

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

OPTIMALIZACE PŘÍPRAVY VZORKU PRO DVOUROZMĚRNOU ELEKTROFORÉZU

PETR VÁŇA a JAN ŠMARDA*

Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, Katedra genetiky a molekulární biologie, Kotlářská 2, 611 37 Brno
smarda@sci.muni.cz, petr_vana@centrum.cz

Došlo 6.5.04, přijato 15.9.04.

Klíčová slova: proteomika, dvourozměrná elektroforéza, příprava vzorku, solubilizace

Obsah

1. Úvod
 - 1.1. Dvourozměrná elektroforéza: charakteristika a význam v proteomice
 - 1.2. Experimentální postup při 2-DE a příprava vzorku
 - 1.3. Možnosti a význam solubilizace vzorku
2. Experimentální část
 - 2.1. Chemikálie a přístroje
 - 2.2. Buněčná linie BM2
 - 2.3. Příprava vzorku a rehydratace IPG stripu
 - 2.4. Isoelektrická fokusace, ekvilibrace, SDS-PAGE, vizualizace a analýza obrazu
3. Výsledky a diskuse
4. Závěr

1. Úvod

1.1. Dvourozměrná elektroforéza: charakteristika a význam v proteomice

Vysokorozlišovací dvourozměrná elektroforéza (2-DE), která spojuje isoelektrickou fokusaci (IEF) v prvním rozměru s polyakrylamidovou gelovou elektroforézou v přítomnosti natrium-dodecyl-sulfátu (SDS-PAGE) v rozměru druhém, je vhodnou metodou pro separaci proteinů v komplexních vzorcích před jejich identifikací hmotnostní spektrometrií^{1,2}. Metoda 2-DE proto předsta-

vuje klíčovou součást proteomiky, tj. odvětví, zabývajícího se analýzou globálních proteinových profilů určitých biologických kompartmentů – tkání, buněk, organel atd. Na rozdíl od genomu, který je v rámci daného organismu stálý, je buněčný proteom proměnlivý a závisí na řadě vnějších i vnitřních faktorů. Studium proteomu je proto perspektivní přístup pro výzkum základních buněčných procesů, jakými jsou diferenciaci, proliferaci, apoptóza a další. Smyslem této studie je prezentace našich zkušeností s optimalizací 2-DE při analýze proteomu kuřecích monoblastů transformovaných onkogenem *v-myb* viru ptačí myeloblastózy – (linie BM2), které byly připraveny injekcí nezralých myeloidních buněk infikovaných virem AMV do kuřecích embryí a následnou izolací transformovaných monoblastů z kostní dřeně³.

1.2. Experimentální postup při 2-DE a příprava vzorku

Experimentální postup 2-DE zahrnuje tyto základní kroky: 1. přípravu vzorku, 2. rehydrataci komerčního proužku gelu s imobilizovaným pH gradientem – IPG stripu, 3. isoelektrickou fokusaci, 4. ekvilibraci IPG stripu, 5. SDS-polyakrylamidovou gelovou elektroforézu – SDS-PAGE, 6. vizualizaci proteinů a analýzu obrazu, 7. analýzu proteinů. Hned první z uvedených kroků, příprava vzorku, do značné míry rozhoduje o kvalitě výsledku 2-DE, a to především z hlediska úspěšnosti rozdělení buněčných proteinů. Vzhledem k velkým rozdílům v typech a původu vzorků je pro přípravu konkrétního typu vzorku zpravidla prováděna optimalizace podmínek jeho přípravy, která by měla zajistit účinnou extrakci proteinů ze vzorku a jejich kompletní solubilizaci, denuraci a redukci^{1,4}. Součástí přípravy vzorků mohou být rovněž kroky vedoucí k odstranění neproteinových komponent, které by mohly komplikovat rozdělení proteinů a jejich následnou vizualizaci. Pro zamezení ztrát proteinů by pak měla být příprava vzorku zkrácena na minimum a zajištěna jeho ochrana před proteolýzou. Proteiny jsou proto nejdříve extrahovány ze vzorku tzv. lyzačním pufrem, který buď vyvolá lýzu buněk, nebo poslouží jako solubilizační prostředí, ve kterém je lýza vyvolána jinými způsoby (např. sonikací). K základním složkám lyzačního pufru patří chaotropní činidla, detergenty (surfaktanty), redukční činidla a amfolyty (tab. I). Lyzační pufr lze v dalším kroku použít pro rehydrataci IPG stripu a současně tak aplikovat vzorek pro isoelektrickou fokusaci. Někdy je však k tomuto účelu používán tzv. rehydratační pufr a to tak, že vzorek v lyzačním pufru je zředěn rehydratačním pufrem v míře potřebné pro dosažení požadovaného množství proteinů s ohledem na délku použitého stripu, metodu vizualizace i experimentální záměr. Vzorek nemusí být součástí rehydratačního pufru a může být rovněž aplikován na již rehydratovaný strip dodatečně. Základní složky rehydratačního

Tabulka I
Základní složky lyzačního pufru a jejich funkce

	Mechanismus působení	Význam	Příklady
Chaotropní činidla	přerušení vodíkových můstků, denaturace	↑solubilizace ^a proteinů, zlepšení rozlišení a hodnotitelnosti	močovina, thiomočovina
Detergenty (surfaktanty)	zamezení hydrofobních interakcí, pokles povrchového napětí	↑solubilizace ^a hydrofobních proteinů a proteinů po denaturaci a odkrytí hydrofobního jádra	Triton X-100, NP-40, CHAPS, ASB 14, SB 3-10
Redukční činidla	přerušení disulfidových můstků, udržení proteinů v redukovaném stavu	kompletní rozvinutí proteinů, zlepšení rozdělení na gelu	mnoha DTT, TBP, DET
Amfolyty	vysoká pufrující schopnost, rozpustnost a konduktivita v oblasti jejich pI, omezují elektrostatické interakce mezi proteiny	tvorba pH gradientu, ↑solubilizace ^a proteinů, minimalizace jejich agregace, zlepšení rozdělení na gelu	komerční přípravky (Ampholyte, Pharmalyte)

^a ↑ – vzestup

pufru jsou obdobné jako v pufru lyzačním (tj. chaotropy, detergenty, redukční činidla a amfolyty), ale pro eliminaci některých nežádoucích vedlejších účinků se doporučuje snížit jejich koncentraci⁵. Pravidelnou součástí rehydratačního pufru je rovněž barvivo (např. bromfenolová modř) umožňující kontrolu distribuce roztoku během rehydratace stripu.

1.3. Možnosti a význam solubilizace vzorku

Zvláště v proteomických studiích je pro kvalitu výsledku 2-DE velmi důležité zajištění solubility proteinů. Zlepšená rozpustnost proteinů zvyšuje počet rozlišitelných proteinových „spotů“ a umožňuje rozdělení hydrofobních proteinů¹. Zajištění rozpustnosti proteinů, tj. rozrušení proteinových agregátů a komplexů na jednotlivé peptidy, je proto zásadním požadavkem při přípravě vzorku, který podmiňuje účinnou extrakci proteinů. Navíc rozpustnost proteinů rozhoduje o jejich vstupu do IEF gelu, zabraňuje adsorpčním ztrátám v průběhu IEF a zlepšuje jejich přenos z IEF stripu do polyakrylamidového gelu užívaného při SDS-PAGE (cit.^{6–8}). Pro omezení ztrát proteinů a vzniku nežádoucích pruhů ve druhém rozměru elektroforézy je vhodné použít co nejučinnější solubilizační postupy, a to zejména u špatně rozpustných membránových a jaderných proteinů, proteinů s velkou molekulovou hmotností a rovněž v případě nanášení velkého množství proteinového vzorku na IPG strip^{7,9}. Většina obvyklých solubilizačních postupů vychází z O'Farrellovy metody¹⁰ a užívá 2–4% směsi neiontových (např. NP-40 nebo Triton X-100) nebo zwitterionových (např. 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonio]propan-1-sulfonát, CHAPS) detergentů, 9–10 M močoviny, 1% dithiotreitolu (DTT) a 2% amfolytů⁹. I když

je tento postup účinný u většiny vzorků, existují proteinové komplexy, které nejsou tímto způsobem účinně solubilizovány. Velkým zlepšením solubilizačních protokolů bylo zavedení thiomočoviny, vedoucí ve směsi s močovinou (optimálně směs 2 M thiomočovina/ 5–7 M močovina) k vytvoření silně chaotropního prostředí, které zlepšilo rozpustnost špatně rozpustných proteinů a proteinů s tendencí k isoelektrické precipitaci⁷. Další rozšíření škály účinných solubilizačních roztoků přinesla kombinace obou chaotropů s novými sulfobetainovými surfaktanty¹. Surfaktanty jsou vybírány na základě své rozpustnosti a účinnosti v přítomnosti použitých chaotropů a podle obtížnosti přerušování molekulárních interakcí v okolí příslušných proteinů^{1,11}. Záměrem naší práce bylo zlepšit podmínky přípravy vzorku leukemické buněčné linie BM2 pro 2-DE tak, abychom dvourozměrnou elektroforézou dosáhli maximálního množství rozdělených proteinů za vysokého rozlišení.

2. Experimentální část

2.1. Chemikálie a přístroje

Pro přípravu lyzačního a rehydratačního pufru byly použity následující chemikálie: močovina v analytické čistotě (Serva), thiomočovina v kvalitě ACS (Sigma-Aldrich), CHAPS, Nonidet P-40, DTT, koktejl inhibitorů fosfatas I, koktejl inhibitorů proteas (Sigma-Aldrich), fenylmethan-sulfonylfluorid – PMSF (Serva), amfolyty Pharmalyte pH 3–10 a Pharmalyte pH 8–10,5 (Sigma-Aldrich), bromfenolová modř – sodná sůl v kvalitě ACS (Amresco). Pro stanovení koncentrace proteinů bylo použito činidlo Bradford

dové (Sigma-Aldrich) a spektrofotometr Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech). Pro přípravu roztoků pro ekvilibraci IPG stripů, SDS-PAGE a vizualizaci proteinů byly použity tyto chemikálie: natrium-dodecyl-sulfát, glycerol 99,5+ % v kvalitě ACS, Trizma base-Reagent Grade, min. 99,9%, jodacetamid, akrylamid/methylenbisakrylamid 40% zásobní roztok (29:1) (Sigma-Aldrich); *N,N,N',N'*-tetramethylethyldiamin (Serva), peroxosíran amonný, glycin, min. 99%, agarosa-typ II: Medium EEO (Sigma-Aldrich), Bio-Safe Coomassie Blue (Bio-Rad). Pro IEF byly použity IPG stripy pH 3–10 a pH 4–7 délky 7 cm (Bio-Rad). IEF byla provedena přístrojem Protean[®] IEF Cell (Bio-Rad). Pro SDS-PAGE byla použita elektroforetická aparatura a zdroj elektrického napětí Power-Pac 300 (Bio-Rad).

2.2. Buněčná linie BM2

Buněčná linie BM2 je linie kuřecích monoblastů transformovaných onkogenem *v-myb* viru ptačí myeloblastózy AMV (cit.³), která byla kultivována v Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich) doplněném o 5% fetální telecí sérum (Gibco BRL), teplotně inaktivované (1 h při 56 °C) 5% kuřecí sérum, 4,5 g.l⁻¹ glukosu, 2 mM L-glutamin, 1 mM pyruvát sodný, 0,1 mg.ml⁻¹ penicilin a 0,1 mg.ml⁻¹ streptomycin (Sigma-Aldrich). Kultivace probíhala při 37 °C v atmosféře 10% CO₂. Pro analýzu proteinů byly buňky sklizeny v logaritmické fázi růstu.

2.3. Příprava vzorku a rehydratace IPG stripu

Buňky byly lyzovány 45 minut při laboratorní teplotě ve dvou základních typech lyzačních pufrů, jejichž hlavní odlišnost spočívala v přítomnosti či nepřítomnosti thiomocoviny (přesné složení je uvedeno v kap. 3). Následně byly vzorky podrobeny sonikaci (8 × 2 s) jehlovým sonikátorem Sonopuls HD 2070 (Bandelin, Německo). Po sonikaci byly vzorky centrifugovány (30 min, 15 000 g, 15 °C) a v supernatantu byla stanovena koncentrace proteinů podle Bradfordové. Objem supernatantu odpovídající 300 μg proteinu byl doplněn rehydratačním pufrům (složení je uvedeno v kap. 3) na konečný objem 125 μl a vzniklý roztok byl použit k 12 hodinové rehydrataci IPG stripu o délce 7 cm.

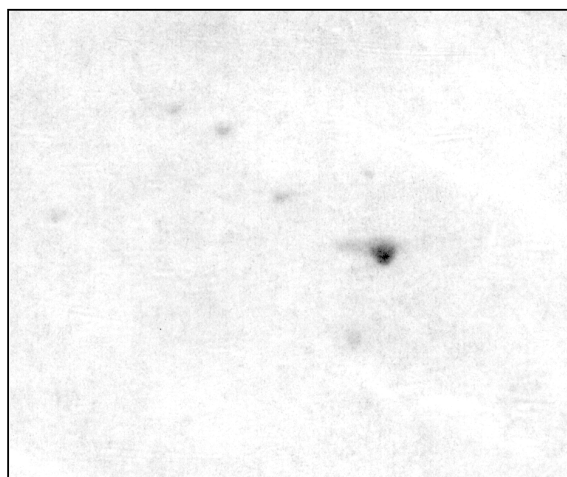
2.4. Isoelektrická fokusace, ekvilibrace, SDS-PAGE, vizualizace a analýza obrazu

Rehydratované IPG stripy o délce 7 cm byly fokusovány na fokusátoru Protean[®] IEF Cell (Bio-Rad) při 15 °C ve 3 krocích. V 1. kroku bylo elektrické napětí během 20 min lineárně zvyšováno z 0 V do 250 V; ve 2. kroku bylo elektrické napětí zvýšeno na 4000 V a na této hodnotě bylo udržováno 2 h. Ve 3. kroku byly elektrické parametry nastaveny tak, aby bylo celkově dosaženo hodnoty 30 kWh. Elektrický proud byl omezen hodnotou 50 μA/strip. Po ukončení IEF byly stripy inkubovány nejprve 15 min při pokojové teplotě na výkyvné třepačce

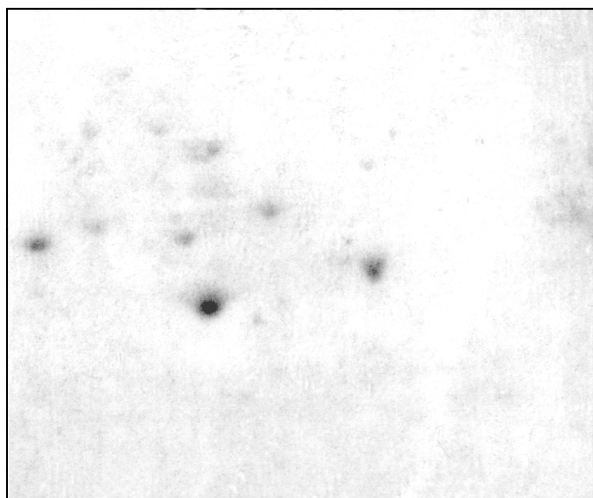
v ekvilibračním pufru [6 M močovina, 20% v/v glycerol a 2% w/v natrium-dodecyl-sulfát (SDS) v 0,375 M tris-HCl (zásobní roztok pH 8,8)] obsahujícím 2% w/v DTT a následně 7 min v ekvilibračním pufru obsahujícím 2,5% w/v jodacetamid a stopy bromfenolové modři. Ve druhém rozměru (SDS-PAGE) bylo rozdělení proteinů podle molekulové hmotnosti provedeno v 10% T dělicím gelu. Ekvilibrované IPG stripy byly na vrcholu zaostřovacího gelu (4% T) ve vertikální elektroforetické aparatuře převrstveny 0,5% roztokem teplé agarosy. Při zaostřovací fázi probíhala SDS-PAGE při napětí 80 V; jakmile bromfenolová modř dosáhla dělicího gelu bylo napětí zvýšeno na 100 V. Zviditelnění proteinů rozdělených 2-DE byla provedeno obarvením Bio-Safe Coomassie Brilliant Blue podle návodu výrobce.

3. Výsledky a diskuse

K důležitým aspektům přípravy vzorku pro 2-DE, které zásadně ovlivňují kvalitu výsledku, patří zajištění solubility proteinů, zamezení jejich degradace a modifikace endogenní proteolytickou aktivitou, případně odstranění interferujících substancí (např. nukleových kyselin)^{1,4}. Ochrana před proteolýzou je zvláště významná u vzorků bohatých na proteasy, jakými jsou rostlinné extrakty, určité živočišné orgány jako např. slinivka břišní, žaludek, játra, slezina, a materiál bohatý na některé buněčné organely jako vakuoly a lysosomy¹². Na rozdíl od těchto vzorků jsme buňky BM2 nepovažovali za rizikové z hlediska obsahu endogenních proteolytických enzymů. Buňky byly podrobeny sonikaci, čímž jsme dosáhli fragmentace nukleových kyselin a omezili tak jejich případné nežádoucí

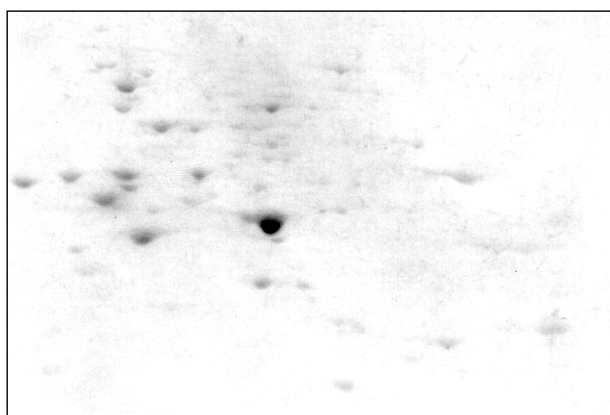


Obr. 1. Tradiční způsob přípravy vzorku dle O'Farrella¹⁰ neposkytuje po 2-DE kvalitní rozdělení proteinů izolovaných z buněk BM2; pro přípravu vzorku jsme použili lyzační pufr obsahující 9 M močovinu, 2% NP-40, 3% CHAPS, 70 mM DTT a 2% amfolyt pH 8–10,5 a rehydratační pufr obsahující 8 M močovinu, 4% CHAPS, 100 mM DTT, 0,001% bromfenolovou modř a 0,2% amfolyt pH 3–10

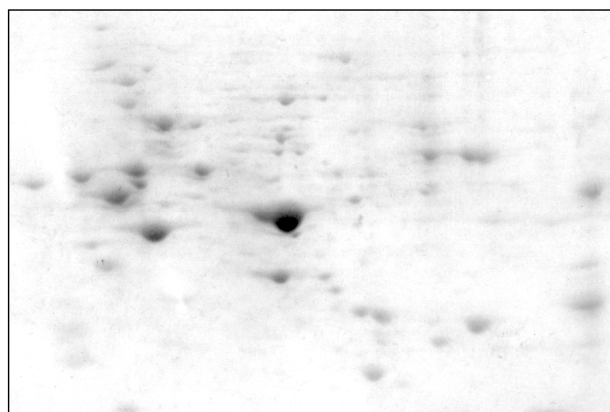


Obr. 2. Použití thiomocoviny v lyzačním pufru zlepšuje kvalitu rozdělení proteinů BM2 při 2-DE; pro přípravu vzorku jsme použili lyzační pufr obsahující 2 M thiomocovinu, 7 M močovinu, 2% NP-40, 3% CHAPS, 70 mM DTT a 2% amfolyt pH 8–10,5 a rehydratační pufr obsahující 8 M močovinu, 4% CHAPS, 100 mM DTT, 0,001% bromfenolovou modř a 0,2% amfolyt pH 3–10

účinky na 2-DE (cit.⁵). Při optimalizaci přípravy vzorku jsme se zaměřili především na zlepšení solubility proteinů, abychom dosáhli zvýšení celkového počtu proteinů rozlišitelných 2-DE a zároveň umožnili separaci hydrofobních proteinů. Vhodné podmínky pro solubilizaci proteinů jsme se snažili navodit změnou složení lyzačního a rehydratačního pufru a použitím sonikace, která se může uplatnit nejen jako prostředek pro navození buněčné lýzy, ale i jako prostředek solubilizační⁹. Pro výchozí experiment byly buňky lyzovány v lyzačním pufru obsahujícím 9 M močovinu, 2% nonidet P-40 (neiontový detergent P-40), 3% CHAPS, 70 mM DTT a 2% amfolyt pH 8–10,5. Uvedený pufr lze považovat za jednu z modifikací původního O'Farrellova lyzačního pufru¹⁰ (kap. 1.3.), který je vyhovující pro většinu vzorků⁹. Navíc při úvodních experimentech s neznámými vzorky nebo při zaměření na dobře rozpustné cytosolické proteiny nebývají součástí solubilizačních roztoků silně denaturující látky^{1,5,12}. Rehydratace IPG stripu byla provedena v rehydratačním pufru obsahujícím 8 M močovinu, 4% CHAPS, 100 mM DTT, 0,001% bromfenolovou modř a 0,2% amfolyt pH 3–10. 2-DE takto připravených vzorků však poskytla extrémně nízký počet rozdělených proteinů (obr. 1). Proto byla k lyzačnímu pufru přidána thiomocovina, která zlepšuje rozpustnost proteinů⁷ (2 M thiomocovina, 7 M močovina, 2% NP-40, 3% CHAPS, 70 mM DTT a 2% amfolyt pH 8–10,5). Tento zásah se projevil zvýšením počtu proteinových „spotů“ rozlišitelných po 2-DE asi 1,5 krát (obr. 2). Současně přidání thiomocoviny k rehydratačnímu pufru (2 M thiomocovina, 7 M močovina, 4% CHAPS, 100 mM DTT, 0,001% bromfenolová modř a 0,2% amfolyt pH 3–10) spojené s užitím vysoké koncentrace směsi amfolytů v pufru lyzačním (2 M thiomocovina, 7 M močovina, 2%



Obr. 3. Přidání thiomocoviny do lyzačního i rehydratačního pufru dále zlepšuje počet proteinů detekovatelných 2-DE; pro přípravu vzorku jsme použili lyzační pufr obsahující 2 M thiomocovinu, 7 M močovinu, 2% NP-40, 3% CHAPS, 70 mM DTT, 2% amfolyt pH 8–10,5 a 2% amfolyt pH 3–10 a rehydratační pufr obsahující 2 M thiomocovinu, 7 M močovinu, 4% CHAPS, 100 mM DTT, 0,001% bromfenolovou modř a 0,2% amfolyt pH 3–10



Obr. 4. Sonikace vzorku zlepšuje kvalitu a počet jednotlivých proteinových „spotů“ rozlišitelných 2-DE; pro přípravu vzorku jsme použili lyzační pufr obsahující 2 M thiomocovinu, 7 M močovinu, 2% NP-40, 3% CHAPS, 70 mM DTT, 2% amfolyt pH 8–10,5 a 2% amfolyt pH 3–10 a rehydratační pufr obsahující 2 M thiomocovinu, 7 M močovinu, 4% CHAPS, 100 mM DTT, 0,001% bromfenolovou modř a 0,2% amfolyt pH 3–10). Po lýzi buněk v lyzačním pufru byl vzorek podroben sonikaci (8 × 2 s)

NP-40, 3% CHAPS, 70 mM DTT, 2% amfolyt pH 8–10,5 a 2% amfolyt pH 3–10) nejméně dvojnásobně zvýšilo počet rozdělených proteinů v porovnání se vzorky, kdy byla thiomocovina přítomna jen v pufru lyzačním (obr. 3). Pozitivní účinky, plynoucí z použití thiomocoviny jako součásti lyzačního pufru, lze zřejmě považovat za výsledek dvou faktorů, a to jednak její vysoké účinnosti při solubilizaci proteinů a zároveň ochraně proteinů před endogenní proteolýzou, která může být důsledkem velmi účinné interakce thiomocoviny s proteasami¹². Vzhledem

k délce rehydratace IPG stripu s vyšším rizikem proteolýzy citlivých proteinů by se ochrana před proteolýzou mohla částečně podílet na zlepšení výsledku 2-DE také po inkorporaci thiomocoviny do rehydratačního pufru. Kromě použití thiomocoviny v lyzačním i rehydratačním pufru vedla k dalšímu zvýšení počtu proteinových „spotů“ sonikace vzorku (obr. 4), a to přibližně 2,5 krát v porovnání s postupem, kdy byla sonikace vynechána (obr. 3). Použití ultrazvuku rovněž zvýšilo denzitu některých proteinových „spotů“ (obr. 4), což svědčí o pozitivním vlivu sonikace na kvantitu proteinů rozdělených 2-DE.

4. Závěr

Použití thiomocoviny v lyzačním a rehydratačním pufru a současné podrobení vzorku sonikací se velmi příznivě projevuje na kvalitě výsledku 2-DE. V našem systému jsme zaznamenali až osminásobné zvýšení počtu rozlišitelných proteinových „spotů“ ve srovnání s postupem bez užití thiomocoviny a bez sonikace. Uvedené kroky proto budou zařazeny do postupu přípravy vzorku pro analýzu změn proteomu leukemických monoblastů BM2 v průběhu jejich terminální diferenciaci a mohou se uplatnit při obdobných studiích jiných leukemických buněčných linií.

Tato práce byla podporována grantem GAČR č. 301/03/1055.

Seznam zkratk

AMV	virus ptačí myeloblastózy („avian myeloblastosis virus“)
ASB 14	3-[dimethyl(3-tetradekanamidopropyl)amonio]propan-1-sulfonát
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonio]propan-1-sulfonát
2-DE	dvourozměrná elektroforéza („two-dimensional electrophoresis“)
DET	dithioerythritol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DTT	dithiotreitol
IEF	isoelektrická fokusace („isoelectric focusing“)
IPG	imobilizovaný pH gradient („immobilised pH gradient“)
NP-40	nonidet P-40 (neiontový detergent P-40)
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
SB 3-10	3-(decyldimethylamonio)propan-1-sulfonát
SDS	natrium-dodecyl-sulfát
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti natrium-dodecyl-sulfátu („sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis“)
% T	koncentrace gelu („total percentage of acrylamide plus crosslinker“)
TBP	tributylfosfin

LITERATURA

- Herbert B.: *Electrophoresis* 20, 660 (1999).
- Bouchal P., Kučera I.: *Chem. Listy* 97, 29 (2003).
- Moscovici C., Zeller N., Moscovici M. G., v knize: *Expression of Differentiated Functions in Cancer Cells* (Revolta R. F., Pontieri G. M., Basilico C., Rovera G., Gallo R., Subak-Sharpe J. H., ed.), str. 435. Raven Press, New York 1982.
- Rabilloud T.: *Electrophoresis* 17, 813 (1996).
- Westermeyer R., Naven T.: *Proteomics in Practice. A Laboratory Manual of Proteome Analysis*. Wiley-VCH, Weinheim 2002.
- Rabilloud T., Adessi C., Giraudel A., Lunardi J.: *Electrophoresis* 18, 307 (1997).
- Rabilloud T.: *Electrophoresis* 19, 758 (1998).
- Adessi C., Miege C., Albrieux C., Rabilloud T.: *Electrophoresis* 18, 127 (1997).
- Harder A., Wildgruber R., Nawrocki A., Fey S.J., Larsen P.M., Gorg A.: *Electrophoresis* 20, 826 (1999).
- O'Farrell J.: *Biol. Chem.* 250, 4007 (1975).
- Macri J., McGee B., Thomas J. N., Du P., Stevenson T. I., Kilby G. W., Rapundalo S. T.: *Electrophoresis* 21, 1685 (2000).
- Castellanos-Serra L., Paz-Lago D.: *Electrophoresis* 23, 1745 (2002).

P. Váňa and J. Šmarda (*Department of Genetics and Molecular Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Brno*): **Proteome Analysis in BM2 Leukemia Cell Line: Determination of Optimal Conditions for Sample Preparation for Two-Dimensional Electrophoresis**

Two-dimensional electrophoresis is a key experimental approach of proteomics. Quality of its result is significantly dependent on the way of sample preparation. The aim of this study was to set up optimal conditions for preparation of the sample of v-myb-transformed chicken monoblasts BM2 to get a high number of resolved proteins on two-dimensional gel. Starting composition of both lysis (9 M urea, 2 % NP-40, 3 % CHAPS, 70 mM DTT and 2 % ampholyte pH 8–10.5) and rehydration buffers (8 M urea, 4 % CHAPS, 100 mM DTT, 0.001 % bromphenol blue and 0.2 % ampholyte pH 3–10) have been modified by addition of thiourea causing clear increase of the number of protein spots detectable on two-dimensional gel. In addition, sonication of the sample before its loading to the gel further increased the number of resolved proteins as well as density of some of them. Addition of thiourea in the lysis and rehydration buffers and sonication increased the number of protein spots resolved in two-dimensional gel about 8-fold. These experimental conditions are going to be used in detailed analysis of proteome changes during terminal differentiation of BM2 monoblasts and they can also be of interest for researchers using two-dimensional electrophoresis as a tool for proteome analysis of another leukemic cells.