

DIGESTIÓ ENZIMÀTICA DE PROTEÏNES EN LÍNIA AMB L'ELECTROFRESI CAPIL·LAR ACOBLADA A L'ESPECTROMETRIA DE MASSES

INTRODUCCIÓ

La caracterització de proteïnes complexes amb espectrometria de masses requereix habitualment una fragmentació o digestió prèvia a l'anàlisi. La tripsina és l'enzim més utilitzat [1].

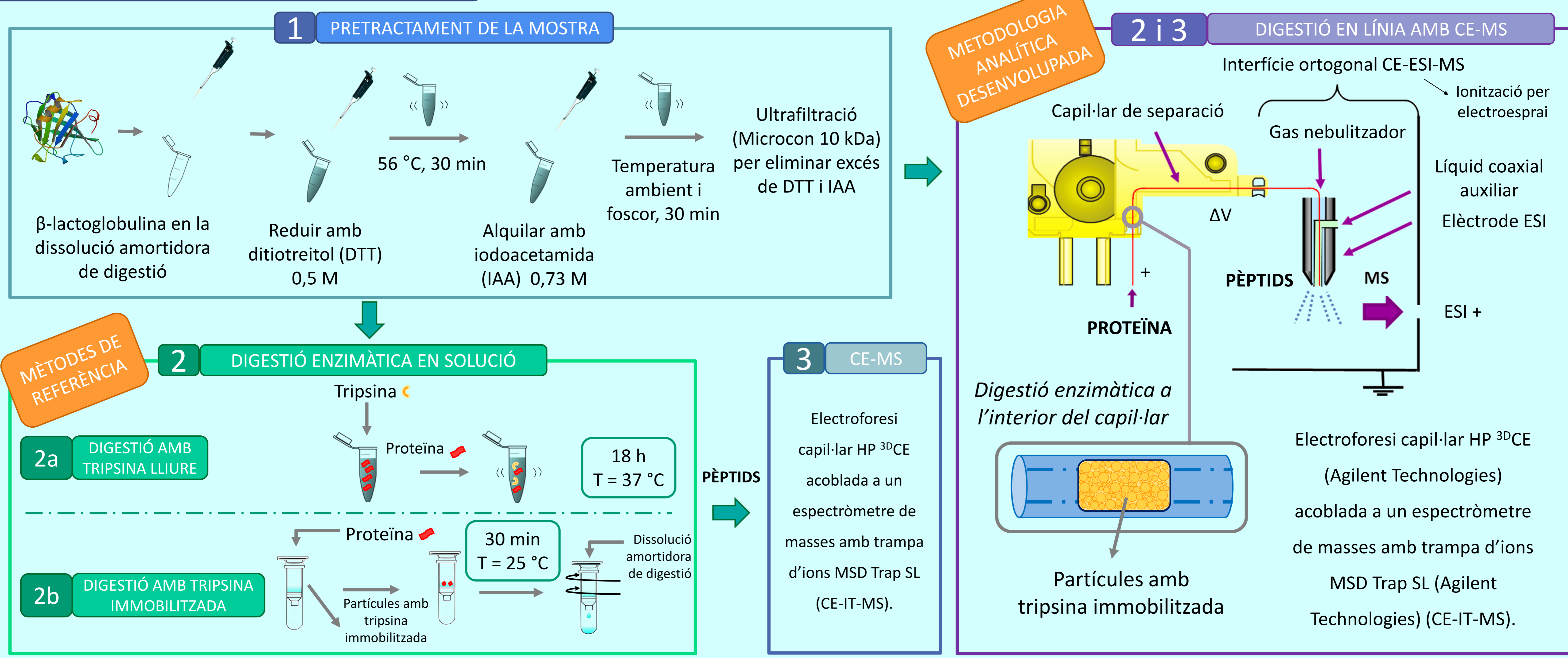
Tradicionalment, la digestió enzimàtica de proteïnes es realitza en dissolució amb tripsina lliure i requereix més de 18 h [2]. Els enzims immobilitzats són una alternativa interessant perquè permeten la recuperació de l'enzim, la disminució del temps de reacció i la prevenció de l'autoprotòlisi.

OBJECTIUS

Els objectius d'aquest projecte són els següents:

- Desenvolupar una metodologia analítica basada en microreactors que contenen partícules amb tripsina immobilitzada per a la digestió enzimàtica de proteïnes en línia amb l'electroforesi capil·lar acoblada a l'espectrometria de masses (CE-MS) [3].
- Comparar-la amb els mètodes de referència de digestió enzimàtica de la proteïna emprant tripsina lliure i immobilitzada en les condicions recomanades pels proveïdors.

PROCEDIMENT EXPERIMENTAL



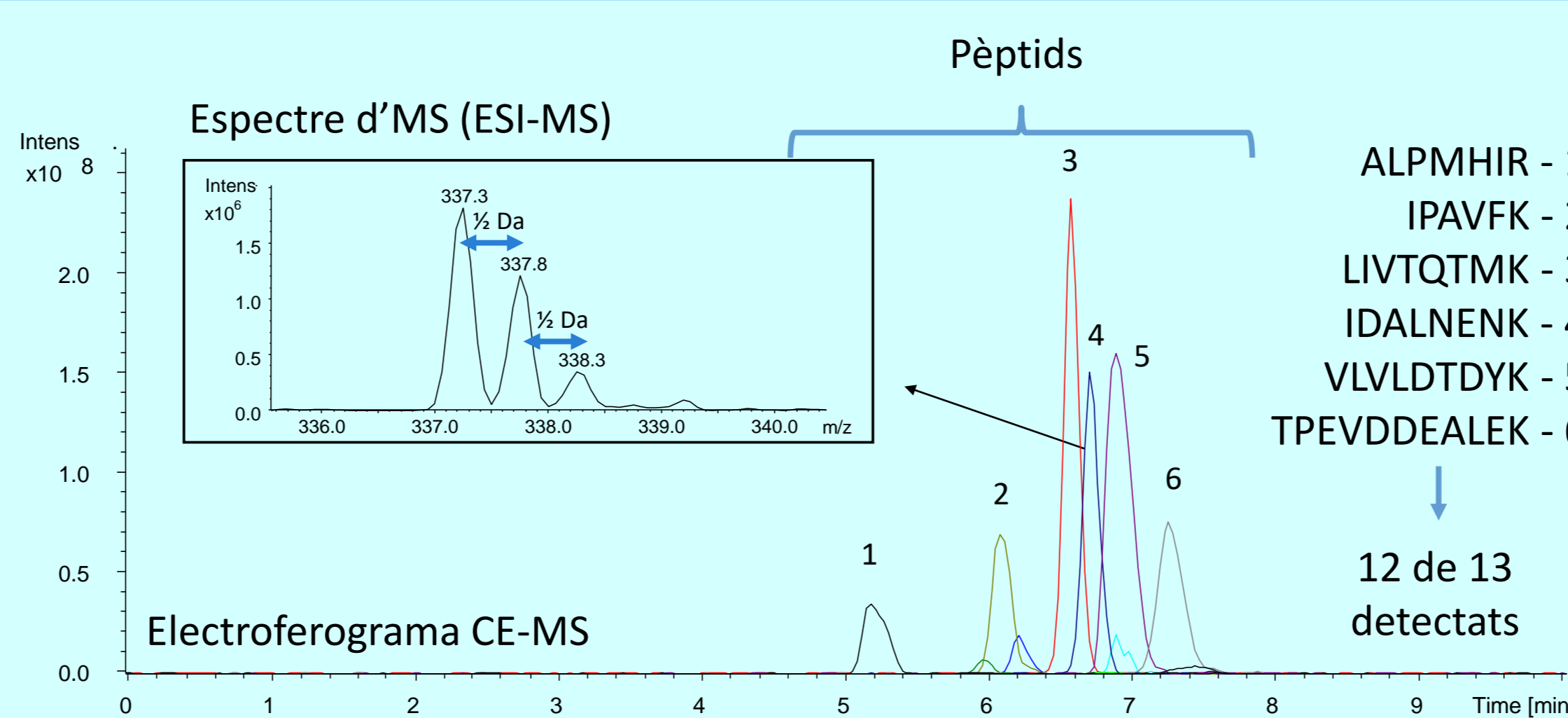
RESULTATS I DISCUSSIÓ

DIGESTIÓ EN SOLUCIÓ AMB TRIPSINA LLIURE

Condicions òptimes

Digestió 18 h

- NH_4HCO_3 50 mM com a dissolució amortidora de digestió, pH = 7,9 (85 % dels aminoàcids de la seqüència de la β -lactoglobulina detectats).
- Temperatura d'anàlisi: 37 °C.

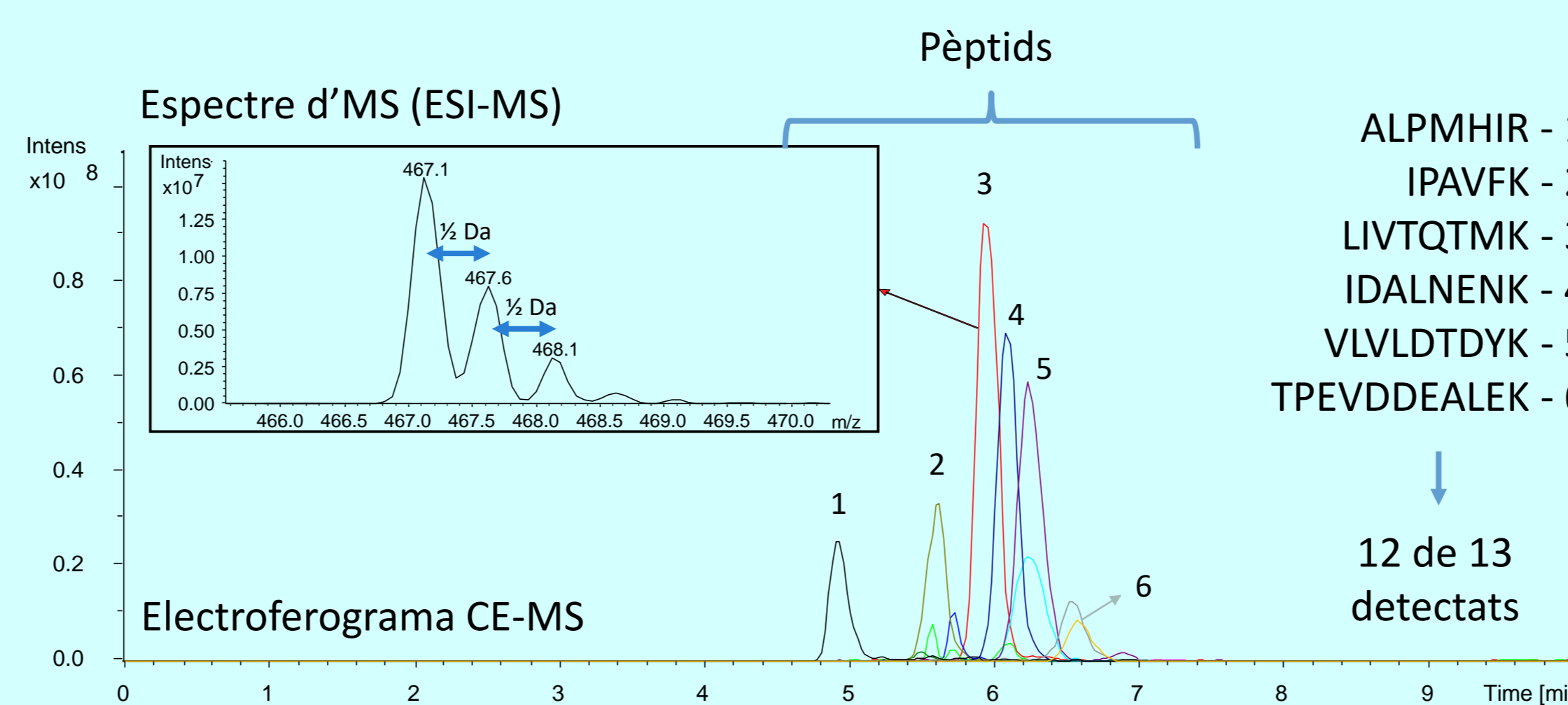


DIGESTIÓ EN SOLUCIÓ AMB TRIPSINA IMMOBILITZADA

Condicions òptimes

Digestió 30 min

- NH_4HCO_3 50 mM com a dissolució amortidora de digestió, pH = 7,9 (85 % d'aminoàcids detectats).
- Temperatura d'anàlisi: 37 °C.



DIGESTIÓ EN LÍNIA

Condicions òptimes

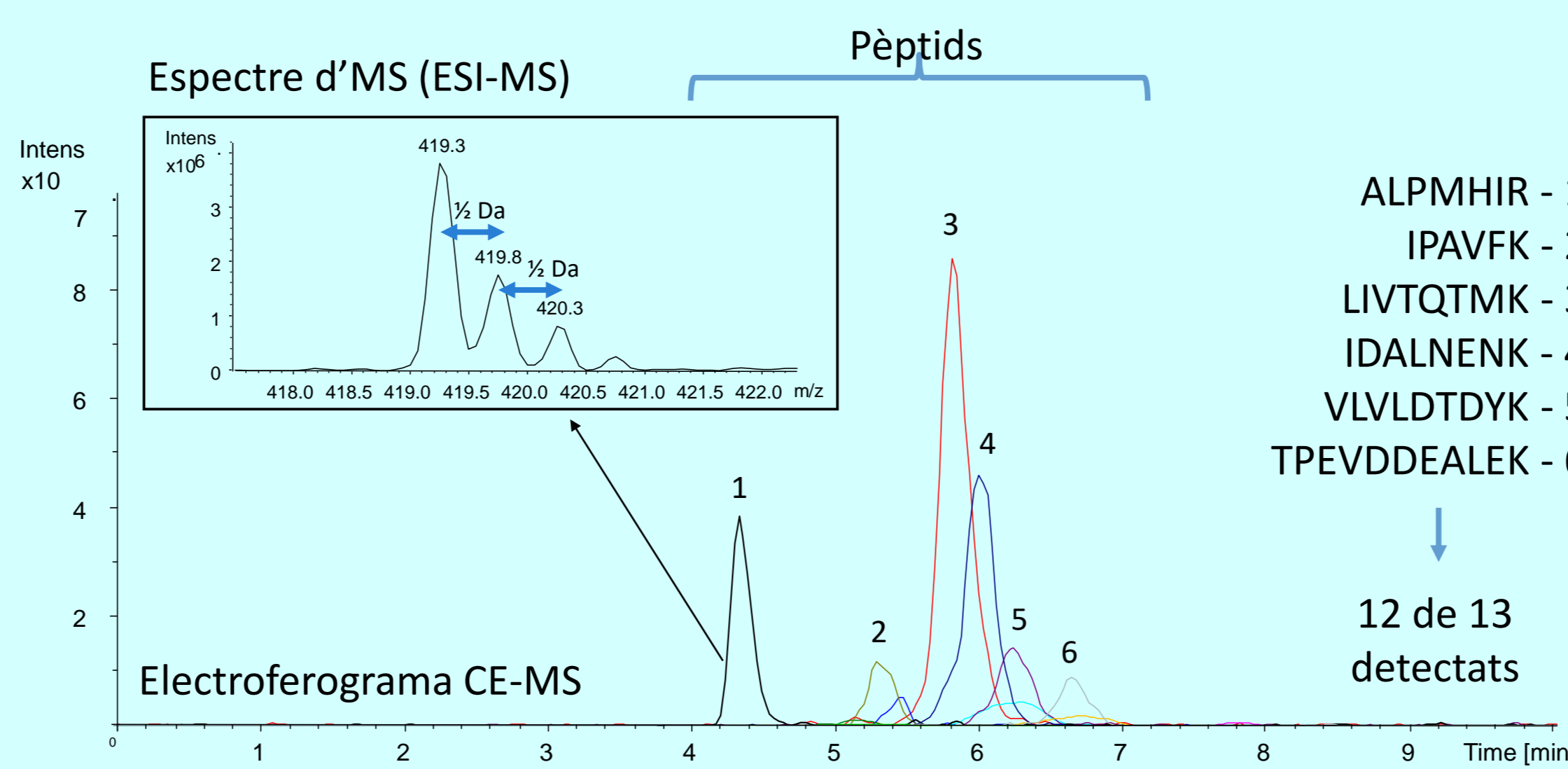
Digestió en línia

- NH_4HCO_3 10 mM com a dissolució amortidora de digestió, pH = 7,9 (85 % d'aminoàcids detectats).
- Temperatura de digestió i anàlisi: 37 °C.

Temps d'anàlisi: 7 min

Separació satisfactòria dels pèptids

Més de 30 digestions consecutives



Electròlit de separació (BGE) → 50 mM àcid acètic : 50 mM àcid fòrmic (pH = 2,3); 25 kV

CONCLUSIONS

S'ha desenvolupat una metodologia analítica eficient, ràpida i senzilla per a la digestió enzimàtica de proteïnes en línia amb CE-MS i s'ha aconseguit:

- La digestió completa de la proteïna, i la separació i identificació dels pèptids resultants en menys de 7 min.
- Una repetibilitat i uns límits de detecció similars als dels dos mètodes de referència.
- Un important estalvi de temps i de manipulacions necessàries i la possibilitat de reutilitzar el microreactor més de trenta vegades.

REFERÈNCIES

- Tsiatsiani, L., Heck, A. J. R., *FEBS J.* 282 (2015) 2612.
- Giménez, E., Ramos-Hernan, R., Benavente, F., Barbosa, J., Sanz-Nebot, V., *Anal. Chim. Acta* 709 (2012) 81.
- Bonneil, E., Waldron, K. C., *Talanta* 53 (2000) 687.

Agraïments

Projecte CTQ2014-56777-R del Ministeri d'Economia i Competitivitat.