

SELDI TOF hmotnostní spektrometrie v onkologickém výzkumu – pilotní metodická data a potenciální klinické aplikace

Greplová K.¹, Pilný R.¹, Dubská L.¹, Brožková K.², Michalová E.², Vojtěšek B.², Žaloudík J.³, Vyzula R.⁴, Nenutil R.², Valík D.¹

¹Oddělení laboratorní medicíny, Masarykův onkologický ústav, Brno

²Oddělení onkologické a experimentální patologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

³Oddělení onkologické a experimentální patologie, Masarykův onkologický ústav, Brno; LF MU Brno

⁴Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav, Brno

SOUHRN

V tomto sdělení prezentujeme naše dosavadní výsledky práce s hmotnostním spektrometrem SELDI TOF, které se týkají přípravy a možnosti analýzy jednotlivých druhů biologického materiálu obecně studovaných v onkologickém preklinickém výzkumu (sérum, plazma, buněčné frakce, nativní tkáň).

Klíčová slova: SELDI TOF, proteomika, hmotnostní spektrometrie.

SUMMARY

Greplová K., Pilný R., Dubská L., Brožková K., Michalová E., Vojtěšek B., Žaloudík J., Vyzula R., Nenutil R., Valík D.: SELDI TOF mass spectrometry in cancer research – pilot methodological data and possible clinical applications

We present our pilot results on application of SELDI TOF mass spectrometry in cancer research. We discuss applicability of this technology on various clinical material commonly studied in cancer patients such as serum, plasma, cell fractions, and native tissues.

Key words: SELDI TOF, proteomics, mass spectrometry.

Úvod

Proteomika se zabývá studiem a identifikací bílkovin, které jsou přítomny v buňkách a tkáních živých organismů, a vysvětlením jejich funkcí za fyziologických nebo patologických podmínek [1]. Komplex bílkovin živých organismů – proteom – lze studovat řadou analytických technik [2–6]. Hlavními technikami studia proteomu jsou dvourozměrná elektroforéza [7] a hmotnostní spektrometrie [8]. Hmotnostní spektrometrie (MS – Mass spectrometry) je fyzikálněchemická technika k určování hmotnosti atomů, molekul a jejich částí po převedení do plynné fáze ve formě kladných nebo záporných iontů. Velmi rozšířenou variantou hmotnostní spektrometrie v proteomickém výzkumu je kombinace ionizačního zdroje MALDI s hmotnostním analyzátozem TOF. Principem MALDI TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) [9, 10] je laserová desorpce vzorku za pomoci tzv. matrice a jejich následná ionizace. Matricí bývá nejčastěji organická kyselina s aromatickým jádrem, která předá absorbovanou energii analyzovanému vzorku, a tak usnadní jeho ionizaci. Technologie SELDI (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization) [11] se od MALDI liší sorpčně aktivním povrchem čipu. Při zpracování vzorku pomocí SELDI se na povrch čipu nejprve nanese vzorek a následně matrice, ta spolu se vzorkem vytvoří krystaly. Vzorek se na povrch čipu naváže pomocí svých fyzikálněchemických vlastností. Aktivním povrchem může být např. povrch hydrofobní, hydrofilní, anex, katex či povrch se specificky navá-

zanou protilátkou. U SELDI se tedy po promytí čipu analyzují pouze komponenty, které se zachytily na čipu s příslušnou selektivitou.

Kvarterní a terciární struktury proteinů je třeba před analýzou SELDI TOF rozrušit a proteiny linearizovat, popř. rozpustit komplexy nebo agregáty přítomné buď fyziologicky, nebo indukované analytickými podmínkami. V chromatografických a elektroforetických metodách se pro denaturaci terciárních a kvarterních struktur bílkovin na struktury sekundární používá nasycený roztok močoviny nebo guanidinu [12]. Pro analýzu technikami hmotnostní spektrometrie lze použít řadu prefrakcionačních kroků, jimiž jsou nejčastěji dvourozměrná elektroforéza a chromatografické techniky.

Materiál a metody

Příprava hmotnostních standardů

Pro naše experimenty jsme používali β -řetězec inzulinu 3 495,89 a. m. u. (Sigma Aldrich, USA), inzulin 5 729,60 a. m. u. (Sigma Aldrich, USA), apomyoglobin 16 952,27 a. m. u. (Sigma Aldrich, USA) a aldolázu 39 211,28 a. m. u. (Sigma Aldrich, USA). Každý standard (10 nmol pevné substance) jsme rozpustili v 1 ml vody a zamrazili při -70 °C. Před použitím jsme jednotlivé standardy rozmrazili a smíchali v poměru 1 díl každého standardu. Vzniklý roztok standardů jsme nanесли na spot čipu (Bio-Rad, USA), nechali zaschnout a ve dvou krocích jsme na spot nanесли matrici, v tomto případě sinapovou kyselinu (SPA, Fluka, USA). Kalib-

rační standardy jsme zpracovávali bez denaturačního a promývacího kroku, protože při zpracování čipu postupem shodným s přípravou biologického materiálu by docházelo k jejich degradaci. U β -řetězce inzulinu jsme experimentálně ověřili teoretický předpoklad, že nepodlehne degradaci během promývacích procesů při přípravě čipu. Proto jsme β -řetězec inzulinu následně použili v některých experimentech jako interní standard.

Příprava vzorků biologického materiálu

Odběr krve jsme provedli do uzavřeného odběrového systému Monovette firmy Sarstedt (Německo) do zkumavky Neutral. Krev jsme nechali srazit po dobu alespoň 45 minut, centrifugovali 20 minut při 1 000 g a vzniklé sérum jsme zamrazili při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Denuraci analyzovaného materiálu jsme provedli v roztoku vzniklém smícháním 9 mol/l močoviny (Fluka, USA), v níž jsme rozpustili iontový detergent 3-((3-cholamidopropyl)dimethylammonio)-propan-sulfonát (CHAPS, Fluka, USA) v koncentraci 20 g/l a následně přidali dithiothreitol (DTT, Sigma Aldrich, USA) na výslednou koncentraci 10 mmol/l. Sérum jsme smíchali s touto denurační směsí v poměru 1 + 1. Takto připravený vzorek jsme 30 minut inkubovali při laboratorní teplotě, poté 10 minut promíchali na třepačce a 10 minut centrifugovali při 14 000 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Lithium heparinovou plazmu jsme zpracovali analogicky. Jaterní tkáň jsme přímo přidali do denuračního roztoku. Lymfocyty jsme izolovali z plné krve pomocí Lymphoprepu (AXIS-SHIELD, Skotsko) a jejich suspenzi pak přímo přidali do denuračního roztoku.

Příprava vzorků biologického materiálu pomocí preparativní izoelektrické fokuse

Pro separaci jsme použili ZOOM IEF frakcionátor (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA USA). Pilotní experimenty jsme provedli se směsným patientským sérem naředěným destilovanou vodou na finální koncentraci proteinu 6 g/l. Do všech separačních komůrek jsme napipetovali po 650 μl ředěného séra. Frakcionace probíhala 20 minut při 100 V, 80 minut při 200 V a 80 minut při 600 V. Koncentraci bílkovin jednotlivých frakcí jsme ověřovali metodou s benzethonium chloridem [13] fy Roche (Basel, Švýcarsko) a metodou s Coomassie brilliant blue [14]. Jednotlivé frakce jsme pro ověření separace nanесли na agarozový gel a provedli elektroforézu bílkovin. Jako poslední krok jsme frakce nanесли na proteinové čipy s povrchem na principu chromatografické normální fáze. Postup promývání a přípravy vzorku na čipu jsme optimalizovali a nanášení proběhlo podle následujícího protokolu: 5 μl 50% acetonitrilu (ACN) 5 minut, ihned nanést 5 μl H_2O 2x 1 minuta, nechat zcela vyschnout při $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, nanést 5 μl vzorku jedné z frakcí a 10 minut míchat na třepačce, promýt 5 μl směsí butanol + octová kyselina + H_2O (12+2+6) 2 x 1 minuta, sušit při $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 minut [15], nanést 2 x 1 μl kyseliny sinapové a mezi každým nanesením nechat důkladně vyschnout při $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Výsledky

1. Prefrakcionace séra pomocí izoelektrické fokuse

Na obrázku 1 demonstrujeme účinnost prefračního kroku za použití IEF. Výsledkem jsou frakce, ve kterých jsou rozděleny bílkoviny v rozmezí pH 3,6–4,6; 4,6–5,4; 5,4–6,2; 6,2–7,0; 7,0–10,0. Albumin se objevil ve frakcích 2 a 3, jinak nedošlo k významnějšímu překrytí jednotlivých frakcí. Normální elektroforeogram použitého směsného séra je uveden jako frakce 6. Takto prefractionsovaný materiál jsme dále analyzovali technikou SELDI TOF MS [16].

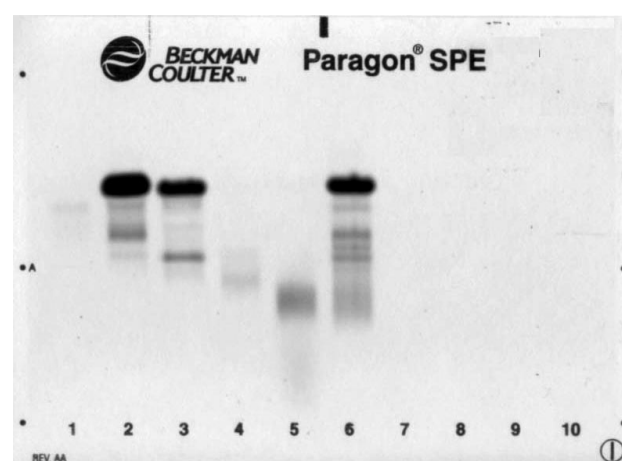


Fig. 1. Serum protein electrophoresis of IEF fractions

Lanes: 1. pH 3.6–4.6; 2. pH 4.6–5.4; 3. pH 5.4–6.2; 4. pH 6.2–7.0; 5. pH 7.0–10.0; lane 6 is the original pooled serum.

2. Vliv koncentrace močoviny na stupeň denaturace proteinu

V experimentu jsme ověřovali účinnou koncentraci močoviny, která denaturuje aktivní protein rozrušením vodíkových můstků. K tomuto testu jsem použili dva enzymy o známé kvarterní struktuře, laktátdehydrogenázu a kreatinkinázu [17, 18]. Při správné denaturující koncentraci močoviny dojde k úplné disociaci kvarterní struktury enzymu, což se projeví vymizením katalytické aktivity LD a CK. Močovinu o koncentraci 9 mol/l jsme smíchali se směsným sérem v poměru 1+1, 30 minut inkubovali při laboratorní teplotě, 10 minut míchali na třepačce a 10 minut centrifugovali při 14 000 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po této přípravě jsme změřili vybrané analyty krevního séra [19, 20]. Celkovou bílkovinu jsme stanovili biuretovou reakcí [21] z důvodu kontroly správnosti ředění [22]. Teprve při koncentraci 3 mol/l močoviny došlo k významnému poklesu aktivity obou enzymů. Tato koncentrace močoviny byla tedy ověřena jako minimálně denaturující.

3. Vliv koncentrace dithiothreitolu na imunologický test

1,4-dithio-DL-threitol (DTT) rozkládá disulfidické můstky [23]. V tomto pokusu jsme sledovali, jaký vliv má určitá koncentrace DTT na stabilitu imunologic-

kého testu. Zkoumali jsme, zda lze frakci izolovanou pomocí izoelektrické fokusace analyzovat standardním imunologickým testem na přítomnost známého analytu. Markerem tohoto jevu byl C-reaktivní protein (CRP), který má 2 protilátky na zachycení analytu. Zjišťovali jsme, zda bude hodnota CRP po přidání DTT nižší vzhledem k zředění vzorku, nebo zda CRP vypadne z roztoku úplně. DTT jsme rozpustili ve vodě a poté jsme ho smíchali s plazmou, která obsahovala CRP v koncentraci vyšší než 100 mg/l. Testovaná výsledná koncentrace DTT se pohybovala v rozmezí 1,5–25 mmol/l DTT. Po smíchání s plazmou jsme tuto směs inkubovali 30 minut při laboratorní teplotě, 10 minut promíchali na třepačce a 10 minut centrifugovali při 14 000 g a 4 °C. Následně jsme odpipetovali supernatant a v něm jsme na přístroji Cobas Integra 800 (Roche) [24] měřili koncentraci CRP. Účinnou koncentrací pro rozklad disulfidických můstků je koncentrace 5 mmol/l DTT a vyšší a tuto koncentraci jsme zvolili jako vhodnou pro metodu SELDI.

4. Vliv teploty a času na tvorbu krystalů matrice

Sinapová kyselina (SPA) slouží při zpracování čipu jako tzv. matrice. Jejím úkolem je předat energii laseru analyzovanému vzorku, aby došlo k jeho rovnoměrnější ionizaci. Rovnoměrnost a reprodukovatelnost tvorby krystalů matrice je nutnou podmínkou kvalitního signálu při analýze TOF hmotnostním spektrometrem. V tomto pokusu jsme nanесли sinapovou kyselinu na podložní sklíčko a sušili ji při teplotách 23 °C, 30 °C, 37 °C. Po zaschnutí SPA jsme pod mikroskopem sledovali rozdíl ve velikosti, pravidelnosti a tvarech krystalů SPA (obr. 2). Nejrovnoměrnější krystaly se vytvořily při 30 °C po dobu 30 minut. Tyto podmínky jsme použili pro přípravu všech typů povrchů proteinových čipů. Z původních 2–4 hodin se doba sušení zkrátila na půl hodiny.



Fig. 2. Crystals of SPA grown for 30 minutes (magnification 200x): from left to right at 23 °C, 30 °C, 37 °C

5. Analytické parametry metody

Měření opakovatelnosti jsme prováděli na dvou typech aktivních chromatografických čipů i) afinitní chromatografie na imobilizovaných iontech kovů (Cu²⁺, Ni²⁺, Co²⁺ atd.) tzv. IMAC ii) chromatografie vázající hydrofobní proteiny vazbou na nepolární povrch C₁₂ tzv. H50. Na každém typu čipu jsme hodnotili tři píky s poměrem signál/šum > 10 v rozpětí 6 000–14 500 a. m. u. Pro měření jsme použili směsné pacientské sérum bez přidání denaturačních činidel a vzorky

jsme na čip nanášeli podle firemních protokolů. Na každém typu povrchu čipu jsme v 16 experimentech hodnotili tři vybrané hmotnostní fragmenty odpovídající třem hlavním píkům na spektrogramu. Výsledky pro čip IMAC 30 jsou uvedeny v tabulce 1 a pro obrácenou fázi v tabulce 2. Vysoké hodnoty SD pro přesnost intenzity jsou způsobené různou krystalizací matrice se vzorkem (i když za stejných podmínek), odlišným povrchem čipů a odlišnými sorpčními vlastnostmi povrchu u jednotlivých spotů.

Table 1. Table show statistical data for IMAC 30 chip, data shown for three peaks of spectrum, n = 16

Precision of m/z				
M/z (a. m. u.)	average	median	SD	CV [%]
6 625	6 624.5	6 624.4	1.49	0.022
8 924	8 923.5	8 923.6	1.54	0.017
14 024	11 718.2	11 717.5	4.93	0.042
Precision of intensity				
M/z (a. m. u.)	average	median	SD	CV [%]
6 623	19.1	20.2	8.85	46
8 904	23.5	21.0	14.30	60
14 024	13.5	10.7	6.26	46

Table 2. Table show statistical data for H50 chip, data shown for three peaks of spectrum, n = 16

Precision of m/z				
M/z (a. m. u.)	average	median	SD	CV [%]
6 623	6623.0	6 623.3	3.09	0.047
8 904	8904.7	8 905.0	4.30	0.048
14 024	14023.9	14 025.1	7.46	0.053
Precision of intensity				
M/z (a. m. u.)	average	median	SD	CV [%]
6 623	31.2	30.6	10.40	33
8 904	10.0	8.5	4.43	44
14 024	11.7	11.9	4.63	39

6. Srovnání technik MALDI – SELDI

Vysoká koncentrace iontů sodíku a draslíku komplikuje analýzu vzorku technikou MALDI. Tyto ionty se kovalentně vážou na analyzované proteiny, a tak pro jednu analyzovanou látku vznikají vícečetné píky, které se liší hmotností 23 a. m. u. (pro Na⁺). Fyziologické koncentrace Na⁺ v biologických tekutinách již představují významný interferent při technice MALDI [25]. U metody SELDI se sodík odstraní promytím čipu, takže jeho přítomnost v původním vzorku není zdrojem analytického problému. Další problém techniky MALDI je močovina, která se chová jako akceptor protonu, a tím potlačuje ionizaci vzorku [26]. V metodě SELDI se močovina použitá na přípravu materiálu opět vymývá (obr. 3).

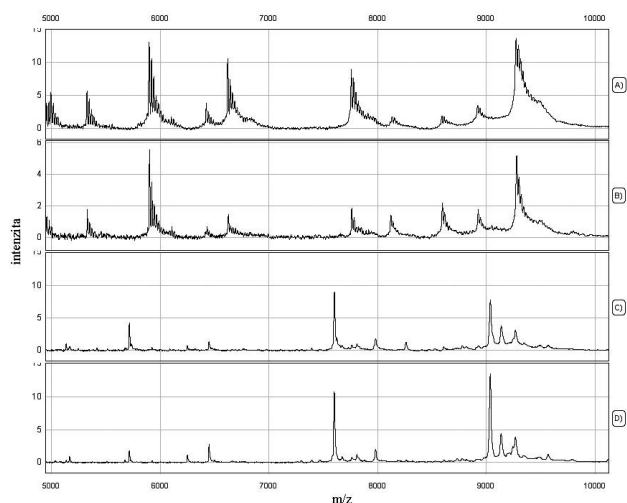


Fig. 3. Mass spectra of native serum demonstrate the difference between MALDI technology and SELDI

a, b) inert surface – golden chip – application MALDI TOF MS (multiple peaks arising in presence of physiological concentration of sodium in a sample); c, d) surface IMAC 30 – application SELDI TOF MS.

7. Reprezentativní hmotnostní profily jednotlivých biologických materiálů

Hmotnostní profily na obrázku 4 jsme získali analýzou plazmy, séra, izolovaných lymfocytů z periferní krve a lidské normální jaterní tkáně.

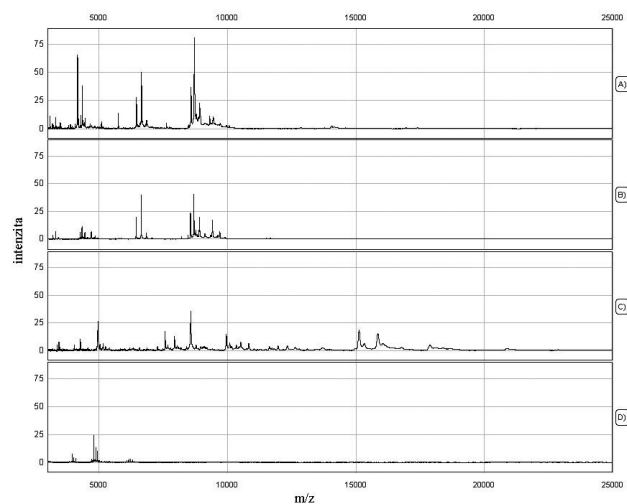


Fig. 4. Comparison of mass spectra of various biological specimens: a) plasma b) serum c) lymphocytes 10% d) liver tissue

8. Srovnání sorpčních povrchů proteinových čipů

Selektivitu proteinových čipů určuje vlastní chromatografický sorbent čipu a eluční podmínky použité k vymytí nenavázaných nebo slabě navázaných komponent.

Eluční podmínky jsou dány hodnotou pH a iontovou silou eluentu.

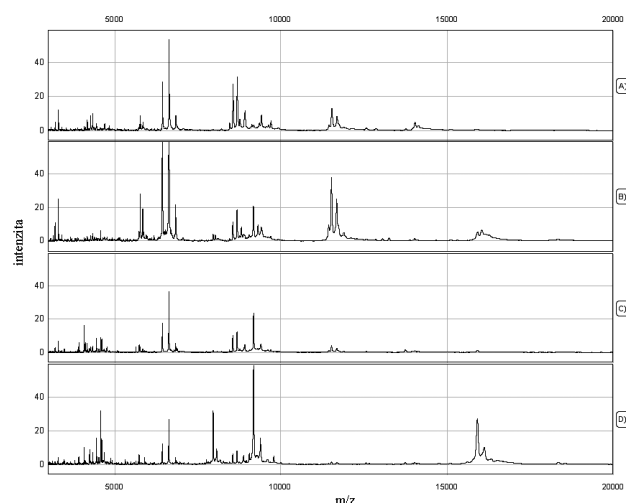


Fig. 5. Mass spectra of one serum on different chip surfaces

a) chip with reverse-phase selectivity; b) immobilized metal ion affinity chip; c) chip with normal phase selectivity alkaline wash; d) chip with normal phase selectivity acidic wash.

Diskuse

Technologie SELDI TOF se používá ve výzkumných laboratořích Masarykova onkologického ústavu v Brně od roku 2004. Během této doby jsme provedli řadu analýz různých biologických materiálů (tkáň, extrakty buněčných kultur, patientská séra, plazma, izolované buněčné subfrakce, materiál získaný pomocí laserové mikrodisekce), jejichž výsledky byly publikovány v řadě sdělení [27–30].

Při práci s technikou SELDI TOF jsme se setkali s řadou preanalytických a analytických problémů. SELDI TOF se nám jeví jako účinná semikvantitativní screeningová metoda schopná poskytnout prvotní informaci o profilu (fingerprintu) proteinů v analyzovaném materiálu, sama však není schopna identifikovat jednotlivé fragmenty.

Naším klíčovým dosavadním výsledkem se zásadním dopadem do praxe bylo zjištění o významném vlivu aktivátoru koagulace na nízkomolekulární proteomový profil lidského séra [25]. Při odběru krve do zkumavek obsahujících aktivátor koagulace dochází pravděpodobně k urychlené proteolýze, která ve svém důsledku generuje tvorbu artefaktů v podobě nízkomolekulárních proteomových fragmentů.

Materiál takto zatížený artefakty není vhodný pro další zpracování novými výzkumnými metodami zaměřujícími se na angiogenezi, proteomové profily, imunologický status apod.

Pomocí techniky SELDI TOF v současné době studujeme tkáňové proteomové profily karcinomu prsu a ledviny a sérové proteomové profily klinických souborů maligního melanomu a germinálních nádorů.

Literatura

1. **Wasinger, V. C., Cordwell, S. J., Cerpa-Poljak, A., Yan, J. X., Gooley, A. A., Wilkins, M. R. et al.** Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*, 1995, 16, 7, p. 1090–1094.
2. **Shapiro, A., Vinuela, E., Maizel, J.** Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1967, 28, 5, p. 815–820.
3. **Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P. G., Gianazza, E., Gorg, A., Westermeier, R., Postel, W.** Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 1982, 6, 4, p. 317–339.
4. **Kenrick, G. K., Margolis, J.** Isoelectric focusing and gradient gel electrophoresis: a two-dimensional technique. *Anal. Biochem.*, 1970, 33, 1, p. 204–207.
5. **Jensen, P. K., Pasa-Tolic, L., Anderson, G. A., Horner, J. A., Lipton, M. S., Bruce, J. E. et al.** Probing proteomes using capillary isoelectric focusing-electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 1999, 71, 11, p. 2076–2084.
6. **Chen, C., Walker, A., Wu, Y., Timmons, R. B., Kinsel, G. R.** Influence of sample preparation methodology on the reduction of peptide matrix-assisted laser desorption/ionization ion signals by surface-peptide binding. *J. Mass Spectrom.*, 1999, 34, 11, p. 1205–1207.
7. **Gorg, A., Postel, W., Gunther, S.** The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 1988, 9, 9, p. 531–546.
8. **Cid, C., Garcia-Bonilla, L., Camafeita, E., Burda, J., Salinas, M., Alcazar, A.** Proteomic characterization of protein phosphatase 1 complexes in ischemia-reperfusion and ischemic tolerance. 2007, 7, 17, p. 3207–3218.
9. **Karas, M., Hillenkamp, F.** Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.*, 1988, 60, 20, p. 2299–2301.
10. **Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T.** Protein and Polymer Analyses up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of flight Mass Spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.*, 1988, 2, p. 151–153.
11. **Vorderwülbecke, S., Cleverley, S., Weinberger, S. R., Wiesner, A.** Protein quantification by the SELDI-TOF-MS–based ProteinChip® System. *Nature Methods*, 2005, 2, p. 393–395.
12. **Voet, D., Voetová, J. G.** *Biochemie*. 1. vydání, Praha: Victoria Publishing 1995, p. 192–193.
13. **Luxton, R., Patel, P., Keir, G., Thompson, E.** A micro-method for measuring total protein in cerebrospinal fluid by using benzethonium chloride in microtiter plate wells. *Clin. Chem.*, 1989, 35, 8, p. 1731–1734.
14. **Bradford, M. M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem.*, 1976, 72, p. 248–254.
15. **Cordingley, H. C., Roberts, S. L., Tooke, P., Armitage, J. R., Lane, P. W., Wu, W. et al.** Multifactorial screening design and analysis of SELDI-TOF ProteinChip array optimization experiments. *Biotechniques*, 2003, 34, 2, p. 368–373.
16. **Pilný, R., Michalová, E., Brožková, K., Greplová, K., Vojtěšek, B., Valík D.** Příprava biologického materiálu pro metodu SELDI TOF MS. *Edukační sborník XXXI. Brněnské onkologické dny*. Brno, 2007, p. 360.
17. *Textbook of Clinical Chemistry*. 3rd ed., Philadelphia, PA: WB Saunders Company, 1999, 669 p.
18. *Textbook of Clinical Chemistry*. 3rd ed., Philadelphia, PA: WB Saunders Company, 1999, 658 p.
19. **van der Heiden, C., Bais, R., Gerhardt, W., Lorentz, K., Rosalki, S.** Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 8. IFCC method for lactate dehydrogenase. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1994, 32, p. 639–655.
20. **Hørder, M., Elser, R. C., Gerhardt, W., Mathieu, M., Sampson, E. J.** IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 7. IFCC method for creatine kinase (ATP: creatine N-phosphotransferase, EC 2.7.3.2). *J. Int. Fed. Clin. Chem.*, 1989, 1, p. 130–139.
21. **Kingsley, G. R.** The direct biuret method for the determination of serum proteins as applied to photoelectric and visual colorimetry. *J. Lab. Clin. Med.*, 1942, 27, p. 840–845.
22. *Textbook of Clinical Chemistry*. 3rd ed., Philadelphia, PA: WB Saunders Company, 1999, 523 p.
23. **Snyder A. P.** *Interpreting Protein Mass Spectra*. New York: Oxford University Press, 2000, 133 p.
24. **Senju, O., Takagi, Y., Gomi, K., Ishii, N., Mochizuki, S., Ishii, N. et al.** The quantitative determination of CRP by latex agglutination photometric assay. *Jap. J. Clin. Lab. Automation*, 1983, 8, p. 161–165.
25. **Tiss, A., Smith, C., Camuzeaux, S., Kabir, M., Gayther, S., Menon, U. et al.** Serum Peptide Profiling using MALDI Mass Spectrometry: avoiding the Pitfalls of Coated Magnetic Beads using Well-established ZipTip Technology. *Proteomics*, 2007, 24, 7, p. 77–89.
26. **Xiang, F., Beavis, R. C., Ens, W.** A method to increase contaminant tolerance in protein matrix-assisted laser desorption/ionization by the fabrication of thin protein-doped polycrystalline films. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1993, 194, 2, p. 199–204.
27. **Helánová, S., Vyzula, R., Žaloudík, J., Nenutil, R., Müller, P., Češková, P. et al.** Technologie CIPHERGEN – nová perspektiva v proteomice nádorových onemocnění. *Klinická onkologie*, 2004, 5, p. 157–161.
28. **Pilný, R., Bouchal, P., Borilova, S., Ceskova, P., Zaloudik, J., Vyzula, R. et al.** Surface-Enhanced Laser Desorption Ionization/Time-of-Flight Mass Spectrometry Reveals Significant Artifacts in Serum Obtained from Clot Activator–Containing Collection Devices. *Clin. Chem.*, 2006, 52, 11, p. 2115–2116.
29. **Češková, P., Brožková, K., Hernychová, L., Štěrba, J., Valík, D., Vojtěšek, B.** Hmotnostní spektrometrie v kvantitativní a diagnostické proteomice: možnosti a limitace. *Chem. listy*, 2006, 100, 11, p. 974–979.
30. **Brožková, K., Knofličková, D., Hernychová, L., Bouchal, P., Holíčáková, J., Michalová, E. et al.** Identifikace potenciálních biomarkerů karcinomu prsu metodou SELDI-TOF MS. *Klinická onkologie*, 2007, 20, 6, p. 377–383.

Práce byla podpořena granty IGA MZ ČR NR-8338-3/2005 a MZ 00020980501.

Do redakce došlo 23. 11. 2007.

Adresa pro korespondenci:
MUDr. Dalibor Valík, Ph.D.
Oddělení laboratorní medicíny
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7, 656 53 Brno
e-mail: valik@mou.cz