
LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

ANALÝZA PROTEINŮ POMOCÍ AUTOMATICKÉ ČIPOVÉ ELEKTRO- FORÉZY EXPERION A POROVNÁNÍ S METODOU SDS-PAGE

JAN BÁRTA, VERONIKA BÁRTOVÁ
a VLADISLAV ČURN

*Katedra rostlinné výroby a agroekologie, Zemědělská fa-
kulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Stu-
dentská 13, 370 05 České Budějovice
barta@zf.jcu.cz*

Došlo 20.10.08, přijato 19.1.09.

Klíčová slova: SDS-PAGE, čipová elektroforéza, analýza
proteinů, patatin

Úvod

V posledních několika desetiletích představuje elektroforéza na polyakrylamidovém gelu probíhající v prostředí dodecyl síranu sodného (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) – tak jak byla popsána v zásadní a dnes již světoznámé práci¹, ale i ve svých dalších modifikacích – jednu ze základních metod analýzy proteinů a je proto hojně používána v biochemii a příbuzných oborech (genetika, molekulární biologie, mikrobiologie aj.). Klasická Laemmliho práce má podle databáze ISI Web of Knowledge více než 100 000 citací. Základní odlišnost od primární nedenaturační polyakrylamidové elektroforézy (PAGE) spočívá v přítomnosti a působení molekul anionického detergentu SDS na proteinový vzorek při jeho přípravě a v gelovém systému při vlastní separaci.

Účinkem detergentu SDS dochází k rozpadu kvarterní struktury proteinů na jednotlivé proteinové podjednotky (což se děje již při přípravě vzorků pro vlastní analýzu za spolupůsobení 2-merkptoethanolu a krátkého záhřevu na denaturační teplotu 100 °C), které na sebe vážou molekuly SDS v konstantním poměru: 1 g polypeptidu naváže 1,4 g SDS (cit.^{2,3}). Skutečné náboje polypeptidů se proto stávají zanedbatelnými v porovnání s negativním nábojem, který poskytuje navázaný anionický detergent, takže vytvořené SDS-polypeptidové komplexy mají v podstatě stejné nábojové hustoty a migrují v polyakrylamidovém gelu o vhodné porozitě podle své velikosti^{4,5}. Mezi migrační dráhou (resp. mezi relativní mobilitou, Rf) proteinu a jeho mole-

kulovou hmotností existuje hyperbolická závislost³, která je většinou pomocí dekadického logaritmu z praktického hlediska převáděna do lineární podoby^{6–8}. Z vhodně sestavené směsi proteinů o známé molekulové hmotnosti (např. komerčně dostupné standardy molekulové hmotnosti proteinů), lze po provedené SDS-PAGE zjistit hodnoty Rf a sestavit kalibrační křivku pro stanovení molekulových hmotností i u neznámých proteinů^{3,9}. Účinnost SDS-PAGE systému pro stanovení molekulové hmotnosti v určitém hmotnostním rozpětí závisí na velikosti pórů separačních gelů. Porozita gelu je určena podílem monomerů akrylamidu a bis-akrylamidu v celkovém objemu gelu (% T) a také zastoupením bis-akrylamidu v celkovém množství obou typů monomerů (% C). Např. separační gel s T = 5 % je vhodný pro rozpětí molekulových hmotností 60 000 až 200 000 Da, naopak gel o T = 15 % je vhodný pro rozpětí molekulových hmotností 10 000–70 000 Da (cit.^{8,9}). Kromě stanovení molekulové hmotnosti je technika SDS-PAGE používána také pro analýzu čistoty proteinu, sledování purifikačního procesu cílového proteinu, odhad relativní a absolutní koncentrace sledovaných proteinů v proteinové směsi, pro detekci proteinových modifikací, při studiu kvarterní struktury proteinů, ale i v jiných aplikacích^{3,7,8,10}.

Přestože je technika SDS-PAGE v biochemii a příbuzných oborech hojně používanou metodou, jde o metodu poměrně pracnou. Zjednodušeně lze průběh celé elektroforetické analýzy při použití klasické detekce pomocí Coomassie Blue shrnout do následujících na sebe navazujících pracovních kroků: příprava polyakrylamidových gelů, příprava vzorků a jejich aplikace na gel, samotný průběh elektroforézy, fixace a detekce podoby proteinových pruhů na gelu pomocí roztoku Coomassie Blue, odbarvování obarveného pozadí gelů, dehydratace a sušení gelů, vyhodnocení získaných dat pomocí obrazové analýzy a speciálního software. I přes použití komerčně nabízených předem připravených (pre-cast) gelů a jejich aktivním usušením po detekčních procedurách trvá analýza nejméně 3 hodiny, ve většině případů však déle (hodiny až dny)^{2,7}. Při přípravě polyakrylamidových gelů je potřebné k nevhodným této metody připočítat také práci s vysoce toxickým monomerním akrylamidem (jde o neurotoxin, karcinogen a mutagen)⁷.

Není proto překvapivé, že v průběhu let byla snaha zavést zjednodušení, automatizaci a vyšší bezpečnost práce při aplikaci této metody v laboratořích (velkokapacitní automaty na SDS-PAGE, kapilární elektroforéza aj.)². Zejména v posledním desetiletí umožnil prudký rozvoj mikrofluidní technologie výrazné zjednodušení a miniaturizaci i v oblasti elektroforetické separace proteinů^{11,12}. Firmy zabývající se separačními technologiemi proteinů, jako jsou Agilent, Bio-Rad, Shimadzu, začaly na trh dodávat automatické elektroforetické systémy pracující na prin-

čipu mikrofluidní technologie, kdy se celá analýza odehrává v miniaturním prostředí speciálního čipu.

Cílem tohoto příspěvku je zhodnocení výsledků analýzy proteinů získaných pomocí systému automatické elektroforézy Experion (Bio-Rad) a jejich porovnání s výsledky tradiční metody SDS-PAGE.

Experimentální část

Proteinové vzorky

a) Pro260 Ladder (Bio-Rad) – směs proteinových standardů, součást analytického kitu pro systém Experion. Obsahuje deset proteinů v rozsahu molekulové hmotnosti (MW) 1,2 až 260 kD. Jedná se o blíže nespecifikované rekombinantní proteiny o MW 1,2; 10; 20; 25; 37; 50; 75; 100; 150 a 260 kDa.

b) SigmaMarker™ – Wide Range, Molecular Weight 6,500–200,000 Da (Sigma) – je proteinový standard určený pro použití v klasických systémech SDS-PAGE dle Laemmliho procedury¹. Sestává z 12 proteinů: aprotinin z hovězích plic (6,5 kDa), α -laktalbumin z kravského mléka (14,2 kDa), trypsinový inhibitor ze sójových bobů (20 kDa), trypsinogen z hovězího pankreatu (24 kDa), karbonátanhydrasa z hovězích erytrocytů (29 kDa), glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasa ze svalu králíka (36 kDa), ovalbumin ze slepičích vajec (45 kDa), glutamátdehydrogenasa z hovězích jater (55 kDa), albumin z hovězího séra (66 kDa), fosforylase b ze svalu králíka (97 kDa), β -galaktosidasa z *E. coli* (116 kDa), myosin ze svalu králíka (200 kDa).

c) Pro demonstraci využitelnosti testovaných systémů v rámci sledování úspěšnosti purifikačního procesu byly použity tři vzorky charakterizující purifikaci patatinu (molekulová hmotnost 40–43 kDa, pI = 4,6–5,2, cit.^{13,14}), hlavního proteinu hlíz brambor (*Solanum tuberosum* L.), pomocí dvoustupňové chromatografie na sloupci. Výchozí materiál (vzorek 1) – centrifugovaná a filtrovaná hlízová voda získaná z bramborových hlíz odrůdy Westamyl byla po úpravě reakce na pH 8,0 pomocí roztoku 1 M Trizma (Sigma) aplikována na ekvilibrovanou kolonu s náplní 5 ml DEAE 52 – Cellulose Servacel (Serva), kolona byla promyta 35 ml promývacího pufru (25 mM Tris-HCl, pH 7,4) a isokraticky eluována 7 ml elučního pufru (25 mM Tris-HCl, pH 7,4 + 0,5 M-NaCl). Získaný eluát (vzorek 2) byl aplikován na ekvilibrovanou kolonu s náplní 5 ml Con A – Sepharose 4B (GE Healthcare) a následně byl promyt stejným pufrům, jakým byla provedena eluce v minulém kroku. Po té byly navázané patatinové proteiny eluovány 7 ml elučního pufru (25 mM Tris-HCl, pH 7,4 + 0,5 M-NaCl + 100 mM α -methyl-D-glukosid). Získaný eluát představuje vzorek 3.

Přístroje a analýza

a) Automatická čipová elektroforéza

Proteiny byly analyzovány na systému automatické čipové elektroforézy Experion (Bio-Rad, USA). Vlastní separace a detekce proteinů probíhá ve speciálních čípech založených na kombinaci mikrofluidní technologie Lab-Chip (Caliper Life Sciences) a citlivé fluorescenční detekce proteinového (resp. RNA či DNA) vzorku. Pro analýzu proteinů byl použit analytický kit Experion Pro260, který obsahuje proteinový standard (Pro260 Ladder), vzorkový pufr (sample buffer), gelový roztok, fluorescenční barvu, centrifugační filtry a mikrofluidní čipy; každý čip pojme 10 vzorků. Příprava vzorku pro analýzu spočívala ve smíchání 4 μ l vzorku a 2 μ l vzorkového pufru, který obsahoval 3,2 % β -merkptoethanolu. Směs vzorku a pufru byla ve vodní lázni zahřata na teplotu 95–100 °C po dobu 3 min a poté rozředěna 84 μ l ultra čisté vody (Millipore). Na čipy, do kterých byly před vlastní analýzou zavedeny gelové roztoky pomocí přístroje „priming station“ (dodávaného jako součást systému) podle instrukcí výrobce (Bio-Rad), byly vzorky aplikovány v množství 6 μ l po výše uvedené úpravě. Vlastní analýza na přístroji Experion a zpracování získaných dat bylo řízeno a provedeno pomocí speciálního software Experion, verze 2.1 (Bio-Rad, USA).

b) SDS-PAGE

SDS-PAGE analyzovaných vzorků proběhla na vertikální elektroforéze Mini Protean pomocí „pre-cast“ gelů Tris-HCl s lineárním gradientem 4–20 % (Bio-Rad, USA). Vzorky byly připraveny smícháním 4 μ l vzorku a 4 μ l vzorkového pufru (0,0625 M Tris-HCl, pH 6,8; 25 % (v/v) glycerol; 2 % (w/v) SDS; 0,01 % (w/v) bromfenolová modř – těsně před použitím se k 19 objemovým dílům tohoto pufru přidá 1 díl β -merkptoethanolu). Směs vzorku a pufru byla ve vodní lázni zahřata na teplotu 95–100 °C po dobu 3 min, poté ochlazená a dále byly vzorky aplikovány na gel v množství 4 μ l takto upraveného vzorku. Vlastní separace byla provedena za podmínek konstantního napětí 200 V po dobu 55 min (jako elektrodový pufr byl použit systém Tris (0,025 M) – glycin (0,192 M) obsahující 0,1 % SDS). Po separaci byly gely vyjmuty, opláchnuty v destilované vodě a separované proteiny byly detegovány pomocí roztoku složeného z 1 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 500 ml methanolu, 100 ml octové kyseliny a 400 ml destilované vody. Následné vymytí detekčního roztoku z pórů gelů tzv. „odbarvení“ bylo provedeno pomocí odbarvacího roztoku (25 % ethanolu, 10 % octové kyseliny, 65 % dest. vody) po dobu 2 h a pomocí destilované vody (2 \times 400 ml po dobu 2 h) za podmínek aktivního třepání gelů o velmi nízké intenzitě na upravené třepače. Po odbarvení byly gely usušeny na sušičce Gel AirDrier (Bio-Rad, USA) a digitalizovány pomocí scanneru Microtek ScanMaker i800 (UMAX). Digitalizované informace byly zpracovány vyhodnocovacím softwarem BioProfil Bio 1D++, verze 99 (Vilber Lourmat, Francie).

Statistické hodnocení analýz

Základní statistické hodnocení získaných dat o molekulové hmotnosti a kvantifikaci proteinů bylo provedeno softwarem STATISTICA, verze 6 (StatSoft, Inc., 2001).

Výsledky a diskuse

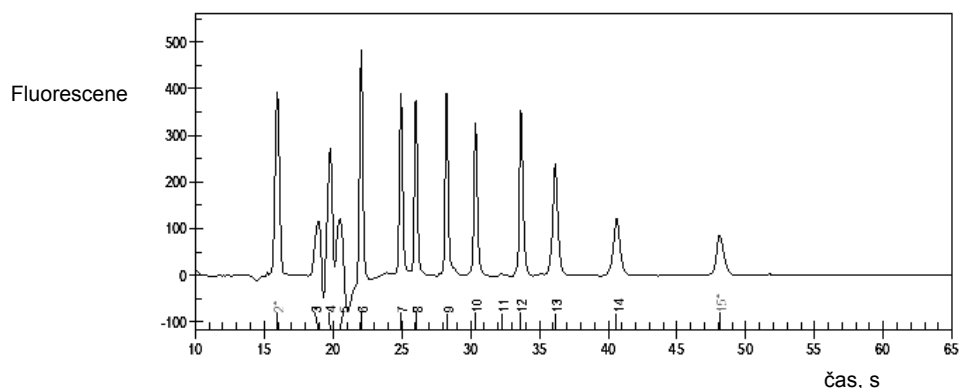
Stanovení molekulové hmotnosti

Stanovení molekulové hmotnosti (MW) je při studiu proteinů jedním ze základních požadavků a její určení pomocí SDS-PAGE je i přes řadu nevýhod této metody dostupná a snadno proveditelná s odpovídající přesností. Jak již bylo v úvodu uvedeno, existuje závislost MW proteinů na jejich migrační dráze resp. relativní mobilitě (Rf). Ta je v prvotní grafické podobě vyjádřena hyperbolou, nicméně používáno je zejména linearizované vyjádření závislosti dekadického logaritmu MW na relativní mobilitě^{3,9,15}. U systému čipové elektroforézy Experion vytváří obslužný a vyhodnocovací software kalibrační křivku,

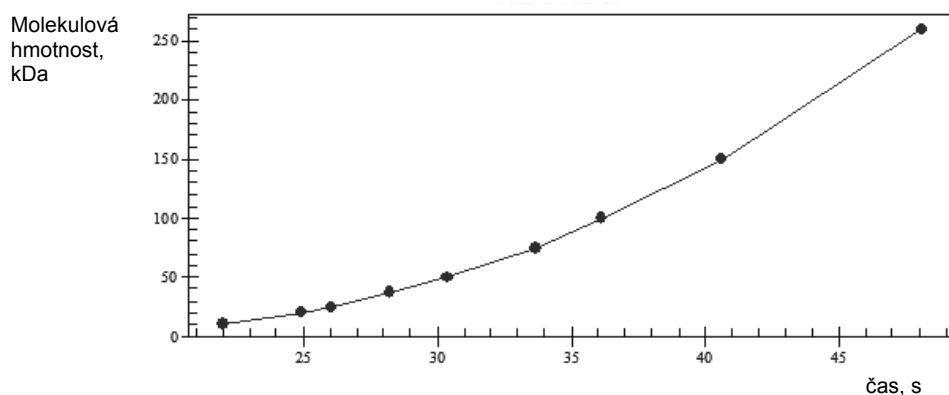
kteřá je založena na migračním čase (MT) a známé MW každého proteinu ve standardu „Pro260 Ladder“ (obr. 1 a 2). MT každého proteinu v rámci spektra vzorku jsou tímto softwarem nejprve normalizovány k separačnímu průběhu proteinového standardu pomocí hraničních proteinových markerů (1,2 a 260 kDa), které jsou přítomny ve vzorkovém pufru a jeho prostřednictvím jsou také součástí analyzovaného vzorku (jako interní standardy)¹⁶.

Pro porovnání přesnosti a reprodukovatelnosti stanovení molekulové hmotnosti byla u obou hodnocených technik analyzována směs proteinů (obr. 3) v podobě proteinového standardu zahrnující široké rozpětí molekulové hmotnosti od 6,5 do 200 kDa (SigmaMarker™ – Wide Range, Molecular Weight 6,500–200,000 Da). Reprodukovatelnost stanovení MW byla vyjádřena užitím relativní směrodatné odchylky (RSD), která byla vypočtena jako směrodatná odchylka / průměr × 100. Přesnost stanovení MW byla naopak vyjádřena jako procentický rozdíl mezi naměřenými a deklarovanými hodnotami MW u jednotlivých proteinů obsažených v proteinové směsi.

Výsledky stanovení MW jsou shrnuty v tabulce I. Vyplývá z nich, že analýza MW proteinů na automatické



Obr. 1. Záznam průběhu analýzy proteinového standardu „Pro260 Ladder“ na systému čipové elektroforézy Experion



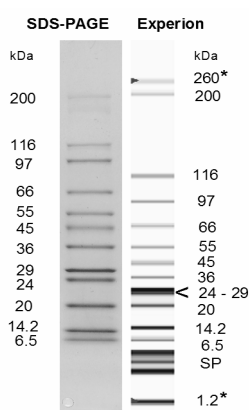
Obr. 2. Kalibrační křivka pro stanovení molekulové hmotnosti proteinů na čipové elektroforéze Experion, konstruovaná na základě migračních časů devíti proteinů standardu „Pro260 Ladder“

Tabulka I

Porovnání přesnosti a reprodukovatelnosti stanovení molekulové hmotnosti u proteinového standardu (SigmaMarker™ – Wide Range, Molecular Weight 6,500–200,000 Da) na SDS-PAGE a automatické čipové elektroforéze Experion

Hodnocený protein	Deklarovaná molekulová hmotnost [kDa]	SDS-PAGE			Experion		
		analyzovaná molekulová hmotnost [kDa] ^a	přesnost ^b [%]	reprodukovatelnost ^c RSD [%]	analyzovaná molekulová hmotnost [kDa] ^a	přesnost ^b [%]	reprodukovatelnost ^c RSD [%]
Myosin ze svalu králíka	200	226,1 ± 3,1	13,1	1,4	239,6 ± 1,6	19,8	0,7
β-Galaktosidasa z <i>E. coli</i>	116	114,6 ± 3,9	-1,3	3,4	126,1 ± 1,5	8,7	1,2
Fosforylase b ze svalu králíka	97	93,5 ± 2,8	-3,6	3,0	96,9 ± 1,8	-0,1	1,8
Albumin (hovězí sérum)	66	64,5 ± 1,9	-2,3	2,9	73,3 ± 1,3	11,0	1,7
Glutamát dehydrogenasa (hovězí játra)	55	49,9 ± 1,3	-9,2	2,6	57,1 ± 0,9	3,8	1,5
Ovalbumin (slepíčí vejce)	45	43,1 ± 1,1	-4,1	2,6	45,8 ± 0,9	1,8	1,9
Glycerinaldehyd-3-fosfát Dehydrogenasa (sval králíka)	36	35,4 ± 0,5	-1,8	1,5	37,5 ± 0,6	4,2	1,7
Karbonát anhydrasa (hovězí erytrocyty)	29	27,6 ± 0,6	-4,8	2,1	30,7 ± 0,5	5,9	1,5
Trypsinogen (hovězí pankreat)	24	24,4 ± 0,5	1,6	2,1	28,9 ± 0,6	20,5	2,1
Trypsin inhibitor (sója)	20	16,0 ± 0,2	-20,0	1,4	22,6 ± 0,3	12,9	1,1
α-Laktalbumin (kravské mléko)	14,2	11,4 ± 0,1	-20,0	0,9	14,5 ± 0,2	2,3	1,2
Aprotinin (hovězí plíce)	6,5	10,0 ± 0,1	53,7	0,8	10,2 ± 0,2	57,5	2,0

^a Průměr ze tří nezávislých měření ± směrodatná odchylka (SD); ^b přesnost (v %) = 100[(analyzovaná molekulová hmotnost – deklarovaná molekulová hmotnost) / deklarovaná molekulová hmotnost]; ^c reprodukovatelnost jako relativní směrodatná odchylka RSD (v %) = [(směrodatná odchylka / průměr)*100]

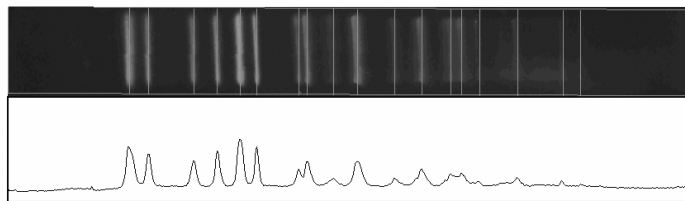


Obr. 3. Separace proteinového standardu (SigmaMarker™ – Wide Range, Molecular Weight 6,500–200,000 Da) na SDS-PAGE a na čipové elektroforéze Experion; * proteiny s MW 1,2 a 260 kDa nejsou součástí proteinového standardu (SigmaMarker™ – Wide Range), ale jsou přítomny ve vzorkovém pufru, který je přidáván ke všem vzorkům analyzovaných pomocí kitu Pro260 na čipové elektroforéze Experion; SP – pruhy systémových píků

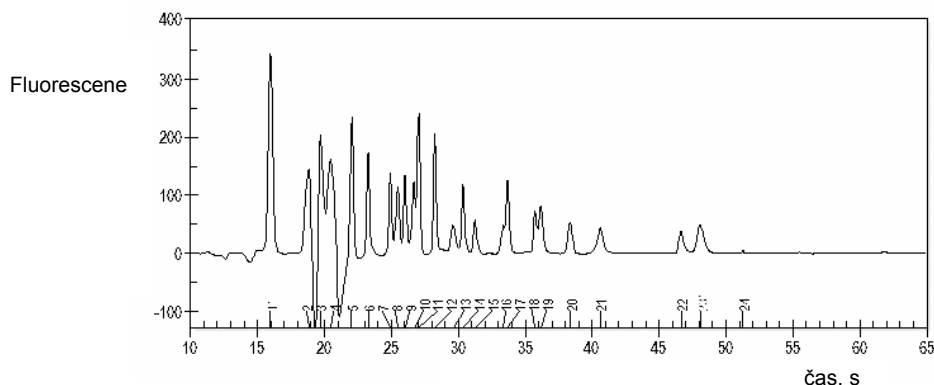
čipové elektroforéze Experion pomocí analytického kitu Pro260 měla vyšší reprodukovatelnost (RSD ≤ 2,09 %; v průměru 1,48 %) než analýza na SDS-PAGE (RSD ≤ 3,36 %; v průměru 2,17). Přesnost stanovení MW se u systému Experion pohybovala v rozpětí od -0,11 do 20,49 %, zatímco u SDS-PAGE bylo nalezeno rozpětí od -19,98 do 13,04 %. Do hodnocení obou charakteristik nebyl zahrnut protein aprotinin, jehož MW 6,5 kDa je mimo rámec analytických možností obou hodnocených metod. Tento fakt potvrzují i velmi výrazné odchylky zjištěných hodnot od deklarované hodnoty MW.

V podobně zaměřené studii, která se rovněž zabývala srovnáním výsledků obou metod¹⁷, bylo zjištěno, že systém Experion vykazuje přesnější a reprodukovatelnější výsledky (RSD ≤ 1,05 %), než tradiční SDS-PAGE (RSD ≤ 3,36 %). Pro systém Experion se v této studii pohybovala přesnost, vyjádřená stejným způsobem procentních odchylek od očekávané MW, v rozpětí od -8,56 do 8,49 %. To je sice o něco užší než u našich výsledků, ale počet provedených opakování u jednoho vzorku byl podstatně vyšší ($n = 25$), než v našem případě ($n = 3$), který se

a



b



Obr. 4. Grafický záznam dat z analýzy směsi proteinových standardů; a) výstup ze zpracování analýzy směsi proteinových standardů po SDS-PAGE pomocí software BioProfil Bio 1D++ (Vilber Lourmat), b) záznam separačního průběhu analýzy směsi proteinových standardů na systému číkové elektroforézy Experion (Bio-Rad)

v počtu provedených opakování více blíží běžné analytické praxi. Zajímavé je, že v této předešlé studii se procentní odchylky přesnosti stanovení MW pohybují jak v kladné, tak i v záporné oblasti, zatímco v našem případě se jedná o posun do kladné oblasti hodnot. V případě SDS-PAGE se v uvedené studii pohybovaly odchylky přesnosti spíše v záporné oblasti hodnot a v našem případě pokrývají kladnou i zápornou oblast hodnot.

Rozlišení

Podle dostupných informací výrobce by separační rozlišení systému Experion při použití analytického kitu Pro260 mělo být obdobné jako poskytují 4–20 % gradientové gely (Tris-HCl), které jsou doporučeny pro analýzy proteinů v rozpětí molekulové hmotnosti 10–260 kDa (cit.^{16,17}). Rozlišení je u separačních technik popisováno pomocí tzv. míry relativní separace dvou látek (R_S). Ta je obecně popisována vztahem $R_S = 1,18 \cdot (V_2 - V_1) / (w_1 + w_2)$, kde $V_1 - V_2$ reprezentuje vzdálenost maximálních bodů dvou píků resp. rozdíl jejich migračních časů, w_1 a w_2 jsou šířky těchto píků v polovině jejich výšky. Dokonalé rozlišení dvou píků až na základní linii je dosaženo při $R_S \geq 1,5$, většinou ale za předpokladu gaussovského tvaru píků postačuje rozlišení $R_S = 1$ (cit.^{18,19}). Z provedených analýz proteinů pomocí systému Experion (při použití analytického kitu Pro260), které se lišily o 10 % v MW, bylo zjištěno, že hodnota R_S roste se zvyšující se MW ana-

lyzovaných proteinů. Např. hodnota R_S při separaci proteinů s MW kolem 10 kDa byla 1,2, při separaci proteinů s MW 25 kDa je $R_S = 1,5$ a při 260 kDa je $R_S = 2$, z čehož vyplývá, že od 25 kDa by měly být rozděleny až na základní linii všechny analyzované proteiny lišící se v MW o 10 % (cit.¹⁷).

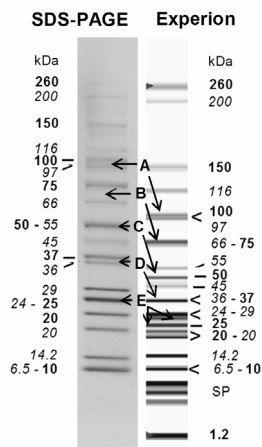
Náš test porovnání rozlišení obou elektroforetických technik zahrnoval 5 dvojic proteinů s podobnou MW v rozpětí od 24 do 100 kDa, které byly vybrány ve spektru proteinové směsi vzniklé smícháním proteinových standardů „Pro260 Ladder“ a „SigmaMarker™ – Wide Range, Molecular Weight 6,500–200,000 Da“ v objemovém poměru 1:1. Celkem takto vzniklá směs proteinů obsahovala 21 proteinů, ze kterých do samostatných píků rozlišil systém Experion 19 a tradiční SDS-PAGE 18 (obr. 4). Jak vyplývá z obr. 5 a dat uvedených v tab. II, oba dva elektroforetické systémy rozlišily tři dvojice proteinů – Experion dvojice A, B, C a SDS-PAGE dvojice A, B, D. Číková elektroforéza Experion dokázala rozlišit i čtvrtou dvojici proteinů (E), ale u trypsinogenu s deklarovanou MW = 24 kDa byla detegována MW = 28,94 kDa, takže nalezený rozdíl od molekulové hmotnosti druhého proteinu (Pro260 protein s deklarovanou MW = 25 kDa a nalezenou MW = 25,26 kDa) byl záporný (–12,72 %). Bradová a Matějová²⁰ se ve své práci zabývaly srovnáním výsledků analýz gluteninových podjednotek s vysokou MW (HMW-GS) u pšenice pomocí SDS-PAGE a číkové elektroforézy Experion. Autorky uvádějí, že v případě analýzy HMW-GS na Expe-

Tabulka II

Porovnání rozlišení vybraných proteinových párů analyzovaných na SDS-PAGE a automatické čipové elektroforéze Experion

Dvojice hodnocených proteinů	Deklarovaná molekulová hmotnost [kDa]	Nalezená molekulová hmotnost				Očekávaný rozdíl ^c [%]	Nalezený rozdíl ^d [%]	
		SDS-PAGE		Experion			SDS-PAGE	Experion
		průměr ^a [kDa]	RSD ^b [%]	průměr ^a [kDa]	RSD ^b [%]			
A Pro260 protein fosforylase b	100	102,7 ± 3,3	3,2	100,5 ± 0,9	0,9	3,1	8,0	4,1
B Pro260 protein albumin (hovězí sérum)	66	77,2 ± 2,1	2,7	75,4 ± 0,9	1,1	13,6	18,0	2,1
C glutamát dehydrogenasa z hovězích jater	55	50,6 ± 1,2	2,4	56,9 ± 0,6	1,1	10,0	0,0	13,3
D Pro260 protein glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenasa ze svalů králíka	37	37,3 ± 0,8	2,2	37,4 ± 0,6	1,6	2,8	4,3	0,0
E Pro260 protein trypsinogen z hovězího pankreatu	25	24,9 ± 0,5	2,2	25,3 ± 0,6	2,5	4,2	0,0	-12,7

^a Průměr ze tří nezávislých měření ± směrodatná odchylka (SD); ^b RSD vyjadřující reprodukovatelnost jako relativní směrodatná odchylka $RSD (v \%) = [(směrodatná\ odchylka / průměr) * 100]$; ^c očekávaný rozdíl – relativní rozdíl mezi deklarovanými molekulovými hmotnostmi proteinů dané dvojice v %; ^d nalezený rozdíl (%) - relativní rozdíl mezi nalezenými molekulovými hmotnostmi proteinů dané dvojice v %



Obr. 5. Separace směšného vzorku proteinových standardů „Pro260 Ladder“ (hodnoty MW proteinů jsou tučně) + „SigmaMarker™ – Wide Range“ (hodnoty MW proteinů jsou kurzívou) na SDS-PAGE a čipové elektroforéze Experion s lokalizací pěti dvojic proteinů (A – E), které byly použity pro porovnání rozlišení obou metod; SP – pruhy systémových piků

rionu neodpovídá separační pořadí podjednotek striktně jejich MW a výsledek tak nesouhlasí s pořadím získaným pomocí SDS-PAGE. Tento fakt může být vysvětlen odlišnými podmínkami během separace proteinů při použití

zmiňovaných metod, pravděpodobně způsobených složenými efekty konformace a tvaru proteinových molekul, společně s rozdíly v interakci specifických proteinů se stěnami kapilár²¹. Tak mohou být vysvětlovány u některých proteinů i větší rozdíly mezi deklarovanými a naměřenými hodnotami MW. Např. MW hovězího sérového albuminu se při analýze na Experionu výrazněji odlišuje od deklarované MW (66 kDa). Podle našich výsledků dosažených na čipové elektroforéze Experion byla MW hovězího sérového albuminu 73,28 kDa (tab. I) resp. 73,80 kDa (tab. II). Zhu a spol.¹⁷ našli u tohoto proteinu při analýze na systému Experion hodnotu MW 71,60 kDa. Rozlišení obou porovnávaných metod tak lze hodnotit jako podobné a je možné souhlasit se závěry jiných autorů¹⁷, že systém Experion může mít v případě některých proteinových dvojic s podobnou MW lepší rozlišení než tradiční SDS-PAGE.

Kvantifikace proteinů

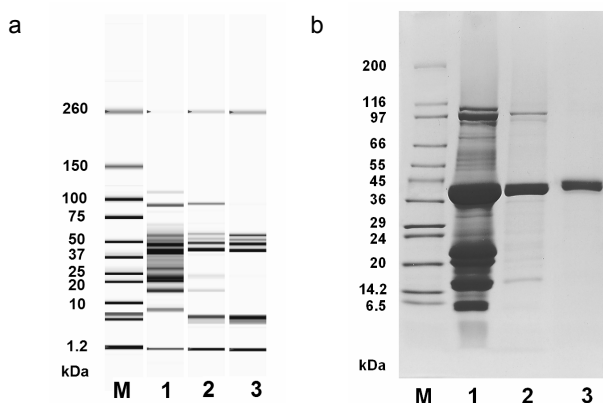
Mezi další uplatnění metody SDS-PAGE patří kvantifikace proteinů⁸. Možnosti metod používaných pro absolutní kvantifikaci proteinů např. UV spektroskopie při 280 nm nebo kolorimetrické techniky^{22,23} může tato separační metoda podstatně rozšířit o relativní a absolutní kvantifikaci konkrétního separovaného proteinu^{19,24}. Elektroforetické systémy založené na mikrofluidní technologii mohou tuto možnost také nabídnout a to v rychlejší a jednodušší podobě. Jako příklad zde uvádíme opět porovnání

Tabulka III

Porovnání SDS-PAGE a automatické čipové elektroforézy Experion při monitoringu relativního zastoupení patatinových proteinů v celkovém proteinu během jejich dvoustupňové chromatografické purifikace

Stupeň purifikace	SDS-PAGE		Experion	
	průměr [kDa] ^a	reprodukovatelnost RSD [%] ^b	průměr [kDa] ^a	reprodukovatelnost RSD [%] ^b
Vzorek 1 hlízová voda brambor (PFJ)	39,2 ± 2,2	5,7	38,6 ± 2,3	5,9
Vzorek 2 eluát po 1. stupni purifikace	86,0 ± 2,6	3,0	79,1 ± 0,6	0,8
Vzorek 3 eluát po 2. stupni purifikace	99,9 ± 0,1	0,1	98,5 ± 0,8	0,8

^a Průměr ze tří nezávislých měření ± směrodatná odchylka (SD), ^b RSD – relativní směrodatná odchylka v % [(směrodatná odchylka / průměr)*100]



Obr. 6. Porovnání čipové elektroforézy Experion (a) a SDS-PAGE (b) při monitoringu dvoustupňové chromatografické purifikace patatinových proteinů z hlízové vody brambor; M – proteinový standard („Pro260 Ladder“ resp. „SigmaMarker™ – Wide Range“), 1 – výchozí stav, hlízová voda brambor, 2 – eluát z kolony s náplní DEAE 52 – Cellulose Servacel, 3 – eluát z kolony s náplní Con A–Sephrose 4B (purifikované patatinové proteiny)

účinnosti obou elektroforetických technik schopných analyzovat komplex SDS-protein (SDS-PAGE a systém Experion) při monitoringu purifikačního procesu skupiny patatinových proteinů. Ty se nacházejí v hlízách brambor ve velkém množství – běžně představují 20–40 % z celkového obsahu proteinů hlíz – a jsou proto považovány za hlavní zásobní proteiny hlíz brambor s MW kolísající v rozsahu 40–43 kDa v závislosti na stupni glykosylace. Úplná podstata fyziologické role těchto proteinů není plně objasněna, neboť vykazují i některé enzymové aktivity, zejména aktivitu nespecifické lipidové acylhydrolasy^{13,14}. Protože se jedná o proteiny s hodnotami isoelektrických bodů v rozmezí pH 4,6–5,2 (cit.¹³), byla v první fázi jejich

purifikace zvolena iontovýměnná adsorpce těchto proteinů spolu s dalšími kyselými proteiny na náplni slabého anexu DEAE 52 – Cellulose Servacel. Ve druhém stupni purifikace byl využit fakt, že patatin je glykoprotein, a proto byla využita afinitní chromatografie na sloupci s náplní Con A – Sepharose 4B s isokratickou elucí navázaných proteinů. Účinnost procesu v podobě změny relativního zastoupení cílových proteinů – patatinových hmotnostních isoform – lze sledovat na obr. 6 a v tab. III. Je patrné, že oba demonstované separační systémy dosáhly při stanovení relativního zastoupení patatinových proteinů (suma zastoupení jeho detegovaných hmotnostních isoform) podobných výsledků na všech třech hodnocených úrovních a bylo potvrzeno, že čistota purifikovaného komplexu patatinových proteinů je více než 98 %. Podobná byla i reprodukovatelnost stanovení (RSD) – u hlízové vody brambor (vzorek 1) byla 5,73 % v případě SDS-PAGE a 5,93 % v případě Experionu. Prakticky stejné hodnoty reprodukovatelnosti bylo dosaženo u vzorků 2 a 3 při analýze na systému Experion (0,81–0,83 %). V případě SDS-PAGE se hodnoty reprodukovatelnosti u vzorků 2 a 3 lišily. Z obr. 6 je zřejmé, že čipová elektroforéza Experion má lepší schopnost rozlišit jednotlivé hmotnostní isoformy patatinu (celkem 4 pruhy na gelu) než SDS-PAGE (pouze 1 pruh). Na druhé straně u SDS-PAGE odpovídala determinovaná MW patatinu jeho deklarované MW (40 až 43 kDa), kdežto u systému Experion byl zjištěn posun hodnot do oblasti 44–58 kDa. Systém automatické elektroforézy Experion je po kalibraci schopný určit také absolutní kvantifikaci separovaných proteinů¹⁷.

Závěr

V této studii byly testovány dvě elektroforetické techniky pro analýzu denaturovaných proteinů – tradiční metoda SDS-PAGE a automatická čipová elektroforéza Experion – z pohledu přesnosti a reprodukovatelnosti určení mo-

lekulové hmotnosti, rozlišení proteinů a odhadu relativního zastoupení cílového proteinu v průběhu purifikačního procesu.

Obě techniky poskytly podobné výsledky u hodnocených vzorků proteinů, technika automatické čipové elektroforézy Experion vykazovala vyšší hodnoty reprodukovatelnosti získaných dat. Je potřebné zdůraznit, že tato technika nabízí v porovnání s SDS-PAGE kratší dobu analýzy a v podstatě automatické vyhodnocení získaných dat, která jsou nabídnuta v podobě kompatibilní s běžným softwarem pro zpracování a úpravu dat. Významnou výhodou je rovněž velmi nízké množství analyzovaných vzorků a vyšší bezpečnost práce obslužného personálu, protože pro analýzu není potřebný toxický akrylamid v porovnání s přípravou gelů pro SDS-PAGE.

Autoři děkují za finanční podporu Ministerstvu zemědělství ČR (projekt NAZV č. 1B44011) a Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy ČR (výzkumný záměr MSM 6007665806).

LITERATURA

- Laemmli U. K.: *Nature* 227, 680 (1970).
- Westemeier R.: *Electrophoresis in Practice. A Guide to Theory and Practice*. 2. vyd. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1993.
- Makowski G. S., Ramsby M. L., v knize: *Protein structure* (Creighton T. E., ed.), kap. 1. Oxford University Press, New York 2002.
- Shapiro A. L., Vinuela E., Maizel J. V.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 815 (1967).
- Weber K., Osborn M.: *J. Biol. Chem.* 244, 4406 (1969).
- Andrews A. T.: *Electrophoresis. Theory, Techniques, and Biochemical and Clinical Applications*. 2. vyd. Oxford University Press, New York 1993.
- Bollag D. M., Rozycki M. D., Edelstein S. J.: *Protein Methods*. 2. vyd. Wiley-Liss, New York 1996.
- Walker J. M., v knize: *The Protein Protocols Handbook* (Walker J. M., ed.), sv. 2, kap. 11. Humana Press, Totowa 2002.
- Garfin D. E., v knize: *Introduction to Biophysical Methods for protein and Nucleic Acid Research* (Glaser J. A., Deutscher M. P., ed.), kap. 2. Academic Press, San Diego 1995.
- Baines D., v knize: *Protein Purification Techniques. A practical Approach* (Roe S., ed.), kap. X. Oxford University Press, New York 2001.
- Grym J., Foret F.: *Chem. Listy* 99, 915 (2005).
- Chang B., Larson E., Whitman-Guliaev C.: *Bio-Rad bulletin* 5285. Bio-Rad Laboratories, Hercules 2006.
- Pots A. M.: *Dissertation*. Wageningen Agricultural University, Wageningen 1999.
- Bárta J., Čurn V.: *Chem. Listy* 98, 373 (2004).
- Hames B. D., Rickwood D.: *Gel Electrophoresis of Proteins. A Practical Approach*. IRL Press, Oxford 1990.
- Zhu K., Strong W.: *Bio-Rad bulletin* 5328. Bio-Rad Laboratories, Hercules 2006.
- Zhu K., Nguyen M., Strong W., Whitman-Guliaev Ch.: *Bio-Radiations* 117, 22 (2005).
- Holzbecher Z., Churáček J.: *Analytická chemie*. SNTL, Praha 1987.
- Janson J.-Ch., Rydén L.: *Protein Purification – Principles, High Resolution Methods and Applications*. VCH Publishers, New York 1989.
- Bradová J., Matějová E.: *Chromatographia Suppl.* 67, S83 (2008).
- Uthayakumaran S., Listiohadi Y., Baratta M., Batey I. L., Wrigley C. W.: *J. Cereal Sci.* 44, 34 (2006).
- Bradford M. M.: *Anal. Biochem.* 72, 248 (1976).
- Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J., Klenk D. C.: *Anal. Biochem.* 150, 76 (1985).
- Smith B. J., v knize: *The Protein Protocols Handbook* (Walker J. M., ed.), sv. 2, kap. 29. Humana Press, Totowa 2002.

J. Bárta^a, V. Bárťová^a, and V. Čurn^b (^a Department of Plant Production, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budějovice, ^b Biotechnological Centre, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic): **Protein Analysis Using Automated Experion Chip Electrophoresis and Its Comparison with SDS-PAGE**

Two methods recommended for analysis of denatured proteins, automated Experion chip electrophoresis and SDS-PAGE, are compared. The Experion method is a novel technique based on combination of the LabChip microfluidic separation technique (Caliper Life Sciences) and sensitive fluorescent detection. Both methods were compared in molecular weight (MW) determination of a protein standard mixture, resolution of protein pairs of near molecular weights and estimation of the abundance of a target protein in the mixture to be purified. Both the methods are appropriate for MW determination and in purification of proteins. The accuracy of the methods is approximately the same (ca. 8%), but the Experion method shows better reproducibility (ca. 1.48%) than SDS-PAGE (ca. 2.17%).