

**M U N I**  
**S C I**

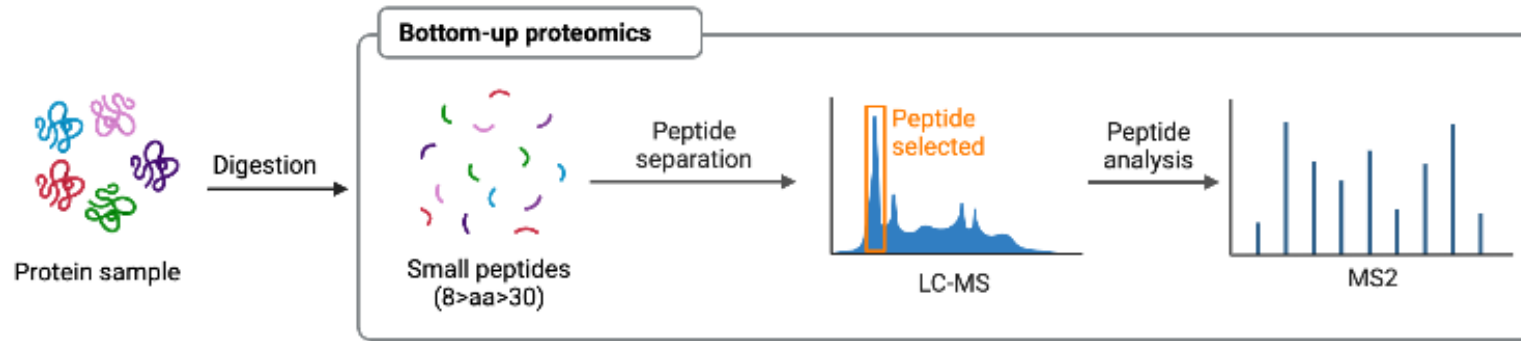
# **CG090 Metody v proteomice**

## **Příprava vzorku pro proteomiku zdola**

Gabriela Lochmanová, Ph.D.

Studijní materiály

# Proteomika zdola

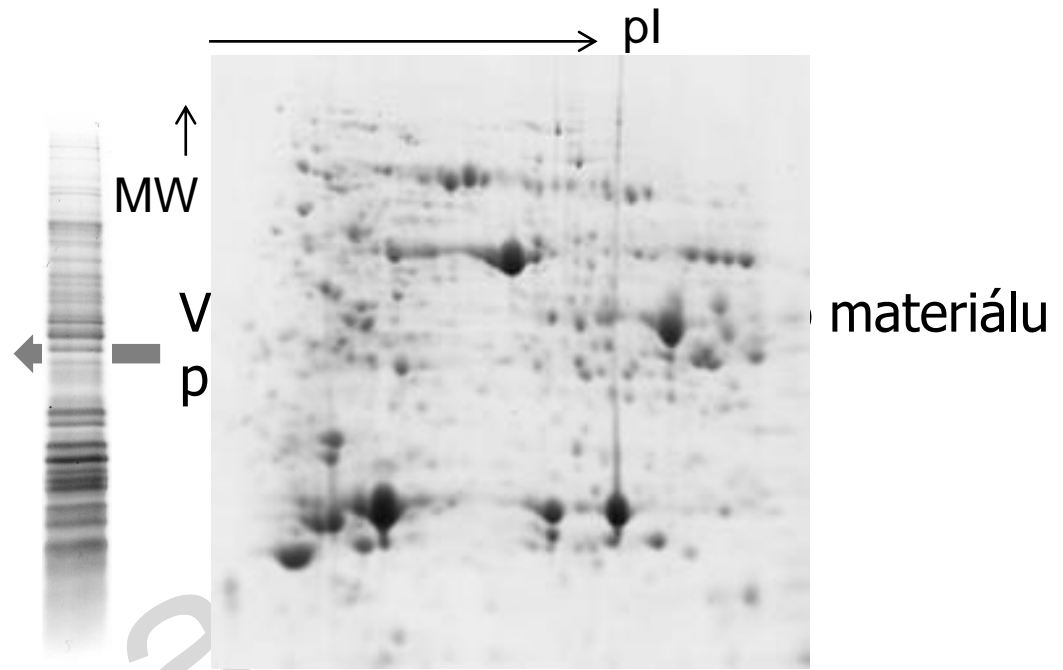
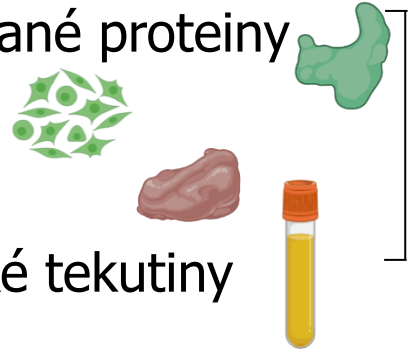


- Peptidy vhodné velikosti pro analýzu běžně dostupnou instrumentací
- Dostupné „open-source“ a komerční programy
- Umožňuje:
  - identifikovat peptidy a z nich odvodit identifikaci proteinů
  - identifikovat a lokalizovat posttranslační modifikace (PTM)
  - určit relativní zastoupení peptidů mezi vzorky
- Identifikace a kvantifikace tisíce proteinů z jednoho vzorku (bez potřeby předchozí znalosti o složení vzorku či dostupnosti protilátek)

# Proteomika zdola

- Vstupní materiál: rozmanité typy vzorků

- purifikované proteiny
- buňky
- tkáně
- biologické tekutiny



- Současný trend:

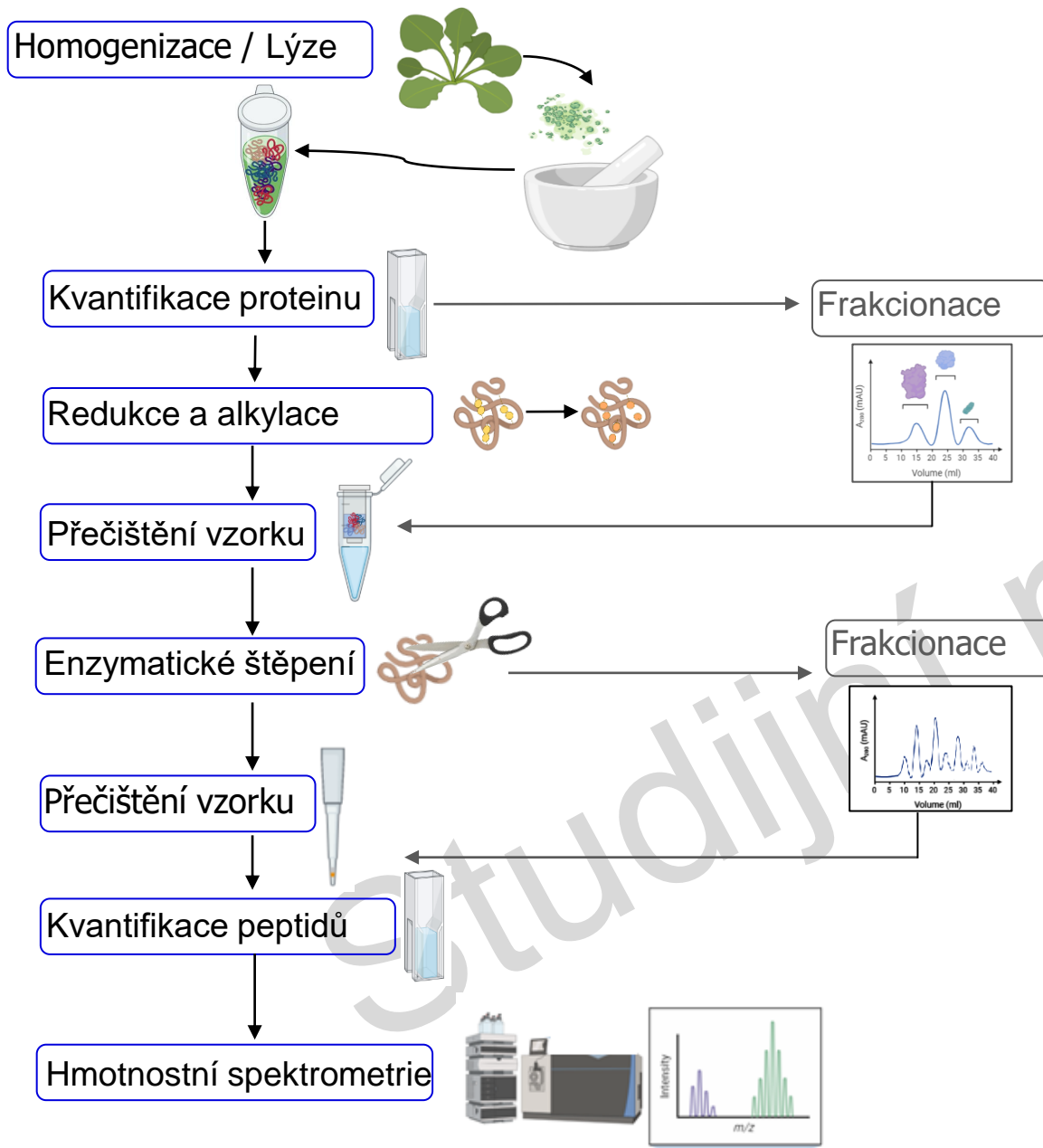
- přístupy v roztoku – časově výhodné, laboratorně jednodušší, minimalizované ztráty vzorku
- přístupy bez precipitace – alternativní metody využívané pro odstranění detergentů a dalších kontaminant (suspension trapping, paramagnetické kuličky)

*Tradiční přečištění vzorku na reverzně-fázové chromatografii lze využít pro odsolení, ale ne pro odstranění detergentů či polymerů*

X

*Nové přístupy využívající magnetické kuličky umožňují odstranění detergentů, polymerů i solí*

# Proteomika zdola – Obecný postup



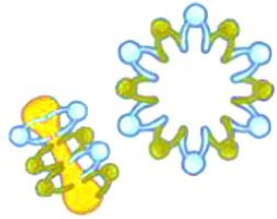
- Sled kroků zahrnující štěpení proteinu na peptidy doprovázené odstraněním kontaminant ze vzorku

- Výběr postupu se odvíjí od **komplexity vzorku a cíle experimentu.**

*Komplexita vzorku – počet proteinů*  
*– dynamický rozsah koncentrace proteinů*

# Homogenizace / Lýze

- Metody založené na reagentiích



- rychlé, jemné, účinné, reprodukovatelné
- extrakce celkového proteinu nebo proteinů subcelulární frakce



- komponenty nekompatibilní s MS musí být následně odstraněny
- vhodné pro buněčné kultury, ale nemusí být účinné pro některé tkáně

- Mechanické přístupy



- lýze široké škály vstupního materiálu
- vysoká lyzační účinnost



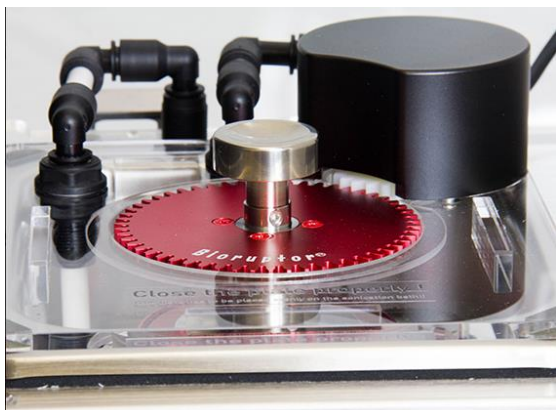
- vyžaduje instrumentaci
- omezená reprodukovatelnost
- denaturace a agregace proteinů kvůli lokálnímu přehřátí
- rozrušení buněk a subcelulárních komponent v různých časech

# Homogenizace / Lýze

## Bioruptor<sup>®</sup> Pico

### Adaptive cavitation Technology **ACT**

- Rychlé změny tlaku v kapalném vzorku během sonikace
- Vznik bublin při lokálním poklesu tlaku
- Praskání bublin při dosažení kritické velikosti



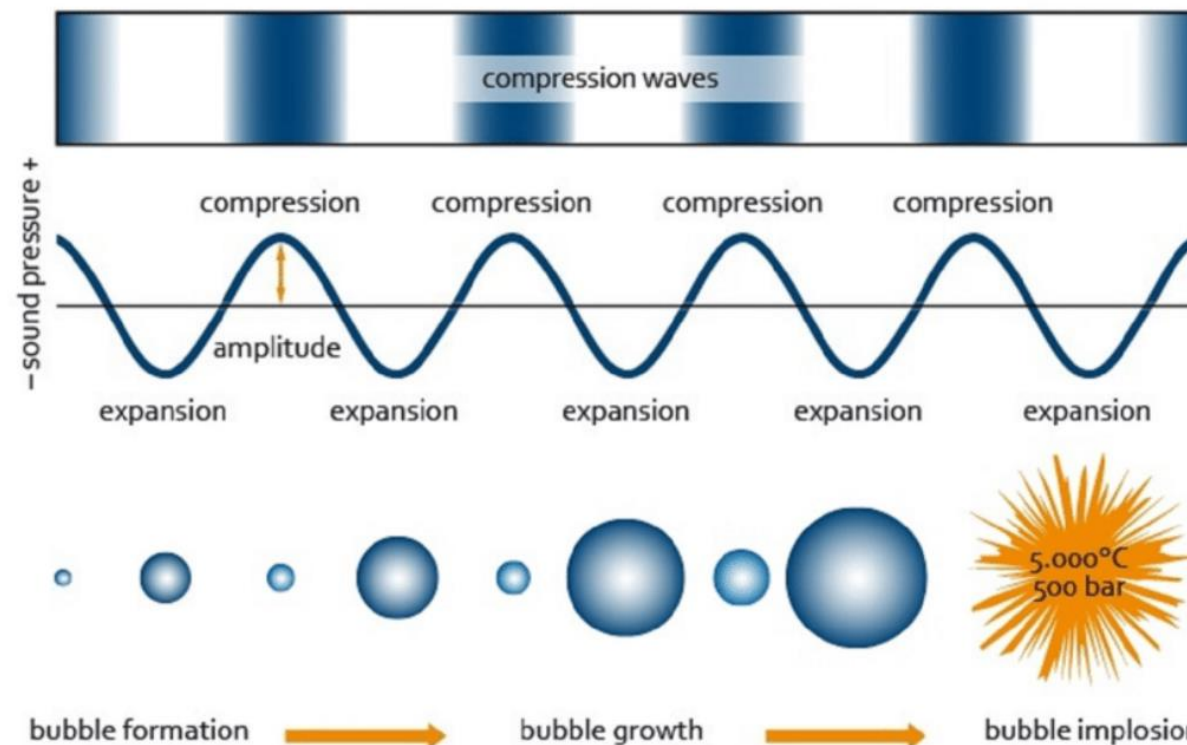
5 mikrolitry až 2 mililitry vzorku  
(v závislosti na adaptéru)



Adaptor for 0.2ml tubes for Bioruptor<sup>®</sup> Pico holder    Adaptor for 0.65ml tubes for Bioruptor<sup>®</sup> Pico holder



Adaptor for 1.5ml tubes for Bioruptor<sup>®</sup> Pico holder    15 ml sonication accessories



# Proteomika zdola – Kvantifikace proteinů / peptidů

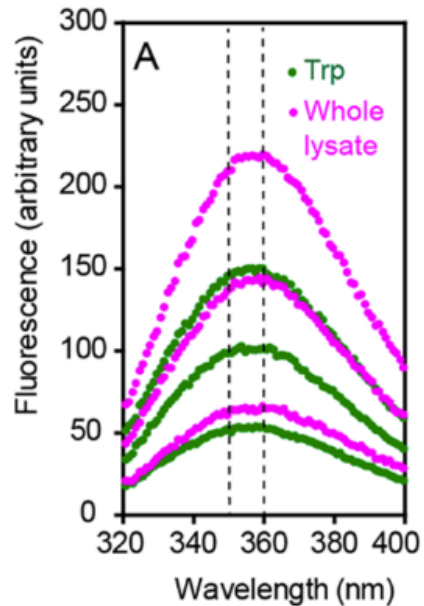
- Kvantifikace proteinů
  - výpočet množství enzymu potřebného pro štěpení proteinů
- Kvantifikace peptidů
  - kontrola výtěžku po štěpení
  - určení objemu vzorku pro nástřik do LC-MS/MS
  - zásadní pro kvantifikační analýzy, kde je třeba přesně nastavit ekvivalentní množství peptidů mezi porovnávanými vzorky
- Kolorimetrická stanovení často interferují s chemikáliemi přítomnými v pufrch potřebných pro lýzi, jako jsou detergenty nebo redukční činidla
  - např. Bradford – nekompatilní s SDS; BCA – nekompatibilní s DTT,  $\beta$ -ME, EDTA.*
- Fluorimetrické metody
  - Proteiny obsahují tři různé aromatické aminokyseliny obsahující benzenové, fenolové či indolové jádro. Každá z těchto skupin může být excitována UV světlem.

## Fluorescence tryptofanu

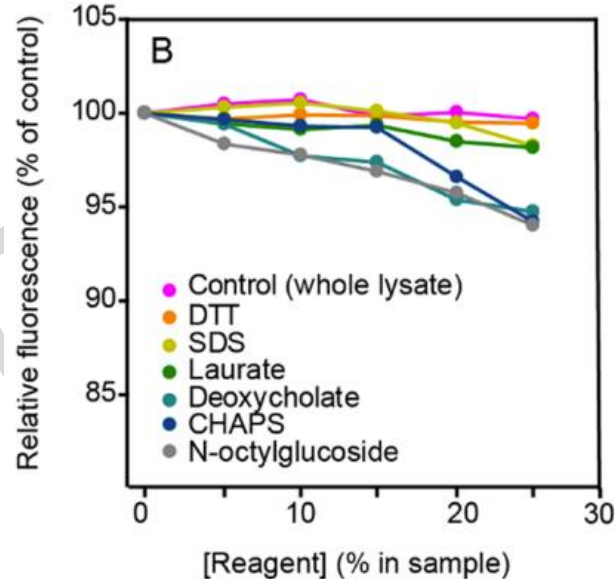
- vysoce citlivá k mikroprostředí, např. polaritě solventu
- zhasena mnoha chemikáliemi přítomnými v pufrch, např. detergenty
- závislá na teplotě a pH

# Stanovení koncentrace proteinu / peptidu na základě fluorescence tryptofanu (WF)

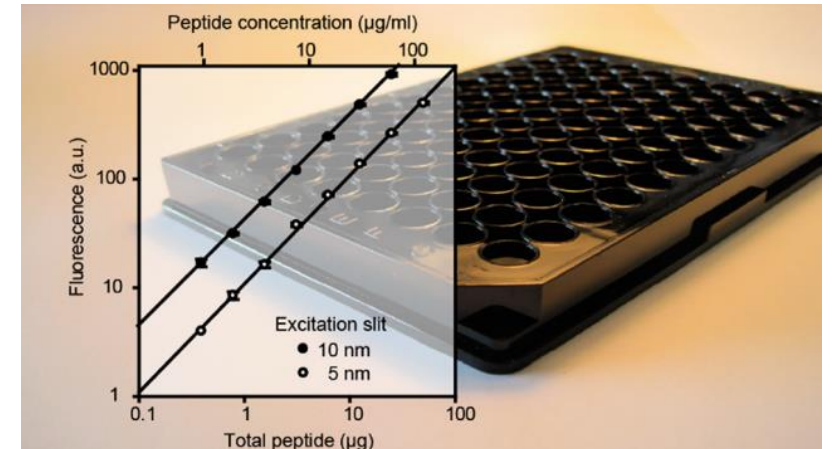
- většina detergentů v koncentraci používaných v solubilizačních pufrch zhasí fluorescenci
- Kvantifikace Trp – nízká interakce detergentů s proteiny v pufru obsahujícím 8 M močovinu, indolová skupina Trp je volně exponována do roztoku;  $E_{m_{max}} = 350 \text{ nm}$
- Vhodné pro vysoce komplexní vzorky, méně pro proteinové / peptidové frakce
- pracovní koncentrace 0.05 - 25.0  $\mu\text{g/mL}$



Emisní spektra celobuněčného lyzátu (6, 12, a 18  $\mu\text{g}$  celkového proteinu) a čistého tryptofanu (0.05, 0.1, a 0.15  $\mu\text{g}$ ) ve 2 mL 8 M močoviny a 10 mM Tris-HCl, pH 7.8.



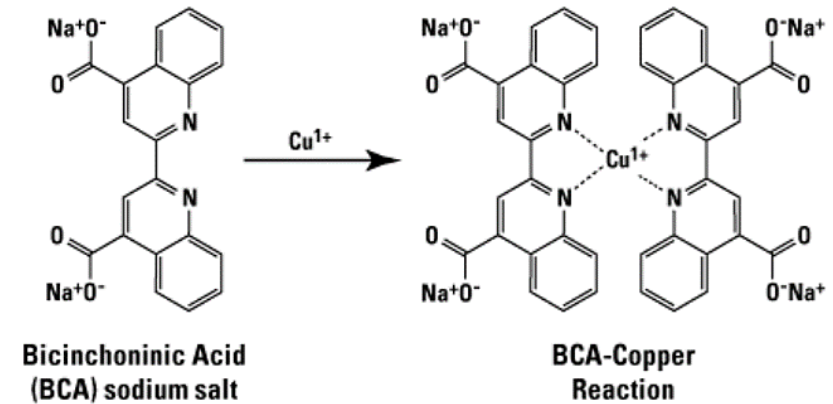
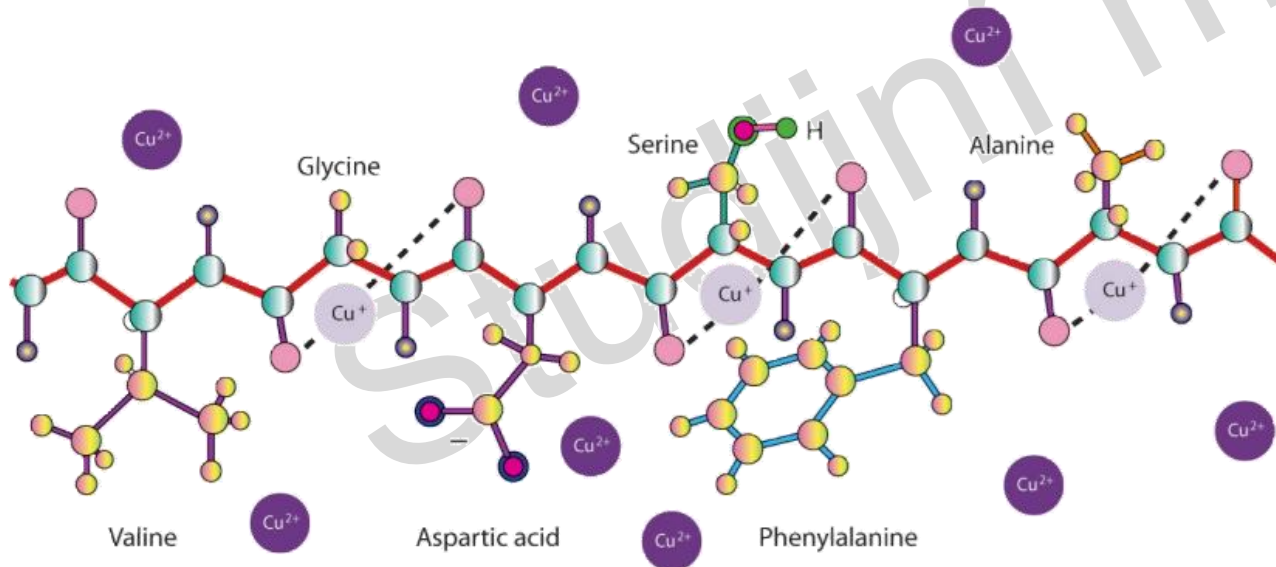
Zhášecí efekt detergentů a DTT. Koncentrace detergentů odpovídá koncentraci v 2  $\mu\text{L}$  roztoku přidaného do 2 mL 8 M močoviny.





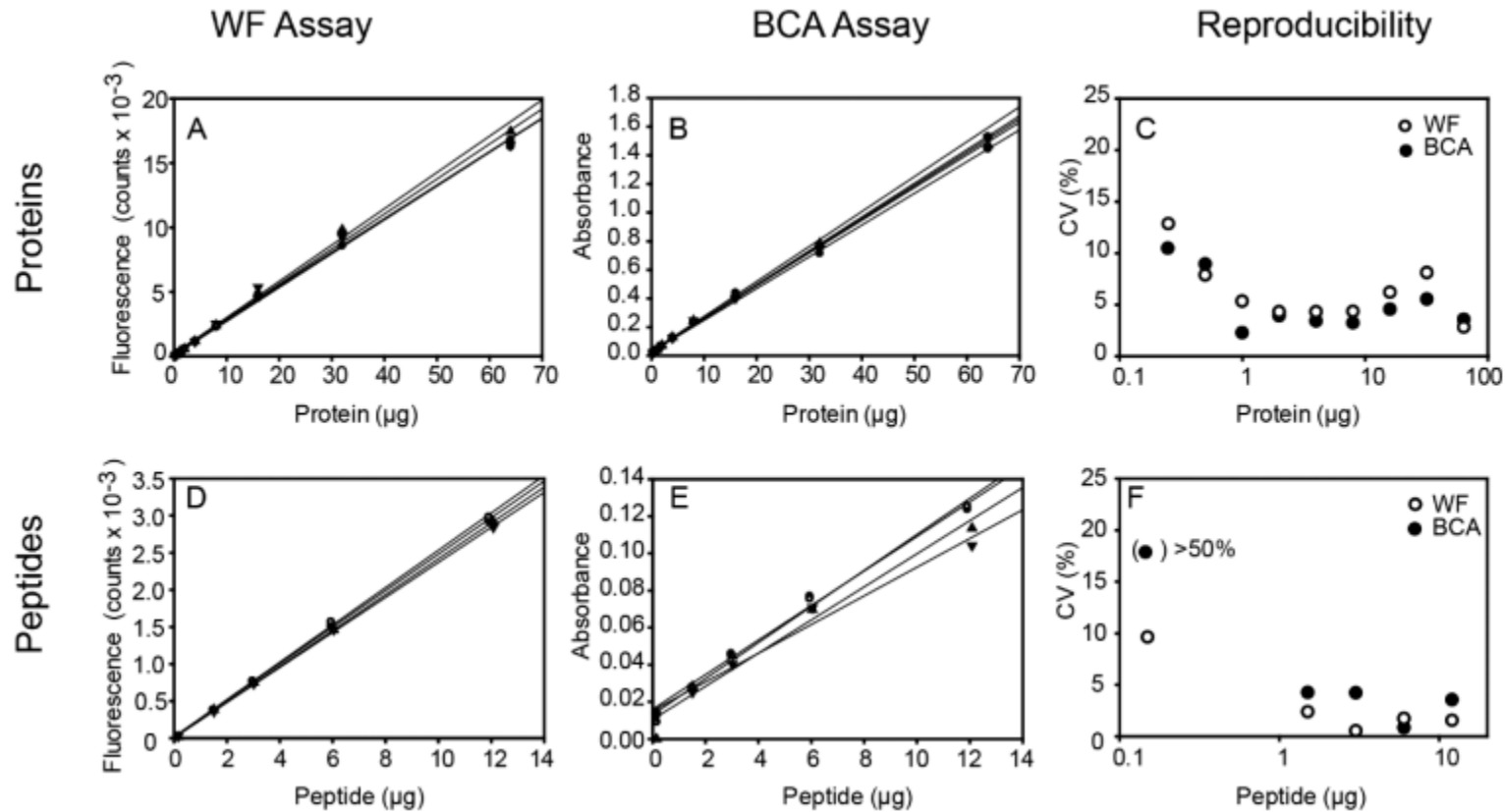
# Stanovení koncentrace proteinu / peptidu pomocí MicroBCA kitu

- kolorimetrická detekce a kvantifikace celkového proteinu / peptidu
- vhodné i pro méně komplexní vzorky
- pracovní koncentrace 0.5-20.0  $\mu\text{g/mL}$
- kompatibilní s detergenty
- nekompatibilní s reduktanty a chelatanty (DTT,  $\beta$ -ME, EDTA...)
- Proteinový roztok je smíchán v alkalickém prostředí s ionty  $\text{Cu}^{2+}$ , které jsou po chelataci peptidickou vazbou redukovány na  $\text{Cu}^{1+}$ .  $\text{Cu}^{1+}$  jsou následně chelatovány 2 molekulami BCA za vzniku fialového produktu, který absorbuje při 562nm.



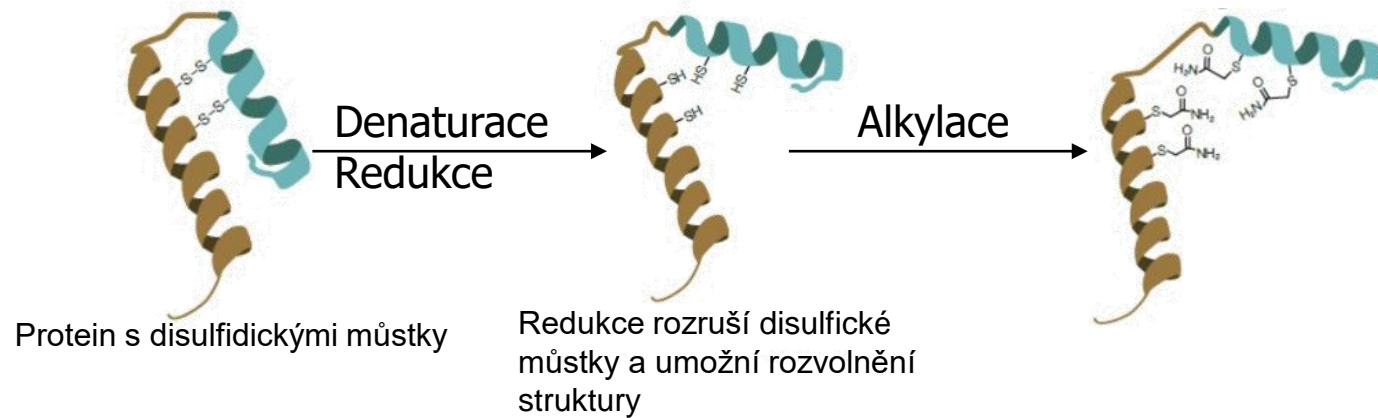
# WF vs. MicroBCA

- Obě metody vysoce citlivé se srovnatelnou reprodukovatelností pro stanovení proteinu v lyzátu
- WF lepší reprodukovatelnost při stanovení peptidů, zejména v nižších koncentracích



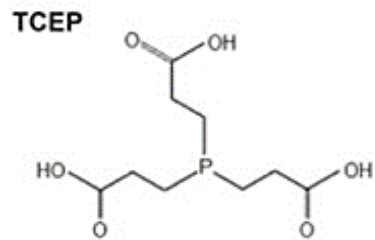
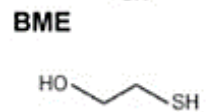
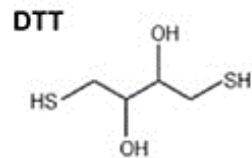
Wisniewski et al., 2015, 87(8):4110-6

# Redukce a alkylace proteinů

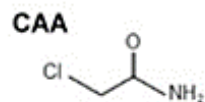
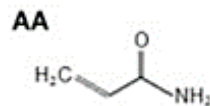
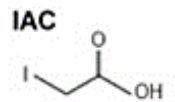
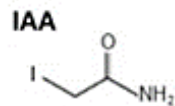


- Disulfidické můstky v proteinu jsou ireverzibilně rozrušeny.
- Tato chemická modifikace zlepšuje identifikaci proteinů s vysokým obsahem disulfidických můstků, ale také vyšší výtěžek peptidů a vyšší sekvenční pokrytí.
- Nekompletní redukce / alkylace může ovlivnit kvalitativní i kvantitativní výsledky.
- Nechtěná alkylace "over-alkylation" = alkylace nethiolových skupin  
N-terminální ak > k. asparagová > k. glutamová > histidin > asparagin > lysin > tyrosin

## Reduction



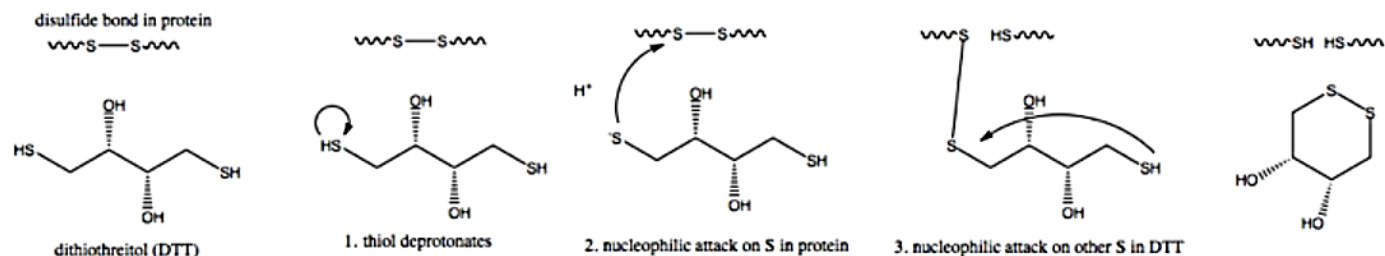
## Alkylation



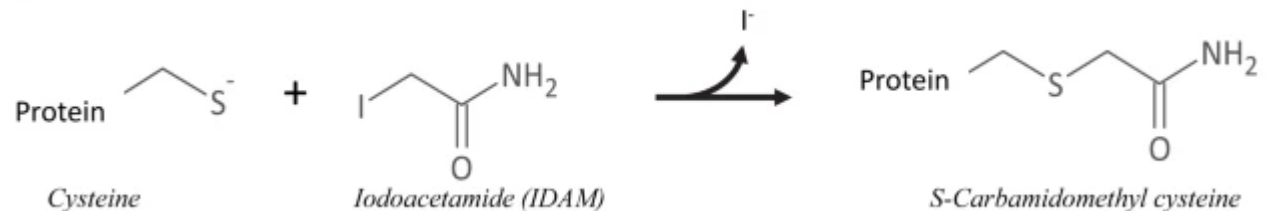
DTT – Dithiothreitol  
TCEP – tris-(2-carboxyethyl)-phosphine  
BME – β-mercaptoethanol

IAA – iodoacetamide  
IAC – iodoacetic acid  
AA – acrylamide  
CAA – chloroacetamide

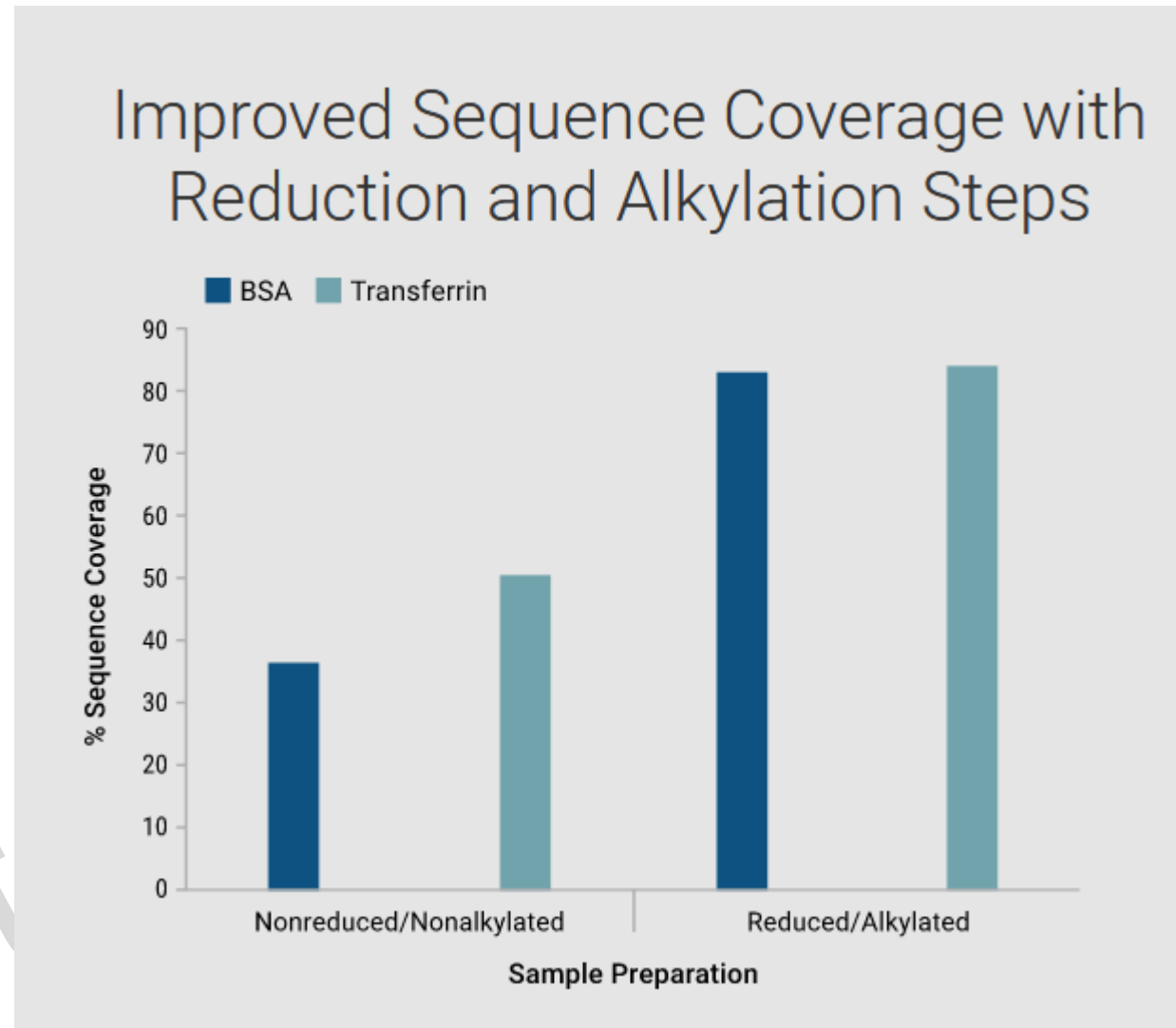
R



A



# Redukce a alkylace proteinů



*Promega datasheet*

# Enzymatické štěpení proteinů

**TPCK Trypsin:** štěpí z karboxy-konce K a R; blokováná autolýza

**SOLu-Trypsin:** dodáván v roztoku, stabilní 1 měsíc při 4°C

**SOLu-Trypsin Dimethylated:** dodáván v roztoku, stabilní 1 měsíc při 4°C; blokováná autolýza

**Rapid Digestion Trypsin:** štěpení 1 h při 70°C

**Platinum Trypsin:** bez nespecifické proteolytické aktivity; rezistentní vůči autolýze

**LysC:** štěpí z karboxy-konce K

**Glu-C (V-8 Protease):** štěpí z karboxy-konce E (v uhličitanovém či acetátovém pufru)  
štěpení může probíhat za E i D (ve fosfátovém pufru)

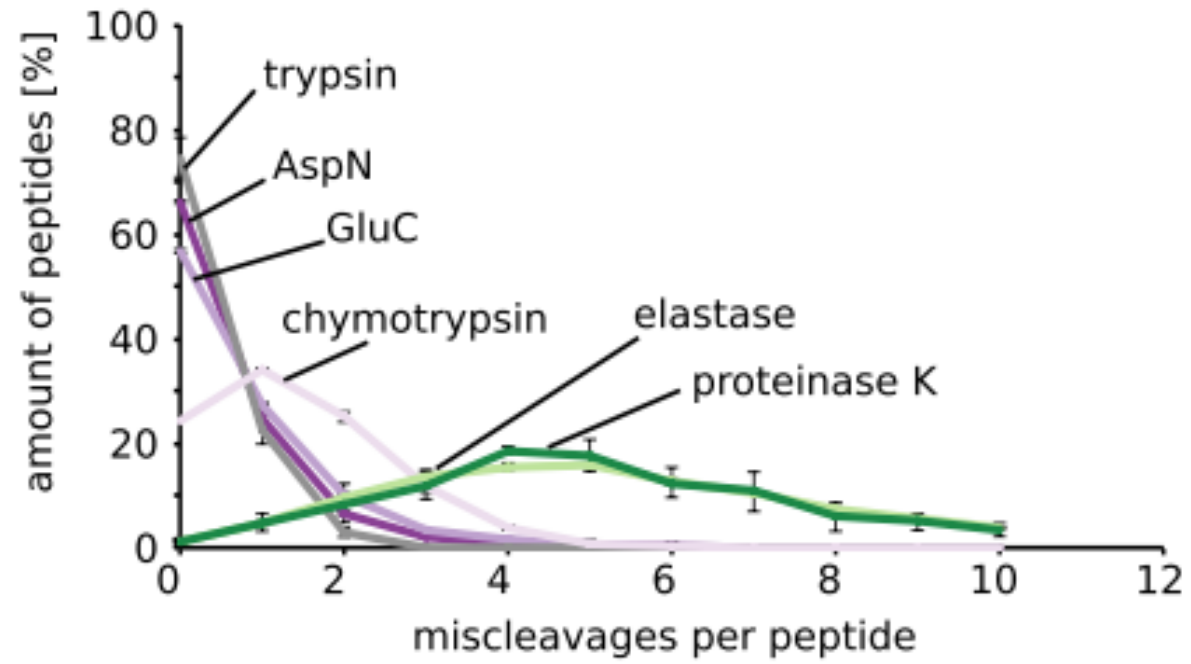
**Asp-N:** štěpí z N-konce D

**Chymotrypsin:** štěpí z karboxy-konce aromatických kyselin - Y, F, W a L.

**Thermolysin:** štěpí z N-konce L, F, V, I, A, M při 65–85°C

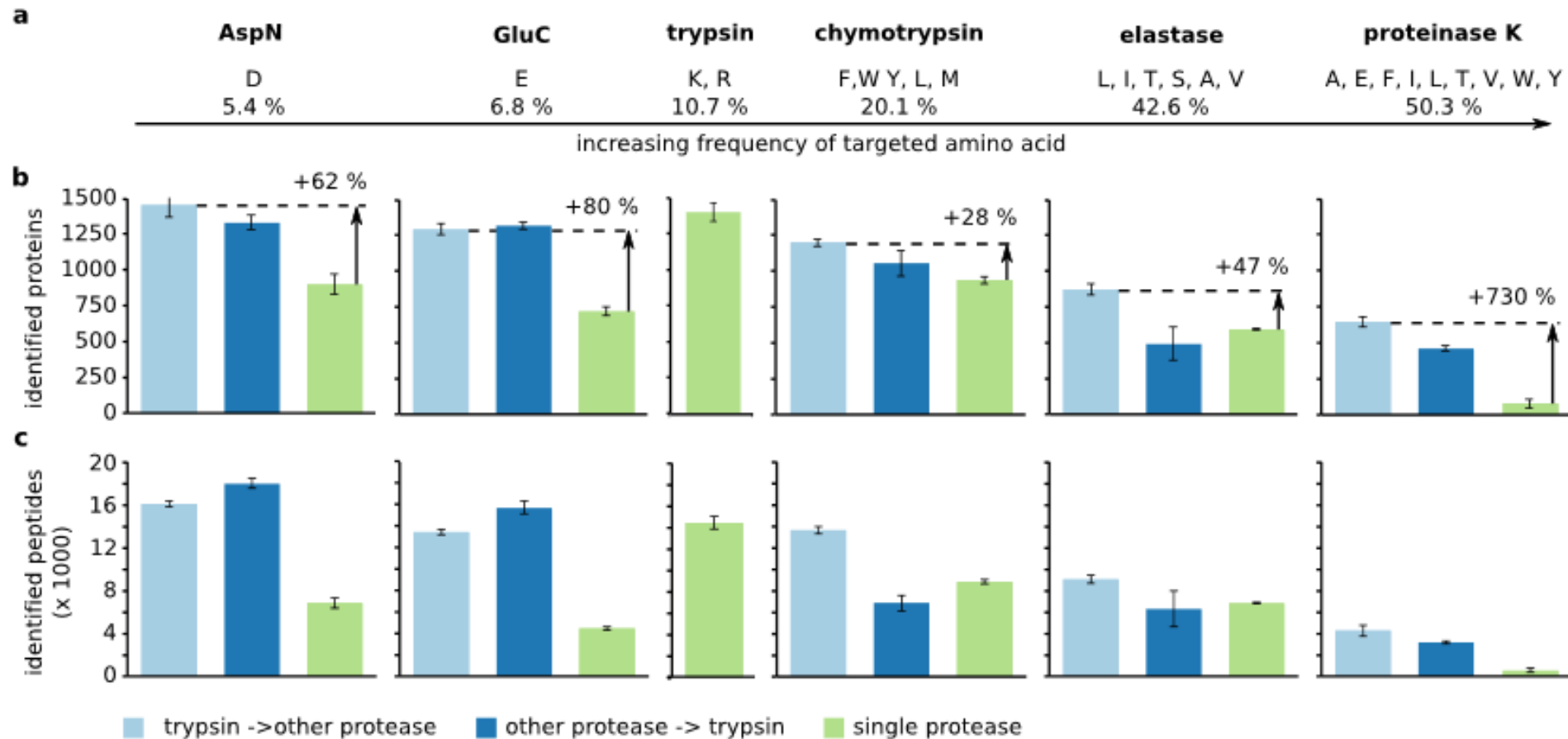
**ProAlanase:** štěpí z karboxy-konce P a A

# Enzymatické štěpení proteinů – alternativní proteázy



Anal. Chem. 2020, 92, 9523–9527

# Sekvenční štěpení



- trypsin – v proteomice proteáza první volby
- specifické studie mohou využít sekvenčního štěpení alternativní proteázy s trypsinem
- specifické studie mohou využít alternativní proteázy

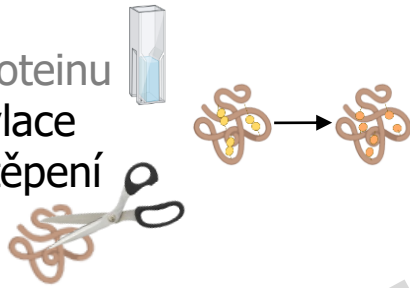
# Proteomika zdola– Postup pro jednoduché proteinové vzorky



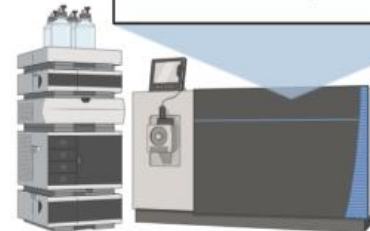
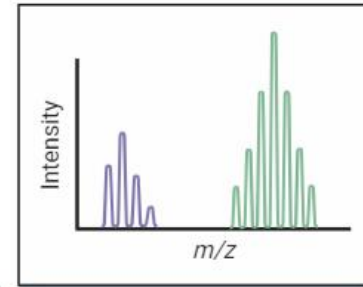
Purifikovaný protein  
Frakce z HPLC  
Subcelulární frakce

Vodný roztok  
MS-kompatibilní roztok

Kvantifikace proteinu  
Redukce a alkylace  
Enzymatické štěpení



Kvantifikace peptidu



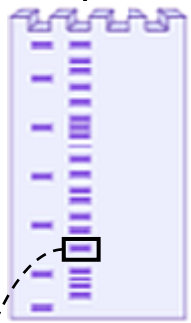


# Proteomika zdola – Postup pro štěpení v gelu



Buňky  
Tkáně  
Biologické tekutiny

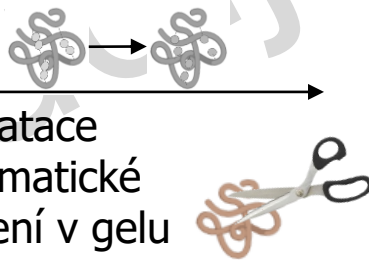
Solubilizační pufr obsahující  
SDS/DTT



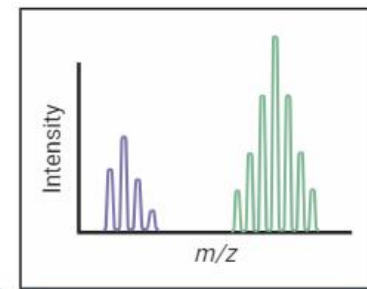
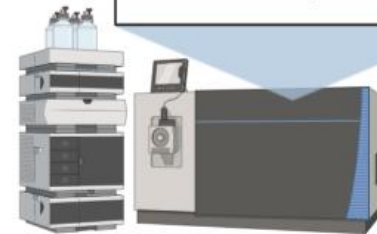
Promytí gelu  
Dehydratace



Redukce a alkylace  
Hydratace  
Enzymatické  
štěpení v gelu



Extrakce  
peptidů



- 1-D nebo 2-D gel – **MS-kompatibilní** vizualizace
- Vstup enzymu do gelu je usnadněn **dehydratací** acetonitrilem a následnou rehydratací pufrům s proteázou (**difúze**).
- Menší kousky gelu – vyšší účinnost štěpení v gelu
- Relativně vysoká koncentrace enzymu
- **Kyselá extrakce peptidů** (50% acetonitril/2.5% k. mravenčí) v kombinaci se **sonikací**.
- Výhoda: kontaminanty (např. detergenty, soli) odstraněny již během elektroforézy
- Nevýhoda: omezená účinnost vzhledem k nízké přístupnosti proteázy do gelu a málo efektivní extrakce naštěpených peptidů z gelové matrice.

# Proteomika zdola – Postup pro komplexní vzorky



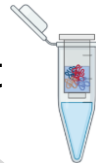
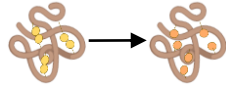
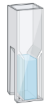
Buňky  
Tkáně  
Biologické tekutiny

Solubilizační roztok obsahující  
detergenty, chaotropní činidla, soli

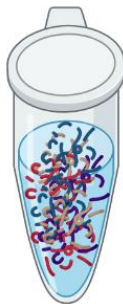
Kvantifikace proteinu

Redukce a alkylace

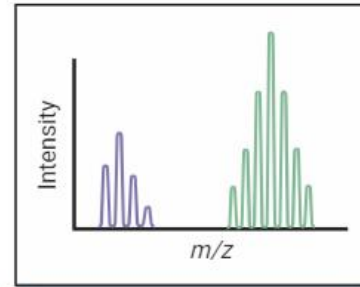
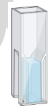
**Přečištění proteinu** (odstranění kontaminantů  
nekompatibilních s MS)



Enzymatické  
štěpení



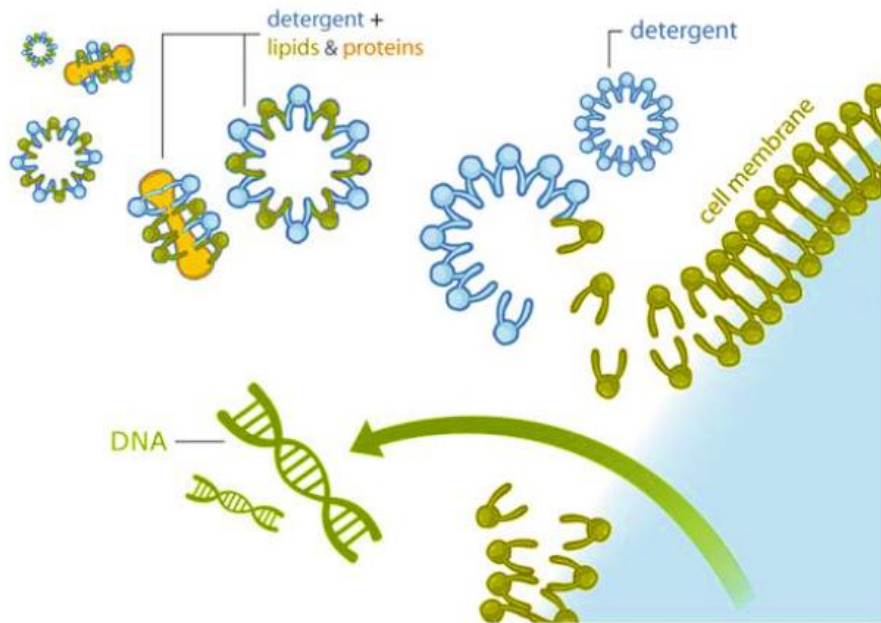
Kvantifikace  
peptidu



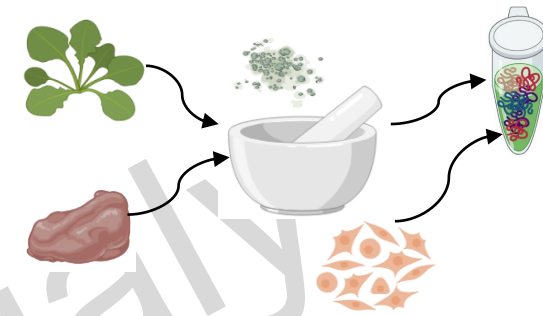
# Solubilizace vysoce komplexních vzorků a přečištění

## Homogenizace v SDT pufru

4% SDS, 0.1M DTT, 0.1M Tris-HCl pH 7.6



## Homogenizace / Lýze



- Proteinový prášek / Buňky přeneseny do zkumavky s horkým **SDT** pufrům.
- Homogenizace podpořena v Bioruptoru, **fragmentace DNA**.
- Kompletní solubilizace proteinů zajištěna inkubací při **95°C, 2h**.
- Přečištění a enzymatické štěpení:  
Filter-Aided Sample Preparation (**FASP**)  
Single-Pot Solid-Phase-enhanced Sample Preparation (**SP3**)  
Suspension Trapping (**S-Trap**)
- Dodatečné přečištění:  
Ethylacetate extraction (**EE**)

## Kritická micelární koncentrace (CMC)

$c < \text{CMC}$  – detergenty se vyskytují jako monomery

$c > \text{CMC}$  – molekuly detergentu jsou organizovány do micel, které zajišťují solubilizaci.

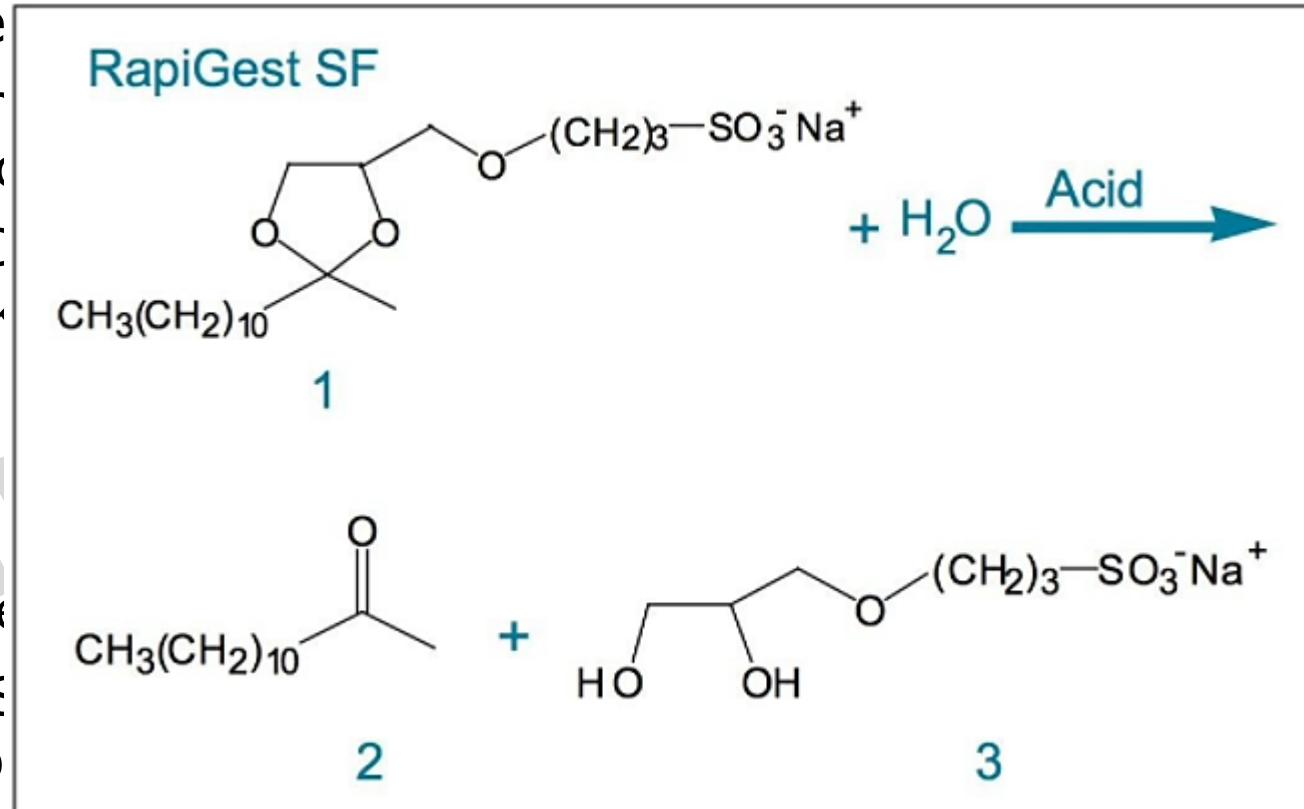
Vzhledem k velikosti, micely SDS a směsné micely s SDS nemůžou být separovány od solubilizovaných proteinů ultrafiltrací. V metodě FASP zajišťuje koncentrovaný roztok močoviny disociaci micel.

# Role SDS v proteomických přístupech

- Usnadnění solubilizace
- Přítomnost SDS napomáhá štěpení membránových proteinů
- Potlačení enzymové aktivity během
- Ovlivnění reverzně-fázové kapalinové separaci peptidů (posun retenčních
- Potlačení ionizace (MS spektra SDS koncentraci a tvorbě signálů aduk

Možná řešení:

- Odstranění SDS (precipitace prote
- MS-kompatibilní alternativy k SDS: Silent Surfactant, octyl  $\beta$ -D-glucos



ší  
ké

PPS

# Přečištění proteinu: Filter-Aided Sample Preparation

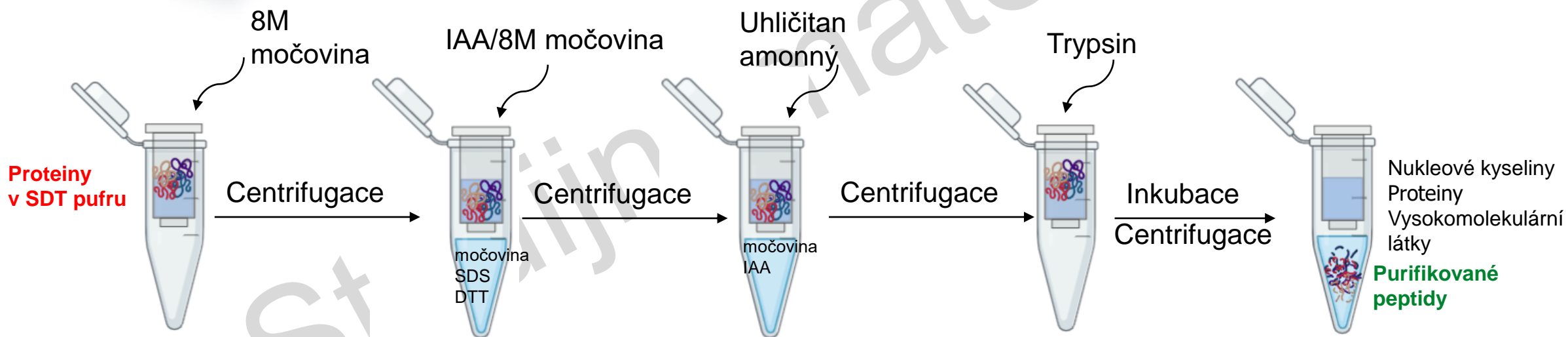
- Vynikající efekt pro vzorky o koncentraci proteinů 25 až 100 µg



**MWCO** „molecular weight cut-off“

Molekula o dané velikosti (Da) zadržena membránou s 90% účinností

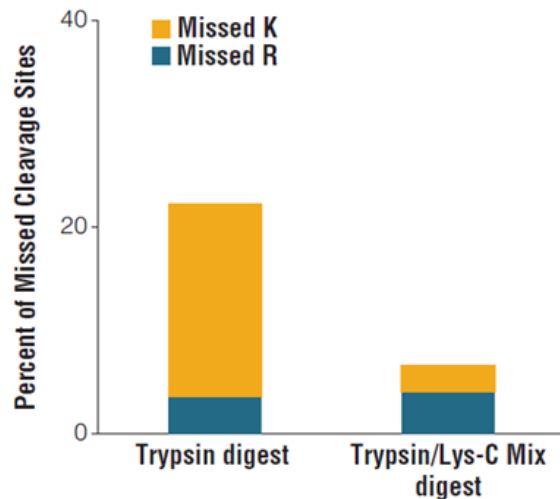
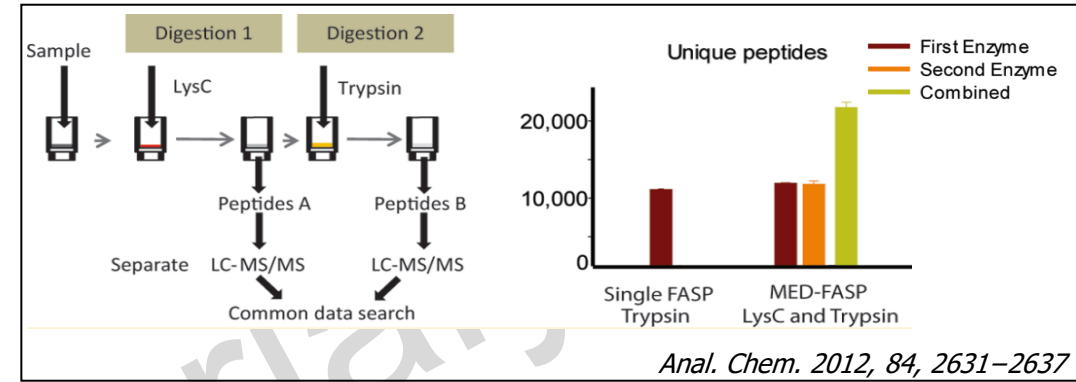
← ultrafiltr



*Nature Methods 6, 359 - 362 (2009)*

# Přečištění proteinu: varianty FASP

- multienzyme digestion (MED) FASP (*Anal. Chem.* 2012, 84, 2631–2637)
  - sekvenční štěpení proteinu více enzymy
  - vyšší počet proteinových identifikací a vyšší pokrytí sekvence
  - vyšší počet identifikovaných fosforylovaných míst



## Trypsin



Digested sample	Missed K	Missed R
Yeast extract	18.6%	3.6%
Mouse extract	6.6%	1.1%

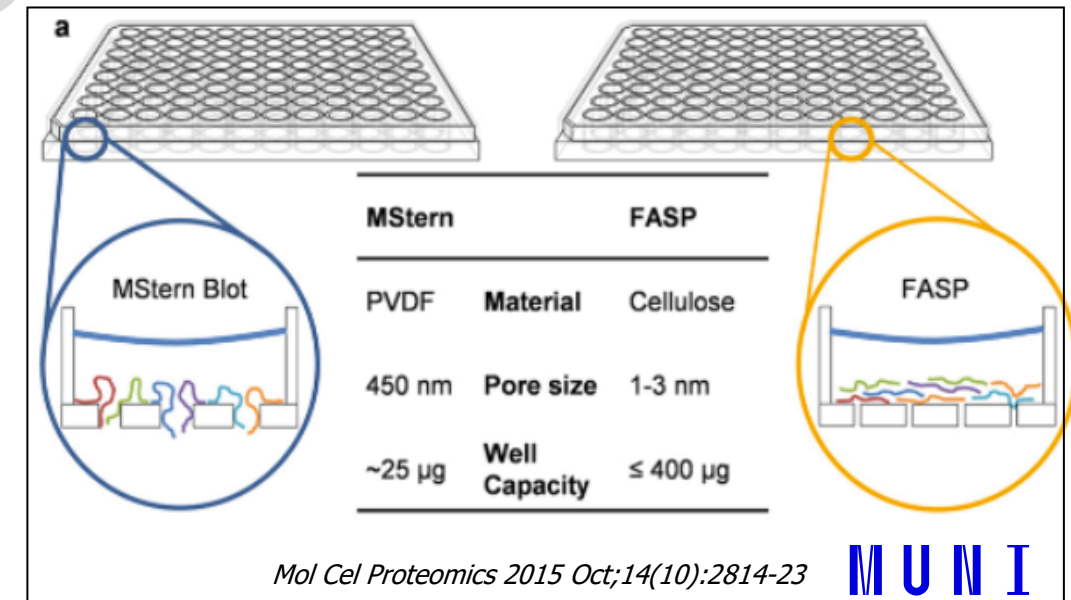
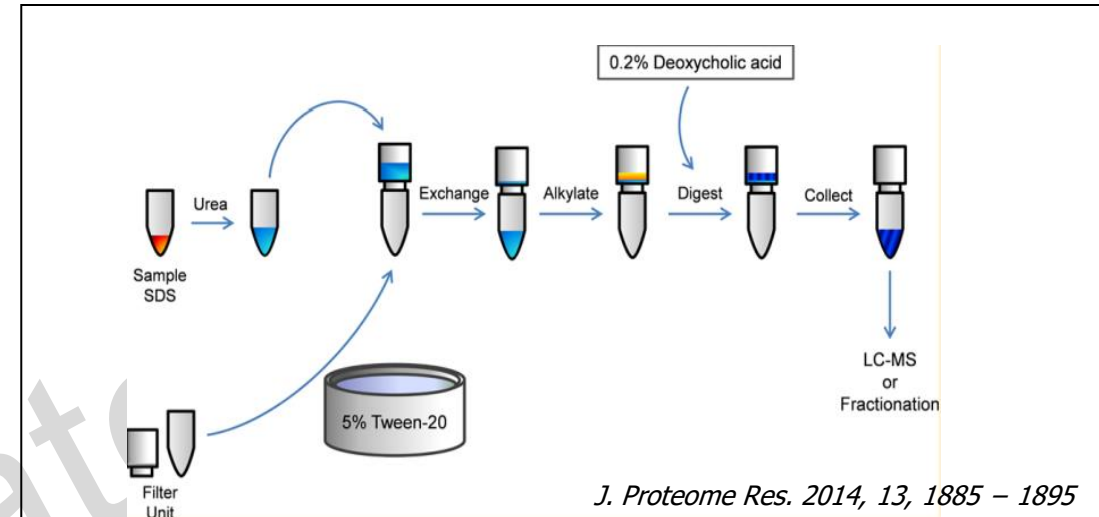
## Trypsin/LysC



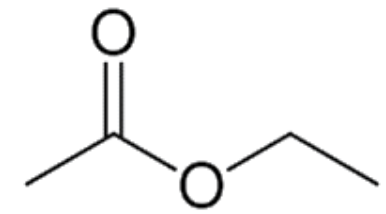
Digested sample	Missed K	Missed R
Yeast extract	2.6%	4%
Mouse extract	2.9%	1.5%

# Přečištění proteinu: varianty FASP

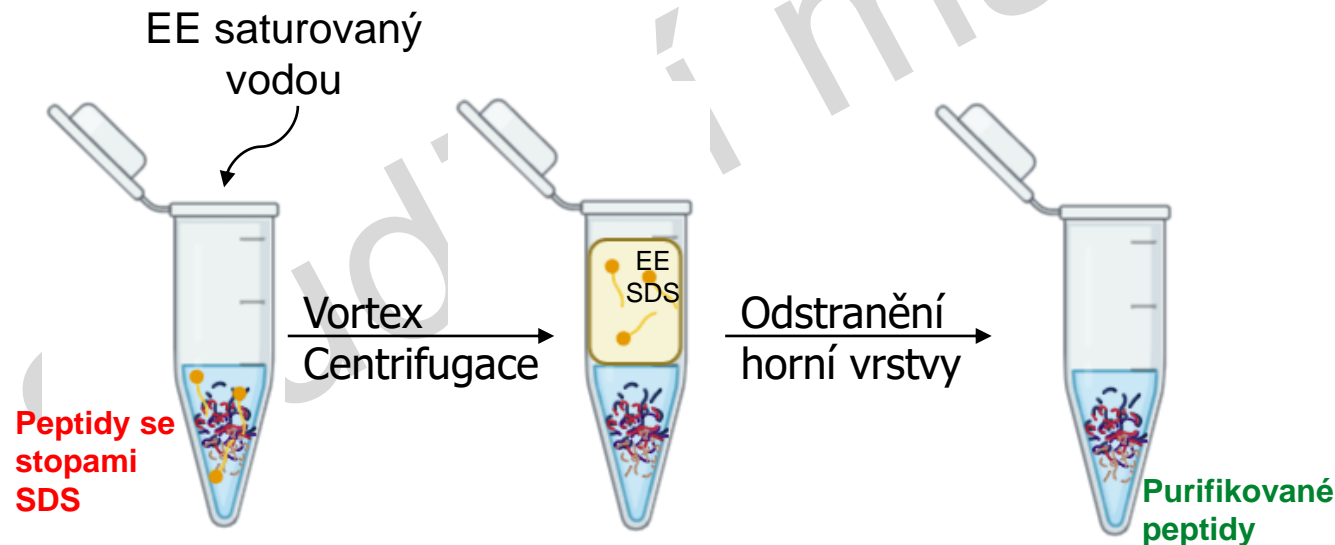
- **enhanced FASP (eFASP)** (*J. Proteome Res. 2014, 13, 1885 – 1895*)
  - pasivace povrchu membrány 5% TWEEN-20 a využití surfaktantu (0.2% k. deoxycholová) během štěpení za účelem zvýšení výtěžku peptidů.
- **96-jamkový formát pro zpracování „high-throughput“**
  - destičky s 10 MWCO membránou; nevýhoda: nízký přenos kapaliny během centrifugace (*Proteomics 2013, 13, 2980–2983*)
  - MStern-blot (MStern) – destičky s polyvinyliden fluoridovou membránou (PVDF) s velkými póry, která efektivně adsorbuje proteiny; rychlý přenos kapaliny přes membránu pomocí vakua. (*Mol Cell Proteomics 2015 Oct;14(10):2814-23*)
  - polyethersulfonová (PES) filtrační membrána umožňuje využití 10% isopropanolu (IPA) jako smáčecího činidla, což vede k 50% redukci času pro výměnu pufru. IPA redukuje povrchové napětí mezi vodnou vrstvou a membránou. Snížená CMC detergentů kvůli přítomnému alkoholu je kompenzována přidávkou močoviny. (*PLoS ONE 2017, 12(7): e0175967*)



# Přečištění peptidů: Ethylacetátová extrakce (EE)



- Ethylacetát
  - vysoce volatilní
  - málo rozpustný ve vodě
  - účinné rozpouštědlo pro většinu detergentů (octylglucosid, SDS, Triton X-100, NP-40....)
- EE extrakce
  - dvoucestný proces: přechod hydrofobních molekul do organické fáze z vodné fáze, a přechod hydrofilních molekul z organické fáze do vodné fáze
  - extrakční rozpouštědlo musí být vysoce čisté
  - skleněné zkumavky a pipety omyté v kyselině pro uchování EE
  - polypropylenové či polyethylenové zkumavky a pipety mohou být použity pouze krátkodobě pro extrakci
  - pětinasobný objem EE oproti objemu peptidového vzorku
  - selektivní ztráta peptidů (např. větší peptidy)



## hustota (g/mL)

EE	0.902
voda	0.998

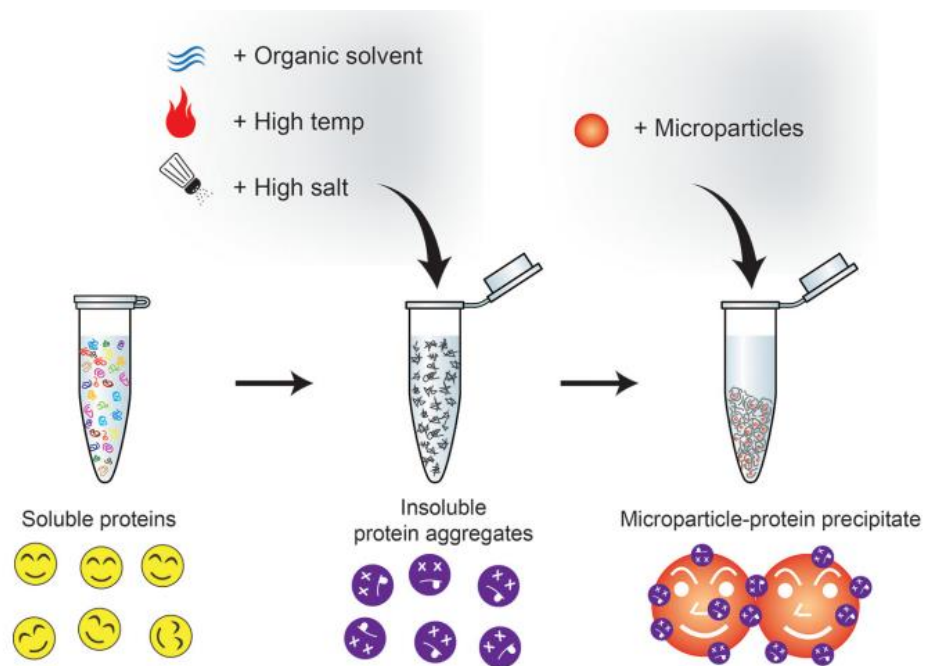


# Alternativní metody pro štěpení / přečištění

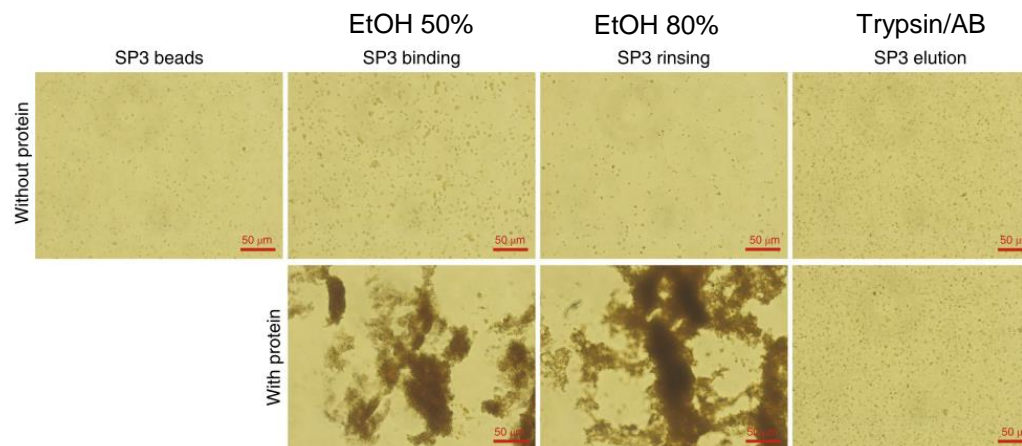
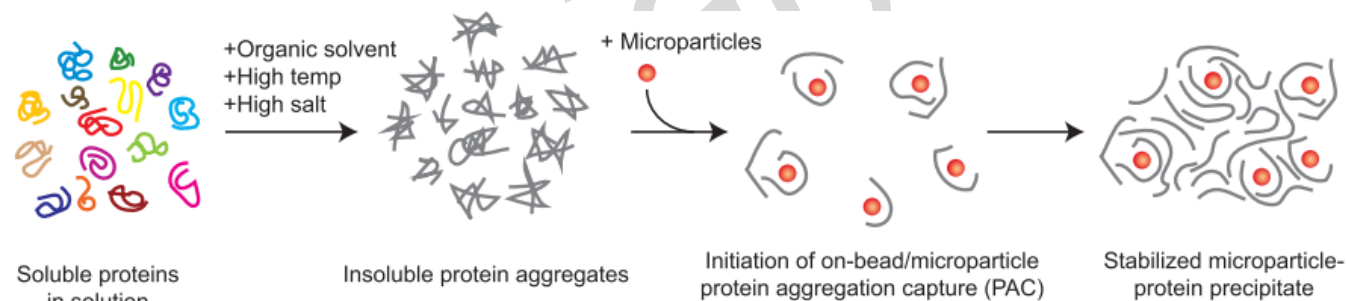
## „Protein Aggregation Capture (PAC)“ na mikročasticích s různým chemickým povrchem

– mechanismus využívající nescifickou immobilizaci precipitovaných a agregovaných proteinů na částicích s různým povrchem

(*Mol Cell Proteomics* 18: 1027–1035, 2019)



(*Mol Cell Proteomics* 18: 1027–1035, 2019)



← Shluknutí kuliček →

*Nature protocols* JANUARY 2019 | 68 – 85

MUNI  
SCI

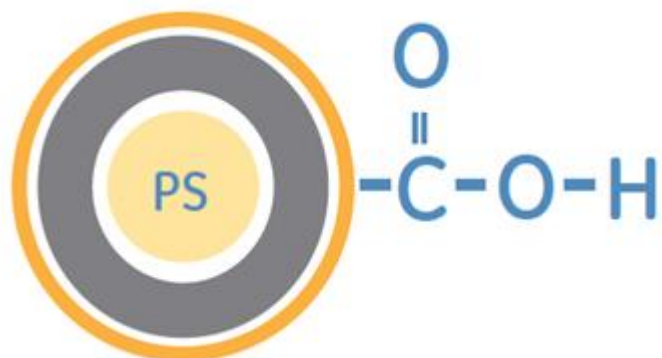
# Alternativní metody pro štěpení / přečištění

## Single-Pot Solid-Phase-enhanced Sample-Preparation (SP3)

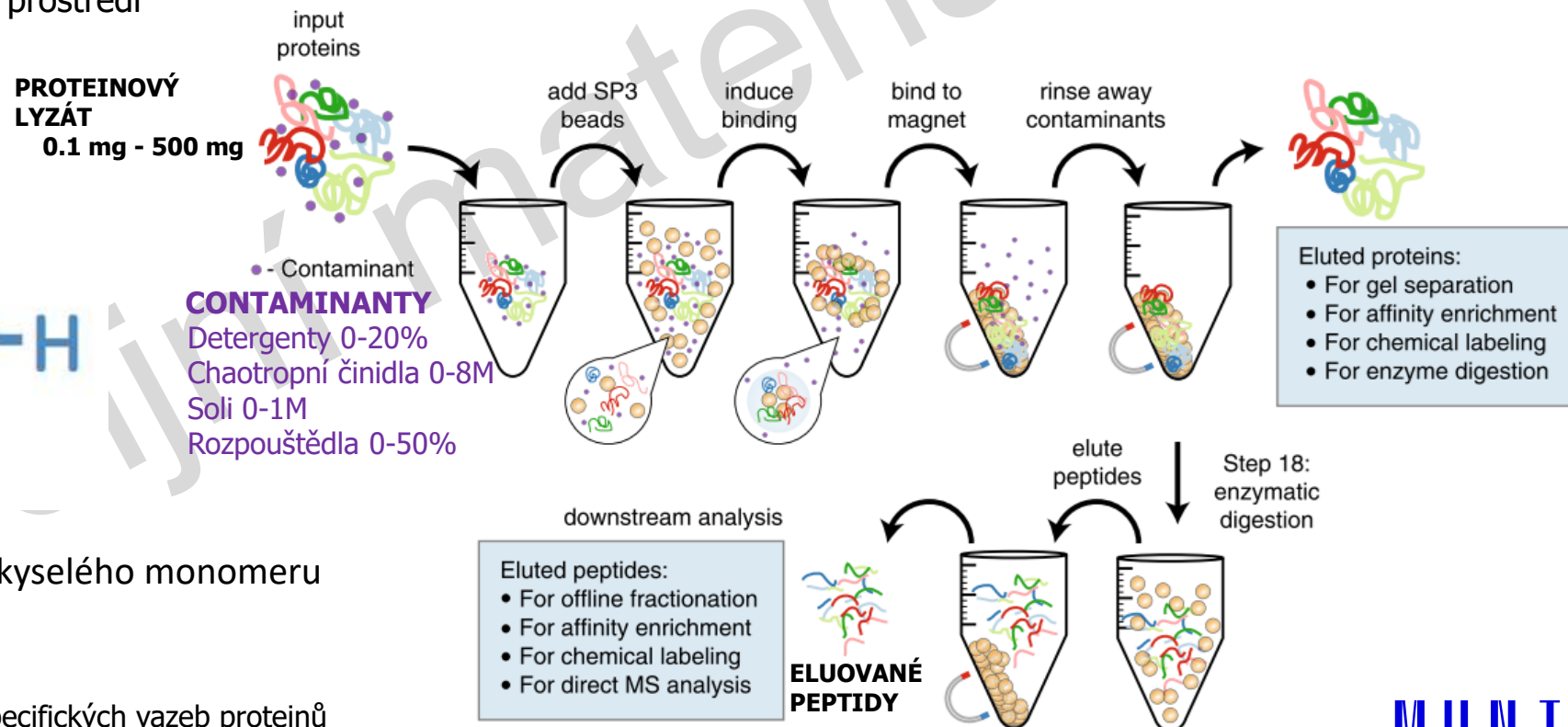
- přístup založený na využití paramagnetických kuliček
- využívá mechanismus PAC pro výměnu nebo odstranění kontaminant (např. detergenty, chaotropní činidla, soli, pufrů, kyseliny, rozpouštědla)
- neselektivní vazba proteinů a promývací kroky, které umožňují využití solvatační vrstvy tvořené rozhraním ethanol-voda na povrchu paramagnetických kuliček
- eluce purifikovaných proteinů ve vodném prostředí



### SeraMag beads

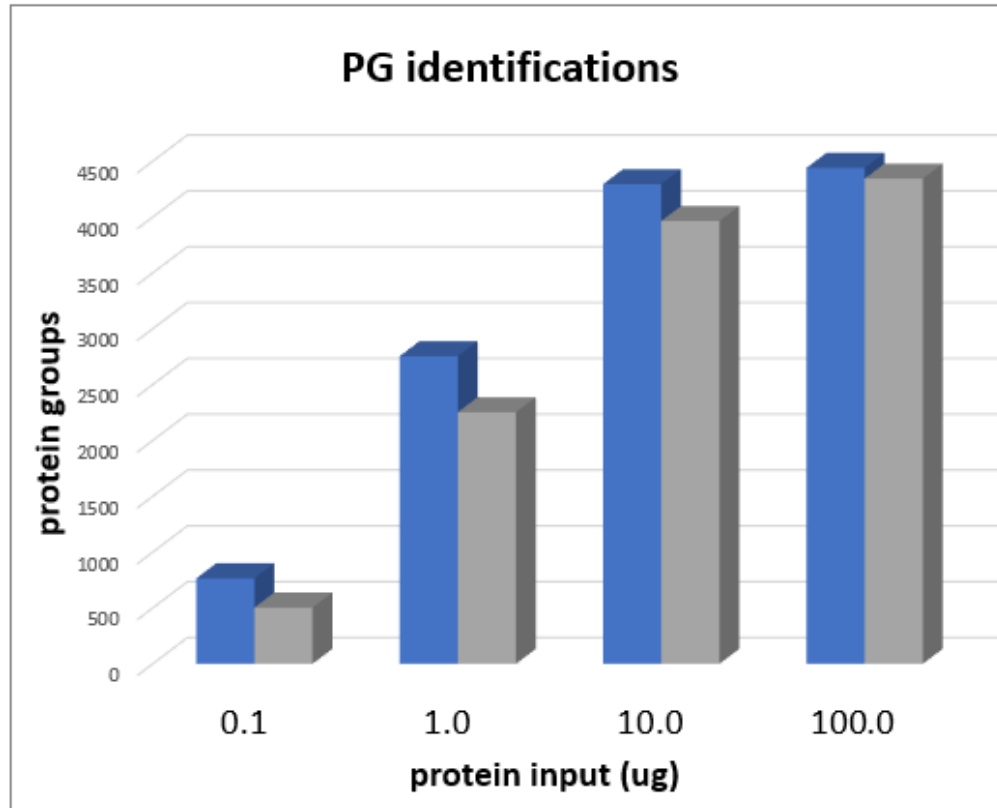


- polystyrenové jádro  
polymerace volných radikálů styrenu a kyselého monomeru
- Vrstva magnetitu
- Karboxalovaný povrch polymeru  
povrch je modifikován za účelem potlačení neselektivních vazeb proteinů

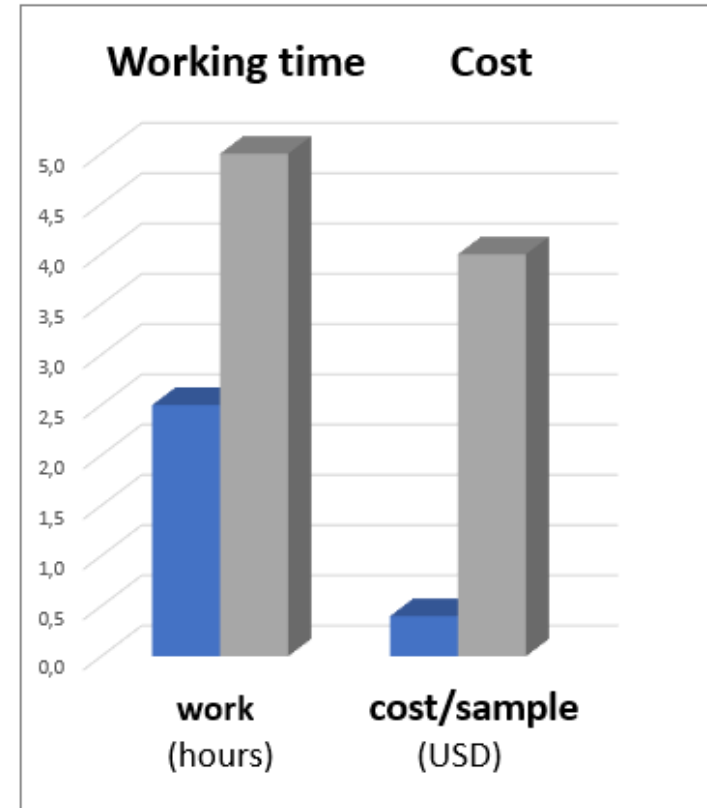


(Nature protocols JANUARY 2019 | 68 – 85)

# SP3 vs. FASP



■ SP3 ■ FASP



■ SP3 ■ FASP

*Front plant Sci 2021 Mar 10;12:635550*

# Přečištění peptidů: SP2

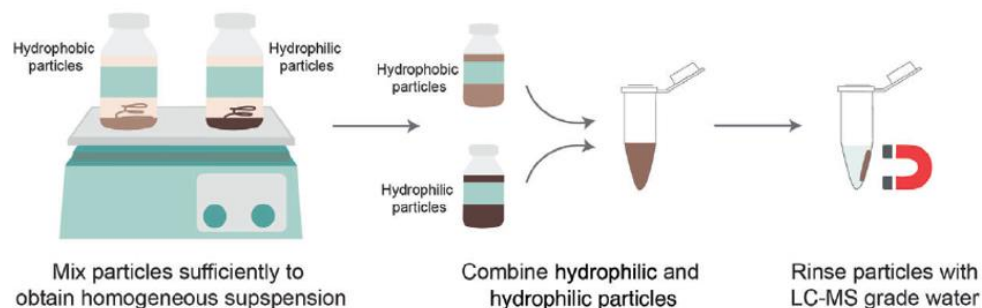
RP-LC C18

- účinný pro odstranění solí a zakoncentrování peptidů
- dostupný v různorodých provedeních (např. Stage-Tips, Sep-Pak Cartridges, Micro SpinColumns)
- nicméně, C18 neodstraní polymerní sloučeniny jako polyethylen glycol (PEG) ani běžné detergenty, (např. NP-40, SDS, Triton X), spíše dojde k jejich zakoncentrování.

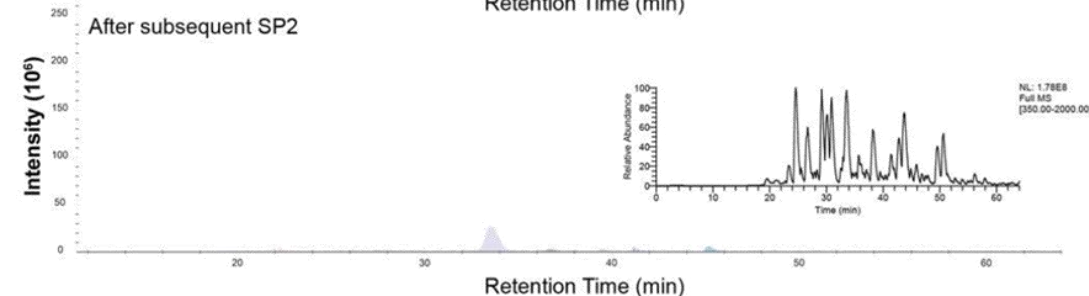
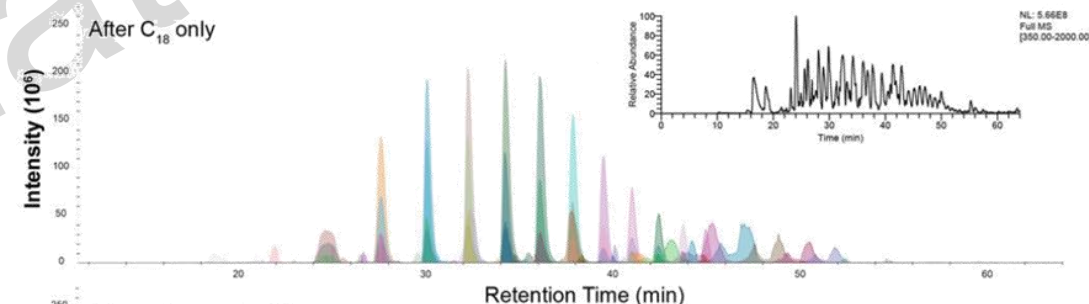
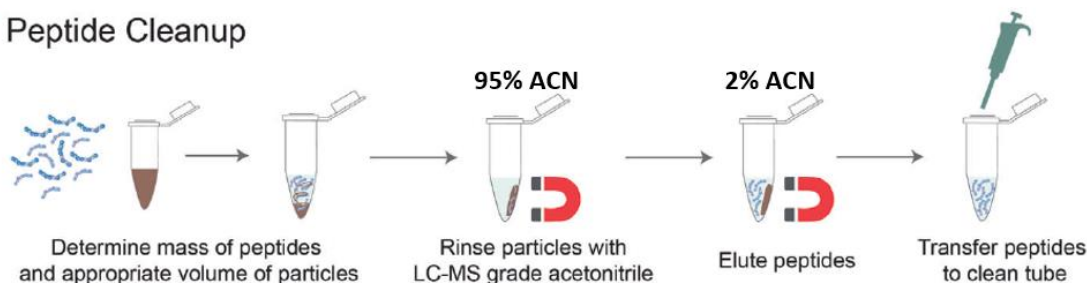
SP2

- nižší vazebná kapacita pro peptidy než pro proteiny:  
50 ng jednoduché peptidové směsi/ $\mu\text{g}$  částic, 200 ng komplexní peptidové směsi/ $\mu\text{g}$  částic  
X 100  $\mu\text{g}$  proteinové směsi/ $\mu\text{g}$  částic
- vhodná metoda pro odstranění široké škály kontaminant; (nevhodná např. pro odstranění Tris)
- pro dlouhé, hydrofobní peptidy či peptidy s negativní nábojem je SP2 reprodukovatelnější než C18

## 1 Particle Preparation **Sera-Mag SpeedBeads Carboxylate-Modified Particles**



## 2 Peptide Cleanup



*J Proteome Res.* 2019 April 05; 18(4): 1644–1656.

## Magnetické stojánky



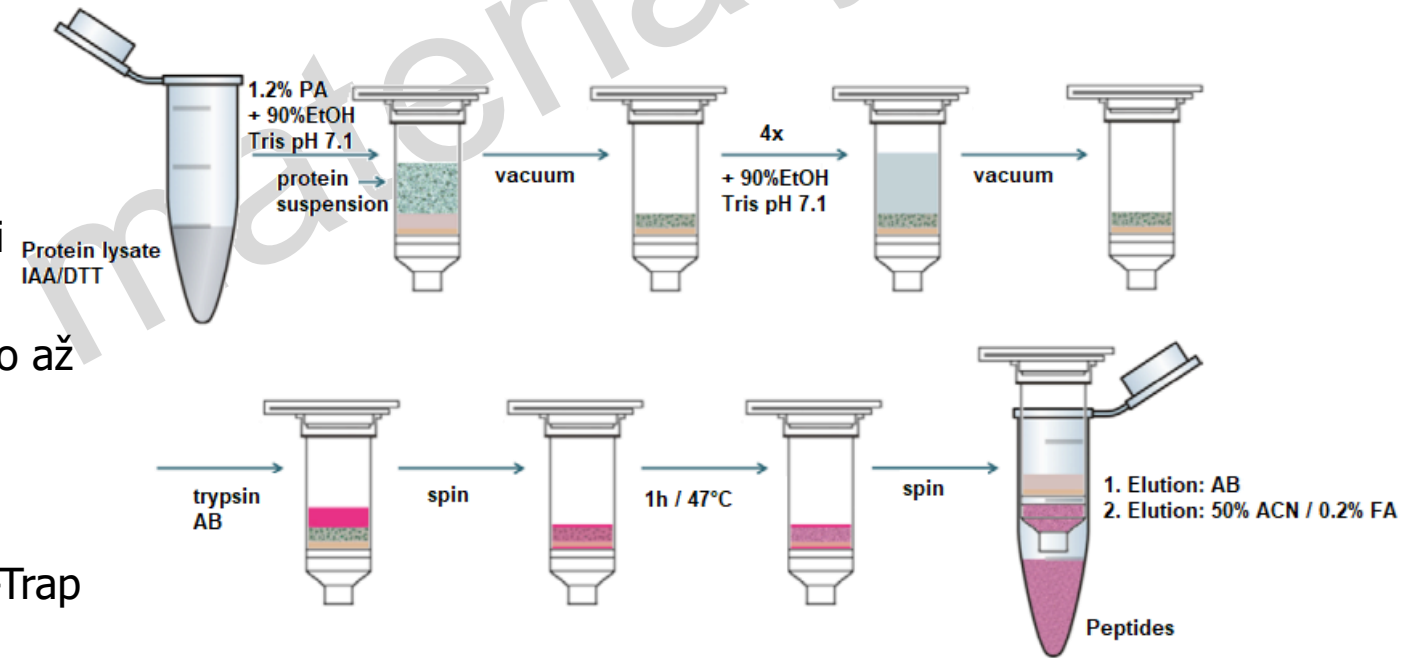
St

# Alternativní metody pro štěpení / přečištění

## Suspension trapping (STrap)

- momentální tvorba jemné suspenze proteinů solubilizovaných v SDS, která je zachycena skleněným filtrem
- agregace suspenze minimalizovaná přidávkem směsi protein–SDS do ethanolického roztoku v neutrálním pH
- monomery SDS jsou solubilní v ethanolickém roztoku a filtrovány společně s ostatními kontaminantami

- Lýze a solubilizace v 5% SDS
- Denaturace proteinu okyselením na pH < 1 a následně přidávkem vysoké koncentrace ethanolu
- Tyto tři stupně denaturace zajišťují kompletní inaktivaci enzymů jako jsou proteázy a fosfatázy
- redukce a alkylace může být provedena v 5% SDS nebo až na koloně po denaturaci a záchytu proteinové směsi



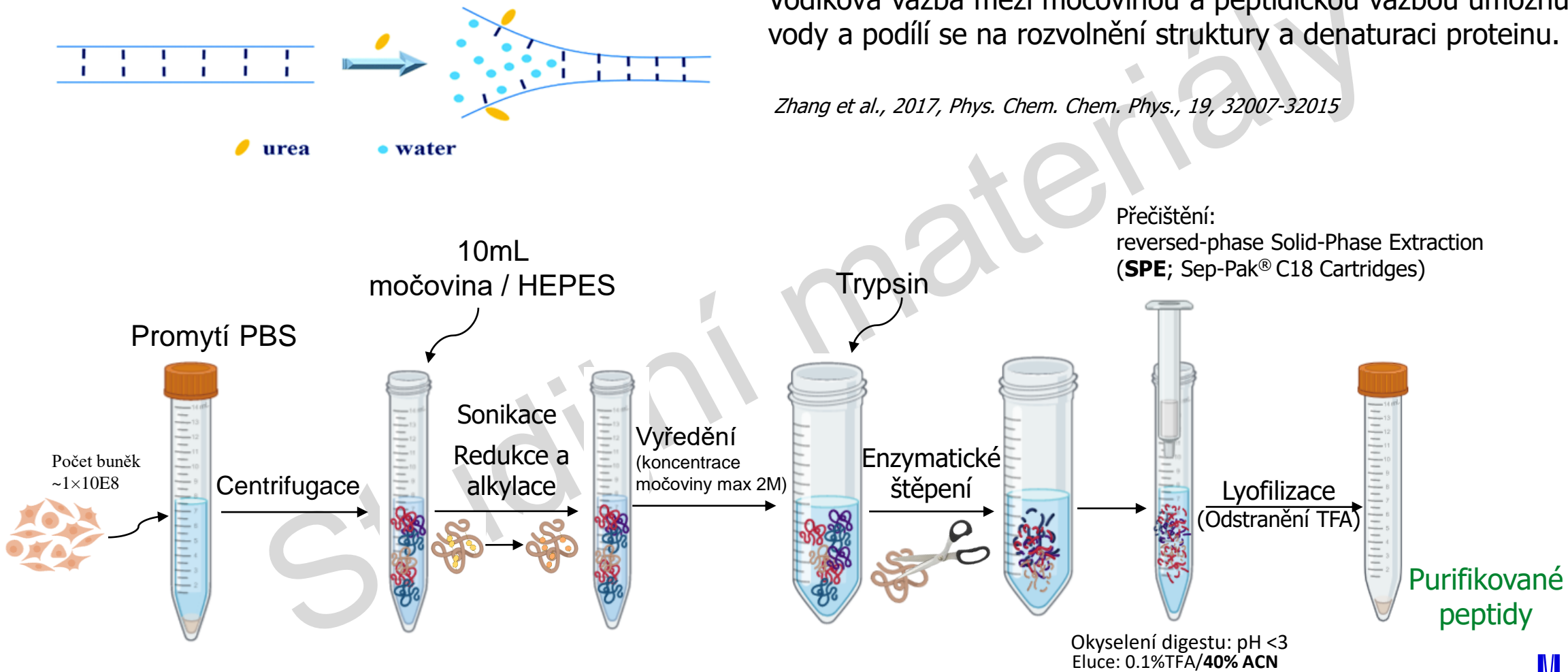
- denaturované, nenaštěpené proteiny jsou vázány na S-Trap pomocí centrifugace či vakua
- Mnohočetné slabé interakce zadržují nenaštěpené proteiny uvnitř pórů upravené siliky S-Trap
- Zachycené proteiny se vyznačují maximální povrchovou plochou, která umožňuje promytí od kontaminant během několika minut: detergenty, PEG, glycerol, soli, Laemmli pufr, etc.

# Solubilizace vysoce komplexních vzorků pro obohacení PTM

Homogenizace v pufru s močovinou  
9M močovina, 20mM HEPES pH 8.0

Vodíková vazba mezi močovinou a peptidickou vazbou umožňuje vstup vody a podílí se na rozvolnění struktury a denaturaci proteinu.

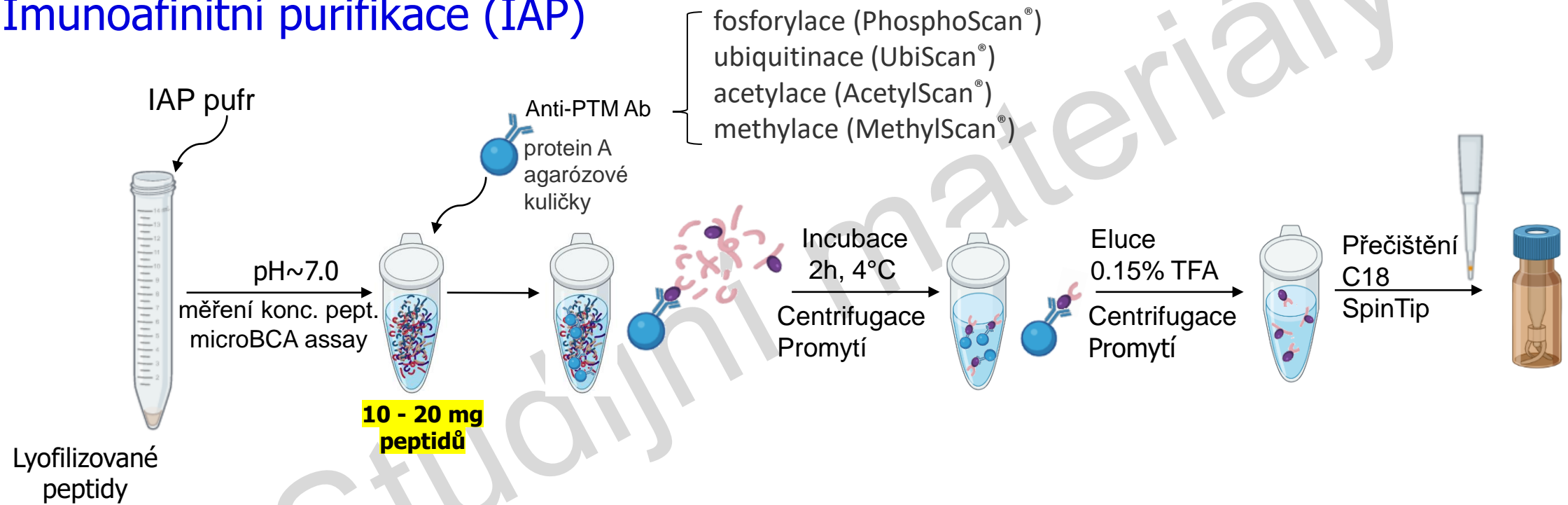
Zhang et al., 2017, Phys. Chem. Chem. Phys., 19, 32007-32015



# Obohacení PTM

PTMScan® Technology (Cell Signaling Technology) – obohacení posttranslačně modifikovaných peptidů imunoprecipitací s využitím specifické protilátky vázané na kuličky, s návazností na kvantitativní analýzu pomocí LC-MS/MS.

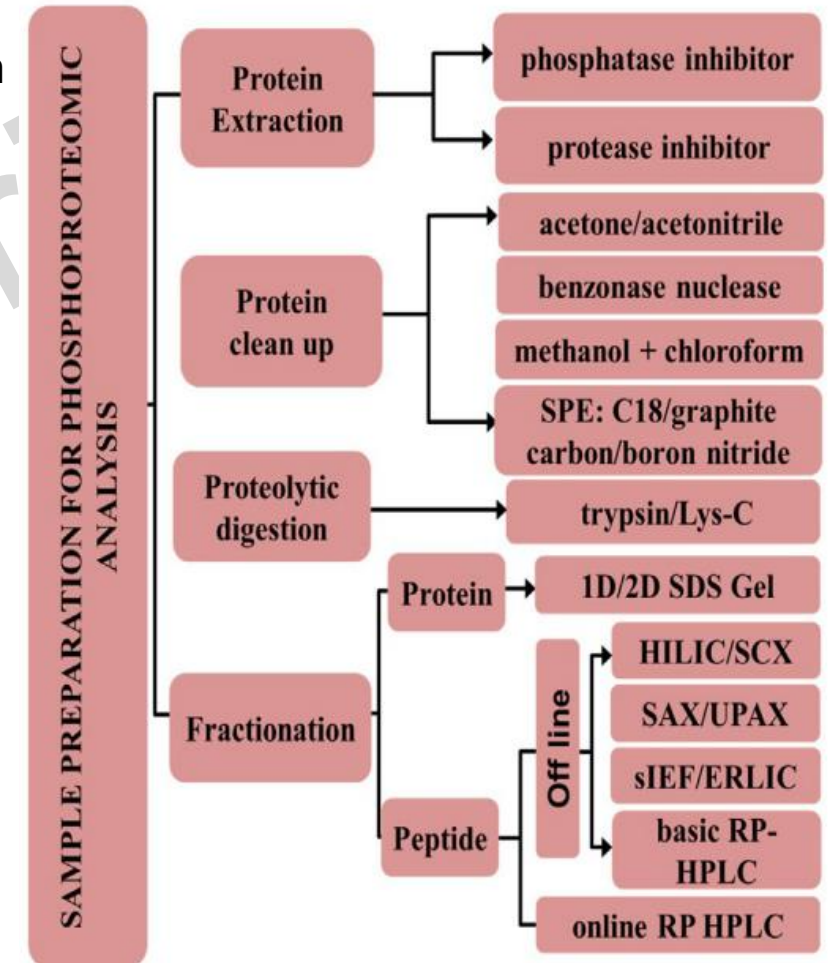
## Imunoafinitní purifikace (IAP)





# Fosfoproteomika

- převážně založena na proteomice zdola (bottom-up)
- fosforylace probíhá na jednom či více místech a může se vyskytovat společně s dalšími PTM, čímž jsou definovány tzv. proteoformy.
- fosfopeptidy jsou nízkoabundantní relativně vůči svým nefosforylovaným protějškům
- fosfopeptidy mají tendenci k nízké ionizační účinnosti vzhledem k
  - (i) fosfátové skupině, která snadno ztrácí proton a nese negativní náboj
  - (ii) pozadí pocházejícího z nadbytku přítomných nefosforylovaných peptidů
- techniky pro analýzu fosfo-serinových/threoninových míst (pSer/pThr) se významně zdokonalily, ale analýza tyrosinových (pTyr) míst je stále náročná kvůli minoritnímu zastoupení (řádově nižší výskyt oproti pSer/pThr)

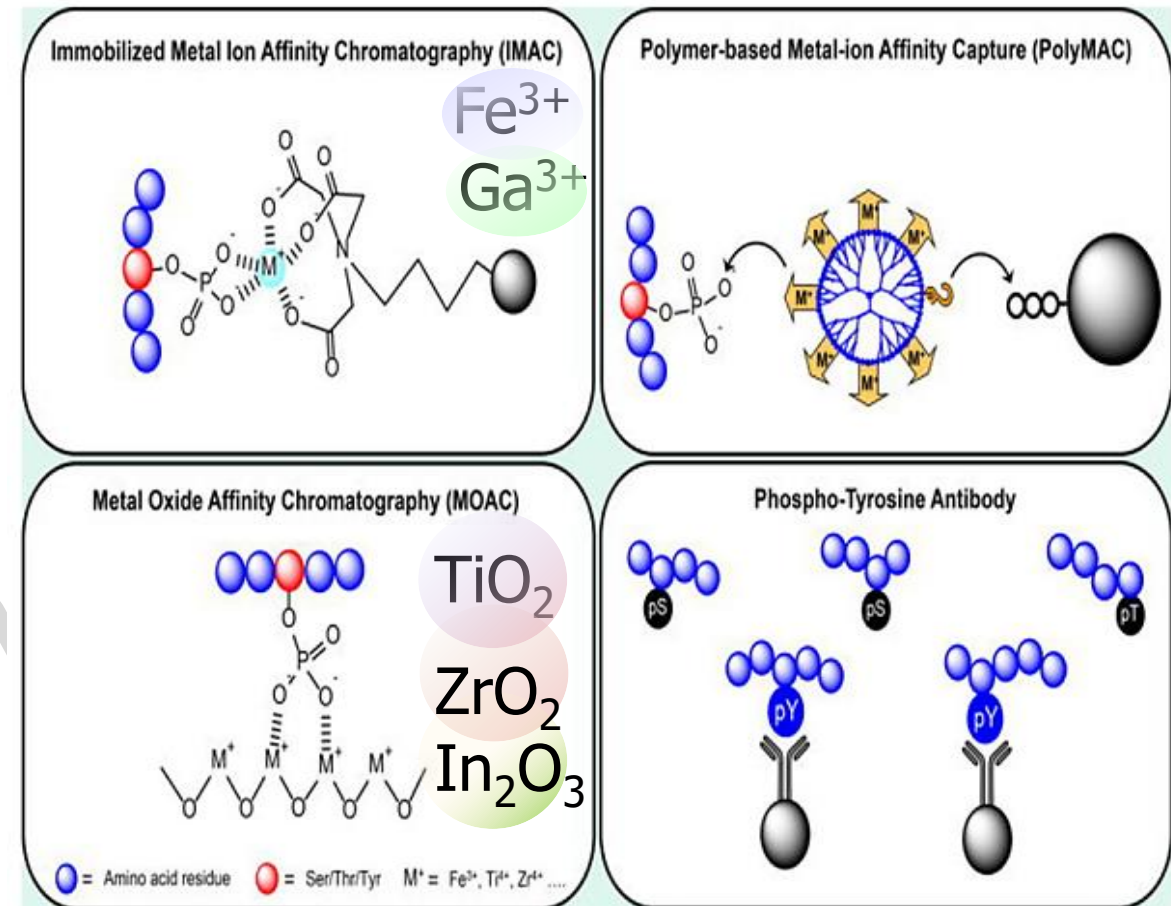


*Analytica Chimica Acta 1129 (2020) 158e180*

# Fosfoproteomika

## Afinitní obohacení fosfopeptidů

- selektivní vazba negativně nabitých fosfátových skupin peptidů na ion kovu či oxid kovu nebo s využitím Ab
- Eluce z IMAC či MOAC uvolněním negativně nabitého fosfátu alkalickým puřem
- IMAC vede k lepší detekci multi-p-peptidů, zatímco obohacení na  $\text{TiO}_2$  vede k vyššímu počtu identifikací mono-p-peptidů kvůli obtížnější disociaci (nekompletní eluci) multi-p-peptidů
- Obohacení pomocí  $\text{TiO}_2$ : vyšší selektivita a specifita, robustnost, amfoterní iontoměničový charakter, tolerance vůči mnoha reagentům (stabilní v širokém rozmezí pH)
- Různá konfigurace MOAC- $\text{TiO}_2$ : spin kolonky, analytické kolony, miniaturní kolony, nanočástice, ma, ...
- pTyr – minoritní frakce p-proteomu; pro selektivní obohacení využívány anti-Tyr Ab (nízká reprodukovatelnost, nízká citlivost, omezená dostupnost, omezená dostupnost velkého množství vstupního materiálu, vysoká cena)

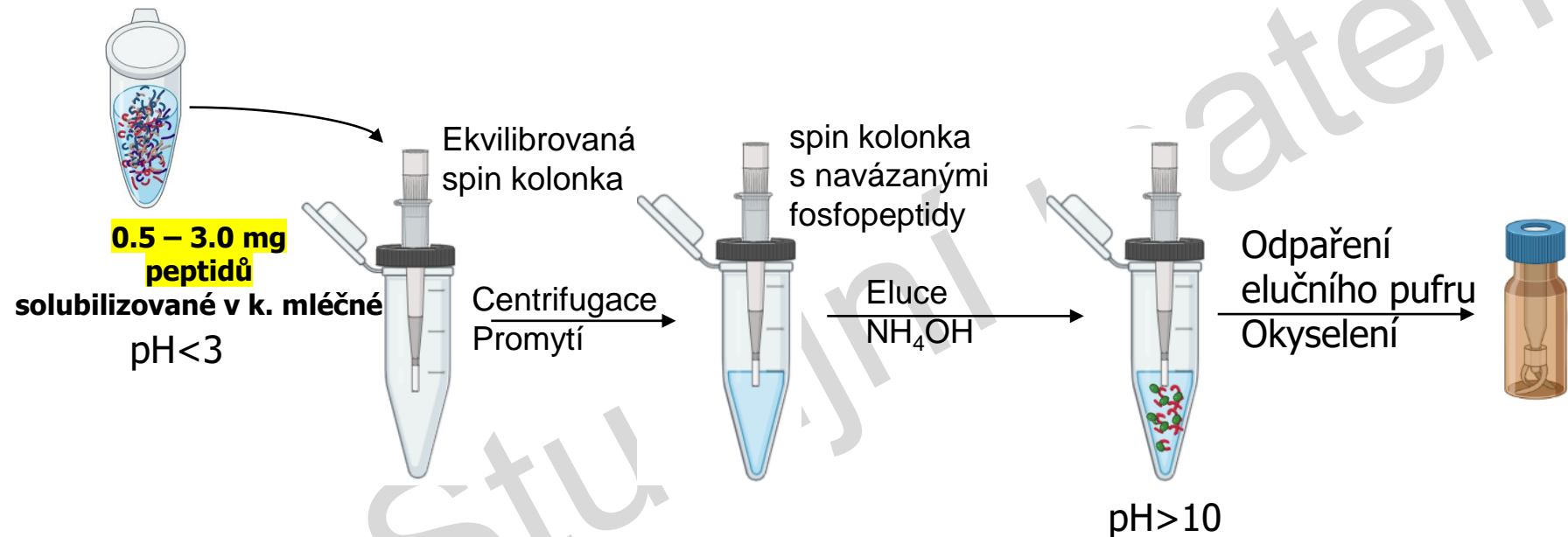


*Analytica Chimica Acta 1129 (2020) 158e180*

# Obohacení fosfopeptidů

## High-Select™ TiO<sub>2</sub> Phosphopeptide Enrichment Kit

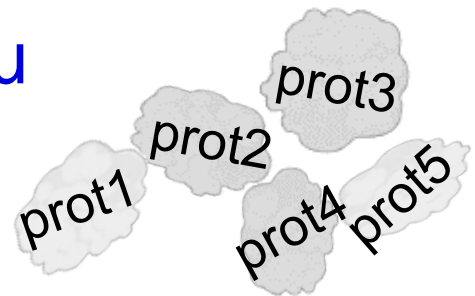
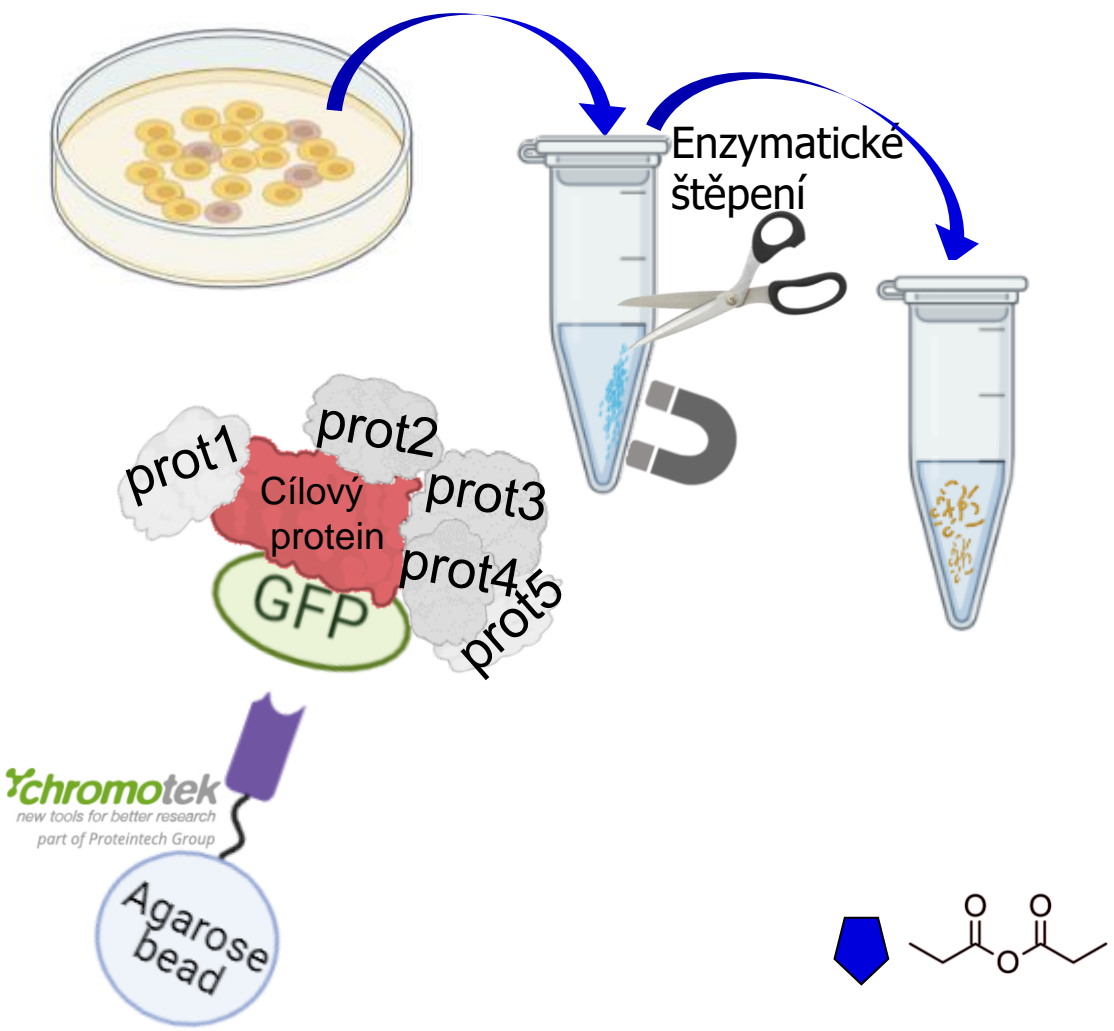
- sférická porózní forma TiO<sub>2</sub>, optimalizované pufrы, spin kolonky
- poskytuje efektivní obohacení a navýšení počtu identifikovaných fosfopeptidů s minimalizací nespecifických vazeb
- výtěžek fosfopeptidů je obvykle ~1-3% výchozího množství peptidů
- vstupní materiál: přečištěné lyofilizované peptidy (bez detergentů a solí)



# Characterizace obohacených (nízkoabundantních) proteinů

## Identifikace / Kvantifikace

- PTM na cílovém proteinu
- Interakčních partnerů



10	20	30	40	50
MGKKQNKKKV	EEVLEEEEEEE	YVVEKVLDRR	VVKGKVEYLL	KWKGFSDN
60	70	80	ac ac ph ph	100
TWEPEENLDC	PDLIAEFLQS	QKTAHETDKS	EGGKRKADSD	SEDKGEESKP
110	120	130	140	150
KKKKEESEKP	RGFARGLEPE	RIIGATDSSG	ELMFLMKWKN	SDEADLVPK
160	ph ph	170	ph ph	180
EANVKCPQVV	ISFYEERLTW	HSYPSEDDDK	KDDKN	

ac		ac					
MSGRGKGGK	LGKGGAKRHR	KVLRDNIQGI	TKPAIRRLAR	RGGVKRISGL			
IYEETRGLK	VFLENVIRDA	VTYTEHAKRK	TVTAMDVVYA	LKRQGRITLYG			

FGG

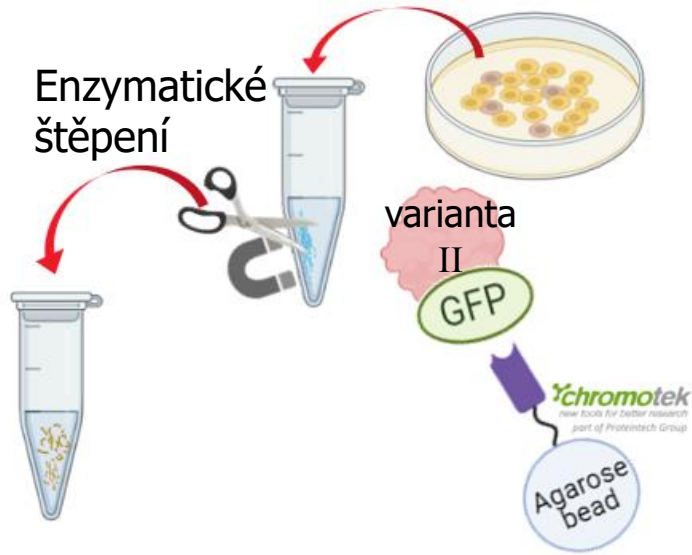
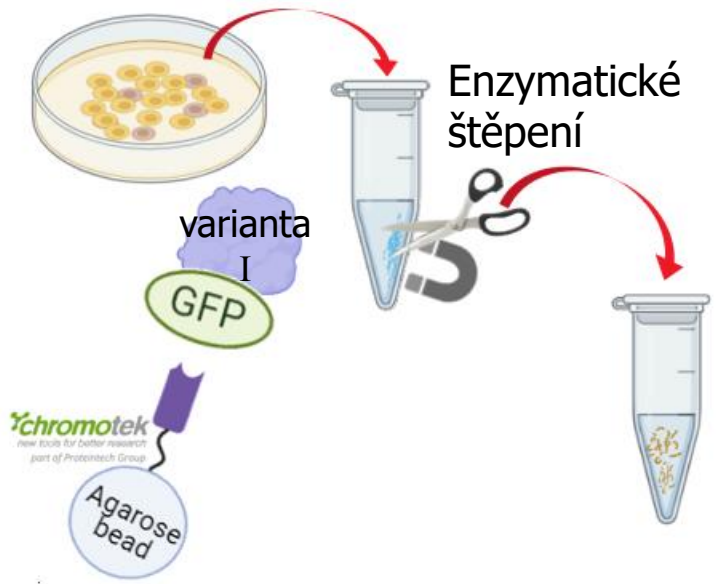
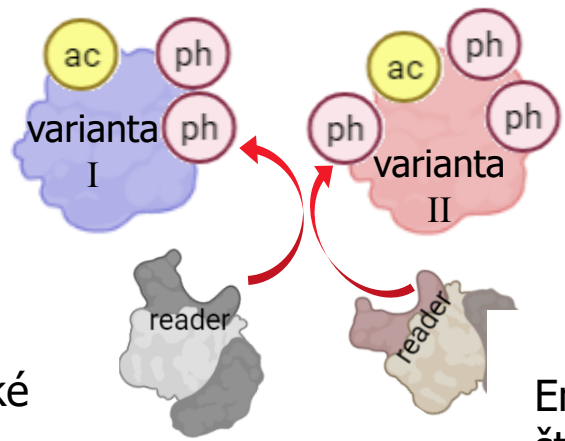
# Characterizace obohacených sekvenčních variant

## varianta I

10	20	30	40	50
MSSRGGKKKS	TKTSRSKAG	VIFPVGRMLR	YIKK <b>G</b> HPKYR	IGVGAPVYMA
60	70	80	90	100
AVLEYLTAEI	LELAGNAARD	NKKGRVTPRH	ILLAVANDEE	LNQLLKGVTI
110	120	130	140	150
ASGGVLPNIH	PELLAKKRG	KGKLEAIITP	PPAKKAKSPS	QKKPVSKKAG
160	170	180	190	200
GKKGARKSKK	KQGEVSKAAS	ADSTTEGTPA	DGFTVLSTKS	LFLGQKL <b>NLI</b>
210	220	230	240	250
<b>HSEISNLAGF</b>	<b>EVEAIINPTN</b>	<b>ADIDLKDDL</b>	NTLEKKGKKE	FVEAVLELRK
260	270	280	290	300
KNGPLEVAGA	AVSAGHGLPA	KFVIHCNSPV	WGADKCEELL	EKTVKNCIAL
310	320	330	340	350
ADDKKLKSIA	FPSIGSGRNG	FPKQTAAQLI	LKAISYFVVS	TMSSSIKTVY
360	370			
FVLFDSSEIG	IYVQEMAKLD	AN		

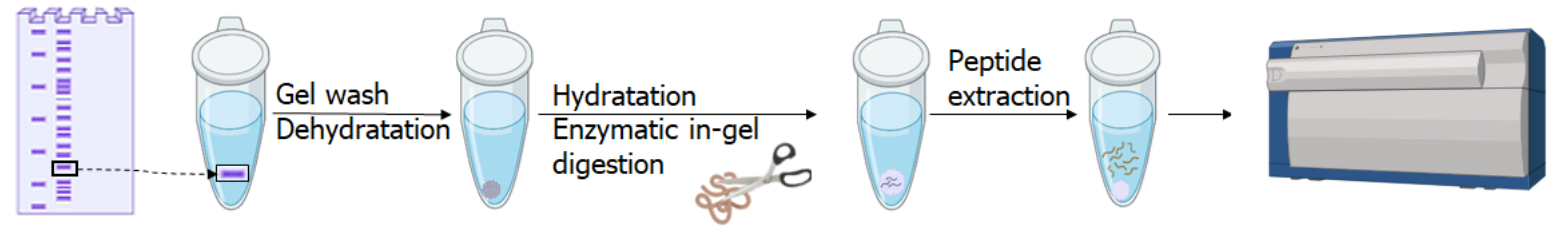
## varianta II

10	20	30	40	50
MSSRGG <b>K</b> KS	TKTSRSKAG	VIFPVGRMLR	YIK <b>K</b> GHPKYR	IGVGAPVYMA
60	70	80	90	100
AVLEYLTAEI	LELAGNAARD	NKKGRVTPRH	ILLAVANDEE	LNQLLKGVTI
110	120	130	140	150
ASGGVLPNIH	PELLAKKRG	KGKLEAIITP	PPAKKAKSPS	QKKPVSKKAG
160	170	180	190	200
GKKGARKSKK	KQGEVSKAAS	ADSTTEGTPA	DGFTVLSTKS	LFLGQKL <b>QVV</b>
210	220	230	240	250
<b>QADIASIDSD</b>	<b>AVVHPTNTDF</b>	<b>YIGGEV</b> GNTL	EKKGGKEFVE	AVLELRKKNG
260	270	280	290	300
PLEVAGAAVS	AGHGLPAKFV	IHCNSPVWGA	DKCEELLEKT	VKNCLALADD
310	320	330	340	350
KKLKSIAFPS	IGSGRNGFPK	QTAAQLILKA	ISSYFVSTMS	SSIKTIVYFVL
360	370			
FDSESIGIYV	QEMAKLDAN			

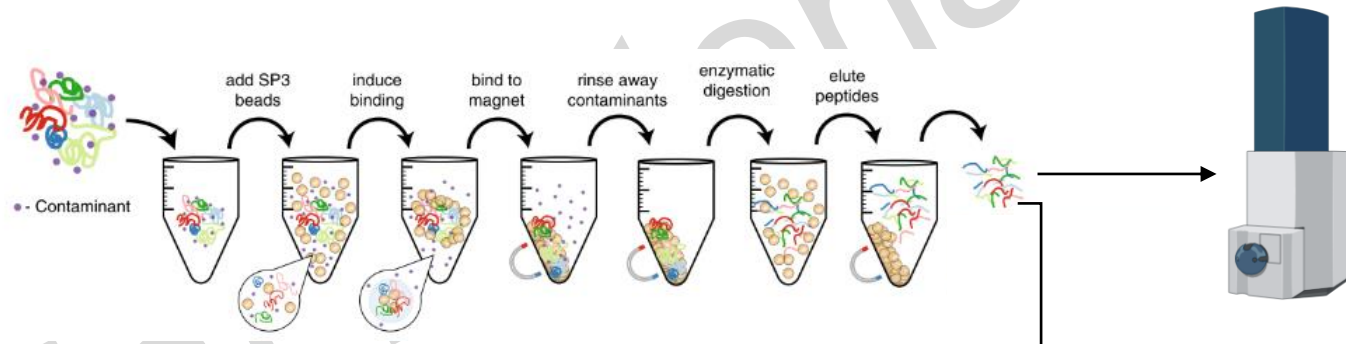


# Practický kurz C8302

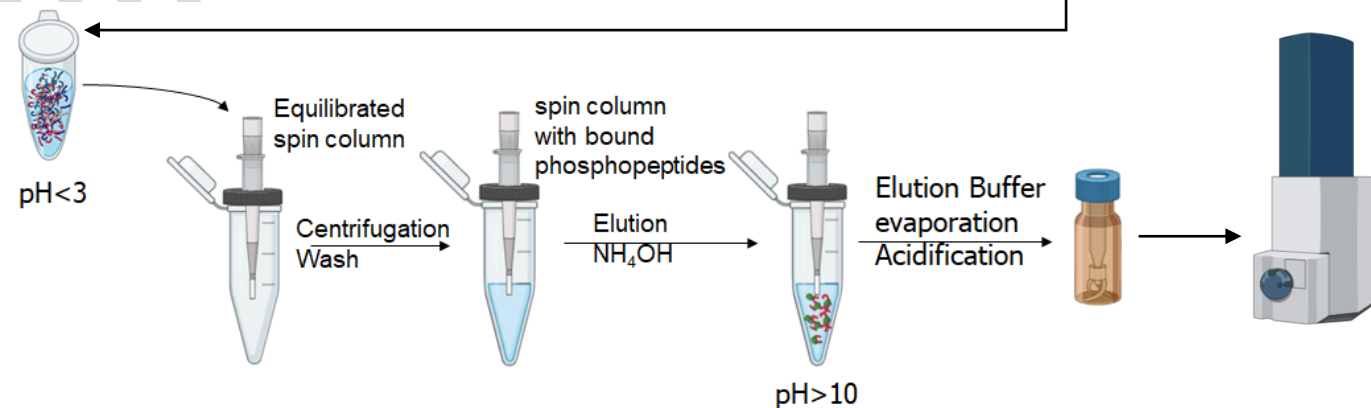
## I. Digesce v gelu



## II. Digesce a přečištění na SP3



## III. Obohacení fosfopeptidů



# Děkuji za pozornost!

Gabriela Lochmanová

[gabriela.lochmanova@ceitec.muni.cz](mailto:gabriela.lochmanova@ceitec.muni.cz)

*Vybrané obrázky byly připraveny v [BioRender.com](https://www.biorender.com).*