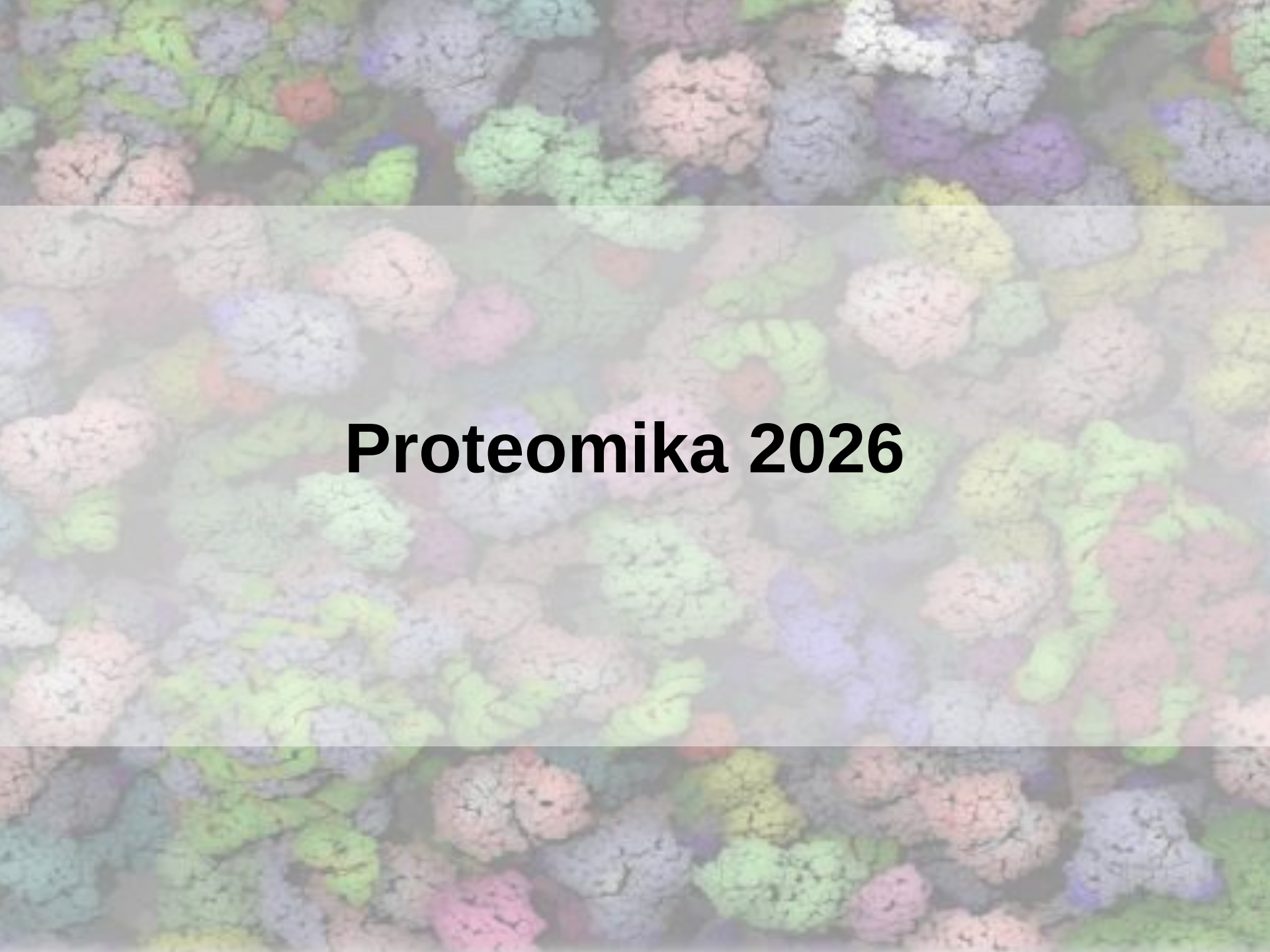




Proteomika 2026

PROTEOMIKA

2026

- **Proteomika, metody práce s bílkovinami** (Petrák 5/10)
- **Separační metody, digesce a principy ID bílkovin pomocí MS** (Petrák 12/10)
- **Principy hmotnostní spektrometrie, instrumentace** (Man 19/10)
- **Hmotnostní spektrometrie v proteomice, analýza PTM** (Man 26/10)
- **ID proteinů, akvizice dat DDA, DIA, databáze, FDR** (Talacko 2/11)
- **Kvantifikace, isotopy, LFQ, cílená proteomika** (Harant 9/11)
- **Příprava vzorku, Design experimentu, zpracování dat....**(Petrák 16/11)
- **Proteomika membránových proteinů, proteinové komplexy** (Petrák 23/11)
- ----- 30/11/2026 přednáška není -----
- **Klinická proteomika, plazma, biomarkery, speciální metody** (Petrák 7/12)

PROTEOMIKA 2026

Prezentace z loňských přednášek + doporučená literatura na adrese:

<http://petraklab.cz/teaching>

Zkouška:

Písemná esej na zadané téma a ústní zkouška

5/10/2026

- **Proteomika, protein, proteom, proteoforma**
- **Počet analytů a jejich koncentrace**
- **Důležité vlastnosti proteinů a AMK**
- **Práce s bílkovinami**
 - Dezintegrace tkání a buněk, detergenty
 - Rozpustnost, srážení, denaturace, koncentrace
 - Značení a imobilizace bílkovin

Proteom – Kompletní sada bílkovin přítomná v daný okamžik v studovaném organismu, tkáni, buňce nebo organele. Zahrnuje PTM, změny lokalizace, jejich metabolický obrat a interakce bílkovin. (Wilkins 1996)

Proteomika – soubor metod, konceptů a přístupů používaných ke kvantitativnímu a kvalitativnímu popisu proteomů

Expresní/diferenční proteomika

usiluje o (semi) kvantitativní porovnávání proteomů, tj. o identifikaci bílkovin, které jsou odlišně exprimovány (zastoupeny) mezi dvěma nebo více vzorky.

Current proteomic workflow

LC-MS/MS



proteins



trypsin...

peptides



Micro or nano-LC
1D or 2D

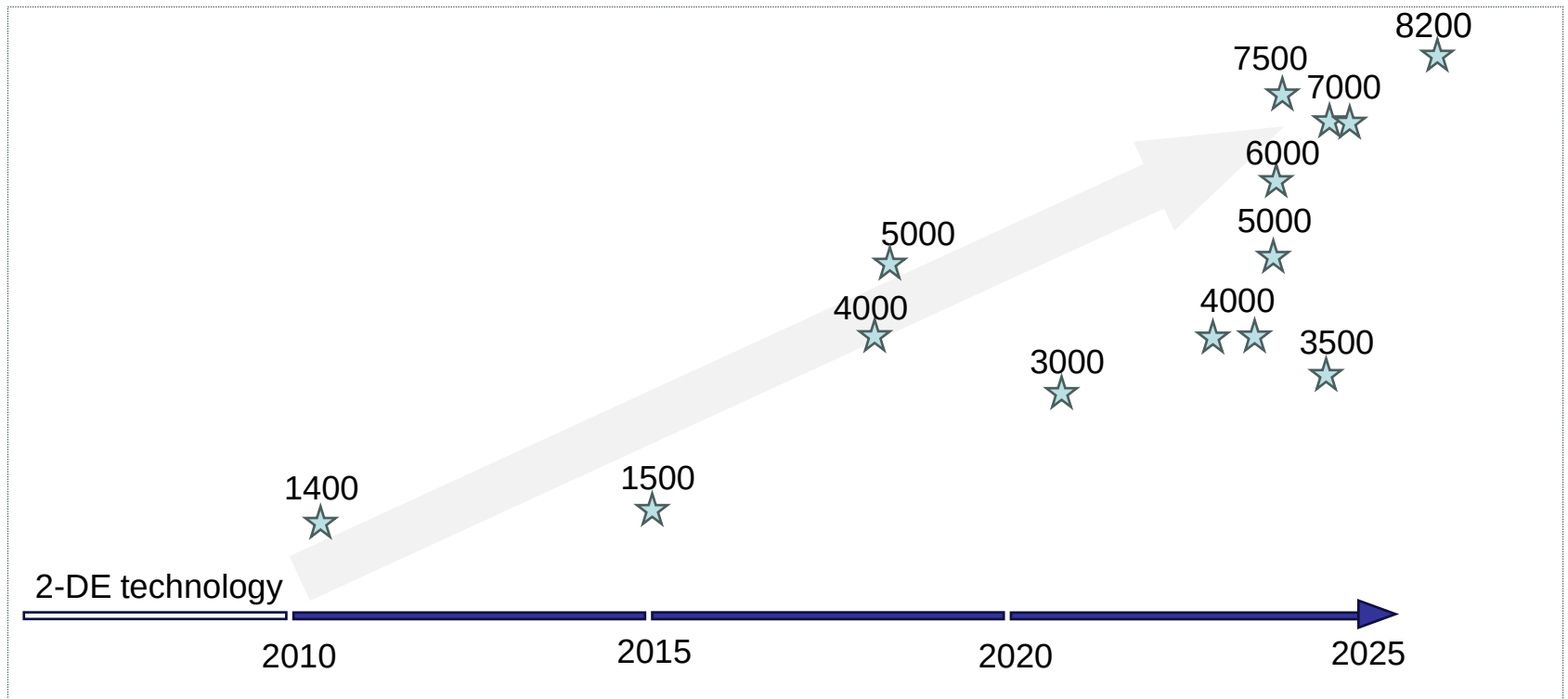


Mass spectrometry



**Peptide/protein
identification and quantification**

Number of proteins identified in single proteomic experiments



- Proteomika, protein, proteom, proteoforma
- **Počet analytů a jejich koncentrace**
- Důležité vlastnosti proteinů a AMK
- Práce s bílkovinami
 - Dezintegrace tkání a buněk, detergenty
 - Rozpustnost, srážení, denaturace, koncentrace
 - Značení a imobilizace bílkovin

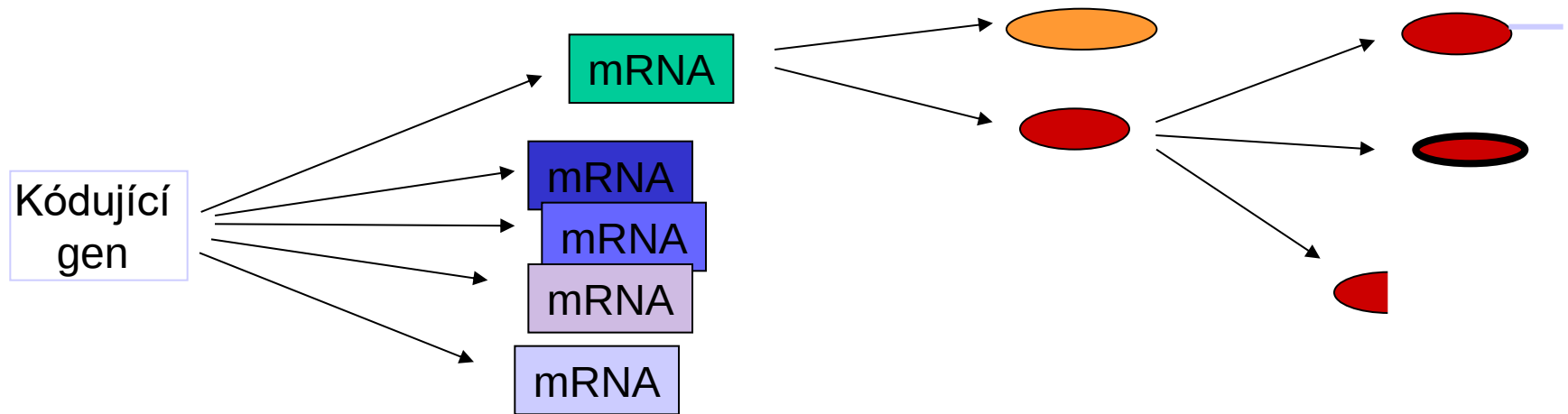
Základní úvahy:

1) Počet analytů

- 2) Koncentrace jednotlivých analytů, dynamický rozsah koncentrací
- 3) Fyzikálně-chemické vlastnosti, rozpustnost, stabilita, MW....

Komplexita proteomu – Kolik je proteinů?

~19 500 lidských genů → ? mRNA ? → ??? Proteinů ???
4-6 různých

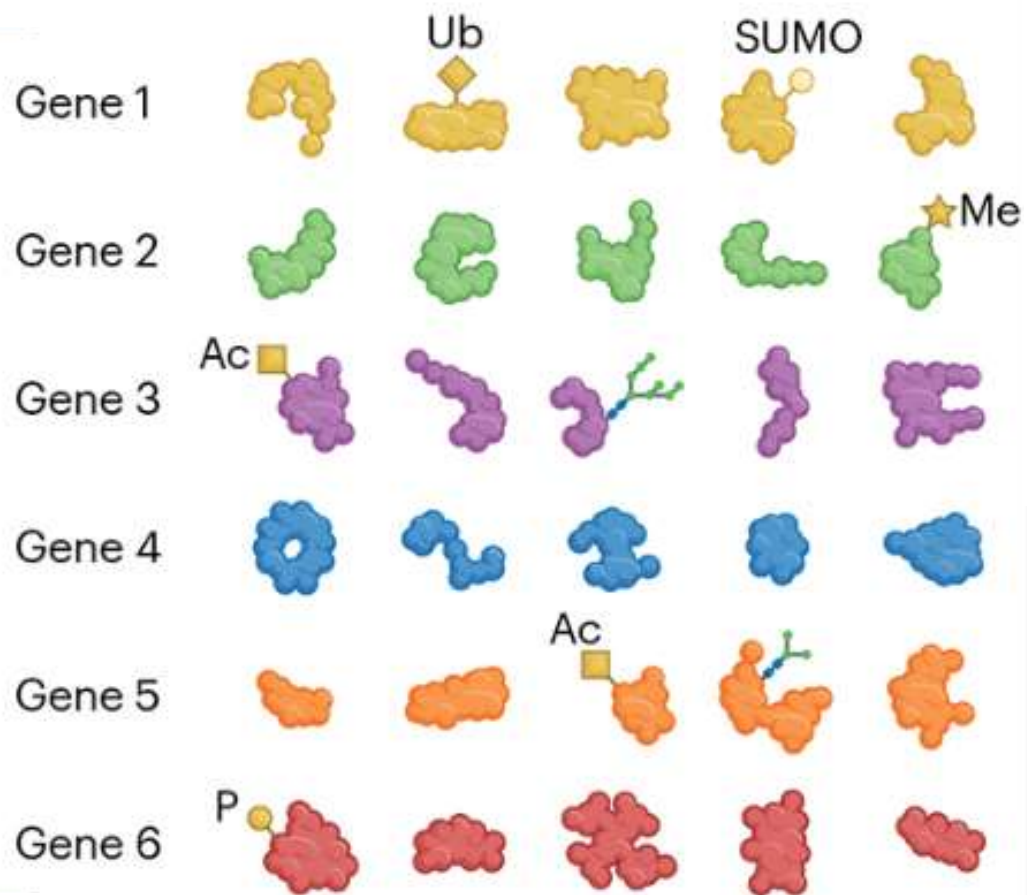


JAK JE DEFINOVÁN PROTEIN?

GENOCENTRICKÝ vs. PROTEOCENTRICKÝ POHLED

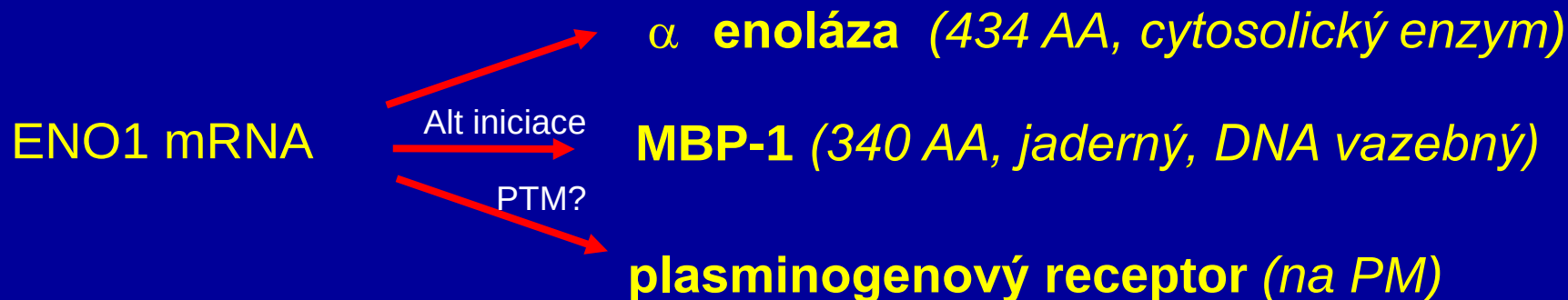
PROTEIN a **PROTEOFORMA**

Proteoforms



Jak je definován protein?

alfa ENOLÁZA



Jsou DVĚ molekuly, lišící se strukturou, funkcí a lokalizací
JEDNÍM proteinem?

Je **protein** definován kódujícím genem?

Strukturou?

Funkcí?

The human proteome – how many proteins do we have?

Gene-centric view

~19 500 protein coding
genes



Cca 19 500 proteins

Proteo-centric view

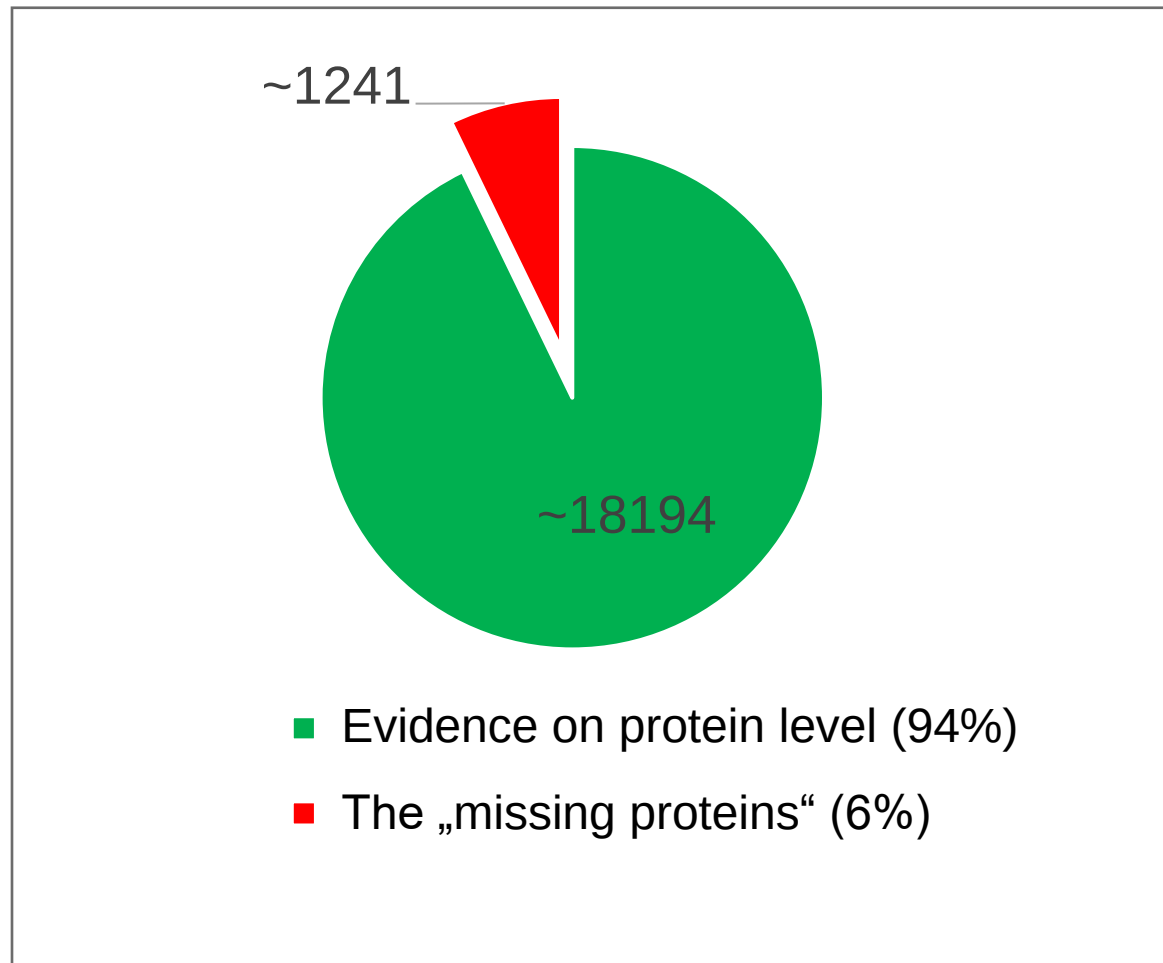
~19 500 protein coding
genes



> 1 000 000 protein variants
(proteoforms)

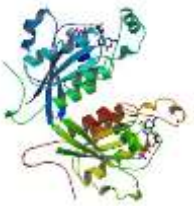
HUPO PROJECT – 2025

~19 435 protein-coding genes



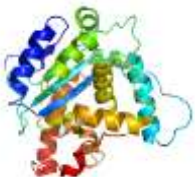


A typical mammalian cell actively transcribes $\frac{1}{2}$ of its genes



> 10 000 proteins

Range of concentrations: up to 7- 8 orders of magnitude



Proteomics uses **liquid chromatography and tandem mass spectrometry** (LC-MS/MS) to identify and quantify as many as possible proteins in the sample

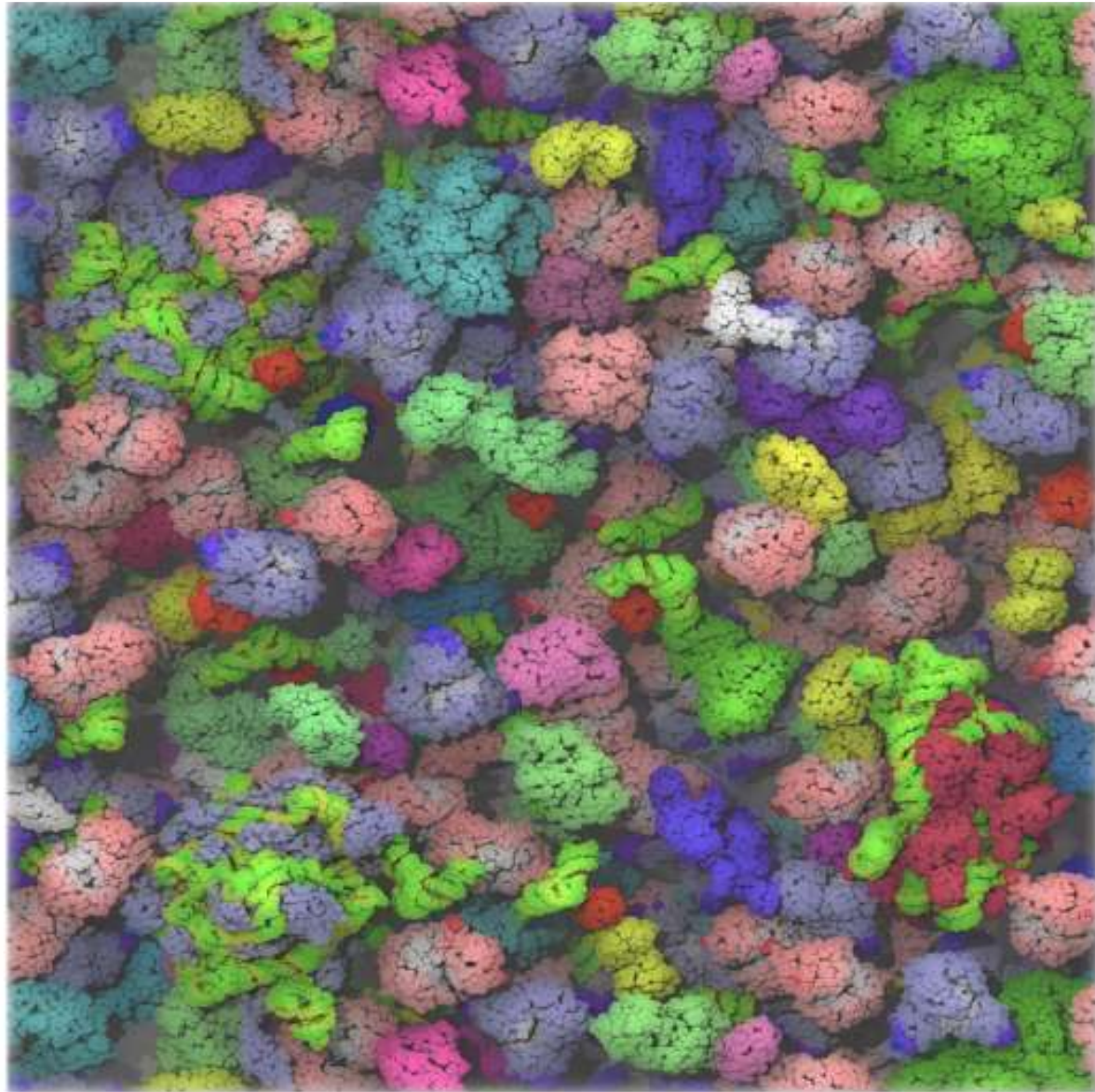
Základní úvahy:

1) Počet analytů

2) **Koncentrace jednotlivých analytů, dynamický rozsah koncentrací**

3) **Fyzikálně-chemické vlastnosti, rozpustnost, stabilita, MW....**

80% of dry mass 75-100 mg/mL

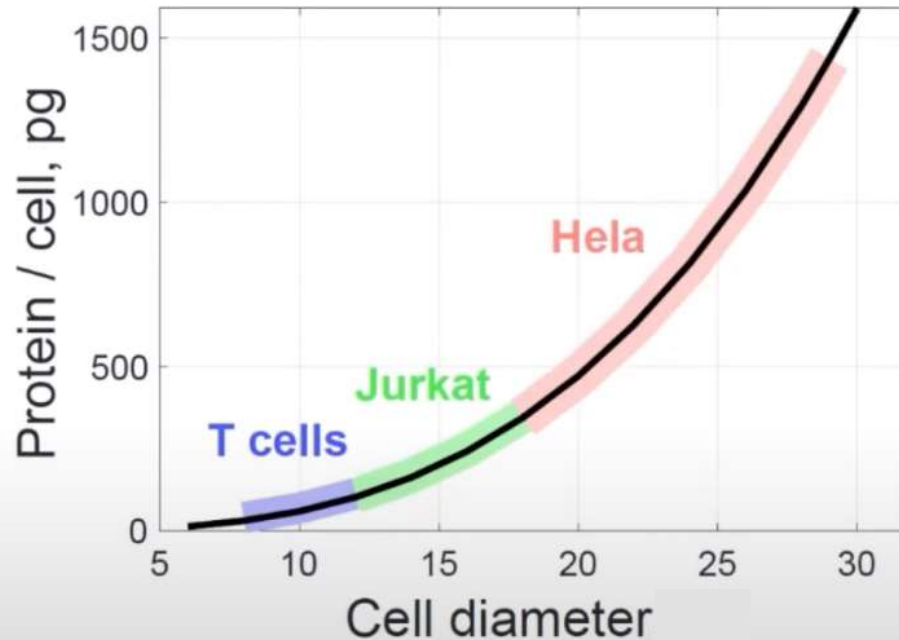


Koncentrace proteinů v buňce

75-100 mg/ml

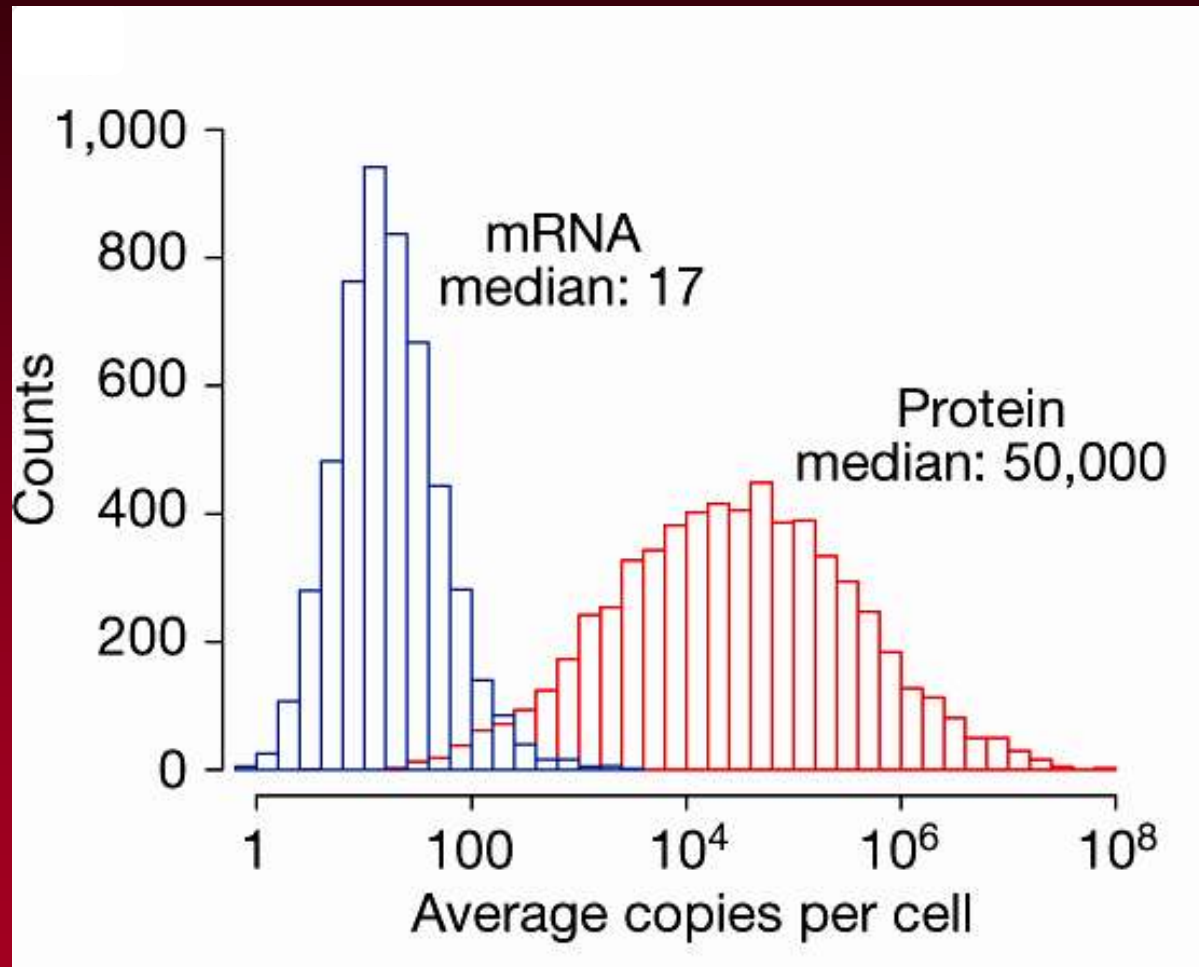
(cca 0,1-1 ng/buňku)

Nižší miliardy proteinových molekul/buňku

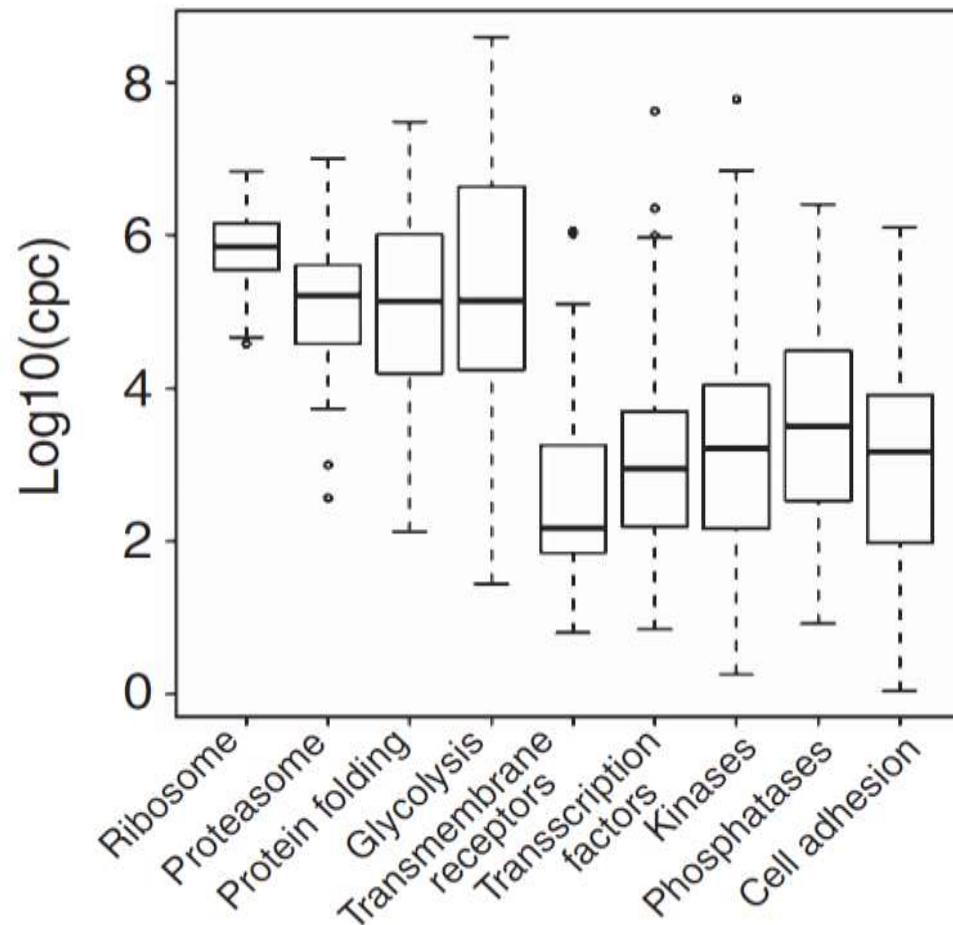


¹Estimates based on R Milo, *Bioessays*, 2013

Rozpětí koncentrace/počtu kopií jednotlivých proteinů na buňku (10 - 10^8)



Rozpětí koncentrace/počtu kopií jednotlivých proteinů na buňku (10^{-10^8})



Desítky kopií až desítky milionů kopií na buňku

Základní úvahy:

- 1) Počet analytů
- 2) Koncentrace jednotlivých analytů, dynamický rozsah koncentrací
- 3) **Fyzikálně-chemické vlastnosti, rozpustnost, MW....**

- Proteomika, protein, proteom, proteoforma
- Počet analytů a jejich koncentrace
- **Důležité vlastnosti proteinů a AMK**
- **Práce s bílkovinami**
 - Dezintegrace tkání a buněk, detergenty
 - Rozpustnost, srážení, denaturace, koncentrace
 - Značení bílkovin



Ser-Tyr

Cys



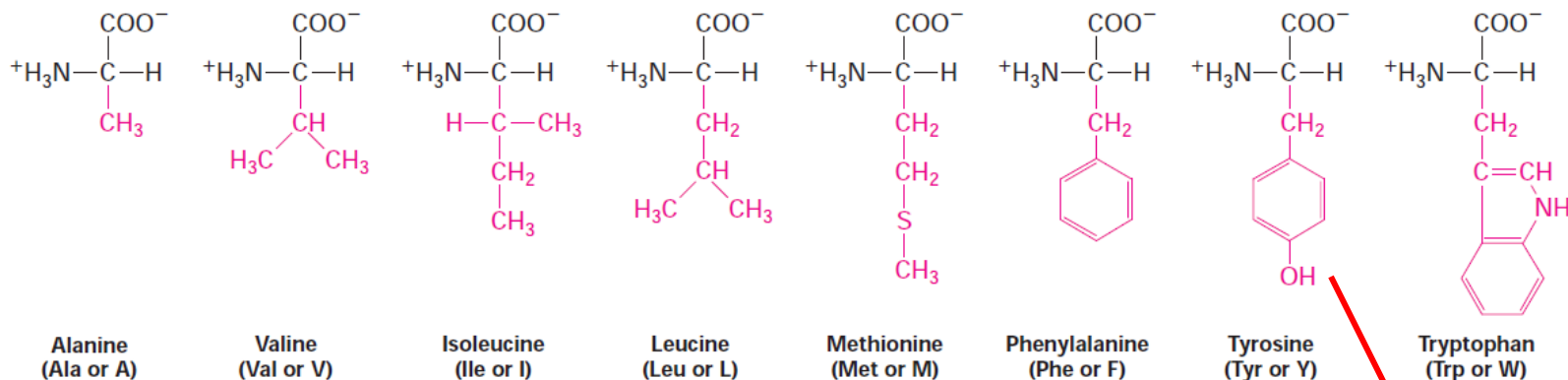
**Amino end
(N-terminus)**

**Carboxyl end
(C-terminus)**

Side chains

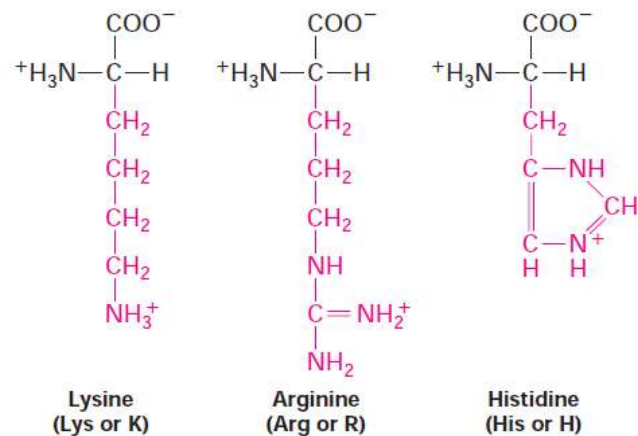
Backbone

HYDROPHOBIC AMINO ACIDS

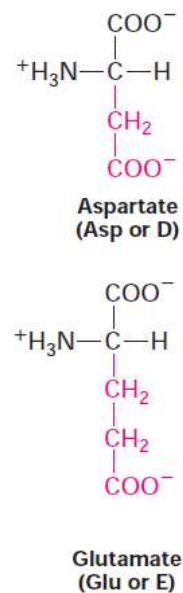


HYDROPHILIC AMINO ACIDS

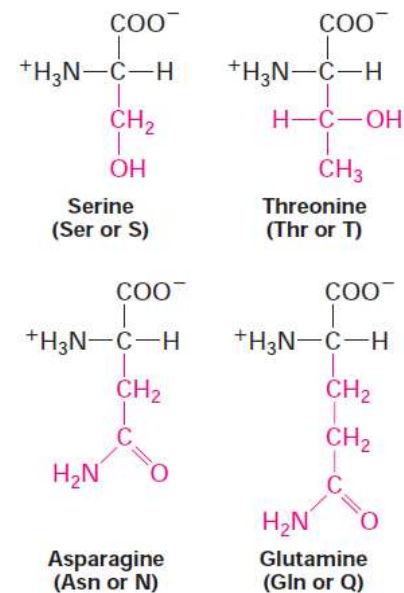
Basic amino acids



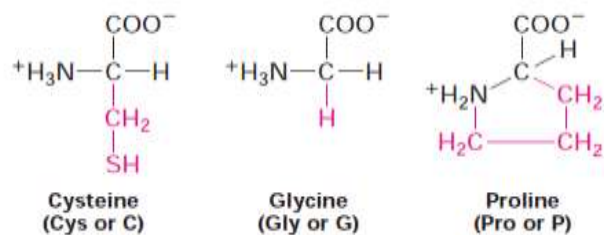
Acidic amino acids



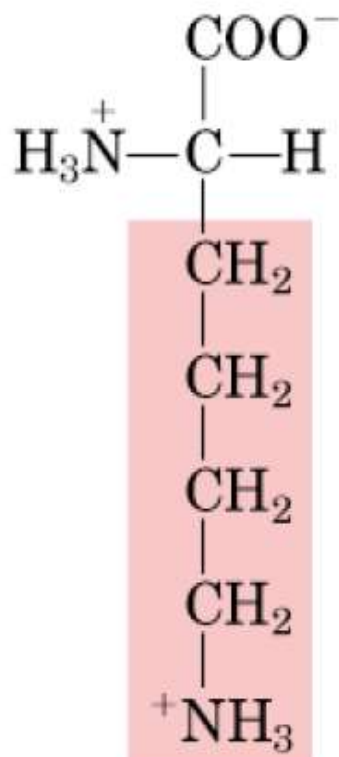
Polar amino acids with uncharged R groups



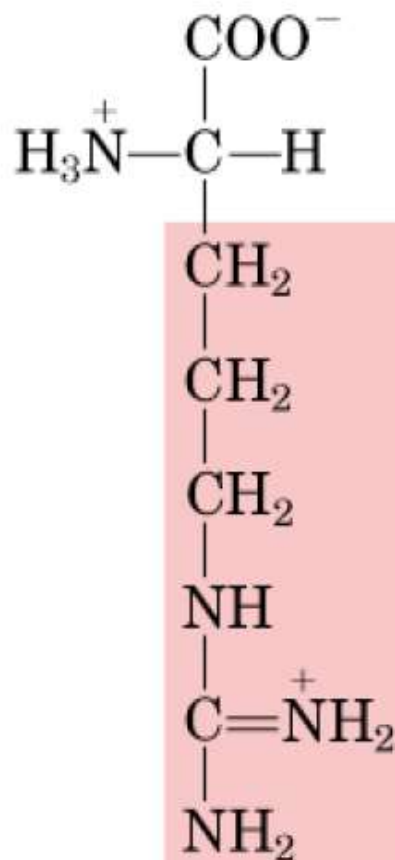
SPECIAL AMINO ACIDS



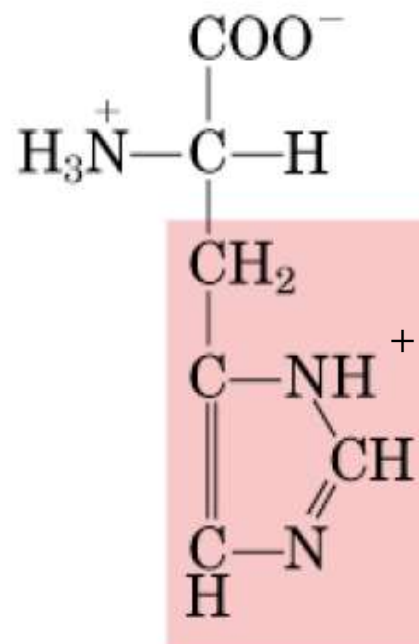
KLADNĚ NABITÉ AMINOKYSELINY (pH 7)
(náboj postranního řetězce)



Lysine



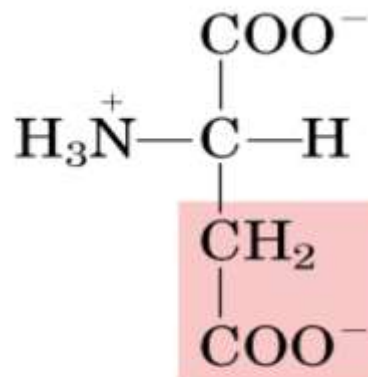
Arginine



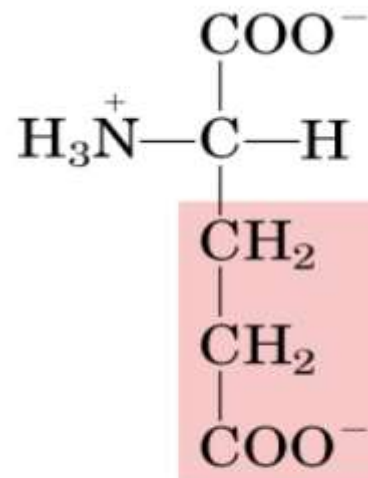
Histidine

ZÁPORNĚ NABITÉ AMINOKYSELINY (náboj postranního řetězce)

pH 7



Aspartate



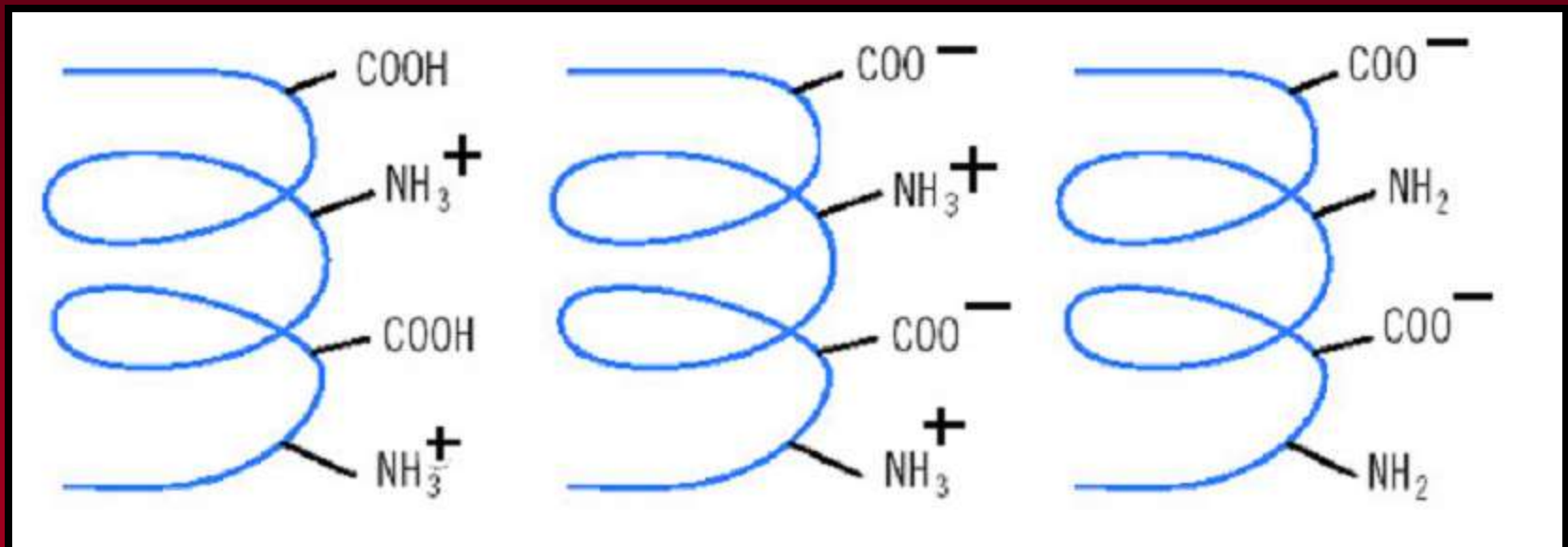
Glutamate

Další skupiny disociující v bazickém prostředí

Cysteine	$-\text{SH} \rightleftharpoons \text{S}^- + \text{H}^+$	8.5
Tyrosine	$\text{—C}_6\text{H}_4\text{—OH} \rightleftharpoons \text{—C}_6\text{H}_4\text{—O}^- + \text{H}^+$	10.0
Lysine	$\text{—NH}_3^+ \rightleftharpoons \text{NH}_2 + \text{H}^+$	10.0
Arginine	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{—N—C} \begin{array}{l} \nearrow \text{NH}_2^+ \\ \searrow \text{NH}_2 \end{array} \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{—N—C} \begin{array}{l} \nearrow \text{NH} \\ \searrow \text{NH}_2 \end{array} \end{array} + \text{H}^+$	12.0

Izoelektrický bod bílkovin

- 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.

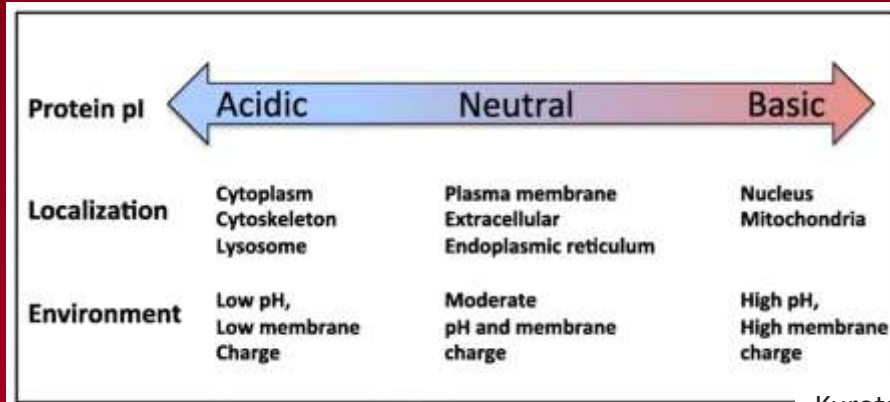
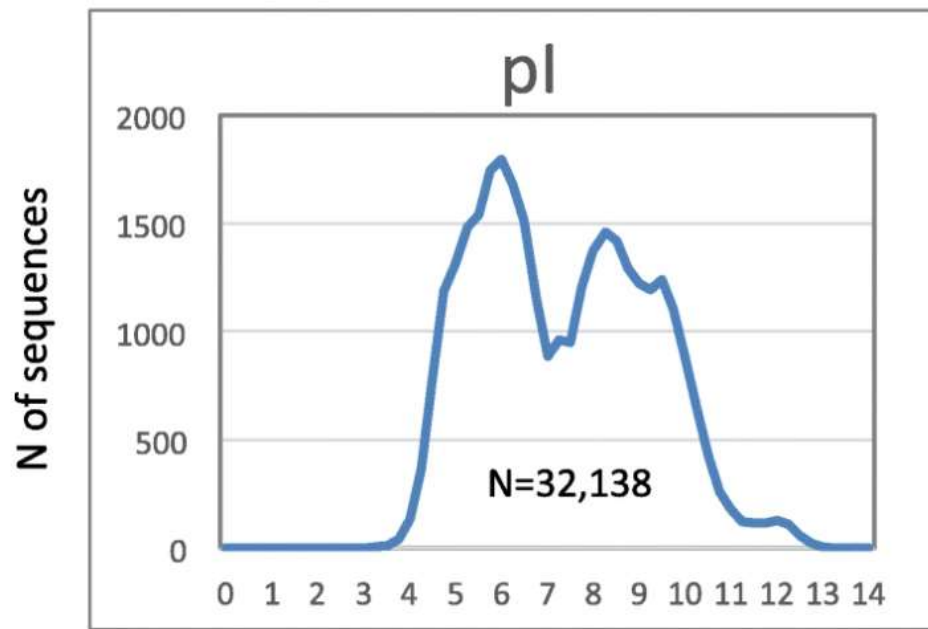


$\text{pH} < \text{pI}$

$\text{pH} = \text{pI}$

$\text{pH} > \text{pI}$

Izoelektrický bod lidských bílkovin



Kurotani A, BMC Mol Cell Biol. 2019;20(1):36.

Proteiny mají nejnižší rozpustnost v oblasti pH kolem jejich izoelektrického bodu !!!
Kontaminace, ztráty, degradace, modifikace, reproducibilita

Hydrofobicita proteinu

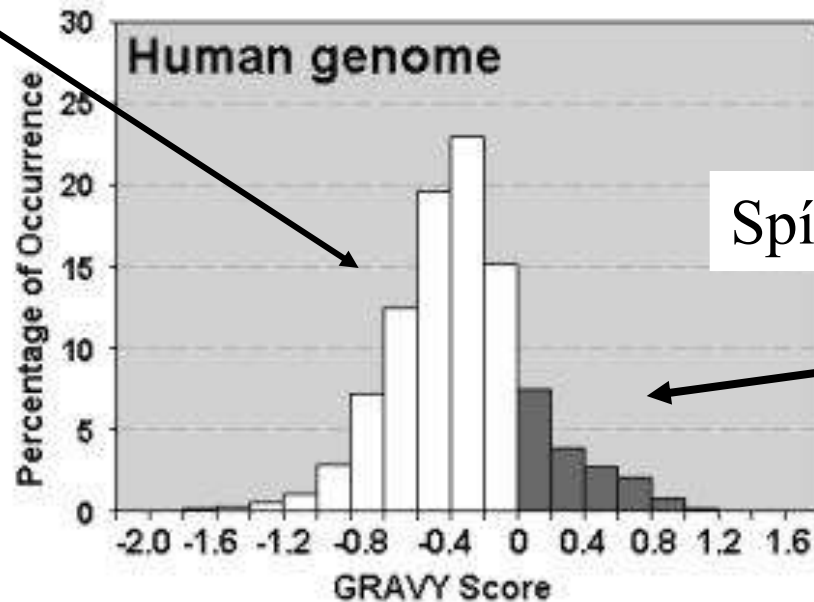
Amino Acid Name	One Letter Code	Hydropathy Score
Isoleucine	I	4.5
Valine	V	4.2
Leucine	L	3.8
Phenylalanine	F	2.8
Cysteine	C	2.5
Methionine	M	1.9
Alanine	A	1.8
Glycine	G	-0.4
Threonine	T	-0.7
Tryptophan	W	-0.9
Serine	S	-0.8
Tyrosine	Y	-1.3
Proline	P	-1.6
Histidine	H	-3.2
Glutamic acid	E	-3.5
Glutamine	Q	-3.5
Aspartic acid	D	-3.5
Asparagine	N	-3.5
Lysine	K	-3.9
Arginine	R	-4.5

GRAVY SCORE – Grand average
hydropathy
(součet „hydrofobicity“ (-4.5 až 4.5)
jednotlivých aminokyselin dělený
počtem aminokyselin)

Hydrofobicita proteinu

GRAVY SCORE – Grand average
hydropathy
(součet „hydrofobicity“ (-4.5 až 4.5)
jednotlivých aminokyselin dělený
počtem aminokyselin)

Spíš rozpustné



Spíš transmembránové

Kyte, J., and Doolittle, R.F. (1982) J.Mol.Biol. 157, 105-132

Velikost proteinů (MW)

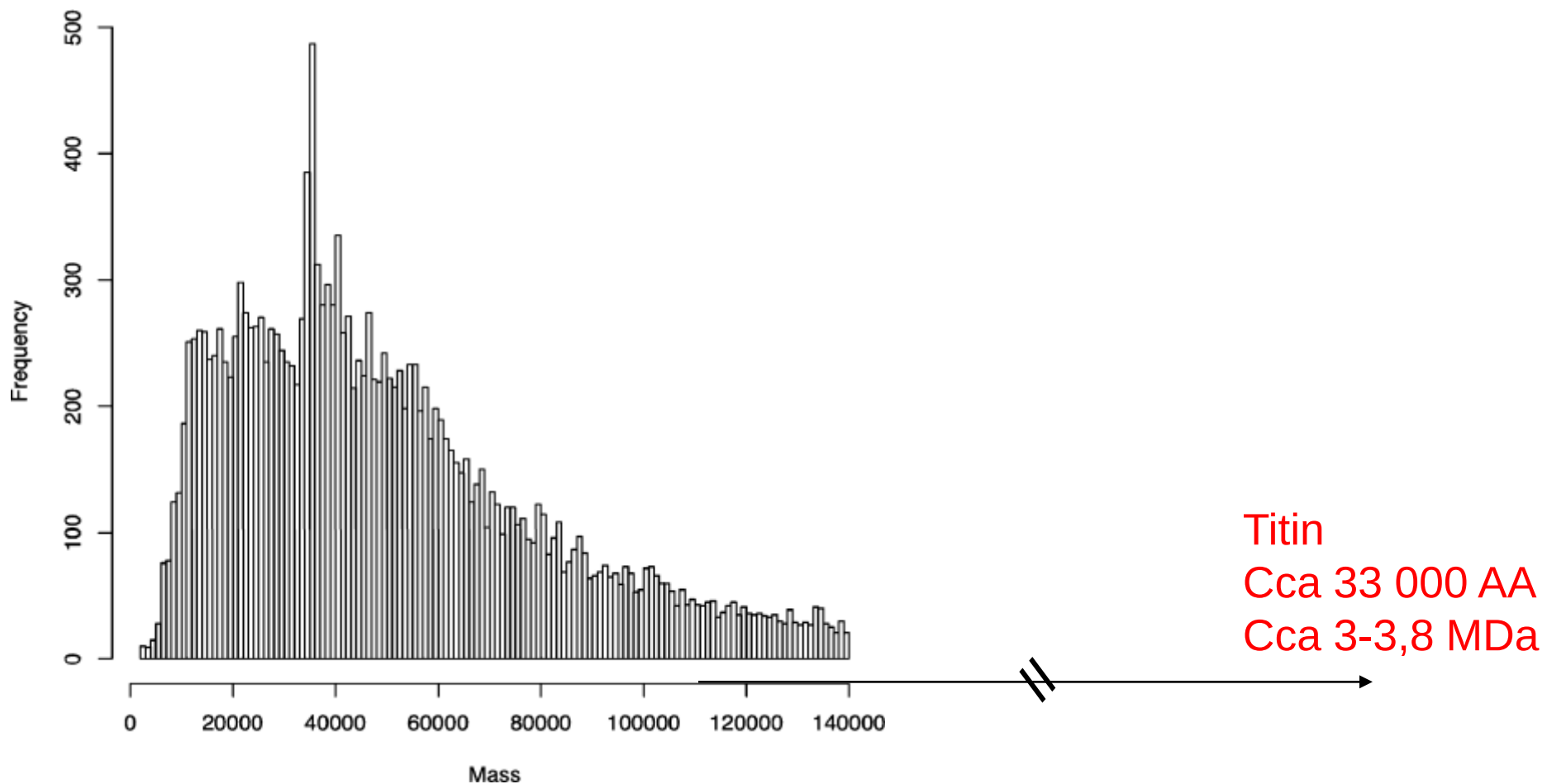


Figure Legend:

Histogram of protein sizes in the human proteome. The plot was created using 18 852 entries for Homo sapiens using the Uniprot Knowledgebase released on April 4, 2011, and the bin size is 1 000 Da.

- Proteomika, protein, proteom, proteoforma
- Počet analytů a jejich koncentrace
- Důležité vlastnosti proteinů a AMK
- **Práce s bílkovinami**
 - Dezintegrace tkání a buněk, detergenty
 - Rozpustnost, srážení, denaturace, koncentrace
 - Značení bílkovin

METODY PRÁCE S PROTEINY

- dezintegrace, lýza, frakcionace
- detergenty
- srážení, precipitace, denaturace
- koncentrace, filtrace
- stanovení koncentrace
- značení bílkovin
- separace proteinů

Dezintegrace buňky, homogenizace tkáně

FYZIKÁLNÍ

- Mechanické homogenizátory
- Mlýny a tlaková zařízení
- Glass beads
- Sonikace
- Hypotonie
- Zamražení



Frakcionace
buněčných organel

FYZIKÁLNE-CHEMICKÉ, CHEMICKÉ

- Detergenty
- Organická rozpouštědla
- Enzymatická příprava protoplastů (lysozym, zymoláza, celuláza)

Dounce homogenizer



Potter-Elvehjem homogenizer



Ultrazvukový
homogenizátor



Bead beater

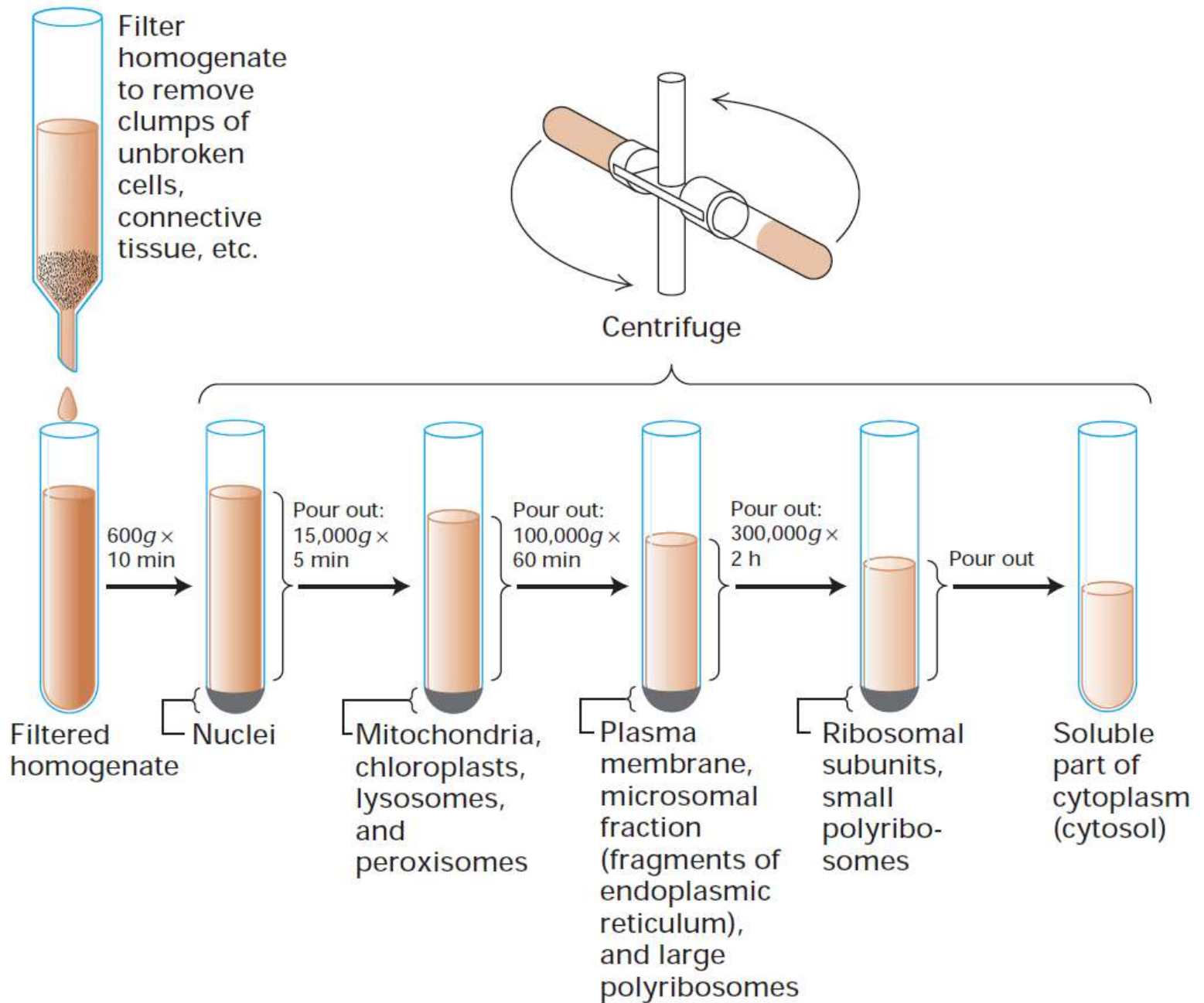


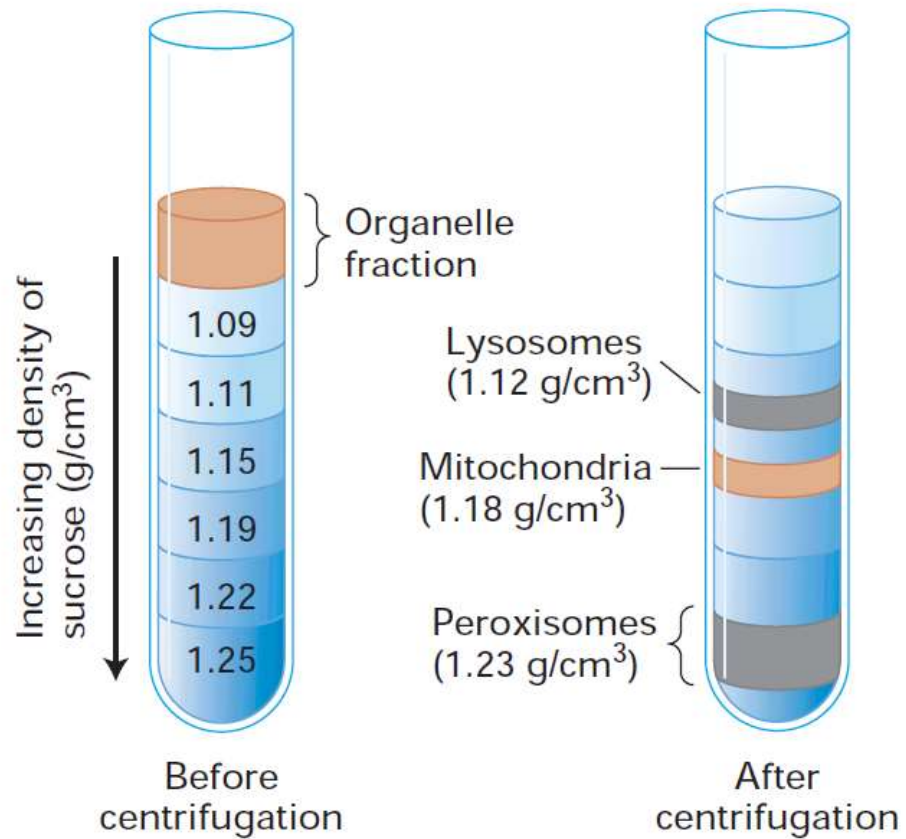
Střížný
homogenizátor



Třecí miska







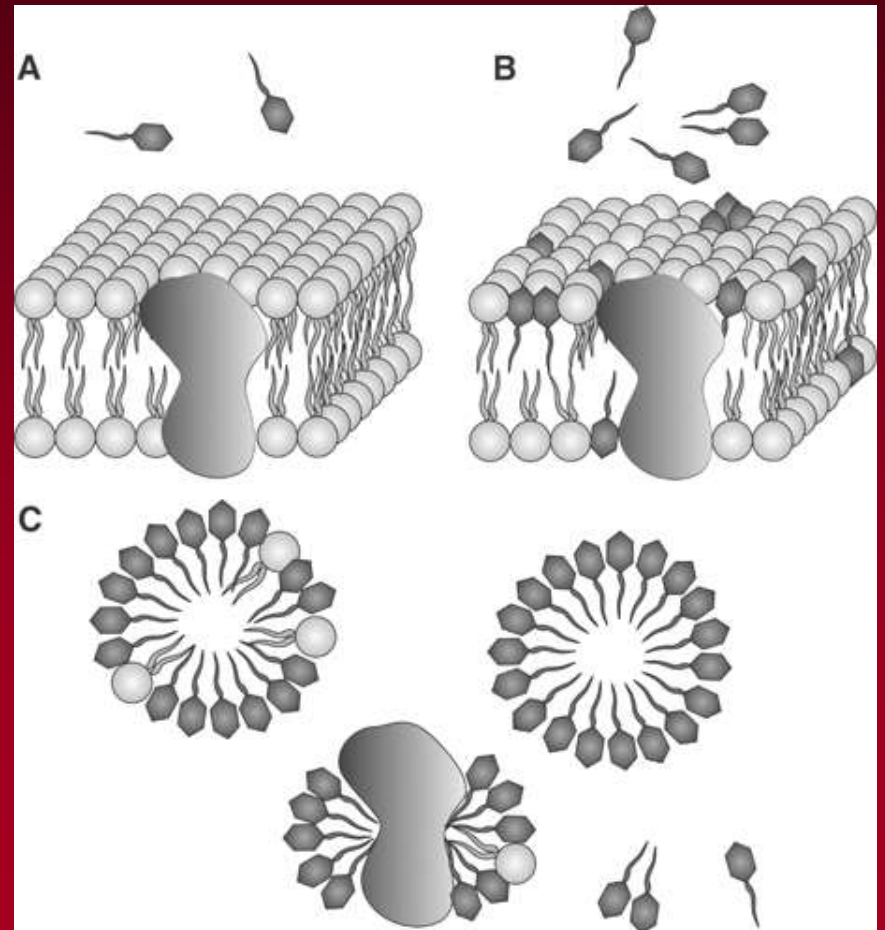
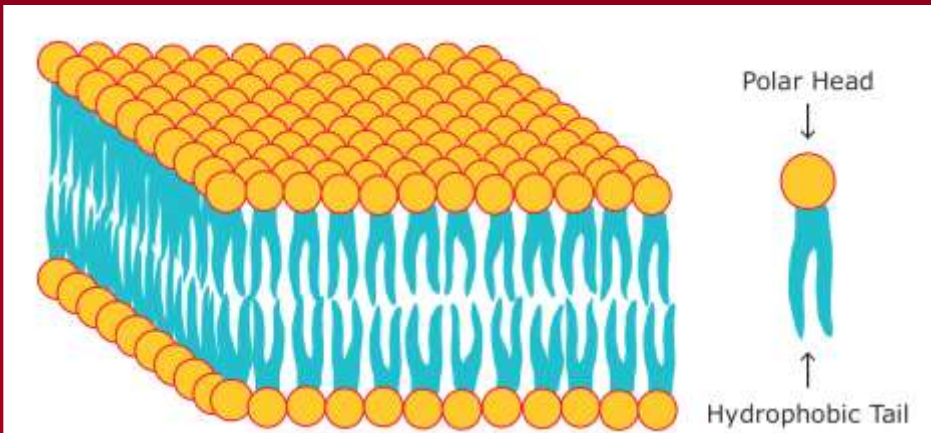
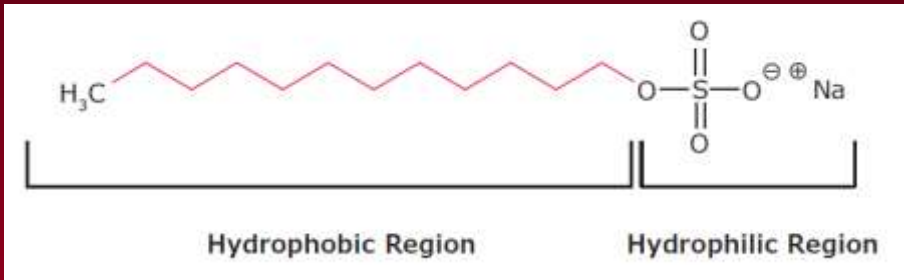
METODY PRÁCE S PROTEINY

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

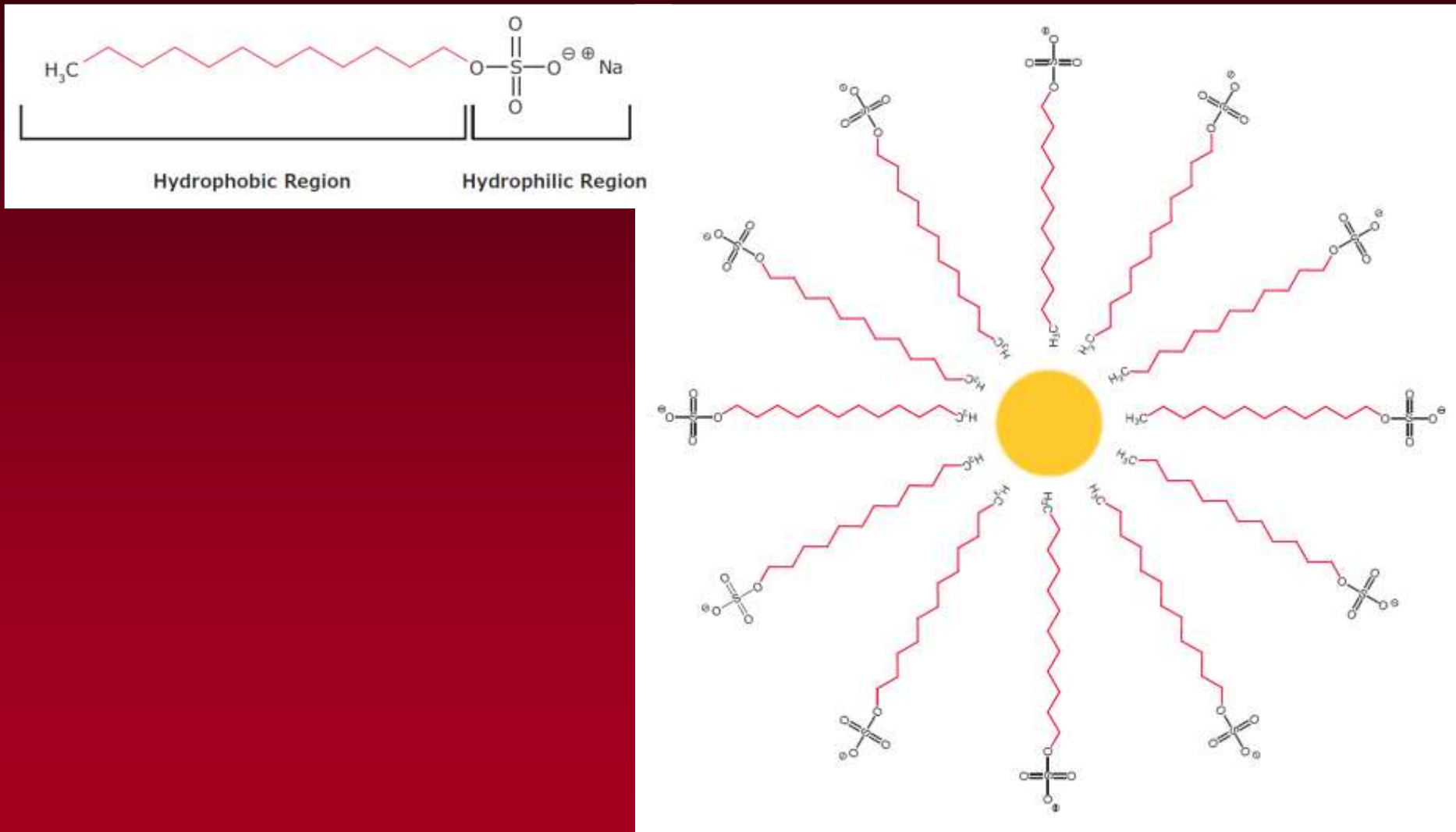
Detergency

- amfifilní molekuly vytvářející ve vodě micely
- interagují s hydrofobní částí proteinů i s vodou
- **dezintegrují membrány a solubilizují proteiny**

SDS

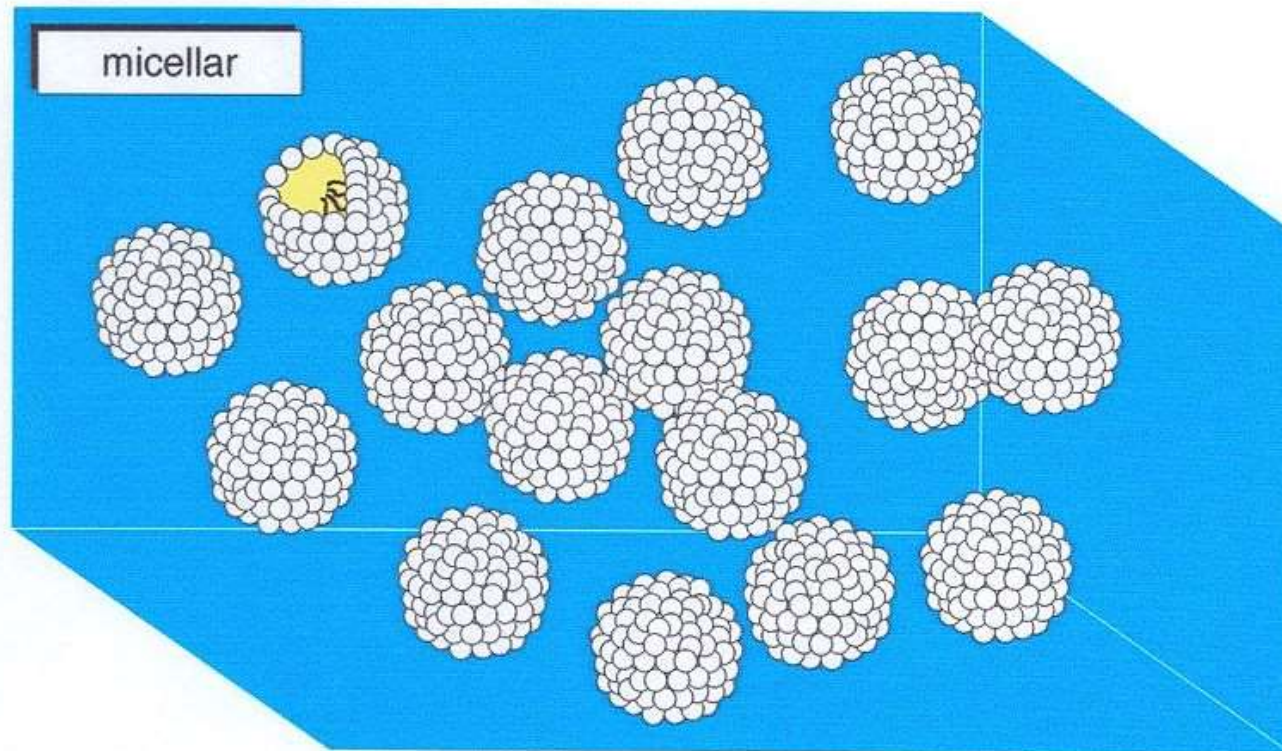


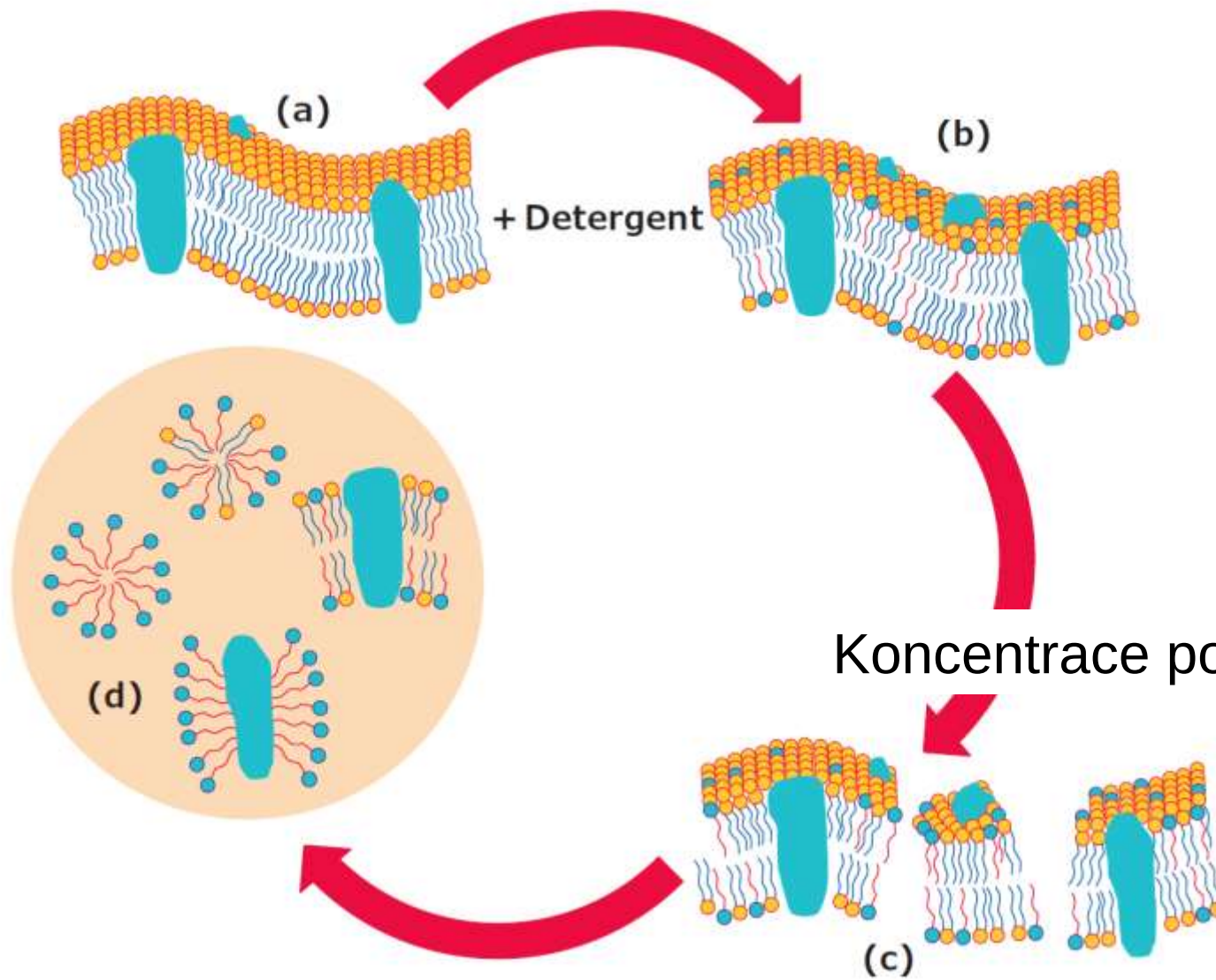
CMC (kritická micelární koncentrace) –koncentrace volného detergentu při jejímž překročení se vytvářejí micely definované velikosti (62 molekul pro SDS, 18 kDa)



CMC (kritická micelární koncentrace) –koncentrace volného detregentu při jejímž překročení se vytvářejí micely definované velikosti (62 molekul pro SDS, 18 k)

Roste s T a klesá s I.





Koncentrace pod CMC

Koncentrace nad CMC

Properties of common detergents.

Agg.# = Aggregation number, which is the number of molecules per micelle.

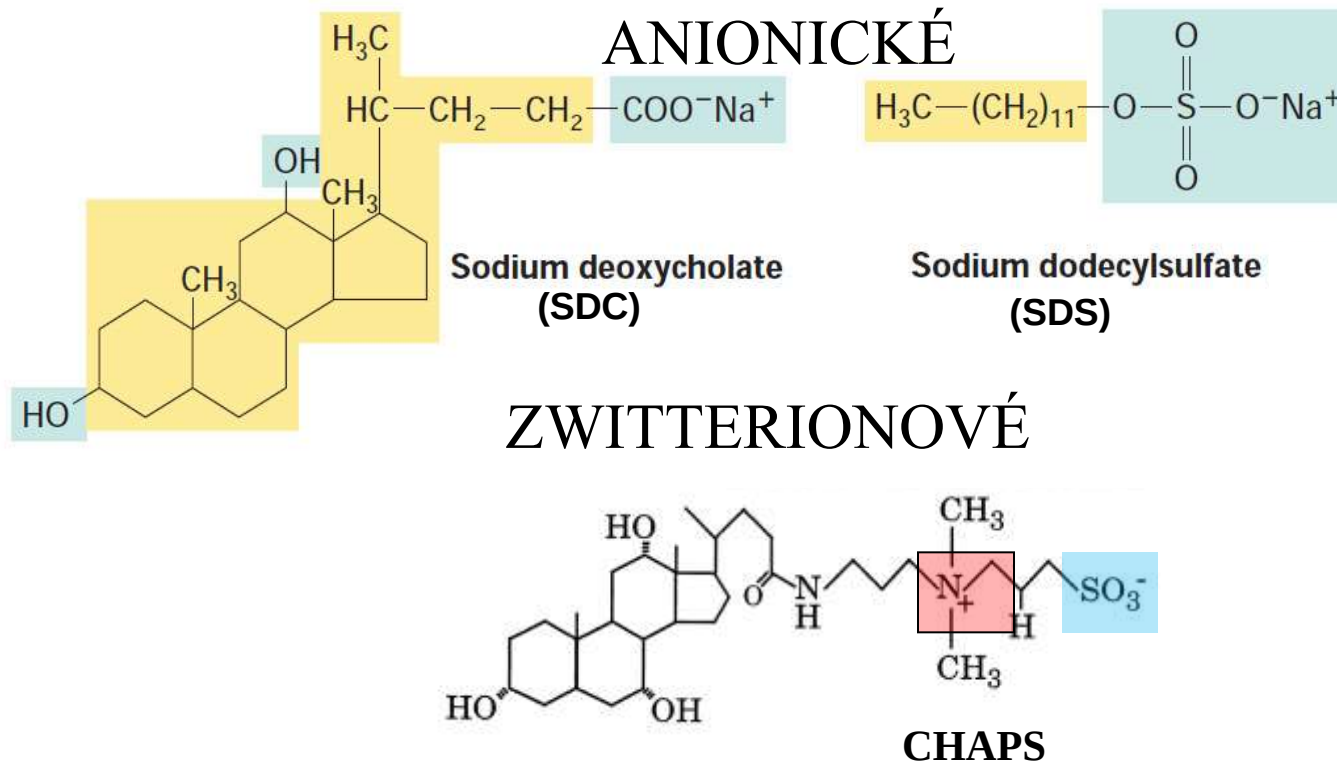
CMC – Critical Micellar Concentration

Detergent	Type	Agg.#	MW mono (micelle)	CMC mM (%w/v)	Cloud Point °C	Dialyzable
Triton X-100	Nonionic	140	647 (90K)	0.24 (0.0155)	64	No
Triton X-114	Nonionic	–	537 (–)	0.21 (0.0113)	23	No
NP-40	Nonionic	149	617 (90K)	0.29 (0.0179)	80	No
Brij-35	Nonionic	40	1225 (49K)	0.09 (0.0110)	>100	No
Brij-58	Nonionic	70	1120 (82K)	0.08 (0.0086)	>100	No
Tween 20	Nonionic	–	1228 (–)	0.06 (0.0074)	95	No
Tween 80	Nonionic	60	1310 (76K)	0.01 (0.0016)	–	No
Octyl glucoside	Nonionic	27	292 (8K)	23-24 (~0.70)	>100	Yes
Octyl thioglucoside	Nonionic	–	308 (–)	9 (0.2772)	>100	Yes
SDS	Anionic	62	288 (18K)	6-8 (0.17-0.23)	>100	No
CHAPS	Zwitterionic	10	615 (6K)	8-10 (0.5-0.6)	>100	Yes
CHAPSO	Zwitterionic	11	631 (7K)	8-10 (~0.505)	90	Yes

Detergenty

- Ionogenní

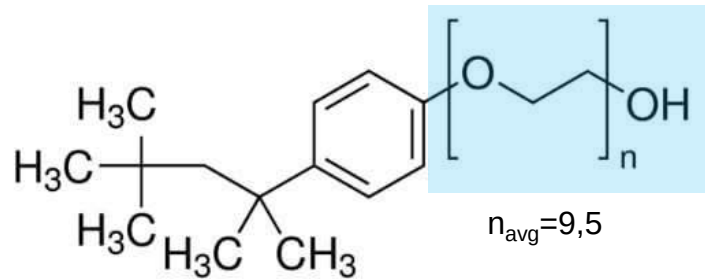
„Silnější“, zpravidla denaturující



Detergenty

Neionogenní

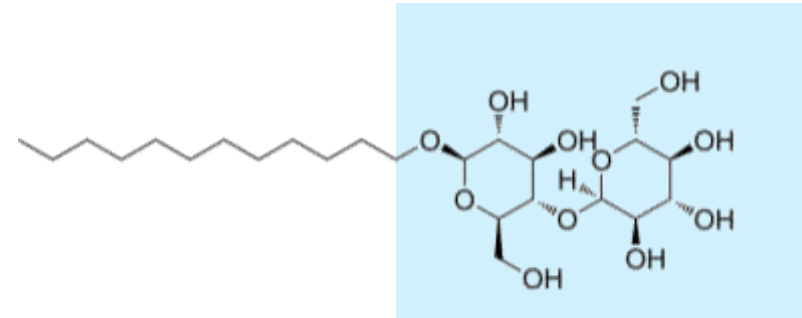
Triton X-100



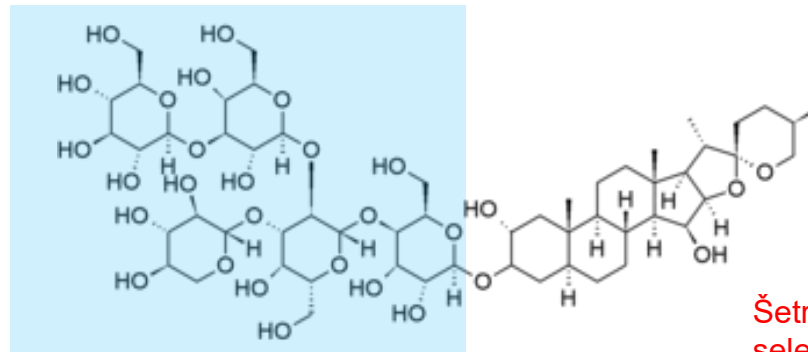
Lauryl maltoside

Dodecyl maltoside, DDM

V nízkých koncentracích slučitelný s LC a MS



Digitonin



Triton X-114

Tween 20

Tween 40

Nonidet

Šetrný k proteinovým komplexům
selektivní permeabilizace PM

METODY PRÁCE S PROTEINY

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

Precipitace bílkovin

Snížení solvatačního potenciálu rozpouštědla a narušení solvatačního obalu proteinu vedoucí k tvorbě precipitátu

Precipitace bílkovin

Snížení solvatačního potenciálu rozpouštědla a narušení solvatačního obalu proteinu vedoucí k tvorbě precipitátu

Rozpustnost proteinu je výsledkem:

- polárních interakcí s vodným rozpouštědlem
- iontových interakcí s přítomnými solemi
- odpuzivých elektrostatických sil

Rozpustnost proteinu závisí na:

- struktury proteinu
- **pH, I a typu soli, T**
- **struktury vody v solvatačním obalu**

Precipitace je POTENCIÁLNĚ spojena s DENATURACÍ!

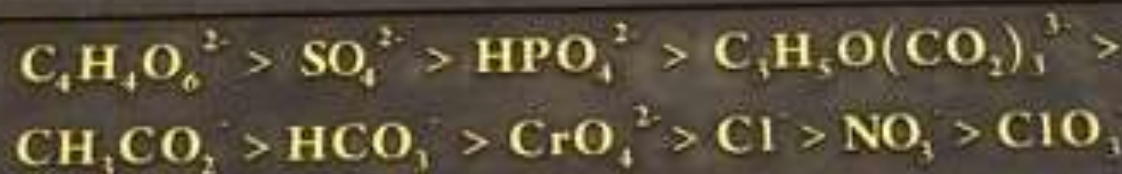
Precipitace v praxi :

- Nízkou iontovou silou
- **Vysolováním (salting-out)**
- **Organickými rozpouštědly**



Franz Hofmeister

VORLESESAAL DER CHEMIE PROF. FRANZ HOFMEISTER (1814-1882)
 SEINER KENNZUNGE DER MINERALOGIE SEIN VORWORT BEI DER ERÖFFNUNG
 DES VORLESERS SALES UND SEINER VORLESER DER MINERALOGIE (1814-1882)



IN DIESEM SALE FÖRSCHE DER MINERALOGIE CHEMIE
 PROF. FRANZ HOFMEISTER (1814-1882), WELCHER DIE MINERALOGIE
 DER MINERALOGIE IN EINER VORLESER UND DER MINERALOGIE
 (HOFMEISTER, SEINER VORLESER)



SALTING-OUT – VYSOLOVÁNÍ

Lyotropní vlastnosti aminokyselin

Jednotlivé soli se liší schopností precipitovat/denaturovat proteiny

HOFMEISTER SERIES

Cations

NH_4^+ K^+ Na^+ Li^+ Mg^{2+} Ca^{2+} guanidinium $^+$



SO_4^{2-} HPO_4^{2-} acetate $^-$ citrate $^-$ Cl^- NO_3^- ClO_3^- I^- ClO_4^- SCN^-

Anions

↑ Precipitace

↓ Denaturace

↑ Stabilita proteinu



↓ Precipitace

↑ Denaturace

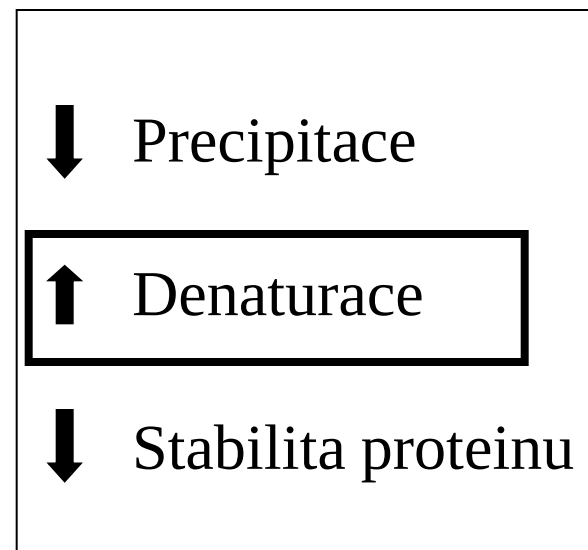
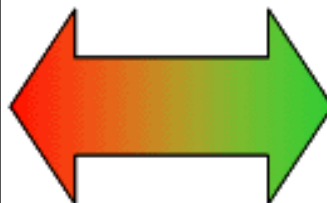
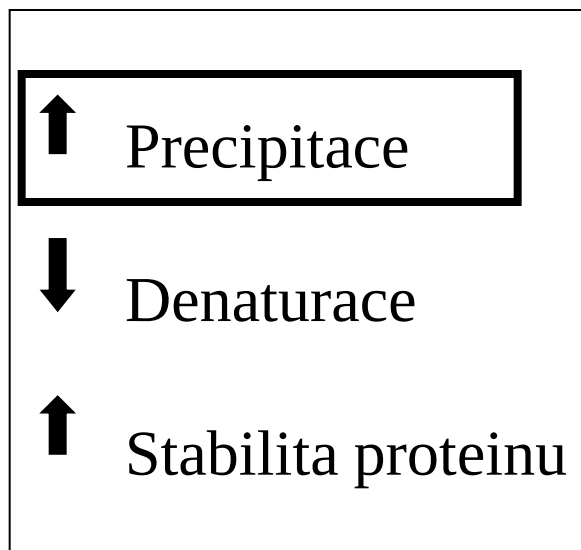
↓ Stabilita proteinu



Franz
Hofmeister
(1850-1922)

HOFMEISTER SERIES

Cations								[CH ₆ N ₃] ⁺ . guanidinium ⁺	
NH ₄ ⁺	K ⁺	Na ⁺	Li ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺				
Anions									
SO ₄ ²⁻	HPO ₄ ²⁻	acetate ⁻	citrate ⁻	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	ClO ₃ ⁻	I ⁻	ClO ₄ ⁻	SCN ⁻



Precipitate síranem amonným

Denaturace guanidinium thiokyanátem

PRECIPITACE ORGANICKÝMI ROZPOUŠTĚDLY



Vytěsnění vody ze solvatačního proteinu organickým rozpouštědlem odhalí se hydrofobní úseky– převáží hydrofobní a van der Waalsovy síly nad elektrostatickými.



Etanol



Aceton (méně denaturující, více volatilní)

Mělo a by být provozováno v teplotách pod bodem mrazu (prevence denaturace – malá konformační flexibilita, solvent se nedostane dovnitř molekuly)



Precipitace 10 % kyselinou trichloroctovou (TCA)

Denaturace

Dezintegrace sekundární a terciální struktury narušením S-S, vodíkových a jiných nevazebných interakcí

Výsledkem je změna uspořádané struktury proteinu do „random coil“ a ztráta biologické funkce. Protein může ale nemusí nutně precipitovat.

- **teplotní** (zvýšení pohyblivosti molekul naruší vodíkové můstky)
- **pH** (změna náboje, vnitřní odpuzování, ztráta solventu)
- **organickým rozpouštědlem** (vyvázání hydrofobních úseků rozpouštědlem, při nízkých teplotách neproniká organika dovnitř molekul a nedenaturuje je) agregace je způsobena interakcí opačně nabitých úseků na površích
- **detergenty**

METODY PRÁCE S PROTEINY

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

Zahušťování roztoku bílkovin

- precipitací
- odpařením solventu
- dialýzou proti nevodnému solventu (polyvinylpyrolidon)
- přidáním suché matrice přijímající vodu (Sephadex)
- (centrifugační) ultrafiltrací na molekulárních filtrech



Filtry s definovaným
filtračním rozsahem pro různé
MW a pro různá rozpouštědla

100 000

30 000

10 000

5 000

3 000

METODY PRÁCE S PROTEINY

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

Stanovení celkové koncentrace proteinu ve vzorku

- UV spektrofotometrie 280 nm (Trp, Tyr) ale i autofluorescence (340 a 305 nm)
- UV spektrofotometrie 190-205 nm (peptidická vazba)
- Redukce Cu^{2+} na Cu^{1+} ionty – Biuret, Lowry, **BCA** (kys. bicinchonová)
- Komplexy AA s pigmenty (CBB G250) 595 nM „dle Bradforda“
- Fluorescenční barviva vážící se na detergentový obal proteinu (NanoOrange, SYPRO Orange/Red/Ruby, Qubit Protein...)



METODY PRÁCE S PROTEINY

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