

METODA DVOUROZMĚRNÉ DIFERENČNÍ GELOVÉ ELEKTROFORÉZY (2-D DIGE) A JEJÍ VYUŽITÍ V PROTEOMICE

PAVEL VÍTÁMVÁS, KLÁRA KOSOVÁ,
ZBYNĚK ŠKODÁČEK a ILJA TOM PRÁŠIL

*Oddělení genetiky a šlechtitelských metod, Výzkumný ústav
rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně
Prasil@vurv.cz*

Došlo 15.4.09, přijato 24.10.09.

Klíčová slova: 2-D DIGE, fluorescenční barviva
CyDyesTM, kvantitativní porovnání proteinů, proteomika

Obsah

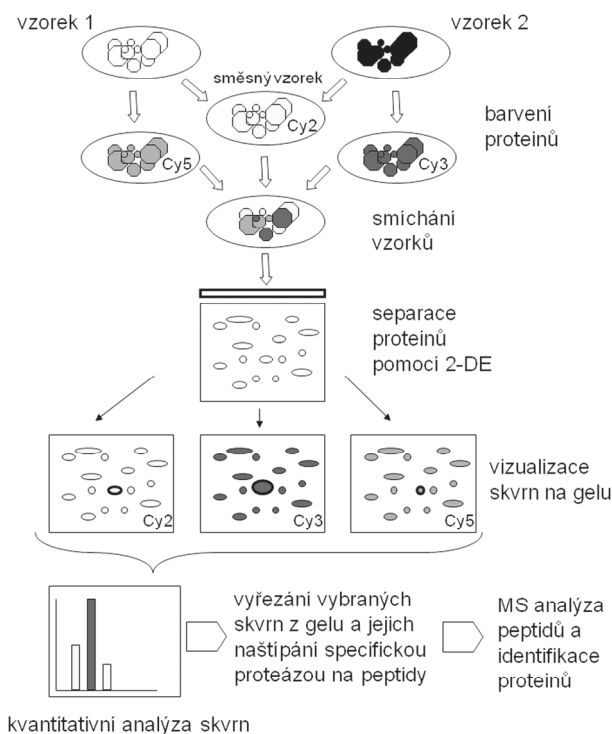
1. Úvod. Stručná charakterizace 2-D DIGE metody
2. Cyaninová fluorescenční barviva CyDyesTM
3. Barvení vzorků
4. Analýza DIGE gelů a identifikace proteinů
5. Výhody (a nevýhody) 2-D DIGE

1. Úvod. Stručná charakterizace 2-D DIGE metody

Dvourozměrná diferenční gelová elektroforéza (2-D DIGE) je moderní modifikace dvourozměrné gelové elektroforézy (2-DE)^{1–3}, která využívá ke značení proteinových vzorků fluorescenčních barviv CyDyesTM (GE Healthcare, Little Chalfont, Velká Británie) a která byla vyvinuta v 90. letech 20. století⁴. O srovnání metody 2-D DIGE s jinými variantami 2-DE viz např.^{4–7}. Užití až tří barviv CyDyes ke značení proteinových vzorků před jejich dělením umožňuje nanášet na jeden gel, resp. jeden proužek s imobilizovaným pH gradientem (IPG proužek) dva různé vzorky a navíc ještě směsný vzorek (obr. 1). Tento vzorek vznikne smísením všech vzorků, s nimiž pracujeme v daném experimentu, a slouží jako interní standard. Tak je výrazně eliminován problém kvantifikace proteinových skvrn v jednotlivých vzorcích, resp. problém opakovatelnosti dvourozměrných gelů, který je hlavním problémem klasické dvourozměrné elektroforézy. Možnost kvantitativně porovnávat dva vzorky v jednom gelu současně spolu s přítomností interního standardu představuje hlavní výhodu 2-D DIGE oproti 2-DE, kde se na jeden IPG proužek nanáší pouze jeden vzorek. 2-D DIGE tak umožňuje rozvíjet a realizovat strategii expresní a srovnávací proteomiky tím, že daleko precizněji porovnává a kvantifikuje změny v proteinové expresi u dvou rozdílných vzorků na jednom

gelu.

Shodně jako u 2-DE se vybrané proteiny, separované na gelu v tzv. proteinových skvrnách, identifikují hmotnostní spektrometrií (MS). O využití metod MS v proteomice viz např. cit.⁸. Na velkých gelech (24 cm velký IPG proužek) lze detegovat až několik tisíc nejčastějších proteinových skvrn v závislosti na vzorku. To už představuje významnou část proteomu, zvláště pokud se jedná o jeho určitou frakci – subproteom (jaderný, mitochondriální, plastidový, membránový, fosfoproteom apod.). V současnosti je 2-D DIGE jedna z vhodných a dostupných proteomických metod, která umožňuje nejen kvantifikovat a identifikovat tisíce proteinů najednou, ale také kvantifikovat různé post-translační modifikace těchto

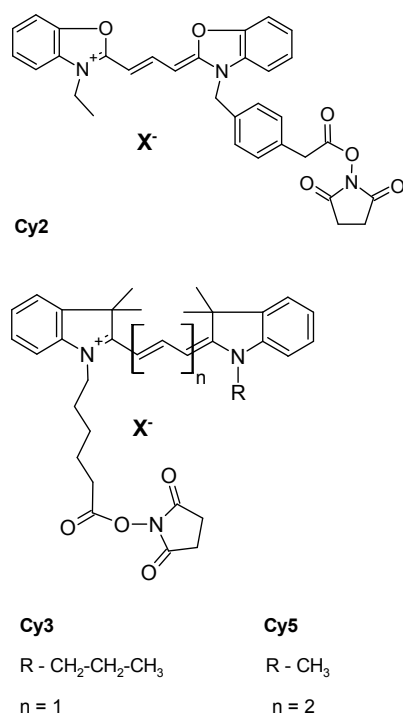


Obr. 1. Celkové schéma uspořádání proteomického experimentu s analýzou proteinů pomocí 2-D DIGE. Před dvourozměrnou elektroforézou se dva vzorky proteinů a jeden směsný vzorek použité jako interní standard označí rozdílnou fluorescenční značkou pomocí CyDye barviv. Tyto vzorky se společně rozdělí na témže gelu a pak se analyzují při třech rozdílných vlnových délkách. Lze tak zjistit kvalitativní a kvantitativní rozdíly proteinových vzorků mezi sebou při minimalizaci problémů spojených s reprodukovatelností elektroforetických analýz. Vybrané skvrny vykazující rozdílnou kvantitu mezi vzorky se následně vyřezou z gelu a proteiny obsažené v jednotlivých skvrnách se identifikují hmotnostní spektrometrií

proteinů díky rozdílné pohyblivosti jejich skvrn na dvou-rozměrných gelech. Přehled proteomických metod je uveden např. v cit.⁹.

2. Cyaninová fluorescenční barviva CyDyes

Barviva CyDyes jsou nízkomolekulární cyaninová barviva používaná ke značení vzorků nanášených na jeden IPG proužek před isoelektrickou fokusací (IEF; 1. rozměr 2-D DIGE). Cyaninová barviva obsahují fluorofor, který způsobuje fluorescenci barviva. Jedná se o funkční skupinu na bázi aromatických heterocyklických struktur obsahujících vždy jeden či více atomů N, případně ještě atomy O nebo S jako heteroatomy – např. pyrol, indol, imidazol, pyridin, chinolin, thiazol. Tyto struktury jsou spojeny methinovými můstky a dohromady vytváří systém konjugovaných dvojných vazeb¹⁰. Cyaninová barviva se vyskytují i v přírodě – např. fykobilinová barviva sinic (*Cyanobacteria*), ruduch (*Rhodophyta*) a skrytěnek (*Cryptophyta*), červený fykoerytrin (u ruduch *R-fykoerytrin*), modrá barviva fykocyanin a allofykocyanin, která slouží jako sběrné fotosyntetické pigmenty¹¹ anebo bilinová (žlučová) barvi-



Obr. 2. Strukturní vzorce barviv Cy2, Cy3 a Cy5 pro minimální barvení podle ^{4,13} a jejich semisystematické názvy podle ¹⁹: Cy2, (3-(4-karboxymethyl)fenylmethyl)-3'-ethyloxakarbocyaninhalid *N*-hydroxysukcinimidylester; Cy3, (1-(5-karboxypentyl)-1'-propylindokarbocyaninhalid *N*-hydroxysukcinimidylester; Cy5, (1-(5-karboxypentyl)-1'-methylindodikarbocyaninhalid *N*-hydroxysukcinimidylester; X⁻ – halogenidový anion

va bilirubin a biliverdin, která vznikají v hepatocytech jako produkty degradace hemoglobinu¹². Fluoroforem těchto přírodních cyaninových barviv jsou lineární tetrapyrrolové struktury spojené methinovými můstky.

Naproti tomu barviva CyDyes byla připravena synteticky: barviva Cy3 a Cy5 byla poprvé připravena skupinou Ůnlü a spol.⁴ z Carnegie Mellon University, kteří licenci na syntézu těchto barviv prodali firmě Amersham Biosciences, jež se posléze stala součástí firmy GE Healthcare. Tato firma později (viz např. cit.¹³) připravila třetí barvivo Cy2. V současnosti jsou všechna barviva Cy2, Cy3 a Cy5 registrovanou značkou firmy GE Healthcare. Molekula každého barviva CyDye se skládá ze tří částí – fluoroforu, spojovací části (tzv. linker) a reaktivní části, jež je nezbytná pro navázání barviva na určitý aminokyselinový zbytek v molekule proteinu vzorku (obr. 2).

Fluorofor tvoří u barviv Cy3 a Cy5 dvě indolová jádra spojená třemi (Cy3), resp. pěti (Cy5) methinovými skupinami CH; u barviva Cy2 je u obou indolových jader atom C v pozici β vzhledem k N nahrazen atomem O a obě heterocyklické struktury jsou spojeny rovněž třemi methinovými skupinami. Spojovací část je alifatický řetězec u barviv Cy3 a Cy5 a benzenové jádro u barviva Cy2. Reaktivní část se liší podle typu barviva, resp. cílového aminokyselinového zbytku (viz dále). Různá délka methinového řetězce ve fluoroforu je kompenzována odlišnou délkou postranního alifatického řetězce navázaného na fluorofor (ethyl u Cy2, *n*-propyl u Cy3, methyl u Cy5), díky čemuž je celková relativní molekulová hmotnost (Mr) všech tří barviv velmi podobná. Téměř shodná relativní molekulová hmotnost barviv je důležitá pro značení proteinů. Fluorofor barviva nese jednotkový náboj na N atomu heterocyklu; barviva jsou tedy běžně dostupná ve formě halidových solí.

Fluorescenční barviva CyDyes mají vzájemně se nepřekrývající absorpční a emisní spektra – viz specifičtější listy k fluorescenčním barvivům CyDyes (GE Healthcare). Proto lze snímat samostatně jednotlivé vzorky. Barvivo Cy2, které se obvykle používá ke značení směsného vzorku používaného jako interní standard, emituje ve žluté oblasti viditelného spektra (absorpční maximum v dimethylformamidu (DMF) 491±3 nm; emisní maximum v DMF 506±5 nm). Barvivo Cy3 emituje v červené oblasti viditelného spektra (absorpční maximum v DMF 552±3 nm; emisní maximum v DMF 572±5 nm) a barvivo Cy5 má emisní maximum v modré oblasti viditelného spektra (absorpční maximum v DMF 648±3 nm; emisní maximum v DMF 669±5 nm). Barviva jsou citlivá na světlo, proto se uchovávají v tmavých tubách, a i při manipulaci s obarvenými vzorky a gely je třeba se vyvarovat jejich expozice na přímém světle. Další unikátní vlastností sady barviv CyDyes (Cy2, Cy3 a Cy5) je jejich téměř shodná relativní molekulová hmotnost Mr: Mr (Cy2 – kation) = 550,59; Mr (Cy3 – kation) = 582,76; Mr (Cy5 – kation) = 580,74. To znamená, že po navázání molekuly fluorescenčního barviva na molekulu proteinu se molekulová hmotnost komplexu protein-barvivo změní pro daný protein vždy o přibližně stejnou hodnotu, ať už se na daný

protein naváže barvivo Cy2, Cy3 nebo Cy5. Tato vlastnost barviv CyDyes je důležitá pro následnou identifikaci separovaných proteinů hmotnostní spektrometrií.

3. Barvení vzorků

Příprava vzorku pro 2-D DIGE se významně neliší od přípravy vzorku pro 2-DE (o přípravě vzorku pro 2-DE viz např. cit.¹⁴). Odlišný je pouze krok obarvení vzorku – označení proteinů ve vzorku fluorescenčním barvivem před smísením vybraných vzorků a jejich nanesením na IPG proužek. Pro správné kvantitativní obarvení vzorku je třeba stanovit koncentraci proteinů ve vzorku. K tomu lze využít některých klasických metod stanovení koncentrace proteinů, např. metody podle Bradfordové¹⁵, barvení proteinů pomocí amidočerně¹⁶ atd. V naší laboratoři s výhodou používáme stanovení koncentrace proteinů pomocí kitu „2D Quant Kit“ (GE Healthcare, Piscataway, USA). Proteinový vzorek se před barvením rozpustí v tzv. lyzačním pufru, jehož základní složení se výrazně neliší od rehydratačního pufru používaného k rehydrataci IPG proužků před IEF a také k rozpouštění a ředění neznárodných proteinových vzorků před 2-DE. Např. v manuálu GE Healthcare¹⁷ je uvedeno doporučené složení lyzačního pufru 30 mM tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), 7 M močovina, 2 M thiomočovina, 4 % (w/v) 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonio]propan-1-sulfonát (CHAPS), pH 8,5.

Před barvením je zapotřebí barviva CyDyes nejprve rozpustit v čistém bezvodém DMF. Fluorescenční barviva se na protein váží kovalentní vazbou na určité aminokyselinové zbytky. Podle údajů firmy GE Healthcare jsou fluorescenční barviva CyDyes připravována ve formě reaktivního esteru s *N*-hydroxysukcinimidem (NHS), konjugátu s maleinimidem anebo ve formě hydrazidu, což umožňuje jejich kovalentní vazbu na primární aminoskupiny, thiolové skupiny anebo aldehydové skupiny. Rozlišují se dva způsoby barvení vzorku – tzv. minimální barvení (minimal labelling) a tzv. saturační barvení (saturation labelling)^{17–19}. Barviva CyDyes ve formě esteru s *N*-hydroxysukcinimidem mohou vytvořit kovalentní amidovou vazbu s ϵ -aminoskupinou lysinu při minimálním barvení anebo tatáž barviva ve formě konjugátu s maleinimidem tvoří kovalentní thioetherovou vazbu s thiolovou skupinou cysteinu při saturačním barvení. Při saturačním barvení je v tomto případě mechanismus vzniku kovalentní vazby mezi barvivem a proteinem odlišný: ke vzniku kovalentní vazby mezi thiolovou skupinou -SH cysteinu a mezi barvivem je využita dvojná vazba maleinimidu a ten se na rozdíl od *N*-hydroxysukcinimidu při reakci neuvolňuje. Při minimálním barvení se v ideálním případě váže jedna molekula fluorescenčního barviva na jednu molekulu proteinu, a to na aminokyselinu lysin. Lysin je poměrně často se vyskytující aminokyselina v proteinech. Při saturačním barvení se v ideálním případě váží molekuly fluorescenčního barviva na všechny zbytky aminokyseliny cysteinu v molekule proteinu, což je poměrně vzácná aminokyselina.

Po vazbě jedné molekuly barviva CyDye na lysin se celkový náboj proteinu (a tím i isoelektrický bod pI proteinu) nemění, neboť jeden kladný náboj lysinu je za podmínky buněčného pH nahrazen jedním kladným nábojem cyaninového fluoroforu barviva. U barviva používaného při saturačním barvení, které se váže na cystein (cysteinový zbytek nenese při buněčném pH elektrický náboj), je jednotkový kladný náboj indolového jádra fluoroforu vykompenzován jednotkovým záporným nábojem sulfonové skupiny ($-\text{SO}_3^-$) navázané v poloze 5 na indolové jádro, čímž se celkový elektrický náboj barviva nemění. Proto se po navázání barviva celkový náboj komplexu barvivo-protein, a tedy i jeho isoelektrický bod v případě minimálního i saturačního barvení proteinů nemění. Minimální barvení se obvykle používá pro experimenty, u kterých není problém získat vzorek s dostatečnou koncentrací proteinů, většinou více než 30 μg . Saturační barvení se naopak používá pro značení velmi vzácných vzorků, u kterých je problém s koncentrací proteinů, např. vzorky získané laserovou mikrodisekcí tkáně (2,7 až 6,6 μg /vzorek – viz²⁰). Pro minimalizování případného preferenčního navázání jednoho druhu barviva na daný protein je doporučováno během experimentu prohodit Cy3 a Cy5 mezi biologickými opakováními. Spotřeba barviv je při metodě minimálního barvení opravdu velice nízká – na označení 50 mg proteinu je třeba jen 400 pmol barviva, zatímco u saturačního barvení je potřeba 100 nmol barviva na 5 mg proteinu. Komerčně dostupný kit pro saturační barvení od GE Healthcare obsahuje pouze barviva Cy3 a Cy5.

V případě minimálního barvení proteinových vzorků probíhá reakce navázání NHS esteru barviva na primární aminoskupinu mechanismem acylace primární aminoskupiny za uvolnění NHS. Konkurenční reakcí je ve vodných roztocích hydrolýza NHS esteru, jejíž rychlost však značně závisí na pH roztoku. Snížení pH roztoku nežádoucí hydrolýzu NHS esteru barviva značně urychluje. Proto se pro barvení doporučuje změřit pH hydratačního pufru, v němž je proteinový vzorek rozpuštěn, a případně ho zvýšit až na hodnotu 8,5 pomocí opatrného přidávání zředěného roztoku NaOH (50 mM). Je rovněž důležité, aby lyzační pufr, v němž probíhá minimální barvení, obsahoval pouze chaotropní činidla (močovina, thiomočovina) a detergenty nebo surfaktanty (CHAPS), které umožňují solubilizaci špatně rozpustných hydrofobních proteinů a zabraňují jejich precipitaci na IPG proužku. Naopak neměl by obsahovat amfolyty, jejichž primární aminoskupiny by byly konkurenční k primární aminoskupině lysinu při navázání barviva, a rovněž redukční činidla, např. dithiothreitol (DTT). Tato činidla se přidávají až do rehydratačního pufru, což je pufr, který je používán k rehydrataci IPG proužku a který se obvykle přidává ke vzorku rozpuštěnému v lyzačním pufru až po skončení barvení. Přidání rehydratačního pufru umožňuje také vzorek naedit na koncentraci vhodnou pro nanášení na IPG proužek.

Po inaktivaci nenavázaných barviv se jednotlivé vzorky s navázanými barvivy CyDyes smísí a společně se nanášejí na IPG proužek. K inaktivaci barviv stačí přídavek 1 μl 10 mM lysinu k reakční směsi, kde dojde

k vyvázávání volného barviva na přidaný lysin. Isoelektrická fokusace a i následný 2. rozměr (separace na SDS-PAGE gelech) se od 2D SDS-PAGE neliší. Odlišná je pak následná detekce separovaných proteinů.

4. Analýza DIGE gelů a identifikace proteinů

K detekci a vyhodnocení separovaných proteinů se využívá laserový fluorescenční scanner nebo fluorescenční CCD-kamera. Speciálním softwarem (např. programy DeCyder od GE Healthcare anebo PDQuest od Bio-Rad, Hercules, USA) se provádí kvalitativní hodnocení na základě hodnot pI a MW a kvantitativní hodnocení proteinových skvrn.

Data získaná densitometrickou analýzou proteinových skvrn představují velice robustní vícedimenzionální soubory dat, kde hodnocená veličina – hustota proteinových skvrn, je proměnnou závisící na větším počtu nezávisle proměnných. K hodnocení tohoto typu dat se používá nejčastěji shluková (klastrová) analýza anebo analýza hlavních komponent. Při metodě hlavních komponent se počet nezávisle proměnných redukuje na menší počet nově konstruovaných proměnných, což někdy může výrazně ovlivnit variabilitu daného souboru dat, a tím i správné klastrování dat²¹.

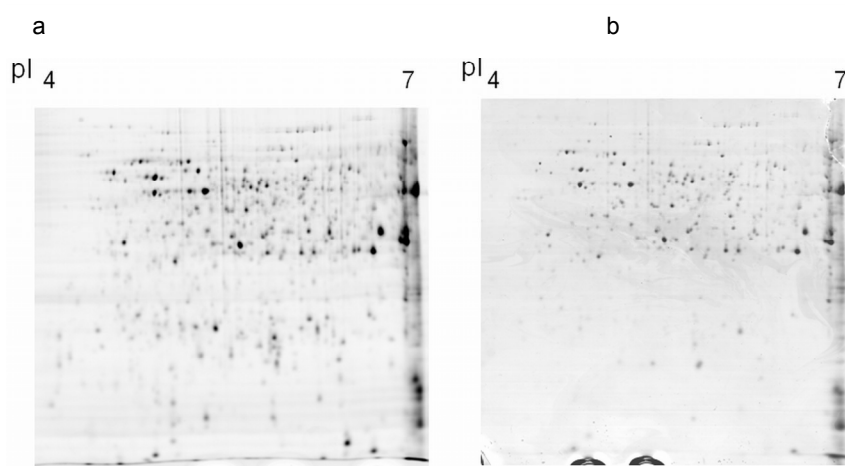
Soubor barviv používaných pro minimální (i saturační) barvení zvyšuje hmotnost značeného proteinu ve všech případech o velmi podobnou hodnotu. V případě minimálního barvení se hmotnost proteinu značeného Cy2 zvyšuje o 434 Da, hmotnost stejného proteinu značeného Cy3 se zvyšuje o 466 Da a v případě značení Cy5 se jedná o 464 Da; v případě saturačního barvení se hmotnost proteinu po označení Cy3 zvyšuje o 686 Da, po označení Cy5 o 684 Da. Tato vlastnost barviv CyDyes je důležitá pro správnou identifikaci stejných proteinů značených různými

barvivy pomocí MS. S využitím MS lze v zásadě vybrat a identifikovat všechny viditelné separované proteinové skvrny na gelu. Avšak pro velké množství skvrn (několik tisíc) a často i kvůli vyšší ceně za identifikaci jednoho proteinu na doporučeném tandemovém MS (MS/MS; např.²²) je nutné zúžit výběr proteinových skvrn vhodných pro MS/MS identifikaci. Proteinové skvrny vhodné pro identifikaci se většinou selektují na základě analýzy hlavních komponent nebo analýzy rozptylu, kdy se vybírají např. skvrny, které se svou hustotou liší např. minimálně 1,5krát ($P = 0,05$) aspoň v jedné variantě experimentu.

Pro vyřezávání vybraných proteinů je třeba gely dobarvit (tzv. post-staining) např. barvivy Deep Purple Total Protein Stain (GE Healthcare, Little Chalfont, Velká Británie) anebo stříbrem (AgNO_3) či Coomassie Brilliant Blue G-250 proto, aby byly skvrny detegovatelné např. CCD kamerou. Následně se pomocí trypsinu vyřezané proteiny naštipou na peptidy, které se identifikují metodou MS (např. MALDI-TOF/TOF, LC-MS/MS) a prohledáním proteinových a EST (Expressed Sequence Tag) databází vhodným programem (např. MASCOT, www.matrixscience.com). Identifikované proteiny se následně charakterizují dle jejich molekulární a biologické funkce či výskytu pomocí vhodných internetových nástrojů (např. www.geneontology.org; www.genome.jp/kegg; www.uniprot.org) či prohledáním vědecké literatury.

5. Výhody (a nevýhody) 2D-DIGE

Nevýhodou 2-D DIGE, oproti „klasické“ 2-DE, jsou vyšší počáteční náklady na pořízení fluorescenčního scanneru nebo CCD kamery a dále pak na pořízení fluorescenčních barviv CyDyes pro označení proteinových vzorků. Tato investice se vrátí díky tomu, že metoda 2-D DIGE oproti klasické 2-DE umožňuje, při stejném množ-



Obr. 3. Srovnání detekce proteinových skvrn pomocí CyDye a stříbra. Proteiny byly rozděleny na 24 cm IPG proužcích (Bio-Rad) a 12,5 % polyakrylamidových gelech. a) proteiny vizualizované pomocí Cy2, 30 μg proteinů, b) proteiny vizualizované pomocí stříbra, 250 μg proteinů

ství vzorků, provádět daleko menší počet elektroforetických analýz. Tím se výrazně snižuje doba a množství elektroforéz nutných pro daný experiment. Současná analýza dvou vzorků na jednom a tom samém gelu spolu s interním standardem navíc značně usnadňuje kvantitativní porovnávání jednotlivých proteinových vzorků a také do značné míry přispívá k řešení problému reprodukovatelnosti 2-DE gelů. Díky existenci interního standardu je možné vynechat technické opakování biologického vzorku, které je jinak nutné minimálně třikrát opakovat. Pro srovnání, v naší laboratoři bylo nutné pro 6 odrůd pšenice, odebíraných ve čtyřech rozdílných termínech pokusu a po třech biologických opakováních (tj. pro 72 vzorků), provést 36 DIGE, zatímco u klasicky barvených gelů by bylo nutné provést minimálně 216 2-DE (72 × 3) (obr. 3).

Další velkou výhodou je vysoký dynamický rozsah a citlivost 2-D DIGE. Barvení pomocí barviv CyDyes umožňuje detegovat jen 125 pg proteinu a kvantifikovat proteiny, jejichž koncentrace se liší v rozsahu více než 4 řádů. Naproti tomu barvením stříbrem lze detegovat 1 až 60 ng proteinu a to v menším než stonásobném dynamickém rozsahu (www4.gelifesciences.com).

Jistou nevýhodou 2D-DIGE je závislost značení proteinových vzorků na přítomnosti určitých aminokyselinových zbytků. Je celkem logické, že při použití techniky minimálního barvení nelze detegovat proteiny, které ve svých molekulách neobsahují lysin, a naopak při saturačním barvení nelze detegovat proteiny, které nemají cystein.

Seznam použitých zkratk

2-D DIGE	dvourozměrná diferenční gelová elektroforéza
2-DE	dvourozměrná gelová elektroforéza
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl) dimethylamonio]propan-1-sulfonát
DMF	dimethylformamid
DTT	dithiothreitol
IEF	isoelektrická fokusace
IPG proužek	proužek obsahující polyakrylamidový gel s imobilizovaným pH gradientem
LC	kapalinová chromatografie
MALDI-TOF/TOF	tandemový hmotnostní spektrometr (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – tandem Time Of Flight)
MS	hmotnostní spektrometrie
NHS	N-hydroxysukcinimid
pI	isoelektrický bod
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza s využitím dodecylsulfátu sodného
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan

Tato práce byla podpořena projekty MŠMT OC08066, MZe 0002700604 a GA ČR GP522/09/P621.

LITERATURA

1. Klose J.: *Humangenetik* 26, 231 (1975).
2. O'Farrell P.H.: *J. Biol. Chem.* 250, 4007 (1975).
3. Scheele G. A.: *J. Biol. Chem.* 250, 5275 (1975).
4. Ünlü M., Morgan M. E., Minden J. S.: *Electrophoresis* 18, 2071 (1997).
5. Bouchal P., Kučera I.: *Chem. Listy* 97, 29 (2003).
6. Kovářová H.: *Chem. Listy* 99, 886 (2005).
7. Thelen J.J., v knize: *Plant Proteomics*, (Šamaj J., Thelen J. J., ed.), str. 1. Springer-Verlag, Berlin 2007.
8. Řehulka P., Řehulková H., Chmelík J.: *Chem. Listy* 101, 279 (2007).
9. Chmelík J.: *Chem. Listy* 99, 883 (2005).
10. IUPAC Compendium of chemical terminology. 2nd Edition (1997) – <http://www.iupac.org/goldbook/C01487.pdf> – staženo 10.3. 2009
11. Kalina T.: *Systém a vývoj sinic a řas*. Skriptum PřF UK, Karolinum, Praha 1994.
12. Murray R. K., v knize: *Harperova biochemie*, (Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W., ed.), str. 354, 2. vydání. Nakladatelství H+H, Praha 1998.
13. Tonge R., Shaw J., Middleton B., Rowlinson R., Rayner S., Young J., Pognan F., Hawkins E., Currie I., Davison M.: *Proteomics* 1, 377 (2001).
14. Váňa P., Šmarda J.: *Chem. Listy* 98, 1130 (2004).
15. Bradford M. M.: *Anal. Biochem.* 72, 248 (1976).
16. Schaffner W., Weissman C.: *Anal. Biochem.* 56, 502 (1973).
17. GE Healthcare: *Amersham CyDye DIGE flours (minimal dyes) for Ettan DIGE*. Product Booklet, GE Healthcare, Little Chalfont 2009.
18. GE Healthcare: *Amersham CyDye DIGE Fluor Labeling Kit for Scarce Samples*. Product Booklet, GE Healthcare, Little Chalfont 2009.
19. Marouga R., David S., Hawkins E.: *Anal. Bioanal. Chem.* 382, 669 (2005).
20. Kondo T., Seike M., Mori Y., Fujii K., Yamada T., Hirohashi S.: *Proteomics* 3, 1758 (2003).
21. Yeung K. Y., Ruzzo W. L.: *Bioinformatics* 17, 763 (2001).
22. Renaut J., Hausman J.-F., Wisniewski M. E.: *Physiol. Plant.* 126, 97 (2006).

P. Vítámvás, K. Kosová, Z. Škodáček, and I. T. Prášil (*Department of Genetics and Plant Breeding, Crop Research Institute, Prague*): **The Method of Two-Dimensional Differential Gel Electrophoresis and Its Application in Proteomics**

Two-dimensional differential gel electrophoresis (2-D DIGE) is a modification of the well-known two-dimensional method (2-DE). The new method enables

separation of two protein samples on one 2-D gel thus avoiding problems associated with reproducibility of 2-D gels and makes it possible to compare different samples. The only extra step in 2-D DIGE is sample labelling with cyanine fluorescent dyes (CyDyesTM). Two types of labelling are used: with succinimidyl esters and with maleimide derivatives of the dyes to label lysine and cysteine residues, respectively. For detection and quantification of protein spots in gels, a special fluorescent scanner or

a CCD camera are required. From densitometric analysis of 2-D DIGE gels, sets of multidimensional data are obtained, which are then analysed by statistical methods. Protein spots can be cut from 2-D DIGE gels and further analysed by MS. The 2-D DIGE method affords much better quantification of proteins in samples. The separation of two samples at a time leads to a large reduction in the used amount of 2-D gels.



JUBILEJNÍ 20. CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ KONFERENCE S MEZINÁRODNÍ ÚČASTÍ

APROCHEM 2011

**TECHNOLOGIE • ROPA • PETROCHEMIE • POLYMERY • BEZPEČNOST • PROSTŘEDÍ
11. – 13. DUBEN 2011 • KOUTY NAD DESNOU • JESENÍKY • HOTEL DLOUHÉ STRÁNĚ**

APROCHEM 2011 • PCHE • Na Dračkách 13, 162 00 Praha 6

T/F: 220 518 698, M: 607 671 866 • E: pcche@csvts.cz • www.aprochem.cz

Připravuje PCHE s ČSPCH, ČSCH, ČSCHl, VŠCHT Praha, SCHP ČR, ÚCHP AV ČR.

ODPADOVÉ FÓRUM 2011

6. ROČNÍK ČESKO-SLOVENSKÉHO SYMPOSIA

VÝSLEDKY VÝZKUMU A VÝVOJE PRO ODPADOVÉ HOSPODÁŘSTVÍ

OZE 2011 • 2. ročník konference ALTERNATIVNÍ ENERGIE

13. – 15. DUBEN 2011 • KOUTY NAD DESNOU • JESENÍKY • HOTEL DLOUHÉ STRÁNĚ

Připravuje CEMC – České ekologické manažerské centrum, Jevanská 12, 100 31 Praha 10

T: 274 784 448, 723 950 237 • F: 274 775 869 • E: symposium@cemc.cz • www.odpadoveforum.cz

**DOPROVODNÉ TECHNICKÉ VÝSTAVKY. FIREMNÍ PREZENTACE A LOGA
v tištěných materiálech a na CD ROM**

1. Cirkulář v září 2010. Přihlášky přednášek do 15. 1. 2011. Plná znění do 15. 3. 2011.
2. Cirkulář s Programem v únoru 2011. Přihlášky účasti budeme prosit do 31. 3. 2011.

**Registrace na jedné akci umožní účast na obou za výhodných podmínek.
Nepřehlédněte místo konání opět v Koutech nad Desnou, Jeseníky. Sledujte web.**

Zveme Vás k účasti a těšíme se na společné setkání.