

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta  
Katedra fyzikální chemie



## **Optimalizace redukce a alkylace proteinů před polyakrylamidovou elektroforézou pro následnou MS identifikaci po in-gel štěpení**

### **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Jakub Lhotský</b>
Studijní program:	B1406 Aplikovaná chemie
Studijní obor:	Aplikovaná chemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. René Lenobel Ph. D</b>
Termín odevzdání práce:	16.8.2010

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne .....

## **Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora:	Jakub Lhotský
Název práce:	Optimalizace redukce a alkylace proteinů před polyakrylamidovou elektroforézou pro následnou MS identifikaci po in-gel štěpení
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce:	Mgr. René Lenobel Ph. D.
Rok obhajoby práce:	2010
Abstrakt:	<p>Polyakrylamidová gelová elektroforéza je v současnosti nejpoužívanější metodou, sloužící k separaci proteinů z komplexních biologických směsí. Ve spojení s hmotnostní spektrometrií představuje mocný nástroj, sloužící k analýze a identifikaci proteinů. Přestože metody jednorozměrné a dvourozměrné polyakrylamidové elektroforézy doznaly během posledních desetiletí značného pokroku, v současnosti nejsou překonány všechny obtíže, které s sebou tyto metody přinášejí. Kritickým krokem je příprava proteinového vzorku. MS analýza proteinů probíhá většinou na peptidech, vzniklých enzymatickým nebo chemickým štěpením proteinů. Pro získání kvalitního fondu peptidů je nutné rozrušit terciární a kvarterní strukturu proteinů redukcí disulfidových vazeb a zabránit jejich reoxidaci procesem alkylace. Tím je dosaženo zvýšení efektivity štěpení proteinů na peptidy. Cílem mé práce byla optimalizace podmínek redukce a alkylace proteinů s využitím různých redukčních a alkylačních činidel před gelovou elektroforézou a provést srovnání proti</p>

klasické metodě redukce a alkylace v gelu po elektroforéze. Lepších výsledků bylo dosaženo s použitím 0,25 mM tris(2-karboxyethyl)fosfinu a 22,73 mM iodoacetamidu při pH 8 před.

Klíčová slova:

Proteomika, SDS-PAGE, BSA, redukce, alkylace, štěpení v gelu, hmotnostní spektrometrie

Počet stran:

Počet příloh:

Jazyk:

čeština

**Bibliographical identification:**

Author's first name and surname: Jakub Lhotský

Title: Optimization of protein reduction and alkylation prior polyacrylamide electrophoresis for subsequent MS identification after in-gel digestion

Department: Department of Physical chemistry

Type of thesis: Bachelor

Supervisor: Mgr. René Lenobel Ph. D.

The year of presentation: 2010

Abstract: Nowadays, polyacrylamide gel electrophoresis is now the most widely used method for the separation of proteins from complex biological mixtures. In conjunction with mass spectrometry it presents powerful tool for the analysis and identification of proteins. Although the methods of one-dimensional and two-dimensional electrophoresis have improved significantly over past few decades, there are still some complications that are not overcome yet. The critical step is sample preparation. MS identification of proteins is usually based on peptides generated by enzymatic or chemical cleavage of proteins. To get a quality fund of peptides, the tertiary and quaternary structure of proteins must be disrupted by reduction of disulfide bonds and released thiol group must be prevented of reoxidation by the process of alkylation. By this approach the effectivity of cleavage of proteins to peptides is highly increased. The aim of my work was to optimize conditions of reduction and alkylation of proteins using different reducing and alkylating

reagents before electrophoresis and compared to the classical method in which the reduction and alkylation is done by dithiothreitol and iodoacetamide in in gel after electrophoresis; the best results were achieved by reduction with tris(2-carboxyethyl)phosphine and alkylation with iodoacetamide in buffer pH 8 before electrophoresis.

Keywords:

Proteomics, SDS-PAGE, BSA, reduction, alkylation, in-gel digestion, mass spectrometry

Number of pages:

Number of appendices:

Language:

Czech

# OBSAH

<b>Cíle práce</b> .....	- 9 -
<b>Teoretická část</b> .....	- 10 -
1 Úvod.....	- 10 -
1.1 Historie proteomiky.....	- 10 -
1.2 Rozdělení proteomiky: typy a přístupy ke studiu proteinů.....	- 13 -
2 Identifikace proteinu .....	- 13 -
2.1 Polyakrylamidová gelová elektroforéza .....	- 14 -
2.2 SDS-PAGE .....	- 15 -
2.3 Detekce proteinů v polyakrylamidovém gelu .....	- 16 -
2.4 Vyřezání proteinových pásů a odbarvení proteinů.....	- 19 -
2.5 Redukce a alkylace proteinů v gelu.....	- 19 -
2.6 Štěpení proteinů .....	- 24 -
2.7 MS analýza peptidů.....	- 26 -
2.7.1 Ionizační zdroje.....	- 26 -
2.7.2 Hmotnostní analyzátory.....	- 28 -
2.8 Způsoby identifikace proteinu pomocí MS dat.....	- 30 -
3 Redukce a alkylace proteinů v roztoku před elektroforézou .....	- 32 -
<b>Experimentální část</b> .....	- 34 -
4.1 Použité chemikálie .....	- 34 -
4.2 Použité přístrojové vybavení .....	- 34 -
4.3 Použité roztoky .....	- 35 -
<b>Experimentální postup</b> .....	- 36 -
5.1 Příprava polyakrylamidových gelů pro SDS-PAGE.....	- 36 -
5.2 Příprava vzorku pro SDS-PAGE.....	- 37 -

5.3 SDS-PAGE separace BSA.....	- 41 -
5.4 Odbarvení gelu.....	- 42 -
5.5 Vyřezání obarvených gelových proužků z polyakrylamidového gelu .....	- 42 -
5.5 Odbarvení gelových kousků .....	- 42 -
5.7 Redukce a alkylace v gelu .....	- 42 -
5.8 Enzymatické štěpení trypsinem .....	- 43 -
5.9 Extrakce a čištění peptidů.....	- 43 -
5.10 Analýza peptidů pomocí LC-MS .....	- 44 -
<b>Výsledky a diskuze .....</b>	<b>- 46 -</b>
<b>Závěr.....</b>	<b>- 52 -</b>
<b>Summary .....</b>	<b>- 53 -</b>
<b>Seznam použitých zkratk .....</b>	<b>- 54 -</b>
<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>- 56 -</b>



## **Cíle práce**

Cílem mé práce bylo vypracovat rešerši na téma metod analýzy proteinů a jejich identifikace pomocí hmotnostní spektrometrie a dále metody a postupy redukce a alkylace proteinů před SDS-PAGE pro analýzu štěpením v gelu. Dále navržení a provedení experimentů zaměřených na různé způsoby redukce a alkylace standardního proteinu, hovězího sérového albuminu (BSA), před polyakrylamidovou elektroforézou a srovnání a vyhodnocení získaných výsledků se standardním postupem redukce a alkylace proteinů během štěpení proteinů v gelu.

## Teoretická část

### 1 Úvod

Proteomika je vědní obor, který se zabývá systematickou analýzou proteinů z hlediska jejich kvality (identity), množství (celkové úrovně exprese), funkce, struktury a vzájemných interakcí, s cílem identifikovat a charakterizovat proteiny v nejnižších možných koncentracích.

V současné době je proteomika jedním z nejdynamičtěji se rozvíjejících oborů v přírodních vědách a to především díky rozvoji hmotnostní spektrometrie (MS) a bioinformatiky, ale také souvisejících oborů – molekulární biologie a genomiky<sup>1, 2</sup>.

Předmětem studia proteomiky je proteom – soubor všech proteinů vyskytujícím se v daném čase a za daných podmínek v dané buňce, tkáni, orgánu nebo organismu. Slovo proteom (**protein complement of genome**) poprvé použil v roce 1994 Australan Mark Wilkins na konferenci v Sienně. Proteomika tak dostala svůj oficiální název<sup>2</sup>. Počátky proteomického bádání však spadají již do 50. let dvacátého století, kdy byly publikovány první práce, zabývající se separací proteinů z komplexních proteinových směsí<sup>3</sup>. Myšlenka systematicky analyzovat a katalogizovat soubor všech proteinů u bakterií, jako *Escherichia Coli*, živočichů, např. myši, a nakonec i člověka, přišla až o několik desítek let později.

#### 1.1 Historie proteomiky

Počátky proteomiky jsou neodmyslitelně spjaty s vývojem separačních metod, a to především elektroforézy v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) a dvojrozměrné elektroforézy (2-DE). První práce, ve které byla uplatněna dvojrozměrná separace proteinů, byla publikována Smithiesem and Poulikem v roce 1956<sup>4</sup>. V prvním rozměru byla separace proteinů prováděna na filtračním papíru nasyceném elektroforetickým pufrem a ve druhém rozměru v agarózovém gelu. Tímto způsobem bylo možné rozseparovat proteiny lidského séra na 20 proteinových skvrn. V těchto a následujících letech se objevily i další modifikace elektroforézy prováděné ve dvou rozměrech<sup>5, 6, 7, 8, 9, 10, 11</sup>, které však oproti původní práci Smithiese a Poulicka nepřinesly žádné zásadnější vylepšení. V roce 1964 pak Raymond jako první použil ke dvojrozměrné separaci proteinů polyakrylamidový gel<sup>12</sup>, ale ani tak se rozlišení podstatněji nezlepšilo.

Dalšímu vývoji 2-DE tak předcházela ještě další vývoj jednorozměrných separačních technik (1-DE). Těmi byly především isoelektrická fokusace v polyakrylamidovém gelu (IEF) a elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE).

Metoda IEF byla popsána v roce 1968 několika autory současně<sup>13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20</sup>. Zveřejnění SDS-PAGE pak následovalo o dva roky později<sup>21</sup>.

Právě tyto dvě techniky pak poskytly optimální separační vlastnosti pro vývoj moderní 2-DE: vysoké rozlišení a separaci podle rozdílných parametrů, *pI* a molekulové hmotnosti. V první polovině 70. let minulého století bylo otištěno hned několik různých publikací, ve kterých byly IEF a PAGE spojeny. Nejdůležitější však byly práce spojující IEF v první dimenzi a diskontinuální SDS-PAGE v dimenzi druhé. Těmi se staly články autorů McGillivraye a Rickwooda<sup>22</sup>, Klosoho<sup>23, 24</sup>, O'Farrella<sup>25</sup> a Sheeleho<sup>26</sup>. Z těchto se nejpoužívanější metodou stala 2-DE podle O'Farrela, která umožňovala, v různých modifikacích např. dle Andersona a Andersonové<sup>27</sup>, separaci proteinů lidského séra přibližně na 300 proteinových skvrn. V průběhu dalších let pak doznala 2-DE podstatných vylepšení. Její nejmodernější variantou se zatím stala metoda nazvaná diferenční gelová elektroforéza (DIGE), která využívá kovalentní značení proteinů fluorescenčními barvivy a umožňuje tak dosáhnout daleko vyšší citlivosti<sup>28</sup>.

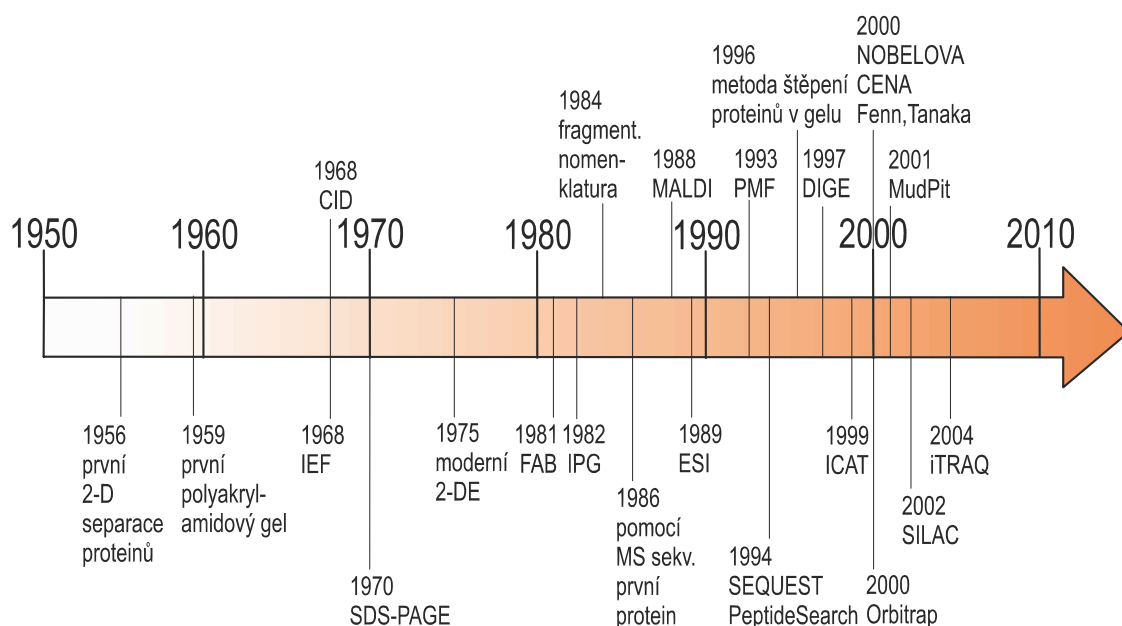
Rostoucí zájem o 2-DE byl podporován myšlenkou možnosti separace složitých proteinových extraktů nebo celkových proteinů buněk rozličného původu. Možnosti klinických aplikací udělaly 2-DE předmětem širšího zájmu odborné veřejnosti, což dokazují titulky některých článků publikovaných v této době v prestižních vědeckých časopisech: Nature 367, 1977, news and views: The protein explosion. Nature 278, 1979, N. Anderson: Making molecular catalogues. Nature 392, 1981, News and views: Toward a total human protein map. The Economist 9, 1981: Mapping the body. TIBS 6, 1981, Celis and Bravo: Cataloguing human and mouse proteins. Science 211, 1981: The complete index to man: "There is a plan to catalogue every protein produced in the human body; meanwhile DNA sequences accumulate apace"<sup>3</sup>.

S rychlým vývojem 2-DE technik ale také vznikla mezera mezi detekcí proteinů a jejich následnou analýzou, a to především identifikací. Ta byla překonána až s rozvojem měkkých ionizačních technik pro MS v osmdesátých a devadesátých letech minulého století. Do té doby používaná metoda Edmanova sekvencování proteinů<sup>29</sup> byla nahrazena MS s různými ionizačními zdroji. Ionizační techniky jako desorpce pomocí plasmy (PD)<sup>30</sup>, bombardování rychlými atomy (FAB)<sup>31</sup> a ionizace pomocí termospreje (TS)<sup>32</sup> byly schopné převést velké molekuly do plynné fáze a umožnily tak první analýzy peptidů pomocí MS. S objevem kolizně indukované disociace (CID)<sup>33</sup> pak bylo poprvé možné studovat fragmentační chování peptidů. Této problematice se v osmdesátých letech minulého století intenzivně věnoval Bienmann<sup>34</sup> a ze získaných poznatků pak byla sestavena fragmentační nomenklatura peptidů<sup>35</sup>. V roce 1986 byl pomocí MS s FAB ionizací sekvencován první protein<sup>36</sup>.

Nejzásadnější průlom v aplikaci MS v proteomice však přinesl vývoj dvou nových ionizačních technik: ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI)<sup>37, 38, 39</sup> a ionizace elektrosprejem (ESI)<sup>40</sup>. O důležitosti těchto metod svědčí fakt, že za jejich objevení byla v roce

2002 udělena Nobelova cena za chemii (K. Tanaka – MALDI, J.B. Fenn – ESI). S rozvojem technik MS souvisí i rozvoj metodologií a softwaru použitelného k identifikaci proteinů ze získaných MS spekter. První návrh takové metodologie byl prezentován Henzelem a kol. v roce 1989<sup>41</sup>. O čtyři roky později vznikla na těchto základech metoda identifikace proteinu pomocí tzv. peptidového mapování (PMF), publikovaná několika vědeckými týmy současně<sup>42, 43, 44, 45, 46</sup>. V roce 1994 spatřily světlo světa dva nové programy SEQUEST<sup>47, 48</sup> a PeptideSearch<sup>49</sup>. Tyto programy jako první umožnily porovnání fragmentačního MS spektra analyzovaného peptidu se spektry získanými teoretickou *in-silico* fragmentací peptidů přítomných v databázi a následně identifikovat neznámý protein. Tato metoda identifikace proteinu pak byla nazvána peptidové sekvencování (PS). Tyto dvě procedury, PMF a vyhledávání PS, pak představují metodologii používanou v posledních 15 letech ve většině proteomických. V mnoha publikacích je tento přístup označován jako „klasická proteomika“<sup>50</sup>.

V posledních dvaceti letech prošla proteomika asi zatím nejbouřlivější etapou svého rozvoje. Metody, které v této době vznikly, jako např. DIGE (viz. výše)<sup>28</sup>, multidimenzionální techniky (MudPit)<sup>51</sup>, kvantifikace proteinů na základě značení stabilními izotopy (jako první byla publikována metoda izotopově kódovaných afinitních značek ICAT<sup>52</sup>, v současnosti jsou ale nejpoužívanějšími technikami iTRAQ<sup>53</sup> a SILAC<sup>54, 55, 56</sup>), a také Orbitrap<sup>57</sup> (hmotnostní spektrometr umožňující analýzu s vysokým rozlišením bez nutnosti pořizování drahých přístrojů typu FT-ICR), představují nástroje proteomiky „druhé generace“. Proteomika se tak v době rostoucího významu systémové biologie<sup>58</sup> stala mocným nástrojem, umožňujícím vhled do složitých biologických procesů, jako je např. patogeneze nemocí, a umožnila návrh a vývoj nových léčiv a biotechnologických produktů<sup>59</sup>.



Obr. 1 Časová osa vývoje proteomiky.

## 1.2 Rozdělení proteomiky

Během svého historického vývoje se proteomika diferencovala do několika odvětví, která se vzájemně liší nejen cílem vlastního proteomického zkoumání, ale také svými přístupy, tzn. metodikami, kterých se při konkrétním zkoumání využívá. Proteomika se tak v zásadě dělí do čtyř hlavních skupin na:

- 1) **Analytickou proteomiku**, jejímž hlavním cílem je identifikace proteinů, včetně stanovení jejich molekulové hmotnosti, aminokyselinové sekvence a určení posttranslačních modifikací. Je založena na kombinaci separace bílkovin ze složitých biologických směsí, jejich charakterizaci hmotnostní spektrometrií a bioinformatickém zpracování získaných údajů.
- 2) **Strukturní proteomiku**, zabývající se studiem nativní struktury proteinů, např. úspěšným či neúspěšným skládáním proteinů. Využívá metody jako je např. krystalografie, NMR, MS, ale také řady dalších technik.
- 3) **Funkční proteomiku**, zabývající se především studiem úlohy proteinů v rámci rozličných životních dějů. Ve spojení s dalšími vědními obory, např. molekulární biologií, pak tento přístup umožňuje zkoumat a charakterizovat vybranou skupinu proteinů, získávat informace o proteinové signalizaci, mechanismu vzniku různých onemocnění, interakcích proteinů s léčivy atd.
- 4) **Diferenční (srovnávací) proteomiku**, sledující změny složení proteomu daného organismu za různých podmínek (například stavy normální oproti stavům patologickým) s cílem nalézt a identifikovat rozdílně se vyskytující proteiny. Využívá metod analytické proteomiky, především různé způsoby relativní a absolutní kvantifikace (např. techniky jako SILAC a iTRAQ, viz. výše)<sup>1</sup>.

## 2. Identifikace proteinu

Identifikace proteinů je ústředním motivem proteomického výzkumu. Je vlastní podstatou projektů zaměřených na katalogizaci co největšího počtu proteinů obsažených v biologických vzorcích a je také základem metod používaných pro profilování exprese jednotlivých proteinů. Ve snaze o hlubší porozumění molekulárním mechanismům a drahám je identifikace proteinů spojena také s mapováním kotranslačních a posttranslačních modifikací<sup>60</sup>. Jak bylo uvedeno v předchozí kapitole, existuje dnes několik různých přístupů k analýze a k identifikaci neznámého proteinu. Odhlédneme-li od v běžné praxi nepříliš časté analýzy celých intaktních proteinů, k níž se váže nutnost použití drahých MS přístrojů typu FT-ICR s vysokým rozlišením a schopností fragmentace celých molekul proteinů, je dnešní typická strategie založena na MS analýze peptidů vzniklých chemickým nebo enzymatickým štěpením proteinů, které byly dříve separovány pomocí SDS-PAGE nebo 2-DE. Pro přesnost nutno také uvést, že

MS analýza může být provedena s peptidy vzniklými štěpením nerozseparované směsi proteinů. Získaná MS data jsou pak dále zpracována, vyhodnocována a interpretována pomocí vhodného bioinformatického softwaru<sup>61</sup>.

## 2.1 Polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE)

PAGE představuje výkonnou a v současnosti také nejpoužívanější separační metodu, určenou pro dělení proteinů, proteinových komplexů, ale také např. buněčných organel. Faktory, přispívající k výkonnosti této metody, jsou jednak vysoká rozlišovací schopnost a ve spojení s příslušnou detekční technikou také možnost vizualizace stopových množství proteinů<sup>62</sup>.

Principem separace proteinů pomocí PAGE je migrace nabitých molekul v homogenním elektrickém poli v prostředí polyakrylamidového gelu. Vzhledem k odlišné velikosti náboje a hmoty se různé molekuly pohybují různými rychlostmi, čímž dochází k jejich rozseparování na jednotlivé frakce. Elektroforetická separace proteinových vzorků probíhá v pufru s přesnými hodnotami pH a konstantní hodnotou iontové síly, která by měla být co nejmenší. Během elektroforézy migrují pak ionty pufru gelem stejně jako nabité molekuly vzorku: kladně nabitě částice a molekuly ke katodě, záporně nabitě k anodě. Důležitým parametrem charakterizujícím nabitou částici nebo molekulu je tzv. elektroforetická mobilita, která je měřítkem rychlosti migrace. Závisí především na pK nabitých skupin a na velikosti částice nebo molekuly. Obecně lze konstatovat, že čím menší má částice nebo molekula velikost a čím větší je její celkový náboj, tím rychleji se bude v elektrickém poli pohybovat. Vztah mezi mobilitou částice  $M$ , rychlostí migrace  $v$  a intenzitou elektrického pole  $E$  vyjadřuje vztah

$$M = \frac{v}{E}$$

Separace proteinů pomocí PAGE tedy závisí na celkové velikosti jejich volného náboje, na napětí vloženém mezi elektrody, ale také na velikosti a tvaru molekuly a teplotě a době trvání separace<sup>63</sup>.

Nosič pro PAGE, polyakrylamidový gel, vzniká sesíťováním akrylamidu a N,N'-metylenbisakrylamidu. Polymerizace gelu je zahájena peroxidisíranem amonným  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  generujícím radikály, přičemž katalyzátorem této reakce je N,N,N',N'-tetramethyldiamin (TEMED). Kyslík je naopak inhibítorem reakce, a proto je nutné reakční směs před zahájením polymerizace odvdušnit, např. pomocí vývěvy. Koncentrace akrylamidu ovlivňuje délku polyakrylamidových řetězců, N,N'-metylenbisakrylamid ovlivňuje stupeň zesíťování. Oba parametry současně ovlivňují vlastnosti gelu – velikost pórů gelu, pružnost a hustotu gelu. Pórovitostí gelu je ovlivněn funkční rozsah gelu – například 10 % gely mají ideální separační vlastnosti v oblastech molekulových hmotností okolo 50-100 kDa, kdežto 15 % gely jsou vhodné k separaci malých proteinů s molekulovými hmotnostmi  $\leq 20$  kDa<sup>62</sup>.

Polyakrylamidové gely se dělí na kontinuální gely s jednotným složením pufru a koncentrací akrylamidu (velikostí pórů)<sup>64</sup> a na diskontinuální gely, které jsou tvořeny dvěma různými gely, lišícími se především velikostí pórů a hodnotou pH pufru použitého k přípravě gelu<sup>21</sup>. Výhodou diskontinuálního gelového systému je oproti kontinuálnímu tzv. samozaostřovací efekt horní gelu.

Elektroforetická separace proteinů a peptidů v polyakrylamidovém gelu by měla dosahovat co nejvyššího rozlišení. Toho je docíleno právě použitím zaostřovacího gelu, který je schopen zakoncentrovat proteiny před vstupem do rozdělovacího gelu do velice úzkých, tzv. „startovacích“ zón. Proces probíhá na principu izotachoforézy. Vzorek proteinů (směsná zóna) migruje mezi nejpohyblivějším (vedoucím) iontem a nejméně pohyblivým (koncovým) iontem elektrolytu. V průběhu separace se rychlejší, resp. pomalejší částice vydělují ze směsné zóny a vytvářejí nové čisté zóny. Po úplném rozseparování proteinů ze směsného vzorku se všechny zóny pohybují stejnou rychlostí. Je třeba dodat, že tímto způsobem je možné separovat vždy pouze molekuly, nesoucí buďto pouze kladný nebo záporný elektrický náboj<sup>63</sup>.

## 2.2 SDS-PAGE

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS-PAGE podle Laemliho<sup>21</sup> je variantou diskontinuální elektroforézy, původně publikované v roce 1964 L. Ornsteinem<sup>65</sup> a B.J. Daviesem<sup>66</sup>. Tato metoda využívá dvou různých gelů, tzv. zaostřovacího (stacking) a dělicího (running) gelu, které se liší především stupněm zesíťování, pH a koncentrací obsaženého pufru Tris/HCl. Navázáním SDS na proteiny (poměr 1,4 g SDS na 1g proteinu) dojde k přerušování vodíkových vazeb, čímž se rozruší jejich sekundární a terciální struktura. Proteiny nesoucí různý náboj získají uniformní záporný náboj a míra pohyblivosti proteinu v elektrickém poli je pak určena pouze jeho velikostí.

K tomu, aby mohl být vzorek proteinů separován pomocí SDS-PAGE, musí být rozpuštěn v tzv. vzorkovacím pufru. Ten obsahuje Tris-HCl pufr (pH = 6,8), redukční činidlo, glycerol, SDS (viz výše) a barvivo bromfenolová modř. Tris-HCl udržuje konstantní pH vzorku a vytváří vhodné prostředí pro elektroforetickou separaci proteinů. Redukční činidlo, např. DTT nebo β-merkptoethanol (MeSH) rozruší kvarterní strukturu proteinů, výsledkem čehož budou pásy rozseparovaných proteinů ostřejší. Glycerol je přidáván pro zvýšení hustoty vzorku – vzorek se pak snadněji aplikuje do jamek gelu a zároveň je zamezeno smíchání vzorku s okolním elektroforetickým pufrům. Barvivo bromfenolová modř zviditelňuje proces migrace proteinů. Vzorek proteinů rozpuštěný ve vzorkovacím pufru je pak obvyklé zahřát na několik minut ve vodní lázni nebo v termobloku, čímž je dosaženo rozpuštění a denaturace všech proteinů<sup>62</sup>.

Takto připravený proteinový vzorek se aplikuje pomocí mikropipety na polyakrylamidový gel, umístěný v elektroforetické cele. Po připojení stejnosměrného elektrického pole o napětí 80 voltů migrují proteiny nejdříve zaostřovacím gelem. Po uplynutí doby nutné k průniku proteinů do rozdělovacího gelu se napětí zvýší, obvykle na 120 voltů. Zde dojde k rozseparování proteinů. Elektroforéza se zpravidla ukončuje v momentě, když barvivo putující s nejrychlejšími ionty opustí gel nebo se přiblíží k jeho okraji. Z takto získaného polyakrylamidového gelu je po vyjmutí ze skleněné formy odstraněna část zaostřovacího gelu. Rozseparované proteiny jsou dále vizualizovány některou z detekčních (barvicích) metod.

### 2.3 Detekce proteinů v polyakrylamidovém gelu

Dalším krokem při identifikaci neznámého proteinu je jeho detekce. K tomuto účelu je v současné době využíváno několika různých metod barvení proteinů. Mezi nejpoužívanější patří barvení pomocí barviva Commassie Brilliant Blue (CBB), barvení stříbrem a barvení fluorescenčními barvivy. Zde je třeba poznamenat, že žádná z dnes používaných detekčních metod nesplňuje zároveň všechny požadavky, které jsou na tyto metody kladeny, tedy zachování možnosti MS analýzy peptidů při dosažení co možná nejnižších detekčních limitů, dosažení stejnoměrné detekce různých proteinů, krátké doby detekce a nízkých nákladů.

V současné proteomické praxi je nejpoužívanější metodou barvení proteinů pomocí CBB. Původní metoda publikovaná v roce 1963 Fazekasem de St. Groth a kol.<sup>67</sup> využívala k detekci dvou různých modifikací CBB: Coomassie R-250 (červený odstín) a Coomassie G-250 (zelený odstín), vážících se na aminoskupiny proteinů pomocí elektrostatických a hydrofobních interakcí. Nevýhodou této metody byla nutnost odbarvení pozadí gelu. Některé proteiny, např. kolagen, se totiž odbarvovaly dříve než gel a nemohly tak být detekovány<sup>68</sup>. Další variantou byla metoda koloidního CBB G-250 publikovaná Diezelem a kol.<sup>69</sup> Tato metoda využívala skutečnosti, že barvivo CBB G-250 rozpuštěné ve 12,5 % kyselině trichloroctové (TCA) tvoří koloidní roztok. Zabarvení gelového pozadí se díky tomuto způsobu barvení výrazně snížilo. Široce zaměřená studie Neuhoffa a kol.<sup>70</sup>, zkoumající více než 600 různých variant detekce koloidním CBB G-250, dala vzniknout protokolu, který je základem většiny dnešních metod a komerčně dostupných souprav používaných při detekci tohoto typu. Barvení proteinů na čistém pozadí gelu koloidním CBB G-250, se děje v prostředí kyseliny fosforečné za přítomnosti síranu amonného. Během barvení se v roztoku ustavuje rovnováha mezi koloidními částicemi a volným barvivem. Volné molekuly barviva pronikají gelem a barví proteiny, zatímco koloidní částice zůstávají vně gelu, čímž se zabrání obarvení gelového pozadí. Tento protokol byl později upraven ve smyslu posunutí rovnováhy na stranu volných částic barviva přidávkem metanolu do barvicího roztoku. Tím se zkrátila celková doba barvení<sup>71</sup>. Neuhofova metoda byla v dalších letech modifikována, většinou ve smyslu zkrácení času



barvení, a publikována v pracích zabývajících se tvorbou proteinových map<sup>72, 73, 74, 75</sup> nebo pozorováním změn úrovně exprese proteinů<sup>76</sup>. Zatím nejcitlivější variantou Neuhoffova protokolu je metoda barvení pomocí tzv. Blue Silver Commassie G-250<sup>77</sup>, dosahující detekčního limitu (v případě BSA) až 1 ng. Oproti původnímu protokolu tato metoda užívá barviva ve vyšší koncentraci (0,12% oproti 0,1%) a také vyšší koncentrace kyseliny fosforečné (10% oproti 2%). Snížení pH barvicího roztoku (z 1,2 na 0,5) má za následek protonaci všech disociovaných skupin, kyseliny asparagové a glutamové a také karboxylového C-konce proteinu. Tím dojde ke zrušení náboje přítomného na proteinu, což vede k nárůstu hydrofobních interakcí barviva s aromatickými a hydrofobními zbytky aminokyselin proteinu. V takto kyselém prostředí může jedna molekula BSA vázat až 100 molekul barviva CBB G-250. Přesto, že jde o nejcitlivější variantu barvení pomocí CBB, nedosahuje zatím stále citlivosti detekce, které je možno dosáhnout barvením stříbrem<sup>78</sup>.

První práce popisující barvení proteinů separovaných SDS-PAGE pomocí stříbra byly publikovány již na konci 70. let minulého století Merrilem a kol.<sup>79, 80</sup>. V současnosti existuje více než 100 různých variant provedení tohoto typu barvení, které je v principu možné rozdělit do tří skupin, a to na tzv. rychlé koloidní barvicí metody, metody využívající dusičnan stříbrný (kyselé barvení) a metody využívající diaminový komplex dusičnanu stříbrného (zásadité barvení).

Rychlé koloidní barvení stříbrem za přítomnosti kyseliny wolframovokřemičité je metoda založená na prvním protokolu, využívajícím stříbro pro barvení proteinů separovaných v agarózovém gelu<sup>81</sup>. Metoda je podstatně méně citlivá, než barvení dusičnanem stříbrným nebo jeho diaminovým komplexem, její výhodou je však kompatibilita s MS.

Další dvě metody, barvení pomocí dusičnanu stříbrného a jeho diaminového komplexu, mají společné čtyři základní kroky:

- 1) Fixace proteinů – slouží k zafixování proteinů v gelu a odstranění nečistot
- 2) Zcitlivění – zvýší citlivost a také i kvalitu obrazu proteinů
- 3) Impregnaci stříbrem pomocí dusičnanu stříbrného nebo jeho diaminového komplexu
- 4) Vyvíjení obarvených proteinů

Proces barvení proteinů dusičnanem stříbrným zahrnuje fixaci proteinů 40 % ethanolem a 10% ACA. Další krok kombinuje navázání glutaraldehydu na proteiny a zcitlivění thiosíranem sodným v přítomnosti octanu sodného. Po několikanásobném opláchnutí v destilované vodě se gel vloží do 0,25% roztoku dusičnanu sodného, obsahujícího malé množství formaldehydu. Vyvíjení se provádí pomocí formaldehydu v zásaditém prostředí, v roztoku obsahujícím uhličitán sodný. Reakce se ukončí umístěním gelu do zředěné ACA nebo ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA). V praxi poskytují nejlepší výsledky a zároveň dosahují nejnižší meze detekce, tj. méně než 1 ng proteinu na skvrnu či pás, metody podle Heukeshovena a Dernicka<sup>82</sup> a Bluma a kol.<sup>83</sup>. Co se týče barvení proteinů diaminovým

komplexem dusičnanu stříbrného, metodou původně publikovanou Eshenbruchem a Bürkem<sup>84</sup>, je fixační krok spojen se zcitlivěním, v tomto případě pomocí naftalen disulfonátu. Vyvíjení formaldehydem probíhá v prostředí kyseliny citronové a je ukončeno přidavkem ACA nebo ethanolinem<sup>68</sup>.

Hlavním problémem metod založených na barvení proteinů stříbrem je vysoká míra interference při MS analýze. Práce publikované na toto téma připisují interference na vrub formaldehydu a glutaraldehydu, způsobujícím kovalentní modifikace proteinů, ale také samotným stříbrným iontům<sup>85</sup>. Proto byla navržena metoda barvení stříbrem, která nepoužívá glutaraldehyd při zcitlivování a formaldehyd v barvicím roztoku dusičnanu stříbrného<sup>86</sup>. Stejně tak byly publikovány práce využívající odbarvení stříbra, např. pomocí kyanoželezitanu<sup>87</sup> nebo peroxidu vodíku<sup>88</sup>. Zatím poslední novinkou je MS kompatibilní varianta barvení stříbrem, tzv. Sweet silver<sup>89</sup>, která nahrazuje formaldehyd ve vyvíjecím roztoku redukujícím cukrem, rozpuštěným v borátovém pufru. Tato metoda vykazuje oproti výše uvedeným variantám zatím nejlepší výsledky co se týče meze detekce a pokrytí sekvence při analýze MS.

Poslední výše zmíněnou skupinou jsou metody detekce proteinů založené na barvení fluorescenčními barvivy. Od uvedení prvního barvení proteinů pomocí Nilské Červeně<sup>90</sup> v roce 1994 byla vyvinuta celá řada fluorescenčních barviv, lišících se navzájem svými vlastnostmi a citlivostí, např. barviva Syphro<sup>®</sup> (Syphro<sup>®</sup> Red, Orange, Tangerine a Ruby)<sup>91, 92</sup>. Citlivost Syphro<sup>®</sup> Red, Orange, Tangerine je srovnatelná s citlivostí dosahovanou CBB, Syphro<sup>®</sup> Ruby je schopné detekovat až 1 ng proteinu. Rabbilloud a kol. publikovali v roce 2001 barvení pomocí komplexu ruthenia<sup>93</sup>. Ještě citlivější metodou barvení než pomocí Syphro<sup>®</sup> Ruby je detekce pomocí barviva Deep Purple<sup>94</sup>. Toto barvivo obsahuje fluorofor „epicoccon“, získaný z řasy *Epicocconum nigrus*, a je schopné detekce až stovek pikogramů.

Fluorescenční barvení proteinů představuje optimální metodu kombinující vysokou citlivost a zároveň možnost kvantifikace v širokém lineárním dynamickém rozsahu (až čtyři řády). V porovnání s barvivy CBB a stříbrem jsou však fluorescenční barviva řádově dražší. K vizualizaci obarvených proteinových pásů či skvrn je navíc nutné použít fluorescenční skener<sup>68</sup>.

Kromě tří výše uvedených nejrozšířenějších typů barvení proteinů existují ještě další techniky detekce, jako je například negativní zinek-imidazolové SDS barvení, barvení chloridem měďnatým atd. Existují také různé další typy fluorescenčních barviv, jako barviva CyDyes, umožňující provedení tzv. DIGE<sup>28</sup>. Detailní popis těchto metod je nad rámec této práce. Detekční limity jednotlivých metod barvení proteinů a průměrné inkubační časy shrnuje tabulka č.1.

Barvivo	Inkubační doba (hod.)	Detekční limit (ng proteinu)
Koloidní Coomassie (G-250)	15	1 – 16
Coomassie R250	12 – 48	30 – 100
Stříbro	0,25 – 3	0,5
Fluorescentní barviva:		
SyproRuby	5,5 – 12	0,5 – 5
Deep Purple	3,5	0,1
Dige	0,75	0,025

Tab. 1 Inkubační doby a detekční limity nepoužívanějších barviv.<sup>95</sup>

#### 2.4 Vyřezání proteinových pásů a odbarvení proteinů

Jak bylo popsáno v předchozí kapitole, existují různé metody barvení proteinů v polyakrylamidovém gelu, kompatibilní více či méně s MS. Například barvivo CBB se váže na proteiny pomocí iontových a hydrofobních interakcí (viz výše). Tyto interakce sulfonových skupin barviva s bazickými zbytky aminokyselin argininu a lysinu znemožňují enzymatické štěpení proteinu trypsinem, štěpící protein právě za těmito aminokyselinami. Proto je nutné detekované proteiny odbarvit. Tímto krokem je také možné odstranit detergenty (SDS) z procesu enzymatického nebo chemického štěpení proteinu a vlastní MS analýzy, při níž se velice snadno ionizují a analýzu znesnadňují<sup>96</sup>. Konkrétní provedení odbarvení se liší v závislosti na použité metodě barvení.

Pás proteinu, vizualizovaný některou z detekčních metod, musí být nejprve vyříznut z polyakrylamidového gelu. To lze provést ručně (pomocí skalpelu) ve flowboxu, nebo lze využít speciálního robota. U některých metod barvení proteinů, např. CBB, je nutné odbarvení gelového pozadí. Pásky separovaných proteinů jsou pak lépe vidět a snadněji se vyřezávají. Pás gelu s proteinem, který byl vyříznut, se dále pomocí skalpelu rozdělí na kousky o velikosti 1-2 mm<sup>3</sup>. To je důležité zejména z důvodů dostatečné saturace gelových kousků odbarvovacím, ale především štěpicím roztokem trypsinu, při proceduře enzymatického štěpení. Pokud jsou proteiny barveny pomocí koloidního CBB G-250, je k odbarvení gelových kousků použito roztoku uhličitanu amonného v acetonitrilu v poměru 1:1<sup>77</sup>. Možnosti a způsoby odbarvení stříbrem barvených gelů byly již zmíněny v předchozí kapitole<sup>86, 87</sup>.

#### 2.5 Redukce a alkylace proteinů v gelu

Jednou z hlavních podmínek, nutných k pozitivní identifikaci proteinu, je získání kvalitního fondu peptidů, vzniklých štěpením proteinu chemicky nebo pomocí některého z

proteolytických enzymů. Z tohoto důvodu je nutné stericky zpřístupnit co možná nejvíce míst, na kterých štěpení proteinu probíhá. V předchozí kapitole byla zmíněna nutnost odstranění barviva, které tento proces také znesnadňuje. Dalším krokem, který se před vlastním štěpením proteinu provádí, je rozštěpení disulfidových intermolekulárních a intramolekulárních vazeb proteinu. Tím se rozruší jeho terciální struktura – dojde k tzv. rozbalení proteinu a zároveň ke zvýšení efektivity štěpení. Volné sulfhydrylové skupiny jsou však velice reaktivní a snadno se reoxidují. Z toho důvodu je nutné tyto skupiny preventivně zablokovat, nejčastěji vnesením alkylového zbytku – tzv. alkyací<sup>97</sup>.

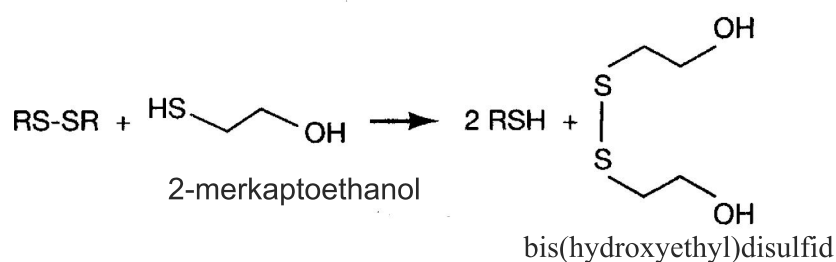
Je také nutné uvést, že význam redukce disulfidových vazeb pro efektivní štěpení proteinu na peptidy a následné alkylace sulfhydrylových skupin, tak jak byl popsán výše, se v jistém ohledu vztahuje také na proteiny, které disulfidové vazby přímo neobsahují, ale mají ve svém řetězci volné thiolové skupiny, které se mohou během analýzy oxidovat a nepodléhají tak procesu alkylace. Vzhledem ke skutečnosti, že reoxidace sulfhydrylových skupin vzdušným kyslíkem probíhá prakticky okamžitě po odstranění redukčního činidla, je alkylace prováděna buďto v jednom kroku společně s redukcí anebo ve dvou krocích, bezprostředně po redukcí v jedné reakční směsi<sup>63</sup>.

Štěpení kovalentní disulfidové vazby cystinu je možné provést několika způsoby, které zahrnují oxidaci, redukcí a nukleofilní substituci. V počátcích sekvenční analýzy proteinů bylo často využíváno oxidativního štěpení disulfidové vazby kyselinou permravenčí<sup>98</sup>. Jedná se o jednostupňovou reakci, která kvantitativně přeměňuje cystin na kyselinu cysteovou a zároveň methionin na jeho sulfonový derivát. Nevýhodou této metody je možná modifikace aminokyselin sousedících s cysteinem (tryptofan) a také možné štěpení některých peptidových vazeb (Asp-Pro) proteinu.

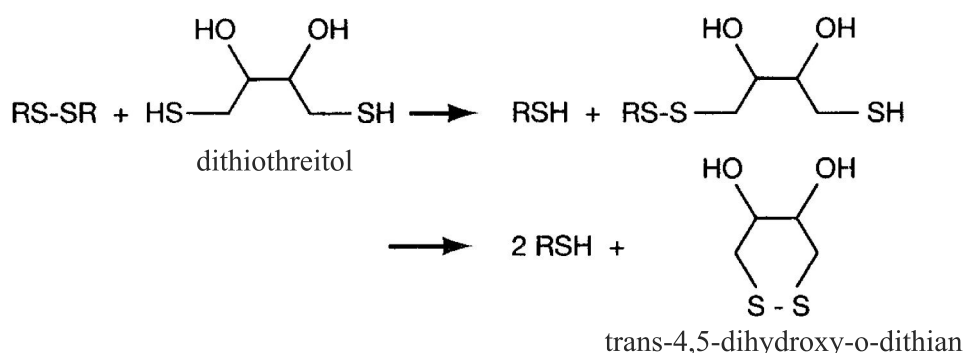
Zdaleka nejpoužívanější metodou štěpení disulfidové vazby je redukční štěpení. Obvykle se provádí v nepřítomnosti kyslíku, v mírně alkalickém pH (~pH 8), za zvýšené teploty (56°C-95°C). Klasický postup využívá k redukcí disulfidových vazeb některého z níže uvedených, nízkomolárních thiolových reductantů, ve sto až tisícinásobném molárním přebytku. Mezi tyto reductanty patří 2-merkptoethanol (MeSH), dithiothreitol (DTT; 2,3-dihydroxy-1,4-dithiolbutan) a jeho izomer dithioerythritol (DTE). Dalšími činidly na bázi trialkylfosfinů, reagující mechanismem nukleofilní substituce jsou tributylfosfin (TBP) a tris(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP).

Přestože byl pro strukturální analýzu proteinů v minulosti tradičně využíván 2-merkptoethanol (MeSH), je po svém objevu v roce 1964 v současnosti nejpoužívanějším redukčním činidlem DTT (jinak též Clelandovo činidlo)<sup>63, 99</sup>. Rovnováha reakce DTT s disulfidovou vazbou proteinu je posunuta značně doprava, tedy směrem k redukované formě cysteinu, a to díky tvorbě termodynamicky stabilní šestičlené cyklické oxidované formy DTT, trans-4,5-dihydroxy-o-dithianu (obsahuje dvojnou vazbu), jejíž tvorba je z energetického

hlediska výhodnější, než tvorba smíšeného disulfidu. Díky nízkému redoxnímu potenciálu (0,33 V při pH = 7) je schopný redukovat disulfidovou vazbu při pH = 8 během několika minut a to v přibližně stonásobném molárním nadbytku. Rovnovážná konstanta redukce disulfidové vazby DTT při pH = 7 byla stanovena na  $1,3 \cdot 10^4$ <sup>99</sup>. DTT je schopné redukce disulfidových vazeb pouze ve formě aniontu. Podíl zastoupené disociované aniontové formy DTT<sup>-</sup> závisí na pH redukčního pufru. Hodnota pK<sub>a</sub> pro DTT je rovna 9,3. Klasicky používané redukční pufr (např. Læmliho pufr) má však pH = 6,8, následkem čehož nebude aniontová forma DTT<sup>-</sup> zastoupena v dostatečném množství a redukce nebude probíhat v dostatečné míře<sup>100</sup>. Proto je vhodné redukci pomocí DTT provádět při vyšších hodnotách pH, např. 8,5 – 8,9<sup>101</sup>. Takto vysoké hodnoty však zvyšují riziko deamidace proteinu. Nevýhodou DTT je také jeho schopnost reagovat s alkylačními činidly, např. s iodoacetamidem (IAM), a negativně ovlivňovat výtěžek alkylace. Výhodou DTT oproti již zmiňovanému MeSH je nejen jeho vyšší redukční potenciál a tím pádem také možnost redukce s využitím nižších látkových množství, ale také vyšší rozpustnost ve vodě a absence zápachu.



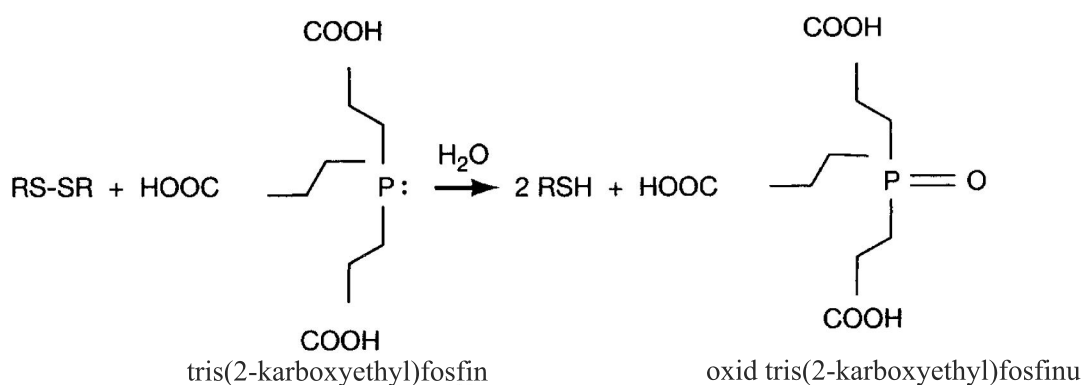
Obr. 2 Redukcí disulfidové vazby pomocí MeSH vzniká bis(hydroxyethyl) bisulfid.<sup>63</sup>



Obr. 3 Redukcí disulfidové vazby pomocí DTT vzniká trans-4,5-dihydroxy-o-dithian.<sup>63</sup>

Další skupinou redukčních činidel jsou trialkylfosfíny. Trialkyl fosfíny redukují disulfidové vazby cystinu ve vodném prostředí v širokém rozsahu pH (4,5 – 11) na thioly snadno a kvantitativně. Jedná se o reakci typu S<sub>N</sub>2. Síla vazby kyslík – fosfor činí reakci nezvratnou. Trialkylfosfíny jsou ve vodných roztocích kineticky stabilní a jsou zároveň nereaktivní vzhledem k ostatním funkčním skupinám. Jedním z trialkyl fosfinů využívaných

pro redukci disulfidových vazeb je TBP. Ve vodném prostředí štěpí tyto vazby stechiometricky (1 mol TBP : 1 mol disulfidu) a relativně rychle. Jedná se o silné redukční činidlo, které je schopné redukovat oxidovanou formu DTT. TBP byl v minulosti používán k redukci disulfidových vazeb v proteinech před 2-DE<sup>102, 103</sup>. Všeobecně ale nebyl pro tyto účely proteomiky přijat, kvůli jeho vysoké toxicitě, nepříjemnému zápachu a nízké rozpustnosti ve vodě<sup>63</sup>. Posledním výše zmíněným redukčním činidlem je (TCEP)<sup>104</sup>, který se v posledních letech stal zajímavou alternativou k výše zmíněným redukovadlům. Jeho výhodou oproti TBP je snadná rozpustnost ve vodě, absence zápachu. Oproti 2-merkptoethanolu a DTT je také mnohem efektivnějším redukčním činidlem, schopným redukce disulfidových vazeb v proteinech při nižším pH, než DTT,<sup>63, 105</sup>.



Obr. 4 Redukcí disulfidové vazby pomocí TCEP vzniká oxid tris(2-karboxyethyl)fosfin.<sup>63</sup>

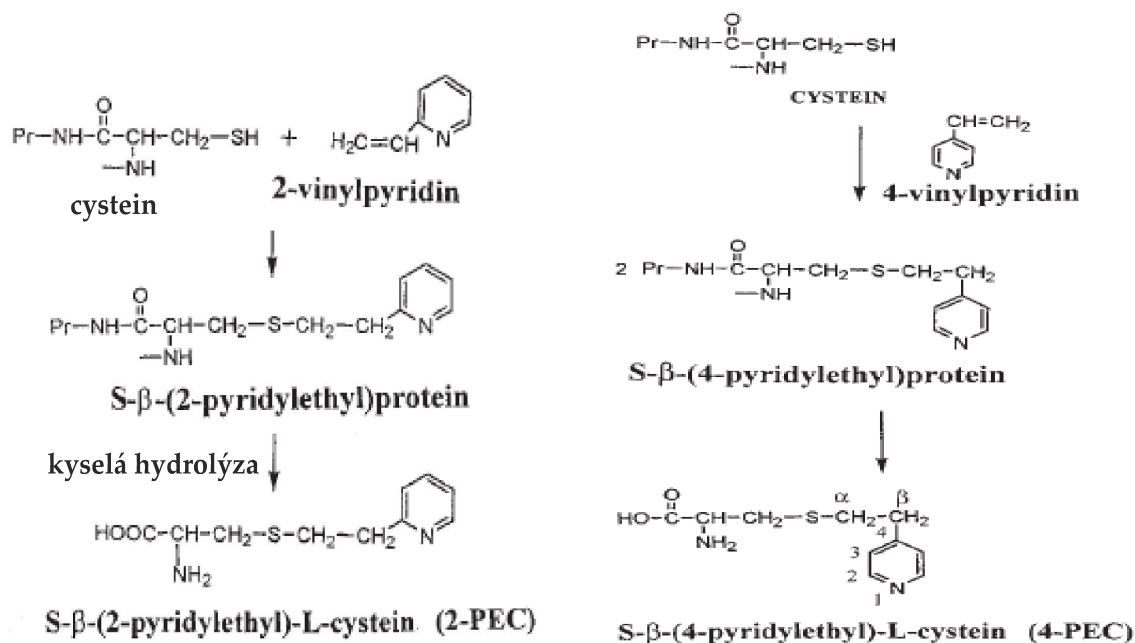
Alkylace sulfhydrylové skupiny cysteinu se nejčastěji provádí nukleofilními adičními nebo substitučními reakcemi, s thiolátovým aniontem jako nukleofilem. Nejpoužívanějšími činidly na bázi haloacetátů a haloacetamidů jsou kyselina iodoctová (IAA) a iodacetamid (IAM)<sup>106</sup>. Reakce těchto činidel probíhá reakčním mechanismem S<sub>N</sub>2 za vzniku jeho S-karboxymethylových a S-karboxamidových (cys-CAM) derivátů. Reakce probíhá bez problémů při pH 8-9 ve tmě (ve vodných roztocích tato činidla podléhají rozkladu světlem). Při nižších hodnotách pH hrozí oxidace methioninu, s vyššími hodnotami roste riziko modifikace aminoskupin. Co se týče rychlosti průběhu reakce, studie zabývající se analýzou proteinů ovčí vlny uvádí, že kompletní karboxymethylace cysteinů pomocí IAA proběhla během 10 minut<sup>107</sup>. V jiných pracích nebylo kompletní alkylace dosaženo ani po 6 hodinách<sup>108</sup>. Uvádí se, že alkylace provedená IAM probíhá v porovnání s IAA zhruba šedesátkrát rychleji<sup>109</sup>.

Dalším činidlem použitelným pro účely alkylace cysteinů je N-ethylmaleimid (NEM) S cysteinu reaguje mechanismem Michaelovy adice – reakce mezi nukleofilem (thiolátový aniont) a olefinem (maleimidový kruh). Produktem alkylace je v tomto případě poměrně stabilní S-sukcinylný cystein. Toto činidlo se v poslední době jeví jako zajímavá alternativa k IAA a IAM.

Studie srovnávající tato činidla uvádí, že pro spolehlivou alkylation 1 molu glutathionu stačí pouze 125 mol NEM oproti 300 až 1000 molárnímu přebytku při použití IAA nebo IAM. Alkylation pomocí NEM také probíhá v širším rozsahu pH (pH 4,3-7) než pomocí IAA a IAM (pH 8-9)<sup>110</sup>.

Dalším činidlem využívaným pro alkylation sulfhydrylových skupin je akrylamid, který reakcí s těmito skupinami tvoří cysteinyl-S- $\beta$ -propionamide (cys-PAM). Byly publikovány práce, které využívají alkylation akrylamidem (při pH = 8,45) jak před SDS-PAGE tak i před 2-DE<sup>111, 112</sup>. Tyto metody vycházejí ze skutečnosti, že se v některých MS spektrech peptidů, alkylovaných například IAA, vyskytují právě deriváty cysteinyl-S- $\beta$ -propionamide (cys-PAM), které jsou způsobeny reakcí cysteinů s nezpolymerizovaným akrylamidem, přítomným v polyakrylamidovém gelu. Analýza spektra, které obsahuje více modifikací cysteinu (cys-CAM) a cys-PAM), je pak velmi stížena.

Alternativou k výše zmíněným činidlům je možnost využití 2-vinylpyridinu (2-VP) nebo jeho derivátu 4-vinylpyridinu (4-VP)<sup>113</sup>. Tato činidla reagují s thiolovými skupinami za vzniku S- $\beta$ -(2-pyridylethyl)cysteinu (2-PEC) a S- $\beta$ -(4-pyridylethyl)cysteinu (4-PEC) a jsou vysoce reaktivní. Optimálních podmínek alkylation je dosaženo, pokud je provedena při neutrálním pH. Tím je zajištěna optimální reaktivita obou složek (terc. aminoskupiny 2-VP nebo 4-VP a -SH skupiny cysteinu). Vzhledem k pK<sub>A</sub> -SH skupiny cysteinu (8,3) a pK<sub>A</sub> terciální aminoskupiny 2-VP (5,3) leží hodnota pH = 7 někde uprostřed. Za těchto podmínek je alkylation řízena parciálním kladným (VP) a záporným nábojem (Cys) obou reaktantů a reakce probíhá poměrně rychle, až do úplného zalkylování všech cysteinů. Volbou neutrálního pH pro alkylation pomocí 2-VP nebo 4-VP se také zabrání možné alkylation aminokyseliny lysinu, která je při tomto pH plně protonována. 2-VP a 4-VP se ze všech alkylačních činidel zatím jeví jako nejúčinnější.



Obr. 5 Alkylation cysteinu pomocí 2-VP a 4-VP.<sup>114</sup>

## 2.6 Štěpení proteinů

Jak již bylo uvedeno v předchozích kapitolách, nejčastěji se MS analýza provádí na peptidech, vzniklých specifickým chemickým nebo enzymatickým štěpením proteinů. Volba metody štěpení závisí především na charakteru proteinového vzorku, způsobu provedení MS analýzy a také na zvolené metodě konečné identifikace. Chemickému nebo enzymatickému štěpení je možné podrobit pouze jediný protein, ale také celou směs proteinů.

Štěpení nerozseparované směsi proteinů, jinak také *štěpení v roztoku (in solution digestion)*, se využívá v případech, kdy je nutné rychle získat informace o celkovém proteinovém složení vzorku. Jednotlivé peptidy z takto získaného souboru jsou pak sekvencovány pomocí tandemové MS a identifikovány s využitím databáze. Proteiny a peptidy nejsou v tomto případě zachyceny v matici gelu a výtěžek peptidů je proto vyšší, než při štěpení v gelu. Metoda je také schopná detekce proteinů obsažených v analyzovaném vzorku ve velmi malých množstvích, které nejsou polyakrylamidovým gelem zadržovány v množství potřebném pro detekci<sup>62</sup>.

Metoda štěpení v gelu (*in-gel digestion*) byla poprvé publikována v roce 1996<sup>85</sup>. V následujících letech byla mnohokrát upravena a je v současnosti nejpoužívanější metodou štěpení proteinů separovaných 1-DE nebo 2-DE. Právě tyto separační metody poskytují mnoho důležitých informací, např. přibližné informace o molekulové hmotnosti a izoelektrickém bodu, podle kterých je možné odhadnout, který pás nebo skvrna může obsahovat námi hledaný protein. Ten je následně vyříznut, odbarven, zredukován a zalkylován a dále vhodným způsobem rozštěpen na peptidy<sup>62</sup>.

Chemické štěpení proteinů není v současnosti tak běžné, jako štěpení enzymatické. Chemické metody nachází uplatnění zejména tam, kde není z konkrétních důvodů možné provádět proteolýzu. Příkladem může být použití bromkyanu (BrCN) pro štěpení ve vodě nerozpustných nebo membránových proteinů (specifické působení činidla na zbytky methioninu). Podobně můžeme pro štěpení zbytků tryptofanu využít 3-brom-3-methyl-2-[(2-nitrofenyl)merkaptol]-3H-indolu (BNPS-skato). Poměrně šetrná je hydrolyza proteinů zředěnou kyselinou mravenčí, která působí v místě zbytků kyseliny asparagové a zároveň je dobrým rozpouštědlem pro řadu proteinů.

Proteolýza se již v rámci proteomiky stala rutinní záležitostí, neboť je komerčně dostupná celá řada enzymů, které lze volit a aplikovat na základě požadavků, kladených na výslednou peptidovou směs. Nabízí několik praktických výhod: vysokou specifitu, minimalizování vedlejších reakcí a dobrou účinnost štěpení. Důležitá je přitom optimalizace složení a pH reakčního pufru, dále poměru enzym/substrát a teploty a doby inkubace. Ze všech dostupných proteolytických enzymů (tab.2) se v proteomice nejčastěji využívá trypsin.



Trypsin (EC 3.4.21.4) je serinová endopeptidasa trávicího traktu obratlovců s mírně alkalickým optimálním pH (7-9). Specificky štěpí proteiny na místě argininu a lysinu. Poskytuje peptidy o velikosti vhodné pro MS analýzu, které mají navíc na C-konci zbytky bazických aminokyselin argininu a lysinu, což usnadňuje přijetí protonu při procesu ionizace. Pokud se provádí štěpení v polyakrylamidovém gelu, je jedním z limitujících faktorů difuze molekuly enzymu k substrátu<sup>115</sup>. Pro 12% polyakrylamidový gel, který je standardně používán k přípravě proteinového vzorku pro MS analýzu, byla odvozena zdánlivá velikost pórů 20 až 30 Å<sup>116</sup>. Molekula β-trypsinu má včetně solvatačního obalu rozměry menší (17 Å). Pro větší molekuly peptidas je difuzi bráněno ze sterických důvodů, případně je zcela znemožněna. V praxi je k dosažení optimální saturace gelu štěpicím roztokem trypsinu nutné, aby byl gelový proužek s proteiny naštipán skalpelem na kostičky o průměru cca 1x1 mm<sup>3</sup>. Ty jsou ještě před přidáním štěpicího enzymatického pufru dehydratovány acetonitrilem, čímž dojde k jejich scvrknutí. Takto připravené kostičky gelu jsou pak rehydratovány roztokem trypsinu (1,5 μM) v 50 mM uhličitanu amonném, obsahujícím vápenaté ionty, potlačující autolytické štěpení trypsinu. Délka rehydratace určuje výtěžek enzymového štěpení. Štěpení se provádí 12 h při 37 °C (je-li použit methylovaný trypsin, štěpí se 30 min při 58 °C)<sup>115</sup>. Takto připravený vzorek tryptických peptidů je následně analyzován MS.

Proteolytické enzymy běžně používané v proteomice

Enzym	Místo štěpení	Výjimka	Rozsah pH
Trypsin	C-konec R-X, K-X	X = P	7,0–9,0
Chymotrypsin	C-konec F-, Y-, W-, L-, I-, V- a M-X	X = P	7,5–8,5
Endoproteinasa Glu-C (V8-DE)	C-konec E-X, D-X	X = P	4,0–8,0
Endoproteinasa Lys-C	C-konec K-X	(X = P)	8,5–8,8
Endoproteinasa Arg-C	C-konec R-X	(X = P)	7,5–8,5
Endoproteinasa Asp-N	N-konec X-D, X-E		6,0–8,5
Elastasa	C-konec A, V, L, I, G, S		8,5
Pepsin	F, M, L, W (zvl. F-L, F-F, F-Y)		2–4
Pronase	směs endo- a exoproteinas, štěpí téměř všechny peptidové vazby		7,0–8,0 <sup>a</sup>
Subtilisin	široká specifita, pref. C-konec nenabitě aminokyseliny		7,0–11,0
Thermolysin	široká specifita (W, Y, F, I, L, V, A, M), převážně N-konec X-F, X-L		6,0–10,0

<sup>a</sup> V závislosti na povaze směsi

Tab. 2 Přehled proteolytických enzymů používaných v proteomice.<sup>115</sup>

## 2.7 MS analýza peptidů

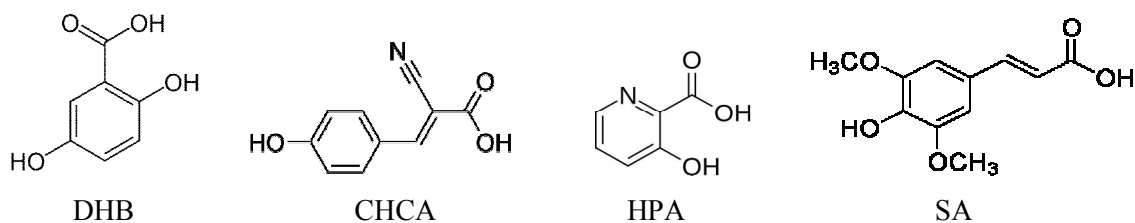
Technologie hmotnostní spektrometrie je založena na měření poměru hmoty ku náboji ( $m/z$ ) molekul. První MS experimenty se datují do konce 19. století a váží se ke jménu J.J. Tompsona<sup>117</sup>. Od těch dob hmotnostní spektrometrie doznala diametrálních změn a vylepšení. V současné době existuje více než 20 různých hmotnostních spektrometrů komerčně dostupných pro proteomické účely<sup>60</sup>.

Způsob identifikace proteinů závisí na zvolené instrumentaci a typu MS analýzy. Ta poskytuje několik druhů kvantitativně odlišných, ale vzájemně komplementárních informací (spekter) v závislosti na zvolené instrumentaci. V současnosti jsou pro potřeby proteomické MS analýzy využívány dva základní typy přístrojů, lišících se především typem ionizačního zdroje. Prvním typem jsou hmotnostní spektrometry s ionizací MALDI. Ty bývají nejčastěji spojeny s analyzátozem doby letu (MALDI-TOF). Druhým typem jsou tandemové hmotnostní spektrometry s ionizací ESI (ESI-MS/MS)<sup>118</sup>.

### 2.7.1 Ionizační zdroje

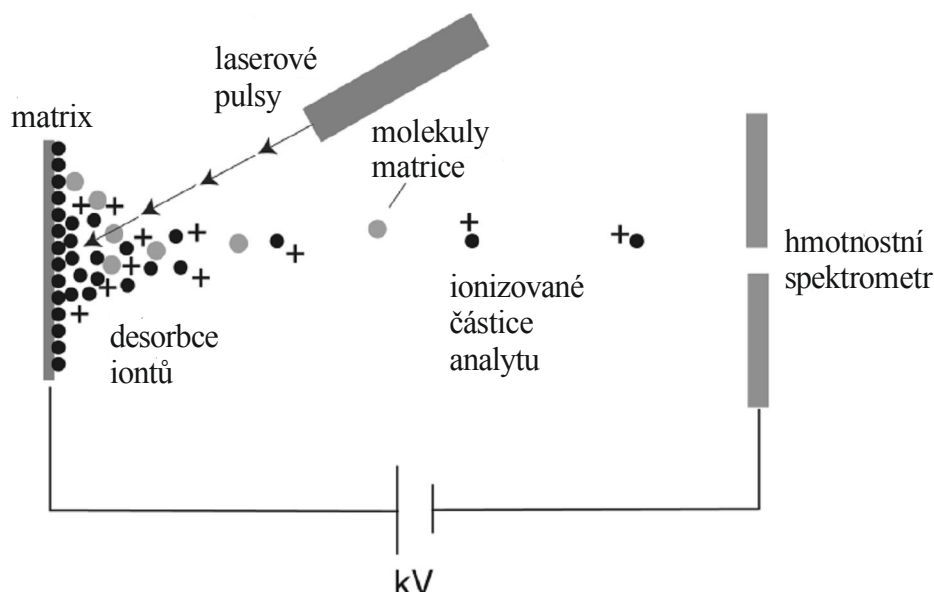
Hmotnostní spektrometrie využívá mnoha různých způsobů ionizace analytu, jako jsou například ionizace nárazem elektronu (EI), chemická ionizace (CI)<sup>119, 120, 121</sup>, bombardování rychlými ionty (FIB) nebo atomy (FAB)<sup>31</sup>, ionizace polem (FD)<sup>122</sup>, ionizace elektrosprejem (ESI) a ionizace pomocí laseru za přítomnosti matrice (MALDI), z nichž jsou pro účely proteomické analýzy nejčastěji používány poslední dva jmenované zdroje.

Technika ionizace MALDI byla poprvé popsána v roce 1987 (K. Tanaka<sup>39</sup>; Karas a Hillenkamp<sup>37, 38</sup>). Společně s ionizací ESI patří k nejdůležitějším metodám ionizace netěkavých, vysokomolekulárních sloučenin, jako jsou proteiny, peptidy, oligonukleotidy, oligosacharidy a syntetické polymery s vysokými molekulovými hmotnostmi<sup>123</sup>. Na přístrojích s měkkou ionizací typu MALDI probíhá analýza peptidů tím způsobem, že se analyt nejdříve smíchá s matricí, obsahující organické molekuly, které jsou schopné absorbovat světelnou energii určité vlnové délky. Jako matrice se používá kyselina  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová (CHCA), vhodná pro peptidy menší než 10 kDa, 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová kys. (sinapová kyselina, SA) pro proteiny větší než 10 kDa, 2,5-dihydroxybenzoová kyselina (DHB) pro neutrální sacharidy, 3-hydroxypikolinová kys. (HPA) pro oligonukleotidy. Výběrem vhodné matrice je možné ovlivnit nejenom vznik iontů, ale také rozsah jejich PSD fragmentace<sup>124</sup>. Tato směs se pak nanese na ocelový MALDI terčik, kde dojde ke kokrytalizaci analytu s matricí.



Obr. 6 Strukturální vzorce některých organických látek, využívaných jako MALDI matrice.

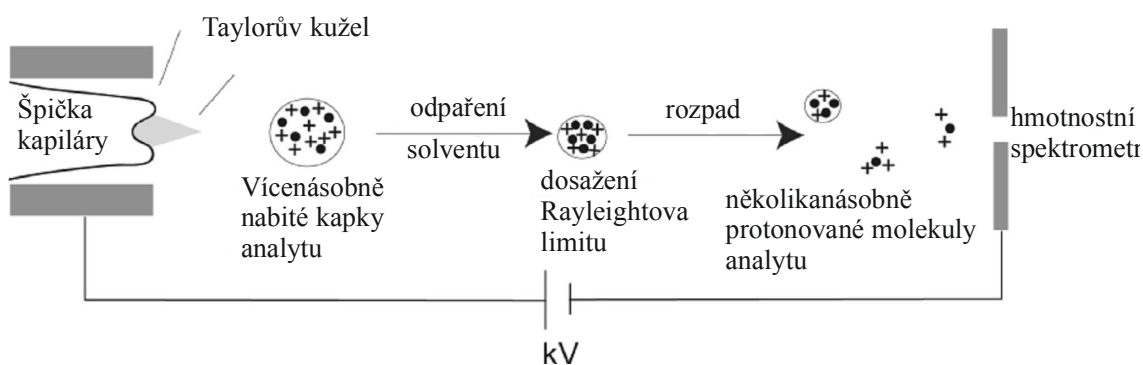
Terčik se vloží do evakuovaného MALDI ionizačního zdroje. Zde je pomocí laserových pulsů (nejčastěji používaný je dusíkový laser o vlnové délce 337 nm) dosaženo vibrační excitace molekul matrice a uvolnění molekul analytu. Matrice se odpaří, molekuly analytu se přijetím protonu matrice ionizují. Obecně lze říci, že se tímto způsobem tvoří většinou ionty typu  $[M + H]^+$ , nesoucí jeden kladný náboj. Tyto částice pak putují do hmotnostního spektrometru, kde jsou podrobeny MS analýze<sup>60</sup>. (Obr.3)



Obr. 7 Schéma ionizace peptidového vzorku pomocí MALDI.<sup>60</sup>

Druhým typem hmotnostních spektrometrů používaných v proteomice jsou přístroje s ionizací ESI. První studie zaměřená na využití elektrosreje jako potenciálního ionizačního zdroje byla publikována v roce 1968 Dolem a kol.<sup>125</sup>. Technika byla znovu zkoumána v roce 1984 Yamashitou a Fennem<sup>126</sup> a byla zaměřena na ionizaci menších biomolekul. Meng a kol.<sup>127</sup> v roce 1988 potvrdili účinnost této metody při analýze proteinů. V roce 1996 byla publikována nová verze ESI, tzv. NanoESI, využívající nižšího průtoku kapalného vzorku. Tato technika je v současnosti nejpoužívanějším typem ionizace vzorku pro LC/MS a LC/MS-MS analýzu komplexních proteinových směsí<sup>123</sup>.

Analyt je do ionizačního zdroje přiváděn v kapalně formě za atmosferického tlaku. Protéká jehlou, na kterou je vloženo vysoké elektrické napětí (1-6 kV). Elektrický potenciál, který existuje mezi jehlou a vstupní štěrbinou hmotnostního analyzátoru, způsobuje akumulaci náboje na kapkách vystupujících ze špičky jehly. Díky elektrostatické repulzi se tyto kapky rozpadají na menší a vzniká tak jemný sprej kapek s velkým povrchovým nábojem. Tento sprej je vystaven toku předehřátého plynu, díky kterému je solvent odpařován. Tím dochází ke zmenšování nabitých kapek. To má za následek růst jejich povrchového náboje. Při dosažení kritické hodnoty náboje, tzv. Rayleighova limitu, kapka exploduje na menší částice s menším nábojem. Tento proces se opakuje do té doby, než se odpaří veškerý solvent a zůstanou samotné, nabité molekuly analytu, které putují dále do hmotnostního analyzátoru. Protože je vzorek peptidů do zařízení tohoto typu zaváděn v kapalném stavu za atmosferického tlaku, mohou být tyto přístroje přímo (on-line) propojeny se separačními systémy, jako je např. kapalinová chromatografie (LC)<sup>60</sup>.



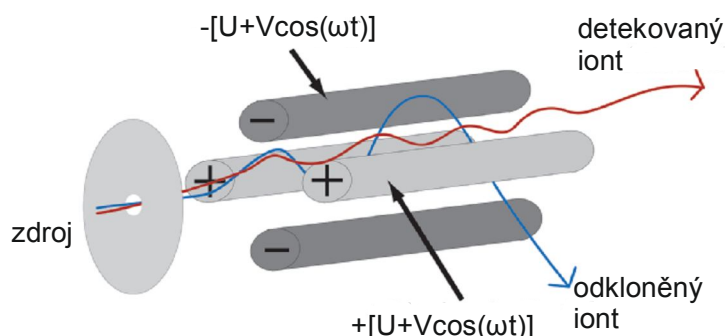
Obr. 8 Schema ionizace peptidového vzorku pomocí ESI.<sup>60</sup>

### 2.7.2 Hmotnostní analyzátoary

Po více než jedno století byly nejoblíbenějšími hmotnostními analyzátoary, používanými v proteomice pro MS analýzu, magnetické a elektrostatické sektorové analyzátoary. S přechodem od ionizačních zdrojů typu EI a FAB k novým ionizačním zdrojům (ESI a MALDI) v devadesátých letech, došlo také k nahrazení sektorových analyzátoarů novými typy hmotnostních analyzátoarů, jako jsou kvadrupól (Q), analyzátoar doby letu (TOF), iontová past (IT) a iontový cyklotronový rezonanční analyzátoar s fourierovou transformací (FT-ICR).

*Kvadrupólový hmotnostní analyzátoar* se skládá ze čtyř paralelních, symetricky uspořádaných kovových tyčí. Jeden pár protilehlých tyčí má pozitivní elektrický potenciál  $+ [U + V \cos(\omega t)]$ , zatímco zbývající dvě protilehlé tyče mají potenciál negativní  $- [U + V \cos(\omega t)]$ . Při průchodu pole ionty oscilují podél centrální osy tyčí. Pro určité hodnoty  $U, V$  a  $\omega$  se pak do resonance dostávají pouze ionty určité hodnoty  $m/z$  a ty pak putují po přímé trajektorii skrze

kvadrupól do detektoru. Trajektorie všech ostatních iontů nejsou polem stabilizovány, jsou vychýleny mimo detektor a dále zachyceny na tyčích. Kvadrupól je tedy vlastně jakýmsi hmotnostním filtrem. Aby bylo získáno celé spektrum, je třeba při analýze (průchodu) vzorku průběžně měnit napětí elektromagnetického pole.



Obr. 9 Kvadrupól. V závislosti na vloženém napětí jsou detekovány ionty o určité hodnotě  $m/z$ .<sup>60</sup>

*Iontová past* je typ hmotnostního analyzátoru, který je schopen na jistou dobu zachytit a zadržet nabitě molekuly analytu. Ionty o určité hodnotě  $m/z$  jsou po jistou dobu zadržovány v místě s určitým elektrickým potenciálem. Dalším typem iontové pasti, avšak s jinou geometrií je lineární iontová past. Tyto hmotnostní analyzátoři jsou podobné kvadrupólovým analyzátorům, ale elektromagnetické signály jsou navrženy k zadržování iontů v prostoru pravoúhlého tvaru. Současné používané přístroje mají vysokou kapacitu skenovat hodnoty  $m/z$  při vysokých rychlostech.

*Analyzátor doby letu (TOF)* měří  $m/z$  iontů urychlených v elektrickém poli, procházejících evakuovanou trubicí k detektoru. Všem iontům je ve zdroji uděleno stejné množství kinetické energie. Jejich rychlost je pak funkcí poměru jejich hmoty a náboje. Čas potřebný pro překonání vzdálenosti od zdroje k detektoru závisí na jejich hodnotách  $m/z$ . Trubice, ve kterých probíhá měření doby letu, jsou v moderních přístrojích s vysokým rozlišením vybaveny tzv. reflektorem. Reflektor využívá elektrického pole ke změně trajektorie letu iontů při jejich cestě k prvnímu detektoru (na konci první trubice). Ionty jsou pak vyslány po mírně odlišných trajektoriích ke druhému detektoru. Ještě vyššího rozlišení lze dosáhnout využitím kombinace reflektoru s metodou zpožděné extrakce (DE). Tato metoda umožňuje sjednotit počáteční rychlost iontů stejné hmoty při vstupu do TOF.

*FT-ICR hmotnostní analyzátor* umožňuje akumulovat a zadržovat ionty po dobu až několika minut. Tento typ hmotnostního analyzátoru obsahuje celou ve tvaru krychle, na kterou působí silné magnetické pole. Ionty analytu rotují s frekvencemi odpovídajícími jejich  $m/z$ . Změnami elektrického pole jsou vyvolány a měřeny změny rotačních frekvencí iontů analytu a s použitím Fourierovy transformace převedeny na hodnoty  $m/z$ .<sup>60</sup>

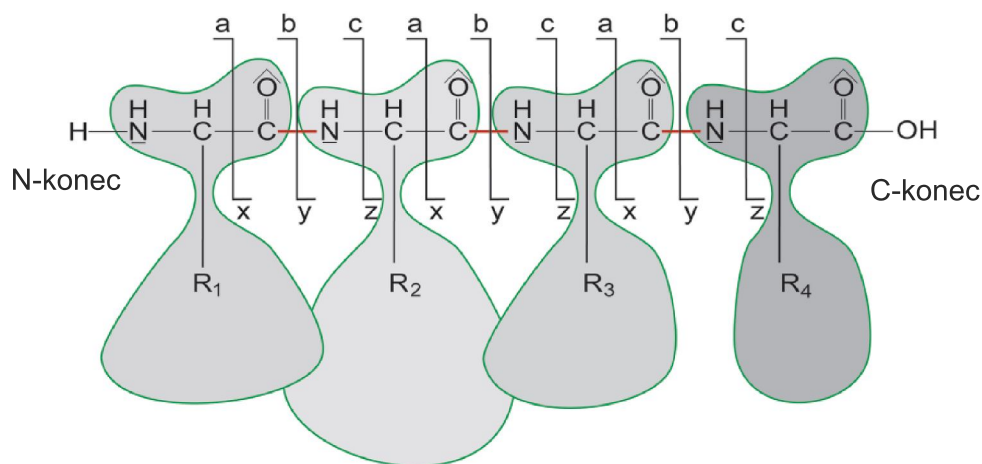
## 2.8 Způsoby identifikace proteinu pomocí MS dat

Existuje několik způsobů identifikace neznámého proteinu s využitím dat, které poskytuje MS analýza peptidů, získaných chemickým nebo enzymatickým štěpením proteinů. Metodologie identifikace proteinů pomocí databáze je založena buď na principu tzv. map molekulových hmotností peptidů (PMF) nebo na principu identifikace úplné nebo částečné sekvence, tzv. sequence tag. Tyto přístupy vycházejí ze srovnávání experimentálně získaných dat s daty předpověděnými, generovanými takzvaným *in-silico* (v počítači) teoretickým štěpením všech proteinů přítomných v databázi. V prvním případě jde o srovnání experimentálně získaného souboru molekulových hmotností peptidů (PMF) nebo souboru molekulových hmotností fragmentových iontů, vznikajících z prekurzorového iontu s příslušnými předpověděnými soubory. V případě druhém se pak srovnává experimentálně zjištěná úplná nebo částečně interpretovaná aminokyselinová sekvence s jejich předpověďmi<sup>115</sup>.

Metoda PMF<sup>42, 43, 44, 45, 46</sup> je v současnosti využívána pro rychlou identifikaci jednotlivých proteinů nebo méně často jednoduchých proteinových směsí. Identifikace pomocí PMF je většinou spojena s přístroji typu MALDI-TOF. Ty jsou schopny s vysokou přesností měřit hmotnost peptidů, vzniklých enzymatickým nebo chemickým štěpením. Experimentálně získané hmotnosti každého peptidu jsou srovnávány s teoreticky předpovězenými hmotnostmi peptidů, vzniklých *in silico* štěpením každého proteinu v prohledávané databázi<sup>123</sup>. Míra spolehlivosti správné identifikace proteinu je hodnocena některým z řady skórovacích algoritmů, především podle počtu shodujících se peptidů (jejich hmotností). Počítá se tzv. skóre, přičemž platí, že čím je počet shodných peptidů vyšší, tím vyšší je skóre. Existuje mnoho algoritmů využívajících různých skórovacích funkcí. Kromě starších algoritmů jako např. FragFit<sup>44</sup>, PeptideSearch<sup>49</sup> a PepFrag<sup>128</sup>, využívajících k výpočtu skóre počet shodných experimentálních a teoretických hmotností peptidů, existují sofistikovanější algoritmy, např. MASCOT<sup>129</sup>, které hodnotí navíc také procentuální pokrytí sekvence proteinu a jsou schopny vypočítat stupeň spolehlivosti identifikace<sup>60</sup>. Při vyhledávání může být brána v úvahu také skutečnost, že větší peptidy se v databázi vyskytují méně často a nalezená shoda by měla v takovém případě mít při hodnocení spolehlivosti identifikace větší váhu. Po nalezení shody je provedeno další hledání, které má za úkol porovnat zbývající peptidy se sekvencí z databáze, pro kterou byla nalezena původní shoda, s ohledem na možnou přítomnost posttranslačních modifikací. Charakterizace proteinů pomocí PMF má několik omezení. Pokud se vyhledávání provádí proti velkým databázím, může dojít k náhodným shodám s mnoha různými proteiny. V případě velmi malých nebo velkých proteinů nemusí být získané PMF vhodné pro vyhledávání v databázi. Štěpení malých proteinů totiž často neposkytuje dostatečné množství peptidů pro spolehlivou identifikaci. Pokud jde o velké proteiny, množství předpovězených (teoretických) peptidů je tak velké, že se jeho velká část může shodovat s jakýmkoli proteinem.

V případě, že hledaný protein není uvedený v prohledávané databázi, ale je nalezena shoda s jeho homologem, je možné k pozitivní identifikaci přispět například dodatečným uvedením informace o původu druhu nebo tkáně, ze které protein pochází.

Databáze mohou být prohledávány také s pomocí dat (spekter), které poskytuje tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS)<sup>123</sup>. Principem MS/MS analýzy je fragmentace prekurzorových iontů, tzv. rodičovských iontů, např. procesem kolizně indukované disociace (CID) na menší fragmentové ionty, tzv. dceřiné ionty. Peptidový prekurzorový iont může být vícenásobně nabitý, ionty fragmentové nesou ve většině případů jeden kladný náboj. Počet píků obsažených ve MS/MS spektru se pohybuje od desítek do několika stovek v závislosti na mnoha faktorech, jako je například délka prekurzorového iontu, kvalita fragmentace, typ hmotnostního spektrometru nebo volba parametrů detekce píků v hrubém spektru. Interpretace těchto spekter není vždy snadnou záležitostí, vzhledem k možnému vzniku mnoha typů fragmentových iontů (obr.10).



Obr.10 Fragmentace tetrapeptidu s odpovídající symbolikou podle Biemann (1990). Pokud se štěpení peptidu týká amidových vazeb, vznikají fragmentové ionty typu b- (náboj je lokalizován na N-konci) nebo y- (náboj je lokalizován na C-konci). Po fragmentaci je detekována pouze část s nábojem. Fragmentové b-ionty a y-ionty mohou tvořit „žebříky“ a rozdíly jejich hmotností pak poskytují informaci o sekvenci peptidu. Další typy fragmentací se týkají ostatních vazeb peptidového skeletu. Tímto způsobem vznikají ionty typu a- a c- nebo x- a z- podle toho, jestli tyto ionty obsahují N-konec nebo C-konec. Navíc, pokud je kolizní energie vysoká (kolem 1 keV), mohou vznikat ještě další typy iontů, vnitřní fragmentové ionty, (vznikají rozštěpením dvou peptidových vazeb) stejně tak jako specifické ionty postranních řetězců (označené d-, v-, a w-, nezobrazeno), které se tvoří při ztrátě postranních řetězců aminokyselin.<sup>60</sup>

Identifikovat protein pomocí fragmentačních MS/MS dat lze několika způsoby. Metoda identifikace proteinu známá jako *Peptide sequence tag*<sup>49</sup> využívá skutečnosti, že prakticky

každé fragmentační spektrum peptidu obsahuje krátkou sekvenci fragmentových iontů, které obsahují informaci o sekvenci krátkého úseku peptidu. Tato částečná sekvence rozděluje peptid na tři části, kde druhá část je částečně interpretovaná sekvence peptidu a první a třetí část jsou zbývající peptidové fragmenty. Konstrukce  $m_1\text{TAG}m_3$  se nazývá peptidový sekvenční úsek (peptide sequence tag), kde  $m_1$  a  $m_3$  jsou molekulové hmotnosti prvního a koncového fragmentového iontu, na kterém začíná a končí interpretovaná krátká sekvence (TAG). Peptidový sekvenční úsek spolu s molekulovou hmotností prekurzorového iontu poskytuje specifickou informaci o analyzovaném peptidu. Proteinová databáze je pak prohledávána s použitím této specifické informace. Každý peptid, který odpovídá specificitě enzymu a molekulové hmotnosti analyzovaného peptidu, je testován na přítomnost identifikovaného úseku na pozici dané údaji  $m_1$  a  $m_3$ . Pro jednoznačnou identifikaci proteinu je většinou postačující, je-li částečně interpretovaná aminokyselinová sekvence delší než dvě aminokyseliny.

Jiný způsob identifikace proteinu pomocí databázového vyhledávání využívá vzájemné korelace mezi experimentálním a teoretickým fragmentačním spektrem, vytvořeným ze sekvence peptidu přítomného v databázi. Peptidy jsou ohodnoceny skórovacím algoritmem na základě součtu intenzit iontů, souvislosti iontů v identifikované sekvenci a podílu identifikovaných fragmentových iontů. Pro peptidy s nejvyšším skóre jsou po prvním kole vyhledávání vytvořena teoretická fragmentační spektra, která jsou pak vzájemně korelována s experimentálním fragmentačním spektrem pomocí rychlé Fourierovy transformace. Výsledné skóre popisuje, do jaké míry je experimentální spektrum pro určitou peptidovou sekvenci podobné spektru odvozenému teoreticky. Příkladem programu, využívajícího tento způsob identifikace, je např. Sequest<sup>130</sup>.

### 3 Redukce a alkylace proteinů v roztoku před elektroforézou

Polyakrylamidová gelová elektroforéza proteinů hraje již více než 35 let ústřední roli při separaci proteinů z komplexních biologických směsí. Za tuto dobu doznala tato metoda značných změn a vylepšení. Nedá se však říci, že by v dnešní době byly překonány všechny obtíže, které separace v polyakrylamidovém gelu přináší. Jedná se především o vznik gelem indukovaných modifikací proteinů (vznik aduktů cys- $\beta$ -propanamidu reakcí cysteinu s neopolymerizovaným akrylamidem), dále modifikací vznikajících křížným spojením polypeptidových řetězců jednotlivých proteinů (vznik nepravých skvrn či pásů), které se často objevují, není-li věnována dostatečná péče přípravě proteinového vzorku. Na toto téma bylo v posledních desetiletích publikováno mnoho prací, které se ve svých závěrech na způsob přípravy vzorku a provedení elektroforetické separace proteinů často liší. Hlavním cílem těchto prací je dosažení optimální redukce a alkylace disulfidových vazeb v proteinech před polyakrylamidovou gelovou elektroforézou, čímž lze předejít výše zmíněným jevům a zároveň



lze dosáhnout vyšší rozlišovací schopnosti těchto metod. Většina těchto prací, kromě několika publikací věnovaných redukci a alkylaci před jednorozměrnou SDS-PAGE<sup>111, 112, 131</sup>, se týká přípravy vzorku pro 2-DE, která využívá v prvním rozměru separaci proteinů podle  $pI$ , technikou izoelektrické fokusace, a ve druhém rozměru separaci pomocí SDS-PAGE<sup>132</sup>.

Poznatky, které přinesly tyto práce, poskytují relativně dostatečné množství informací pro navržení experimentů, týkajících se optimalizace redukce a alkylace proteinů před jednorozměrnou SDS-PAGE separací proteinů, konkrétně volby vhodných redukčních a alkylačních činidel a pH vzorkovacího pufru. Provedení optimální redukce a alkylace proteinů v roztoku před elektroforézou s sebou přináší možnost zkrácení jinak časově náročné procedury, menší manipulaci se vzorkem a tím i snížení rizika kontaminace analyzovaných proteinů keratiny, které je při tomto typu analýzy velmi časté.

## EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použité chemikálie

ethanol (Penta), methanol (Lach-Ner), kys. fosforečná (Sigma-Aldrich), kyselina octová (Lach-Ner), kyselina mravenčí (Riedel-de Haën®), akrylamid (Serva), N',N'-methylen-bis-akrylamid (Serva), tris(hydroxyethyl)aminomethan, kyselina chlorovodíková (Lach-Ner), glycin (Serva), n-butanol (Lach-Ner), dodecylsulfát sodný (Serva), peroxodisíran amonný (Sigma-Aldrich), N,N,N,N-tetramethyl-ethylendiamin (Carl Roth GmbH+Co.KG), dithiotreitol (Serva), iodoacetamid (Fluka), tris(2-karboxyethyl)fosfin hydrochlorid (Fluka), hovězí sérový albumin (Sigma-Aldrich), Coomassie Brilliant Blue G-250 (Thermo Scientific), acetonitril (Sigma-Aldrich), hydrogenuhličitan amonný (Sigma-Aldrich), chlorid vápenatý (Sigma-Aldrich), hovězí pankreatický trypsin modifikovaný rafinosou (Prof. Marek Šebela, katedra biochemie, UPOL), propan-2-ol (Merck), kyselina ethylendiamintetraoctová (Sigma-Aldrich), bromfenolová modř (Sigma-Aldrich)

### 4.2 Použité přístrojové vybavení

pipety (Eppendorf, Hamburg, Německo), předvážky 440-33N (Kern, Hampshire, Velká Británie), analytické váhy AE240 S (Mettler-Toledo, Praha, Česká republika), centrifuga mini spin (Eppendorf, Hamburg, Německo), centrifuga 5415R (Eppendorf, Hamburg, Německo), centrifugační vakuová odparka Concentrator plus (Eppendorf, Hamburg, Německo), elektroforetická cela Mini PROTEAN® 3 (Bio-Rad, Philadelphia, USA), elektromagnetická míchačka (Biosan Laboratories Inc., Warren, USA), ultrazvuková lázeň RK 31 (Schalltec, Mörfelden, Německo), HPLC (Waters, Milford, USA), hmotnostní spektrometr UHR-q-TOF maXis (Bruker Daltonics, Brémy, Německo), laminární box Steril-VBH (Schoeller, Zwolle, Holandsko), magnetické míchadlo MM4 (Lavot a.s., Radim u Kolína, Česká republika), magnetické míchadlo MR (Heidolph, Schwabach, Německo), orbitální třepačka OS-10 (Biosan Laboratories Inc., Warren, USA), pHmetr Microprocessor pH 211 (Hanna Instruments, Damašek, Sýrie), termoblok (Major Sciences, Saratoga, USA), Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg, Německo), transiluminátor basic 2 (KAISER, Buchen, Německo), zdroj vysokého napětí a PowerPac™ HC (Bio-Rad, Philadelphia, USA).

### 4.3 Použité roztoky

#### SDS-PAGE

příprava polyakrylamidových gelů: Akrylamid/Bis (T 30%, C 2,67%), 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8, 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8, vodou saturovaný n-butanol, 10% (w/v) SDS, 10% (w/v) APS, elektrodový pufr: 10x koncentrovaný elektrodový pufr Tris/glycin, pH 8,3

vzorkovací pufr: 2x koncentrovaný vzorkovací pufr (0,125 M Tris/HCl, pH 6,8, 20% glycerol, 4% SDS, 0,1% bromfenolová modř), 2x koncentrovaný vzorkovací pufr (0,0125 M Tris/HCl (pH 6,8), 20% glycerol, 4% SDS, 0,01% bromfenolová modř, 0,1 mM EDTA), 2x koncentrovaný vzorkovací pufr (0,4 M Tris/HCl (pH 8), 20% glycerol, 4% SDS, 0,01% bromfenolová modř, 0,1mM EDTA), 2x koncentrovaný vzorkovací pufr (62,5 mM Tris/HCl (pH 8,5), 10% glycerol, 2% SDS, 0,0025% bromfenolová modř)

roztoky redukčních činidel: 0,65 M DTT, 1 M DTT, 2 mM TCEP, 5 mM TCEP,

roztoky alkylačních činidel: 0,125 M, 0,25 M IAM, 1,08 M IAM, 1,625 M IAM, 3,846 M akrylamid

#### Barvení a odbarvování proteinů

barvení: zásobní roztok barviva (12,5% (v/v)  $H_3PO_4$ , 12,5% (w/v)  $(NH_4)_2SO_4$ , 0,15% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250)

odbarvování: 10% (v/v) kyselina octová

#### Štěpení proteinů v gelu

odbarvování: odbarvovací roztok (50% (v/v) acetonitril/100 mM  $NH_4HCO_3$ ), 100% acetonitril

redukce a alkylace: 10 mM DTT/100 mM  $NH_4HCO_3$ , 55 mM IAM/100 mM  $NH_4HCO_3$

štěpení proteinů: štěpicí pufr s trypsinem 20 (ng/ $\mu$ l) ve 20 mM  $NH_4HCO_3$ /1mM  $CaCl_2$

#### Extrakce a čištění peptidů

extrakce: extrakční roztok 30% (v/v) acetonitril/5% (v/v) kys. mravenčí,

čištění: 5% (v/v) kys. mravenčí, eluční roztok 50% (v/v) methanol/2,5% kys. mravenčí, 0,5 kys. mravenčí

## **Analýza peptidů pomocí LC-MS**

kalibrační roztok Glu1-Fibrinopeptidu o koncentraci 1 pmol/μl

pufř A: 2% (v/v) acetonitril, 0,5% (v/v) kyselina mravenčí

pufř B: 80% (v/v) acetonitril, 0,5% (v/v) kyselina mravenčí

## **Experimentální postup**

### **5.1 Příprava polyakrylamidových gelů pro SDS-PAGE**

#### ***Příprava spodního, tzv. dělicího gelu (12%), objem 10 ml (2 gelů)***

Do kádinky (150 ml) bylo za stálého míchání postupně napipetováno 3,7 ml deionizované vody, 4 ml roztoku akrylamid/Bis (T 30%, C 2,67%), 2,5 ml 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8). Takto vzniklý roztok byl 15 minut odvzdušňován ve vývěvě. Dále bylo připipetováno 0,1 ml 10% (w/v) SDS, 5 μl TEMED a pro vlastní zahájení polymerizace bylo připiperováno 50 μl 10% APS (čerstvě připraveného). Roztok byl promíchán a nanesen mezi skla. Roztok byl převrstven několika kapkami vodou saturovaného n-butanolu a byl ponechán polymerovat 30-45 minut při laboratorní teplotě. Po zpolymerizování gelu byl n-butanol odsát filtračním papírem a gel byl dále opláchnut destilovanou vodou.

#### ***Příprava horního, tzv. zaostřovacího gelu (5 %), objem 10 ml (2 gely)***

Do kádinky (150 ml) bylo za stálého míchání postupně napipetováno 5,7 ml deionizované vody, 1,7 ml roztoku akrylamid/Bis (T 30%, C 2,67%), 2,5 ml 1,5 M Tris/HCl (pH 6,8). Takto vzniklý roztok byl 15 minut odvzdušňován ve vývěvě. Dále bylo připipetováno 0,1 ml 10% (w/v) SDS, 10 μl TEMED a pro vlastní zahájení polymerizace bylo připiperováno 50 μl 10% APS (čerstvě připraveného). Roztok byl promíchán a nanesen mezi skla na spodní gel. Do takto připraveného roztoku horního gelu byl vložen plastový hřebínek pro vytvoření jamek. Gel byl ponechán 30 minut polymerizovat. Po zpolymerizování gelu byla skla s těmito gely zabalena do destilované vody zvlhčeného filtračního papíru, vložena do uzavíratelného plastového pytle a skladována v lednici při 5 °C.

## 5.2 Příprava vzorku pro SDS-PAGE

Celkem bylo provedeno 11 různých variant přípravy proteinového vzorku pro SDS-PAGE. Pro každou z variant bylo připraveno vždy 10 stejných vzorků. Obsah BSA v každém vzorku byl 1 µg. Varianta č.1 byla provedena bez redukce a alkylace a slouží jako negativní srovnávací vzorek. Varianta č.2 byla provedena s redukcí pomocí 10 mM DTT a alkylací pomocí 55 mM IAM v gelu po SDS-PAGE. Varianty č.3 a č.4 byly provedeny s redukcí (DTT) a alkylací (IAM) v pufru o pH 6,8 před SDS-PAGE s tím, že u varianty č.4 byla zvýšena koncentrace IAM tak, aby poměr látkových množství redukčního činidla (DTT) a alkylačního činidla (IAM) byl 1:5. U variant č.5 a č.6 bylo k redukcí ve vzorkovacím pufru o pH 6,8 použito TCEP v koncentracích 0,1 mM (č.5) a 0,25 mM (č.6) a alkylačního činidla IAM, vždy ve stonásobném molárním přebytku IAM nad TCEP. U variant č.7 a č.8 bylo použito DTT a IAM v koncentracích jako u variant č.3 a č.4 (poměr látkových množství redukčního a alkylačního činidla zvýšen na 1:5), ale bylo zvýšeno pH vzorkovacího pufru z pH 6,8 na pH 8, kvůli přezkoumání možného vlivu vyššího pH na průběh redukce a alkylace. U variant č.9 a č.10 bylo použito TCEP a IAM v koncentracích jako u variant č.5 a č.6, ale bylo zvýšeno pH vzorkovacího pufru z pH 6,8 na pH 8. Varianta č.11 byla provedena s redukcí pomocí DTT a alkylací pomocí akrylamidu v pufru o pH 8,5 před SDS-PAGE. Koncentrace alkylačních činidel v nadpisech variant č.3 – č.11 jsou vztaženy k finálnímu objemu, který byl dávkován na gel (11 µl). V případě varianty č.1 a č.2 bylo dávkováno 10 µl vzorku na jamku.

### ***Varianta č.1 SDS-PAGE bez redukce a alkylace***

K 50 µl 2x koncentrovaného vzorkovacího pufru (0,125 M Tris/HCl (pH 6,8), 20% glycerol, 4% SDS, 10% β-merkaptoethanol, 0,1% bromofenolová modř) byly připipetovány 2 µl zásobního roztoku BSA (5 mg/ml), 48 µl deionizované vody a vzniklá směs byla jemně zvertexována. Finální koncentrace redukčního vzorkovacího pufru byla 0,0625 M Tris/HCl (pH 6,8), 10% glycerol, 2% SDS, 5% β-merkaptoethanol, 0,005% bromofenolová modř. Takto připravený vzorkovací pufr s BSA byl inkubován v termostatu 5 min. při 95 °C, dále byl zchlazen na lab. teplotu a zcentrifugován na stolní centrifuze.

### ***Varianta č.2 SDS-PAGE s redukcí a alkylací v gelu (po elfo)***

Příprava vzorku pro SDS-PAGE byla pro tuto variantu shodná s variantou č.1

***Varianta č.3 SDS-PAGE s redukcí (32,5 mM DTT) a alkylací (98 mM IAM) v roztoku pH 6,8 (před elfo)***

Ke 450 µl 2x koncentrovaného vzorkovacího pufru (0,125 M Tris/HCl (pH 6,8), 20% glycerol, 4% SDS, 0,01% bromfenolová modř, 0,1 mM EDTA) bylo připipetováno 50 µl 650 mM DTT, roztok byl jemně zvortexován. Finální koncentrace vzorkovacího pufru byla 0,0625 M Tris/HCl (pH 6,8), 10% glycerol, 2% SDS, 0,005% bromfenolová modř, 0,05 mM EDTA, 32,5 mM DTT. Dále bylo do 10 plastových zkumavek (0,5 ml) napipetováno vždy 5 µl vzorkovacího pufru s redukčním činidlem, 3 µl dest. vody a 2µl roztoku BSA (0,5 mg/ml). Vzorky byly dále jemně zvortexovány, zcentrifugovány na stolní centrifuze a dále inkubovány 5 min. při 95 °C v termobloku a ochlazeny pod tekoucí vodou. Dále byl ke vzorkům připipetován 1 µl vodného roztoku alkylačního činidla (1,08 M IAM) a vzorky byly inkubovány 20 min. ve tmě.

***Varianta č.4 SDS-PAGE s redukcí (32,5 mM DTT) a alkylací (147,7 mM IAM) v roztoku pH 6,8 (před elfo)***

Ke 450 µl 2x koncentrovaného vzorkovacího pufru (0,125 M Tris/HCl (pH 6,8), 20% glycerol, 4% SDS, 0,01% bromfenolová modř, 0,1 mM EDTA) bylo připipetováno 50 µl 650 mM DTT, roztok byl jemně zvortexován. Finální koncentrace vzorkovacího pufru byla 0,0625 M Tris/HCl (pH 6,8), 10% glycerol, 2% SDS, 0,005% bromfenolová modř, 0,05 mM EDTA, 32,5 mM DTT. Dále bylo do 10 plastových zkumavek (0,5 ml) napipetováno vždy 5 µl redukčního vzorkovacího pufru a 3 µl dest. vody a 2µl roztoku BSA (0,5 mg/ml). Vzorky byly dále jemně zvortexovány, zcentrifugovány na stolní centrifuze a dále inkubovány 5 min. při 95 °C v termobloku a ochlazeny pod tekoucí vodou. Dále byl ke vzorkům připipetován 1 µl vodného roztoku alkylačního činidla (1,625 M IAM) a vzorky byly inkubovány 20 min. ve tmě.

***Varianta č.5 SDS-PAGE s redukcí (0,1 mM TCEP) a alkylací (11,36 mM IAM) v roztoku pH 6,8 (před elfo)***

Ke 450 µl 2x koncentrovaného vzorkovacího pufru (0,125 M Tris/HCl (pH 6,8), 20% glycerol, 4% SDS, 0,01% bromfenolová modř, 0,1 mM EDTA) bylo připipetováno 50 µl 2 mM TCEP, roztok byl jemně zvortexován. Finální koncentrace vzorkovacího pufru byla 0,0625 M Tris/HCl (pH 6,8), 10% glycerol, 2% SDS, 0,005% bromfenolová modř, 0,05 mM EDTA, 0,1 mM TCEP. Dále bylo do 10 plastových zkumavek (0,5 ml) napipetováno vždy 5 µl redukčního vzorkovacího pufru a 3 µl dest. vody a 2µl roztoku BSA (0,5 mg/ml). Vzorky byly dále jemně zvortexovány, zcentrifugovány na stolní centrifuze a dále inkubovány 5 min. při 95 °C

v termobloku a ochlazený pod tekoucí vodou. Dále byl ke vzorkům připipetován 1 µl vodného roztoku alkylačního činidla (0,125 M IAM) a vzorky byly inkubovány 20 min. ve tmě.

***Varianta č.6 SDS-PAGE s redukcí (0,25 mM TCEP) a alkylací (22,73 mM IAM) v roztoku pH 6,8 (před elfo)***

Ke 450 µl 2x koncentrovaného vzorkovacího pufru (0,125 M Tris/HCl (pH 6,8), 20% glycerol, 4% SDS, 0,01% bromfenolová modř, 0,1 mM EDTA) bylo připipetováno 50 µl 5 mM TCEP, roztok byl jemně zvortexován. Finální koncentrace vzorkovacího pufru byla 0,0625 M Tris/HCl (pH 6,8), 10% glycerol, 2% SDS, 0,005% bromfenolová modř, 0,05 mM EDTA, 0,25 mM TCEP. Dále bylo do 10 plastových zkumavek (0,5 ml) napipetováno vždy 5 µl redukčního vzorkovacího pufru a 3 µl dest. vody a 2µl roztoku BSA (0,5 mg/ml). Vzorky byly dále jemně zvortexovány, zcentrifugovány na stolní centrifuze a dále inkubovány 5 min. při 95 °C v termobloku a ochlazený pod tekoucí vodou. Dále byl ke vzorkům připipetován 1 µl vodného roztoku alkylačního činidla (0,25 M IAM) a vzorky byly inkubovány 20 min. ve tmě.

***Varianta č.7 SDS-PAGE s redukcí (32,5 mM DTT) a alkylací (98 mM IAM) v roztoku pH 8 (před elfo)***

Ke 450 µl 2x koncentrovaného vzorkovacího pufru (0,4 M Tris/HCl (pH 8), 20% glycerol, 4% SDS, 0,1 mM EDTA, 0,01% bromfenolová modř) bylo připipetováno 50 µl 650 mM DTT, roztok byl jemně zvortexován. Finální koncentrace vzorkovacího pufru byla 0,2 M Tris/HCl (pH 8), 10% glycerol, 2% SDS, 0,05 mM EDTA, 0,005% bromfenolová modř, 32,5 mM DTT. Dále bylo do 10 plastových zkumavek (0,5 ml) napipetováno vždy 5 µl redukčního vzorkovacího pufru a 3 µl dest. vody a 2µl roztoku BSA (0,5 mg/ml). Vzorky byly dále jemně zvortexovány, zcentrifugovány na stolní centrifuze a dále inkubovány 5 min. při 95 °C v termobloku a ochlazený pod tekoucí vodou. Dále byl ke vzorkům připipetován 1 µl vodného roztoku alkylačního činidla (1,08 M IAM) a vzorky byly inkubovány 20 min. ve tmě.

***Varianta č.8 SDS-PAGE s redukcí (32,5 mM DTT) a alkylací (147,7 mM IAM) v roztoku pH 8 (před elfo)***

Ke 450 µl 2x koncentrovaného vzorkovacího pufru (0,4 M Tris/HCl (pH 8), 20% glycerol, 4% SDS, 0,1 mM EDTA, 0,01% bromfenolová modř) bylo připipetováno 50 µl 650 mM DTT, roztok byl jemně zvortexován. Finální koncentrace vzorkovacího pufru byla 0,2 M Tris/HCl (pH 8), 10% glycerol, 2% SDS, 0,05 mM EDTA, 0,005% bromfenolová modř, 32,5 mM DTT. Dále bylo do 10 plastových zkumavek (0,5 ml) napipetováno vždy 5 µl redukčního

vzorkovacího pufru a 3  $\mu$ l dest. vody a 2  $\mu$ l roztoku BSA (0,5 mg/ml). Vzorky byly dále jemně zvortexovány, zcentrifugovány na stolní centrifuze a dále inkubovány 5 min. při 95 °C v termobloku a ochlazeny pod tekoucí vodou. Dále byl ke vzorkům připipetován 1  $\mu$ l vodného roztoku alkylačního činidla (1,625 M IAM) a vzorky byly inkubovány 20 min. ve tmě.

***Varianta č.9 SDS-PAGE s redukcí (0,1 mM TCEP) a alkylací (11,36 mM IAM) v roztoku pH 8 (před elfo)***

Ke 450  $\mu$ l 2x koncentrovaného vzorkovacího pufru (0,4 M Tris/HCl (pH 8), 20% glycerol, 4% SDS, 0,1 mM EDTA, 0,01% bromfenolová modř) bylo připipetováno 50  $\mu$ l 2 mM TCEP, roztok byl jemně zvortexován. Finální koncentrace vzorkovacího pufru byla 0,2 M Tris/HCl (pH 8), 10% glycerol, 2% SDS, 0,05 mM EDTA, 0,005% bromfenolová modř, 0,1 mM TCEP. Dále bylo do 10 plastových zkumavek (0,5 ml) napipetováno vždy 5  $\mu$ l redukčního vzorkovacího pufru a 3  $\mu$ l dest. vody a 2  $\mu$ l roztoku BSA (0,5 mg/ml). Vzorky byly dále jemně zvortexovány, zcentrifugovány na stolní centrifuze a dále inkubovány 5 min. při 95 °C v termobloku a ochlazeny pod tekoucí vodou. Dále byl ke vzorkům připipetován 1  $\mu$ l vodného roztoku alkylačního činidla (0,125 M iodacetamid) a vzorky byly inkubovány 20 min. ve tmě.

***Varianta č.10 SDS-PAGE s redukcí (0,25 mM TCEP) a alkylací (22,73 mM IAM) v roztoku pH 6,8 (před elfo)***

Ke 450  $\mu$ l 2x koncentrovaného vzorkovacího pufru (0,4 M Tris/HCl (pH 8), 20% glycerol, 4% SDS, 0,1 mM EDTA, 0,01% bromfenolová modř) bylo připipetováno 50  $\mu$ l 5 mM TCEP, roztok byl jemně zvortexován. Finální koncentrace vzorkovacího pufru byla 0,2 M Tris/HCl (pH 8), 10% glycerol, 2% SDS, 0,05 mM EDTA, 0,005% bromfenolová modř, 0,25 mM TCEP. Dále bylo do 10 plastových zkumavek (0,5 ml) napipetováno vždy 5  $\mu$ l redukčního vzorkovacího pufru a 3  $\mu$ l dest. vody a 2  $\mu$ l roztoku BSA (0,5 mg/ml). Vzorky byly dále jemně zvortexovány, zcentrifugovány na stolní centrifuze a dále inkubovány 5 min. při 95 °C v termobloku a ochlazeny pod tekoucí vodou. Dále byl ke vzorkům připipetován 1  $\mu$ l vodného roztoku alkylačního činidla (0,25 M iodacetamid) a vzorky byly inkubovány 20 min. ve tmě.

***Varianta č.11 SDS-PAGE s redukcí (50 mM DTT) a alkylací (1,349 M AM) v roztoku pH 8,5 (před elfo)***

Ke 450  $\mu$ l 2x koncentrovaného vzorkovacího pufru (62,5 mM Tris/HCl (pH 8,5), 10% glycerol, 2% SDS, 0,0025% bromfenolová modř) bylo připipetováno 50  $\mu$ l 1 M DTT a roztok byl jemně zvortexován. Finální koncentrace vzorkovacího pufru byla 31,25 mM Tris/HCl (pH 8,5), 5%



glycerol, 1% SDS, 0,00125% bromfenolová modř, 50 mM DTT. Dále bylo do 10 plastových zkumavek (0,5 ml) napipetováno vždy 5  $\mu$ l redukčního vzorkovacího pufru a 3  $\mu$ l dest. vody a 2  $\mu$ l roztoku BSA (0,5 mg/ml). Vzorky byly dále jemně zvortexovány, zcentrifugovány na stolní centrifuze a dále inkubovány 5 min. při 95 °C v termobloku a ochlazeny pod tekoucí vodou. Dále bylo ke vzorkům připipetováno 4,7  $\mu$ l vodného roztoku alkylačního činidla (4,2 M akrylamid) a vzorky byly inkubovány 20 min. ve tmě.

### 5.3 SDS-PAGE separace BSA

#### *Příprava elektroforetické cely*

Byla sestavena elektroforetická cela (Mini-PROTEAN® 3 Cell). Do ní bylo umístěno sklo s polyakrylamidovým gelem, ze kterého byl odstraněn plastový hřebínek. Do prázdné pozice byla vložena plastová náhrada. Na dno elektroforetické cely a do prostoru mezi skla s polyakrylamidovým gelem a plastovou náhradou byl až po okraj nalit elektrodotový pufr (10 x zředěný zásobní roztok Tris/glycin, pH 8,3).

#### *Příprava barvicího roztoku*

Nejdříve byl důkladně promíchán zásobní roztok barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 (45 min.). Po promíchání bylo do kádinky odlito 80 ml zásobního roztoku barviva a za neustálého promíchávání (30 min.) bylo postupně přidáno 20 ml methanolu.

#### *SDS-PAGE*

Do každé z 10 jamek polyakrylamidového gelu bylo napipetováno 10  $\mu$ l připraveného vzorkovacího pufru s BSA (var.č.1. a č.2 přípravy vzorku) nebo 11  $\mu$ l připraveného roztoku s BSA (var.č.3-10 přípravy vzorku). Varianta č.11 využívá k alkylaci v roztoku před SDS-PAGE 4,7  $\mu$ l 4,2 M akrylamidu a na jednu jamku bylo v tomto případě dávkován objem 14,7  $\mu$ l vzorku. Elektroforéza probíhala vždy po dobu 45 minut při 80 V. Po uplynutí této doby bylo napětí zvýšeno na 120 V. Elektroforéza byla zastavena ve chvíli, kdy barvivo vyšlo z gelu. Po ukončení elektroforézy byl slit elektrodotový pufr, rozložena cela a vyjmuto sklo s gelem. Opatrně bylo odstraněno krycí sklo, plastovou špachtlí odstraněn zaostřovací gel. Rozdělovací gel byl opatrně přenesen do Petriho misky s 50 ml barvicího roztoku a ponechán barvit na laboratorní třepačce přes noc.

#### 5.4 Odbarvení gelu

Po obarvení gelu roztokem barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 bylo toto barvivo slito, bylo přidáno 50 ml destilované vody a takto třepáno na třepačce 5 min. Destilovaná voda byla nahrazena 50 ml roztokem 10% kys. octové a gel byl odbarvován na třepačce 30 min. (1x opakováno). Po uplynutí této doby byl roztok kyseliny odstraněn a nahrazen 50 ml dest. vody.

#### 5.5 Vyřezání obarvených gelových proužků z polyakrylamidového gelu

Gel byl opatrně přenesen na čistou skleněnou podložku, zvlhčenou malým množstvím destilované vody, umístěnou na podsvěcovači. Jednotlivé obarvené proužky gelu byly pečlivě vyříznuty čistým skalpelem a přeneseny do čistých plastových zkumavek o objemu 1,5 ml. Tyto proužky byly dále tupou stranou skalpelu rozděleny na cca 4-5 menších dílků.

#### 5.6 Odbarvení gelových kousků

Do 1,5 ml plastové zkumavky byl připraven odbarvovací roztok 50% (v/v) acetonitril/100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  smícháním 500  $\mu\text{l}$  100% acetonitrilu a 500  $\mu\text{l}$  100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . Do každé zkumavky s kousky gelu bylo připipetováno 100  $\mu\text{l}$  odbarvovacího roztoku. Gelové kousky byly dále třepány v termomixeru při 1000 rpm, 15 min, při 25 °C. Po uplynutí této doby byl odbarvovací roztok odpipetován, nahrazen novým a gelové kousky byly znovu odbarvovány třepáním v termomixeru při 1000 rpm, 15 min, při 25 °C. Odbarvovací roztok byl odpipetován. Kousky gelu byly mechanicky sklepany na dno plastových zkumavek. Ke každému vzorku nich bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  100% acetonitrilu. Dále byly třepány v termomixeru při 1000 rpm, 15 min, při 25 °C. Po uplynutí této doby byl roztok odpipetován a vzorky byly 5 minut sušeny při 25 °C v termomixeru.

#### 5.7 Redukce a alkylace v gelu

Redukce a alkylace byla v tomto bodě provedena pouze pro variantu č.2 přípravy vzorku pro SDS-PAGE. Ke kostičkám gelu bylo připipetováno 100  $\mu\text{l}$  10 mM DTT/100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  a takto byly inkubovány v termomixeru po dobu 30 minut, při 56 °C. Roztok redukčního činidla byl odpipetován a nahrazen 100  $\mu\text{l}$  100% acetonitrilu. Gelové kousky byly dále třepány v termomixeru při 1000 rpm, 5 min., při 25 °C. Acetonitril byl odpipetován a vzorky byly 5 min. sušeny v termomixeru 5 min. při 25 °C. Ke kouskům gelu byl připipetován roztok alkylačního činidla 55 mM IAM/100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . Inkubace probíhala 20 min ve tmě. Roztok alkylačního činidla byl odpipetován a nahrazen 100  $\mu\text{l}$  100% acetonitrilu. Gelové

kousky byly dále třepány v termomixéru při 1000 rpm, 5 min., při 25 °C. Acetonitril byl odpipetován a vzorky byly 5 min. sušeny v termomixéru 5 min. při 25 °C.

## 5.8 Enzymatické štěpení trypsinem

Ke gelovým kouskům bylo nejdříve připipetováno 100  $\mu$ l štěpicího pufru bez trypsinu (20 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ /1 mM  $\text{CaCl}_2$ ). Takto připravené vzorky byly třepány v termomixeru při 1000 rpm, 15 min, při 25 °C. Po uplynutí této doby byl roztok štěpicího pufru odpipetován a nahrazen 100  $\mu$ l 100% acetonitrilu. Gelové kousky byly třepány v termomixeru při 1000 rpm, 5 min, při 25 °C. Roztok byl odpipetován a kousky gelu byly 5 minut sušeny při 25 °C v termomixeru. Dále bylo ke všem vzorkům připipetováno 20  $\mu$ l štěpicího pufru s trypsinem (1  $\mu$ l zás. roztoku trypsinu/344  $\mu$ l 20 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ /1 mM  $\text{CaCl}_2$ ; výsledná koncentrace 20 ng/ $\mu$ l) a ponecháno inkubovat 15 min v lednici. Po uplynutí této doby byly vzorky zkontrolovány na přítomnost dostatečného množství trypsinu (gelové kousky by měly být ideálně všechny pod hladinu štěpicího roztoku), případně bylo doplněno několik mikrolitrů štěpicího roztoku. Takto připravené vzorky byly umístěny do termostatu a inkubovány při 37 °C přes noc.

## 5.9 Extrakce a čištění peptidů

### *Extrakce peptidů*

Po ukončení procedury enzymatického štěpení byly vzorky (s gelovými kousky a štěpicím roztokem trypsinu) zcentrifugovány na stolní centrifuze a ke všem vzorkům bylo připipetováno 100  $\mu$ l extrakčního roztoku (30% (v/v) acetonitril/5% (v/v) kys. mravenčí) a byly třepány v termomixeru při 1200 rpm, 30 min., při 37 °C. Po uplynutí této doby byl supernatant odpipetován do čistých plastových zkumavek (1,5 ml). Zkumavky se supernatantem byly ponechány odpařovat ve vakuové centrifugační odparce. K původním vzorkům (obsahujícím gelové kousky) bylo znovu přidáno 100  $\mu$ l extrakčního roztoku a byly dále třepány v termomixeru při 1200 rpm, 30 min., při 37 °C. Supernatant byl dále přepipetován k již odpařovaným vzorkům. Vzorky byly ponechány v centrifugační vakuové odparce až do úplného odpaření supernatantu.

### *Čištění peptidů*

Během odpařování bylo připraveno deset plastových zkumavek (1,5 ml), do kterých byly umístěny Stagetipy, obsahující reverzní fázi C 18. Zkumavky se Stagetipy byly umístěny do PCR centrifugy a aktivovány promytím 40  $\mu$ l 2-propanolem při 4000 rpm, 5 min., při 25 °C (1x

opakováno) a dále ekvilibrovány 40 µl 5% (v/v) kys. mravenčí v PCR centrifuze při 2000 rpm, 5 min., při 25°C (1x zopakováno). Takto připravené Stagetipy byly přemístěny do nových plastových zkumavek (1,5 ml). K odpařeným vzorkům peptidů bylo připipetováno 50 µl 5% (v/v) kys. mravenčí, dále byly třepány při 1400 rpm, 5 min., při 25 °C, zcentrifugovány na stolní centrifuze, 5 min. sonikovány v ultrazvukové lázni, zcentrifugovány na stolní centrifuze a nakonec aplikovány na Stagetipy. Stagetipy se vzorky byly centrifugovány na PCR centrifuze při 1000 rpm, 15 min., při 25 °C. Stagetipy byly dále dvakrát promyty 40 µl 5% (v/v) kys. mravenčí na PCR centrifuze při 2000 rpm, 5 min., při 25 °C.

### ***Eluce peptidů***

Stagetipy byly umístěny do nových plastových zkumavek (0,5 ml). Peptidy byly vyeluovány připipetováním 40 µl elučního roztoku (50% (v/v) methanol/2,5% kys. mravenčí) a centrifugací na PCR centrifuze při 1200 rpm, 15 min., při 25 °C (1x zopakováno). Plastové zkumavky se supernatantem obsahujícím peptidy byly odpařeny na vakuové centrifugační odparce. Původní plastové zkumavky (1,5 ml) byly přetaženy parafilmem a zamraženy (mohou obsahovat analyzované peptidy). Po odpaření supernatantu bylo k odparkům přidáno 15 µl 0,5% (v/v) kys. mravenčí a dále byly sonikovány 5 min. v ultrazvukové lázni, přepipetovány do vialek a předány k hmotnostně spektrometrické analýze.

### **5.10 Analýza peptidů pomocí LC-MS**

Připravené vzorky byly analyzovány UHR-MS maXis systémem spojeným s kapilární kapalinovou chromatografií vybavenou automatickým dávkovačem vzorků. Před měřením vzorků byl MS systém kalibrován použitím standardního peptidu Glu<sup>1</sup>-Fibrinopeptidu. Přečištěné a odpařené vzorky byly rozpuštěny v 15 µl 0,5% (v/v) kyseliny mravenčí a byly následně postupně analyzovány. Každý vzorek byl nastříknut v objemu 2 µl do nano-LC systému a přímo nanášen na nanokapilární kolonu (75 µm x 100 mm plněnou 5 µm C18 AQ částicemi) pomocí pufru A po dobu 20 minut s průtokem 300 nl/minutu. Zachycené peptidy byly poté separovány binárním gradientem dlouhým 90 minut. Pro analýzu byl zvolen gradient 0 – 5 min pufr A, 5 – 70 min lineární zvýšení pufru B až k 60 %, 70 – 80 min lineární zvýšení pufru B až k 90 %, 80 – 85 min konstantní hodnoty B při 90 %, 85 – 90 min lineární snížení k 0 % B. Reekvilibrace kolony na počáteční podmínky pufr A byla provedena po dobu 20 min před nástřikem následujícího vzorku. Separované peptidy byly eluovány do MS systému a při MS analýze byly ionty tříděny v MS modu v rozsahu 350-3000 m/z za 1 s. MS/MS data byla pořizena v rozsahu 50 – 3000 m/z pro pět nejintenzivnějších iontů s nábojem 2 a 4 s cyklem

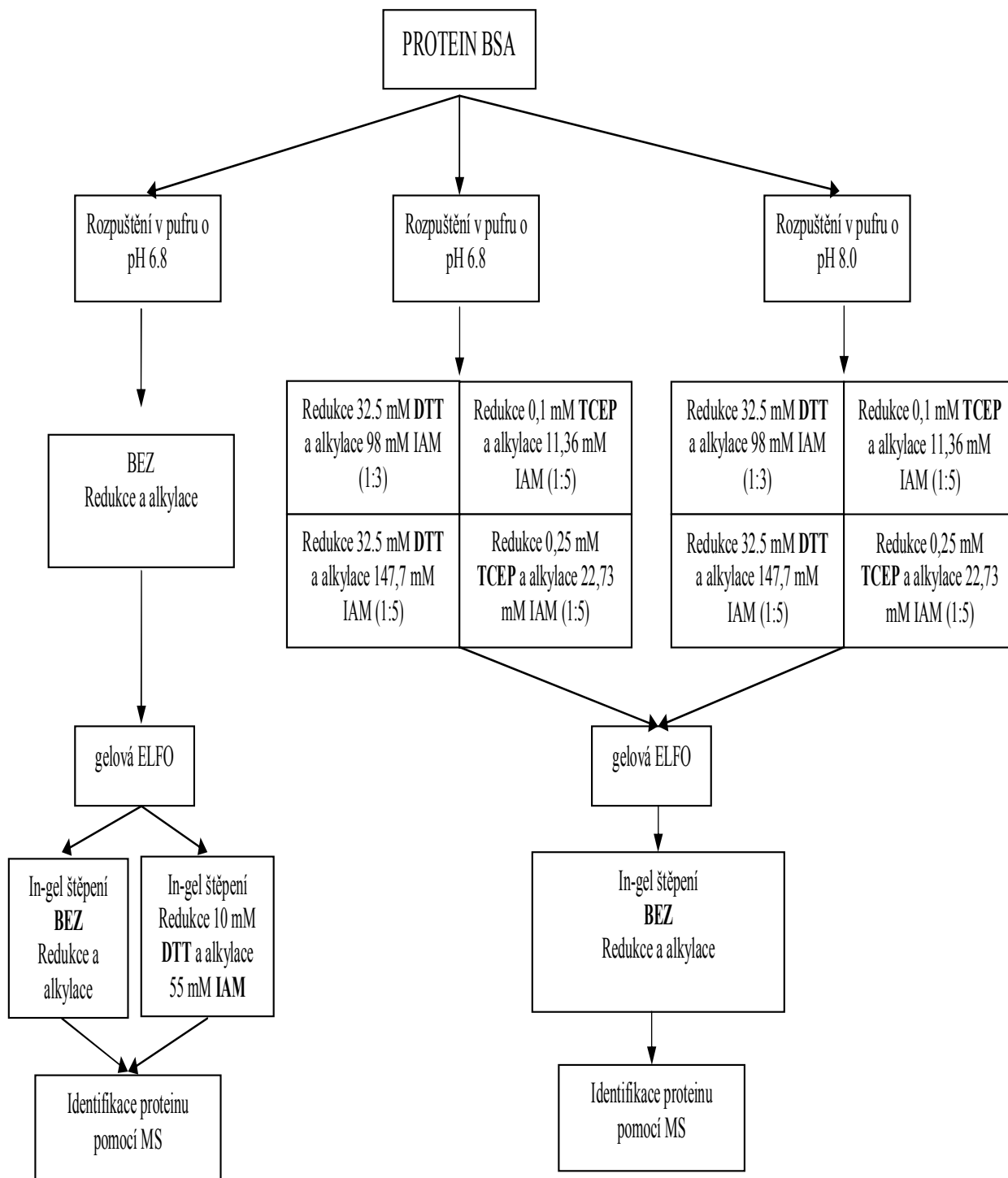
trvajícím 1-2 s pro analýzu vybraného iontu. Všechny prekurzorové ionty skenované v MS/MS modu byly vyloučeny z další fragmentace po dobu 0,32 minuty.

Surová data byla zpracována softwarem Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonics), který generuje datový soubor xml obsahující seznam odpovídajících prekurzorů a jejich fragmentů. Identifikace proteinů byla provedena pomocí algoritmu Mascot provozovaným na lokálním serveru Mascot Server 2.2 proti SwissProt databázi (verze 51.6). Parametry pro vyhledávání byly následující: proteolytický enzym trypsin; jedno vynechané štěpení; variabilní modifikace karbamidomethylace cysteinu, oxidace methioninu a deaminace asparaginu a guanidinu. Pro analýzu byl nastavena hmotnostní tolerance v MS módu 50 ppm a v MS/MS módu 0.05 Da, typ instrumentu: ESI-Q-TOF.

## Výsledky a diskuze

Navržené experimenty byly provedeny podle schématu uvedeného na obr. 11. Vzorek proteinu BSA byl nejdříve rozpuštěn v pufru s pH 6,8 nebo 8, následně byla provedena redukce a alkylace uvedenými činidly, dále byla provedena SDS-PAGE s následným enzymatickým štepením trypsinem a MS analýzou vzniklých peptidů.

Pomocí provedených experimentů byl potvrzen pozitivní vliv redukce a alkylace disulfidových vazeb v BSA na jeho enzymatické štepení trypsinem a následně také na pozitivní identifikaci BSA pomocí MS a databázového vyhledávání. Z výsledků uvedených v tab. 3 je patrné, že pokud redukce a alkylace proteinu provedena nebyla, byla průměrná hodnota skóre a hodnota procentuálního pokrytí sekvence proteinu, oproti experimentům s redukcí a alkylací, poměrně nízká. V kontrolním experimentu, kde nebyla provedena redukce a alkylace, byla získána hodnota procentuálního pokrytí sekvence BSA 26 % a přibližně se shoduje s hodnotami uvedenými v literatuře (~23%)<sup>131</sup>. U všech dalších provedených experimentů byla procentuální úspěšnost identifikace a pokrytí sekvence BSA vyšší (viz. tab.3). Dále byl zkoumán vliv pH vzorkovacího pufru na průběh a kvalitu redukce a alkylace BSA. Literatura uvádí, že pH 6,8 klasického vzorkovacího pufru pro SDS-PAGE podle Laemliho není pro průběh redukce a alkylace optimální a je vhodnější provádět redukcí s alkylací v pufru před SDS-PAGE při vyšších hodnotách pH 8 – 9<sup>110</sup>. V tomto smyslu byly otestovány experimenty s redukcí pomocí DTT a IAM při pH vzorkovacího pufru 6,8 a 8, aby bylo možné rozhodnout, jestli má zvýšení pH pufru vliv na kvalitu provedení redukce a alkylace těmito činidly. Ze získaných dat je patrné (viz. tab. 3), že zvýšení pH z 6,8 na 8 nepřineslo žádné zlepšení, ale naopak mírné zhoršení kvality redukce a alkylace, což je v rozporu s literaturou<sup>110</sup>. Jedním z možných vysvětlení tohoto jevu je zvýšení reaktivity DTT a IAM při pH blízkému 8 a jejich vzájemná reakce. Dále byl u DTT a IAM zkoumán vliv poměru látkového množství redukčního a alkylačního činidla na průběh a kvalitu redukce a alkylace. Poměr mezi redukčním a alkylačním činidlem byl zvolen přibližně 1 : 3 a 1 : 5. Zde byly získány lepší výsledky pro experimenty s poměrem látkového množství redukčního činidla ku alkylačnímu činidlu 1:5 a to i za zvýšeného pH 8, což je v souladu s literaturou<sup>86</sup> (viz. tab. 3). Zlepšení vlastností redukce a alkylace pomocí těchto činidel je více patrné pro experimenty pracující s pufrům o pH 6,8.



Obr. 11 Schéma znázorňující všechny provedené experimenty.

Ze získaných výsledků (viz. tab. 3) bylo dále zjištěno, že zvýšení pH vzorkovacího pufru má pozitivní vliv na průběh redukce disulfidových vazeb BSA pomocí TCEP s následnou alkylací pomocí IAM. Byly vyzkoušeny dvě různé koncentrace TCEP s alkylací pomocí IAM, vždy ve stonásobném molárním přebytku IAM nad TCEP. Pokud probíhala redukce a alkylace v pufru při pH 6,8 nebylo dosaženo výrazně lepších výsledků redukce než s DTT a IAM. Při použití stejných koncentrací TCEP a IAM ve vzorkovacím pufru s pH 8 bylo dosaženo mnohem lepších výsledků redukce a alkylace BSA. To je v souladu s předpokladem lepší reaktivity TCEP při pH 8, které je blízkém  $pK_A$  jeho fosfoniového centra (7,66) a shoduje se literaturou<sup>104</sup>. Z výsledků je také patrný nárůst hodnot skóre s roztoucí koncentrací TCEP. Z hlediska koncentrace redukčního činidla je nutno zdůraznit, že v případě TCEP bylo použito přibližně 300 krát menšího látkového množství než pro redukci pomocí DTT, při dosažení podobné nebo i lepší kvality redukce a následné alkylace, což se projevilo na hodnotě pokrytí a počtu identifikovaných peptidů z BSA.

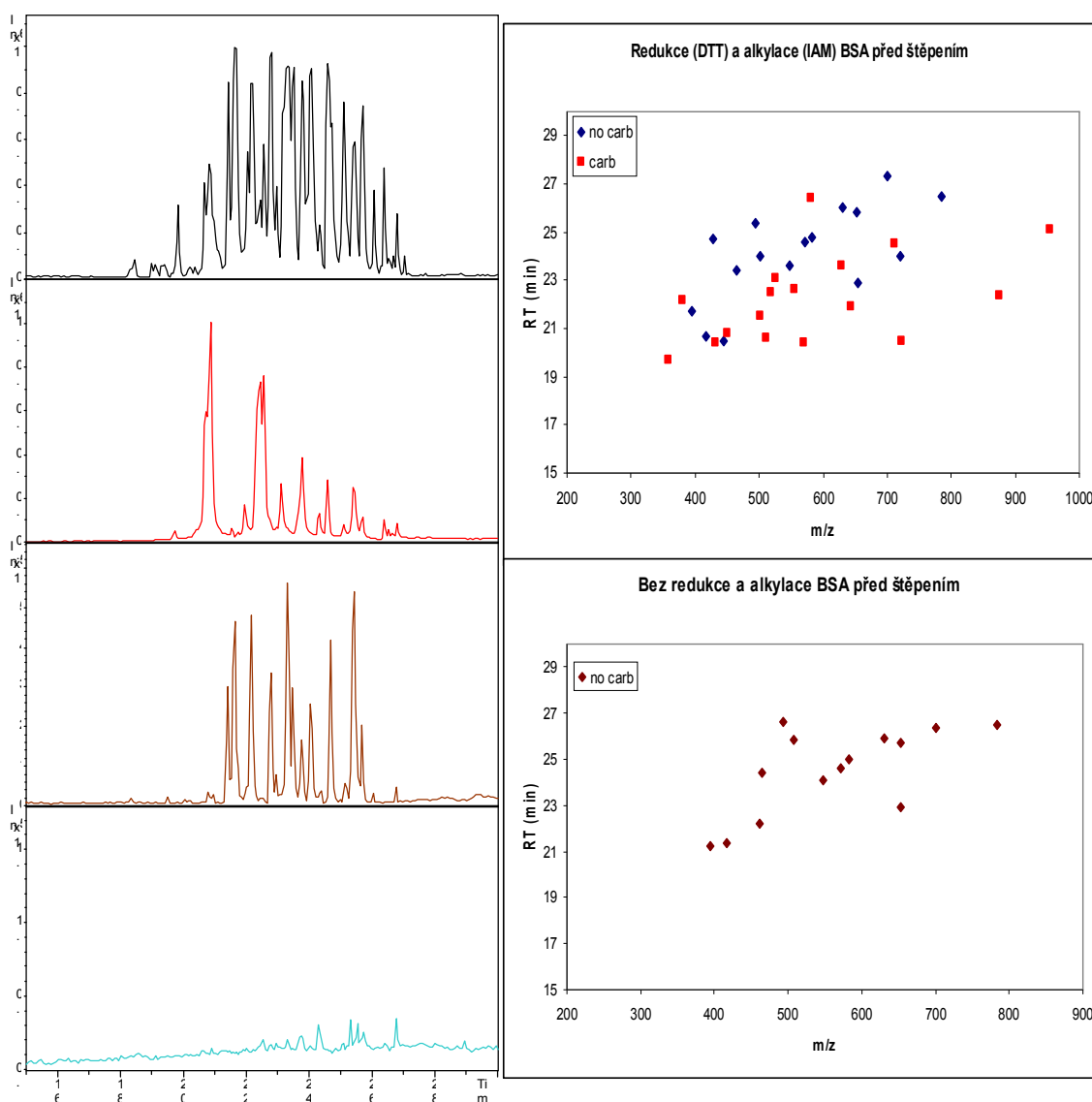
V posledním experimentu byla vyzkoušena metoda využívající k redukci DTT a k alkylaci akrylamid v pufru o pH 8,5 před SDS-PAGE. Tento způsob redukce a alkylace byl zvolen jako doplněk k variantám s redukcí DTT a alkylací IAM (viz. tab. 3). Získané hodnoty procentuálního pokrytí sekvence se však neshodují s výsledky, které byly publikovány v příslušné literatuře<sup>111</sup>.

Způsob provedení redukce a alkylace	skóre	pokrytí sekvence %	počet peptidů			
			1x CAM	2x CAM	3x CAM	
Bez red. a alk. po SDS-PAGE	777 ± 102	26 ± 1,4	0	0	0	
S red. a alk. po SDS-PAGE klasicky	1706 ± 100	56 ± 4,0	13	6	2	
pH 6,8	32,5 mM DTT/98 mM IAM	776 ± 97	32 ± 4,5	5	2	0
	32,5 mM DTT/147,7 mM IAM	1513 ± 191	44 ± 3,6	12	5	1
	0,1 mM TCEP/11,36 mM IAM	1014 ± 129	34 ± 6,7	6	0	0
	0,25mM TCEP/22,73 mM IAM	1138 ± 62	42 ± 1,4	8	1	0
pH 8,0	32,5 mM DTT/98 mM IAM	712 ± 114	28 ± 1,2	6	2	1
	32,5 mM DTT/147,7 mM IAM	916 ± 71	29 ± 3,6	7	1	1
	0,1 mM TCEP/11,36 mM IAM	1947 ± 118	69 ± 1,1	16	7	3
	0,25mM TCEP/22,73 mM IAM	2734 ± 73	72 ± 1,4	17	7	3
pH 8,5	50 mM DTT/ 1,349 M AM	1053 ± 123	39 ± 2,8	8*	4*	1*

Tab. 3 Průměrné hodnoty skóre, procentuálního pokrytí sekvence BSA a počtu tryptických peptidů s jedním, dvěma a třemi CAM-cysteiny poskytnutých programem Mascot. Tabelaované průměrné hodnoty a jejich směrodatné odchylky vycházejí z vybraných pěti naměřených hodnot pro každou z variant provedení redukce a alkylace BSA. \*V tomto případě se jedná o peptidy s cys-PAM.



Ve srovnání s klasickou metodou redukce a alkylace proteinů v gelu po SDS-PAGE bylo dosaženo lepších výsledků redukce a alkylace pouze ve dvou experimentech, využívajících k redukci TCEP a k alkykaci IAM v pufru s pH 8 před SDS-PAGE. Ostatní provedené experimenty dosahovaly vždy nižších hodnot skóre i procentuálního pokrytí celkové sekvence BSA oproti klasické metodě redukce a alkylace (viz. tab.3).



Obr. 12 Chromatogram HPLC separace peptidů získaných enzymatickým štěpením BSA: chromatogram obsahující všechny peptidy po provedení redukce (DTT) a alkylace (IAM) BSA (vlevo nahoře), chromatogram obsahující pouze cys-CAM peptidy (druhý shora), chromatogram všech peptidů získaných enz. štěpením BSA bez provedení redukce a alkylace (třetí shora), chromatogram odpovídající peptidům s cysteiny (vlevo dole).

Význam kvalitního provedení redukce a alkylace proteinů před SDS-PAGE pro pozitivní identifikaci BSA je patrný z počtu identifikovaných peptidů obsahujících cystein.

Z obr. 12 jsou zřetelně vidět rozdíly mezi celkovým počtem peptidů, které byly získány při provedení redukce a alkylace BSA (vlevo nahoře) a celkovým počtem peptidů získaných bez provedení redukce a alkylace BSA (třetí shora). Při provedení redukce a alkylace BSA je chromatogram zobrazující všechny peptidy (vlevo nahoře) bohatší o peptidy s cys-CAM (druhý shora). Naopak chromatogram odpovídající peptidům, které byly získány bez provedení redukce a alkylace BSA, je chudší o peptidy obsahující cystein (vlevo dole). Tab. 4 znázorňuje celkový počet pozitivně identifikovaných peptidů obsahujících cystein. Ze srovnání hodnot procentuální úspěšnosti identifikace těchto peptidů s hodnotami celkového procentuálního pokrytí sekvence BSA (tab. 3) je zřetelně vidět vliv, který má pozitivní identifikace těchto peptidů na pozitivní identifikaci BSA.

Způsob provedení redukce a alkylace		Celkový počet úspěšně identifikovaných peptidů s cysteiny (%)
Bez red. a alk. po SDS-PAGE		0
S red. a alk. po SDS-PAGE klasicky		80.8
pH 6,8	32,5 mM DTT/98 mM IAM	26.9
	32,5 mM DTT/147,7 mM IAM	76.9
	0,1 mM TCEP/11,36 mM IAM	23.1
	0,25mM TCEP/22,73 mM IAM	34.6
pH 8	32,5 mM DTT/98 mM IAM	34.6
	32,5 mM DTT/147,7 mM IAM	34.6
	0,1 mM TCEP/11,36 mM IAM	100
	0,25mM TCEP/22,72 mM IAM	100
pH 8,5	50 mM DTT/ 1,35 M AM	50

Tab. 4 Procentuální vyjádření počtu úspěšně identifikovaných cys-CAM (\*cys-PAM) peptidů pro jednotlivé varianty přípravy vzorku BSA. Při výpočtu byly porovnávány počty identifikovaných peptidů s cys-CAM pro každou varianu přípravy vzorku proti počtu peptidů cysteiny, které byly odečteny ze spektra, získaného teoretickým štěpením BSA.

Absence peptidů obsahujících cystein, při neprovedení redukce a alkylace proteinů, je způsobena neschopností enzymu specificky štěpit vazby, které jsou pro něj stericky nepřístupné. Tyto vazby jsou často situovány uvnitř struktury proteinu. Provedením redukce a alkylace dochází k rozrušení terciární a kvarterní struktury proteinu (k rozbalení proteinu), tvořené disulfidovými můstky mezi cysteiny, čímž je zajištěn zisk peptidů obsahujících právě cystein. V MS spektrech byly při neprovedení redukce a alkylace identifikovány peptidy, které cystein neobsahovaly. Tyto peptidy jsou pravděpodobně situovány na povrchu struktury proteinu a jsou proto snadno přístupné enzymatickému štěpení. MS spektra peptidů získané enzymatickým

štěpením redukovaného a alkylovaného BSA obsahovaly enzymy s cysteinem, pocházející z vnitřní části struktury proteinu. Na obr. 13 je znázorněna aminokyselinová sekvence BSA. Modře jsou vyznačeny peptidy, které byly získány bez redukce a alkylace. Zeleně jsou znázorněny peptidy, které bylo možné získat až po provedení redukce a alkylace BSA.

```

      10          20          30          40          50          60
MKWVTFISLL LLFSSAYSRG VFREDTHKSE IAHRFKDLGE EHFKGLVLIA FSQYLQQCPF

      70          80          90          100         110         120
DEHVKLVNEL TEFAKTCVAD ESHAGCEKSL HTLFGDELCK VASLRETYGD MADCEEKQEP

      130         140         150         160         170         180
ERNECFLSHK DDSPDLPKLK PDPNTLCDEF KADEKKFWGK YLYEIARRHP YFYAPELLYY

      190         200         210         220         230         240
ANKYNGVFQE CCQAEDKGAC LLPKIETMRE KVLASSARQR LRCASIQKFG ERALKAWSVA

      250         260         270         280         290         300
RLSQKFPKAE FVEVTKLVTD LTKVHKECCH GDLLECADDR ADLAKYICDN QDTISSKLKE

      310         320         330         340         350         360
CCDKPLLEKS HCIAEVEKDA IPENLPPLTA DFAEDKDVCK NYQEAKDAFL GSFLYEYSRR

      370         380         390         400         410         420
HPEYAVSVLL RLAKEYEATL EECCADDPH ACYSTVFDIL KHLVDEPQNL IKQNCDQFEK

      430         440         450         460         470         480
LGEYGFQNAL IVRYTRKVPQ VSTPTLVEVS RSLGKVGTRC CTKPESERMP CTEDYLSLIL

      490         500         510         520         530         540
NRLCVLHEKT PVSEKVT KCC TESLVNRRPC FSALTPDETY VPKAFDEKLF TFHADICTLP

      550         560         570         580         590         600
DTEKQIKKQT ALVELLKHKP KATEEQLKTV MENFVAFVDK CCAADDKEAC FAVEGPKLVV

```

Obr. 13 Znázornění sekvence aminokyselin BSA s vyznačenými cysteiny (žlutá, zelená), štěpnými místy argininy a lysiny (červeně). Modře jsou vyznačeny peptidy, které byly ve spektru přítomny bez alkylace, zeleně peptidy obsahující cystein, které byly identifikovány až po redukcii a alkylaci BSA.

## Závěr

Tato práce je věnována významu redukce a alkylace proteinů pro úspěšnou identifikaci proteinů po proteolytickém štěpení. V teoretické části této práce je uveden přehled historického vývoje separačních technik, dále jsou popsány jednotlivé kroky nutné k identifikaci proteinů pomocí enzymatického štěpení a metod hmotnostní spektrometrie. Součástí teoretické části je také podrobnější přehled a význam používaných metod redukce a alkylace proteinů ve vztahu k identifikaci peptidů obsahujících ve struktuře cystein. V experimentální části této práce jsou popsány navržené a provedené experimenty, které měly za cíl otestovat možnosti redukce a alkylace proteinů před SDS-PAGE separací proteinů. K účelům redukce a alkylace hovězího sérového albuminu (BSA) bylo využito redukčních činidel dithiothreitolu a tris(2-karboxyethyl)fosfinu a alkylačních činidel iodoacetamidu a akrylamidu. Byl zkoumán vliv pH pufru na průběh redukce a alkylace jednotlivými redukčními a alkylačními činidly. Dále byl zkoumán vliv vzájemných poměrů látkového množství redukčních a alkylačních činidel. Z provedených experimentů je patrné, že provedení redukce a alkylace proteinů je nutné pro dosažení pozitivní a kvalitní identifikace proteinu metodou enzymatického štěpení a MS. Bylo potvrzeno, že při vynechání redukce a alkylace nedochází k identifikaci peptidů obsahujících cystein. Z otestovaných variant redukce a alkylace bylo dosaženo nejlepších výsledků metodou využívající k redukci 0,25 mM TCEP a k alkylaci 22,73 mM IAM při zvýšeném pH 8 vzorkovacího pufru. Použitím této metody bylo dosaženo srovnatelných výsledků s klasickým provedením redukce a alkylace proteinů v gelu po SDS-PAGE.

## SUMMARY

This thesis is dedicated to the value of protein reduction and alkylation in sense of successful identification of proteins after protein enzymatic cleavage. The theoretical part of this thesis includes a historical review of separation techniques and also includes description of all steps that need to be performed for successful protein identification by enzymatic cleavage of protein and its subsequent analysis by mass spectrometry. Detailed review of methods used for the reduction and alkylation and their relation to positive identification of cysteine contained peptides is included. Designed and performed experiments aimed at testing of possibilities of the reduction and alkylation of proteins prior SDS-PAGE are situated in the experimental part of the thesis. For the purpose of the reduction of bovine serum albumine (BSA) dithiothreitol and tris(2-carboxyethyl)phosphine were used and iodoacetamide and acrylamide were used for the alkylation. Influence of pH of the sample buffer on reduction and alkylation was investigated for each agent. Influence of molar ratio the of reducing and alkylating agents was also investigated. From the experiments performed it is obvious that the performance of reduction and alkylation is for the getting of positive and qualitative identification of the protein by the approach of enzymatic cleavage and MS. It was confirmed that, if the reduction and alkylation is omitted, no peptides with cysteine are identified. The best results of the reduction and alkylation of protein was reached by using 0,25 mM TCEP and 22,73 mM IAM in sample buffer with pH 8. Using this approach we were able to get final results comparable with the classical method in which the reduction and alkylation is performed in gel after SDS-PAGE.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

1-DE	one dimensional electrophoresis – jednorozměrná elektroforéza
2-DE	two dimensional electrophoresis – dvojrozměrná elektroforéza
2-PEC	S- $\beta$ -(2-pyridylethyl)cysteine – S- $\beta$ -(2-pyridylethyl)cystein
4-PEC	S- $\beta$ -(4-pyridylethyl)cysteine – S- $\beta$ -(4-pyridylethyl)cystein
ACA	acetic acid – kyselina octová
ACN	acetonitrile – acetonitril
BrCN	cyanobromide – bromkyan
BNSP-skatol	3-bromo-3-methyl-2-[(2-nitrophenyl)mercapto]-3H-indole – 3-brom-3-methyl-2-[(2-nitrofenyl)merkaptó]-3H-indol
CBB	Comassie Brilliant Blue
CHCA	$\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid – $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina
CI	chemical ionization – chemická ionizace
CID	collision induced dissociation – kolizně indukovaná disociace
cys-CAM	cysteinyl-S-carbamide – cysteinyl-S-cyrbamid
cys-PAM	cysteinyl-S- $\beta$ -propionamide – cysteinyl-S- $\beta$ -propionamid
Da	Dalton – Dalton (jednotka relativní mol. hmotnosti)
DE	delayed extraction – zpožděná extrakce
DHB	2,5-dihydroxybenzoic acid – 2,5-dihydroxybenzoová kyselina
DIGE	difference gel electrophoresis – diferenční gelová elektroforéza
DTE	dithioerythritol – dithioerythritol
DTT	dithiothreitol – dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid – kyselina ethylenediamintetraoctová
EI	electron ionization – ionizace elektrony
ESI	electron spray ionization – ionizace elektrosprejem
ESI-MS/MS	electron spray ionization tandem mass spectrometry – tandemová hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem
FAB	fast atoms bombardment – bombardování rychlými atomy
FIB	fast ion bombardment – bombardování rychlými ionty
FD	field ionization – ionizace polem
FT-ICR	Fourier transform ion cyclotron resonance – iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
HABA	2-(4-hydroxy-phenylazo) benzoic acid – 2-(4-hydroxy-fenylazo)benzoová kys.
HPA	3-hydroxypicolinic acid – 3-hydroxypikolinová kys.
HPLC	high performance liquid chromatography – vysoceúčinná kapalinová chromatografie

IAA	iodoacetic acid – kyselina iodoctová
IAM	iodoacetamide – iodoacetamid
ICAT	isotope-coded affinity tag – izotopově kódované afinitní značky
IPG	immobilized pH gradient – imobilizovaný pH gradient
iTRAQ	isobaric tag for relative and absolute quantitation – izobarické značky pro relativní a absolutní kvantifikaci
MALDI	matrix assisted desorption/ionization – ionizace za přítomnosti matrice
MALDI-TOF	matrix assisted desorption/ionization-time of flight spectrometer- spektrometr s ionizací za přítomnosti matrice a analyzátozem doby letu
MeSH	2-mercaptoethanol – 2-merkaptóethanol ( $\beta$ -merkaptóethanol)
MS	mass spectrometry – hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandem mass spectrometry – tandemová hmotnostní spektrometrie
Mudpit	multidimensional protein identification technology – multidimenzionální technologie identifikace proteinu
NEM	N-ethylmaleimide – N-ethylmaleimid
NMR	nuclear magnetic resonance – nukleární magnetická resonance
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis – elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PD	plasma desorption – plasmatická desorpce
PFF	peptide fragment fingerprinting – mapování peptidových fragmentových
pI	isoelectric point – isoelektrický bod
PMF	peptide mass fingerprinting – peptidové mapování
PS	peptide sequencing – peptidové sekvencování
SA	sinapinic acid – sinapová kyselina
SDS	sodium dodecylsulphate – dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis – elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného
SILAC	stable isotope labelling of amino acids – značení aminokyselin stabilními izotopy
TBP	tributyl phosphine – tributylfosfin
TCA	trichloroacetic acid – trichloroctová kyselina
TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphine – tris(2-karboxyethyl)fosfin
TOF	time of flight mass analyser – analyzátor doby letu
TS	termospray ionization – ionizace termosprejem

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 
- <sup>1</sup> Josef Chmelík (2005) Proteomický průvodce. Chem.Listy 99, 883-885.
- <sup>2</sup> Hana Kovářová (2005) Proteomika v postgenové době. Chem. Listy 99, 886-889.
- <sup>3</sup> Joachim Klose (2009) From 2-D electrophoresis to proteomics. Electrophoresis 30, 142-149.
- <sup>4</sup> Smithies O., Poulik M.D. (1956) Two-dimensional electrophoresis of serum proteins. Nature 177, 1033.
- <sup>5</sup> Grabar P., Williams C.A. (1953) Methods permitting the combined study of the electrophoretic and the immunochemical properties of protein mixtures. Biochim. Biophys. Acta 10, 193-194.
- <sup>6</sup> Bussard A., Huet J.M. (1959) Description of a technic simultaneously combining electrophoresis and immunochemical precipitation in gel: electrosyneresis. Biochim. Biophys. Acta 34, 258-260.
- <sup>7</sup> Laurell C. B. (1965) Antigen-antibody crossed electrophoresis. Anal. Biochem. 10, 358-361.
- <sup>8</sup> Ressler N. (1960) Two-dimensional electrophoresis of protein antigens with an antibody containing buffer. Clin. Chim. Acta 5, 795-800.
- <sup>9</sup> Margolis J., Kenrick, K. G. (1969) 2-dimensional resolution of plasma proteins by combination of polyacrylamide disc and gradient gel electrophoresis. Nature 221, 1056-1057.
- <sup>10</sup> Kaltschmidt, E., Wittmann, H. G. (1970) Ribosomal proteins. VII. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis for fingerprinting of ribosomal proteins. Anal. Biochem. 36, 401-412.
- <sup>11</sup> Raymond S., Wientraub, L. (1964) Acrylamide gel as supporting medium for zone electrophoresis. Science 130, 711.
- <sup>12</sup> Raymond S. (1964) Acrylamide gel electrophoresis. Ann. N. Y., Acad. Sci. 121, 350-365.
- <sup>13</sup> Awdeh Z. L., Williamson A. R., Askonas B. A. (1968) Isoelectric focusing in polyacrylamide gel and its application to immunoglobulins. Nature 219, 66-67.
- <sup>14</sup> Catsimpoolas N. (1968) Micro isoelectric focusing in polyacrylamide gel columns. Anal. Biochem. 26, 480-482.
- <sup>15</sup> Dale G., Latner A. L. (1968) Isoelectric focusing in polyacrylamide gels. Lancet 1, 847-848.
- <sup>16</sup> Fawcett J. S. (1968) Isoelectric fractionation of proteins on polyacrylamide gels. FEBS Lett. 1, 81-82.
- <sup>17</sup> Leaback D. H., Rutter A. C. (1968) Polyacrylamide-isoelectric-focusing. A new technique for the electrophoresis of proteins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 32, 447-453.
- <sup>18</sup> Riley R.F., Coleman M. K. (1968) Isoelectric fractionation of proteins on a microscale in polyacrylamide and agarose matrices. J. Lab. Clin. Med. 72, 714-720.



- 
- <sup>19</sup> Wrigley C.W. (1968) Analytical fractionation of plant and animal proteins by gel electrofocusing. *J. Chromatogr.* 36, 362-365.
- <sup>20</sup> Wrigley C. W., (1968) *Sci. Tools* 15, 21-23.
- <sup>21</sup> Lämli U.K., (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- <sup>22</sup> MacGillivray A.J., Rickwood D. (1974) The heterogeneity of mouse-chromatin nonhistone proteins as evidenced by two-dimensional polyacrylamide-gel electrophoresis and ion-exchange chromatography. *Eur. J. Biochem.* 41, 181-190.
- <sup>23</sup> Klose J. (1975) Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutation in mammals. *Humangenetik* 26, 231-243.
- <sup>24</sup> Klose J., Neubert D., Merker H. J. (1975) *New Approaches to the Evaluation of Abnormal Embryonic Development.* pp. 375-387 Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany.
- <sup>25</sup> O'Farrell P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021.
- <sup>26</sup> Scheele G.A. (1975) Two-dimensional gel analysis of soluble proteins. Characterization of guinea pig exocrine pancreatic proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 5375-5385.
- <sup>27</sup> Anderson L., Anderson N.G. (1977) High resolution two-dimensional electrophoresis of human plasma proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5421-5425.
- <sup>28</sup> Unlu M., Morgan M.E., Minden J.S. (1997) Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18, 2071-2077.
- <sup>29</sup> Edman P. (1949) A method for the determination of the amino acid sequence of peptides. *Arch. Biochem. Biophys.* 22, 475-483.
- <sup>30</sup> Mcfarlane R.D., Torgerson D.F. (1976) Californium-252 plasma desorption mass spectroscopy. *Science* 191-920.
- <sup>31</sup> Barber M., Bordoli R.S., Sedgewick R.D., Tyler A.N. (1981) Fast Atom Bombardment of solids (FAB). A new ion source for mass spectrometry. *J. Chemistry Soc.-Chemical Comm.* 11, 325-7.
- <sup>32</sup> Blakley C.R., Vestal M.L. (1983) Thermospray interface for liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.* 55-750.
- <sup>33</sup> Jennings K.R. (1968) Collision-induced decomposition of aromatic molecular ions. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 1, 227-35.
- <sup>34</sup> Biemann K. (1992) Mass spectrometry of peptides and proteins. *Annu Rev. Biochem.* 61, 977-1010.
- <sup>35</sup> Roepstorff P., Fohlman J. (1984) Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom.* 11, 601.

- 
- <sup>36</sup> Hunt D.F., Yates J.R. 3rd, Shabanowitz J., Winston S., Hauer C.R. (1986) Protein sequencing by tandem mass spectrometry. *Proc.Nat.I.Acad.Sci. USA* 83, 6233-7.
- <sup>37</sup> Karas M., Bachman D., Bahr U., Hillenkamp F. (1987). Matrix-Assisted Ultraviolet Laser Desorption of Non-Volatile Compounds. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 78, 53-68.
- <sup>38</sup> Karas M., F. Hillenkamp (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* 60, 2299-2301.
- <sup>39</sup> Tanaka K., Waki H., Ido Y., Akita S., Yoshida Y., Yoshida T. (1988) Protein and Polymer Analyses up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of flight Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2, 20, 151-3.
- <sup>40</sup> Fenn J. B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M. (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246, 64-71.
- <sup>41</sup> Henzel W.J., Stults J.T., Watanabe C. (1989) Proceedings of the Third Symposium of the Protein Society. Seattle, WA.
- <sup>42</sup> Pappin D.J., Hojrup P., Bleasby A.J. (1993) Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr. Biol.* 3, 6, 327-32.
- <sup>43</sup> James P., Quadroni M., Carafoli E., Gonnet G. (1993) Protein identification by mass profile fingerprinting. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195, 58-64.
- <sup>44</sup> Henzel W.J., Billeci T.M., Stults J.T. Wong S.C., Grimley C., Watanabe C. (1993) Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5011-5.
- <sup>45</sup> Mann M., Hojrup P., Roepstorff P. (1993) Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases. *Biol. Mass Spectrom.* 22, 338-45.
- <sup>46</sup> Yates J.R. 3<sup>rd</sup>., Speicher S., Griffin P.R., Hunkappiler T. (1993) Peptide mass maps: a highly informative approach to protein identification. *Anal. Biochem.* 214, 397-408.
- <sup>47</sup> Eng J., McCormack A.L., Yates J.R. III. (1994) An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J.Amer. Soc. Mass. Spectrom.* 5, 976-89.
- <sup>48</sup> Yates J.R. 3rd, Eng J.K., McCormack A.L. Schieltz D. (1995) Method to correlate tandem mass spectra of modified peptides to amino acid sequences in the protein database. *Anal. Chem.* 67, 1426-36.
- <sup>49</sup> Mann M., Wilm M. (1994) Error-tolerant identification of peptides in sequence databases by peptide sequence tags. *Anal Chem.* 66, 43-909.
- <sup>50</sup> Cañas B., López-Ferer D., Ramos-Fernández A., Camafeita E., Calvo E. (2006) Mass spectrometry technologies for proteomics. *Brief.In Functional Genomic and Proteomics* 4, 4, 295-320.
- <sup>51</sup> Washburn M.P., Wolters D., Yates J.R. 3rd. (2001) Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.* 19, 242-7.

- 
- <sup>52</sup> Gygi S.P., Rist B., Gerber S.A., Turecek F., Gelb M.H., Aebersold R. (1999) Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.* 17, 994-9.
- <sup>53</sup> Ross P.L., Huang Y.N., Marchese J.N., Williamson B., Parker K., Hattan S., Khainovski N., Pillai S., Dey S., Daniels S., Purkayastha S., Juhasz P., Martin S., Bartlet-Jones M., He F., Jacobson A., Pappin D.J. (2004) Multiplexed protein quantitation in *saccharomyces cerevisiae* using aminereactive isobaric tagging reagents. *Mol. Cell Proteomics.*, 3, 1154-69.
- <sup>54</sup> Jiang H., English A.M. (2002) Quantitative Analysis of the Yeast Proteome by Incorporation of Isotopically Labeled Leucine. *Journal of Proteome Research* 1, 4, 345-50.
- <sup>55</sup> Ong S.E., Blagoev B., Kratchmarova I., Kristensen D.B., Steen H., Pandey A., Mann M. (2002) Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular & Cell Proteomics* 1, 5, 376-86.
- <sup>56</sup> Zhu H., Pan S., Gu S., Bradbury E.M., Chen X. (2002) Amino acid residue specific stable isotope labeling for quantitative proteomics. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 16, 22, 2115-23.
- <sup>57</sup> Makarov A. (2000) Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis. *Anal. Chem.* 72, 1156-1162.
- <sup>58</sup> Vidal M. (2009) A unifying view of 21st century systems biology. *FEBS Lett.* 583, 3891-4.
- <sup>59</sup> Feng X., Liu X., Luo Q., Liu B.F. (2008) Mass spectrometry in systems biology: an overview. *Mass Spectrom Rev.* 27, 6, 635-60.
- <sup>60</sup> Wilkins M.R., Appel R.D., Williams K.L., Hochstrasser D.F. (2007) *Proteome research: Concepts, technology and applications.* pp. 41, 47-50, 51, 52, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, Germany.
- <sup>61</sup> Mann M., Hendrickson R.C., Pandey A. (2001) Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 437-73.
- <sup>62</sup> Kinter M., Sherman N.E. (2000) *Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry.* pp. 117, 125, 152, 154, 160, 161, Willey-interscience, New York, USA.
- <sup>63</sup> Simpson R.J. (2003) *Proteins and proteomics - a laboratory manual.* pp.41-44, 347-351, Cold spring harbour laboratory press, New York, USA.
- <sup>64</sup> Weber K., Osborne M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412.
- <sup>65</sup> Ornstein L. (1964) Disc electrophoresis. I. background and theory. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 321-349.
- <sup>66</sup> Davis B.J. (1964) Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 121, 404-427.
- <sup>67</sup> Fazekas de St Groth S., Webster R. G., Datyner A. (1963) Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins in electrophoresis strips. *Biochim. Biophys. Acta.* 71, 377-391.

- 
- <sup>68</sup> Westermeier R., Marouga R. (2005) Protein detection methods in proteomic research. *Bioscience Reports* 25, 19-32.
- <sup>69</sup> Diezel W., Kopperschlager G., Hofmann E. (1972) An improved procedure for protein staining in polyacrylamide gels with a new type of Coomassie Brilliant Blue. *Anal. Biochem.* 48, 617-620.
- <sup>70</sup> Neuhoff V., Stamm R., Eibl H. (1985) Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis*, 6, 427-448.
- <sup>71</sup> Neuhoff V., Arold N., Taube D., Ehrhardt W. (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9, 255–262.
- <sup>72</sup> Anderson N.L., Esquer-Blasco R., Hofmann J.-P., Anderson N.G. (1991) A two-dimensional gel database of rat liver proteins useful in gene regulation and drug effects studies. *Electrophoresis* 12, 907-930, 1991.
- <sup>73</sup> Pieper R., Gatlin C.L., Makusky A.J., Russo P.S. Schatz C.R., Miller S.S., Su Q., McGrath A.M., Estock M.A., Parmar P.P., Zhao M., Huang S.T., Zhou J., Wang F., Esquer-Blasco R., Anderson N.L., Taylor J., Steiner S. (2003) The human serum proteome: Display of nearly 3700 chromatographically separated protein spots on two-dimensional electrophoresis gels and identification of 325 distinct proteins. *Proteomics* 3, 1345-1364.
- <sup>74</sup> Miller I., Friedlein A., Tsangaris G., Maris A., Fountoulakis M., Gemeiner M. (2004) The serum proteome of *Equus caballus*. *Proteomics* 4, 3227-3234.
- <sup>75</sup> Tsangaris G., Weitzdoerfer R., Pollak D., Lubec G., Fountoulakis M. (2004) The amniotic fluid cell proteome. *Electrophoresis* 25, 1168-1173.
- <sup>76</sup> Fountoulakis M., Soumaka E., Rapti K., Mavroidis M., Tsangaris G., Maris A., Weisleder N., Capetanaki Y. (2005) Alterations in the heart mitochondrial proteome in a desmin null heart failure model. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 38, 461-474.
- <sup>77</sup> Candiano G., Bruschi M., Musante L., Santucci L., Ghiggeri G.M., Carnemolla B., Orecchia P., Zardi L., Righetti P.G. (2004) Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25, 1327-1333.
- <sup>78</sup> Miller I., Crawford J., Gianazza E. (2006) Protein stains for proteomic applications: Which, when, why?. *Proteomics* 6, 5385-5408.
- <sup>79</sup> Switzer R.C. 3rd, Merrill C.R., Shifrin S. (1979). A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem.* 98, 1, 231-237.
- <sup>80</sup> Merrill C.R., Switzer R.C., Van Keuren M.L. (1979) Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids detected by two-dimensional electrophoresis and a highly sensitive silver stain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4335-4339.
- <sup>81</sup> Kerényi L., Gallyas F. (1972) A highly sensitive method for demonstrating proteins in electrophoretic, immunoelectrophoretic and immunodiffusion preparations. *Clin. Chim. Acta* 38, 465-467.

- 
- <sup>82</sup> Heukeshoven J., Dernick R. (1985) Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 6, 103-112.
- <sup>83</sup> Blum H., Beier H., Gross H.J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99.
- <sup>84</sup> Eschenbruch M., Bürk R. R. (1982) Experimentally improved reliability of ultrasensitive silver staining of protein in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 125, 96-99.
- <sup>85</sup> Richert S., Luche S., Chevallet M., Dorsselaer A.V., Leize-Wagner E., Rabilloud T. (2004) About mechanism of interference of silver staining with peptide mass spectrometry. *Proteomics*, 4, 909-916.
- <sup>86</sup> Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850-858.
- <sup>87</sup> Gharahdaghi F., Weinberg C.R., Meagher D.A., Imai B.S., Mische S.M. (1999) Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: A method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis* 20, 601-605.
- <sup>88</sup> Sumner L.W., Wolf-Sumer B., White S.P., Asirvatham V.S. (2006) Silver stain removal using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for enhanced peptide mass mapping by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16, 160-168.
- <sup>89</sup> Chevallet M., Luche S., Diemer H., Strub J.M., van Dorsselaer A., Rabilloud T. (2008) Sweet silver: A formaldehyde-free silver staining using aldoses as developing agents, with enhanced compatibility with mass spectrometry. *Proteomics*, 8, 4853-4861.
- <sup>90</sup> Bermudez A., Daban J.-R., Garcia J.R., Mendez E. (1994) Direct blotting, sequencing and immunodetection of proteins after five-minute staining of SDS and SDS-treated IEF gels with Nile Red. *Biotechniques* 16, 621-624.
- <sup>91</sup> Steinberg T.H., Hangland R.P., Singer V.I. (1996) Applications of SYPRO Orange and SYPRO Red protein gel stains. *Anal. Biochem.* 239, 238-245.
- <sup>92</sup> Berggren K.N., Schulenberg B., Lopez M.F., Steinberg T.H., Bogdanova A., Smejkal G., Wang A., Patton W.F. (2002) An improved formulation of SYPRO Ruby protein gel stain: comparison with the original formulation and with a ruthenium II tris(bathophenanthroline disulfonate) formulation. *Proteomics* 2, 486-498.
- <sup>93</sup> Rabilloud T., Strub J.-M., Luche S., van Dorsselaer A., Lunardi J. (2001) A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics* 1, 699-704.
- <sup>94</sup> Mackintosh J.A., Choi H.-Y., Bae S.-H., Veal D.A., Bell P.J., Ferrari B.C., Van Dyk D.D., Verrills N.M., Paik Y.-K., Karuso P. (2003) A fluorescent natural product for ultra sensitive detection of proteins in one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 3, 2273-2288.
- <sup>95</sup> Grandvogl B., Plösher M., Eichacker L.A., (2007) Hample preparation by in-gel digestion for mass spectrometry-based proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 991-1002.
- <sup>96</sup> Westermeier R., Naven T., Höpker H.-R. (2008) *Proteomics in practice: A guide to experimental design* 2<sup>nd</sup> ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.

- 
- <sup>97</sup> Hale J.E., Butler J.P., Gelfanova V., You J.-S., Knierman M.D. (2004) A simplified procedure for the reduction and alkylation of cysteine residues in proteins prior to proteolytic digestion and spectral mass analysis. *Anal. Biochem.* 333, 174-181.
- <sup>98</sup> Sanger F. (1949) Fractionation of oxidized insulin. *J. Biochem.* 44, 126-128.
- <sup>99</sup> Cleland W.W. (1964) Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Biochemistry* 3, 480-482.
- <sup>100</sup> Lundell N., Schreitmüller T. (1999) Sample preparation for peptide mapping-a pharmaceutical quality-control perspective. *Analytical Biochemistry* 266, 31-47.
- <sup>101</sup> Yan J.X., Kett W.C., Herbert B.R., Gooley A.A., Packer N.H., Williams K.L. (1998) Identification and quantitation of cysteine in proteins separated by gel electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 813, 187-200.
- <sup>102</sup> Herber B., Molloy M.P., Gooley A.A., Walsh B.J., Bryson W.G., Williams K.L. (1998) Improved solubility in two-dimensional electrophoresis using tributyl phosphine as a reducing agent. *Electrophoresis* 19, 845-851.
- <sup>103</sup> Herbert B. (1999) Advances in protein solubilization for two dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 20, 650-663.
- <sup>104</sup> Burns J.A., Butler J.C., Morgan J., Whitesides G.M. (1991) Selective reduction of disulfides by tris(2-carboxyethyl)phosphine. *J.Org.Chem.* 56, 2648-2650.
- <sup>105</sup> Getz E.B., Xiao M., Chakrabarty T., Cooke R., Selvin P.R. (1999) A comparison between sulfhydryl reductants tris(2-carboxyethyl)phosphine and dithiothreitol for use in biochemistry. *Anal.Biochem.* 273, 73-80.
- <sup>106</sup> Crestfield A.M., Moore S., Stein W.H. (1963) The preparation of enzymatic hydrolysis of reduced S-carboxymethylated proteins. *J. Biol. Chem.* 238, 622-627.
- <sup>107</sup> Plowman J.E., Flanagan LM, Paton L.N., Fitzgerald A.C., Joyce N.I., Bryson W.G. (2003) The effect of oxidation or alkylation on the separation of wool keratin proteins by two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 3, 942.
- <sup>108</sup> Galvani M., Hamdan M., Herbert B., Righetti P.G. (2001) Alkylation kinetics of proteins in preparation for two-dimensional maps. A matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry investigation. *Electrophoresis* 22, 2058.
- <sup>109</sup> Mikami B., Aibara S., Morita Y. (1980) Chemical modification of sulfhydryl groups in soybean  $\alpha$ -amylase. *J. Biochem.* 88, 103.
- <sup>110</sup> Lundblad L. (2005) Chemical reagent for protein modification 3<sup>rd</sup> ed. pp. 155-163, CRC press, London, England.
- <sup>111</sup> Mineki R., Taka H., Fujimura T., Kikkawa M., Shindo N., Murayama K. (2002) In situ alkylation with acrylamide for identification of cysteinyl residues in proteins during oneand two-dimensional sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. *Proteomics* 2, 1672-1681.

- 
- <sup>112</sup> Yokono T., Mineki R., Taka H., Kotaniguchi H., Murayama K. (2003) Improvement of Automatic In-Gel Digestion by in Situ Alkylation of Proteins. *Journal of Biomolecular Techniques*. 14,191-196.
- <sup>113</sup> Raftery M.A., Cole R.D. (1966) On the aminoethylation of proteins. *J. Biol. Chem.* 241, 3457-3461.
- <sup>114</sup> Friedman M. (2001) Application of the S-Pyridylethylation reaction to the elucidation of the structures and functions of proteins. *Journal of Protein Chemistry* 20, 6, 431-453.
- <sup>115</sup> Štosová T., Havliš J., Lenobel R., Šebela M. (2005) Proteolytické enzymy: Význam pro proteomiku. *Chem. Listy* 99, 896-905.
- <sup>116</sup> Sarbolouki M.N., Mahnam K., Rafiee-Pour H.A. (2004) Determination of pore/protein size via electrophoresis and slit sieve model. *Electrophoresis* 25, 2907.
- <sup>117</sup> Thomson J.J. (1899) On the masses of the ions in gasses at low pressure. *Philosophical magazine* 48, 295, pp. 547-567.
- <sup>118</sup> Liebler D.C. (2002) Introduction to proteomics-Tools for new biology. pp.55, 999 Riverview Drive, Suite 208 Totowa, New Jersey 07512, USA.
- <sup>119</sup> Munson M.S.B., Field F.H. (1966) Chemical Ionization Mass Spectrometry I. General Introduction. *J. Am. Chem. Soc.* 88, 2621-2630.
- <sup>120</sup> Fales H.M., Milne G.W., Pisano J.J., Brewer H.B., Blum M.S., MacConnell J.G., Brand J., Law N. (1972). Biological applications of electron ionization and chemical ionization mass spectrometry. *Recent Prog. Horm. Res.* 28, 591-626.
- <sup>121</sup> Dougherty R.C. (1981) Negative chemical ionization mass spectrometry: applications in environmental analytical chemistry. *Biomed. Mass Spectrom.* 8, 283-92.
- <sup>122</sup> Beckey H.D. (1969) Field ionization mass spectrometry. *Research/Development*. 20, 26.
- <sup>123</sup> Hamdan M., Righetti P.R. (2005) Proteomics today: Protein assessment and biomarkers using mass spectrometry, 2D electrophoresis, and microarray technology. pp. 17-19, 56-58, Wiley-Interscience, Hoboken, New Jersey, USA.
- <sup>124</sup> Karas M., Bahr U., Strupat K., Hillenkamp F., Tsarbopoulos A., Pramanik B.N. (1995) Matrix dependence of metastable fragmentation of glycoproteins in MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal. Chem.* 67, 675.
- <sup>125</sup> Dole M., Mack L.L., Hines R. L., Mobley R.C., Ferguson L.D. Alice M.B. (1968) Molecular Beams of Macroions. *Journal of Chemical Physics* 49, 5, 2240-2249.
- <sup>126</sup> Yamashita M., Fenn J.B. (1984) Electrospray ion source. Another variation of free-jet theme. *J. Phys. Chem.* 88, 4451.
- <sup>127</sup> Meng C.K., Mann M., Fenn J.B. (1988). Of Protons and Proteins. *Zeitschrift für Physik, D, Atoms, Molecules and Clusters* 10, 361-368.
- <sup>128</sup> Fenyo D., Qin J., Chait B.T. (1998) Protein identification using mass spectrometric information. *Electrophoresis*, 19, 998-1005.

---

<sup>129</sup> Perkins D.N., Pappin D.J., Creasy D.M., Cotrell J.S. (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 551.

<sup>130</sup> Řehulka P., Řehulková H., Chmelík J. (2007) Měření proteomických dat hmotnostní spektrometrií a jejich bioinformatická interpretace. *Chem. Listy* 101, 279-286.

<sup>131</sup> Sechi S., Chait B.T., (1998) Modification of Cysteine Residues by Alkylation. A tool in peptide mapping and protein identification. *Anal. Chem.* 70, 5150-5158.

<sup>132</sup> Hamdan M., Galvani M., Righetti P.G. (2001) Monitoring 2-DE gel-induced modifications of proteins by MALDI-TOF mass spectrometry. *Mass spectrometry reviews* 20, 121-141.