

The background features a complex network of nodes and edges, with nodes represented by small, multi-colored spheres (pink, green, blue) and edges as thin white lines. Overlaid on this network are several thick, 3D-rendered ribbons in shades of green and blue, which are twisted and looped, resembling protein secondary structures like alpha-helices and beta-strands. The overall aesthetic is scientific and digital, set against a dark blue gradient background.

# Proteomika 2023

# PROTEOMIKA

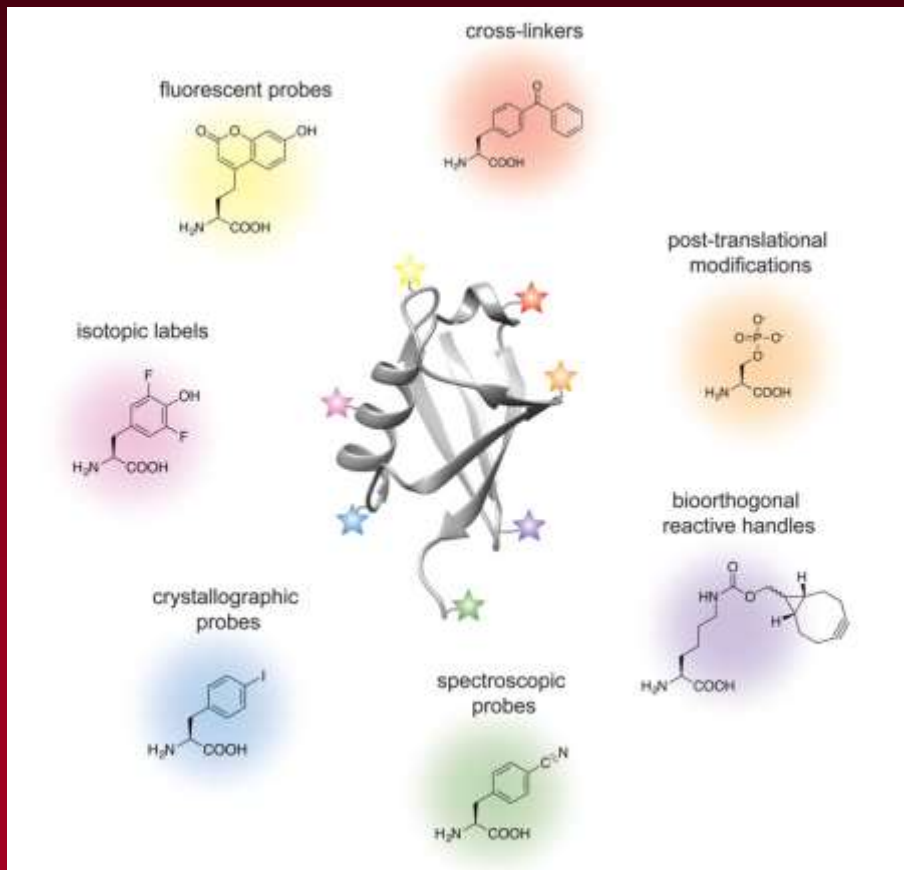
## 2023

- Proteomika, Metody práce s bílkovinami (Petrák 16/10)
- **Separační metody, digesce a principy ID bílkovin pomocí MS** (Petrák 23/10)
- **Principy hmotnostní spektrometrie, instrumentace** (Man 30/10 )
- **Hmotnostní spektrometrie v proteomice, analýza PTM** (Man 6/11)
- **ID proteinů, DDA, DIA, databáze, FDR** (Talacko 13/11)
- **Kvantifikace, isotopy, LFQ, cílená proteomika** (Harant 20/11)
- **Design experimentu, zpracování dat, bioinformatika...**(Harant 27/11)
- **Proteomika membránových proteinů, proteinové komplexy** (Petrák 4/12)
- **Klinická proteomika, speciální metody** (Petrák 11/12)

# METODY PRÁCE S PROTEINY

- dezintegrace, lýza, frakcionace
- detergenty a jejich vlastnosti
- srážení, precipitace, denaturace
- koncentrace, filtrace
- stanovení koncentrace
- **značení a imobilizace bílkovin**

# ZNAČENÍ A ZAKOTVOVÁNÍ PROTEINŮ



Reaktivní skupiny bílkovin

**sulfhydryl (–SH)**

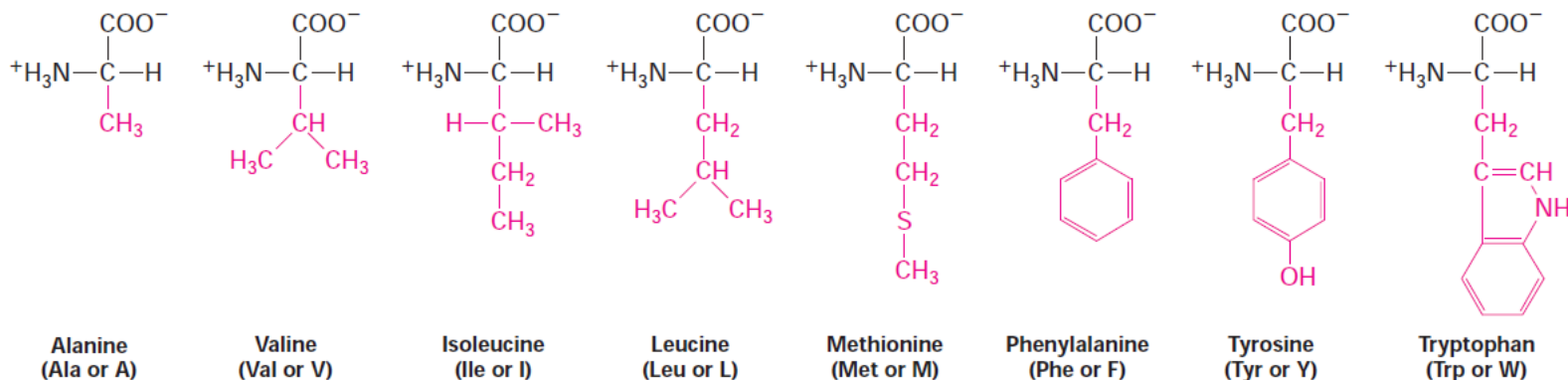
**primární amin (–NH<sub>2</sub>)**

**karboxyl (–COOH)**

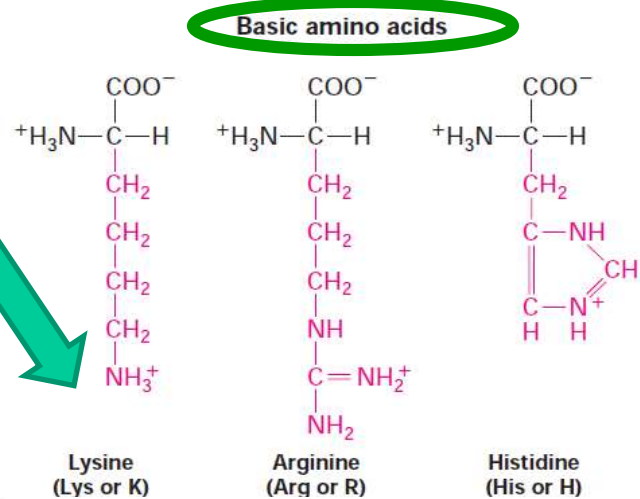
**karbonyl sacharidu (–CHO)**



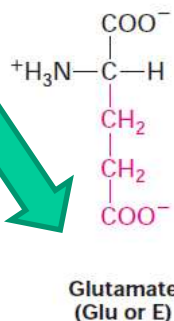
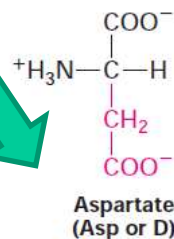
## HYDROPHOBIC AMINO ACIDS



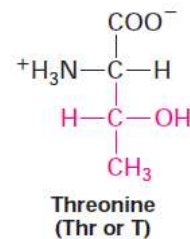
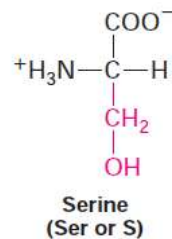
## HYDROPHILIC AMINO ACIDS



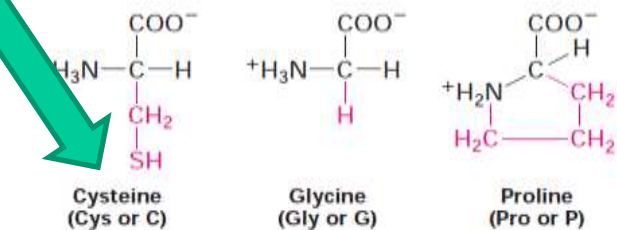
## Acidic amino acids



## Polar amino acids with uncharged R groups



## SPECIAL AMINO ACIDS



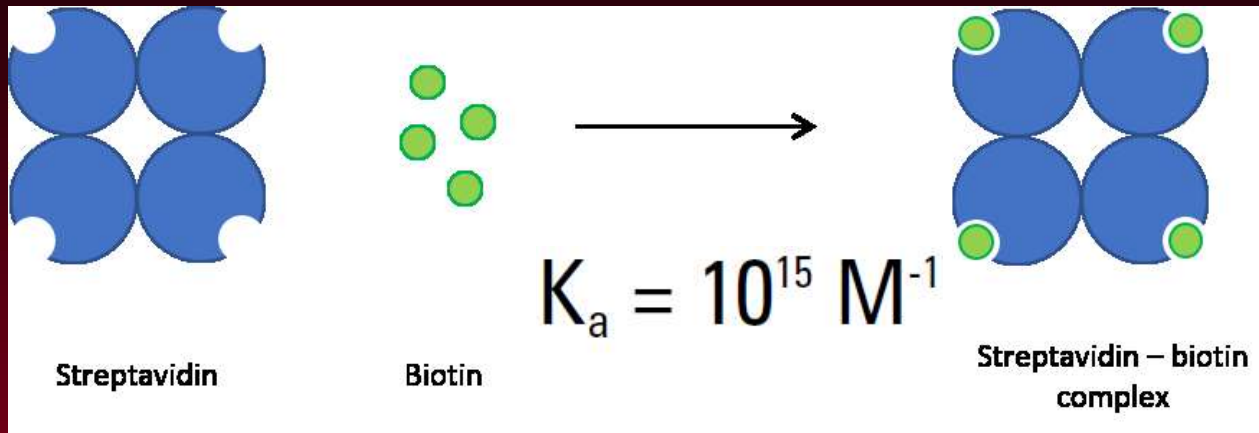
Vhodně reaktivní:

Cystein (-SH)

Lysin (epsilon aminoskupina)  
N' - (aminoskupina)

-C' (karboxyl + Asp, Glu)

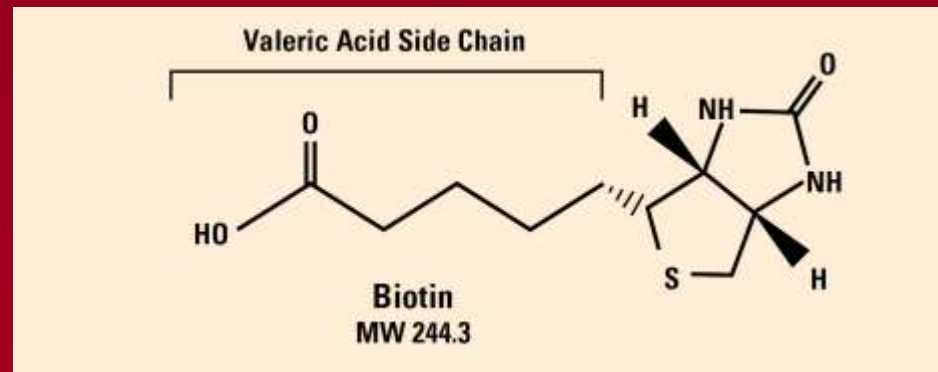
# Vazba Avidin (Streptavidin) - Biotin



Nejsilnější známá nekovalentní interakce  
mezi proteinem a ligandem

**Avidin (Streptavidin), tetramerní proteiny 50-70 kDa**

**Biotin  
(vitamín B7)**

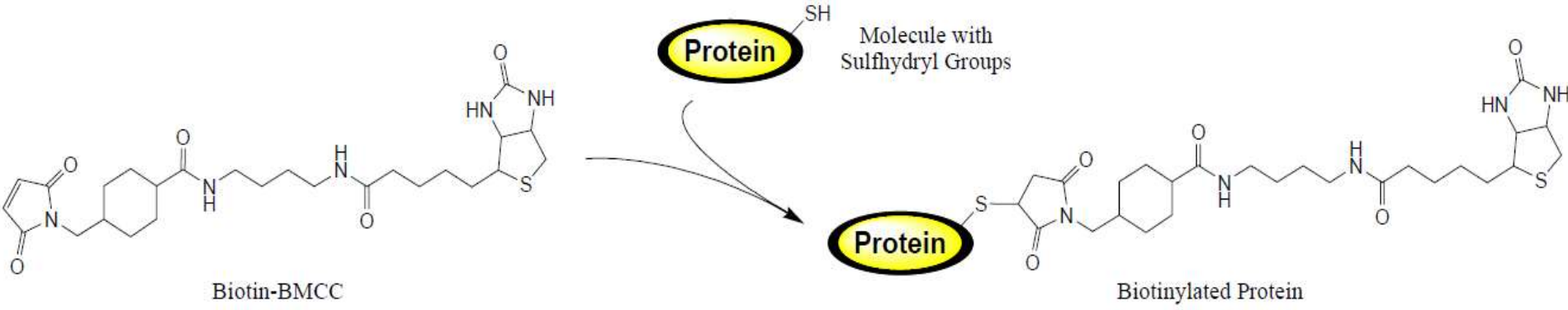


SH-

Cys

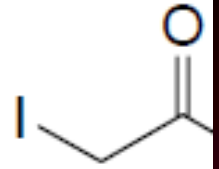


Maleimid

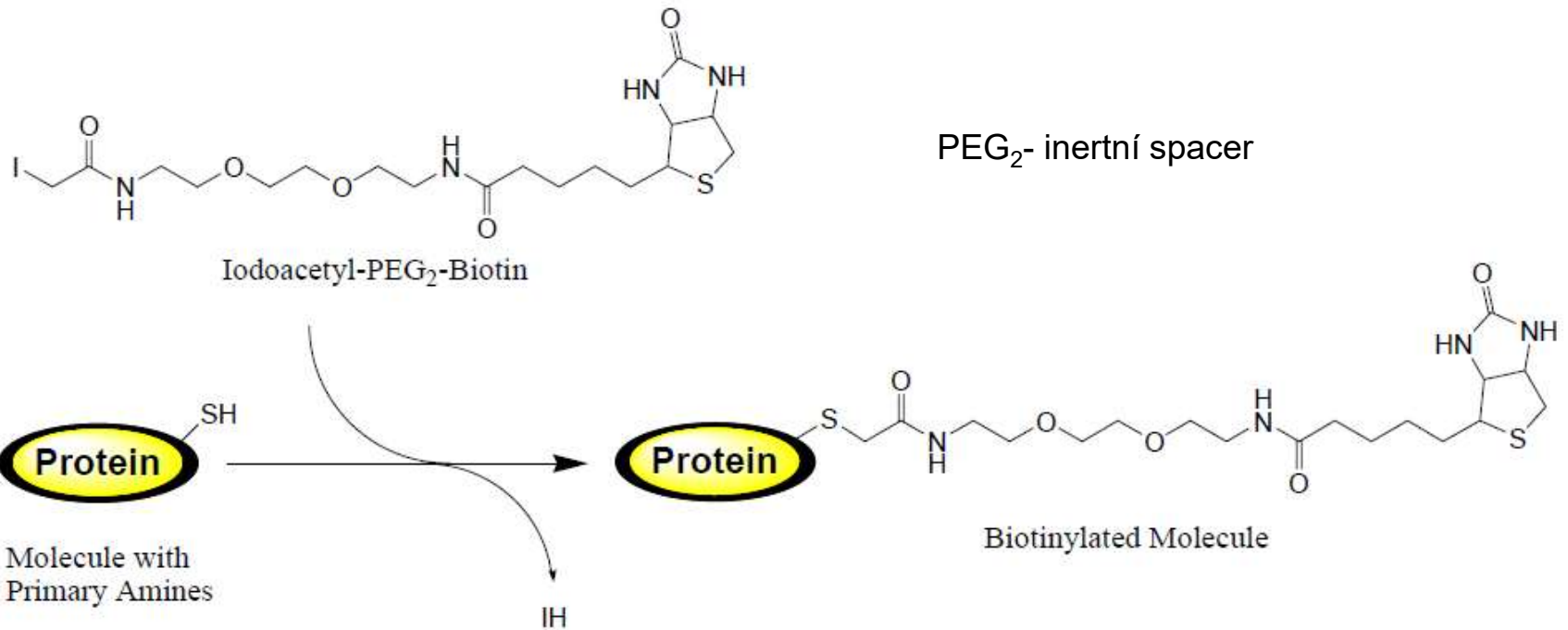


SH-

Cys



Iodoacetyl

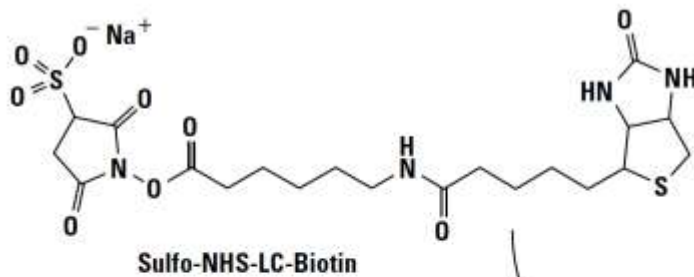
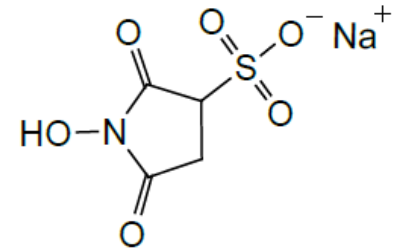
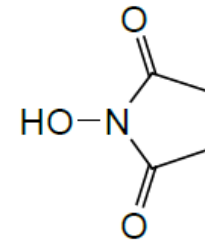




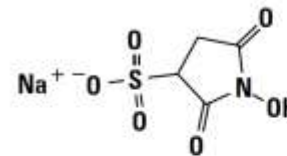


N', epsilon aminoskupina Lys

N-hydroxysukcinimid (NHS)  
sulfo N-hydroxysukcinimid (NHS)

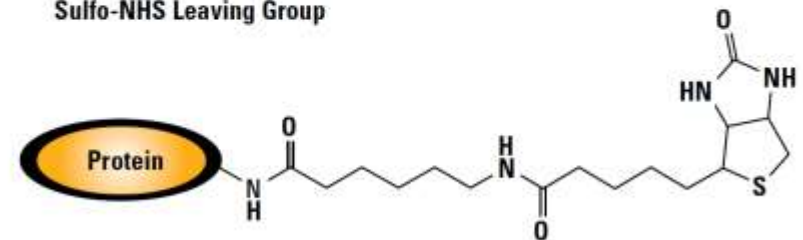


Sulfo-NHS-LC-Biotin



Sulfo-NHS Leaving Group

Protein  
NH<sub>2</sub>  
Molecule with  
Primary Amines



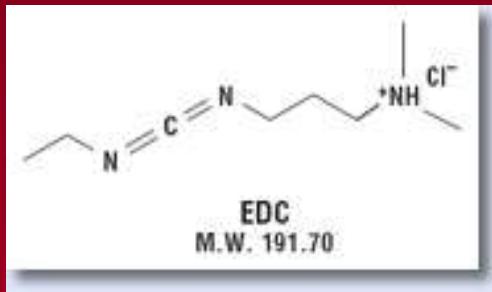
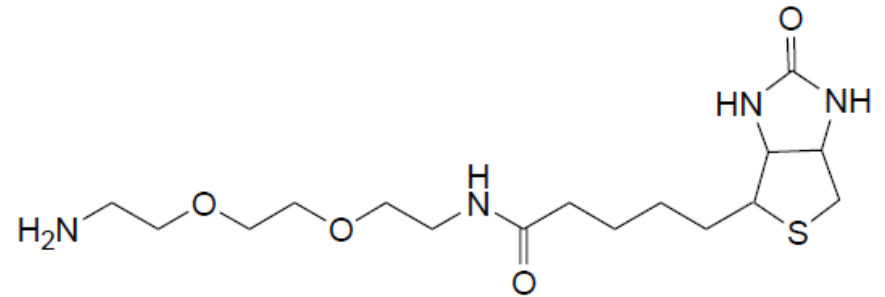
Biotinylated Molecule

COOH-

C', Asp. Glu

Protein-COOH

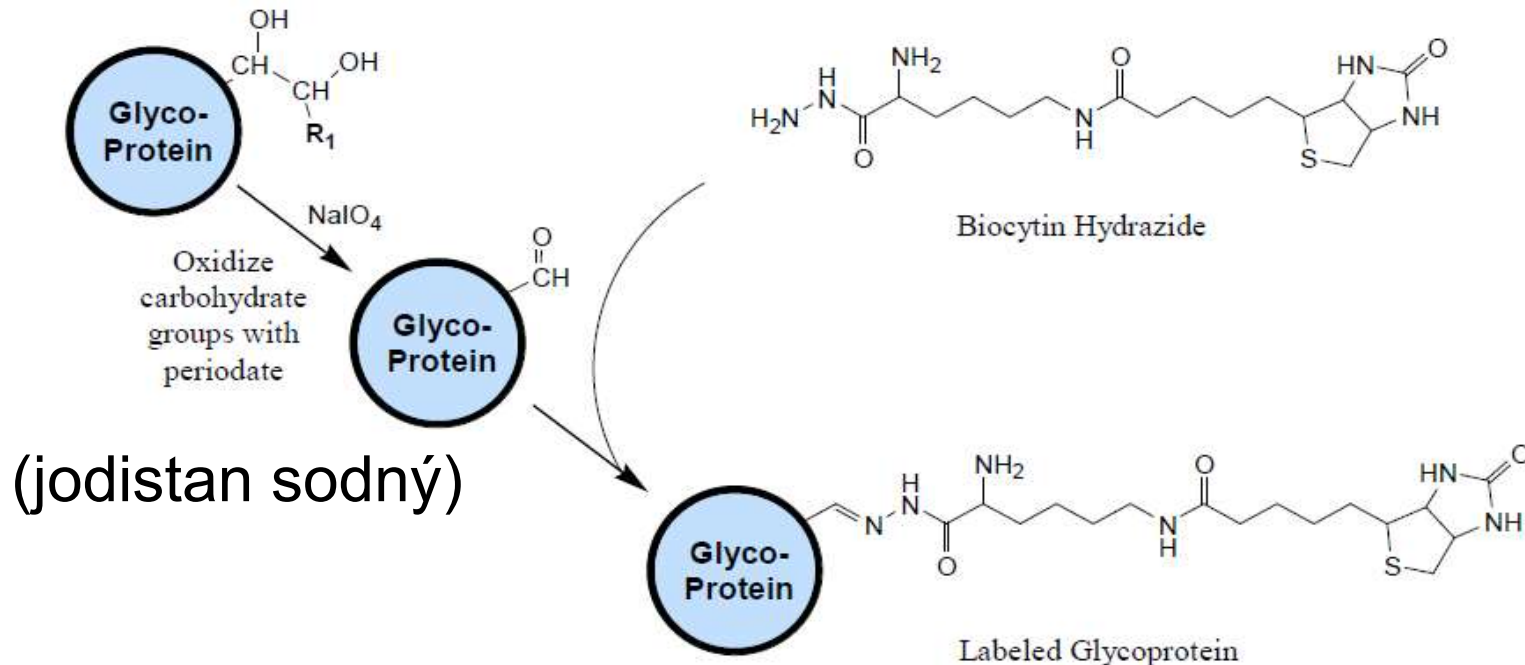
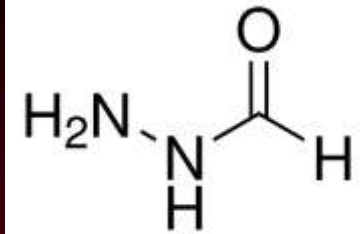
+



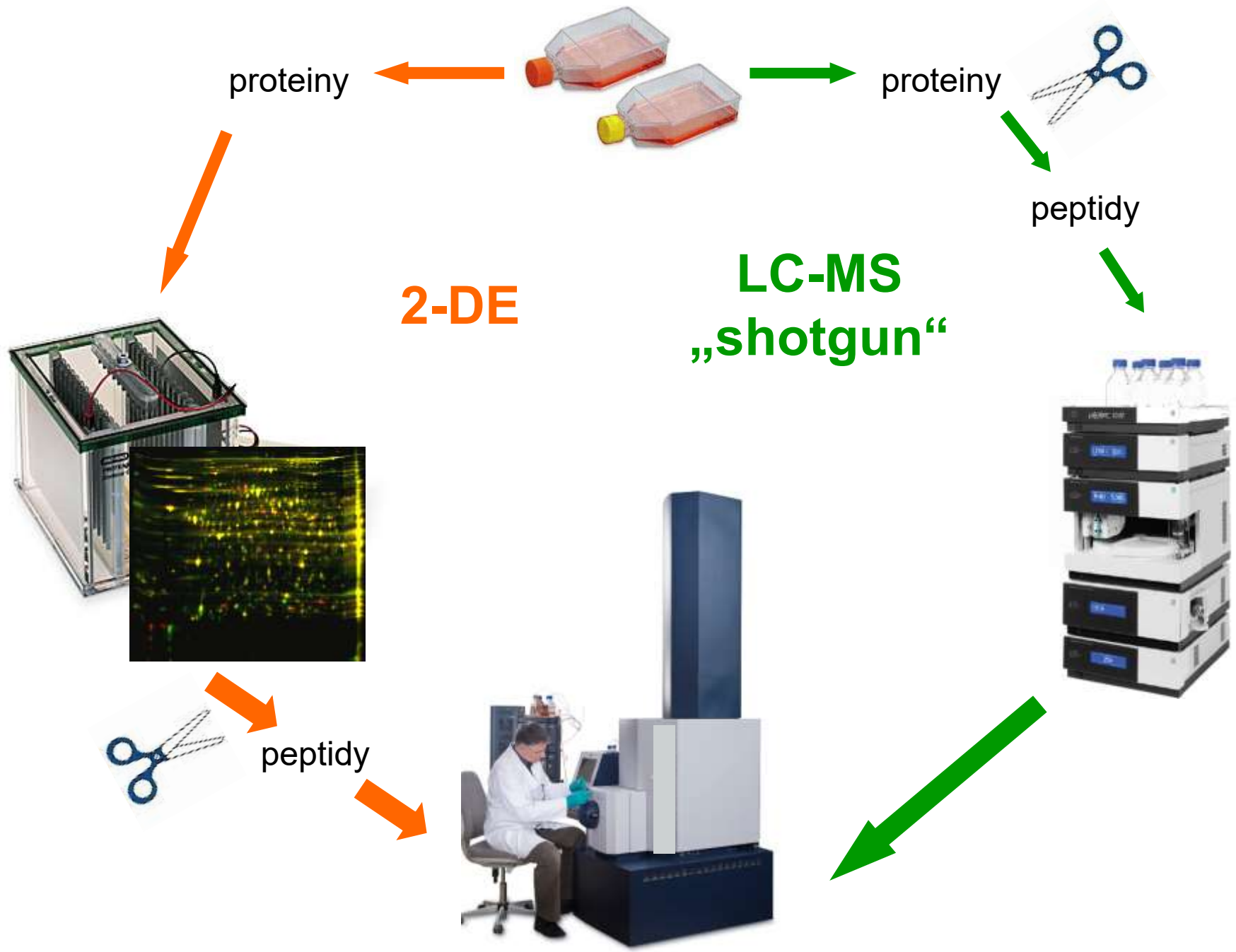
kroslinker EDC

# Cukry

hydrazid



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



# SEPARAČNÍ METODY

- CHROMATOGRRAFIE
  - Gelová filtrace, SEC
  - Iontoměničová chromatografie
  - Afinitní chromatografie
  - Chromatografie v reverzní (obrácené) fázi
  - HILIC (chromatografie hydrofilních interakcí)
- ELEKTROFORÉZY

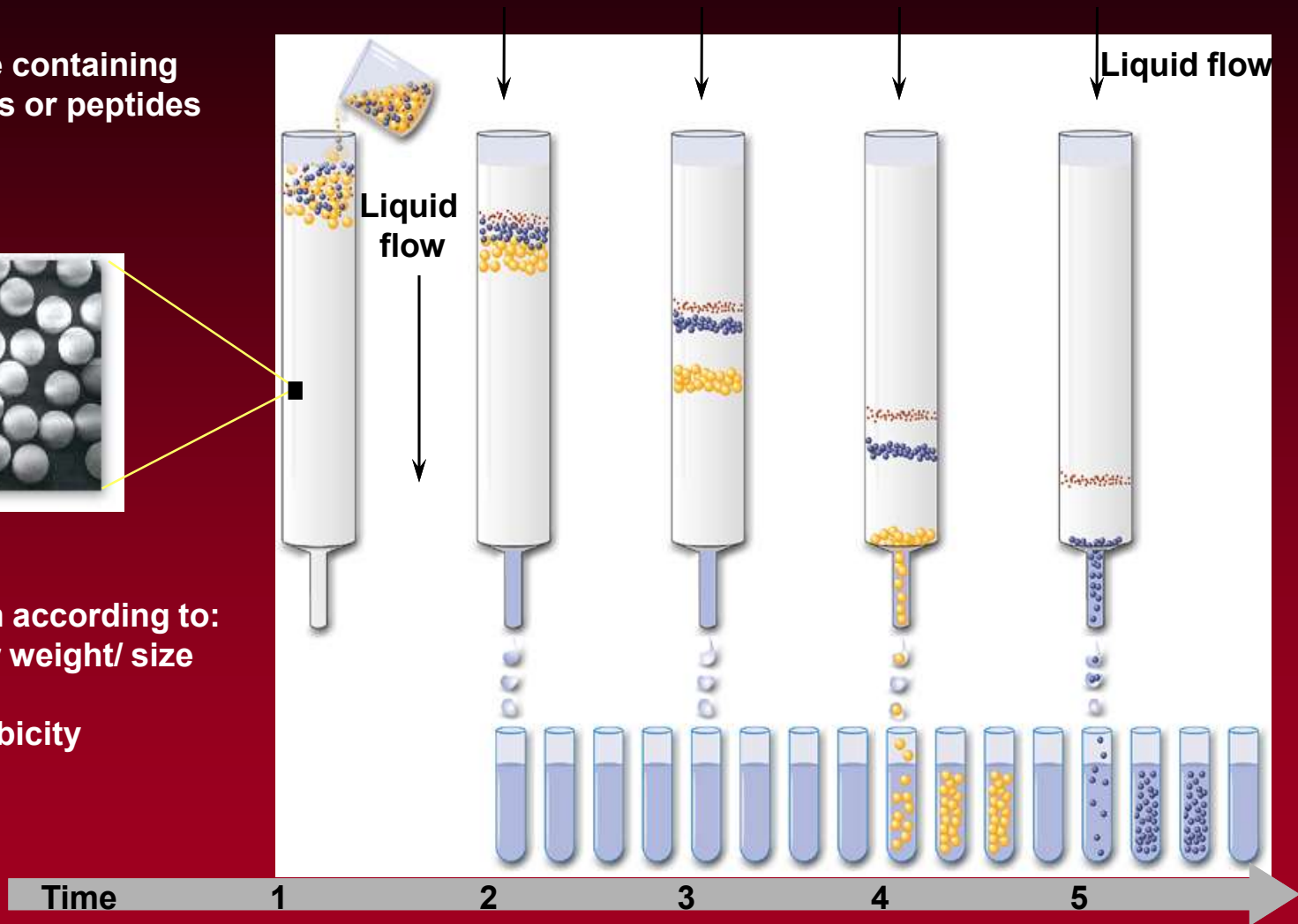


# Liquid Chromatography (LC)

Sample containing proteins or peptides



Separation according to:  
-molecular weight/ size  
-charge  
-hydrophobicity  
-affinity



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

# KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE (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 (Sepharose)
- polyakrylamid (Sepahacryl)
- silica - kyselina ortokřemičitá
- polystyren a jiné synt. polymery

# METODY Chromatografické SEPRACE BIOMOLEKUL

**VELIKOST**



**Gelová filtrace**  
(Size-exclusion chromatography)

**AKTUÁLNÍ NÁBOJ**



**Iontoměničová chromatografie**  
(Ion exchange chromatography)

**SPECIFICKÉ  
INTERAKCE**



**Afinitní chromatografie**  
(Affinity chromatography)

**HYDROFOBICITA**



**Chromatografie v reverzní fázi**  
(Reverse phase chromatography)

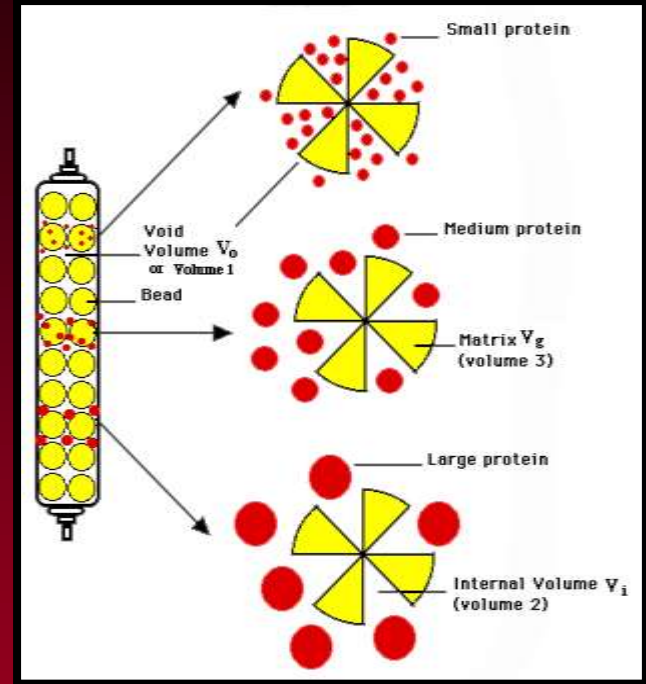
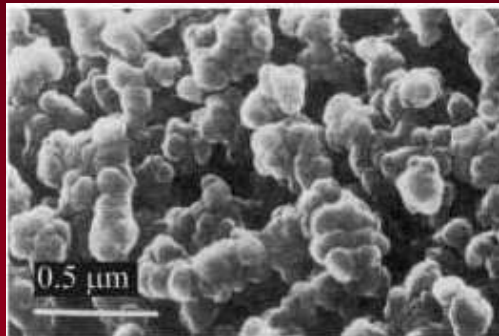
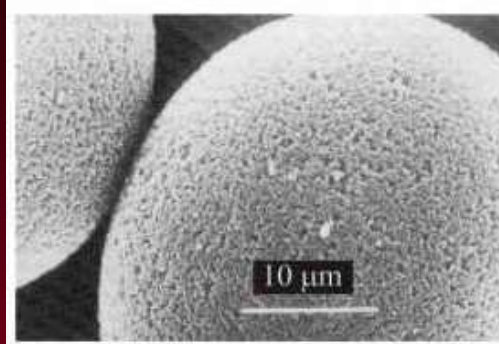
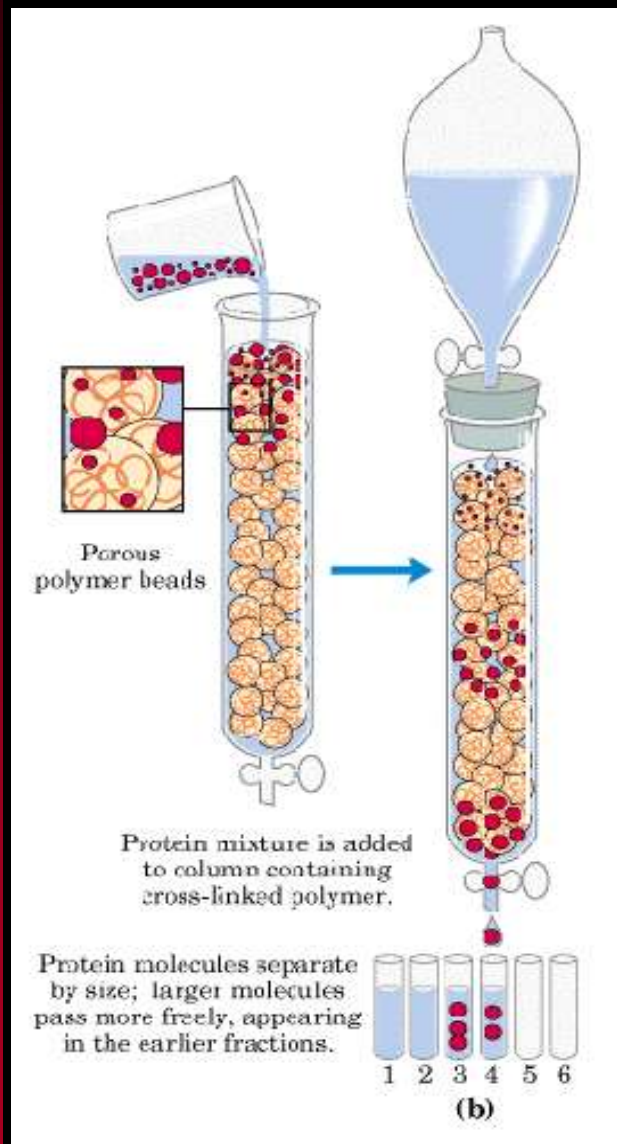
**HYDROFILNOST**



**Chromatografie hydrofilních interakcí**  
(Hydrophilic interaction LC)

# GELOVÁ FILTRACE

## SIZE-EXCLUSION CHROMATOGRAPHY GEL-PERMEATION CHROMATOGRAPHY



Částice se v porézní matrix rozdělují na základě velikosti

Lze provádět za nativních podmínek !

Separáčnı rozmezı až do 1000-2 000 000 Da

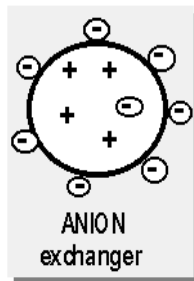
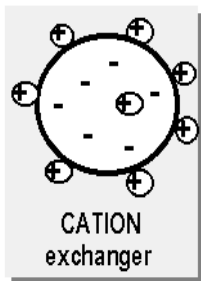
Vhodná pro proteiny a proteinové komplexy

# ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY

## IONTOMĚNIČOVÁ CHROMATOGRAFIE

- Dělí na základě aktuálního celkového náboje

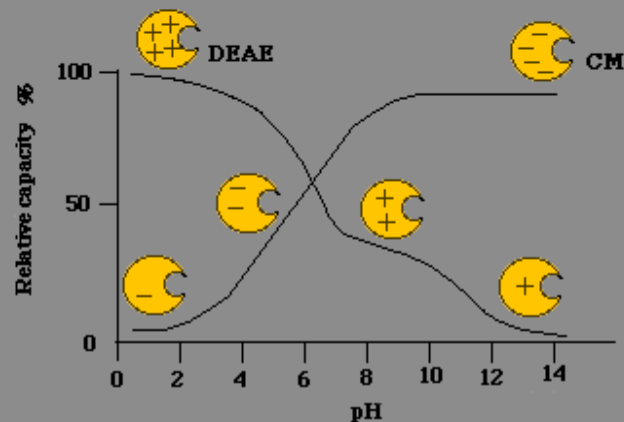
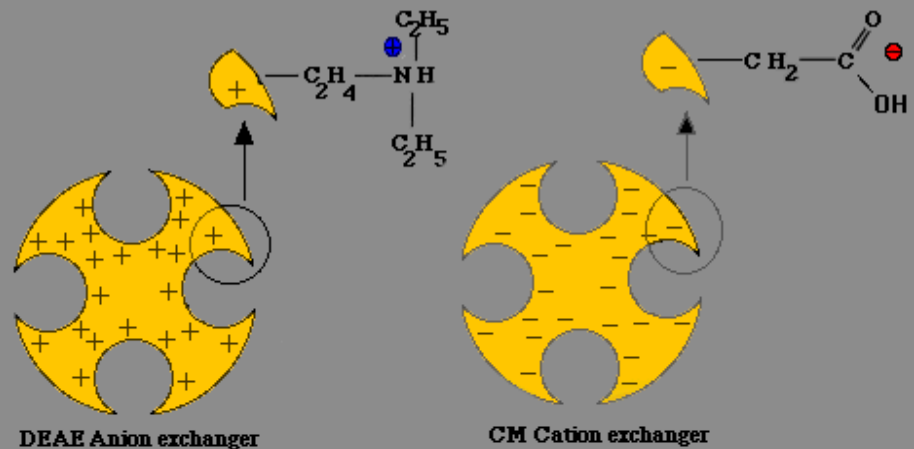
### Ion exchange resins



*Anex je pozitivně nabitý*

*Katex je negativně nabitý*

### Charge Properties of Ion Exchangers



Vhodná pro proteiny i peptidy

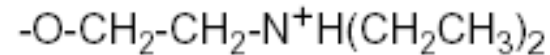


## Funkční skupiny iontoměničů

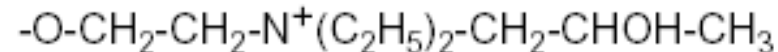
### Anion exchangers

### Functional group

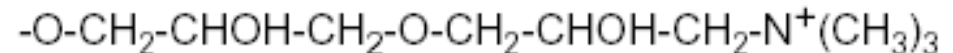
Diethylaminoethyl (DEAE)



Quaternary aminoethyl (QAE)



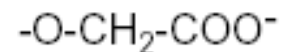
Quaternary ammonium (Q)



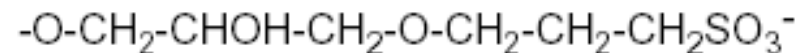
### Cation exchangers

### Functional group

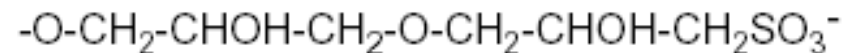
Carboxymethyl (CM)



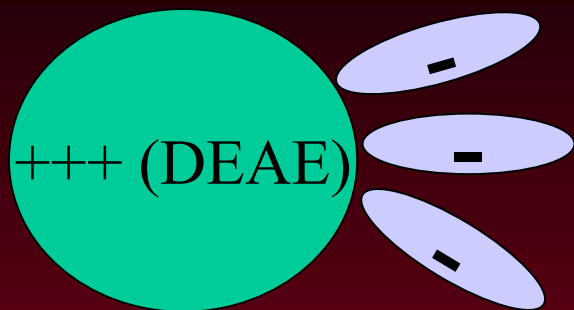
Sulphopropyl (SP)



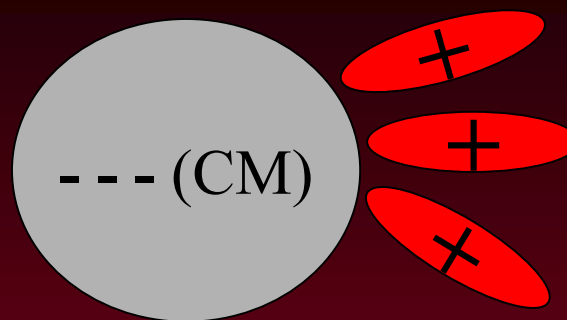
Methyl sulphonate (S)



# ANEX



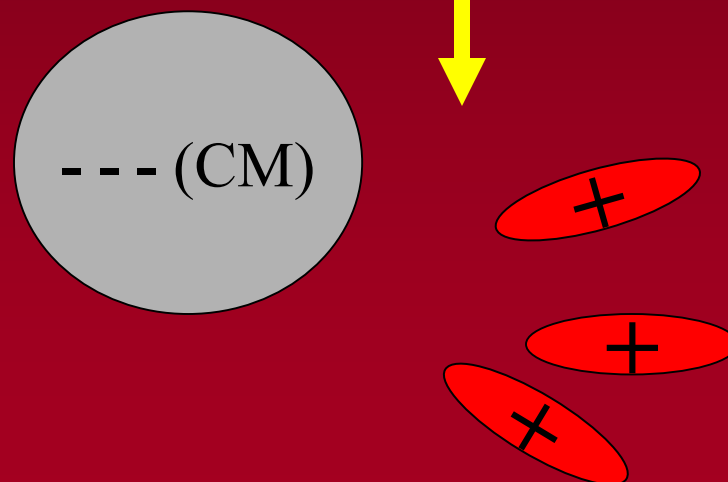
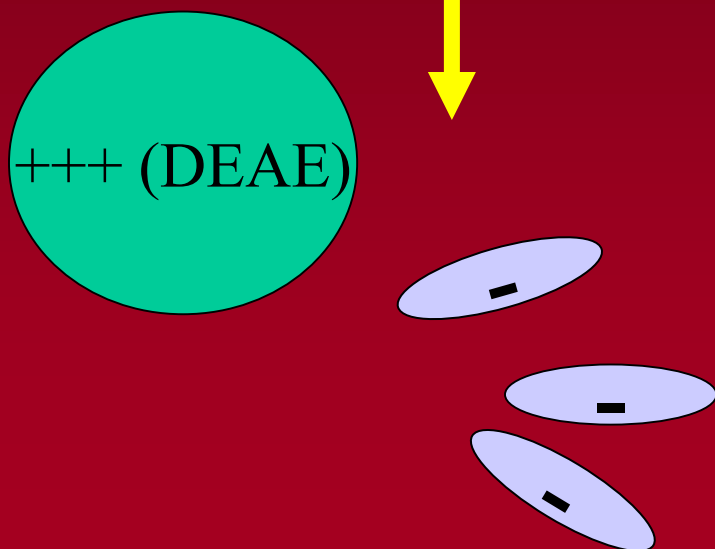
# KATEX



ELUCE:

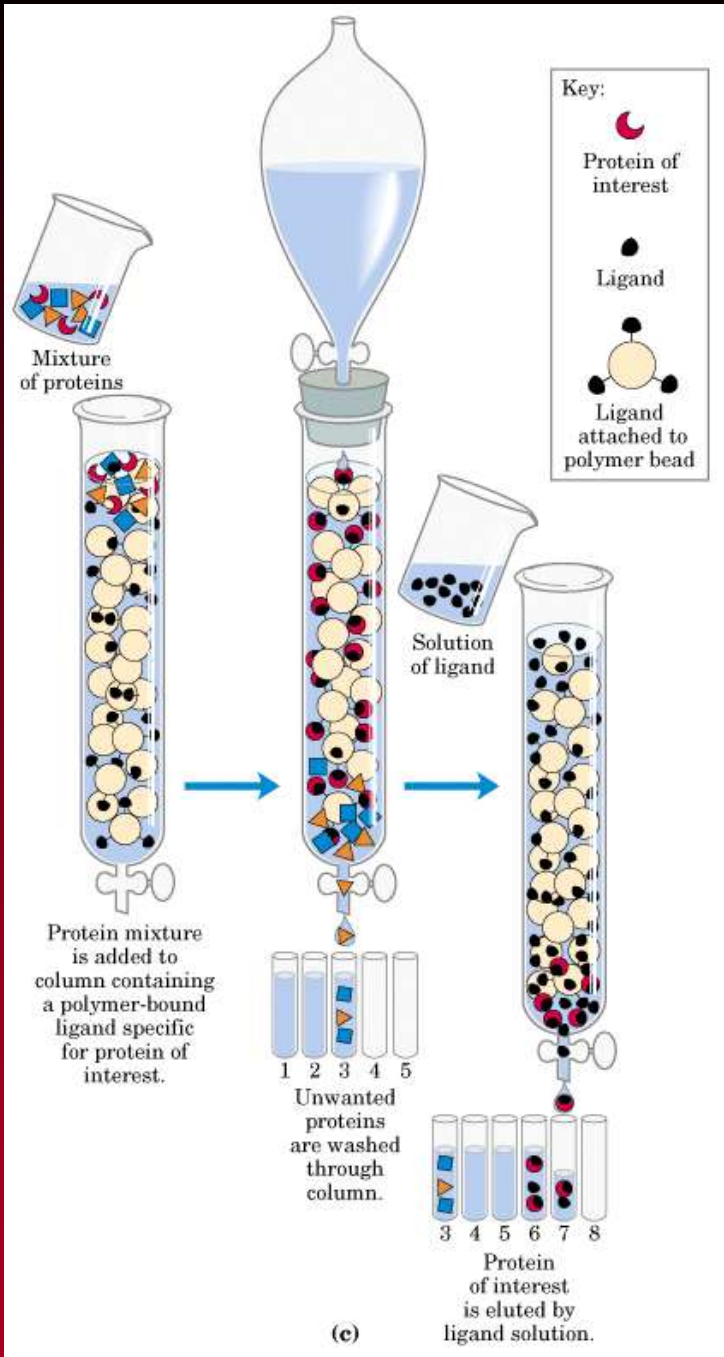
**Zvýšená iontová síla (snížení ES interakcí)**

Změna pH = chromatofokusace



# AFINITNÍ CHROMATOGRFIE

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



## Eluce:

- ligand
- pH
- iontová síla
- denaturační činidlo

Vhodná pro proteiny i peptidy

## AFINITNÍ MATRIX

### Aktivované matrice:

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

CNBr Sepharose.....lze vázat za aminoskupinu

EAH Sepharose .....lze vázat za karboxyl

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

### Matrice s afinitou pro IgG a některé další Ig (nekovalentní)

Protein G Sepharose

Protein A Sepharose

Protein A, G magnetic beads

### Matrice s afinitou pro glykoproteiny (nekovalentní)

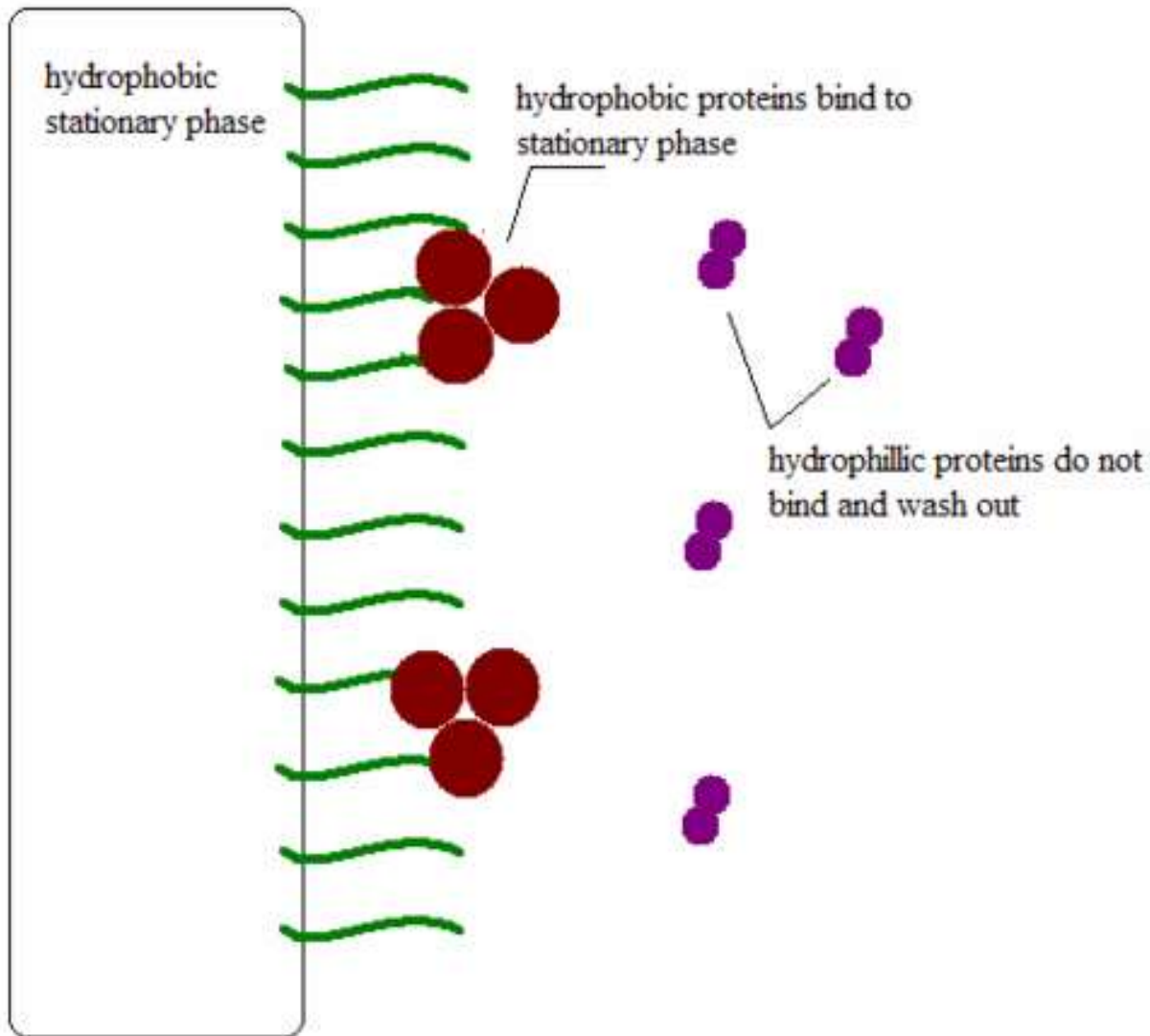
ConA Sepharose

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

Malé ligandy (nukleotid, NADP, hormon...) možnost vazby 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

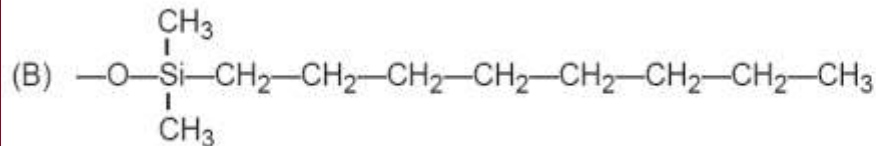
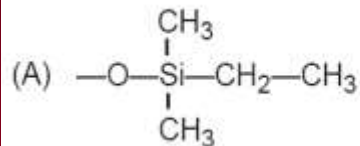


# REVERZNÍ FÁZE (REVERSE PHASE CHROMATOGRAPHY)

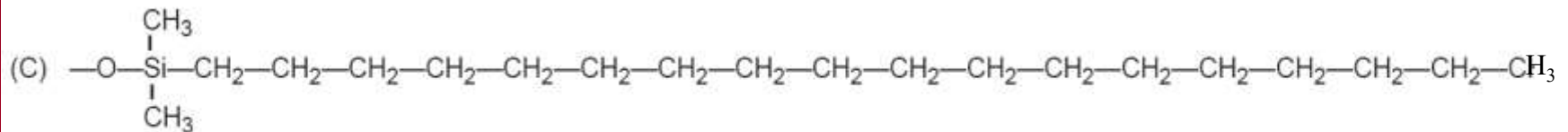
Dělení na základě interakce s hydrofobní matricí  
(na základě odlišné hydrofobicity peptidů/proteinů)

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

**Ligandy** – hydrofobní alifatické řetězce C2-C18, nebo jiné polymery



**C18**



Kompatibilita s MS!

Vhodná pro proteiny i peptidy

# HILIC – hydrophilic interaction liquid chromatography (chromatografie hydrofilních interakcí)

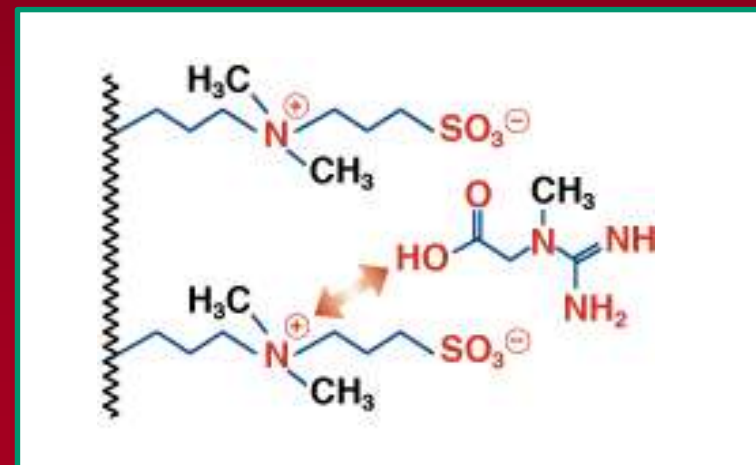
## Dělí analyty na základě polárních interakcí

Stacionární fáze – polární, retenční čas roste s polaritou analytu

Mobilní fáze – organické rozpouštědlo, eluce zvyšující se polaritou  
(podílem vody a/nebo soli)

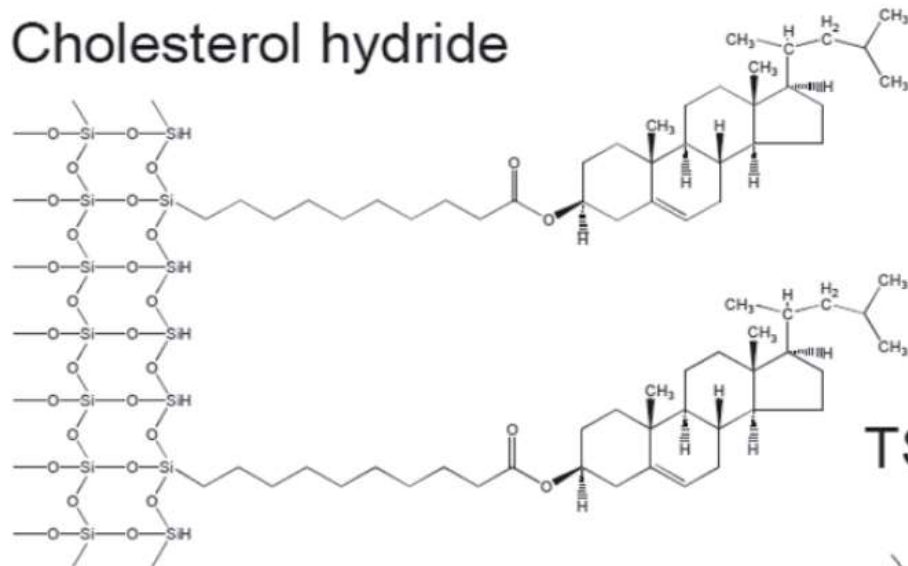
*Komplexní proces - Podílí se více typů interakcí a mechanismů separace*

Polární interakce OH skupiny na  
peptidu s polární skupinou  
stacionární fáze



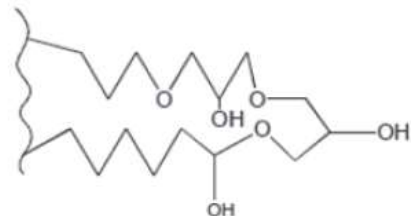
Vhodná pro proteiny i peptidy

Cholesterol hydride

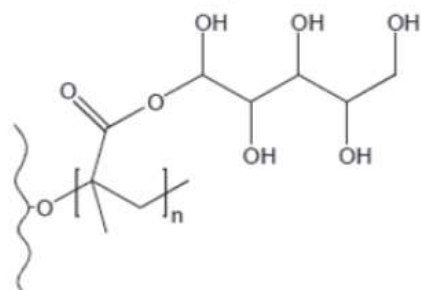


HILIC matrix

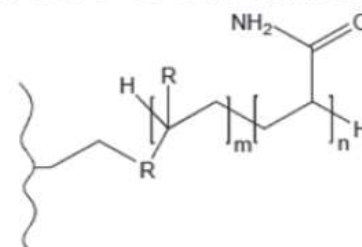
Cross-linked diol



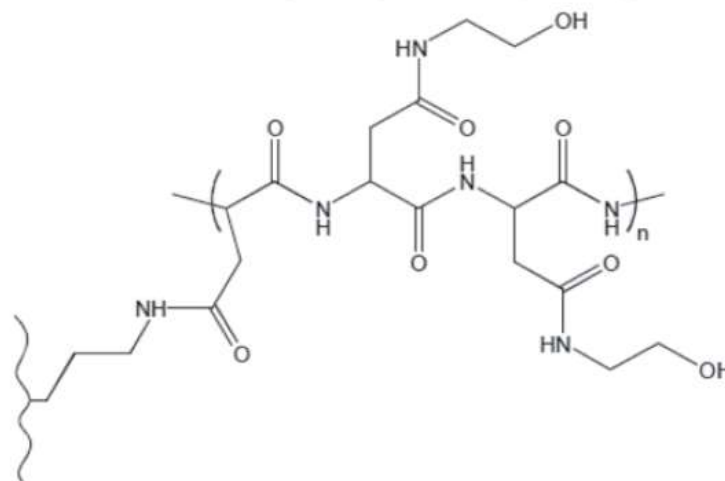
Sorbitol methacrylate-silica



TSK-Gel Amide-80



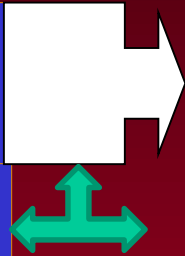
Silica - Poly Hydroxyethyl A



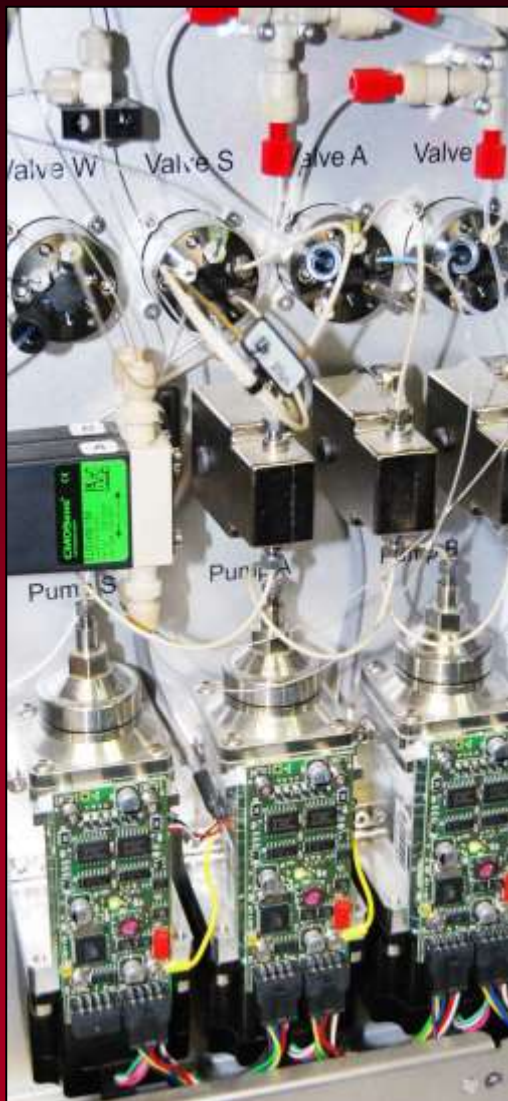
# HPLC podle průtoku

Vnitřní průměr  
kolony

Průtok

<b>Nano HPLC</b>	20-100 $\mu\text{m}$	20-10000 nL/min		<b>On-line MS</b>
<b>Capillary HPLC</b>	100-100 $\mu\text{m}$	0.4-200 $\mu\text{L}/\text{min}$		
<b>Micro HPLC</b>	1.0-2.1 mm	50-1000 $\mu\text{L}/\text{min}$		
<b>Normal HPLC</b>	4.0-5.0 mm	1.0 -10.0 mL/min		

# HPLC



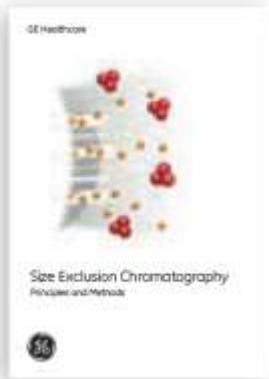
# Macrotrap



# Zip-Tips



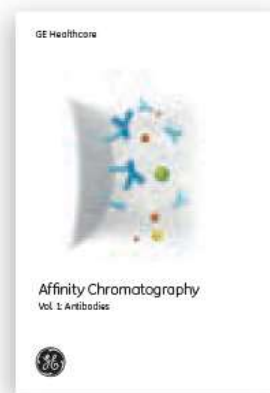




## Size Exclusion Chromatography

### Principles and Methods

18102218



## Affinity Chromatography

### Vol. 1: Antibodies

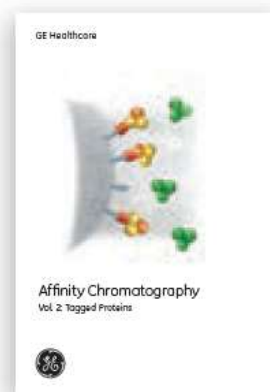
18103746



## Ion Exchange Chromatography

### Principles and Methods

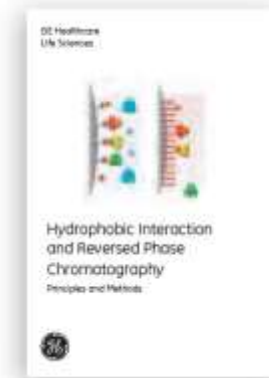
11000421



## Affinity Chromatography

### Vol. 2: Tagged Proteins

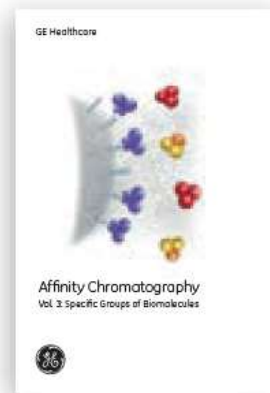
18114275



## Hydrophobic Interaction and Reversed Phase Chromatography

### Principles and Methods

11001269



## Affinity Chromatography

### Vol. 3: Specific Groups of Biomolecules

18102229

# SEPARAČNÍ METODY

- CHROMATOGRRAFIE
  - Gelová filtrace, SEC
  - Iontoměničová chromatografie
  - Afinitní chromatografie
  - Chromatografie v reverzní (obrácené) fázi
  - HILIC (chromatografie hydrofilních interakcí)
- ELEKTROFORÉZY, 2-DE

# Elektroforéza

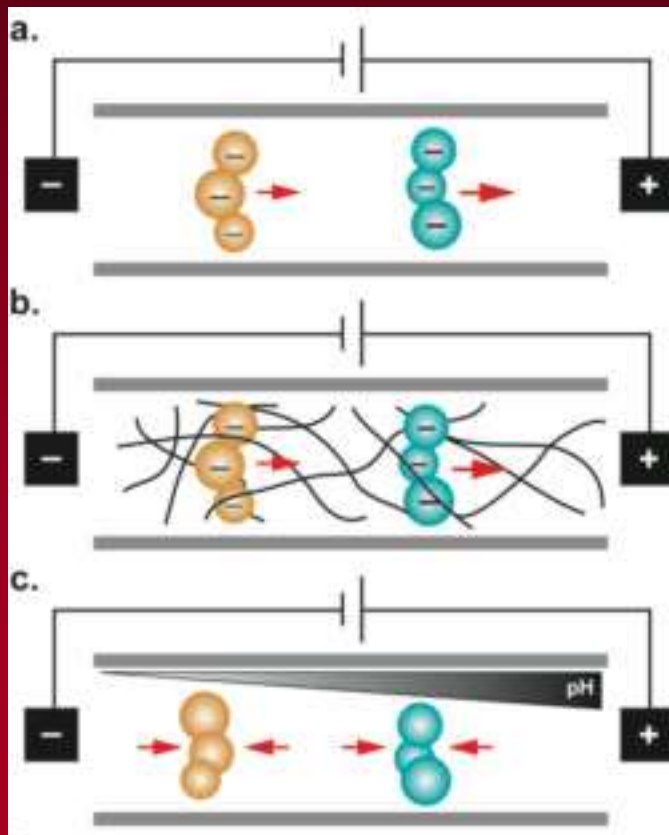
Specifická mobilita

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

$z$  - náboj

$\eta$  viskozita

$r$  Stokesův poloměr částice



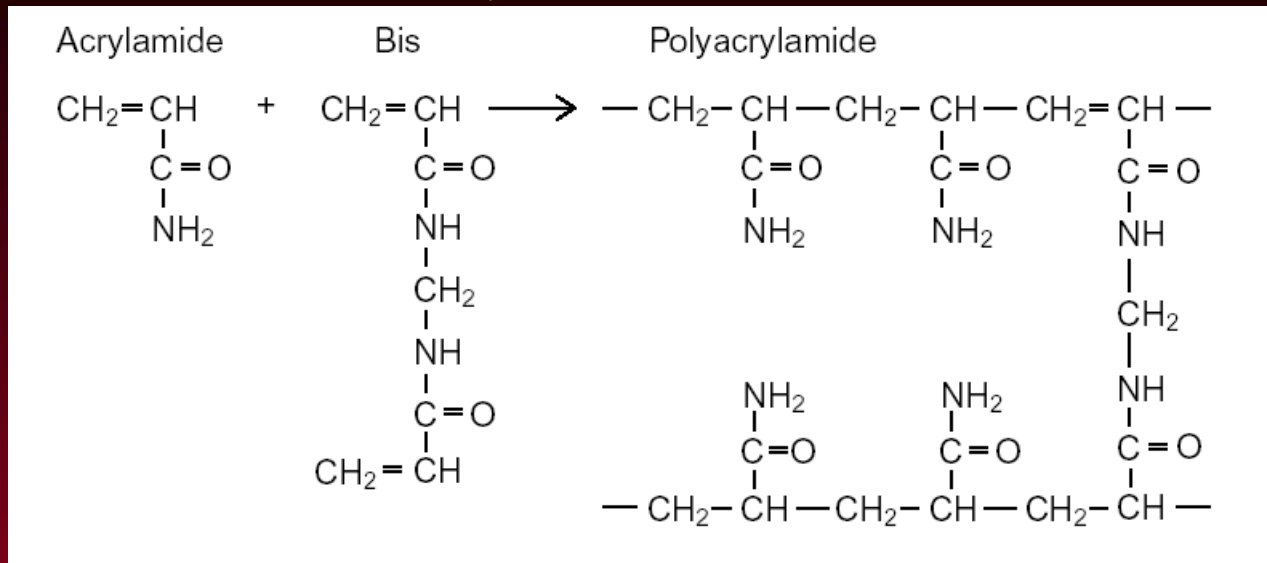
Elektroforéza v roztoku

Elektroforéza v gelu

Izoelektrická fokusace

# POLYAKRYLAMIDOVÉ GELY

1959 *Raymond and Weintraub*



## Složení a příprava gelu:

- **akrylamid** (monomerní) **NEUROTOXIN !**
- **bis-akrylamid** (zesíťování polymeru) **NEUROTOXIN !**
- **APS** (peroxodisíran amonný, katalyzátor, produkuje volné radikály),
- **TEMED** (tetramethylethylendiamin, 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.

Lämmli gels tris-glycine

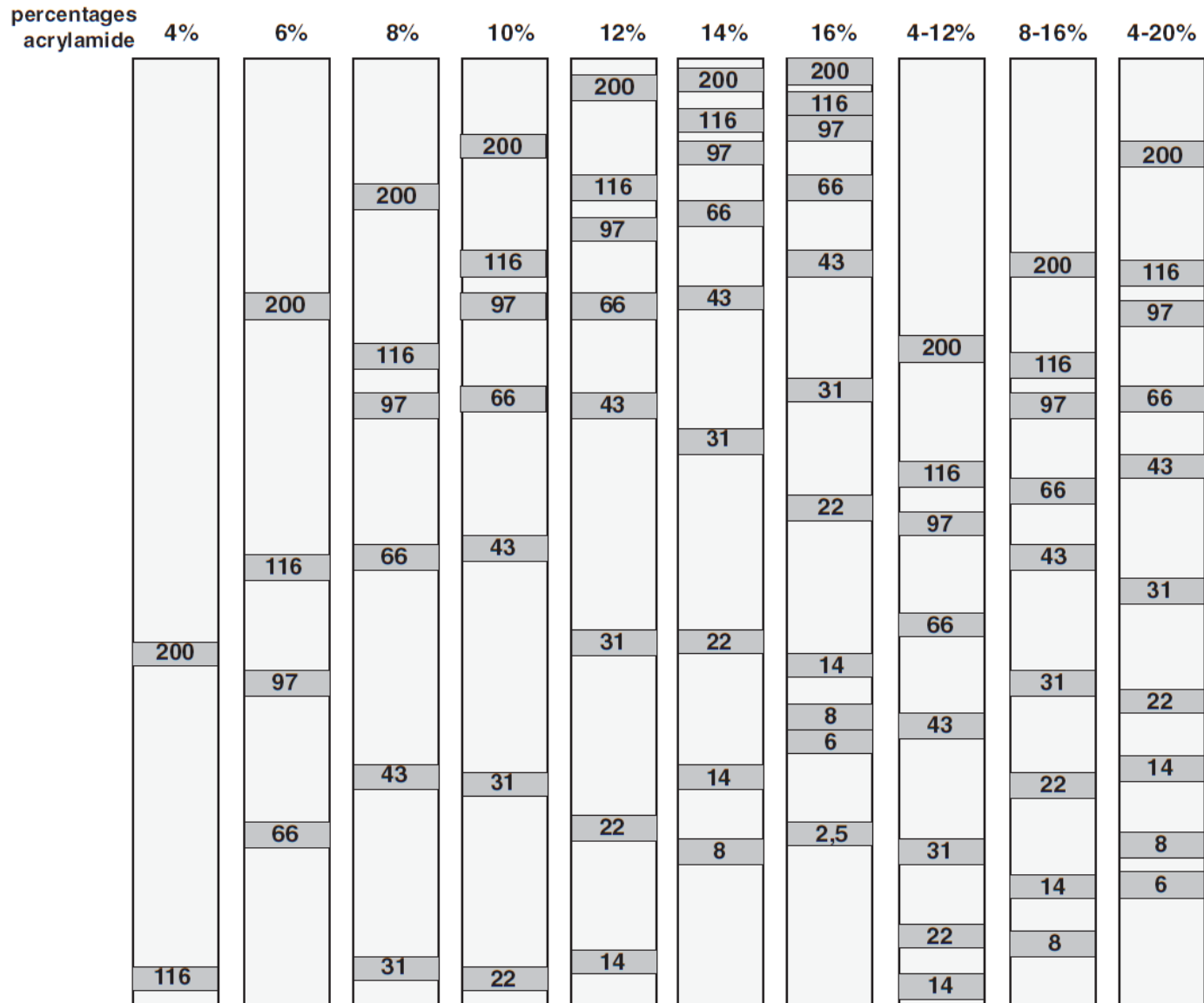
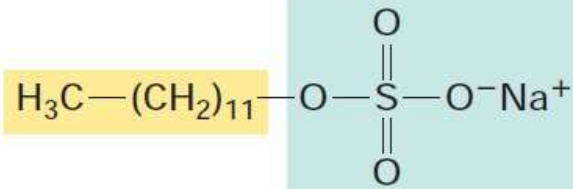


Figure 1.2. Run speed of MW markers in SDS gels.

# SDS ELEKTROFORÉZA

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

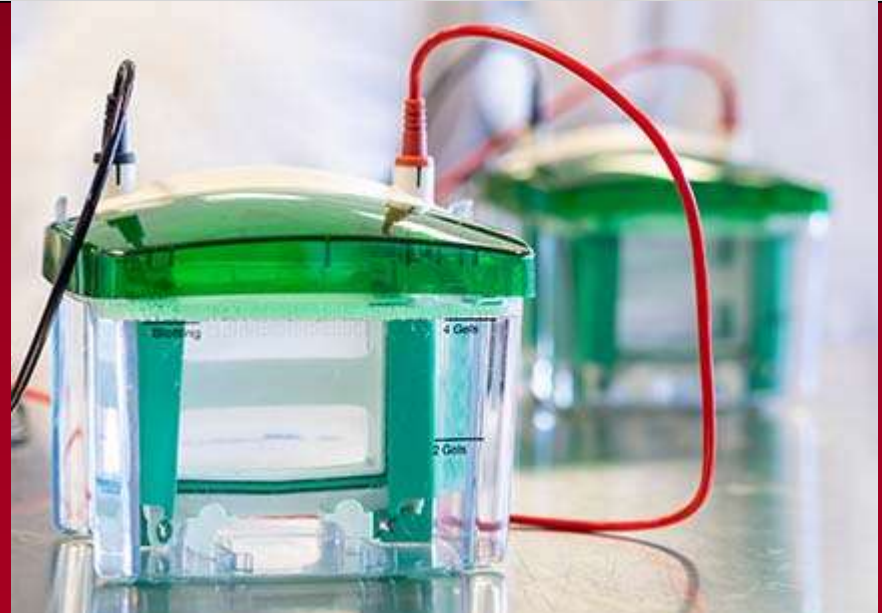
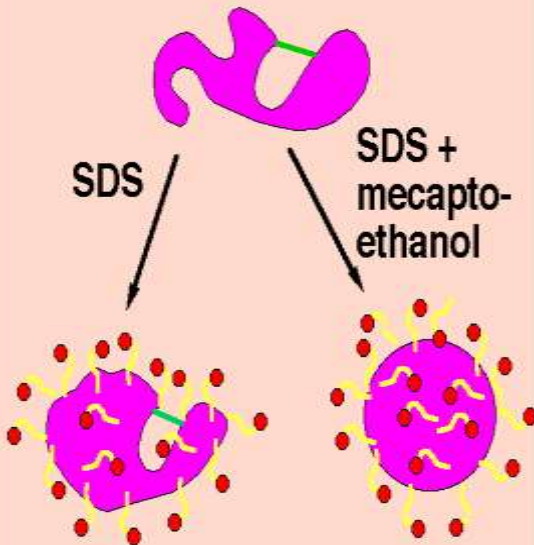


•Bílkoviny se rozdělují na základě jejich MW

•Záporně nabitě SDS tvoří komplexy s bílkovinami 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



# **Dvojrozměrná elektroforéza, 2-DE**

(proteomika 1990-2010)



1975

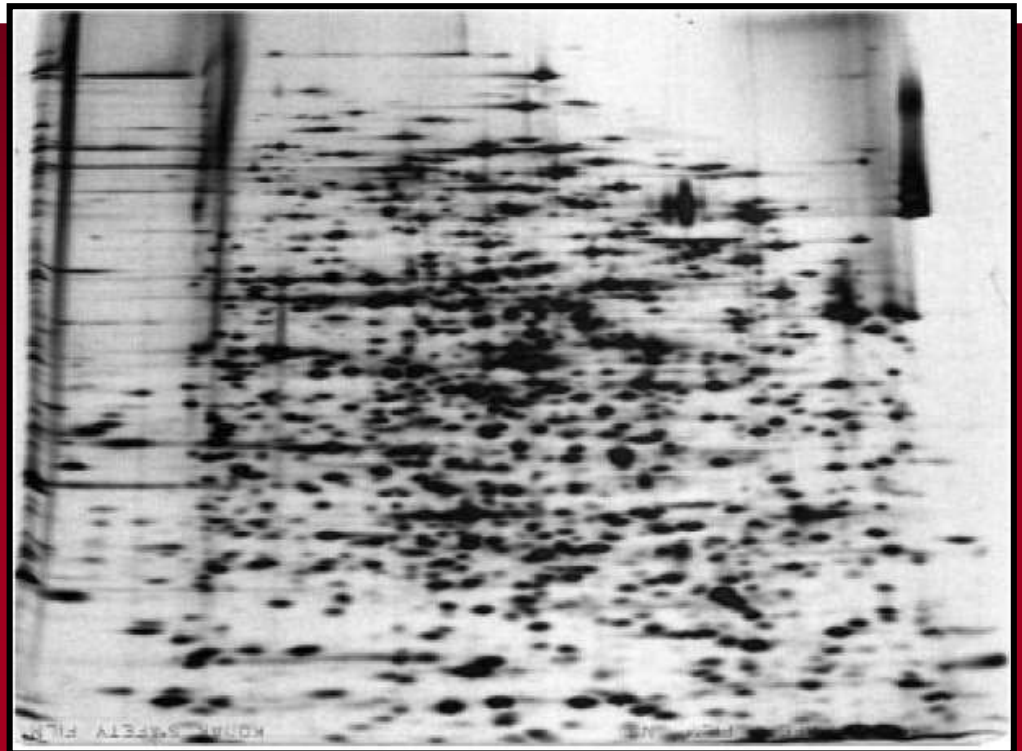
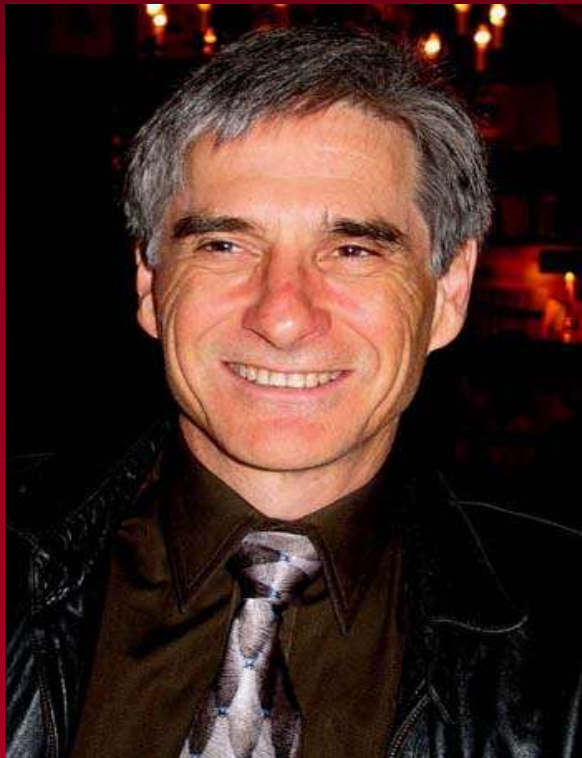
# High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins\*

(Received for publication, September 5, 1974)

PATRICK H. O'FARRELL†

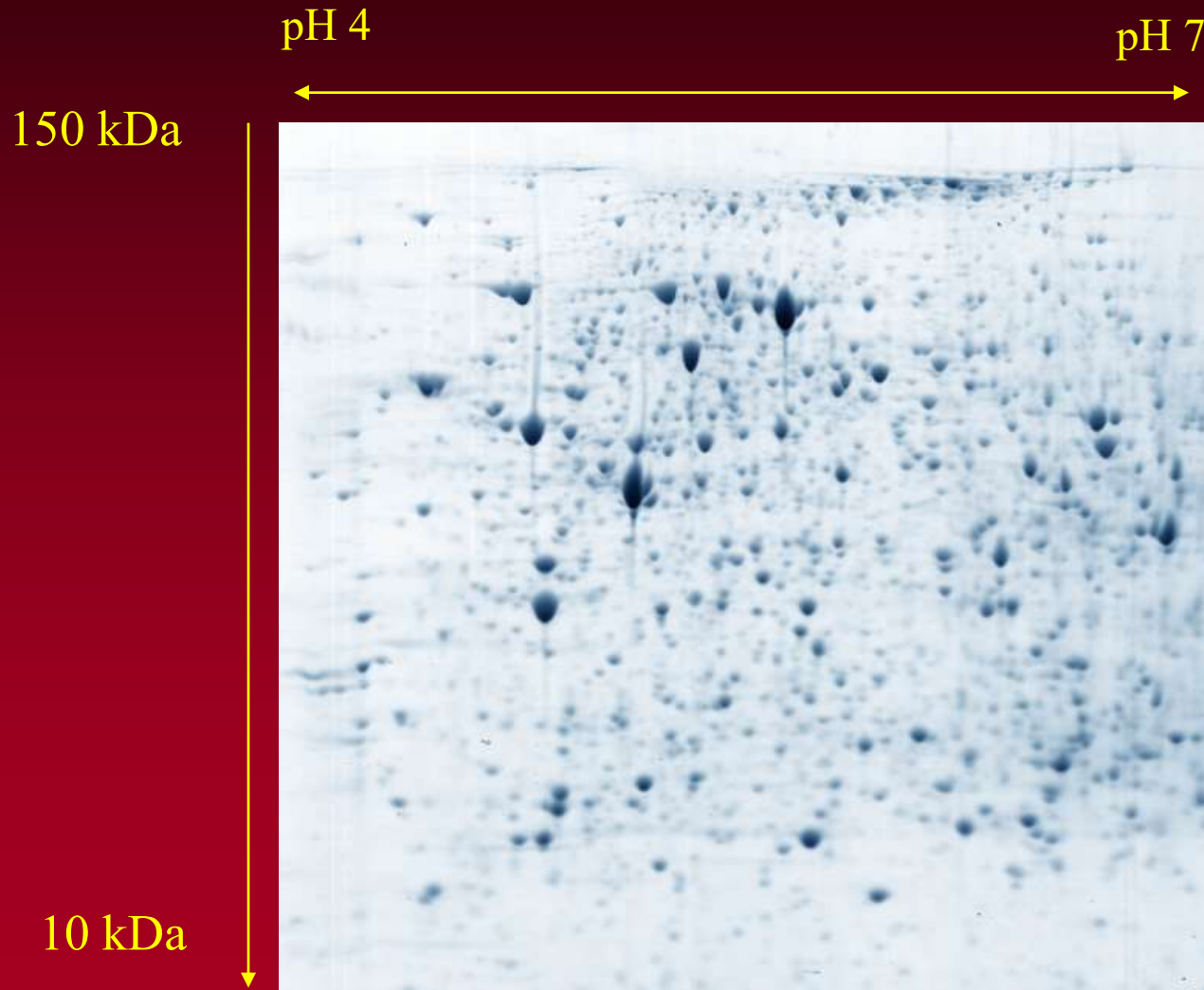
*From the Department of Molecular, Cellular and Developmental Biology, University of Colorado, Boulder,  
Colorado 80302*

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



## DVOJROZMĚRNÁ ELEKTROFORÉZA (2-DE)

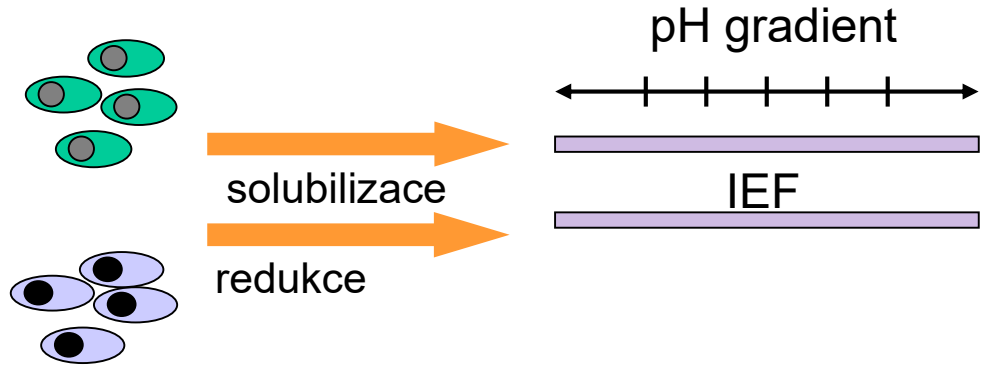
Rozděluje proteiny nejdříve podle jejich **náboje** a následně kolmo na směr původní migrace dle jejich **MW**



**Jaterní homogenát,**

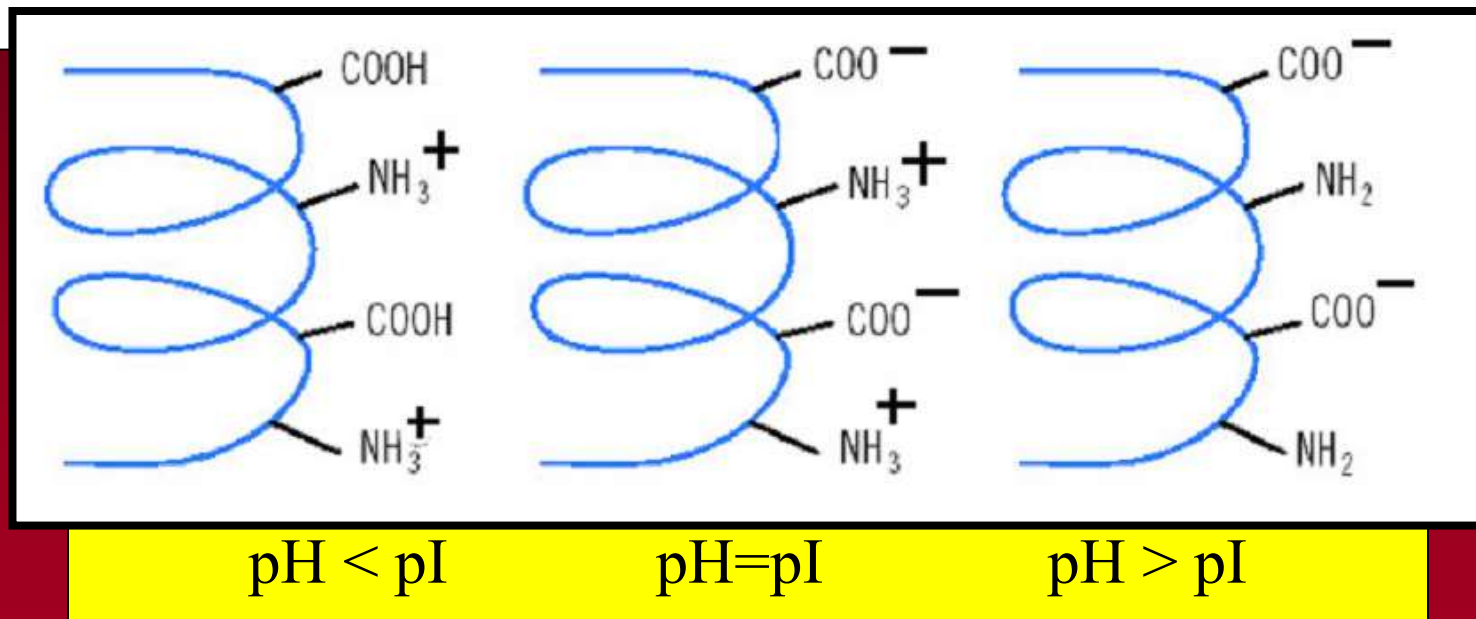
**1025 proteinových  
skvrn**

# Typický 2-DE experiment (cca 1990-2010)



# 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.
- Bílkovina/peptid v elektrickém poli v gradientu pH migruje do bodu, kde je její/jeho celkový náboj rovný nule.
- pH tohoto bodu odpovídá izoelektrickému bodu (pI) dané bílkoviny/peptidu.



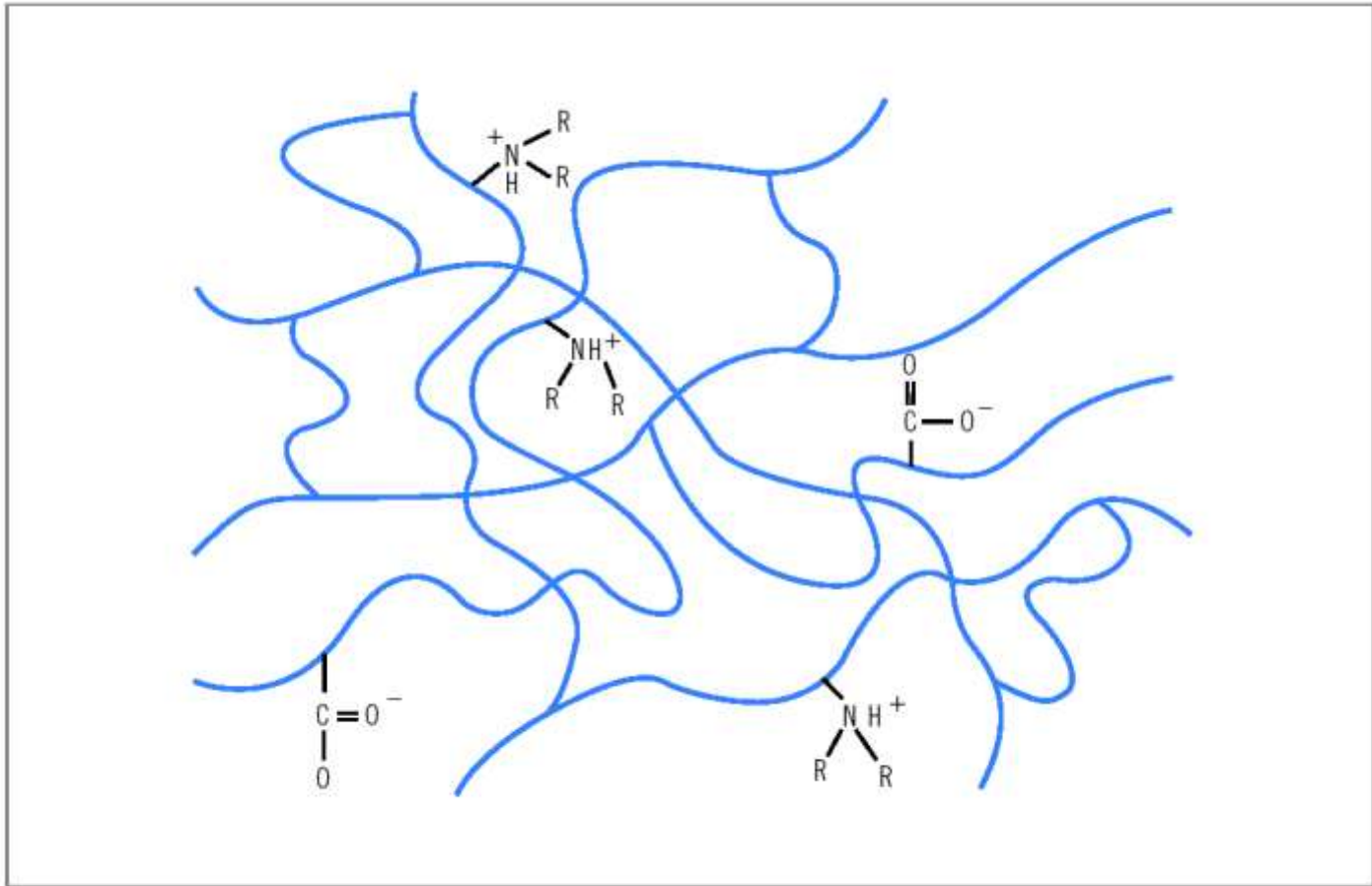
migruje k -

migruje k +



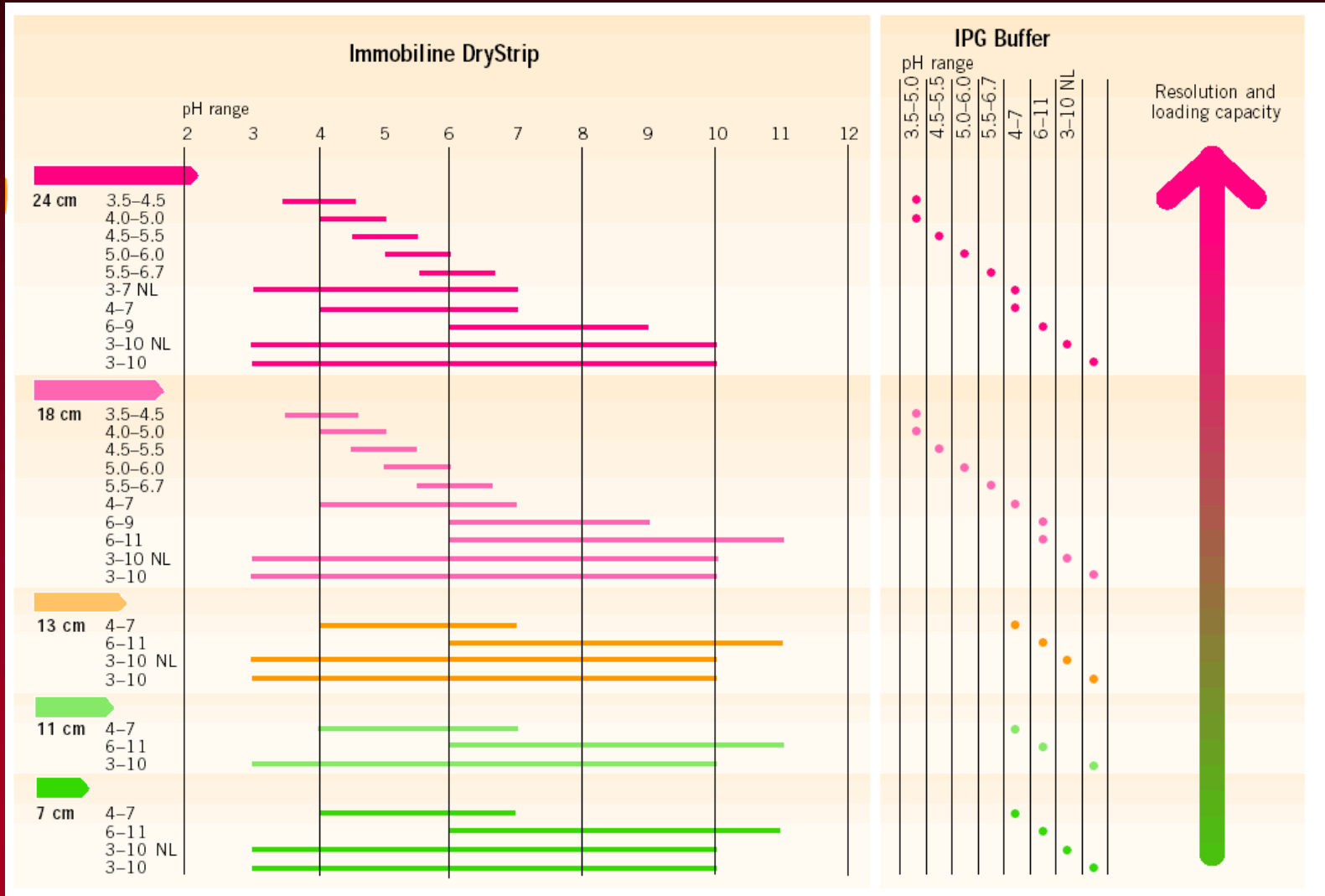
# ZAKOTVENÉ PH GRADIENTY (IMMOBILIZED pH GRADIENTS – IPG)

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.

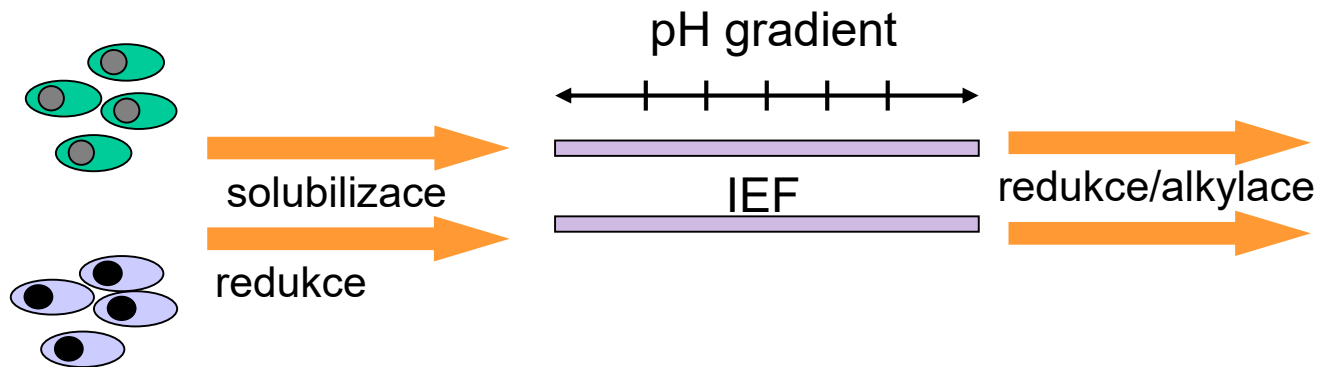




# INSTRUMENTACE IEF

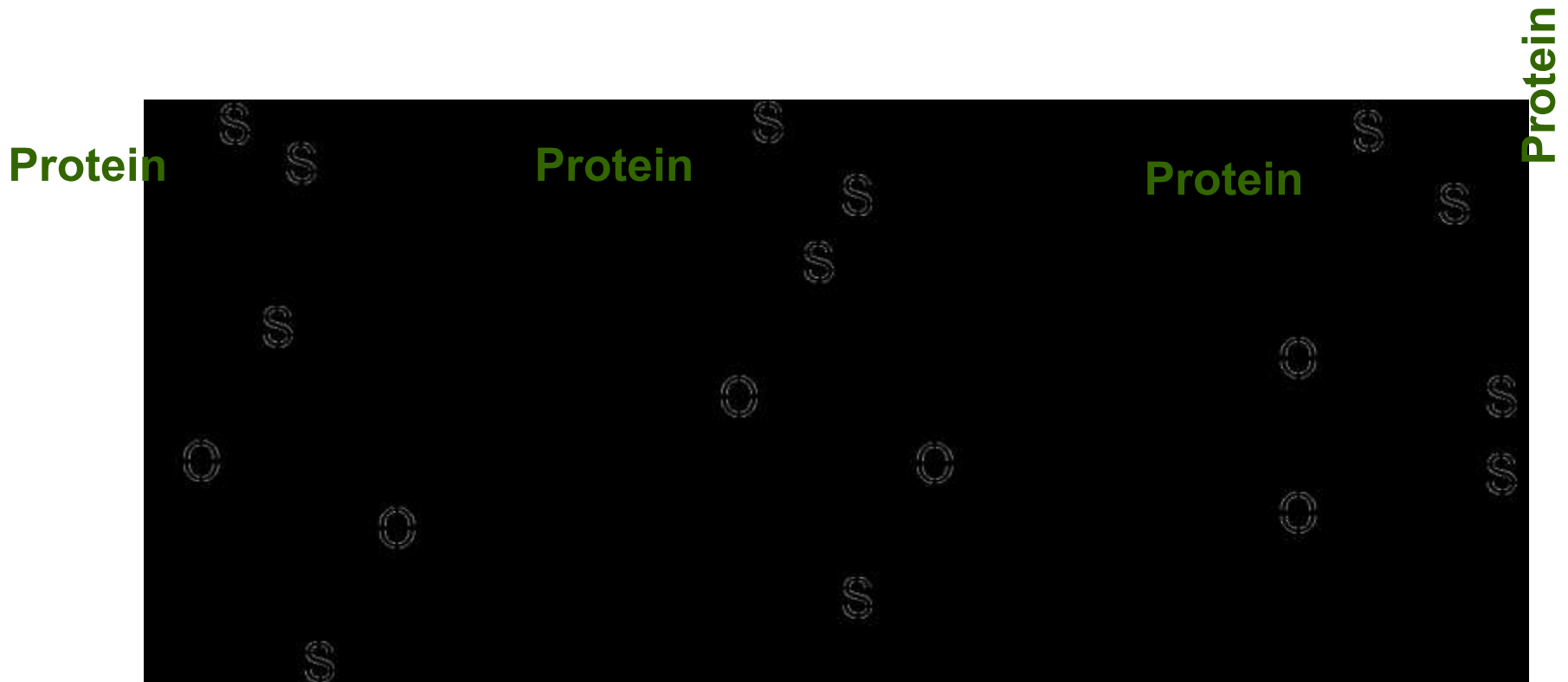


# Typický 2-DE experiment (cca 1990-2010)



# Redukce disulfidických vazeb

Thiol-disulfidová výměna DTT s proteinem



# Alkylace cysteinů iodacetamidem



The diagram shows a horizontal black bar representing a protein chain. On the left side, the word "Protein" is written in green text with a white background. On the right side, the word "Protein" is also written in green text with a white background. A red rectangular box is drawn around a portion of the black bar, located towards the right side of the image.

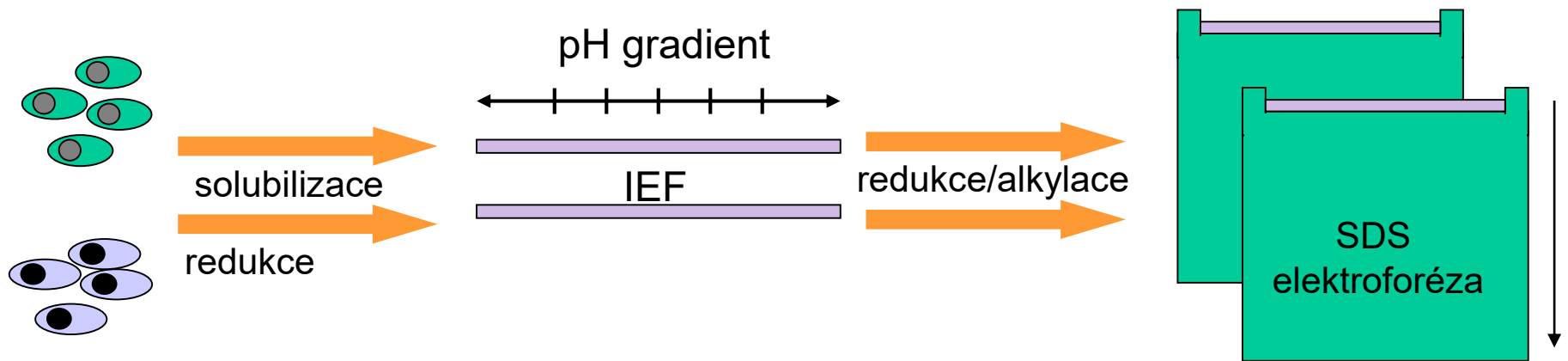
Protein

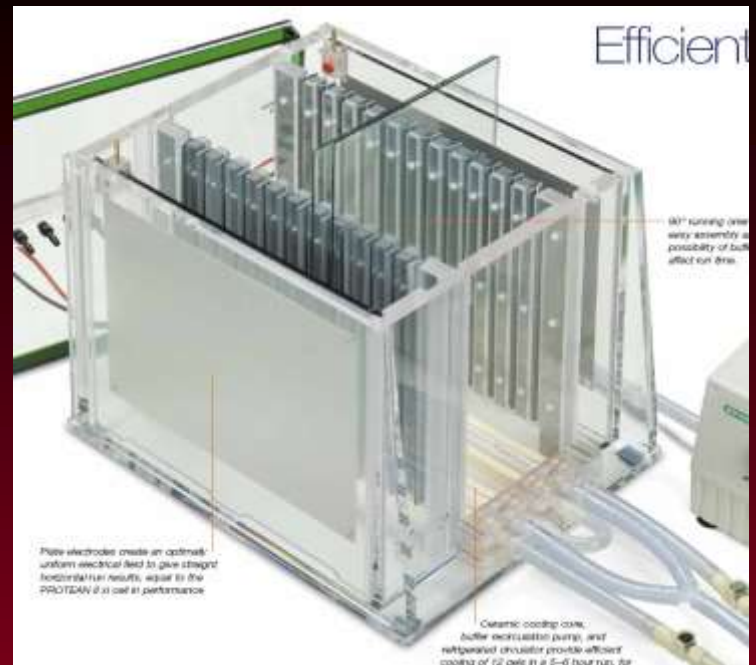
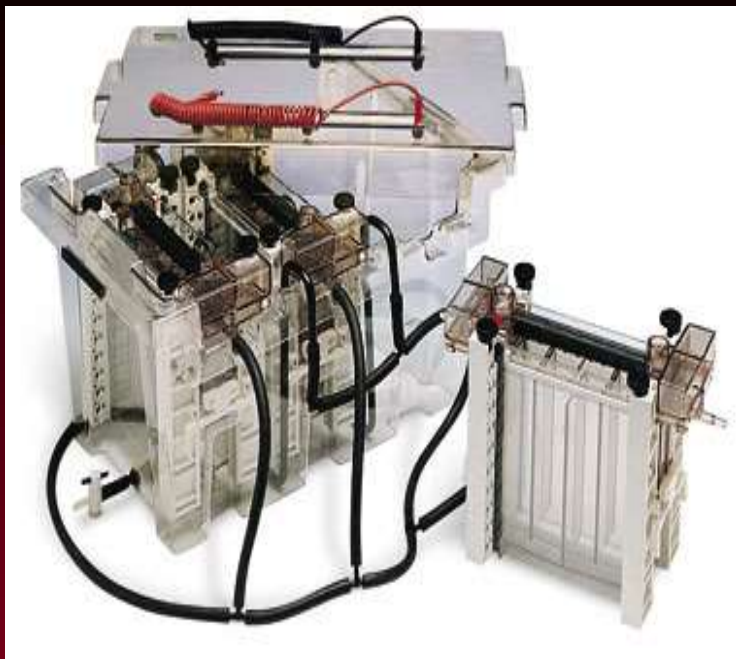
Protein

iodacetamid

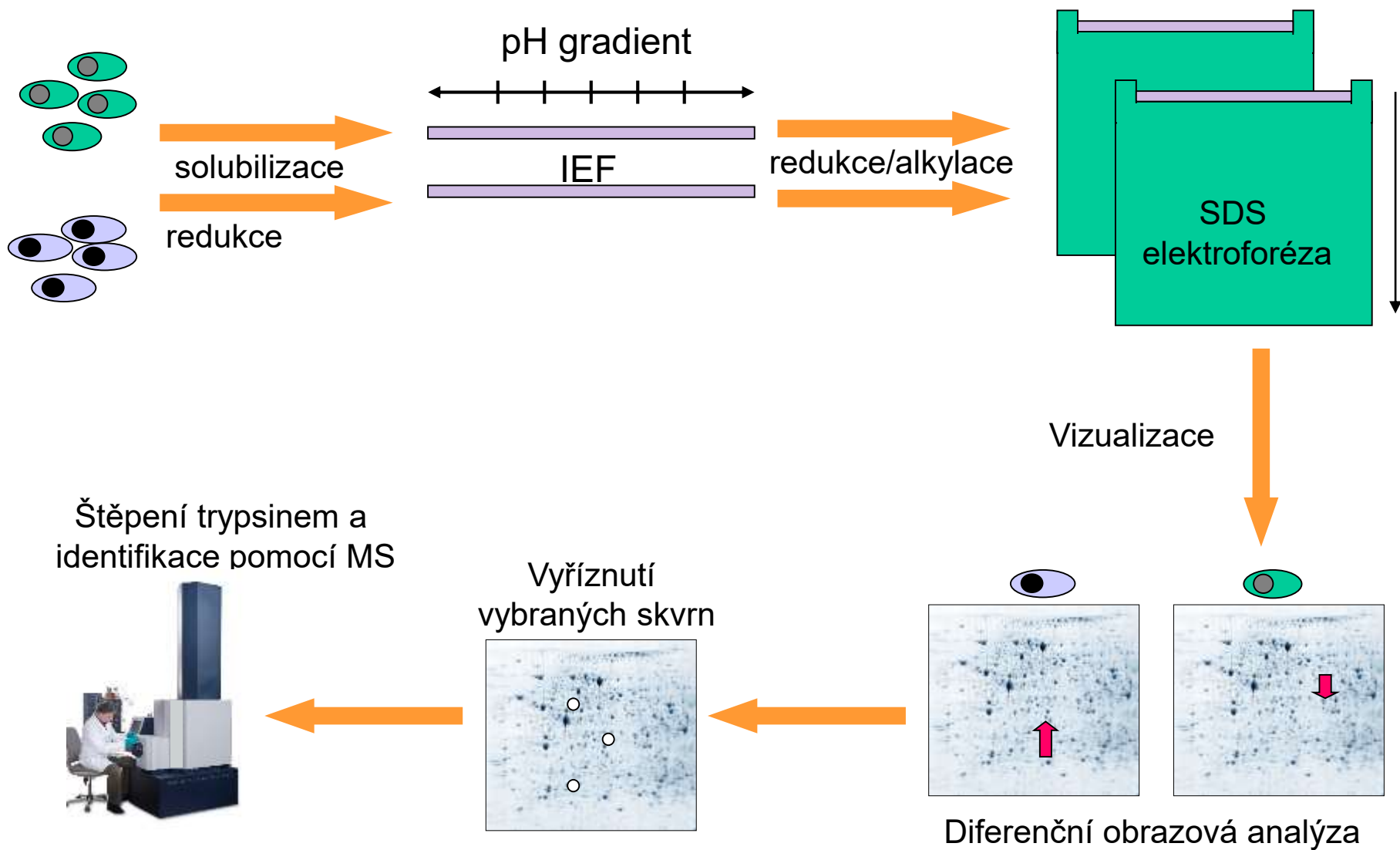
Karbamidometyl

# Typický 2-DE experiment





# Typický 2-DE experiment





# DETEKCE a VIZUALIZACE BÍLKOVIN V GELECH

- Citlivost
- Možnost kvantifikace
- Linearita signálu
- Dynamický rozsah
- Kompatibilita s MS
- Cena

## Kolorimetrické „viditelné“ barvení

- CBB
- Stříbro

## Fluorescenční barvení A DIGE

- Sypro
- Deep Purple
- Flamingo
- Krypton
  
- DIGE

# 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

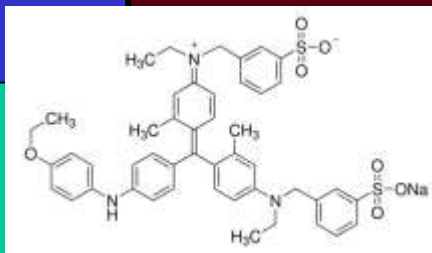
Alkohol-kyselina  
Odbarvování proteinů  
Špatná kvantifikace  
Nízká cena

**G 250**

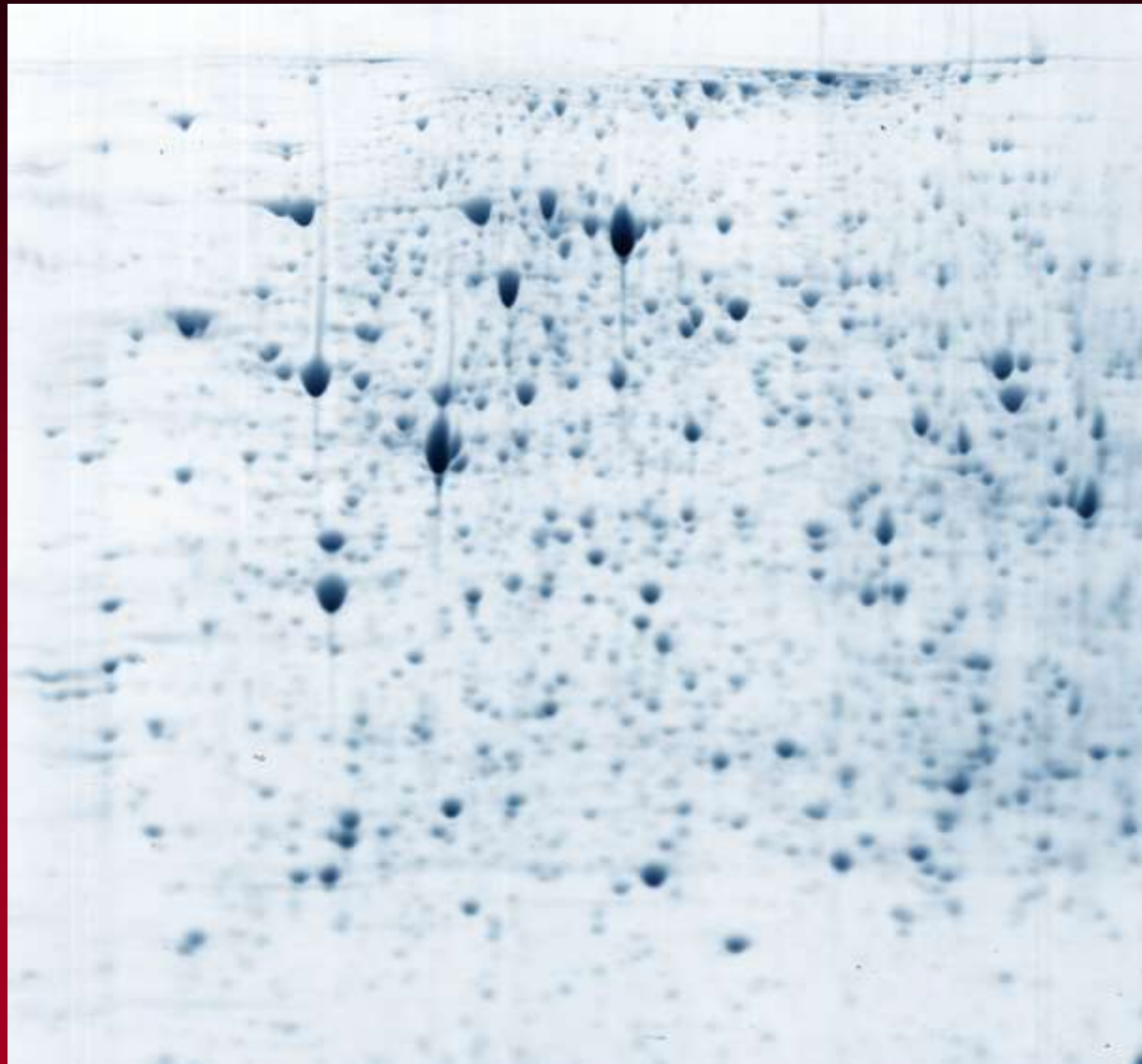
**KOLOIDNÍ CBB  
(CBB-G250)**

Citlivost 10-30 ng

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



**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,

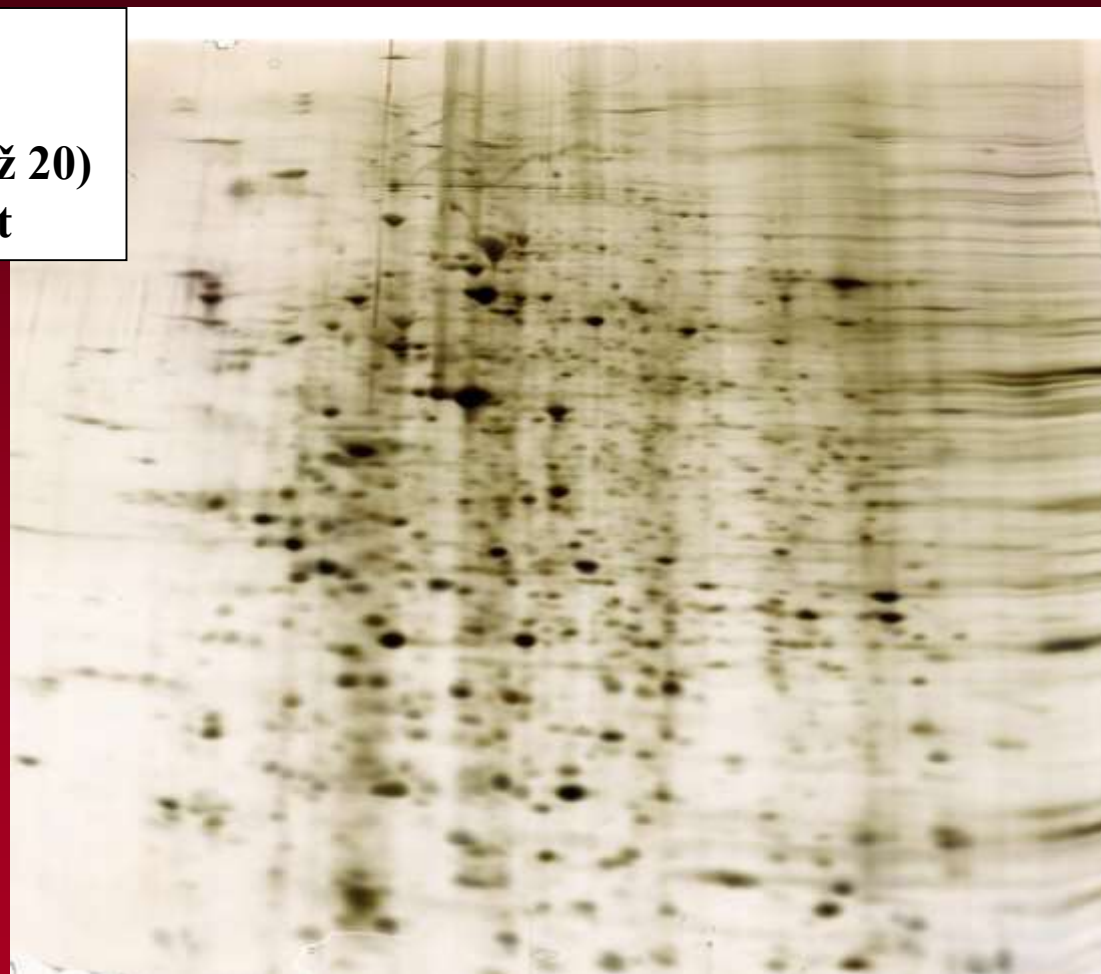
barví : Lys, Arg, His, Tyr, Trp

**Citlivost 0.5 ng !**

**nízká cena**

**Vícekový postup (až 20)**

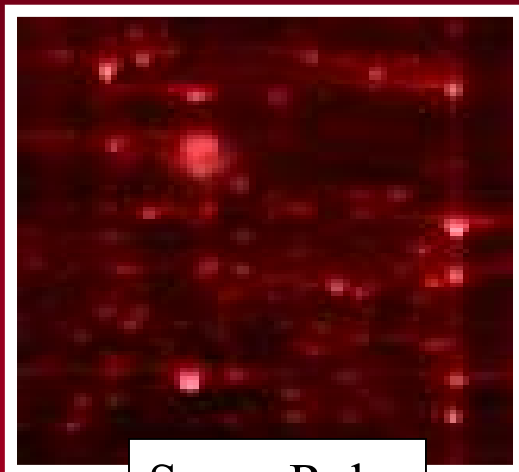
**Citlivý na přesnost**



# 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, ta se váže na bazické AA a Tyr, Trp)



Sypro Ruby

**SYPRO RUBY** (Molecular Probes)

**FLAMINGO** (BIO-RAD)

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

**KRYPTON** (Pierce)

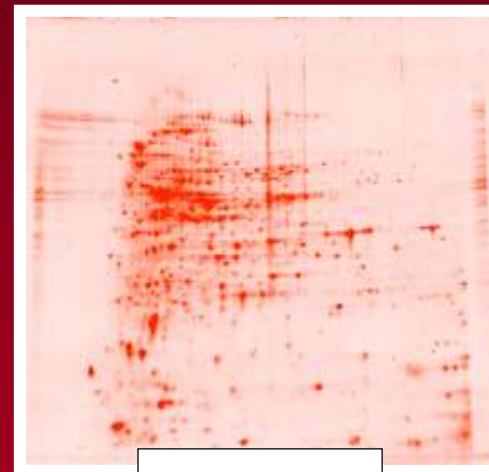
Dobrá kvantifikace

Minimum kroků

Dynamický rozsah

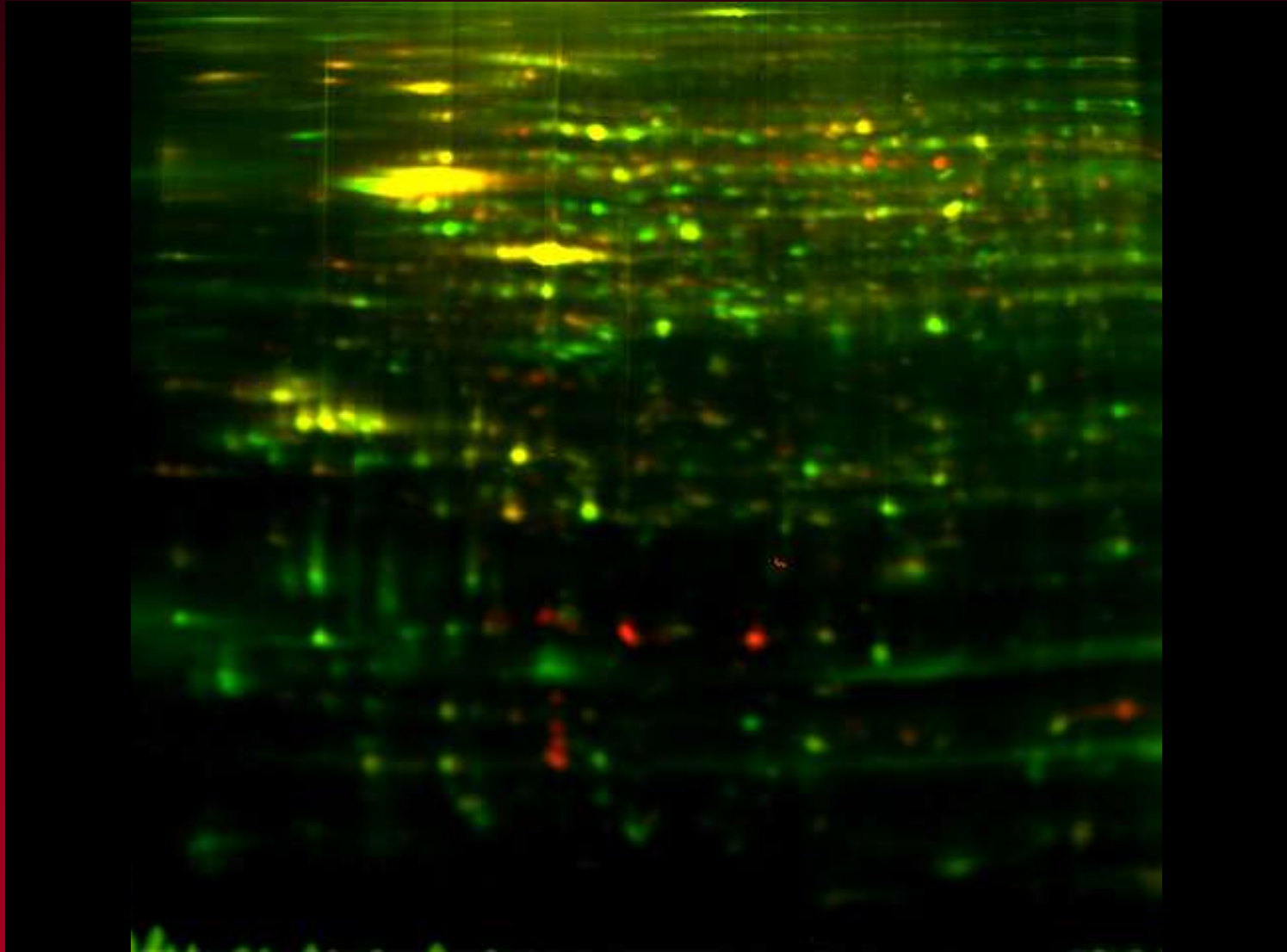
Fluorescenční scanner

CCD kamera



Flamingo

# DIGE - Differential gel electrophoresis

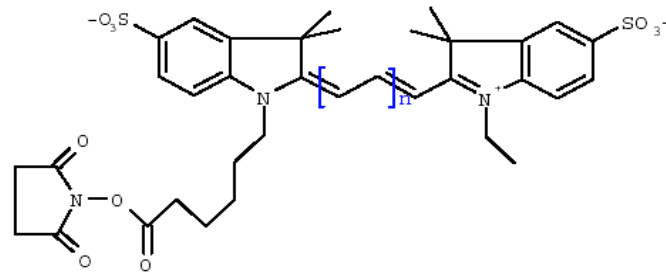


# 2D-DIGE : 2D DIFFERENČNÍ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA

(Cy2, Cy3, Cy5 Difference gel electrophoresis)

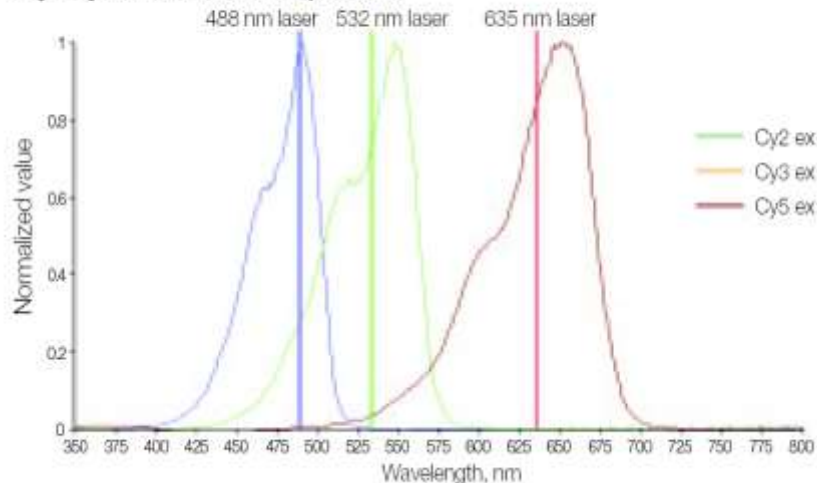


## Cyaninové fluorofory

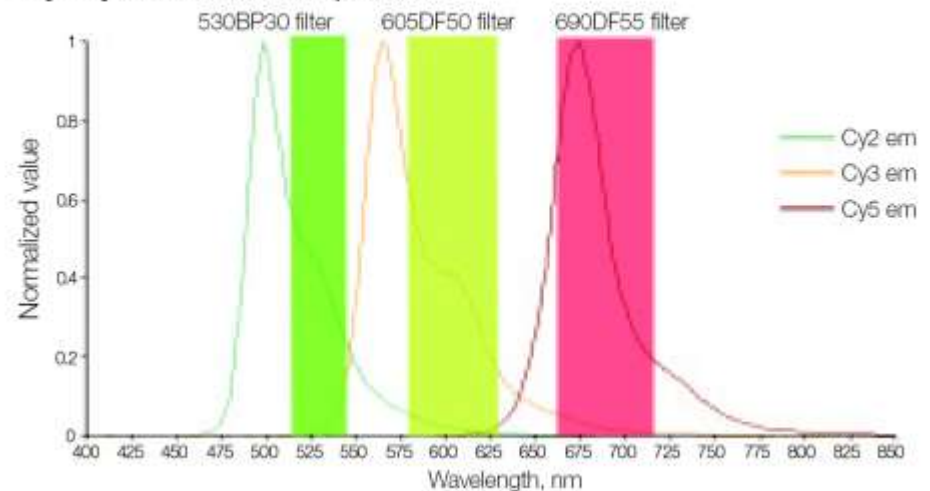


**Maleimid** - Cys (-SH)  
**Succinimid** - N-term a Lys ( $\epsilon$ )

### Cy Dye Excitation Spectra

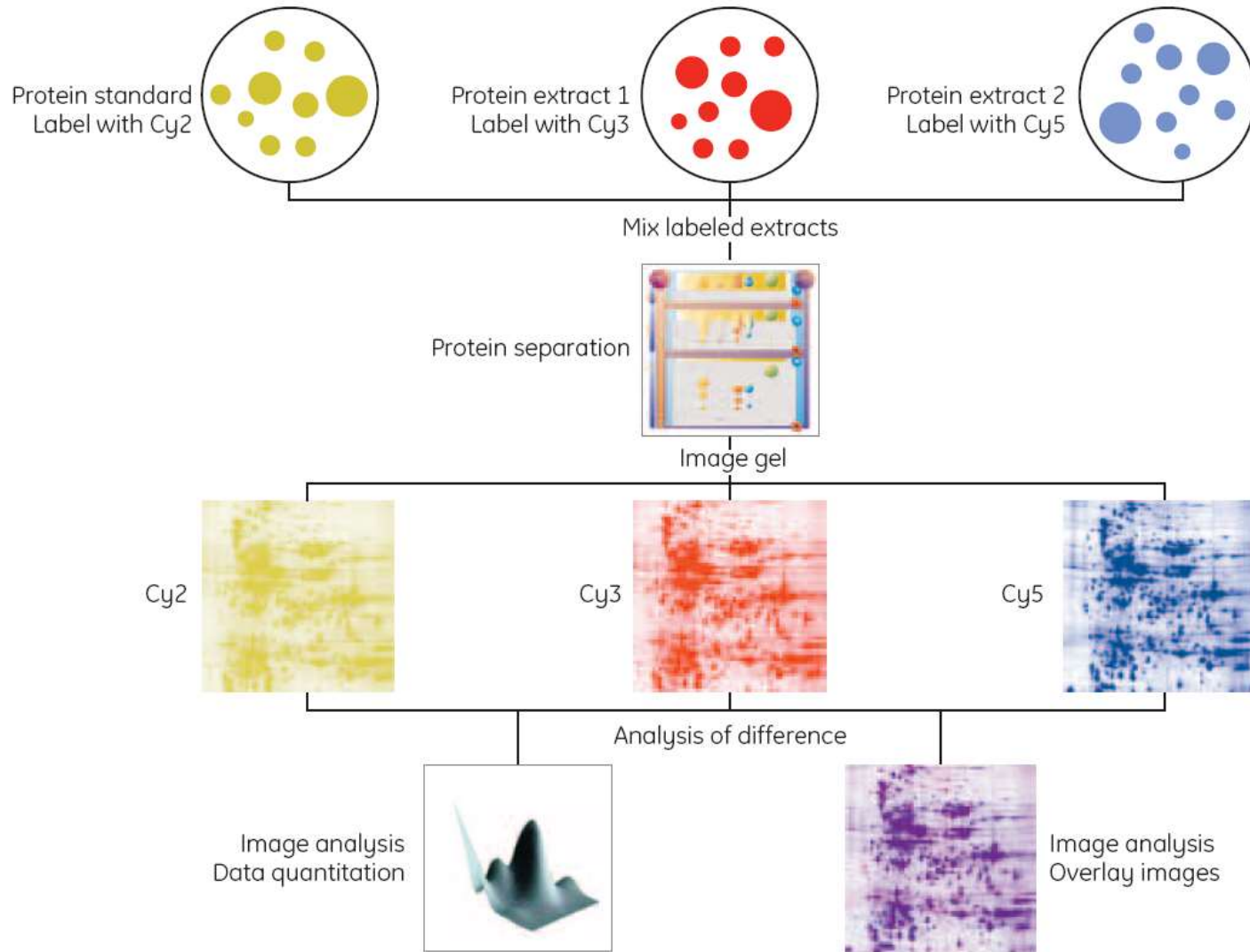


### Cy Dye Emission Spectra

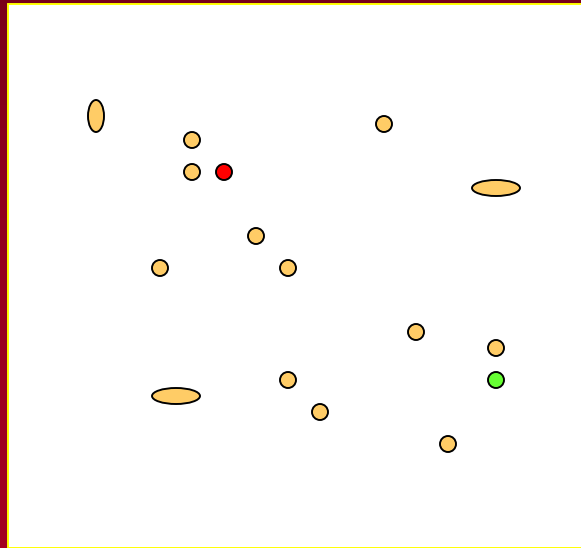
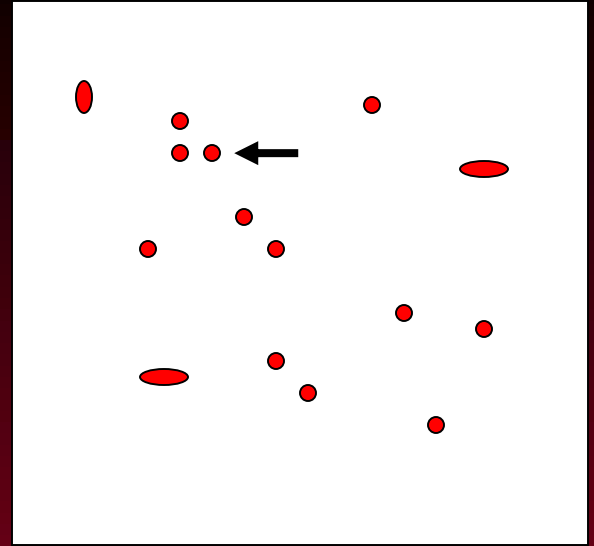
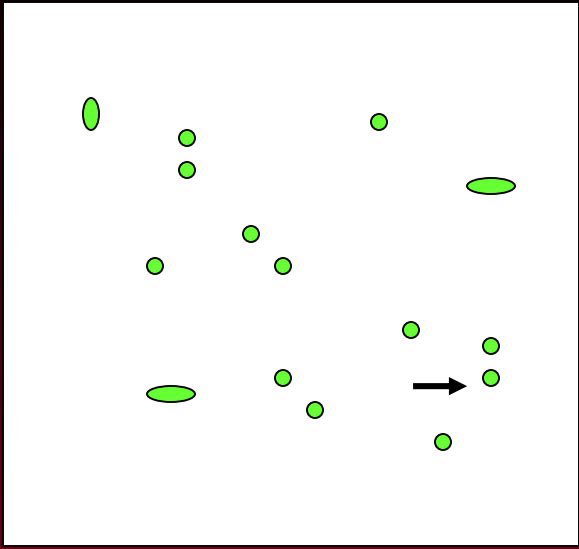


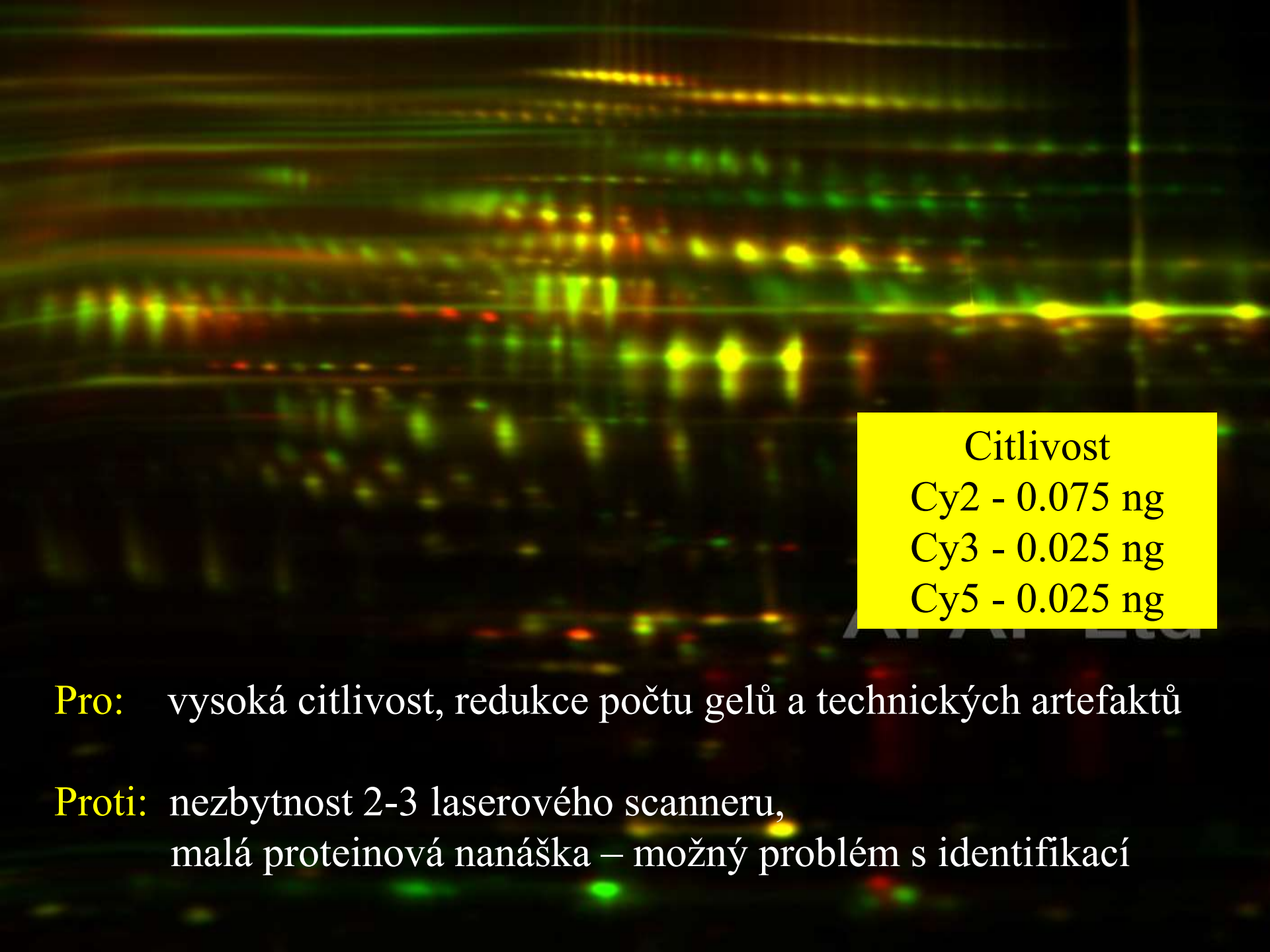


# EXPERIMENTÁLNÍ USPOŘÁDÁNÍ PRO DIGE



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





Citlivost

Cy2 - 0.075 ng

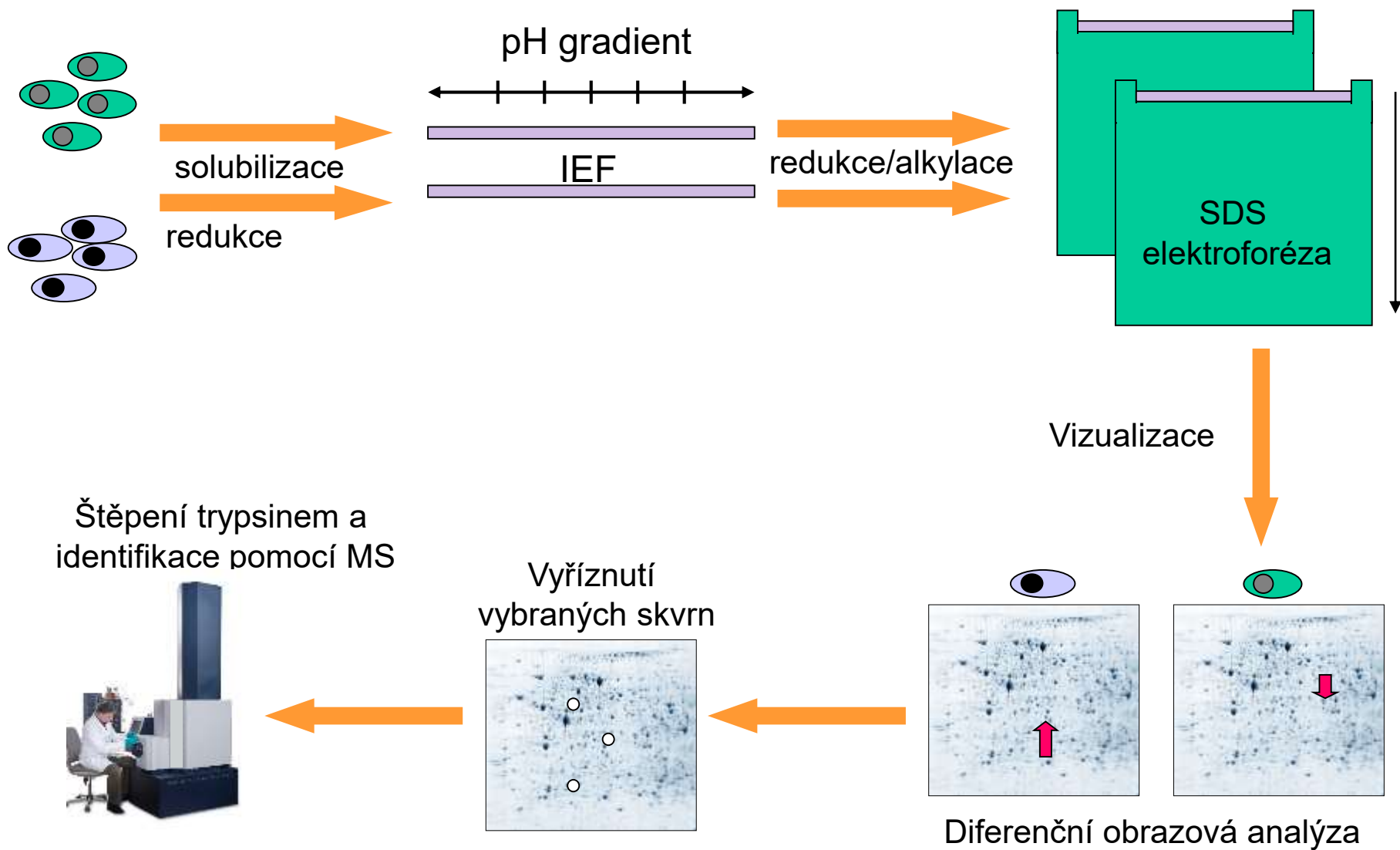
Cy3 - 0.025 ng

Cy5 - 0.025 ng

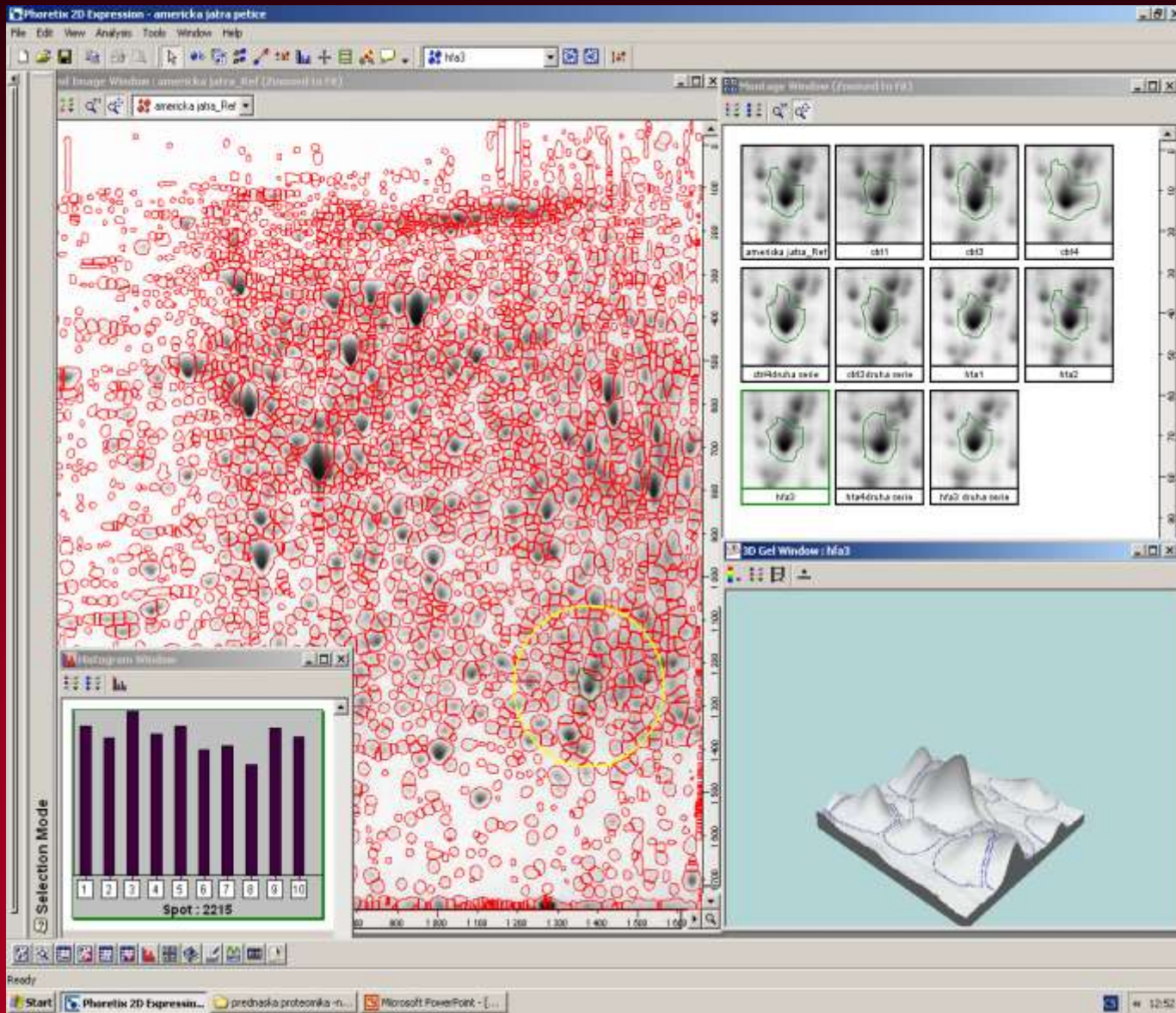
**Pro:** vysoká citlivost, redukce počtu gelů a technických artefaktů

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

# Typický 2-DE experiment



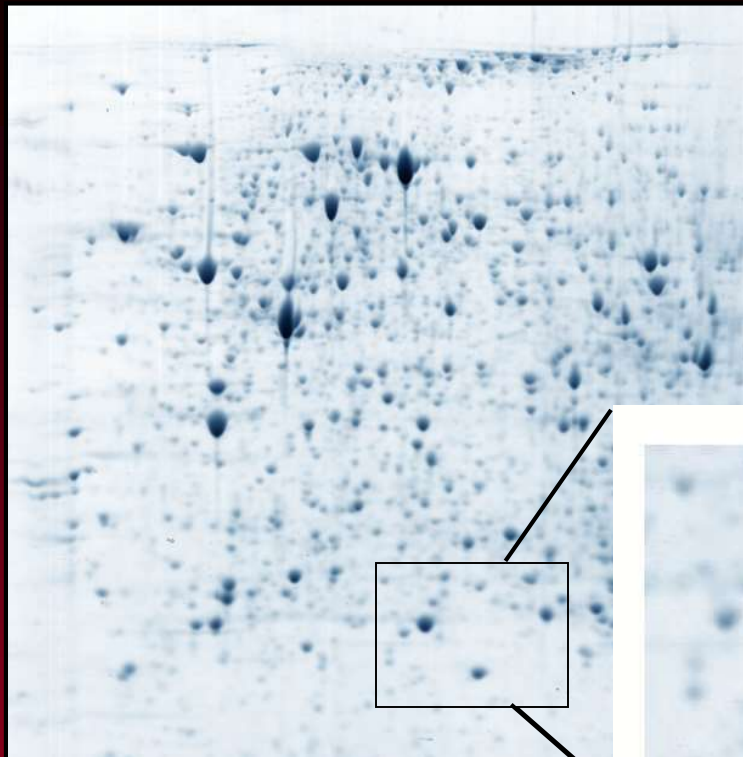
# Softwarové vyhodnocení 2D gelů



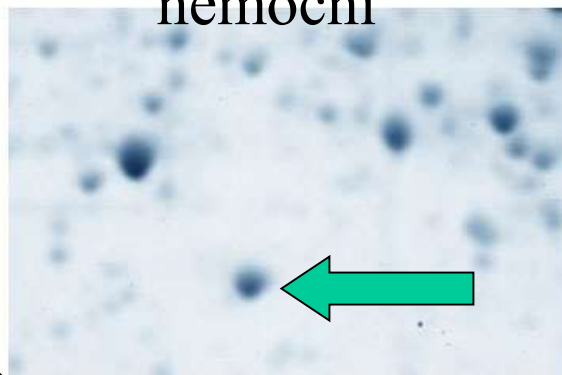
# IDENTIFIKACE PROTEINU

- digesce vzorku a extrakce peptidů
- principy identifikace proteinu pomocí MS





nemocní



zdraví



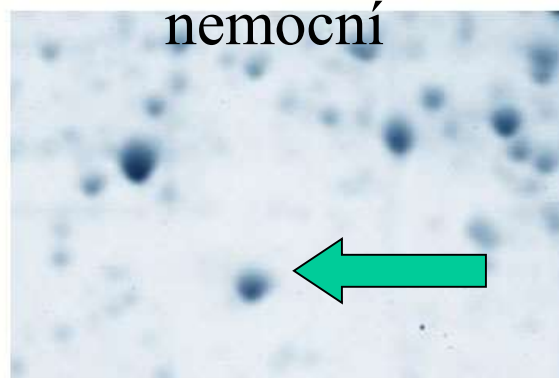
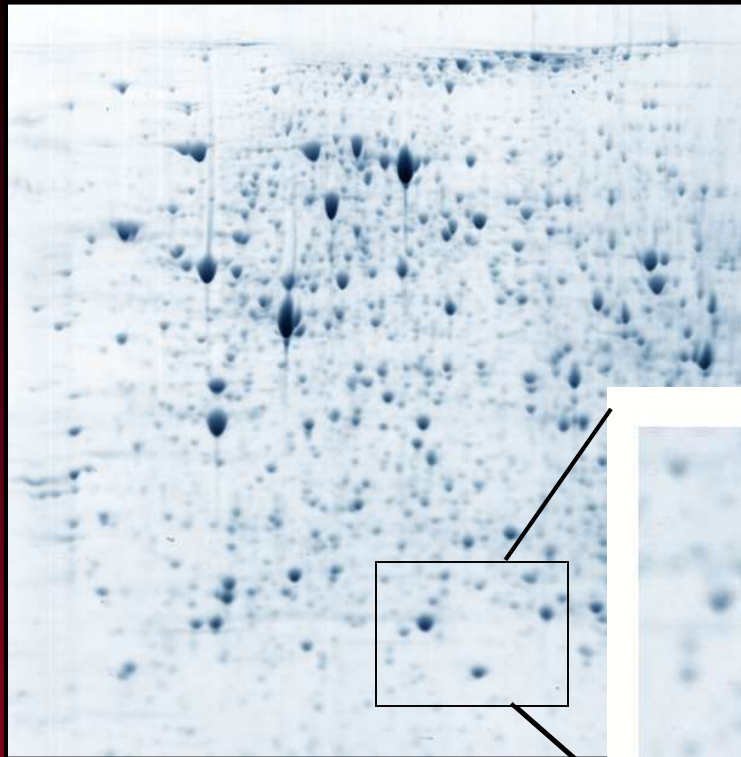
Neznámý diferenciólně exprimovaný protein „XY“ (20 kDa)



Identifikace s využitím hmotnostní spektrometrie

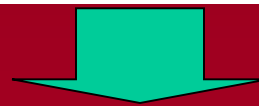


## Identifikace diferenciálně exprimovaného proteinu



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

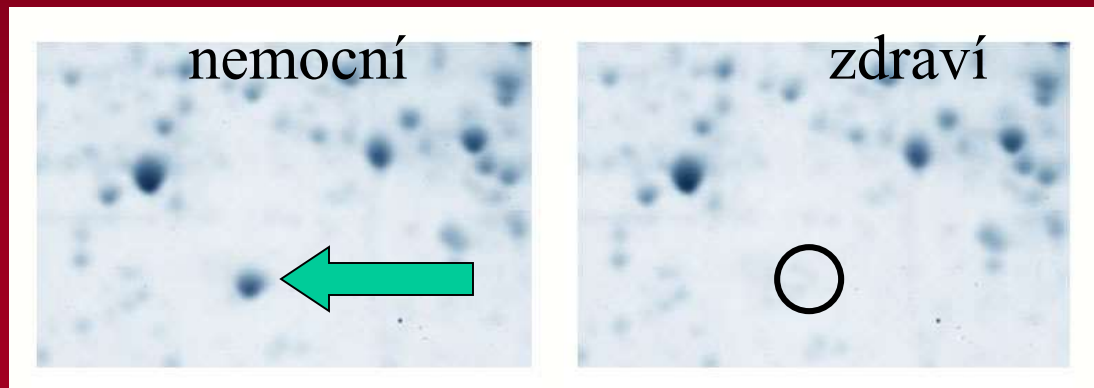
# TRYPSIN

MW 23 kDa

z kravského nebo prasečího pankreatu  
**štěpí v mírně bazickém pH**

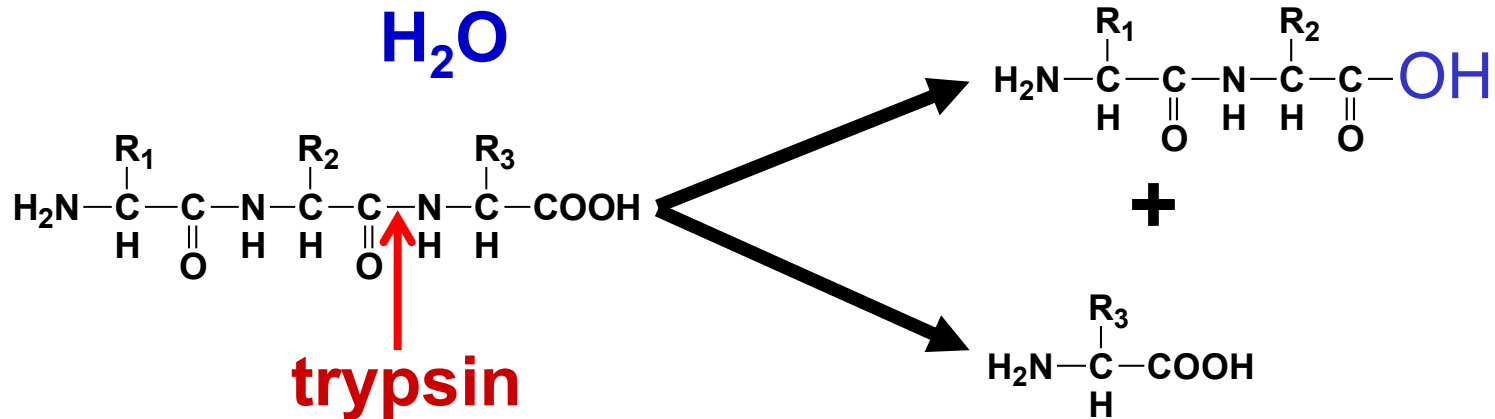
- 50 kDa protein → cca 30 peptidů
- Použití v roztoku, na blotu, v gelu

Trypsin **štěpí za Lys a Arg** pokud nenásleduje Pro

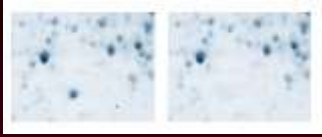


*SSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEKREG  
YERLLKMQNQRGGRALFQD IKKPAEDEWGTKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHAL  
GSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKL IKKMGDHLTNLHRLGGPEAG LGEYLFERLT LKHD*

# Štěpení trypsinem



# 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

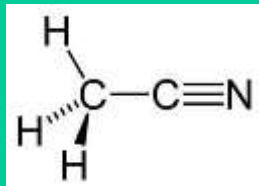
Extrakce PEPTIDŮ (ACN)

Čištění a koncentrace

MS analýza  
a identifikace

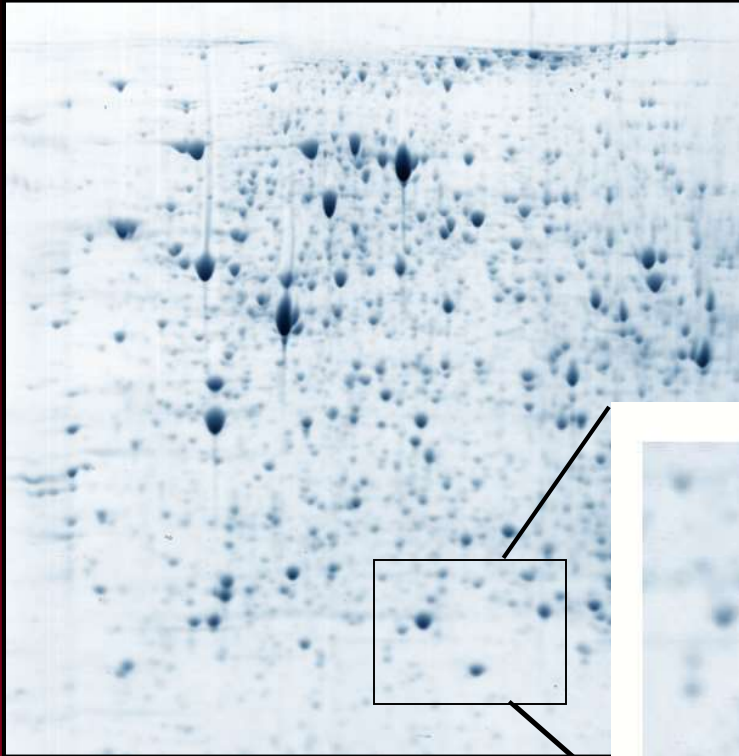
**KERATIN !!!**

**Acetonitril**  
(ACN, MeCN)

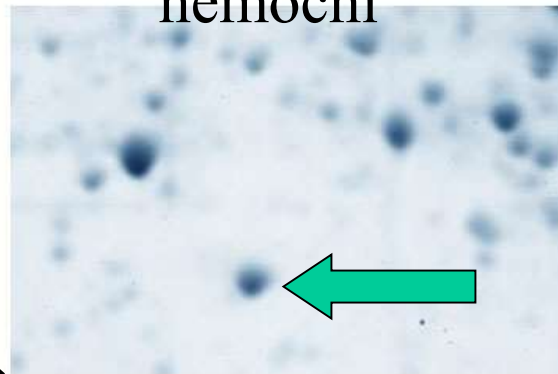


- nesráží proteiny/peptidy
- neabsorbuje v UV
- má nízkou viskozitu
- kompatibilní s RP-LC

# Identifikace diferenciálně exprimovaného proteinu



nemocní



zdraví



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

SSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEKREGYERLLK  
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**

**ELAEK**K**R**

**ALFQD IK**

**AAMALE**KK****

**KPAEDEWG**K****

**MGDHLTNL**H**R**

**DDVALEGVSHFF**R****

**LNQALLDLHALGS**A**R**

**LGGPEAG LGEYLF**E**R**

**TDPHLCDFLETHFLDEEV**K****

**QNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFD**R****

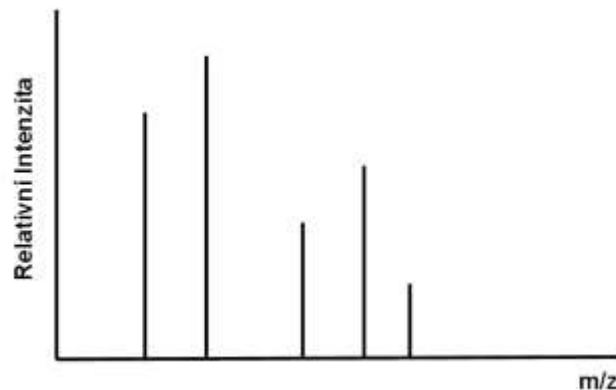


**Identifikace bílkovin  
pomocí hmotnostní spektrometrie**



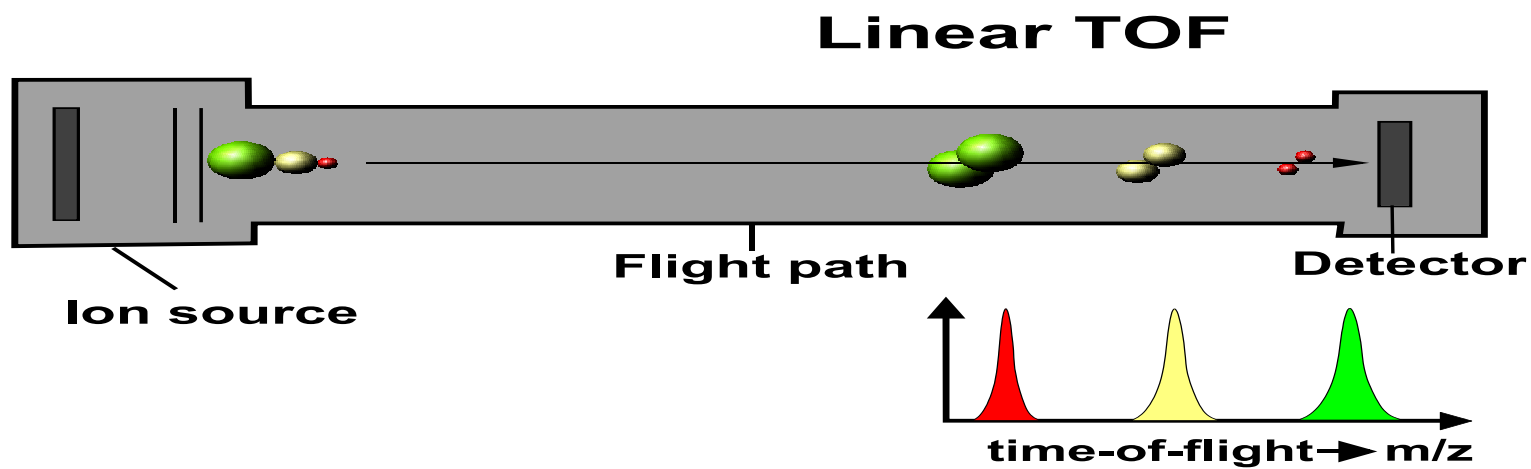
# Identifikace bílkovin pomocí hmotnostní spektrometrie (MS)

- 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 typu TIME OF FLIGHT (TOF)



# Identifikace bílkovin pomocí hmotnostní spektrometrie (MS)

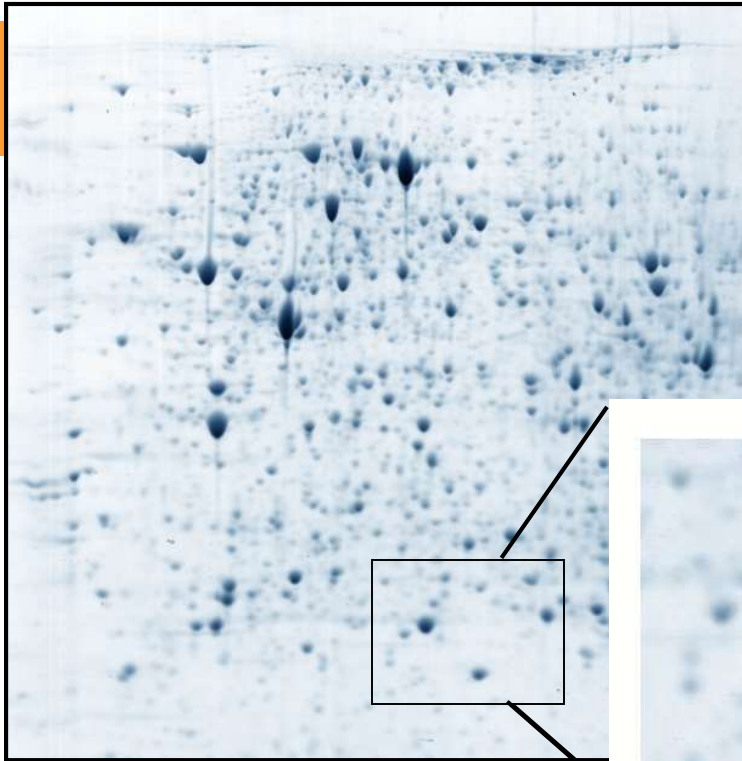
## Peptidové mapování (Peptidový fingerprinting)

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

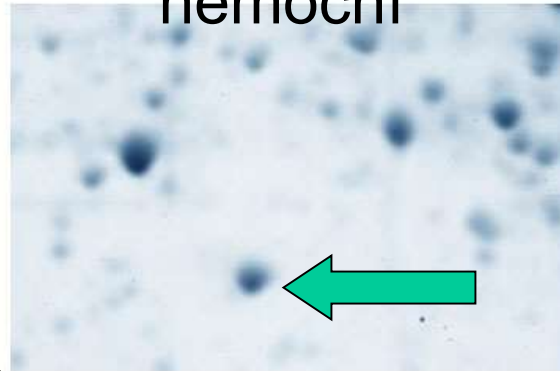
## Fragmentace peptidů/sekvenování (MS/MS)

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

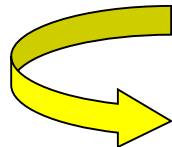


zdraví



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

*SSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEKREG  
YERLLKMQNQRGGRALFQD IKKPAEDEWGTKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHAL  
GSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKL IKKMGDHLTNLHRLGGPEAG LGEYLFERLT LKHD*



**Extrakce směsi peptidů z gelu**

# Peptidové mapování (Peptidový fingerprinting)

**LLK**

**GGR**

**SSQIR**

**L IKK**

**LT LK**

**EGYER**

**MQNQR**

**TPDAMK**

**ELAEER**

**ALFQD IK**

**AAMALEKK**

**KPAEDEWVK**

**MGDHLTNLHR**

**DDVALEGVSHFFR**

**LNQALLDLHALGSAR**

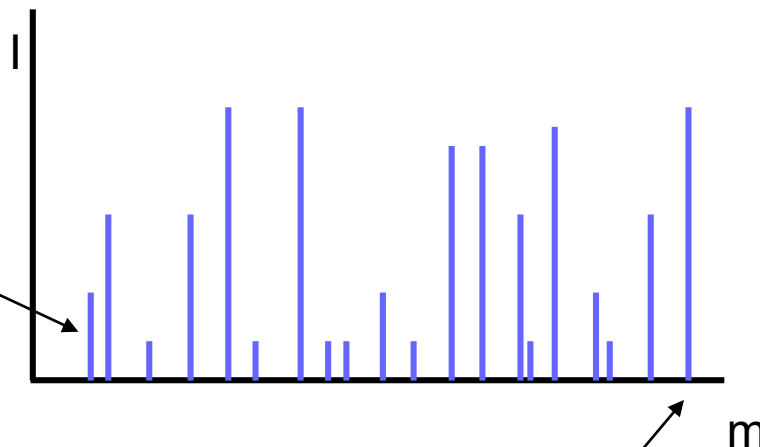
**LGGPEAG LGEYLFER**

**TDPHLCDFLETHFLDEEVK**

**QNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDR**

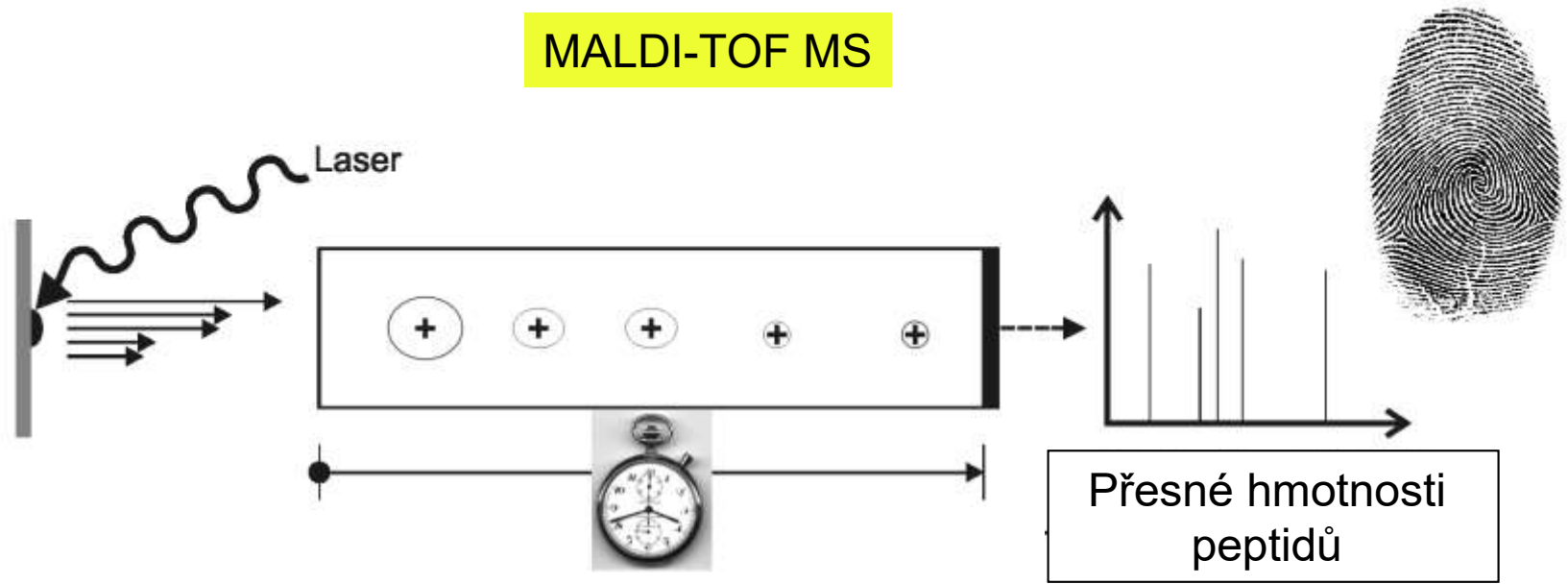
# Peptidové mapování (Peptidový fingerprinting)

<b>LLK</b>	(373.280)
<b>L IK</b>	(373.280)
<b>LT LK</b>	(474.328)
<b>SSQIR</b>	(590.327)
<b>EGYER</b>	(653.673)
<b>MQNQ R</b>	(676.319)
<b>TPDAMK</b>	(662.317)
<b>ELAE EK</b>	(718.361)
<b>AAMALEK</b>	(733.391)
<b>KPAEDEW GK</b>	(1059.510)
<b>MGDHLTNLHR</b>	(1079.54)
<b>DDVALEGVSHFFR</b>	(1491.722)
<b>LNQALLDLHALGSAR</b>	(1591.891)
<b>LGGPEAGLGEYLFER</b>	(1607.806)
<b>TDPHLCDFLETHFLDEEVK</b>	(2288.054)
<b>QNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDR</b>	(3924.897)



# Peptidové mapování (Peptidový fingerprinting)

## MALDI-TOF MS



# Identification of protein in databases from MS data

**GENES, ORFs**



*In silico* translation

PROTEINS



*In silico* digestion with trypsin (-R/-K)

PEPTIDES



**theoretical MWs of peptides**

**Gene/Protein identification**

**MS data**

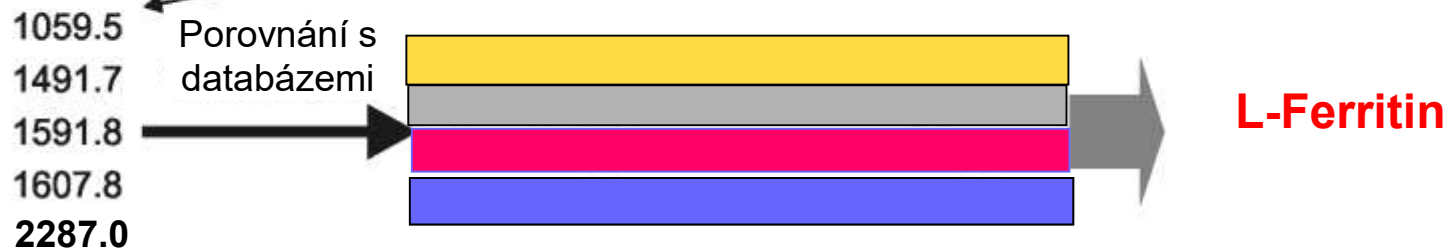
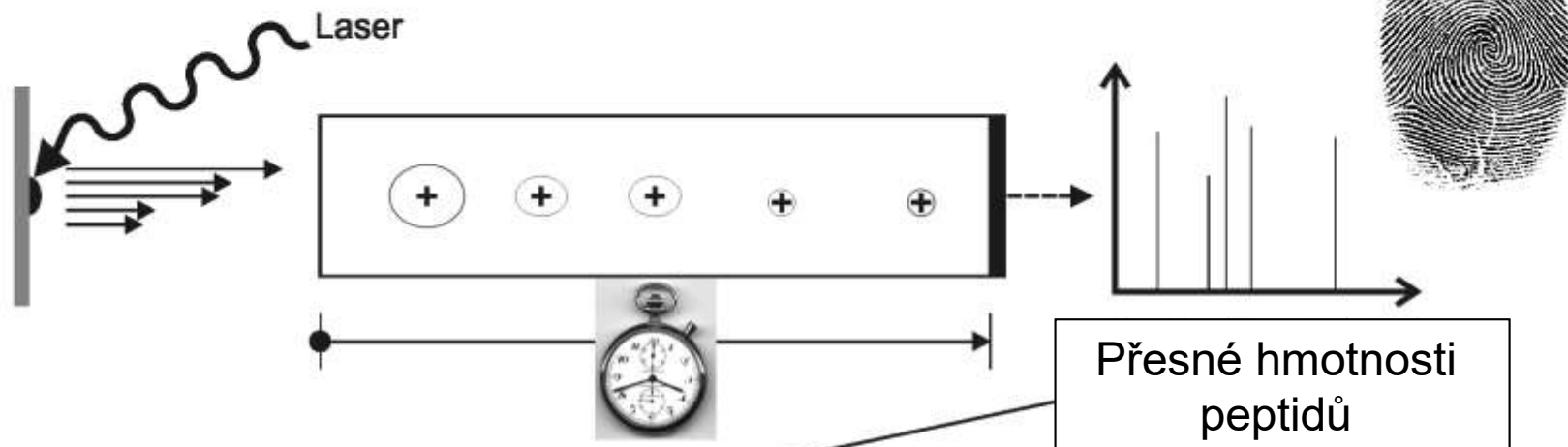
Masses/MWs of  
**peptides**





# Peptidové mapování (Peptidový fingerprinting)

## MALDI-TOF MS



*SSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDR* [redacted] *ELAEKREG*  
*YERLLKMQNQRGGRALFQD* [redacted] *TPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHAL*  
*GSAR* [redacted] *L IKKMGDHLTNLHR* [redacted] *LTLKHD*

**Co když máme ve vzorku směs proteinů?**

# Identifikace bílkovin pomocí hmotnostní spektrometrie

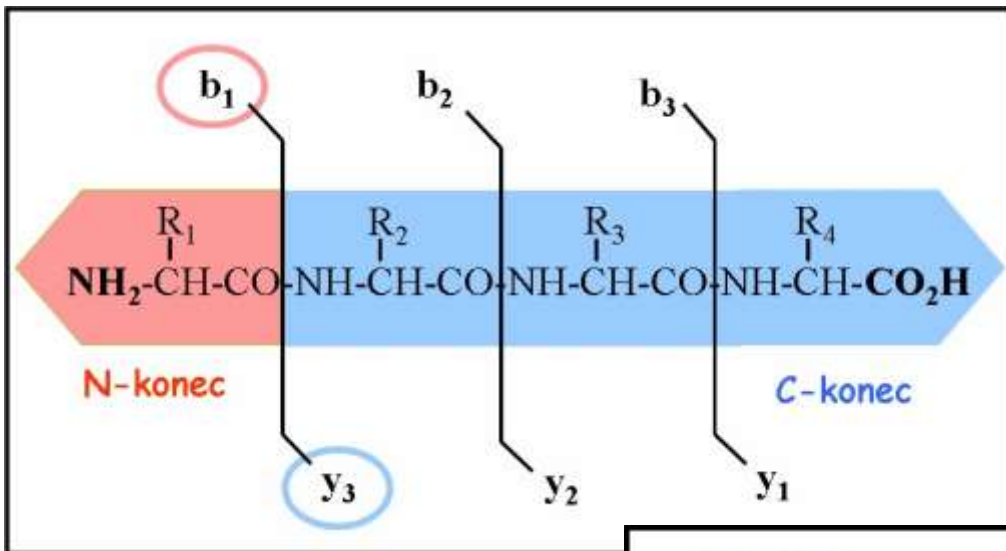
## Peptidové mapování (Peptidový fingerprinting)

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.

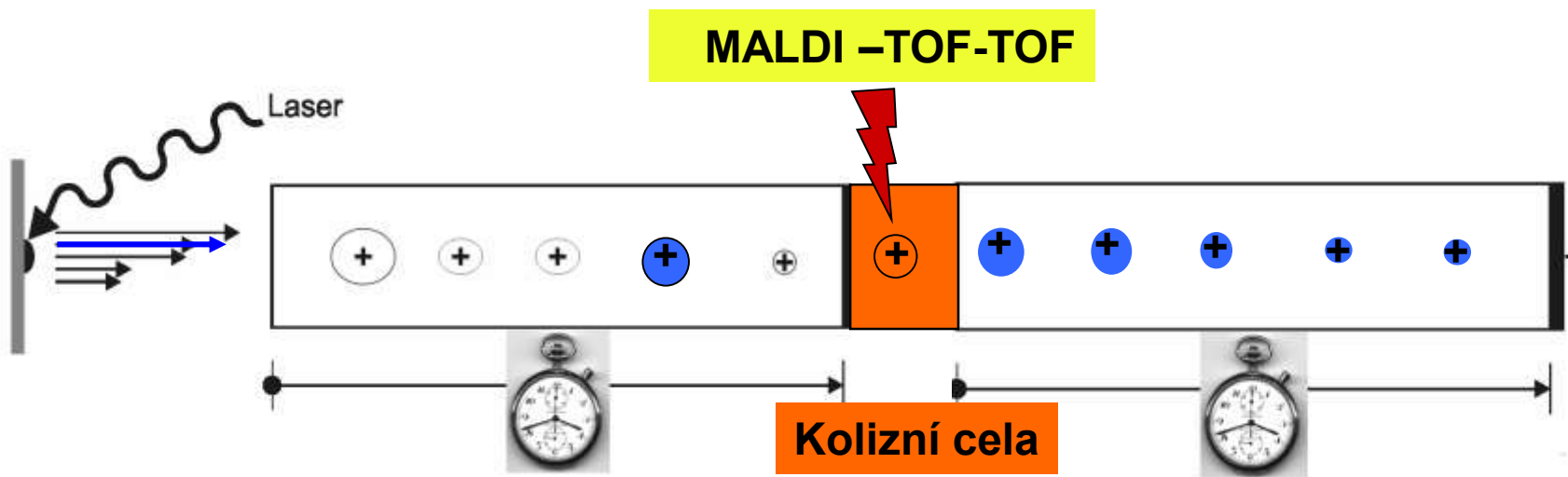
# Fragmentace peptidu (mikrosekvenování, MS/MS)



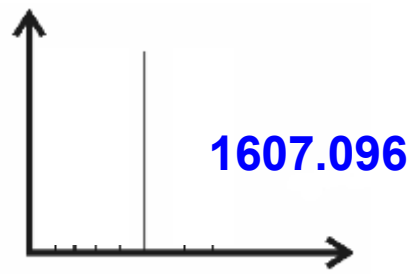
**S-P-A-F-D-S-I-M-A-E-T-L-K**  
**MH<sup>+</sup> = 1410.6**

<u><b>b-ions<sup>+</sup></b></u>		<u><b>y-ions<sup>+</sup></b></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)

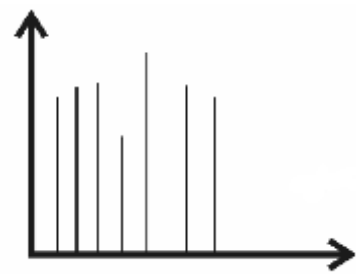


MW peptidu



m/z jeho fragmentů

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



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

# Identification of protein in databases from MS data

**GENES, ORFs**



*In silico* translation

**PROTEINS**



*In silico* digestion with trypsin (-R/-K)

**PEPTIDES**



**theoretical MWs of peptides**

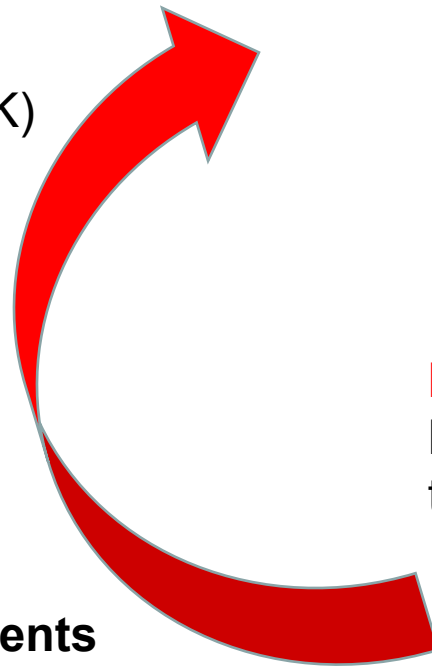
**FRAGMENTS**



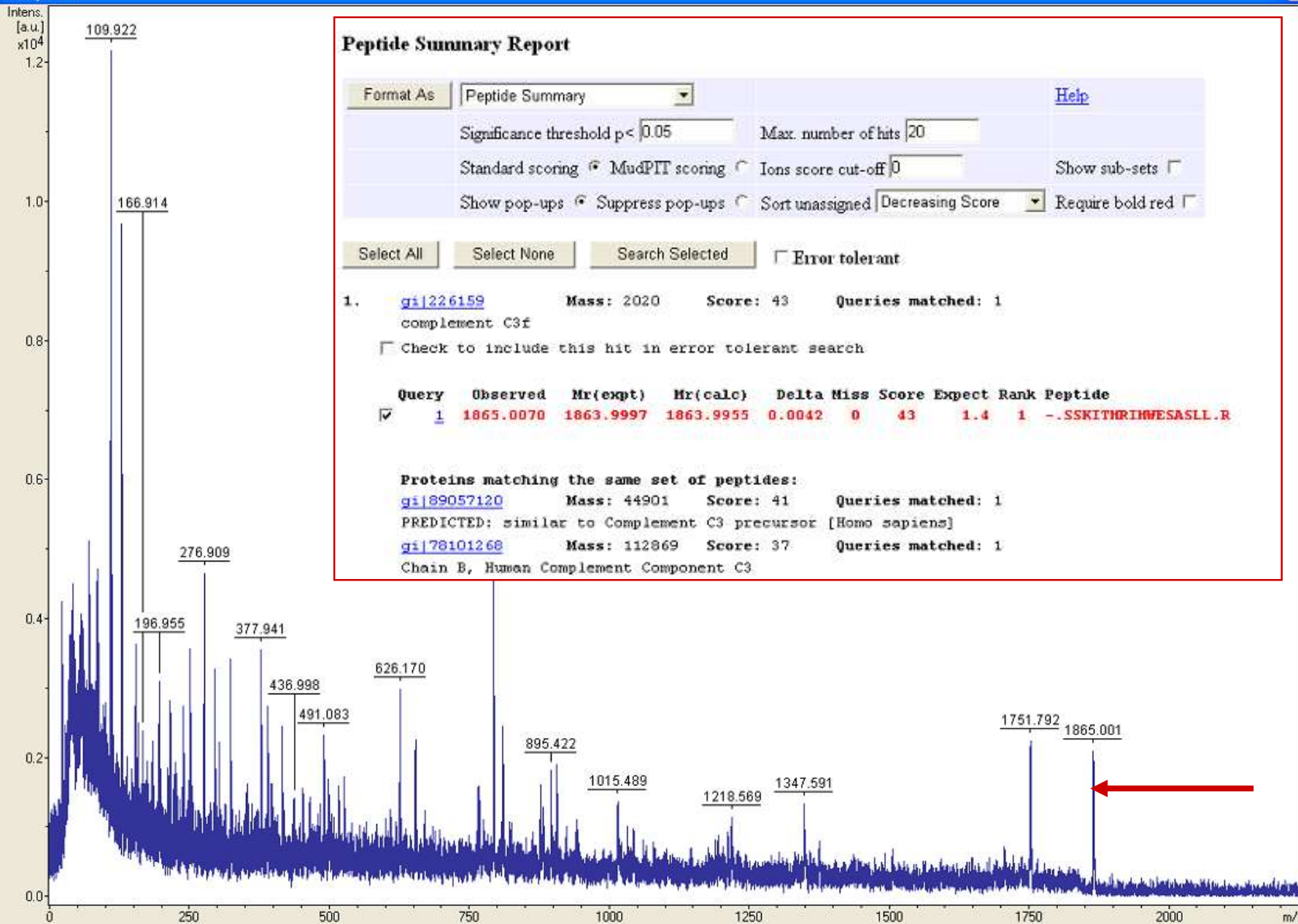
**theoretical MWs of peptide fragments**

**Gene/Protein identification**

**MS data**  
MWs of **peptides** and  
their **fragments**



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

- [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	-.SSKITHRIHWESASLL.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

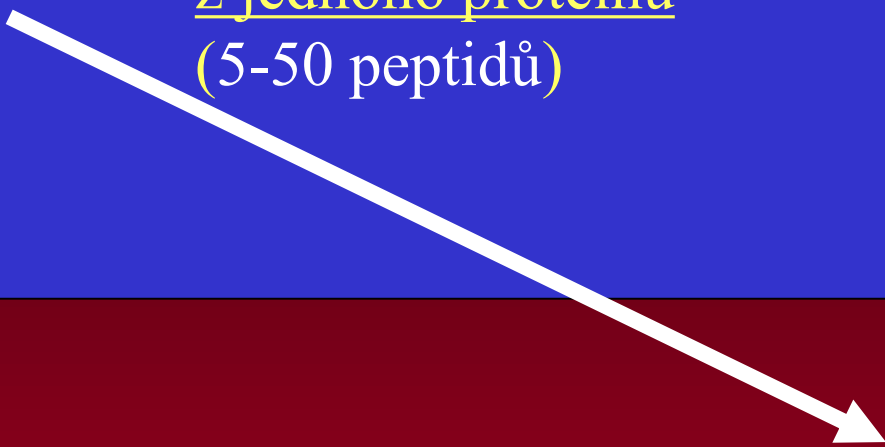
Jediný protein



Směs peptidů  
z jednoho proteinu  
(5-50 peptidů)



**MS**  
(PMF)



Směs proteinů



Směs peptidů  
z mnoha proteinu  
(300-10<sup>6</sup> peptidů)

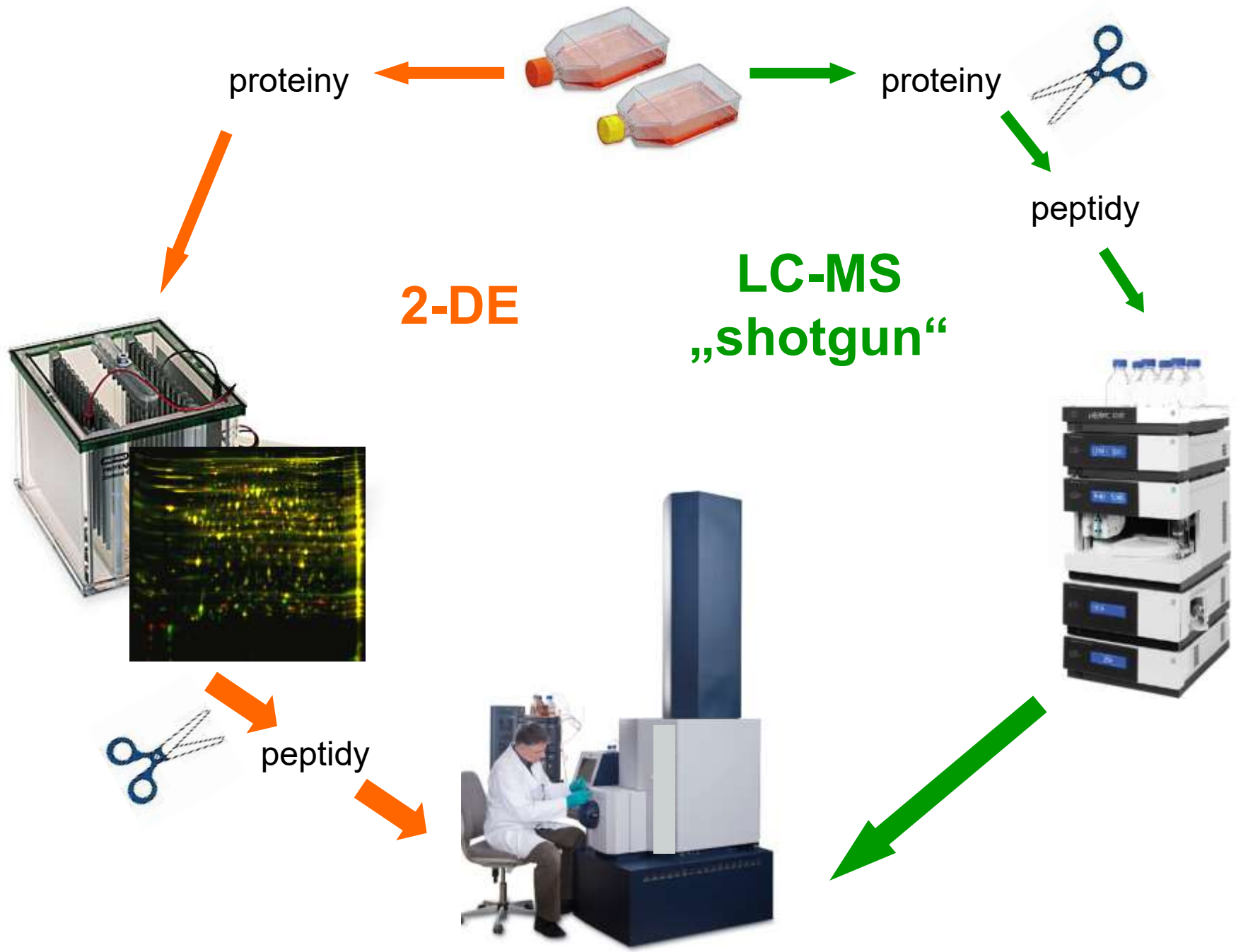


**chromatografická  
separace**



**MS/MS**  
(fragmentace)





proteiny

proteiny

2-DE

LC-MS  
„shotgun“

peptidy

peptidy

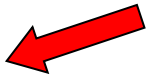
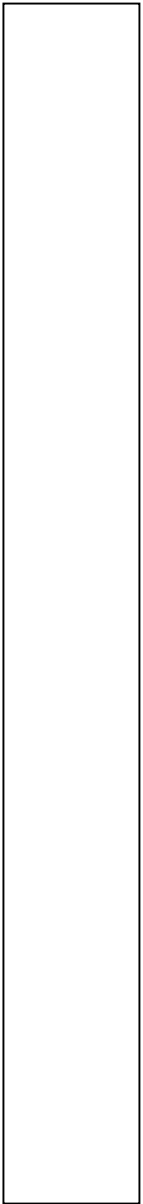


# Identifikace proteinů v shot-gun experimentech

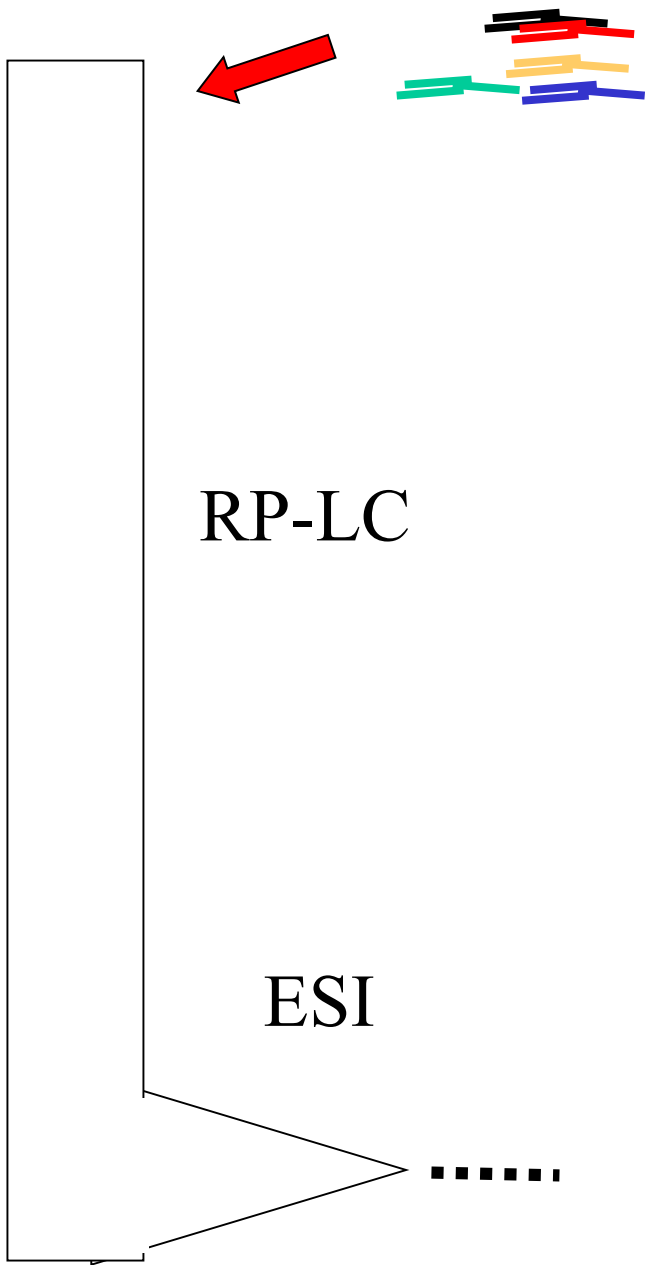
Až stovky tisíc různých peptidů  
kontinuálně eluovaných z (RP) LC

**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.

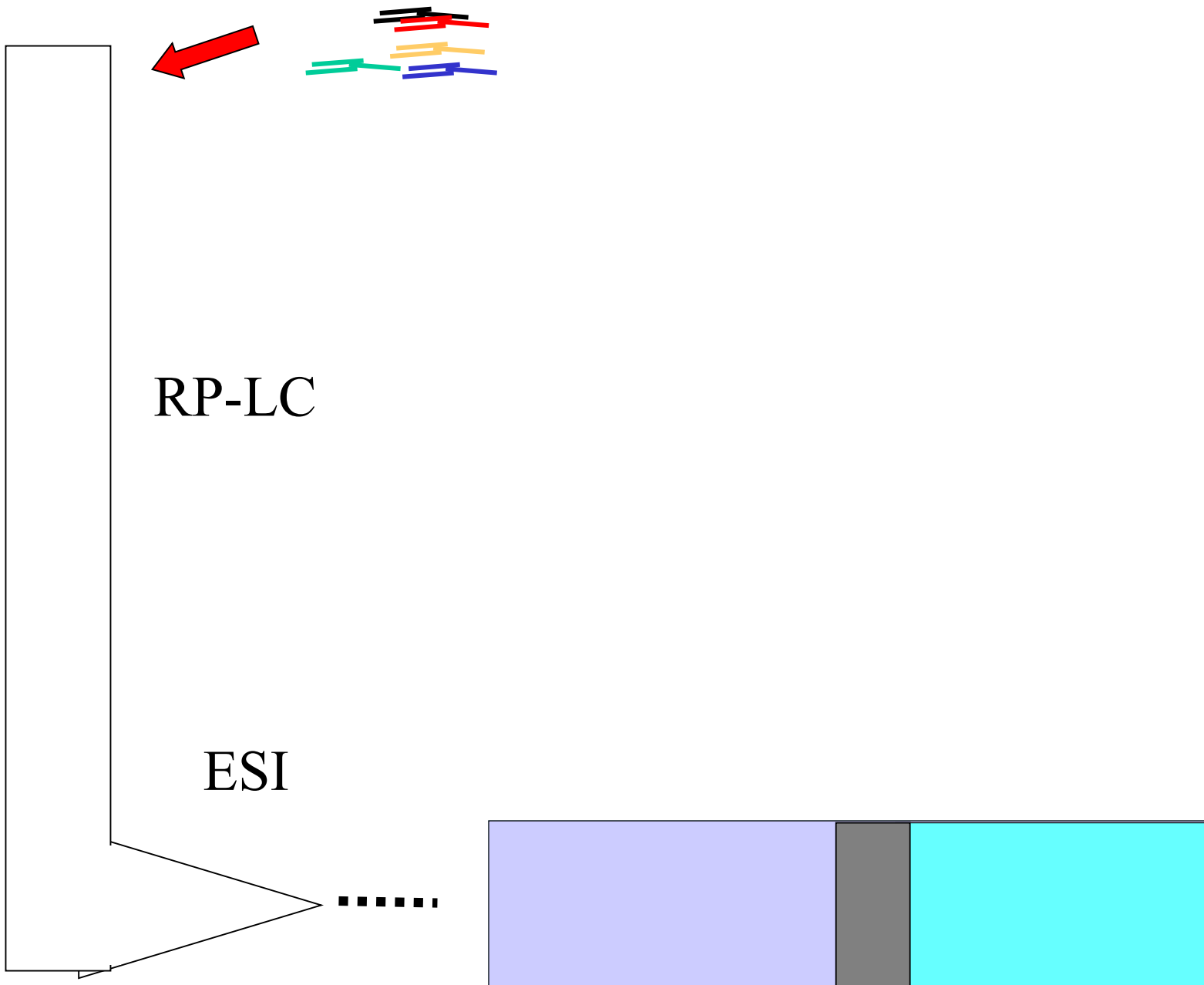


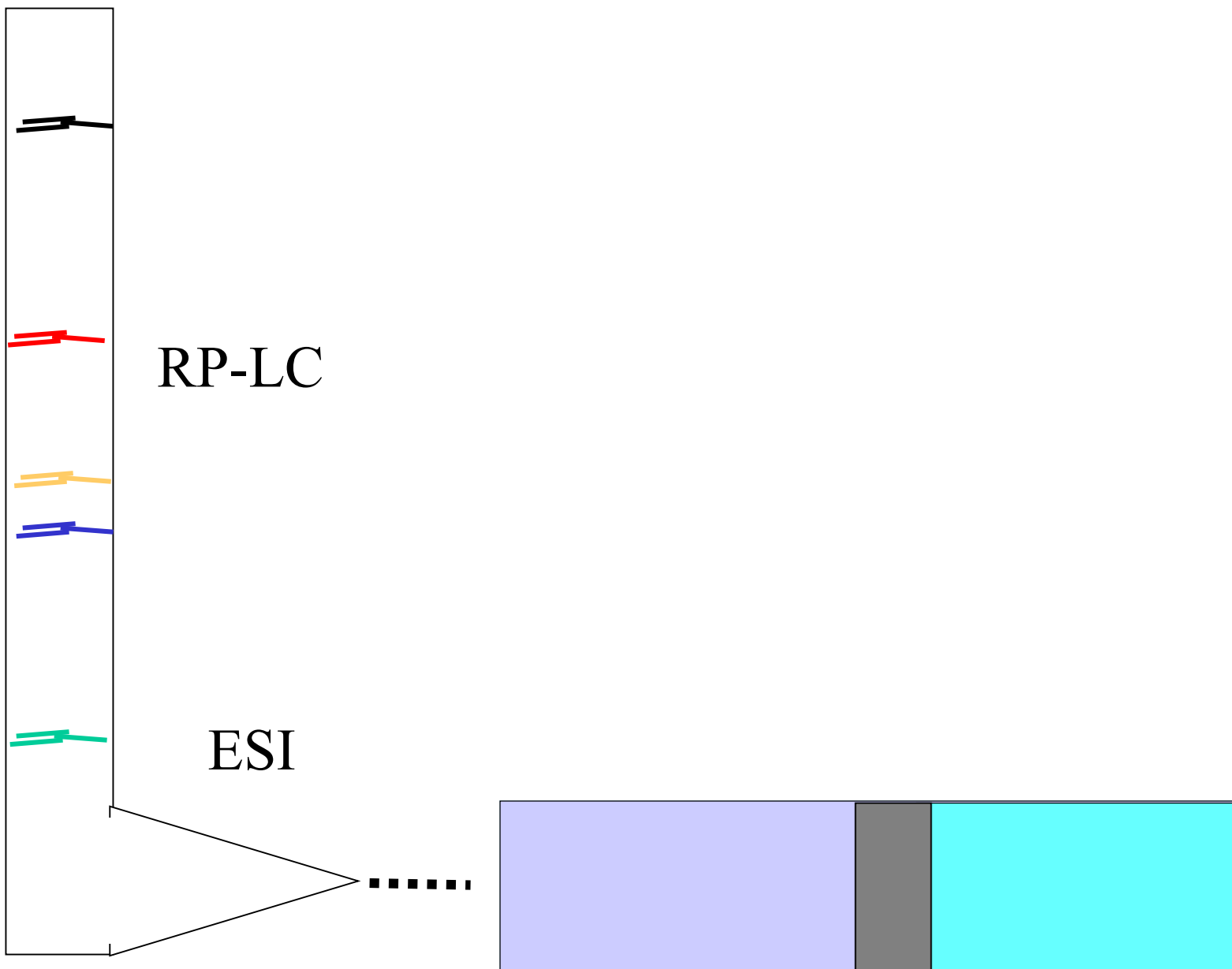
RP-LC

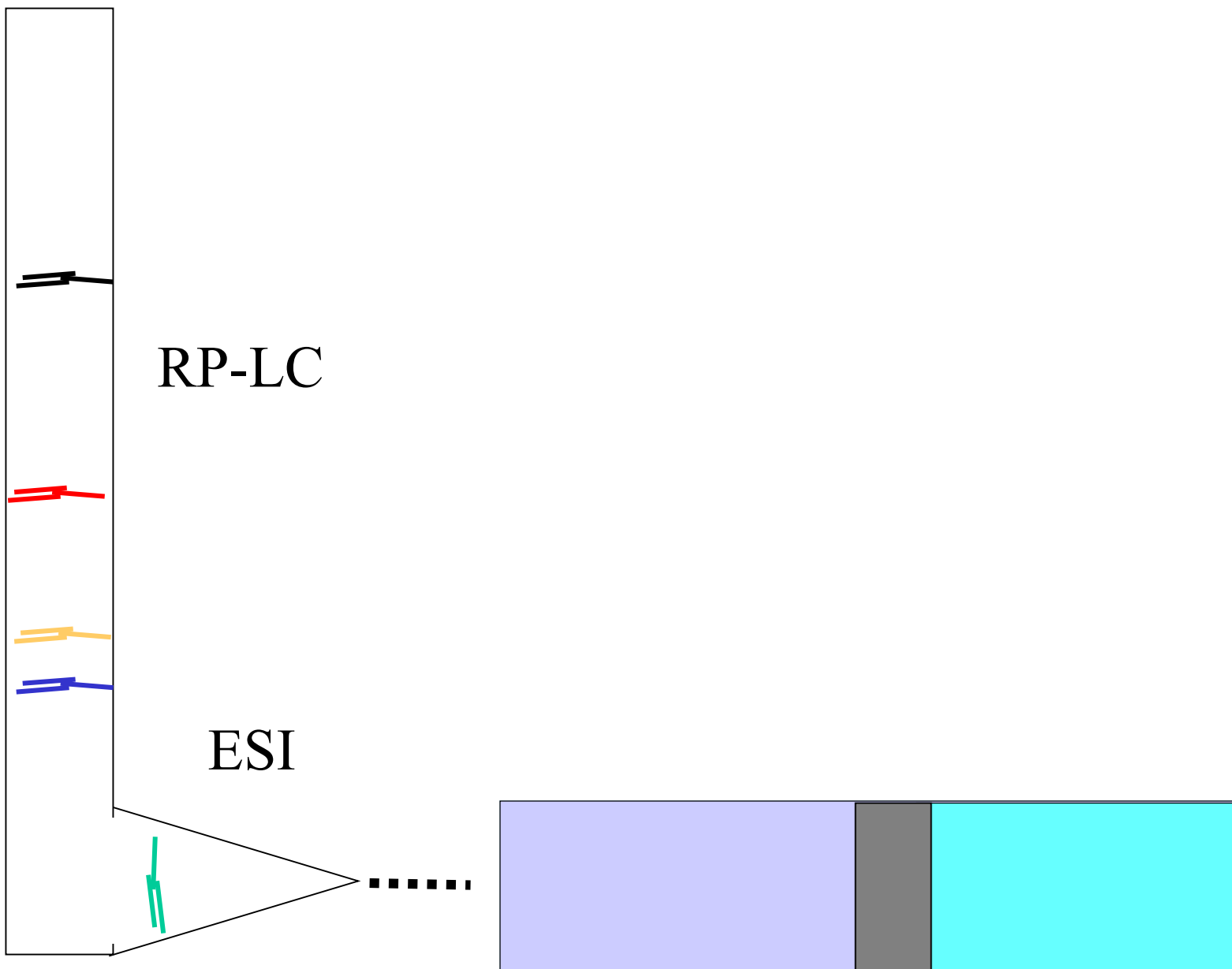


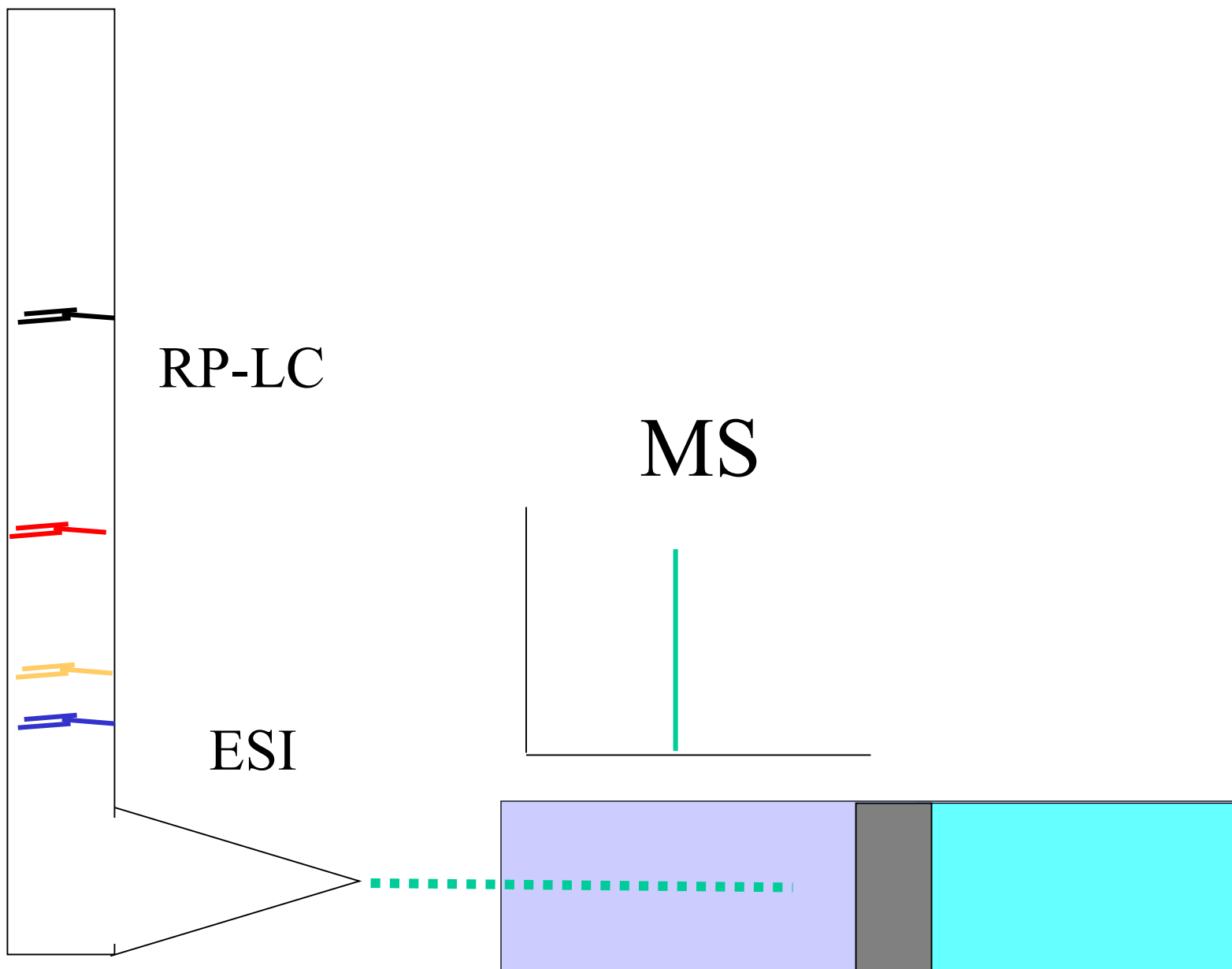
RP-LC

ESI

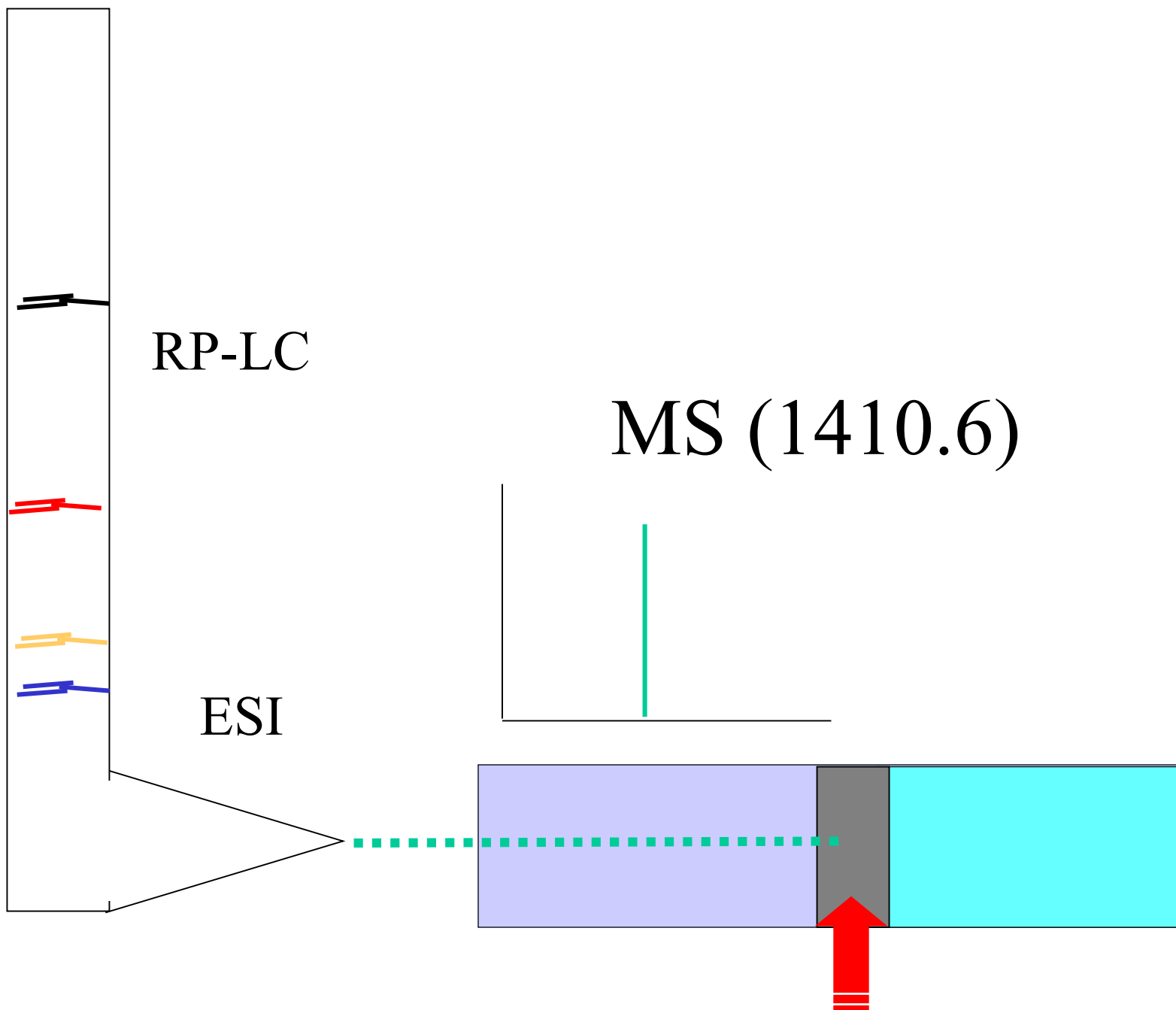








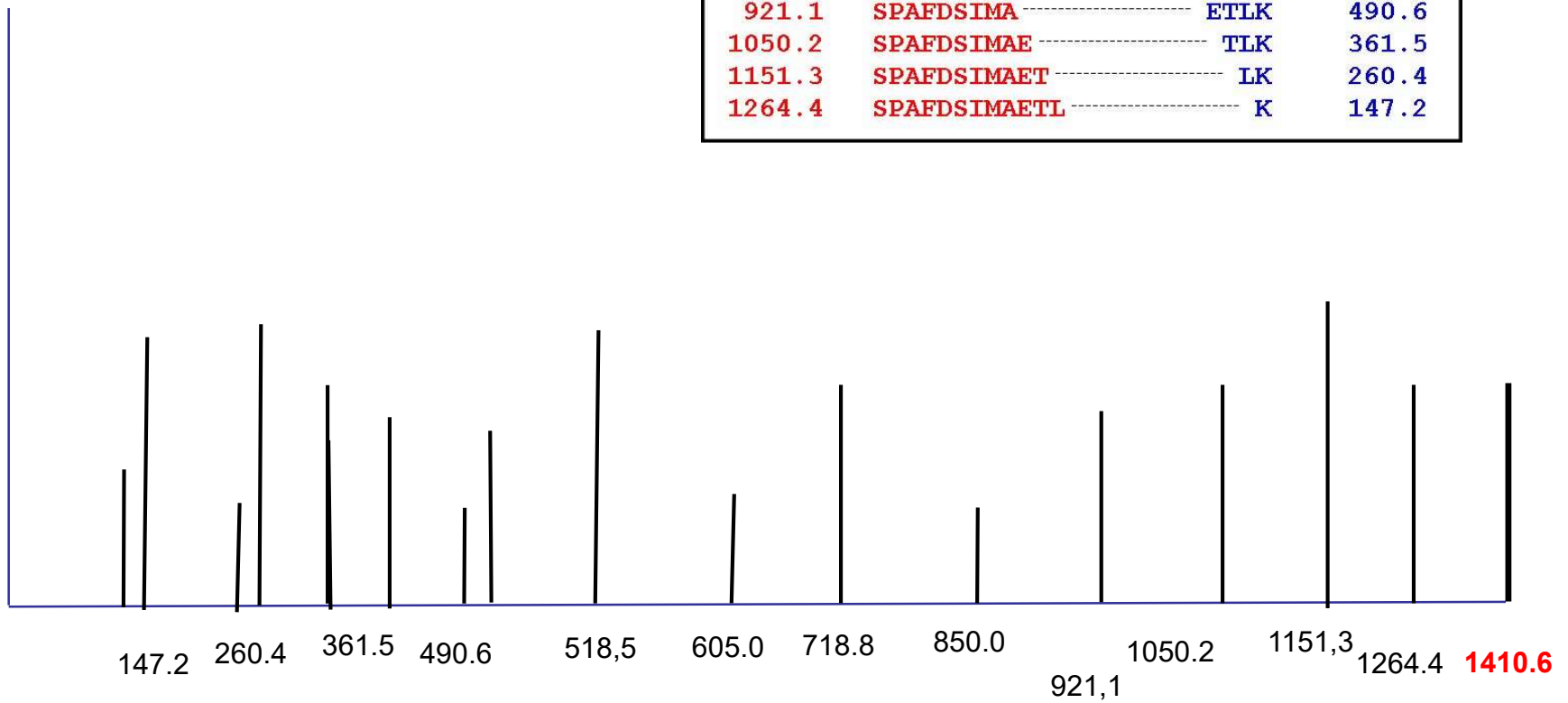




# S-P-A-F-D-S-I-M-A-E-T-L-K

MH<sup>+</sup> = 1410.6

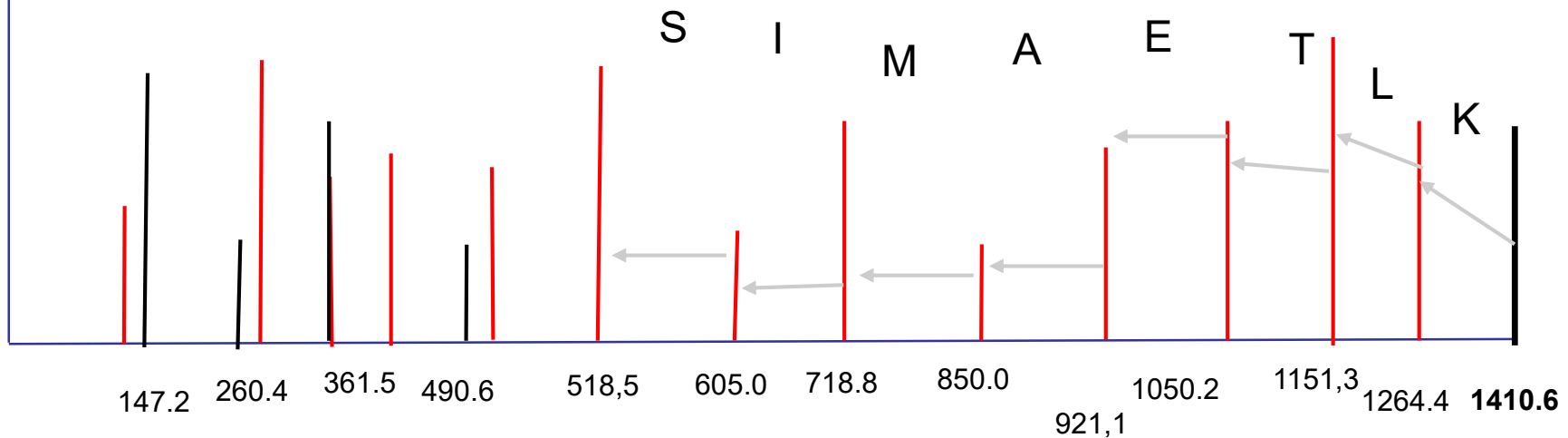
<u>b-ions<sup>+</sup></u>		<u>y-ions<sup>+</sup></u>	
88.1	S	PAFDSIMAETLK	1323.6
185.2	SP	AFDSIMAETLK	1226.4
256.3	SPA	FDSIMAETLK	1155.4
403.5	SPAF	DSIMAETLK	1008.2
518.5	SPAFD	SIMAETLK	893.1
605.6	SPAFDS	IMAETLK	806.0
718.8	SPAFDSI	MAETLK	692.3
850.0	SPAFDSIM	AETLK	561.7
921.1	SPAFDSIMA	ETLK	490.6
1050.2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



# S-P-A-F-D-S-I-M-A-E-T-L-K

MH<sup>+</sup> = 1410.6

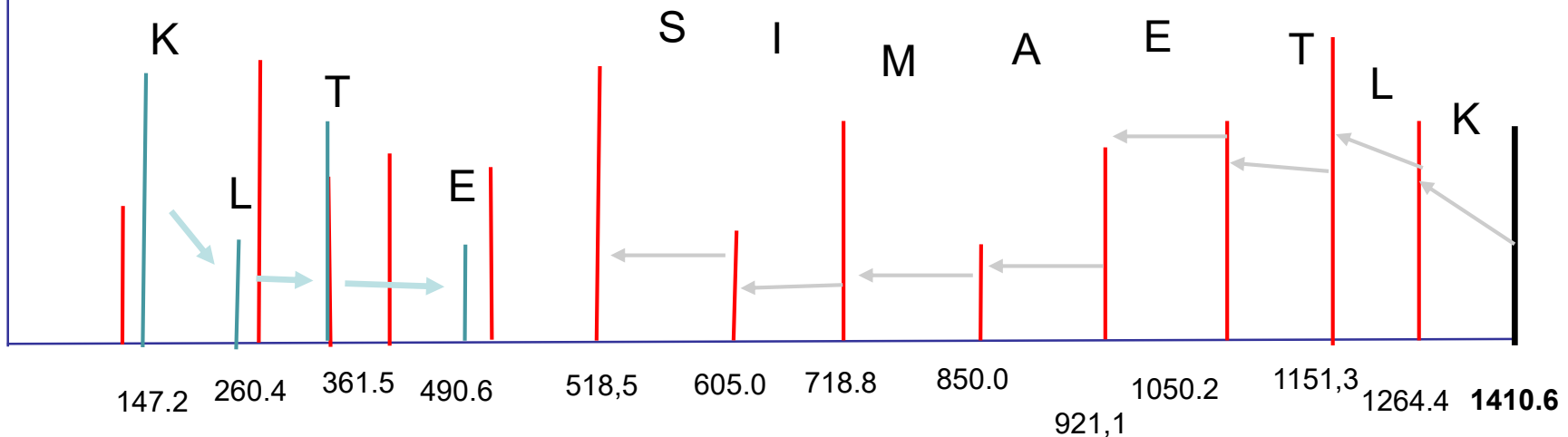
<u>b-ions<sup>+</sup></u>		<u>y-ions<sup>+</sup></u>
88.1	S	PAFDSIMAETLK
185.2	SP	AFDSIMAETLK
256.3	SPA	FDSIMAETLK
403.5	SPAF	DSIMAETLK
518.5	SPAFD	SIMAETLK
605.6	SPAFDS	IMAETLK
718.8	SPAFDSI	MAETLK
850.0	SPAFDSIM	AETLK
921.1	SPAFDSIMA	ETLK
1050.2	SPAFDSIMAE	TLK
1151.3	SPAFDSIMAET	LK
1264.4	SPAFDSIMAETL	K



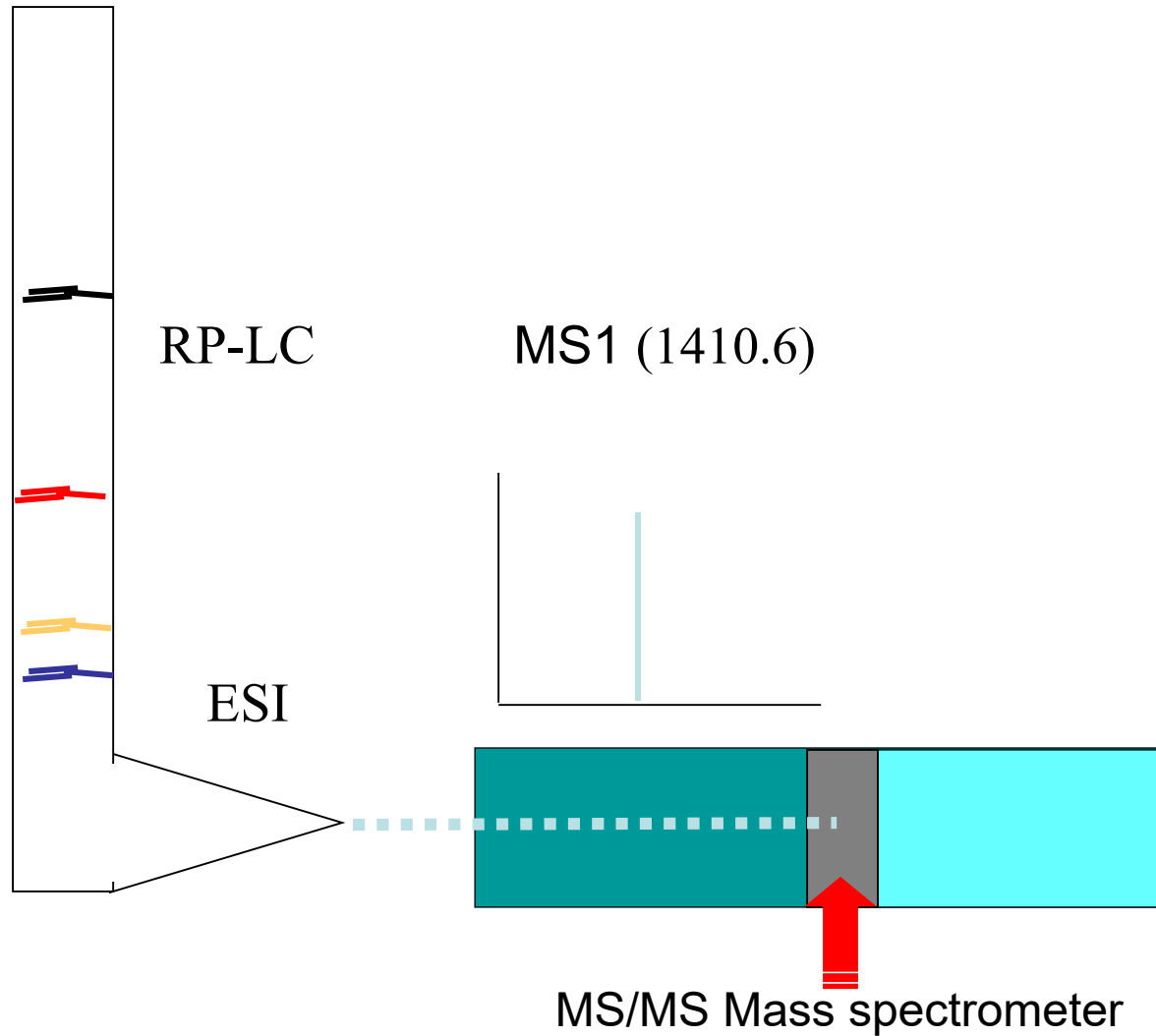
# S-P-A-F-D-S-I-M-A-E-T-L-K

MH<sup>+</sup> = 1410.6

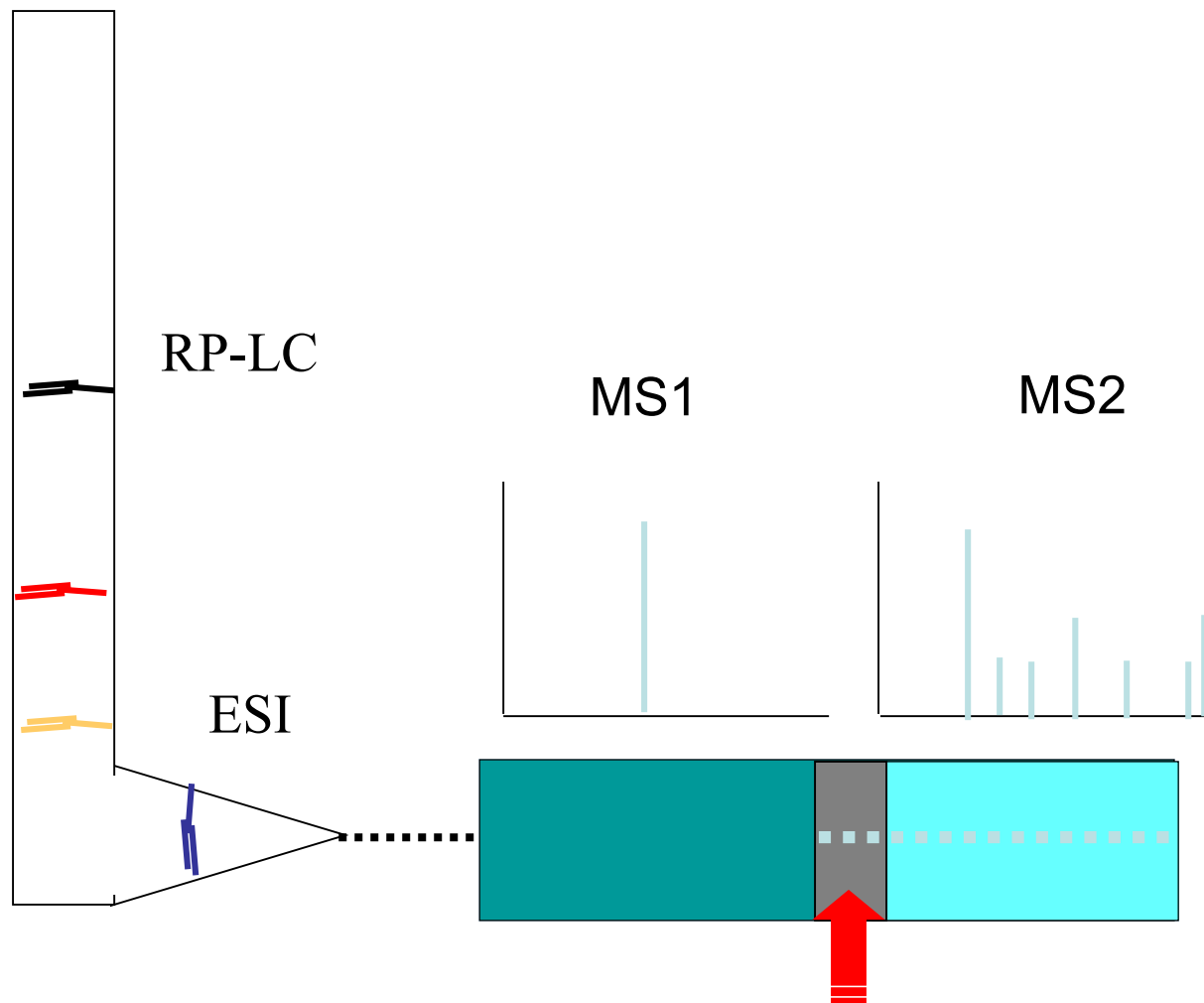
<u>b-ions<sup>+</sup></u>		<u>y-ions<sup>+</sup></u>
88.1	S-----	PAFDSIMAETLK
185.2	SP-----	AFDSIMAETLK
256.3	SPA-----	FDSIMAETLK
403.5	SPAF-----	DSIMAETLK
518.5	SPAFD-----	SIMAETLK
605.6	SPAFDS-----	IMAETLK
718.8	SPAFDSI-----	MAETLK
850.0	SPAFDSIM-----	AETLK
921.1	SPAFDSIMA-----	ETLK
1050.2	SPAFDSIMAE-----	TLK
1151.3	SPAFDSIMAET-----	LK
1264.4	SPAFDSIMAETL-----	K



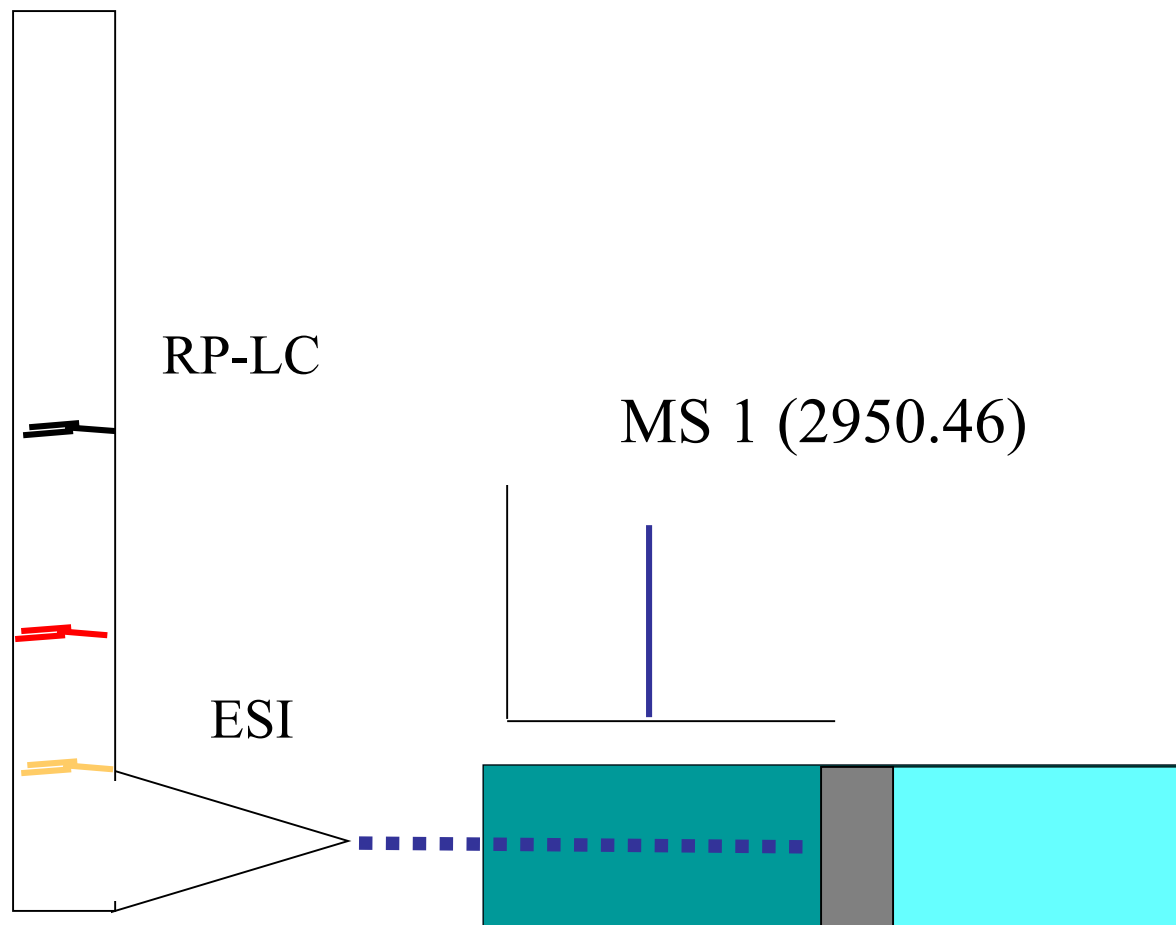
# LC-MS/MS



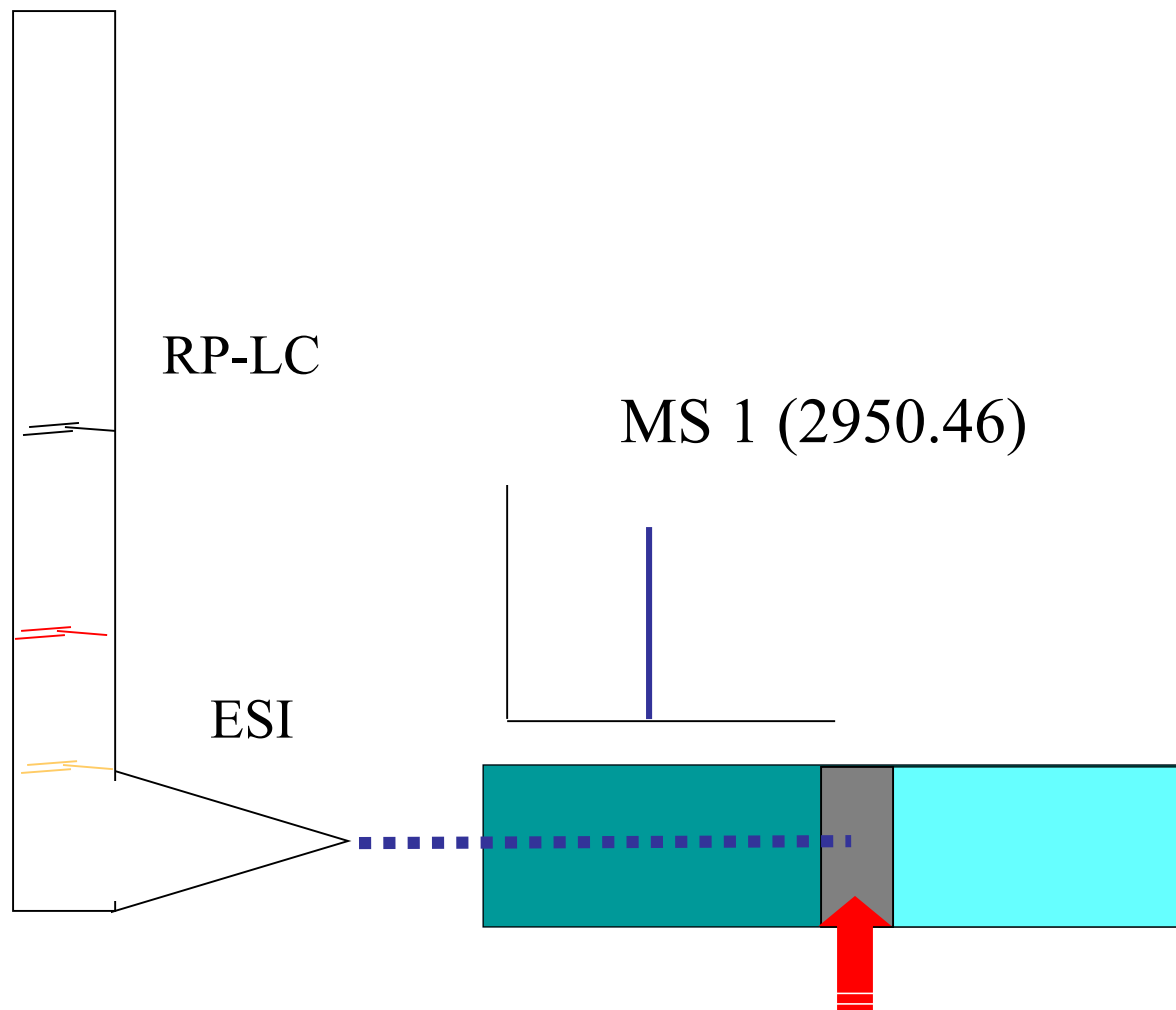
# LC-MS/MS



# LC-MS/MS

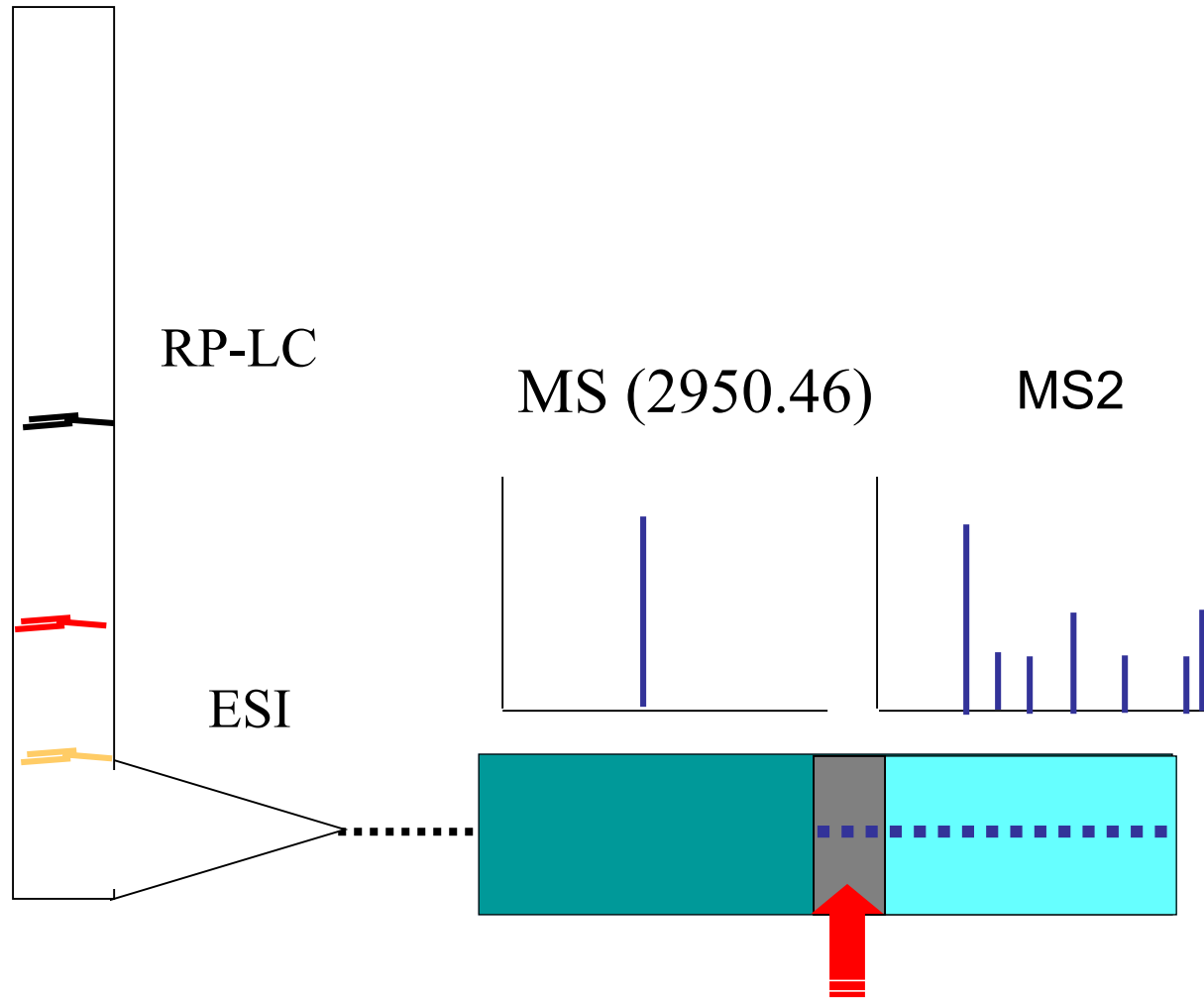


# LC-MS/MS

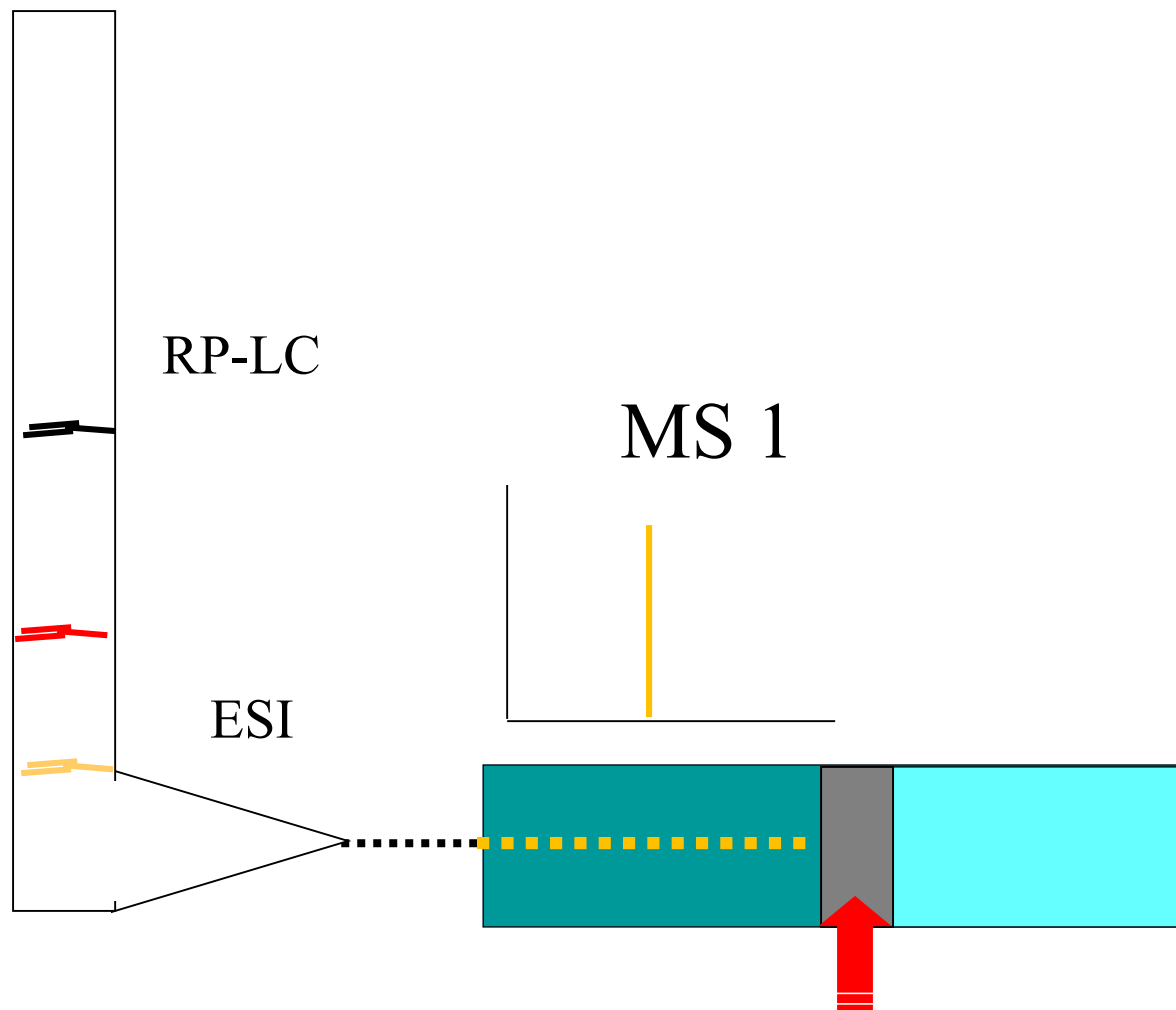




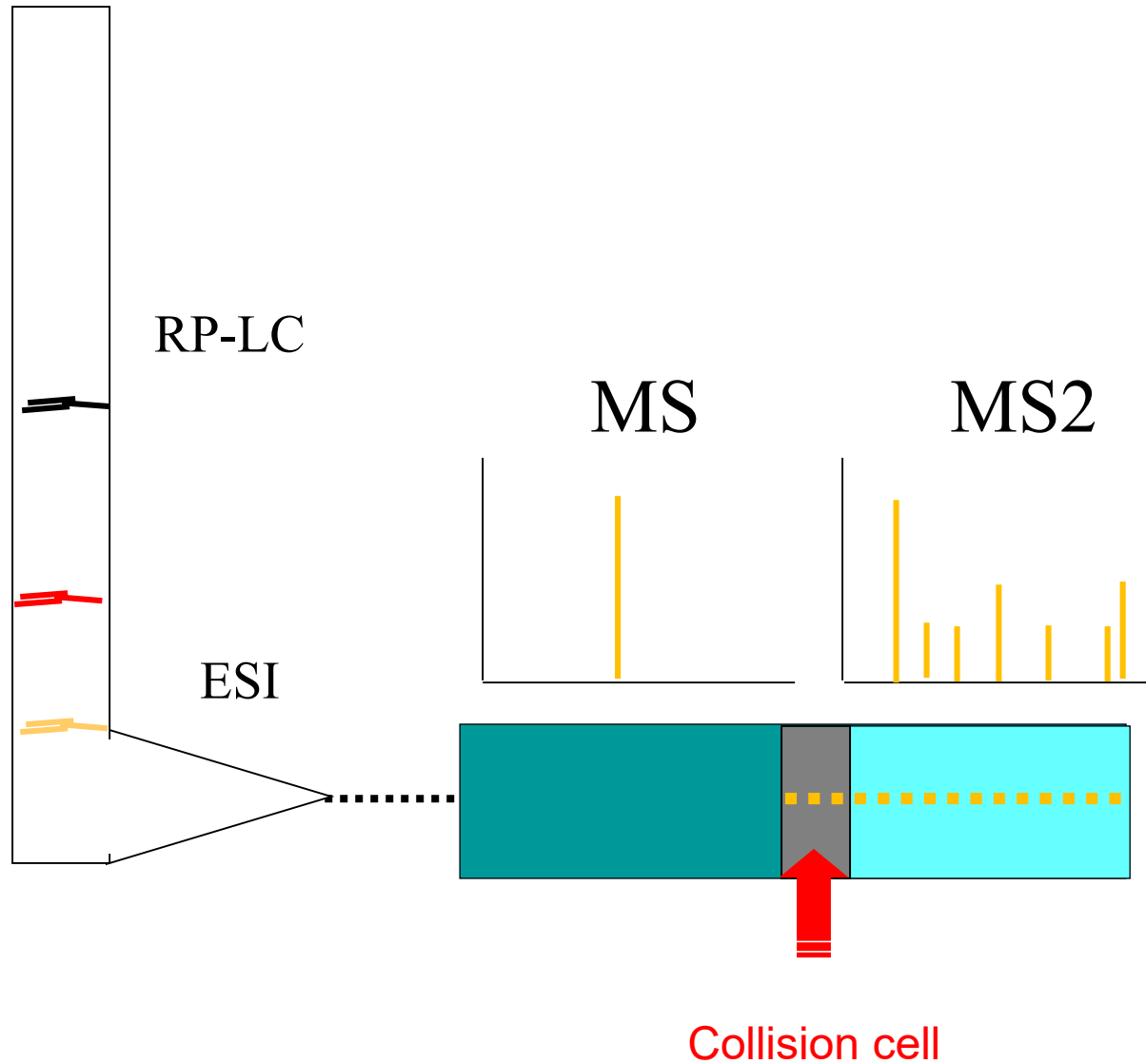
# LC-MS/MS



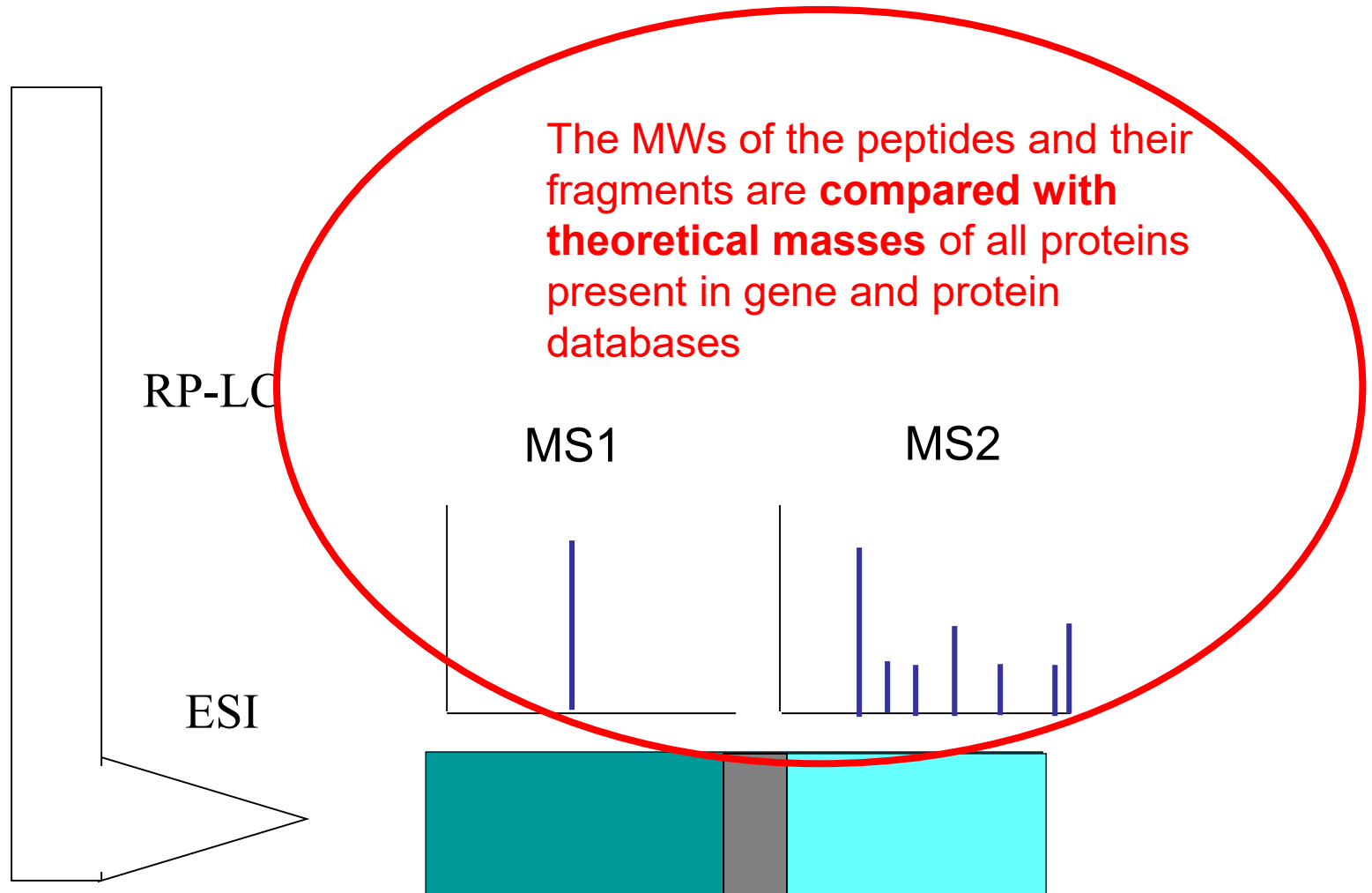
# LC-MS/MS



# LC-MS/MS



# LC-MS/MS



# Identification of protein in databases from MS data

**GENES, ORFs**



*In silico* translation

**PROTEINS**



*In silico* digestion with trypsin (-R/-K)

**PEPTIDES**



**theoretical MWs of peptides**

**FRAGMENTS**



**theoretical MWs of peptide fragments**

**Gene/Protein identification**

**MS data**  
MWs of **peptides** and  
their **fragments**

