


Proteomika

Złożoność proteomów

Źródła złożoności

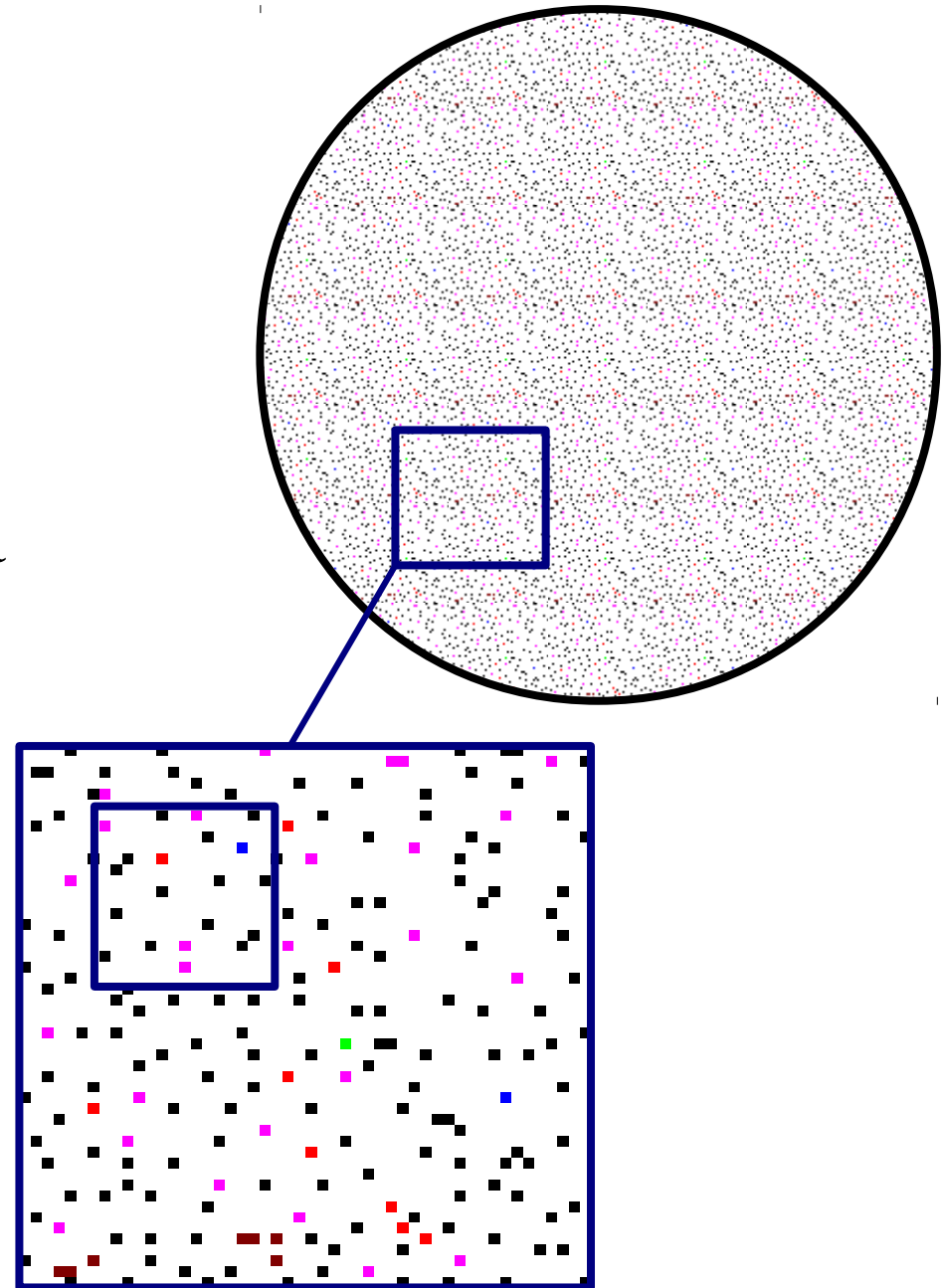
- Złożoność jakościowa pojedynczych białek
 - geny
 - alternatywnie złożone transkrypty,
 - modyfikacje potranslacyjne
 - przycinanie, itp.
 - struktura
 - Oddziaływania
 - z białkami lub innymi cząsteczkami
 - trwałe kompleksy
 - przejściowe łączenie cząsteczek
 - modyfikowanie, cięcie, degradacja
 - składanie białek (chaperoniny)
- 

Zmienność stężenia białek

- „Złożoność ilościowa”
 - Kilka cząsteczek w komórce — setki milionów
 - Zakres dynamiczny stężeń białek w osoczu $\sim 10^9$
 - mechanizmy regulacji
 - ekspresji genów
 - składania transkryptów
 - translacji
 - szybkość składania i transport
 - modyfikacji
 - degradacji

Problemy badawcze

- „Głębokość analizy”
w genomice i transkryptomice
- Identyfikacja
 - peptydy i białka, bark amplifikacji
 - ograniczona „głębokość analizy”
 - spektrometr mas jest w stanie fragmentować ograniczoną liczbę peptydów w przebiegu
 - ograniczona czułość i zakres dynamiczny



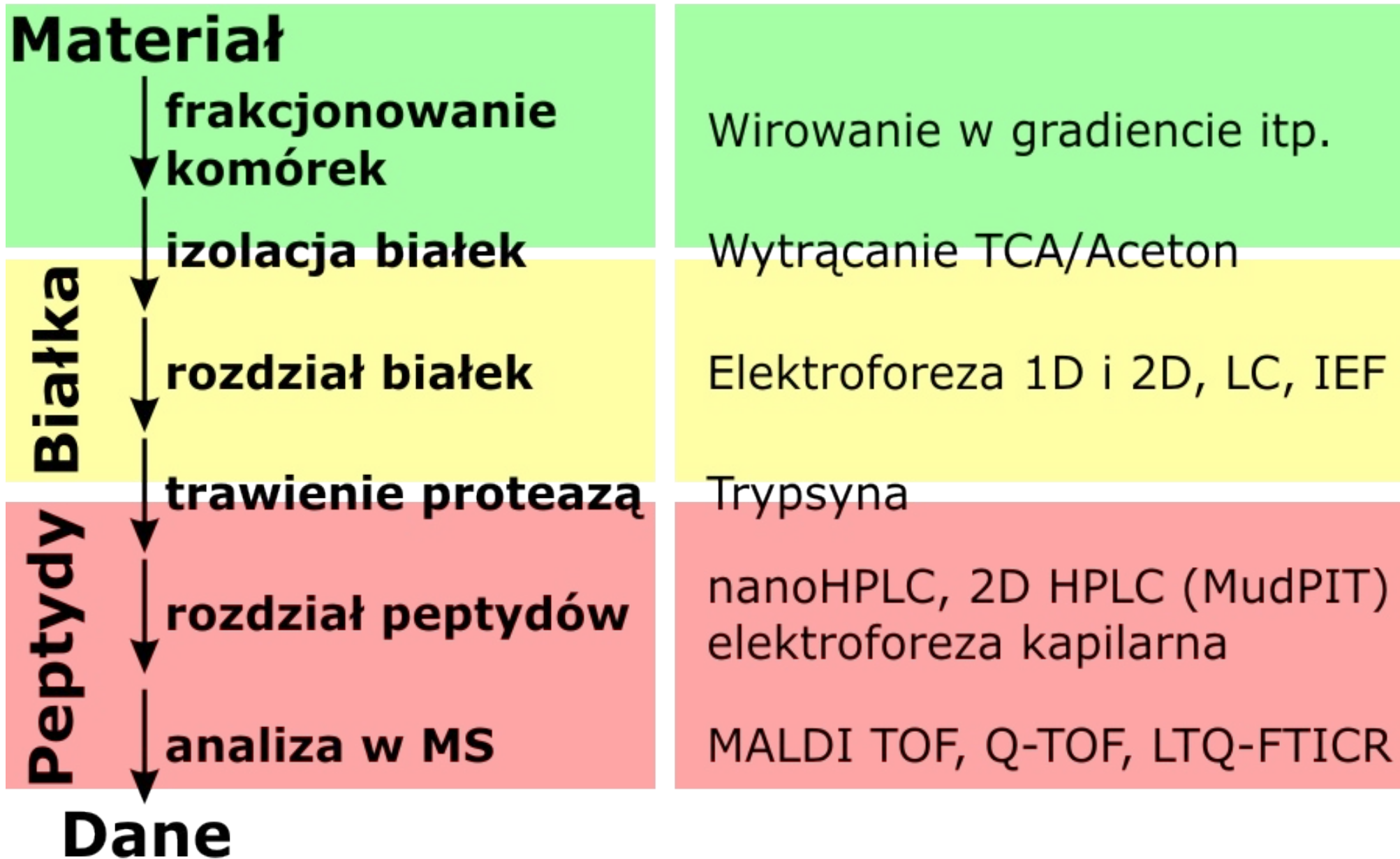
Czułość

- Minimalna ilość cząsteczek pozwalająca na
 - pomiar masy
 - identyfikację peptydu
- Złożona mieszanina
 - Większe prawdopodobieństwo pomiaru MS/MS cząsteczek o dużym stężeniu
 - Zakres dynamiczny urządzenia
 - Z góry określona maksymalna ilość białka poddawanego analizie np. w układzie LC-MS
 - niewystarczająca liczba cząsteczek białek o małym stężeniu w określonym preparacie

Radzenie sobie ze złożonością

- Postęp w spektrometrii mas
 - Szybsze i bardziej czułe spektrometry
 - Q-TOF → do 150 białek/przebieg LC-MS
 - Orbitrap Velos → do 2000 białek/przebieg LC-MS
 - Poziom proteomu bakterii
- Frakcjonowanie

Etapy analiz proteomicznych



Strategie

- Nacisk na rozdział białek
 - typowo elektroforeza 2D → trawienie → MALDI
- Metody typu 'Shotgun'
 - MudPIT (Multidimensional Protein Identification Technology)
- Metody mieszane
 - Rozdział białek i rozdział peptydów

Selekcja i frakcjonowanie komórek

- Badania organów, tkanek itp.
- Mikrodysekcja laserowa

Metody do selekcji lub frakcjonowania komórek:

- Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)
- Elektroforeza przepływowa (Free-Flow Electrophoresis)
- Wirowanie w gradientach gęstości
- Izolacja konkretnych organelli komórkowych

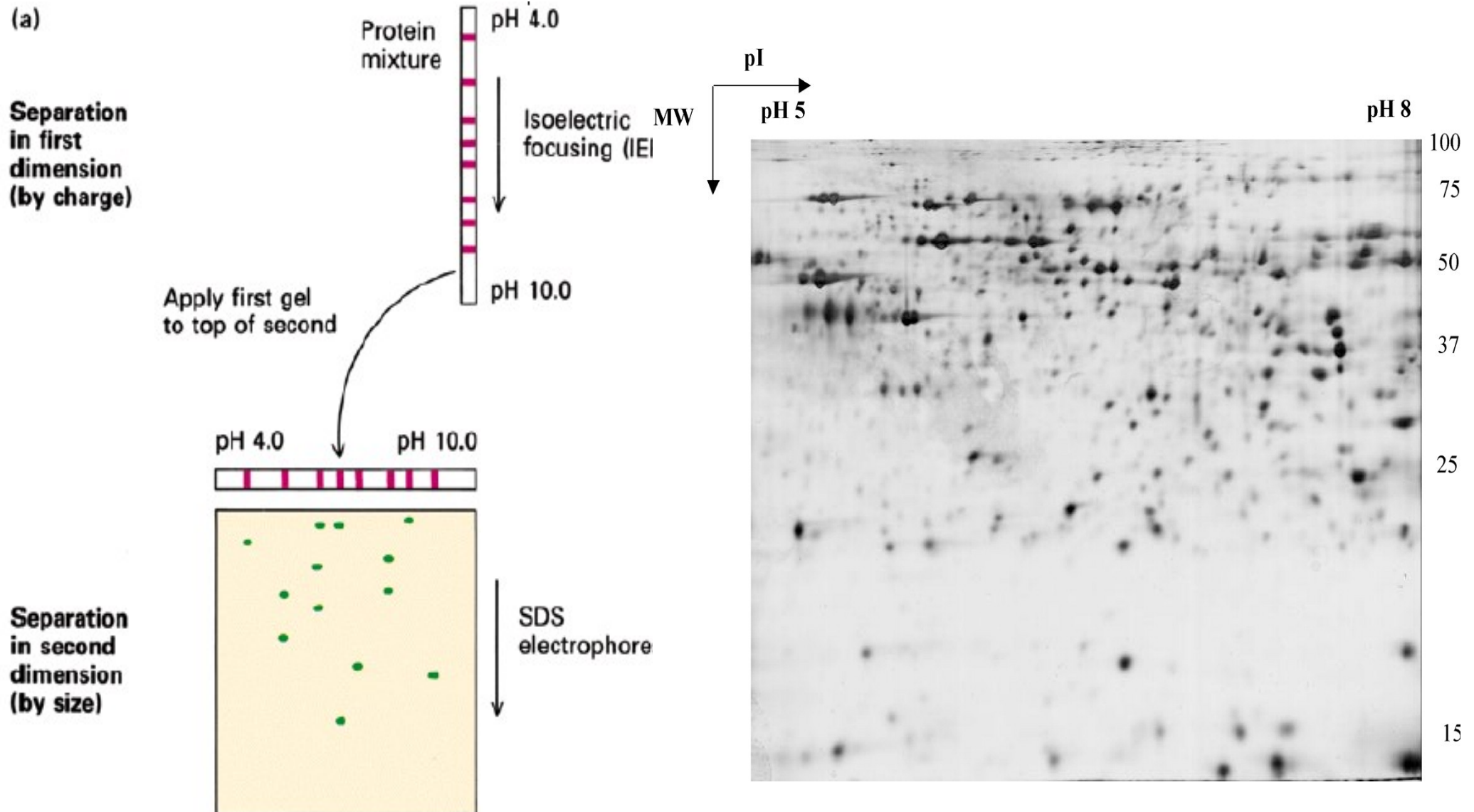
Izolacja białek

- Liza/homogenizacja komórek
- Konieczne rozpuszczenie białek
 - utrudniają to różne właściwości chemiczne
 - bufony „łagodne” pozwolą na badania białek rozpuszczalnych w wodzie
 - detergenty np. SDS, mocznik, chlorowodorek guanidyny
 - inaktywują enzymy, mogą uniemożliwiać elektroforezę itp.
 - np. SDS (inaktywuje trypsynę, nie pozwala na IEF), chlorowodorek guanidyny (inaktywuje trypsynę, strąca SDS).
- Usunięcie innych substancji pochodzący z badanego materiału i dodanych podczas preparatyki
 - zależne od metod dalszej analizy
 - strącanie, dializa, ultrafiltracja, itp.
 - duże straty materiału

Rozdział białek

- Wytrącanie różnicowe, itp.
- Elektroforeza 1D i 2D
 - 1D: SDS-PAGE, ogniskowanie izoelektryczne (IEF), natywna, AU-PAGE (acid urea), itp.
 - 2D: ogniskowanie izoelektryczne — SDS-PAGE
 - można wyciąć prążki lub plamki, białka strawić w żelu i poddać analizie LC-MS
- Chromatografia
 - sączenie molekularne, jonowymienna, oddziaływań hydrofobowych, odwróconej fazy (np. RP-HPLC)

Elektroforeza dwukierunkowa



Podział ze względu na ciśnienie

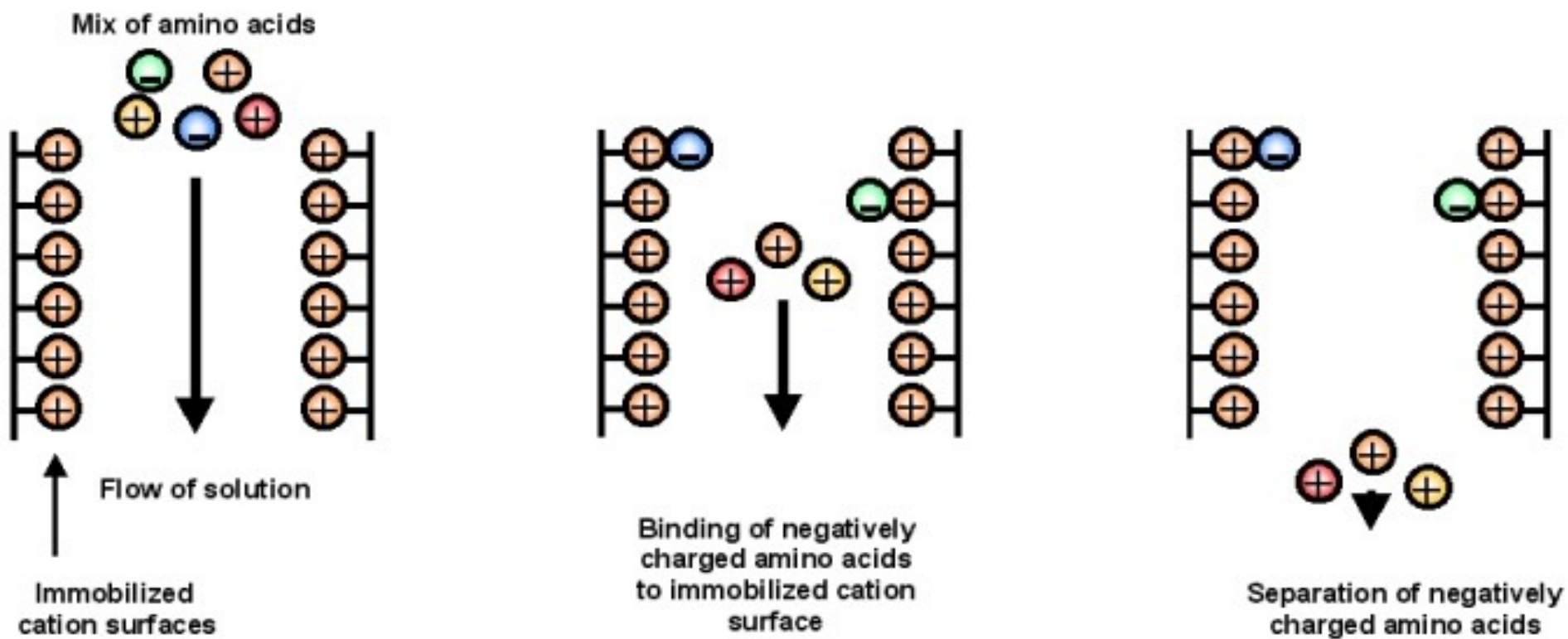
- Chromatografia kolumnowa (Liquid Chromatography – LC)
 - Standardowa niskociśnieniowa
 - przepływ eluenta: grawitacja lub pompa
- FPLC (Fast Protein/Performance LC)
- HPLC (High Performance/Pressure LC)
 - nanoHPLC
- UPLC (Ultra Performance LC)
 - nanoUPLC
 - możliwe bardzo krótkie przebiegi w skali analitycznej

Chromatografia odwróconej fazy

- Najczęściej stosowana w systemach HPLC
- typowe złoże: C-4 do **C-18**
 - łańcuchy węglowodorowe
 - drobniejsze ziarna złoże → większa rozdzielczość i ciśnienie
 - współczynnik kształtu kolumny
- Duża rozdzielczość
- Uniwersalna

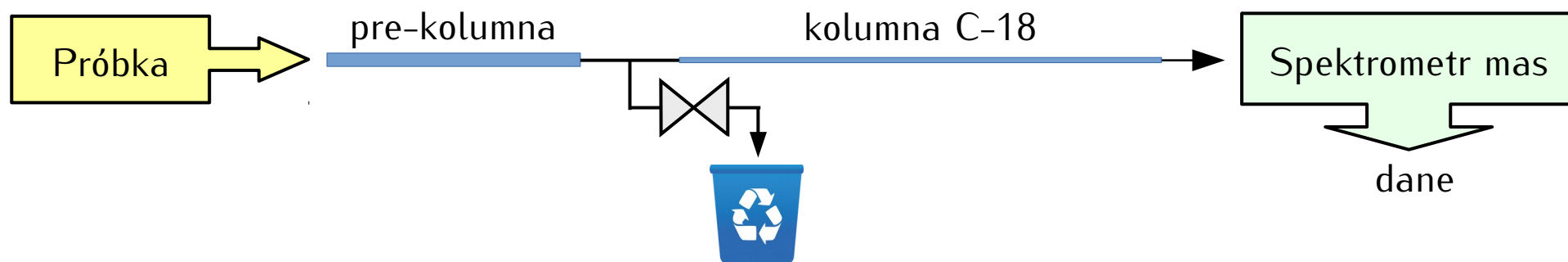
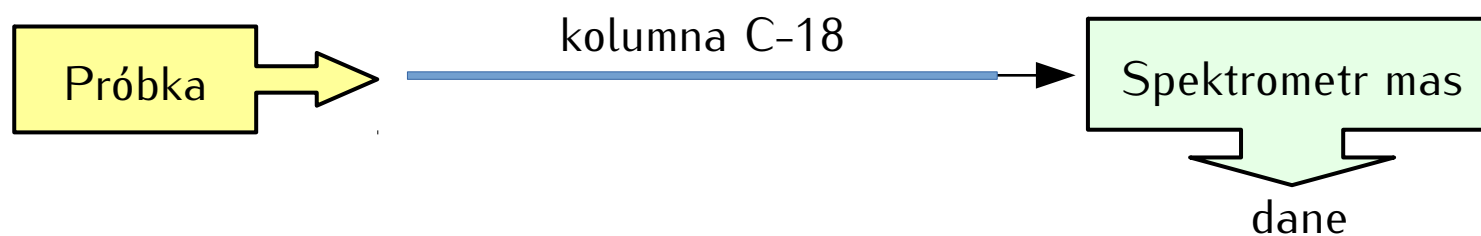
Chromatografia jonowymienna

- Rozdział ze względu na ładunek
 - zależna od pH
 - kationit/anionit
 - sól w buforze — nie działa w połączeniu z ESI



Rozdział peptydów

- Standardowy układ: nanoHPLC (złóże C18) połączony ze źródłem jonów spektrometru mas
 - przepływ np. 250 nl/min



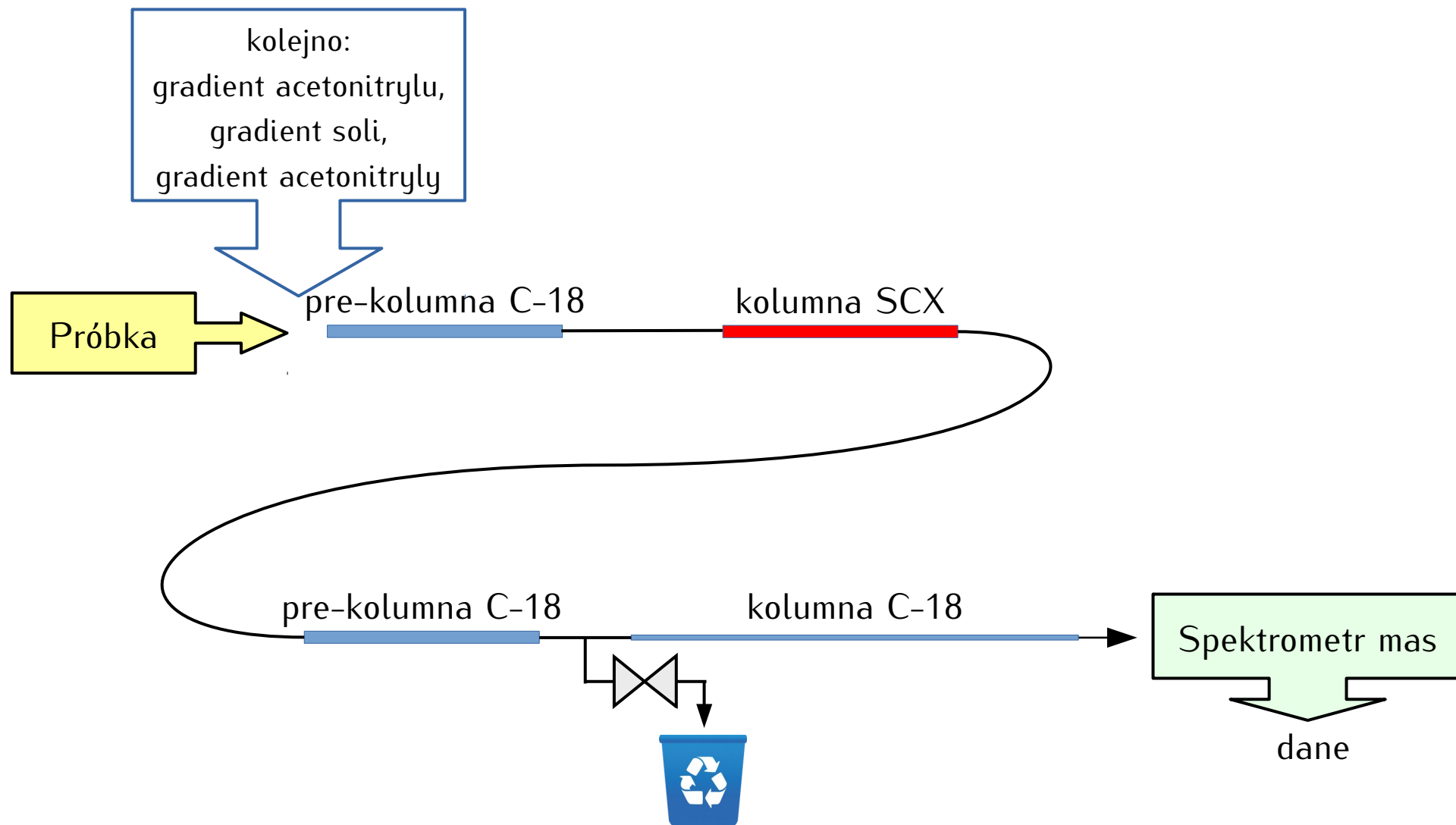
nanoHPLC-MS

- Ważna rozdzielczość
 - Rozdział peptydów + zagęszczenie próby
- Typowe parametry kolumn
 - Złóże C-18
 - średnica ziaren 1,7 – 5 μm
 - średnica kolumny 50 – 150 μm
 - długość kolumny 7 – 50 cm
- Dobór czasu przebiegu
- Ekstremalne HPLC (np. wielometrowe kolumny)

Chromatografia dwuwymiarowa

- Multidimensional Protein Identification Technique (MudPIT)
- Najczęściej stosowana chromatografia jonowymienna przed chromatografią odwróconej fazy
 - każdą z frakcji po chromatografii jonowymiennej można analizować w standardowym systemie LC-MS
 - można zbudować układ robiący takie analizy „on-line”

Zautomatyzowany system



Wszystko w jednej kolumnie



Kolumna ze złożem SCX i C-18



Kolumna ze złożem C-18, SCX, C-18

- Kolumna może być zintegrowana z igłą źródła jonów
- Zintegrowane kolumny są często stosowane w standardowych systemach LC-MS

Ogniskowanie izoelektryczne

- Peptydy można rozdzielić w immobilizowanych gradientach pH
 - Działa tak samo dla całych białek i peptydów
- Żel można pociąć na fragmenty, wyeluować peptydy i poddać analizie w układzie LC-MS
 - można uzyskać dużo frakcji peptydów

Elektroforeza kapilarna

- Można połączyć ze spektrometrem mas
 - sprawia problemy (napięcia, kierunek migracji, itp.)
- Bardzo rzadko stosowana
- Dobra rozdzielczość

Optymalny wybór metod

- Charakterystyka białek
 - białka hydrofobowe, o skrajnym pI
 - białka bardzo trudno rozpuszczalne
- Zanieczyszczenia preparatu
 - substancje natywne DNA/RNA, lipidy, polisacharydy
- Złożoność proteomu i liczba białek, które chcemy badać
- Koszty

Liczba badanych białek

- Elektroforeza 2D

kilkaset analiz spektrometrycznych (trawienie+pomiar) ~ 1000 białek

– niska czułość i mały zakres dynamiczny, nie nadaje się do białek hydrofobowych i o skrajnym pI

- preparat → trawienie → LC-MS (nanoHPLC-MS)

jeden przebieg systemu HPLC-MS np. 4 godziny spektrometru ~ 1000 białek

- preparat → SDS-PAGE → trawienie → LC-MS

np. 10 przebiegów LC-MS, np. 24 godziny, kilka tysięcy białek

- preparat → trawienie → 2D-LC-MS

kilka do kilkanaście przebiegów LC-MS, kilkanaście tysięcy białek

- preparat → trawienie → IEF → LC-MS

kilka do kilkanaście przebiegów LC-MS, kilkanaście tysięcy białek

Podsumowanie

- Dobór strategii bardzo istotny
- Większa liczba kroków frakcjonowania zwiększa liczbę identyfikowanych/badanych białek
 - może powodować utratę białek
- Koszty analizy zależą przede wszystkim od czasu użycie drogiego sprzętu (spektrometr mas)