

Mintaelőkészítés tömegspektrometriára

Ahhoz, hogy az eredményeket értelmezni tudjuk, ismernünk kell a minta előéletét. Tudnunk kell miből, hogyan lett izolálva, milyen fehérjékkel, vegyszerekkel találkozott, mit mutatott a kontroll. Például az ellenanyag mellé becsúszhat más fehérje is: a táptalajból némi marha szérum kerülhet a preparátumba, a biotinra kihegyezett oszlop elengedheti az avidint. Oxidáló anyagok hatására szulfoxid lesz a metioninból, ciszteinsav a ciszteinből, egy vagy két oxigént fesszed a triptofán is. Karbamid oldatban való melegítés vagy hosszas tárolás az N-terminális és a Lys-oldalláncok karbamoilezéséhez vezethet. Ha proteáz inhibitorok nélkül izolálunk, rágott lesz a fehérjénk, foszfatáz inhibitorok nélkül elveszítjük a módosítást.

Általános megjegyzések, észrevételek.

- Ne tároljunk kis mennyiségű peptidet, fehérjét üvegedényben!
- Használjuk a legkisebb szükséges térfogatú, kónikus tárolóedényeket, például 0,5 ml-es eppendorf csöveket! Tapasztalataink szerint az Eppendorf Protein LoBind illetve a Safe-Lock mikrocentrifuga csövei megfelelő minőségűek.
- A nem megfelelően karbantartott, szennyezett liofilizáló, vagy vákuumcentrifuga is elszennyezheti a mintánkat pl. polimerekkel.
- Célszerű a legnagyobb tisztaságú vegyszerekkel dolgoznunk.
- Oda kell figyelni mindenre, ami érintkezik a mintánkkal, beleértve a munkaasztalt és a tároló edényeket is.
- Azonosítani csak azt a fehérjét tudjuk, amely szerepel valamelyik adatbázisban (leginkább a UniProt adatbázist használjuk). Ha különleges fajból származó mintákat kell vizsgálnunk, sokat segíthet a publikus/letölthető speciális adatbázisokról kapott információ.
- Poszt-transzlációs vagy egyéb kovalens módosítások jellemzéséhez pontosan ismernünk kell a módosított fehérje szekvenciáját. Ilyen analízishez jóval több minta szükséges mint fehérje azonosításhoz, és sokat segít, ha a minta kevésbé szennyezett más fehérjékkel.

Peptidek, fehérjék oldatban - Ajánlott minta koncentrációk:

Peptidekből néhány pikomol/μl, fehérjékből pedig 10-20 pikomol/μl az ideális koncentráció. Az oldatokban esetleg jelenlévő detergensok, sók és egyéb adalékanyagok megnehezítik, esetleg ellehetetlenítik a sikeres analízist. Legjobb az anyagokat víz és minimális mennyiségű acetonitril keverékében feloldani. Jó, ha az oldószer tartalmaz 0,1-1% hangyasavat. (Víz, ACN, HCOOH HPLC-minőségű). Fehérjékre a legmegbízhatóbb mennyiségi meghatározás az aminosav analízis. A színreakción alapuló eljárásoknál nem ritka a fehérjemennyiség 10-szeres túlbecslése.

Fehérjék gélben

- 2D-gélelektroforézis esetén célszerű az izoelektromos fókuszálás után derivatizálni a cisztein szulfhidril csoportokat pl. jód-acetamiddal. Így

megelőzhetjük, hogy akrilamid addíciónáljon a fehérjére, továbbá a random diszulfidhidak képződését is.

- MS-kompatibilis gél-festést kell alkalmazni – pl. Pierce™ Silver Stain for Mass Spectrometry, EZBlue™ Gel Staining Reagent (SigmaAldrich).
- Soha ne használjunk púderezett gumikesztyűt! Kb. 8x annyi fehérje oldódik ki belőle, mint a púdermentesből. A jó kesztyű grammonként nem tartalmaz 50 µg-nál több vízzel extrahálható fehérjét. A nitril kesztyűk még jobbak!
- Humán keratin a leggyakoribb gélszennyezés, amely az analízist igen megnehezíti, olykor lehetetlenné teszi. Ennek elkerülésére néhány ötletünk:
 - * Próbáljuk az oldatokat akkor elkészíteni, amikor kevesen vannak a laborban!
 - * Már a vegyszerek bemérésekor viseljük kesztyűt, lehetőleg a sebészek által viselt sapkát és lemosható műanyag köpenyt vagy ruhaujjat!
 - * Ha lehet, a festést, kiértékelést, foltok kivágását is akkor végezzük, amikor nem nagy a mozgás a laborban, vagy egy túlnyomásos fülke alatt, amit előzőleg roppant gondosan kiürítettünk és kitakarítottunk (m)etanollal.
 - * A kivágott géldarabokat Eppendorf csőben, lehetőleg HPLC tisztaságú desztillált vízben 4 °C-on tárolhatjuk.
 - * Semmiképpen ne fagyasszuk le a géldarabokat!

Mielőtt munkához látna, kérjük vegye fel velünk a kapcsolatot az eredményesebb együttműködés érdekében!