

Review Paper / Derleme Makalesi
NEW APPROACHES IN ELECTROPHORESISLeman YALÇINTEPE GÜNEŞTUTAR*¹, Macide CANTÜRK RODOP²¹*Istanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Çapa-İSTANBUL*²*Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Fizik Bölümü, Esenler-İSTANBUL*

Received/Geliş: 19.01.2009 Revised/Düzeltilme: 30.04.2009 Accepted/Kabul: 15.05.2009

ABSTRACT

Electrophoresis is a technique used to separate and sometimes purify macromolecules – especially proteins and nucleic acids - that differ in charge, size or shape. It is one of the most widely-used techniques in biochemistry and molecular biology.

Keywords: Mobility, electric field, electrophoresis, proteomics, cancer.

ELEKTROFOREZDE YENİ YAKLAŞIMLAR

ÖZET

Elektroforez farklı yük, büyüklük veya biçimde olan özellikle protein ve nükleik asit gibi makromoleküllerin ayrılması ya da saflaştırılması amacı ile kullanılan bir tekniktir. Biyokimya ve moleküler biyolojide başlıca kullanılan yöntemlerdendir.

Anahtar Sözcükler: Mobilite, elektrik alanı, elektroforez, proteomiks, kanser.

1. GİRİŞ

Elektroforez bir elektrik alanın etkisi altında yüklü parçacıkların göç etmesi esasına dayanır. Bu yüklü parçacıklar bakteriler, virüsler, protein molekülleri, nükleik asitler veya sentetik parçacıklar olabilir. Elektroforez yöntemi etkin ayırma gücü, uygulama kolaylığı ve ucuzluğu nedenleri ile tercih edilen, aynı zamanda sürekli geliştirilen bir elektrokinetik yöntemdir.

Elektroforez, patolojik durumların tanımlanmasında ve takibinde sıklıkla kullanılır. Serumda, dokuda, hemoglobinde ve idrarda, patolojik durumlar sonucunda ortaya çıkan normal olmayan proteinlerin varlığını, normal proteinlerin yokluğunu veya tedavi sırasında hastalığın seyrini izlemek amacıyla kullanılır. Son yıllarda proteomiks teknolojisinin en önemli yöntemlerinden biri haline gelmiştir. Bu yöntem ile protein miktarlarındaki çok küçük değişikliklerin dahi analizleri yapılabilmektedir. Bu sayede patolojik durumlarda ortaya çıkan yeni proteinler kolaylıkla tanımlanabilmektedir.

Elektroforezin uygulanabilmesi için iki koşulun var olması gerekir:

a) Üzerinde çalışılması istenen parçacık elektrik yükü taşımali veya yüklenebilir özellikte olmalıdır. Birçok aminoasit, protein veya parçacık bu özellikleri taşır.

*Corresponding Author/Sorumlu Yazar: e-mail/e-ileti: lemany@istanbul.edu.tr, tel: (532) 467 58 56

b) Elektroforezin uygulanacağı ortam, iletken olmalıdır.

Teorik olarak elektroforetik teknikler, ya bölge (zone) elektroforezi ya da hareketli cephe elektroforezi olarak sınıflandırılabilir.

Yüklü bir parçacığa, bir elektrik alanda etki eden kuvvet Coulomb Kanununa göre,

$$F = ZeE \quad (1)$$

Burada Z ; parçacığın yükü (+1, -1, +2, -2 v.b), e ; elektron yükü (1.6×10^{-19} C), E ; elektrik alan şiddetidir.

Diğer taraftan Stokes yasasına göre, sonsuz hacimli viskoz bir sıvıda, üzerine dışarıdan bir F kuvveti etki eden r yarıçaplı bir küreye, F kuvvetine eşit ve zıt yönde bir kuvvet etki eder, yani

$$F = 6\pi\eta r v = f v \quad (2)$$

Burada η ; sıvının viskozitesi, v ; parçacığın hızı, f ; molekülün biçimine ve yoğunluğuna bağlı sürtünme katsayısıdır.

Yukarıdaki (1) ve (2) no.lu eşitliklerden;

$$ZeE = 6\pi\eta r v$$

elde edilir. Devamında, $\frac{v}{E} = \frac{Ze}{6\pi\eta r}$ ile verilen ifadede v/E birim elektrik alan şiddeti için

hızı, yani mobilitiyi (μ) ifade etmektedir. O halde:

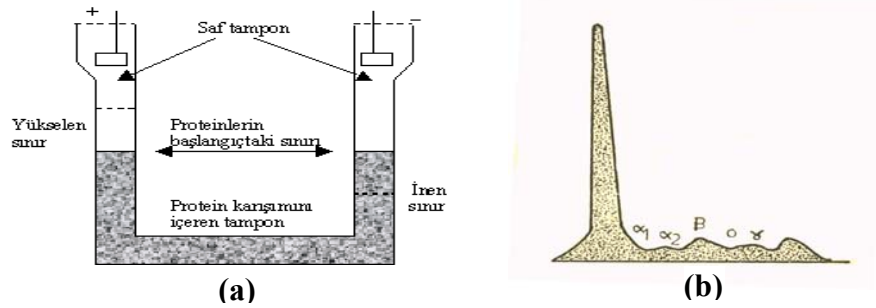
$$\mu = \frac{Ze}{6\pi\eta r} \quad (3)$$

yazılabilir [2]. Mobilitenin belirlenmesi halinde, taneciklerin yükleri ile yarıçapları arasındaki oran belirlenebilir.

2. ELEKTROFOREZ YÖNTEMLERİ

2.1. Serbest veya Hareketli Cephe Elektroforezi

Hareketli cephe elektroforezi 1930'larda Tiselius tarafından geliştirilmiştir (Şekil 1a).



Şekil 1. Tiselius hareketli cephe elektroforez aletinin şematik görünümü (a) İnsan kanındaki plazma proteinlerinin elektroforetik deseni (b) A=serum albumini, α_1 , α_2 , β ve γ =çeşitli globülinler.

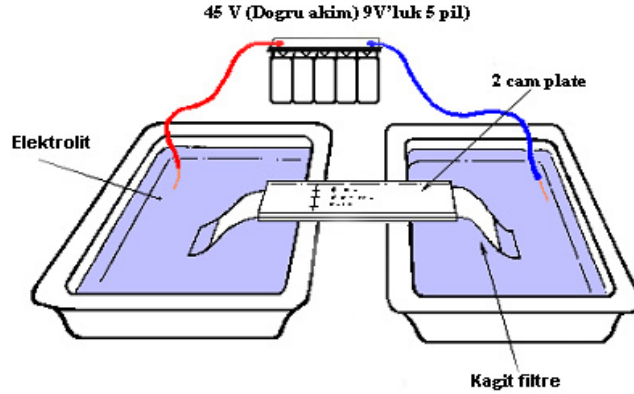
Hareketli cephe elektroforezinde U şeklinde bir borunun alt kısmı protein karışımını içeren bir tampon çözeltisi ile, üst kısmı ise saf tamponla doldurulur. U borusunun ağız kısımlarına bir akım kaynağının pozitif ve negatif kutuplarına bağlanmış elektrotlar yerleştirilir. Elektrotlara gerilim uygulandığında negatif yüklü proteinler anoda, pozitif yüklü proteinler de katoda doğru hareket etmeye başlarlar. Karışımdaki proteinlerin tümünü veya çoğunu ayırabilmek için tampon pH'sı genellikle proteinlerin tümünün veya çoğunun aynı işaretten yükler taşıyacağı bir değere ayarlanır. Örneğin, tampon pH'sında bütün proteinler negatif yüklü iseler akım uygulandığında bu proteinler proteinsiz tampon içine doğru göç etmeye başlarlar. Bu olay borunun proteinsiz tampon bölgesinde kırılma indeksi değişikliklerine yol açarak *Schlieren desenleri* adı verilen görüntülerin oluşmasına neden olur. Belli başlı proteinlerin birbirlerine göre hareket hızları ve yönleri de boru boyunca yapılacak optik ölçümlerden saptanabilir. Şekil 1b böyle bir ölçümün sonuçlarını göstermektedir ve buradaki pikler insan kanı plazmasındaki çeşitli protein hatlarının elektroforez borusu üzerinde aldıkları konumları göstermektedir [3].

2.2. Bölge (Zone) Elektroforezi

Günümüzde hareketli cephe elektroforezinin yerini bölge elektroforezi almıştır. Değişik türleri bulunmaktadır.

2.2.1 Kâğıt ve Selüloz Asetat Elektroforezi

Kâğıt elektroforezinin düşük ve yüksek voltajlı olmak üzere iki türü bulunmaktadır. Düşük voltajlı kâğıt elektroforezi, proteinlerin ve enzimlerin ayırt edilmelerinde kullanılır (Şekil 2).



Şekil 2. Düşük gerilimle çalışan kâğıt elektroforez düzeneği. Kâğıt tampon çözelti ile doyurulduktan sonra, iki ucu tampon çözeltiye batacak şekilde gerilir. Örnek madde kâğıt üzerine genellikle bir çizgi halinde sürülür. Kurumaması için kâğıt hem üstten kapatılır hem de bir su deposu üstünde tutulur. Gerilim uygulandıktan sonra bir süre bekletilir, süre tamamlandığında kâğıt çıkartılır, kurutulur ve analiz edilir.

Kâğıt, oldukça düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin ayırt edilmeleri için en iyi ortamdır. Yüksek voltajlı kâğıt elektroforezinde genellikle her cm için 20 Volt'dan fazla gerilim kullanılır. Bu yöntem en çok peptitler ve aminoasitlerin ayırt edilmelerinde kullanılmaktadır.

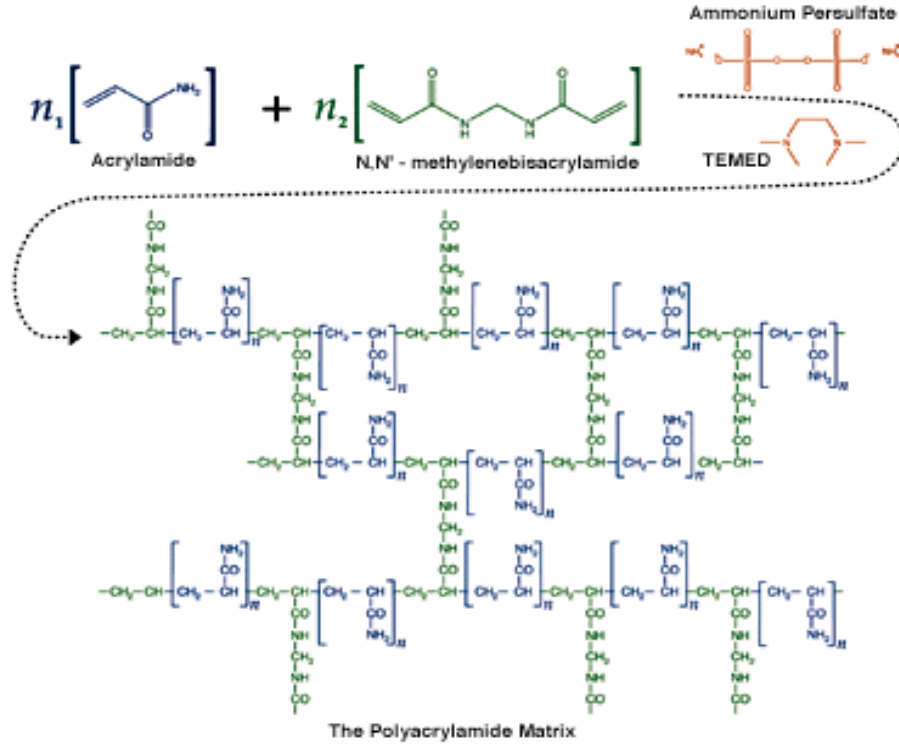
Selüloz asetat elektroforezi ise öncelikle serum proteinlerinin elektroforezinde önemlidir. Ayrıca kâğıt elektroforezi ile çok iyi ayırma yapılamayan bazı serum örneklerinde selüloz asetat ile başarılı sonuç alınabilir [4].

2.2.2. Jel Elektroforezi

Destek ortam olarak, agaroz ve nişasta jelleri de kullanılabilmesine rağmen genellikle daha iyi sonuç alınması için poliakrilamid jeller tercih edilmektedir. Poliakrilamid jel ile yapılan elektroforez, örneklerin daha iyi ayrılmasını sağlar. Çünkü ayırma hem moleküler hem de elektroforetik mobiliteye dayanır. Poliakrilamid jeller, minimum protein adsorpsiyonu, hızlı analize olanak sağlanması, kolay hazırlanması, boyama, kopyasını alabilme ve gözenek büyüklüğünün ayarlanabilir olması gibi birçok avantaja sahiptir [5].

2.3. Poliakrilamid Jellerin Hazırlanması

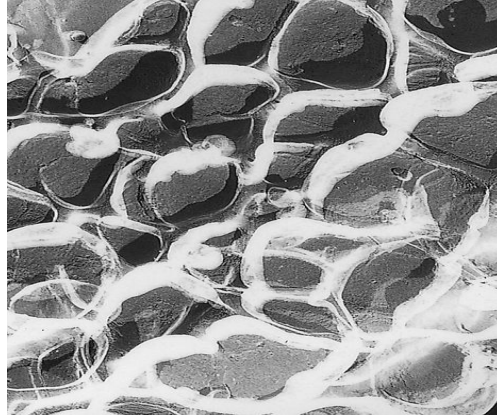
Poliakrilamid, bir radikal oluşturucu tarafından katalizlenen akrilamid ($\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}$) ile N,N'-Metilen bisakrilamidin ($\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}$) birlikte polimerize edilmesiyle elde edilir. Katalizör olarak %0.1-0.3 (KH) β -Dimetilaminopropionitril (DMAP) ya da N,N,N',N'-Tetrametilendiamin (TEMED) ile birlikte kullanılır (Şekil 3) [6].



Şekil 3. Akrilamid, N,N'-Metilenbisakrilamid, TEMED ve Amonyum Persülfat moleküllerinin ve poliakrilamid jelinin yapısı.

Jelin gözenek büyüklüğü, akrilamid monomerinin konsatrasyonu ve N,N'-Metilen bisakrilamidin oluşturduğu çapraz bağın oranıyla belirlenir (Şekil 4).

Uzun molekül zincirleri biçiminde polimerize olan akrilamid, bisakrilamid köprüleri üzerinden üç boyutlu bir örgü oluşturur [7].



Şekil 4. Elektron mikroskobu kullanılarak elde edilmiş poliakrilamid jel görüntüsü. Jelin gözenek büyüklüğü akrilamid konsantrasyonuna ve çapraz köprü oranına bağlıdır.

2.3.1. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (PAGE) (Laemmli) Yöntemi

Mobilite, moleküllerin hem yüklerine hem de boyutlarına bağlıdır. Protein moleküllerinin yükleri eşit ise mobilite sadece büyüklüğe bağlı olacaktır. Eğer proteinlerin disülfid bağları MET (β -Merkapto etanol) aracılığı ile kırıldıktan sonra elektrofrez uygulanırsa, proteinlerin molekül ağırlıkları hesaplanabilir [8]. Protein moleküllerinin sodyum dodesil sülfat (SDS) ile muamelesi sonucu polipeptit zincirlerinin ikincil, üçüncül ve dördüncül yapıları parçalanır [9]. Ayrıca deterjan, proteinin hidrofobik bölgelerine bağlanarak, proteinlerin doğal yüklerini maskeler. Sonuçta, polipeptit zincirlerinde sabit bir yük/kütle oranına sahip tek bir yapı ortaya çıkar. SDS-polipeptit kompleksi, SDS ile hazırlanmış bir jele konulduğunda ortamdaki hızını belirleyen temel etken molekül kütesidir. Elektrik alan sadece filtrasyon olayının itici gücü görevini yapar.

2.3.2. İzoelektrik Odaklama (IEF) Yöntemi

Bu yöntemin temeli, izoelektrik pH değeri ortamın pH değeri ile uyuşmayan bir proteinin ortam içinde sürekli hareket edeceği ilkesine dayanır. Klasik elektrofrezden farklı olarak izoelektrik odaklamada, proteinlerin ayrıştığı mesafeler, ortamdaki pH gradyanına bağlıdır [10]. Bu pH gradyanını oluşturan moleküllere amfolitler denir. Amfolitler, molar kütleleri 300-1000 g/mol aralığında olan poli-aminoasitlerdir (13). Bu moleküller, proteinler gibi bir izoelektrik noktaya (pI) sahip oldukları için bu noktalarda net elektrik yükleri sıfırdır. Bir proteinin çözünürlüğü pI noktasında minimum olduğu ve protein molekülü bu pH'de net bir yük taşımadığı için elektrik alanında hareket edemez. Sonuç olarak amfolitler poliakrilamid jellere katılarak, pH 2.5-11 arasında bir pH gradyanı oluştururlar.

2.4. İki Boyutlu PAGE Jel Elektrofrez (2D PAGE)

Protein moleküllerini, farklı özelliklerine göre birbirinden ayırmayı sağlayan elektrofrez yöntemidir [11]. Genellikle moleküller önce izoelektrik noktalarına ve ardından büyüklüklerine göre ayrılırlar. Bu yöntemde boyamadan sonra jel üzerinde çok sayıda proteinin varlığını gösteren noktalar belirir [12]. Bu noktaların yorumlanabilmesi veya diğer noktalarla karşılaştırılabilmesi için bilgisayar desteğine ihtiyaç duyulur.

2D-PAGE, ilk olarak 1975 yılında O'Farrel tarafından tanımlanmıştır. Çok sayıda proteinin varlığını gösterebilen bir yöntemdir. Protein analizlerinde oldukça güçlü bir yöntem

olmasına karşın, deneyin tamamlanması oldukça uzun bir zaman alır. Her örneğin ayrı bir jelde yürütülmesi diğer bir dezavantajdır. Bu nedenle, birden fazla sayıda protein örneği ile çalışılacağı zaman, miktarlarının belirlenmesinde ve miktar karşılaştırılmasında her zaman aynı sonuçları elde etmek mümkün olmayabilir.

2.5. İki Boyutlu Floresan Jel Elektroforezi (2D DIGE)

DIGE, örneğe iki boyutlu jel elektroforezi uygulanmadan önce floresan bir madde ile işaretlenmesi esasına dayanır [14]. Örneğin 3 farklı floresan boya ile işaretlenebildiği bu yöntemde, genellikle *Cyber* boyalar (Cy2, Cy3, Cy5) kullanılır [14, 15, 16]. İşaretlenmiş örnek daha sonra jel üstüne konularak ayrışması sağlanır. Elektrofrezin sonunda jel, kullanılan boyaların eksitasyon dalga boyunda ışıkla uyarılarak, jel üzerinde protein örnekleri görüntülenir ve analiz edilir. DIGE analizinin yapılabilmesi için, CeCyder, Delta 2D, Progeness ve REDFİN gibi bilgisayar programlarından yararlanır.

Bu yöntemin en büyük avantajlarından biri, birden fazla protein örneğinin çok küçük miktarlarının tek bir jel üzerinde doğru olarak görüntülenebilmesini sağlayacak duyarlılıkta olmasıdır. *Cyber* boyaların duyarlılığını örnek vermek gerekirse, Cy2 boya ile 0.075 ng, Cy3 ve Cy5 boyaları ile 0.025 ng'lık çok küçük protein miktarlarını ölçme duyarlılığına sahiptirler. Klasik elektrofrez yönteminde kullanılan gümüş boyalarının duyarlılığı ise, 1 ng'lık protein örneğini görüntüleyecek kadardır.

DIGE'nin kullanım kolaylığı sağlayan diğer önemli avantajı ise, protein örneklerinin analizi sırasında, jeller arasındaki değişkenliklerin önlenmesidir. Dolayısıyla, aynı jel üzerinde birden fazla protein örneğine ait internal standartlar kullanılarak analiz edilmesi bu yöntemin güvenilirliğini artırır [17-21].

3. PROTEOM ÇALIŞMALARINDA 2D DIGE KULLANILMASI

İnsan genom projesi, yaklaşık 32000 genin tanımlanmasını hedeflemiştir [22, 23]. Genomun şifrelediği proteinlerin yani proteomların belirlenebilmesi için çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Bazı genler, birden çok proteini şifreleyebilir. Fosforilasyon, glikozilasyon ve proteolitik yıkımları da içeren birçok post-translasyonel modifikasyon sonucu proteinlerin yapısı ve fonksiyonu değişir. Benzer şekilde oligosakkaritler ve lipitler gibi moleküller proteinlere eklenerek hücre kompartmanlarındaki yerleri belirlenir. Sonuç olarak, vücutta çeşitli şekillerde onbinlerce farklı proteinin sentezi yapılmaktadır.

Proteomiks teknolojisi ile sağlık ve hastalık gibi farklı koşullarda bulunan hücre, doku ve vücut sıvılarındaki proteinlerin birbirleri ile ilişkileri, yapı ve fonksiyonları sistematik olarak incelenmekte ve nicel (kantitatif) analizleri yapılmaktadır [24]. Son yıllarda, bu teknoloji biyolojik belirteçlerin (biomarker) tanımlanmasında kullanılmaya başlanmıştır. Biyolojik belirteçler, bir biyolojik sistemin fizyolojik durumunu yansıtır. Bu durum hastalık süresince değişebilir [25]. Bu nedenle biyolojik belirteçler birçok hastalığın teşhis ve tedavisinde önemli rol oynamaktadır.

3.1. Proteomiks ve Kanser Teşhisi

Kanser belirteçleri biyolojik belirteçlerin önemli bir grubunu oluşturmaktadır. Örneğin, gastrointestinal kanserde CEA, Ca19-9 ve Ca72-4 gibi serumda ölçülen belirteçler %20-%60 duyarlılıkta ölçülebilmektedir [26, 27, 28, 29]. Bu tür belirteçlerin duyarlılık düzeyi diğer kanser türleri içinde yüksek değildir. Bundan dolayı, birçok kanser olmayan hastada pozitif-yanlış sonuç alınabilmektedir. Tümöre çok daha duyarlı ve tümörün varlığını spesifik olarak gösteren belirteçlere ihtiyaç bulunmaktadır.

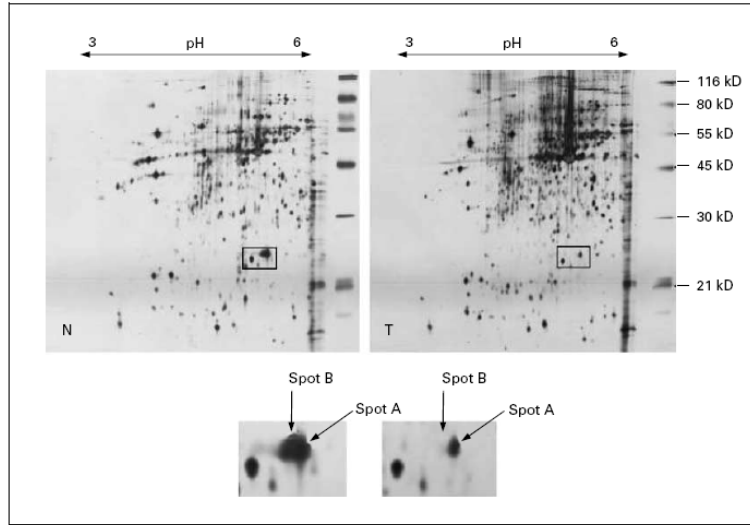
3.2. Proteomiks ve Kanser Tedavisi

Biyolojik belirteçler, kanser tedavisinde anlamlı gelişmelere yol açmaktadırlar. Örneğin, yumurtalık kanserinde görülen ve hastalık sırasında gen anlatımı (expression) yaklaşık %30 artan HER2/neu proteini, bir membran proteindir. Bu artış, HER-2 kinaz aktivasyonu ile mitojenik sinyal iletimi ve hücre çoğalmasıyla sonuçlanmaktadır. HER2/neu'a karşı hazırlanan bir monoklonal antikor (Herceptin; Genentech, Inc., San Francisco, Calif., USA), HER2/neu epitopu gen anlatımına sahip olan hastaların tedavisinde kullanılmaktadır.

4. İKİ BOYUTLU JEL ELEKTROFOREZİ VE KANSER

İki boyutlu jel elektroforezi 1975'den beri laboratuvarlarda sıklıkla kullanılan bir yöntem olmasına rağmen, kanser teşhisinde rutin olarak kullanılan bir belirteç haline gelememiştir. Bununla birlikte son yıllarda, 2D-PAGE veya 2D-DIGE'nin kütle spektrometresiyle birlikte kullanılması, biyolojik belirteçlerin tayininde bu yöntemlerin önemini daha da artırmıştır.

Tümörlü dokular, normal dokunun hücreleri, vasküler endotel hücreleri ve enflamatuvar hücreler gibi tümör olmayan hücreleri de içerir. Buna ilave olarak tümörlü dokularda plazma proteinlerini içeren plazma hücreleri de bulunabilir. Dolayısıyla elektroforez uygulanacak protein karışımlarında sayılan tüm hücre tipleri bulunabilir. Daha saf bir kesimle çalışmak için, istenilen hücre grubu laser ile mikrodiseksiyon (laser microdissection, LMD) denilen bir yöntemle hazırlanır [30, 31, 32, 33]. LMD yöntemi ile dokudan oldukça küçük bir kesit alınarak (örneğin 1mm² lik yüzeyden 1µm kalınlıkta) istenilen hücre grubu elde edilir. LMD yöntemi ile elde edilen hücreler, 2D-PAGE veya 2D-DIGE ile görüntülenirler. 2D-PAGE kullanılması durumunda, görüntülenme gümüş boyama ile gerçekleştirilir. Şekil 5'te mide kanserli bir hastadan alınan normal (N) ve tümör dokularından (T) izole edilmiş epitel hücrelerin 2D-elektroforez profilleri görülmektedir. A ve B noktaları elektroforezin ardından kesilmiş, tripsin ile yıkılarak kütle spektrometresinde Ca11 proteini tanımlanmıştır. Mide kanserlerinde Ca11 proteininin gen anlatımı azalmıştır.



Şekil 5. Mide kanserli bir hastadan alınan normal (N) ve tümör dokularından (T) izole edilmiş epitel hücrelerin 2D-elektroforez profilleri görülmektedir. A ve B noktaları elektroforezin ardından kesilmiş, tripsin ile yıkılarak kütle spektrometresinde Ca11 proteini tanımlanmıştır. Mide kanserlerinde Ca11 proteininin gen anlatımı azalır.

Bu yöntem için ortalama 5000 hücre yeterli olmaktadır [34]. Bu şekilde yaklaşık 450-1000 protein noktası analiz edilebilir. Ancak bir jel üzerinde tek bir protein örneğinin görüntülenmesi ve tüm deneyin yaklaşık 4 gün sürmesi bu yöntemin rutinde kullanımını zorlaştırmaktadır.

İlk olarak Kondo ve grubu [35], farede normal intestinal epitel hücreler ile adenoma kanser hücrelerini elektroforetik yöntem ile karşılaştırdılar. Çalışılan hücreler LMD kullanılarak elde edildi ve iki boyutlu floresan elektroforezle ayrıştırıldı ve yaklaşık 1500 protein noktası analiz edilebildi. Belirlenen noktalardan 37 tanesi kütle spektrometresi ile tanımlandı. Adenom kanserinde ortaya çıkan 3 protein ve bunlara ait elektroforez jeli üzerinde 3 protein noktası görüntülenip tanımlandı. Bu çalışma ile 2D-DIGE yönteminin kanser proteomiks çalışmalarında oldukça önemli bir yöntem olduğu gösterilmiştir.

Gharbi ve grubu ise [16], meme kanseri modelinde luminal epitelyum hücrelerinin ErbB-2 aracılı transformasyonun incelenmesinde 2D-DIGE yöntemini kullandılar. ErbB-2 bir reseptör kinazdır ve meme kanserinde gen anlatımı yaklaşık olarak %25-30 artmaktadır. 2D-DIGE yöntemi ile normal ve kanserli dokuların karşılaştırılması sonunda, 35 adet protein noktasının miktarlarında değişiklik belirlendi. Bunlardan 18 tanesi kütle spektrometresi ile tanımlandı. Bu çalışma 2D-DIGE'nin 2D-PAGE'ye göre hem çok daha hızlı ve farklılıkların tanımlanmasında çok daha anlamlı olduğunu göstermiştir.

5. SONUÇ

Elektroforez biyolojik belirteçlerin tayininde ve tanımlanmasında oldukça çok kullanılan bir yöntemdir. Kanser belirteçlerinin tayininde proteomiks teknolojisi yöntemlerinin kullanılması ile oldukça güçlü bir yöntem özelliği kazanmıştır. 2D-PAGE'nin uzun zaman alması ve standardizasyonundaki güçlüklerden dolayı, 2D-DIGE yöntemi günümüzde daha çok tercih edilmektedir. Sonuç olarak, 2D-DIGE ile kütle spektrometresinin birlikte kullanılması kanser teşhis ve tedavisine yeni katkılar getirebilmektedir.

REFERENCES / KAYNAKLAR

- [1] Bier M., Palusinski, O.A., Mosher R.A., et al., "Electrophoresis: Mathematical modeling and computer simulation", Science, 219, 1281,1983.
- [2] Biyofizik Uygulama Notları, İ.Ü. Basımevi ve Film Merkezi, 2000.
- [3] Çelebi G., "Biyofizik", Çağlayan Kitabevi, 1989.
- [4] Başar M., Bodur H., "Klinikte Kâğıt Elektroforezi", 1964.
- [5] Weber K., Pringle, J.R., Osborn, M., "Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-Acrylamide gel", Meth. Enzymologie, 3-9, 1972.
- [6] Walker J.M., Gaastra W., "Techniques in Molecular Biology", Coom Helm Ltd, Provident House, 1983.
- [7] Nelson C.A., Journal of Biological Chemistry, Volume 246, 389, 1980.
- [8] Laemmli U.K., Favre M., "Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events Journal of Molecular Biology", 80, 575-599, 1973.
- [9] Andrews A.T., "Electrophoresis", Oxford Science publication, 93-110, 1995.
- [10] Reisner A.H., Nemes P., Bucholtz C., "The use of Coomassie BBG250 Perchloric Acide Solution for Staining in Electrophoresis and Isoelectric Focusing on Polyacrylamide Gels", Anal. Biochem., 64, 509-516, 1975.
- [11] Bleich R., "Analytische, Elektrophoreseverfahren", G. Thiemeverlag, Stuttgart, 1978.
- [12] O'Farrell P.H., "High Resolution Two Dimensional Electrophoresis of Proteins" J. Biol. Chem., 250, 4007-40021, 1975.
- [13] Anderson, N.G., Anderson, N.L., "Two-Dimensional Analysis of Serum and Tissue Proteins: Mutiple Isoelectric Focusing", Anal. Biochem., 85, 331-340, 1978.

- [14] Unlu M., Morgan M.E., Minden J.S., "Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts", *Electrophoresis*, 18, 2071-2077, 1997.
- [15] Zhou G., Li H., DeCamp D., et al., "2D differential in-gel electrophoresis for the identification of esophageal scans cell cancer-specific protein markers", *Mol. Cell. Proteomics*, 1:117, 2002.
- [16] Gharbi S., Gaffney P., Yang A., et al., "Evaluation of two-dimensional differential gel electrophoresis for proteomic expression analysis of a model breast cancer cell system", *Mol. Cell. Proteomics*, 1:91, 2002.
- [17] Van den Bergh G., Clerens S., Cnops L. et al., "Fluorescent two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry identify age-related protein expression differences for the primary visual cortex of kitten and adult cat", *J. Neurochem.*, 85:193, 2003.
- [18] Ablan A., David S.O., Bjorkesten L., et al., "A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal Standard", *Proteomics*, 3:36, 2003.
- [19] Friedman D.B., Hill S., Keller J.W., et al., "Proteome analysis of human colon cancer by two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry", *Proteomics* 4:793, 2004.
- [20] Swatton J.E., Prabakaran S., Karp N.A., et al., "Protein profiling of human postmortem brain using 2-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis (2-D DIGE)", *Mol. Psychiatry*, 9:128, 2004.
- [21] Shaw J., Rowlinson R., Nickson J., et al., "Evaluation of saturation labelling two-dimensional difference gel electrophoresis fluorescent dyes", *Proteomics*, 3:1181, 2003.
- [22] Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W. et al., "The sequence of the human genome", *Science*, 291, 1304-1351, 2001.
- [23] Lander ES, Linton LM, Birren B., et al., "Initial sequencing and analysis of the human genome", *Nature*, 409, 860-921, 2001.
- [24] Srinivas P.R., Srivastava S., Hanash S., et al., "Proteomics in early detection of cancer", *Clin. Chem.*, 47, 1901-1911, 2001.
- [25] Wulfkuhle J.D., Liotta L.A., Petricoin E.F., "Proteomic applications for the early detection of cancer", *Nat. Rev. Cancer*, 3, 267-275, 2003.
- [26] Marrelli D., Roviello F., De Stefano A., et al., "Prognostic significance of CEA, CA 19-9 and CA 72-4 preoperative serum levels in gastric carcinoma", *Oncology*, 57, 55-62, 1999.
- [27] Nakajima K., Ochiai T., Suzuki T., et al., "Impact of preoperative serum carcinoembryonic antigen, CA 19-9 and alpha fetoprotein levels in gastric cancer patients", *Tumor Biol.*, 19, 464-469, 1998.
- [28] Ishigami S., Natsugoe S., Hokita S., et al., "Clinical importance of preoperative carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9 levels in gastric cancer" *J. Clin. Gastroenterol.*, 32, 41-44, 2001.
- [29] Tocchi A., Costa G., Lepre L. et al., "The role of serum and gastric juice levels of carcinoembryonic antigen, CA19-9 and CA72-4 in patients with gastric cancer", *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 124, 450-455, 1998.
- [30] Banks R.E., Dunn M.J., Forbes M.A., et al., "The potential use of laser capture microdissection to selectively obtain distinct populations of cells for proteomic analysis--preliminary findings", *Electrophoresis*, 20, 689-700, 1999.
- [31] Ornstein DK, Gillespie JW, Paweletz C.P. et al., "Proteomic analysis of laser capture microdissected human prostate cancer and in vitro prostate cell lines", *Electrophoresis*, 21, 2235-2242, 2000.
- [32] Emmert-Buck M.R., Gillespie J.W., Paweletz C.P., et al., "An approach to proteomic analysis of human tumors", *Mol. Carcinog.*, 27, 158-165, 2000.

- [33] Lawrie L.C., Curran S., McLeod H.L., et al., "Application of laser capture microdissection and proteomics in colon cancer", *Mol. Pathol.*, 54, 253-258, 2001.
- [34] Kondo T., Hirohashi S. "Application of highly sensitive fluorescent dyes (CyDye DIGE Fluor saturation dyes) to laser microdissection and two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) for cancer proteomics", *Nat. Protoc.*, 1, 2940-2956, 2006.
- [35] Kondo T., Seike M., Mori Y., et al., "Application of sensitive fluorescent dyes in linkage of laser microdissection and two-dimensional gel electrophoresis as a cancer proteomic study tool", *Proteomics*, 3, 1758-66, 2003.