



MASARYKOVA UNIVERZITA

„Rozvoj týmu pro výuku, výzkum a aplikace v oblasti funkční genomiky a proteomiky“
(CZ.1.07/2.3.00/09.0132)

Dvoudimenzionální elektroforéza

Hana Konečná

Oddělení funkční genomiky a proteomiky

ÚEB PŘF MU

www.sci.muni.cz/pVpKnb/

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

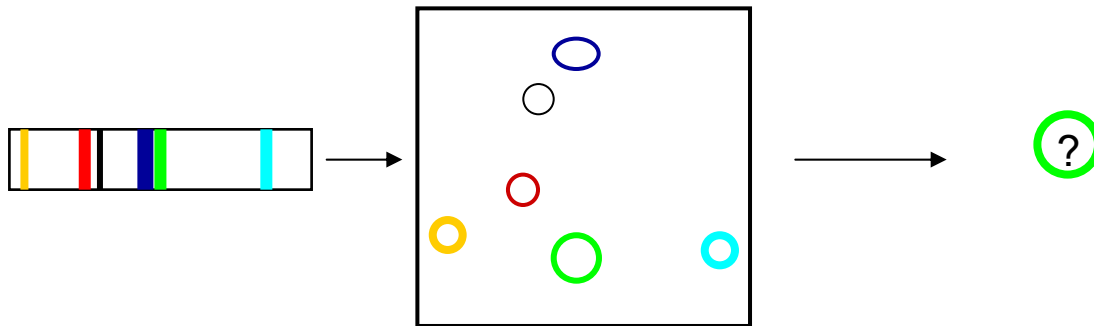


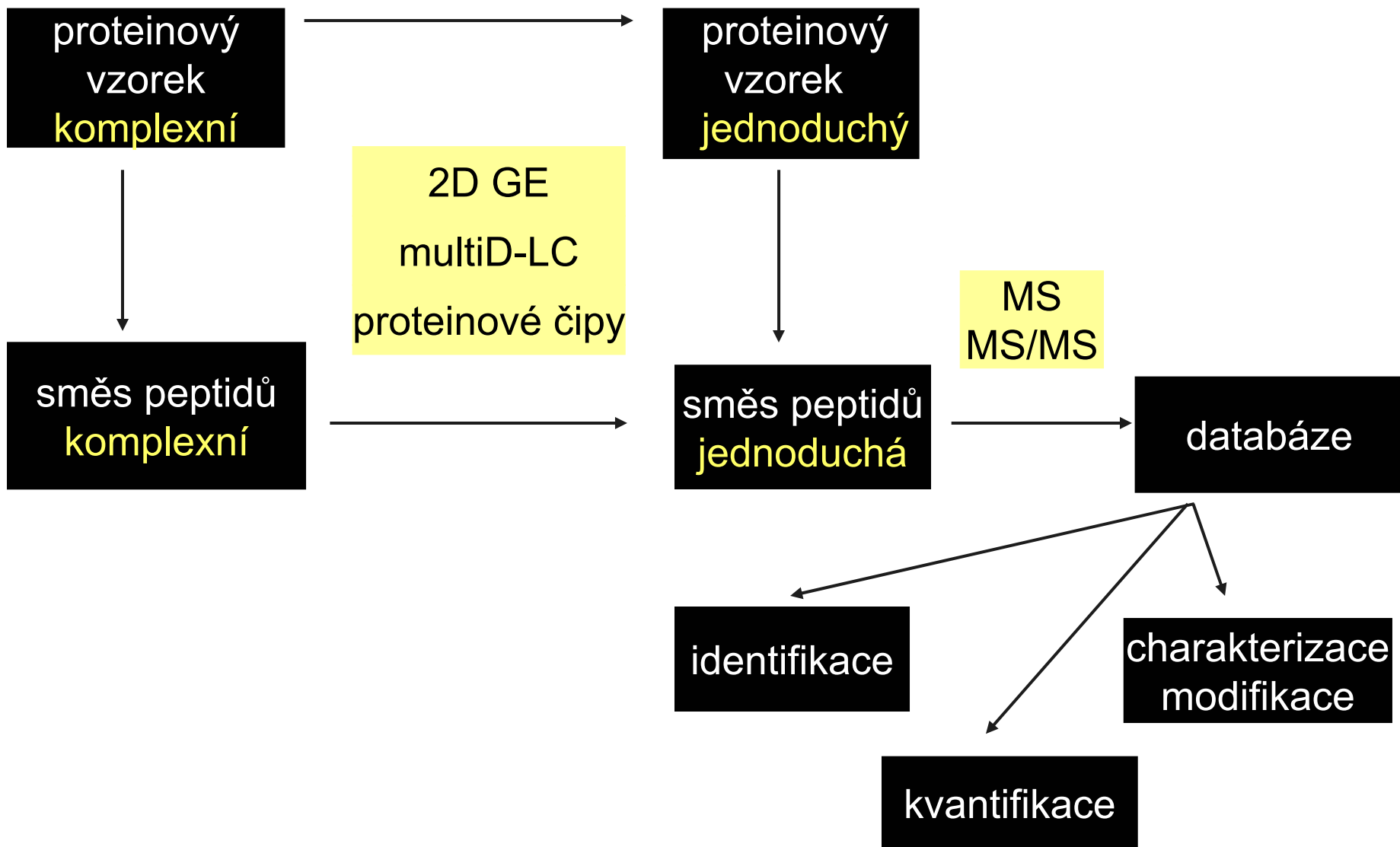
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Oddělení funkční genomiky a proteomiky
Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity
CENTRÁLNÍ LABORATOŘ

Dvoudimenzionální elektroforéza **2-DE**

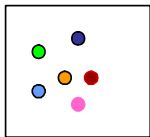
Hana Konečná





Proteomický experiment

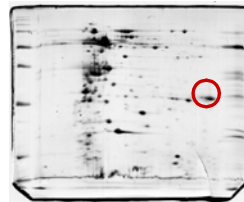
extrakce



fokusace



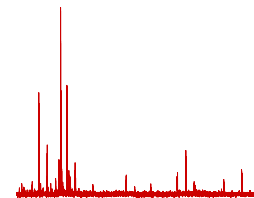
SDS-PAGE



digest



MS

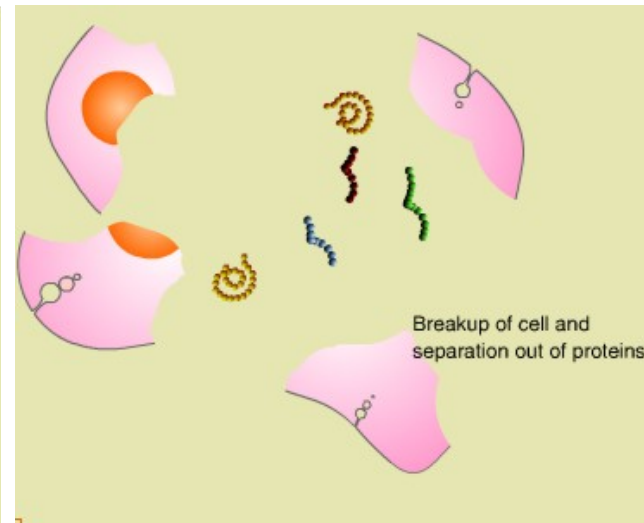
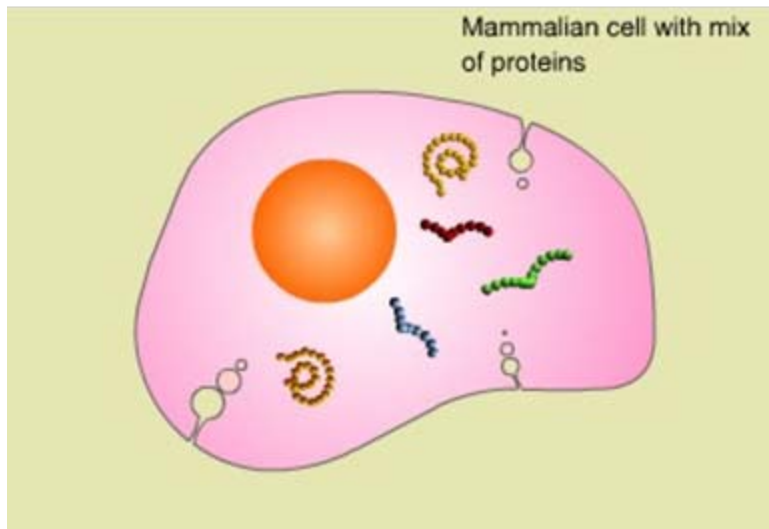


identifikace

neznámý protein

HOMOGENIZACE

- mechanicky
- ultrazvukem
- tlakem
- zmražením / rozmražením
- detergentovou lyzí



PŘÍPRAVA VZORKU

solubilizace močovina, thiomčovina, detergenty

redukce DTT, TBP

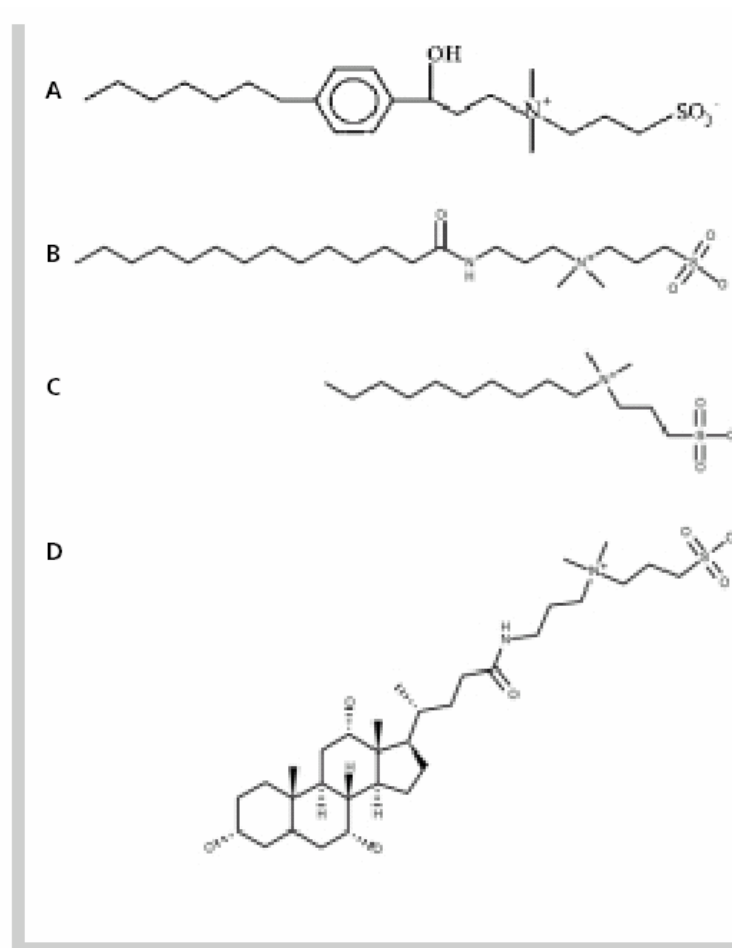
inhibice proteáz, fosfatáz, glykosyláz

odstranění kontaminant

DETERGENTY

- žádný celkový náboj
- 0.5 - 4%
- použitelné ve vysokých koncentracích močoviny
- **neionogenní**
- **zwitterointové**
- SDS jen v nízkých koncentracích (do 0.25%)

Zwitteriontové detergenty



C7BzO

ASB-14

SB 3-10

CHAPS

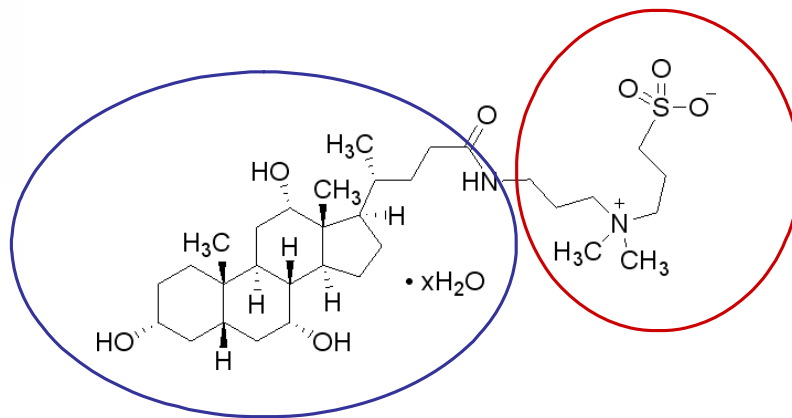
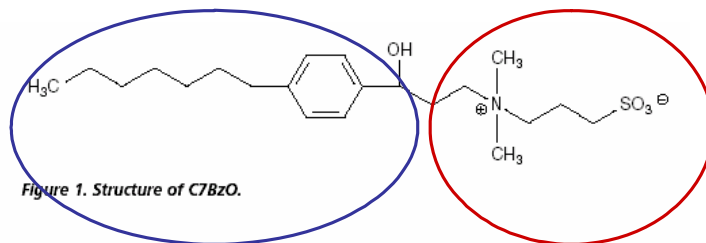
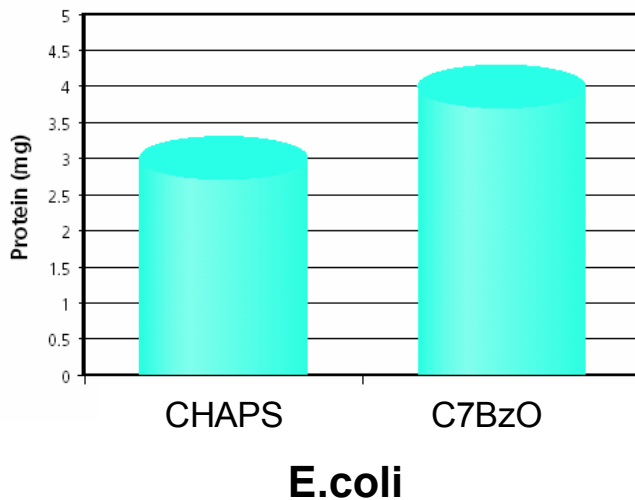


C7BzO

3-(4-Heptyl)phenyl-3-hydroxypropyl)dimethylammonio)propanesulfonate

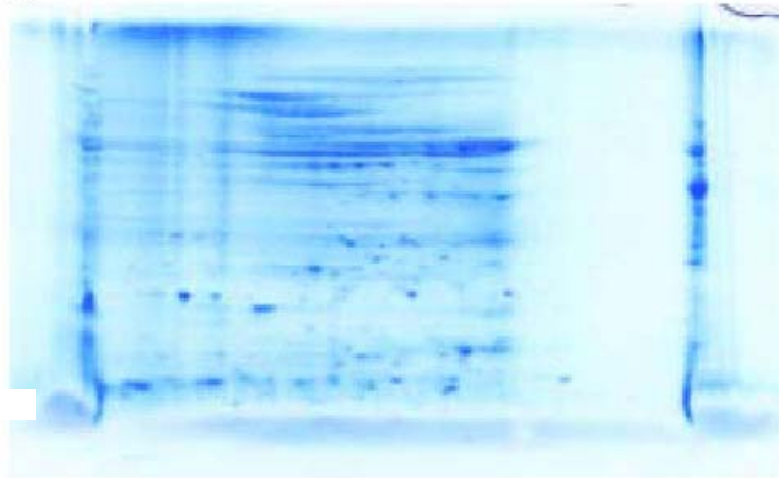
CHAPS

3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate



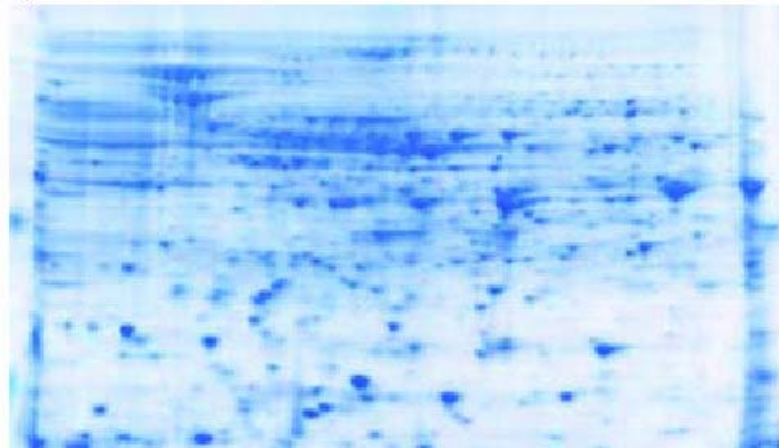
E.coli

A)



CHAPS

B)



C7BzO



ZÁKLADNÍ PRAVIDLA

- zabránit proteolýze
- jednoduchý postup
- čerstvé reagensy
- čerstvý vzorek
- odstranit pevné částice - centrifugace
- odstranit kontaminanty

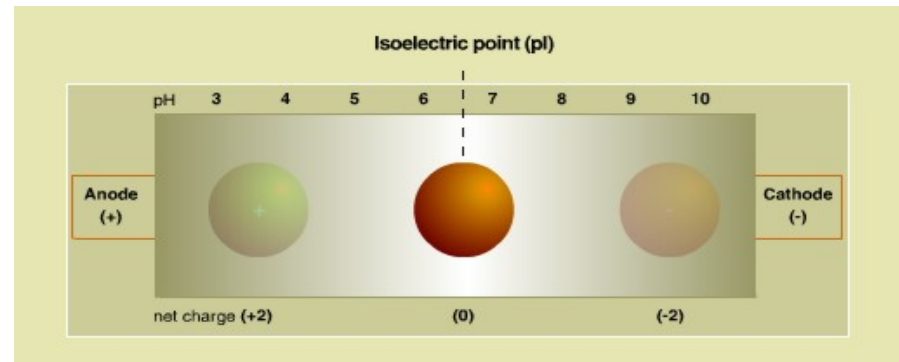
KONTAMINANTY

- soli, zbytky pufrů
- malé endogenní molekuly
- iontové detergenty
- nukleové kyseliny
- polysacharidy
- lipidy
- fenolické látky

2-DE

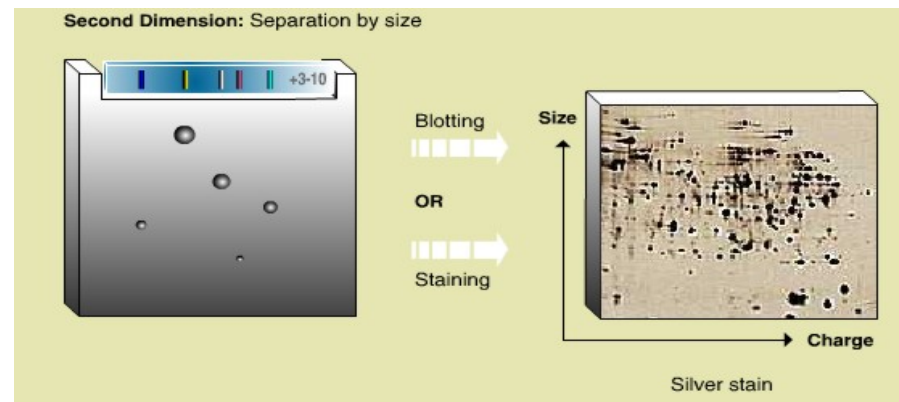
- první rozměr

IEF



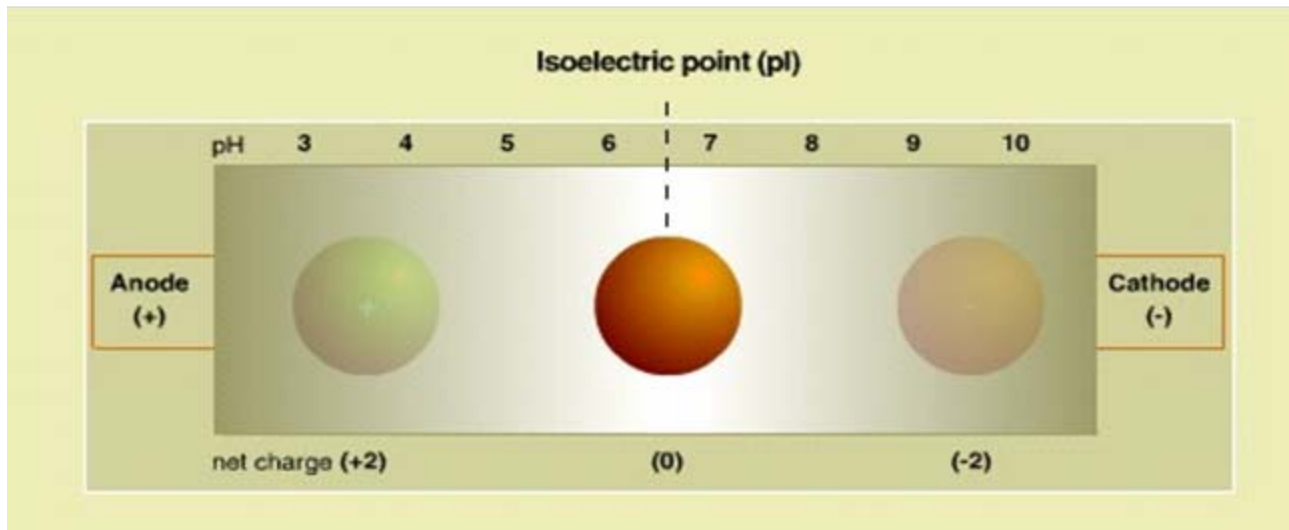
- druhý rozměr

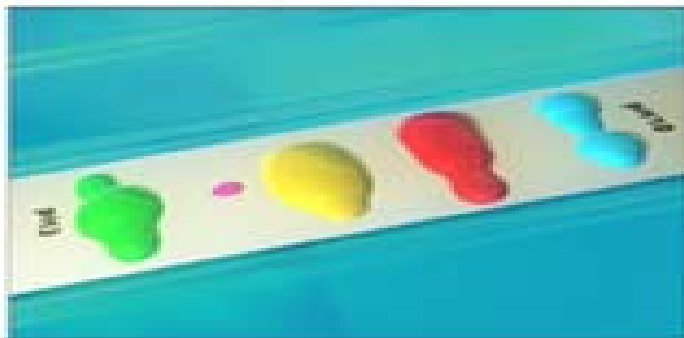
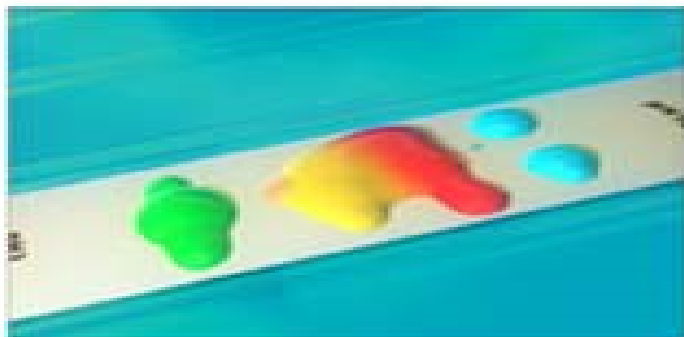
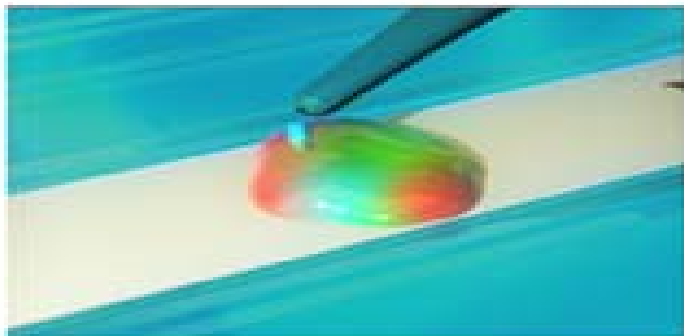
SDS-PAGE



1. ROZMĚR **IZOELEKTRICKÁ FOKUSACE**

migrace nabitých částic v gradientu pH v elektrickém poli





IZOELEKTRICKÁ FOKUSACE

- imobilizovaný pH gradient
- amfolyty

Marie Štábová

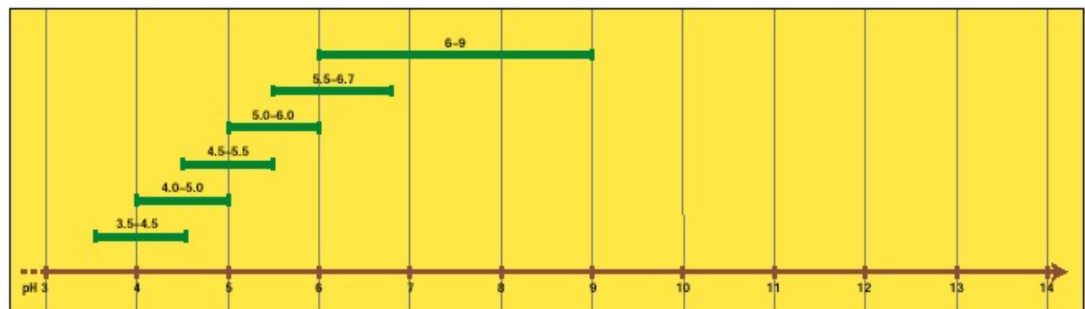
WUOLAH | Institut pro analytické chemie

WUOLAH | Institut pro analytické chemie

FOKUSOVANÉ PROTEINY



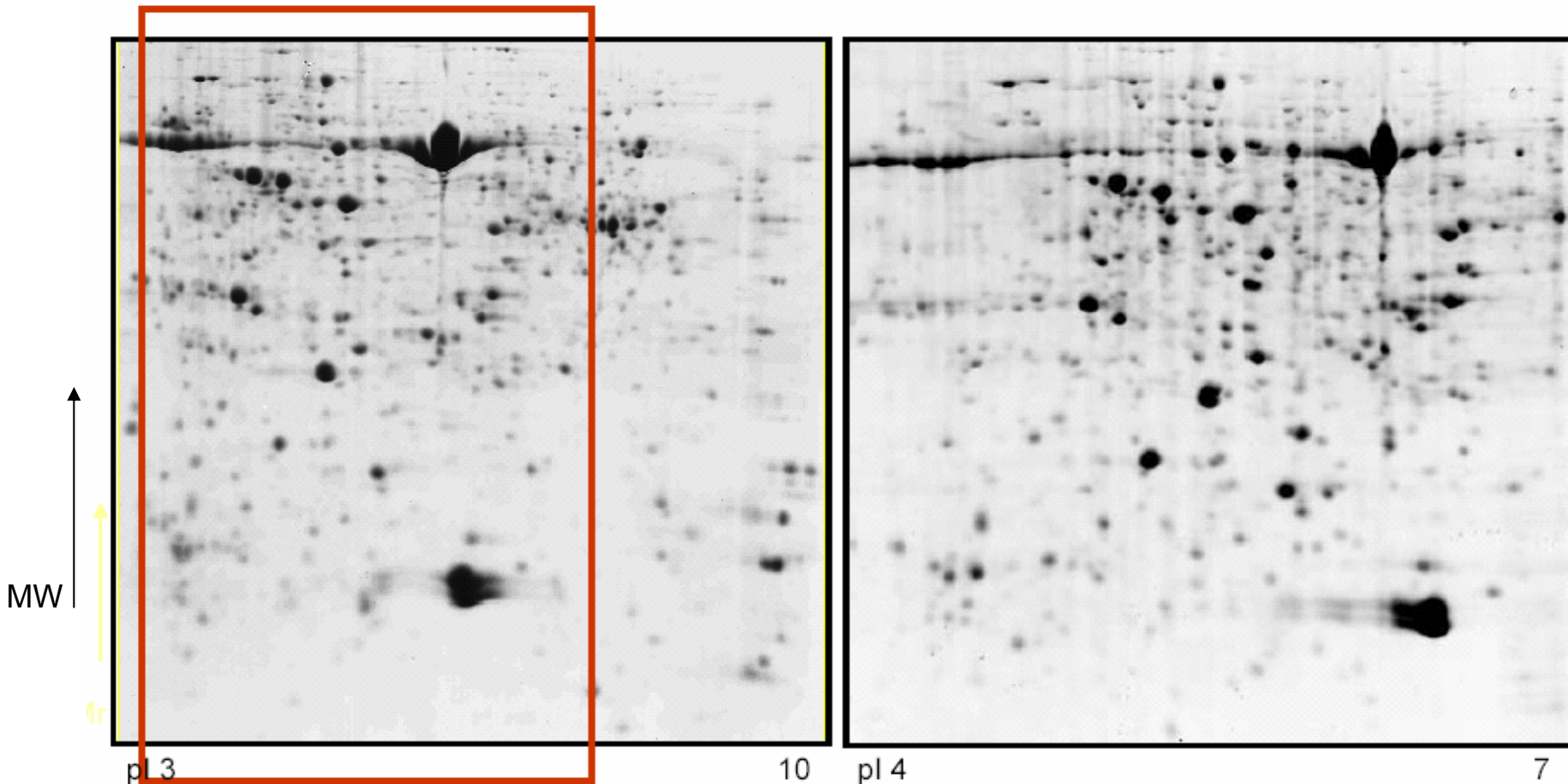
ROZSAH STRIPU ROZMĚR STRIPU



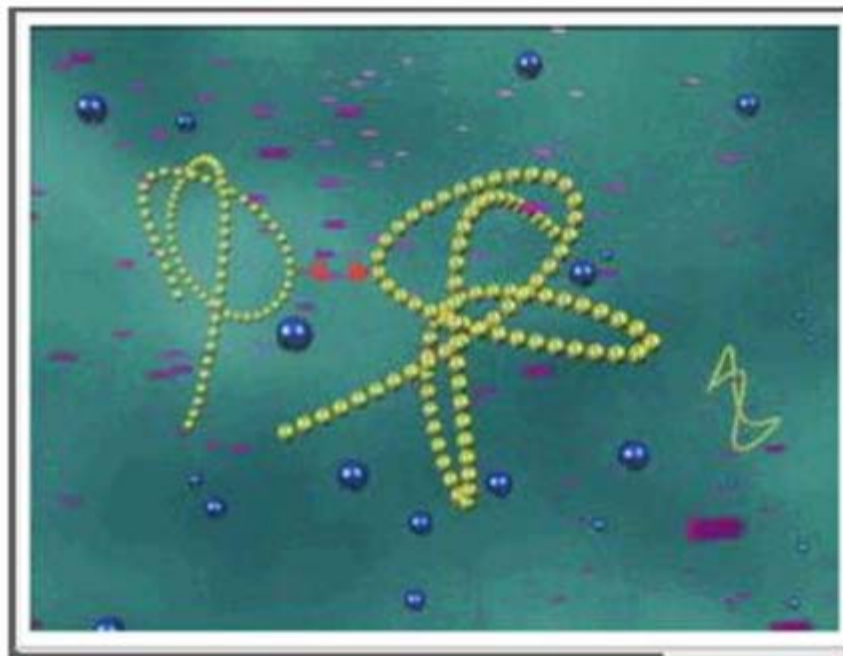
ROZSAH STRIPU

pl 3 - 10 NL

pl 4 - 7

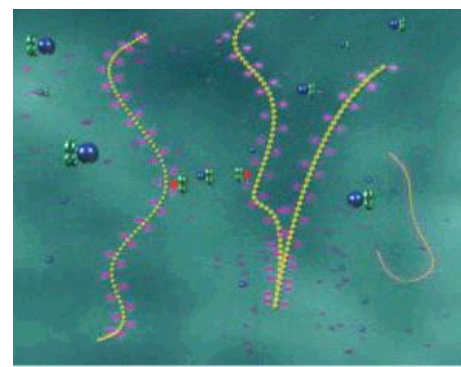
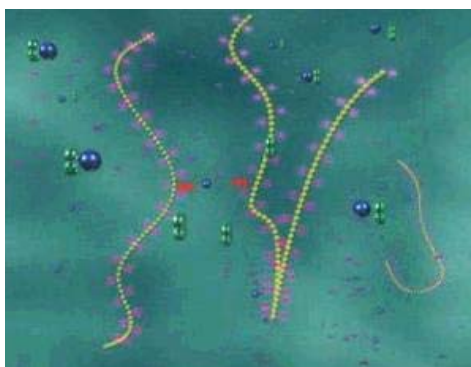
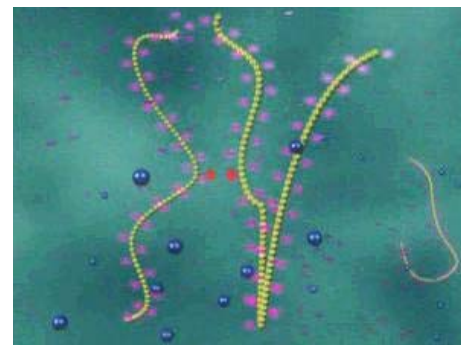
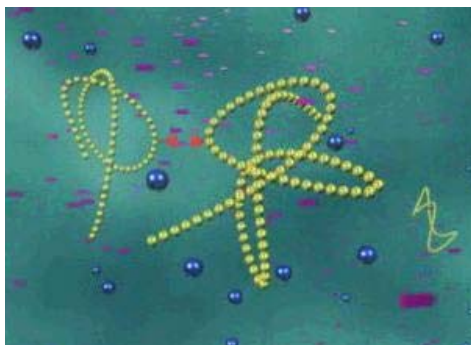


EKVILIBRACE STRIPU



EKVILIBRACE STRIPU

denaturace **SDS** ●



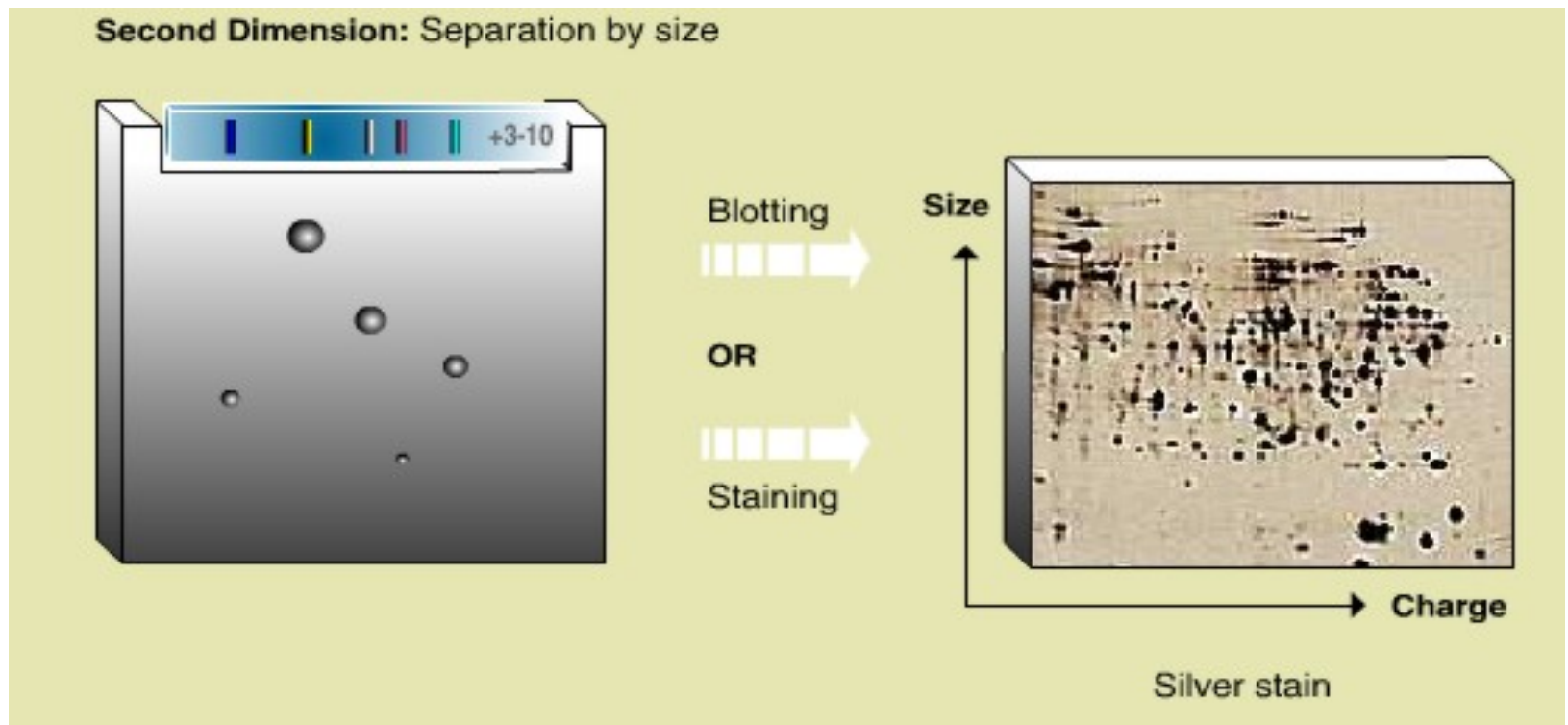
redukce **DTT** ●

alkylace **IAA** ●



2. ROZMĚR **SDS-PAGE**

migrace aniontů v elektrickém poli podle MW

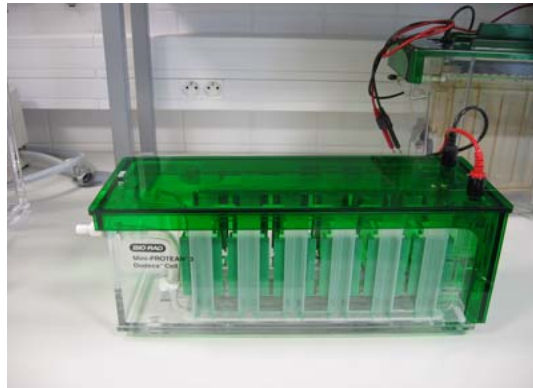


2-DE INSTRUMENTACE

- Protean IEF
 - Protean Dodeca Cell
 - Densitometer GS-800
 - FLA-7000, STORM
- PDQuest, Quantity One*



Protean Plus Dodeca Cell



Mini-Protean 3 Dodeca Cell

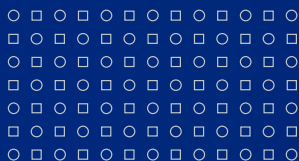


Protean II xi Cell



DETEKCE PROTEINU

- gel x blot
- visualizace
 - barvení
 - radioaktivita
 - imunodetekce
- barvení v gelu
 - po elektroforéze
 - před elektroforézou
 - specifické pro protein
 - specifické pro PTM
 - viditelné spektrum
 - fluorescence



BARVENÍ PROTEINU V GELU

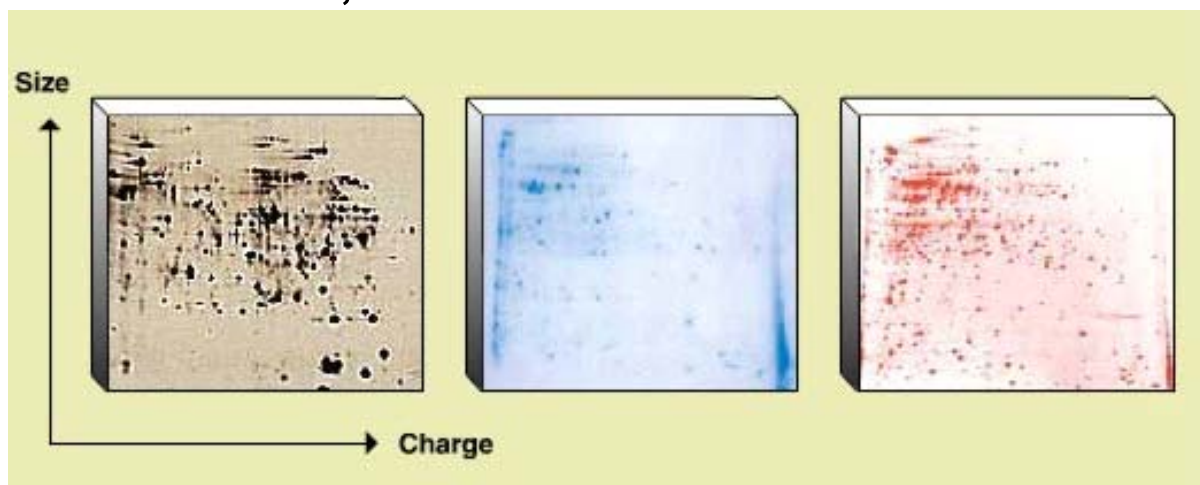
Coomassie Blue R-250, Coomassie Blue G-250

Stříbro: kompatibilní s MS

nekompatibilní s MS

Sypro Ruby, Flamingo Pink, Lucy, Deep Purple

Pro-Q Diamond, Pro-Q Emerald

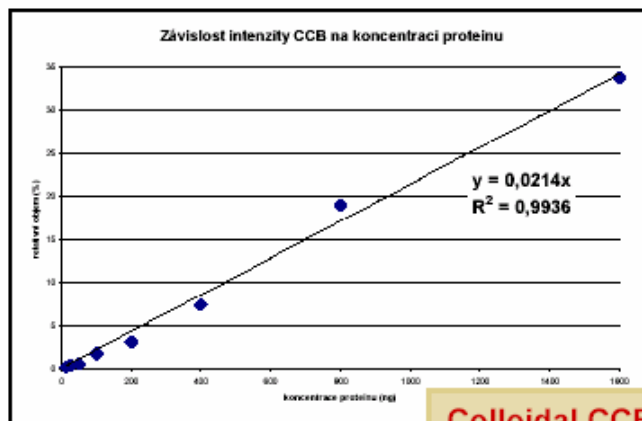


Stříbro
0.6 ng

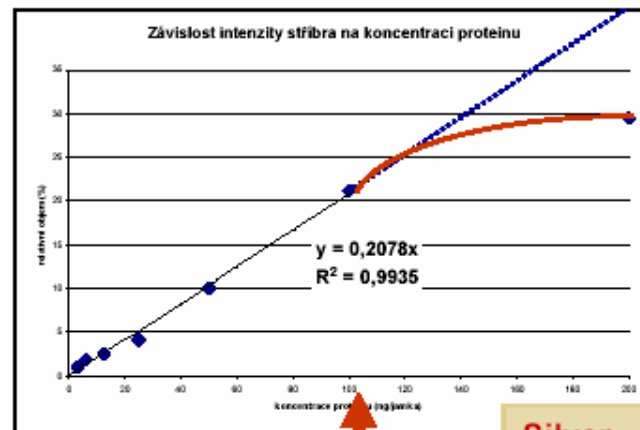
Coomassie
(8 ng) 36 ng

Sypro Ruby
1 - 4 ng

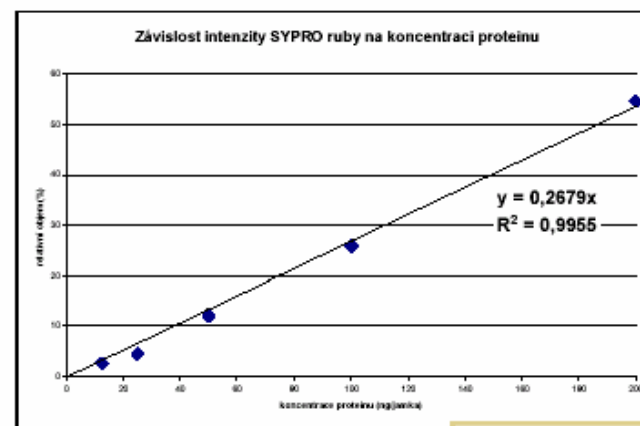
BARVENÍ PROTEINU LINEARITA



Colloidal CCB



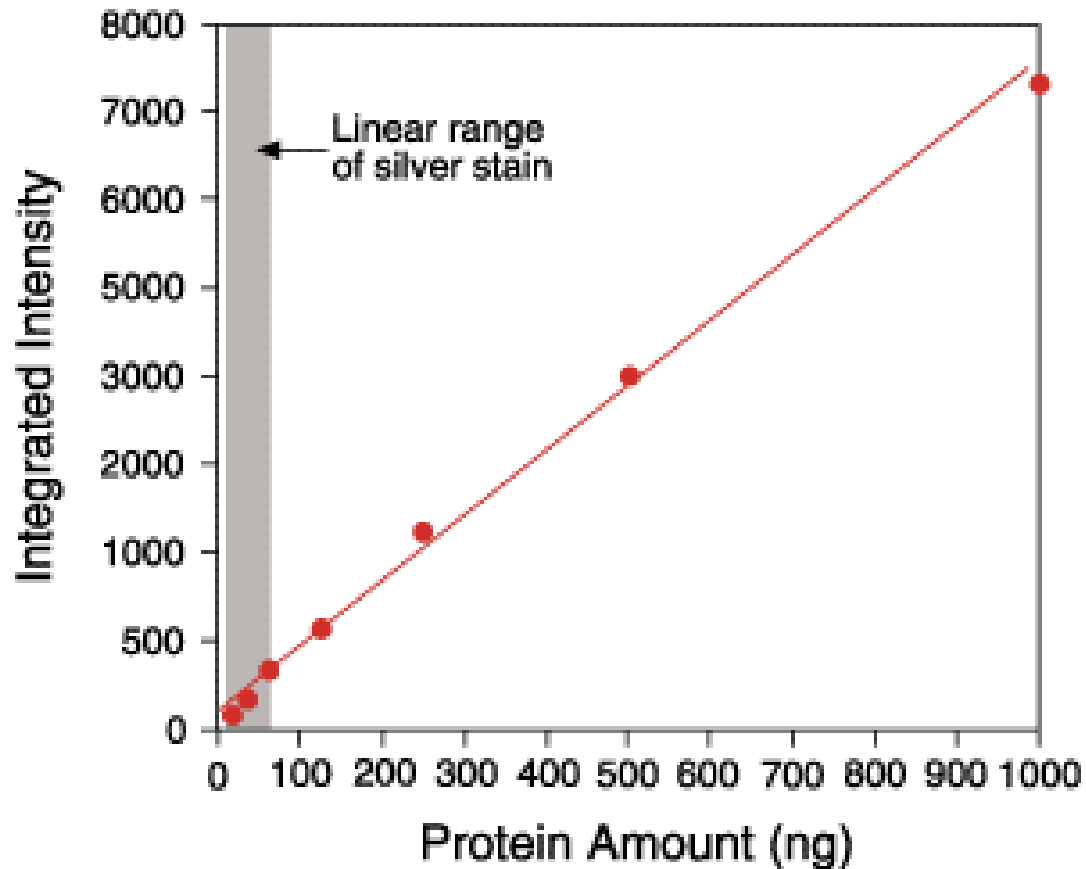
Silver

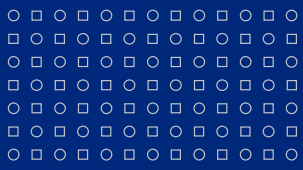


SYPRO Ruby

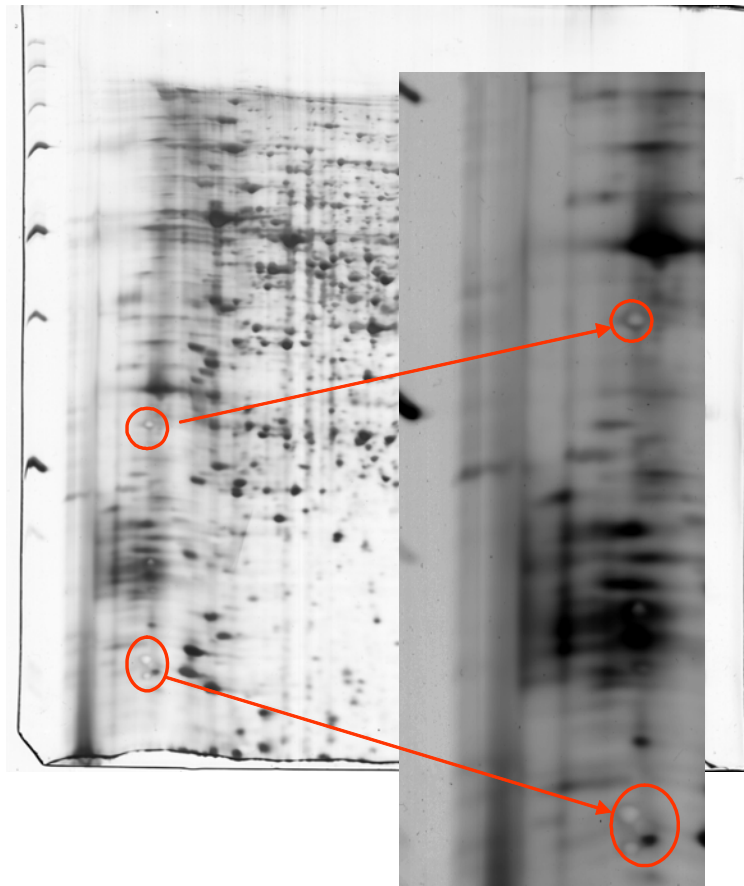
BARVENÍ PROTEINU – LINEARITA

Sypro Ruby

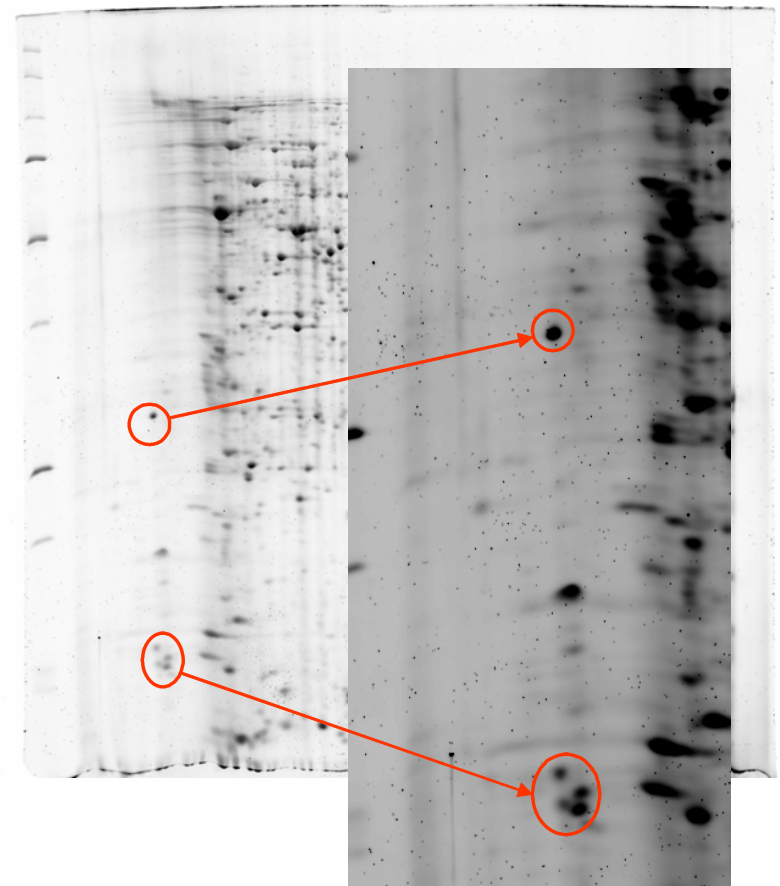




Ag

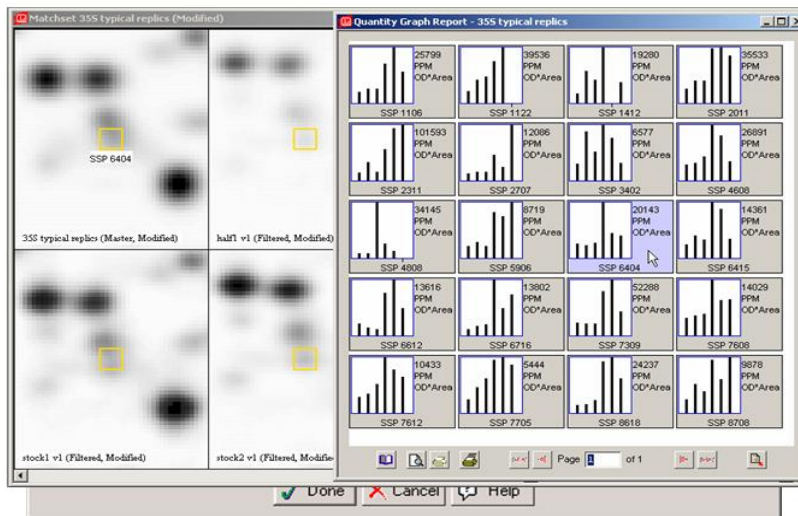
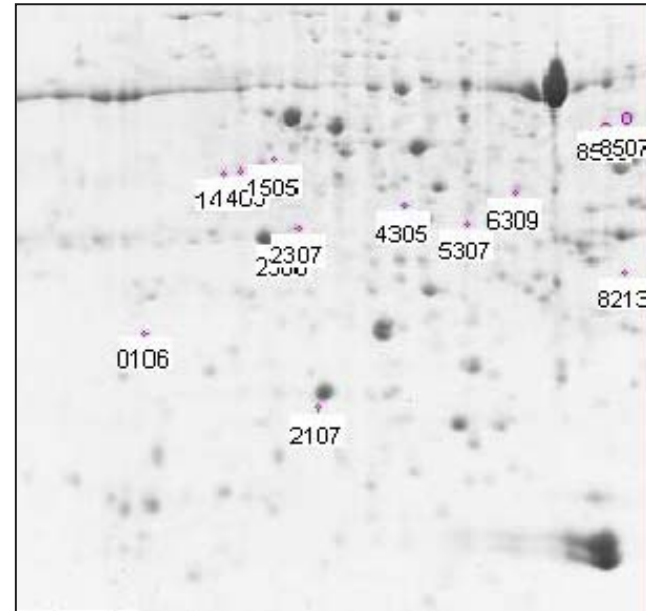


Sypro Ruby

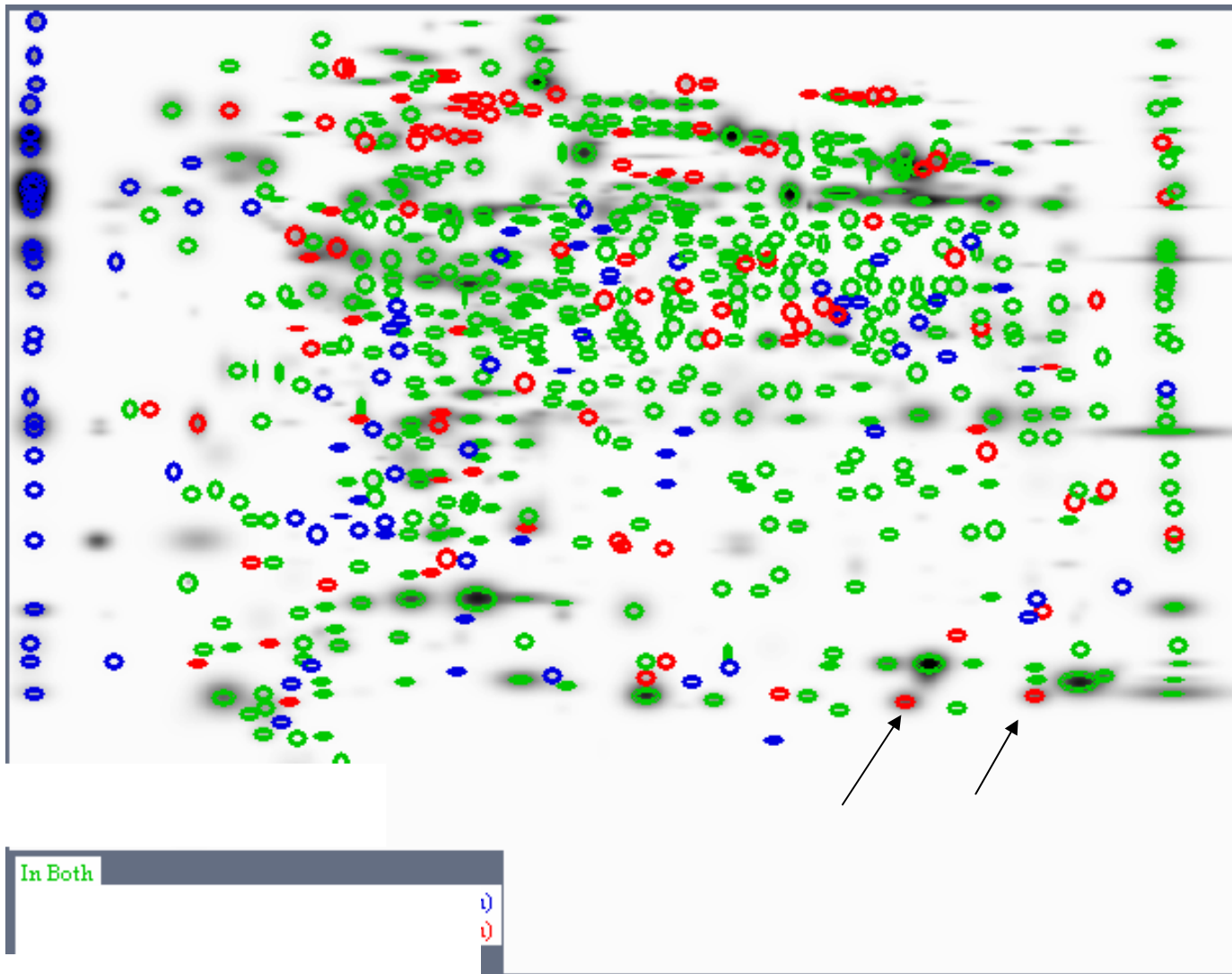


ANALÝZA OBRAZU

- kvalitativní
- kvantitativní



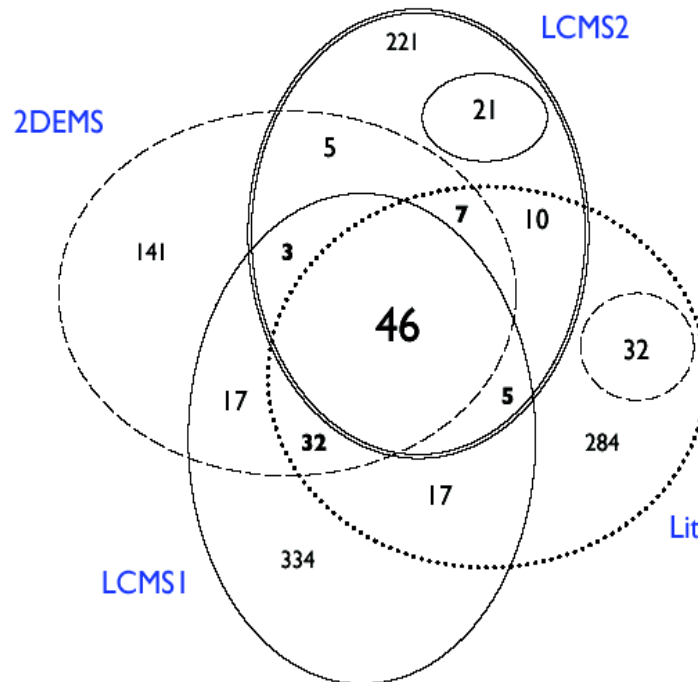
PDQuest



2D or not 2D ?

- rozlišení
- vizuální aspekty
- multigelové jednotky
- dynamický rozsah
- extrémní proteiny (membránové, basické...)
- reprodukovatelnost, image analýza
- citlivost barvení
- pracnost
- nesnadná automatizace
- postdigesční extrakce

Different Platforms See Different Plasma Proteomes: Small Overlap of Four Plasma Proteome Datasets (Number of NR proteins)



- 46 proteins in all four lists
- 195 proteins in 2 or more lists
- 1175 NR proteins total

MULTIDIMENZIONÁLNÍ CHROMATOGRRAFIE

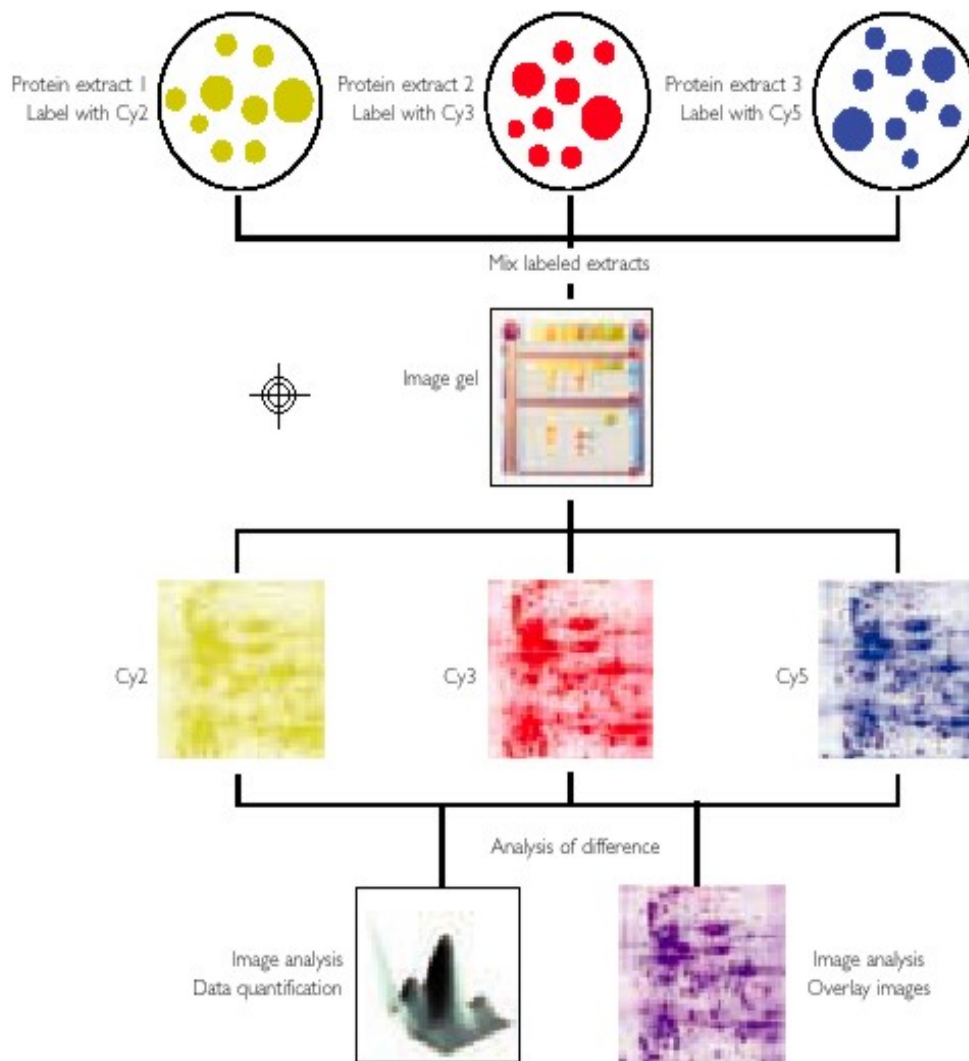
PRO

- velké objemy vzorku
- možnost koncentrace na koloně
- membránové proteiny, basické proteiny
- není nutno barvit
- peptidy – přímé napojení na MS
- automatizace

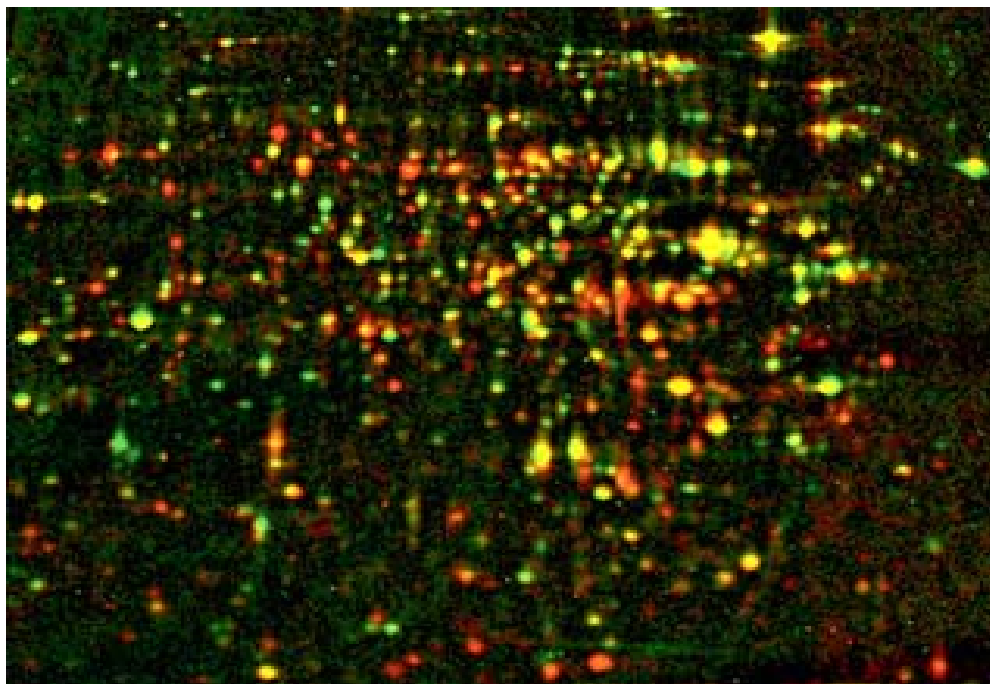
PROTI

- vizuální aspekty ztraceny: pI a M_r
- LC je sériová analýza
- GE může běžet současně pro více vzorků

Difference Gel Electrophoresis DIGE

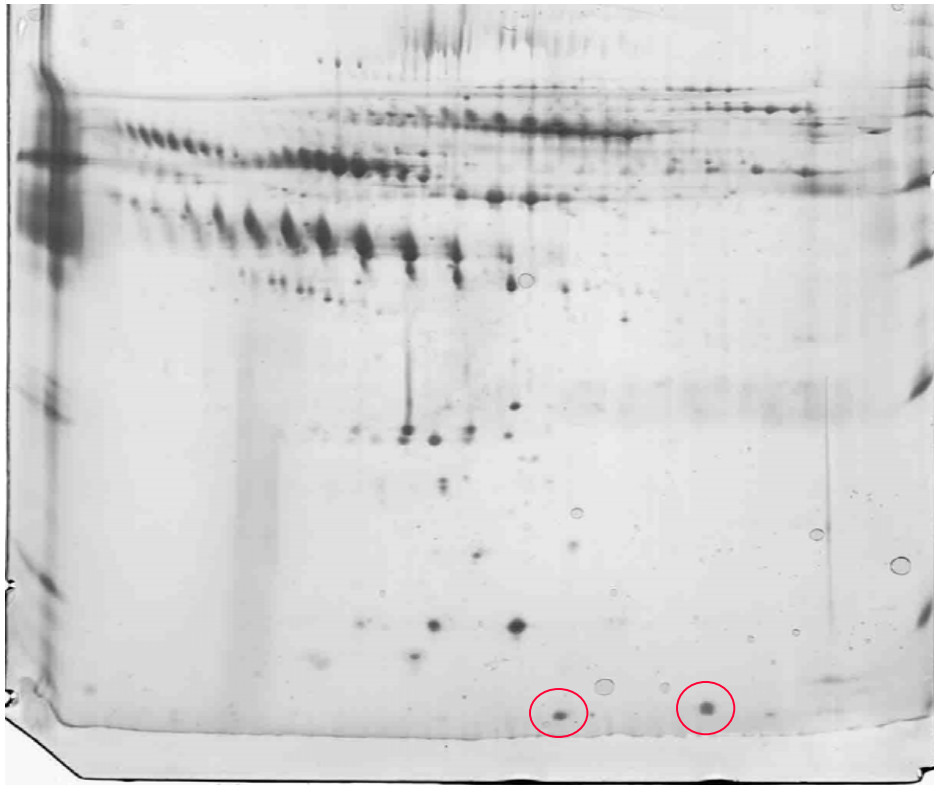


DIGE

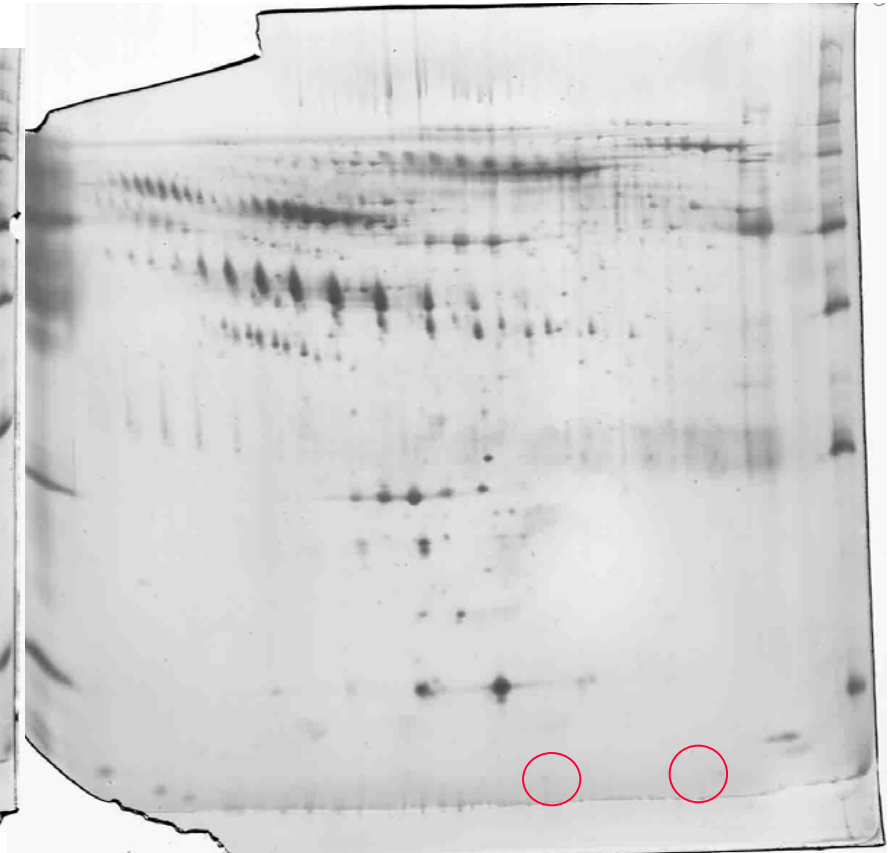


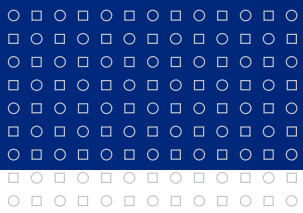
Biomarkery v lidské plasmě

Den 21 – před klinickým projevem



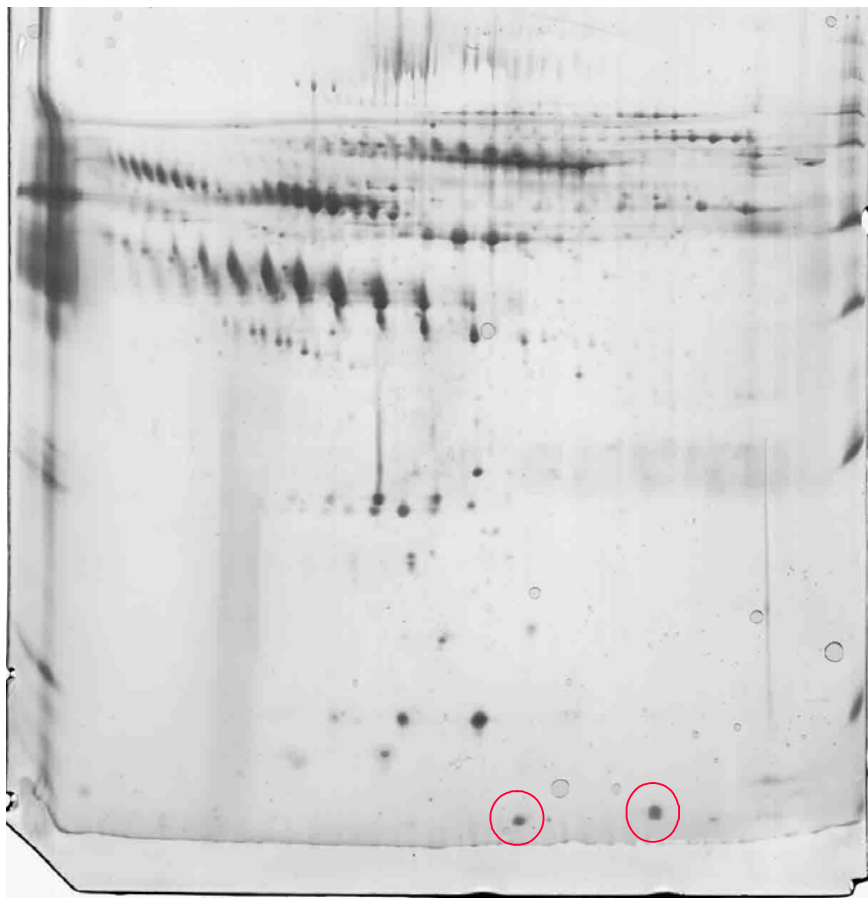
Den 44 – po klinickém projevu





separace

depletovaná plasma



identifikace

vesikly kmenových buněk



↓ **DIGESCE**

trypsin Glu-C Asp-N thermolysin

MAVEPFRRPITRPHASIEVDTS GTGG SAGSSE
 KVFLIGQAEGGEPNTVYELR NYAQA KRLFR
 SGELLD AIELAWGSNP NYTAGRILAMRIEDAK
 PASAEIGGLKITSKIYGNV ANNIQV GLEKNTLS
 DSLRLR VIFQDDRFNEVYD NIGNIFTIKYKGEE
 ANATFSVEHDEETQKASRL VLKVG DQEVKSY
 DLTGGAYDYTNAITDINQLPDFEAKLSPFGD
 KNLESSKLDKIENANIKDKAVYVKA VFGDLE
 KQTAYNGIVSFEQLNAEGEVPSNVEVEAGEES
 ATVTATSPIKTIEPFELTKLKGGTNGEPPATWA
 DKLDKFAHEGGYYIVPLSSKQSVHAEVASFV
 KERSDAGEPMRAIVGGGFNESKEQLFGRQAS
 LSNPRVSLVANS GTFVMDDGRKNHVPAYMV
 AVALGGLASGLEIGESITFKPLRVSSLDQIYESI
 DLDELNENGIISIEFVRNRTNTFFRIVDDVTTFN
 DKSDPVKAEMAVGEANDFLVSELKVQLEDQF
 IGTRTINTSASI KDFIQSYLGRKKRDNEIQDFP
 AEDVQVIVEGNEARISMTVYPIRSFKKISVSLV
 YKQQT LQA

- IN-GEL
- IN-SOLUTION

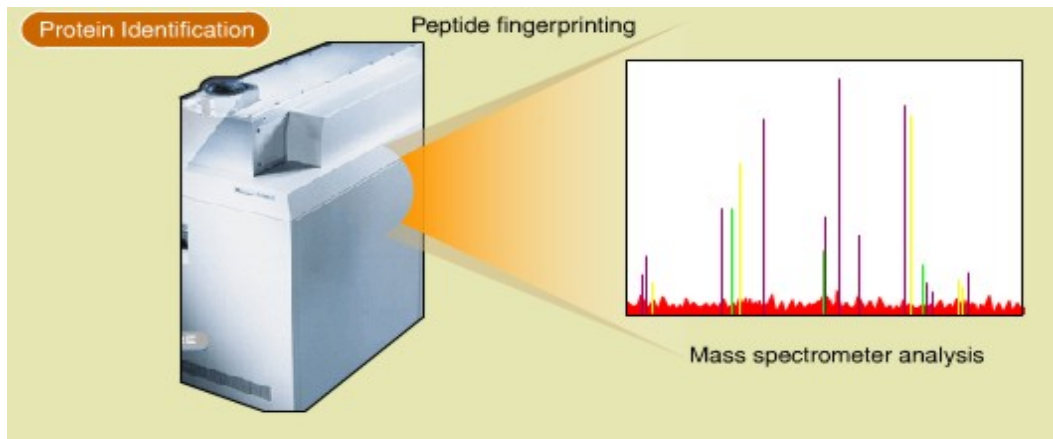


MS

IDENTIFIKACE

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

- ionizátor, analyzátor, detektor
- hmotnost/náboj
- **MALDI** generuje ionty z pevné fáze
- **ESI** generuje ionty z kapalné fáze

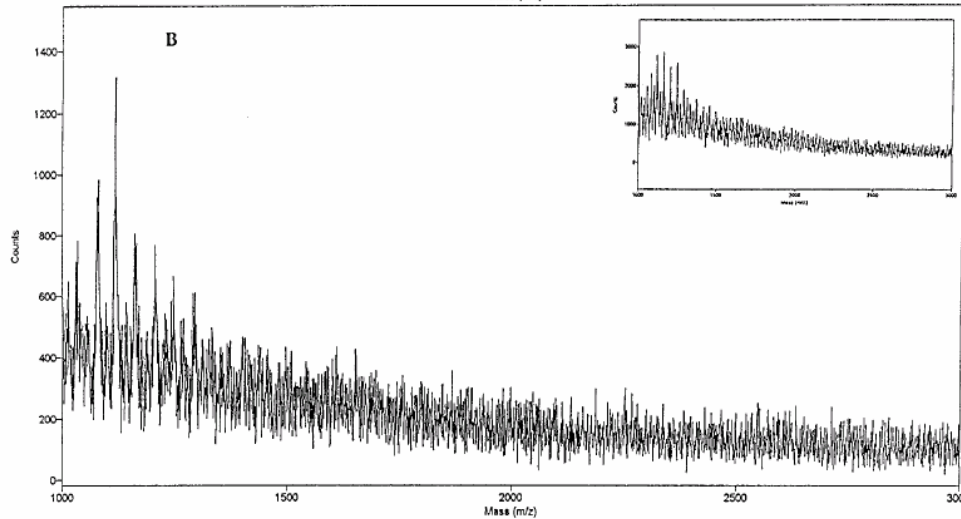
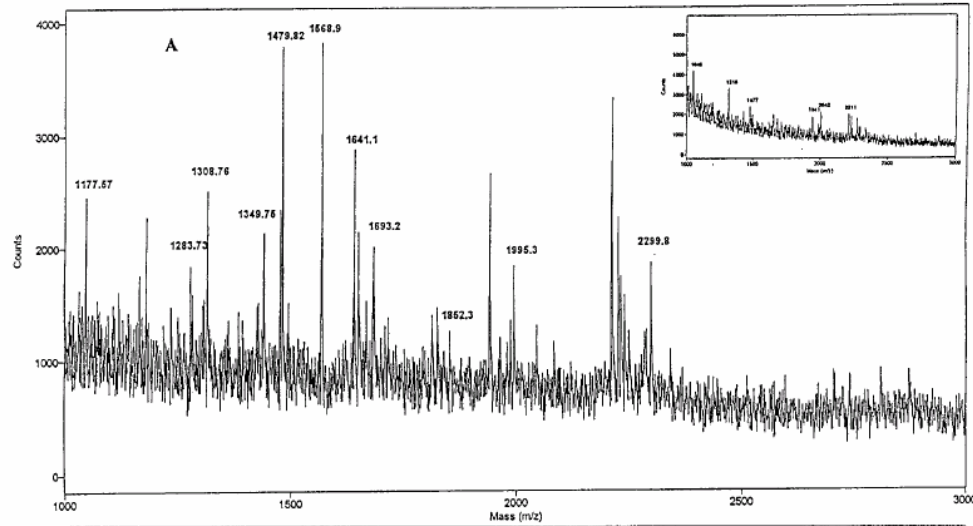


databáze



identifikace





DIGEST

BSA

v gelu

kompatibilní stříbro

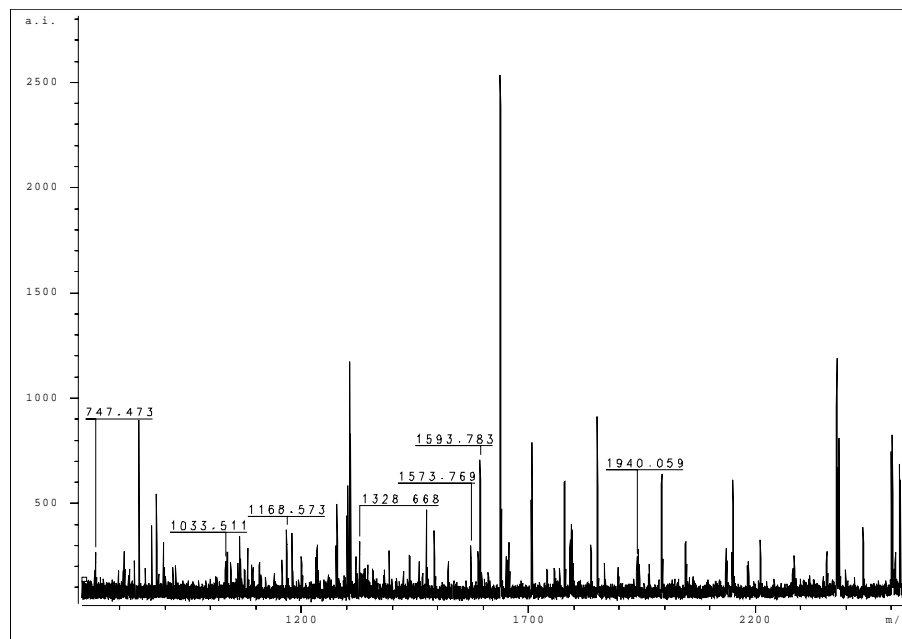
odbarvený gel

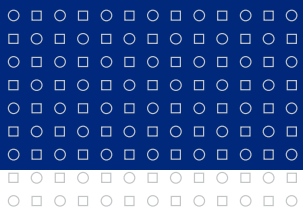
gel bez odbarvení



KERATINY !!! Potlačení ionizace

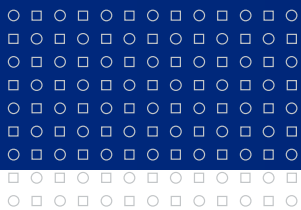
alpha-1-antiproteinase, antitrypsin Score 83
potvrzeno na MALDI-TOF/TOF MS Score 239
Neoznačené píky: **keratiny** nebo autolýza trypsinu





G I G O





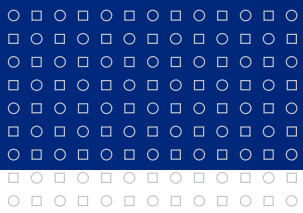
G I G O

GARBAGE IN - GARBAGE OUT



LITERATURA

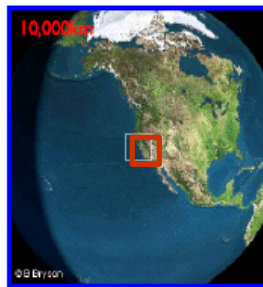
- R.M. Twyman: Principles of Proteomics
- R.Westermeier, T.Naven, H-R Höpker: Proteomics in Practice
- A.J.Link: 2D Proteome Analysis Protocols
- Current Protocols in Protein Science
- R.J.Simpson: Proteins and Proteomics
- T.Rabilloud: Proteome Research: Two-dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods
- A. Görg, W. Weiss, M.J.Dunn: Proteomics 2004, 4, 3665, rev.
- I. Miller, J. Crawford, E. Gianazza: Proteomics 2006, 6, rev.
- F.Chevalier: Proteome Science 2010, 8:23, review
- R. Burgess, M. Deutscher: Guide to Protein Purification



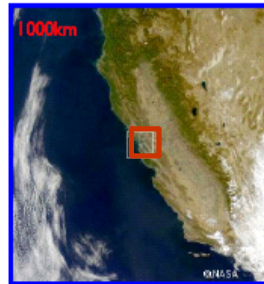
II. PREFRAKCIONACE



10^{10} Really Is Wide Dynamic Range



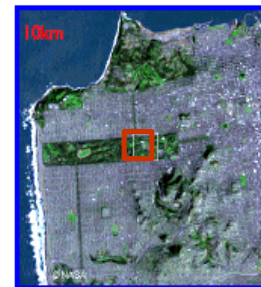
10 10 000km



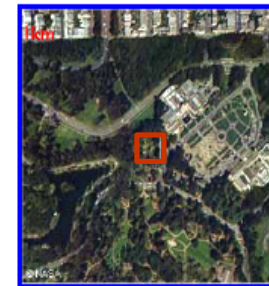
9 1 000km



8 100km



7 10km



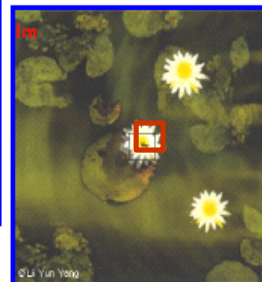
6 1km



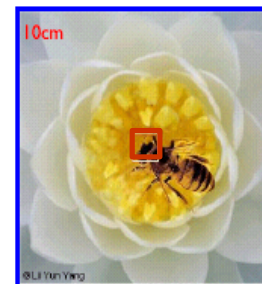
5 100m



4 10m



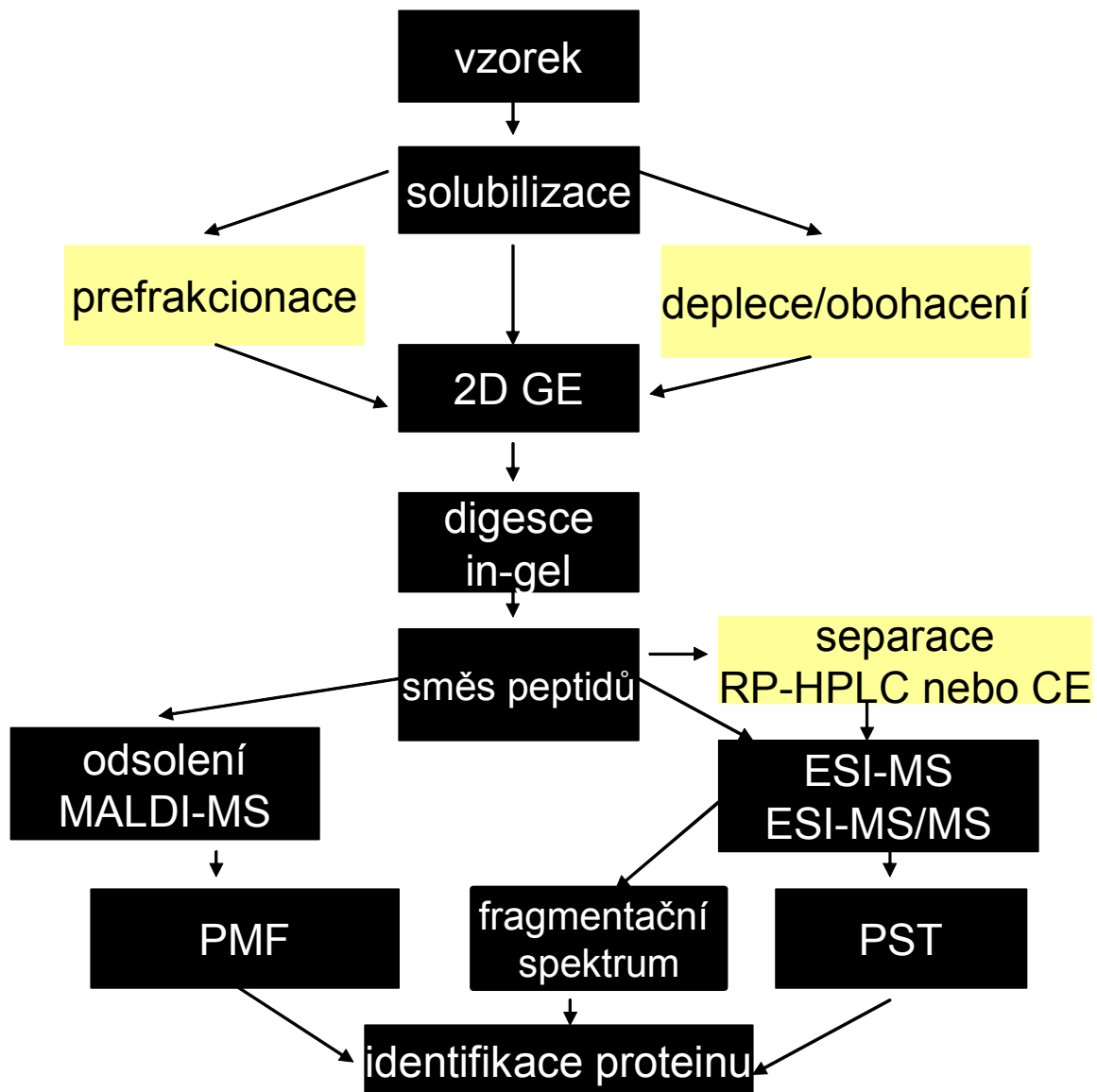
3 1m



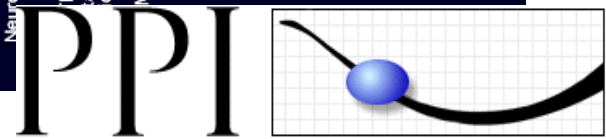
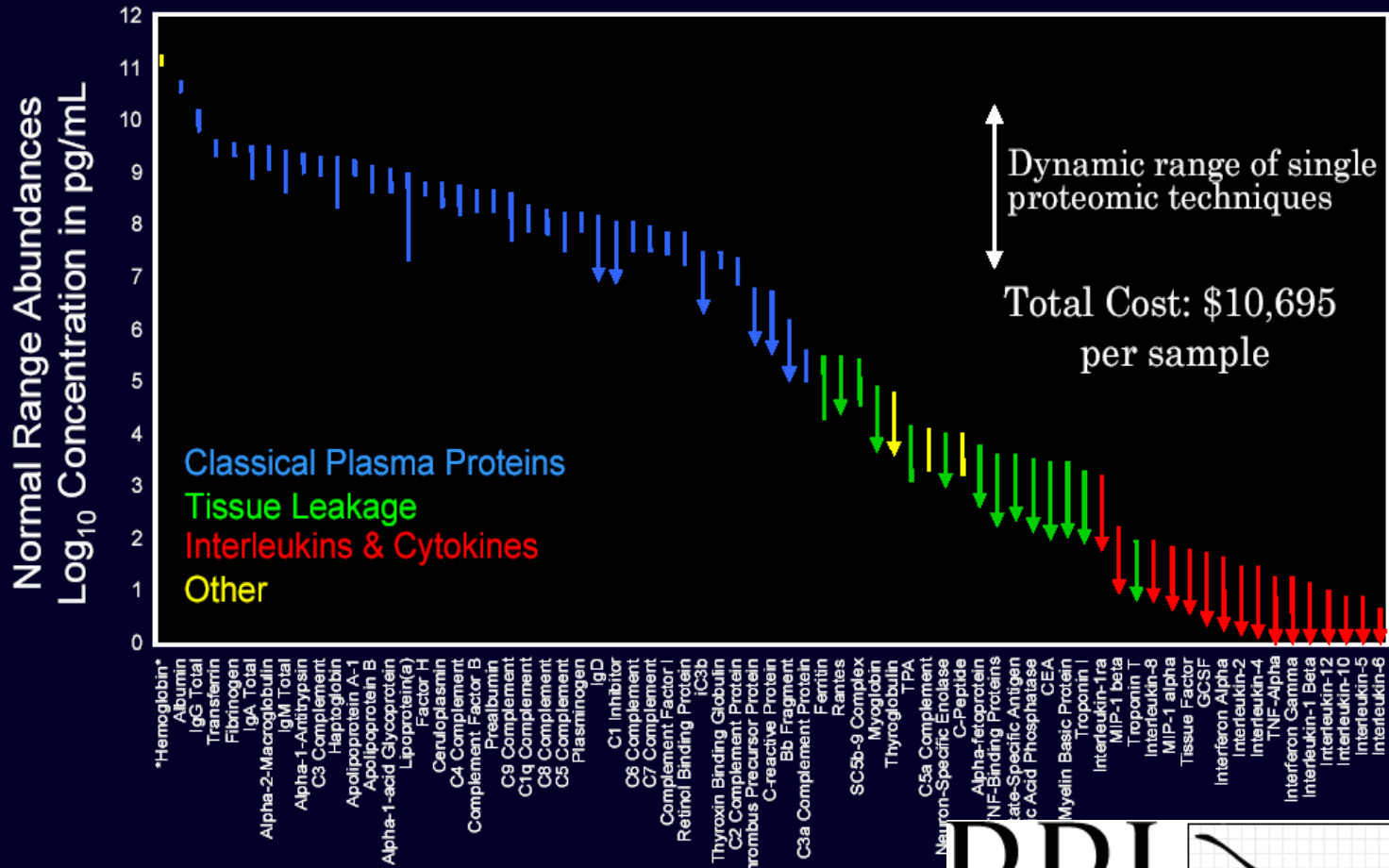
2 10cm

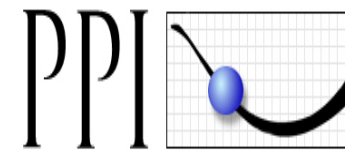


1 1cm

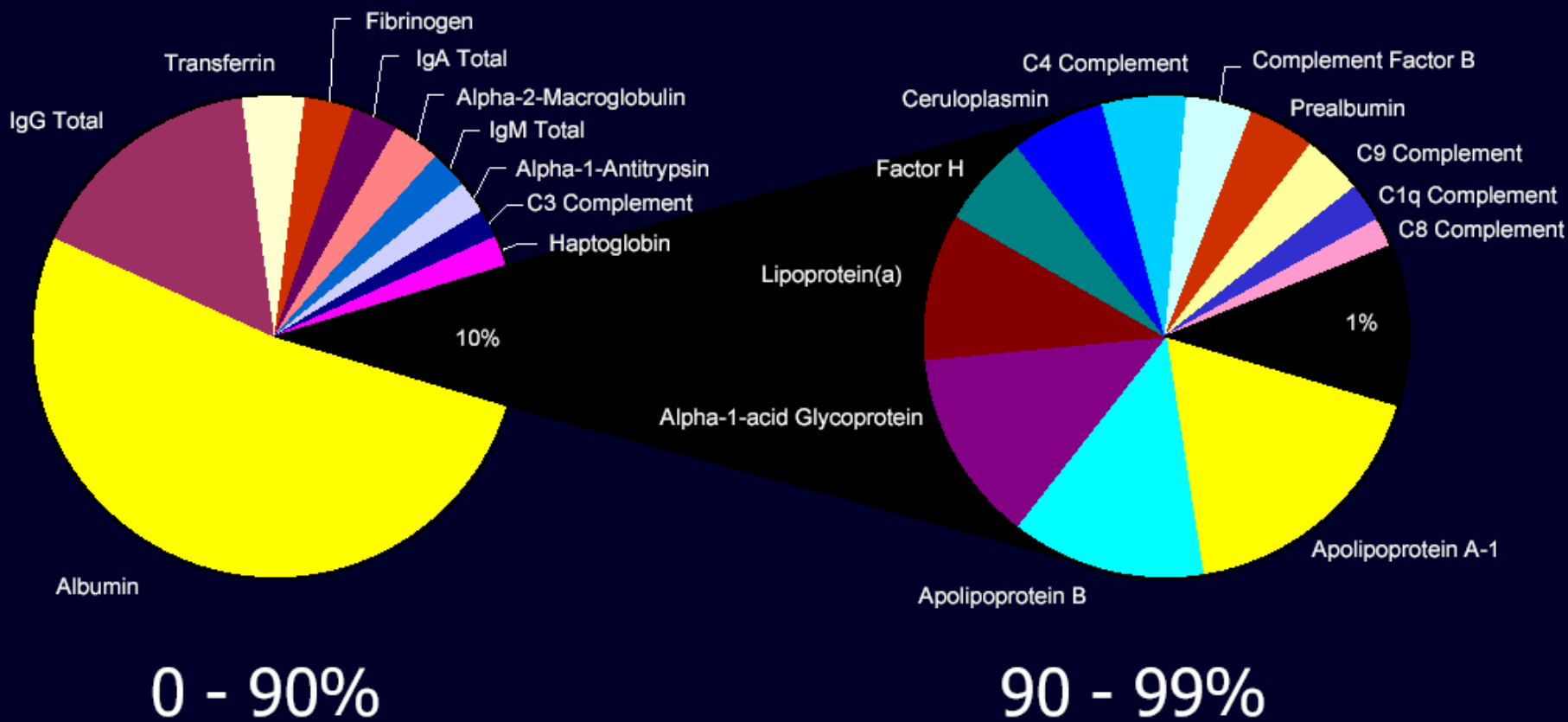


Proteins Measured Clinically in Plasma Span > 10 Orders of Magnitude in Abundance





The Plasma Proteome Institute

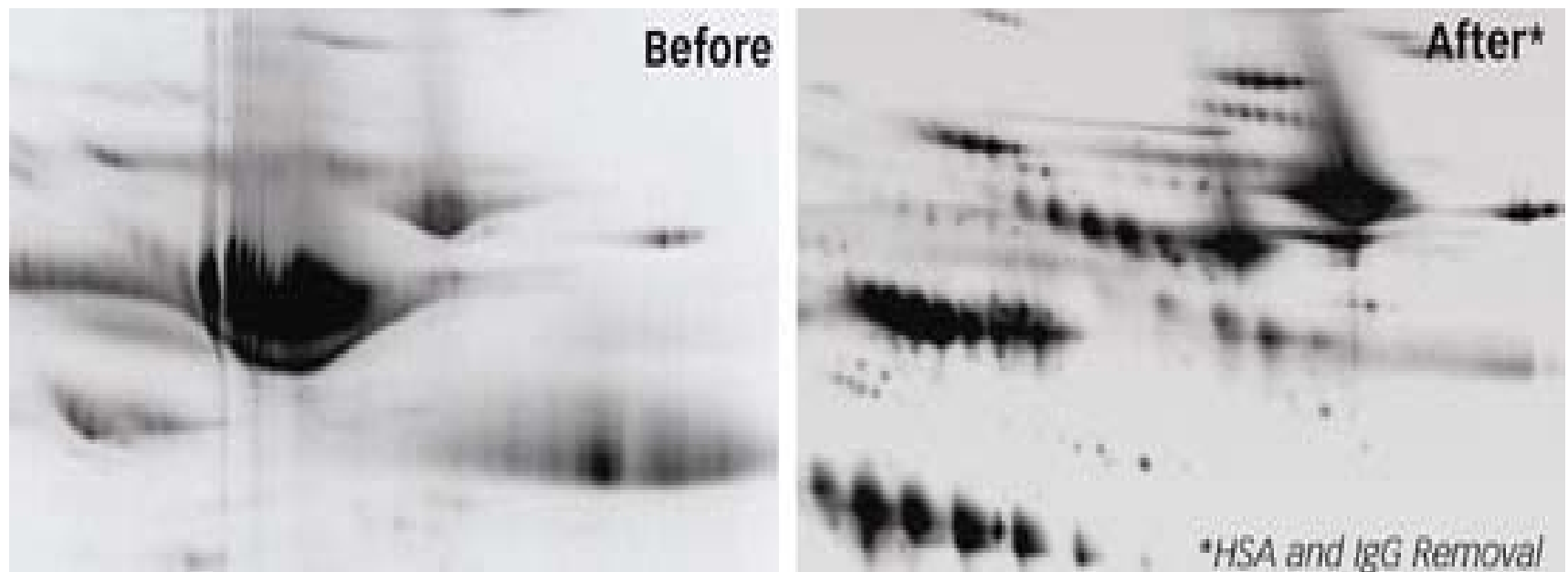


DEPLECE

odstranění abundantních proteinů

HSA

IgG



Lidská plazma - vázaná frakce po afinitní depleci

ALBUMIN

IgG

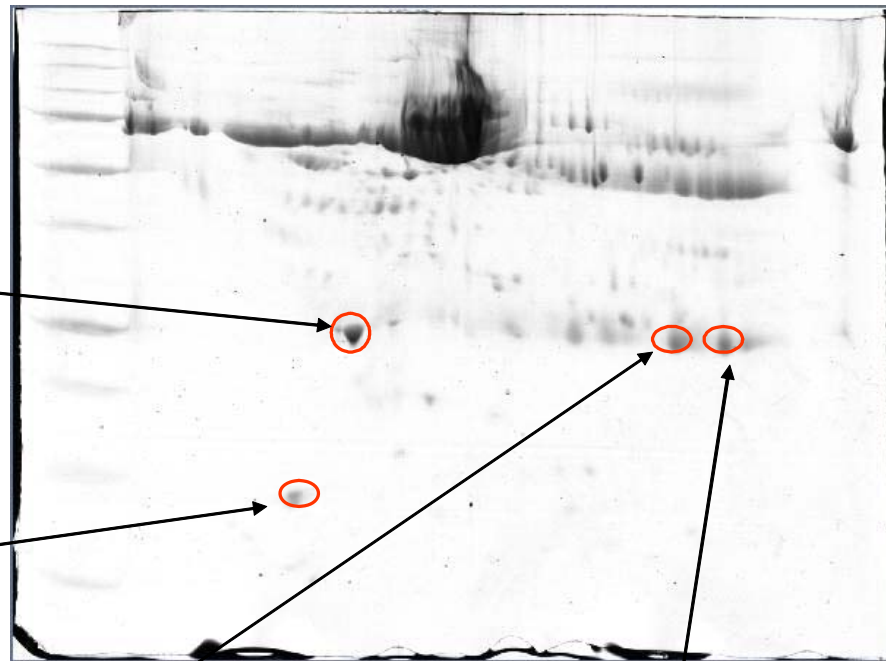
Barvení: CB G-250

Apolipoprotein

albumin

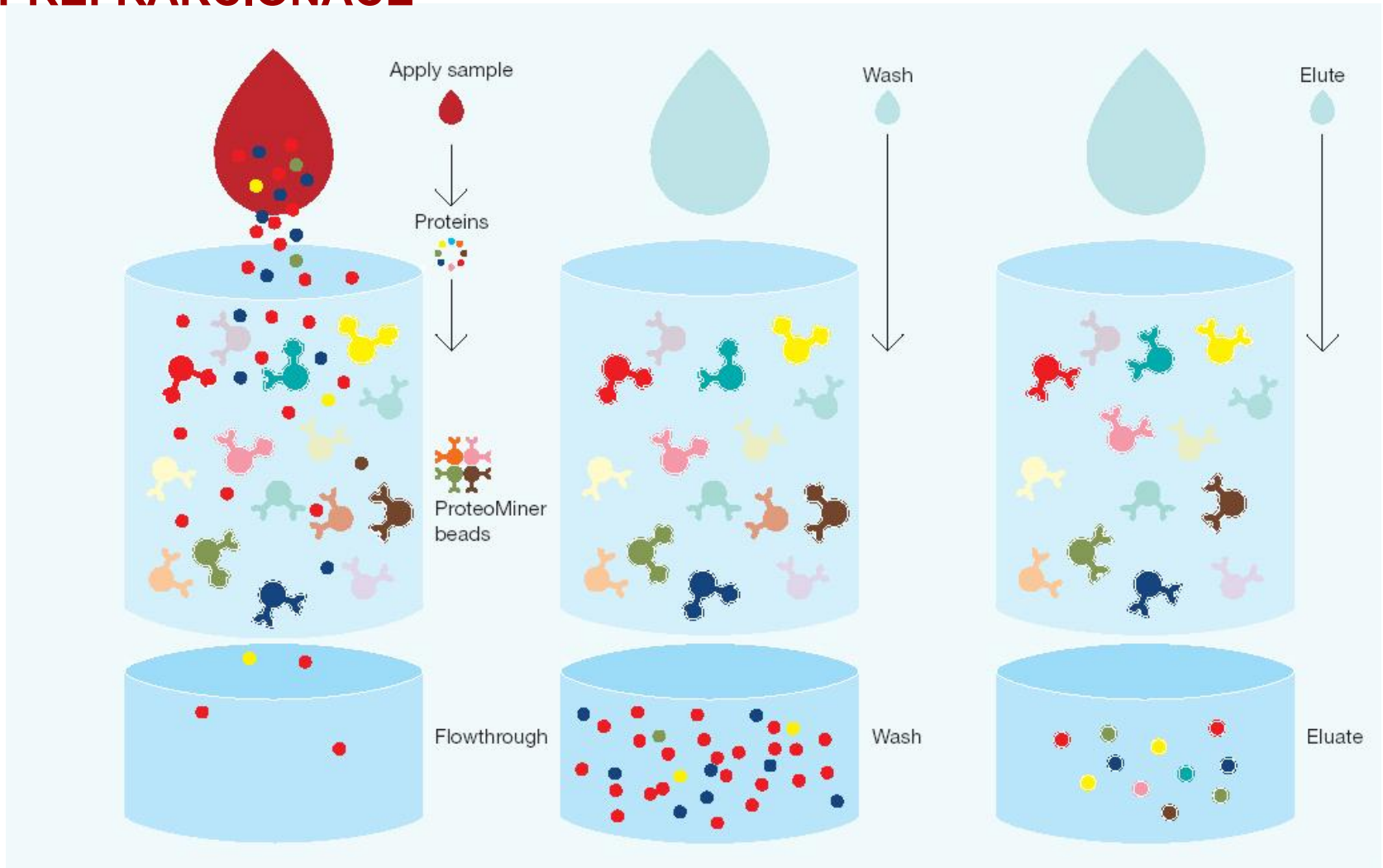
Immunoglobulin kappa light chain

Immunoglobulin light chain



PREFRAKCIONACE

PROTEOMINER



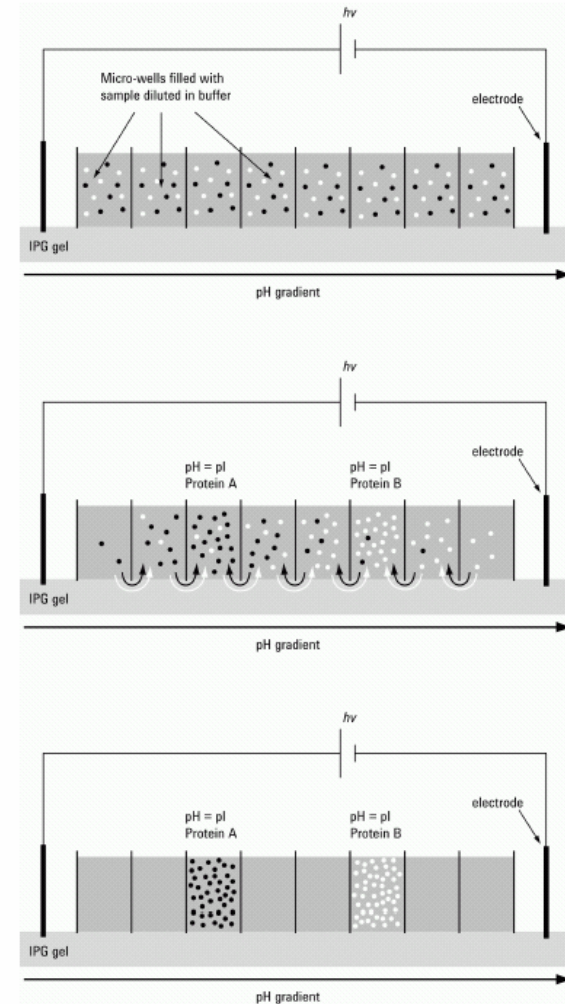
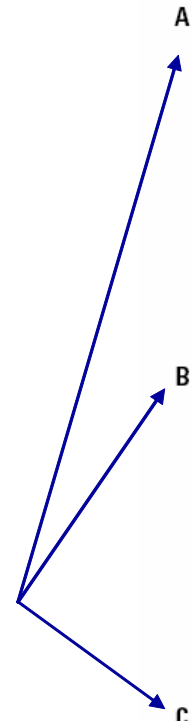
PREFRAKCIONACE

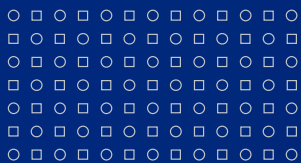


MicroRotor

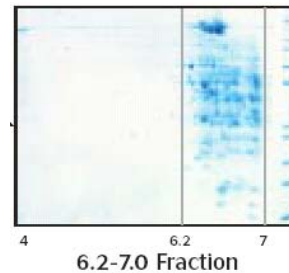
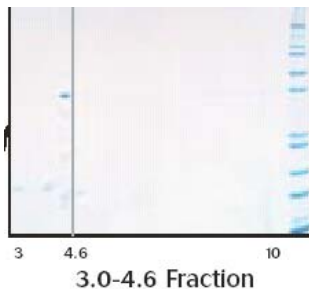
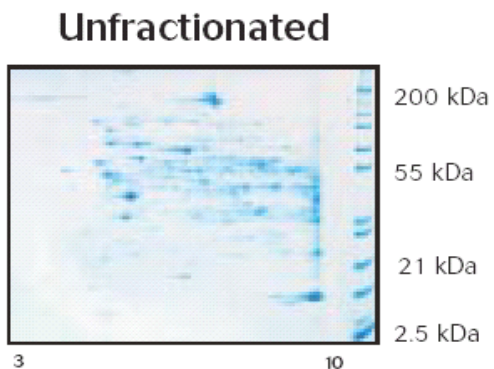


OffGel Fractionator

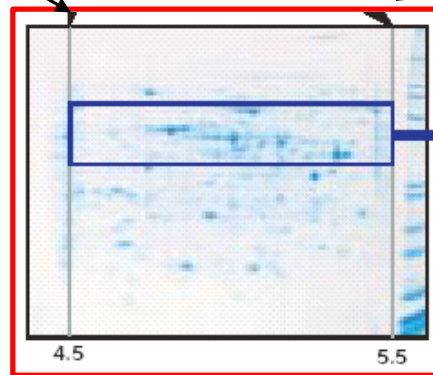
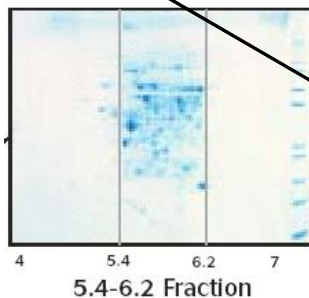
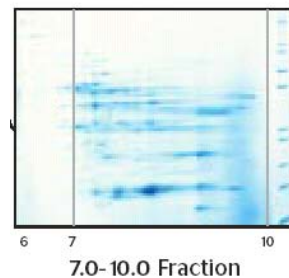
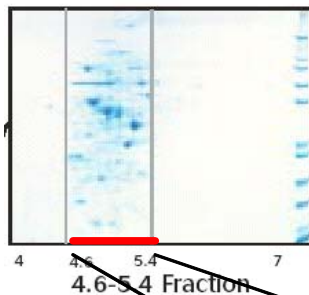




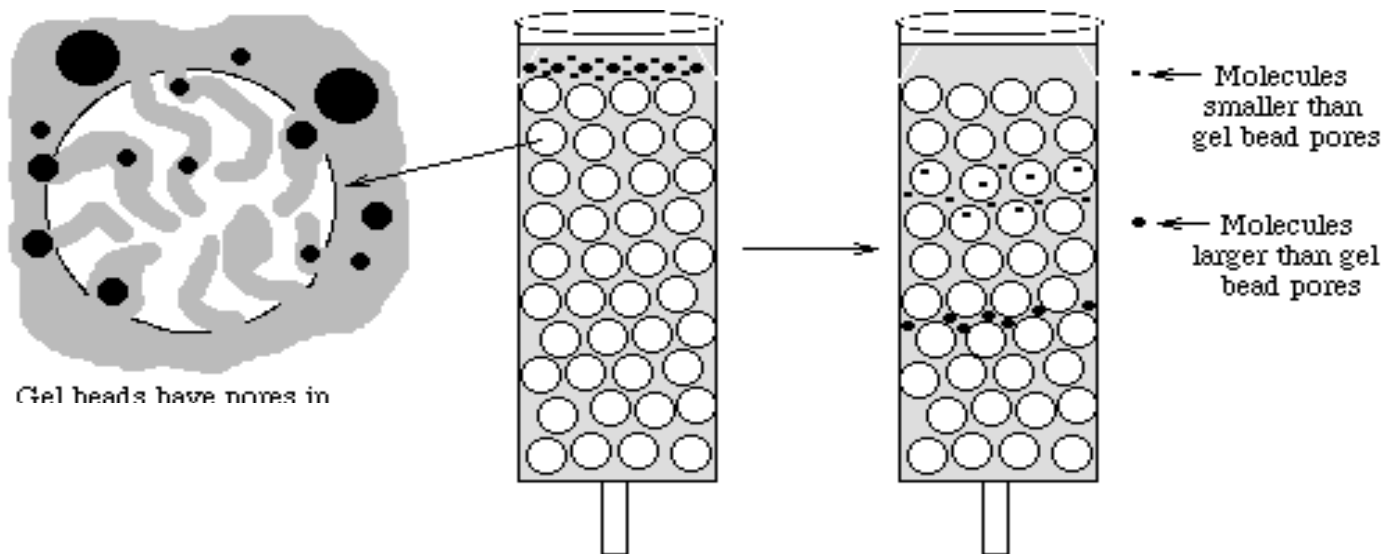
PREFRAKCIONACE MIKRO ROZSAHY

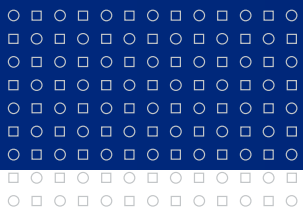


pl



GELOVÁ CHROMATOGRAFIE





III. CENTRÁLNÍ LABORATOŘ



CENTRÁLNÍ LABORATOŘ

- přístup k pokročilým technologiím na bázi sdílené instrumentace a její kvalifikované obsluhy

- proteomické techniky
- genomické techniky

- výuka - přednášky a praktické kurzy
- členství v **A**ssociation of **B**iomolecular **R**esource **F**acilities

TECHNIKY V CENTRÁLNÍ LABORATOŘI

- sekvenování a fragmentační analýza DNA
- syntéza a purifikace oligonukleotidů
- kapalinová chromatografie
- gelová elektroforéza
- analýza obrazu
- digesce proteinů
- hmotnostní spektrometrie
- minisklad reagensů pro molekulární biologii


http://www.sci.muni.cz/FGP

Soubor Úpravy Zobrazit Přejít Zložky Nástroje Nápoje

file:///c:/Documents%20and%20Settings/lmfr/Dokumenty/DOCUMENTS/zaloha/CL/FGP.htm Přejít

Mozilla Firefox Přehled zpráv Startovní stránka M... Startovní stránka M... Bio-Chem Valve Inc. ... labelling miniprotein leaking -... idos.cz - Vyhledat G... Vivascience : Protein... Ústav imunologie Pet...











English

 **Oddělení funkční genomiky a proteomiky**
Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta
Brno, Česká republika

ABVMK CL LMFR

Vyhledávání OK

DFGP

-  D NÁS
-  VÝZKUM
-  VÝUKA
-  PUBLIKACE
-  SPOLUPRÁCE
-  NOVINKY
-  VOLNÁ MÍSTA
- SLUŽBY**
 - proteomické techniky
 - genomické techniky
 - syntéza oligonukleotidů
 - minisklad
 - další
-  TECHNICKÉ ZÁZEMÍ
-  ODKAZY
-  KONTAKTY

SLUŽBY

Proteomické techniky
Genomické techniky
Syntéza oligonukleotidů
Minisklad pro molekulární biologii

PROTEOMICKÉ TECHNIKY

Jednorozměrná a dvojrozměrná multigelová elektroforéza (Bio-Rad)
Kapalinové chromatografy Ultimate (Dionex-LC Packings)
Hmotnostní spektrometry Reflex IV a Esquire 2000 (Bruker)
Nabízíme všechny kroky nutné ke zpracování vzorku - od izolace proteinů až po jejich charakterizaci a bioinformatické zpracování dat. Provádíme solubilizaci vzorku, depleci abundančních proteinů, prefraekcionaci, isoelektrickou fokusaci na imobilizovaných gradientech pH, separaci polyakrylamidovou gelovou elektroforézou (1-DE, 2-DE), barvení po separaci v gelu, image analýzu, dále pak frakcionaci a separaci kapalinovou chromatografií, proteinovou digesci (in-gel nebo in-solution) a MS analýzu (MALDI-TOF MS a LCMSMS).

Kontaktní osoby

<u>Hana Konečná, RNDr.</u>	54949 5050	hanak@sci.muni.cz
	54949 1465	
<u>Zbyněk Zdrahal RNDr., Dr.</u>	54949 1466	zdrahal@sci.muni.cz
	54949 8258	

Objednávkový formulář
Ceník elektroforetických separací
Ceník MS analýz

Tato prezentace vznikla s podporou projektu **OP VK**
„Rozvoj týmu pro výuku, výzkum a aplikace v oblasti funkční genomiky a proteomiky“
(CZ.1.07/2.3.00/09.0132)

Děkuji za pozornost

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

