

Identificación, caracterización y cuantificación de péptidos y proteínas por técnicas de nanoHPLC-espectrometría de masas.

OBJETIVO

Identificación, cuantificación y caracterización de péptidos y proteínas por nano-cromatografía líquida-espectrometría de masas, procedentes de muestras biológicas.

ESTADO DEL ARTE

La Proteómica se ocupa directamente de la integración de la expresión a gran escala de los genes con su función celular a nivel de proteína. La espectrometría de masas acoplada a nano-cromatografía líquida se ha convertido el método de análisis de proteínas por excelencia. Proteómica basada en MS es una disciplina que se ha hecho posible gracias a la disponibilidad de bases de datos de genes y la secuencia del genoma y los avances técnicos y conceptuales en muchas áreas, especialmente el descubrimiento y desarrollo de métodos de ionización de péptidos y proteínas junto con las mejoras en métodos de preparación y separación.

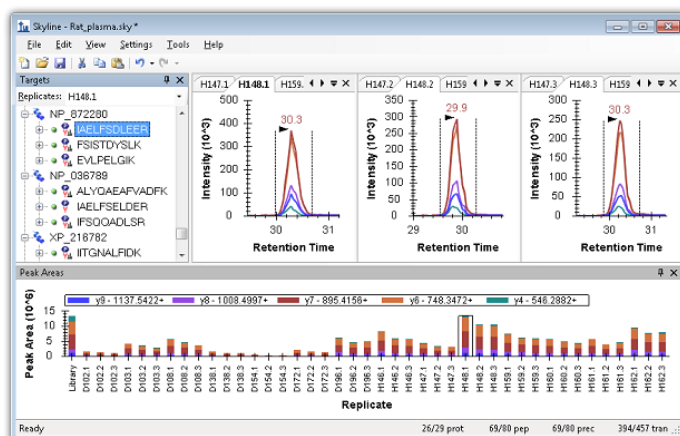
Actualmente, se vienen usando un número considerable de aproximaciones técnicas proteómicas de alto rendimiento tales como el "shotgun", el uso de marcaje isotópico (iTRAQ, TMT, iCAT, SILAC) y métodos de "label free", los cuales usan datos de espectros adquiridos por CID, fundamentalmente, que derivan en la identificación de una lista de péptidos y sus correspondientes proteínas. Por otra parte los métodos de Proteómica dirigida como "Selected/Multiplex Reaction Monitoring (SRM/MRM)", Parallel Reaction Monitoring (PRM), métodos de adquisición de dato-independiente (DIA/SWATH) y métodos de Proteómica dirigida en MS1 dato-dependiente se han convertido en herramientas muy potentes para la cuantificación, descubrimiento y validación de biomarcadores, en rangos de límites de detección entre pico y attomolar. Todo ello en conjunción con la bioinformática que permite el manejo de secuencias de genoma y/o transcriptoma, como bases de datos para identificación y análisis de proteínas en cualquier tipo de organismo, y obtener resultados que se integren dentro de la biología de sistemas.

EQUIPAMIENTO

La Unidad de Proteómica dispone de dos sistemas basados tanto en DDA como en DIA por medio de tecnología Orbitrap (Thermo Scientific) y QTRAP (Sciex) que permite abarcar un rango de análisis muy amplio.

Los flujos de trabajo que se realizan con tecnología Orbitrap permite una colección amplia de espectros CID MS/MS para identificar sus proteínas con la ayuda de algoritmos de búsqueda específicos (MASCOT, SEQUEST, PARAGON, XTAMDEM, OMMSA, etc).

Previamente las mezclas de péptidos se separan por nano-cromatografía en 1 ó 2 dimensiones (nano-UHPLC Ultimate 3000, Dionex-Thermo) por fase reversa o intercambio iónico seguido de fase reversa, respectivamente. Además la tecnología QTRAP facilita la realización de métodos SRM/MRM para el estudio de biomarcadores en experimentos de proteómica dirigida. Todos los datos generados por Proteómica dirigida pueden ser analizados por programas como Skyline (McCoss Lab.), SIEVE (Thermo Scientific), etc mediante la cuantificación de transiciones.



APLICACIONES

- Análisis de péptidos y proteínas en agroalimentación e investigación clínica, biomédica y básica.
- Identificación y cuantificación de biomarcadores tanto para la industria farmacéutica como la agroalimentaria.
- Detección de alérgenos proteicos en alimentos.

REFERENCES

1. Mass spectrometry-based proteomics. Ruedi Aebersold & Matthias Mann Nature 422, 198-207 (13 March 2003)
2. Electrospray ionization for the mass spectrometry of large biomolecules Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. & Whitehouse, C. M.. Science 246, 64-71 (1989).
3. Multiplexed and data-independent tandem mass spectrometry for global proteome profiling. Chapman JD1, Goodlett DR, Masselon CD. Mass Spectrom Rev. 2014 Nov-Dec;33(6):452-70. doi: 10.1002/mas.21400
4. Skyline: An Open Source Document Editor for Creating and Analyzing Targeted Proteomics Experiments. MacLean, Bioinformatics 2010