Dwuwymiarowa elektroforeza żelowa: od eksperymentu po profile ekspresji. Część pierwsza – eksperyment

Two-dimensional gel electrophoresis: from experiment to protein expresion profiles. Part one – experiment

Agnieszka Suchwałko[1,2], Halina Podbielska[1]

[1] Instytut Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, Politechnika Wrocławska, Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław, tel. +48 (71) 320 28 25, e-mail: agnieszka.suchwalko@pwr.wroc.pl,
[2] MedicWave AB, Stalverksgatan 1, SE-302 45 Halmstad, Sweden

Streszczenie

Dwuwymiarowa (dwukierunkowa) elektroforeza żelowa (2-DE) jest metodą znaną od lat 70. poprzedniego stulecia. Zainteresowanie badaczy metodą 2-DE wynika z możliwości separacji nawet kilku tysięcy białek w jednym żelu, co pozwala na ich detekcję i identyfikację. Dzięki wysokiej rozdzielczości wyników separacji możliwe staje się ustalenie roli biologicznej poszczególnych białek czy odkrywanie wpływu czynników zewnętrznych na organizmy żywe na poziomie proteomu. Metoda 2-DE wciąż ewoluuje. W ostatniej dekadzie nastąpił ogromny postęp w sposobie przeprowadzania eksperymentów z dużą powtarzalnością. Zmieniło się też całkowicie podejście do analizy obrazów żeli i wykorzystywane do tego celu algorytmy. Ze względu na tak szybki rozwój technik dwuwymiarowej elektroforezy żelowej autorzy postanowili przedstawić obecny stan wiedzy w tym zakresie. Praca składa się z dwu części. W pierwszej opisano zmiany, jakie zaszły w technikach przeprowadzania eksperymentów elektroforetycznych. Druga część skupia się na analizie obrazów uzyskanych za pomocą metody 2-DE, z uwzględnieniem zmian w schemacie analizy. Pierwsza część pracy koncentruje się na eksperymencie dwuwymiarowej elektroforezy żelowej. Opisano poszczególne kroki eksperymentu: od przygotowania próbki, przez ładowanie próbek do pierwszego wymiaru, IEF, SDS-PAGE, barwienie żeli, aż po zapis obrazów żeli. Praca nie porusza szczegółów biochemicznych eksperymentu. Opisane zostały również formaty plików, technika DIGE, wpływ eksperymentu na dalszą analizę, modyfikacje posttranslacyjne oraz pozyskanie próbek protein z żeli do ewentualne identyfikacji za pomocą innych technik proteomicznych.

Słowa kluczowe: elektroforeza żelowa, 2-DE, eksperyment, analiza obrazów, schemat analizy 2-DE

Abstract

Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) is a method commonly used since seventies of the previous century. It owns its non weakening interest of researchers because of the possibility of separation even a few thousands of proteins in one gel, what allows for protein detection and identification. Thanks to high resolution of separation results, it is possible to determine a biological role of particular proteins or to discover influence of external factors on living organisms on the proteome level. Though 2-DE is still evolving. In the last decade, a great progress has been made in the way of performing experiments and their reproducibility. Approach to the analysis of gel images and algorithms used for the analysis have been entirely changed. For the reason of such instant changes of methods and techniques of the two-dimensional gel electrophoresis, the authors decided to describe state of the art. This work consists of two parts. The first part describes changes that have been made in performing of electrophoretic experiments. The second part concentrates on the analysis of obtained images, with emphasis the analysis workflow.
The first part focuses on the experiment of the dwo-dimensional gel electrophoresis. Description of particular steps of the experiment is given: from the sample preparation, through loading of samples for the first dimension, IEF, SDS-PAGE, gels staining, to recording of gel images. This work does not bring up biochemical details of the experiment. File formats, DIGE technology, influence of the expriment on the further analysis, posttraslational modifications and acquisition of protein samples from gels for identification using other proteomic techniques have been described in detail.

Keywords: gel electrophoresis, 2-DE, experiment, image analysis, 2-DE analysis workflow

Wstęp

Dwuwymiarowa (dwukierunkowa) elektroforeza żelowa (2-DE) jest metodą znaną od lat 70. ubiegłego stulecia [1]. Podstawową zasadą działania elektroforezy jest migracja naładowanych elektrycznie cząstek w polu elektrycznym. Jej zadaniem jest separacja cząsteczek badanej próbki, a efektem płytka pokryta żelem, zawierająca rozdzielone cząstki. Płytka żelowa może zostać zarejestrowana za pomocą odpowiedniego skanera lub kamery jako obraz cyfrowy możliwy do dalszej analizy z użyciem dedykowanych do tego celu programów komputerowych. Natomiast rozdzielone cząstki, mogą zostać wycięte z żelu (ręcznie lub przy użyciu robota) i odpowiednio przygotowane, aby poddać je dalszej analizie (np. spektrometrii mas).

Najbardziej typowym zastosowaniem elektroforezy w proteomice jest separacja białek w zależności od pH oraz masy cząsteczkowej (M_r). Separacja taka jest możliwa, ponieważ proteiny i peptydy są substancjami amfoterycznymi i w związku z tym mogą zostać naładowane dodatnio albo ujemnie, w zależności od pH środowiska, w którym się znajdują. Dzięki temu mogą się przemieszczać w polu elektrycznym.

Ze względu na dużą liczbę trudnych danych, jakie niesie ze sobą każdy zarejestrowany cyfrowo obraz żelu pochodzący z eksperymentu elektroforetycznego, analiza ilościowa obrazów żeli uwzględniająca przetwarzanie obrazu, modelowanie

zjawisk zachodzących w żelach czy estymację statystyczną zaburzonych danych stała się przedmiotem zainteresowań badaczy różnych dziedzin. Analizowanie obrazów żeli stało się tematem interdyscyplinarnym interesującym biologów, lekarzy, chemików, jak również fizyków, informatyków i matematyków.

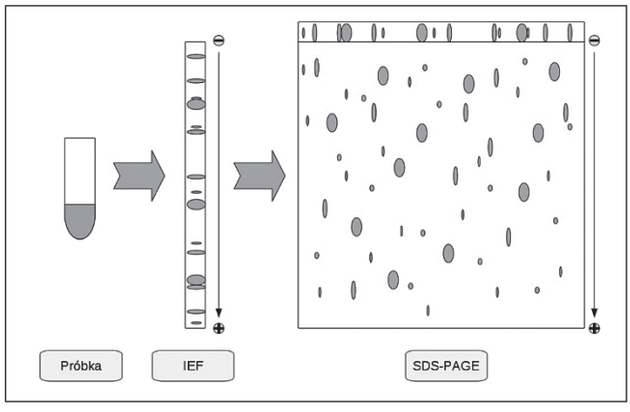
Pierwsza grupa badaczy osiąga coraz lepszą powtarzalność eksperymentów [2-5], uzyskuje coraz dokładniejsze dane, ma zasługi w ustaleniu zasad wykonywania eksperymentu, aby jego wyniki było możliwie łatwo analizować, czy wreszcie zapewnia odpowiednie substancje chemiczne, które umożliwiają zarówno analizę obrazu, jak i wykorzystanie rozdzielonych protein do dalszych badań.

Druga grupa naukowców odgrywa ważną rolę w budowie systemów analizujących obrazy. Na taką analizę składa się bardzo wiele zagadnień, począwszy od opisania zachowań żelu, takich jak na przykład kurczenie czy pocenie w określonych warunkach. Część procesu, dotycząca przetwarzania obrazu przed przystąpieniem do analizy danych, nazywa się obróbką wstępną (*preprocessing*). Obróbka wstępna wymaga zastosowania między innymi aparatu statystycznego, jak również wiedzy z zakresu kodowania danych. Każdy kolejny etap analizy wymaga sprawnego wykorzystania informacji z różnych dziedzin, co powoduje, że jest to niezwykle skomplikowany proces.

Rezultatem analizy pojedynczego żelu jest ilościowa informacja o ekspresji poszczególnych białek, ich punktach izoelektrycznych oraz estymowanej masie cząsteczkowej. Wynikiem analizy w przypadku wielu żeli jest zwykle – oprócz informacji ilościowych o każdym żelu – porównanie ekspresji protein pomiędzy żelami z danego eksperymentu.

Do uzyskania z wyników eksperymentu 2-DE informacji istotnych dla dalszej analizy konieczne jest wykonanie kilku operacji w następującej kolejności:

1. eksperyment elektroforetyczny
   - pobranie i przygotowanie próbki,
   - przeprowadzenie eksperymentu w pierwszym wymiarze (IEF),
   - przeprowadzenie eksperymentu w drugim wymiarze (SDS-PAGE);
2. wizualizacja wyników eksperymentu za pomocą wprowadzonych do żelu barwników;
3. zapis obrazu żelu za pomocą skanera lub kamery w postaci cyfrowej;
4. analiza obrazów zakończona wygenerowaniem profili ekspresji poszczególnych protein;
5. analiza profili ekspresji;
6. wycięcie białek z żeli i ich wytrawienie;
7. dalsza analiza wybranych protein przy pomocy innych technik proteomicznych (np. spektrometrii mas).



Rys. 1 Schemat eksperymentu dwuwymiarowej elektroforezy żelowej. Próbka w pierwszym wymiarze jest separowana za pomocą metody obrazowania izoelelektrycznego (IEF). W drugim wymiarze podział następuje z użyciem techniki SDS-PAGE

Techniki przygotowania oraz przeprowadzenia eksperymentu (punkt 1) zostaną omówione w tej części pracy, bez poruszania szczegółów biochemicznych. Podobnie barwienie protein i ich wizualizacja (punkt 2). Przedmiotem pracy jest również transfer informacji, dotyczących białek zawartych w żelu, do postaci cyfrowej (punkt 3). W drugiej części pracy, poświęconej analizie obrazu, omówione zostaną szczegółowo stosowane schematy analizy [6]. Wynikiem końcowym analizy są profile ekspresji poszczególnych protein i informacje o znalezionych różnicach w ekspresji protein pomiędzy próbkami (punkt 4). Analiza profili ekspresji, wycinanie, trawienie oraz dalsza analiza proteomiczna próbki (punkty 5-7) to osobne, bardzo szerokie zagadnienia, które nie będą poruszane.

Przeprowadzenie eksperymentu i zapis obrazu

Dwuwymiarowa elektroforeza żelowa

Dwuwymiarowa elektroforeza żelowa jest wciąż jedną z najczęściej stosowanych metod separacji białek w proteomice. Swoją popularność zawdzięcza wysokiej rozdzielczości oraz separacji ze względu na dwie, niezależne od siebie cechy białek – punkt izoelektryczny (pI) w pierwszym wymiarze (oś X) i masę cząsteczkową (M_r) w drugim wymiarze (oś Y). Schemat eksperymentu przedstawia rys. 1. Dzięki temu można rozdzielić nawet do 10 000 protein, zobrazowanych i zgromadzonych na jednym żelu bez zmiany ich właściwości [7]. Pozwala to na dalszą analizę wybranych białek za pomocą spektrometrii mas (*mass spectrometry* – MS) lub bezpośrednio na porównanie ekspresji poszczególnych protein w zależności od badanego czynnika. Jeśli jedna plama zawiera więcej niż jedną proteinę, nie jest możliwa ich analiza ilościowa na podstawie obrazu uzyskanego z żelu, ale jest możliwa ich identyfikacja i charakteryzacja za pomocą spektrometrii mas.

Z powodu nakładania się na siebie protein [8, 9] najbardziej popularne są duże formaty żeli, które ułatwiają separację poszczególnych białek. Jeśli rozdzielczość jest zbyt mała, można podzielić preparat na podstawie pI (punkt izoelektryczny – wartość pH, dla której cząsteczka staje się obojętna elektrycznie) badanych cząsteczek zawartych w próbce i przeprowadzić analizę na żelach o zachodzących na siebie gradientach pH. Eksperyment można przeprowadzić na kombinacji żeli o kwasowym gradiencie pH, na przykład od 4 do 7, i osobno zasadowym gradiencie pH od 6 do 11 [10-12]. Takie operacje są znacznie uproszczone dzięki paskom IPG (*immobilized pH gradients* – ustalone gradienty pH), które są dostępne w szerokiej gamie gradientów pH.

Przygotowanie próbek

Aby w pełni wykorzystać możliwości metody 2-DE, proteiny z pobranej próbki muszą zostać poddane denaturacji, rozbiciu skupisk, redukcji oraz rozpuszczeniu [13, 14]. Dopiero takie działania pozwalają na całkowite rozerwanie wzajemnych oddziaływań między cząsteczkami oraz zapewniają, że każda plama znajdująca się w żelu reprezentuje pojedynczy polipeptyd. Nie ma jednej, uniwersalnej techniki przygotowywania próbek. Wiele zależy od pochodzenia próbki, czy jest ona pochodzenia roślinnego czy zwierzęcego, czy pochodzi z tkanek, komórek czy z krwi. Można jednak podać pewne ogólne zalecenia odnośnie do przygotowania próbek do badań 2-DE.

W skład próbki nie mogą wchodzić żadne proteiny, czy peptydy nienależące do badanej próbki. Próbka nie może być w żaden sposób uszczuplona, ponieważ tylko kompletny pro-

teom jest przydatny do analizy. Sprawą bardzo trudną jest uniknięcie interakcji pomiędzy proteinami, które w tak skompilowanej miksturze zdarzają się niezwykle często. Należy wystrzegać się niekontrolowanej utraty części protein. Ważne jest rozerwanie wszystkich skupisk, ponieważ są one zbyt duże, żeby wejść do żelu i w takiej postaci nie nadają się do analizy. Konieczne jest przeciwdziałanie aktywności enzymów – proteazy i fosfatazy, które są aktywne również w warunkach denaturacji [15]. Wymagane jest również usunięcie składników zakłócających analizę, takich jak: sole, lipidy, polisacharydy, kwasy nukleinowe, polifenole, nie usuwając przy tym protein [16].

Do przeprowadzenia eksperymentu niezbędna jest odpowiednia liczba komórek w próbce. Przyjmuje się, że w przypadku wybarwiania srebrem lub barwnikami fluorescencyjnymi niezbędne jest około 100 μm protein (wielkość próbki określana jest za pomocą długości łańcucha aminokwasów).

W celu uniknięcia strat białek ich przygotowanie musi zostać ograniczone do niezbędnego minimum. Dodatkowo, żeby próbka nie zmieniała się samoczynnie, należy ją przechowywać w możliwie chłodnym miejscu, a czas od pobrania do przeprowadzenia eksperymentu powinien być jak najkrótszy. Ponieważ proteiny muszą zostać wyodrębnione z próbek pochodzących na przykład z tkanek, proces taki może trwać nawet kilka dni. Próbki płynne muszą zostać poddane denaturacji, aby zapobiec interakcji pomiędzy proteinami i tworzeniu się oligomerów polipeptydowych i agregatów proteinowych.

Zbyt duża ilość soli w próbce przeszkadza w IEF i powoduje powstanie smug na końcowym obrazie. Zachodzące reakcje powodują powstanie ograniczonych, poziomych obszarów bez plam proteinowych. Aby do tego nie dopuścić, używane substancje muszą być najlepszej jakości.

Obrazowanie w pierwszym wymiarze – IEF

Obrazowanie izoelektryczne (*isoelectric focusing* – IEF) jest techniką stosowaną do rozdzielenia białek w pierwszym wymiarze techniki 2-DE (rys. 1). Podczas badania IEF proteiny są separowane ze względu na ich punkt izoelektryczny (pI). Technika IEF separuje proteiny w oparciu o ich relatywną zawartość kwasowych i zasadowych reszt aminokwasowych. Proteiny są wprowadzane do unieruchomionego żelu poliakrylamidowego, w którym mamy zróżnicowane pH. Na przeciwnych końcach żelu umieszczane są elektrody. Migracja białek rozpoczyna się wraz z przyłożeniem prądu i zatrzymuje się dla danej cząsteczki, gdy dotrze ona do charakterystycznego dla siebie punktu izoelektrycznego. Punkty izoelektryczne to wartości pH, dla których ładunki dodatnie i ujemne reszt aminokwasowych równoważą się. Dlatego proteiny kończą wędrówkę w charakterystycznych dla siebie punktach izoelektrycznych wewnątrz żelu. Jest to również sposób na precyzyjne określenie pI poszczególnych białek z próbki. Technika ma możliwość niezwykle dokładnego separowania protein. Optymalnym efektem jest rozdzielenie wszystkich protein.

Badanie IEF można przeprowadzić na żelach wytworzonych w laboratorium, jak również na dostępnych w sprzedaży żelach mających postać wąskiego i długiego (od 7 cm do 24 cm) paska. Takie paski noszą nazwę pasków IPG, czyli pasków o ustalonych gradientach pH [10]. Gradient dla pasków może być liniowy lub nieliniowy (np. logarytmiczny). Paski żelowe są wykonane zgodnie z precyzyjnie określonymi standardami, a ich jakość jest pod stałą kontrolą. Do przeprowadzenia eksperymentu znacznie wygodniejsze są gotowe paski IPG, które zapewniają lepszą powtarzalność wyników, niż żele wykonane w laboratorium. W pracy [17] można jednak znaleźć informację o większej wariancji wyników dla pasków niepochodzących z jednego żelu niż dla pasków, których oznaczenia producenta sugerują, że pochodzą z jednego żelu. Wykazana różnica to prawie 10%. Dodatkową zaletą gotowych, suchych pasków jest możliwość ich przechowywania, zanim zostaną wykorzystane w eksperymencie. Praca [17] zawiera wiele cennych informacji na temat eksperymentów na bazie gotowych pasków IPG.

Zasadnicze różnice pomiędzy pasakmi dotyczą gradientu pH i długości pasków. Zwykle stosuje się gradient o przedziale od pH 3 do pH 10. Dostępne są również węższe gradienty kwasowe o zakresie pH 4-7 lub pH 3-7, jak również zasadowe o zakresie pH 6-11 lub pH 6-9. Zakres pH pasków może być znacznie węższy, np. pH 4,5-5,5, a nawet węższy, jeśli jest potrzebny. Zastosowanie w IEF pasków o wąskich, nachodzących na siebie gradientach (np. 4-5, 4,5-5,5, 5-6, 5,5-6,7 i 6–9), a następnie usunięcie powtarzających się fragmentów, pozwala poprawić rozdzielczość [12] i zwiększyć detekcję protein o słabej ekspresji [10, 11]. W proteomice zwykle używa się najdłuższych możliwych pasków, czyli o długości 18 cm lub 24 cm, aby po przeprowadzeniu elektroforezy w obu wymiarach otrzymać żele rozmiaru około 20 cm na 20 cm. Tak wysoka rozdzielczość żeli jest niezbędna do separacji wszystkich białek z danego proteomu. Krótkie paski, o długości 7 cm, nadają się bardzo dobrze do sprawdzenia poprawności przygotowania eksperymentu.

Tuż przed użyciem paski muszą zostać nawodnione, za pomocą dołączonego preparatu, dzięki czemu odzyskują pierwotną grubość 0,5 mm i są gotowe do wprowadzenia próbki. Paski żelowe różnią się dość mocno między sobą, nie tylko ze względu na długość czy gradient. Żele o dużych porach są zwykle stosowane do wyeliminowania efektu sita lub artefaktów spowodowanych różnicą w tempie migracji protein różnych rozmiarów.

Nie bez znaczenia dla eksperymentu są stosowane preparaty. Wiadomo, że muszą mieć one odpowiednie właściwości. Detergenty stosowane w badaniu IEF muszą być obojętne elektrycznie. Można stosować tylko detergenty niejonowe albo tzw. obojnacze (zwitterjonowe). Jednak jonowe detergenty, jakie jak SDS (*sodium dodecyl sulfate* – laurylosiarczan sodu), mogą być użyte do przygotowanie próbki, w celu lepszego rozpuszczenia i ułatwienia usunięcia składników wchodzących w reakcję w dalszej części eksperymentu. Małe ilości SDS mogą być tolerowane podczas badania IEF, pod warunkiem dostarczenia dużych ilości mocznika i niejonowych lub zwitterjonowych detergentów, co zapewnia całkowite usunięcie SDS podczas eksperymentu IEF. Większe ilości SDS muszą zostać usunięte przed przystąpieniem do IEF [18].

Próbkę do żelu można wprowadzić na co najmniej trzy sposoby. Jedna z możliwości to wymieszanie preparatu do nawadniania paska z próbką i nasączenie taką mieszaniną suchego paska. Ponieważ pory paska są początkowo bardzo wąskie, jako pierwsze znajdą się w nich: woda, mocznik, detergent i środek redukujący, a dopiero później proteiny. Taki sposób wprowadzania próbki jest bardzo czasochłonny (zajmuje nawet ponad 12 godzin). Cała procedura powinna się odbywać w temperaturze około 20 °C [16].

Pozostałe metody wymagają wcześniejszego nasączenia paska żelowego przeznaczonym do tego celu środkiem. Do nasączonego paska próbkę można wprowadzić za pomocą pojemnika umieszczonego blisko jednego z końców paska (np. tuż przed anodą). Na końcach paska zamocowane są elektrody, a pasek ułożony jest żelem do góry. Między paskiem a elektrodami umieszczone są papierowe filtry nasączone wodą destylowaną, tak żeby elektrody były wilgotne, ale nie mokre. Do pojemnika wprowadza się próbkę i włącza prąd. Próbka jest zatem wprowadzana za pomocą elektroforezy.

Ostatni ze stosowanych sposobów pozwala na wprowadzenie do paska o długości 18 cm większych ilości próbki niż poprzednie (do 5 mg protein). Jest to aktywna metoda wprowadzania próbki. Pomiędzy jedną z elektrod (np. anodą) a pa-

skiem żelowym umieszcza się papierowy pasek nasączony próbką (nawet 500 μL). Jeśli próbka ładowana jest od strony anody, należy ją odsunąć możliwie daleko od paska IPG, a katodę umieścić blisko przeciwnego końca. Duża ilość próbki wymaga położenia pomiędzy katodą a paskiem IPG sporego fragmentu papieru do pochłaniania nadmiaru wody, która wydziela się jako efekt „pocenia się" żelu pod wpływem płynącego prądu. Elektrody – jak poprzednio – umieszczone są na nawilżonych wodą destylowaną filtrach papierowych.

Im dłuższy pasek IPG i im węższy gradient pH, tym dłużej przebiega proces badania metodą pierwszego wymiaru 2-DE. Zbyt krótkie obrazowanie spowoduje powstanie poziomych smug. Zbyt długie obrazowanie wywoła wydzielanie się wody na powierzchni paska. To prowadzi do zaburzonych wzorców proteinowych, poziomych smug na zasadowym końcu żelu i utraty części protein. Jeśli drugi wymiar nie może być przeprowadzony zaraz po IEF, to pasek powinien zostać natychmiast zamrożony w temperaturze -70 °C [16].

Obrazowanie w drugim wymiarze – SDS-PAGE

Rozdzielone ze względu na różne pI proteiny w drugim wymiarze elektroforezy separuje się ze względu na ich masę cząsteczkową (rys. 1). Do separacji niezbędne jest zapewnienie hydrofobowym proteinom środowiska, które będzie pozbawione wody, dzięki czemu proteiny zostaną rozproszone i przestaną tworzyć skupiska. Dodatkowo trzeba naładować cząsteczki proporcjonalnie do ich masy cząsteczkowej. Substancją, która pozwala na takie działanie, jest laurylosiarczan sodu (*sodium dodecyl sulfate* – SDS). SDS to anionowy detergent, którego zadaniem w elektroforezie jest denaturacja i ujemne naładowanie protein w zależności od ich masy. Efektem elektroforezy proteomu (mającego stały ładunek na jednostkę masy) po przyłączeniu SDS jest podział protein ze względu na ich masę. Tak jak w eksperymencie w pierwszym wymiarze, na dwóch końcach żelu umieszczane są elektrody, a proces rozdzielania białek zaczyna się, gdy włączony zostanie prąd. Wędrówka proteiny kończy się, gdy staje się ona obojętna elektrycznie.

Do przeprowadzenia eksperymentu posłużą paski, na których znajdują się rozdzielone ze względu na pI białka. Paski są przytwierdzane do płytki żelowej, w której będzie miał miejsce eksperyment w drugim wymiarze. Gdy wszystko jest już przygotowane, włączany jest prąd i rozpoczyna się separacja protein. Pole elektryczne powoduje, że negatywnie naładowane proteiny migrują przez żel w stronę anody. W zależności od rozmiaru białka będą w różny sposób przemieszczały się przez siatkę żelu. Mniejsze proteiny łatwiej przenikają przez pory żelu, natomiast większe mogą mieć z tym trudności i przez to poruszają się wolniej. Eksperyment trwa zwykle od kilku do kilkunastu godzin. Czas trwania eksperymentu zależy od natężenia prądu przyłożonego do żelu: wyższe natężenie powoduje szybszy przebieg elektroforezy, ale daje gorszej jakości wyniki (smużenie). Natomiast zbyt małe natężenie nie rozdzieli cząstek. Po ustalonym czasie proteiny znajdą się w różnych miejscach żelu, zależnie od ich masy cząsteczkowej. Mniejsze proteiny przebędą dłuższą drogę wewnątrz żelu, podczas gdy większe pozostaną bliżej miejsca, z którego rozpoczęły wędrówkę. Z tego powodu proteiny mogą być separowane ze względu na rozmiar, a tym samym masę cząsteczkową [18].

Eksperyment elektroforetyczny przeprowadzany jest w specjalnym aparacie oraz przy zapewnieniu odpowiedniego środowiska. W celu zapewnienia odpowiednich warunków przygotowuje się kationowy i anionowy roztwór buforowy o ustalonym pH i stałej sile jonowej. Warunki są tak ustalane, aby molekuły miały taki sam ładunek, a tym samym przemieszczały się w tym samym kierunku.

Badanie SDS-PAGE może się odbywać w systemach pionowych bądź poziomych. Paski IPG po zakończonym IEF są przytwierdzane do płytki żelowej. W przypadku systemu poziomego niezbędna jest dodatkowa warstwa żelu do optymalnego przejścia protein z paska do żelu na płytce. System pionowy nie wymaga dodatkowej warstwy żelu.

Elektroendosmoza

Na obrazach żeli często obserwujemy występowanie smug i zamazanych, nieostrych fragmentów. Przyczyną takiego smużenia są naładowane cząsteczki znajdujące się w żelu lub na powierzchni szklanych płytek, które ujawniają się w polu elektrycznym podczas przeprowadzania eksperymentu. W obecności zasadowego lub neutralnego bufora zostają zjonizowane, a następnie w polu elektrycznym są przyciągane prze anodę (podczas badania SDS–PAGE). Ponieważ takie naładowane cząsteczki są na stałe umieszczone w macierzy żelowej, więc ich przemieszczanie nie jest możliwe. Równowaga fizykochemiczna musi jednak zostać zachowana i dlatego jony hydroniowe wędrują w stronę katody. Takie zachowanie nazywane jest elektoendosmozą [18].

W przypadku elektroforezy obserwujemy przepływ wody wraz z proteinami w stronę katody, czego niepożądanym efektem są niewyraźnie fragmenty obrazów żeli. Może to być również przyczyną trudności w przemieszczeniu protein z pasków IPG do drugiego wymiaru podczas elektroforezy (czasem obserwuje się „ginięcie" protein pomiędzy wymiarami).

Wpływ jakości nieobrobionych danych na jakość dalszej analizy żeli

W analizie 2-DE jakość surowych danych (obrazów przed jakimkolwiek przetwarzaniem) ma znaczny wpływ na otrzymane wyniki. Precyzyjne wykonanie eksperymentu jest zatem kluczowe dla dokładnej analizy ilościowej badanej próbki. Warto wobec tego zebrać informacje o konsekwencjach, jakie niosą ze sobą, z pozoru drobne błędy czy przeoczenia podczas wykonywania eksperymentu elektroforezy.

Z punktu widzenia analizy komputerowej obrazów żeli największym błędem jest przecenianie możliwości komputerów. Komputer nie jest w stanie usunąć błędów, które powstały podczas przeprowadzania eksperymentu. Dostarczając do analizy obrazy żeli zawierające artefakty, dużą liczbę smug lub obrazy o bardzo ciemnym tle i małym kontraście, zmienia się właściwości plam, a tym samym uniemożliwia wykonanie poprawnej analizy. Zaburzenia żelu mogą zmieniać proteiny (obcinać je), dodatkowe plamki powodują błędy na etapie detekcji plam białkowych lub zaburzają ich charakterystyki. Szumy mogą uniemożliwić detekcję słabych plam, ciemne tło zmniejsza zakres dostępnych poziomów szarości, będących odwzorowaniem natężenia [19]. Oprogramowanie nie powinno wykorzystywać do analizy danych, które nie są jednoznaczne. Jeśli można zapobiec powstaniu szumów, artefaktów, smug lub innych elementów obrazu, które nie są plamami proteinowymi, to warto poświęcić na to czas i energię. Efektem będzie bardziej precyzyjna analiza badanych próbek, a tym samym bardziej wiarygodne wyniki.

Elektroendosmoza jest – obok artefaktów – jednym z najczęściej pojawiających się efektów, uniemożliwiających dokładną analizę obrazu. Z powodu przemieszczających się razem z białkami niepożądanych cząsteczek nie jest możliwe precyzyjne oszacowanie rozmiaru białka. Rozmiar białka w takim przypadku jest szacowany z dużym błędem. Utrudnione jest również wycięcie (zwłaszcza ręczne) pojedynczej proteiny do dalszych badań.

Większość dostępnych na rynku programów do analizy 2-DE pozwala na ręczną modyfikację obrazów, co ułatwia usunięcie zbędnych obiektów. Wymaga to jednak rozróżnienia szczegółów obrazu, które mogą – lub nie – mieć wpływ na

dalszą analizę. Istnieje wiele metod przetwarzania obrazów, których powinno się unikać. Nie należy dokonywać zmian, które zmienią wyniki analizy (np. usuwanie fragmentów tła). Nie wolno też usuwać żadnych plam proteinowych, a czasem trudno je odróżnić od artefaktów. Bez obaw można obracać obrazy lub obcinać fragmenty obrazu, które nie są interesujące dla badacza. Inaczej mówiąc, wszystkie operacje, które nie zmieniają natężenia w analizowanym obrazie, są bezpieczne. Problemu nie stwarzają też operacje liniowe, które bez trudu można odwrócić. Nie powodują one utraty informacji [19]. W celu ułatwienia rozróżnienia dopuszczalnych modyfikacji i tych, których nie należy stosować, wystarczy nie wykonywać żadnych manipulacji na obrazach poza programami dedykowanymi do analizy obrazu 2-DE. Jeśli nie pozwalają one na wykonanie pewnych operacji, które dostępne są w programach do obróbki obrazu, to najprawdopodobniej ze względu na specyfikę danych. Przykłady takich modyfikacji to korekcja gamma, wyrównanie histogramu czy eksport do formatów powodujących utratę informacji.

Barwienie próbek i wizualizacja plam proteinowych

Analiza plam możliwa jest dzięki wprowadzeniu do żelu substancji, która przywiera do protein i pozwala na ich wizualizację w odpowiednim świetle. Idealny barwnik łączy się z białkami w ilości liniowo zależnej od masy cząsteczek. Barwnik nie powinien przywierać do żelu ani żadnych substancji [19]. Ważne jest też, żeby pozwalał na detekcję bardzo małych ilości białek, ponieważ różnice w koncentracji w próbkach biologicznych mogą sięgać nawet sześciu rzędów wielkości [20]. Niepożądanym efektem jest saturacja, która utrudnia późniejszą normalizację i charakteryzację. W praktyce, w zależności od użytego barwnika, tylko białka o silnej ekspresji są wizualizowane.

Najczęściej do barwienia protein używa się pochodnych srebra, bądź barwnika o nazwie *Coomassie Brilliant Blue* (CBB). Metoda wybarwiania za pomocą CBB zyskała popularność ze względu na niewygórowaną cenę oraz kompatybilność z większością metod stosowanych po analizie techniką 2-DE, w tym ze spektrometrią mas. Jednak zastosowanie do detekcji CBB uniemożliwia analizę białek o słabej ekspresji, ze względu na małą wrażliwość barwnika (barwnik nie przylega w wystarczającej ilości do takich protein). Inaczej wygląda zastosowanie pochodnych srebra. Jest ono znacznie bardziej wrażliwe niż CBB, dzięki czemu można wizualizować cząsteczki o słabej ekspresji. Niestety metody barwienia srebrem nie są stechiometryczne. Są one również znacznie mniej powtarzalne niż CBB, przez co utrudniają ilościową analizę danych [21]. Dodatkowo barwienie najbardziej wrażliwymi pochodnymi srebra uniemożliwia późniejszą spektrometrię mas.

Od pewnego czasu powszechna stała się substancja Sypro Ruby [22], która jest bardziej wrażliwa niż srebro oraz nie utrudnia późniejszej analizy za pomocą MS [23, 24]. Lepsze i bardziej pewne wyniki, zarówno jeśli chodzi o wrażliwość, jak i dynamikę, uzyskuje się w oparciu o barwniki fluorescencyjne oraz radioaktywne [25], połączone z bardzo wrażliwymi, elektronicznymi technikami detekcji [16, 26]. Mają one jednak pewne ograniczenia. Fluorescencyjne barwniki cyjaninowe stosowane są z dużym powodzeniem w technice elektroforetycznej DIGE, a techniki radioaktywne – pomijając względy bezpieczeństwa – są bardzo kosztowne [27].

Wizualizacja plam proteinowych następuje w takim świetle, w jakim widoczny jest dostarczony wraz z próbką barwnik. W przypadku barwienia srebrem i Coomassie Blue plamy proteinowe są dobrze widoczne w świetle dziennym. Jeśli wprowadzone zostały barwniki cyjaninowe, do wizualizacji wyników eksperymentu potrzebne jest światło ultrafioletowe o wskazanej dla danego barwnika długości fali. Barwniki zostały opisane szczegółowo w pracach [19, 28-30].

Modyfikacje posttranslacyjne (PTM)

Sekwencjonowanie genomu nie pozwala uzyskać informacji na temat modyfikacji posttranslacyjnych protein (*posttranslational modifications* – PTM). Najważniejsze modyfikacje posttranslacyjnych to fosforylacja [31] i glikozylacja [16]. Detekcja i charakteryzacja PTM jest jednym z zadań proteomiki. Metoda 2-DE jest w stanie zlokalizować PTM, ponieważ często uwidaczniają się jako wyraźne rzędy plam w jednym z kierunków elektroforezy. Analiza ilościowa fosfoprotein na próbce bakterii została opisana w pracy [32]. Więcej informacji dotyczących metod detekcji PTM w 2-DE znajduje się w pracach [33-38].

Cyfrowy obraz żelu

Bezpośrednie porównywanie żeli między sobą bez użycia jakichkolwiek narzędzi nie jest możliwe. Żele szybko zmieniają swoje właściwości, dlatego niezbędne jest dokładne ich odwzorowanie na obraz cyfrowy. Zapis obrazów żeli w postaci cyfrowej odbywa się za pomocą specjalistycznego skanera lub kamery.

Wybór urządzenia, które będzie rejestrowało obraz żelu, zależy od systemu stosowanego do wizualizacji. Kamery CCD czy densytometry są dobrymi urządzeniami ogólnego zastosowania, ponieważ pozwalają na wizualizację żeli po zastosowaniu różnych barwników. Jednak są one bardziej podatne na efekt przesycenia skali niż na przykład laserowe densytometry, które dla odmiany potrzebują więcej czasu do zarejestrowania obrazu. Dodatkowo trzeba zwrócić uwagę na rozdzielczość urządzenia, która nie powinna być mniejsza niż 16 bitów przy zapisie danych i analogicznie przy odczycie wartości natężenia. Densytometry laserowe czy fluorescencyjne systemy zapisu obrazów to zwykle maszyny mogące odczytać 105 wartości intensywności i zapisujące 216 poziomów do pliku zawierającego obraz żelu. Niestety systemy fluorescencyjne są dedykowane dla barwników fluorescencyjnych, typowych dla techniki DIGE (*difference gel electrophoresis*) i nie nadają się do stosowania z innymi rodzajami barwników. Więcej informacji na temat zapisu obrazów żeli i technik do tego stosowanych można znaleźć w pracach [39-42].

Formaty plików do przechowywania obrazów żeli

Najbardziej powszechnym, niededykowanym formatem obrazów otrzymywanych metodą 2-DE jest 16-bitowy format TIFF. Taki format daje możliwość zapisu 216, czyli 65 536 poziomów natężenia skali szarości. Natomiast urządzenia rejestrujące są w stanie odczytać z żelu nawet 100 000 poziomów intensywności. Dlaczego więc nie wykorzystuje się informacji tak szczegółowej, skoro jest ona dostępna? Najlepszym argumentem jest porównanie wyników analizy obrazów 16- i 32-bitowych. Analiza obrazów 32-bitowych nie daje zauważalnie lepszych wyników przy znacznie większych wymaganiach sprzętowych, programowych i czasowych. Algorytmy pracujące na danych graficznych 16- i 32-bitowych dają niemal identyczne rezultaty przy nieporównywalnym czasie działania.

Rozważmy przykład. Dobrej jakości obraz żelu to macierz o rozmiarach około 2000 na 2000 punktów. Każdy element takiej macierzy to 16 bitów danych. Mnożąc ilość elementów macierzy przez ilość zajmowanego przez każdy element miejsca w pamięci, otrzymujemy rozmiar pliku. Dla plików 16-bitowych będzie to $2000^2 \cdot 16 = 8$ MB na obraz. Analogicznie dla plików 32-bitowych będzie to $2000^2 \cdot 32$, czyli 16 MB. Seria

obrazów do przeanalizowania z jednego eksperymentu to zwykle od kilku do kilkunastu sztuk. Przy projektowaniu programu zawsze trzeba brać pod uwagę najgorszą opcję, co dla danych pochodzących z matody DIGE (*difference gel electrophoresis*) potraja ilość zajmowanego miejsca (każdy żel daje trzy obrazy). Przyjmując, że eksperyment składa się z 20 obrazów uzyskanych techniką DIGE, do analizy należy wczytać 60 obrazów. Wykorzystanie zapisu 32-bitowowego oznacza prawie gigabajt samych danych wejściowych. Algorytmy stosowane do przetwarzania obrazów muszą przechowywać w pamięci wyniki przynajmniej części obliczeń. Część danych jest kopiowana, inne dane są przetwarzane, a następnie porównywane z pierwotnymi. Dlatego nie jest możliwe analizowanie serii tak dużych plików na typowych komputerach. Należy też pamiętać, że czas potrzebny na przeprowadzenie analizy często nie rośnie liniowo, a wykładniczo względem wielkości danych.

Zatem jak zmniejszyć ilość informacji, nie pozwalając jednocześnie na utratę ważnych danych podczas rejestracji obrazu żelu? Do tego celu stosowana jest kompresja danych. Format GEL, który został stworzony specjalnie do zapisu obrazów żeli 2-DE, używa algorytmu, który oblicza pierwiastek kwadratowy z odczytanej przez urządzenie rejestrujące wartości, dzięki czemu można zapisać informację na 16 bitach pamięci. Odwzorowanie to wymaga zaokrąglania dużej części wyników, co oznacza, że niektóre dane zostaną utracone. Jest to jednak optymalny sposób kompresji, ponieważ najmniejsze wartości natężenia mają najciemniejsze punkty obrazu, czyli fragmenty plam proteinowych, które mają bardzo silną ekspresję. Są to fragmenty obrazu, które bez względu na zastosowaną kompresję pozostaną bardzo dobrze widoczne. Białka o małej ekspresji są jasnymi plamami na obrazie, a wartości natężenia odpowiadające ich ekspresji są duże. Oznacza to, że najwięcej informacji tracimy w przypadku dobrze widocznych punktów, a najmniej dla punktów bardzo jasnych. Inaczej mówiąc, białka o słabej ekspresji zostaną odwzorowane znacznie lepiej niż białka o silnej ekspresji, a taka sytuacja powoduje, że dalsza analiza może odbyć się bez obawy o poprawność otrzymanych wyników.

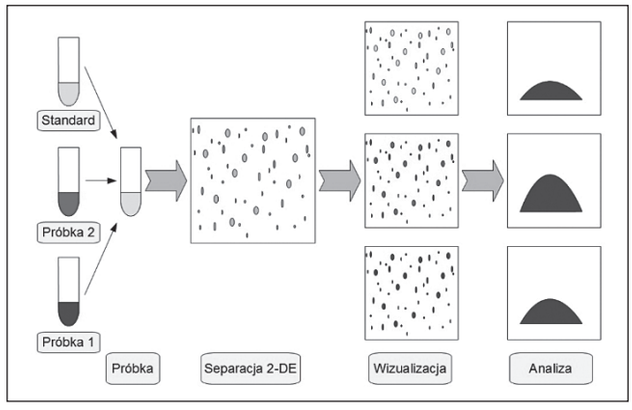
Większość systemów do analizy pozwala na eksport obrazów w formatach GIF, JPG, BMP i innych. Nie są to jednak pliki, jakie powinny być wczytywane do oprogramowania analizującego. Te formaty nie pozwalają na przechowywanie tak szczegółowej informacji, jak TIFF czy GEL. Są to tak zwane formaty stratne. Obcinają one dużą część informacji, stosując kompresję danych (jest to inna kompresja niż w przypdku formatu GEL). Po zastosowaniu kompresji pliki zajmują znacznie mniej miejsca w pamięci, ale nie nadają się do wiarygodnej analizy. Należy unikać wykonywania analizy obrazów 2-DE na plikach innych niż przeznaczone do tego celu.

Wycinanie protein

Po zakończeniu komputerowej analizy obrazów żeli znane jest położenie białek, które mają zostać poddane dalszej analizie. Kolejnym etapem jest wycięcie protein z płytki żelowej. Wycinanie najczęściej odbywa się ręcznie. Nie jest to bardzo efektywny sposób, gdyż jest narażony na błędy ze strony człowieka. Dlatego zostały stworzone specjalne roboty, które wycinają proteiny na podstawie danych dostarczonych przez program do analizy obrazów żeli. Z programu dostarczana jest informacja o położeniu i wielkości plamy, a robot precyzyjnie pobiera żądany fragment żelu wraz ze znajdującą się w nim proteiną bądź proteinami. Bardzo ważne jest więc, aby żel nie zmienił swoich właściwości do czasu uruchomienia robota. Uzyskuje się to, unieruchamiając płytki żelowe na przykład na podkładce ze szkła, dzięki czemu nie kurczą się [18].

Technika DIGE

Technika DIGE (*difference gel electrophoresis*) opiera się na etykietowaniu próbek przed przystąpieniem do 2-DE za pomocą jednego z trzech fluorescencyjnych barwników cyjaninowych: Cy2, Cy3 lub Cy5 [43]. Metoda pozwala na poddanie eksperymentowi równocześnie trzech próbek. Przyjęto, że dwie próbki oraz mieszanina wszystkich próbek biorących udział w eksperymencie (*pooled internal standard*) są separowane wewnątrz jednego żelu. Próbka, będąca mieszaniną, jest później punktem odniesienia do normalizacji danych zawartych w obrazach i znacznie ułatwia analizę porównawczą. Wizualizacja odbywa się za pomocą różnej długości fal świetlnych, zależnej od barwników. Wszystkie próbki są poddawane elektroforezie w identycznych warunkach [36, 44], dzięki czemu metoda pozwala ominąć problemy z dopasowywaniem do siebie poszczególnych protein, gdyż znajdują się one dokładnie w tych samych miejscach. Schemat eksperymentu przedstawia rys. 2. Technika DIGE pozwala dwukrotnie zmniejszyć liczbę żeli, które należy poddać elektroforezie w danym eksperymencie, jednocześnie zwiększając wiarygodność wyników poprzez uwzględnienie próbki standardowej. Zaletą metody jest również jej pełna kompatybilność ze spektrometrią mas [45]. Jest to najbardziej precyzyjna metoda dostarczająca danych do analizy porównawczej.



Rys. 2 Schemat eksperymentu przeprowadzanego techniką DIGE. Próbka poddawana separacji w jednym żelu składa się z trzech wymieszanych próbek: standardu, czyli mieszaniny wszystkich próbek pochodzących z eksperymentu, próbki pierwszej (np. kontrolnej) i próbki drugiej (np. eksperymentalnej). Wizualizacja każdej z próbek odbywa się z użyciem innej długości fal świetlnych, dzięki czemu powstają trzy obrazy, każdy dla jednej z próbek. Następnie analizuje się uzyskane obrazy próbki kontrolnej i eksperymentalnej (analiza porównawcza) oraz całą serię obrazów (np. analiza wariancji biologicznej)

Wybarwianie za pomocą barwników cyjaninowych nie ma wpływu na pI cząsteczek, ale ujawnia się w Mr. Ze względu na wpływ na próbki, należy używać jak najmniejszych ilości barwników. W praktyce tylko 3-5% protein zawartych w próbce jest oznakowanych. Wzrost Mr bywa problemem przy wycinaniu plam do dalszej analizy innymi technikami proteomicznymi, np. spektrometrią mas [46].

W wyniku eksperymentów przeprowadzanych techniką DIGE mamy do czynienia z trzema obrazami (trzy próbki i barwniki) dla każdego żelu [47]. Schemat analizy takich obrazów różni się nieznacznie od schematu analizy w klasycznym eksperymencie. Nie ma zasadniczych różnic w stosowanych algorytmach. Większość zmian dotyczy rodzaju danych. Sposób planowania eksperymentów DIGE opisano w pracy [48].

Podsumowanie

Proteomika od lat rozwija się bardzo intensywnie [49]. Analiza proteomu jako ostatniego poziomu ekspresji genów rozpoczęła się właśnie dzięki metodzie 2-DE [50]. Mimo powstania wielu nowych technik i podejść, dwuwymiarowa elektroforeza żelowa jest jednak wciąż jedną z niezastąpionych technik proteomiki i jako taka wymaga ogromnych nakładów pracy, aby otrzymywane wyniki były jeszcze bardziej precyzyjne, a analiza przebiegała prościej i szybciej. Ostatnia dekada pozwoliła na wprowadzenie wielu udogodnień dla badaczy posługujących się tą metodą.

Zaliczają się do nich: gotowe paski IPG, urządzenia pozwalające wykonywać eksperymenty w obu wymiarach nawet dla 20 próbek równocześnie, technika DIGE itd. To tylko część usprawnień związana z samym eksperymentem. Wciąż jednak brakuje pełnej automatyzacji zarówno eksperymentu, jak i działania oprogramowania. Otrzymywanie dokładniejszych wyników przybliża naukowców do połączenia wiedzy poteomicznej z genomiczną, transkryptomiczną i metabolomiczną i w efekcie konstrukcji modeli opisujących złożone systemy biologiczne. ■

Literatura

1. T. Rabilloud: *Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains*, Proteomics, vol. 2, 2002, s. 3-10.
2. K.K. Challapalli, C. Zabel, J. Schuchhardt, A.M. Kaindl, J. Klose, H. Herzel: *High reproducibility of large-gel two-dimensional electrophoresis*, Electrophoresis, vol. 25, 2004, s. 3040-3047.
3. S.M.N. Hunt, M.R. Thomas, L.T. Sebastian, S.K. Pedersen, R.L. Harcourt, A.J. Sloane, M.R. Wilkins: *Optimal replication and the importance of experimental design for gel-based quantitative proteomics*, Journal of Proteome Research, vol. 4(3), 2005, s. 809-819.
4. K. Lee, K. Pi, H.G. Lee: *Influence of gel dimensions on resolution and sample throughput on two-dimensional gels*, Biochemistry, vol. 73, 2008, s. 427-431.
5. M.P. Molloy: *Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients*, Analytical Biochemistry, vol. 280, 2000, s. 1-10.
6. A. Suchwałko H. Podbielska: *Dwuwymiarowa elektroforeza żelowa: od eksperymentu po profile ekspresji. Część druga – analiza obrazu*, Inżynieria Biomedyczna – Acta Bio--Optica et Informatica Medica, vol. 16, 2010, w druku.
7. P. Jungblut, B. Thiede, U. Zimny-Arndt, E.C. Müller, C. Scheler, B. Wittmann-Liebold, A. Otto: *Resolution power of two-dimensional electrophoresis and identification of proteins from gels*, Electrophoresis, vol. 17, 1996, s. 839--847.
8. M.C. Pietrogrande, N. Marchetti, F. Dondi, P.G. Righetti: *Spot overlapping in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis separations: a statistical study of complex protein maps*, Electrophoresis, vol. 23, 2002, s. 283-291.
9. M.C. Pietrogrande, N. Marchetti, F. Dondi, P. G. Righetti: *Spot overlapping in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis maps: relevance to proteomics*, Electrophoresis, vol. 24, 2003, s. 217-224.
10. J.A. Westbrook, J.X. Yan, R. Wait, S.Y. Welson, M.J. Dunn: *Zooming-in on the proteome: very narrow-range immobilised pH gradients reveal more protein species and isoforms*, Electrophoresis, vol. 22, 2001, s. 2865-2871.
11. R. Wildgruber, A. Harder, C. Obermaier, G. Boguth, W. Weiss, S.J. Fey, P.M. Larsen, A. Görg: *Towards higher resolution: Two-dimensional Electrophoresis of Saccharomyces cerevisiae proteins using overlapping narrow immobilized pH gradients*, Electrophoresis, vol. 21, 2000, s. 2610-2616.
12. A. Görg, W. Postel, A. Domscheit, S. Günther: *Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients of leaf proteins from barley (Hordeum vulgare): method, reproducibility and genetic aspects*, Electrophoresis, vol. 9, 1988, s. 681-692.
13. W. Weiss A. Görg: *Sample solublization buffers for two-dimensional electrophoresis*, Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), vol. 424, 2008, s. 35-42.
14. A.B.T. de Marqui, A. Vidotto, G.M. Polachini, C.D.M. Bellato, H. Cabral, A.M. Leopoldino, J.F. de Góis Filho, E.E. Fukuyama, F.A.P. Settanni, P.M. Cury, G.O. Bonilla-Rodriguez, M.S. Palma, E. H. Tajara: *Solubilization of proteins from human lymph node tissue and two-dimensional gel storage*, Journal of Biochemistry and Molecular Biology, vol. 39, 2006, s. 216-222.
15. L. Castellanos-Serra, D. Paz-Lago: *Inhibition of unwanted proteolysis during sample preparation: evaluation of its efficiency in challenge experiments*, Electrophoresis, vol. 23, 2002, s. 1745-1753.
16. A. Görg, W. Weiss, M.J. Dunn: *Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics*, Proteomics, vol. 4, 2004, s. 3665-3685.
17. M. Eravci, S. Fuxius, O. Broedel, S. Weist, S. Eravci, U. Mansmann, H. Schluter, J. Tiemann, A. Baumgartner: *Improved comparative proteome analysis based on two-dimensional gel electrophoresis*, Proteomics, vol. 7, 2007, s. 513--523.
18. R. Westermeier, T. Naven, H. Höpker: *Proteomics in practice: a guide to successful experimental design*, Wiley-VCH, 2008.
19. M. Berth, F.M. Moser, M. Kolbe, J. Bernhardt: *The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images*, Applied microbiology and biotechnology, vol. 76, 2007, s. 1223-1243.
20. G.L. Corthals, V.C. Wasinger, D.F. Hochstrasser, J.C. Sanchez: *The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research*, Electrophoresis, vol. 21, 2000, s. 1104-1115.
21. P. Sinha, J. Poland, M. Schnölzer, T. Rabilloud: *A new silver staining apparatus and procedure for matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis of proteins after two-dimensional electrophoresis*, Proteomics, vol. 1, 2001, s. 835-840.
22. J.C. Nishihara K.M. Champion: *Quantitative evaluation of proteins in one- and two-dimensional polyacrylamide gels using a fluorescent stain*, Electrophoresis, vol. 23, 2002, s. 2203--2215.
23. K. Lilley: *Two-dimensional gel electrophoresis: recent advances in sample preparation, detection and quantitation*, Current Opinion in Chemical Biology, vol. 6, 2002, s. 46-50.
24. M.F. Lopez, K. Berggren, E. Chernokalskaya, A. Lazarev, M. Robinson, W.F. Patton: *A comparison of silver stain and SYPRO Ruby Protein Gel Stain with respect to protein detection in two-dimensional gels and identification by peptide mass profiling*, Electrophoresis, vol. 21, 2000, s. 3673-3683.
25. A.J. Link: *Autoradiography of 2-D gels*, Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), vol. 112, 1999, s. 285-290.
26. S.D. Patterson G.I. Latter: *Evaluation of storage phosphor imaging for quantitative analysis of 2-D gels using the Quest II system*, BioTechniques, vol. 15, 1993, s. 1076-1083.
27. H. Boucherie, A. Massoni, C. Monribot-Espagne: *Radiolabeling for two-dimensional gel analysis*, Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), vol. 424, 2008, s. 125-135.
28. T. Rabilloud: *Detecting proteins separated by 2-D gel electrophoresis*, Analytical chemistry, vol. 72, 2000, s. 48A-55A.
29. W. Weiss, F. Weiland, A. Görg: *Protein detection and quantitation technologies for gel-based proteome analysis*, Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), vol. 564, 2009, s. 59--82.

30. W.F. Patton: *Detection technologies in proteome analysis*, Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences, vol. 771, 2002, s. 3-31.
31. J. Reinders A. Sickmann: *State-of-the-art in phosphoproteomics*, Proteomics, vol. 5, 2005, s. 4052-4061.
32. C. Eymann, D. Becher, J. Bernhardt, K. Gronau, A. Klutzny, M. Hecker: *Dynamics of protein phosphorylation on Ser/Thr/Tyr in Bacillus subtilis*, Proteomics, vol. 7, 2007, s. 3509-3526.
33. A.K. Bendt, A. Burkovski, S. Schaffer, M. Bott, M. Farwick, T. Hermann: T*owards a phosphoproteome map of Corynebacterium glutamicum*, Proteomics, vol. 3, 2003, s. 1637-1646.
34. D. Kalume: *Tackling the phosphoproteome: tools and strategies*, Current Opinion in Chemical Biology, vol. 7, 2003, s. 64-69.
35. M. Mann, O.N. Jensen: *Proteomic analysis of post-translational modifications*, Nature Biotechnology, vol. 21, 2003, s. 255-261.
36. N.H. Packer, M.S. Ball, P.L. Devine: *Glycoprotein detection of 2-D separated proteins*, Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), vol. 112, 1999, s. 341-352.
37. A. Paradela, J.P. Albar: *Advances in the analysis of protein phosphorylation*, Journal of Proteome Research, vol. 7, 2008, s. 1809-1818.
38. K. Löster, C. Kannicht: *2D-electrophoresis. Detection of glycosylation and influence on spot pattern*, Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), vol. 194, 2002, s. 301-316.
39. H.Y. Tan, T.W. Ng, O.W. Liew: *Effects of light spectrum in flatbed scanner densitometry of stained polyacrylamide gels*, BioTechniques, vol. 42, 2007, s. 474-478.
40. K. Miura: *Imaging and detection technologies for image analysis in electrophoresis*, Electrophoresis, vol. 22, 2001, s. 801-813.
41. K. Miura: *Imaging technologies for the detection of multiple stains in proteomics*, Proteomics, vol. 3, 2003, s. 1097-1108.
42. M.D. Miller, R.A. Acey, L.Y.T. Lee, A.J. Edwards: *Digital imaging considerations for gel electrophoresis analysis systems*, Electrophoresis, vol. 22, 2001, s. 791-800.
43. A. Alban, S.O. David, L. Bjorkesten, C. Andersson, E. Sloge, S. Lewis, I. Currie: *A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard*, Proteomics, vol. 3, 2003, s. 36-44.
44. N.B. Larbi, C. Jefferies: *2D-DIGE: comparative proteomics of cellular signalling pathways*, Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), vol. 517, 2009, s. 105-132.
45. J.X. Yan, A.T. Devenish, R. Wait, T. Stone, S. Lewis, S. Fowler: *Fluorescence two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry based proteomic analysis of Escherichia coli*, Proteomics, vol. 2, 2002, s. 1682-1698.
46. J. Shaw, R. Rowlinson, J. Nickson, T. Stone, A. Sweet, K. Williams, R. Tonge: *Evaluation of saturation labelling two-dimensional difference gel electrophoresis fluorescent dyes*, Proteomics, vol. 3, 2003, s. 1181-1195.
47. G. Van den Bergh, L. Arckens: *Protein profiling based on two-dimensional difference gel electrophoresis*, Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), vol. 439, 2008, s. 211--224.
48. N.A. Karp, K.S. Lilley: *Maximising sensitivity for detecting changes in protein expression: experimental design using minimal CyDye*s, Proteomics, vol. 5, 2005, s. 3105-3115.
49. M.R. Wilkins, R.D. Appel, J.E. van Eyk, M.C.M. Chung, A. Görg, M. Hecker, L.A. Huber, H. Langen, A.J. Link, Y.-K. Paik, S.D. Patterson, S.R. Pennington, T. Rabilloud, R.J. Simpson, W. Weiss, M.J. Dunn: *Guidelines for the next 10 years of proteomics*, Proteomics, vol. 6, 2006, s. 4-8.
50. P.H. O'Farrell: *High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins*, The Journal of Biological Chemistry, vol. 250, 1975, s. 4007-4021.

otrzymano / received: 05.05.2010 r.
zaakceptowano / accepted: 26.06.2010 r.