

ПРОТОКОЛЫ ПРОТЕОМНОГО АНАЛИЗА: ВЫДЕЛЕНИЕ, СОЛЮБИЛИЗАЦИЯ БЕЛКОВ И ГИДРОЛИЗ БЕЛКОВ ПРОТЕАЗАМИ

*Е.Н. Обухова¹, Е.В. Хрянова², С.Е. Новикова², Л.Ш. Казиева², О.В. Тихонова², В.Г. Згода^{*2}*¹Сколковский институт науки и технологий, 121205, Москва, Большой бул., 30с1²Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, 119435, Москва, Погодинская ул., 10; *e-mail: victor.zgoda@gmail.com

Высокопроизводительные исследования белкового состава биологических образцов в настоящее время стали рутинными и используются практически во всех направлениях науки о жизни. Современные методы протеомики позволяют провести достоверную идентификацию и количественную оценку тысяч белков в одном эксперименте. Стандартная процедура протеомного анализа включает следующие стадии: 1. солюбилизация и выделение белков и их последующий гидролиз протеазами; 2. анализ образовавшихся пептидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием; 3. биоинформатическая и статистическая обработка результатов. В данной работе представлены протоколы первого этапа протеомного анализа – пробоподготовки, которые рутинно используются в лаборатории системной биологии Института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича.

Ключевые слова: протеомика; солюбилизация белков; высокоспецифичная протеаза; протокол**DOI:** 10.18097/BMCRM00277**ВВЕДЕНИЕ**

Протеомика – область биохимии, изучающая качественный и количественный состав белков биологических объектов, а также структурно-функциональные свойства белков. Совокупность всех белков биологического объекта называется протеом [1]. Выделяют два протеомных подхода к изучению белков с использованием масс-спектрометрии:

1. определение первичной структуры и модификаций аминокислот на основании масс-спектрометрического анализа целой белковой молекулы (т.н. top-down, анализ сверху вниз).

2. bottom-up (анализ снизу вверх) анализ, который основан на масс-спектрометрическом анализе фрагментов (пептидов) белков. В статье рассмотрены протоколы пробоподготовки для данного подхода.

1. ЭТАПЫ ПРОБОПОДГОТОВКИ ДЛЯ ПРОТЕОМНОГО АНАЛИЗА

Стандартная процедура протеомного bottom-up анализа включает следующие стадии: солюбилизация и выделение белков и их гидролиз протеазами, последующий анализ образовавшихся пептидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС) и, наконец, биоинформатическая и статистическая обработка результатов.

1.1. Выделение белка

Биологические матрицы (клетки, ткани, биожидкости) могут содержать различные компоненты (липиды, соли,

нуклеиновые кислоты), которые снижают чувствительность и затрудняют масс-спектрометрическую детекцию пептидов. Первый этап пробоподготовки – выделение белка. В самом простом случае, например при изучении протеомов клеточных линий, достаточно использовать стандартный лизис-буфер для гидролиза в растворе с последующим «озвучиванием» пробы в ультразвуковой бане или с использованием специализированных гомогенизаторов (Протокол 1). После выделения белковой фракции следует измерение концентрации белка любым используемым методом. Мы в своей работе используем колориметрическое определение белка с бичинхониновой кислотой (BCA, с англ. bicinchoninic acid) (Протокол 2). Есть определенные требования к концентрации и количеству белка в образце для проведения полноценного протеомного анализа. Так, если количество белка в 100 мкл образца превышает 25 мкг, то этого достаточно для проведения протеомного эксперимента. Если концентрация белка ниже 0.25 мкг/мкл, то необходимо провести концентрирование образца из большего объема. Обычно для повышения концентрации белка используют осаждение в системе метанол-хлороформ (Протокол 3) или органическими растворителями такими как ацетонитрил, метанол (Протокол 4), ацетон (Протокол 5). Осаждение белков также используют для удаления липидов при анализе протеомов мембранных компонент клеток. Другой подход для увеличения концентрации пробы – использование молекулярных фильтров с отсечением (по массе) 1-30 кДа.

1.2. Солюбилизация белков

Успех протеомного анализа во многом определяется эффективностью ферментативного гидролиза, который, в свою очередь, зависит от активности используемых протеаз и



доступности сайтов расщепления. Если активность протеаз достаточно легко регулировать созданием оптимальных условий реакции (советующие значения pH, ионной силы и концентрация используемой протеазы), то обеспечение доступности сайтов гидролиза в белковых экстрактах может оказаться сложной задачей. Для обеспечения доступности сайтов гидролиза белки необходимо денатурировать. Это особенно актуально при изучении мембранных белков, гистонов, высокоструктурированных белков и их комплексов. В этом случае для солюбилизации и денатурации белков и их комплексов необходимо использовать сильные детергенты. Однако избыток детергентов в пробе не совместим с последующими этапами протеомного анализа, т.к. отрицательно влияет на хроматографическое разделение пептидов и их масс-спектрометрический анализ. Поэтому возникает задача очистки пробы от детергентов перед анализом.

В своей работе мы используем такие денатурирующие агенты, как мочеви́на, дезоксихолат натрия (DOXHNa), натриевая соль лаурилсерной кислоты (SDS, англ. sodium dodecyl sulfate) и коммерческий детергент ProteaseMAX («Promega», США).

SDS – один из самых сильных детергентов, используемых для солюбилизации белков. Это недорогой и эффективный реагент, и для его удаления из пробы есть несколько подходов. Гидролиз белка в геле был одним из первых опубликованных протоколов, с которых начинались протеомные исследования [2]. При этом белки, денатурированные в буфере для загрузки и при проведении электрофореза белков в полиакриламидном геле в присутствии SDS (SDS-PAGE), отмывались от окраски и детергента в вырезанном кусочке геля. После регидратации к гелю добавляли протеазу (трипсин), который, проникая в поры геля, гидролизует полипептидную цепь белков. После экстракции, пептиды анализируют методами масс-спектрометрии (Протокол 6).

Технологии S-Trap (с англ. Suspension Trapping, захват в суспензии) и FASP (с англ. Filter-Aided Sample Preparation, пробоподготовка с использованием молекулярных фильтров) также позволяют использовать SDS для солюбилизации и денатурации белков.

Ключевая идея S-Trap заключается в создании суспензий денатурированных белков на поверхности фильтров [3]. Для этого подкисленный раствор белка в SDS (pH <1) смешивают с 90% метанолом и наносят на кварцевый фильтр. Суспензия белка оседает на фильтре, а SDS растворяется в метаноле и смывается вместе с солями и другими мешающими масс-спектрометрии компонентами пробы. После нескольких последовательных промывок белки гидролизуют ферментом, а образовавшиеся пептиды переходят в растворимое состояние и элюируются с фильтра (Протокол 7).

Метод пробоподготовки на фильтрах FASP также позволяет использовать SDS для растворения белковых проб [4]. Кроме того, использование ультрафильтрации позволяет сконцентрировать белки пробы, если исходная концентрация была недостаточной. Пробоподготовка на фильтре состоит из следующих этапов: (i) нанесение пробы, содержащей детергент, на фильтры для центрифужной ультрафильтрации с отсечением по молекулярному весу <10-30 кДа, (ii) многократная отмывка от детергентов и солей на фильтре, (iii) ферментативный гидролиз с последующей элюцией

образовавшихся пептидов через поры фильтра (Протокол 8).

Кроме удаления детергентов из пробы методом отмывки часто используют осаждение детергентов при снижении их растворимости при изменении pH среды. Так, например, DOXHNa при нейтральном и слабо щелочном pH, при котором и проводится реакция гидролиза трипсином, хорошо растворим в воде и хорошо солюбилизирует мембранные белки. Реакцию ферментативного расщепления останавливают добавлением избытка кислоты до конечной концентрации 5% муравьиной кислоты (FA, formic acid); при этом DOXHNa теряет растворимость и выпадает в осадок. Последующее центрифугирование и осторожный отбор надосадка позволяет полностью избавиться от негативного влияния DOXHNa на хромато и масс-спектрометрический анализ (Протокол 1).

В отличие от DOXHNa, ProteaseMAX не выпадает в осадок при низких pH, а деградирует в ходе реакции гидролиза на составляющие, легко удаляемые перед ВЭЖХ и МС анализом. ProteaseMAX широко используют в ходе пробоподготовки в комбинации с такими протеазами, как трипсин, химотрипсин и Lys-C (лизилэндопептидаза). Детергент ProteaseMax – это органический гидрофобный анионный сульфат, который разрушается на 3-аминопропан-1-сульфоновую кислоту и 1-(фуран-2-ил) ундекан-1-ол в слабощелочной среде при нагревании [5], что соответствует условиям реакции ферментативного гидролиза белка протеазами, упомянутыми выше. Полученные продукты деградации удаляются из образца методами обращенно-фазовой твердофазной экстракции и центрифугированием, соответственно. ProteaseMAX дорогой и разрекламированный коммерческий продукт, эффективность которого для ускорения и повышения эффективности гидролиза показана во многих работах [6]. Мы используем этот сурфактант для гидролиза белков в растворе (Протокол 9), хотя показана его эффективность при использовании для гидролиза белков в геле [7].

Кроме описанных выше, опубликовано большое количество различных методов, протоколов солюбилизации и денатурации белков. В обзоре Danko и соавт. [8] представлена исчерпывающая информация об используемых в пробоподготовке детергентах.

1.3. Ферментативный гидролиз

Для расщепления белка обычно используют ферменты с высокой специфичностью, которые позволяют получить пептидные фрагменты с известными аминокислотными последовательностями. Важные параметры ферментов – их специфичность, активность и стабильность в присутствии детергентов приведены для наиболее часто используемых в протеомике ферментов в таблице 1.

В протеомике широко используют такие ферменты, как трипсин (Протокол 1), Lys-C (Протокол 10), несколько реже химотрипсин (Протокол 11). Для решения некоторых задач, таких как подтверждение полной последовательности белков, масс-спектрометрическое *de novo* секвенирование белков с неизвестной первичной структурой, выявление сайтов и природы посттрансляционных модификаций аминокислотных остатков белков (ПТМ), могут быть использованы другие протеазы, например Arg-C, Glu-C (Протокол 12), Lys-N [9]. Для анализа структуры антител используют ферменты папаин (Протокол 13) и IdeZ

Таблица 1. Ферменты, наиболее часто используемые в протеомике

Название	Специфичность	Оптимум pH	Рабочий буфер
Трипсин	Arg-X, Lys-X*. Фрагменты -Lys-Pro- и -Arg-Pro- устойчивы к действию трипсина	7.5**	50 мМ ТЭАБ***
Химотрипсин	Химотрипсиноген А. Гидролизует пептидные связи после Tyr, Trp, Phe, частично – после Leu, Met, Ala, Asp.	7.8 – 8	50 мМ ТЭАБ
Lys-C	Лизилэндопептидаза. Гидролизует пептидную связь после лизина (Lys-X).	7 – 9	50 мМ ТЭАБ
Glu-C	Глутамил пептидаза. Специфичность зависит состава буфера. В бикарбонате аммония (pH 7-8) или ацетате аммония (pH 4) расщепляет связь Glu-X. В фосфатных буферах (pH 7.8-8.5) расщепляет связи Glu-X, Asp-X.	4 или 8	50 мМ ТЭАБ
Asp-N	Пептидил-Asp металлопептидаза. Гидролизует пептидные связи X-Asp.	4 – 9	
Lys-N	Пептидил-Lys металлоэндопептидаза. Гидролизует пептидные связи X-Lys.	9.5	50 мМ ТЭАБ
Пепсин	Неспецифический фермент, с наибольшей скоростью гидролизует пептидные связи ароматических аминокислот	1 – 4 ****	40 мМ HCl либо 100 мМ Na-цитратный буфер
Arg-C	Клострипаин. Гидролизует пептидные связи Arg-X.	7 – 8	50 мМ ТЭАБ
Папаин	Растительный «пепсин». Гидролизует амиды, пептиды, белки с незамещенной аминогруппой	Рабочий диапазон 3-12, оптимум – 5-8	50 мМ Na-фосфатный буфер, 50 мМ L-цистеин, 2 мМ ЭДТА
IdeZ	Рекомбинантный фермент, распознает антитела человека, овцы, обезьяны и кролика. Специфично расщепляет антитела на Fab и Fc фрагменты.	6.6	50 мМ Na-фосфатный буфер, 150 мМ NaCl

Примечание. *X – любой аминокислотный остаток. **pH доводят гидроксидом натрия. ***ТЭАБ – триэтиламмония бикарбонат. ****pH доводят 1 N хлороводородной кислотой.

(Протокол 14) [10]. Зная специфичность протеаз и аминокислотную последовательность белка, можно рассчитать точную массу, паттерн фрагментации при масс-спектрометрическом tandemном анализе и предсказать время удерживания пептида на колонке с обращенной фазой [11, 12]. Таким образом, в зависимости от конкретной задачи эксперимента можно планировать использование вышеперечисленных ферментов по отдельности или в комбинации.

Перед проведением ВЭЖХ-МС анализа следует проверить полноту гидролиза, а также провести выравнивание концентрации пептидов для последующего количественного анализа. Для этого измеряют концентрацию пептидов в пробах (Протокол 15).

1.4. Алгоритм выбора протокола пробоподготовки для разного типа проб

Как правило, пробоподготовка для протеомного анализа состоит из нескольких этапов и включает лизис проб, очистку, концентрирование, гидролиз. В таблице 2 приведены рекомендации по выбору протоколов пробоподготовки для разного типа проб.

Протокол 7 (S-Trap) и Протокол 8 (FASP) универсальные и могут быть использованы для любого вида образцов. Необходимо отметить, что, несмотря на заверения разработчиков о высоком (более 90%) выходе пептидов в ходе гидролиза [41, 42], мы наблюдали значимые (до

30%) потери образца при исполнении данных протоколов. Поэтому при ограниченном количестве образца лучше использовать протоколы гидролиза в растворе или в геле (Протоколы 1, 6, 9). При проведении экспериментов по сравнению концентрации белков пробах рекомендуется проводить измерение концентрации пептидов согласно Протоколу 15. При необходимости содержание пептидов в пробах выравнивают по минимальному значению в ряду образцов разведением 0.1% муравьиной кислотой.

Необходимо заранее предусмотреть хранение готовых образцов. Результатом описанных протоколов пробоподготовки являются пробы пептидов в водном растворе 0.1% муравьиной кислоты. Образцы передают на анализ немедленно или хранят не более суток при температуре 4°C. Если образцы планируют хранить дольше, то необходимо упарить их в вакуумном концентраторе досуха и хранить при -20°C.

2. ПРОТОКОЛЫ ПРОБОПОДГОТОВКИ ДЛЯ ПРОТЕОМНОГО АНАЛИЗА

Во всех протоколах необходимо использовать особо чистые органические растворители для ВЭЖХ-МС. Использование растворителей меньшей чистоты (например, химически чистые или 95%) приводит к усилению фонового сигнала масс-спектрометра и снижению чувствительности анализа. Для удобства и в качестве примера в протоколах указаны производители растворителей и реагентов,

Таблица 2. Рекомендации по выбору методов проведения пробоподготовки для протеомных исследований.

Образцы	Минимально необходимое количество образца	Рекомендуемые протоколы	Ссылки
Бактерии	1 млн клеток	Протокол 7 или Протокол 8	[12], [13]
Эукариотические клетки	0.2-1 млн клеток	Протокол 1 или Протокол 9	[14], [15], [16]
Клетки мозга, адипоциты	0.2-1 млн клеток	Протокол 3 (или Протокол 5) -> Протокол 7 или Протокол 8	[17], [18]
Ткани	0.2-1 мг	Протокол 7 или Протокол 8	[19], [20], [21]
Мембранные фракции клеток, ядра	0.050 – 0.1 мг	Протокол 3 -> Протокол 7 или Протокол 8	[22], [23], [24]
Биологические жидкости:			
Плазма/сыворотка	0.01-0.05 мл	Протокол 1 или Протокол 9	[25], [26], [27]
Моча	5 мл	Протокол 5 -> Протокол 1	[28]
Спинномозговая жидкость	0.1 мл	Протокол 1	[29], [30]
Слюна	0.5 – 1 мл	Протокол 1	[31]
Слезы, глазная жидкость	0.050-0.1 мл	Протокол 1	[32]
Пищевые продукты (молоко, колбасы, мясо, рыба, беспозвоночные, икра, слизь, биопленки и т.д.)	Обычно присутствуют в избытке	Протокол 3 (или Протокол 5) -> Протокол 7 или Протокол 8 Протокол 4	[33], [34], [35], [36]
Очищенные фракции/белки	10 -50 мкг	Протокол 1 Протокол 6 *, 8	[37], [38], [39]
Очищенное антитело	10 - 50 мкг	Протоколы 1, 10-14	

Примечание.*Если препарат содержит большие концентрации детергентов, глицина, имидазола и других соединений, используемых для хранения и выделения белков.

применяемых в нашей лаборатории. Используемые буферы готовят в день анализа.

2.1. Протокол 1. Гидролиз белка в растворе с солюбилизацией белка в дезоксихолате натрия

Реактивы и приборы

- Вода бидистиллированная (подготовлена на системе Milli-Q, «Merck», США).
- Дезоксихолат натрия («Sigma Aldrich», США).
- 1 М Триэтиламмония бикарбонат (ТЭАБ) («Supelco», США).
- Муравьиная кислота 98% («Acros Organics», Бельгия).
- Буфер для солюбилизации белка/лизиса клеток: 2% дезоксихолат натрия в 50 мМ ТЭАБ.
- 400 мМ раствор хлорацетамида («Acros Organics», Бельгия) в 50 мМ ТЭАБ.
- 500 мМ раствор ТСЕР (трис(2-карбоксиэтил)фосфина гидрохлорид) («Supelco», США).
- Раствор трипсина («Promega», США, #V5111) концентрации 200 нг/мкл (хранится при -20°C).
- Раствор 50% муравьиной кислоты в воде.
- Раствор 0.1% муравьиной кислоты в воде.
- Ультразвуковой дезинтегратор Bandelin Sonopuls, («Bandelin Electronic», Германия).

Гидролиз в растворе

1. Солюбилизация белков/лизис клеток. Для образцов очищенных белков: отобрать объем, содержащий 100

мкг белка (после предварительного измерения белка колориметрическим методом с бицинхониновой кислотой (BCA) - см. Протокол 2) и довести объем до 100 мкл добавлением 50 мМ ТЭАБ. Для образцов биологических жидкостей: отобрать объем, содержащий 100 мкг белка (после предварительного измерения белка - см. Протокол 2) и довести объем до 100 мкл буфером для солюбилизации белка. Для образцов тканей, клеток или их компонентов, а также образцов пищевых продуктов: отобрать минимальное необходимое количество (см. Табл. 2) и добавить к нему 100 мкл буфера для лизиса тканей. Образец обработать ультразвуком с помощью ультразвукового дезинтегратора 3 раза по 30 с на мощности 50% при температуре 0°C (на влажном льду), центрифугировать при 10000 g в течение 5 мин. Далее измерить концентрацию белка в надосадке (см. Протокол 2).

2. В объеме пробы для гидролиза в растворе должно содержаться 100 мкг белка. Для восстановления дисульфидных связей и алкилирования к образцам добавить по 2 мкл раствора, содержащего 500 мМ Трис (2-карбоксиэтил)фосфина гидрохлорид (ТСЕР) и 4 мкл 400 мМ хлорацетамида (САА) в 50 мМ ТЭАБ. Образцы перемешать, инкубировать 30 мин при температуре 80°C и затем охладить до комнатной температуры. Перед гидролизом восстановленный и алкилированный образец разбавить в 5-6 раз добавлением 50 мМ ТЭАБ.

3. Для гидролиза в растворе к образцам добавить раствор трипсина в соотношении фермент:субстрат 1:50. Смесь инкубировать в течение ночи при температуре 37°C.

4. Для остановки реакции трипсинолиза и осаждения дезоксихолата натрия добавить к образцам 10 мкл

Таблица 3. Приготовление калибраторов для измерения концентрации белка методом BCA на спектрофотометре CLARIOStar

№	Концентрация калибратора, мкг/мл	Объем исходного раствора	Объем воды, мкл	Концентрация белка после добавления 1 мл BCA, мкг/мл
1	2	2 мкл x Раствор 2	28	0.066
2	5	5 мкл x Раствор 2	25	0.166
3	10	10 мкл x Раствор 2	20	0.33
4	25	2.5 мкл x Раствор 1	27.5	0.83
5	50	5 мкл x Раствор 1	25	1.66
6	75	7.5 мкл x Раствор 1	22.5	2.5
Холостая проба	0	0	30	0

раствора 50% муравьиной кислоты с последующим центрифугированием при 14000 g в течение 20 мин.

5. Надосадочную жидкость перенести в стеклянную виалу, высушить в вакуумном концентраторе при 45°C до полного высыхания образца.

6. Образцы перерастворить в 0.1% муравьиной кислоте до конечной концентрации пептидов 2 мкг/мкл и передать на масс-спектрометрический анализ.

2.2. Протокол 2. Измерение концентрации белка в пробах методом BCA

Реактивы

- Вода бидистиллированная (подготовлена на системе Milli-Q).
- Бицинониновая кислота (BCA) («Thermo Scientific», США).
- Карбонат натрия («Sigma Aldrich»).
- Тартрат натрия («Sigma Aldrich»).
- Гидроксид натрия («Acros Organics»).
- Гидрокарбонат натрия («Sigma Aldrich»).
- Сульфат меди («NeoFroxx», Германия).
- Реактив BCA. 0.2 г BCA, 4 г карбоната натрия, 0.32 г тартрата натрия, 0.8 г гидроксида натрия, 1.9 г гидрокарбоната натрия на 200 мл воды.
- 4% раствор сульфата меди.
- Бычий сывороточный альбумин (BCA) («Диа М», Россия)

Измерение концентрации белка методом BCA на спектрофотометре NanoDrop («Thermo Scientific», США)

1. В виале на 1.5 мл смешать 10 мкл пробы, 20 мкл воды, 1 мл реактива BCA, 20 мкл 4% раствора сульфата меди. Для приготовления холостой пробы смешать 30 мкл воды, 1 мл реактива BCA, 20 мкл 4% раствора сульфата меди. Пробу встряхнуть и инкубировать 20 мин при 56°C в термоблокере с перемешиванием.

2. Пробу охладить до комнатной температуры. Анализ проб на спектрофотометре (в нашем случае NanoDrop) проводить в трех повторях (при необходимости – больше, для расчетов берутся три повторяющиеся близкие значения).

3. Полученные значения концентрации белков в пробах пересчитать в общее количество белка на пробу (в соответствии с объемом пробы).

Измерение концентрации белка методом BCA на спектрофотометре CLARIOStar («BMG Labtech», Германия)

1. Приготовить калибраторы для построения калибровочной кривой. Раствор 1 BCA концентрации 10 мг/мл (например, 0.01257 г в 1.257 мл воды). Раствор 2 BCA концентрации 1 мг/мл (например, 100 мкл Раствора 1 + 900 мкл воды).

2. В пробирках на 1.5 мл приготовить калибраторы в соответствии с таблицей 3.

3. В виалы на 1.5 мкл аликвотировать образцы. На анализ следует брать не более 30 мкл образца и доводить водой до 30 мкл (например, 10 мкл + 20 мкл воды) в зависимости от предполагаемой концентрации белка и доступного количества образца.

4. В виалы с образцами и калибраторами добавить по 1 мл реактива BCA и 20 мкл 4% раствора сульфата меди.

5. Пробу встряхнуть и инкубировать 20 мин при 56°C с перемешиванием.

6. Охладить пробу до комнатной температуры. Анализировать на спектрофотометре в трех повторях.

7. Полученные значения концентрации белков в пробах пересчитать в общее количество белка на пробу (в соответствии с объемом пробы).

Примечания

1. При анализе на приборе в программу необходимо вводить значения концентрации калибраторов после разведения BCA (0.066, 0.166 и т.д., см. таблицу 3).

2. На практике концентрации белка в пробе редко превышают 20-30 мкг. Можно исключить при составлении калибровочной кривой калибраторы № 5 и 6, чтобы избежать отрицательных значений измеряемых концентраций.

3. Если общее содержание белка в пробах невелико (менее 100-150 мкг), для дальнейшего гидролиза на фильтрах используют весь имеющийся объем. Если концентрация более 200 мкг белка в пробе, берут равные количества белка из каждой пробы и доводят до одинакового объема.

4. Если объем проб ограничен, можно сделать прикидочный анализ на одной пробе. Для этого к 1 мкл образца добавить 29 мкл воды, 1 мл BCA, 20 мкл сульфата меди и инкубировать 20 мин при 56°C. В зависимости от интенсивности окраски корректируют отбираемый на анализ объем образца: если цвет бледно-голубой – 10 мкл

пробы, если наблюдается насыщенная фиолетовая окраска – 1-5 мкл. Это позволит уложиться в динамический диапазон прибора (2 – 3700 нг/мкл).

2.3. Протокол 3. Осаждение белка методом хлороформ-метанольной экстракции

Реактивы

- Вода бидистиллированная (подготовлена на системе Milli-Q).
- Хлороформ («Химмед», Россия).
- Метанол («Labchem», США).

Осаждение белка методом хлороформ-метанольной экстракции

Протокол рассчитан на объем образца 100 мкл. При необходимости количества растворителей можно изменить пропорционально объему аликвоты.

1. К образцу добавить 400 мкл метанола и перемешать. Затем добавить 100 мкл хлороформа и перемешать. После чего добавить 300 мкл бидистиллированной воды и снова перемешать. Образец должен стать мутным.

2. Образец центрифугировать 2 мин при 14000 g. Надосадочный водный слой отобрать и отбросить.

3. К образцу добавить 300 мкл метанола, перемешать и центрифугировать 3 мин при 14000 g.

4. Надосадочную жидкость отобрать, образовавшийся после центрифугирования осадок высушить при комнатной температуре либо в вакуумном концентраторе без нагревания. Важно не пересушить образец, иначе его трудно будет растворить для дальнейшего анализа.

5. Образец хранить при температуре -20°C до дальнейшего использования.

2.4. Протокол 4. Осаждение подкисленным метанолом с последующим обессоливанием пептидов на наконечниках с C18

Реактивы

- Вода бидистиллированная (подготовлена на системе Milli-Q).
- Метанол («Labchem»).
- Уксусная кислота ледяная («Химмед»).
- Муравьиная кислота 98% («Acros Organics»).
- Ацетонитрил («Acros Organics»).
- Наконечники для экстракции – Pierce C18 Tips, 100 мкл («Thermo Scientific», Германия),
- Буфер для экстракции – 90% метанол в воде с 1% уксусной кислотой.
- Буферы для обессоливания: 0.1% муравьиная кислота в воде, 100% ацетонитрил, 50% ацетонитрил в воде.

Осаждение метанолом белка из биологических жидкостей

1. В пробу добавить 100 мкл буфера для экстракции, образцы обработать на влажном льду (0°C) ультразвуком на ультразвуковом дезинтеграторе (10 мин, мощность 50%).

2. Центрифугировать образцы 20 мин при 16000 g. Супернатант перенести в чистую пробирку на 1.5 мл.

3. К оставшемуся осадку добавить 100 мкл буфера для экстракции, перемешать и центрифугировать 20 мин при 16000 g. Супернатанты объединить.

4. Повторить п. 3.

5. Объединенные супернатанты упарить в вакуумном концентраторе при 45°C и передать для дальнейшего гидролиза в растворе (см. Протокол 1, Протоколы 9-12).

Осаждение метанолом белка из тканей

1. В ручной пестиковый гомогенизатор («DWK Life Sciences», США, #885450-0020) добавить 100 мкл буфера для экстракции.

2. Пробу ткани массой приблизительно 10-15 мг измельчить скальпелем, перенести в гомогенизатор и гомогенизировать до однородного состояния. Жидкую часть перенести в чистую пробирку на 1.5 мл.

3. В гомогенизатор добавить еще 100 мкл буфера для экстракции, гомогенизировать и объединить полученные жидкости.

4. Повторить п.3.

5. Объединенные гомогенаты обработать на влажном льду (0°C) ультразвуком на ультразвуковом дезинтеграторе Bandelin Sonopuls, («Bandelin Electronic», Германия) в течение 10 мин на мощности 50%, затем центрифугировать 20 минут при 20000 g.

6. Супернатанты перенести в чистые подписанные пробирки на 1.5 мл.

7. К осадку добавить 100 мкл буфера для экстракции, перемешать и центрифугировать 20 мин при 16000 g. Супернатанты объединить.

8. Повторить п. 7.

9. Объединенные супернатанты упарить в вакуумном концентраторе при 45°C и передать для дальнейшего гидролиза в растворе (см. Протокол 1, Протоколы 9-12).

Обессоливание на наконечниках с C18

1. В гидролизованные пробы после упаривания добавить по 100 мкл 0.1% муравьиной кислоты. Измерить pH, при необходимости добавить 1-5 мкл 2% муравьиной кислоты до достижения pH<3.

2. Наконечник для экстракции объемом 100 мкл последовательно промыть буферами: 3 раза по 100 мкл 100% ацетонитрила, 3 раза по 100 мкл 0.1% муравьиной кислоты. Здесь и далее важно не допускать полного сливания жидкости из наконечника во избежание попадания в него пузырей воздуха.

3. Нанести образец на сорбент пипетированием его в наконечнике 15 раз.

4. Промыть наконечник от солей 3 раза по 100 мкл 0.1% муравьиной кислоты.

5. Элюировать пептиды с сорбента в стеклянную вставку для ВЭЖХ-МС анализа: набирать и сливать во вставку 10 раз по 10 мкл 50% ацетонитрила в воде. В ходе последнего повтора слить жидкость из наконечника полностью.

6. Элюат упарить в вакуумном концентраторе при 45°C и передать для дальнейшего анализа.

2.5. Протокол 5. Осаждение белка ацетоном

Реактивы

- Вода бидистиллированная (подготовлена на системе Milli-Q).
- Ацетон («Химмед»).
- 1 М Триэтиламмония бикарбонат (ТЭАБ) («Supelco»)
- 100 мМ ТЭАБ (реакционный буфер).

Осаждение белка ацетоном

Перед началом процедуры предварительно охладить бутылку с ацетоном во льду или в холодильнике при температуре 4°C.

1. Образцы поместить на влажный лед и аликвотировать по 100 мкл в чистые подписанные пробирки. К образцам добавить 5-кратный объем холодного ацетона. Инкубировать от 1 ч до 10-12 ч (ночь) при -20°C.

2. Пробы заморозить (20 мин при -80°C). При этом водная часть пробы с белками замерзает на дне пробирки.

3. Образцы центрифугировать 5 мин при 14000 g и 4°C. Нежелательно центрифугировать образцы более 10 мин, так как это приводит к уплотнению осадка.

4. Надосадочный слой отобрать и отбросить.

5. К осадку добавить 200 мкл 50 мМ ТЭАБ, поместить вials на влажный лед и обработать на ультразвуковом дезинтеграторе в пульсовом режиме при 50% мощности в течение 20-30 с.

6. Образцы центрифугировать 20 мин при 4°C на оборотах центрифуги 15000 - 20000 g (выбрать максимальное значение ускорения, возможное для используемого прибора).

7. Надосадочную жидкость отобрать в чистые вials и передать для дальнейшего анализа.

2.6. Протокол 6. Гидролиз трипсином в геле

Реактивы

- Вода бидистиллированная (подготовлена на системе Milli-Q).
- Ацетонитрил («Acros Organics»).
- Муравьиная кислота 98% («Acros Organics»).
- 1 М Триэтиламмония бикарбонат (ТЭАБ) («Supelco»).
- 100 мМ ТЭАБ (реакционный буфер).
- Дитиотреитол (DTT) («MP Biomedicals», LLC, Франция).
- Йодацетамид (IAA) («GE Healthcare», Англия).
- 45 мМ раствор DTT (аликвотируется и хранится при -20°C).
- 100 мМ раствор IAA (аликвотируется и хранится при -20°C).
- 50% ацетонитрил в 100 мМ ТЭАБ.
- Раствор трипсина («Promega», V5111) в концентрации 100 нг/мкл (хранится при -20°C).
- Раствор 1% муравьиной кислоты в воде.
- Раствор 50% ацетонитрила в 0.1% муравьиной кислоте.
- Раствор 0.1% муравьиной кислоты в воде.

Гидролиз в геле после окрашивания Кумасси

1. Гель перенести на лабораторное стекло, скальпелем вырезать полосы и разрезать их на кусочки 1x1 мм. Кусочки перенести в чистые подписанные пробирки.

2. К измельченному гелю добавить 300 мкл 100 мМ ТЭАБ. Инкубировать 15 мин при комнатной температуре.

3. Отобрать и отбросить супернатант.

4. Добавить к пробам по 150 мкл 100 мМ ТЭАБ.

5. Восстановление и алкилирование (если электрофорез проводился в денатурирующих и восстанавливающих условиях, этот шаг не обязателен). Добавить 10 мкл 45 мМ DTT (или 2.25 мкл 200 мМ). Инкубировать 15 мин при 50°C. Добавить 10 мкл 100 мМ IAA, инкубировать 15 мин в темноте при комнатной температуре.

6. Отобрать и отбросить супернатант.

7. Добавить 300 мкл 50% ацетонитрила в 50 М ТЭАБ. Инкубировать 15 мин. Отобрать и отбросить супернатант.

8. Повторять п. 7 минимум 2 раза до обесцвечивания геля.

9. Отобрать и отбросить супернатант. Добавить 150 мкл 100% ацетонитрила, инкубировать 10 мин при комнатной температуре (гель должен стать белым).

10. Отобрать и отбросить супернатант. Упаривать досуха в течение 5 мин в вакууме. ВАЖНО: высушенный гель можно хранить при -20°C месяц.

11. Приготовить раствор трипсина с концентрацией 10 нг/мкл разбавлением стокового раствора трипсина (100 нг/мкл) в 10 раз в 50 мМ ТЭАБ. Добавить по 100 мкл разбавленного раствора фермента к пробе.

12. Инкубировать пробы при 37°C в течение ночи.

13. После завершения инкубации супернатант отобрать в чистые вials.

14. Добавить к гелю 200 мкл водного раствора 50% ацетонитрила с 0.1% муравьиной кислотой. Перемешать, инкубировать 15 мин при 37°C. Отобрать и объединить супернатанты с полученными в п. 13.

15. Повторить п. 14 еще раз.

16. Объединенные супернатанты упарить в вакуумном концентраторе при 45°C.

17. Остаток перерастворить в 0.1% муравьиной кислоте до конечной концентрации пептидов 2 мкг/мкл и передать на ВЭЖХ-МС анализ.

Гидролиз в геле после окрашивания серебром

Окрашивание серебром позволяет детектировать в несколько раз меньшие количества белка по сравнению с окрашиванием Кумасси. Однако серебро в полосах геля мешает масс-спектрометрическому детектированию, создавая сильный фон. Для удаления серебра из геля его растворяют с использованием растворов тиоцианата натрия и феррицианида калия.

Дополнительные реактивы:

- Тиоцианат натрия («Химмед»),
- Феррицианид калия («Химмед»),
- 100 мМ раствор тиоцианата натрия (15.8 мг на 1 мл воды),
- 30 мМ раствор феррицианида калия (9.9 мг на 1 мл воды),
- Раствор для обесцвечивания: смешать 100 мМ раствор

тиоцианата натрия и 30 мМ раствор феррицианида калия в соотношении 1/1,

▪ Раствор для промывки геля – 50% ацетонитрил в 50 мМ ТЭАБ.

Гидролиз в геле

1. Гель перенести на лабораторное стекло, скальпелем вырезать полосы и разрезать их на кусочки 1x1 мм. Кусочки перенести в чистые подписанные пробирки.

2. К измельченному гелю добавить 100 мкл обесцвечивающего раствора. Инкубировать 15 мин с перемешиванием при комнатной температуре.

3. Отобрать и отбросить супернатант.

4. Добавить 200 мкл 50% ацетонитрил в 50 мМ ТЭАБ. Инкубировать 10 мин при перемешивании. Отобрать и отбросить супернатант.

5. Повторить п.4 еще два раза.

6. Добавить 200 мкл 100% ацетонитрила, инкубировать 10 мин при комнатной температуре (гель должен стать белым).

7. Отобрать и отбросить супернатант. Упарить досуха в течение 5 мин в вакууме. ВАЖНО: высушенный гель можно хранить при -20°C месяца.

8. Развести стоковый раствор трипсина (100 нг/мкл) в 50 мМ ТЭАБ в 20 раз. Так как концентрация белка в полосках геля мала, используется по 25-50 нг трипсина на пробу. К пробам добавить по 50 мкл 50 мМ ТЭАБ и 25 нг трипсина (5 мкл разведенного раствора). Инкубировать 1 ч при 37°C.

9. Добавить к образцам еще по 25 нг трипсина и инкубировать при 35°C в течении ночи.

10. После завершения инкубации супернатант отобрать в чистые вials.

11. Добавить к гелю 200 мкл водного раствора 50% ацетонитрила с 0.1% муравьиной кислотой. Перемешать и инкубировать 15 мин с перемешиванием при 37°C. Отобрать и объединить супернатанты.

12. Повторить п. 11 еще раз.

13. Объединенные супернатанты упарить в вакуумном концентраторе при 45°C.

14. Остаток перерастворить в 0.1% муравьиной кислоте до конечной концентрации пептидов 2 мкг/мкл и передать на ВЭЖХ-МС анализ.

2.7. Протокол 7. Гидролиз белков с использованием спин – колонки S-Trap («Protifi», США)

Реактивы

▪ Фильтры S-Trap («Protifi», США, C02-micro-80).

▪ Вода бидистиллированная (подготовлена на системе Milli-Q).

▪ Ацетонитрил («Acros Organics»).

▪ Метанол («Labchem»).

▪ Фосфорная кислота («Химмед»).

▪ Муравьиная кислота 98% («Acros Organics»).

▪ SDS («Химмед»).

▪ 1 М Триэтиламония бикарбонат (ТЭАБ) («Supelco»).

▪ 10% SDS в 100 мМ ТЭАБ.

▪ 100 мМ ТЭАБ (реакционный буфер).

▪ 400 мМ раствор хлорацетамида («Acros Organics») в 50 мМ ТЭАБ.

▪ 500 мМ раствор ТСЕР (трис(2-карбоксиэтил)фосфина гидрохлорид) («Supelco»).

▪ 12% раствор фосфорной кислоты.

▪ 90% метанол в 100 мМ ТЭАБ (связывающий буфер).

▪ Раствор трипсина («Promega», V5111) концентрации 200 нг/мкл (хранится при -20°C),

▪ 50 мМ ТЭАБ (элюирующий буфер 1),

▪ 0.2% раствор муравьиной кислоты в 50 мМ ТЭАБ (элюирующий буфер 2),

▪ 0.2% раствор муравьиной кислоты в 50% ацетонитриле (элюирующий буфер 3).

Гидролиз белков с использованием спин – колонки S-Trap

S-Trap в размере мини рассчитана на пробы с содержанием белка до 100 мкг. Пробы для анализа предварительно очищают: лиофилизаты белков растворяют в 50 мМ ТЭАБ, растворы смесей белков центрифугируют от примесей и растворяют в 50 мМ ТЭАБ или ацетате аммония. Если белки не растворяются, пробы обрабатывают ультразвуком на льду 30-60 с на 50% мощности и центрифугируют. Концентрацию белка в пробах измеряют методом BCA (Протокол 2).

1. Для анализа взять объем пробы, содержащий 50 мкг белка. Если этот объем меньше 20 мкл, довести свежим раствором 100 мМ ТЭАБ до 20 мкл (меньший объем неудобно обрабатывать ультразвуком). На этом этапе рассчитать объемы буфера, которые будут внесены в пробу в дальнейшем, чтобы выбрать минимально необходимый объем пробирок для аликвотирования проб.

2. В пробы добавить равный объем 10% SDS в 100 мМ ТЭАБ (до финальной концентрации SDS 5%) и обработать ультразвуком в пульсовом режиме 3 раза по 15 с.

3. Центрифугировать пробы 3 мин при 13000 g (чтобы осадить пену SDS).

4. Восстановление и алкилирование. В пробы добавить по 2 мкл 500 мМ ТСЕР, встряхнуть, центрифугировать для сброса капель 1 мин при 1500 g. Добавить в пробы по 4 мкл 400 мМ хлорацетамида в 50 мМ ТЭАБ. Встряхнуть, центрифугировать 1 мин при 1500 g. Инкубировать 30 мин при 80°C. Охладить пробы до комнатной температуры, центрифугировать 1 мин при 1500 g для сброса конденсата с крышек пробирок.

5. Приготовление суспензии белка. В пробы добавить 12% раствор фосфорной кислоты в объеме равном 10% от объема пробы (после п. 4). Финальная концентрация кислоты 1%. Добавить 6-кратный объем 90% MeOH в 100 мМ ТЭАБ. Перемешать пипетированием, не центрифугировать (чтобы не осела суспензия). На этом этапе в пробе может образоваться осадок.

6. Фильтры S-trap промыть реакционным буфером для очистки и смачивания: на фильтры нанести по 170 мкл 100 мМ ТЭАБ, центрифугировать 3 мин при 4000 g, отбросить жидкость, прошедшую через фильтр.

7. Пробы вместе с осадком нанести на фильтр S-trap. Пробу наносить по 170 мкл и центрифугировать 3 мин при 4000 g до полного переноса проб. Важно не превышать эту скорость центрифугирования, так как кварцевый фильтр не выдерживает высокого давления.

8. Отмыть пробы от SDS. Нанести на фильтры 150 мкл 90% MeOH в 100 мМ ТЭАБ, центрифугировать 3 мин при

4000 g. Повторить отмывку еще 3 раза (всего 4 промывки). Еще раз центрифугировать 1 мин при 4000 g без нанесения раствора для полного удаления буфера из фильтра. В противном случае фильтр будет хуже удерживать жидкость в ходе инкубации образца на этапе гидролиза.

9. Гидролиз трипсином. Фильтры перенести в чистые подписанные вials на 1,5 мл. Добавить в пробы раствор трипсина в 50 мМ ТЭАБ концентрации 200 нг/мкл в соотношении фермент:белок 1:50 (по массе). Фильтры аккуратно встряхнуть, чтобы вышли пузырьки и раствор смочил фильтр, и не плотно закрыть крышкой. Инкубировать 2 ч при 47°C без перемешивания.

10. Элюция пептидов. В фильтры с раствором после гидролиза добавить 80 мкл 50 мМ ТЭАБ (элюирующий буфер 1), центрифугировать 1 мин при 4000 g, отобрать элюат в чистую стеклянную вставку. Аналогично провести элюцию элюирующими буферами 2 и 3.

11. Три элюата объединить в стеклянной вставке для анализа («Agilent», США), упарить в вакуумном концентраторе при 45°C, перерастворить в 0.1% муравьиной кислоте до конечной концентрации пептидов 2 мкг/мкл и передать на ВЭЖХ-МС анализ.

2.8. Протокол 8. Протокол FASP (Filter – Aided Sample Preparation)

Методика основана на предложенном в 2009 г. Маттиасом Манном методе пробоподготовки на фильтрах. Первоначально использовали фильтры на 10 кДа. Но в 2011 году [43] Wiśniewski и соавторы показали, что более эффективны фильтры на 30 кДа: в них пробы центрифугируются в 3 раза быстрее, и при анализе увеличивается количество identifications более крупных пептидов.

Реактивы

▪ Фильтры-концентраторы с отсечением по молекулярной массе 30 кДа Microcon Ultracel PL – 30 («Merck Millipore Limited», Ирландия).

▪ Вода бидистиллированная (подготовлена на системе Milli-Q).

▪ Ацетонитрил («Acros Organics»).

▪ Муравьиная кислота 98% («Acros Organics»).

▪ SDS («Химмед»).

▪ 1М Триэтиламмония бикарбонат (ТЭАБ) («Supelco»).

▪ Мочевина («Химмед»).

▪ 100 мМ ТЭАБ (реакционный буфер).

▪ 50 мМ ТЭАБ.

▪ 1% SDS в 50 мМ ТЭАБ.

▪ 400 мМ раствор хлорацетамида («Acros Organics») в 50 мМ ТЭАБ.

▪ 500 мМ раствор ТСЕР (трис(2-карбоксиэтил)фосфина гидрохлорид) («Supelco»).

▪ 8 М раствор мочевины в 50 мМ ТЭАБ. Готовят из навески, из расчета 1 мл раствора на 1 пробу + 1 мл запаса. На 1 мл ТЭАБ – 480,48 мг мочевины.

▪ Раствор трипсина («Promega», V5111) в концентрации 200 нг/мкл (хранится при -20°C).

▪ 1 % раствор муравьиной кислоты в 50 мМ ТЭАБ.

▪ Раствор 30% муравьиной кислоты в воде.

▪ Раствор 70% ацетонитрила в воде с 0.1% трифторуксусной кислотой.

▪ Раствор 0.1% муравьиной кислоты в воде.

Протокол FASP

1. Фильтры-концентраторы промыть реакционным буфером для смачивания и удаления остаточных количеств глицерина: на фильтры нанести по 200 мкл 100 мМ ТЭАБ, центрифугировать при 10000 g в течение 15 мин, отбросить жидкость, прошедшую через фильтр.

2. К образцу, содержащему 100 мкг белка добавить 100 мкл солибилизирующего буфера, содержащего 1% SDS в 50 мМ ТЭАБ. Образцы обработать ультразвуком с помощью ультразвукового дезинтегратора 3 раза по 30 сек при температуре 0°C (на льду) и мощности 50%, затем центрифугировать со скоростью 10000 g в течение 5 мин.

3. Для восстановления и алкилирования дисульфидных связей солиблизованные образцы перенести на предварительно промытые фильтры-концентраторы, добавить 2 мкл 500 мМ ТСЕР и 4 мкл 400 мМ хлорацетамида в 50 мМ ТЭАБ. Инкубировать 30 мин при температуре 80°C, после чего образцы охладить до комнатной температуры.

4. Отмывку от SDS провести буферным раствором, содержащим 8 М мочевины в 50 мМ ТЭАБ: нанести на фильтр по 200 мкл, центрифугировать при 10000 g в течение 15 мин.

5. Повторить п. 4 еще 4 раза.

6. Отмывку от 8 М мочевины проводить 50 мМ ТЭАБ. Нанести на фильтр по 200 мкл, центрифугировать при 10000 g в течение 15 мин.

7. Повторить п. 6 еще 4 раза.

8. После финального центрифугирования фильтр перенести в чистую пробирку емкостью 1.5 мл.

9. Для гидролиза трипсином добавить в пробы 50 мкл в 50 мМ ТЭАБ, содержащего трипсин в соотношении к белку 1:50. Инкубировать 24 ч при температуре 37°C.

10. Остановить гидролиз, добавив 50 мкл буфера, содержащего раствор 1% муравьиной кислоты в 50 мМ ТЭАБ, образцы центрифугировать 5 мин при 10000 g.

11. На фильтр добавить 50 мкл раствора 30% муравьиной кислоты в воде. Образцы центрифугировать 5 мин со скоростью 10000 g. Затем на фильтры добавить 50 мкл 70% раствора ацетонитрила в воде с 0.1% трифторуксусной кислотой в воде и центрифугировать 5 мин со скоростью 10000 g.

12. Элюат из накопительной пробирки перенести в стеклянную вialу и упарить в вакуумном концентраторе при 45°C. Пробу перерастворить в 0.1% муравьиной кислоте до конечной концентрации пептидов 2 мкг/мкл и передать на ВЭЖХ-МС анализ.

2.9. Протокол 9. Гидролиз белка в растворе с использованием ProteaseMAX

Протокол требует точного соблюдения концентрации ProteaseMAX. Более высокие концентрации сурфактанта могут привести к потере пептидов или помешать очистке. Объемы растворов реагентов (1% раствор ProteaseMAX, 400 мМ раствор хлорацетамида и 500 мМ раствор ТСЕР) необходимо рассчитывать на объем конкретной пробы. По

этой причине в протоколе указаны концентрации реагентов в пробе, а не объемы исходных растворов.

Реактивы

- ProteaseMAX («Promega»).
- Муравьиная кислота 98% («Acros Organics»).
- 1 М Триэтиламмония бикарбонат (ТЭАБ) («Supelco»).
- 50 мМ ТЭАБ (реакционный буфер).
- 400 мМ раствор хлорацетамида («Acros Organics») в 50 мМ ТЭАБ.
- 500 мМ раствор ТСЕР (трис(2-карбоксиэтил)фосфина гидрохлорид) («Supelco»).
- Раствор трипсина («Promega», #V5111) концентрации 0.5 мкг/мкл (хранится при -20°C),
- Раствор 50% муравьиной кислоты в воде.
- Раствор 0.1% муравьиной кислоты в воде.

Гидролиз в растворе с использованием ProteaseMAX

1. Для получения 1% раствора добавить 100 мкл 50 мМ ТЭАБ в вialу ProteaseMAX. Полученный раствор аликвотировать и хранить при температуре -20°C.

2. К образцу, содержащему 100 мкг белка и растворенному в 20 мкл 50 мМ ТЭАБ, добавить ProteaseMAX, ТСЕР и хлорацетамид до конечных концентраций 0.2% ProteaseMAX, 30 мМ ТСЕР и 50 мМ хлорацетамида. Если на анализ берется проба после преципитации или проба, хранившаяся в сухом виде, то для солюбилизации используют 20 мкл 0.2% раствора ProteaseMAX в 50 мМ ТЭАБ и далее добавляют только растворы хлорацетамида и ТСЕР до нужных концентраций. Далее для восстановления и алкилирования дисульфидных связей пробы инкубировать при температуре 80°C в течение 40 мин.

3. Затем реакцию смесь разбавить в 6 раз 50 мМ ТЭАБ и повторно добавить сурфактант ProteaseMAX до конечной концентрации 0.048%, а также раствор трипсина с концентрацией 0.5 мкг/мкл в соотношении масса трипсина к массе общего белка 1:70. Пробу инкубировать в течение ночи при 37°C.

4. По окончании инкубации к реакционной смеси добавить муравьиную кислоту до конечной концентрации 5% с последующим центрифугированием при 14000 g в течение 5 мин. Надосадочную жидкость высушить в вакуумном концентраторе при 45°C.

5. Высушенные образцы растворить в 20 мкл раствора 0.1% муравьиной кислоты и передать на масс-спектрометрический анализ.

2.10. Протокол 10. Гидролиз белка в растворе ферментом Lys-C

Реактивы

- Вода бидистиллированная (подготовлена на системе Milli-Q).
- Муравьиная кислота 98% («Acros Organics»).
- 1 М Триэтиламмония бикарбонат (ТЭАБ) («Supelco»).
- 50 мМ ТЭАБ в воде (реакционный буфер).
- 400 мМ раствор хлорацетамида («Acros Organics») в 50 мМ ТЭАБ.

- 500 мМ раствор ТСЕР (трис(2-карбоксиэтил)фосфина гидрохлорид) («Supelco»).
- Раствор Lys-C («Promega») 100 нг/мкл (хранится при -20°C).
- Муравьиная кислота 98% («Acros Organics»).
- Раствор 0.1% муравьиной кислоты в воде.

Гидролиз в растворе

Объем аликвоты образца, содержащей 100 мкг белка, довести до 94 мкл раствором 50 мМ ТЭАБ, pH 8.

1. Восстановление и алкилирование. К образцу добавить 2 мкл 500 мМ ТСЕР и 4 мкл 400 мМ хлорацетамида, перемешать и инкубировать 40 мин при 60°C, после чего охладить до комнатной температуры.

2. Далее к восстановленному и алкилированному образцу добавить Lys-C в соотношении фермент:субстрат, равном 1:50. Реакционную смесь инкубировать при 37°C в течение ночи.

3. Для остановки реакции к образцу добавить концентрированную муравьиную кислоту до конечной концентрации 0,5% и центрифугировать гидролизат 10 мин при 10000 g.

4. Супернатант отобрать в чистую стеклянную вставку и упарить в вакуумном концентраторе при 45°C. Высушенные препараты пептидов растворить в 0.1 % муравьиной кислоте для дальнейшего хромато-масс-спектрометрического анализа.

2.11. Протокол 11. Гидролиз белка в растворе химотрипсином

Реактивы

- Вода бидистиллированная (подготовлена на системе Milli-Q),
- Муравьиная кислота 98% («Acros Organics»).
- 1 М Триэтиламмония бикарбонат (ТЭАБ) («Supelco»).
- 50 мМ ТЭАБ в воде (реакционный буфер),
- 400 мМ раствор хлорацетамида («Acros Organics») в 50 мМ ТЭАБ.
- 500 мМ раствор ТСЕР (трис(2-карбоксиэтил)фосфина гидрохлорид) («Supelco»).
- Раствор химотрипсина («Sigma Aldrich») 200 нг/мкл (хранится при -20°C).
- Муравьиная кислота 98% («Acros Organics»).
- Раствор 0.1% муравьиной кислоты в воде.

Гидролиз в растворе

Объем аликвоты образца, содержащей 100 мкг белка, довести до 94 мкл раствором 50 мМ ТЭАБ, pH 8.

1. Восстановление и алкилирование. К образцу добавить 2 мкл 500 мМ ТСЕР и 4 мкл 400 мМ хлорацетамида, перемешать и инкубировать 40 мин при 60°C, после чего охладить до комнатной температуры.

2. Далее к восстановленному и алкилированному образцу добавить химотрипсин в соотношении фермент:субстрат, равном 1:20 (по массе). Реакционную смесь инкубировать при 37°C в течение ночи.

3. Для остановки реакции к образцу добавить

концентрированную муравьиную кислоту до конечной концентрации 0.5% и центрифугировать гидролизат 10 мин при 10000 g.

4. Супернатант отобрать в чистую стеклянную вставку и упарить в вакуумном концентраторе при 45°C. Высушенные препараты пептидов растворить в 0.1 % муравьиной кислоте для дальнейшего хромато-масс-спектрометрического анализа.

2.12. Протокол 12. Гидролиз белка в растворе ферментом Glu-C

Реактивы

- Вода бидистиллированная (подготовлена на системе Milli-Q).
- Муравьиная кислота 98% («Acros Organics»).
- 1 М Триэтиламония бикарбонат (ТЭАБ) («Supelco»).
- 50 мМ ТЭАБ в воде (реакционный буфер).
- 400 мМ раствор хлорацетамида («Acros Organics») в 50 мМ ТЭАБ.
- 500 мМ раствор ТСЕР (трис(2-карбок시에тил)фосфина гидрохлорид) («Supelco»),
- Раствор Glu-C («Promega») 100 нг/мкл (хранится при -20°C).
- Муравьиная кислота 98% («Acros Organics»).
- Раствор 0.1% муравьиной кислоты в воде.

Гидролиз в растворе

Объем аликвоты образца, содержащей 100 мкг белка, довести до 94 мкл раствором 50 мМ ТЭАБ, pH 8.

1. Восстановление и алкилирование. К образцу добавить 2 мкл 500 мМ ТСЕР и 4 мкл 400 мМ хлорацетамида, перемешать и инкубировать 40 мин при 60°C, после чего охладить до комнатной температуры.

2. Далее к восстановленному и алкилированному образцу добавить Glu-C в соотношении фермент:субстрат, равном 1:50 (по массе). Реакционную смесь инкубировать при 37°C в течение ночи.

3. Для остановки реакции к образцу добавить концентрированную муравьиную кислоту до конечной концентрации 0.5% и центрифугировать гидролизат 10 мин при 10000 g.

4. Супернатант отобрать в чистую стеклянную вставку и упарить в вакуумном концентраторе. Высушенные препараты пептидов растворить в 0.1 % муравьиной кислоте для дальнейшего хромато-масс-спектрометрического анализа.

2.13. Протокол 13. Гидролиз антител в растворе папаина

Реактивы

- Вода бидистиллированная (подготовлена на системе Milli-Q)
- Натрия гидрофосфат додекагидрат («Sigma Aldrich»)
- Натрия дигидрофосфат моногидрат («PanReac AppliChem», Испания)
- Цистеин («Химмед»).
- ЭДТА («Химмед»).

- Буфер для реакции: 50мМ Na-фосфатный буфер, 50 мМ цистеин, 2 мМ ЭДТА, pH=7.4.

- Раствор папаина («Sigma Aldrich», #P4762) 1 мкг/мкл (хранится при -20°C),

- 400 мМ хлорацетамид в 50 мМ ТЭАБ («Acros Organics»)

Гидролиз в растворе

1. Объем аликвоты образца, содержащей 50 мкг антитела, довести до 45 мкл буфером для реакции.

2. Далее к образцу добавить папаин в соотношении фермент:субстрат, равном 1:10 (по массе). Реакционную смесь инкубировать при 37°C в течение 6 ч.

3. Для остановки реакции к образцу добавить 400 мМ хлорацетамид до конечной концентрации 20 мМ. Гидролизированный образец хранить при температуре -20°C.

2.14. Протокол 14. Гидролиз антител в растворе ферментом IdeZ

Реактивы

- Вода бидистиллированная (подготовлена на системе Milli-Q).
- Натрия гидрофосфат додекагидрат («Sigma Aldrich»)
- Натрия дигидрофосфат моногидрат («PanReac AppliChem», Испания)
- Хлорид натрия («Химмед»)
- Буфер для реакции: 50 мМ Na-фосфатный буфер, 150 мМ NaCl, pH=6.6,
- Раствор IdeZ («Promega») 50 ед/мкл (хранится при -70°C).

Гидролиз в растворе

1. Объем аликвоты образца, содержащей 50 мкг антитела, довести до 50 мкл буфером для реакции.

2. Добавить IdeZ в соотношении 1 ед на 1 мкг антитела. Реакционную смесь инкубировать при 37°C в течение 1 ч.

3. Гидролизированный образец хранить при температуре -20°C.

2.15. Протокол 15. Измерение концентрации пептидов

Концентрацию пептидов в пробе измеряют колориметрически с помощью набора «Pierce Quantitative Colorimetric Peptide Assay» («Thermo Scientific», США, #23275) согласно рекомендациям производителя с небольшими модификациями на приборе NanoDrop («Thermo Scientific», США).

Реактивы

1. Реактивы А, В, С набора для приготовления рабочего раствора.
2. Раствор стандарта гидролизованного белка концентрации 1 мг/мл (входит в набор).
3. Бидистиллированная вода (подготовлена на системе Milli-Q).
4. Пробирки 200 мкл.

Таблица 4. Приготовление калибраторов для измерения концентрации пептидов с помощью набора «Pierce Quantitative Colorimetric Peptide Assay»

Калибратор	Объем исходного раствора	Объем H ₂ O, мкл	Концентрация калибратора, мкг/мгЛ
1	Stock		1000
2	10 мкл Stock	10	500
3	10 мкл калибратора 2	10	250
4	10 мкл калибратора 3	10	125
5	10 мкл калибратора 4	10	62.5
6	10 мкл калибратора 5	10	31.3
7	10 мкл калибратора 6	10	15.6
Холостая проба	0	20	0

Измерение концентрации пептидов

1. Приготовить растворы калибраторов (табл. 4).
2. Приготовить образцы пептидов. Для анализа берут образцы пептидов после гидролиза белка. Растворы после гидролиза упарить и перерастворить в воде. Количество воды соответствует количеству белка, взятого на анализ. Например, для образцов, содержащих 50 мкг белка – 50 мкл воды для перерастворения полученных пептидов.
3. Приготовить рабочий раствор из реагентов А, В, С набора в соотношении 50/48/2 соответственно. Количество рабочего раствора рассчитывают по формуле: (количество проб + количество калибраторов)х 18 мкл. Объем рабочего раствора округлить в большую сторону.
4. В пробирки на 200 мкл добавить по 2 мкл проб и калибраторов, затем во все вials внести по 18 мкл рабочего раствора. Вials встряхнуть и инкубировать при комнатной температуре 30 мин.
5. Для анализа проб на приборе NanoDrop сначала построить калибровочную кривую, затем измерить образцы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Понятно, что каждая исследовательская группа использует свой набор протоколов пробоподготовки и протеомного анализа белков. В данной работе мы представляем только проверенные протоколы, которые рутинно используются в лаборатории системной биологии ИБМХ имени В.Н. Ореховича и открыты для исправлений и дополнений с основной целью создания сборника методик для начинающих исследователей.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не связана с исследованиями, в которых в качестве объекта выступают люди или животные.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021 - 2030 годы) (№122030100168-2)

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

ЛИТЕРАТУРА

1. Kahn, P. (1995) From genome to proteome: looking at a cell's proteins. *Science* (New York, N.Y.), **270**(5235), 369–370. DOI: 10.1126/science.270.5235.369
2. Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J.V., Mann, M. (2006) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*, **1**(6), 2856–2860. DOI: 10.1038/nprot.2006.468
3. Thanou, E., Koopmans, F., Pita-Illobre, D., Klaassen, R.V., Özer, B., Charalampopoulos, I., Smit, A.B., Li, K.W. (2023) Suspension TRAPping Filter (sTRAP) Sample preparation for quantitative proteomics in the low µg input range using a plasmid DNA micro-spin column: analysis of the hippocampus from the 5xFAD Alzheimer's disease mouse model. *Cells*, **12**(9), 1242. DOI: 10.3390/cells12091242
4. Wiśniewski, J.R., Zougman, A., Nagaraj, N., Mann, M. (2009) Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature Methods*, **6**(5), 359–362. DOI: 10.1038/nmeth.1322
5. Ji, Y., Liu, M., Bachschmid, M. M., Costello, C. E., Lin, C. (2015). Surfactant-Induced Artifacts during Proteomic Sample Preparation. *Analytical chemistry*, **87**(11), 5500–5504. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b00249
6. Pirmoradian, M., Budamgunta, H., Chingin, K., Zhang, B., Astorga-Wells, J., Zubarev, R.A. (2013) Rapid and deep human proteome analysis by single-dimension shotgun proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, **12**(11), 3330–3338. DOI: 10.1074/mcp.O113.028787
7. Saveliev, S.V., Woodroffe, C.C., Sabat, G., Adams, C.M., Klaubert, D., Wood, K., Urh, M. (2013) Mass spectrometry compatible surfactant for optimized in-gel protein digestion. *Analytical Chemistry*, **85**(2), 907–914. DOI: 10.1021/ac302423t
8. Danko, K., Lukasheva, E., Zhukov, V.A., Zgoda, V., Frolov, A. (2022) Detergent-assisted protein digestion-on the way to avoid the key bottleneck of shotgun bottom-up proteomics. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**(22), 13903. DOI: 10.3390/ijms232213903
9. Tsiatsiani, L., Heck, A.J. (2015) Proteomics beyond trypsin. *The FEBS Journal*, **282**(14), 2612–2626. DOI: 10.1111/febs.13287
10. Kazieva, L. S., Farafonova, T. E., Zgoda, V. G. (2023) Proteomika antitel [Antibody proteomics]. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **69**(1), 5–18. DOI: 10.18097/PBMC20236901005
11. PEPTIDEMASS - a World-Wide Web accessible tool for peptide characterization. Retrieved May 7, 2025, from: https://web.expasy.org/peptide_mass
12. Fragment Ion Calculator. Retrieved May 7, 2025, from: <http://db.systemsbiology.net:8080/proteomicsToolkit/FragIonServlet.html>
13. Karneyeva, K., Kolesnik, M., Livenskiy, A., Zgoda, V., Zubarev, V., Trofimova, A., Artamonova, D., Ispolatov, Y., Severinov, K. (2024) Interference requirements of type III CRISPR-Cas systems from *thermus thermophilus*. *Journal of Molecular Biology*, **436**(6), 168448. DOI: 10.1016/j.jmb.2024.168448
14. Demina, I.A., Serebryakova, M. V., Ladygina, V.G., Rogova, M.A., Zgoda, V.G., Korzhenevskiy, D.A., Govorun, V.M. (2009) Proteome of the bacterium *mycoplasma gallisepticum*. *Biochemistry*. *Biokhimiya*, **74**(2), 165–174. DOI: 10.1134/s0006297909020072
15. Vavilov, N.E., Zgoda, V.G., Tikhonova, O.V., Farafonova, T.E., Shushkova, N.A., Novikova, S.E., Yarygin, K.N., Radko, S.P., Ilgisonis, E.V., Ponomarenko, E.A., Lisitsa, A.V., Archakov, A.I. (2020) Proteomic analysis of Chr 18 proteins using 2D fractionation. *Journal of Proteome Research*, **19**(12), 4901–4906. DOI: 10.1021/acs.jproteome.0c00856
16. Novikova, S., Tikhonova, O., Kurbatov, L., Farafonova, T., Vakhrushev, I., Lupatov, A., Yarygin, K., Zgoda, V. (2021) Omics technologies to decipher regulatory networks in granulocytic cell differentiation. *Biomolecules*, **11**(6), 907. DOI: 10.3390/biom11060907
17. Shkrigunov, T., Kisrieva, Y., Samenkova, N., Larina, O., Zgoda, V., Rusanov, A., Romashin, D., Luzgina, N., Karuzina, I., Lisitsa, A., Petushkova, N. (2022)

- Comparative proteoinformatics revealed the essentials of SDS impact on HaCaT keratinocytes. *Scientific Reports*, **12**(1), 21437. DOI: 10.1038/s41598-022-25934-4
18. Buneeva, O.A., Kapitsa, I.G., Kazieva, L.S., Vavilov, N.E., Zgoda, V.G. (2023) Quantitative changes of brain isatin-binding proteins of rats with the rotenone-induced experimental parkinsonism. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **69**(3), 188–192. DOI: 10.18097/PBMC20236903188
19. Medvedev, A., Kopylov, A., Buneeva, O., Kurbatov, L., Tikhonova, O., Ivanov, A., Zgoda, V. (2020) A Neuroprotective dose of isatin causes multilevel changes involving the brain proteome: prospects for further research. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**(11), 4187. DOI: 10.3390/ijms21114187
20. Anselm, V., Novikova, S., Zgoda, V. (2017) Re-adaption on earth after spaceflights affects the mouse liver proteome. *International Journal of Molecular Sciences*, **18**(8), 1763. DOI: 10.3390/ijms18081763
21. Vavilov, N.E., Ilgisonis, E.V., Lisitsa, A.V., Ponomarenko, E.A., Farafonova, T.E., Tikhonova, O.V., Zgoda, V.G., Archakov, A.I. (2022) Deep proteomic dataset of human liver samples obtained by two-dimensional sample fractionation coupled with tandem mass spectrometry. *Data in Brief*, **42**, 108055. DOI: 10.1016/j.dib.2022.108055
22. Kurochkina, N.S., Orlova, M.A., Vigovskiy, M.A., Zgoda, V.G., Vepkhvadze, T.F., Vavilov, N.E., Makhnovskii, P.A., Grigorieva, O.A., Boroday, Y.R., Philippov, V.V., Lednev, E.M., Efimenko, A. Y., Popov, D. V. (2024) Age-related changes in human skeletal muscle transcriptome and proteome are more affected by chronic inflammation and physical inactivity than primary aging. *Aging Cell*, **23**(4), e14098. DOI: 10.1111/accel.14098
23. Davydov, D.R., Dangi, B., Yue, G., Ahire, D. S., Prasad, B., Zgoda, V.G. (2022) Exploring the interactome of cytochrome P450 2E1 in human liver microsomes with chemical crosslinking mass spectrometry. *Biomolecules*, **12**(2), 185. DOI: 10.3390/biom12020185
24. Novikova, S., Tolstova, T., Kurbatov, L., Farafonova, T., Tikhonova, O., Soloveva, N., Rusanov, A., Archakov, A., Zgoda, V. (2022) Nuclear proteomics of induced leukemia cell differentiation. *Cells*, **11**(20), 3221. DOI: 10.3390/cells11203221
25. Zgoda, V.G., Moshkovskii, S.A., Ponomarenko, E.A., Andreewski, T.V., Kopylov, A.T., Tikhonova, O.V., Melnik, S.A., Lisitsa, A.V., Archakov, A.I. (2009) Proteomics of mouse liver microsomes: performance of different protein separation workflows for LC-MS/MS. *Proteomics*, **9**(16), 4102–4105. DOI: 10.1002/pmic.200900050
26. Kopylov, A.T., Ponomarenko, E.A., Ilgisonis, E.V., Pyatnitskiy, M.A., A.V., Poverennaya, E.V., Kiseleva, O.I., Farafonova, T.E., Tikhonova, O.V., Zavalova, M.G., Novikova, S.E., Moshkovskii, S.A., Radko, S.P., Morukov, B.V., Grigoriev, A.I., Paik, Y.K., Salekdeh, G.H., Urbani, A., Zgoda, V.G., Archakov, A.I. (2019) 200+ Protein concentrations in healthy human blood plasma: targeted quantitative SRM SIS screening of chromosomes 18, 13, Y, and the mitochondrial chromosome encoded proteome. *Journal of Proteome Research*, **18**(1), 120–129. DOI: 10.1021/acs.jproteome.8b00391
27. Zgoda, V.G., Kopylov, A.T., Tikhonova, O.V., Moisa, A.A., Pyndyk, N.V., Farafonova, T.E., Novikova, S.E., Lisitsa, A.V., Ponomarenko, E.A., Poverennaya, E.V., Radko, S.P., Khmeleva, S.A., Kurbatov, L.K., Filimonov, A.D., Bogolyubova, N.A., Ilgisonis, E.V., Chernobrovkin, A.L., Ivanov, A.S., Medvedev, A.E., Mezentsev, Y.V., Archakov, A.I. (2013) Chromosome 18 transcriptome profiling and targeted proteome mapping in depleted plasma, liver tissue and HepG2 cells. *Journal of Proteome Research*, **12**(1), 123–134. DOI: 10.1021/pr300821n
28. Smirnova, L., Seregin, A., Boksha, I., Dmitrieva, E., Simutkin, G., Kornetova, E., Savushkina, O., Letova, A., Bokhan, N., Ivanova, S., Zgoda, V. (2019) The difference in serum proteomes in schizophrenia and bipolar disorder. *BMC Genomics*, **20**(Suppl 7), 535. DOI: 10.1186/s12864-019-5848-1
29. Pastushkova, L.H., Rusanov, V.B., Goncharova, A.G., Brzhozovskiy, A.G., Kononikhin, A.S., Chernikova, A.G., Kashirina, D.N., Nosovsky, A.M., Baevsky, R.M., Nikolaev, E.N., Larina, I.M. (2019) Urine proteome changes associated with autonomic regulation of heart rate in cosmonauts. *BMC Systems Biology*, **13**(Suppl 1), 17. DOI: 10.1186/s12918-019-0688-9
30. Novikova, S., Soloveva, N., Farafonova, T., Tikhonova, O., Shimansky, V., Kugushev, I., Zgoda, V. (2023) Proteomic shotgun and targeted mass spectrometric datasets of cerebrospinal fluid (liquor) derived from patients with vestibular schwannoma. *Data*, **8**(4), 71. DOI: 10.3390/data8040071
31. Zavalova, M.G., Shevchenko, V.E., Nikolaev, E.N., Zgoda, V.G. (2017) Is myelin basic protein a potential biomarker of brain cancer? *European Journal of Mass Spectrometry* (Chichester, England), **23**(4), 192–196. DOI: 10.1177/14690667171719810
32. Baskova, I.P., Zavalova, L.L., Basanova, A.V., Moshkovskii, S.A., Zgoda, V.G. (2004) Protein profiling of the medicinal leech salivary gland secretion by proteomic analytical methods. *Biochemistry. Biokhimiia*, **69**(7), 770–775. DOI: 10.1023/b:biry.0000040202.21965.2a
33. Kliuchnikova, A.A., Samokhina, N. ., Ilina, I.Y., Karpov, D.S., Pyatnitskiy, M.A., Kuznetsova, K.G., Toropygin, I.Y., Kochergin, S.A., Alekseev, I.B., Zgoda, V.G., Archakov, A.I., Moshkovskii, S.A. (2016) Human aqueous humor proteome in cataract, glaucoma, and pseudoexfoliation syndrome. *Proteomics*, **16**(13), 1938–1946. DOI: 10.1002/pmic.201500423
34. Odorskaya, M.V., Mavletova, D.A., Nesterov, A.A., Tikhonova, O.V., Soloveva, N.A., Reznikova, D.A., Galanova, O.O., Vatin, A.A., Slynko, N.M., Vasilieva, A.R., Peltek, S.E., Danilenko, V.N. (2024) The use of omics technologies in creating LBP and postbiotics based on the limosilactobacillus fermentum U-21. *Frontiers in Microbiology*, **15**, 1416688. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1416688
35. Pakharukova, M.Y., Savina, E., Ponomarev, D.V., Gubanova, N.V., Zaparina, O., Zakirova, E.G., Cheng, G., Tikhonova, O.V., Mordvinov, V.A. (2023) Proteomic characterization of opisthorchis felinus exosome-like vesicles and their uptake by human cholangiocytes. *Journal of Proteomics*, 283–284, **104927**. DOI: 10.1016/j.jprot.2023.104927
36. Gerringer, M.E., Yancey, P.H., Tikhonova, O.V., Vavilov, N.E., Zgoda, V.G., Davydov, D.R. (2020) Pressure tolerance of deep-sea enzymes can be evolved through increasing volume changes in protein transitions: a study with lactate dehydrogenases from abyssal and hadal fishes. *The FEBS Journal*, **287**(24), 5394–5410. DOI: 10.1111/febs.15317
37. Fedulova, L., Vasilevskaya, E., Tikhonova, O., Kazieva, L., Tolmacheva, G., Makarenko, A. (2022) Proteomic markers in the muscles and brain of pigs recovered from hemorrhagic stroke. *Genes*, **13**(12), 2204. DOI: 10.3390/genes13122204
38. Filatov, A.V., Krotov, G.I., Zgoda, V.G., Volkov, Y. (2007) Fluorescent immunoprecipitation analysis of cell surface proteins: a methodology compatible with mass-spectrometry. *Journal of Immunological Methods*, **319**(1–2), 21–33. DOI: 10.1016/j.jim.2006.09.014
39. Kopylov, A.T., Zgoda, V.G., Lisitsa, A.V., Archakov, A.I. (2013) Combined use of irreversible binding and MRM technology for low- and ultralow copy-number protein detection and quantitation. *Proteomics*, **13**(5), 727–742. DOI: 10.1002/pmic.201100460
40. Laptsev, I., Shvetsova, E., Levitskii, S., Serebryakova, M., Rubtsova, M., Zgoda, V., Bogdanov, A., Kamenski, P., Sergiev, P., Dontsova, O. (2020) METTL15 interacts with the assembly intermediate of murine mitochondrial small ribosomal subunit to form m4C840 12S rRNA residue. *Nucleic Acids Research*, **48**(14), 8022–8034. DOI: 10.1093/nar/gkaa522
41. Ludwig, K. R., Schroll, M. M., Hummon, A. B. (2018). Comparison of In-Solution, FASP, and S-Trap Based Digestion Methods for Bottom-Up Proteomic Studies. *Journal of proteome research*, **17**(7), 2480–2490. DOI: 10.1021/acs.jproteome.8b00235
42. Wiśniewski, J. R., Ostasiewicz, P., Mann, M. (2011). High recovery FASP applied to the proteomic analysis of microdissected formalin fixed paraffin embedded cancer tissues retrieves known colon cancer markers. *Journal of proteome research*, **10**(7), 3040–3049. DOI: 10.1021/pr200019m
43. Wiśniewski, J.R., Zielinska, D.F., Mann, M. (2011) Comparison of ultrafiltration units for proteomic and N-glycoproteomic analysis by the filter-aided sample preparation method. *Analytical Biochemistry*, **410**(2), 307–309. DOI: 10.1016/j.ab.2010.12.004

Поступила: 29.04.2025
После доработки: 10.05.2025
Принята к публикации: 13.05.2025

PROTOCOLS FOR PROTEOMIC ANALYSIS: ISOLATION, SOLUBILIZATION AND HYDROLYSIS BY PROTEASES

*E.N. Obukhova¹, E.V. Khryapova², S.E. Novikova², L.Sh. Kazieva², O.V. Tikhonova², V.G. Zgoda^{*2}*

¹Skolkovo Institute of Science and Technology, 30c1 Bolshoi Boulevard, Moscow, 121205 Russia

²Institute of Biomedical Chemistry, 10 Pogodinskaya str., Moscow, 119435 Russia; *e-mail: victor.zgoda@gmail.com

High-throughput studies of protein composition of biological samples have become routine and are used practically in all areas of life sciences. Modern proteomics methods allow reliable identification and quantification of thousands of proteins in a single experiment. The standard procedure for proteomic analysis includes the following steps: 1. isolation and solubilization of proteins, their hydrolysis by proteases; 2. analysis of the resulting peptides by high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection; 3. bioinformatics and statistical processing of the results. This paper presents protocols of the first stage of proteomic analysis, i.e. sample preparation, which are routinely used in the Laboratory of Systems Biology of the Institute of Biomedical Chemistry.

Key words: proteomics; protein solubilization; highly specific protease; protocol

FUNDING

The work was carried out within the framework of the Russian Federation fundamental research program for the long-term period for 2021-2030 (№-122030100168-2).

Received: 29.04.2024, revised: 10.05.2025, accepted: 13.05.2025