

2. A fehérjevizsgálatok általános és alapvető módszerei – a minták előkészítése

Különbéle minták előkészítése

LUDÁNY ANDREA

Klinikai kutatólaboratóriumokban a biológiai minták sokféleségével kell szembesülnünk. Gondolnunk kell egyrészt az experimentális munkákra: így az állatkísérletekből nyert sejt-, szövet- és szervmintákra, sejt-kultúrákra, másrészt pedig a klinikai, azaz betegekből nyert mintákra is, amikor rendszerint célzottan diagnosztikus markereket (pl. fehérjemolekulákat) keresünk.

Napjainkban a fehérjeanalitika modern módszerei képesek tükrözni a biológiai minták fehérje-összetételének sokféleségét és változékonyságát (diverzitását). Azok a fehérjetérképek pl., melyeket 1975 óta a nagyfelbontású kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis technikával [11] kaptunk – ha érzékeny detektálási eljárással párosítottuk – kezdetben akár „zavart” is, a bőség zavarát is okozhatták. Valóban nehezítette az értékelést a fehérjék „túl nagy” száma (akár 3000 is) egyetlen nagy gélen. Több mint szükséges, mondhattuk. Másrésztől viszont ennél az érzékeny technikánál szembesülhettünk azzal, hogy a helyes mintavétel, a standardizált mintakezelés elengedhetetlen az adott kérdés megválaszolásában, az eredmények reprodukálhatóságában. A kérdés megfelelő kiválasztásával és alkalmas mintakezeléssel az értékelés könnyebbé válhat.

E fejezet részben a következő vizsgálatok minta-előkészítéséről lesz szó:

- Proteinek in vitro vizsgálatai.
- Sejtmentes, teljes sejt, teljes szerv.
- Fehérjekimutatások, mennyiségi meghatározások.

Általánosságban megállapíthatjuk, hogy különböző mintatípusoknál a következő sajátosságokat kell szem előtt tartanunk:

- Sejtek, sejt-kultúrák – szinkronizálás, kontrollált körülmények.
- Szövetek – sejtösszetételükben heterogének.
- Organellumok – a kinyerési módszer meghatározó.
- Biológiai folyadékok – dinamikusan változóak.

Az in vitro fehérjeanalíziseknél gyakran szembesülünk a következő fogalmakkal is:

- A fehérjék oldékonysága (szolubilizálása).
- Fehérjeprecipitáció (mint tisztítási, előfrakcionálási eljárás).
- A minta integritása (a proteindegradáció veszélye).

Célunk mindenképpen az lesz, hogy az in vitro vizsgálatokhoz minél egyszerűbb és hatékonyabb fehérjekivonási módszereket alkalmazzunk. Egyszerűségét és reprodukálhatóságát tekintve ilyen lenne pl. egy egylépcsős extrakciós módszer, melyet valamennyi mintára egyöntetűen alkalmazhatnánk. Természetesen ilyen univerzális módszer nem létezik. Ellenkezőleg, az irodalomban közölt ún. „standard” protokollok száma igen nagy, melyeket vagy mintatípusokra fejlesztettek ki és tovább „optimalizáltak” (pl. mikrobiológiai minták vagy emlősszövetek), vagy célzottan kérdéses fehérjék/fehérjecsoportok vizsgálatára ajánlanak (mint pl. az oldékony „citoszol”-fehérjék vagy az inszolubilis citoszeletális sejt-komponensek).

A minták előkészítése és a fehérjék oldatba vitele. A kiválasztott protokollunknál mindenképpen két vezérlő elvet helyes betartani:

- A minta előkészítése (kezelése) olyan egyszerű legyen, amennyire csak lehetséges (a jó reprodukálhatóság érdekében).
- Minimálisra kell csökkenteni a fehérjék in vitro módosulásait/károsodását, azaz lehetőleg meg kell tartani eredeti tulajdonságaikat.

Sejtes minták előkészítése

A sejtes minták előkészítése röviden a következőkben foglalható össze:

- Sejtfeltárás.
- Az interferáló anyagok inaktiválása, ill. eltávolítása.
- A fehérjék ezt követő szolubilizálása (oldatba vitele).

A SEJTEK FELTÁRÁSA

A sejtek feltárása fizikai (mechanikai) vagy kémiai (biokémiai) úton egyaránt elérhető. Ismerünk ultrahangos kezelést, ozmotikus „sejtoldást”, fagyasztás és olvasztás ciklikus ismétlését, detergens (tenzid-) kezelést, a sejtfal enzimes oldását, nagy nyomásos préseléses eljárásokat, különböző mechanikus homogenizálásokat: közelebbről forgó késes, üveg- vagy teflondugattyús és áramlásos feltárásokat. Ezek a módszerek alkalmanként egyenként is, de kombinációkban is használhatók. Mindegyiknek van előnye és hátránya is. A kezelendő minta típusa határozza meg kiválasztásukat. Típusosan pl. a baktériumok vagy növényi szövetek keményebb bánásmódot követelnek a sejtfeltáráshoz extrémén ellenálló sejtfaluk miatt, míg az emlősszövetek jóval kíméletesebb módszert igényelnek. Jóval „gyengédebb” sejtfeltárási procedura (pl. enzimes lízis) szükséges az intakt organellek kinyeréséhez (pl. mitokondriumok), főleg ha ezt követően proteomikai vizsgálatot akarunk végezni.

INTERFERÁLÓ ANYAGOK INAKTIVÁLÁSA VAGY ELTÁVOLÍTÁSA

A sejt lizálása alatt (és után) *interferáló vegyületek* szabadulnak ki a sejtekből (pl. proteolitikus enzimek, sók, lipidek, poliszacharidok, nukleinsavak és/vagy növényi fenolok). Ezeket szükséges lehet hatástalanítani vagy eltávolítani. A legjelentősebb zavaró tényező a sók és a fehérjék degradációja (proteolízis).

Proteázok. A proteázok működését mindenkor gátolni kell, hogy megelőzzük a vizsgált fehérje degradációját, mely járulékos fehérjefrakciókat eredményezhet, és a nagy molekulatömegű (Mr) fehérjék

mennyiségének csökkenéséhez vezet. Elméletileg egyszerűen *proteázgátlók* adásával célhoz tudnánk érni, de a fehérjék töltésmódosulatai miatt ilyenkor is keletkezhetnek műtermékek.

Másik megoldás lenne pl. a *forralás SDS-tartalmú mintapufferben*, de a proteázok inaktiválása alacsony pH-n is szóba jöhetne (lásd *jéghideg triklórecetsavas – TCA-s – fehérjekicsapás*).

Sajnos igaz, hogy nem könnyű valamennyi fehérje-bontó enzimet egyidejűleg és teljesen hatástalanítani. Az ismertetett megoldások közül a TCA-s kicsapás valóban minimalizálja a fehérjék degradációját, egyidejűleg eltávolítja az interferáló vegyületeket, végül a csapadékban a teljes sejtlizátum alkalikus fehérjéi fel is dúsulhatnak (pl. riboszómafehérjék, [3, 4]). Számolni kell azonban azzal a fehérjevesztéssel, amit az inkomplett precipitáció és az újraoldás eredményez. Ha a TCA-kezelt és nem kezelt sejt minták fehérjetérképeit összevetjük, a különbségek szembeötlők.

Sóval szennyeződés. A sejt minták sókkal történő szennyeződése lehet a másik igen gyakori probléma. Ismert, hogy az ionok (sók) jelenléte lerontja az elektroforetikus és az izoelektromos fókuszálós elválasztások hatékonyságát. Extrém nagy sókoncentráció-értékeknél (>100 mM) a minta fehérjéi akár ki is csapódhatnak. A sók eltávolításának klasszikus módjaként a *dialízis* kínálkozik, de elérhetjük a médium (puffer) cseréjét *ultrafiltrációs kamrában* is (nitrogéntúlnyomás alatt), és sótlaníthatjuk fehérjemintáinkat akár *elektroforézissel* is. Ilyenkor kezdeti alacsony feszültségen (100 V) „kivándoroltatjuk” a rendszerből az ionokat. (Számos protokollnál példát találhatunk erre az irodalomban.)

A dialízishez a kereskedelmi forgalomban kapható membránok garantált pórusmérettel rendelkeznek. Megfelelő kezeléssel és duzzasztással aktiválhatók, és akár ismételten újra használhatók. Ha a mintánk a dialízist követően sűrítésre, azaz koncentrálásra kerül, ajánlatos olyan illékony pufferelegyet alkalmazni a sómentesítéshez (pl. ammónium-bikarbonátot), amely később pl. a liofilizáláskor akadálytalanul eltávolítható.

Lipidek. A lipidek mint interferáló molekulák eltávolítására – különösen az olyan lipidekben gazdag biológiai mintánál, mint az agyszövet – *organikus*

oldószeres extrakció is szóba jöhet. A hideg alkoholos vagy acetonos extrakciónál azonban jelentős fehérjevesztést észleltek: egyrészt bizonyos fehérjék szolvensbe kikerülése miatt, másrészt a delipidált anyag nem teljes újraoldódása miatt. Alternatív megoldásként a feltárt szövet vagy biológiai minta lipidmentesítését *ultracentrifugálással* lehet elvégezni, amikor is a flotálódott, azaz a nem ülepedő lipidréteg a minta felszínéről egyszerűen eltávolítható (pl. „Air-fuge” centrifugák használata a rutin klinikai laboratóriumokban a szérumminták delipidálásához).

Poliszacharidok és nukleinsavak. A *poliszacharidok* (különösen, ha töltéssel rendelkeznek) és a nukleinsavak kölcsönhatásba lépnek a fehérjékkel, és ezek az összetett makromolekulák az oldatok viszkozitását jelentősen megnövelve zavarhatják a fehérjevizsgálatokat (gélpórusok eltömítése stb.). Hacsak nem igen kis koncentrációban vannak jelen, eltávolításuk javasolt. A már említett *TCA-s fehérjekicsapás* – számolva a fehérjevesztéssel – itt is szóba jöhet.

A *nukleinsavak* esetében *proteázmentes RNS-áz* vagy *DNS-áz kezelést*, ill. *bázikus poliamin addíciót* (pl. spermin) és *ultracentrifugálást* lehet az irodalom szerint alkalmazni [13].

Fenolok. A növényekben, különösen a növényi levelekben jelen lévő fenolok a fehérjékkel kölcsönhatásban zavarhatják a 2D elektroforézis gélek fehérjetérképét. Ajánlott a polifenol vegyületeket vízben nem oldódó (inszolubilis) *polivinilpolipirolidonhoz* (PVPP) kötni.

Fehérjék. Végül a mintában nagy mennyiségben (túlsúlyban) „*ballasztként*” jelen lévő fehérjék zavarhatják a kisebb koncentrációban jelen lévő fehérjék vizsgálatát. Más szóval egyszerűen elfedhetik a számunkra érdekes és kérdéses fehérjefrakciókat. Közismerten ilyen az albumin, amely a plazmafehérjék 60%-át képviseli a vérplazmában. Eltávolítására a kereskedelembe *albuminmentesítő kitek* kaphatók. Használatuk azért int óvatosságra, mert a nem specifikus kötésen alapuló módszer más fehérjéket is eltávolíthat a mintánkból [15]. Magunknak egyébként a *blue-dextránnal* volt kétségtelenül pozitív tapasztalatunk, amelynek hatása az albumin festékkötési affinitásán alapszik.

A FEHÉRJÉK SZOLUBILIZÁLÁSA (OLDATBA VITELE)

A sejteltávolítást és az interferáló anyagok eltávolítását követően a mintafehérjék híg pufferoldatban szolubilizálhatók. A fehérjefunkciók megtartása kíméletes eljárást feltételez, általában enyhén alkalikus közegben, az intakt fehérjekomplexek szolubilizálása mellett. Az individuális polipeptidláncok vizsgálatához a fehérjéket denaturálják, az intra- és intermolekuláris kölcsönhatásokat minimalizálják, miközben az eredeti töltéviszonyokat igyekeznek megtartani.

A nem denaturáló pufferhez denzitásnövelés céljából glicerint vagy szacharózt adhatunk, és nem ionos detergenssekkel növeljük az oldékonyságot és a fehérjemolekulák diszpergálását. A kalcium- és magnéziumdependens proteázok hatásának tompítására EDTA vagy EGTA jelenléte szolgál.

A denaturáló szolubilizáló rendszerek kaotróp anyagokat (urea és/vagy tiourea) tartalmaznak, redukálószerrel (ditiotritol és/vagy β -merkaptotanol) adjuválhatók, valamint különböző ionos és nem ionos detergenssekkel egészülnek ki.

Kaotróp anyagok. A kaotróp anyagok, pl. az urea hatékony szer a hidrogénhidak felbontására, és a fehérjék kitekeredéséhez (unfolding), végül is denaturációhoz vezet. A tiourea még hatékonyabb a hidrofób interakciók megszüntetésére, de szemben az ureával, nehezen oldódik vízben. A legjobb megoldás az extrém hidrofób fehérjék oldására az a kompromisszum, hogy 5–7 M ureát és 2 M tioureát kombinálnak megfelelő detergenssel az oldatban. Ureás oldatban a fehérjék karbamilációjára mindig gondolnunk kell. Ennek elkerülésére az oldat hőmérsékletét 37 °C fölé nem szabad emelni. A karbamiláció mértéke az általában ajánlott 24 órás periódus alatt – mely a legtöbb szolubilizációs protokoll időtartama – elhanyagolható. Az elektroforézis során az urea bomlástermékei eltávoznak a rendszerből.

Detergenssek (felületaktív anyagok). Ionos és nem ionos detergenssek széles körben elterjedtek a fehérjeanalitikában. Hatásuk a hidrofób kölcsönhatások megszüntetésében, az aggregáció és precipitáció okozta fehérjevesztések megelőzésében jelentkezik.

Az anionos detergenssek között az SDS-t (nátrium-dodecil-szulfát) tartják az egyik leghatékonyabb

szolubilizáló ágensnek, különösen ha az oldatot felhasználjuk. A *nem ionos* detergensek közül az *NP-40-et* és a *Triton X-100-at* kell megemlítenünk, melyek igaz, elmaradnak az SDS hatékonyságától, de számos más előnyös tulajdonsággal rendelkeznek. Az extrém hidrofób fehérjék vizsgálatához (pl. membránkomponensek) az *ikerionos* detergensnek, mint a *CHAPS* vagy a *szulfobetainok* (SB 3-10, ASB 14) ajánlottak [10, 14]. E felületaktív anyagok használata különösen a korábban említett kaotróp ágensekkel (urea, tiourea) párosítva jár sikerrel.

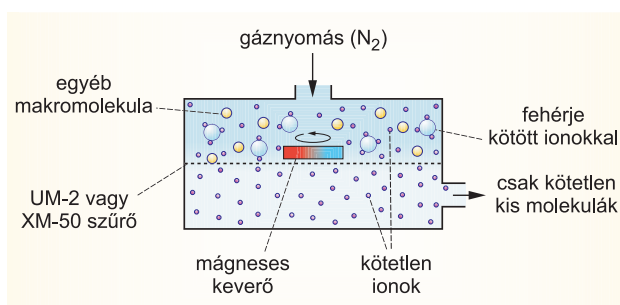
A detergensnek esetében is igaz, hogy univerzális recept nem adható meg valamennyi biológiai mintára. Esetenként empirikusan kell az optimális módszert kidolgoznunk a detergensnek különböző fajtáinak kombinációját párosítva egyéb adjuvánsokkal, pufferekkel, akár organikus oldószerekkel.

A megfelelő detergens kiválasztásakor figyelembe kell vennünk a kritikus micelláris koncentrációt (CMC), a nem ionos detergensnek jellemzésére használt lipofil/hidrofil balansz/egyensúlyi adatot (HLB-érték: 1–20) és a detergenshatást befolyásoló egyéb faktorokat (hőmérséklet/CMT érték, ellenionok, sók, szennyeződések, kaotróp anyagok stb.).

A fogalmak tisztázására egyrészt kémia, biokémia tankönyvek szolgálhatnak, a detergensnek számszerűsített jellemzőinek pedig vegyszerkatalógusokban ajánlott utánanézni.

Redukálószer. A minta-előkészítés folyamatában kritikus lépést jelenthet a redukció és a diszulfidhidatok újraképződésének megakadályozása. A redukcióval a molekulán belüli és a molekulák közötti diszulfidhidak felszakítása és a fehérjék teljes „kitekerekedése” (unfoldingja) érhető el. A leggyakrabban használt redukálószer – a *ditiotreitol* (DTT) és a *ditioeritriol* (DTE) – vízben jól oldódnak, így nagy feleslegben alkalmazhatók. Hátrányuk, hogy nem minden fehérjénél hatékonyak, így a nagy ciszteintartalmú gyapjúkeratin esetében helyettük a kevésbé oldékony és toxikus *tributylfoszfint* (TBP) ajánlják.

A vizsgálandó fehérjék koncentrációja. Fehérjeminták analíziséhez 5–10 mg/ml fehérjekoncentráció az ideális. Túl csekély koncentrációnál (< 0,1 mg/ml) a minta fehérjetartalma hozzátapad a kémcső, pipetta vagy laboratóriumi edény falához, tovább növelve a nem kívánt veszteséget. Híg fehérjeoldatoknál – ha



2-1. ábra. Kötött és szabad anyagok elválasztása ultraszűréssel. Az Amicon ultrafiltrációs elválasztás vázlatos ábrázolása. A technika a minta-előkészítés tekintetében az egyik legkíméletesebb eljárás

nagy a sókoncentráció – „sótalanítás” szükséges, amit a fehérjék koncentráálásával kapcsolhatunk össze. Ultraszűréssel a fehérjéket károsodás nélkül egyidejűleg lehet sómentesíteni és dúsítani is (2-1. ábra).

A fizikai-kémiai fehérjekicsapásos eljárások (szerves oldószerekkel, pl. alkohollal, savas, pl. TCA-s, hőkezeléssel stb.) célravezetők lehetnek, de mindig felvetődik a natív fehérjék károsodásának veszélye. Illékony pufferoldatokkal (ammónium-bikarbonát) végzett dialízis liofilezéssel (fagyasztva szárítással) párosítva is ajánlott megoldás. Kis pórusátmérőjű ultraszűrő membránok alkalmazásával a fehérjeoldat szintén koncentrálnak, ill. különböző áteresztőképességű (cut-off) membránok segítségével akár frakcionálható is.

A MINTÁK TÁROLÁSA

Rövid ideig – néhány órás vagy éjszakán át való várakozásnál – elegendő a mintákat hűtőben 4 °C-on tartani. Hosszabb időre a minták fagyasztoóban (–70 °C), száraz jégben (–78 °C) vagy folyékony nitrogénben (–196 °C) tárolhatók.

Ismételt fagyasztás és olvasztás mindig kerülendő. Többszöri felhasználáshoz a mintát célszerű 100–200 µl-es adagokban szétosztva tárolni.

A minták előfrakcionálása az analízisekhez

Tekintettel a biológiai minták fehérjetartalmának összetettségére és dinamikus változékonyságára, előfrakcionálási lépés(ek) közbeiktatása gyakran ajánlott. Ezzel a lépéssel a közvetlen analízisre kerülő

szubfrakciók komplexitása mérséklődik, és a vele járó dúsulással a diszkrét fehérjefrakciók is detektálhatóvá válnak.

Néhány példa a minta típusától és a vizsgálatok céljától függő előfrakcionálásra:

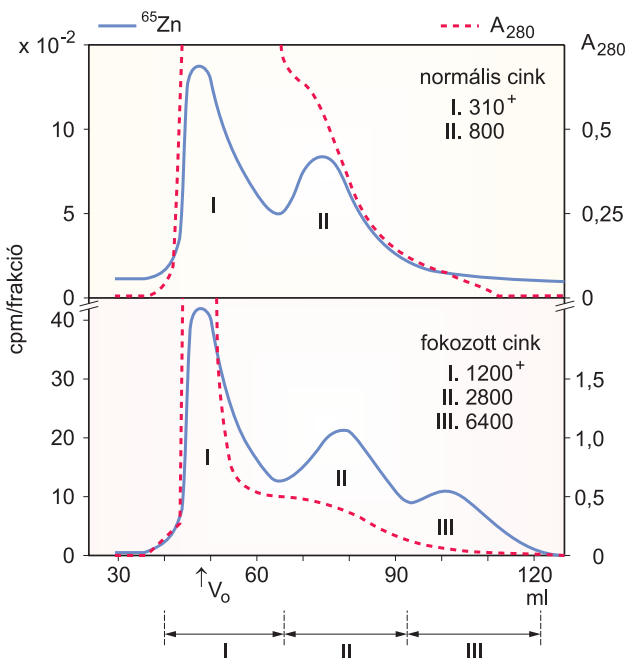
- Specifikus sejtek izolálása szövetből pl. FACS technikával (fluorescence activated cell sorting) vagy lézer-mikrodisszekcióval (LCM laser capture microdissection).
- Sejtkompartmentek és/vagy organelumok izolálása pl. szacharóz-gradiens centrifugálással.
- Szelektív fehérjecsoportok kicsapása (pl. riboszómafehérjék TCA/aceton kezelése).
- Lépcsőzetes extrakciós eljárások növekvő oldékonyság alapján (vizes pufferek, organikus oldószerek, detergens alapú extrakciós oldatok).
- Kromatográfias vagy elektroforetikus elválasztási módszerek (gelszűrési, ioncserés oszlop-kromatográfia, affinitásos tisztítási eljárások, preparatív izoelektromos fókuszálás stb.) (2-2., 2-3. ábra).

Mindig nagy probléma a rendszerint rendkívül heterogén emlősszövetből (pl. rákbetegség esetén) a további vizsgálatra kerülő célsejteket megfelelő mennyiségben kinyerni. Nagyszámú metszet készítésével az LCM (lézer-mikrodisszekció) technika révén tiszta

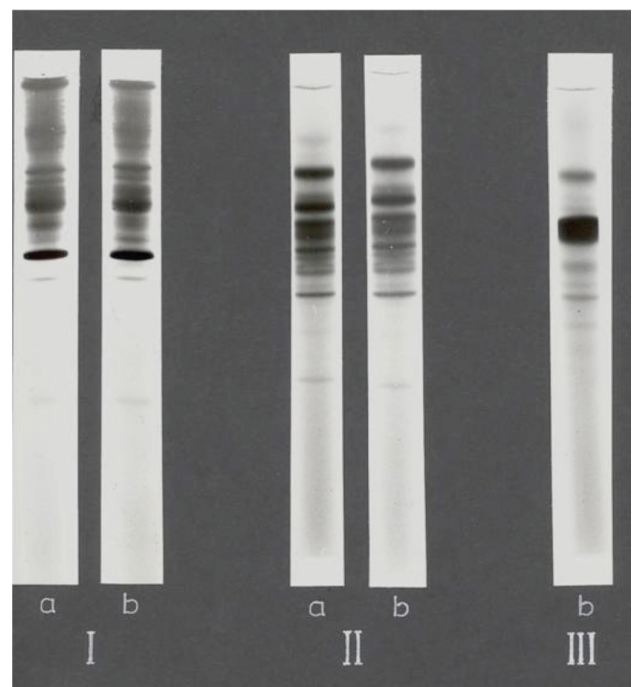
sejtpopulációhoz lehet jutni, mely tovább analizálható 2D elektroforetikus eljárással. Az LMC hátránya munka- és időigényessége. Másik lehetőség a FACS (fluorescent activated cell sorting) technika, mely antitestkötés alapján nyeri ki a specifikus célsejteket, azaz a kívánt szöveti szubpopulációt [12]. A sejtszeparálási eljárások közül a vér alakos elemei vizsgálatában a Fikoll-gradiens és centrifugálás együttes alkalmazása látszik a legkönnyebben elérhetőnek.

Az organelumok (pl. mitokondriumok) izolálására leghatékonyabb módszer a növekvő sűrűségű cukoroldatban való ún. gradiens-centrifugálás. Az eljárás egyik hagyományos változatának tekinthető a differenciálcentrifugálás [7]. Ilyenkor puffertolt cukoroldatban egy- és kétértékű kationok jelenlétében a kíméletesen homogenizált szövetmintát lépcsőzetesen kiülepítjük, és a sejtorganelumokat, azaz a sejtmagot, a mitokondriumokat, a mikroszóma- és a citoszolfrakciókat elválasztjuk.

Szemben a humán és az állati sejtekkel, ahol a sejtfelszíni struktúrák könnyen megbonthatók, a mikroorganizmusok esetében a rendkívül ellenálló sejtfal miatt bonyolultabb eljáráshoz kell folyamodni,



2-2. ábra. Cinkkötő fehérjék gélkromatográfias előfrakcionálása (Sephadex G-75, minta: patkánymájsejt-citoszol)



2.-3. ábra. Gelszűrési frakciók (Sephadex G-75 I., II., III., 1D elektroforetikus) nem denaturáló PAGE képe. A nem denaturáló alkalikus gélek az előző ábra frakcióinak elektroforetikus fehérjemegoszlását hasonlítják össze (a detektáláshoz amidofekete-festést használtak, 100 µg/gélrúd proteinmennyiségekkel)

ugyanakkor a kinyert organellumok épségét is óvni kell. Élesztősejtek mitokondriumainak izolálásához a sejtfal poliszacharidbontó enzimés kezelését követően a sejttartalmat hipotóniás oldattal és/vagy kémiletes mechanikus úton nyerik ki [9, 18].

A teljes sejtlizátumok analízise nem vezet eredményre az egyes fehérjék célzott vizsgálatakor. Az analitikai eljárás kapacitása, felbontóképessége limitálja a vizsgálandó protein mennyiségét. Ennek áthidalására ajánlott a fejezetünkben már többször említett *precipitációs (TCA/acetone) eljárás*, amelynek számos előnyét hangsúlyoztuk. Az alkalikus fehérjék dúsítása, azaz az analizálandó proteinek mennyiségének növelése ebben az esetben együtt jár a nem kívánt proteolitikus hatások kiküszöbölésével és az interferáló vegyületek eltávolításával.

A sejtek és a szövetek lépcsőzetes extrakciója elérhető a *fehérjék oldékonysága* alapján. Végső soron ide tartoznak a lépcsőzetes kimosási eljárások (ammónium-szulfát), organikus oldószerként az alkoholos frakcionált kicsapások (Cohn-frakcionálás/albumin), ureakezelések (pl. szérum alkalikus foszfataz izoenzim vizsgálatok) a hidrofób fehérjék vizsgálatában (membránfehérjék), de a hőkezelések is a hőstabil és hőreisztegens fehérjecsoportok szeparálására (pl. tropomiozinkinyerés vérlemezkékből).

Itt kell megemlítenünk a *nem ionos detergens*ek használatát a sejtfrakcionálásban. A detergens-rezisztens sejtfrakció a citoszkeleton felfedezéséhez vezetett. Számos sejtfunkció vizsgálata a detergens szolubilis, az ún. lazán kötött fehérjék és a citoszkeletonfehérjék dinamikusan változó kölcsönhatásához kapcsolódik.

A különböző *kromatográfiás eljárások* hatékony eszközei lehetnek az előfrakcionálásnak. A frakciók közötti keresztszennyeződések itt kevésbé érvényesülnek, mint általában az említett extrakciós módszerekben. Megfelelő detektálások kombinációival, kémiletes körülmények között értékes, a további analízisekre minőségben és mennyiségben optimális mintákat kaphatunk.

A *gél-szűrés* elvén (azaz a molekulaméreten) alapuló, valamint az ioncserélő kromatográfiás elválasztásokat kihasználó (kation- és anioncserélő oszlopok) és az affinitásos (ligandkötésen alapuló) elválasztási technikák a preparatív laboratóriumi munkák során egyaránt felhasználásra kerülhetnek. A nem denaturáló rendszerek különösen előnyösek lehetnek

a fehérjék biológiai aktivitásának megőrzésében. Dextrán-, akril-, agaróz-, poliakrilamidgél alapú elválasztási rendszerek egyaránt ismertek. A fehérjefrakciók elválasztásának követésére alkalmas módszerek a spektrofotometria, az enzimaktivitás mérése, az izotópaktivitás, valamint a kemilumineszcenciás detektálás (lásd 2-2., 2-3. ábra).

További lehetőség fehérjék csoportjainak izolálására és dúsítására az egy- és kétdimenziós *elektroforézis technikák*. Fehérjekomplexek vizsgálatában alkalmaztuk magunk is, a következők szerint:

- Cink/fehérje komplexeket vizsgáltunk. Az előzetes feltáró/elválasztó eljárásokhoz (homogenizálás, centrifugálás, dialízis, ultraszűrés, gél-szűrés) csatoltan végül – mintegy befejező lépésként – nem denaturáló gélben végeztük a natív fehérjekomplexek elegyének vizsgálatát. E frakciókban a komplexek funkciója rendszerint megtartott. Ha viszont 2D elektroforézissel folytattuk az elválasztást denaturáló jellegű lapgélben, az első dimenziós natív fehérjekomplexek összetételéről (pl. alegységeiről) kaphattunk információt.
- Nagyobb fehérjefelbontást akkor értünk el mintáinkban, ha az első dimenziós frakcionálásra izoelektromos fókuszálással és denaturáló rendszerben került sor. Széles, 1–11 pH-tartományban ún. preparatív IEF gélben előfrakcionáltunk. Majd befejezésül az O'FARRELL által bevezetett és jól ismert nagy feloldású kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézissel fehérjetérképet készítettünk. A térkép készítésekor – analitikai célból – már nem széles, hanem keskeny pH-tartományt használtunk a nagyobb felbontás elérésére. Immunkémiai detektálást alkalmazva vagy tömegspektrometriás (MS) mérésekkel kombinálva (MS-kompatibilis jelöléssel!) a fehérjefrakciók azonosításához juthatunk (lásd proteomika).

Összefoglalásként megállapítható, hogy az előfrakcionálási eljárások sok előnnyel rendelkeznek, melyek közül a fehérjék dúsítása és a diszkrét fehérjefrakciók megjelenítése kiemelendő. Hátrányuk lehet viszont az individuális frakciók keresztszennyeződése, a munka- és időigényesség, amit tovább növel az a tény, hogy a kromatográfiás és a hígítási folyamatok miatt rendszerint mintakoncentráció szükséges. Vé-

gűl megjegyezzük, hogy az egyedi mintakezelések miatt csak néhány minta egyidejű párhuzamos kezelése lehetséges.

Eljárások (protokollok) [6]

SEJT- ÉS SZÖVETI MINTÁK EXTRAKCIÓJA ÉS SZOLUBILIZÁCIÓJA

Fejezetünk további részében néhány konkrét eljárást ismertetünk kivonatolva, rövid összefoglalások formájában. Az összeállítás választási lehetőséget kínál az igen különböző biológiai minták analízisében. A rövid leírások mikroorganizmusok, növényi magvak és emlősszövetek extrakciós és szolubilizációs kezeléseiről egyaránt szólnak. A procedura általában a sejtek és a szövetek mechanikus roncsolásával (fel-tárással) kezdődik, és ez alatt vagy ezt követően a sejteket lizálják, majd az interferáló anyagokat vagy közömbösítik, vagy eltávolítják. A proteineket urea- és detergenstartalmú lízispufferben oldják ultrahangkezelés mellett. Az ajánlott mintamennyiség 5×10^8 sejt/szám, 50 mg máj- vagy szívsvet, az optimális fehérjekoncentráció 5–10 mg/ml.

A fehérjék szolubilizációját követően az ureatartalmú extraktumokat 10 000 g-vel 15 °C-on egy órán át centrifugálják az oldhatatlan sejtörmelékek kiüleptetésére. Az SDS-tartalmú minták mind alacsony, mind magasabb hőmérsékleten (4–37 °C között) centrifugálhatók. Az IEF-szeparálás előtt a fehérjekivonatot célszerű a detergenstől megszabadítani (pl. a fehérjék kicsapásával).

A proteinkivonatok közvetlenül használhatók, vagy több hónapig –70 °C-on tárolhatók. A 2D-PAGE-elektroforézisekhez analitikai céllal 50–100 µg protein, preparatív munkáknál 0,5–1,0 mg is futtat-ható.

Reagensok, mintapufferek

- *Ureatartalmú lízispuffer denaturáló IEF-hez:* 9,5 M urea, 1% ditiotritol, 2% nem ionos detergens, 2% Ampholine (pH 3–10), 10 mM proteázgátló.
- *Tiourea/urea lízispuffer rezisztens fehérjék denaturáló kezelésére:* 2 M tiourea, 7 M urea, 4% CHAPS (ikerionos detergens), 1% redukálószer, 2% Ampholine (pH 3–10), 10 mM proteázgátló.

- *SDS-tartalmú mintapuffer:* 1% SDS, 100 mM TRIS-HCl puffer (pH 9,5).
- *Precipitáló reagens:* 20% TCA + 0,2% ditiotritol jéghideg acetonban (–20 °C).
- *Precipitátum mosáshoz:* 0,2% ditiotritol jéghideg acetonban (–20 °C).
- *Pufferolt sóoldat (PBS):* 0,9%-os NaCl-oldat 10 mM foszfátpufferben (pH 7,4).

Fontos megjegyzések: Az ureatartalmú oldatokat nem szabad hőkezelti a fehérjék karbamilációja miatt. Az Ampholine-tartalmú lízispufferek „romlandók”, elkészítésüket követően 1 ml-es adagokban mélyhűtve, fagyaszta tárolandók (–70 °C).

Mikroorganizmusok. A mikrobiológiai sejt kultúrák, mint a baktériumok vagy a gombák tenyésztése optimalizálást és standardizálást igényel. Mivel a növekedési fázis nagymértékben függ a sejtek biokémiai állapotától, a minták összegyűjtését előre kigondoltan és standardizáltan kell elvégezni. A sejtek proteázokat és más extracelluláris enzimeket választanak ki a szövetkultúra médiumába, és ezek a molekulák interferálnak az extrakcióval. Ezen anyagoktól meg kell szabadulni, mert károsítják a vizsgálandó fehérjéket, csökkentve a kinyerés határfokát. A kultúrát ezért izotóniás pufferoldattal (pl. PBS) vagy szacharózzal kell átmosni. Hogy stresszhatást ne okozunk, a mosópuffernek azonos hőmérsékletűnek és pH-értékűnek kell lennie, mint a médium [2]. A mosási lépés ugyanolyan körülményeket biztosít a sejtek számára, mint amelyek a mintagyűjtést megelőzően voltak a kultúrában.

A sejtfallal körülvett sejtek, pl. a gombák ozmotikusan sokkal eredményesen nem extrahálhatók. Az ilyen sejteknél erőteljes roncsolásra van szükség: ez vagy mechanikusan, pl. üveggöngyös rázással, urea/tiourea tartalmú lízispufferben (jégfürdőben) való ultrahangos kezeléssel vagy SDS jelenlétében melegítéssel érhető el. Ha szükséges, proteázmentes DNS-áz és RNS-áz adható a nukleinsavak emésztésére.

A bakteriális fehérjék szolubilizációja. A sejtek összegyűjtésére előre meghatározott növekedési fázisban és tenyésztési körülmények között kerül sor. Hacsak lehet, kémiaiailag jól definiált médium a kísérleteknél előnyös lehet. Nagy optikai denzitás esetén számításba kell venni, hogy ilyenkor sok halott sejt

kerülhet az analízisbe. Mintagyűjtésre ezért a korai logaritmikus növekedési fázis ajánlott, mert akkor még túlnyomórészt élő sejtek kerülnek feldolgozásra.

1. A sejtek centrifugálása 3 percig 10 000 g-vel végezhető. Ez az ülepítés a legtöbb baktériumtípus számára elegendő. Az indítás meghatározott térfogattal kezdődik: pl. 10 ml 0,5 optikai denzitású kultúra. Az üledéknek ebben az esetben jól láthatónak kell lennie. Azonos térfogatú előmelegített PBS-sel reszuszpendálás következik, majd ismételt centrifugálás. A kívánt tisztaságú és interferáló molekuláktól mentes vizsálati minta nyeréséhez többszöri mosás és centrifugálás szükséges.

Megjegyzés: Ha az extracelluláris proteolitikus enzimek eltávolítása mégsem teljes, a fehérjetérképen a nagy molekulatömegű fehérjék eltűnnek; míg horizontális csíkok vagy fehérjeprecipitátumok megjelenése a minta nagy sókoncentrációjára utal.

2. Az üledéket 0,2 ml SDS-tartalmú szolubilizáló lízispufferben szuszpendáljuk. A puffer vagy jéghideg legyen, vagy aktív proteázok esetén 95 °C-ra hevítés szükséges.
3. Következik a minta ultrahangos homogenizálása.
4. A roncsolt és feltárt sejteket mikrocentrifugában 14 000 g-vel 30 percig 4 °C-on ülepítjük.
5. A felülúszót óvatosan leszívjuk, majd 50-50 µl-es adagokban -70 °C-on tároljuk. Az extraktumok felengedés és ismételt fagyasztás nélkül egy évig stabilak.
6. Izoelektromos fókuszáláshoz az SDS-sel kezelt fehérjemintákat 150 µl tiourea/urea lízispufferrel hígítjuk a detergens leszorítására.

Emlősszövetminták. Az emlősszöveti mintákat (állati szövetek, szöveti biopsziák stb.) kivétel után azonnal le kell fagyasztani (pl. folyékony nitrogén alatt -196 °C-on). Kisebb minták fagyasztás/felolvasztás eljárással, nagyobb szövetdarabok késes homogenizálás után lízispufferben való szolubilizálással tárhatók fel.

Egérmájfehérjék szolubilizálása:

1. A lefagyasztott májszövetet erőteljes hűtés mellett homogenizáljuk proteinázgátló jelenlétében.
2. A homogenizálást követően 60 mg anyagot azonnal 1,0 ml lízispuffert tartalmazó mikrocentrifugacsőbe mérünk.

3. A hatékony sejtlyízis érdekében 5 × 2 másodperces (10 mp szünetekkel) ultrahangkezelést végzünk. 30 perc szobahőmérsékleten való inkubációt követően 40 000 g-vel 60 percig 15 °C-on centrifugálunk.

4. A szupernatánst -70 °C-on tároljuk. Az extraktum fehérjekoncentrációja ideális esetben 5-10 mg/ml legyen.

Megjegyzés: A teljes máj eltávolítása esetén a további analízisek szempontjából ajánlott a teljes szerv perfúziója vértelenítés céljából. Pufferolt szacharózoldat a portális vénán keresztül általunk is kipróbált előnyös beavatkozás lehet.

Alkalikus fehérjék dúsítása egérmáj-szövetben TCA/aceton kicsapással:

1. Mélyhűtött egérmáj-homogenizátum a kiindulási anyag.
2. 100 mg alapanyagot egy előhűtött (-20 °C), 25 ml acetonban oldott 20% TCA-t (triklórecetsavat) és 0,2% ditiotreitolt (DTT) tartalmazó centrifugacsőben felfuszpendálunk.
3. A centrifugacsövet -20 °C-on tartjuk a fehérjék komplett kicsapása érdekében. 40 000 g-vel 60 percig -10 °C-on centrifugáljuk, a felülúszót elöntjük. Az üledéket 20 ml 0,2% DTT-t tartalmazó jéghideg acetonban reszuszpendáljuk.
4. Ismételt centrifugálás következik, majd az üledéket vákuum alatt szárítjuk. A mintákat ismételt vortex-kezeléssel/vagy ultrahanggal oldjuk megfelelő térfogatú (2-3 ml) lízispufferben. A fehérjeoldat koncentrációja 5-10 mg/ml tartományban legyen. Kis mennyiségekben szétosztva -70 °C-on tároljuk.

Megjegyzés: A fehérjeüledéket vákuumos szárítás nélkül direkt oldhatjuk a lízispufferben.

Növény minták

A száraz növényi *magvakat*, amelyekben a proteázok rendszerint nem aktívak, egyszerűen összetörjük. A növényi szövetet ezt követően lízispufferben oldjuk, centrifugáljuk és szétosztjuk [16, 17].

Megjegyzés: Specifikus fehérjefrakciók kivonása érdekében ezeknél a mintáknál is végezhetünk előfrakcionálást az analízisek előtt. Ilyen pl. a vízben oldódó fehérjék (albumin) kivonása, vagy az alkoholban oldható fehérjék (gliadinok) elválasztása.

Növények *levelei* nem csak fehérjebontó enzime-

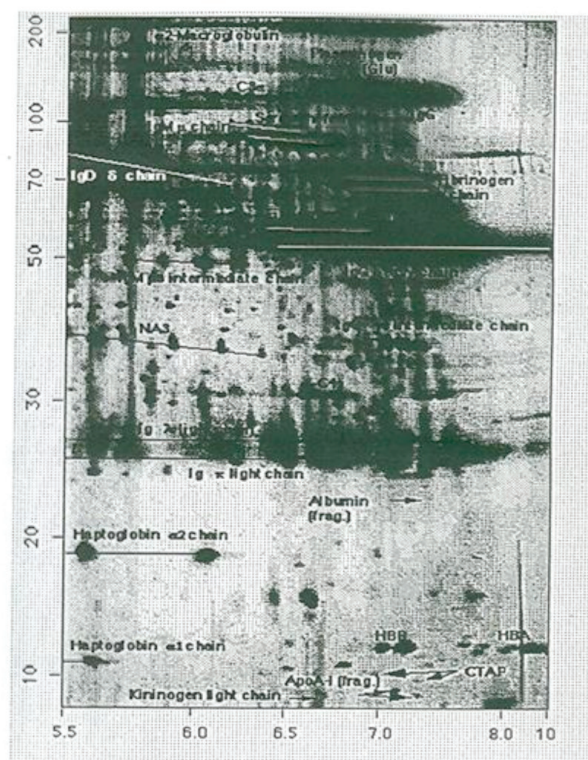
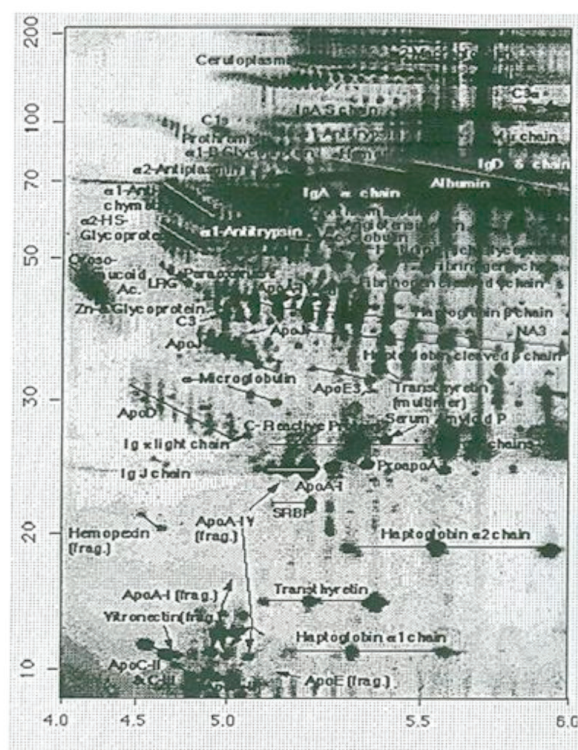
ket, hanem fenolokat is tartalmaznak igen nagy koncentrációban, amelyek proteinek adszorbeálókat, és csíkozottságot okoznak a kétdimenziós (2D) gél-térképeken. Ezt a zavaró hatást elkerülendő, itt is a májszövetnél leírtakhoz hasonlóan járunk el. A sejteket egy mozsárban széttronsoljuk, a fehérjéket 20% TCA-t tartalmazó jéghideg acetonnal kicsapjuk. Az üledéket kétszer $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os acetonnal mossuk a növényi fenolok eltávolítására, a végső üledéket szárítjuk és lízis-pufferben oldjuk.

AZ INTERFERÁLÓ VEGYÜLETEK ELTÁVOLÍTÁSA A MINTÁKBÓL

A mintaelőkészítés során számos zavaró komponens kerülhet az analizálandó mintába, melyektől meg kell szabadulni. Ezek lehetnek módosult fehérjék, fehérje és nem fehérje természetű szennyezések, sejtes elemek, nukleinsavak stb. Ha pl. a proteomikai vizsgálat alapját képező fehérjetérképeket szándékozunk készíteni, a 2D gélben látható műtermékek, zavaró festődő sávzottság, elmosódott frakcionálás teszi néha lehetetlenné az értékelést.

A leggyakoribb interferáló mintaösszetevők és az eltávolításukra javasolt leginkább használatos egyszerű módszerek a következők lehetnek:

- **Töltéssel rendelkező molekulák.** Ezek lehetnek sók (pl. NaCl, KCl), puffer komponensek (pl. TRIS, PBS) és töltéssel rendelkező egyéb molekulák, mint pl. nukleotidok. Az izoelektromos fókuszálások szerény felbontásának ez az egyik leggyakoribb oka. A sók és a töltéssel rendelkező molekulák ugyanis megnyújtják a fókuszálási időt, azaz a fehérjék csak akkor érik el az izoelektromos pontjukat, ha az ion elhagyja a hordozót. A töltéssel bíró molekulákat dialízissal vagy gélszűrővel lehet eltávolítani.
- **SDS.** A fehérjék az SDS-molekulákkal komplexet alkothatnak. A keletkezett komplex többszörösen negatív töltésű, ezért a pozitív elektród felé vándorol. Acetonos precipitáció segít az SDS-koncentráció csökkentésében. Ha az SDS-koncentráció, amit a minta előkészítéséhez használtunk, nem túl nagy (0,25–0,50%), nem ionos detergenssel (pl. NP-40) 5:1–8:1 arányban hígítva a hatását minimalizálni lehet.



2-4. ábra. Szérumproteinek (2D PAGE – O'FARRELL-technika). SwissProt adatbázisból átvett kép a frakciógazdagság demonstrálására

- **DNS.** A DNS negatívan töltött; fehérjékhez kötődve műterméket eredményez, és mint nagy molekula, a szeparáló gél pórusait eltömíti. Ha ezüstözéssel detektáljuk a fehérjéket, a DNS szintén festődik, növeli a háttér festődését. A DNS a mintából enzimikus kezeléssel (DNS-áz) vagy ultrahanggal vonható ki.
- **Részecskék a mintában.** Nagy fordulatszámu centrifugálással ülephethetők ki.
- **Szérumfehérjék.** A szérumfehérjék, mint az albumin és az immunglobulinok (IgG), a teljes fehérjetartalomnak mintegy 75%-át teszik ki. A két nagy mennyiségű fehérje eltávolítása megkönnyíti a kisebb szérumfehérje-frakciók detektálhatóságát. Módszertanilag affinitásos kromatográfiás eljárással, pl. Blue Dextran révén érhető el a szérumfehérjék eltávolítása. Kerekedelmi forgalomban beszerezhetők olyan antitesteket tartalmazó kitek, amelyek tetszés szerint a 6, 12, 20 legnagyobb mennyiségű szérumfehérjét képesek eltávolítani (2-4., 2-5. ábra).

Megjegyzés: A dialízis, a gélszűrés, az affinitásos kromatográfiás szeparálások, valamint a fehérjekicsapós eljárások részletei a megfelelő irodalomban fellelhetők.

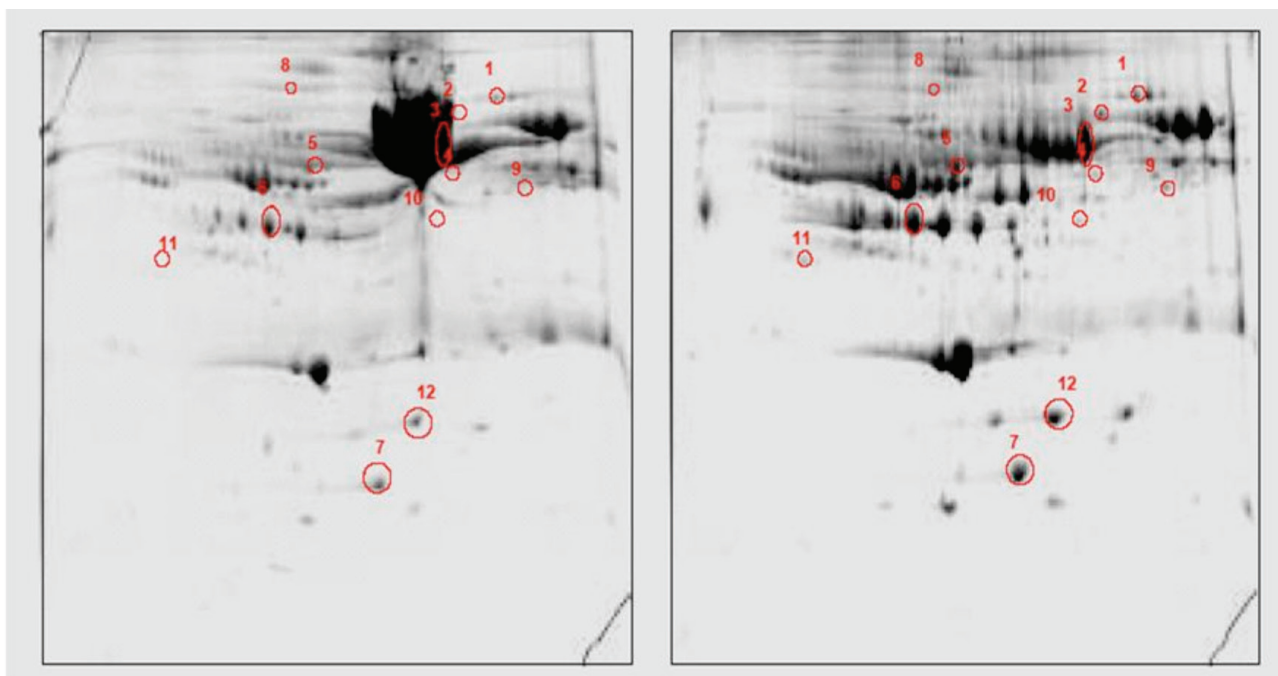
A MINTÁK ELŐFRAKCIONÁLÁSA

A prefrakcionálás a rendkívül összetett fehérjeminta analízisek előtti, kisebb frakciókra való elválasztását jelenti. Célja a minta komplexitásának csökkentése. Segítségével dúsítani lehet az érdeklődésünk közepontjában szereplő fehérjefrakciót.

- **Folyadék fázisú izoelektromos fókuszálás.** Lényege, hogy izoelektromos pontjuk alapján pH-tartományokba frakcionáljuk a sejtizátumot.
- **Szubcelluláris frakcionálás.** A sejthomogenizátumok szubcelluláris frakciókra választhatók differenciál-centrifugálással (magok, mitochondriumok, mikroszómák, detergensreisz-tens sejtalkotók stb.)
- **Konvencionális kromatográfiás technikák.** Itt utalunk ismételt a gélszűréses, ioncserés és affinitás kromatográfiákra.

FEHÉRJEMEGHATÁROZÁSOK

A fehérjekoncentráció pontos meghatározása elengedhetetlen a fehérjevizsgálatokban. Mind a preparatív, mind az analitikai eljárások fontos vonatkoztatási alapja. Fehérjemintázatok összehasonlító értékelése csak azonos mennyiségekkel végezhető. A kísérleti



2-5. ábra. Humán plazmafehérjék 2D PAGE térképe (az értékelést az albumin- és IgG-mentesítés – mint ajánlott előtisztítás – lényegesen megkönnyíti)

minták speciális egyedi fehérjéit nem koncentrációban adjuk meg, hanem össz-fehérjetartalomra fejezzük ki. Ha térfogati adatokkal nem rendelkezünk, rendszerint fehérjére számolunk.

Az irodalomban számos érzékeny fehérjemennyiség-mérési módszer ismeretes. Megjegyzendő, hogy a mintánk tartalmazhat olykor olyan komponenst, amely interferál az adott meghatározással (urea, detergens, redukálószer stb.). Olyan módszert kell kiválasztani, amely nem érzékeny ezekre az anyagokra.

Fehérjekoncentráció-mérési módszerek

Direkt fotometria. A direkt fotometriás eljárások közül ismert a 205 nm-en, valamint a 280 nm-en való mérés. Az előbbi a peptidkötések meglétén, az utóbbi az aromás aminosavak jelenlétén alapszik. Előnyük, hogy a minta nem „használdódik” el, további vizsgálatokhoz rendelkezésre áll. Leginkább kromatográfiás elválasztások frakciókövetésére használatosak. Hátrányuk, hogy érzékenységük elmarad pl. a Folin-féle vagy a különböző festékkötéses módszerekétől, és mennyiségi referenciájuk (kalibráció és standardizálás) sem megoldott.

Biuret reagens. A peptidkötést detektáló alkáliás réz reagens, a keletkező színreakcióban követi a Lambert–Beer-törvényt. Klasszikus, a rutin laboratóriumokban használatos spektrofotometriás mennyiségi fehérjemeghatározás.

A reakció elve a következő: A réz(II)ionok a peptidkötés 4-4 N-atomjával alkalikus közegben vörösbolya komplexet képeznek, amelyet 546 nm hullámhosszon fotometriásan mérnek. A biuret reagens (kereskedelmi forgalomban kapható, rutin laboratóriumi reagens) rézszulfátot, kálium-nátrium-tartarátot, kálium-jodidot és nátrium-hidroxidot tartalmaz. A tartarát köti komplexbe a réz(II)iont, amely alkalikus pH-nál mint réz(II)hidroxid kiválna, a jodid megakadályozza a réz(II)ion autoredukcióját. A színintenzitás a peptidkötések számával arányos. 150–1000 µg/mL proteinkoncentráció tartományban alkalmazható.

Lowry-féle fehérjemeghatározás. Kis fehérjekoncentrációnál használatos módszer a tudományos laboratóriumokban. Valójában a biuretmódszer LOWRY által módosított változata ez a fehérjemeghatározás,

amelynél a réz-peptid komplexek a rákövetkezően hozzáadott Folin-reagenssel (foszfomolibdát/foszfomolibdát) molibdénképpé redukálódnak.

Használatos reagens:

1. 2%-os Na-karbonát (2 g 0,1-szer normál NaOH 100 ml-ében oldva).
2. 1%-os $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (1 g 100 ml vízben).
3. 2%-os Na-tartarát (2 g 100 ml vízben).
4. Munkaoldat: Alkalikus rézoldat; (98 ml 1-es oldat + 1 ml 3-as oldat + 1 ml 2-es oldat – a sorrend betartása ajánlatos).
5. Folin-reagens (gyári készítmény). (Folin & Ciocalteu's phenol reagent suitable for determination of total protein by Lowry method).

A meghatározás menete:

- 0,2 ml minta
 - 1 ml alkalikus rézoldat (4-es oldatkeverék, frissen készülő)
 - 15 perc várakozás
 - 1 ml víz
 - 0,1 ml 1:1 hígítású Folin-reagens (vizes hígítás)
 - 30 perc várakozás után fotometrlás 500 nm-nél
- Megjegyzés: Triton-X detergenst tartalmazó minták esetén az 1 ml víz helyett 1 ml 10%-os SDS-t kell bemérni. Az ionos detergens jelenlétében megszűnik a minták zavarossága.
- Standard: ismert fehérjekoncentrációjú standard oldat 100–600 µg/ml tartományban (pl. BSA, marha-szérumalbumin) hasonlóan kezelve alkalmas a kalibrációs egyenes felvételére [8].

Fehérjemeghatározás mikrobiuret-módszerrel (Benedikt-módszer). Mivel a Lowry-módszer részben az aromás aminosavak – mint a tirozin és a triptofán – jelenlétén alapszik, ezért ha ezek alig vagy egyáltalán nem fordulnak elő a fehérjében, a proteinoldat fehérjemeghatározására ez a Benedikt-módszer látszik alkalmasnak. A meghatározás a *peptidkötések* számán alapszik. Érzékenység: 0,25–5 g/L protein.

Reagens:

1. 17,3 g trinátrium-citrát $\times 2\text{H}_2\text{O}$ + 10 g vízmentes Na-karbonát kevés vízben oldva.
2. 1,73 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ oldva 10 ml vízben, és az oldathoz az 1. oldatot hozzáadni
3. A keveréket 100 ml-re vízzel feltölteni (*Benedikt-reagens*).

Procedúra: 1 ml 3%-os NaOH, 50 µl Benedikt-reagens és 100 µl proteinoldat.

Fotometráls: 330 nm-nél.

Fehérjemeghatározás BRADFORD szerint, mikromódszerrel. Festékkötésen alapuló eljárás (1–1,400 µg/ml protein). Ez a módszer a fehérjék és a Coomassie Brilliant Blue G festék kötődésén alapszik. A fehérjeminta a festékreagenssel összekeverve, rövid ideig tartó, szobahőmérsékleten való inkubációt követően 595 nm-en fotometrálnak. Nagy érzékenysége miatt a meghatározáshoz a biológiai mintákat rendszerint hígítani kell. (A humán könnymintánál pl. 20–40-szeres hígítást alkalmaztunk.)

A Bradford-reagens összetétele:

- – 10 mg Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250
- – 5 ml 95% etanol
- – 10 ml 85% foszforsav
- – 85 ml desztillált víz

15 µl mintához 200 µl Bradford-reagenst adunk. (A térfogatok természetesen arányosan növelhetők: pl. 150 µl mintához 2000 µl Bradford-reagens.)

5 perc inkubációt követően 595 nm hullámhosszon vakkal szemben fotometrálnak.

Standardként 1 mg/ml pl. BSA törzsoldatból készült hígítási sort (25–400 µg/ml) használhatunk, az eredményeket grafikusán ábrázoljuk. A fehérjekoncentrációkat a hígítások figyelembevételével az eredeti mintára visszaszámoljuk (g/l).

IRODALOM

- [1] BRADFORD, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254, 1976.
- [2] DREWS, O., WEISS, W., REIL, G. et al.: High pressure effects step-wise altered protein expression in *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Proteomics* 2:765–774, 2002.
- [3] GÖRG, A., OBERMAIER, C., BOGOUTH, G. et al.: Recent developments in 2D gel electrophoresis with immobilized pH gradients: Wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures. *Electrophoresis* 20:712–717, 1999.
- [4] GÖRG, A., BOGOUTH, G., HARDER, A. et al.: The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21:1037–1053, 2000.
- [5] GÖRG, A., WEISS, W., DUNN, M. J.: Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4:3665–3685, 2004. (Review)
- [6] GÖRG, A., LÜCK, C., WEISS, W.: Sample prefractionation in granulated Sephadex-IEF gel. *Meth. Mol. Biol.* 424:277–286, 2007.
- [7] HUBER, L. A., PFALLER, K., VIETOR, I.: Organelle Proteomics: implications for subcellular fractionation in proteomics. *Circ. Res.* 92:962–968, 2003.
- [8] LOWRY, O. H. et al.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265–275, 1951.
- [9] MEISINGER, C., SOMMER, T., PFANNER, N.: Purification of *S. cerevisiae* mitochondria devoid of microsomal and cytosolic contaminant. *Anal. Biochem.* 287:339–342, 2000.
- [10] MOLLOY, M. P.: Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients. *Anal. Biochem.* 280:1–10, 2000.
- [11] O'FARRELL, P. H.: High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. *J. Biol. Chem.* 250:4007–4021, 1975.
- [12] ORFAO, A., RUIZ-ARGUELLES, A.: General concept about cell sorting techniques. *Clin. Biochem.* 29:5–9, 1996.
- [13] RABILLOU, T.: Solubilization of proteins in 2-D electrophoresis. An outline. *Methods Mol. Biol.* 112:9–19, 1999.
- [14] SANTONI, V., MOLLOY, M., RABILLOU, T.: Membrane proteins and proteomics: Un amour impossible? *Electrophoresis* 21:1054–1070, 2000.
- [15] SIMPSON, R. J.: International proteomics initiatives: technological challenges. *European Pharmaceutical Review* 1:25–36, 2004.
- [16] WEISS, W., POSTEL, W., GÖRG, A.: Application of sequential extraction procedures and glycoprotein blotting for the characterization of the 2-D polypeptide patterns of barley seed proteins. *Electrophoresis* 13:770–773, 1992.
- [17] WEISS, W., VOGELMEIER, C., GÖRG, A.: Electrophoretic characterization of wheat grain allergens from different cultivars involved in baker's asthma. *Electrophoresis* 14:805–816, 1993.
- [18] ZINSER, E., DAUM, G.: Isolation and biochemical characterization of organelles from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 11: 493–536, 1995.

Sejtes minták vizsgálómódszerei

KÖSZEGI TAMÁS

Intracelluláris fehérjék kimutatása

Sejtkultúrák. A sejtek in vitro tenyésztése több mint 50 éves múltra tekint vissza. A különböző tápfolyadékok, tenyésztési körülmények optimalizálását jórészt tapasztalati úton végezték és végzik ma is. Fontos körülmény, hogy a sejtek rendszerint akkor képesek szaporodásra, osztódásra, ha a tápoldat tartalmazza a tápanyagok mellett a sejtosztódáshoz szükséges növekedési faktorokat is. Ezt egyszerűen úgy érjük el, hogy a tenyésztő médiumhoz 10%-ban embrionális marhaszérumot keverünk.

Bármilyen legyen is az alkalmazott sejtípus vagy tápoldat, a siker meghatározó tényezője a *steril körülmények betartása*. Ez egyben analitikai előnyt is jelent, hiszen a minta nem tartalmazhat idegen organizmusokat (baktériumok, mikrogombák). Ugyanakkor a tenyésztő médium – elsősorban a savótartalma miatt – egyéb fehérjékben is gazdag, ami hátrányt jelent. A szövettenyésztés hőskorában nem álltak rendelkezésre ún. *sejtvonalak*, amelyek ma már a kereskedelemben beszerezhetők és garantált tulajdonságokkal rendelkeznek. Az első sejtkultúrákat műtéti mintákból, biopsziás anyagokból készítették. Ezeket ma *primer kultúrának* nevezzük. A primer kultúrát a steril körülmények közt kimetszett élő szövetekből különböző eljárásokkal lehet kinyerni, pl. finom szitán való préseléssel vagy óvatos tripszines emésztéssel, de e módszerek részletes bemutatása nem célja a jelen fejezetnek. Az így kapott sejtek megfelelő tápfolyadékba téve néhány osztódási cikluson mennek keresztül, majd előbb-utóbb elpusztulnak. A perifériás vérből is lehet sejteket izolálni, erre legegyszerűbb módszer a szeparálás sűrűség alapján (gradiens-centrifugálás). Amennyiben nem malignusan transzformált sejtekről van szó, a primer kultúrák élettartama mindenképp véges. Néha azonban történnek finom genetikai változások a tenyésztés során, és az így kialakult sejtek – még nem daganatsejtek – korlátlan ideig fenn tarthatók. Ezeket a sejtvonalakat szokás *immortalizált sejtkultúrának* nevezni. A harmadik, legkönnyebben tenyésztethető típus a valódi *daganatsejt-kultúra*.

A szövettenyésztés második titka a rendszeres

tápanyag-utánpótlás, az ún. *passzálás*. Ilyenkor lecseréljük a már kihasznált tápfolyadékot a tenyésztőedényből, és a sejtek egy kis hányadát kinyerve, új médiumba és rendszerint új edénybe tesszük azokat. Az inkubálást emlőssejtek esetében stabil 5% szén-dioxid-koncentrációt fenntartó, 37 °C-os termosztátban végzik.

Az emlőssejteken kívül lehetséges különböző növényi kultúrákat is létrehozni és fenntartani. Itt olyan szöveteket kell választani, amelyek megtartják osztódóképességüket, és akár pluripotensek is lehetnek (pl. gyökércsúcsszövet, rügyek merisztémaszövevei stb.). A növényi kultúráknál az optimális körülményekhez a periodikus megvilágítás is hozzátartozik.

Természetesen mikrobiológiai módszerekkel baktériumok és mikro-gombák is tenyésztethetők, ennek részleteire nem térünk ki.

Az emlős sejtkultúrák típusai. Alapvetően kétféle típust különböztetünk meg:

- A tenyésztőedény falához kitapadó (anchorage = horgony függő) sejteket.
- Szuszpenzióban növvő sejteket.

Nagyon fontos különbség a kétféle sejtípus között, hogy a kitapadó sejtek csak akkor képesek normális életfunkciókra és szaporodásra, ha a tenyésztőedény fala alkalmas azok megtapadására. Hidrofób felületeken ezek a sejtek nem szaporíthatók, szuszpenziót alkotva legömbölyödött alakot vesznek fel és leáll az osztódásukhoz szükséges fehérje- és nukleinsavszintézis. A passzáláshoz először a használt tápfolyadék eltávolítása után a kitapadt sejtek kíméletes leválasztása (tripszines-citrátos oldattal) szükséges, majd felsuszpendálás után a kitapadó felülettől megfosztott, lekerekedett sejtek egy részét új edénybe és friss tápfolyadékba tesszük.

A szuszpenzióban növvő sejtek (pl. lymphoblastok) tenyésztése rendkívül egyszerű, itt a passzáláshoz lecentrifugáljuk a mintát és annak egy kis részét új edényben, friss tápoldatban reszuszpéndáljuk.

Vizsgálati lehetőségek, modellek

Kitapadó sejtek. Általában a sejteket tenyésztőflaskákban, egyrétegű (monolayer) formában előtenyésztjük úgy, hogy a fedettség kb. 80%-os legyen. Ez nagyon fontos – különösen akkor, ha daganatsejtekkel dolgozunk –, mert a daganatsejtek szeretnek egy-

más „tetejére” is nőni, így elveszítik az egysejt-réteg jelleget. A monolayer formának technikai jelentősége is van: a kezelő oldatoknak minden sejtet egyszerre, azonos valószínűséggel kell elérnie. Az előtenyésztett kultúrát 80%-os fedettségénél leválasztjuk az edény faláról és friss tápfolyadékban reszuszpendáljuk. A kísérletekhez leggyakrabban szövettenyésztő lemezeket használunk, ezek lehetnek 6, 24 vagy 96 lyukú, szabvány méretű lemezek, tetővel ellátva. A lyukakba tehetünk beleillő kerek műanyag vagy üveglapkát is („betétes tenyészet”), ekkor a sejtek ránőnek a betétre, és később egy mozdulattal kivehetők onnan. A lyukakat friss tápfolyadékban lévő sejtsuszpenzióból töltik meg steril pipettázással, minden lyukba azonos térfogatot mérve. Ennél a fázisnál nagyon kell vigyázni, hogy a sejtsuszpenzió homogén legyen, hogy minden lyukba közel azonos számú sejt kerüljön. Általában egynapos előtenyésztést végzünk, hogy a sejtek kitapad hassanak és folytathassák normális életműködésüket. A sejtek kezelhetők úgy, hogy a vizsgálni kívánt anyagot egyenként a lyukakba pipettázuk, de úgy is, hogy a tápfolyadékot steril tűvel, vákuummal eltávolítjuk és a kezelő oldatot már tartalmazó új tápfolyadékra cseréljük.

A kitapadó sejtek előnye, hogy a kezelés során – amennyiben nem pusztulnak el – mindvégig lehorogonyozódva maradnak, így mosásuk, előkészítésük a további vizsgálatokhoz egyszerű. Betétes tenyészeteket használva a kiemelt lemezeket morfológiai, mikroszkópos célokra is könnyen alkalmazhatjuk.

Sejtsuszpenziók. A szuszpenzióban növekvő sejteket módszertanilag máshogyan kell megközelíteni, mint a kitapadókat. Jóllehet a passzálásuk egyszerű, de a kezelések, mosások centrifugálást igényelnek. A centrifugálás során vigyázni kell, nehogy túl nagy fordulatszámot használjunk, mert ekkor a sejtek sérülhetnek vagy aktiválódhatnak, ugyanakkor túl alacsony fordulatszámon nem ülepednek ki teljesen és egy részüket elveszíthetjük. További problémát jelenthet a sejtek aggregációja (a daganatsejtek szeretnek kis csoportokban, kolóniákban nőni), ezért a kísérletekhez óvatos szuszpendálást kell alkalmazni, legjobb az 1 ml-es pipettahegygel fel-le szívás.

Sejtes modellek használata. A sejt kultúrákat sokféle módon, sokféle kérdés megválaszolására használhatjuk. Az egyik gyakori vizsgálati típus izolált molekulák

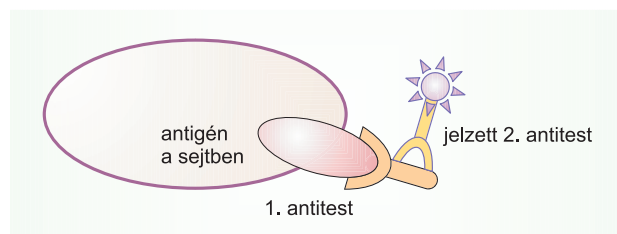
(toxinek, gyógyszerek, gyógyszer-molekula-jelöltek, természetes gyógyhatású anyagok stb.) hatásának analízise. Elsősorban toxicitásvizsgálatról van szó, ahol a célsejtek életképességének mérése a döntő, ill. az esetleges toxikus hatás molekuláris mechanizmusának felderítése (apoptózis, nekrosis). Mind több tanulmány foglalkozik a sejten belüli jelátviteli folyamatokkal, azok fehérjemediátoraiival. A tiszta, sejtes modellek erre is nagyon alkalmasak, hogy csak néhány példát említsünk.

Módszertani megközelítések

EGYEDI FEHÉRJÉK KIMUTATÁSA MORFOLÓGIAI MÓDSZEREKKEL

Immunfluoreszcencia. A sejt felszínén vagy a sejten belül található fehérjemolekulák láthatóvá tételére alkalmas módszer. Lehetőség van direkt és indirekt kimutatásra. A *direkt eljárásban* egyetlen specifikus antitestet használunk a keresett fehérje kimutatására, mely kovalensen kötött fluoreszcenciás jelölőt hordoz. Ez a módszer egyszerű, széles körben alkalmazzák nem mikroszkópos megfigyelésre is, pl. flow citometriában. Az *indirekt módszer* „szendvics”-elven alapuló, két antitestet használó eljárás, ahol az első antitest alakítja ki a keresett molekulával a specifikus kötést, a második antitest pedig a már lekötődött első antitest ellen termeltetett immunglobulin, mely fluoreszcens jelölőt hordoz (2-6. ábra).

A morfológiai vizsgálathoz fluoreszcens mikroszkóp szükséges. Ennek optikája különleges, az ultraibolya fényt is átengedő üvegből készül, a megvilágító fényforrás pedig nagy energiájú UV-sugarakat is kibocsát (higanylámpa, xenonlámpa). A mikroszkóp felépítésében gyakori a fordított elrendezés: az objektív a tárgyat alulról látja (fordított, inverz mikro-



2-6. ábra. Transzmembrán sejtfehérje kimutatása immunfluoreszcenciás módszerrel

szkóp). Ez a geometria azért terjedt el, mert a mintát gerjesztő fény az objektíven keresztül halad át, és nem kerül bele az okulárrendszerbe, minimálisra csökkentve a gerjesztő fény zavaró hatását. A mintából a fényemisszió a tér minden irányában terjed, így a hasznos jel szintén az objektíven halad át visszafelé az okulárokba. Mind a gerjesztő fény útjában, mind a megfigyelési oldalon a fénysugarak megfelelő hullámhosszúságú szűrőkön haladnak keresztül, tovább növelve a jel/zaj viszonyt.

Az egyik leggyakrabban alkalmazott immunfluoreszcenciás vizsgálat a sejtváz (citoszkeleton) fehérjének vizualizációja megfelelő antitestek használatával, lehetőség van külön az aktin, a tubulin és a köztes (intermediate) filamentumok kimutatására. Amennyiben különböző hullámhosszon emittáló jelölőket használunk, akkor egyszerre kettő vagy mind a három citoszkeletonrendszert láthatóvá tudjuk tenni ugyanabban a sejtben, a mikroszkópban változtatva a gerjesztés hullámhosszát és az emissziós oldalon a szűrőket. Az egyes hullámhosszakon kapott képeket lefényképezzük, és azután a digitalizált képeket számítógép segítségével egymásra vetítjük.

A citoszkeleton aktin komponense, a mikrofilamentáris rendszer antitest nélkül, más specifikus molekuláris interakcióval is detektálható. Ehhez a gyilkos galóca (*Amanita phalloides*) falloidin toxinjának használata terjedt el széles körben. Fluoreszcens festékek kovalensen jelzett falloidint használnak leginkább erre a célra, mely irreverzibilisen kötődik a fibrilláris (F) aktinhoz. Jelölőként leggyakrabban fluoreszcein-izotiocianátot (FITC, zöld színű emisszió) és tetrametil-rodamin-izotiocianátot (TRITC, piros) alkalmaznak. A fluoreszcein igen intenzív emissziót mutat, de hátránya az UV-gerjesztés hatására gyorsan bekövetkező halványulás (fading). Ma már széles körben hozzáférhetőek a kioltásra nem vagy alig érzékeny fluoreszkáló molekulák is, pl. az AlexaFluor-származékok.

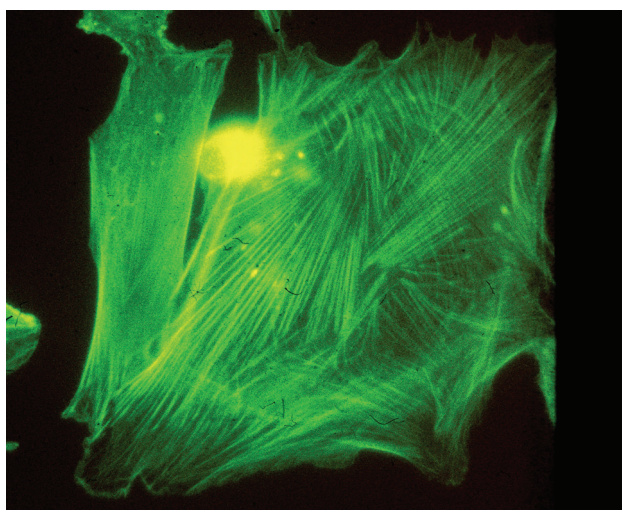
Aktinfilamentumok kimutatása indirekt immunfluoreszcenciával és jelölt falloidinnel. Ezen a példán keresztül kívánjuk bemutatni az egyedi fehérjemolekulák mikroszkópos detektálásának általánosan bevált receptjét. Nagyon fontos, hogy a sejtek jó minőségű üveglemezre legyenek tenyésztve, a műanyag optikailag nem megfelelő. Nem szabad túl sok sejtet tartalmazó kultúrát vizsgálni, legjobban kb. 30%-os fe-

dettség. Általánosságban a következő lépésekből áll a folyamat, amelyet a következőkben részletezünk is: sejtek mosása, fixálás, blokkolás, permeabilizálás (átjárhatóvá tevés), jelölés specifikus antitesttel vagy más módon, mosás, második antitest hozzáadása, mosás, beágyazás, mikroszkópos megfigyelés. Falloidin esetében a jelölést egy lépésben végzik, a második inkubációt elhagyjuk.

- **Fixálás.** A hideg pufferelt sóoldattal (PBS) mosott monolayer sejteket vagy -20°C -ra hűtött acetonnal, vagy metanolmentes pufferelt formaldehidoldattal (2,0–4,0%-os) fixáljuk 10 percig. Az aceton a fixáláson kívül a sejteket permeabilizálja is, ezért ebben az esetben ez a lépés a továbbiakban elhagyható.
- **Blokkolás.** Az intracelluláris nem specifikus kötődések kivédésére szokás a sejteket PBS-ben oldott 1%-os albuminoldattal kezelni szobahőmérsékleten 1 órát.
- **Permeabilizálás.** A formaldehidben fixált, blokkolt sejteket alaposan, többször mossuk PBS-ben, majd 0,1% Triton-X 100-at (nem ionos detergens) tartalmazó PBS-oldatba tesszük a mintát szobahőmérsékleten, 15 percre. Amennyiben detergenst alkalmazunk, akkor minden további lépésben az oldatoknak tartalmazniuk kell a detergenst.
- **Inkubálás az 1. antitesttel.** Ehhez a lépéshez célszerű a sejteket az üveglemezen „bekeríteni”, pl. körömlakkal vagy speciális, levegőn megdermedő anyaggal, ily módon akadályozva meg, hogy a drága antitest a mintáról lefolyjon. Az inkubációt szobahőmérsékleten végezzük 60 percig a blokkolóoldattal hígított antitesttel. A mintát nedves kamrába téve óvjuk a beszáradástól. Az antitest optimalizálásához célszerű kikísérletezni a legmegfelelőbb hígítást. Detergenst tartalmazó oldatnál különösen vigyázni kell, hogy az nehegy lecsússzon a mintáról.
- **Mosás és inkubálás a 2. antitesttel.** A sejteket többször mossuk PBS-sel, majd befedjük a jelzett 2. antitest megfelelő hígítású oldatával, és az előző pont szerint inkubálunk. A mintát ne érje fény!
- **Mosás, beágyazás.** A sejteket újra többször mossuk PBS-sel, majd az utolsó mosás után a mintát rövid ideig desztillált vízbe mártjuk a sók eltávolítása érdekében. A sejt oldallal lefelé a

lemezt tiszta tárgylemezre cseppentett speciális „anti-fading” készítményre helyezzük (pl. VectaShield), ami a fluoreszcens jel halványulását késlelteti.

- **Mikroszkópos megfigyelés.** Először normális megvilágítással vagy fáziskontrasztos módszerrel ellenőrizzük a készítményt. Ezután megfelelő hullámhosszúságú gerjesztő és analízáló szűrők alkalmazásával először kis nagyítással tanulmányozzuk a sejteket, vigyázva arra, hogy a megfigyelt látóteret ne érje túl sokáig a gerjesztő fény. Immerziós nagyításra is van lehetőség, ekkor speciális, fluoreszcenciás minőségű immerziós olajat kell alkalmaznunk.
- **Dokumentáció.** Hagyományos analóg fényképezésnél lehetőleg 400 ASA érzékenységű filmet használjunk, a legjobb a színes diapozitív film (napjainkban kevesen használják és nehezen hozzáférhető, de jobb felbontást ad a digitális technikánál). A digitális technika ma már széles körben rendelkezésre áll különböző, hűtött CCD chipet tartalmazó nagy érzékenységű kamerával és analízáló szoftverrel.
- **Általános megjegyzések.** Nagyon fontos, hogy a minta nem száradhat ki az egész procedúra során, mert álpozitív jelölést kaphatunk. Mindig legyen negatív kontroll, ami olyan mintát jelent, amit csak a 2. antitesttel inkubáltunk (ennek negatívnak kell lennie).

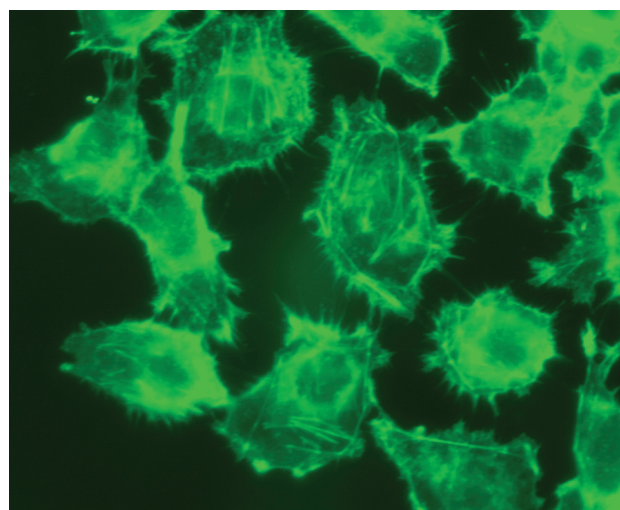


2-7. ábra. Humán embrionális fibroblastsejtek aktinfilamentjeinek detektálása nyúlban termeltetett antiaktin primer antitesttel és FITC-vel jelzett antinyúl-IgG másodlagos antitesttel (200×) (Fujifilm 400 ASA, Contax fényképezőgép)

A 2-7. és 2-8. ábrán indirekt immunfluoreszcens és falloidines módszerrel vizualizált aktinfilamenteket mutatunk. A két képen jól megfigyelhető az eltérő sejtípusok eltérő mikrofilamentum struktúrája.

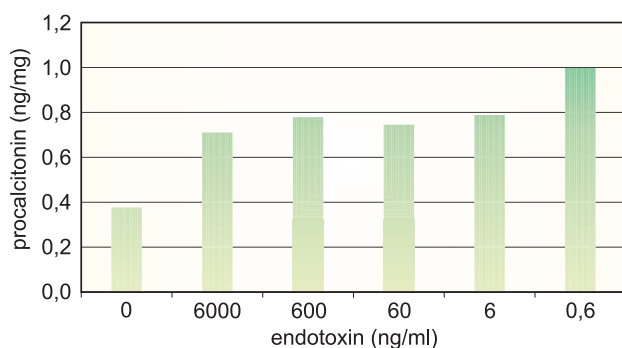
EGYEDI FEHÉRJÉK KIMUTATÁSA EGYÉB MÓDSZEREKKEL

Western blot. További lehetőség az intracelluláris fehérjék egyedi kimutatására a sejtek feltárása után az SDS-PAGE-vel szétválasztott mintáknál Western blot alkalmazása. A módszer részleteiről már szó esett ebben a fejezetben, itt csak annyit jegyeznénk meg, hogy ezt a vizsgálatot gyakran alkalmazzák egy bizonyos fehérje expressziójának követésére. Mivel a leggyakrabban használt kemilumineszcenciás detektálás közel kvantitatív mérést tesz lehetővé, ezért a különböző mintákban a kérdéses fehérje átírásáról mennyiségi információt is kaphatunk. Ehhez szükség van egy referensként használt fehérje detektálására is, melynek mennyisége független az alkalmazott kezelésektől. Erre a célra leggyakrabban a β -aktint és a GAPDH-t (glicerinaldehid-foszfát-dehidrogenáz) használják. A vizsgálni kívánt molekula lumineszcenciás jelét a referens molekula jeléhez viszonyítva nyomon követhetővé válik a kérdéses fehérje expressziójának változása.



2-8. ábra. MDCK (kutya-vesetubulus tenyészet) aktinfilamentjeinek festése AlexaFluorral jelzett falloidinnel (400×) (Olympus Cell^D CCD kamera és képelemző szoftver)

Immunkémiai módszerek. A kép nem lenne teljes anélkül, hogy az érzékeny immunoassay- (lásd 7. Automatizáció a fehérjeanalitikában) palettát meg ne említenénk. Itt lehetőség van nem denaturáló módszerekkel feltárt sejtekből (sejtlizátumokból) vagy a tenyésztőmédiumból egyedi fehérjék, peptidek mennyiségi meghatározására. A vonatkoztatási alap a tápfolyadékban a szérumhoz hasonlóan a térfogat (pl. nmol/l), a sejtlizátumokból pedig általában a sejtek/minták összfehérje-tartalma. A 2-9. ábrán bemutatott kísérletünkben HepG-2 (transzformált máj-sejtkultúra) sejteket endotoxinhatásnak tettünk ki 24 órán keresztül (endotoxint tartalmazó tápfolyadékban tenyésztettük őket), majd eltávolítva a médiumot a sejteket nem-ionos detergenssel lizáltuk. A lizátumokból kemilumineszcenciás immunoassay-vel prokalcitoninméréseket végeztünk, a prokalcitoninértékeket a sejtek fehérjetartalmára vonatkoztattuk.



2-9. ábra. Endotoxinexpozícióra bekövetkező prokalcitoninválasz kimutatása HepG-2 sejtek lizátumaiban

Érdekességgként megjegyezzük, hogy a sejtekben a prokalcitonin mennyisége az endotoxinnal fordított arányosságot mutatott. Hasonló modelleket alkalmazva, a patofiziológiás történéseket utánozva számos biológiai aktív molekula viselkedése tanulmányozható.

IRODALOM

- <http://www.protocol-online.org/prot/Immunology/Immunofluorescence/>
- <http://web.mit.edu/ki/facilities/microscopy/immunofluorescence-protocol.pdf>
- http://www.protocol-online.org/prot/Cell_Biology/Cell_Culture/
- <http://www.molecularstation.com/protocol-links/Cell-Biology-Cell-Culture/>
- <http://www.mnstate.edu/provost/cellcultureprotocol.pdf>
- <http://www.andor.com/learning/applications/Immunofluorescence/>
- <http://www.google.hu/search?q=cell+culture+protocols&hl=hu&client=firefox-a&hs=MaV&rls=org.mozilla:en-US:official&channel=s&prmd=ivns&ei=S-rU2TZDnN435sgbzptWfAQ&start=10&sa=N>
- <http://www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb2/part1/actin.htm>
- <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cell-and-Tissue-Analysis/Cellular-Imaging/Fluorescence-Microscopy-and-Immunofluorescence-IF/Phalloidin-and-Phalloidin-Conjugates-For-Staining-Actin.html>

