

Kvantitativna proteomika na osnovi masne spektrometrije

Kvantitativna proteomika je veja biokemije, ki se ukvarja z določanjem količine proteinov v celici. Pomembna metoda pri tem je masna spektrometrija, ki je bila do nedavnega uporabna zgolj za kvalitativno določanje. Kasneje pa sorazvilišepristop, kinam je omogočil, da pridobimo kvantitativno informacijo o proteomu. Pritejmetodi primerjamo signal istega peptida pod različnimi pogoji in tako dobimo grobo relativno ocenokoličine proteina v dveh proteomih. Peptide označimo s stabilnimi izotopi, da dobimo različne mase peptidov, iz masnega spektra pa dobimo kvantitativno informacijo. Izotopelahkovključimonadvanačina :kemijsko ali pa v živo celico preko metabolne inkorporacije.

Metoda označevanja s stabilnimi izotopi

Je zelo natančna metoda in je postala standard za kvantifikacijo proteoma na osnovi masne spektroskopije. Označke lahko v peptid oz. protein vstavimo na različne načine: dopiranje preko izotopsko označenega analoga, vključitev preko encima med prebavo proteinov, vključitev izotopa v peptid ali protein in vključitev izotopa v metabolizem celic. Razlika mas med lahkim in težkim peptidom mora biti vsaj 3-4 Da. Najbolj se uporabljata ^{13}C in ^{15}N , manj pa ^2H . Kvantitativna razmerja se določijo iz relativne primerjave intenzitet signalov pri eni sami analizi z MS (v primeru koeluiranih vrhov) ali iz površin vrhov, ugotovljenih iz XIC (ekstrahiran ionski tok), lahkega in težkega peptida.

Pristopi kemijskega označevanja

Pri tem pristopu kemijski reagenti, označeni s stabilnimi izotopi, kot tarčo izberejo reaktivna mesta na proteinu ali peptidu. Primer je ICAT, kjer izolirane proteine iz vzorca in kontrole denaturiramo, reduciramo in modificiramo z lahkim oz. težkim ICAT reagentom (napade cisteine). Proteome razgradimo in označene peptide izoliramo s pomočjo avidin kolone, nato pa jih analiziramo z MS. Poleg cisteinske -SH skupine lahko označimo tudi primarne aminske in karboksilne skupine. Na ta način lahko kvantificiramo tudi posttranslacijske modifikacije.

Metabolna inkorporacija stabilnih izotopov

Pomembna način označevanja je SILAC (stable isotope labeling by amino acids in cell culture). Gre za označevanje aminokislinske s stabilnimi izotopi v celičnih kulturah. Označene esencialne AA dodamo v gojiščedveh celičnih kultur in tako uvedemo lahko oz. težko aminokislino v novo sintetiziran polipeptid. Nato protein razgradimo s tripsinom in analiziramo z MS. Vsak par peptidov se loči na osnovi razlike v masi lahkega oz. težkega izotopa.

Zakaj kvantitativna proteomika?

Trenutna tehnologija nam omogoča preučevanje celotnega transkriptoma. V bioloških procesih pa so večinoma deleženi proteini, s količino mRNA pa ne moremo natančno opredeliti količine proteinov, ki se sintetizirajo, saj nadejamo količino le-teh v celicivplivajo različni faktorji, kot so njihova razgradnja, razgradnja mRNA in posttranslacijske modifikacije. Zato je včasih nujno, da analiziramo proteine same oz. primerjamo razmerje med količinami proteina in mRNA. Da bi bilo mogoče kvantificirati celotno genomsko, pa bi bilo boljše izboljšati masno spektrometrijo in povečati njihovo občutljivost.