

Identificación de proteínas por espectrometría de masas MALDI TOF-TOF

OBJETIVO

Identificación de proteínas, con herramientas bioinformáticas, a partir de datos obtenidos por espectrometría de masas en tandem (MS+MS/MS), usando búsquedas en bases de datos.

ESTADO DEL ARTE

MALDI-TOF/TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Flight) es una técnica de ionización suave utilizada en espectrometría de masas para el análisis de péptidos e incluso proteínas enteras hasta un cierto tamaño. Los péptidos o proteínas son ionizados por la incidencia de un láser de nitrógeno sobre la muestra. La ionización se favorece por la mezcla del material proteico con una matriz sólida, generalmente el ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico. En este tipo de ionización los péptidos toman o pierden un único protón ($z=+1$).

En un primer análisis de masas (MS) se determina el valor m/z de los péptidos, y algunos de estos son seleccionados de forma individual, aislados y fragmentados. Los fragmentos generados se separan y analizan en un segundo análisis de masas, obteniendo el espectro de fragmentación o MS/MS de cada péptido, que contiene información tanto de la masa del péptido precursor como de la secuencia de aminoácidos de este.

Los espectrómetros de masas de tipo MALDI TOF/TOF son muy utilizados para identificar proteínas por varias razones: son altamente sensibles, cuentan con un elevado poder de resolución y son capaces de medir con excelente exactitud la masa.

La aplicación de la técnica MALDI TOF/TOF a la Proteómica, junto con la disponibilidad de bases de datos y el desarrollo de herramientas informáticas ha supuesto un gran avance en la identificación de proteínas.

METODOLOGIA

Equipamiento. El equipo disponible es un Espectrómetro de Masas 4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer (AB Sciex). Como equipamiento accesorio, se dispone de una Estación Automática de Picado de Geles (ProPic, GenomicSolutions) y una Estación Automática de Digestión y Dispensación de Proteínas sobre Placa de MALDI (PROPREP II, Digilab).

Descripción del procedimiento: Los péptidos resultantes de la digestión con tripsina de las proteínas de interés (proteínas separadas en gel o proteínas en solución), se purifican mediante una microcolumna de resina C18 (ZipTip, Millipore), eluyéndose directamente con una solución de matriz (3 mg/ml de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico en 70% acetonitrilo/0.1% TFA) sobre la placa MALDI en un volumen de 1 μ l. Tras la cocrystalización sobre la placa, las muestras se analizan mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF para obtener la huella peptídica (MS) en un espectrómetro de masas (4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer (AB Sciex)) equipado con extracción retardada, reflector y en modo positivo, en un rango de masa/carga (m/z) de 800 a 4000 Da, con un voltaje de aceleración de 20 kV. Se realiza calibración interna de los espectros utilizando las relaciones masa/carga (m/z) de los péptidos resultantes de la autólisis de la tripsina porcina ($M+H^+=842.509$, $M+H^+=2211.104$), obteniéndose de esta manera una precisión en la medida de las m/z de ± 20 ppm. De cada muestra se obtienen espectros de fragmentación (MS/MS) de las ocho m/z más intensas.

La identificación de proteínas se realiza combinando los espectros MS y sus correspondientes MS/MS sobre bases de datos públicas de secuencias de proteínas (NCBI Inróniprot), utilizando MASCOT v2.0 (MatrixScience Ltd., London; <http://www.matrixscience.com>) como motor de búsqueda, integrado en el programa GPS Explorer™ v3.5 (AB Sciex).

APLICACIONES

- Identificación de proteínas implicadas en procesos biológicos.
- Estudios de cambios de expresión proteica.
- Análisis del proteoma como herramienta para la caracterización de diferentes enfermedades y/o caracterización funcional de distintos organismos.
- Detección de biomarcadores de enfermedades para su posterior uso en clínica; estudios de respuesta a tratamientos; respuesta ante el envejecimiento.

REFERENCIAS

1. Henzel, W.J., Watanabe, C. and Stults, J.T. (2003). Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 14(9), 931-942.
2. Santos-González, M., López-Miranda, J., Pérez-Jiménez, F., Navas, P. and Villalba, J.M. (2011) Dietary oil modifies the plasma proteome during aging in the rat. *AGE*. DOI 10.1007/s11357-011-9239-z.
3. Castillejo, M.A., Fernández-Aparicio, M. and Rubiales, D. (2012). Proteomic analysis by two-dimensional in gel electrophoresis (2D DIGE) of the early response of *Pisum sativum* to *Orobanchaceae*. *Journal of Experimental Botany*, 63(1), 107-119. doi:10.1093/jxb/err246.
4. Collado-Romero, M., Martins, R.P., Arce, C., Moreno, A., Lucena, C., Carvajal, A. and Garrido, J.J. (2012). An in vivo proteomic study of the interaction between *Salmonella typhimurium* and porcine ileum mucosa. *Journal of Proteomics*, 75, 2015-2026. doi:10.1016/j.jprot.2012.01.001.
5. Fuentes-Almagro, C.A., Prieto-Álamo, M.J., Pueyo, C. and Jurado, J. (2012). Identification of proteins containing redox-sensitive thiols after PRDX1, PRDX3 and GCLC silencing and/or glucose oxidase treatment in Hepa 1-6 cells. *Journal of Proteomics*, 77, 262-279. doi:10.1016/j.jprot.2012.08.025.
6. Peinado, J.R., Pardo, M., de la Rosa, O. and Malagón, M.M. (2012). Proteomic characterization of adipose tissue constituents, a necessary step for understanding adipose tissue complexity. *Proteomics*, 12, 607-620. doi:10.1002/pmic.201100355.
7. Aragüez, I., Cruz-Rus, E., Botella, M.A., Medina-Escobar, N., and Valpuesta, V. (2013). Proteomic analysis of strawberry achenes reveals active synthesis and recycling of L-ascorbic acid. *Journal of Proteomics*, 83, 160-179. doi:10.1016/j.jprot.2013.03.016.