



# Proteomikai metodikák az élelmiszer- vizsgálatban

Csősz Éva - Gulyás Gabriella

2014., korrig. 2015

TÁMOP-4.1.1.C-12/1/KONV-2012-0014  
Élelmiszerbiztonság és gasztronómia vonatkozású  
egyetemi együttműködés,  
DE-SZTE-EKF-NYME

Nemzeti Fejlesztési Ügynökség  
[www.ujszechenyiterv.gov.hu](http://www.ujszechenyiterv.gov.hu)  
06 40 638 638



A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.



## Tartalomjegyzék

<b>1. MINTAELŐKÉSZÍTÉS .....</b>	<b>3</b>
Fehérjék izolálása májszövetből .....	5
Fehérjék izolálása hússzövetből .....	6
Fehérjék izolálása vérplazmából.....	6
Fehérjék izolálása tojásfehérje és sárgája mintákból .....	8
Fehérjék izolálása tej mintákból.....	8
<b>2. FEHÉRJE KONCENTRÁCIÓ MEGHATÁROZÁSA .....</b>	<b>10</b>
<b>3. FRAKCIONÁLÁS .....</b>	<b>12</b>
ProteoMiner.....	12
MiroRotor.....	14
Molekulatömeg szerinti frakcionálás .....	17
<b>4. KÉTDIMENZIÓS POLIAKRILAMID GÉLELEKTROFORÉZIS (2D-PAGE) .....</b>	<b>19</b>
Első dimenzió - Izoelektromos fókuszálás.....	20
Ekvilibrálás.....	24
Második dimenzió - SDS-PAGE .....	25
A futtatás során felmerülő problémák .....	28
<b>5. EGYDIMENZIÓS POLIAKRILAMID GÉLELEKTROFORÉZIS (SDS-PAGE).....</b>	<b>32</b>
<b>7. FEHÉRJÉK DETEKTÁLÁSA .....</b>	<b>38</b>
Coomassie alapú festés.....	38
Ezüst festés.....	39
Fluoreszcens festés .....	41
<b>8. GÉLKÉPEK ELEMZÉSE .....</b>	<b>42</b>
<b>9. GÉLBEN EMÉSZTÉS (IN-GEL DIGESTION) .....</b>	<b>48</b>
Egydimenziós gélelektroforézis során elválasztott fehérjék gélben emésztése.....	51
Kétdimenziós gélelektroforézis során elválasztott fehérjék gélben emésztése .....	53
<b>10. OLDATBAN EMÉSZTÉS (IN-SOLUTION DIGESTION) .....</b>	<b>55</b>
<b>11. MINTAELŐKÉSZÍTÉS TÖMEGSPEKTROMETRIÁS ANALÍZISHEZ.....</b>	<b>60</b>
<b>12. FEHÉRJÉK AZONOSÍTÁSA TÖMEGSPEKTROMETRIÁS ANALÍZIS SEGÍTSÉGÉVEL.....</b>	<b>62</b>
MASCOT keresőmotor használata.....	62
A ProteinPilot keresőmotor használata.....	71

## 1. Mintaelőkészítés

A kétdimenziós gél alapú vizsgálatok sikerességét nagymértékben befolyásolja a minták előkészítése. A hatékony mintaelőkészítés megakadályozza a fehérjék aggregációját, az enzimatis és kémiai módosításokat a fehérjék szerkezetében, eltávolítja a nukleinsavakat és más interferáló molekulákat. Mivel a mintaelőkészítés nemcsak szövetenként, hanem fajonként is eltérő, ezért mindig nagy gondot kell fordítanunk arra, hogy megtaláljuk az optimális beállításokat, melyek segítségével a későbbiekben a legtöbb egyedi fehérjét tudjuk elkülöníteni a poliakrilamid géleken. A minták előkészítésénél használt detergenssek, amfolitok, redukáló ágensek és kaotrópikus sók koncentrációjának módosításával nagy változásokat érhetünk el a kétdimenziós mintázatban. A mintaelőkészítés során használt legfontosabb vegyszerek az alábbiak:

**Detergenssek:** szétszakítják a hidrofób kötések és növelik a fehérjék szolubilitását. A detergenssek nem ionos vagy ikerionos vegyületek, így a fehérjék szabadon migrálhatnak a saját töltésüknek megfelelően. Nem ionos például az octylglukozid, ikerionos például a 3-[(3-kolamidopropil)-dimetilammónium]-1-propánszulfonát (CHAPS).

**Kaotrópikus sók:** az urea és a thiourea a leggyakrabban használt kaotrópikus só a mintaelőkészítésénél. Megbontják a makromolekulák háromdimenziós szerkezetét, ezenkívül a thiourea segít oldatba vinni az egyébként nehezen oldható fehérjéket. Az urea és a thiourea is a hidrogénkötéseket bontja, akkor használják őket, amikor a hidrogénkötések nem kívánt aggregációt vagy formációt okoznának a másoddimenziós struktúrában, ezzel befolyásolva a fehérjék mobilitását.

**Amfolitok:** segítik kiegyensúlyozni az elégtelen só koncentrációt a mintákban. Az amfolitok amfoter molekulák, savas és bázikus csoportokat is tartalmaznak. Stabilizálják a pH grádienszt a fókuszálásnál.

**Redukáló ágensek:** leggyakrabban használt redukáló ágens a dithiothreitol (DTT), erősen redukálja a diszulfidkötéseket, a thiol csoportokat pedig redukált állapotban tartja. Közismert



redukáló ágens még a tributilfoszfin (TBP), melyet nehéz kezelhetősége miatt ritkábban használnak a laboratóriumi gyakorlatban.

DeStreak reagens: csökkenti a nem specifikus oxidációs reakciókat a fehérjék között, emellett mérsékelheti a kétdimenziós poliakrilamid gélek bázikus régiójában gyakran előforduló vízszintes csíkozottságot, így jelentősen növelve a reprodukálhatóságot. Általában DTT helyett használják.

### **Szükséges eszközök:**

- Latexmentes kesztyű
- 1,5 ml-es csövek, 1,5 ml-es csőtartó
- Dörzsmoszár
- Szike
- Lapos spatula
- Analitikai mérleg
- Pipetta 0,2-10  $\mu$ l
- Pipetta 10-100  $\mu$ l
- Pipetta 20-200  $\mu$ l
- Pipetta 200-1000  $\mu$ l
- Pipettahegyek
- Hegyledobó
- Vortex
- Cell Distrupator homogenizáló
- Centrifuga
- Hűtő/fagyasztó

## Fehérjék izolálása májszövetből

### Szükséges vegyszerek, minták:

proteáz inhibitor, urea, thiourea, CHAPS, DTT, ampholyte, dH<sub>2</sub>O, folyékony nitrogén, 500 mg csirkemáj

### A munka menete:

A mintavételt követően a máj darabkákat, azonnal folyékony nitrogénbe kell helyezni, a további tárolás -80 °C-on történik. A folyékony nitrogén (-196 °C) megakadályoz minden enzimátikus folyamatot, melyek normál körülmények között végbemennének a szövetben a vágást követően. A proteomikai vizsgálatok során, különösen nagy gondot kell fordítanunk arra, hogy a mintánk a lehető legrövidebb időn belül folyékony nitrogénbe kerüljön, ezzel megakadályozva a fehérje bontó enzimek (proteázok) aktivitását.

1. A -80 °C-on tárolt mintából 500 mg-ot kimérünk, dörzsoszárban folyékony nitrogénnel porrá törjük.
2. A homogenizált mintából 100 mg-ot kimérünk spatula segítségével egy eppendorf csőbe, hozzáadunk 80 µl-t a 25X-ös proteáz inhibitorból, majd 1 ml lízis puffert. A lízis puffer összetétele: 8,5 M urea, 2 M thiourea, 4 m/V% CHAPS, 60mM DTT, 0,2 V/V% 100X Bio-Lyte ampholyte. A lízis puffereket már korábban elkészíthetjük, 1-1 ml-enként csövekbe osztjuk szét, tárolásuk -80 °C-on történik. A már egyszer felolvasztott lízis puffereket nem fagyasztjuk vissza.
3. Egy órát szobahőmérsékleten inkubáljuk a mintánkat (közben gyakori vortexelést igényel), ezt követően 10000 g-n 45 percig centrifugáljuk. A centrifugálást követően a felülúszót a lehető leghamarabb át kell pipetáznunk egy steril csőbe, azért hogy a csapadékban lévő sejttörmelék ne oldódjon vissza a tiszta fehérje oldatba. A felülúszó közvetlenül használható a további gél-alapú vizsgálatokhoz.



## Fehérjék izolálása hússzövetből

### Szükséges vegyszerek, minták:

proteáz inhibitor, urea, thiourea, CHAPS, DTT, ampholyte, dH<sub>2</sub>O, folyékony nitrogén, 500 mg szarvasmarha izomszövet

### A munka menete:

A mintavételt követően a hús darabkákat, azonnal folyékony nitrogénbe kell helyezni, a további tárolás -80 °C-on történik.

1. A -80 °C-on tárolt mintából 500 mg-ot kimérünk, dörzsmozsárban folyékony nitrogénnel porrá törjük.
2. A homogenizált mintából 100 mg-ot kimérünk spatula segítségével egy eppendorf csőbe, majd hozzáadunk 80 µl 25X-ös proteáz inhibitor, majd 1 ml lízis puffert. A lízis puffer összetétele: 8 M urea, 2 M thiourea, 2 m/V% CHAPS, 50 mM DTT, 0,2 V/V% 100X Bio-Lyte ampholyte
3. A csövek tartalmát 10 percig Cell Disruptor készülékkel homogenizáljuk. Az eljárás során felmelegednek a mintáink, ezért célszerű a 2 perces homogenizálási lépések közé 1 perces jégben hűtést beiktatni. A lizálást követően a mintákat 40 percig inkubáljuk szobahőmérsékleten (közben gyakori vortex), utána 10000 g-n centrifugáljuk 45 percig. A felülúszó közvetlenül használható a további vizsgálatokhoz.

## Fehérjék izolálása vérplazmából

### Szükséges vegyszerek, minták:

proteáz inhibitor, urea, CHAPS, DTT, ampholyte, dH<sub>2</sub>O, 2-D Cleanup Kit (Bio-Rad), 50 µl szarvasmarha vérplazma

### **A munka menete:**

A vérmintákat közvetlenül a levétel után, centrifugálással szeparáljuk plazmára és alakos elemekre, a plazmát egy steril csőbe pipettázzuk (proteáz inhibitor tartalmaz), majd azonnal folyékony nitrogénbe helyezzük.

A vérplazma mintáinkat 2-D Cleanup Kittel kell tisztítanunk, mivel a benne lévő sók, ionok, lipidek zavarják az izoelektromos fókuszálást. A Cleanup Kit-hez mellékelt használati utasítás instrukciói alapján végezzük el a tisztítást:

1. 500 µg fehérjének megfelelő térfogatú vérplazmát pipettázunk egy eppendorf csőbe (a fehérje koncentráció meghatározásának lépéseit ld. 2. fejezet), melyet dH<sub>2</sub>O-val 100 µl-re egészítünk ki.
2. 300 µl „precipitating agent 1”-et adunk a mintánkhoz, majd vortexeljük. Ügyeljünk arra, hogy a pipetta hegyét ne érintsük a csőben lévő mintához, mert fehérje veszteséget okozhat. 15 percig jégen inkubáljuk a mintát.
3. 300 µl „precipitating agent 2”-t adunk az elegyhez, majd vortexeljük.
4. 13,000 x g-n 5 percig centrifugáljuk a mintánkat. A centrifugálást követően két fázis alakul ki a csőben, a felső vizes réteget egy pipetta segítségével eltávolítjuk, anélkül, hogy a hegytel az alsó fázist (csapadék) megzavarnánk. A centrifugálásnál ügyeljünk arra, hogy a csöveket mindig azonos pozícióban tegyük be a gépbe (pl. a kupakot nyitó fül mindig befelé nézzen).
5. 40 µl wash reagent 1-et pipettázunk a csapadékra (vortex), majd ismét 5 percig centrifugáljuk 13,000 x g-n. Pipetta segítségével eltávolítjuk a mosó reagenst.
6. 25 µl dH<sub>2</sub>O-t pipettázunk a csapadékra, majd 10-20 másodpercig vortexeljük.
7. 1 ml „wash reagent 2”-t (melyet előzőleg -20°C-on tároltunk legalább egy órát) és 5 µl „wash 2 additive”-t adunk a mintánkhoz, majd 1 percig vortexeljük.
8. -20°C-on 30 percig inkubáljuk a mintánkat, közben 10 percenként 30 másodpercig vortexeljük.
9. Az inkubációt követően ismét 5 perc centrifugálás következik (13,000 x g), majd eltávolítjuk a felülúszót. Szobahőmérsékleten maximum 5 percig levegőn szárítjuk a csapadékot.



10. 50 µl minta pufferben (8M urea, 2% CHAPS, 50 mM DTT, 0,2% 100X Bio-Lyte 3/10 ampholyte) felszuszpendáljuk a csapadékot, legalább 30 másodpercig vortexeljük. Szobahőmérsékleten 5 percig inkubáljuk a mintát, majd újra vortexeljük.
11. 5 perc centrifugálást (13,000 x g) követően, a felülúszó közvetlenül alkalmas gél-alapú proteomikai vizsgálatokhoz.

### **Fehérjék izolálása tojásfehérje és sárgája mintákból**

#### **Szükséges vegyszerek, minták:**

urea, thiourea, CHAPS, DTT, ampholyte, dH<sub>2</sub>O, 30 µl tojásfehérje, tojássárgája

A tojásfehérjét és sárgáját elválasztjuk egymástól, majd a tojásfehérjét mágneses keverővel homogenizáljuk, hogy csökkentjük a viszkozitását. A mintákat a további felhasználásig cryocsövekben (proteáz inhibitorot tartalmaz), -80°C-on tároljuk.

#### **A munka menete:**

A -80 °C-on tárolt mintákból a tojásfehérje és sárgája esetében is 30 µl-t homogenizálunk 500 µl lízispufferben, melynek összetétele: 2 M thiourea, 8,5 M urea, 4% CHAPS, 60 mM DTT, 0,2% 100X Bio-Lyte ampholyte. Egy órát jégen inkubáljuk a mintákat gyakori vortexelés mellett, ezt követően 15000 g-n 45 percig centrifugáljuk. A felülúszót használjuk a további vizsgálatokhoz.

### **Fehérjék izolálása tej mintákból**

#### **Szükséges vegyszerek, minták:**

PBS puffer, metanol, kloroform, urea, thiourea, CHAPS, DTT, Triton X 100, dH<sub>2</sub>O, 1,5 ml tehéntej





### **A munka menete:**

Az tejsír MFG (milk fat globule) frakciójának vizsgálata bizonyos esetekben helyettesítheti az invazív tőgybiopsziát, ami kiemelten előnyös egy nagy értékű tejelő állatnál. A tejmintát proteom analízis előtt frakcionálnunk kell a vizes fázis fehérjéire és MFG fehérjékre. Az MFG fehérjék a tejsírcseppet körülvevő membránburok fehérjéit és a zsírcseppben lévő citoplazma fehérjéket jelentik, vagyis a tejsírt kiválasztó sejt plazma és membrán proteomját.

1. 1,5 ml tejet 5000 g-n 15 percig centrifugálunk. A centrifugálás után kialakuló felső fehér lipid réteget leszívjuk (ez a réteg tartalmazza az MFG-ket). 3-szor mossuk PBS-sel, a mosások után 5000 g-n centrifugáljuk 15 percig, így lesz lehetséges az MFG-k elválasztása a mosó, vizes fázistól.
2. A mintából el kell távolítanunk a lipideket, metanol és kloroform segítségével: 0,1 ml fehérje minta + 0,2 ml metanol, centrifugálás 9000 g-n 10 másodpercig + 0,2 ml kloroform, centrifugálás 9000 g-n 10 másodpercig + 0,3 ml dH<sub>2</sub>O, centrifugálás 9000 g-n 1 percig.
3. A kialakult felső fázist eltávolítjuk, majd további 0,3 ml metanolt adunk a megmaradt kloroform és a precipitálódott fehérjék rétegéhez, 2 percig centrifugáljuk 9000 g-n. Centrifugálás után a felülúszót eltávolítjuk és a csapadékot szobahőmérsékleten beszárítjuk.
4. A beszárított csapadékot minta pufferben vesszük fel: 2 M thiourea, 7 M urea, 65 mM DTT, 0,5% Triton X 100, 4% CHAPS.
5. Az így előkészített mintát 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáljuk, majd 2 percig centrifugáljuk 10000 g-n. A felülúszót -80 °C-on tároljuk a további felhasználásig.

## 2. Fehérje koncentráció meghatározása

A minta előkészítés során nyert fehérje oldatok fehérje koncentrációjának meghatározására spektrofotométert alkalmazunk. A spektrofotometriai mérések az oldatok fényelnyelésén alapulnak, a minta által elnyelt fényt, a beeső és az áteresztett fényintenzitás hányadosával jellemezzük.

A fehérje koncentráció meghatározásának egyik legegyszerűbb módja a Bradford-módszer. A módszer lényege az, hogy a Bradford reagensben található Coomassie Brilliant Blue G-250 festék savas közegben képes a fehérjékhez kötődni. A kötődést követően a festék abszorpciós maximuma 465 nm-ről 595 nm-re tolódik. Szemmel látható változást is tapasztalhatunk, ugyanis a Bradford reagens barnás színe a fehérje oldat hozzáadását követően kékre változik.

### Szükséges eszközök:

- Latexmentes kesztyű
- 1,5 ml-es csövek, 1,5 ml-es csőtartó
- Pipetta 0,2-10  $\mu$ l
- Pipetta 10-100  $\mu$ l
- Pipetta 200-1000  $\mu$ l
- Pipettahegyek
- Hegyledobó
- Vortex
- Spektrofotométer

### Szükséges vegyszerek, minták:

Bradford reagens, BSA standard,  $\text{dH}_2\text{O}$ , spektrofotométer, eppendorf cső, fehérje minta, a mintának megfelelő lízis puffer

### **A munka menete:**

1. Első lépésként el kell készítenünk a kalibrációs görbe felvételéhez szükséges oldatokat, melyekhez ismert koncentrációjú fehérje oldatokat (BSA standard) használunk 0 és 2000  $\mu\text{g/ml}$  közötti tartományban. Nyolc eppendorf cső mindegyikébe 250  $\mu\text{l}$  Bradford reagenst pipetázunk, majd 5-5  $\mu\text{l}$ -t az ismert koncentrációjú oldatokból, az utolsó csőbe pedig 5  $\mu\text{l}$  vizet, ez lesz a „vak”, mely nem tartalmaz fehérjét.
2. A hús és máj mintákból származó fehérje oldatokat koncentrációmérés előtt ki kell hígítanunk, mert ezek rendszerint magas koncentráció értékekkel rendelkeznek, melyek nem esnek bele az általunk mérhető tartományba. Ehhez a minta előkészítés során alkalmazott lízis puffert használjuk. 20-szoros hígítás eléréséhez 95  $\mu\text{l}$  lízis pufferhez 5  $\mu\text{l}$  fehérje mintát kell adnunk. A Cleanup Kit-tel tisztított vérminták hígítása nem szükséges. A minták számával megegyező számú eppendorf csőbe 250  $\mu\text{l}$  Bradford reagenst pipetázunk, melyekhez 5  $\mu\text{l}$  ismeretlen koncentrációjú fehérje mintát adunk.
3. A spektrofotométerhez kapcsolt számítógép programjai közül kiválasztjuk az ND-1000 elnevezésűt. A műszer alkalmas DNS, RNS és fehérje koncentráció meghatározására is, így először kiválasztjuk a felajánlott opciók közül a „Protein Bradford” elnevezésű ikont. Ezt követően vízzel, majd a vakkal (0  $\mu\text{g/ml}$  fehérje koncentráció) kalibráljuk a berendezést. Ügyelnünk kell arra, hogy buborékmentesen vigyük fel a mintát a megfelelő helyre.
4. Elsőként a kalibrációs oldatok abszorbanciáját mérjük le (mindegyik oldatot háromszor), melyekhez hozzárendeljük a koncentráció értékeket, így jön létre a kalibrációs görbe. A program az ismeretlen koncentrációjú oldatok abszorbancia értékeiből a kalibrációs görbe alapján adja meg a koncentráció értékeket.
5. A kalibrációs görbe felvételét követően elkezdhetjük a még ismeretlen koncentrációjú minták abszorbanciájának mérését. Egy-egy mintát háromszor kell lemérnünk, majd a kapott értékek átlagát vesszük. A hígított minták esetén kapott koncentráció értékeket még a hígítás mértékével (ebben az esetben 20) meg kell szoroznunk, a kapott érték lesz a mintánk valós koncentrációja.

### 3. Frakcionálás

A proteomikai vizsgálatoknál mindig komoly problémát jelent a minták komplexitása, hiszen egy-egy szövettípus akár több ezer különböző fehérjét is tartalmazhat. Ezért is okoz nehézséget, hogy megtaláljuk azokat a fehérjéket, melyek ténylegesen reagálnak az általunk elvégzett kezelésre. A minták előkészítése során ezt az összetettséget prefrakcionációval csökkenthetjük, ezáltal növekedhet a detektálható fehérjék száma. Számos frakcionálási módszer közül választhatunk, melyek alapjául a fehérje molekulák különböző fizikai és kémiai tulajdonságai szolgálnak, mint például a fehérjék oldhatósága, sejten belüli lokalizációja, mérete, töltése, izoelektromos pontja.

#### ProteoMiner

Bizonyos mintatípusok esetén (tojás, tej, különböző italok, vérplazma) komoly problémát okoz a nagy gyakoriságú fehérjék jelenléte, ezek a fehérjék a gélekpeken elfedhetik a számunkra nagyobb jelentőséggel bíró kisebb gyakoriságú proteineket, ezért mindig nagy kihívást jelent, hogy csökkentjük ezeknek a fehérjéknek a gyakoriságát.

Ennek a problémának a megoldására fejlesztették ki a különböző kombinatorikus peptid ligand könyvtárakat. A kombinatorikus könyvtárakat nagyszámú, kismolekulájú vegyületekből állítják elő. A proteomikában általában hexapeptid könyvtárakat alkalmaznak. Ezek hat aminosavból álló oligopeptid ligandok különböző aminosav szekvenciákkal (nagy diverzitás), melyeket attól függően generálnak, hogy a kis vagy a nagy gyakoriságú fehérjék megkötését tűzték ki célul. Háromféle kombinatorikus peptid ligand könyvtárat használnak a gyakorlatban: hexapeptidek primer aminnal terminálva (kereskedelmi forgalomban: ProteoMiner), hexapeptidek carboxyl csoporttal, hexapeptidek harmadlagos amin csoporttal.

#### Szükséges eszközök:

- Latexmentes kesztyű
- 1,5 ml-es csövek, 1,5 ml-es csőtartó
- Pipetta 0,2-10  $\mu$ l



- Pipetta 10-100  $\mu$ l
- Pipetta 20-200  $\mu$ l
- Pipetta 200-1000  $\mu$ l
- Pipettahegyek
- Hegyledobó
- Vortex
- Centrifuga

### **Szükséges vegyszerek, minták:**

dH<sub>2</sub>O, ProteoMiner Kit (Bio-Rad), 200  $\mu$ l szarvasmarha vérplazma

A ProteoMiner Kit alkalmazása során a gyártó által mellékelt használati utasítás lépéseit kell követnünk. A kit egy nagy diverzitású gyöngyökhöz kötött peptid ligand könyvtárat tartalmaz, melyhez a kis ill. közepes gyakoriságban előforduló fehérjék kötődnek.

### **A munka menete:**

1. Első lépésben eltávolítjuk az oszlopokat alul-felül lezáró tetőket, melyeket még a későbbiekben használni fogunk.
2. Az oszlopokat egy tető nélküli gyűjtőcsőbe helyezük, majd 1 percig 1000 x g-n centrifugáljuk, hogy a benne lévő folyadékot eltávolítsuk. A cső alján összegyűlt folyadékot eltávolítjuk.
3. Az alsó tetőt visszahelyezzük az oszlopra, majd 200  $\mu$ l „wash buffer”-t pipetázunk a gyöngyökre, a felső tetőt is visszatesszük.
4. 5 percen keresztül óvatosan fel-le forgatjuk az oszlopokat.
5. Eltávolítjuk az alsó tetőt, és visszatesszük az oszlopot a gyűjtőcsőbe, majd 1 percig centrifugáljuk 1000 x g-n. A cső alján összegyűlt folyadékot eltávolítjuk.
6. A 3., 4. és 5. lépést megismételjük.
7. Visszahelyezzük az alsó tetőt, az így előkészített oszlop 20  $\mu$ l gyöngyöt tartalmaz, melyek alkalmasak a minták megkötésére.

8. 200 µl vérplazmát pipettázunk a gyöngyökre, majd visszatesszük a felső tetőt és 2 órán keresztül inkubáljuk szobahőmérsékleten, egy rázógépen.
9. Eltávolítjuk az alsó tetőt, és visszatesszük az oszlopot a gyűjtőcsőbe, majd 1 percig centrifugáljuk 1000 x g-n. A cső alján összegyűlt folyadékot eltávolítjuk.
10. Visszahelyezzük az alsó tetőt, majd 200 µl „wash buffer”-t pipettázunk a gyöngyökre, a felső tetőt is visszatesszük. 5 percig inkubáljuk az oszlopokat, miközben néhányszor megforgatjuk.
11. Eltávolítjuk az alsó tetőt, és visszatesszük az oszlopot a gyűjtőcsőbe, majd 1 percig centrifugáljuk 1000 x g-n. A cső alján összegyűlt folyadékot eltávolítjuk.
12. A 10. és 11. lépést kétszer megismételjük.
13. Visszahelyezzük az alsó tetőt és 200 µl vizet pipettázunk a gyöngyökre, majd a felső kupakot visszatesszük és néhányszor megforgatjuk az oszlopokat.
14. Eltávolítjuk az alsó és felső tetőt is, és visszatesszük az oszlopot a gyűjtőcsőbe, majd 1 percig centrifugáljuk 1000 x g-n. A cső alján összegyűlt folyadékot eltávolítjuk.
15. Az alsó kupakot visszatesszük és 20 µl rehidratált „elution reagent”-et adunk a mintához és rátesszük a felső kupakot. Óvatosan vortexeljük 5 másodpercig.
16. Szobahőmérsékleten inkubáljuk a csöveket 15 percig, közben néhányszor óvatosan vortexeljük.
17. Eltávolítjuk a kupakokat és új gyűjtőcsövekbe helyezzük az oszlopokat majd 1 percig centrifugáljuk 1000 x g-n. A cső alján összegyűlt folyadék tartalmazza az eluált fehérjéinket.
18. Ismételjük meg a 15., 16. és 17. lépést.
19. Az így előkészített fehérje oldat közvetlenül alkalmas gél-alapú proteomikai vizsgálatokhoz.

### **MiroRotor**

Az izoelektromos pont (pI) az a pH érték, amelynél a pozitív és a negatív töltések kiegyenlítik egymást, azaz az aminosav neutrális viselkedést mutat elektromos térben. Az izoelektromos pont alapján történő elválasztás a kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis első dimenzióját képezi, ez az izoelektromos fókuszálás.



Az izoelektromos fókuszálás során a fehérjéket egy már előre kialakított pH grádiensű vékony poliakrilamid gélben (strip) választjuk el az izoelektromos pontjuknak megfelelően. Lehetőségünk van azonban folyadék közegben is elvégezni ezt az izoelektromos fókuszálást az ún. MicroRotofor készülék segítségével. A folyadék közegben történő elválasztás eredményeként létrejövő frakciók könnyen begyűjthetők, csoportosíthatók és akár újra frakcionálhatók más módszerek segítségével. Különösen alkalmas a nem-szolubilis fehérjék vizsgálatára, illetve minden más olyan fehérje esetén, melyek nehezen választhatók el a gél alapú izoelektromos fókuszálással.

#### **Szükséges eszközök:**

- Latexmentes kesztyű
- 1,5 ml-es csövek, 1,5 ml-es csőtartó
- MicroRotofor készülék
- Vákuumcsapda
- Tápegység
- Pipetta 0,2-10  $\mu$ l
- Pipetta 10-100  $\mu$ l
- Pipetta 20-200  $\mu$ l
- Pipetta 200-1000  $\mu$ l
- Pipettahegyek
- Hegyledobó
- Vortex

#### **Szükséges vegyszerek, minták:**

dH<sub>2</sub>O, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, NaOH, dH<sub>2</sub>O, urea, thiourea, CHAPS, glycerol, 3-10 ampholyte, tisztított fehérje minta

### A munka menete:

1. Az ioncserélő membránokat egy egész éjszakán át a megfelelő elektrolit oldatban kell ekvilibrálnunk. Az anód membránt 0,1 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , míg a katód membránt 0,1 M NaOH oldatban.
2. Az ioncserélő membránokat felhasználás előtt desztillált vízzel mossuk, majd egy csipesz segítségével a fókuszáló kamra két végére helyezzük, majd magukat az elektródokat és az elektrolit tartályokat is rácsavarjuk a kamrára.
3. Ügyeljünk arra, hogy a minta feltöltésére szolgáló lyukak egy vonalba kerüljenek az elektród tartályokon található lyukakkal. Az ellentétes oldalon található lyuksor a már fókuszált minták kinyerésére szolgál, ezért a mintafeltöltés előtt ragasztószalaggal le kell ragasztanunk.
4. A mintánkból 3 mg fehérjének megfelelő térfogatú oldatot kimérünk egy centrifuga csőbe, majd hozzáadunk 150  $\mu\text{l}$  pH 3-10 ampholyte-ot és 2,5 ml puffert (7 M urea, 2 M thiourea, 2 m/v% CHAPS, 10 v/v% glycerol).
5. Az így előkészített mintát egy fecskendő segítségével a fókuszáló kamrán található középső lyukon keresztül lassan, buborékmentesen betöltjük a kamrába, majd szárazra töröljük és leragasztjuk a mintafeltöltő lyukakat.
6. A jelöléseknek megfelelően (anód - piros; katód – fekete) elhelyezzük a fókuszáló kamrát a hűtő blokkban és egy fecskendő segítségével feltöltjük az elektrolit tartályokat. Az anódhoz tartozót 6 ml 0,1 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , míg a katódhoz tartozót 6 ml 0,1 M NaOH oldattal.
7. Csatlakoztatjuk a berendezést a tápegységhez, a hűtő blokkot 20 °C-ra állítjuk. A futtatás kondíciói: 150 V - 10 min, 200 V – 10 min, 300 V – 60 min, az áramerősséget 20 mA-ben, míg a teljesítményt 2 W-ban limitáljuk.
8. Az elektroforézist követően egy vákuumcsapdát kell kapcsolnunk a MicroRotoforhoz, mely segítségével tulajdonképpen kiszippantjuk az egyes frakciókat a fókuszáló kamrából. A 10 frakció egy tízcsatornás tálcába kerül, mely a minták tárolására is alkalmas (-80 °C). Az így nyert frakciókat tovább szeparálhatjuk molekulatömeg szerint egydimenziós poliakrilamid gélelektroforézis segítségével.



## Molekulatömeg szerinti frakcionálás

A proteomikai vizsgálatok során előfordulhat, hogy csak bizonyos molekulatömeg tartományba tartozó fehérjékkal szeretnénk dolgozni. Ebben az esetben a centrifugális szűrők segítségével gyors és hatékony frakcionálást végezhetünk. A laboratóriumi gyakorlatban általában 3.000 és 100.000 Da közötti molekulatömeg limittel rendelkező filterek vásárolhatók. Egy 100 kDa-os szűrő esetén például, a 100 kDa-nál nagyobb méretű fehérjék fennmaradnak a filteren (ezeket visszaoldhatjuk), míg a kisebb molekulatömegű proteinek az átfolyóba kerülnek. A frakcionálás hatékonyságát egy- ill. kétdimenziós gélelektroforézissel ellenőrizhetjük.

### Szükséges eszközök:

- Latexmentes kesztyű
- 1,5 ml-es csövek, 1,5 ml-es csőtartó
- 100 kDa, 50 kDa, 30 kDa mérettartományú szeparáló szűrő
- Pipetta 200-1000  $\mu$ l
- Pipettahegyek
- Hegyledobó
- Vortex
- Centrifuga

### Szükséges vegyszerek, minták:

tisztított, hígított fehérje minta (1 mg/ml)



**A munka menete:**

1. Három különböző mérettartományú filtert alkalmazunk: 100 kDa, 50 kDa és 30 kDa. Ennek az az oka, hogy a kisebb méretű szűrők használata előtt célszerű a mintát a 100 kDa-os filteren átengedni és a filtrátumot tovább vinni.
2. 1 ml (1 mg/ml) mintát pipetázunk a 100 kDa-os centrifugális szűrőre, melyet 700 g-n 30 percig centrifugálunk.
3. Az átfolyó fehérje oldatot az 50 és a 30 kDa-os fehérje szeparáló szűrőre visszük tovább, majd 10000g-n 30 percig centrifugáljuk (a gyártó utasítása szerint).
4. A frakcionálás hatékonyságát egy- ill. kétdimenziós gélelektroforézissel ellenőrizhetjük.

#### 4. Kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis (2D-PAGE)

A gél alapú proteomikai vizsgálatok során leggyakrabban használt módszer a kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis. Az elektroforézis széleskörű alkalmazhatósága és nagy felbontóképessége miatt az egyik leggyakrabban használt technika a fehérjék elválasztására.

A fehérjék első dimenzióban történő elválasztása az izoelektromos pontjuk alapján történik, az izoelektromos fókuszáló berendezés segítségével. Az izoelektromos pont (pI) az a pH érték, amelynél a pozitív és a negatív töltések kiegyenlítik egymást, azaz az aminosav neutrális viselkedést mutat elektromos térben. A legtöbb fehérje izoelektromos pontja pH 3-12 tartományba esik. Amikor a fehérjéket olyan közegbe helyezzük, ahol előzőleg már kialakítottunk egy pH grádienszt, akkor elektromos áram hatására vándorolni kezdenek ebben a grádiensben és eközben vagy protonokat vesznek fel vagy protonokat adnak le. Végül elérnek egy olyan pontot a pH grádiensben, mely megegyezik az izoelektromos pontjukkal.

A laboratóriumi gyakorlatban mára már széleskörben elterjedt az ún. immobilizált pH grádiensek (IPG) használata, melyek felváltották a korábban használt ún. cső géleket (amfolit alapú grádiensek). Ezekben a vékony poliakrilamid gél csíkokban (stripek) egy már előre kialakított pH grádinis található (kovalensen beépítve az akrilamid mátrixába). Az IPG stripek különböző méretben és pH tartományban beszerezhetők, illetve a pH grádinis linearitásában is (lineáris, nem lineáris) eltérhetnek egymástól. Használatuk során, első lépésben rehidratálnunk kell a gélcsíkokat, hogy elérjék eredeti vastagságukat. Ez történhet aktív (alacsony feszültség használatával) vagy passzív (csak a fehérjék abszorpcióját kihasználva) módon valamilyen rehidratáló oldattal.

A fókuszált fehérjék szolubilizálásához és a nátrium-dodecil szulfát (SDS) burok kialakításához elengedhetelen, hogy a molekulatömeg szerinti elválasztást megelőzően SDS-tartalmú pufferekben ekvilibráljuk a fehérjéket. Az SDS egy anionikus detergens, mely elmaszkírozza az egyes fehérjék valódi töltését és egységes negatív töltést ad nekik, így azok csak a molekulásúlyuk alapján különböznek egymástól. Az ekvilibrálás lépésben történik meg a cisztein oldalláncok redukálása és alkilálása is. A cisztein oldalláncok szulfhidril

csoportjának redukálása egy DTT tartalmú pufferben játszódik le (ekvilibráló puffer I.), majd a már redukált csoportok alkilálását végezzük el egy iodoacetamidot tartalmazó puffer segítségével (ekvilibráló puffer II.).

Az így előkészített fehérjék már alkalmasak arra, hogy molekulatömeg szerint elválasszuk őket. Az ekvilibrált IPG stripeket egy kis koncentrációjú agaróz gél segítségével helyezük el a második dimenziós elválasztást biztosító poliakrilamid gélek tetején. Az agaróz gél biztosítja, hogy a fehérjék akadálytalanul tudjanak vándorolni a stripből az SDS-tartalmú poliakrilamid gélbe.

A második dimenzióban az elválasztás egy SDS tartalmú poliakrilamid gélben történik. A már előzőleg a pI alapján elkülönített fehérjéket tovább szeparáljuk a molekulásúlyuk (MW) alapján. Az SDS-sel burkolt fehérjék negatív töltésűek, így a poliakrilamid gél pórusainak szűrő hatására méret szerint elkülöníthetők egymástól. A poliakrilamid gélek pórus méretét a gélben található akrilamid és biszakrilamid (N,N'-metilén-biszakrilamid) koncentrációja (%T) határozza meg. Az akrilamid vizes közegben képes a polimerizációra, amely során különféle méretű lineáris poliakrilamid-szálak keletkeznek. A biszakrilamid szolgál keresztkötő reagensként, mely képes összekapcsolni a poliakrilamid-szálakat. Az akrilamid polimerizációjának és a keresztkötések kialakulásának sebességét a szabadgyökök jelenléte megnöveli, ezért alkalmaznak a gélek készítése során szabadgyök képző ammónium-perszulfátot (APS) és a szabadgyököket stabilizáló tetrametilén-diamint (TEMED).

### **Első dimenzió - Izoelektromos fókuszálás**

#### **Szükséges eszközök:**

- Latexmentes kesztyű
- 1,5 ml-es csövek, 1,5 ml-es csőtartó
- Protean IEF Cell
- Rehidratáló tálca
- Fókuszáló tálca



- Csipesz
- Pipetta 2-20  $\mu$ l
- Pipetta 20-200  $\mu$ l
- Pipettahegyek
- Hegyledobó
- Vortex

### **Szükséges vegyszerek, minták:**

dH<sub>2</sub>O, urea, thiourea, CHAPS, DTT, DeStreak reagens, Bio-Lyte 4/6 és 6/8-as ampholyt, brómfenolkék, ásványi olaj, szűrőpapír, pH 5-8 IPG strip, tisztított fehérje minta

### **A munka menete:**

Az első dimenzióban a fehérjéket izoelektromos pontjuk alapján választjuk el Protean IEF Cell (Bio-Rad) izoelektromos fókuszáló berendezés segítségével. 7 cm-es pH 5-8-as IPG stripeket használunk a fókuszáláshoz.

1. Mintatípusonként eltérő mennyiségű fehérjét viszünk fel a stripekre:

Mintatípus	Máj	Hús	Tej	Tojás
Fehérje mennyiség	150 $\mu$ g	300 $\mu$ g	200 $\mu$ g	200 $\mu$ g

2. A fehérje mintákhoz rehidratáló puffert kell adnunk, melynek összetétele szintén mintatípus függő. A teljes rehidratálási térfogat 125  $\mu$ l.
3. A hús és a tej mintákhoz szükséges rehidratáló puffer: 8 M urea, 2 M thiourea, 2 m/V% CHAPS, 50 mM DTT, 0,2 V/V% Bio-Lyte 4/6 és 6/8-as ampholyt 1:2 arányban, 0,002 m/V% brómfenolkék.
4. A máj és a tojás mintákhoz szükséges rehidratáló puffer: 8 M urea, 2 M thiourea, 2 m/V% CHAPS, 15 mg/ml DeStreak reagens, 0,2 V/V% Bio-Lyte 4/6 és 6/8-as ampholyt 1:2 arányban, 0,002 m/V% brómfenolkék. A rehidratáló puffereket már

korábban elkészíthetjük, 1-1 ml-enként csövekbe osztjuk szét, tárolásuk  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történik. A már egyszer felolvasztott lízis puffereket nem fagyasztjuk vissza.

5. A megfelelő rehidratáló pufferben felvett mintákat a rehidratáló tálca csatornáiba pipetázzuk, ügyelve arra, hogy a csatorna két végén lévő 1-1 cm-es részre már ne kerüljön a mintából, illetve a csatornák belső falához érintjük a pipetta hegyet és így oszlatjuk el a mintát. A stripekről eltávolítjuk a műanyag védőfóliát a csipesz segítségével és a géles oldalával lefelé ráhelyezzük a mintára, ügyelve arra, hogy ne kerüljön buborék a gél és a minta közé. A stripeket csak a csipesszel fogjuk meg a két végükön található műanyag résznél, így nem sértjük meg a gél felületét.



1. kép: Az IPG stripek rehidratálásának lépései



2. kép: Az izoelektromos fókuszáláshoz szükséges csipeszek, rehidratáló és fókuszáló tálcák

6. Fél óra elteltével a stripeket ásványi olajjal fedjük le, ezzel megakadályozva a párolgást. A stripek rehidratálása kb. 12-16 órát vesz igénybe.
7. A rehidratálást követően a mintákat át kell helyoznünk a fókuszáló tálcába. Először kis szűrőpapír szeletekkel lefedjük a fókuszáló tálcán található elektródokat, erre azért van szükség, hogy összegyűjtsék a mintában található sókat és egyéb zavaró anyagokat. Mindegyik papírra 8  $\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O-t pipettázunk, lecsöpögtetjük a stripekről az olajat, majd a csatornába helyezük azokat géles oldalukkal lefelé. Újra ásványi olajat pipettázunk a stripek felszínére és a fókuszáló tálca tetejének ráhelyezését követően a tálcát betesszük az izoelektromos fókuszálóba.
8. Az izoelektromos fókuszálás kondíciói:
  1. lépés -250 V 15 perc (lineáris feszültség emelkedés)
  2. lépés -4000 V 2,5 óra (lineáris feszültség emelkedés)
  3. lépés -4000 V 20000 Vh (gyors feszültség emelkedés )
9. A fókuszálást követően a mintákról lecsöpögtetjük az olajat, majd géles oldalukkal felfelé áttesszük egy rehidratáló tálcára, ezt követően lefagyaszthatjuk, vagy közvetlenül vihetjük tovább a stripeket a második dimenzióra.

## Ekvilibrálás

### Szükséges eszközök:

- Latexmentes kesztyű
- Rehidratáló tálca
- Csipesz
- Horizontális rázógép
- Pipetta 200-1000 µl
- Pipettahegyek
- Hegyledobó
- Vortex

### Szükséges vegyszerek, minták:

dH<sub>2</sub>O, urea,, tris, DTT, iodoacetamid, glicerol, fókuszált IPG strip

### A munka menete:

1. A fókuszált stripeket a második dimenziós elválasztás előtt ekvilibráljuk. Az IPG stripeket 10 percig inkubáljuk az ekvilibráló I. oldatban (6 M urea, 2 m/V% SDS, 0,05 M Tris/HCl pH 8,8, 20 V/V% glicerol, 2 m/V% DTT). Az inkubálást követően, óvatosan öntjük le a stripekről az oldatot, nehogy kicsússzanak a tálcából.
2. Ezt követően 10 percig az ekvilibráló II. oldatban (6 M urea, 2 m/V% SDS, 0,05 M Tris/HCl pH 8,8, 20 V/V% glicerol, 2,5 V/V% iodoacetamide) inkubáljuk a mintákat.
3. Az ekvilibráló puffereket már korábban elkészíthetjük, 2-2 ml-enként csövekbe osztjuk szét, tárolásuk -80 °C-on történik. Felhasználás előtt addig vortexeljük, míg teljesen víztiszta lesz az oldat. A már egyszer felolvasztott ekvilibráló puffereket nem fagyasztjuk vissza.





4. Az ekvilibrálást rendszerint akkor végezzük el, amikor a második dimenzióhoz szükséges gélek már polimerizálódtak, hiszen az ekvilibrálást követően azonnal el kell indítanunk az elektroforézist.

### **Második dimenzió - SDS-PAGE**

#### **Szükséges eszközök:**

- Latexmentes kesztyű
- Csipesz
- Üveglapok
- Gélöntő állvány
- Mágneses keverő
- Mágnes
- Üvegpohár
- Analitikai mérleg
- 500 ml-es mérőhenger
- Elektroforézis készülék (Cleaver Scientific)
- Tápegység (Bio-Rad)
- Pipetta 0,2-10  $\mu$ l
- Pipetta 10-100  $\mu$ l
- Pipetta 200-1000  $\mu$ l
- Pipetta 1-5 ml
- Pipettahegyek
- Hegyledobó

**Szükséges vegyszerek, minták:**

dH<sub>2</sub>O, poliakrilamid, SDS, TEMED, ammónium-perszulfát, tris, glicin, agaróz, brómfenolkék, ekvilibrált IPG strip

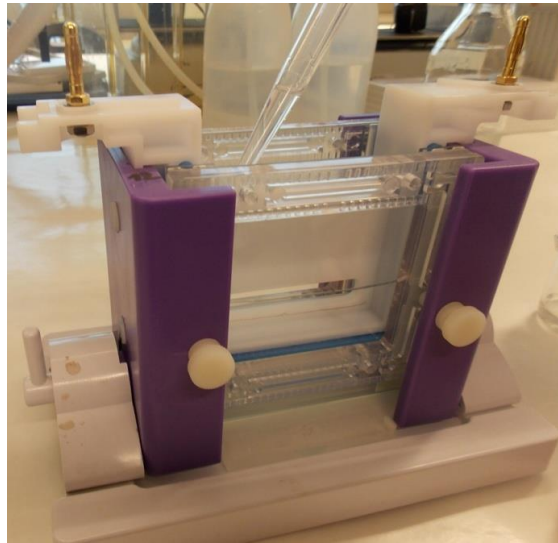
**A munka menete:**

1. Ellenőrizzük, hogy a gélöntéshez használt üveglapok megfelelő tisztaságúak-e, amennyiben nem, mosószeres vízzel, majd desztillált vízzel mossuk azokat.
2. Összeillesztünk egy rövidebb és egy távtartókkal ellátott, nagyobb üveglapot, majd behelyezzük a két lapot a gélöntő állványba, úgy hogy a rövidebb az állvány belseje felé nézzen. A másik oldalon is ugyanígy elhelyezünk két üveglapot, majd az egész szerkezetet a gumipadra szorítjuk két kar segítségével.
3. Egy 50 ml-es üveg pohárban összeállítjuk a gélhez szükséges oldatot:

Az SDS poliakrilamid gél összetétele (13%), 1 géltre:

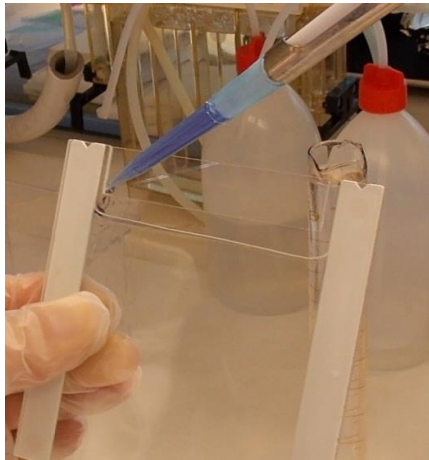
dH <sub>2</sub> O	3,4 ml
40 m/V% akrilamid/ biszakrilamid (37,5:1)	2,6 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2,0 ml
<u>10 m/V% SDS</u>	<u>80 µl</u>
10 m/V% ammónium perszulfát	75 µl
TEMED	7,5 µl

4. Az akrilamid veszélyes reagens, súlyos idegrendszeri károsodást okoz, ezért a gélek készítésekor különös körültekintéssel dolgozzunk vele.
5. Az ammónium perszulfát oldatot mindig frissen kell elkészíteni, felhasználás előtt maximum 5 perccel. Ehhez egy eppendorf csőbe kimérünk 10 mg ammónium perszulfát port, melyhez 100 µl dH<sub>2</sub>O-t adunk, majd alaposan vortexeljük. A reagenseket a fentebb leírt sorrendben mérjük össze, közben lassan kevertetjük egy mágneses keverőn. A TEMED hozzáadását követően az oldatot a két üveglap közé pipettázzuk, úgy hogy a folyadék szintje kb. 1,5 cm-re legyen a kisebb üveglap tetejétől. Vízzel telített izopropanolt rétegezzünk a gél tetejére.

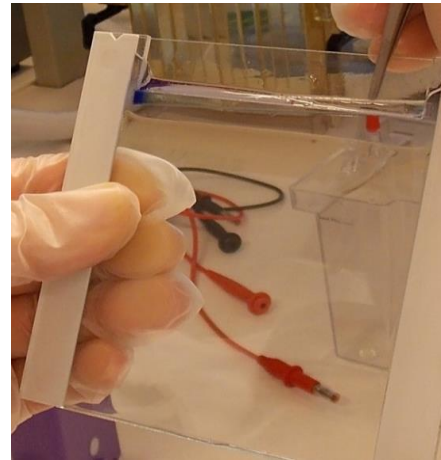


3. kép: Gélöntés

6. A gél polimerizációs ideje kb. 15-20 perc.
7. Elkészítjük az elektroforézishez szükséges futtató puffert: 10X Tris – Glicin – SDS puffert kihígítunk 1X-re, ehhez 50 ml 10X-es puffert 450 ml vízzel kihígítunk egy mérőhengerben.
8. A gélek megszilárdulását követően az ekvilibrált stripeket egy csipesz segítségével belemerítjük a kihígított futtató pufferbe, ezzel lemosva az ekvilibráló puffert. A stripeket 0,5%-os agaróz oldat és egy csipesz segítségével (0,5 g agarózt 100 ml 1X TGS pufferben oldunk fel, melyet brómfenolkékkel színezünk) elhelyezzük az SDS gélek tetején. Ehhez először a mikrohullámú sütőben felolvasztott agaróz oldatot a gél tetejére pipettázuk, majd a csipesszel ráhelyezzük a strippet a nagyobb üveglapra, úgy hogy a géles oldala nézzen felfelé. Innen óvatosan beletoljuk a strippet az agarózba, amíg el nem éri a gél felszínét. Ügyeljünk arra, hogy ne sértsük meg a strip géles oldalát a csipesszel, illetve arra is, hogy a strip és az SDS tartalmú gél között ne legyenek levegő buborékok.



4. kép: Agaróz gél felvitele



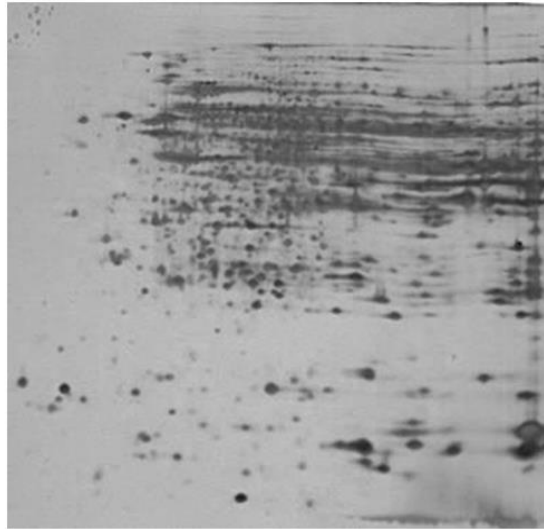
5. kép: Strip elhelyezése

9. Az agaróz 1-2 perc alatt megszilárdul. A géleket visszatesszük a gélöntő állványba, mely tulajdonképpen maga az elektroforézis készülék és az egészet behelyezzük a futtatókádba, ügyelve az anód és katód megfelelő pozíciójára. Majd a gélek által kialakított belső puffer tartályt felöntjük a futtató pufferrel, úgy hogy átfolyjon a külső puffer tartályba is.
10. A futtatókádat csatlakoztatjuk a tápegységhez. Az első 10 percben 80 V-on futtatjuk a mintákat, majd felemeljük a feszültséget 160 V-ra. Az elektroforézist mindaddig végezzük, míg az agaróz gélből származó jelző festék (brómfenolkék) el nem éri a gél alját.
11. A futtatást követően az üveglapokat óvatosan elválasztjuk egymástól és a géleket vízzel teli festőedénybe helyezzük, majd az alkalmazni kívánt festési eljárás protokollját követjük.

### A futtatás során felmerülő problémák

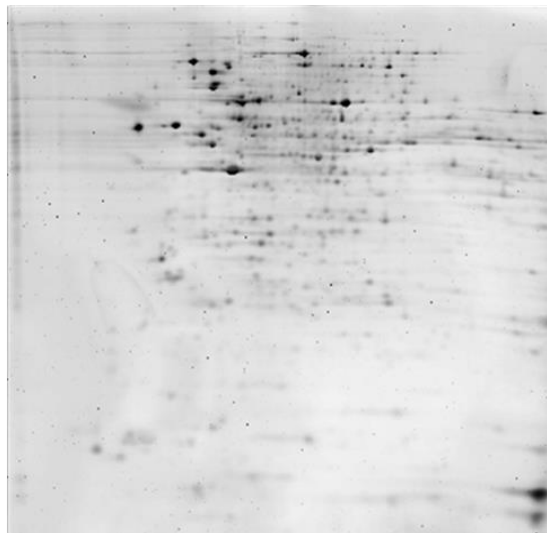
A kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis metodika célja, hogy minél több egyedi fehérje foltot különíthessünk el a géleken. A módszer összetettsége miatt számos probléma merülhet fel a mintaelőkészítés és a futtatás során, mely a géleken látható fehérje mintázatban okoz zavart. Az alábbiakban néhány olyan gélkép kerül bemutatásra, melyek mintázata alapján egyértelműen kiderül, hogy mi volt a probléma az elválasztás során.

1. gélkép



Túl nagy fehérjemennyiség a gélen (1. gélkép). Minden mintatípus esetén tesztelni kell az elválasztáshoz szükséges ideális fehérje mennyiséget. Ez függ a gél méretétől ill. a festés módjától is. A túl nagy fehérjemennyiség miatt a gélkép egyes régióiban nem lehet egyedi foltokat megkülönböztetni, ezáltal lehetetlenné válik a fehérje mintázat szoftveres analízise.

2. gélkép



Az első dimenziós izoelektromos fókuszálás optimalizálása szükséges (2. gélkép). A legtöbb foltnál egy vízszintes csík figyelhető meg a gélképen. Az izoelektromos fókuszálás ideális időtartamát kell beállítanunk ebben az esetben. Különbségek figyelhetők meg az egy ill. több lépéses fókuszálás között azonos  $V_h$  értékek mellett is. A többlépéses fókuszálás során az első lépésben egy alacsony feszültség értéket használunk (250 V) és csak ezután kezdjük

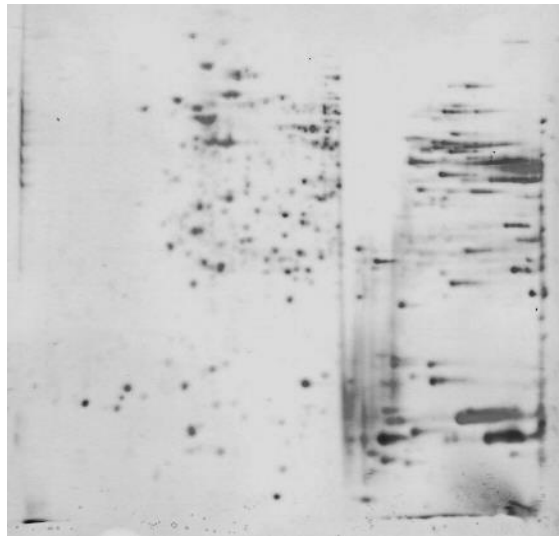
lineárisan növelni, majd csak a harmadik lépésben kerül sor gyors feszültség emelésre. Valószínűleg ez a kezdeti alacsony feszültség segít a fehérjéknek, hogy megkezdjék migrációjukat a gélben a saját izoelektromos pontjuk felé. Ezzel ellentétben az egy lépéses fókuszálás gyorsan emelkedő feszültsége nem kedvez minden mintatípusnak.

3. gélkép



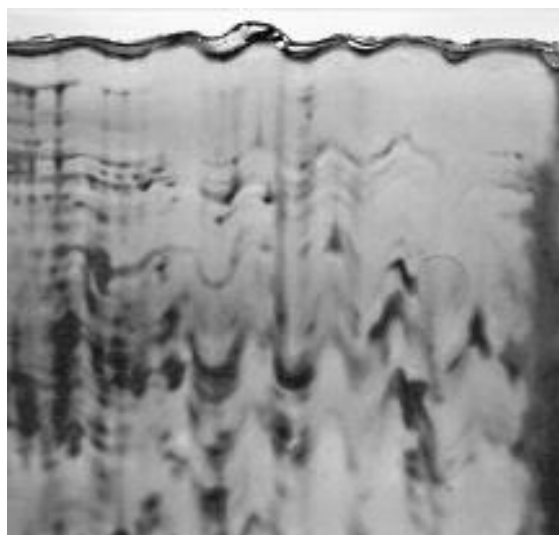
A gélképen látható probléma (a spotok függőleges irányban megnyúltak, 3. gélkép) háttérében több különböző tényező is állhat. Leggyakrabban a nem megfelelő ekvilibrálás okozza a gondot, ilyenkor célszerű 15 percre emelni az ekvilibrálás időtartamát. Az ekvilibráláshoz használt régi DTT és/vagy iodoacetamid reagens is vezethet ilyen mintázathoz. Ebben az esetben friss ekvilibráló puffert kell készítenünk új reagensekből. Néha előfordul, hogy az elektroforézis egység felső puffertartálya ereszt, futtatás közben a puffer egy része elfolyik, ez a jelenség is okozhatja ezt a függőleges irányú megnyúlást. Az üveglapokat kicsit megnedvesíthetjük, mielőtt betesszük az elektroforézis egységbe, így jobb tapadást érhetünk el, ami megakadályozza az eresztést.

4. gélkép



Az első dimenzióban használt IPG strip megsérült (4. gélkép). Amikor az SDS tartalmú poliakrilamid gélekre helyezük az IPG stripeket, akkor egy csipesz segítségével toljuk a stripet a megfelelő pozícióba. Ilyenkor nagy körültekintéssel kell eljárunk, ugyanis a stripek már tartalmazzák a fókuszált fehérjéket és a csipesszel könnyedén megsérthetjük a vékony gél felületet.

5. gélkép



A hullámos mintázatot a második dimenziós SDS gél felületének egyenetlensége okozza (5. gélkép). A gélöntést követően rétegezzük vízzel telített izopropanolt a gélek tetejére, így egy tiszta, egyenes felületet hozhatunk létre.

## 5. Egydimenziós poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)

Az egydimenziós poliakrilamid gélelektroforézis során molekulásúly szerint választhatjuk el a fehérjéket. Az elektroforézis előtt a mintákat SDS-sel kell forralni, ezáltal egységes negatív töltést kapnak a fehérjék, így a poliakrilamid gél pórusainak szűrő hatására méret szerint elkülöníthetők egymástól.

### Szükséges eszközök:

- Latexmentes kesztyű
- Üveglapok
- Gélöntő állvány
- Mágneses keverő
- Mágnes
- Üvegpohár
- Analitikai mérleg
- Vízfürdő
- 500 ml-es mérőhenger
- Elektroforézis készülék (Clever Scientific)
- Tápegység (Bio-Rad)
- Pipetta 0,2-10  $\mu$ l
- Pipetta 10-100  $\mu$ l
- Pipetta 200-1000  $\mu$ l
- Pipetta 1-5 ml
- Pipettahegyek
- Hegyledobó



**Szükséges vegyszerek, minták:**

dH<sub>2</sub>O, poliakrilamid, SDS, TEMED, ammónium-perszulfát, tris, urea, DTT, glicerol, glicin, brómfenolkék, tisztított fehérje minta

**A munka menete:**

Az egydimenziós poliakrilamid gélelektroforézis során molekulásúly szerint választhatjuk el a fehérjéket. Az elektroforézis előtt a mintákat SDS-sel kell forralni, ezáltal egységes negatív töltést kapnak a fehérjék, így már csak a molekulásúlyukban különböznek egymástól.

1. Ellenőrizzük, hogy a gélöntéshez használt üveglapok megfelelő tisztaságúak-e, amennyiben nem, mosószeres vízzel, majd desztillált vízzel mossuk azokat.
2. Összeillesztünk egy rövidebb és egy távtartókkal ellátott üveglapot, majd behelyezzük a két lapot a gélöntő állványba, úgy hogy a rövidebb az állvány belseje felé nézzen. A másik oldalon is ugyanígy elhelyezünk két üveglapot, majd az egész szerkezetet a gumipadra szorítjuk két kar segítségével.
3. Egy 50 ml-es üvegpohárban összeállítjuk az elválasztó gélhez szükséges oldatot, melynek összetételét az 1. táblázatban láthatjuk. (Az akrilamid veszélyes reagens, súlyos idegrendszeri károsodást okoz, ezért a gélek készítésekor különös körültekintéssel dolgozzunk vele.) Az összemért reagenseket lassan kevertetjük egy mágneses keverőn. A kész oldatot a két üveglap közé pipettázzuk, úgy hogy a folyadék szintje kb. 2 cm-re legyen a kisebb üveglap tetejétől.
4. Az elválasztó gél polimerizációs ideje kb. 15-20 perc. Ezalatt elkészítjük a gyűjtő gél (1. táblázat), melyet az elválasztó gél megszilárdulását követően rápipettázunk erre az alsó géltre és rögtön a két üveglap közé helyezünk egy fésűt, mely a minta felvitelére szolgáló zsebeket alakítja ki. A fésű elhelyezésekor különösen figyelniünk kell, hogy ne legyenek levegőbuborékok a gél felszínén.
5. A fehérje mintákból mintatípustól függően 10-30 µg fehérjét viszünk fel a géltre, melyekhez 1:2 arányban adunk SDS tartalmú puffert (10% SDS, 10 mM DTT, 20% glicerol, 0,2 M pH 6,8 Tris HCl, 8 M urea, brómfenolkék). Az így előkészített fehérje mintákat 5 percig 95 °C-os vízfürdőben inkubáljuk.

- Az elektroforézishez szükséges futtató puffert egy 0,25 M Tris; 1,92 M Glicin; 1% SDS összetételű pufferből tízszeres hígítással állítjuk elő. 50 ml tömény pufferhez 450 ml dH<sub>2</sub>O-t adunk, ez az 500 ml egy futtatókád (2 gél) feltöltéséhez elegendő.
- A gélöntő állványt behelyezzük a futtatókádba, ügyelve az anód és katód megfelelő pozíciójára. Majd a gélek által kialakított belső puffer tartályt felöntjük a futtató pufferrel, úgy hogy átfolyjon a külső puffer tartályba is.
- A mintákat ill. egy molekulasúly markert (5 µl) pipettával betöltünk a zsebekbe.
- Az első 10 percben 80 V-on futtatjuk a mintákat, majd felemeljük a feszültséget 160 V-ra. Az elektroforézist mindaddig végezzük, míg a jelző festék (brómfenolkék) el nem éri a gél alját.

1. táblázat: A gyűjtő és az elválasztó gél összetétele (egy géltre elegendő mennyiség)

Gyűjtő gél		Elválasztó gél	
desztillált H <sub>2</sub> O	2,25 ml	desztillált H <sub>2</sub> O	3,34 ml
40% Akrilamid	350 µl	40% Akrilamid	2,58 ml
0,5 M Tris (pH 6,8)	0,875 ml	1,5 M Tris (pH 8,8)	2 ml
10% SDS	35 µl	10% SDS	80 µl
10% Ammonium-persulfate	30 µl	10% Ammonium-persulfate	75 µl
TEMED	3,5 µl	TEMED	7,5 µl

## 6. Kétdimenziós differenciáló gélelektroforézis (2D-DIGE)

Az egyik legmodernebb gél-alapú eljárás a fehérjék jelölésére és elválasztására a kétdimenziós differenciáló gélelektroforézis (Two Dimensional - Difference In Gel Electrophoresis, 2D-DIGE).

Ennél a módszernél a mintában lévő fehérjéket már a kétdimenziós elválasztás előtt megjelöljük fluoreszcens festékekkel (Cyanine2, Cyanine3, Cyanine5). Külön jelölést kap a kontroll és a kezelt csoport, valamint a belső standard, melyet a kísérletben szereplő összes minta elegyéből hozunk létre. Így válik lehetségessé, hogy egy gélben fut a kontroll és a kezelt csoport mintája, valamint a belső standard is. Ezek a fluoreszcens festékek más-más hullámhosszon gerjeszthetők, melyek nem fednek át egymással, a jelölés kémiai hátterében az áll, hogy a fehérjék lizin  $\epsilon$ -aminocsoportjával N-hydroxysuccinimide észtert képez a festék.

Ezzel a módszerrel csökkenthetőek az eltérő futtatásokból eredő különbségek a géleképeken, valamint a belső standard használatával a gélelemzés pontosabbá tehető.

### Szükséges eszközök:

- Latexmentes kesztyű
- Üveglapok
- Gélöntő állvány
- Mágneses keverő
- Mágnes
- Üvegpohár
- 1,5 ml-es csövek, 1,5 ml-es csőtartó
- Protean IEF Cell
- Rehidratáló tálca
- Fókuszáló tálca
- Csipesz
- Horizontális rázó gép
- Analitikai mérleg



- 500 ml-es mérőhenger
- Elektroforézis készülék (Clever Scientific)
- Tápegység (Bio-Rad)
- Pipetta 0,2-10  $\mu$ l
- Pipetta 10-100  $\mu$ l
- Pipetta 200-1000  $\mu$ l
- Pipetta 1-5 ml
- Pipettahegyek
- Hegyledobó
- Vortex

#### **Szükséges vegyszerek, minták:**

CyDye DIGE Fluor Kit (GE Healthcare), dH<sub>2</sub>O, poliakrilamid, SDS, TEMED, ammónium-persulfát, tris, urea, DTT, CHAPS, glicerol, glicin, lizin, brómfenolkék, tisztított fehérje minta

#### **A munka menete:**

1. A -80 °C-on tárolt mintából 500 mg-ot kimérünk, dörzsmozsárban folyékony nitrogénnel porrá törjük. A homogenizált mintából 50 mg-ot kimérünk egy eppendorf csőbe és hozzáadunk 1 ml DIGE kompatibilis lízis puffert: 7 M urea, 2 M thiourea, 4 m/V% CHAPS, 30 mM Tris (pH 8,5).
2. Az elegyet jégen inkubáljuk 60 percig, közben 10 percenként vortexeléssel homogenizáljuk. Ezt követően a mintákat 45 percig centrifugáljuk 10000 g-n, ennek következtében két fázis alakul ki a csőben. Az alsó fázis tartalmazza a sejttörmeléket, míg a felső fázis (felülúszó) az oldatba vitt fehérjéket. A felülúszót a további felhasználásig -80 °C-on tároljuk. A fehérje oldatok koncentrációját a 2. fejezetben leírtak szerint határozzuk meg.
3. A minták jelölésére CyDye DIGE Fluor Kit-et (GE Healthcare) használunk. Cy3 festékekkel a kontroll csoportba tartozó állatok mintáit jelöljük, míg a Cy5 festékekkel a

kezelt csoportba tartozó egyedek mintáit. A két csoport összes egyedének mintáiból létrehozunk egy mixet, melyet a Cy2 festékekkel jelölünk és a későbbiekben a gélek szoftveres elemzése során ezeket a mintákat használjuk belső standard-ként.

4. A fehérjék jelölését a gyártó utasításainak megfelelően végezzük, 50 µg fehérjéhez 400 pmol CyDye festéket adunk (2 µl). A jelölt fehérje oldatot vortexelést követően sötétben, jégen 30 percig inkubáljuk. A jelölési folyamat leállításához 1 µl 10 mM lizin oldatot használunk, így megkötvén a fel nem használt festéket, majd ismételt vortexelést követően 10 percig sötétben, jégen inkubáljuk a csöveket. Az így előkészített mintákat egy 8 M urea, 130 mM DTT, 4 m/V% CHAPS, 2 V/V% 100X Bio-Lyte 3/10 ampholyte (a pH 5-8-as stripeknél 4/6 és 6/8-as ampholytot használtunk 1:2 arányban) tartalmú pufferben vesszük fel.
5. A fehérjék első és második dimenziós elválasztását a 4. fejezetben leírtak szerint végezzük. Mintánként 50 µg fehérjét viszünk fel az egyes stripekre (Cy2 50 µg, Cy3 50 µg, Cy5 50 µg) így egy IPG stripben összesen 150 µg fehérjét tudunk elválasztani. Az izoelektromos fókuszálást megelőzően a stripeket passzívan rehidratáljuk a mintákat is tartalmazó rehidratáló oldatban (2 M thiourea, 7 M urea, 4 m/V% CHAPS, 13 mM DTT, 1 V/V% Bio-Lyte 4/6 és 6/8 ampholyte 1:2 arányban, 0.002 m/V% brómfenolkék).
6. A második dimenziós elválasztást követően a Cy2 (belső standard), Cy3 és Cy5 festékekkel jelölt fehérjék láthatóvá tételére Molecular Imager Phorox Plus System (Bio-Rad) készüléket használunk. Ez a gélszkennelő berendezés lehetővé teszi, hogy az egyes festékeket a saját gerjesztési hullámhosszukon emittáló lézerrel szkennelve láthatóvá váljon a fehérje mintázat, így gélenként 3 gélképet kapunk. A fluoreszcens jelölés detektálását követően, a géleket Coomassie G-250 festékekkel is megfesthetjük, erre azért van szükség, hogy a spotok szabad szemmel is láthatóvá váljanak.

## 7. Fehérjék detektálása

A fehérjék detektálásának hagyományos módja valamilyen festési eljárás. A leggyakrabban az ún. Coomassie blue (érzékenység: 10ng/fehérjefolt) festést alkalmazzák, ennek az az oka, hogy egyszerű, olcsó, ugyanakkor tömegspektrométerrel kompatibilis festék.

A poliakrilamid gélelektroforézist követően a géleket ki kell venni a két üveglap közül. Egy spatulát bedugunk az üveglapok közé és óvatosan szétfeszítjük azokat. A gél az alsó vagy a felső üveglapra tapad, a spatula segítségével a stripet levágjuk a gélről. Egy festő edénybe 200-300 ml desztillált vizet töltünk, majd ebbe óvatosan beletesszük a géleket.

### Szükséges eszközök:

- Latexmentes kesztyű
- Festő edények
- Horizontális rázógép
- Mérőhengerek

### Coomassie alapú festés

### Szükséges vegyszerek, minták:

dH<sub>2</sub>O, CBB G-250, alumínium szulfát-(14-18)-hidrát, etanol (96%), ortofoszforsav

### A munka menete:

1. A Coomassie alapú festést megelőzően a géleket háromszor mossuk desztillált vízzel.
2. Áthelyezzük a géleket 200 ml Coomassie festékoldatba, melynek összetétele: 0,02 m/V% CBB G-250, 5 m/V% alumínium szulfát-(14-18)-hidrát, 10 V/V% etanol (96%), 2 V/V% ortofoszforsav (85%). A festékoldat elkészítése során először az alumínium-szulfátot oldjuk fel vízben, majd hozzáadjuk az etanolt és a CBB G-250 festék port. Amikor a festék teljesen feloldódott, hozzáadhatjuk a foszforsavat,

ilyenkor a Coomassie molekulák kolloid állapotba kerülnek. Utolsó lépésként vízzel kiegészítjük a kívánt térfogatra. A festékkoldatot felhasználás előtt jól fel kell ráznunk, hogy a kolloid részecskéket eloszlassuk.

3. Egy éjszakán át inkubáljuk ebben az oldatban a géleket, 10 perc után már megjelennek az első spotok, 2 órán belül kb. a 80%-át láthatjuk a foltoknak, a 100%-os maximumot az egész éjszakai inkubálással érhetjük el. A festést követően óvatosan leöntjük az oldatot a gélekről, majd kétszer mossuk azokat desztillált vízzel. Végül az ún. „destaining” oldat segítségével eltávolítjuk a felesleges festéket. A destaining oldat összetétele: 10 V/V% etanol (96%) és 2 V/V% ortofoszforsav (85%). A gélek további tárolása +4 °C-on történik.

### **Ezüst festés**

A Coomassie festésnél érzékenyebb az ezüst-nitráttal vagy fluoreszcens festékekkel történő festés (érzékenység: 1 ng/fehérjefolt). Ennél a módszernél a poliakrilamid gélt először ezüsttel telítik, majd eltávolítják a gélmátrixhoz kötött fémionokat és redukálják a fehérjéhez kötött ezüstöt.

#### **Szükséges vegyszerek, minták:**

dH<sub>2</sub>O, metanol, ecetsav, nátrium-tioszulfát, ezüst-nitrát, formaldehid, nátrium-karbonát, ecetsav

#### **A munka menete:**

1. Elsőként elkészítjük a fixáló oldatot, mely fixálja a fehérje molekulákat és eltávolítja az interferáló anyagokat (pl.: SDS, Tris) a gélből. 50 ml metanolhoz 5 ml ecetsavat adunk, majd desztillált vízzel kiegészítjük 100 ml-re. Ebben az oldatban 2 órán át vagy egy teljes éjszakán keresztül inkubáljuk a géleket.
2. A fixálást követően metanolos oldattal (50 ml metanol + 50 ml dH<sub>2</sub>O) 20 percig mossuk a géleket. Majd desztillált vízzel kétszer 15 percig folytatjuk a mosást.
3. Az érzékenyítéshez nátrium-tioszulfát oldatot használunk, a nátrium-tioszulfát kapcsolódik a fehérjékhez, melyek így képessé válnak az ezüst ionok megkötésére.



31,6 mg nátrium-tioszulfátot 100 ml desztillált vízben oldunk fel, az érzékenyítő oldatot maximum 5 perccel felhasználás előtt kell elkészíteni. Az inkubálás időtartama 3 perc.

4. Kétszer 1 percig mossuk desztillált vízzel a géleket.
5. A festés során az 1%-os ezüst-nitrát törzsoldatból (1 g ezüst-nitrát 100 ml-re kiegészítve desztillált vízzel) 15 ml-t kimérünk és 85 ml dH<sub>2</sub>O-val 100 ml-re kiegészítjük. Az inkubálás időtartama 30 perc.
6. Kétszer 2 percig mossuk desztillált vízzel a géleket.
7. Az előhívási lépésben válnak láthatóvá a fehérje foltok a gélen. Az előhívó oldat végtérfogata 200 ml, mely 4 g nátrium-karbonátot és 80 µl formaldehidet tartalmaz. Először kb. 50 ml oldatot öntünk a géltre, sötét sárgás-barnás színűre vált ez az oldat, mivel a felesleges ezüst kimosódik a gélből, ezt leöntjük, majd ismét 50 ml-t öntünk rá, ez az oldat is barnás színű lesz még. Végül a maradék 100 ml oldatban addig inkubáljuk a gélét, míg a fehérje foltok láthatóvá válnak.
8. Az előhívás leállításához használt oldat 1 ml ecetsavat és 99 ml dH<sub>2</sub>O-t tartalmaz. Az ezüstfestés nem végpontos festés (nem tudjuk megadni azt az időtartamot, amennyi idő alatt eléri a festés az intenzitásának a maximumát, ezért túl lehet hívni), tehát nekünk kell kiválasztanunk a megfelelő pillanatot az előhívás leállításához.

2. táblázat: Az ezüst festés lépéseinek összefoglalása

Lépések	Vegyszerek	Inkubálási idő
1. fixálás	50 V/V% metanol, 5 V/V% ecetsav	2 óra
2. mosás	50 V/V% metanol dH <sub>2</sub> O	20 perc 2X15 perc
3. érzékenyítés	1,27 mM nátrium-tioszulfát	3 perc
4. mosás	dH <sub>2</sub> O	2X1 perc
5. festés	0,15 m/V% ezüst-nitrát	30 perc
6. mosás	dH <sub>2</sub> O	2X2 perc
7. előhívás	0,04 V/V% formaldehid 2 m/V% nátrium-karbonát	a fehérje spotok megjelenéséig
8. leállítás	1 V/V% ecetsav	5 perc



## Fluoreszcens festés

A fluoreszcens festék az ezüst festéssel azonos érzékenységű festés. A fluoreszcens festékek közül leggyakrabban a SyproRuby festéket használják, ez is tömegspektrométerrel kompatibilis és az ezüst-festéssel ellentétben végpontos festési eljárás.

### **Szükséges vegyszerek, minták:**

dH<sub>2</sub>O, metanol, ecetsav, Sypro Ruby Protein Gel Stain (Lonza)

### **A munka menete:**

1. A géleket először egy prefixáló oldatba helyezzük, melynek összetétele: 50% metanol, 10% ecetsav (50 ml metanol, 10 ml ecetsav, 40 ml dH<sub>2</sub>O). Ebben az oldatban 12 órán keresztül inkubáljuk a géleket.
2. A festő oldatból (Sypro Ruby Protein Gel Stain) 100 ml-t használunk, melyben 24 órán keresztül festjük a géleket.
3. A festést követő postfixáló oldat összetétele: 10% metanol, 7% ecetsav (10 ml metanol, 7 ml ecetsav, 83 ml dH<sub>2</sub>O). Ebben az oldatban 30 percig inkubáljuk a géleket.
4. A gélen lévő fehérje mintázat láthatóvá tételére Molecular Imager PharosFX Plus System (Bio-Rad) készüléket használunk. A fluoreszcens festés intenzitását 532 nm-en detektáljuk.

## 8. Gélképek elemzése

Ugyanaz a spot (fehérjefolt a gélen) ugyanolyan futtatási paraméterek mellett sem mindig ugyanott helyezkedik el a gélen. Ennek több oka is lehetséges: inhomogén poliakrilamid, különbségek a hőmérsékletben, különbségek az áramerősségben. Ezáltal nehézkesé válik a gélképek összehasonlítása és az expressziós különbségek detektálása. A gélelemző szoftverek segítségével csökkenthető a festésből adódó háttérzaj, elvégezhető a spotok párosítása (matching), a gélek egymásra illesztése (warping), fúziós gélek létrehozása, a spotok detektálása és kvantifikálása, valamint statisztikai próbák alkalmazása. A legismertebb gélelemző szoftverek: Delta2D (Decodon, Germany) PDQuest, ProteomWeaver (Bio-Rad, USA), SameSpots, Progenesis (Nonlinear Dynamics, UK), Decyder 2D (GE Healthcare).

A gélképek szoftveres elemzését a Delta2D (Decodon™ GmbH, Germany) program segítségével végezzük. A 2D-PAGE és a 2D-DIGE módszerrel készített gélképek elemzése eltérő.

A 2D-PAGE gélképek elemzésének 5 legfontosabb lépése a gyártó használati utasítása alapján:

### 1. lépés: Új projekt létrehozása

- Csoportok kialakítása és elnevezése.
- Gélképek feltöltése a megfelelő csoportba.

### 2. lépés: Gélek illesztés

- Illesztési stratégia kiválasztása (warp strategy): a leggyakrabban használt illesztési stratégia az ún. „group warping strategy”, mely során egy csoporton belül az első gélképhez hasonlítja a többit, majd a csoportok első gélképeit egymáshoz (1. ábra).
- A „job manager” alkalmazásával a program automatikusan elvégzi az illesztéseket, erre azért van szükség, hogy a különböző futtatásokból adódó esetleges elcsúszások az elemzést ne befolyásolják.

- Az illesztés manuálisan pontosítható, a program vektorokkal párosítja össze a különböző gélen lévő azonos spotokat, a vektorok szerkeszthetőek, törölhetőek, ill. újak is hozzáadhatók.



1. ábra: Illesztési stratégia (2D-PAGE)

Forrás: Delta2D ([www.decodon.com](http://www.decodon.com))

### 3. lépés: A fehérje foltok detektálása és számszerűsítése

- Fúziós gél létrehozása, amelyen a géleken jelen lévő összes fehérjefolt megtalálható.
- Fehérje foltok detektálása a fúziós gélen. A program minden olyan intenzitásváltozást megjelöl, melyet fehérjeként értelmez. A szoftver a fehérjefoltok intenzitását százalékos (V%) adatként határozza meg. A V% egy fehérjefoltra vonatkoztatva azt adja meg, hogy a detektált intenzitás hány %-a az összes detektált fehérjefolt intenzitásának. A szoftver figyelembe veszi a pixelek számát és azok szürke (fehér – fekete) skálán kifejezhető intenzitását. Az abszolút értékkel szemben, a fehérjefolt intenzitás % esetében a felvitt fehérjemennyiségek közötti eltérésekből adódó hiba nem torzítja az eredményt.
- A detektált fehérje foltokat utólag manuálisan pontosíthatjuk. Lehetőségünk van új foltok kijelölésére és törölhetünk is olyan foltokat, melyeket a program fehérjeként értelmez, de csak szennyeződések. Gyakran előfordul, hogy egy fehérje foltot két foltként

azonosít a szoftver, ilyenkor ezeket összevonhatjuk, illetve ellenkező esetben egy foltot két- vagy többfelé „vághatunk”. A foltok szerkesztését csak a fúziós gélen végezzük el!

- A detektált foltokat ezután transzferáljuk az összes gélképre, ezáltal lehetőségessé vált az eredmények összehasonlítása.

#### **4. lépés: Expressziós mintázat elemzése**

- Az egyes gélképeken látható fehérje foltokhoz tartozó számadatokat az ún. „quantitation table” tartalmazza. A V% értékek mellett a táblázatból leolvashatjuk például a foltok pozícióját a gélen, területüket, az azonosítójukat vagy V értéküket (abszolút intenzitás). A „quantitation table”-ben található adatok szinkronizálva vannak a Delta2D program többi nézetével. Például ha egy folthoz tartozó értéket kijelölünk ebben a táblázatban, akkor az a folt mindegyik gélképen jelölve lesz

- A program keretén belül számos statisztikai próbát használhatunk az adatok értékelésére: pl. varianciaanalízis (ANOVA), T-próba, Wilcoxon Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, Mack-Skillings, Fisher-Exact tesztek, főkomponens-analízis.

- Két vizsgálati csoport összehasonlítása esetén általában kétmintás T-próbát használunk az expressziós különbségek detektálására.

#### **5. lépés: Eredmények prezentálása**

- Több lehetőséget is biztosít a program az eredmények bemutatására. Készíthetünk egy projekt összefoglalót, mely tartalmazza az általános információkat a mintákról, a csoportokról, a gélekről, stb. Az általunk kiválasztott foltokból létrehozhatunk egy ún. folt albumot, mely az adott foltok képét és adatait tartalmazza.

- Eredményeinket exportálhatjuk MS Excel ill. MS PowerPoint formátumba.

A 2D-DIGE módszer esetén is az előzőekben ismertetett 5 lépésben végezzük el a gélképek elemzését, azonban a belső standard használata miatt bizonyos beállítások eltérőek. A gyártó használati utasítása alapján az elemzés fontosabb lépései a következők:

#### **1. lépés: Új projekt létrehozása**

- Csoportok kialakítása és elnevezése.

- Gélképek feltöltése a megfelelő csoportba.

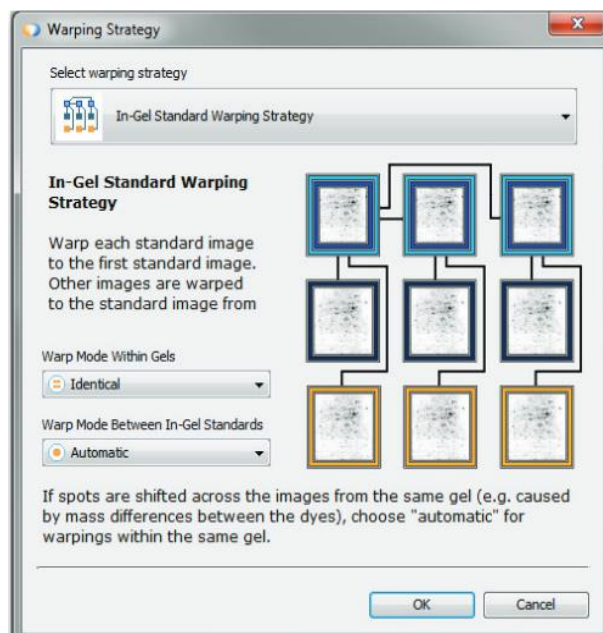
- A „Gel Image Attributes” fül alatt ki kell választanunk, mely gélek tartoznak a belső standardok közzé (rendszerint a Cy2-vel jelöljük a belső standardot), ill. melyik mintát melyik festékkel jelöltük.

## 2. lépés: Gélek illesztés

- Illesztési stratégia kiválasztása (warp strategy): A DIGE módszer használata esetén mindig azt az opciót kell választanunk, mely lehetővé teszi a belső standardok használatát. Az illesztési stratégiák közül ennek a feltételnek az ún. „in-gel standard warping strategy” felel meg. Ebben az esetben, az ugyanabban a gélben futtatott egyedek gélképeit illeszti a velük együtt futtatott belső standard gélképére, majd a standardokat az általunk kiválasztott első standard gélhez illeszti (2. ábra).

- A „job manager” alkalmazásával a program automatikusan elvégzi az illesztéseket, erre azért van szükség, hogy a különböző futtatásokból adódó esetleges elcsúszások az elemzést ne befolyásolják.

- Az illesztés manuálisan pontosítható, a program vektorokkal párosítja össze a különböző gélen lévő azonos spotokat, a vektorok szerkeszthetőek, törölhetőek, illetve újak is hozzáadhatóak.



2. ábra: Illesztési stratégia (2D-DIGE)

Forrás: Delta2D ([www.decodon.com](http://www.decodon.com))

### 3. lépés: A fehérje foltok detektálása és számszerűsítése

- Fúziós gél létrehozása, amelyen a géleken jelen lévő összes fehérjefolt megtalálható.
- A fúziós gél létrehozásakor a belső standard gélképeit nem használjuk.
- Fehérje foltok detektálása a fúziós gélen. A program minden olyan intenzitásváltozást megjelöl, melyet fehérjeként értelmez. A szoftver a fehérjefoltok intenzitását százalékos (V%) adatként határozza meg. A belső standard használata esetén, a standard gélen lévő adott fehérje foltot veszi 100%-nak és ehhez viszonyítja ugyanazon fehérje folt intenzitását a két vizsgálati csoportban. A szoftver figyelembe veszi a pixelek számát és azok szürke (fehér – fekete) skálán kifejezhető intenzitását. Az abszolút értékkel szemben, a fehérjefolt intenzitás % esetében a felvitt fehérjemennyiségek közötti eltérésekből adódó hiba nem torzítja az eredményt.
- A detektált fehérje foltokat utólag manuálisan pontosíthatjuk. Lehetőségünk van új foltok kijelölésére és törölhetünk is olyan spotokat, melyeket a program fehérjeként értelmez, de csak szennyeződések. Gyakran előfordul, hogy egy fehérje foltot két foltként azonosít a szoftver, ilyenkor ezeket összevonhatjuk, illetve ellenkező esetben egy foltot két- vagy többfelé „vághatunk”. A foltok szerkesztését csak a fúziós gélen végezzük el!
- A detektált foltokat ezután transzferáljuk az összes gélképre, ezáltal lehetségessé vált az eredmények összehasonlítása.

### 4. lépés: Expressziós mintázat elemzése

- Az egyes gélképeken látható fehérje foltokhoz tartozó számadatokat az ún. „quantitation table” tartalmazza. A V% értékek mellett a táblázatból leolvashatjuk például a foltok pozícióját a gélen, területüket, az azonosítójukat vagy V értéküket (abszolút intenzitás). A „quantitation table”-ben található adatok szinkronizálva vannak a Delta2D program többi nézetével. Például ha egy foltot tartozó értéket kijelölünk ebben a táblázatban, akkor az a folt mindegyik gélképen jelölve lesz.
- A program keretén belül számos statisztikai próbát használhatunk az adatok értékelésére: pl. varianciaanalízis (ANOVA), T-próba, Wilcoxon Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, Mack-Skillings, Fisher-Exact tesztek, főkomponens-analízis.
- Két vizsgálati csoport összehasonlítása esetén általában kétmintás T-próbát használunk az expressziós különbségek detektálására.



### **5. lépés: Eredmények prezentálása**

- Több lehetőséget is biztosít a program az eredmények bemutatására. Készíthetünk egy projekt összefoglalót, mely tartalmazza az általános információkat a mintákról, a csoportokról, a gélekről, stb. Az általunk kiválasztott spotokból létrehozhatunk egy ún. spot albumot, mely az adott spotok képét és adatait tartalmazza.
- Eredményeinket exportálhatjuk MS Excel, illetve MS PowerPoint formátumba.

## 9. Gélben emésztés (in-gel digestion)

A gélben emésztés célja, hogy a gélben levő fehérjékből egyedi enzimek vagy enzim kombinációk felhasználásával peptid keveréket állítson elő, amelyet majd tovább lehet analizálni tömegspektrométer segítségével.

A gélben emésztés során az előzőleg poliakrilamid gélelektroforézissel elválasztott fehérjéket emésztjük meg a kívánt enzimmal – az esetek nagy részében tripszinnel – majd a keletkezett peptideket kivonjuk a gélből. A gélben emésztésnek két fő előnye van. Egyrészt az olyan puffer összetevőket, amelyek interferálhatnak a későbbi tömegspektrometriás analízissel (pl. detergenssek) vagy az enzimes emésztéssel (pl. proteáz inhibitorok) eltávolíthatjuk, másrészt a gélben a fehérjék denaturált, kitékert állapotban vannak, ezért az emésztő enzimek jobban hozzáférnek a hasító helyekhez.

A gélben emésztés első lépésében a kívánt fehérjét tartalmazó sávokat kivágjuk, a jobb diffúziós paraméterek elérése érdekében kb.  $1 \text{ mm}^3$  nagyságú kockákra feldaraboljuk, majd kimossuk a poliakrilamid gélelektroforézis után, a fehérjék vizualizálására alkalmazott festéket. Ez után következik a fehérjékben levő diszulfid hidak redukálása dithiothreitol (DTT) vagy trisz(2-karboxietil)foszfin (TCEP) segítségével, majd a keletkező –SH csoportokat alkiláljuk jódacetamid (IAA) vagy metil-metantioszulfonát (MMTS) felhasználásával, ezáltal megakadályozzuk a diszulfid hidak újraalakulását. Az esetek nagy részében a DTT és jódacetamid párost szoktuk használni, de olyan esetekben, amikor a pH problémát jelenthet a pH érzékeny DTT számára, vagy fokozatosabb, kíméletesebb, de ugyanakkor hatásos redukálást kívánunk elérni, akkor TCEP-t használunk. A IAA és MMTS egyaránt jól működik, a IAA olcsóbb, viszont az MMTS kevésbé mérgező.

A redukálás és alkilálás után következik az enzimes emésztés. Az enzimes emésztés az esetek nagy részében tripszinnel történik, mivel a tripszin nagyon specifikus, a polipeptid láncban levő arginin (Arg, R) vagy lizin (Lys, K) után hasít, így a keletkező peptidek C-terminális végén pozitív töltésű Lys vagy Arg oldallánc lesz. Ennek a tömegspektrometriás analízis során van óriási jelentősége.

Az emésztés után a peptidek kivonása, extrahálása következik. Ez különböző mennyiségű szerves oldószert tartalmazó pufferek segítségével történik, majd a keletkező peptideket tartalmazó elegyet beszárítjuk és a tömegspektrometriás analízis megkezdéséig  $-20^\circ\text{C}$ -on tároljuk.



Az egyes redukáló-, alkiláló ágensek és az enzim hozzáadása előtt a géldarabokat beszárítjuk, hogy a hozzáadott oldatok gyorsabban beszívódjanak, ezáltal hamarabb fejtsék ki a hatásukat. Az egyes oldatok elkészítésénél pufferként általában ammónium bikarbonát oldatot használunk, amely biztosítja a tripszin számára optimális pH értéket. Más enzimek használatakor mindig ügyelni kell a megfelelő puffer biztosítására!

A tömegspektrometriás analízisek során nagy problémát jelenthet a gyakran előforduló keratin-szennyeződés. A mintába kerülve a keratin a minta fehérjéivel együtt emésztődik meg, és nagyon sok keratinra jellemző jelt detektálunk a tömegspektrometriás analízis során, vagy a kis, de még kimutatható mennyiségben, jelen levő fehérjék esetében a keratin teljesen elfedheti a mintából érkező jeleket, olyannyira, hogy csak a keratin jelenlétét tudjuk detektálni. A keratin megtalálható a bőrben, hajban. A haj hullásával, a bőr természetes hámlásával (főleg száraz bőrék esetén) jelentős mennyiségű keratin jut a laboratóriumi berendezésekre, a laborköpenyre vagy megtalálható a laboratóriumi porban is. Ezért a keratin szennyeződés elkerülése igazi kihívást jelent a proteomikai laboratóriumok számára. A megfelelő keratinmentes környezet biztosítása érdekében, kiemelt figyelmet kell fordítani a tisztaságra, a védőfelszerelések használatára és a megfelelő szabályok betartására. Célszerű a laboratóriumban keratin-mentes környezetet/részt kialakítani és kesztyű nélkül vagy koszos kesztyűvel nem szabad a keratinmentes részben levő eszközöket megérinteni! Fontos szem előtt tartani, hogy a sterilitás nem feltétlenül jelent keratin mentességet is!

### **Szükséges eszközök:**

- Vizsgálni kívánt gél vagy előre kivágott gélsávok
- Keratinmentes fülke
- Egyszer használatos köpeny
- Hajvédő, szájmasc
- Púdermentes kesztyű
- Metanol vagy Etanol törléshez
- 1,5 ml-es csövek, 1,5 ml-es csőtartó
- Szőszmentes kendő
- Szike



- Lapos spatula
- Üveglap
- Pipetta 20-200  $\mu$ l
- Pipetta 0,5-10  $\mu$ l
- Pipettahegyek
- Loading hegyek
- Hegyledobó
- Vortex
- Centrifuga
- Speed-vac
- Hűtő/fagyasztó
- Blokktermosztát

**Oldatok:**

- DTT oldat /20 mM dithiothreitol 100 mM ammónium bikarbonát oldatban/
- IAA oldat /55 mM jódacetamid 100 mM ammónium bikarbonát oldatban/
- 50 mM ammónium bikarbonát oldat
- 25 mM ammónium bikarbonát 50% ACN-ben oldva
- 5 % ACN / 0,1 % TFA oldat
- 50 % ACN 0,1 % TFA oldat
- 1  $\mu$ l tripszin törzsoldat (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l)
- 1 % FA oldat
- MQ víz

**Rövidítések:**

ACN – acetonitril

IAA – jódacetamid



DTT – dithiothreitol

FA – hangyasav

TFA – trifluor-ecetsav

MQ – MilliQ víz, nagy tisztaságú víz

### **Egydimenziós gélelektroforézis során elválasztott fehérjék gélben emésztése**

#### **A munka menete:**

1. Gélkép alapján meghatározzuk és beszámozzuk a kivágandó sávokat. Ennek megfelelően 1,5 ml-es csöveket feliratozunk és kb. 0,5 ml MQ vízzel töltjük.
2. Keratinmentes környezet biztosítása: egyszer használatos köpeny, púdermentes kesztyű, hajvédő, köpenyvédő és szájmaszk viselése, új alufólia réteggel fedjük a vegyifülkét. Az üveglapot, szikét és spatulát metanolos/etanolos szöszmentes kendővel áttöröljük, majd az üveglap alá egy A4-es fehér lapot helyezünk.
3. Szikével a megfelelő gélsávot kivágjuk, 1 mm<sup>3</sup> –es darabokra felaprítjuk. Az egyes sávok kivágása között a szikét, spatulát és az üveg felületet metanolos/etanolos szöszmentes kendővel kell letörölni!
4. Több 1,5 ml-es cső esetén ügyelni kell, hogy a megfelelő gélsáv kerüljön a megfelelő számú 1,5 ml-es csőbe! A gélképen korrigálni kell az esetleges eltérést!
5. Festékmentesítés: Az MQ vizet loading hegygel leszívjuk, a pipetta hegyet üres állapotban félretesszük. A mintákra a gél mennyiségétől függően 100 - 150 µl 25 mM ammónium bikarbonát 50 % ACN oldatát pipetázzuk úgy, hogy jól ellepje, és 20 percig rázatjuk.
6. Loading hegygel leszívjuk a mosó oldatot és a pipetta hegyet félretesszük. Több sáv esetén ügyelni kell a kialakult sorrendre! A mosási lépést kétszer megismételjük, közben kivesszük a fagyasztóból a DTT és IAA oldatokat olvadni.
7. A mintákról leszívjuk a mosó oldatot. Rövid centrifugálás után teljesen leszívjuk a maradék oldatot és a géldarabokat speed-vacben 20-30 percig szárítjuk.

8. Redukálás: A gél mennyiségétől függően 100 - 150 µl DTT oldatot /20 mM dithiothreitol 100 mM ammónium bikarbonát oldatban/ pipettázunk rá, úgy hogy a géldarabokat ellepje!
9. Vortex és centrifugálás után 56 °C-on 1 órán át inkubálódik.
10. Alkilálás: Lehülés után röviden lecentrifugáljuk a mintát, hogy összegyűjtsük a kupakban lévő folyadékot is, majd leszívjuk a DTT oldatot. Ezután 100 - 150 µl IAA oldatot /55 mM jóacetamid 100 mM ammónium bikarbonát oldatban/ adunk hozzá.
11. Vortex és centrifugálás után szobahőmérsékleten, 45 percig, sötétben inkubáljuk.
12. IAA oldatot eltávolítjuk és 100 µl 25 mM ammónium bikarbonát 50 % ACN-ben oldatát pipettázuk rá, úgy hogy ellepje, majd 10 percig vortexeljük.
13. A mosási lépést kétszer megismételjük. Rövid centrifugálás után loading hegygel teljesen leszívjuk a maradék oldatot, majd a speed-vacben 20-30 perc alatt beszárítjuk.
14. Emésztés: A liofilizált gél darabokhoz mintánként 20 µl tripszin oldatot adunk: (jégen tartott 1 µl tripszin törzsoldat (0,5 µg/µl) + 99 µl 50 mM ammónium bikarbonát oldat). A tripszin oldat maradékát mintaként kezeljük és a mintával együtt inkubáljuk.
15. A mintát jégen rehidráljuk 15 percig, ez idő alatt a gél darabok megduzzadnak, majd annyi 50 mM ammónium bikarbonát oldatot mérünk rá, hogy azokat ellepje.
16. Emésztés: 37 °C-on 4 órán át, vagy szobahőmérsékleten 16 órán át inkubáljuk a mintát, majd az inkubálási idő elteltével hozzáadunk 1 µl koncentrált FA oldatot.
17. Vortex és centrifugálás után a keletkezett peptideket extraháljuk.
18. Extrahálás: Feliratozott, új 1,5 ml-es csövekbe loading hegygel átpipettázuk a felülúszót és a gél darabokhoz adott 100 µl 5 % ACN / 0,1 % TFA oldattal rázatjuk 30 percig.
19. Röviden centrifugáljuk és a felülúszót a 18. pontnál feliratozott csőbe tesszük.
20. A 18. lépést megismételjük, a felülúszót az előzőleg feliratozott 1,5 ml-es csőbe tesszük, a gél darabokhoz 100 µl 50 % ACN / 0,1 % TFA oldatát adjuk, és 30 percig rázatjuk.
21. Röviden centrifugáljuk, majd a felülúszót leszívjuk és az előzőleg feliratozott 1,5 ml-es csőbe tesszük. Rövid centrifugálás után loading hegygel teljesen leszívjuk a maradék oldatot és az extraktumokat tartalmazó 1,5 ml-es cső tartalmát beszárítjuk, majd mérésig -20 °C-on tároljuk.

## Kétdimenziós gélelektroforézis során elválasztott fehérjék gélben emésztése

A fenti protokoll gélelektroforézissel elválasztott fehérjék esetében érvényes. A kétdimenziós elektroforézis során kapott foltok emésztése is a fenti protokollnak megfelelően történik, annyi különbséggel, hogy a redukálás és alkilálás lépések itt nem szükségesek.

### A munka menete:

1. Keratinmentes környezet biztosítása: egyszer használatos köpeny, púdermentes kesztyű, hajvédő, köpenyvédő és szájmaszk viselése, új alufólia réteggel fedjük a vegyifülkét. Az üveglapot, szikét és spatulát metanolos/etanolos szőszmentes kendővel áttöröljük, majd az üveglap alá egy A4-es fehér lapot helyezünk.
2. Szikével a gélfoltot,  $1 \text{ mm}^3$ -es darabokra felaprítjuk.
3. Festékmentesítés: Az MQ vizet loading hegygel leszívjuk, a pipetta hegyet üres állapotban félretesszük, majd a mintákra a gél mennyiségétől függően 50 - 150  $\mu\text{l}$  25 mM ammónium bikarbonát 50 % ACN oldatát pipetázuk úgy, hogy jól ellepje, és 20 percig rázatjuk.
4. Loading hegygel leszívjuk a mosó oldatot és a pipetta hegyet félretesszük. Több minta esetén ügyelni kell a kialakult sorrendre! A mosási lépést kétszer megismételjük, közben kivesszük a fagyasztóból a DTT és IAA oldatokat olvadni.
5. A mintákról leszívjuk a mosó oldatot. Rövid centrifugálás után teljesen leszívjuk a maradék oldatot és a géldarabokat speed-vacben 20-30 percig szárítjuk.
6. Emésztés: A liofilizált gél darabokhoz mintánként 20  $\mu\text{l}$  tripszin oldatot adunk: (jégen tartott 1  $\mu\text{l}$  tripszin törzsoldat (0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 99  $\mu\text{l}$  50 mM ammónium bikarbonát oldat). A tripszin oldat maradékát mintaként kezeljük és a mintával együtt inkubáljuk.
7. A mintákat jégen rehidráljuk 15 percig, ez idő alatt a gél darabok megduzzadnak, majd annyi 50 mM ammónium bikarbonát oldatot mérünk rá, hogy azokat ellepje.
8. Emésztés: 37 °C-on, 4 órán át vagy szobahőmérsékleten, 16 órán át inkubálódik, majd hozzáadunk 1  $\mu\text{l}$  koncentrált FA oldatot és vortexeljük, majd az inkubálási idő elteltével hozzáadunk 1  $\mu\text{l}$  koncentrált FA oldatot.
9. Vortex és centrifugálás után a keletkezett peptideket extraháljuk.



10. Extrahálás: Feliratozott, új 1,5 ml-es csövekbe loading hegygel átpipetázzuk a felülúszót és a gél darabokhoz adott 100  $\mu$ l 5 % ACN / 0,1 % TFA oldattal rázatjuk 30 percig.
11. Röviden centrifugáljuk és a felülúszót a10. pontnál feliratozott csőbe tesszük.
12. Az extrahálást megismételjük, a felülúszót az előzőleg feliratozott 1,5 ml-es csőbe tesszük, a gél darabokhoz 100  $\mu$ l 50 % ACN / 0,1 % TFA oldatát adjuk és 30 percig rázatjuk.
13. Röviden centrifugáljuk, majd a felülúszót leszívjuk és az előzőleg feliratozott 1,5 ml-es csőbe tesszük. Rövid centrifugálás után loading hegygel teljesen leszívjuk a maradék oldatot és az extraktumokat tartalmazó 1,5 ml-es cső tartalmát beszárítjuk, majd mérésig -20 °C-on tároljuk.

## 10. Oldatban emésztés (in-solution digestion)

Az oldatban emésztés célja, hogy az oldatban levő fehérjékből egyedi enzimek vagy enzim kombinációk felhasználásával peptid keveréket állítson elő, amelyet majd tovább lehet analizálni tömegspektrométer segítségével.

Az oldatban emésztés során tetszőleges, oldatban lévő fehérjét emésztünk meg a kívánt enzimmel – az esetek nagy részében tripszinnel – majd a keletkezett peptideket bekonzentráljuk. Az oldatban emésztés fő előnye, hogy bármilyen minta esetében felhasználható, nem szükséges előzetes gélelektroforézis. Alkalmazható tisztított mintákon, pl. kromatográfiás elválasztás során gyűjtött frakciók esetében vagy nem tisztított mintákon, pl. teljes sejtlizátumon, élelmiszerekből származó kivonatokon, szűrleteken stb. A nem tisztított minták esetében nagy valószínűséggel a fehérjék mellett egyéb komponensek (pl. lipidek, nukleinsavak, szénhidrátok stb.) is jelen lehetnek a mintában, sok esetben célszerű ezek eltávolítása. A leggyakrabban triklór-ecetsavas (TCA) vagy acetonos kicsapást szoktak e célra alkalmazni, amely kicsapja a fehérjét és oldatban hagyja az egyéb komponenseket. A fehérje csapadékot centrifugálással össze lehet gyűjteni és a felülúszó eltávolítása után a csapadék mosásával, majd feloldásával tisztított fehérje mintát lehet nyerni. Fontos megjegyezni, hogy a fehérjék kicsapása során a fehérjék egy része csapódik ki, másik része oldatban marad, és ezt elveszítjük. A fehérje veszteség az alkalmazott protokolltól, a fehérje minta összetételétől stb. függően igen jelentős is lehet.

Az oldatban a fehérjék feltekeredett állapotban találhatók, emiatt az emésztő enzimek nehezebben férnek hozzá. Ahhoz, hogy a megfelelő hozzáférést biztosítsuk, valamilyen kaotrópikus/denaturáló ágens hozzáadása szükséges. Az esetek nagy részében ehhez ureát használnak, azonban egyes forgalmazók olyan felületaktív anyagokat ajánlanak (pl. RapiGest – Waters), amelyek alkalmasak, mind a fehérje szolubilizálására, mind az enzimaktivitás elősegítésére. Ha RapiGest felületaktív anyagot alkalmazunk, akkor azt az első lépésnél adjuk a mintához, majd a folyamatsor végén, a minta savasításával kicsapódik és centrifugálással eltávolítható a mintából.

Az oldatban emésztés további lépései hasonlóak a gélben emésztés lépéseéhez.

Az ureával történő denaturálás után következik a fehérjékben levő diszulfid hidak redukálása dithiothreitol (DTT) vagy trisz(2-karboxietil)foszfin (TCEP) segítségével, majd a keletkező –SH csoportok alkilálása jódacetamid vagy metil-metantioszulfonát (MMTS)

felhasználásával. Ezáltal redukáljuk a diszulfid hidakat és megakadályozzuk újraalakulásukat. Az esetek nagy részében a DTT és jódiacetamid párost szoktuk használni, de olyan esetekben, amikor a pH problémát jelenthet a pH érzékeny DTT számára, vagy fokozatosabb, kíméletesebb, de ugyanakkor hatásos redukálást kívánunk elérni, akkor TCEP-t használunk. A IAA és MMTS egyaránt jól működik, a IAA olcsóbb, viszont az MMTS kevésbé mérgező.

A redukálás és alkilálás után következik az enzimes emésztés. Az enzimes emésztés az esetek nagy részében tripszinnel történik, mivel a tripszin nagyon specifikus, a polipeptid láncban levő arginin (Arg, R) vagy lizin (Lys, K) után hasít, így a keletkező peptidek C-terminális végén pozitív töltésű Lys vagy Arg oldallánc lesz. Ennek a tömegspektrometriás analízis során van óriási jelentősége. Az emésztés előtt az urea koncentrációt csökkenteni kell, hogy ne akadályozzuk meg az emésztő enzim aktivitását. Ez a tripszin esetében 1M, azaz 1M urea mellett a tripszin még jól működik, de e fölötti értékek már jelentősen csökkentik az aktivitását.

Az emésztés után következik a peptideket tartalmazó oldat beszáritása. A beszáritott peptideket tartalmazó mintákat a tömegspektrometriás analízis megkezdéséig  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároljuk.

Pufferként általában ammónium bikarbonát oldatot használunk, amely biztosítja a tripszin számára optimális pH értéket. Más enzimek használatakor mindig ügyelni kell a megfelelő puffer biztosítására!

A tömegspektrometriás analízisek során nagy problémát jelenthet a gyakran előforduló keratin-szennyeződés. A mintába kerülve a keratin a minta fehérjével együtt emésztődik meg, és olyan mennyiségben van jelen általában, hogy nagyon sok keratinra jellemző jelt detektálunk a tömegspektrometriás analízis során. A kis, de még kimutatható mennyiségben jelen levő minta esetében a keratin teljesen elfedheti a mintából érkező jeleket, olyannyira, hogy csak a keratin jelenlétét tudjuk detektálni. A keratin megtalálható a bőrben, a hajban, a haj hullásával, a bőr természetes hámlásával (főleg száraz bőrűek esetén) jelentős mennyiségű keratin jut a laboratóriumi berendezésekre, a laborköpenyre vagy megtalálható a laboratóriumi porban is. Ezért a keratin szennyeződés elkerülése egy igazi kihívást jelent a proteomikai laboratóriumok számára. A megfelelő keratinmentes környezet biztosítása érdekében kiemelt figyelmet kell fordítani a tisztaságra, a védőfelszerelések használatára és a megfelelő szabályok betartására. Célszerű a laboratóriumban keratin-mentes környezetet/részt kialakítani és kesztyű nélkül vagy koszos kesztyűvel nem szabad a keratinmentes részben





levő eszközöket megérinteni! Fontos szem előtt tartani, hogy a sterilitás nem feltétlenül jelent keratin mentességet is!

**Szükséges eszközök:**

- Vizsgálni kívánt fehérjék oldata
- Keratinmentes fülke
- Egyszer használatos köpeny
- Hajvédő, szájmaszk
- Púdermentes kesztyű
- 1,5 ml-es csövek, 1,5 ml-es csőtartó
- Pipetta 200-1000  $\mu$ l
- Pipetta 20-200  $\mu$ l
- Pipetta 0,5-10  $\mu$ l
- Pipetta 0,2-2  $\mu$ l
- Pipettahegyek
- Hegyledobó
- Vortex
- Centrifuga
- Speed-vac
- Hűtő/fagyasztó
- Blokktermosztát

**Oldatok:**

- Urea oldat /8 M urea MQ vízben/
- DTT oldat /100 mM dithiothreitol MQ vízben/
- IAA oldat /200 mM jódacetamid MQ vízben /
- 25 mM ammónium bikarbonát oldat
- 1  $\mu$ l tripszin törzsoldat (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l)



- 1 % FA oldat
- Aceton

### **Rövidítések:**

ACN – acetonitril

IAA – jódacetamid

DTT – dithiothreitol

FA – hangyasav

### **A munka menete:**

1. Keratinmentes környezet biztosítása: egyszer használatos köpeny, púdermentes kesztyű, hajvédő, köpenyvédő és szájmaszk viselése, új alufólia réteggel fedjük a vegyifülkét.
2. Acetonos kicsapás: Megmérjük a minta térfogatát, majd a mintákat 6x-os térfogatú, -20 °C-on előhűtött acetonnal keverjük össze.
3. Vortex és centrifugálás után 30 percig -20 °C-on inkubáljuk.
4. Fél óránként kivesszük a mintát, vortexeljük, majd centrifugáljuk és visszatesszük -20 °C-ra.
5. 4 óra után a mintákat lecentrifugáljuk és a felülúszót leszívjuk.
6. A csapadékot nyitott 1,5 ml-es csőben szobahőn néhány percig szárítjuk.
7. A csapadékot teljesen feloldjuk 25 mM ammónium bikarbonát oldatban.
8. Vortex és centrifugálás.
9. Denaturálás: A mintákhoz 8 M urea oldatot adunk olyan mennyiségben, hogy 6 M legyen az urea végkoncentrációja.
10. Vortex és centrifugálás után 30 percig szobahőn inkubáljuk.
11. Redukálás: A mintákhoz 100 mM DTT oldatot adunk olyan mennyiségben, hogy 10 mM legyen a DTT végkoncentrációja.
12. Vortex és centrifugálás után 60 percig 37 °C-on inkubáljuk.

13. Alkilálás: A mintákhoz 200 mM IAA oldatot adunk olyan mennyiségben, hogy 20 mM legyen az IAA végkoncentrációja.
14. Vortex és centrifugálás után szobahőmérsékleten 45 percig sötétben inkubáljuk.
15. A mintákat 25 mM ammónium bikarbonát oldat segítségével kihígítjuk, úgy, hogy az urea koncentrációja 1 M legyen!
16. 0,2 µl mintát pH papírra cseppentünk fel és ellenőrizzük a pH-t. Az emésztést akkor kezdjük el, ha a pH 7,5-8 között van. Ebben a pH tartományban működik jól a tripszin. Szükség esetén a pH-t 7,5-8-ra állítjuk!
17. Emésztés: A mintákhoz 1:25 arányban tripszin törzsoldatot adunk.
18. Vortex és centrifugálás után 37 °C-on egy éjszakán át inkubáljuk.
19. A tripszin aktivitását savasítással le tudjuk csökkenteni, és ezáltal leállítjuk az emésztést. Az emésztés leállításához 1 µl koncentrált hangyasav oldatot adunk.
20. Az emésztményt lecentrifugáljuk, hogy az esetleges kicsapódott fehérjéket (vagy a RapiGest adalékot, ha használtunk ilyen) eltávolítsuk, majd a felülúszót leszívjuk és az új 1,5 ml-es csőbe tesszük. Speed-vac segítségével beszárítjuk, majd mérésig -20 °C-on tároljuk.

## 11. Mintaelőkészítés tömegspektrometriás analízishez

A gélben vagy oldatban megemésztett mintát a tömegspektrometriás analízis megkezdése előtt sómentesíteni szükséges, ugyanis a mintában levő sók, detergensok stb. zavarhatják a tömegspektrometriás analízist. Ez a lépés tulajdonképpen egy reverz fázisú kromatográfiának felel meg, amikor a C18 töltet egy pipettahegyben található. A módszer elve az, hogy az enyhén savas közegben levő mintát felszívjuk a pipettahegybe, ekkor a peptidek kikötődnek a töltetbe, az erősen hidrophil sók, detergensok és egyéb anyagok pedig nem. A nem kötődött anyagok lemosása után magas szerves oldószer tartalmú (50% acetonitril) eluáló oldattal leoldjuk a töltetbe kötődött peptideket. A módszer alkalmas egyrészt a peptideket tartalmazó minták sómentesítésére, de ugyanakkor a minták koncentráálására is szolgálhat. A sómentesített és koncentrált mintákat felhasználhatjuk a tömegspektrometriás analízishez.

### Szükséges eszközök:

- ZipTip C18 pipettahegy (Millipore)
- Tisztítani kívánt minta
- 1-10 µl pipetta

### Oldatok:

- Aktiváló oldat: 100% acetonitril (ACN),  
0,1% trifluoecetsav (TFA) MilliQ vízben (MQ víz)
- Eluáló oldat: 50% ACN/0,1% TFA
- 1% hangyasav (FA) MQ vízben, feloldáshoz.

### Rövidítések:

- ACN – acetonitril
- FA – hangyasav
- TFA – trifluor-ecetsav
- MQ – MilliQ víz, nagy tisztaságú víz

### **A munka menete:**

#### Equilibrálás:

1. A ZipTip hegyet 10  $\mu$ l-re állított pipettára helyezzük.
2. Felszívunk az előre kikészített 20  $\mu$ l 100% ACN-ből 10  $\mu$ l-t, majd a hegy tartalmát kiürítjük. Ezt a lépést megismételjük!
3. Felszívunk az előre kikészített 20  $\mu$ l 0,1% TFA oldatból 10  $\mu$ l-t, majd a hegy tartalmát kiürítjük. Ezt a lépést megismételjük! Ezzel a hegy aktiválva van!

#### Kötés és mosás:

4. A 10  $\mu$ l-re állított pipetta segítségével 10 alkalommal felszívjuk a ZipTip hegybe a mintát, majd visszaengedjük. A végén a hegyet üresen hagyjuk!
5. Felszívunk az előre kikészített 20  $\mu$ l 0,1% TFA oldatból 10  $\mu$ l-t, majd egy MOSÓ feliratú csőbe pipetázzuk. Ezt a lépést megismételjük! Ezzel a hegyre kötött sókat lemostuk!

#### Eluálás:

6. Felszívunk egy előre kikészített 30  $\mu$ l 50% ACN/0,1% TFA oldatból 10  $\mu$ l-t, és az ELUÁTUM feliratú csőbe pipetázzuk a hegy tartalmát. Ezt a lépést 3 alkalommal megismételjük, így 30  $\mu$ l eluátumot gyűjtünk össze.
7. Az eluátumot tartamazó csövet speed-vac segítségével beszárítjuk, majd 10  $\mu$ l 1% FA-ban feloldjuk.

Az így előkészített mintákat a tömegspektrometriás analízishez azonnal felhasználjuk.

## 12. Fehérjék azonosítása tömegspektrometriás analízis segítségével

A fehérjék emésztéséből származó peptid keveréket a tömegspektrométer segítségével analizáljuk. Az analízis során a HPLC segítségével megtörténik az egyes komponensek elválasztása, ezáltal a minta komplexitását csökkentjük, majd a tömegspektrométerben megtörténik az egyes komponensek analízise, az ún. MS/MS spektrumok felvétele. Az MS/MS spektrumok alapján, megfelelő keresőprogramok (MASCOT, ProteinPilot, MassLynx stb.) segítségével azonosítani lehet a mintában levő fehérjéket. Az egyes minták tömegspektrometriás analízise, az MS/MS spektrumok felvétele automatizált, akárcsak a minták analízisekor kapott spektrum adatok elemzése. Fontos megjegyezni azonban, hogy a keresőprogramok által kiadott eredményeket értelmezni kell és a programok által kiadott találatokat manuális analízis segítségével szűrni kell. A gyakorlat során a ProteinPilot és MASCOT keresőszoftverek által kiadott eredmények értelmezésével foglalkozunk. A többi keresőszoftver eredményeit nem értelmezzük, de keresőszoftverek által kiadott eredmények főbb sajátosságai nagyon jól illusztrálhatók e két keresőmotor alkalmazásával.

### MASCOT keresőmotor használata

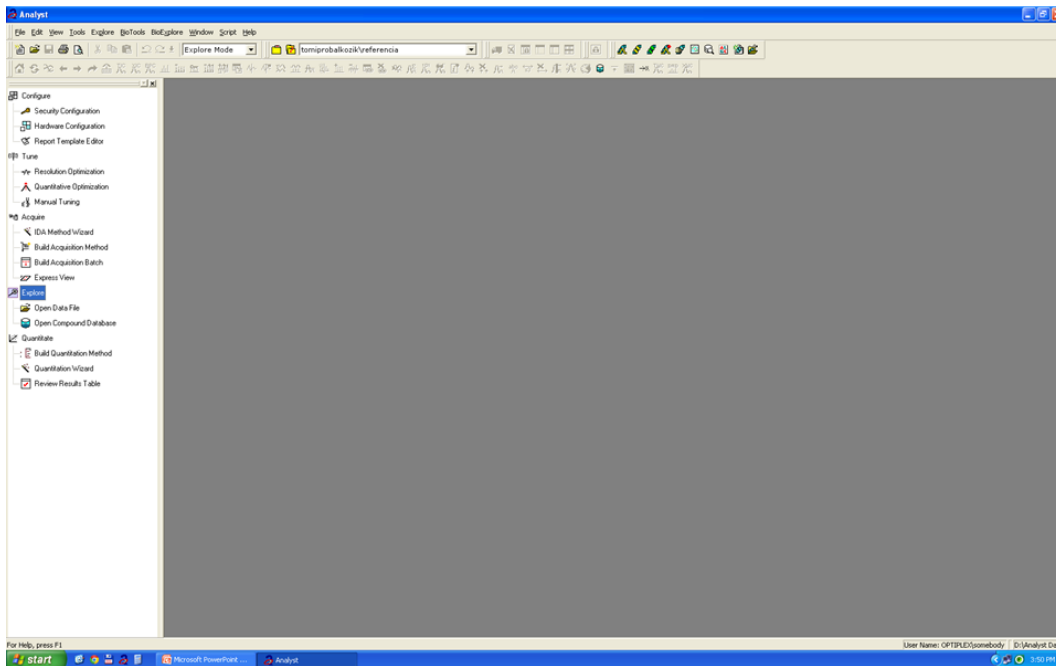
A MASCOT ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) keresőmotor egy viszonylag könnyen használható, robusztus, interneten elérhető szoftver. A keresőmotor ingyenes változata lehetővé teszi 1200 spektrum elemzését. E fölötti spektrumszám esetén, ami komplex mintákból származó hosszabb mérések esetén gyakran előfordul, szükséges, hogy az általunk elemezni kívánt spektrumot kisebb részekre daraboljuk. A gyakorlat során egy juhból származó minta kétdimenziós elektroforézise során elválasztott folt tömegspektrometriás analízise során kapott eredményeket elemezzük.

#### **A munka menete:**

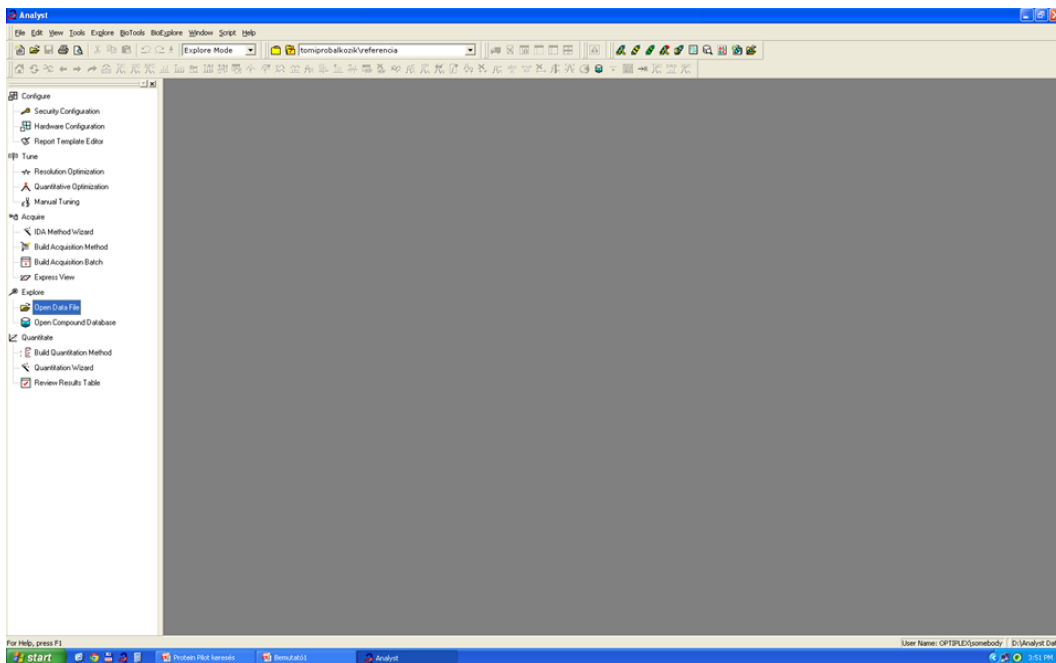
Először megnyitjuk az Analyst 1.4.2 szoftvert, majd az alábbi lépéseket végezzük el a megadott sorrendben!



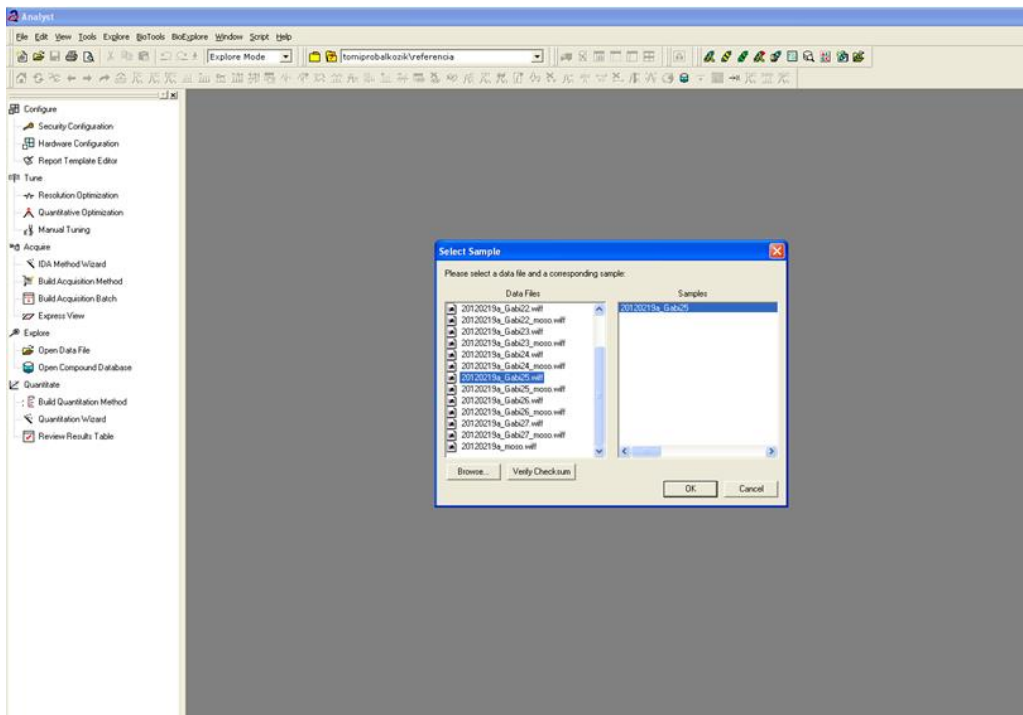
## 1. Analyst - Explore



## 2. Analyst – Explore – Open data file

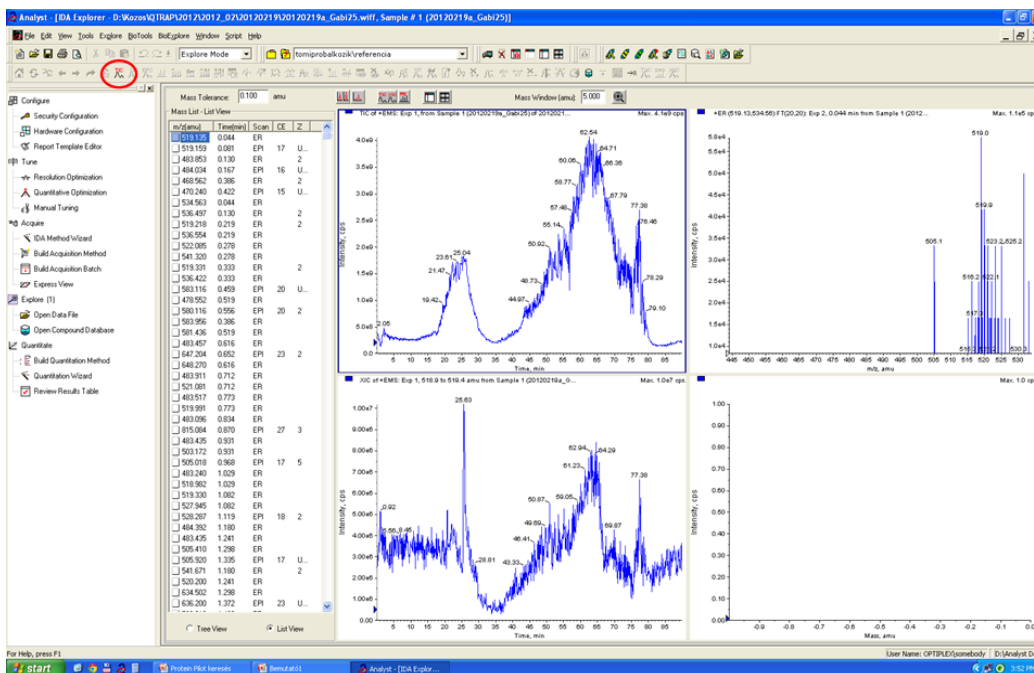


### 3. Analyst – Explore – Open data file – fájl kiválasztása



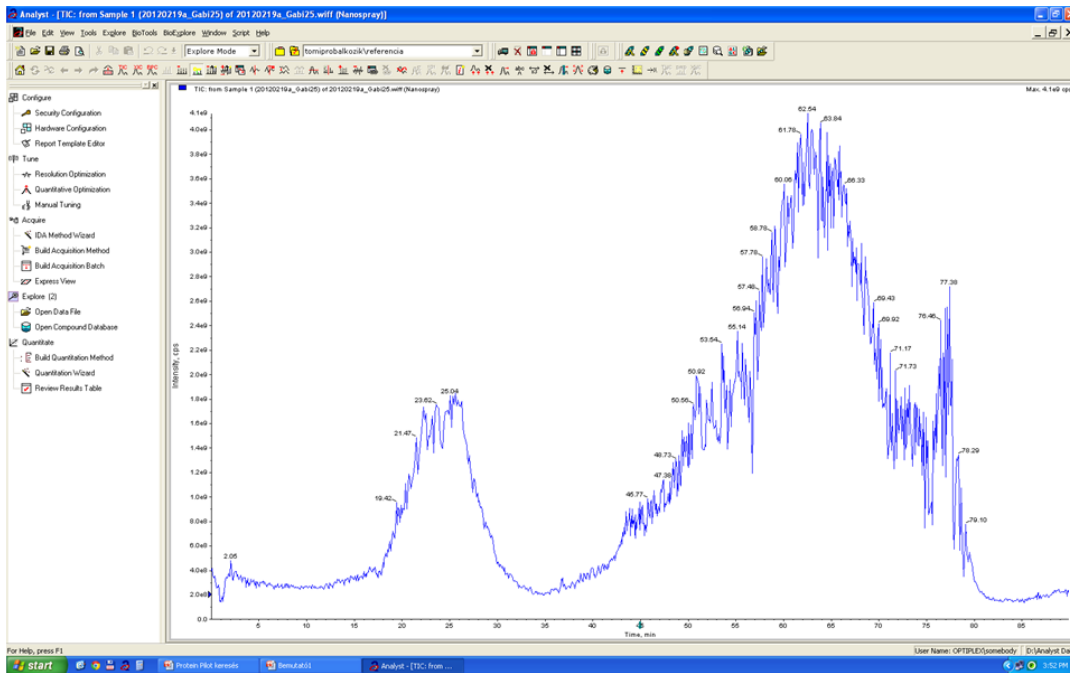
### 4. Analyst eredményfájl (.wiff) megjelenítése

### 5. TIC (Total Ion Chromatogram) kiválasztása

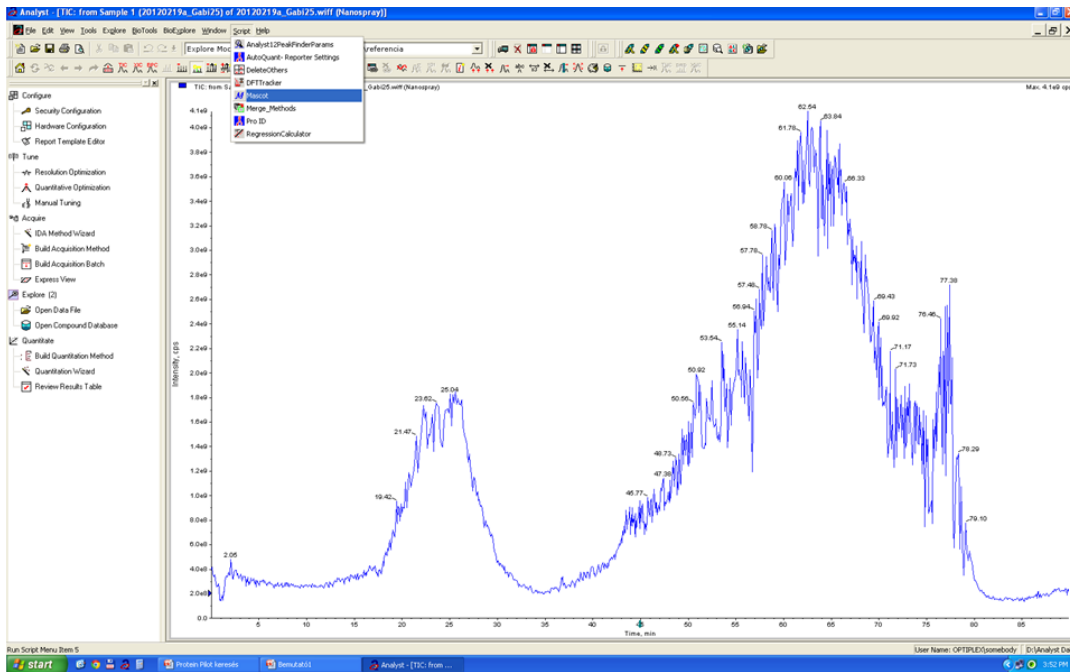




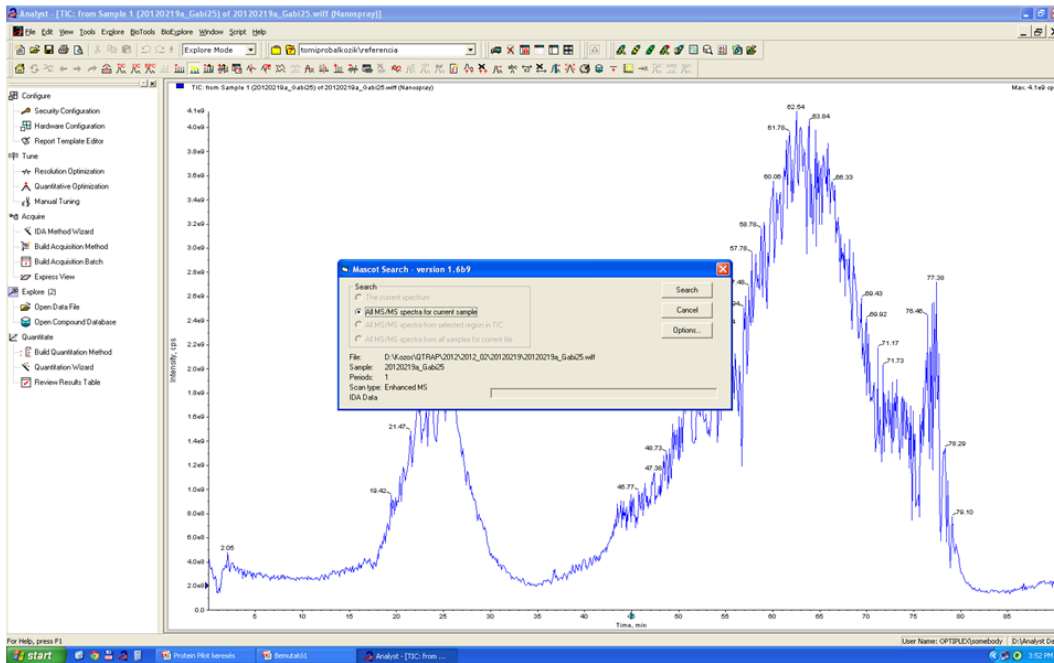
### 6. TIC megvizsgálása



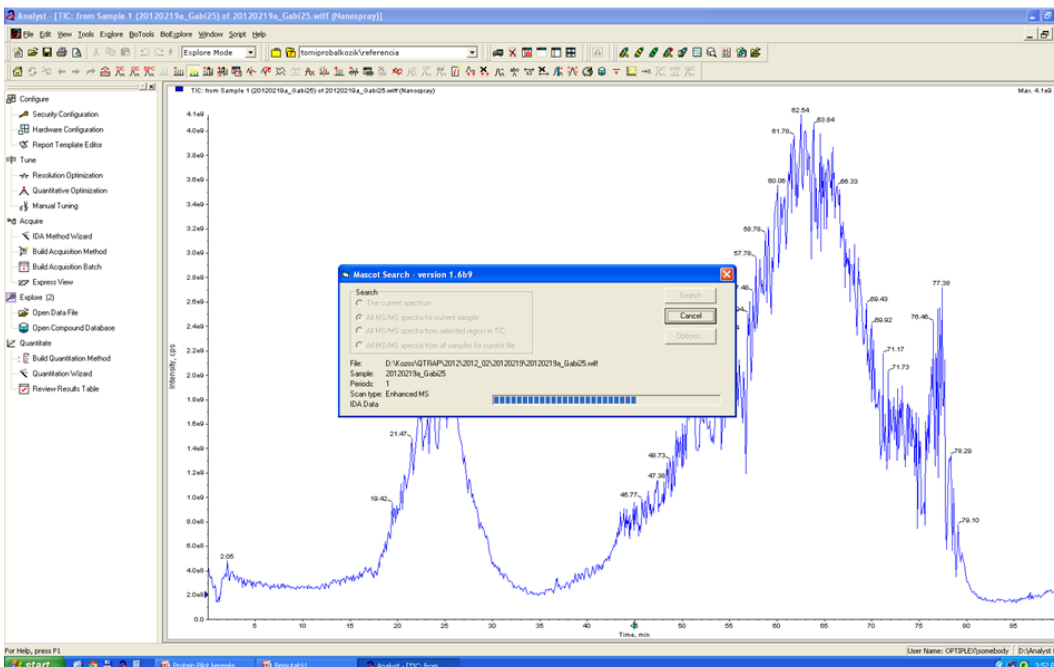
### 7. Analyst – Script menü – Mascot



### 7. Analyst – Script menü – Mascot – Search



### 8. Analyst – Script menü – Mascot – Search

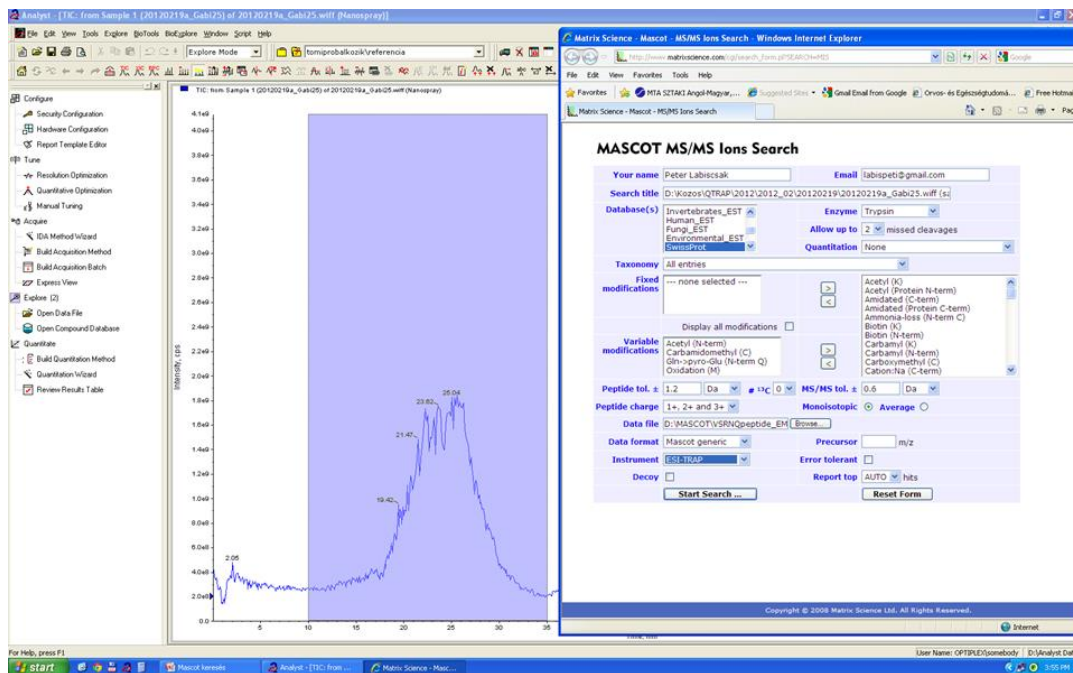


### 9. Mascot – keresési paraméterek beállítása – Start Search

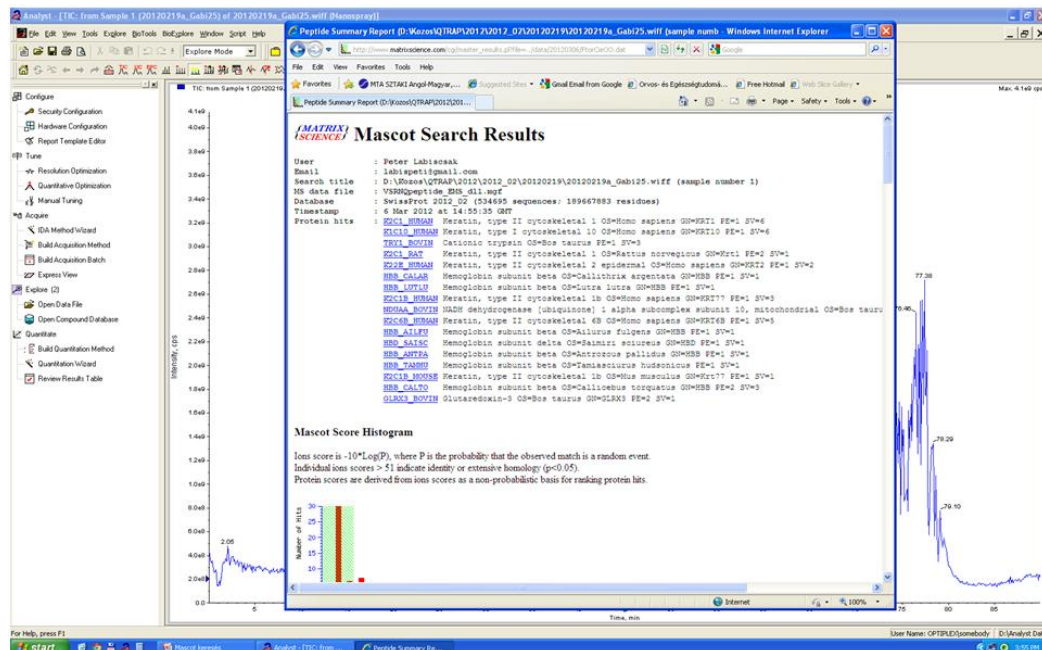
### 10. Mascot – MS/MS keresési eredmények megjelenítése – frissülő ablak

11. Mascot MS/MS keresés eredmény – túl sok spektrum

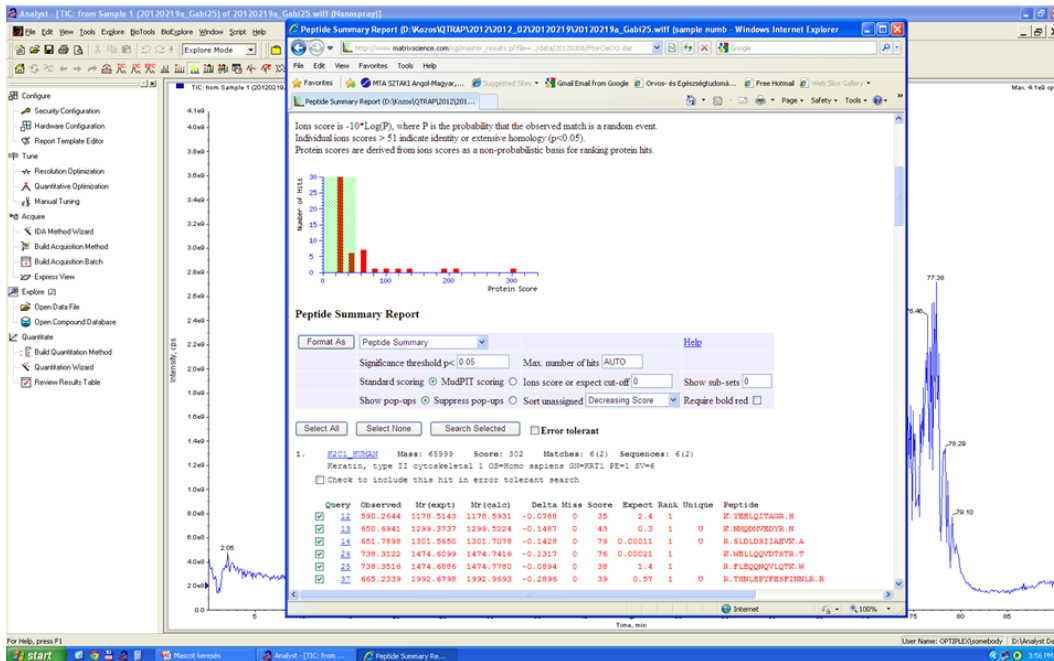
12. Mascot MS/MS keresés – kisebb terület kijelölése a kereséshez és 7-10 lépések megismétlése



13. Mascot keresési eredmény 1.

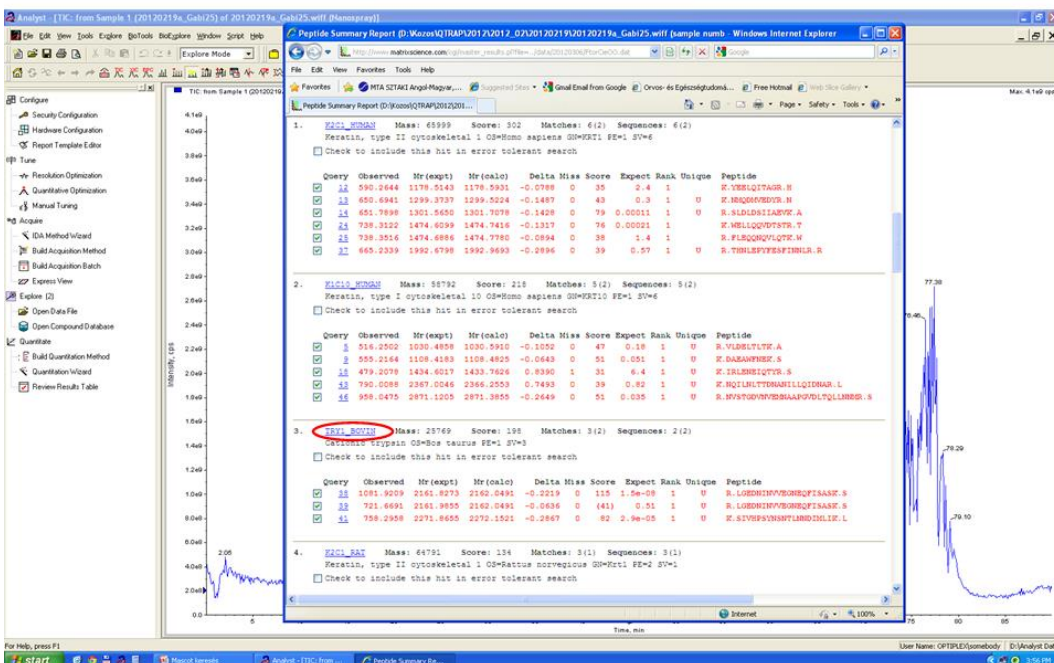


### 14. Mascot keresési eredmény 2.



### 15. Mascot eredmények megtekintése, értékelése

### 16. Megtekinteni kívánt fehérje kiválasztása a fehérjére történő kattintással



17. A fehérjére, majd a szekvenciára és a spektrumra vonatkozó adatok megtekintése

**Mascot Search Results: Protein View**  
 Match to: TRV1\_BOVIN Score: 198  
 Cationic trypsin OS=Bos taurus PE=1 SV=3  
 Found in search of VSRNQPptide\_EMS\_dli.mgf  
 Nominal mass (M<sub>0</sub>): 25769; Calculated pI value: 8.40  
 NCBI BLAST search of TRV1\_BOVIN against nr  
 Unformatted sequence listing for pasting into other applications  
 Taxonomy: [Bos taurus](#)  
 Variable modifications: Acetyl (N-term), Carbamidomethyl (C), Glu->pyro-Glu  
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of RR unless next residue is P  
 Sequence Coverage: 14%

**Mascot Search Results: Peptide View**  
 Peptide View  
 MS/MS Fragmentation of LGEDNINVEGEQFISASK  
 Found in TRV1\_BOVIN, Cationic trypsin OS=Bos taurus PE=1 SV=3  
 Match to Query 38: 2161.827264 from(1081.920908,2-) index(12)  
 Title: File: 20120219a\_Gab25.waf Sample: 20120219a\_Gab25 (sample number 1), Elution: 22.18 to 22.5 min, Period: 1, Cycle(s) 258-259 (Experiment 3), 260 (Experiment 4)  
 Data file: VSRNQPptide\_EMS\_dli.mgf  
 Click mouse within plot area to zoom in by factor of two about that point  
 Or  to  Da   
 Label all possible matches  Label matches used for scoring

Monoisotopic mass of neutral peptide M<sub>r</sub>(calc): 2162.0491  
 Ions Score: 115 Expect: 1.5e-08  
 Matches: 29/214 Fragment ions using 42 most intense peaks [\(help\)](#)

#	b	b <sup>++</sup>	b <sup>+</sup>	b <sup>+++</sup>	b <sup>0</sup>	b <sup>0++</sup>	Seq.	y	y <sup>++</sup>	y <sup>+</sup>	y <sup>+++</sup>	y <sup>0</sup>	y <sup>0++</sup>	#
1	114.0913	57.5493					L							20
2	171.1128	86.0600					G	2049.9724	1025.4898	2052.9458	1016.9765	2031.9618	1016.4845	19
3	300.1454	150.5813			282.1448	141.5761	E	1992.9509	996.9791	1975.9243	988.4658	1974.9403	987.9738	18
4	415.1822	208.0948			397.1718	199.0895	D	1863.9083	932.4578	1846.8817	923.9445	1845.8977	923.4525	17
5	529.2253	265.1163	512.1987	256.6030	511.2147	256.1110	N	1748.8814	874.9443	1731.8548	866.4310	1730.8708	865.9390	16
6	642.3093	321.6583	625.2828	313.1450	624.2988	312.6530	I	1634.8384	817.9229	1617.8119	809.4096	1616.8279	808.9176	15
7	756.3523	378.6798	739.3257	370.1665	738.3417	369.6748	N	1521.7544	761.3808	1504.7278	752.8675	1503.7438	752.3755	14
8	855.4207	428.2140	838.3941	419.7007	837.4101	419.2087	V	1407.7114	704.3594	1390.6849	695.8461	1389.7009	695.3541	13
9	854.4892	427.7482	937.4624	469.2349	936.4785	468.7429	V	1308.6430	654.8251	1291.6165	646.3119	1290.6325	645.8199	12
10	1083.5317	542.2695	1066.5051	533.7562	1065.5211	533.2642	E	1209.5746	605.2909	1192.5481	596.7777	1191.5640	596.2857	11
11	1140.5531	570.8702	1123.5266	562.2669	1122.5426	561.7749	G	1080.5320	540.7966	1063.5055	532.2564	1062.5214	531.7644	10
12	1254.5961	627.8017	1237.5695	619.2884	1236.5855	618.7964	N	1023.5106	512.2589	1006.4840	503.7456	1005.5000	503.2536	9
13	1383.6387	692.2230	1366.6121	683.8097	1365.6281	683.3177	E	909.4676	454.2374	892.4411	446.7242	891.4571	446.2322	8
14	1511.6972	756.3523	1494.6707	747.8390	1493.6867	747.3470	Q	780.4250	390.7162	763.3985	382.2029	762.4145	381.7109	7
15	1658.7657	829.8865	1641.7391	821.3732	1640.7551	820.8812	F	652.3665	326.6869	635.3399	318.1736	634.3559	317.6816	6
16	1771.8497	886.4285	1754.8232	877.9152	1753.8392	877.4232	I	585.2980	293.1527	568.2715	284.6394	567.2875	284.1474	5
17	1858.8817	929.9445	1841.8552	921.4312	1840.8712	920.9392	S	392.2140	196.6106	375.1874	188.0974	374.2034	187.6053	4
18	1929.9189	965.4631	1912.8923	956.9498	1911.9083	956.4578	A	305.1819	153.0946	288.1554	144.5813	287.1714	144.0893	3
19	2016.9509	1008.9791	1999.9243	1000.4658	1998.9403	999.9738	S	234.1448	117.5761	217.1183	109.0628	216.1343	108.5708	2
20							K	147.1128	74.0600	130.0863	65.5468			1

18. A szekvenciára és a spektrumra vonatkozó adatok megtekintése

b vagy y ionsorozatok jelenléte!!!

Monoisotopic mass of neutral peptide M<sub>r</sub>(calc): 2162.0491  
 Ions Score: 115 Expect: 1.5e-08  
 Matches: 29/214 Fragment ions using 42 most intense peaks [\(help\)](#)

#	b	b <sup>++</sup>	b <sup>+</sup>	b <sup>+++</sup>	b <sup>0</sup>	b <sup>0++</sup>	Seq.	y	y <sup>++</sup>	y <sup>+</sup>	y <sup>+++</sup>	y <sup>0</sup>	y <sup>0++</sup>	#
1	114.0913	57.5493					L							20
2	171.1128	86.0600					G	2049.9724	1025.4898	2052.9458	1016.9765	2031.9618	1016.4845	19
3	300.1454	150.5813			282.1448	141.5761	E	1992.9509	996.9791	1975.9243	988.4658	1974.9403	987.9738	18
4	415.1822	208.0948			397.1718	199.0895	D	1863.9083	932.4578	1846.8817	923.9445	1845.8977	923.4525	17
5	529.2253	265.1163	512.1987	256.6030	511.2147	256.1110	N	1748.8814	874.9443	1731.8548	866.4310	1730.8708	865.9390	16
6	642.3093	321.6583	625.2828	313.1450	624.2988	312.6530	I	1634.8384	817.9229	1617.8119	809.4096	1616.8279	808.9176	15
7	756.3523	378.6798	739.3257	370.1665	738.3417	369.6748	N	1521.7544	761.3808	1504.7278	752.8675	1503.7438	752.3755	14
8	855.4207	428.2140	838.3941	419.7007	837.4101	419.2087	V	1407.7114	704.3594	1390.6849	695.8461	1389.7009	695.3541	13
9	854.4892	427.7482	937.4624	469.2349	936.4785	468.7429	V	1308.6430	654.8251	1291.6165	646.3119	1290.6325	645.8199	12
10	1083.5317	542.2695	1066.5051	533.7562	1065.5211	533.2642	E	1209.5746	605.2909	1192.5481	596.7777	1191.5640	596.2857	11
11	1140.5531	570.8702	1123.5266	562.2669	1122.5426	561.7749	G	1080.5320	540.7966	1063.5055	532.2564	1062.5214	531.7644	10
12	1254.5961	627.8017	1237.5695	619.2884	1236.5855	618.7964	N	1023.5106	512.2589	1006.4840	503.7456	1005.5000	503.2536	9
13	1383.6387	692.2230	1366.6121	683.8097	1365.6281	683.3177	E	909.4676	454.2374	892.4411	446.7242	891.4571	446.2322	8
14	1511.6972	756.3523	1494.6707	747.8390	1493.6867	747.3470	Q	780.4250	390.7162	763.3985	382.2029	762.4145	381.7109	7
15	1658.7657	829.8865	1641.7391	821.3732	1640.7551	820.8812	F	652.3665	326.6869	635.3399	318.1736	634.3559	317.6816	6
16	1771.8497	886.4285	1754.8232	877.9152	1753.8392	877.4232	I	585.2980	293.1527	568.2715	284.6394	567.2875	284.1474	5
17	1858.8817	929.9445	1841.8552	921.4312	1840.8712	920.9392	S	392.2140	196.6106	375.1874	188.0974	374.2034	187.6053	4
18	1929.9189	965.4631	1912.8923	956.9498	1911.9083	956.4578	A	305.1819	153.0946	288.1554	144.5813	287.1714	144.0893	3
19	2016.9509	1008.9791	1999.9243	1000.4658	1998.9403	999.9738	S	234.1448	117.5761	217.1183	109.0628	216.1343	108.5708	2
20							K	147.1128	74.0600	130.0863	65.5468			1

## 19. Jelentés készítése

1.

```
Match to: TRY1_BOVIN Score: 198
Cationic trypsin OS=Bos taurus PE=1 SV=3
Found in search of VSRNQpeptide_EMS_d11.mgf

Nominal mass (Mn): 25769; Calculated pI value: 8.40
-----
Variable modifications: Acetyl (N-term), Carbamidomethyl (C), Gln->pyro-G
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Sequence Coverage: 164

Matched peptides shown in Bold Red

  1 MKTFIFLALL GAAVAFPVDD DDKIVGGYTC GANTVPYQVS LNSGYHFCGG
  51 SLINQWVVS AAHCYKSGIQ VRLGEDNINV VEGNEQFISA SKSIVHPSYN
 101 SNTLNNDIML IKLKSAAASLN SRVASISLPT SCASAGTQCL ISGWGNTKSS
 151 GTSYPDVLCG LKAPILSDSS CKSAYPGQIT SNMFCAGYLE GGDSCQGDG
 201 GGPVVCSGKL QGIVSWGSGC AQKKNKPGVYT KVCNIVSWIK QTIASN
```

Csak akkor fogadjuk el egy szekvenciát találatként, ha azt legalább négy, sorozatban levő b vagy y ion megléte támaszt alá. Azokat a peptideket, ahol ez a kritérium teljesül, elfogadottnak tekintjük. Egy fehérje azonosítását akkor fogadjuk el, ha a találatok között szerepel legalább két ilyen peptid!

### A ProteinPilot keresőmotor használata

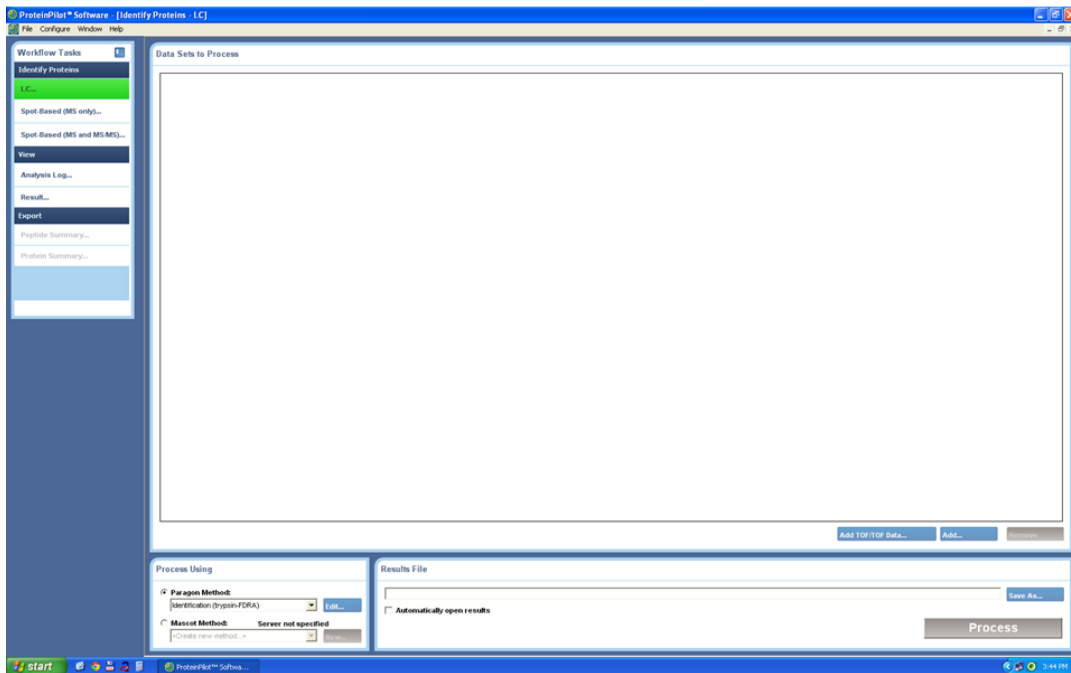
A ProteinPilot keresőszoftvert az ABSciex cég fejlesztette ki és szabadon hozzáférhető változata nincs. A ProteinPilot szoftver kissé más algoritmust használ a fehérjék szekvencia alapú azonosítására, mint a MASCOT. Az előbbieken, a MASCOT kereséshez is használt nyers adatokat használjuk fel a ProteinPilot szoftverrel történő fehérje azonosításhoz.

#### A munka menete:

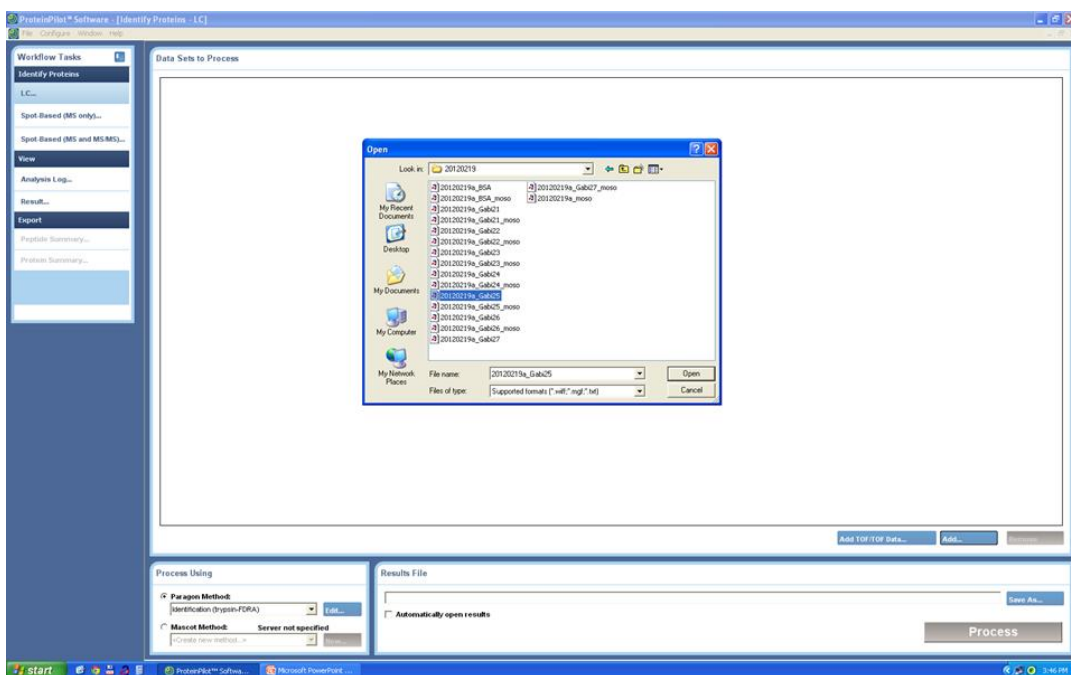
Először megnyitjuk a ProteinPilot keresőszoftvert, majd elvégezzük az alábbi lépéseket a megadott sorrendben!

### 1. Protein Pilot szoftver megnyitása

### 2. A bal menüsorból az Identify Proteins – LC kiválasztása

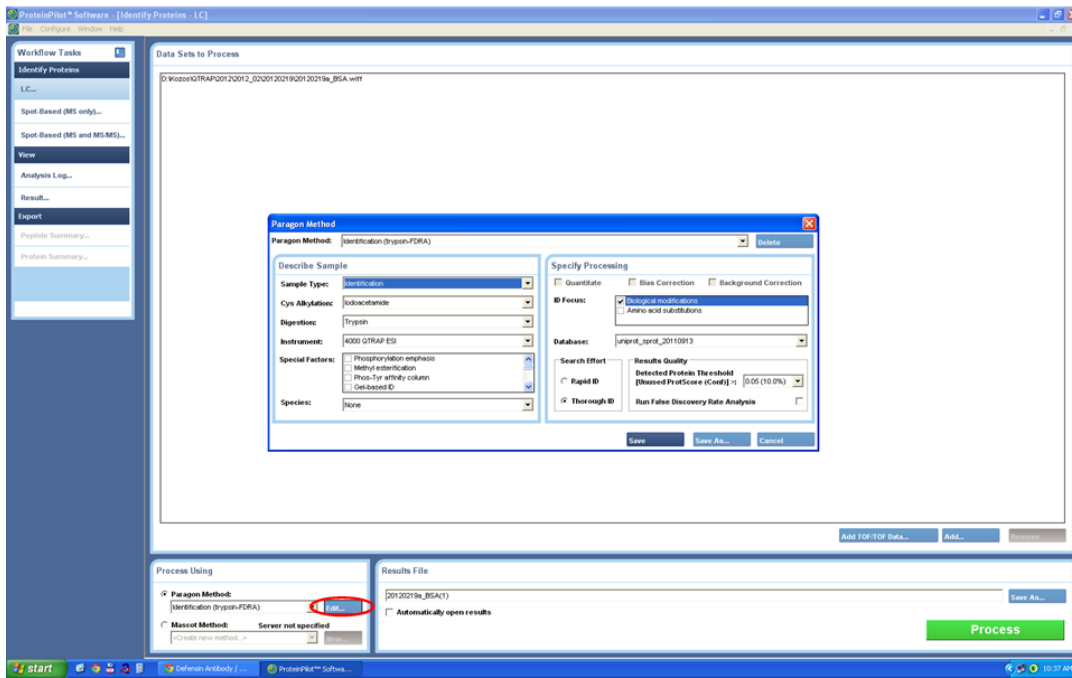


### 3. Protein Pilot – Identify Proteins – LC – fájl kiválasztása - Open

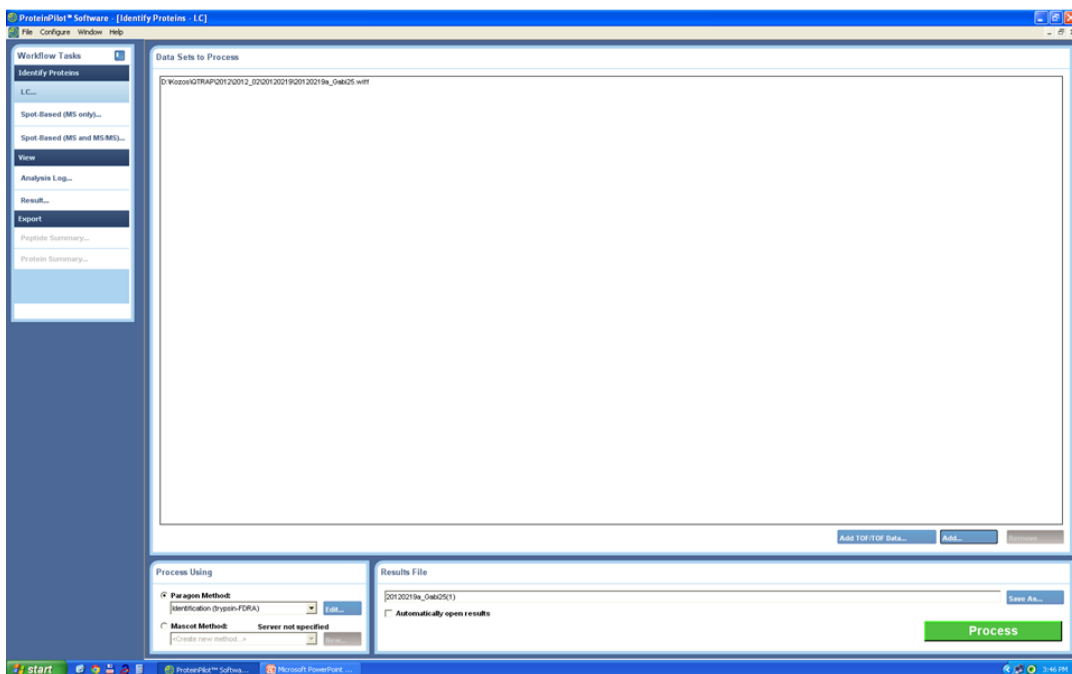




#### 4. Paragon módszer kiválasztása

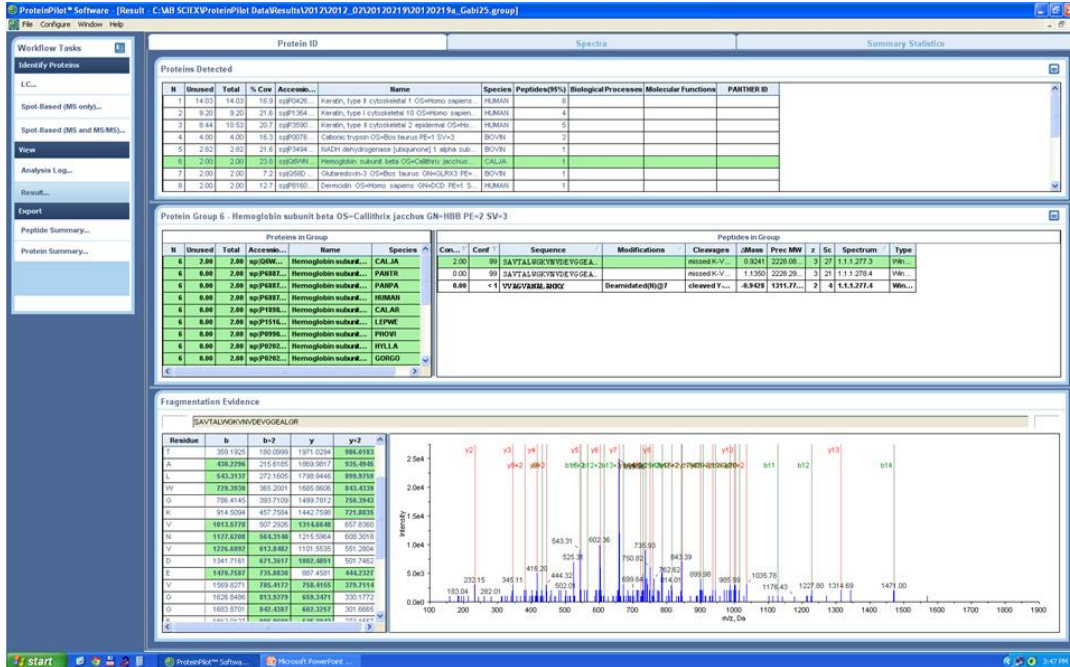


#### 5. Protein Pilot – Process

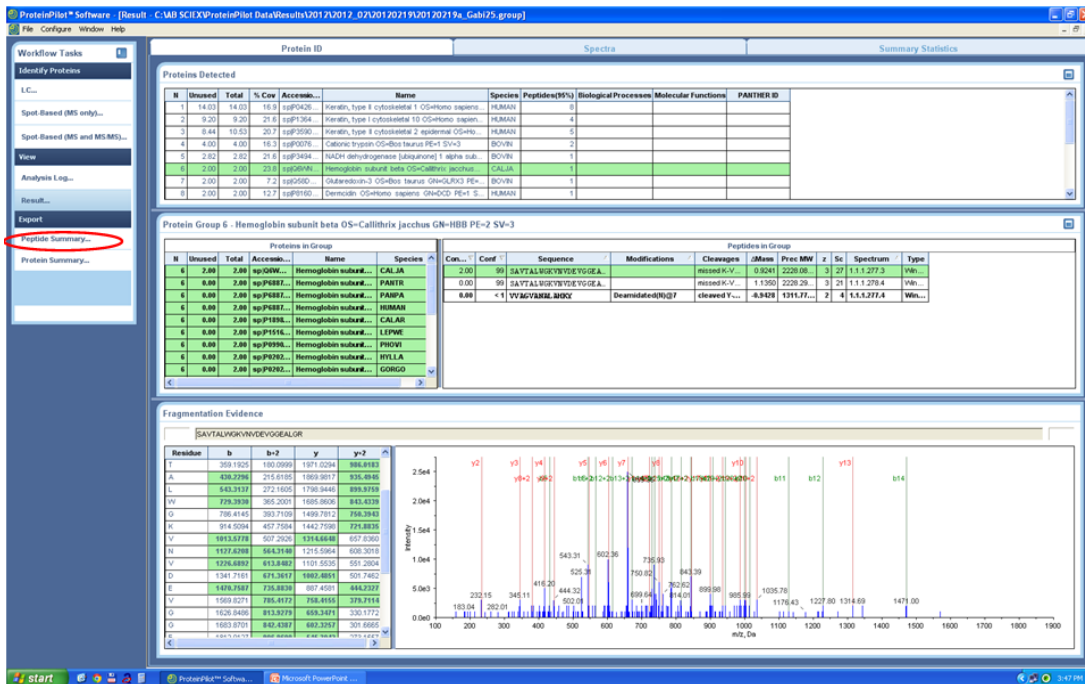




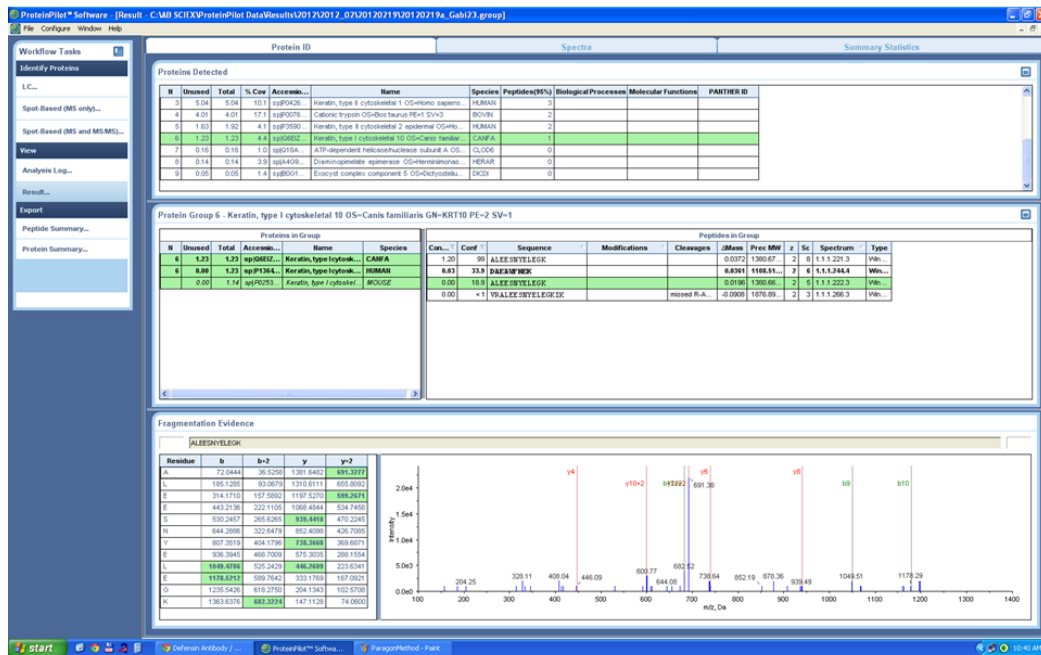
### 8. A kiválasztott fehérjére kattintva egy ablakban a spektrumra és szekvenciára vonatkozó információk megjelenítése



### 9. Jelentés készítése – Export menü – Peptide summary exportálása



## 10. Jelentés készítése – nem releváns találatok eltávolítása



Ebben az esetben is csak akkor fogadunk el egy szekvenciát találatként, ha azt legalább négy, sorozatban levő b vagy y ion megléte támaszt alá. Azokat a peptideket, ahol ez a kritérium teljesül, elfogadottnak tekintjük. Egy fehérje azonosítását akkor fogadjuk el, ha a találatok között szerepel legalább két ilyen peptid!

### Feladat:

1. Ugyanazon minta tömegspektrometriás analízise során kapott nyers adatokat használjuk fel és mindkét keresőprogram segítségével azonosítjuk a mintában levő fehérjéket.
2. Az eredményeket a megadott szempontok alapján értékeljük és jelentést készítünk.
3. Összehasonlítjuk a két különböző szoftverrel, ugyanarról a mintáról kapott eredményeket.
4. Az eredmények elemzése során tapasztaltakat megbeszéljük a gyakorlatvezetővel és megbeszéljük az egyes keresőmotorok által kiadott találatok interpretálásának főbb különbségeit.