

3. SECUENCIACION DE NOVO

De novo sequencing of proteins not represented in databases using LTQ-Orbitrap: a case study

Casado-Vela, J.¹⁾; Martínez-Ballesta, M.C.²⁾; Muries, B.²⁾; Carvajal, M.²⁾; Matthiesen, R.³⁾; Elortza, F.¹⁾

1) Unidad de Proteómica, CIC bioGUNE. Parque Tecnológico de Bizkaia, Edificio 800, 48160, Bizkaia. 2) Departamento de Nutrición Vegetal. Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura - CSIC. Apdo. Correos 164, 30100 Espinardo, Murcia. 3) Unidad de Bioinformática, CIC bioGUNE. Parque Tecnológico de Bizkaia, Edificio 800, 48160, Bizkaia.

Protein identification using proteomic technologies is routinely achieved through the comparison of experimental MS or MS² spectral peak lists with the theoretical ones calculated from peptide/nucleotide sequence databases. Whilst this general strategy is successful when applied to fully sequenced species, it is very limited when species underrepresented in databases are the aim of the study (Jensen *et al.*, 2006). In this study we take advantage of the high mass accuracy of LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific), combined with the use of the *de novo* sequencing software PEAKS (Bioinformatic Solutions, Inc.) to approach the characterization of plasmatic and vacuolar aquaporins isolated from broccoli (*Brassica oleracea* L. var *italica*) plants. Aquaporins belong to the major intrinsic protein (MIP) family and facilitate the flow of water across cellular membranes (plasma and vacu-

olar membranes), following osmotic or hydrostatic pressure gradients (Chrispeels and Maurel, 1994). In most of plant species investigated, pharmacological and/or genetic evidence has suggested that aquaporins represent a major role during water uptake by roots (Martínez-Ballesta *et al.*, 2006).

References

Chrispeels, MJ, Maurel, C. (1994). *Plant Physiology* 105, 9-13.

Jensen, O. N. (2006). *Nature Reviews in Molecular Cell Biology*. 7: 391-403.

Martínez- Ballesta MC, Silva C, López-Berenguer C, Cabañero FJ, Carvajal M (2006). *Plant Biology* 8: 535-546.

Secuenciación de novo de péptidos diferenciadores del decápodo de interés comercial *Pleoticus muelleri*

Ortea I., Barros L., Gallardo J. M.

Introducción

La identificación de especies marinas tiene capital importancia en la industria pesquera, ya que las regulaciones comerciales impuestas por diferentes países imponen requisitos de trazabilidad y de correcta identificación y etiquetado de los productos (Secretaría General de Pesca Marítima, 2005). El objetivo de este trabajo es caracterizar, por medio

de técnicas de proteómica, péptidos marcadores de una determinada especie de crustáceo decápodo de gran interés comercial: *Pleoticus muelleri*.

Material y métodos

Se solubilizaron las proteínas de la fracción sarcoplásmica del abdomen de individuos de *P. muelleri* y

de otras especies de decápodos comerciales próximas filogenéticamente. Estas proteínas sarcoplásmicas se separaron por electroforesis bidimensional, y se seleccionó un spot presente en los geles de todas las especies estudiadas, identificado como Arginina Kinasa. Este spot fue recortado de cada gel y digerido in situ con tripsina, (Jensen *et al.*, 1999), y una fracción de los péptidos resultantes de la digestión de cada spot fue analizada mediante espectrometría de masas con fuente de ionización tipo MALDI y analizador de tiempo de vuelo, para obtener su huella peptídica e identificar la presencia de péptidos específicos de *P. muelleri*. Una vez que estos péptidos fueron identificados, se analizó otra fracción mediante cromatografía líquida en fase reversa acoplada a espectrometría de masas trampa iónica e ionización por electrospray (HPLC-ESI-IT MS) o mediante nanospray (nESI-IT MS) (Piñeiro *et al.*, 2001). Se obtuvieron así los espectros de fragmentación de los péptidos diferenciadores, que debido a la ausencia de información de *P. muelleri* en las bases de datos, fueron analizados mediante secuenciación *de novo* con interpretación manual, obteniéndose así su secuencia aminoacídica.

Resultados y conclusiones

Aunque se observó poca variabilidad entre las especies estudiadas, se detectaron y caracterizaron 3 péptidos presentes únicamente en *P. muelleri*. En la Figura 1 se presenta el espectro de fragmentación de

uno de ellos, de 1130.6 Da. Se concluye que estos péptidos pueden utilizarse como marcadores para identificar esta especie.

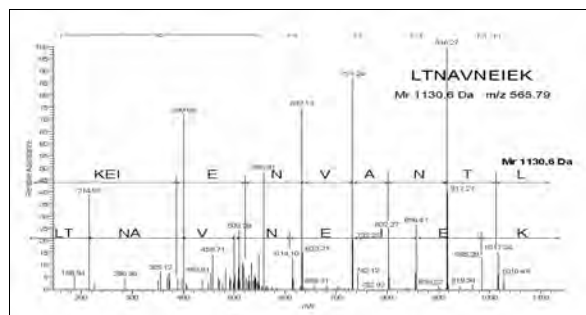


Fig. 1. Espectro MS/MS de un péptido específico de *P. muelleri*.

Bibliografía

- Secretaría General de Pesca Marítima. Resolución de 18 de enero de 2005, por la que se establece el listado de denominaciones comerciales de especies pesqueras y de acuicultura admitidas en España. *BOE*, 11 de marzo de 2005, 8711.
- Jensen, O. N., Wilm, M., Shevchenko, A., Mann, M., en: Link, A. J. (Ed.). Humana Press, Totowa 1999, pp. 513-530.
- Piñeiro, C., Vázquez, J., Marina, A. I., Barros-Velázquez, J. et al. *Electrophoresis*, 2001, 22: 1545-1552.

Proteómica de familias multigénicas de especies poco representadas en bases de datos: polifenol oxidasas de níspero (*Eriobotrya japonica*)

Sellés-Marchart S¹, Luque P², Casado-Vela J³, Martínez-Esteso MJ¹, Bru-Martínez R¹.

¹Grupo de Proteómica y Genómica Funcional de Plantas. Departamento de Agroquímica y Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad de Alicante. Campus de San Vicente del Raspeig. Apdo.99. E-03080 Alicante (Spain). Teléfono: +34 965903400, Fax: 965903880 e-mail:Roque.Bru@ua.es. ²Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis Avda. Américo Vespucio 49.41092 -Sevilla. Spain. ³Unidad de tecnología de proteínas. Centro Nacional de investigaciones oncológicas (CNIO). Madrid.

Introducción

El análisis de proteínas de especies poco representadas en bases de datos y la presencia de fami-

lias multigénicas en eucariotas dificultan e incluso previenen la identificación del origen génico de la proteína, el cual proporciona una información valiosa para comprender el proceso biológico en