

4. Az analitikai kémia módszerei a fehérjekutatásban – Fehérjeelválasztási és fehérjedetektálási technikák

LUDÁNY ANDREA, KŐSZEGI TAMÁS

Elektroforézis mint elválasztási technika

A KLINIKAI KUTATÁSBAN HASZNÁLTATOS MÓDSZEREK ÁTTEKINTŐ ISMERTETÉSE

Az elektroforetikus eljárások alkalmasak a fehérjék mint töltéssel rendelkező ún. amfotér molekulák szeparálására. A fehérjemolekulák elektromos térben vándorlásra képesek. A különböző molekulák aktuális ionizáltsági állapota a vezetőképességet biztosító médium, rendszerint egy pufferoldat adott pH-jától függ. Minél távolabbi az amfotér fehérjemolekula izoelektromos pontja ettől az értéktől, annál nagyobb a vándorlási sebessége az ellenkező pólus felé. A vándorlási sebességet nem csak a töltés, hanem a molekula mérete is befolyásolja (fordított arányban). Az elválasztandó fehérjék és a hordozó anyagának kölcsönhatásai miatt ez utóbbiak szerkezete is hatással van a vándorlási sebességre. A különböző töltéssel és mérettel rendelkező fehérje-összetevők adott vándorlási idő elteltével a vizsgálandó mintára jellemző elektroforetikus megoszlási képet eredményeznek.

A hordozók szerint megkülönböztetünk papír-, keményítő gél-, nitrocellulóz membrán, agar/agaróz gél, poliakrilamidgél-elektroforézist. A felsorolás egymásutánisága utal a történeti sorrendiségre is. Ezek egyik része elsősorban rutin klinikai kémiai eljárás-ként nyert teret, míg mások – így a poliakrilamidgél (PAG) alapú elválasztás – a kutatásokban kaptak elsődlegesen szerepet.

Formailag a hordozók szilárdságuktól függően vagy önállóan (áthidalásokkal kiegészítve) képesek a minta közegét biztosítani, vagy támasztékot (üveg, műanyag lemez, cső, kapilláris) igényelnek a funkciójukhoz.

A készülékek tartozékai:

- az „elektroforézis-futtatókád”, ami manapság már a legkülönbözőbb alakot veheti fel, és nem is hasonlít kádhoz. Inkább hídnak mondanánk, amely a két elektromos pólus között feszül ki, és a hordozókkal együtt a vándorlási teret biztosítja.
- Mindenképpen része a rendszernek a két elektród, amely az egymástól elválasztott puffertankokba merül, valamint az áramforráshoz kapcsolódik.
- Az áramforrások egyenáramot szolgáltatnak. Pulzáló vagy folyamatos áramerősséget, ill. feszültséget képesek szabályozni.

GÉLELEKTROFORETIKUS TECHNIKÁK – PAGE

Az elválasztási technikák közül legflexibilisebbek a poliakrilamidgél (PAGE) alapú eljárások. Ennek oka, hogy itt a gélkonzentráció tetszőleges tartományban alakítható ki, és jól is reprodukálható. A polimerizáció két alapelemense az akrilamid-monomer és a metilén-bisz-akrilamid keresztkötő reagens. A polimerizációnak két útja lehet:

- Fotopolimerizáció (riboflavin + UV-kezelés).
- Kémiai polimerizáció (ammónium-perszulfát).

Az utóbbi használata elterjedtebb, jóllehet oxidációs hatása nem egészen közömbös az érzékeny molekula-komplexeknél. A fotopolimerizációt korábban a nem denaturáló IEF-nél írták le, de ma már ehhez is a kémiai polimerizációt használják.

Csőves és lapgél módszerek egyaránt ismertek. Mindkét módszerrel kivitelezhetők többszörös és szinkron mintaanalízisek.

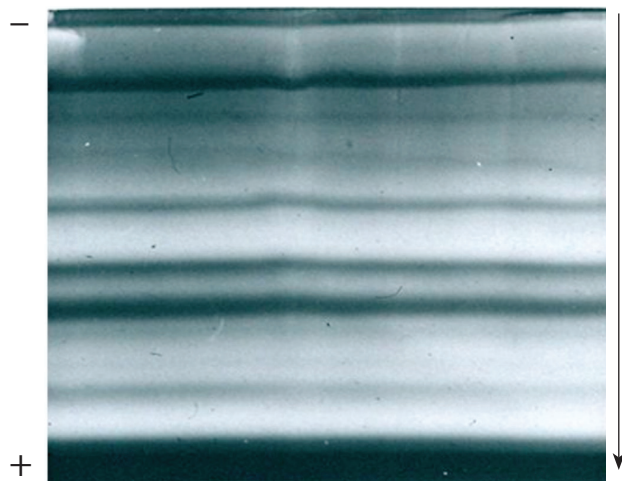
PREPARATÍV ÉS ANALITIKAI PAGE-ELJÁRÁSOK

A poliakrilamidgél-elektroforézisek vertikálisan (függő/álló helyzetben), pl. rudakban (üvegcsövekben) és lapgéllemben (üveglemezek között kiöntött kazettákban), valamint horizontálisan fektetett lemezen is végezhetők.

A *vertikális rendszerek* rendszerint vastagabbak, több gél egymás melletti futtatására is alkalmasak, a pufferoldattal közvetlen kontaktusban vannak, nagyobb mintamennyiséget képesek felvenni. Kezelésük egyszerűbb, nem kíván különösebb óvatosságot. Magától értetődően ezek alkalmasabbak a mikro-preparatív módszerekre is (4-1., 4-2. ábra).

A *planáris horizontális gélek* igen vékony gélfilmet alkotnak, izoelektromos fókuszálásra is ideálisak. Nem szükséges üveglap a gél kialakításához. Ehhez a rendszerhez lehet leginkább hozzájutni a kereskedelmi forgalomban, kész változatban is. Izoelektromos fókuszálásra különösen ajánlottak a non ekvilibrium pH-gradiensek futtatásához.

Amint említettük, kereskedelmi kiserelésben ún. kész gélek kaphatók, de házilag készített változatok is használatosak. Jóllehet a saját készítésű rendszerek munka- és időigényesek, de ezeket lehet leginkább kutatási célokra a vizsgálandó mintákhoz kívánság szerint megfelelően igazítani.



4-1. ábra. Preparatív lap-gélelektroforézis (Nem denaturáló alkalikus gél – PAGE – preparatív elektroforézis; minta: szérumfehérjék, amidofekete festés; a festés kizárólag demonstráció céljából készült)

HOMOGÉN ÉS GRADIENS GÉLEK

A *gél koncentrációja* szerint lehet *lág*y vagy *tömör gél*. A polimerizált gél pórusmérete a monomerkoncentráció függvénye. Munkánk tervezésekor a vizsgálandó fehérjeelegység összetétele és a célfehérje molekulamérete szerint állítható össze a szeparálógél szerkezete. Az egyébként kémiaiailag inert gélhálózat „lágyabb” gélnél (5–10%-os AA-koncentráció) a nagyobb fehérjemolekuláknak kedvez, míg kis molekulatömegű fehérjékhez rigidebb gél (13–15%) ajánlott.

Tudnunk kell, hogy a polimerizáció hőmérsékletfüggő, és a reakció folyamán hőfejlődés észlelhető. Az inkomplett polimerizáció megelőzésére 20 °C fölött kell a környező hőmérsékletet tartani. A gél oxigén-elnyelésének minimalizálására a gél kiöntésekor annak felszínét vákuumal „gáztalanítjuk” és folyadékkal felülrétegezve a külső légtérrel lezárjuk. (Így egyúttal egyenletes polimerizációs felszínt nyerhetünk.)

Az *elválasztóképesség növelésére* fejlesztették ki az ún. *diszkontinuus* (homogén) és a *gradiens* géleket.

- A *diszkontinuus gél* [13] nevét onnan kapta, hogy két egymás fölött képzett gélmezőt tartalmaz. Ebből már következik, hogy a vertikális szisztémák épülnek így módon fel. A felső ún.



4-2. ábra. Analitikai poliakrilamid-gélelektroforézis (festés: amidofekete)

(Nem denaturáló alkalikus gél – PAGE: 5–15% gradiens gél; minta: humán szérumalbumin „mentesítése”)

a) Kezeletlen minta

b) Kezelt minta

gyűjtő- (stacking) gél feladata valamennyi gélbe vándorló fehérjemolekula összegyűjtése a lényegi szeparálódás előtt. A pórusmérete nagy, ezért nem akadályozza az extrém nagy molekulák gélbe hatolását sem. Az alsó *szeparáló*gél koncentrációját a várható molekulaméretű fehérje-elegy ideális elválasztásához állítjuk be.

- *Gradiens* gél elkészítésénél az ioncserés kromatográfás eljárások puffer/só oldatainak hígításaihoz (gradienseihez) hasonlóan lineárisan vagy exponenciálisan folyamatosan változó gél-koncentrációt alakítunk ki a vertikális lemez kazettarendszerében.

A *munkafolyamat*, csak röviden, a lényeget kiemelve: A lezárt keverőtankból folyamatosan rétegezve folytatjuk a monomerkeveréket a feltöltendő kazettába. Az elfolyás egy tároló (rezervoár) magas koncentrációjú tankból azonos sebességgel pótlódik. Az ily módon létrehozott koncentrációváltozás exponenciális összefüggést mutat (lásd később, a Protokollok című fejezet részben). Különösen jó eredményt lehet elérni az O'Farrell-féle kétdimenziós fehérjetérképezésnél.

NATÍV ÉS DENATURÁLÓ PAGE-RENDSZEREK

Natív fehérjekomplexek vizsgálata. Már a minták előkészítésével kezdődik a két eljárás megkülönböztetése. A mintafeltárás, a szolubilizálás és a tisztítási lépés során végig szem előtt kell tartani a biológiailag aktív fehérjekomplexek védelmét, aktivitásuk megőrzését. Proteolízisgátlás, oxidatív károsító effektusok kivédése, fehérjeaggregáció elkerülése, fiziko-kémiai ágensek hatásának megakadályozása egyaránt szerepet kap a minták előkészítésében. Előtisztításként pl. a gél-sűrűsítés eljárások jönnek leginkább számításba.

A legismertebb PAGE-technika, melyet magunknak is alkalmunk volt számos esetben sikeresen alkalmazni, a nem denaturáló *alkalikus* gélelektroforézis. A mintákat gélrudakban, de lapgélben is elektroforetizálhattuk. A biológiai funkciót a gélrudak szegmentjeiben (a kiszemelt frakciók magasságában) akár biokémiai módszerekkel kontrollálhattuk.

Említést érdemel a rutin klinikai vizsgálatok során a mostanra kifejlesztett és automatizálásra alkalmas *agarózgél-elektroforézis* (HYDRAGEL), amely szintén nem denaturáló rendszernek tekinthető. Igazolja ezt a különböző izoenzimdetektálási technika,

melyeket számos mintánál diagnosztikusan is felhasználunk.

Denaturáló PAGE-rendszerek. Denaturáló elektroforetikus eljárásokat különböző biológiai mintákra célirányosan dolgoztak ki az ismert kutatócsoportok.

- *Savanyú urea gél elektroforézis.* Az eljárást ismert, nagyon hidrofób és bázikus fehérjék urea jelenlétében való PAGE-szeparálására fejlesztették ki. A magfehérjék, köztük a hiszton típusúak, térképezését ezzel az ureatartalmú, savanyú típusú (ecetsavas) szeparálási móddal indítottuk.
- *Laemmli-féle SDS gél elektroforézis.* Ez a legismertebb denaturáló PAGE módszer. Nem lehet olyan fehérjeanalitikával foglalkozó közleménnyel találkozni, mely ne használná vagy ne idézné ezt a szellemes és sikeres frakcionálást. Az SDS-sel borított szolubilizált fehérjemolekulák az ionos detergenssel bevonva elvesztik eredeti töltésüket, és elsődlegesen molekulatömegük szerint vándorolnak a gélben. A kicsik gyorsabban, a nagyobbak egyre lassabban mobilizálódnak. Fontos tudni – és ez a kísérő molekula markerek vándorlási sebességéből is kiderül –, hogy nem lineáris, hanem logaritmikus az összefüggés a két tulajdonság (molekulaméret és sebesség) között.

IZOELEKTROMOS FOKUSZÁLÁSOK

POLIAKRILAMID- (PAG-) ÉS AGARÓZGÉLLEN

A fejezetben megemlített egydimenziós PAGE részletezésén túl az izoelektromos fókuszálás mint elválasztási technika itt kiemelését érdemel, jóllehet elvileg lényegesen különbözik az előzőktől.

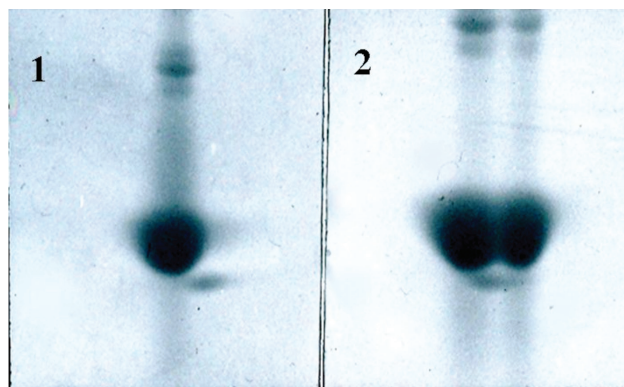
Az izoelektromos fókuszálás töltéssel rendelkező molekulák szeparálása izoelektromos pontjuk szerint. A savba merülő pozitív pólus (anód) és a lúgba merülő negatív pólus (katód) között létrehozott mesterséges, pH-gradienst „szállító” (carrier) amfolit molekulák hozzák létre. Ezek szintetikus oligoamino/oligokarboxil savak keveréke, alacsony molekulatömeggel és eltérő izoelektromos ponttal. Az áram rákapcsolásával az egyébként nagy diffúziós sajátosságú amfolitok közül az alacsony pI-értékűek az anód felé, a magas pI-értékkel bírók a katód felé mozdulnak, és pufferolt

pH-gradienst hoznak létre. Az egyes amfolitok addig vándorolnak, amíg el nem érik az izoelektromos pontjuknak megfelelő pH-értéket, majd ott maradnak. (Az izoelektromos pontjukon túlhaladva ugyanis megfordul vándorlási irányuk, kilépni a hordozóból ezért nem tudnak.) Az így elkészült pH-„grádics” most már készen várja a hasonló amfotér tulajdonságú fehérjemolekulákat a minta felvitele után. Az amfolitok nagy pufferkapacitással rendelkeznek, és nincs biológiai hatásuk.

Az izoelektromos fókuszálás különböző hordozókban mehet végbe (agaróz-, PAG-, szacharózoszlop, immobilizált réteg stb.). Ismerünk natív és denaturáló fókuszáló rendszereket.

Izelektromos fókuszálás immobilizált pH-gradiens gélben (IPG). Bevezetésre került az immobilizált pH-gradiens (IPG) fogalma, amely az izoelektromos fókuszálásban új távlatokat nyitott. Számos méretben és különböző pH-tartományban kereskedelmi forgalomban megvásárolható.

Az immobilizált pH-gradiens olyan akrilamidszarmazékokból épül fel, amelyek pufferoló csoportokkal az immobilinokkal együtt kopolimerizálódtak az akrilamidgélben. Előnye, hogy stabil és reprodukálható gradienst lehet létrehozni, igen nagy felbontóképességgel (a finom pH-érték-különbségek miatt). Megfelelő tápegységet (magas feszültség) és horizontális szeparálásra alkalmas felszerelést (tankot) igényel. Alkalmazása forradalmasította a 2D-elektroforézist.



4-3. ábra. 2D PAGE alkalmazása albumin/biszalbumin frakciók vizsgálatára (festés: CBB; nem denaturáló 1. dimenzió + SDS lapgél 2. dimenzió)

1. Humán szérumalbumin
2. Biszalbumin

KÉTDIMENZIÓS ELVÁLASZTÁSOK KOMBINÁCIÓI

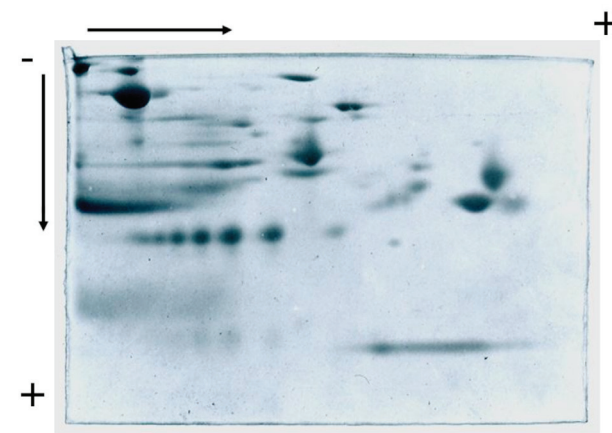
Az elválasztások felbontóképessége a kétdimenziós módszerek bevezetésével természetesen tovább növelhető. A gradiens-gél-elektroforézisek csak a második dimenzióban kaphattak teret, de az első dimenziós elektroforézisek/izoelektromos fókuszálások színes változatai kínálják a különböző kombinációs lehetőségeket. Fejezetünkben ezekről részletesebb módszertani ismertetőt adunk.

- Nem denaturáló alkalikus gél + SDS elektroforézis (4-3. ábra, 4-4. ábra).
- Savanyú urea gél + SDS-gélelektroforézis
- Denaturáló IEF + SDS gradiens vagy homogén gélelektroforézis.

FEHÉRJEDETEKTÁLÁSI TECHNIKÁK

A KLINIKAI KUTATÓMUNKÁBAN

A fejezet az elektroforetikusan elválasztott fehérjefrakciók megjelenítési módjait taglalja. A detektálási módok fajlagosságukban és érzékenységükben jelentősen különbözők lehetnek. A minták analízisének a helyesen kiválasztott és alkalmazásra kerülő jelöléssel keressük a választ feltett kérdéseinkre.



4-4. ábra. 2D PAGE alkalmazása szérumglobulinok megjelenítésére (Nem denaturáló 1. dimenzió + SDS lapgél 2. dimenzió; minta: albumin-„mentesített” humán szérum, festés: CBB)

IZOTÓPOS JELÖLÉS

Izotópjelölési módok rendszerint élő sejtekre alkalmazhatók. Kellő érzékenységgű detektálási lehetőséget kínálnak, és mennyiségi értékelésre is alkalmasak. Leggyakrabban baktériumok és sejtek/szövetek kultúráiban, de kísérleti állatoknál is használatos módszer. A fémek (pl. Zn és Cd) izotópjainak beépülését a fehérjekomplexeikben nem magában a hordozó gélekben, hanem az eltávolított/kimetszett frakciók aktivitásának mérésével *in vitro* igazoljuk. A lágy β -sugárzó izotópok (H, C, P, S) jelenlétében optimális jelölési effektust érhetünk el a minták elektroforetikus szeparálását követően magában a gélben is. A detektálás megfelelő fényátalakító (szcintillációs) kezeléssel autoradiográfiásan, helyesebben fluorográfiásan kivitelezhető és dokumentálható.

FESTÉKKÖTÉSES JELÖLÉS

Festékkötésen alapuló eljárások mind agaróz-, mind poliakrilamidgélre széles körben elterjedtek. Általános fehérjefestésként a leginkább ismert az amidofekete és a Coomassie Brilliant Blue (R250 és G250) festés. Az utóbbi festék csaknem valamennyi fehérjéhez és peptidhez mennyiségileg is értékelhetően kapcsolódik, érzékenysége 0,1 μ g.

Alternatívaként *negatív festés* érhető el az imidazol-cink (Hardy és mtsai, 1996) technikával, mely az előbbieknél jóval érzékenyebb. A detektálási limit 15 ng-nál van. Ennél a módszernél a köztes terek festődnek és nem a proteinek, ami a további kinyerések számára és egy tervezett tömegspektrometriás fehérjeazonosításnál előnyt jelent.

EZÜSTÖZÉS

Ezüstözési eljárásoknál direkt és kombinált jelölési módok különböztethetők meg. A direkt ezüstözés a fehérjemolekulákat közvetlenül jelöli, míg a kombinált eljárások egy megelőző fehérjefestéssel párosulnak. A nagyszámú (több mint 50) közölt eljárásnál mind ezüst-nitrátos, mind ezüst-diaminos változatok szerepelnek. A legérzékenyebb detektálás akár 0,2 ng fehérjét tartalmazó foltot is képes megjeleníteni. A változatok nem mindegyike alkalmas viszont proteomikai vizsgálatokra, mert nem MS-kompatibilisek.

A módszerek rendszerint többlépcsősek, a reagensek (víz) tisztasága és a rendszer keratinszennyeződéstől óvása elengedhetetlen a sikeres vizsgálatok érdekében.

FLUORESzcENS FESTÉS

A fluoreszcens festési eljárások kevésbé érzékenyek (2–8 ng limittel), mint az ezüstözési technikák. Mennyiségi méréshez viszont széles lineáris tartománnyal rendelkeznek, és MS-kompatibilisek is. A kereskedelmi forgalomban kapható festékek sajnos igen drágák, és az értékeléshez scanner vagy CCD-kamera szükséges. A detektálórendszernek megfelelő hullámhosszú fényforrással és szűrőkkel kell rendelkeznie, hogy különböző festékeket alkalmazhassunk.

IMMUNREAKCIÓN ALAPULÓ JELÖLÉS

Immunreakción alapuló azonosítások agarózban és PAGE-szeparálás és transzfer után blotting membránfelszínen (Western blotting).

Agarózban mind elektroforetikus szeparálással kombinálva, mind a nélkül a rendkívül fajlagos antigén-antitest találkozás lejátszható. Az agarózgél pórusai megengedik a makromolekulák diffúzióját is, és a két immunkomponens között a megfelelő arányban létrejövő „találkozás” látható, festéssel jól detektálható precipitációt eredményez. Ezek a fajta vizsgálatok egyébként kontrollok használata mellett akár szemi-kvantitatív értékelést is lehetővé tesznek a klinikai/biológiai laboratóriumokban.

A **Western blotting** ma már a legtöbb laboratóriumban elsajátított rutin eljárásnak számít. Mi magunknak is módunk volt mindkét alapvető blotolási módszert kipróbálni. Az ún. *nedves* módszer vertikális (függőleges) kazettában és pufferoldatba merülő elektroforetikus fehérjetranszfert jelent. A *félszáraz* módszernél a transzfer horizontális grafitlemezek között történik, csak nedvesített szűrőpapírrétegek áramvezetésével.

A blotting lépései egész röviden a következők:

- *Elektroforézis* (pl. PAGE).
- Elektroforetikus *transzfer* nitrocellulózmembránra.

- A membrán *blokkolása* (a szabad kötőhelyek lefedése immunológiailag inert makromolekulával).
- *Primer antitestkezelés* és mosás.
- *Szekunder (jelölt) antitestkezelés* és mosás.
- A jelölőreakció lejátszása (*előhívás*).

Az előhívás a jelölőreakciónak megfelelően végzendő (pl. peroxidáz alapú reakciók változatai: diaminobenzidin – DAB – vagy NiDAB és ezüstözés).

A mennyiségi mérésre is alkalmas, igen érzékeny kemilumineszcens reakciók műszeres értékelése a fehérjefrakciók azonosításán túl új távlatokat nyitott a kutatásnak (piko- és femtomol koncentrációkról van szó). Nem utolsósorban megfelelő készülékeket használva a minták dokumentációja is megoldott.

Protokollok – A klinikai kutatásban általunk adaptált és alkalmazott elválasztási és fehérjelölési eljárások

Fejezetünk következő részében olyan szeparálási/elektroforetikus (túlnyomórészt PAGE) technikákat és detektálási eljárásokat közlünk, amelyek a tervezett proteomikai vizsgálatok alapját képezhetik. A leírások különös információs értéke abban rejlik, hogy valamennyi módszer általunk kidolgozott, ma is sikeresen alkalmazható és többszörösen kipróbálásra került klinikai kutatásunkban.

Hangsúlyoznunk kell, hogy az esetek túlnyomó részében az ismertetett eljárások leginkább azért tűnnek hagyományosnak, mert mellőzik a kereskedelmi forgalomban kapható ún. kész reagens összeállításokat. Ezt elsősorban nem finanszális ok, hanem mindenkori kutatási célunk változó igényei indokolták.

Elválasztási technikák

NEM DENATURÁLÓ ÉS DENATURÁLÓ PAGE GÉLRUDAKBAN ÉS LAPGÉLEKEN

NEM DENATURÁLÓ ALKALIKUS GÉLELEKTROFORÉZIS (ORNSTEIN ÉS DAVIS SZERINT)

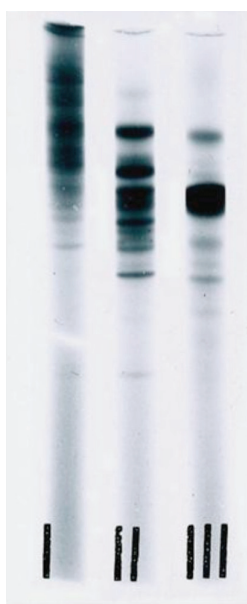
Az egydimenziós poliakrilamidgél-elektroforézis nem denaturáló közegben különösen alkalmas *biológiai fehérjekomplexek* elválasztására és a funkcionálisan megtartott fehérjék in situ gélben való detektálására. Mind gélrudakban, mind vertikális gállapon elvégezhető (4-5. ábra a, b).

Oldatok:

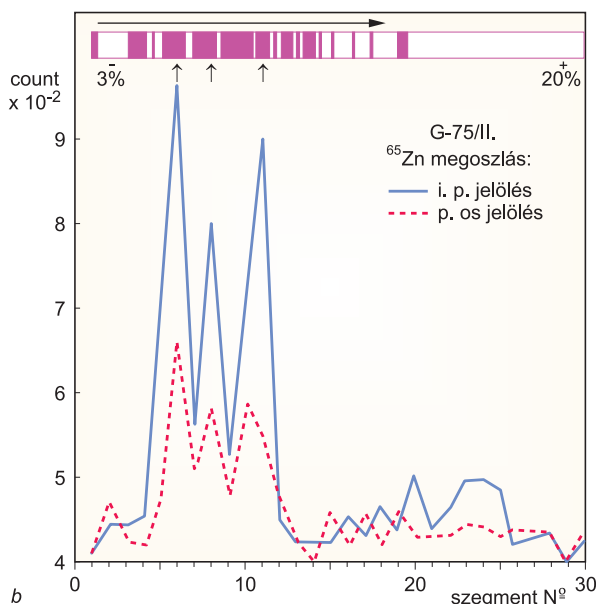
1. Pufferoldat a géleleegyhez (A):

36,3 g TRIS és kb. 48 ml 1M sósav elegye, 8,9 pH-t eredményez.

Az oldatot 0,46 mL TEMED (N,N,N',N'-tetra-metilén-diamin) hozzámérése után 100 mL-re egészítjük ki desztillált vízzel.



a



b

4-5. ábra. Nem denaturáló PAGE
a) Sephadex G-75 gélkromatográfiás cink-fehérje frakciók „fehérjeképe” (festés: amidofekete)
b) Sephadex G-75 kromatográfiás frakció összehasonlító vizsgálata: Zn⁶⁵-aktivitások a nem denaturáló PAGE-szegmentekben)

2. Akrilamid-keverék (B):

45 g akrilamidot és 1,2 g metilén-bisz-akrilamidot oldás után 100 mL-re egészítünk ki desztillált vízzel.

3. Ammónium-perszulfát-oldat (C):

28 mg ammónium-perszulfátot 20 mL desztillált vízben oldunk. Az oldat a gélkészítés előtt közvetlenül, mindenkor frissen készítendő!

4. Mintapuffer az alkalikus gél elektroforézishez:

14,25 g TRIS-t vízben oldás után 1M H_3PO_4 -gyel (kb. 64 mL) 6,9 pH-ra hozunk elektromos pH-mérővel kontrollálva, majd 1000 mL-re egészítjük ki desztillált vízzel. A pufferoldat 5-szörös töménységű törzsoldatot képez, ezért a használathoz desztillált vízzel 5-szörösére hígítjuk. A hígított mintapuffer a denzitás növelésére, a minták felülrétegzésének megkönnyítésére 10% glicerint is tartalmaz.

5. Futtatópuffer:

12 g TRIS-t és 57,6 g glicint oldás után 1000 mL-re egészítünk ki desztillált vízzel. A pufferoldat pH-ja 8,3. A használatos puffert az említett oldat 10-szeres hígításával készítjük.

A gélek elkészítése:

8 mL gélkeverékhez az AA-koncentrációtól függően a 4-1. táblázatban szereplő adatok alapján mérjük össze a komponenseket. Ha nagyobb gélmenyiség szükséges, ezek többszöröseit alkalmazzuk. (A szükséges mennyiség a lapgélek, ill. a gélcsövek méretéből és számából adódik.)

A gélelegy összekeverése és vákuum alatti gáztalanítása után az üvegcsöveket megtöltjük. Majd felülretegzése következik 50-50 μL desztillált vízzel.

4-1. táblázat. Alkalikus gél keverék készítése nem denaturáló alkalikus gél elektroforézishez

Kívánt gélkoncentráció	5%	7,5%	10%
A oldat	1 mL	1 mL	1 mL
B oldat	0,87 mL	1,3 mL	1,78 mL
H_2O	2,11 mL	1,70 mL	1,22 mL
C oldat	4 mL	4 mL	4 mL

Minta-előkészítés alkalikus gélhez:

A fehérjetartalmú mintákat mintapufferben oldjuk. A minták gélre való felvitele után azt óvatosan felülretegezzük a futtatópufferrel. Alkalikus közegben a fehérjék anionként az anód felé vándorolnak, így a pozitív pólus (anód) alul helyezkedik el a kárendszerben.

Elektroforézis:

2 mA/cső konstans áramerősség mellett elektroforétizálunk. Jelzőfestékként brómfenolkéket tehetünk a mintákhoz. Az elektroforézis az alatt megy végbe, amíg a szabad festék a gélcső alsó részét eléri.

Festés:

Az üvegcsövekből eltávolított géleket 1%-os amidofekete oldatával festhetjük.

A festékoldat összetétele: 10 g amidofekete, 70 mL jegecet, 100 mL metanol; desztillált vízzel 1 literre egészítjük. A festés időtartama 1 óra.

Differenciálás:

7% ecetsav, 10% metanol vizes oldatában, a differenciálóoldat többszöri változtatásával.

DENATURÁLÓ SDS-GÉLELEKTROFORÉZIS (LAEMMLI SZERINT)

Egydimenziós poliakrilamid-gélelektroforézis SDS-t és β -merkaptóetanolt tartalmazó *denaturáló* közegben. A fehérjék molekulatömegük szerint vándorolnak. A gélcső vagy a lapgél ún. „disc” (nem folytonos) elektroforézist képez, ugyanis felső gyűjtőgél és alsó szeparálógél tartalmaz az élesebb elválasztás céljából (4-6. ábra a, b).

Oldatok:**1. Akrilamidelegy (A):**

30% akrilamidot és 0,8% metilén-bisz-akrilamidot tartalmaz:

30 g akrilamid

0,8 g bisz-akrilamid oldása után 100 mL-re egészítjük ki desztillált vízzel.

2. TRIS-puffer az alsó gélelegyhez (pH 8,8) (B):

18,17 g TRIS-t vízben oldunk. pH-ját 6M sósavval elektromos pH-mérő kontrolljával 8,8-re állítjuk (kb. 20–25 mL).

4 mL 10%-os vizes SDS-oldatot adunk hozzá, majd desztillált vízzel 100 mL-re egészítjük ki.

3. *TRIS-puffer a felső géleleegyhez (pH 6,8) (C):*

6,06 g TRIS-t oldás után 6N sósavval 6,8-es pH-ra hozunk.

4 ml 10%-os SDS hozzámerése után desztillált vízzel 100 mL-re egészítjük ki.

4. *Pufferoldat az elektroforézishez (D):*

4-szeres töménységű TRIS-glicin törzsoldat (pH 8,3).

12 g TRIS-t + 57,6 g glicint oldás után desztillált vízzel 1000 mL-re egészítünk ki.

5. *Mintapuffer (E):*

- 10 mL glicerín
- 5 mL β -merkaptoetanol
- 30 mL 10%-os SDS

12,5 mL felső gél TRIS-puffer elegyét desztillált vízzel 100 mL-re egészítjük ki.

6. *Ammónium-perszulfát-oldat (AP) (F):*

200 mg ammónium-perszulfátot 2 mL desztillált vízben oldunk. A gélkészítés előtt mindenkor frissen készülni!

A gélek elkészítése:

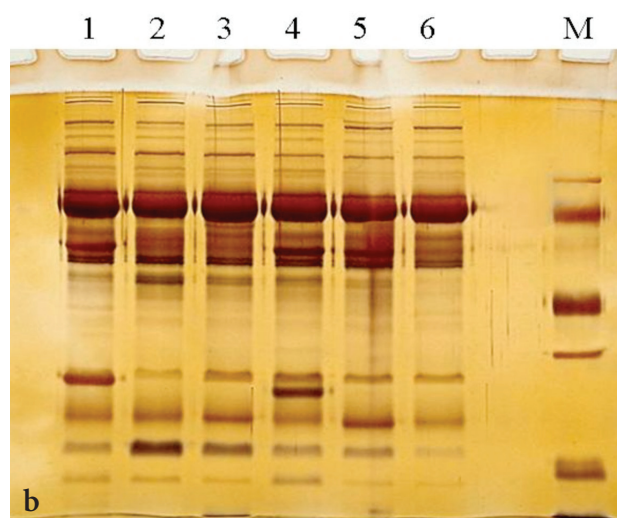
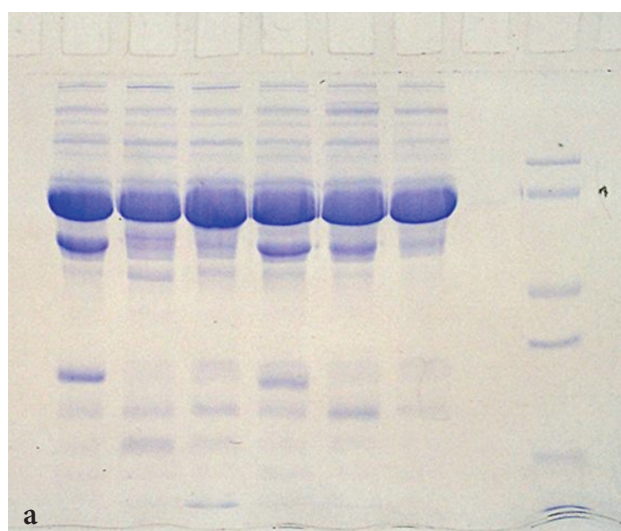
Megfelelően tisztított üveglemezeket (esetleg üvegcsöveket) függőleges helyzetben a gélkiöntő állvány-

ba erősítünk. A gélkiöntéséhez a kívánt gélkoncentrációtól függően a 4-2. táblázat szerint oldatkeveréket készítünk. A táblázatban megadott mennyiség két 9 × 12 cm-es szeparálógélhez (0,75 mm vastagságnál) elegendő.

4-2. táblázat. Gélkészítés denaturáló LAEMMLI szerinti SDS-gélelektroforézishez

Alsó (futtató/szeparáló) gél			
Kívánt gélkoncentráció	10%	12,5%	15%
H ₂ O	4,2 mL	3,45 mL	2,5 mL
A oldat	3,4 mL	4,15 mL	5,0 mL
B oldat	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
F oldat	30 μ L	30 μ L	30 μ L
TEMED	5 μ L	5 μ L	5 μ L

Felső (gyűjtő/koncentráló) gél	
Az alsó gél koncentrációjától függetlenül azonos gélelegyet készítünk	
H ₂ O	2,9 mL
A oldat	0,83 mL
C oldat	1,25 mL
F oldat	15 μ L
TEMED	5 μ L



4-6. ábra. SDS-lapgél

a) Detektálás: Coomassie Brilliant Blue (CBB) R250 (minta: 6 klinikai beteg széruma, M: marker)

b) Detektálás: CBB + kombinált ezüstözés (minta: 6 klinikai beteg széruma, M: marker)

A gélelegy összekeverése után a cellákat megtöltjük. Felülrétegzését 0,1%-os SDS-oldattal végezzük.

A „kondenzvíz” kiittatása után 2–2,5 mL-t rétegezzünk az alsó gél fölé. A fésűk behelyezése buborékmentes legyen.

A minták előkészítése az elektroforézishez:

1. A fehérjemintát ún. mintapufferben oldjuk (E oldat).
2. 2-3 percig 100 °C-on forraljuk.
3. 0,1%-os brómfenolkékoldatból 5 µL-t adunk a molekulatömeg-jelölő fehérjékhez, majd a mintákat a gélekre visszük (10–20 µL térfogatban).
4. A felülrétegzésre futtatópuffert használunk (lásd a következő pontban).

Futtatópuffer:

125 mL D oldatot (4-szeres töménységű) és 5 mL 10%-os SDS-oldatot 500 ml-re egészítünk ki desztillált vízzel.

Elektroforézis

Az SDS-sel fedett fehérjemolekulák anionként az anód felé vándorolnak. Az elektroforéziskészülék alsó tankjába merül a pozitív pólus (anód).

A minicellánál konstans, 150 V feszültséggel elektroforetizálunk, míg a brómfenolkék jelzőfesték éppen az alsó gél végéig vándorol (ez kb. 45 perc).

Festés (4-7. ábra a, b):

Coomassie Brilliant Blue-val, 2 óra hosszan át a következő összetételű festékoldatban:

- 1 g CBB (Coomassie Brilliant Blue) R-250
- 450 mL víz
- 450 mL metanol
- 100 mL jégcet

Differenciálás:

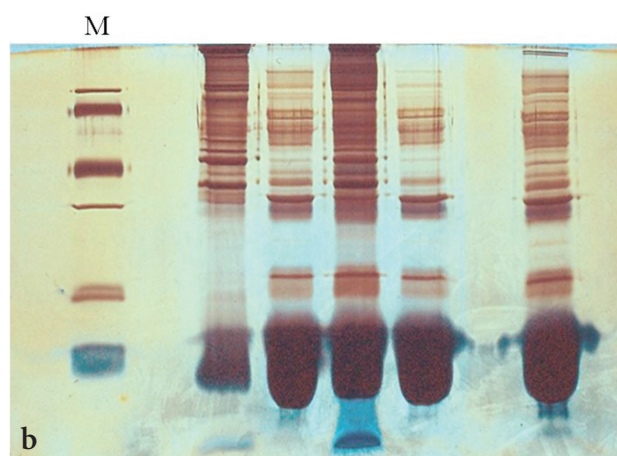
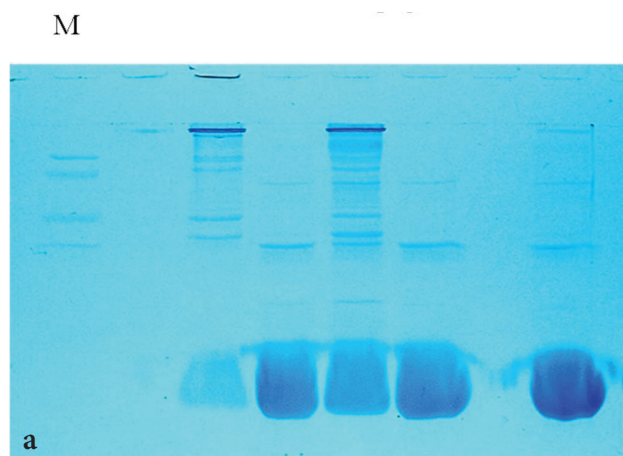
Differenciálóoldat:

- 100 mL ecetsav
- 450 mL metanol
- 450 mL víz

Ezeket elegyítjük, ebben differenciáljuk, az oldat többszörös cseréjével.

KÉTDIMENZIÓS PAGE DENATURÁLÓ RENDSZERBEN

Nagy felbontású kétdimenziós poliakrilamid-gél-elektroforézis technika (O'FARRELL). Denaturáló jellegű kétdimenziós poliakrilamidgél-elektroforézis. Az első dimenzió izoelektromos fókuszálás urea és redukáló ágens (β -merkapto-etanol, ditiotreitol vagy ditioeritol) jelenlétében. Adaptáló kezelést követően az izoelektromos fókuszált gélcsöveket – vagy az immobilizált pH-gradiens elválasztott fehérjéket – SDS-elektroforézisnek vetjük alá, homogén gélkoncentrációjú vagy exponenciális gradiens gélkoncentrációjú poliakrilamidgélben. Míg az első dimenzió során a peptidláncok izoelektromos pontjuk szerint, a második dimenzió során molekulatömegük szerint vándorolnak a poliakrilamidgélben.



4-7. ábra. Lizált mosott vörösvértestek fehérjéi (M: marker)

a) CBB R250 festéssel SDS-lapgélen

b) CBB + kombinált ezüstözéssel

IZOELEKTROMOS FOKUSZÁLÁS GÉLCSÖVEKBEN

Az izoelektromos fókuszálás oldatai:

A. *Lízispuffer* a minták szolubilizálásához.

Az oldat összetétele:

- 9,5 M urea (5,7 g)
- 2% Nonidet P-40 detergens (tömeg/térfogat%)
- 5% β -merkaptóetanol (térfogat%/térfogat%)
- 1,6% pH 5–8-as Amfolit/Servalit (0,4 mL)
- 0,4% pH 3–10-es Amfolit/Servalit (0,1 mL)

A zárójelben feltüntetett adatok 10 mL mintapufferre vonatkoznak. Az amfolit cégenként változó névvel kereskedelmi forgalomban kapható. Az A oldat 1 ml-es adagokban $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tárolandó.

A lízispuffer az ureát a fehérjék oldatban tartásához telített oldatban tartalmazza. A detergensnek a szolubilizáláshoz természetesen kizárólag nem ionos vagy ikerionos detergensnek lehetnek (pl. NP-40 vagy Triton X-100) az izoelektromos fókuszálás miatt.

D. *Akrilamid törzsoldat* izoelektromos fókuszáláshoz: 30%-os

28,38%-os akrilamid és 1,62%-os metilén-bisz-akrilamid vizes oldata.

10 mL elkészítése javasolt, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tárolandó.

E. Nonidet P-40 (vagy Triton X-100) detergens törzsoldata: 10 tömeg/térfogat%-os.

10 mL oldatot készítünk, és $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároljuk.

G. *Ammónium-perszulfát* 10 tömeg/térfogat%-os vizes oldata. (1 mL elkészítése javasolt; frissen készülni.)H. 8 M-os urea vizes oldata. Az ureából ún. „ultra-pure” tisztaságú készítmény ajánlott. 4,8 g ureát vízben oldunk, majd 10 mL-re egészítjük ki. Tárolása $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on javasolt.I. Izoelektromos fókuszáláshoz *anódoldat*: 0,01 M-s H_3PO_4 .

85%-os H_3PO_4 (analitikai tisztaságú) 0,67 mL-ét hígítjuk 1 literre desztillált vízzel. Az anódoldat az izoelektromos fókuszálás során a vertikális kamrarendszerben alul helyezkedik el, és mint a nevéből is kiderül, a pozitív pólus merül bele.

J. *Katódoldat*: 0,02 M-s NaOH; 1,6 g NaOH granulált készítményt oldunk 2 liter desztillált vízben. Mind az anód-, mind a katódoldat $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tárolható.

K. *Felülrétegző oldat*: 8 M ureát és 1% Amfolit/Servalit keveréket tartalmaz.

- 0,8% pH 5–8-as Amfolit/Servalit (0,2 mL).
 - 0,2% pH 3–10-es Amfolit/Servalit (0,05 mL).
- 4,8 g ureát oldás után az Amfolittal összekeverünk, és desztillált vízzel 10 mL-re egészítjük ki. 1 mL-es adagokban $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on fagyasztva tároljuk.

A gélcsovek elkészítése és előfókuszálás

10 ml gélkeverékhez az alábbi mennyiségek szükségesek:

- 1,5 g ultra-pure urea
- 1,33 ml akrilamid törzsoldat (D)
- 2 mL NP-40 törzsoldat (E)
- 1,97 mL víz
- 0,4 mL pH 5–8-as Amfolit
- 0,1 mL pH 3–10-es Amfolit

A keverék igen kevés vízben oldandó az urea nagy térfogata miatt!

A receptben feltüntetett vízmennyiség elegendő a 10 mL-es össztérfogathoz.

Teljes oldódás után

- 10 μL 10%-os ammónium-perszulfát (G)
- 7 μL TEMED hozzámerése biztosítja a polimerizációt.

A polimerizálatlan géleleget igen vékony hosszú üvegcsövekbe töltjük (mi 20 cm-re vágott 1 mL-es botpipettákat használunk erre a célra). Felülrétegzését 50–50 μL 8 M ureaoldattal (H) végezzük.

1–2 óra állás után a már megpolimerizált gélekről a H oldatot 50–50 μL lízispufferrel (A) cseréljük le. A lízispuffer fölé 20–20 μL desztillált vizet rétegünk a bekoncentráció, ill. az ureaaktiválás megelőzésére. Újabb 1–2 óra állás után friss lízispufferrel (A) előzetes izoelektromos fókuszálást végzünk. Ennek célja az Amfolit pH-gradiensének kialakítása a minták felvitelének időpontjára.

Az egydimenziós elektroforézis kamrarendszerbe, vertikális helyzetben felerősítjük az Amfolit-tartalmú gélcsoveket. Az alsó puffertankba kerül a sav, míg a

felső puffertankba a lúg. A savba merül a pozitív, a lúgba pedig a negatív pólus.

Konstans feszültség mellett az alábbiak szerint izoelektromos fókuszálást végzünk ennél a lépésnél:

- 200 V/15 perc
- 300 V/30 perc
- 400 V/30 perc

Az előfókuszálást követően a készüléket kikapcsoljuk, a katódoldatot elöntjük, majd a csövek felső részét a lúgtól szűrőpapír csíkokkal leitatjuk.

A minták felvitele és izoelektromos fókuszálása

A fehérjetartalmú mintákat A oldatban oldjuk, ill. szükséglet szerint a kívánt fehérjekoncentrációnak megfelelően hígítjuk. 20–100 µl térfogatban ajánlott a minták gélre rétegzése, melyet K oldattal való felülrétegzés követ. 50–50 µl K oldat védi meg a mintákat a közvetlen lúghatástól.

Friss NaOH-oldattal feltöltjük a csöveket és a felső pufferkamrát. Az izoelektromos fókuszálás 12 órán át konstans feszültség mellett 400 V-on megy végbe. Az elválasztott frakciók élesítése végett befejezés előtt 800 V-on 1 órán át fókuszálunk.

Az üvegcsövekből eltávolított géleket a szükségletnek megfelelően detektáljuk (festés, izotópaktivitás-mérés, pH-mérés stb.), vagy a második dimenziós elválasztáshoz adaptáló kezelésnek vetjük alá.

Az izoelektromosan fókuszált gélcsíkok festése

Ha a minta nem kerül második dimenziós elválasztásra, a gélcsíkok fehérjefrakcióit megfesthetjük. A festés során nem csak az elválasztott fehérjefrakciók detektálására, hanem azok fixálására és a szintén festődő, tehát zavaró Amfolit eltávolítására is szükség van. Mindezek elérésére a gélrudakat a következő kezelésnek vetjük alá:

1. 50% triklórecetsav és 0,1% Coomassie-Brilliant-Blue tartalmú vizes oldatban 1 órát kezeljük a géleket.
2. Tovább festjük, majd differenciáljuk ORTEC szerrint 65 °C-on, az ún. gyorsfestési eljárással.
 - Festés az alábbi festékoldatban 1 órán át 65 °C-on.
 - 45 rész etanol
 - 45 rész 0,2%-os CBB vizes oldata
 - 10 rész ecetsav

- Differenciálás és rehidrálás:
 - 25 rész etanol
 - 10 rész ecetsav
 - 65 rész víz elegyében kétszer 60 percig 65 °C-on.

A metakromáziásan festődő fehérjefrakciók előhívására és a gélek tárolására 10%-os ecetsavat használunk.

MÁSODIK DIMENZIÓ; SDS-ELEKTROFORÉZIS HOMOGÉN VAGY EXPONENCIÁLIS GRADIENS POLIAKRILAMIDGÉLBEN

Oldatok:

L. 0,4%-os SDS-tartalmú alsó gél puffer: 1,5 M-s TRIS-sósav, pH 8,8.

36,34 g TRIS-t vízben oldunk, 2 M sósavval pH-mérő kontrolljával 8,8 pH-ra titráljuk, majd 0,8 g SDS-t oldunk az elegyben. 200 ml-re desztillált vízzel feltöltjük. 4 °C-on tárolandó.

M. Felső gél puffer: 0,4% SDS-tartalmú, 0,5 M-s TRIS-sósav, pH 6,8.

6,05 g TRIS-t oldunk desztillált vízben, 2 N sósavval, 6,8 pH-ig titrálunk, majd 0,4 g SDS-t oldunk hozzá, és 100 ml-re desztillált vízzel feltöltjük. 4 °C-on tárolandó.

Megjegyzendő, hogy ugyanez a puffer készül az O oldathoz is, de SDS nélkül.

N. 30%-os akrilamid-törzsoldat SDS-gélhez:

29,2 g akrilamidot és 0,8 g metilén-biszakrilamidot desztillált vízben oldunk és 100 ml-re jelíg hígítjuk. 4 °C-on tárolandó.

O. SDS mintapuffer: 10% glicerint, 5% β-merkaptoetanolt, valamint 2,3% SDS-t tartalmazó 0,0625 M-s TRIS-sósav puffer (pH 6,8).

Az SDS nélküli M oldatból 12,5 ml-t veszünk, 10 ml glicerint, 5 ml β-merkaptoetanolt, valamint 2,3 g SDS-t adva hozzá desztillált vízben feloldjuk, és 100 ml-re egészítjük ki. 4 °C-on tárolandó.

P. 1% agaróztartalmú O oldat az első dimenziós gélcsíkok beágyazásához: 10 ml-t készítünk:

100 mg agarózt oldunk 10 ml O oldatban melegítéssel. A gélbeágyazás előtt, frissen készítjük.

Q. Futtatópuffer SDS-elektroforézishez

0,025 M TRIS, 0,192 M glicin-, valamint 0,1% SDS-tartalmú oldat.

10-szeres töménységű törzsoldat készítése javasolt, amely 20 °C-on tárolható.

1 liter törzsoldathoz az alábbi mennyiségeket mérjük ki:

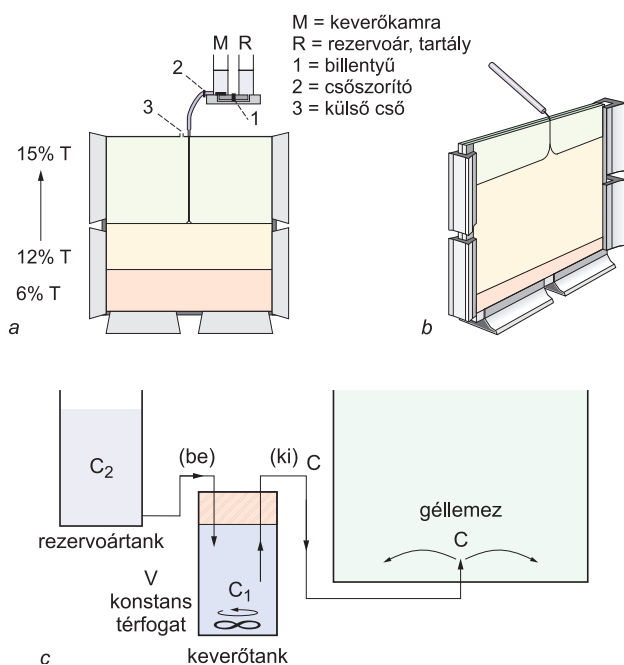
30,28 g TRIS-t, 139,27 g glicint, 10 g SDS-t oldunk desztillált vízben, és 1 literre feltöltjük. A törzsoldat 10-szeres vizes hígításából készül a mindenkor futtatópuffer.

R. 50% triklórecetsavat, valamint 0,1% Coomassie Brilliant Blue-t tartalmazó vizes festékoldat a géllemezek festéséhez. 1000 g triklórecetsavat 1 liter vízben oldunk és 1 g CBB-t (melyet megelőzően desztillált vízben oldunk) adunk hozzá.

S. Dehidrálófolyadék a megfestett és fixált géllemezek kezeléséhez: 50% etanolt, 7% jégecet, valamint 0,005% CBB-t tartalmazó oldat.

T. 7% ecetsavtartalmú rehidráló, differenciáló oldat.

A második dimenziós géllemezek elkészítése (4-8. ábra a, b).



4-8. ábra. Gélek kiöntése

a) Gradiens gélek kiöntése

b) Homogén gélek kiöntése

c) A konvex gradiens gél készítése elve

Általában az elektroforézist megelőző napon készítjük el a futtatógélt. Használható homogén koncentrációjú gállap, de készíthetünk ún. exponenciális konvex gradiensgélt is. Ez utóbbi felel meg az eredeti O'Farrell elválasztási technikának. A rendelkezésünkre álló oldatokból 5–22,5%-os akrilamidgél-koncentráció alakítható ki.

100 × 140 × 2 mm 1-1 lemez mérete, 2 lemezt elektroforetizálunk egyszerre. A szükséges gélkeverék 60 ml össztérfogatú.

A gél kialakításánál a következő térfogatarányokat kell betartani:

0,25 térfogat alsó gél puffer (L).

A gélkoncentrációtól függően 0,75 térfogatot képvisel az akrilamid-törzsoldat (N) és a hígító víz együttes mennyisége.

A polimerizációhoz 0,0033 térfogat 10%-os ammónium-perszulfát-oldat (G), valamint 0,0005 térfogat TEMED szükséges.

Gradiensgélnél a nagy gélkoncentrációjú komponens hígítójaként víz helyett 75%-os glicerint tartalmaz, és a G oldat térfogataránya 0,00145-re csökkentett.

Homogén gélkoncentráció kialakítása lemezben

Példa homogén 12,5%-os géllemezek kiöntéséhez (60 ml össztérfogat esetén).

- 15 ml L oldat
- 25 ml N oldat
- 20 ml víz
- 200 µl G oldat
- 30 µl TEMED

Összekeverés után az összeállított második dimenziós géltartályokat megtöltjük ezzel az eleggyel, majd kb. 1 ml desztillált vízzel felülrétegezzük. 1 óra elteltével a polimerizáció végbemegy, majd 4-szeresre hígított L oldattal cseréljük le a felülrétegező vizet. Az így előkészített alsó, ún. futtató/szeparáló gél másnapig áll.

Konvex gradiens gél kialakítása

Exponenciálisan növekvő konvex gradiens gélkoncentráció kialakítása azért ajánlott, hogy a második dimenziós gállapon a molekulatömeggel lineáris vándorlási sebességet érjünk el a fehérjéknél a gállapon. A különböző molekulatömegű fehérjék így egyenletesen oszlanak el a géllemezen. A gélkialakítás az egyre fokozódó koncentrációjú gél alárétegzésével ér-

hető el, ez legegyszerűbben a tankok alulról való feltöltésével érhető el keveredés nélkül. Az egyre változó gélkoncentráció *konstans térfogatú keverőtank* és változó térfogatú feltöltő-, rezervoártank összekapcsolásával alakítható ki (lásd a 4-8. b ábrát).

A konstans térfogatú keverőtankból töltjük fel a géllemezeket. Az alacsony gélkoncentrációjú komponenssel levegőmentesre feltöltjük a keverőtankot, és egyrészt a géllemezekhez, másrészt a rezervoártankhoz csatlakoztatjuk. A rezervoártankból befolyó magasabb gélkoncentrációjú oldat áramlási sebessége megegyezik a géllapok feltöltési sebességével, így a keverőtank térfogata a feltöltés során változatlan marad.

A keverőkamrában a gélkoncentráció folyamatosan változik a következő egyenlet szerint:

$$C = C_2 - (C_2 - C_1) \exp^{-K}$$

ahol

C: a keverőtankból eltávozó folyadék koncentrációja a kérdéses időpontban, ill. volumennél.

C_1 : a keverőkamra kezdeti gélkoncentrációja.

C_2 : a rezervoártankban lévő, tehát a keverőtankba beemenő folyadék gélkoncentrációja.

K: a keverőtankból eltávozott folyadék térfogataránya a keverőtankban lévő fix volumenhez képest a kérdéses időpontban ($K = v/V$).

Példák exponenciális konvex gradiens gél kialakítására: A lemezek kiöntéséhez az említett méretek mellett 60 ml gélre van szükség. 60 ml konstans keverőtank-térfogat mellett az alacsony gélkoncentrációból 60 ml-t, a magasabb gélkoncentrációból (a lemezekhez szükséges gélmenyiség szabályozza) szintén 60 ml-t készítünk.

1. példa

60 ml 5%-os gélhez (keverőtankban)	60 ml 15%-os gélhez (rezervoár tankban)
15 ml L	15 ml L
10 ml N	30 ml N
35 ml víz	15 ml 75%-os glicerin
200 µl AP (G)	90 µl AP (G)
30 µl TEMED	30 µl TEMED

E gélkeverék elkészítése után a 60 ml elfolyási pontnál az említett egyenlet szerint a következő gélkoncentráció érhető el:

$$15 - (15 - 5) e^{-60/60} = 11,4\%,$$

tehát a géllemezek feltöltésével 5–11,4%-os gradiens gél keletkezik.

2. példa

60 ml 8%-os gélhez (keverőtankban)	60 ml 20%-os gélhez (rezervoártankban)
15 ml L	15 ml L
16 ml N	40 ml N
29 ml víz	5 ml 75%-os glicerin
200 µl AP (F)	200 µl AP (G)
30 µl TEMED	30 µl TEMED

$$20 - (20 - 8) e^{-60/60} = 15,7\%,$$

tehát 8–15,7%-os gél fogunk kapni.

A felülrétegezést hasonló módon végzik, mint a homogén géllemezeknél. Mindkét géllemeztípusra másnap ún. hordozógélt öntünk ki. Ennek célja, hogy a gélcsövekből kimozduló fehérjék az elektroforézis során ebben felgyűljenek és azonos startpozícióban lépjenek be a futtatógélbe.

A gyűjtőgél elkészítése

4,75% akrilamidot, 0,1% SDS-t és 0,125 M-s TRIS-sósav puffert tartalmaz (pH 6,8):

- 0,25 térfogat felső gél puffer (M)
- 0,15 térfogat akrilamid törzs (N)
- 0,6 térfogat víz
- 0,03 térfogat AP (G)
- 0,001 térfogat TEMED

10 ml gél-elegy elkészítése elegendő

Miután a futtatógélről a rétegezőfolyadékot eltávolítottuk, ezt a gélelegyet rátöltjük. A polimerizáció 30 perc körül következik be. A hordozógélt 4-szeresre hígított M oldattal ajánlatos felülrétegezni.

Az első dimenziós gélcsíkokat időközben az izo-elektromos fókuszálás befejeztével adaptáljuk, ill. ekvilibráljuk (redukció, SDS stb.) a második dimenziós elválasztás körülményeihez. Ehhez a gélcsíkokat 5-5

ml O oldatban tartjuk 2-3 órán keresztül szobahőmérsékleten. Az így ekvibrált gélek második dimenziós géllemezre való beágyazása következik.

A gélcsíkok beágyazása a második dimenziós géllemezre

80 °C-ra hevített O oldatot öntünk (kb. 5 ml) a hordozógél tetejére. Az ekvibrált gélcsíkokat ebbe fektetjük. Az agaróz rövid időn belüli megdermedése után a második dimenziós géllemezeket 10-szeresre hígított futtatópuffert (Q) tartalmazó elektroforézis-tankba helyezünk. A második dimenziós elektroforézist 20 mA/géllemez konstans áramerősség mellett végezzük. A felső tankba oldott kis mennyiségű brómfenolkék vándorlási sebessége jelzi az elektroforézis befejeztét.

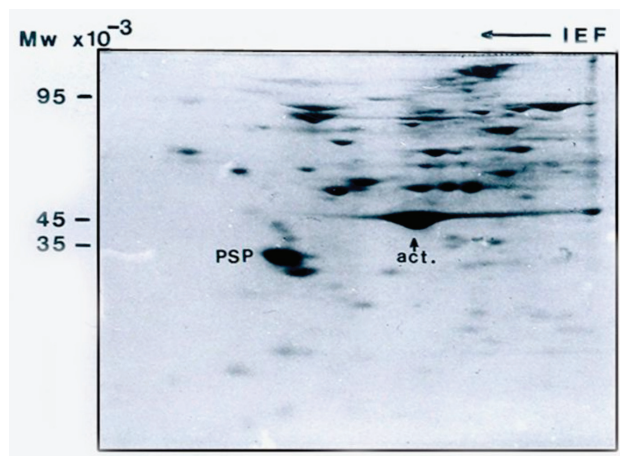
A géllemezek megfesthetők, ill. festés nélkül megfelelő kezeléssel autoradiográfiás értékeléshez felhasználhatók.

A géllemezek festése

Két órán át R oldatban festünk. Ezt követően 24 órát S oldatban dehidrálunk. Végül T oldatban hívjuk elő, differenciáljuk és tároljuk a megfestett fehérjefrakciókat (4-9. ábra).

Megjegyzés: autoradiográfiás detektáláshoz a megfestett géllemez is felhasználható.

Ehhez a fluorográfiás detektálás megfelelő előkészítése, valamint a gélek szárítása szükséges (lásd később). Röntgenfilmre, -20 °C-on exponáljuk.



4-9. ábra. 2D PAGE O'Farrell szerint (minta: 400 µg protein, humán thrombocytafehérjék; CBB-festés)

IZOELEKTROMOS FOKUSZÁLÁS LAPGÉLEN – DENATURÁLÓ RENDSZERBEN

(AZ O'Farrell-TECHNIKA ELSŐ DIMENZIÓJÁNAK MEGFELELŐ RENDSZER)

A gél összetétele (15 ml-hez):

- 5% akrilamid – 2,5 ml (törzs: 2,838g AA + 0,085g Bis AA ad 10 ml desztillált víz)
- 9 M urea – 8,1g
- 1% Ampholine pH 3–10 – 0,15 ml
- 4% Ampholine pH 5–8 – 0,6 ml
- 2% Triton X-100 v. NP-40 – 0,3 ml
- ad 15 ml desztillált víz
- 15 ml készül 25 µl 10%-os ammónium-perszulfáttal és 25 µl TEMED-del!

Mintapufferben oldott fehérjék:

Az összetétel megfelel az O'Farrell-technika A oldatának:

- 9 M urea
- 1% Ampholine pH 3–10
- 4% Ampholine pH 5–8
- 2% Triton X-100
- 5% β-merkaptóetanol

Fokuszálás a katódos mintafelvitelt követően:

5 W konstans áram 4 órán át (teljesítményreguláció!)

8 W konstans áram 2 órán át.

Anódoldat (+) 10 mM H₃PO₄ – alul (vertikális rendszer esetén).

Katódoldat (–) 20 mM NaOH – felül.

Fixálás – 20–50%-os TCA-ban festékekkel vagy festék nélkül.

A továbbiakban az O'Farrell-technika szerint kell eljárni.

Detektálási technikák

GÉLELŐKÉSZÍTÉS AUTORADIOGRÁFIÁHOZ

FLUOROGRÁFIÁS DETEKTÁLÁS

(BONNER ÉS LASKEY SZERINT)

¹⁴C, ³H vagy ³⁵S izotópot tartalmazó minták poliakrilamidgélben való detektálásához mind fixálatlan, mind fixált, mind festett gélek alkalmasak.

A detektálás folyamata:

1. A géllemezeket 20-szoros térfogatuknak megfelelő dimetilszulfoxidba merítjük 30 percig.
2. Ismételt dimetilszulfoxidos kezelés következik friss reagensben (30 perc).
3. Az előző két lépéssel vízmentesített, impregnált géleket 4-szeres térfogat szcintillációs oldatba merítjük: 20%-os (súly/súly) PPO-t (2,5-difeniloxazolt) tartalmazó dimetilszulfoxid (DMSO). A kezelés 3 órán át tart.
4. 20-szoros térfogat desztillált vízben a PPO-t a gélben kicsapjuk (1 órás kezelés).
5. A géleket desztillált vízzel leöblítjük a felesleges csapadéktól, majd nedves celofánba burkolva a gél-száritó készülékbe fektetjük.
6. Szobahőmérsékleten vákuum alatt szárítjuk.
7. A megszáritott poliakrilamidlemezeket RP Royal „X-Omat” filmen (vagy ezzel megegyező röntgen-film) -70°C -on exponáljuk. (Az idő az előzőleg tesztelt radioaktivitás mértékétől függ.)
8. Az előhíváshoz KODAK hívót, ill. fixálót használunk.

EZÜSTÖZÉSI ELJÁRÁSOK**FEHÉRJÉK DIREKT EZÜSTÖZÉSE EGYDIMENZIÓS SDS LAPGÉLEN [6]****Oldatok:**

- A. Savas alkoholos fixálóoldat* – 150 ml/gél.
- 50%-os etanol, 10%-os ecetsav;
 - 500 ml abszolút etanol.
 - 100 ml cc. ecetsav, desztillált vízzel 1000 ml-re kiegészítve.
- B. Glutáraldehid „cross linking” oldat* – 150 ml/gél.
- 10%-os oldat: frissen készül használat előtt!
 - 100 ml 25%-os glutáraldehid
 - 150 ml desztillált víz
- C. Ammóniás ezüsfestő oldat* – 150 ml/gél.
- Törzsoldatai – előre elkészíthetők (4°C).
1. 90 mM NaOH: 3,6 g NaOH ad 1000 ml desztillált víz
 2. 14,8 M NH_4OH – cc. ammóniaoldat, gyógyszer-tári kiszerelésben
 3. 1,14 M AgNO_3 -oldat: 19,38 g ad 100 ml desztillált víz (sötét üvegben tartandó)

Munkaoldat – felhasználás előtt kell elkészíteni:

- 31,5 ml 90 mM NaOH
- 2,5 ml 14,8 M NH_4OH
- 4 ml 1,14 M AgNO_3
- + 110 ml desztillált víz

D. Citromsav – formaldehid hívó – 500 ml/gél

Törzsoldatai:

1. 47,6 mM citromsav: 9,14 g citromsav (vízmentes) vagy 10 g citromsav (egy kristályvizes) ad 1000 ml desztillált víz
2. 37% formaldehidoldat (9 rész) + 10% metanol (1 rész), 100 ml készül.

Munkaoldat – felhasználás előtt összeönteni

- 2,5 ml 47,6 mM citromsav
- 250 μl (!) formaldehid/metanol
- + 500 ml desztillált víz

Eljárás

Az ezüstözést csak vékony (max. 1 mm) gélen lehet végezni. Valamennyi edény 3-szor desztillált vízzel tisztítandó, és a reagensek is azzal készülnek!

1. Fixálás 150 ml A oldatban, 30 percig, mozgatva (tárolásra is alkalmas médium).
 2. Keresztkötés 150 ml B oldatban.
 3. Mosás 3-szor desztillált vízzel (2-3 liter, átfolyó rendszerben).
 4. Kezelés C oldat 150 ml-ével, mozgatva (3-5 percig, gélvastagságtól függően).
 5. Mosás 2-szer 500-500 ml váltott vízben 1-1 percig.
 6. Másik edényben előhívás 500 ml frissen készült D oldatban. Hívási idő a felvitt fehérjemennyiségtől függ: 2-7 perc.
 7. Mosás másik edényben, többször váltott desztillált vízzel. Legalább 3 literrel, órákig!
- Kevés mosás magas háttérrel okoz!

KOMBINÁLT (GYORS) EZÜSTÖZÉSI ELJÁRÁS**LESZÁRÍTOTT FESTETLEN, ILL. FESTETT „NEDVES” GÉLLEMEZEKEN (WILLOUGHBY ÉS LAMBERT [19])****Gélszáritás és a festetlen gélek előkészítése:**

1. 30 perces fixálás 20%-os TCA-ban.
2. 2×5 perc metanol : cc. ecetsav : víz = 45:10:45 elegyben.
3. 4×2 perc vizes mosás.
4. 2 perc 0,75%-os glicerines áztatás.
5. Szárítás.

Oldatok gyors ezüstözéséhez:

A. 25 g Na_2CO_3 (10 kristályvizessből 67,5 g!) 500 ml desztillált vízben oldva.

B. oldat:

- 1 g NH_4NO_3
- 1 g AgNO_3
- 5 g szilikovolframát
- 7 ml formaldehidet (37%-os) vízben 500 ml-re oldani.

C. Rögzítőoldat:

- 0,05 mol/l glicin
- 3,75 g glicin
- ad 1000 ml víz

Valamennyi oldat készítésekor nagy tisztaságú 3-szor desztillált víz használandó.

Eljárás:

1. Közvetlenül a felhasználás előtt készült 35 ml A és 65 ml B oldat elegyében a kívánt intenzitásig ezüst-hívást végzünk.
2. Rövid, 2-szer váltott vizes mosás.
3. Rögzítés: C oldatban. A kívánt ezüstöt a gélfelszínről „letörölni”, majd újabb C oldatban dokumentálásig tárolni.

Megjegyzés: Az előkészítés (szárítás) csak festetlen gélek esetén szükséges. Az ezüstözés CBB-festések után is alkalmazható. (Kolloidos festések, CBB-R250 vagy

formalinós CBB G-250 eljárásokat követően.) Ajánlott minden olyan esetben, amikor a festett gél intenzitása nem elegendő (SDS-elektroforézis vagy IEF poliakrilamidgélben, de agaróz hordozóra is).

Az ecetsavban tárolt, festett géleket az ezüstözés előtt vízben kell rövid ideig áztatni (4-10. ábra a, b)!

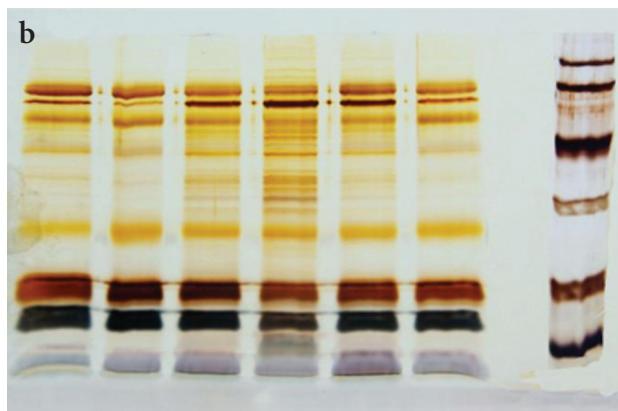
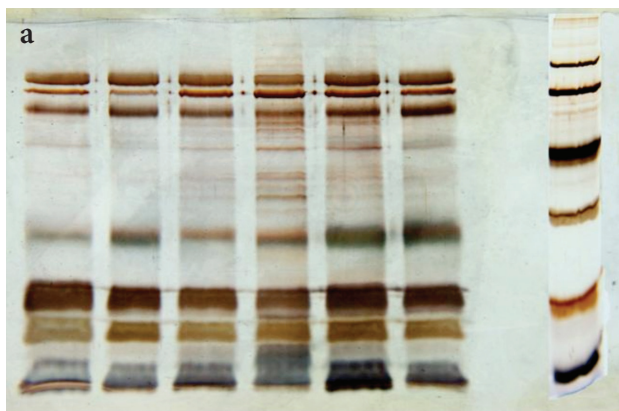
EZÜSTÖZÉSES FEHÉRJEDETEKTÁLÁS ULTRAVÉKONY PAGE-LEMEZEKEN (SAMMONS [16])

Bármelyik fajta poliakrilamidgél-elektroforézis után, ha azt 1 mm körüli vastagságú lemezgélen végezzük, a fehérjedetektálás nagy érzékenységgű ezüstözéssel lehetővé válik.

Szétszedhető cellában 0,8 mm vastag SDS 6-12% poliakrilamid gradiens gél állítunk elő, a szokásos módon elektroforetizálunk, majd a fehérje-előhívást ezüstözéssel végezzük.

Szükséges oldatok (készítésükhöz ioncserélt vizet használunk):

1. *Fixálóoldat*: 50% etilalkohol, 10% ecetsavtartalmú vizes oldat.
2. *Mosóoldat I.*: 25% etilalkohol, 10% ecetsavtartalmú vizes oldat.
3. *Mosóoldat II.*: 10% etilalkohol, 0,5% ecetsavtartalmú vizes oldat.
4. *Ekvilibrálóoldat*: 1,9 g/l ezüst-nitrát-tartalmú vizes oldat. 1,9 g AgNO_3 -t feloldunk desztillált vízben, és 100 ml-re egészítjük ki. Használat előtt 10-szeres hígítást készítünk a szükséges mennyiségben.
5. *Redukálóoldat*: 30 g/l nátrium-hidroxid-tartalmú



4-10. ábra. Két ezüstözési eljárás összehasonlítása (egyedi könnyminták, SDS-PAGE)

a) Kombinált ezüstözés (CBB festés + ezüst; pásztánként 1,3 μg protein, Willoughby-féle ezüstözés)

b) Direkt ezüstözés (pásztánként 1,3 μg protein, Giulian-féle ezüstözés)

oldatban közvetlenül a használat előtt 37%-os formaldehidet (7,5 ml/l), ill. nátrium-borohidridet (80 mg/l) oldunk.

6. *Színstabilizáló oldat*: 7,5 g/l töménységű nátrium-karbonát.

A festés menete:

Az elektroforézis után az óvatosan eltávolított géleket (kézzel ne fogjuk meg) műanyag dobozban legalább 2 óráig fixáljuk. Az oldatot lecseréljük, és legalább 2 óra hosszat, de inkább egy éjszakán át tovább fixáljuk. A gél az I. mosóoldattal, kétszeri váltással egy óra hosszat, majd a II. mosóoldattal szintén kétszeri váltással egy óra hosszat mossuk. (Ha a festést nem tudjuk befejezni, ennél a lépésnél abbahagyhatjuk, ebben az oldatban a gél tárolható.)

A további lépéseket külön edényekben kell végezni!

A gél lassú rázás közben 2 óra hosszat az ekvibrálóoldatban inkubáljuk, majd ioncserélt vízzel a felületre tapadt ezüstöt rövid mosással eltávolítjuk (10–20 s). Utána a gél a redukálóoldatba merítjük, amelyet közvetlenül a használat előtt készítünk el. A fehérjefoltok néhány perc után halványsárga háttérben kezdenek előtűnni. Az első elszíneződött redukálóoldatot kb. 1 perc elteltével elöntjük és frissel pótoljuk. A redukálóoldatban a kívánt színintenzitás eléréseig hagyjuk a gél (kb. 10–15 perc), majd a színstabilizálóba tesszük azokat. 1 órás inkubálás után a színstabilizálót cseréljük, majd a gél ebben az oldatban tárolhatjuk. A szín ebben az oldatban napokon keresztül stabil.

A MINTÁK FEHÉRJEDÚSÍTÁSA ÉS EZÜST-DETEKTÁLÁSA (MARSHALL SZERINT [12])

A minták fehérjedúsítása

A kétdimenziós elektroforézisek esetén gyakran nem elég koncentrált a vizsgálandó minta sem az első dimenziós felvitelhez (IEF), sem a második dimenziós detektáláshoz. Az itt ismertetésre kerülő Marshall-féle ultraszenzitív ezüstözési eljárás egy *közbeiktatott dúsítási eljárással* nagyságrendileg növelheti a mintafehérjék detektálásának érzékenységet a második dimenziós lapgelen.

Az eljárás elve: az előkészítés során a minták fehérjetartalmát CBB R-250 alkoholos savas festékreagens segítségével kicsapjuk, SDS-oldat hozzáadásával növeljük a precipitációs tartományt, majd a fehérje-fes-

ték komplexet centrifugálva üledékként nyerjük vizsgálandó mintáinkat. A felesleges festéket acetonos mosással távolítjuk el. A módszert vizeletfehérjék 2D vizsgálatához írták le először.

Munkaoldatok:

Coomassie Brilliant Blue R-250 festékreagens (a precipitációhoz):

- CBB 0,05 g/40 ml vízben
- etanol 25 ml
- 85% foszforsav 30 ml

majd desztillált vízzel kiegészítjük 100 ml-re + 10% SDS-oldat

Eljárás:

A Bradford-módszer alapján megelőzően meghatározott fehérjekoncentrációjú mintákat két csoportra osztjuk:

- A 0,1–1,0 g/l fehérjetartalmú minták 1 ml-éhez 0,25 ml festékreagenst és 3 µl SDS-t adunk
- Az 1,0 g/l-nél magasabb fehérjetartalmú vizeletek 0,25 ml-éhez 1 ml festékreagenst és 5 µl SDS-oldatot mérünk.

Ezután centrifugálás következik: 13 500 rpm 5 percig Eppendorf típusú centrifugában, ill. nagy mennyiségű minta esetén Du Pont Sorvall RC5 típusú centrifugában.

A felülúszót leöntve az üledéket 1 ml acetonnal felfuszpendáltuk, majd ezt követően újra centrifugálás következik. Célunk a felesleges kezelőoldat kimosása. A felülúszót leöntve a végső pelletet lízispufferbe vesszük fel (lásd 2D elfo). A végső fehérjekoncentrációt 2 mg/ml-nek állítjuk be.

FEHÉRJÉK DETEKTÁLÁSA MARSHALL SZERINT MÓDOSÍTOTT ULTRASZENZITÍV EZÜSTÖZÉSI ELJÁRÁSSAL [10]

A módszer lényege, hogy a fixált géleket az ezüstözés során „túlhívjuk”, majd differenciálással (destaining) a feleslegben kivált ezüstöt eltávolítjuk. Ily módon a jel/zaj arány mintától függő optimális beállítása érhető el (4-11., 4-12. ábra).

Ezüstözés

Felhasznált oldatok:

Savas, alkoholos fixálóoldat (500 ml/gél):

- metanol 500 ml
- ecetsav 100 ml
- tridesztillált vízzel 1000 ml-re kiegészítve

Formaldehidoldat (500 ml/gél):

- 37% formaldehyd 2,7 ml
- tridesztillált vízzel 1000 ml-re kiegészítve

Diaminos ezüsfestő oldat (400 ml/gél, mindig frissen készül használat előtt):

- 40% metil-amin 8 ml
- 0,36% NaOH-oldat 40 ml
- 20% AgNO₃ 12 ml
- tridesztillált víz 340 ml

Hívóoldat (500 ml/ gél, többször cserélve):

- 1% citromsav 15 ml
- 37% formaldehydoldat 1,62 ml
- tridesztillált víz 3 l

Festési procedúra:

1. Fixálás egy éjszakán át 200 ml savas, alkoholos fixálóoldatban.
2. Mosás 2 × 200 ml tridesztillált vízben 10, majd 20 percig.
3. Inkubálás 200 ml formaldehydoldatban 60 °C-on 30 percig.
4. Mosás, hűtés 200 ml vízben 10 percig.
5. Kezelés diaminoldattal, mozgatva, 10 percig.
6. Mosás kétszer, 200-200 ml váltott tridesztillált vízben, 1-1 percig.
7. Előhívás 200 ml frissen készített hívóoldattal 5 percnként cserélve az oldatot, maximum 30 percig, amíg a gél felszínén az egyenletes ezüstitükrözéteg megjelenik. (A túlhívás a metodikához tartozik, így érünk el minél nagyobb jelölési effektust.)

8. Mosás kétszer 200-200 ml vízben 10, ill. 20 percen keresztül.

9. Tárolás tridesztillált vízben legalább egy éjszakán át.

Destaining

A kezelés célja a megfelelő háttér elérése úgy, hogy minél több fehérjefrakció látható maradjon. A *destaininghez felhasználandó oldatok* (elkészítve SWITZER és munkatársai szerint):

A oldat:

- NaCl 11,1 g
- CuSO₄ 11,1 g
(17,3 g CuSO₄ · 5H₂O)
- tridesztillált víz 285 ml
- NH₄OH, amíg a feltisztuló oldat sötétkék lesz

B oldat:

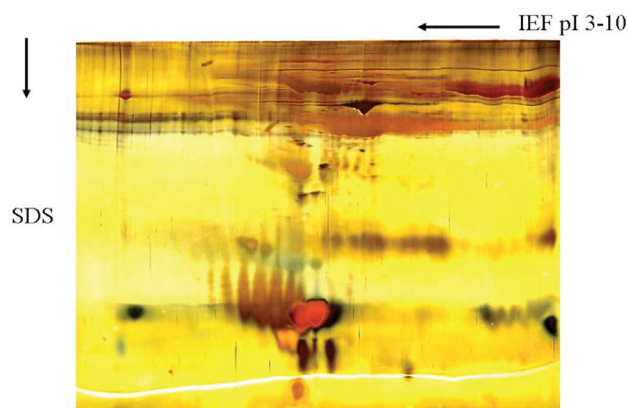
- Na-tioszulfát-pentahidrát 44 g
- tridesztillált víz 70 ml

C oldat:

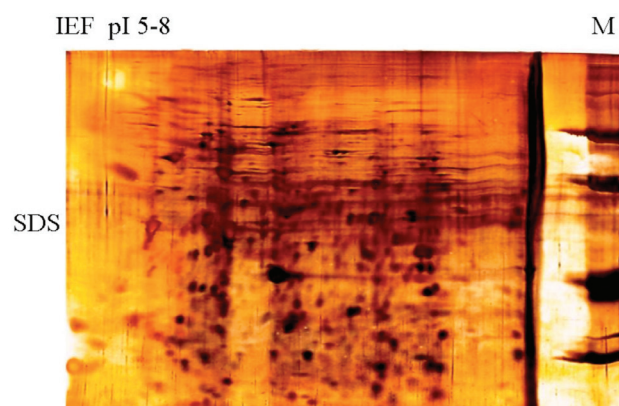
- Hypo (kereskedelmi) 5 ml (12,5 ml)
- tridesztillált víz 195 ml (488 ml)

Destaining kezelés

1. Az A és B oldatot 1:1 arányban összekeverjük, a 10%-os gél esetében tapasztalataink szerint 3-szoros, a 12,5%-os gél esetében 4-szeres mennyiségű vizet adunk hozzá.
2. A gél 1–4 percre az így elkészült oldatba (200 ml/gél) helyezzük, az aranyárga színű háttér eléréséig.



4-11. ábra. 2D PAGE Marshall-ezüstözés lapgélén (75 µg protein; minta: humán könny)



4-12. ábra. Marshall-ezüstözés 2D O'Farrell-gélén (minta: H50 sejt kultúra)

3. Mosás kétszer 200-200 ml váltott tridesztillált vízben 1-1 percig.
4. Destaining leállítása 200 ml C (Hypo) oldattal 30 percig.
5. Mosás 200 ml desztillált vízben 10, 20, ill. 30 percen át.
6. Tárolás tridesztillált vízben

A gélek kezelésekor minden esetben kesztyűt használtunk.

Dokumentáció

A gélfotókat alsó megvilágításból (transzparencia), Fujicolor 100 ASA filmre készítettük.

MS-KOMPATIBILIS FEHÉRJEDETEKTÁLÁSOK POLIAKRILAMIDGÉLEN

MS-ANALÍZISHEZ AJÁNLOTT CBB-FESTÉS (WANG [20])

Az eljárás a következő

1. Elektroforézis után a gél 20 térfogat fixálóoldatba merítjük és fixáljuk 1 órát
fixálóoldat:
 - 10% (v/v) ecetsav
 - 10% v/v metanol
 - 40% v/v etanol
2. Ezt követően a gél érzékenyítőoldatba merítjük és további két órát mozgatva keverjük (rázzuk).
érzékenyítőoldat:
 - 1% v/v ecetsav
 - 10% ammónium-szulfát
3. 20 térfogat festőoldatba helyezük legkevesebb 4 órára vagy egy éjszakára.
festőoldat:
 - 5% v/v ecetsav
 - 45% v/v etanol
 - 0,125% v/v CBB R250
4. A festés után a gél 1 órára keverés mellett az I. differenciálóba tesszük.
I. differenciáló:
 - 5% v/v ecetsav
 - 40% v/v etanol
5. Ezt követően a II. differenciálóba helyezük, amíg a háttér tiszta lesz.
II. differenciáló:
 - 3% v/v ecetsav

– 30% v/v etanol

6. Végül a gél 5% w/v ecetsavban hónapokig tárolhatjuk.

MS-KOMPATIBILIS EZÜSTFESTÉS GÉLBEN (GROMOVA [7])

A módszer az ezüst-nitrát-festési procedura (Shevchenko et al., 1996; Yan et al., 2000) módosítása, amely alkalmas fehérjék megjelenítésére, gélben való emésztést követő MS-analízishez.

Nagy érzékenységgű és alacsony háttérű eredményhez fontos az inkubációs idők szoros betartása. Valamennyi oldathoz és mosáshoz „ultra pure” víz szükséges.

Az eljárás menete (Az eredeti cikk tükörfordításával) Oldatok

1. *Fixálóoldat:* 50% etanol, 12% ecetsav, 0,05% formalin.
1 literhez: 120 ml jégcetet adjunk 500 ml 96%-os etanolhoz, valamint további 500 µl 35% formaldehidet. (A kereskedelmi formaldehid 35%-os!) Egészítsük ki egy literre. Szobahőmérsékleten tárolható.
2. *Mosás:* 20% etanol.
1 literhez: adjunk 200 ml 96%-os etanolt 800 ml deionizált vízhez. Szobahőmérsékleten tárolható.
3. *Érzékenyítőoldat:* 0,02% (w/v) nátrium-tioszulfát ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$).
1 literhez: adjunk 200 mg vízmentes nátrium-tioszulfáthoz kis vizet, oldódás után egészítsük ki a végső térfogatra.
4. *Festés:* 0,2% (w/v) ezüst-nitrát (AgNO_3), 0,076% formalin. Frissen készítendő!
1 literhez: 2 g ezüst-nitrátot oldunk kevés vízben, majd 760 µl 35%-os formaldehidet adunk hozzá. Oldódás után kiegészítjük a végső térfogatra ionmentes vízzel. Használat előtt lehűtjük az oldatot 4 °C-ra.
5. *Hívó:* 6% (w/v) nátrium-karbonát (Na_2CO_3), 0,0004% (w/v) nátrium-tioszulfát ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), 0,05% formalin.
1 literhez: 60 g nátrium-karbonátot kevés vízben oldunk. 4 mg vízmentes nátrium-tioszulfátot külön kevés vízben oldunk. Keverjük össze a két oldatot, adjunk hozzá 500 µl 35% formaldehidet és egészítsük ki egy literre. Szobahőmérsékleten tárolható.

6. Leállítóoldat: 12% ecetsav.

1 literhez: adjunk 120 ml jégacetet 500 ml ionmentes vízhez. Keverjük össze és egészítsük ki egy literre. Szobahőmérsékleten tárolandó.

A festés menete

A festési eljárás teljes időtartama alatt talkummentes gumikesztyű viselete ajánlott. Mossuk le a kesztyűt vízzel a festési eljárás előtt és alatt. A gélfixálást és a mosási lépéseket olyan festőtartályban végezzük (polipropilén ajánlott), amelyet kizárólag csak ezüstfestésre használunk. A tartály mérete legyen elég nagy ahhoz, hogy a rázás alatt a gél szabadon mozoghasson. Minden lépéshez elegendő folyadékmennyiséget kell használni, hogy az teljesen befedje a gél. Zárjuk le a műanyag tartályt egy fedővel, és helyezzük egymásra, megvédve a párolgástól. Valamennyi lépést szobahőmérsékleten, tartályonként egy géllal végezzük, és a rázóasztalon alacsony sebességgel mozgatjuk. A kezelés során ne érintsük a gél kesztyű nélkül vagy fémtárggyal. Műanyag pipettaheggyel vagy hagyományos üvegpipettával kezelhetjük a géleket.

1. Az elektroforézist követően távolítsuk el a gél a kazettából és helyezzük a fixálóoldatot tartalmazó tartályba. Áztassuk a gél ebben az oldatban kb. 2 órát. A fixálás megakadályozza a protein kiáramlását a gélmátrixból, és el fogja távolítani az interferáló ionokat és a detergenst a gélből. A fixálás éjszakán át is végezhető. Ez növeli a festés érzékenységét és csökkenti a háttér.

2. Öntsük le a fixálóoldatot, és mossuk a gél 20% etanolban 20 percig. Váltuk az oldatot háromszor, hogy eltávolítsuk a maradék detergenst, az ionokat és a fixáló savakat a gélből.

Megjegyzés: Víz helyett etanolos oldat használatát ajánljuk a mosáshoz, ezzel megelőzve a gél duzzadását. Ha mégis vizes mosást végeznek, akkor 20%-os etanol 20 perces inkubációjával a gélnagyság megőrizhető.

3. Az etanolos oldat elöntése után adjunk a gélhez elegendő térfogatú érzékenyítőoldatot. Az inkubálás erős rotáció mellett 2 percig tart. Ez növelni fogja az érzékenységet és a festés kontrasztosságát.

4. Öntsük el az érzékenyítőoldatot és mossuk a gél kétszer 1-1 percig ionmentes vízzel. Öntsük el a vizet.

5. Adjunk a gélhez *hideg* ezüst festőoldatot, és rázzuk

20 percig, hogy az ezüstionok rákötődjenek a fehérjékre.

Megjegyzés: Ne öntsük a festőoldatot közvetlenül a gélre, mert ez egyenlőtlen háttér eredményezhet. Adjuk az oldatot pl. a tartály sarkába.

6. A komplett festés befejeződésével öntsük le a festőoldatot, és öblítsük le a gél nagy mennyiségű ionmentes vízzel 20–60 másodpercig, hogy a felesleges, azaz a kötetlen ezüstionokat eltávolítsuk. Ismételjük meg a mosást még egyszer.

Megjegyzés: ha a gél mosása tovább tart, mint egy perc, eltávolíthatja az ezüstionokat a gélből is, és ez magától értetődően csökkent érzékenységet eredményez.

7. Öblítsük le a gél hirtelen a hívóoldattal. Öntsük el az oldatot.

8. Adjunk hozzá egy új adag hívóoldatot, és hívjuk elő a fehérjeképet a gél 300 ml hívóban való 2–5 perces inkubációjával. A reakció azonnal leállítható, ha a kívánt intenzitást eléri a frakciók.

9. Állítsuk le a redukciót 50 ml ún. „termináló”-oldatnak a gélhez öntésével, mikor a gél még a hívóban van. Erőteljes rázás következik 10 percig. Ha az oldat buborékolása megszűnik, a hívás leállítódott.

10. A nedves gélek 4 °C-on 12%-os ecetsavban, műanyag zsákban eltarthatók. (Vagy 20%-os etanolos kezelés után vákuumban leszárazíthatók.)

IMMUNOBLOTTING TECHNIKÁK FEHÉRJÉK AZONOSÍTÁSÁRA

Létezik nedves és félszáraz transzferálás

MINI-TRANS-BLOT KÉSZÜLÉK HASZNÁLATA („NEDVES” ELJÁRÁS)

A „blotting” általános menete/Fehérje-„blotting” (immunológiai detektálással)

- Elektroforézis (pl. SDS PAGE Laemmli-féle vagy 2D O’Farrell-féle).
- Ekvilibráció transzfer előtt (15 perc–1 óra).
- Elektroforetikus transzfer (gélről nitrocellulóz-membránra, több órán át).
- A le nem kötött membránhelyek blokkolása (1 óra).
- Inkubáció a primer antitesttel (egy éjszakán át, 4 °C).

- Az el nem reagált anyag kimosása a membránból (5 × 10 perc).
- Inkubáció a szekunder antitesttel (1 óra szobahőmérsékleten).
- A főlöleges és nem specifikus reagens kimosása a membránból (4 × 10 perc).
- Detektálás (reakció-előhívás) (5 percen belül).

Használatos felszerelés

Elektroforézishez: Mini Protean II. Dual Slab Cell vagy Bio Rad Dual Vertical Slab Gel Electrophoretic Apparate (Model 220).

Elektroforetikus transzferhez: Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell; tápegység – pl. Büchler Instrument.

Használatos oldatok és reagensek

1. *Transzferpuffer* pH 8,1–8,3 (transzfer előtti ekvilibráláshoz és elektroforetikus transzferhez használatos).

- 25 mM TRIS: 3,03 g TRIS; 1000 ml-re desztillált/deionizált vízzel feltöltve
- 192 mM glicin: 14,4 g glicin
- 20% metanol (v/v): 200 ml metanol

Hűtőszekrényben kell tartani. Használatkor fontos, hogy 4 °C-os legyen indításkor. Sem savat, sem lúgot nem szabad hozzáadni a pH-állításhoz. Analitikai tisztaságú metanol használata ajánlott.

2. *Ponceau S festés* (az immunológiai detektálást megengedi) a transzfer effektivitásának ellenőrzésére. *Festékoladat:*

- 0,25% Ponceau S 0,25 g
 - 40% metanol 40 ml
 - 15% ecetsav 15 ml
- kiegészítés 100 ml-re desztillált vízzel

Differenciálás: desztillált vízzel (20 perc után látható fakulás)

3. *TBS* –TRIS pufferolt sóoldat pH 7,5 (alapoldat és mosóoldat a detektálás előtt)
- 50 mM TRIS: 6,05 g
 - 150 mM NaCl: 8,78 g
- pH-beállítás HCl-lel 7,5-re
ad 1 liter desztillált vízzel (tárolás 4 °C-on)

Az egyszerűség kedvéért 2 literre való anyagot oldunk, és a pH-t beállítjuk, de 1 literre töltjük csak

fel (2-szeres töménységű TBS-oldatot használva!). 500 ml-re felezzük, és úgy töltjük fel egyik felét újra 1 literre. A másik részt a zselatinos oldathoz használjuk.

4. *Zselatinos TBS-oldat* (kezelőoldat immundetektálásnál és hígítóoldat a szekunder antitesthez)

- 0,25% zselatin 2,5 g
- TBS-ben 1 liter

2,5 g zselatint melegítéssel 100 ml desztillált vízben oldunk. A feloldódott zselatint az 500 ml 2-szeres töménységű TBS-hez öntjük, desztillált vízzel 1000 ml-re kiegészítjük. 4 °C-on tároljuk.

5. *Blokkolóoldat* – zselatinos TBS + BSA

- 1% BSA (bovine serum albumin, liofilizátum)
- 1 g BSA-t oldunk 100 ml 4-es oldatban (4 °C).

6. *Zselatinos TBS + azid* (hígítóoldat a primer antitesthez)

- 0,02% nátrium-azid (20 mg = 0,02 g)
- 100 ml zselatinos TBS (4-es oldatban (4 °C)

Tudni kell, hogy az azid a peroxidázreakció potenciális inhibitora!

7. *Szubsztrátoldat a peroxidázreakcióhoz* (frissen készűl, 1-2 órával a detektálás előtt)

- 20 mg DAB (diaminobenzidin tetra HCl, Serva)
- 100 ml TBS-ben oldani, fénytől védeni kell.

Csiszolt dugós Ehrlenmayer-lombikot alufóliával burkolni, keverés mellett oldani. Nem szabad melegíteni. 1 óra alatt maradéktalanul oldódik. Szűrés nem szükséges: a kezelt szűrőpapír a festéket „kíránthatja” az oldatból, amint azt észleltük. A reakció 100 µl 30%-os H₂O₂-oldat hozzáadásával indul. A reakciót 2 × 50 ml TBS-oldattal való mosással állítjuk le. Látható reakció 5 percen belül.

A blotting kivitelezése

A blottingegység összeállítása

Elektroforetikus transzfer

- *Vizsgálati „anyag”*. AA géllemez, Laemmli-féle SDS-elektroforézist vagy 2D O’Farrell-féle nagy felbontású elektroforézist követően. A Mini-Trans-Blot blotoló apparátushoz a maximális gélnagyság 7,5 × 10 cm. A géllemez közepén

elfelezve a kérdéses mező blottolható a „nagy” géllemezből is. A „mini” gél nagysága megfelel a blottolóegységnek.

- *Előkészület a transzferhez.* Szükséges eszközök összekészítése: puffertank, elektródrész, 2 gél-tartó kazetta, 3 üvegcád, 4 °C-ra hűtött transzferpuffer (2 liter), tápegység (Büchler), nitrocellulózmembrán, mágneses keverő: azaz „Kerge-Ferke”.

A gélek és a membránok ekvilibrlása. A géllapokat egy transzferpuffert tartalmazó üvegcádba helyezük (kb. 500 ml), és a gél vastagságától függően 15 perctől 60 percig ekvilibrljuk. Az ekvilibrlás célja az SDS-elektroforézis médiumának eltávolítása. (A transzfer alatti hőképződés csökkentésére). A gél méreteit az inkubáció letelte előtt meghatározzuk. Maximális nagysága 7,5 × 10 cm lehet. A kb. 2 mm vastag O’Farrell-géllemezt 1 órát áztatjuk. A lemez nagyságának megfelelő membránt éles szikével vagy pengével felvágjuk (7,5 × 10 cm). A felvágott membránokat tiszta edényben 15–30 perc időtartamban transzferpufferrel ekvilibrljuk.

Szűrőpapír. Schleicher–Schüll- vagy Whatmann-szűrőpapírból a gél vastagságától függő számban 7,7 × 10,2 cm-es darabokat vágunk: gélenként 4–6 darabot, O’Farrell-gélhez 2 × 2 réteget (összesen 2 gélhez 8 db-ot).

Szivacs. A szivacsokat transzferpufferrel telítjük. Üvegcádba transzferpuffert öntünk; a szivacsokat és a szűrőpapírokat ebben telítjük pufferrel.

Géltartó kazetta. A két géltartó kazettát a harmadik üvegcádba helyezzük. A kazetták szürke része fekszik az edény alján. A kinyitott kazetta átlátszó része az edény oldalának támaszkodik. A kazettába helyezzük a transzferpufferrel telített „szendvics”-rétegeket, pontosan egymásra centrálva, minden réteg után transzferpufferrel meglocsolva, buborékmentesen a következőképpen:

- szivacs (8 × 11 cm)
- 2 vagy 3 réteg szűrőpapír (7,7 × 10,2 cm)
- géllemez (7,5 × 10 cm)
- nitrocellulózmembrán (az orientáció bejelölve, pl. a lemez sarkának lemetszésével; 7,5 × 10 cm).

A membrán/gél adhéziós kontaktusának biztosítása-

ra egy kémcsővel, nyomással és görgetéssel érjük el a megfelelő érintkezést.

- 2-3 réteg szűrőpapír (7,7 × 10,2 cm)
- szivacs

A kazettát óvatosan zárjuk, a műanyag kallantyú oldalra fordításával és visszacsúsztatásával.

Puffertank. A puffertankot kb. 400 ml transzferpufferrel töltjük. Az elektródegységet behelyezzük. Kb. 2–2,5 cm-es keverőpalcát engedünk az alá. A géltartó kazettákat az elektródrészbe csúsztatjuk. Szürke oldaluk néz az elektródpanel szürke oldalára mindkét kazetta esetén. A tankot mágneses keverőre állítjuk. A keverőt bekapcsoljuk. Ha hűtőegységet nem használunk (éjszakán át végzett transzfer, alacsony feszültség) további kb. 450 ml transzferpufferrel teljesen megtölthető a tank.

Ügyeljünk a túlfolyás elkerülésére.

Elektroforetikus transzfer. A tető ráhelyezésével és az elektródok csatlakoztatásával a tápegységhez, hideg (4 °C) pufferrel indul. Ügyelni kell a színazonosságra a csatlakozásnál. Piros a piroshoz, fekete a feketehez, mind a tetőnél, mind a tápegység kimenőinél.

Az ily módon összeállított blottingegységben a fehérjék a gélből az anód felé vándorolva (anód: a kazetta átlátszó része, az elektród piros jelölése) a membránhoz kötődnek.

Elektroforetikus transzfer. Konstans feszültségállásnál (volt-regulálás) a tápegységen a 0–200 V és 0–200 mA tartomány kiválasztása után az áramot bekapcsoljuk, és 30 V-ra állítjuk a feszültséget. A transzfer 20 órát vesz igénybe. (O’Farrell-géleknél – kb. 2 × 2 mm-es gélvastagságnál – induláskor fokozatosan csökken 200 mA-ról 100 mA-re a vezetés, és ez az érték másnapig megmarad.) A transzfer befejezése után az áramot kikapcsoljuk, a kazettákat kiemeljük, majd a membránokat tetszés szerint festjük.

Festés immundetektálás előtt. Ponceau S-festéssel, desztillált vizes öblítéssel végezzük. A membránokat a gélről leemelve, a géllal érintkező oldalukkal felfelé, óvatosan festéssel töltött tiszta edénybe helyezzük. (A további kezelés is végbemehet ebben az edényben). A membránok fotografálását azonnal el kell végezni a fakulás miatt.

Immundetektálás. Lényege, hogy a gélről a membránra átkerült és rákötött fehérjék közül specifikus antitest (primer antitest) segítségével keressük és azonosítjuk a kérdéses fehérjét.

Antigén-antitest találkozás esetén a specifikus reakció kimutathatóságának érzékenységét nagymértékben növelhetjük egy második antitesttel, amelyet valamilyen módon korábban jelöltünk. Ez a jelölés fogja „indikátorként” igazolni a kérdéses fehérje és a primer antitest kapcsolódását. Esetünkben egy olyan alkalmazást ismertetünk, ahol a szekunder antitest enzimmal, nevezetesen peroxidázzal jelölt. Szubsztrát jelenlétében az immobilizált enzim látható reakciót katalizál (ELISA-módszer), és a termék a keletkezés helyén marad. [A nitrocellulózra lejátszódó immunreakciónak nagy előnye, hogy az antigén (transzblottolt) fehérjemembránhoz kötődése, tehát fix helyzete miatt nincs szükség ún. immunprecipitációra, vagyis optimális antigén-antitest arányra a kimutatáshoz].

Az eljárás menete. Az elektroforetikus blottolt (festett vagy festetlen) nitrocellulózmembránt a géllal érintkező felszínével fölfelé reakcióedénybe helyezük. Előnyös a fedeles kis „ételdobozok” használata.

1. *Blokkolás.* A le nem kötött membránkötő helyek blokkolása az immunreakció szempontjából indifferens fehérjével.

20 ml blokkolóoldattal (5-ös oldat).

Rázás 1 órán át szobahőmérsékleten, majd leöntés.

2. *Primer antitestreakció.* Az antitest a megadott adatok szerinti mértékben hígítandó zselatinos + azidos TBS-sel 6-os oldat); példaként a tropomiozinra irányuló vizsgálatunkat mutatjuk be:

Tropomiozinnál pl. 160-szoros hígítás ajánlott (125 μ l + 20 ml hígítóoldat) (Sigma: csírkeizom tropomiozin ellen termelt nyúl-immunsavó).

Egy éjszakán át 4 °C-on tartva (37 °C 1 óra, 25 °C 2-3 óra).

Az antitestoldat visszatöltése további használatra (4 °C-on tartva).

3. *Az el nem reagált anyag kimosása a membránból.*

50 ml zselatinos TBS-sel (4-es oldat) 10 percig.

(Ezt a lépést 5 \times 50 ml-re 5 \times 10 percig ajánlatos végezni, szobahőmérsékleten, rázogatva).

4. *Inkubáció a szekunder antitesttel;* pl. peroxidázkonjugált nyúl-IgG-ellenes kecskeszérumot hasz-

nálva, a tartósítószer nem azid, hanem tiomerzál. Az antitest hígítása zselatinos TBS-sel (4-es oldat) 1:1000 arányban (20 μ l + 20 ml hígító).

20 ml hígított szekunder antitestet öntünk a membránra. Inkubáció szobahőmérsékleten legalább 1 óras rázás mellett.

5. *A fölösleges és nem specifikus reagens kimosása a membránból:*

1 \times 50 ml zselatinos TBS (4-es oldat) 10 perc

4 \times 50 ml TBS (3-as oldat) 4 \times 10 perces rázással, szobahőmérsékleten.

6. *Detektálás: enzimreakció (tisztá edényben):*

50-50 ml szubsztrátoldat lemezenként (7-es oldat), a membrán belecsúsztatása „színével” fölfelé, 2-2 csepp (kb. 50-50 μ l) 30%-os H₂O₂-oldat rázás mellett.

Színreakció előhívása 5 percen belül. Mosás 2 \times 50 ml TBS-sel, fotografálás, szárítás nedves szűrőpapír között szobahőmérsékleten, fénytől védve.

Megjegyzés:

A szárított membránok könyv lapjai között tárolhatók.

További felhasználás lehetséges. Új reakció 2-3-szor lejátszható, ha megfelelő detergens kezeléssel az antitesteket az elektroforetikus blottolt fehérjéről eltávolítjuk. Ily módon az ismételt reakciónál különböző primer antitestek próbálhatók ki.

IMMUNOBLOTTING TECHNIKA A FEHÉRJÉK AZONOSÍTÁSÁRA (SEMI-DRY BLOTTING)

A fehérjefrakciók immunkémiai detektálására szolgál. Az immundetektáláshoz pásztánként (mintánként) 3–5 μ g proteint elektroforetízálunk.

Oldatok

Blokkolóoldatok: a szabad kötőhelyek blokkolására

– 3 és 5%-os tejes zselatinos TBS-oldat

– 3, ill. 5 g tejpor

100 ml zselatinos TBS-ben

vagy

– 1%-os BSA (bovin szérumalbumin, liofilizátum)

– 1 g BSA

100 ml zselatinos TBS-ben

Alternatív puffer pH 8,1–8,3: a transzfer előtti ekvilibráláshoz és az elektroforetikus transzferhez használatos:

- 48 mM TRIS 5,8 g
 - 39 mM glicin 2,9 g
- oldás után 1,3 mM SDS 3,7 ml 10%-os oldata
ad 800 ml desztillált víz
- 20% metanol 200 ml

Hűtőszekrényben tároljuk, használatkor 4 °C-os legyen.

TBS (TRIS-pufferolt sóoldat), pH 7,5 (alapoldat és mosóoldat a detektálás előtt)

- 50 mM TRIS 6,05 g
- 150 mM NaCl 8,78 g

pH beállítása HCl-lel 7,5-re, és 1000 ml-re vízzel kiegészíteni.

Zselatinos TBS (kezelőoldat immunreakciónál és hígítóoldat az antitesthez)

- 0,25% zselatin 2,5 g
- ezt melegítéssel oldjuk 100 ml vízben
- + 2-szeres töménységű TBS-ből 500 ml
- a fentieket desztillált vízzel kiegészítjük 1000 ml-re.

Elektroforetikus transzfer

Az egydimenziós géllap transzferálásának menete nitrocellulózmembránra: A semi-dry NovaBlot (Pharmacia) készülék grafitlapjainak benedvesítése után az alternatív pufferbe mártott szűrőpapírokat egymásra tesszük, föléjük helyezzük a vízzel benedvesített membránt, majd az alternatív pufferben ekvibrált gél, majd ismét a nedves szűrőpapírokat.

A transzferálást 150 mA áramerősségen 20 percen keresztül végezzük.

A membrán blokkolása:

A blokkoláshoz a membránt egy éjszakán át 4 °C-on, tejben vagy BSA pufferoldatban tartjuk.

Immunreakció:

Vizsgálataink során többféle fehérjét detektáltunk (vírusfehérjék, hősokkprotein, aktin, aktomiozin, lizozim, szekretoros IgA, laktoferrin, orozomukoid, XIII. faktor, fibrinogén stb.).

A *jel-zaj arány optimalizálásához* fehérjénként különböző médiumokat fejlesztettünk ki. Az immunreakcióhoz használt különböző médiumok lehetnek:

- A oldat: 5% tej- (non fat dry milk) tartalmú TBS.
- B oldat: 0,05% Tween 20 TBS-ben.
- C oldat: TBS.

- D oldat: 0,5% Tween 20 zselatinos TBS-ben.
- E oldat 0,05% Tween 20 zselatinos TBS-ben.
- F oldat: zselatinos TBS.

A primer antitestreakció egy órán át 37 °C-on termosztátban ment végbe, folyamatos rázás mellett.

Az immunreakció közege minden esetben a vizsgált fehérjére lett kifejlesztve. Az immunreakció részleteit a 4-3. táblázaton foglaltuk össze. HRP-konjugátumokat használtunk a jelölésre. A táblázat ennek változatait mutatja be, a teljesség igénye nélkül.

AZ IMMUNREAKCIÓ „ELŐHÍVÁSA”

A peroxidázreakció előhívásához két különböző eljárást is alkalmaztunk:

Ni-DAB-reakció ezüstintenzifikálással (Gallyas et al., 2003)

Ni-DAB-reakció:

Az előhívás enzimreakción alapul: a szekunder antitesthez kötött peroxidáz enzim szubsztrátja a H_2O_2 . A reakció hatására a DAB elszíneződik, és a színreakciót a $NiSO_4$ erősíti fel.

Előhívóoldat: Ni-DAB-reagens

- 20 mg DAB (3,3-diamino-benzidin-tetrahidroklorid)
- 56 mg nikkel-szulfát ($NiSO_4 \times 7H_2O$)

Mindkettőt külön-külön feloldjuk 50-50 ml TBS-ben.

Az oldódás után összeöntjük, és a Ni-DAB-oldatba 50 μ l 30%-os H_2O_2 -t teszünk. Az így frissen készült előhívóoldatba helyezzük a membránt, és megvárjuk, amíg a színreakció kifejlődik. A színreakció leállításához a membránt 1%-os nátrium-acetát-oldatba tesszük néhány percre.

Ezüstintenzifikálás:

A Ni-DAB-os immundetektálást követően az ezüst-erősítést a következő elegyben végezzük [Na-volframátot és C-vitamint (gyógyszertári ampulla) tartalmazó oldat].

Oldatok:

- 60 ml A oldat (pufferolt detergenssel stabilizált Ag-kolloid-oldat).
- 7,5 ml B oldat: 5% Na-volframát-dihidrát.
- 7,5 ml C oldat: 0,2% aszkorbinsav vizes oldata.

4-3. táblázat. Fehérje detektálása immunreakcióval*

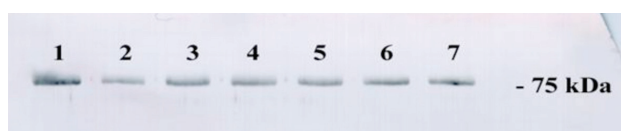
Módszer	1.	2.	3.
blokkolás	A oldat	3% tejes zselatinos TBS	1% BSA zselatinos TBS
mosás	–	C oldat	C oldat
primer antitest	poliklonális antipatkány IgA (kecske) 1:50 hígítás A oldatban	poliklonális anti-tojásfehérje lizozim (nyúl) 1:50 hígítás D oldatban	antihumán laktoferrin (nyúl) 1:50 hígítás F oldatban
mosás	4 × 5 perc B oldat	5 × 10 perc D oldat	5 × 10 perc E oldat
szekunder antitest:	antikecske immunglobulin (nyúl) 1:1000 hígítás A oldatban	antinyúl immunglobulin (disznó) 1:1000 hígítás F oldatban	antinyúl immunglobulin (disznó) 1:1000 hígítás F oldatban
mosás	3 × 10 perc B oldat 10 perc C oldat	10 perc D oldat 3 × 10 perc C oldat	3 × 10 perc E oldat 10 perc C oldat

*Az immunreakció közege minden esetben a vizsgált fehérjékre lett kifejlesztve. HRP konjugátumokat használtunk a jelölésre. A táblázat ennek változatait mutatja be, a teljesség igénye nélkül.

Közvetlenül használat előtt készítjük el a három komponens keverékét az előbbi arányban. Az előhívás során a kívánt intenzitás eléréséig tart a kezelés. Az ezüstözési reakció leállításához 1%-os ecetsavoldatot használunk.

Az előhívott membránt üveglapon szárítjuk tri-desztillált vízzel átitatott szűrőpapír között. A megszáradt membránok száraz körülmények között, szobahőmérsékleten, fénytől védve archiválhatók (4-13. ábra).

Kemilumineszcencia (ECL, enhanced chemiluminescence). A kemilumineszcencia az a fénykibocsátás, amely a kémiai reakció során felszabaduló energiából keletkezik. Leggyakrabban peroxidáz enzimmel konjugált második antitestet használtunk a detektáláshoz, amely ECL esetében a következő reakciósémán alapul:

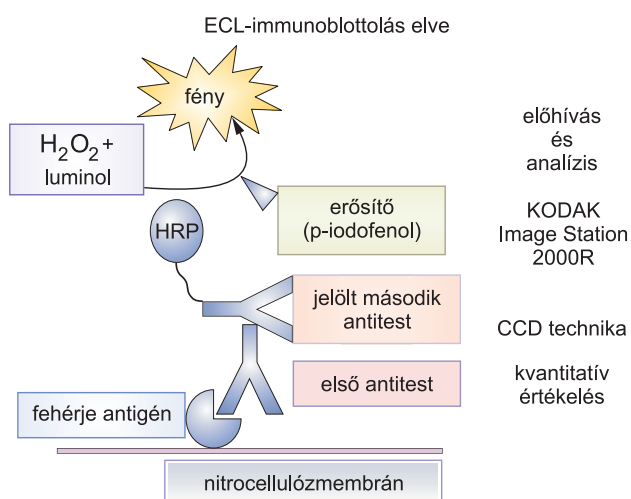


4-13. ábra. Western blotting. Gallyas-féle immundetektálás (minta: humán könnyminták, laktoferrin; detektálás: Ni-DAB + ezüst)

A fényjel gyorsan csökken (flash típusú kemilumineszcencia), ezért ún. erősítőt is használunk.

Az immunoblott ECL detektálását a 4-14. és 4-15. ábrán mutatjuk be: a membránhoz kötött, detektálni kívánt fehérjéhez először hozzákapcsolódik a primer antitest, majd a torna-peroxidáz-konjugátummal jelölt szekunder antitest. Erősítő ágensként parajodofenolt alkalmaztunk, ezután a H_2O_2 - és luminoltartalmú reagens hozzáadásával fénykibocsátás történik, amelyet detektálunk.

A parajodofenol mint jól bevált erősítő hatására a kemilumineszcencia-intenzitás percekig stabil ma-



4-14. ábra. Western blotting; az ECL-detektálás elve

rad, a csökkenés lassan megy végbe. Az oldat pH-jának növelése is nagyobb jelet eredményez.

Általunk kipróbált és ajánlott ECL-reagensok:

- Kereskedelmi forgalomba kapható gyári kit:
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce Biotechnology Inc.) 34077; 50 ml Luminol/Enhancer + 50 ml Stable Peroxide (szubsztrát)
A reagens szobahőmérsékleten tartandó, kb. 1 évig stabil, a gyári ajánlás szerint 800 cm² felületre elegendő.
A kereskedelmi forgalomban ma már akár 1000-szer érzékenyebb reagens is elérhető. Mi könnyfehérjék identifikálásában használtuk.
- „Házilag”, laboratóriumunkban készült reagens-elegy:
– Luminololdat (10 ml):

0,1 M TRIS-HCl puffer, pH 9,35 100 ml-ében
78 mg luminol + 95 mg parajodofenol együtt oldva.

– Szubsztrát: 10 µl H₂O₂

Az eljárás részletezése:

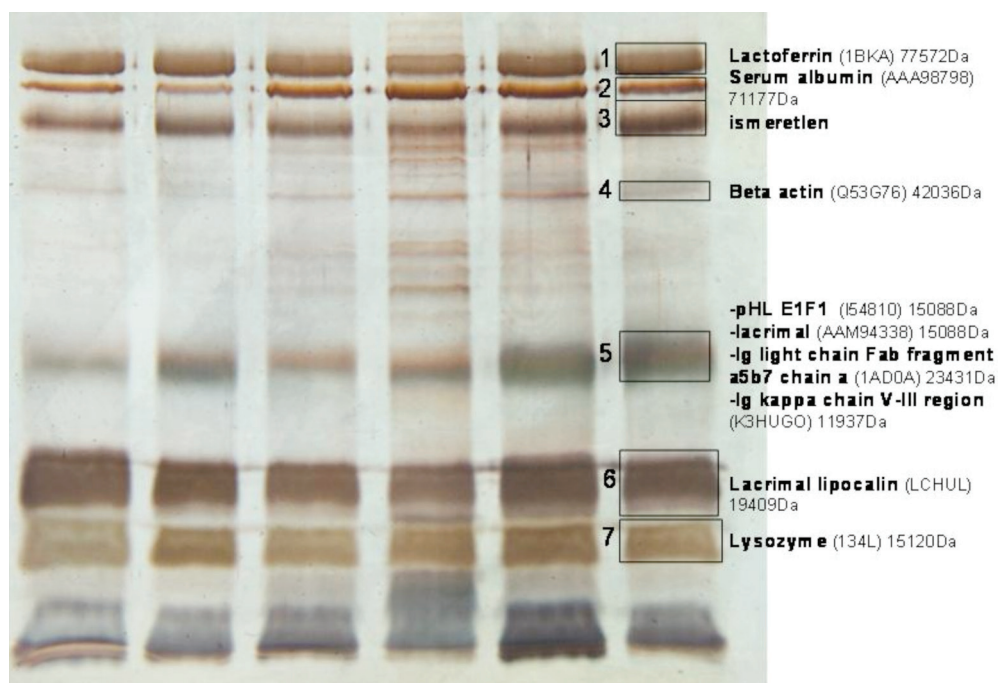
1. A gyári reagensknél a két komponenst (luminol és szubsztrát) 1:1 arányban elegyítjük, a szükséges mennyiségnek megfelelően. Az összekevert reagens szobahőmérsékleten órákig stabil marad. Óvjuk az oldatot erős fénytől.
2. Az ECL-reagenssel való előhívás két módja ismeretes:
 - Folyadékfilmmel, amely a takarékos változat.
 - A membránt éles felével fölfelé reagensbe merítjük. Ez utóbbi érzékenyebb és stabilabb detektálást eredményez.
3. Fényszegény környezetben inkubáljuk 5 percig.
4. Az értékelés esetünkben KODAK Image Station 2000R készülékkel végeztük, de ez készülék hiányában röntgenfilm-expozícióval is helyettesíthető.

A KODAK Image Station 2000R készülék:

CCD (charge-coupled device) technikát alkalmaz: lényege, hogy a detektorba érkező fotonok egyenként, közvetlenül számolhatók, így ez a módszer kvantitatív értékelésre is alkalmas.



4-15. ábra. Western blotting; lizozim ECL-detektálása

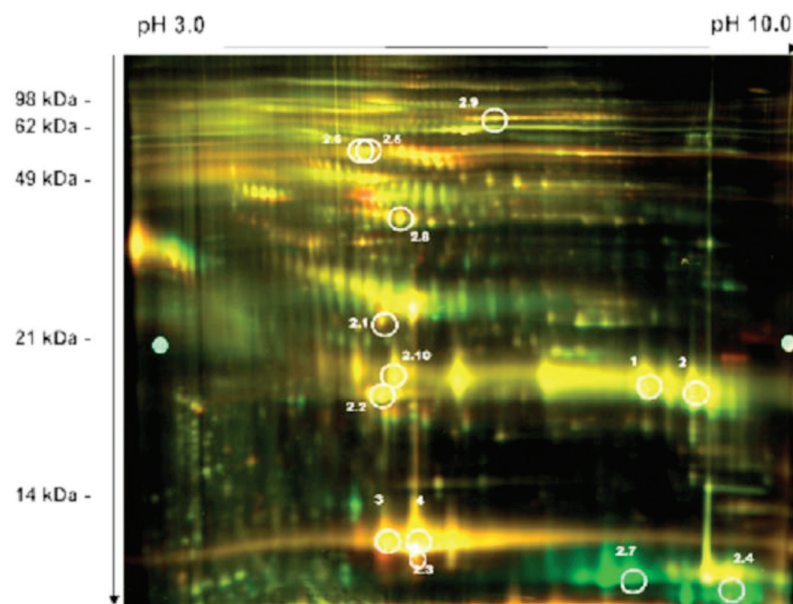


4-16. ábra. MS-kompatibilis detektálást követő könnyfehérje-azonosítás (MALDI TOF)

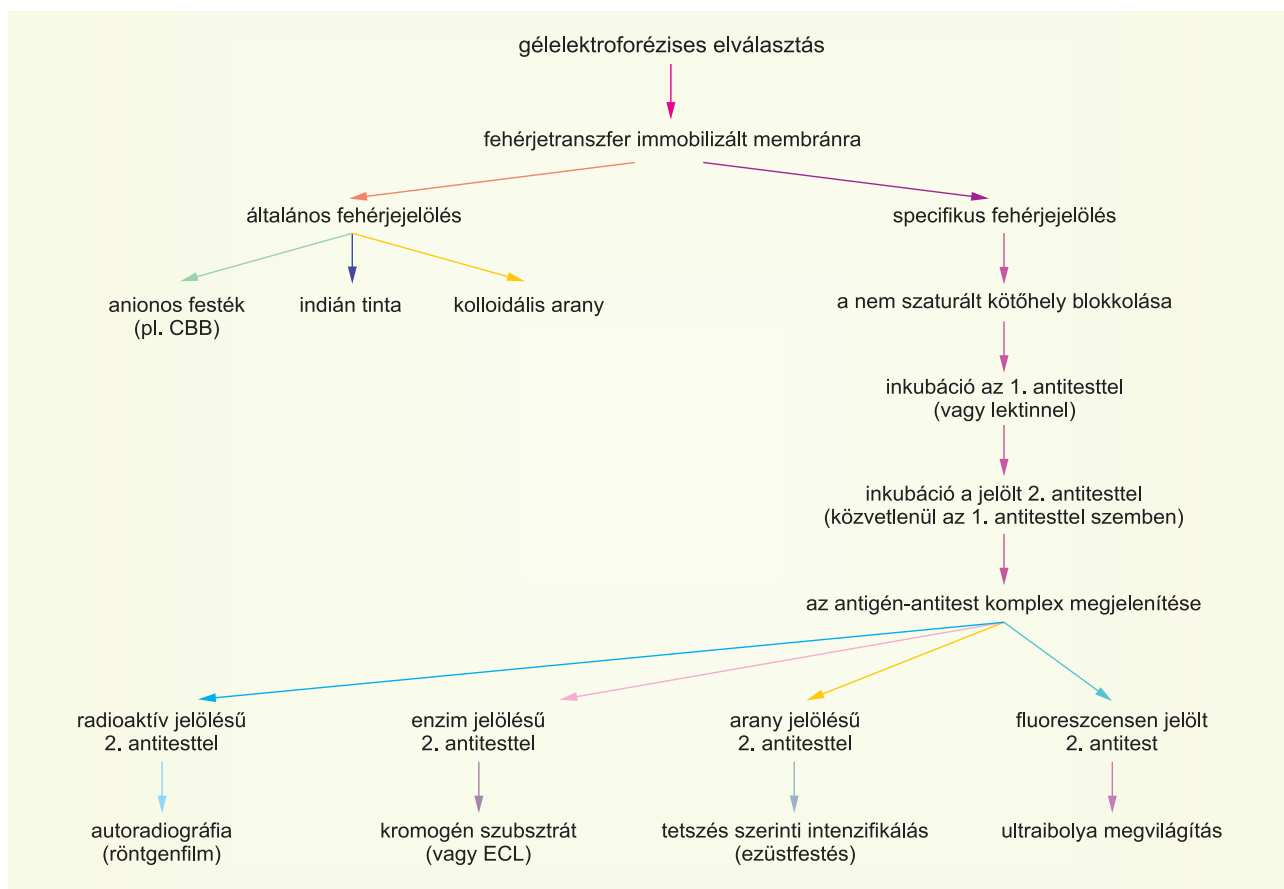
A CCD-kamerás felvétel a berendezés saját szoftverével értékelhető. Ez lehetőséget ad mind automata, mind kézi vezérlésű elemzésre. Az alapparaméterek egy adott területről a következők lehetnek:

- átlagos fényintenzitás
- az összes képpont szummált (összegzett) jele
- nettó intenzitás (az összes képpont szummált jele – a háttér intenzitás)
- a terület nagysága, alakja stb.

A berendezés ugyanakkor alkalmas a kép valós idejű követésére, azaz kinetikus mérésre és a jel/zaj viszony optimalizálására is. Hagyományos festett gélek (4-16. ábra) és fluoreszcencián jelzett gélek fotózása (4-17. ábra) és kiértékelése szintén (2×2 cm-től 20×20 cm nagyságig) lehetséges ezzel a technikával (4-18. ábra).



4-17. ábra. 2D DIGE analízis (fluoreszcens jelöléssel).
A szeparálás itt is az O'Farrell-technikán alapszik



4-18. ábra. Fehérjejelölési módok a blottingot követően (összefoglalás)

Dokumentáció. A gélfotókat alsó megvilágításból (transzparencia), Fuji Velvia 50 ASA filmre készítettük, ill. számítógépes, digitális technikával rögzítettük.

POLIAKRILAMIDGÉL-LEMEZ SZÁRÍTÁSA ZSELATINNAL (POPESCU SZERINT [15])

A módszer vékony és nagy poliakrilamid-koncentrációjú gradiens lemezek szárítására alkalmas. 0,8 mm vastagságú, 17–25%-os koncentrációjú lemezgélek töredezés nélkül leszárlíthatók.

1. A festett géleket differenciálás, a festetlen géleket 40%-os etanolban való 1-2 órás fixálás után 7,5% ecetsavat és 1,5% glicerint tartalmazó oldatban áztatjuk 2 órán át, szobahőmérsékleten.
2. Az így előkészített géllemezt vízszintezett plexilapra helyezük. A gél és a plexilap közé szorult buborékokat óvatosan eltávolítjuk. A gél felszínéről és széleiről a felesleges folyadékot felitatjuk.
3. Háztartási zselatin 5%-os vizes oldatát (+ 0,02% Na-azid) még forró állapotban, 1-2 mm vastagságban a gélfelszínre rétegezzük, vigyázva arra, hogy az a széleken ne csorduljon le. 1-2 óra múlva, amikor a zselatin már elég viszkózus, de még nem gél állapotú, a lemezszélekre pipettával újabb zselatinréteget húzunk úgy, hogy az kb. 1,0–1,5 cm szélességben ráterjedjen a plexilapra is.

Így a géllemezt borító zselatinréteg középütt vékonyabb, mint a széleken. Ez az előfeltétele a deformálódás nélküli száradásnak.

A lemez szobahőmérsékleten 36–48 óra alatt leszárad. Teljes száradás után a plexilapról film formájában lehúzható.

Ajánlatos a gélfilmet sima felszínek között tárolni.

IRODALOM

A módszertanok eredeti forrásai szerint

- [1] BONNER, W. M., LASKEY, R. A.: A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* 46: 83–88, 1974.
- [2] BURNETTE, W. N.: „Western Blotting”: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112:195–203, 1981.
- [3] DAVIS, B. J.: Disc Electrophoresis. 2. Method and application to human serum proteins. *Ann. New York Acad. Sci.* 121:404–427, 1964.
- [4] O'FARRELL, P. H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, 250:4007–4021, 1975.
- [5] GERSHONI, J. M., PALADE, G.E.: Protein blotting: principles and applications. *Anal. Biochem.* 131:1–45, 1983.
- [6] GIULIAN, G. G. et al.: Improved methodology for analysis and quantitation of proteins on one-dimensional silver stained slab gels. *Anal. Biochem.* 128:277–287, 1983.
- [7] GROMOVA, I. CELIS, J. E.: Protein detection in gels by silver staining: A procedure compatible with mass-spectrometry. In: Celis, J. E., Carter, N., Hunter, T. et al. (eds): *Cell Biology: Laboratory Handbook*. 3rd Ed. Academic Press, Elsevier, 2006.
- [8] LAEMMLI, U. K.: Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685, 1970.
- [9] LUDÁNY, A., GALLYAS, F., GASZNER, B. et al.: Skimmed milk blocking improves silver post-intensification of peroxidase-diamino-benzidine staining on nitrocellulose membrane in immunoblotting. *Electrophoresis* 14:78–80, 1993.
- [10] MARSHALL, T.: Detection of protein in polyacrylamide gels using an improved silver stain. *Anal. Biochem.* 136:340–346, 1984.
- [11] MARSHALL, T., WILLIAMS, K. M.: Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of urine: concentration of urinary proteins by precipitation with Coomassie Blue. *Clin. Chem.* 39/11:2314–2318, 1993.
- [12] MARSHALL, T., WILLIAMS, K.: Two-dimensional electrophoresis of human urinary proteins following concentration by dye precipitation. *Electrophoresis* 17:1265–1272, 1996.
- [13] ORNSTEIN, L.: Disc Electrophoresis, 1. Background and Theory. *Ann. New York Acad. Sci.* 121:321–349, 1964.
- [14] OTEY, C. A., KALNOSKI, M. H., BULINSKI, J. C.: A procedure for the immunoblotting of proteins separated on isoelectric focusing gels. *Anal. Biochem.* 157:71–76, 1986.
- [15] POPESCU, O.: A simple method for drying polyacrylamide slab gels using glycerol and gelatin. *Electrophoresis* 4:432–433, 1983.
- [16] SAMMONS, D. W. et al.: Ultrasensitive silver-based color staining of polypeptides in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 2:135–141, 1981.
- [17] TOWBIN, H. et al.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitro-cellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:4350–4354, 1979.

- [18] WESTERMEIER, R.: Electrophoresis in Practice. 4th Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH Co. KGaA, Weinheim, 2005. (Ajánlott összefoglaló munka)
- [19] WILLOUGHBY, E. W., LAMBERT, A.: A sensitive silver stain for protein in agarose gel. *Anal. Biochem.* 130:353–358, 1983.
- [20] WANG, XUCHU et al.: A modified CBB staining method at nanogram sensitivity compatible with proteomic analysis. *Biotechnol. Lett.* 29:1599–1603, 2007.
- A gradiens gél kialakításához
- [21] WORK, E. (eds): Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Vol. 2. North-Holland publishing Company, Amsterdam–London, 1970.

