

## THE INFLUENCE OF ORGANIC SOLVENT PROTEIN PRECIPITATION ON SDS PAGE PROTEIN PROFILE IN SERUM

### *Pengaruh Pengendapan Protein Serum dengan Pelarut Organik terhadap Profil SDS PAGE Protein Serum*

Tri Joko Raharjo\*, Rusmiati Suprihatin, and Deni Pranowo

Department of Chemistry, Gadjah Mada University, Sekip Utara Yogyakarta 55281

Received 27 July 2007; Accepted 30 August 2007

#### ABSTRACT

A study on the influence of organic solvent protein precipitation to the profile of the serum protein has been accomplished. The expected conditions were precipitation of abundant proteins present in serum result in increasing relative concentration of minor protein which can be useful for sample preparation for biomarker studies. The serum were precipitated with various diluted (<10%) acetonitrile, methanol and ethanol followed by SDS-PAGE analysis of the supernatant in order to investigate the protein profile. There were no linear relationship between solvent concentration and the number of protein bands. However, an optimal condition of precipitation was found which is by methanol 0.1%.

**Keywords:** Biomarker, organic solvent, precipitation

#### PENDAHULUAN

Penelitian-penelitian dalam bidang patologi penyakit serta pencarian obat untuk penyembuhannya memasuki tahap baru yaitu studi pada tingkat molekul yang dikenal sebagai biomarker. Menurut NIH (*National Institute Health*), biomarker didefinisikan kurang lebih sebagai suatu molekul indikator atas keadaan biologi tertentu yang dapat digunakan untuk mengukur perkembangan suatu penyakit maupun efektivitas suatu proses pengobatan. Biomarker dapat berupa berbagai senyawa kimia dalam tubuh seperti asam lemak [1] senyawa senyawa ionik oksidatif seperti yang diduga berperan pada penyakit Alzheimer [2] maupun protein dan peptide. Beberapa biomarker yang sudah dikenal antara lain biomarker tumor  $\alpha$ -fetoprotein, CEA dan PSA [3].

Biomarker biasanya dianalisis dari serum darah. Serum merupakan larutan dengan pelarut air yang mengandung zat terlarut bermacam senyawa kimia mulai makromolekul (protein, enzim, polinukleotida), ion, metabolit primer dan sekunder, gas sampai senyawa organik seperti asam asetat [3]. Kandungan serum begitu beragam yang sekaligus mencerminkan fisiologi dalam tubuh menjadikan serum merupakan sampel utama dalam kimia klinik yang juga menjadikan serum menjadi obyek utama untuk penelitian dalam rangka pencarian biomarker.

Penggunaan serum untuk studi biomarker, terutama yang berupa protein dan peptida, terhambat olah adanya kandungan protein yang tinggi pada serum. Serum mengandung 8-10 mg/dL total protein, tetapi didominasi oleh protein albumin (3,2-4,5 g/100 mL) dan

globulin (2,3-3,5 g/100 mL) yang mencakup 60-90% total protein di dalam serum [4]. Beberapa teknik telah dikembangkan untuk penghilangan albumin dan globulin antara lain dengan menggunakan kolom kromatografi seperti penggunaan *immobilized metal affinity chromatography* (IMAC) [5] maupun dengan *solid phase extraction* (SPE) [6]. Walaupun memberikan hasil yang spesifik baik IMAC maupun SPE memerlukan material fabrikasi yang mahal sehingga kurang sesuai untuk studi awal biomarker.

Protein albumin dan globulin, seperti protein pada umumnya, dapat diendapkan dengan pelarut organik seperti metanol etanol dan asetonitril. Prinsip pengendapan protein dengan pelarut organik dengan tujuan fraksinasi protein telah dilaporkan untuk protein pada kultur sel *Catharanthus roseus* [7]. Dalam hal sampel serum, pemilihan jenis dan jumlah pelarut organik sangat penting supaya didapatkan kondisi pengendapan terhadap albumin dan globulin yang maksimal tanpa mengendapkan protein-protein lain yang mempunyai konsentrasi lebih rendah (kandidat biomarker).

Penelitian ini dilakukan dengan melakukan pengendapan albumin dan globulin pada serum darah manusia dengan beberapa pelarut organik metanol, etanol, asetonitril dalam beberapa variasi konsentrasi. Pengamatan dilakukan dengan membandingkan pita-pita protein yang muncul pada SDS PAGE antara serum tanpa pengendapan dengan serum setelah pengendapan. Kondisi optimal pengendapan didapatkan dengan mengamati pola pita hasil SDS PAGE dengan jumlah pita protein terbanyak.

\* Corresponding author. Tel/Fax : 0062-274-545188  
Email address : trijr\_mipa@ugm.ac.id

## METODE PENELITIAN

### Bahan

Bahan-bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: Serum darah manusia, metanol p.a., etanol p.a., asetronitril p.a., sodium dodesil sulfat (SDS), bovine serum albumin (BSA), akrilamid, bis-akrilamid, SDS PAGE marker.

### Alat

Alat-alat utama yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: Alat SDS PAGE (Miniprotean, Biorad), spektrometer *UV-Visible* (Shimadzu), TLC scanner (CAMAG)

### Prosedur Kerja

#### Preparasi sampel serum

Sampel serum disiapkan adalah berasal dari Laboratorium di Yogyakarta. Sampel yang digunakan merupakan gabungan sampel beberapa pasien yang melakukan pemeriksaan laboratorium ke rumah sakit tersebut. Sampel serum yang diambil diusahakan sedemikian rupa sehingga hanya sampel serum dari pasien sehat (hasil pemeriksaan laboratoriumnya berada dalam ambang normal) yang digunakan.

#### Optimalisasi pengendapan albumin dan globulin serum

Pengendapan albumin dan globulin dilakukan dengan melakukan variasi kondisi pengendapan dan variasi konsentrasi bahan pengendap yaitu: metanol pada konsentrasi 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1; 2; 5 dan 10%; etanol pada konsentrasi 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2; 5 dan 10%; serta asetronitril pada konsentrasi 0,5; 0,75; 1; 2, 5 dan 10%. Pengendapan dilakukan dengan mencampurkan 500 $\mu$ L serum dengan sejumlah volume larutan pengendap sehingga diperoleh konsentrasi yang diinginkan. Pengendapan dilakukan dengan membiarkan campuran selama 16 jam (*overnight*) pada 4 °C.

Setelah proses pengendapan campuran serum dengan larutan pengendap, albumin dan globulin yang terendapkan dipisahkan dengan cara sentrifugasi. Sentrifugasi dilakukan dengan microcentrifuge pada kecepatan 14000 rpm selama 5 menit. Albumin dan globulin didapatkan sebagai endapan, sedangkan supernatan yang digunakan untuk proses lanjutan diambil sebanyak 300  $\mu$ L ke dalam mikrotube baru, disimpang dalam freezer sampai digunakan.

#### Penentuan konsentrasi protein serum

Protein total yang terkandung dalam serum maupun supernatan hasil pengendapan ditentukan konsentrasinya untuk mengetahui jumlah volume yang digunakan untuk mengetahui efektivitas pengendapan dan jumlah volume sampel yang digunakan dalam SDS-PAGE untuk masing-masing sampel. Konsentrasi

protein ditentukan dengan metode Lowry dan Peterson [8,9], menggunakan bovine serum albumin (BSA) sebagai standard

Penentuan dimulai dengan penambahan pereaksi Lowry 0,2 mL ke dalam 1 mL larutan serum atau larutan standar BSA kemudian campuran didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit. Pereaksi Lowry. Campuran kemudian ditambah dengan 0,1 mL pereaksi Folin Ciocalteu dicampur dengan vorteks kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Dilakukan pembacaan absorbansi pada  $\lambda = 595$  nm dengan spektrofotometer UV-Vis. Konsentrasi di dapatkan dengan memasukkan nilai absorbansi sampel ke dalam persamaan absorbansi terhadap konsentrasi standar BSA.

#### Elektroforesis SDS PAGE

Larutan Akrilamid stok (30% (w/v) akrilamid and 0,8% (w/v) bis-akrilamid) dibuat dengan melarutkan 150 g akrilamid dan 4 g bis-akrilamid dengan akuades dengan volume akhir 500 mL. Ditambahkan 1 g resin AG 501-XB (Bio-Rad) distiring selama 10 menit kemudian disaring. Bufer Gel (atas pH 6,8 & bawah pH 8,6) (1,5 M TrisHCl, 0,4% SDS) dibuat dengan melarutkan 90,85 g Tris base, 2 g SDS dalam 400 mL akuades. pH diatur menjadi 6,8 atau 8,6 dengan penambahan HCl kemudian diencerkan sampai 500 mL. Bufer Overlay dibuat dengan mencampur 20 mL bufer gel, 30 mL 2-butanol distiring. Ditunggu sampai terjadi dua lapisan (lapisan atas yang digunakan). Bufer Sampel (0,0625 M TrisHCl, 2% SDS, 10% glycerol, 0,1M DTT, 0,01% BMB, pH 6,8) dibuat dengan melarutkan 0,75 g Trisbase, 2 g SDS, 10 g glycerol, 1,54 g DTT, 0,01 g BMB dalam 80 mL akuades. pH diatur sampai 6,8 dengan HCl kemudian diencerkan sampai dengan 100 mL. APS 10% dibuat dengan melarutkan 0,05 g ammonium persulphate dalam 0,5 mL akuades divorteks (dibuat baru setiap kali mau dipakai). Marker dibuat dengan larutkan 1 vial dalam 200  $\mu$ L buffer sampel (untuk staining dengan CBB). Bufer elektroda 10X dibuat dengan melarutkan 30,25 g Tris base, 144 g glisin, 10 g SDS dalam 1 L akuades, diaduk sampai larut. Untuk bufer 1x didapatkan dengan pengenceran 10x bufer 10x dengan akuades. Larutan Staining dibuat dengan membuat larutan 0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% (v/v) metanol, dan 5% asam asetat glasial. Larutan Destaining dibuat dengan larutan 35% (v/v) metanol dan 10% (v/v) asam asetat [10].

Proses SDS PAGE dilakukan sesuai metode Lammeali [11] dimulai dengan menyiapkan/casting gel. Sebelum dipakai perlu dipastikan bahwa alat casting tidak bocor. Setelah itu disiapkan gel running dengan cara mencampur akuades (1,6 mL) akrilamid stok (2 mL) bufer gel pH 8,6 (1,5 mL) APS (50  $\mu$ L) dan TEMED (10  $\mu$ L). Campuran diaduk dan dituangkan ke dalam alat casting tanpa menimbulkan gelembung udara. Di

bagian atas ditambahkan bufer overlay. Setelah gel runing terbentuk disiapkan gel stacking dengan mencampur akuades (2,1 mL) akrilamid stok (0,5 mL) bufer gel pH 6,8 (0,5 mL) APS (30  $\mu$ L) dan TEMED (5  $\mu$ L) diaduk dengan stirer dan dituangkan diatas gel runing yang sudah dibersihkan dari bufer overlay. Dipasang sisir pada gel stacking. Setelah gel stacking terbentuk sisir diambil. Gel dilepas dari alat casting dan dipasang ke dalam alat runing dan dimasukkan ke dalam tempat elektroforesis yang telah diisi dengan bufer elektrode. Sampel (10  $\mu$ g) ditambahkan bufer sampel dengan perbandingan 1:2 dan dipipetkan ke dalam sumuran bekas sisir. Di salah satu sumuran ujung dimasukkan 5  $\mu$ L marker. Setelah semua sampel selesai dimasukkan alat elektroforesis ditutup dan dihubungkan dengan arus listrik dengan beda potensial 80 V. Elektroforesis dijalankan sampai dengan warna biru bufer sampel sampai diujung bawah gel runing. Dengan hati-hati gel diambil dan dilepaskan. Gel stacking dan gel runing dipisahkan. Gel runing selanjutnya distaining dengan larutan Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% (v/v) metanol, dan 5% asam asetat glasial dengan cara perendaman disertai penggoyangan selama 30 menit. Dilanjutkan dengan perendaman dengan penggoyangan larutan distaining selama 30 menit. Setelah staining, gel dicuci dua kali dengan cara merendam dan menggoyang dalam akuades selama 2 menit. Gel hasil kemudian didokumentasikan dengan kamera digital, di pres dan dianalisis dengan CAMAG TLC Scanner.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel yang didapatkan dari salah satu Laboratorium Klinik di Yogyakarta rata-rata 1,5 mL pasien. Hal ini menjadikan tidak mungkin mendapatkan hanya satu macam sampel homogen untuk keseluruhan percobaan. Untuk itu dilakukan pengambilan sampel dari 20 pasien. Mengingat kandungan protein masing-masing pasien berbeda-beda maka dilakukan pencampuran sebelum dibagi untuk berbagai perlakuan.

### Pengendapan Protein dalam Serum

Hasil pengendapan protein serum dengan larutan asam dan basa terangkum dalam Tabel 1. Berdasarkan Tabel 1 dapat dilihat bahwa beberapa kondisi pengendapan sudah diketahui menarik untuk ditelaah lebih lanjut. Hal ini dilihat dari nilai persen pengendapan yang cukup besar tetapi masih dibawah nilai persen kandungan albumin dan albumin (60%) sehingga diharapkan kondisi dimana sudah banyak albumin dan globulin yang terendapkan tetapi masih sedikit protein-protein lain yang terendapkan. Kondisi-kondisi pengendapan dimaksud adalah: asetonitril 0,5; 1; 2; 5; dan 10%; metanol 0,1; 0,2; 0,3; dan 0,4%; serta etanol 0,25; 0,5; 0,75; dan 1%.

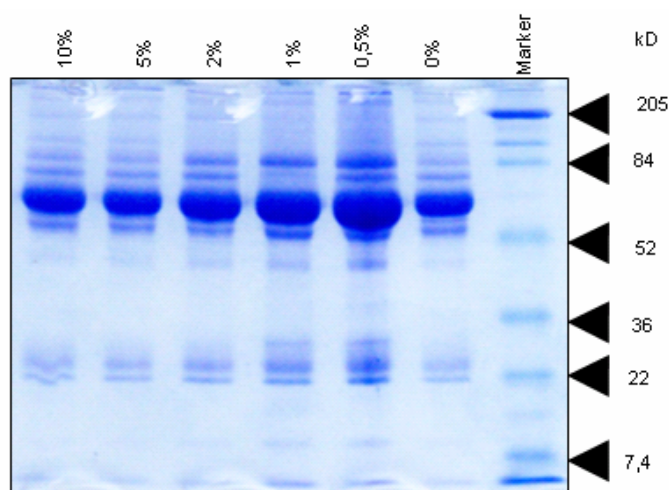
**Tabel 1.** Pengendapan serum dengan Asetonitril, Metanol, dan Etanol

No	Perlakuan pengendapan	Konsentrasi protein ( $\mu$ g/mL)	% Terendapkan
1	Serum tanpa pengendapan	3397	-
2	Serum asetonitril 0,5%	2763	<b>19%</b>
3	Asetonitril 1%	2604	<b>23%</b>
4	Asetonitril 2%	1649	<b>51%</b>
5	Asetonitril 5%	1474	<b>57%</b>
6	Asetonitril 10%	1330	<b>61%</b>
7	Metanol 0,1%	1806	<b>47%</b>
8	Metanol 0,2%	1647	<b>52%</b>
9	Metanol 0,3%	1488	<b>56%</b>
10	Metanol 0,4%	1171	<b>65%</b>
11	Metanol 0,5%	853	75%
12	Metanol 1%	534	84%
13	Metanol 2%	534	84%
14	Metanol 5%	375	89%
15	Metanol 10%	375	89%
16	Etanol 0,25%	2284	<b>33%</b>
17	Etanol 0,5%	1961	<b>43%</b>
18	Etanol 0,75%	1649	<b>51%</b>
19	Etanol 1%	1330	<b>61%</b>
20	Etanol 2%	853	75%
21	Etanol 5%	534	84%
22	Etanol 10%	375	89%

### SDS PAGE

Untuk membandingkan pengaruh pengendapan terhadap jumlah protein terdeteksi dengan SDS PAGE, dilakukan SDS PAGE dengan jumlah sampel yang sama (jumlah  $\mu$ g) dari sampel dalam suatu seri percobaan pengendapan. Pengamatan terhadap jumlah pita protein yang terdeteksi tidak hanya dilakukan secara pengamatan visual tetapi juga dengan menggunakan alat TLC Scanner yang dapat merubah pita-pita hasil SDS PAGE menjadi pola kromatogram berikut intensitasnya. Jumlah pita SDS PAGE ditunjukkan dalam jumlah puncak kromatogram. *SDS PAGE hasil pengendapan dengan asetonitril*

Hasil SDS PAGE pengendapan protein serum dengan asetonitril ditunjukkan dalam Gambar 1, sedangkan data jumlah pita protein hasil scanning menggunakan TLC scanner ditunjukkan dalam Tabel 2. Gambar 1 menunjukkan pengendapan protein serum dengan asetonitril memberikan hasil visual yang sangat menarik. Dengan konsentrasi asetonitril yang sangat rendah 0,5 dan 1% diperoleh beberapa pita-pita protein ukuran relatif kecil. Terlihat pita protein ukuran sekitar 10, 28, dan 45 kDa dapat terlihat. Hasil scanning menggunakan TLC scanner menunjukkan hasil yang berlawanan dimana terdapat jumlah pita protein yang hampir sama dalam jumlah antara protein dalam serum tanpa pengendapan dan dengan berbagai konsentrasi pengendapan asetonitril.



**Gambar 1.** SDS PAGE pengendapan protein serum dengan asetonitril

**Tabel 2.** Tabel jumlah pita protein hasil scanning SDS PAGE pengendapan protein serum

No	Konsentrasi pengendap	Jumlah pita protein		
		Asetonitril	Metanol	Etanol
1	Marker	9	9	9
2	Serum tanpa pengendap	14	14	14
3	0,1	<i>td</i>	19	<i>td</i>
4	0,2	<i>td</i>	18	<i>td</i>
5	0,25	<i>td</i>	<i>td</i>	19
6	0,3	<i>td</i>	18	<i>td</i>
7	0,4	<i>td</i>	16	<i>td</i>
8	0,5	19	<i>td</i>	18
9	0,75	<i>td</i>	<i>td</i>	17
10	1	19	<i>td</i>	17
11	2	16	<i>td</i>	<i>td</i>
12	5	15	<i>td</i>	<i>td</i>
13	10	15	<i>td</i>	<i>td</i>

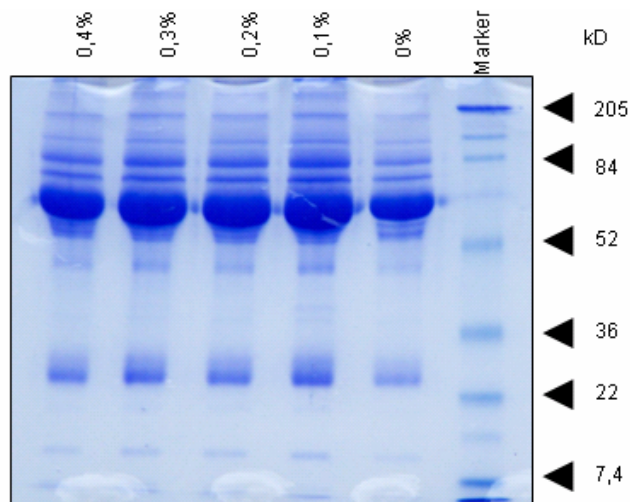
*td* = tidak dilakukan

### SDS PAGE hasil pengendapan dengan metanol

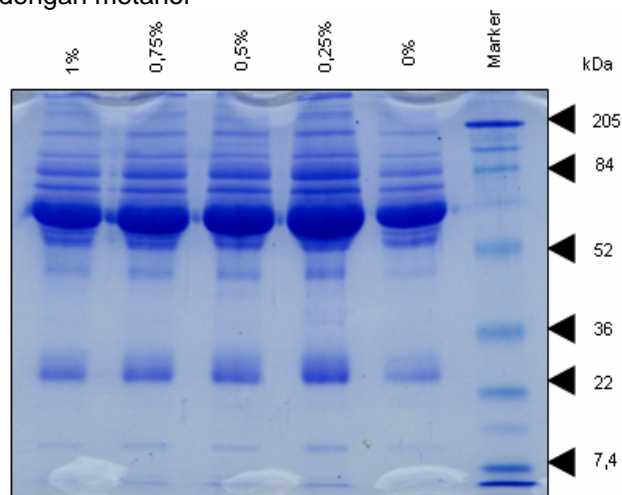
Hasil SDS PAGE pendendapan protein serum dengan metanol ditunjukkan dalam Gambar 2, sedangkan data jumlah pita protein hasil scanning menggunakan TLC scanner ditunjukkan dalam Tabel 2. Pengendapan protein serum dengan metanol secara visual memberikan hasil yang hampir sama dengan pengendapan menggunakan asetonitril. Sejumlah pita protein berukuran relatif kecil terdeteksi seperti protein-protein dengan ukuran 10, 10, 28, dan 45 kDa. Scanning dengan TLC scanner menunjukkan hasil yang lebih baik. Secara umum terdapat penambahan jumlah pita terdeteksi yang begitu nyata terjadi pada konsentrasi 0,1% dibandingkan serum tanpa perlakuan.

### SDS PAGE hasil pengendapan dengan etanol

Hasil SDS PAGE pendendapan protein serum dengan etanol ditunjukkan dalam Gambar 3, sedangkan



**Gambar 2.** SDS PAGE pengendapan protein serum dengan metanol



**Gambar 3.** SDS PAGE pengendapan protein serum dengan Etanol

data jumlah pita protein hasil scanning menggunakan TLC scanner ditunjukkan dalam Tabel 2.

Data Gambar 3 menunjukkan adanya jumlah pita protein yang lebih banyak pada sampel-sampel serum yang diendapkan dengan etanol dibandingkan serum tanpa perlakuan di antaranya pita protein baru pada ukuran sekitar 10 kDa yang tidak terdeteksi pada serum tanpa perlakuan. Dari hasil scanning dengan TLC scanner ditunjukkan bahwa perlakuan dengan menggunakan etanol memberikan jumlah pita protein yang lebih sedikit dibandingkan dengan serum tanpa perlakuan pengendapan.

Secara umum dapat dilihat bahwa tidak ada perlakuan pengendapan dapat memunculkan pita-pita protein baru pada SDS PAGE untuk semua daerah ukuran protein. Beberapa pita protein muncul pada perlakuan dengan pelarut tertentu tetapi tidak muncul pada perlakuan yang lain dan sebaliknya. Hal ini sangat dimungkinkan terhadap stabilitas protein

tersebut pada perlakuan yang berbeda. Pengaruh konsentrasi ternyata juga tidak selalu linear terhadap munculnya pita-pita baru protein. Beberapa perlakuan memberikan jumlah konsentrasi optimum untuk pengendapan dimana didapatkan jumlah pita yang banyak walaupun konsentrasi bahan pengendap tidak maksimal. Sepertinya konsentrasi bahan pengendap yang besar (di atas konsentrasi optimum) menyebabkan pita-pita protein yang muncul pada konsentrasi lebih rendah ikut terendapkan.

Perhitungan jumlah pita protein merupakan bagian terpenting sekaligus tersulit dalam penelitian ini. Pengamatan dilakukan secara visual dan dengan bantuan TLC scanner dengan melihat kolom-kolom pita protein dibandingkan serum tanpa perlakuan dan marker. Hambatan metode visual adalah metode staining SDS PAGE yang tergantung jenis protein untuk dapat divisualisasi. Metode SDS PAGE sendiri juga hanya memungkinkan sedikit pita protein terdeteksi. Di dalam serum banyak sekali protein yang mempunyai ukuran hampir sama yang tidak bisa dipisahkan hanya berdasarkan ukurannya seperti dengan metode SDS PAGE. Dengan menggabungkan SDS PAGE dengan *Iso Electric Focusing* (IEF) menjadi 2D gel elektroforesis akan didapatkan jumlah protein terdeteksi yang lebih banyak.

Penggunaan TLC scanner untuk kuantifikasi pita protein dalam SDS PAGE memang lazim digunakan untuk mengatasi subyektivitas dalam pengamatan visual. Kendala yang muncul adalah seringkali bentuk kolom protein dalam gel yang tidak sejajar satu sama lain sehingga menyulitkan untuk mengeset posisi scanning. Perlakuan pengendapan protein juga mengakibatkan intensitas pita karena persen relatif yang naik setelah protein lain yang dominan (albumin dan globulin) mengendap. Kenaikan intensitas pita ini sering kali menyebabkan berkurangnya resolusi antara pita yang satu dengan yang lain, yang pada akhirnya dengan TLC scanner hanya dibaca sebagai satu pita. Kasus ini muncul pada pengendapan dengan etanol, yang secara visual memberikan hasil pita yang lebih banyak untuk serum setelah perlakuan dibanding serum sebelum perlakuan, tetapi hasil scanner menunjukkan hasil yang berlawanan.

Pada akhirnya pemilihan metode pengendapan harus didasarkan pada persentase konsentrasi bahan pengendap untuk memberikan jumlah pengendapan yang maksimal terhadap protein yang tidak diinginkan (albumin dan globulin) tetapi minimal terhadap protein-protein lain (terutama protein-protein ukuran kecil) yang ditunjukkan dengan jumlah pita yang terdeteksi dengan SDS PAGE. Pelarut organik asetonitril memerlukan konsentrasi yang relatif besar untuk menghasilkan pengendapan yang signifikan. Metanol dan etanol memerlukan konsentrasi dibawah 1% untuk menjadikan

pengendapan bermakna. Dalam hal jumlah pita metanol sedikit mempunyai keunggulan terhadap etanol. Berdasarkan data scanning, semakin tinggi konsentrasi etanol yang dipakai ternyata justru mengurangi jumlah pita yang terdeteksi.

## KESIMPULAN

Pelaut organik dapat digunakan untuk mengendapkan komponen utama protein serum (albumin dan globulin) dan meningkatkan terdeteksinya protein-protein lain yang ukuran realtif kecil. Untuk masing-masing bahan pengendap tidak ditemui korelasi linier antara jumlah konsentrasi bahan pengendap dengan jumlah jenis protein terdeteksi dengan SDS PAGE. Beberapa kondisi optimal konsentrasi bahan pengendap dapat teramati. Kondisi pengendapan adalah dengan menggunakan metanol 0,1% dengan hasil pita protein terbanyak

## DAFTAR PUSTAKA

1. Van Biesen, G. and Parrish, C. C., 2005, *Marine Environ. Res.*, 60, 375-388
2. Migliore L, Fontana I, Colognato R, Coppede F, Siciliano G, Murri L., 2005, *Neurobiol. Aging*, 26 (5), 587-595
3. Widman, F K., 1983, *Clinical Intrepretation of Laboratory Tests*, F.A. Davis Company, Philadelphia, PA, USA
4. www.bioscience.org, diakses 17 Maret 2005
5. Summers, M., Allen, D., Peterson, K., Allen, B., Fang, HX., Feitelson, J., Zhang, W., 2004, *Proteome mapping of serum after a 3D separation: immonuaffinity chromatography-FFE-SDSPAGE*, ABRF 2004 Integrating Technologies in Proteomics and Genomics, Portland, OR, USA
6. Chernokalskaya, E., Kavonian, M., Gutierrez, S., Lazarez, A., Pitt, AM., Leonard, JT., 2004, *Purification of serum peptides by ultrafiltration and solid phase extraction*, ABRF 2004 Integrating Technologies in Proteomics and Genomics, Portland, OR, USA
7. Jacobs, D. I., van der Heijden, R., Verpoorte, R., 2001, *Proteomics*, 1, 1345-1350
8. Lowry, OH., Rosebrough, NJ., Farr, AL., Randall, RJ., 1951, *J. Biol. Chem.* 193: 265-275
9. Peterson GL., 1977, *Anal Biochem.* 83: 346-356.
10. Sambrook, J., Fritsch, EF., and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
11. Laemmli UK., 1970, *Nature*, 227: 680-685.