

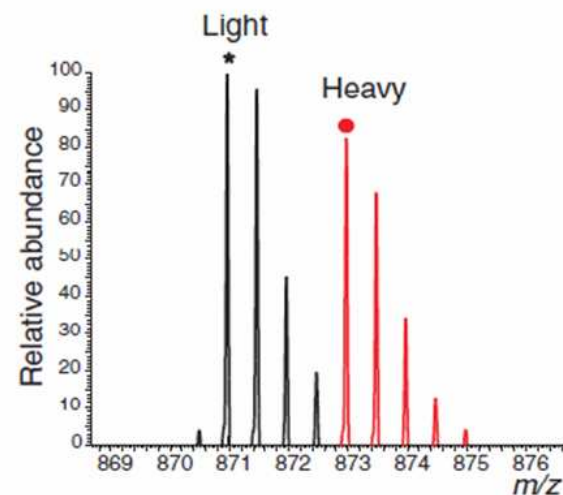
Kvantitativna proteomika na osnovi masne spektrometrije

Tanja Korpar

Filip Kolenc

Ines Šterbal

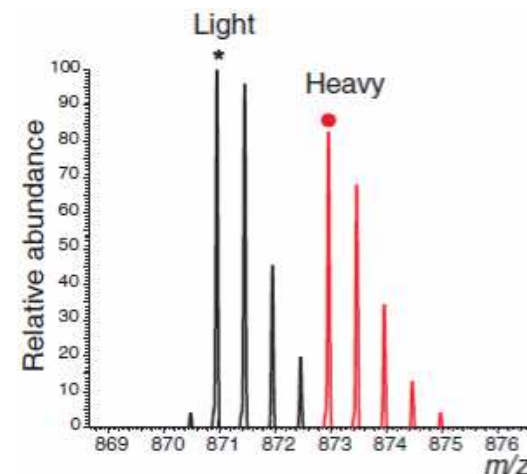
- Kvantitativna proteomika – določanje količine proteinov v celici
- Sprva 2-DE, nato MS
- MS: proteine označimo z lahkim oz. težkim izotopom, primerjamo vrhove – dobimo relativno količino proteinov



**Označevanje s stabilnimi izotopi v
kvantitativne namene na osnovi
masne spektroskopije**

Osnovne značilnosti

- I. Neradioaktivne izotopske oznake (C13, N15, H2)
- II. Peptid kot njegov označen analog imata oba enako ionizacijsko učinkovitost
- III. Masna razlika mora znašati vsaj 3 – 4 Da
- IV. MALDI
- V. Kvantitativna razmerja se določijo iz relativne primerjave intenzitet signalov



Metode izotopskega označevanja

1. dopiranje skozi izotopsko označen analog
2. vključitev skozi encim med prebavo proteinov
3. vključitev kemikalije (izotopske oznake) na peptid ali protein
4. vključitev skozi metabolizem celic

Metode izotopskega označevanja

Vključitev skozi izotopsko označen analog

- Temelji na absolutni kvantifikaciji proteinov
- Analog peptida služi kot interni standard
- Vključi se ga v pozni fazi, med ali po prebavi proteina
- Kakršnekoli predhodne kvantitativne napake interni standard ne popravi

Vključitev skozi encim med prebavo proteinov

- Prebava se dogaja v $H_2O \rightarrow O^{18}$
- Med razgradnjo tripsin vgradi izotop kisika v peptide
- Zamenjati se morata oba karboksilna kisika
- Metoda se ni najbolj uporabna

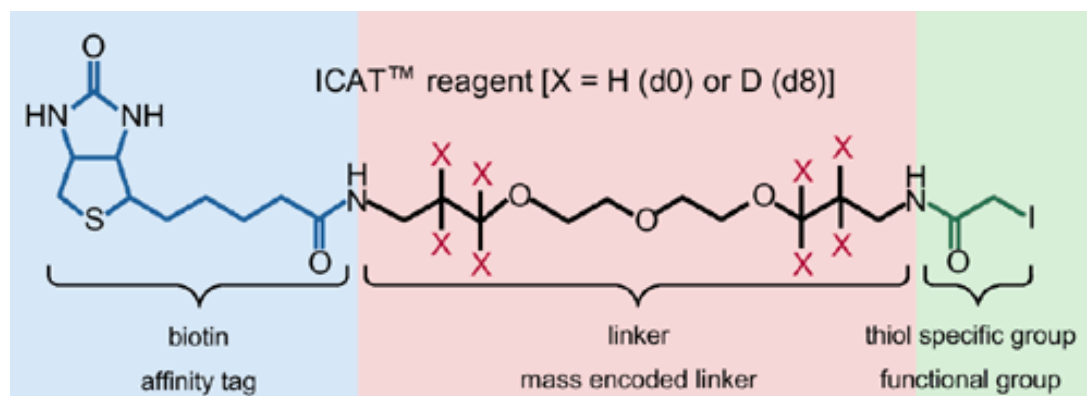
Pristopi kemičnega označevanja v kvantifikaciji osnovani na masni spektroskopiji

Ø ICAT (Isotope-coded affinity tag)

Ø ICAT reagenti so sestavljeni iz reaktivne skupine (cistein usmerjene), linkerske regije in biotinske skupine

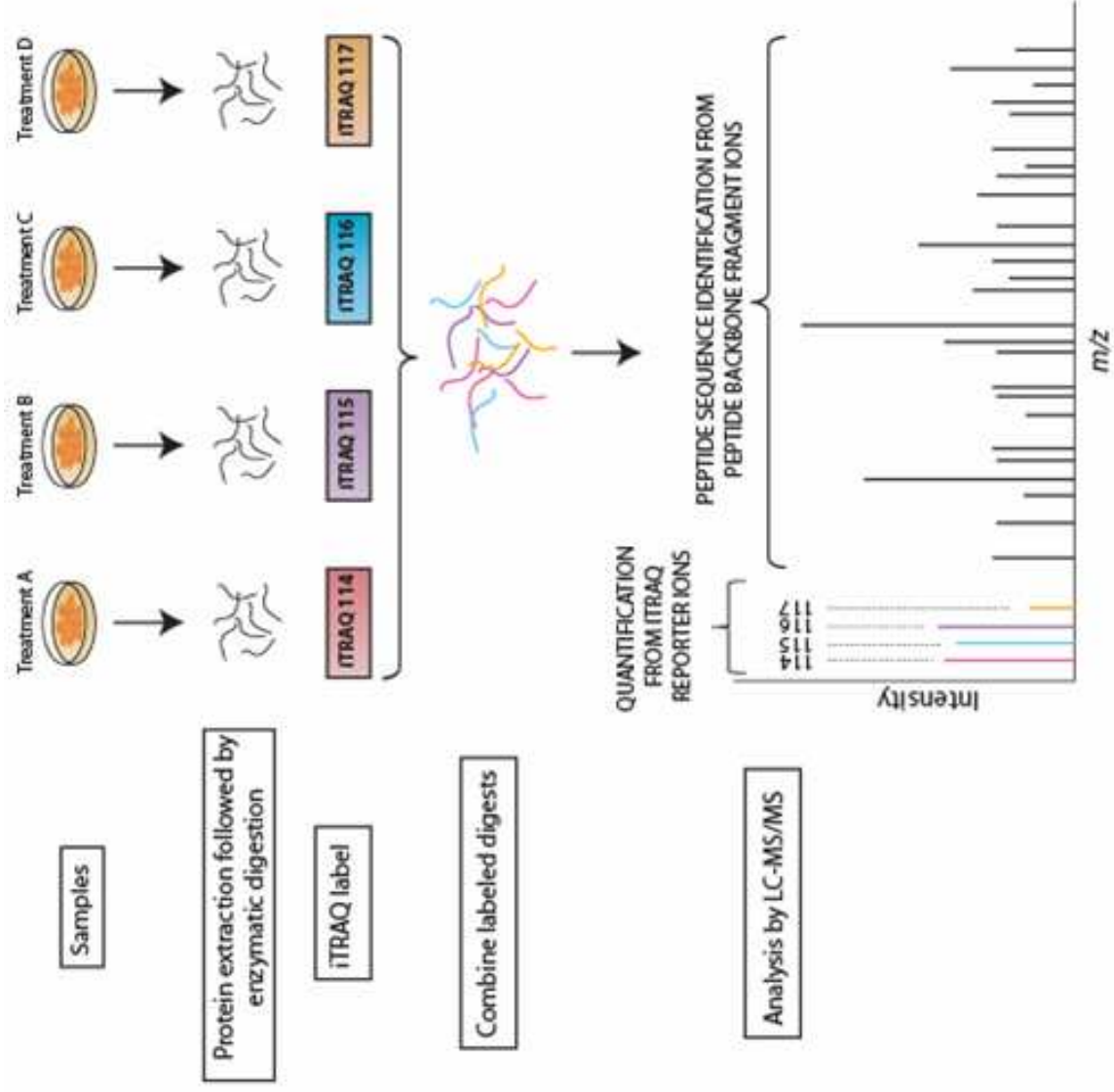
Ø Proteini iz eksperimenta ter kntrole se denaturirajo, reducirajo in modificirajo z lahkim ali težkim ICAT reagentom

Ø Slabosti: Nepopolno označevanje, že majhne sledi stranskih reakcij vodijo k velikemu povečanju kompleksnosti peptidne analizirane zmesi.



Amines	Tandem mass tags (TMT)	D	109
	Succinic anhydride	D	110
	<i>N</i> -acetoxysuccinamide	D	56
	Acetic anhydride	D	111
	Propionic anhydride	D	58
	Nicotinoyloxy succinimide (Nic-NHS)	D	55
	Isotope-coded protein label (ICPL, Nic-NHS)	D	57
	Phenyl isocyanate	D	112
	Isotope-coded <i>n</i> -terminal sulfonation (ICenS) 4-sulfophenyl isothiocyanate	¹³ C	113
	Sulfo-NHS-SS-biotin and ¹³ C, ¹⁵ N-methyl iodide	¹³ C, D	114
	Formaldehyde	D	115
	Isobaric tag for relative and absolute quantitation (iTRAQ)	¹³ C, ¹⁵ N & ¹⁸ O	59
Lysines	Guanidination (O-methyl-isourea) mass-coded abundance tagging (MCAT)	No isotope	116
	Guanidination (O-methyl-isourea)	¹³ C, ¹⁵ N	117,118
	Quantitation using enhanced sequence tags (QUEST)	No isotope	119
	2-Methoxy-4,5-1 <i>H</i> -imidazole	D	120
Carboxyl	Methyl esterification	D	51
	Ethyl esterification	D	121

- I. Aminske in karboksilne skupine
- II. Kvantificira se lahko tudi stopnje post-translacijskih modifikacij
- III. Sukcinilacija za zaščito aaminskih skupin na lizinih
- IV. iTRAQ



METABOLNA INKORPORACIJA STABILNIH IZOTOPOV

à prekurzorje s stabilnimi izotopi dodamo v rastni medij
à rast celice à prekurzorji se inkorporirajo v celične
proteine

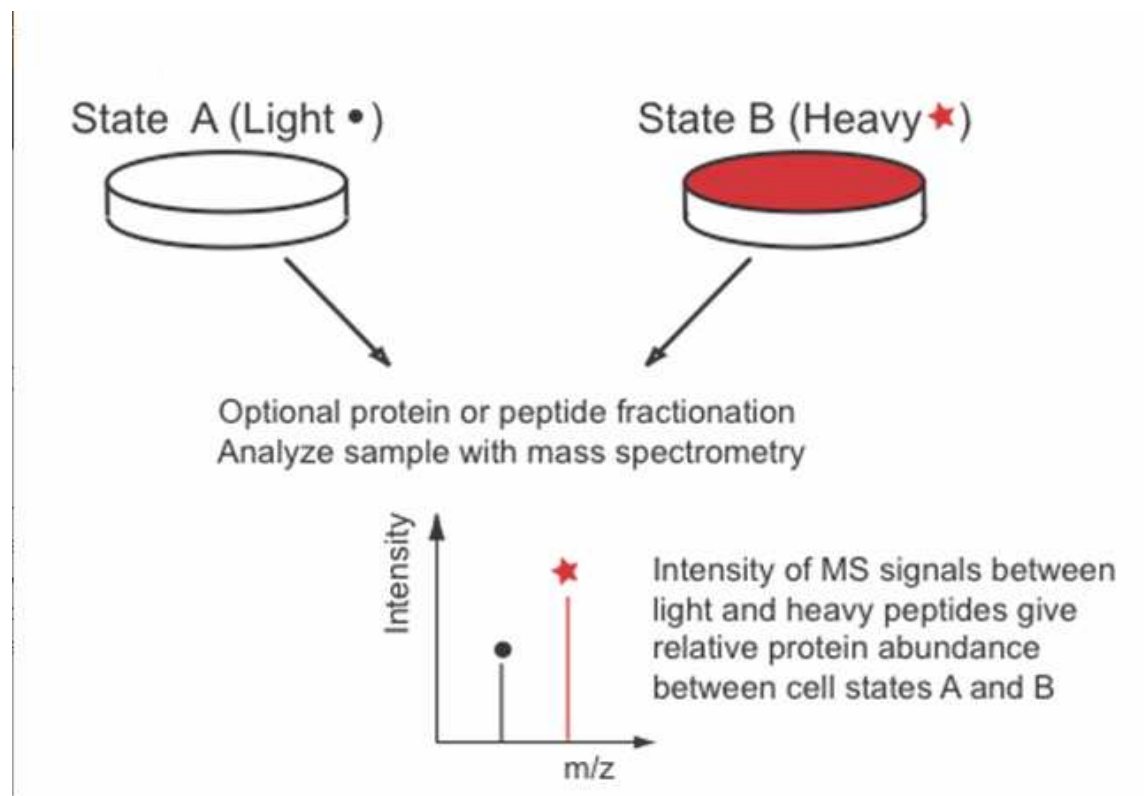
à celice rastejo v „lahkem“ in „težkem“ mediju à dve
populaciji à to razlikujemo z MS



- à poteka v živih celicah
- à odsotnost stranskih reakcij
- à relativno poceni

SILAC (STABLE ISOTOPE LABELING BY AMINO ACIDS IN CELL CULTURE)

à označevanje aminokislin s stabilnimi izotopi v celičnih kulturah



RASTNI MEDIJ

- à običajno uporabljamo dializirani serum
- à nekatere celične linije ne rastejo v dializiranem serumu (izguba esencialnih rastnih faktorjev) à kombinacija dializiranega in nedializiranega seruma

Zakaj uporabiti kvantitativno proteomiko?

- Ker so v biološke procese večinoma udeleženi proteini – s količino mRNA pa ne moremo napovedati dejanske količine proteinov

Proteom kot „molekularni film“

- Spremljanje spreminjanja proteoma v času
- SILAC

