

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

PROTEÍNOVÉ ČIPY PRI ŠTÚDIU EXPRESIE CYTOKÍNŮV NA NÁDOROVOM MODELE – OPTI- MALIZÁCIA PRÍPRAVY VZORIEK

JÁN STRNÁDEL^{a,b}, MILOSLAV KVERKA^c,
HANA REISNEROVÁ^b, JANA HLUČILOVÁ^a,
DUŠAN USVALD^a, DANIELA PLÁNSKÁ^a,
PETR VÁŇA^a, FRANTIŠEK JÍLEK^b, LUCA
VANNUCCI^{a,c} a VRATISLAV HORÁK^a

^a Ústav živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd České republiky, v.v.i., Rumburská 89, 277 21 Liběchov, ^b Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6, ^c Mikrobiologický ústav Akademie věd České republiky, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
neoplasma_9@post.sk

Došlo 20.3.07, prijaté 27.9.07.

Klíčové slová: proteínové čipy, cytokíny, matricový efekt, mikroprostredie nádoru, sarkóm potkana Lewis

Úvod

V období posledných desiatich rokov došlo k prudkému rozvoju metód, umožňujúcich štúdium expresie génov a mapovanie génových mutácií pomocou tzv. „DNA čipov“ na úrovni genómu^{1–3}. Pozornosť biochemického, biomedicínskeho a klinického výskumu sa však čoraz viac sústreďuje na štúdium proteínov alebo celkového proteínového profilu – proteómu⁴. K realizácii informácie o zvýšenej expresii génov dochádza práve cez proteíny, z nich niektoré majú potenciál stať sa biomarkermi patologických procesov napr. pri nádorových chorobách. Výskum na úrovni proteómu podnietilo aj poznanie, že zvýšená expresia génov v mnohých prípadoch nekoreluje so zvýšenou expresiou kódovaných proteínov⁵. Základnou technikou proteomiky, používanou pri charakterizácii rozdielov v expresii proteínov, stále zostáva dvojrozmerná gélová elektroforéza (2D PAGE). Niektoré nedostatky tejto metódy (časová náročnosť, problémy v reprodukcií výsledkov, nemožnosť prenosu výsledkov priamo do klinického testu) viedli k vývoju metód, založených napríklad na princípe dvojrozmernej HPLC chromatografie⁶, či hmotnostnej spektrometrie, kombinovanej s tzv. proteínovými čipmi. Príkladom je SELDI TOF-MS (Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight

Mass Spectrometry)⁷ – rýchla a extrémne citlivá metóda, ktorá je schopná vytvoriť a porovnať proteínový profil pacientov a zdravých jedincov a takto identifikovať viacero navzájom korelujúcich biomarkerov. Citlivosť a výpovedná hodnota takejto analýzy potom umožňuje stanoviť diagnózu pre niektoré nádorové ochorenia takmer v 90 % (cit.⁸).

Výhody detekcie viacerých proteínov v rámci jedného experimentu pomocou proteínových čipov je možné využívať aj bez nákladnej prístrojovej techniky (laserové ionizačné zariadenie, hmotnostný spektrometer). Na trhu sa objavujú proteínové čipy, tvorené pevnou fázou [sklo, plast, PVDF (polyvinylidenfluorid) alebo nitrocelulózoová membrána] s naviazaným spektrom protilátok proti rozličným antigénom, prítomným v biologických vzorkách (sérum, plazma, slzy, mozgomiešňový mok, moč, tkanivový exudát, nádorové tkanivo)⁹. Protilátky proti jednotlivým cytokínom sú viazané (imobilizované) na pevnú fázu adsorpciou alebo pomocou chemickej väzby na dvoch (duplety), troch (triplety) prípadne aj štyroch miestach naraz. Súbor protilátok potom vytvára na povrchu pevnej fázy mapu, s presne lokalizovateľnou polohou naviazaného antigénu. Prítomnosť, či neprítomnosť antigénov vo vzorke sa detekuje pomocou zmesi sekundárnych protilátok, značených biotínom. Po inkubácii so streptavidín-peroxidázovým komplexom a následne s chromogénnym, či chemiluminiscenčným substrátom je možné detekovať signál vizuálne (pri použití chromogénneho substrátu) alebo pomocou expozície na fotografický film, či chemiluminiscenčným detektorom. Rozdiel v expresii proteínov medzi vzorkami indikujú zmeny vo veľkosti a intenzite škvŕn (tzv. „spotov“) na definovaných miestach proteínového čipu. Densitometrická analýza pomocou rozličných softvérových produktov napr. voľne dostupného programu ImageJ (National Institute for Health, USA)¹⁰ umožňuje tieto zmeny porovnávať a semikvantitatívne hodnotiť.

Existuje viacero modifikácií proteínových čipov – usporiadanie využívajúce systém dvoch protilátok na imobilizáciu a detekciu antigénu (analogia so sendvičovým usporiadaním protilátok v testoch ELISA) je označovaný ako „antibody array protein chip“. Medzi jeho výhody patrí citlivosť pre daný súbor antigénov, pohybujúca sa v oblasti koncentrácií rádovo 10^{-12} g ml⁻¹. Citlivosť v tejto oblasti, spolu s možnosťou sledovať zmeny v expresii viacerých proteínov v jednom experimente predurčuje použitie metódy na detekciu malých signálnych proteínových modulátorov imunitného systému – cytokínov.

Cytokíny sú hlavnými protagonistami v procese imunitnej odpovede na infekciu a nádor¹¹. Fyziologicky sú prítomné a účinné už pri koncentráciách 10^{-12} g ml⁻¹ krvi. Cytokíny nepôsobia jednotlivo, ale v kaskáde na seba navzájom nadväzujúcich interakcií. Zmena v expresii jedného cytokínu indukuje zmeny v expresii ďalších cytokí-

nov. Sledovať zmeny viacerých parametrov naraz je dôležitým krokom k pochopeniu a vysvetleniu vzájomných interakcií v rámci zložitej cytokínovej siete.

Použitie proteínových čipov na detekciu zmien v hladinách viacerých cytokínov v jednej vzorke je preto logické. Experimentátor sa pri práci s nimi môže stretnúť s niektorými nežiadúcimi javmi, vyplývajúcimi zo samotnej povahy vzoriek, z postupu ich izolácie a uskladnenia a z prítomnosti interferujúcich zložiek. Jedným z významných nežiadúcich efektov je tzv. „matricový efekt“ (matrix effect), ktorý je definovaný ako súbor nežiadúcich interakcií zložiek vzorky, nepriaznivo ovplyvňujúcich detekciu analytu. V prípade metód založených na detekcii a kvantifikácii analytov pomocou protilátok je jedným z najčastejšie sa uplatňujúcich efektov tzv. efekt proteínovej matrice vzorky. Vo vzorke s vysokým obsahom proteínov dochádza k sterickej blokácii interakcie antigénov s protilátkou, imobilizovanou na pevný povrch. Analyt je prítomný, ale nedochádza k jeho interakcii s protilátkou. Inkubácia na trepačke (kedy dochádza k premiešavaniu vzorky), spolu s vhodným riedením vzorky (ktoré zníži viskozitu, ale zároveň nenariedi analyt vo vzorke pod detekčnú hladinu metódy) môže pomôcť odstrániť tento problém, resp. ho minimalizovať. Optimálne riedenie vzoriek, pri ktorom sa dosiahne najvyšší pomer signál/šum si však musí pre každý typ vzorky určiť samotné pracovisko. Druhým významným nežiadúcim javom je prítomnosť endogénnych peroxidáz. Proces optimalizácie získavania, prípravy a úpravy vzorky teda výrazne ovplyvňuje výsledok celého stanovenia a je kľúčovým krokom pri práci s proteínovými čipmi.

Cieľom tejto práce je preto prezentovať optimalizovaný protokol na šetrnú extrakciu cytokínov z nádorového tkaniva a úpravu vzoriek (nádorové lyzáty a séra) pred detekciou na proteínových čipoch typu „antibody array“. Protokol vznikol na základe skúseností z Laboratoře biologie nádorů ÚŽFG v Liběchove a v spolupráci s MBÚ AV ČR v Prahe.

Experimentálna časť

Metódou proteínových čipov sme mapovali expresiu 19 cytokínov v krvnom sére a lyzátoch z nádorov (sarkómov) na potkanoch línie Lewis.

Krvné sérum

Krv na izoláciu séra sme pokusným zvieratám odoberali z chvostovej žily do polypropylénovej skúmavky (skúmavky z polystyrénu nie sú vhodné kvôli adsorpcii proteínov na povrch skúmavky), množstvo odobranej krvi bolo cca 1,5 ml. Krv sme nechali vydržať 1 hodinu pri laboratórnej teplote. Hodinový interval postačuje na výťažnosť cca 0,4–0,7 ml séra z 1,5 ml krvi. Dlhšia doba zrážania nie je potrebná, ani vhodná kvôli novej degradácii vzorky. Po centrifugácii (1100 × g, 4 °C, 10 min) sme

sérum zbavené krvného koláča opätovne centrifugovali pri rovnakých podmienkach. Ku vzorkám sme pridali azid sodný vo finálnej koncentrácii 0,2–0,4 % na inhibíciu aktivity endogénnych peroxidáz (koncentrácia azidu sodného bola optimalizovaná na základe inhibičného efektu na aktivitu peroxidáz, určenú meraním absorbancie chromogénneho substrátu). Takto ošetrované sérum sme alikvotovali a uložili pri –80 °C až do analýzy.

Nádorové lyzáty

V celkovej anestézii sme vykonali excíziu nádorov, ktoré vznikli po podkožnej aplikácii buniek, izolovaných zo sarkómu, objaveného na jednom jedincovi laboratórneho potkana línie Lewis¹² na našom pracovisku. Vzorky s rozmermi 1×1×1 cm sme fixovali na korkovú podložku, následne celé zaliali kryoprotektívnym médiom (Jung tissue freezing medium) a zmrazili v tekutom dusíku. Následne sme ich preniesli a uschovali pri –80 °C alebo priamo spracovali na sériové kryorezy hrúbky 8–10 μm (Leica CM 1850 cryocut) pri teplote –25 °C. Cca 100 kryorezov z každej vzorky sme preniesli do polypropylénovej skúmavky, v ktorej sme ich zaliali 1 ml vychladeného lyzačného pufru (50 mM Tris, pH 7,4, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1% Triton X-100, Sigma). Tesne pred použitím sme do lyzačného pufru pridali zmes inhibítorov proteáz (Complete Protease Inhibitor Tablets, Roche) a 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride, Roche). Samotnú extrakciu proteínov sme uskutočnili pri 0 °C na ľade počas 30 min s občasným vortexovaním vzorky. Následne sme extrakty centrifugovali 15 min pri 4 °C (12 000 × g). Táto procedúra viedla k prečisteniu vzorky. (V prípade použitia vzoriek melanómov, napr. myšacej nádorovej línie B16 alebo vzoriek melanómov miniprasiat línie MeLiM, viedol tento postup k úplnému vyčisteniu vzorky a odstráneniu melanínu z pigmentovaných nádorov).

Lyzáty z niektorých nádorov môžu byť značne hemoragické a vykazujú vysokú koncentráciu interferujúcich látok s peroxidázovou aktivitou. Keď sme k takémuto lyzátu pokusne pridali chromogénny, prípadne chemiluminiscenčný substrát pre peroxidázu, zaznamenali sme vysoký signál (pre niektoré vzorky až 1,5–3,5 jednotiek absorbancie pri vlnovej dĺžke 450 nm pre TMB substrát). K odstráneniu tohto javu a inhibícii zložiek s endogénnou peroxidázovou aktivitou sme opätovne použili azid sodný (0,8–1,5 %). Pred samotnou detekciou pomocou proteínových čipov sme nádorové lyzáty ekvilibrovali t.j. upravili na rovnakú koncentráciu celkových proteínov v každej vzorke. Celkovú koncentráciu proteínov sme stanovovali pomocou kitu (BCA Protein assay kit, Pierce). Na základe výsledkov sme vzorky upravili na rovnakú hodnotu koncentrácie proteínov riedením pomocou vzorkového pufru, priloženého ku každej sade proteínových čipov. Zvýšenie signálu pre daný cytokín(y) v porovnaní s kontrolnou vzorkou takto skutočne reflektuje vyššiu expresiu cytokínov (analógia s ekvibráciou vzoriek pri SDS-PAGE).

Detekcia cytokínov

Na detekciu cytokínov v krvnom sére a nádorových lyzátov sme použili proteínové čipy firmy RayBiotech (USA). Ide o produkt pod názvom „RayBio Rat Cytokine Antibody Array“. Sada obsahuje proteínové čipy, tvorené nitrocelulóзовou membránou s presne lokalizovanými oblasťami naviazaných protilátok proti 19 potkaním cytokínom. Každý cytokín detekuje protilátka na dvoch paralelne pod sebou ležiacich miestach na čipe. Sadu ďalej tvorí súbor pufrovacích roztokov na riedenie vzoriek a premývanie medzi jednotlivými inkubáciami, zmes detekčných protilátok značených biotínom a koncentrovaný roztok komplexu streptavidín-chrenová peroxidáza.

Signál sme detekovali pomocou chemiluminiscenčného detektora LAS-1000, je možné ho však detekovať aj expozíciou na film, podobne ako pri metóde SDS-PAGE. Obrazové súbory boli spracované pomocou programu ImageJ (National Institute for Health, USA)¹⁰, voľne dostupnom na Internete.

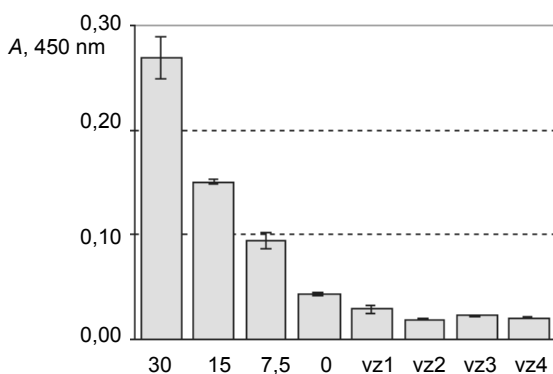
Výsledky a diskusia

V práci uvádzame postup izolácie cytokínov z nádorov pomocou extrakcie z kryorezov. Táto metóda je síce časovo náročnejšia ako bežné postupy s homogenizátormi, na druhej strane však umožňuje šetrnejšie spracovanie vzorky, čo môže mať vplyv na väčšiu výťažnosť cytokínov. Okrem toho je možné sériové rezy, pripravené z rovnakej oblasti nádoru, z akej sa pripravuje lyzát, histologicky spracovať a konkrétne cytokíny a bunky, ktoré ich produkujú, detekovať aj imunofluorescenčne značenými protilátkami. Táto metóda teda umožňuje komplexne a detailne študovať mikroprostredie nádoru („tumour mic-

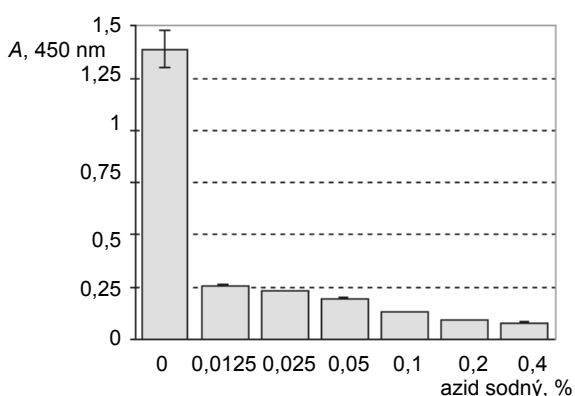
roenvironment“).

Veľmi dôležitým aspektom pri príprave vzorky je optimálne riedenie – v komerčných ELISA kitch a uvedených proteínových čipoch sa doporučené riedenie pohybuje v rozmedzí 2–10krát, nie je však univerzálne. Pri skúšaní vhodného riedenia vzorky je možné pozorovať paradoxný jav – so zvyšujúcim sa riedením sa zvyšuje signál pre analyt až po určitý inflexný bod, kedy dochádza k poklesu signálu v dôsledku veľkého riedenia a dosiahnutia podprahových hodnôt detekcie. Dáta, demonštrujúce efekt proteínovej matrice boli získané pomocou komerčného ELISA kitu na detekciu IFN-gamma (interferón gama) na spektrofotometri TECAN SUNRISE (Schöller) pri vlnovej dĺžke 450 nm, po zastavení reakcie 1 M H₂SO₄ (obr. 1). Absorbancia vzoriek je nižšia ako absorbancia prislúchajúca nulovej koncentrácii analytu (koncentrácii 0 pg ml⁻¹ v kalibračnej čiare). Tento zdanlivo nezmyselný výsledok je spôsobený vysokou koncentráciou proteínov vo vzorke, ktoré znemožňujú kontakt antigénu s protilátkou a zároveň pôsobia ako blokačný roztok. Nešpecifická väzba sekundárnej protilátky, prípadne komplexu streptavidínu s peroxidázou na plast je potom nižšia, ako v prípade nulovej koncentrácie štandardu v kalibračnej čiare. S týmto javom sa často stretávajú pracovníci, používajúce metódu ELISA na detekciu a kvantifikáciu niektorých proteínov v biologických vzorkách. V mnohých prípadoch môže byť efekt proteínovej matrice príčinou nepoužiteľnosti údajov, nameraných pomocou drahých ELISA detekčných súprav, rovnako ako „antibody array“ proteínových čipov. Vhodné riedenie vzoriek je preto kľúčovým krokom pri detekcii cytokínov pomocou týchto dvoch metód. Optimálne riedenie pre naše vzorky séra bolo 1:8 (vzorka : vzorkový pufo), pre nádorové lyzáty 1:7 (lyzát : vzorkový pufo).

Vzorky séra i lyzátu z nádorového tkaniva často vy-

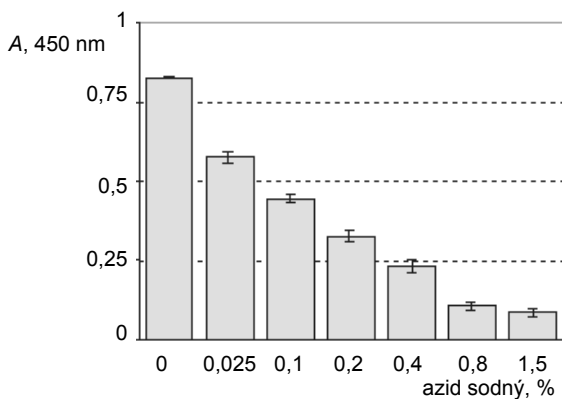


Obr. 1. **Demonštrácia tzv. efektu proteínovej matrice** (protein matrix effect). Neriedené vzorky séra 1–4 vykazujú paradoxne nižšiu hodnotu absorbancie, ako je hodnota pre 0 pg ml⁻¹ v kalibračnej čiare (zobrazené posledné štyri hodnoty). Namerané údaje sú z analýzy interferónu-gama pomocou metódy ELISA, pracujúcej na rovnakom princípe, ako proteínové čipy

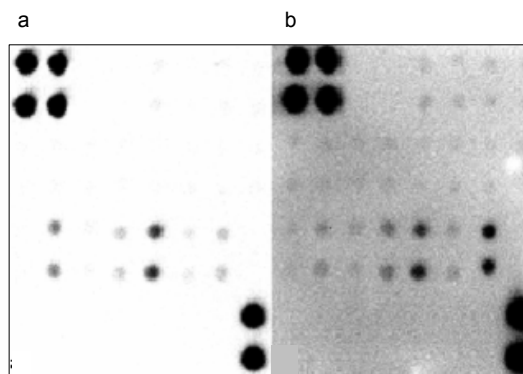


Obr. 2. **Aktivita endogénnych peroxidáz a myeloperoxidáz vo vzorke séra potkana línie Lewis s indukovaným nádorom, meraná pred pridaním (0 %) a po pridaní rôznych koncentrácií azidu sodného.** Dostatočný inhibičný účinok má azid sodný v oblasti 0,2–0,4 %. Absorbancia meraná po zastavení reakcie 1 M H₂SO₄ pri 450 nm

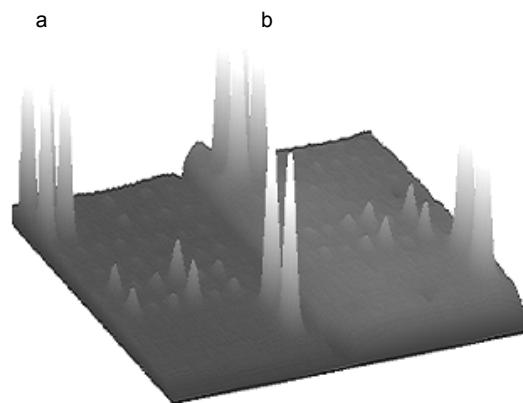
kazujú vysokú aktivitu endogénnych peroxidáz a myeloperoxidáz. Ich prítomnosť vo vzorkách znižuje citlivosť detekcie antigénu zvyšovaním nešpecifického signálu pozadia a znížením pomeru signál/šum. „Cytokine antibody array“ proteínový čip rovnako ako ELISA a iné imunodetekčné techniky využívajú peroxidázové konjugáty na detekciu naviazaného antigénu. Prítomnosť zložiek s endogénnou peroxidázovou aktivitou vo vzorke je teda nežiadúca, pretože nepriaznivo ovplyvňuje samotné stanovenie. Prídavok azidu sodného vo vhodne zvolenej koncentrácii môže pomôcť odstrániť tento problém. Testovali sme inhibičnú aktivitu azidu sodného na endogénne peroxidázy pomocou merania zmien absorbancie pri 450 nm (substrátom, indikujúcim mieru aktivity peroxidáz bol TMB) pre rozličné koncentrácie azidu sodného. Optimálna finálna koncentrácia azidu pre vzorky séra bola určená v rozsahu 0,2–0,4 %, pre nádorové lyzáty sa pohybovala v rozmedzí 0,8–1,5 %. Ďalšie zvyšovanie koncentrácie azidu sodného, pridávaného do vzoriek, nie je žiadúce, pretože pri nedokonalom premytí počas analýzy na proteínovom čipe hrozí inhibícia detekčnej peroxidázy. Na dosiahnutie požadovanej koncentrácie sme azid sodný pridávali do vzoriek zo zásobného 20% roztoku. Pre ilustráciu je prítomnosť endogénnych peroxidáz (detekovaná prídavkom chromogénneho substrátu pre peroxidázu – TMB) a následná inhibícia ich aktivity pomocou azidu sodného uvedená na obr. 2 a obr. 3. Ako prídanie azidu sodného vo vhodnej koncentrácii ovplyvní výsledok stanovenia pomocou proteínového čipu je markantné z obr. 4. Po prevedení intenzít signálu vzoriek, pozitívnych kontrol a pozadia do formátu 3D píkov je táto situácia ešte zreteľnejšia (obr. 5). Použitie azidu sodného v uvedených nízkych koncentráciách je výhodné aj kvôli jeho konzervačným účinkom na vzorky (bežne sa používa na konzervovanie protilátok a štandardných proteínov).



Obr. 3. Inhibičný účinok azidu sodného na endogénne peroxidázy a myeloperoxidázy v nádorovom lyzáte, meraný na základe poklesu absorbancie chromogénneho substrátu pre peroxidázu (TMB). Dostatočná inhibičná koncentrácia azidu bola v oblasti 0,8–1,5 %



Obr. 4. Porovnanie intenzity pozadia a pomeru signál/šum na dvoch vzorkách nádorových lyzátov na dvoch proteínových čipoch; a) s prídavkom azidu sodného (1,5 %), b) bez prídavku azidu sodného. Obrázok invertovaný v programe ImageJ



Obr. 5. 3D mapa dvoch proteínových čipov s vyobrazenými píkmí intenzít signálov pre jednotlivé cytokíny. Vzorka na proteínovom čipe „b“ má zreteľne vyššie pozadie (nešpecifický signál), oproti situácii pozorovanej na čipe „a“, kde sa na detekciu použila vzorka (lyzát z nádoru), ošetrená prídavkom azidu sodného (1,5%). Spracované v programe ImageJ

Záver

V tejto práci prezentujeme optimalizáciu prípravy vzoriek séra a nádorových lyzátov na štúdium cytokínov pomocou techniky „antibody array“ proteínových čipov. S ohľadom na možnú degradáciu cytokínov vo vzorkách nádorov sme navrhli postup ich izolácie priamo z kryorezov pri zníženej teplote počas celej extrakcie. Pomocou údajov, získaných technikou ELISA, pracujúcou na rovnakom princípe ako „antibody array“ čip, sme demonštrovali efekt proteínovej matrice vzorky, ktorý nepriaznivo ovplyvňuje samotné stanovenie cytokínov vo vzorkách s vysokým obsahom proteínov. Dokázanú prítomnosť endogénnych peroxidáz a látok s peroxidázovou aktivitou vo vzorkách sme inhibovali prídavkom azidu sodného vo vhodne zvolených (po sérii titrácií) koncentráciách.

Proteinové čipy v usporiadaní „cytokine antibody array“ predstavujú techniku, vhodnú na multiparametrovú analýzu niektorých cytokínov, uplatňujúcich sa v rôznych fyziologických i patologických procesoch. Laboratór biológie nádorů ÚŽFG AV ČR, v.v.i. v Liběchove využíva túto techniku na štúdium interakcie sarkómových buniek s imunitným systémom počas progresie a pri spontánnej regresii nádorov u potkanov línie Lewis.

Táto práca vznikla s podporou grantov GAČR 524/04/0102, 523/03/H076 a 310/03/H147, GA AV ČR IAA600450601 a IAA500200510, Výzkumného záměru ÚŽFG AV ČR v. v. i. č. AV OZ50450515, č. AV OZ50200510, MSM 6046070901 a NPVII 2B06130.

Zoznam použitých skratiek

2D PAGE	two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (dvojrozmerná gélová elektroforéza)
MeLiM	Melanoma-bearing Libechov Minipigs (melanóm nesúce miniprasiatka z Liběchova)
PVDF	polyvinylidenfluorid
SDS PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS gélová elektroforéza)
TMB	tetramethyl benzidine (tetrametylbenzidín)

LITERATÚRA

- Schena M., Shalon D., Davis R. W., Brown P. O.: *Science* 270, 467 (1995).
- Lockhart D. J., Winzeler E. A.: *Nature* 405, 827 (2000).
- Shyamsundar R., Kim Y. H., Higgins J. P., Montgomery K., Jorden M., Sethuraman A., van de Rijn M., Botstein D., Brown P. O., Pollack J. R.: *Genome Biol.* 6, 404 (2005).
- Srinivas P. R., Verma M., Zhao Y., Srivastava S.: *Clin. Chem.* 48, 1160 (2002).
- Varambally S., Yu J., Laxman B., Rhodes D. R., Mehra R., Tomlins S. A., Shah R. B., Chandran U., Monzon F. A., Becich M. J., Wei J. T., Pienta K. J., Ghosh D., Rubin M. A., Chinnaiyan A. M.: *Cancer Cell* 8, 393 (2005).
- Skalníková H., Kovářová H., Moos J., Filová V., Halada P.: *Chem. Listy* 99, 952 (2005).
- Issaq H. J., Veenstra T., Conrads T. P., Felschow D.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292, 587 (2002).
- Bhattacharyya S., Siegel E. R., Petersen G. M., Chari S. T., Suva L. J., Haun R. S.: *Neoplasia* 6, 674 (2004).
- Haab B. B.: *Mol. Cell. Proteomics* 4, 377 (2005).
- <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, stiahnuté 13.3. 2007.
- Dranoff G.: *Nat. Rev. Cancer* 4, 11 (2004).
- Morávková A., Málek O., Pokorná E., Strnádel J., Hradecký K., Horák V.: *Folia Biol. (Praha)* 51, 159 (2005).

J. Strnádel^{a,b}, M. Kverka^c, H. Reisnerová^b, J. Hlučilová^a, D. Usvald^a, D. Plánská^a, P. Váňa^a, F. Jílek^b, L. Vannucci^{a,c} and V. Horák^a (^a *Institute of Animal Physiology and Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Liběchov*, ^b *Czech University of Life Sciences, Prague*, ^c *Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Protein Chips in Cytokine Expression Study on Tumour Model: Optimization of Sample Preparation**

Background and Objectives

Two-dimensional SDS PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) coupled with mass spectrometry is still a mainstream approach to analysing multiple protein expression levels. The requirement for some sophisticated devices and the lack of quantitative measurements for low-abundant proteins (e.g. cytokines) greatly limit its broad application. Cytokines present in the pg/ml levels in non-stimulated biological samples are traditionally detected by ELISA. We used a cytokine antibody array, a highly sensitive protein chip, for simultaneous detection of multiple cytokine expression levels in rat sarcoma lysates and serum samples.

Material and methods

We present here an optimized protocol for preparation and handling of tumour tissue lysates in protein chip detection. The sarcoma samples were processed at low temperatures to prevent cytokine degradation. Tumour cryosections (8–10 mm) were used for extraction of cytokines. The addition of NaN₃ destroyed a high endogenous peroxidase activity, which may interfere with protein chip assay and decrease the signal/noise ratio. The data for the protein matrix effect from sandwich ELISA can also affect the protein chip detection. The optimal dilution of samples must be found to prevent pitfalls due to the non-optimal signal-to-noise ratio. This also enables recovery of low amounts of cytokines from difficult samples.

Results

We report optimized procedures for extraction, sample handling, inhibition of endogenous peroxidase activity and prevention of the protein matrix effect in serum and tumour lysates by detection of cytokine expression using the cytokine antibody array protein chip.