

# „Choroby genetycznie uwarunkowane – edukacja i diagnostyka”

## Przygotowanie próbek do analizy proteomicznej, cz. I

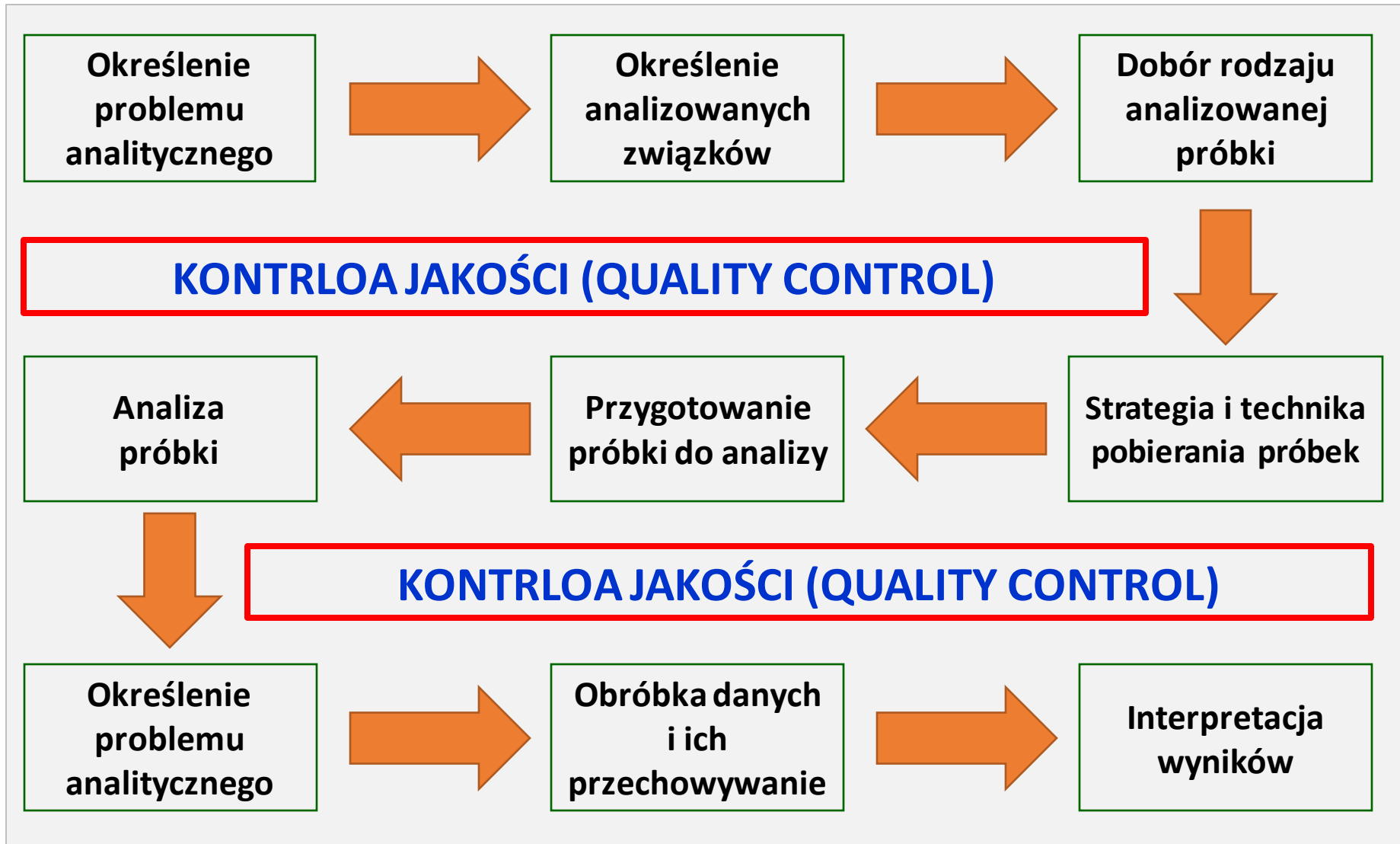
Dr n. chem. Jakub Nawął

**Zakład Badań Przesiewowych i Diagnostyki Metabolicznej IMiD**

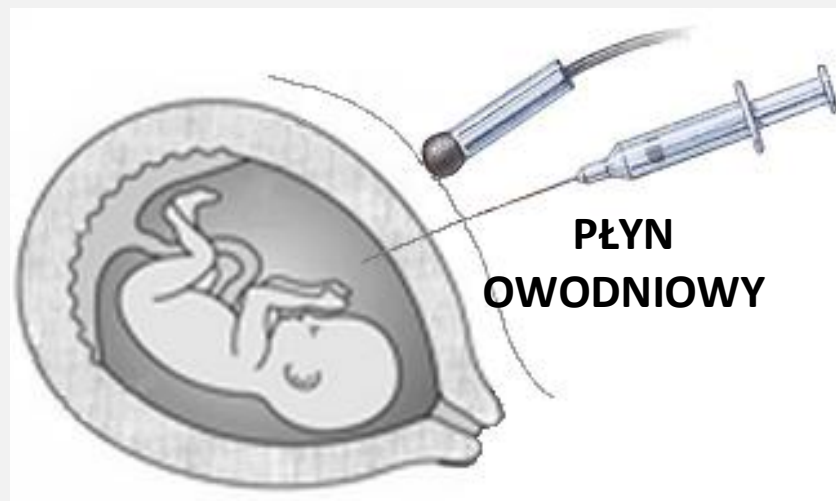
**Kierownik Zakładu:** dr n. biol. Mariusz Ołtarzewski

*Warszawa 12 kwietnia 2021 r*

# Proces analityczny



# Rodzaj próbki



**Fundusze Europejskie**  
Wiedza Edukacja Rozwój



**Rzeczpospolita  
Polska**



**Instytut  
Matki i Dziecka**

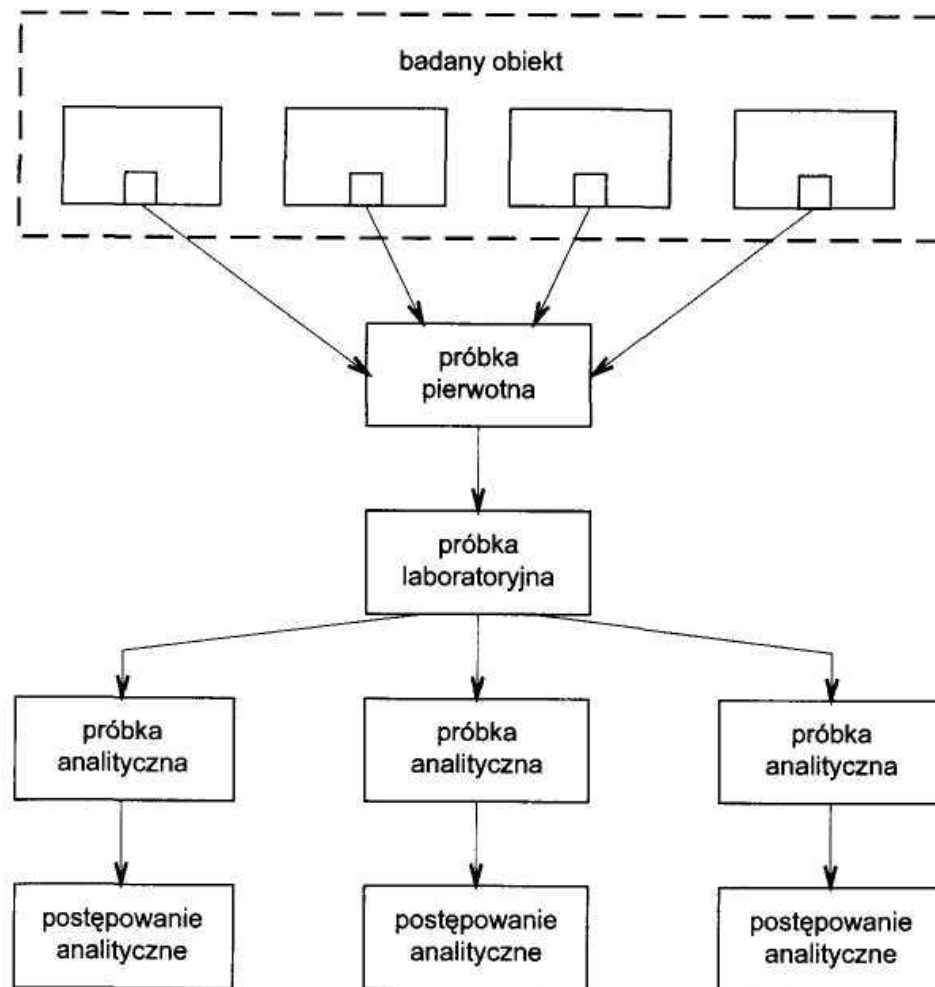
**Unia Europejska**  
Europejski Fundusz Społeczny



# Przygotowanie próbek do analizy

| Cel                                                                                                                                                   | Sposób realizacji                                                                       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| Homogeniczność pobranej próbki                                                                                                                        | Mielenie, mieszanie, analiza sitowa                                                     |
| Stabilność próbki na etapie przechowywania lub transportu                                                                                             | Konserwacja chemiczna, termiczna lub liofilizacja                                       |
| Usunięcie interferentów z matrycy próbki                                                                                                              | odpylanie, usuwanie, zawiesiny, osuszanie, odtlenienie, usuwanie składników reaktywnych |
| Przekształcenie analitów w pochodne w celu:<br>1. Ułatwienia izolacji<br>2. Rozdzielenie składników mieszaniny<br>3. Analizy ilościowej i jakościowej | Reakcje derywatyzacji                                                                   |
| Zmiana matrycy próbki pod daną technikę analityczną                                                                                                   | Odparowanie do sucha, ekstrakcja, sorpcja                                               |
| Zwiększenie stężenia substancji śladowych                                                                                                             | Techniki wzbogacania i zateżniania próbek                                               |

# Przygotowanie próbek do analizy



# Przygotowanie próbek do analizy

Najczęstsze problemy spotykane na etapie przygotowania próbek:

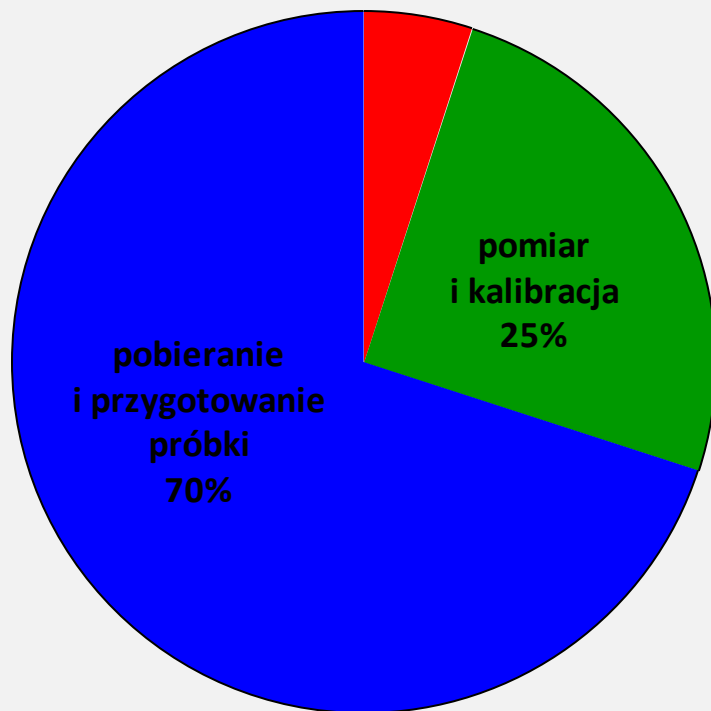
1. Czas przygotowania próbek
2. Zbyt niskie odzyski
3. Obecność zanieczyszczeń
4. Powtarzalność
5. Koszt



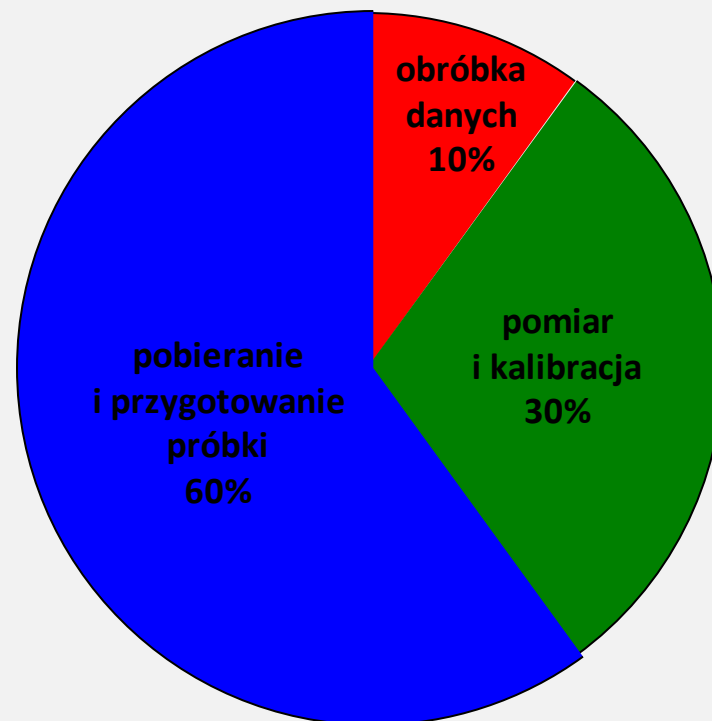


# Przygotowanie próbek do analizy

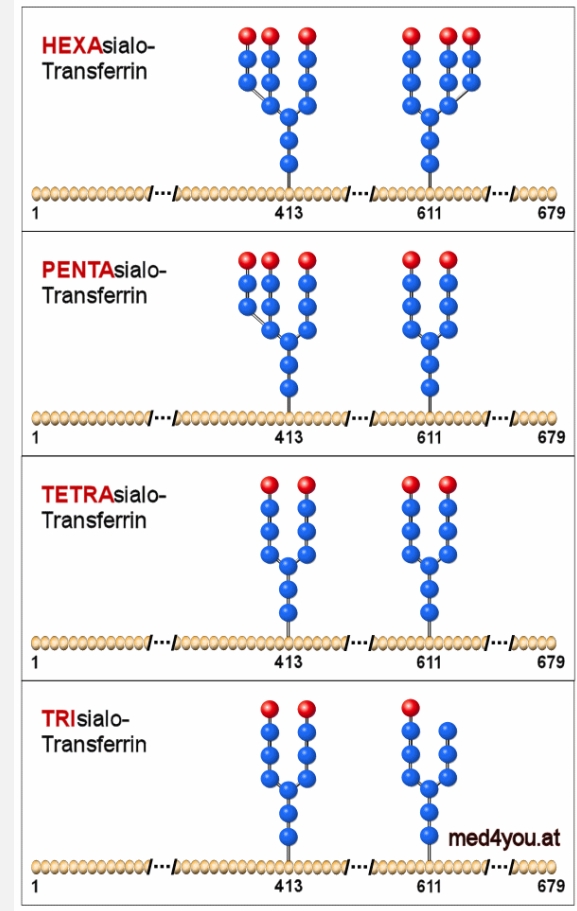
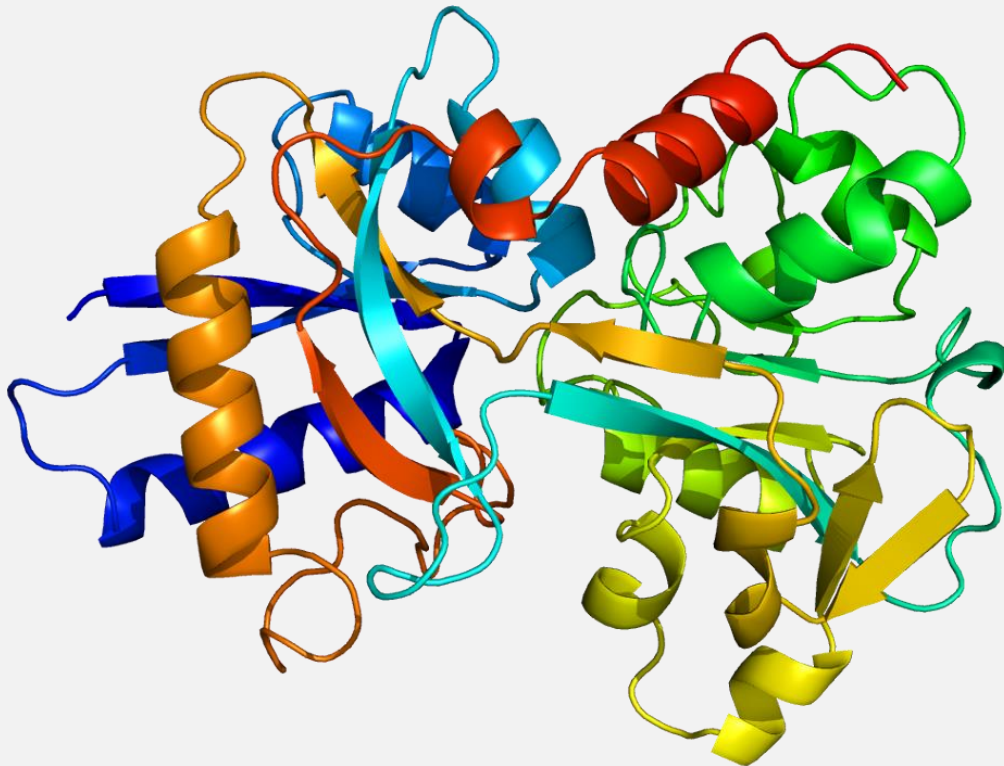
Potrzebny czas



Źródła błędów



# Analizowany związek



Fundusze Europejskie  
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita  
Polska



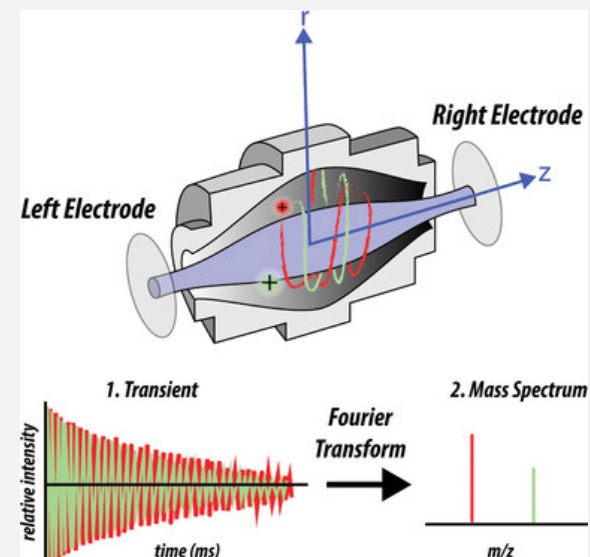
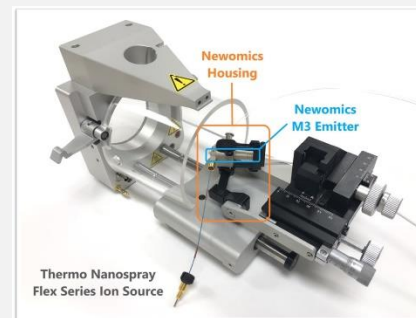
Instytut  
Matki i Dziecka

Unia Europejska  
Europejski Fundusz Społeczny

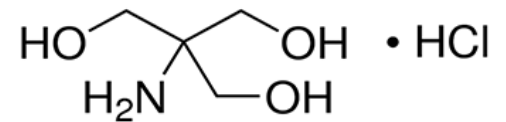
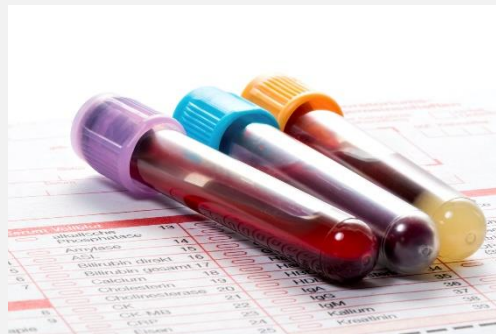
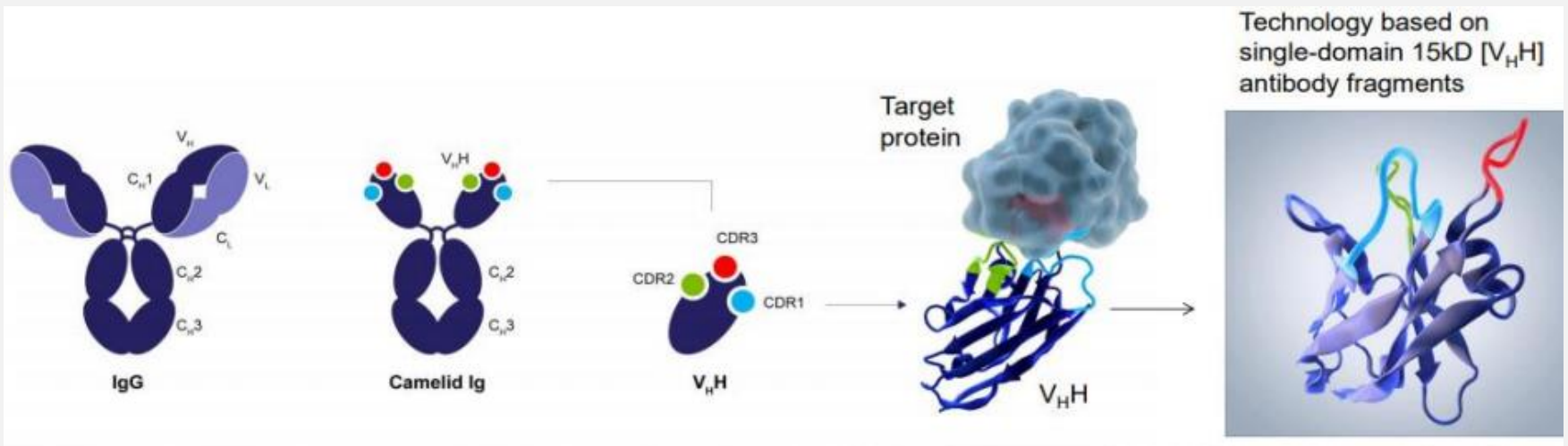




# Technika analityczna



# Izolacja transferyny

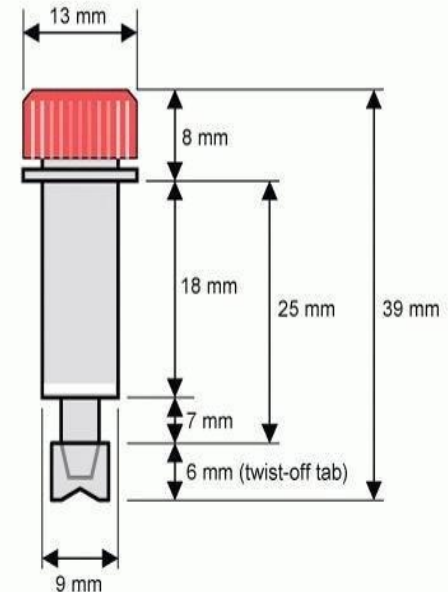


# Wymagana aparatura



Thermo Scientific Pierce  
Centrifuge Columns, 0.8 mL  
(Cat. No. 89868)

Total column capacity = 0.8 mL



Fundusze Europejskie  
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita  
Polska

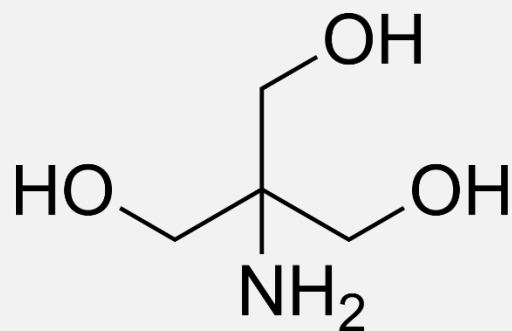


Instytut  
Matki i Dziecka

Unia Europejska  
Europejski Fundusz Społeczny



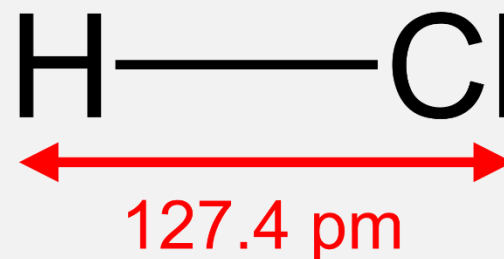
# Wymagane odczynniki



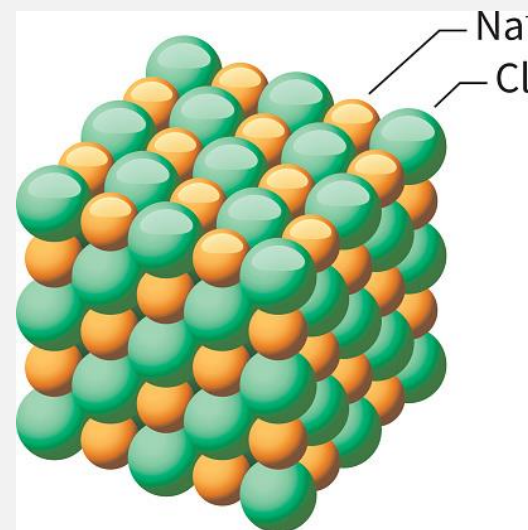
TRIS



Matryca do izolacji transferyn



HCl



NaCl



## Procedura przygotowania próbek

1. Kolumnę wirówkową (Pierce, nr kat. 89868) zawierającą 40  $\mu$ l zawiesiny perełek antytransferyny przemyć 4 razy 700  $\mu$ l 10 mM Tris-HCl, pH 7.
2. 10- $\mu$ l próbkę osocza rozcieńczyć 90  $\mu$ l 0,9% roztworu NaCl i nanieść na kolumnę wirówkową.
3. Próbkę inkubować przez 15 minut w temperaturze pokojowej, po czym przemyć próbkę 6-krotnie 700  $\mu$ l 10 mM Tris-HCl, pH 7.
4. Elucja transferyny (50  $\mu$ l, 100 mM glicyna-HCl, pH 2,7).
5. Wymytą frakcję zobojętnić 1–1,5  $\mu$ l 1,0 M Tris-HCl, pH 9,0
6. Przechowywano w temperaturze -80 ° C.
7. W celu ponownego użycia kolumnę przemyć 5 razy 700 ml 1 M glicyny-HCl, pH 2,7 i zrównoważyć buforem do przemywania (5 razy 700 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7).
8. Analizować za pomocą nanoLC-HRMS.