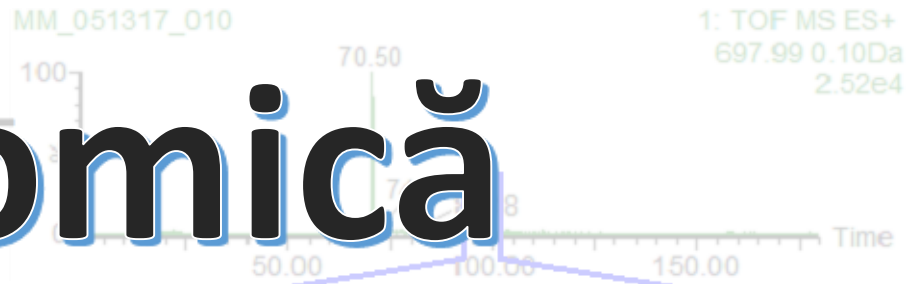
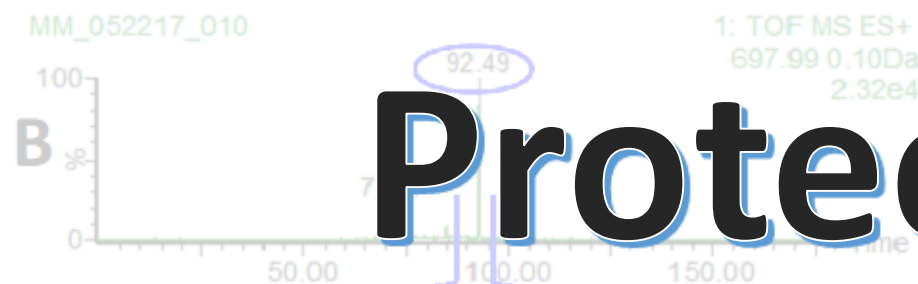
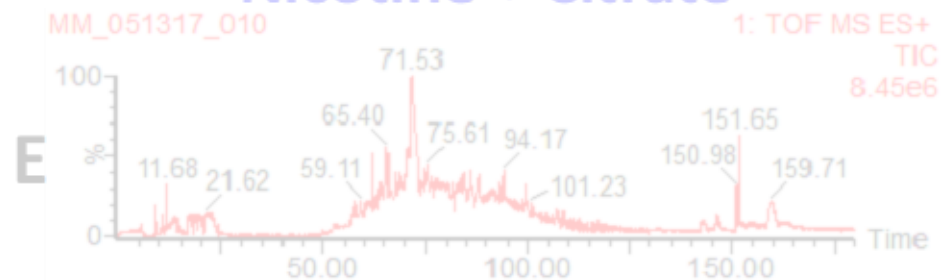
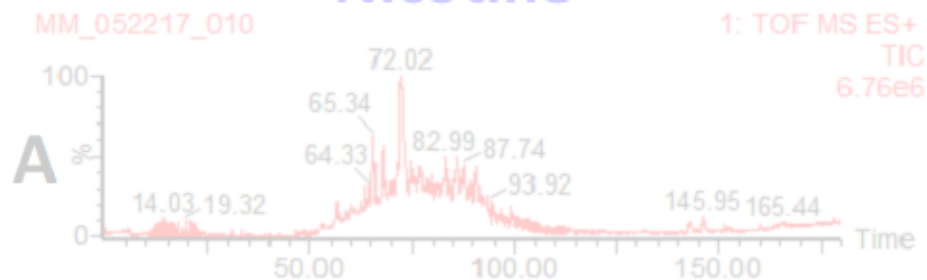
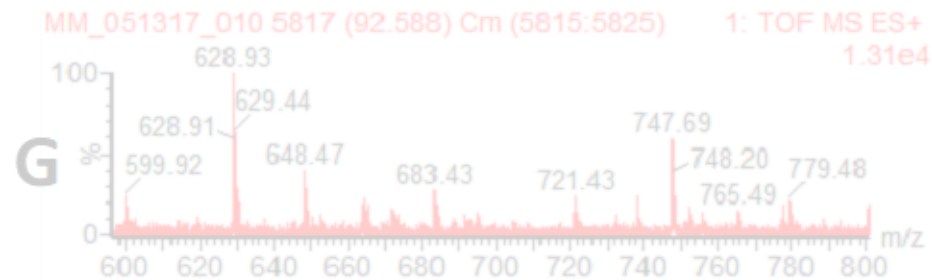


Nicotine

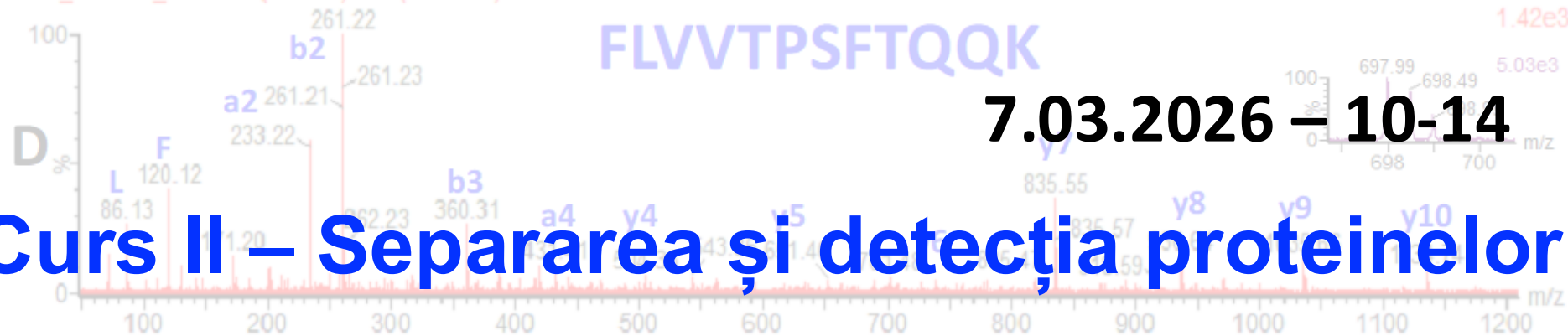
Nicotine + Citrate



Proteomică



MM_052217_010 511 (92.509) Cm (510:512)

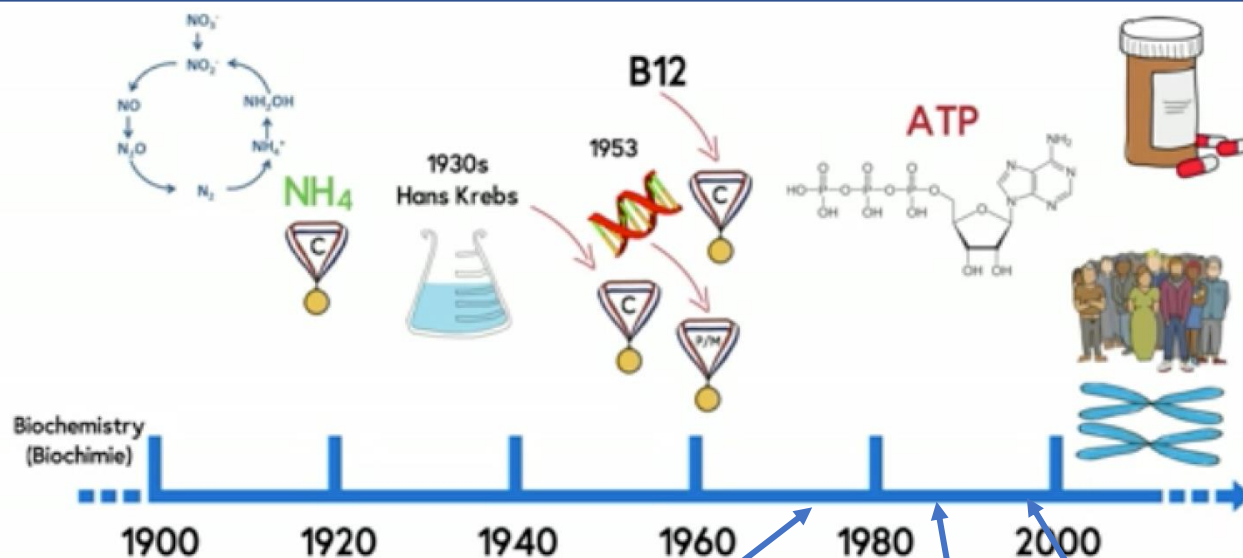
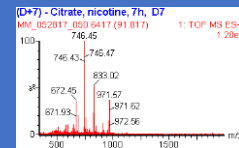


FLVVTPSFTQQK

7.03.2026 – 10-14

Curs II – Separarea și detecția proteinelor

Tehnologii cheie ce au permis apariția proteomicii



1975 - primul studiu de proteomică:

Analiza electroforetică 2D a proteinelor din *E. coli*

1988, Hillenkam dezvoltă instrumentul MALDI-MS

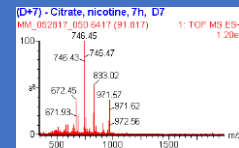
1988, Fenn dezvoltă instrumentul ESI-MS

1995, Wilkins introduce termenul de proteomică

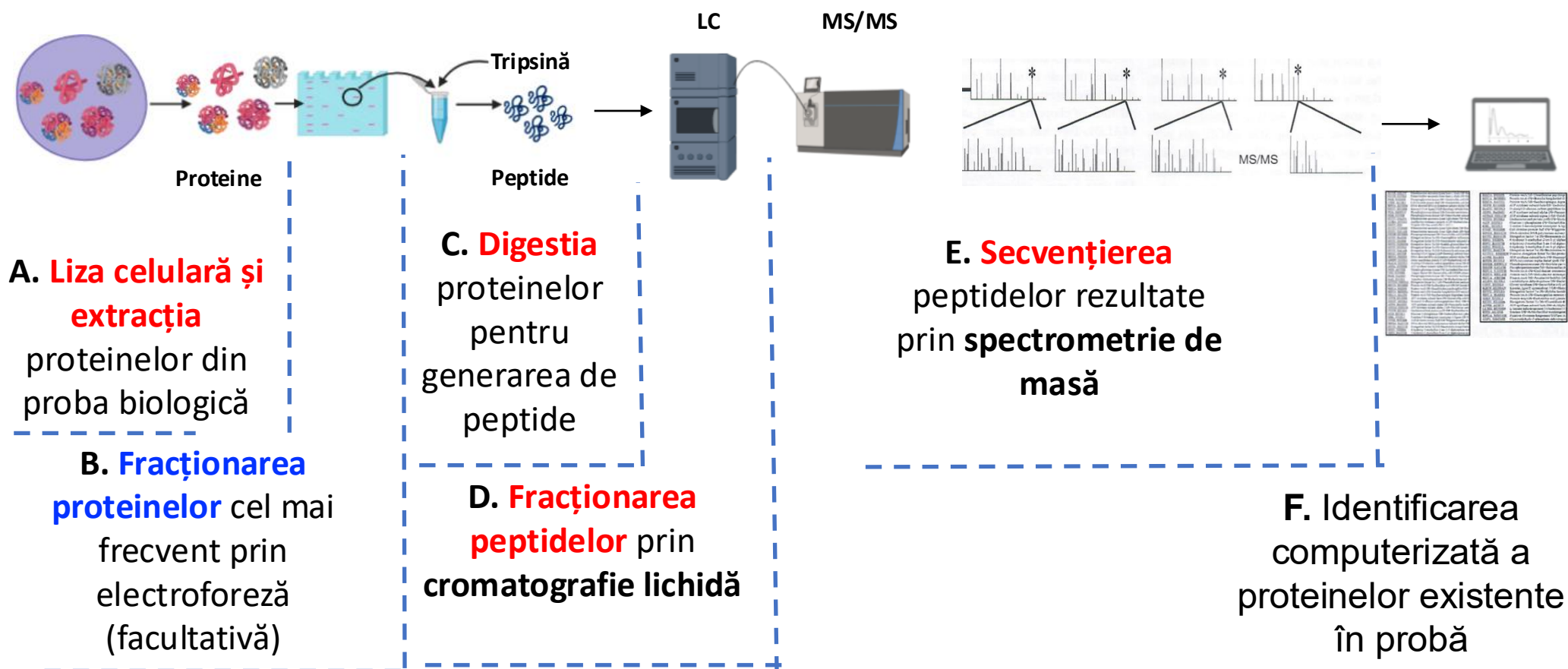
Apariția și dezvoltarea recentă a proteomicii ca ramură a științelor vieții a fost posibilă datorită realizării de descoperiri importante în 4 direcții majore:

1. Dezvoltarea metodelor de **separare, fracționare și detecție a proteinelor și peptidelor**;
2. Apariția instrumentelor de **spectrometrie de masă** și dezvoltarea unor metodelor de **ionizare eficientă a peptidelor**;
3. **Secvențierea** acizilor nucleici și **apariția bazelor de date** cu secvențe;
4. Descrierea unor **metode bioinformatic** de prelucrare computerizată a spectrelor de masă.

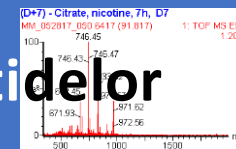
Ce presupune un studiu de proteomică?



Pentru studiul simultan al întregului set de proteine produse la un moment dat de o celulă, țesut sau organism au apărut diverse metode de proteomică, dar care au în comun parcurgerea următoarele etape majore:



Capitolul I. Separarea, fracționarea și detecția proteinelor/peptidelor



Una din problemele pe care studiile de proteomică trebuie deci să le rezolve este complexitatea probei de analizat, complexitate care se referă la:

A. Prezența unui număr mare de contaminanți non-proteici. În orice studiu se pornește de la o probă biologică ce este dezagregată (**prin pulverizare, liză, sonicare, omogenare**) pentru a elibera moleculele proteice. Odată cu acestea sunt însă eliberate și un număr mare de molecule ce nu interesează în cazul de față – lipide, glucide, acizi nucleici - și care devin așadar **molecule contaminante**.

B. Numărul mare și concentrația variată a moleculelor țintă. Toate studiile de proteomică se bazează în prezent pe un singur tip de instrument analitic - **spectrometrul de masă - ce secvențiază peptidele rezultate din digestia proteinelor din proba de analizat**. Dacă considerăm o celulă umană care produce în jur de **30 000** de proteine cu masa medie de 50 kDa, fiecare proteină va genera aprox.

30 de peptide diferite. În analiza proteomului unei celule umane, instrumentul trebuie să așadar **analizeze aproximativ 6 000 000 de peptide**. Acest număr uriaș de peptide nu poate fi secvențiat complet de nici un spectrometru disponibil în prezent.

TABLE 1-1	Molecular Components of an <i>E. coli</i> Cell	
	Percentage of total weight of +1cell	Approximate number of different
Water	70	1
Proteins	15	3,000
Nucleic acids		
DNA	1	1
RNA	6	>3,000
Polysaccharides	3	5
Lipids	2	20
Monomeric subunits and intermediates	2	500
Inorganic ions	1	20

Table 1-1
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

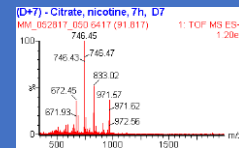
Toate studiile de proteomică se bazează în prezent pe spectrometrul de masă

Toate studiile de proteomică se bazează în prezent

pe un singur tip de instrument analitic - spectrometrul de masă

ce secvențiază peptidele rezultate din digestia proteinelor din proba de analizat

I. 1. Extracția și separarea proteinelor



Din acest motiv, sub o formă sau alta toate studiile de proteomică cuprind **etape de:**

1. **Extracție a proteinelor** din matrixul biologic și **separare** a acestora de moleculele contaminante non proteice;
2. **Fracționare a proteinelor din proba de analizat, a peptidelor rezultate sau a ambelor.** Prin aceasta, peptidele ce urmează a fi secvențiate sunt împărțite în fracții și sunt livrate treptat, în cantități mai mici instrumentul analitic pentru ca acesta să le poată analiza.

I. 1. Extracția și separarea proteinelor

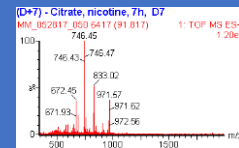
Scopul acestei etape este de a extrage din proba de analizat moleculele proteice și de a le solubiliza pentru a putea fi mai apoi analizate. Etapa trebuie să se **realizeze exhaustiv**, pe cât posibil extractul să conțină toate proteinele de interes din proba de analizat, însă cât mai puține moleculele contaminante. De asemenea, este foarte important ca această etapă să **păstreze proteinele în starea lor nativă** în ceea ce privește **modificările post-traducere**. Etapa cel mai frecvent debutează cu operațiunea de **liză a probei** și eliberarea conținutului celular într-o **soluție tampon de extracție** convenabilă.

Liza probei biologice se realizează funcție de specificul probei de analizat, urmând principiile următoare:

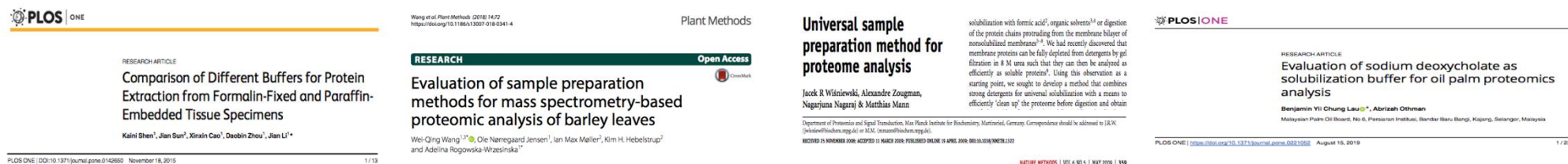
- celulele sunt dislocate din țesuturi prin acțiune mecanică – omogenizare, ultra-sonicare;
- **celulele bacteriene** sunt tratate cu **lizozim** pentru distrugerea **peretelui celular peptidoglicanic** și apoi resuspendate într-o soluție tampon de liză;
- **celulele de drojdii** sunt tratate cu **liticăză** ce distruge peretele celular de natură chitinoasă și apoi resuspendate într-o soluție tampon de tampon de liză;
- **celule vegetale** sunt tratate cu celulază ce distruge peretele **celulozic** și apoi resuspendate într-o soluție tampon de tampon de liză;
- celulele **eucariote** din culturi de celule sunt resuspendate direct într-o soluție de tampon ce funcționează ca soluție de liză și care conține detergenți.



I. 1. Extracția și separarea proteinelor



Deși se consideră că nu există o soluție tampon de extracție universal valabilă capabilă să mențină solubile toate proteinele, indiferent de unde provin, se cunosc în prezent diverse rețete create specific pentru anumite celule sau țesuturi.



În general, orice metodă de extracție a proteinelor dintr-un matrix biologic cu scopul analizei proteomice utilizează o soluție tampon de extracție ce conține:

1. **Un detergent puternic** precum SDS (**Sodium dodecyl sulfate**), CHAPS (**3-([3-cholamidopropyl]dimethylammonio)-1-propane sulfonate**) sau Tween (denumirea comercială pentru detergenți neionici din clasa polisorbaților – derivați de la sorbitol esterificați cu acizi grași) cu ce au rolul de a solubiliza proteinele membranare, de a le extrage din bistratul lipidic și de a le separa de moleculele lipidice;
2. **Agenți denaturanți**, de obicei în concentrații mari – cel mai frecvent uree sau acizi tari - modifică tăria ionică și pH-ul soluției și, prin aceasta, elimină interacțiunile dintre proteine și destabilizează structurile secundare și terțiare;
3. **Agenți reducători** - cel mai frecvent ditiotreitol DTT, mercaptoetanol sau tiouree - rup legăturile disulfidice și preîntâmpină oxidarea grupelor funcționale
3. **Enzyme** - (DNAze, RNAaze) – au rolul de a cliva macromoleculele contaminante.

(D+7) - Citrate, nicotine, 7h, D7
 MM_052017_050 6417 (91.817) 1: TOF MS ES+
 1.20e

Mass spectrum showing relative intensity (%) versus m/z. The base peak is at m/z 746.45. Other significant peaks are labeled at m/z 746.43, 746.47, 893.02, 971.57, 972.56, 971.62, 672.45, and 671.93.

A. Metode electroforetice – SDS-PAGE, Izoelectrofocarea, 2D-PAGE

B. Metode cromatografice – cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC)

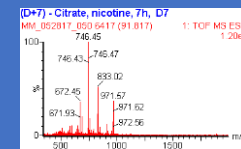
Electroforeza este o metodă de separare care **se bazează pe capacitatea particulelor coloidale sau moleculelor încărcate electric de a migra, sub influența unui câmp electric generat de doi electrozi, în direcția electrodului purtător al sarcinii opuse**. Viteza de migrare depinde în principal de dimensiunea sarcinii electrice și din acest motiv moleculele cu sarcini diferite vor avea o mobilitate electroforetică diferită, separându-se în fracții. În principiu, această metodă poate fi aplicată tuturor macromoleculelor încărcate electric.

A black and white portrait of a middle-aged man with dark hair, wearing a patterned suit jacket, a light-colored shirt, and a dark tie. He is looking directly at the camera with a neutral expression. The background is dark and out of focus.

1. **Separarea în soluții tampon** – foarte puțin utilizată, importanță istorică. Reprezintă prima metodă de separare electroforetică și a fost pusă la punct de Arne Tiselius în anul 1937.
2. **Separarea în medii stabilizatoare** (plăci cu silicagel, filme, geluri). Funcție de amplasarea fizică a mediului stabilizator, putem distinge:

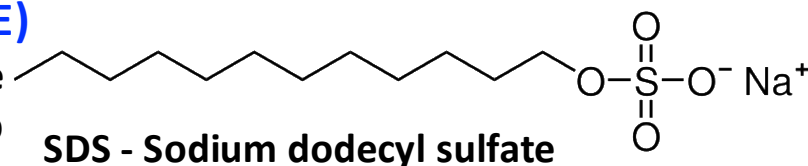
2.B. electroforeza în sistem vertical - suporturi care trebuie ferite de oxigen, precum poliacrilamida. Reprezintă tipul de electroforeză standard pentru separarea proteinelor în studiile de proteomică.

I. 2. Fraționarea proteinelor



A.I. Electroforeza proteinelor în condiții denaturante (SDS-PAGE)

Denumirea acestei metode face referire la faptul că **moleculele proteice nu sunt separate în forma lor nativă, ci sunt denaturate** sub acțiunea temperaturii, a detergentului **SDS**-ului și agentului reducător



β -mercaptoetanol. Plierea tridimensională a moleculelor proteice înlăturată, proteinele fiind transformate în catenele liniare de aminoacizi. Suplimentar, **SDS-ul se fixează pe catenele polipetidice într-o cantitate proporțională cu lungimea acestora și ecranează sarcinile datorate încărcării aminoacizilor.** Toate proteinele vor fi, prin urmare, încărcate negativ, dimensiunea sarcinii fiind direct proporțională cu cantitatea de SDS fixată, adică cu lungimea catenei. **În acest tip de electroforeză separarea se realizează în funcție de un singur parametru și anume de lungimea catenelor polipeptice, adică masa moleculară.**

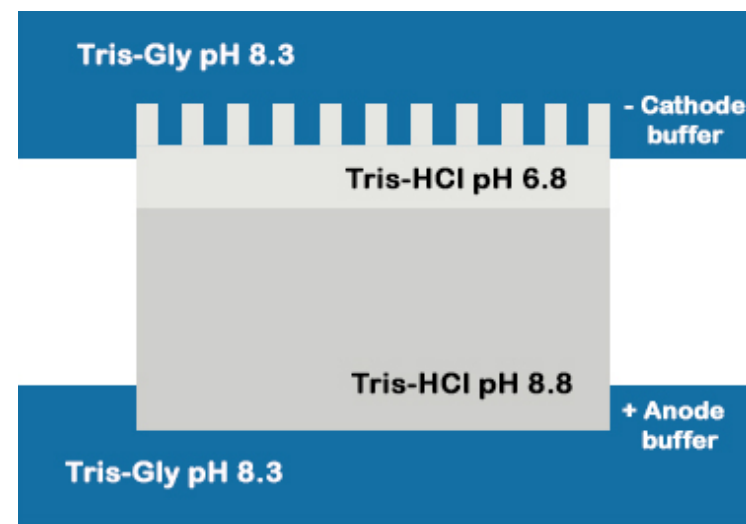
Proteinele sunt separate pe geluri pe poli(acrilamidă (PAGE-poliacrilamide gel electrophoresis) folosind un sistem tampon discontinuu. Discontinuitatea se referă la 4 parametri:

1. **porozitatea gelului** – gelul în care se realizează separarea electroforetică conține două zone de concentrații diferite, una în zona superioară de **concentrație mică** (pori de dimensiuni mari, **gel de concentrare**) și una în zona inferioară de **concentrație mare** (pori de dimensiuni mici, **gel de separare**);

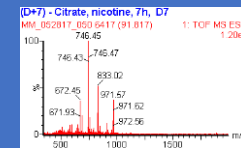
2. **pH-ul gelului** – gelul de concentrare are **pH-ul 6,8** iar cel de **migrare are pH-ul 8,8**;

3. **tăria ionică a soluțiilor tampon** din interiorul gelului – gelul de concentrare conține 0,125 mol/l TRIS-HCl, iar gelul de separare 0,375 mol/l TRIS-HCl;

4. **natura ionilor din gel și din tamponul de electrod**; gelul conține ioni Cl⁻ iar tamponul de migrare glicină.



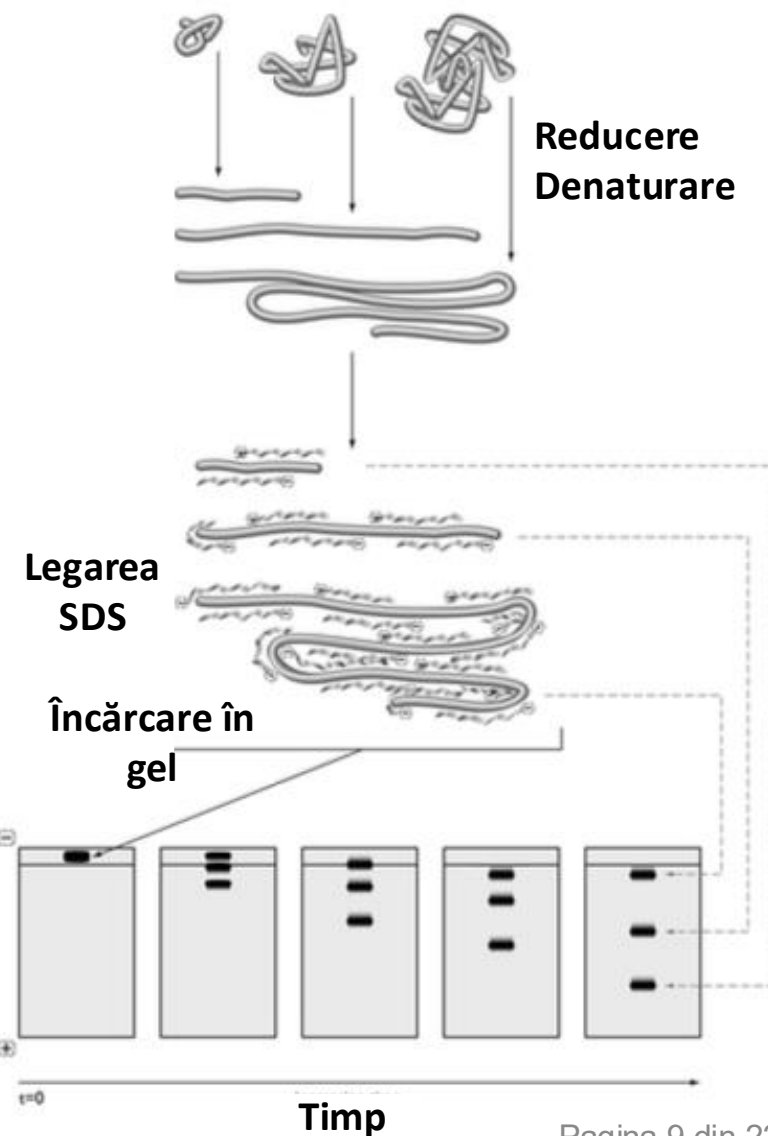
I. 2. Fraționarea proteinelor



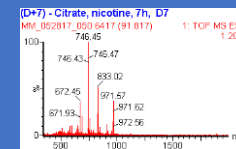
Separare proteinelor în sistemul discontinuu are loc în două etape, corespunzătoare celor două geluri:

1. **Etapa de concentrare a fracțiilor proteice.** Probele reprezentate de soluția proteică sunt plasate în gelul de concentrare, al cărui pH este de 6,8. La această valoare a pH-ului, glicina (punctul izoelectric, $pI=6,7$) este practic lipsită de sarcină electrică, iar Cl este încărcat negativ. La aplicarea curentului electric, glicina va avea o mobilitate redusă (datorită lipsei sarcinii), iar clorul va avea mobilitate maximă. Cele două molecule realizează două fronturi, unul puternic încărcat negativ și foarte mobil, și unul neutru cu mobilitate redusă. Proteinele au grade diferite de încărcare datorită interacțiunii cu gelul de poliacrilamidă și vor avea mobilități intermediare, plasându-se între frontul glicinei și cel al clorului, realizând legătura între aceste două fronturi și formând așa-numitul „tren de ioni”. Când acest tren al ionilor ajunge în zona de contact dintre gelul de concentrare și cel de migrare, rezistența datorată porilor mici ai gelului de migrare crește, ceea ce duce la concentrarea proteinelor sub forma unei singure benzi foarte fine.

2. **Etapa de separare a fracțiilor proteice.** În gelul de separare, la pH 8,8, glicina este încărcată negativ și, datorită masei moleculare mici, continuă să migreze împreună cu frontul clorului cu o viteză relativ mare, depășind frontul proteic întârziat la intrarea în acest gel. Proteinele se desprind din trenul ionilor și se separă în funcție de sarcina electrică = masa moleculară.



I. 2. Fraționarea proteinelor



A.II. Izoelectrofocuseria

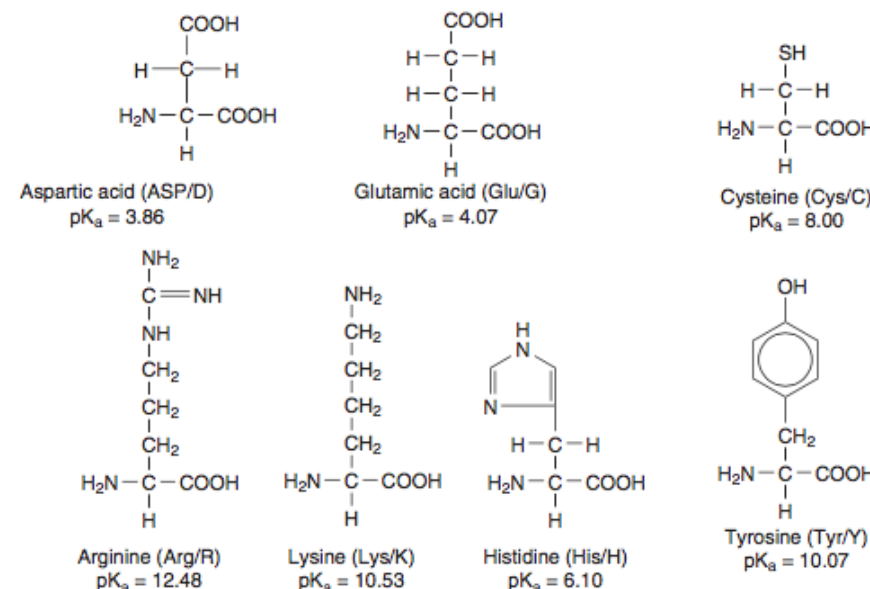
O bună parte a aminoacizilor proteinogeni conțin grupe funcționale care, în anumite condiții pot ioniza, și deci care pot genera sarcini electrice (COOH în COO^- , $-\text{NH}_3$ în $-\text{NH}_4^+$). De asemenea, MPT-urile pot introduce grupe funcționale ionizabile pe suprafața moleculelor proteice (PO_4^-) și astfel genera sarcini. Ionizarea acestor grupe este influențată de pH-ul soluției, în sensul în care **la valori de pH mici**, majoritatea grupelor funcționale ce pot accepta H^+ îi vor accepta și vor deveni **neutre sau pozitive**. **La valori mari de pH**, majoritatea grupelor funcționale ce pot ceda H^+ îi vor ceda și vor deveni **neutre sau negative**. Fiecare grupă funcțională se caracterizează astfel

printr-o valoare specifică de pH ionizează, valoare de pH care se notează pK_a . Grupele funcționale ionizabile din structura aminoacizilor se influențează reciproc, ceea ce face ca fiecare aminoacid să fie caracterizat **printr-o valoare unică de pH la care nici una dintre grupele funcționale nu sunt încărcate electric, aminoacidul fiind lipsit de sarcină – punct izoelectric, pI** .

Același lucru este valabil și pentru proteine. În cazul rol, grupele funcționale de ale aminoacizilor de la suprafața moleculelor proteice pot ioniza și deci genera sarcini. Interacțiunea dintre grupele funcționale ionizabile de la suprafața moleculei proteice face ca fiecare proteină să fie caracterizată de un pI unic. Funcție de valoarea acestuia, proteinele se pot împărți în:

A. proteine acide, $\text{pI} < 7$,

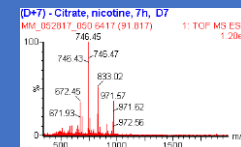
B. Proteine bazice, $\text{pI} > 7$.



(D+7) - Citrate, nicotine, 7h, D7
 MM_052017_050 6417 (91.817) 1: TOF MS ES-
 1.20e

Mass spectrum showing relative intensity (%) versus m/z. The base peak is at m/z 746.45. Other significant peaks are labeled at m/z 746.43, 746.47, 893.02, 971.57, 972.56, 971.62, 672.45, and 671.93.

I. 2. Fraționarea proteinelor



A.III. Electroforeza 2D-PAGE

Electroforeza 2D-PAGE este o metodă de separare a proteinelor în geluri de poliacrilamidă (**polyacrylamide gel electrophoresis - PAGE**) care combină principiile descrise anterior pentru a separa amestecurile proteice funcție de 2 parametri sau dimensiuni (2D):

A. punctul izoelectric – printr-o etapă inițială de izoelectrofoculare

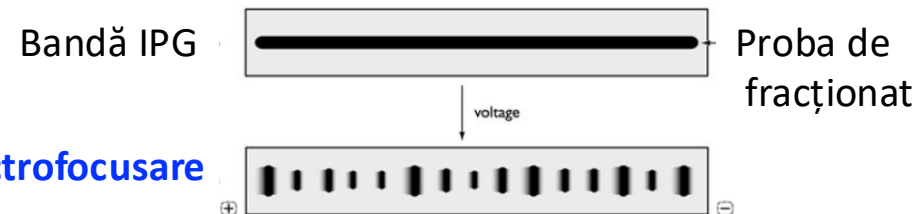
B. masă moleculară - printr-o etapă de SDS-PAGE.

Deși principiile și metoda în sine a fost introdusă încă din anii 70, aceasta nu a fost utilizată foarte intens datorită dificultăților tehnice întâmpinate în:

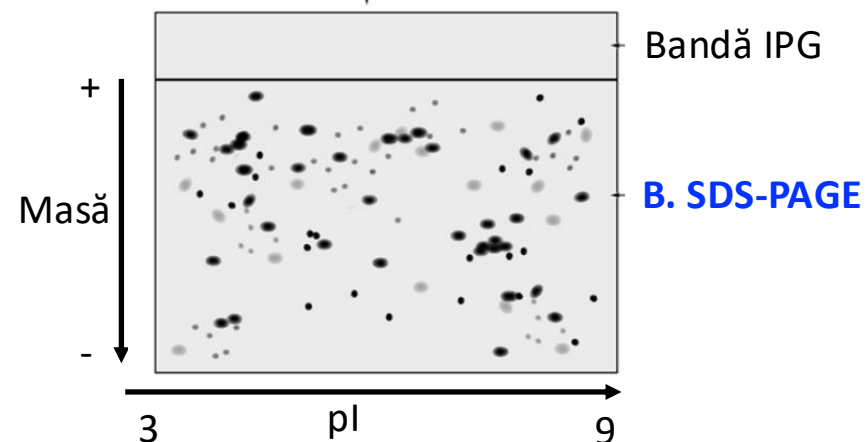
A. Izoelectrofoculare

- realizarea într-o manieră repetabilă a gradiului de pH;
- atașarea gelului pentru electrofoculare peste gelul SDS-PAGE și transferul proteinelor dintr-un gel în altul.

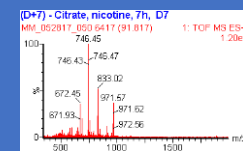
În prezent, prin utilizarea în etapa de electrofoculare a unor benzi de gel în care compușii ce generează gradientul de pH sunt imobilizați pe un gel de acrilamidă (**benzi IPG – imobilized pH Gradient**), 2D-PAGE a devenit metoda de referință pentru studiile de proteomică, ea permițând inclusiv separarea moleculelor proteice cu aceeași secvență, dar cu MPT diferite (Ex. diverse nivele de fosforilare)



Spălare, adăugare de SDS, reducere
Banda IPG este amplasată peste gelul SDS-PAGE



I. 2. Fraționarea proteinelor



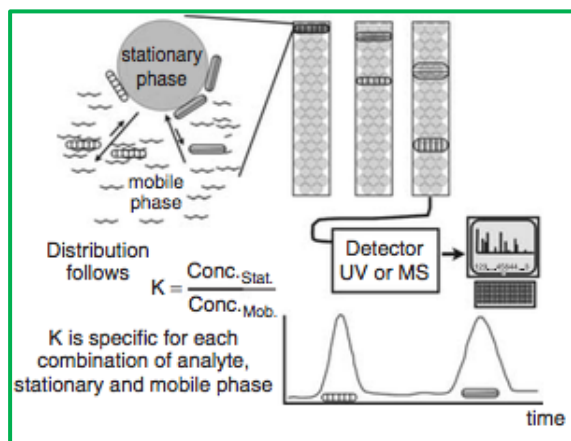
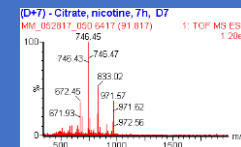
A.IV. Detecția proteinelor pe geluri

Pentru evidențierea proteinelor separate pe gelurile de poliacrilamidă au fost descrise numeroase protocoale ce pot fi împărțite în doua categorii mari:

1. **colorații specifice** cu care sunt evidențiate doar anumite fracțiuni din toate proteinele separate; aceste colorații se folosesc în special pentru evidențierea unor enzime;
2. **colorații nespecifice** care realizează colorarea uniformă a tuturor proteinelor separate. Diversele metode de colorare nespecifică diferă între ele prin nivelul de sensibilitate și prin complexitatea. Indiferent de metoda de colorare, la bază stă reacția unui reactiv de culoare cu resturi specifice de aminoacizi din catena polipeptidică (ex. nucleeele aromatice). Din acest motiv intensitatea culorii nu depinde doar de cantitatea de proteină din gel, ci și de secvența de aminoacizi a proteinei colorate.

Metodă de colorare		Sensibilitate	Observații
Coomassie brilliant blue R-250		0,3-1 µg/bandă	Simplă, tradițională, cu sensibilitate redusă. Recomandată pentru gelurile SDS-PAGE) și 2D-PAGE
Coomassie brilliant blue G-250 (coloidal)		100 ng/bandă	Recomandată pentru toate tipurile de geluri, sensibilitate bună dar necesită un timp mai îndelungat de colorare.
Colorație cu argint		10 ng/bandă	Sensibilitate foarte bună, dificil de realizat, necesită o calitate deosebit de bună a reactivilor utilizați
Colorație cuprică		10-100 ng/bandă	Rapidă și ușor de realizat, nu poate fi aplicată decât pentru gelurile cu SDS.
Colorație cu Zn		10-100 ng/bandă	Rapidă și ușor de realizat, nu poate fi aplicată decât pentru gelurile cu SDS.
Coloranți luminescenti tip SYPRO		1-8 ng/bandă	Rapidă și ușor de realizat, aplicabilă tuturor tipurilor de geluri, necesită sistem de achiziție a imaginilor în UV

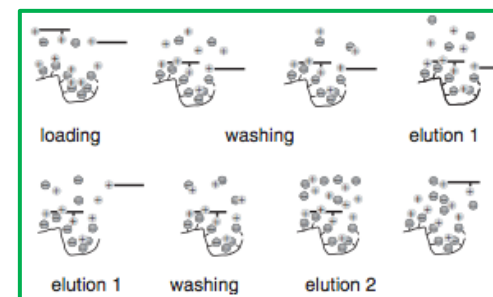
I. 2. Fraționarea proteinelor



B.I. Metode cromatografice de separare a proteinelor

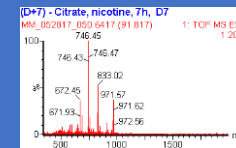
Cromatografia este o metodă fizică de separare a componentelor unui amestec pe baza interacțiunilor diferite pe care le realizează aceștia cu după faze: o fază mobilă și o fază staționară. Funcție de interacțiuni pe baza cărora se realizează, metodele cromatografice aplicabile în cazul proteinelor sunt:

1. Cromatografia prin schimb ionic (Ion exchange chromatography, IEX) are la bază existența de sarcini electrice pe suprafața moleculelor proteice. Faza staționară este de asemenea încărcată electric (pozitiv sau negativ), în așa fel încât proteinele vor avea o afinitate mai mare sau mai mică funcție de aceasta. Numele acestui tip de separare provine de la faptul că eluarea proteinei de pe coloană se realizează prin concentrații crescute de săruri ionizate, faza staționară schimbând proteinele fixate de aceasta cu ioni sării.



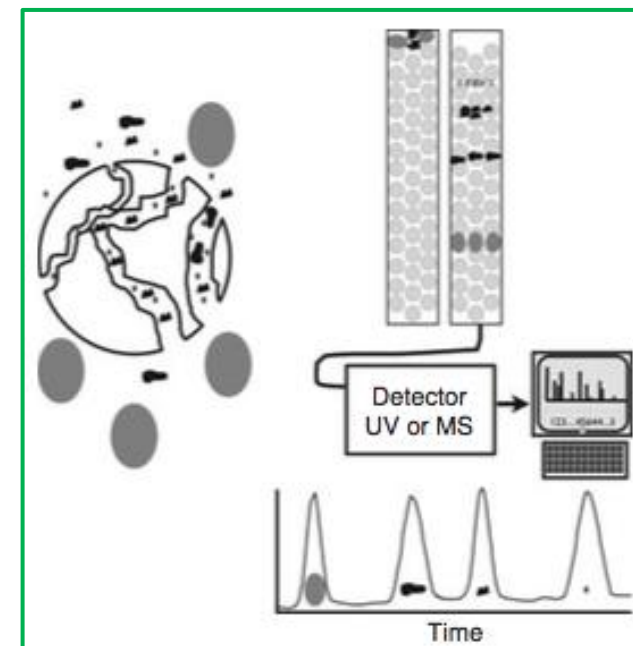
2. Cromatografia pe bază de interacțiuni hidrofobe (Hydrophobic Interaction Chromatography, HIC) – separarea se realizează la concentrații mari de săruri ce rețin puternic apa în sfera de hidratare. În aceste condiții, moleculele proteice vor fi lipsite de apa de hidratare și vor interacționa cu o fază staționară puțin hidrofobă, tăria interacțiunii depinzând de dimensiunea zonelor hidrofobe de pe suprafața moleculelor proteice. Prin scăderea concentrației de sare, apa de hidratare devine disponibilă, moleculele proteice interacionează cu aceasta și se desprind de pe faza staționară.

I. 2. Fraționarea proteinelor



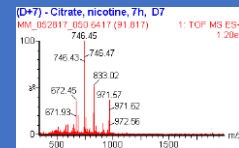
3. Cromatografia pe bază interacțiuni hidrofile (Hydrophilic interaction chromatography, HILIC) – se bazează pe interacțiunile cu o fază staționară puternic hidrofilă, însă aplicabilitatea acestei metode în separarea proteinelor este redusă la proteinele membranare și apolipoproteine.

4. Filtrarea prin gel (Size-exclusion chromatography, SEC) - are la bază principiul de separare care presupune excluderea din gel în funcție de dimensiuni (engl. *size-exclusion*). În funcție de masă, moleculele de dimensiuni diferite vor fi reținute diferențiat la traversarea unui gel cu pori de dimensiuni fixe, astfel încât moleculele mari, care nu pot pătrunde prin pori, vor avea un grad mai mic de reținere, în timp ce moleculele mici vor pătrunde prin porii gelului și se vor „pierde”, fiind astfel foarte mult întârziate.



5. Cromatografia de fază inversată (Reversed-phase liquid chromatography, RPLC) – este în mod traditional utilizată pentru separarea peptidelor, însă recent s-a găsit aplicații și în separarea proteinelor. Din motive didactice, principiile și detalii suplimentare vor fi discutate la capitolul corespunzător separării peptidelor post-digestie.

I. 2. Fraționarea proteinelor

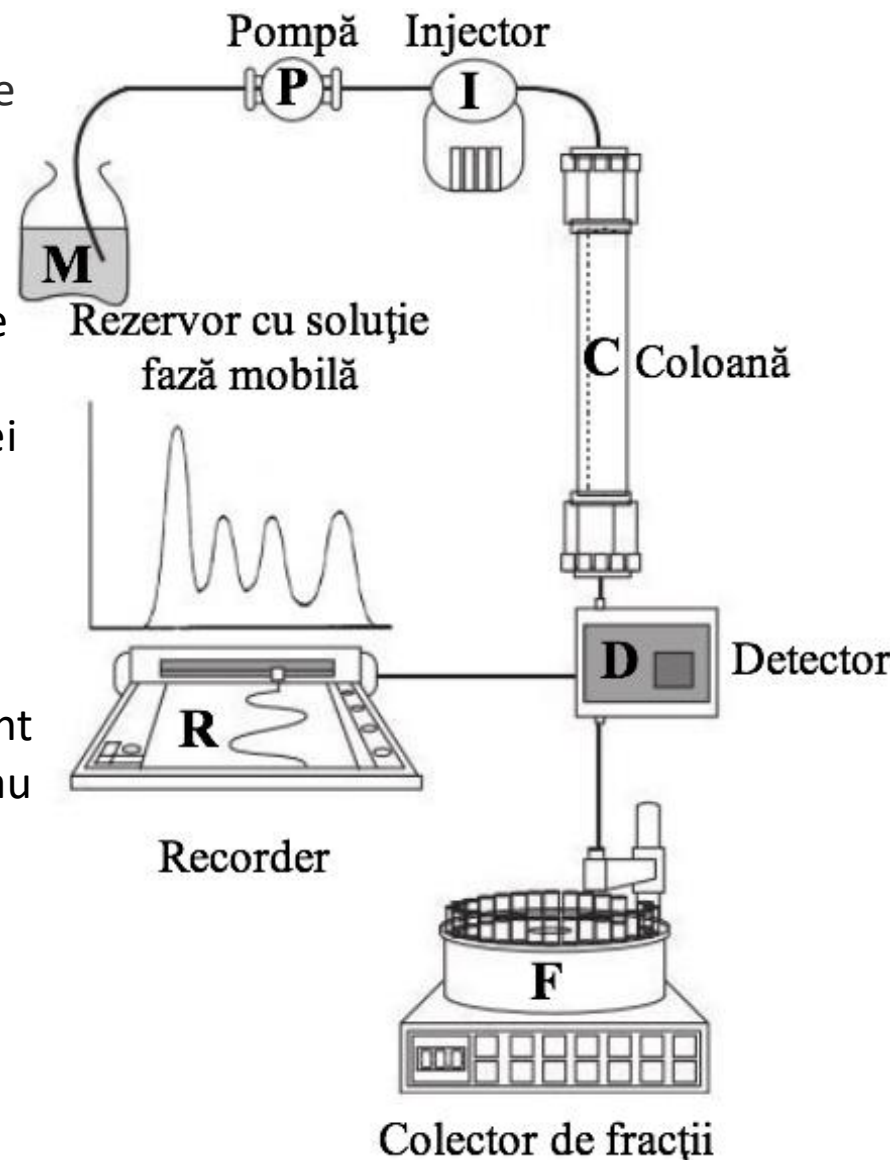


Fraționarea proteinelor folosind tehnicile cromatografice se realizează în **sisteme cromatografice** care cel mai frecvent sunt alcătuite din:

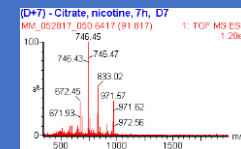
1. **rezervor** cu soluție reprezentând faza mobilă (M) – capacitatea minimă a rezervorului este dată de dimensiunile coloanei cromatografice, fiind necesar ca acesta să conțină suficientă fază mobilă pentru a permite echilibrarea coloanei și separarea cromatografică propriu-zisă;

2. **pompă (P)** – are rolul de a asigura un debit constant în timpul separării; pentru GF este suficientă o pompă peristaltică simplă, deoarece presiunile atinse în coloană sunt mici; aplicațiile mai complexe necesită o pompă cu piston sau chiar un sistem format din două sau patru pompe cu piston;

3. **injector (I)** – permite injectarea probei de analizat în coloană la momentul stabilit de utilizator. În cazul instrumentelor moderne injector este înlocuit de un autosampler ce încarcă automat probele de analizat;



I. 2. Fraționarea proteinelor

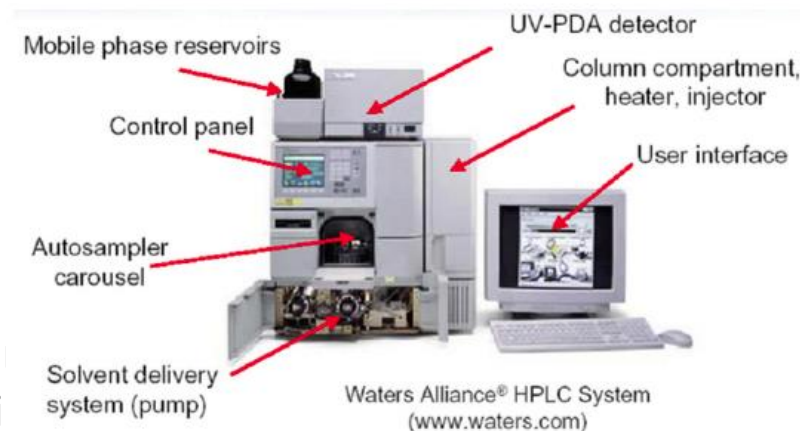


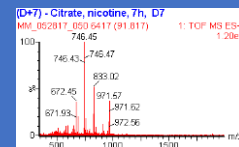
4. **coloana cromatografică** (C) – este elementul în care se realizează propriu-zis separarea; coloanele cromatografice conțin diverse tipuri de faza staționară, funcție de tipul de separare (SEC; HILIC; RPLC, HIC, IEX);

5. **detector** (D) – permite monitorizarea în timp real concentrației de proteine din faza mobilă la ieșirea din coloana cromatografică și detecția momentului în care protei investigată este eluată;

6. **colector de fracții** (F) – permite colectarea fracționată automată în eprubete separate a eluentului de pe coloană; nu este obligatoriu, sistemele cromatografice pot fi conectate direct la un spectrometru de masă;

7. **aparat de înregistrare** (recorder (R)) – are rolul de a prelua și prezenta grafic valorile înregistrate de către detector; informațiile sunt prezentate sub forma unui grafic numit cromatogramă, pe abscisă (axa Ox) fiind reprezentat timpul (sau volumul), iar pe ordonată (axa Oy) extincția fazei mobile; în cazul sistemelor moderne de cromatografie, sistemul de înregistrare este înlocuit de software-ul de control al întregului sistem cromatografic; acesta permite nu doar monitorizarea, ci și ajustarea în timp real a parametrilor separării.

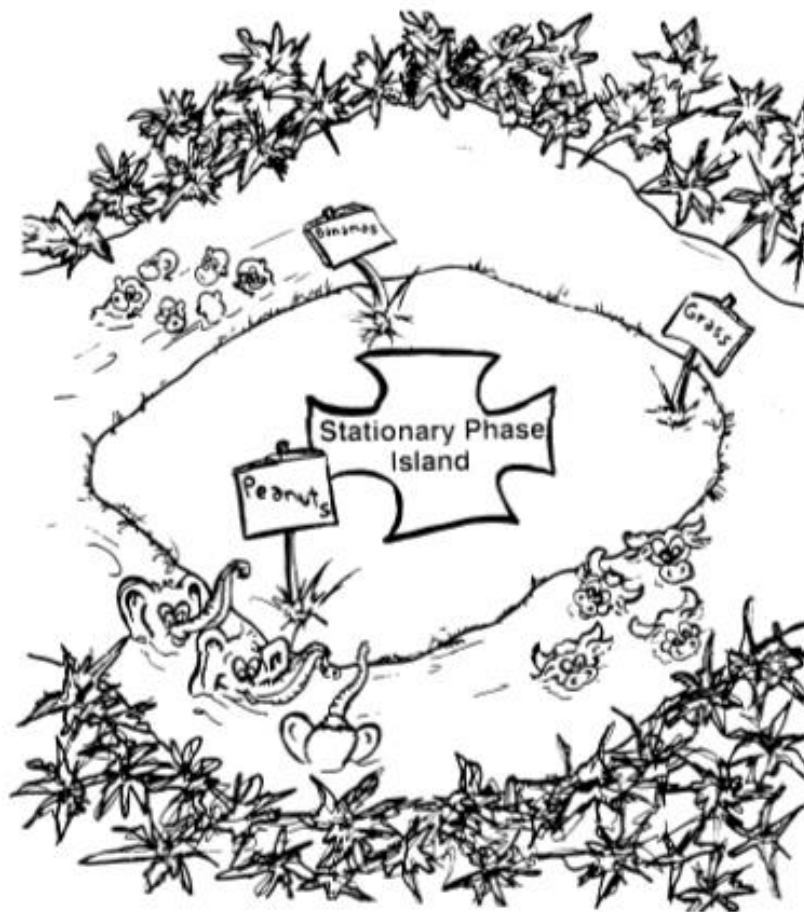
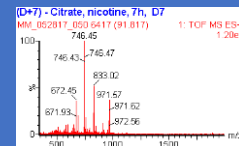




A Simple Analogy

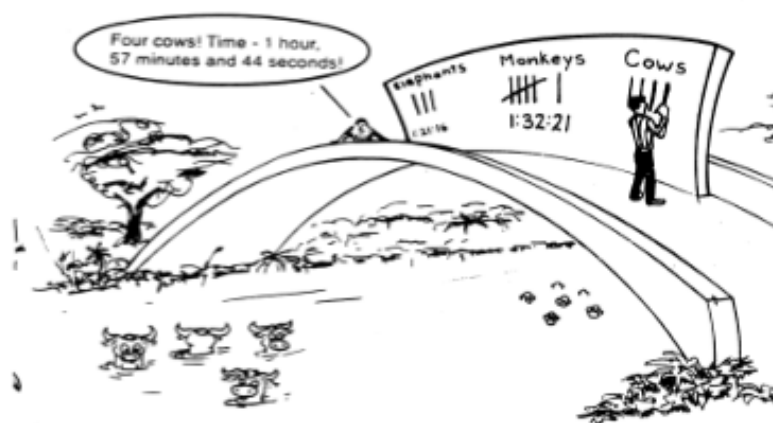
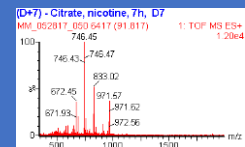
A zoo train derailed over a river. Monkeys, elephants and cows were free!

6



A Simple Analogy

The animals drifted by an island that had bananas, grass and peanuts. Each animal stopped at their favorite food. They each took their time eating before setting off.



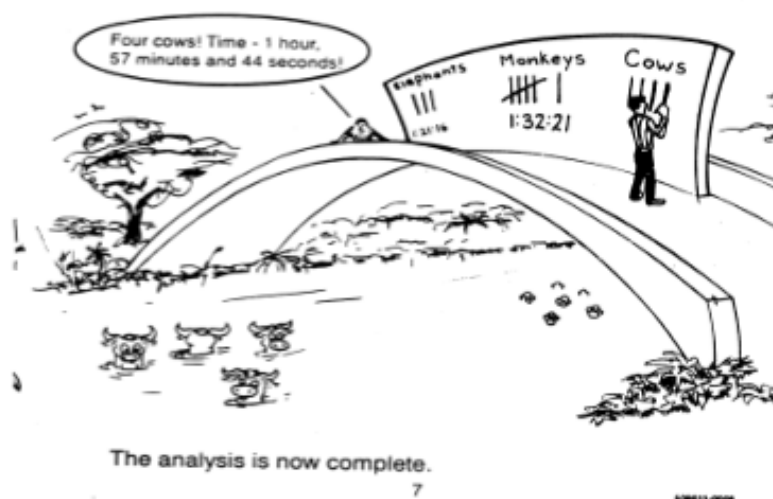
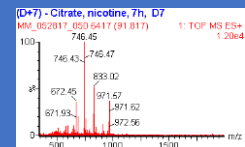
The analysis is now complete.

7

©2011 JG006

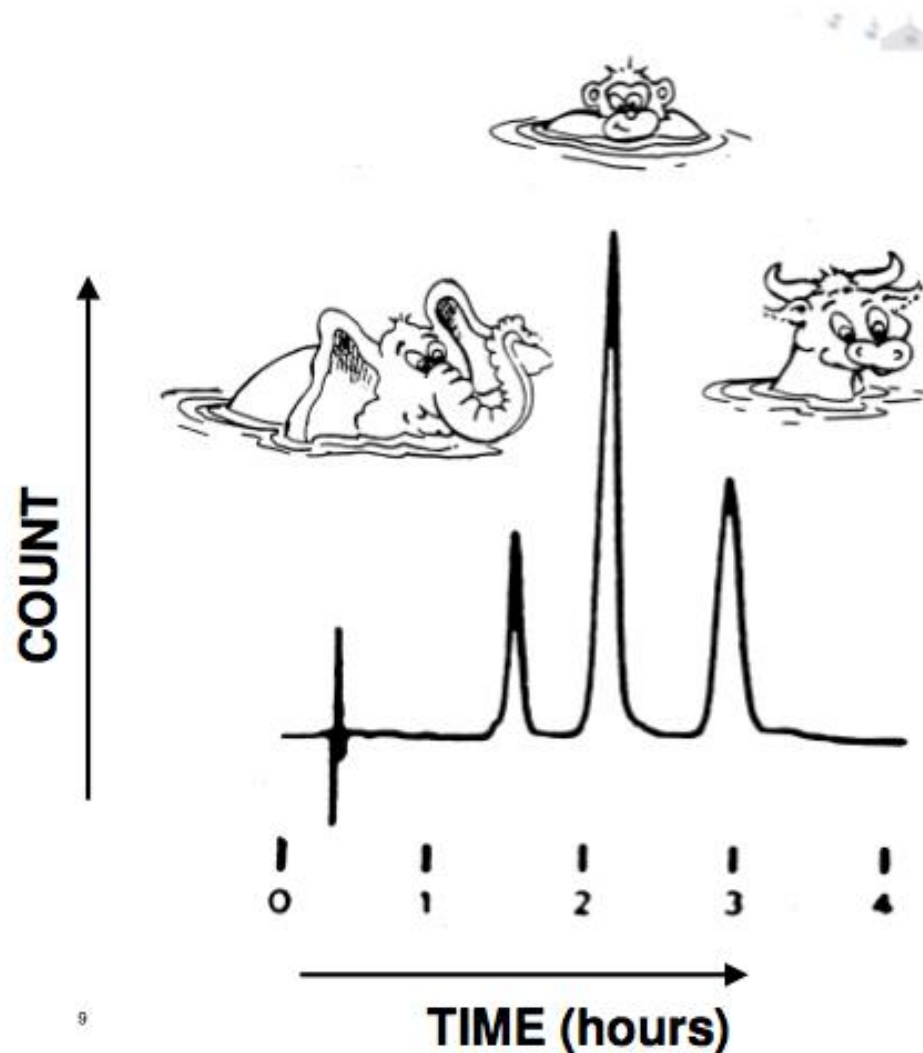
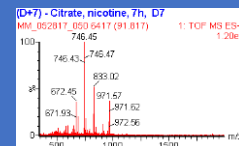
A Simple Analogy

Eventually, the animals floated under a bridge. As the animals went under the bridge, the “detector” called out the time and the number of each animal.



A Simple Analogy

Eventually, the animals floated under a bridge. As the animals went under the bridge, the “detector” called out the time and the number of each animal.



A Simple Analogy

The caretakers graphed the detector's data. They plotted the number of each animal on the y-axis and the time it passed under the bridge on the x-axis.

9