

# Methodenoptimierung für den automatisierten „On-Membrane-Digest“ nach Western Blot

Anne Christine Wagner



INAUGURALDISSERTATION zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
VVB LAUFERSWEILER VERLAG



**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

---

**Methodenoptimierung für den  
automatisierten „On-Membrane-Digest“ nach  
Western Blot**

---

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Anne Christine Wagner**

aus Gießen

Gießen 2010

Aus dem Biochemischen Institut  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen,  
Leiter: Prof. Dr. Klaus T. Preissner

Gutachter:

PD Dr. Günter Lochnit  
Biochemisches Institut (FB 11)  
Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter:

Prof. Dr. Alfred Pingoud  
Biochemisches Institut (FB 08)  
Justus-Liebig-Universität Gießen

Tag der Disputation:

14.07.2010

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

"Das Maß der Hochachtung für eine Leistung richtet sich zu Recht nach den bei dem Unternehmen überwundenen Fehlschlägen."

Voltaire (1694-1778)

Veröffentlichung im Zusammenhang mit dieser Arbeit:

### **Kongreßposter**

B. H. Bender, A. Wagner, J. Grabitzki, P. Kiesau, B. McGlothlen, C. Mang, P. Engel und G. Lochnit „Automated „in-gel“ and „on-membrane“ digest for high-throughput protein identification“ Human Proteome Organisation 7th World-Congress, 16.-20. August 2008, Amsterdam, Niederlande



<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	I
<b>Abkürzungen</b> .....	IV
<b>Abbildungen</b> .....	VI
<b>Tabellen</b> .....	X
<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1 Proteomik .....	1
1.2 Gel- und LC-basierende Methoden der Proteinauftrennung .....	2
1.3 Massenspektrometrie: ESI- und MALDI-TOF-MS .....	3
1.4 Western Blot und On-Membrane-Verdau .....	5
1.5 Datenbanken.....	6
1.6 Automatisierung .....	8
<b>2. Material und Methoden</b> .....	9
2.1 Chemikalien .....	9
2.2 Puffer .....	10
2.3 Geräte und Materialien.....	13
2.4 Herstellung der Proteinproben.....	16
2.4.1 Proben, die jeweils ein Protein beinhalten .....	16
2.4.2 Proben, die jeweils mehrere Proteine beinhalten (Proteingemische).....	17
2.5 Herstellung der Acrylamid-Mini-Gele .....	21
2.6 Gelelektrophorese.....	22
2.7 Elektrophoretischer Transfer .....	22
2.8 Western Blot.....	23
2.9 Färbung der Membranen mit DB71 .....	24
2.10 Färbung der Gele mit Coomassie .....	24
2.11 Gewinnung der Spots .....	25
2.12 Verdau .....	25
2.12.1 Zubereitung der Trypsinlösung .....	25
2.12.2 automatisierter In-Gel-Verdau .....	26
2.12.3 automatisierter On-Membrane-Verdau .....	26
2.13 Matrices .....	27
2.13.1 HCCA-Matrix nach Jahn.....	27
2.13.2 DHB/HCCA-Mischmatrix .....	27
2.13.3 DHB/Phosphorsäure-Matrix.....	28
2.14 Massenspektrometrische Messung und Bearbeitung der Spektren .....	28
2.15 Suche in der Datenbank.....	29

<b>3. Ergebnisse</b> .....	30
<b>3.1 Verdau- und Extraktionsvarianten</b> .....	30
3.1.1 Verdau von Dot-Blots von NC- und PVDF-Membranen mithilfe des Verdauroboters .....	30
3.1.2 Proteinverdau von Blot-Membranen mit dem Verdauroboter .....	33
3.1.3 Manueller Proteinverdau von Blot-Membranen.....	37
3.1.4 Verdauzeit von 8 Stunden nach Protokoll des Verdauroboters.....	43
3.1.5 Verdauzeit von 16 Stunden nach Protokoll des Verdauroboters.....	46
3.1.6 Vergleich der Extraktion per Hand mit der Extraktion per Verdauroboter.....	49
3.1.7 Verdau mit 25µl Trypsinlösung .....	52
3.1.8 Zusammenfassung Teil 1 .....	57
<b>3.2 Verdau nach Elektro-Blot und Blockierung der Membran mit Roti-Block – Waschvarianten</b> .....	60
3.2.1 Verdau ohne Waschen.....	60
3.2.2 Messung der Proben aus 3.2.1 (Verdau ohne Waschen) mit verschiedenen Matrices.....	65
3.2.3 Verdau nach manuellem Waschen in Wells 3 mal über 2 Stunden.....	75
3.2.4 Verdau nach manuellem Waschen in Wells 6 mal über 2 Stunden.....	78
3.2.5 Verdau nach automatisiertem Waschen mit ACN .....	82
3.2.6 Verdau nach manuellem Waschen in Wells 2 mal über 17 Stunden.....	84
3.2.7 Zusammenfassung Teil 2 .....	87
<b>3.3 Verdau vor und nach ECL</b> .....	90
3.3.1 Schritt 1: Verdau vom Elektro-Blot ohne ECL.....	90
3.3.1.1 Proteinverdau ohne Octylglycosid von NC- und PVDF-Membran-Spots mit dem Verdauroboter .....	90
3.3.1.2 Proteinverdau mit Octylglycosid von NC- und PVDF-Membran-Spots mit dem Verdauroboter .....	92
3.3.1.3 Coomassie-Gel-Verdau zum Vergleich mit dem On-Membrane-Verdau.....	99
A) kleine Spots .....	99
B) große Spots .....	102
3.3.1.4 Proteinverdau mit Octylglycosid von jeweils 50% der Banden von NC- und PVDF-Membran mit dem Verdauroboter .....	104
3.3.2 Schritt 2: Verdau von mit Roti-Block behandelten Blot-Membranen nach manuellem Waschen in Schalen.....	109
3.3.3 Schritt 3: Verdau nach ECL .....	117
3.3.3.1 Verdau nach Blockade mit Roti-Block, ECL und manuellem Spülen in Schalen .....	117
3.3.3.2 Verdau nach Blockade mit Roti-Block, ECL und automatisiertem Spülen.....	125
3.3.3.3 Verdau nach Blockade mit Roti-Block, ECL und automatisiertem Spülen und Schütteln.....	136
3.3.3.4 Verdau nach Blockade mit Roti-Block, ECL und manuellem Spülen in Schalen mit DB71-Verdünnungslösung.....	146
3.3.3.5 Verdau nach ECL und Blocking mit PVP .....	153
3.3.4 Zusammenfassung Teil 3 .....	158

<b>4. Diskussion</b> .....	162
4.1 Eigenschaften des Elektrolots .....	162
4.2 Färbemethoden .....	163
4.3 Verdau von der Membran.....	163
4.4 Verdauzeit .....	165
4.5 Zusammensetzung von Verdaupuffer und Extraktionslösung .....	166
4.6 Automatisierung .....	169
4.7 Western Blot.....	170
4.8 Waschschritte vor dem Verdau .....	172
4.9 Matrices .....	175
4.10 Datenauswertung und PMF .....	178
4.11 Handhabung subpicomolarer Proteinmengen .....	179
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	183
<b>6. Summary</b> .....	184
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	185

## **Danksagung**

## Abkürzungen

A	Ampère
ACN	Acetonitril
BSA	bovines Serumalbumin
DB71	Direct Blue 71
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DHB/H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	DHB/Phosphorsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemoluminescence (verstärkte Chemolumineszenz)
ESI	electrospray ionisation
f	femto
g	Gramm
h	Stunde(n)
HCCA	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure
HCl	Salzsäure
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IAA	Iodacetamid
kDa	kilo Dalton
l	Liter
LC	liquid chromatography
LMW	low molecular weight
m	milli
MALDI-TOF-MS	Matrix-unterstützte Laser-Desorptions/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie
MilliQ	bidestilliertes Wasser
min	Minute(n)
MS	Massenspektrometrie
n	nano
NC	Nitrocellulose
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-Kochsalz-Puffer
p	pico
PTM	peptide mass fingerprinting
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidone
s	Sekunde(n)
SDS	Sodium Dodecylsulfat
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
H <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	Ammoniumhydrogencarbonat (Ammoniumbicarbonat) bzw. 50mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> -Puffer
KCl	Kaliumchlorid
HCl	Salzsäure

PMF	peptide mass fingerprinting
PP4fach	Probenpuffer 4fach
RT	Raumtemperatur
AK	Antikörper
μ	mikro

## Abbildungen

Abb. 1:	Schematischer Aufbau des Verdauroboters .....	14
Abb. 2:	Aufnahme des Grundrisses des Verdauroboters .....	15
Abb. 3:	Mikrotiterplatte mit Flüssigkeit und ausgestanzten Membran-Spots .....	25
Abb. 4:	Massenspektrum und Sequenzabdeckung von Ovalbumin, verdaut als Dot-Blot von der NC-Membran, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix.....	32
Abb. 5:	Massenspektrum und Sequenzabdeckung von Ovalbumin, verdaut als Dot-Blot von der PVDF-Membran, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix .....	33
Abb. 6:	NC-Membran nach der Färbung mit DB71 .....	34
Abb. 7:	PVDF-Membran nach der Färbung mit DB71 .....	34
Abb. 8:	A: NC-Membran, B: PVDF-Membran jeweils nach der Färbung mit DB71 und dem Ausstanzen von Spots mit dem Spot Cutter.....	35
Abb. 9:	Spektrum von BSA, verdaut als Elektro-Blot von der NC-Membran, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix.....	37
Abb. 10:	NC-Folie mit Proteingemisch 1 nach Färbung mit DB71 .....	38
Abb. 11:	Spektrum von BSA, Verdünnung 1, manuell verdaut von der NC-Membran, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix .....	41
Abb. 12:	Spektrum von BSA, manuell verdaut von der PVDF-Membran, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix .....	42
Abb. 13:	Sequenzabdeckungen vom Verdau mit einer Extraktionszeit von 30 Minuten.....	42
Abb. 14:	Sequenzabdeckungen vom Verdau mit einer Extraktionszeit von 40 Minuten.....	42
Abb. 15:	Mowse Scores vom Verdau mit einer Extraktionszeit von 30 Minuten .....	43
Abb. 16:	Mowse Scores vom Verdau mit einer Extraktionszeit von 40 Minuten .....	43
Abb. 17:	Spektrum von BSA, Verdünnung 2, verdaut über 8 Stunden von der NC-Membran, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix.....	45
Abb. 18:	Spektrum von Ovalbumin, Verdünnung 1, verdaut über 8 Stunden von der PVDF-Membran, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix .....	46
Abb. 19:	Spektrum von BSA, Verdünnung 1, verdaut über 16 Stunden von der NC-Membran, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix.....	48
Abb. 20:	Spektrum von BSA, Verdünnung 2, verdaut über 16 Stunden von der PVDF-Membran, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix.....	49
Abb. 21:	Spektrum von BSA, Verdünnung 1, nach Verdau mit manueller Extraktion von der NC-Membran, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix .....	51
Abb. 22:	Spektrum von BSA, Verdünnung 3, nach Verdau mit automatisierter Extraktion von der NC-Membran, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix .....	52
Abb. 23:	Spektrum von BSA, Verdünnung 2, verdaut von der NC-Membran mit 25µl Trypsin, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix.....	54
Abb. 24:	Spektrum von BSA, Verdünnung 2, verdaut von der PVDF-Membran mit 25µl Trypsin, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix .....	55
Abb. 25:	Vergleich der Sequenzabdeckungen des Verdau über 8 Stunden mit 25µl Trypsinlösung mit den ersten beiden 8-Stunden-Verdau mit 10µl Trypsinlösung .....	56
Abb. 26:	Gel mit BSA-Proben nach Färbung mit Coomassie .....	60
Abb. 27:	Spektrum von BSA, Verdünnung 1, Verdau ohne Waschen von der NC-Membran, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix.....	63

Abb. 28: Spektrum von BSA, Verdünnung 2, Verdau ohne Waschen von der NC-Membran, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix.....	64
Abb. 29: Spektrum von BSA, Verdünnung 1, Verdau aus dem Gel, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix.....	65
Abb. 30: BSA, Verdünnung 1, Verdau ohne Waschen von der NC-Membran, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix.....	66
Abb. 31: BSA, Verdünnung 1, Verdau ohne Waschen von der PVDF-Membran, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix.....	67
Abb. 32: Roti-Block gebrauchsfertig verdünnt, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix.....	68
Abb. 33: BSA, Verdünnung 1, Verdau ohne Waschen von der NC-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn.....	69
Abb. 34: BSA, Verdünnung 1, Verdau ohne Waschen von der PVDF-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn.....	70
Abb. 35: Roti-Block gebrauchsfertig verdünnt, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn.....	71
Abb. 36: BSA, Verdünnung 1, Verdau ohne Waschen von der NC-Membran, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix.....	72
Abb. 37: BSA, Verdünnung 1, Verdau ohne Waschen von der PVDF-Membran, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix.....	73
Abb. 38: Roti-Block gebrauchsfertig verdünnt, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix.....	74
Abb. 39: Spektrum von BSA, Verdünnung 2, verdaut nach 3x über 2 Stunden Waschen von der NC-Membran, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix.....	77
Abb. 40: Spektrum von BSA, Verdünnung 1, verdaut nach 3x über 2 Stunden Waschen von der PVDF-Membran, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix.....	78
Abb. 41: Spektrum von BSA, Verdünnung 2, verdaut nach 6x über 2 Stunden Waschen von der NC-Membran, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix.....	81
Abb. 42: Spektrum von BSA, Verdünnung 1, verdaut nach 6x über 2 Stunden Waschen von der PVDF-Membran, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix.....	82
Abb. 43: Spektrum von BSA, Verdünnung 1, verdaut von der NC-Membran nach 2-maligem Waschen mit ACN, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix.....	84
Abb. 44: Massenspektrum und Sequenz von BSA, Verdünnung 1, vom Verdau nach 2x Waschen über 17 Stunden von der NC-Membran.....	86
Abb. 45: Spektrum von Carboanhydrase, Verdünnung 1, Spots verdaut mit Octylglycosid von der NC-Membran, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix.....	94
Abb. 46: Spektrum von Carboanhydrase, Verdünnung 1, Spots verdaut mit Octylglycosid von der NC-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn.....	96
Abb. 47: Spektrum von Glycogenphosphorylase, Verdünnung 1, Spots verdaut mit Octylglycosid von der PVDF-Membran, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix.....	97
Abb. 48: Spektrum von Carboanhydrase, Verdünnung 1, Spots verdaut mit Octylglycosid von der PVDF-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn.....	99
Abb. 49: Spektrum von Carboanhydrase, Verdünnung 1, Verdau kleiner Spots aus dem mit Coomassie gefärbten Gel, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix.....	101
Abb. 50: Spektrum von Carboanhydrase, Verdünnung 1, Verdau großer Spots aus dem mit Coomassie gefärbten Gel, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn.....	103
Abb. 51: A: NC-Folie nach Färbung mit DB71, B: dieselbe Folie mit ausgeschnittenen Banden.....	105

Abb. 52: A: PVDF-Folie nach Färbung mit DB71, B: dieselbe Folie mit ausgeschnittenen Banden .....	106
Abb. 53: Spektrum von Ovalbumin, Verdünnung 1, Verdau von 50% der Banden mit Octylglycosid von der NC-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn ...	108
Abb. 54: Spektrum von Trypsin Inhibitor, Verdünnung 1, Verdau von 50% der Banden mit Octylglycosid von der NC-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn .....	109
Abb. 55: Spektrum von Carboanhydrase, Verdünnung 1, Verdau nach 3x manuellem Waschen von der NC-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn .....	113
Abb. 56: Spektrum von Ovalbumin, Verdünnung 3, Verdau nach 3x manuellem Waschen von der NC-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn.....	114
Abb. 57: Spektrum von Carboanhydrase, Verdünnung 1, Verdau nach 3x manuellem Waschen von der PVDF-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn.....	116
Abb. 58: Röntgenfilm nach der ECL, P: Abdruck der PVDF- und N: Abdruck der NC-Membran .....	119
Abb. 59: NC-Membran nach der ECL, gefärbt mit DB71.....	120
Abb. 60: PVDF-Membran nach der ECL, gefärbt mit DB71 .....	120
Abb. 61: Spektrum von Ovalbumin, Verdünnung 1, Verdau nach ECL und manuellem Spülen von der NC-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn.....	122
Abb. 62: Spektrum von Ovalbumin, Verdünnung 2, Verdau nach ECL und manuellem Spülen von der PVDF-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn .....	124
Abb. 63: Röntgenfilm mit sichtbar gemachten Ovalbumin-Banden zwischen 37 und 50 kDa, N: NC-Membran, P: PVDF-Membran.....	126
Abb. 64: A: NC-Folie nach Roti-Blockade, ECL und Färbung mit DB71. B: Dieselbe Folie nach dem Ausschneiden der Banden .....	127
Abb. 65: A: PVDF-Folie nach Roti-Blockade, ECL und Färbung mit DB71. B: Dieselbe Folie nach dem Ausschneiden der Banden .....	128
Abb. 66: Spektrum und Sequenzabdeckung von Ovalbumin, Verdünnung 2, verdaut nach ECL und automatisiertem Spülen von der NC-Membran, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix .....	130
Abb. 67: Spektrum und Sequenzabdeckung von Ovalbumin, Verdünnung 1, verdaut nach ECL und automatisiertem Spülen von der NC-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn.....	131
Abb. 68: Spektrum und Sequenzabdeckung von Ovalbumin, Verdünnung 2, verdaut nach ECL und automatisiertem Spülen von der PVDF-Membran, gemessen auf DHB/Phosphorsäure-Matrix .....	133
Abb. 69: Spektrum von Carboanhydrase, Verdünnung 3, verdaut nach ECL und automatisiertem Spülen von der PVDF-Membran, gemessen auf DHB/Phosphorsäure-Matrix .....	134
Abb. 70: Spektrum und Sequenzabdeckung von Ovalbumin, Verdünnung 1, verdaut nach ECL und automatisiertem Spülen von der NC-Membran, gemessen auf HCCA-Matrix nach Jahn.....	135
Abb. 71: NC-Folie nach ECL und Färbung mit DB71 .....	136
Abb. 72: PVDF-Folie nach ECL und Färbung mit DB71 .....	137
Abb. 73: Spektrum und Sequenzabdeckung von Ovalbumin, Verdünnung 1, verdaut nach automatisiertem Waschen mit Schütteln von der NC-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn .....	139

Abb. 74: Spektrum von Glycogenphosphorylase, Verdünnung 1, verdaut nach automatisiertem Waschen mit Schütteln von der NC-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn .....	140
Abb. 75: Spektrum von Ovalbumin, Verdünnung 2, verdaut nach automatisiertem Waschen mit Schütteln von der NC-Membran, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix .....	141
Abb. 76: Spektrum von Ovalbumin, Verdünnung 1, verdaut nach automatisiertem Waschen mit Schütteln von der PVDF-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn.....	143
Abb. 77: Spektrum von Ovalbumin, Verdünnung 1, verdaut nach automatisiertem Waschen mit Schütteln von der PVDF-Membran, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix .....	145
Abb. 78: Röntgenfilm mit geschwärzten Banden an den Stellen der leuchtenden Banden auf den Blot-Membranen als Ergebnis der ECL. N: Abdruck von der NC-Membran, P: Abdruck von der PVDF-Membran .....	147
Abb. 79: NC-Folie nach Behandlung mit Roti-Block, ECL, Waschen mit DB71-Entfärber .....	148
Abb. 80: PVDF-Folie nach Behandlung mit Roti-Block, ECL, Waschen mit DB71-Entfärber .....	148
Abb. 81: Spektrum von Ovalbumin, Verdünnung 1, verdaut nach Waschen mit DB71 von der NC-Membran, gemessen auf HCCA-Matrix nach Jahn .....	150
Abb. 82: Spektrum von Ovalbumin, Verdünnung 1, verdaut nach Waschen mit DB71 von der PVDF-Membran, gemessen auf HCCA-Matrix nach Jahn .....	152
Abb. 83: Röntgenfilm nach Blockade durch PVP und anschließender ECL.....	153
Abb. 84: NC-Folie nach Blockade mit PVP, ECL und Färbung mit DB71 .....	154
Abb. 85: PVDF-Folie nach Blockade mit PVP, ECL und Färbung mit DB71 .....	154
Abb. 86: Spektrum von Ovalbumin, Verdünnung 1, verdaut nach Blockade mit PVP von der NC-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn.....	156
Abb. 87: Spektrum und Sequenzabdeckung von Ovalbumin, Verdünnung 1, verdaut nach Blockade mit PVP von der PVDF-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn .....	157

## Tabellen

Tab. 1:	Proteinmengen pro Spur von Proben, die jeweils ein Protein beinhalten.....	17
Tab. 2:	Proteinmengen pro Spot von Proben, die jeweils ein Protein beinhalten .....	17
Tab. 3:	Proteinmengen pro Spot beim Dot-Blot .....	17
Tab. 4:	Proteinmassen pro Spur bei Proteingemisch 1 .....	18
Tab. 5:	Proteinmengen pro Spur bei Proteingemisch 1.....	19
Tab. 6:	Proteinmengen pro Spot bei Proteingemisch 1.....	19
Tab. 7:	Proteinmassen pro Spur bei Proteingemisch 2 .....	20
Tab. 8:	Proteinmengen pro Spur bei Proteingemisch 2.....	20
Tab. 9:	Proteinmengen pro Spot bei Proteingemisch 2.....	20
Tab. 10:	Proteinmengen pro halber Bande bei Proteingemisch 2.....	21
Tab. 11:	Proteinmengen pro (kleinem) bzw. großem Spot .....	21
Tab. 12:	Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel.....	21
Tab. 13:	Verdauschritte des Verdauroboters beim In-Gel-Digest .....	26
Tab. 14:	Verdauschritte des Verdauroboters beim On-Membrane-Verdau .....	27
Tab. 15:	Methode in Flex Analysis .....	28
Tab. 16:	Suchkriterien.....	29
Tab. 17:	Kriterien Sequence Editor.....	29
Tab. 18:	Kriterien Sequence Editor.....	29
Tab. 19:	Schritte im Verdauprotokoll für den On-Membrane-Verdau .....	31
Tab. 20:	Sequenzabdeckungen und Mowse Scores vom Verdau des Dot-Blots von der NC- bzw. PVDF-Membran.....	31
Tab. 21:	Verdünnungsreihe von Proteingemisch 1 .....	34
Tab. 22:	Verdauprotokoll Blot-Membranen .....	35
Tab. 23:	Sequenzabdeckungen und Mowse Scores vom 2-Stunden-Verdau von der NC- Membran, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix.....	36
Tab. 24:	Protokoll manueller Verdau.....	39
Tab. 25:	Anteil ACN und Einwirkzeiten beim manuellen Verdau .....	39
Tab. 26:	Sequenzabdeckungen und Mowse Scores von BSA, Verdünnung 1, vom manuellen Verdau von der NC- und der PVDF-Membran bei unterschiedlichen Konzentrationen von Acetonitril in der Extraktionslösung und unterschiedlichen Extraktionszeiten, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix. ....	40
Tab. 27:	Verdauprotokoll 8 Stunden.....	44
Tab. 28:	Sequenzabdeckungen und Mowse Scores vom 8-Stunden-Verdau von der NC- Membran, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix.....	44
Tab. 29:	Sequenzabdeckungen und Mowse Scores vom 8-Stunden-Verdau von der PVDF-Membran, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix. ....	44
Tab. 30:	Verdauprotokoll 16 Stunden.....	47
Tab. 31:	Sequenzabdeckungen und Mowse Scores vom 16-Stunden-Verdau von der NC- Membran, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix.....	47
Tab. 32:	Sequenzabdeckungen und Mowse Scores vom 16-Stunden-Verdau von der PVDF-Membran, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix. ....	47
Tab. 33:	Verdauprotokoll Extraktionsvergleich.....	50
Tab. 34:	Sequenzabdeckungen und Mowse Scores des Verdaus, bei dem die Extraktion manuell ausgeführt wurde.....	50

Tab. 35:	Sequenzabdeckungen und Mowse Scores des Verdau, bei dem die Extraktion vom Verdauroboter ausgeführt wurde .....	50
Tab. 36:	Verdauprotokoll 25µl Trypsinlösung.....	53
Tab. 37:	Sequenzabdeckungen und Mowse Scores des Verdau mit 25µl Trypsinlösung....	53
Tab. 38:	Zusammenfassung Teil 1 .....	57
Tab. 39:	Verdauprotokoll Teil 1.....	59
Tab. 40:	Verdauprotokoll ohne Waschen.....	61
Tab. 41:	Sequenzabdeckungen und Mowse Scores des Verdau der mit Roti-Block behandelten Membranen, gemessen auf einer DHB/HCCA-Mischmatrix. ....	62
Tab. 42:	Sequenzabdeckungen und Mowse Scores des Verdau der mit Roti-Block behandelten Membranen, gemessen auf einer DHB/Phosphorsäure-Matrix.....	63
Tab. 43:	Sequenzabdeckungen und Mowse Scores des Verdau im mit Coomassie gefärbten Gel, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix. ....	64
Tab. 44:	Verdauprotokoll 3x über 2 Stunden Waschen .....	76
Tab. 45:	Sequenzabdeckungen und Mowse Scores vom Verdau nach 3-maligem Waschen der Spots mit Verdau puffter, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix .....	76
Tab. 46:	Sequenzabdeckungen und Mowse Scores vom Verdau nach 3-maligem Waschen der Spots mit Verdau puffter, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix .....	76
Tab. 47:	Verdauprotokoll 6x über 2 Stunden waschen .....	79
Tab. 48:	Sequenzabdeckungen und Mowse Scores vom Verdau nach 6-maligem Waschen der Spots mit Verdau puffter, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix .....	80
Tab. 49:	Sequenzabdeckungen und Mowse Scores vom Verdau nach 6-maligem Waschen der Spots mit Verdau puffter, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix .....	80
Tab. 50:	Verdauprotokoll Waschen mit ACN.....	83
Tab. 51:	Sequenzabdeckungen und Mowse Scores vom Verdau nach 2-maligem Waschen der Spots mit Acetonitril, gemessen auf der DHB/Phosphorsäure-Matrix.....	83
Tab. 52:	Verdauprotokoll 2x Waschen über 17 Stunden .....	85
Tab. 53:	Sequenzabdeckungen und Mowse Scores des Verdau nach 17 Stunden Waschen mit Verdau puffter, gemessen auf DHB/HCCA-Mischmatrix. ....	85
Tab. 54:	Sequenzabdeckungen und Mowse Scores des Verdau nach 17 Stunden Waschen mit Verdau puffter, gemessen auf DHB/Phosphorsäure-Matrix.....	85
Tab. 55:	Zusammenfassung Teil 2 .....	87
Tab. 56:	Verdauprotokoll Teil 2.....	89
Tab. 57:	Verdünnungsreihe von Proteingemisch 2 .....	90
Tab. 58:	Verdauprotokoll Spots ohne Octylglycosid.....	90
Tab. 59:	Sequenzabdeckungen und Mowse Scores vom Verdau von NC-Spots ohne Octylglycosid, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix.....	91
Tab. 60:	Sequenzabdeckungen und Mowse Scores vom Verdau von PVDF-Spots ohne Octylglycosid, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix.....	92
Tab. 61:	Sequenzabdeckungen und Mowse Scores des Verdau von Spots von der NC-Membran mit Octylglycosid, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix .....	93
Tab. 62:	Sequenzabdeckungen und Mowse Scores des Verdau von Spots von der NC-Membran mit Octylglycosid, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn.....	95

Tab. 63:	Sequenzabdeckungen und Mowse Scores des Verdaus von Spots von der PVDF-Membran mit Octylglycosid, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix. ....	97
Tab. 64:	Sequenzabdeckungen und Mowse Scores des Verdaus von Spots von der PVDF-Membran mit Octylglycosid, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn. ....	98
Tab. 65:	Verdauprotokoll Coomassie-Gel-Verdau kleiner Stanzkopf.....	100
Tab. 66:	Sequenzabdeckungen und Mowse Scores des Verdaus von mit dem kleinen Stanzkopf ausgestochenen Gel-Spots mit Octylglycosid, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix. ....	101
Tab. 67:	Verdauprotokoll Coomassie-Gel-Verdau großer Stanzkopf.....	102
Tab. 68:	Sequenzabdeckungen und Mowse Scores des Verdaus von mit dem großen Stanzkopf ausgestochenen Gel-Spots mit Octylglycosid, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn.....	102
Tab. 69:	Vergleich ungefährender absoluter Mengen in großen und kleinen Gel-Spots.....	103
Tab. 70:	Verdauprotokoll 50% der Banden mit Octylglycosid.....	106
Tab. 71:	Ausgestanzte Spots und Ergebnisse des Verdaus von 50% der Banden mit Octylglycosid von der NC-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn ...	107
Tab. 72:	Ausgestanzte Spots und Ergebnisse des Verdaus von 50% der Banden mit Octylglycosid von der PVDF-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn .....	108
Tab. 73:	Verdauprotokoll Roti-Block + 3x manuelles Waschen .....	111
Tab. 74:	Ausgestanzte Spots und Ergebnisse des Verdaus nach 3x manuellem Waschen von der NC-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn.....	111
Tab. 75:	Ausgestanzte Spots und Ergebnisse des Verdaus nach 3x manuellem Waschen von der NC-Membran, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix.....	112
Tab. 76:	Ausgestanzte Spots und Ergebnisse des Verdaus nach 3x manuellem Waschen von der PVDF-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn. ....	115
Tab. 77:	Ausgestanzte Spots und Ergebnisse des Verdaus nach 3x manuellem Waschen von der PVDF-Membran, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix. ....	115
Tab. 78:	Verdauprotokoll Roti-Block, ECL und manuelles Spülen .....	121
Tab. 79:	Ausgestanzte Spots und Ergebnisse des Verdaus nach ECL und manuellem Spülen von der NC-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn.....	121
Tab. 80:	Ausgestanzte Spots und Ergebnisse des Verdaus nach ECL und manuellem Spülen von der NC-Membran, gemessen mit DHB-Phosphorsäure-Matrix. ....	122
Tab. 81:	Ausgestanzte Spots und Ergebnisse des Verdaus nach ECL und manuellem Spülen von der PVDF-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn .....	123
Tab. 82:	Ausgestanzte Spots und Ergebnisse des Verdaus nach ECL und manuellem Spülen von der PVDF-Membran, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix.....	123
Tab. 83:	Verdauprotokoll Roti-Block, ECL und automatisiertes Spülen .....	129
Tab. 84:	Ausgestanzte Spots und Ergebnisse des Verdaus von der NC-Membran nach ECL und automatisiertem Spülen, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix....	129
Tab. 85:	Ausgestanzte Spots und Ergebnisse des Verdaus von der NC-Membran nach ECL und automatisiertem Spülen, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn.....	130
Tab. 86:	Ausgestanzte Spots und Ergebnisse des Verdaus von der PVDF-Membran nach ECL und automatisiertem Spülen, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix. ....	132

Tab. 87:	Ausgestanzte Spots und Ergebnisse des Verdaus von der PVDF-Membran nach ECL und automatisiertem Spülen, gemessen auf HCCA-Matrix nach Jahn .....	135
Tab. 88:	Verdauprotokoll ECL + automatisiertes Spülen mit Schütteln .....	137
Tab. 89:	Sequenzabdeckungen und Mowse Scores des Verdaus nach automatisiertem Waschen mit Schütteln von der NC-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn.....	138
Tab. 90:	Sequenzabdeckungen und Mowse Scores des Verdaus nach automatisiertem Waschen mit Schütteln von der NC-Membran, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix. ....	141
Tab. 91:	Sequenzabdeckungen und Mowse Scores des Verdaus nach automatisiertem Waschen mit Schütteln von der PVDF-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn.....	142
Tab. 92:	Sequenzabdeckungen und Mowse Scores des Verdaus nach automatisiertem Waschen mit Schütteln von der PVDF-Membran, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix. ....	144
Tab. 93:	Verdauprotokoll ECL + manuelles Spülen mit DB71-Verdünnungslösung .....	149
Tab. 94:	Sequenzabdeckungen und Mowse Scores des Verdaus nach Waschen mit DB71 von der NC-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn.....	149
Tab. 95:	Sequenzabdeckungen und Mowse Scores des Verdaus nach Waschen mit DB71 von der NC-Membran, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix. ....	150
Tab. 96:	Sequenzabdeckungen und Mowse Scores des Verdaus nach Waschen mit DB71 von der PVDF-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn .....	151
Tab. 97:	Sequenzabdeckungen und Mowse Scores des Verdaus nach Waschen mit DB71 von der PVDF-Membran, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix .....	151
Tab. 98:	Verdauprotokoll ECL + Blocking mit PVP.....	155
Tab. 99:	Sequenzabdeckungen und Mowse Scores des Verdaus nach Blockade mit PVP von der NC-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn.....	155
Tab. 100:	Sequenzabdeckungen und Mowse Scores des Verdaus nach Blockade mit PVP von der PVDF-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn .....	156
Tab. 101:	Zusammenfassung Teil 3 .....	158
Tab. 102:	Mowse Scores und Sequenzabdeckungen von Ovalbumin, Verdünnung 1, aus verschiedenen Versuchen im Vergleich. Verdaut wurden in jedem der Versuche ca. 50% der Banden, gemessen wurde mit HCCA-Matrix.....	160
Tab. 103:	Verdauprotokoll Teil 3.....	161



## **1. Einleitung**

### **1.1 Proteomik**

Seit der Enthüllung der DNA-Struktur 1953 rückte die Erforschung des gesamten menschlichen Genoms in den Mittelpunkt wissenschaftlichen Interesses [21], ein Ziel, das mit der Vollendung des "Human Genome Project" [22], der vollständigen Entschlüsselung des menschlichen Genoms, verwirklicht wurde. Somit wurde eine Grundlage für die Analyse der DNA-Produkte, der Proteine, geschaffen, die nunmehr ein vorrangiges Forschungsziel darstellt.

Der Begriff "Proteom" wurde 1994 von Marc Wilkins geprägt [134]. Er definierte das Proteom als die Gesamtheit aller exprimierten Proteine einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt; als Proteomik wird dementsprechend die Erforschung des Proteoms bezeichnet. Die Expressierung der Proteine ist im Gegensatz zum statischen Genom hochdynamisch, nämlich von Umgebungseinflüssen abhängig [74] und somit stark variabel; ein Gen kodiert für ein Protein, dieses kann aber aufgrund unterschiedlicher Veränderungen während und nach der Expression verschiedenste Modifikationen erhalten und damit verschiedene Funktionen im Organismus übernehmen. So umfaßt das menschliche Genom etwa 25.000 Gene, das menschliche Proteom besteht aber aus etwa 100.000 Proteinen [77]. Die Eigenschaften eines Genproduktes lassen sich somit unmöglich weder von der Gensequenz noch von der mRNA herleiten.

Die unterschiedlichen Strukturen, die Proteine trotz identischer genetischer Basis besitzen, sind durch die Existenz verschiedener Protein-Isoformen erklärbar (bis zu 22 Protein-Isoformen können in eukaryoten Zellen auf der Grundlage eines einzigen Gens exprimiert werden) [57; 108]. Die Isoformen entstehen u.a. durch unterschiedliche Arten des Splicing, durch C- und N-terminale Brüche sowie durch co- und posttranslationale Modifikationen (PTMs), wie z.B. Phosphorylierungen, Methylierungen, Glykosylierungen etc. [57; 94]. Mehr als 200 verschiedene Arten von posttranslationalen Modifikationen wurden charakterisiert und es kommen regelmäßig neue hinzu [76; 87]. PTMs finden sich bei allen Arten von Proteinen, von nuklearen Transkriptionsfaktoren bis hin zu metabolischen Enzymen, Strukturproteinen und Plasmamembran-Rezeptoren [68]; auch verschiedene Arten von Signalsequenzen, die der intrazellulären Kommunikation dienen, sind Ergebnisse von PTMs [15]. Die PTM Phosphorylcholin ist beispielsweise ein Pathogenitätsfaktor von Parasiten [52]. Anhand von mit ESI-MS/MS erzeugten Spektren ist es möglich, nicht nur die Aminosäuresequenz eines Proteins, sondern auch die Lokalisation seiner PTMs zu detektieren und diese zu identifizieren [97].

Die Proteome von Zellen unterscheiden sich allerdings nicht nur durch die unterschiedliche Struktur der Proteine, sondern auch durch deren topologische Anordnung und deren Anzahl innerhalb der Zelle [14]. Die Proteinzusammensetzung einer Zelle repräsentiert ihren funktionellen Status. So kann z.B. die Hoch- bzw. Herunterregulation eines bestimmten Proteins mit einer Krankheit (wie z.B. Alzheimer [86]) oder der Entstehung eines Karzinoms assoziiert sein [70; 27].

Die Proteine einer Zelle interagieren auch miteinander, was sich in der Bildung von Proteinkomplexen oder Netzwerken aus Proteinen mit verschiedenen Funktionen niederschlägt [49]. Die Erforschung von Protein-Protein-Interaktionen ermöglicht es, biologische Prozesse zu verstehen, die von diesen reguliert werden [21]. Substanzen, die diese Interaktionen stören, können das Proteinnetzwerk beeinflussen und somit z.B. teratogen oder krankheitsauslösend wirken.

Eines der Ziele der Proteomforschung ist es, die Funktionen der zellulären Proteine aufzudecken und damit nicht nur Erkenntnisse über intrazelluläre biologische Abläufe zu erlangen, sondern auch über die dadurch bedingten Lebensprozesse des gesamten Organismus Aufschluß zu erhalten. Dies ist kein einfaches Unterfangen, wenn man bedenkt, daß allein in einem einfachen Organismus wie der Hefe ca. 80.000 solcher Interaktionen existieren [129] und in höheren Organismen das Interaktionsnetzwerk noch komplexer ist. "Interaction Proteomics", die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen, ist einer der wichtigsten Bereiche der Proteomik und bedient sich spezieller Analysemethoden, wie dem "Yeast Two-hybrid System" [44], der "Affinity Purification" oder der "Protein Chip Methode" [21]. Das Verständnis der Regulierung von Abläufen biologischer Prozesse und das Aufdecken von Reaktionsketten innerhalb der Zelle und des gesamten Organismus ermöglicht es schon heute, in die Entstehung von Krankheiten einzugreifen bzw. neue Therapien zu entwickeln [22].

## **1.2 Gel- und LC-basierende Methoden der Proteinauftrennung**

Die Proteomforschung wurde durch die Verfügbarkeit von Genomsequenz-Daten sowie durch die laufenden technischen Fortschritte in der Proteinanalytik [109; 21], dem Ursprung der Proteomik, ermöglicht.

Grundlegende Techniken der Proteinanalytik sind neben der Probenvorbereitung Trennmethode für Proteingemische wie die 2-dimensionale Gelelektrophorese, bei der eine Separierung der Proteine aufgrund ihres isoelektrischen Punktes sowie ihrer Molekülgröße erfolgt, oder die Flüssigkeitschromatographie (Liquid Chromatography, LC), bei der

komplette Proteome proteolytisch fragmentiert und anschließend die Peptide chromatographisch aufgetrennt werden [100].

Im Gegensatz zu den gelbasierenden Trennmethode, bei denen eine Quantifizierung densitometrisch durch die Anfärbung der Proteinspots auf dem Gel erfolgt (die Farbintensität der Spots ist proportional zu ihrem Proteingehalt), nutzen LC-basierende Methoden die Massenspektrometrie teils unter Zuhilfenahme interner Standards für die genaue Quantifizierung der Proben [100].

Das gängigste Verfahren zur Identifizierung von Proteinen ist nach wie vor die 2D-SDS-Gelelektrophorese kombiniert mit der MALDI-TOF-Massenspektrometrie, da es sich hierbei um eine sensitive Methode handelt, mit der eine große Spanne verschiedener Proteine dargestellt werden kann; zudem existieren 2D-Gel-Profile in Literatur und Datenbanken [32], auf die zwecks Datenabgleich zurückgegriffen werden kann.

Die Technik der 2D-Gelelektrophorese existiert seit den 1970er Jahren [81; 106]. Zunächst werden die Proteine mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) nach ihrer Ladung nach ihrem isoelektrischen Punkt in der sogenannten ersten Dimension aufgetrennt, anschließend erfolgt die Trennung nach dem Molekulargewicht in der zweiten Dimension mittels SDS-PAGE [116].

Die SDS-PAGE kommt allerdings an ihre Grenzen, wenn das Gemisch zu geringe Proteinmengen enthält, die Proteinprobe zu komplex ist oder die aufzutrennende Probe stark hydrophobe, extrem basische oder extrem große oder kleine Proteine enthält. Dennoch gibt es bisher kein Verfahren, das der 2D-Gelelektrophorese überlegen wäre [57]. Vorteile der SDS-PAGE bestehen darin, daß die meisten Proteine in SDS löslich sind, daß eine breite molekulare Masse von 10.000 bis 300.000 Da abgedeckt wird und daß schwach saure oder basische Proteine aufgetrennt werden können [108]. Strukturgleiche Proteine, die sich lediglich in ihrer PTM unterscheiden, was sich z.B. auf ihren isoelektrischen Punkt oder auf ihre molekulare Masse auswirkt, können somit erfolgreich voneinander getrennt werden [126]. Mit der Einführung der großen 2D-"Klose"-Gele wurde versucht, mehr Proteinspezies aufzutrennen [75].

### **1.3 Massenspektrometrie: ESI- und MALDI-TOF-MS**

Die Erforschung des Proteinaufbaus und der damit verbundenen Informationen über die Proteinfunktionen stellt den Mittelpunkt der Proteomforschung dar. Zur Analyse von Proteinsequenzen existieren unterschiedliche Verfahren.

Ein seit den 1980er Jahren häufig genutztes Verfahren zur Bestimmung der Aminosäure-Sequenz einer Peptid-Kette ist die Edman-Sequenzierung. Es handelt sich um eine Methode, bei der die Peptidkette am N-terminalen Ende schrittweise abgebaut wird, was voraussetzt, daß das Amino-Ende der Aminosäure nicht blockiert sein darf [35; 37; 36].

Dieses klassische Verfahren wurde heutzutage weitgehend ersetzt durch die Massenspektrometrie, da diese sensitiver ist, sich hierbei ein höherer Durchsatz an Proben erzielen läßt und keine einheitlich aufgereinigten Proteine oder Peptide benötigt werden, womit sie auch bei Proteingemischen anwendbar ist und damit die Methode der Wahl für die Analyse komplexer Proteinproben darstellt [108]. Definitionsgemäß besteht ein Massenspektrometer aus einer Ionenquelle, einem Massenanalysegerät, das das Masse-zu-Ladungsverhältnis  $m/z$  des ionisierten Analyten mißt, und einem Detektor, der die Anzahl der Ionen bei einem bestimmten  $m/z$ -Wert mißt [55]. Es gibt im Wesentlichen vier verschiedene Typen von Massenanalysegeräten. Dies sind die Ionenfalle, time-of-flight (TOF) -, Quadrupol- und Fourier Transform Ionen Cyclotron (FT-MS) – Analysegeräte [2]; die Messungen erfolgen bei allen Geräten in der Gasphase.

In der Geschichte der Massenspektrometrie gab es in den 1980er Jahren zwei erwähnenswerte technische Durchbrüche, und zwar die Entwicklung zweier "weicher" Ionisationsmethoden, bei denen es nur zu einer minimalen Fragmentierung des Analytenmoleküls kommt [1].

Zum einen ist dies die Elektrospray Ionisation (ESI), für deren Entwicklung mit Beginn in den 1988er Jahren schließlich 2002 der Nobelpreis für Chemie vergeben wurde [42; 41]. Hierbei wird eine Peptidlösung durch Einwirkung eines elektrischen Feldes mit Hilfe einer Sprayerkapillare zu einem Aerosol vernebelt und es kommt schließlich zur Bildung freier Ionen, die durch die Potentialdifferenz zwischen Sprayerkapillare und Gegenelektrode in das Massenspektrometer gelenkt werden. In einem ersten Schritt werden einzelne Peptide aus der Lösung isoliert und in einem zweiten Schritt fragmentiert und dadurch sequenziert [108]. ESI kann mit oben erwähnten flüssigkeitsbasierenden Trennmethode wie der Flüssigkeits-Chromatographie (LC) oder der 2D-SDS-PAGE gekoppelt werden, was durch eine initiale Separierung der Peptide die Analyse komplexer Proteinproben ermöglicht [108].

Die zweite Methode ist die Matrix-unterstützte Laser Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS). Bei diesem Verfahren werden eine Matrix und der Analyt kokristallisiert, indem der Analyt während des Trocknens in die Matrix-Kristalle eingebaut wird. Beim Beschuß z.B. mit einem Stickstofflaser für ca. 2-5 ns kommt es zur Energieübertragung und Ionisation der Analytmoleküle.

Die ESI ist meist gekoppelt an Ionenfallen oder Triple Quadrupol-Analysegeräte, die sogenannte fragmentierte Ionen-Spektren (kollisionsinduzierte Spektren; CID) liefern; diese entstehen durch die Kollision der eingefangenen Ionen mit einem Inertgas, was zum weiteren Zerfall der Ionen führt. Die ESI-Ion Trap-MS z.B. zeigt eine hohe Sensitivität bis in den Femtomol-Bereich [34].

Im Gegensatz dazu ist die MALDI meist an TOF-Analysegeräte gekoppelt, die die Massen intakter Peptide messen. Die Proteinidentifizierung mit MALDI-TOF wird auch als Peptide Mapping oder Peptide Mass Fingerprinting (PMF) [61] bezeichnet, was bedeutet, daß die im Experiment gemessenen Massen der Peptide, die beim Verdau eines Proteins entstanden sind, mit den Peptidmassen einer Datenbank verglichen werden. Je mehr identische Peptidmassen in der Datenbank gefunden werden, desto höher ist die resultierende Sequenzabdeckung [10]. MALDI-TOF-MS eignet sich für die Analyse einfacher Peptidgemische sowie für die Analyse von Proteinen höheren Molekulargewichts [34]. Die MALDI-Geräte erreichen eine Sensitivität bis in den Femto- und Attomolbereich [78].

Kollisionsinduzierte (CID) Spektren liefern im Gegensatz zum PMF nicht nur Informationen über die Peptidmassen, sondern auch über die Peptidsequenz [2]. Massenspektrometrische Methoden, die in der Lage sind, auch für geringe Probenmengen solch detaillierte Informationen über unbekannte Peptide zu liefern (wie die Nanospray Tandem MS), sind allerdings technisch komplexer und nehmen eine längere Analysezeit in Anspruch als Hochdurchsatzmethoden wie PMF mit MALDI-TOF-MS und sind daher eher für Proben geeignet, bei denen Interesse an einer besonders genauen Analyse besteht [28].

#### **1.4 Western Blot und On-Membrane-Verdau**

Die häufigsten Techniken in der Proteomik sind die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen und deren anschließende massenspektrometrische Identifizierung [136].

Es besteht die Möglichkeit, nach der Auftrennung im Gel die Proteine mittels Elektro-Blot auf eine NC- oder PVDF-Membran zu transferieren und die Spots dann immunochemisch sichtbar zu machen. Dieses Vorgehen wird als Western Blot [96] oder Lektin Blot bei der Verwendung von Lektinen anstelle von Antikörpern [107] bezeichnet. Die Technik des Western Blot wurde in den 1979er Jahren eingeführt [114; 125] und weiterentwickelt [18]. Die immunochemische Detektion beim Western Blot wird dadurch ermöglicht, daß ein Antikörper, der gegen ein bestimmtes Epitop oder eine bestimmte Modifikation eines Proteins, z.B. gegen eine Phosphorylierung, gerichtet ist, an das entsprechende Epitop bindet. Ein zweiter, enzymgebundener Antikörper wird anschließend an den ersten Antikörper

gebunden. Der nächste Schritt beinhaltet eine Chemofluoreszenz oder Chemolumineszenz-Reaktion. Letztere wird über ein Enzym wie Meerrettichperoxidase (Horse Raddish Peroxidase; HRP) oder Alkalische Phosphatase (AP), das an den zweiten Antikörper gekoppelt ist, vermittelt. Durch die Umsetzung eines enzymespezifischen Substrates mithilfe eines Verstärkers (Enhancer) wird auf chemischem Wege Licht erzeugt, das einen Röntgenfilm an den durch den Antikörper markierten Stellen schwärzt [54].

Somit können z.B. gezielt Spots sichtbar gemacht werden, die Phosphat-Reste enthalten. Da Phosphorylierungen bei der Aktivierung bestimmter Moleküle und bei der Signaltransduktion innerhalb von Zellen von Bedeutung sind, können mittels Western Blot und Immunodetektion z.B. gezielt nur die aktivierten Stadien bestimmter Proteine markiert werden [108].

Aufgrund der hohen Sensitivität und Spezifität wird der Western Blot mit anschließender ECL (Enhanced Chemoluminescence) beispielsweise beim HIV-Test in Kombination mit ELISA eingesetzt [25].

Die geblotteten Proteine können nach Immunodetektion auf der Blot-Membran verdaut werden. Ohtsu et al. entwickelten die Methode "Western MS", bei der eine MALDI-TOF-MS-Analyse nach dem Verdau direkt von der PVDF-Membran erfolgt [102]. Ebenso ist es möglich, den On-Membrane-Verdau klassisch in Mikrotiterplatten ablaufen zu lassen und anschließend die Peptide zu extrahieren und auf ein Target zu spotten, bevor sie der MS Analyse zugeführt werden [33].

Für die Durchführung des On-Membrane-Verdaus existieren zahlreiche unterschiedliche Methoden, wie z.B. der tryptische Verdau in einem 2-Phasen-System aus Butanol und  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Puffer über 24 Stunden [140] oder der tryptische Verdau in  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Puffer über 16 Stunden [107].

Besonders geeignet ist die Kombination der Immunodetektion mit dem anschließenden On-Membrane-Verdau für komplexe Proben mit nur wenigen immunreaktiven Komponenten, bei denen es beim Verdau vom parallel hergestellten Vergleichs-Gel schwierig wäre, die auf der Membran immunologisch markierten Spots auf dem korrespondierenden Gel wiederzufinden. Die Möglichkeit, nach der Immunodetektion die markierten Proteine auf der Membran dem Verdau und damit der MS Analyse zuzuführen, verringert außerdem den Bedarf an Probenmaterial, da nur noch ein Gel für die Analyse benötigt wird [89].

## **1.5 Datenbanken**

Eine Fülle an Informationen, wie sie die proteomanalytische Forschung liefert, verlangt eine effiziente und dauerhafte Speicherung, so daß jederzeit Zugriffe auf die Daten möglich sind.

In den späten 1970er Jahren wurden erstmals mithilfe der damals neu entwickelten 2D-Gelelektrophorese Datenbanken geschaffen, in denen die Spot-Muster der in 2D-Gelen aufgetrennten Proteingemische abrufbar waren und mit speziellen Computerprogrammen analysiert werden konnten [5]. Heutzutage existieren Datenbanken, die ganze Proteome, beispielsweise die von humanem Plasma, Leber, Erythrozyten [118] oder Niere sowie die der häufig untersuchten Bäckerhefe oder *Escherichia coli* enthalten.

Die Identifikation einzelner Proteine gelang erst ab den 1990er Jahren mit der Entwicklung der Massenspektrometrie [108]. Seither entstanden Datenbanken, in denen die Peptidmassen einzelner Proteine gespeichert sind (Peptide Mass Fingerprinting). Da Trypsin die Proteine C-terminal von den Aminosäuren Arginin und Lysin spaltet, lassen sich die Massen der durch tryptischen Verdau entstehenden Peptide theoretisch berechnen. Die experimentell mit Hilfe der MALDI-MS ermittelten Peptidmassen werden dann mit den theoretischen in der Datenbank abgeglichen und es ergibt sich ein Score, der umso höher ist, je mehr experimentelle Peptidmassen mit denen eines Proteins aus der Datenbank übereinstimmen [108].

Die ESI-MS/MS ermöglicht es, über die Fragmentierung von Peptiden die Lokalisation bestimmter Aminosäuren innerhalb eines Peptids zu bestimmen, wodurch das Peptid aufgrund seines speziellen Aminosäuren-Musters "etikettiert" und in Sequenzdatenbanken gefunden werden kann [108]. Solche Proteinsequenz-Datenbanken werden mit Hilfe theoretischer Translation aus Nukleinsäure-Sequenzen hergestellt, woraus ersichtlich ist, daß die Genomik die Grundlage für die Proteomik bildet [57].

Zahlreiche solche Proteinsequenz-Datenbanken und Peptid-Bibliotheken sind in den vergangenen Jahren durch die Zusammenarbeit zwischen Proteomforschung und Bioinformatik entstanden. Sie haben sich als praktisch für die Identifikation von Proteinen v.a. im Zuge von Hochdurchsatz-Verfahren mittels MALDI-TOF-MS erwiesen. Mit der Entwicklung geeigneter Software ist es möglich, die vorhandenen Datenbanken nach Übereinstimmungen mit experimentell gewonnenen MALDI-TOF-Spektren zu durchsuchen, was die Entwicklung weiterer Datenbanken und proteomischer Landkarten z.B. für Mikroorganismen vorantreibt [132]. Momentan sind bestimmte Bereiche der Proteomik, wie z.B. Proteinsequenzen für einige Modellorganismen, gut in Datenbanken erfaßt, andere, wie z.B. PTMs oder Proteinsequenzen für weniger bekannte Organismen, jedoch (noch) nicht [57]. Bekannte Proteinsequenzdatenbanken sind z.B. MSDB oder SwissProt.

Steht keine Proteinsequenzdatenbank zur Verfügung, kann immer noch auf sogenannte EST (Expressed-Sequence-Tags)-Datenbanken zurückgegriffen werden [16; 93]. Als ESTs werden

Stücke von cDNA bezeichnet, mit deren Hilfe es möglich ist, kodierende Sequenzen für ein bestimmtes Protein zu finden und somit exprimierte Gene einer Zelle zu erfassen.

## **1.6 Automatisierung**

Bei der Erforschung von Proteomen im großen Stil ist es erforderlich, eine sehr hohe Anzahl an Proteinen zu analysieren. Aus diesem Grund geht der aktuelle Trend in die Richtung, möglichst viele Arbeitsschritte im Ablauf des Proteinidentifikationsprozesses zu automatisieren und Hochdurchsatzverfahren zu entwickeln, um Zeit und Aufwand zu sparen [113]. Die drei Schritte, die für die konventionelle Proteinidentifikation nötig sind, bestehen aus dem Ausschneiden von Spots aus Gel oder Membran und deren Transfer in Mikrotiterplatten, aus dem Proteinverdau mithilfe einer Protease, sowie aus dem Auftragen des Verdauproduktes auf ein MALDI-Target bzw. ein Einbringen in die Elektrospray-Quelle eines Massenspektrometers [57]. Die bisherige technische Entwicklung erlaubt es, mithilfe spezieller Gerätschaften und Roboter jeden einzelnen dieser Schritte automatisiert ablaufen zu lassen. Die anschließende Datenanalyse, d.h. die Bearbeitung und Kalibrierung der Spektren, wird jedoch meistens manuell durchgeführt.

Vor allem der zweite Arbeitsschritt, der Proteinverdau, bildet oft ein zeitliches Hindernis, weshalb vielerorts schon mit Pipettier- und Verdaurobotern gearbeitet wird [67]. Schon vor über 10 Jahren wurden erste Roboter zum automatisierten In-Gel-Verdau entwickelt [66] und heutzutage sind viele verschiedene Modelle zu erwerben. Aber auch die anderen Arbeitsschritte, wie Spot Picking, Extraktion, Spotting, MS-Analyse und sogar die Bearbeitung der Spektren werden mancherorts automatisch durchgeführt [99].

Die MALDI-TOF-MS ist aufgrund der Möglichkeit, automatische Messungen durchzuführen und damit in kurzer Zeit eine große Anzahl an Proteinen zu identifizieren, die Methode der Wahl in den meisten Laboratorien [105].

In der vorliegenden Arbeit liegt der Schwerpunkt auf der Entwicklung einer Verdau- und Extraktionsmethode, wobei der Verdau nicht wie herkömmlich im Gel, sondern auf Membranen ablief, mit denen zuvor ein Western Blot durchgeführt worden war.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Wasser wurde mit dem "Milli-Q Ultra-pure water system" (Millipore, Eschborn) entsalzt und gereinigt.

Aceton, Roth, Karlsruhe

Acetonitril, Roth

Acrylamid-Lösung: "Rotiphorese Gel 30", Roth

Ammoniumpersulfat, GE Healthcare, Freiburg

Antikörper 1: "Monoclonal Anti-Chicken Egg Albumin, Clone OVA-14 (Ovalbumin)",  
Sigma, Steinheim

Antikörper 2: "Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunglobulins/HRP", Dako, Hamburg

Bromphenolblau, Serva, Heidelberg

bovines Serumalbumin, Sigma

1-Butanol, Merck, Darmstadt

Casein, Sigma

Citronensäure-Monohydrat, Roth

Coomassie-Färbung: Serva Blue R, Serva

2,5-Dihydroxybenzoesäure, Sigma

Direct Blue 71, Sigma

DTT: "DL-Dithiothreitol for electrophoresis", Sigma

ECL Plus Western Blotting Detection System, GE Healthcare

Essigsäure, Merck

Ethanol (unvergällt), Roth

Ethanol (vergällt), Roth

Glycerin, Roth

Glycin, Roth

$\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure, Sigma

HCl, Roth

Iodacetamid, Sigma

KCl, Merck

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Merck

Methanol, Merck

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ , Merck

NaCl, Roth

NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, Sigma

Nitrocellulose-Membran: Hybond-ECL, Porengröße 0,45 µm, GE Healthcare

Octylglycosid: Octyl-β-D-glucopyranoside, Sigma

Ovalbumin, Sigma

Peptid-Standard: "Peptide Calibration Standard Mono II", Bruker Daltonik, Bremen

Phosphorsäure, Sigma

Polyvinylidenfluorid-Membran: Hybond-P, Porengröße 0,45 µm, GE Healthcare

Proteingemisch 2: "LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis", GE Healthcare

Protein-Marker für Gelelektrophorese: "Precision Plus Protein Standards, Dual Color",  
Bio Rad, München

Polyvinylpyrrolidone, Sigma

Roti-Block, 10 x Konzentrat, Roth

Sodium Dodecylsulfat ultra pure, Roth

N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin, GE Healthcare

Tetrahydrofuran, Roth

Triflouressigsäure: 25% Trifluoressigsäure, Applied Biosystems, Darmstadt

Transferrin, Sigma

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Roth

Trypsin Gold Mass Spectrometry Grade, Promega, Mannheim

Tween 20, Sigma

## **2.2 Puffer**

Für die Proteinprobenzubereitung:

Probenpuffer 4fach:

302,8 mg TRIS

800 mg SDS

4 ml Glycerin

4 mg Bromphenolblau

in 7 ml H<sub>2</sub>O aufnehmen

pH 6,8 mit HCl einstellen,

auf 10 ml mit H<sub>2</sub>O auffüllen

Für die Herstellung von Mini-Gelen:

Sammelgelpuffer 4fach:

3 g TRIS

40 ml H<sub>2</sub>O

mit HCl auf pH 6,8 einstellen

mit H<sub>2</sub>O auf 50 ml auffüllen

Trenngelpuffer 4fach:

90,75 g TRIS

400 ml H<sub>2</sub>O

mit HCl auf pH 8,8 einstellen

500 ml H<sub>2</sub>O

Für die Gelelektrophorese:

Elektrophorese-Laufpuffer 1fach:

100 ml Elektrophorese-Laufpuffer 10fach

900 ml H<sub>2</sub>O

Elektrophorese-Laufpuffer 10fach:

75,5 g TRIS

360,5 g Glycin

25 g SDS

2,5 l H<sub>2</sub>O

Für den Elektrobplot:

Towbin-Puffer 1fach:

250 ml Towbin-Puffer 10 x

1750 ml H<sub>2</sub>O

500 ml Ethanol (unvergällt)

Towbin-Puffer 10fach:

75,75 g TRIS

360,4 g Glycin

2,5 l H<sub>2</sub>O

Für den Western Blot:

PBS-T-Puffer:

8 g NaCl  
0,2 g KCl  
1,4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$   
0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
0,5 ml Tween  
auf 1 l mit  $\text{H}_2\text{O}$  auffüllen

Für den In-Gel-Verdau:

50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Puffer:

2,5 ml 1M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung  
mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 50 ml aufgießen

25mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Verdaupuffer:

0,5 ml 1M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung  
auf 20 ml  $\text{H}_2\text{O}$  aufgießen  
fakultativ 20 mg Octylglycosid

Extraktionslösung (1% TFA, fakultativ 0,1% Octylglycosid):

20 ml  $\text{H}_2\text{O}$   
200  $\mu\text{l}$  TFA  
fakultativ 20 mg Octylglycosid

DTT-Lösung (10mM):

10 ml 50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Puffer  
15,4 mg DTT

IAA-Lösung (10mM):

10 ml 50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Puffer  
102 mg IAA

Dunkel lagern da lichtempfindlich.

Für den On-Membrane-Verdau:

Entfärbelösung:

25 ml Ethanol (unvergällt)  
7,5 ml 1M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung  
mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 50 ml auffüllen

50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Puffer:

5 ml ACN  
2,5 ml 1M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung  
mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 50 ml auffüllen

25mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Verdaupuffer:

2 ml ACN  
0,5 ml 1M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung  
mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 20 ml aufgießen  
fakultativ 20 mg Octylglycosid

Extraktionslösung (50% ACN, 1% TFA, fakultativ 0,1% Octylglycosid):

10 ml ACN  
10 ml  $\text{H}_2\text{O}$   
200  $\mu\text{l}$  TFA  
fakultativ 20 mg Octylglycosid

PVP-Lösung (0,25% PVP, 0,1% Essigsäure):

10 ml  $\text{H}_2\text{O}$   
10  $\mu\text{l}$  Essigsäure  
25 mg PVP

## 2.3 Geräte und Materialien

Verdauroboter "Microlab Starlet", Hamilton, Martinsried

mit Pipettenspitzen "Co-RE Tips (300 $\mu\text{l}$ ) without filters", Hamilton

Mikrotiterplatten (Well-Platten), Greiner, Frickenhausen

Lagerplatten, Nerbe Plus, Winsen/Luhe

Der Verdauroboter besitzt 4 Pipettierkanäle, 4 temperierbare Plätze für Well-Platten, einen Plattenschüttler und mehrere temperierbare Plätze für die Verdauerpuffer und das Trypsin. Die von dem Roboter auszuführenden Arbeitsschritte lassen sich über einen Computer steuern. Somit ist der Roboter in der Lage, nicht nur einen automatischen Verdau inklusive Extraktion durchzuführen, sondern z.B. auch ein Stahl-Target oder einen Anchor-Chip mit Matrix bzw. mit Probe für die massenspektrometrische Analyse zu beschichten.

### On-membrane Digests

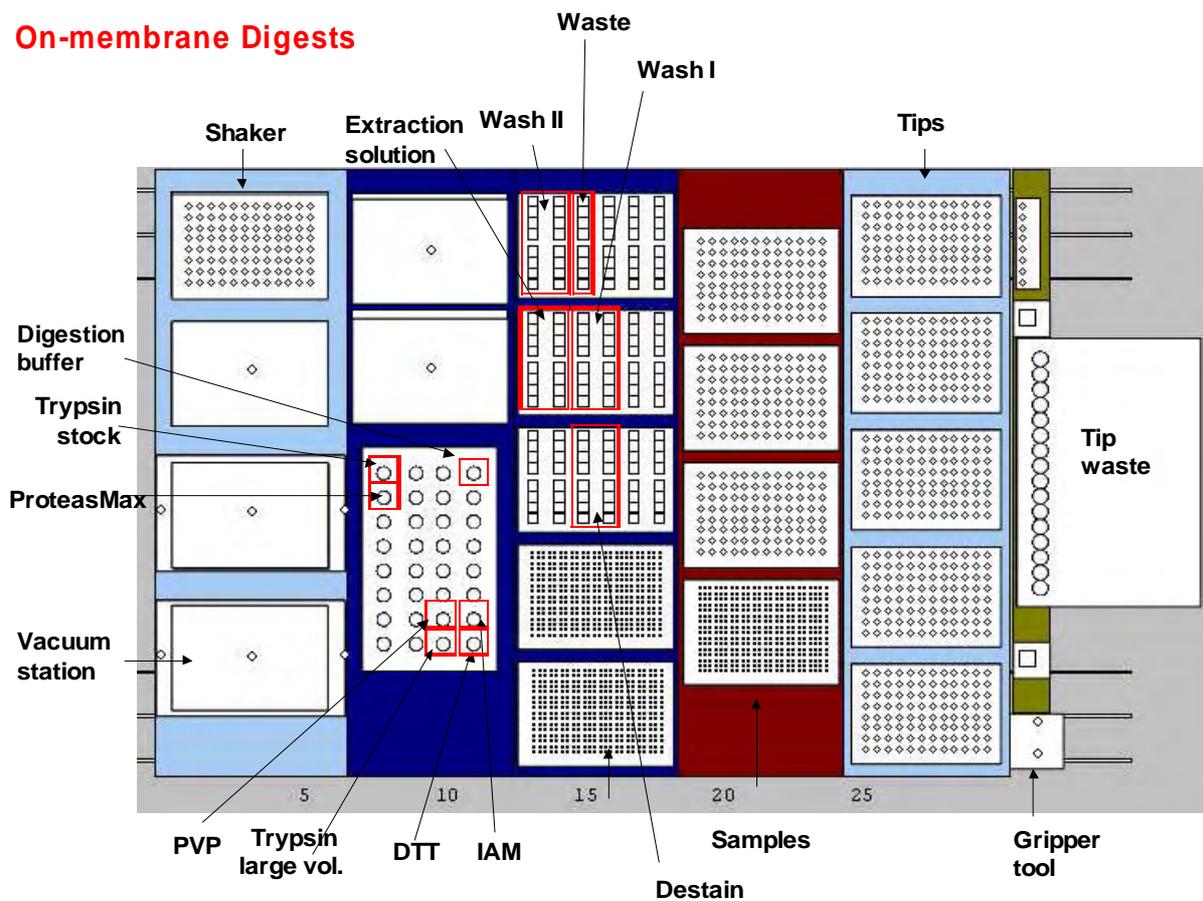


Abb. 1: Schematischer Aufbau des Verdauroboters



Abb. 2: Aufnahme des Grundrisses des Verdauroboters

Spotcutter ExQuest, Bio Rad

großer Gel-Stanzkopf, Durchmesser 3,5mm

kleiner Gel-Stanzkopf, Durchmesser 2mm

Membran-Stanzkopf, Durchmesser 1mm

Ultraflex I TOF/TOF Massenspektrometer, Bruker Daltonik

Edelstahl-Target, Bruker Daltonik

Anchor-Chip, Bruker Daltonik

Universal 32 R-Zentrifuge, Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen

Ultraschallbad Badelin Sonorex TK 52, Roth

digitale Einwaage Mettler AJ150, Mettler PB3000, Mettler-Toledo, Gießen

Pipetten: 0,2 – 2 µl / 1 – 10 µl / 10 – 100 µl / 100 – 1000 µl, Socorex, Ecublens/Lausanne  
mit zugehörigen Pipettenspitzen

Plattenschüttler, MAGV, Rabenau

Schüttler klein "Thermomixer compact", Eppendorf, Hamburg

Whirler "Combi-Spin", Kisker, Steinfurt

Eppendorf-Röhrchen "Protein LoBind Tube 1,5ml", MAGV

Plastikschalen, Bio Rad

Handschuhe Nitra Tex, Ansell, München

Papiertücher Kimberley Clark, Roth

Tubes "Cellstar PP-Test tubes, 15ml und 50ml, steril", Greiner

Für die Herstellung von Mini-Gelen und die Gelelektrophorese:

Gießapparatur mit Zubehör für Mini-Gele, Bio Rad

2D-Elektrophoresekammer: Hoefer 600, GE Healthcare

Netzgerät: Electrophoresis Power Supply EPS 2A200, GE Healthcare

Für den Elektro-Blot:

Blotkammer "10x10 cm Elektroblogger für 4 Blots", Bio Step, Jahnsdorf

Netzgerät "Electrophoresis Power Supply EPS 3501 XL", GE Healthcare

Blotkassette, Biostep, Jahnsdorf

Schwämme "Foam Sponges", GE Healthcare

Blotpapier "Hybond Blotting Paper", GE Healthcare

Magnetrührer, MAGV

Kühlaggregat, GE Healthcare

Für den Western Blot:

Folienschweißgerät, Petra-Electric, Burgau

Saranfolie, Roth

Röntgenfilm 18 x 24 cm "High performance chemiluminescence film", GE Healthcare

Fotokassette, 18 x 24 cm, GE Healthcare

Entwicklerlösung: Cronex MD-Developer, Agfa, Dübendorf

Fixiererlösung: Cronex MFE-Developer, Agfa

## **2.4. Herstellung der Proteinproben**

### **2.4.1 Proben, die jeweils ein Protein beinhalten**

Die Proteine wurden in H<sub>2</sub>O im Ultraschallbad gelöst:

BSA-Lösung 1µg/µl,

Ovalbumin-Lösung 1µg/µl,

Casein-Lösung 1µg/µl,

Aus den Proteinlösungen wurden anschließend Verdünnungsreihen hergestellt: 20µl Protein-Lösung, 40µl H<sub>2</sub>O und 20µl Probenpuffer 4fach wurden in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und gemischt. Anschließend wurde das Gemisch 5 Minuten lang bei 100°C gekocht.

Nach dem Auskühlen bei RT und kurzem Abzentrifugieren konnten von dieser Mischung folgende Mengen in die Gel-Taschen pipettiert werden:

4µl pro Tasche entsprechen Verdünnung 1 → 1µg Protein / Spur

2µl pro Tasche entsprechen Verdünnung 2 → 0,5µg Protein / Spur

1µl pro Tasche entsprechen Verdünnung 3 → 0,25µg Protein / Spur

Bei einer absoluten Molekülmasse von 66kDa für BSA, 45kDa für Ovalbumin und 23,5kDa für Casein ergaben sich folgende Proteinmengen in pmol pro Spur:

Verdünnung	1 [pmol/Spur]	2 [pmol/Spur]	3 [pmol/Spur]
BSA	15,2	7,6	3,8
Ovalbumin	22,2	11,1	5,55
Casein	42,6	21,3	10,65

Tab. 1: Proteinmengen pro Spur von Proben, die jeweils ein Protein beinhalten

Hieraus ergaben sich folgende geschätzte Proteinmengen in pmol pro ausgestanztem Membranspot (Durchmesser 1 mm; ca. 1/8 der Bande; siehe Ergebnisteil 3.2):

Verdünnung	1 [pmol/Spot]	2 [pmol/Spot]	3 [pmol/Spot]
BSA	1,9	0,95	0,475

Tab. 2: Proteinmengen pro Spot von Proben, die jeweils ein Protein beinhalten

Hier die geschätzten Proteinmengen in pmol pro Membranspot (Durchmesser 1 mm; ca. 1/6 der Fläche) beim Dot-Blot (Auftrag 1 µl, siehe 3.1.1):

Verdünnung	1 [pmol/Spot]
BSA	2,5
Ovalbumin	3,7
Casein	7,1

Tab. 3: Proteinmengen pro Spot beim Dot-Blot

#### 2.4.2 Proben, die jeweils mehrere Proteine beinhalten (Proteingemische)

"Proteingemisch 1" enthält Proteine in folgenden Konzentrationen:

1 µg/µl Transferrin

1 µg/µl BSA

1 µg/µl Ovalbumin

1 µg/µl Casein

Durch Zugabe von H<sub>2</sub>O wurden folgende Verdünnungen von Proteingemisch 1 hergestellt:

Verdünnung 1:	10	µg / 60µl
Verdünnung 2:	5	µg / 60µl
Verdünnung 3:	2,5	µg / 60µl
Verdünnung 4:	1,25	µg / 60µl
Verdünnung 5:	0,625	µg / 60µl

Für den Auftrag in die Gel-Taschen wurden die Verdünnungen von Proteingemisch 1 durch Zugabe von Probenpuffer 4fach (10µl PP4fach auf 30µl Verdünnung von Proteingemisch 1) nochmals verdünnt zu folgenden Konzentrationen:

Verdünnung 1 + PP4x:	5	µg / 40µl
Verdünnung 2 + PP4x:	2,5	µg / 40µl
Verdünnung 3 + PP4x:	1,25	µg / 40µl
Verdünnung 4 + PP4x:	0,625	µg / 40µl
Verdünnung 5 + PP4x:	0,3125	µg / 40µl

Die Proben wurden 5 Minuten lang bei 100°C gekocht, bei Raumtemperatur abgekühlt und kurz abzentrifugiert. Es wurden jeweils 8µl einer Verdünnung in die jeweilige Geltasche eingebracht.

Damit ergaben sich folgende Proteinmassen pro Spur:

Verdünnung	1 [µg/Spur]	2 [µg/Spur]	3 [µg/Spur]	4 [µg/Spur]	5 [µg/Spur]
Transferrin	1	0,5	0,25	0,125	0,0625
BSA	1	0,5	0,25	0,125	0,0625
Ovalbumin	1	0,5	0,25	0,125	0,0625
Casein	1	0,5	0,25	0,125	0,0625

Tab. 4: Proteinmassen pro Spur bei Proteingemisch 1

Bei einer absoluten Molekülmasse von 77,7kDa für Transferrin, 66kDa für BSA, 45kDa für Ovalbumin und 23,5kDa für Casein ergaben sich folgende Proteinmengen in mol pro Spur:

Verdünnung	1 [pmol/Spur]	2 [pmol/Spur]	3 [pmol/Spur]	4 [pmol/Spur]	5 [pmol/Spur]
Transferrin	12,87	6,4	3,2	1,6	0,8
BSA	15,2	7,6	3,8	1,9	0,95
Ovalbumin	22,2	11,1	5,6	2,8	1,4
Casein	42,6	21,3	10,7	5,3	2,7

Tab. 5: Proteinmengen pro Spur bei Proteingemisch 1

Hieraus ergaben sich folgende geschätzte Proteinmengen in pmol pro ausgestanztem Membranspot (Durchmesser 1 mm; ca. 1/8 der Bande; ab Ergebnisteil 3.1.2):

Verdünnung	1 [pmol/Spot]	2 [pmol/Spot]	3 [pmol/Spot]	4 [pmol/Spot]	5 [pmol/Spot]
Transferrin	1,6	0,8	0,4	0,2	0,1
BSA	1,9	0,95	0,475	0,238	0,119
Ovalbumin	2,775	1,388	0,7	0,35	0,175
Casein	5,325	2,662	1,338	0,662	0,338

Tab. 6: Proteinmengen pro Spot bei Proteingemisch 1

"**Proteingemisch 2**" entspricht dem LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis, GE Healthcare. Es enthält die Proteine Glycogenphosphorylase, BSA, Ovalbumin, Carboanhydrase und Trypsin Inhibitor.

Ein Vial wurde in 100µl H<sub>2</sub>O gelöst. Für zwei Gele wurden 4µl aus dem Vial mit 96µl Probenpuffer in einem Eppendorf-Gefäß gemischt und gewirbelt. Von diesem Gemisch (= Verdünnung 1) wurden noch 6 weitere Verdünnungen hergestellt, indem immer die Hälfte der Verdünnung (50µl) abgenommen und mit 50µl PP4fach gemischt wurde. Pro Gelspur wurden dann 20µl der jeweiligen Verdünnung aufgetragen.

Folgende Proteinmassenangaben beziehen sich auf die jeweilige Gel-Spur:

<b>Verdünnung</b>	<b>1 (µg/Spur)</b>	<b>2 (µg/Spur)</b>	<b>3 (µg/Spur)</b>	<b>4 (µg/Spur)</b>	<b>5 (µg/Spur)</b>	<b>6 (µg/Spur)</b>	<b>7 (µg/Spur)</b>
Glycogenphos.	0,536	0,268	0,134	0,067	0,0335	0,01675	0,008375
BSA	0,664	0,332	0,166	0,083	0,0415	0,02075	0,010375
Ovalbumin	1,176	0,588	0,294	0,147	0,0735	0,03675	0,018375
Carboanhydr.	0,664	0,332	0,166	0,083	0,0415	0,02075	0,010375
Trypsin Inhib.	0,64	0,32	0,16	0,08	0,04	0,02	0,01

Tab. 7: Proteinmassen pro Spur bei Proteingemisch 2

Bei einer absoluten Molekülmasse von 97kDa für Glycogenphosphorylase, 66kDa für BSA, 45kDa für Ovalbumin, 30kDa für Carboanhydrase und 20,1kDa für Trypsin Inhibitor ergaben sich folgende Proteinmengen in mol pro Spur:

<b>Verdünnung</b>	<b>1 (pmol/Spur)</b>	<b>2 (pmol/Spur)</b>	<b>3 (pmol/Spur)</b>	<b>4 (pmol/Spur)</b>	<b>5 (pmol/Spur)</b>	<b>6 (pmol/Spur)</b>	<b>7 (pmol/Spur)</b>
Glycogenphos.	5,52	2,76	1,38	0,69	0,35	0,17	0,09
BSA	10,06	5,03	2,52	1,26	0,63	0,31	0,16
Ovalbumin	26,14	13,07	6,53	3,27	1,63	0,82	0,41
Carboanhydr.	22,14	11,07	5,53	2,77	1,38	0,69	0,35
Trypsin Inhib.	31,84	15,92	7,96	3,98	1,99	1	0,5

Tab. 8: Proteinmengen pro Spur bei Proteingemisch 2

Hieraus ergaben sich folgende geschätzte Proteinmengen in pmol pro ausgestanztem Membran-Spot (Durchmesser 1 mm; ca. 1/8 der Bande; siehe Ergebnisteile 3.3.1.1 und 3.3.1.2):

<b>Verdünnung</b>	<b>1 (pmol/Spot)</b>	<b>2 (pmol/Spot)</b>	<b>3 (pmol/Spot)</b>	<b>4 (pmol/Spot)</b>	<b>5 (pmol/Spot)</b>	<b>6 (pmol/Spot)</b>	<b>7 (pmol/Spot)</b>
Glycogenphos.	0,69	0,345	0,173	0,086	0,043	0,022	0,011
BSA	1,258	0,629	0,281	0,158	0,079	0,039	0,0196
Ovalbumin	3,268	1,634	0,816	0,409	0,204	0,102	0,051
Carboanhydr.	2,768	1,384	0,691	0,346	0,173	0,087	0,043
Trypsin Inhib.	3,98	1,99	0,995	0,498	0,249	0,124	0,062

Tab. 9: Proteinmengen pro Spot bei Proteingemisch 2

Hieraus ergaben sich folgende geschätzte Proteinmengen in pmol pro ausgeschnittener halber Membran-Bande (ca. 50% der Bande; siehe Ergebnisteil 3.3.1.4):

Verdünnung	1 (pmol/ Bande)	2 (pmol/ Bande)	3 (pmol/ Bande)	4 (pmol/ Bande)	5 (pmol/ Bande)	6 (pmol/ Bande)	7 (pmol/ Bande)
Glycogenphos.	2,76	1,38	0,69	0,345	0,173	0,086	0,043
BSA	5,03	2,515	1,26	0,629	0,314	0,157	0,079
Ovalbumin	13,07	6,535	3,268	1,634	0,817	0,408	0,204
Carboanhydr.	11,07	5,535	2,768	1,384	0,692	0,346	0,173
Trypsin Inhib.	15,92	7,96	3,98	1,99	0,995	0,498	0,249

Tab. 10: Proteinmengen pro halber Bande bei Proteingemisch 2

Folgende geschätzte Proteinmengen in pmol pro ausgestanztem (kleinen) bzw. großen Gel-Spot (Durchmesser 2 bzw. 3,5 mm; ca. 1/6 bzw. 1/3 der Bande; siehe Ergebnisteil 3.3.1.3):

Verdüng	1 (pmol/ Spot)	2 (pmol/ Spot)	3 (pmol/ Spot)	4 (pmol/ Spot)	5 (pmol/ Spot)	6 (pmol/ Spot)	7 (pmol/ Spot)
Glyc.phos.	(0,92); 1,84	(0,46); 0,92	(0,23); 0,46	(0,115); 0,23	(0,058); 0,115	(0,029); 0,058	(0,014); 0,029
BSA	(1,677); 3,353	(0,838); 1,677	(0,419); 0,84	(0,2095); 0,42	(0,105); 0,21	(0,052); 0,105	(0,026); 0,053
Ovalbumin	(4,357); 8,713	(2,178); 4,357	(1,089); 2,178	(0,545); 1,089	(0,272); 0,545	(0,136); 0,272	(0,068); 0,136
Carb.anhyd.	(3,69); 7,38	(1,845); 3,69	(0,923); 1,845	(0,461); 0,923	(0,231); 0,461	(0,115); 0,231	(0,058); 0,115
Trypsin Inh.	(5,307); 10,613	(2,653); 5,307	(1,327); 2,653	(0,663); 1,327	(0,332); 0,663	(0,166); 0,332	(0,083); 0,166

Tab. 11: Proteinmengen pro (kleinem) bzw. großem Gel-Spot

## 2.5 Herstellung der Acrylamid-Mini-Gele

Die zweite Dimension der Proteintrennung, die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, hat ihren Ursprung in der Methode von Laemmli [81].

Das 10%ige Trenngel und das 4%ige Sammelgel wurden nach folgenden Angaben hergestellt:

	Trenngel	Sammelgel
Acrylamidlösung	6,7 ml	1,3 ml
Trenngelpuffer 4fach	5 ml	
Sammelgelpuffer 4fach		2,5 ml
H <sub>2</sub> O	8 ml	6,1 ml
10% SDS-Lsg.	200 µl	100 µl
10% Ammoniumpersulfat-Lsg.	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Tab. 12: Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel

Acrylamidlösung, Trenn- bzw. Sammelgelpuffer und H<sub>2</sub>O wurden in einem Becherglas gemischt und für ca. 2 min entgast, dann wurden SDS-, Ammoniumpersulfat- und TEMED-Lösung hinzugegeben.

Zuerst wurde das Trenngel gegossen und mit ca. 2ml 1-Butanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Nach etwa 45 min war das Trenngel polymerisiert. Das 1-Butanol wurde entfernt, die Oberfläche wurde kurz mit Wasser abgespült, dann wurde die Sammelgellösung eingefüllt, die Gelkämme wurden hineingesteckt und die Polymerisation des Sammelgels abgewartet.

## **2.6 Gelelektrophorese**

Die Gele wurden in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt. Die Gelkämme wurden entfernt und die Elektrophoresekammer wurde außen mit 200ml und innen mit 125ml Elektrophorese-Laufpuffer 1fach gefüllt. In die Geltaschen wurden die vorbereiteten Proteinproben hineinpipettiert. Bei einigen Gelen wurden nur in die erste Geltasche 20µl eines parallel zu den Proteinproben aufzutrennenden Proteinmarkers zur Übersicht über das Molekulargewicht pipettiert.

Die Elektrophorese erfolgte dann mit 100V für 15 min und mit 200V für ca. 60 min.

Anschließend wurden die Gele herausgenommen, das Sammelgel wurde entfernt und die obere rechte Ecke des Trenngels als Markierung abgeschnitten.

Die Gele wurden dann entweder mit Coomassie gefärbt oder ungefärbt im Elektrobplot-Verfahren weiterverarbeitet. Bei Bedarf wurden die Gele in Wasser bei 4°C zwischengelagert.

## **2.7 Elektrobplot**

Elektro- bzw. Western-Blot wurden abgewandelt nach der Methode von Towbin durchgeführt [125].

Per Elektrobplot wurden die aufgetrennten Proteine vom Gel auf eine NC- bzw. PVDF-Membran übertragen. Die Membranen wurden zunächst auf die Größe des Gels zugeschnitten, die obere rechte Ecke wurde mit einem weichen Bleistift markiert.

Die PVDF-Membran wurde 3 bis 5 s mit Methanol benetzt und 2 x 5 min mit Wasser gewaschen. Dann wurden beide Membranen sowie die Gele für mindestens 15 min in Towbin-Puffer (1fach) gelegt. Auch die Filterpapiere und die Schwämme für die Kassetten wurden für ca. 15 min in Towbin-Puffer (1fach) eingeweicht.

Der "Sandwichaufbau" erfolgte folgendermaßen: Auf die Anodenseite der Kassette wurde zunächst ein Schwamm und darauf ein Filterpapier gelegt, darauf möglichst blasenfrei die

Blot-Membran mit der markierten Ecke nach oben rechts plaziert. Auf die Membran wurde das Gel – ebenfalls mit der markierten Ecke nach oben rechts – gelegt. Darauf wurde wieder ein Filterpapier gelegt. Durch leichtes Darüberrollen mit einer Walze wurden Luftblasen entfernt. Zuletzt wurde wieder ein Schwamm daraufgelegt und die Kassette geschlossen. Die Kassetten wurden in die Blotkammer eingesetzt, die bis zur Markierung mit ca. 2,5 l Towbin-Puffer (1fach) gefüllt wurde. Am Boden der Kammer wurde ein Rührfloh mit 120 Umdrehungen pro min eingestellt. Das Kühlaggregat wurde auf 15°C eingestellt. Geblottet wurde mit maximal 100 W und maximal 400 mA mit 570 Vh, also z.B. für 19 h mit konstant 30 V. Es wurde über Nacht geblottet, da bekannt ist, daß dies effektiver ist als ein kurzes Blotten bei höherer Spannung [31].

Nach dem Blotten wurden die Membranen entnommen, 5 x für einige Sekunden mit Wasser gespült und konnten anschließend bei Bedarf in Wasser gelagert werden.

Wurden die Membranen mit DB71 gefärbt, so konnten sie danach in saurer DB71-Verdünnungslösung aufbewahrt werden.

Ungefärbt konnten die Membranen im Western Blot-Verfahren weiterverarbeitet werden.

## **2.8 Western Blot**

Es wurden 20ml Roti-Block-Konzentrat und 180ml H<sub>2</sub>O gemischt. Die Blot-Membranen wurden zur Blockierung für ca. 2 h in je 100 ml der gebrauchsfertigen Roti-Block-Lösung in Schalen auf den Plattenschüttler gestellt.

Anschließend wurden je 5ml AK 1 gegen Ovalbumin, verdünnt 1:10000 in Roti-Block (Blocking-Reagenz in der Antikörperlösung soll die Hintergrunddetektion vermindern [31]), in ein 50ml-Tube gegeben, in das die Blot-Membran mit der Proteinseite nach innen gesteckt worden war. Die Tubes wurden über Nacht bei 4°C gerollt.

Am nächsten Morgen wurden die Blot-Membranen einmal für einige s mit ca. 50ml PBS-T-Puffer (1fach) abgespült und danach 5 x 3 min mit ca. 50ml PBS-T-Puffer (1fach) in Schalen auf dem Schüttler gewaschen. Dann wurden je 6ml AK 2 (verdünnt 1:3000 in Roti-Block) in ein 50ml-Tube gegeben, die Blot-Membran wurde mit der Proteinseite nach innen in das Tube gesteckt und die Tubes wurden 1h bei 21°C RT im Dunkeln gerollt. Anschließend wurden die Blot-Membranen einmal für einige s mit ca. 50ml PBS-T-Puffer (1fach) abgespült und dann wieder 5 x 3 min mit ca. 50ml PBS-Puffer (1fach) in Schalen auf dem Schüttler gewaschen. Dann wurden die Folien über die Kante auf Papiertücher abgetropft und mit der Proteinseite nach oben auf eine Glasplatte gelegt. Für die anschließende Chemolumineszenz-Reaktion wurde ECL Plus Western Blotting Detection System benutzt [4]. Die ECL-Lösungen wurden

im Verhältnis A:B 40:1 gemischt. Ca. 10ml ECL-Lösung wurden auf jede Membran pipettiert und 5 min einwirken gelassen. Die Membranen wurden über die Kante abgetropft, in Folie eingeschweißt, mit der Proteinseite nach oben in eine Röntgenkassette gelegt und in der Dunkelkammer mit einem Röntgenfilm bedeckt. Eine Expositionszeit von 5 s erwies sich als optimal. Danach wurde der Film 1 min in Entwicklerlösung, 30 s in Wasser und 5 min in Fixierlösung getaucht, mit Wasser abgespült und an der Luft getrocknet. Zur Orientierung wurden die Banden des Proteinmarkers mit einem Edding auf dem Film markiert. Die Blot-Membranen wurden nach der immunchemischen Detektion aus der Schweißfolie genommen und 5 mal mit ca. 100ml Wasser für einige s abgespült, damit bei der anschließenden Färbung mit DB71 keine ungewollten Flecken auf den Membranen entstanden.

### **2.9 Färbung der Membranen mit DB71**

Die Färbung Direct Blue 71, deren Sensitivität von 10-20 ng Protein auf PVDF-Membranen bis zu 5-10 ng Protein auf NC-Membranen reicht, wurde nach Angaben von Hong et al. hergestellt [63; 64].

Eine Stammlösung wurde hergestellt aus 50ml H<sub>2</sub>O und 50mg DB71-Pulver. Die "DB71-Verdünnungslösung" wurde hergestellt aus 400ml Ethanol (unvergällt), 100ml Essigsäure und 500ml H<sub>2</sub>O.

Die gebrauchsfertige Färbelösung bestand aus 40ml DB71-Verdünnungslösung und 3,2ml Stammlösung. Gefärbt wurde pro Membran mit 45ml Farbe bei einer Einwirkzeit von 5 bis 7 min. Danach wurde die Membran zum Stoppen des Färbeprozesses für ca. 5 min in DB71-Verdünnungslösung geschwenkt (die Flüssigkeit wurde 2 mal erneuert), in der sie anschließend auch bei RT gelagert werden konnte.

Zum Entfärben der Membranen direkt vor dem Verdau wurde die Entfärbelösung (siehe 2.2) benutzt.

### **2.10 Färbung der Gele mit Coomassie**

Die Routinefärbung mit Coomassie-Brillant-Blau erreicht eine Sensitivität von 100 ng Protein pro Bande [64].

Die Färbung wurde hergestellt aus 10ml Methanol, 50ml H<sub>2</sub>O und 0,2g Coomassie. Gefärbt wurde pro Gel mit 45ml Farbe für 60 min. Der Entfärber wurde hergestellt aus 250ml Methanol, 30ml Ethanol (unvergällt) und 220ml H<sub>2</sub>O, entfärbt wurde über Nacht. Danach konnte das Gel bei Bedarf bei 4°C in H<sub>2</sub>O gelagert werden.

## 2.11 Gewinnung der Spots

Aus Gelen wurden die Spots automatisch mittels Spot Cutter ausgestochen. Hierfür standen zwei austauschbare Stanzköpfe mit Durchmessern von 2 und 3,5 mm zur Verfügung.

Aus Membranen wurden die Spots automatisch ausgestochen, wofür ein Stanzkopf von 1 mm Durchmesser zur Verfügung stand. Desweiteren wurden aus den Membranen bei Bedarf auch manuell halbe Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten, wozu die nassen Membranen auf eine Glasplatte gelegt wurden.

Der Spot Cutter wurde gesteuert und kalibriert mit der Software „PD Quest Advanced 8.0.1“. Mit diesem Gerät ist es möglich, pro Minute bis zu 600 Spots auszustechen.

Sowohl Gele als auch Membranen mußten während des Ausstechvorganges naß sein. Nach dem Ausstanzen bzw. dem Ausschneiden wurden die Spots sofort in Well-Platten mit Flüssigkeit (70µl H<sub>2</sub>O pro Well für Gel-Spots, 70µl DB71-Verdünnungslösung pro Well für Membran-Spots) gelegt, um ein Austrocknen und eine elektrostatische Aufladung zu verhindern, die die Spots von den Wells abgestoßen hätte.



Abb. 3: Mikrotiterplatte mit Flüssigkeit und ausgestanzten Membran-Spots

## 2.12 Verdau

### 2.12.1 Zubereitung der Trypsinlösung

Das Trypsin lag als Lyophilisat in Vials zu je 100µg vor. Ein Vial wurde in 100µl H<sub>2</sub>O mit einem Anteil von 0,01% TFA gelöst. Davon wurden 10µl abgenommen und in einem Eppendorf-Gefäß mit 90µl 25mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Verdaupuffer ohne Octylglycosid (siehe 2.2) gemischt.

Von dieser Mischung wurde die für den Verdau benötigte berechnete Menge in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und an die dafür vorgesehene Stelle im Verdauroboter gestellt.

Dieser stellte dann durch Zugabe von 25mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Verdaupuffer (mit bzw. ohne Octylglycosid) kurz vor dem Verdau eine Trypsinlösung mit der Konzentration 10ng/μl her. Von dieser Trypsinlösung wurde dann vom Roboter die im Verdauprotokoll angegebene Menge auf die zu verdauenden Proben pipettiert.

### 2.12.2 Automatisierter In-Gel-Verdau

Der automatisierte Verdau im Gel lief nach den unten aufgelisteten Schritten ab (nach Bruker), wobei die zu pipettierenden Volumina, die Einwirkzeiten, die Temperatur und die Anzahl der Wiederholungen der durchzuführenden Schritte vom Benutzer zu variieren waren; zusätzlich konnten die Proben bei Bedarf auch auf einem integrierten Plattenschüttler geschüttelt werden. Gesteuert wurde der Verdauroboter mit der zugehörigen Software „Hamilton Method Editor 4.0“ bzw. „Hamilton Run Control 4.0“. Die passenden Parameter für den Verdau im Gel waren am Verdauroboter „MicroLab Starlet“ der Firma Hamilton schon ermittelt worden [9].

Step	Description	Vol [μl]	Time [min]	Temp [°C]	Cycles
1	Wash with MilliQ	150	10	21	1
2	Wash with 50%ACN	150	10	21	1
3	Dehydrate with 100%ACN	150	2	21	1
4	Reduction with DTT	20	30	56	1
5	Alkylation with IAA	20	30	21	1
6	Wash with NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	150	5	21	1
7	Dehydrate with 100%ACN	150	2	21	1
8	Add Trypsin	17	15	8	1
9	Add Digestion Buffer	50	0,1	8	1
10	Digest		120	45	1
11	Extraction	10	30	21	1

Tab. 13: Verdauschritte des Verdauroboters beim In-Gel-Digest

### 2.12.3 Automatisierter On-Membrane-Verdau

Das untenstehende Verdauprotokoll zeigt die Schritte im Ablauf eines Verdaus von NC- bzw. PVDF-Membranen. Auch hier konnten einzelne Parameter wie Volumina, Einwirkzeiten und Temperatur vom Benutzer variiert werden – die Optimierung der Verdauparameter war Bestandteil dieser Arbeit.

Step	Description
1	Destain
2	Wash with MilliQ
3	Block with PVP
4	Wash with NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>
5	Add Trypsin
6	Digest
7	Extraction

Tab. 14: Verdauschritte des Verdauroboters beim On-Membrane-Verdau

## 2.13 Matrices

### 2.13.1 HCCA-Matrix nach Jahn

Eine reine HCCA-Matrix wurde nach der Methode von Jahn hergestellt [67].

Für 100µl Matrix wurden 90µl THF, 5µl 1 M Citronensäure, 5µl 0,01% TFA und 10mg HCCA in ein Eppendorf-Röhrchen gegeben und 5 min ins Ultraschallbad gestellt, anschließend wurde gewhirlt.

Mit der Pipette wurden 2µl der frisch angesetzten Matrix schnell als Tropfen über die Spots eines Anchor Chips gezogen ("thin layer" [50]). Dann wurde 1µl der Peptidprobe aufgetragen und nach einer Einwirkzeit von ca. 5 min nach Trocknung der Probe der Anchor Chip mit 0,01% TFA gewaschen. Flüssigkeit wurde rasch danach vorsichtig mit einem Papiertuch oder einer Pipette entfernt.

### 2.13.2 DHB/HCCA-Mischmatrix

Eine Mischmatrix wurde basierend auf der Methode von Laugesen hergestellt [83].

Für 1ml Matrix wurde aus einer Stammlösung (bestehend aus 7ml ACN, 3ml H<sub>2</sub>O und 1µl TFA) je 1ml in zwei Eppendorf-Röhrchen gegeben und in dem einen 10mg DHB, in dem anderen 10mg HCCA im Ultraschallbad gelöst und gewhirlt. Anschließend wurden aus jedem Eppendorf-Röhrchen 500µl entnommen und miteinander vermischt.

Auf einen Anchor Chip wurden 0,5µl Matrix aufgetragen, getrocknet und anschließend wurde 1µl der Peptidprobe aufgetragen.

### 2.13.3 DHB/Phosphorsäure-Matrix

Für 1ml Matrix wurden 330µl ACN, 660µl H<sub>2</sub>O, 10µl Phosphorsäure und 20mg DHB in ein Eppendorf-Röhrchen gegeben und 5 min lang ins Ultraschallbad gestellt, anschließend gewhirlt.

Auf ein Stahl-Target wurden 0,5µl Matrix aufgetragen, getrocknet, anschließend wurde 1µl der Peptidprobe aufgetragen.

## 2.14 Massenspektrometrische Messung und Bearbeitung der Spektren

Die massenspektrometrische Messung der tryptisch verdauten Proteinproben wurde mit dem Ultraflex I TOF/TOF Massenspektrometer im positiven Reflektormodus durchgeführt. Mit einem Stickstofflaser wurden die auf das Stahl-Target bzw. auf den Anchor-Chip aufgetragenen Peptidproben beschossen. Je nach Matrix wurde eine unterschiedliche Laserstärke für die Messung verwendet. Für die Probenmessung auf DHB/Phosphorsäure-Matrix und DHB/HCCA-Mischmatrix eignete sich am besten eine Laserstärke von 30 bis 40%, für eine Messung auf Matrix nach Jahn eignete sich am besten eine Laserstärke von 17 bis 20%.

Zur Erzeugung von Kalibrierungsspektren wurde der "Peptide Calibration Standard Mono II" von Bruker für die externe Kalibrierung mitgemessen.

Zur Aufsummierung eines Spektrums wurden ca. 300 bis 600 Einzelspektren addiert.

Zur Auswertung der gemessenen Spektren wurde die Software "Compass for flex-series 1.2" verwendet. Diese enthielt die Programme „FlexControl 3.0“, „FlexAnalysis 3.0“ und „Bio Tools 3.1“. Die gemessenen Spektren wurden mit dem Programm Flex Analysis bearbeitet. Die Methode, mit der die Spektren bearbeitet wurden, enthielt die folgenden Kriterien:

Peak Detection Algorithmus	Snap
Signal to Noise Threshold	3
Relative Intensity Threshold	0%
Minimum Intensity Threshold	0
maximal number of peaks	100
Quality Factor Threshold	30
SNAP average composition	Average
Fragment Peak Width	0,75 m/z
SILE Mass Difference(s)	(H-I)
SILE Partner Theshold	2,5
Baseline Subtraction	top hat

Tab. 15: Methode in Flex Analysis

Eine interne Kalibrierung wurde anhand der Autolyseprodukte von Trypsin vorgenommen bzw. eine externe Kalibrierung wurde anhand des benachbarten Peptidstandards vorgenommen. Störende Hintergrundsignale, wie z.B. tryptische Autolyseprodukte wurden anschließend mithilfe einer Referenzmassenliste aus der Peak-Liste entfernt.

## 2.15 Suche in der Datenbank

Für die bearbeiteten Spektren wurde anschließend in der MSDB-Datenbank mithilfe der Mascot-Suchmaschine (<http://www.matrixscience.com>) nach passenden Proteinsequenzen gesucht. Für die Suche wurden folgende Kriterien festgelegt:

Taxonomy	all entries
Database	MSDB
Global Modifications	Membranverdau: keine
	Gelverdau: Carbamidomethyl [C]
Variable Modifications	Oxidation (M)
Mass Tolerance MS	75 ppm
Partials	1
Mass Values	MH+
Monoisotopic	

Tab. 16: Suchkriterien

Wurde in der Datenbank keine passende Proteinsequenz gefunden, wurde mithilfe des Programmes „Sequence Editor 3.1“ von Bruker Daltonik der Verdau des jeweiligen Proteins zu Peptiden simuliert und die so erhaltene Sequenz mit der des zu untersuchenden Spektrums verglichen.

Hierfür wurden bei dem virtuell zu verdauenden Protein folgende Kriterien angegeben:

Cys	Membranverdau: Reduced
	Gelverdau: Carbamidomethyl [C]
Left	hydrogen
Right	free acid

Enzyme	Trypsin/P
Error	75 ppm
MSMS Error	0,2 Da
Partials	1
optinal modification	ja
Ion Mode	Mono MH+

Tab. 17 und 18: Kriterien Sequence Editor

### **3. Ergebnisse**

Das Ziel dieser Arbeit ist die Optimierung des automatisierten Proteinverdau von NC- und PVDF-Membranen mithilfe eines Verdauroboters. Die Arbeit gliedert sich in drei Teile:

Im ersten Teil (3.1) wurden der Verdauablauf und die Extraktion beim Verdau von per Elektro-Blot auf die Membranen übertragenen Proteinen optimiert. Hierzu wurde Proteingemisch 1 verwendet, das geeignete Standard-Proteine enthielt.

Im zweiten Teil (3.2) wurden die Waschschritte optimiert, die dazu dienten, Roti-Block von den entsprechend behandelten Blot-Membranen zu entfernen und dadurch einen Proteinverdau von Blot-Membranen nach einer ECL zu ermöglichen. Hierzu wurden BSA-Proben verdaut.

Im dritten Teil (3.3) wurden Proteine von Blot-Membranen nach Ablauf einer ECL verdaut. Hier wurde Proteingemisch 2 verwendet.

#### **3.1 Verdau- und Extraktionsvarianten**

##### **3.1.1 Verdau von Dot-Blots von NC- und PVDF-Membranen mithilfe des Verdauroboters**

Hier wurde untersucht, ob ein automatisierter Verdau von Proteinen, die als Dot-Blot auf eine NC- bzw. PVDF-Membran aufgetragen worden waren, mit dem hier angewendeten Protokoll überhaupt möglich ist.

Es wurden verschiedene Punkte auf einer trockenen NC- bzw. PVDF-Membran mit einem weichen Bleistift markiert. Dann wurde jeweils 1 µl der folgenden Protein-Lösungen (Konzentration 1 µg / 1 µl) mit der Pipette innerhalb des markierten Bereiches aufgetragen (siehe 2.4.1):

BSA, Molekulargewicht 66 kDa;

Ovalbumin, Molekulargewicht 48 kDa;

Casein, Molekulargewicht 20 kDa.

Die Membranen wurden für ca. 15 min an der Luft getrocknet und danach mit DB71 gefärbt. Anschließend wurde aus den Membranen von jedem der aufgetragenen Punkte mit dem Spot Cutter ein Spot (Durchmesser 1mm) ausgestochen und in einer Mikrotiterplatte plaziert, in der pro Well 10µl Wasser vorgelegt worden waren.

Die Spots wurden mit dem Verdauroboter nach folgendem Protokoll verdaut:

Step	Description	Vol [ $\mu$ l]	Time [min]	Temp [ $^{\circ}$ C]	Cycles
1	Destain of DB71	130	20	21	1
2	Wash with MilliQ	150	5	21	2
3	Block with PVP	20	20	21	1
4	Wash with NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	150	5	21	2
5	Add Trypsin	10	0,1	21	1
6	Digest		120	45	1
7	Extraction (10% ACN)	10	30	21	1

Tab. 19: Schritte im Verdauprotokoll für den On-Membrane-Verdau

Die nach dem Verdau extrahierten Peptide wurden massenspektrometrisch identifiziert.

Zur Messung benutzt wurde DHB/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Matrix.

		NC	PVDF
BSA	SC %	32,9	21,1
	Score	154	115
OV	SC %	59,5	55,7
	Score	139	149
Casein	SC %	31,6	33,9
	Score	89,3	82,1

Tab. 20: Sequenzabdeckungen (SC %) und Mowse Scores (Score) vom Verdau des Dot-Blots von der NC- bzw. PVDF-Membran.

BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin.

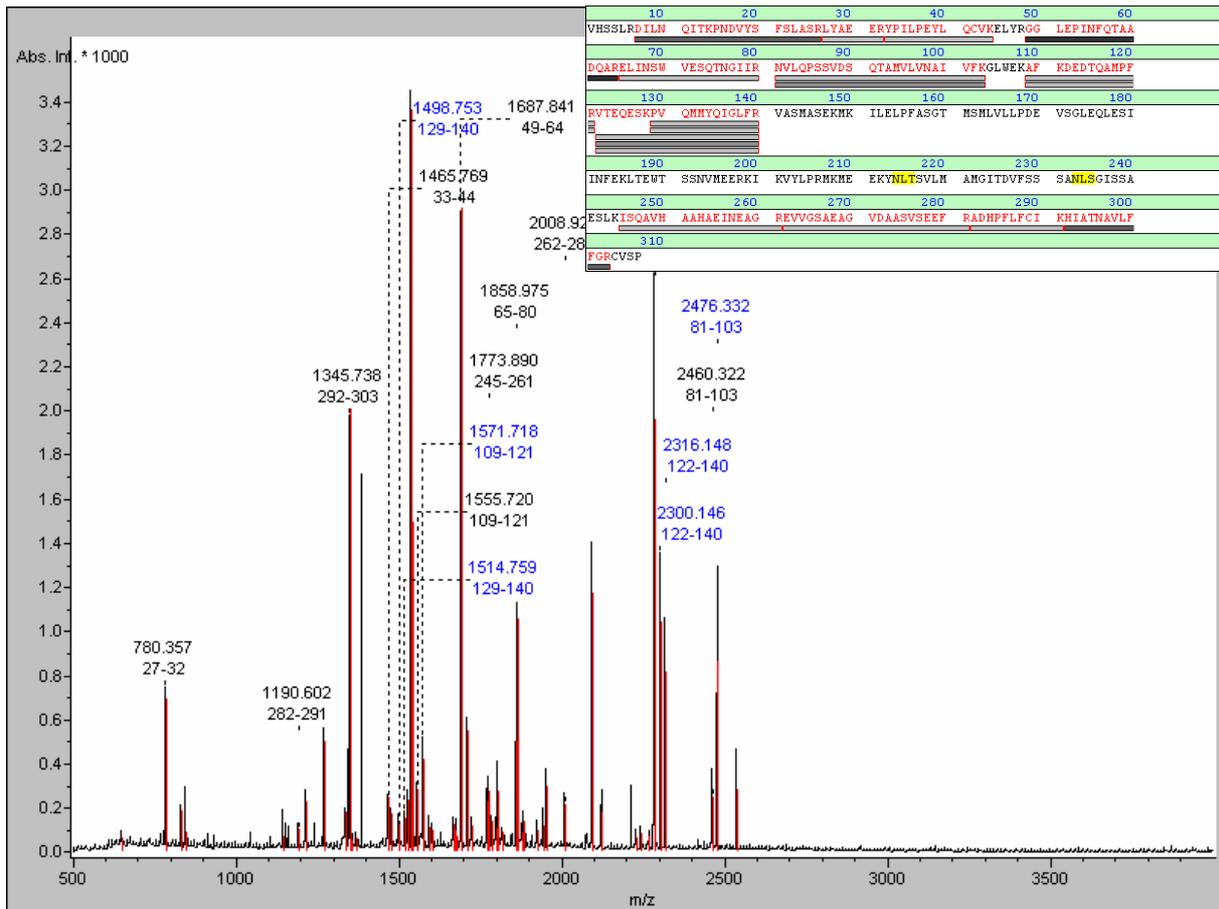


Abb. 4: Massenspektrum und Sequenzabdeckung von Ovalbumin, verdaut als Dot-Blot von der NC-Membran, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix. Die MS-Analyse ergab eine Sequenzabdeckung von 59,5%; in der Datenbank gefundene Peptide sind in der Sequenz rot markiert.

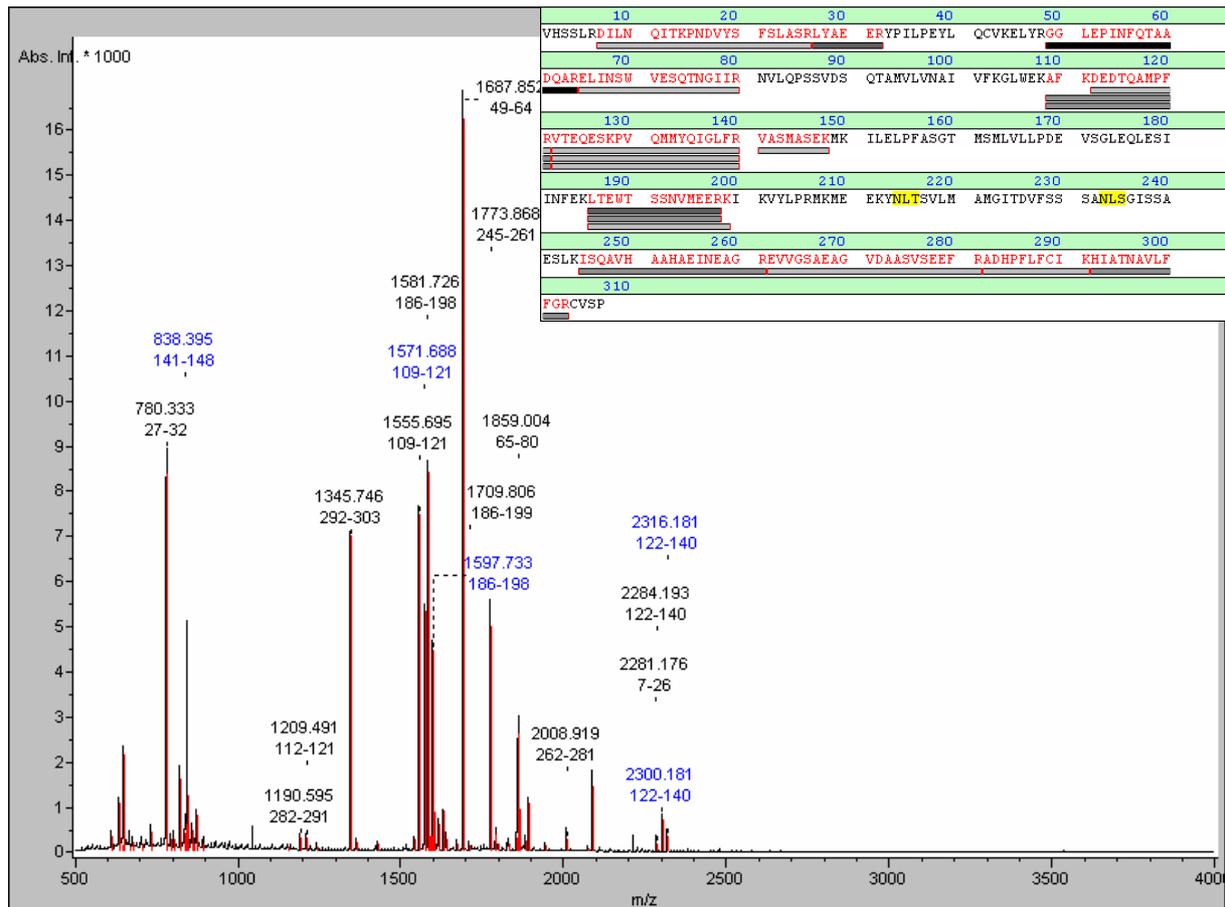


Abb. 5: Massenspektrum und Sequenzabdeckung von Ovalbumin, verdaut als Dot-Blot von der PVDF-Membran, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix. Die MS-Analyse ergab eine Sequenzabdeckung von 55,7%; in der Datenbank gefundene Peptide sind in der Sequenz rot markiert.

Fazit:

Der Verdau von Proteinen, die auf eine NC- bzw. PVDF-Membran pipettiert worden waren, zeigte gute Ergebnisse.

### 3.1.2 Proteinverdau von Blot-Membranen mit dem Verdauroboter

Hier wurde untersucht, ob der automatisierte Verdau von Proteinen, die auf eine NC- bzw. PVDF-Membran – im Gegensatz zum vorherigen Versuch – nicht aufpipettiert, sondern geblottet wurden, möglich ist.

Es wurden zwei Mini-Gele mit 10% Acrylamid gegossen. Proteingemisch 1, das schon in verschiedenen Verdünnungen vorlag, wurde folgendermaßen mit Probenpuffer gemischt: Es wurden von der jeweiligen Verdünnung von Proteingemisch 1 (Verdünnung 1 bis 5; siehe 2.4.2) 30µl mit 10µl Probenpuffer in einem Eppendorf-Gefäß gemischt. Von dieser Mischung wurden pro Gel-Tasche 8µl aufgetragen, so daß sich folgende absolute Proteinmengen pro Spur ergaben:

Verdünnung	1 [pmol/Spur]	2 [pmol/Spur]	3 [pmol/Spur]	4 [pmol/Spur]	5 [pmol/Spur]
Transferrin	12,87	6,4	3,2	1,6	0,8
BSA	15,2	7,6	3,8	1,9	0,95
Ovalbumin	22,2	11,1	5,6	2,8	1,4
Casein	42,6	21,3	10,7	5,3	2,7

Tab. 21: Verdünnungsreihe von Proteingemisch 1

Unter den verschiedenen Verdünnungen von Proteingemisch 1 (oberste Zeile) gibt jedes Tabellenfeld die Menge in pmol des jeweiligen Proteins an, die in einer Bande der entsprechenden Verdünnung von Proteingemisch 1 enthalten ist.

Anschließend wurden durch SDS-PAGE die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Danach wurden im Tank-Blot-Verfahren die Proteine von den zwei Mini-Gelen jeweils auf eine NC- bzw. auf eine PVDF-Membran geblottet. Auf den Gelen waren in der routinemäßigen Coomassie-Färbung nach dem Blot keine Banden mehr anfärbbar, was zeigte, daß die Proteine komplett auf die Membranen übertragen worden waren.

Die Membranen wurden anschließend mit DB71 gefärbt.

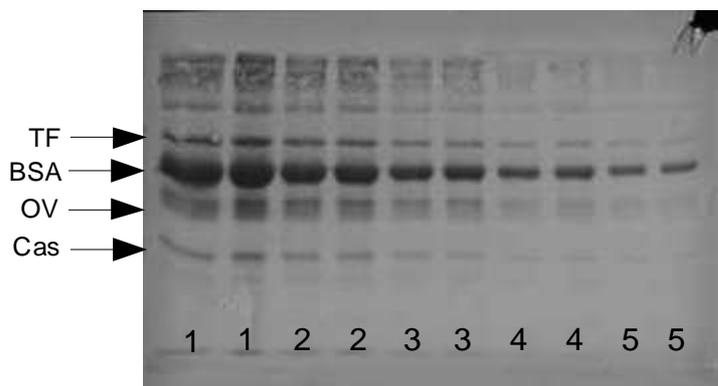


Abb. 6: NC-Membran nach der Färbung mit DB71.

TF: Transferrin, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, Cas: Casein, 1 – 5: Verdünnungen

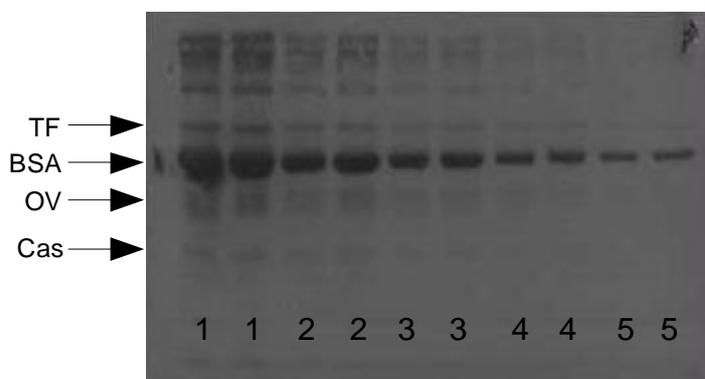


Abb. 7: PVDF-Membran nach der Färbung mit DB71.

TF: Transferrin, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, Cas: Casein, 1 – 5: Verdünnungen

Mithilfe des Spot Cutters wurden aus jeder Membran zunächst 40 Spots ausgestochen, d.h. von jeder Konzentration aus jeder Bande ein Spot. Darunter waren zur Kontrolle auch 5 Leerproben.

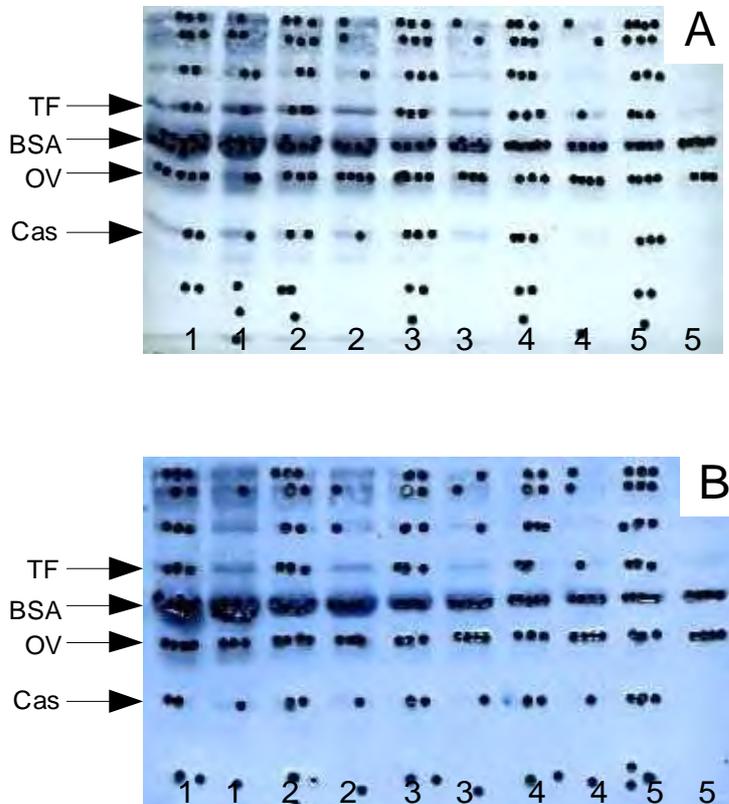


Abb. 8: A: NC-Membran, B: PVDF-Membran jeweils nach der Färbung mit DB71 und dem Ausstanzen von Spots mit dem Spot Cutter. TF: Transferrin, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, Cas: Casein, 1 – 5: Verdünnungen

Die ausgestochenen Spots wurden im Digester nach folgendem Protokoll verdaut:

Step	Description	Vol [µl]	Time [min]	Temp [°C]	Cycles
1	Destain of DB71	130	20	21	1
2	Wash with MilliQ	150	5	21	2
3	Block with PVP	20	20	21	1
4	Wash with NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	150	5	21	2
5	Add Trypsin	10	0,1	21	1
6	Digest		120	45	1
7	Extraction (10% ACN)	20	20	21	1

Tab. 22: Verdauprotokoll Blot-Membranen

Die nach dem Verdau extrahierten Peptide wurden massenspektrometrisch analysiert. Zur Messung benutzt wurde eine DHB/HCCA-Mischmatrix.

Bande	Verdünnung		1	2	3	4	5
1	BSA	SC %	9,9	14,2	16,5		
		Score	[64,8]	87,4	98,3		
2	BSA	SC %	26,5	14,5			
		Score	118	94,2			
3	BSA	SC %	12,7	17,5	15		
		Score	[68,4]	108	91,1		
4	TF	SC %	26,4	20,9			
		Score	202	161			
5	BSA	SC %	31,1	16,6	19,6	19,6	27,7
		Score	192	111	127	126	156
6	OV	SC %	4,3*	7,3*	4,2*		
		Score					
7	Casein	SC %	31,1				
		Score	82,2				
8	Blank						

Tab. 23: Sequenzabdeckungen (SC %) und Mowse Scores (Score) vom 2-Stunden-Verdau von der NC-Membran, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix.

Werte in Klammern stehen für Mowse Scores, die nicht mehr im statistisch signifikanten Bereich liegen. Für leere Felder konnte bei der Messung kein Spektrum erhalten werden. Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mithilfe des Programmes „Sequence Editor“ ermittelt, in diesem Fall liegt kein Mowse Score vor. BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, TF: Transferrin, Blank: Leerprobe.

Die Messung der Proben des 2-Stunden-Verdaus von der PVDF-Membran mit DHB/HCCA-Mischmatrix ergab keine Spektren.

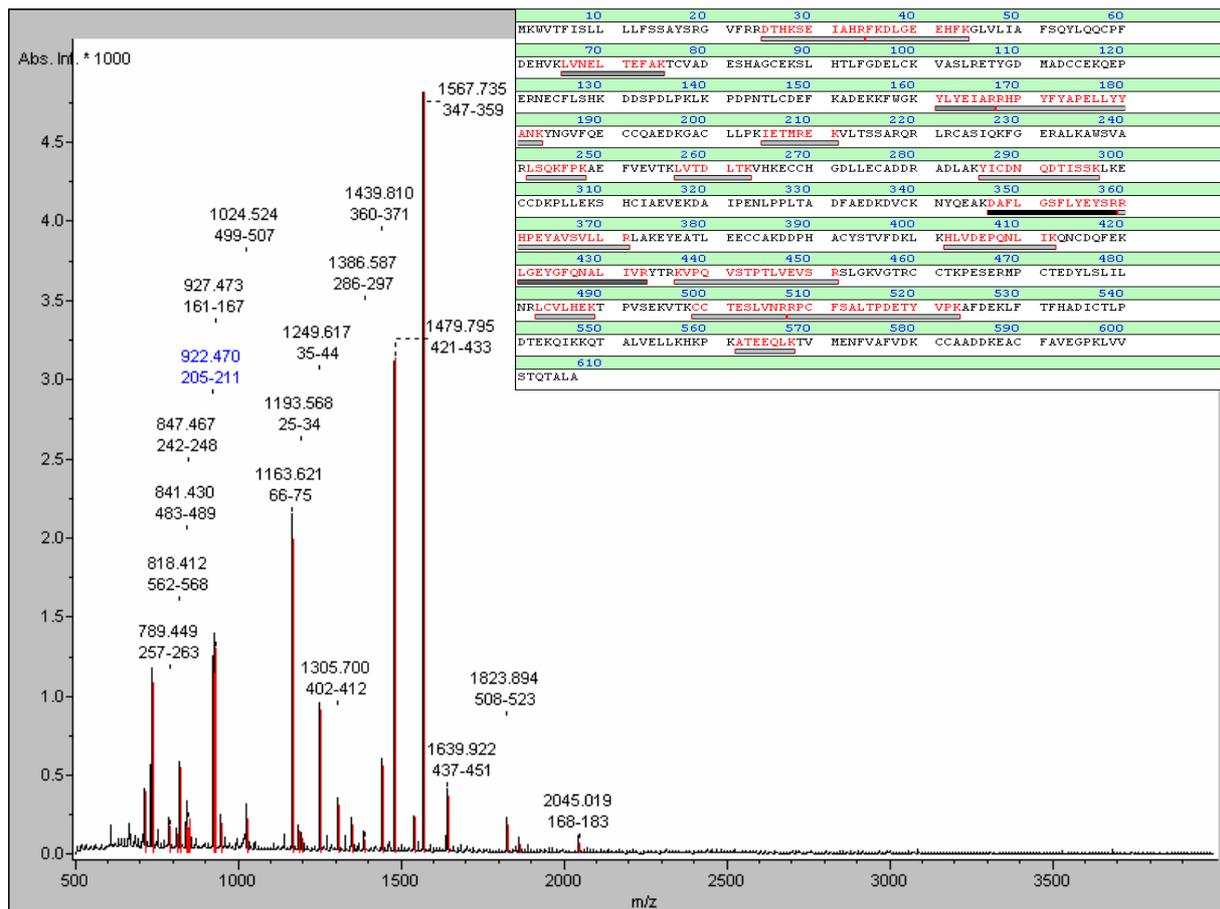


Abb. 9: Spektrum von BSA, verdaut als Elektro-Blot von der NC-Membran, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix. Sequenzabdeckung 31,1%.

Fazit:

Im Vergleich zum vorherigen Versuch waren hier zwei Parameter verändert worden: zum einen war von einem Elektro-Blot anstatt von einem Dot-Blot verdaut worden, zum anderen war eine DHB/HCCA-Mischmatrix anstatt einer DHB/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Matrix zur Messung verwendet worden. Der Verdau von auf NC-Membran geblotteten Proteinen zeigte teilweise recht gute Ergebnisse. Beim Verdau von auf PVDF-Membran geblotteten Proteinen hingegen war kein Spektrum zu messen.

### 3.1.3 Manueller Proteinverdau von Blot-Membranen

Als Vergleich zum automatisierten Verdau wurde ein Verdau von Hand durchgeführt.

Bei diesem manuellen Verdau sollte gleichzeitig untersucht werden, wie sich der prozentuale Anteil von Acetonitril in der Extraktionslösung auf die Ergebnisse auswirken würde.

Bisher war mit einem Anteil von 10% ACN extrahiert worden.

Der manuelle Verdau unterschied sich vom automatisierten Verdau in folgenden Punkten:

1. durch eine längere Verdauzeit (verdaut wurde über Nacht im Brutschrank ca. 18 Stunden lang anstatt 2 Stunden),
2. durch eine niedrigere Verdautemperatur (37°C anstatt 45°C),
3. durch unterschiedlich hohe Anteile von ACN in den Extraktionslösungen,
4. durch unterschiedlich lange Einwirkzeiten der Extraktionslösungen auf die Proben.

Für den manuellen Verdau wurden je 8 BSA-Spots aus der NC- bzw aus der PVDF-Membran mithilfe des Spot Cutters aus Verdünnung 1 ausgestochen.

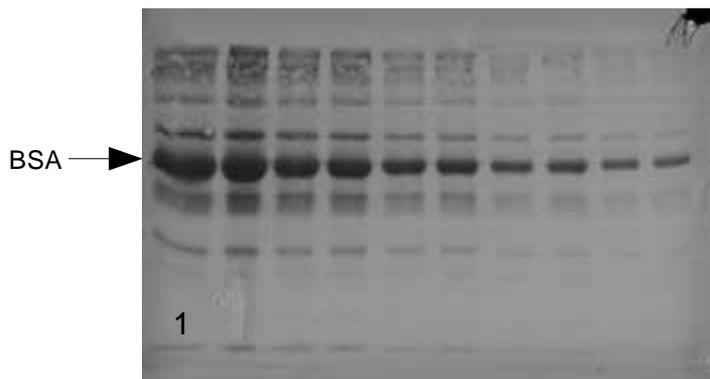


Abb. 10: NC-Folie mit Proteingemisch 1 nach Färbung mit DB71.  
BSA: Bovines Serumalbumin, 1: Verdünnung 1.

Jeder Spot wurde anschließend in einem Eppendorf-Gefäß plaziert, in dem 5µl Verdünnungslösung für DB71 vorgelegt worden waren, um der elektrostatischen Aufladung der Spots entgegenzuwirken.

Der Verdau wurde nach dem gleichen Protokoll durchgeführt, das dem automatischen Verdau mit dem Verdauroboter zugrunde lag:

Schritt	Temp [°C]	Beschreibung
1. Entfärbung	21	130µl Entfärbelösung wurden auf die Proben pipettiert, nach 20 min wieder abgenommen
2. Waschen mit H <sub>2</sub> O	21	150µl H <sub>2</sub> O mit 10% ACN wurden auf die Proben pipettiert, nach 5 min wieder abgenommen
3. Waschen mit H <sub>2</sub> O	21	wie 2.
4. Blocking mit PVP	21	20µl PVP-Lösung wurden auf die Proben pipettiert, nach 20 min wieder abgenommen
5. Waschen mit Puffer	21	150µl Puffer wurden auf die Proben pipettiert nach 5 min wieder abgenommen
6. Waschen mit Puffer	21	wie 5.
7. Zugabe von Trypsin	21	10µl Trypsinlösung wurden auf die Proben pipettiert und die Eppendorf-Gefäße wurden verschlossen
8. Verdau	37	über Nacht (18 h) im Brutschrank
9. Extraktion	21	20µl Extraktionslösung wurden auf die Proben pipettiert, Proben auf den Schüttler gestellt, nach 20 bzw. 30 min wurden der Überstand und der Extrakt in neue Eppendorf-Gefäße pipettiert.

Tab. 24: Protokoll manueller Verdau

Die Extraktionslösungen enthielten zum einen unterschiedlich hohe Anteile an ACN, zum anderen waren die Einwirkzeiten der Extraktionslösungen auf die Proben unterschiedlich.

Probe Nr.	ACN in Extraktionslösung (%)	Einwirkzeit (min)
1	0	40
2	10	30
3	10	40
4	20	30
5	20	40
6	50	30
7	50	40
8	60	30

Tab. 25: Anteil ACN und Einwirkzeiten beim manuellen Verdau

Die nach dem Verdau extrahierten Peptide wurden massenspektrometrisch analysiert.

Zur Messung benutzt wurde eine Mischmatrix aus DHB/HCCA.

			<b>NC</b>	<b>PVDF</b>
<b>ACN (%)</b>	0	<b>SC %</b>	42,8	18,9
<b>Zeit (min)</b>	40	<b>Score</b>	224	98,5
<b>ACN (%)</b>	10	<b>SC %</b>	43,5	16,1
<b>Zeit (min)</b>	30	<b>Score</b>	183	127
<b>ACN (%)</b>	10	<b>SC %</b>	37,1	13
<b>Zeit (min)</b>	40	<b>Score</b>	189	86,8
<b>ACN (%)</b>	20	<b>SC %</b>	35,6	17,5
<b>Zeit (min)</b>	30	<b>Score</b>	158	88,1
<b>ACN (%)</b>	20	<b>SC %</b>	44	17,5
<b>Zeit (min)</b>	40	<b>Score</b>	173	112
<b>ACN (%)</b>	50	<b>SC %</b>	40,7	19,6
<b>Zeit (min)</b>	30	<b>Score</b>	201	83,7
<b>ACN (%)</b>	50	<b>SC %</b>	41	22,4
<b>Zeit (min)</b>	40	<b>Score</b>	192	140
<b>ACN (%)</b>	60	<b>SC %</b>	38,7	32
<b>Zeit (min)</b>	30	<b>Score</b>	198	153

Tab. 26: Sequenzabdeckungen (SC %) und Mowse Scores (Score) von BSA, Verdünnung 1, vom manuellen Verdau von der NC- und der PVDF-Membran bei unterschiedlichen Konzentrationen von Acetonitril in der Extraktionslösung und unterschiedlichen Extraktionszeiten, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix. ACN (%): prozentualer Anteil von Acetonitril in der Extraktionslösung, Zeit (min): Extraktionszeit in Minuten.

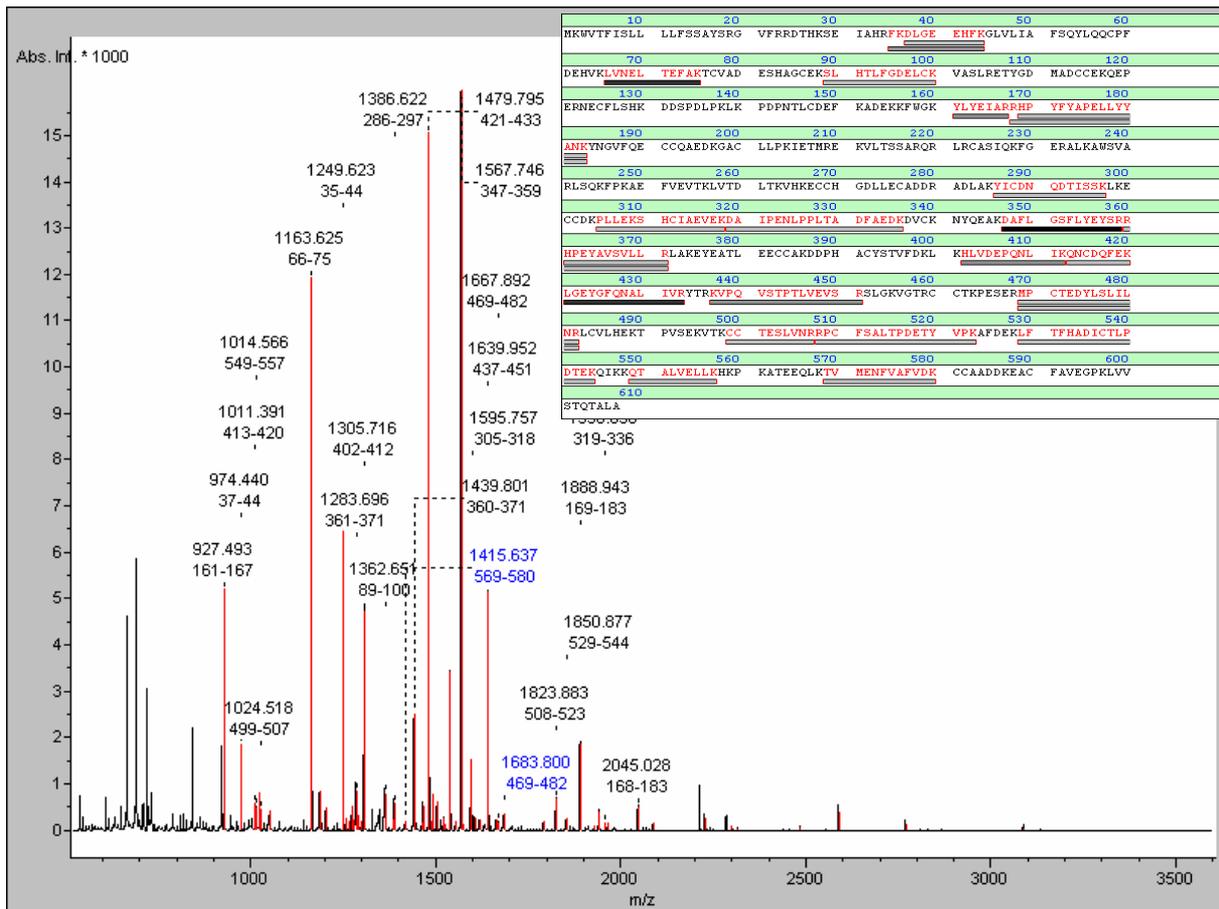


Abb. 11: Spektrum von BSA, Verdünnung 1, manuell verdaut von der NC-Membran, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix. Extraktionslösung mit 50% ACN, Einwirkzeit 30 min. Sequenzabdeckung 40,7%.

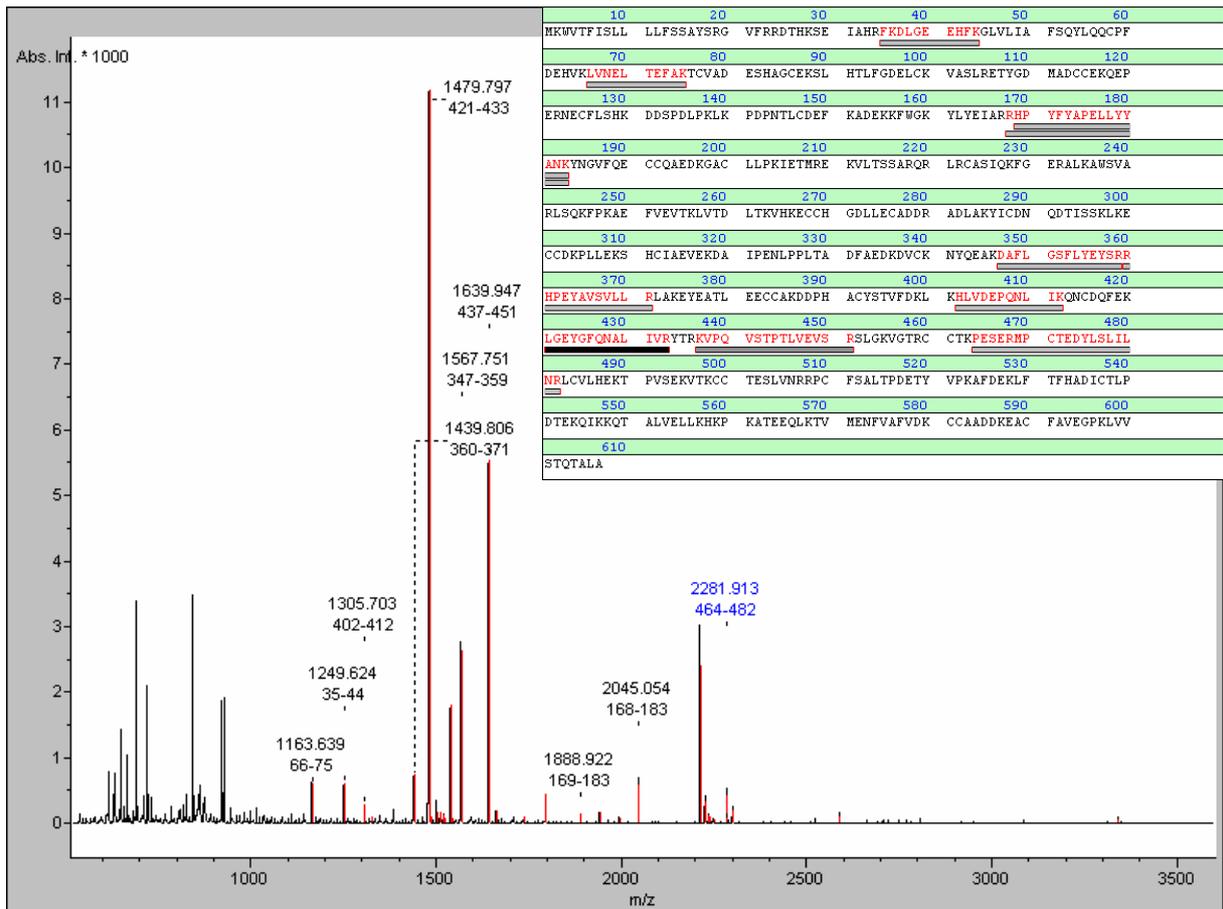


Abb. 12: Spektrum von BSA, manuell verdaut von der PVDF-Membran, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix. Extraktionslösung mit 50% ACN, Einwirkzeit 30 min. Sequenzabdeckung 19,6%.

Extraktionszeit 30 Minuten

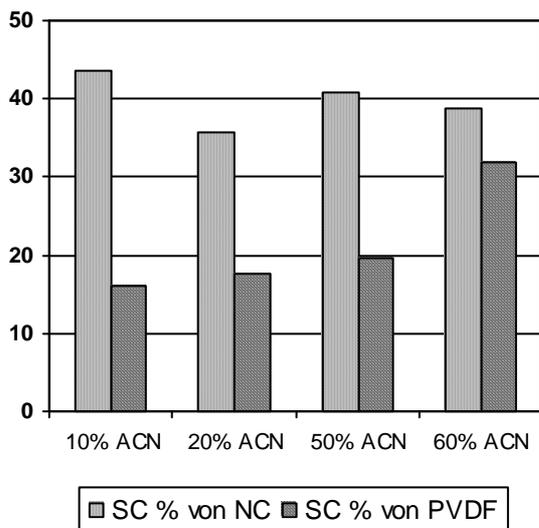


Abb. 13: Sequenzabdeckungen (SC %) vom Verdau mit einer Extraktionszeit von 30 Minuten.

Extraktionszeit 40 Minuten

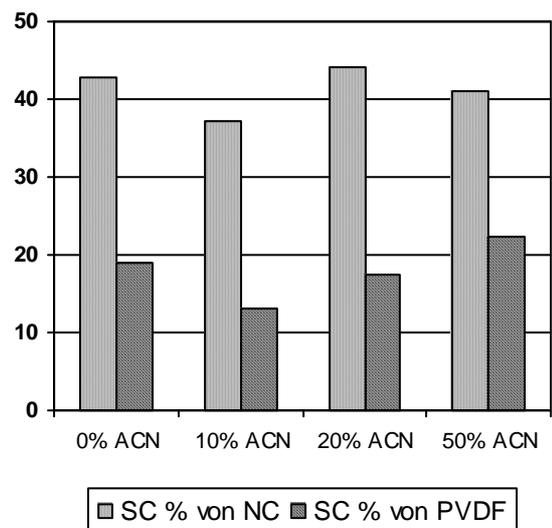


Abb. 14: Sequenzabdeckungen (SC %) vom Verdau mit einer Extraktionszeit von 40 Minuten.

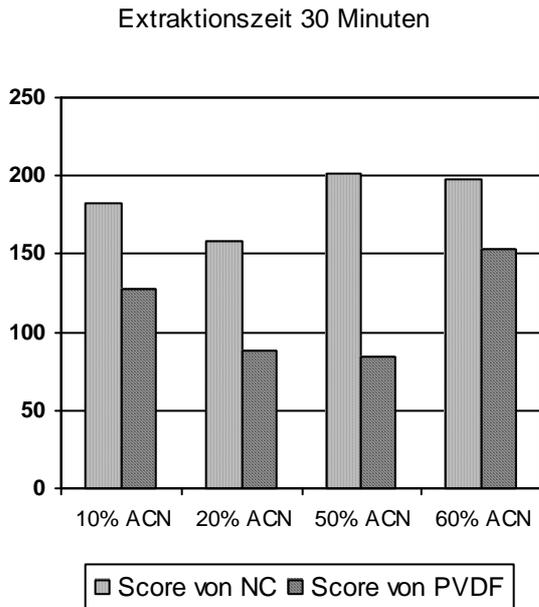


Abb. 15: Mowse Scores (Score) vom Verdau mit einer Extraktionszeit von 30 Minuten.

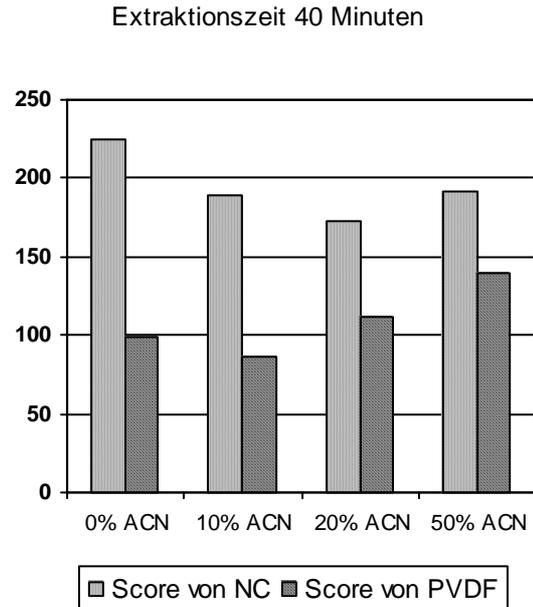


Abb. 16: Mowse Scores (Score) vom Verdau mit einer Extraktionszeit von 40 Minuten.

Fazit:

Der manuelle On-Membrane-Verdau zeigte mit Sequenzabdeckungen in einem Bereich von 35,6% bis 44%, daß der Anteil an ACN in der Extraktionslösung die Peptidausbeute nicht stark beeinflusste.

Beim Verdau von der PVDF-Membran war eine größere Differenz zwischen den Sequenzabdeckungen, die von 13% bis 32% reichten, zu erkennen. Hohe Sequenzabdeckungen waren vor allem bei einem höheren Anteil (50% bis 60%) an ACN zu erhalten.

Als am besten geeignet wurde daraufhin eine Extraktion mit einem Anteil von 50% ACN über 30 min befunden.

### 3.1.4 Verdauzeit von 8 Stunden nach Protokoll des Verdauroboters

Da der manuelle Verdau – insbesondere was die Ergebnisse von der PVDF-Membran betraf – sehr viel bessere Ergebnisse gezeigt hatte als der automatisierte Verdau, sollte bei letzterem im Protokoll die Verdauzeit von 2 Stunden bei 45°C auf 8 Stunden bei 37°C verlängert werden, um in diesem Punkt den Umständen beim manuellen Verdau (hier war über Nacht 18 Stunden bei 37°C verdaut worden) näherzukommen. Außerdem wurde ab diesem Versuch mit 30µl extrahiert, da angenommen wurde, daß Teile des Extraktes bei Lagerung verdunsten könnten. Ein Verdau von 8 Stunden sollte gegebenenfalls auch über Nacht durchgeführt

werden können und erforderte somit eine Lagerung der Platten für einige Stunden bei Kühlung.

Aus der NC- bzw. PVDF-Membran wurden jeweils 10 Spots ausgestochen, und zwar 5 aus der Verdünnungsreihe der BSA-Banden und 5 aus der Verdünnungsreihe der Ovalbumin-Banden.

Diese Spots wurden nach dem bekannten Protokoll vom Digester verdaut, allerdings mit folgender Änderung im Verdauprotokoll:

Step	Description	Vol [ $\mu$ l]	Time [min]	Temp [ $^{\circ}$ C]	Cycles
1	Destain of DB71	130	20	21	1
2	Wash with MilliQ	150	5	21	2
3	Block with PVP	20	20	21	1
4	Wash with NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	150	5	21	2
5	Add Trypsin	10	0,1	21	1
6	Digest		<b>480</b>	<b>37</b>	1
7	Extraction (50% ACN)	30	30	21	1

Tab. 27: Verdauprotokoll 8 Stunden

Die Proben wurden mit DHB/HCCA-Mischmatrix gemessen.

Verdünnung		1	2	3	4	5
BSA	SC %	29,2	32,6	25,2	15,8	32
	Score	118	203	167	109	120
OV	SC %	8,6*	6,6*	7,8*	4,7*	7,8*
	Score					

Tab. 28: Sequenzabdeckungen (SC %) und Mowse Scores (Score) vom 8-Stunden-Verdau von der NC-Membran, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix.

Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mithilfe des Programmes „Sequence Editor“ ermittelt, in diesem Fall liegt kein Mowse Score vor. BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin.

Verdünnung		1	2	3	4	5
BSA	SC %	13,7*	12,4*	7,9*	11,4*	14,3*
	Score					
OV	SC %	14,3*	4,4*	4,7*	7,5*	4,7*
	Score					

Tab. 29: Sequenzabdeckungen (SC %) und Mowse Scores (Score) vom 8-Stunden-Verdau von der PVDF-Membran, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix.

Für leere Felder konnte bei der Messung kein Spektrum erhalten werden. Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mithilfe des Programmes „Sequence Editor“ ermittelt, in diesem Fall liegt kein Mowse Score vor. BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin.

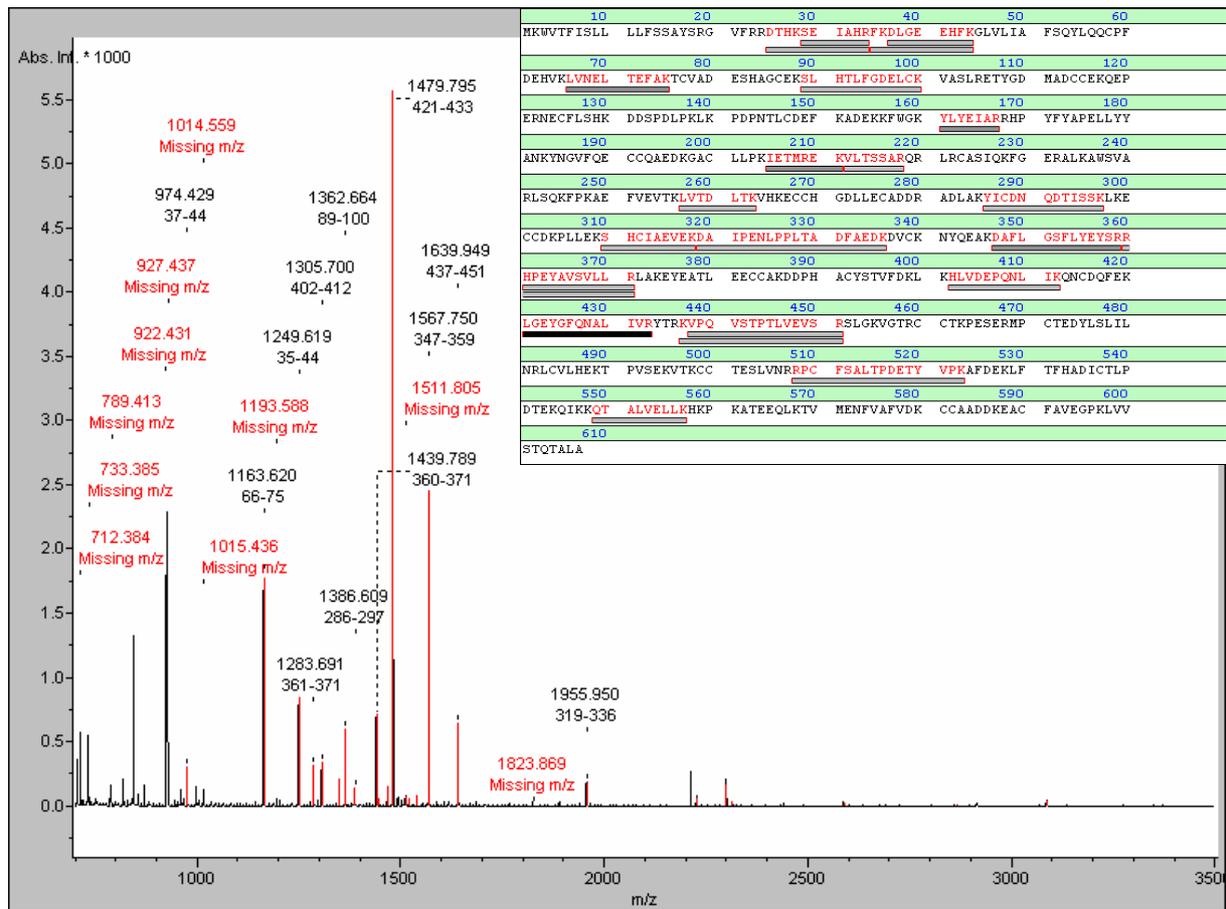


Abb. 17: Spektrum von BSA, Verdünnung 2, verdaut über 8 Stunden von der NC-Membran, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix. Sequenzabdeckung 32,6%.

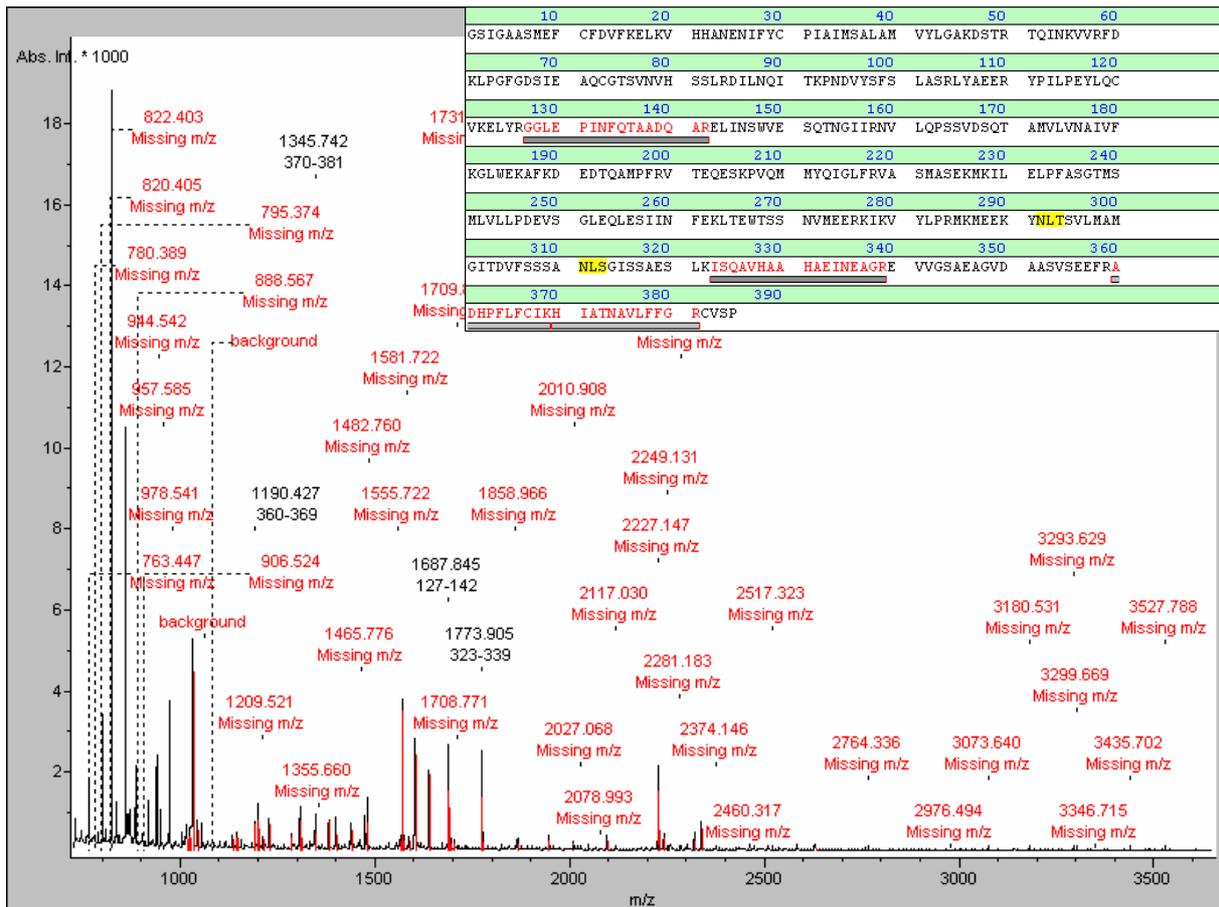


Abb. 18: Spektrum von Ovalbumin, Verdünnung 1, verdaut über 8 Stunden von der PVDF-Membran, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix. Sequenzabdeckung 14,3%.

#### Fazit:

Der 8-stündige automatisierte Verdau lieferte gute Ergebnisse von NC- und PVDF-Membran. Im Vergleich mit dem 2-Stunden-Verdau (siehe 3.1.2, Tab. 22, BSA Bande 5) zeigte der 8-Stunden-Verdau (Tab. 27, BSA) vergleichbar hohe Sequenzabdeckungen für BSA um 20 bis 30% vom Verdau von NC. Auch vom Verdau von PVDF konnten beim 8-Stunden-Verdau im Gegensatz zum 2-Stunden-Verdau Spektren gemessen werden.

### 3.1.5 Verdauzeit von 16 Stunden nach Protokoll des Verdauroboters

In diesem Versuch sollte die Verdauzeit im automatisierten Verdau weiter an die Verdauzeit beim manuellen Verdau angeglichen werden. Die Verdauzeit beim automatisierten Verdau wurde nun auf 16 Stunden bei 37°C verlängert.

Aus der NC- bzw. PVDF-Membran wurden jeweils 10 Spots ausgestochen, wieder 5 aus der Verdünnungsreihe der BSA-Banden und 5 aus der Verdünnungsreihe der darunterliegenden Ovalbumin-Banden.

Diese Spots wurden nach dem bekannten Protokoll vom Verdauroboter verdaut, mit folgender Änderung:

Step	Description	Vol [ $\mu$ l]	Time [min]	Temp [ $^{\circ}$ C]	Cycles
1	Destain of DB71	130	20	21	1
2	Wash with MilliQ	150	5	21	2
3	Block with PVP	20	20	21	1
4	Wash with NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	150	5	21	2
5	Add Trypsin	10	0,1	21	1
6	Digest		<b>960</b>	<b>37</b>	1
7	Extraction (50% ACN)	30	30	21	1

Tab. 30: Verdauprotokoll 16 Stunden

Gemessen wurden die Proben mit der DHB/HCCA-Mischmatrix.

Verdünnung		1	2	3	4	5
BSA	SC %	29,3	19,1	26,7	14,3	14,7
	Score	188	137	160	[69,9]	[54,6]
OV	SC %	4,7*	4,2*	1,6*		
	Score					

Tab. 31: Sequenzabdeckungen (SC %) und Mowse Scores (Score) vom 16-Stunden-Verdau von der NC-Membran, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix.

Werte in Klammern stehen für Mowse Scores, die nicht mehr im statistisch signifikanten Bereich liegen. Für leere Felder konnte bei der Messung kein Spektrum erhalten werden. Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mithilfe des Programmes „Sequence Editor“ ermittelt, in diesem Fall liegt kein Mowse Score vor. BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin.

Verdünnung		1	2	3	4	5
BSA	SC %	4,3*	4,6*	1,2*	2,1*	
	Score					
OV	SC %	4,7*	4,2*	3,4*		
	Score					

Tab. 32: Sequenzabdeckungen (SC %) und Mowse Scores (Score) vom 16-Stunden-Verdau von der PVDF-Membran, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix.

Für leere Felder konnte bei der Messung kein Spektrum erhalten werden. Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mithilfe des Programmes „Sequence Editor“ ermittelt, in diesem Fall liegt kein Mowse Score vor. BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin.

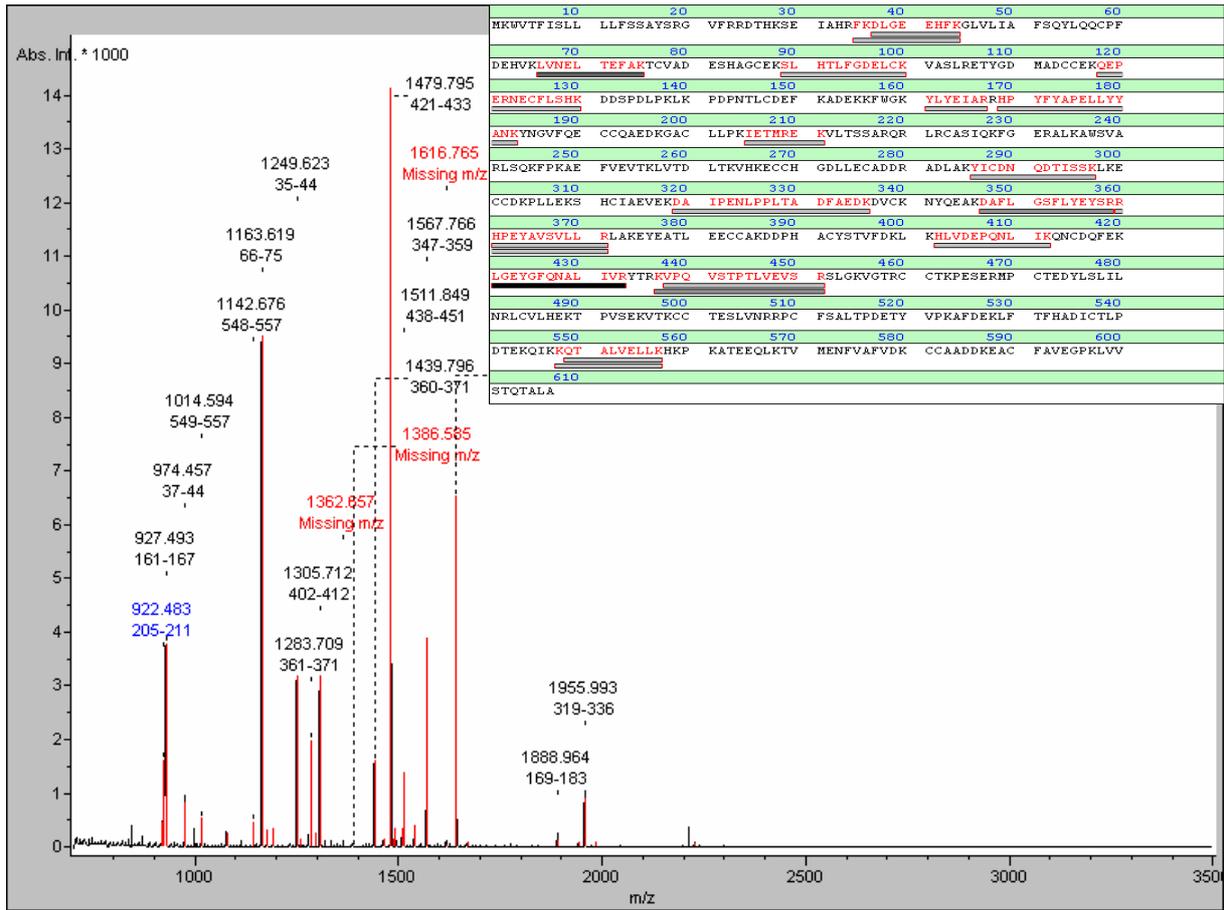


Abb. 19: Spektrum von BSA, Verdünnung 1, verdaut über 16 Stunden von der NC-Membran, gemessen auf DHB/Phosphorsäure-Matrix. Sequenzabdeckung 29,3%.

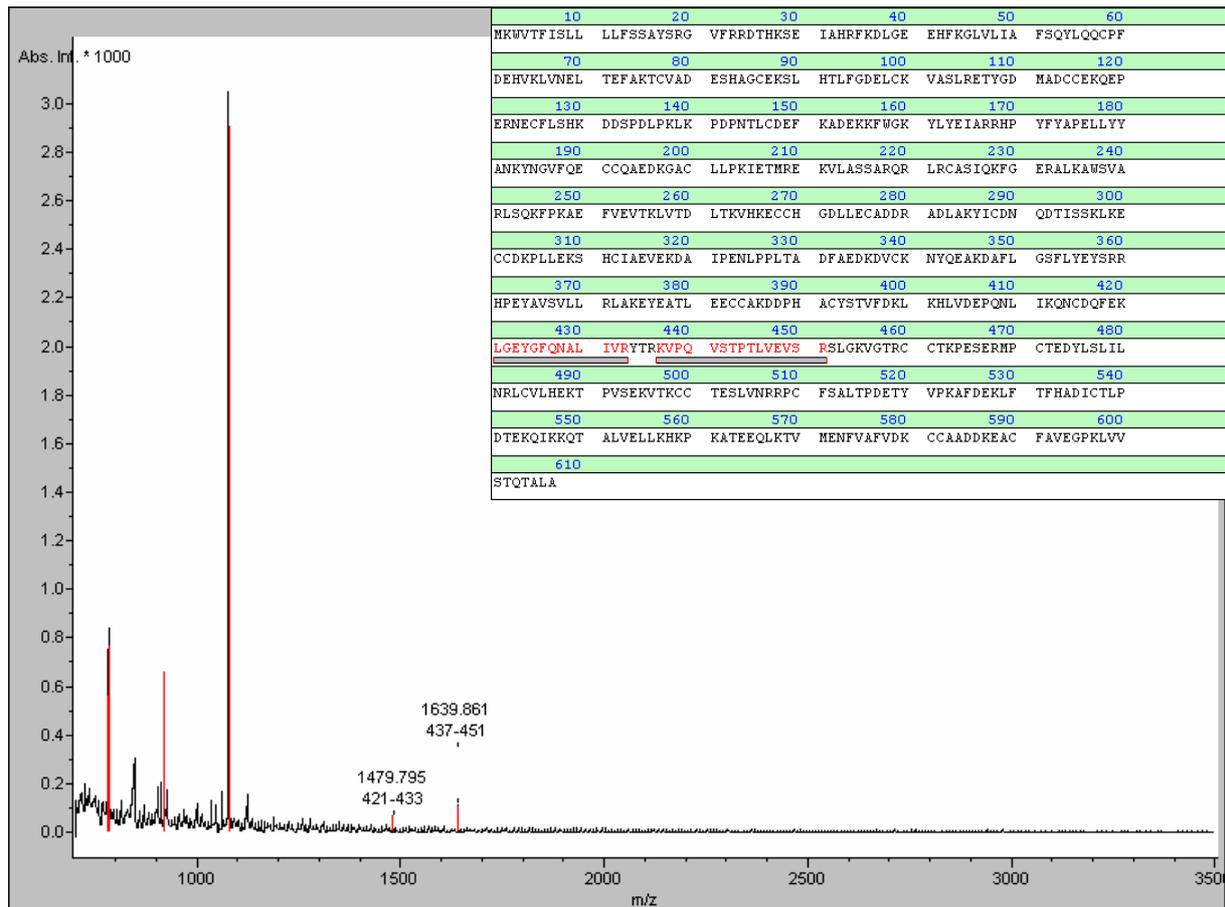


Abb. 20: Spektrum von BSA, Verdünnung 2, verdaut über 16 Stunden von der PVDF-Membran, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix. Sequenzabdeckung 4,6%.

Fazit:

Sowohl 8- als auch 16-Stunden-Verdau zeigten gute Sequenzabdeckungen, wobei der 8-stündige Verdau die bisher besten Ergebnisse von der PVDF-Membran erbrachte. Der 8-Stunden-Verdau bei 37°C wurde für weitere Versuche übernommen.

### 3.1.6 Vergleich der Extraktion per Hand mit der Extraktion per Verdauroboter

In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob es einen Unterschied macht, den letzten Schritt im Ablauf des Verdauprotokolls – die Extraktion – manuell oder automatisiert auszuführen.

Mit dem Spot Cutter wurden von der NC- und der PVDF-Membran jeweils 10 Spots aus den BSA-Banden ausgestanzt, und zwar immer zwei Spots aus jeder Bande der Verdünnungsreihe. Die Spots wurden vom Spot Cutter in die Wells gesetzt, in denen jeweils 70 µl DB71-Verdünnungslösung zur Aufhebung der elektrostatischen Kräfte vorgelegt worden waren.

Die Verarbeitung der Spots lief diesmal in drei Schritten folgendermaßen ab:

1. Die Waschschritte von 1) bis einschließlich 4) liefen zuerst ab, anschließend wurden die Wells, in denen die Spots in ihrer geringen Restflüssigkeit lagen, zugeklebt und über Nacht im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

2. Am nächsten Tag fand der Verdau von Schritt 5) bis einschließlich 6) statt.

3. Danach teilte sich für Schritt 7) der Ablauf in zwei Wege: es wurde die eine Hälfte der Proben manuell, die andere Hälfte der Proben automatisch extrahiert.

Das Verdauprotokoll sah insgesamt folgendermaßen aus:

Step	Description	Vol [ $\mu$ l]	Time [min]	Temp [ $^{\circ}$ C]	Cycles
1	Destain of DB71	130	20	21	1
2	Wash with MilliQ	150	5	21	2
3	Block with PVP	20	20	21	1
4	Wash with NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	150	5	21	2
5	Add Trypsin	10	0,1	21	1
6	Digest		480	37	1
7	Extraction (50% ACN)	30	30	21	1

Tab. 33: Verdauprotokoll Extraktionsvergleich

Gemessen wurden die Proben mit der DHB/HCCA-Mischmatrix.

Verdünnung		1	2	3	4	5
BSA von NC	SC %	41,5	1,3*	26	17,6	
	Score	187		116	76,9	
BSA von PVDF	SC %	13,2	12,5	24,5		23,2
	Score	78,6	[66,8]	138		141

Tab. 34: Sequenzabdeckungen (SC %) und Mowse Scores (Score) des Verdaus, bei dem die Extraktion manuell ausgeführt wurde.

Werte in Klammern stehen für Mowse Scores, die nicht mehr im statistisch signifikanten Bereich liegen. Für leere Felder konnte bei der Messung kein Spektrum erhalten werden. Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mithilfe des Programmes „Sequence Editor“ ermittelt, in diesem Fall liegt kein Mowse Score vor. BSA: Bovines Serumalbumin.

Verdünnung		1	2	3	4	5
BSA von NC	SC %	19,3	35,6	53,2	34,8	15,8
	Score	138	138	279	188	111
BSA von PVDF	SC %	13,2	13,2	19,4	11,4*	1,2*
	Score	84,2	89,4	77,9		

Tab. 35: Sequenzabdeckungen (SC %) und Mowse Scores (Score) des Verdaus, bei dem die Extraktion vom Verdauroboter ausgeführt wurde.

Für leere Felder konnte bei der Messung kein Spektrum erhalten werden. BSA: Bovines Serumalbumin.

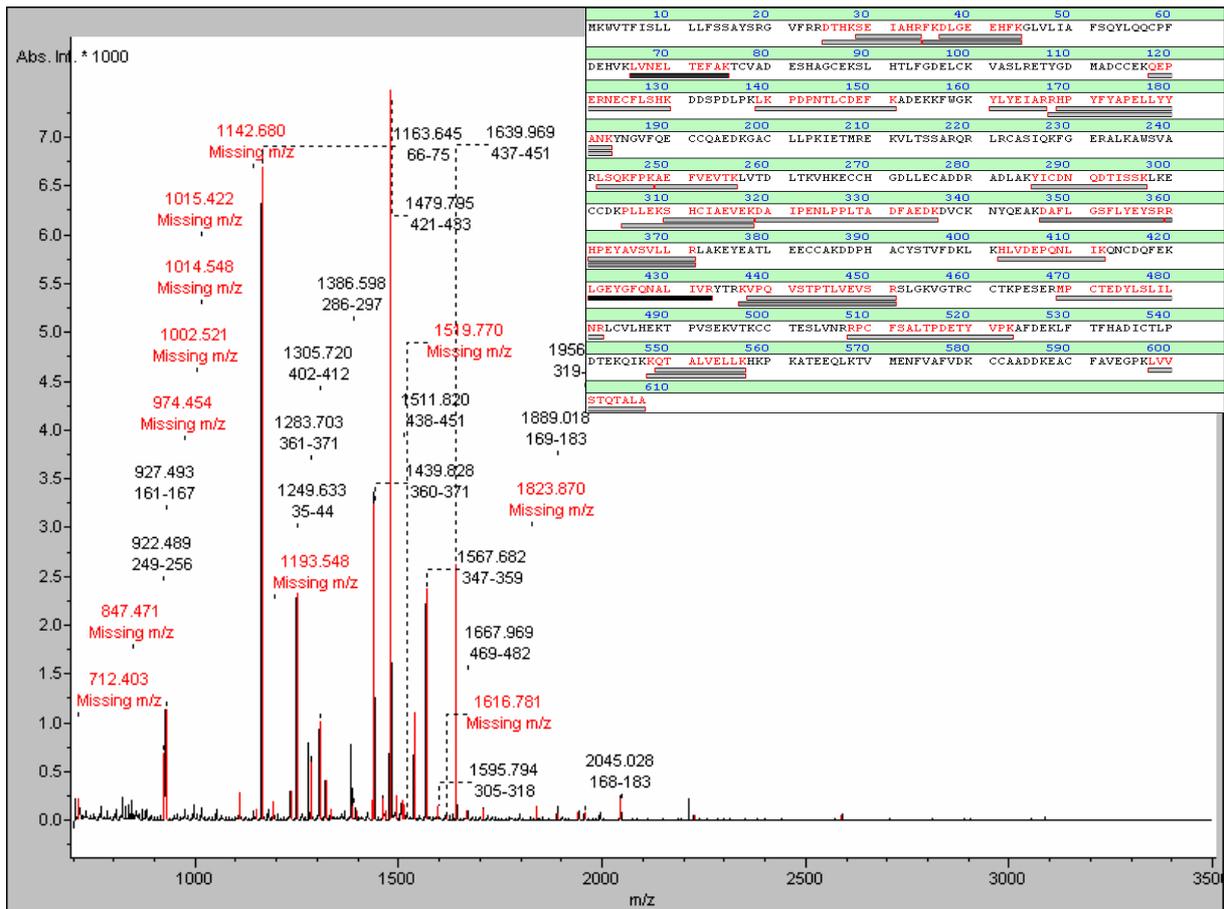


Abb. 21: Spektrum von BSA, Verdünnung 1, nach Verdau mit manueller Extraktion von der NC-Membran, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix. Sequenzabdeckung 41,5%.

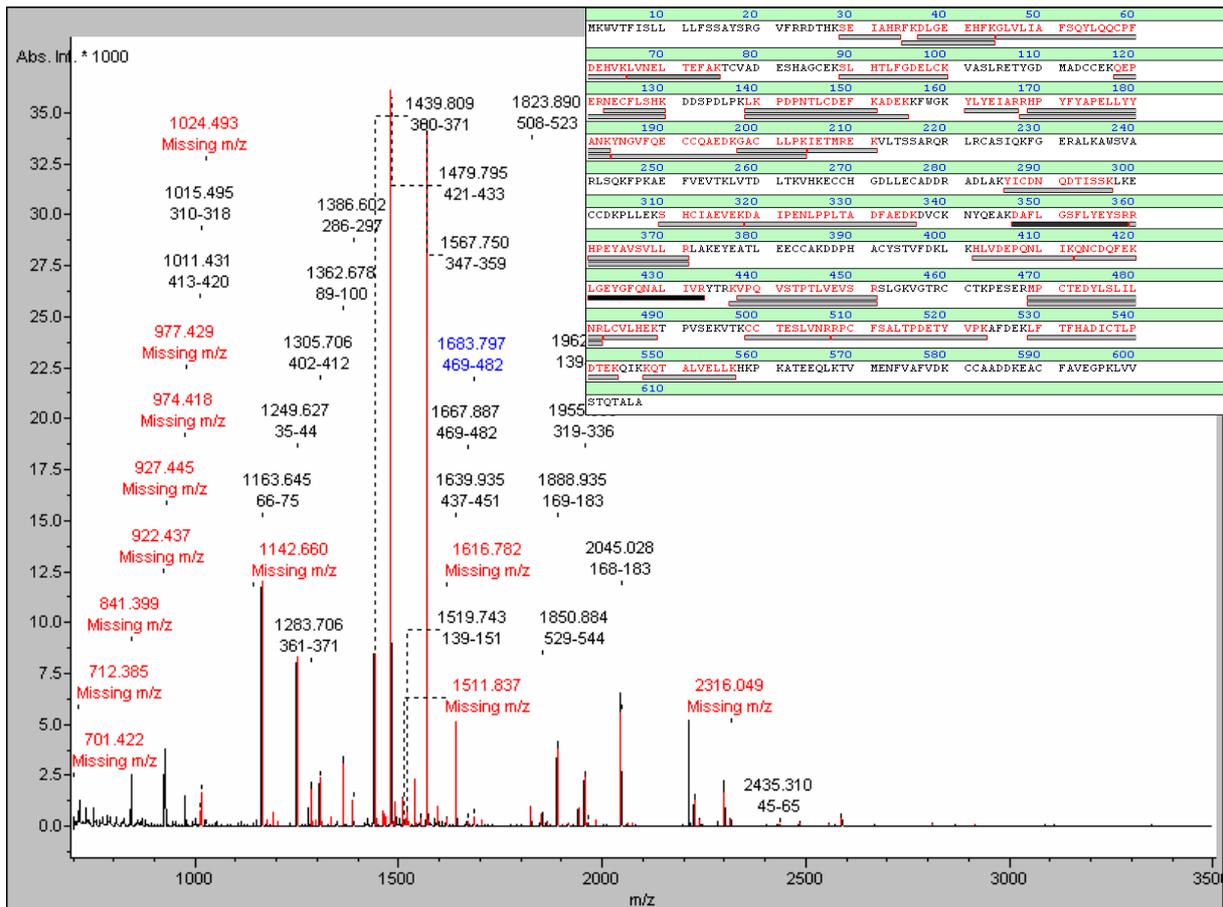


Abb. 22: Spektrum von BSA, Verdünnung 3, nach Verdau mit automatisierter Extraktion von der NC-Membran, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix. Sequenzabdeckung 53,2%.

Fazit:

Die Ergebnisse der automatisierten Extraktion waren gleichwertig mit denen der manuellen Extraktion.

### 3.1.7 Verdau mit 25µl Trypsinlösung

Da beobachtet worden war, daß die bisher zugegebenen 10µl Trypsinlösung während der Zeit des Verdau verdunsteten, so daß die Extraktionslösung dann auf mehr oder minder trockene oder nur noch leicht benetzte Membranstückchen aufgegeben wurde, sollte in diesem Versuch untersucht werden, welche Konsequenzen es hat, wenn statt der bisherigen 10µl nun 25µl Trypsinlösung (Konzentration 10ng/µl) zum Verdau benutzt werden.

Zu diesem Zweck wurden mit dem Spot Cutter insgesamt 4 Spots ausgestanzt, und zwar BSA in den beiden höchsten Konzentrationen, jeweils von der NC- und von der PVDF-Membran.

In den Wells waren manuell 5µl DB71-Verdünnungslösung vorgelegt worden.

Der Verdau lief insgesamt nach folgendem Protokoll ab:

Step	Description	Vol [ $\mu$ l]	Time [min]	Temp [ $^{\circ}$ C]	Cycles
1	Destain of DB71	130	20	21	1
2	Wash with MilliQ	150	5	21	2
3	Block with PVP	20	20	21	1
4	Wash with NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	150	5	21	2
5	Add Trypsin	<b>25</b>	0,1	21	1
6	Digest		480	37	1
7	Extraction (50% ACN)	30	30	21	1

Tab. 36: Verdauprotokoll 25 $\mu$ l Trypsinlösung

Das Verdauprotokoll wurde nach dem Punkt "Digest" gestoppt. Es war festzustellen, daß die Spots – im Gegensatz zum Trypsinzusatz von 10 $\mu$ l – nach dem Verdau noch gut von Flüssigkeit bedeckt waren.

Danach wurde die automatische Extraktion angeschlossen.

Gemessen wurden die Proben mit DHB/HCCA-Mischmatrix.

Verdünnung		1	2
BSA von NC	SC %	24,2	29,4
	Score	151	163
BSA von PVDF	SC %	8,1*	12,7*
	Score		

Tab. 37: Sequenzabdeckungen (SC %) und Mowse Scores (Score) des Verdaus mit 25 $\mu$ l Trypsinlösung.

Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mithilfe des Programmes „Sequence Editor“ ermittelt, in diesem Fall liegt kein Mowse Score vor. BSA: Bovines Serumalbumin.

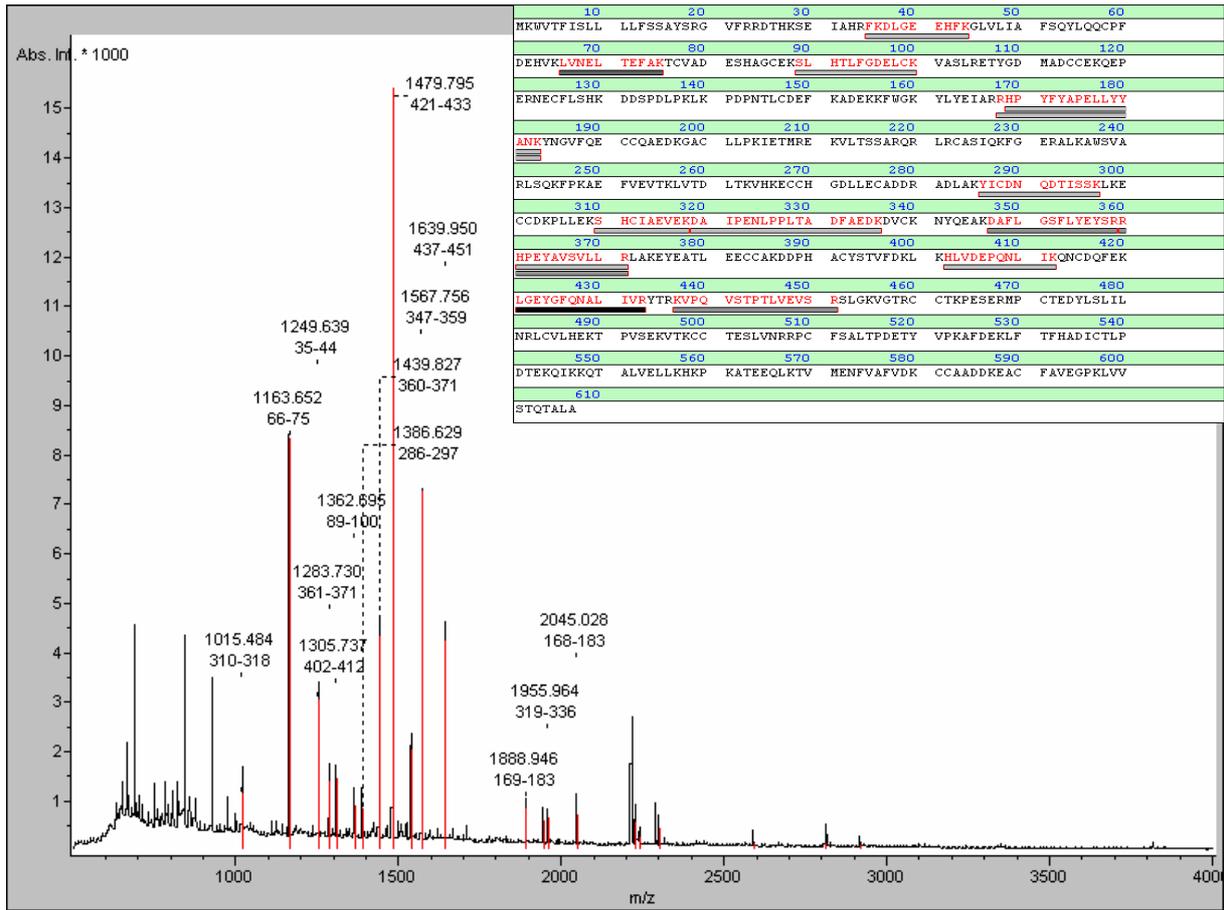


Abb. 23: Spektrum von BSA, Verdünnung 2, verdaut von der NC-Membran mit 25µl Trypsin, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix. Sequenzabdeckung 29,4%.

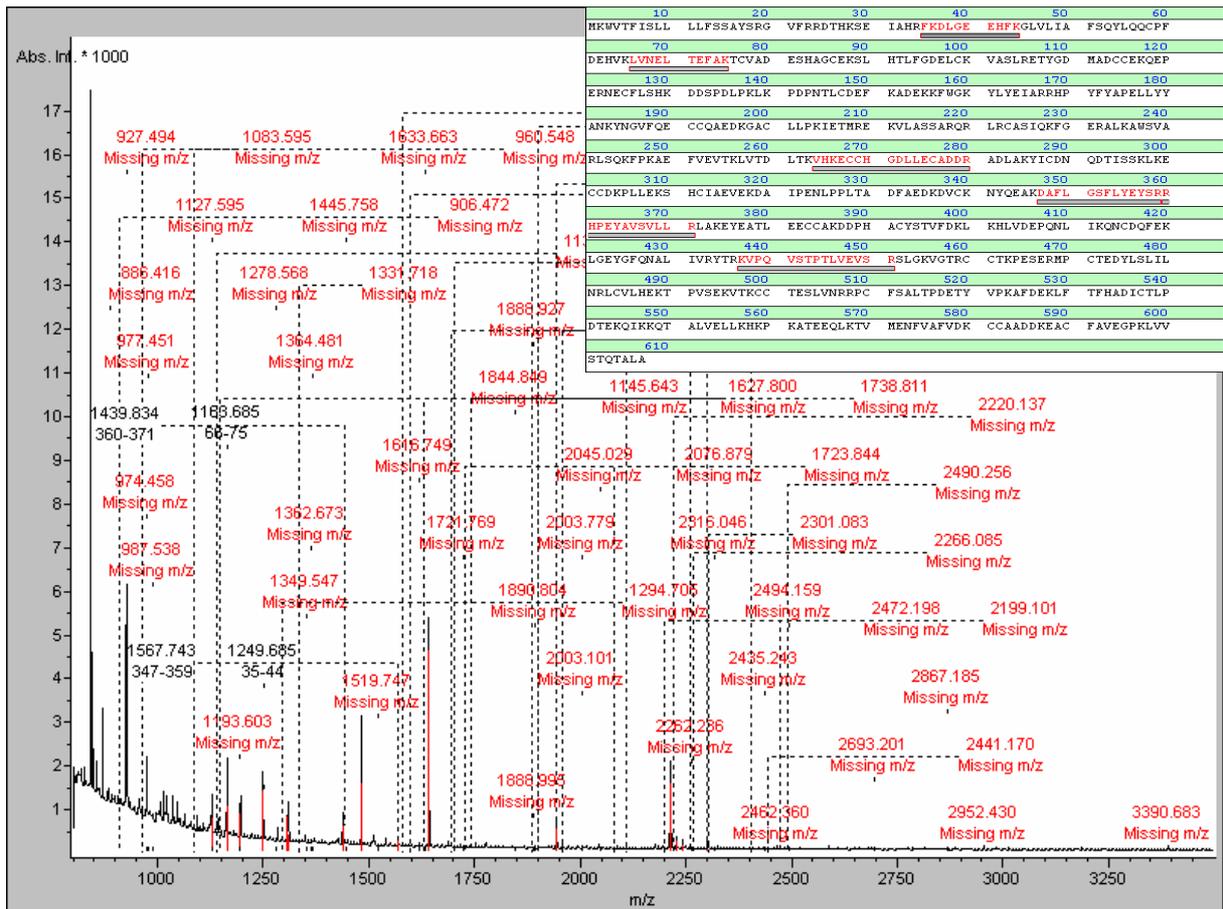
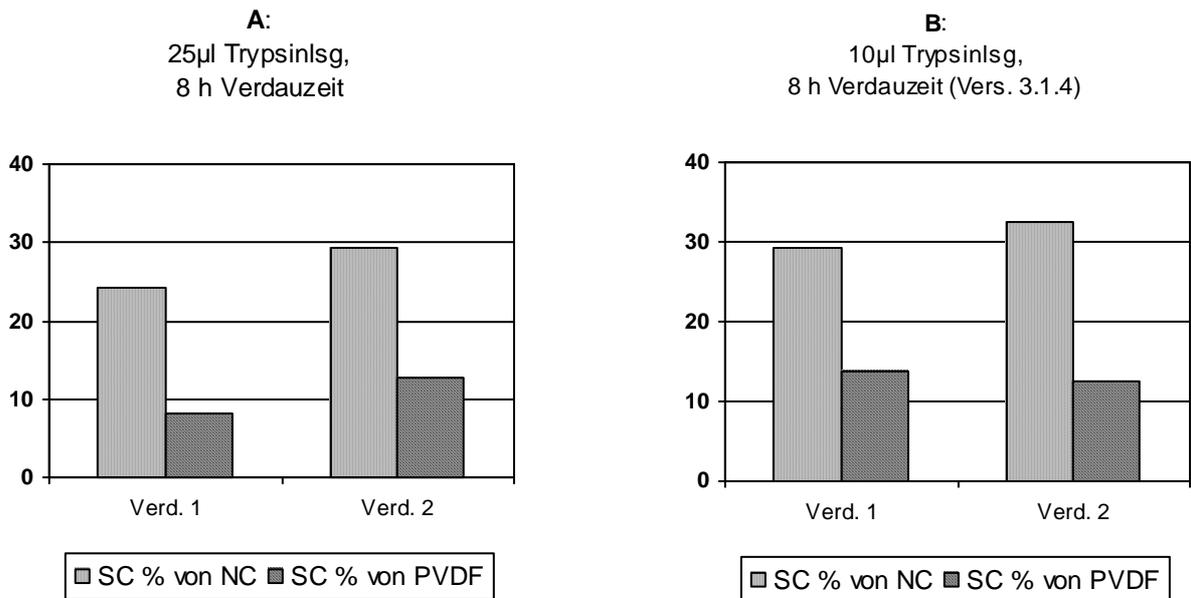


Abb. 24: Spektrum von BSA, Verdünnung 2, verdaut von der PVDF-Membran mit 25µl Trypsin, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix. Sequenzabdeckung 12,7%.



**C:**  
 10µl Trypsinlg, 8 h Verdauzeit,  
 automat. Extraktion (Vers. 3.1.6)

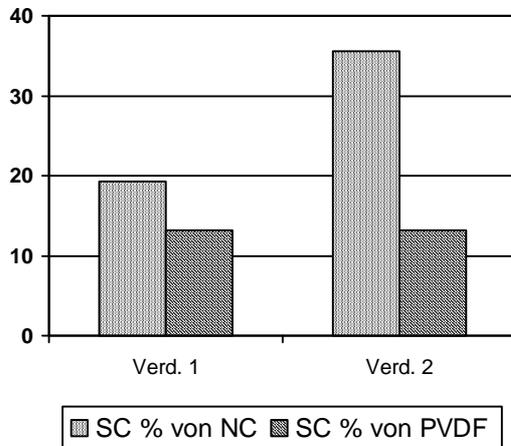


Abb. 25: Vergleich der Sequenzabdeckungen (SC %) des Verdaus über 8 Stunden mit 25µl Trypsinlösung mit anderen 8-Stunden-Verdaus mit 10µl Trypsinlösung. Verdaut wurde in allen Versuchen BSA.  
 A: 25 µl Trypsinlösung, B: 10 µl Trypsinlösung (Versuch 3.1.4), C: automatische Extraktion (Versuch 3.1.6)

Fazit:

Es erschien sinnvoll, mehr als 10µl Trypsinlösung beim automatisierten Verdau zu benutzen, um ein unerwünschtes Austrocknen der Spots zu verhindern.

Die Ergebnisse dieses Versuches mit 25µl Trypsinlösung lagen bei NC zwischen 24 und 29% und bei PVDF um 10% und unterschieden sich somit nicht merklich von anderen Versuchen, in denen mit 10µl Trypsinlösung verdaut worden war.

Aufgrund der ähnlichen Ergebnisse wurde angenommen, daß die Zugabe von mehr als 10µl Trypsinlösung sich nicht nachteilig auswirkt. Die im Versuch benutzten 25µl waren augenscheinlich jedoch etwas zu viel Flüssigkeit. Daher sollte in weiteren Versuchen – als Mittelweg – mit einer auf 17µl erhöhten Trypsinmenge verdaut werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde beobachtet, daß bei einer Menge von 17 µl bei einer 8-stündigen Verdauzeit weder Membran-Spots noch größere Membranstückchen austrockneten.

### 3.1.8 Zusammenfassung Teil 1:

Parameter	Variation	Fazit
Verdauzeit + Extraktion	Verdau 2 h Extraktion über 20 min mit 20µl, 10% ACN	größtenteils gute Spektren für die ersten 3 von 5 Verdünnungen von NC, keine brauchbaren Spektren von PVDF
	Verdau 8 h Extraktion über 30 min mit 30µl, 50% ACN	größtenteils gute Spektren für alle 5 Verdünnungen von NC und für die ersten 4 Verdünnungen von PVDF
	Verdau 16 h Extraktion über 30 min mit 30µl, 50% ACN	größtenteils gute Spektren für alle 5 Verdünnungen von NC und für die ersten 3 Verdünnungen von PVDF
% ACN in der Extraktionslösung	0%	gut
	10%	gut
	20%	gut
	50%	sehr gut
	60%	sehr gut
Extraktion 50% ACN (30µl)	manuell	gute Spektren für alle 5 Verdünnungen
	automatisiert	gute Spektren für alle 5 Verdünnungen
Enzymmenge	10µl Trypsin	Spots teilweise trocken
	25µl Trypsin	alle Spots blieben benetzt

Tab. 38: Zusammenfassung Teil 1

Der erste mit dem Verdauroboter automatisierte On-Membrane-2-Stunden-Verdau lief unkompliziert ab und lieferte hohe Sequenzabdeckungen. Hier war von einem Dot-Blot verdaut und die Proben waren mit DHB/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Matrix gemessen worden.

Im nächsten 2-Stunden-Verdau wurde Proteingemisch 1 verwendet. Die Proteinmengen in pmol waren hierbei etwas niedriger als beim Dot-Blot-Verdau (siehe 3.1.2). Hierbei wurde zum ersten mal vom Elektrolot verdaut und die Proben wurden mit einer DHB/HCCA-Mischmatrix gemessen. Es zeigte sich, daß der Elektrolot-Verdau von NC für Verdünnung 1 ähnliche Sequenzabdeckungen lieferte wie der Dot-Blot-Verdau, von PVDF beim Elektrolot-Verdau allerdings keine Spektren zu messen waren.

Ein manueller Verdau derselben Proteinproben, ebenfalls gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix, über ca. 18 Stunden hatte jedoch höhere Sequenzabdeckungen von NC zum Ergebnis als der 2-Stunden-Verdau, außerdem wurden auch Spektren von PVDF gemessen. Daraufhin wurde je ein automatisierter 8- und 16-Stunden-Verdau von BSA und Ovalbumin

durchgeführt, um zu sehen, ob eine verlängerte Verdauzeit die Ergebnisse beeinflussen würde. Es war festzustellen, daß bei einer längeren Verdauzeit im Gegensatz zum 2-Stunden-Verdau auch hier wieder Spektren von der PVDF-Membran zu erhalten waren. Die Spektren von der NC-Membran waren in der Höhe ihrer Sequenzabdeckungen den Ergebnissen des 2-Stunden-Verdau vergleichbar.

Wie im nächsten Versuch festgestellt wurde, ergaben sich bei einer Verdauzeit von 16 Stunden ebenfalls gute Ergebnisse, die jedoch die des 8-Stunden-Verdau nicht übertrafen. Um sicherzugehen, daß der Verdau auch vollständig abzulaufen konnte, sowie vor dem Hintergrund der Tatsache, daß eine lange Verdauzeit von 18 Stunden der Qualität der am Ende gemessenen Spektren keinesfalls abträglich war, wurde in den weiteren Versuchen mit einer Verdauzeit von 8 Stunden bei 37°C verdaut.

Ein weiterer Versuch sollte zeigen, ob der prozentuale Anteil von ACN in der Extraktionslösung einen Einfluß auf die Verdauergebnisse haben würde. Nach einem manuellen Verdau wurden hierzu Extraktionslösungen mit verschiedenen hohen Anteilen an ACN im Vergleich verwendet. Es stellte sich heraus, daß der ACN-Anteil bei der Extraktion von NC eine eher untergeordnete Rolle spielte. Von 0% bis 60% ACN-Anteil zeigten sich zufriedenstellende Ergebnisse mit hohen Sequenzabdeckungen. Beim Verdau von der PVDF-Membran waren allerdings die höchsten Sequenzabdeckungen mit einem höheren Anteil von ACN zu erhalten. Daraufhin wurde ein Anteil von 50% ACN und eine Extraktionszeit von 30 Minuten für das weitere Vorgehen gewählt.

Im nächsten Versuch wurde der Verdau nur bis zum Extraktionsschritt automatisiert durchgeführt. Die Extraktion wurde dann einmal manuell und einmal automatisiert ausgeführt, wobei das Ergebnis ein Gleichstand beider Methoden war.

Bisher war mit 10µl Trypsinlösung gearbeitet worden. In einem weiteren Versuch, der gute Sequenzabdeckungen lieferte, wurde festgestellt, daß bei Zugabe von 25µl Trypsinlösung die Spots während des Verdau nicht austrockneten, sondern von Flüssigkeit bedeckt blieben. In den folgenden Versuchen wurde eine mittlere Flüssigkeitsmenge von 17µl verwendet. Es zeigte sich, daß bei einer Flüssigkeitsmenge von 17 µl bei einer 8-stündigen Verdauzeit sowohl Membran-Spots als auch größere Membranstückchen während des gesamten Verdauvorganges befeuchtet blieben.

In diesem Versuchsteil wurde eine Methode entwickelt, mit der aus Blot-Membranen ausgestochene Protein-Spots automatisiert verdaut werden können.

Folgendes Verdauprotokoll wurde nun favorisiert:

Step	Description	Vol [ $\mu$ l]	Time [min]	Temp [ $^{\circ}$ C]	Cycles
1	Destain of DB71	130	20	21	1
2	Wash with MilliQ	150	5	21	2
3	Block with PVP	20	20	21	1
4	Wash with NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	150	5	21	2
5	Add Trypsin	17	0,1	21	1
6	Digest		480	37	1
7	Extraction (50% ACN)	30	30	21	1
Treshold for clot detection:		350			
Aspirate height over bottom of the well [mm]:		0,5			
Dispense height over bottom of the well [mm]:		9			

Tab. 39: Verdauprotokoll Teil 1

### 3.2 Verdau nach Elektro-Blot und Blockierung der Membran mit Roti-Block – Waschvarianten

Eine Blockierung der nicht mit Protein beladenen Stellen auf der Elektro-Blot-Membran mit Roti-Block stellt eine Bedingung für die Durchführung eines Western Blots mit anschließender Chemolumineszenz-Reaktion dar. Doch verträgt sich eine Behandlung mit Roti-Block mit dem anschließenden On-Membrane-Verdau und der MS-Analyse? Der Klärung dieser Frage dient das folgende Kapitel.

#### 3.2.1 Verdau ohne Waschen

Es sollte zunächst untersucht werden, inwieweit die Blockierung der Membranen mit Roti-Block die Identifizierung der von den Membranen verdauten Proteine beeinflusst.

Es wurden 2 Mini-Gele mit 10% Acrylamid gegossen. In die zehn Taschen des ersten Mini-Gels wurde BSA-Lösung (siehe 2.4.1) in den folgenden Mengen aufgetragen:

Taschen 1 bis 4:  $4\mu\text{l} \rightarrow 1\mu\text{g BSA}$  (Verdünnung 1 =  $15,2\text{pmol/Spur}$ )

Taschen 5 bis 8:  $2\mu\text{l} \rightarrow 0,5\mu\text{g BSA}$  (Verdünnung 2 =  $7,6\text{pmol/Spur}$ )

Taschen 9 bis 10:  $1\mu\text{l} \rightarrow 0,25\mu\text{g BSA}$  (Verdünnung 3 =  $3,8\text{pmol/Spur}$ )

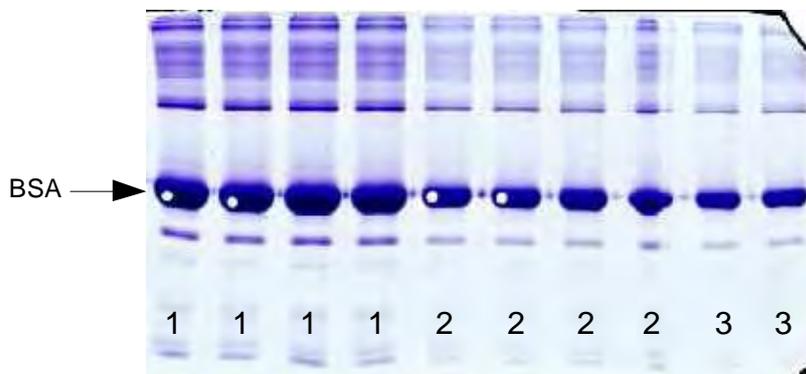


Abb. 26: Gel mit BSA-Proben nach Färbung mit Coomassie.  
Die Spuren 1 bis 4 enthalten je  $1\mu\text{g BSA}$  (= Verdünnung 1), Spuren 5 bis 8 enthalten je  $0,5\mu\text{g BSA}$  (= Verdünnung 2), Spuren 9 und 10 enthalten je  $0,25\mu\text{g BSA}$  (= Verdünnung 3). BSA: Bovines Serumalbumin

In die zehn Taschen des zweiten Mini-Gels wurde die BSA-Lösung (siehe 2.4.1) in den folgenden Mengen aufgetragen:

Taschen 1 bis 3: 4µl → 1µg (Verdünnung 1 = 15,2pmol/Spur)  
 Tasche 4: 2µl → 0,5µg (Verdünnung 2 = 7,6pmol/Spur)  
 Tasche 5: blieb leer  
 Taschen 6 bis 8: 4µl → 1µg (Verdünnung 1 = 15,2pmol/Spur)  
 Taschen 9 bis 10: 2µl → 0,5µg (Verdünnung 2 = 7,6pmol/Spur)

Anschließend wurden durch SDS-PAGE die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Das erste Gel wurde nach der Elektrophorese direkt mit Coomassie gefärbt und nach dem Färbvorgang bei 4°C in Wasser aufbewahrt.

Das zweite Gel wurde im Bereich der leeren Tasche in 2 Hälften geschnitten. Im Tank-Blot-Verfahren wurde die vordere Gelhälfte auf eine NC-Membran, die hintere Hälfte auf eine PVDF-Membran geblottet. Nach dem Blot wurden die beiden Membranen je in eine Schüssel mit Roti-Block gelegt und diese für 4 Stunden auf einen Schüttler gestellt. Anschließend wurden die Membranen mit DB71 gefärbt und danach in DB71-Verdünnungslösung aufbewahrt. Aus den Membranen wurden mit dem Spot Cutter insgesamt 8 Spots ausgestochen, und zwar von jeder Membran je zweimal BSA aus den Banden mit der Menge 1µg und je zweimal BSA aus den Banden mit der Menge 0,5µg.

Diese Spots wurden nach folgendem Protokoll verdaut:

Step	Description	Vol [µl]	Time [min]	Temp [°C]	Cycles
1	Destain of DB71	130	20	21	1
2	Wash with MilliQ	150	5	21	2
3	Block with PVP	20	20	21	1
4	Wash with NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	150	5	21	2
5	Add Trypsin	17	0,1	21	1
6	Digest		480	37	1
7	Extraction (50% ACN)	30	30	21	1

Tab. 40: Verdauprotokoll ohne Waschen

Die Messung der Proben erfolgte mit einer Mischmatrix aus DHB/HCCA sowie mit einer DHB/Phosphorsäure-Matrix.

Verdünnung		1	1	2	2
BSA von NC	SC %	9,6*			
	Score				
BSA von PVDF	SC %				
	Score				

Tab. 41: Sequenzabdeckungen (SC %) und Mowse Scores (Score) des Verdaus der mit Roti-Block behandelten Membranen, gemessen auf einer DHB/HCCA-Mischmatrix.

Für leere Felder konnte bei der Messung kein Spektrum erhalten werden. Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mithilfe des Programmes „Sequence Editor“ ermittelt, in diesem Fall liegt kein Mowse Score vor. BSA: Bovines Serumalbumin.

Man sah in allen mit Mischmatrix gemessenen Spektren ein sich für Roti-Block als typisch erweisendes clusterartiges Muster, das die Signale der Peptide oft vollständig überdeckte.

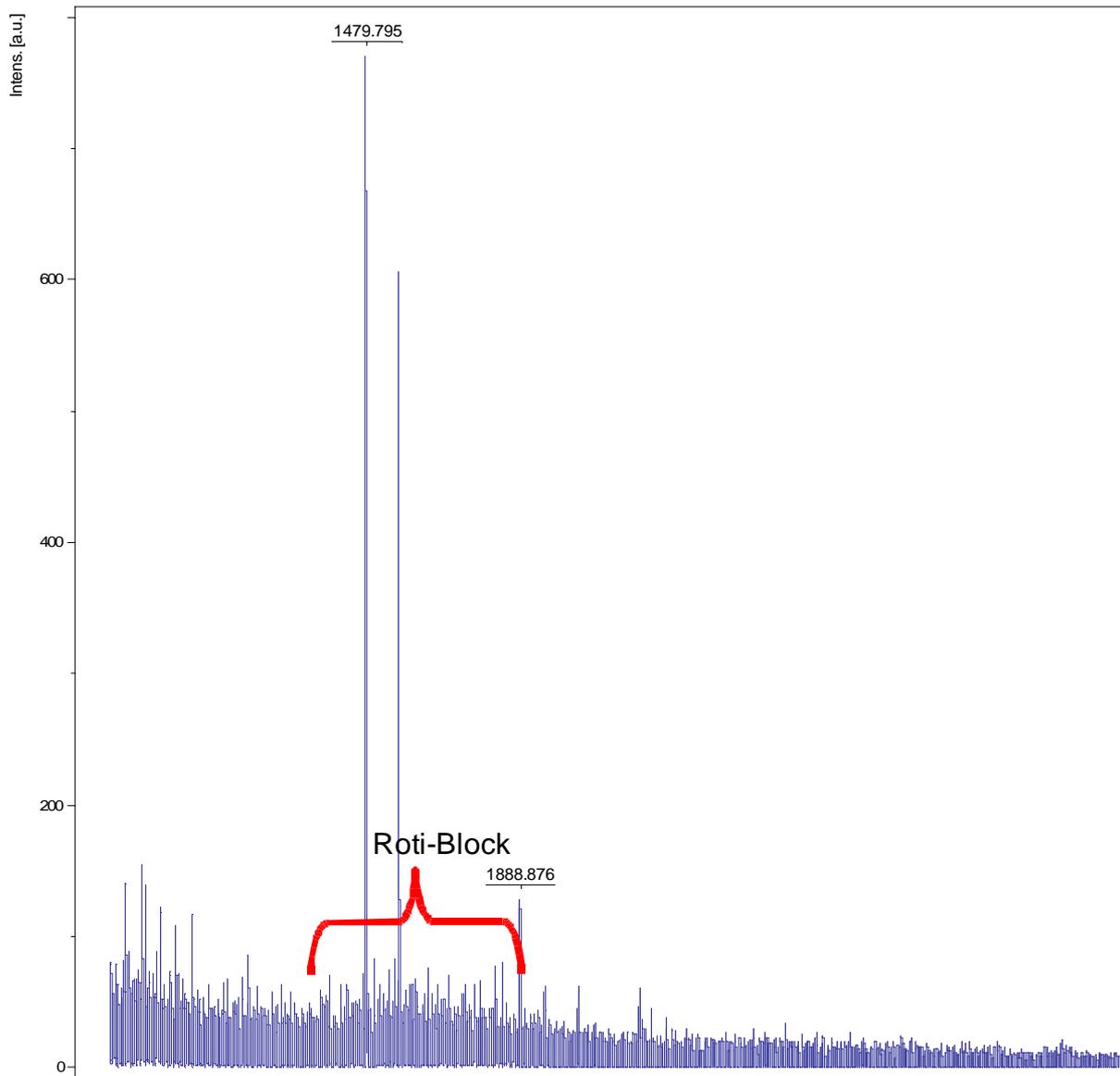


Abb. 27: Spektrum von BSA, Verdünnung 1, Verdau ohne Waschen von der NC-Membran, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix. Roti-Block überdeckt clusterartig das Spektrum.

Die mit DHB/Phosphorsäure-Matrix gemessenen Proben zeigten jedoch gute Spektren.

Verdünnung		1	1	2	2
BSA von NC	SC %	21,3	25,5	33,1	16,1
	Score	115	113	107	90,1
BSA von PVDF	SC %	11,2*	13,5	12,9*	7,2*
	Score		[65,6]		

Tab. 42: Sequenzabdeckungen (SC %) und Mowse Scores (Score) des Verdaus der mit Roti-Block behandelten Membranen, gemessen auf einer DHB/Phosphorsäure-Matrix.

Werte in Klammern stehen für Scores im statistisch nicht relevanten Bereich. Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mithilfe des Programmes „Sequence Editor“ ermittelt, in diesem Fall liegt kein Mowse Score vor. BSA: Bovines Serumalbumin.

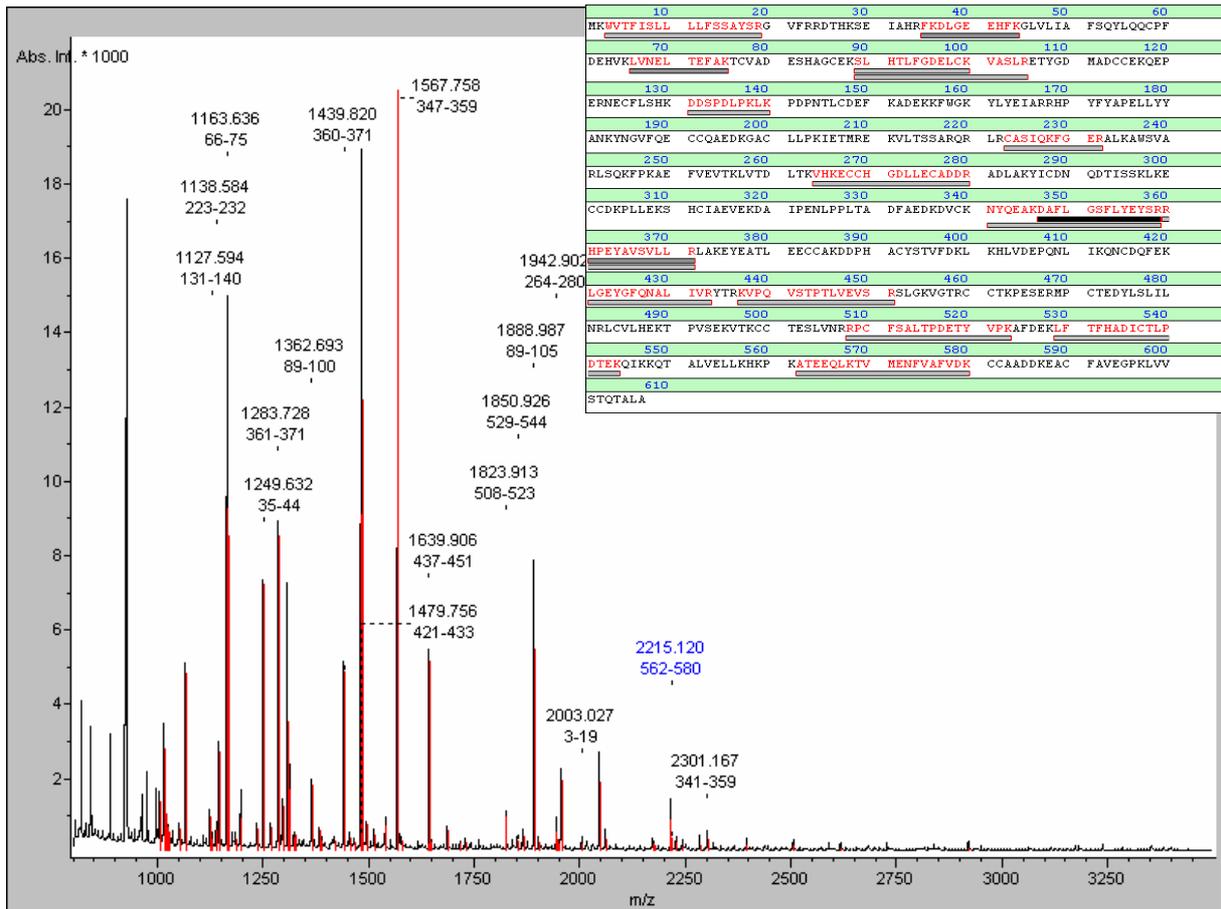


Abb. 28: Spektrum von BSA, Verdünnung 2, Verdau ohne Waschen von der NC-Membran, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix. Sequenzabdeckung 33,1%.

Zum Vergleich wurden mit dem Spot Cutter kleine Spots (2 mm) aus dem Gel ausgestanzt (2 mal aus Verdünnung 1; 2 mal aus Verdünnung 2; siehe Abb. 26) und automatisiert nach üblichem Protokoll verdaut (siehe 2.12.2).

Auch aus dem Verdau des coomassiegefärbten Geles ergaben sich bei Messung mit Mischmatrix gute Spektren.

Verdünnung		1	1	2	2
BSA	SC %	28,8	26,9	22,9	23,1
	Score	196	178	159	161

Tab. 43: Sequenzabdeckungen (SC %) und Mowse Scores (Score) des Verdau im mit Coomassie gefärbten Gel, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix.  
BSA: Bovines Serumalbumin.

Fazit:

In diesem Versuch zeigten sich gute Sequenzabdeckungen beim Verdau der Proteine aus dem Gel, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix, sowie beim mit DHB/Phosphorsäure-Matrix gemessenen On-Membrane-Verdau. Der auf Mischmatrix gemessene On-Membrane-Verdau erlaubte jedoch keine gute Proteinidentifizierung, woraus gefolgert wurde, daß der störende Faktor Roti-Block sein mußte. Das morphologische Korrelat hierfür stellten die Cluster in den mit Mischmatrix gemessenen Spektren dar, die nur wenige Peptid-Peaks erkennen ließen. Die DHB/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Matrix erwies sich als mit Roti-Block kompatibel.

### **3.2.2 Messung der Proben aus 3.2.1 (Verdau ohne Waschen) mit verschiedenen Matrices**

Um die unterschiedlichen Reaktionen von Roti-Block mit verschiedenen Matrices näher zu untersuchen, wurden einige Proben aus dem vorherigen Versuch (3.2.1, Verdau von mit Roti-Block behandelten Membranen ohne Waschen) sowie Roti-Block gebrauchsfertig verdünnt (siehe 2.8) auf drei verschiedenen Matrices gemessen: auf DHB/HCCA-Mischmatrix, auf Citronenmatrix nach Jahn und auf DHB/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Matrix.

# DHB/HCCA-Mischmatrix:

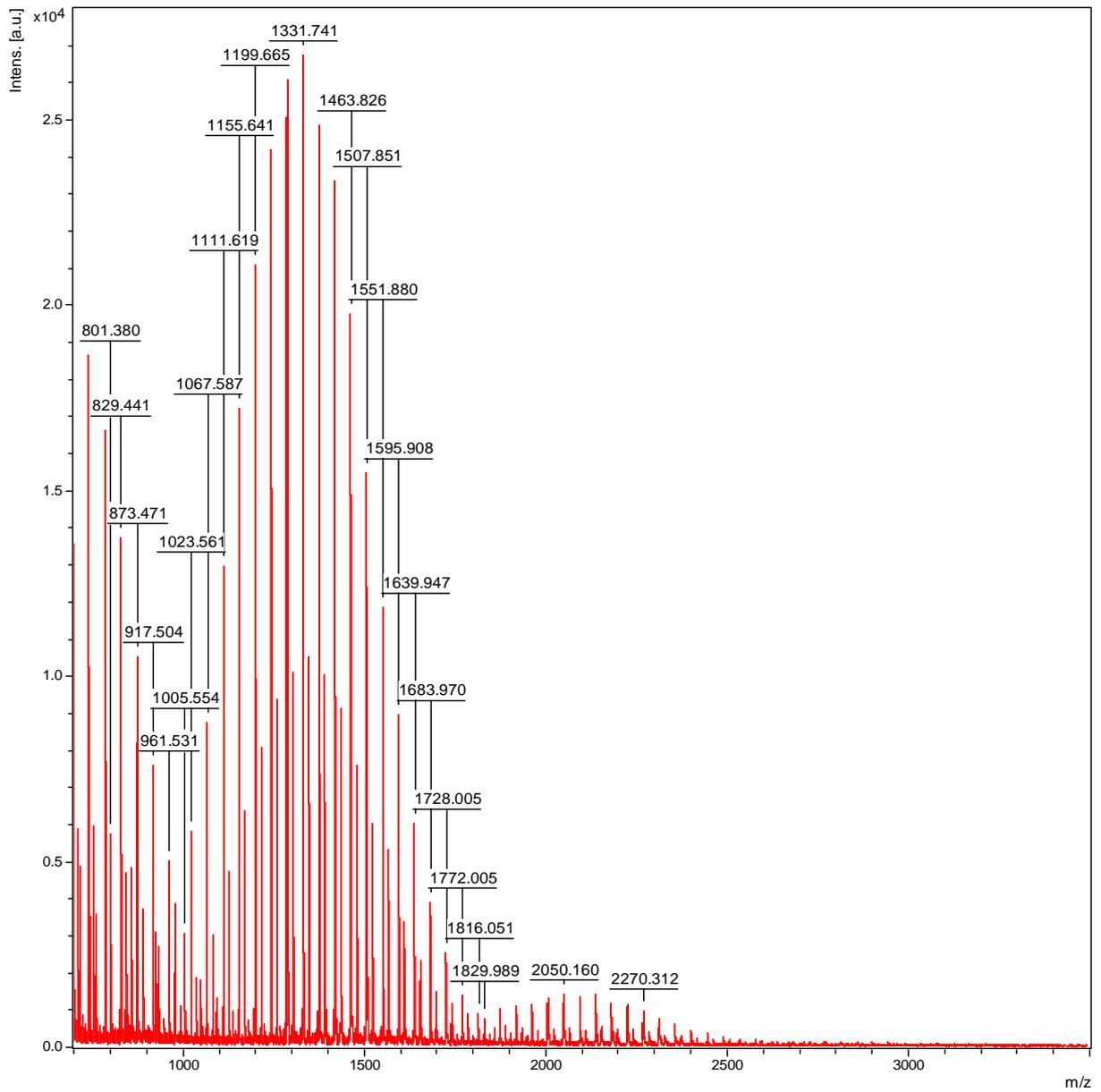


Abb. 30: BSA, Verdünnung 1, Verdau ohne Waschen von der NC-Membran, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix. Keine Sequenzabdeckung.

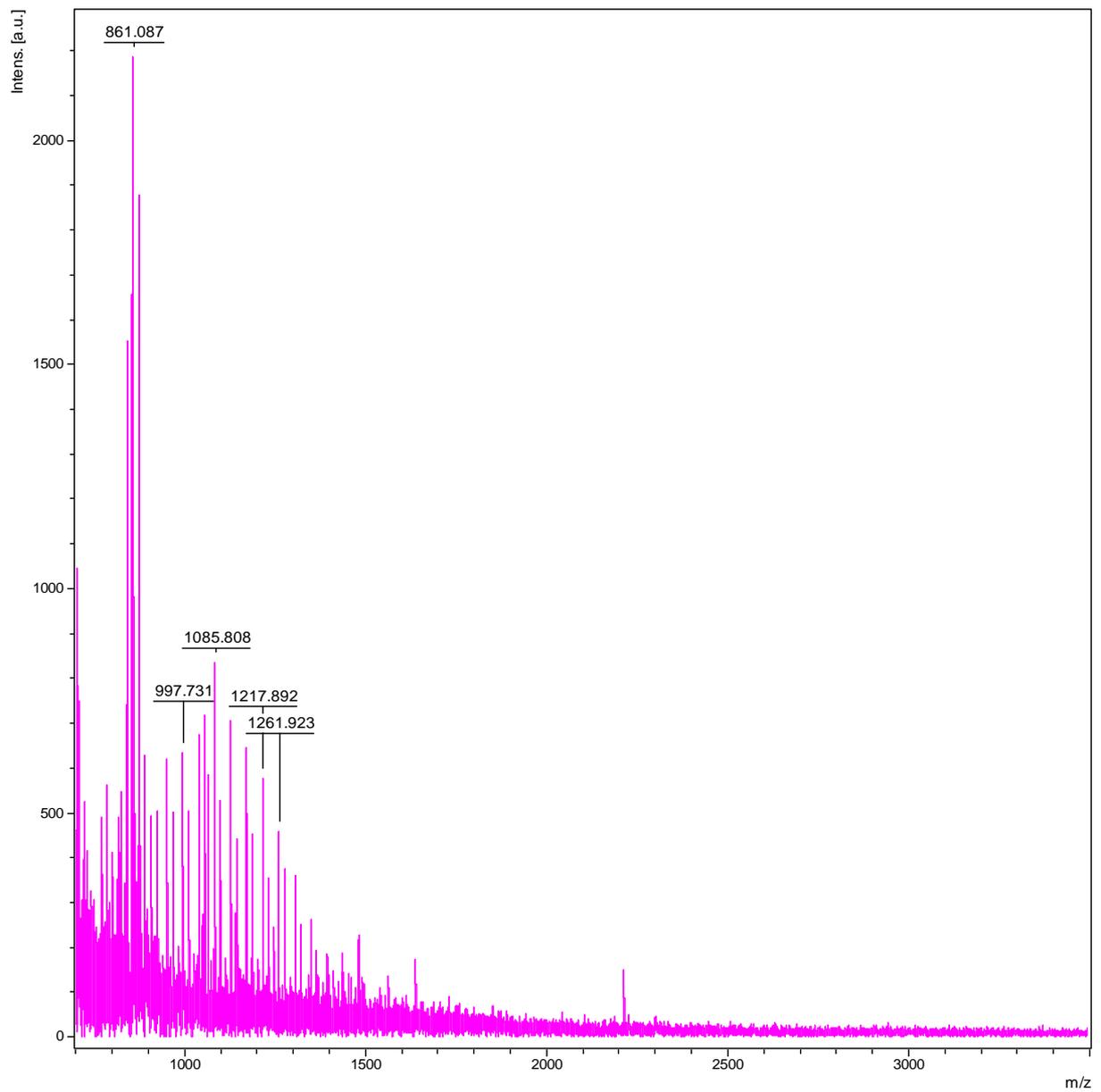


Abb. 31: BSA, Verdünnung 1, Verdau ohne Waschen von der PVDF-Membran, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix. Keine Sequenzabdeckung.

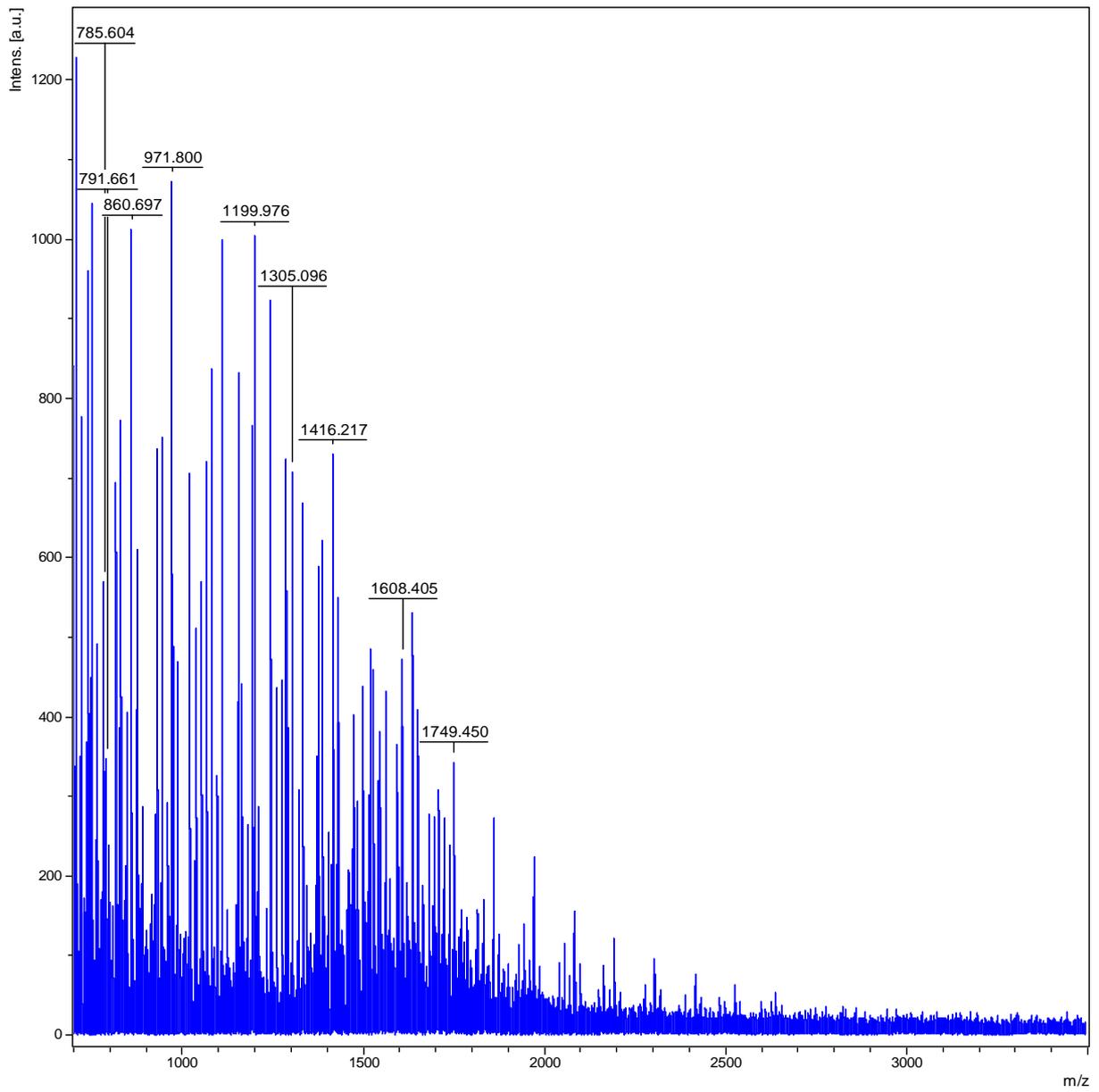


Abb. 32: Roti-Block gebrauchsfertig verdünnt, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix.

## HCCA-Matrix nach Jahn:

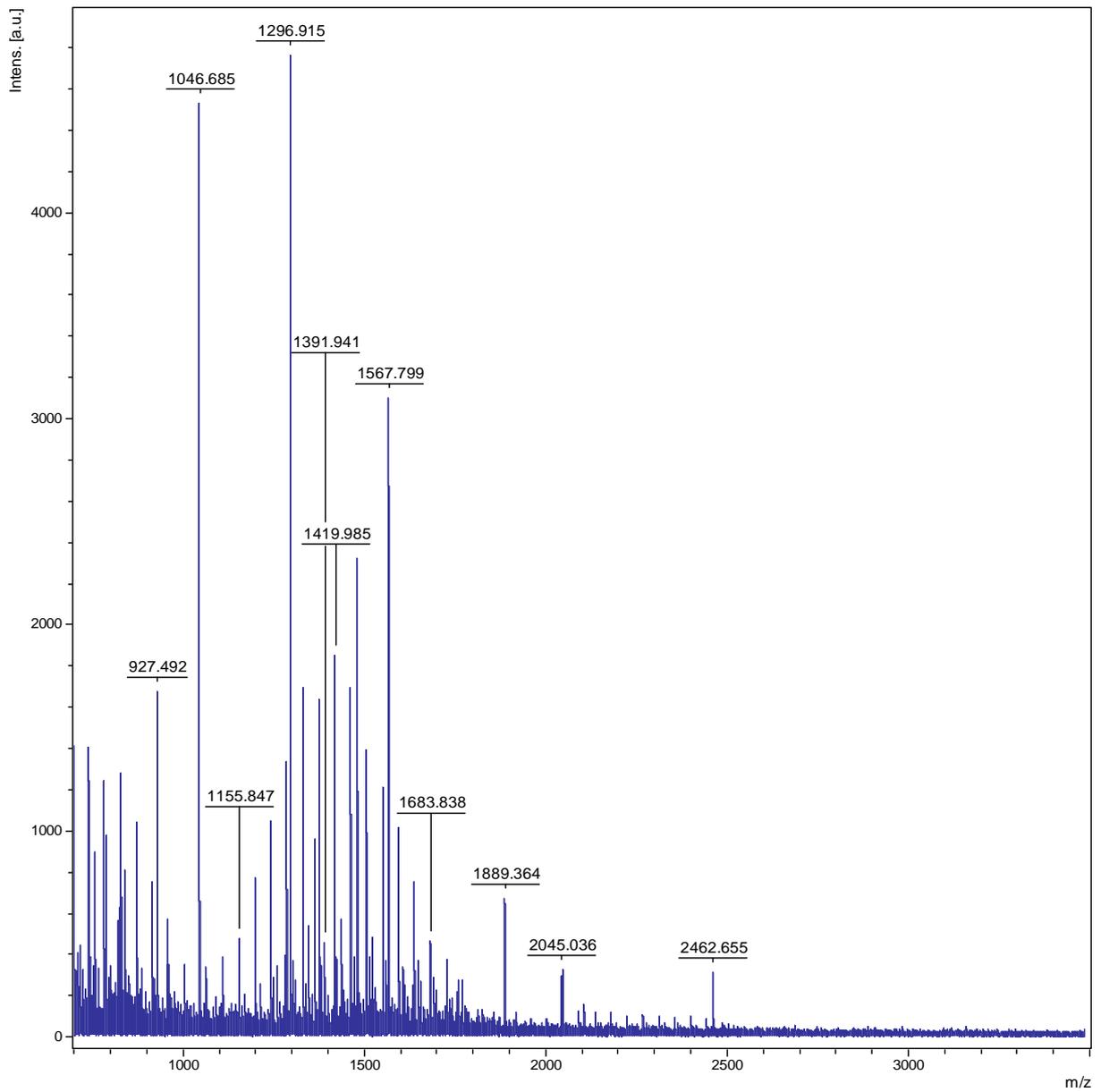


Abb. 33: BSA, Verdünnung 1, Verdau ohne Waschen von der NC-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn. Sequenzabdeckung 13%.

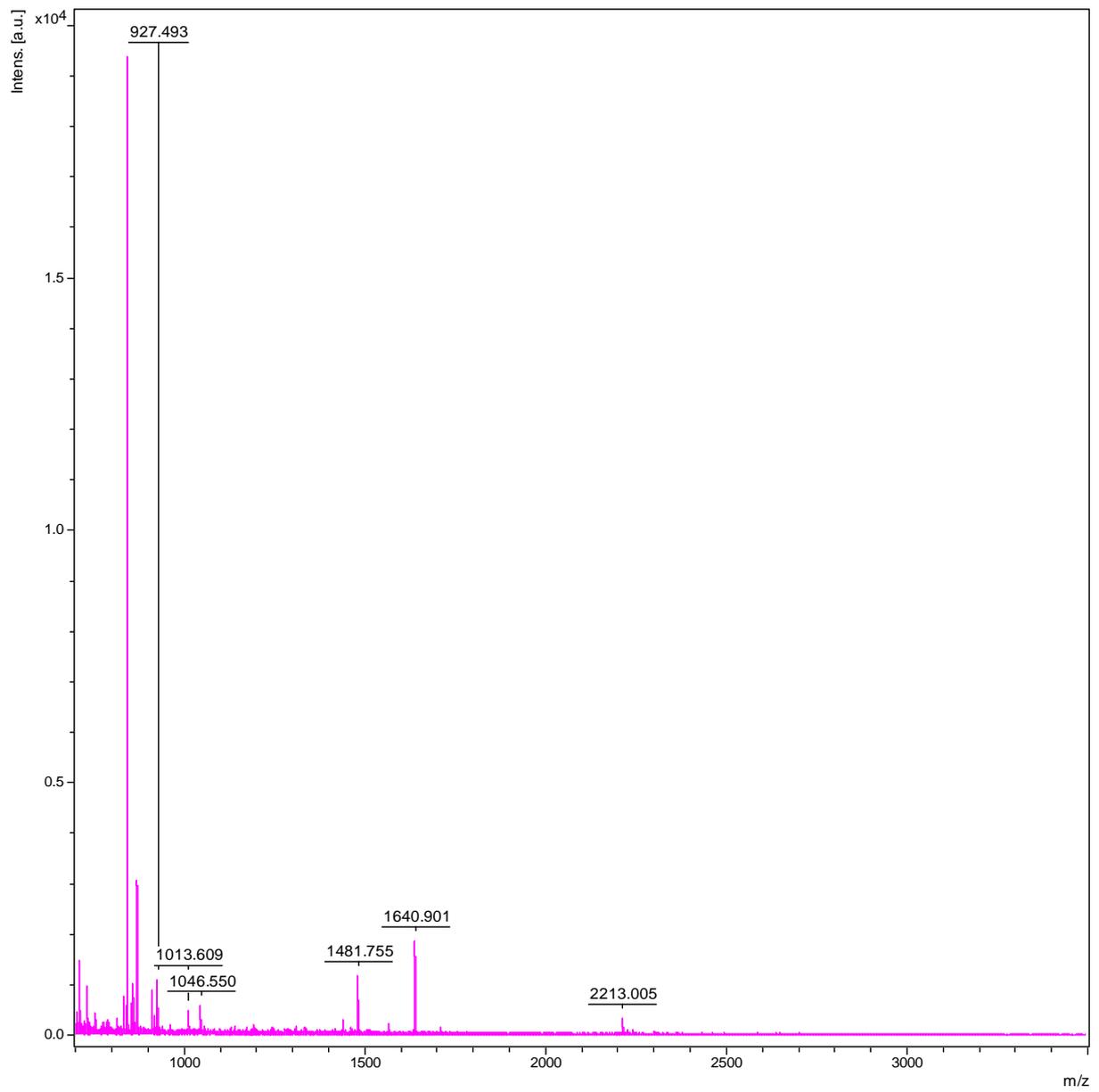


Abb. 34: BSA, Verdünnung 1, Verdau ohne Waschen von der PVDF-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn. Sequenzabdeckung 3,1%.

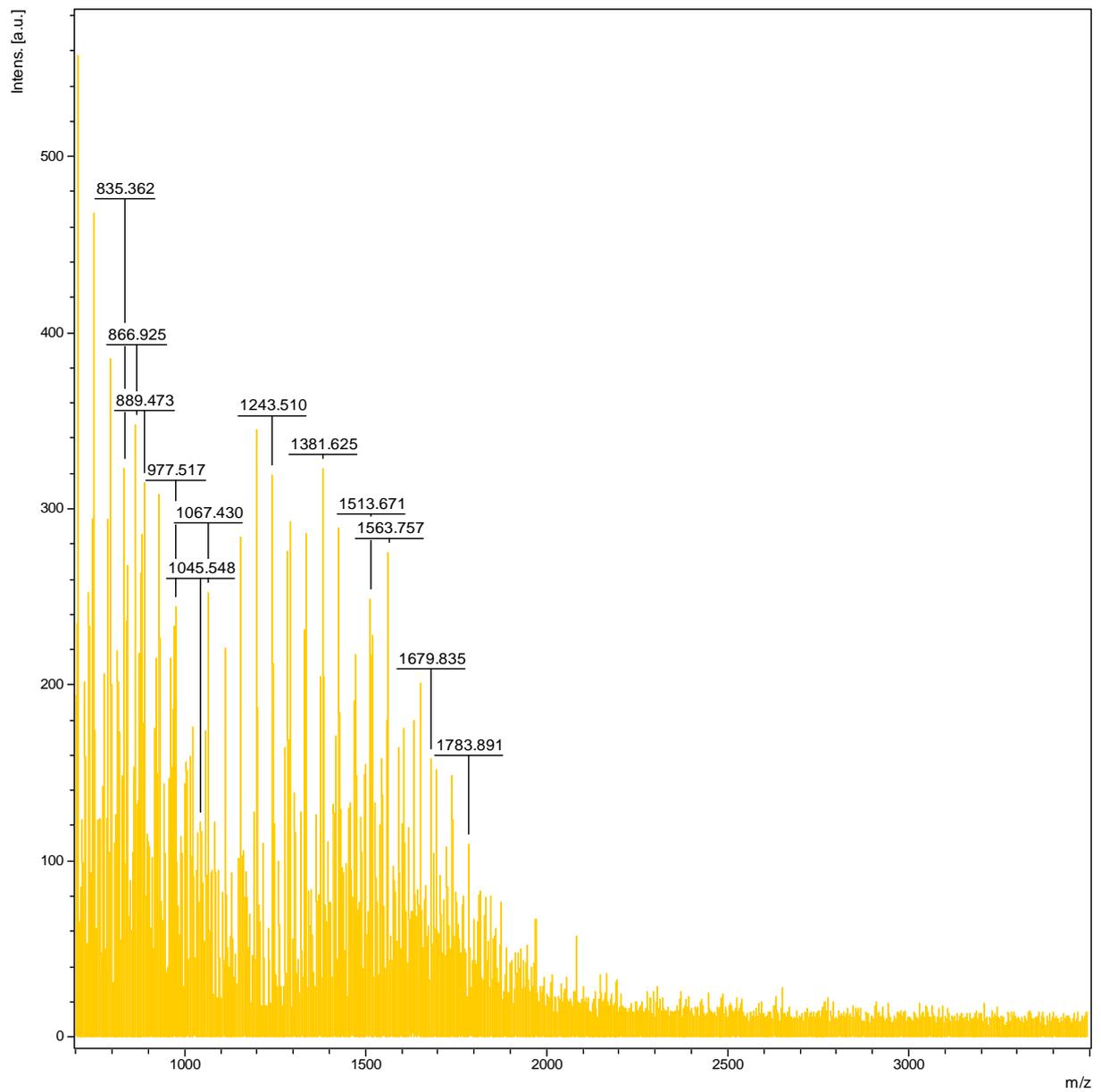


Abb. 35: Roti-Block gebrauchsfertig verdünnt, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn.

DHB/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Matrix:

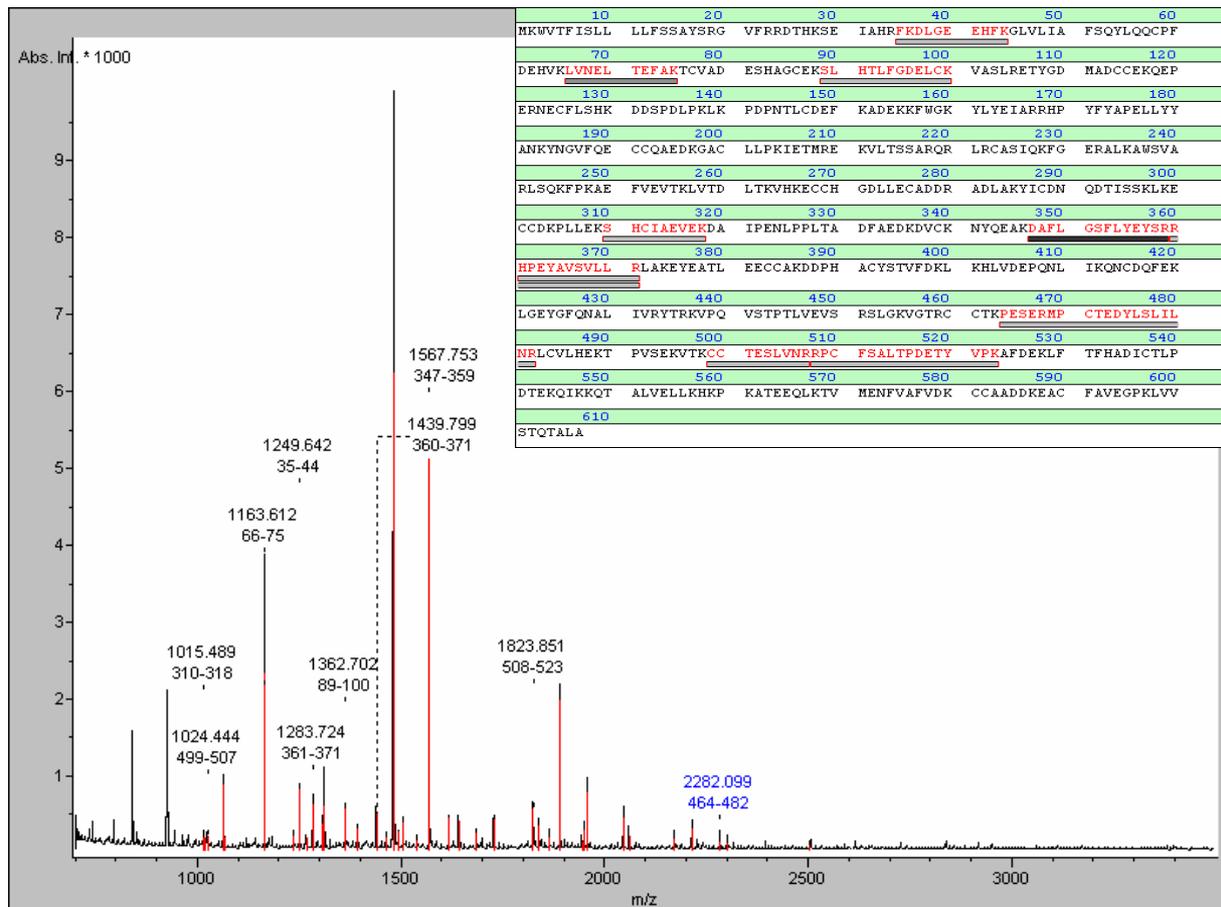


Abb. 36: BSA, Verdünnung 1, Verdau ohne Waschen von der NC-Membran, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix. Sequenzabdeckung 18,1%.

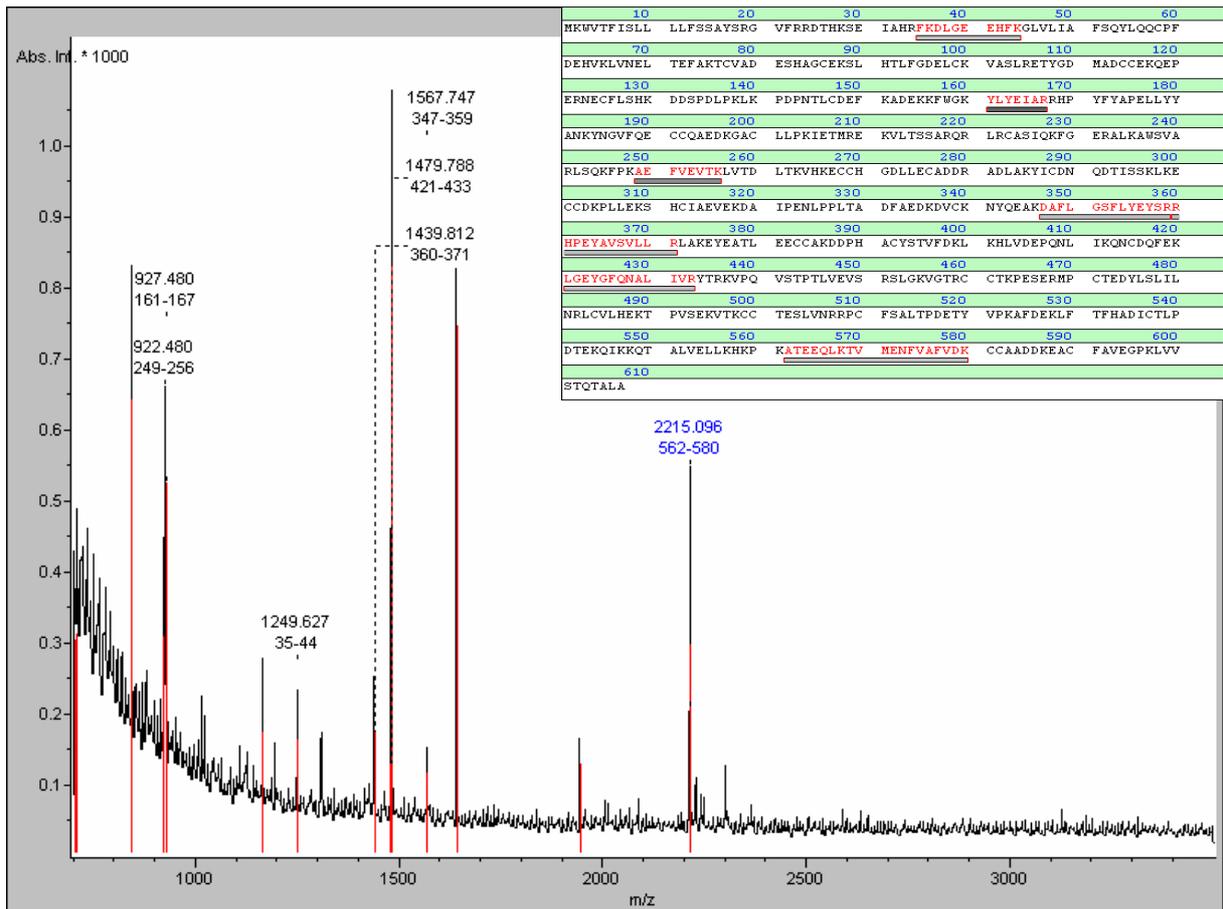


Abb. 37: BSA, Verdünnung 1, Verdau ohne Waschen von der PVDF-Membran, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix. Sequenzabdeckung 13,5%.

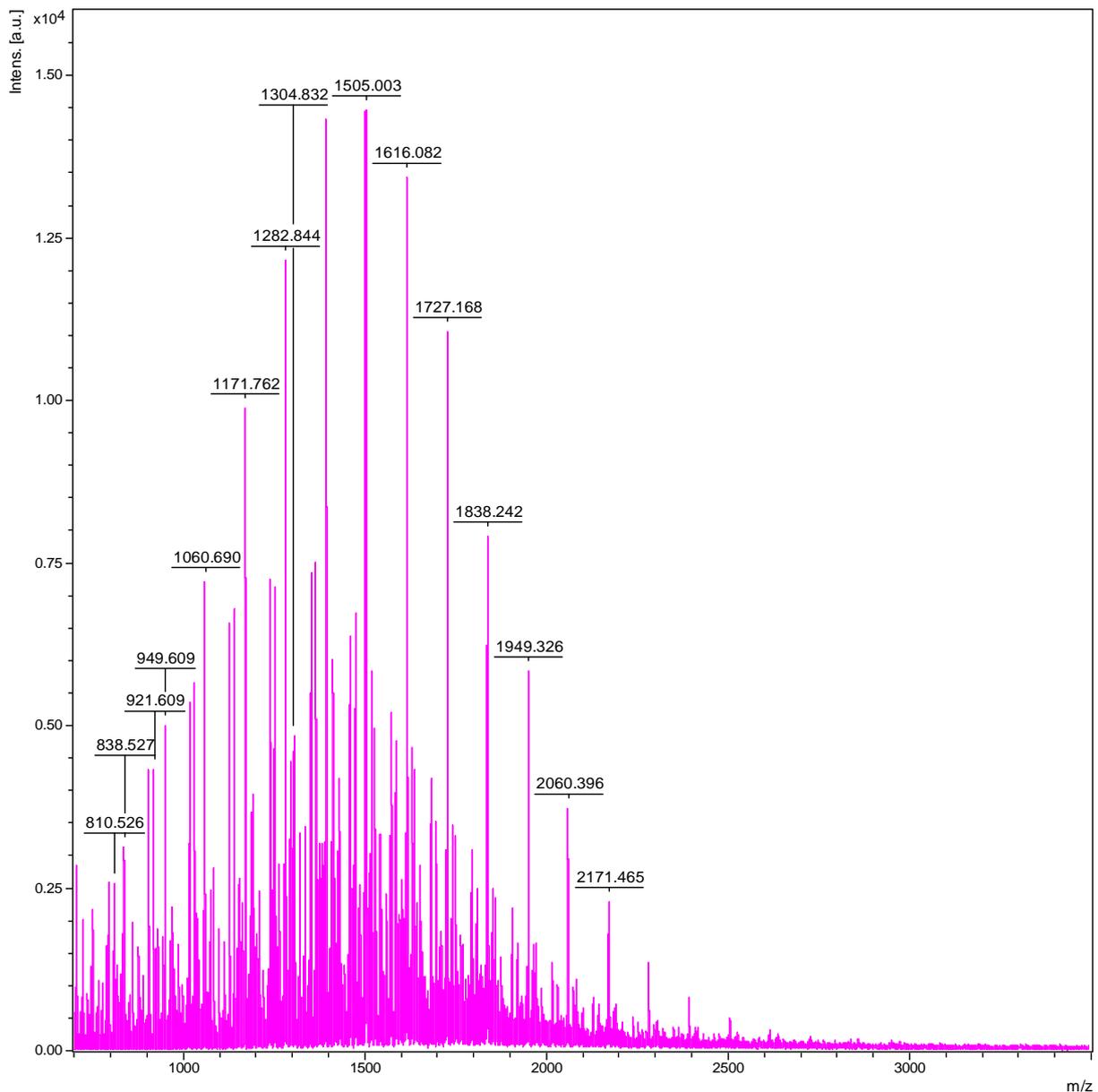


Abb. 38: Roti-Block gebrauchsfertig verdünnt, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix.

#### Fazit:

Die Matrixpräparation ist bei der massenspektrometrischen Identifizierung von Proteinen von entscheidender Bedeutung, da die Matrices unterschiedliche Eigenschaften besitzen, die sich auf die Intensität der Spektren auswirken und zudem unterschiedlich auf Roti-Block reagieren.

Die DHB/HCCA-Mischmatrix und die HCCA-Matrix nach Jahn enthalten HCCA, das sich gleichmäßig über den gesamten Meßspot auf dem Target bzw. auf dem Anchor Chip verteilt, wodurch sich diese Matrices gut für automatische Messungen eignen. Allerdings verteilen sich auch die Peptide, die in der zu messenden Probe enthalten sind, über den gesamten Meßspot, wodurch die Probe im Vergleich zu DHB/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Matrix relativ dünn ist.

Bei DHB/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Matrices bilden sich hingegen DHB-Kristalle am Rande des Meßspots, in denen sich das Gros der Peptide konzentriert, wodurch sich bei manueller Messung mit der DHB/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Matrix die besten Spektren erzielen lassen. Von Nachteil ist allerdings, daß Phosphorsäure auf Dauer die Oberfläche des Targets angreift.

In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, daß bei der Messung mit HCCA-haltigen Matrices, je niedriger konzentriert die Peptidprobe ist, Roti-Block umso stärker im Spektrum hervortritt und die ohnehin schwachen Peptidsignale überdeckt, wodurch eine Identifizierung des Proteins oft verhindert wird.

Auch bei der Messung verdünnten Roti-Blocks mit DHB/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Matrix entstehen Cluster, bei der Messung der Verdauextrakte mit DHB/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Matrix sind die Cluster jedoch nicht mehr zu erkennen, wodurch die Identifikation Roti-Block-haltiger Proben bei der Messung mit DHB/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Matrix kein Problem darstellt.

Es scheinen also hauptsächlich die Matrixeigenschaften dafür verantwortlich zu sein, ob Roti-Block bei einer Messung stärker oder schwächer in den Vordergrund tritt.

### **3.2.3 Verdau nach manuellem Waschen in Wells 3 mal über 2 Stunden**

Da sich im vorherigen Versuch gezeigt hatte, daß Roti-Block die Identifizierung der Proteine stört, sollte nun eine Methode gefunden werden, die Roti-Block vor dem Verdau weitmöglichst wieder von den Blot-Membranen entfernen sollte.

Aus den mit Roti-Block behandelten und mit DB71 gefärbten Membranen wurden mit dem Spot Cutter insgesamt 6 Spots ausgestochen, und zwar von der NC- und von der PVDF-Membran jeweils 3 Spots aus den Banden mit folgenden Mengen an BSA:

2 x ein Spot aus einer Bande mit 1µg BSA (= Verdünnung 1)

1 x ein Spot aus einer Bande mit 0,5µg BSA (= Verdünnung 2)

Die Proben wurden

1 x 60 min,

1 x 45 min und

1 x 15 min

gewaschen, indem manuell in jedes Well 250µl Verdau-puffer pipettiert wurden. Dann wurde die Wellplatte für die oben angegebene Zeitdauer auf einen Schüttler gestellt und nach Ablauf

dieser Zeit die alte Flüssigkeit manuell durch neue ersetzt. Nach den 3 Waschschritten wurde die Flüssigkeit sofort manuell wieder abpipettiert.

Die Proben wurden anschließend nach dem untenstehenden Protokoll vom Verdauroboter verdaut.

Step	Description	Vol [ $\mu$ l]	Time [min]	Temp [ $^{\circ}$ C]	Cycles
1	Destain of DB71	130	20	21	1
2	Wash with MilliQ	150	5	21	2
3	Block with PVP	20	20	21	1
4	Wash with NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	150	5	21	2
5	Add Trypsin	17	0,1	21	1
6	Digest		480	37	1
7	Extraction (50% ACN)	30	30	21	1

Tab. 44: Verdauprotokoll 3x über 2 Stunden Waschen

Gemessen wurden die Proben mit DHB/HCCA-Mischmatrix sowie mit DHB/Phosphorsäure-Matrix.

Verdünnung		1	1	2
BSA von NC	SC %	20,1	19,6	20,6
	Score	170	135	181
BSA von PVDF	SC %			
	Score			

Tab. 45: Sequenzabdeckungen (SC %) und Mowse Scores (Score) vom Verdau nach **3-maligem Waschen** der Spots mit Verdau puffter, gemessen mit **DHB/HCCA-Mischmatrix**.

Für leere Felder konnte bei der Messung kein Spektrum erhalten werden. BSA: Bovines Serumalbumin.

Verdünnung		1	1	2
BSA von NC	SC %	15,2	12,4*	18,5*
	Score	92,9		
BSA von PVDF	SC %	11,5*	26,4	20,8*
	Score		125	

Tab. 46: Sequenzabdeckungen (SC %) und Mowse Scores (Score) vom Verdau nach **3-maligem Waschen** der Spots mit Verdau puffter, gemessen mit **DHB/Phosphorsäure-Matrix**.

Für leere Felder konnte bei der Messung kein Spektrum erhalten werden. BSA: Bovines Serumalbumin.

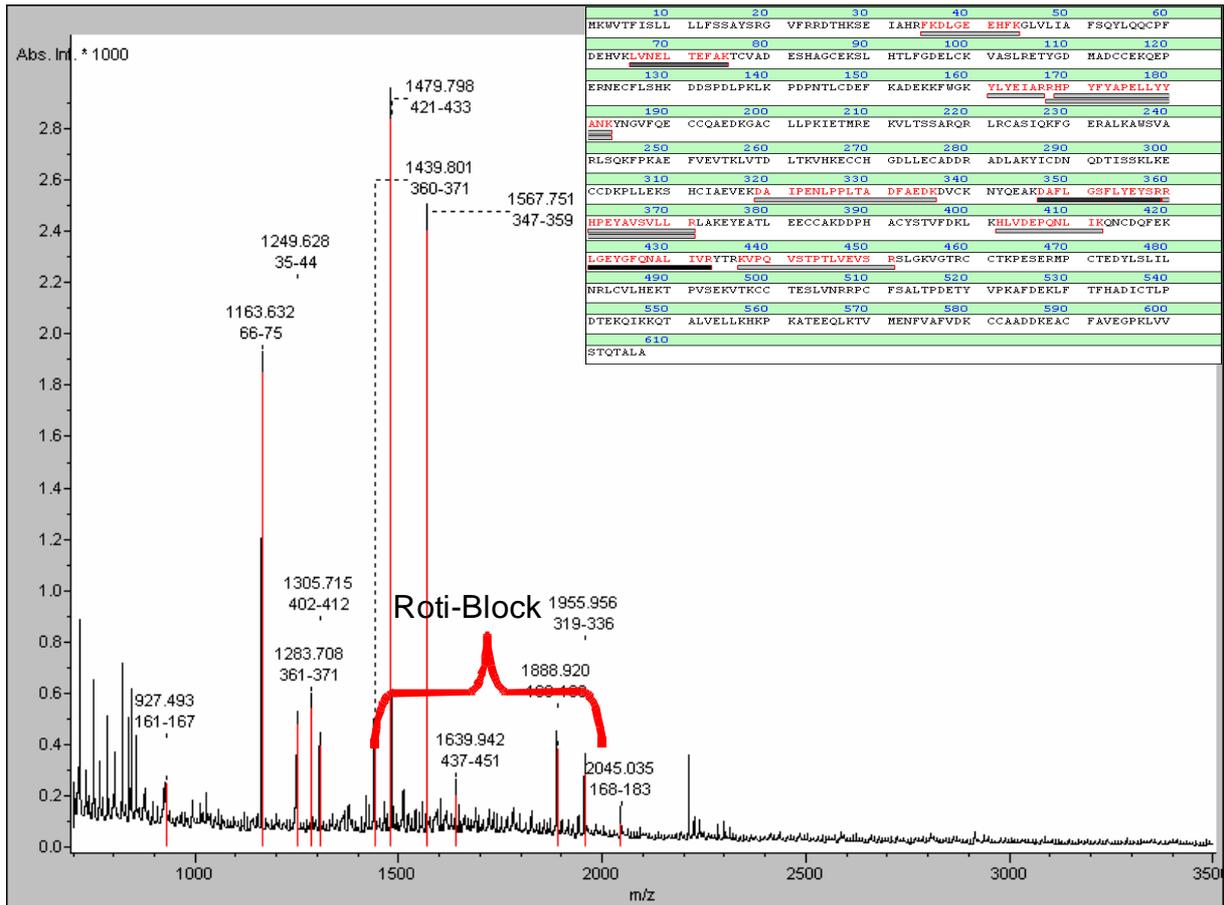


Abb. 39: Spektrum von BSA, Verdünnung 2, verdaut nach 3x über 2 Stunden Waschen von der NC-Membran, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix. Sequenzabdeckung 20,6%.

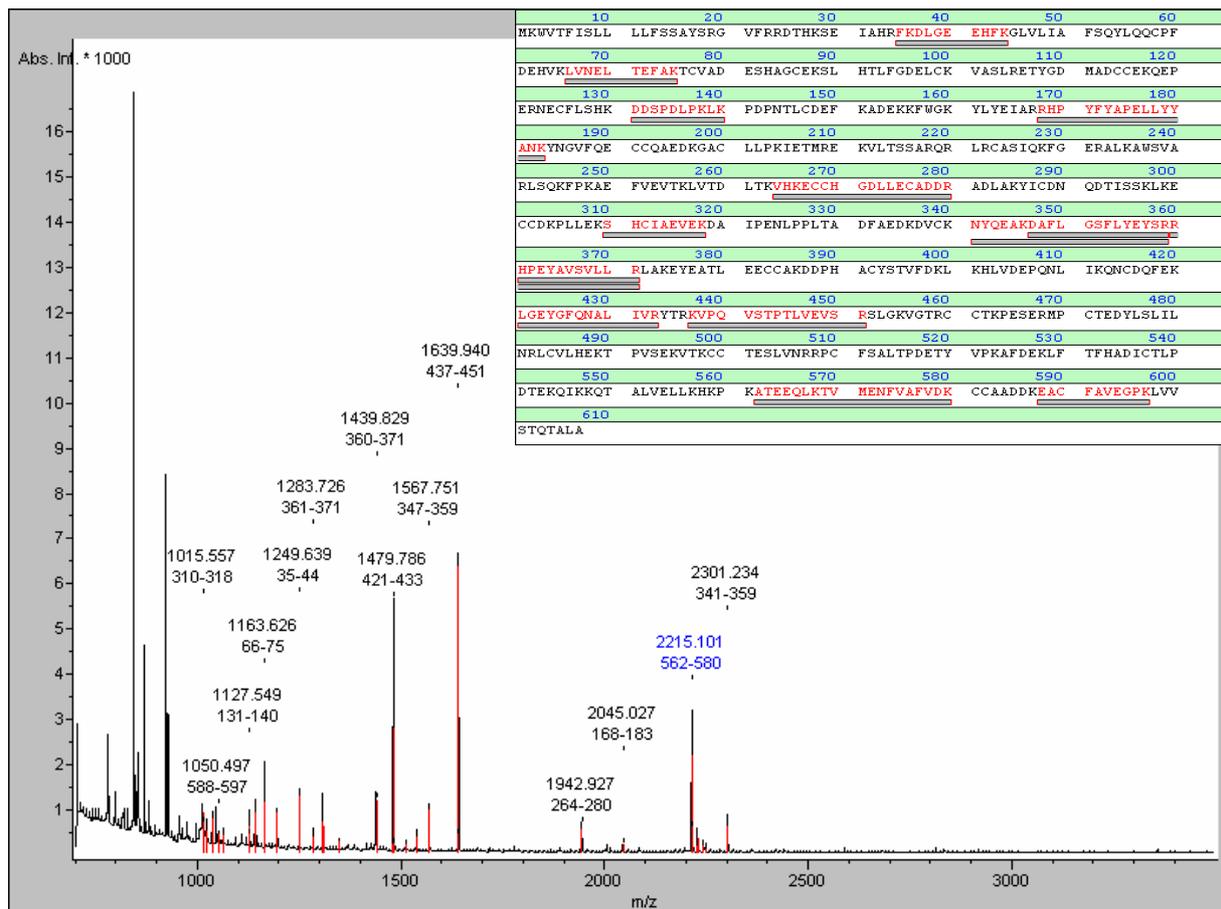


Abb. 40: Spektrum von BSA, Verdünnung 1, verdaut nach 3x über 2 Stunden Waschen von der PVDF-Membran, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix. Sequenzabdeckung 26,4%.

Fazit:

Im Vergleich mit dem Verdau der Spots, die nach der Behandlung mit Roti-Block nicht gewaschen worden waren, war festzustellen, daß das 3-malige Waschen mit Verdaupuffer sich auf die Ergebnisse der Messung mit DHB/HCCA-Mischmatrix positiv auswirkte. Die Messung der Proben von der NC-Membran ergab gute Spektren, wobei die typischen Roti-Cluster teilweise immer noch vorhanden waren (s.o.). Die Messungen der Proben von der PVDF-Membran ließen aufgrund der Cluster kaum ein Spektrum erkennen, vermutlich da hier der Roti-Block im Gegensatz zur NC-Membran noch nicht ausreichend entfernt worden war.

### 3.2.4 Verdau nach manuellem Waschen in Wells 6 mal über 2 Stunden

Da sich im vorherigen Versuch gezeigt hatte, daß sich Roti-Block recht erfolgreich wieder von den Membranen entfernen ließ, sollte in diesem Versuch untersucht werden, ob sich der Erfolg dieser Prozedur noch steigern ließe, wenn man nun die Spots häufiger und mit

größerem Volumen waschen würde. Aus diesem Grund wurde die Anzahl der Waschschrirte verdoppelt, und es wurde statt mit 250µl mit 300µl pro Well gewaschen.

Wie in 3.2.3 wurden noch einmal aus den mit Roti-Block behandelten und mit DB71 gefärbten Membranen mit dem Spot Cutter 6 Spots von NC- und PVDF-Membran aus den Banden mit BSA ausgestochen.

Die Proben wurden

1 x 45 min,

1 x 30 min und

3 x 15 min

gewaschen, indem manuell in jedes Well 300µl Verdaupuffer pipettiert wurden. Dann wurde die Mikrotiterplatte für die oben angegebene Zeitdauer auf einen Schüttler gestellt und nach Ablauf der Zeit die alte Flüssigkeit gegen neue gewechselt.

Nach diesen fünf Waschschrirten wurden alle Proben noch einmal manuell für einige s mit 300µl Verdaupuffer gespült.

Der automatisierte Verdau lief anschließend nach folgendem Protokoll ab:

Step	Description	Vol [µl]	Time [min]	Temp [°C]	Cycles
1	Destain of DB71	130	20	21	1
2	Wash with MilliQ	150	5	21	2
3	Block with PVP	20	20	21	1
4	Wash with NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	150	5	21	2
5	Add Trypsin	17	0,1	21	1
6	Digest		480	37	1
7	Extraction (50% ACN)	30	30	21	1

Tab. 47: Verdauprotokoll 6x über 2 Stunden waschen

Gemessen wurden die Proben auf DHB/HCCA-Mischmatrix sowie auf DHB/Phosphorsäure-Matrix.

Verdünnung		1	1	2
BSA von NC	SC %	21,4	20,1	27,2
	Score	126	92,6	166
BSA von PVDF	SC %	4,6*	7,7*	4,6*
	Score			

Tab. 48: Sequenzabdeckungen (SC %) und Mowse Scores (Score) vom Verdau nach **6-maligem Waschen** der Spots mit Verdauopuffer, gemessen mit **DHB/HCCA-Mischmatrix**.

Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mithilfe des Programmes „Sequence Editor“ ermittelt, in diesem Fall liegt kein Mowse Score vor. BSA: Bovines Serumalbumin.

Verdünnung		1	1	2
BSA von NC	SC %	8,4*	33,3	25
	Score		142	113
BSA von PVDF	SC %	19,1	9,7*	7,9*
	Score	82,9		

Tab. 49: Sequenzabdeckungen (SC %) und Mowse Scores (Score) vom Verdau nach **6-maligem Waschen** der Spots mit Verdauopuffer, gemessen mit **DHB/Phosphorsäure-Matrix**.

Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mithilfe des Programmes „Sequence Editor“ ermittelt, in diesem Fall liegt kein Mowse Score vor. BSA: Bovines Serumalbumin.

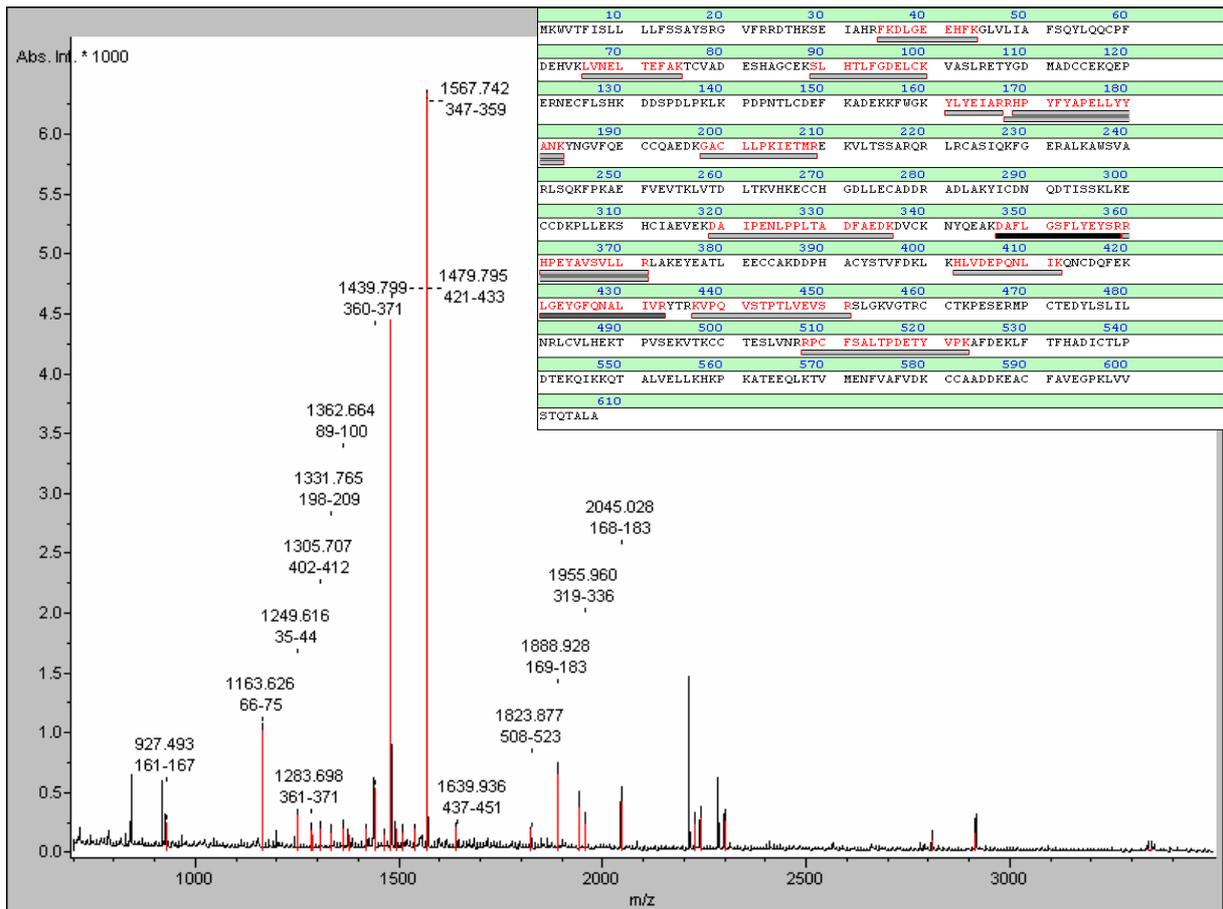


Abb. 41: Spektrum von BSA, Verdünnung 2, verdaut nach 6x über 2 Stunden Waschen von der NC-Membran, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix. Sequenzabdeckung 27,2%.

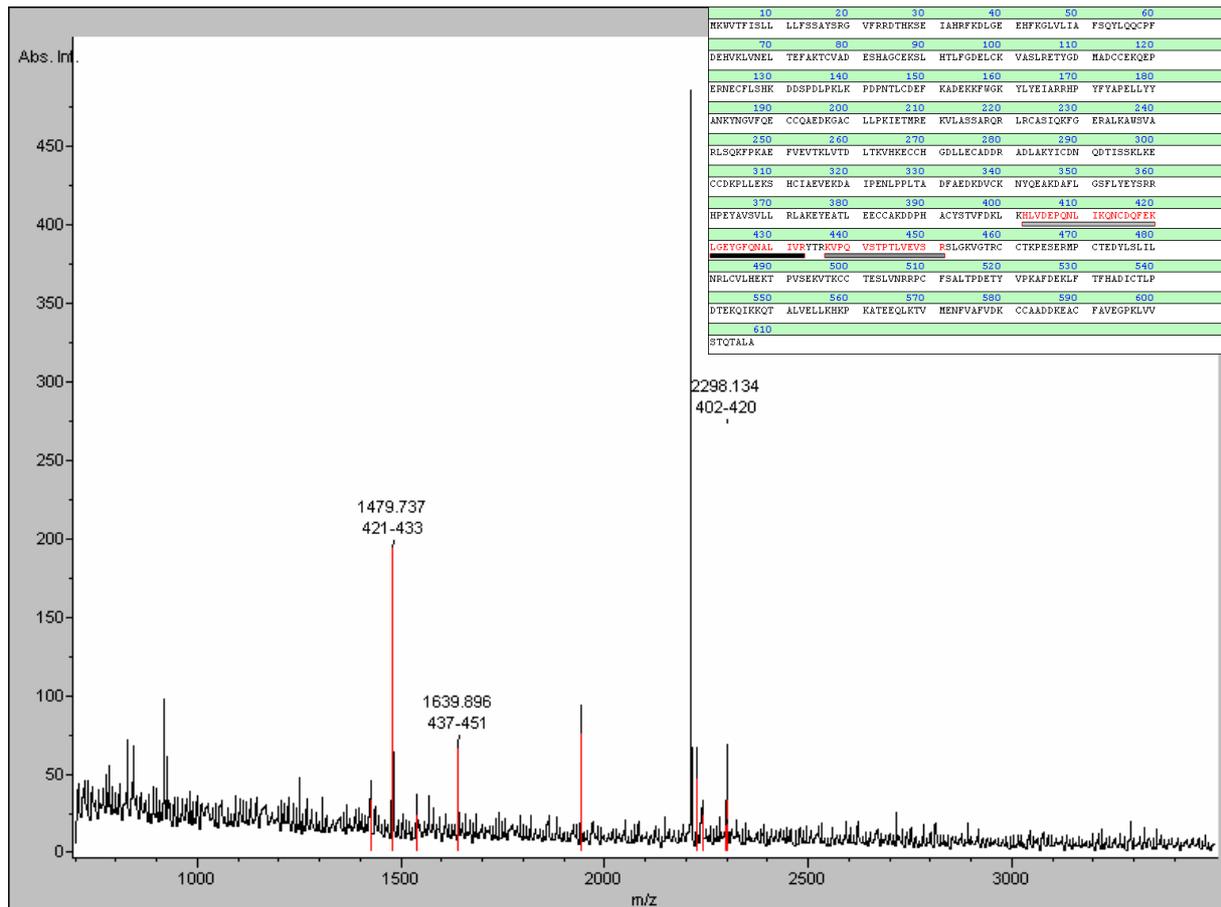


Abb. 42: Spektrum von BSA, Verdünnung 1, verdaut nach 6x über 2 Stunden Waschen von der PVDF-Membran, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix. Sequenzabdeckung 7,7%.

Fazit:

Vergleich man den Verdau nach 6-maligem Waschen der Spots mit dem Verdau nach nur 3-maligem Waschen, so konnte man feststellen, daß sich die Ergebnisse bei Messung mit Mischmatrix verbesserten, je öfter die Spots gewaschen wurden. Es konnten nun gute Spektren von den Proben von der NC-Membran gemessen werden, und auch von den Proben von der PVDF-Membran waren Spektren zu messen. Letztere besaßen jedoch noch nicht die Qualität, um eine verlässliche Identifizierung der Proteine zu erlauben. Dennoch gab die Tatsache, daß nach mehrmaligem Waschen überhaupt Spektren von der PVDF-Membran zu erzielen waren, einen Hinweis darauf, daß das Waschen der Membranen sich positiv auf die Verdauergebnisse auswirkt.

### 3.2.5 Verdau nach automatisiertem Waschen mit ACN

Es wurden wieder wie in 3.2.3 die 6 Spots aus NC- bzw. PVDF-Membran ausgestochen. Die Spots wurden nach einem Protokoll verdaut, das vor dem Verdau als zusätzliche Waschschrte noch das Waschen mit 50% ACN für 10 min und das Waschen mit 100% ACN für 2 min enthielt.

Step	Description	Vol [ $\mu$ l]	Time [min]	Temp [ $^{\circ}$ C]	Cycles
1	Destain of DB71	130	20	21	1
2	Wash with MilliQ	150	5	21	2
3	<b>Wash with 50% ACN</b>	<b>150</b>	<b>10</b>	<b>21</b>	<b>1</b>
4	<b>Wash with 100% ACN</b>	<b>150</b>	<b>2</b>	<b>21</b>	<b>1</b>
5	Block with PVP	20	20	21	1
6	Wash with $\text{NH}_4\text{HCO}_3$	150	5	21	2
7	Add Trypsin	17	0,1	21	1
8	Digest		480	37	1
9	Extraction (50% ACN)	30	30	21	1

Tab. 50: Verdauprotokoll Waschen mit ACN

Gemessen wurden die Proben mit DHB/HCCA-Mischmatrix sowie mit DHB/Phosphorsäure-Matrix.

Der Verdau nach 2-maligem Waschen der Spots mit Acetonitril, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix, lieferte keine Spektren bei der MS Analyse.

Verdünnung		1	1	2
BSA von NC	SC %	6,6*	2,8*	1,6*
	Score			
BSA von PVDF	SC %	3,3*	2,6*	
	Score			

Tab. 51: Sequenzabdeckungen (SC %) und Mowse Scores (Score) vom Verdau nach **2-maligem Waschen** der Spots mit Acetonitril, gemessen mit **DHB/Phosphorsäure-Matrix**.

Für leere Felder konnte bei der Messung kein Spektrum erhalten werden. Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mithilfe des Programmes „Sequence Editor“ ermittelt, in diesem Fall liegt kein Mowse Score vor. BSA: Bovines Serumalbumin.

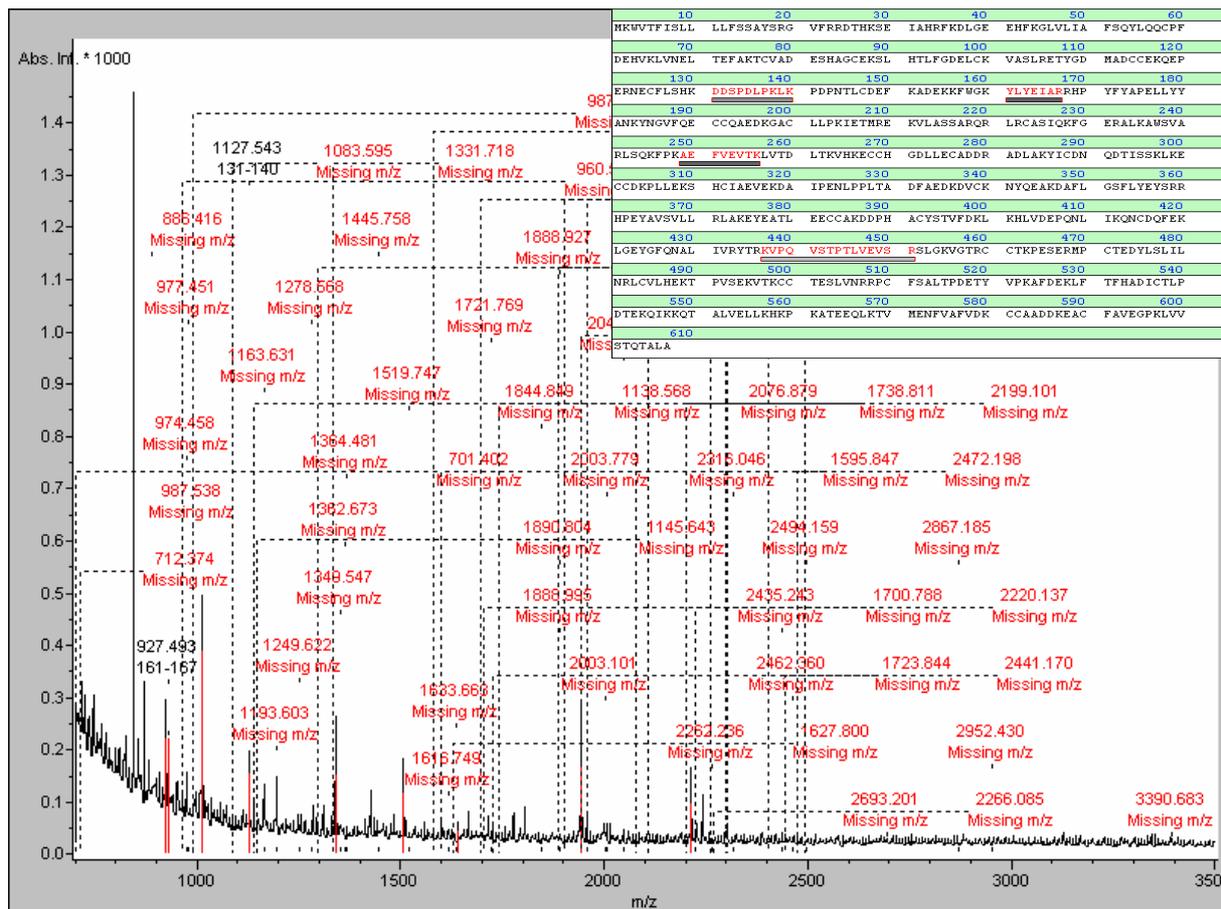


Abb. 43: Spektrum von BSA, Verdünnung 1, verdaut von der NC-Membran nach 2-maligem Waschen mit ACN, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix. Sequenzabdeckung 6,6%.

Fazit:

Das 2-malige Waschen der Spots mit ACN brachte kein verbessertes Ergebnis. Mit der Mischmatrix waren keine Spektren zu messen und mit der DHB/Phosphorsäure-Matrix waren nur vereinzelte Peaks zu detektieren, weshalb die hier angewandte Waschmethode keine weitere Verwendung finden sollte.

### 3.2.6 Verdau nach manuellem Waschen in Wells 2 mal über 17 Stunden

In diesem Versuch sollte nicht die Anzahl der Waschschriffe, sondern die Zeitdauer des Waschvorganges erhöht werden.

Wie in 3.2.3 wurden wieder 6 Spots aus NC- bzw. PVDF-Membran ausgestochen. Auf jeden Spot in der Well-Platte wurden manuell 300µl Verdau puffer pipettiert, dann wurde die Well-Platte zugeklebt und für 17 h auf den Schüttler gestellt. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Flüssigkeit manuell gegen neue (wieder 300µl Verdau puffer) ausgewechselt und sofort danach manuell wieder abpipettiert.

Der anschließende automatisierte Verdau lief nach folgendem Protokoll ab:

Step	Description	Vol [ $\mu$ l]	Time [min]	Temp [ $^{\circ}$ C]	Cycles
1	Destain of DB71	130	20	21	1
2	Wash with MilliQ	150	5	21	2
3	Block with PVP	20	20	21	1
4	Wash with $\text{NH}_4\text{HCO}_3$	150	5	21	2
5	Add Trypsin	17	0,1	21	1
6	Digest		480	37	1
7	Extraction (50% ACN)	30	30	21	1

Tab. 52: Verdauprotokoll 2x Waschen über 17 Stunden

Gemessen wurde mit DHB/HCCA-Mischmatrix sowie auf DHB/Phosphorsäure-Matrix.

Verdünnung		1	1	2
BSA von NC	SC %	20,6	13,8*	8,4
	Score	94,4		[54,3]
BSA von PVDF	SC %	6,8*	4,3*	
	Score			

Tab. 53: Sequenzabdeckungen (SC %) und Mowse Scores (Score) des Verdaus nach **17 Stunden Waschen** mit Verdaupuffer, gemessen auf **DHB/HCCA-Mischmatrix**.

Werte in Klammern stehen für Mowse Scores, die nicht mehr im statistisch signifikanten Bereich liegen. Für leere Felder konnte bei der Messung kein Spektrum erhalten werden. Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mithilfe des Programmes „Sequence Editor“ ermittelt, in diesem Fall liegt kein Mowse Score vor. BSA: Bovines Serumalbumin.

Verdünnung		1	1	2
BSA von NC	SC %	7,9*	19,6	12,9*
	Score		92,9	[54,3]
BSA von PVDF	SC %	13,3	10,4	
	Score	[70,6]	[53,2]	

Tab. 54: Sequenzabdeckungen (SC %) und Mowse Scores (Score) des Verdaus nach **17 Stunden Waschen** mit Verdaupuffer, gemessen auf **DHB/Phosphorsäure-Matrix**.

Werte in Klammern stehen für Mowse Scores, die nicht mehr im statistisch signifikanten Bereich liegen. Für leere Felder konnte bei der Messung kein Spektrum erhalten werden. Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mithilfe des Programmes „Sequence Editor“ ermittelt, in diesem Fall liegt kein Mowse Score vor. BSA: Bovines Serumalbumin.

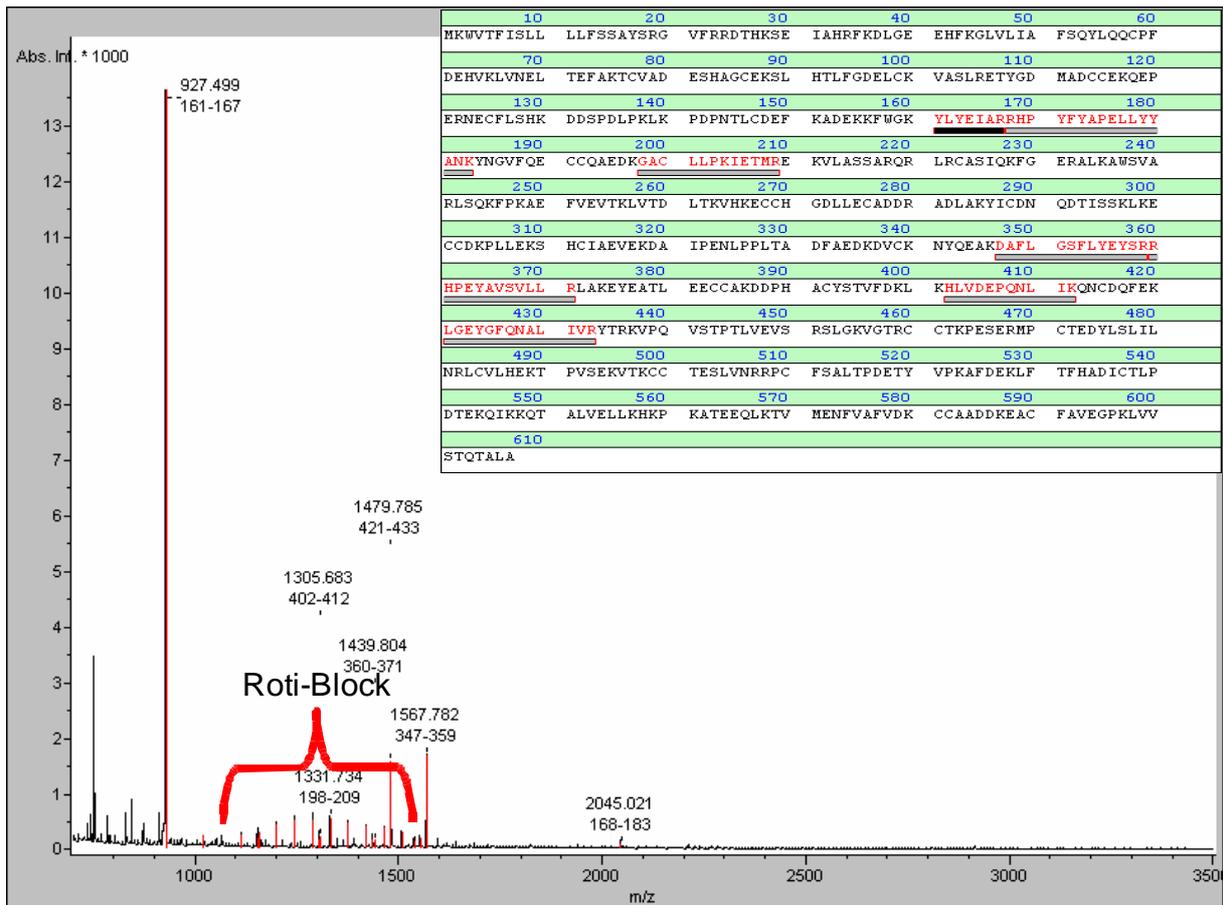


Abb. 44: Massenspektrum und Sequenz von BSA, Verdünnung 1, vom Verdau nach 2x Waschen über 17 Stunden von der NC-Membran. Die per Sequence Editor ermittelte Sequenzabdeckung beträgt 13,8%; gefundene Peptide sind in der Sequenz rot markiert. Der typische Roti-Cluster ist zwischen 1200 und 1500 m/z zu erkennen.

#### Fazit:

Das Waschen der Membran-Spots mit Verdauopuffer über einen Zeitraum von 17 Stunden mit anschließendem Wechsel der Waschlösung hatte nicht ausgereicht, um genügend Roti-Block zu entfernen. Bei der Messung stieß man bei den meisten Proben auf die typischen Roti-Cluster, die es erschwerten, ein brauchbares Spektrum zu messen.

Im Vergleich mit den Versuchen, in denen die Membranstückchen 3 mal bzw. 6 mal mit Verdauopuffer über 2 Stunden gewaschen worden waren, lieferte das 17-stündige Waschen etwas niedrigere Sequenzabdeckungen. Daraus wurde gefolgert, daß nicht die Zeitdauer der Waschschrte der erfolgversprechende Faktor war, sondern die Anzahl der Waschschrte: je öfter, desto besser.

### 3.2.7 Zusammenfassung Teil 2:

Parameter	Variation	Fazit (bezogen auf DBH/HCCA-Mischmatrix)
nicht waschen vor Verdau		keine Spektren
manuell waschen in der Mikrotiterplatte mit Verdaupuffer	3 x Flüssigkeitswechsel bei 2 h Gesamtwaschzeit	gute Spektren von NC, keine von PVDF
s.o.	6 x Flüssigkeitswechsel bei 2 h Gesamtwaschzeit	gute Spektren von NC, im Vergleich zu NC schlechtere Spektren von PVDF
s.o.	2 x Flüssigkeitswechsel bei 17 h Gesamtwaschzeit	schlechte Spektren von NC und PVDF
automatisiert waschen in der Mikrotiterplatte mit ACN	2 x Flüssigkeitswechsel bei 12 min Gesamtwaschzeit	keine Spektren

Tab. 55: Zusammenfassung Teil 2

In diesem Versuchsteil wurde BSA verdaut; in Verdünnung 1 waren als Höchstmenge 15,2 pmol BSA pro Spur enthalten (siehe 2.4.1).

Es wurde hier erstmals festgestellt, daß bei der Messung von Proben, die Reste von Roti-Block enthielten, mit DHB/HCCA-Mischmatrix sowie mit HCCA-Matrix nach Jahn starke störende Signale in Clusterform entstehen, die oftmals eine Proteinidentifikation verhindern. Dies war vor allem bei niedriger konzentrierten Peptidproben der Fall. Die Messung mit DHB/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Matrix ergab jedoch gute Spektren auch bei Roti-Block-haltigen Proben, wodurch deutlich wurde, daß die Matrices aufgrund ihrer unterschiedlichen Eigenschaften auch unterschiedlich mit Roti-Block reagierten.

Um auch mit HCCA-haltigen Matrices Spektren solcher Proben messen zu können, sollte versucht werden, Roti-Block vor dem eigentlichen Verdau durch entsprechende Waschschrte zu beseitigen. Die Inkubation der Membranen mit Roti-Block wird zur Blockade von Antikörper-Bindungsstellen auf Blot-Membranen benutzt und ist ein unerläßlicher Schritt, um die anschließende Chemolumineszenz-Reaktion zu ermöglichen. Der erste Versuch mit Roti-Block zeigte, daß ohne vorheriges Waschen der ausgestanzten Spots das Roti-Block-Reagenz die massenspektrometrische Messung so sehr stört, daß keine Spektren bei der Messung zu erhalten waren.

Daraufhin wurden nach der Inkubation der Blot-Membranen mit Roti-Block die Spots in der Mikrotiterplatte mit Verdaupuffer gewaschen. Dies brachte den gewünschten Erfolg: Schon nach 3maligem Waschen der Membranen über 2 Stunden waren einige Spektren von der NC-Membran meßbar, nach 6maligem Waschen konnten auch Spektren von der NC-Membran gemessen werden und sogar von der PVDF-Membran, von der generell immer schlechtere

Spektren zu erwarten waren als von NC, konnten Spektren gemessen werden, wenn sie auch in ihrer Qualität nicht mit den Spektren von der NC-Membran vergleichbar waren.

Ein weiterer Versuch mit 2maligem Waschen der Spots über 17 Stunden zeigte keine so guten Ergebnisse wie nach dem 6maligen Waschen.

Aus diesen Beobachtungen konnte geschlußfolgert werden, daß die Anwendung mehrerer Waschschrte mit Verdaupuffer vor dem Verdau die sinnvollste Waschvariante ist und zu den besten Ergebnissen führt.

In einem weiteren Versuch sollte herausgefunden werden, ob sich Roti-Block auch durch 2maliges, automatisiertes Waschen zuerst mit 50% ACN für 2 Minuten und dann mit 100% ACN für 10 Minuten entfernen ließe. Dies war jedoch, wie sich bei der massenspektrometrischen Messung feststellen ließ, nicht der Fall – die Spektren waren zu stark überlagert von störendem Roti-Block.

In diesem Versuchsteil wurde eine Methode entwickelt, um Roti-Block so weit von Blot-Membranen zu entfernen, daß nach dem Verdau auch mit einer HCCA-haltigen Matrix Spektren gemessen werden können, die eine Identifizierung der Proteine ermöglichen.

Diese Methode sah folgendermaßen aus:

Es sollten folgende Waschschrte vor dem Verdau manuell durchgeführt werden (die Membran-Spots befanden sich hierzu in den Wells einer Mikrotiterplatte):

1 x waschen mit 300µl Verdaupuffer für 45 min,

1 x waschen mit 300µl Verdaupuffer für 30 min,

je 3 x waschen mit 300µl Verdaupuffer für je 15 min.

Nach folgendem Protokoll wurde anschließend vom Verdauroboter verdaut:

Step	Description	Vol [ $\mu$ l]	Time [min]	Temp [ $^{\circ}$ C]	Cycles
1	Destain of DB71	130	20	21	1
2	Wash with MilliQ	150	5	21	2
3	Block with PVP	20	20	21	1
4	Wash with $\text{NH}_4\text{HCO}_3$	150	5	21	2
5	Add Trypsin	17	0,1	21	1
6	Digest		480	37	1
7	Extraction (50% ACN)	30	30	21	1
	Treshold for clot detection:	350			
	Aspirate height over bottom of the well [mm]:	0,5			
	Dispense height over bottom of the well [mm]:	9			

Tab. 56: Verdauprotokoll Teil 2

### 3.3 Verdau vor und nach ECL

#### 3.3.1 Schritt 1: Verdau vom Elektro-Blot ohne ECL

##### 3.3.1.1 Proteinverdau ohne Octylglycosid von NC- und PVDF-Membran-Spots mit dem Verdauroboter

In diesem Versuch wurde Proteingemisch 2 (LMW Calibration Kit) verwendet. Zu Beginn sollte untersucht werden, inwieweit die Proteine dieses Gemisches nach einem On-Membrane-Verdau identifizierbar sind.

Es wurden zwei Mini-Gele mit 10% Acrylamid gegossen. In jeweils 7 Taschen eines Gels wurden je 20µl einer der 7 Verdünnungen von Proteingemisch 2 aufgetragen (siehe 2.4.2):

Verdünnung	1 (pmol/ Spur)	2 (pmol/ Spur)	3 (pmol/ Spur)	4 (pmol/ Spur)	5 (pmol/ Spur)	6 (pmol/ Spur)	7 (pmol/ Spur)
Glycogenphos.	5,52	2,76	1,38	0,69	0,35	0,17	0,09
BSA	10,06	5,03	2,52	1,26	0,63	0,31	0,16
Ovalbumin	26,14	13,07	6,53	3,27	1,63	0,82	0,41
Carboanhydr.	22,14	11,07	5,53	2,77	1,38	0,69	0,35
Trypsin Inhib.	31,84	15,92	7,96	3,98	1,99	1	0,5

Tab. 57: Verdünnungsreihe von Proteingemisch 2.

Unter den verschiedenen Verdünnungen von Proteingemisch 2 (oberste Zeile) gibt jedes Tabellenfeld die Menge in pmol des jeweiligen Proteins an, die in einer Bande der entsprechenden Verdünnung von Proteingemisch 2 enthalten ist.

Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine je auf eine NC- und PVDF-Membran geblottet und danach mit DB71 gefärbt.

Mit dem Spot Cutter wurde aus jeder sichtbaren Bande ein Spot aus der NC- bzw. PVDF-Membran ausgestochen und in eine Mikrotiterplatte gelegt.

Es wurde vom Verdauroboter nach folgendem Protokoll verdaut:

Step	Description	Vol [µl]	Time [min]	Temp [°C]	Cycles
1	Destain of DB71	130	20	21	1
2	Wash with MilliQ	150	5	21	2
3	Block with PVP	20	20	21	1
4	Wash with NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	150	5	21	2
5	Add Trypsin	17	0,1	21	1
6	Digest		480	37	1
7	Extraction (50% ACN)	30	30	21	1

Tab. 58: Verdauprotokoll Spots ohne Octylglycosid

Massenspektrometrisch gemessen wurden die Proben auf einer DHB/HCCA-Mischmatrix, wobei jedoch kein Spektrum gemessen werden konnte; daraufhin wurden die Proben noch einmal mit einer DHB/Phosphorsäure-Matrix gemessen.

Verdünnung		1	2	3	4	5	6
GP Bde 1	SC %	3,4*					
	Score						
GP Bde 2	SC %	1,9*					
	Score						
BSA	SC %	2,1*					
	Score						
OV	SC %	3,4*					
	Score						
CA	SC %						
	Score						
TI	SC %						
	Score						

Tab. 59: Sequenzabdeckungen (SC %) und Mowse Scores (Score) vom Verdau von **NC-Spots** ohne Octylglycosid, gemessen mit **DHB/Phosphorsäure-Matrix**.

Für leere Felder konnte bei der Messung kein Spektrum erhalten werden. Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mithilfe des Programmes „Sequence Editor“ ermittelt, in diesem Fall liegt kein Mowse Score vor. Grau hinterlegt sind die auf der Membran nicht mehr anfärbaren Banden, die daher nicht ausgestochen werden konnten. GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase, TI: Trypsin Inhibitor.

Verdünnung		1	2	3	4	5
GP Bde 1	SC %					
	Score					
GP Bde 2	SC %					
	Score					
BSA	SC %					
	Score					
OV	SC %					
	Score					
CA	SC %					
	Score					
TI	SC %	4,6*				
	Score					

Tab. 60: Sequenzabdeckungen (SC %) und Mowse Scores (Score) vom Verdau von **PVDF-Spots** ohne Octylglycosid, gemessen mit **DHB/Phosphorsäure-Matrix**.

Für leere Felder konnte bei der Messung kein Spektrum erhalten werden. Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mithilfe des Programmes „Sequence Editor“ ermittelt, in diesem Fall liegt kein Mowse Score vor. Grau hinterlegt sind die auf der Membran nicht mehr anfärbaren Banden, die daher nicht ausgestochen werden konnten. GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase, TI: Trypsin Inhibitor.

Fazit:

Dieser On-Membrane-Verdau hatte bei der massenspektrometrischen Messung schlechte Spektren ergeben. Dennoch konnte gezeigt werden, daß der Verdau von Proteinen aus Proteingemisch 2, dem "LMW Calibration Kit", von der Blot-Membran prinzipiell möglich ist. Die verwendeten Verdünnungen von Proteingemisch 2 enthielten vergleichbare absolute Proteinmengen in pmol wie die von Proteingemisch 1.

### 3.3.1.2 Proteinverdau mit Octylglycosid von NC- und PVDF-Membran-Spots mit dem Verdauroboter

Der vorherige Versuch wurde hier wiederholt, allerdings sollte in diesem Versuch Octylglycosid zu Verdaupuffer und Extraktionslösung hinzugegeben werden, in der Absicht, bei der Extraktion die Herauslösung der Peptide aus der Blot-Membran zu verbessern.

Aus derselben NC- bzw. PVDF-Membran wie in 3.3.1.1 wurden erneut die gleichen Proben mit dem Spot Cutter ausgestochen und in Wells abgelegt. Der Verdau fand nach demselben Protokoll wie im vorherigen Versuch statt, nur mit dem Unterschied, daß die Extraktionslösung und der Verdaupuffer diesmal Octylglycosid enthielten.

Die Proben wurden nach dem Verdau mit DHB/HCCA-Mischmatrix und mit HCCA-Matrix nach Jahn gemessen.

Verdünnung		1	2	3	4	5	6
GP Bde1	SC %	1,4*					
	Score						
GP Bde2	SC %	1,4*	1,4*				
	Score						
BSA	SC %	18,9	4,3*				
	Score	136					
OV	SC %	30,6	5,2*				
	Score	93,5					
CA	SC %	63,7	46,7	43,2			
	Score	224	104	98,4			
TI	SC %	8,8*					
	Score						

Tab. 61: Sequenzabdeckungen (SC %) und Mowse Scores (Score) des Verdaus von Spots von der **NC-Membran** mit Octylglycosid, gemessen auf **DHB/HCCA-Mischmatrix**.

Für leere Felder konnte bei der Messung kein Spektrum erhalten werden. Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mithilfe des Programmes „Sequence Editor“ ermittelt, in diesem Fall liegt kein Mowse Score vor. Grau hinterlegt sind die auf der Membran nicht mehr anfärbaren Banden, die daher nicht ausgestochen werden konnten. GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase, TI: Trypsin Inhibitor.

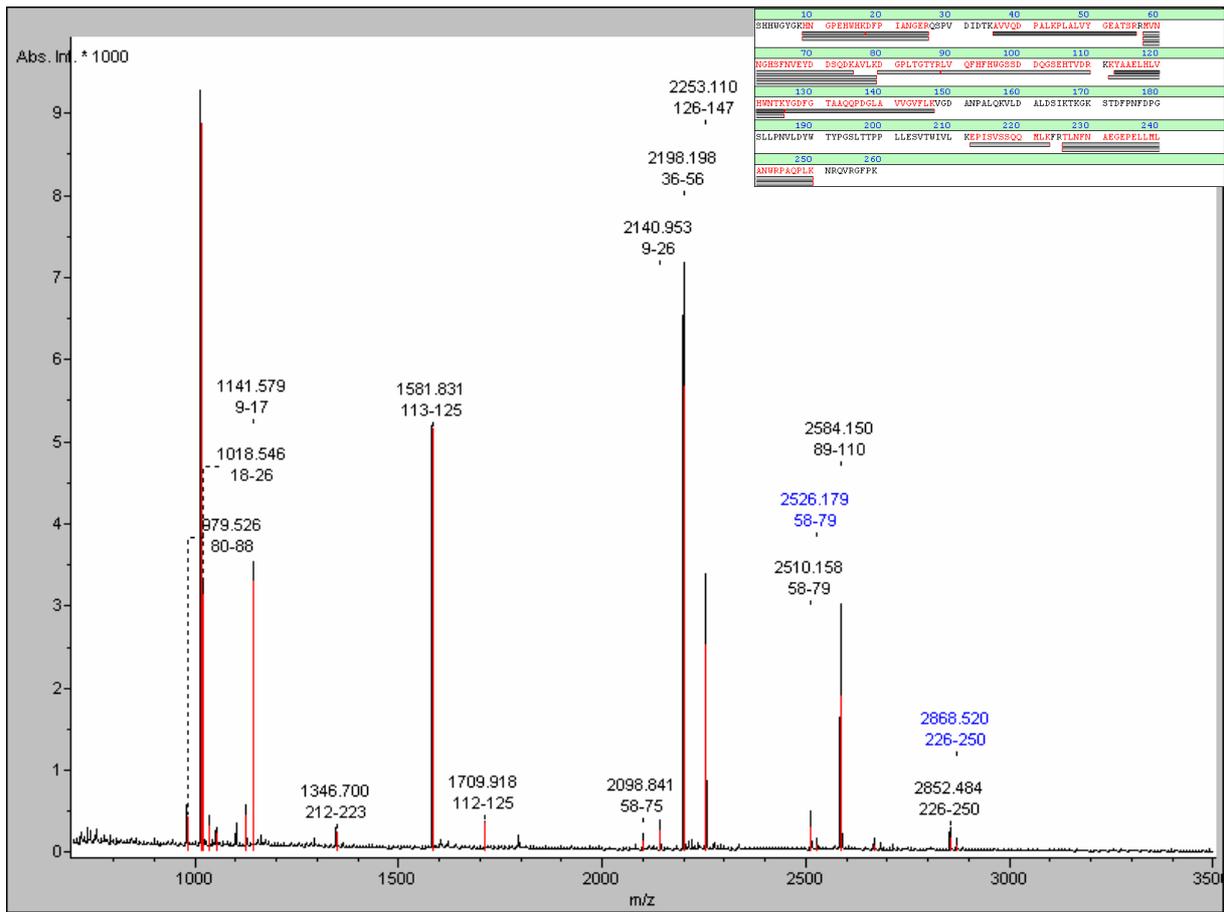


Abb. 45: Spektrum von Carboanhydrase, Verdünnung 1, Spots verdaut mit Octylglycosid von der NC-Membran, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix. Sequenzabdeckung 63,7%.

Verdünnung		1	2	3	4	5	6
GP Bde1	SC %	1,7*	0,8*				
	Score						
GP Bde2	SC %						
	Score						
BSA	SC %	6,6*	4,9*				
	Score						
OV	SC %						
	Score						
CA	SC %	18,5*	15*	6,9*			
	Score						
TI	SC %						
	Score						

Tab. 62: Sequenzabdeckungen (SC %) und Mowse Scores (Score) des Verdaus von Spots von der **NC-Membran** mit Octylglycosid, gemessen mit **HCCA-Matrix nach Jahn**.

Für leere Felder konnte bei der Messung kein Spektrum erhalten werden. Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mithilfe des Programmes „Sequence Editor“ ermittelt, in diesem Fall liegt kein Mowse Score vor. Grau hinterlegt sind die auf der Membran nicht mehr anfärbbaren Banden, die daher nicht ausgestochen werden konnten. GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase, TI: Trypsin Inhibitor.

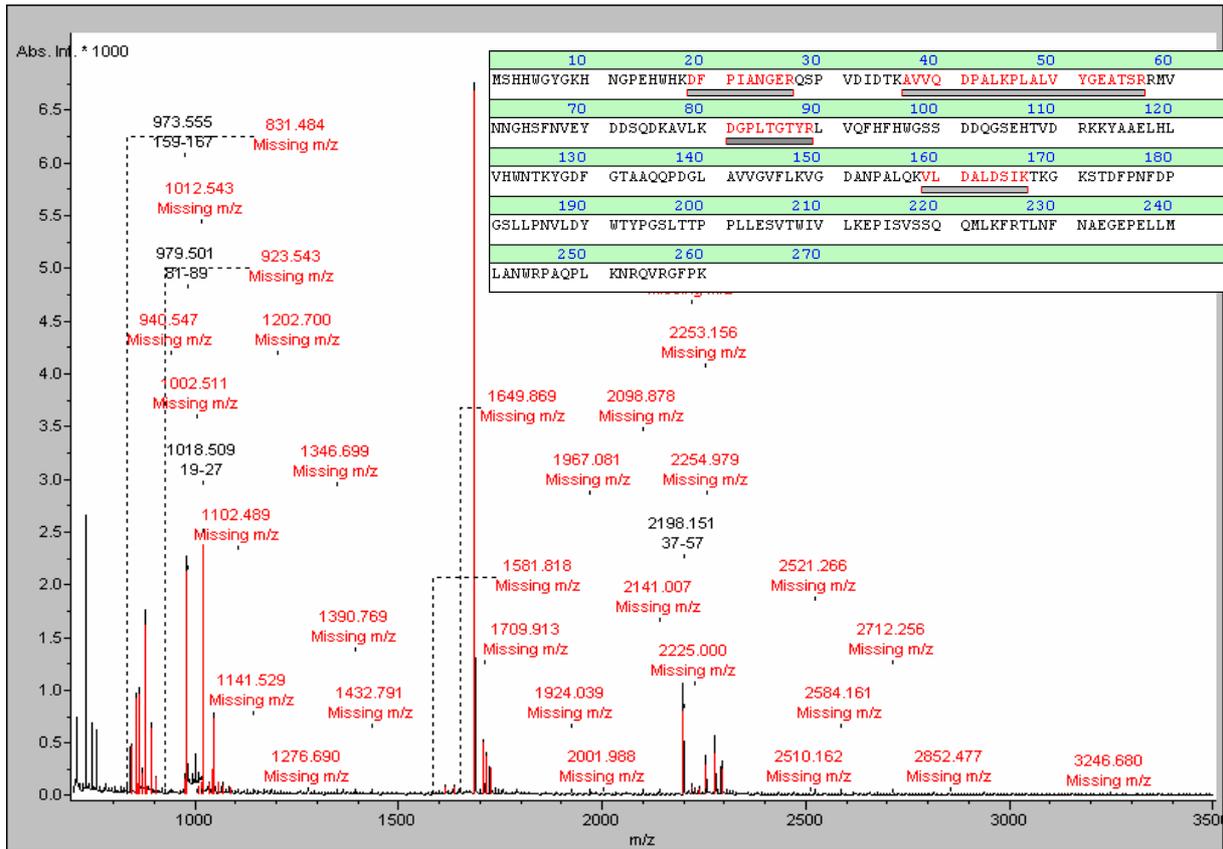


Abb. 46: Spektrum von Carboanhydrase, Verdünnung 1, Spots verdaut mit Octylglycosid von der NC-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn. Die mit dem Sequence Editor erhaltene Sequenzabdeckung beträgt 18,5%.

Verdünnung		1	2	3	4	5
GP Bde 1	SC %	3,4*				
	Score					
GP Bde 2	SC %	21	1,4*			
	Score	171				
BSA	SC %	16,1		2,1*		
	Score	108				
OV	SC %	7,3*	11,7*			
	Score					
CA	SC %	10,5*	19,2*			
	Score					
TI	SC %	7,4*	11,1*			
	Score					

Tab. 63: Sequenzabdeckungen (SC %) und Mowse Scores (Score) des Verdau von Spots von der **PVDF-Membran** mit Octylglycosid, gemessen auf **DHB/HCCA-Mischmatrix**.

Für leere Felder konnte bei der Messung kein Spektrum erhalten werden. Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mithilfe des Programmes „Sequence Editor“ ermittelt, in diesem Fall liegt kein Mowse Score vor. Grau hinterlegt sind die auf der Membran nicht mehr anfärbbaren Banden, die daher nicht ausgestochen werden konnten. GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase, TI: Trypsin Inhibitor.

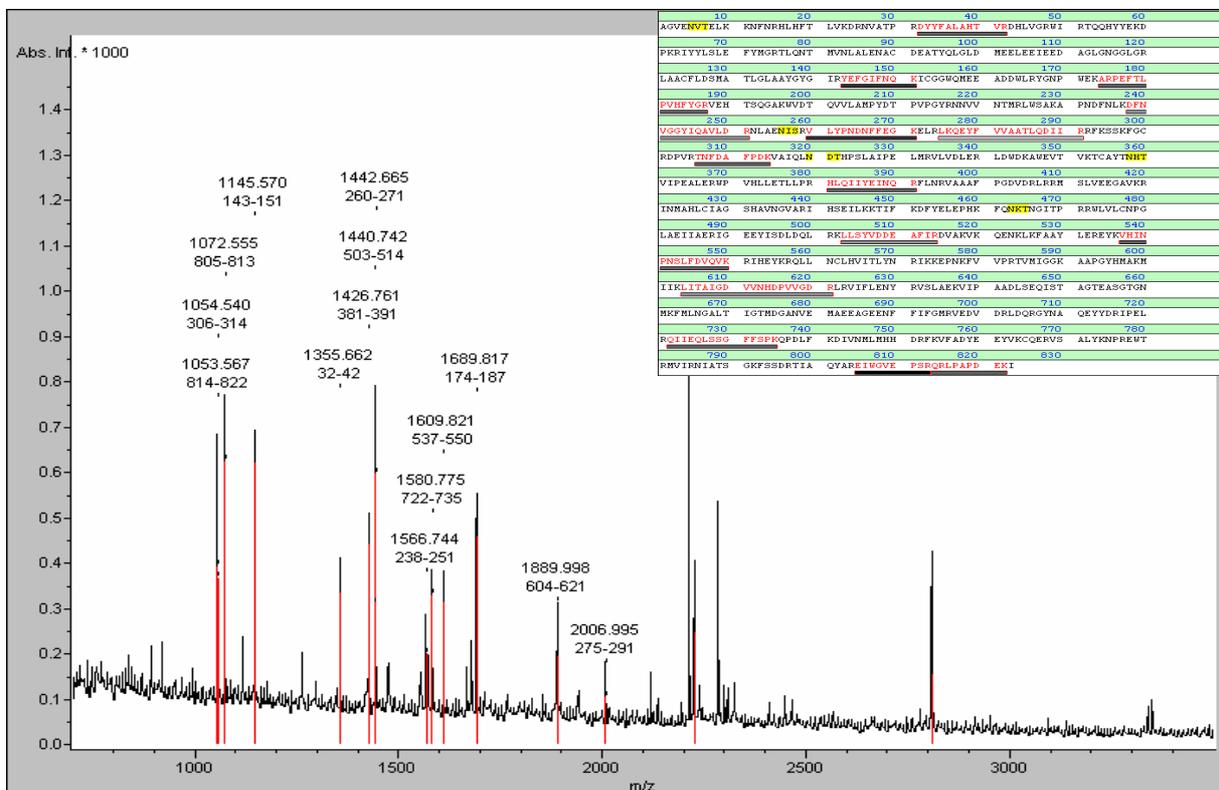


Abb. 47: Spektrum von Glycogenphosphorylase, Verdünnung 1, Spots verdaut mit Octylglycosid von der PVDF-Membran, gemessen mit DHB/HCCA-Mischmatrix. Sequenzabdeckung 21%.

Verdünnung		1	2	3	4	5
GP Bde 1	SC %					
	Score					
GP Bde 2	SC %					
	Score					
BSA	SC %	7,7*				
	Score					
OV	SC %	3,1*				
	Score					
CA	SC %	8,1*				
	Score					
TI	SC %					
	Score					

Tab. 64: Sequenzabdeckungen (SC %) und Mowse Scores (Score) des Verdaus von Spots von der **PVDF-Membran** mit Octylglycosid, gemessen auf **HCCA-Matrix nach Jahn**.

Für leere Felder konnte bei der Messung kein Spektrum erhalten werden. Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mithilfe des Programmes „Sequence Editor“ ermittelt, in diesem Fall liegt kein Mowse Score vor. Grau hinterlegt sind die auf der Membran nicht mehr anfärbaren Banden, die daher nicht ausgestochen werden konnten. GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase, TI: Trypsin Inhibitor.

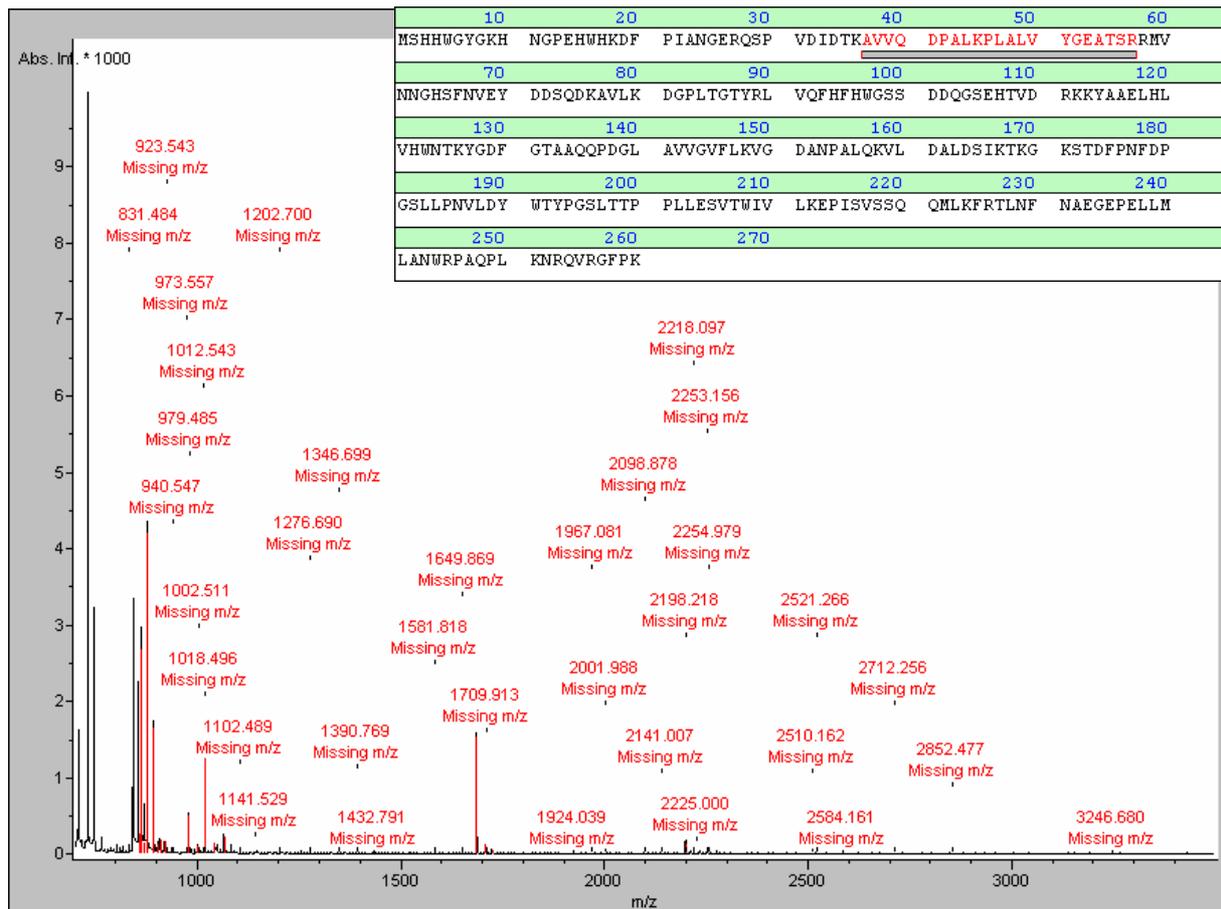


Abb. 48: Spektrum von Carboanhydrase, Verdünnung 1, Spots verdaut mit Octylglycosid von der PVDF-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn. Die mit dem Sequence Editor erhaltene Sequenzabdeckung beträgt 8,1%.

#### Fazit:

Der Einsatz von Octylglycosid hatte das Ergebnis des Verdaus verbessert. Die Messung der Proben mit Mischmatrix ergab schon mehr Spektren als die Messung der Proben des Verdaus ohne Octylglycosid mit Mischmatrix. Aus diesem Grund wurde das Detergens von nun an zu Extraktionslösung und Verdauerpuffer jedes weiteren Verdaus hinzugegeben.

Die Proben aus diesem Versuch wurden außerdem mit HCCA-Matrix nach Jahn gemessen, was bei NC niedrigere Sequenzabdeckungen und bei PVDF weniger Spektren ergab als die Messung der Proben mit DHB/HCCA-Mischmatrix, jedoch war auch hier die durch den Einsatz von Octylglycosid erzielte Verbesserung zu erkennen.

### 3.3.1.3 Coomassie-Gel-Verdau zum Vergleich mit dem On-Membrane-Verdau

#### A) kleine Spots

Es wurde ein Mini-Gel mit 10% Acrylamid gegossen. In 7 Taschen des Gels wurde erneut Proteingemisch 2 (LMW Calibration Kit) in ansteigenden Verdünnungen aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Größentrennung der Proteine wurde das Gel mit Coomassie gefärbt.

Aus dem Gel wurden mit dem Spot Cutter (kleiner Stanzkopf, Durchmesser 2mm) Spots aus den Proteinbanden von Glycogenphosphorylase, BSA, Ovalbumin, Carboanhydrase und Trypsin Inhibitor in den ersten 5 Konzentrationen ausgestochen und in einer Mikrotiterplatte gelagert.

Die Proben wurden nach untenstehendem Protokoll verdaut, diesmal wurde – als Neuerung – auch beim Gelverdau der Extraktionslösung und dem Verdau puffter Octylglycosid zugesetzt.

Step	Description	Vol [ $\mu$ l]	Time [min]	Temp [ $^{\circ}$ C]	Cycles
1	Wash with 50% ACN	150	10	21	1
2	Dehydrate with 100% ACN	150	2	21	1
3	Reduction with DTT	20	30	56	1
4	Alkylation with IAA	20	30	21	1
5	Wash with NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	150	5	21	1
6	Dehydrate with 100 % ACN	150	2	21	1
7	Add Trypsin	17	15	8	1
8	Add Digestion Buffer	50	0,1	8	1
9	Digest		120	45	1
10	Extraction	10	30	21	1

Tab. 65: Verdauprotokoll Coomassie-Gel-Verdau kleiner Stanzkopf

Gemessen wurden die Proben zuerst mit DHB/HCCA-Mischmatrix. Da hierbei keine Spektren zu erhalten waren, erfolgte eine zweite Messung mit HCCA-Matrix nach Jahn, wobei jedoch auch keine Spektren zu messen waren. Eine dritte Messung mit DHB/Phosphorsäure-Matrix lieferte folgende Ergebnisse:

Verdünnung		1	2	3	4	5	6
GP	SC %						
	Score						
BSA	SC %						
	Score						
OV	SC %	32,6					
	Score	86,4					
CA	SC %	48,3	47,1	39,8			
	Score	122	139	104			
TI	SC %						
	Score						

Tab. 66: Sequenzabdeckungen (SC %) und Mowse Scores (Score) des Verdaus von mit dem **kleinen Stanzkopf** ausgestochenen Gel-Spots mit Octylglycosid, gemessen mit **DHB/Phosphorsäure-Matrix**. Für leere Felder konnte bei der Messung kein Spektrum erhalten werden. GP: Glycogenphosphorylase, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase, TI: Trypsin Inhibitor.

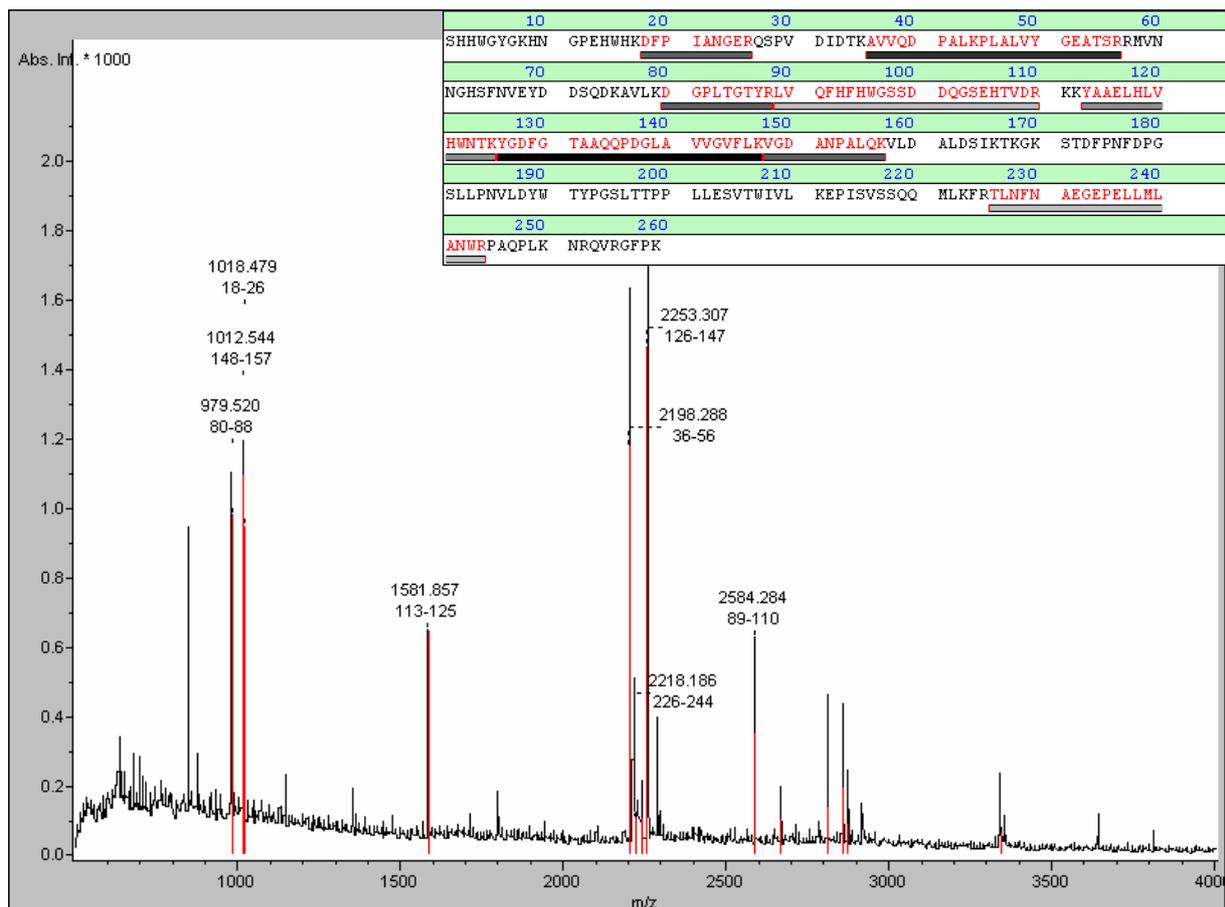


Abb. 49: Spektrum von Carboanhydrase, Verdünnung 1, Verdau kleiner Spots aus dem mit Coomassie gefärbten Gel, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix. Sequenzabdeckung 48,3%.

## B) große Spots

Aus dem Mini-Gel aus Versuch A) wurden die gleichen 5 x 5 Proben wie vorher ausgestochen, allerdings immer in doppelter Ausführung (also 2 x 25). Diesmal wurde der große Stanzkopf (Durchmesser 3,5mm) benutzt.

Der Verdau der Proben erfolgte nach folgendem Protokoll, ebenfalls mit Zusatz von Octylglycosid zu Verdaupuffer und Extraktionslösung:

Step	Description	Vol [ $\mu$ l]	Time [min]	Temp [ $^{\circ}$ C]	Cycles
1	Wash with 50% ACN	150	10	21	1
2	Wash with 100% ACN	150	2	21	1
3	Reduction with DTT	20	30	56	1
4	Alkylation with IAA	20	30	21	1
5	Wash with NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	150	5	21	1
6	Dehydrate with 100 % ACN	150	2	21	1
7	Add Trypsin	17	15	8	1
8	Add Digestion Buffer	50	0,1	8	1
9	Digest		120	45	1
10	Extraction	20	30	21	1

Tab. 67: Verdauprotokoll Coomassie-Gel-Verdau großer Stanzkopf

Die verdauten Proben wurden auf HCCA-Matrix nach Jahn gemessen.

Es ergaben sich folgende Meßwerte:

Verdünnung		1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6
GP	SC %	32,9	47,1	22	20,4	28,8		14				
	Score	286	400	131	109	246		[65]				
BSA	SC %	46,8	57,5	55,2	46,5	32	33,8	26,9	24,5			
	Score	273	364	292	265	158	170	139	115			
OV	SC %	61,6	52,8	55,7	42,7	55,7	48,5	48,2	34,2		32,6	
	Score	214	147	180	143	165	153	168	121		98,3	
CA	SC %	71,8	41,3	54,4	52,2	46,3	40,9	37,1	40,5			
	Score	225	111	176	191	118	129	79,7	102			
TI	SC %	40,1	45,3	57,5	48,1	30,3		22,4	35,8			
	Score	94,8	82,4	133	105	86,6		[67,7]	105			

Tab. 68: Sequenzabdeckungen (SC %) und Mowse Scores (Score) des Verdau von mit dem **großen Stanzkopf** ausgestochenen Gel-Spots mit Octylglycosid, gemessen mit **HCCA-Matrix nach Jahn**.

Werte in Klammern stehen für Mowse Scores, die nicht mehr im statistisch signifikanten Bereich liegen. Für leere Felder konnte bei der Messung kein Spektrum erhalten werden. GP: Glycogenphosphorylase, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase, TI: Trypsin Inhibitor.

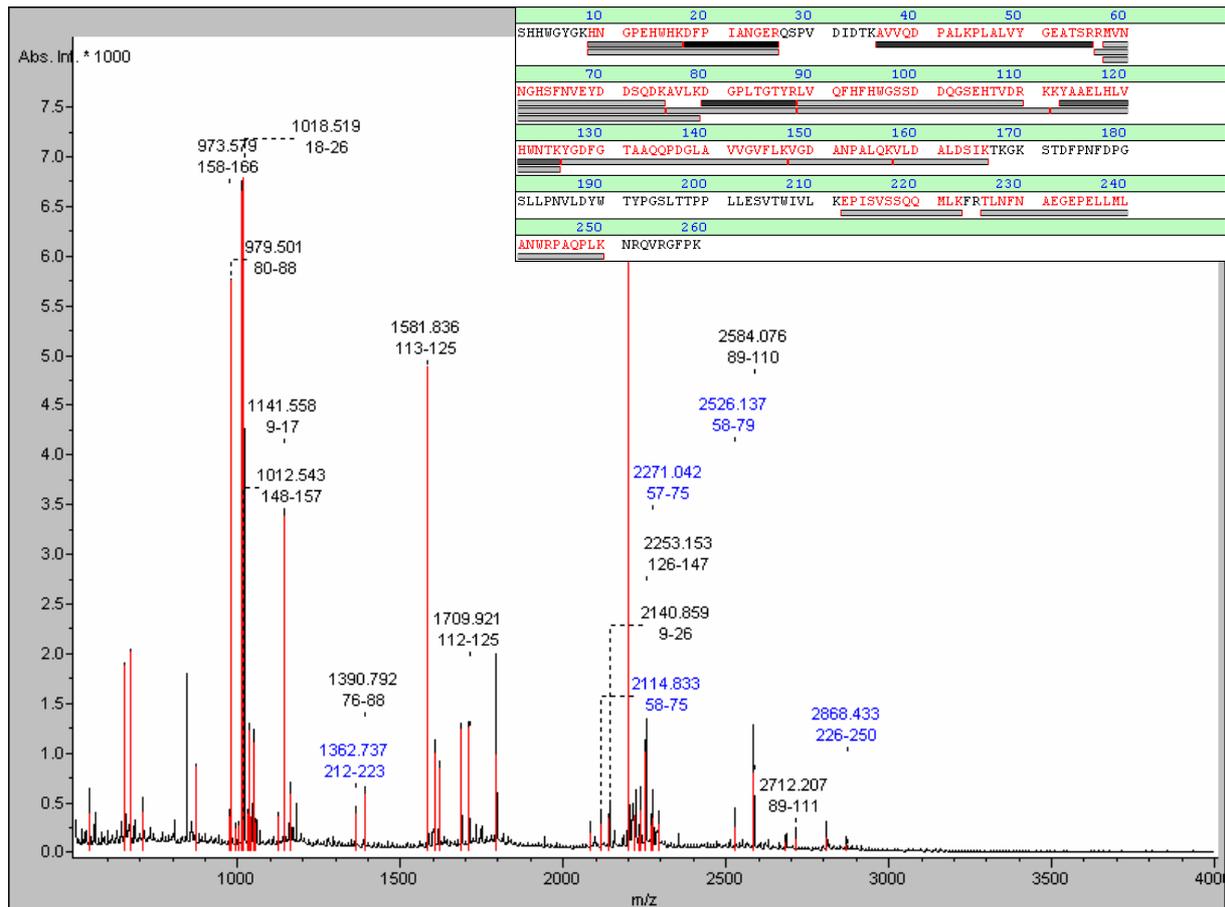


Abb. 50: Spektrum von Carboanhydrase, Verdünnung 1, Verdau großer Spots aus dem mit Coomassie gefärbten Gel, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn. Sequenzabdeckung 71,8%.

#### Fazit:

Um den Nachweis zu erhalten, daß Proteingemisch 2 beim Verdau gute Spektren liefern kann, wurde in diesem Versuch im Gel verdaut und mit HCCA-Matrix nach Jahn gemessen. Hierbei wurden beim Verdau großer Spots sehr gute Ergebnisse erzielt.

Aus den Ergebnissen dieses Versuches ist weiterhin ersichtlich, daß die Anzahl intensiver Spektren größer wird und die Höhe der Sequenzabdeckungen sich steigert, wenn große Spots mit mehr enthaltenem Proteinmaterial anstatt kleiner Spots verdaut werden.

Verdünnung	1 (pmol/ kleinem Spot)	1 (pmol/ großem Spot)
Glycogenphos.	0,92	1,84
BSA	1,677	3,353
Ovalbumin	4,357	8,713
Carboanhydr.	3,69	7,38
Trypsin Inhib.	5,307	10,613

Tab. 69: Vergleich ungefährender absoluter Mengen in großen und kleinen Gel-Spots bei der Annahme, daß ein kleiner Spot 1/6 der Bande und ein großer Spot 1/3 der Bande entspricht.

### 3.3.1.4 Proteinverdau mit Octylglycosid von jeweils ca. 50% der Banden von NC- und PVDF-Membran mit dem Verdauroboter

Um bessere bzw. mehr Spektren auch aus einem Membranverdau zu erhalten, sollte in diesem Versuch die Menge an verdaulichem Protein erhöht werden. Statt der bisher ausgestanzten Spots sollten nun ca. 50% der Banden mit dem Skalpell aus den Membranen ausgeschnitten und zum Verdau verwendet werden.

Es wurden zwei Mini-Gele mit 10% Acrylamid gegossen. In die erste Tasche der Gele wurden 10µl des Markers Precision Plus Protein Standard Dual Color aufgetragen. In die verbleibenden 9 Taschen wurde Proteingemisch 2 in folgenden Verdünnungen aufgetragen:

- Spur 1: Marker
- Spur 2 + 3: Verdünnung 1
- Spur 4 + 5: Verdünnung 2
- Spur 6: Verdünnung 3
- Spur 7: Verdünnung 4
- Spur 8: Verdünnung 5
- Spur 9: Verdünnung 6
- Spur 10: Verdünnung 7

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung des Proteingemisches wurden die 2 Gele per Elektrobloß auf je eine NC- und eine PVDF-Membran geblottet. Die Membranen wurden mit DB71 gefärbt.

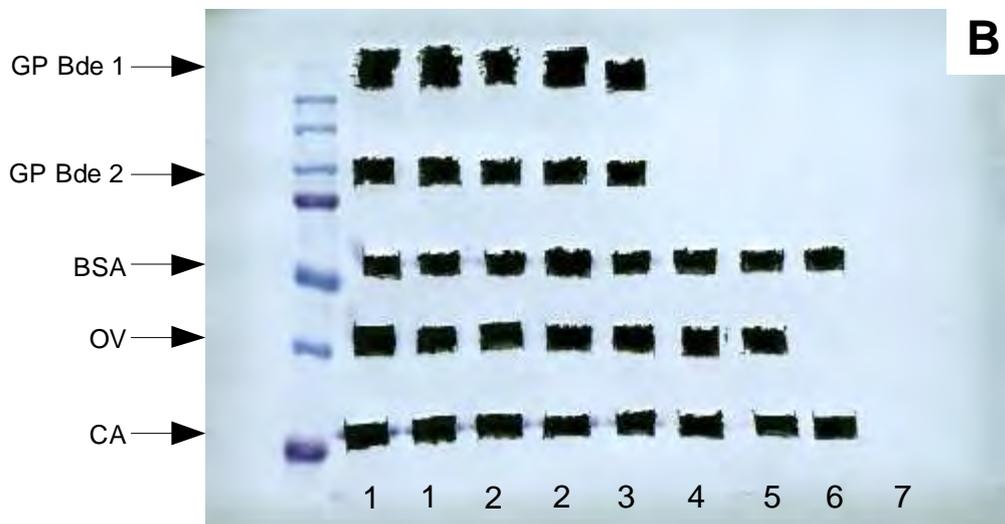
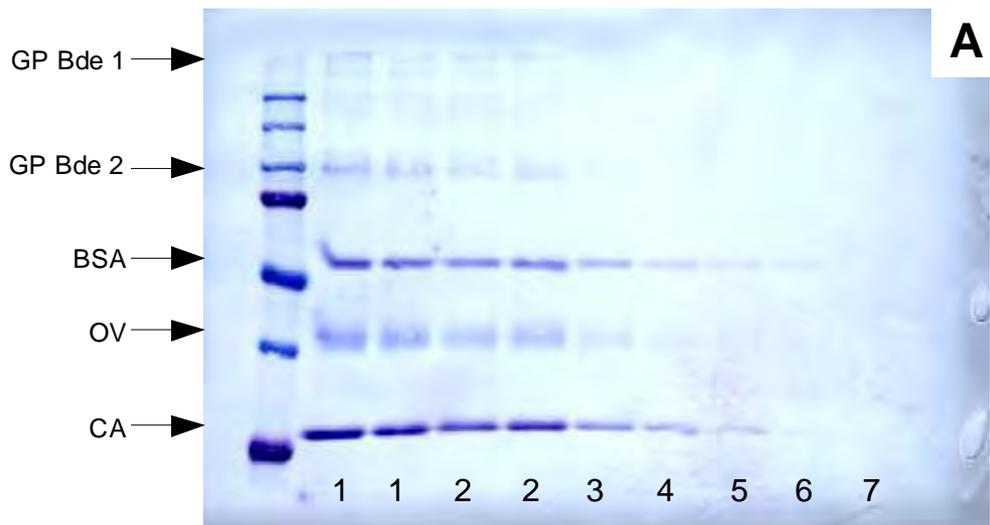
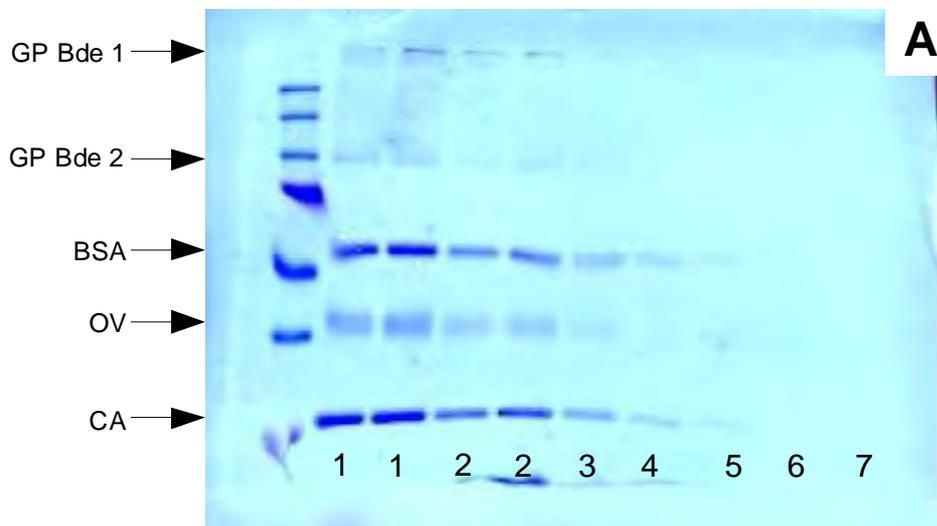


Abb. 51: A: NC-Folie nach Färbung mit DB71, B: dieselbe Folie mit ausgeschnittenen Banden.  
 GP Bde 1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde 2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase, 1 – 7: Verdünnungen.



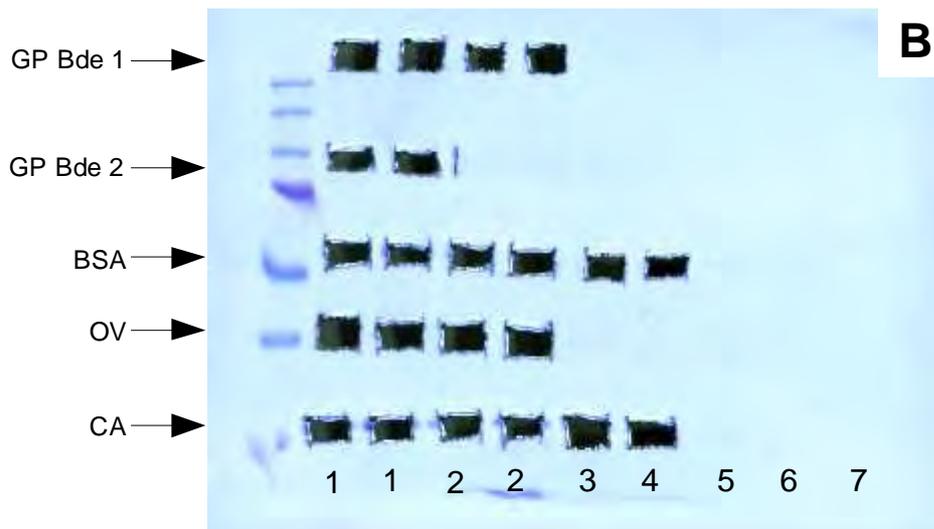


Abb. 52: A: PVDF-Folie nach Färbung mit DB71, B: die selbe Folie mit ausgeschnittenen Banden.  
 GP Bde 1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde 2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase, 1 – 7: Verdünnungen.

Alle sichtbaren Banden auf den Folien wurden halb mit dem Skalpell ausgeschnitten und in Wells gelegt.

Der Verdau (mit Zusatz von Octylglycosid in der Verdaulösung und in der Extraktionslösung) lief nach folgendem Protokoll ab:

Step	Description	Vol [ $\mu$ l]	Time [min]	Temp [ $^{\circ}$ C]	Cycles
1	Destain of DB71	130	20	21	1
2	Wash with MilliQ	150	5	21	2
3	Block with PVP	20	20	21	1
4	Wash with $\text{NH}_4\text{HCO}_3$	150	5	21	2
5	Add Trypsin	17	0,1	21	1
6	Digest		480	37	1
7	Extraction (50% ACN)	30	30	21	1

Tab. 70: Verdauprotokoll 50% der Banden mit Octylglycosid

Die verdauten Proben wurden massenspektrometrisch analysiert. Dazu wurde HCCA-Matrix nach Jahn verwendet.

Verdünnung		1	1	2	2	3	4	5	6	7
GP Bde1	SC %	9,7*		4,4*						
	Score									
GP Bde2	SC %	4,9*	18							
	Score		75							
BSA	SC %	14,2*	6,6*	5,8*	4,6*	9,2	4,9*			
	Score					[54]				
OV	SC %	40,4	40,4	28,3	34,9	34,9				
	Score	107	98,2	92,2	115	90,9				
CA	SC %	32	27	28,6	27	11,9*	15,8*			
	Score	[59,2]	[43,3]	[44,8]	[48,1]					

Tab. 71: Ausgestanzte Spots und Ergebnisse des Verdaus von 50% der Banden mit Octylglycosid von der **NC-Membran**, gemessen mit **HCCA-Matrix nach Jahn**.

Werte in Klammern stehen für Mowse Scores, die nicht mehr im statistisch signifikanten Bereich liegen. Für leere Felder konnte bei der Messung kein Spektrum erhalten werden. Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mithilfe des Programmes „Sequence Editor“ ermittelt, in diesem Fall liegt kein Mowse Score vor. Grau hinterlegt sind die auf der Membran nicht mehr anfärbaren Banden, die daher nicht ausgestochen werden konnten. GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase, SC: Sequenzabdeckung, Score: Mowse Score (%).

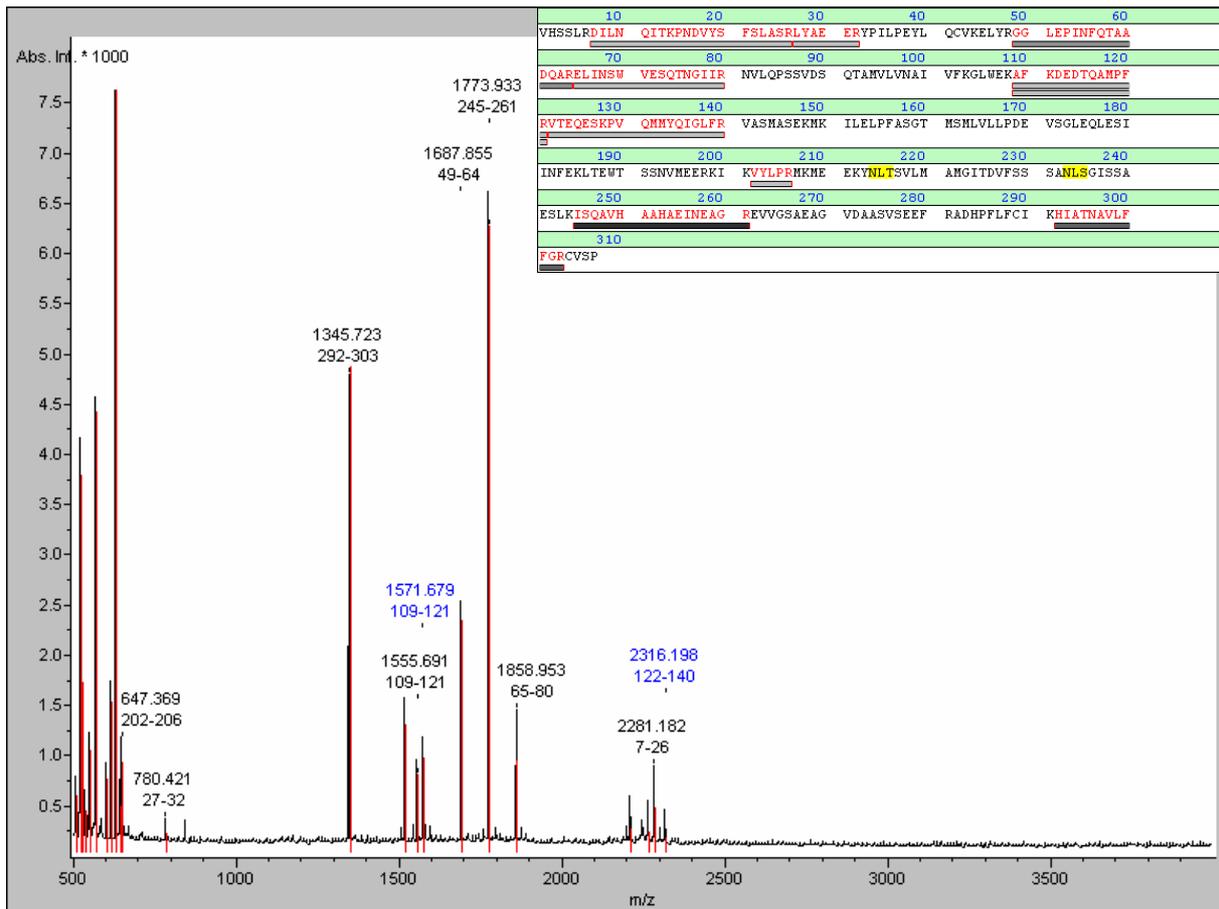


Abb. 53: Spektrum von Ovalbumin, Verdünnung 1, Verdau von 50% der Banden mit Octylglycosid von der NC-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn. Sequenzabdeckung 40,4%.

Verdünnung	1	1	2	2	3	4	5
GP Bde 1							
GP Bde 2	6,4*						
BSA	10,4*	8,4*					
OV	5,7*	4,4*					
CA	6,9*	8,1*	8,1*				
TI	14,9*						

Tab. 72: Ausgestanzte Spots und Ergebnisse des Verdau von 50% der Banden mit Octylglycosid von der **PVDF-Membran**, gemessen mit **HCCA-Matrix nach Jahn**.

Für leere Felder konnte bei der Messung kein Spektrum erhalten werden. Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mithilfe des Programmes „Sequence Editor“ ermittelt, in diesem Fall liegt kein Mowse Score vor. Grau hinterlegt sind die auf der Membran nicht mehr anfärbaren Banden, die daher nicht ausgestochen werden konnten. GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase, TI: Trypsin Inhibitor.

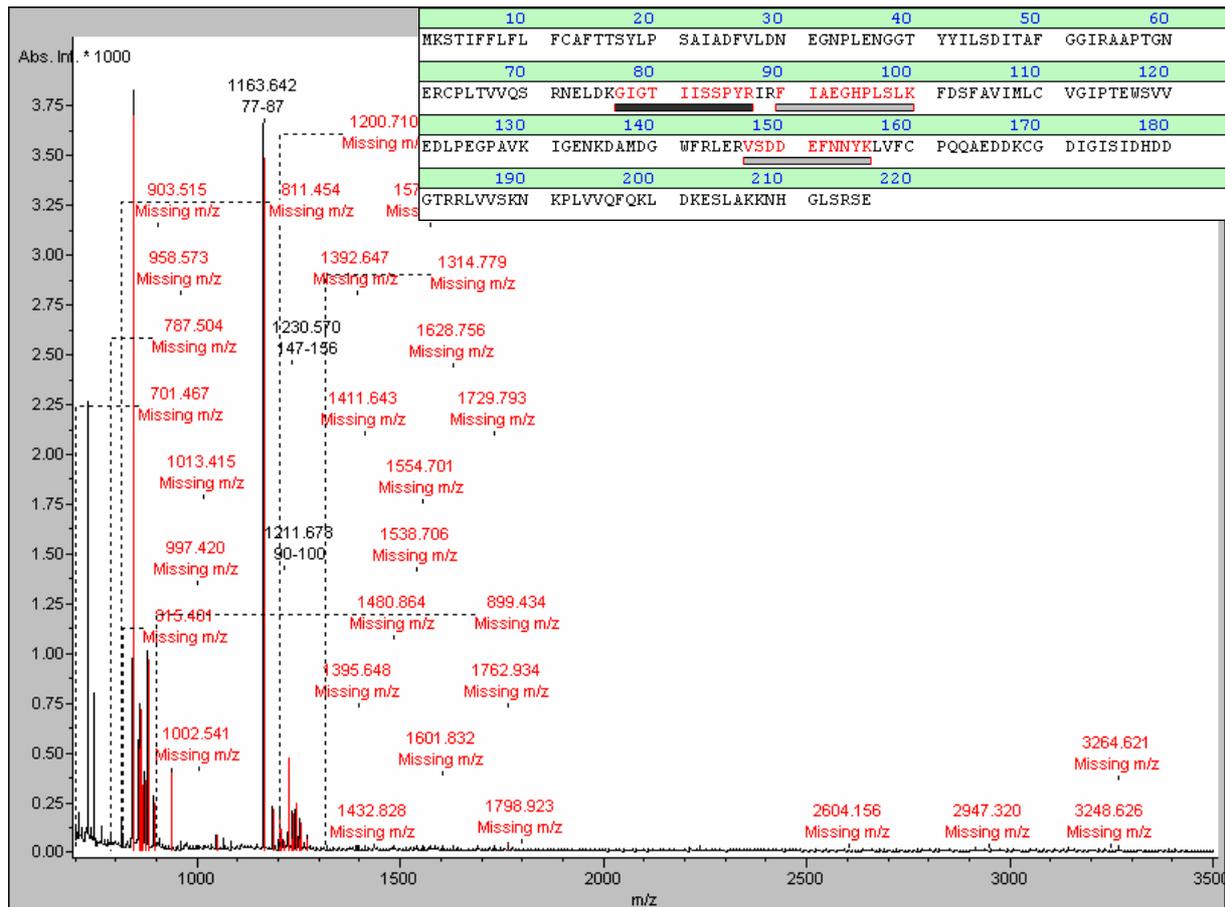


Abb. 54: Spektrum von Trypsin Inhibitor, Verdünnung 1, Verdau von 50% der Banden mit Octylglycosid von der NC-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn. Die mit dem Sequence Editor erhaltene Sequenzabdeckung beträgt 14,9%.

#### Fazit:

In diesem Versuch zeigte sich noch einmal, daß durch den Verdau einer größeren Proteinmenge auch bessere Spektren bei der massenspektrometrischen Messung zu erhalten waren. Dies war sowohl beim Verdau von 50% der Banden von der NC- als auch von der PVDF-Membran erkennbar. Die Ergebnisse des Bandenverdaus waren besser als die des Verdaus von Spots in 3.3.1.2 (beide Versuche wurden mit HCCA-Matrix nach Jahn gemessen). Aus diesem Grund sollten in den folgenden Versuchen weiterhin 50% der Banden verdaut werden. In den halben Banden von Verdünnung 1 befanden sich Proteinmengen von ca. 2,76 bis 15,92 pmol (siehe 2.4.2).

### 3.3.2 Schritt 2: Verdau von mit Roti-Block behandelten Blot-Membranen nach manuellem Waschen in Schalen

In diesem Versuch sollte herausgefunden werden, wie die Behandlung der Membranen mit Roti-Block und das anschließende Waschen vor dem Verdau die Ergebnisse beeinflussen würde. Da sich schon in 3.2.4 gezeigt hatte, daß die Verdauergebnisse sich durch vorheriges

Waschen der Membranen verbessern ließen, war im nächsten Versuch durch die Waschschrte ein positiver Effekt auf die MS-Messung zu erwarten.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Membranen zu waschen. Es können entweder – wie in 3.2 – die ausgeschnittenen Membranstückchen mit ca. 180µl Spülflüssigkeit in den Wells der Mikrotiterplatte gewaschen werden, was viele Pipettierschritte erfordert (diese sollten später auch, wie in 3.2.5, durch den Pipettierroboter ausgeführt werden), es kann aber auch die ganze Membran vor der Färbung mit DB71 in einer Schale mit ca. 150ml Spülflüssigkeit gewaschen werden, was sehr viel weniger aufwendig ist. Letztere Methode sollte daher in diesem Versuch angewendet werden.

Die bestimmenden Parameter beider Waschmethoden sind die Waschzeit und das Waschvolumen. In diesem Versuch wurde die Zeit auf 90 Stunden und das Volumen auf 3 x 150ml (waschen in einer Schale) erhöht.

Wie in 3.3.1.1 beschrieben, wurde ein neuer NC- bzw. PVDF-Elektroblot hergestellt. Die beiden Blotfolien wurden jeweils in eine Schale mit ca. 200ml 10-fach verdünntem Roti-Block gelegt und für 4 Stunden auf den Schüttler gestellt.

Anschließend wurden die Folien zum Spülen jeweils in eine Schale mit ca. 150ml Verdaupuffer (mit 10% ACN, ohne Octylglycosid) gelegt und für ca. 48 Stunden auf den Schüttler gestellt. Danach wurde die Spülflüssigkeit erneuert und die Folien wurden ca. 36 Stunden gespült. Dann wurde die Flüssigkeit noch einmal erneuert und es wurde ca. 6 Stunden gespült.

Danach wurde jede Folie einmal kurz (ca. 15 s) mit bidest. Wasser gespült und anschließend mit DB71 gefärbt.

Auf der NC-Folie konnte man nach der Färbung die ersten 3 Spuren (= die ersten 3 Verdünnungen) erkennen, auf der PVDF-Folie nur die erste Spur (= die erste Verdünnung). Aus beiden Folien wurde aus jeder sichtbaren Bande mithilfe eines Skalpell die Hälfte der jeweiligen Bande ausgeschnitten und in einem der Wells plziert.

Anschließend erfolgte der Verdau (mit Octylglycosid) nach folgendem Protokoll:

Step	Description	Vol [ $\mu$ l]	Time [min]	Temp [ $^{\circ}$ C]	Cycles
1	Destain of DB71	130	20	21	1
2	Wash with MilliQ	150	5	21	2
3	Block with PVP	20	20	21	1
4	Wash with NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	150	5	21	2
5	Add Trypsin	17	0,1	21	1
6	Digest		480	37	1
7	Extraction (50% ACN)	30	30	21	1

Tab. 73: Verdauprotokoll Roti-Block + 3x manuelles Waschen

Die Messung erfolgte auf der HCCA-Matrix nach Jahn sowie auf DHB/Phosphorsäure-Matrix.

Verdünnung		1	2	3	4
GP Bde1	SC %	36,8		3,8*	
	Score	268			
GP Bde2	SC %	37,8	3,7*	23,3	
	Score	320		135	
BSA	SC %	5,9*	2,1*	8,2*	
	Score				
OV	SC %	4,9*	38,8	38,8	
	Score		114	126	
CA	SC %	46,7	43,8		
	Score	115	95,4		
TI	SC %	11,6*	11,6*	6,5*	
	Score				

Tab. 74: Ausgestanzte Spots und Ergebnisse des Verdaus nach 3x manuellem Waschen von der **NC-Membran**, gemessen mit **HCCA-Matrix nach Jahn**.

Mit \* markierte Sequenzabdeckungen sind mit dem Programm „Sequence Editor“ ermittelt worden. Leere Felder bedeuten, daß hier bei der Messung kein Spektrum zu erhalten war. GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase, TI: Trypsin Inhibitor, SC: Sequenzabdeckung (%), Score: Mowse Score.

Verdünnung		1	2	3	4
GP Bde1	SC %	18,5	2,3*	3,7*	
	Score	99,5			
GP Bde2	SC %	28,1	19	2,5*	
	Score	200	[70,4]		
BSA	SC %	29,2		6,6*	
	Score	143			
OV	SC %	24,1	29,4*	30,6	
	Score	[49,6]		112	
CA	SC %	39,8	25,4*	43,1	
	Score	65,8		[73]	
TI	SC %	28,5	19,4	13,4*	
	Score	[64,6]	[63,8]		

Tab. 75: Ausgestanzte Spots und Ergebnisse des Verdaus nach 3x manuellem Waschen von der **NC-Membran**, gemessen mit **DHB/Phosphorsäure-Matrix**.

Mit \* markierte Sequenzabdeckungen sind mit dem Programm „Sequence Editor“ ermittelt worden. Werte in Klammern stehen für Mowse Scores im statistisch nicht relevanten Bereich. Leere Felder bedeuten, daß hier bei der Messung kein Spektrum zu erhalten war. GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase, TI: Trypsin Inhibitor, SC: Sequenzabdeckung (%), Score: Mowse Score.

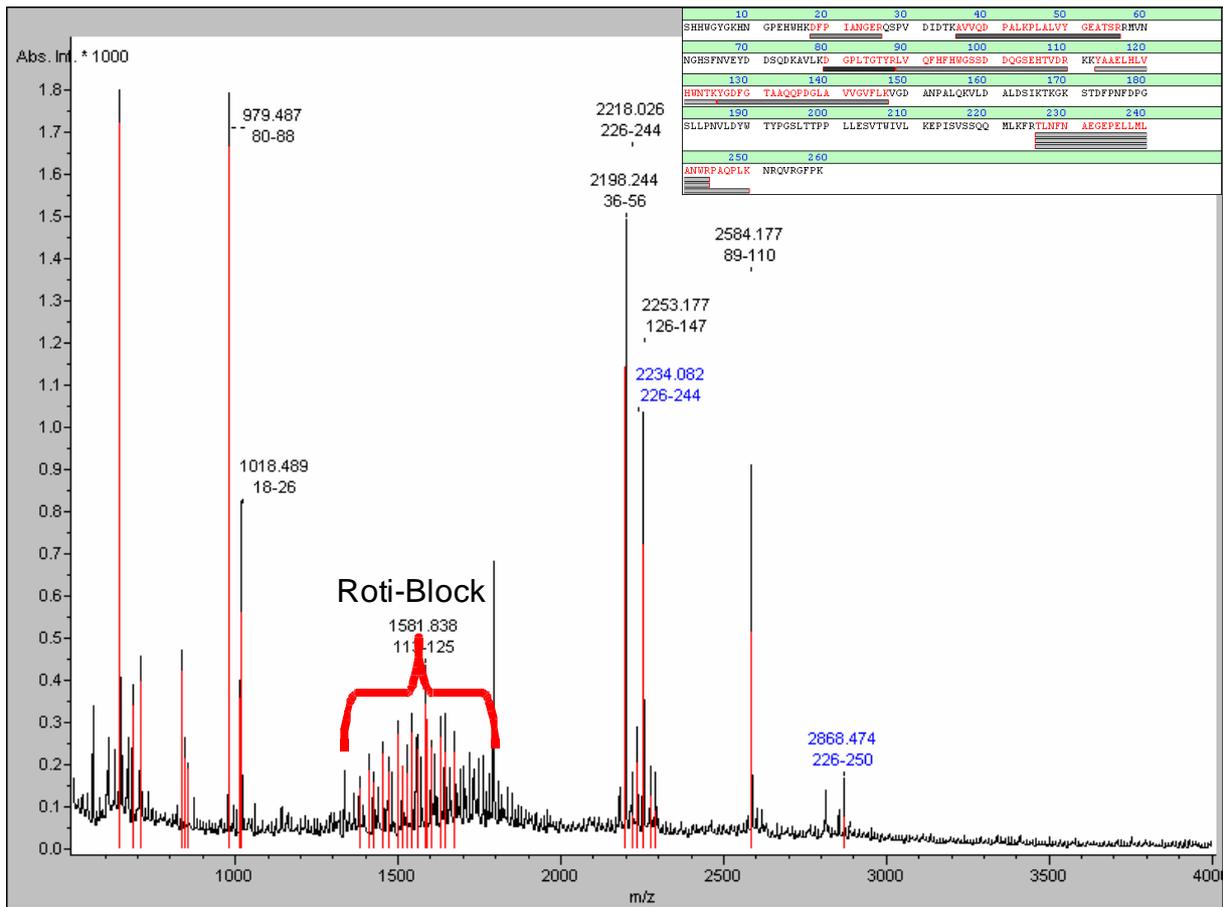


Abb. 55: Spektrum von Carboanhydrase, Verdünnung 1, Verdau nach 3x manuellem Waschen von der NC-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn. Sequenzabdeckung 46,7%.

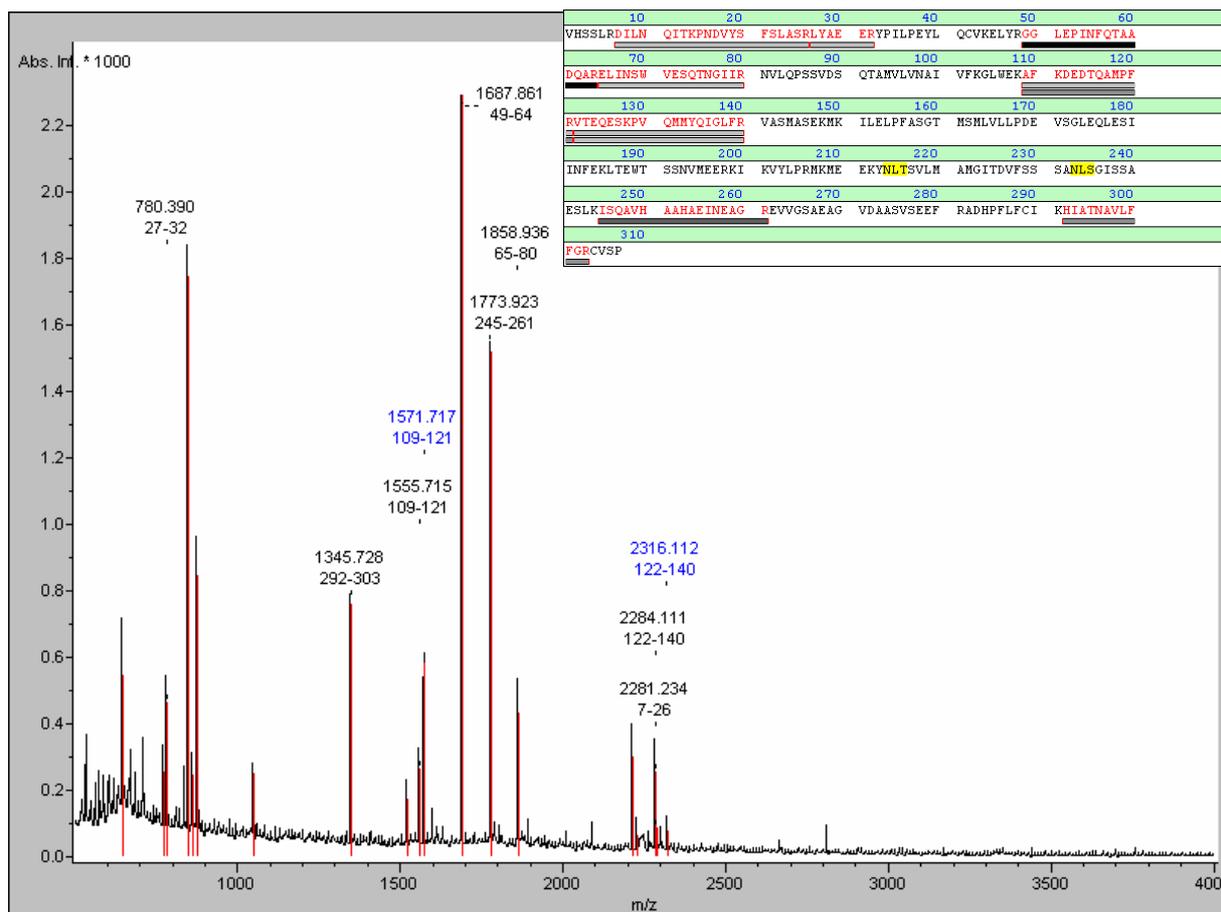


Abb. 56: Spektrum von Ovalbumin, Verdünnung 3, Verdau nach 3x manuellem Waschen von der NC-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn. Sequenzabdeckung 38,8%.

Verdünnung		1	2	3	4	5
GP Bde1	SC					
	Score					
GP Bde2	SC					
	Score					
BSA	SC	2,5*				
	Score					
OV	SC	12,7*				
	Score					
CA	SC	63,3	53,1	46,2	43,8	
	Score	151	155	149	93,9	
TI	SC	23,6				
	Score	[53,7]				

Tab. 76: Ausgestanzte Spots und Ergebnisse des Verdaus nach 3x manuellem Waschen von der **PVDF-Membran**, gemessen auf **HCCA-Matrix nach Jahn**.

Werte in Klammern stehen für Mowse Scores im statistisch nicht relevanten Bereich. Leere Felder bedeuten, daß hier bei der Messung kein Spektrum zu erhalten war. rau hinterlegt sind die auf der Membran nicht mehr anfärbaren Banden, die daher nicht ausgestochen werden konnten. GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase, TI: Trypsin Inhibitor, SC: Sequenzabdeckung (%), Score: Mowse Score.

Verdünnung		1	2	3	4	5
GP Bde1	SC					
	Score					
GP Bde2	SC	3,1*				
	Score					
BSA	SC	4,6*				
	Score					
OV	SC	29,3				
	Score	88,9				
CA	SC	32,4	48,8	13,1*	20*	
	Score	81,7	105			
TI	SC	7,4*				
	Score					

Tab. 77: Ausgestanzte Spots und Ergebnisse des Verdaus nach 3x manuellem Waschen von der **PVDF-Membran**, gemessen auf **DHB/Phosphorsäure-Matrix**.

Werte in Klammern stehen für Mowse Scores im statistisch nicht relevanten Bereich. Grau hinterlegt sind die auf der Membran nicht mehr anfärbaren Banden, die daher nicht ausgestochen werden konnten. GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase, TI: Trypsin Inhibitor, SC: Sequenzabdeckung (%), Score: Mowse Score.

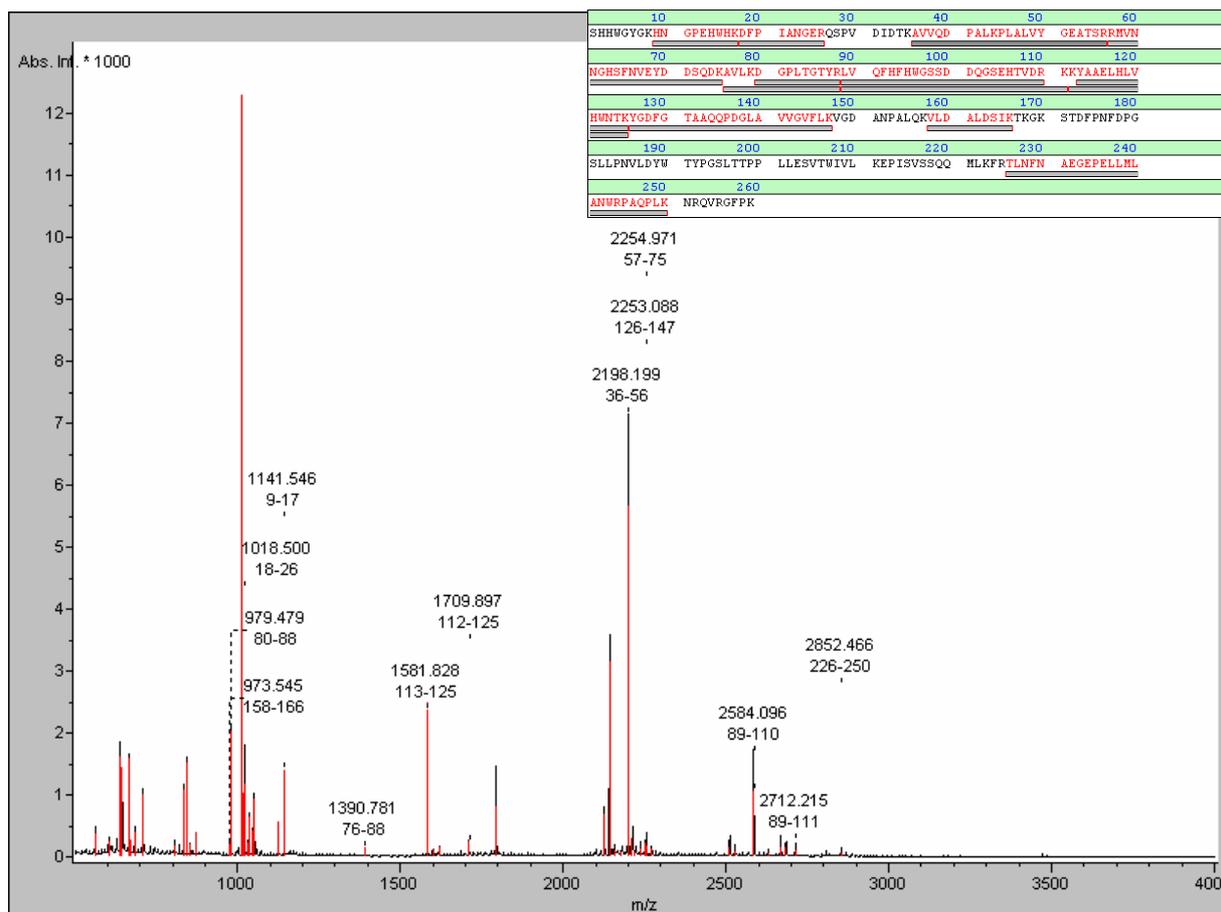


Abb. 57: Spektrum von Carboanhydrase, Verdünnung 1, Verdau nach 3x manuellem Waschen von der PVDF-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn. Sequenzabdeckung 63,3%.

#### Fazit:

In diesem Versuch brachte das dreimalige Waschen der gesamten Membranen in Schalen mit einem größeren Volumen über einen längeren Zeitraum (90 Stunden) gute Ergebnisse.

Im Vergleich zu 3.3.1.4, dem Verdau halber Banden ohne Roti-Block, ergab dieser Versuch, ebenfalls gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn, vergleichbare Spektren und Sequenzabdeckungen beim Verdau von NC. Der Verdau von PVDF zeigte in diesem Versuch im Vergleich zu 3.3.1.4 eine ähnliche Anzahl an Spektren, aber leicht erhöhte Sequenzabdeckungen. Somit war gezeigt worden, daß Roti-Block ausreichend entfernt werden konnte, um eine massenspektrometrische Messung auf HCCA-haltiger Matrix zu ermöglichen.

Im nächsten Schritt sollte eine komplette ECL erfolgen und die Membranen sollten aufgrund des geringeren Aufwandes wieder in Schalen gewaschen werden, allerdings sollte die Anzahl der Waschschrte erhöht werden, da sich als beste Waschmöglichkeit in 3.2.4 ein häufiges (6-maliges) Waschen der Membran-Spots in den Wells über 2 Stunden herausgestellt hatte.

### **3.3.3 Schritt 3: Verdau nach ECL**

#### **3.3.3.1 Verdau nach Blockade mit Roti-Block, ECL und manuellem Spülen in Schalen**

In diesem Versuch sollte im Gegensatz zum vorherigen die Waschzeit auf 21 Stunden gesenkt und dafür das Waschvolumen auf 10 x 150ml erhöht werden.

Bei der ECL werden durch Chemolumineszenz Proteinbanden auf der Blot-Membran kurzzeitig sichtbar gemacht. Roti-Block verhindert das unspezifische Binden von Antikörpern auf der Membran. So werden nur die zu markierenden proteinhaltigen Banden mit AK 1 besetzt. Auf diesen ersten Antikörper setzt sich im nächsten Schritt AK 2, der mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) beladen ist. Durch die Zugabe von ECL-Reagenz wird selbiges durch die HRP aktiviert und die Proteinbanden werden zum Leuchten angeregt. Legt man auf die Blot-Membran nun einen Röntgenfilm, färbt sich dieser an den Stellen der Banden schwarz. Auf diese Weise kann man erkennen, an welcher Stelle der Membran die speziellen Proteinbanden liegen.

In diesem Versuch sollten die gewünschten Proteinbanden auf der Membran nach abgelaufener ECL mit DB71 angefärbt, verdaut und die Proteine massenspektrometrisch identifiziert werden.

Hierzu wurde wie in 3.3.1.4 je ein NC- bzw. PVDF-Elektroblot mit Proteingemisch 2 hergestellt, der die folgenden Verdünnungen beinhaltet:

Spur 1: Marker

Spur 2 + 3: Verdünnung 1

Spur 4 + 5: Verdünnung 2

Spur 6: Verdünnung 3

Spur 7: Verdünnung 4

Spur 8: Verdünnung 5

Spur 9: Verdünnung 6

Spur 10: Verdünnung 7

Nach dem Blotten wurden die beiden Folien je in eine Schale mit Roti-Block (Verdünnung 1:10) gelegt und für 3 Stunden auf den Schüttler gestellt. Danach wurde jede Folie eingerollt und in ein Röhrchen mit 5ml Roti-Block und 1µl IgG-anti-Ovalbumin-Antikörper (entspricht einer Verdünnung von 1:5000) gesteckt, wobei darauf zu achten war, daß die Vorderseite, also die Proteinseite der Blotfolie, zur Innenseite des Röhrchens zu liegen kam, damit sie gut

von der Flüssigkeit benetzt werden konnte. Die Röhren wurden über Nacht im Kühlraum bei 4°C gerollt.

Am nächsten Tag wurden die Folien aus den Röhren genommen und 5 x 3 Minuten mit PBS-Puffer gespült. Dann wurden die Folien erneut eingerollt und je in ein Röhren mit 6ml Roti-Block und 2µl HRP-gekoppeltem IgG-anti-Maus-Antikörper (entspricht einer Verdünnung von 1:3000) gesteckt, wieder mit der Proteinseite nach innen. In diesen Röhren wurden sie bei Raumtemperatur eine Stunde lang im Dunklen gerollt. Danach wurden die Folien aus den Röhren genommen und wieder 5 x 3 Minuten mit PBS-Puffer gespült.

Die nächsten Arbeitsschritte erfolgten in der Dunkelkammer:

Die verbleibende Flüssigkeit auf den Folien ließ man vorsichtig über den Rand der Folien auf Kleenex-Tücher abtropfen. Dann wurden die Folien mit der Proteinseite nach oben auf eine ebene Unterlage gelegt und vollständig mit ECL-Reagenz bedeckt. Nach 5 Minuten Einwirkzeit wurde wieder vorsichtig mit Kleenex-Tüchern alle Flüssigkeit von den Membranen entfernt, und sie wurden in Plastikfolie eingeschweißt. Die eingeschweißten Folien wurden in einer Röntgen-Kassette fixiert. Bei ausgeschaltetem Licht wurde dann ein Röntgenfilm auf die Folien gelegt und schon nach wenigen Sekunden wieder abgenommen. Der Röntgenfilm wurde dann für 1 Minute in Entwickler und für 5 Minuten in Fixierflüssigkeit gelegt, danach mit bidest. Wasser abgespült.

Auf den fertig entwickelten Röntgenfilm wurden anschließend zur besseren Orientierung die Marker-Banden von den Original-Blotfolien mit einem farbigen Stift übertragen.

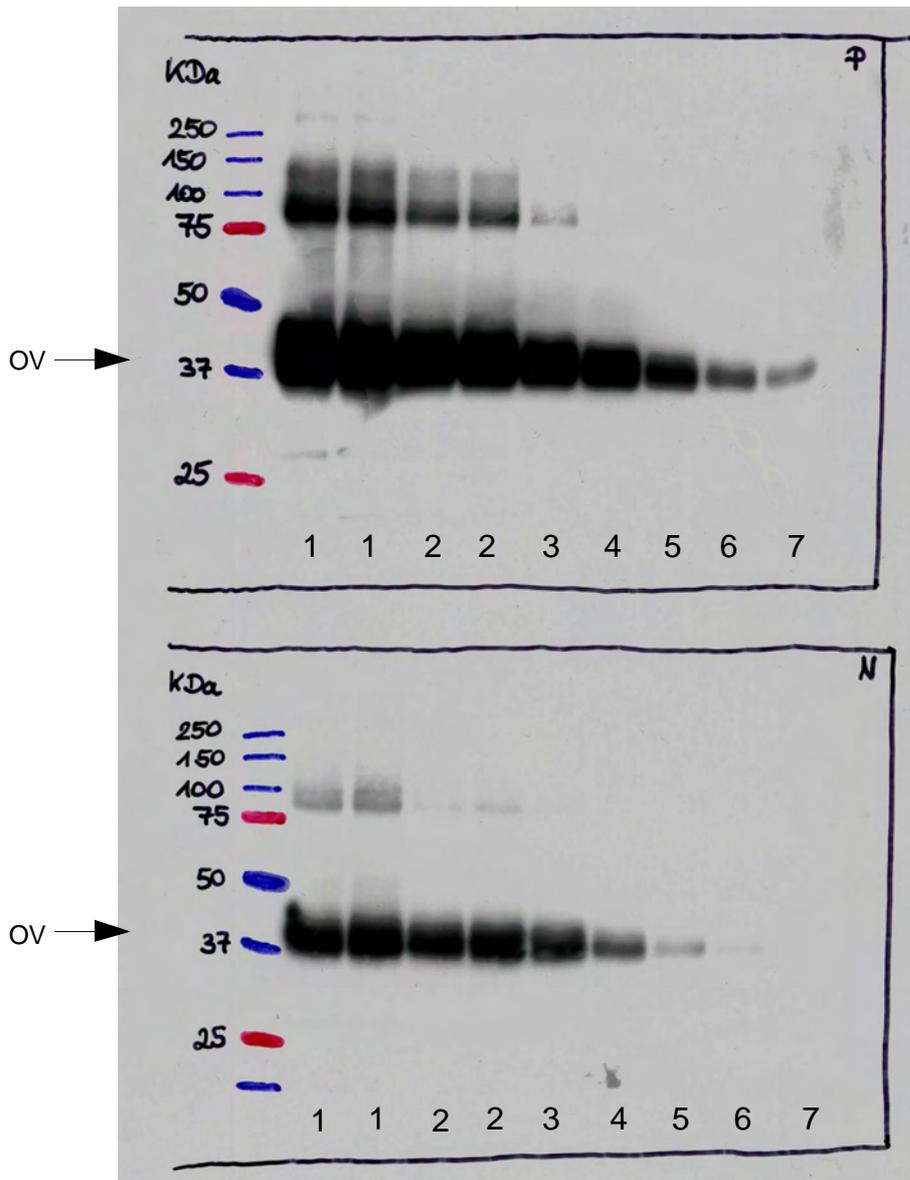


Abb. 58: Röntgenfilm nach der ECL, P: Abdruck der PVDF- und N: Abdruck der NC-Membran. Die Banden zwischen 37 und 50 kDa sind die durch die ECL sichtbargemachten Ovalbumin-Banden (OV). 1 – 7: Verdünnungen.

Die Blotfolien wurden anschließend aus der Verschweißung genommen und 5 mal mit bidest. Wasser gespült. Danach wurden sie je in eine Schale mit Verdaupuffer (mit 10% ACN, ohne Octylglycosid) gelegt und für 2 Stunden auf den Schüttler gestellt. Danach wurde die Flüssigkeit erneuert und die Folien wurden über Nacht (ca. 18 Stunden) auf dem Schüttler geschwenkt.

Am nächsten Tag wurden die Folien erneut mit Verdaupuffer 8 x 5 Minuten gespült, indem sie in je einer Schale auf den Schüttler gestellt wurden.

Danach wurden sie in ihren Schalen noch 3 mal einige Sekunden lang mit bidest. Wasser gespült.

Nach diesen Waschschrissen wurden die Folien mit DB71 gefärbt und in Verdünnungslösung für DB71 bis zum nächsten Tag aufbewahrt.



Abb. 59: NC-Membran nach der ECL, gefärbt mit DB71.  
GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase, 1 – 7: Verdünnungen.

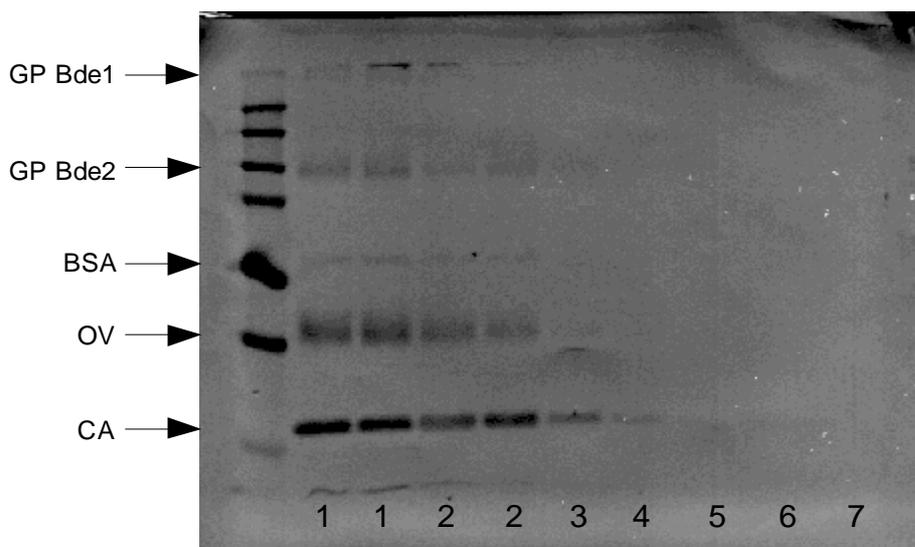


Abb. 60: PVDF-Membran nach der ECL, gefärbt mit DB71.  
GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase, 1 – 7: Verdünnungen.

Von den gefärbten Folien wurde aus jeder sichtbaren Bande die Hälfte mit dem Skalpell ausgeschnitten. Die Membranstückchen wurden dann in Wells gelegt, in denen je 70µl von der DB-Entfärbelösung vorgelegt worden waren. Nach 20 Minuten Einwirkzeit fand der Verdau (mit Zusatz von Octylglycosid) nach folgendem Protokoll statt:

Step	Description	Vol [ $\mu$ l]	Time [min]	Temp [ $^{\circ}$ C]	Cycles
1	Remove liquid	70		21	1
2	Wash with MilliQ	150	5	21	2
3	Block with PVP	20	20	21	1
4	Wash with NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	150	5	21	2
5	Add Trypsin	17	0,1	21	1
6	Digest		480	37	1
7	Extraction (50% ACN)	30	30	21	1

Tab. 78: Verdauprotokoll Roti-Block, ECL und manuelles Spülen

Die verdauten Proben wurden mit HCCA-Matrix nach Jahn sowie mit DHB/Phosphorsäure-Matrix gemessen.

Verdünnung		1	1	2	2	3	4	5
GP Bde1	SC %	11,5*	15,9					
	Score		116					
GP Bde2	SC %	18,9	18,8	3,7*	11,4*	0,8*		
	Score	122	122					
BSA	SC %	4,6*						
	Score							
OV	SC %	42,3	34,5	26,4	7,5*			
	Score	104	102	87,5				
CA	SC %	53,3	49,8	49,8	49,4	49	37,1	
	Score	143	138	168	122	109	80,7	

Tab. 79: Ausgestanzte Spots und Ergebnisse des Verdaus nach ECL und manuellem Spülen von der **NC-Membran**, gemessen auf **HCCA-Matrix nach Jahn**.

Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mit dem Sequence Editor ermittelt. Leere Felder bedeuten, daß hier bei der Messung kein Spektrum zu erhalten war. GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase, SC: Sequenzabdeckung (%), Score: Mowse Score.

Verdünnung		1	1	2	2	3	4	5
GP Bde1	SC %	29,8	21,4	9,4*		1,3*		
	Score	195	139					
GP Bde2	SC %	30,1	27,4	19,8	16,4			
	Score	187	237	83,2	88,9			
BSA	SC %	25,7		4,6*	4,6*	3,3*	7,7	
	Score	144					[35]	
OV	SC %	51,9	60,9	19,8	36,8	44,3	20,3*	
	Score	139	153	137	[67,6]	93,9		
CA	SC %	51	71,4	57,9	24,2*	39,6	27,4	
	Score	91,4	183	125		95	73	

Tab. 80: Ausgestanzte Spots und Ergebnisse des Verdauas nach ECL und manuellem Spülen von der NC-Membran, gemessen mit **DHB-Phosphorsäure-Matrix**.

Werte in Klammern stehen für Mowse Scores, die nicht mehr im statistisch signifikanten Bereich liegen. Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mit dem Sequence Editor ermittelt. Leere Felder bedeuten, daß hier bei der Messung kein Spektrum zu erhalten war. GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase, SC: Sequenzabdeckung (%), Score: Mowse Score.

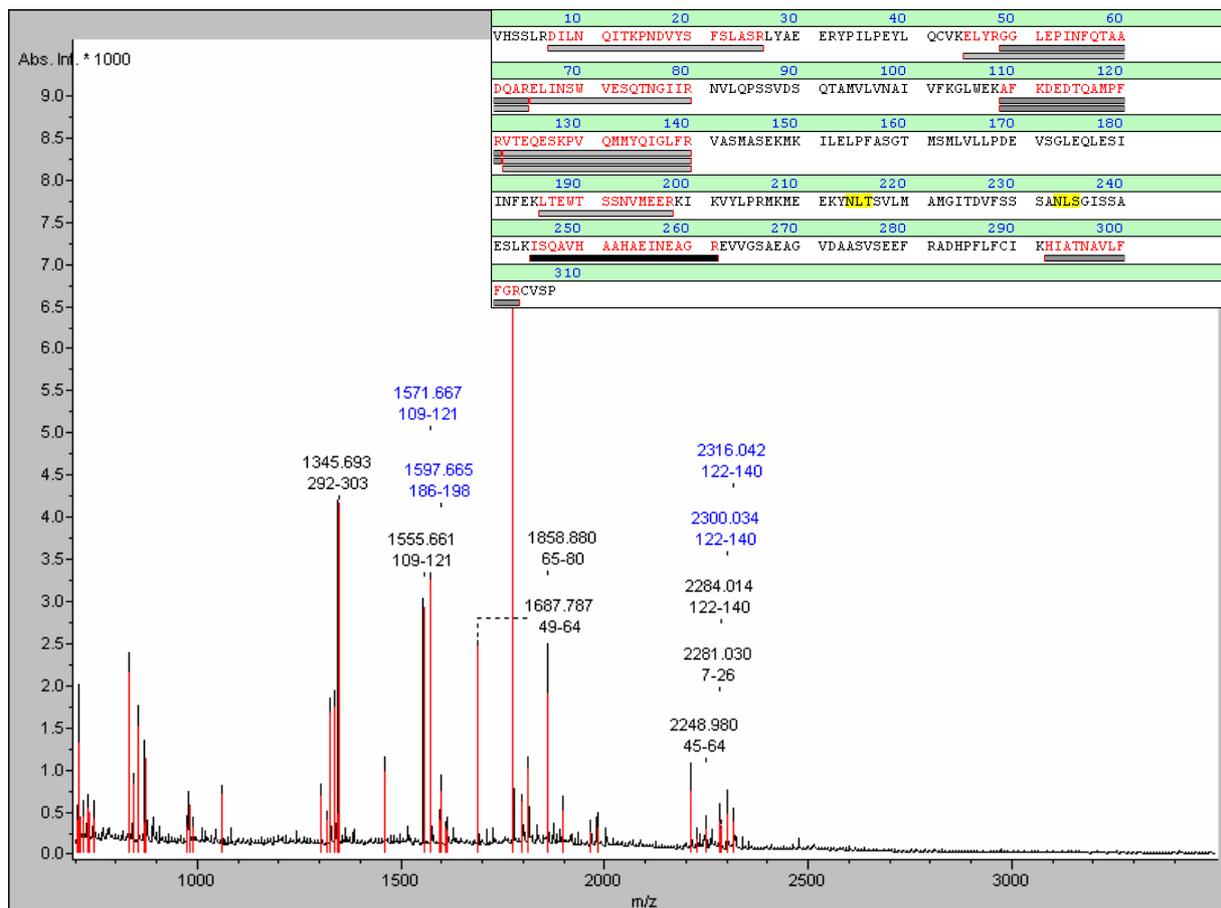


Abb. 61: Spektrum von Ovalbumin, Verdünnung 1, Verdau nach ECL und manuellem Spülen von der NC-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn. Sequenzabdeckung 42,3%.

Verdünnung		1	1	2	2	3	4
GP Bde1	SC %			1,7*			
	Score						
GP Bde2	SC %	4,7*		7,1*			
	Score						
BSA	SC %	4,6*					
	Score						
OV	SC %	22,1	27,4	33,9	4,4*		
	Score	79,1	84,8	98,8			
CA	SC %	59,1	51	28,5*	59,8	44,4	
	Score	168	193		193	93,3	

Tab. 81: Ausgestanzte Spots und Ergebnisse des Verdaus nach ECL und manuellem Spülen von der **PVDF-Membran**, gemessen mit **HCCA-Matrix nach Jahn**.

Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mit dem Sequence Editor ermittelt. Leere Felder bedeuten, daß hier bei der Messung kein Spektrum zu erhalten war. GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase, SC: Sequenzabdeckung (%), Score: Mowse Score.

Verdünnung		1	1	2	2	3	4
GP Bde1	SC %	10,4*	3,3*	1,1*			
	Score						
GP Bde2	SC %	5,3*				1,2*	
	Score						
BSA	SC %	83,3		4,6*			
	Score	[31]					
OV	SC %	31,9	34,9	18,4*	19,2*	7,5*	
	Score	88,7	79				
CA	SC %	25,5	6,9*	43,8	57,3	40,4	
	Score	[53,3]		92	109	96,6	

Tab. 82: Ausgestanzte Spots und Ergebnisse des Verdaus nach ECL und manuellem Spülen von der **PVDF-Membran**, gemessen mit **DHB/Phosphorsäure-Matrix**.

Werte in Klammern stehen für Mowse Scores, die nicht mehr im statistisch signifikanten Bereich liegen. Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mit dem Sequence Editor ermittelt. Leere Felder bedeuten, daß hier bei der Messung kein Spektrum zu erhalten war. GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase, SC: Sequenzabdeckung (%), Score: Mowse Score.

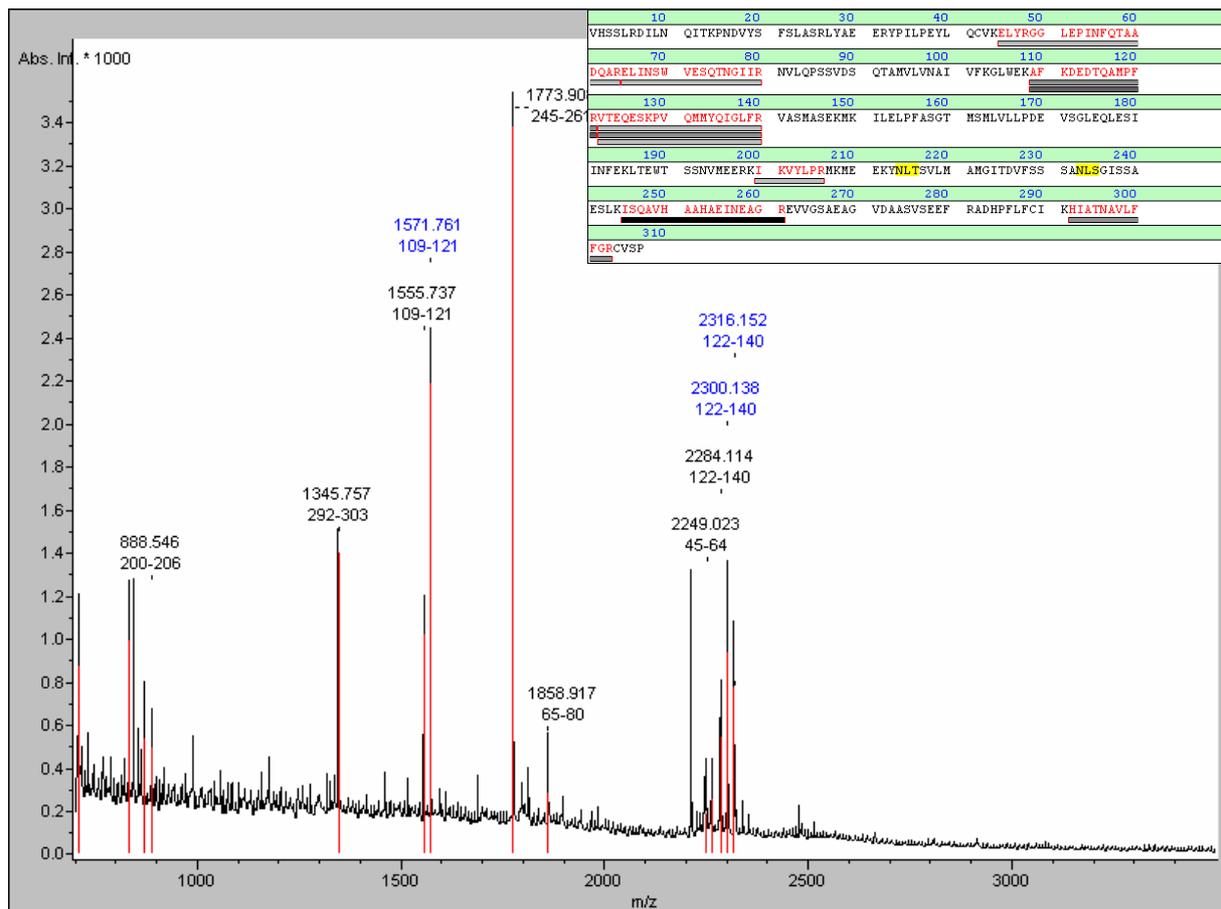


Abb. 62: Spektrum von Ovalbumin, Verdünnung 2, Verdau nach ECL und manuellem Spülen von der PVDF-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn. Sequenzabdeckung 33,9%.

#### Fazit:

In diesem Versuch wurden die Membranen nach der Behandlung mit dem ECL-Reagenz 10 mal mit Verdaupuffer über ca. 20 Stunden gewaschen. Der Verdau lieferte ähnliche Ergebnisse wie der vorherige Versuch, bei dem nur Roti-Block entfernt werden mußte. Es sollte daher aus Zeitgründen ein häufiges Waschen über einen kürzeren Zeitraum wie in diesem Versuch bevorzugt werden.

In den Spektren dieses Versuches waren keine zusätzlichen Peptid-Peaks zu erkennen, die auf die bei der ECL eingesetzten Antikörper hingewiesen hätten.

Im Vergleich zu 3.3.1.4, dem Verdau halber Banden ohne Roti-Block, waren hier bei Messung mit HCCA-Matrix nach Jahn von NC für Glycogenphosphorylase und Carboanhydrase höhere Sequenzabdeckungen, für BSA und Ovalbumin aber weniger Spektren bzw. niedrigere Sequenzabdeckungen zu erhalten.

Beim Verdau von der PVDF-Membran zeigten sich im Vergleich zu 3.3.1.4 für Glycogenphosphorylase und BSA vergleichbare Spektren, für Carboanhydrase und

Ovalbumin waren jedoch höhere Sequenzabdeckungen und auch Spektren von niedrigerer Verdünnung zu erhalten, womit sich die Ergebnisse hier verbessert hatten.

Die Verbesserung der Qualität der Spektren einzelner Proteine wurde zurückgeführt auf eine Verminderung von Verunreinigungen auf den zu verdauenden Membranen und damit in der extrahierten Peptidflüssigkeit durch das mehrmalige Waschen der Membranen mit Verdauerpuffer vor dem Verdau. Dadurch waren weniger Störfaktoren bei der massenspektrometrischen Messung vorhanden.

### **3.3.3.2 Verdau nach Blockade mit Roti-Block, ECL und automatisiertem Spülen**

Da das mehrmalige Spülen der Membranen nach der ECL einen positiven Effekt hatte, sollte im nächsten Schritt versucht werden, die Waschschritte, die bisher manuell erfolgt waren, auf dem Pipettierroboter zu automatisieren.

Es wurde je ein NC- bzw. PVDF-Elektroblot mit Proteingemisch 2 hergestellt. Nach dem Blotten wurden die Folien je in eine Schale mit Roti-Block (Verdünnung 1:10) gelegt und für 4 Stunden auf den Schüttler gestellt.

Danach erfolgte, wie im vorherigen Versuch beschrieben, die Inkubation der Folien mit AK1 und AK2. Die ECL wurde in der Dunkelkammer durchgeführt.

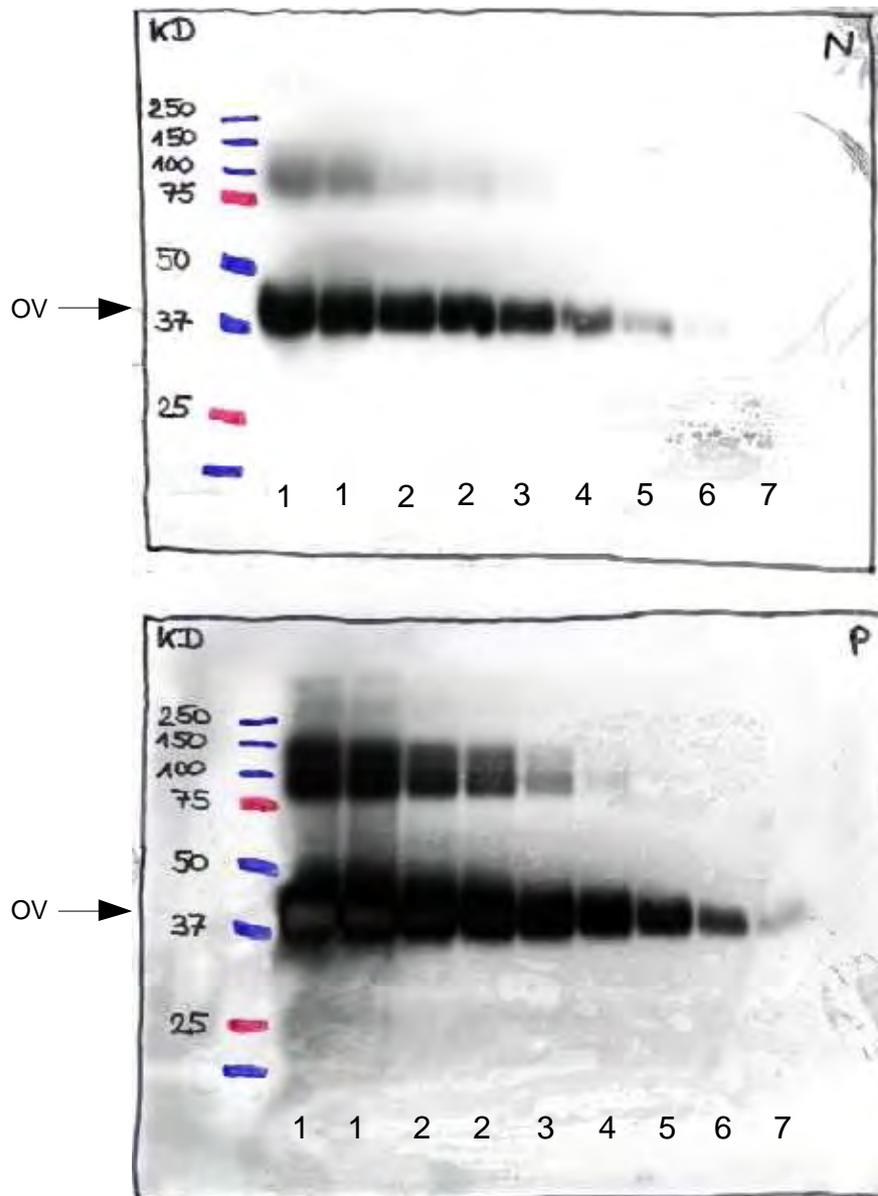


Abb. 63: Röntgenfilm mit sichtbar gemachten Ovalbumin-Banden zwischen 37 und 50 kDa, N: NC-Membran, P: PVDF-Membran. OV: Ovalbumin, 1 – 7: Verdünnungen.

Nach der ECL wurden die Membranen aus der Einblisterung genommen und 5 mal für einige Sekunden mit bidest. Wasser gespült und danach mit DB71 gefärbt.

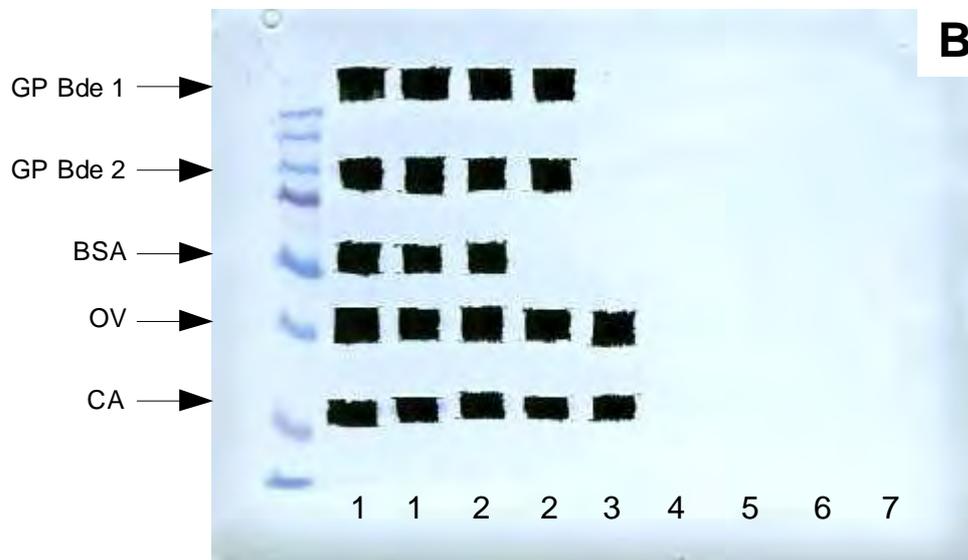
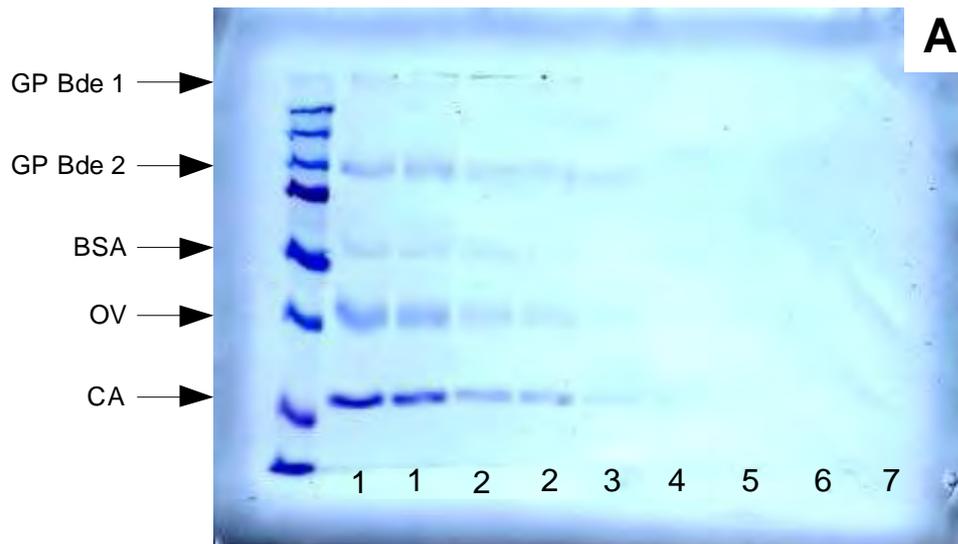


Abb. 64: A: NC-Folie nach Roti-Blockade, ECL und Färbung mit DB71. B: Dieselbe Folie nach dem Ausschneiden der Banden.  
 GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase, 1 – 7: Verdünnungen.

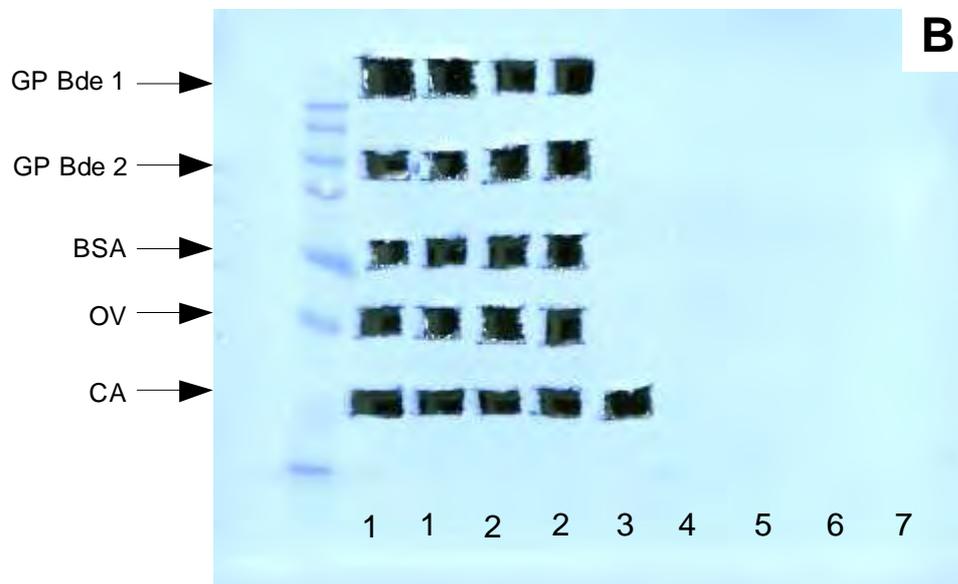
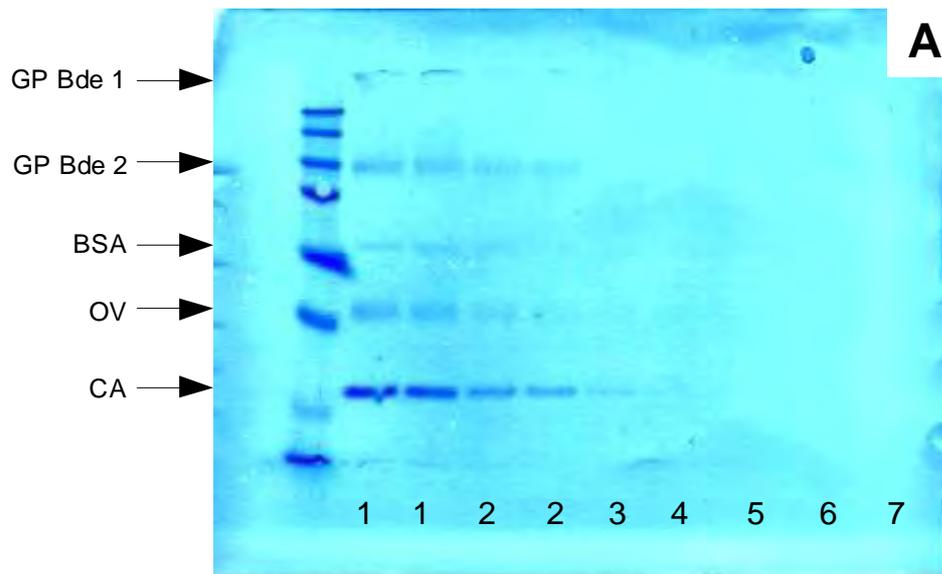


Abb. 65: A: PVDF-Folie nach Roti-Blockade, ECL und Färbung mit DB71. B: Dieselbe Folie nach dem Ausschneiden der Banden.

GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase, 1 – 7: Verdünnungen.

Die darauffolgenden 10 Waschschrte mit Verdaupuffer (10% ACN, kein Octylglycosid) sollten nun vom Verdauroboter ausgeführt werden. Hierzu wurde aus allen sichtbaren Banden jeweils eine halbe Bande mit dem Skalpell ausgeschnitten und in Wells gelegt, in denen je 10µl Verdünnungslösung für DB71 vorgelegt worden waren.

Die Waschschrte und der angeschlossene Verdau (mit Zusatz von Octylglycosid) liefen nach folgendem Schema ab:

Step	Description	Vol [ $\mu$ l]	Time [min]	Temp [ $^{\circ}$ C]	Cycles
1	Spülen mit DigBuff 25mM + 10%ACN	<b>180</b>	<b>15</b>	<b>21</b>	<b>10</b>
2	Destain	130	20	21	1
3	Wash with MilliQ	150	5	21	1
4	PVP	20	20	21	1
5	Wash with NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	150	5	21	2
6	Add Trypsin	17	0,1	21	1
7	Digest		480	37	1
8	Extraction (50%ACN)	30	30	21	1

Tab. 83: Verdauprotokoll Roti-Block, ECL und automatisiertes Spülen

Die verdauten Proben wurden auf HCCA-Matrix nach Jahn sowie auf DHB/Phosphorsäure-Matrix gemessen.

Verdünnung		1	1	2	2	3	4
GP Bde 1	SC %	15,1	18,2	10,3*	9,3*		
	Score	[76,2]	80,5				
GP Bde 2	SC %	17,9	26,5	3,4*			
	Score	107	189				
BSA	SC %	18,7	11,2*	2,1*			
	Score	[39,3]					
OV	SC %	19,2*	22,6*	16,6*	48,5	11,7*	
	Score				100		
CA	SC %	41,9*	38,6	21,5*	63,8	21,5*	
	Score		88,4		139		

Tab. 84: Ausgestanzte Spots und Ergebnisse des Verdaus von der **NC-Membran** nach ECL und automatisiertem Spülen, gemessen mit **DHB/Phosphorsäure-Matrix**.

Werte in Klammern stehen für Mowse Scores, die nicht mehr im statistisch signifikanten Bereich liegen. Für leere Felder konnte bei der Messung kein Spektrum erhalten werden. Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mithilfe des Programmes „Sequence Editor“ ermittelt, in diesem Fall liegt kein Mowse Score vor. Grau hinterlegt sind die auf der Membran nicht mehr anfärbaren Banden, die daher nicht ausgestochen werden konnten. GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase, SC: Sequenzabdeckung (%), Score: Mowse Score.

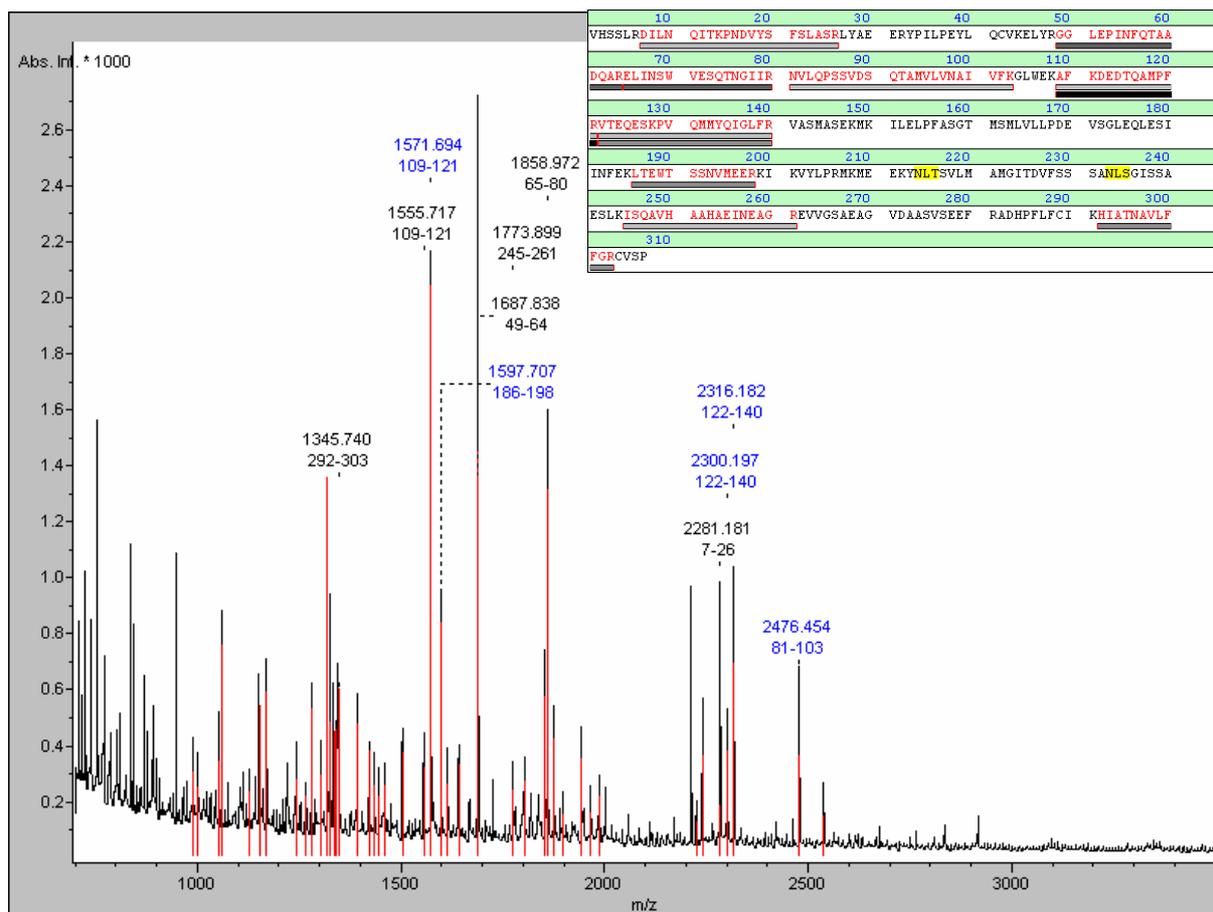


Abb. 66: Spektrum und Sequenzabdeckung von Ovalbumin, Verdünnung 2, verdaut nach ECL und automatisiertem Spülen von der NC-Membran, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix. Sequenzabdeckung 48,5%.

Verdünnung		1	1	2	2	3	4
GP Bde 1	SC %	6,7*	8,6*				
	Score						
GP Bde 2	SC %	7,8*	8,7*				
	Score						
BSA	SC %	10,4*					
	Score						
OV	SC %	7,3*	3,1*				
	Score						
CA	SC %	25,4*					
	Score						

Tab. 85: Ausgestanzte Spots und Ergebnisse des Verdaus von der **NC-Membran** nach ECL und automatisiertem Spülen, gemessen mit **HCCA-Matrix nach Jahn**.

Für leere Felder konnte bei der Messung kein Spektrum erhalten werden. Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mithilfe des Programmes „Sequence Editor“ ermittelt, in diesem Fall liegt kein Mowse Score vor. Grau hinterlegt sind die auf der Membran nicht mehr anfärbaren Banden, die daher nicht ausgestochen werden konnten. GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase, SC: Sequenzabdeckung (%), Score: Mowse Score.

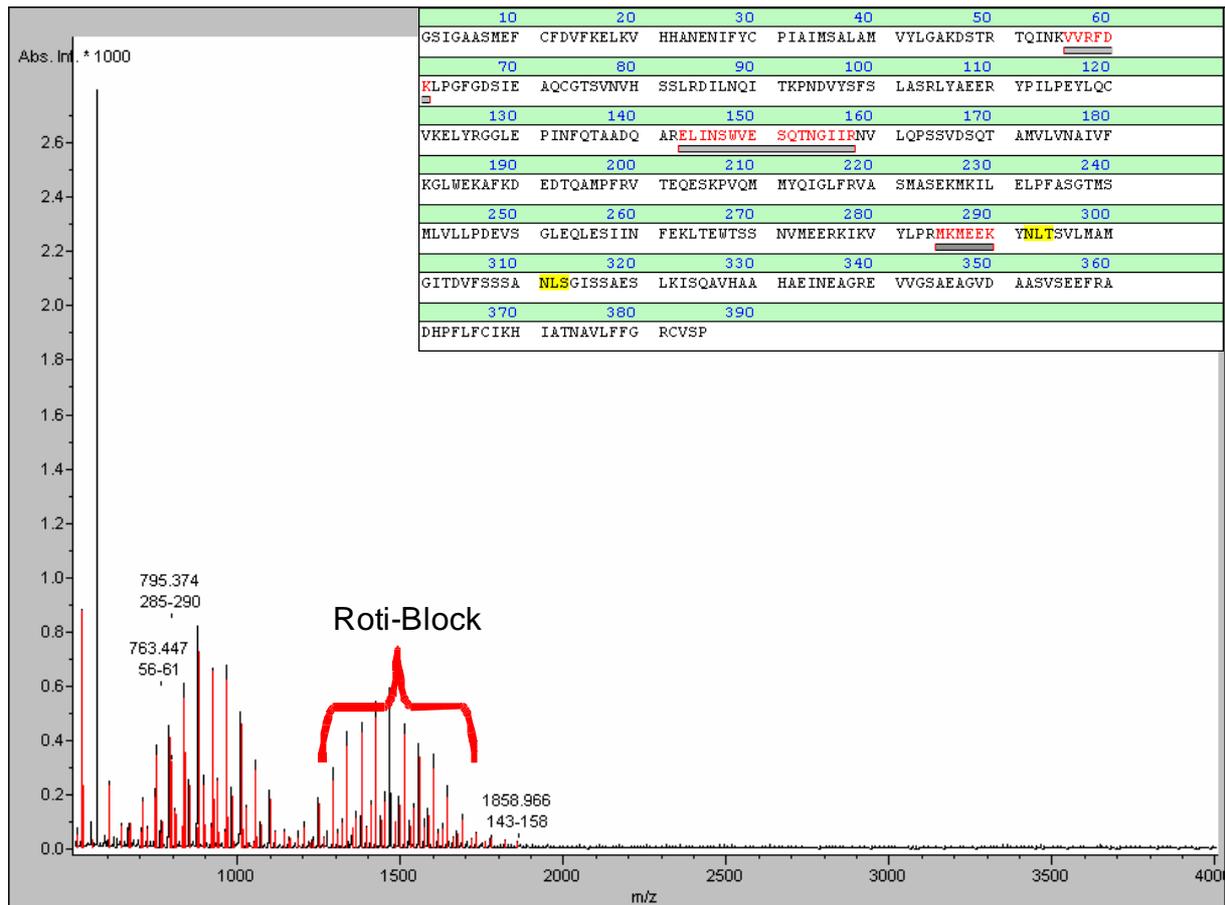


Abb. 67: Spektrum und Sequenzabdeckung von Ovalbumin, Verdünnung 1, verdaut nach ECL und automatisiertem Spülen von der NC-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn. Es sind zwei störende Cluster im Spektrum zu sehen, die auf den Roti-Block zurückzuführen sind.

Verdünnung		1	1	2	2	3	4
GP Bde 1	SC %	4,5*	19,9	10*	12,2*		
	Score		115				
GP Bde 2	SC %	9,1		8,8*	9*		
	Score	[70,4]					
BSA	SC %	12,5*	9,4*		4,3*		
	Score						
OV	SC %	13,8*		32,9	12,5*		
	Score			90,9			
CA	SC %	47,9	48,6	35,1	21,5*		
	Score	116	96	74,3			

Tab. 86: Ausgestanzte Spots und Ergebnisse des Verdaus von der **PVDF-Membran** nach ECL und automatisiertem Spülen, gemessen mit **DHB/Phosphorsäure-Matrix**.

Werte in Klammern stehen für Mowse Scores, die nicht mehr im statistisch signifikanten Bereich liegen. Für leere Felder konnte bei der Messung kein Spektrum erhalten werden. Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mithilfe des Programmes „Sequence Editor“ ermittelt, in diesem Fall liegt kein Mowse Score vor. Grau hinterlegt sind die auf der Membran nicht mehr anfärbaren Banden, die daher nicht ausgestochen werden konnten. GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase, SC: Sequenzabdeckung (%), Score: Mowse Score.

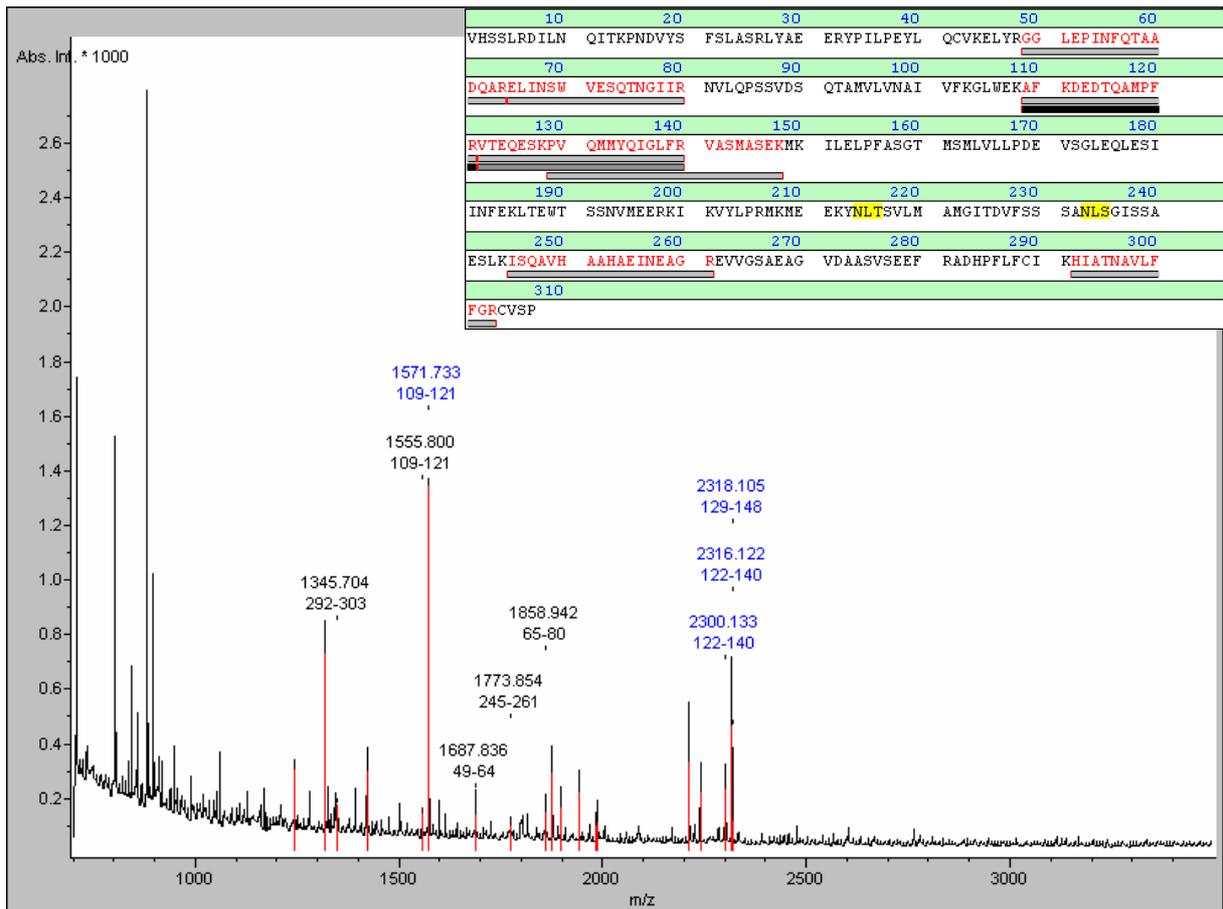


Abb. 68: Spektrum und Sequenzabdeckung von Ovalbumin, Verdünnung 2, verdaut nach ECL und automatisiertem Spülen von der PVDF-Membran, gemessen auf DHB/Phosphorsäure-Matrix. Sequenzabdeckung 32,9%.

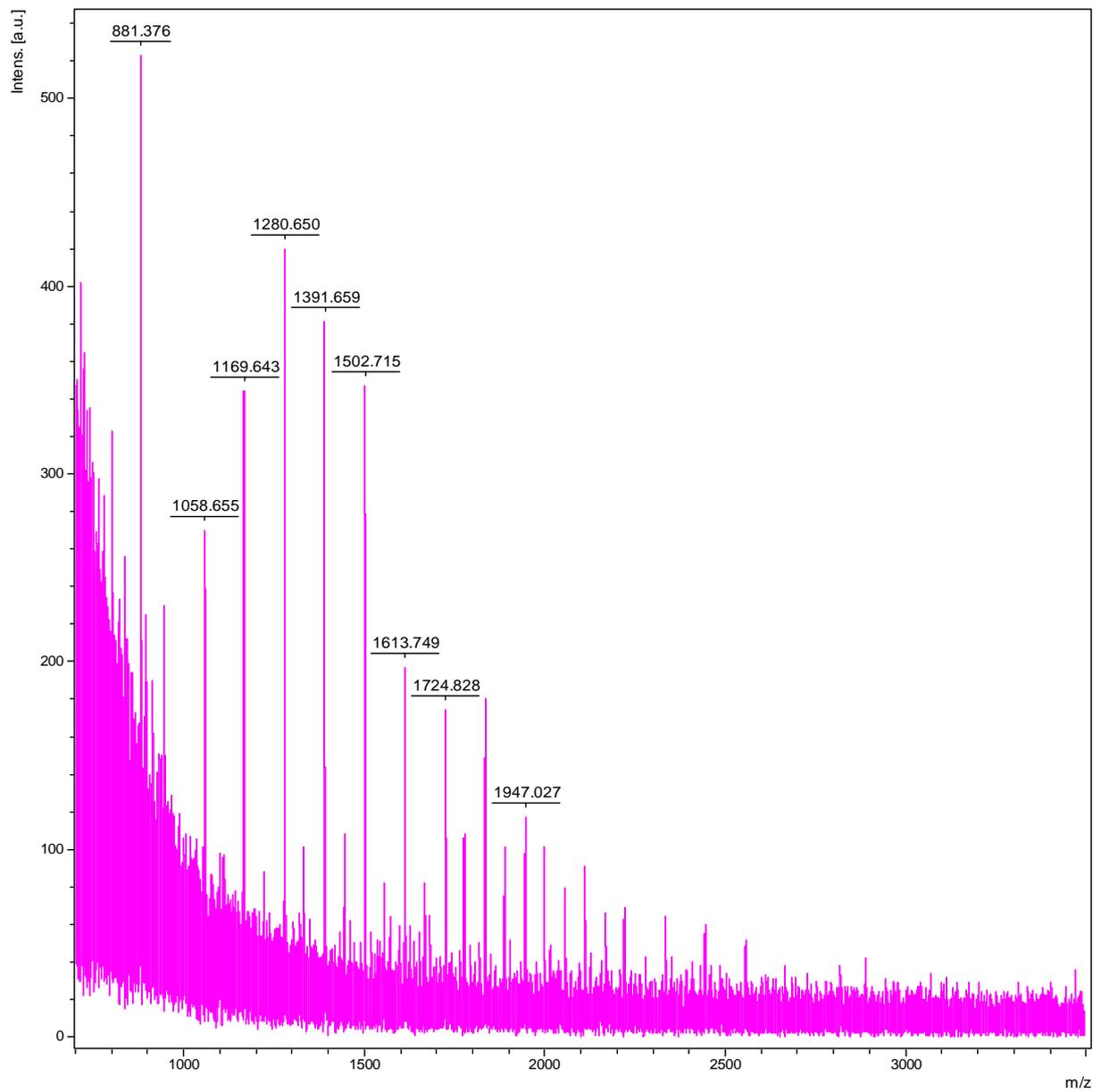


Abb. 69: Spektrum von Carboanhydrase, Verdünnung 3, verdaut nach ECL und automatisiertem Spülen von der PVDF-Membran, gemessen auf DHB/Phosphorsäure-Matrix. Das Spektrum wird überdeckt von Clustern des Roti-Block.

Verdünnung		1	1	2	2	3	4
GP Bde 1	SC %	6,4*	6*				
	Score						
GP Bde 2	SC %	7,2*					
	Score						
BSA	SC %	13,5*					
	Score						
OV	SC %	1,3*					
	Score						
CA	SC %	38,1*					
	Score						

Tab. 87: Ausgestanzte Spots und Ergebnisse des Verdau von der **PVDF-Membran** nach ECL und automatisiertem Spülen, gemessen mit **HCCA-Matrix nach Jahn**.

Für leere Felder konnte bei der Messung kein Spektrum erhalten werden. Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mithilfe des Programmes „Sequence Editor“ ermittelt, in diesem Fall liegt kein Mowse Score vor. Grau hinterlegt sind die auf der Membran nicht mehr anfärbaren Banden, die daher nicht ausgestochen werden konnten. GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase, SC: Sequenzabdeckung (%), Score: Mowse Score.

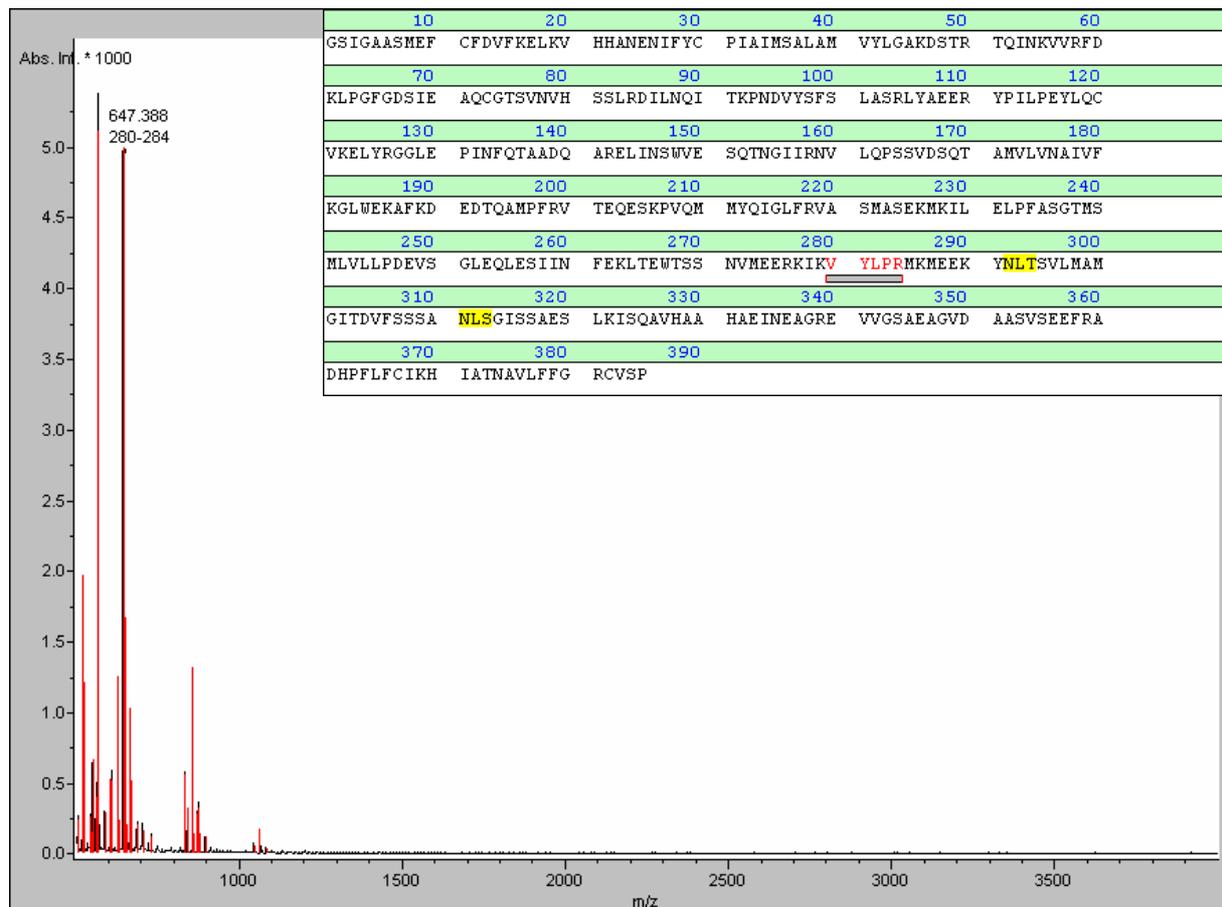


Abb. 70: Spektrum und Sequenzabdeckung von Ovalbumin, Verdünnung 1, verdaut nach ECL und automatisiertem Spülen von der NC-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix n. Jahn. Sequenzabdeckung 1,3%

Fazit:

Das automatisierte Spülen in Wells zeigte sich im Vergleich dem manuellen Spülen in Schalen unterlegen, wie die Anzahl und die Qualität der nach den automatisierten Waschschritten gemessenen Spektren zeigten. Der Roti-Block war in einigen Spektren noch deutlich als eine clusterartige Ansammlung von Peaks erkennbar.

### 3.3.3.3 Verdau nach Blockade mit Roti-Block, ECL und automatisiertem Spülen und Schütteln

Im Unterschied zu den automatisierten Waschschritten wurden bei den manuellen Waschschritten die Folien in Schalen gewaschen, die dabei geschüttelt wurden. Daher sollte in diesem Versuch ein automatisierter Waschvorgang erfolgen, während dem die ausgeschnittenen Membran-Streifen in ihren Wells auch geschüttelt werden sollten, so wie beim manuellen Waschen.

Wie in 3.3.1.1 wurden zwei Mini-Gele hergestellt und die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt, anschließend wurde je ein NC- bzw. PVDF-Elektroblot hergestellt.

Nach dem Blotten wurden die beiden Folien je in eine Schale mit Roti-Block (Verdünnung mit bidest. Wasser 1:10) gelegt und für 1 Stunde auf den Schüttler gestellt.

Die Inkubation mit den AK und die ECL erfolgten wie in den vorherigen Versuchen beschrieben.

Dann wurde jede Folie 5 mal mit bidest. Wasser gespült und mit DB71 gefärbt.

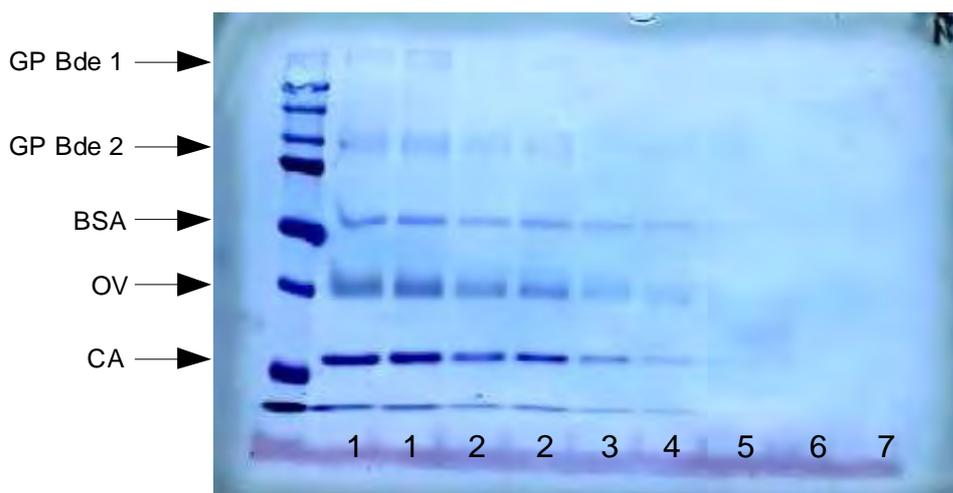


Abb. 71: NC-Folie nach ECL und Färbung mit DB71.

GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase, 1 – 7: Verdünnungen.

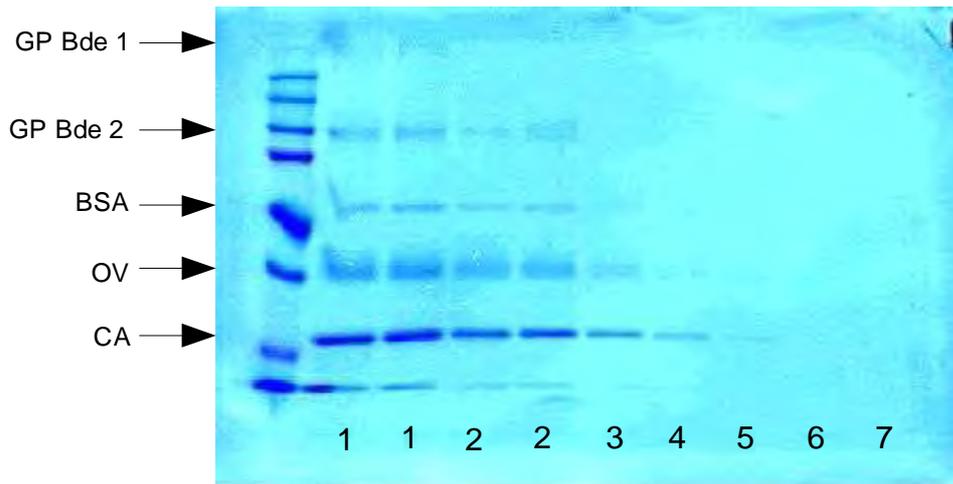


Abb. 72: PVDF-Folie nach ECL und Färbung mit DB71.  
 GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase, 1 – 7: Verdünnungen.

Alle sichtbaren Banden wurden mit dem Skalpell halb ausgeschnitten und in einer Well-Platte mit vorgelegten 10µl Verdünnungslösung für DB71 plaziert.

Die Folienstückchen wurden vom Digester mit Verdaupuffer 25mM + 10% ACN gewaschen.

Waschschritte und Verdau liefen nach folgendem Protokoll ab:

Step	Description	Vol [µl]	Time [min]	Temp [°C]	Cycles
1	<b>Wash with DigBuff 25mM + 10%ACN</b>	<b>200</b>	<b>6</b>	<b>21</b>	<b>9</b>
2	Destain	130	20	21	1
3	Wash with MilliQ	150	5	21	1
4	Block with PVP	20	20	21	1
5	Wash with NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	150	5	21	2
6	Add Trypsin	17	0,1	21	1
7	Digest		480	37	1
8	Extraction (50% ACN)	30	30	21	1

Tab. 88: Verdauprotokoll ECL + automatisiertes Spülen mit Schütteln

Die Proben wurden anschließend auf HCCA-Matrix nach Jahn sowie auf DBH/Phosphorsäure-Matrix gemessen.

Verdünnung		1	1	2	2	3	4	5	6	7
GP Bde 1	SC %	2*		3*		4,3*				
	Score									
GP Bde 2	SC %	16,1*	2*	3*	4*					
	Score									
BSA	SC %	10,4*	12,4*	6,6*	8,6*					
	Score									
OV	SC %	36,8	27,4	15,1*	28,7					
	Score	115	[73,6]		[64,9]					
CA	SC %	57,9	45,6	35,9						
	Score	120	103	[77,4]						

Tab. 89: Sequenzabdeckungen (SC %) und Mowse Scores (Score) des Verdauung nach automatisiertem Waschen mit Schütteln von der **NC-Membran**, gemessen mit **HCCA-Matrix nach Jahn**.

Werte in Klammern stehen für Mowse Scores, die nicht mehr im statistisch signifikanten Bereich liegen. Für leere Felder konnte bei der Messung kein Spektrum erhalten werden. Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mithilfe des Programmes „Sequence Editor“ ermittelt, in diesem Fall liegt kein Mowse Score vor. Grau hinterlegt sind die auf der Membran nicht mehr anfärbaren Banden, die daher nicht ausgestochen werden konnten. GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase.

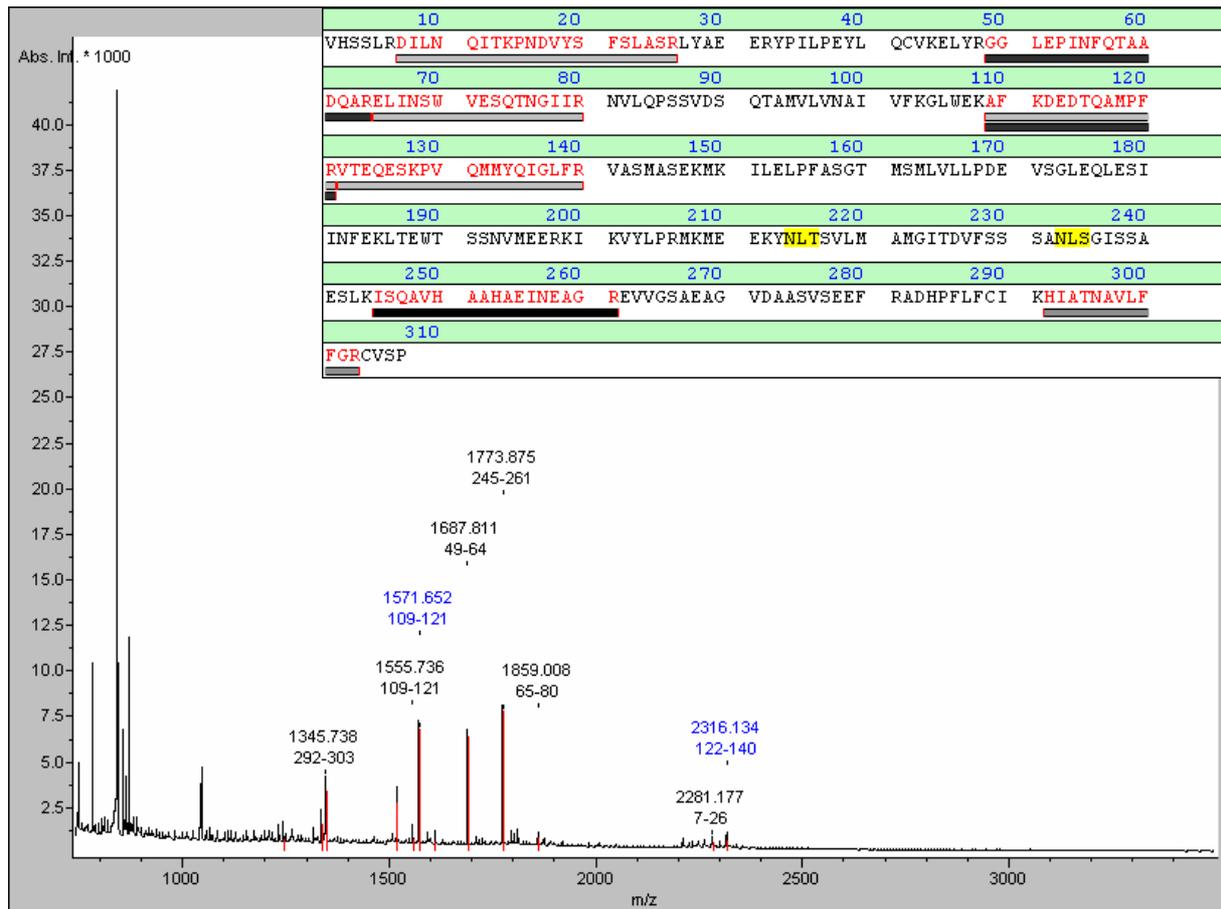


Abb. 73: Spektrum und Sequenzabdeckung von Ovalbumin, Verdünnung 1, verdaut nach automatisiertem Waschen mit Schütteln von der NC-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn. Sequenzabdeckung 36,8%.

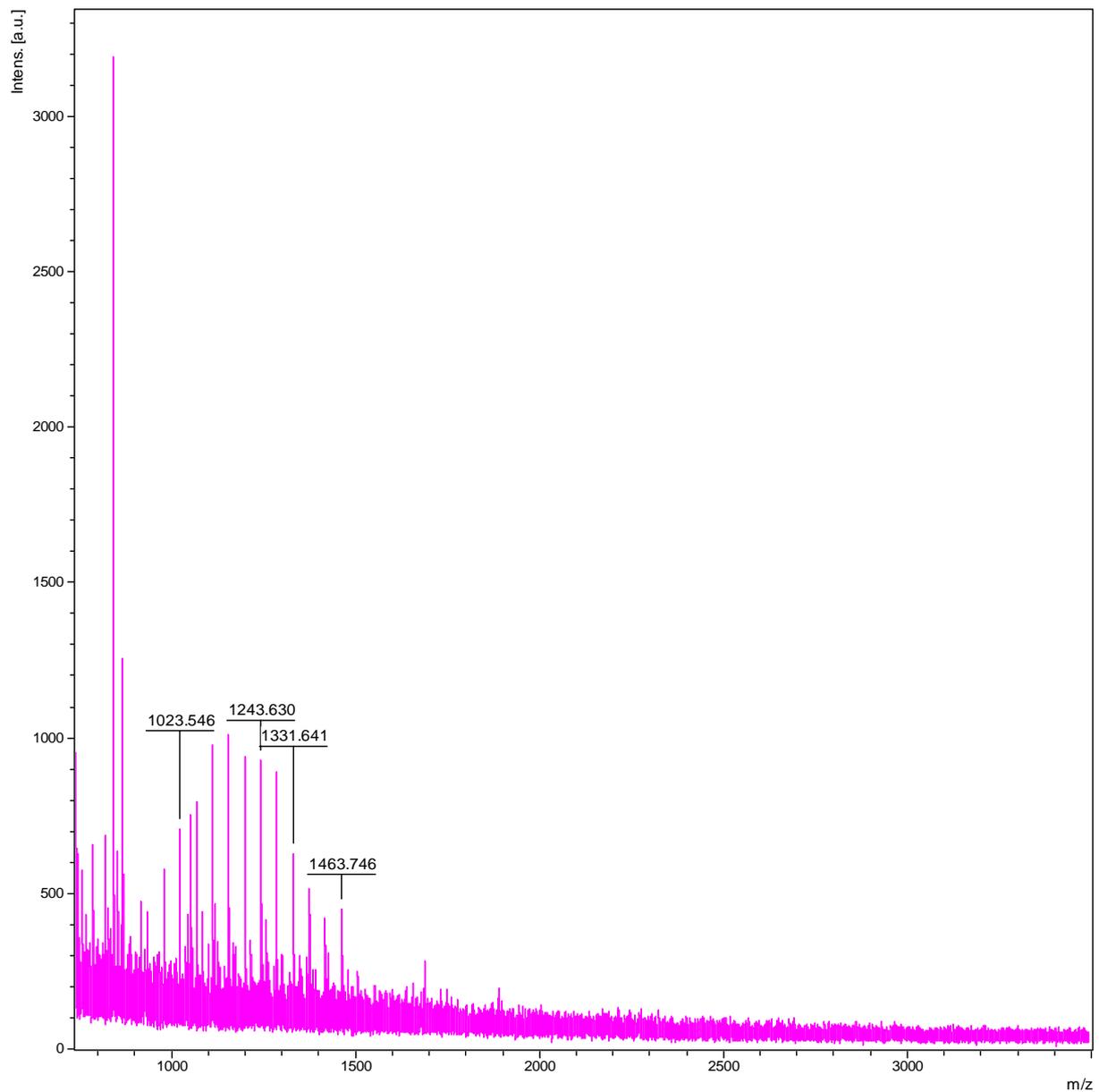


Abb. 74: Spektrum von Glycogenphosphorylase, Verdünnung 1, verdaut nach automatisiertem Waschen mit Schütteln von der NC-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn. Sequenzabdeckung 2%. Aufgrund der vielen störenden Cluster des Roti-Block ergab sich nur eine sehr niedrige Sequenzabdeckung.

Verdünnung		1	1	2	2	3	4	5	6	7
GP Bde 1	SC %	27,2	16,6	12,2	5,3*	1,9*				
	Score	169	122	76,3						
GP Bde 2	SC %	40,5	49,9	21,5	16,9		6,3*			
	Score	271	344	132	120					
BSA	SC %	30	16,5	11,5	10,4	18,9	16,3			
	Score	170	122	88	[68,9]	117	87,1			
OV	SC %	42,1	48,5	48,5	44,3	27		11,7*		
	Score	122	97	125	107	87,8				
CA	SC %	50,6	57,9	30	65,3	16,5*	23,5	26,9	15*	
	Score	97,4	135	[57,8]	180		[55,6]	[50,4]		

Tab. 90: Sequenzabdeckungen (SC %) und Mowse Scores (Score) des Verdaus nach automatisiertem Waschen mit Schütteln von der **NC-Membran**, gemessen mit **DHB/Phosphorsäure-Matrix**.

Werte in Klammern stehen für Mowse Scores, die nicht mehr im statistisch signifikanten Bereich liegen. Für leere Felder konnte bei der Messung kein Spektrum erhalten werden. Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mithilfe des Programmes „Sequence Editor“ ermittelt, in diesem Fall liegt kein Mowse Score vor. Grau hinterlegt sind die auf der Membran nicht mehr anfärbbaren Banden, die daher nicht ausgestochen werden konnten. GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase.

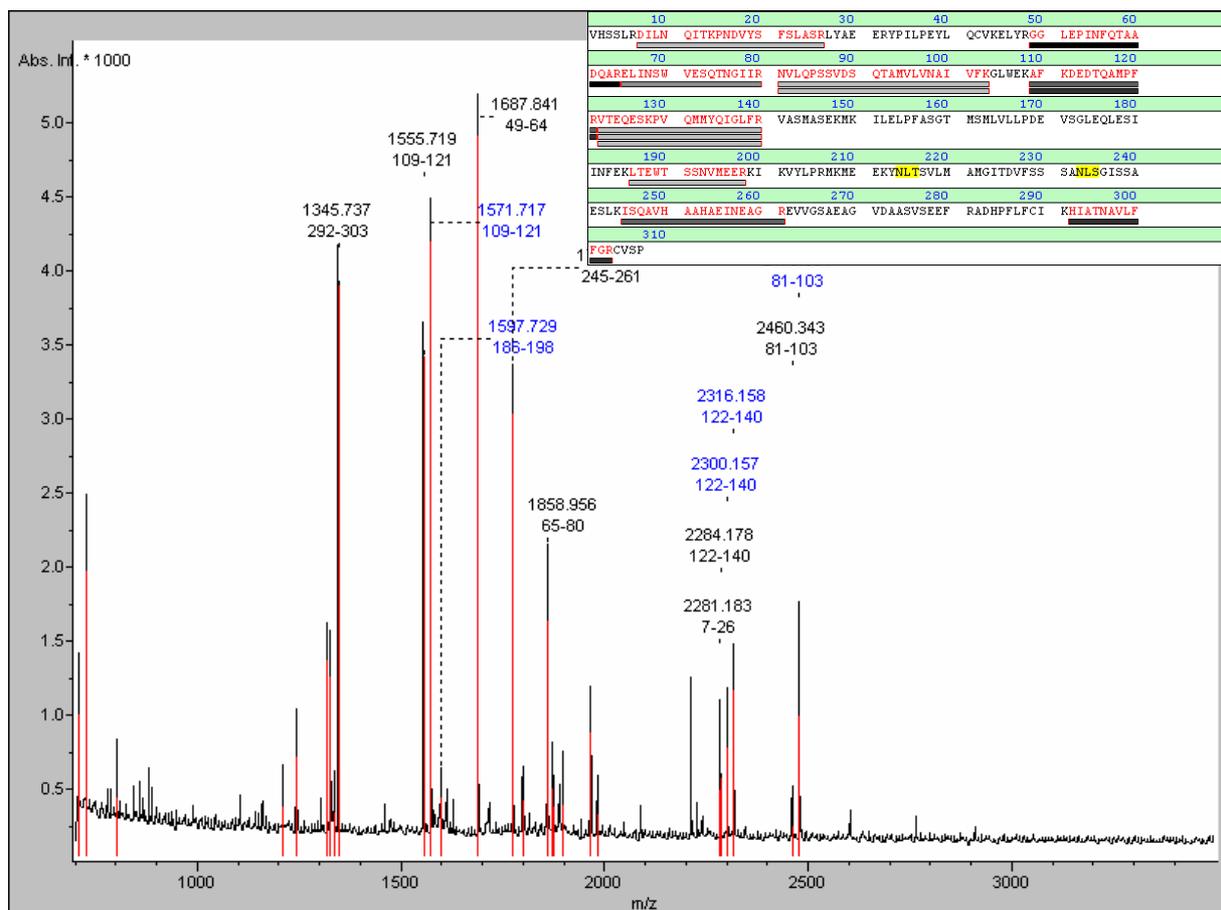


Abb. 75: Spektrum von Ovalbumin, Verdünnung 2, verdaut nach automatisiertem Waschen mit Schütteln von der NC-Membran, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix. Sequenzabdeckung 48,5%.

Verdünnung		1	1	2	2	3	4	5
GP Bde 1	SC %							
	Score							
GP Bde 2	SC %							
	Score							
BSA	SC %							
	Score							
OV	SC %							
	Score							
CA	SC %	32,4	35,9	40,9	44,4			
	Score	[75,4]	93,5	93,3	116			

Tab. 91: Sequenzabdeckungen (SC %) und Mowse Scores (Score) des Verdaus nach automatisiertem Waschen mit Schütteln von der **PVDF-Membran**, gemessen mit **HCCA-Matrix nach Jahn**.

Werte in Klammern stehen für Mowse Scores, die nicht mehr im statistisch signifikanten Bereich liegen. Für leere Felder konnte bei der Messung kein Spektrum erhalten werden. Grau hinterlegt sind die auf der Membran nicht mehr anfärbaren Banden, die daher nicht ausgestochen werden konnten. GP Bde1:

Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase.

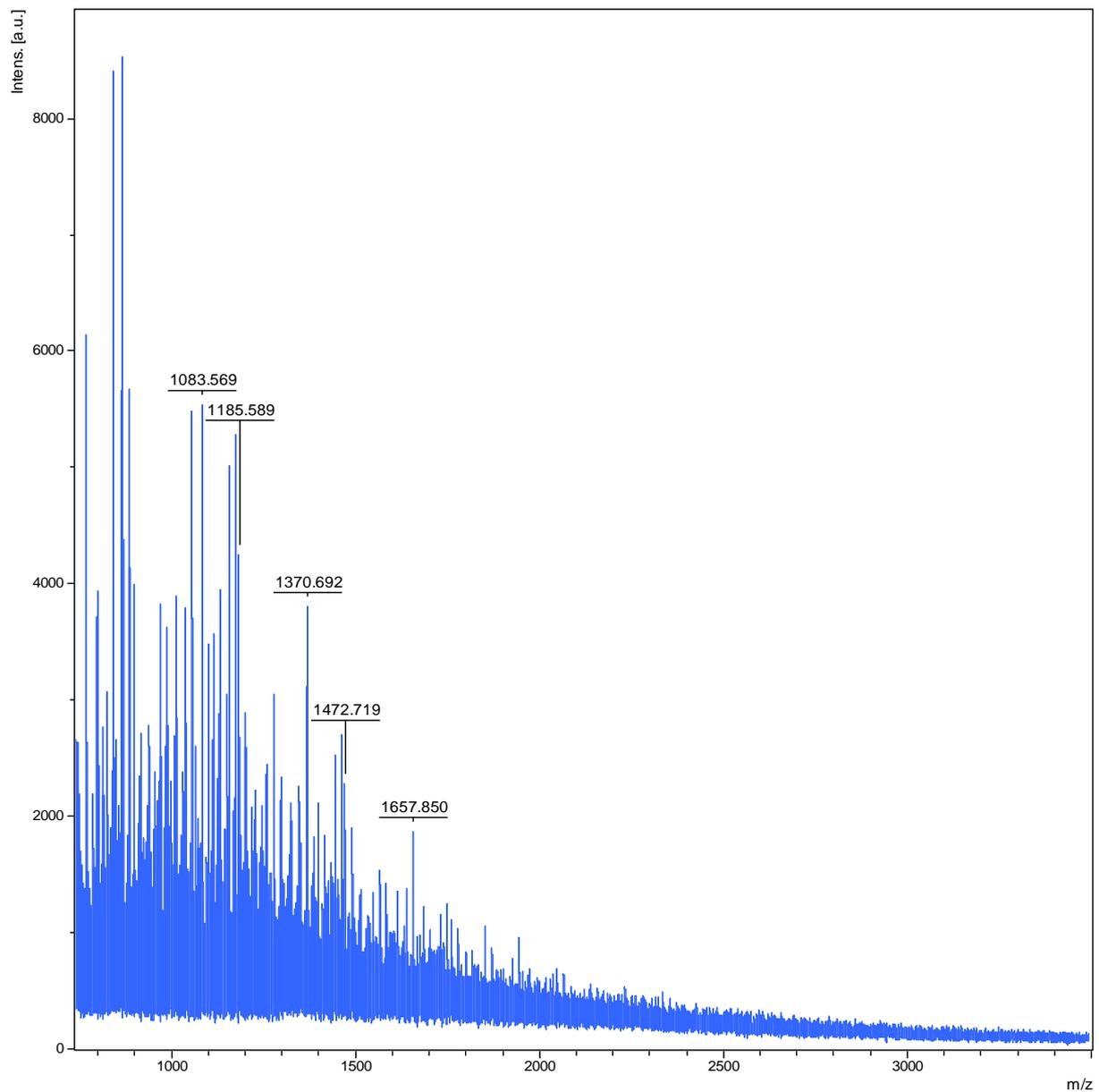


Abb. 76: Spektrum von Ovalbumin, Verdünnung 1, verdaut nach automatisiertem Waschen mit Schütteln von der PVDF-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn. Eine Sequenzabdeckung konnte aufgrund der störenden Cluster des Roti-Block nicht ermittelt werden.

Verdünnung		1	1	2	2	3	4	5
GP Bde 1	SC %							
	Score							
GP Bde 2	SC %	4,5*	20,3					
	Score		135					
BSA	SC %	5,6*	13,5	4,6*	8,6*			
	Score		[54,5]					
OV	SC %	34,3	32,7	4,4*	12,5*			
	Score	84,6	87,5					
CA	SC %	54,4	45,6	39	37,5	30,5	23,5*	
	Score	105	83,3	91,6	99,6	86,6		

Tab. 92: Sequenzabdeckungen (SC %) und Mowse Scores (Score) des Verdaus nach automatisiertem Waschen mit Schütteln von der **PVDF-Membran**. Gemessen mit **DHB/Phosphorsäure-Matrix**.

Werte in Klammern stehen für Mowse Scores, die nicht mehr im statistisch signifikanten Bereich liegen. Für leere Felder konnte bei der Messung kein Spektrum erhalten werden. Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mithilfe des Programmes „Sequence Editor“ ermittelt, in diesem Fall liegt kein Mowse Score vor. Grau hinterlegt sind die auf der Membran nicht mehr anfärbbaren Banden, die daher nicht ausgestochen werden konnten. GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase.

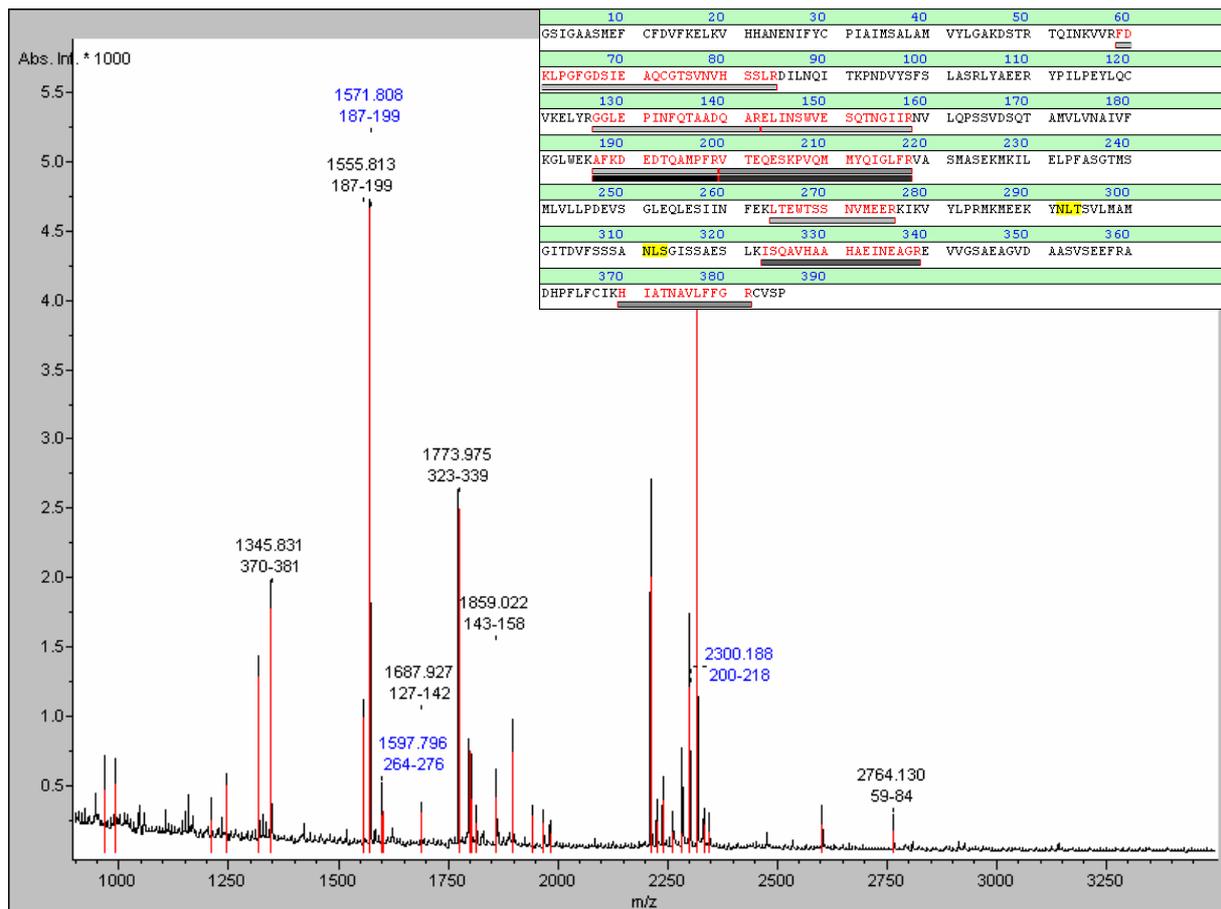


Abb. 77: Spektrum von Ovalbumin, Verdünnung 1, verdaut nach automatisiertem Waschen mit Schütteln von der PVDF-Membran, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix. Sequenzabdeckung 34,3%.

#### Fazit:

Ob während der vor dem Verdau stattfindenden Waschschritte die Mikrotiterplatte vom Roboter geschüttelt wurde oder nicht, schlug sich in den Messungen mit HCCA-Matrix nach Jahn geringgradig nieder. Es wurden leichte Verbesserungen einzelner Sequenzabdeckungen festgestellt. Dies betraf vor allem die Ergebnisse von der NC-Membran – hier konnten im Gegensatz zur Waschvariante ohne Schütteln u.a. für Ovalbumin auch von Verdünnung 2 Spektren erhalten werden.

Spektren des Verdaus von der PVDF-Membran waren sowohl in dem Versuch mit als auch in dem ohne Schütteln nur lückenhaft zu erhalten, wobei sich in beiden Versuchen teils noch Roti-Block-Cluster in einzelnen Spektren zeigten.

Im Vergleich zu dem Verdau nach manuellem Waschen zeigte der Verdau nach automatischem Waschen mit Schütteln keine auffälligen Unterschiede; lediglich die Ergebnisse des Verdaus von der PVDF-Membran gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn waren beim manuellen Waschen besser – hierbei war insgesamt eine größere Anzahl an Spektren zu erhalten.

Zusammenfassend war festzustellen, daß die in den Waschablauf eingebauten Schüttelschritte eine leichte Verbesserung der Verdauergebnisse bewirkten und es wurde somit entschieden, sie beizubehalten.

#### **3.3.3.4 Verdau nach Blockade mit Roti-Block, ECL und manuellem Spülen in Schalen mit DB71-Verdünnungslösung**

Ein anderes Problem hatte sich bei der Anfärbung der Proteinbanden mit Direct Blue nach dem mehrfachen Waschen der Folien mit Verdaupuffer ergeben: Die Banden mit dem stärker verdünnten Proteingemisch ließen sich nur noch relativ schlecht anfärben, so daß es ab Verdünnung 3 schwierig wurde, die Banden zu erkennen, was ein Ausschneiden von Membran-Streifen unmöglich machte. Wurden die Banden direkt nach dem Elektro-Blot mit Direct Blue angefärbt, ergab sich dieses Problem nicht.

Da der Verdaupuffer, der zum Waschen der Membranen nach der ECL benutzt wurde, alkalisch war, die Direct Blue-Farbe aber sauer, sollte in diesem Versuch herausgefunden werden, ob nach dem Waschen der Membranen nach der ECL mit der sauren DB71-Verdünnungslösung die Membranen besser anfärbbar wären bzw. ob die Veränderung der Spülflüssigkeit einen Einfluß auf den Verdauergebnisse haben würde. Gewaschen wurden die Membranen in diesem Versuch manuell.

Es wurden hierzu zwei Mini-Gele gegossen, die Proteine darin elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend die Elektro-Blots hergestellt.

Nach dem Blotten wurden die beiden Folien je in eine Schale mit Roti-Block (Verdünnung mit bidest. Wasser 1:10) gelegt und für 2 Stunden auf den Schüttler gestellt.

Es erfolgte die Inkubation mit den beiden AK, anschließend die ECL in der Dunkelkammer.

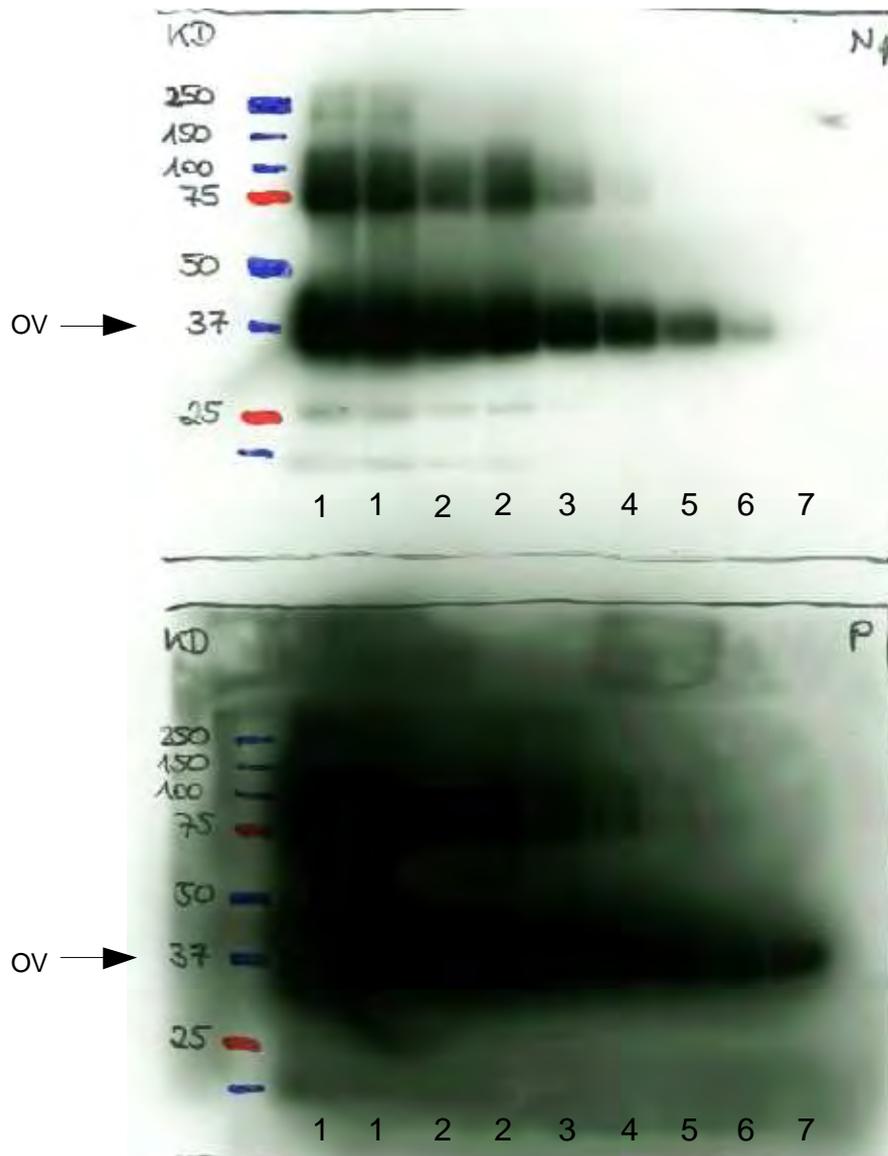


Abb. 78: Röntgenfilm mit geschwärzten Banden an den Stellen der leuchtenden Banden auf den Blot-Membranen als Ergebnis der ECL.  
 N: Abdruck von der NC-Membran, P: Abdruck von der PVDF-Membran.  
 OV: Ovalbumin, 1 – 7: Verdünnungen.

Danach wurde jede Folie 5 mal für einige Sekunden mit bidest. Wasser gespült und anschließend mit DB71 gefärbt.



Abb. 79: NC-Folie nach Behandlung mit Roti-Block, ECL, Waschen mit DB71-Entfärber.  
 GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase, 1 – 7: Verdünnungen.

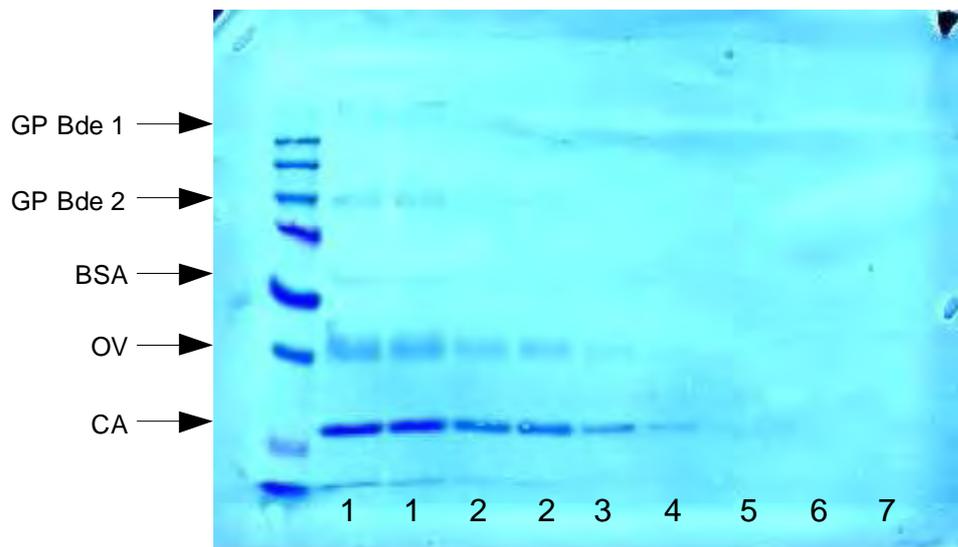


Abb. 80: PVDF-Folie nach Behandlung mit Roti-Block, ECL, Waschen mit DB71-Entfärber.  
 GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase, 1 – 7: Verdünnungen.

Dann wurde jede Folie 10 x 5 Minuten in eine Schale mit saurer DB71-Verdünnungslösung gelegt und auf den Schüttler gestellt.

Alle sichtbaren Banden wurden zur Hälfte mit dem Skalpell ausgeschnitten und in Wells mit vorgelegten 70µl Verdünnungslösung für DB71 gelegt. Der Verdau der Membranstückchen erfolgte nach folgendem Protokoll:

Step	Description	Vol [ $\mu$ l]	Time [min]	Temp [ $^{\circ}$ C]	Cycles
1	Destain	130	20	21	1
2	Wash with MilliQ	150	5	21	1
3	Block with PVP	20	20	21	1
4	Wash with NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	150	5	21	2
5	Add Trypsin	17	0,1	21	1
6	Digest		480	37	1
7	Extraction (50% ACN)	30	30	21	1

Tab. 93: Verdauprotokoll ECL + manuelles Spülen mit DB71-Verdünnungslösung

Die verdauten Proben wurden massenspektrometrisch mit HCCA-Matrix nach Jahn sowie mit DHB/Phosphorsäure-Matrix gemessen.

Verdünnung		1	1	2	2	3	4	5
GP Bde1	SC %	9,4*	18,6*					
	Score							
GP Bde2	SC %	38,4	3,7*					
	Score	220						
BSA	SC %	16,3	7,9*			8,6*		
	Score	[68,9]						
OV	SC %	30,3	24,1	7,5*	7,5*			
	Score	[66,6]	[47,9]					
CA	SC %	62,5	40,5	32	32	34,4		
	Score	152	95,2	[75,5]	90,9	[60,2]		

Tab. 94: Sequenzabdeckungen (SC %) und Mowse Scores (Score) des Verdaus nach Waschen mit DB71 von der **NC-Membran**, gemessen mit **HCCA-Matrix nach Jahn**.

Werte in Klammern stehen für Mowse Scores, die nicht mehr im statistisch signifikanten Bereich liegen. Für leere Felder konnte bei der Messung kein Spektrum erhalten werden. Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mithilfe des Programmes „Sequence Editor“ ermittelt, in diesem Fall liegt kein Mowse Score vor. Grau hinterlegt sind die auf der Membran nicht mehr anfärbbaren Banden, die daher nicht ausgestochen werden konnten. GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase.

Verdünnung		1	1	2	2	3	4	5
GP Bde1	SC %	22,1	22,8	2,5*	3,2*			
	Score	121	183					
GP Bde2	SC %	27,1	30	10,8*	4,5*			
	Score	195	215					
BSA	SC %	12	4,6*	5,8*	10,5	5,8*	9,4*	
	Score	[59,6]			[53,7]			
OV	SC %	39,4	36,8	24,1	7,5*	18,9		
	Score	86,1	55,9	[62,2]		[51,3]		
CA	SC %	32,4	37,5	53,8	15*	24,2*	37,5	
	Score	68,3	78,5	142			91,9	

Tab. 95: Sequenzabdeckungen (SC %) und Mowse Scores (Score) des Verdaus nach Waschen mit DB71 von der NC-Membran, gemessen mit DHB/Phosphorsäure-Matrix.

Werte in Klammern stehen für Mowse Scores, die nicht mehr im statistisch signifikanten Bereich liegen. Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mithilfe des Programmes „Sequence Editor“ ermittelt, in diesem Fall liegt kein Mowse Score vor. Grau hinterlegt sind die auf der Membran nicht mehr anfärbaren Banden, die daher nicht ausgestochen werden konnten. GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase.

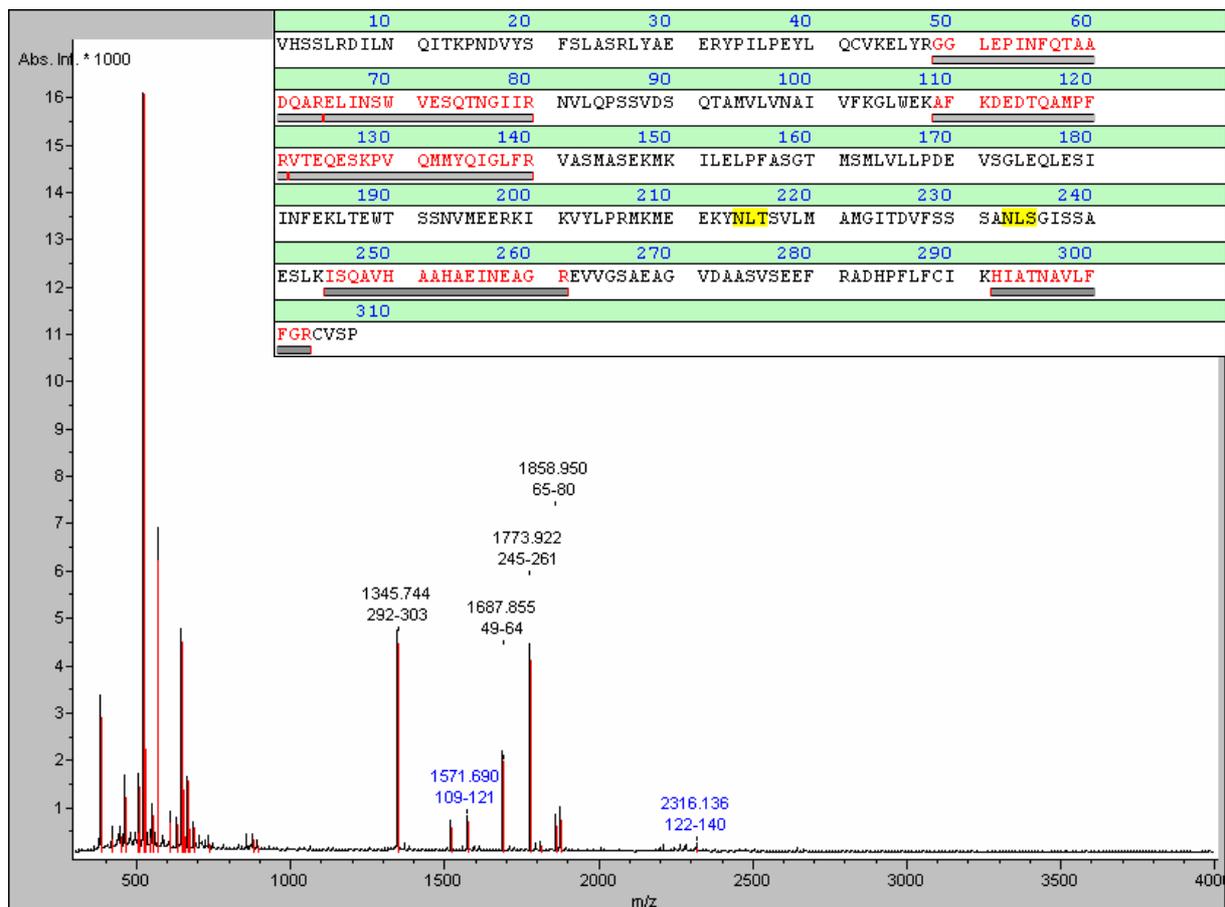


Abb. 81: Spektrum von Ovalbumin, Verdünnung 1, verdaut nach Waschen mit DB71 von der NC-Membran, gemessen auf HCCA-Matrix nach Jahn. Sequenzabdeckung 30,3%.

Verdünnung		1	1	2	2	3	4	5
GP Bde1	SC %							
	Score							
GP Bde2	SC %							
	Score							
BSA	SC %							
	Score							
OV	SC %	11,7*	11,7*					
	Score							
CA	SC %	42,9	42,7*					
	Score	81,6						

Tab. 96: Sequenzabdeckungen (SC %) und Mowse Scores (Score) des Verdaus nach Waschen mit DB71 von der **PVDF-Membran**, gemessen mit **HCCA-Matrix nach Jahn**.

Für leere Felder konnte bei der Messung kein Spektrum erhalten werden. Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mithilfe des Programmes „Sequence Editor“ ermittelt, in diesem Fall liegt kein Mowse Score vor. Grau hinterlegt sind die auf der Membran nicht mehr anfärbbaren Banden, die daher nicht ausgestochen werden konnten. GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase.

Verdünnung		1	1	2	2	3	4	5
GP Bde1	SC %	3,4*						
	Score							
GP Bde2	SC %							
	Score							
BSA	SC %							
	Score							
OV	SC %	29,3	22,1*	22,9*	36,8			
	Score	[64,2]			98,6			
CA	SC %	37,5	32,8	25,1	31,7	40,9		
	Score	[86,9]	[63,4]	[58,2]	81	96,9		

Tab. 97: Sequenzabdeckungen (SC %) und Mowse Scores (Score) des Verdaus nach Waschen mit DB71 von der **PVDF-Membran**, gemessen mit **DHB/Phosphorsäure-Matrix**.

Werte in Klammern stehen für Mowse Scores, die nicht mehr im statistisch signifikanten Bereich liegen. Für leere Felder konnte bei der Messung kein Spektrum erhalten werden. Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mithilfe des Programmes „Sequence Editor“ ermittelt, in diesem Fall liegt kein Mowse Score vor. Grau hinterlegt sind die auf der Membran nicht mehr anfärbbaren Banden, die daher nicht ausgestochen werden konnten. GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase.

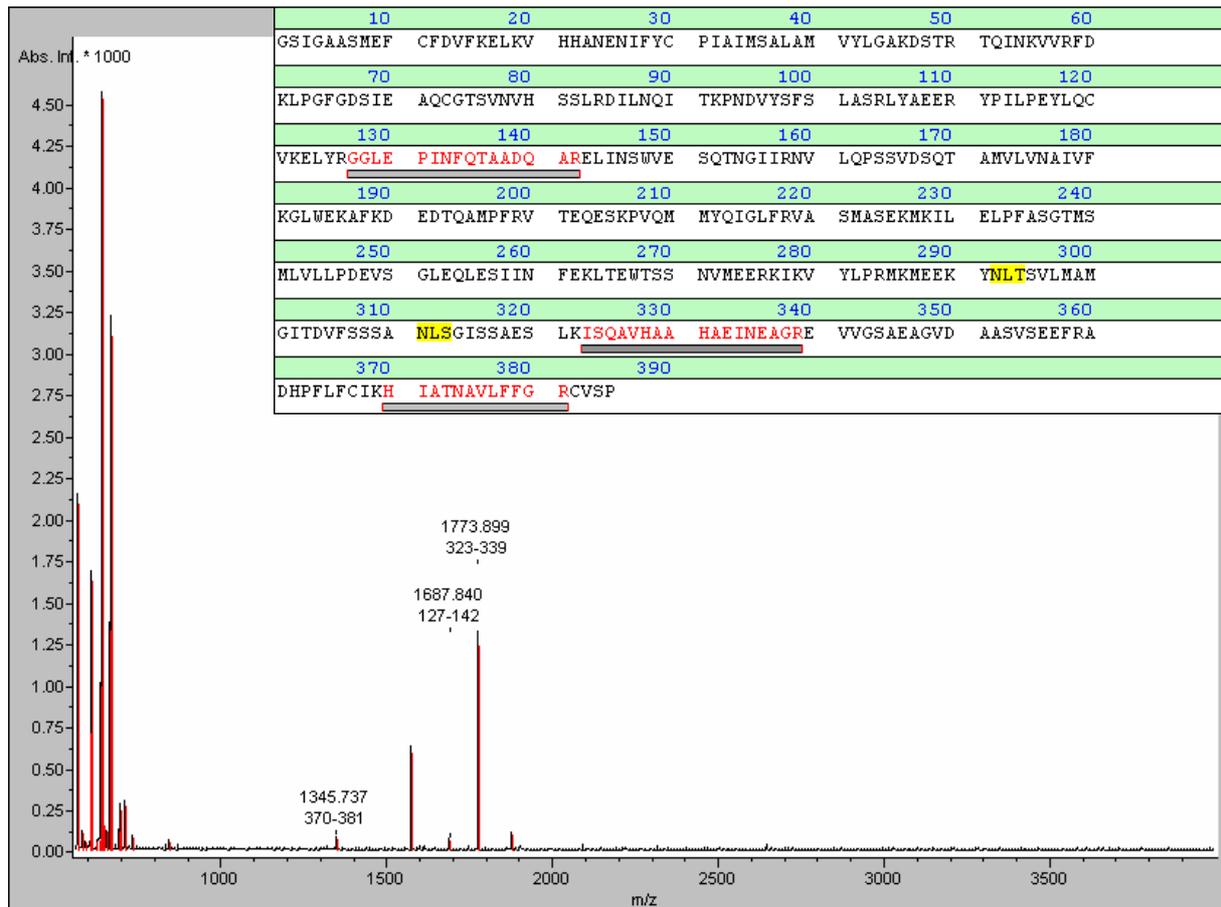


Abb. 82: Spektrum von Ovalbumin, Verdünnung 1, verdaut nach Waschen mit DB71 von der PVDF-Membran, gemessen auf HCCA-Matrix nach Jahn. Sequenzabdeckung 11,7%.

#### Fazit:

Nach 10maligem Spülen mit saurer DB71-Verdünnungslösung waren die Proteinbanden auf den Membranen nicht besser als nach Spülen mit alkalischem Verdaupuffer in 3.3.3.1. In der Anzahl und der Qualität der nach dem Verdau gemessenen Spektren, insbesondere den Verdau der Ovalbumin-Proteinbanden betreffend, zeigte sich im Vergleich zum Spülen mit Verdaupuffer keine Verbesserung, weshalb letztere Variante im Folgenden beibehalten wurde.

Als optimales Waschprotokoll für den Roboter wurde das Protokoll aus 3.3.3.3, also ein 9maliges Waschen mit 200µl Verdaupuffer pro Well inklusive Schütteln der Mikrotiterplatte favorisiert.

### 3.3.3.5 Verdau nach ECL und Blocking mit PVP

In diesem Versuch sollte herausgefunden werden, ob es möglich wäre, die Antikörper-Bindungsstellen auf den Blot-Membranen vor der Durchführung der ECL anstatt mit Roti-Block mit PVP zu blockieren. Dies hätte den Vorteil des vollständigen Wegfallens der bei der Verwendung von Roti-Block nötigen anschließenden Waschschrirte mit Verdaupuffer nach der ECL, da das PVP die massenspektrometrische Messung nicht beeinflussen dürfte.

Hierzu wurden wieder zwei Mini-Gele gegossen und Elektro-Blots hergestellt.

Nach dem Blotten wurden die Folien je in eine Schale mit PVP-Lösung (1000mg PVP, 400ml bidest. Wasser, 400µl Essigsäure) gelegt und für 2 Stunden auf den Schüttler gestellt.

Die Inkubation mit den AK und die ECL erfolgten nach bekanntem Schema.

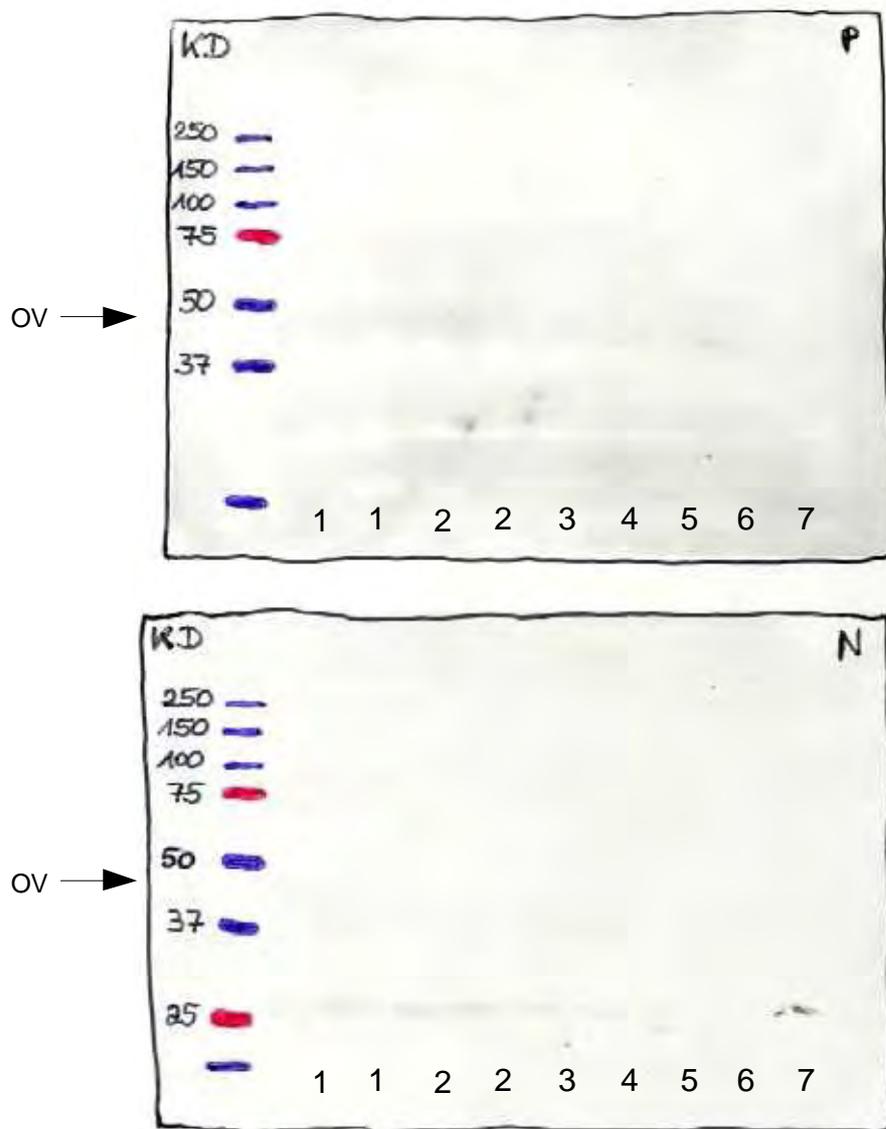


Abb. 83: Röntgenfilm nach Blockade durch PVP und anschließender ECL. Es sind keine Banden auf dem Röntgenfilm sichtbar geworden. N: Abdruck von der NC-Membran, P: Abdruck von der PVDF-Membran. OV: Ovalbumin, 1 – 7: Verdünnungen.

Die Folien wurden aus der Einschweißung genommen und 3 mal einige Sekunden lang mit bidest. Wasser gespült, anschließend mit DB71 gefärbt.

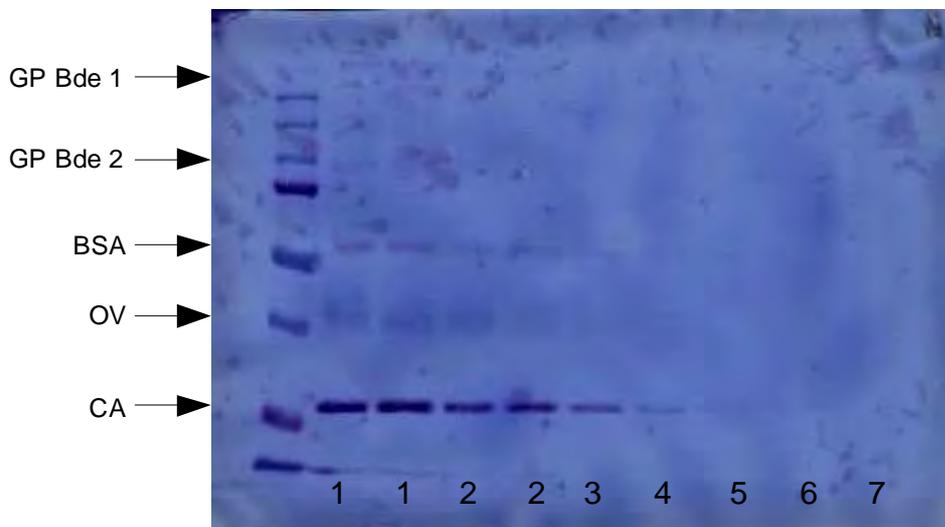


Abb. 84: NC-Folie nach Blockade mit PVP, ECL und Färbung mit DB71.  
 GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase, 1 – 7: Verdünnungen.

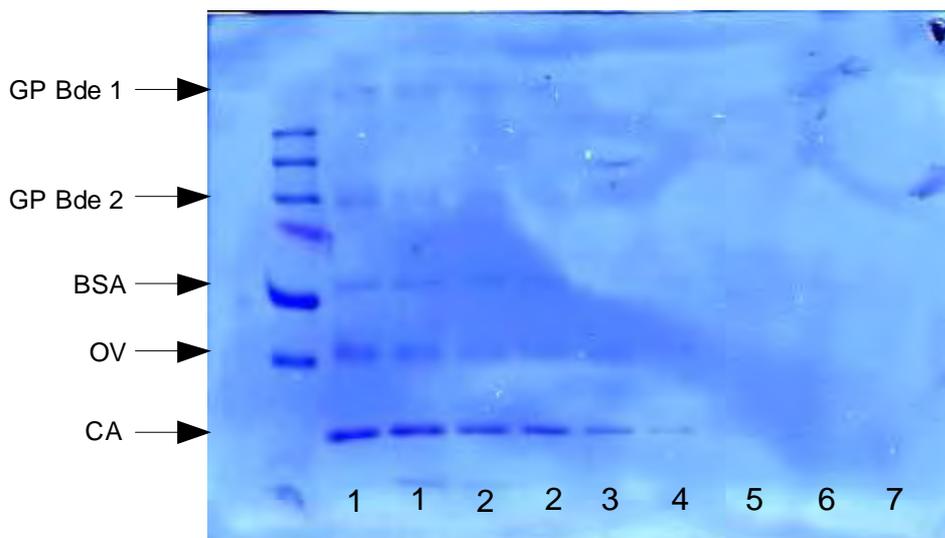


Abb. 85: PVDF-Folie nach Blockade mit PVP, ECL und Färbung mit DB71.  
 GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase, 1 – 7: Verdünnungen.

Von allen sichtbaren Banden auf den gefärbten Folien wurden halbe Banden mit dem Skalpell ausgeschnitten und in Wells mit je 70µl Verdünnungslösung für DB71 gelegt.

Der Verdau erfolgte nach folgendem Schema:

Step	Description	Vol [ $\mu$ l]	Time [min]	Temp [ $^{\circ}$ C]	Cycles
1	Destain	130	20	21	1
2	Wash with MilliQ	150	5	21	1
3	Block with PVP	20	20	21	1
4	Wash with NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	150	5	21	2
5	Add Trypsin	17	0,1	21	1
6	Digest		480	37	1
7	Extraction (50% ACN)	30	30	21	1

Tab. 98: Verdauprotokoll ECL + Blocking mit PVP

Die Messung der Proben erfolgte auf einer HCCA-Matrix nach Jahn.

Verdünnung		1	1	2	2	3	4	5	6	7
GP Bde1	SC %		1,4*							
	Score									
GP Bde2	SC %	7,1*								
	Score									
BSA	SC %	11,5*	11,5	6,3*						
	Score		88							
OV	SC %	33,6	18,9	24,1	19,9					
	Score	83,5	[51,4]	85,1	[56,6]					
CA	SC %	40,5	37,1	28,5*	28,6					
	Score	88,3	86,2		80					

Tab. 99: Sequenzabdeckungen (SC %) und Mowse Scores (Score) des Verdaus nach Blockade mit PVP von der **NC-Membran**, gemessen mit **HCCA-Matrix nach Jahn**.

Werte in Klammern stehen für Mowse Scores, die nicht mehr im statistisch signifikanten Bereich liegen. Für leere Felder konnte bei der Messung kein Spektrum erhalten werden. Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mithilfe des Programmes „Sequence Editor“ ermittelt, in diesem Fall liegt kein Mowse Score vor. Grau hinterlegt sind die auf der Membran nicht mehr anfärbaren Banden, die daher nicht ausgestochen werden konnten. GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase.

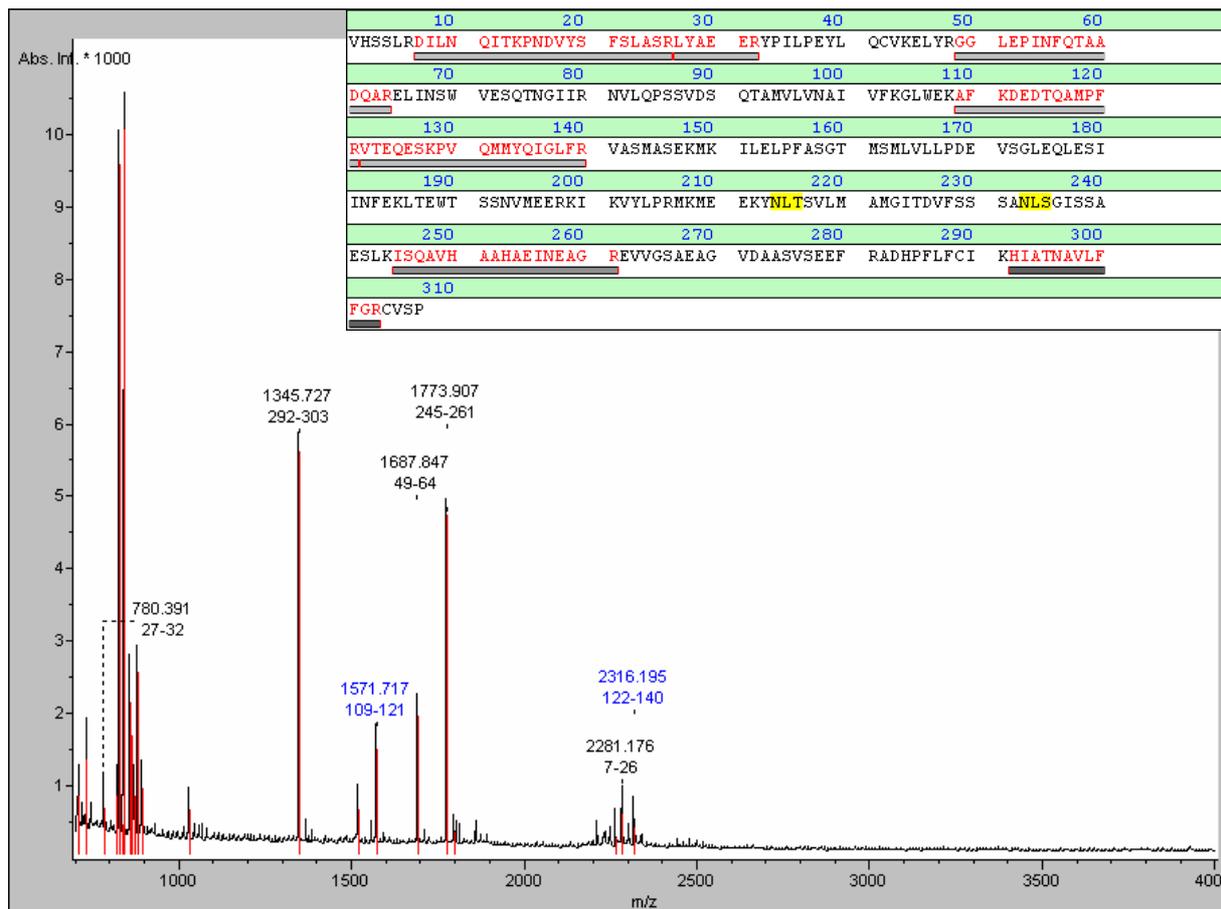


Abb. 86: Spektrum von Ovalbumin, Verdünnung 1, verdaut nach Blockade mit PVP von der NC-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn. Sequenzabdeckung 33,6%.

Verdünnung		1	1	2	2	3	4	5
GP Bde1	SC %	5*						
	Score							
GP Bde2	SC %	16,7	16,7					
	Score	108	108					
BSA	SC %	2,1*	6,6*					
	Score							
OV	SC %	41	19,9	22,1				
	Score	119	[52]	[68,6]				
CA	SC %	36,9*	37,1	47,7*	47,9	15*	8,1*	
	Score		[64,7]		88,8			

Tab. 100: Sequenzabdeckungen (SC %) und Mowse Scores (Score) des Verdaus nach Blockade mit PVP von der PVDF-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn.

Werte in Klammern stehen für Mowse Scores, die nicht mehr im statistisch signifikanten Bereich liegen. Für leere Felder konnte bei der Messung kein Spektrum erhalten werden. Mit \* gekennzeichnete Sequenzabdeckungen wurden mithilfe des Programmes „Sequence Editor“ ermittelt, in diesem Fall liegt kein Mowse Score vor. Grau hinterlegt sind die auf der Membran nicht mehr anfärbaren Banden, die daher nicht ausgestochen werden konnten. GP Bde1: Glycogenphosphorylase Bande 1, GP Bde2: Glycogenphosphorylase Bande 2, BSA: Bovines Serumalbumin, OV: Ovalbumin, CA: Carboanhydrase.

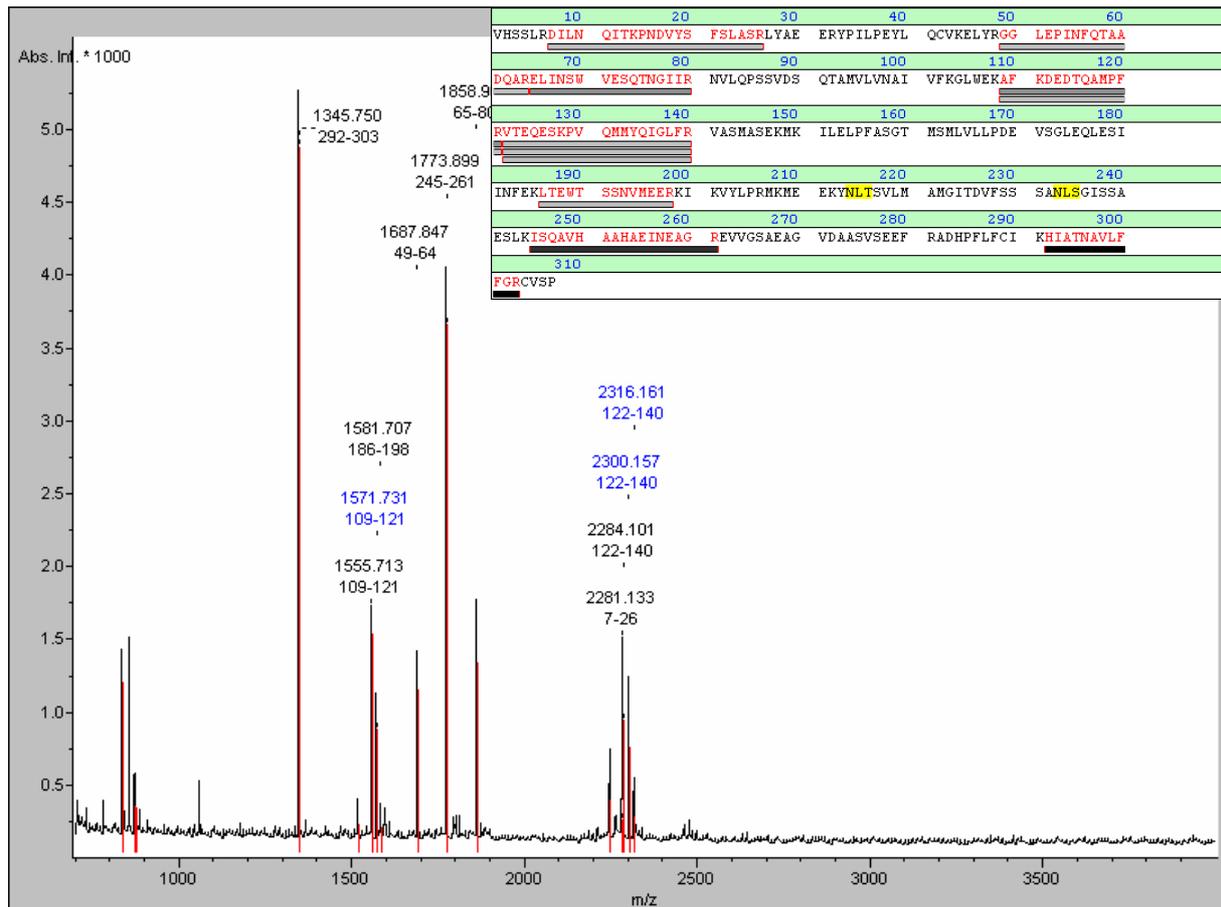


Abb. 87: Spektrum und Sequenzabdeckung von Ovalbumin, Verdünnung 1, verdaut nach Blockade mit PVP von der PVDF-Membran, gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn. Sequenzabdeckung 41%.

#### Fazit:

Die ECL nach Blockade der Membranen mit PVP war nicht erfolgreich. Vermutlich wurden auch die Antikörper-Bindungsstellen der auf die Membranen geblotteten Proteine blockiert, oder das PVP-Molekül war zu groß, so daß der zugegebene erste Anti-Ovalbumin-Antikörper die Antikörper-Bindungsstellen des Ovalbumins nicht mehr besetzen konnte.

Der anschließend durchgeführte Verdau brachte bezüglich der Qualität und Anzahl der Spektren ähnliche Ergebnisse wie der Verdau nach Behandlung der Membranen mit Roti-Block, ECL und anschließenden Waschschritten.

### 3.3.4 Zusammenfassung Teil 3:

Parameter	Variation	Fazit (bezogen auf HCCA-Matrix nach Jahn)
Proteinverdau von Membran-Spots	ohne Octylglycosid	geringe Ausbeute an Spektren
	mit Octylglycosid	bessere Ausbeute an Spektren sowohl von NC als auch von PVDF
Proteinverdau von 50% der Banden mit Octylglycosid	ohne Roti-Block / ohne Waschen	mehr Spektren als beim Verdau von Spots
	nach Behandlung mit Roti-Block und manuellem Spülen mit Verdaupuffer in Schalen	Spektren von NC und PVDF vergleichbar mit dem Verdau ohne Roti-Block
	nach ECL und manuellem Spülen in Schalen mit Verdaupuffer	gute Ausbeute an Spektren vor allem bei den ersten beiden Verdünnungen
	nach ECL und automatisiertem Spülen in Wells mit Verdaupuffer	geringere Anzahl an Spektren als bei manuellem Spülen nach ECL
	nach ECL und automatisiertem Spülen in Wells mit Verdaupuffer inklusive Schütteln	für NC ähnliche Ergebnisse, für PVDF schlechtere Ergebnisse wie beim manuellen Spülen in Schalen nach ECL
	nach ECL und Spülen mit DB71-Verdünnungslösung	geringere Anzahl an Spektren als bei Spülen mit Verdaupuffer, vor allem beim Verdau von der PVDF-Membran
	nach Blocking mit PVP und ECL	ECL funktionierte nicht
Coomassie-Gel-Verdau mit Octylglycosid	kleiner Stanzkopf	nur vereinzelt Spektren meßbar
	großer Stanzkopf	sehr gute Spektren in fast allen Verdünnungen

Tab. 101: Zusammenfassung Teil 3

Der erste Versuch, Spots aus Banden von Proteingemisch 2 (LMW Calibration Kit) ohne Octylglycosid zu verdauen, ergab ein recht unbefriedigendes Ergebnis. Bei fast allen Proben war massenspektrometrisch nichts als ein Rauschen zu messen.

Der nächste Versuch, in dem die Spots mit Octylglycosid verdaut wurden, ergab schon einige Spektren mehr. Octylglycosid fördert das Herunterlösen der Peptide von der Membran bei der Extraktion, was hier durch die erhöhte Anzahl detektierbarer Peptid-Peaks verdeutlicht wurde. Zum Vergleich mit dem Verdau von Membranen wurde ein Verdau vom Coomassie-Gel mit dem gleichen Proteingemisch durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß der Verdau kleiner Gelspots kaum Ergebnisse brachte, der Verdau großer Gelspots hingegen zeigte gute Spektren.

Da die Anzahl der gemessenen Spektren beim On-Membrane-Verdau bisher nicht sonderlich hoch war, wurden im nächsten Versuch statt der Spots ca. 50% der Banden verdaut, wodurch sich der Proteingehalt in der Probe erhöhte und somit auch mehr Spektren zu erzielen waren. Der Verdau von halben Banden wurde daher bei den folgenden Versuchen beibehalten.

Der nächste Schritt bestand in der Behandlung der Membranen mit Roti-Block und anschließenden 3 Waschschritten in Schalen vor dem Verdau. Es erhöhten sich hierbei im Vergleich zum Vorversuch leicht die Sequenzabdeckungen von der PVDF-Membran, die Sequenzabdeckungen von der NC-Membran blieben vergleichbar hoch.

Im nächsten Versuch, einem Verdau nach ECL und einer auf 10 erhöhten Anzahl von Waschschritten in Schalen, ergaben sich bei NC für Ovalbumin gute Ergebnisse bis einschließlich Verdünnung 2, womit der Verdau unbehandelter Membranen jedoch nicht übertroffen wurde. Die Anzahl der gemessenen Spektren und die Sequenzabdeckungen von PVDF erhöhten sich hingegen deutlich im Vergleich zum Verdau unbehandelter Membranen. Diese Verbesserung beim Verdau von PVDF wurde auf das Spülen der Membranen mit Verdau-puffer zurückgeführt. Es wurde vermutet, daß durch die Waschschrritte nicht nur der die massenspektrometrische Messung störende Roti-Block entfernt worden war, sondern auch noch andere Verunreinigungen, die bei den vorherigen Versuchen im Verdauextrakt enthalten waren und ebenfalls die Messung störten.

Weiterhin sollten diese Waschschrritte automatisiert, also vom Verdauroboter ausgeführt werden. Das Ergebnis war nicht so gut wie beim manuellen Waschen: Es ergaben sich nur Spektren für die am höchsten konzentrierte Proteinbande.

Um die Effektivität der Waschschrritte zu verbessern, wurde daher im nächsten Versuch das Schütteln der Mikrotiterplatte während des automatisierten Waschvorganges eingeführt. Diese Veränderung verbesserte die Ergebnisse von NC im Vergleich zum Waschen ohne Schütteln. Um herauszufinden, ob die schlechtere Anfärbbarkeit der Banden auf den Membranen nach der ECL auf die Einwirkung des alkalischen Verdau-puffers zurückzuführen war, wurde dieser in einem weiteren Versuch durch die saure DB71-Verdünnungslösung ersetzt. Dies ergab im Vergleich mit dem Verdau nach manuellem Waschen mit Verdau-puffer jedoch weder eine verbesserte Anfärbbarkeit der Banden noch eine bessere Ausbeute an Spektren, weshalb die alte Methode beibehalten wurde.

Ein anderer Versuch sollte zeigen, ob das Blocking der Membranen statt mit Roti-Block auch mit PVP erfolgen kann. Dies ist jedoch, wie sich durch die erfolglose ECL zeigte, nicht möglich.

In diesem Versuchsteil wurde eine Methode entwickelt, die es erlaubt, Proteine, in diesem Fall Ovalbumin, von NC- bzw. PVDF-Membranen nach erfolgter ECL durch Messung mit HCCA-Matrix nach Jahn zu identifizieren.

Im Vergleich zur Identifikation von Ovalbumin aus einem einfachen Gel-Verdau schnitt die Identifikation nach ECL und On-Membrane-Verdau schlechter ab, hier wurde mehr Probenmaterial benötigt als beim Gel-Verdau.

Dieses Ergebnis ist allerdings insofern als positiv zu betrachten, als man sich vor Augen führen muß, daß die Blot-Membranen – im Gegensatz zu einem Gel – durch den Prozeß der ECL sehr viele Arbeitsschritte durchlaufen müssen, die eventuell auch einen minimalen Proteinverlust bewirken, der sich schließlich bei der MS-Analyse bemerkbar macht; dennoch war es möglich, die Proteine nach ECL von Membranen zu identifizieren.

<b>Versuch</b>	<b>NC</b>		<b>PVDF</b>	
	SC %	Score	SC %	Score
ohne Roti-Block, OV Verdünnung 1	40,4	107	5,7*	-
Roti-Block+manuell waschen, OV Verdünnung 1	4,9*		12,7*	
ECL+manuell waschen, OV Verdünnung 1	42,3	104	27,4	84,4
ECL+automatisch waschen, OV Verdünnung 1	7,3*		1,3*	
ECL+schütteln, OV Verdünnung 1	36,8	115	-	-
ECL+manuell in DB71-Verd.lsg., OV Verdünnung 1	30,3	[66,6]	11,7*	
ECL mit PVP-Block, OV Verdünnung 1	33,6	83,5	41	119
Coomassie-Gel-Verdau, großer Stanzkopf, OV Verdünnung 1	61,6	214	61,6	214

Tab. 102: Mowse Scores (Score) und Sequenzabdeckungen (SC %) von Ovalbumin, Verdünnung 1, aus verschiedenen Versuchen im Vergleich. Verdaut wurden in jedem der Versuche ca. 50% der Banden, gemessen wurde mit HCCA-Matrix.

Das finale Verdauprotokoll sah folgendermaßen aus:

<b>Step</b>	<b>Description</b>	<b>Vol [<math>\mu</math>l]</b>	<b>Time [min]</b>	<b>Temp [<math>^{\circ}</math>C]</b>	<b>Cycles</b>
1	Wash with DigBuff 25mM + 10%ACN	200	6	21	9
2	Destain	130	20	21	1
3	Wash with MilliQ	150	5	21	1
4	Block with PVP	20	20	21	1
5	Wash with NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	150	5	21	2
6	Add Trypsin	17	0,1	21	1
7	Digest		480	37	1
8	Extraction (50% ACN)	30	30	21	1

Tab. 103: Verdauprotokoll Teil 3

## 4. Diskussion

In dieser Arbeit wird eine Methode automatisiert, die es erlaubt, Proteine nach erfolgter Detektion durch Chemolumineszenz auf ihrer Blot-Membran zu verdauen. Dieser Vorgang stellt eine Alternative zum klassischen In-Gel-Verdau dar und birgt den Vorteil, daß weniger Probenmaterial benötigt wird und aufgrund der Chemolumineszenz-Markierung anschließend aus den auf der Membran angefärbten Proteinen gezielt ganz bestimmte Proteine identifiziert werden können.

### 4.1 Eigenschaften des Elektroblobs

Eingeführt in den 1970er Jahren [125] und vielfach weiterentwickelt [18; 80] ist die Technik des Elektroblobs heute eine gängige Methode. In der vorliegenden Arbeit wurde das "tank blotting" angewendet, das vor allem für die Detektion von Proteinen empfohlen wird, die in kleinen Mengen im Gel vorhanden sind [73].

Kontrovers diskutiert wird hierbei die Zugabe von Methanol zum Towbin-Puffer. Einerseits entfernt Methanol das SDS aus den Protein-SDS-Komplexen [73], es erhöht das Proteinbindevermögen von NC und stabilisiert während des Blotvorganges die Struktur des Geles [47]. Andererseits vermindert es das Herauslösen der Proteine aus dem Gel und sorgt somit für eine verlängerte Blot-Zeit, insbesondere, um Proteine mit hohem Molekulargewicht sowie stark basische Proteine [3] erfolgreich auf die Membran zu übertragen [47; 73]. In der vorliegenden Arbeit wurde dem Towbin-Puffer aufgrund der überwiegenden Nachteile kein Methanol zugesetzt.

Einen weiteren Einfluß auf den Erfolg des Blottens hat die Porengröße der Blotmembran. So binden vor allem Proteine mit niedrigem Molekulargewicht weniger stark an NC-Membranen und können somit während des Transfers verloren gehen, indem sie durch die Membran hindurchwandern [47]. Es gibt auch Membranen mit geringerer Porengröße, die diesen Verlust vermindern sollen [47]. Durchgesetzt hat sich die heutzutage meistbenutzte Porengröße von 0,45 µm, die in der vorliegenden Arbeit sowohl die NC- als auch die PVDF-Membran besaßen.

Ebenfalls in der Literatur erwähnt wird die Zugabe von SDS als anionisches Detergens zum Blot-Puffer, da es aufgrund seiner micellenbildenden Eigenschaft in geringer Menge helfe, Proteine mit hohem Molekulargewicht zu transferieren [11]. Nach dem Blotvorgang sollen die Proteine auf der Membran frei von SDS sein [92]. Von dieser Möglichkeit wurde in dieser Arbeit kein Gebrauch gemacht.

## 4.2 Färbemethoden

Die am häufigsten verwendete Färbemethode für Polyacrylamidgele ist Coomassie Blue [98; 71] mit einem Detektionslimit von ca. 100 ng Protein [62], die in dieser Arbeit für das Färben von Proteinbanden in Gelen verwendet wurde.

Für die Anfärbung von Proteinen auf Elektroblobs werden meist Farbstoffe wie Amido Black [47] (Detektionslimit 50 ng), Ponceau S [117] (Detektionslimit 100 ng) oder India Ink [56] (Detektionslimit 100 ng [13]) verwendet [62].

Ein erstmals von Hong et al. [63] beschriebener Farbstoff, Direct Blue 71, stellt eine der sensitivsten Anfärbemöglichkeiten von geblotteten Proteinen dar mit dem Nachweis von 5-10 ng Protein auf NC und 10-20 ng Protein auf PVDF [62]. DB71 wurde in der vorliegenden Arbeit zur Anfärbung von Proteinen auf NC- und PVDF-Membranen benutzt. Es handelt sich hierbei um einen auf Ethanol-Basis hergestellten blauen Farbstoff, der im sauren Milieu mit hoher unspezifischer Affinität an Proteine bindet [62]. Der Färbevorgang nimmt nur ca. 5 Minuten in Anspruch, wobei sich der Hintergrund der PVDF-Membran im Gegensatz zur NC-Membran leicht anfärbt. Die Membranen können mehrmals ge- und entfärbt werden, ohne daß ein Sensitivitätsverlust entsteht.

## 4.3 Verdau von der Membran

Der On-Membrane-Verdau ist ein altbekanntes Verfahren, erstmals eingeführt von Aebersold et al. [3], das vor allem in den letzten Jahren in verschiedensten Varianten mit dem Ziel der Optimierung der Peptidausbeute weiterentwickelt worden ist.

Es existiert eine große Auswahl an Membranen aus verschiedenen Materialien wie Nylon, Polyethylen, NC oder PVDF, mit unterschiedlichen Eigenschaften und mit verschiedenen Porengrößen [47], was sich auf die Proteinbindekapazität und -intensität und damit auch auf das Verdauergebnis auswirken kann.

Durchgesetzt haben sich die heute am häufigsten benutzten NC- und PVDF-Membranen [85], die in der vorliegenden Arbeit in jedem Versuch parallel verwendet wurden. Bei der Durchführung der Versuche hat sich gezeigt, daß die PVDF-Membran recht robust ist. Die NC-Membran hingegen ist eher brüchig und somit etwas empfindlicher gegenüber mechanischen Manipulationen, außerdem kann sie von organischen Lösungsmitteln zersetzt werden. Proteine werden von der NC-Membran stark absorbiert [85]. Vermutlich sind deshalb auf NC-Membranen im Gegensatz zu PVDF-Membranen auch Banden in sehr geringen Konzentrationen anfärbbar, die auf der korrespondierenden PVDF-Membran nicht mehr zu erkennen sind. Der Verdau von auf NC geblotteten Proteinen zeigte in fast allen Versuchen

der vorliegenden Arbeit bessere Ergebnisse als der Verdau von auf PVDF geblotteten Proteinen. Dies zeigte sich schon in 3.1.2 beim Verdau des ersten Elektroblobs; hier lieferte NC einige gute Spektren, PVDF jedoch keines.

Der erste Versuch in dieser Arbeit ist der Verdau eines Dot-Blots, d.h. in Wasser gelöstes Protein wurde mit einer Pipette auf die Membran aufgetragen und an der Luft getrocknet. Anschließend wurden Spots ausgestanzt und im Verdauroboter automatisch verdaut.

Die hieraus resultierenden Sequenzabdeckungen lagen bei der PVDF-Membran zwischen 21 und 55% und bei der NC-Membran zwischen 31 und 59%. Im nächsten Versuch, in dem die gleichen Proteine nach dem gleichen Protokoll, nur vom Elektroblob verdaut wurden, lagen die von der NC-Membran erhaltenen Sequenzabdeckungen für Ovalbumin sehr viel niedriger; bei den Proben von der PVDF-Membran hingegen waren gar keine Signale zu messen. Dieses Ergebnis war auf drei veränderte Parameter zurückzuführen: Zum einen enthielten die Proben weniger Protein als beim Dot-Blot, weiterhin war der Dot-Blot-Versuch mit DHB/Phosphorsäure-Matrix, die Elektroblob-Proben aber mit einer DHB/HCCA-Mischmatrix gemessen worden (siehe 4.9), zudem ist das Herauslösen von Proteinen aus Elektroblobs sehr viel schwieriger als aus Dot-Blots. Dies liegt an der unterschiedlichen Tiefenverteilung der Proteine in der Dot-Blot- und der Elektroblob-Membran sowie an der stärkeren Anhaftung der Proteine an der Membran nach dem Blotvorgang [85].

Eine interessante Alternative zum klassischen On-Membrane-Verdau stellen Bienvenut et al. mit der Kombination zweier Verdaumethoden vor. Sie starteten zunächst einen tryptischen In-Gel-Verdau parallel für alle Proteine eines Geles gleichzeitig für nur 30 Minuten. Um den partiellen Verdau zu vollenden, wurden die Proteine bzw. Peptide anschließend per Elektroblob auf eine PVDF-Membran übertragen, wobei noch eine Membran mit immobilisiertem Trypsin zwischen Gel und PVDF-Membran gelegt wurde, so daß es während des Transfers zum Verdau der übrigen Proteine kam. Zwar lieferte diese Kombination höhere Sequenzabdeckungen als die Anwendung nur einer der Methoden allein, dennoch kamen die Autoren zu dem Schluß, daß der klassische In-Gel-Verdau, gefolgt vom klassischen On-Membrane-Verdau, die besten Sequenzabdeckungen liefert [11].

Ähnliche Beobachtungen machten Courchesne et al., als sie die massenspektrometrisch minimal nachweisbare Menge an Protein nach Verdau im Gel und nach Verdau von verschiedenen PVDF-Membranen verglichen: Sie kamen zu dem Schluß, daß die Ausbeute an Peptiden beim On-Membrane-Verdau kleiner und damit die Identifikation des Proteins schwieriger ist als beim In-Gel-Verdau, wobei allerdings auch hier, wie oben erwähnt, große

Unterschiede in der Peptidausbeute zwischen PVDF-Membranen mit unterschiedlicher Porengröße beobachtet wurden [26].

Dieser Aussage schlossen sich auch Staudenmann et al. an, in deren Versuchen der Verdau von der PVDF-Membran weder dem herkömmlichen Verdau im Gel noch dem dort beschriebenen "Ping Pong"-Verdau überlegen war [122].

Auch in der vorliegenden Arbeit bestätigte sich die Überlegenheit des Verdau im Gel: Der In-Gel-Verdau in 3.3.1.3 B ermöglichte die Identifikation aller Proteine bis einschließlich Verdünnung 4 (0,69 bis 3,98 pmol / Bande), wohingegen der ebenfalls mit HCCA-Matrix nach Jahn gemessene On-Membrane-Verdau von NC-Spots in 3.3.1.2 nur vereinzelte Spektren bis einschließlich Verdünnung 3 (5,53 pmol Carboanhydrase / Bande) bzw. der Verdau von PVDF-Spots nur Spektren von Verdünnung 1 (10,06 bis 26,14 pmol / Bande) ergab.

#### **4.4 Verdauzeit**

Die Zeit, die der Verdau von der Membran optimalerweise benötigt, wird überaus kontrovers diskutiert. Einige Autoren bevorzugen eine verkürzte Verdauzeit, z.B. 1 h bei 37°C [17], 2 h bei 37°C [91] oder 4 h bei 37°C [8].

Andere Autoren bleiben bei einer längeren Verdauzeit, z.B. über Nacht bei 37°C [3], über Nacht bei RT [11], 16 h bei 30°C [101], 15 h bei 37°C [123], 15 h bei RT [122] oder 24 h bei 37°C [140].

Luque-Garcia et al. untersuchten beim On-Membrane-Verdau Verdauzeiten von 30 min bis 16 h, wobei sie feststellten, daß bei einer längeren Verdauzeit weniger "missed cleavages" vorhanden waren, d.h. daß der Verdau vollständiger ablief, dennoch aber auch schon gute Sequenzabdeckungen nach einem 30minütigen Verdau zu erzielen waren [92].

Finehout und Lee untersuchten beim In-Gel-Verdau Verdauzeiten von 4 h und 12 h und kamen zu dem Schluß, daß die bei einem längeren Verdau erhöhte Ausbeute an Peptiden sich die Waage halte mit den ebenfalls erhöhten Autolyseprodukten des Trypsins. Sie konstatierten allerdings, daß eine Erhöhung der Verdauzeit durchaus die Sequenzabdeckung erhöhen könne [45].

In der vorliegenden Arbeit wurden Verdauzeiten von 2 h bei 45°C, 8 h bei 37°C, 16 h bei 37°C und 18 h bei 37°C angewendet. Im Vergleich mit dem 8-Stunden-Verdau zeigte der 2-Stunden-Verdau gleichwertige Sequenzabdeckungen für NC, aber keine Spektren für PVDF und war diesem somit unterlegen.

8- und 16-Stunden-Verdau zeigten vergleichbare Ergebnisse, wobei der 8-stündige Verdau von der PVDF-Membran die bisher besten Ergebnisse erbrachte. Aufgrund dieser Beobachtungen und um sicherzugehen, daß der Verdau möglichst vollständig ablief, sowie aufgrund der durch die guten Ergebnisse des manuellen Verdaus bewiesenen Tatsache, daß selbst eine Verdauzeit von ca. 18 h sich nicht negativ auf die erhaltenen Sequenzabdeckungen auswirkte, wurde eine Verdauzeit von 8 h bei 37°C für das weitere Vorgehen übernommen. Ein Vorteil der niedrigen Verdautemperatur war die in reduziertem Maße ablaufende Autolyse des Trypsins. Vom Hersteller empfohlen wird ein Verdau über Nacht bei 37°C [110]. Zwar wurde von anderen Autoren festgestellt, daß das Arbeitsoptimum von modifiziertem Trypsin bei ca. 50°C liegt [58], es wurden aber von vielen Autoren beim Verdau mit modifiziertem Trypsin bei einer Verdautemperatur von 37°C oder bei RT gute Ergebnisse erzielt [123; 122; 11; 140].

#### **4.5 Zusammensetzung von Verdauopuffer und Extraktionslösung**

Der On-Membrane-Verdau findet mittlerweile breite Anwendung in der Proteinanalytik. Demzufolge existieren viele verschiedene Verdauprotokolle, die sowohl in der Zusammensetzung der Verdauopuffer als auch in der Anzahl der Verdau Schritte variieren. In der vorliegenden Arbeit ist der erste wichtige Schritt im Verdauablauf nach dem Waschen der Membranen der Blockierschritt mit PVP-40. PVP ist ein wasserlöslicher Stoff, der zur Blockierung der nicht mit Proteinen besetzten Stellen auf Blot-Membranen verwendet wird, so daß das Verdauenzym möglichst nur an die proteinbeladenen Stellen gelangt. Beim On-Membrane-Verdau ist dieser Schritt gängig, jedoch gibt es auch hier Varianten. So wird der Blockierschritt von einigen Autoren weggelassen, da eine ideale Verdauemethode ihn überflüssig mache [91]. Andere betrachten den Blockierschritt im Verdauablauf als essentiell [3]. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde er in den Verdauablauf integriert. Ein weiterer, bezüglich seiner Anwendung im Verdauprotokoll kontrovers diskutierter Schritt ist der der Reduktion und Alkylierung der Cysteine, die zum Spalten der Disulfidbrücken eines Proteins führt. Er wird beim In-Gel-Verdau und beim On-Membrane-Verdau des öfteren angewendet. Dieser Schritt ist jedoch kein absolutes Muß für einen erfolgreichen Verdau. Viele Autoren sehen ihn als obsolet an und nehmen ihn nicht in ihr Verdauprotokoll auf [120; 107; 92]. Die Alkylierung der Cysteinreste erfolge oft inkomplett, zudem schwanke durch die Alkylierung der Peptide deren Signalintensität in der massenspektrometrischen Messung und ohnehin wiesen mehr als 80% der Peptide im detektierbaren Bereich keine Cysteinreste auf [53]. In anderen Versuchen findet eine Reduktion/Alkylierung der Proteine anstelle der

Denaturierung durch Kochen im Rahmen der Probenvorbereitung noch vor der SDS-Gelelektrophorese statt [101]. Es existieren also viele Varianten; in der vorliegenden Arbeit wird auf eine Reduktion/Alkylierung im Rahmen des On-Membrane-Verdaus verzichtet, stattdessen werden die Proben vor der SDS-Gelelektrophorese durch Kochen denaturiert. Nach einem Waschschrift mit Bikarbonat-Puffer bestand der nächste Schritt in der Zugabe von Trypsin, das am besten im basischen Bereich arbeitet. Anfänglich wurden in der vorliegenden Arbeit 10µl Trypsinlösung (Konzentration 10ng/µl) auf die Spots gegeben. Es erschien allerdings sinnvoll, mehr als 10µl Trypsinlösung zu benutzen, um Spots oder auch größere Membranstücke während des Verdauvorganges nicht austrocknen zu lassen. Ein Versuch mit 25µl Trypsinlösung ergab gute Ergebnisse, ebenso wie die vorhergehenden Versuche mit 10µl Trypsinlösung. In den weiteren Versuchen wurde mit einer Trypsinmenge von 17µl gearbeitet. Die absolute Menge an Trypsin betrug hierbei 170ng, was sowohl für den Verdau von Probenmaterial von Spots als auch von größeren Membranstückchen ausreichen sollte. Im Laufe der Arbeit wurde beobachtet, daß bei einer Menge von 17µl bei einer 8-stündigen Verdauzeit weder Membran-Spots noch größere Membranstückchen austrockneten. Die von Promega empfohlene Trypsinmenge für den Verdau von Gelspots beträgt 200 bis 400 ng pro Spot [110], wobei zu beachten ist, daß eine höhere Trypsinmenge die Zahl der Autolyseprodukte erhöhen kann.

In der Literatur finden sich mehrere Ansätze, den On-Membrane-Verdau durch Veränderungen in der Zusammensetzung der Puffer zu optimieren, um eine höhere Sequenzabdeckung und eine verlässliche Proteinidentifizierung zu erhalten. So erzielten Zhou et al. durch den Einsatz eines zweiphasigen Verdaupuffers aus n-Butanol und 25 mM Bikarbonatpuffer (1:1) beim On-Membrane-Verdau gute Ergebnisse [140]. Bunai et al., die die Protease Lys-C verwendeten, empfehlen den Verdau in einem hohen Anteil (80%) organischem Lösungsmittel wie ACN ablaufen zu lassen, da ACN nicht nur ab einer Konzentration von 30% die Anhaftung von Peptiden an Kunststoffoberflächen vermindere [38], sondern auch die Effizienz des Verdaus steigere [17]. Dieser Meinung schlossen sich auch Aebersold et al. an, die vermuteten, daß hydrophile Kräfte zwischen Peptiden und NC-Membran durch die Anwesenheit organischen Lösungsmittels reduziert würden, weshalb sie einen Anteil von 5% ACN im Verdaupuffer empfehlen [3]. Wieder andere Autoren benutzten einen Anteil von 10% ACN im Verdaupuffer und erzielten ebenfalls gute Ergebnisse [60]. Die Aktivität von Trypsin soll sich bei Benutzung eines Verdaupuffers mit 10% ACN im Vergleich zu einem Verdaupuffer ohne ACN um 300% steigern [12]. Andererseits ist jedoch auch bekannt, daß die Enzymaktivität in organischen Lösungsmitteln nur 20% bis 40% derer

in wäßrigen Lösungen entspricht [138]. In der vorliegenden Arbeit enthielt der Verdaupuffer ebenfalls 10% ACN; der Effekt eines höheren Anteils wurde hier nicht untersucht.

Näher untersucht wurde in der vorliegenden Arbeit die Auswirkung unterschiedlich hoher Anteile von ACN in der Extraktionslösung auf die Sequenzabdeckung. Zu diesem Zweck wurde ein manueller Verdau von der Membran durchgeführt, wobei anschließend die Proben für 30 oder 40 Minuten mit Extraktionslösungen behandelt wurden, die einen ACN-Anteil von 0 bis 60% enthielten. Es zeigten sich beim Verdau von der NC-Membran durchgängig gute Sequenzabdeckungen von 35% bis 44%, die keinen Rückschluß auf unterschiedliche Peptidausbeuten aufgrund des unterschiedlichen ACN-Anteils zuließen. Beim Verdau von der PVDF-Membran lagen die erhaltenen Sequenzabdeckungen mit 13% bis 32% weiter auseinander als beim NC-Verdau. Die höheren Sequenzabdeckungen wurden hier bei einem Anteil von 50 – 60% ACN in der Extraktionslösung erzielt. Aus diesem Grund wurde in den folgenden Versuchen mit einem Anteil von 50% ACN und 1% TFA 30 Minuten lang extrahiert. In der Literatur variieren die Angaben zur Zusammensetzung der Extraktionslösung. Lui et al. beschrieben eine Extraktionslösung mit einem Anteil von 40% ACN als sehr effektiv für die Peptidextraktion von NC- und PVDF-Membranen, allerdings nur im Beisein von 10% TFA [91]. Courchesne et al empfehlen eine Mischung mit Anteilen von 30% ACN und 2,5% TFA; außerdem stellten sie fest, daß der Hauptanteil der verdauten Peptide sich entweder im Verdaupuffer oder in der Extraktionsflüssigkeit befand [26], weshalb es sinnvoll erscheint, diese beiden Flüssigkeiten für die massenspektrometrische Messung zu kombinieren, wie in der vorliegenden Arbeit geschehen – Verdaupuffer und Extraktionslösung wurden hier gepoolt.

Von anderen Autoren wurde das Vorhandensein von ACN im Probenpuffer bzw. in der Matrixlösung als vorteilhaft für die Intensität der bei der massenspektrometrischen Messung erzielten Spektren beschrieben [135].

Ein Punkt, der gegen eine zu hohe Konzentration von ACN in Verdau- oder Extraktionslösung spricht, ist die Eigenschaft von ACN, die Matrixkomponenten DHB und HCCA zu lösen. Je höher der Anteil an ACN in der Probe ist, desto eher zeigt die Probe beim Auftragen auf das Target eine Tendenz zum Verlaufen über den Rand des Meßtellers hinaus. Eine weitere Option ist der Zusatz von Octylglycosid zu Verdaupuffer und Extraktionslösung. Octylglycosid ist ein mildes, nicht-ionisches, wasserlösliches Detergenz, das die Proteinlöslichkeit fördert [7] und bei der massenspektrometrischen Messung die Signalintensität vor allem großer Peptide verstärkt [130]. Die verstärkende Wirkung von Octylglycosid auf MS-Spektren ist seit langem bekannt und wurde von vielen Autoren

genutzt [24; 26; 128; 112; 10]. Octylglycosid hat im Gegensatz zu anderen Detergenzien wie Zwittergent 3-16, Triton X-100 [43] oder Tween 20 [50], die beim Verdauungsprozess ebenfalls die Herauslösung von Peptiden aus Membranen fördern, den Vorteil der MS-Kompatibilität [96]. Auch kann Octylglycosid anstelle von SDS als Bestandteil von Gelen verwendet werden, da es offensichtlich den gleichen positiven Effekt auf die Proteinlöslichkeit hat [122]. Dennoch gibt es Autoren, die der Verwendung von Octylglycosid keinen nennenswerten Effekt auf das Herauslösen von Peptiden aus Membranen zuschreiben [91]. In der vorliegenden Arbeit waren in den Versuchen 3.3.1.1 und 3.3.1.2 Membran-Spots ohne bzw. mit Zusatz von Octylglycosid in den genannten Puffern verdaut worden, und es war zu erkennen, daß der Zusatz von Octylglycosid ganz eindeutig die Ergebnisse verbesserte. Aus diesem Grund wurde in allen weiteren Versuchen Octylglycosid verwendet.

#### **4.6 Automatisierung**

In der Literatur finden sich einige erfolgreiche Verwirklichungen der Automatisierung des On-Membrane-Verdau. Schon seit ca. 10 Jahren werden Kombinationen aus Spot Cuttern und Verdaurobotern entwickelt und sind auch kommerziell erhältlich [30; 65; 131].

So verwirklichte Staudenmann et al. mit einer eigens entworfenen Apparatur die sogenannte "ping pong digestion" [122]. Bei diesem In-Gel-Verdau werden die elektrisch aus dem Gel eluierten Proteine durch eine mit Trypsin beladene Kapillare geleitet und dabei verdaut, womit der herkömmliche In-Gel-Verdau, was die Peptidausbeute angeht, um 20% übertroffen wurde.

Canelle et al. benutzten einen Pipettierroboter zum Spotten und einen zum Verdau von Proteinen im Gel [19].

Nakanishi et al. veröffentlichten vor kurzem ihre Ergebnisse zur Automatisierung eines On-Membrane-Verdau von Phosphoproteinen nach Immunodetektion mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern. Hierfür verwendeten sie einen chemischen Tintenstrahldrucker, der die Verdauopuffer auf die PVDF-Membran aufdruckte [101]. Ebenfalls mit einem solchen Drucker arbeiteten Ohtsu et al., die nach einem Western Blot die Proteine auf der Blot-Membran ebenfalls mit DB71 färbten, die Spots ausschneiden, auf ein Target klebten und dort die nötigen Puffer, das Trypsin und die Matrix aufdruckten und anschließend die MS-Analyse starteten [107].

In der vorliegenden Arbeit wurde mit einem Spot Cutter, einem Verdauroboter und einem Massenspektrometer mit der möglichen Funktion einer automatischen Messung gearbeitet.

Beim Ausstechen von Spots aus Membranen mit dem Spot Cutter war streng darauf zu achten, die Membranen mit DB71-Verdünnungslösung immer feucht zu halten und ca. 10 µl davon pro Well vorzulegen, da nur so die elektrostatischen Kräfte überwunden werden konnten, die die Spots ansonsten von den Mikrotiterplatten abstießen.

Dem Pipettierroboter konnte über eine Excel-Datei ein Verdauprotokoll vorgegeben werden. Unabhängig vom Protokoll einstellbar waren technische Details wie z.B. die Höhe, in der die Pipettenspitzen über den Wells anhalten sollten, was in Vorversuchen erfolgte.

In 3.1.6 zeigte sich, daß der Verdauroboter die Fähigkeit zum präzisen Pipettieren besaß: Die automatisierte Extraktion zeigte im Vergleich mit der manuellen gleichwertige Ergebnisse.

Mit dem Massenspektrometer wurden während der Versuche der vorliegenden Arbeit parallel auch erfolgreich einige automatische Messungen mit HCCA-Matrix nach Jahn durchgeführt, wozu mit einer Excel-Datei dem Meßprogramm FlexControl die Koordinaten der Meßpunkte auf dem Anchor-Chip vorgegeben wurden. Diese Daten sind nicht in der Arbeit enthalten, es wurden jedoch die Proben fast aller Versuche der Möglichkeit einer Automatisierung wegen auch mit HCCA-Matrix nach Jahn gemessen.

#### **4.7 Western Blot**

Wenn Proteine mittels Elektrobplot von einem Gel auf eine Membran übertragen und anschließend auf dieser durch Immunodetektion visualisiert werden, nennt man diese Kombination einen Western Blot [133].

Blotmembranen verfügen im Vergleich zu Gelen über einige Vorteile: Sie sind nicht so leicht zerbrechlich, was ihre Handhabung bedeutend erleichtert, und es besteht die Möglichkeit, nicht nur die Gesamtheit aller Proteine mit einem Farbstoff anzufärben, sondern auch gezielt spezielle Proteine mit radioaktiven Antikörpern [133] oder Fluoreszenzfarbstoffen [51] zu markieren.

Außerdem existieren immunochemische Methoden, die die Detektion spezieller Proteine erlauben; so gibt es z.B. Antikörper passend für spezielle posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen, die durch Anheftung eines zweiten, enzymgekoppelten (Meerrettichperoxidase oder alkalische Phosphatase [23]) Antikörpers und Zugabe von Substrat selektiv diese speziellen Proteine sichtbar machen können [73]. Mit dieser sogenannten ECL-Reaktion ("enhanced chemoluminescence") können Proteine auf Blot-Membranen ohne Verwendung radioaktiver Stoffe am sensitivsten bis in den Femtomolbereich nachgewiesen werden [82]; sie fand in der vorliegenden Arbeit Verwendung. Immunochemische Detektionsmethoden sind unter Umständen sogar mehrfach

hintereinander auf einer Blot-Membran anwendbar [47; 133], wozu die Antikörper zwischendurch von den Membranen wieder entfernt werden müssen ("Stripping"). Die im Immunoblot visualisierten Proteine können anschließend den zugehörigen Spots auf einem parallel gefärbten Gel zugeordnet werden [111; 90]. Was die Zuordnung von Spots auf der Membran zu Spots auf dem Gel häufig erschwert, sind die Unterschiede in der Färbung und die Tendenz von Gelen zum Schrumpfen [33] sowie das Auffinden von Einzelspots in einer Spotgruppe im Gel auf engem Raum [20], außerdem muß aufgrund des parallel hergestellten Vergleichsgeles immer die doppelte Menge an Probenmaterial vorhanden sein [88]. Eine Möglichkeit, die Herstellung eines Parallelgels zu umgehen, zeigten Eynard et al. mit der immunochemischen Detektion spezieller Proteine auf einer Membran, auf der die Gesamtheit aller Proteine zuvor durch die Färbung mit India Ink sichtbar gemacht worden war [40].

Dufresne-Martin et al. gingen einen Schritt weiter und färbten die Proteine auf der Blot-Membran zunächst mit India Ink, blockierten die Membran dann entweder mit Tween 20, PVP-40 oder Milchpulver und verdauten nach der Immunodetektion, die von vier Waschschrritten gefolgt war, die visualisierten Proteine direkt von der Membran [33].

In der vorliegenden Arbeit wurde eine ähnliche Methode angewandt: Ovalbumin wurde, nachdem nicht mit Protein beladene Membranstellen durch Roti-Block, einem Reagenz, das das unspezifische Binden von Antikörpern verhindert, blockiert worden waren, immunochemisch sichtbar gemacht. Nach anschließender Entfernung des Roti-Blocks durch mehrere Waschschrritte wurde die Membran mit dem sensitiven Farbstoff DB71 gefärbt, so daß die durch ECL visualisierte Bande leicht gefunden und dem Verdau zugeführt werden konnte. Die Färbung der Membran erst nach der ECL hatte den Vorteil, daß die Farbe nicht während der Prozedur der Immunodetektion verblaßte wie anderswo berichtet [20; 96].

In der vorliegenden Arbeit wurden auch einige Varianten untersucht, die vom geschilderten Ablauf abwichen. Unter anderem wurden in 3.3.3.5 die Membranen mit dem MS-kompatiblen PVP-40 anstatt mit Roti-Block blockiert, bevor die immunochemische Detektion durchgeführt wurde. Hierbei zeigte sich, daß diese Blockade erfolglos war, da die immunochemische Detektion mit dem PVP-40-Schritt nicht gelang, ein Ergebnis, das im Kontrast zu dem von Dufresne-Martin et al. [33] steht. Aufgrund des ungeschwärzten Röntgenfilmes wurde vermutet, daß auch die Antikörper-Bindungsstellen der auf die Membranen geblotteten Proteine durch PVP-40 blockiert worden waren, was die Immunodetektion verhinderte. Alternative Stoffe zur Blockierung der Membran sind BSA, Milchpulverlösungen oder Tween 20, wobei die ersten beiden die massenspektrometrische Proteinidentifikation stören können

und letzteres zu Intensitätsunterschieden von Banden während der Immunodetektion führen kann [121]. Außerdem gibt es auch eine ursprünglich von Millipore Co. entwickelte Variante des Western Blots, die den Blockierschritt vor Zugabe der Antikörper aufgrund der Hydrophobizität der PVDF-Membran ausläßt [95], die jedoch nicht auf NC-Membranen anwendbar ist.

Eine Frage, die sich beim Verdau vom Immunoblot stellt, ist die Kompatibilität der für die immunochemische Detektion benutzten Antikörper, die zusammen mit den zu analysierenden Proteinen verdaut werden, mit der Massenspektrometrie. In der vorliegenden Arbeit wurde bezüglich des Einflusses der Antikörper auf die Spektren eine ähnliche Beobachtung gemacht wie von Dufresne-Martin et al., bei deren Versuchen sich die Sequenzabdeckung eines Proteins nicht verbesserte, wenn vor der massenspektrometrischen Messung die Antikörper von der Blot-Membran entfernt wurden ("Stripping") [33].

In der vorliegenden Arbeit fanden sich in den Massenspektren keine Peptid-Peaks, die aus dem Verdau der Antikörper stammten. Die Abwesenheit von zusätzlichen Peaks durch die Antikörper läßt sich dadurch erklären, daß die Menge an gebundenem Antikörper sehr viel niedriger ist als die des detektierten Proteins und damit die Peptidmenge einfach zu gering ist, als daß sie bei der MS-Analyse ins Gewicht fallen würde. Es gibt allerdings auch andere Autoren, die ein Stripping der Antikörper für wichtig halten, da es die Ausbeute an detektierbaren Peptiden erhöhe [107].

#### **4.8 Waschschritte vor dem Verdau**

Eine wichtige Beobachtung, die im Verlauf dieser Arbeit gemacht wurde, war die positive Auswirkung mehrerer dem Verdau vorgeschalteter Waschschritte auf das Verdauergebnis. Die Einführung von Waschschritten vor dem Verdau findet sich auch bei anderen Autoren. So wird z.B. die NC-Membran nach dem Blockierschritt mit PVP-40 vor dem Verdau bis zu 10 mal mit Wasser gewaschen [92], oder es wird nach dem Verdau die NC-Membran mit Wasser gewaschen, was die Sensitivität der anschließenden MS-Analyse erhöht [85], obwohl es dabei zu Probenverlusten kommen kann [6].

In der vorliegenden Arbeit wurden die Membranen nach durchgeführter ECL vor dem Verdau mit Verdau-puffer gewaschen; dieser war basisch und enthielt 10% ACN. Eine Waschlösung dieser Zusammensetzung wurde auch von anderen Autoren für das Waschen von Membranen nach immunochemischer Detektion verwendet [33; 96]. Lui et al. stellten fest, daß Proteine nicht aus einem NC-Elektroblot gelöst wurden, wenn dieser mit bis zu 40% organischem

Lösungsmittel wie ACN in wäßriger Lösung gewaschen wurde, sei es in saurem oder basischem Milieu [91].

In der vorliegenden Arbeit wurden die Membranen alternativ in einem Versuch mit saurer DB71-Verdünnungslösung anstatt mit Verdaupuffer gewaschen. Diese bestand aus H<sub>2</sub>O, Ethanol und Essigsäure im Verhältnis 5:4:1. Bezüglich der Sichtbarkeit der Banden nach der anschließenden Färbung mit DB71 war ähnliches festzustellen wie nach dem Waschen mit Verdaupuffer: Die Banden der in schwächerem Maße vorhandenen Proteine wie Glycogenphosphorylase und BSA waren ab Verdünnung 3 nicht mehr anfärbbar. Was die Anzahl der Spektren von NC betraf, zeigte sich im Vergleich des Waschens mit DB71-Verdünnungslösung mit dem manuellen Waschen mit Verdaupuffer keine Verbesserung.

In der vorliegenden Arbeit war die Idee, die Membranen vor dem Verdau zu waschen, entstanden, als festgestellt wurde, daß die Messung Roti-Block-haltiger Proben mit HCCA-haltigen Matrices nicht kompatibel war; dies zeigte sich erstmals in 3.2.1, als bei der Messung von Proben mit Roti-Block mit Mischmatrix keine Spektren sondern Cluster zu erhalten waren.

In 3.2 wurde eine Waschmethode entwickelt, mit der es möglich war, Roti-Block zunächst von Spots von Membranen, bei denen keine ECL durchgeführt worden war, ausreichend zu entfernen, so daß die Proben auch mit HCCA-Matrices gemessen werden konnten: Nach 3maligem Waschen der Spots über 2 Stunden waren vereinzelt Spektren von NC meßbar, jedoch kein Spektrum von PVDF, nach 6maligem Waschen zeigten sich höhere Sequenzabdeckungen von NC und es konnten erstmals auch Spektren von PVDF gemessen werden. Ein Versuch mit 2maligem Waschen der Spots über 17 Stunden zeigte geringfügig niedrigere Sequenzabdeckungen als mit 6maligem Waschen über 2 Stunden. In einem weiteren Versuch wurde herausgefunden, daß sich Roti-Block durch 2maliges automatisiertes Waschen zuerst mit 50% ACN für 2 Minuten und dann mit 100% ACN für 10 Minuten nicht genügend entfernen ließ, um Spektren mit einer HCCA-Matrix zu erhalten.

Aus diesen Beobachtungen wurde der Schluß gezogen, daß die Anwendung von mehreren, nämlich 6 Waschrufen mit Verdaupuffer über einen kurzen Zeitraum von 2 Stunden zu den besten Ergebnissen führt.

In 3.3 wurde die Waschmethode weiterentwickelt, um bestmögliche Ergebnisse von Membranen zu erhalten, bei denen eine ECL durchgeführt worden war. Hierbei wurden alle Proben sowohl mit DHB/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Matrix als auch mit HCCA-Matrix nach Jahn gemessen, wobei die im folgenden diskutierten Ergebnisse sich auf die Messung mit letzterer beziehen.

Zunächst wurden in 3.3.2 Membranen, die nur mit Roti-Block inkubiert worden waren, noch einmal, ähnlich wie in 3.2.6, über einen langen Zeitraum mit Verdaupuffer gewaschen (3 mal über 90 h). Es wurden von NC nun Spektren für alle Proteine bis einschließlich Verdünnung 3 gemessen, auch, im Gegensatz zu 3.3.1.4, wo unbehandelte Membranen ohne vorherige Waschschrte verdaut worden waren, für Glycogenphosphorylase. Auf PVDF konnte außer der starken Bande von Carboanhydrase (bis Verdünnung 4) bei allen anderen Proteinen nur Verdünnung 1 angefärbt und somit auch nur von diesen Banden Spektren erhalten werden. Im nächsten Versuch, 3.3.3.1, wurden Membranen, bei denen eine ECL durchgeführt worden war, mit Verdaupuffer 10mal über 20 h gewaschen. Der Verdau lieferte von NC für die starken Banden Ovalbumin bzw. Carboanhydrase gute Spektren bis einschließlich Verdünnung 2 bzw. 4 (13,07 bzw. 2,77 pmol / Spur). Es konnten jedoch nicht nur gute Spektren von NC gemessen werden, sondern auch der Verdau von PVDF ergab diesmal gute Spektren der starken Proteine Ovalbumin bzw. Carboanhydrase bis einschließlich Verdünnung 2 bzw. 3. In 3.3.1.4, dem Verdau unbehandelter Membranen, waren von PVDF ohne den „Sequence Editor“ keine Sequenzabdeckungen zu erhalten. Zurückgeführt wurde diese Verbesserung, wie schon in 3.2.4, auf eine Verminderung von Verunreinigungen auf den Membranen und damit im Verdauextrakt durch das mehrmalige Spülen, wodurch weniger Störfaktoren bei der massenspektrometrischen Messung vorhanden waren. Durch die Waschschrte lieferte somit selbst ein Verdau nach ECL bessere Ergebnisse als ein Verdau ohne ECL, vor dem die Membranen nicht gewaschen worden waren.

In den nächsten Versuchen wurden die Waschschrte automatisiert. Zu diesem Zweck wurden nun nicht mehr die gesamten Membranen vor der Färbung mit Verdaupuffer gewaschen, sondern die Membranen wurden zuerst gefärbt, dann die halben Banden ausgeschnitten und einzeln in den Mikrotiterplatten vom Pipettierroboter gewaschen, wobei auch das Schütteln der Mikrotiterplatte auf dem integrierten Schüttler möglich war. Es war festzustellen, daß der Schüttelschritt die Ergebnisse von NC verbesserte, da nicht nur Spektren in Verdünnung 1, sondern auch in Verdünnung 2 zu messen waren. Was PVDF betraf, so waren in beiden Versuchen lediglich vereinzelt Spektren zu erhalten. Im Vergleich mit 3.3.3.1, dem manuellen Spülen, waren die Ergebnisse in diesem Versuch (automatisches Spülen + Schütteln) von NC ähnlich, die Spektren von PVDF sehr viel spärlicher und vereinzelt durch Roti-Block überlagert (nur Carboanhydrase konnte hier identifiziert werden). Als beste automatisierte Waschmöglichkeit für NC hatte sich in dieser Arbeit das 9malige Waschen mit 200 µl Verdaupuffer pro Well inklusive Schütteln der Mikrotiterplatte

herausgestellt. Hiermit konnten bei der Messung mit HCCA-Matrix nach Jahn Spektren von Ovalbumin von NC bis einschließlich Verdünnung 2 (13,07 pmol / Spur) erhalten werden. Beim automatisierten 10maligen Waschen mit 180 µl Verdauopuffer pro Well ohne Schütteln konnten mit HCCA-Matrix nach Jahn von PVDF Spektren aller Proteine in Verdünnung 1 (5,52 bis 26,14 pmol / Spur) gemessen werden.

Im Vergleich zum Verdau nach automatisiertem Waschen ergab die Messung mit HCCA-Matrix nach Jahn des Verdau nach 10maligem manuellen Spülen der ganzen Membranen mit Verdauopuffer Spektren von NC von Ovalbumin bis einschließlich Verdünnung 2 (13,07 pmol/Spur) bzw. von Carboanhydrase bis einschließlich Verdünnung 4 (2,77 pmol/Spur) und Spektren von PVDF von Ovalbumin bis Verdünnung 2 bzw. von Carboanhydrase bis Verdünnung 3 (5,53 pmol/Spur). Die etwas besseren Ergebnisse nach manuellem Waschen sind eventuell dadurch zu erklären, daß manuell mit einer größeren Flüssigkeitsmenge (ca. 150 bis 200 ml) gewaschen wurde als automatisch (180 bis 200 µl).

Die parallele Messung aller Versuche mit DHB/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Matrix ergab immer Spektren auch von stärker verdünnten Proben von BSA, Ovalbumin oder Carboanhydrase meist bis einschließlich Verdünnung 4 oder Verdünnung 5.

#### **4.9 Matrices**

Anfänglich wurden geblottete Proteine auf Glasfaser-, PVDF- oder NC-Membranen tryptisch verdaut und dann mit einem Sequencer die Aminosäure-Sequenz aus dem Material in der Extraktionsflüssigkeit bestimmt [3; 8]. Mit der Entwicklung der Massenspektrometrie wird heutzutage statt des Sequencing meist die Kombination MALDI-TOF-MS mit PMF angewendet, da MALDI zeiteffektiv und automatisierbar ist [69]. In der vorliegenden Arbeit wurde im Hinblick auf eine mögliche Automatisierung jede Messung nicht nur mit einer DHB-haltigen, sondern auch mit einer HCCA-haltigen Matrix durchgeführt; insgesamt wurden 3 verschiedene Matrices verwendet: HCCA-Matrix nach Jahn (siehe 2.13.1), DHB/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Matrix (siehe 2.13.3) und DHB/HCCA-Mischmatrix (siehe 2.13.2).

HCCA-haltige Matrices verteilen sich gleichmäßig über den gesamten Meßteller und eignen sich gut für automatische Messungen [48], da der Laser nach einem bestimmten, vom Benutzer eingegebenen Schema seine Schüsse über den gesamten Meßteller verteilt, die so in jedem Fall auf Matrix treffen. Die Peptide verteilen sich allerdings auch über den gesamten Meßteller, wodurch die Probe relativ dünn wird. Je niedriger konzentriert die Probe, desto weniger Peptid-Peaks sind detektierbar. In der vorliegenden Arbeit wurde die HCCA-Matrix nach Jahn auf einen Anchor-Chip aufgetragen, der aufgrund der hydrophoben Umrandung des

Meßtellers die Matrix auf einen kleinen Bereich konzentrierte [119] und außerdem ein Verlaufen der Probe verhinderte. Die Matrix lieferte um so bessere Spektren, je dünner sie aufgetragen wurde, d.h. je schneller die Pipettenspitze über die Meßteller gezogen wurde. Aufgrund ihrer dünnen Beschaffenheit war sie sehr empfindlich gegenüber höherer Laserpower und mehrmaligem Beschuß. Die Ausbeute an Spektren war im gesamten Meßbereich aufgrund der gleichmäßigen Verteilung der Probe gleich. Nach dem Auftragen der Probe wurden die Meßspots auf dem Target noch einmal gewaschen, eine Praktik, die auch von anderen Autoren bei der Benutzung HCCA-haltiger Matrices empfohlen wird [50; 84; 139], da Salze und Verunreinigungen so entfernt werden können.

DHB-haltige Matrices hingegen bilden Kristalle am äußersten Rand des Meßspots [139], die umso größer sind, je langsamer die Matrix trocknet. Diese DHB-Kristalle nehmen die Peptide besonders gut auf, wodurch es zu einer Konzentration der Peptide in einem bestimmten Bereich des Meßtellers kommt [48]. Werden diese "hot spots" [139] gezielt manuell anvisiert, erhält man besonders intensive Signale, was jedoch eine automatische Messung aufgrund der inhomogenen Verteilung der Kristalle ausschließt. Die DHB/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Matrix wurde auf einem Stahl-Target gemessen. Ein Nachteil dieser Matrix besteht darin, daß die Phosphorsäure auf Dauer die Oberfläche des Stahl-Targets angreift, was bei häufigerer Benutzung zu einem Verlaufen der aufgetragenen Matrix oder der Proben über den Meßteller hinaus führt. Oft fand sich die zu messende Probe dann neben dem Meßteller oder war mit der benachbarten Probe zusammengelaufen, wodurch die Identifikation erschwert wurde oder der Probenauftrag wiederholt werden mußte.

Abhilfe schaffen könnte hierbei eine erst vor kurzem eingeführte Variante der DHB/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Matrix, bei der DHB mit Methylen-Diphosphonsäure kombiniert wird [79], die das Edelstahl-Target nicht angreifen dürfte. Es wäre sinnvoll, diese Matrix zukünftig auf ihre massenspektrometrischen Eigenschaften und die erzielten Sequenzabdeckungen hin zu untersuchen.

Auch die DHB/HCCA-Mischmatrix wurde auf einem Stahl-Target gemessen, was ebenfalls die oben erwähnte Problematik des Verlaufens mit sich brachte. Auch hier sammelten sich die Peptide vor allem in den DHB-Kristallen, die allerdings spärlicher vorhanden waren als in obiger Matrix. Es konnten teilweise auch Spektren in HCCA-Bereichen gemessen werden, die allerdings nicht die Intensität der Spektren besaßen, die bei Beschuß der DHB-Kristalle erreicht wurde.

Die "Sanftheit" der massenspektrometrischen Messung ist abhängig vom Ausmaß der Fragmentierung der Peptide. Dieses ist um so niedriger, je höher die initiale

Ionengeschwindigkeit ist, und diese wird wiederum von der verwendeten Matrix bestimmt [59]. Bei einer Messung mit HCCA ist die initiale Ionengeschwindigkeit relativ niedrig und das Ausmaß der Fragmentierung relativ hoch, bei DHB ist die initiale Ionengeschwindigkeit relativ hoch und das Ausmaß der Fragmentierung folglich relativ niedrig, weshalb HCCA auch als "heiße" und DHB als "kalte" Matrix bezeichnet wird [46]. Messungen mit DHB-Matrix zeigen bei wiederholtem Beschuß eine länger anhaltende Signalintensität als Messungen mit HCCA-Matrix [59].

In der vorliegenden Arbeit fällt beim Vergleich von Spektren von HCCA- und DHB-Matrices auf, daß selbst niedrig konzentrierte Proben durch die Messung mit DHB/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Matrix aufgrund der Entstehung intensiverer Signale noch identifiziert werden können, was bei HCCA-haltigen Matrices nicht der Fall ist. Die DHB/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Matrix sollte daher als Goldstandard bezeichnet werden.

Ein Beispiel hierfür ist u. a. Versuch 3.3.3.3, in dem eine Messung mit DHB/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Matrix von NC Carboanhydrase bis zu 0,692 pmol / halber Bande identifizierbar macht, eine Messung mit HCCA-Matrix nach Jahn dies jedoch nur bis zu einer Menge von 5,535 pmol / halber Bande erlaubt.

Auch andere Autoren stellten fest, daß mit DHB/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Matrix eine höhere Signalintensität erreicht wird als mit Matrices auf HCCA-Basis [135].

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, daß in den Proben vorhandener Roti-Block nicht mit allen Matrices kompatibel ist. Einzig die DHB/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Matrix lieferte gute Spektren von solchen Proben, HCCA-haltige Matrices wie die DHB/HCCA-Mischmatrix oder die HCCA-Matrix nach Jahn jedoch nicht. So zeigte sich in 3.2.2, daß Roti-Block bei der Messung mit HCCA-Matrices Cluster bildet, die das Massenspektrum des zu messenden Proteins komplett überdecken bzw. nur den Erhalt einer niedrigen Sequenzabdeckung aufgrund des resultierenden schlechten Spektrums erlauben.

Die Matrixpräparation ist von entscheidender Bedeutung für die Intensität der zu messenden Spektren, da sie bei der Messung die Entstehung von Ionen stark beeinflusst [84]. Während des MALDI-Ionisierungsschrittes können sehr unterschiedliche Ionensignale auftreten, was durch die inhomogene Verteilung des Analyten in den Matrix/Proben-Kristallen bedingt ist [29].

Es existiert eine große Anzahl unterschiedlicher Matrixpräparationsmethoden [127]; im Folgenden sind einige häufig verwendete erwähnt, von denen aber wiederum abgewandelte Formen bestehen.

Am häufigsten Verwendung findet die "dried droplet"-Methode [72]. Hierbei werden Matrixlösung und Peptidprobe gemischt, auf ein Target aufgetragen, getrocknet und gemessen. Mit dieser Technik können, wenn die Matrix langsam auskristallisiert, vor allem die Signale von größeren Peptiden oder Proteinen mit höheren Massen detektiert werden [135].

Eine weitere ist die "Sandwich"- oder "Two-layer"-Methode, bei der zuerst eine Schicht Matrix aufgetragen und getrocknet und darauf eine zweite Schicht aus Matrix oder Proben-Matrix-Gemisch aufgetragen wird [104].

Bei der "Bottom-layer"-Methode wird auf das Target zuerst die Probe aufgetragen und getrocknet und darauf als zweite Schicht die Matrix aufgetragen [39]. Mit dieser Technik können besonders gut Signale von Peptiden oder Proteinen mit niedrigeren Massen nachgewiesen werden [135].

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Variante der Sandwich-Methode angewandt: Es wurde zuerst die Matrix auf Target oder Anchor Chip aufgetragen, getrocknet und anschließend die Probe auf die Matrix aufgetragen und getrocknet (siehe 2.13).

#### **4.10 Datenauswertung und PMF**

Die Bearbeitung der MALDI-Massenspektren erfolgte manuell mit dem Programm Flex Analysis. Nach Anwendung der Optionen "Smooth" und "Baseline Substraction" erfolgte zunächst die Verbesserung der Massengenauigkeit über interne Kalibrierung, entweder statistisch oder anhand einer Liste, die unter anderem die Peaks mit den Massen 842.5099 und 2211.1046 m/z aus der Autolyse des Trypsins enthielt.

Die Kalibrierung der Spektren und die anschließende Suche in der Datenbank erfordern menschliches Eingreifen aufgrund bestimmter, teils auf Erfahrung basierender Überlegungen und eignen sich daher nicht für eine Automatisierung. Es gibt zwar Arbeiten, in denen PMF automatisiert wurde, dennoch ist eine darauffolgende manuelle Bearbeitung der Spektren vonnöten, um die Identifikationsrate zu erhöhen [19].

Die Idee des "Peptide Mass Fingerprinting" entstand 1993 [137; 61]. Das beim Verdau durch ein bestimmtes Enzym entstandene Massenspektrum ist spezifisch wie ein Fingerabdruck für das verdaute Protein und kann von einem Suchprogramm (z.B. Mascot) in einer Datenbank (z.B. MSDB) gesucht werden, in der die Fingerabdrücke aller enthaltenen Proteine aus ihren Aminosäuresequenzen berechnet worden sind. Abhängig von der Anzahl der Peptidmassen aus dem Verdau wird die AS-Sequenzabdeckung bestimmt, die zusammen mit dem Mowse Score das wichtigste Kriterium für eine verlässliche Identifikation ist.

#### 4.11 Handhabung subpicomolarer Proteinmengen

Die Massenspektrometrie erlaubt heutzutage die Detektion von Peptiden bis in den Femtomolbereich. Der limitierende Faktor dabei ist allerdings vor allem der Verlust von Probenmaterial bei der Handhabung der Proben, die ein "analytisches schwarzes Loch" darstellt [103]. Bei Proteinmengen von etwa 100 pmol fällt ein geringer Verlust noch nicht ins Gewicht, aber bei Mengen kleiner als 5 bis 10 pmol sind auch geringe Verluste von ausschlaggebender Bedeutung für die Proteinidentifikation und die Ausbeute an identifizierbaren Peptiden fällt zunehmend ab [122]. Je niedriger die initiale Probenmenge im Gel ist, desto höher ist der prozentuale Probenverlustanteil während des Verdauvorganges [120].

Bei einem In-Gel-Verdau sind es typischerweise ca. 5% bis 10% der durch den Verdau erhaltenen Peptide, die schließlich auf das Target aufgetragen und massenspektrometrisch identifiziert werden können [92; 28].

Courchesne et al. gaben an, Proteine bis zu 0,5 pmol/Spur von PVDF-Membranen identifizieren zu können, unterhalb dieser Menge sei dies – im Gegensatz zum In-Gel-Verdau, dessen Detektionslimit von den Autoren mit 0,125 pmol/Spur angegeben wurde – nur in vereinzelten Fällen möglich [26].

Lochnit et al. identifizierten Proteinmengen von ca. 80 fmol aus In-Gel-Verdau; für die verlässliche Proteinidentifikation von On-Membrane-Verdau nach ECL benötigten sie aber eine zehnfach höhere Proteinmenge, da im Gegensatz zu Gelen Blot-Membranen einen größeren Hintergrund an Verunreinigungen haben [88].

Dufresne-Martin et al. vermuten auch einen Probenverlust während der vielen (Wasch)schritte beim Western Blot und beschränken sich in ihren Versuchen auf den Nachweis der reichlich vorhandenen Proteine [33].

In der vorliegenden Arbeit war nach Durchführung der ECL mit anschließenden Waschschritten (siehe 3.3.3.3) die Identifikation bei Messung mit DHB/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Matrix bis einschließlich Verdünnung 4 (1,26 bis 3,27 pmol / Spur) oder 5 (0,63 bis 1,63 pmol / Spur) nur von BSA, Ovalbumin und Carboanhydrase möglich. Glycogenphosphorylase konnte nur bis einschließlich Verdünnung 3 (1,38 pmol / Spur) identifiziert werden und Trypsin Inhibitor war auf der Membran nach Färbung mit DB71 nicht mehr zu erkennen, was für einen Probenverlust dieses kleinen Proteins eventuell während der Waschschriffe spricht.

Als Faustregel gilt, daß Spots, die mit Coomassie anfärbbar sind, auch mit PMF identifiziert werden können [124]. Da DB71 eine etwa 10mal so hohe Sensitivität hat wie Coomassie [63], ist es zwecklos, aus auf der Membran nicht mehr anfärbbaren Banden "blind" Proben

auszuschneiden bzw. Spots auszustechen, worauf in der vorliegenden Arbeit auch verzichtet wurde (graue Tabellenzellen).

Materialverluste können während jedes Schrittes des Arbeitsablaufes entstehen; so werden beispielsweise beim Blotvorgang die Proteine nicht zu 100% vom Gel auf die Blotmembran übertragen [17], sei es aufgrund inkompletten Transfers oder unzureichender Bindeeigenschaften der Membran [133].

Generell ist bekannt, daß bei einem On-Membrane-Verdau die Peptidausbeute mit Lys-C durchschnittlich nur ca. 50% und mit Trypsin ca. 70% beträgt [91]. Darüber hinaus bleiben bei den Pipettierschritten, die der Verdauvorgang erfordert, oftmals Peptide an den Wandungen der Reaktionsgefäße oder an Pipettenspitzen hängen [50]. Auch nach der Resuspension von zuvor in der Speed Vac getrockneten Verdauextrakten zeigen sich oft Materialverluste, die ebenfalls auf das Anhaften der Peptide an Reaktionsgefäßen zurückgeführt werden [45]. Aus diesem Grund bringt diese Prozedur oftmals keine Verbesserung der Sequenzabdeckung, obwohl augenscheinlich ein größerer Prozentsatz der Probe auf das Target gespottet wird [45].

Um Verlusten entgegenzuwirken, sollte man die Menge an verfügbarem Ausgangsmaterial in Gel oder Membran möglichst hoch wählen und versuchen, die Ausbeute an Peptiden während des Verdauens und während der Extraktion weitestgehend zu erhöhen. Um die Menge des Ausgangsmaterials zu erhöhen, wird beispielsweise vorgeschlagen, durch dem Verdau vorangehende Proteinpurifikation Material zu konzentrieren [122; 113], mehrere Spots zu sammeln und vor dem Verdau mittels Gelkonzentrierungssystem auf einen einzigen Spot zu übertragen [8; 122] oder mehrere Spots zusammen in einem Behältnis zu verdauen [53]. In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls das Ausgangsmaterial erhöht, um verlässliche Identifikationen zu erhalten. Beim In-Gel-Verdau von kleinen Spots (Durchmesser 2 mm) von Proteingemisch 2 ergaben sich nur für Ovalbumin (Verdünnung 1) und Carboanhydrase (Verdünnungen 1 bis 3) verlässliche Identifikationen, alle anderen Spots lieferten keine Verdauergebnisse. Als derselbe Versuch aber mit großen Spots (Durchmesser 3,5 mm) durchgeführt wurde, lieferten alle Spots bis einschließlich Verdünnung 4 (0,23 bis 1,327 pmol Protein pro Spot) verlässliche Proteinidentifikationen. Aus den Ergebnissen dieser Versuche ist ersichtlich, daß die Anzahl an identifizierten Proteinen sehr viel größer ist, wenn große Spots (Durchmesser 3,5 mm) statt kleiner (Durchmesser 2 mm) verdaut werden, da in den großen geschätzt etwa doppelt soviel Proteinmaterial enthalten ist (siehe 2.4.2), was die Identifizierung der Proteine erleichtert.

Eine ähnliche Beobachtung wurde in Versuch 3.3.1.2, beim Verdau von Membran-Spots gemessen mit HCCA-Matrix nach Jahn gemacht. Hier konnten aus Proteingemisch 2 lediglich Proteine aus Verdünnung 1 und 2 mithilfe des Sequence Editors identifiziert werden; die PVDF-Membran lieferte nur drei Spektren aus Verdünnung 1. Es wurde vermutet, daß die spärliche Ausbeute an verlässlichen Sequenzabdeckungen sich auf die geringen absoluten Proteinmengen in den Spots zurückführen ließ. Spots der Banden von Verdünnung 1 des Proteingemisches 2 beinhalteten geschätzte Mengen von ca. 0,69 bis 3,27 pmol.

In Versuch 3.3.1.4 wurden anstatt Membran-Spots halbe Banden verdaut. Ausgeschnitten aus Verdünnung 1 enthielten sie geschätzte Proteinmengen von ca. 2,76 bis 15,92 pmol. Der Verdau von der NC-Membran lieferte teils zuverlässige Identifikationen bis Verdünnung 3 und vereinzelte Identifikationen mittels Sequence Editor bis Verdünnung 4. Der Verdau von der PVDF-Membran zeigte im Vergleich zum Verdau von Spots ähnliche bis leicht erhöhte Sequenzabdeckungen.

Eine weitere Möglichkeit, die Menge an Ausgangsmaterial zu erhöhen, besteht darin, die entstandenen Peptide nach dem Verdau zu konzentrieren, etwa indem die Verdauextrakte mit sogenannten ZipTips<sub>C18</sub>, Reverse-Phase-Mikrotrennsäulen, konzentriert werden [124] oder die Extrakte in der Speed Vac getrocknet und anschließend in kleineren Volumina wieder gelöst werden [135], wobei durch diese zusätzlichen Schritte aber wiederum das Risiko des Probenverlustes erhöht wird [96]. In der vorliegenden Arbeit wurde daher auf solche Konzentrierungsschritte verzichtet.

Weitere Faktoren, die der Proteinidentifikation ein Limit setzen, sind chemische Verunreinigungen der Probe, die sich in Form von "Rauschen" in den gemessenen Spektren niederschlagen. Solche Verunreinigungen können neben Roti-Block z.B. Rückstände von Färbungen, Verschmutzung durch Keratin oder Autolyseprodukte von Trypsin sein. Um z.B. Verunreinigungen durch Farbstoff entgegenzuwirken, wurde bei den Experimenten der vorliegenden Arbeit für die Färbung der Membranen der Farbstoff DB71 verwendet, der sich hierbei als mit der Massenspektrometrie kompatibel erwiesen hat. Es wurde stets mit Handschuhen gearbeitet oder aber es wurden die erforderlichen Pipettierschritte durch den Verdauroboter ausgeführt, so daß die Gefahr einer Verschmutzung durch Keratin minimiert wurde. Als Verdauenzym wurde modifiziertes Trypsin verwendet, das relativ resistent gegenüber Autolysereaktionen ist [115].

In der vorliegenden Arbeit war die verlässliche Identifikation von Ovalbumin von der NC-Membran nach ECL bei Messung mit HCCA-Matrix nach Jahn bis einschließlich

Verdünnung 2 (13,07 pmol/Spur), vom unbehandelten Gel bei Messung mit HCCA-Matrix nach Jahn hingegen bis Verdünnung 4 (3,27 pmol/Spur) möglich.

Die Messung des NC-Verdau nach ECL mit DHB/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Matrix ergab Spektren von Ovalbumin bis einschließlich Verdünnung 5 (1,63 pmol/Spur). Dies zeigt, daß der On-Membrane-Verdau durchaus vergleichbar gute Ergebnisse wie der In-Gel-Verdau liefern kann.

Proteine wie Glycogenphosphorylase oder Trypsin Inhibitor waren von der Membran nicht bis in diesen Picomolbereich zu identifizieren, was vom Gel problemlos möglich war. Dies ist allerdings nicht verwunderlich, wenn man sich über die oben erwähnten Quellen des Materialverlustes bewußt ist und außerdem die Behandlung der Membranen während und nach der ECL in Betracht zieht.

Das Ziel dieser Arbeit, nämlich die erfolgreiche massenspektrometrische Identifikation von mit Chemolumineszenz detektierten und mit DB71 gefärbten Proteinen im niedrigen Picomolbereich von einer einzigen Membran herunter wurde erreicht, dennoch sind bei einem so komplexen Thema mit so vielen veränderbaren Parametern sicherlich durch weitere Forschung in diesem Bereich noch viele alternative Wege möglich, die ebenfalls zum Ziel führen können.

## 5. Zusammenfassung

Ein wichtiger Bestandteil der Proteomik ist die Identifizierung exprimierter Proteine und die Analyse der Proteome von Zellen, Organellen und ganzen Organismen. Diese Methoden werden z.B. bei der Untersuchung von Krankheitserregern oder pathologischen Veränderungen in der medizinischen Forschung eingesetzt.

Die 2D-Gelelektrophorese mit anschließendem In-Gel-Verdau in Kombination mit der Massenspektrometrie stellt neben LC-basierenden Methoden eine der bisher besten Möglichkeiten dar, Proteine zuverlässig zu identifizieren.

In dieser Arbeit wurde eine automatisierte Methode entwickelt, nach der 2D-Gelelektrophorese und dem Transfer der Proteine auf NC- bzw. PVDF-Membranen den proteolytischen Verdau auf der Blot-Membran zu ermöglichen.

Zur Detektion der Proteine auf den Membranen wurden diese mit dem Farbstoff Direct Blue 71 angefärbt. Anschließend konnten die Spots aus den Membranen ausgeschnitten und dem automatisierten Verdau zugeführt werden. Ein Großteil dieser Arbeit bestand darin, den automatischen On-Membrane-Verdau hinsichtlich der nachfolgenden massenspektrometrischen Identifizierung der Proteine durch Peptide-Mass-Fingerprint-Analysen zu optimieren, indem Parameter wie Verdauzeit, Zusammensetzung der Extraktionslösung, Zugabe von Octylglycosid zu den Verdau puffern und Trypsinmenge variiert wurden.

Diese Methode wurde dann für die Analyse von Proteinen nach vorangegangenem Western Blot und Immunodetektion per ECL weiterentwickelt. Hier war die Entwicklung einer effizienten Waschmethode zur Entfernung des Blockierungsreagenzes Roti-Block von entscheidender Bedeutung.

Nach dem automatischen Verdau wurden die Verdauextrakte nach geeigneter Matrixpräparation auf einen MS-Probenträger aufgetragen und der MS-Analyse zugeführt. In diesem Teil der Arbeit wurden die Proteinidentifizierungen mittels dreier verschiedener Matrices verglichen: HCCA-Matrix nach Jahn, DHB/HCCA-Mischmatrix und DHB/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Matrix. Hierbei stellte sich heraus, daß Matrices unterschiedlich stark auf Kontaminationen aus dem Western-Blot Prozess reagieren. So stört das Blockierungsreagenz Roti-Block die Messung mit HCCA-haltigen Matrices erheblich.

Die Entwicklung dieser automatisierten Verdauemethode direkt von Western Blot-Membranen ermöglicht nun mit minimiertem manuellem Aufwand die Identifizierung von Proteinen aus komplexen Proteinproben heraus direkt von Western Blot-Membranen nach immunologischer Detektion und wird zukünftig derartige Analysen deutlich erleichtern.

## 6. Summary

An important part of proteomics is the identification of expressed proteins and the analysis of proteomes of cells, organelles or whole organisms. These methods are used in medical research e.g. for the investigation of pathogens or pathologic changes.

The 2D-gel-electrophoresis combined with in-gel digest and mass spectrometry is – apart from LC-based methods – so far one of the best strategies to identify proteins reliably.

In this thesis, an automated method for the proteolytic digest on the blotting membranes after 2D-gel-electrophoresis and blotting of the proteins onto NC- or PVDF-membranes was developed.

For the detection of proteins on the membranes, a Direct Blue 71 staining was performed.

Afterwards, spots were picked from the membranes and subjected to the automated digestion.

A major part of this work focused on the optimization of the automated on-membrane-digest in order to get optimal results in the following mass spectrometric protein identification by peptide-mass-fingerprint-analysis. Therefore, parameters like digestion time, composition of the extraction solution, addition of detergents like octylglycoside to the digestion buffer or the amount of trypsin were varied.

Furthermore, this method adapted for the analysis of proteins after western blotting and immunodetection via ECL. For this purpose, the development of an efficient washing method to remove the blocking reagent Roti-Block was the critical point.

After the automated digestion and the extracted peptides were applied onto the MS sample tray by appropriate matrix preparation and subjected to MS-analysis.

In a further part of the thesis, three different matrices were compared regarding optimal protein identification: the HCCA-matrix introduced by Jahn, a mixed matrix consisting of DHB/HCCA and the DHB/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-matrix.

It was observed that the matrices showed remarkably different sensitivities towards contaminations of the samples with Roti-Block derived from the blocking process of the western blot process. The blocking reagent Roti-Block was found to impair the measurement with HCCA-containing matrices tremendously.

The automated digestion method directly from western blot membranes developed in this thesis enables now the identification of proteins from complex protein samples directly from western blot membranes after immunologic detection with a minimal manual intervention and will, therefore, facilitate such analyses in the future significantly.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Aebersold, R. and D. R. Goodlett (2001). "Mass spectrometry in proteomics." Chem Rev **101**(2): 269-95.
2. Aebersold, R. and M. Mann (2003). "Mass spectrometry-based proteomics." Nature **422**(6928): 198-207.
3. Aebersold, R. H., J. Leavitt, et al. (1987). "Internal amino acid sequence analysis of proteins separated by one- or two-dimensional gel electrophoresis after in situ protease digestion on nitrocellulose." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(20): 6970-4.
4. Akhavan-Tafti, H., R. DeSilva, et al. (1998). "Characterization of Acridancarboxylic Acid Derivatives as Chemiluminescent Peroxidase Substrates." J. Org. Chem. **63**(4): 930-937.
5. Anderson, N. L., J. Taylor, et al. (1981). "The TYCHO system for computer analysis of two-dimensional gel electrophoresis patterns." Clin Chem **27**(11): 1807-20.
6. Bai, J., M. G. Qian, et al. (1995). "Peptide mapping by CNBr degradation on a nitrocellulose membrane with analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry." Anal. Chem. **67**(10): 1705-1710.
7. Baron, C. and T. E. Thompson (1975). "Solubilization of bacterial membrane proteins using alkyl glucosides and dioctanoyl phosphatidylcholine." Biochim Biophys Acta **382**(3): 276-85.
8. Bauw, G., J. Van Damme, et al. (1989). "Protein-electroblotting and -microsequencing strategies in generating protein data bases from two-dimensional gels." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(20): 7701-5.
9. Bender, B. H. (2009). "Methodenoptimierung für die automatisierte Proteinidentifikation." VVB Laufersweiler Verlag, Gießen
10. Bensalem, N., S. Masscheleyen, et al. (2007). "High Sensitivity Identification of Membrane Proteins by MALDI TOF-MASS Spectrometry Using Polystyrene Beads." Journal of Proteome Research **6**: 1595-1602.
11. Bienvenut, W. V., J. C. Sanchez, et al. (1999). "Toward a clinical molecular scanner for proteome research: parallel protein chemical processing before and during western blot." Anal Chem **71**(21): 4800-7.
12. Boehringer Mannheim Biochemica. "Technical Note on Trypsin, 0892.T31.4. 1419242 B RD 2497."
13. Birkelund, S., L. Bini, et al. (1997). "Characterization of Chlamydia trachomatis 12-induced tyrosine-phosphorylated HeLa cell proteins by two-dimensional gel electrophoresis." Electrophoresis **18**(3-4): 563-7.
14. Blobel, G. (1980). "Intracellular protein topogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(3): 1496-500.

15. Blobel, G. (2000). "Protein targeting." Biosci Rep **20**(5): 303-44.
16. Boguski, M. S., T. M. Lowe, et al. (1993). "dbEST--database for "expressed sequence tags"." Nat Genet **4**(4): 332-3.
17. Bunai, K., M. Nozaki, et al. (2003). "Proteomic analysis of acrylamide gel separated proteins immobilized on polyvinylidene difluoride membranes following proteolytic digestion in the presence of 80% acetonitrile." Proteomics **3**(9): 1738-49.
18. Burnette, W. N. (1981). ""Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." Anal Biochem **112**(2): 195-203.
19. Canelle, L., C. Pionneau, et al. (2004). "Automating proteome analysis: improvements in throughput, quality and accuracy of protein identification by peptide mass fingerprinting." Rapid Commun Mass Spectrom **18**(23): 2785-94.
20. Chevallet, M., V. Procaccio, et al. (1997). "A nonradioactive double detection method for the assignment of spots in two-dimensional blots." Anal Biochem **251**(1): 69-72.
21. Cho, S., S. G. Park, et al. (2004). "Protein-protein interaction networks: from interactions to networks." J Biochem Mol Biol **37**(1): 45-52.
22. Cho, W. C. (2007). "Proteomics technologies and challenges." Genomics Proteomics Bioinformatics **5**(2): 77-85.
23. Chu, N. M., A. J. Janckila, et al. (1989). "Assessment of a method for immunochemical detection of antigen on nitrocellulose membranes." J Histochem Cytochem **37**(2): 257-63.
24. Cohen, S. L. and B. T. Chait (1996). "Influence of matrix solution conditions on the MALDI-MS analysis of peptides and proteins." Anal Chem **68**(1): 31-7.
25. Constantine, N. T., J. Bansal, et al. (1994). "Enhanced chemiluminescence as a means of increasing the sensitivity of western blot assays for HIV antibody." J Virol Methods **47**(1-2): 153-64.
26. Courchesne, P. L., R. Luethy, et al. (1997). "Comparison of in-gel and on-membrane digestion methods at low to sub-pmol level for subsequent peptide and fragment-ion mass analysis using matrix-assisted laser-desorption/ionization mass spectrometry." Electrophoresis **18**(3-4): 369-81.
27. Crane, R., B. Gadea, et al. (2004). "Aurora A, meiosis and mitosis." Biol Cell **96**(3): 215-29.
28. Cummings, E. D., J. M. Brown, et al. (2007). "High-throughput proteomics processing of proteins in polyacrylamide in a multiwell format." J Proteome Res **6**(4): 1603-8.

29. Dai, Y., R. M. Whittal, et al. (1996). "Confocal Fluorescence Microscopic Imaging for Investigating the Analyte Distribution in MALDI Matrices." Analytical Chemistry **68**(15): 2494–2500.
30. Davis, M. T., T. D. Lee, et al. (1995). "Microscale immobilized protease reactor columns for peptide mapping by liquid chromatography/mass spectral analyses." Anal Biochem **224**(1): 235-44.
31. Dickinson, J. and S. J. Fowler (2002). Quantification of Proteins on Western Blots Using ECL. The Protein Protocols Handbook. J. M. Walker. Totowa, NJ, Humana Press Inc.: 429-437.
32. Dove, A. (1999). "Proteomics: translating genomics into products?" Nat Biotechnol **17**(3): 233-6.
33. Dufresne-Martin, G., J. F. Lemay, et al. (2005). "Peptide mass fingerprinting by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry of proteins detected by immunostaining on nitrocellulose." Proteomics **5**(1): 55-66.
34. Dutt, M. J. and K. H. Lee (2000). "Proteomic analysis." Curr Opin Biotechnol **11**(2): 176-9.
35. Edman, P. (1949). "A method for the determination of amino acid sequence in peptides." Arch Biochem **22**(3): 475.
36. Edman, P. (1970). "Sequence determination." Mol Biol Biochem Biophys **8**: 211-55.
37. Edman, P. and G. Begg (1967). "A protein sequenator." Eur J Biochem **1**(1): 80-91.
38. Erdjument-Bromage, H., M. Lui, et al. (1998). "Examination of micro-tip reversed-phase liquid chromatographic extraction of peptide pools for mass spectrometric analysis." J Chromatogr A **826**(2): 167-81.
39. Evason, D. J., M. A. Claydon, et al. (2001). "Exploring the limits of bacterial identification by intact cell-mass spectrometry." J Am Soc Mass Spectrom **12**(1): 49-54.
40. Eynard, L. and M. Lauriere (1998). "The combination of Indian ink staining with immunochemiluminescence detection allows precise identification of antigens on blots: application to the study of glycosylated barley storage proteins." Electrophoresis **19**(8-9): 1394-6.
41. Fenn, J. B. (2003). "Electrospray wings for molecular elephants (Nobel lecture)." Angew Chem Int Ed Engl **42**(33): 3871-94.
42. Fenn, J. B., M. Mann, et al. (1989). "Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules." Science **246**(4926): 64-71.
43. Fernandez, J., M. DeMott, et al. (1992). "Internal protein sequence analysis: enzymatic digestion for less than 10 micrograms of protein bound to polyvinylidene difluoride or nitrocellulose membranes." Anal Biochem **201**(2): 255-64.

44. Fields, S. and O. Song (1989). "A novel genetic system to detect protein-protein interactions." Nature **340**(6230): 245-6.
45. Finehout, E. J. and K. H. Lee (2003). "Comparison of automated in-gel digest methods for femtomole level samples." Electrophoresis **24**(19-20): 3508-16.
46. Gabelica, V., E. Schulz, et al. (2004). "Internal energy build-up in matrix-assisted laser desorption/ionization." J Mass Spectrom **39**(6): 579-93.
47. Gershoni, J. M. and G. E. Palade (1983). "Protein blotting: principles and applications." Anal Biochem **131**(1): 1-15.
48. Ghafouri, B., H. Karlsson, et al. (2007). "2,5-Dihydroxybenzoic acid instead of alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid as matrix in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for analyses of in-gel digests of silver-stained proteins." Anal Biochem **371**(1): 121-3.
49. Gingras, A. C., R. Aebersold, et al. (2005). "Advances in protein complex analysis using mass spectrometry." J Physiol **563**(Pt 1): 11-21.
50. Gobom, J., M. Schuerenberg, et al. (2001). "Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid affinity sample preparation. A protocol for MALDI-MS peptide analysis in proteomics." Anal Chem **73**(3): 434-8.
51. Goodman, T., B. Schulenberg, et al. (2004). "Detection of phosphoproteins on electroblot membranes using a small-molecule organic fluorophore." Electrophoresis **25**(15): 2533-8.
52. Grabitzki, J., V. Sauerland, et al. (2005). "Identification of phosphorylcholine substituted peptides by their characteristic mass spectrometric fragmentation." Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng) **11**(3): 335-44.
53. Granvogl, B., P. Gruber, et al. (2007). "Standardisation of rapid in-gel digestion by mass spectrometry." Proteomics **7**(5): 642-54.
54. Haan, C. and I. Behrmann (2007). "A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background." J Immunol Methods **318**(1-2): 11-9.
55. Han, X., A. Aslanian, et al. (2008). "Mass spectrometry for proteomics." Curr Opin Chem Biol.
56. Hancock, K. and V. C. Tsang (1983). "India ink staining of proteins on nitrocellulose paper." Anal Biochem **133**(1): 157-62.
57. Harry, J. L., M. R. Wilkins, et al. (2000). "Proteomics: capacity versus utility." Electrophoresis **21**(6): 1071-81.
58. Havlis, J., H. Thomas, et al. (2003). "Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins." Anal Chem **75**(6): 1300-6.

59. Hazama, H., H. Nagao, et al. (2008). "Comparison of mass spectra of peptides in different matrices using matrix-assisted laser desorption/ionization and a multi-turn time-of-flight mass spectrometer, MULTUM-IMG." Rapid Commun Mass Spectrom **22**(10): 1461-6.
60. Henzel, W. J., T. M. Billeci, et al. (1993). "Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(11): 5011-5.
61. Henzel, W. J., C. Watanabe, et al. (2003). "Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting." J Am Soc Mass Spectrom **14**(9): 931-42.
62. Hong, H.-Y., G.-S. Yoo, et al. (2002). Detection of Proteins on Blots using Direct Blue 71. The Protein Protocols Handbook. J. M. Walker, Humana Press: 387-392.
63. Hong, H. Y., G. S. Yoo, et al. (2000). "Direct Blue 71 staining of proteins bound to blotting membranes." Electrophoresis **21**(5): 841-5.
64. Hong, H. Y., G. S. Yoo, et al. (2002). Detection of Proteins on Blots Using Direct Blue 71. The Protein Protocols Handbook. J. M. Walker. Totowa, NJ, Humana Press Inc.: 387-392.
65. Houthaeve, T., H. Gausepohl, et al. (1997). "Automated protein preparation techniques using a digest robot." J Protein Chem **16**(5): 343-8.
66. Houthaeve, T., H. Gausepohl, et al. (1995). "Automation of micro-preparation and enzymatic cleavage of gel electrophoretically separated proteins." FEBS Lett **376**(1-2): 91-4.
67. Jahn, O., D. Hesse, et al. (2006). "Technical innovations for the automated identification of gel-separated proteins by MALDI-TOF mass spectrometry." Anal Bioanal Chem **386**(1): 92-103.
68. Jensen, O. N. (2006). "Interpreting the protein language using proteomics." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(6): 391-403.
69. Jensen, O. N., P. Mortensen, et al. (1997). "Automation of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using fuzzy logic feedback control." Anal Chem **69**(9): 1706-14.
70. Jungblut, P. R., U. Zimny-Arndt, et al. (1999). "Proteomics in human disease: cancer, heart and infectious diseases." Electrophoresis **20**(10): 2100-10.
71. Kang, D., Y. S. Gho, et al. (2002). "Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis." Bull. Korean Chem. Soc. **23**(11): 1511-1512.
72. Karas, M. and F. Hillenkamp (1988). "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons." Anal Chem **60**(20): 2299-301.

73. Kaufmann, H., J. E. Bailey, et al. (2001). "Use of antibodies for detection of phosphorylated proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis." Proteomics **1**(2): 194-9.
74. Kaufmann, H., X. Mazur, et al. (1999). "Influence of low temperature on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells." Biotechnol Bioeng **63**(5): 573-82.
75. Klose, J. (1975). "Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals." Humangenetik **26**(3): 231-43.
76. Krishna, R. G. and F. Wold (1993). "Post-translational modification of proteins." Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol **67**: 265-98.
77. Kussmann, M. and M. Affolter (2006). "Proteomic methods in nutrition." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **9**(5): 575-83.
78. Kuster, B. and M. Mann (1998). "Identifying proteins and post-translational modifications by mass spectrometry." Curr Opin Struct Biol **8**(3): 393-400.
79. Kuyama, H., K. Sonomura, et al. (2008). "Sensitive detection of phosphopeptides by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: use of alkylphosphonic acids as matrix additives." Rapid Commun Mass Spectrom **22**(8): 1109-16.
80. Kyhse-Andersen, J. (1984). "Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose." J Biochem Biophys Methods **10**(3-4): 203-9.
81. Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
82. Laing, P. (1986). "Luminescent visualization of antigens on blots." J Immunol Methods **92**(2): 161-5.
83. Laugesen, S. and P. Roepstorff (2003). "Combination of two matrices results in improved performance of MALDI MS for peptide mass mapping and protein analysis." J Am Soc Mass Spectrom **14**(9): 992-1002.
84. Lee, K., D. Bae, et al. (2002). "Evaluation of parameters in peptide mass fingerprinting for protein identification by MALDI-TOF mass spectrometry." Mol Cells **13**(2): 175-84.
85. Liang, X., J. Bai, et al. (1996). "Characterization of SDS--PAGE-separated proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry." Anal Chem **68**(6): 1012-8.
86. Liu, F., K. Iqbal, et al. (2004). "O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(29): 10804-9.

87. Lochnit, G., J. Grabitzki, et al. (2006). "First identification of a phosphorylcholine-substituted protein from *Caenorhabditis elegans*: isolation and characterization of the aspartyl protease ASP-6." Biol Chem **387**(10-11): 1487-93.
88. Lochnit, G., S. Schmitt, et al. (2005). "Neue Trends im Proteomlabor: von "spot picking" und "in gel digestion" zu "membrane cutting" und "on membrane processing"." Biospektrum: 768-772.
89. Lochnit, G., Schmitt, S., Grabitzki, J., Geyer, R. (2005). "Neue Trends im Proteomlabor: von "spot picking" und "in gel digestion" zu "membrane cutting" und "on membrane processing"." Biospektrum: 768-772.
90. Lock, R. A., G. W. Coombs, et al. (2002). "Proteome analysis of highly immunoreactive proteins of *Helicobacter pylori*." Helicobacter **7**(3): 175-82.
91. Lui, M., P. Tempst, et al. (1996). "Methodical analysis of protein-nitrocellulose interactions to design a refined digestion protocol." Anal Biochem **241**(2): 156-66.
92. Luque-Garcia, J. L., G. Zhou, et al. (2006). "Use of nitrocellulose membranes for protein characterization by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry." Anal Chem **78**(14): 5102-8.
93. Mann, M. (1996). "A shortcut to interesting human genes: peptide sequence tags, expressed-sequence tags and computers." Trends Biochem Sci **21**(12): 494-5.
94. Mann, M. and O. N. Jensen (2003). "Proteomic analysis of post-translational modifications." Nat Biotechnol **21**(3): 255-61.
95. Mansfield, M. A. (1995). "Rapid immunodetection on polyvinylidene fluoride membrane blots without blocking." Anal Biochem **229**(1): 140-3.
96. Methogo, R. M., G. Dufresne-Martin, et al. (2005). "Mass spectrometric peptide fingerprinting of proteins after Western blotting on polyvinylidene fluoride and enhanced chemiluminescence detection." J Proteome Res **4**(6): 2216-24.
97. Mikesh, L. M., B. Ueberheide, et al. (2006). "The utility of ETD mass spectrometry in proteomic analysis." Biochim Biophys Acta **1764**(12): 1811-22.
98. Mitra, P., A. K. Pal, et al. (1994). "A staining procedure using Coomassie brilliant blue G-250 in phosphoric acid for detection of protein bands with high resolution in polyacrylamide gel and nitrocellulose membrane." Anal Biochem **223**(2): 327-9.
99. Mooney, B. P., H. B. Krishnan, et al. (2004). "High-throughput peptide mass fingerprinting of soybean seed proteins: automated workflow and utility of UniGene expressed sequence tag databases for protein identification." Phytochemistry **65**(12): 1733-44.
100. Moresco, J. J., M. Q. Dong, et al. (2008). "Quantitative mass spectrometry as a tool for nutritional proteomics." Am J Clin Nutr **88**(3): 597-604.

101. Nakanishi, T., E. Ando, et al. (2007). "Direct on-membrane peptide mass fingerprinting with MALDI-MS of tyrosine-phosphorylated proteins detected by immunostaining." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **847**(1): 24-9.
102. Nakanishi, T., I. Ohtsu, et al. (2005). "Direct MS/MS analysis of proteins blotted on membranes by a matrix-assisted laser desorption/ionization-quadrupole ion trap-time-of-flight tandem mass spectrometer." J Proteome Res **4**(3): 743-7.
103. Naylor, S. (2004). "Genomic and proteomic sample preparation: higher throughput solutions. 26-27th April, 2004, World Trade Center, Boston, MA, USA." Expert Rev Proteomics **1**(1): 11-6.
104. Nilsson, C. L. (1999). "Fingerprinting of Helicobacter pylori strains by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis." Rapid Commun Mass Spectrom **13**(11): 1067-71.
105. Nordhoff, E., V. Egelhofer, et al. (2001). "Large-gel two-dimensional electrophoresis-matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry: an analytical challenge for studying complex protein mixtures." Electrophoresis **22**(14): 2844-55.
106. O'Farrell, P. (1975). "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins." J Biol Chem(250): 4007-4021.
107. Ohtsu, I., T. Nakanishi, et al. (2005). "Direct matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric identification of proteins on membrane detected by Western blotting and lectin blotting." J Proteome Res **4**(4): 1391-6.
108. Pandey, A. and M. Mann (2000). "Proteomics to study genes and genomes." Nature **405**(6788): 837-46.
109. Pennington, S. R., M. R. Wilkins, et al. (1997). "Proteome analysis: from protein characterization to biological function." Trends Cell Biol **7**(4): 168-73.
110. Promega (2006). "Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Instructions for use of product V5280." Technical Bulletin.
111. Pryor, J. L., W. Xu, et al. (1992). "Immunodetection after complete destaining of coomassie blue-stained proteins on immobilon-PVDF." Anal Biochem **202**(1): 100-4.
112. Quach, T. T., N. Li, et al. (2003). "Development and applications of in-gel CNBr/tryptic digestion combined with mass spectrometry for the analysis of membrane proteins." J Proteome Res **2**(5): 543-52.
113. Quadroni, M. and P. James (1999). "Proteomics and automation." Electrophoresis **20**(4-5): 664-77.
114. Renart, J., J. Reiser, et al. (1979). "Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(7): 3116-20.

115. Rice, R. H., G. E. Means, et al. (1977). "Stabilization of bovine trypsin by reductive methylation." Biochim Biophys Acta **492**(2): 316-21.
116. Righetti, P. G., A. Castagna, et al. (2004). "Critical survey of quantitative proteomics in two-dimensional electrophoretic approaches." J Chromatogr A **1051**(1-2): 3-17.
117. Salinovich, O. and R. C. Montelaro (1986). "Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis." Anal Biochem **156**(2): 341-7.
118. Sanchez, J. C., R. D. Appel, et al. (1995). "Inside SWISS-2DPAGE database." Electrophoresis **16**(7): 1131-51.
119. Schuerenberg, M., C. Luebbert, et al. (2000). "Prestructured MALDI-MS sample supports." Anal Chem **72**(15): 3436-42.
120. Speicher, K. D., O. Kolbas, et al. (2000). "Systematic Analysis of Peptide Recoveries from In-Gel Digestions for Protein Identifications in Proteome Studies." J Biomol Tech **11**: 74-86.
121. Spinola, S. M. and J. G. Cannon (1985). "Different blocking agents cause variation in the immunologic detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes." J Immunol Methods **81**(1): 161-5.
122. Staudenmann, W., P. D. Hatt, et al. (1998). "Sample handling for proteome analysis." Electrophoresis **19**(6): 901-8.
123. Tempst, P., A. J. Link, et al. (1990). "Internal sequence analysis of proteins separated on polyacrylamide gels at the submicrogram level: improved methods, applications and gene cloning strategies." Electrophoresis **11**(7): 537-53.
124. Thiede, B., W. Hohenwarter, et al. (2005). "Peptide mass fingerprinting." Methods **35**(3): 237-47.
125. Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.
126. Unwin, R. D., C. A. Evans, et al. (2006). "Relative quantification in proteomics: new approaches for biochemistry." Trends Biochem Sci **31**(8): 473-84.
127. Vaidyanathan, S., C. L. Winder, et al. (2002). "Sample preparation in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of whole bacterial cells and the detection of high mass (>20 kDa) proteins." Rapid Commun Mass Spectrom **16**(13): 1276-86.
128. van Montfort, B. A., B. Canas, et al. (2002). "Improved in-gel approaches to generate peptide maps of integral membrane proteins with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry." J Mass Spectrom **37**(3): 322-30.

129. von Mering, C., R. Krause, et al. (2002). "Comparative assessment of large-scale data sets of protein-protein interactions." Nature **417**(6887): 399-403.
130. Vorm, O., B. T. Chait, et al. (1993). "Proceedings of the 41st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics; San Francisco, CA, May 31 - June 4." 621.
131. Walsh, B. J., M. P. Molloy, et al. (1998). "The Australian Proteome Analysis Facility (APAF): assembling large scale proteomics through integration and automation." Electrophoresis **19**(11): 1883-90.
132. Weiller, G. F., M. J. Djordjevic, et al. (2001). "A specialised proteomic database for comparing matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry data of tryptic peptides with corresponding sequence database segments." Proteomics **1**(12): 1489-94.
133. Westermeier, R. and R. Marouga (2005). "Protein detection methods in proteomics research." Biosci Rep **25**(1-2): 19-32.
134. Wilkins, M. R., K. L. Williams, et al. (1997). Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics, Springer-Verlag Heidelberg.
135. Wu, Y. C., C. H. Hsieh, et al. (2006). "Matrix-assisted laser desorption/ionization of peptides on AnchorChip targets with alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid and nitrocellulose as matrix." Rapid Commun Mass Spectrom **20**(2): 309-12.
136. Yates, J. R., 3rd (1998). "Mass spectrometry and the age of the proteome." J Mass Spectrom **33**(1): 1-19.
137. Yates, J. R., 3rd, S. Speicher, et al. (1993). "Peptide mass maps: a highly informative approach to protein identification." Anal Biochem **214**(2): 397-408.
138. Zaks, A. and A. M. Klibanov (1988). "The effect of water on enzyme action in organic media." J Biol Chem **263**(17): 8017-21.
139. Zheng, J., N. Li, et al. (2005). "Simple and robust two-layer matrix/sample preparation method for MALDI MS/MS analysis of peptides." J Proteome Res **4**(5): 1709-16.
140. Zhou, J., Y. Lin, et al. (2008). "Development and application of a two-phase, on-membrane digestion method in the analysis of membrane proteome." J Proteome Res **7**(4): 1778-83.

## **Danksagung**

Ich danke meinem Doktorvater PD Dr. Günter Lochnit für die permanente Betreuung vor Ort, die dank großer fachlicher Kompetenz und Erfahrung sowohl Hinweise zur Durchführung der Versuche als auch die sofortige Unterstützung beim Angehen konkreter Probleme technischer, chemischer oder rechnerischer Art umfaßte. Sein Erfindergeist und seine Kreativität waren eine große Hilfe bei der erfolgreichen Lösung von Problemen, wobei seine Flexibilität dennoch Freiraum für eigene Ideen und deren Umsetzung ließ.

Mein Dank gilt weiterhin Frau Dr. Sigrid Schmitt, die sich immer Zeit nahm, in Ruhe schwierige Sachverhalte anschaulich zu erläutern und die immer wußte, wo benötigte Chemikalien oder der versteckte Anschluß für ein Gerät zu finden waren. Ihrem erfahrungsbasierten Wissen, ihrer pädagogischen Ader und der damit verbundenen Fähigkeit, mir in vermeintlichen Sackgassen den Ausweg zu zeigen, verdanke ich einen großen Teil meiner Motivation.

Des weiteren sei Dank ausgesprochen an Frau Dr. Julia Grabitzki, die mir eine sehr große Hilfe bei der Durchführung von Versuchen aller Art war. Sie kennt sich exzellent aus mit Chemikalien, Puffern und Gerätschaften sowie mit den Eigenschaften von Matrices und mit der Literaturrecherche und sie teilte dieses Wissen gern, anschaulich und auf konstruktive Art und Weise mit den Doktoranden – außerdem verteilte sie leckere Quarkbällchen.

Weiterhin danke ich Björn Bender für seine Tips und die Bereitstellung von Bildmaterial, Sebastian Galuska für die Unterstützung bei gelegentlichen Kämpfen mit den Finessen der Massenspektrometrie, Peter Dotzauer für die Anleitung zum Mischen von Matrices und die Weitergabe vieler Lebensweisheiten sowie Hanno Welker für die Verbreitung von guter Laune und die musikalische Untermalung meiner Laborarbeit.

*schön sein im Alltag*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5544-8



9 1783835 1953448