

- Lin D., Masana I., HPLC-FosfoChip: análisis selectivo de Fosfopéptidos por LC/MS. *Lifescienceslab* 2009; 5 :30-35.
- [4] Björhall K, Miliotis T, Davidsson P. Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum. *Proteomics* 2005; 5: 307–317.
- [5] Hubner N.C., Ren S., Mann M. Peptide separation with immobilized pI strips is an attractive alternative to in-gel protein digestion for proteome analysis. *Proteomics* 2008; 8(23-24):4862-72.
- [6] Kandasamy K, Pandey A, Molina H. Evaluation of Several MS/MS Search Algorithms for ETD Experiments. *Anal. Chem.* 2009; 81 (17): 7170–7180.

Luces y sombras de la cuantificación con iTRAQ

María Luz Valero, Virginia Rejas, Manuel Mateo Sánchez del Pino

Laboratorio de Proteómica. Centro de Investigación Príncipe Felipe. Avda. Autopista del Saler 16. 46012 Valencia

La cuantificación de las diferencias entre dos o más estados fisiológicos de un sistema biológico es una de las tareas más importantes y difíciles en proteómica. En los últimos años se están desarrollando métodos de cuantificación basados en la espectrometría de masas como complemento a las técnicas más clásicas basadas en 2D PAGE. Los métodos más populares utilizan marcajes isotópicos diferenciales siendo uno de los más utilizados el sistema iTRAQ (Applied Biosystems).

Para obtener la máxima información de un experimento iTRAQ es fundamental un adecuado diseño del mismo. Según el problema biológico que queramos abordar será necesario utilizar un número de réplicas biológicas suficiente para discernir las variaciones intrínsecas a la muestra [1; 2] de las debidas al problema biológico en estudio. En el caso de experimentos complejos con elevado número de réplicas que impliquen varios experimentos iTRAQ será necesario introducir en todos los experimentos un estándar interno que permita posteriormente un análisis global de todas las muestras presentes en el estudio.

Preparación de la muestra

Una vez se dispone de un diseño experimental claro el primer paso es la preparación de las muestras. En nuestra experiencia es mejor partir de la mayor cantidad de proteína recomendada para evitar

problemas debidos al exceso de reactivos, como la formación de precipitados y la obturación de los sistemas cromatográficos.

Una vez elegidas y disponibles las muestras a analizar hemos de ponerlas en un medio adecuado para el análisis. En general, la precipitación es el método más usado en este paso. Para la elección del medio para redissolver las proteínas hay que tener en cuenta que sea compatible con los tratamientos de reducción, alquilación y digestión. Además, para el marcaje posterior ha de evitarse la presencia de aminos reactivos en el medio y de otros posibles nucleófilos como tioles. Con estas restricciones en ocasiones es difícil disolver la muestra, siendo necesaria una puesta a punto para cada tipo de extracto proteico. Tras disolver la muestra es necesario realizar una cuantificación fiable de la cantidad total de proteína presente en cada muestra.

Marcaje y separación de los péptidos

Las muestras marcadas diferencialmente se combinan y se elimina el exceso de reactivos y compuestos que podrían potencialmente interferir con la cromatografía líquida o el análisis de MSMS de los péptidos. En la mayoría de aplicaciones es necesario prefraccionar la mezcla de péptidos ya que las muestras suelen ser demasiado complejas para un único análisis LCMSMS.

Hay diferentes métodos de separación de péptidos que pueden aplicarse en este punto. La elección de uno u otro dependerá del tipo de péptidos que queramos separar y de la disponibilidad de equipos. En el laboratorio habitualmente realizamos cromatografía C18RP a pH básico [3; 4], cromatografía SCX y, más recientemente, también mediante IEF [5] en gradientes de pH inmovilizados (3-10NL, 7 cm, GE). En todos los casos se prefraccionan de 200 a 400 µg de péptidos y suele ser necesario un tratamiento posterior de limpieza y/o concentración antes del análisis por LCMSMS.

Fragmentación de los péptidos

Para el análisis por MSMS de los péptidos marcados es necesario ajustar los parámetros respecto a los que utilizaríamos para los péptidos no marcados. En el caso de los espectrómetros de masas QTOF de ABI (QStar) este ajuste es muy sencillo, y consiste en incrementar los valores de *intercept* de la ecuación $|CE|_0 = (\text{slope}) * (m/z) + (\text{intercept})$ usada para calcular la energía de colisión para cada ión. El incremento es mayor para los péptidos derivatizados con iTRAQ 4 plex que con iTRAQ 8plex. Con otro tipo de espectrómetros de masas su puesta a punto es más compleja [6].

Análisis de resultados

Con los péptidos analizados se ha de proceder a la identificación y cuantificación de las proteínas presentes en las muestras. El hecho de que ambas determinaciones se realicen simultáneamente supone una gran ventaja respecto a los sistemas de cuantificación basados en la separación de las proteínas en gel. La identificación de proteínas se hace de manera convencional indicando simplemente la modificación química utilizada.

El hecho de que la cuantificación se realice a nivel de MSMS hace que las relaciones S/N sean mejores. En este punto cabe destacar que según el instrumento utilizado en el análisis el rango lineal para la determinación de estas áreas será diferente. Para la cuantificación se utilizan todos los espectros asignados a péptidos con una confianza adecuada y en los que haya sido posible medir las áreas de los iones reporteros con bajo error.

Por otro lado, al realizar la cuantificación ha de tenerse en cuenta que se ha podido introducir un error experimental diferente en la manipulación de cada muestra, así como la pureza de los distintos reactivos usados. Ha de comprobarse también que no se han utilizado para cuantificar péptidos que pertenezcan a varias proteínas (isoformas) o cuya asignación sea dudosa.

Si todo esto se realiza adecuadamente la técnica nos permitirá disponer de un elevado número de proteínas cuantificadas en un periodo de tiempo razonable.

Referencias

- [1] Anderson NL & Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* 2002; 1: 845-67.
- [2] Molloy MP, Brzezinski EE, Hang J, McDowell MT & VanBogelen RA. Overcoming technical variation and biological variation in quantitative proteomics. *Proteomics* 2003; 3: 1912-9.
- [3] Dowell JA, Heyden WV & Li L. Rat neuropeptidomics by LC-MS/MS and MALDI-FTMS: Enhanced dissection and extraction techniques coupled with 2D RP-RP HPLC. *Journal of proteome research* 2006; 5: 3368-75.
- [4] Tenorio-Laranga J, Valero ML, Mannisto PT, Sanchez del Pino M & Garcia-Horsman JA. Combination of snap freezing, differential pH two-dimensional reverse-phase high-performance liquid chromatography, and iTRAQ technology for the peptidomic analysis of the effect of prolyl oligopeptidase inhibition in the rat brain. *Analytical biochemistry* 2009; 393: 80-7
- [5] Cargile BJ, Sevinsky JR, Essader AS, Stephenson JL, Jr. & Bundy JL. Immobilized pH gradient isoelectric focusing as a first-dimension separation in shotgun proteomics. *J Biomol Tech* 2005; 16: 181-9.
- [6] Bantscheff M, Boesche M, Eberhard D, Matthieson T, Sweetman G & Kuster B. Robust and sensitive iTRAQ quantification on an LTQ Orbitrap mass spectrometer. *Mol Cell Proteomics* 2008; 7: 1702-13.