

KVANTIFIKACE PROTEINOVÝCH BIOMARKERŮ POMOCÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE PRACUJÍCÍ V REŽIMU MONITOROVÁNÍ VYBRANÝCH REAKCÍ

JAKUB FAKTOR^a, IVA STRUHÁROVÁ^{a,b},
ALENA FUČÍKOVÁ^c, MARTIN HUBÁLEK^c,
BOŘIVOJ VOJTĚŠEK^b a PAVEL BOUCHAL^{a,b}

^a Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, ^b Regionální centrum aplikované a molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno, ^c Ústav molekulární patologie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, Třebešská 1575, 500 03 Hradec Králové
bouchal@chemi.muni.cz

Došlo 25.11.10, přijato 17.3.11.

Klíčová slova: kvantifikace proteinů, hmotnostní spektrometrie, proteomika

Obsah

1. Úvod
2. Princip metody
 - 2.1. Příprava vzorku
 - 2.2. Kapalinová chromatografie a ionizace nanosprejem
 - 2.3. Princip kvantifikace pomocí přechodů v trojitém kvadrupólu
 - 2.4. Možnosti hybridního analyzátoru typu trojitý kvadrupól-lineární iontová past
3. Vybrané aplikace při kvantifikaci proteinů
4. Závěr

1. Úvod

Kvantitativní hmotnostní spektrometrie pracující v režimu monitorování vybraných reakcí („selected reaction monitoring“, SRM) je již řadu let rutinně využívána pro stanovení nízkomolekulárních látek v oblasti farmacie^{1,2}, environmentální analýzy^{3–5} a při stanovení nízkomolekulárních analytů v klinických vzorcích. V poslední době však SRM získává nové velmi významné postavení při kvantitativní analýze proteinů, a to na základě kvantifikace peptidů, tedy produktů enzymového štěpení proteinů. Vlastní měření probíhá ve hmotnostních spektrometrech na bázi trojitého kvadrupólu (QqQ). Hlavní výhodou metodiky je možnost cílené kvantifikace řady zvolených proteinů v jediné analýze s vysokou citlivostí a selektivitou. Její nejvýznamnější aplikace nyní spočívají ve stanovení vybraných proteinů v souborech biologických vzorků (tkáňové lyzáty, krevní plazma, další biologické tekutiny),

kde se metodika mimo jiné využívá pro kvantifikaci zvolených proteinů na velkých souborech pacientů. Úspěšně validované proteiny pak mohou sloužit jako biomarkery různých onemocnění. Metodika je základem nového směru označovaného jako cílená proteomika („targeted proteomics“). Někdy je SRM analýza ne zcela správně označována také jako „multiple reaction monitoring“ (MRM)⁶. Toto označení není podporováno Mezinárodní unií pro čistou a užitou chemii (IUPAC).

Cílem tohoto článku je vysvětlit principy metodiky, popsat nejdůležitější současné aplikace a nastínit další možné směry jejího využití.

2. Princip metody

2.1. Příprava vzorku

Důležitým krokem celé analýzy je získat proteiny v roztoku, který je vhodný pro všechny následné kroky. Pufry, které se k tomuto účelu používají, nesmí obsahovat složky interferující v dalších fázích přípravy vzorku (inhibitory trypsinu, látky reagující se značícími činidly) a při samotné analýze (např. vysoké koncentrace dodecylsulfátu sodného). V některých případech lze koncentraci interferujících látek snížit precipitací nebo jinými postupy. Obecně však platí, že nejlepší je se těmito látkám vyvarovat. Proteiny ve vzorku je vhodné zbavit S-S můstků a volné –SH skupiny derivatizovat (provádí se redukce a alkylace). Proteiny jsou následně podrobeny enzymatickému štěpení proteasou za vzniku peptidů. K tomuto účelu se nejčastěji používá trypsin štěpící na C-straně lysinu a argininu, pokud tyto na C-straně nesousedí s prolinem.

V případě kvantifikace proteinů přítomných ve velmi nízké koncentraci ve vzorcích s velkým rozsahem koncentrací různých proteinů je možné použít další přístupy usnadňující jejich detekci. Prvním přístupem je imunochemická redukce komplexity vzorku odstraněním jednoho nebo více vysoce koncentrovaných proteinů (např. albuminu z krevního séra). Principiálně opačným přístupem je tzv. imunoobohacení (immunoenrichment) vzorku pomocí protilátky proti proteinu resp. peptidu našeho zájmu (např. metoda označovaná zkratkou SISCAPA⁷). Třetím přístupem redukce komplexity vzorku je jeho frakcionace vhodnou separační metodou. Součástí přípravy vzorků jsou i kroky vedoucí k relativní nebo absolutní kvantifikaci. To znamená značení peptidů nebo přidavek isotopově označených peptidů.

2.2. Kapalinová chromatografie a ionizace nanosprejem

Před hmotnostní analyzátor, který používá jako ionizační proces elektrosprej, se obvykle předřazuje separace

peptidů kapalinovou chromatografií. Nejčastěji se používají kolony na principu reverzně fázové chromatografie s vnitřním průměrem 50–200 μm umožňující účinnou separaci v průtocích kolem 200 nl min^{-1} . Přes sprejovací kapiláru, která je umístěna v elektrickém poli (vkládá se napětí v rozsahu 2000–3000 V), je separovaný vzorek ionizován a transportován přímo do hmotnostního spektrometru. Toto uspořádání se nazývá nanosprej. Ve srovnání s ionizací klasickým elektrosprejem je tento proces citlivější, je ovšem o něco méně robustní. Separací účinnost lze ovlivnit například nastavením délky chromatografické separace. Existuje ovšem optimum délky separace při zachování citlivosti analýzy.

2.3. Princip kvantifikace pomocí přechodů v trojitém kvadrupólu

SRM analýzy se obecně provádí v hmotnostním spektrometru typu trojitý kvadrupól. Jedná se přitom o jednu z nejcitlivějších a nejselektivnějších metod ke kvantitativnímu stanovení zvolených analytů. Vysoké selektivity je dosaženo monitorováním jak prekurzorového iontu (v našem případě peptidu), tak zároveň produktových iontů (peptidových fragmentů) (obr. 1). Každý kvadrupól je složen ze 4 tyčí s kruhovým nebo hyperbolickým průřezem, které jsou dokonale paralelní a rovné. Jejich úkolem je především separace (filtrování) iontů dle poměru hmotnosti a náboje (m/z) na základě stability jejich trajektorií v oscilujících elektrických polích, která jsou na tyče vkládána. Při SRM analýze slouží kvadrupóly Q1 a Q3 jako hmotnostní filtry, které propouští pouze ionty o vybraném poměru m/z . Q2 představuje kolizní celu napuštěnou inertním plynem (N_2 , Ar, He), v níž dochází ke kolizím indukované disociaci (fragmentaci) prekurzorového iontu vybraného v Q1 za vzniku produktových iontů. Ty jsou v SRM módu dále filtrovány v Q3 a následně dopadají na detektor.

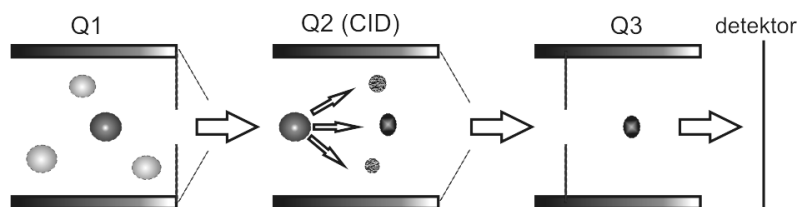
Pro SRM kvantifikaci je klíčový pojem „iontový přechod“ (transition), který je definován jako pár hodnoty m/z prekurzorového iontu vybraného v Q1 a hodnoty m/z jeho produktového iontu vybraného v Q3. Právě vhodnými kombinacemi prekurzorových a produktových iontů se dosahuje vysoké selektivity metody. Pro kvantifikaci jednoho proteinu se využívají nejméně 2 prekurzorové peptidy, každý v jednom či více nábojových stavech. Pro spo-

lehlivou SRM kvantifikaci je následně třeba detegovat alespoň 2 produktové ionty každého peptidu. Z toho vyplývá, že každá kvantifikace proteinu je spojena s minimálně 4 přechody. Obr. 2 znázorňuje modelovou kvantifikaci kvasinkové beta-galaktosidasy v SRM na základě sedmi peptidů, přičemž každý byl monitorován dvěma přechody. Při kvantifikaci jednotek až desítek proteinů ve vzorku je tedy nutné měřit desítky až stovky přechodů. V současnosti jsou dostupné *in silico* algoritmy optimalizující proces návrhu přechodů, které jsou založeny na kombinaci teoretických pravidel a empirických zkušeností. Pokud byl už protein kvantifikován v SRM a nachází se ve veřejně přístupné databázi (např. MRAtlas⁸, Peptide Atlas⁹), je návrh přechodů dále usnadněn.

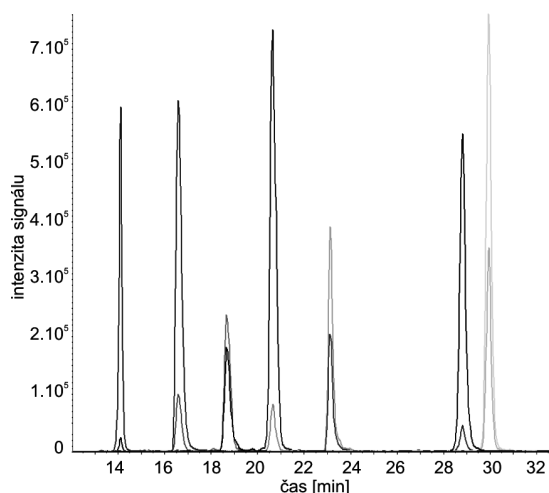
Počet přechodů, které mohou být s vysokou přesností a citlivostí kvantifikovány v průběhu jedné LC-MS analýzy, je omezen a je závislý především na době cyklu (tzv. „duty cycle“) neboli době, za kterou přístroj jedenkrát kvantifikuje všechny požadované přechody. Doba, po kterou se měří jednotlivý ion, se nazývá čas prodlevy („dwell time“). Například analýza 10 peptidů, každý s 5 přechody a časem prodlevy 20 ms trvá přibližně 1 s ($10 \times 5 \times 20$ ms), každou sekundu je tedy zaznamenána intenzita každého z přechodů. K dosažení vysoké citlivosti musí být čas prodlevy dostatečně dlouhý, aby byl zaznamenán dostatečně kvalitní signál. Se zvyšujícím se počtem měřených přechodů se však prodlužuje doba cyklu. Příliš dlouhá doba cyklu pak může vést k nedostatečnému počtu měření v průběhu eluce daného peptidu, a tím ke zhoršení přesnosti analýzy. Je tedy třeba nalézt kompromis mezi časem prodlevy a celkovým počtem přechodů měřených v jednom experimentu tak, aby byl každý přechod měřen alespoň osmkrát v průběhu jeho eluce z kolony.

Průběh analýzy je dále možné optimalizovat zařazením měření přechodů pouze v době experimentálně zjištěné eluce příslušných peptidů (tzv. „scheduled SRM“). Další možností je použití tzv. inteligentního SRM (iSRM) (cit.¹⁰). Tento postup využívá sběru dat závislého na detegovaném signálu. V okamžiku, kde je zachycen signál vybraného přechodu, je možné identitu peptidu potvrdit tím, že se v tomto okamžiku spustí monitorování dalších specifických přechodů pro tento peptid.

Kvantifikace proteinu se vypočte na základě kvantifikace dvou a více peptidů jednoznačně příslušných k danému proteinu.



Obr. 1. Schéma hmotnostního spektrometru typu trojitý kvadrupól (QqQ) pracujícího v režimu monitorování vybraných reakcí (SRM). První kvadrupól (Q1) slouží pro výběr prekurzorového peptidu, v kolizní cele (Q2) dochází k fragmentaci pomocí kolizí indukované disociace a třetí kvadrupól (Q3) pracuje jako filtr umožňující výběr peptidových fragmentů před dopadem na detektor



Obr. 2. SRM záznam modelového proteinu (β -galaktosidasa) monitorovaného na sedm peptidů, každý peptid sledován dvěma přechody. Peptidy jsou separované v čase na koloně naplněné reverzní fází a následně zaznamenány na hybridním přístroji typu trojitý kvadrupól-lineární iontová past (QqQLIT) v uspořádání SRM

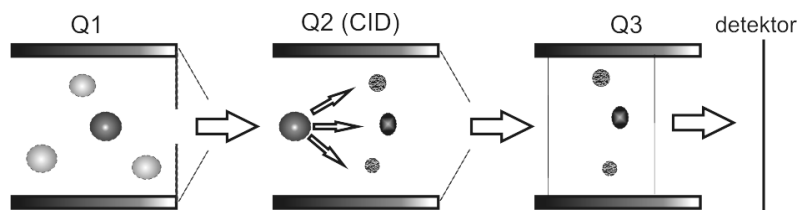
Metoda SRM umožňuje kvantifikovat jak relativně, tak absolutně. Při relativní kvantifikaci zjišťujeme relativní poměr hladin proteinů ve dvou a více skupinách vzorků. Příkladem může být kvantifikace proteinů ve skupinách zdravých a nemocných pacientů, stanovení hladin proteinů v odpovědi na změnu vnějších podmínek, stres, aktivaci signální dráhy apod. Při SRM analýze se pro tento účel často používá značení značkami vážícími se na aminoskupiny peptidů (viz příprava vzorku). Jedná se např. o značky mTRAQ™, které umožňují měření dvou nebo tří vzorků v jedné analýze, přičemž jeden ze vzorků je vždy tzv. globální interní standard, vzniklý smícháním alikvotů všech vzorků v experimentu. Značky mají stejný sumární vzorec, při syntéze se však používají různé stabilní izotopy uhlíku, dusíku a kyslíku tak, aby rozdíl molekulových hmotností značek byl právě 4 Da ($\Delta 0$, $\Delta 4$, $\Delta 8$). Díky těmto rozdílům mohou být pro peptidy označené různými značkami navrženy SRM přechody sestávající z různých pre-

kurzorových, ale stejných produktových iontů, čímž je umožněno nezávislé, avšak plně srovnatelné měření různých označených peptidů. Relativní kvantifikace je pak založena na srovnání intenzit signálů produktových iontů vzniklých fragmentací různě značených peptidů.

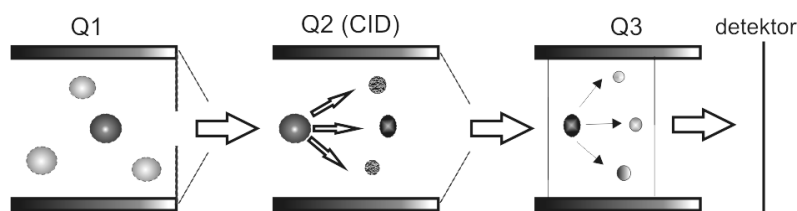
Absolutní kvantifikace se provádí tehdy, pokud je třeba stanovit koncentraci resp. látkové množství peptidu (proteinu) ve vzorku. V tom případě se používají izotopově značené syntetické analogy stanovovaných peptidů o známé koncentraci, které se přidávají ke vzorkům jako interní standard. Značené a neznačené peptidy mají identické vlastnosti při LC separaci, rozdíl v hmotnostech peptidů se podobně jako u relativní kvantifikace využije při výběru různých forem peptidů v Q1 pro následnou fragmentaci. Porovnáním intenzit odpovídajících produktových iontů a přepočtem s použitím koncentrace interního standardu se určí přesná koncentrace daného peptidu. Tento přístup je označován jako AQUA (cit.¹¹) a kromě kvantifikace absolutní umožňuje pochopitelně i kvantifikaci relativní.

2.4. Možnosti hybridního analyzátoru typu trojitý kvadrupól-lineární iontová past

Zkratka QqQLIT označuje hybridní hmotnostní spektrometr na bázi trojitého kvadrupólu, kdy třetí kvadrupól je konfigurován tak, že může pracovat v režimu lineární iontové pasti. Hlavními přínosy QqQLIT pro SRM jsou oproti trojitému kvadrupólu tyto: (i) možnost získat plná fragmentační (MS/MS) spektra peptidů a (ii) možnost tzv. MRM³ (viz níže). V případě prvně jmenovaného uspořádání, které vede k získání plného MS/MS spektra, jsou všechny produktové ionty vybraného prekurzoru zachytávány v Q3, přičemž je využito akumulární schopnosti lineární iontové pasti (obr. 3). Tento proces vede ke zvýšení citlivosti oproti měření plného MS/MS spektra v kvadrupólovém nastavení, protože na rozdíl od situace, kdy třetí kvadrupól funguje jako hmotnostní filtr, nedochází k odklonu iontů. Tato možnost je výhodná při návrzích přechodů, kdy je možné skenovat na přítomnost všech iontů vzniklých fragmentací a následně vybrat nejvhodnější kandidátní ionty pro zařazení do přechodů. Druhou výhodou QqQLIT je možnost provádět MRM³ neboli „MRM cubed“. Tato technika je založená na dvou postupných



Obr. 3. Schéma hmotnostního spektrometru typu trojitý kvadrupól-lineární iontová past (QqQLIT) pracujícího v režimu plného MS/MS skenu. První kvadrupól (Q1) slouží pro výběr prekurzorového peptidu, v kolizní cele (Q2) dochází k fragmentaci pomocí kolizí indukované disociace. Všechny vzniklé fragmenty jsou zachyceny v Q3 nastaveném jako lineární iontová past, odkud jsou postupně směřovány na detektor



Obr. 4. Schéma hmotnostního spektrometru typu trojitý kvadrupól-lineární iontová past (QqQLIT) pracujícího v režimu MRM³. První kvadrupól (Q1) slouží pro výběr prekurzorového peptidu, v kolizní cele (Q2) dochází k fragmentaci pomocí kolizí indukované disociace. Ionty fragmentů jsou pak zachyceny v Q3 nastaveném jako lineární iontová past, kde následuje ionizace zvoleného iontu a jeho aktivace za účelem druhé fragmentace. Akumulované produktové ionty druhé generace jsou poté během skenu postupně propouštěny na detektor

fragmentacích, kdy po fragmentaci v Q2 dochází k další fragmentaci v Q3 lineární iontové pasti (obr. 4). Ukázalo se přitom, že přidání třetího stupně MS významně zvyšuje selektivitu a eliminuje vysoké pozadí. Výsledkem je nižší dolní limit kvantifikace. Zvýšené selektivity lze však dosáhnout i zvýšením rozlišení prvního kvadrupólu. V případě správného vyladění dojde k efektivnější separaci pouze žádaného prekurzorového iontu od iontů o podobném m/z bez redukce citlivosti. Této možnosti mohou využívat přístroje, které umožňují nastavení zvýšeného rozlišení, a to nezávisle na tom, zda se jedná o přístroje hybridního typu nebo standardní trojitý kvadrupól.

3. Vybrané aplikace při kvantifikaci proteinů

Jak už bylo uvedeno výše, výhoda metody SRM spočívá ve vysoké selektivitě a schopnosti detegovat proteiny obsažené v nízkých koncentracích, které mohou sloužit jako biomarkery různých biologických stavů. Byly již publikovány práce zabývající se kvantifikací řady proteinů krevní plazmy^{12–16}, biomarkerů pro artritidu¹⁷, akutní poškození jater¹⁸ a kardiovaskulární onemocnění¹³. Metoda byla využita i při kvantifikaci nádorových biomarkerů, jako např. prostata-specifického antigenu (PSA)¹⁹, napsinu-A a proteinu AGR-2 (cit.²⁰). Při kvantifikaci PSA s použitím imunodeplece albuminu a jednoduché frakcionace extrakcí pevnou fází se podařilo za využití metody MRM³ kvantifikovat PSA v reálných vzorcích jak zdravých pacientů, tak s karcinomem prostaty. Naměřený rozsah koncentrací PSA v klinických vzorcích se pohyboval v rozmezí 4–30 ng ml⁻¹ (cit.¹⁹).

Klíčová práce Picotti a spol.²¹ provedená na buněčných lyzátech kvasinek (*Sacharomyces cerevisiae*) popisuje kvantifikaci proteinů přítomných v širokém koncentračním rozsahu pomocí SRM. Bylo vybráno 100 proteinů a pro každý protein bylo zvoleno 5 proteotypických peptidů. Výsledky ukázaly, že v jediném SRM experimentu je možno detegovat proteiny v širokém koncentračním rozsahu od 45 až po milióny kopií na buňku. Experiment dokázal, že metoda SRM umožňuje zaznamenat i takové proteiny, které jsou pod limitem detekce imunochemických metod („western blot“, „enzyme linked immunosorbent

assay“ – ELISA). Podařilo se nalézt i dříve nedetegované proteiny²¹. Součástí práce je i kvantitativní analýza proteinů vybraných biochemických cest v průběhu hladovění, díky níž lze sledovat koncentrační změny jednotlivých sledovaných proteinů v reakci na změny koncentrace živin. Výhodou je možnost sledovat změny koncentrace všech vybraných proteinů najednou a to velmi přesně.

Metodu SRM lze také využít ke sledování posttranslačních modifikací, což poskytuje další úhel pohledu na biochemické děje v komplexních biologických systémech. Za využití SRM byla monitorována fosforylace transkripčního faktoru MEF2A, který je zodpovědný za vývoj buněk kosterních svalů a srdečního svalu^{22,23}. Dále byla studována fosforylace dvou míst ERK1 (cit.²⁴) proteinu a fosforylace proteinu FAK (cit.²⁵). Zatímco signální dráha proteinu ERK reguluje buněčný cyklus, proliferaci a diferenciaci, fosforylace proteinu FAK ovlivňuje adhezi buněk a vývoj cévního epitelu. Metody SRM bylo využito i ke studiu dalších forem posttranslačních modifikací – acetylace^{22,26} i glykosylace²⁷.

4. Závěr

Příklady uvedené v tomto článku poukazují na citlivost a selektivitu metody SRM, která umožňuje kvantifikaci diagnosticky významných proteinů z biologických vzorků na peptidové úrovni. Vyvinout SRM experiment pro kvantifikaci několika proteinů je v porovnání s metodami založenými na použití protilátek (ELISA, „western blot“) méně finančně i časově náročné, přičemž kvantifikace metodou SRM je přesnější a selektivnější. Toto jsou pádné argumenty pro další rozvoj a rozšíření metody. Mezi její největší limitace pak patří rozlišení a rozsah nyní používaných hmotnostních spektrometrů, který se běžně pohybuje v rozsahu 1000–3000 m/z . Z hlediska citlivosti je dosahováno výborných výsledků (jednotky amol^{12,28}) u purifikovaných proteinů, u komplexních směsí se však citlivost snižuje. Pomoci mohou zmiňované kroky přípravy vzorku jako imunodeplece, imunoafinitní obohacení a frakcionace. Zlepšení rozlišení a citlivosti jsou tak nyní hlavními úkoly pro konstruktéry hmotnostních spektrometrů pro SRM.

V současnosti má SRM význam zejména v biomedicinském výzkumu, kde umožňuje přesnou kvantifikaci zvolených proteinů ve velkých souborech vzorků. Ve střednědobém časovém horizontu má pak proteinové SRM potenciál proniknout na pole klinické diagnostiky v oblasti rutinní kvantifikace biomarkerů.

Tato práce byla vypracována v rámci řešení projektu Grantové agentury České republiky č. P304/10/0868, projektu Ministerstva zdravotnictví ČR č. MZ0MOU2005, projektu Ministerstva školství ČR MSM0021622413 a s podporou Evropského fondu pro regionální rozvoj a státního rozpočtu České republiky (RECAMO; CZ 1.05/2.1.00/03.0101).

LITERATURA

- Kovarik P., Grivet C., Bourgogne E., Hopfgartner G.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21, 911 (2007).
- Singhal P., Gaur A., Gautam A., Varshney B., Paliwal J., Batra, V.: *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 859, 24 (2007).
- Spoof L., Vesterkvist P., Lindholm T., Meriluoto J.: *J. Chromatogr.* 1020, 105 (2003).
- Samanidou V., Evaggelopoulos E., Trotsmuller M., Guo X. H., Lankmayr E.: *J. Chromatogr.* 1203, 115 (2008).
- Bueno M. J. M., Aguera A., Gomez M. J., Hernando M. D., Garcia-Reyes J. F., Fernandez-Alba A. R.: *Anal. Chem.* 79, 9372 (2007).
- Murray K. K., Boyd R. K., Eberlin M. N., Langley G. J., Li L., Naito Y., Tabet J. C.: *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 229, 212 (2005).
- Anderson N. L., Anderson N. G., Haines L. R., Hardie D. B., Olafson R. W., Pearson T. W.: *J. Proteome Res.* 3, 235 (2004).
- <http://www.mrmatlas.org>; staženo 1.11. 2010.
- <http://www.peptideatlas.org>; staženo 1.11. 2010.
- Kiyonami R. S. A., Prakash A., Peterman S., Zabrouskov V., Picotti P., Aebersold R., Huhmer A., Domon B.: *Mol. Cell. Proteomics*, v tisku.
- Gerber S. A., Rush J., Stemman O., Kirschner M. W., Gygi S. P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 6940 (2003).
- Keshishian H., Addona T., Burgess M., Kuhn E., Carr S. A.: *Mol. Cell. Proteomics* 6, 2212 (2007).
- Anderson L., Hunter C. L.: *Mol. Cell. Proteomics* 5, 573 (2006).
- Kay R. G., Gregory B., Grace P. B., Pleasance S.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21, 2585 (2007).
- Stahl-Zeng J., Lange V., Ossola R., Eckhardt K., Krek W., Aebersold R., Domon B.: *Mol. Cell. Proteomics* 6, 1809 (2007).
- McKay M. J., Sherman J., Laver M. T., Baker M. S., Clarke S. J., Molloy M. P.: *Proteomics: Clin. Appl.* 1, 1570 (2007).
- Kuhn E., Wu J., Karl J., Liao H., Zolg W., Guild B.: *Proteomics* 4, 1175 (2004).
- Zhang F., Bartels M., Stott W.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 491 (2004).
- Fortin T., Salvador A., Charrier J. P., Lenz C., Lacoux X., Morla A., Choquet-Kastylevsky G., Lemoine J.: *Mol. Cell. Proteomics* 8, 1006 (2009).
- Nishimura T., Nomura M., Tojo H., Hamasaki H., Fukuda T., Fujii K., Mikami S., Bando Y., Kato H.: *J. Proteomics* 73, 1100 (2010).
- Picotti P., Bodenmiller B., Mueller L. N., Domon B., Aebersold R.: *Cell* 138, 795 (2009).
- Kitteringham N. R., Jenkins R. E., Lane C. S., Elliott V. L., Park B. K.: *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877, 1229 (2009).
- Cox D., Zhong F., Du M., Duchoslav E., Sakuma T., McDermott J.: *J. Biomol. Tech.* 16, 83 (2005).
- Tang N., Miller C. A., Waddell K., v: *Annual Meeting of the American Society for Mass Spectrometry; Annual Meeting of The American Society for Mass Spectrometry: Denver, Colorado, 2008, poster WP 237.*
- Ciccimaro E., Hevko J., Blair I. A.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 3681 (2006).
- Griffiths J. R., Unwin R. D., Evans C. A., Leech S. H., Corfe B. M., Whetton A. D.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18, 1423 (2007).
- Hulsmeier A. J., Paesold-Burda P., Hennet T.: *Mol. Cell. Proteomics* 6, 2132 (2007).
- Onisko B., Dynin I., Requena J. R., Silva C. J., Erickson M., Carter J. M.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18, 1070 (2007).

J. Faktor^a, I. Struhárová^{a,b}, A. Fučíková^c, M. Hubálek^c, B. Vojtěšek^b, and P. Bouchal^{a,b}
 (^aDepartment of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, ^bRegional Centre for Applied and Molecular Oncology, Masaryk Oncological Institute, Brno, ^cInstitute of Molecular Pathology, Faculty of Military Health Care, University of Defence, Hradec Králové):
Mass-Spectrometry Quantification of Protein Biomarkers by Selected Reaction Monitoring

Selected reaction monitoring (SRM) is a quantitative MS-based method which recently expanded to analysis of proteins by determination of peptides. The instrumentation consists of a nanoflow liquid chromatograph coupled with nanoelectrospray ionization and a triple-quadrupole mass spectrometer. In principle, the first quadrupole works as a mass filter, transmitting only a selected peptide, which is fragmented in a second quadrupole via collision-induced dissociation. The third quadrupole transmits the selected peptide fragments, which are then directed to the detector. This approach enables targeted quantification of tens of proteins in a single analysis with very good sensitivity and selectivity. The SRM becomes a key method in a new targeted-proteomics toolbox. The most important field of its applications lies in the life sciences research where SRM enables fast, accurate and cost-effective determination of proteins in large sets of samples.