

## **Análisis de la expresión diferencial de proteínas en el suero de ratones C57BL/6 silvestres respecto a ratones C57BL/6 deficientes para CD38 utilizando una colección combinatoria de hexapéptidos (*ProteoMiner*) y electroforesis 2-D**

*Antonio Rosal, Sonia García-Rodríguez, Esther Zumaquero, Pilar Navarro, Mercedes Zubiaur, Jaime Sancho*

Departamento de Biología Celular e Inmunología, Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra", CSIC, Armilla (Granada)

### **Introducción**

La tecnología asociada al ProteoMiner permite reducir el rango dinámico del proteoma sérico aumentando la concentración de las proteínas poco abundantes y disminuyendo simultáneamente la concentración de las proteínas más abundantes, consiguiéndose una mayor diversidad de especies proteicas. Una desventaja es que en su formato tradicional se necesita partir de una concentración de proteínas relativamente grande, impidiendo su utilización cuando el material de partida es escaso. En este estudio se ha utilizado esta técnica en combinación con la separación de proteínas por electroforesis en geles 1-D ó 2-D e identificación por espectrometría de masas, para el análisis de la expresión diferencial de proteínas en sueros de ratones B6 silvestres en comparación con ratones deficientes para CD38 (CD38ko) a partir de volúmenes de sangre relativamente pequeños (100-200  $\mu$ l).

### **Material y métodos**

El kit ProteoMiner de pequeña capacidad para análisis por geles 2-D (Bio-Rad) fue utilizado siguiendo las instrucciones del fabricante. Las proteínas eluidas de las columnas de hexapéptidos se separaron en geles 1-D (30  $\mu$ g) o 2-D (50  $\mu$ g). Para la separación en geles 2-D se utilizó el sistema *Protean IEF* (Bio-Rad) en la primera dimensión y el sistema *CRITERION* (Bio-Rad) en la segunda (1). Para la primera dimensión se compararon dos soluciones diferentes: Solución I (7M Urea, 2 M Thiourea, 1% ASB-14, 40 mM Tris, 2 mM TBP y 0.2% Anfolitos) o Solución II (8 M Urea, 2% CHAPS, 50 mM DTT, 2 mM TBP y 0.2% Anfolitos). Los geles se tiñeron con SYPRO Ruby. La identificación de proteínas por MS o MS/MS se realizó de forma idéntica a la de

nuestro trabajo previo [1]. El análisis diferencial se realizó utilizando el software PDQuest Advanced versión 8.0.1.

### **Resultados**

A partir de volúmenes relativamente de suero relativamente pequeños (200  $\mu$ l o 10 mg de proteína total) se obtenía un rendimiento de alrededor del 2%, con suficiente cantidad de proteína para análisis posteriores por 2-D tradicional o 2-D DIGE (la presencia de Urea y CHAPS en el buffer de eluido permite la utilización de la técnica 2-D DIGE si previamente se ajusta el pH a 8.0-8.5 con 1 M Tris). El perfil de bandas obtenidas en geles 1-D o el de spots en geles 2-D de los eluidos del ProteoMiner eran claramente diferentes del de los sueros sin fraccionar o de las proteínas no unidas a las columnas, aunque proteínas mayoritarias como albúmina o las inmunoglobulinas eran todavía detectables. La solución II es superior a la solución I en cuanto al número, la resolución y la calidad de los spots obtenidos, así como su posterior identificación por espectrometría de masas. Se identificaron proteínas séricas que están en un rango de concentración que va desde  $\mu$ g/L hasta g/L, lo que demuestra que esta tecnología permite detectar proteínas presentes en un amplio rango dinámico de concentración.

### **Conclusiones**

La utilización del ProteoMiner en combinación con geles 2-D, tinción con SYPRO Ruby e identificación de las proteínas por MS y posterior secuenciación de péptidos específicos por MS/MS permite identificar un mayor número de proteínas poco abundantes, pero reteniendo una representación de todas las proteínas de partida en sueros de ratón.

La utilización de volúmenes reducidos de suero o plasma (100-200  $\mu$ l) no es un impedimento para un análisis diferencial de expresión por técnicas 2-D DIGE, SELDI-TOF o LC-MS.

## Referencias

- [1] Pavon EJ, Munoz P, Lario A, Longobardo V, Carrascal M, Abián J, et al. Proteomic analysis of plasma from patients with systemic lupus erythematosus: increased presence of haptoglobin alpha2 polypeptide chains over the alpha1 isoforms. *Proteomics* 2006; 6: 282-92.

## Developing MRM Assays for Peptide Quantitation: *The MIDAS™ workflow and Qtrap™ technology*

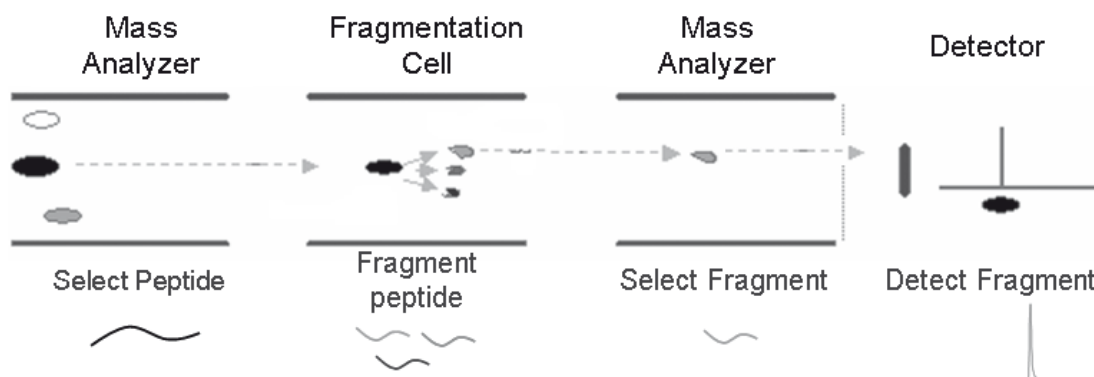
Antonio Serna Sanz

Applied Biosystems

In the field of proteomics, most of the information needed on biological samples of interest extends beyond just the identity of the protein. Once the protein identification is made from a variety of MS and orthogonal experiments, a more in-depth study is necessary to characterize isoforms, sites of post-translational modification, or even sites of cleavage after activation or secretion. Additionally, constructing methods to determine the presence of a specific protein or peptide in a complex mixture is of greater importance as the field of biomarker discovery and validation grows. Robust and sensitive techniques for this targeted

discovery and characterization of peptides and proteins are necessary.

The information known about the sample, such as the protein sequence or a hypothesized post-translational modification, allows more specific questions to be addressed. Normal information dependent acquisition techniques will not always detect the components of interest if they are of low abundance, or are poorly amenable to MS analysis. A more hypothesis-driven acquisition approach is often more effective such as the MIDAS™ workflow (Figure 1 and 2). The utility and power of this approach is explored here.



**Figure 1.** Schematic of the Multiple Reaction Monitoring (MRM) scan for high selectivity and sensitivity.  $Q1$  is set to transmit only the parent  $m/z$  of the peptide, the collision energy is optimized to produce a diagnostic charged fragment of this peptide in  $Q2$ , and  $Q3$  is set to transmit this diagnostic fragment only. Because of the short dwell times required (10-50 ms) and the ability to change rapidly between MRM transitions, many components (transitions) in a mixture can be monitored simultaneously in a single LC/MS/MS run.