detergenty

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

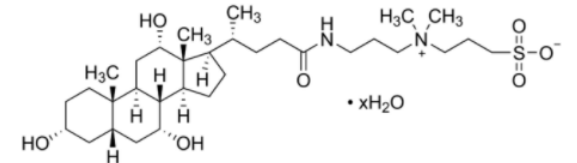
SDS

Sodium Dodecyl Sulfate



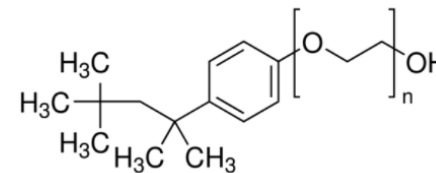
CHAPS

3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate



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

Nonidet P-40



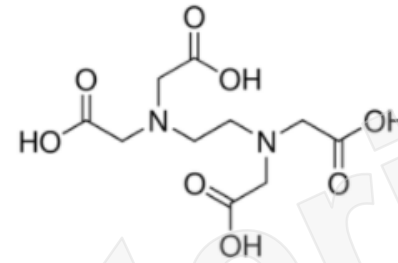
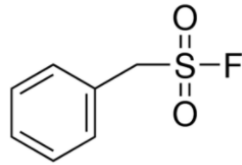
- Vliv teploty

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

Příklady inhibitorů proteáz

phenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF):

inhibitor serinových i cysteinových proteáz



kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA):

inhibitor metaloproteáz



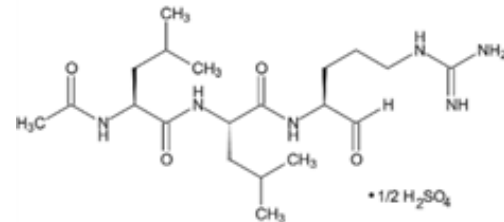
Aprotinin:

inhibitor serinových proteáz

komplex disociuje při pH >10 nebo <3.2

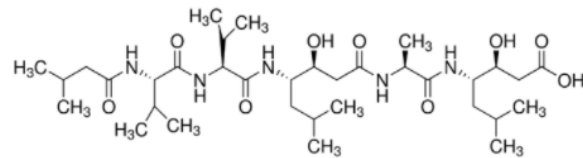
Leupeptin:

inhibitor serinových a cysteinových proteáz



Pepstatin A:

inhibitor kyselých proteáz



Příklady inhibitorů fosfatáz

fluorid sodný (NaF):

inhibitor serinových i treoninových fosfatáz

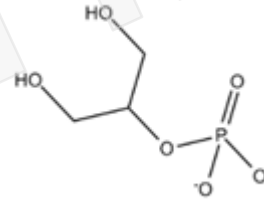
vanadičnan sodný (Na₃VO₄):

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

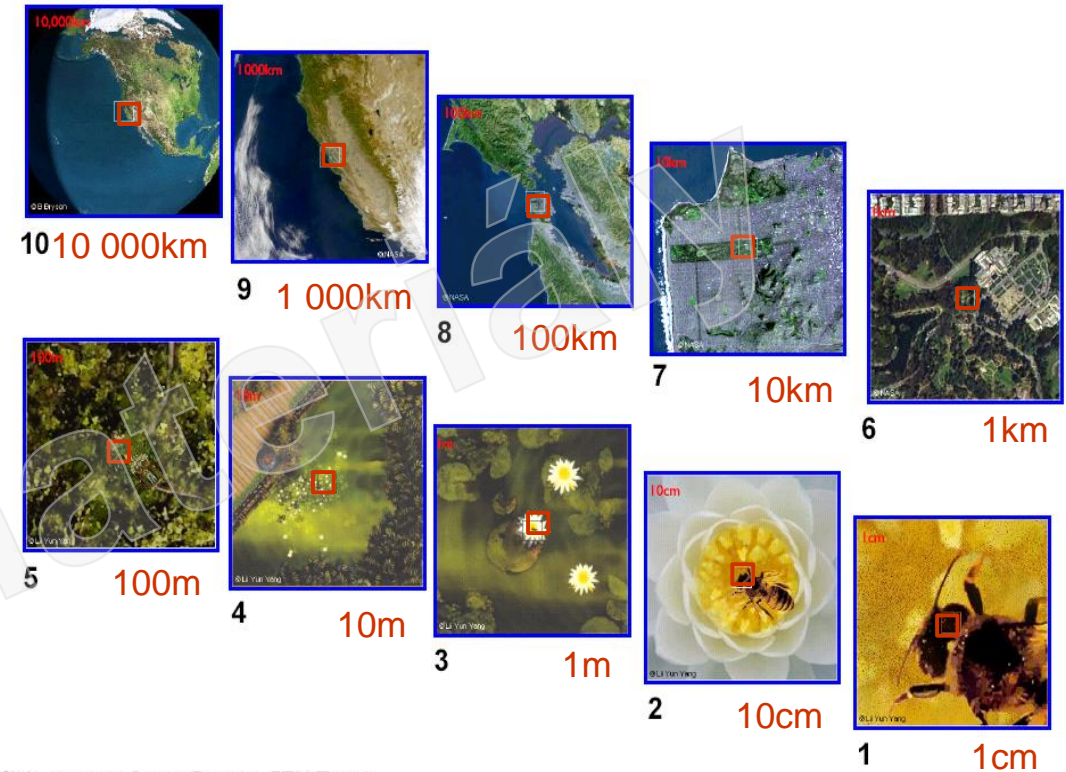
Cíl MS:

- 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

10^{10} Really Is Wide Dynamic Range



Slide courtesy Bruno Domon, ETH Zurich

Požadavek: čistý vzorek s omezenou komplexitou

MS analýza proteinového vzorku

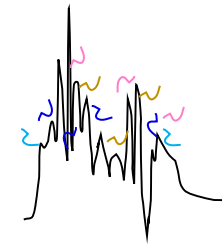
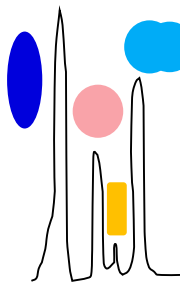
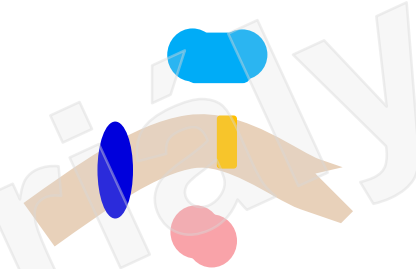
Snížení komplexity vzorku

Subcelulární frakcionace

Frakcionace na úrovni proteinu

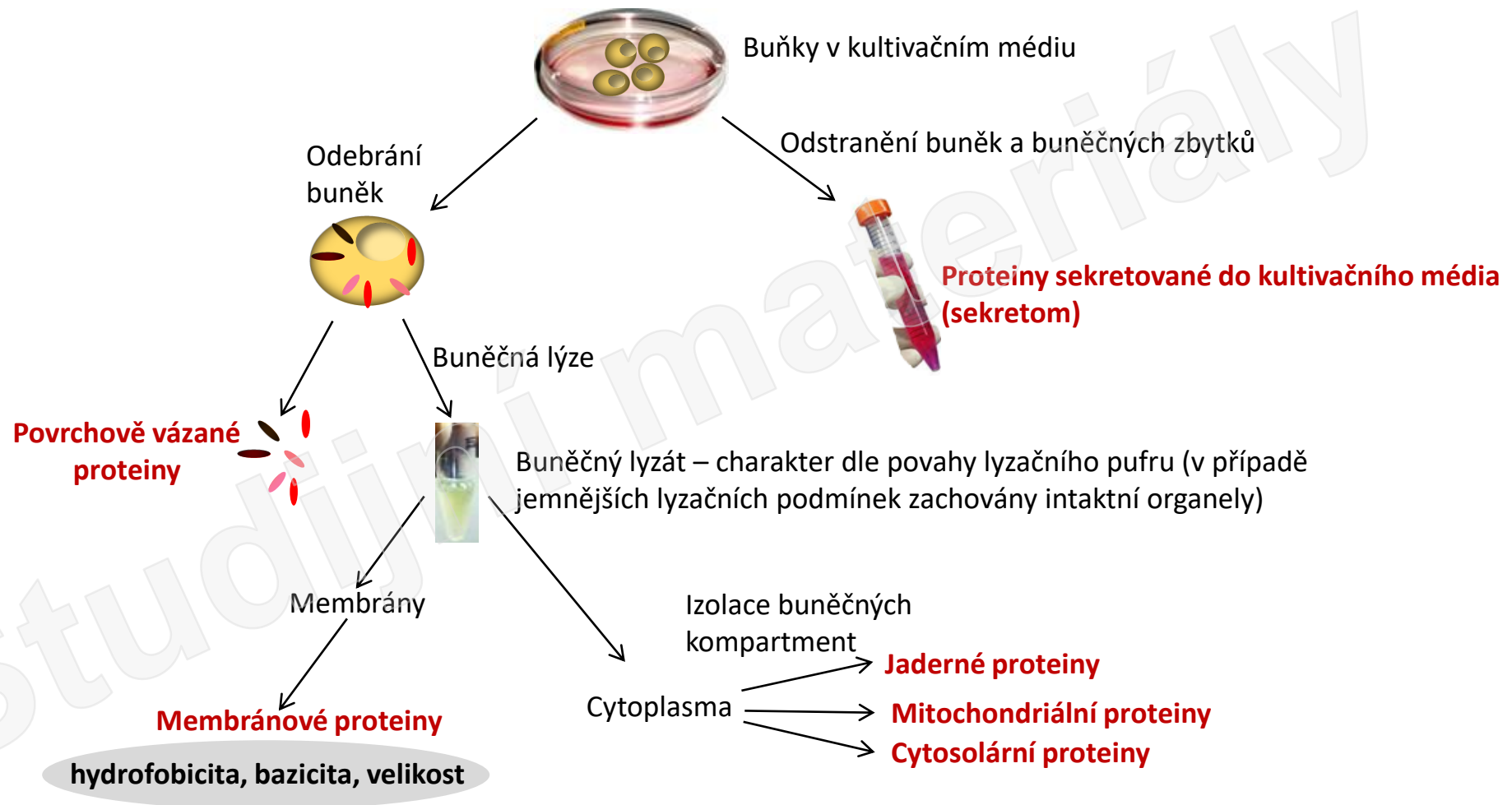
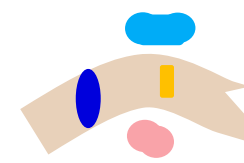
Frakcionace na úrovni peptidu

Separace
Deplece
Obohacení



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

- **Centrifugační metody**

Ultracentrifugace (hustota)

- **Elektroforetické metody**

Gelová elektroforéza (velikost/náboj)

Izoelektrická fokusace (pI)

Kapilární elektroforéza (velikost/náboj)

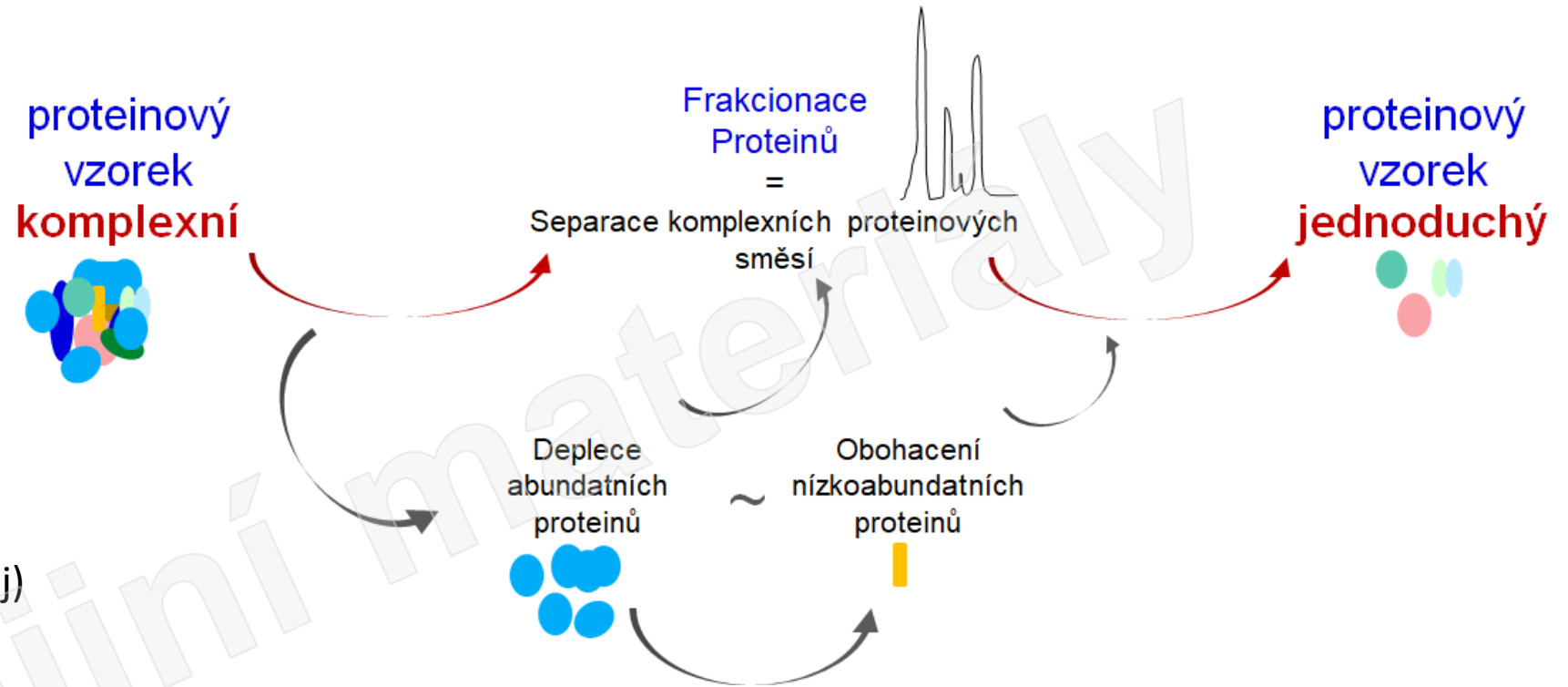
- **Chromatografické metody**

Reverzní fázová kapalinová chromatografie (hydrofobicita)

Iontoměničová chromatografie (náboj)

Afinitní chromatografie (specifická biomolekulární interakce)

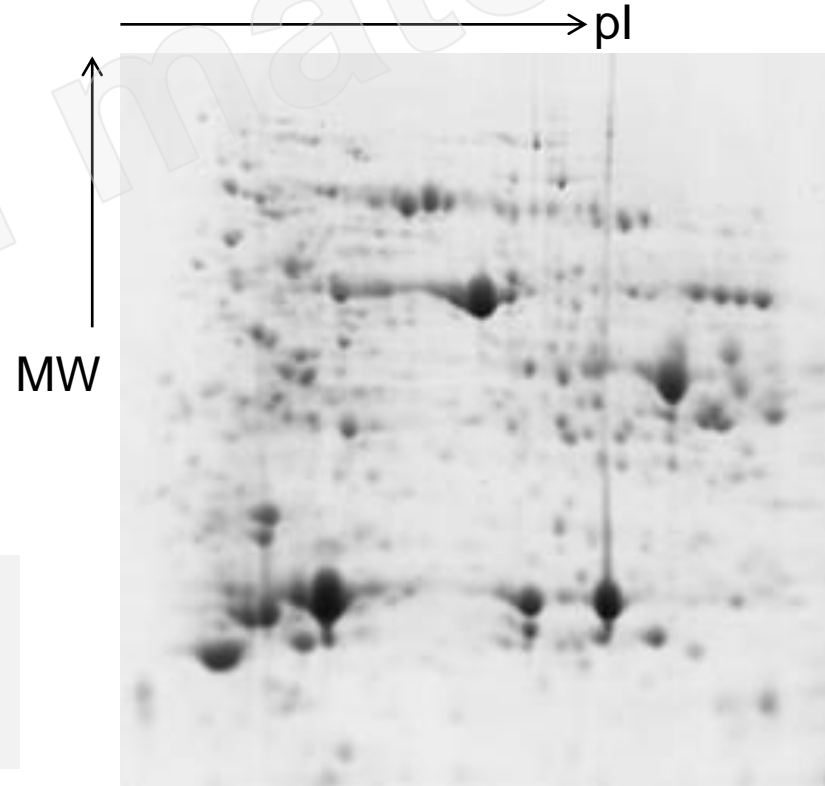
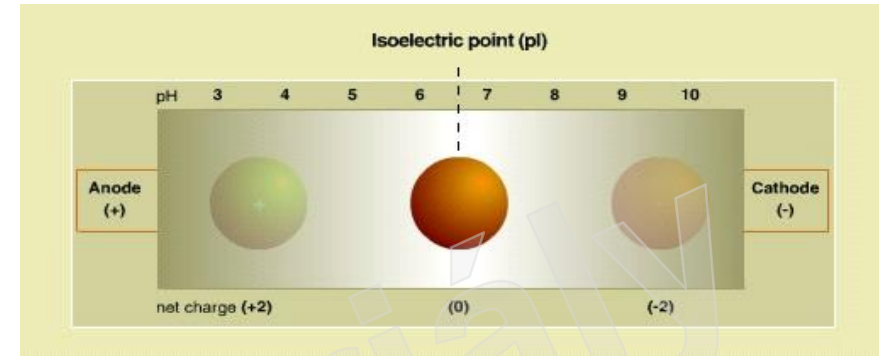
Gelová chromatografie (velikost)



MS analýza proteinového vzorku

2D SDS-PAGE:

- 1. rozměr = Izoelektrická fokusace (IEF)
 - elektromigrační metoda - migrace nabitých částic v gradientu pH v elektrickém poli
 - separace proteinů dle pI
- 2. rozměr = SDS-PAGE
 - elektromigrační metoda - migrace aniontů v elektrickém poli dle MW
 - 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

Složení solubilizačního roztoku:

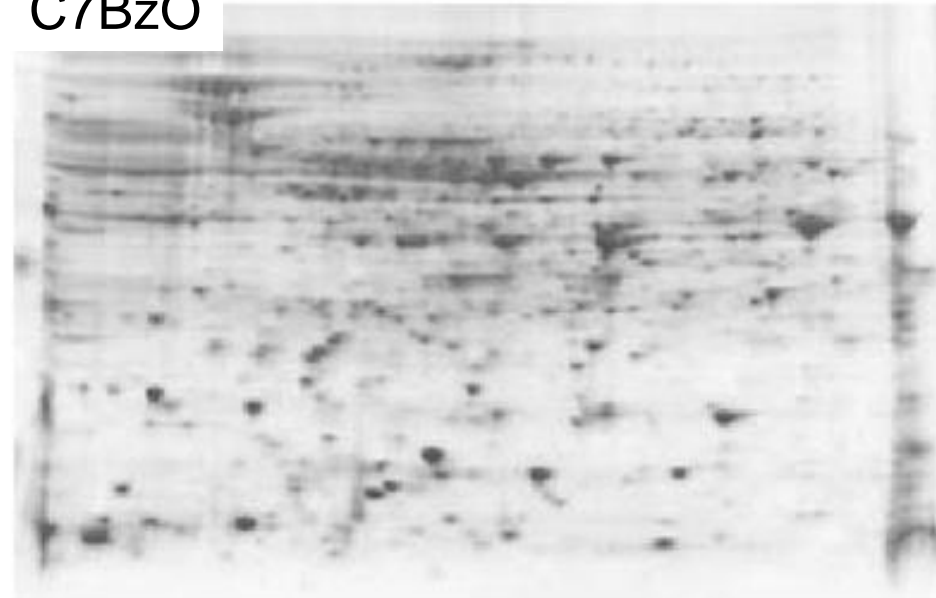
- Chaotropní činidla (močovina, thiomočovina)
- Neionogenní detergent (CHAPS, C7BzO)
- Redukční činidla (DTT, TBP)
- Inhibitory proteáz a enzymů odstraňujících modifikace (např. fosfatáz, deacetyláz, ...)
- Amfolyty

Komponenty kompatibilní s IEF - nesmí zvyšovat iontovou sílu

CHAPS



C7BzO

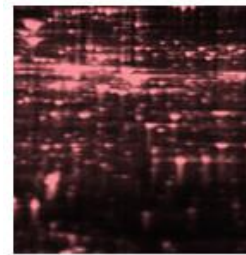


MS analýza proteinového vzorku

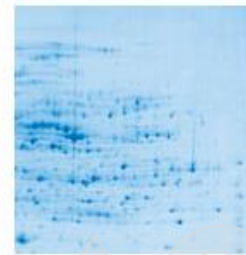
Typy detekce:

Značení před analýzou (DIGE – CyDye, radioaktivní značení)

Barvení po analýze



Sypro Ruby



Coomassie



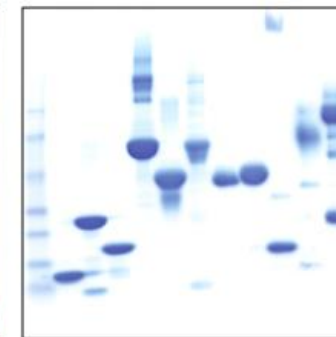
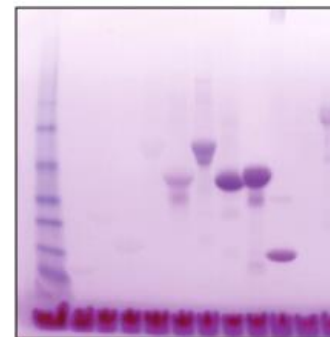
silver

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

Instrumentace:

Izoelektrický fokusátor

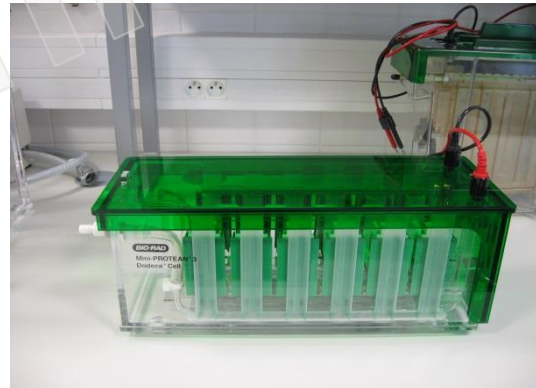
Elektroforetická aparatura

Denzitometr / Fluorescenční skener

SW pro obrazovou analýzu



Protean Plus Dodeca Cell



Mini-Protean 3 Dodeca Cell



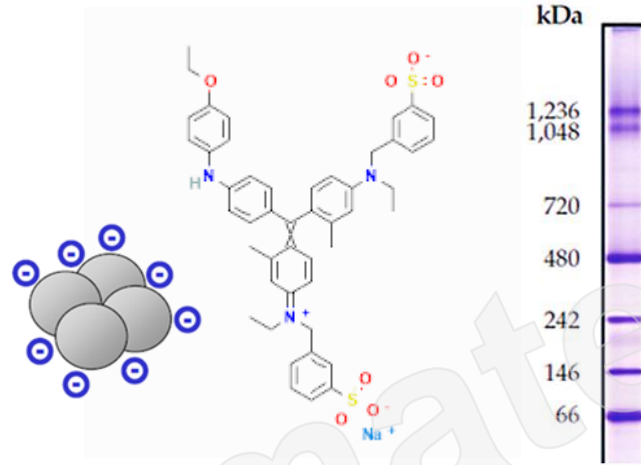
Protean II xi Cell

MS analýza proteinového vzorku

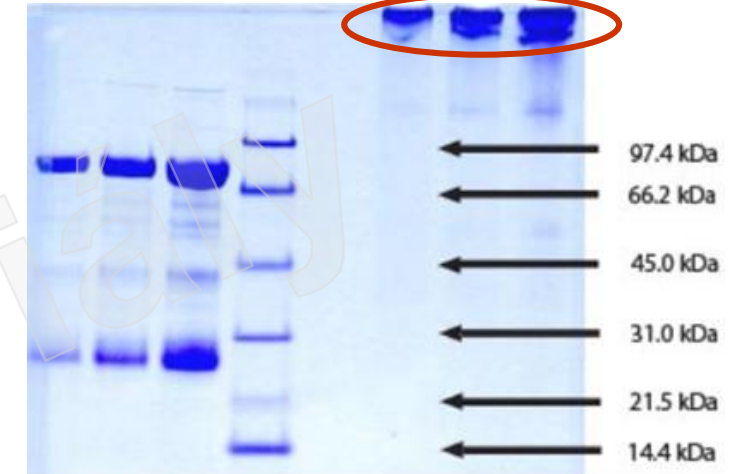
Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů

Blue Native Electrophoresis (BNE)

- Separace proteinů v nativním stavu
- Separace membránových komplexů (10 – 10 000 kDa)
- Vzorky solubilizovány neionogenními detergenty
- Náboj udělen Coomassie G-250



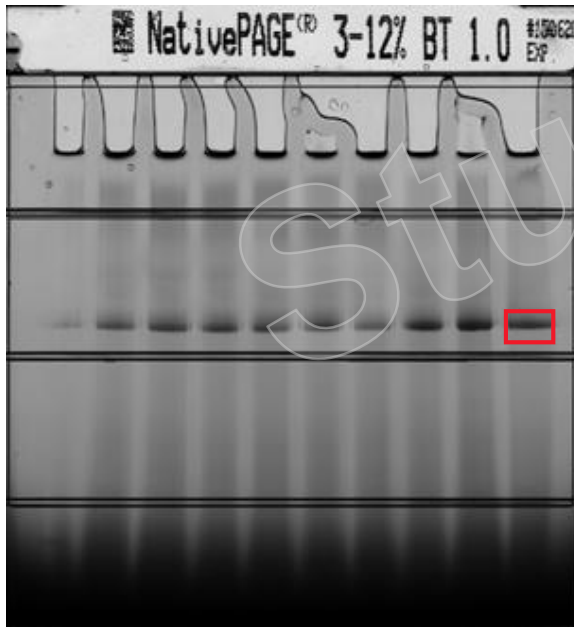
velké nativní proteiny



denaturované
(SDS/DTT/95 °C)

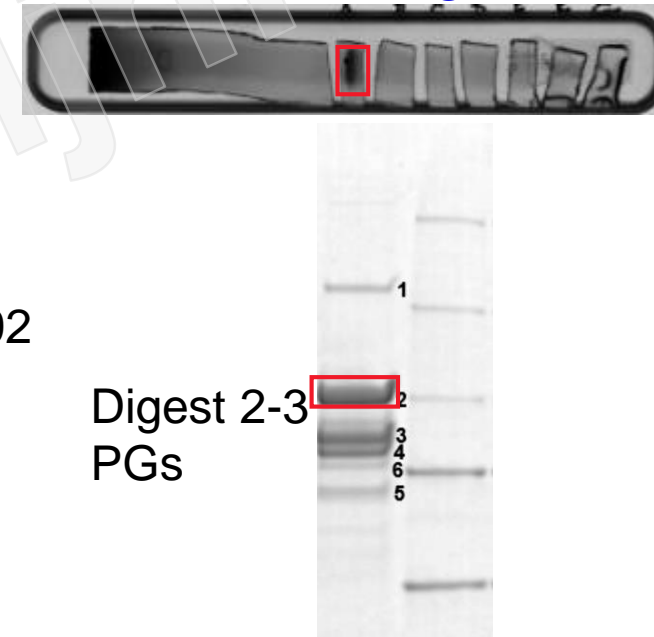
nativní

1. Rozměr BNE



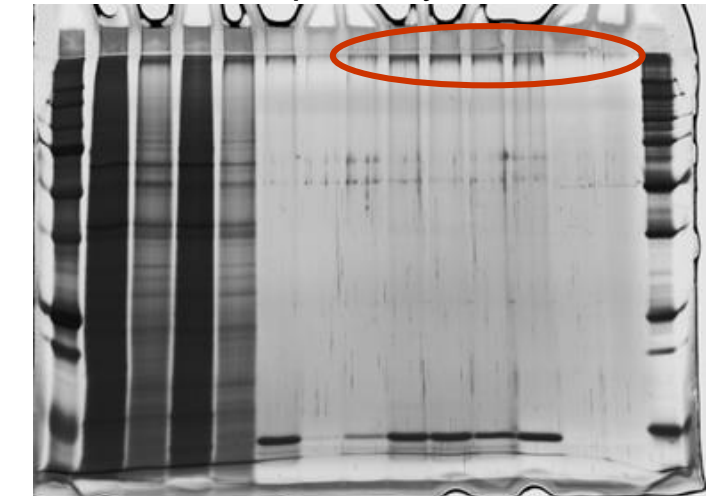
Digest 92
PGs

2. Rozměr SDS-PAGE



Digest 2-3
PGs

membránové proteiny



denaturované (SDS/DTT/95 °C)

MS analýza proteinového vzorku

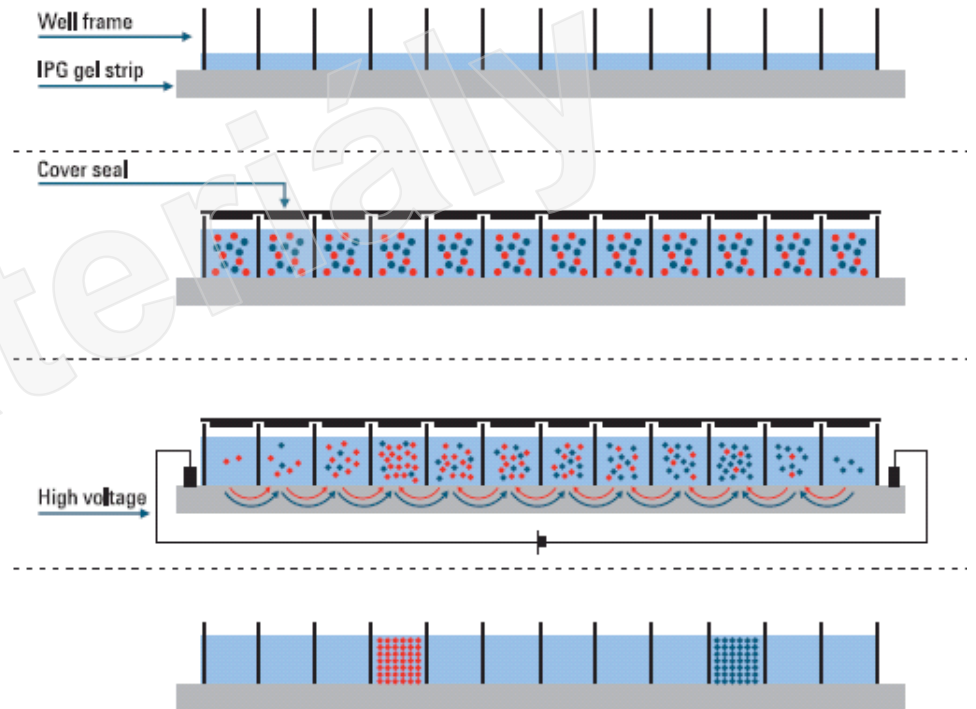
Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni proteinů

prefrakcionace v roztoku

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



MicroRotor



prefrakcionace na IPG stripu

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

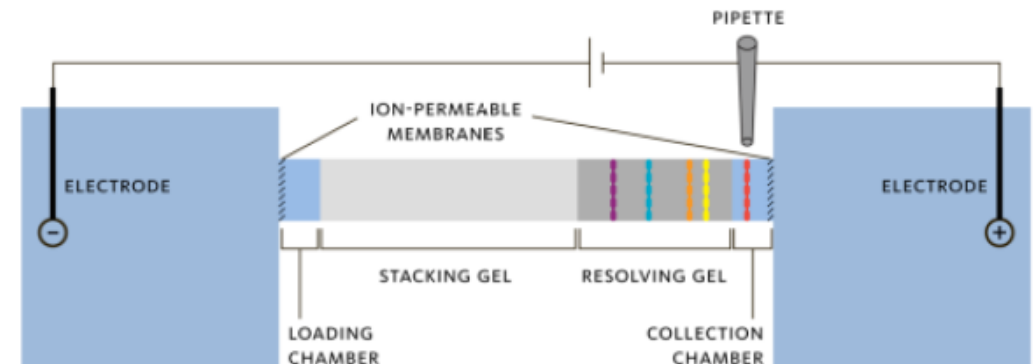


OffGel Fractionator

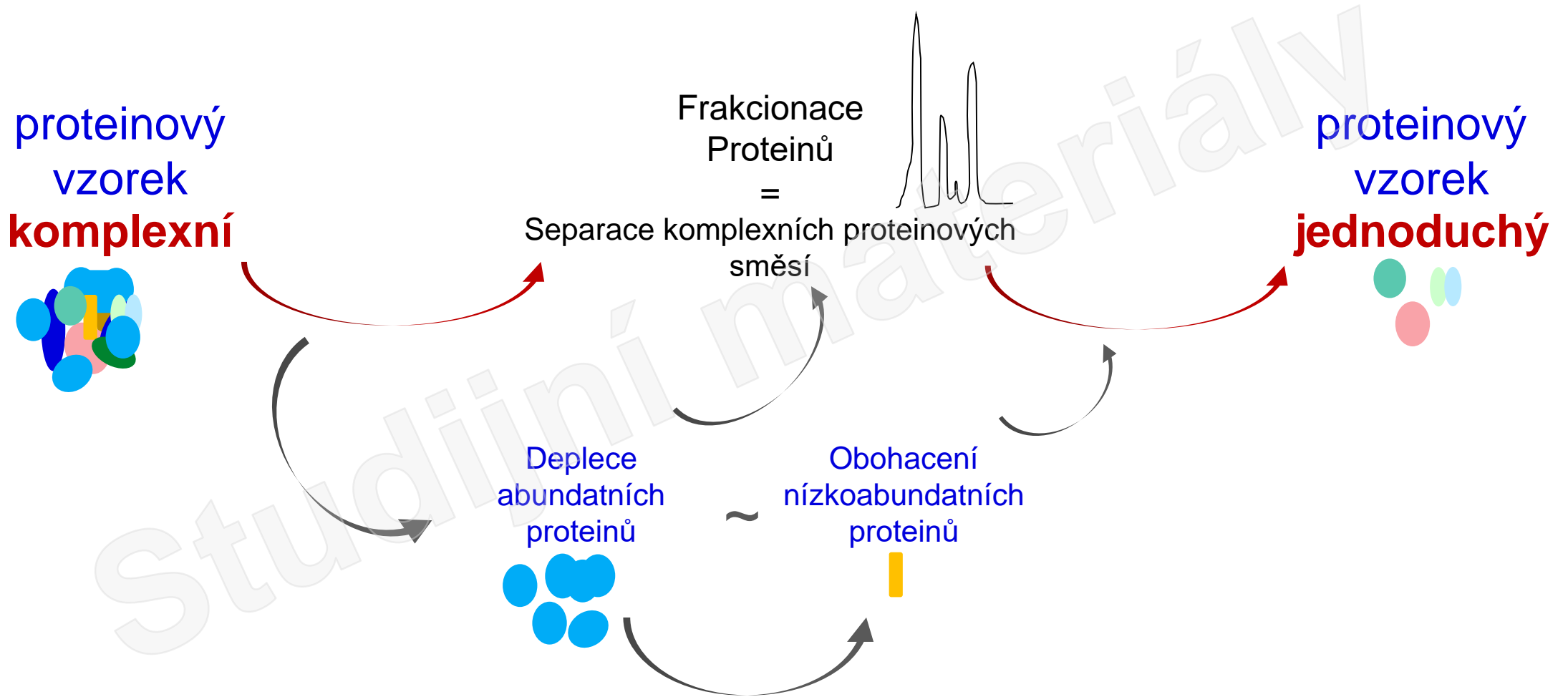
prefrakcionace v roztoku s využitím SDS-PAGE gelu

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

Gel Elution Liquid Fraction Entrapment Electrophoresis (GELFrEE)



MS analýza proteinového vzorku



MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Deplece abundantních proteinů

Metody

- Precipitace abundantního proteinu
- Chromatografie (kapalinová, gelová, ...)
- Immunodeplece

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

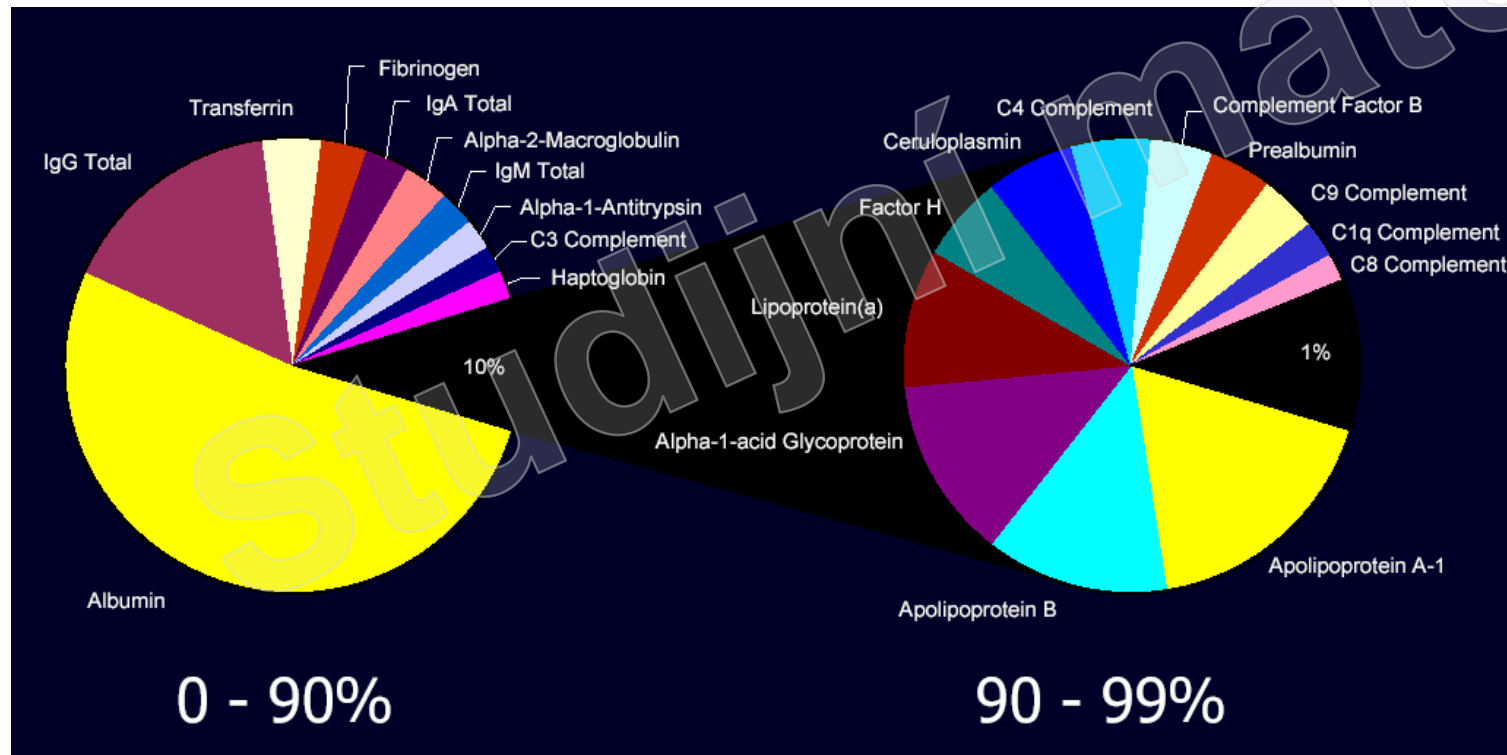
MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Deplece abundatních proteinů

Příklad: Proteiny plasmy

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

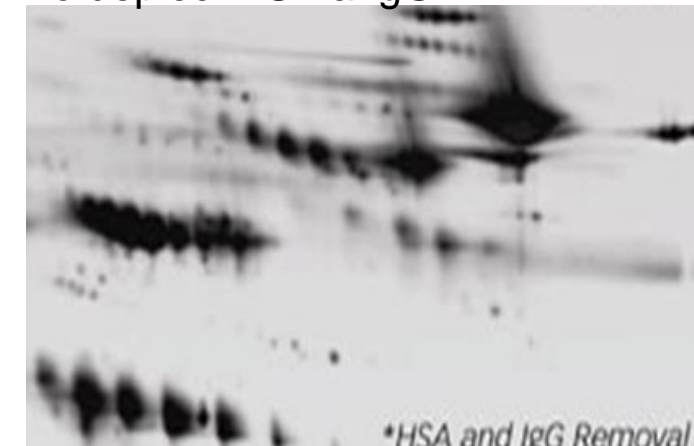
Potenciální biomarkery: ~ **pg/ml**, nízké hladiny zvláště v brzké fázi nemoci



Před deplecí HSA a IgG



Po depleci HSA a IgG



MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: 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

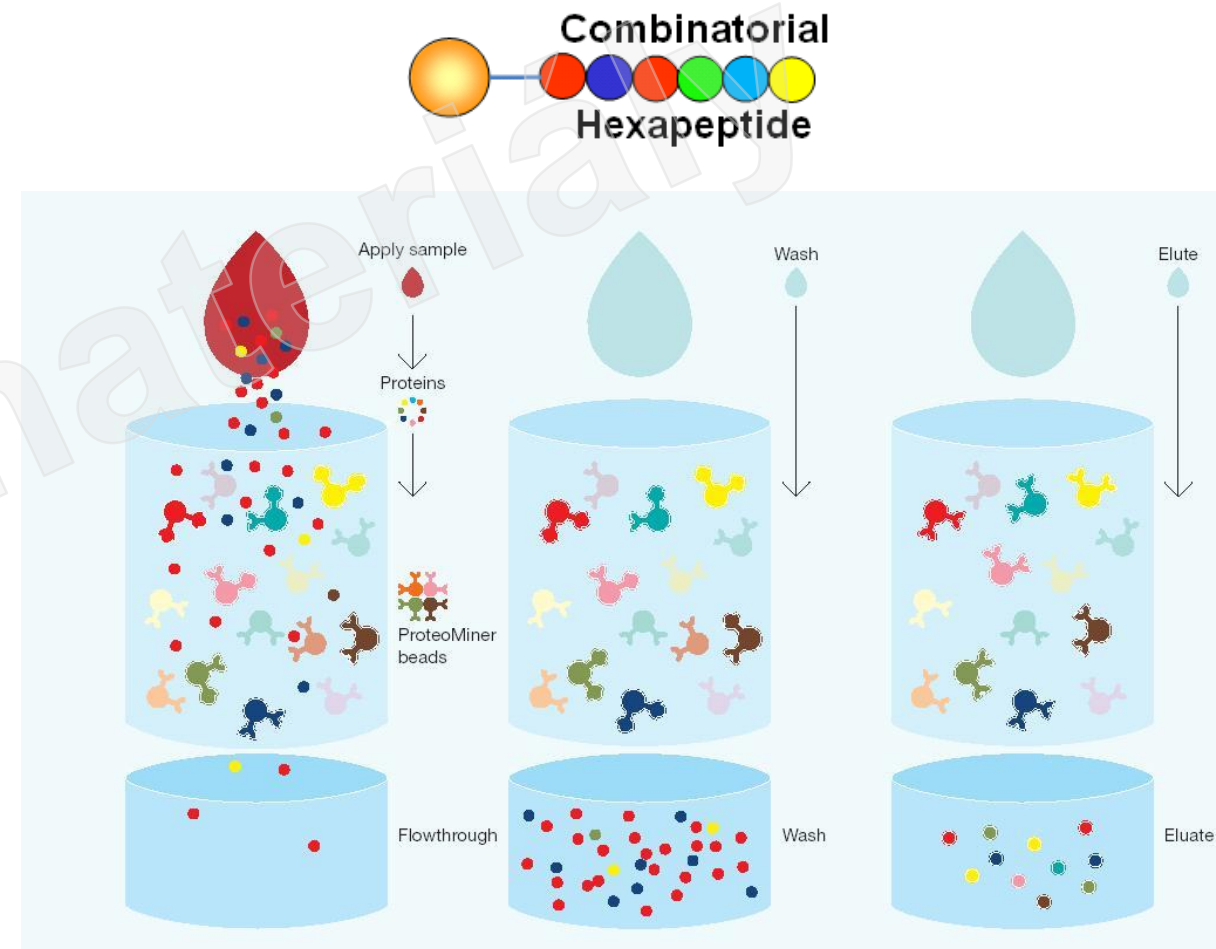
Abundantní proteiny saturují afinitní ligandy a nadbytečné proteiny jsou odmyty

x

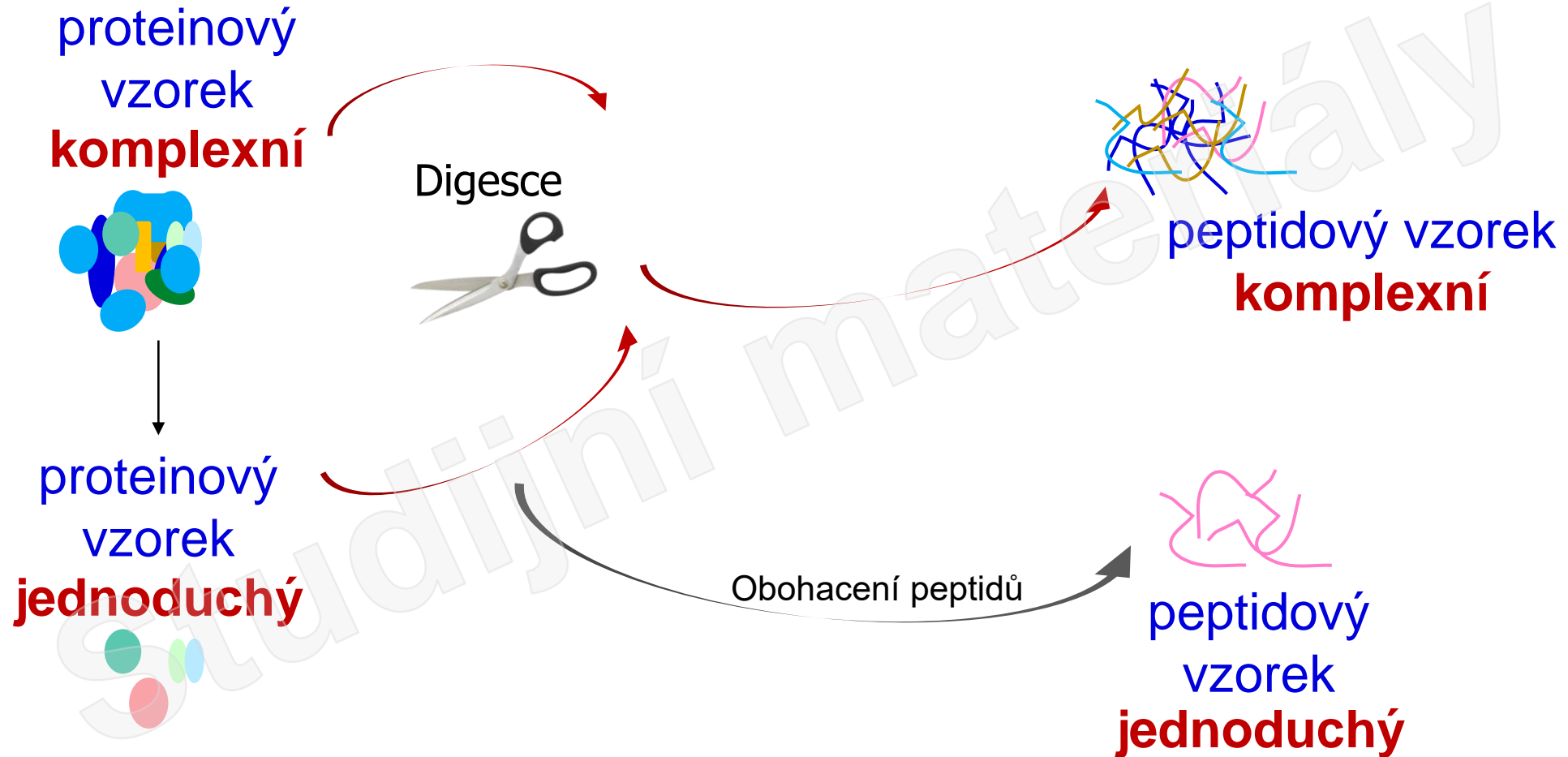
Středně a nízkoabundantní proteiny jsou zakonzentrovány na specifických ligandech

Výhody:

- Snížení dynamického rozsahu koncentrací při zachování zástupců všech proteinů původního vzorku
- vhodný pro rozmanité typy vzorků, nezávislá na dostupnosti protilátek (na rozdíl od imunodeplece)



MS analýza proteinového vzorku



MS analýza proteinového vzorku

Digestce proteinů

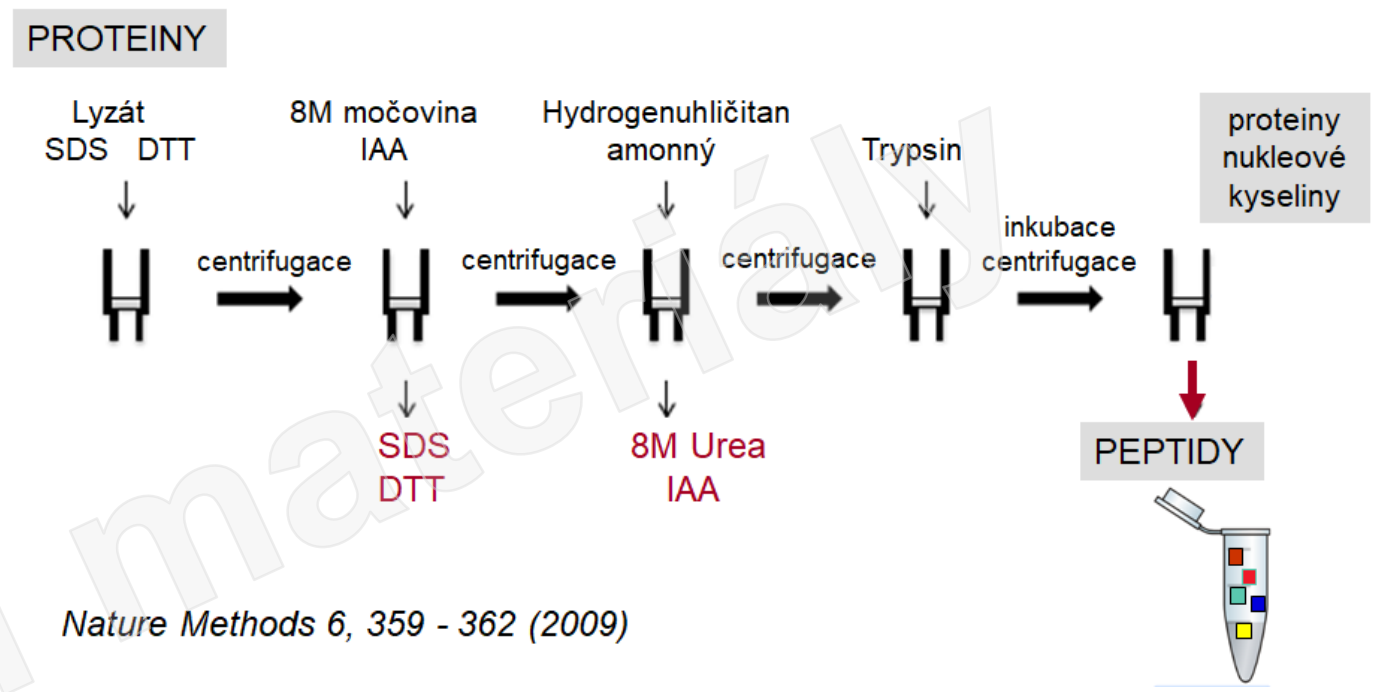
- Výběr vhodné proteiny (event. kombinace proteinas)
- Redukce a alkylace S-S můstků před digescí
- Digestce ovlivňuje: poměr enzym:substrát, teplota, doba
- Kompatibilita roztoků s následnou MS
 - odstranění kontaminant – např. FASP, SP3



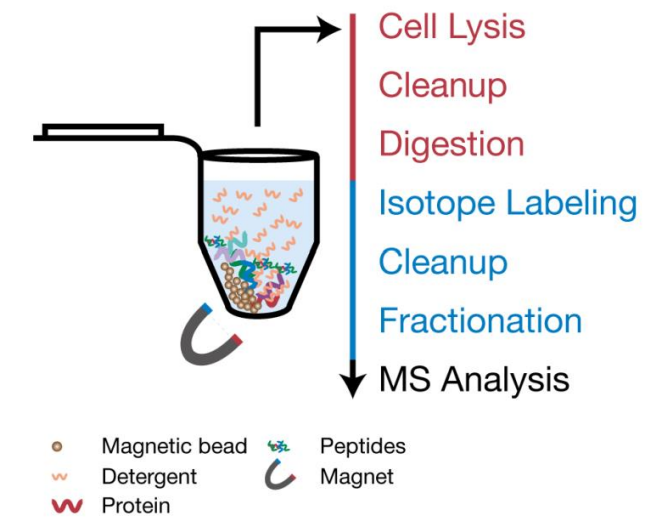
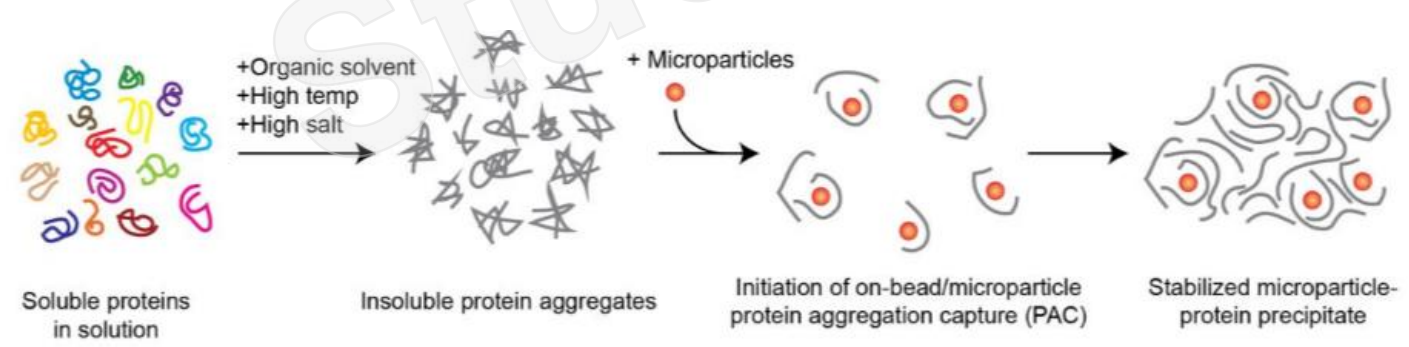
MS analýza proteinového vzorku

Digestce proteinů v roztoku

- **FASP** = Filter Aided Sample Preparation



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



MS analýza proteinového vzorku

Frakcionace na úrovni peptidů

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)

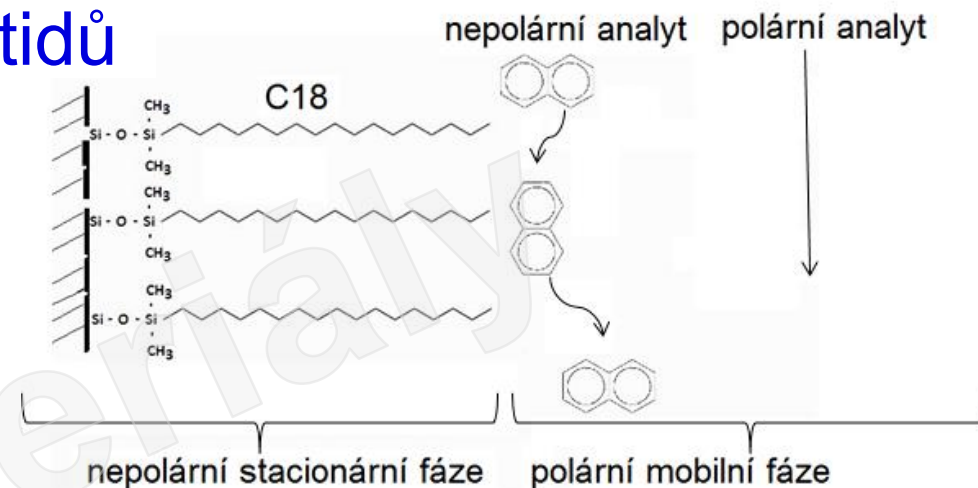
MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni peptidů

Frakcionace peptidů v roztoku pomocí LC

Chromatografie na reverzní fázi

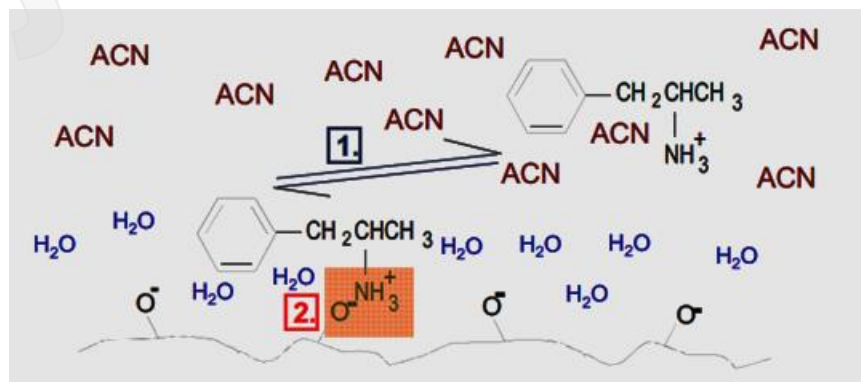
- Nejčastěji používaná
- Separace molekul v roztoku na základě hydrofobicity
 - separace na základě rozdělovacího koeficientu mezi polární mobilní a hydrofobní (nepolární) stacionární fázi
- Separaci ovlivňuje: teplota, rozměry kolony, stacionární fáze, velikost částic, iontově-párující činidla, gradient



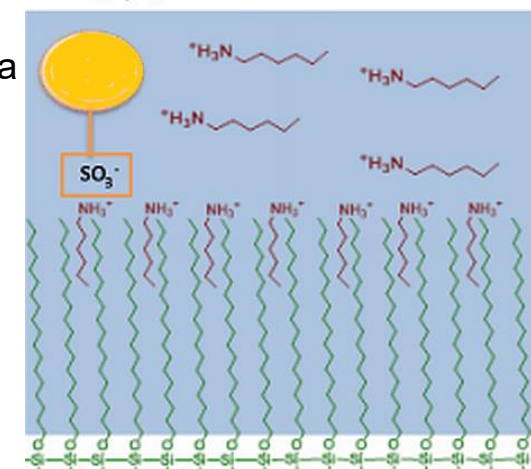
Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC)

- Separace hydrofilních peptidů
- Hydrofobní mobilní fáze (např. ACN + voda, pufr)
- 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, $-(\text{CH}_2)_n\text{-N(Me)}_2^{(+)}\text{-(CH}_2)_n\text{-SO}_3^{(-)}$



Iontově párující činidla



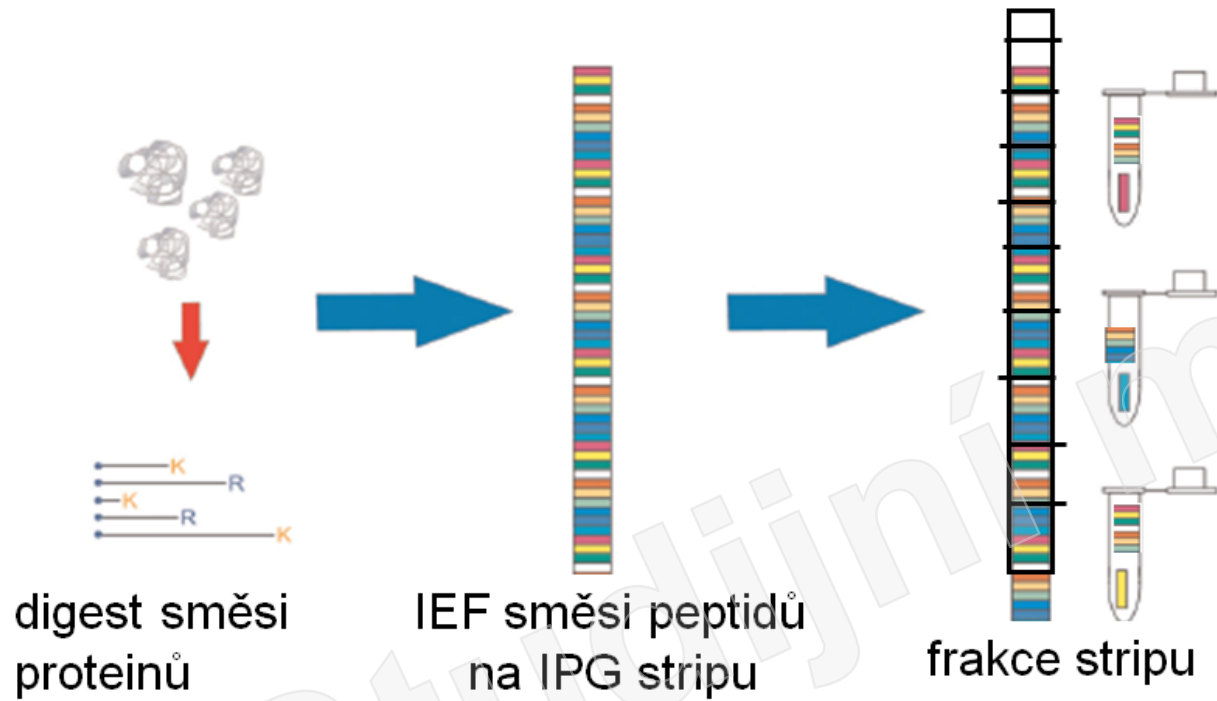
1. Distribuce mezi vodnou a organickou vrstvou
2. Iontoměničová interakce se skupinami stacionární fáze

- Vhodná pro separaci posttranslačně-modifikovaných peptidů

MS analýza proteinového vzorku

Snížení komplexity: Frakcionace na úrovni peptidů

Frakcionace peptidů v gelu



MS analýza proteinového vzorku

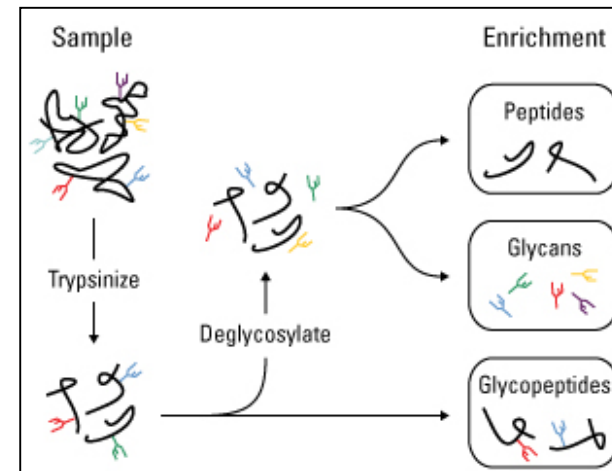
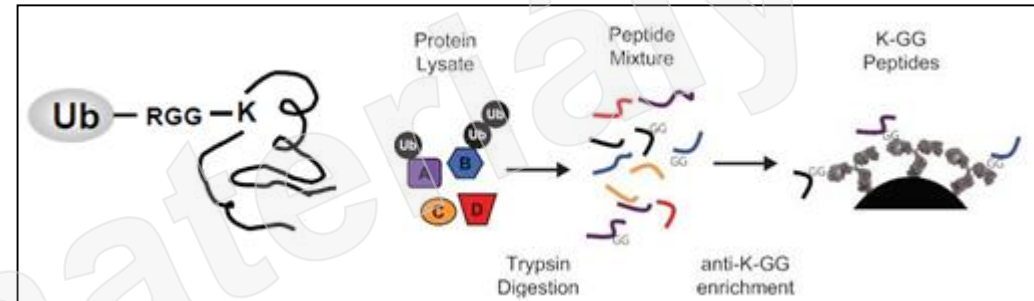
Snížení komplexity: Obohacení peptidů

Obohacení specifických posttranslačně modifikovaných peptidů

- Fosforylace
- Ubiquitinace
- Glykosylace
- Acetylace

Přístupy:

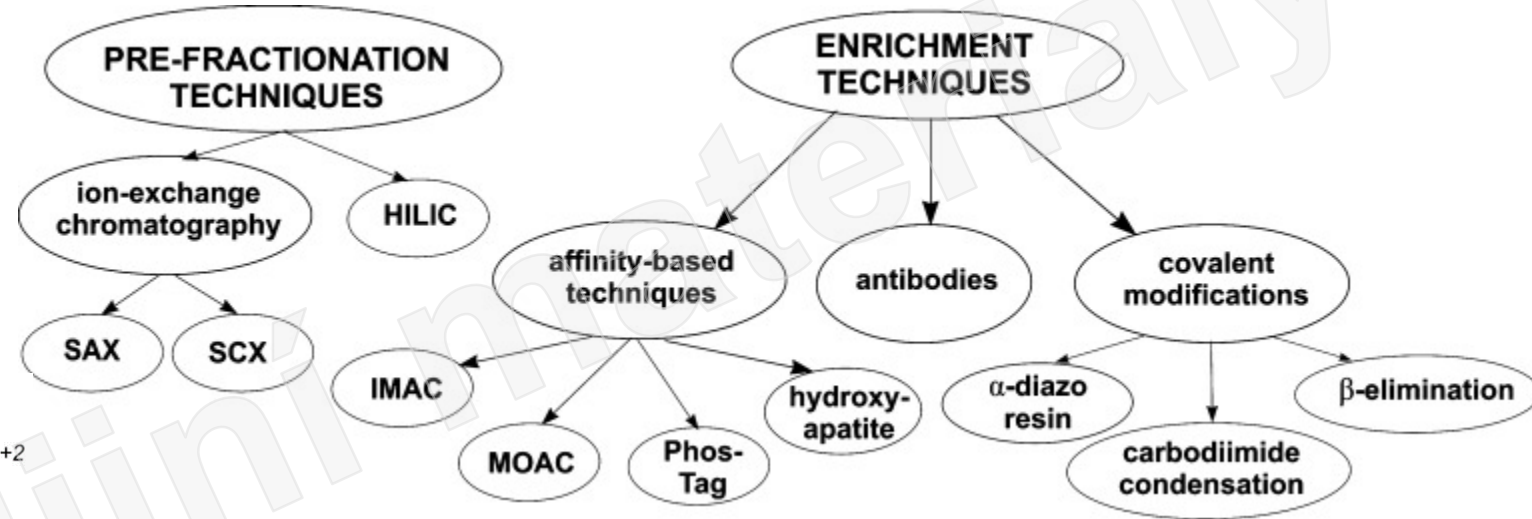
- Imunoprecipitace (IP)
(specifické protilátky proti PTM)
- Afinity chromatografie
(protilátka nebo ligand – specifita pro PTM)
- Enzymatická modifikace
(specifický enzym pro danou modifikaci)
- Chemická modifikace



MS analýza proteinového vzorku

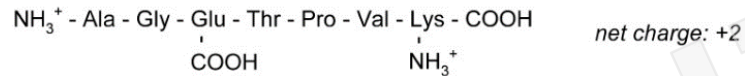
Snížení komplexity: Obohacení peptidů

- Přístupy pro obohacení fosfopeptidů



SCX

typical non-phosphorylated peptide



typical phosphorylated peptide



multiply-phosphorylated peptide



C-terminal non-phosphorylated peptide



Zpracování vzorku v minimálním objemu

Celoproteomová analýza vyžaduje desítky mikrogramů vstupního ($\sim 10^5$ buněk) vzorku vzhledem k:

- dynamickému rozsahu koncentrace proteinů v buňce
- citlivosti hmotnostních spektrometrů

Při zpracování velkého množství vzorku se ztrácí informace o heterogenitě buněk. I v rámci jednoho buněčného typu existují různé populace, které se liší v genové expresi.

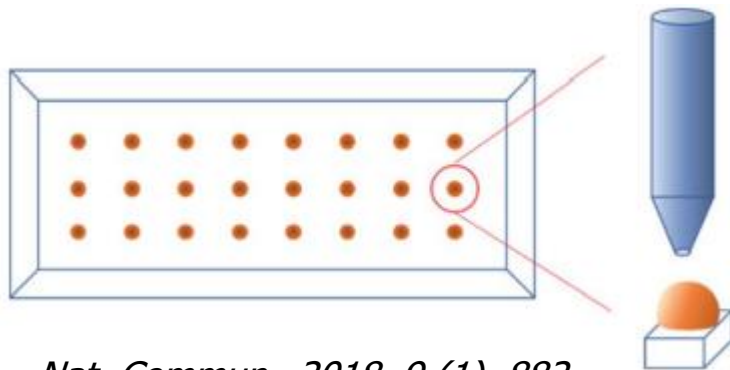
Minimalizace ztrát vzorku kvůli nespecifickým interakcím proteinů/peptidů s povrchy

Nutno:

- minimalizovat objem vzorku při zpracování
- eliminovat přenos vzorku
- blokovat nespecifické interakce

Zpracování vzorku v minimálním objemu

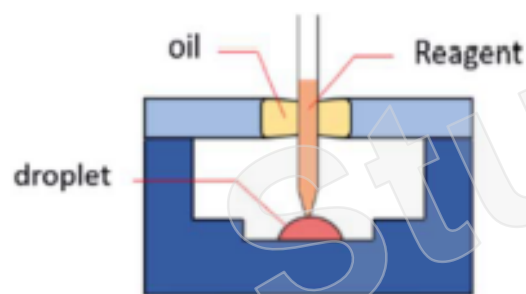
NanoPOTS



Nat. Commun., 2018, 9 (1), 882.

- Skleněný čip s hydrofilním povrchem (průměr 1 mm).
- Všechny kroky (extrakce, redukce, alkylace, digesce) probíhají v nanojamce (objem 200 nl) – 99% redukce objemu oproti standardním přístupům
- Pro lýzi použit detergent kompatibilní s MS (Rapigest).
- Identifikace: stovky proteinů z jednotlivých HeLa buněk

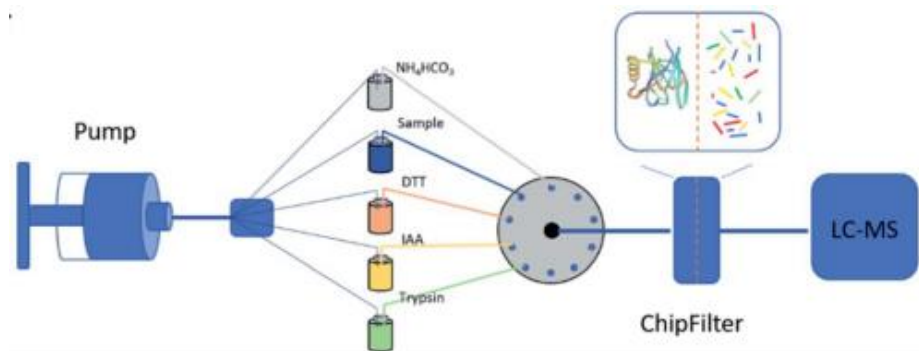
OAD (Oil-Air-Droplet) chip



Anal. Chem., 2018, 90 (8), 5430 – 5438.

- Kapka s buňkami na nízkovazebném milimetrovém čipu.
- Vzorek převrstven kapkou oleje (potlačení evaporace).
- Identifikace: stovky proteinů z jednotlivých HeLa buněk
- Všechny kroky (extrakce, redukce, alkylace, digesce) probíhají v nanokapce (550 nl).
- Kapilára C18 vložena do kapky – on-line odsolení.
- Identifikace: 51 proteinů (z 1 HeLa b.) – 1360 (ze 100 HeLa b.).

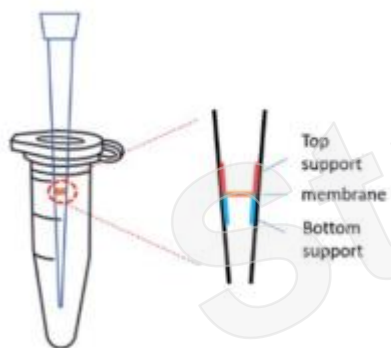
ChipFilter



J. Proteome Res., 2020, 19 (7), 2654 – 2663.

- Ultrafiltrační membrána v utěsněné mikroreakční komůrce (objem 1.2 ml).
- Založeno na přístupu FASP – miniaturizace (objem 600 nl).
- Integrovaná pumpa s vícecestnými ventily pro přívod reagensů.
- On-line napojení na LC-MS/MS.

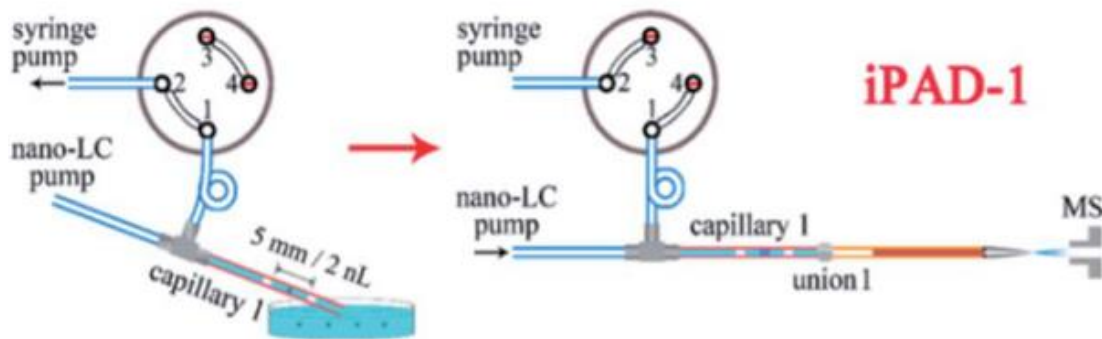
MicroFASP



Anal. Chem., 2020, 92 (7), 5554 – 5560.

- Miniaturizace povrchu filtrační membrány u FASP (0.1 mm²).
- Membrána integrována do 20ul pipetovací špičky.
- 1/10 objemu oproti standardnímu FASP.
- Identifikace: 3000 proteinů (z 10e3 buněk).

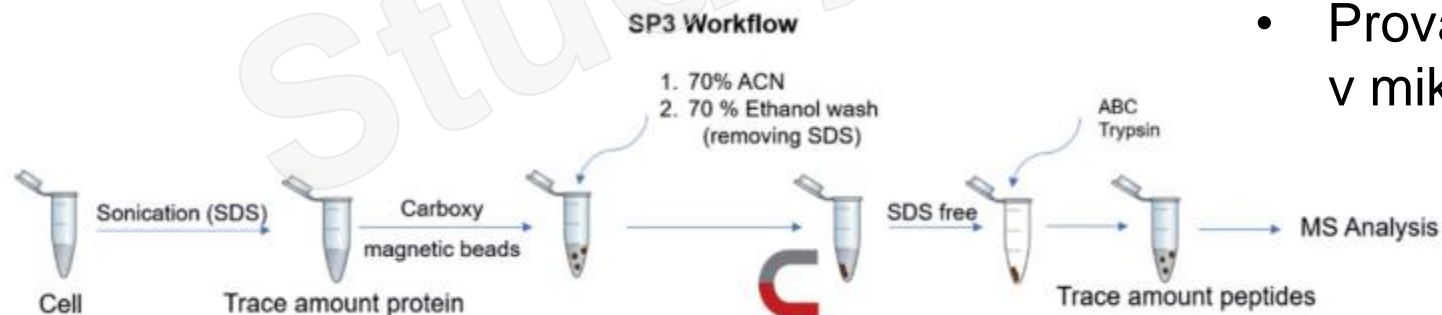
iPAD (Integrated Proteome analysis Device)



Anal. Chem., 2015, 87 (13), 6674 – 6680.

Anal. Chem., 2018, 90 (23), 14003 – 14010.

SP3



Mol. Syst. Biol., 2014, 10, 757.

- Buňky (10^2) v chladném roztoku (soli, guanidine hydrochlorid, EDTA, trypsin) injikovány do kapiláry, kde proběhla lýze i digesce ($50\text{ }^\circ\text{C}$).
- Přímé napojení na LC-MS/MS.
- Identifikace: 813 proteinů (ze 100 buněk).
- Vylepšení – zúžení kapilár (objem 20 nL)
- HeLa buňka nasáta kapilárou pod mikroskopem, zvýšená teplota, ultrasonikace pro podporu lýze a digesce, on-line s LC-MS/MS.
- Identifikace: 180 proteinů (z 1 buňky).

- SP3 vhodný pro přípravu vzorku s limitním množstvím proteinu.
- Provádí se klasicky ve zkumavkách, v mikrolitrových množstvích.

Děkuji za pozornost!

Gabriela Lochmanová

gabriela.lochmanova@ceitec.muni.cz