

P-09 | Szilárd-fázisú extrakciós módszerek összehasonlítása foszfopeptidek tisztítására

Karvaly Krisztián Márk^{1,2}, Bugyi Fanni¹, Turiák Lilla¹

¹ MTA-TTK Lendület Glikán Biomarker Kutatócsoport, HUN-REN Természettudományi Kutatóközpont, Budapest

² Eötvös Lóránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Kémia Intézet, Budapest

A fehérjék poszt-transzlációs módosításainak egyik fajtája a foszforiláció, mely számos biológiai funkciót lát el. Kis mennyiségű biológiai minták foszforilációjának hatékony nanoHPLC-MS/MS vizsgálatához nélkülözhetetlen a mérést megelőző szilárd-fázisú extrakciós (SPE) tisztítás. Célunk olyan SPE módszer optimalizálása volt, mely minimális mintaveszteség mellett alkalmazható kis mennyiségű (0,5-1 µg) komplex biológiai minták foszfopeptidjeinek sómentesítésére.

A módszerfejlesztéshez formalin-fixált paraffinba ágyazott (FFPE) tüdőrákos szöveteket használtunk. A fehérjék szövet felületi triptikus emésztését követően a kapott peptidkeveréket a fordított fázisú SPE módszerrel tisztítottuk meg, majd a foszfopeptideket TiO₂ SPE módszerrel dúsítottuk. A dúsítást követően sómentesítésre négy állófázist (fordított fázisú SPE: Thermo Scientific™ Pierce™ C₁₈ Column és Pierce™ C₁₈ Spin Tips, Affinisep AttractSPE® Disks Tips C₁₈, hidrofil-liofil kölcsönhatáson alapuló SPE: Affinisep AttractSPE® Disks Tips HLB) használtunk különböző oldószerrendszerekkel. Öt SPE tisztítómódszert hasonlítottunk össze öt párhuzamos mintát használva, emellett öt párhuzamos tisztítatlan mintát használtunk kontrollnak. Waters nanoAcquity HPLC-vel kapcsolt Bruker Maxis II tömegspektrométerrel végeztük a nanoHPLC-MS/MS mérést. A peptid és a fehérje azonosításához a Byonic szoftvert használtuk.

Minden módszer esetében összevetettük az azonosított foszfopeptidek számát, az azonosított foszfopeptidek GRAVY értékét, izoelektromos pontját, a foszforiláció helyének és a foszforiláció számának eloszlását. A legtöbb SPE módszer hasonlóan teljesített, ugyanakkor a Thermo Pierce C₁₈ Spin Tip volt a leghatékonyabb. Ezzel az SPE módszerrel 6,7 %-kal több foszfopeptid került azonosításra, mint a tisztítatlan kontrollminták esetében. Összevetve az azonosított foszfopeptidek átfedését a módszerek között, az azonosított foszfopeptidek nagyjából 50%-a csak egy módszerrel volt kimutatható. Kis mennyiségű komplex minta foszfopeptidjeinek vizsgálatára a Thermo Scientific™ Pierce™ C₁₈ Spin Tip megfelelő hatékonyságot mutatott.