



RETURN TO ISSUE | < PREV ARTICLE NEXT >

Depletion of High-Molecular-Mass Proteins for the Identification of Small Proteins and Short Open Reading Frame Encoded Peptides in Cellular Proteomes

Liam Cassidy, Philipp T. Kaulich, and Andreas Tholey*

✓ Cite this: *J. Proteome Res.* 2019, 18, 4, 1725–1734

Publication Date: February 19, 2019

<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00948>

Copyright © 2019 American Chemical Society

[RIGHTS & PERMISSIONS](#)

Article Views

911

Altmetric

3

Citations

11



Twitter (9)
Mendeley (28)

Share

Add to

Export



Read Online



PDF (5 MB)

SUBJECTS: Protein identification, Peptide identification, Peptides and proteins, ▾

1- Quel est la problématique ?

2- Quel est la méthode utilisé ?

- quel matériel biologique
- quel homogénéisation/extraction ?

Pourquoi ?

- quel méthode analytique est utilisée ?

A simple protein mixture consisting of six proteins (bovine insulin, bovine serum albumin (BSA), lactoglobulin and casein from bovine milk, equine cytochrome c, and ovalbumin) was utilized for method optimization. For the initial experiments, the six-protein mixture was solubilized in 100 mM triethylammonium bicarbonate (TEAB) buffer (pH 8.5).

Cultivation of *M. mazei* Gö1 under nitrogen-limiting conditions was performed as previously described on minimal media in an anaerobic environment until an optical density (OD) at 600 nm of 0.6 was reached.⁶ The cells were concentrated via centrifugation, washed in 100 mM TEAB, and then disrupted via freeze-thaw cycling and homogenization in a mixing mill with glass beads in lysis buffer (100 mM TEAB, 1× EDTA-free cOmplete protease inhibitor cocktail (Roche, Germany), pH 7.4). The protein concentration was determined via BCA protein assay, and aliquots of the samples were stored at -20 °C until required.

Here we present an alternative depletion method, based on selective ACN precipitation of larger proteins, for the isolation of the small-protein complement of a proteome. We have optimized several key parameters such as pH, ion strength, and temperature and established a protocol that allows for the reproducible depletion of higher-molecular-weight proteins (higher than ~15 kDa). The application of this easy-to-perform method leads to a significant reduction of the background proteome.

For visualization of the isolated proteins, SDS-PAGE (16% T) was performed, and the gels were stained with either Coomassie Brilliant Blue (CBB) or silver staining.

For the analysis of proteins via LC-MS, protein samples were suspended in 100 mM TEAB and reduced with dithiothreitol (DTT) (10 mM, 56 °C, 1 h) before alkylation was performed with iodoacetamide (IAA) (50 mM, RT, 30 min). Enzymatic digestion was performed with sequencing-grade trypsin (Promega, Germany) (enzyme to protein ratio of 1:50, 37 °C, overnight). All samples were then cleaned on a

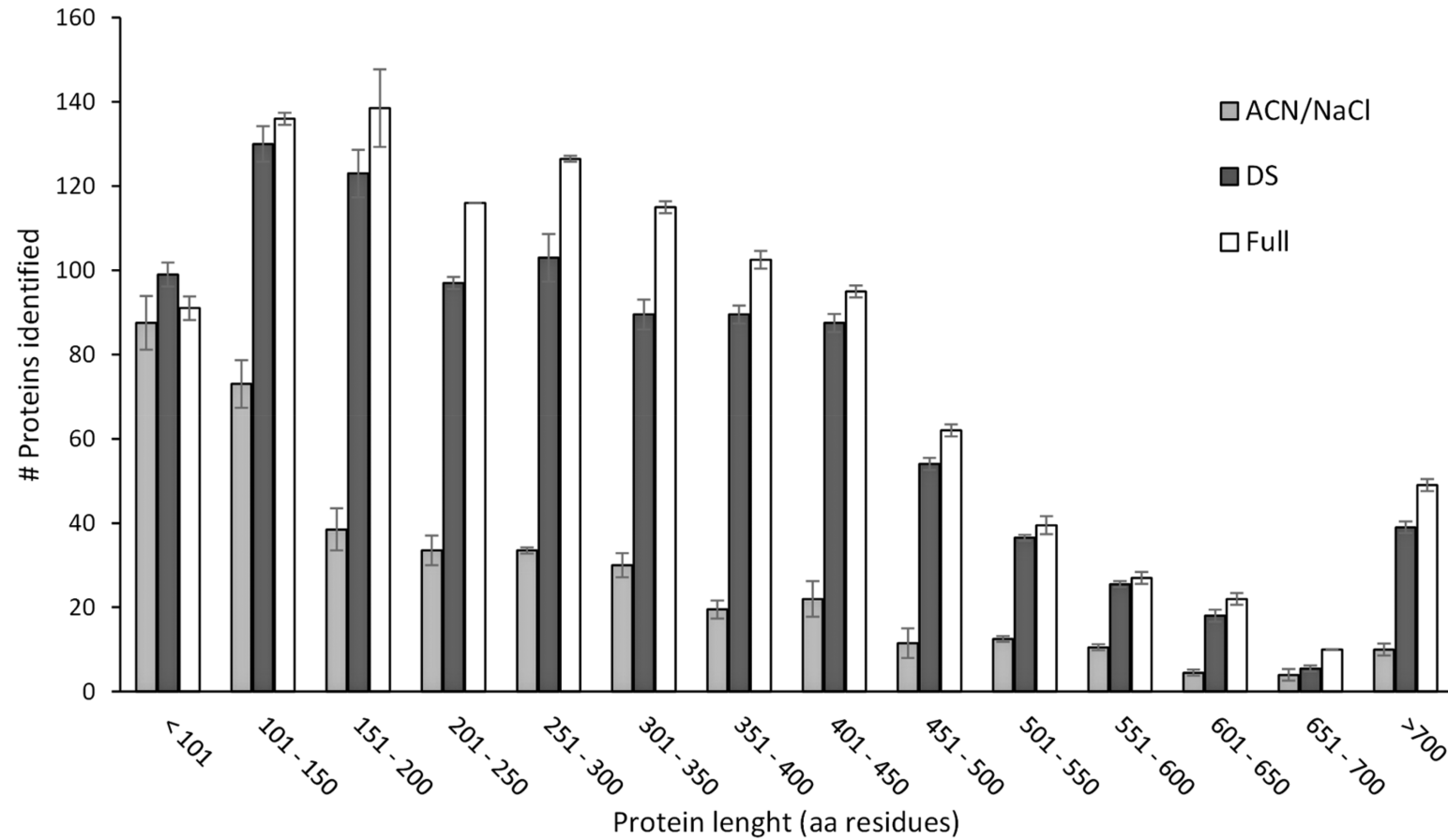
Qu'est ce que la méthode « DS » ?

the prefractionation of the low-molecular-weight fraction of proteomes is the differential solubilization (DS) methodology that is based on the precipitation of all protein species from a sample before resolubilizing the “small” protein complement of the precipitated sample using acetonitrile (ACN).⁹ This

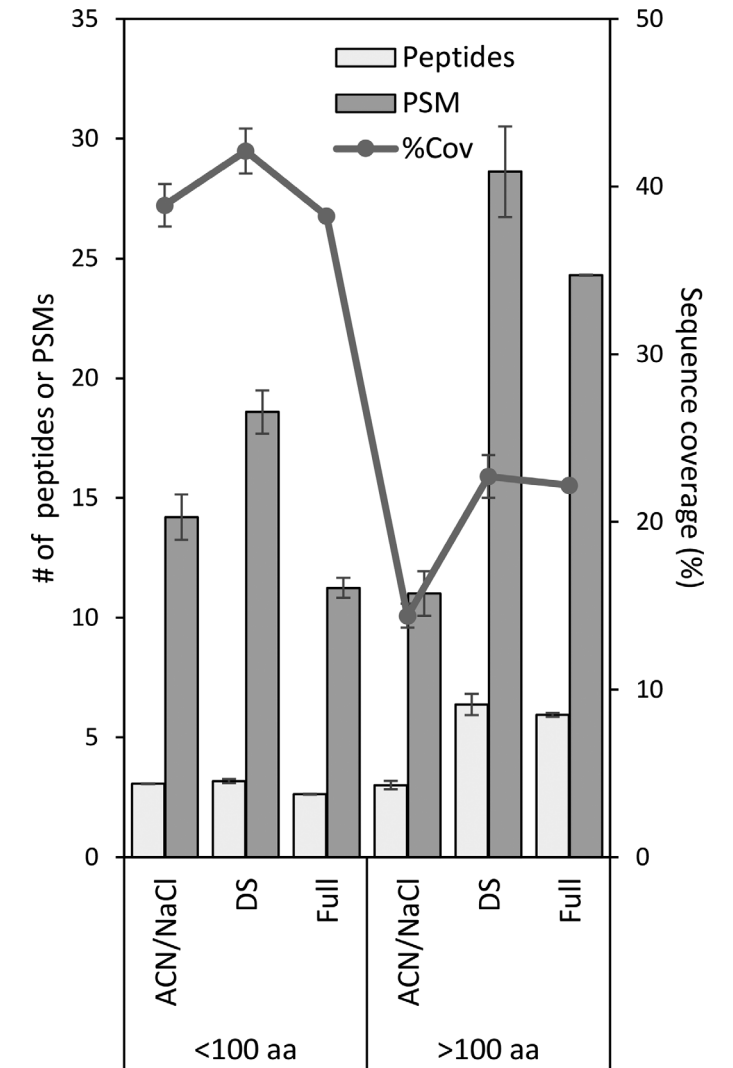
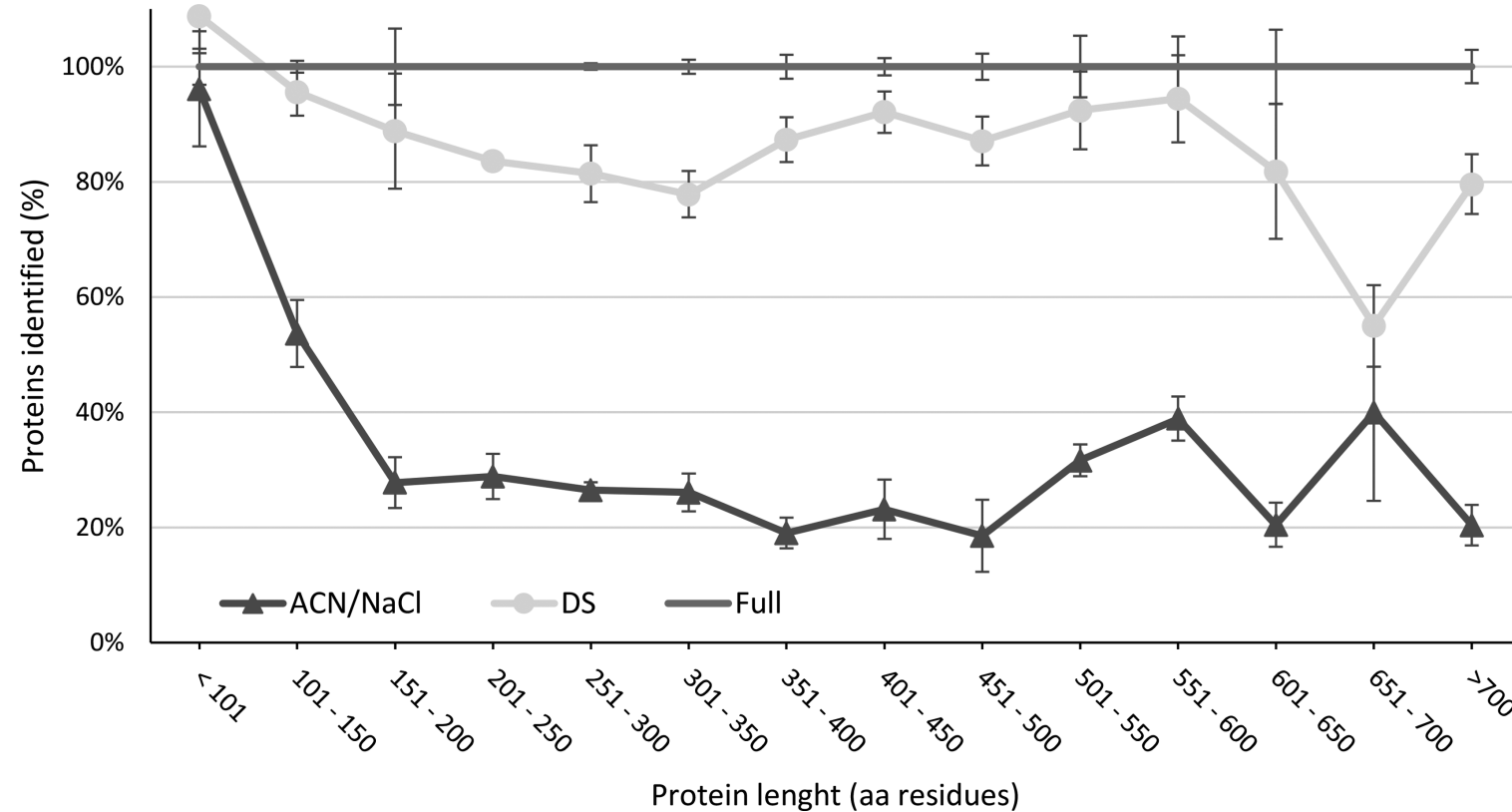
Quel en sont les étapes ?

resolubilization.⁷ An aliquot of our sample was diluted 1:2 with 20 μ L of denaturing solution (7 M urea, 2 M thiourea, and 20 mM DTT), slowly dropped into 900 μ L of ice-cold acetone, and immediately stirred at 4 °C for 1 h, followed by centrifugation at 19 000g for 15 min at 4 °C. The precipitate was taken up in 200 μ L of 70% ACN containing 12 mM HCl and mixed at 4 °C for 1 h, then centrifuged again at 19 000g for 15 min at 4 °C. The low-molecular-mass proteins/peptides were extracted into the supernatant.

3- Quel est le résultat ? quel sont les limites de la méthode ?



3- Quel est le résultat ? quel sont les limites de la méthode ?



3- Quel est la conclusion ?

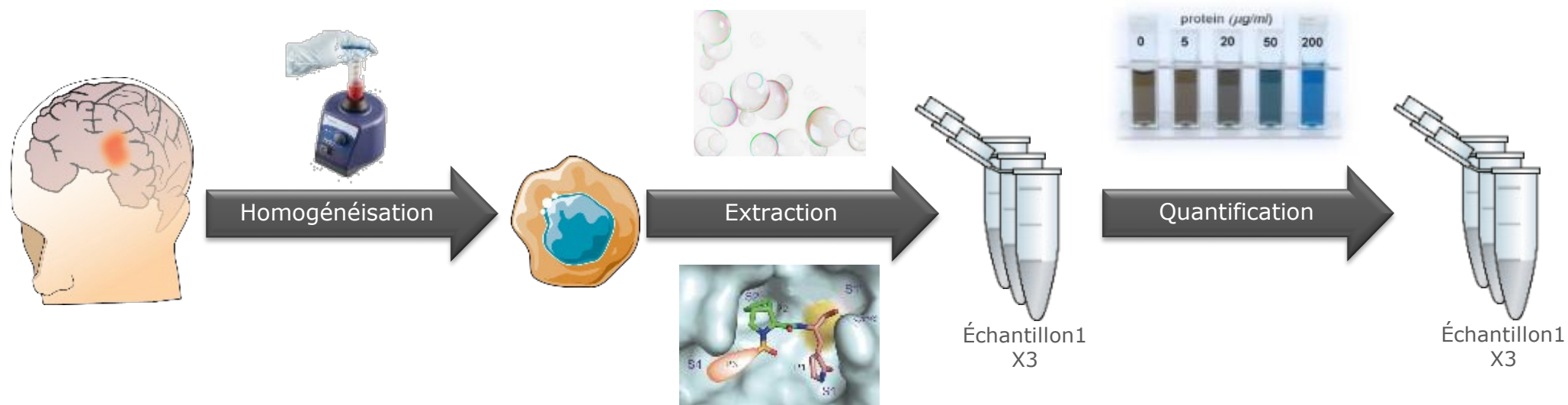
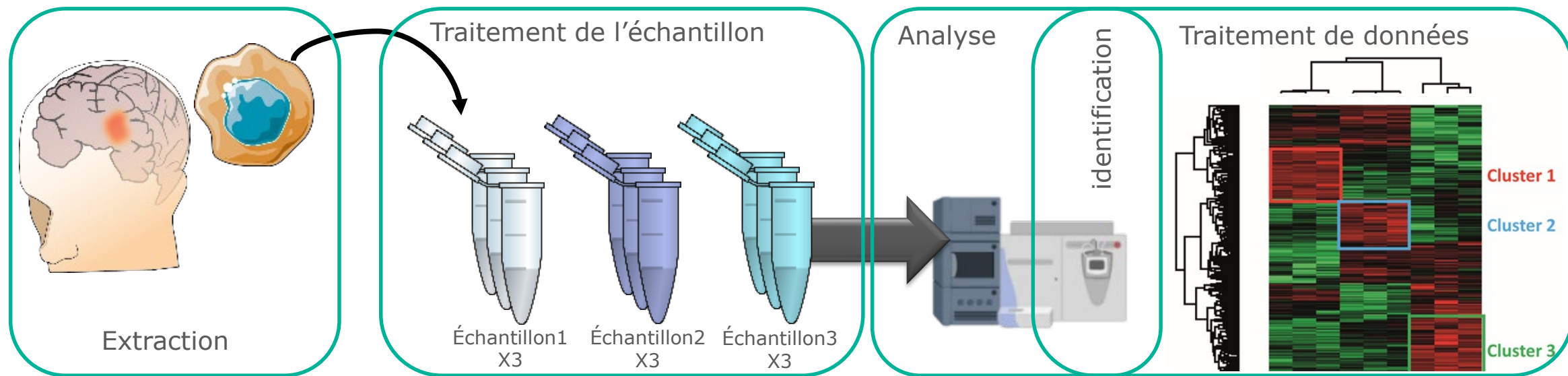
The selective isolation of the small-protein complement of a system is a useful step toward the identification and molecular characterization of potentially biologically important small proteins and peptides in a cellular context. Whereas previous iterations for the depletion of large proteins using ACN have focused on the removal of highly abundant, predominantly large proteins from plasma and serum, the ability to fine-tune the procedure for the enrichment of small proteins from cellular proteomes offers a revival of this methodology.

The approach presented here is based on the (selective) depletion of larger proteins with simultaneous retention of proteins below ~ 150 amino acids in solution. We achieved a depletion of $>70\%$ of proteins above ca. 150 amino acids, which was significantly higher than that achieved by the DS method. However, like in all depletion methods, a loss of smaller proteins was also observed.

Bases de la protéomique

Principes et Applications

Les étapes pour la protéomique



Techniques d'analyses

Stratégies par Spectrométrie de Masse (MS)

Spectrométrie de masse utilisée pour l'identification des molécules

Possibilité de faire de la fragmentation (MS/MS)

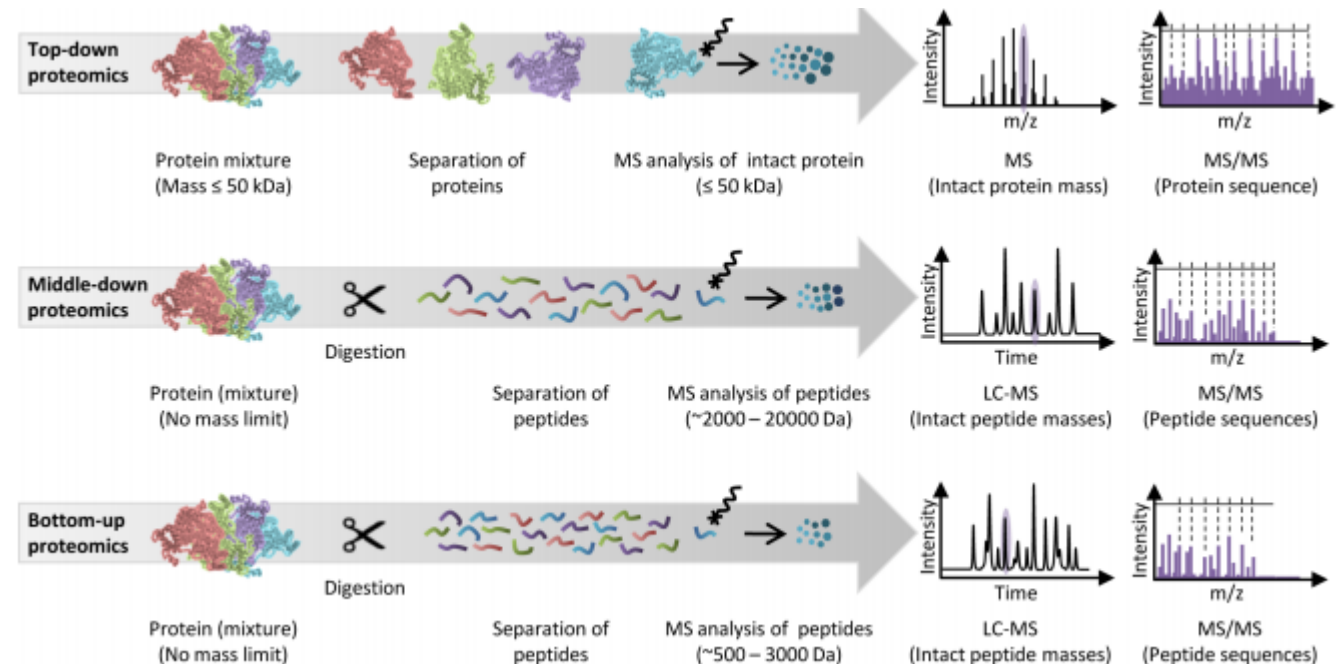
3 approches possibles:

- *Bottom-up*
- *Middle-Down*
- *Top-down*

Bottom-up/Middle-down : utilisation de **clivages enzymatiques ou chimiques**

Top-down: analyse protéines **intactes**

Mélange complexe nécessite **techniques séparatives**



Stratégie Bottom-up

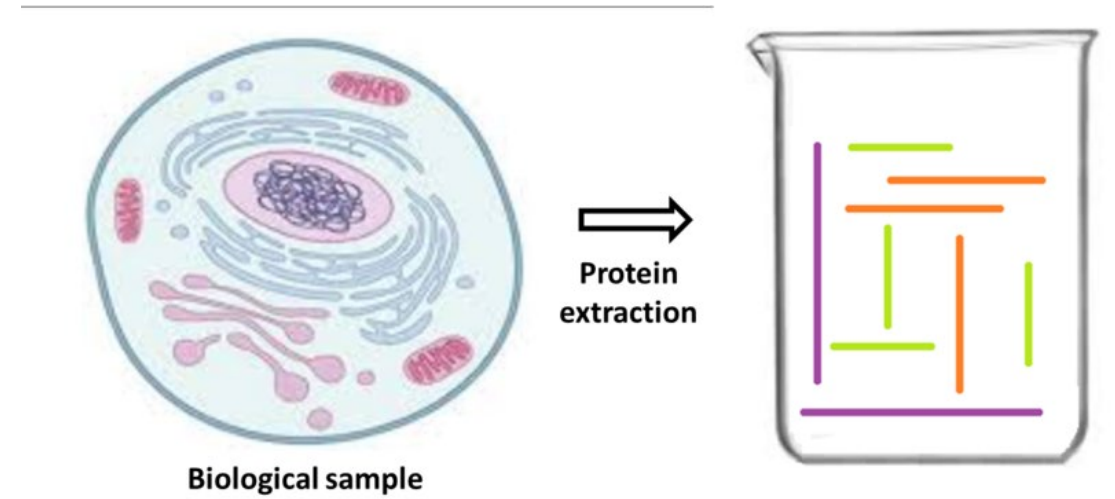
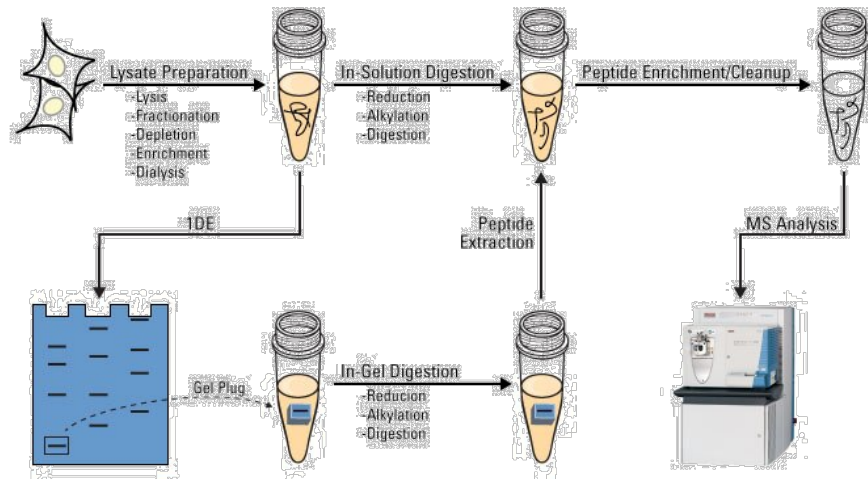
Analyse Bottom-up

Digestion des protéines pour former des peptides

Peptides plus simples à analyser en MS
(**ionisation, fragmentation**)

Utilisation d'une **méthode séparative** avant ou après la digestion enzymatique

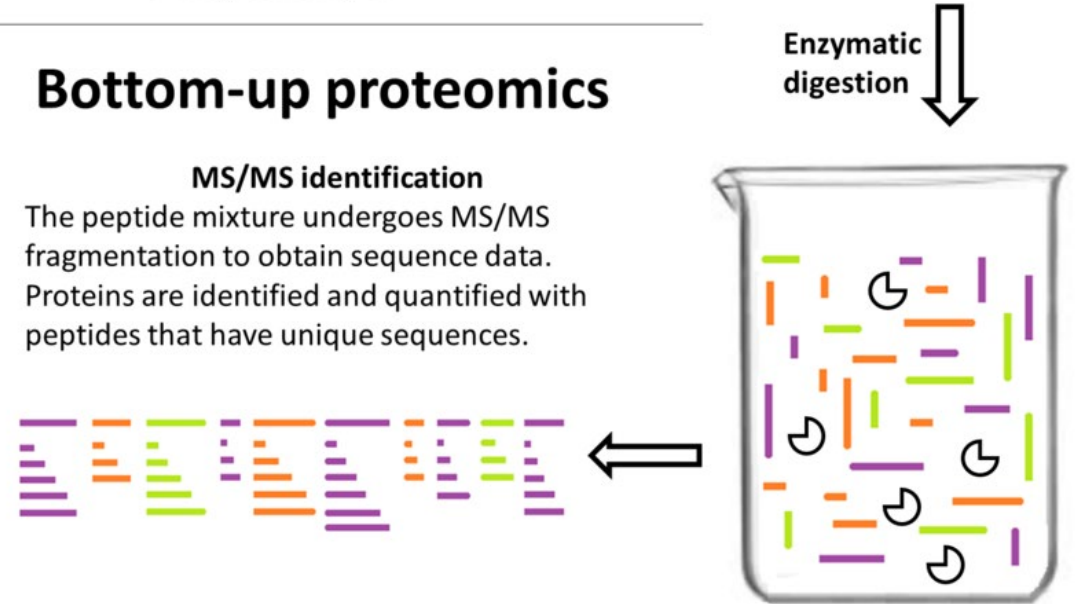
Shotgun= digestion mélange complexe sans séparation des protéines préalables



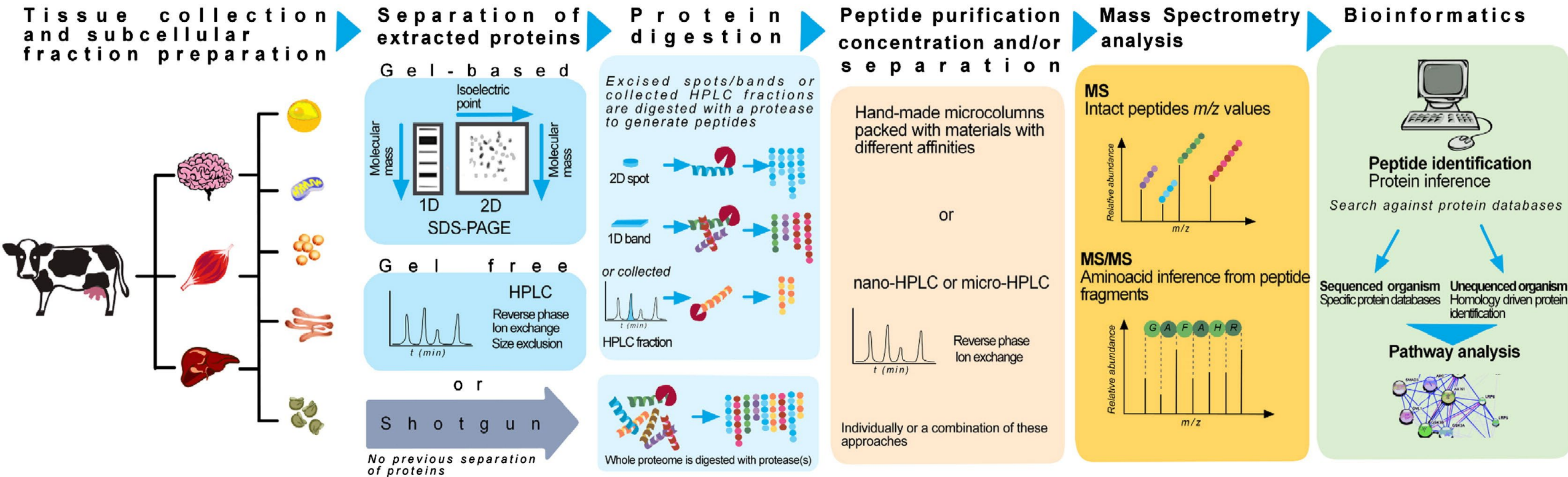
Bottom-up proteomics

MS/MS identification

The peptide mixture undergoes MS/MS fragmentation to obtain sequence data. Proteins are identified and quantified with peptides that have unique sequences.



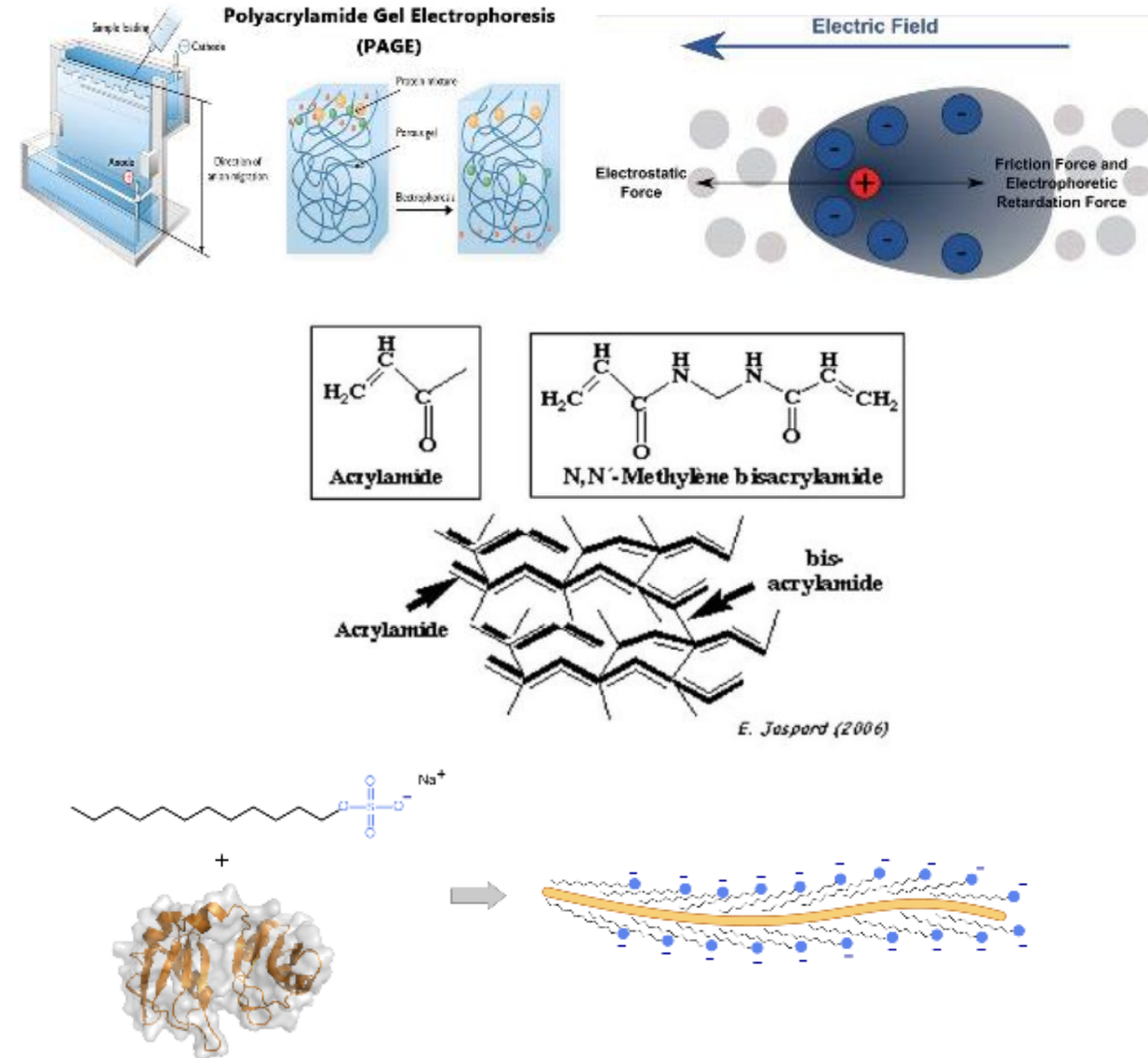
Bottom-up et Shotgun



séparation en gel

Electrophorèse monodimensionnelle

- Date de 1970
 - Méthode de séparation des protéines en **fonction de leur masse moléculaire**
 - Utilise un gel de polyacrylamide contenant du **SDS = SDS-PAGE**
 - Gel **réticulé**: polymérisation acrylamide forme des chaînes et bis-acrylamide forme des ponts entre ces chaînes
 - Utilisation d'un **champ électrique** cathode (-) vers anode (+)
 - Nécessite **charge globale négative** pour les protéines → utilisation de SDS et **linéarisation** de la protéine (**agent réducteur + chaleur**)
 - Méthode dénaturante
-
- **Protéines de hautes masses migrent moins que protéines plus petites.**



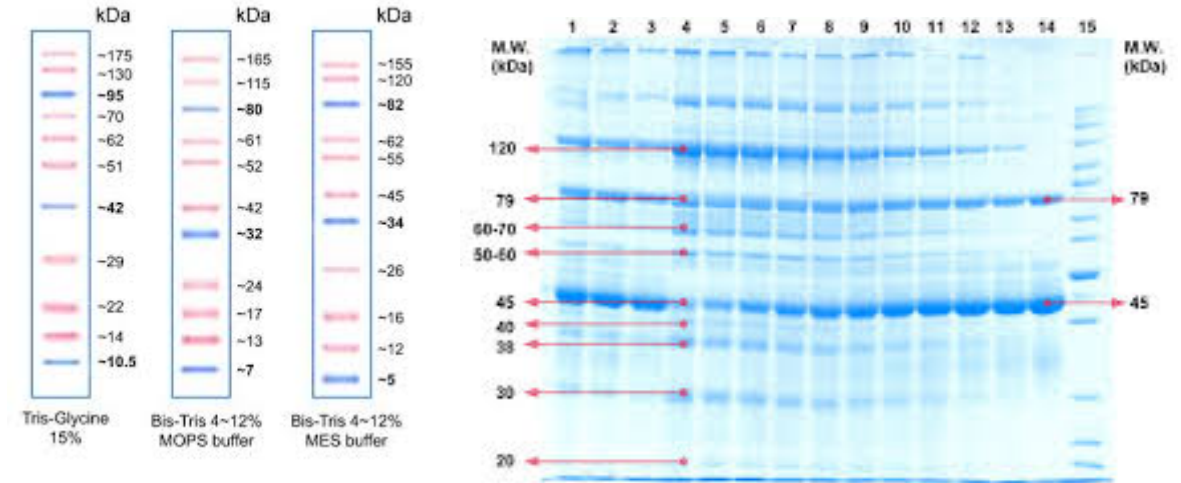
Gel SDS-PAGE

Gel discontinu (**gel de concentration** et **gel de séparation**)

- Gel de **concentration** ou focalisation **peu concentré en acrylamide** (4-5%)
- Gel de séparation, 8 à 15% en acrylamide
- Permet une bonne **focalisation des protéines**

Comment migre les protéines volumineuses lorsque le % en Acrylamide augmente ?

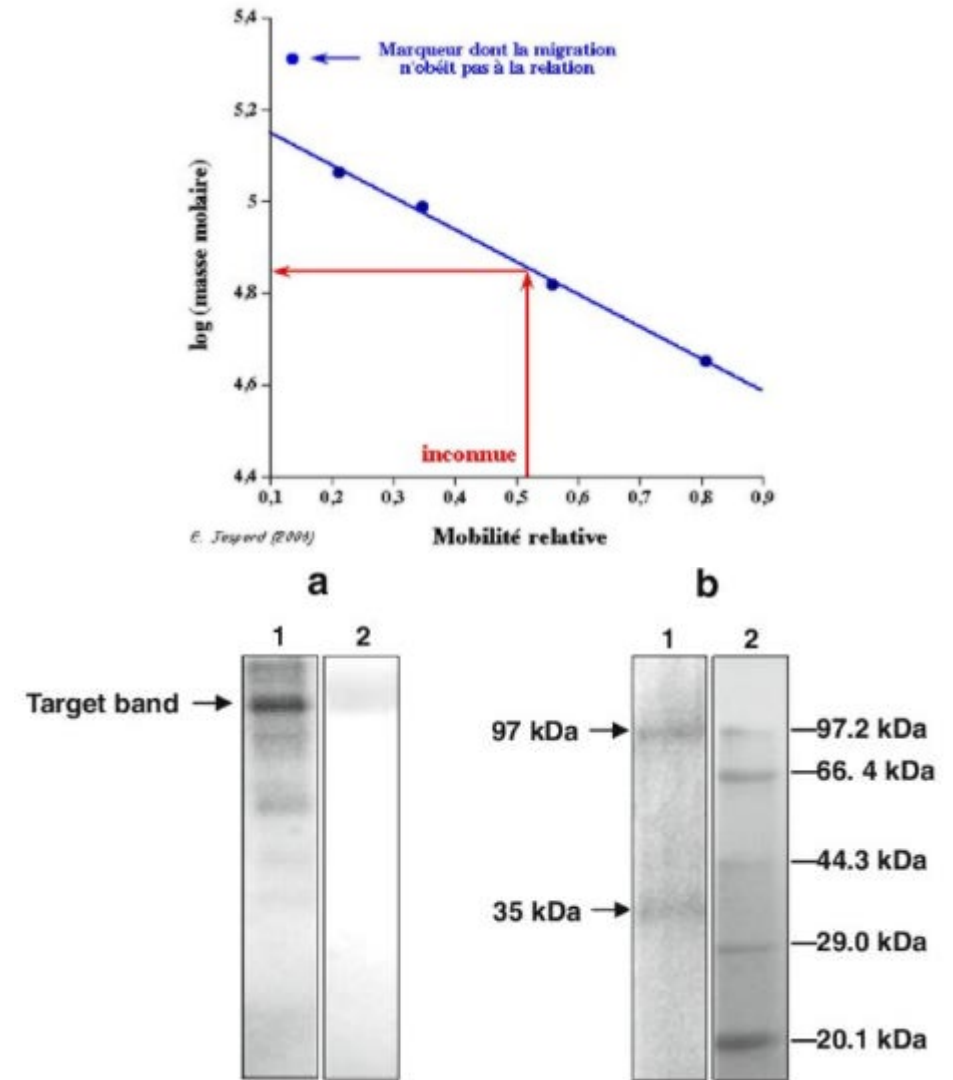
Efficacité de séparation limitée
Nécessite une **coloration pour visualiser** les bandes



Pourcentage d'acrylamide	Gamme de séparation en kDa
7,5	45 - 400
10	22 - 300
12	13 - 200
15	2,5 - 100

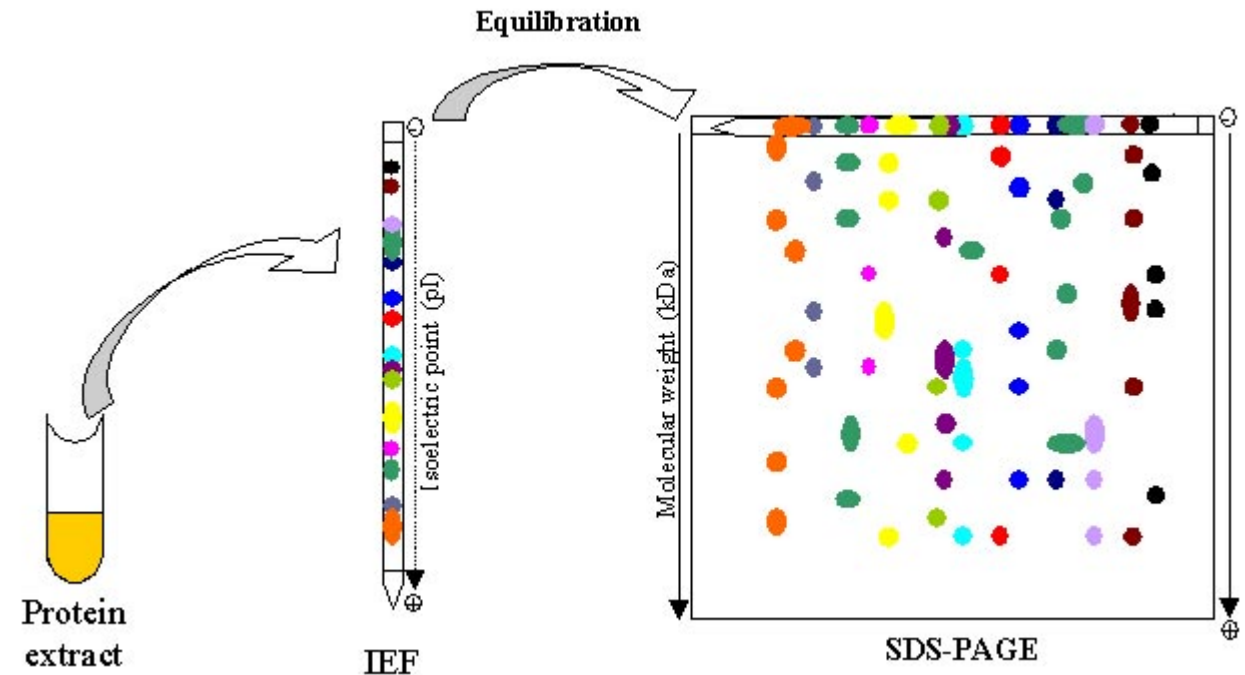
Gel SDS-PAGE

- Détermination de la masse moléculaire (nécessite des **marqueurs de MW**)
- Reproductibilité des gels → gel pré coulé
- Utilisation de **façon ciblée (Western blot)**
- Possibilité d'utilisation comme **fractionnement de l'échantillon** (méthode GeLC)
- Possibilité de l'utiliser en condition native (native-PAGE) nécessite l'utilisation de **tampon adapté non dénaturant**



Gel bidimensionnel

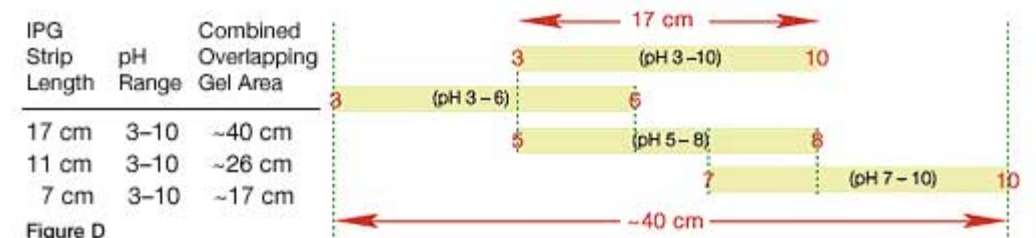
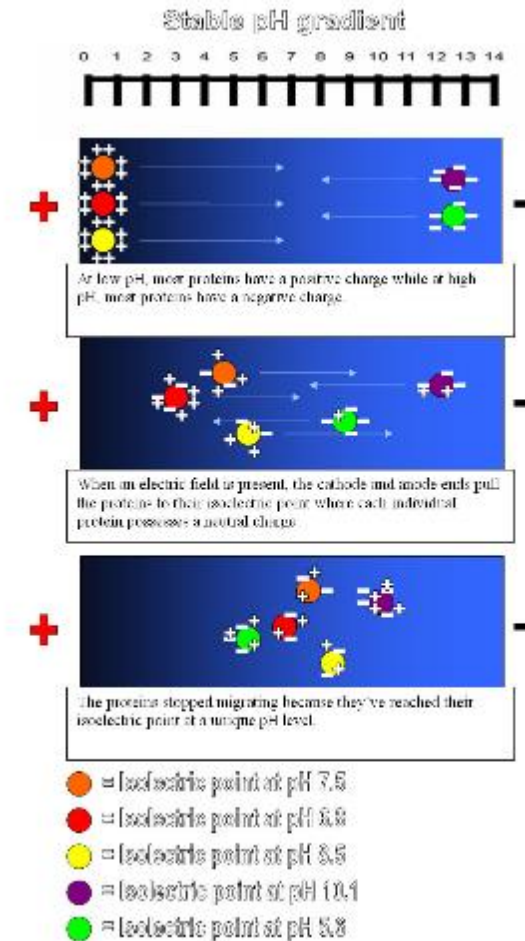
- **Séparation dans deux dimensions** → permet une meilleure séparation des protéines
- Nécessite d'utiliser des **détergents compatibles pour la première dimension**
- Séparation suivant le **point isoélectrique** des protéines et de la masse moléculaire
- **Dépend de la composition en acide aminée**
- Conservation des PTMs



1^{er} dimension: IEF

1^{er} dimension = Iso électrofocalisation (IEF – IsoElectric Focusing)

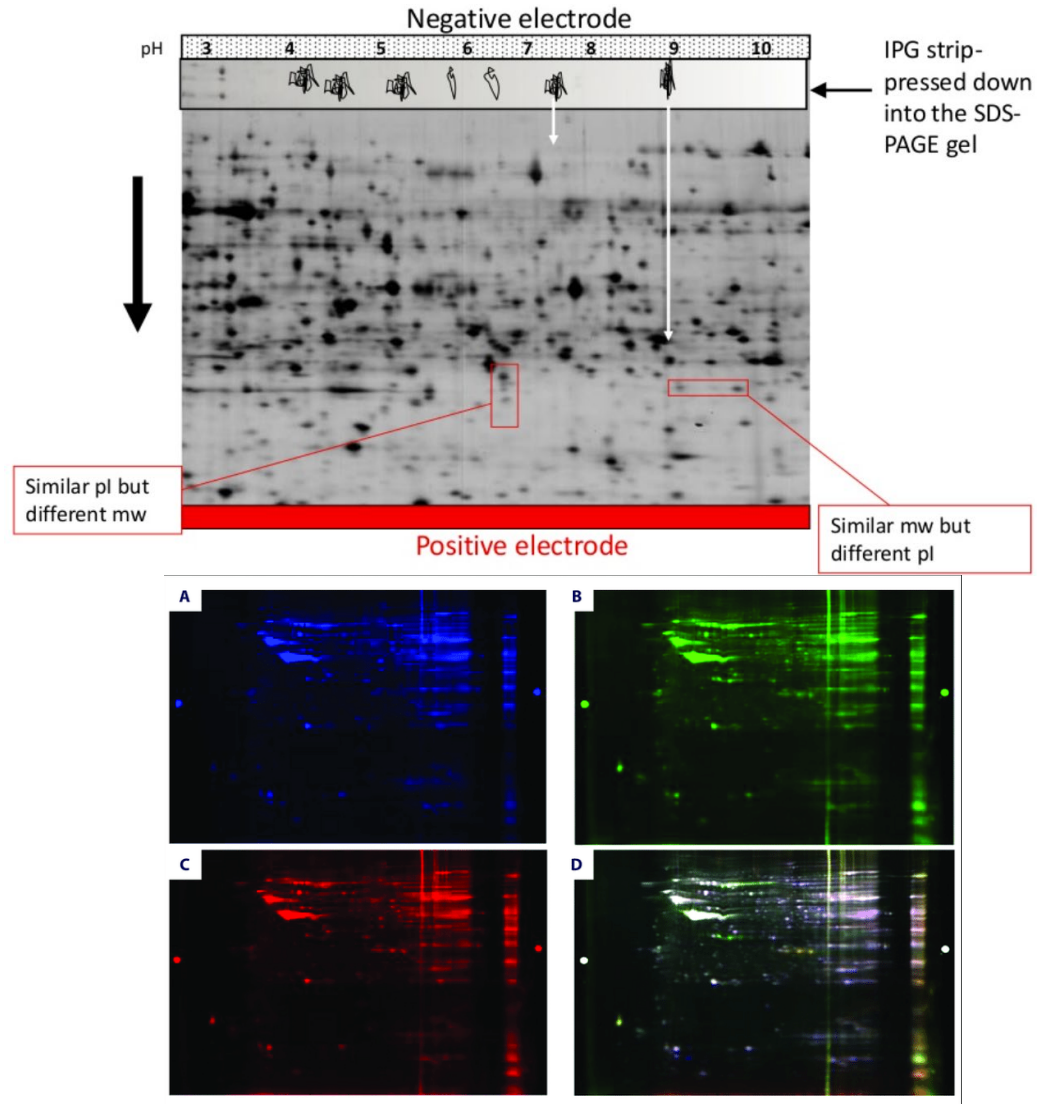
- Séparation des molécules amphotères
- **Dépend de leur charge** (pK_a des sites accepteurs de protons)
- Inclut charges de la partie N- et C-term et composition en arginine, lysine, histidine, acide aspartique et acide glutamique
- **Point isoélectrique** (pI ou pKi) ou potentiel isoélectrique (pHi) = **pH pour lequel la charge électrique nette de la molécule est nulle**
 - si $pH < pI$, la charge globale est **positive**, car la molécule a tendance à conserver ses protons ou à en capter du milieu.
 - si $pH > pI$, la charge globale est **négative**, car la molécule a tendance à céder ses protons au milieu.
- Utilisation de bandelettes (strip) de **gradient de pH immobilisé** ou formation dans un gel contenant des ampholytes
- Sous l'action d'un champ électrique, les protéines s'immobilisent à leur **pI car charge globalement neutre**



2^{ème} dimension: SDS-PAGE

2^{ème} dimension orthogonale: SDS-PAGE

- Nécessite une étape d'équilibration :
- utilisation SDS et DTT → **protéines dénaturées et globalement chargées négativement**
- Bandelettes issues de la première dimension déposée à 90° sur gel de séparation.
- Fonctionnement similaire au gel 1D
- Visualisation des protéines dans le gel nécessite une coloration
- **Bleu de Coomassie** (100ng à 10µg de protéines, compatible MS)
- **Coloration à l'argent** (1ng à 1µg de protéines, compatibilité MS problématique)
- **Marquage fluorescent** (Sypro Ruby, 1ng à 10ng, compatible MS)
- Possibilité d'utiliser des marqueurs avec longueur d'onde différentes permettant de mélanger les échantillons avant la séparation
- Obtention d'une carte 2D où chaque spot **est défini par un pI et une MW**



Points importants pour la préparation

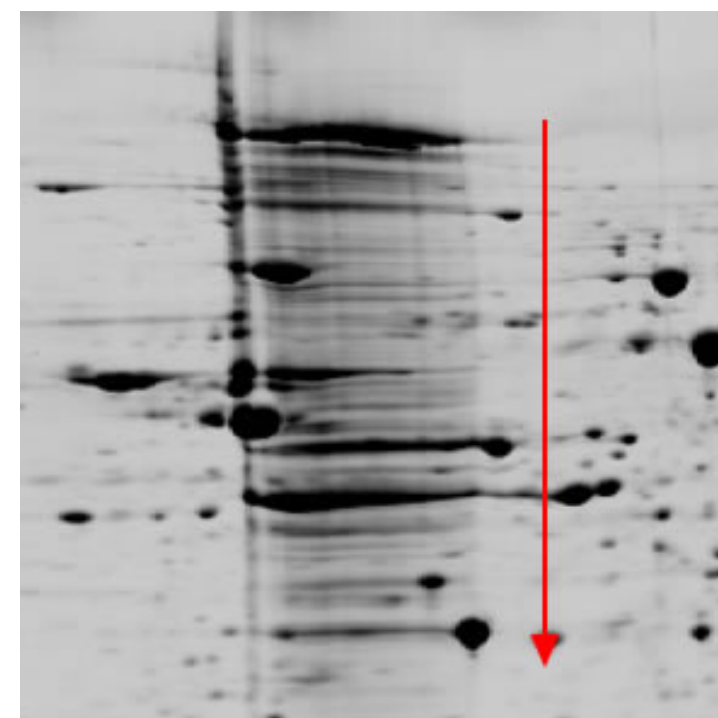
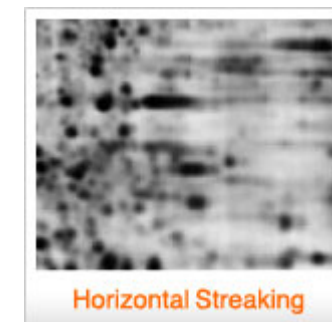
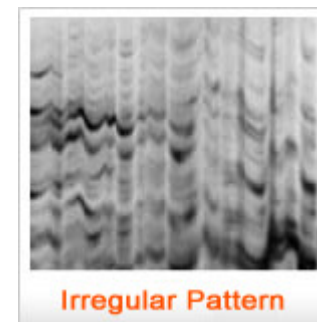
IEF:

- Utilisation urée pour solubiliser et dénaturer les protéines.
- **Thiourée** utilisé en complément pour solubilisation des **protéines hydrophobes** (7M urée, 2M thiourée)
- **Non compatibles avec détergents ioniques**, uniquement **non-ioniques ou zwitterioniques** (CHAPS, triton X-100, NP-40...)
- Nécessite très haut voltage et période longue (10 000V pendant **10h**)

SDS-PAGE:

- Faire attention à la mise en place de la bandelette et de son orientation
- Nécessite l'utilisation d'un tampon **SDS contenant du DTT**.
- Étape d'alkylation avec IAA
- Nécessite une **coloration** des protéines pour visualisation et un système d'acquisition d'image
- Besoin de plusieurs répliques pour observer les différences

/!\ : Plusieurs protéines sous un même spot !



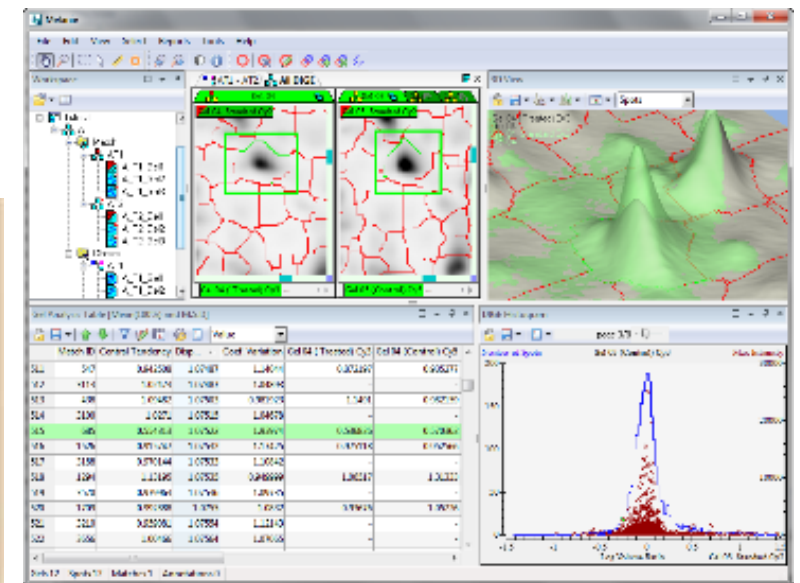
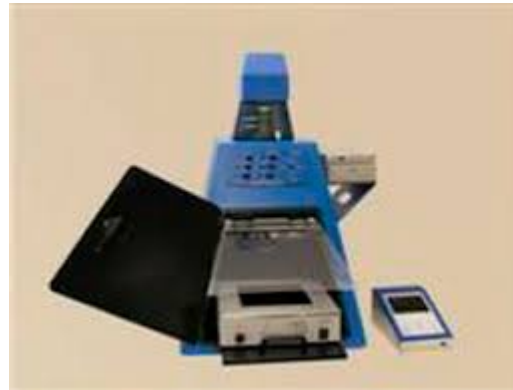
Analyse d'images

Plusieurs centaines de spots sur un gel → nécessite une acquisition d'images et logiciel d'analyse

Système d'acquisition dépend de la coloration:

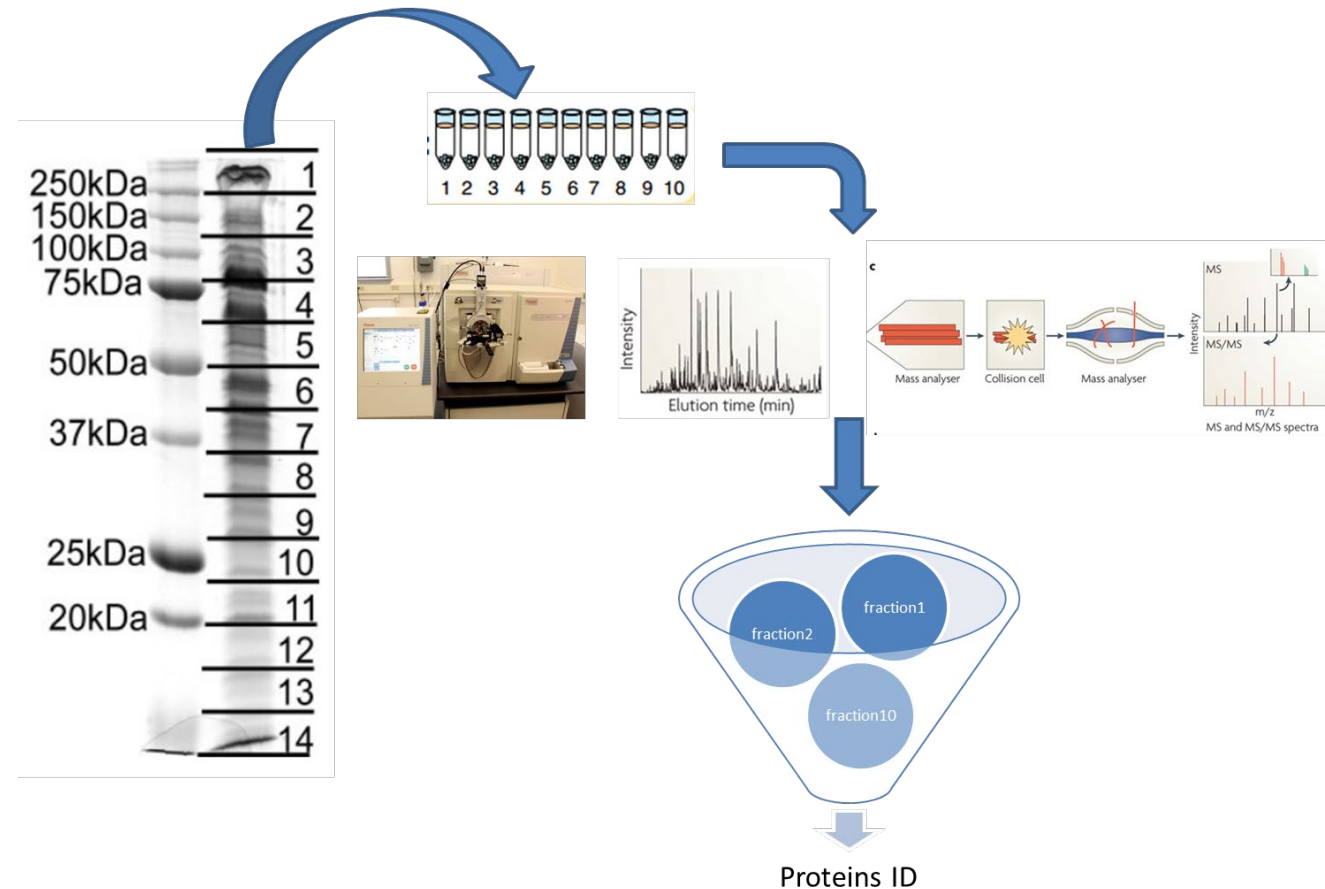
- *Scanner à plat: **densité** de couleur ou noir et blanc*
- ***Camera CCD:** possibilité d'utiliser lumière visible, fluorescence...*
- ***Scanner laser:** meilleure résolution spatiale, compatible fluorescence à plusieurs longueurs d'ondes.*

Alignement des gels pour comparaison



Fractionnement protéines gel 1D: GeLC

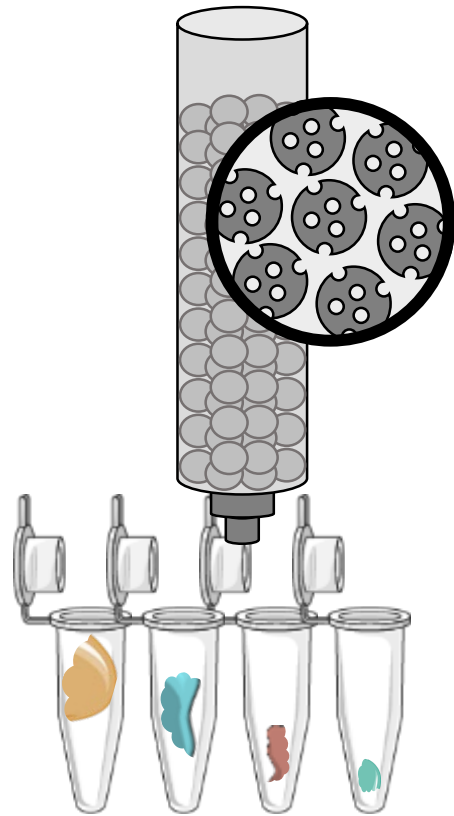
- Utilisation séparation des protéines d'un mélange complexe en **SDS-PAGE**
- Découpe du gel en morceaux de taille équivalente
- **Digestion en gel**
- Chaque morceau est analysé en MS et **identification des protéines de l'ensemble**



Autres méthodes séparatives

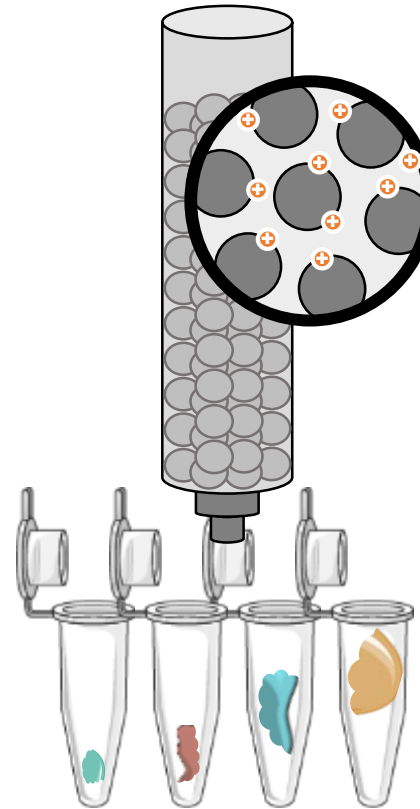
D'autres méthodes séparatives : Chromatographie liquide préparative (phase inverse, échange d'ions, affinité...)

SEC : Size Exclusion Chromatography



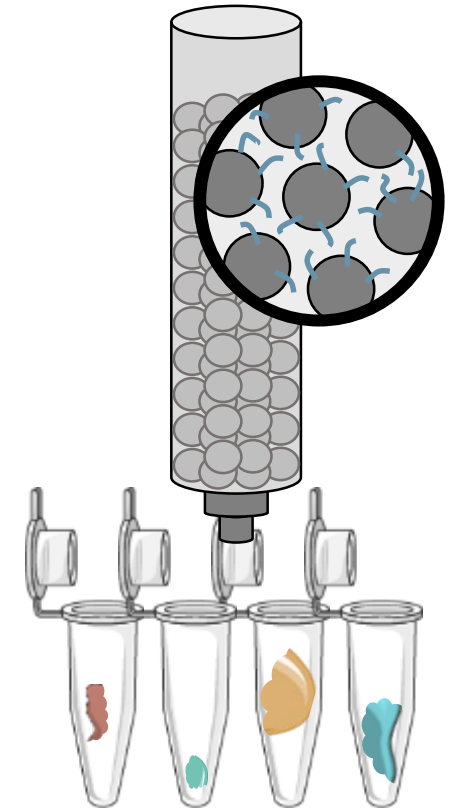
La taille diminue

SCX : Strong Cation Exchange



Les charges + augmentent

RP: Reverse Phase (C18)



L'hydrophobicité augmente