

PROTEOMICKÉ SEPARAČNÍ METODY

2-D elektroforéza jako jádro současné
proteomiky

Pavel Bouchal

Laboratoř proteomiky
Ústav biochemie PŘF MU

Genomika – transkriptomika - proteomika

Genom

- soubor genů
- informace převážně o genetických dispozicích
- statický

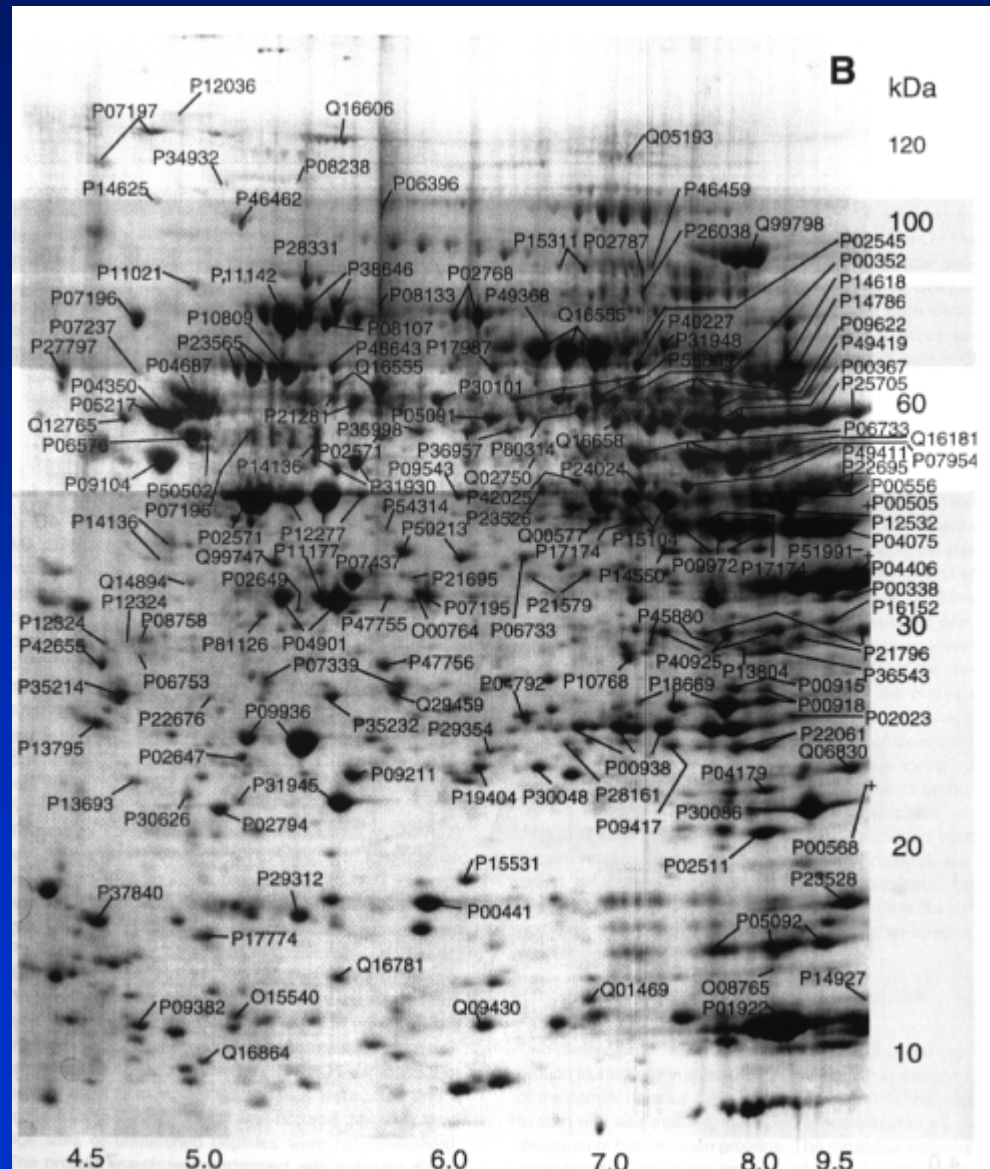
Proteom (*PROTEin complement expressed by a genOME*)

- soubor proteinů
- informace o skutečných efektoch buněčných procesů
- dynamický

Transkriptom

- soubor molekul mRNA v daném čase
- dynamický
- hladiny mRNA neodpovídají plně hladinám proteinů (degradace, posttranslační modifikace)
- snadné stanovení genové exprese pomocí qRT-PCR ve srovnání s proteiny

2-D proteinová mapa



Langen H. *et al.*: 2-DE map of human brain proteins. *Electrophoresis* 20, 907 (1999)

Příprava vzorku pro 2-DE

Desintegrace buněk, tkáně

Sonikace, French-press, osmotická či enzymatická lýze!!!!

Inhibice proteas (PMSF, Pefabloc™, Complete™)!! (rostliny!!!!)

Inhibice fosfatas (Na₂VO₃, NaF)!

Odstranění nukleových kyselin (DNAsa I, benzonasa)!!!

Odstranění dalších interferujících látek (polysacharidy, fenolické I.) !

Nízká iontová síla (10 mM soli)!!!!

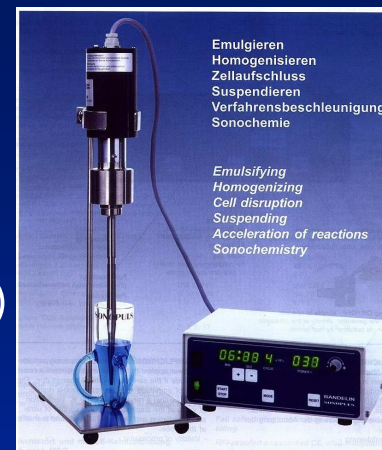
Analýza „subproteomů“

cytoplasma, periplasma, ribosomy: diferenciální centrifugace

membrány: diferenciální centrifugace, extrakce detergenty (TX-114) nebo extrakce Na₂CO₃

Precipitace vzorku (zakoncentrování, delipidace): aceton, trichloroctová kyselina

Solubilizace vzorku, pak centrifugace (~16000 g, 20 min, 4°C)



Solubilizace vzorku

- **CHAOTROPNÍ ČINIDLA** omezují vodíkové vazby a elektrostatické interakce
7 M močovina, 2 M thiomočovina
- **DETERGENTY** obalují hydrofobní části bílkovin a tím zvyšují jejich rozpustnost
2-4% CHAPS nebo 1% ASB 14 nebo 1% C7BzO; 0,5-1% TRITON X-100
- **REDUKČNÍ ČINIDLA** štěpí disulfidické vazby -S-S- mezi cysteiny
50-100 mM dithiothreitol (5 mM tributylfosfin)
- **AMFOLYTY** pufrují pH a také zlepšují rozpustnost proteinů
Pharmalyte, Bio-Lyte, Ampholyte (0,2-2%)

Příklady:

7 M močovina, 2 M thiomočovina, 4 % CHAPS, 70 mM DTT, 2% amfolyty
nebo

7 M močovina, 2 M thiomočovina, 1 % C7BzO, 70 mM DTT, 2% amfolyty
nebo

7 M močovina, 2 M thiomočovina, 1 % ASB 14, 1% TRITON X-100, 70 mM DTT,
2% amfolyty – pro membránové proteiny

Příprava vzorku: praktický příklad

- sklizení buněk 5000 g, 30 min, 4 °C
- promytí** 10 mM Tris/HCl pH 7, supernatant odlít
- k peletu přidat **lyzační pufr** (7M močovina, 4% thiomočovina, 4% CHAPS, 70 mM DTT, 2% Pharmalyte 3/10, proteasové a fosfatasové inhibitory)
- desintegrace** ultrazvukem 60 x 0.1 s
- přidat 150 U **benzonasy**
- solubilizace 1 h/lab T
- centrifugace 16000 g/20 min/4 °C
- stanovení bílkoviny
- 150 µg proteinu **precipitovat** 7,5 násobkem acetonu přes noc / -20°C
- centrifugace 16000 g/20 min/4 °C
- resolubilizace** peletu v rehydratačním pufru (7M močovina, 2M thiomočovina, 4% CHAPS, 70 mM DTT, 2% Pharmalyte 3/10)
- nanesení na IPG strip

Bouchal P. Zdráhal Z., Helánová Š., Janiczek O., Hallberg K.B., Mandl M., Proteomics 2006, 6, 4278-4285

Příprava vzorku: obecné doporučení

„AS SIMPLE
AS POSSIBLE“

1. rozměr: isoelektrická fokusace (IEF)

Separace podle pI. Počítají se volthodiny (Vh)

- **IPG-IEF** (proužky s imobilizovaným pH gradientem) – dobrá reprodukovatelnost, napětí až 10000 V, současný standard, komerčně dostupné
Základní pH gradienty 3-10, 3-10 NL, 4-7, 6-11
Gradienty v úzkém rozsahu i jedné jednotky pH
Dávkování vzorku: in-gel rehydratace (standard)
cup loading (bazické gradienty, např. pH 6-11)
- **CA-IEF** - IEF s nosnými amfolyty (vytvářejí gradient pH v trubičkových gelech) – obtížná manipulace, nedobrá reprodukovatelnost, katodický drift
- **NEpHGE** (nerovnovážný systém pro analýzu bazických a kyselých proteinů; trubičkové gely) – obtížná kontrola chování gradientu

Aparatury na IEF

CA-IEF



IPG-IEF



IPG-IEF



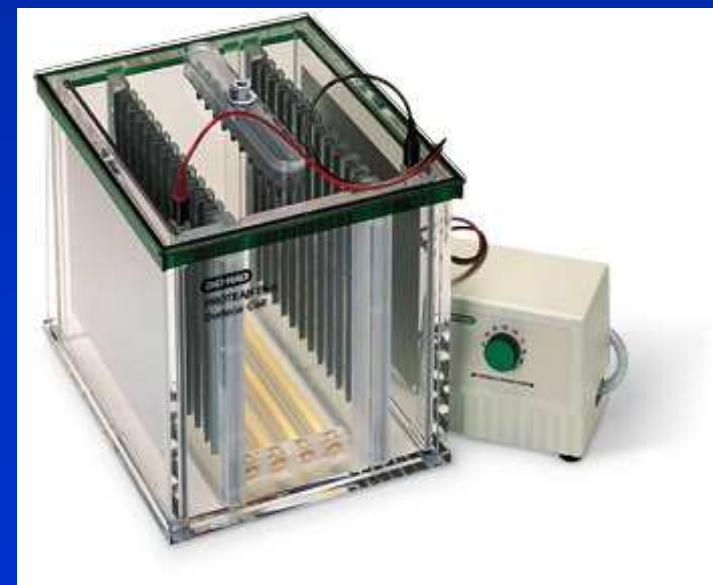
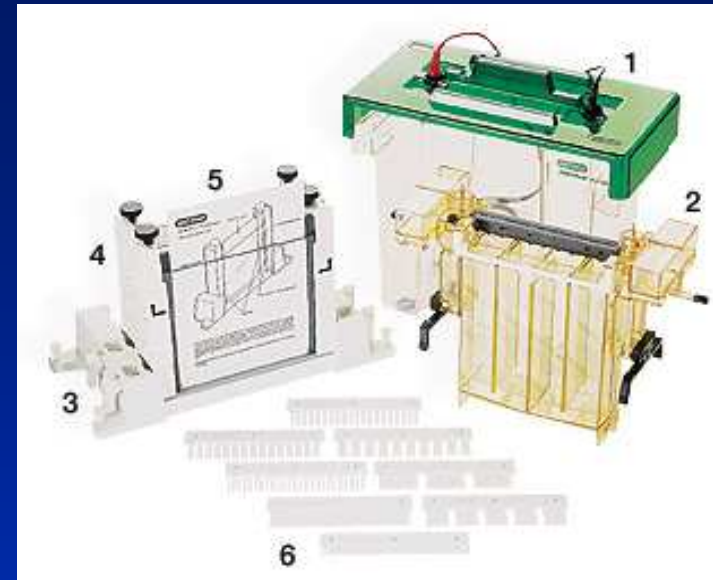
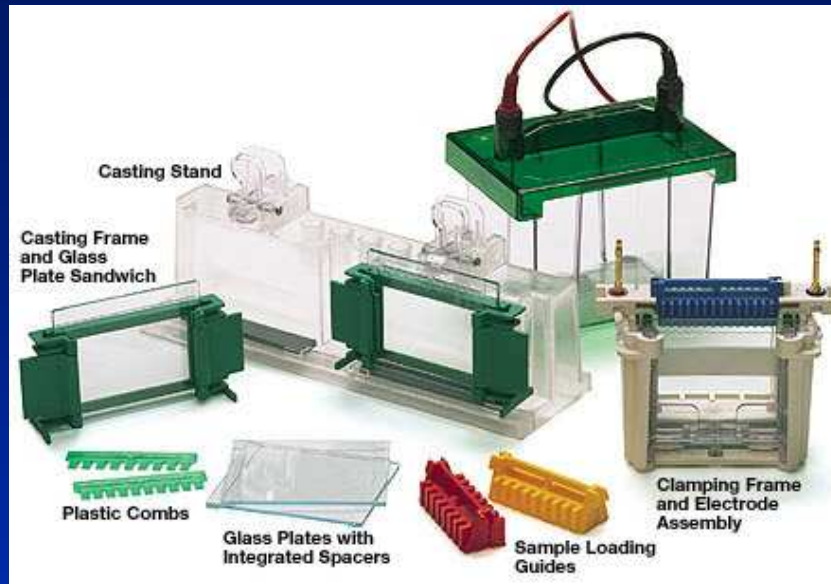
IPG-IEF



2. rozměr: SDS-PAGE

- Ekvilibrace IPG proužků před SDS-PAGE: obalení proteinů SDS – (uděluje proteinům uniformní náboj na jednotku hmotnosti), další redukce (DTT) a alkylace (jodacetamid)
- SDS-PAGE (malý i velký formát)
 - 10 až 12 % (homogenní) M_r 15000-100000
 - 8-16% (porozitní gradient) M_r 10000-150000 reprodukovatelnost!
- Pufrové systémy:
 - tris-glycin-SDS (= „Laemmli“) - standard
 - tricinový (pro nízkomolekulární proteiny, od M_r 1000)
 - taurinový (membránové prot.)

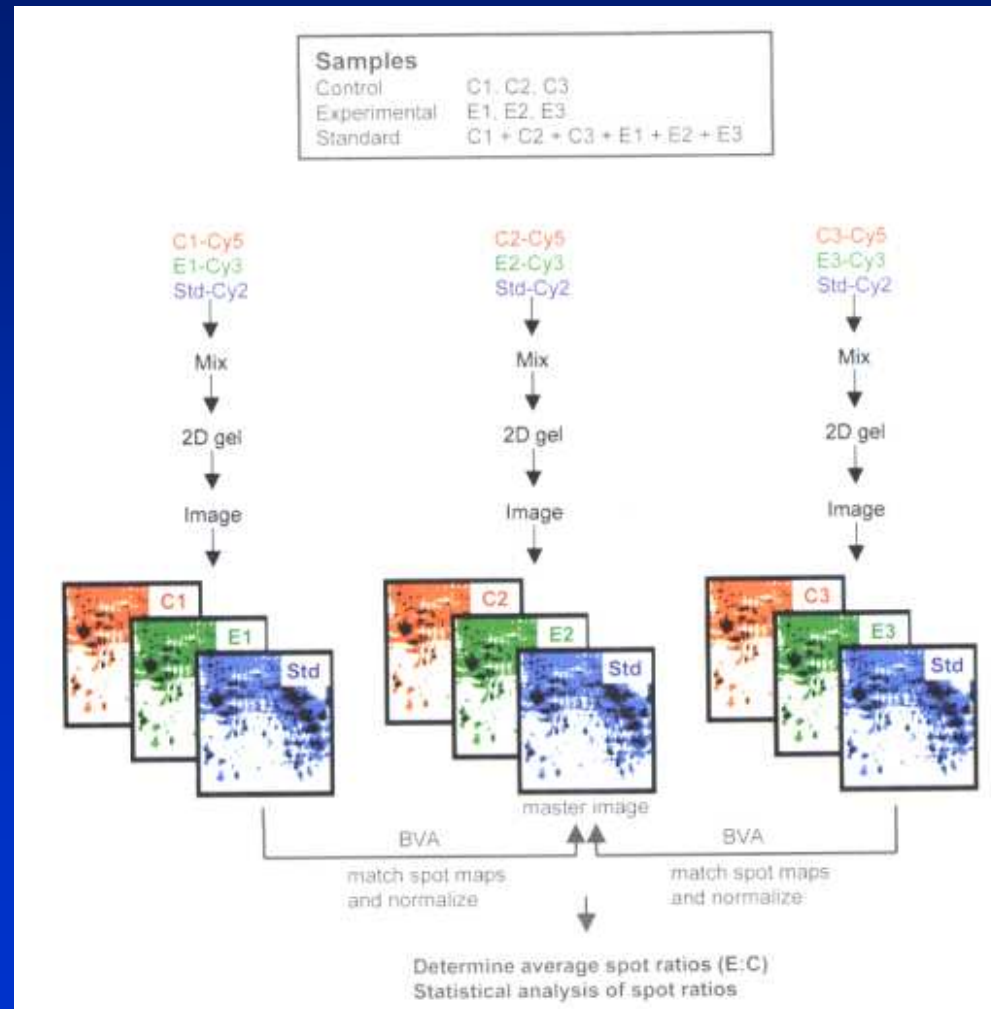
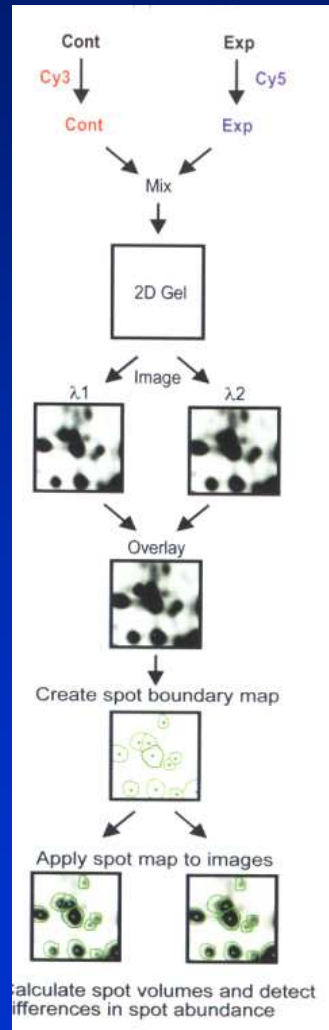
Aparatury na SDS-PAGE



Barvení gelů

»	relat. citlivost
• Stříbrem: analytické (problémy s MS!)	+ + +
• Coomassie brilliant blue (mikropreparativní) koloidní CBB	+ + +
• SYPRO Ruby/Orange – fluorescenční (analyt.+mikroprep.)	+ + (+)
• detekce na filmu – autoradiografie (analyt., inkorporace značeného izotopu během biosyntézy proteinů)	+ + +
• DIGE (diferenční gelová elektroforéza) (fluorescenční obarvení 2 vzorků před 2-DE analýzou, všechny vzorky v 1 gelu, vizualizace: 3 různé λ (jedna referenční))	+ + (+)

2-D DIGE (diferenční 2-D elektroforéza)



Obrazová analýza 2-DE gelů

- Odečtení pozadí a detekce spotů
- Manuální kontrola a korekce detekovaných spotů
- Vzájemné přiřazování odpovídajících si spotů na různých gelech v jedné sadě (matchsetu) – MATCHING
- Kvantitativní a statistická analýza dat
- Tvorba obrazových 2-D databází

PDQUEST (Bio-Rad)

IMAGE MASTER (Amersham Biosciences)

MELANIE (Geneva Bioinformatics)

PHORETIX 2-D / AIDA (Nonlinear Dynamics)

Možnosti identifikace proteinů

- Peptide mass fingerprinting (MALDI-TOF MS)
- Částečná sekvenace peptidů (MALDI-TOF/TOF, LC-MS/MS)
- N-terminální sekvenace: Edmanovo odbourávání
 - ↳ srovnání s databází (NCBI, Swiss-Prot/TrEMBL)
- Western-blotting + imunochemická detekce (protilátky!)

Proteomické databáze a algoritmy

- Databáze obsahující sekvence proteinů

- NCBI** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

- UniProt** <http://www.expasy.org/>

redundantní x nerdundantní databáze

- Obrazové databáze 2-DE gelů

- SWISS-2D-PAGE** (zde odkazy na další)
<http://www.expasy.org/ch2d/2d-index.html>

- Internetové algoritmy

- Např. v rámci ExPASy <http://www.expasy.org/> - nástroj protparam a jiné: určení pI, MW, hydrofobicity (GRAVY), subbuněčné lokalizace, počet a lokalizace transmembránových domén (TMHMM) aj. ...

GRAVY<0 hydrofilní; GRAVY>0 hydrofobní

PROBLÉMY 2-D ELEKTROFORÉZY
aneb
doporučení, jak naplánovat
proteomický experiment a po jeho
provedení nedojít k závěru, že “takhle
to nejde“

Problém č. 1: Reprodukovatelnost

- Reprodukovatelnost (relativní odchylka ~ 30 %)
- Při srovnání proteinové exprese nutnost paralelní analýzy **MINIMÁLNĚ 3 REPLIKÁTŮ** (analytické x biologické replikáty)
- rozdíl mezi integrálními denzitami spotů: **>2x AND statisticky významný rozdíl** (Student t-test, Mann-Whitney test); normalizace!!!
- při srovnávání více než 2 vzorků **NUTNO PŘEDEM NAPLÁNOVAT EXPERIMENT – STATISTIKA!** (často nutnost aplikace pokročilých statistických metod)

Problém č. 2: Extrémně bazické, kyselé, nízko- a vysokomolekulární proteiny

Bazické proteiny (pH > 7) hledat na bazickém gradientu (např. 6-11). V bazické oblasti širokého gradientu pH 3-10 bývá špatné rozlišení. Použít redukční činidlo DeStreak.

Kyselé proteiny: pH gradienty v kyselé oblasti jsou ve vývoji

Pro nízkomolekulární proteiny (<15 kDa) použít ~16% SDS-PAGE + tricinový pufrový systém ve 2.rozměru

Vysokomolekulární proteiny (>120 kDa): obecně problém, zkusit použít 8 % SDS-PAGE či gradientovou SDS-PAGE ve 2.rozměru

Problém č. 3:

Dynamický rozsah koncentrací proteinů

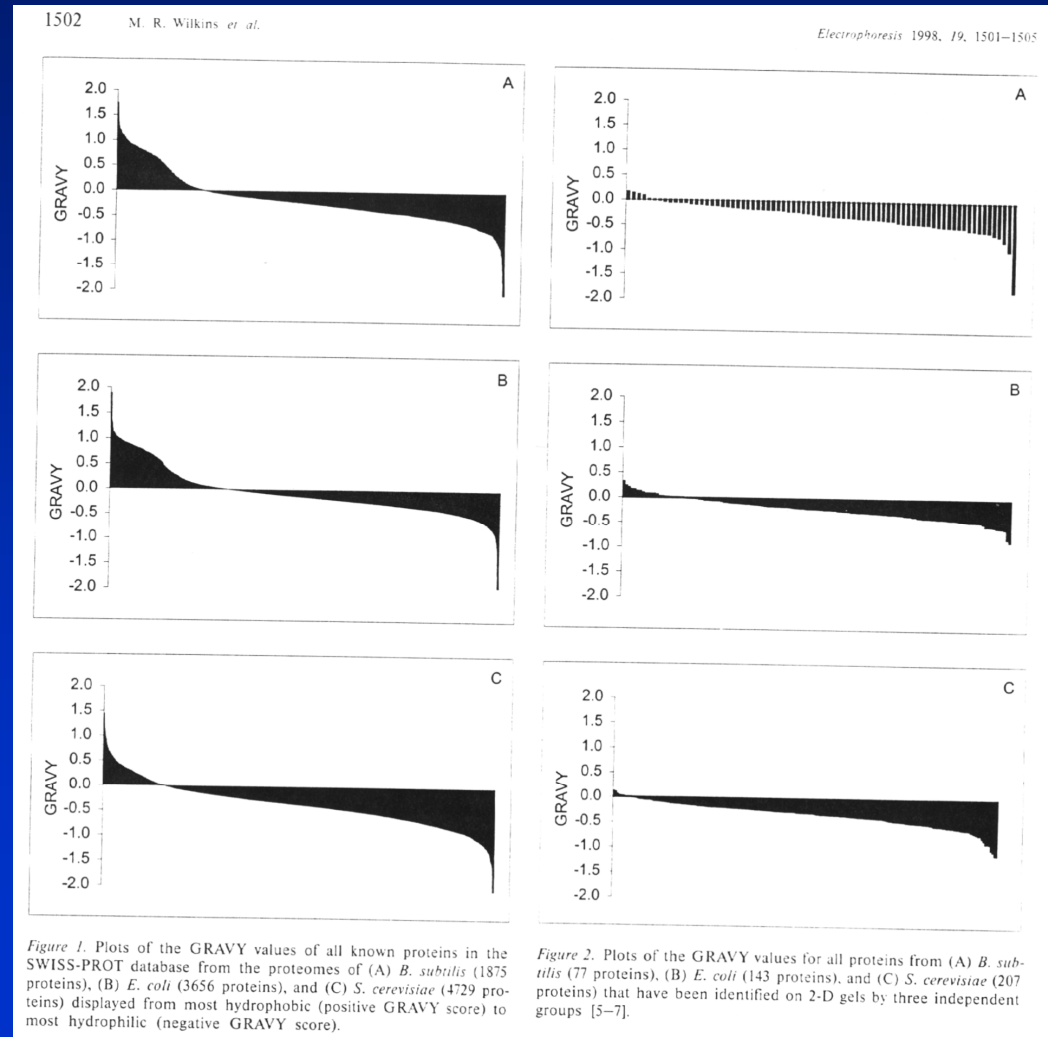
- Jednotlivé proteiny v celobuněčném vzorku se liší až o 12 řádů v rozsahu koncentrací
- Více koncentrované proteiny zákonitě překrývají ty méně koncentrované
- Málo koncentrované proteiny jsou pod limitem detekce 2-DE a barvení

Náznak řešení:

- Prefrakcionace
- Odstranění nejkonzentrovanějších proteinů (např. albuminu z krevního séra)
- Použití pH gradientů v úzkém rozsahu

Problém č. 4: Hydrofobní a membránové proteiny

2-DE je obecně
neúspěšná v analýze
hydrofobních a
membránových
proteinů (GRAVY
(Grand Average
of hydropathy)
> 0)



Problém č. 4:

Hydrofobní a membránové proteiny

2-DE je v tomto případě méně účinná než 1-DE, tyto proteiny se také špatně enzymaticky štěpí

Možnosti řešení

- známe-li sekvenci, zjistíme GRAVY (pro 2-DE musí být <0) <http://www.genome.ad.jp/SOSui/index.html>
- nativní varianty 2-DE: 16-BAC/SDS-PAGE, blue native electrophoresis (delikátní!)
- 1-D SDS-PAGE + LC-MS/MS

Komplementární metody k 2-DE

2-DE je přes své nevýhody zatím jediná rutinní proteomická separační metoda. Mezi možné alternativy patří:

- Surface enhanced laser desorption-ionization (SELDI-TOF MS)
- Isotope-coded affinity tags (ICAT-LC-MS/MS)
- SILAC značení
- Dvoudimensionální (resp. multidimensionální) chromatografie + hmotnostní spektrometrie se značením (např. iTRAQ-2DLC-MS/MS)
- Analýza proteinů na protilátkových arrays

Každá metoda má své výhody a problémy, metody se vzájemně doplňují = jsou komplementární, žádná není ideální

Zdroje informací

ExPASy server <http://www.expasy.org/>

Görg A., Weiss W., Dunn MJ., Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. Proteomics 2004, 4, 3665–3685

