

PROTEOMIKA – NOVÝ A RYCHLÝ NÁSTROJ PRO IDENTIFIKACI ODRŮD JEČMENE PROTEOMICS – A NEW AND FAST TOOL FOR IDENTIFICATION OF BARLEY VARIETIES

RNDr. JOSEF CHMELÍK, CSc., Mgr. PAVEL ŘEHULKA, Ústav analytické chemie AV ČR, Brno/ Institute of Analytical Chemistry, Academy of Sciences of Czech Republic, Brno, Czech Republic
CORINA MAYRHOFER, Prof. GÜNTER ALLMAIER, Ústav analytické chemie Vídeňské univerzity, Vídeň/ Institute for Analytical Chemistry, University of Vienna, Vienna, Austria

Klíčová slova: proteomika, identifikace bílkovin, ječmen, identifikace odrůd, hmotnostní spektrometrie

Key words: proteomics, protein identification, barley, variety identification, mass spectrometry

1 ÚVOD

Pochopení funkce biologických systémů vyžaduje znalost jejich chemického složení. Stav životního cyklu buňky v kterémkoli okamžiku je dán především složením jejích bílkovin, tj. jejím proteomem. Existuje několik způsobů identifikace bílkovin, ale většinou jsou to časově velmi náročné postupy. Moderním a účinným nástrojem je proteomika. Ta je založena na srovnání známých sekvencí DNA a primárních struktur bílkovin, které jsou dostupné v databázích, s experimentálně stanovenými molekulovými hmotnostmi peptidů, získaných enzymatickým rozkladem studované bílkoviny. Identifikace bílkovin touto proteomickou metodou byla aplikována na řadu biologických systémů [1,2]. Identifikace bílkovin je nyní důležitým úkolem v mnoha oblastech včetně identifikace odrůd sladovnického ječmene, neboť bílkoviny jsou často označovány jako biochemické markery určitých vlastností (např. odrůdové příslušnosti) sladovnického ječmene [3].

Pro rychlou identifikaci bílkovin je vhodné využít kombinace gelové elektroforézy pro separaci bílkovin ze směsi a hmotnostní spektrometrie pro stanovení hmotnosti enzymaticky naštěpaných peptidů [4]. Tyto metody spolu s počítačovým vyhledáváním v databázích jsme použili pro identifikaci bílkovin z ječmene (*Hordeum vulgare* L.). Bílkoviny byly izolovány buď z listů nebo ze zrn, potom separovány jednorozměrnou SDS gelovou elektroforézou (SDS-PAGE) a následně enzymaticky rozloženy na peptidy pomocí trypsinu přímo v separačním gelu. Hmotnosti peptidů byly stanoveny pomocí hmotnostně spektrometrické metody nazvané desorpce a ionizace laserem v přítomnosti matrice (MALDI-TOF MS) [5]. Na závěr bylo provedeno srovnání změřených hmotností peptidů s údaji v databázi.

Úspěšnost této metody závisí především na přítomnosti sekvence hledané bílkoviny v databázi. V případě ječmene je známo jen asi 20 % genomu a navíc existuje mnoho odrůd ječmene, což úspěšnost identifikace snižuje. Navzdory této komplikaci se nám podařilo identifikovat několik bílkovin a na identifikaci dalších se pracuje. Získané výsledky potvrdily, že proteomický přístup je vhodným nástrojem pro identifikaci bílkovin ječmene, a že má potenciál pro identifikaci odrůd sladovnického ječmene.

2 MATERIÁL A METODY

Pro identifikaci bílkovin z ječmene kombinací gelové elektroforézy a hmotnostní spektrometrie ve spojení s databázovým vyhledáváním byla zvolena odrůda Luxor. Analyzovanými částmi rostliny pak byly listy a zrna, z nichž byly extrahovány studované bílkoviny.

Listy ječmene byly nejprve rozdrceny v kapalném dusíku. Extrakce bílkovin z 1 g této směsi probíhala v 10 ml 2,5% NaCl po dobu 1 h za stálého třepání. K analýze byl pak použit supernatant získaný po centrifugaci. Podobně byla po rozdrcení extrahována zrna pomocí 5% NaCl po dobu 15 minut.

Vzorky pro gelovou elektroforézu byly připraveny smícháním extraktu se vzorkovým pufrem (50 mM TRIS-HCl, pH 6,8, 4% SDS, 12% glycerol, 2% β -merkaptoethanol, 0,01% bromfenolová modř) v poměru 1:1. Po povaření (vodní lázeň, 30 minut) bylo nanášeno 20 μ l této směsi na polyakrylamidový

1 INTRODUCTION

Understanding of the function of biological systems requires knowledge of their chemical composition. The state-of-life of a cell at any given time is defined by its protein composition, i.e., its proteome. There are several ways of protein identification, however, majority of them are very time consuming procedures. A modern and efficient tool is the combination of separation techniques with mass spectrometry as used in proteomics. It is based on comparison of known DNA sequences and primary protein structures of a rapidly growing number of species that are now available (many more will be completed in the near future) in databases with experimentally obtained molecular masses of enzyme-digested peptides. Protein identification from electrophoretic gels by mass spectrometric peptide mapping or peptide sequencing combined with sequence database searching is established and has been applied to numerous biological systems [1, 2]. Protein identification is nowadays very important task in various fields including variety identification of malting barley because proteins are often indicated as biochemical markers of certain properties (e.g. variety appurtenance) of malting barley [3].

For high throughput proteomics, it is very useful to use a combination of gel electrophoresis with peptide mass fingerprinting based on mass measurement of enzyme-digested peptides [4]. These methods together with database searching we used for identification of some proteins from barley (*Hordeum vulgare* L.). Protein mixtures were isolated from barley leaves or grains, then separated using one-dimensional SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and *in-gel* digested with trypsin. Exact peptide molecular masses were obtained by means of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) [5] and these used as input into the database-searching programs.

This strategy is not always successful because the success depends mainly on presence of the protein in the database. In the case of barley only about 20% of genome is known and moreover there exist many variants of barley. In spite of this complication, several proteins were identified. It proved that the combination SDS PAGE followed by *in-gel* digestion and MALDI-TOF MS is a suitable strategy for the identification of known and for the characterization of unknown barley proteins and furthermore for the reliable variety identification.

2 MATERIAL AND METHODS

For the identification of barley proteins, applying a combination of SDS-PAGE and mass spectrometry followed by database search, a barley variety Luxor was selected. Extracts from leaves and grains were analyzed.

Barley leaves were milled in liquid nitrogen. Proteins were extracted from 1 g of this mixture in 10 ml 2.5% NaCl for 1 hour while shaking. The supernatant after centrifugation was used for further analysis. Grains were extracted in a similar way with 5% NaCl for 15 minutes.

Samples for gel electrophoresis were prepared by mixing a particular extract with the sample buffer (50 mM TRIS-HCl,

gel (koncentrační vrstva – 6%, separační vrstva – 20%) o rozměrech 100 x 100 x 0,7 mm. Vizualizace byla provedena pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250 fixací v 45,4% methanolu/4,6% kyselině octové (1 hodina), obarvením v 45,4% methanolu/4,6% kyselině octové/0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250 (1 hodina) a následným odbarvením pozadí gelu v 5% methanolu/7,5% kyselině octové (24 hodin).

Vyříznutý proužek gelu obsahující bílkovinu byl po rozkrájení (kousky přibližně o velikosti 1 mm³) omyt v alkylačním pufru (50 mM NH₄HCO₃, 5 mM EDTA, pH 7,8). Bílkovina v gelu byla dále podrobena redukci v 200 µl alkylačního pufru/5 µl 1,4 M dithiothreitolu (1 hodina) a alkylaci v 200 µl alkylačního pufru/15 µl 1 M jodoacetamidu (30 minut). Odstranění solí a barviva bylo provedeno omytím ve směsi 40 % acetonitrilu/60% digesčního pufru (50 mM NH₄HCO₃, pH 7,8) po dobu 1 hodiny. Čisté kousky gelu byly usušeny ve vakuové centrifuze a poté k nim bylo přidáno 5 µl trypsinu (Roche, Modified Sequencing Grade) v digesčním pufru o koncentraci 20 ng/µl. Po 15 minutách byl přidán další digesční pufr tak, aby pokryl kousky gelu (přibližně 20 µl). Trypsinové štěpení proběhlo přes noc ve vodní lázni o teplotě 37 °C. Peptidy byly extrahovány dvakrát prostřednictvím 100 µl 60 % acetonitrilu/40 % vody po dobu 1 hodiny. Extrakty byly smíchány, lyofilizovány a po rozpuštění v 50 µl 0,1% kys. trifluoroctové přečištěny pomocí technologie ZipTip C₁₈.

Stanovení molekulových hmotností bylo provedeno na přístrojích Kompact MALDI IV tDE a AXIMA-CFR (Kratos Analytical) TOF. Na terčík bylo naneseno 0,5 µl matrice (α-kyano-4-hydroxyskořicová kyselina, nasycený roztok v acetonu) a po uschnutí matrice, která vytvořila homogenní vrstvu jemných krystalů, bylo přidáno 0,5 µl vzorku, jež byl usušen pod mírným proudem vzduchu. Relativní molekulové hmotnosti peptidů odečtené ze spektra v rozsahu 1000-3000 Da byly zadány do programu ProteinProspector – MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml3.4/msfit.htm>). Přesnost stanovených molekulových hmotností peptidů použitá pro vyhledávání v databázích byla 200 ppm. Jako vyhledávací databáze byla zvolena databáze SwissProt.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Výsledky gelové elektroforézy směsi bílkovin extrahovaných z listů (1) a ze zrna (2) jsou znázorněny na obr. 1. Po enzymatickém rozkladu separovaných bílkovin trypsinem přímo ve vyříznutých částech elektroforetického gelu byly izolované a purifikované peptidy naneseny na MALDI terčík v přítomnosti kyseliny α-kyano-4-hydroxyskořicové. Příklad MALDI-TOF spektra peptidů získaných působením trypsinu na bílkovinu izolovanou gelovou elektroforézou z extraktu listu je uveden na obr. 2. Označené peptidy byly použity pro identifikaci bílkovin, jejíž výsledky jsou uvedeny v tab. 1. Je zřejmé, že hledaná bílkovina je ribulosa bifosfat karboxylasa (prekursor velkého řetězce), která je na obr. 1 označena R, což potvrzuje jak statistická analýza výsledků uvedená v tab. 1, tak porovnání relativních molekulových hmotností identifikovaných peptidů s primární strukturou této bílkoviny (tab. 2). Z výsledků v tab. 1 vyplývá, že všechny nalezené bílkoviny jsou ribulosa bisfosfat karboxylasy z různých druhů a že jejich statistiky jsou téměř shodné. Tato zjištění potvrzují skutečnost, že ribulosa bisfosfat karboxylasa je velmi podobná v různých druzích zelených rostlin. Protože použitý extrakt byl z listů ječmene, je zřejmé, že námi identifikovaná bílkovina je třetí v pořadí ribulosa bisfosfat karboxylasa (prekursor velkého řetězce) z *Hordeum vulgare* (zkratka HORVU).

Příklad výsledků identifikace bílkovin extrahovaných ze zrna je uveden v tab. 3 a 4, z nichž vyplývá, že hledanou bílkovinou je β-amylasa (na obr. 1 označená jako B). Další identifikovanou bílkovinou v extraktu ze zrna je aldosa reduktasa (na obr. 1 označená jako A). Kromě uvedených bílkovin bylo identifikováno několik bílkovin ze skupiny tzv. hordeinů [6] a na identifikaci dalších bílkovin se pracuje.

pH 6,8, 4% SDS, 12% glycerol, 2% β-mercaptoethanol, 0,01% bromophenol blue) in the volume ratio 1:1. After boiling (water bath, 30 min) 20 µl of this mixture was applied onto the polyacrylamide gel (concentrating layer – 6%, separating layer – 20%, size 100 x 100 x 0.7 mm). Visualisation was carried out with Coomassie Brilliant Blue R-250 by fixing in 45.4% methanol/4.6% acetic acid (1 hour), staining in 45.4% methanol/4.6% acetic acid/0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250 (1 hour) and subsequent destaining in 5% methanol/7.5% acetic acid (24 hours).

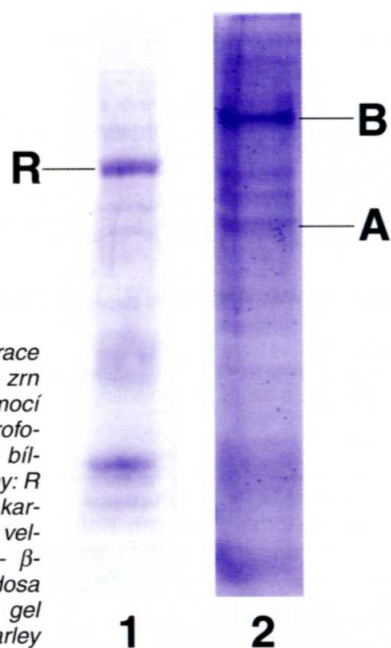
A stripe of gel containing protein was washed in alkylation buffer (50 mM NH₄HCO₃, 5 mM EDTA, pH 7.8) after cutting into small pieces (of size about 1 mm³). Protein was reduced in the gel with 200 µl alkylation buffer/5 µl 1.4 M dithiothreitol (1 hour) and alkylated in 200 µl alkylation buffer/15 µl iodoacetamide (30 minutes). Removal of salts and the dye was carried out in 40% acetonitrile/60% digestion buffer (50 mM NH₄HCO₃, pH 7.8) for 1 hour. Pure gel pieces were dried in vacuum centrifuge and 5 µl of 20 ng/µl trypsin (Roche, Modified Sequencing Grade) in digestion buffer were added. After 15 minutes next digestion buffer was added to cover gel pieces (about 20 µl). Trypsin digestion was carried out in a water bath at 37 °C overnight. Peptides were extracted twice with 100 µl 60% acetonitrile/40% water for 1 hour. Extracts were mixed together, lyophilized and purified by means of ZipTip C₁₈ technology after redissolving in 50 µl 0.1% trifluoroacetic acid.

Determination of molecular masses was performed either on Kompact MALDI IV tDE or AXIMA-CFR (Kratos Analytical) TOF instrument. 0.5 µl of matrix solution (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid, saturated solution in acetone) was put on the target and after drying of this droplet, forming a homogeneous layer of small crystals, 0.5 µl of sample solution was deposited and air-dried. From the positive ion MALDI mass spectra, exact molecular masses of the tryptic peptides in the region m/z 1000 to 3000 were obtained and submitted into the program ProteinProspector – MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml3.4/msfit.htm>). The mass accuracy used for the search was 200 ppm. SwissProt was used as a searching database.

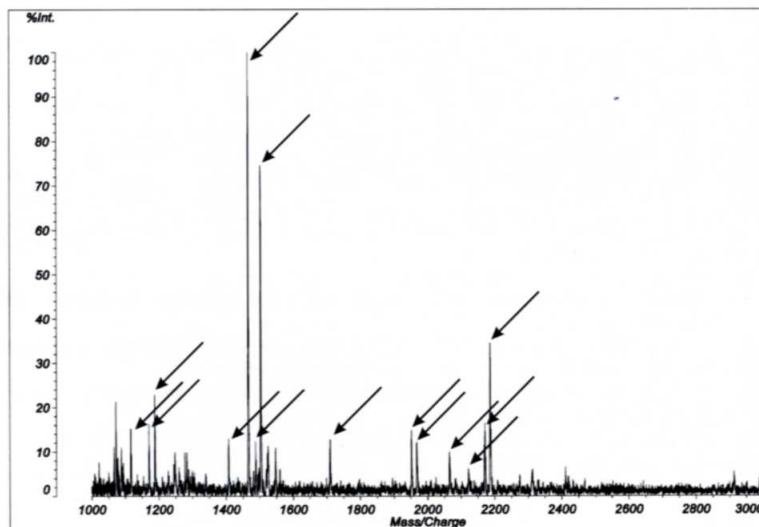
3 RESULTS AND DISCUSSION

The SDS gel electropherograms of protein mixtures extracted from the leaves (1) and the grains (2) are shown in Fig. 1. After *in-gel* digestion of the separated proteins by trypsin, the isolated and purified peptides were transferred on a MALDI target covered with the matrix α-cyano-4-hydroxycinnamic acid. An example of the MALDI-TOF spectrum of peptides from leaf extract is shown in Fig. 2. The marked peptides were used for protein identification; the results are summarized in Tab. 1. The protein was identified as ribulose biphosphate carboxylase large chain precursor, which is supported by the statistical analysis of the results shown in Tab. 1 and by the comparison of the determined relative molecular masses of the identified peptides to the primary structure of the identified protein (Tab. 2). In fact, all identified proteins in Tab. 1 are ribulose biphosphate carboxylases from various species and their statistics are almost the same. It also shows that ribulose biphosphate carboxylase is a highly conservative protein in green plants. Because we used the extract from barley leaves, we can conclude that our protein is the rank 3 in Tab. 1: ribulose biphosphate carboxylase large chain precursor from *Hordeum vulgare* (abbreviation HORVU).

An example of identification of proteins from the grain extract is given in Tabs. 3 and 4. It shows that the identified protein is β-amylase (marked as B in Fig. 1). Another identified protein is aldose-reductase (marked as A in Fig. 1). Besides these identified proteins, several proteins from so-called hordein group [6] were identified and identification of other proteins is under development.



Obr. 1/ Fig. 1 Separace extraktů z listů (1) a zrn (2) ječmene pomocí SDS gelové elektroforézy. Identifikované bílkoviny jsou označeny: R – ribulosa bisfosfat karboxylasa (prekursor velkého řetězce), B – β -amylasa, A – aldosa reduktasa./ SDS gel electrophoresis of barley extracts from leaves (1) and grains (2). The identified proteins are labeled: R – ribulose biphosphate carboxylase large chain precursor, B – β -amylase, A – aldose-reductase.



Obr. 2/ Fig. 2 MALDI-TOF MS spektrum směsi peptidů získaných působením trypsinu na bílkovinu (identifikovanou jako ribulosa bisfosfat karboxylasa) izolovanou gelovou elektroforézou z extraktu listů ječmene. Šipkou označené peptidy byly využity k databázové identifikaci./ MALDI-TOF MS spectrum of a peptide mixture from in-gel tryptic digest of a protein (identified as ribulose biphosphate carboxylase) isolated by gel electrophoresis from barley leaf extract. The arrow-marked peptides were used for database searching.

Výhody zvolené proteomické metody oproti jiným používaným metodám spočívají především v malé spotřebě vzorku a v rychlosti identifikace bílkovin. Nejmenší potřebné množství bílkoviny je takové, které jsme schopni vidět po obarvení separačního gelu. I gely obarvené nejcitlivějšími způsoby (např. stříbrem) obsahují dostatečné množství bílkoviny (asi 10 ng) pro její

The advantages of the proteomic method we used in comparison to other methods are mainly in lower consumption of the sample and rapidity of protein identification. The necessary amount of the protein is given by sensitivity of the staining procedure used to visualize protein spots on the separation gels. Even spots visualized by very sensitive

Tab. 1

Přehled výsledků databázového vyhledávání / Summary of database searching						
R	S	P	M/pi	D	A	N
1	1.14e+003	7/14 (50%)	43917.4 / 6.40	NELLU	Q05800	RIBULOSE BISPHOSPHATE CARBOXYLASE LARGE CHAIN (RUBISCO LARGE SUBUNIT)
2	1.08e+003	8/14 (57%)	46114.2 / 6.40	SPIMR	P36488	RIBULOSE BISPHOSPHATE CARBOXYLASE LARGE CHAIN (RUBISCO LARGE SUBUNIT)
3	1.06e+003	8/14 (57%)	47090.9 / 6.32	HORVU	P05698	RIBULOSE BISPHOSPHATE CARBOXYLASE LARGE CHAIN PRECURSOR (RUBISCO LARGE SUBUNIT)
4	1.02e+003	7/14 (50%)	48674.7 / 6.60	BYBLI	P28386	RIBULOSE BISPHOSPHATE CARBOXYLASE LARGE CHAIN (RUBISCO LARGE SUBUNIT)
5	1.02e+003	8/14 (57%)	48720.8 / 6.54	GLYEC	Q62970	RIBULOSE BISPHOSPHATE CARBOXYLASE LARGE CHAIN (RUBISCO LARGE SUBUNIT)

Vysvětlivky / Abbreviations:
R – výsledné pořadí dle skóre / rank
S – MOWSE skóre definované podle Pappin et al, Current Biology, 1993, Vol 3, No 6, pp 327-332 / MOWSE score based on Pappin et al, Current Biology, 1993, Vol 3, No 6, pp 327-332
P – poměr počtu shodných ku počtu zadáných peptidů / ratio of matched and submitted peptides
M – relativní molekulová hmotnost / relative molecular mass
pi – izoelektrický bod bílkoviny vypočítaný na základě primární struktury / isoelectric point of protein based on computing from primary structure
D – původ bílkoviny / protein origin
A – klíč bílkoviny v databázi SwissProt / accession number of protein in SwissProt database
N – název bílkoviny / protein name

Tab. 2

Přehled identifikovaných peptidů / Summary of identified peptides						
m/z	MH ⁺	Delta ppm	S	K	PS	M
1170.4100	1170.5591	-127.3488	304	312	(R)QKNHGMHFR(V)	1Met-ox
1187.4700	1187.6649	-164.1158	286	295	(R)DNGLLLHIHR(A)	
1407.4300	1407.6684	-169.3494	22	32	(K)LTYYTPEYETK(D)	
1465.6300	1465.7552	-85.4073	147	159	(K)TFQGPPIHGIQVER(D)	
1708.8400	1708.8771	-21.7056	147	161	(K)TFQGPPIHGIQVERDK(L)	1Met-ox
2063.8700	2064.0990	-110.9669	147	164	(K)TFQGPPIHGIQVERDKLNK(Y)	
2063.8700	2064.0132	-69.3917	296	312	(R)AMHAVIDRQKNHGMHFR(V)	
2169.6300	2169.9875	-164.7507	195	213	(R)GGLDFTKDDENVNSQPFMR(W)	
2185.5800	2185.9824	-184.0918	195	213	(R)GGLDFTKDDENVNSQPFMR(W)	1Met-ox

Vysvětlivky / Abbreviations:
m/z – poměr hmotnosti a náboje peptidu / mass/charge ratio of peptide
MH⁺ – relativní molekulová hmotnost protonovaného peptidu / relative molecular mass of protonized peptide
Delta ppm – odchylka změřené a nalezené hmotnosti peptidu v ppm / difference between measured and found mass of peptide in ppm
S – počáteční pozice peptidu v identifikované bílkovině / start position of peptide in identified protein
K – koncová pozice peptidu v identifikované bílkovině / end position of peptide in identified protein
PS – sekvence peptidu / peptide sequence
M – modifikace / modification

Tab. 3

Přehled výsledků databázového vyhledávání / Summary of database searching						
R	S	P	M/pi	D	A	N
1	1.24e+003	7/15 (46%)	59647.9 / 5.58	HORVU	P16098	BETA-AMYLASE (1,4-ALPHA-D-GLUCAN MALTOHYDROLASE)
2	144	7/15 (46%)	98659.1 / 8.37	BYDVR	P29045	PUTATIVE RNA-DIRECTED RNA POLYMERASE [CONTAINS: 39 KD PROTEIN]
3	136	7/15 (46%)	98663.2 / 8.45	BYDVP	P09505	PUTATIVE RNA-DIRECTED RNA POLYMERASE [CONTAINS: 39 KD PROTEIN]
4	76.2	6/15 (40%)	44549.3 / 6.36	BRUPA	Q17473	CATHEPSIN L-LIKE PRECURSOR
5	75.5	6/15 (40%)	83253.5 / 8.82	HUMAN	Q15349	RIBOSOMAL PROTEIN S6 KINASE ALPHA 2 (S6K-ALPHA 2) (90 KDA RIBOSOMAL PROTEIN S6 KINASE 2) (P90-RSK 2) (RIBOSOMAL S6 KINASE 3) (RSK-3) (PP90RSK3)

Vysvětlivky / Abbreviations:
R – výsledné pořadí dle skóre / rank
S – MOWSE skóre definované podle Pappin et al, Current Biology, 1993, Vol 3, No 6, pp 327-332 / MOWSE score based on Pappin et al, Current Biology, 1993, Vol 3, No 6, pp 327-332
P – poměr počtu shodných ku počtu zadaných peptidů / ratio of matched and submitted peptides
M – relativní molekulová hmotnost / relative molecular mass
pi – izoelektrický bod bílkoviny vypočítaný na základě primární struktury / isoelectric point of protein based on computing from primary structure
D – původ bílkoviny / protein origin
A – klíč bílkoviny v databázi SwissProt / accession number of protein in SwissProt database
N – název bílkoviny / protein name

Tab. 4

Přehled identifikovaných peptidů / Summary of identified peptides						
m/z	MH ⁺	Delta ppm	S	K	PS	M
1326.8700	1326.6694	151.2126	384	394	(R)YDPTAYNTILR(N)	
1753.0900	1752.8921	112.9142	419	433	(R)LSNQLVEGQNYVNFK(T)	
2022.1200	2021.9317	93.1255	111	128	(R)DVGTRDPDIFYTDGHGTR(N)	
2086.3000	2086.0722	109.2181	129	146	(R)NIEYLTGLVDNQPLFHGR(S)	
2206.3000	2206.0901	95.1284	439	457	(R)MHANLPRDPYVDPMAPLPR(S)	1Met-ox
2222.2100	2222.0851	56.2297	439	457	(R)MHANLPRDPYVDPMAPLPR(S)	2Met-ox
2841.2300	2841.2869	-20.0121	217	242	(K)AAAAVGHPEWEPNDVGQYNDTPER(T)	

Vysvětlivky / Abbreviations:
m/z – poměr hmotnosti a náboje peptidu / mass/charge ratio of peptide
MH⁺ – relativní molekulová hmotnost protonovaného peptidu / relative molecular mass of protonized peptide
Delta ppm – odchylka změřené a nalezené hmotnosti peptidu v ppm / difference between measured and found mass of peptide in ppm
S – počáteční pozice peptidu v identifikované bílkovině / start position of peptide in identified protein
K – koncová pozice peptidu v identifikované bílkovině / end position of peptide in identified protein
PS – sekvence peptidu / peptide sequence
M – modifikace / modification

identifikaci. Zpracování gelu trvá sice zhruba 24 hodin, ale je možné současně zpracovat více bílkovin, jejichž peptidy jsou použity na MALDI-TOF MS. Tato měření nejsou časově příliš náročná (cca 10 min na jednu bílkovinu). Následné počítačové vyhledávání je úměrné přesnosti stanovení molekulových hmotností peptidů. To znamená, že za optimálních podmínek je možné za 48 hodin identifikovat několik bílkovin. Identifikace jedné bílkoviny jinými způsoby vyžaduje řádově týdny práce, pro kterou je nezbytné mnohem větší množství bílkoviny.

Naše výsledky ukazují, že gelová elektroforéza, MALDI-TOF MS a bioinformatika jsou účinnými nástroji pro analýzu bílkovin a proteomu ječmene a mohou být využity pro identifikaci odrůd sladovnického ječmene [6]. Strategie identifikace bílkovin založená na hmotnostní spektrometrii má některé výhody (např. malá spotřeba vzorku). Spolu s dostatečnou citlivostí umožňuje nejen identifikaci bílkovin, ale i detailní analýzu výskytu a funkčnosti jednotlivých bílkovin v organismu, včetně studia bílkovinných komplexů, charakterizaci posttranslačních modifikací bílkovin [4,7] a stanovení složení bílkovin v různých částech organismu v různých stadiích jeho života, což umožní studovat životní procesy na molekulární úrovni.

Poděkování

Tato práce byla podpořena grantem č.521/99/1576 od Grantové agentury České republiky a grantem ME 230/1998 od Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy. J. Chmelík děkuje prof. O. N. Jensenovi a prof. P. Roepstorffovi za pomoc při identifikaci hordeinů během pobytu na universitě v Odense.

staining procedures (e.g. silver staining) contain enough protein material (about 10 ng) for identification. The *in-gel* digestion and peptide extraction and purification take about 24 hours. However, because it is possible to prepare several protein spots simultaneously for MALDI-TOF MS and these measurements are not too time demanding (about 10 min for one protein), it is possible to identify several proteins within 48 hours. It means much faster than it is possible by other methods.

Our results show that gel electrophoresis, MALDI-TOF mass spectrometry, and bioinformatics are important tools for protein and proteome analysis of barley and they can be successfully applied to the identification of malting barley varieties [6]. The mass spectrometry-based strategy designed for protein identification exhibits good sensitivity and this approach allows even detailed structure/function analyses. It includes studying the molecular composition of multiprotein complexes, characterization of post-translational modifications of proteins [4,7] and investigation of protein composition at different stages of the plant life, which allows studying biochemical processes at molecular level.

Acknowledgment

This work was supported by the grant 521/99/1576 from the Grant Agency of the Czech Republic and an Austrian-Czech Republic Collaboration Grant (II/4). J. Chmelík thanks to Prof. O. N. Jensen and Prof. P. Roepstorff for their kind help with identification of hordeins during his stay at Odense University.

Literatura/References

- [1] JENSEN, O. N., LARSEN, M. R., ROEPSTORFF, P.: Proteins, Suppl. 2, 1998, s. 74
- [2] PERKINS, D. N., PAPPIN, D. J. C., CREASY, D. M., COTTRELL, J. S.: Electrophoresis **20**, 1999, s. 3551
- [3] KRAUS, I., ŠPUNAROVÁ, M.: Kvasny Prum. **46**, 2000, s. 158
- [4] AEBERSOLD, R., GOODLETT, D. R.: Chem. Rev. **101**, 2001, s. 269
- [5] KARAS, M., HILLENKAMP, F.: Anal. Chem. **60**, 1988, s. 2299
- [6] CHMELÍK, J., JENSEN, O. N., ROEPSTORFF, P.: rukopis v přípravě/ *manuscript in preparation*
- [7] GROSS, J., STRUPAT, K.: TRAC-Trends Anal. Chem. **17**, 1998, s. 470

Lektoroval RNDr. Igor Kraus

Překlad RNDr. Josef Chmelík, CSC.

Do redakce došlo 26. 4. 2001

Chmelík, J.- Řehulka, P. – Mayrhofer, C. – Allmaier, G.: Proteomika – nový a rychlý nástroj pro identifikaci odrůd ječmene. Kvasny Prum. **47**, 2001, č. 6, s. 159–163.

Na základě identifikace několika bílkovin z různých částí ječmene jsme ukázali, že proteomická metoda založená na kombinaci gelové elektroforézy, MALDI-TOF MS a bioinformatiky je účinným nástrojem pro analýzu proteomu ječmene a že může být využita pro identifikaci odrůd sladovnického ječmene. Strategie identifikace bílkovin založená na hmotnostní spektrometrii má výhody (např. malá spotřeba vzorku, rychlost identifikace bílkovin) oproti stávajícím metodám. Identifikovanými bílkoviny byly ribulosa bисfosfat karboxylasa v extraktu z listů a β -amylasa a aldosa reduktasa v extraktu ze zrna.

Chmelík, J.- Řehulka, P. – Mayrhofer, C. – Allmaier, G.: Proteomics – A New and Fast Tool for Identification of Barley Varieties. Kvasny Prum. **47**, 2001, No. 6, p. 159–163.

Identification of several proteins from various barley samples by the proteomic method based on combination of gel electrophoresis, MALDI-TOF mass spectrometry, and bioinformatics is an important tool for proteome analysis of barley and it can be successfully applied to the identification of malting barley varieties. The mass spectrometry-based strategy designed for protein identification exhibits good sensitivity and rapid protein identification in comparison to other methods. The identified proteins were ribulose bисphosphate carboxylase from barley leaves and β -amylase and aldose-reductase from barley grains.

Chmelík, J. – Řehulka, P. – Mayrhofer, C. – Allmaier, G.: Proteomik – ein neues und schnelles Instrument zur Identifikation der Gerstensorten. Kvasny Prum. **47**, 2001, Nr. 6, S. 159–163.

Aufgrund der Identifikation einiger Eiweißstoffe aus verschiedenen Gerstenteilen zeigen die Autoren, dass die proteomische Methode, die auf der Kombination der Gel-Elektrophorese, MALDI-TOF-Masse-Spektrometrie und Bioinformatik basiert, ein wirksames Instrument zur Analyse des Gerstenproteoms darstellt und zur Identifikation der Braugerstensorten ausgenutzt werden kann. Die auf der Masse-Spektrometrie basierende Strategie der Eiweißidentifikation hat Vorteile gegenüber den bisherigen Methoden (kleiner Verbrauch der Probe, Schnelligkeit der Identifikation). Von den Eiweißstoffen wurden identifiziert: Ribulose Bисphosphat Karboxylase aus dem Extrakt der Blätter und β -Amylase und Aldose Reduktase aus dem Kornextrakt.

Хмелик, Й. – Ржегулка, П. – Майергофер, Ц. – Аллмайер, Г.: Современный быстродействующий метод для идентификации сорта ячменя – протеомика. Kvasny Prum. **47**, 2001, № 6, стр. 159–163.

На основе идентификации нескольких белков из разных частей растения было доказано, что протеомика, основанная на комбинировании гель-электрофореза, MALDI-TOF MS и биоинформатики, является эффективным средством для анализа протеома ячменя и позволяет идентификацию сортов солодорастиельного ячменя. Настоящая стратегия идентификации белков, базирующая на масс-спектрометрии, имеет некоторые преимущества по сравнению с до сих пор существующими методами, как напр. малое количество образца и быстрое определение белков. Идентифицированными белками были рибулоза бисфосфат карбоксилаза в экстракте из листьев и бета-амилаза и альдоза редуктаза в экстракте из зерна.