

PROTEOMIKA

2015

- Proteomika, proteiny, co a proč. Metody práce s bílkovinami
- Separační metody, 2-DE
- 2-DE detaily a záludnosti, identifikace bílkovin pomocí MS
- Principy hmotnostní spektrometrie
- Identifikace proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie
- Shot-gun strategie, kvantitativní metody
- Proteomika membránových proteinů, proteinové komplexy
- Klinická proteomika, zvláštní metody
- Proteomické čtení, ukázkové studie

- Co je proteomika ? Proteom? Protein?
- Experimentální strategie proteomiky
- Vlastnosti AMK a proteinů

METODY PRÁCE S PROTEINY

- dezintegrace, lyzace, frakcionace
- detergenty
- srážení, precipitace, denaturace
- koncentrace, filtrace
- stanovení koncentrace
- značení bílkovin
- chromatografie
- elektroforéza

ZNAČENÍ A ZAKOTVOVÁNÍ PROTEINŮ

Reaktivní skupiny bílkovin

sulfhydryl (–SH)

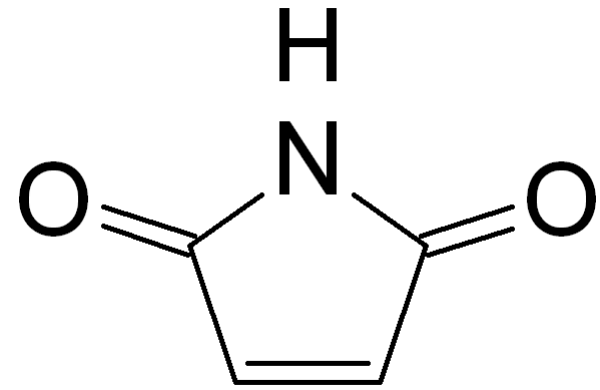
primární amin (–NH₂)

karboxyl (–COOH)

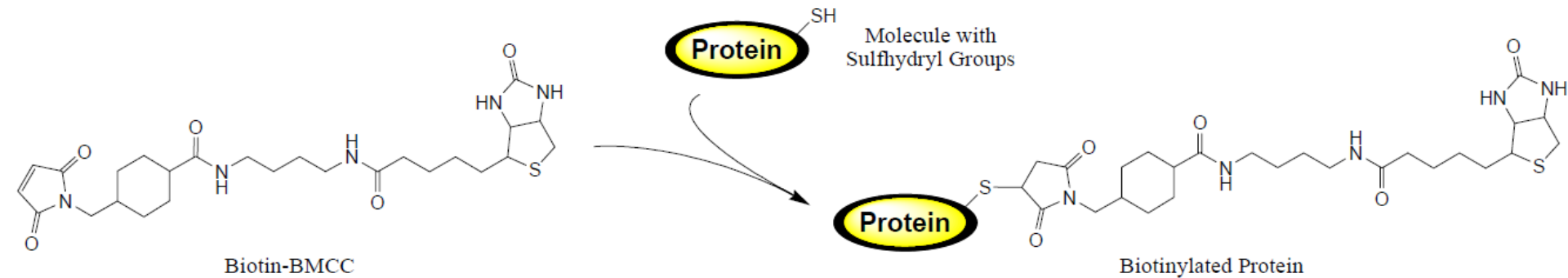
karbonyl sacharidu (–CHO)

SH-

Cys

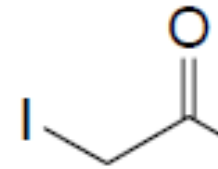


Maleimid

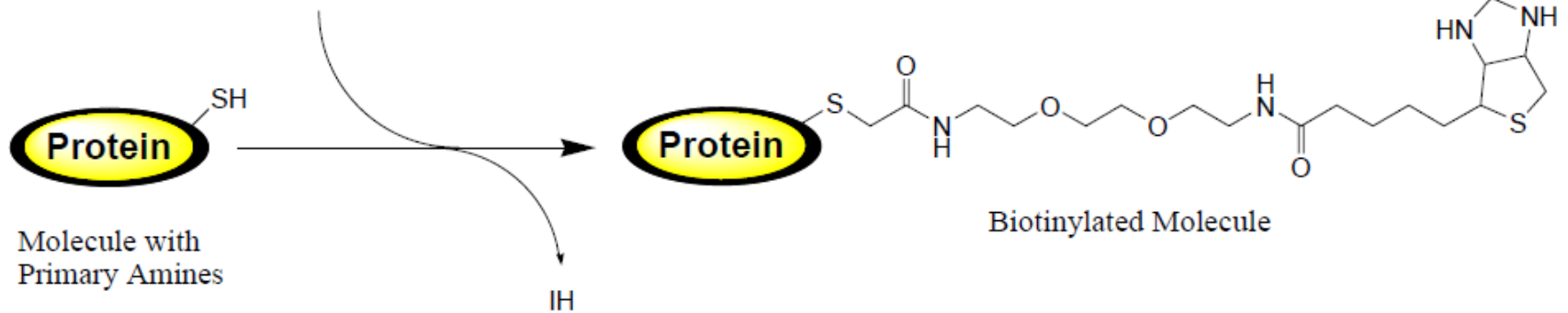
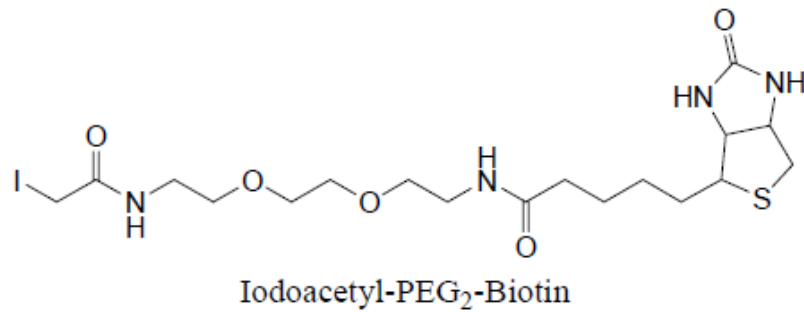


SH-

Cys

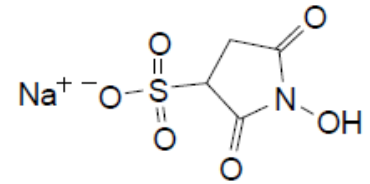


Iodacetyl

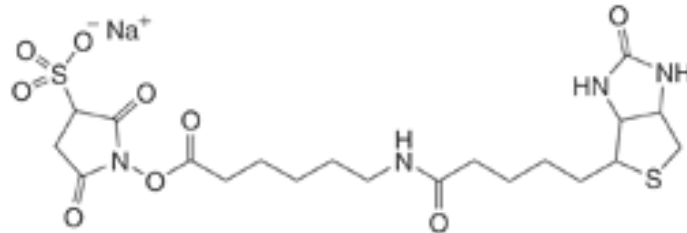


NH₂-

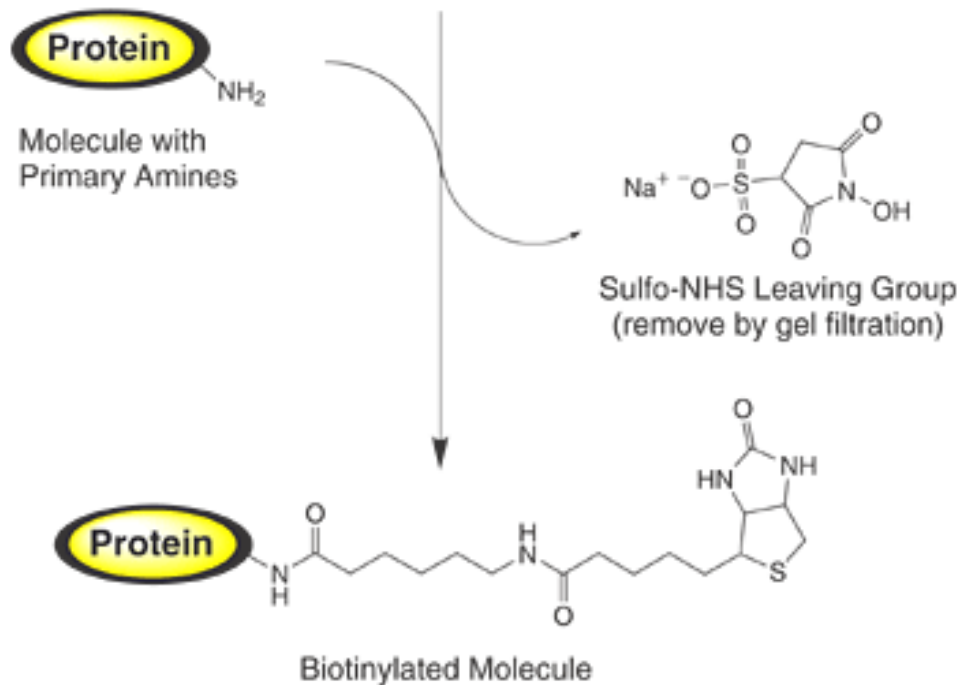
N', epsilon aminoskupina Lys



(NHS-succinimide)

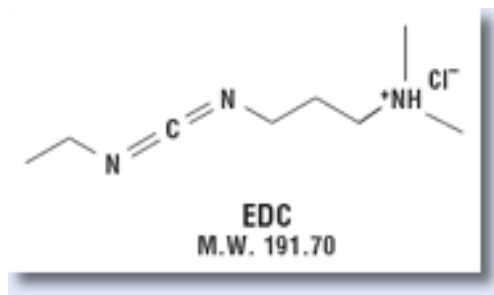
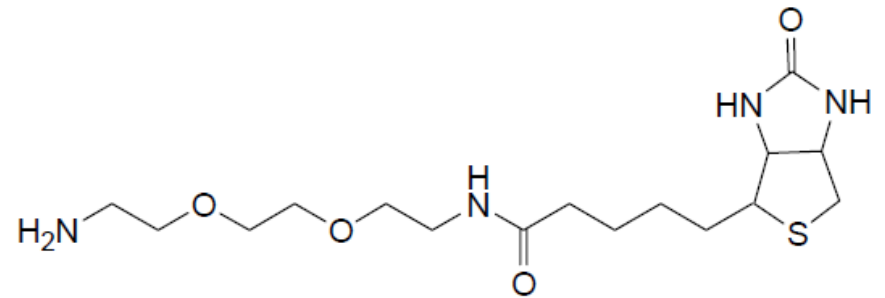
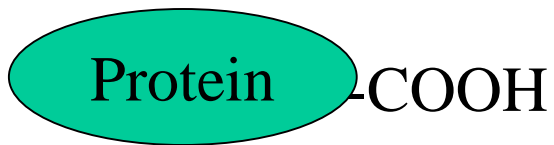


Sulfo-NHS-LC-Biotin



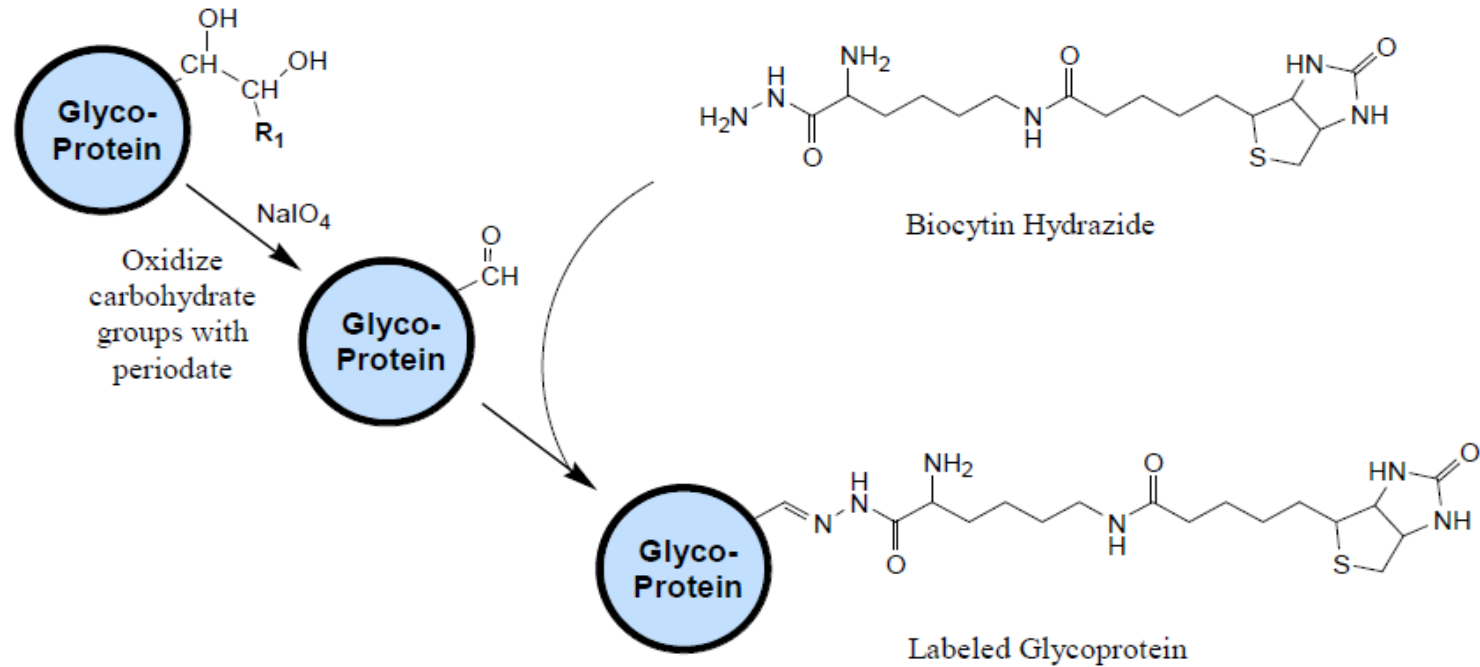
COOH-

C', Asp. Glu



Crosslinker EDC

Cukry



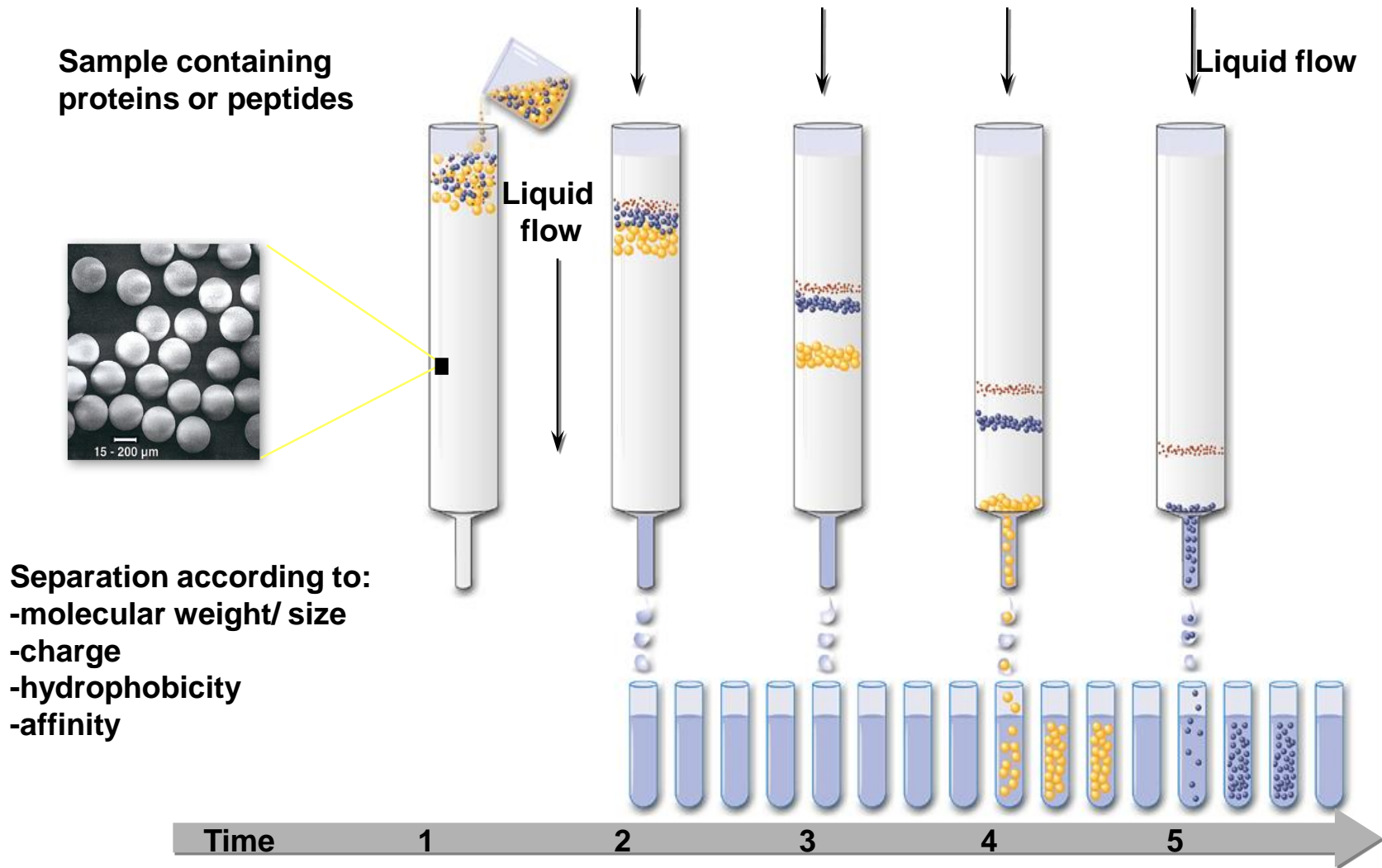
Biotin Hydrazide **bind to oxidized carbohydrates through the hydrazide group ($-\text{NH-NH}_2$), forming a hydrazone linkage.** Oxidation of glycoproteins generates reactive aldehydes that react specifically with hydrazide groups.

- Co je proteomika ? Proteom? Protein?
- Experimentální strategie proteomiky
- Vlastnosti AMK a proteinů

METODY PRÁCE S PROTEINY





- dezintegrace, lyzace, frakcionace
- detergenty
- srážení, precipitace, denaturace
- koncentrace, filtrace
- stanovení koncentrace
- značení bílkovin
- chromatografie
- elektroforéza

Liquid Chromatography (LC)



- Vzorek se rozděluje mezi mobilní a stacionární (pevnou) fázi

METODY Chromatografické SEPRACE BIOMOLEKUL

VELIKOST		Gelová filtrace (Size-exclusion chromatography)
HYDROFOBICITA		Chromatografie v reverzní fázi (Reverse phase chromatography)
AKTUÁLNÍ NÁBOJ		Iontoměničová chromatografie (Ion exchange chromatography)
SPECIFICKÉ INTERAKCE		Afinitní chromatografie (Affinity chromatography)

KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE (LC)



- Atmosférická
- Nízkotlaká (FPLC, MPLC)
- Vysokotlaká (HPLC)

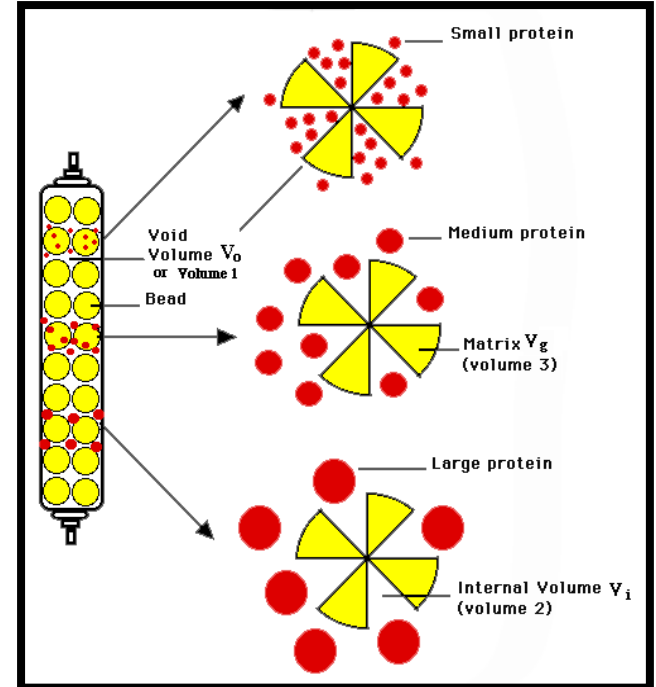
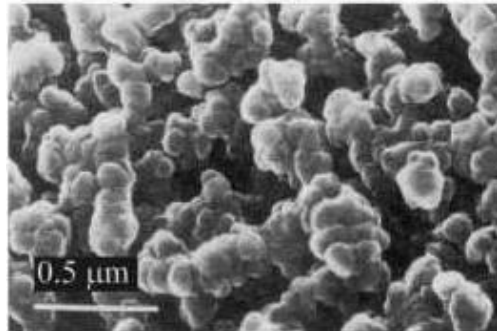
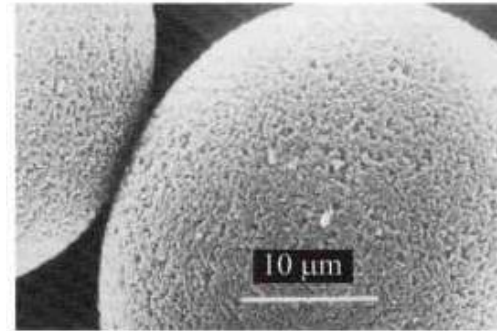
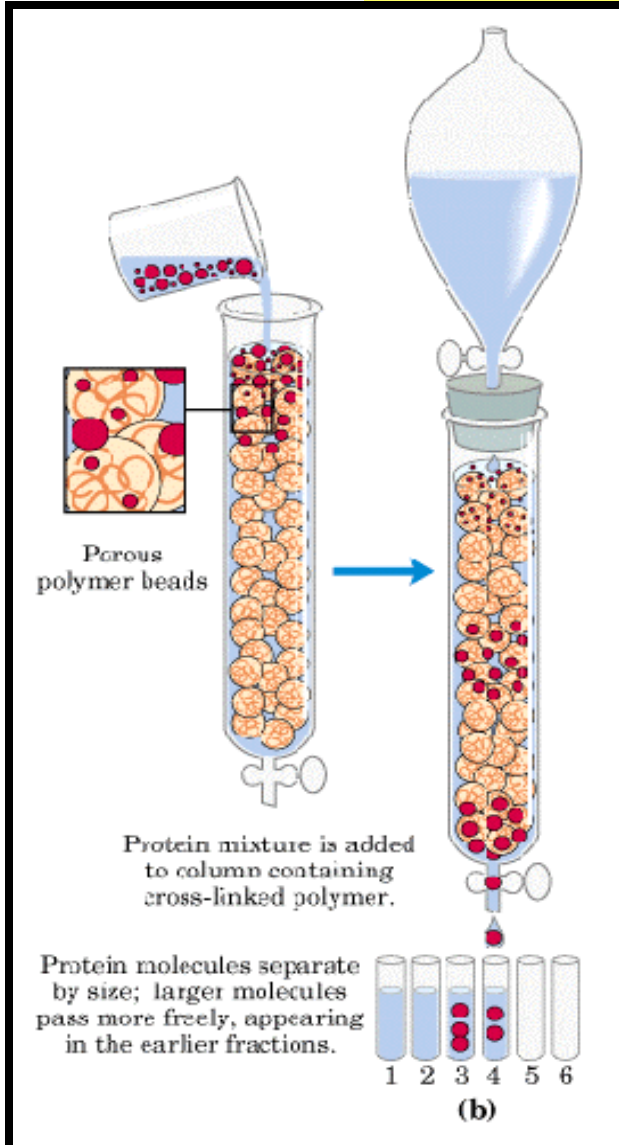
Klesá : objem vzorku, průtok
a průměr kolony
Roste: rychlost separace

MATRIX :

- kroslinkovaný dextran (Sephadex)
- kroslinkovaná celulóza (Sephacel)
- kroslinkovaná agarosa (Sephrose)
- polyakrylamid (Sepahacryl)
- silica - kyselina ortokřemičitá
- polystyren a jiné synt. polymery

GELOVÁ FILTRACE

SIZE-EXCLUSION CHROMATOGRAPHY GEL-PERMEATION CHROMATOGRAPHY



Částice se v porézní matrix rozdělují na základě velikosti

Lze provádět za nativních podmínek !

Separáční rozmezí až do 1000-2 000 000 Da

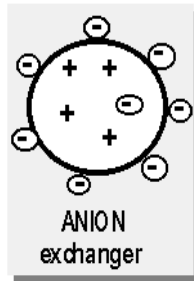
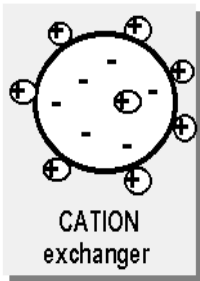
Vhodná pro proteiny.

ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY

IONTOMĚNIČOVÁ CHROMATOGRAFIE

- Dělí na základě aktuálního celkového náboje

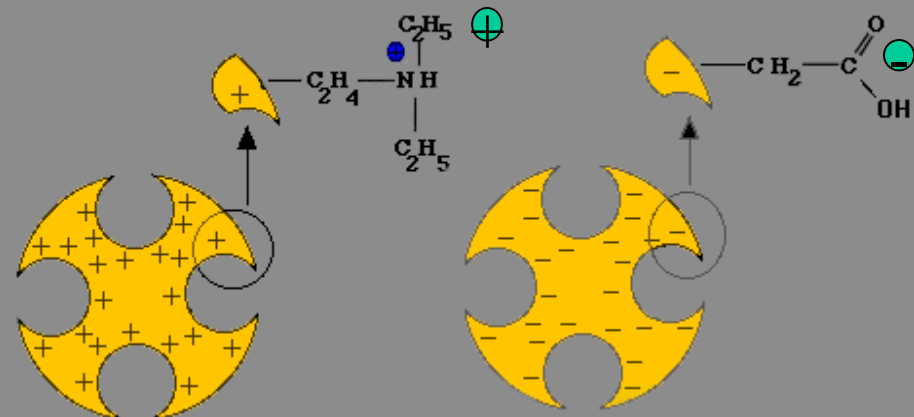
Ion exchange resins



Anex je pozitivně nabitý

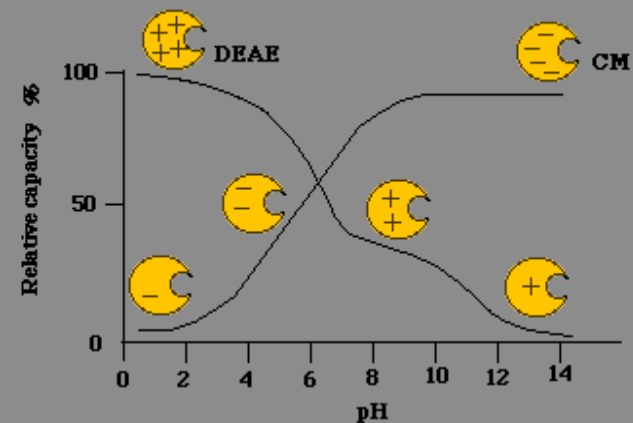
Katex je negativně nabitý

Charge Properties of Ion Exchangers



DEAE Anion exchanger

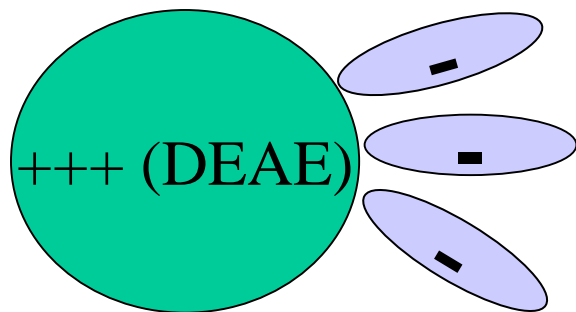
CM Cation exchanger



Funkční skupiny iontoměníčů

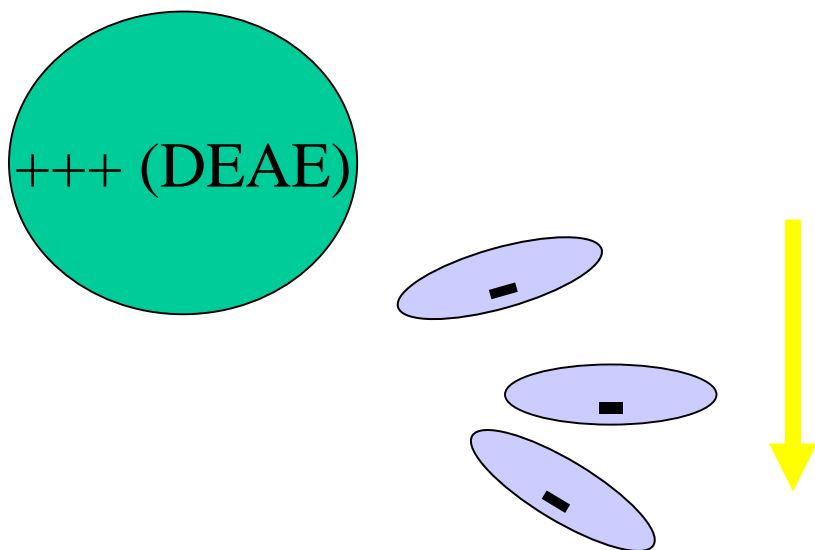
Anion exchangers	Functional group
<u>Diethylaminoethyl (DEAE)</u>	$-O-CH_2-CH_2-N^+H(CH_2CH_3)_2$
Quaternary aminoethyl (QAE)	$-O-CH_2-CH_2-N^+(C_2H_5)_2-CH_2-CHOH-CH_3$
Quaternary ammonium (Q)	$-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-CH_2-CHOH-CH_2-N^+(CH_3)_3$
Cation exchangers	Functional group
<u>Carboxymethyl (CM)</u>	$-O-CH_2-COO^-$
Sulphopropyl (SP)	$-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2SO_3^-$
Methyl sulphonate (S)	$-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-CH_2-CHOH-CH_2SO_3^-$

ANEX

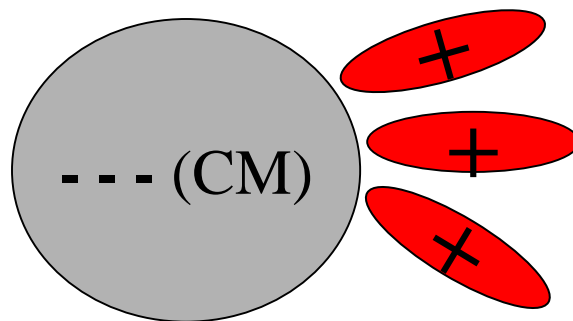


ELUCE:

**Zvýšená iontová síla =
snížení ES interakcí**
Změna pH = chromatofokusace

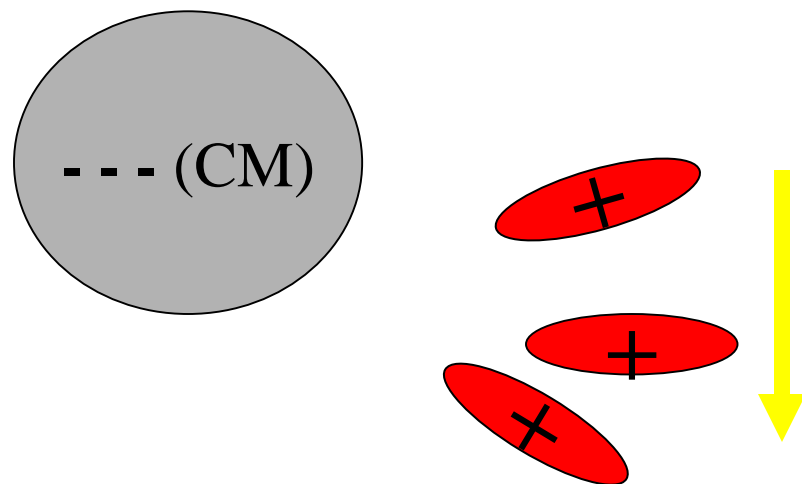


KATEX



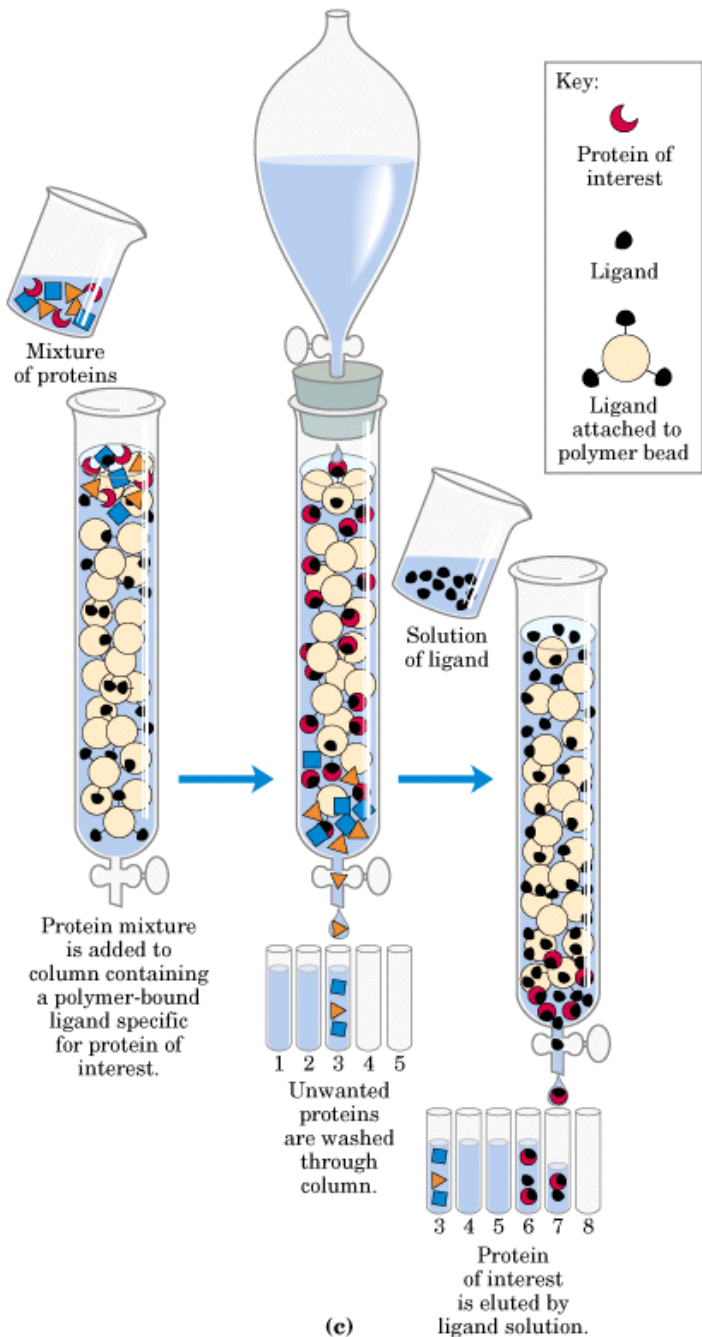
ELUCE:

**Zvýšená iontová síla =
snížení ES interakcí**
Změna pH = chromatofokusace



AFINITNÍ CHROMATOGRFIE

Interakce proteinu s jeho specifickým ligandem metabolit, kov, DNA, protilátka.....



Eluce:

- ligand
- pH
- iontová síla
- denatuační činidlo

AFINITNÍ MATRIX

Aktivované matrice:

NHS Sepharose.....lze vázat za aminoskupinu (succinimid)

CNBr Sepharose.....lze vázat za aminoskupinu

EAH Sepharoselze vázat protein za karboxyl (karbodiimid)

Thiol sepharose.....lze vázat za SH cysteinu

Matrice s afinitou pro IgG

Protein G Sepharose

Protein A sepharose

Protein A, G magnetic beads

Matrice s afinitou pro glykoproteiny

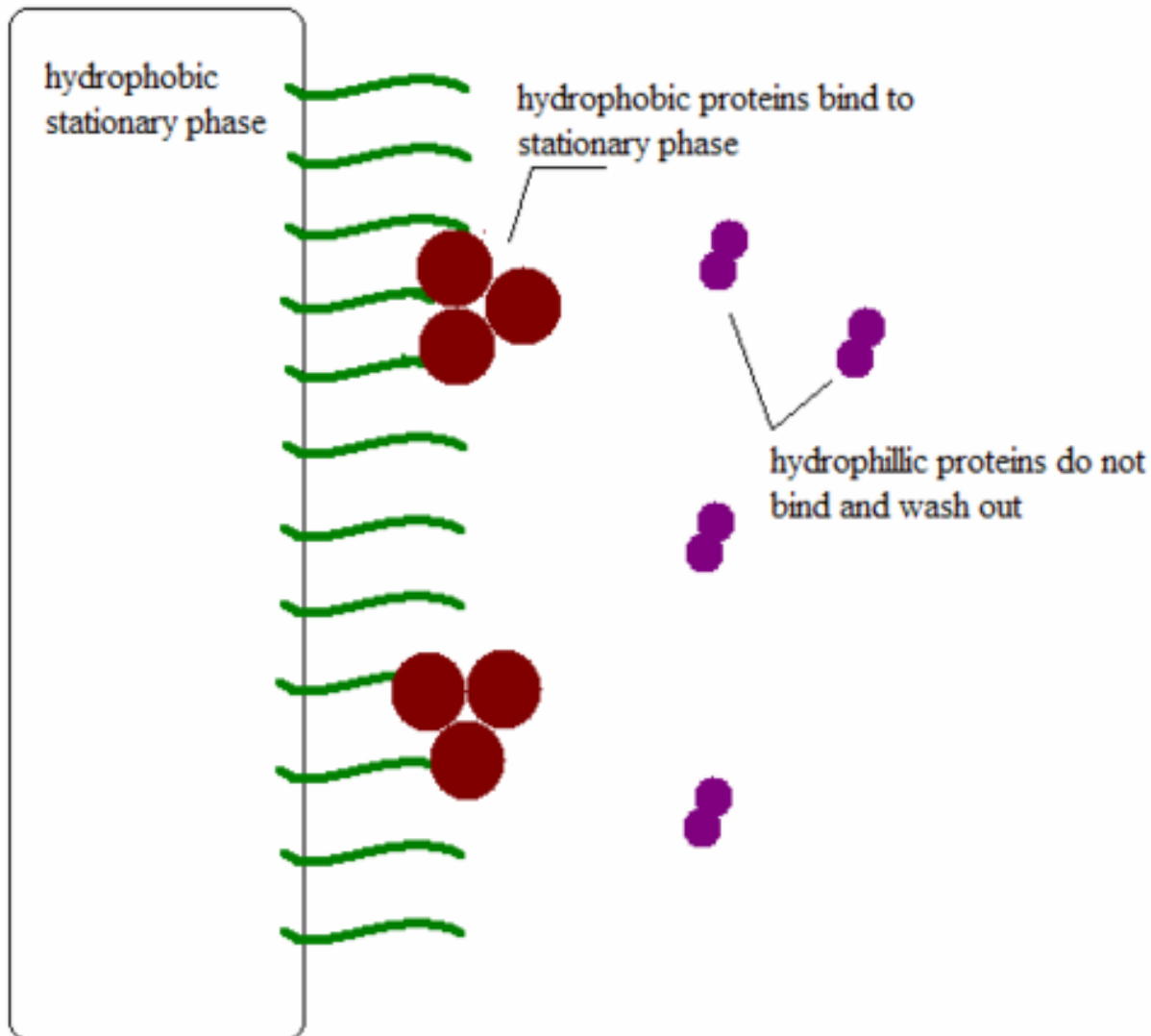
ConA Sepharose

Velké ligandy (DNA, protein) lze vázat přímo na matrix.

Malé ligandy (nukleotid, NADP, hormon...) se váží přes inertní „spacer arm“.

REVERZNÍ FÁZE (REVERSE PHASE CHROMATOGRAPHY)

Dělení na základě interakce s hydrofobní matricí
(na základě odlišné hydrofobicity peptidů/proteinů)



- Matrice a ligand: vysoce hydrofobní alifatické řetězce
- Vzorek je v hydrofilním rozpouštědle
- Eluce: **gradientem organického rozpouštědla**

$\text{CH}_3\text{-OH}$
Methanol

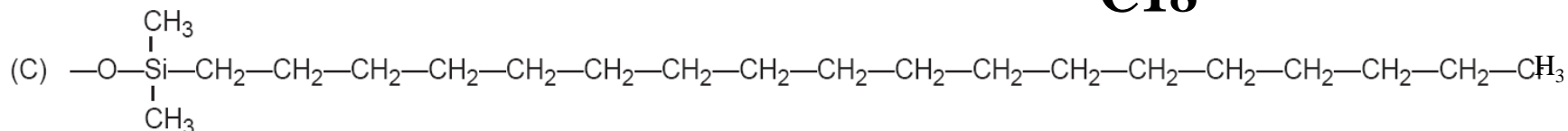
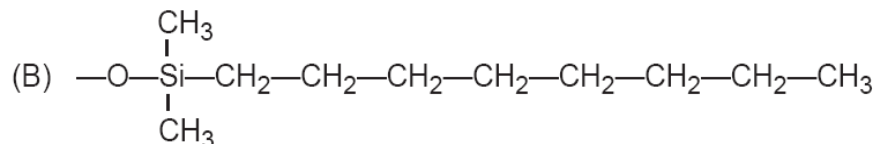
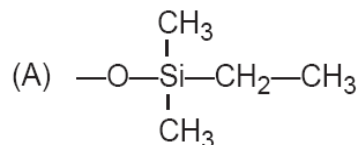
$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$
Propanol

$\text{CH}_3\text{-C}\equiv\text{N}$
Acetonitrile

$\begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_2 \quad \text{CH}_2 \\ | \quad | \\ \text{CH}_2\text{-CH}_2 \end{array}$
Tetrahydrofuran

Matrice - nerozpustná, odolná organice a vysokému tlaku
– silica, polystyren...

Ligandy – hydrofobní alifatické řetězce C2-C18



C18

Vhodnost: proteiny, peptidy

Kompatibilita s MS!

HPLC podle průtoku

Vnitřní průměr
kolony

Průtok

Nano HPLC	25-100 μm	24-4000 nL/min
Capillary HPLC	100-100 μm	0.4-200 $\mu\text{L}/\text{min}$
Micro HPLC	1.0-2.1 mm	50-1000 $\mu\text{L}/\text{min}$
Normal HPLC	4.0-5.0 mm	1.0 -10.0 mL/min



**LC-MALDI
ESI-MS**

HPLC



Macrotrap



Zip-Tips



Prezentace z přednášek budou ke stažení na adrese:

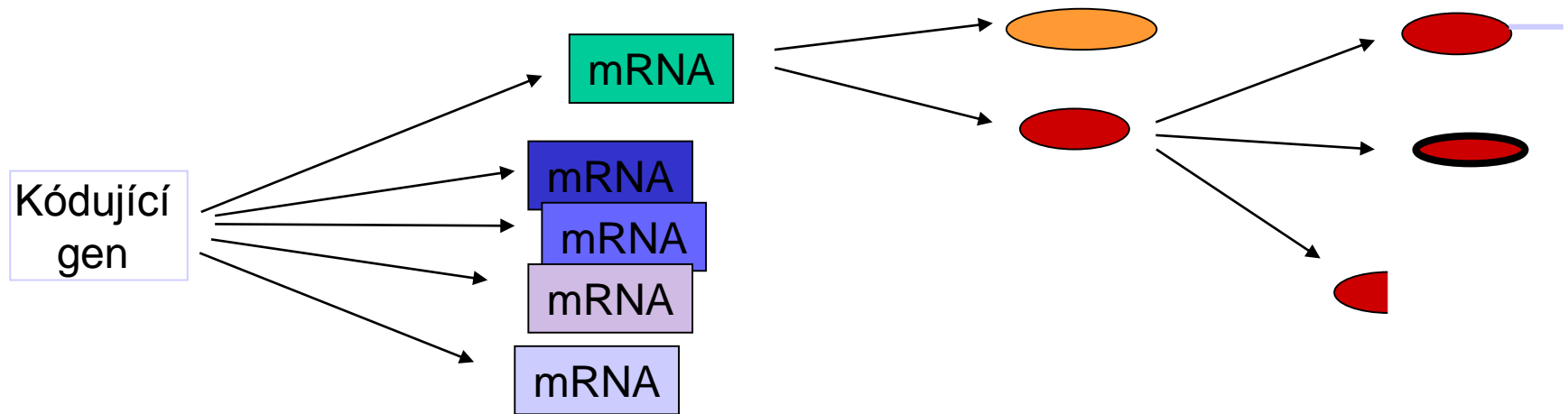
<http://patf.lf1.cuni.cz/proteomika>

včetně pdf souborů s doporučenou literaturou

R. Scopes – Protein purification. Principles and practice. *Springer Verlag*

Komplexita proteomu – Kolik je proteinů?

~20 600 lidských genů → ? mRNA ?
x 10 variant → ??? Proteinů ???



JAK JE DEFINOVÁN PROTEIN?

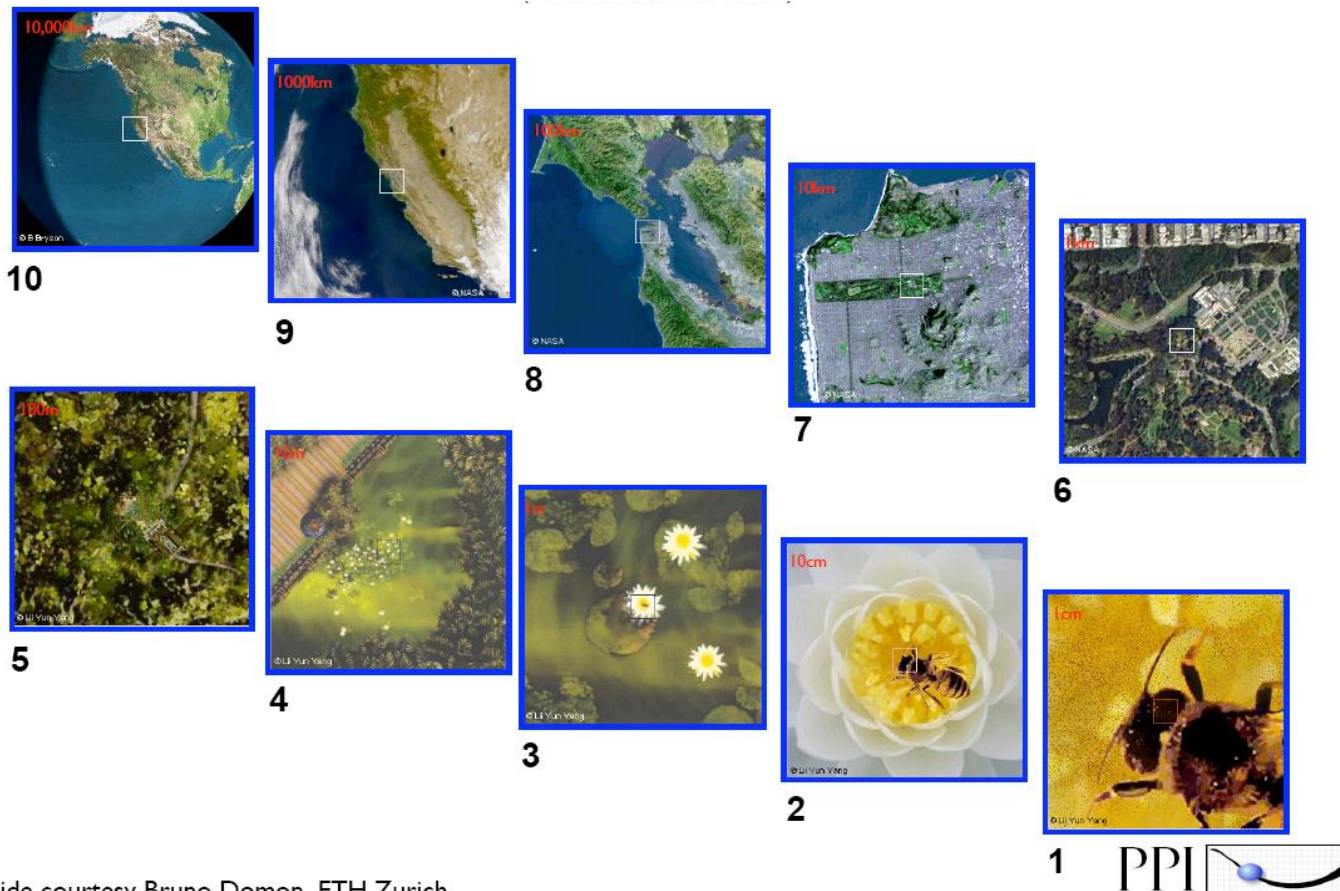
GENOCENTRICKÝ vs. PROTEOCENTRICKÝ POHLED

PROTEIN a PROTEOFORMA

Jaká je koncentrace jednotlivých proteinů a dynamický rozsah?

V savčí buňce: 10-10 000 000 kopií/buňku (10^7)

V séru/plazmě: pg/ml až mg/ml (10^{10})



PROTEOMICKÝ EXPERIMENT

„KLASICKÁ“
STRATEGIE



Štěpení všech
bílkovin (trypsin)

Elektroforéza, chromatografie a jejich kombinace

Separace směsi **BÍLKOVIN**

Separace směsi **PEPTIDŮ**

Štěpení vybraných
bílkovin + čištění
peptidů

Měření přesné hmotnosti peptidů
(a jejich fragmentů)

Získání hmotnostních
spekter

„SHOT-GUN“
STRATEGIE

Porovnání hmotností sady
peptidů (jejich fragmentů) s
údaji o všech dostupných
ORFs v databázích

Identifikace bílkovin (+ kvantifikace)

**KLASICKÁ
STRATEGIE**

2-DE-MS

(proteiny)

**„SHOT-GUN“
STRATEGIE**

2D-LC-MS

IEF-LC-MS

(peptidy)

SEPARAČNÍ METODY

- chromatografie
- elektroforézy

2-DE

- příprava vzorků
- izoelektrická fokusace
- ekvibrace
- SDS-PAGE
- detekce bílkovin a DIGE
- zpracování dat a vyhodnocení
- digesce vzorku a extrakce peptidů
- limity a záludnosti 2-DE

Elektroforéza

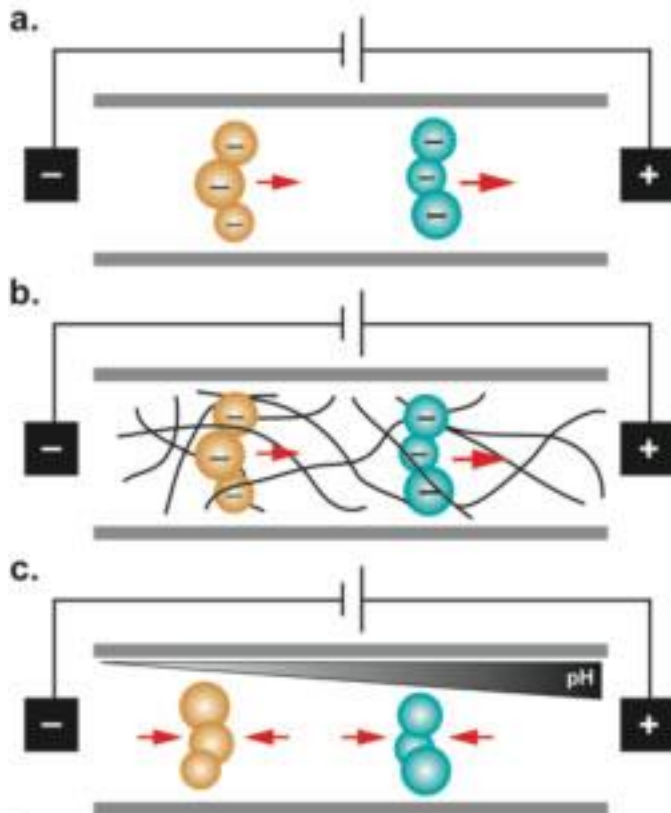
Specifická mobilita

$$u = \frac{z}{6\pi\eta r}$$

z - náboj

η viskozita

r Stokes průměr částice



Elektroforéza v roztoku

Elektroforéza v gelu

Izoelektrická fokusace

1807 *F.F. Reuss*

1930 *Arne Tiselius* – volná a papírová elektroforéza

(1948 Nobelova cena)

1955 *O. Smithies* – škrobový gel

1959 *Raymond and Weintraub* - polyakrylamidový gel

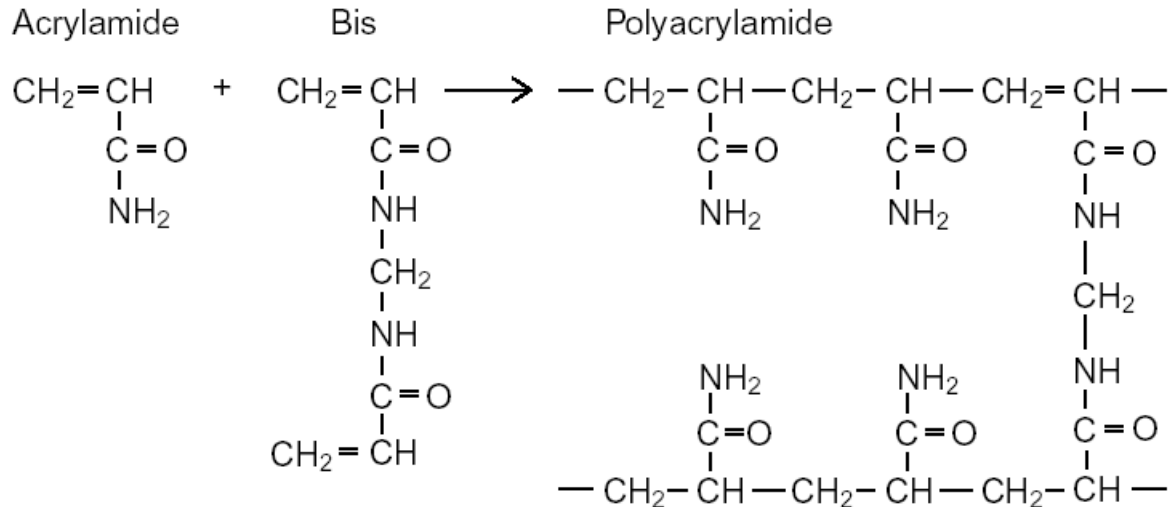
1961 *Svensson and Vesterberg* – IEF a amfolyty

1970 *U.K. Laemli* – SDS –PAGE

1975 *Patrick O'Farrell* – 2-DE

POLYAKRYLAMIDOVÉ GELY

1959 *Raymond and Winstraub*- první AA gel



Složení a příprava gelu:

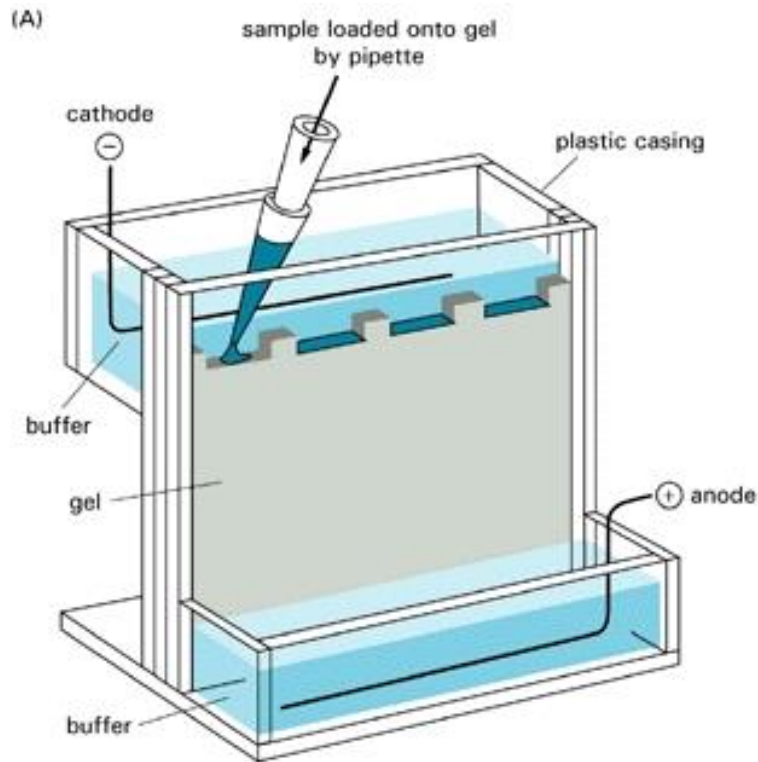
- **akrylamid** (monomerní)
- **bis-akrylamid** (zesíťování polymeru)
- **APS** (peroxodisíran amonný, katalyzátor, produkuje volné radikály),
- **TEMED** (tetramethylethylenediamine, stabilizuje volné radikály)
- **pufř a SDS**

Celková koncentrace akrylamidu a bis-akrylamidu určuje **KONCENTRACI (T)** gelu v procentech (**2-20 %**)

Poměr bis-akrylamidu a akrylamidu **POROZITU (C)** gelu.

APS v zásaditém prostředí může reagovat s Trisem, koncentrace co nejnižší ve prospěch TEMEDu.

POLYAKRYLAMIDOVÉ GELY



IZOELEKTRICKÁ FOKUSACE

dělení na základě izoelektrického bodu v gradientu pH

DENATURUJÍCÍ SDS-ELEKTROFORÉZA

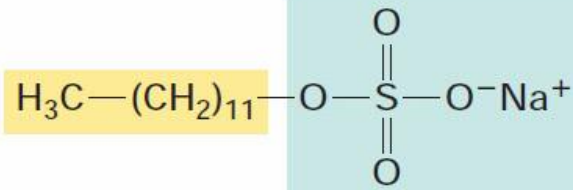
dělení na základě MW proteinu

NATIVNÍ ELEKTROFORÉZA

dělení na základě velikosti (průměru částice) a náboje

SDS ELEKTROFORÉZA

SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)



• **Bílkoviny se rozdělují na základě jejich MW**

• **Záporně nabitě SDS tvoří komplexy s bílkoviny a stíní náboje proteinu (1,4g SDS :1g proteinu)**

• **Komplex má jednotkový náboj na hmotnostní jednotku.**

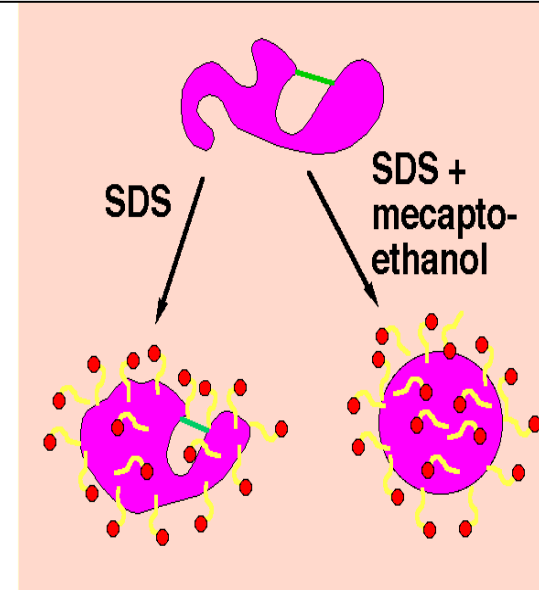
• **Všechny komplexy jsou záporně nabitě a migrují k anodě**



SE 600 requires MultiTemp III and power supply EPS601 to complete the system.

PUFR:
Tris-Cl/Tris-glycin
0.1 % SDS
pH 8.8

**Redukce disulfidických můstků
(Dithiothreitol, Dithioerythrol, TCEP,
beta-mercaptoethanol)**



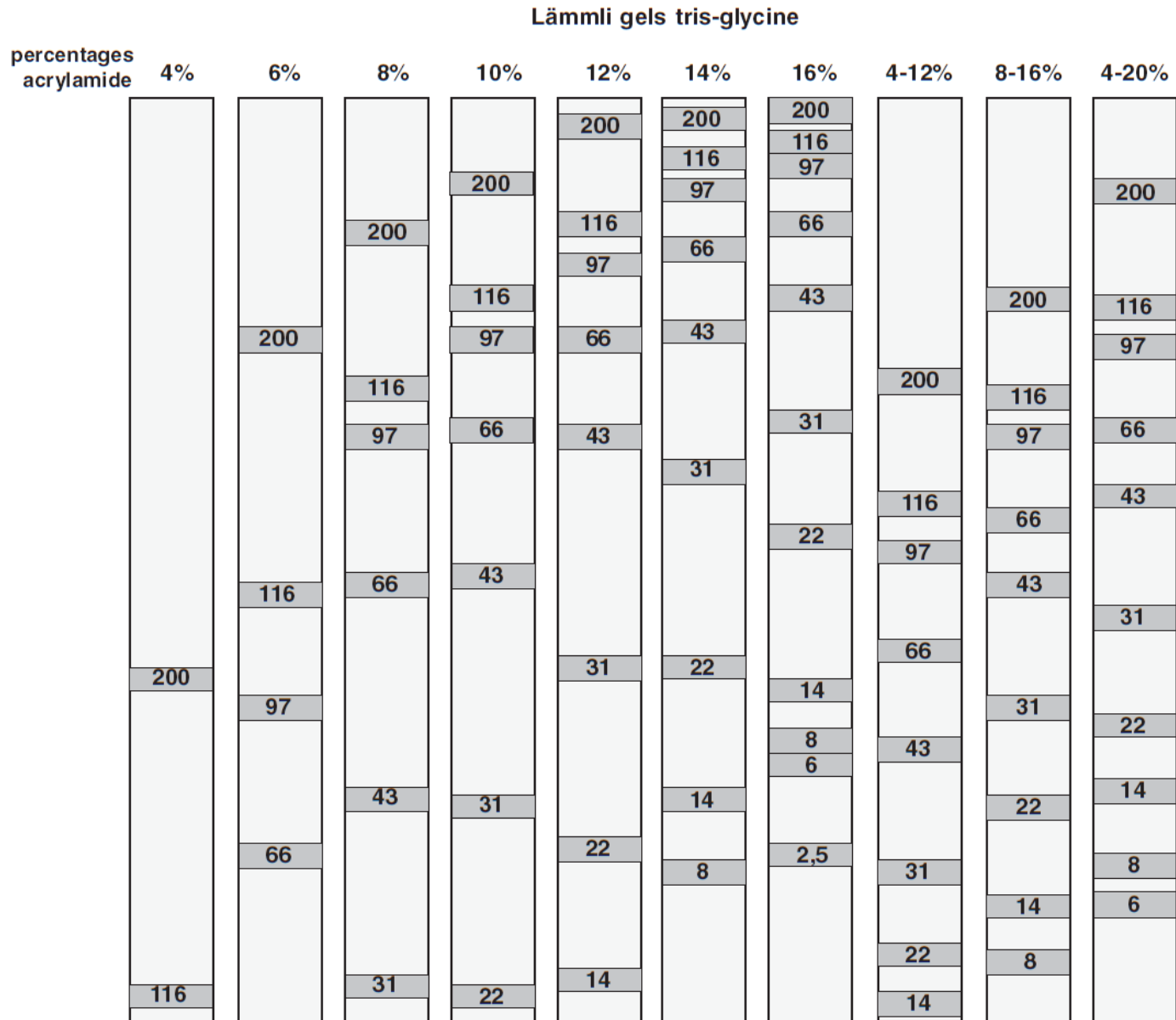
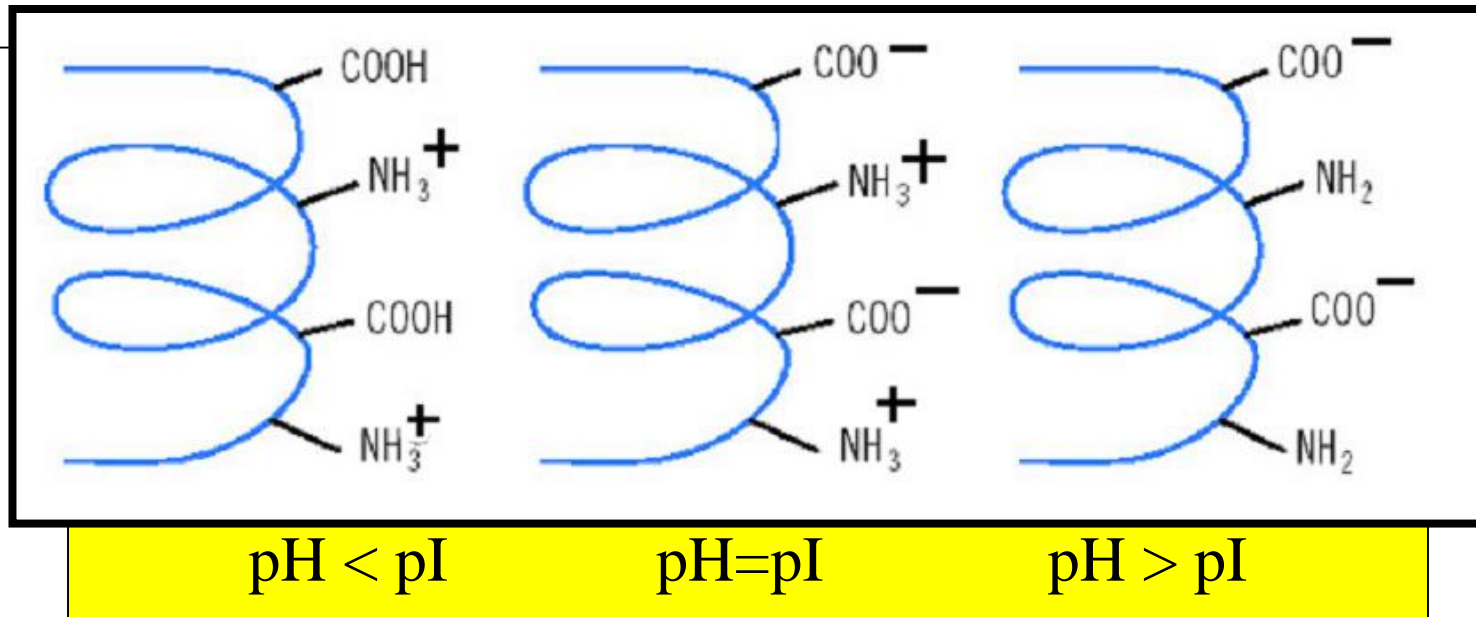


Figure 1.2. Run speed of MW markers in SDS gels.

Izoelektrická fokusace - pohyb nabité částice v gradientu pH

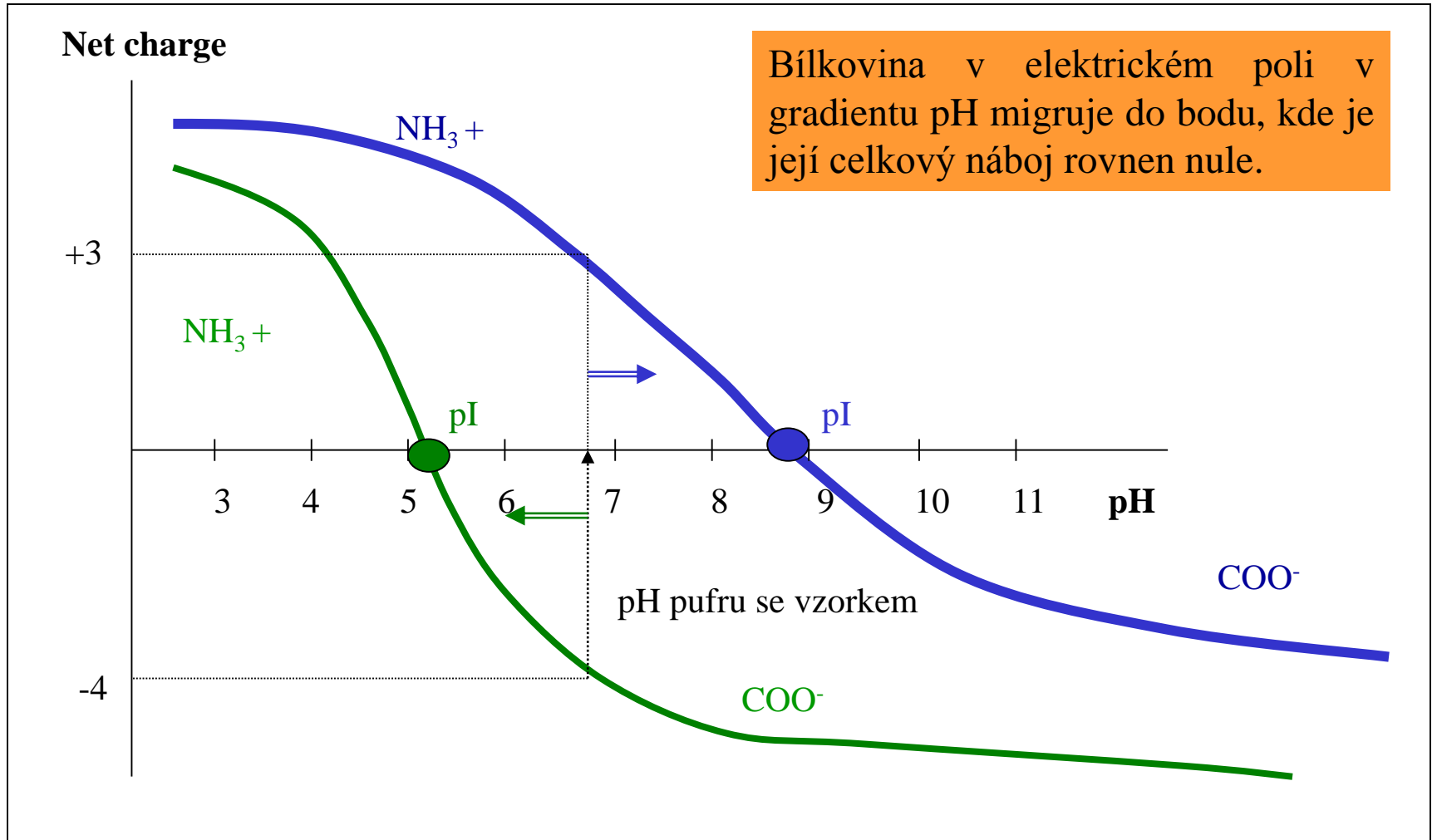
- Celkový náboj proteinu (net charge) je součtem všech jeho negativních i pozitivních nábojů.
- Kyselé a zásadité skupiny polypeptidu jsou protonovány a deprotonovány v závislosti na pH prostředí.
- Amfoterní molekula (bílkovina) v elektrickém poli v gradientu pH migruje do bodu, kde je její celkový náboj rovný nule.
- pH tohoto bodu odpovídá izoelektrickému bodu (pI) dané bílkoviny.



migruje k -

migruje k +

TEORETICKÁ DISOCIAČNÍ KŘIVKA DVOU BÍLKOVIN



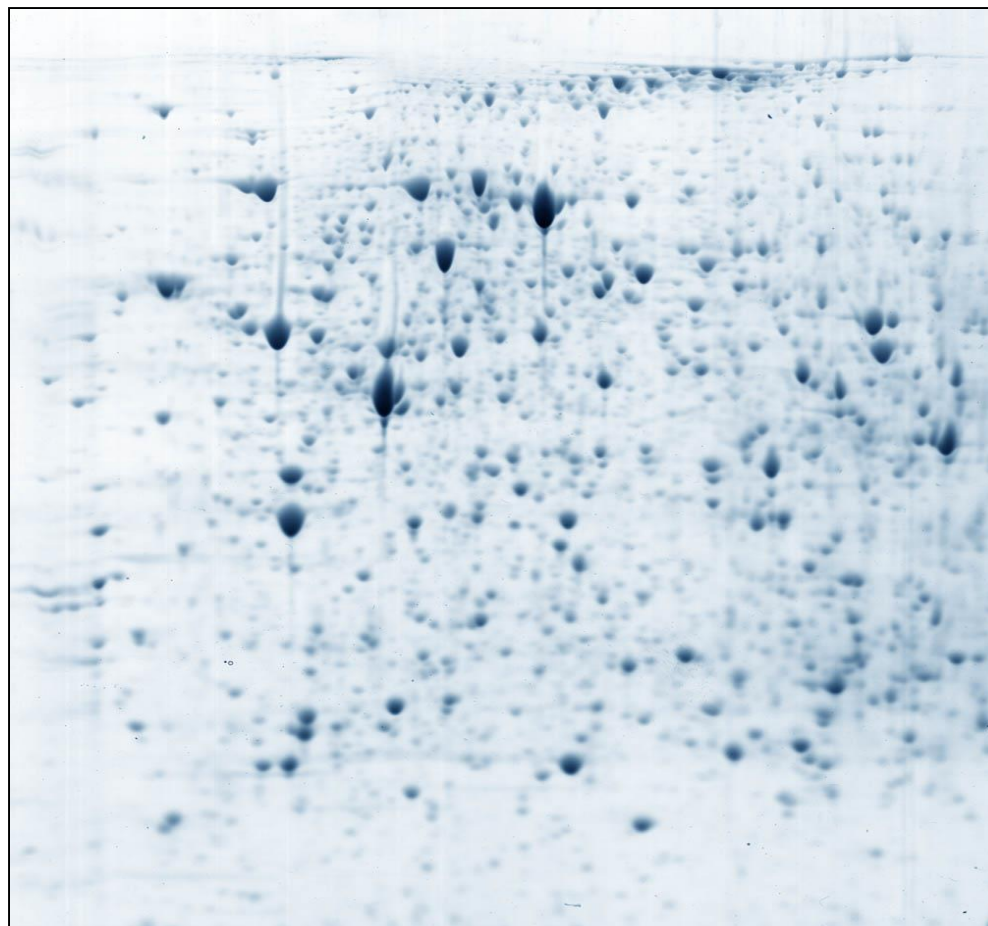
DVOJROZMĚRNÁ ELEKTROFORÉZA (2-DE)

Rozděluje proteiny nejdříve podle jejich náboje a následně kolmo na směr původní migrace dle jejich MW

pH 4

pH 7

150 kDa



10 kDa

**Jaterní homogenát,
2 mg, barvení
koloidní Coomassie
Blue**

1025 spotů

1975

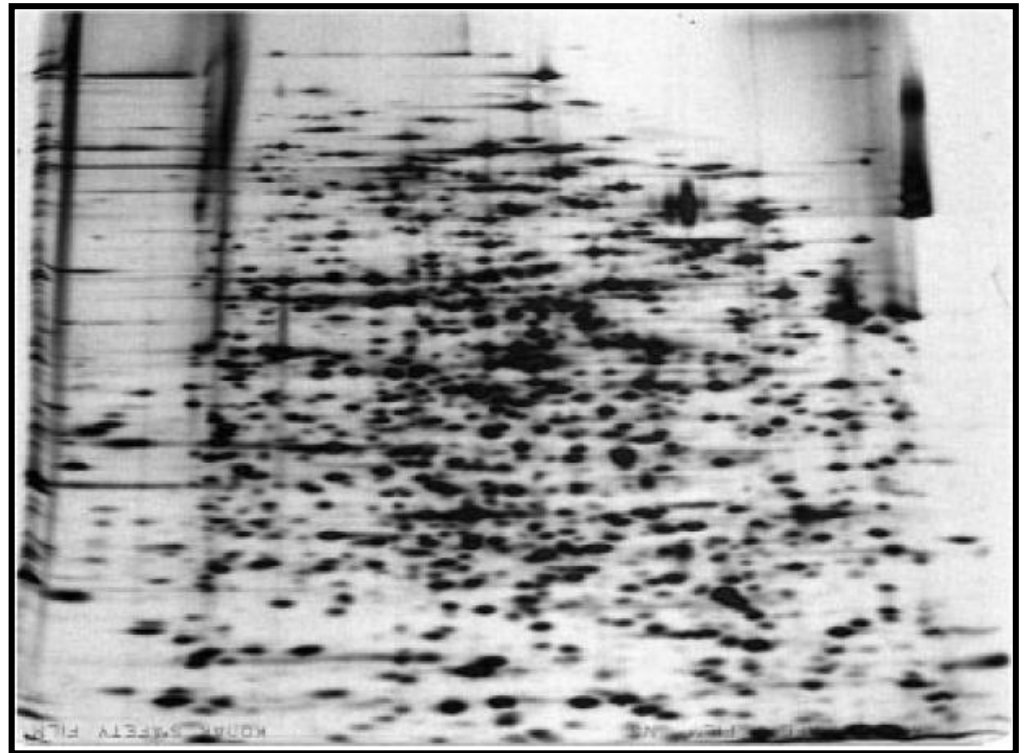
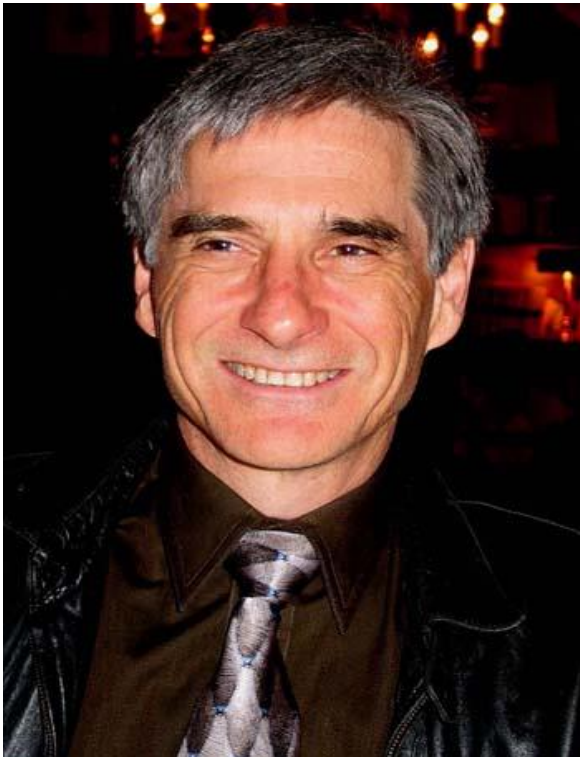
High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins*

(Received for publication, September 5, 1974)

PATRICK H. O'FARRELL†

*From the Department of Molecular, Cellular and Developmental Biology, University of Colorado, Boulder,
Colorado 80302*

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
Vol. 250, No. 10, Issue of May 25, pp. 4007-4021, 1975
Printed in U.S.A.



1957

Comparison and Combination of the Starch-Gel and Filter-Paper Electrophoretic Methods Applied to Human Sera: Two-Dimensional Electrophoresis

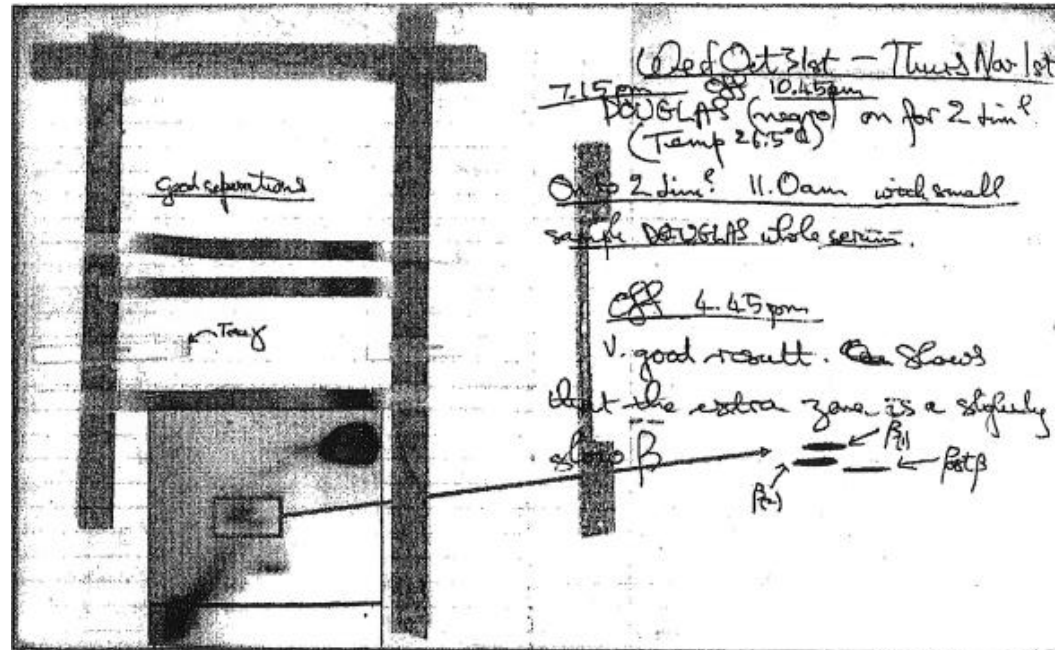
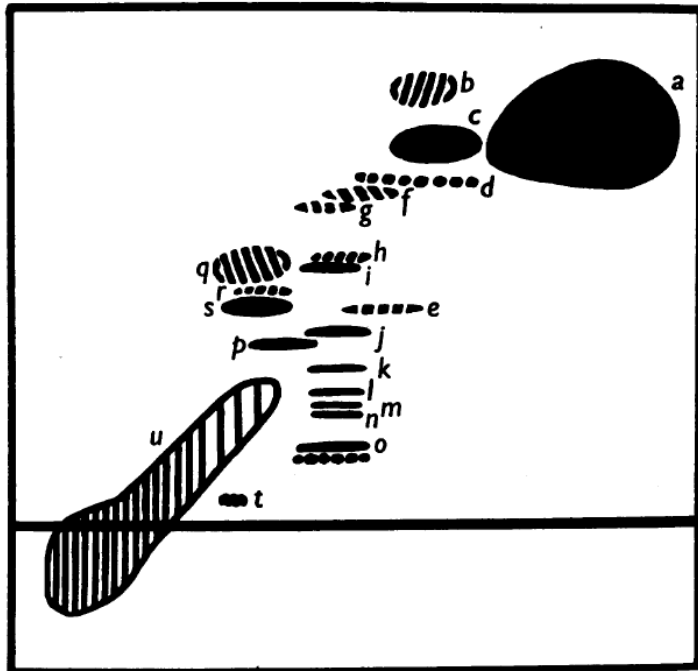
BY M. D. POULIK* AND O. SMITHIES

Department of Public Health and Connaught Medical Research Laboratories,
University of Toronto, Canada

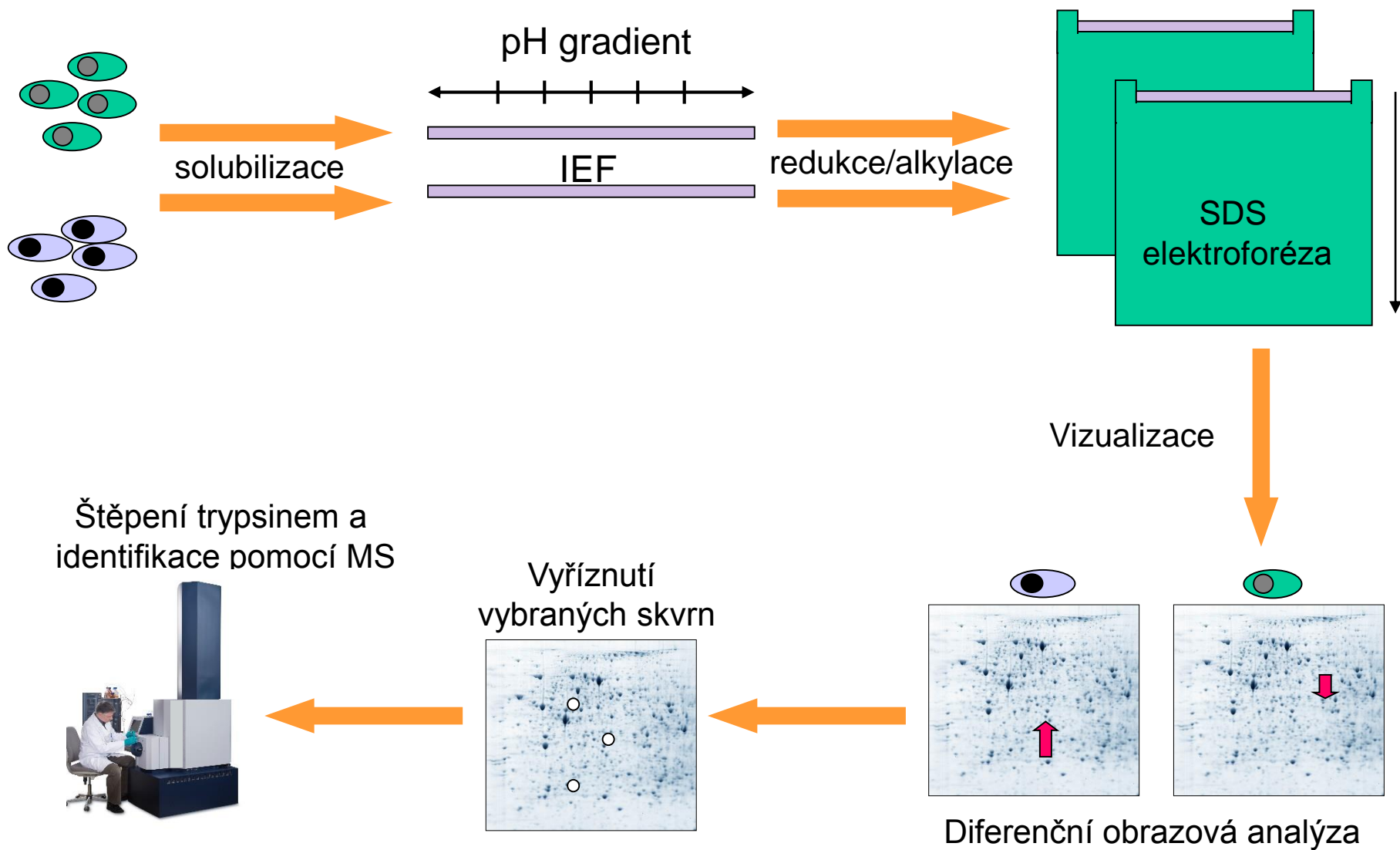
(Received 20 August 1957)

Figs. 2 and 4): a, albumin; b, acidic α_1 -glycoprotein; c, α_1 -globulin B; d, α_1 -globulin C; e, $\alpha_1\alpha_2$ -globulin A; f, α_2 -globulin A; g, α_2 -globulin B; h, type 1-1 haptoglobins; i, α_2 -globulin D; j, k, l, m and n, type 2-1 specific haptoglobins; o, $\Sigma\alpha_2$ -globulin; p, $\alpha_2\beta$ -globulin A; q, β -globulin A; r, β -globulin B; s, β -globulin C; t, high-molecular-weight β -lipoprotein; u, γ -globulins.

1/11/1955



Typický 2-DE experiment



SEPARAČNÍ METODY

- chromatografie
- elektroforézy

2-DE

- příprava vzorků
- izoelektrická fokusace
- ekvibrace
- SDS-PAGE
- detekce bílkovin a DIGE
- zpracování dat a vyhodnocení
- digesce vzorku a extrakce peptidů
- limity a záludnosti 2-DE

PŘÍPRAVA VZORKŮ

LYZAČNÍ PUFER PRO IEF:

solubilizace

Močovina, thiomčovina – chaotropní činidlo, zvýšení rozpustnosti, denaturace bílkovin

solubilizace

Detergent (CHAPS) – čistý zwitteriontový detergent – zvýšení rozpustnosti
snížení agregace bílkovin

redukce –S-S-

Redukční činidlo (DTT) – redukce disulfidický můstků (ionizují se nad pH 8, migrují pryč ze stripu na alkalickém konci)
DTT, DTE versus TCEP (Tris[2-carboxyethyl] phosphine , tributylphosphine

běh elektroforézy a pH gradient

Nosičové amfolyty -- (carrier ampholytes, IPG buffers) – jsou náhražkou pufřů, je to směs ionizovatelných látek vytvářejí potřebný pH gradient

Pigment (BFB) – pro snazší manipulaci

Typický lyzační/rehydratační pufr

- 7 M Močovina
- 2 M Thiomčovina
- 2 - 4 % CHAPS
- 0.2 % DTT (TCEP, tributylfosfin)
- 0.5 – 1 % Nosičové amfolyty (IPG pufr)
- 0.002 % BFB

Každá sůl škodí vaší separaci!

Vše nabité pryč!

PROTEÁZY A KONTAMINACE VE VZORKU

PROTEÁZY stále aktivní i ve vysoké koncentraci močoviny !!!

DNA a RNA	Zhoršená separace Barví se v kyselé oblasti gelu	Sonikace, DNázy, RNázy, Precipitace, komplexování s amfolyty
LIPIDY	Zhoršená separace	Detergent nebo precipitace
SOLI	Špatná separace	Ultrafiltrace, mikrodialýza, precipitace
PROTEÁZY	Degradace bílkovin	Inhibitory proteáz – PMSF, koktejly Precipitace

UNIVERZÁLNÍ ŘEŠENÍ ?

Precipitace acetonem, TCA nebo kombinací.

Problém s rozpustostí pelety!

- Stanovení koncentrace bílkovin
- Analytická versus preparativní nanáška (10-3000 mikrogramů)

SEPARAČNÍ METODY

- chromatografie
- elektroforézy

2-DE

- příprava vzorků
- izoelektrická fokusace
- ekvibrace
- SDS-PAGE
- detekce bílkovin a DIGE
- zpracování dat a vyhodnocení
- digesce vzorku a extrakce peptidů
- limity a záludnosti 2-DE

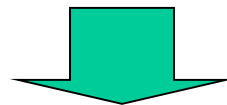
NOSIČOVÉ AMFOLYTY (CARRIER AMPHOLYTES)

**Amfoterní molekuly nesoucí disociovatelné bazické i kyselé skupiny
Zajišťují vytvoření stabilního a hladkého gradientu pH v elektrickém poli**

Vlastnosti:

- Vysoká pufrační kapacita a rozpustnost při vlastním pI
- Dostatečná a stálá elektrická vodivost
- Absence biologických efektů
- Nízká MW

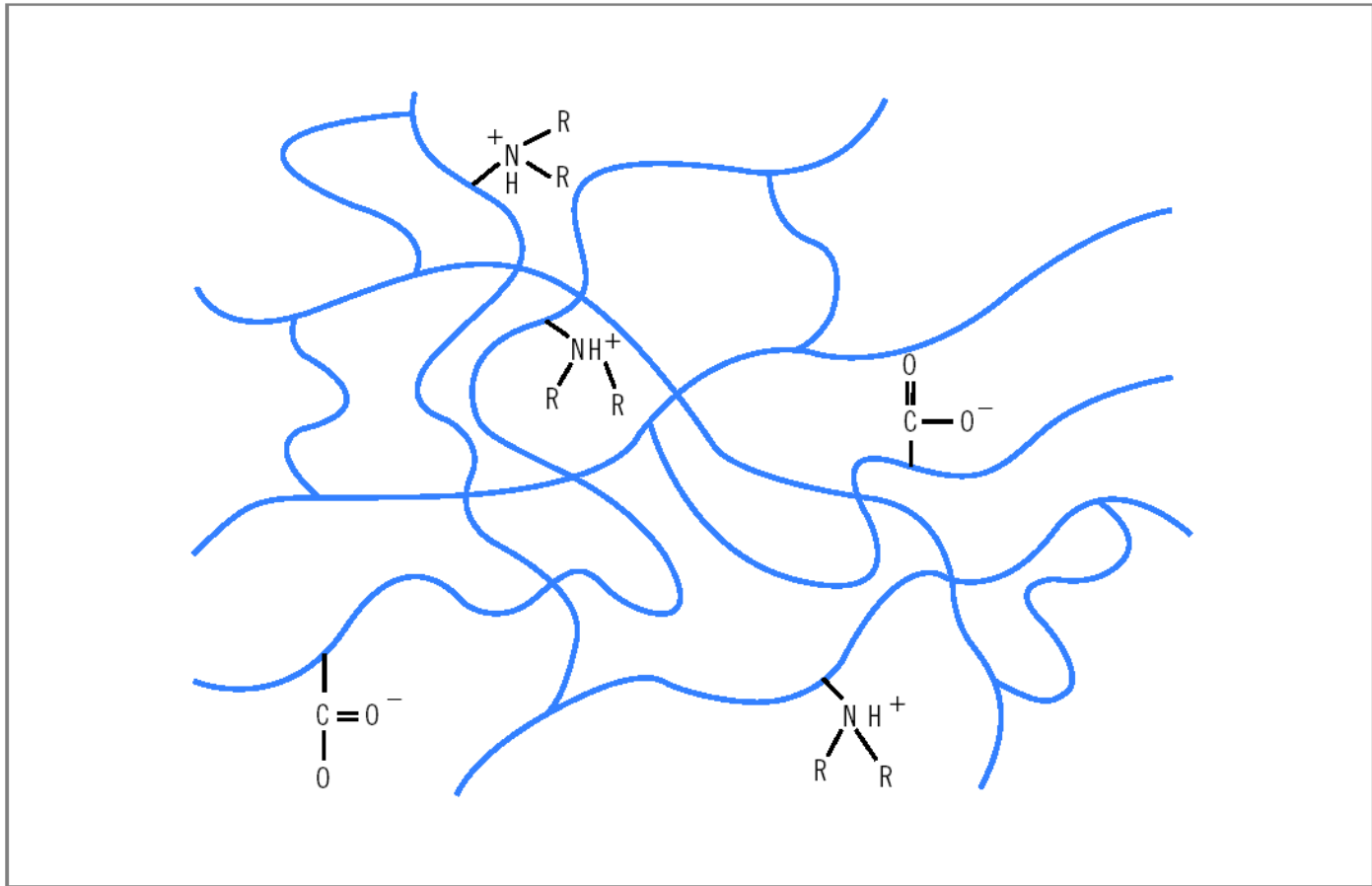
Původně: směsi **různě dlouhých řetězců**
Oligoamino-oligokarboxylových kyselin
MIGRACE a nestabilní gradient !!!



Zakotvené pH gradienty (Immobilized pH gradients – IPG)
(derivovaný akrylamid) **1982 Bjellqvist**

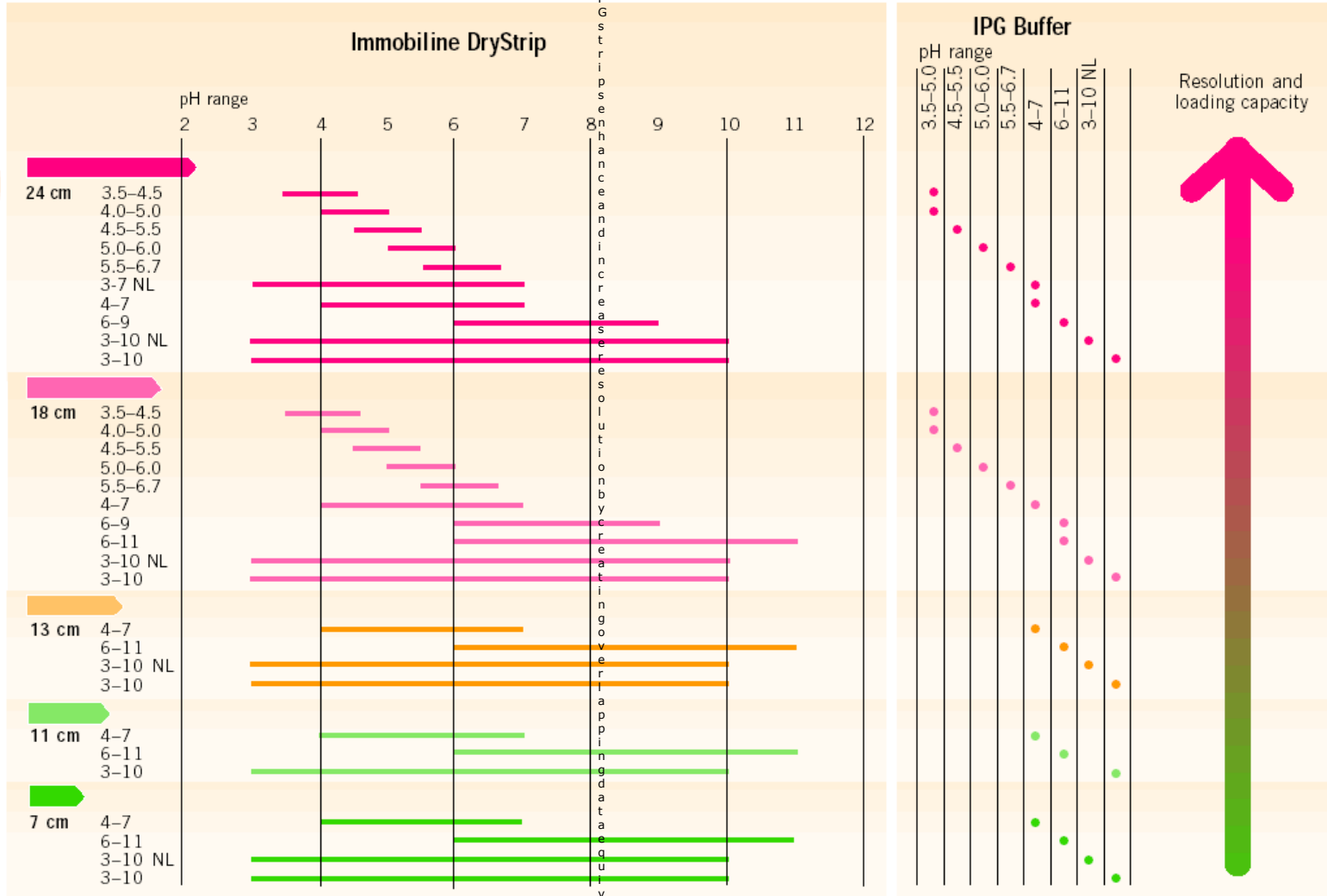
ZAKOTVENÉ PH GRADIENTY (IMMOBILIZED pH GRADIENTS – IPG)

Derivovaný akrylamid s disociovatelnými karboxy- a aminoskupinami



IPG STRIPY (IPG STRIPS)

3 mm široké, 0.5 mm silné, dehydrované - trvanlivost, reproducibilita, plastova podložka, stabilita, nemigrují, neinterferují s nimi redukční činidla.



ZOOMING

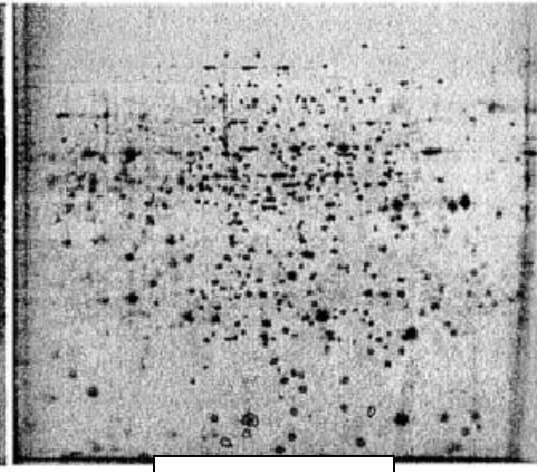
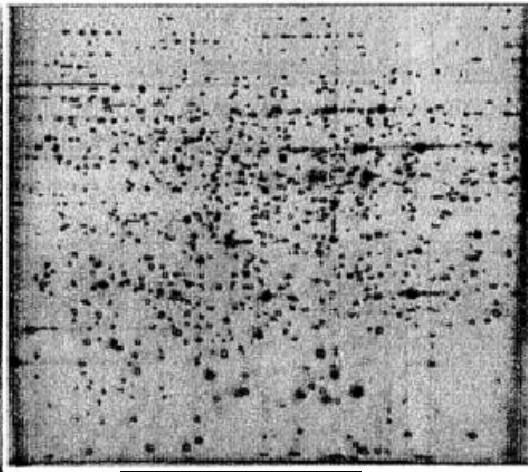
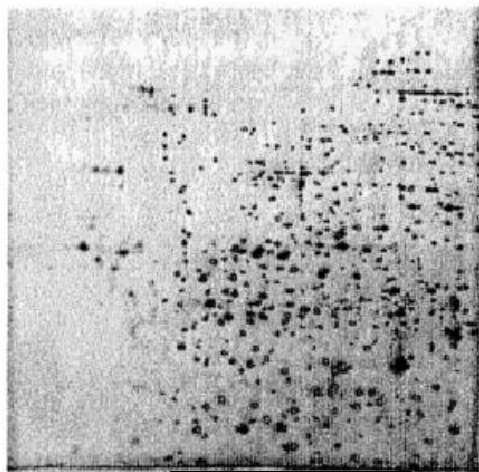
pH 4-7

1071

$\Sigma 498$

$\Sigma 370$

$\Sigma 896$



pH 4-5

pH 5-6

pH 5,5-6,7

498

896

376

Celkem 1754

REHYDRATAČNÍ NANÁŠKA

REHYDRATAČNÍ NANÁŠKA

versus

CUP LOADING

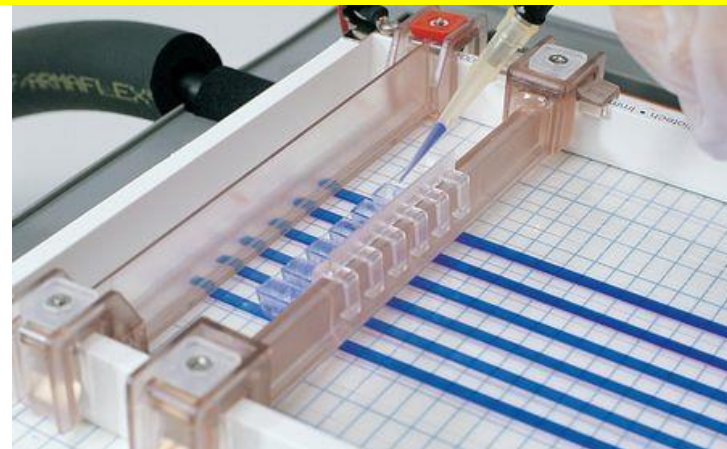


PRO:

- Rehydratace a nanáška spojena v jeden krok
- Proteiny rovnoměrně rozložené, neprecipitují v místě nanášky
- Aktivní rehydratace zlepšuje vstup velkých bílkovin do gelu

PROTI:

Vzorek je dlouhodobě při pokojové teplotě



PRO:

IEF ve vysoce kyselých a zásaditých gradientech probíhá lépe

PROTI:

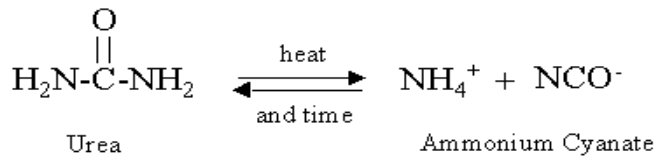
Proteiny s pI blízko bodu nanášky mají nízkou rozpustnost a mobilitu a mají tendenci precipitovat na povrchu gelu

PODMÍNKY IZOELEKTRICKÉ FOKUSACE

Optimalizace podmínek pro každý vzorek, typ stripu a nanášky.
Platí zvláště pro: větší nanášky, a větší a hydrofobnější proteiny.

Teplota: kolem 20 °C (**PREVENCE KARBAMYLACE !** versus krystalizace močoviny za nízkých teplot)
Aktivní chlazení !!! Dochází k přehřívání na tzv. HOT SPOTS

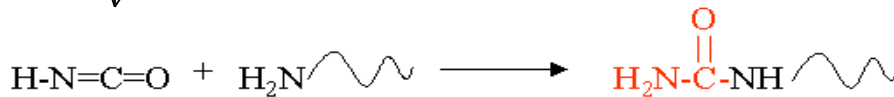
Decomposition of Urea



IonSource.Com

Carbamylation of Proteins

(amino terminus of a peptide used as an example)



Kyselina
izokyanatá

N'konec nebo
epsilon aminoskupina lyzinu

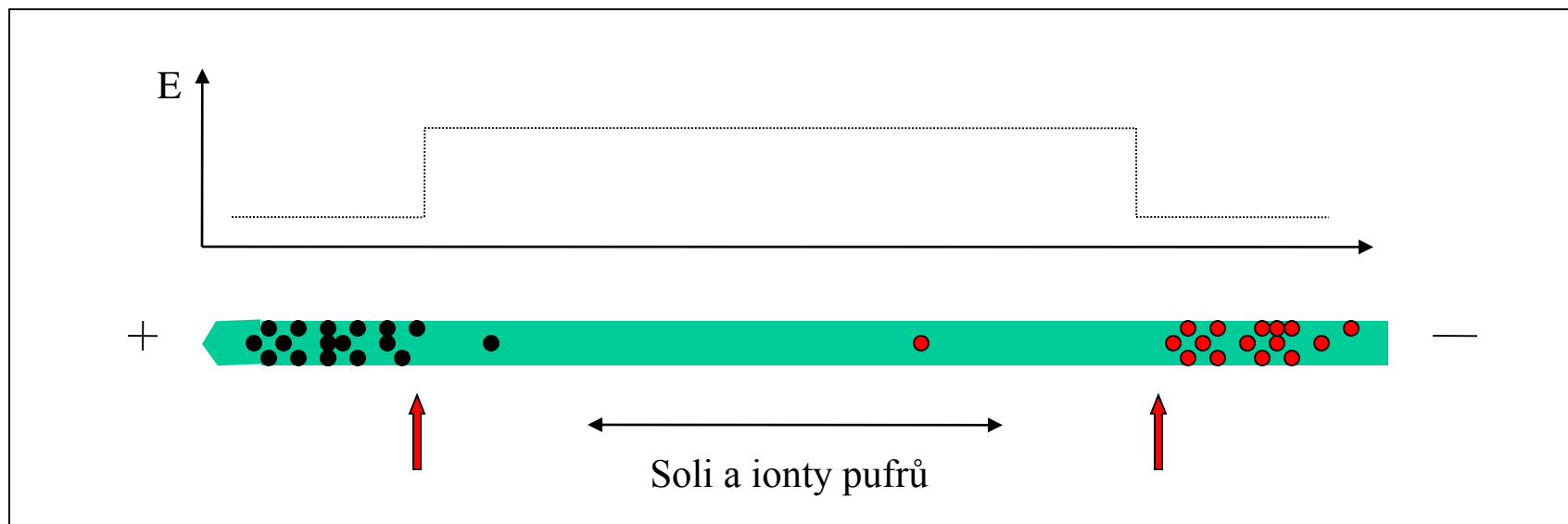
Nízký proud!
Vysoké napětí

Elektrické podmínky : 50-70 microA na strip, U co nejvyšší, kroky nebo pozvolný vzestup
V praxi až 10 kV. Celková fokusace pro 18-24 cm stripu 40-80 kVh

Prevence oxidace a vysychání stripu : parafinový olej

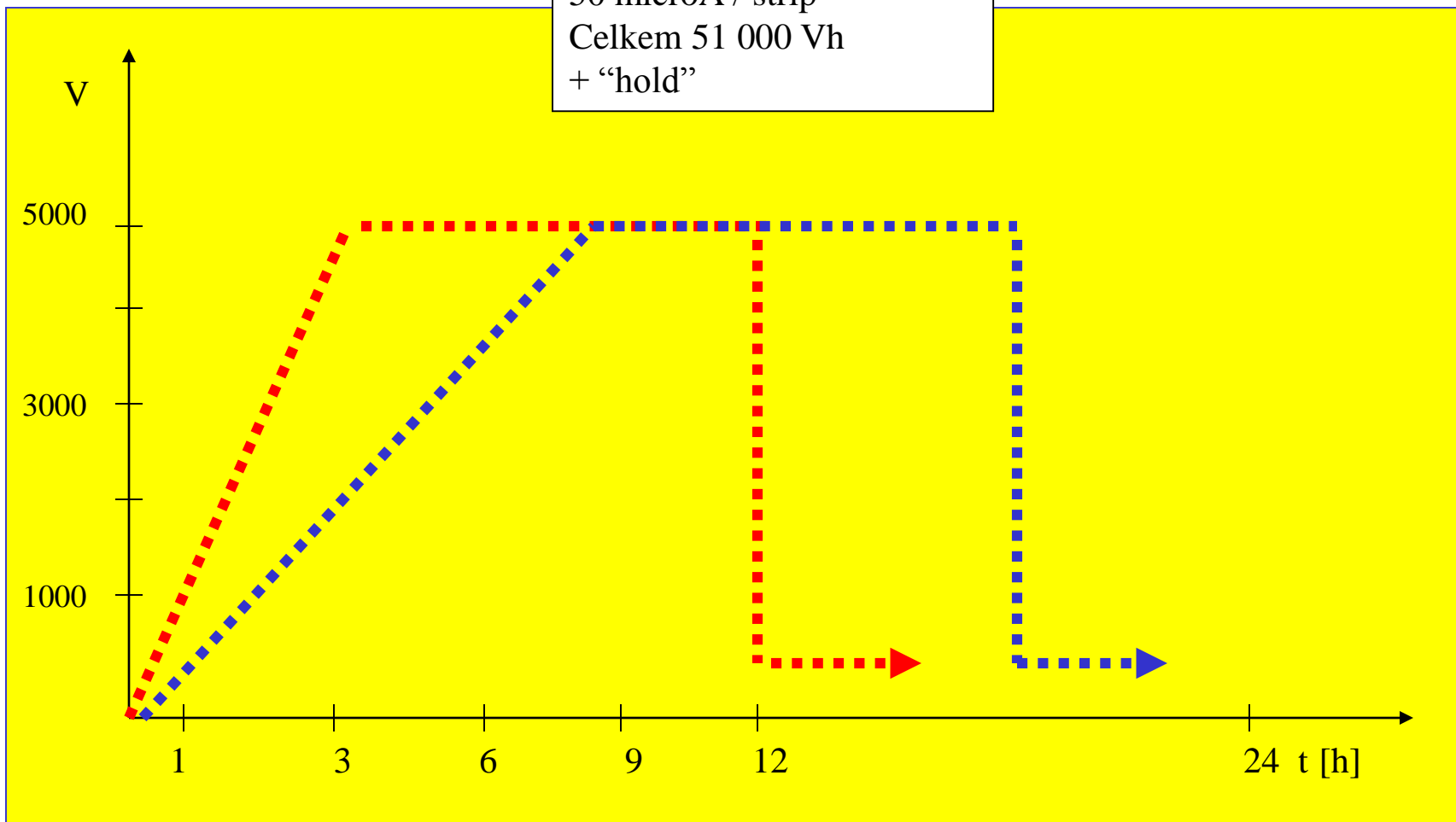
PŘEHŘÍVÁNÍ IPG STRIPŮ NA TZV. HOT SPOTS

(HOT SPOTS jsou hrany iontových pásů - hranice oblasti s nízkou a vysokou vodivostí)



TYPICKÝ IEF BĚH

BIO-RAD Protean IEF Cell
18 cm strip pH 3-10
Rehydratační nanáška 1mg
50 microA / strip
Celkem 51 000 Vh
+ "hold"



INSTRUMENTACE IEF



EKVILIBRACE STRIPŮ PŘED DRUHÝM ROZMĚREM

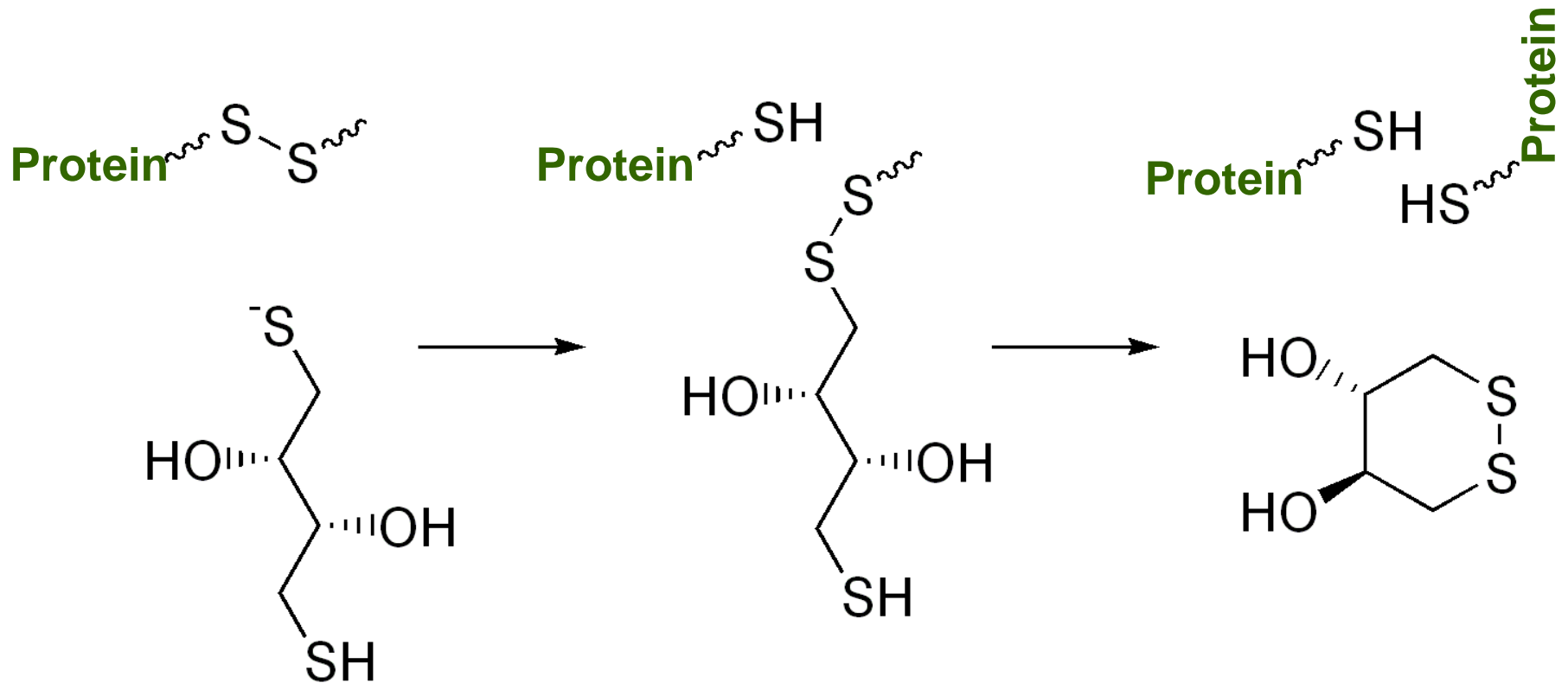
Cíle ekvibrace:

Převést bílkoviny do pufrů vhodných pro redukci, alkylaci a SDS separaci

- Maximalizovat přenos bílkovin ze stripu
- **Redukovat disulfidické můstky**
- **Alkylovat cysteiny**

Redukce disulfidických vazeb

Thiol-disulfidová výměna DTT s proteinem



Alkylace iodacetamidem



Karbamidometyl

EKVILIBRACE STRIPŮ PŘED DRUHÝM ROZMĚREM

Cíle ekvilibrace:

Převést bílkoviny do pufrů vhodných pro redukci, alkylation a SDS separaci

- Maximalizovat přenos bílkovin ze stripu
- **Redukovat disulfidické můstky**
- **Alkylovat cysteiny**

EKVILIBRAČNÍ PUFR (EQP):

50 mM Tris pH 8.8

2% SDS,

6 M močovina

30 % glycerol

Redukce: 15-20 min EQP + 1% DTT (dithiothreitol)

Alkylation: 15-20 min EQP + 2.5 % iodacetamid (!)

ELEKTROENDOOSMOTICKÝ EFEKT

Nepohyblivé (zakotvené) nabité skupiny v elektrickém poli !!

Po ekvilibraci v neutrálním nebo zásaditém pufru:

- COOH disociovaná na COO⁻,
- aminoskupiny zůstávají nedisociované

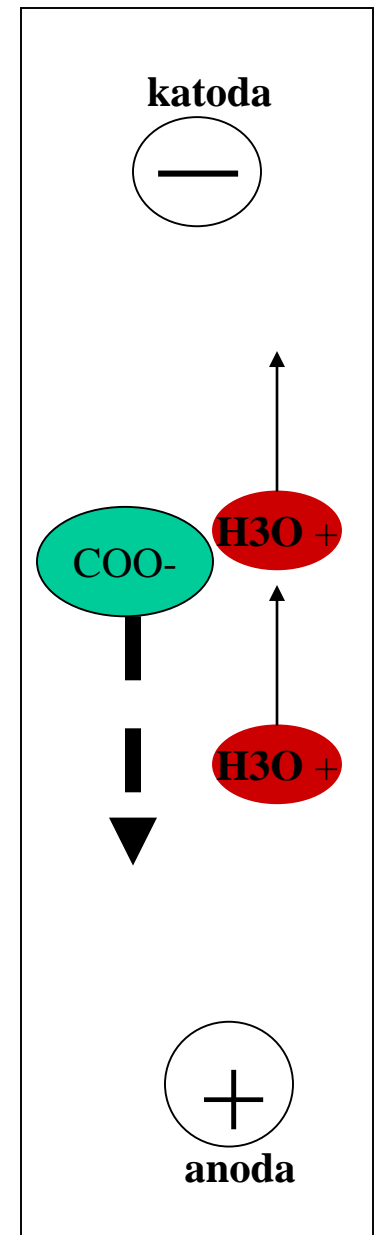
Disociovaný karboxyl je přitahována k anodě (+), ale nemůže.....
To je kompenzováno migrací H₃O⁺ ke katodě (-)

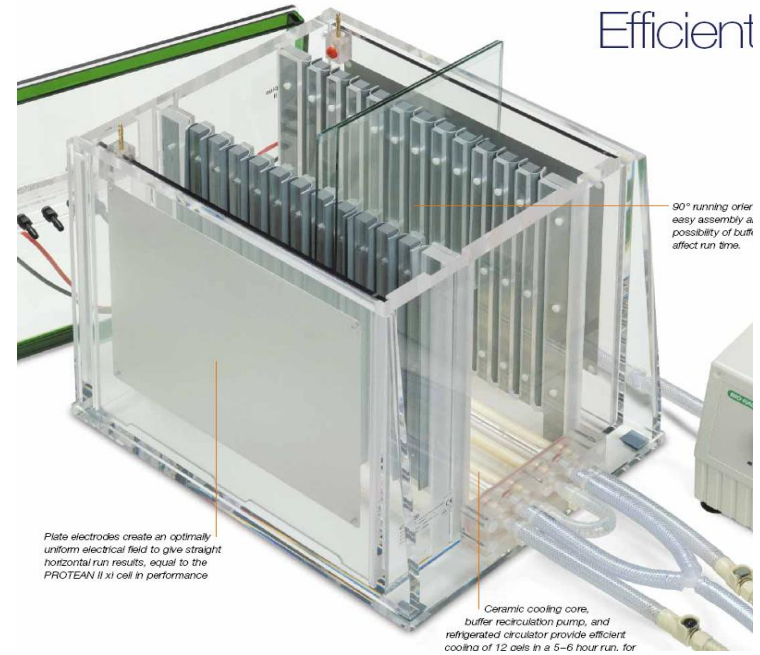
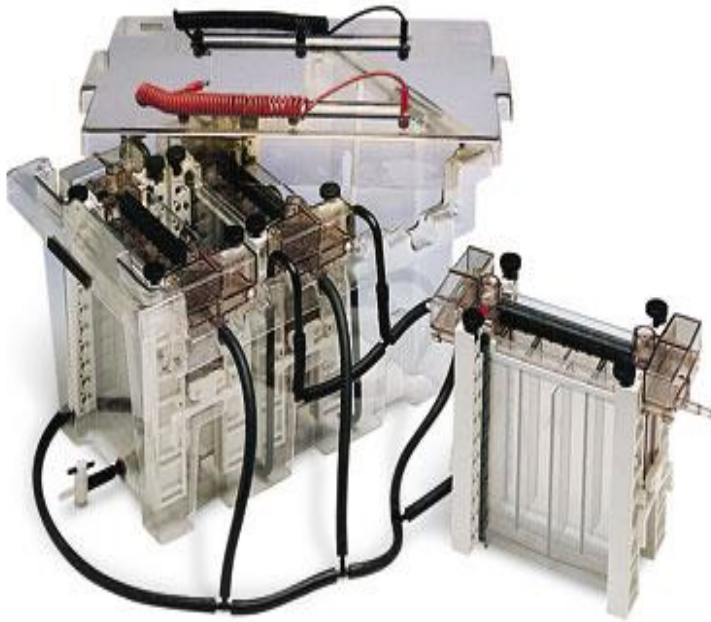
Voda nese rozpuštěné částice směrem ke katodě !

Následky:

IEF : bobtnání katodického (bazického) konce
zhošená separace

SDS-PAGE : ztráta bílkovin na vstupu do gelu
zhoršená separace





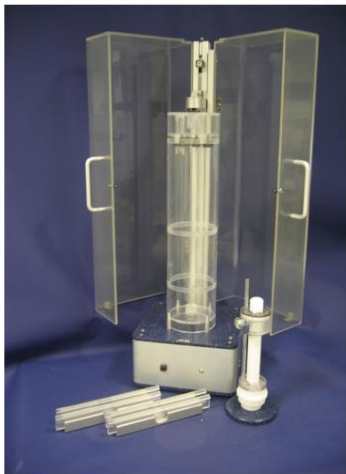
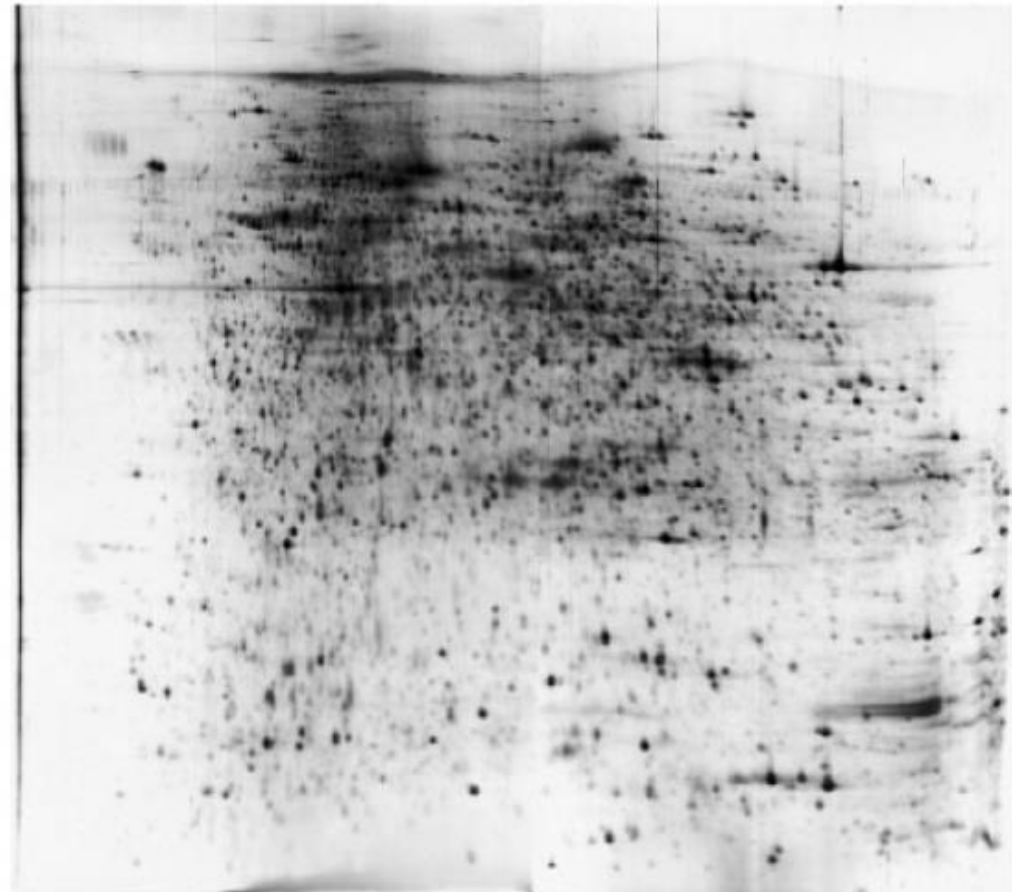
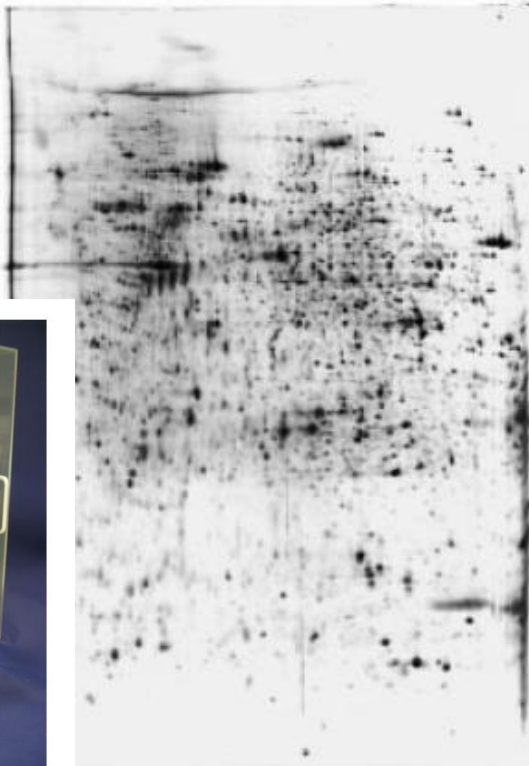
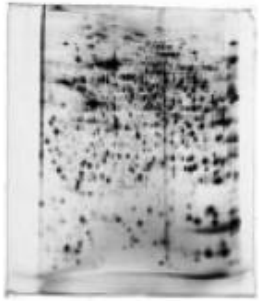
Trubičky a obří gely

WITA

Small (8x7 cm), large (24x32 cm) and giant gels (48x32 cm)
(mouse ovary total protein extract, 5000-8000 spots).



2nd Dim. Chamber WITA 2D 6pack



1st Dim. Chamber WITA 1D

SEPARAČNÍ METODY

- chromatografie
- elektroforézy

2-DE

- příprava vzorků
- izoelektrická fokusace
- ekvibrace
- SDS-PAGE
- speciální metody
- detekce bílkovin a DIGE
- zpracování dat a vyhodnocení
- digesce vzorku a extrakce peptidů
- limity a záludnosti 2-DE