



Quantification



Why?

- Tipo de célula
- Resposta a condições de *stress*
- Marcadores ou alvos terapêuticos



Quantificação de proteínas

- Imunoensaios

- Western blot

- Actividade enzimática

Proteómica quantitativa - Gel

- Pré-marcação
 - Isotiocianato (-1970)
- Coomassie, Prata
 - 10 ng
- Marcação negativa
 - CuCl_2 , ZnCl_2
- SPYRO (Molecular Probes Inc.)
 - Não covalente, sensível, gama linear



Análise de imagem

- Preparação da amostra
- Composição do gel
- Condições de corrida
- Reprodutibilidade da 1^a dimensão
 - IEF

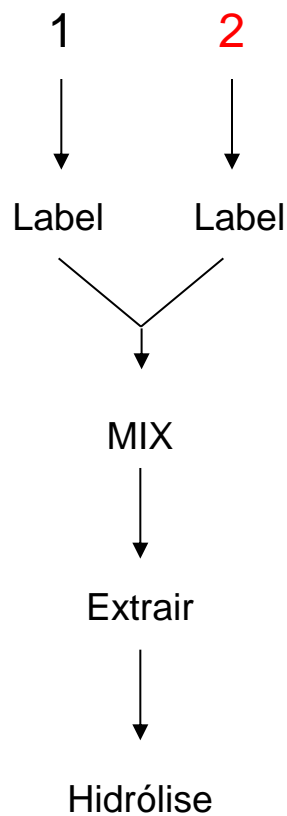
MS - Quantificação

- Marcação *in vivo*
- Marcação *in vitro*
 - Pós hidrólise
 - Anterior à hidrólise

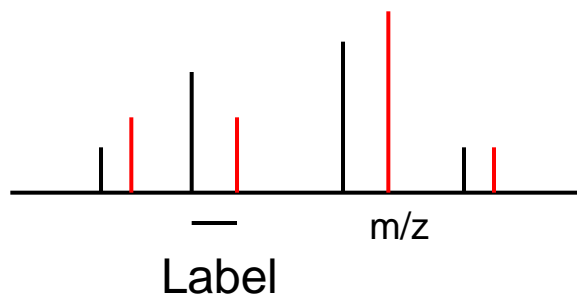
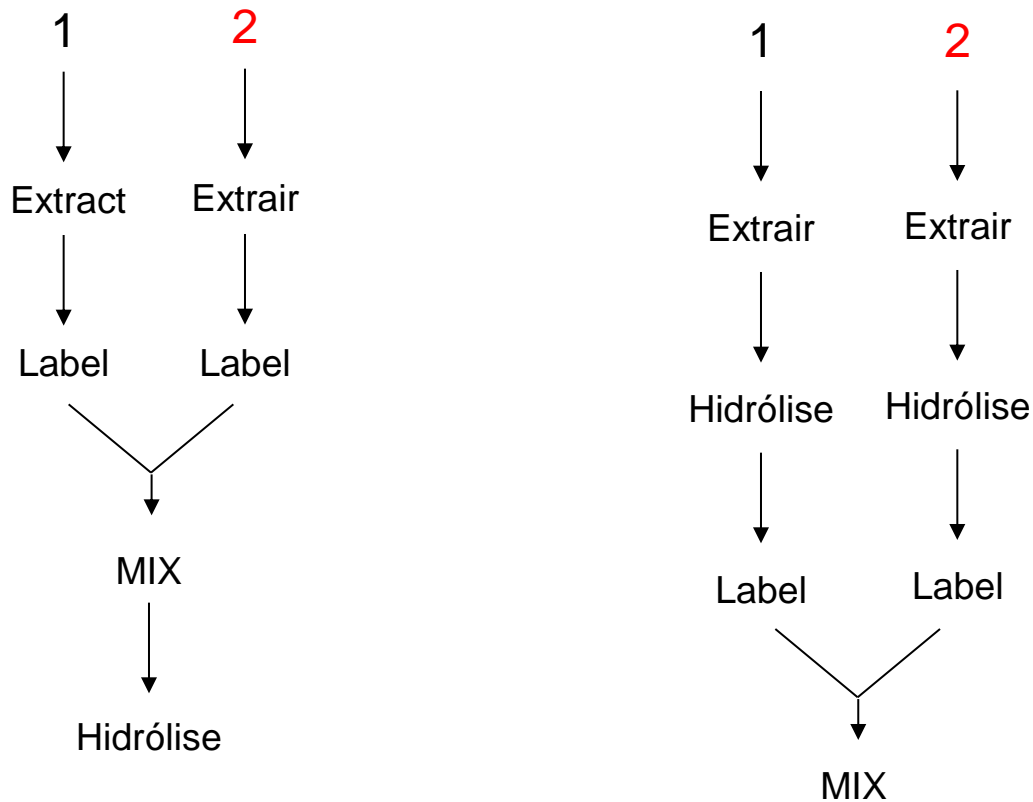
Comparação de amostras marcadas

^1H	^2H
^{12}C	^{13}C
^{14}N	^{15}N
^{16}O	^{18}O

In vivo



In vitro

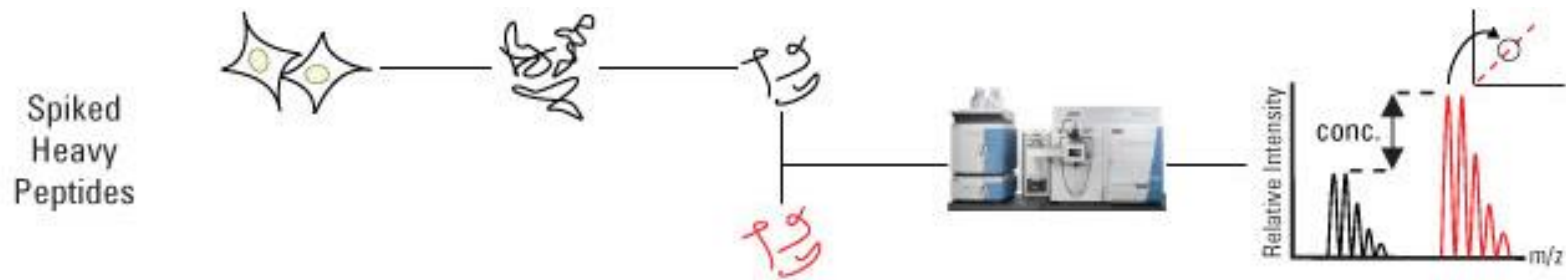




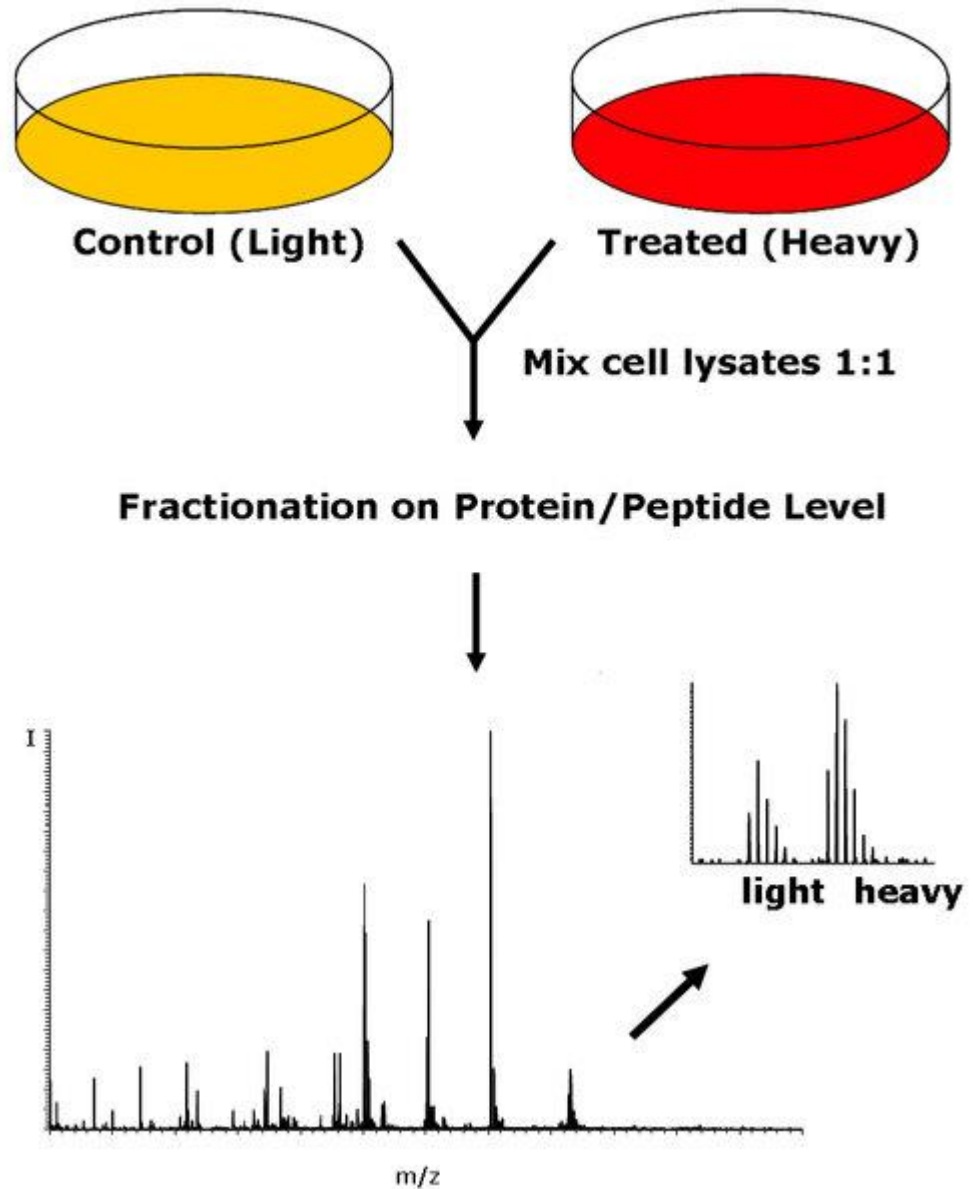
Métodos de marcação

- Spiking
- **SILAC** (Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture)

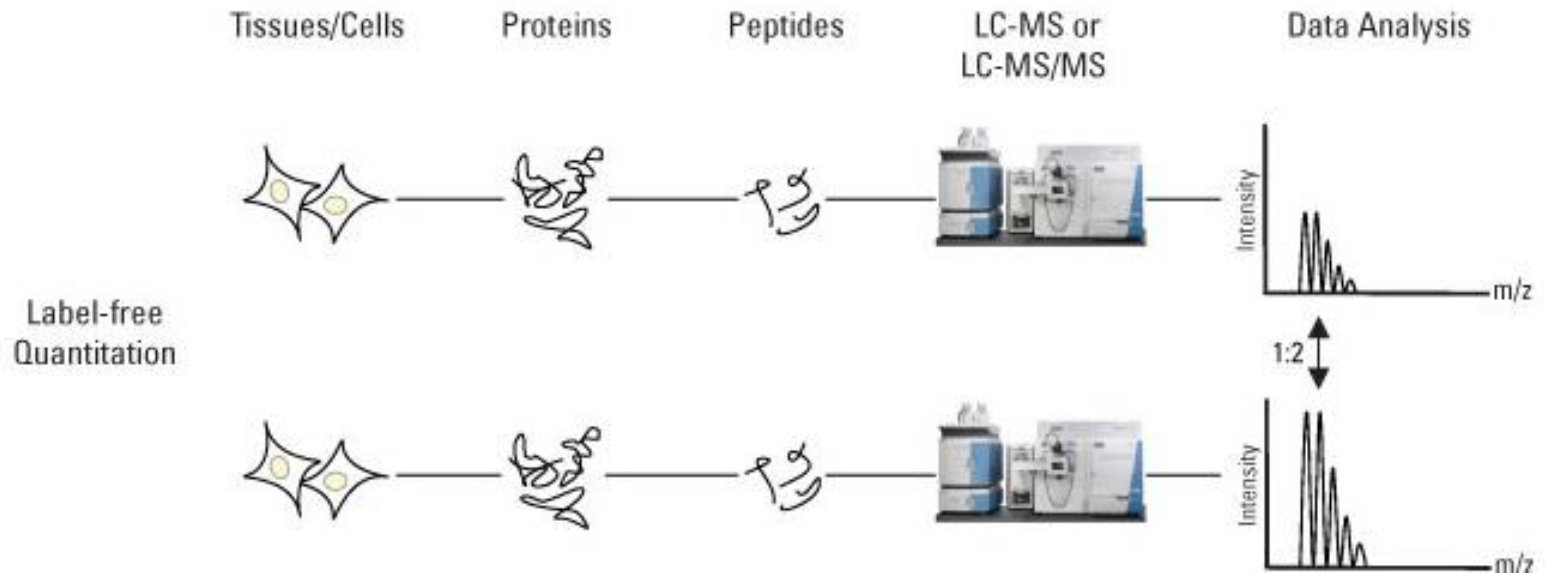
Spiking



SILAC



Label Free

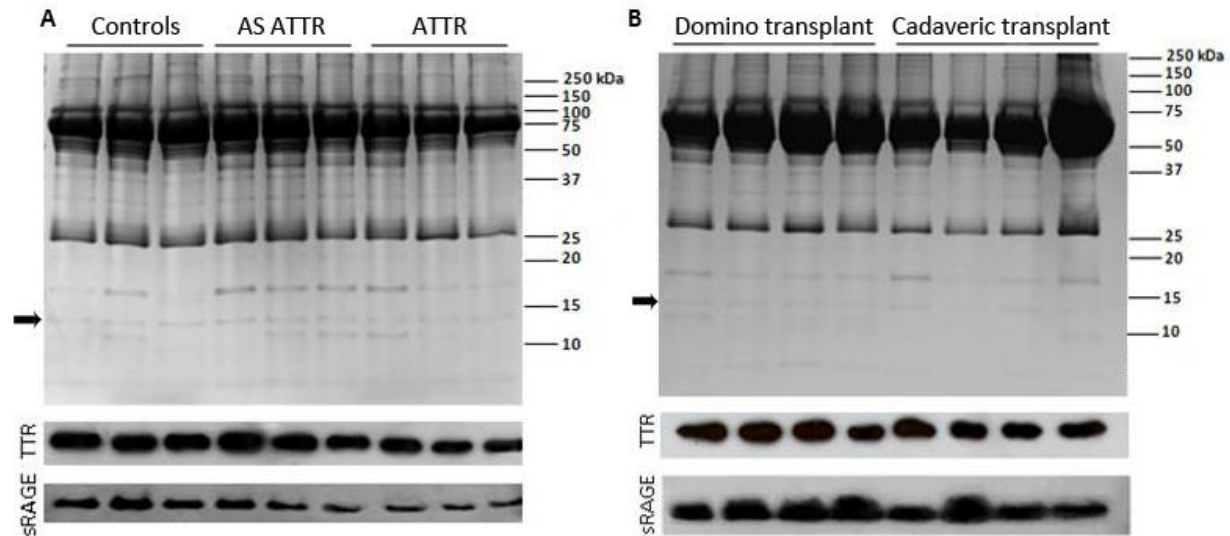




ATTR

- Humans
 - can't label
- More than 100 mutations
 - Too many for synthetic peptides

Gels simply won't do...

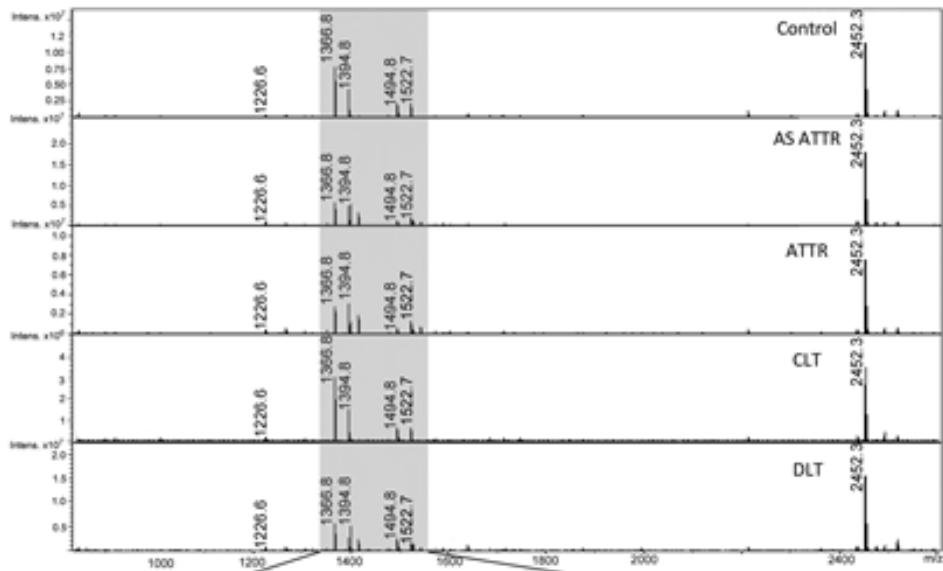


Label free with a twist

10 20 30 40 50 60
GPTGTGESKC PLMVKVLDAV RGSPAINVAV HVFRKAADDT WEPFASGKTS ESGELHGLTT
70 80 90 100 110 120
EEEFVEGIYK VEIDTKSYWK ALGISPFHEH AEVVF TANDS GPRRYTIAAL LSPYSYSTTA
VVTNPKE



V30M



C

