



Aspekty metodyczne analiz proteomicznych z wykorzystaniem metod elektroforezy dwukierunkowej i spektrometrii mas

Magdalena Łuczak¹, Marek Figlerowicz¹, Przemysław Wojtaszek^{1,2}

¹Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań

²Zakład Biologii Molekularnej i Komórkowej, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

Methodological aspects of proteomic analyses involving two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry

Summary

Proteomics is a scientific discipline that focuses on the large-scale study of proteins, particularly their structures, functions and interactions. The proteome is the full complement of proteins expressed by genome. During the last decade, thanks to subset of proteomic techniques and workflows, it has been possible to identify: diagnostic protein biomarkers, potential therapeutic targets and also biotechnologically important plant proteins, like those that give a plant resistance to drought. Over the last years, proteomics has generated a relatively large number of reviews on technical aspects and concepts. Although total automation and reproducibility are possible, the protocols of protein isolation and separation are sample specific. Moreover, most of them address the development of optimal sample preparation protocols of mammalian cells and tissue. In contrast, plant proteomics is still in its infancy, probably because plant material is very recalcitrant. The objective of this review is to pay attention to some methodological aspects of proteomic analyses using 2DE and mass spectrometry, especially in the case of plant material.

Key words:

2DE, mass spectrometry, sample preparation, proteins.

Adres do korespondencji

Magdalena Łuczak,
Instytut Chemii
Bioorganicznej,
Polska Akademia Nauk,
ul. Noskowskiego 12/14,
61-704 Poznań;
e-mail:
magdalu@ibch.poznan.pl

biotechnologia

2 (85) 7–26 2009

1. Wstęp

Od kilkunastu lat analizy proteomiczne i identyfikacja białek z wykorzystaniem spektrometrii mas stały się bardzo użytecznym narzędziem wykorzystywanym w wielu dziedzinach biologii i medycyny. Korelowanie ekspresji danego genu z cechą fenotypową ujawnioną w wyniku działania jego produktu, jest niezwykle trudne. Nie stwierdzono bowiem ścisłej zależności pomiędzy poziomem mRNA i zawartością, a tym bardziej aktywnością, białek w komórce. Stosowanie tradycyjnych metod genomycznych jest zatem niewystarczające, gdyż białko – egzekutor przemian biochemicznych, ulega licznym modyfikacjom i wchodzi w interakcje, których nie da się ustalić na podstawie sekwencji jego genu. Występowanie splicingu alternatywnego, proces degradacji mRNA oraz aktywność regulatorowa mikroRNA dodatkowo komplikują obraz, stąd niezbędne staje się jak najpełniejsze badanie proteomów.

Jednym z najbardziej popularnych podejść proteomicznych jest tzw. proteomika porównawcza, którą stosuje się w celu znalezienia markerów badanego procesu, np. infekcji wirusowej, nowotworzenia czy reakcji na stres. Poprzez porównanie profili białkowo-peptydowych próby kontrolnej z próbą badaną, uzyskuje się informacje o zmianach jakościowych i ilościowych wywołanych danym czynnikiem. Takie podejście znalazło zastosowanie zarówno w badaniach proteomicznych z użyciem materiału roślinnego jak i zwierzęcego czy ludzkiego. W przypadku roślinnej proteomiki porównawczej najbardziej popularne są poszukiwania markerów procesów infekcji wirusowej (1) lub grzybowej (2), formowania korzeni bocznych (3) czy programowanej śmierci komórki (4). Dzięki zastosowaniu kombinacji 2-D DIGE (ang. *two-dimensional difference gel electrophoresis*) z techniką MALDI ToF (ang. *matrix assisted laser desorption ionisation-time of flight*) określono bardzo dokładnie zmiany zachodzące w proteomie komórek kukurydzy po zadziałaniu stresu solnego. Zidentyfikowano 75 białek, które uznano za markery stresu osmotycznego i solnego (5). Analizy proteomiczne umożliwiły również znalezienie markerów stresu suszy w łodydze lubinu białego (6). Dzięki zastosowaniu proteomiki, zidentyfikowano także wiele białek zaangażowanych w reakcje obronne, fałdowanie białek, a także enzymy antyoksydacyjne (2). W porównaniu jednak ze stanem zaawansowania badań proteomicznych organizmów prokariotycznych, drożdży i zwierząt, proteomika roślin dopiero wkracza w fazę rozwoju. Przyczyny takich opóźnień upatrywać można w tym, że rośliny stanowią trudny materiał biologiczny, ze względu na obecność ścian komórkowych, dużą zawartość metabolitów wtórnych oraz „rozcieńczenie” białek, spowodowane obecnością wakuol. Pewnym wytłumaczeniem może być także fakt, że sekwencjonowanie genomów roślinnych jest mniej zaawansowane niż sekwencjonowanie genomów innych grup organizmów. Konsekwencją są znaczące braki w anotacji białek w bazach danych dla wielu gatunków roślin. Z tych również przyczyn najbardziej popularnymi gatunkami roślin poddawanych analizom proteomicznym są rzodkiewnik, ryż, kukurydza oraz topola.

Zastosowanie proteomiki w poszukiwaniu biomarkerów procesów chorobowych człowieka, szczególnie kancerogenezy, doprowadziło w ostatnich latach do odkrycia wielu białek uczestniczących w rozwoju tych zaburzeń. Tą drogą wykazano, że kalretikulinę można uznać za potencjalny marker nowotworu pęcherza moczowego (7). Opisano również wiele białek, których poziom akumulacji zmieniał się istotnie podczas rozwoju nowotworu wątroby (8,9), trzustki (10,11), przełyku (12,13), żołądka (14,15), jelita grubego (16,17) czy płuc (18,19). Niestety z wielu przyczyn bardzo mało z opisanych dotąd białek jest z powodzeniem stosowanych w diagnostyce nowotworów. Jedynie kilka biomarkerów białkowych takich jak: antygen PSE swoisty dla prostaty, neurospecyficzna α -enolaza oraz izomeraza trójfosforanowa, powszechnie wykorzystywanych jest w profilaktyce i wczesnym wykrywaniu nowotworów. Badanie z użyciem przeciwciał skierowanych na wimentynę, antygeny CD117 i CD34, z powodzeniem stosuje się w diagnostyce guzów stromalnych (np. mięsak podścieliskowy przewodu pokarmowego). Wimentyna jest także typowym markerem raka tarczycy, ziarniszcza jajnika, raka kory i rdzenia nadnerczy. Większość z opisanych dotąd białek została zidentyfikowana z użyciem klasycznej strategii obejmującej: izolację i oczyszczenie białek, ich separację i identyfikację metodami spektrometrii mas. Każdy z tych etapów może przesądzić o powodzeniu analizy i uzyskaniu wiarygodnych wyników, a trudności z tym związane wynikają z konieczności stosowania rozwiązań zindywidualizowanych w zależności od pochodzenia materiału biologicznego. Celem pracy nie jest jednak omówienie metod izolacji, separacji i identyfikacji białek, opracowania takie są bowiem dostępne (20). Pragniemy jedynie zwrócić uwagę na niektóre aspekty metodyczne analiz proteomicznych, zwłaszcza tych z wykorzystaniem metody elektroforezy dwukierunkowej (2DE) i spektrometrii mas (MS).

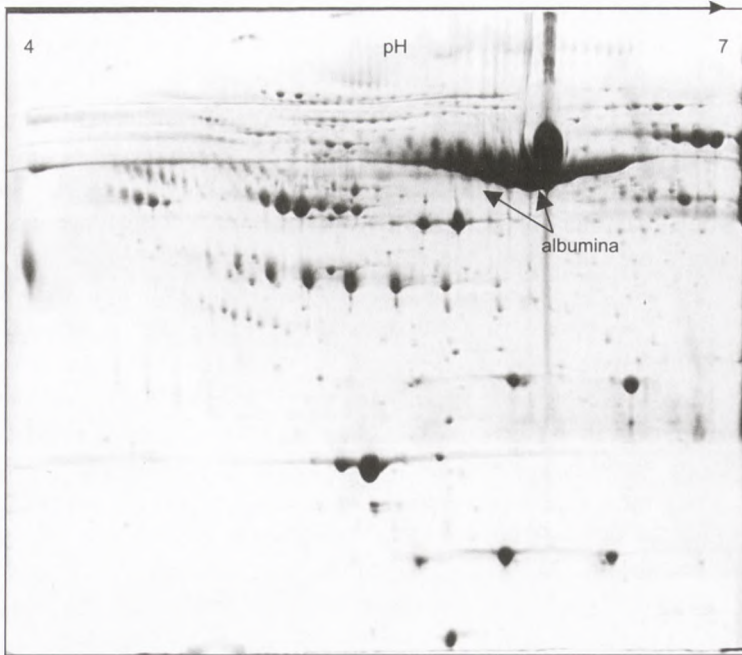
2. Przygotowanie prób białkowych

Przygotowanie materiału to etap krytyczny analiz proteomicznych, od którego zależy jakość i wiarygodność uzyskanych później danych. Etap ten wymaga stosowania precyzyjnych i niezawodnych procedur, które z jednej strony będą bardzo wydajne, a z drugiej niezwykle powtarzalne. Opracowanie takiej optymalnej metody jest trudne ze względu na różnice pomiędzy poszczególnymi próbami. Inne podejście zostanie zastosowane do izolacji białek z komórek hodowanych *in vitro*, a inne do izolacji białek z tkanek roślinnych czy zwierzęcych. W przypadku hodowli komórkowych wystarczy zastosowanie bezpośredniej lizy w buforze zawierającym mocznik, tiomocznik, detergent CHAPS (ang. 3-[(2-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane-sulfonate hydrate), ditriotreitol i amfolit. Jest to roztwór silnie denaturujący, dzięki czemu nie dochodzi do degradacji i modyfikacji białek, a użycie inhibitorów proteaz staje się zbędne. Jednocześnie jest to ten sam bufor, który dalej służy do ogniskowania izoelektrycznego białek w metodzie 2DE. Zostaje za-

tem zminimalizowana liczba etapów obróbki, a próbki po zmierzeniu stężenia białka są gotowe do rozdziału. Godne polecenia, jak się wydaje, jest stosowanie mieszaniny mocznika i tiomocznika (w miejsce wykorzystywanego niegdyś samego mocznika), która znacząco zwiększa ilość rozpuszczonych białek i poprawia uzyskany obraz elektroforetyczny. Przy wyborze tej metody dezintegracji komórek należy jednak pamiętać, że takie odczynniki jak: mocznik, detergenty czy amfolity, często zaburzają pomiar stężenia białka, np. metodą Bradford (21). W związku z tym konieczne staje się zastosowanie alternatywnych metod pomiaru, np. z wykorzystaniem gotowych zestawów przystosowanych do takich analiz (2D-Quant Kit).

W przypadku komórek zorganizowanych w tkanki, opisany rodzaj lizy jest niewystarczający i izolacja białek wymaga zastosowania bardziej skomplikowanych metod. W tej sytuacji etapem niezwykle podnoszącym jakość obrazów 2DE, zarówno pod względem liczby jak i jakości obserwowanych plamek, jest zastosowanie izolacji metodą fenolową opracowaną przez Hurkmanna i Tanakę (22). Procedurę tę można z powodzeniem stosować do izolacji białek z materiału roślinnego czy zwierzęcego, jak i do oczyszczania mieszanin białek uzyskanych za pomocą innych metod. Szczególnie przydatna jest ona do izolacji białek błonowych. Stosowanie tej metody znacząco zmniejsza ilość zanieczyszczeń, szczególnie w postaci soli, co również podwyższa wydajność późniejszej identyfikacji białek metodą MALDI ToF. W przypadku roślin silnie zdrewniałych lub z wysoką zawartością substancji interferujących, takich jak: barwniki, polifenole i polisacharydy (np. oliwka, bambus, łubin), dobre efekty daje wstępna precypitacja mieszaniną kwas trójchlorooctowy/acetone, a następnie przepłukanie uzyskanego osadu za pomocą metanolu i acetonu (23). Dopiero tak podczyszczony materiał poddaje się ekstrakcji fenolowej. Połączenie obu procedur znacznie podwyższa czystość i rozpuszczalność białek oraz poprawia jakość map białkowych uzyskanych metodą 2DE. Niektórzy autorzy polecają również prowadzenie ekstrakcji fenolowej w obecności SDS, który poprawia rozdzielczość i zwiększa liczbę plamek widocznych na żelach dwuwymiarowych (24). Jednak w tym przypadku należy być bardzo ostrożnym, gdyż obecność SDS w próbce efektywnie zaburza elektroogniskowanie białek podczas I kierunku rozdziału elektroforetycznego.

W odróżnieniu od roślin, w przypadku zwierząt i ludzi, możliwe jest pozyskanie bardzo atrakcyjnego materiału, jakim są płyny ustrojowe, takie jak: krew, osocze, mocz czy płyn mózgowo-rdzeniowy. Większość z nich jest stosunkowo łatwo dostępna i dobrze odzwierciedla stan fizjologiczny organizmu, ma bowiem kontakt z wieloma tkankami. Zastosowanie płynów ustrojowych umożliwia również wykonanie analiz bez dodatkowych etapów oczyszczania. Dla przykładu, białka osocza można rozdzielać bezpośrednio metodą 2DE. Połączenie kilkunastu mikrolitrów osocza z roztworem lizującym, w którym przeprowadza się rozdział ogniskujący, umożliwia uzyskanie wysokorozdzielczej mapy proteomicznej, mimo bardzo wysokiej zawartości soli nieorganicznych w osoczu (rys. 1). Jest to możliwe dzięki zastosowaniu tzw. aktywnej rehydratacji, która m.in. umożliwia migrację substancji drobnocząsteczkowych i ich usunięcie z żelu (patrz rozdz. 3).



Rys. 1. Profil białkowy osocza ludzkiego rozdzielonego metodą 2DE w zakresie pH 4-7. 15 μ l osocza połączono z 435 μ l buforu lizującego (7 M mocznik, 2 M tiomocznik, 2% CHAPS, 55 mM DTT i 0,5% amfolit pH 4-7), a następnie rozdzielono na 24 cm paskach żelowych z immobilizowanym gradientem pH.

Z medycznego punktu widzenia płyny ustrojowe człowieka stanowią bardzo interesujący, choć nie pozbawiony wad obiekt badań. Jednym z najistotniejszych problemów napotykanym w ich globalnej analizie proteomicznej jest ogromne zróżnicowanie stężenia poszczególnych białek. Skrajnym przykładem jest osocze zawierające aż do 70% albuminy (25). Problem ten dotyczy także analitów roślinnych, gdzie w podobnych ilościach wykrywa się podjednostki Rubisco. Występowanie niektórych białek w bardzo wysokim stężeniu (ang. *high abundant proteins*) sprawia, że często nie jesteśmy w stanie wykryć białek niskokopijnych (ang. *low abundant proteins*). Tymczasem geny białek regulatorowych, takich jak: czynników transkrypcyjnych, receptorów, hormonów białkowych, enzymów, cytokin czy białek uczestniczących w transdukcji sygnałów, ulegają ekspresji na bardzo niskim poziomie, choć spełniają niezwykle istotne funkcje w komórkach. Ocenia się, że białka wysokokopijne występują w komórce w ilościach 10-12 rzędów wielkości wyższych niż białka niskokopijne. Istnieje kilka metod umożliwiających wzbogacenie frakcji białek niskokopijnych (26), z których najbardziej popularna jest chromatografia powinowactwa oraz ultrafiltracja na membranach o odpowiednim punkcie odcięcia. Zestawy w których wykorzystuje się te metody są stosowane od wielu lat do usuwania białek, takich jak albumina czy immunoglobuliny. Ostatnio pojawiły się również

pierwsze zestawy do usuwania Rubisco, które stanowi nawet do 40% wszystkich białek w liściach zielonych. Zestaw Seppro[®] (27) działa na bazie techniki immunoprecypitacji przy użyciu przeciwciał IgY z jaja kurzego, połączonych ze złożem chromatograficznym. Usuwanie albuminy przed rozpoczęciem analiz proteomicznych to rutynowy zabieg stosowany od wielu lat w biologii i medycynie. Przy wyborze optymalnej metody należy jednak pamiętać, że albumina to tzw. białko nośnikowe zdolne do wiązania innych białek, lipidów i małych cząsteczek, takich jak cytokiny, hormony czy interferon (28,29). Zidentyfikowano kilkadziesiąt różnych białek, które tworzą tzw. albuminom i wiążą się w sposób selektywny z albuminą (29,30). Wykazano m.in., że białko gp41 wirusa HIV-1, wiąże się z albuminą swoją N-końcową częścią (31). Zdolność albuminy do wiązania innych cząsteczek może spowodować, że usunięcie jej z mieszaniny z jednej strony spowoduje wzbogacenie frakcji białek niskokopijnych i umożliwi ich detekcję, z drugiej jednak może być przyczyną utraty potencjalnych biomarkerów. Rozsądnym rozwiązaniem „pośrednim” – w eksperymentach z użyciem osocza – jest, jak się wydaje, usunięcie albuminy poprzez denaturację próby, a następnie ultrafiltracja na membranie o punkcie odcięcia mniejszym niż masa albuminy (32). Denaturacja powoduje zniesienie większości interakcji pomiędzy białkiem nośnikowym a innymi składnikami osocza, zmniejszając tym samym ryzyko usunięcia innych białek wraz z albuminą. Niedogodnością jest to, że usunięte zostają jednocześnie białka wysokocząsteczkowe. Zgodnie jednak z wiedzą literaturową to właśnie białkom o niskich masach cząsteczkowych przypisuje się związek z rozwojem nowotworów (33), cukrzycą (34) czy chorobami układu krążenia (35).

Metody izolacji białek z większości organelli roślinnych są dość dobrze opisane w literaturze. Nie dotyczy to jednak izolacji białek ze ścian komórkowych. Prawdopodobnie, dlatego też w porównaniu do proteomów przedziałów subkomórkowych, takich jak mitochondria czy chloroplasty, proteom ściany komórkowej i apoplastu jest słabo scharakteryzowany. Białka stanowią bardzo istotny element roślinnych ścian komórkowych. Ze względu na stopień związania białek w ścianach można wyróżnić co najmniej trzy populacje. Są to białka luźno związane ze ścianami, które są wydzielane do przestworów międzykomórkowych bądź do medium hodowlanego w przypadku zawiesiny komórek. Drugą populację stanowią białka, które są związane w strukturze ściany wiązaniami jonowymi, a trzecią – białka trwale związane, dzięki wiązaniom kowalencyjnym z polisacharydami tworzącymi rusztowanie ściany. Populacje te częściowo nakładają się na siebie. W analizach proteomicznych ogromną rolę odgrywa poziom zanieczyszczeń próbki, który w przypadku białek ścian komórkowych jest zależny od stopnia ich związania ze ścianami, a zatem w praktyce od zastosowanej metody ekstrakcji. Białka apoplastyczne można wyizolować techniką IWF (ang. *intracellular washing fluid*), czyli infiltracji przestworów międzykomórkowych za pomocą buforu o pH zbliżonym do pH ścian i zawierającym sól w wysokim stężeniu (36). Czyni się to w warunkach, w których ciągłość błon pozostaje nienaruszona, a komórki nie ulegają zniszczeniu. Podobnie można izolować

białka zewnątrzkomórkowe komórek hodowanych w zawiesinie. Komórki poddaje się działaniu 0,2 M CaCl_2 , a białka związane ze ścianami są wymywane do buforu bez lizy komórek (37). W tym przypadku jednak uzyskuje się białka ścian pierwotnych, które też najłatwiej jest analizować zarówno metodą LC-MS/MS jak i MALDI ToF. Białka wydzielane do medium hodowanego są homogenne, nie występują w połączeniu ze związkami fenolowymi i cukrami, które obniżają wydajność identyfikacji metodami spektrometrii mas. Podczas izolacji białek związanych w ścianach komórkowych roślin trzeba uprzednio zniszczyć strukturę ścian i rozbić komórki, a to oznacza ryzyko zanieczyszczeń. Po usunięciu białek cytozolowych i mikrosomalnych pozostały osad traktuje się roztworem soli o wysokim stężeniu, co pozwala na rozerwanie wiązań jonowych, wiążących białka ze ścianami (38). Ponadto, zastosowanie detergentów, mnogość etapów, a co za tym idzie, również długi czas trwania izolacji, mogą znacząco wpływać na jakość analiz. Szczególną trudność sprawia identyfikacja białek kowalencyjnie związanych ze ścianami komórkowymi. Opracowano metodykę izolacji takich białek (39), która obejmuje trawienie enzymatyczne oczyszczonych ścian. Niedogodnością tej metody jest obecność w próbce enzymów hydrolitycznych, co sprawia, że mieszanina peptydów, powstałych w wyniku trawienia takiej próby trypsyną, zawiera znaczącą liczbę peptydów pochodzących z rozpadu stosowanych hydrolaz, co znacznie utrudnia identyfikację białek metodami MS.

3. Elektroforeza dwukierunkowa oraz metody detekcji białek

Elektroforeza dwukierunkowa w żelu poliakryloamidowym, dzięki połączeniu techniki ogniskowania izoelektrycznego (IEF) oraz standardowej elektroforezy w warunkach denaturujących (SDS-Page), zapewnia wyjątkowo dobry rozdział mieszaniny białek. Przeprowadzenie ogniskowania w handlowo dostępnych paskach żelowych z immobilizowanym gradientem pH zapewnia wysoką powtarzalność analiz w odróżnieniu od metod starszych, w których stosowało się kapilarki wypełnione żelem z amfolitem. Gradient pH w takim żelu ustalał się sam indywidualnie w każdej kapilarze w pierwszym etapie elektroforezy, w rezultacie powtarzalność wyników była bardzo mała. Zakresy pH komercyjnych pasków żelowych są bardzo zróżnicowane, co umożliwia uwzględnienie zarówno typu eksperymentu jak i oczekiwanego wyniku. Paski żelowe są dostępne handlowo w formie wysuszonej. Ogniskowanie rozpoczyna się od rehydratacji paska, która trwa minimum 12 godzin. W zależności od używanego aparatu do IEF stosować można rehydratację paska, a następnie wprowadzenie mieszaniny białek w celu ogniskowania lub jednoczesną rehydratację wraz z białkami przeznaczonymi do rozdziału. W tym ostatnim przypadku możliwe jest prowadzenie tzw. aktywnej rehydratacji stosując niewielkie napięcie (20-120V), które nie tylko ułatwia białkom, szczególnie tym o wysokich masach cząsteczkowych, wniknięcie w żel, ale również umożliwia wymycie z paska żelowe-

go zanieczyszczeń niskocząsteczkowych, które znajdują się w próbce, a które mogłyby zaburzać ogniskowanie. Bardzo użytecznym zabiegiem, który również poprawia jakość uzyskanych obrazów, jest zastosowanie lekko zwilżonych wodą papierków z cienkiej bibuły o wielkości 3x5 mm, które przed rozpoczęciem rehydratacji umieszcza się pomiędzy paskiem a elektrodą i pozostawia na cały czas trwania elektroforezy. Osadzają się na nich zanieczyszczenia pochodzące z próbki, chroniąc tym samym pasek żelowy, który dzięki temu nie zmienia swojej objętości. Ponadto absorbują one nadmiar wody, która jest transportowana wraz z białkami pomiędzy elektrodami. Ogromną wadą metody 2DE jest jej czasochłonność oraz wymóg stosowania bardzo dużych ilości białka, w porównaniu do metod chromatograficznych. Ilość materiału białkowego jest uzależniona od wielkości paska, w którym będzie rozdzielany, jak i metody wizualizacji po rozdziale. W przypadku próbek poddanych wcześniej frakcjonowaniu, w których można spodziewać się niewielkiej liczby białek, należy użyć pasków krótkich 7 lub 11 cm. Gdyby na takich paskach rozdzielać nie rozfrakcjonowaną uprzednio mieszaninę białek, uzyskany obraz byłby mało czytelny, a różnice niezwykle trudne do wykrycia. Stąd konieczne staje się użycie pasków długich, np. 24 cm, co z kolei znacznie zwiększa ilość białka, którą trzeba nałożyć na pasek. Duże znaczenie ma również wybór zakresu pH stosowanych pasków. Używając szerokiego zakresu pH, np. 3-10 lub 3-11, można uzyskać ogólny obraz profilu białkowego. Zawiera on setki nakładających się na siebie plamek, co uniemożliwia wykrycie wszystkich z nich. Ponadto białka niskokopijne nie ujawniają się w tej mnogości cząsteczek. Rozwiązaniem jest rozdzielanie białek na kilku paskach o wąskich zakresach pH, które będą się częściowo na siebie nakładały, np. 4-5, 4.5-5.5, 5-6, 5.5-6.7. Stosując taką metodę wykryto wiele białek niskokopijnych w proteomie komórek linii chłoniaka (40). Wadą tego rozwiązania jest czasochłonność, jak również bardzo duża ilość materiału białkowego koniecznego do analiz. Metoda ta nie sprawdza się jednak w przypadku białek zasadowych. Należy również pamiętać, że ilość białek użytych do rozdziału na pasku żelowym o zakresie pH 3-10, będzie niewystarczająca w przypadku pasków o węższym zakresie pH, gdyż część z nich po prostu się nie rozdzieli. Białka te wędrują na końcu paska, gdzie zaczynają precypitować, jak również koprecypitować z innymi białkami o pI zbliżonym do pH końca paska. Aby uniknąć precypitacji białek o pI poza zakresem paska, jak również aby rozwiązać problem nakładania na pasek o wąskim zakresie pH bardzo dużej ilości białka, można spróbować wcześniejszego frakcjonowania białek ze względu na ich punkt izoelektryczny. Na uwagę zasługuje metoda frakcjonowania za pomocą elektrolizera MCE (ang. *multi-compartment electrolyser*), który wykorzystuje membrany izoelektryczne do frakcjonowania białek osocza na: białka kwaśne, zasadowe oraz frakcję albuminy o pI pomiędzy 5.6 a 6.1 (41). Metoda ta, choć obiecująca, wymaga dopracowania wielu szczegółów, ponieważ jej największą wadą jest utrata białek o pI zbliżonym do 5.6, które precypitują na membranie.

Dla powodzenia analiz proteomicznych ogromne znaczenie ma również wybór odpowiedniej metody detekcji rozdzielonych elektroforetycznie białek. Najbardziej

popularnymi są obecnie: barwienie znacznikami fluorescencyjnymi, barwienie metodą srebrową lub barwnikami z rodziny Coomassie Brilliant Blue (CBB). Bardzo czytelne obrazy 2D można uzyskać stosując metodę srebrową wg Jungblut (42). Największą zaletą tej metody jest duża czułość wykrywania (około 1000 razy większa niż z CBB), dochodząca nawet do 0,02 ng białka/mm³ żelu. Jest to metoda, która w żelach dwuwymiarowych zwykle w sposób zadowalający wizualizuje plamki białek bez nadmiernego tła, niestety, równocześnie poważnie utrudnia późniejsze analizy MS. Barwienie srebrem z użyciem aldehydu glutarowego znacznie obniża wydajność identyfikacji peptydów, nawet po uprzednim odbarwieniu żeli. Z inną sytuacją spotkamy się przy użyciu mniej czułych metod koloidalnego Coomassie i barwienia związkami fluorescencyjnymi, które umożliwiają znacznie wydajniejszą analizę MS. Dla przykładu wcześniej wykazano, że identyfikacja białek wybarwionych metodą srebrową (42) z użyciem spektrometru MALDI ToF, jest bardzo nieefektywna (39). Z kolei metoda barwienia srebrem wg Schevchenki (43), opisywana jako kompatybilna z metodami MS, umożliwiła uzyskanie zadowalających wyników identyfikacji białek jedynie przy użyciu czulej metody LC-MS/MS, lecz nie z wykorzystaniem techniki MALDI ToF. W ostatnich latach w literaturze pojawiło się kilka prac opisujących wpływ srebra na wydajność identyfikacji białek i mechanizm oddziaływania takiego barwienia z metodami spektrometrii mas (44,45). Rola samego srebra nie jest do końca jasna. Wydaje się jednak, że to nie metal jest odpowiedzialny za dramatyczny spadek wydajności (46), lecz formaldehyd, który sieciując białko w żelu nie tylko może obniżać wydajność identyfikacji, ale również zafałszowywać wyniki. Zastąpienie formaldehydu innym czynnikiem redukującym poprawia wydajność identyfikacji, jednak i tak nie jest ona porównywalna z wynikami uzyskanymi po barwieniu CBB. Ponadto spada czułość detekcji i pojawia się ciemne tło utrudniające dalsze procedury (44). Przy wyborze metody barwienia musimy zatem kierować się również rodzajem metody, którą będziemy stosować następnie do identyfikacji białek. Teoretycznie, jeżeli prążek lub plamka są widoczne po wybarwieniu każdą metodą, oznacza to, że zawartość w nich białka jest wystarczająca do analiz. W praktyce jednak, im więcej białka w plamce czy prążku, tym stosunek sygnału do szumu będzie większy. Dlatego też w przypadku identyfikacji białek metodą tandemowej spektrometrii mas, technika srebrowa bez użycia aldehydu glutarowego (43) jest wystarczająca. Niestety identyfikując białka z wykorzystaniem spektrometru MALDI ToF, który charakteryzuje się mniejszą czułością i rozdzielczością, trzeba korzystać z innych technik.

Barwnikiem fluorescencyjnym o czułości detekcji porównywalnej do srebra, jest oparty na związkach rutenu SYPRO Ruby (Molecular Probes). Wiąże się on niekowalencyjnie do peptydów rozdzielonych w żelu; nie stwierdzono też jego interferencji z metodami identyfikacji białek, a procedura barwienia jest szybka i łatwa. Minusem tej metody jest konieczność stosowania drogich robotów do wycinania prążków czy plamek wybarwionych białek, gdyż są one widoczne tylko po naświetleniu światłem o odpowiedniej długości fali i tylko przez krótki czas.

W przypadku późniejszej identyfikacji białek metodą MALDI ToF, najlepszą metodą, jak się wydaje, jest technika opisana przez Candiano i wsp. (47), nazwana Blue Silver. W metodzie tej wykorzystuje się standardowy protokół barwienia koloidalnym Coomassie (48) z modyfikacjami polegającymi na zwiększeniu stężeń: kwasu fosforowego z 2 (v/v) do 10% (v/v) i barwnika CBB G-250 z 0,1 (w/v) do 0,12% (w/v). Pomiar densytometryczny wskazuje, że metodą Blue Silver można wizualizować prążek w żelu jednokierunkowym nawet po nałożeniu 1ng białka. Również wyniki identyfikacji białek wybarwionych Blue Silver są zadowalające. Wysoka czułość metody, jak się wydaje, wynika prawdopodobnie ze zmiany pH. W tradycyjnym protokole Neuhoffa (48) pH roztworu barwiącego wynosi 1,2, podczas gdy pH mieszaniny Blue Silver wynosi 0,5. Jest wysoce prawdopodobne, że obniżenie pH powoduje protonację niektórych reszt aminokwasowych (głównie Glu i Asp) i jednocześnie może obniżać liczbę ładunków ujemnych w łańcuchu peptydowym. Dzięki temu ułatwia tworzenie mostków jonowych pomiędzy barwnikiem, a aminokwasami. Prawdopodobnie pojawiają się również dodatkowe oddziaływania hydrofobowe (47). Na podstawie przeprowadzonych porównań żeli jedno- i dwuwymiarowych (rys. 2) barwionych azotanem srebra (43), SYPRO Ruby (49) i metodą Blue Silver wykazano, że różnice w czułości detekcji nie są duże (39). Czułość metody Blue Silver jest zbliżona do tej uzyskanej na żelu barwionym SYPRO Ruby. Największą liczbę plamek widać na żelu barwionym metodą srebrową. Plamki białek oznaczone strzałkami zostały wycięte i zidentyfikowane metodą MALDI ToF. Na osiem białek wybarwionych techniką Blue Silver powiodła się identyfikacja wszystkich białek, natomiast wśród 12 białek wybarwionych srebrem zidentyfikowano jedynie jedno (tab.). Jednak i w tym przypadku są widoczne różnice w jakości uzyskanego wyniku. Stopień pokrycia sekwencji dla białka wybarwionego CBB wynosi 40% przy 9 zidentyfikowanych peptydach, natomiast dla białka wybarwionego srebrem jest to jedynie 29% przy 6 zidentyfikowanych peptydach. Na rysunku 3 przykładowo pokazano porównanie map peptydowych jedyne białko zidentyfikowanego metodą MALDI ToF. Charakterystyczny jest ubogi skład peptydowy próby barwionej srebrem (widmo B) w stosunku do próby wybarwionej Blue Silver (widmo A) co wyraźnie potwierdza negatywny wpływ tej techniki na wydajność i jakość identyfikacji. Dodatkowo można zaobserwować na tym widmie dużą liczbę pików o m/z poniżej 1000 Da nie pochodzących z białek oraz wysoki stosunek sygnału do szumu. Takich pików nie obserwuje się na widmie masowym produktów trawienia białka wybarwionego Blue Silver, widoczna była za to większa liczba pików pochodzących od peptydów i mała ilość zanieczyszczeń.

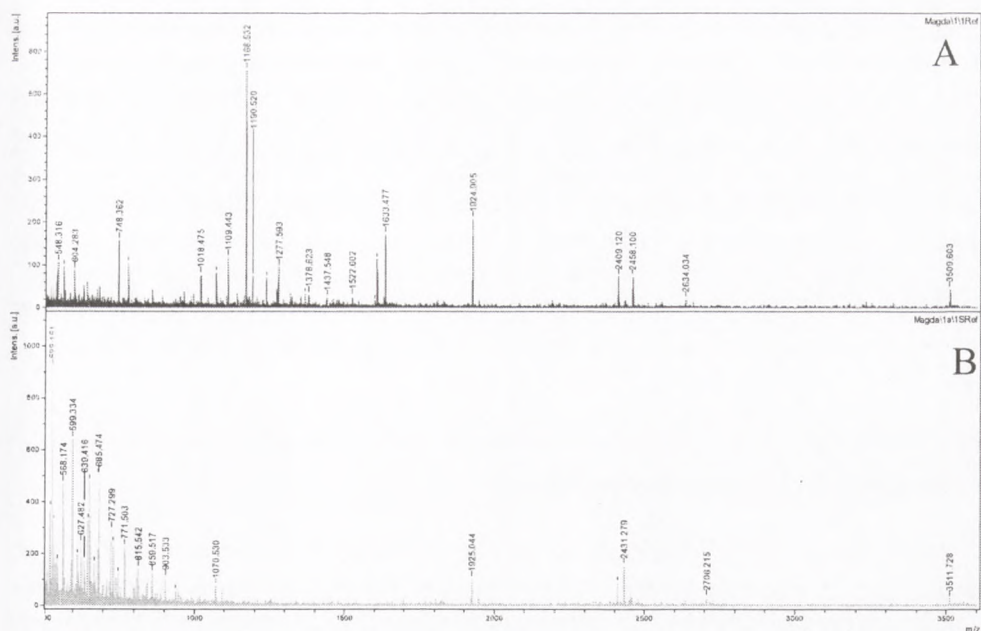
Białka ścian komórkowych zawiesiny *Arabidopsis* po rozdzielach 2-DE

Nr plamki	Metoda barwienia	Identyfikacja białka	Nr białka w bazie MSDB	Stopień pokrycia sekwencji (%)	Score	Liczba peptydów
1	Blue Silver	białko reakcji obronnych LRR	Q8LGC3	45	74	20
2	Blue Silver	białko biorące udział w aposporii	Q940G5	40	98	9
3	Blue Silver	białko biorące udział w aposporii	NP001030815	32	60	8
4	Blue Silver	peroksydaza AtPO ₂	CAA67551	36	73	9
5	Blue Silver	białko o nieznannej funkcji	BAB10799	15	62	8
6	Blue Silver	acetyloesteraza pektyn	Q940J8	28	76	8
7	Blue Silver	proteaza aspartylowa	T47599	19	73	6
8	Blue Silver	białkowy inhibitor poligalakturonazy	Q541D6	40	82	9
1a-7a	AgNO ₃	nie zidentyfikowany				
8a	AgNO ₃	białkowy inhibitor poligalakturonazy	Q541D6	29	62	6
9a-12a	AgNO ₃	nie zidentyfikowany				

Białka wybarwiono dwiema metodami: Blue silver (46) i AgNO₃ (42), a następnie analizowano metodą MALDI ToF. Cyfry w pierwszej kolumnie odpowiadają oznaczeniom plamek na rysunku 2.

Wybierając skalę rozdzielania 2DE i metodę detekcji należy również pamiętać o wydajności metod izolacji białek. Aby uzyskać obraz 2DE białek wybarwionych azotanem srebra lub Sypro Ruby, na żelach o wymiarach 24×25 cm, należy zastosować około 0,1 mg białka. Technika Blue Silver wymaga użycia 0,5-1 mg białka, co np. dla białek ścian komórkowych łubinu wymagałoby prowadzenia ekstrakcji z ok. 0,5 kg materiału roślinnego. W przypadku łubinu białego taka skala ekstrakcji nie stanowi problemu, może się on jednak pojawić w przypadku innych gatunków roślin. Ilość tkanki otrzymanej z korzenia jednej rośliny *Arabidopsis* jest rzędu miligramów. Podobnie z materiałem zwierzęcym. Wycinki tkanki czy określone populacje komórek to materiał niezwykle trudno dostępny, a w przypadku białek nie istnieje technika równoważna do techniki PCR, która umożliwiłaby amplifikację interesujących makrocząsteczek.

Wybierając długie paski żelowe trzeba również pamiętać, że żel do przeprowadzania II kierunku też będzie dużych rozmiarów. Częsty błąd popełniany podczas przygotowywania żeli poliakryloamidowych o dużych formatach związany jest z temperaturą i czasem polimeryzacji. Związanie akrylamidu i metylenobisakrylamidu



rys. 3. Porównanie map peptydowych prób wyciętych z żelu wybarwionego metodą Blue silver (widmo A, plamka nr 1 na rys. 2) i AgNO_3 (widmo B, plamka nr 1a na rys. 2). Na podstawie obu widm białko zidentyfikowano jako białko inhibitor poligalakturonazy.

du, jak się wydaje, trwa około 0,5-1 godziny w zależności od wielkości żelu. Jednak polimeryzacja, szczególnie w dużych żelach, trwa jeszcze kilkanaście godzin, a jej właściwy przebieg ma miejsce w temperaturze pokojowej. Przeprowadzanie elektroforezy w żelach nie do końca spolimeryzowanych prowadzi do zaburzeń rozdziału oraz powstania tła. Ponadto, powstałe wskutek zbyt krótkiej polimeryzacji mono- i oligomery akrylamidu mogą być przyczyną wysokiego tła widocznego na widmach masowych (50). Najlepiej zatem przygotować żel, odczekać godzinę aż spolimeryzuje, a następnie, po zawinięciu w wilgotną bibułę, pozostawić w temperaturze pokojowej przez noc.

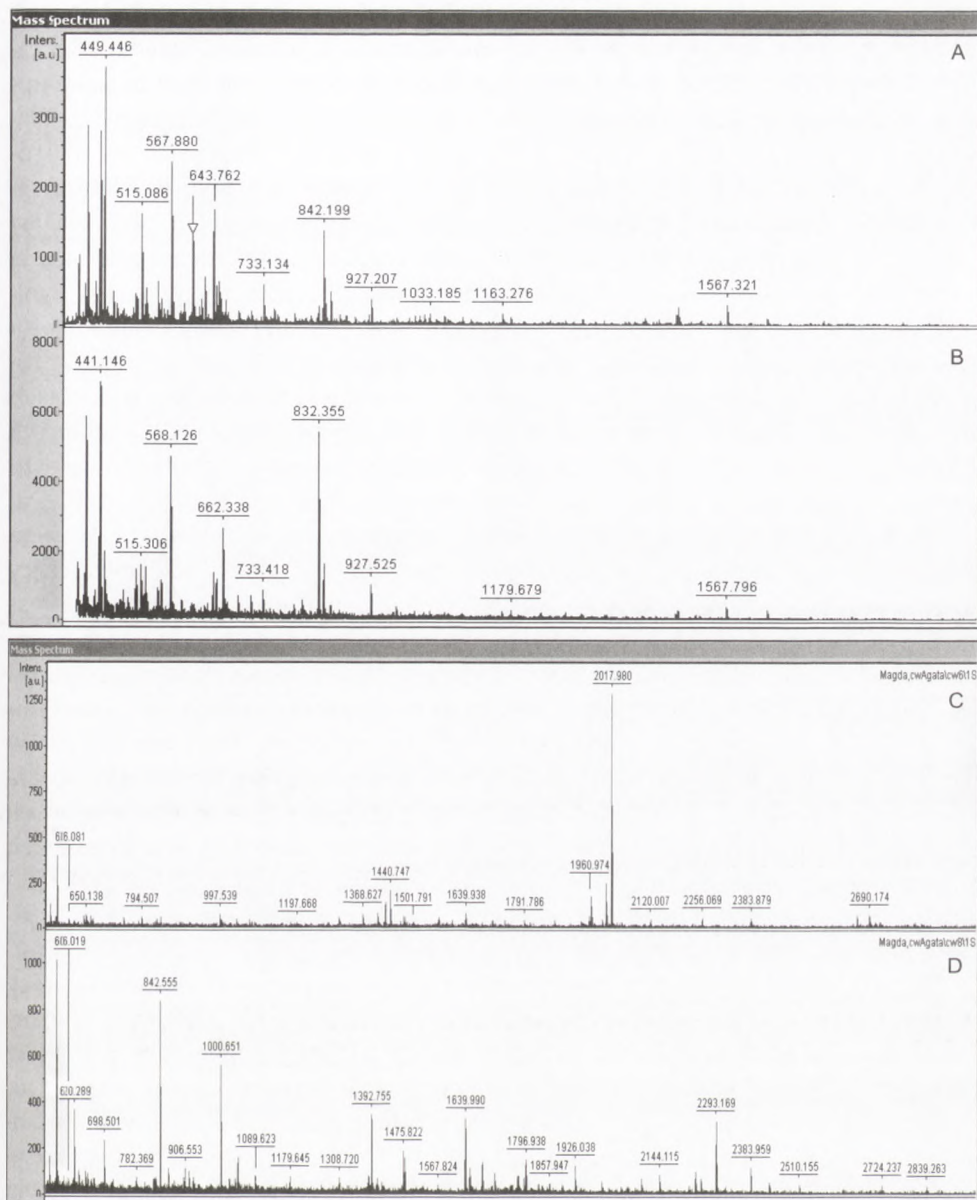
Aby dodatkowo podnieść powtarzalność analiz, skrócić ich czas i znacznie zmniejszyć ilość materiału niezbędną do rozdzielów 2DE, można zastosować elektroforezę różnicową 2D DIGE (ang. *difference gel electrophoresis*) (51). W technice tej przed rozdziałem stosuje się niezależne znakowanie prób za pomocą znaczników fluorescencyjnych Cy2, Cy3 i Cy5. Tak wyznakowane próby miesza się następnie ze sobą i rozdziela w jednym żelu. Po zakończonej elektroforezie, wykorzystując różne właściwości spektralne znaczników Cy, z jednego żelu można uzyskać trzy mapy proteomiczne poszczególnych prób, co umożliwia uniknięcie błędów technicznych związanych z przeprowadzeniem samej elektroforezy. Ponadto technika ta pozwala na zastosowanie tzw. standardu wewnętrznego, który przygotowuje się poprzez

zmieszanie ze sobą tej samej ilości wszystkich prób z eksperymentu. Dla przykładu, w doświadczeniu, w którym porównuje się próby kontrolne z próbami badanymi, standardem wewnętrznym będą wszystkie próby kontrolne i wszystkie próby badane zmieszane ze sobą w jednej próbówce i wyznakowane Cy2. Próbę taką zawsze rozdziela się na jednym żelu z jedną próbą kontrolną wyznakowaną Cy3 i jedną próbą badaną wyznakowaną Cy5, co znacznie podwyższa powtarzalność analiz, ponieważ obserwowana zmiana w próbie kontrolnej, będzie zawsze miała odbicie w standardzie wewnętrznym. Wadą tej metody jest to, że nie widać „gołym okiem” plamek białek, które powinny zostać wycięte do identyfikacji. Rozwiązaniem, jak już wspomniano, mogą być urządzenia do automatycznego wycinania plam, (ang. *Spot Picker*), niestety są one bardzo kosztowne.

4. Identyfikacja białek metodami MS

Wyzolowane mieszaniny białek po oczyszczeniu, rozdzieleniu metodą 2DE oraz wizualizacji poddaje się analizie za pomocą specjalistycznego oprogramowania, za pomocą którego dokonuje się porównań ilościowych i jakościowych uzyskanych map proteomicznych. W celu identyfikacji białek najczęściej używanymi metodami są: ESI-MS/MS, czyli tandemowy spektrometr z jonizacją poprzez elektrorozpraszanie i MALDI ToF. Istotą metody ESI-MS/MS jest uzyskanie widm fragmentacyjnych na podstawie których możliwe jest ustalenie sekwencji badanego białka. W metodzie MALDI ToF uzyskuje się jedynie mapy peptydowe, które porównuje się następnie z danymi zawartymi w bazach białkowych i na tej podstawie dokonuje się identyfikacji białka. Nie jest możliwe ustalenie sekwencji aminokwasowej badanego białka, w rezultacie możliwa jest jedynie identyfikacja białek już znanych, których sekwencje zdeponowane są w bazach.

Plamki zawierające interesujące nas białka, po wycięciu z żelu przygotowuje się do identyfikacji. Przygotowanie polega na przeprowadzeniu serii płukań, dzięki czemu z żelu są wymywane pozostałości barwników, sole i detergenty. Ma to istotne znaczenie, gdyż w analizach MS barwnik CBB daje charakterystyczny pik o masie (m/z) 832 Da, którego intensywność jest wprost proporcjonalna do zawartości CBB w próbce. Przeprowadza się również reakcje redukcji, w celu rozbicia mostków disiarczkowych do wolnych grup $-SH$, które następnie blokuje się w reakcji alkilacji. Etap ten znacznie poprawia wydajność trawienia białek, gdyż grupy $-S-S-$ są mało stabilne podczas hydrolizy i mogą ulegać przegrupowaniom lub w inny sposób zaburzać rozcinanie polipeptydów przez proteazy. Na etapie przygotowywania prób do trawienia ogromny wpływ na jakość analiz uzyskanych metodami spektrometrii mas ma czystość i jakość odczynników oraz stosowanych akcesoriów. Zasadę tę powinno się stosować na każdym etapie analiz proteomicznych, jednak właśnie ta faza przygotowań jest szczególnie wrażliwa na pewne czynniki. Stosowane wyroby plastikowe powinny cechować się podwyższoną odpornością, szczególnie na rozpusz-



Rys. 4. Porównanie map peptydowych uzyskanych metodą MALDI ToF. Widma A i B obrazują wpływ przygotowania trypsyny oraz obecności zanieczyszczeń na jakość uzyskanych widm. Na podstawie takich widm nie zidentyfikowano analizowanego białka. Dwie mapy peptydowe poniżej (C i D), uzyskane po wyeliminowaniu problemów technicznych, pozwoliły na pomyślną identyfikację białka. Szczegóły w tekście.

czalniki, bowiem niektóre z nich, np. acetonitryl, mogą wypłukiwać z tworzyw związki zakłócające wyniki analiz. Dotyczy to zwłaszcza próbek przygotowywanych do analiz techniką MALDI ToF, która jest bardzo czuła na niewielkie nawet ilości zanieczyszczeń (plastyfikatory, inicjatory polimeryzacji) wymytych z kolorowych tipsów, probówek plastikowych niezbyt dobrej jakości, a nawet pudru z rękawiczek lateksowych. Niedokładnie wypłukany detergent używany do mycia szkła czy sól stosowana we współczesnych zmywarkach mogą doprowadzić do sytuacji, w której tygodniami przygotowany eksperyment zakończy się niepowodzeniem, ponieważ na widmach masowych zamiast sygnałów peptydów pojawiają się przede wszystkim piki pochodzące od chlorku sodu. Zasadnicze znaczenie dla jakości uzyskanych wyników identyfikacji, ma również sposób przygotowania oraz przechowywania trypsyny. Zamrażanie i rozmrażanie enzymu może doprowadzić do utraty jego aktywności. Na rysunku 4 pokazaliśmy przykładowe porównanie widm masowych uzyskanych metodą MALDI ToF (39). Dwa górne widma (A i B) uzyskano dla prób białkowych przygotowanych za pomocą kilkakrotnie rozmrażanej trypsyny i akcesoriów plastikowych niezbyt dobrej jakości. Widoczne piki, w większości o masie do 1000 Da, pochodzą z zanieczyszczeń próby i matrycy; peptydy o masie 1163 i 1179 Da to fragmenty keratyny. Widoczny jest tylko jeden peptyd o masie 1567 pochodzący prawdopodobnie z analizowanego białka. Na podstawie takiego widma nie jest możliwe utworzenie mapy peptydowej białka. Charakterystyczne są również wysokie intensywności pików pochodzących z zanieczyszczeń, pików pochodzących od barwnika CBB (832 Da), czy trypsyny (842 Da) w stosunku do intensywności peptydu o m/z 1567. Przy takim stosunku sygnału do szumu, większość oczekiwanych pików po prostu nie zostanie ujawniona. Umieszczone widma masowe C i D uzyskano dla białka analizowanego po wyeliminowaniu problemów technicznych związanych z przygotowaniem do trawienia. Widocznych jest kilkanaście peptydów uzyskanych po strawieniu badanego białka i niewiele pików o masie poniżej 1000 Da. Brak również drastycznej różnicy między intensywnością pików analizowanego białka, a pikiem pochodzącym z autotrawienia trypsyny (842 Da).

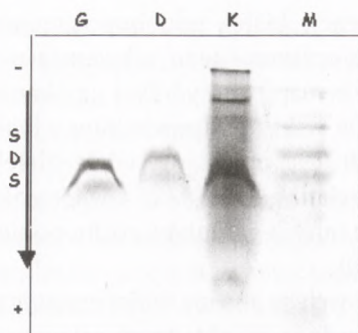
W niektórych przypadkach właściwy dobór opisanych parametrów nie wystarczy do identyfikacji białek. Istnieje pula białek ścian komórkowych o unikatowym wzorcu N-glikozylacji wykazujących powinowactwo do lektyny – aglutyniny z kielków pszenicy. Wcześniej wykazano, że białka te cechują się wysoką odpornością na trawienie proteolityczne (39). W związku z tym niemożliwa jest ich identyfikacja zarówno metodą LC-MS/MS jak i metodą MALDI ToF. Dopiero denaturacja i deglikozylacja enzymatyczna białek przy użyciu rekombinowanej N-glikozydazy F, pozbawia je odporności proteolitycznej, dzięki czemu możliwe staje się trawienie trypsyną i wykonanie analiz metodami spektrometrii mas (39).

Problematyczna jest również analiza i identyfikacja białek z organizmów, których genom nie został jeszcze poznany, np. z łubinu. Szczególnie dotyczy to metody MALDI ToF, gdyż ze względu na niemożność sekwencjonowania peptydów, wyniki uzyskiwane tą metodą są niewystarczające do identyfikacji białek (39). Aby białko

zostało zidentyfikowane, jego sekwencja lub sekwencje białek podobnych muszą być obecne w bazach danych. Jeśli nie zostało ono opisane i jego sekwencja nie znajduje się w bazach, programy, które na podstawie mapy peptydowej uzyskanej metodą MALDI ToF przeprowadzają identyfikację, nie wskażą odpowiedniego białka, mimo uzyskania wiarygodnych widm masowych. Dla przykładu, wiele białek łubinowych zidentyfikowano jedynie przy użyciu techniki LC-MS/MS, a większość z uzyskanych sekwencji przypisano do homologów z innych gatunków roślin ponieważ dla łubinu brak było jakichkolwiek anotacji (39).

Kolejnym istotnym elementem badań proteomicznych są analizy bioinformatyczne uzyskanych wyników. W bazach danych istnieje bardzo wiele błędnych sekwencji białek. Wśród wspomnianych już łubinowych białek ścian komórkowych (39) znalazły się m.in. homologi dwóch esteraz pektynowych z *Arabidopsis*, metyloesterazy pektyn z marchwi, i metyloesterazy pektynowej (*Populus tremula* x *P. tremuloides*). Pomimo wielokrotnie udokumentowanej lokalizacji tych enzymów w ścianach komórkowych (52,53), na podstawie analizy bioinformatycznej uzyskanych sekwencji nie wykazano obecności sekwencji kierujących na szlak sekrecyjny. Można zatem sądzić, że zdeponowane sekwencje w bazach danych są niepełne lub błędne. Podobnie, w przypadku chitynazy klasy V z tytoniu uzyskano mało wiarygodne wyniki bioinformatycznych poszukiwań sekwencji sygnałowych (39). Program PSORT, który na podstawie sekwencji dokonuje predykcji lokalizacji białka, wykrył w tym białku sekwencję kierującą do mitochondrium, natomiast program TargetP (o podobnej funkcji) nie znalazł żadnej sekwencji kierującej, czy to do mitochondriów, czy do chloroplastów, czy też na szlak sekrecyjny. Chitynaza klasy V wykazuje aktywność przeciwgrzybową wobec kiełkujących spor *Fusarium solani* (54). Choć aktywność enzymatyczną chitynazy obserwowano głównie wewnątrz komórki, sygnał pochodzący od tego białka zaobserwowano także w ekstraktach białek zewnątrzkomórkowych. Peroksydaza 2 odgrywa istotną rolę w tworzeniu mostków dehidrodiferulowych lub izodityrozynowych, a zatem wiązań poprzecznych wzmacniających ściany komórkowe oraz w polimeryzacji lignin podczas tworzenia ścian wtórnych. Interesujące, że na podstawie analizy bioinformatycznej sekwencji tego białka, nie wykazano obecności żadnego peptydu sygnałowego, choć w bazie NCBI odnośnikiem literaturowym do sekwencji białka AA013838, a zatem zidentyfikowanej peroksydazy, jest publikacja opisująca peroksydazę apoplastyczną (55). Uzyskane wyniki mogą podważać wiarygodność algorytmów stosowanych w programach TargetP i PSORT, stosowanych powszechnie do predykcji lokalizacji komórkowej. Również kryteria podane przez Jamet i wsp. (56), niezbędne do uznania danej sekwencji za białko ścian komórkowych: obecność sekwencji sygnałowej, brak sekwencji KDEL i brak domen hydrofobowych, w obliczu uzyskanych wyników nie są do końca przekonujące.

Na zakończenie warto jeszcze wspomnieć o jednej kwestii. Analizując białka roślin należy pamiętać, że peroksydazy ścian zachowują aktywność nawet po wieloetapowej metodzie ekstrakcji (rys. 5), a także po rozdziale elektroforetycznym w warunkach denaturujących (39). Świadczy to o ich bardzo dużej trwałości i zdolności



Rys. 5. Aktywności peroksydaz ścian komórkowych izolowanych z górnej (G) i z dolnej części (D) hipokotyli oraz z korzenia (K) 20-dniowej siewki lubin białego po rozdzielach metodą SDS-PAGE. Żele barwiono z użyciem *o*-dianizydyny i H₂O₂ (57).

do renaturacji. Stąd w doświadczeniach, których etapem analitycznym jest immunodetekcja białek roślinnych z użyciem przeciwciał wtórnych należy unikać stosowania przeciwciał sprzężonych z peroksydazą chrzanową, a raczej stosować koniugaty z fosfatazą alkaliczną.

Podsumowując, analizy proteomiczne są wbrew pozorom bardzo skomplikowane, a zaplecze tych analiz ma ogromny wpływ na jakość uzyskiwanych wyników. Sprzęt o wysokich walorach technicznych nie gwarantuje sukcesu w identyfikacji białek, a optymalizacja przygotowania prób wymaga niezwyklej staranności na wszystkich etapach analiz. Uzyskanie wiarygodnych wyników przy wykorzystaniu zarówno spektrometru MALDI ToF jak i LC-MS/MS jest zależne od bardzo wielu czynników. Parametrami krytycznymi są: sposób przygotowania i oczyszczania białek, wybór techniki barwienia żeli poliakrylamidowych, a także jakość stosowanych odczynników i materiałów plastikowych.

Praca powstała w ramach realizacji projektów badawczych finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego: 3 P04C 011 22, 2 P04C 055 29, PBZ-MNii-2/1/2005 i N N402 2098 33.

Literatura

1. Ventelon-Debout M., Delalande F., Brizard J-P., Diemer H., van Dorsselaer A., Brugidou C., (2004), *Proteomics*, 4, 216-225.
2. Campo S., Carrascal M., Coca M., Abián J., San Segundo B., (2004), *Proteomics*, 4, 383-396.
3. Hochholdinger F., Guo L., Schnable P. S., (2004), *Plant Mol. Biol.*, 56, 397-412.
4. Swidzinski J. A., Leaver C. J., Sweetlove L. J., (2004), *Phytochemistry*, 65, 1829-1838.
5. Ndimba B. K., Chivasa S., Simon W. J., Slabas A. R., (2005), *Proteomics*, 5, 4185-4196.
6. Pinheiro C., Kehr J., Ricardo C. P., (2005), *Planta*, 221, 716-728.
7. Kageyama S., Isono T., Iwaki H., Wakabayashi Y., Okada Y., Kontani K., Yoshimura K., Terai A., Arai Y., Yoshiki T., (2004), *Clin. Chem.*, 50, 857-866.
8. Park K. S., Kim H., Kim N. G., Cho S. Y., Choi K-H., Seong J. K., Paik Y-K., (2002), *Hepatology*, 35, 1459-1466.
9. Li C., Hong Y., Tan Y. X., Zhou H., Ai J-H., Li S-J., Zhang L., Xia Q-C., Wu J-W., Wang H-Y., Zeng R., (2004), *Mol. Cell. Proteomics*, 3, 399-409.

10. Gronborg M., Bunkenborg J., Kristiansen T. Z., Jensen O. N., (2004), *J. Proteome Res.*, 3, 1042-1055.
11. Shen J., Person M. D., Zhu J., Abbruzzese J. L., Li D., (2004), *Cancer Res.*, 64, 9018-9026.
12. Zhou G., Li H., DeCamp D., Chen S., Shu H., Gong Y., Flaig M., Gillespie J.W., Hu N., Taylor P. R., Emmert-Buck M. R., Liotta L. A., Petricoin III E. F., Zhao Y., (2002), *Mol. Cell. Proteomics*, 1, 117-123.
13. Zhou G., Li H., Gong Y., Zhao Y., Cheng J., Lee P., Zhao Y., (2005), *Proteomics*, 5, 3814-3821.
14. Ryu J. W., Kim H. J., Lee Y. S., Myong N. H., Hwang C. H., Lee G. S., Yom H. C., (2003), *J. Korean Med. Sci.*, 18, 505-509.
15. Melle C., Ernst G., Schimmel B., Bleul A., Kaufmann R., Hommann M., Richter K. K., Daffner W., Sett-macher U., Claussen U., von Eggeling F., (2005), *J. Proteome Res.*, 4, 1799-1804.
16. Alfonso P., Nunez A., Madoz-Gurpide J., Lombardia L., Sánchez L., Casal J. I., (2005), *Proteomics*, 5, 2602-2611.
17. Dundas S. R., Lawrie L. C., Rooney P. H., Murray G. I., (2005), *J. Pathol.*, 205, 74-81.
18. Seike M., Kondo T., Fujii K., Okano T., Yamada T., Matsuno Y., Gemma A., Kudoh S., Hirohashi S., (2005), *Proteomics*, 5, 2939-2948.
19. Tyan Y. C., Wu H. Y., Su W. C., Chen P. W., Liao P. C., (2005), *Proteomics*, 5, 1062-1074.
20. Praca zbiorowa pod redakcją Kraj A., Silberring J., (2004), *Proteomika*, Wydział Chemii UJ, Kraków.
21. Bradford M. M., (1976), *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
22. Hurkman W. J., Tanaka C. K., (1986), *Plant Physiol.*, 81, 802-806.
23. Wang W., Vignani R., Scali M., Cresti M., (2006), *Electrophoresis*, 27, 2782-2786.
24. Wang W., Scali M., Vignani R., Spadafora A., Sensi E., Mazzuca S., Cresti M., (2003), *Electrophoresis*, 24, 2369-2375.
25. Turner M. W., Hulme B., (1970), *The plasma proteins: en introduction*, Pitman Medical & Scientific Publishing Co., Ltd., London.
26. Ahmed N., Rice E. G., (2005), *J. Chromatogr. B.*, 815, 39-50.
27. Huang L., et al., (2005), *Proteomics*, 5, 3314-3328.
28. Burtis C. A., Ashwood E. R., (2001), *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, 5th ed., W. B. Saunders Company, Philadelphia, PA.
29. Lowenthal M. S., Mehta A. I., Frogale K., Bandle R. W., Araujo R. P., Hood B. L., Veenstra T. D., Conrads T. P., Goldsmith P., Fishman D., Petricoin III E. F., Liotta L. A., (2005), *Clin. Chem.*, 51, 1933-1945.
30. Gundry R. L., Fu Q., Jelinek C. A., ven Eyk J. E., Cotter R. J., (2007), *Proteomics Clin. Appl.*, 1, 73-88.
31. Gordon L. M., Curtin C. C., McCloyn V., Kirkpatrick A., Mobley P. W., (1993), *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 9, 1145-1156.
32. Tirumalai R. S., Chan K. C., Prieto D. A., Issaq H. J., Conrads T. P., Veenstra T. D., (2003), *Mol. Cell. Proteomics*, 2, 1096-1103.
33. Petricoin E. F., Ardekani A. M., Hitt B. A., Levine P. J., Fusaro V. A., Steinberg S. M., Mills G. B., Simone C., Fishman D. A., Kohn E. C., Liotta L. A., (2002), *Lancet*, 359, 572-577.
34. Basso D., Valerio A., Seraglia R., Mazza S., Piva M. G., Greco E., Fogar P., Gallo N., Pedrazzoli S., Tiengo A., Plebani M., (2002), *Pancreas*, 24, 8-14.
35. Rubin R. B., Merchant M., (2000), *Am. Clin. Lab.*, 19, 28-29.
36. Hammond-Kosack K. E., Guerr S. J., McPherson M. J., Bowles D. J., (1992), *Molecular Plant Pathology. A Practical Approach*, Oxford University Press, 15-21.
37. Smith J. J., Muldoon E. P., Lamport D. T., (1984), *Phytochemistry*, 23, 1233-1239.
38. Wojtaszek P., Bolwell G. P., (1995), *Plant Physiol.*, 108, 1001-1012.
39. Łuczak M., (2006), *Analiza proteomiczna ścian komórkowych roślin*, praca doktorska, Wydział Biologii UAM, Poznań.
40. Hoving S., Voshol H., van Oostrum J., (2000), *Electrophoresis*, 21, 2617-2621.
41. Herbert B., Righetti P. G., (2000), *Electrophoresis*, 21, 3639-3648.
42. Jungblut P. R., Seifert R., (1990), *J. Biochem. Biophys. Methods*, 21, 47-58.
43. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M., (1996), *Anal. Chem.*, 68, 850-858.
44. Richert S., Luche S., Chevallet M., van Dorsselaer A., Leize-Wagner E., Roabilloud T., (2004), *Proteomics*, 4, 909-916.

45. White I. R., Pickford R., Wood J., Skehel J. M., Gangadharan B., Cutler P., (2004), *Electrophoresis*, 25, 3048-3054.
46. Wise G. E., Lin F., (1991), *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 22, 223-231.
47. Candiano G., Bruschi M., Musante L., Santucci L., Ghiggeri G. M., Carnemolla B., Orecchia P., Zardi L., Righetti P. G., (2004), *Electrophoresis*, 25, 1327-1333.
48. Neuhoff V., Arold N., Taube D., Ehrhardt W., (1988), *Electrophoresis*, 9, 255-262.
49. Lopez M. F., Berggren K., Chernokalskaya E., Lazarev A., Robinson M., Patton W. F., (2000), *Electrophoresis*, 21, 3673-3683.
50. Westermeier R., (2007), *Pract. Proteomics*, 1, 60-63.
51. Ünlü M., Morgan M. E., Minden J. S., (1997), *Electrophoresis*, 18, 2071-2077.
52. Nari J., Noat G., Ricard J., (1991), *Biochem J.*, 279, 343-350.
53. Castillejo C., de la Fuente J. I., Iannetta P., Botella M. A., Valpuesta V., (2004), *J. Exp. Bot.*, 55, 909-918.
54. Meichers L. S., Apotheker-de Groot M., van der Knap J. A., Ponstein A. S., Sela-Buuriage M. B., van der Enzen P. J., Linthorst H. J., (1994), *Plant J.*, 5, 469-480.
55. Price N. J., Pinheiro C., Soares C. M., Ashford D. A., Ricardo C. P., Jackson P. A., (2003), *J. Biol. Chem.*, 278, 41389-41399.
56. Jamet E., Canut H., Boudart G., Pont-Lezica R. F., (2006), *Trends Plant Sci.*, 11, 33-39.
57. Sato Y., Sugiyama M., Komamine A., Fukuda H., (1995), *Planta*, 196, 141-147.