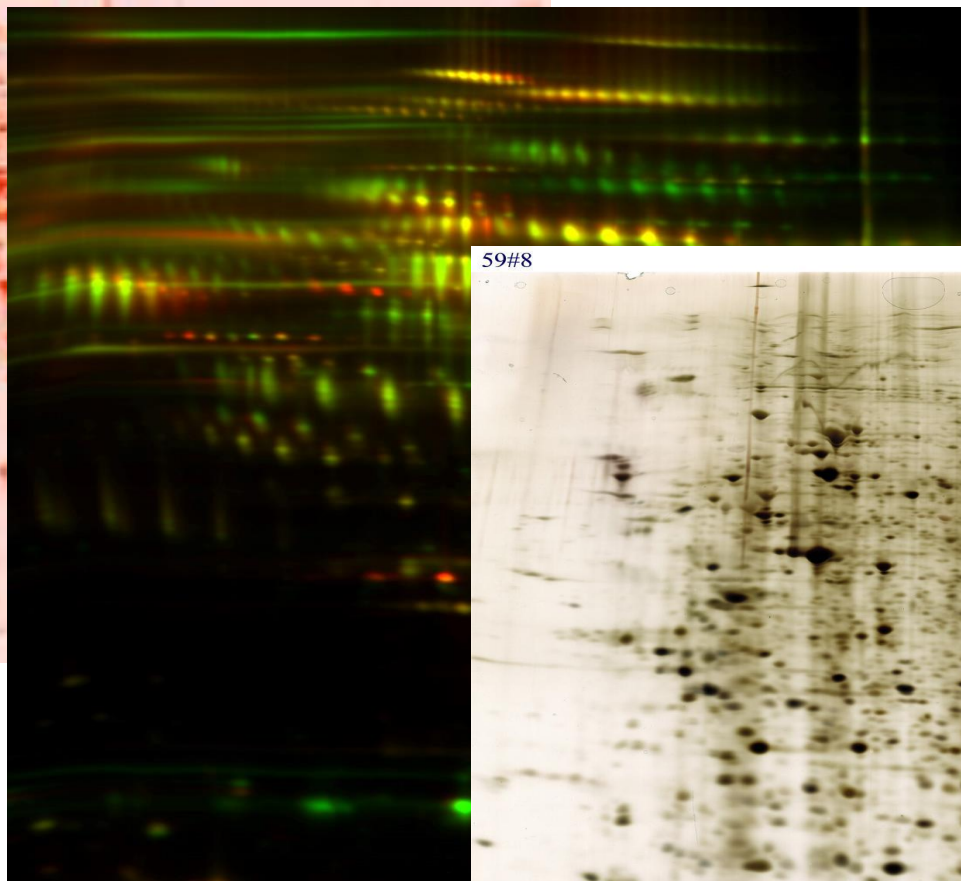
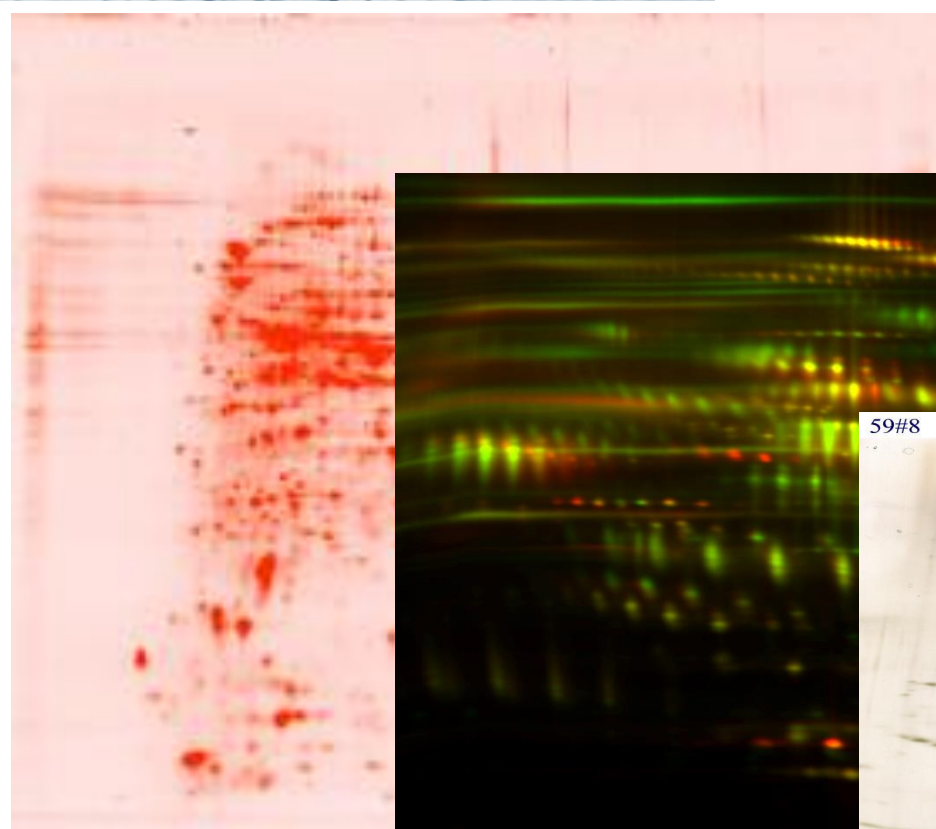
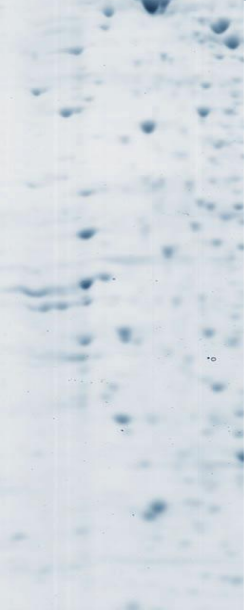
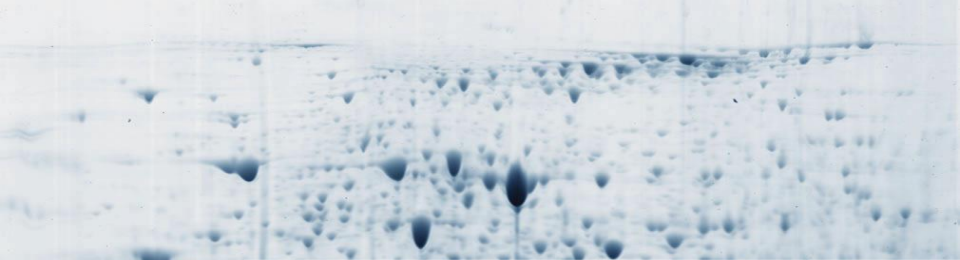


# SEPARAČNÍ METODY

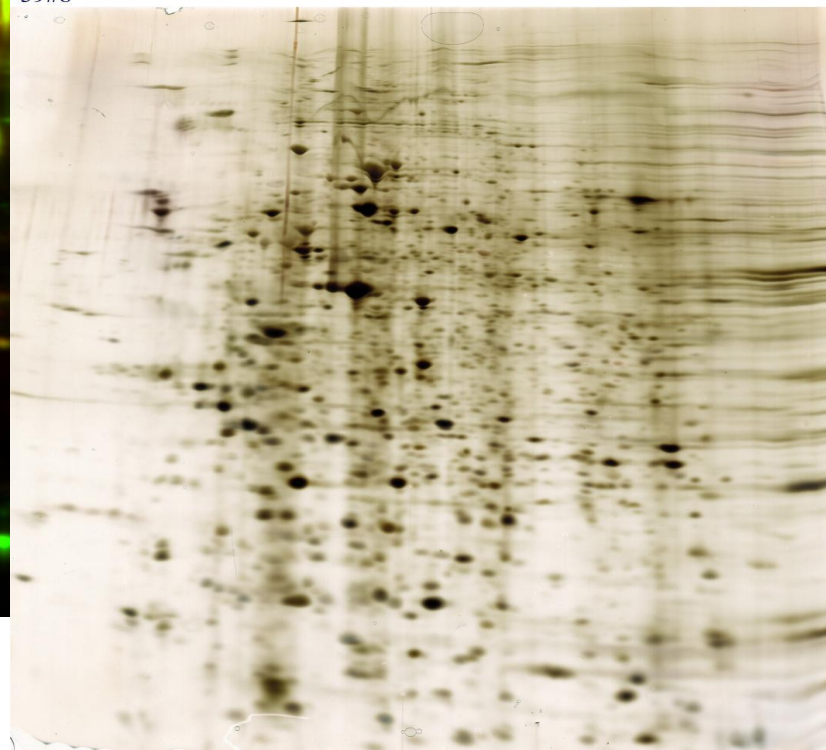
- chromatografie
- elektroforézy

## 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



59#8



# DETEKCE a VIZUALIZACE BÍLKOVIN V GELECH

- **Citlivost**
- **Možnost kvantifikace**
- **Linearita signálu**
- **Dynamický rozsah**
- **Kompatibilita s MS**
- **Cena**
- (nízká toxicita)

## Kolorimetrické „viditelné“ barvení

- CBB
- Stříbro

## Fluorescenční barvení A DIGE

- Sypro
- Deep Purple
- Flamingo
- Krypton

- Cy2, Cy3, Cy5
- FlaSH

## Radioaktivní detekce

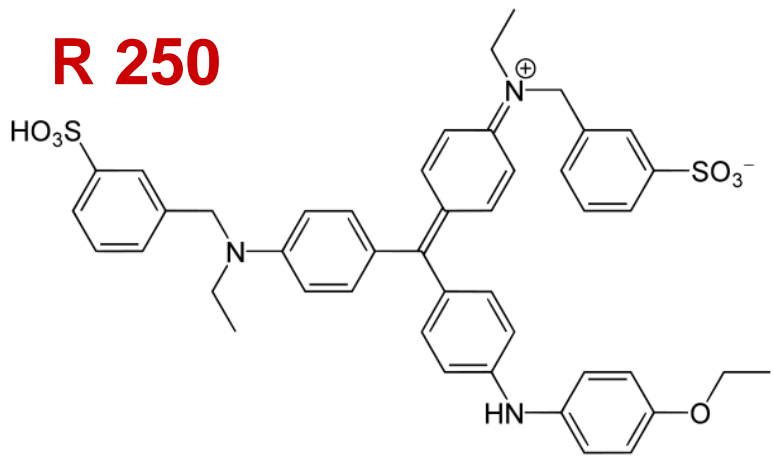
# DETEKCE BÍLKOVIN VIDITELNÝMI PIGMENTY

- COOMASSIE BLUE G250/ R250

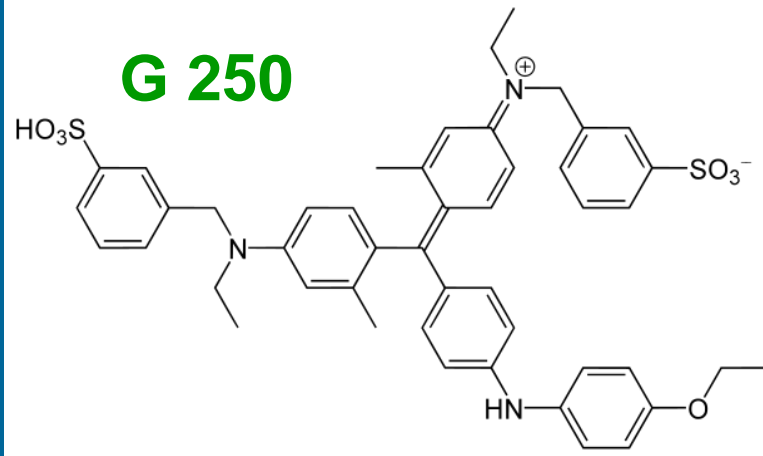
! Různá účinnost na různé proteiny !  
Barví: Lys, Arg, His, Tyr (Trp, Leu)

## COOMASSIE BRILIANT BLUE

**R 250**



**G 250**



# DETEKCE BÍLKOVIN VIDITELNÝMI PIGMENTY

- COOMASSIE BLUE G250/ R250

! Různá účinnost na různé proteiny !  
Barví: Lys, Arg, His, Tyr (Trp, Leu)

## COOMASSIE BRILIANT BLUE

**R 250**

KLASICKÁ CBB  
(CBB-R250)

Citlivost 50-100 ng

Alkohol-kyselina  
Odbarvování proteinů  
Špatná kvantifikace  
Nízká cena

**KOLOIDNÍ CBB**  
(CBB-G250)

Citlivost 10-30 ng

Alkohol - kyselina –  
síran amonný  
„Steady state“ (bez  
ztráty při odbarvení)  
Dobrá kvantifikace  
Středně vysoká cena

„BLUE SILVER“  
(CBB-G250)

Citlivost 1-10 ng

- Více pigmentu
- Alkohol - kyselina –  
síran amonný

„Steady state“ (bez  
ztráty při odbarvení)  
Dobrá kvantifikace  
Středně vysoká cena

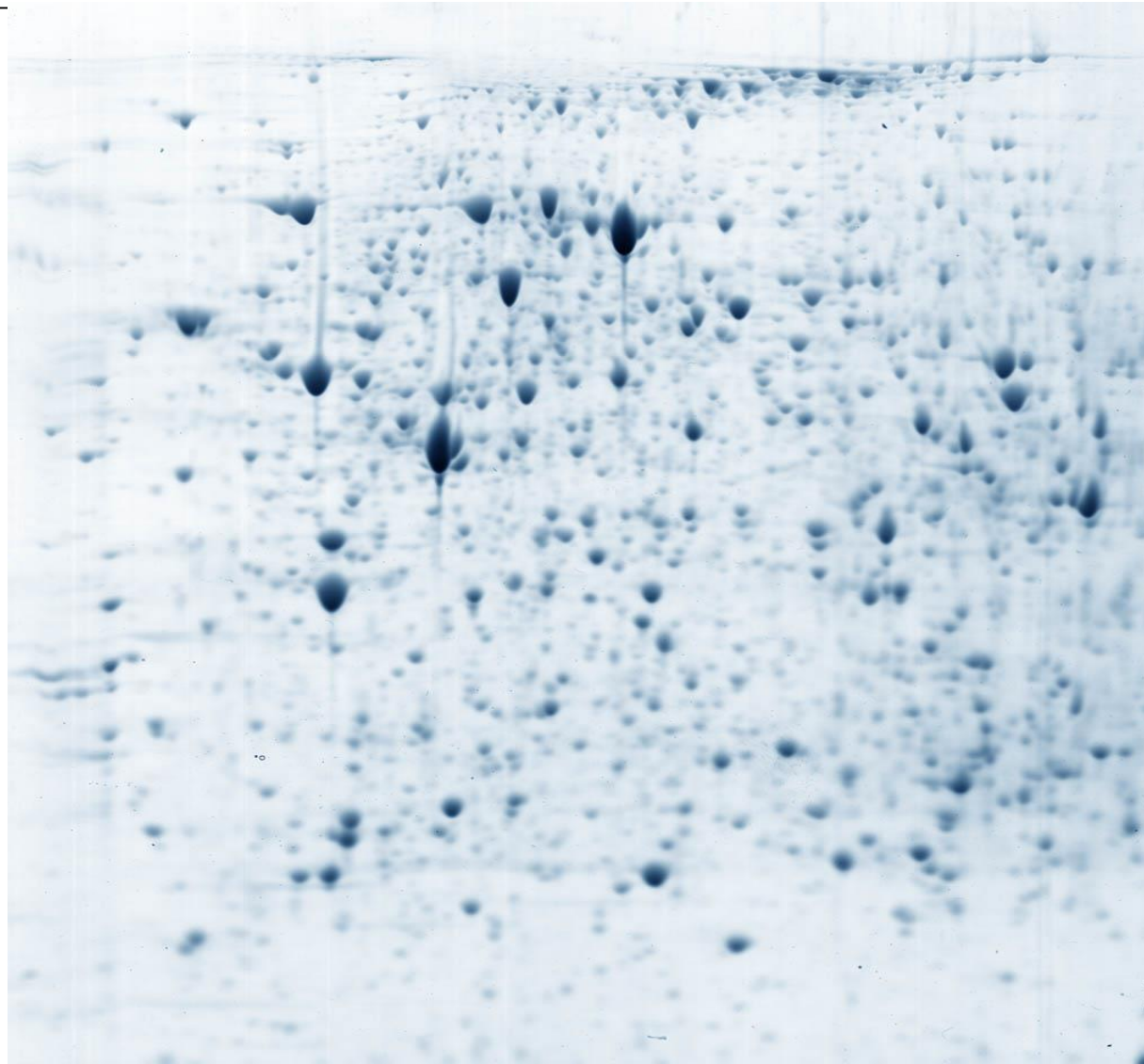
**G 250**

**FLUORESCENČNÍ  
CBB**  
(CBB-G250)

Citlivost pod 1 ng !

Detekce IR laserem

**Jaterní homogenát, preparativní nanáška 2 mg, barvení koloidní Coomassie Blue  
1025 spotů**



pH 4

pH 7

# DETEKCE BÍLKOVIN VIDITELNÝMI PIGMENTY

## • DETEKCE STŘÍBŘENÍM

Redukce dusičnanu stříbrného na kovové stříbro,

barví : Lys, Arg, His, Tyr, Trp

**Citlivost 0.5 ng !**

**nízká cena**

**Vícekový postup (až 20)**

**Citlivý na přesnost**

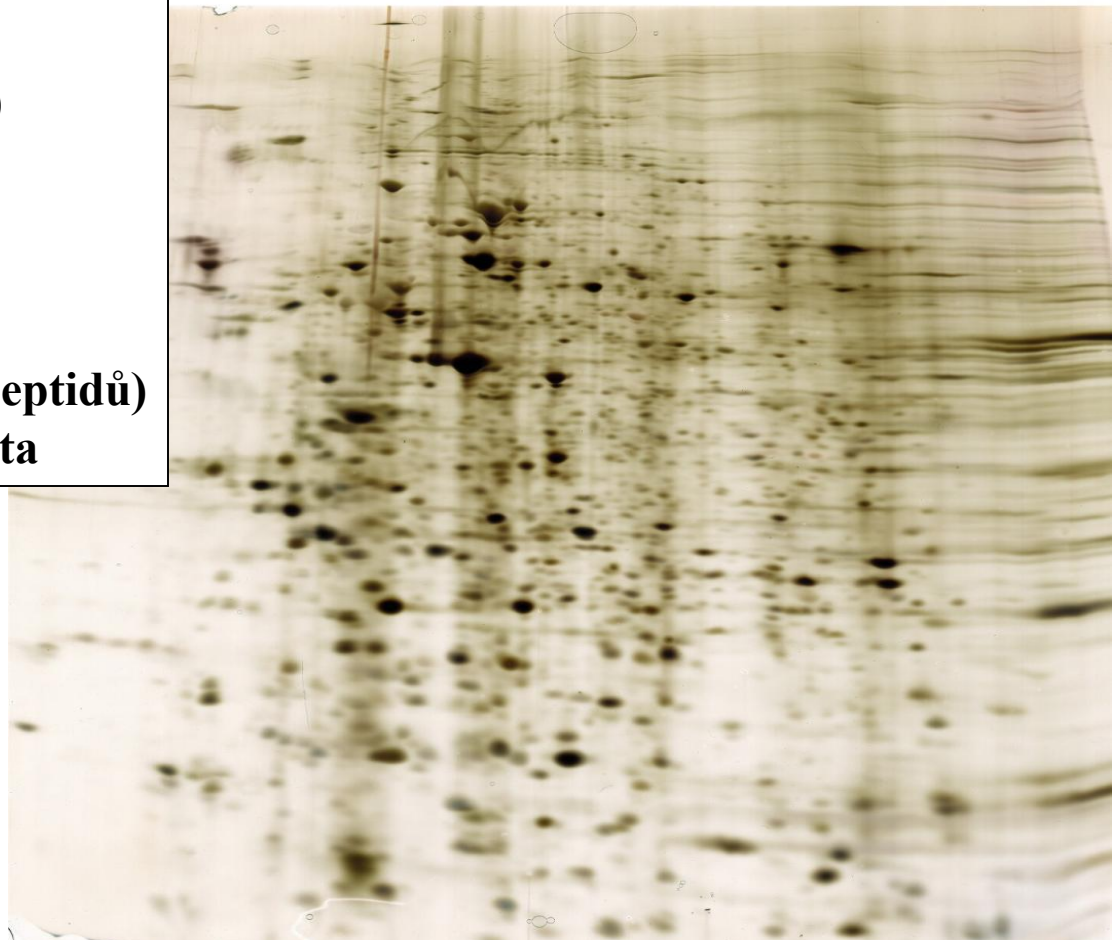
**Nízký dynamický rozsah**

**Negativní barvení**

**Komplikace s MS**

**(glutaraldehyd a nízká extrakce peptidů)**

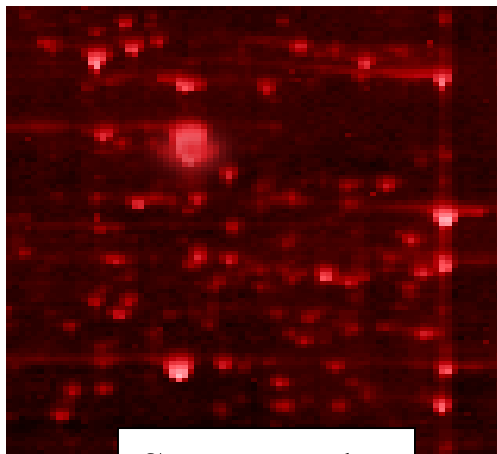
**Problematická reproducibilita**



# FLUORESCENČNÍ DETEKCE

<u>SYPRO Orange (470 nm, 570 nm)</u>	• (4–8 ng/band)
<u>SYPRO Red (550 nm, 630 nm)</u>	• (4–8 ng/band)
<u>SYPRO Ruby (450 nm, 610 nm)</u>	• (1–2 ng/band; comparable to silver staining)
<u>SYPRO Tangerine (490 nm, 640 nm)</u>	• (4–8 ng/band)

Pigmenty se váží na detergentový (SDS) obal proteinu  
(kromě Sypro Ruby – bazické AA)



Sypro Ruby

**SYPRO RUBY** (Molecular Probes)

**FLAMINGO** (BIO-RAD)

**(DEEP) LAVA PURPLE** (GE-Amersham)

**KRYPTON** (Pierce)

**Dobrá kvantifikace**

**Kompatibilní s dalším barvením**

**Minimum kroků**

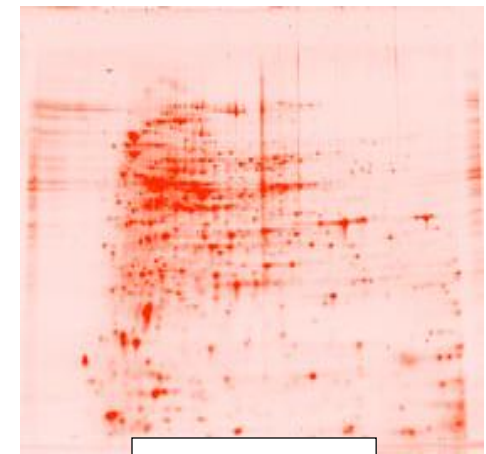
**Dynamický rozsah**

**Fluorescenční scanner**

**(excitace také v UV, kromě Kryptonu)**

**Sběr spotů je komplikovaný**

**Vysoká cena, ale .....**

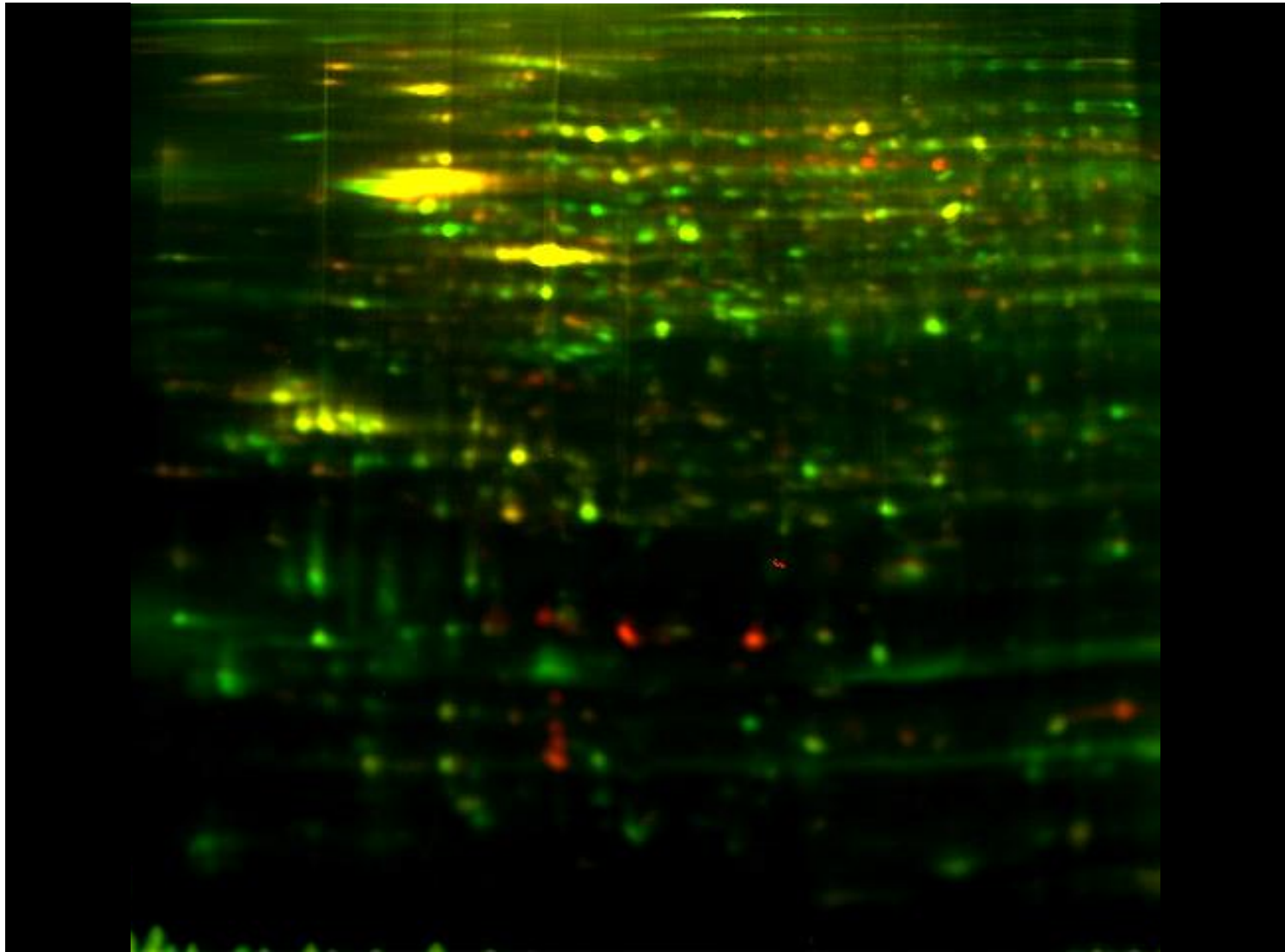


Flamingo

....**ALE** je tu ruthenium a **bathophenantrolinsulfát**

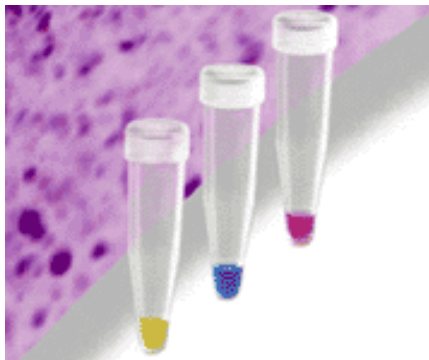


# DIGE - Differential gel electrophoresis

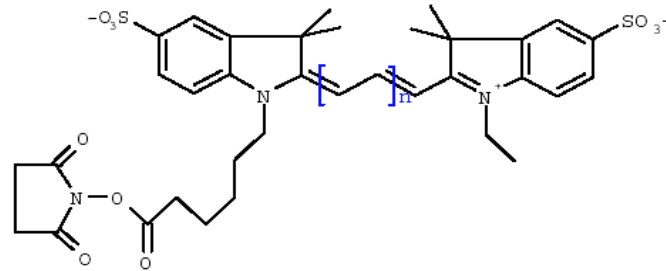


# 2D-DIGE : 2D DIFFERENČNÍ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA

(Cy2, Cy3, Cy5 Difference gel electrophoresis)

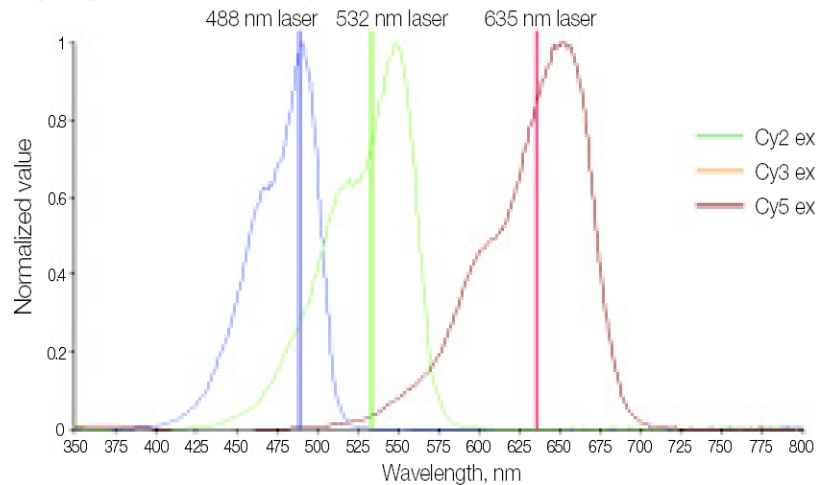


## Cyaninové fluorofory

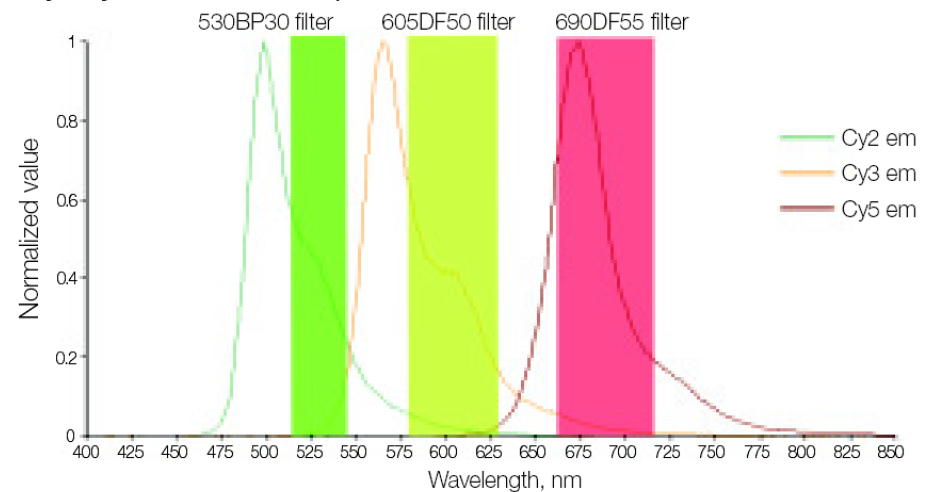


**Maleimid** - Cys (-SH)  
**Succinimid** - N-term a Lys (ε)

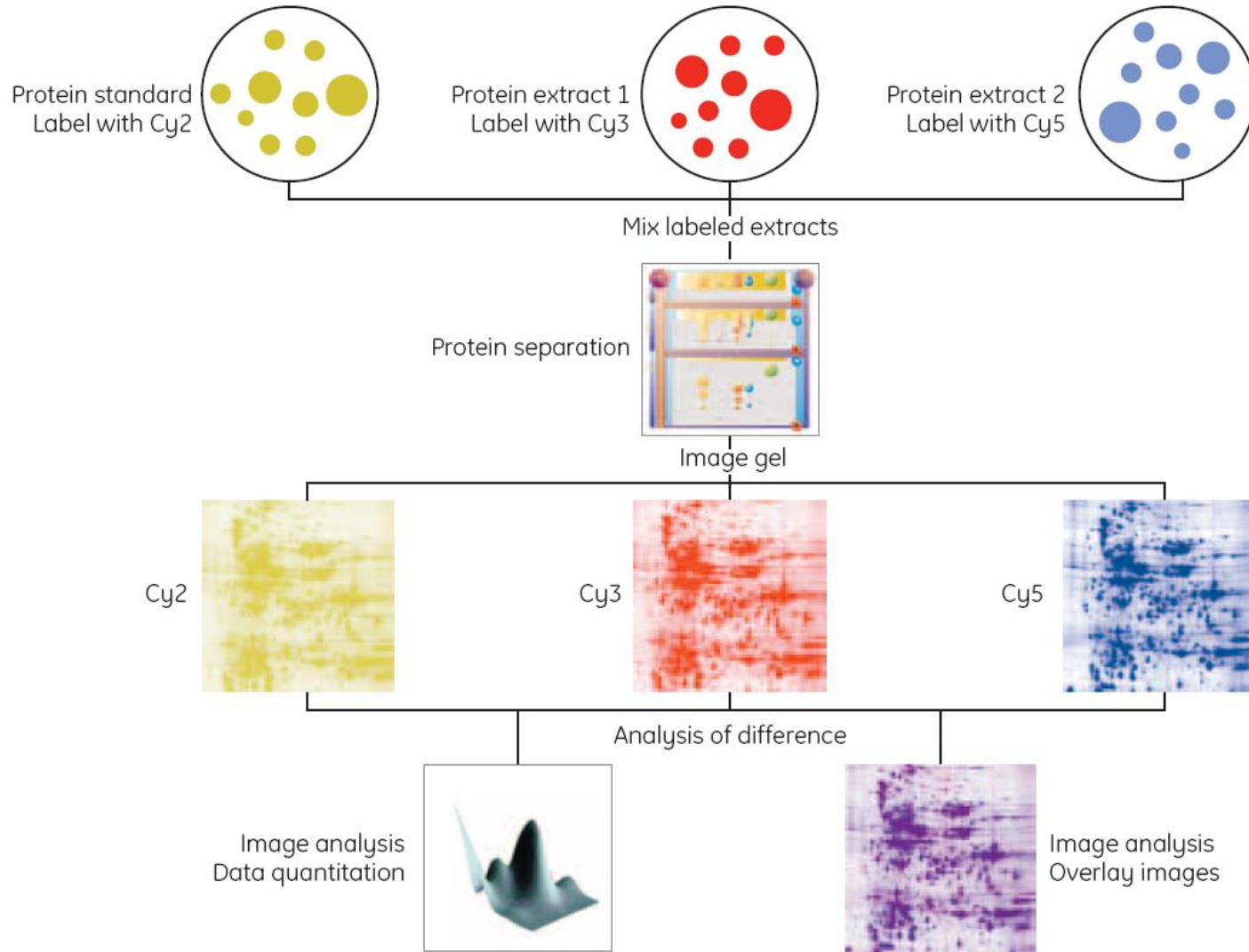
## Cy Dye Excitation Spectra



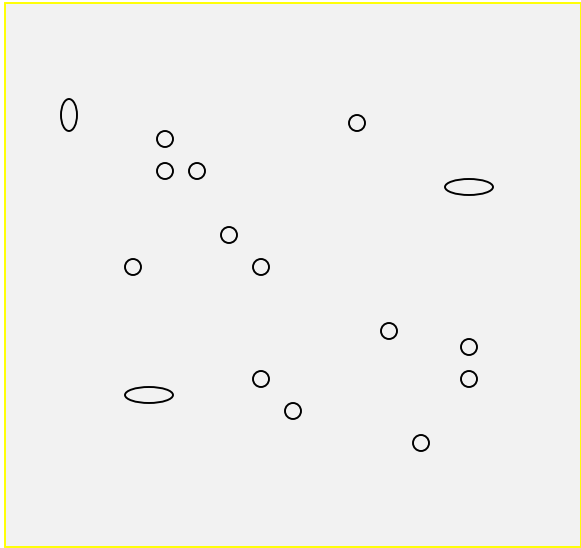
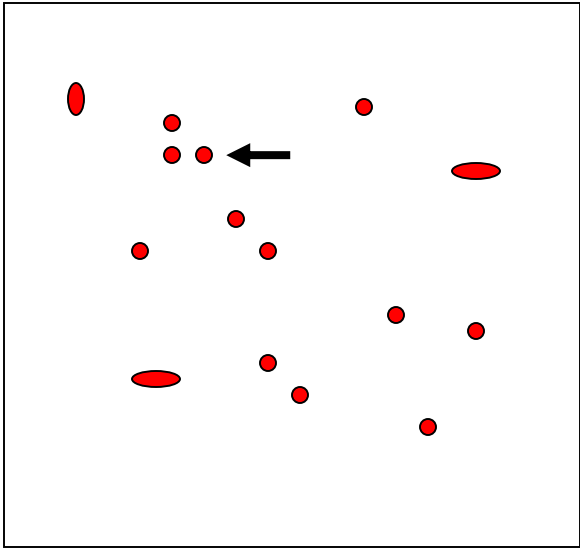
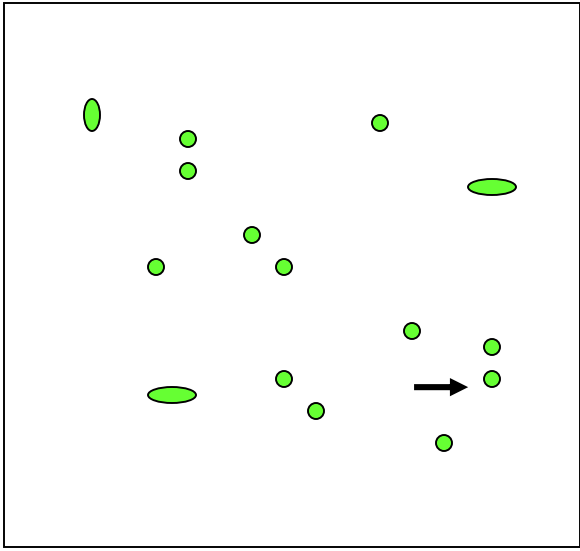
## Cy Dye Emission Spectra

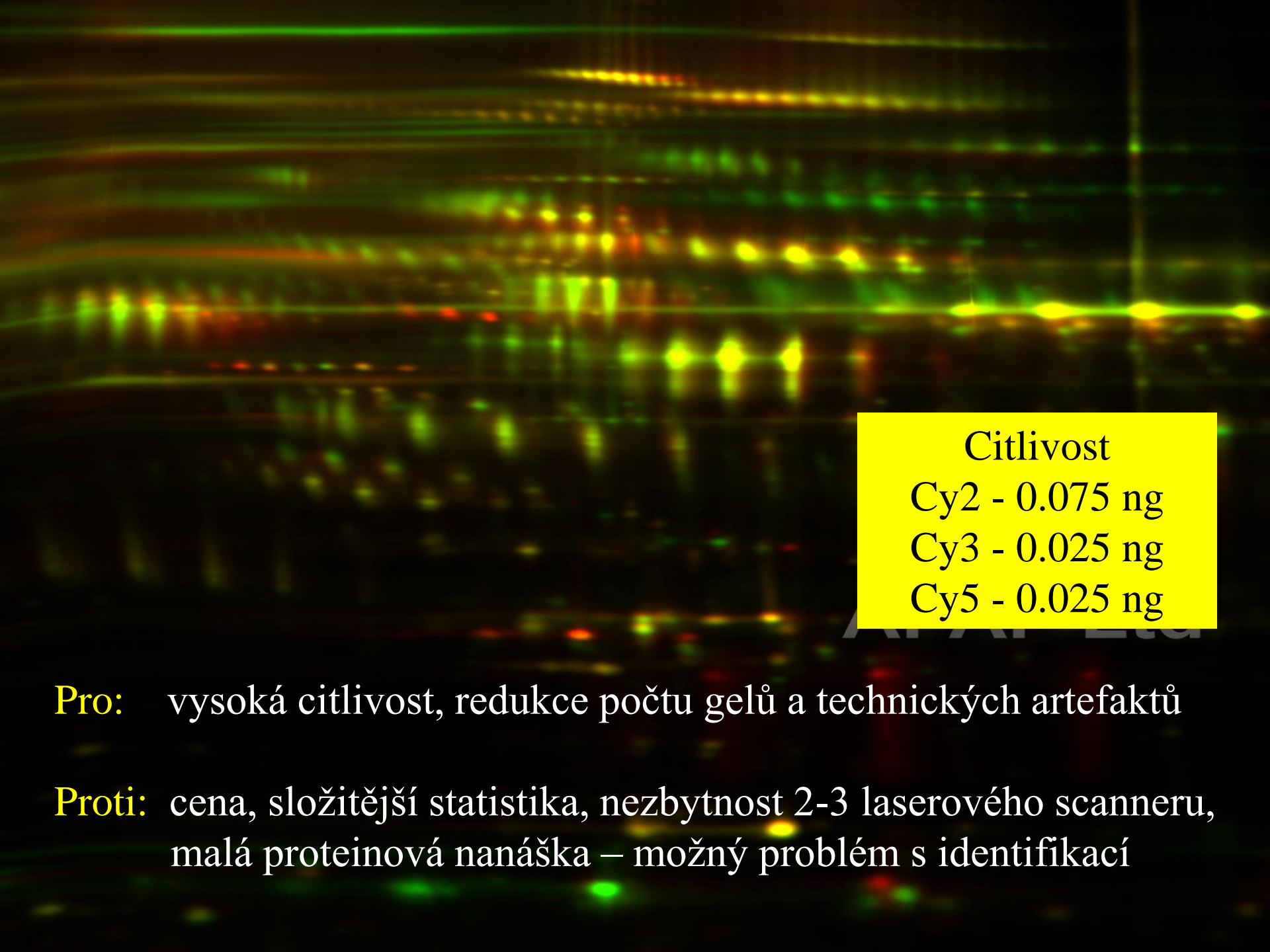


# EXPERIMENTÁLNÍ USPOŘÁDÁNÍ PRO DIGE



**Minimální versus maximální značení**  
**Rozdíly v migraci, off-set**





Citlivost

Cy2 - 0.075 ng

Cy3 - 0.025 ng

Cy5 - 0.025 ng

**Pro:** vysoká citlivost, redukce počtu gelů a technických artefaktů

**Proti:** cena, složitější statistika, nezbytnost 2-3 laserového scanneru, malá proteinová nanáška – možný problém s identifikací

# RADIOAKTIVNÍ ZNAČENÍ

Inkorporace značených aminokyselin ( $^{35}\text{S}$  methionin, beta zářič)  
nebo jiných prekurzorů ŽIVÝMI buňkami - metabolické značení

**Vysoká citlivost**

**Nejvyšší dynamické rozsah**

**ALE....**

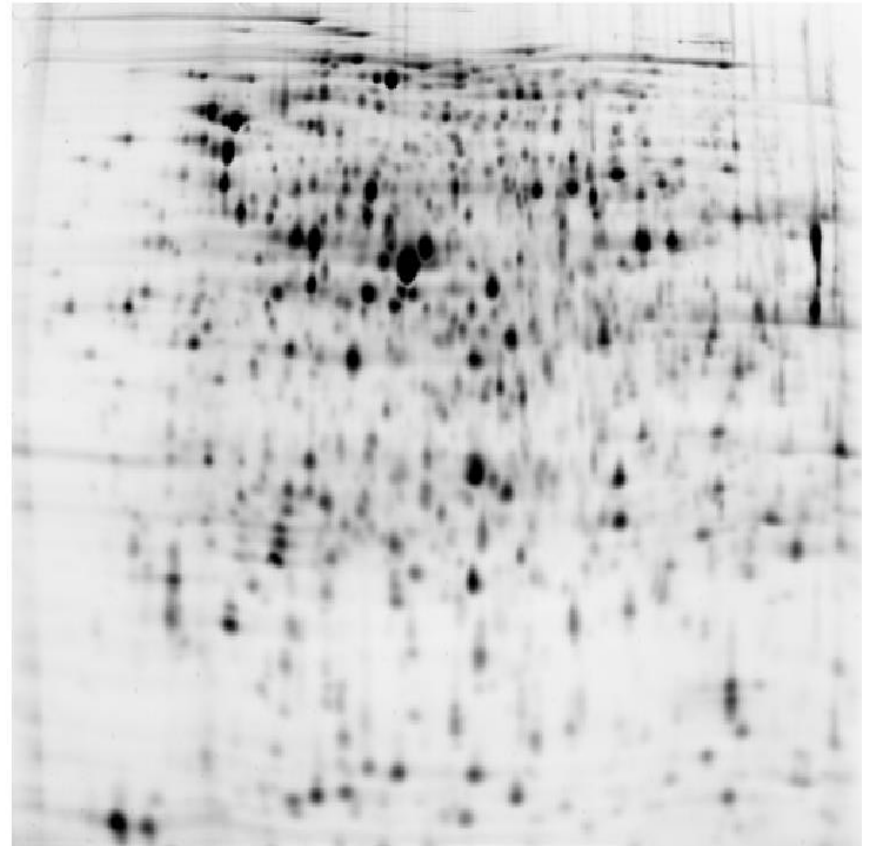
**Gel je nutné usušit před detekcí**

**Klasická radiografie je nepraktická**

**Fosfoimager nezbytný**

**Rizika práce s izotopy**

**Studium PTM !!!**



Viditelné	Klasická CBB	nízká citlivost
	Koloidní CBB	střední citlivost, dobrá kvantifikace
	Stříbření	vysoká citlivost
Fluorescenční	Sypro, Flamingo, Lava a Krypton	vyšší citlivost, kvantifikace, dynamický rozsah, F-scanner
	IR CBB	nezbytnost IR laseru, vysoká citlivost i rozsah
	Cy-2, 3, 5 a další	vysoká citlivost, cena !, scanner a software
DIGE		
Radioaktivní detekce	35S a další	nejvyšší citivost, kvantifikace, dynamický rozsah, P-imager

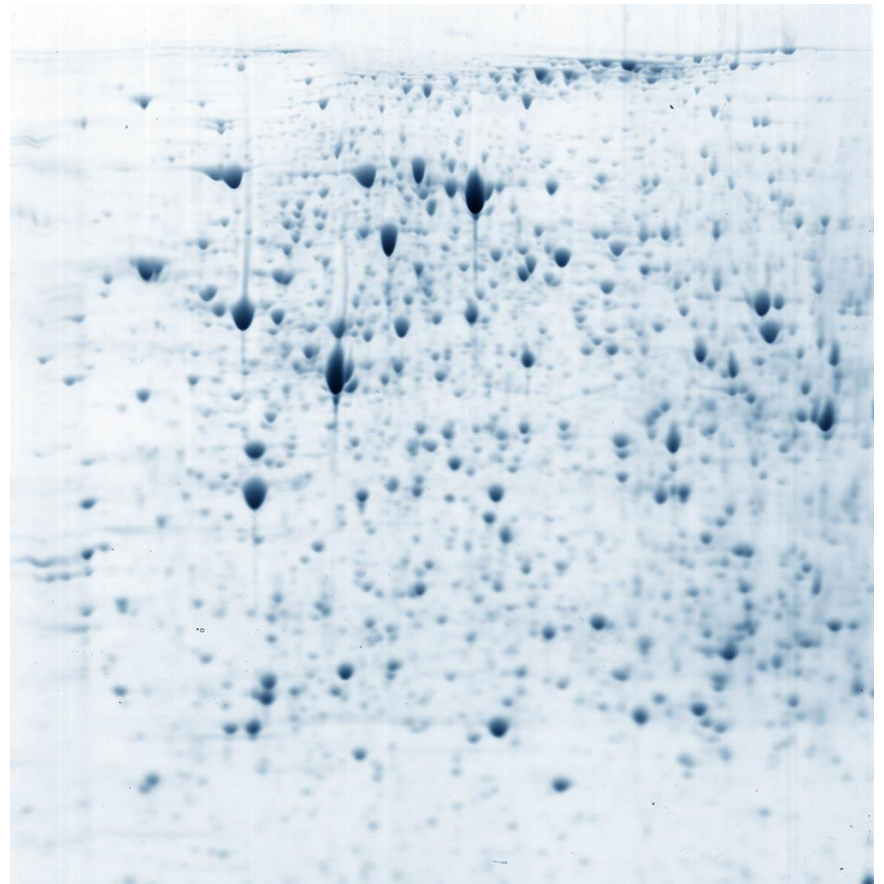
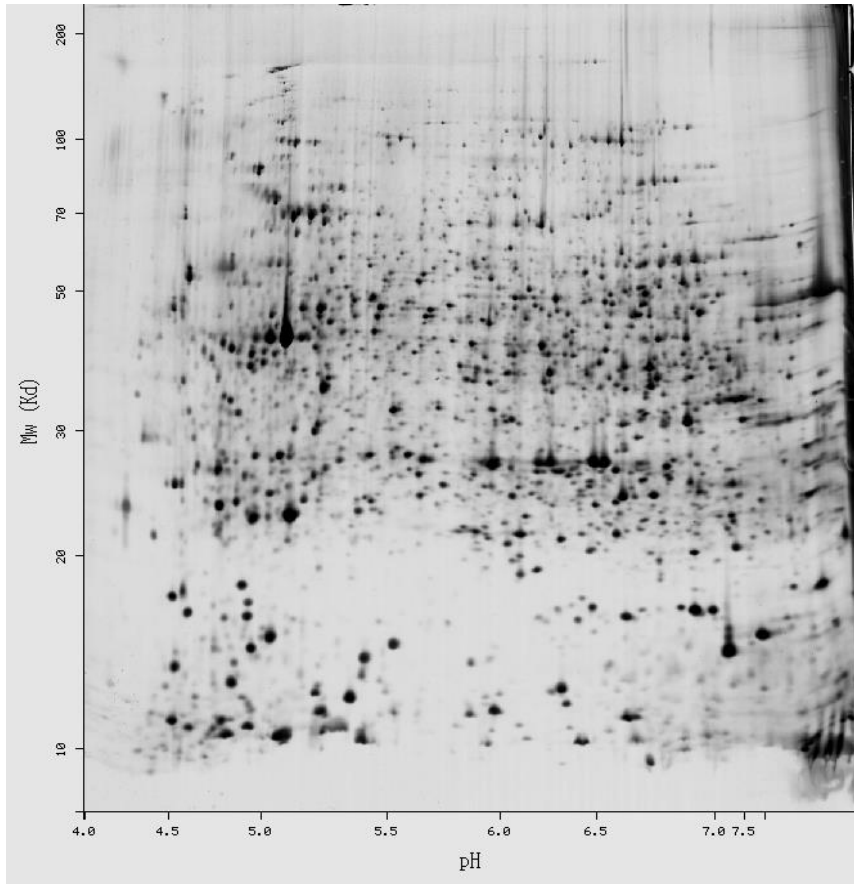
# SEPARAČNÍ METODY

- chromatografie
- elektroforézy

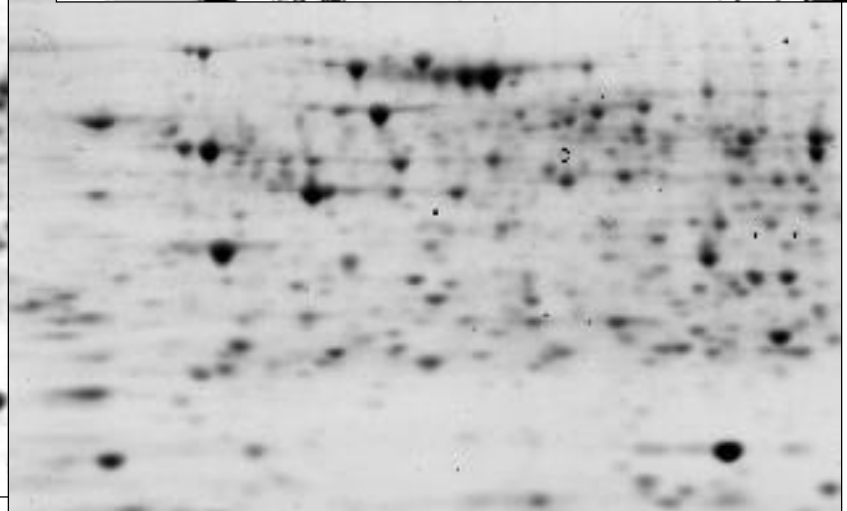
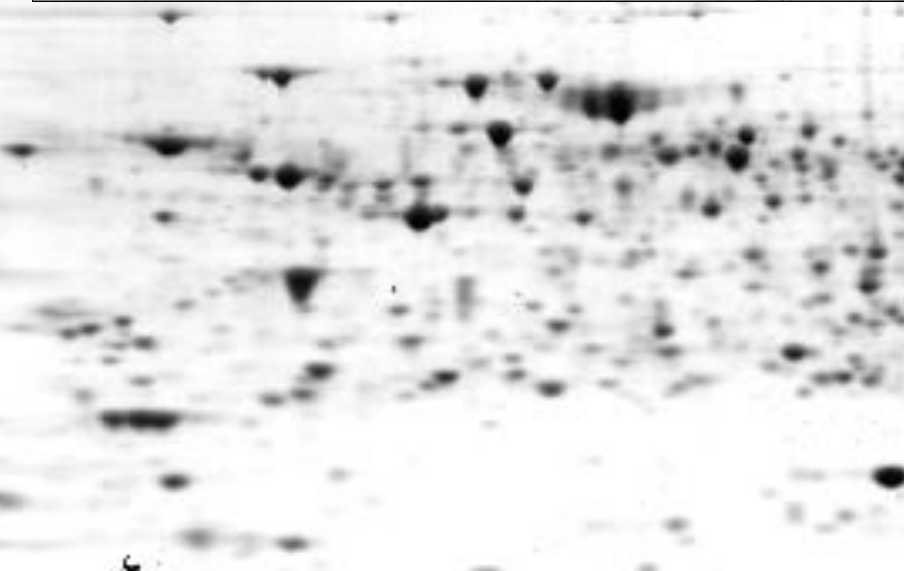
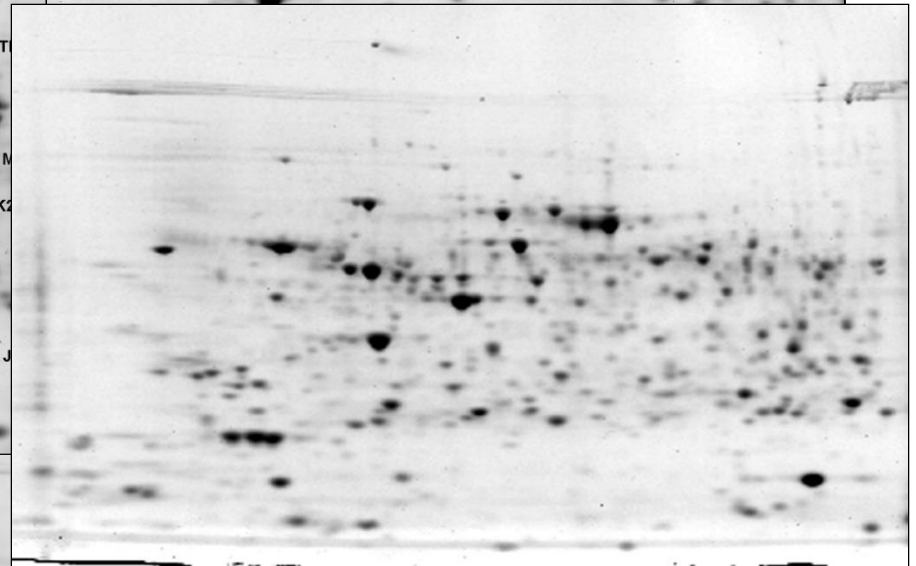
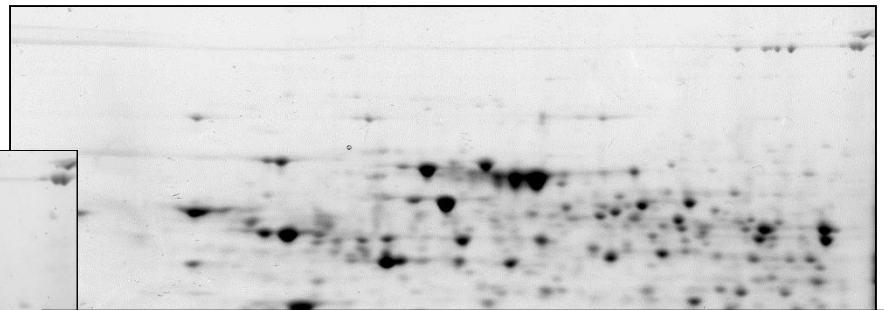
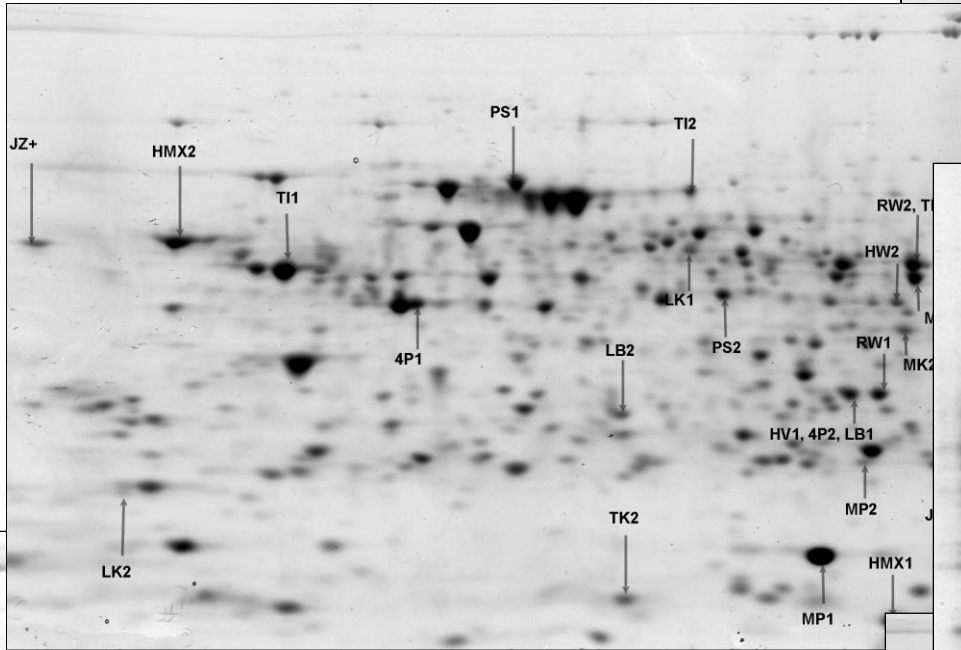
## 2-DE

- 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





# Proteomické praktikum

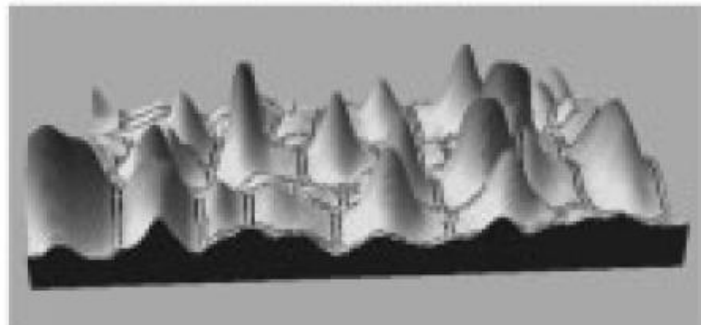
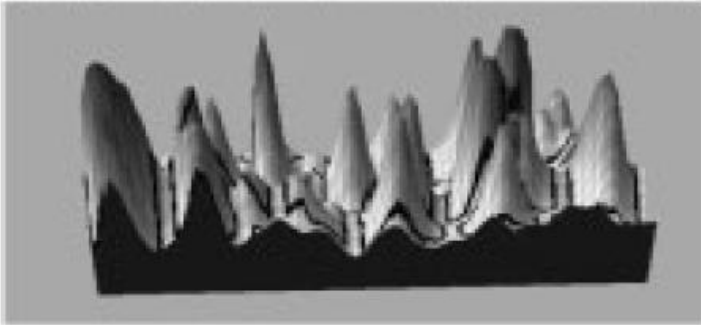
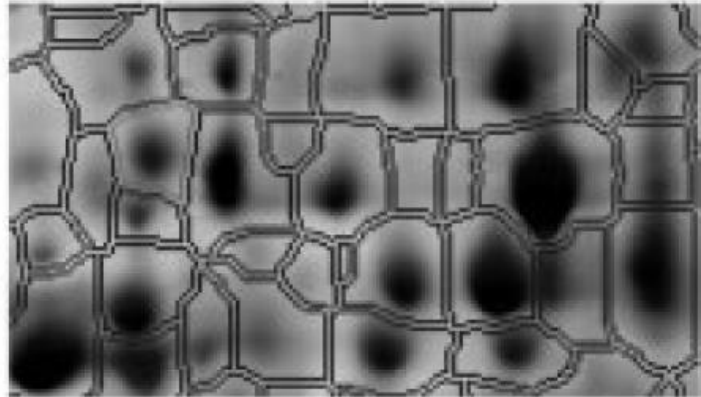
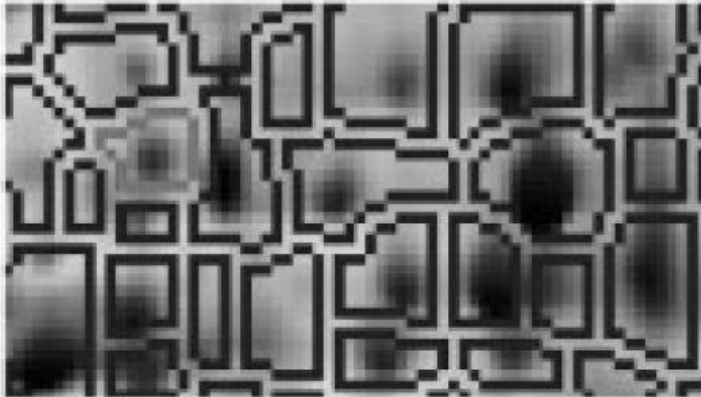
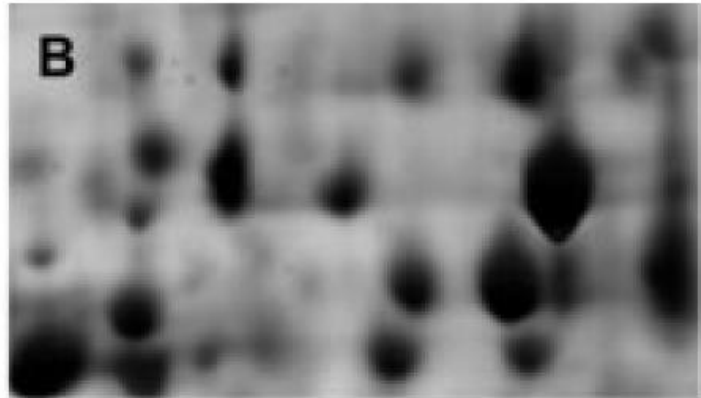
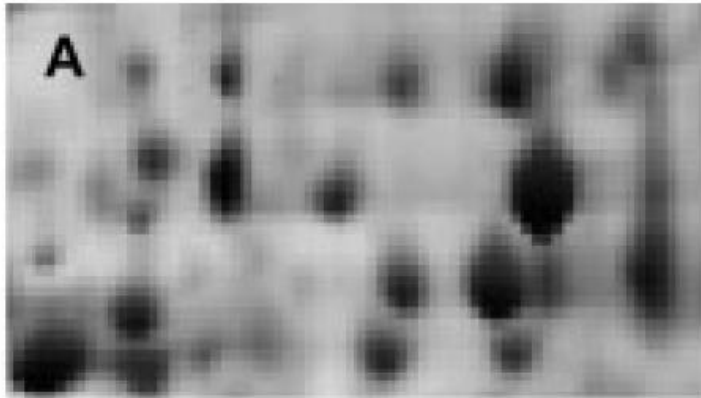


# ZÍSKÁNÍ A ZPRACOVÁNÍ OBRAZU

Kritické parametry:

- rozlišení (dpi, mm)
- bitová hloubka
- dynamický rozsah

Criteria	Laser scanners	Document scanners	CCD devices	
			Scanning	Fixed
Image resolution ( $\mu\text{m}$ )	10–250	20–250	50–200	>120
Dynamic range (orders of magnitude)	5	4–5	3–4	3–4
Scan speed	Slow	Fast	Slow	Medium
Wavelength accuracy	High	Low	High	High
Silver, Coomassie, autoradiography	Yes	Yes	Yes	Yes
Storage phosphor	Yes	No	No	No
Single color fluorescence (CyDyes, Deep Purple, ProQ, FlaSH)	Yes	No	Yes	Yes
Multicolor fluorescence (DIGE)	Yes	No	Yes	Limited
Chemiluminescence	Yes	No	Yes	Yes
Cost	££££	£	£££	££

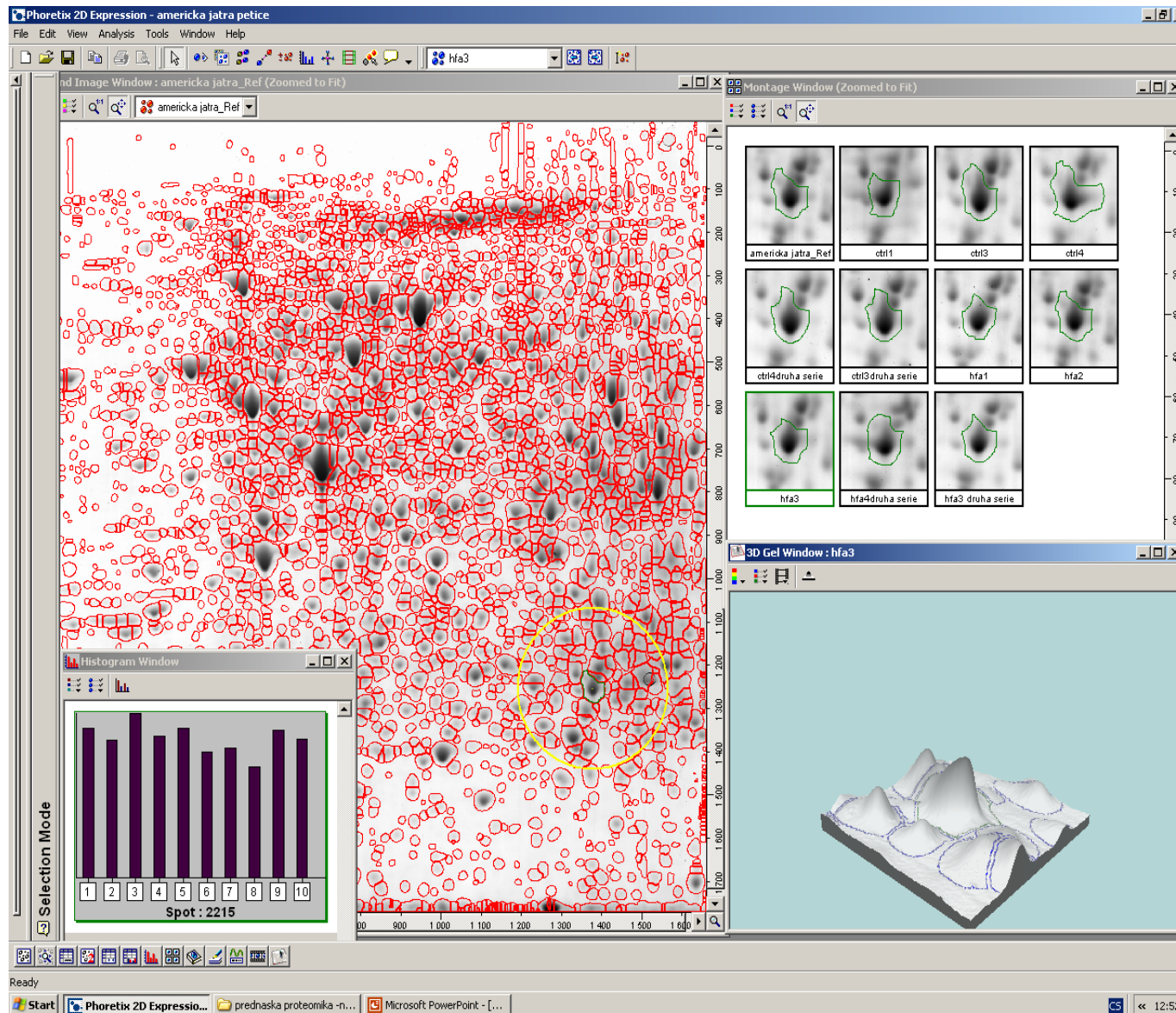


**100 dpi**

**300 dpi.**

- ➔ Scanovat při dostatečném rozlišení (300 dpi a více)
- ➔ Stupně šedi: 16 bitů je více než 8 ( $2^{16}$  je víc než  $2^8$ )
- ➔ Pozor na saturaci a dynamický rozsah
- ➔ Neprovádět žádné úpravy ani konverzi do jpg, gif...

# Softwarové vyhodnocení 2D gelů



**Komerční:**

**PDQuest**  
**Phoretix**  
**Progenesis**  
**Decodon**  
**ProFinder**  
**Bio Numerics**  
a další

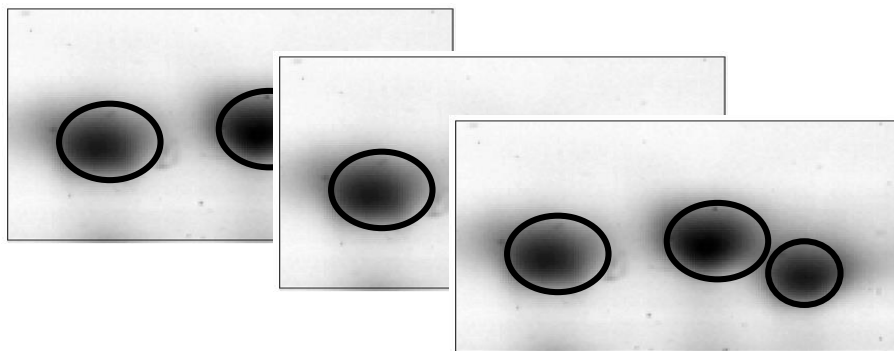
**Volně dostupné:**

**GelScape**  
**Open2Dprot**

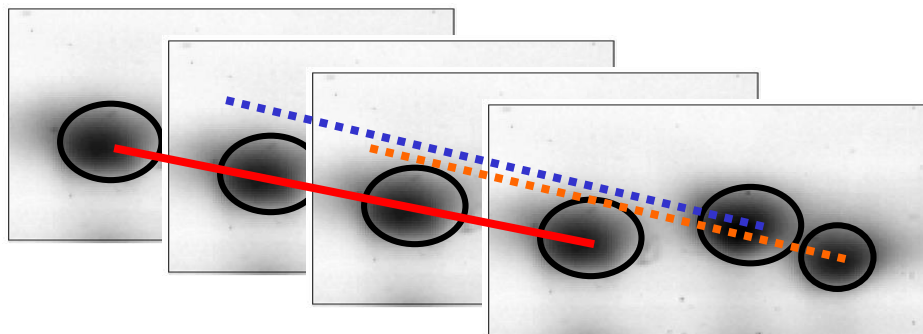
**Služby:**

**Ludesi**

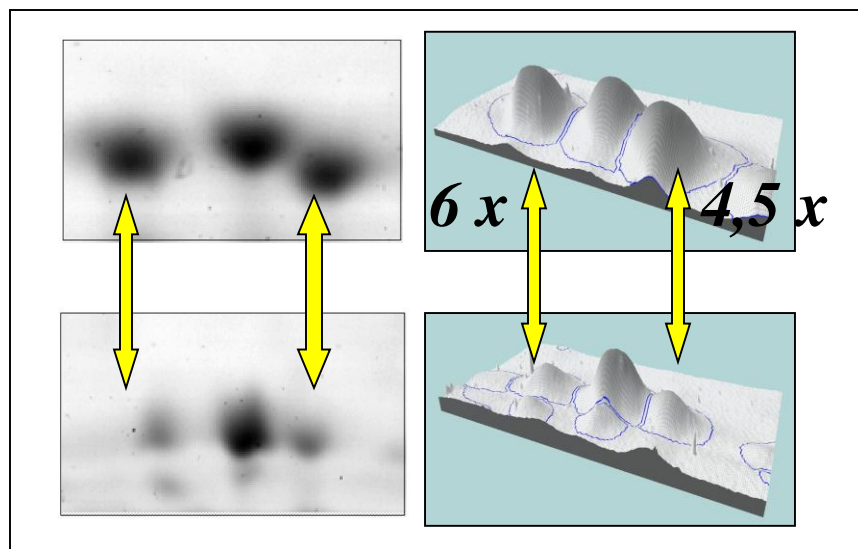
Detekce spotů

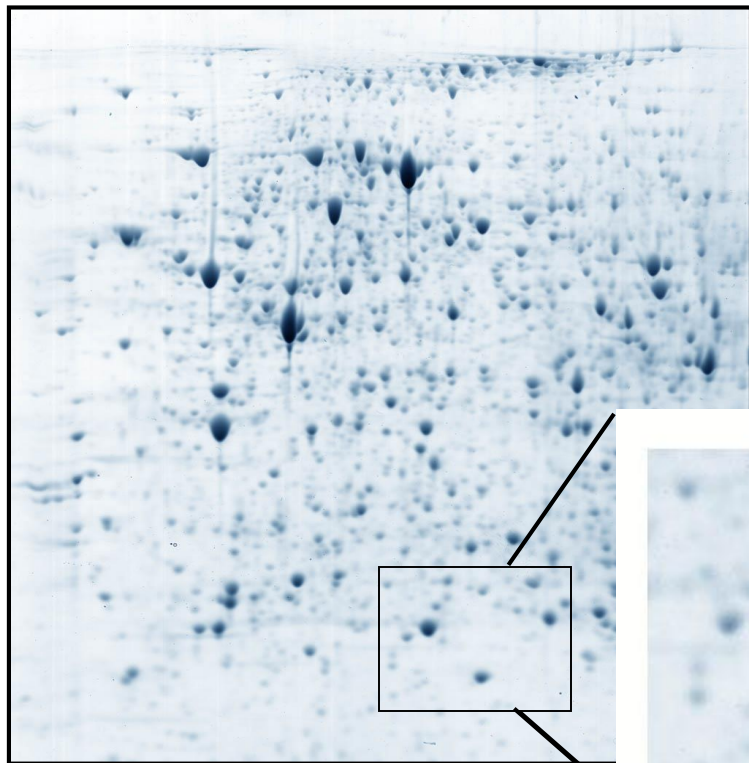


Matching  
a  
odečtení pozadí

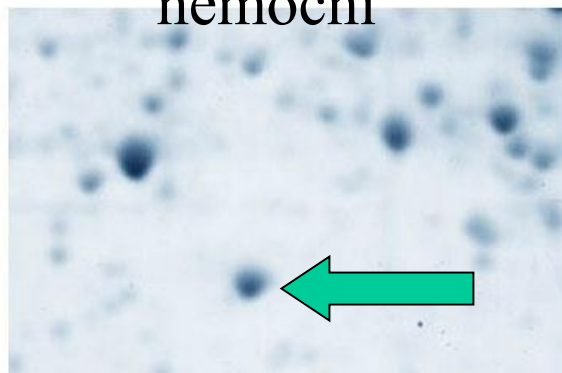


Normalizace  
a  
kvantifikace

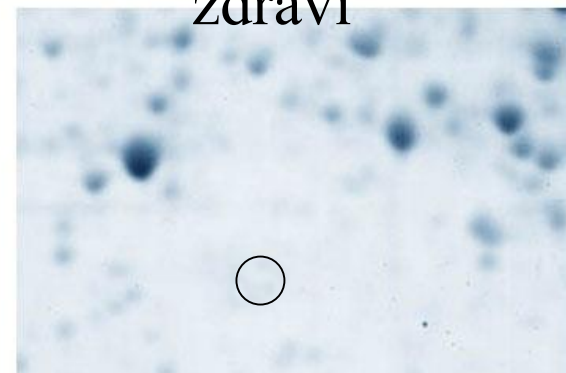




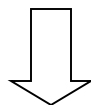
nemocní



zdraví



Neznámý diferenciólně exprimovaný protein „XY“ (20 kDa)



Identifikace s využitím hmotnostní spektrometrie



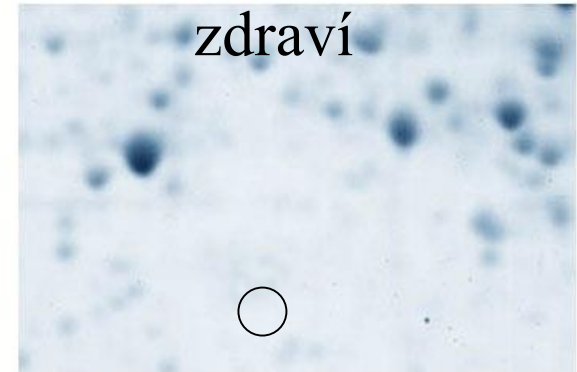
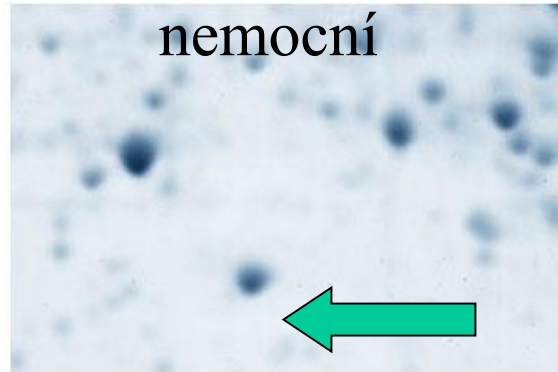
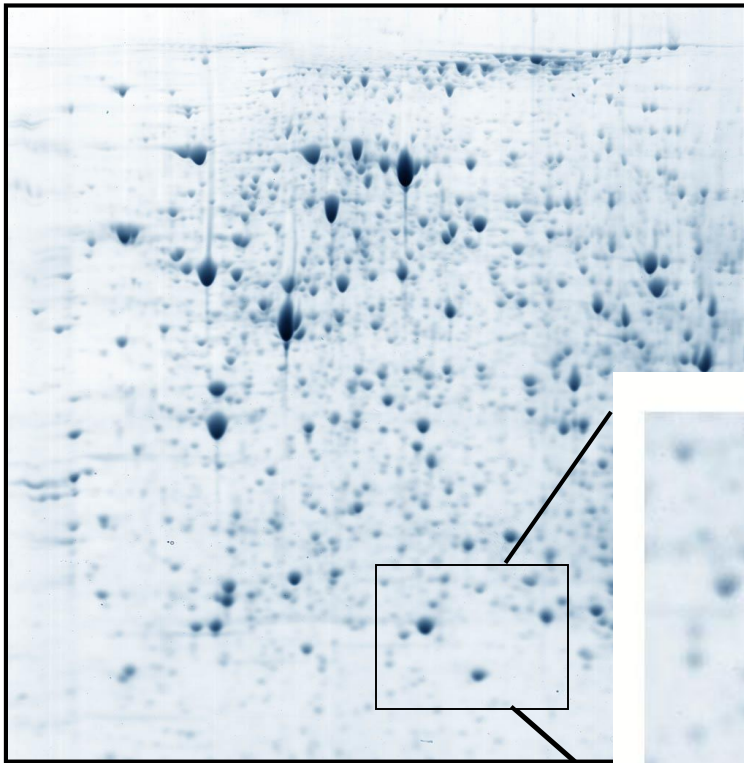
# SEPARAČNÍ METODY

- chromatografie
- elektroforézy

## 2-DE

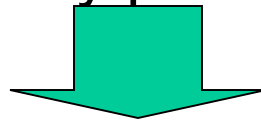
- příprava vzorků
- izoelektrická fokusace
- ekvibrace
- SDS-PAGE
- speciální metody
- detekce bílkovin a DIGE
- zpracování dat a vyhodnocení
- **digesce vzorku a extrakce peptidů**
- limity a záludnosti 2-DE

## Identifikace diferenciálně exprimovaného proteinu



Neznámý diferenciálně exprimovaný protein „XY“ (20 kDa)

- Extrahovat intaktní protein z gelu je obtížné/nemožné
- Celý protein je nevhodný pro MS analýzu



**Naštěpení specifickou endoproteázou přímo v gelu**

# SPECIFICKÉ ŠTĚPENÍ BÍLKOVIN

## Cíl fragmentace:

Definovaně fragmentovat protein, aby jednotlivé peptidy byly dostatečně malé na optimální MS analýzu, ale zároveň poskytly dostatečnou sekvenční informaci

Optimum 6-20 AA, cca 800-2500 Da

Proteáza	Místo štěpení	Poznámka
<b>Trypsin</b>	<b>za Lys, Arg</b>	<b>nenásleduje Pro</b>
Glu-C (Proteáza V8)	za Glu a Asp	nenásleduje Pro
Chymotrypsin	za Phe, Trp, Tyr, Leu, Ileu, Val, Met	nenásleduje Pro
Lys-C	za Lys	nenásleduje Pro
Arg-C	za Arg	nenásleduje Pro
Asp-N	před Asp, Cys	
Chemická digesce		
<b>CNBr</b>	<b>Met</b>	<b>organika, hydrofobní P.</b>

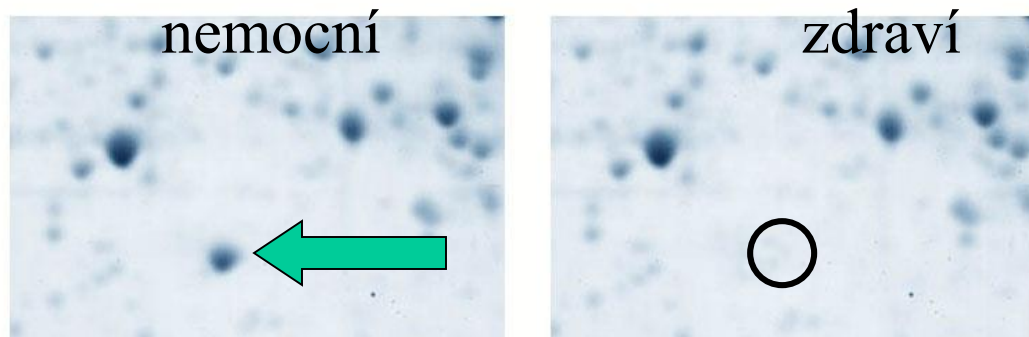
# TRYPSIN

MW 23 kDa

z kravského nebo prasečího pankreatu  
štěpí v mírně bazickém pH

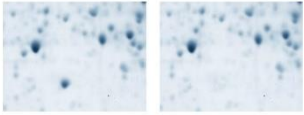
- 50 kDa protein → cca 30 peptidů
- Použití v roztoku, na blotu, v gelu

Trypsin štěpí za Lys a Arg pokud nenásleduje Pro



*SSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEKREG  
YERLLKMQNQRGGRALFQD IKKPAEDEWGTKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHAL  
GSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKL IKKMGDHLTNLHRLGGPEAG LGEYLFERLT LKHD*

# PŘÍPRAVA VZORKŮ Z GELU PRO IDENTIFIKACI POMOCÍ MS



Výběr a vyříznutí spotu/PROTEINU (spotpicking)

Dehydratace gelu (redukce, alkylace)  
ACN, vakuum

Rehydratace v pufru s Trypsinem

Digeste 37 °C

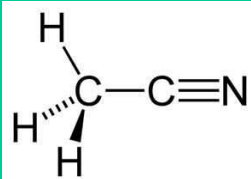
Extrakce PEPTIDŮ (ACN)

Čištění a koncentrace

MS analýza  
a identifikace

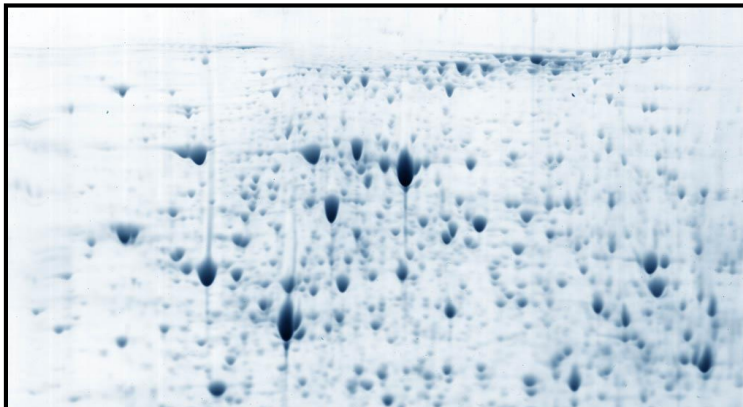
**KERATIN !!!**

**Acetonitril**  
(ACN, MeCN)

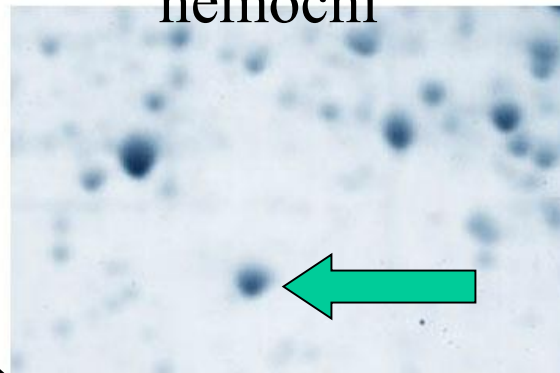


- nesráží proteiny/peptidy
- neabsorbuje v UV
- má nízkou viskozitu
- kompatibilní s RP-LC

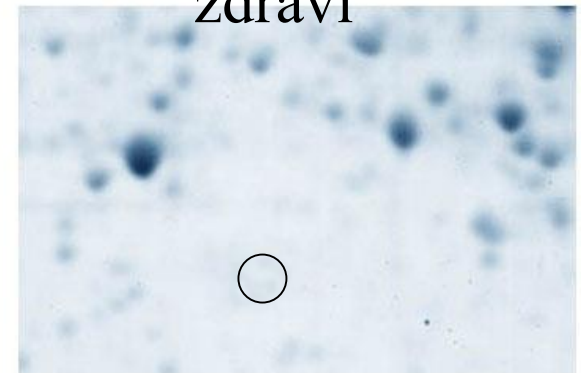
# Identifikace diferenciálně exprimovaného proteinu



nemocní

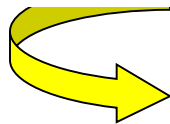


zdraví



„In gel“ **naštěpení trypsinem** (za Arg, Lys)

SSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKREGYERLLK  
MQNQRGGRALFQD IKKPAEDEWGTKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHAL  
GSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKL IKKMGDHLTNLHRLGGPEAG LGEYLFERLT LKHD



Extrakce směsi peptidů z gelu

# In-gel štěpení trypsinem (za R a K)

**LLK**

**GGR**

**SSQIR**

**L IKK**

**LT LK**

**EGYER**

**MQNQR**

**TPDAMK**

**ELAEER**

**ALFQD IK**

**AAMALEKK**

**KPAEDEWGK**

**MGDHLTNLHR**

**DDVALEGVSHFFR**

**LNQALLDLHALGSAR**

**LGGPEAG LGEYLFER**

**TDPHLCDFLETHFLDEEVK**

**QNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDR**

# ČIŠTĚNÍ A KONCENTRACE PEPTIDŮ PO DIGESCI

## ZipTips

**Chromatografie v reverzní fázi (Reverse Phase)**

**Hydrofobní vazba peptidu na alifatické uhlovodíkové řetězce (C18 nebo C4)**

**Objem vzorku po extrakci obvykle > 40 mikrolitrů**

**Po koncentraci a odsolení na ZipTips jen 1 – 10 mikrolitrů**

Single or Multi-Channel Operation



ZipTip is compatible with most single channel 10  $\mu$ l pipettors. The Biohit Proline® electronic multi-channel pipettor is recommended for simultaneous processing of eight samples.

## Types of Chromatography

- Reversed-Phase (C4/C18)
- Ion Exchange (SCX)
- Affinity (IMAC)

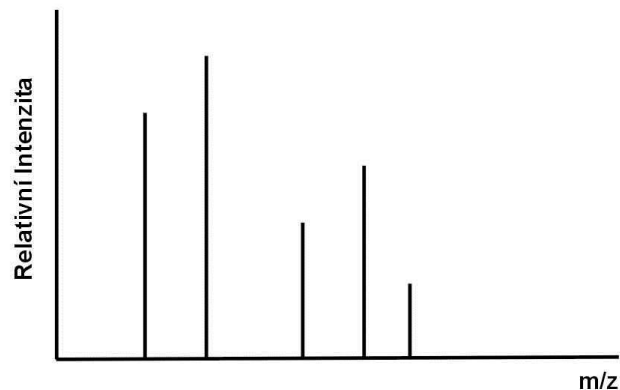


The slide features a decorative design of four overlapping rectangular frames. The frames are positioned in the upper half of the slide, with each subsequent frame being slightly larger and shifted to the right and down from the previous one. The text is centered within the innermost frame.

**Identifikace bílkovin  
pomocí hmotnostní spektrometrie**

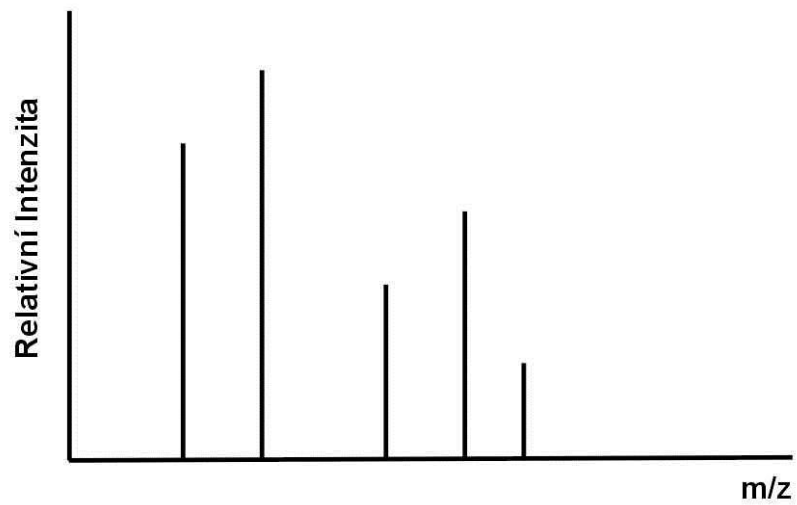
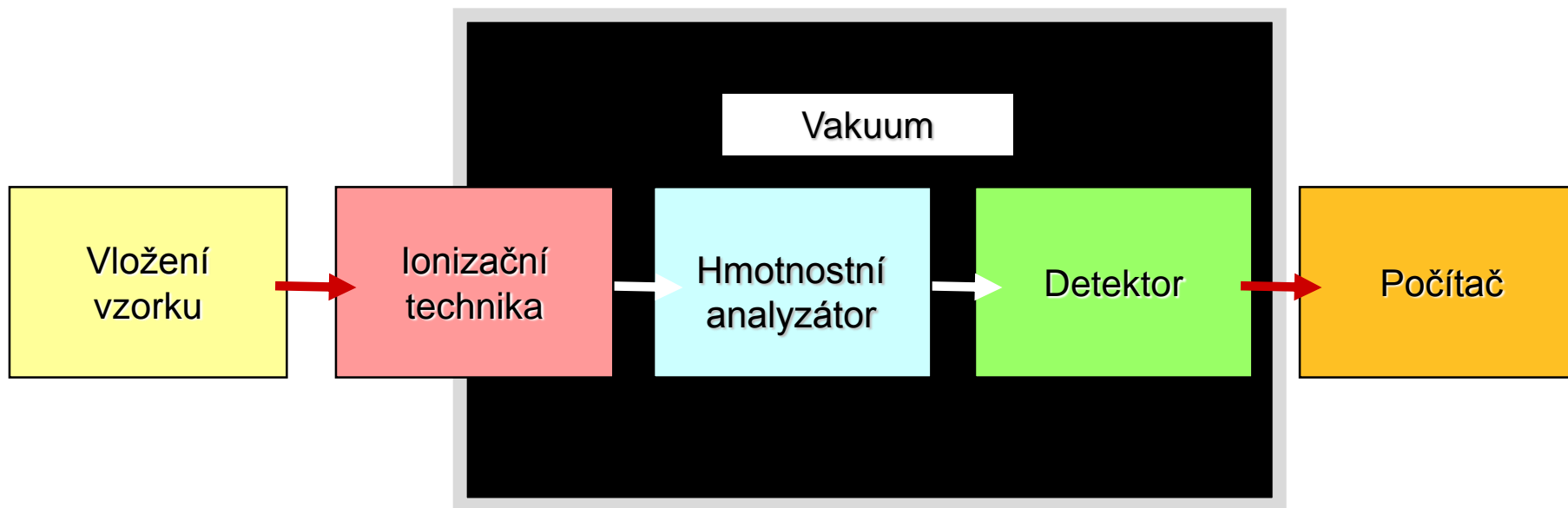
# Identifikace bílkovin pomocí hmotnostní spektrometrie (MS)

- Stanovení velmi **přesné hmotnosti peptidů nebo jejich fragmentů**.
- Pohyb nabitě částice ve vakuu, elektromagnetickém poli je funkcí její hmotnosti ( $m$ ) a náboje ( $z$ ).
- Hmotnostní spektrometr částice ionizuje (pseudomolekulární ionty) a separuje podle jejich  $m/z$ . Hmotnostní spektrum ukazuje závislost četnosti jednotlivých iontů na  $m/z$ .



**Přesné hmotnosti peptidů, nebo jejich fragmentů jsou porovnávány s vypočtenými hmotnostmi všech (teoretických) peptidů nebo fragmentů, které jsou přítomny v proteinových a genových databázích.**

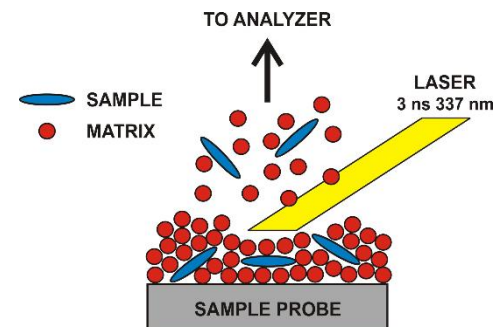
# Hmotnostní spektrometr



# Ionizační techniky MS

## **MALDI**- Matrix Assisted Laser Desorption Ionization

(z pevné fáze)

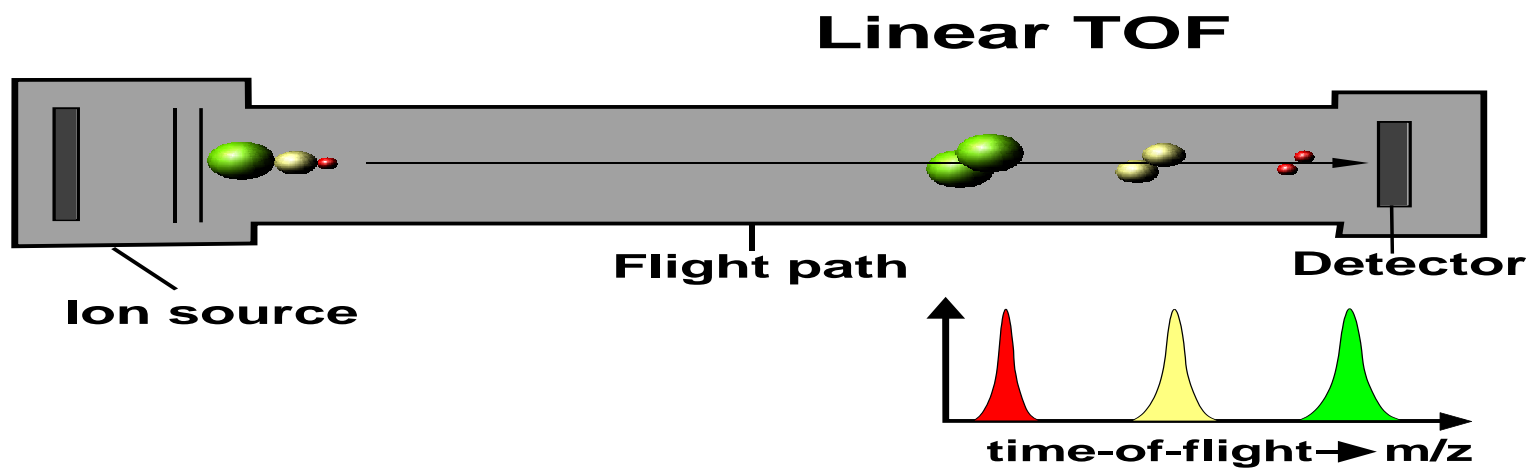


## **ESI** – Electrospray Ionization

(z roztoku)



# Hmotnostní spektrometr typu TIME OF FLIGHT (TOF)



# Identifikace bílkovin pomocí hmotnostní spektrometrie (MS)

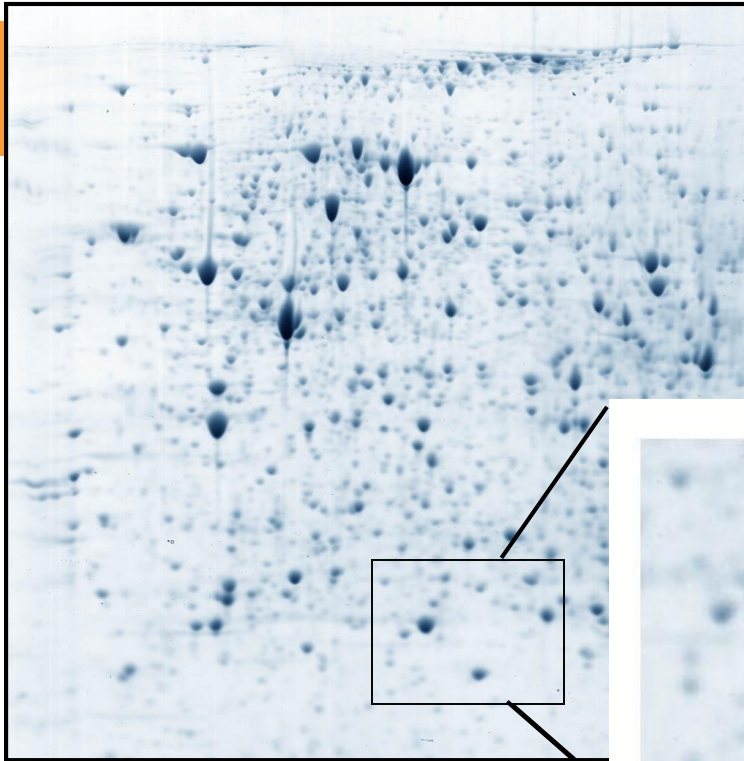
## Peptidové mapování (Peptidový fingerprinting)

na základě změření přesných **hmotností peptidů** vzniklých štěpením specifickou endoproteázou

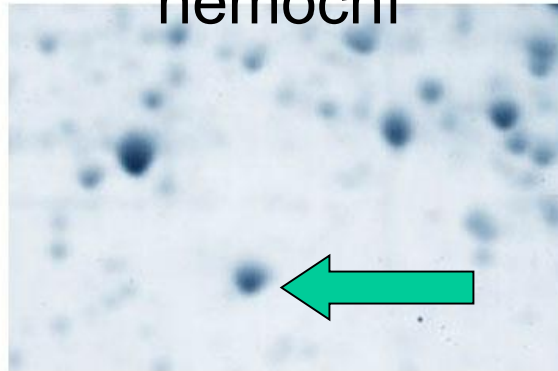
## Fragmentace peptidů/sekvenování (MS/MS)

na základě změření přesných **hmotností fragmentů peptidu**. Peptid nejnáze fragmentuje v peptidické vazbě. Je tak získána (částečná) aminokyselinová sekvence v daném peptidu.

## Identifikace diferenciálně exprimovaného proteinu



nemocní

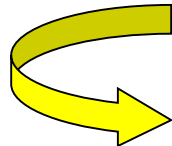


zdraví



„In gel“ **naštěpení trypsinem** (za Arg, Lys)

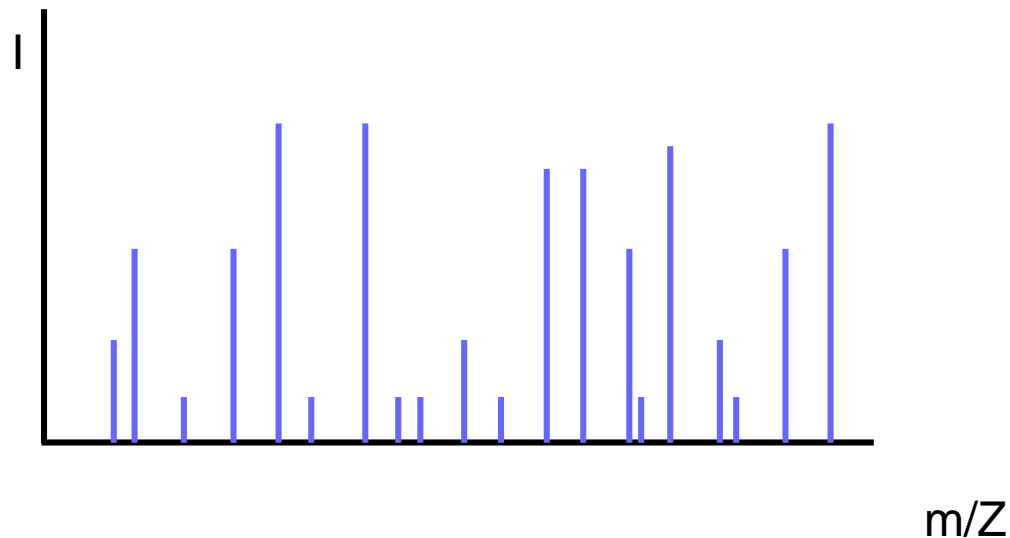
*SSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEKREG  
YERLLKMQNQRGGRALFQD IKKPAEDEWGTKPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHAL  
GSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKL IKKMGDHLTNLHRLGGPEAG LGEYLFERLT LKHD*



Extrakce směsi peptidů z gelu

# Peptidové mapování (Peptidový fingerprinting)

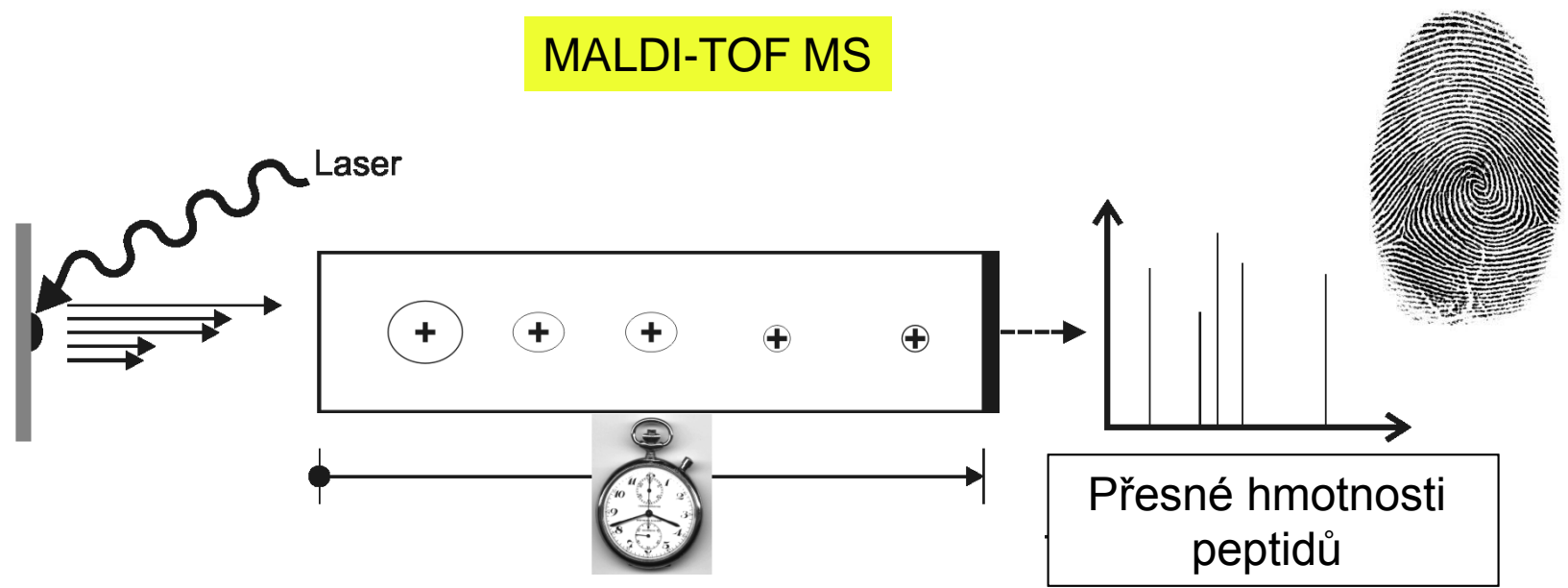
**LLK**  
**GGR**  
**SSQIR**  
**L IKK**  
**LT LK**  
**EGYER**  
**MQNQR**  
**TPDAMK**  
**ELAEK**R****  
**ALFQD IK**  
**AAMALE**KK****  
**KPAEDEWG**K****  
**MGDHLTNL**HR****  
**DDVALEGVSHFF**R****  
**LNQALLDLHALGS**AR****  
**LGGPEAG LGEYLF**ER****  
**TDPHLCDFLETHFLDEEV**K****  
**QNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFD**R****





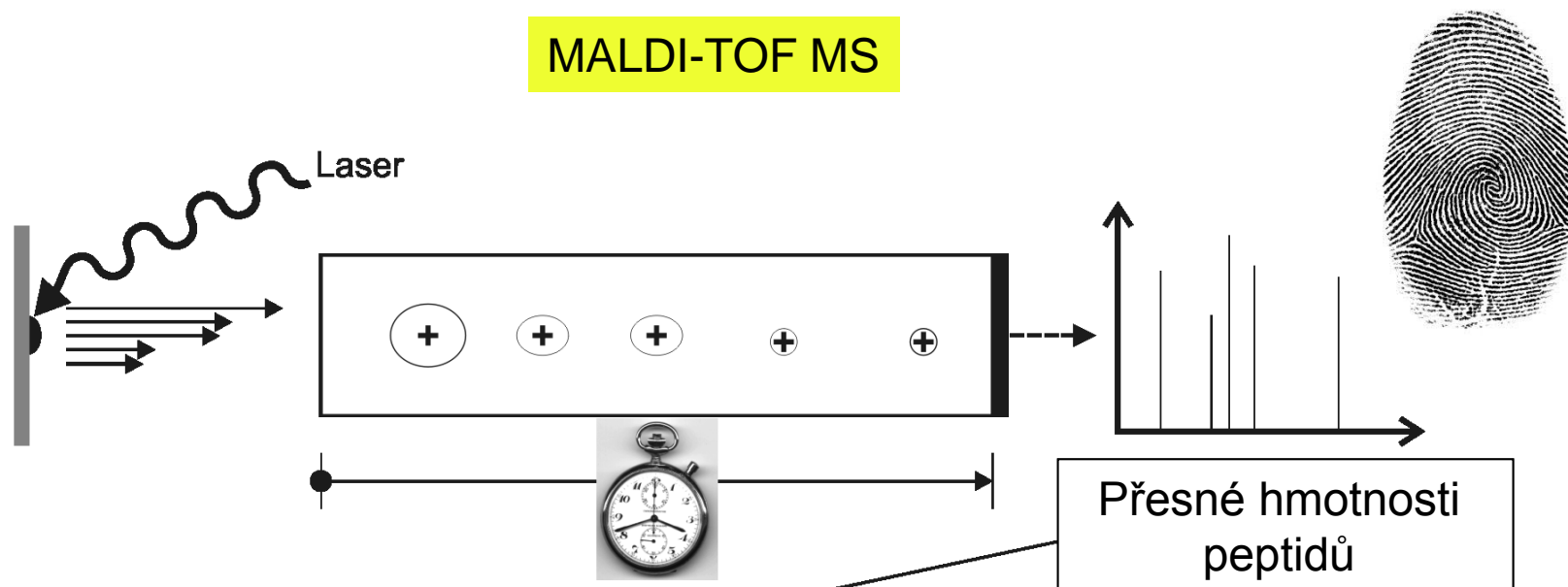
# Peptidové mapování (Peptidový fingerprinting)

## MALDI-TOF MS



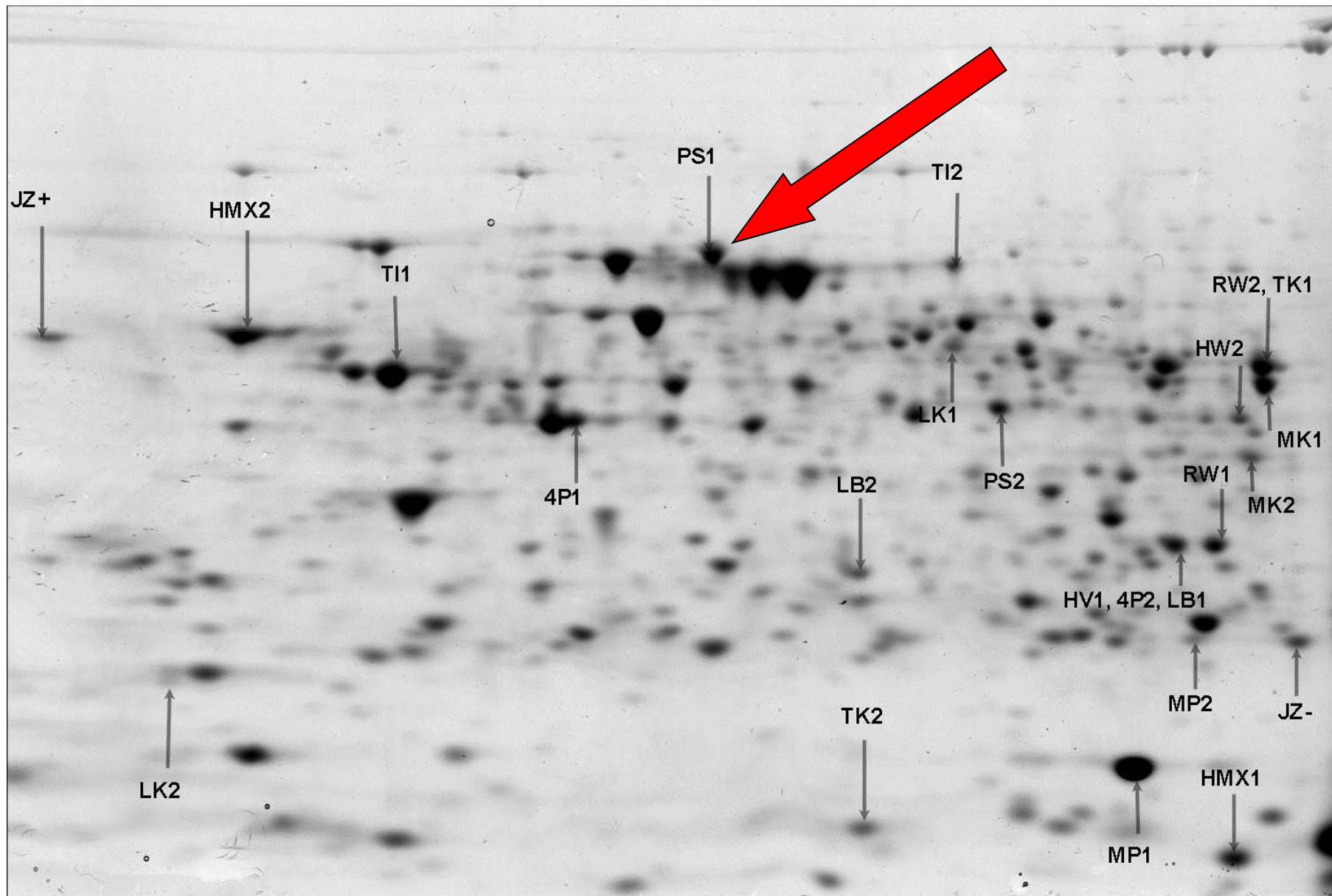
# Peptidové mapování (Peptidový fingerprinting)

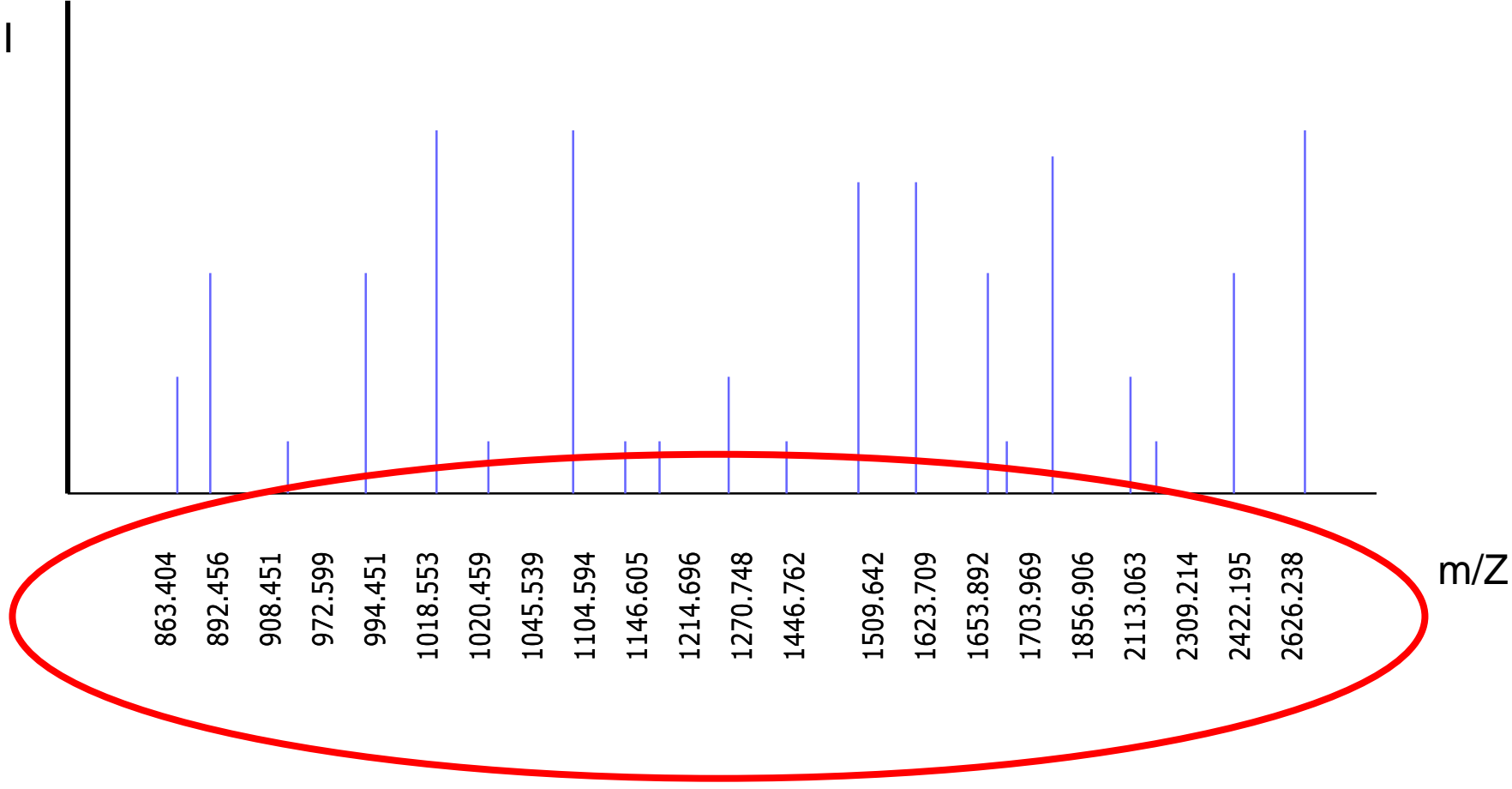
## MALDI-TOF MS



SSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEKREG  
YERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDEWGKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHAL  
GSA RTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLKHD

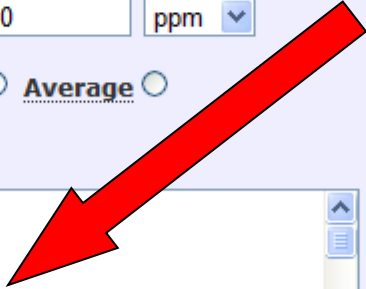
Proteomické praktikum 2012  
2-DE myšního jaterního homogenátu, pH 4-7, 4-20% SDS-PAGE





# MASCOT Peptide Mass Fingerprint

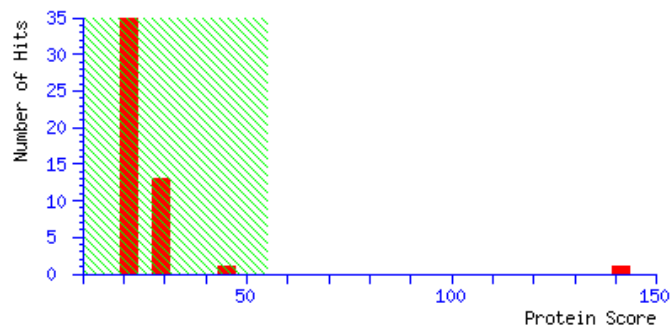
<b>Your name</b>	<input type="text" value="jaj"/>	<b>Email</b>	<input type="text" value="jpetr@lf1.cuni.cz"/>
<b>Search title</b>	<input type="text"/>		
<b>Database(s)</b>	<input type="text" value="SwissProt"/> NCBI nr contaminants cRAP	<b>Enzyme</b>	<input type="text" value="Trypsin"/>
		<b>Allow up to</b>	<input type="text" value="1"/> missed cleavages
<b>Taxonomy</b>	<input type="text" value="Mus musculus (house mouse)"/>		
<b>Fixed modifications</b>	<input type="text" value="Carbamidomethyl (C)"/> <input type="checkbox"/> Display all modifications	<input type="button" value="&gt;"/> <input type="button" value="&lt;"/>	<input type="text" value="Acetyl (K)"/> Acetyl (Protein N-term) Amidated (C-term) Amidated (Protein C-term) Ammonia-loss (N-term C) Biotin (K) Biotin (N-term) Carbamyl (K) Carbamyl (N-term) Carboxymethyl (C) Cation:Na (C-term)
<b>Variable modifications</b>	<input type="text" value="Oxidation (M)"/> Acetyl (N-term)	<input type="button" value="&gt;"/> <input type="button" value="&lt;"/>	
<b>Protein mass</b>	<input type="text"/> kDa	<b>Peptide tol. ±</b>	<input type="text" value="50"/> ppm
<b>Mass values</b>	<input checked="" type="radio"/> MH <sup>+</sup> <input type="radio"/> M <sub>r</sub> <input type="radio"/> M-H <sup>-</sup>	<b>Monoisotopic</b>	<input checked="" type="radio"/> Average <input type="radio"/>
<b>Data file</b>	<input type="text"/>		
<b>Query</b>	<input type="text" value="700.2339"/> 703.9470 719.9204 721.3330 737.3428 748.3209		
<b>Decoy</b>	<input type="checkbox"/>	<b>Report top</b>	<input type="text" value="AUTO"/> hits



User : jaj
Email : jpetr@lf1.cuni.cz
Search title :
Database : SwissProt 2013\_09 (540958 sequences; 192206270 residues)
Taxonomy : Mus musculus (house mouse) (16632 sequences)
Timestamp : 24 Sep 2013 at 15:01:41 GMT
Top Score : 141 for GRP75\_MOUSE, Stress-70 protein, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Hspa9 PE=1 SV=3

Mascot Score Histogram

Protein score is -10\*Log(P), where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 55 are significant (p<0.05).



Concise Protein Summary Report

Format As: Concise Protein Summary
Significance threshold p<: 0.05
Max. number of hits: AUTO
Preferred taxonomy: All entries

Re-Search All Search Unmatched

1. GRP75\_MOUSE Mass: 73701 Score: 141 Expect: 1.3e-10 Matches: 39
Stress-70 protein, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Hspa9 PE=1 SV=3



## Protein View: GRP75\_MOUSE

Stress-70 protein, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Hspa9 PE=1 SV=3

### Protein sequence coverage: 63%

Matched peptides shown in **bold red**.

1	MISASRAAAA	RLVGTAASRS	PAAARPQDGW	NGLSHEAFRF	VSRRDYASEA
51	<b>IKGAVVGIDL</b>	<b>GTTNSCVAVM</b>	<b>EGKQAKVLEN</b>	<b>AEGARTTPSV</b>	<b>VAFTADGERL</b>
101	<b>VGMPAKRQAV</b>	<b>TNPNTFYAT</b>	<b>KRLIGRRYDD</b>	<b>PEVQKDTKNV</b>	<b>PFKIVRASNG</b>
151	<b>DAWVEAHGKL</b>	<b>YSPSQIGAFV</b>	<b>LMKMKETAEN</b>	<b>YLGHTAKNAV</b>	<b>ITVPAYFNDS</b>
201	<b>QRQATKDAGQ</b>	<b>ISGLNVLRVI</b>	<b>NEPTAAALAY</b>	<b>GLDKSEDKVI</b>	<b>AVYDLGGGTF</b>
251	<b>DISILEIQKG</b>	VFEVKSTNGD	<b>TFLGGEDFDQ</b>	<b>ALLRHIVKEF</b>	<b>KRETGVDLTK</b>
301	<b>DNMALQRVRE</b>	AAEKAKCELS	<b>SSVQTDINLP</b>	<b>YLTMDASGPK</b>	<b>HLNMKLTRAQ</b>
351	<b>FEGIVTDLIK</b>	<b>RTIAPCQKAM</b>	<b>QDAEVSKSDI</b>	<b>GEVILVGGMT</b>	<b>RMPKVQQTVQ</b>
401	<b>DLFGRAPSKA</b>	VNPDEAVAIG	AAIQGGVLAG	DVTDVLLLDV	TPLSLGIETL
451	GGVFTKLINR	NTTIPTKKSQ	<b>VFSTAADGQT</b>	<b>QVEIKVCQGE</b>	<b>REMGADNKLL</b>
501	<b>GQFTLIGIPP</b>	<b>APRGVPQIEV</b>	<b>TFDIDANGIV</b>	<b>HVSAKDKGTG</b>	<b>REQQIVIQSS</b>
551	<b>GGLSKDDIEN</b>	<b>MVKNAEKYAE</b>	<b>EDRRKKERVE</b>	<b>AVNMAEGIIH</b>	<b>DTETKMEEFK</b>
601	DQLPADECNK	LKEEISKMRA	<b>LLAGKDSETG</b>	<b>ENIRQAASSL</b>	<b>QQASLKLFFEM</b>
651	<b>AYKKMASERE</b>	GSGSSGTGEQ	KEDQKEEKQ		

**Co když se peptidové mapování nezdaří  
nebo máme ve vzorku směs proteinů?**



# Identifikace bílkovin pomocí hmotnostní spektrometrie

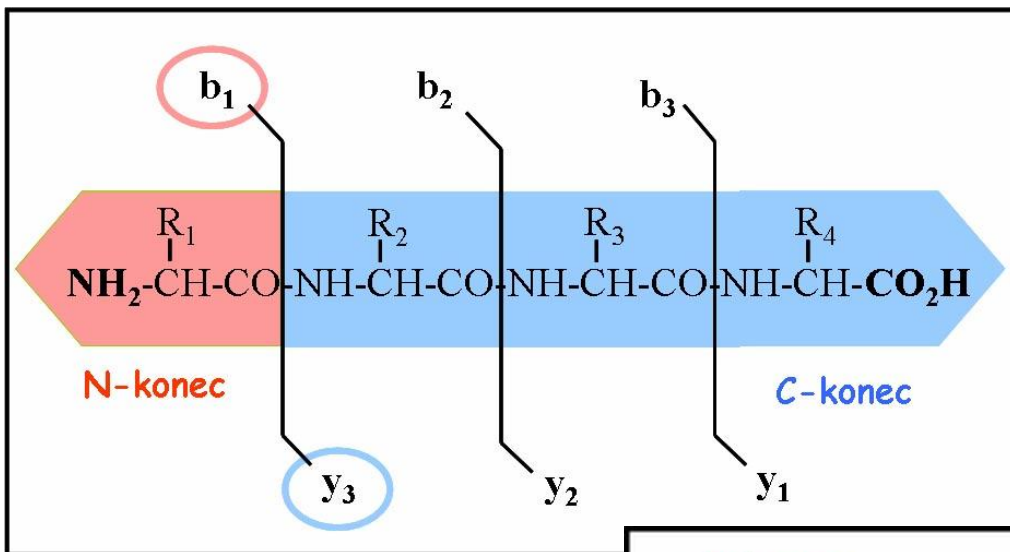
## Peptidové mapování (Peptidový fingerprinting)

na základě změření přesných hmotností peptidů vzniklých štěpením specifickou endoproteázou

## Fragmentace peptidů/sekvenování (MS/MS)

na základě změření přesných hmotností fragmentů peptidu. Peptid nejnáze fragmentuje v peptidické vazbě. Je tak získána (částečná) aminokyselinová sekvence v daném peptidu.

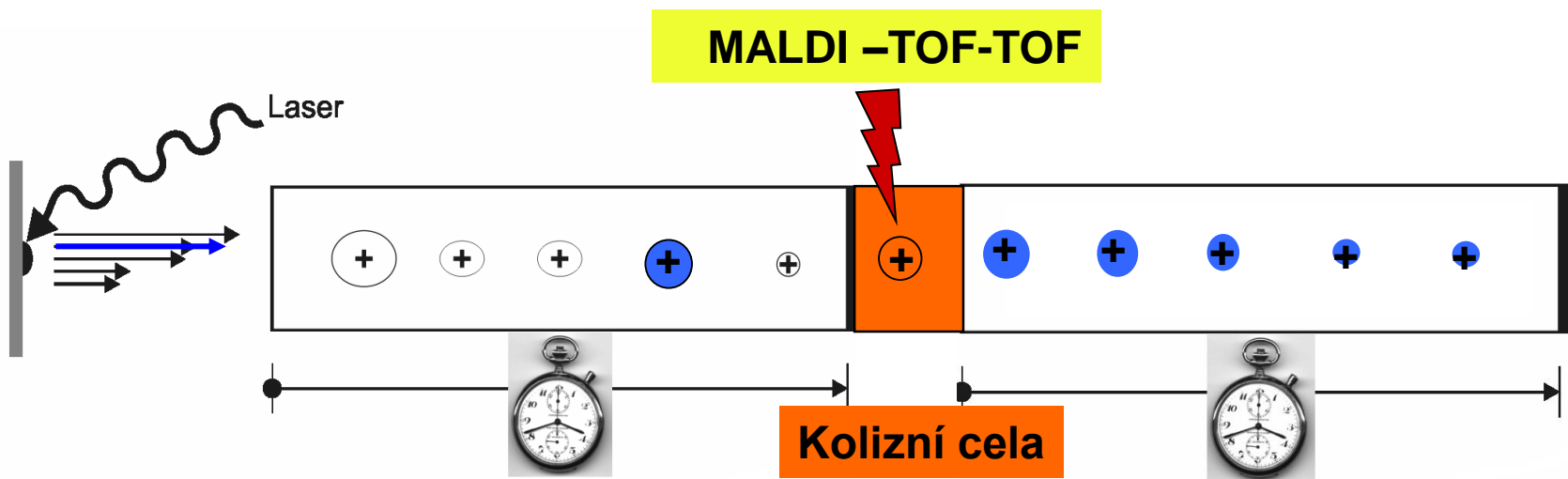
# Fragmentace peptidu (mikrosekvenování, MS/MS)



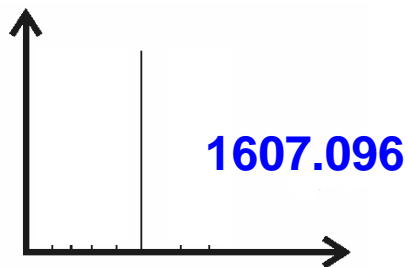
**S-P-A-F-D-S-I-M-A-E-T-L-K**  
 $\text{MH}^+ = 1410.6$

<u>b-ions<sup>+</sup></u>		<u>y-ions<sup>+</sup></u>
88.1	<b>S</b> ----- PAFDSIMAETLK	1323.6
185.2	<b>SP</b> ----- AFDSIMAETLK	1226.4
256.3	<b>SPA</b> ----- FDSIMAETLK	1155.4
403.5	<b>SPAF</b> ----- DSIMAETLK	1008.2
518.5	<b>SPAFD</b> ----- SIMAETLK	893.1
605.6	<b>SPAFDS</b> ----- IMAETLK	806.0
718.8	<b>SPAFDSI</b> ----- MAETLK	692.3
850.0	<b>SPAFDSIM</b> ----- AETLK	561.7
921.1	<b>SPAFDSIMA</b> ----- ETLK	490.6
1050.2	<b>SPAFDSIMAE</b> ----- TLK	361.5
1151.3	<b>SPAFDSIMAET</b> ----- LK	260.4
1264.4	<b>SPAFDSIMAETL</b> ----- K	147.2

# Fragmentace peptidu (mikrosekvenování, MS/MS)

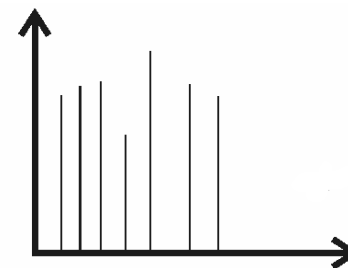


MW peptidu



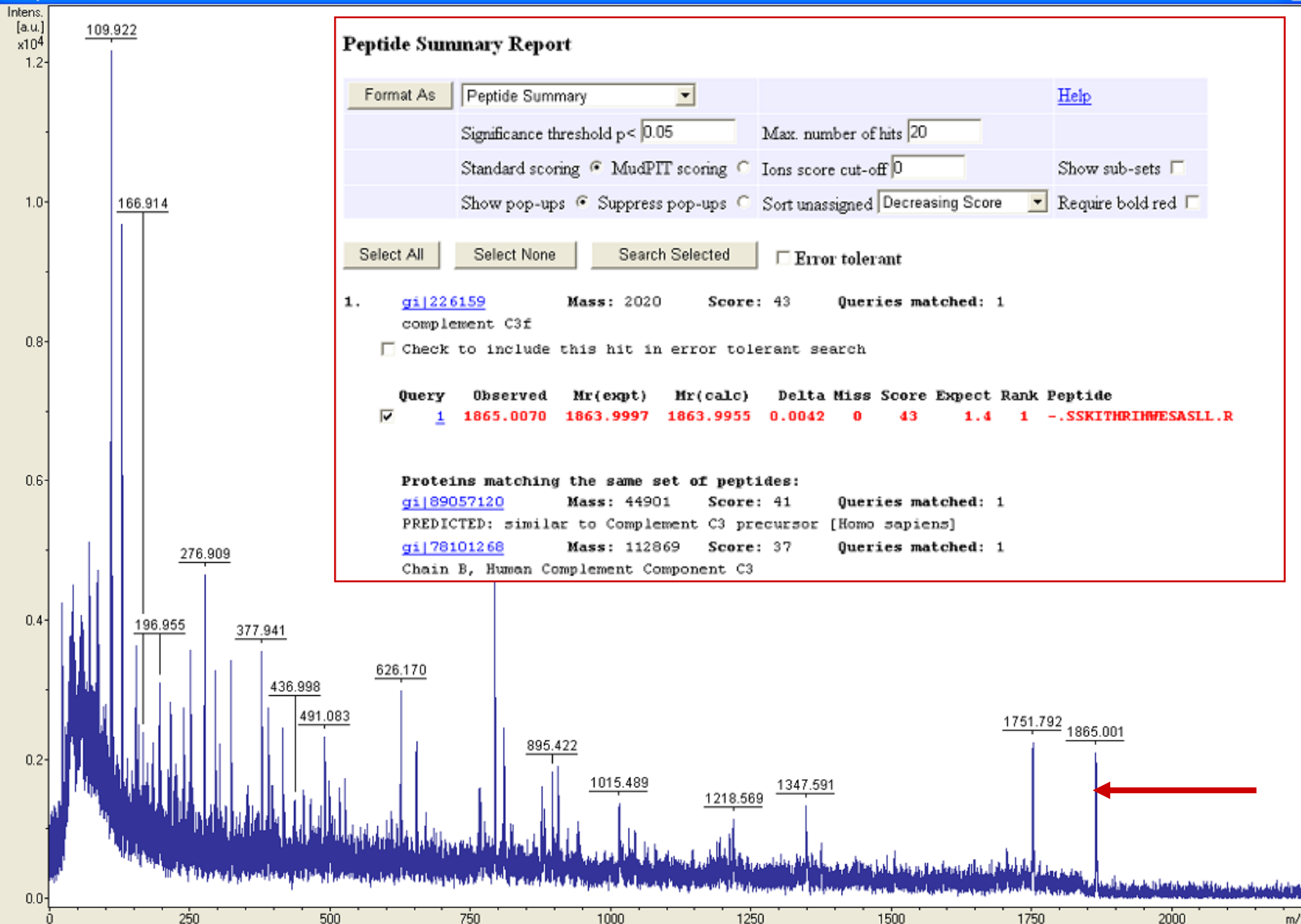
LGGPEAGLGEYLFER  
LGGPEAGLGEYLF...R  
LGGPEAGLGEYLF...ER  
LGGPEAGLGEYL...FER  
LGGPEAGLGEY...LFER  
LGGPEAGLGE...YLFER

m/z jeho fragmentů



Identifikace peptidu **LGGPEAGLGEYLFER**  
a proteinu **L-FERRITIN**

Mass Spectrum



Peptide Summary Report

Format As Peptide Summary [Help](#)

Significance threshold p <  Max. number of hits

Standard scoring  MudPIT scoring  Ions score cut-off  Show sub-sets

Show pop-ups  Suppress pop-ups  Sort unassigned Decreasing Score Require bold red

Select All Select None Search Selected  Error tolerant

1. [gi|226159](#) Mass: 2020 Score: 43 Queries matched: 1  
 complement C3f  
 Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">1</a>	1865.0070	1863.9997	1863.9955	0.0042	0	43	1.4	1	-.SSKITHRIHWESALL.R

Proteins matching the same set of peptides:

- [gi|89057120](#) Mass: 44901 Score: 41 Queries matched: 1  
 PREDICTED: similar to Complement C3 precursor [Homo sapiens]  
[gi|78101268](#) Mass: 112869 Score: 37 Queries matched: 1  
 Chain B, Human Complement Component C3

# Kdy použít PMF a kdy musím fragmentovat peptid?

Jediný protein  
( z 2-DE)



Směs peptidů  
z jednoho proteinu  
(5-50 peptidů)



**MS**  
(PMF)

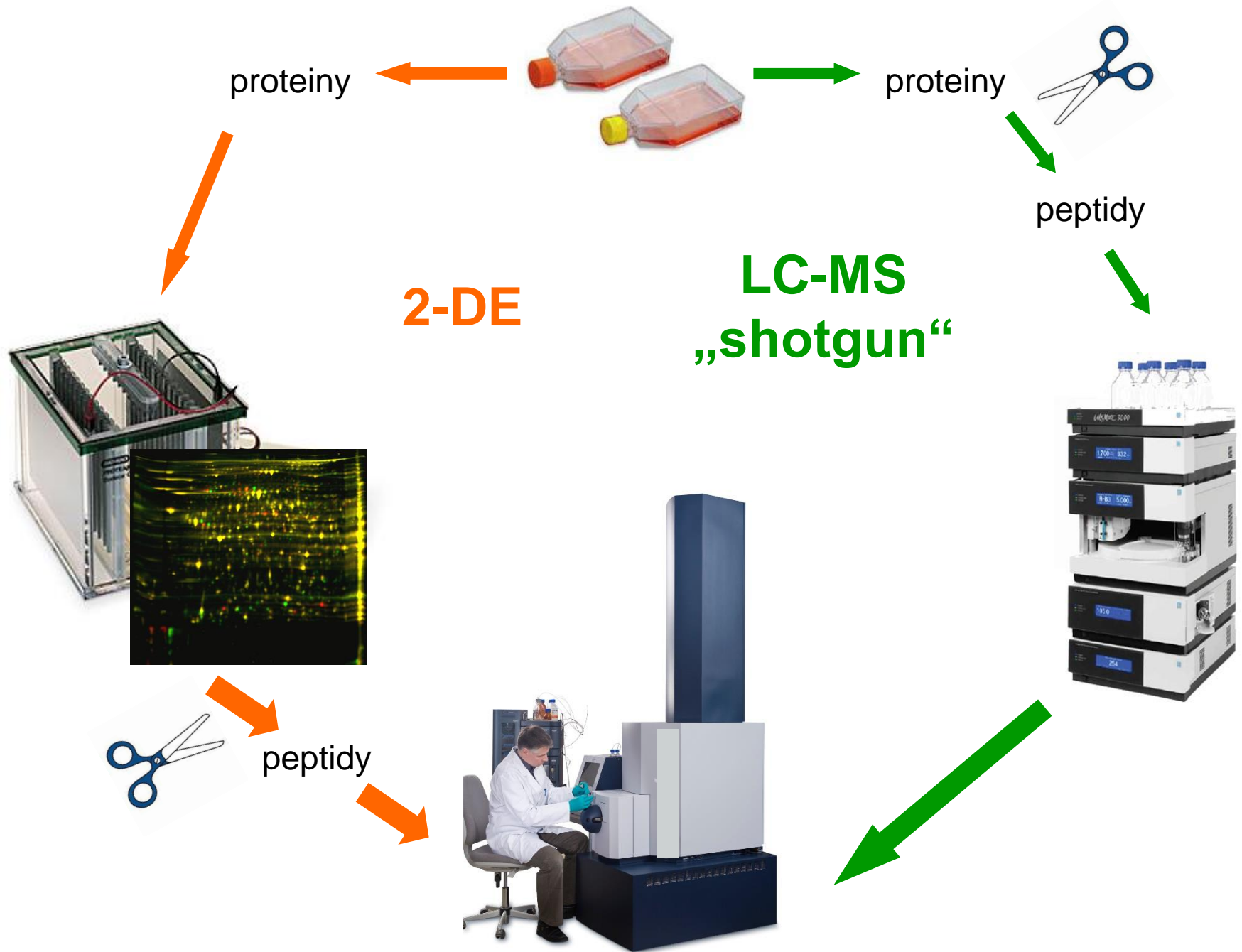


**MS/MS**  
(fragmentace)

Směs proteinů

Směs peptidů  
z mnoha proteinu  
( )

**FRAKCIONACE!**



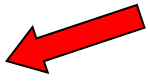
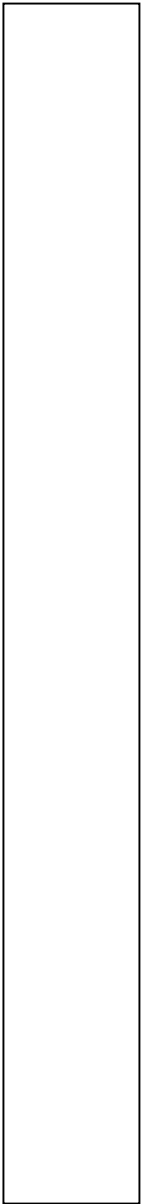
# Identifikace proteinů v shot-gun experimentech

Až stovky tisíc různých peptidů  
kontinuálně eluovaných z (RP) LC

**On-line MS** – přímé spojení LC kolony s **ESI-MS**.

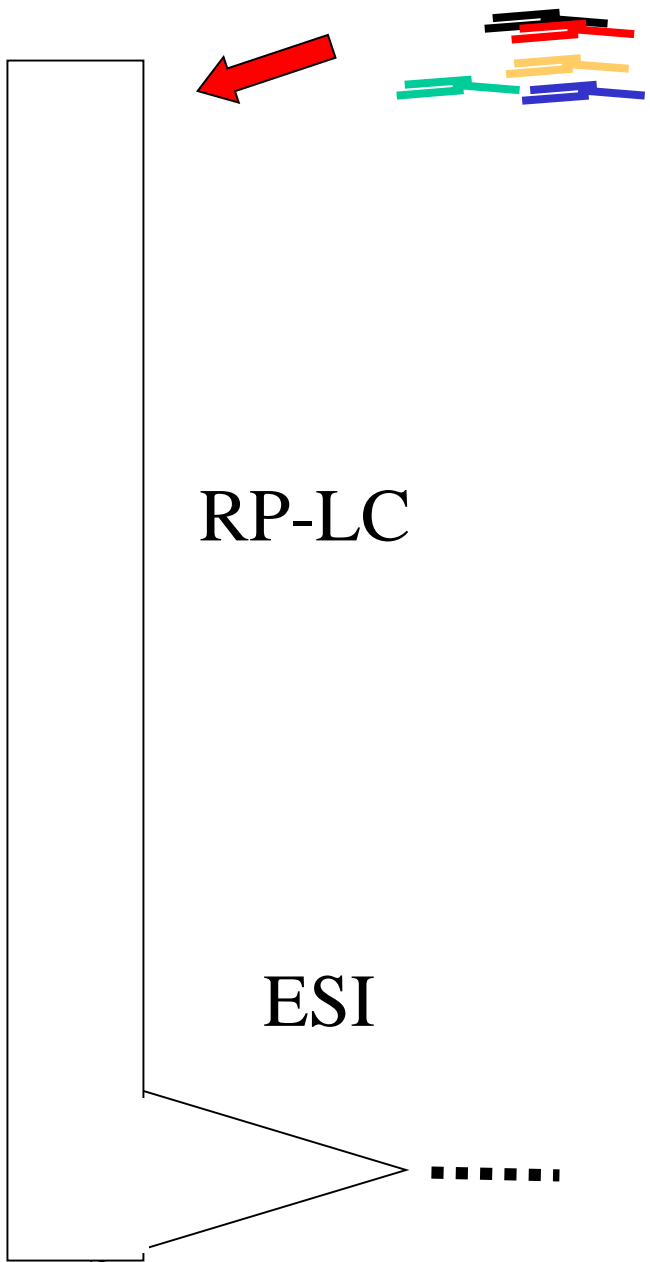
V reálném čase (60-600 minut) jsou eluované peptidy ionizovány. Změřeno MS, izolován prekurzor a provedena fragmentace. Cyklus přepnutí MS-MS/MS až několikrát za sekundu.

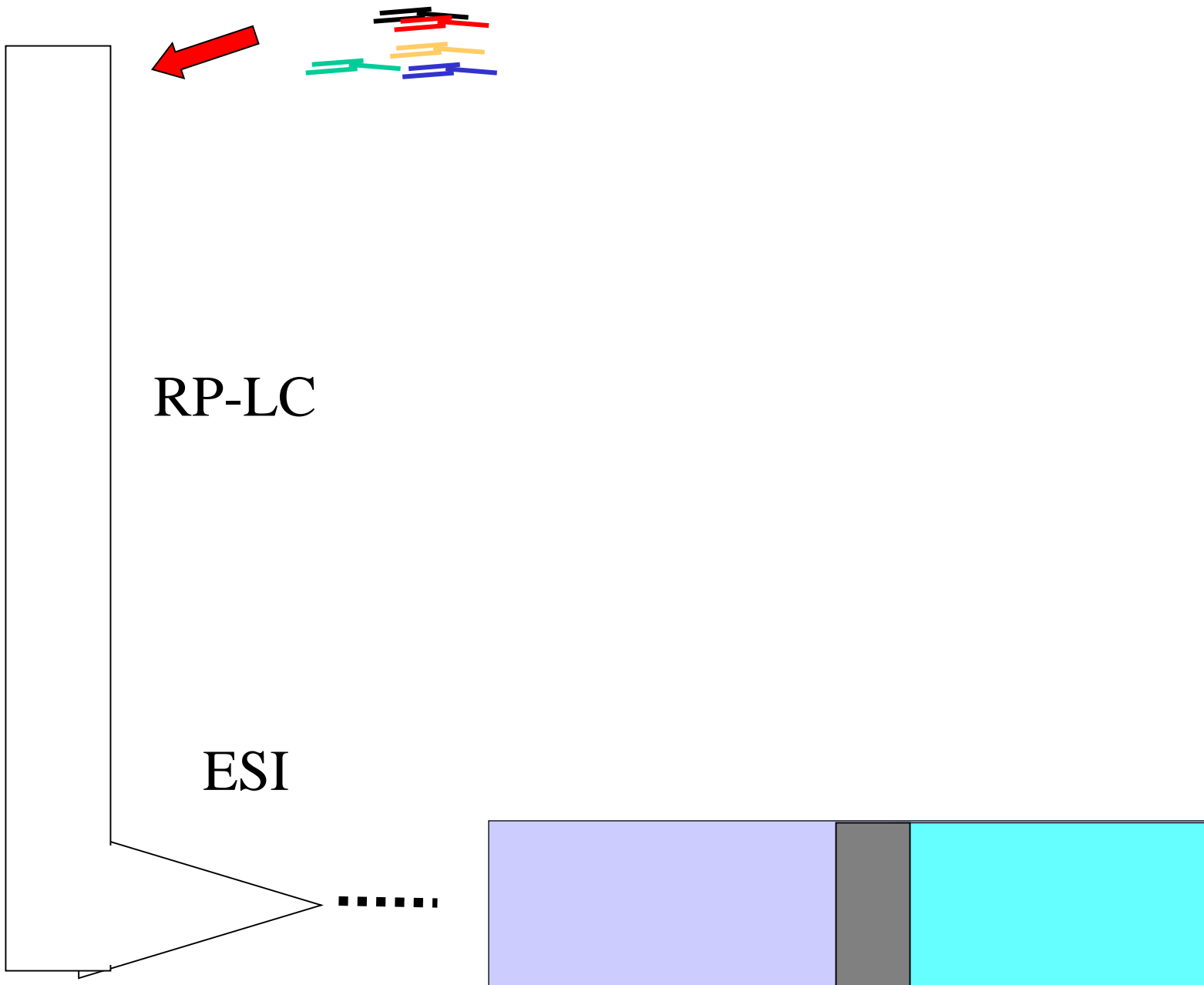
**Off-line MS** – např. **LC-MALDI**. Frakce eluujících peptidů jsou sbírány a MS probíhá až po sběru. Typicky sběr mikrofrakcí (nL) na MALDI destičku s následným měřením MS a MS/MS.

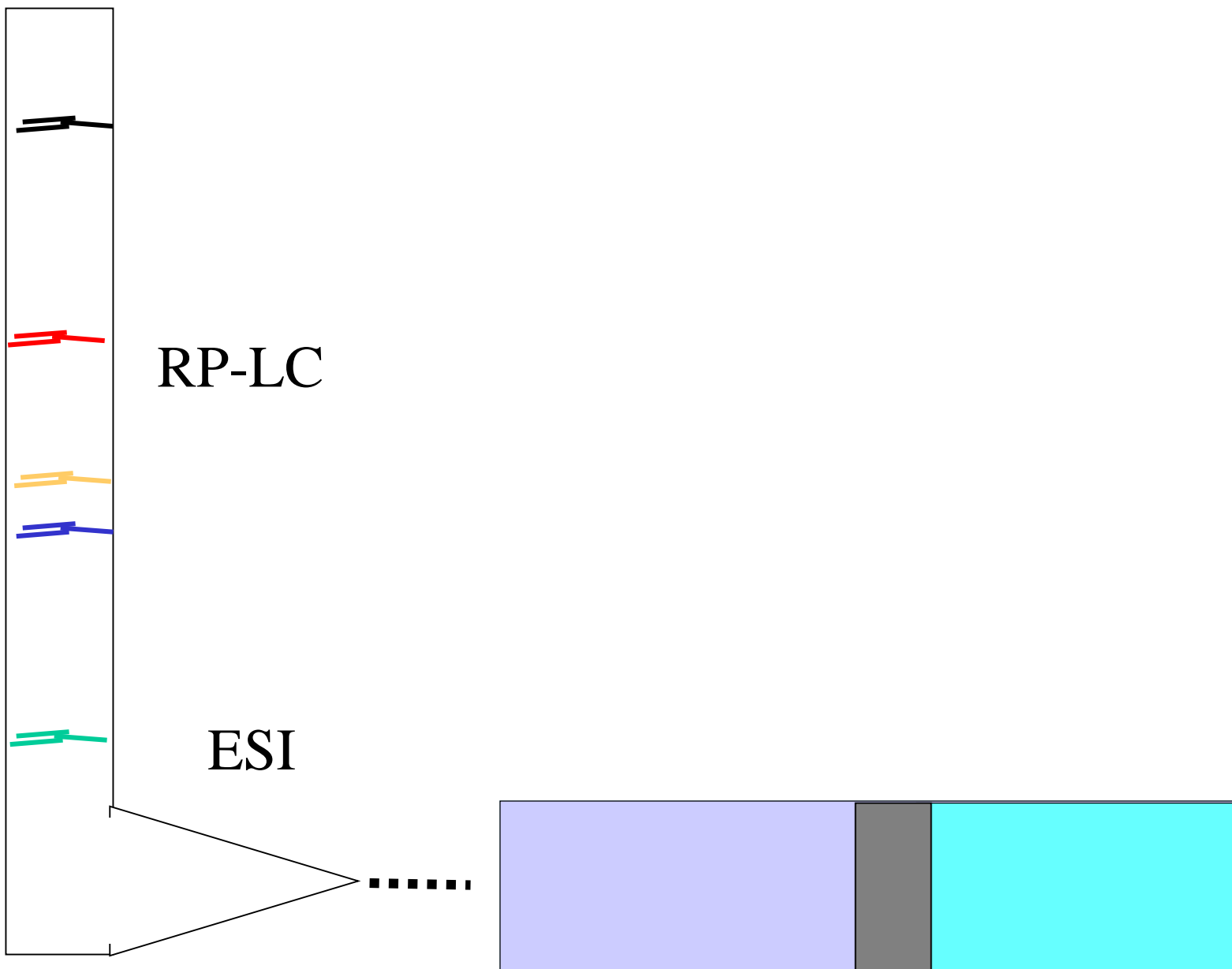


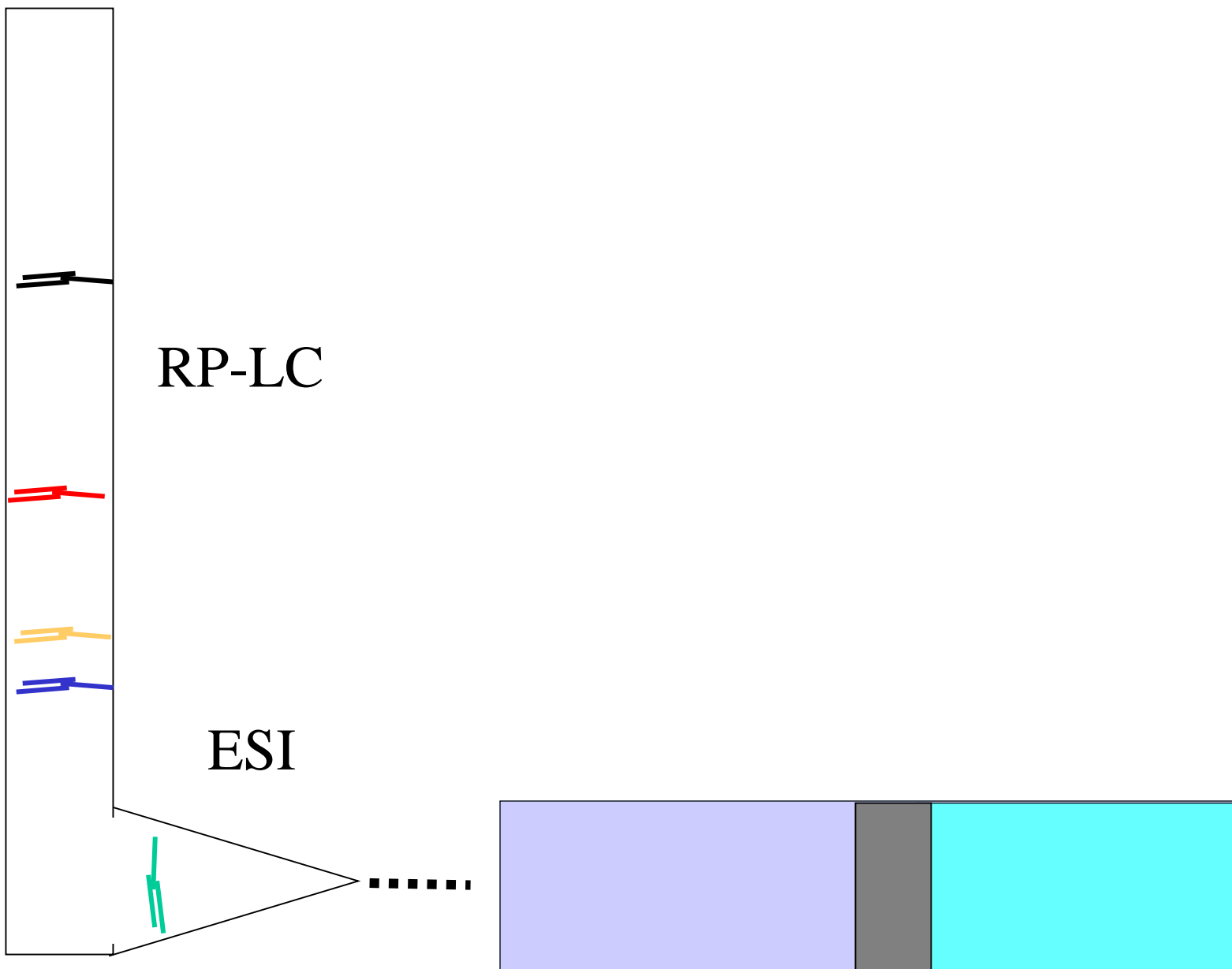
RP-LC

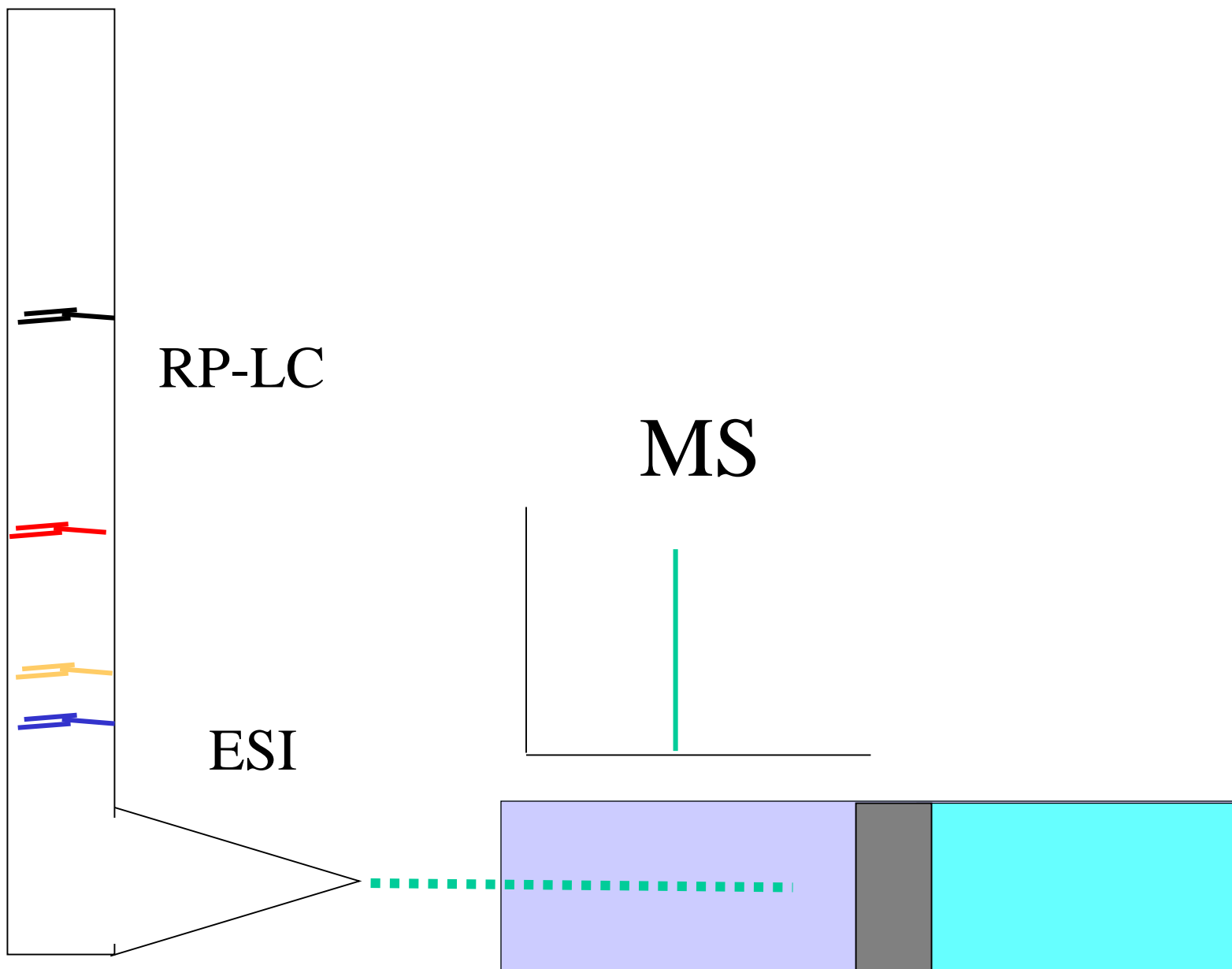


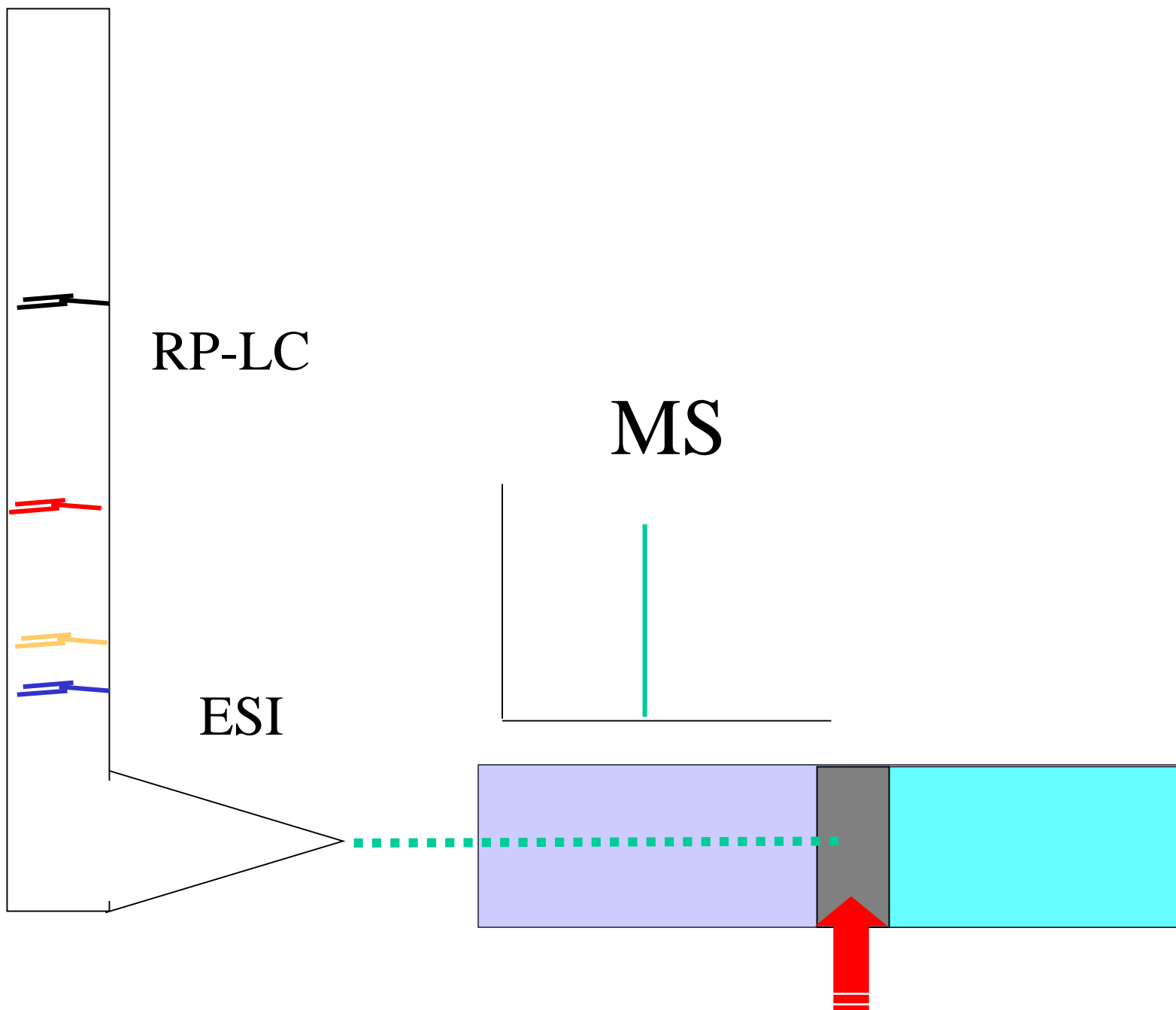


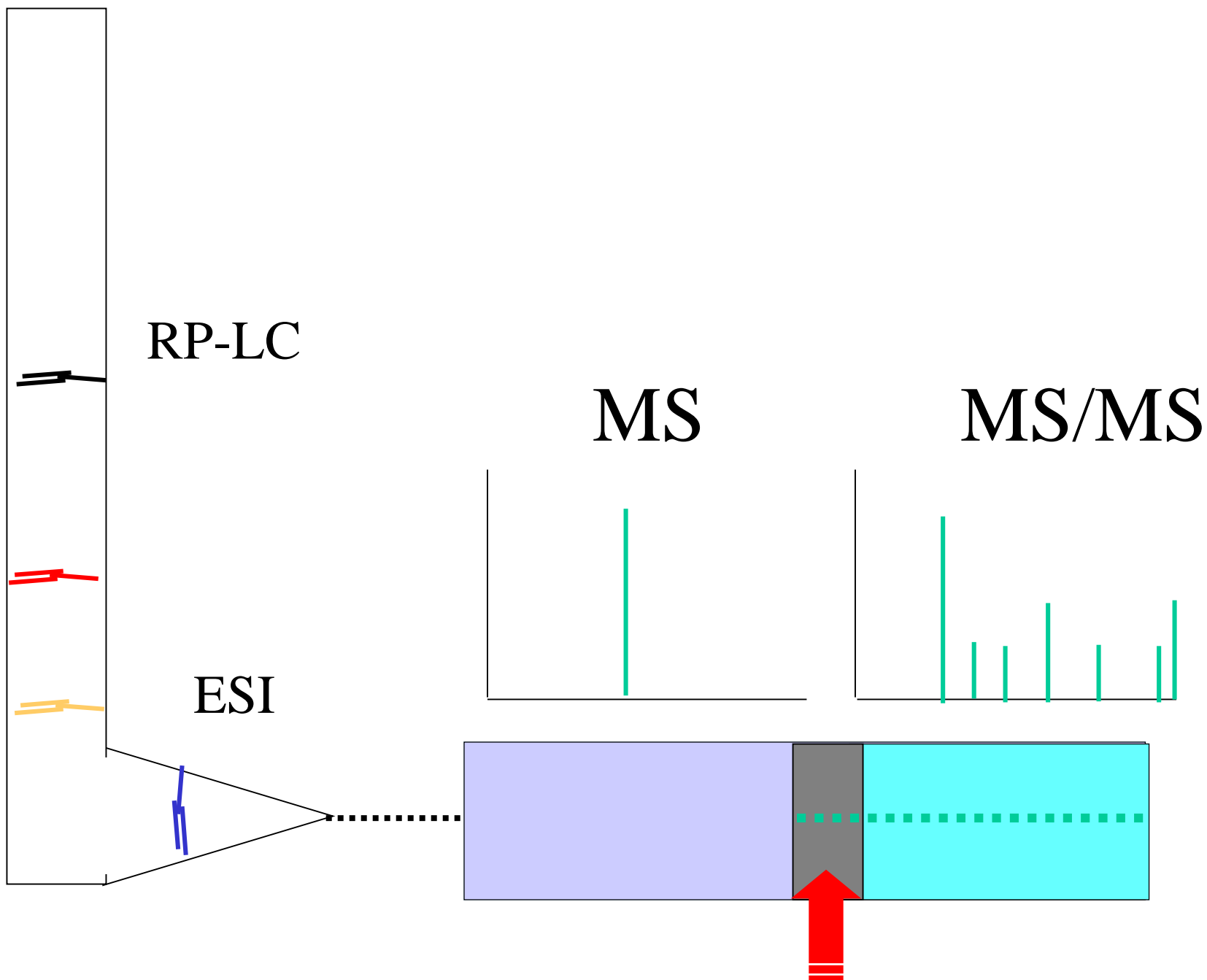


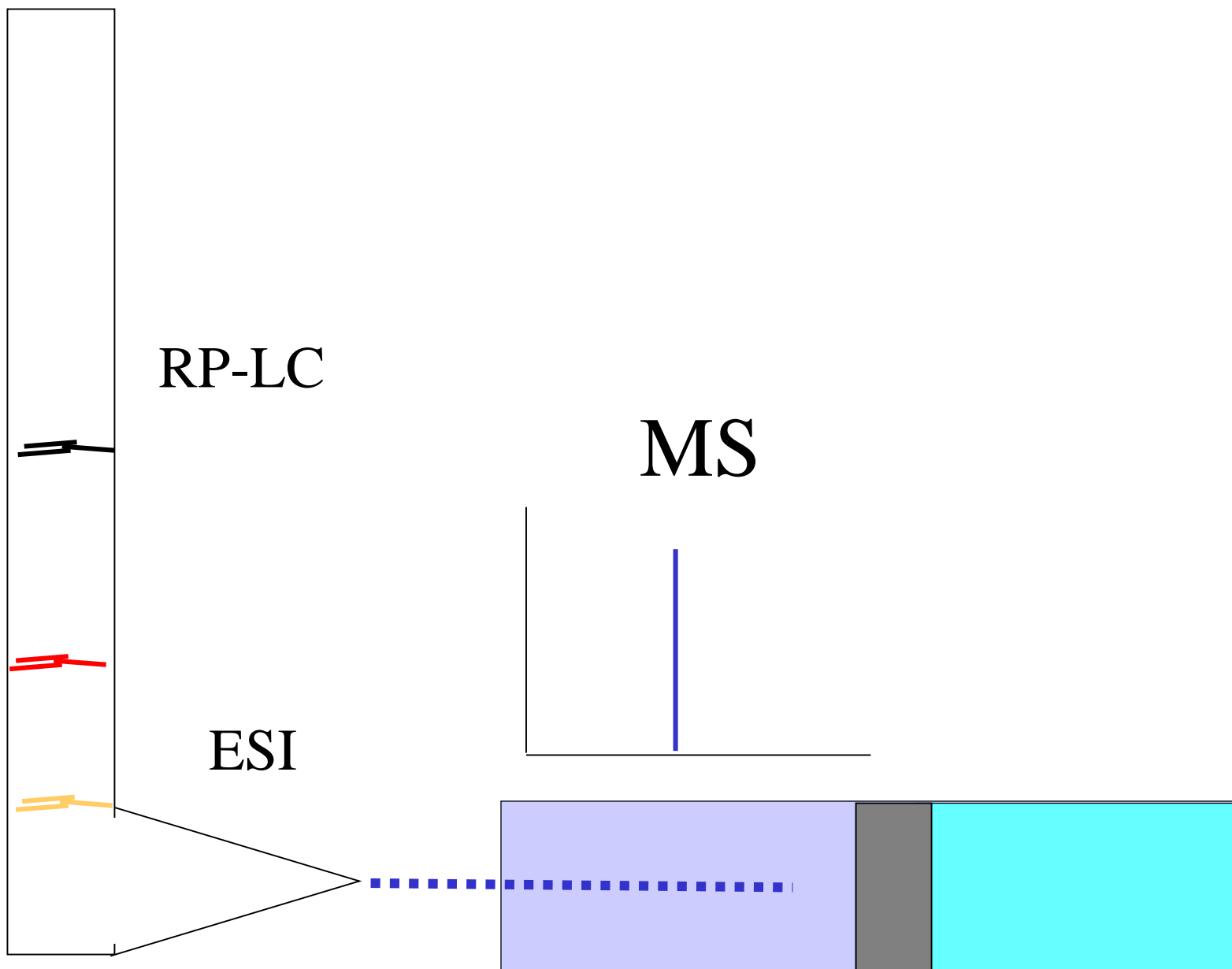










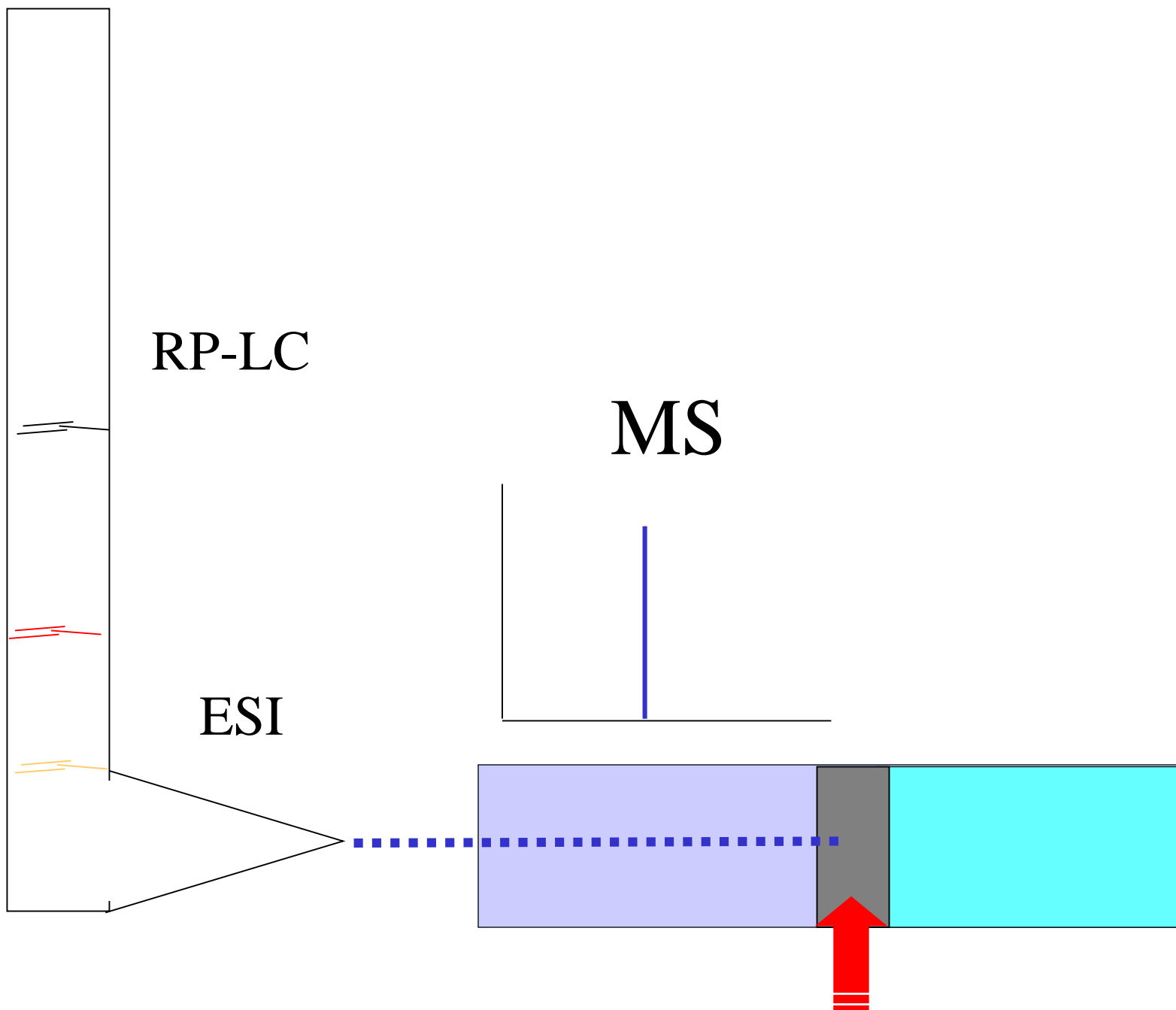


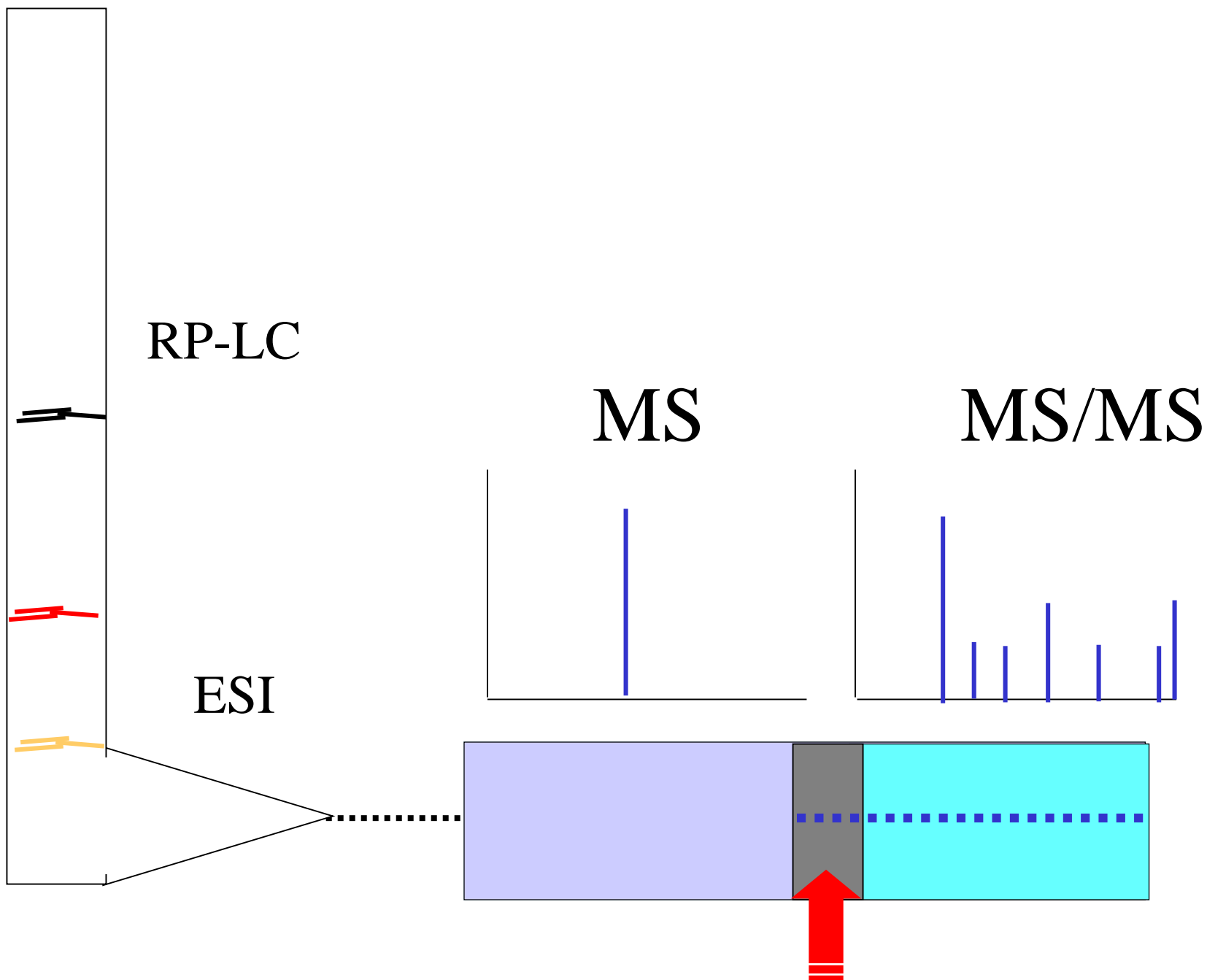
RP-LC

MS

ESI







# 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

**2-DE or not 2-DE?**

**Až 2000 spotů...**





## **OMEZENÍ 2D TECHNOLOGIE**



**Bílkoviny s extrémním pI**

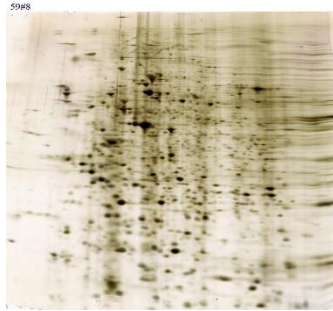
**Bíloviny nad 120-150 kDa**

**Membránové (hydrofobní) bílkoviny**

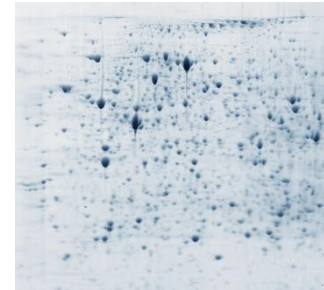


# LIMITY 2-DE

Kolik kopií proteinu musí být v buňce, abychom ho viděli na 2-DE?



Silver staining\*

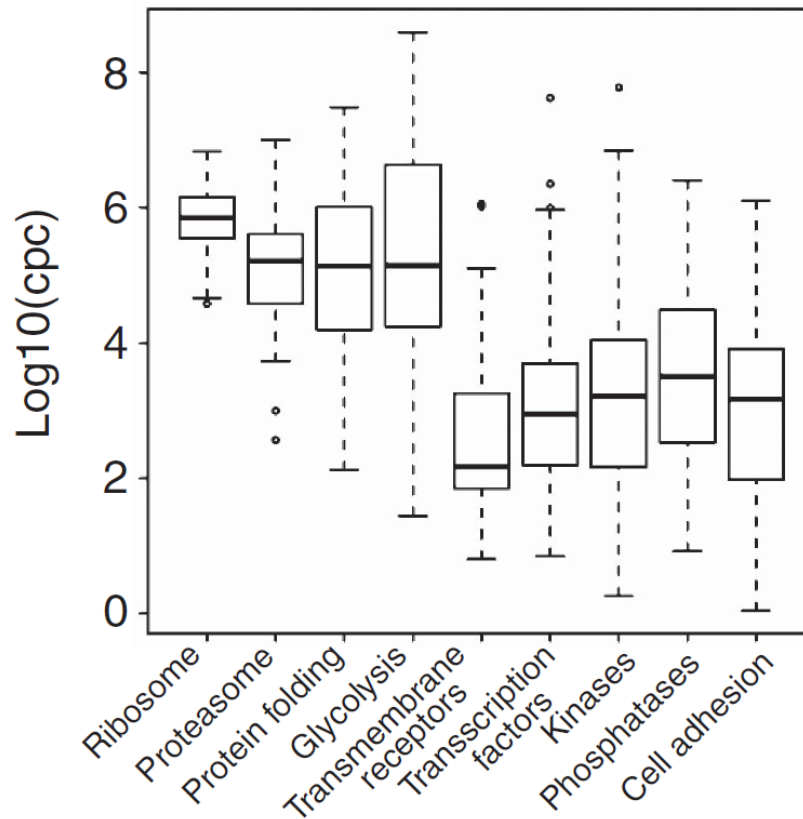


Coomassie staining\*

Protein abundance, copies per cell	Protein amount, mg <sup>†</sup>	Number of cells	Protein amount, mg <sup>†</sup>	Number of cells
10	20.073	$1.20 \times 10^9$	2007.3	$1.20 \times 10^{11}$
100	2.007	$1.20 \times 10^8$	200.7	$1.20 \times 10^{10}$
1,000	0.201	$1.20 \times 10^7$	20.1	$1.20 \times 10^9$
10,000	0.020	$1.20 \times 10^6$	2.0	$1.20 \times 10^8$
100,000	0.002	$1.20 \times 10^5$	0.2	$1.20 \times 10^7$

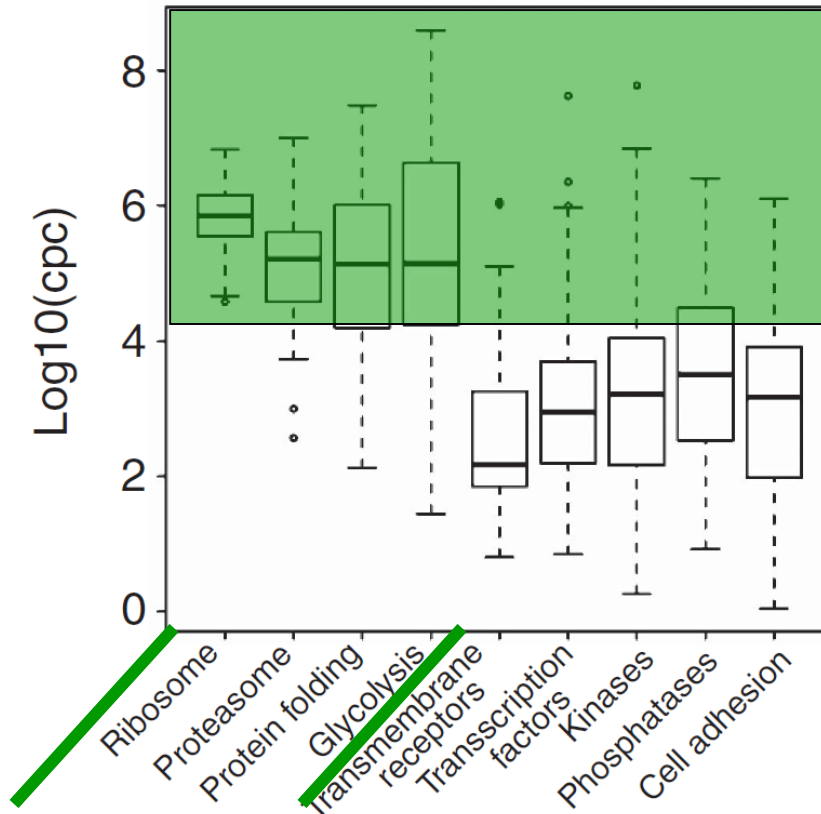
\*Protein detection limits for silver and Coomassie staining were 1 and 100 ng, respectively.

# Abundance/koncentrace buněčných bílkovin



Desítky kopií až desítky milionů kopií na buňku

# Abundance/koncentrace buněčných bílkovin



Typy proteinů,  
jejichž  
koncentrace  
V buňce jsou  
slučitelné s 2-DE



+ cytoskelet, některé další metabolické enzymy  
a proteiny redoxního stresu



# Ztráty v průběhu 2D experimentu

*Proteomics* 2005, 5, 2739–2747

DOI 10.1002/pmic.200401178

2739

REGULAR ARTICLE

## A quantitative investigation into the losses of proteins at different stages of a two-dimensional gel electrophoresis procedure

Shaobo Zhou<sup>1</sup>, Matthew J. Bailey<sup>1</sup>, Michael J. Dunn<sup>2\*</sup>, Victor R. Preedy<sup>1</sup>  
and Peter W. Emery<sup>1</sup>

### ZTRÁTY:

Rehydratace 20-55 %

IEF 7-14 %

Ekvilibrace 17-24 %

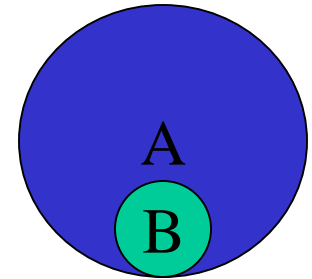
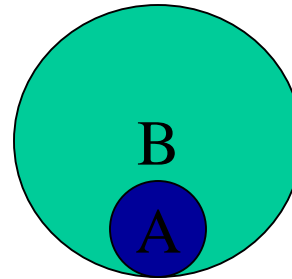
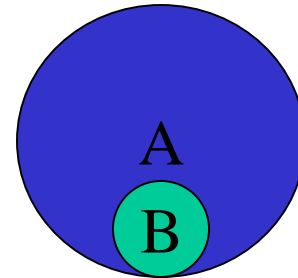
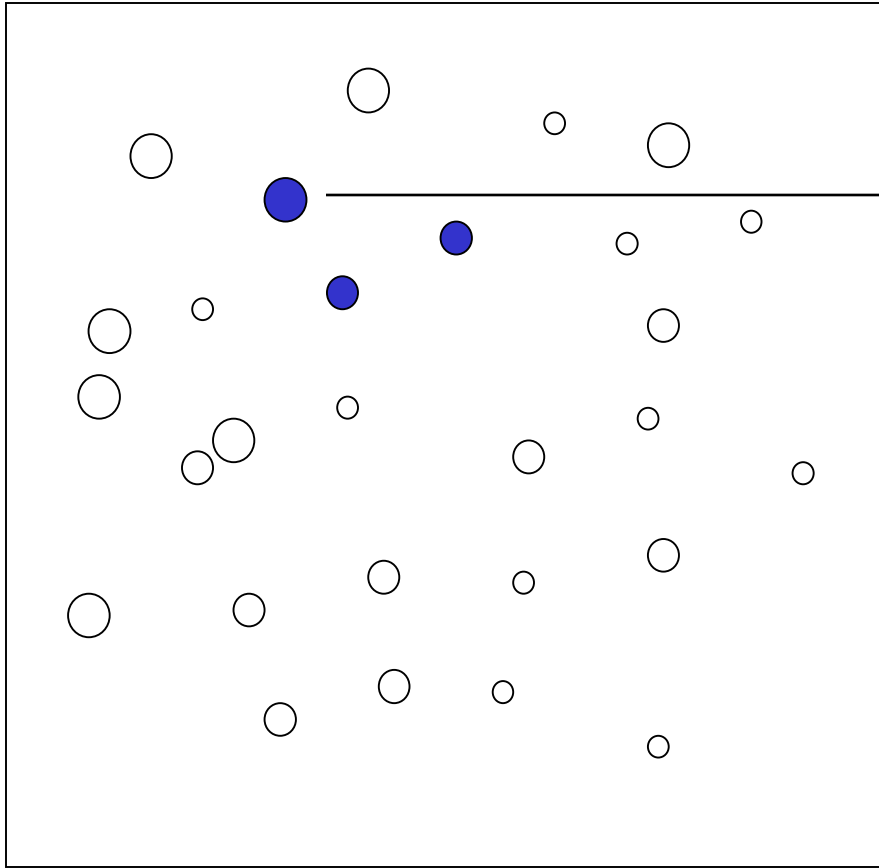
SDS-PAGE

Fixace a barvení

	(dpm)	(% of amount loaded)
Loaded onto IPG strip	3418	
After reswelling	2024	59
After focussing	1547	45
After equilibration	736	22
After second dimension run	663	20 !

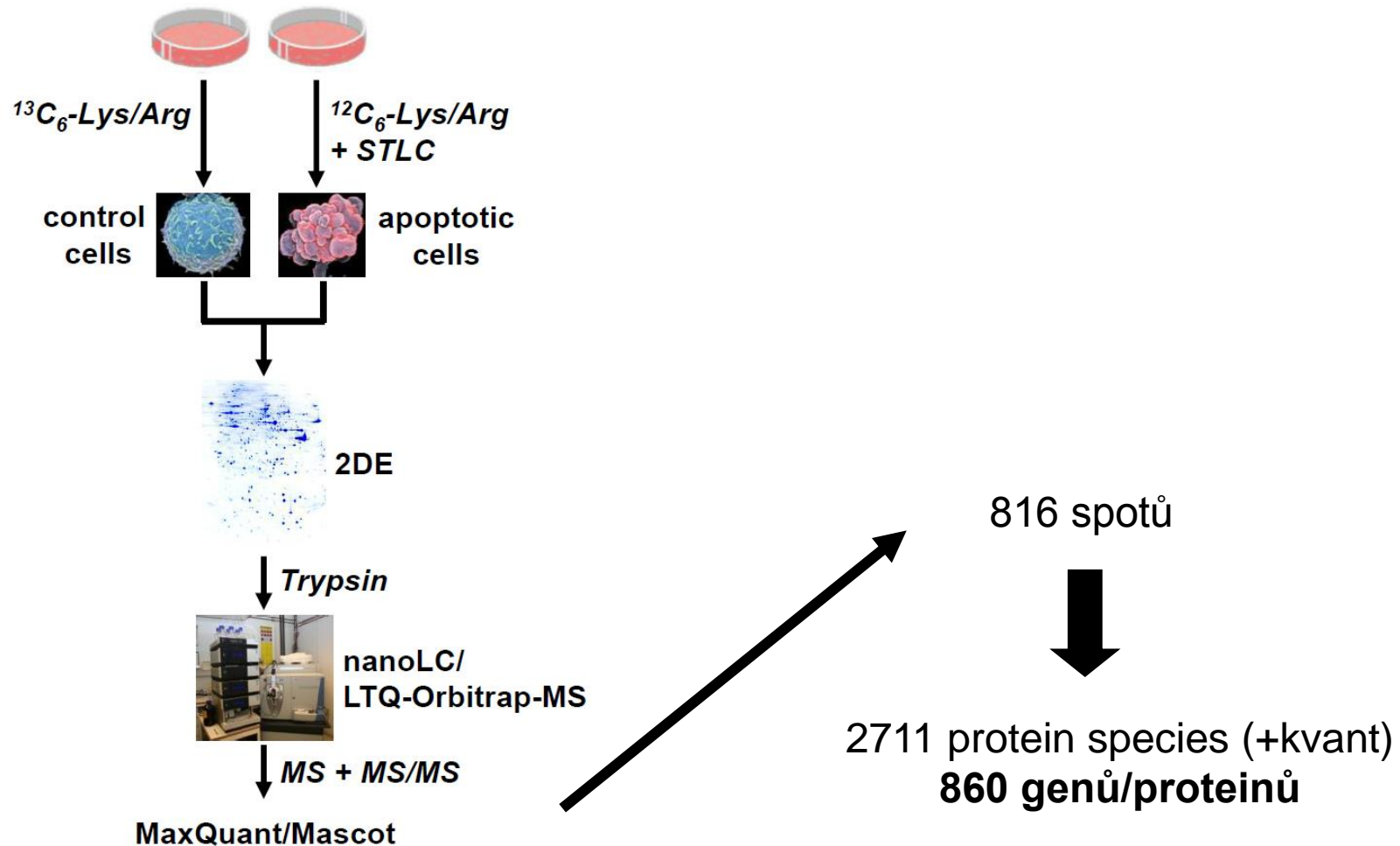
Až 80 % proteinů může být ztraceno v průběhu konvenčního 2D experimentu !!!!!

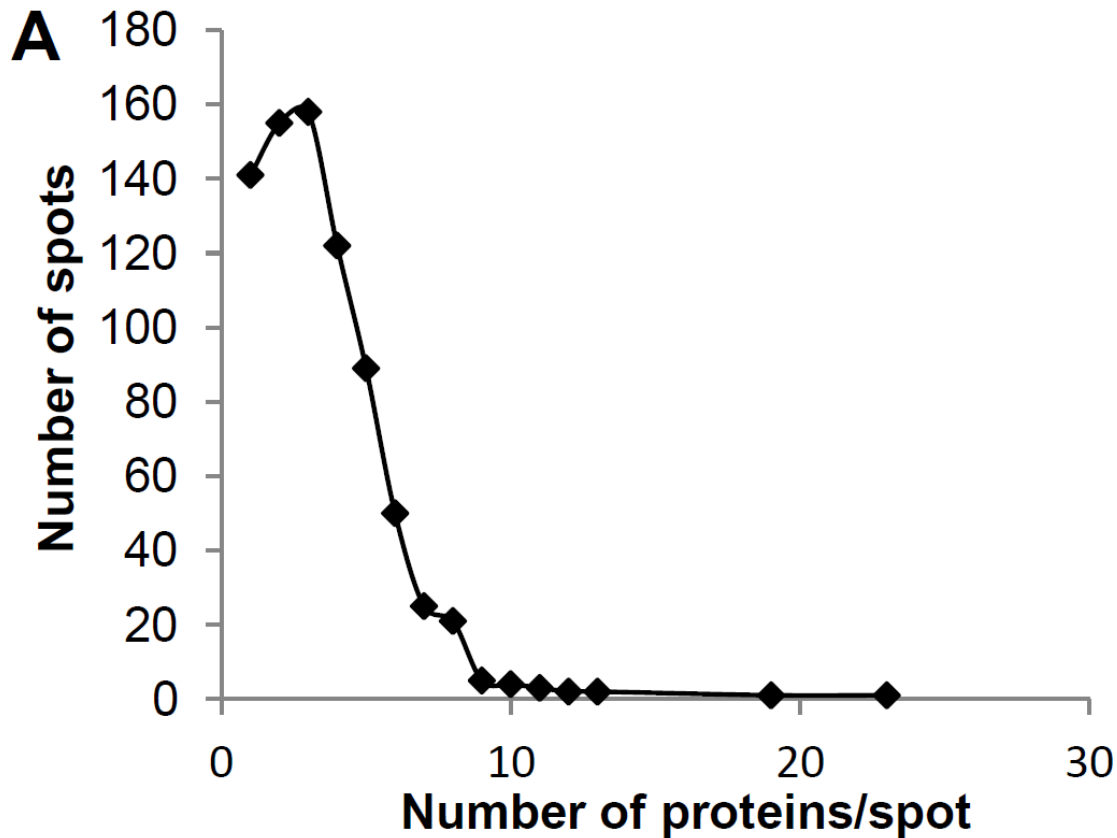
# Záludnosti 2-DE PŘEKRYV SPOTŮ



# Jak spolehlivá je kvantifikace při 2-DE?

Thiede et al. Protein species high resolution quantitative proteomics of HeLa cells using SILAC-2-DE-nanoLC/LTQ-Orbitrap mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2013 Feb;12(2):529-38

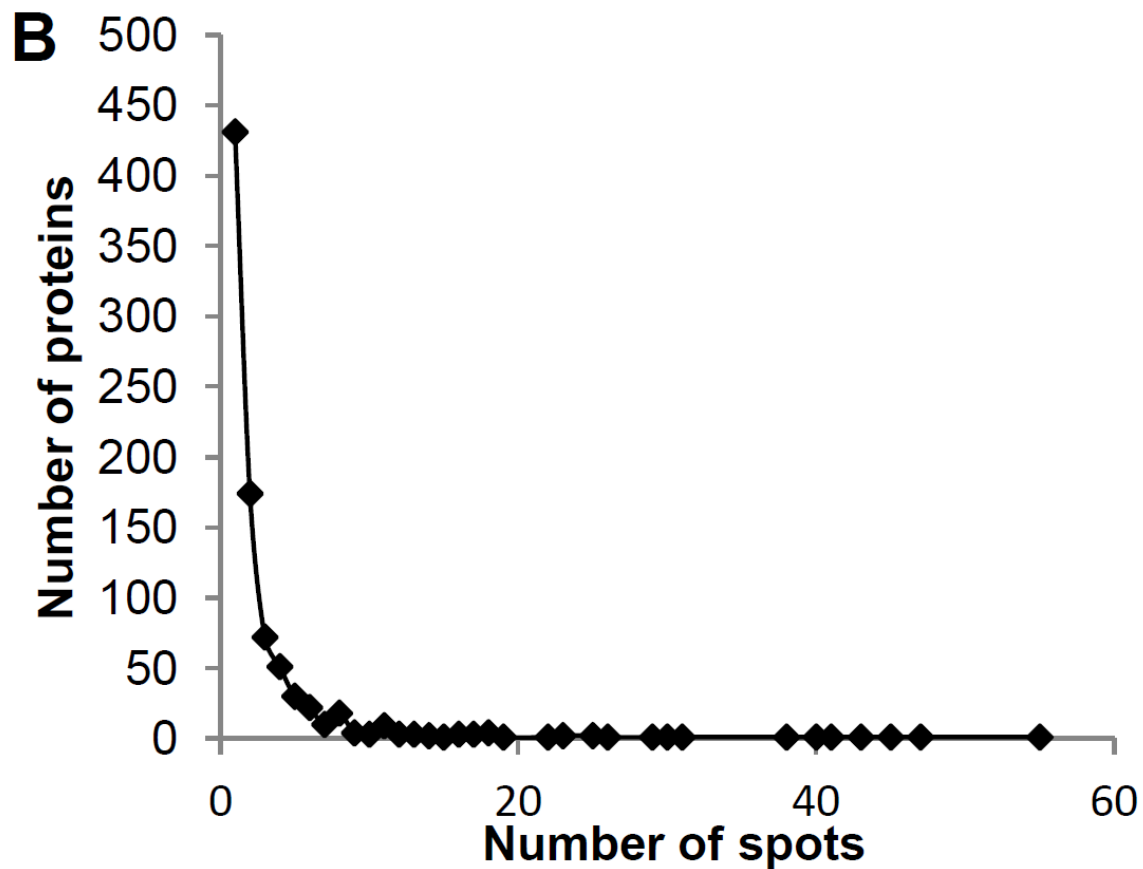




**84 % spotů na 2-DE obsahuje více než 1 protein  
téměř polovina spotů obsahuje více než 3 proteiny**

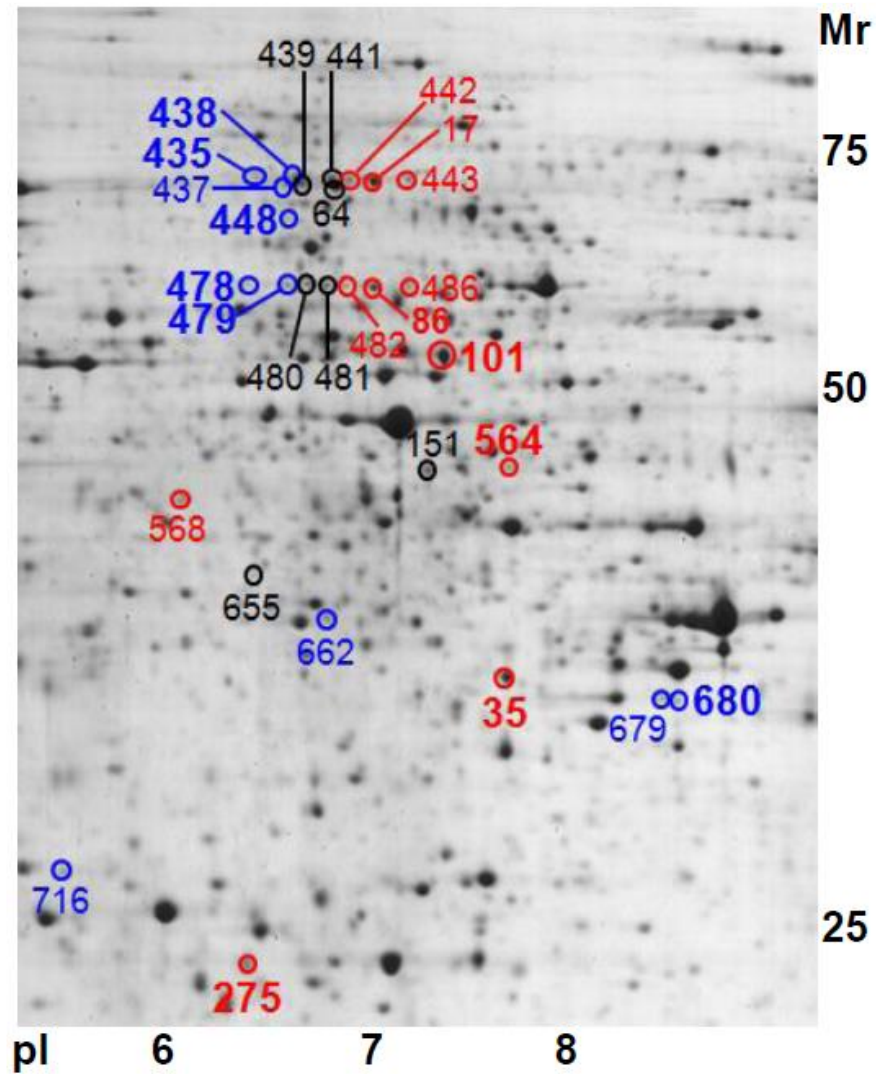
**V polovině spotů bylo zastoupení „hlavního“ proteinu menší než 90%**

**! Kvantifikace založená na intenzitě spotu je v 50 % nepřesná !  
Nemusí znamenat změnu exprese identifikovaného „hlavního“ proteinu! !**



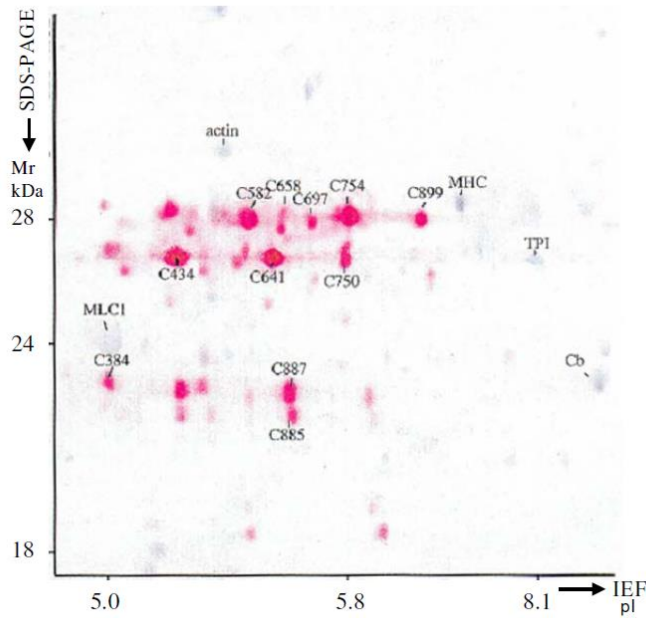
**Zhruba polovina identifikovaných proteinů  
je zastoupena více než jednou proteoformou (je ve více než jednom spotu)**

## Kde všude na 2-DE je lamin A/C?



28 proteoforem

# HSP27 proteoformy



**HSP27** – nejméně 30 forem

**Enolase 1** – 38 forem

**Heat shock cognate 71 kDa protein** – 31 forem

**Vimentin** – 29 forem

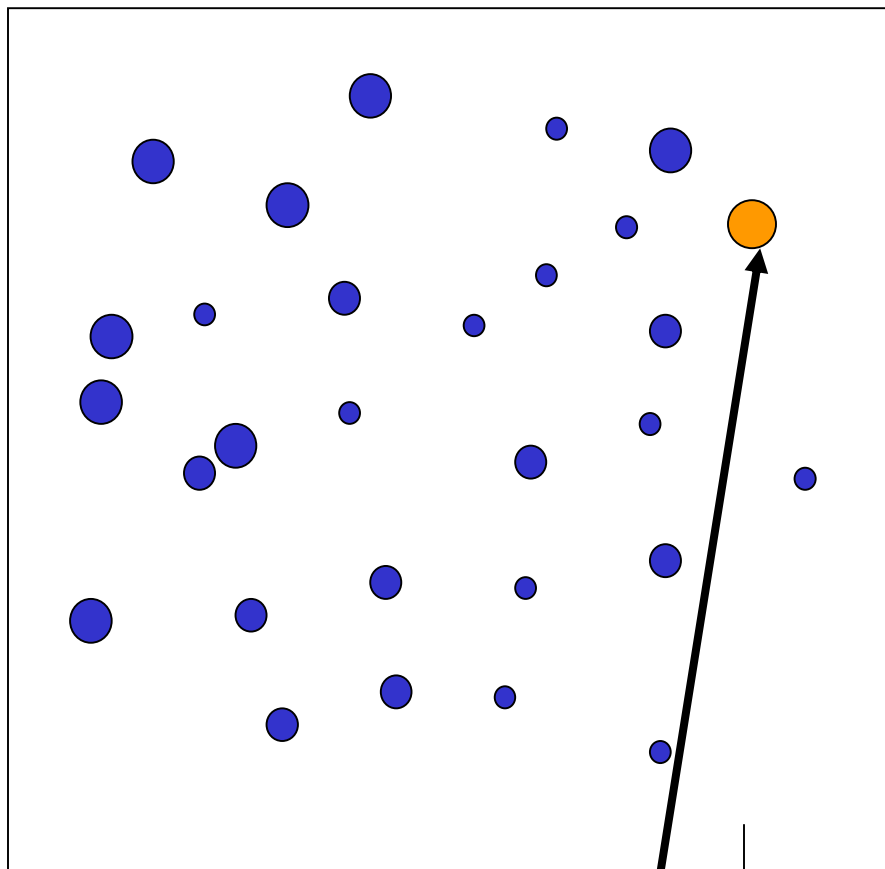
atd...

Jungblut, PR. et al. *Chemistry Central Journal* 2008, 2:16

Thiede. et al. *Mol Cell Proteomics*. 2012 in print

# Záludnosti 2-DE PTM

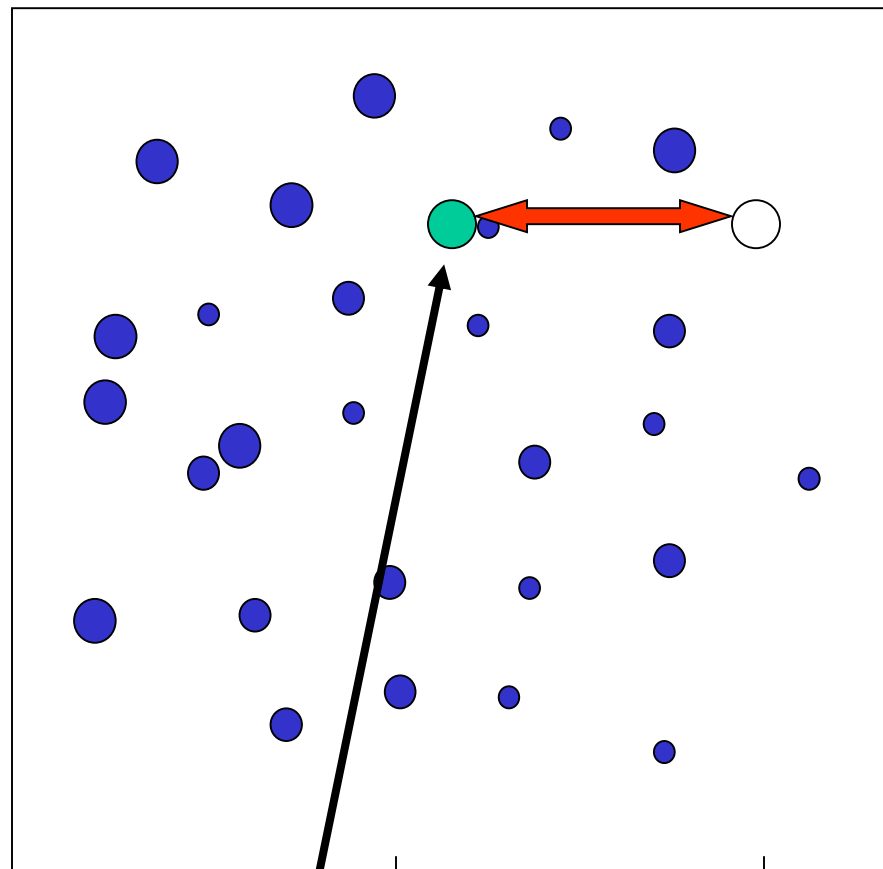
## CTRL



pH 7,8

Protein A

## TREATED



pH 7,5

Protein A-P

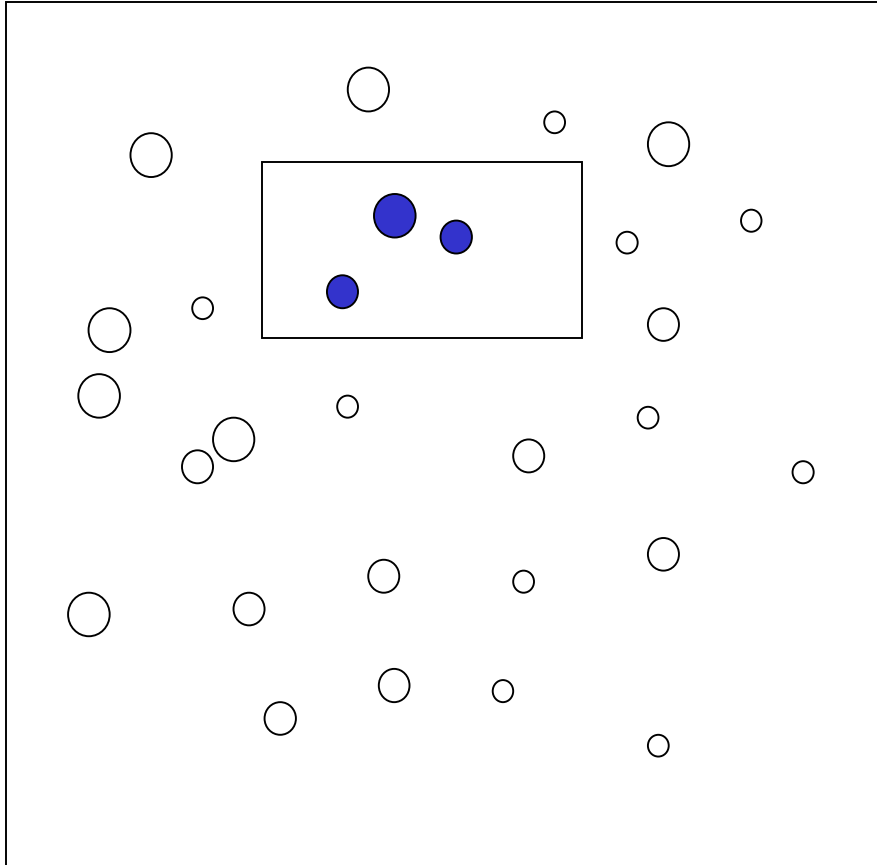
„kyselý“ shift



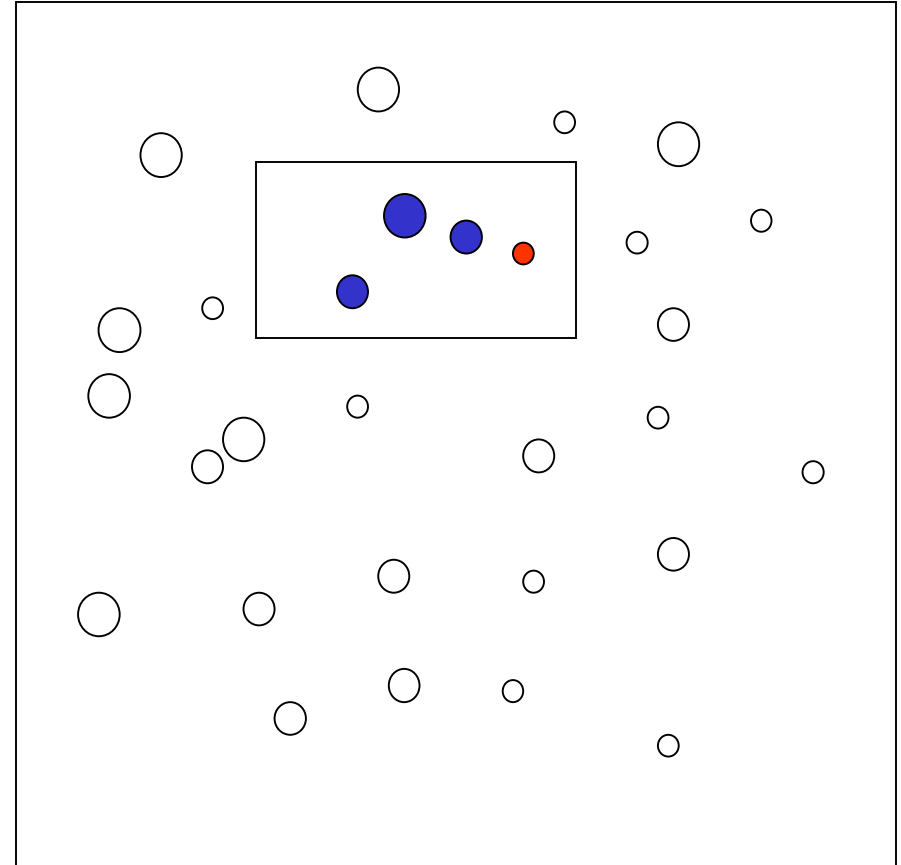
# Záludnosti 2-DE

## 4 různé „proteoformy“

**CTRL**



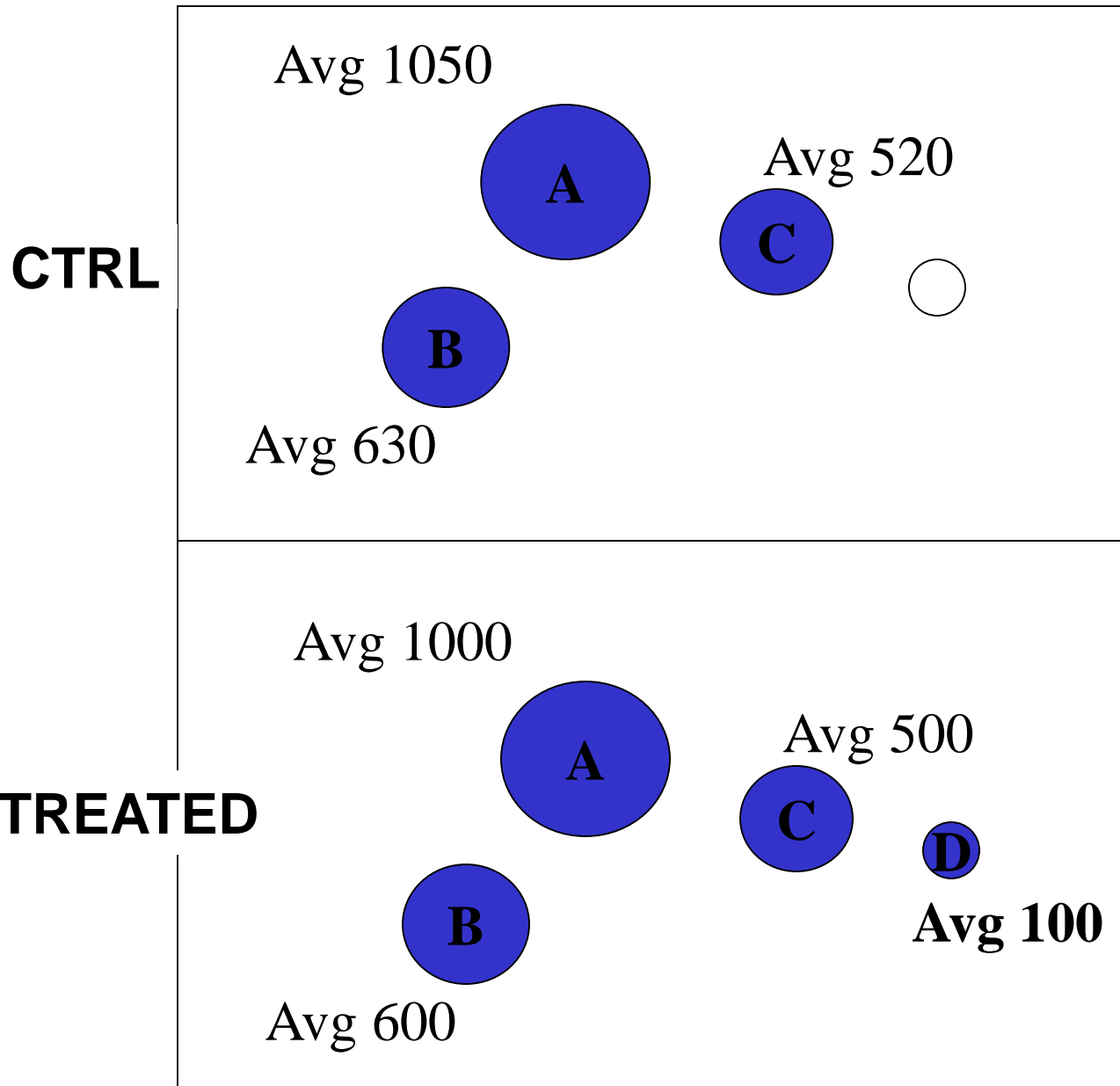
**TREATED**



● „diferenciálně exprimovaný“ protein XY

# Záludnosti 2-DE

## 4 různé „proteoformy“



**A 1050/1000 N.S.**

**B 630/600 N.S.**

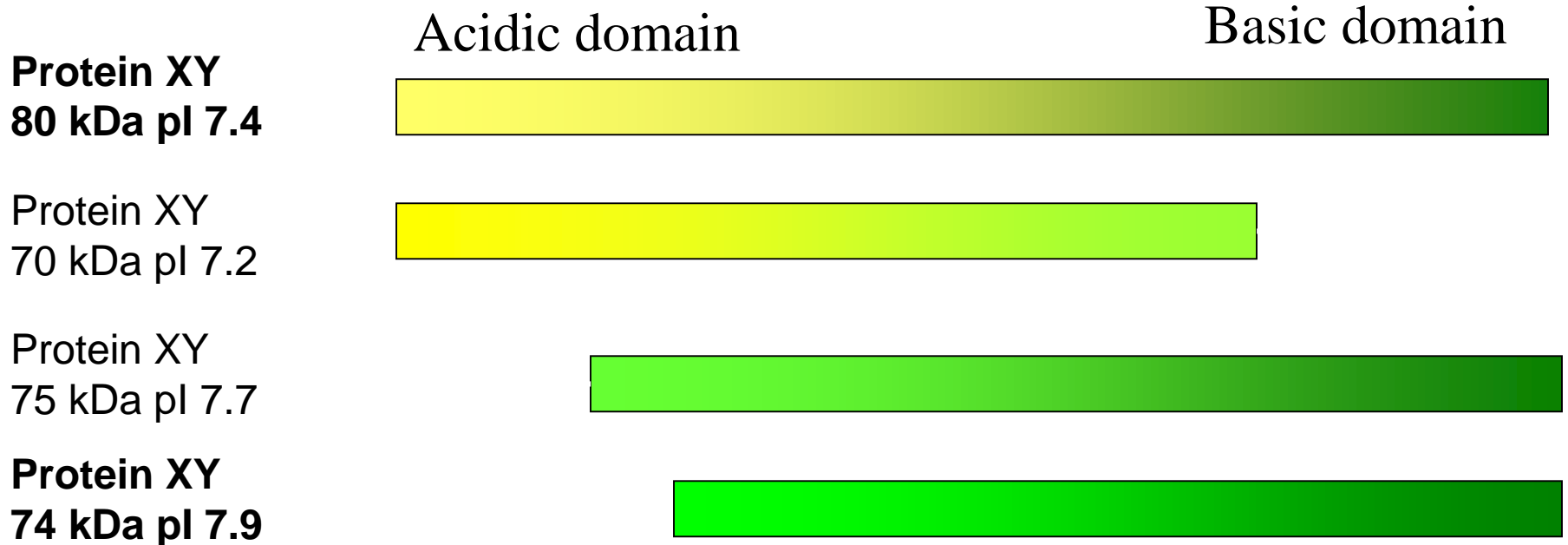
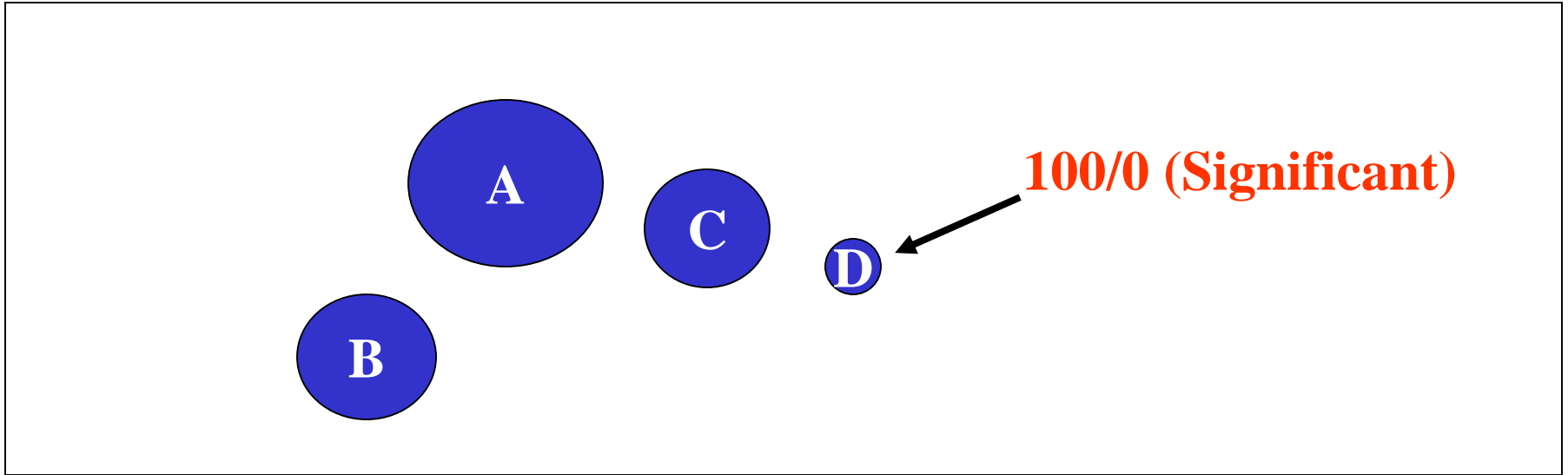
**C 520/500 N.S.**

**D 0/100 !!!!**

**XY 2200/2200**

# Záludnosti 2-DE

## 4 různé „proteoformy“





## 2-DE PROTEOMIC DÉJÀ VU.

Heat-shock proteins, proteasome subunits, enolase, tubulin, peroxiredoxins, elongation factors, PDIs and hnRNPs  
.... again ?

**The same identified proteins seem to predominate regardless of experiment, tissue or species!**

# TOP 15

## Individual proteins

**HSP27** (34 identifications, 31% of experiments)

**1 ENOLASE 1** (31 identifications, 29% of experiments)

**2 TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE** (22 identifications, 20% of experiments)

**3 pyruvate kinase M1/M2** (21 identifications, 19 % of experiments)

**4-6 peroxiredoxin 1** (21 identifications, 19 % of experiments)

**4-6 peroxiredoxin 2** (21 identifications, 19 % of experiments)

**4-6 vimentin** (20 identifications, 19 %)

**7 annexin A4** (19 identifications, 18 %)

**8 HSC71** (18 identifications, 17%)

**9 peptidyl-prolyl isomerase A** (17 identifications, 16%)

**10-11 cytokeratin 8** (17 identifications, 16%)

**10-11 cathepsin D** (16 identifications, 15%)

**12 ATP synthase beta subunit** (15 identifications, 14%)

**13 Grp78/Bip** (14 identifications, 13%)

**14-15 Rho GDI** (14 identifications, 13%)

**14-15**

HUMAN

# TOP 15

## Protein families

**KERATINS** (70 identifications in 108 experiments)

**1 ANNEXINS** (67 identifications in 108 experiments)

**2 PEROXIREDOXINS** (61 identifications in 108 experiments)

**3 actins** (36 identifications)

**4-6 HSP27** (34 identifications)

**4-6 tropomyosins** (34 identifications)

**4-6 GSTs** (33 identifications)

**7 enolases** (32 identifications)

**8-10 PDIs** (32 identifications)

**8-10 tubulins** (32 identifications)

**8-10 cathepsins** (26 identifications)

**11 TCP-1** (24 identifications)

**12 triosephosphate isomerases** (22 identifications)

**13-14 pyruvate kinases** (22 identifications)

**13-14 vimentin** (20 identifications)

**15**

HUMAN

# HUMAN

triosophosphate isomerase  
pyruvate kinases  
cathepsins  
keratins  
vimentin  
TCP-1  
HSP27

enolases  
peroxiredoxins  
tubulins  
PDIs  
annexins  
actins  
GSTs  
tropomyosins

# RODENT

HSP60  
14-3-3 proteins  
Apolipoproteins  
Carbonic anhydrases  
Malate dehydrogenases  
ATP synthase beta subunit  
dihydropyrimidinase-like proteins

**23 % of experiments present at least 5 of the TOP15**





## 2-DE or not 2-DE?



- Nepokrývá více jak 5-10% eukaryotního buněčného proteomu
- Nefunguje na TMP, extrémní pI, extrémní MW
- **Umožňuje studium proteinů s nejméně desítkami tisíc kopií na buňku**
- Ztráty v průběhu experimentu jsou až 80%
- Většina bílkovin je zastoupena více proteoformami
- Ve většině spotů je více až mnoho proteinů
- **Kvantifikace založená na barvení skvrn je nespolehlivá**
- **2-DE umožňuje analýzu jednotlivých proteoform**
- Náročná experimentálně, nenáročná statisticky a z hlediska MS