

MASTEROPPGAVE I LEGEMIDDELANALYSE FOR GRADEN MASTER I FARMASI

Evaluering av molecular imprinted polymers for ProGRP: Fokus på selektivitet og retensjonsmekanismer

Odd Gøran Ore



Avdeling for Farmasøytisk Kjemi

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Vår 2015

Evaluering av molecular imprinted polymers for ProGRP: Fokus på selektivitet og retensjonsmekanismer

Odd Gøran Ore

Masteroppgaven ble utført ved Faggruppen for Legemiddelanalyse

Avdeling for Farmasøytisk Kjemi

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Vår 2015

Veiledere:

Professor Léon Reubsaet, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.

Stipendiat Cecilia Rossetti, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.

Førsteamanuensis Trine Grønhaug Halvorsen, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo

Odd Gøran Ore

2015

Evaluering av molecular imprinted polymers for ProGRP:
Fokus på selektivitet og retensjonsmekanismer

Odd Gøran Ore

<http://www.duo.uio.no>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Forord

Først og fremst vil jeg takke mine veiledere Professor Léon Reubsæet, Stipendiat Cecilia Rossetti og Førsteamanuensis Trine Grønhaug Halvorsen for en uvurderlig støtte og hjelp med skriving av denne oppgaven. Jeg har fra første stund følt meg som en del av teamet. Dere har alltid vært åpne for spørsmål og diskusjoner hvor dere i tillegg har gitt en god opplæring og oppfølging under hele oppgaven.

Spesielt vil jeg takke Professor Léon Reubsæet og alle på avdelingen for legemiddelanalyse for støtte og forståelse i den vanskelige tiden jeg var igjennom da jeg mistet min mor i startfasen av denne masteroppgaven. Det varmet godt!!

Avdelingen for legemiddelanalyse er en flott gjeng som sammen med mine medstudenter Line, Christine, Mumtaz, Hesam, Rojin og Emilia har gitt et godt faglig miljø og et uforglemmelig år.

Oslo, mai 2015

Odd Gøran Ore

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	9
Forkortelser	10
1 Introduksjon	13
2 Bakgrunn	14
2.1 Kreft	14
2.2 Lungekreft	14
2.3 Biomarkører for SCLC	15
2.4 ProGRP	15
2.4.1 Dagens bestemmelsesmetoder for ProGRP.....	17
2.4.2 Bruk av kunstige antistoff til bestemmelse av ProGRP.....	18
3 Målsetninger & delmål	19
4 Teori	20
4.1 Proteomikk	20
4.2 Enzymatisk proteolyse	20
4.2.1 Trypsinering	21
4.2.2 Signaturpeptider etter trypsinering.....	22
4.3 Prøveopparbeidelse	22
4.3.1 Fast-fase ekstraksjon SPE	22
4.4 LC-MS/MS	27
4.4.1 Væsekromatografi LC.....	27
4.4.2 Massespektrometri MS.....	28
4.5 Multivariat analyse	34
4.5.1 Principal Component Analysis PCA	34
4.5.2 Partial Least Square PLS.....	36
5 Materialer & Metoder	38
5.1 Kjemikalier, proteiner og utstyr	38
5.2 Brukte løsninger	41
5.2.1 Mobilfaser	42
5.3 LC-MS/MS prosedyrer	43
5.3.1 LTQ Orbitrap.....	43
5.3.2 Triple quadrupole TSQ	46
5.4 Trypsinering	47
5.5 Prosedyrebeskrivelse for samtlige forsøk	48
5.6 SPE prosedyrer for C18	50
5.6.1 Tillagning av C18 SPE	50
5.6.2 Bruk av C18 SPE	51
5.7 SPE prosedyrer for MIP og NIP	51
5.7.1 Tillagning av MIP- og NIP SPE.....	51
5.7.2 Bruk av MIP- og NIP SPE.....	53
5.8 Kapasitet test av MIP SPE	53
5.8.1 Kapasitet test av MIP SPE Prosedyre	53
5.9 PCA og PLS	54
5.10 pH influens	57

Innholdsfortegnelse

5.11 Data verktøy	58
5.11.1 ProteinProspector	58
5.11.2 Proteom Discoverer	59
6 Resultater & diskusjon	60
6.1 Utvalgte peptider	60
6.2 C18 SPE	63
6.3 MIP- & NIP SPE	65
6.3.1 MIP mot C18.....	66
6.3.2 MIP mot NIP	66
6.4 Kapasitet test av MIP SPE	69
6.5 Multivariat analyse	71
6.5.1 PCA	71
6.5.2 PLS.....	72
6.6 pH influens	74
6.6.1 Effekt av pH på NLLGLIEAK	75
6.6.2 Effekt av pH på BSA peptider.....	77
7 Konklusjon	81
Referanser	82
Appendiks 1	87
Appendiks 2	94
Appendiks 3	99
Appendiks 4	105
Appendiks 5	111
Appendiks 6	113
Appendiks 7	116

Sammendrag

Pro Gastrin Releasing Peptide (ProGRP) har utpekt seg som en av de beste biomarkørene for (SCLC) på grunn av sin sensitivitet. Hos friske personer er referanseverdier lavere enn 50 pg/mL. ProGRP kan bestemmes med væskechromatografi massespektrometri (LC-MS) gjennom sin såkalte signaturpeptid (NLLGLIEAK) som genereres ved hjelp av trypsin. I en LC-MS basert proteomikk er prøveopparbeidelsen svært viktig ved kvantifisering av lave verdier.

I dag er det antistoffer som blir brukt til prøveopparbeidelser i LC-MS basert bestemmelse av ProGRP nivået. Disse har sine ulemper og et alternativ kan være bruk av Molecularly Imprinted Polymer (MIP) ekstraksjon i prøveopparbeidelsestrinnet. Dette kan være en fordel sammenlignet med antistoffer siden MIP er billigere, enklere å produsere og har en bedre stabilitet ovenfor ekstreme pH verdier, organiske løsningsmidler og temperatur. Siden MIP ennå ikke er veletablert til fastsettelse av ProGRP trengs en dypere forståelse av retensjonsmekanismene og selektiviteten.

I denne oppgaven ble det foretatt sammenligning mellom C18, MIP og Non-Imprinted Polymer (NIP) sine peptid elueringsprofiler. Resultatene viste en forskjell på retensjonsmekanismen mellom C18 og MIP samt en forskjell på elueringen av ProGRP sitt signaturpeptid NLLGLIEAK når MIP og NIP ble sammenlignet.

Statistiske analyser ble foretatt for å korrelere elueringene av peptider med forskjellige peptidegenskaper og sammenligning mellom MIP og NIP. Det ble brukt en PLS analyse for å kunne forutsi 50 % punktet for peptidenes eluering for både MIP og NIP ved å bruke peptidenes egenskaper. Det samlede resultatet fra de statistiske analysene indikerte at både hydrofobisiteten og polariteten sammen med negativladning er av størst betydning for retensjonsmekanismen i MIP/NIP.

For å bedre forstå mekanismene bak ble det foretatt forskjellige MIP- og NIP SPE eksperimenter med en varierende pH verdi ut i fra pKa verdiene til NLLGLIEAK og den funksjonelle monomerene. Resultatene viste at pH spilte en avgjørende rolle.

Ut i fra disse forsøkene ble det konkludert med at MIP SPE sannsynligvis virker som en Mix-mode SPE som i tillegg har et hulrom med selektivitet mot NLLGLIEAK, men hullommets steriske form med sine interaksjoner for NLLGLIEAK ser ikke ut til å spille en signifikant rolle på dette tidspunkt.

Forkortelser

ABC	Ammoniumbikarbonat
ABDV	2, 2'- azobis (2, 4-dimethylvaleronitrile)
ACN	MeCN (Acetonitril)
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization
API	Atmospheric pressure ionization
Bn	Bombesin
BRS-3 reseptor eller BB3-reseptor	Bombesin reseptor subtype-3
BSA	Bovint serum albumin
CID	Collision-induced dissociation
CNS	Central nervous system, sentralnervesystemet
Da	Dalton
DNA	Deoksyribonukleinsyre
DSMO	Dimethyl sulfoxide
DTT	DL-Dithiuthreitol
DVB	Cross-linkeren divinilbenzene
EAMA	N-(2-aminoethyl) methacrylamide hydrochloride
ED-SCLC	Extensive disease-SCLC
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ESI	Elektrosprayionisasjon
FA	Maursyre
FTICR	Fourier-transform ion cyclotron resonance
FTMS	Full scan singel MS
GI-trakt	Gastrointestinaltrakten
GRP	Gastrin-releasing peptide
GRPR eller BB2-reseptor	GRP foretrekkende reseptor

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IS	Intern standarden NLLGLIEA[K- ¹³ C ₆ ¹⁵ N ₂]
ITMS	Produkt ione scan MS/MS-mode
IAA	Iodoaceticacid
LC	Liquid Chromatography/væskekromatografi
LC-MS	Væskekromatografi massespektrometri
LC-MS/MS	Væskekromatografi tandem massespektrometri
LD-SCLC	Limited disease-SCLC
LTQ	Linear ion trap
<i>m/z</i>	masse/ladning (mass/charge)
MeCN	Acetonitril
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz (10 ⁶)
MIP	Molecularly imprinted polymer
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NaOH	Natriumhydroksid
NH ₃	Ammoniakk
NIP	Non-imprinted polymer
NLLGLIEA[K- ¹³ C ₆ ¹⁵ N ₂]	Intern standarden (8 Da tyngre enn NLLGLIEAK)
NLLGLIEAK	Signalpeptid til ProGRP
NMB	Neuromedin B
NMBR eller BB1-reseptor	NMB foretrekkende reseptor
NSCLC	Non-small-cell lung cancer
NSE	Neuron-specific enolase
PC	Principal Component
PCA	Principal Component Analysis
PEG-20000	Polyethylene glycol-2000

Forkortelser

pI	Isoelektriske punktet
PLS	Partial Least Square Regression
ppm	Parts per million (1×10^6)
PreProGRP	Forløper av ProGRP
ProGRP	Pro-gastrin-releasing peptide (forløper av GRP)
Q	Quadrupole
QIT	Quadrupole ion trap
RAFT	Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer
RF	Radio frekvens
rpm	Omdreininger per minutt (Revolutions per minute)
SCC-Ag	Squamous cell carcinoma antigen
SCLC	Small-cell lung cancer
SPE	Solid Phase Extraction, fast-fase ekstraksjon
TOF	Time-of-flight
TQ	Triple Quadrupole
TR-IFMA	Time-resolved immuno-fluorometric assay
Z-NLLGLIEA-Nle-OH	Templatet brukt i oppgavens MIP produksjonen

1 Introduksjon

Mye av proteomikk forskningen i dag fokuserer på å finne biomarkører. På grunn av massespektrometrenes (MS) sensitivitet muliggjøres deteksjon av biomarkører ved lave konsentrasjoner i de biologiske matriksene. MS brukes også fordi de gir spesifikke resultater som dermed gir pålitelige svar. Anvendelse av MS til biomarkøranalyser er relevant for ledelsen i helsevesenet, fordi de fører til billigere analyser som gir tidlig screening av sykdommer. Dette medfører til en tidligere diagnostisering og tidligere igangsetting av terapi behandlinger. En tidligere terapistart medfører økt sannsynlighet for friskmeldte pasienter. Med tanke på lunge kreft utgjør small-cell lung cancer (SCLC) om lag 15 % av den totale forekomsten [1]. Sannsynligheten for en 5 års overlevelse er på 20 % ved Limited Disease-SCLC (LD-SCLC) mot kun 5 % ved Extensive Disease-SCLC (ED-SCLC). Derfor er en tidlig diagnose helt avgjørende siden dette er en meget aggressiv kreftform med rask celledeling og tidlig dannelse av metastaser [2, 3]. De mulige diagnostiske tilnærmingene til gode biomarkører finner en best ved å se på de biologiske karakteristikene for SCLC [4]. Blant mange biomarkører er ProGRP blant de beste på grunn av sin sensitivitet og evne til å diskriminere mellom hovedformene av lungekreften [2, 4]. Denne biomarkøren blir brukt til å diagnostisere SCLC ved å sammenligne pasientens verdi mot hva som er normalen hos friske personer. Hos friske personer vil denne verdien ligge under 50 pg/mL (referanseverdi). Det vil si at verdier over denne grensen indikerer en mulig SCLC sykdom [5, 6]. Siden kvantifiseringen av ProGRP hos friske mennesker ligger under 50 pg/mL, noe som er et svært lavt nivå, vil prøveopparbeidelsen bli en svært viktig del i en LC-MS basert proteomikk [7]. Til nå har antistoffer blitt brukt til opprensning og oppkonsentrering av ProGRP i biologiske prøver før LC-MS analyse. Et alternativ til dette kan være Molecularly Imprinted Polymers (MIP) som har en god stabilitet ved ekstreme pH verdier, organiske løsningsmidler og temperatur. I tillegg er de enklere å produsere, billige og kan brukes på nytt [8, 9]. Siden MIP ennå ikke er veletablert trengs det å utføre flere studier for å forstå deres festemekanismer og deres selektivitet ovenfor peptider.

2 Bakgrunn

2.1 Kreft

Minimum to kriterier er viktig for mutasjon dannelse. Først må det oppstå en lesjon i DNA og det må foregå en celle deling som omdanner lesjonen til en mutasjonen. Oftest må det flere mutasjoner til før det dannes kreft og i tillegg må mutasjonen skje i et kritisk området som kontrollerer celle delingen [10].

Tumorer (svulster) blir dannet på grunn av unormal celledeling som skyldes som nevnt ovenfor mutasjoner.

Tumorene deles inn i benigne (godartet svulst) og i maligne (kreft) tumorer. Typisk for benigne tumorer er dannelsen av et bindevevskapsel rundt svulstvevet slik at den kun presser på omliggende vev når den vokser. Maligne tumorer danner ikke dette, men infiltrer seg inn i omliggende vev. De vokser hurtig, kan spre seg med blodet til andre steder i kroppen (metastaser) og kan danne nye blodårer for å sikre seg blodtilførsel [10, 11].

2.2 Lungekreft

Lungekreft deles i dag inn i to hovedgrupper; non-small-cell lung cancer (NSCLC) som står for 85 % og small-cell lung cancer (SCLC) som utgjør de resterende 15 %. Disse hovedgruppene blir videre delt inn i undergrupper. Klinisk blir NSCLC delt inn i; adenokarsinom, plateepitelkarsinom og storcellekarsinom [1]. SCLC blir klinisk delt inn i limited disease (LD-SCLC) og extensive disease (ED-SCLC) hvor inndelingen er bestemt ut i fra hvor langt sykdomsforløpet har kommet. Holdes tumoren seg innenfor hemothorax, mediastinum og supraklavikulær lymfe knuter blir den betegnet som LD-SCLC [12].

Histologisk er SCLC små, runde, inneholder lite cytoplasma og har en finkornet kjerne uten kjernelegeme [3, 12]. De kjennetegnes også med en rask celledeling, nevroendokrin differensiering og tidlig metastase dannelser slik at pasientene ofte får en sen diagnostisering og derfor diagnosen ED-SCLC. På grunn av sen diagnose er det uvanlig med operasjoner, men selv om SCLC er meget følsom overfor kjemoterapi og stråling er den kjent for å danne raskt resistensutvikling slik at tilbakefall er vanlige [2, 3].

Det er viktig med en tidlig diagnose da 5 års overlevelsen er på rundt 20 % ved LD-SCLC mot under 5 % ved ED-SCLC. Biopsi tillater ikke tidlig diagnostisering av SCLC og ofte ligger tumoren plassert på en slik måte at nøyaktig vevsprøver blir vanskelig. En tidligere

diagnostisering for SCLC muliggjøres ved å ta i bruk biomarkører som blant annet kan finnes i prøver av plasma eller serum slik at overlevelses raten kan økes [2, 3].

2.3 Biomarkører for SCLC

Biomarkører kan ses på som et molekyl som sier noe om organismens biologiske prosesser ut i fra normalen. En biomarkør for kreft vil kunne brukes for å oppdage sykdommen, diagnostisere og oppdage eventuelle tilbakefall. Den kan også gi informasjonen over hvordan sykdomsbildet utvikler seg med tanke på regresjon eller progresjon [13].

De mulige diagnostiske tilnærmingene som kan brukes finner en best ved å se på de biologiske karakteristikkene for SCLC. De diagnostiske tilnærmingene for SCLC kan deles inn i tre hoved deler. 1; Biomarkører for nevroendokrin opphav. 2; Biomarkører med paraneoplastisk syndrom. 3; Biomarkører med ikke nevroendokrin opphav. Det finnes i dag mange mulige biomarkører for SCLC, men svært få er egnet til å bruke til diagnostisering alene da de alle har sine svakheter. Ved å kombinere to eller flere derimot kan gi en bedret sensitivitet og/eller spesifisitet. Forsøk har vist at kombinasjonen av biomarkørene squamous cell carcinoma antigen (SCC-Ag) som er en ikke-nevroendokrin biomarkør, neuron-specific enolase (NSE) og progastatin releasing peptide (ProGRP) som begge er nevroendokrine biomarkører, ga en forbedret deteksjon med sensitivitet (evnen til å klassifisere korrekt malignitet [14]) på 79,5 %, spesifisitet (evnen til å klassifisere korrekt ikke-malignitet [14]) på 99,6 % og en forutsigbarheten (antall pasienter med positiv test som har sykdommen [15]) på 98,6 % [4]. ProGRP har isolert sett vist seg som en god biomarkør siden den kan diskriminere mellom NSCLC og SCLC, er sjeldent forhøyet i andre kreftformer og har en høyere sensitivitet i forhold til den mye brukte biomarkøren NSE [2, 4].

2.4 ProGRP

Peptider som tilhører bombesin (Bn) familien har fått sitt navn fordi de først ble isolert fra froskehuden til arten med navnet bombesin. Bn er et polypeptid som består av 14 aminosyrer hvor C-terminalen ender med Gly-His-Leu-Met-NH₂. Hos pattedyr er det to Bn-relaterte peptider som likner, dette er peptidene gastrin-releasing peptide (GRP) and neuromedin B (NMB). GRP består av 27 aminosyrer som i tillegg har de samme 7 peptidene på C-terminal enden som man finner hos Bn og det er dette som man mener gir de samme biologiske aktivitetene [16, 17].

Bakgrunn

Studier har vist at disse peptidene er vidt distribuert i både sentralnervesystemet (CNS), lunger og perifere vev spesielt i gastrointestinaltrakten (GI-trakt) hvor det er blitt funnet mye GRP i det enteriske nervesystemet spesielt i tykktarmen og i tynntarmen. I CNS er GRP fordelt i nevronene, men med høyest forekomst i forhjernen, hypothalamus og i sensoriske kjerner [5, 16].

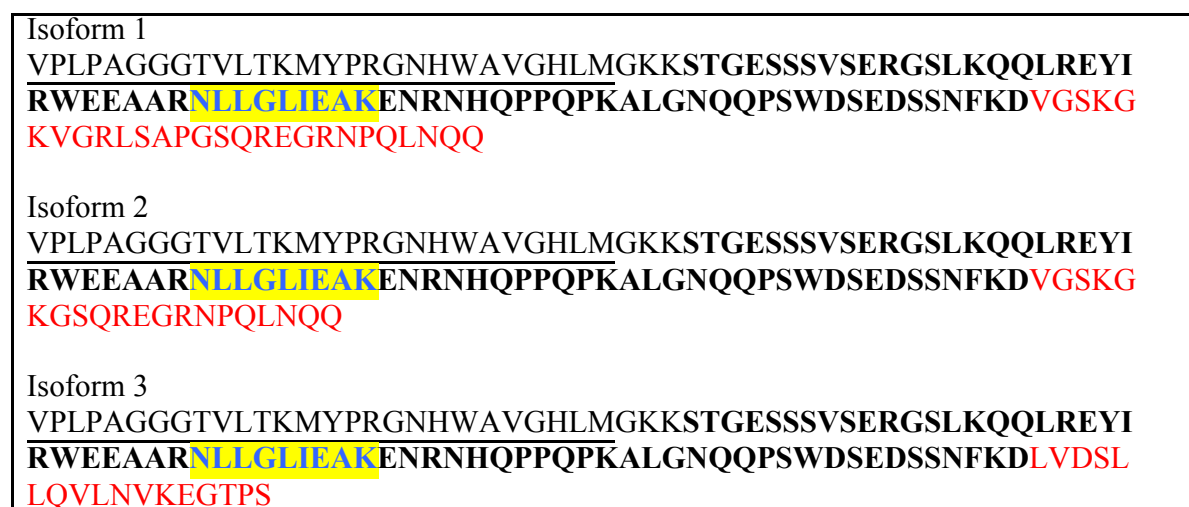
Hos mennesker er det tre reseptorer som tilhører Bn familien. 1; GRP foretrekkende reseptor (GRPR eller BB2-reseptor). 2; NMB foretrekkende reseptor (NMBR eller BB1-reseptor). 3; bombesin reseptor subtype-3 (BRS-3 reseptor eller BB3-reseptor) som har en 47 -52 % homologitet med GPRR og NMBR [16].

Når GRP stimulerer reseptoren GRPR utføres det en rekke farmakologiske og biologiske responser som kontraksjon av glattmuskulatur i urogenital og GI-trakt med effekt på motiliteten og peristaltikken i GI, effekt på immunceller, stimulering for sekresjon og frigjøring av hormoner og den virker som en potent vekst fremmer av normalt og neoplastisk vev. I CNS vil den kunne regulere circadiane rytmen, varme reguleringen, angst og metthetsfølelsen [16].

Forskning har vist at reseptorene som tilhører Bn familien har en vekstfremmende effekt både på normalt og neoplastisk vev i tillegg er denne reseptorgruppen en av de mest overuttrykte. I mange kreftformer vil både NMB og GRP ha en autokrin vekst effekt, fordi de virker vekstfremmende i seg selv, reseptoren er overuttrykt og sist men ikke minst fordi tumoren produserer den selv [16]. For SCLC har flere forskningsrapporter antydnet at tumoren produserer GRP og at den derfor vil kunne være en god kandidat som en biomarkør, men dessverre har den en for kort halveringstid (kun 2 minutter) som gjør nøyaktig bestemmelse vanskelig. I midlertid har GRP forløperen ProGRP vist seg å være stabil nok til å kunne brukes som en biomarkør [4-6].

GRP-genet er lokalisert på kromosomet 18q21 og består av tre eksoner. Transkripsjon av GRP-genet gir opphav til tre mRNA som ved translasjon gir opphav til tre PreProGRP der den lengste blir kalt PreProGRP 1, den nest lengste blir kalt PreProGRP 2 og den korteste har blitt kalt PreProGRP 3. Disse forløper peptidene av ProGRP 1, 2 og 3 består av en lik N-terminal sekvens (-23 til -1) som blir fjernet etter en posttranslational modifikasjon slik at det kun gjenstår ProGRP 1, 2 og 3 (isoform 1, 2 og 3). GRP-sekvensen (1-27) er lik for alle forløperpeptidene [18, 19]. Dermed står man igjen med tre varianter av ProGRP hvor man ved prøvetagning kun bruker total mengden av ProGRP siden de tre variantene ikke er blitt nærmere utforsket [20]. Figur 2.4.1 viser hvordan aminosyre sekvensen er for de tre

isoformene av ProGRP samt hvor forskjellen ligger mellom dem og hvor GRP sekvensen befinner seg.



Figur 2.4.1 – De forskjellige isoformene av ProGRP. Understrek viser GRP (1-27), uthevet skrift viser den homologe delen ProGRP (31-98), uthevet blå skrift med gul bakgrunn viser signaturpeptidet NLLGLIEAK og rød skrift viser hvor isoformene er forskjellig [6, 18].

Biomarkøren ProGRP blir brukt til diagnostisering av SCLC ved å sammenligne pasientens verdi mot hva som er normalen hos friske personer. Hos friske personer vil denne verdien ligge under 50 pg/mL (referanseverdi). Det vil si at verdier over denne referansegrensen indikerer en mulig SCLC [5, 6].

2.4.1 Dagens bestemmelsesmetoder for ProGRP

Bestemmelse av ProGRP utføres i klinikker i dag ved bruk av immunometriske metoder som enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), radioimmunoassay (RIA) og time-resolved immuno-fluorometric assay (TR-IFMA) [6, 21].

Det finnes forskjellige produsenter til hver av disse assays. Fordi det ofte brukes forskjellige antistoffer mellom produsentene kan dette medføre varierende testresultater fra de forskjellige laboratoriene som utfører testene. Derfor er det viktig for pasienten at det brukes samme assay fra samme produsent slik at betingelsene for resultatene kan bli sammenlignbare. I tillegg er ikke metodene feilfrie da det kan oppstå kryssreaktiviteter som kan medføre falske positive og negative resultater. Kryssreaksjonene skyldes dannelse av autoantistoffer, anti-reagens antistoffer og Hook effekter [22].

De immunometriske metodene er også kostbare og tidskrevende å generere noe som vanskeligjør videre utvikling av nye metoder.

Bakgrunn

I den siste tiden har LC-MS blitt brukt til analyse av ProGRP hvor det benyttes en bottom up prosedyre til å bestemme mengden av dens tryptiske signaturpeptid NLLGLIEAK [20, 23]. Ved en LC-MS basert proteomikk vil prøveopparbeidelsen være viktig siden kvantifisering av ProGRP ligger på et svært lavt nivå hos friske personer. Prøveopparbeidelsen er viktig på grunn av MS begrensede dynamikk i forhold til blodprøvene som har et stort omfang av proteiner med et dynamisk proteinnivå. I tillegg kommer andre forstyrrelse som salter og mulige matriks effekter [7].

Bruk av antistoff i prøveopparbeidelsen av serum gir såpass mye opprensning og oppkonsentrering at ProGRP nivåer hos friske personer kan måles ved hjelp av LC-MS [20, 23].

2.4.2 Bruk av kunstige antistoff til bestemmelse av ProGRP

Som nevnt ovenfor er de immunometriske metodene kostbare og tidskrevende å generere. Av den grunn er det ønskelig med andre affinitets materiale som Molecularly Imprinted Polymers (MIP) siden de enkle, raske og har lave kostnader ved produksjon.

Det er blitt utført en rekke forsøk for å finne den optimale MIP med tanke på ProGRP sitt tryptiske signaturpeptid NLLGLIEAK. Den optimale kombinasjonene er vist å bestå av den funksjonelle monomeren N-(2-aminoethyl) methacrylamide hydrochloride (EAMA) og med den hydrofobe cross-linkeren divinilbenzene (DVB) [24].

Det er i dag blitt en videre utvikling av MIP materialet ved å bruke en overflate initiert polymerisering ved hjelp av Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer (RAFT) modifisert mesoporøs silika. Denne metoden gir dermed et sfærisk MIP materiale [25].

I tillegg er det også blitt utført optimalisering av MIP SPE protokollen, men per i dag er ikke referanseverdien oppnådd [25]. Av den grunn trengs det å utføre flere studier for å forstå deres festemekanismer og deres selektivitet ovenfor peptider.

3 Målsetninger & delmål

Målsetningen i denne oppgaven er å studere hvordan MIP SPE ekstraherer ProGRP sitt signaturpeptid NLLGLIEAK og hvordan andre tryptiske peptider interagerer med MIP.

Til dette ble følgende delmål brukt:

- Øke forståelse for MIP sin selektivitet ved å se på forskjellen mellom C18, MIP og NIP av de forskjellige eluerte peptidene
- Å teste kapasiteten av MIP SPE
- Bruk av multivariat analyse (PCA og PLS) for å korrelere elueringene av peptider med forskjellige peptidegenskaper og sammenligning mellom MIP og NIP modellen
- Se hvordan pH influerer elueringen til de forskjellige peptidene

4 Teori

4.1 Proteomikk

Et genom omfatter, for en organisme eller en celle, det totale DNA innholdet. Ser vi på et menneske vil det humane genomet omfatte både DNA i cellens mitokondrier og i cellekjernen [26]. Man sier at genomet er statisk, fordi den alene ikke kan forklare en organismes funksjon. Proteom derimot omfatter cellens eller organismens totale utrykte proteiner og sies å være dynamisk siden de kan endres etter translasjonen. Denne endringen kan skyldes både ytre eller indre påvirkninger [27, 28]. I proteomikk så studeres og analyseres proteome for struktur, funksjon og for hva som aktiverer eller regulerer den [27]. Den vide bruken av proteomikk er viktig både innen forskning og klinisk medisin. Proteomikk kan hjelpe forskerne med økt forståelse til de underliggende mekanismene bak sykdommer, den kan gi nye target for medisiner og den kan gi nye sykdomsmarkører [29].

4.2 Enzymatisk proteolyse

Ved enzymatisk proteolyse blir intakte peptider og proteiner spaltet opp til mindre peptider. I dag er denne metoden mye brukt innen MS-basert proteomikk og som ofte utføres i en bottom-up metode. Fordi det normalt foreligger en begrensning i oppløsningsevnen til MS instrumentene er det ønskelig å holde seg innenfor disse ved å holde peptidlengde mellom 7 – 35 residuer [30].

Som oftest vil det etter proteolyse foreligge mange peptider som også er spesifikke og støkiometrisk relatert for det proteinet eller den isoformen som de kommer fra. Disse peptidene blir kalt for signaturpeptider hvor den beste deteksjonsfølsomheten nås ved å velge de signaturpeptidene som gir høyest MS respons [31, 32]. Med andre ord brukes disse signaturpeptidene til å beregne mengden av det intakte proteinet eller peptidet.

Denne måten å kvantifisere proteiner på, kalt bottom-up prinsippet, gir en bedre følsomhet og er mindre komplisert sammenliknet med direktekvantifisering av store proteiner på MS apparatet [33].

I dag er den vanligste enzymatiske proteolyse utført med trypsin [30].

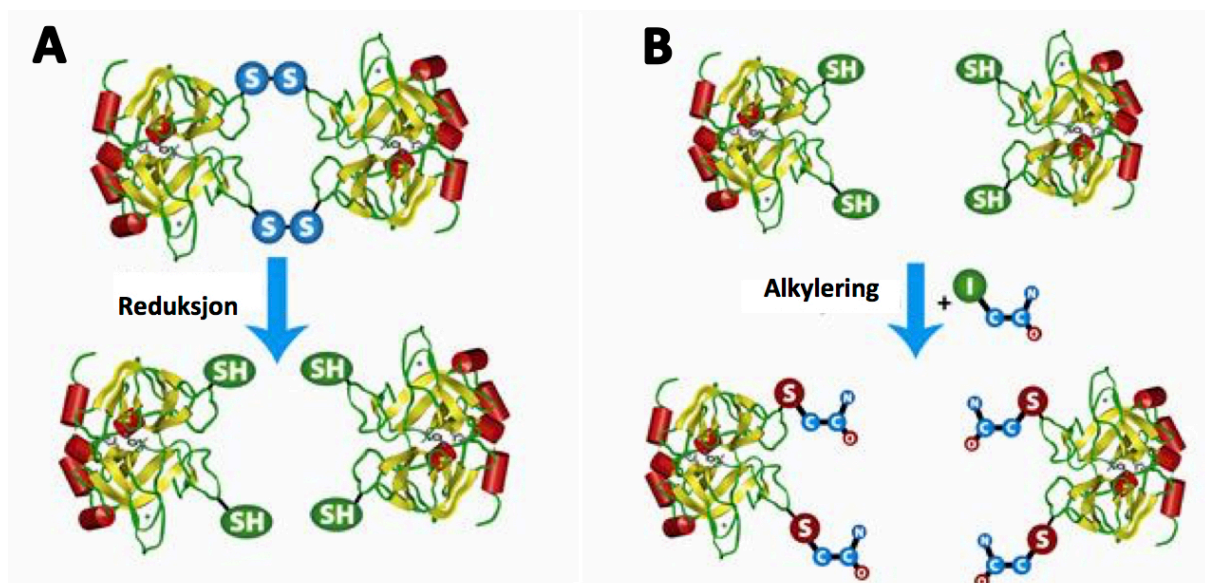
4.2.1 Trypsinering

Hos mennesker blir trypsin produsert i bukspyttkjertelen i den inaktive formen trypsinogen før den blir aktivert til den aktive formen i tynntarmen. Trypsin hører til gruppen serinprotease og er en av de viktigste proteasene hos virveldyr [30].

Trypsin er som sagt en av de mest brukte proteasene innen proteomikk, fordi den er lett tilgjengelig har høy effektivitet, god selektivitet på spalte-sete og fordi den fungerer godt på MS baserte analyser. Det sistnevnte skyldes at trypsin kløyver på C-terminalen av arginin (R) og lysin (K) som sammen med N-terminalen gir multiple ladninger av peptidet. Denne multiple ladningen har vist seg å gi en god ionisering av peptidene [30, 34].

For å få en mer effektiv trypsinering er det fordel å hjelpe trypsinet først slik at den lettere kommer til sine spaltningsseter på proteinet. Dette kan gjøres ved denaturering (varme), reduksjon og alkylering av proteinet. I denne oppgaven er det brukt reduseringsreagensen DL-Dithiothreitol (DTT) som fjerner di-sulfidbindingene mellom cystein residuene på proteinet. Videre alkyleres de frie SH gruppene ved bruk av Iodoaceticacid (IAA), som hindrer di-sulfidbindingene i å gå sammen igjen [30, 33].

Figur 4.2.1 viser hvordan reduseringsreagensen fjerner di-sulfidbindingene og hvordan de frie SH gruppene alkyleres.



Figur 4.2.1- A: viser hvordan DTT fjerner di-sulfidbindingene. B: viser hvordan IAA alkylerer de frie SH gruppene [35].

4.2.2 Signaturpeptider etter trypsinering

Når man bruker tryptiske peptider og skal finne signaturpeptid brukes ofte tommelfingerregelen:

- Proteotypisk protein bør være unikt for det relaterte proteinet det kommer fra [32].
- Proteotypiske protein bør ligge mellom 6 – 25 residuer [32].
- For å hindre missed cleavage bør ikke peptidet inneholde prolin hverken foran eller etter arginin eller lysin [32, 36].
- Bør ikke inneholde kjemisk aktive residuer [32].
- Peptidet bør ikke ha to basiske aminosyrer (arginin og lysin) etter hverandre [31, 32].

4.3 Prøveoppbehandling

Prøver som inneholder blod, plasma og urin er eksempel på komplekse prøver siden de kan inneholde flere tusen komponenter. Prøveoppbehandling er viktig for å kunne fjerne komponenter som kan forurense analysesystemet og interferere med prøveresultatene. Ofte forekommer analytten i en lav konsentrasjon. Siden massespektrometeret har en begrenset dynamiskområde vil følsomheten kunne øke ved å fjerne uønskede komponenter i prøveoppbehandling (bakgrunnsstøy). Prøveoppbehandling muliggjør også en økt følsomheten ved hjelp av oppkonsentrering og ved behov kan analytten overføres til en mer egnet løsningsmiddel for injisering i det analytiske systemet [7, 37, 38].

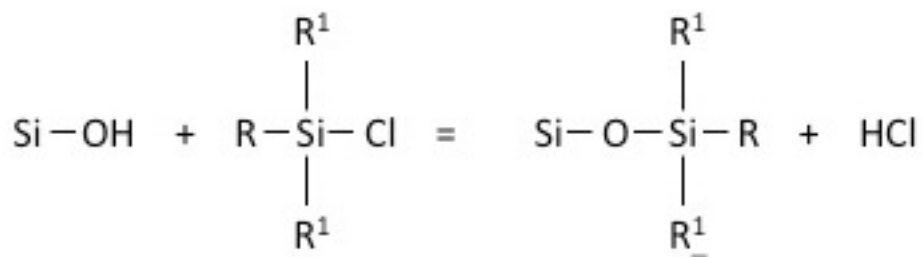
4.3.1 Fast-fase ekstraksjon SPE

Fast-fase ekstraksjon (Solid Phase Extraction (SPE)) er en type prøveoppbehandling som brukes til å isolere, rense og oppkonsentrere analytter fra en væske. Metoden er basert på hvordan et stoff fordeler seg mellom en væske og en overflaten til et fast stoff (sorbenten). Er interaksjonen som oppstår mellom stoffene og sorbenten større enn stoffene og væsken, vil stoffene bli sittende på sorbenten [37, 38].

Det finnes ulike sorbenter til SPE: normalfase, omvendt fase, ionebytter, mix-mode og så videre. I denne oppgaven ble kun silikabasert C18 brukt samt Molecularly Imprinted Polymers (MIP). Det er disse to materialene som beskrives nedenfor.

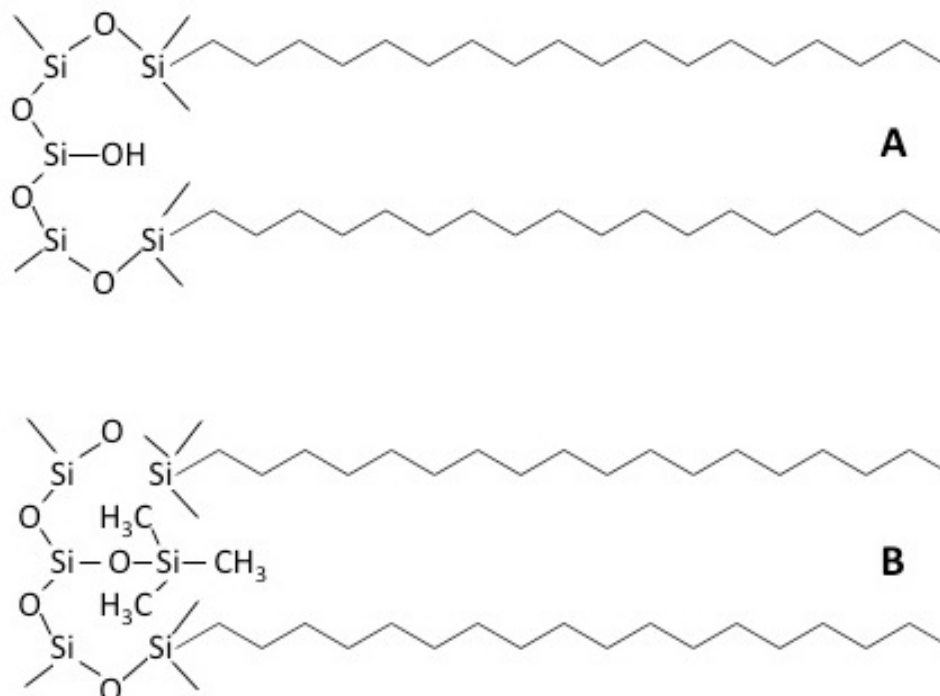
C18

Typisk fremstilling av sorbenten foregår ved å binde klorsilanhydrofobe grupper til silanolgruppene [38]. Figur 4.3.1 viser denne reaksjonen.



Figur 4.3.1 – Typisk fremstilling av en omvendtfase foregår ved hjelp av klorsilaner som reagens. R¹ er her typisk CH₃. R kan variere, men får en C18 vil den være en octadecyl (CH₂)₁₇-CH₃.

Siden silanolgruppene ofte sitter så tett vil det oppstå steriske hindringer som derfor vanskeliggjør at samtlige grupper kan reagere med klorsilanreagensen. Dermed oppstår det man kaller restsilanol grupper. pKa verdien til restsilanol gruppene er vanskelig å fastsette, men normalt anses gruppen for uladet ved pH 2. En økende pH over dette gir restsilanol gruppene en økende dissosiering. Disse gruppene kan skape problemer i form av elektrostatiske interaksjoner, men kan løses ved å ta i bruk derivatisering som blir kalt *endcapping* [38, 39]. Figur 4.3.2 viser en omvendtfase C18 sorbent med silanolgruppe og hvordan silanol problematikken kan bli redusert ved hjelp av *endcapping*.



Figur 4.3.2 – A: viser en C18 sorbent med restsilanol gruppe. B: viser hvordan *endcapping* kan fjerne restsilanol gruppen.

Teori

Retensjonsmekanismen i en omvendtfase SPE hvor C18 benyttes er basert på interaksjon mellom hydrokarbonkjedene til sorbenten og mellom analyttens hydrokarbonkjeder. Denne interaksjonen kalles for Van der Waals-krefter [38].

I denne oppgaven er det benyttet en Empore® Extraction Disks, Octadecyl (C18) 47 mm som er *endcapped*.

Fordelen med silikabaserte sorbenter er at materiale er lett å kontrollere med henhold til partikkel størrelsen, porestørrelsen, overflatens areal, den har høy mekanisk styrke, kjemisk stabile og kan brukes sammen med vandige løsninger [37, 38].

Den generelle prosedyren for ekstraksjonsprosessen vil kunne variere noe (spesielt vaske trinnet til mixed mode).

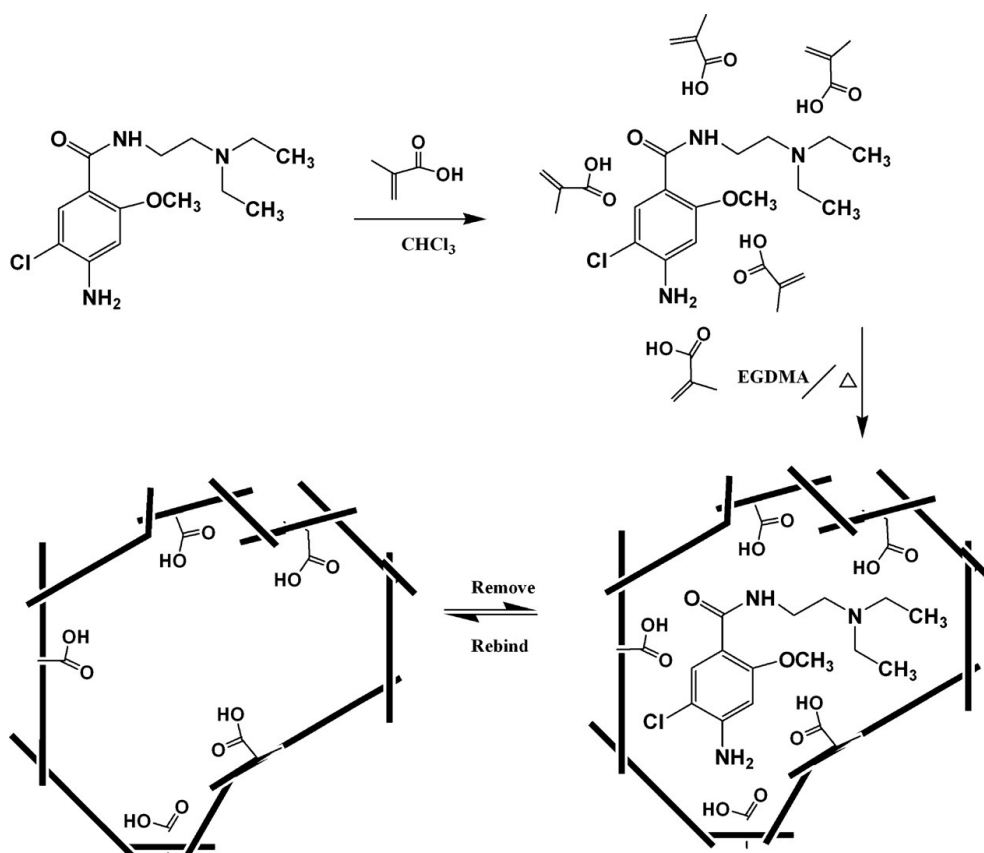
Den generelle prosedyren for omvendtfase er:

- **Kondisjonering:**
Siden sorbenten er tørr vil den aktive overflatearealet bli liten. Kondisjoneringen vil øke det aktive overflatearealet og sikrer en maksimal kontakt mellom sorbenten og prøveløsningen. Så lenge det er snakk om en hydrofob overflate er det mest vanlig å bruke 100 % MeOH.
- **Re-ekvilibrering:**
For å sikre analytten god kontakt med de funksjonelle gruppene må all løsning brukt i kondisjoneringen bli vasket bort. Ønsker å lage kjemien rundt sorbenten så lik prøven som mulig.
- **Prøvepåsetting:**
Målet ved prøvepåsettingen er å få stoffene retardert eller fanget på kolonnen. For å få til dette er det viktig å ha sterke nok interaksjonskrefter til stedet. Derfor må styrken (les: løsemiddelstyrken) til prøveløsningen ikke være for sterke. Dette vil derfor avhenge av hva slags sorbent som benyttes
- **Vask:**
Her er det ønskelig å bruke en så sterk elueringsstyrke som mulig uten at analytten blir eluert. På denne måten blir mest mulig av forurensningene fjernet.
- **Eluering:**
Elueringsstyrken må være sterk nok til å bryte alle interaksjonene mellom analytten og sorbenten. Dette vil også avhenge av type sorbent og analytt man står overfor. Løsemiddelstyrken skal være sterk nok til å få et lite volum, men ikke så sterkt at forurensninger blir med og ikke så svakt at analytten blir igjen [37, 38].

Molecularly-imprinted Polymer MIP

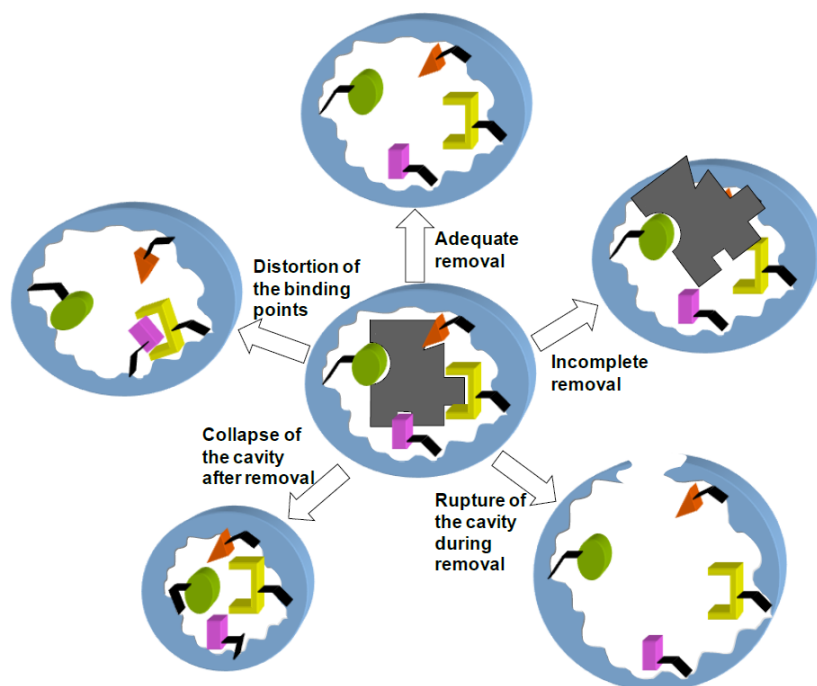
I SPE brukes Molecularly-Imprinted Polymer (MIP) i prøveopparbeidelsen for å selektivt separere analytten fra en væske. De har ofte fått betegnelsen som ”kunstig antistoff” på grunn av sin selektivitet. I tillegg er de mer stabile ovenfor ekstreme pH forandringer, temperatur og organiske løsningsmidler som derfor gjør dem mer egnet til analytiske metoder i forhold til antistoffer [8, 37]. Siden MIP fremstilles ved bruk av polymerer, kan det derfor forhånds bestemmes hvilke analytt den skal utvise selektivitet for. MIP syntetiseringen går utpå bruk av funksjonell monomer, cross-linket monomer og templat (analytten) som så polymeriseres. Senere, når templatet fjernes, står det igjen et hulrom som har sin selektivitet for templatet på bakgrunn av templatets steriskform og interaksjonene mellom templatet og monomerene. Typiske interaksjoner som finnes mellom templatet og monomerene er hydrogenbinding, elektrostatiske og hydrofobe bindinger [37].

Figuren 4.3.3 viser skjematisk representasjon av en MIP produksjon og hvordan man ser for seg templatets hulrom med sine monomerer som gir interaksjonene med templatet.



Figur 4.3.3 – Skjematisk representasjon av MIP produksjon. 1: Monomerer, templat og solvent. 2: Cross-linker monomerer som så blandes og aktiveres av en initiator. 3: Polymerisering: over et varme bad på 60 °C i 24 timer. 4: Knuser og filtrerer polymerene til ønsket størrelse. 5: Tørker og vasker ut templatene [8].

Fordi det er vanskelig å få fjernet alt templat etter produksjonen selv etter mange vaskesykluser er dette derfor sett på som det mest kritiske punktet i hele produksjonen. Dette er et viktig punkt siden templat ”bleeding” vil interferere med analysene. Det er blitt gjort få studier, men det viktigste er å unngå for ekstreme pH eller temperaturer da dette kan medføre svelling, forvrengninger og/eller rupturer av hulrommet. Andre metoder er å bytte ut templatet med analoger slik at ”bleeding” ikke vil ha noe betydning siden de gir andre signaler på MS- og MS/MS-kromatogrammet [40]. Figur 4.3.4 viser hvordan MIP kan tenkes å forandre seg under fjerning av templatet ved bruk av for ekstreme metoder.



Figur 4.3.4 – utfordringer ved fjerning av templatet [40].

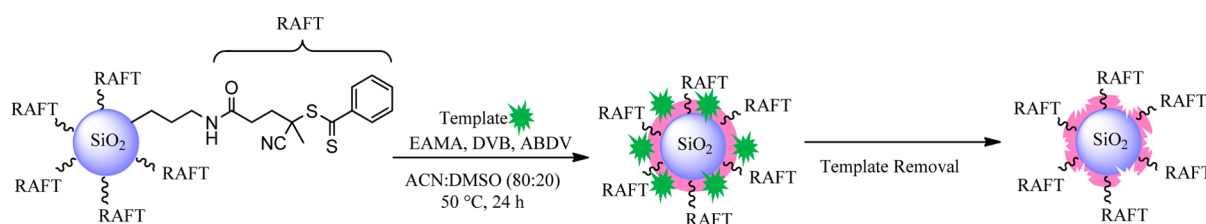
Bruk av MIP SPE i prøveopparbeidelsen har i flere studier vist å gi gode resultater for selektivitet og utbytte så lenge molekylvekten har vært lav (<1500 Da) [8, 41-44].

MIP og NIP materiale brukt i oppgaven

Forskjellen mellom et MIP og Non-imprinted Polymer (NIP) materiale er at NIP mangler templatet når den syntetiseres. NIP består derfor av de samme funksjonelle og cross-linket monomerene som hos MIP, men uten hulrommet fra templatet. Ved forsøk blir det produsert NIP i tillegg til MIP for å kunne vise til betydningen av det steriske hulrommet til templatet. I denne oppgaven ble brukt funksjonell og cross-linket monomerer som ble optimalisert ut i fra et tidligere forsøk [24].

MIP som ble brukt i denne oppgaven ble produsert i hensikt av å utvise selektivitet mot ProGRP sitt signaturpeptid NLLGLIEAK. Syntetiseringen av MIP ble utført via en Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer (RAFT) modifisert mesoporøs silika hvor det ble brukt den hydrofobe cross-linkeren divinilbenzene (DVB), funksjonelle monomeren N-(2-aminoethyl) methacrylamide hydrochloride (EAMA) og templatet Z-NLLGLIEA-Nle-OH. Den RAFT modifiserte mesoporøse silika har en gjennomsnitt på 30 µm partikkelstørrelse, 50 nm porediameter og etter polymeriseringen ble det dannet et uniformt belegg på rundt 3 nm. I MIP syntetiseringen ble det brukt et templat som er forskjellig fra det tryptiske signaturpeptidet (NLLGLIEAK). Dermed unngås at templat ”bleeding” vil interferere med analysen, fordi det brukte templatet får et annet signal og man kan dermed skille mellom templatet og signaturpeptidet. I tillegg har templatet en bedre løselighet i solventen [25].

Figur 4.3.5 viser hvordan MIP blir produsert på en RAFT modifisert silika.



Figur 4.3.5 – MIP syntetiseringen. 2, 2'- azobis (2, 4-dimethylvaleronitrile) (ABDV) er en initiator, mens ACN:DSMO (Dimethyl sulfoxide (DSMO)) er solventen [25].

4.4 LC-MS/MS

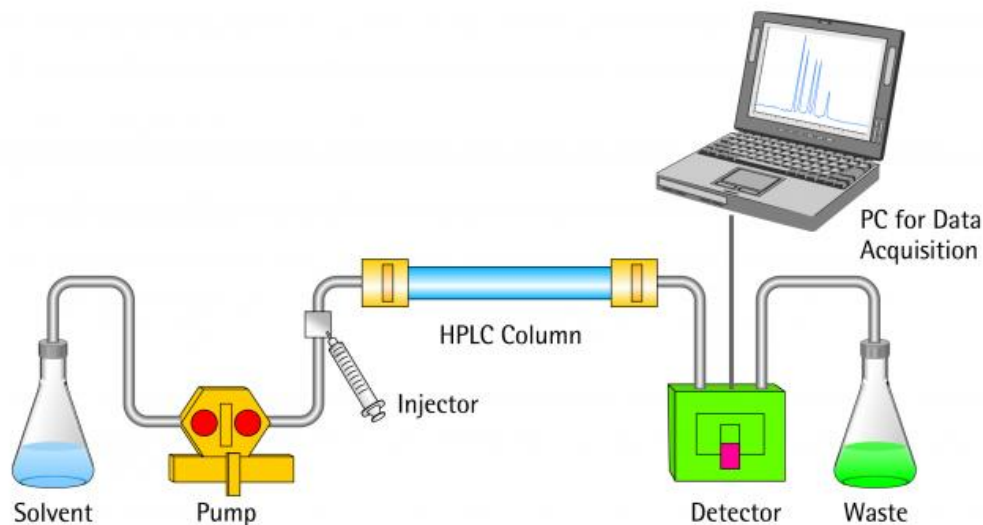
På grunn deres høye følsomhet og selektivitet er LC-MS (væskekromatografi massespektrometri) og LC-MS/MS (væskekromatografi tandem massespektrometri) i dag hovedmetodene til detektering og bestemmelse av peptider [34]. Denne teknikken muliggjør at koeluerte peptider kan skilles på bakgrunn av deres forskjellige masser. I tillegg vil tandem massespektroskopi gi peptidenes fragmentspesifikke masser slik at de kan brukes til kvantifisering og til identifisering (se også kapittel 6.1) [33].

4.4.1 Væskekromatografi LC

LC (Liquid Chromatography) eller HPLC (High Performance Liquid Chromatography) er basert på at en mobilfase (væske) blir presset igjennom en pakket kolonne (stasjonærfasen). Kolonnen er produsert slik at stoffene retarderes og siden stoffene injisert før kolonnen vil de

derfor separeres før de detekteres på detektoren (for eksempel en MS/MS-detektor) [38].

Figur 4.4.1 viser hvordan et HPLC system er bygd opp.



Figur 4.4.1 – HPLC system [45]. Figuren viser en pumpe som suger opp mobilfasen (Solvent) før den pumpes forbi injektoren på vei til kolonnen. Stoffene injiseres før kolonnen hvor de retarderes og kan så bli detektert på detektoren. Mobilfasen går fra detektoren til *waste*.

Den mest brukte separasjonsprinsippet innen væskerkromatografi er omvendt-fase-kromatografi. I et slikt system er mobilfasen en vandig løsning som er kompatibelt med prøveløsningen, mens stasjonærfasen er av et hydrofobt materiale. Stasjonærfasen blir oftest fremstilt kjemisk på en slik måte at silanolgruppene på silikamaterialet bindes til hydrofobe grupper. De hydrofobe gruppene til stasjonærfasen vil retardere analytten på grunn av interaksjonene som oppstår mellom dem. Størrelsen på denne interaksjonen avhenger av stasjonærfasen, analyttens hydrofobisitet, men også av mobilfasesammensetningen. En sterk mobilfase (sterk løsemiddelstyrke) vil bryte interaksjonene lettere i forhold til en svak. På denne måten kan retensjonstiden endres for analytter som sitter lenge på kolonnen. Ofte benyttes det som kalles gradienteluering som betyr at mobilfasen endres gradvis fra en svak mobilfase til en sterkere under selve sekvensen. Dette muliggjør en bedre separering når stoffene har forskjellig retensjon. Ulempen er økt behov for re-ekvilibrering og grunnlinje drift [38].

4.4.2 Massespektrometri MS

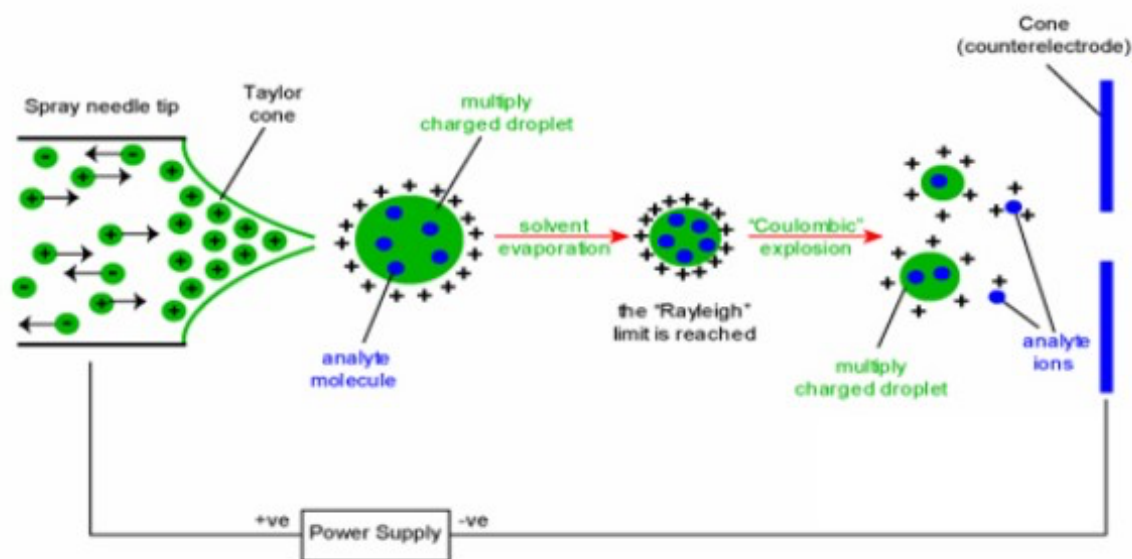
Et massespektrometer består hovedsakelig av tre deler.

1. Ionekilde.
2. Masseanalysator.
3. Detektor.

Mens ionekilden gjør analyttionet om til gass-fase ion vil masseanalysatoren separerer de analyserte analyttene basert på deres m/z verdier og til slutt vil detektoren telle antall ioner basert på deres m/z verdi [46]. Det finnes flere typer ionekilder, men den mest aksepterte grensesnitte som brukes innen komplekse prøver er atmospheric pressure ionization (API). De mest brukte av disse er elektroprayionisasjon (ESI) [34] og atmospheric pressure chemical ionization (APCI) [33]. I denne oppgaven er ionekilden av typen ESI, mens selve masseanalysatoren og detektoren er å finne i en LTQ Orbitrap. Det finnes i dag en mengde med typer masseanalysatorer hvor de mest vanlige er: Orbitrap, quadrupole (Q), ion trap (som kan enten være quadrupole ion trap (QIT) eller av typen linear ion trap (LIT)), time-of-flight (TOF) og Fourier-transform ion cyclotron resonance (FTICR). De er alle konstruert forskjellig og har forskjellige ytelses karakteristikk. I tillegg finnes det hybrider som: TQ, Q-TOF, TOF-TOF, LTQ-FTICR og LTQ Orbitrap. Fordelen med et hybrid instrument er at man bruker styrken til den enkelte MS [46, 47].

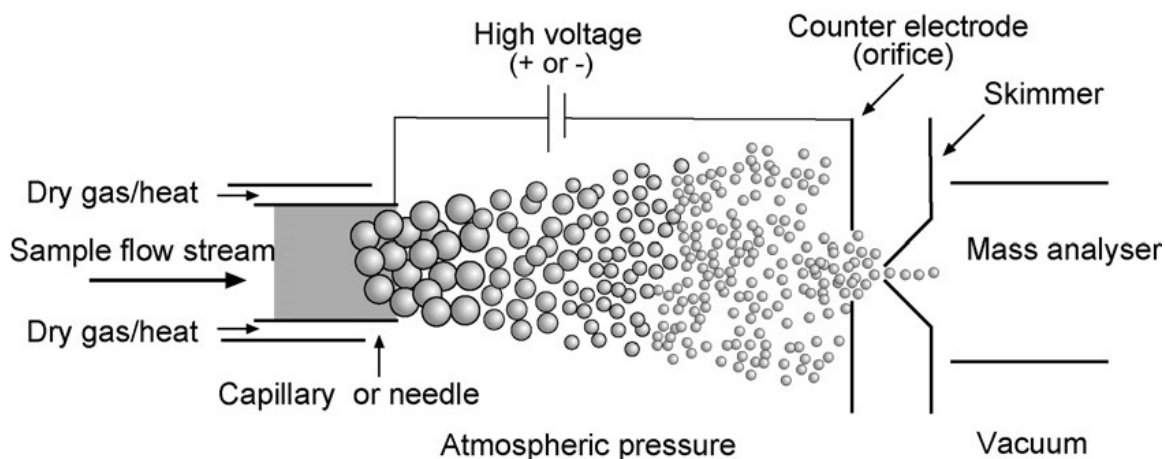
Elektroprayionisasjon ESI

ESI er en myk ioniserings metode. Det vil si at metoden ikke omdanner molekylionene videre til fragmenter [38]. ESI kan stilles i positiv mode for å måle protonerte ioner eller i negativ mode for å måle deprotonerte ioner. Siden peptider kan inneholder multiple aminosyrer med basiske amino residuer blir disse lett protonert i en sur mobilfase [33]. I denne oppgaven settes ESI i positive mode, fordi det brukes peptider dannet fra tryptisk proteolyse og mobilfaser med 0,1 % FA. Figur 4.4.2 viser hvordan ESI mekanismen fungerer i en positive mode innstilling.



Figur 4.4.2 – ESI mekanismen (positive mode) [48].

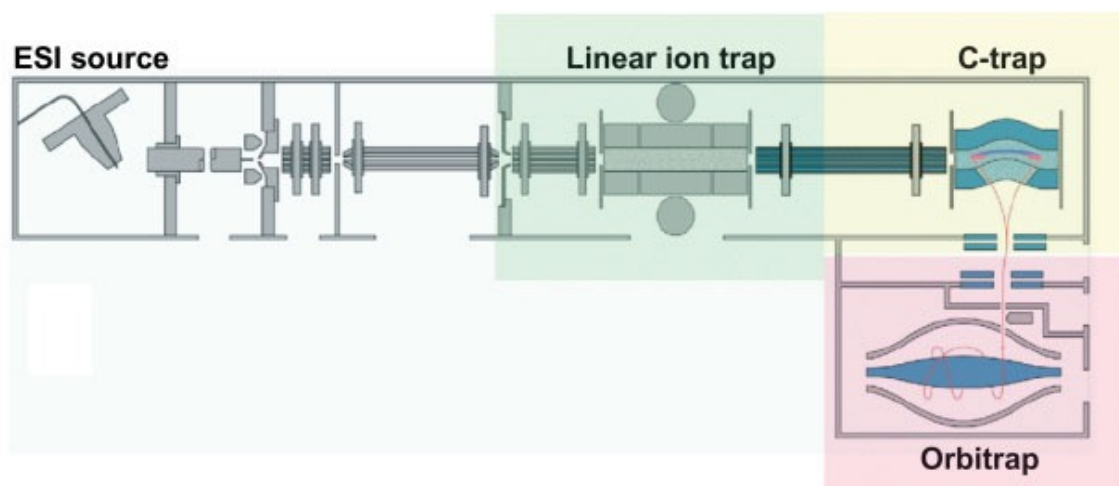
Ved å sette på en høy spenning (3-5 kV) mellom spray tuppen og motelektroden vil de forstøvede dråpene bli ladet. Motelektroden trekker til seg de ladede dråpene på grunn av ladnings forskjellen og bidrar til finforstøvningen av dråpene (aerosol). Denne fin forstøvningen kan ytterligere bedres ved å bruke gasstrykkluft. I ESI er hovedoppgaven til gassen (oftest Nitrogen (N_2)) å gi fordampning av solventen på dråpene som i tillegg får hjelp av den høye temperaturen i ione transfer capillary (før skimmeren). I figur 4.4.2 vises hva som skjer når solventen fordampner fra dråpen. Dråpens overflatespenning vil til slutt nå sin grense (Rayleigh) og det oppstår en Coulombic eksplosjon hvor dråpene blir revet fra hverandre til mindre dråper. Slik fortsetter denne prosessen helt til ionets ladningsfelt overstiger dråpens overflatespenning som fører til emittering av ionet. Ionet er nå desolvatisert. Som vist i figur 4.4.3 vil kun enkelte desolvatiserte ioner passere forbi skimmer og videre inn i vakuum delen i masseanalysatoren [49-51].



Figur 4.4.3 – ESI prosessen [49].

LTQ Orbitrap

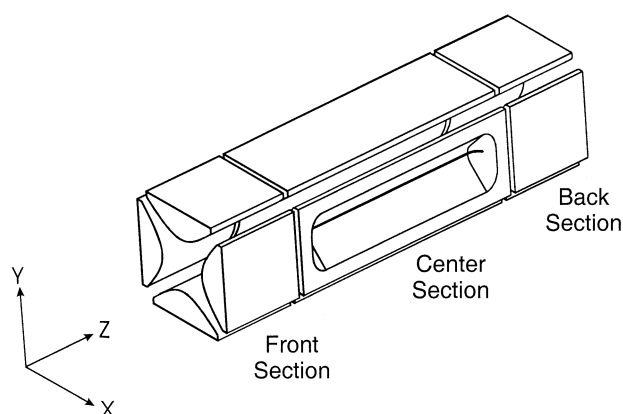
LTQ Orbitrap består av to masseanalyser: en linear ion trap (LIT) og siden den er koblet sammen med orbitrap er dette et hybrid instrument hvor LIT kan operere alene eller sammen med orbitrapen. Som figur 4.4.4 viser inneholder hybridene også en C-trap.



Figur 4.4.4 – Skjematisk oppsett til LTQ Orbitrap [52]. Grønn del viser LIT med detektorene på hver side. Gul del viser C-trap og til slutt rosa del som viser orbitrapen.

LIT:

Som figur 4.4.5 viser består LIT av fire stenger som hver er delt inn i tre seksjoner. Mellom hver seksjon er det en liten spalte som gir plass til frigjorte ioner under ut-skanningen. Stengene ovenfor hverandre er elektrisk koblet sammen slik at hver seksjon kan tenkes bestående av to deler. Hver seksjon er så koblet til en likestrøm (DC) med forskjellig størrelse slik at ionet blir fanget i den midtre seksjonen. I positiv mode vil det typisk ligge -9 V på fremre seksjon og -7 V på bakre seksjon ved lagring og 0 V på både fremre og bakre seksjon ved analysering. Den midtre seksjonen vil da typisk ha en spenning på -12 V både under lagring og analysering [53-55].



Figur 4.4.5 – Viser en LTQ [54].

Som nevnt er hver seksjonstang som ligger ovenfor hverandre koblet sammen elektrisk og blir sett på som en del. På hver seksjonsdel er det lagt til en radio frekvens (RF) spenning med en fast frekvens på $1,2\text{ MHz}$ mens det er spennings amplituden som varierer. Hver

Teori

seksjonsdel har en lik RF spenningsamplitude, men med motsatt fortegn (amplituden er 180 grader forskjøvet til hverandre). Dette fører til det man kaller en to-dimensjonal quadrupole felt [53-55].

Når man så ønsker å analysere eller å frigjøre ikke ønskelige ioner gjøres dette blant annet ved å øke amplituden på RF spenningen. Det oppstår en ustabilitet i ionene som kalles for resonansspenningen. Ved å holde RF spenningen lav vil alle ioner over en minimum m/z forbli fanget [53-55].

- Detektore ionene:

Begge de bakre seksjonsdelene og begge de fremre seksjonsdelene kobles til en vekselspanning (AC). Spenningsamplituden er her lik, men med en 180 graders forskyvning. Ved å endre på frekvensen nås resonansfrekvensen til ionet slik at den tar til seg kinetisk energi. Om spenningen holdes høyt nok for denne resonansfrekvensen sammen med resonansspenningen vil ionet kunne frigjøres og bli detektert av detektoren [53-55].

- Isolering av ioner:

Ved å unngå resonansspenningen og resonansfrekvensen til de utvalgte ionene vil de resterende bli frigjorte fra LTQ [53-55].

- Fragmentering:

Collision-induced dissociation (CID) oppnås ved å tilføre resonansfrekvensen til ionet, men her holdes spenningsamplituden så lav at ionet ikke klarer å frigjøre seg fra LTQ. Det oppstår kollisjon med den inerte gassen som til slutt vil føre til en fragmentering av ionet (indre energien øker) [53-55].

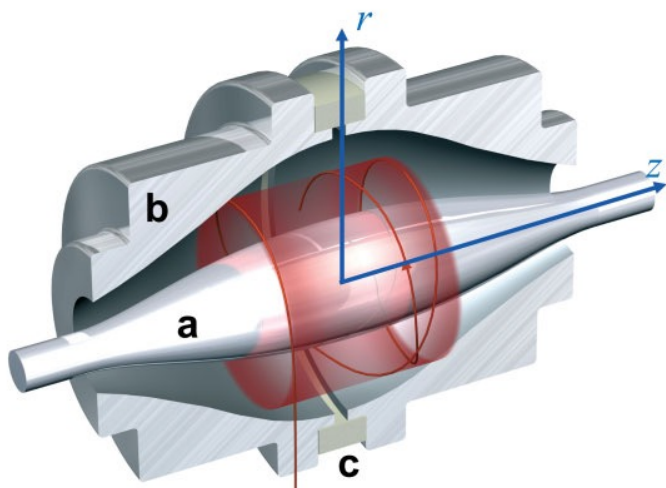
C-trap:

LIT kan også sende ionene videre til en C-trap via octapolen (lokalisert mellom LIT og C-trap). C-trap er en RF quadrupole og fungerer som en ionetrap. Ved å fange ionene en kortperiode før de sendtes vider gir en økt analytisk kapasitet for orbitrapen. Fra C-trap sendes så ionene inn i en ione-optikk som tilfører høy kinetisk energi og skyter dermed ionet videre inn i orbitrapen [56]. En C-trap holder ionene fanget med en RF spenning mens ionene frigjøres ved å sette RF spenningen til 0 V [57].

Orbitrap:

Ved at ionene holdes fanget i C-trap gir en økt kapasitet på orbitrapen. Ionene som skytes inn på orbitrapen med stor fart blir fanget i et raskt økende elektriskfelt i orbitrapen. Som figur 4.4.6 viser vil ionene som skytes inn i orbitrapen starte å osciller rundt z-aksen. På dette

tidspunktet vil de elektrostatiske kreftene være i balanse med sentrifugalkreftene slik at ionene forblir på orbitrapen. Denne oscilleringen som ionene forårsaker vil gi et bilde strøm som kan måles av elektrodene. Siden den oscillerende frekvensen korrelerer med ionenes m/z kan disse finnes ved å bruke en Fourier transformer [52].

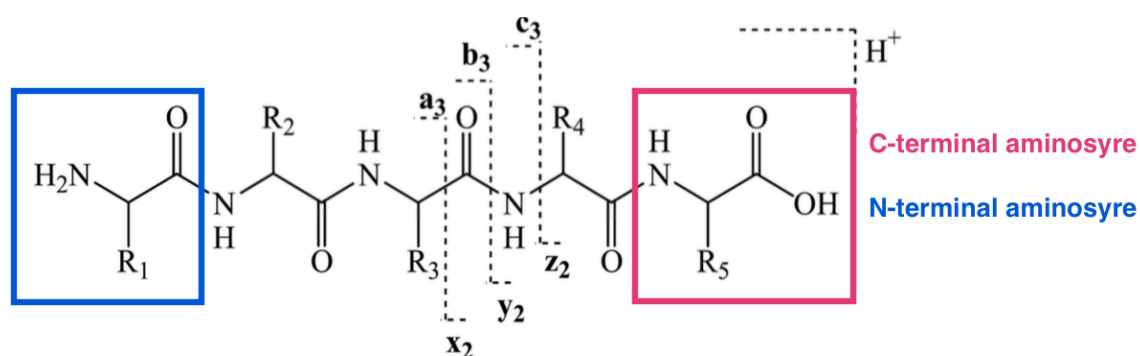


Figur 4.4.6 – Orbitrap.

Fragmentering

Som nevnt tidligere vil kromatogrammet til MS/MS kunne brukes i kvantifisering og identifisering av peptider siden fragmentene er spesifikke for peptidet [33].

Fragment typene som kan oppstå blir beskrevet av en spesifikk nomenklatur [33]. Figur 4.4.7 viser denne nomenklaturen.



Figur 4.4.7 – Nomenklatur på vanlige ione typer som oppstår ved fragmentering [34].

Det finnes i dag flere fragmenteringsmetoder, men den mest brukte innen MS/MS proteomikk er Collision-induced dissociation (CID). Denne metoden er en lav-energi variant og gir derfor hovedsakelig b- og y-ioner [46]. De andre metodene som gir høyere

fragmenteringsenergi kan igjen gi andre brudd i peptidets ryggrad som: a-, x-, c- og z-ioner. Spaltning av sidekjedene kan også forekomme og har fått nomenklaturen d-, v- og w-ioner (vises ikke i figuren). Denne sidekjede spaltningen vil da komme i tillegg til den vanlige spaltningen av peptidets ryggrad [34].

Om fragmentering i N-terminal gir ladning vil det produseres b-ioner eller om C-terminalen gir ladning vil det produseres y-ioner. Hos multiple ladet peptid vil det kunne dannes komplementære fragmenter og som ofte vil vises med forskjellig konsentrasjon fordi de ikke er like stabile eller fordi instrumentet kan diskriminere [34].

Tryptiske peptider vil normalt ha multiple ladninger i ESI. Dette skyldes N-terminalen som alltid består av en amino del mens trypsinet kutter i C-terminalen etter arginin og lysin. Fordi det er de frie protonene som initierer spaltningene vil multiple ladninger gi et rikere fragmenterings mønster som også gir en mer komplisert tolkning [34].

4.5 Multivariat analyse

4.5.1 Principal Component Analysis PCA

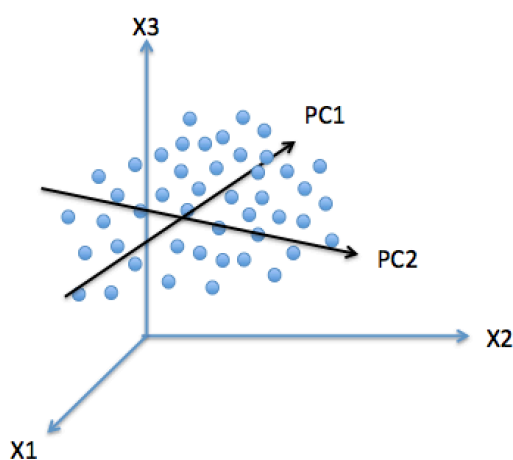
Om man har tester der det er mange variabler og mange objekter som i dette tilfelle, vil det bli vanskelig å kunne finne likhetene mellom objektene. Her er for eksempel objektene alle peptidene med deres bestemte variabler som for eksempel er deres masser, ladninger også videre. Om peptidene kalles for objekter n og ser på variablene mellom disse som p vil man klare å lage et sett med matriser ($n \times p$) som ofte kalles for datamatriser. Dermed blir det hele meget kompleks. Som nevnt over blir det ofte vanskelig å kunne finne likheten mellom objektenes "skjulte" egenskaper. Det er i disse tilfellene at man kan bruke Principal Component Analyser (PCA) som et verktøy [58]. I denne oppgaven har jeg brukt programvaren "The Unscrambler" som nettopp er et program som bruker PCA som et verktøy.

Nedenfor er det en kort beskrivelse av hvordan PCA fungerer.

Hvordan lage den første Principal Component linjen:

La oss se på 3 ulike variabler (X_1 , X_2 og X_3) som alle har hver sin akse med samme opprinnelse som i tillegg også har en måleenhet som kan være forskjellige, men som kan skrives ned som lengde. Se for deg at disse aksene er ortogonale. Siden aksene er ortogonale til hverandre har jeg dermed fått et 3 dimensjonalt system. Disse ulike variablene som er avhengig av hverandre vil dermed lage en punkt sverm fra dataen.

I den retning hvor det er mest spredning mellom punktene kan det legges en linje. Det er denne linjen som nå vil kalles for den første Principal Component (PC1) linjen. Denne linjen finner man ved å beregne den linjen som gir maksimum varians i fra data settet [58]. Man finner også denne linjen ved å benytte seg av minste kvadraters metoden [58]. Ved denne metoden beregner man seg til den linjen som gir lavest sum av kvadratrøttene $\sum(e_i)^2$ av de vinkelrette avstandene e_i til hvert punkt i svermene i forhold til linjen som er valgt (disse to metodene gir den samme linjen) [58]. I figur 4.5.1 vises et 3 dimensjonalt system hvor PC1 og PC2 er tegnet inn.



Figur 4.5.1 - Viser et 3 dimensjonalt system hvor det er tegnet inn PC1 og PC2.

Hvordan få flere Principal Component linjer:

Om den første linjen som vi lagde ikke kan forklare punkt svermen godt nok lager vi en eller enda flere Principal Component (PC) linjer.

Den andre Principal Component (PC2) linjen vil ligge i en retning som er ortogonalt med PC1 [58]. Den vil med denne retningen ha den nest største variansen. Om jeg trenger flere PC vil den neste igjen ligge ortogonalt til de andre PC (PC1 og PC2) [58]. Den neste PC vil ha den tredje største variansen. Det vil si at man sitter med et system med flere PC som alle ligger ortogonalt til hverandre og som hver har en maksimum varians i en nedad stigende rekkefølge i fra den første PC [58]. Det kan være verdt å merke seg at ved å introdusere PC har vi klart å frakoble de opprinnelige variablene og heller fått nye uavhengige variabler [58]. I programmet "The Unscrambler" bruker man resultatplotter som forklarer hvordan objektene er fordelt i forhold til hverandre. Under disse vinduene står poengsum i prosent. Prosenten sier noe om hvor god variansen er for X (variablene) for den bestemte PC linjen. Ved å

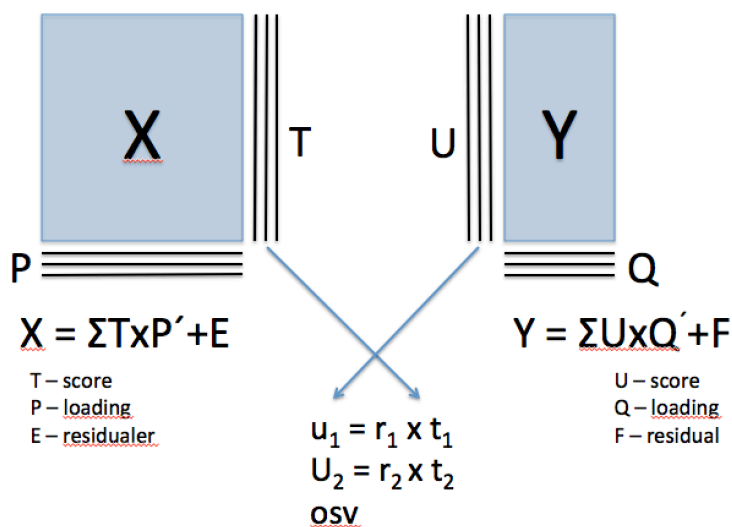
summere opp disse prosentene får man den totale prosent som disse to PC linjene gir. Dette gir tall for den totale variansen for X i plotten.

4.5.2 Partial Least Square PLS

Partial Least Square Regression (PLS) er en metode som brukes for å utføre multivariat analyse. Multivariat analyser brukes når man ønsker å korrelere informasjon i en data matriks (X) med informasjonen som er i en annen data matriks (Y) [58]. Metoden er derfor egnet for å kunne forutsi resultatet i data matriksen Y når man kun har matriksen X [58]. Det er to forskjellige PLS versjoner. I PLS1 har man kun en Y-variabel, mens i PLS2 er det flere Y-variabler [58]. I min oppgave benyttes kun PLS1.

Hva er kjernen i PLS?

Den enkleste måten å forklare PLS er ved å se på X- og Y-matriksen som to forskjellige PCA med hver sin likning. Om vi ser på figur 4.5.2 så kan vi forklare Y-matrikset ut i fra likningen.

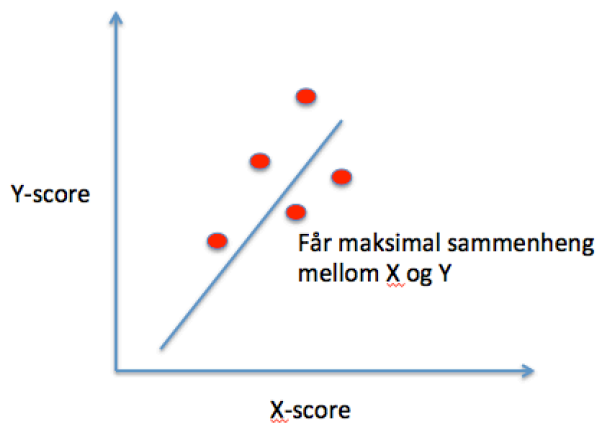


Figur 4.5.2 - Viser PLS oppbyggingen

Ved hjelp av denne likningen er det mulig å forutsi Y bare ved å bruke U-verdien.

X-matrikset har på tilsvarende måte sin likning. I PLS utvikles en modell der den første scoren i X (t_1) har sin maksimale kovarians med første scoren i Y (u_1) også videre. Ut i fra denne modellen kan vi dermed forutsi u-verdien så lenge vi har t-verdien [58]. Som forklart i starten kunne vi se for oss matriksene som to forskjellige PCA. I PLS bruker man ikke PC, men PLS Component linjer [58]. Disse linjene finner vi ved å bruke andre utregnings

metoder enn vanlige PC og vil ikke bli omtalt her. Figur 4.5.3 viser hvordan kovariansen øker når man bruker PLS Component.



Figur 4.5.3 - Viser hvordan PLS Component blir.

PLS Component linje gir en bedre sammenheng mellom X og Y. Vi får med andre ord en større kovarians.

PLS kan derfor brukes for å kunne forutsi en Y matriks når man kun har X matrikset. I denne oppgaven ble PLS brukt til å forutsi en Y-verdi som i denne oppgaven er 50 % MIP og 50 % NIP verdiene. 50 % MIP og 50 % NIP er ekstraksjons styrken til MeCN i vasken som må brukes for å ekstrahere ut 50 % av peptidene mens X matriksen består av peptidenes forskjellige egenskaper. Ut i fra dette kan man dermed antydet hvilke egenskaper som er av størst betydning hos peptidene.

5 Materialer & Metoder

5.1 Kjemikalier, proteiner og utstyr

Tabell 5.1.1 - Kjemikalier

Kjemikalier:	Kvalitet:	Leverandør:
Acetonitril (MeCN), CH ₃ CN	LC-MS-kvalitet	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Ammoniumbikarbonat, NH ₄ HCO ₃	≥ 99,5 %	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, MO, USA
Ammoniakk, NH ₃	25 %	E. Merck, Darmstadt, Tyskland
DL-Dithiothreitol (DTT) (1,4-ditiotretiol), C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂	≥ 99,5 %	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, MO, USA
Iodoaceticacid (IAA) (Jodeddiksyre), C ₂ H ₃ IO ₃	≥ 98 %	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, MO, USA
Maursyre (FA), HCOOH	≈ 98 %, MS-kvalitet	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, MO, USA
Metanol (MeOH), CH ₃ OH	LC-MS-kvalitet	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Natriumhydroksid, NaOH	Minimum 99 %	VWR International BVBA, Leuven, Belgia

Tabell 5.1.2 - Proteiner og peptider

Proteiner/peptider	Kvalitet:	Leverandør:
Bovint serum albumin (BSA)	≥ 96 %	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, MO, USA
Intern standard, NLLGLIEA[K- ¹³ C ₆ ¹⁵ N ₂]	> 95 %	Innovagen AB, Lund, Sverige
Trypsin fra bovine pankreas (Trypsin fra storfe)	≥ 10000 BAEE units/mg protein	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, MO, USA

Tabell 5.1.3 - Utstyr til produksjon av SPE

Utstyr :	Modell:	Leverandør:
Glasspasteurpipetter	150 mm	VWR International, Leuven, Belgia
Pipettespisser	Finnpipette and Gilson Pipeteman®, 1-300 µL	VWR International, LLC Radnor, PA, USA
Polyetylen frits	Isolute Frits 5 µm	Biotage, Lund, Sverige
SPE disk C18	Empore® Extraction Disks, Octadecyl (C18) 47 mm, 20/Pk	Penomenex, Torrance, CA, USA
MIP	SiRMIPT2 Modifisert mesoporøse silika	University of Dortmund, Dortmund, Tyskland
NIP	SiRNIPT2 Modifisert mesoporøse silika	University of Dortmund, Dortmund, Tyskland

Tabell 5.1.4 - Utstyr til nano LC MS/MS

Utstyr:	Modell:	Produsent:
Autosampler	Ultimate 3000 RS	Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, USA
Flow Manager	Ultimate 3000 Flow Manager	Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, USA
Ionefelle	LTQ XL	Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, USA
Kolonne	Acclaim PepMap®, 75 µm x 150 mm, C18, 3 µm, 100Å	Thermo Scientific, Amsterdam, Nederland
Loading Pump	Ultimate 3000 LoadingPump	Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, USA
MicroPump	Ultimate 3000 MicroPump	Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, USA
Orbitrap	LTQ Orbitrap Discovery	Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, USA

Programvare	Xcalibur v. 2.0.7 Chromeleon v. 6.80 SR8	Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, USA
Trap kolonne	BioBasic C8, 5 µm, 10 x 1 mm	Thermo Scientific, Amsterdam, Nederland

Tabell 5.1.5 - Forbruksmateriell

Utstyr:	Modell:	Produsent:
Eppendorfrør	Brand Microtubes 1,5 mL	Brand, Tyskland
Eppendorfrør, LoBind	Protein LoBind Tube 1,5mL og 2,0 mL	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland
Glasspasteurpipetter	150 mm	VWR International, Leuven, Belgia
Hvite korker til vialer		Nerliens Meszansky, Oslo, Norge
Inserts	Micro-insert 0.1 mL clear glass	VWR
pH-papir	Universalindikator pH 0-14	Merck, Darmstadt, Tyskland
Pipettespisser	Optifit	Sartorius Biohit Liquid Handling Oy, Helsinki, Finland
Sentrifugerør	15 mL med skrukork, sterile 50 mL med skrukork, sterile	VWR International, LLC Radnor, PA, USA
Vialer	32 x 11,6 mm	Nerliens Meszansky, Oslo, Norge

Tabell 5.1.6 - Øvrig utstyr

Utstyr:	Modell:	Produsent:
Automatpipette	Finnpipette® Biohit®	Thermo electron corp. Cheshire, UK Biohit Oyj, Helsinki, Finland
pH-meter	744 pH Meter	Metrohm Ltd., Herisau, Sveits

Termomikser	Comfort eppendorf 1,5 mL	Fisher Scientific, Oslo, Norge
Sentrifuge	Centrifuge 5804 Galaxy Mini centrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland VWR International, Leuven, Belgia
Ultralydbad	Ultrasonic Cleaner	VWR International, Leuven, Belgia
Vannrenseanlegg	Milli-Q(R) Integral 3/5/10/15 System	EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
Vekt	Metler AE 200 Mettler toledo	Mettler-Toledo AS, Oslo, Norge
Vortex-mikser	IKA® MS3 digital	IKA Works inc., Wilmington, NC, USA

5.2 Brukte løsninger

Tabell 5.2.1 – Brukte løsninger

0,1 % Maursyre (FA)
50 mM Ammoniumbikarbonat-buffer (ABC-buffer)
100 mM Reduksjonsreagensen DL-Dithiothreitol (DTT)
400 mM Alkyleringsreagensen Iodoaceticacid (IAA)
1 mg/mL Trypsinløsning
5 µg/mL Trypsinløsning
Standardløsninger NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂]
0,51 mM NLLGLIEA[K- ¹³ C ₆ ¹⁵ N ₂] løsning
0,51 µM NLLGLIEA[K- ¹³ C ₆ ¹⁵ N ₂] løsning
50 nM NLLGLIEA[K- ¹³ C ₆ ¹⁵ N ₂] løsning
Standardløsninger av BSA:
1 mg/ml BSA løsning
100 µg/ml BSA løsning

Løsninger som brukes til pH forsøket:
12,5 M NaOH løsning
0,1 % FA løsning (1:1000)
10 % FA løsning (1:10)
2,5 % NH ₃ løsning (1:10)
0,25 % NH ₃ løsning (1:100)
0,025 % NH ₃ løsning (1:1000)

Tillagningen av de brukte løsningene som er å finne appendiks 3.

5.2.1 Mobilfaser

Orbitrapen er et fintfølede instrument derfor er det viktig at glassene som brukes til mobilfasene er rene. Derfor håndvaskes og skylles de. De skylles både i vanlig vann og i ionebyttet vann før det avsluttes med MeCN. Dette ble gjort i tillegg til vanlig oppvaskmaskin. Denne prosessen ble utført for å fjerne kontamineringskilder som såperester og papirrester.

Tabell 5.2.2 - Mobilsammensetning

Mobilfase A	Mobilfase B	Mobilfase C	Loading buffer
5 % MeCN	95 % MeCN	50 % MeOH	3 % MeCN
0,1% FA	0,1 % FA	0	0,1 % FA
Ionebyttet vann	Ionebyttet vann	Ionebyttet vann	Ionebyttet vann

5.3 LC-MS/MS prosedyrer

5.3.1 LTQ Orbitrap

HPLC-parametere

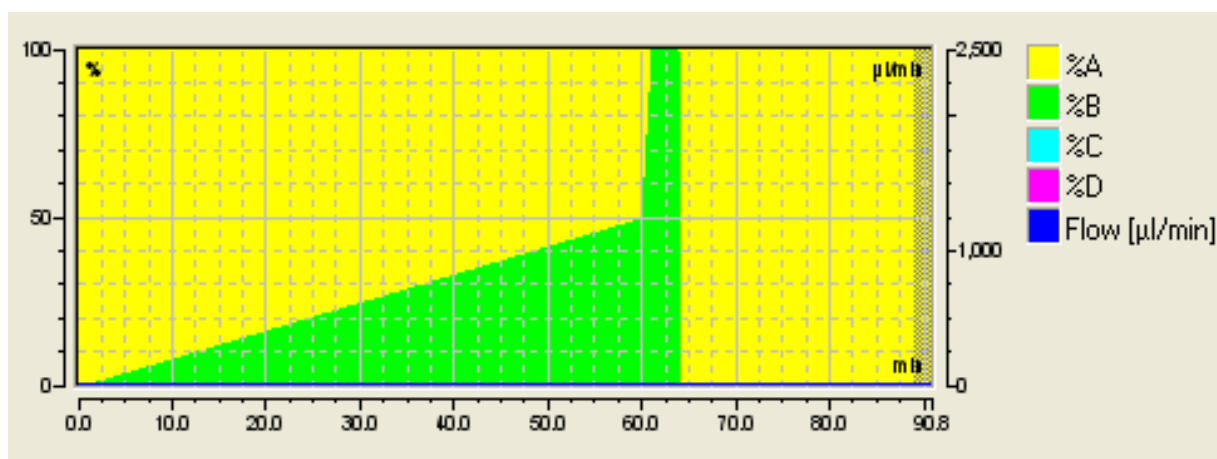
HPLC betingelser:

Mobilfase A:	5 % MeCN og 0,1 % FA resterende er ionebyttet vann
Mobilfase B:	95 % MeCN og 0,1 % FA resterende er ionebyttet vann
Trap kolonne:	BioBasic C8, 10 mm x 1 mm, 5 µm partikkelstørrelse
Kolonne:	Acclaim PepMap® C18, 75 µm x 150 mm, 3 µm partikkelstørrelse, 100Å
Injeksjonsvolum:	10 µL
Flow:	0,300 µL/min

Tabellen 5.3.1 viser den gradientlueringen som er brukt. Det utføres en re-ekvilibrering av kolonnen med 100 % mobilfase A fra tiden 64,10 min og holdes konstant til 86,00 min. Figur 5.3.1 viser grafisk fremstilling av gradienten.

Tabell 5.3.1 - Gradientlueringen for alle analyser som er blitt utført

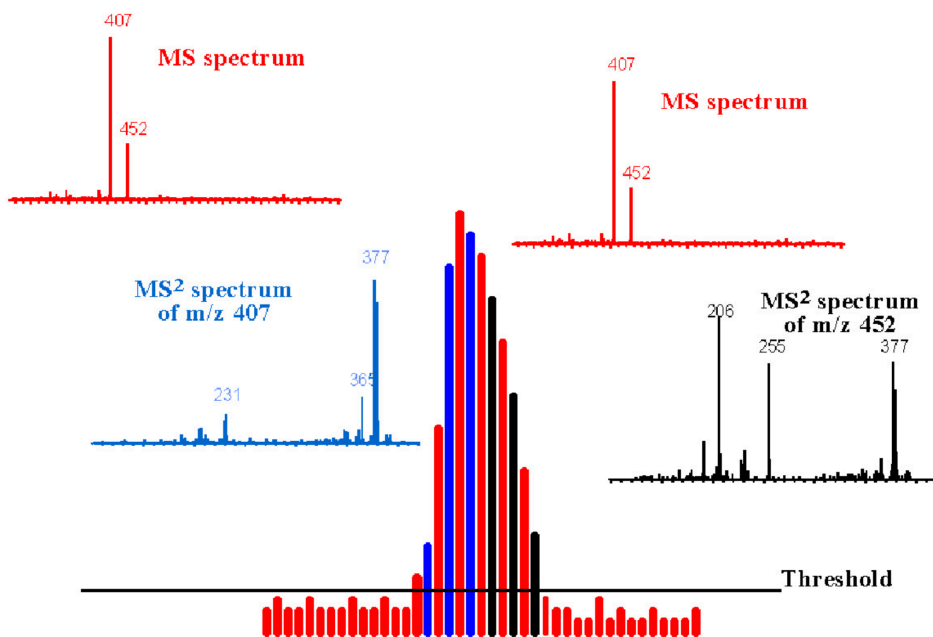
Tid (min)	Flow (µL/min)	Mobilfase A (%)	Mobilfase B (%)
0,000	0,300	100	0
60,000	0,300	50	50
61,000	0,300	0	100
64,000	0,300	0	100
64,100	0,300	100	0
74,000	0,300	100	0
75,000	0,400	100	0
85,000	0,400	100	0
86,000	0,300	100	0



Figur 5.3.1 - Grafisk fremstilling av gradienten. X-aksen viser tiden (min) og den venstre Y-aksen viser andel av mobilfase (%). Høyre Y-akse viser flow (µL/min). Helt til høyre i figuren vises fargene til mobilfasene.

MS-parametere

I alle forsøkene ble det benyttet ESI i positiv mode. Det ble benyttet en to scan metode til detektering av peptidene. I første scan event utfører orbitrapen en full scan singel MS (FTMS). I andre scan event plukker den ut det ionet med høyest intensitet som deretter fragmenteres i ionefellen. Fragmenteringen skjer i produkt ione scan MS/MS-mode (ITMS). Orbitrapen benytter en dynamisk eksklusjonsliste hvor alle peptidene som er blitt fragmentert havner. Her blir de fragmenterte ionene liggende i 15 sekunder før de igjen blir fjernet. Denne metoden bidrar til at også ioner med lavere intensitet kan bli fragmentert og gir derfor en mer utfyllende liste av fragmenterte peptider. Orbitrapen foretar fragmenteringer av seks forskjellige ioner ut i fra deres intensiteten basert på første scan event, men ekskluderer de som ligger på ekskluderings listen. Figur 5.3.2 viser hvordan eksklusjonsliste metoden fungerer. Tabellene 5.3.2 – 5.3.6 viser noen viktige MS-betingelser hvor en mer utfyllende liste er å finne i appendiks 1.



Figur 5.3.2 – Viser hvordan en dynamisk eksklusjonsliste fungerer. MS spekteret viser to forskjellige ioner med forskjellig intensitet. Hvor den med laveste intensitet også blir fragmentert fordi ionet med høyeste intensitet blir lagt i eksklusjonslisten [59].

Tabell 5.3.2 – Scan event 1 (FTMS)

Scantid	4 - 85 (min)
Scan range	250 – 2000 (<i>m/z</i> området)
Oppløsningen	30000

Tabell 5.3.3 – Scan event 2-7 (ITMS)

Data avhengig MS/MS scan	Stor båndbredde MS/MS av mest intense ion fra event 1, deretter foretar den fra event 2 og så videre. (dynamisk eksklusjon)
Activation type	CID
Minimum signal required	100
Isolation with	2
Normalized collision energy	35 (V)
Default charge state	2
Activation Q	0,250
Activation time	30

Tabell 5.3.4 – Data avhengig innstillinger

Exclusion mass with relative to low (ppm)	10
Exclusion mass with relative to high (ppm)	10
Reject mass with relative to low (ppm)	10
Reject mass with relative to high (ppm)	10

Tabell 5.3.5 – Dynamisk eksklusjons

Repeat count	1
Repeat duration	30
Exclusion list size	500
Exclusion duration	15
Exclusion mass with relative to low (ppm)	10
Exclusion mass with relative to high (ppm)	10

Tabell 5.3.6 -

Tørkegass	Nitrogen
Hastighet på tørkegass	10-20 L/min
Forstøvergass	Nitrogen
Kildespenning	5 kV
Kapillærtemperatur	275 °C

5.3.2 Triple quadrupole TSQ

I tillegg til LTQ Orbitrap ble det også utført få forsøk med triple quadrupole (TSQ). Dette var et lite forsøk som ble utført for å kontrollere MIP og NIP materialenes renhet før de ble brukt i forsøkene. I forsøket ble det benyttet metode som er beskrevet i artikkel [25]. En sammenfatning av denne er å finne i appendiks 2.

5.4 Trypsinering

I forsøkene er det brukt BSA fra to hoved løsninger med forskjellig konsentrasjon. Derfor er det foretatt to trypsineringer av BSA. BSA konsentrasjonene har en slutt konsentrasjon etter digesteringen på henholdsvis 15 nM og 600 nM. Siden BSA inneholder aminosyren cystein har proteinet disulfidbindinger. Av den grunn er det viktig å bruke reduksjonsreagensen (DTT) slik at disse bindingene kan brytes opp og alkyleringsreagenset (IAA) for å hindre at bindingene går sammen igjen. Bruken av DTT og IAA gjør at trypsinet lettere kan komme til for å kløvet opp proteinet.

Prosedyre for trypsinering av 15 nM BSA (2 mL total volum):

1. 20 μL av 100 $\mu\text{g/mL}$ BSA tilsettes 455 μL 50 mM ABC-buffer i ett LoBind eppendorfrør.
2. 2,5 μL av 100 mM DTT tilsettes prøven som settes i en termomikser (1100 rpm) ved 60 $^{\circ}\text{C}$ i 15 minutter.
3. Prøven avkjøles til romtemperatur.
4. 2,5 μL av 400 mM IAA tilsettes prøven som så blandes på en vortex-mikser før den settes mørkt i 15 minutter.
5. 20 μL av 5 $\mu\text{g/mL}$ trypsin tilsettes prøven (totalt 500 μL) som settes i en termomikser (1100 rpm) ved 37 $^{\circ}\text{C}$ over natten.
6. Dagen etter tilsettes 1500 μL 50 mM ABC-buffer.
Løsningen blir så ristet på en vortex-mikser med en kort tur innom sentrifugen.

Prosedyre for trypsinering av 600 nM BSA (2 mL totalt volum):

- 1) 80 μL av 1 mg/mL BSA tilsettes 403,5 μL 50 mM ABC-buffer i ett LoBind eppendorfrør.
- 2) 5 μL av 100 mM DTT tilsettes prøven som settes i en termomikser (1100 rpm) ved 60 $^{\circ}\text{C}$ i 15 minutter
- 3) Prøven avkjøles til romtemperatur
- 4) 7,5 μL av 400 mM IAA tilsettes prøven som så blandes på en vortex-mikser før den settes mørkt i 15 minutter.
- 5) 4 μL av 1 mg/mL trypsin tilsettes prøven (totalt 500 μL) som settes i en termomikser (1100 rpm) ved 37 $^{\circ}\text{C}$ over natten.

6) Dagen etter tilsettes 1500 μL 50 mM ABC-buffer.

Løsningen blir så ristet på en vortex-mikser med en kort tur innom sentrifugen.

5.5 Prosedyrebeskrivelse for samtlige forsøk

Forkortelser av de utførte forsøkene:

Exp 1 – SPE prosedyrer for C18

Exp 2 – SPE prosedyrer for MIP- og NIP

Exp 3 – Kapasitet test av MIP SPE

Exp 4 – PCA og PLS

Exp 5 – pH influens

Det blir etter kondisjonering og rekondisjoneringen (punkt 1) og 2) i prosedyren) byttet til nye LoBind eppendorfrør som kolonnene putes i (se kapittel 5.6.1 og figur 5.6.2). Heretter ble det benyttet nye LoBind eppendorfrør før hver flow through fra prøvepåsetting, vask og eluering.

All væske som tilføres ved hver eluering blir presset igjennom kolonnene ved bruk av sentrifugering. Det ble brukt sentrifugen Centrifuge 5804 med 7000 rpm i 3 min for Exp 1 og 6000 rpm i 3 min for Exp 2 – 5. Det er viktig å kontrollere at all væske er gått igjennom kolonnene slik at det ikke ligger igjen rester før neste trinn utføres.

1) Kondisjonering av sorbent:

100 μL MeOH.

2) Re-ekvilibrering av sorbenten:

a) Exp 1 – 4:

100 μL 50mM ABC buffer.

b) Exp 5:

i) pH 2,2 : 100 μL med re-ekvilibrering løsning 1.

ii) pH 7,05: 100 μL med re-ekvilibrering løsning 2.

iii) pH 9,5 : 100 μL med re-ekvilibrering løsning 3.

iv) pH 12 : 100 μL med re-ekvilibrering løsning 4.

3) Prøvepåsetting:

a) Exp 1 – 2:

50 μL med 12 nM BSA og 10 nM NLLGLIEA[K₁₃C₆¹⁵N₂].

- b) Exp 3:
- i) 50 μL med 480 nM BSA og 10 nM NLLGLIEA[$\text{K}_-^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$].
 - ii) 50 μL med 120 nM BSA og 10 nM NLLGLIEA[$\text{K}_-^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$].
 - iii) 50 μL med 48 nM BSA og 10 nM NLLGLIEA[$\text{K}_-^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$].
 - iv) 50 μL med 12 nM BSA og 10 nM NLLGLIEA[$\text{K}_-^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$].
- c) Exp 4:
- 50 μL med 48 nM BSA og 10 nM NLLGLIEA[$\text{K}_-^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$].
- d) Exp 5:
- i) pH 2,2 : 50 μL med prøveløsning 1.
 - ii) pH 7,05: 50 μL med prøveløsning 2.
 - iii) pH 9,5 : 50 μL med prøveløsning 3.
 - iv) pH 12: : 50 μL med prøveløsning 4.
- 4) Vask:
- a) Exp 1:
- Det utføres 13 vask på hver av de 3 kolonnene med en suksessiv og økende konsentrasjon av MeCN (starter med 5 %).
- 3 x 50 μL med X MeCN med ionebyttet vann, hvor X er 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 60 %, 70 % og 80 %.
- b) Exp 2 og Exp 4:
- Det utføres 8 vask på hver av de 6 kolonnene (3 MIP og 3 NIP) med en suksessiv og økende konsentrasjon av MeCN.
- 6 x 50 μL med X MeCN med ionebyttet vann, hvor X er 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 % og 40 %.
- c) Exp 3:
- Totalt 6 MIP SPE kolonner
- 6 x 250 μL 7,5 % MeCN med ionebyttet vann.
- d) Exp 5:
- Totalt 4 kolonner til hver pH (2 MIP og 2 NIP)
- i) pH 2,2 : 4 x 250 μL med vaskløsning 1.
 - ii) pH 7,05: 4 x 250 μL med vaskløsning 2.
 - iii) pH 9,5 : 4 x 250 μL med vaskløsning 3.
 - iv) pH 12 : 4 x 250 μL med vaskløsning 4.
- 5) Eluering:
- a) Exp 1:

Materialer & Metoder

- i) 50 μ L med 80 % MeCN med 0,1 % FA
- ii) 50 μ L med 80 % MeCN med 3 % FA
- b) Exp 2 -5:
 - 50 μ L med 80 % MeCN med 0,1 % FA.

Tillagningen av de brukte løsningene som er å finne appendiks 3.

5.6 SPE prosedyrer for C18

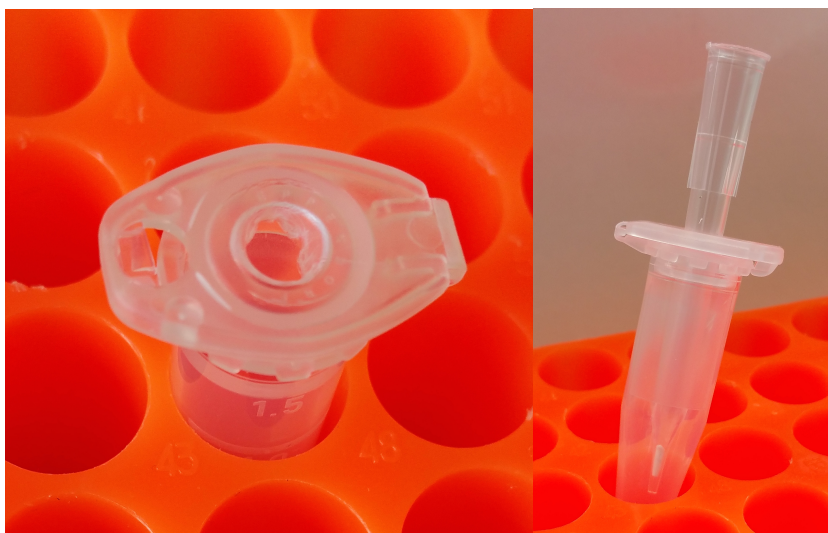
5.6.1 Tillagning av C18 SPE

I dette forsøket ble det brukt ”in house made” C18 SPE for å kunne se hvordan peptiden oppførte seg. I dette forsøket ble det produsert tre like C18 SPE kolonner som alle ble likt behandlet. Som venstre del av figur 5.6.1 viser, ble C18 SPE kolonnen produsert ved å bruke en glasspasteurpipette (150 mm) til å presse ut 5 små puter fra en Empore® ekstraksjons disk. Disse putene ble så puttett inn i en pipette fra Gilson Pipeteman® (1-300 μ L) ved hjelp av en metalltråd. Som figur 5.6.1 viser får man med denne pipettespissen pakket C18 ekstraksjons diskene så rett og tett som mulig.



Figur 5.6.1 – Venstre: viser produksjon av C18 SPE kolonnen. Høyre: viser en ferdig produsert C18 SPE kolonne.

Når så C18 SPE kolonnen er ferdig produsert lages det hull i en 1,5 mL eppendorfrør hvor kolonnen putes i. Figur 5.6.2 viser hvordan hullet i eppendorfrøret ser ut og hvordan kolonnen er puttett inn i eppendorfrøret.



Figur 5.6.2 – Viser hvordan hullet i eppendorfrøret ser ut og hvordan kolonnen er puttet inn i eppendorfrøret.

5.6.2 Bruk av C18 SPE

For prosedyrebeskrivelse se kapittel 5.5 (Prosedyrebeskrivelse for samtlige forsøk).

Tilberedningen av den brukte prøveløsningen er å finne i appendiks 3.

All *flow through* fra punkt 3) til 5) (se kapittel 5.5) blir fortynnet med 450 μL 0,1 % FA løsning før de ristes på en vortex-mikser med en kort tur innom sentrifugen. Prøvene blir så overført til vialer hvor det injiseres 10 μL for LC-MS-analyse på LTQ Orbitrap.

Det ble i tillegg tatt ut og laget en fortynning av prøveløsningen. 50 μL fra den tilberedte prøveløsningen ble fortynnet med 450 μL 0,1 % FA. Den fortynnede prøven blir ristet på en vortex-mikser med en kort tur innom sentrifugen. Dette blir så overført til en vialer hvor det injiseres 10 μL for LC-MS-analyse på LTQ Orbitrap.

Ved hjelp av programmet Xcalibur blir resultatene analysert. Xcalibur beregner ut et arealet monitorert på innhold av peptidene i forsøket. Siden det er brukt tre like C18 SPE kolonner som alle er behandlet likt med tanke på prøvopåsetting, vaskene og eluering er det derfor beregnet et gjennomsnitt for disse resultatene.

5.7 SPE prosedyrer for MIP og NIP

5.7.1 Tillagning av MIP- og NIP SPE

Det ble produsert tre MIP- og NIP SPE kolonner som alle ble likt behandlet. Siden materialet til MIP og NIP er pulverisert ble det brukt polyetylen frits for å hindre at materialet forsvinner ut i prøven. På grunn av størrelsen til fritsen ble det brukt en glasspasteurpipette (150 mm) til å presse ut en liten pute fra frits materialet. Puten ble så puttet inn i en

Materialer & Metoder

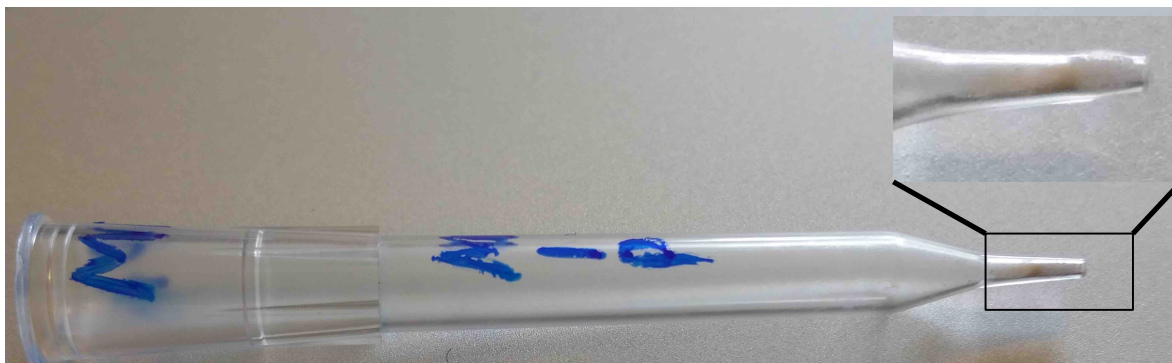
pipettespiss fra Gilson Pipeteman® (1-300 µL) ved hjelp av en metalltråd. Fordelen med å bruke denne pipettespissen er at fritsen dermed ligger så rett og tett som mulig.

Som nevnt ovenfor er MIP og NIP materialet pulverisert og for å kunne produsere disse SPE kolonnene må det derfor lages en slurry for å kunne tilføre rett mengde pulver til hver. Det ble brukt følgende fremgangsmåte til å produsere MIP- og NIP SPE.

- 1) Tre kolonner ble fylt med MIP materialet SiRMIPT2.
 - a) 10 mg av SiRMIPT2 materialet blandes med 250 µL 100 % MeCN. Blandingen ristes ved å bruke vortex-mikseren og vi får en slurry.
 - b) 20 µL (0,8 mg SiRMIPT2) av blandingen pipetteres kvikt over til SPE kolonnen. (Viktig at dette gjøres raskt siden SiRMIPT2 materialet er uløselig og det dannes hurtig bunnfall.)
 - c) Det lages så et hul i en 1,5 mL eppendorfrør hvor NIP SPE kolonnen puttes i.
 - d) MIP SPE sentrifugers på Centrifuge 5804 med 3000 rpm i 3 min for å fjerne MeCN.

- 2) Tre kolonner ble fylt med NIP materialet SiRNIPT2.
 - a) 10 mg av SiRNIPT2 materialet blandes med 250 µL 100 % MeCN. Blandingen ristes ved å bruke vortex-mikseren og vi får en slurry.
 - b) 20 µL (0,8 mg SiRNIPT2) av blandingen pipetteres kvikt over til SPE kolonnen. (Viktig at dette gjøres raskt siden SiRNIPT2 materialet er uløselig og det dannes hurtig bunnfall.)
 - c) Det lages så et hul i en 1,5 mL eppendorfrør hvor NIP SPE kolonnen puttes i.
 - d) NIP SPE sentrifugers på Centrifuge 5804 med 3000 rpm i 3 min for å fjerne MeCN.

Figur 5.7.1 viser en ferdig produsert MIP SPE, som det forstørrede bilde viser kan man se frits materialet (hvit del) og antyde det pulveriserte SiRMIPT2 materialet (lysegul farge).



Figur 5.7.1 – Viser en ferdig produsert MIP SPE kolonne.

5.7.2 Bruk av MIP- og NIP SPE

Som nevnt i kapittel 5.3.2 ble det utført forsøk for å kontrollere MIP og NIP materialenes renhet før de ble brukt til forsøket. Resultatet viste at de ikke inneholdt noen forurensninger.

Før prosedyrebeskrivelse se kapittel 5.5 (Prosedyrebeskrivelse for samtlige forsøk).

Tilberedningen av den brukte prøveløsningen er å finne i appendiks 3.

All *flow through* fra punkt 3) til 5) (se kapittel 5.5) blir fortynnet med 450 μL 0,1 % FA løsning før de ristes på en vortex-mikser med en kort tur innom sentrifugen. Prøvene blir så overført til vialer hvor det injiseres 10 μL for LC-MS-analyse på LTQ Orbitrap.

Det ble i tillegg tatt ut og laget en fortynning av prøveløsningen. 50 μL med 12 nM BSA og 10 nM NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂] ble derfor fortynnet med 450 μL 0,1 % FA. Den fortynnede prøven ble ristet på en vortex-mikser med en kort tur innom sentrifugen. Prøvene ble så overført til vialer hvor det injiseres 10 μL for LC-MS-analyse på LTQ Orbitrap.

Ved hjelp av programmet Xcalibur ble resultatene analysert. Xcalibur beregner ut et areal monitort på innhold av peptidene i forsøket. Siden det er brukt tre like MIP- og NIP SPE kolonner som alle er behandlet likt med tanke på prøvepåsetting, vaskene og eluering er det derfor beregnet et gjennomsnitt for disse resultatene.

5.8 Kapasitet test av MIP SPE

Til dette forsøket ble det brukt to like MIP SPE kolonner til hver BSA konsentrasjoner på 480 nM, 120 nM, 48 nM og 12 nM. NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂] (m/z 978,62) konsentrasjonen på samtlige prøver holdes likt på 10 nM. Selve produksjonen av MIP- og NIP SPE er forklart i kapittel 5.7.1 (Tillagning av MIP- og NIP SPE). Tilberedningen av disse prøveløsningene er å finne i appendiks 3.

5.8.1 Kapasitet test av MIP SPE Prosedyre

Før prosedyrebeskrivelse se kapittel 5.5 (Prosedyrebeskrivelse for samtlige forsøk).

All *flow through* fra punkt 3) til 5) (se kapittel 5.5) blir fortynnet med 450 μL 0,1 % FA løsning før de ristes på en vortex-mikser med en kort tur innom sentrifugen. Prøvene ble så overført til vialer hvor det injiseres 10 μL for LC-MS-analyse på LTQ Orbitrap.

Det ble i tillegg tatt ut og laget en fortynning av hver prøvekonsentrasjon. 10 μL fra hver prøvekonsentrasjon ble fortynnet med 90 μL 0,1 % FA. Den fortynnede prøven blir ristet på en vortex-mikser med en kort tur innom sentrifugen. Prøvene ble så overført til vialer hvor det injiseres 10 μL for LC-MS-analyse på LTQ Orbitrap.

Ved hjelp av programmet Xcalibur ble resultatene analysert. Ut i fra det monitorerte innholdet av NLLGLIEA[K_ $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$] (m/z 978,62) beregner Xcalibur ut arealet. Siden det er brukt to like MIP SPE kolonner for hver prøvekonsentrasjon som blir behandlet likt med tanke på prøvopåsetting, vaskene og eluering er det derfor beregnet et gjennomsnitt for disse resultatene.

5.9 PCA og PLS

Det statistiske programmet PCA og PLS fra ” The Unscrambler” ble brukt i dette forsøket for å kunne gi informasjon om MIP SPE og for å se på forskjellen mellom MIP- og NIP SPE. Det ble brukt tre like MIP- og NIP SPE kolonner og en prøvekonsentrasjon på 48 nM BSA og 10 nM NLLGLIEA[K_ $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$] (m/z 489,80). Selve produksjonen av MIP- og NIP SPE er forklart i kapittel 5.7.1 (Tillagning av MIP- og NIP SPE).

Tilberedningen av den brukte prøveløsningen er å finne i appendiks 3.

MIP- og NIP SPE Prosedyre:

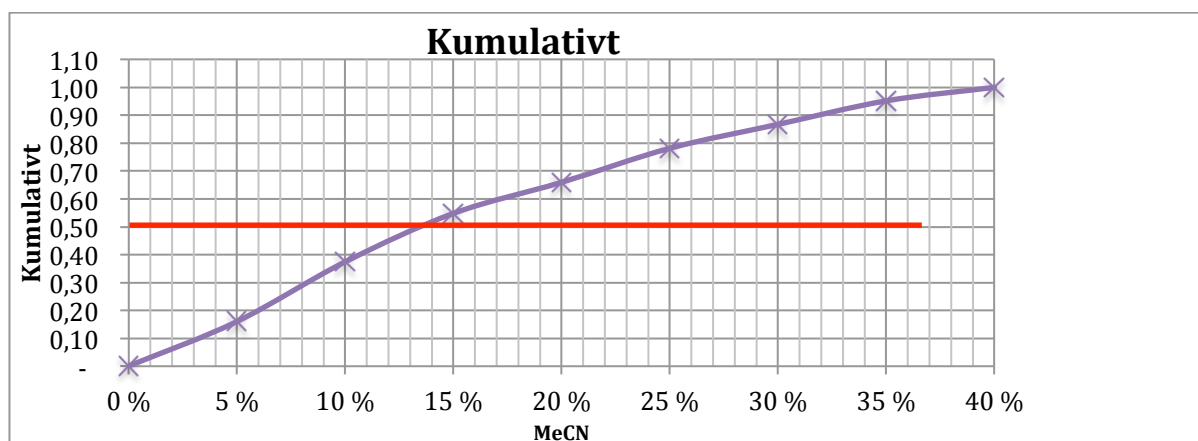
For prosedyrebeskrivelse se kapitel 5.5 (Prosedyrebeskrivelse for samtlige forsøk).

All *flow through* fra punkt 3) til 5) (se kapitel 5.5) blir fortynnet med 450 μL 0,1 % FA løsning før de ristes på en vortex-mikser med en kort tur innom sentrifugen. Prøvene blir så overført til vialer hvor det injiseres 10 μL for LC-MS-analyse på LTQ Orbitrap.

Det ble i tillegg tatt ut og laget en fortynning av selve prøven. 50 μL med 48 nM BSA og 10 nM NLLGLIEA[K_ $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$] ble derfor fortynnet med 450 μL 0,1 % FA. Den fortynnede prøven ble ristet på en vortex-mikser med en kort tur innom sentrifugen. Prøvene ble så overført til vialer hvor det injiseres 10 μL for LC-MS-analyse på LTQ Orbitrap.

Ved hjelp av programmet Xcalibur ble resultatene analysert. Xcalibur beregner ut et areal monitorert på innhold av peptidene i forsøket. Siden det er brukt tre like MIP- og NIP SPE kolonner som alle er behandlet likt med tanke på prøvopåsetting, vaskene og eluering er det derfor beregnet et gjennomsnitt for disse resultatene.

50 % MIP betyr den MeCN mengden hvor 50 % av peptidet er eluert. Det er i skjæringspunktet mellom den røde linjen og den kumulative kurven som gir ekstraksjons styrken for den enkelte peptid. Figur 5.9.1 viser et eksempel på hvordan 50 % av et eluert peptid beregnes.



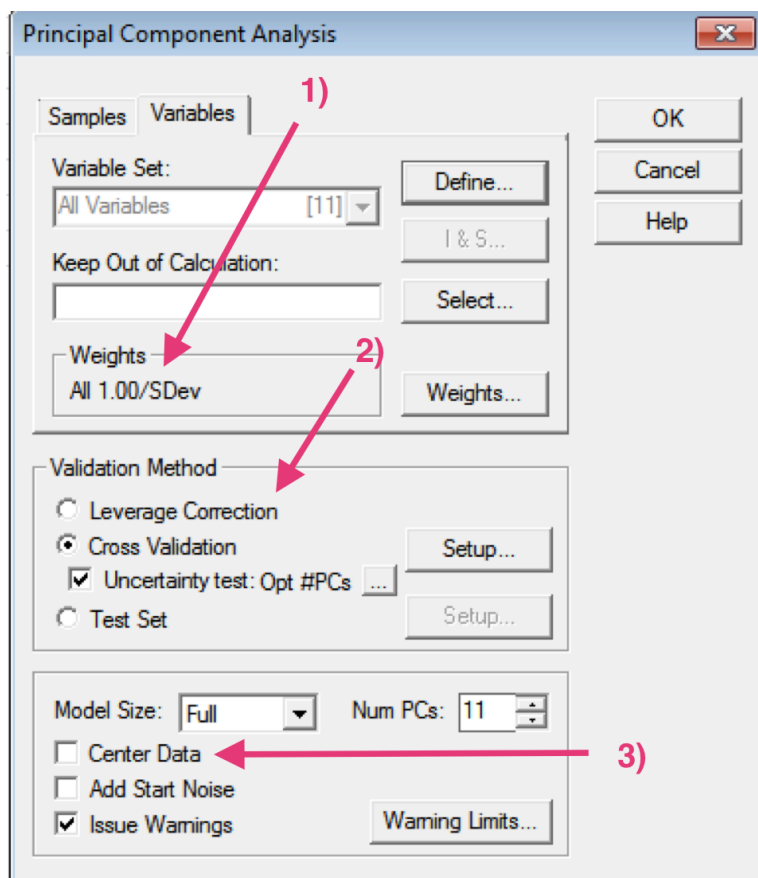
Figur 5.9.1 – Viser hvordan 50 % eluert peptid beregnes ved bruk av en kumulativ kurve.

Som tabell 5.9.1 viser ble også andre egenskaper til peptidene benyttet i PCA og PLS dataen. Her brukes egenskaper som peptidets størrelse (antall aminosyrer og g/mol), antall positivt og negativt ladede aminosyrer, antall aromatiske og hydrofobe aminosyrer, gravity (gravity - gir indikasjon på peptidets polaritet og hydrofobisitet, hvor et negativt fortegn indikerer hydrofil karakter [60]) og til slutt peptidets isoelektriske punkt (pI) (pI - pH som gir peptidet en nøytral form).

Tabell 5.9.1 – Viser variablene og verdiene for 50 % MIP og 50 % NIP som blir brukt i PCA og PLS.

The Unscrambler - [PCA data]												
File Edit View Plot Modify Task Results Window Help												
	n #A:	# neg. lad	# pos. lad	# polar	Aromatic	# hydrofo	vekt: g/mol	Gravy:	so-electric	50% MIP	50% NIP	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
FKDLGEEHF	1	10.0000	3.0000	3.0000	0.0000	2.0000	1.0000	1.2494e+03	-1.2500	5.3400	4.4000	4.4000
YICDNQDTIS	2	12.0000	2.0000	1.0000	5.0000	1.0000	2.0000	1.3865e+03	-0.8333	3.8800	2.6000	2.3000
CCTESLVNR	3	9.0000	1.0000	1.0000	3.0000	0.0000	2.0000	1.0242e+03	0.0000	6.1400	2.5000	2.3000
HLVDEPQNL	4	11.0000	2.0000	2.0000	2.0000	0.0000	4.0000	1.3055e+03	-0.5818	5.2100	13.5000	4.5000
YLYEIAR	5	7.0000	1.0000	1.0000	0.0000	2.0000	3.0000	927.0700	-7.1400e-02	6.8200	15.0000	15.0000
YNGVFQECQ	6	14.0000	3.0000	1.0000	3.0000	2.0000	2.0000	1.6338e+03	-0.9143	3.8300	2.3000	2.4000
KVPQVSTPT	7	15.0000	1.0000	2.0000	5.0000	0.0000	5.0000	1.6399e+03	-6.6600e-02	10.0900	16.7000	18.6000
KQTALVELLK	8	10.0000	1.0000	2.0000	2.0000	0.0000	5.0000	1.1424e+03	0.1900	9.8800	17.1000	18.4000
LVVSTQTALA	9	10.0000	0.0000	0.0000	4.0000	0.0000	6.0000	1.0022e+03	1.3900	6.0100	9.3000	6.9000
LVNELTEFAK	10	10.0000	2.0000	1.0000	2.0000	1.0000	4.0000	1.1633e+03	0.1300	4.2600	6.6000	5.0000
SLHTLFGDE	11	12.0000	2.0000	2.0000	2.0000	1.0000	3.0000	1.3626e+03	5.8300e-02	5.2100	4.3000	3.6000
QTALVELLK	12	9.0000	1.0000	1.0000	2.0000	0.0000	5.0000	1.0142e+03	0.6444	6.9400	13.9000	13.9000
LFTFHADICT	13	16.0000	3.0000	2.0000	3.0000	2.0000	4.0000	1.8511e+03	4.3800e-02	4.3000	6.7000	10.6000
LGEYGFQNA	14	13.0000	1.0000	1.0000	2.0000	2.0000	5.0000	1.4797e+03	0.2923	6.8900	19.6000	22.1000
SHCIAEVEKI	15	31.0000	8.0000	4.0000	3.0000	1.0000	10.0000	3.3988e+03	-0.4097	4.0600	0.0000	0.0000
NLLGLIEAK*	16	9.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000	5.0000	978.6000	0.7111	6.9400	16.0000	17.6000

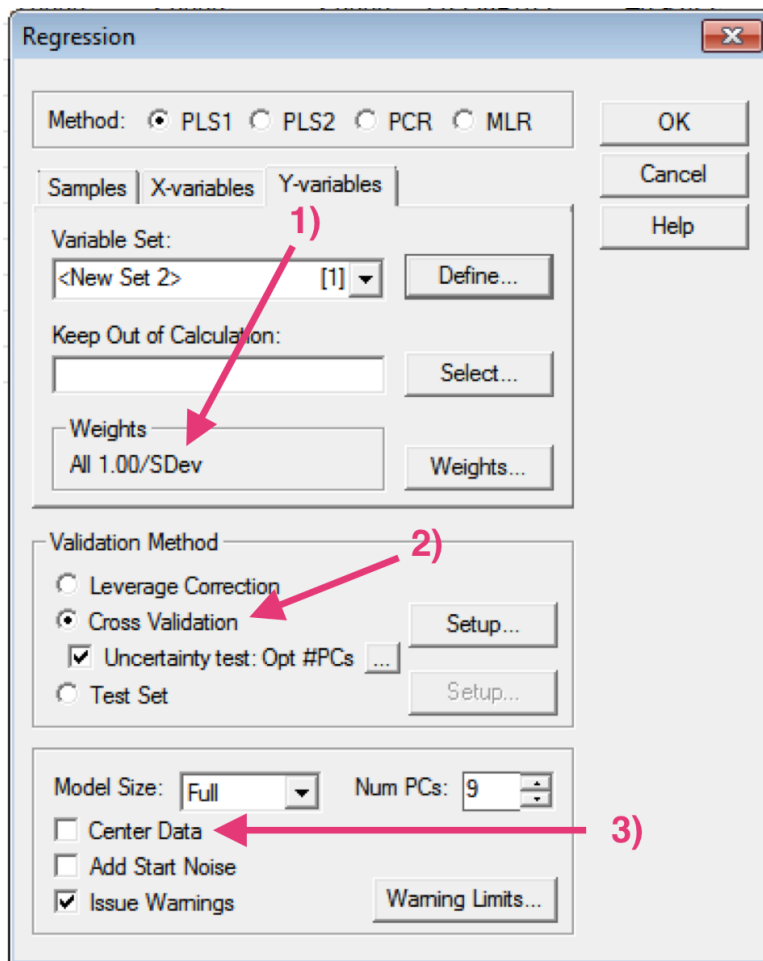
I figur 5.9.2 og 5.9.3 vises innstillingene som ble brukt i PCA og PLS med for forklaringer.



Figur 5.9.2 – viser hoved innstillingene som ble brukt i PCA. Pilene indikerer hvor det er gjort endringer i forhold til forhåndsinnstillingene.

I figur 5.9.2 viser hovedinnstillingene som er brukt i PCA. Pil 1) viser at det foretatt en normalisering som beregnes ut i fra Standardavviket. Pil 2) viser at det er huket av ”Cross Validation. Pil 3) viser at ”Center Data” er huket bort.

Figur 5.9.3 viser hovedinnstillingene som er brukt i PLS, innstillingene er like for sample, X-variables og i Y-variabels fanene. Her er det brukt de samme innstillingene som forklart ovenfor for figur 5.9.2.



Figur 5.9.3 – viser hoved innstillingene som ble brukt i PCA. Pilene indikerer hvor det er gjort endringer i forhold til forhåndsinnstillingene.

Resultater med plotter for PCA og PLS er å finne i kapittel 6.5 som omfatter resultater og diskusjon.

5.10 pH influens

Prøver med pH 2,2; 7,05 og 9,5 ble satt på. I den andre fasen ble det foretatt forsøk med pH på 12. Det ble brukt to MIP- og NIP SPE til hver pH verdi. Selve produksjonen av MIP- og NIP SPE er forklart i kapittel 5.7.1 (Tillagning av MIP- og NIP SPE).

Tilberedningen av de brukte re-ekvilibrering løsningene, prøveløsningene og vaskeløsningene er å finne i appendiks 3.

pH influens på MIP- og NIP SPE prosedyre:

Denne prosedyren er lik for hvert eneste pH forsøk. I re-ekvilibrering, prøvepåsetting og vasken er det viktig å bruke de tilhørende løsningsnumrene sammen. Dette er avgjørende for å holde riktig pH til hvert forsøk.

For prosedyrebeskrivelse se kapittel 5.5 (Prosedyrebeskrivelse for samtlige forsøk).

50 µL fra *flow through* fra punkt 4) (se kapittel 5.5) ble pipettert og fortynnet med 450 µL 0,1 % FA løsning. All *flow through* fra punkt 3) og 5) (se kapittel 5.5) ble fortynnet med 450 µL 0,1 % FA løsning. Deretter ble fortynningene ristet på en vortex-mikser med en kort tur innom sentrifugen. Prøvene ble så overført til vialer hvor det injiseres 10 µL for LC-MS-analyse på LTQ Orbitrap.

Det ble i tillegg tatt ut 100 µL av fortynnet prøveløsning 1 og 2 (avhenger av første eller andre forsøk i forsøket) se appendiks 3. De fortynnede prøvene ble ristet på en vortex-mikser med en kort tur innom sentrifugen. Prøvene ble så overført til vialer hvor det injiseres 10 µL for LC-MS-analyse på LTQ Orbitrap.

Ved hjelp av programmet Xcalibur ble resultatene analysert. Xcalibur beregner ut et areal monitorert på innhold av peptidene i forsøket. Til hvert pH forsøk ble det brukt to MIP- og NIP SPE kolonner. Siden disse er behandlet likt med tanke på prøvepåsetting, vasken og eluering ble det derfor beregnet et gjennomsnitt for disse resultatene.

5.11 Data verktøy

5.11.1 ProteinProspector

Dette er et data program som ligger gratis ute på internett. Når man kjenner sekvensen til sitt protein kan man bruke ProteinProspector til å finne ut hvilke peptider som dannes ved en proteolyse samt se hvilke fragmenter som dannes når disse peptidene fragmenteres. Som beskrevet i kapittel 6.1 (utvalgte peptider) kan programmet brukes når man manuelt ønsker å finne ut om signalene i MS/MS-spekteret stammer fra peptidet.

ProteinProspector inneholder mange programmer, men for å gjøre en proteolyse og dertil kunne se på dens peptiders fragmenter må linken ”MS-digest” først velges.

Ved søk av BSA ble følgende innstillinger brukt:

Digest:	Trypsin
Max. Missed Cleavages:	2
Constant Mods:	Carboxymethyl (Cystein)
Variable Mods:	Oxidation (M)

Peptide Mass:	250 – 4000 (<i>m/z</i>)
Report Multiple Charges:	Hukes av
User Protein Sequence:	BSA sekvensen
Instrument:	ESI-Q-high-res

5.11.2 Proteom Discoverer

Når LC-MS/MS-analysen har ferdig kjørt prøvene kan resultat filene bli analysert av Proteom Discoverer. Ut i fra antall treff av de tilhørende b- og y-fragmentene til peptidene fra MS/MS-spekteret kan programmet identifisere proteinet og presenterer antall treff i %. Dette programmet blir brukt får å identifisere de proteinene og/eller peptidene som er til stede i en prøve.

Ved søk av fra de forskjellige BSA konsentrasjonene ble følgende innstillinger brukt:

Søkealgoritme:	SEQUEST HT
Masse området:	250 – 5000 Da
Activation Type:	CID
S/N Threshold:	3
Database:	12-08-21_BSA.fasta
Enzyme:	Trypsin
Missed Cleavages:	2
Precursor Mass Tolerance:	10 ppm
Dynamic Side Chain Modifications:	Oxidation M
Static Side Chain Modifications:	Carboxymethyl C

6 Resultater & diskusjon

6.1 Utvalgte peptider

I disse forsøkene er det benyttet flere peptider i tillegg til NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂].

Peptidene har blitt generert ved å klippe BSA. Dette er blitt gjort for å kunne lage en mer kompleks prøve som vil kunne gi en bedre beskrivelse av hvordan MIP og NIP vil oppføre seg ved bruk av serum.

Tabellene 6.1.1 og 6.1.2 viser de ulike peptider som har blitt generert og blitt monitorert under forsøkene. Tabell 6.1.1 viser til peptidene etter tryptiskklipping av 12 nM BSA mens tabell 6.1.2 viser til peptidene etter tryptiskklipping av 48 nM BSA. I begge prøvene ble det tilsatt NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂] i en konsentrasjon på 10 nM.

MS/MS-spektrene av de utvalgte peptidene fra de tryptisk proteolyseringene i tabell 6.1.1 og 6.1.2 er å finne i appendiks 4.

Tabell 6.1.1 – Viser peptidsekvens, målt m/z -verdi og målte N-terminal og C-terminal fragmenter for prøveinnhold på 12 nM BSA og 10 nM NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂].

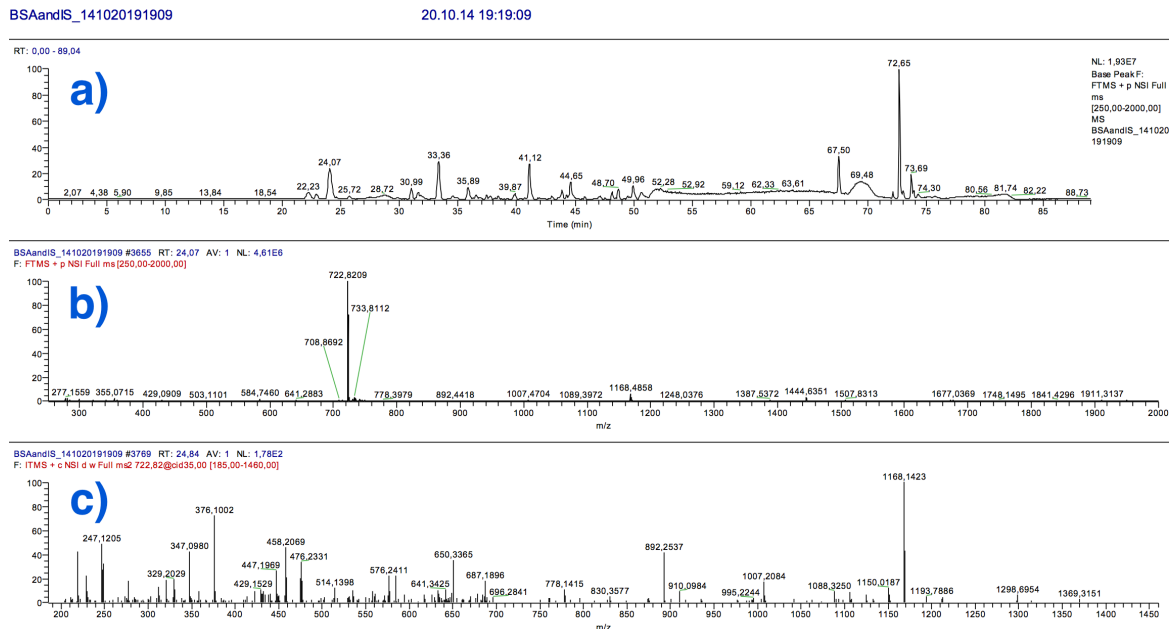
Peptid	m/z	N-terminalfragmenter	C-terminalfragmenter
YICDNQDTISSK	722,82	b_4^{2+} , b_2 , b_{11}^{2+} , b_5 -NH ₃ , b_6 -NH ₃ , b_7 -NH ₃ , b_7 -H ₂ O, b_9 -NH ₃ , b_{11} -NH ₃	y_3 , y_4 , y_{10}^{2+} , y_6 , y_7 , y_8 -NH ₃ , y_8 , y_9 , y_{10} , y_{11}
HLVDEPQNLIK	653,36	b_2 , b_3 , b_4 , b_5 , b_8 , b_9 , b_9^{2+} , b_{10}	y_6 , y_7 , y_8 , y_9 , y_{10}
KVPQVSTPTLVEVSR	820,47	b_3	y_4 , y_5 , y_{13}^{2+} , y_{14}^{2+} , y_8 , y_9 , y_{10} , y_{11} , y_{13}
KQTALVELLK	571,86	b_2 -NH ₃ , b_3 -NH ₃ , b_9^{2+} -H ₂ O, b_9^{2+} , b_6 , b_7 , b_8 , b_9 -NH ₃	y_2 , y_3 , y_4 , y_5 , y_9^{2+} -H ₂ O, y_9^{2+} -NH ₃ , y_6 , y_7 , y_8 , y_8 -H ₂ O, y_9 , y_9 -NH ₃
LVVSTQTALA	1002,58	b_8 , b_8 -NH ₃ , b_9 , b_9 -NH ₃	
LGEYGFQNALIVR	740,40	b_3 , b_4 , b_6 -H ₂ O, b_8 -NH ₃ , b_{10} -NH ₃ , b_{10} , b_{11} , b_{12} , b_{12} -NH ₃	y_2 , y_3 , y_4 , y_5 , y_9^{2+} -NH ₃ , y_{10}^{2+} , y_6 , y_7 , y_7 -NH ₃ , y_8 , y_9 , y_{10}
NLLGLIEA[K- ¹³ C ₆ ¹⁵ N ₂]	978,62	b_5	y_5 , y_6 , y_7 , y_8

Tabell 6.1.2 – Viser peptidsekvens, målt m/z -verdi og målte N-terminal og C-terminal fragmenter for prøveinnhold på 48 nM BSA og 10 nM NLLGLIEA[K- $^{13}\text{C}_6$ $^{15}\text{N}_2$].

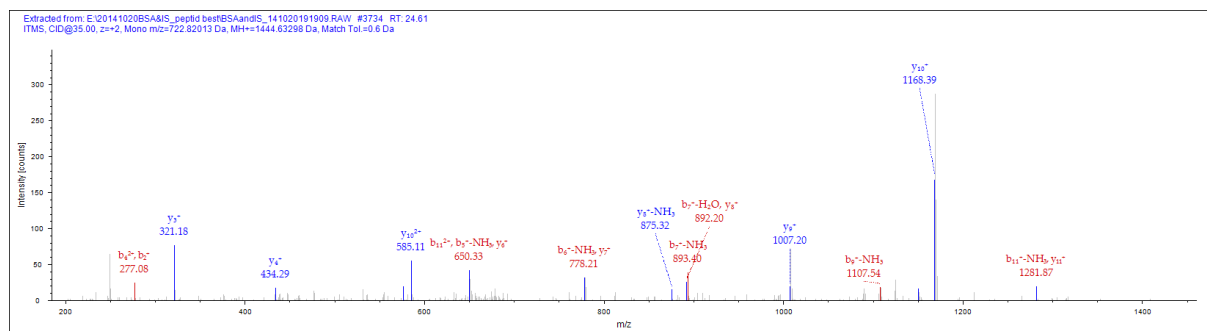
Peptid	m/z	N-terminalfragmenter	C-terminalfragmenter
FKDLGEEHFK	417,21	b_5^{2+} -H ₂ O, b_6^{2+} , b_3 , b_5 -NH ₃ , b_5 , b_9^{2+} , b_6 -H ₂ O, b_6	y_1 , y_2^{2+} , y_4^{2+} -H ₂ O, y_4^{2+} -NH ₃ , y_3^{2+} , y_7^{2+} , y_8^{2+} , y_9^{2+} , y_5 -NH ₃ , y_6 -H ₂ O, y_6 , y_8 -NH ₃ , y_8
YICDNQDTISSK	722,82	b_4^{2+} , b_2 , b_4 -H ₂ O, b_{11}^{2+} , b_5 -NH ₃ , b_6 -NH ₃ , b_7 -H ₂ O, b_9 -H ₂ O	y_3 , y_5 , y_{10}^{2+} , y_6 , y_7 , y_8 , y_9 , y_{10} -NH ₃ , y_{10}
CCTESLVNR	570,74	b_2 , b_4 -H ₂ O, b_5 -H ₂ O, b_6 -H ₂ O, b_7 -H ₂ O	y_1 , y_2 -NH ₃ , y_2 , y_5^{2+} , y_3 -NH ₃ , y_7^{2+} -H ₂ O, y_7^{2+} -NH ₃ , y_4 , y_5 , y_6 , y_7 -H ₂ O, y_7
HLVDEPQNLIK	653,36	b_2 , b_3 , b_4 , b_9^{2+} , b_5 , b_8 , b_9 , b_{10}	y_6 , y_7 -H ₂ O, y_7 , y_8 , y_9 , y_{10}
YLYEIAR	464,25	b_2	y_3 , y_4 , y_5
YNGVFQECQAEDK	875,34	b_3 , b_5 -NH ₃ , b_6 -NH ₃ , b_7 -NH ₃	y_3 -H ₂ O, y_4 , y_{10}^{2+} , y_6 , y_7 , y_8 , y_9 -NH ₃ , y_9 , y_{10} , y_{11} , y_{12}
KVPQVSTPTLVEVSR	547,32	b_2^{2+} -H ₂ O, b_5 , b_{11}^{2+} , b_{12}^{2+} , b_7 , b_{10}	y_2 , y_3^{3+} -H ₂ O, y_3 , y_8^{2+} , y_4 , y_5 , y_{13}^{2+} -H ₂ O, y_{13}^{2+} -NH ₃ , y_7 , y_8 -H ₂ O, y_8
KQTALVELLK	571,86	b_2 -NH ₃ , b_9^{2+} , b_5 , b_6 , b_8 , b_9 -NH ₃	y_2 , y_3 , y_9^{2+} -H ₂ O, y_9^{2+} -NH ₃ , y_5 , y_6 , y_7 , y_8 -H ₂ O, y_8 , y_9 -NH ₃ , y_9
LVVSTQTALA	1002,58	b_6 , b_7 , b_8 -H ₂ O, b_8 , b_9 -H ₂ O, b_9	
SLHTLFGDELCK	474,23	b_6^{2+} -H ₂ O, b_4 -H ₂ O, b_9^{2+} , b_5 -H ₂ O, b_6 , b_7	y_2 , y_3 , y_7^{2+} , y_9^{2+} -NH ₃ , y_4 , y_{10}^{2+} , y_5 , y_6 , y_7 -H ₂ O, y_7
QTALVELLK	507,81	b_2 -H ₂ O, b_7^{2+} -H ₂ O, b_7^{2+} -NH ₃ , b_4 -NH ₃ , b_6 -H ₂ O, b_7 -H ₂ O, b_8 -NH ₃	y_1 , y_4^{2+} -H ₂ O, y_2 , y_3 , y_4 -H ₂ O, y_5 , y_6 , y_7
LFTFHADICTLPDTEK	636,97	b_{11}^{2+} -H ₂ O, b_7 , b_8	y_5 , y_6 , y_7 , y_{14}^{2+}
LGEYGFQNALIVR	740,40	b_3 , b_4 , b_6 -H ₂ O, b_8 -NH ₃ , b_9 , b_{10} -NH ₃ , b_{10} , b_{11} , b_{12} -NH ₃ , b_{12}	y_2 , y_3 , y_4 , y_9^{2+} -NH ₃ , y_5 , y_{10}^{2+} , y_6 , y_7 -NH ₃ , y_7 , y_8 , y_9 , y_{10}
NLLGLIEA[K- $^{13}\text{C}_6$ $^{15}\text{N}_2$]	489,80	b_2 , b_3 , b_5 , b_6	y_3 , y_5 , y_6 , y_7 , y_8
SHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDKDVCK	879,16	b_{11}^{2+} , b_{12}^{2+} , b_{23}^{3+} -NH ₃ , b_{12}	y_{19}^{3+} , y_{17}^{2+} , y_{19}^{2+}

Resultater & diskusjon

For å bevise identiteten til disse peptidene ble både MS/MS, Proteom Discoverer og ProteinProspector [61] brukt. Figurene 6.1.1 og 6.1.2 viser data hentet ut fra en analyse. LGEYGFQNALIVR (m/z 722,82) ble her brukt som et eksempel.



Figur 6.1.1 – a) Kromatogrammet fra fullscan analyse. b) MS-spekter av topp ved RT = 24,07 min. c) MS/MS-spekter av m/z 722,82.



Figur 6.1.2 - MS/MS-spekteret av peptidet LGEYGFQNALIVR (m/z 722,82) med de respektive N-terminalfragmenter (b-fragmenter) og C-terminalfragmenter (y-fragmenter) (fra Proteom Discoverer).

Bekreftelsen kan gjøres på to måter:

- 1) Fra figur 6.1.1 kan man finne de eksperimentelle data som retensjonstid (figur 6.1.1 a)), m/z verdi av toppen (figur 6.1.1 b)) og MS/MS spekteret av denne toppen (figur 6.1.1 c)). Dette MS/MS-spekteret blir da sammenlignet med de teoretiske mulige fragmentene som er å finne i ProteinProspector [61]

2) På tilsvarende måte kan man se på figuren 6.1.2 som viser MS/MS-spekteret fra Proteom Discoverer. Figuren viser de respektive b- og y-fragmentene for peptidet. Begge metodene viser det samme hvor fragmentene blir som et fingeravtrykk for peptidet.

Tabell 6.1.3 viser m/z verdiene til b- og y-fragmentene til peptidet LGEYGFQNALIVR (m/z 722,82).

Tabell 6.1.3 – Teoretisk m/z verdier til b- og y-fragmenter av LGEYGFQNALIVR (m/z 722,82) [61]. Tallene trykket i fet-skrift og understrek er eksperimentelt bekreftet.

N-terminal												
b-NH ₃	---	---	---	---	650.21	778.27	893.29	994.34	1107.42	1194.46	1281.49	---
b-H ₂ O	---	---	---	535.18	649.22	777.28	892.31	993.36	1106.44	1193.47	1280.51	---
b	---	277.15	438.16	553.19	667.23	795.29	910.32	1011.37	1124.45	1211.48	1298.52	---
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C-terminal												
y	---	1281.56	1168.47	1007.46	892.43	778.39	650.33	535.30	434.26	321.17	234.14	147.11
y ⁺²	---	641.28	584.74	504.23	446.72	389.70	325.67	268.15	217.63	161.09	117.57	74.06
y-NH ₃	---	1264.53	1151.45	990.43	875.41	761.36	633.30	518.28	417.23	304.15	217.11	130.08
y-NH ₃ ⁺²	---	632.77	576.22	495.72	438.20	381.18	317.15	259.64	209.12	152.57	109.06	65.54
y-H ₂ O	---	1263.55	1150.46	989.45	874.42	760.38	632.32	517.29	416.25	303.16	216.13	---
y-H ₂ O ⁺²	---	632.27	575.73	495.23	437.71	380.69	316.66	259.15	208.62	152.08	108.57	---
	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1

Alle andre peptider fra tabell 6.1.1 og 6.1.2 ble bekreftet på samme måte. MS/MS-spekteret til disse er vist i appendiks 4.

6.2 C18 SPE

For å kunne se hvordan de ulike peptidene oppførte seg i et omvendt fase SPE system, ble en ”in house made” C18 SPE brukt. Som beskrevet i materialer og metoder (kapittel 5.6.2) ble alle vasketrinn (med økende konsentrasjon av MeCN) monitorert på innholdet av peptider ved hjelp av data programmet Xcalibur. Siden det er brukt tre like C18 SPE kolonner som alle er behandlet likt med tanke på prøvopåsetting, vask og eluering er det derfor beregnet et gjennomsnitt for disse resultatene. Resultatene ses i tabell 6.2.1.

Tabell 6.2.1 – Gjennomsnitt av arealene for peptidene i C18 SPE forsøket.

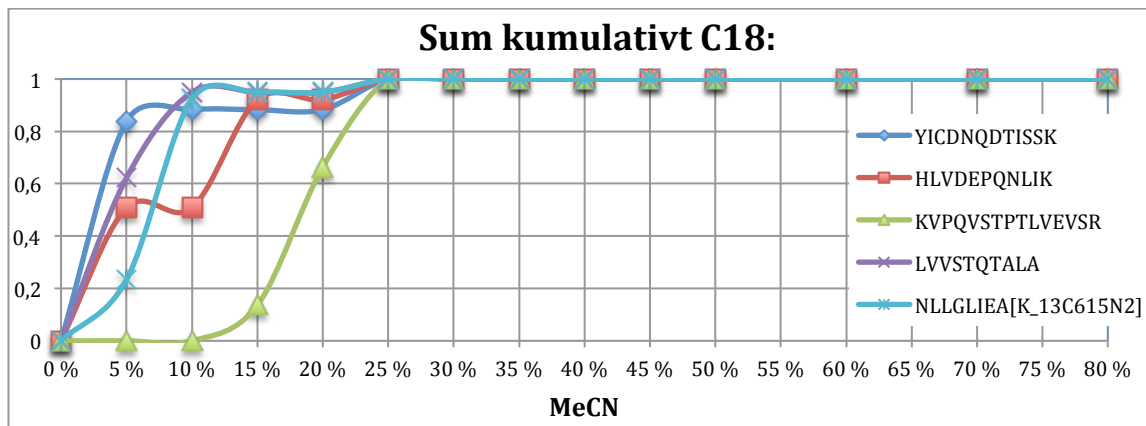
Gjennomsnitt					
	YICDNQDTISSK	HLVDEPQNLIK	KVPQVSTPTLVEVSR	LVVSTQTALA	NLLGLIEA[K- ¹³ C ₆ ¹⁵ N ₂]
BSA & IS	1 822 225	344 470	1 949 254	620 449	2 005 370
Wash SPE	YICDNQDTISSK	HLVDEPQNLIK	KVPQVSTPTLVEVSR	LVVSTQTALA	NLLGLIEA[K- ¹³ C ₆ ¹⁵ N ₂]
5 %	3 339 089	53 165	0	946 463	509 733
10 %	178 667	0	0	497 762	1 509 290
15 %	0	43 279	126 641	0	57 139
20 %	0	0	491 415	0	0
25 %	466 994	8 279	313 729	77 055	109 453
30 %	0	0	0	0	0
35 %	0	0	0	0	0
40 %	0	0	0	0	0
45 %	0	0	0	0	0
50 %	0	0	0	0	0
60 %	0	0	0	0	0
70 %	0	0	0	0	0
80 %	0	0	0	0	0
Sum	3 984 750	104 723	931 785	1 521 280	2 185 616

I tabellen er IS NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂].

For å få resultatene mer forståelig blir de presentert i en kumulativ kurve. Kumulative verdier lages ved å bruke arealet for hvert peptid ved en bestemt MeCN konsentrasjon som deles på summen til peptidets areal. Verdien for hver MeCN konsentrasjon legger man sammen slik at verdien bygger seg opp ved den økende MeCN konsentrasjon. Resultatet brukes til å lage den kumulative kurven. Tabell 6.2.2 viser resultatet kumulativt og hvor figur 6.2.1 viser de kumulative kurvene til disse peptidene.

Tabell 6.2.2 – Resultatene presentert kumulativt.

Kumulativt					
	YICDNQDTISSK	HLVDEPQNLIK	KVPQVSTPTLVEVSR	LVVSTQTALA	NLLGLIEA[K- ¹³ C ₆ ¹⁵ N ₂]
0 %	0	0	0	0	0
5 %	0,838	0,508	0	0,622	0,233
10 %	0,883	0,508	0	0,949	0,924
15 %	0,883	0,921	0,136	0,949	0,950
20 %	0,883	0,921	0,663	0,949	0,950
25 %	1	1	1	1	1,000
30 %	1	1	1	1	1,000
35 %	1	1	1	1	1
40 %	1	1	1	1	1
45 %	1	1	1	1	1
50 %	1	1	1	1	1
60 %	1	1	1	1	1
70 %	1	1	1	1	1
80 %	1	1	1	1	1



Figur 6.2.1 - Kumulativt ekstraksjon av C18 SPE ved forskjellig vask av de utvalgte peptidene.

Dette forsøket viste som forventet at de fleste peptidene samt NLLGLIEA[K_13C_6^15N_2] (m/z 978,62) kom tett på hverandre, hvis man ser bort i fra peptidet KVPQVSTPTLVEVSR (m/z 820,47). Ser man på dette peptidet har den en gravy på $-0,066$ [62] i forhold til NLLGLIEA[K_13C_6^15N_2] (m/z 978,62) som har en gravy på $0,711$ [62]. Det vil si at KVPQVSTPTLVEVSR (m/z 820,47) i utgangspunktet er mer polart enn NLLGLIEA[K_13C_6^15N_2] (m/z 978,62). I en C18 kolonne er det normalt at de mest polare peptidet kommer først ut. Forklaringen til denne anomaliteten vi ser i figur 6.2.1 for dette peptidet kan tenkes å ligge i restsilanol grupper som kan forekomme i C18 materialer. Restsilanol grupper har en pKa rundt 2 og vil derfor bli ladet ved pH over dette. Ved 50 mM ABC-buffer løsningen (pH 7,8 [25]) har peptidet KVPQVSTPTLVEVSR (m/z 820,47) en totalladning rundt $+1$ [63], mens NLLGLIEA[K_13C_6^15N_2] (m/z 978,62) vil ha en ladning rundt -1 [63]. Hvis denne antagelsen stemmer er det derfor ikke usannsynlig at det finnes en interaksjon mellom restsilanol gruppene og peptidet KVPQVSTPTLVEVSR (m/z 820,47).

6.3 MIP- & NIP SPE

For å se hvordan de samme peptidene fra C18 SPE forsøket oppførte seg på en MIP- og NIP SPE ble det produsert "in house made" MIP- og NIP SPE.

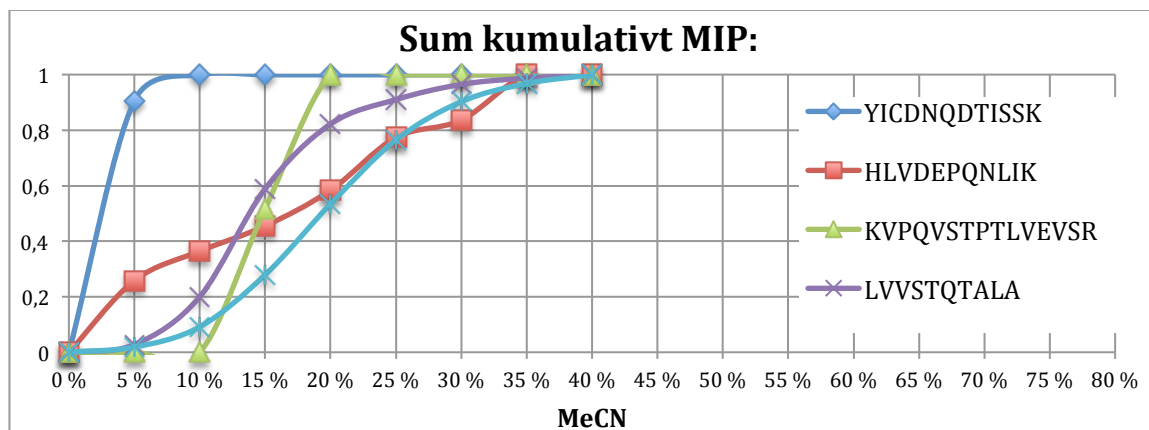
Som beskrevet i materialer og metoder (kapittel 5.7.2) ble MIP og NIP materialet testet for forurensninger av templatet. Ingen forurensninger ble påvist i denne testen og materialene kunne derfor trygt brukes i videre forsøk.

I tillegg ble det beskrevet (kapittel 5.7.2) at alle vasketrinn (med økende konsentrasjon av MeCN) ble monitorert på innholdet av peptider ved hjelp av data programmet Xcalibur.

Tabeller over resultatene for MIP- og NIP SPE finnes i tabell 5.1 – 5.4 i appendiks 5.

6.3.1 MIP mot C18

Ved å se på den kumulative kurven til MIP SPE mot C18 SPE kan man foreta en sammenligning for å se om det foreligger forskjellig retensjon mellom kolonnene. Figur 6.3.1 viser de kumulative kurvene av de samme peptidene brukt i C18 SPE forsøket.

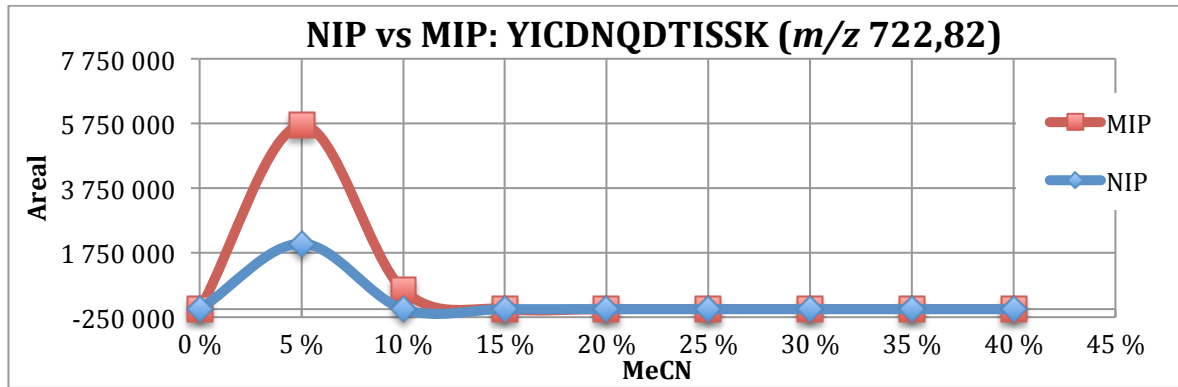


Figur 6.3.1 - Kumulativt ekstraksjon av MIP SPE ved forskjellig vask av de valgte peptidene. Bakgrunnen for kurvene vises i tabellen 5.2 i appendiks 5. IS er her NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂].

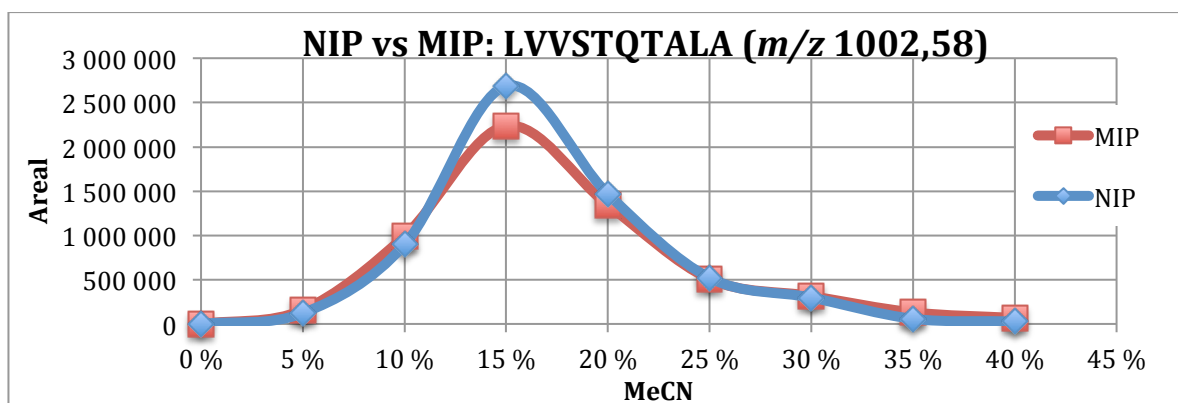
Ved å sammenligner figurene 6.2.1 og 6.3.1 kommer det frem at MIP SPE har en svakere helning av de fleste peptidene, mens peptidet LGEYGFQNALIVR (m/z 722,82) oppfører seg ganske likt og er nesten 100% ekstrahert allerede ved 10 % MeCN. Isolert sett har NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂] (m/z 978,62) en svakere helning og forflyttet seg slik at den blir liggende blant de siste ekstraherte peptidene. En svakere helning indikerer at det foreligger en større retensjon av samtlige peptid (unntaket er LGEYGFQNALIVR (m/z 722,82)). Det vil si at disse peptidene har en større interaksjon med MIP SPE sorbenten i forhold til C18 SPE sorbenten.

6.3.2 MIP mot NIP

Ved å sammenligne de monitorerte peptidene på MIP og NIP kolonnene kan man se om det foreligger samme retensjonsprofil mellom de to materialene. Som beskrevet i materialer og metoder (kapittel 5.7.2) blir det for hver brukte konsentrasjon av MeCN i vasken beregnet et areal monitorert på innholdet av den enkelte peptid som så settes inn i en graf som er å finne i figurene 6.3.2 til 6.3.4. Tabellene til disse resultatene er å finne i appendiks 5 (tabell 5.1 og 5.3).

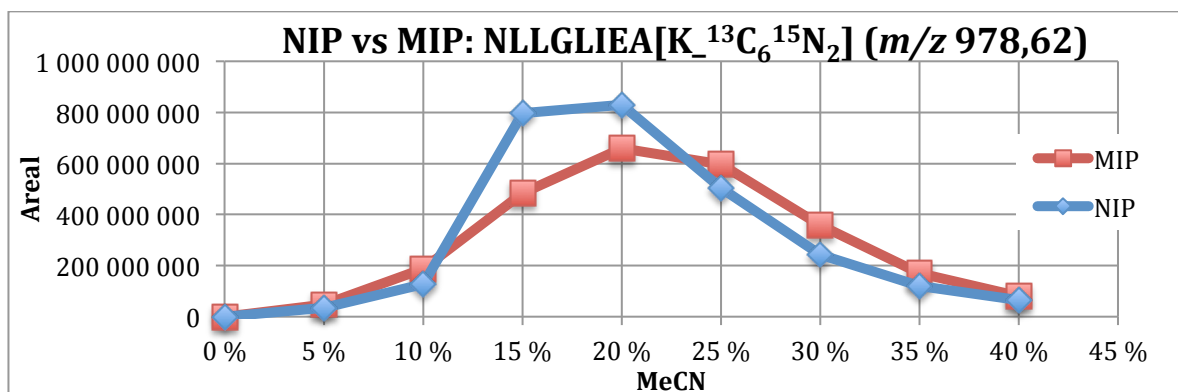


Figur 6.3.2 - Viser MIP og NIP sine konsentrasjoner i alle vasketrinnene til peptidet YICDNQDTISSK (m/z 722,82). Bakgrunnen for figuren vises i tabellene 5.1 og 5.3 i appendiks 5.



Figur 6.3.3 - Viser MIP og NIP sine konsentrasjoner i alle vasketrinnene til peptidet LVVSTQATALA (m/z 1002,58). Bakgrunnen for figuren vises i tabellene 5.1 og 5.3 i appendiks 5.

Ut i fra figur 6.3.2 og 6.3.3 ser man at MIP og NIP materialene har samme elueringsmønster i forhold til % MeCN for peptidene YICDNQDTISSK (m/z 722,82) og LVVSTQATALA (m/z 1002,58). Ved å sammenlikne de overnevnte figurene mot figur 6.3.4 ser man en klar forskjell på elueringsmønsteret mellom MIP og NIP materialet.

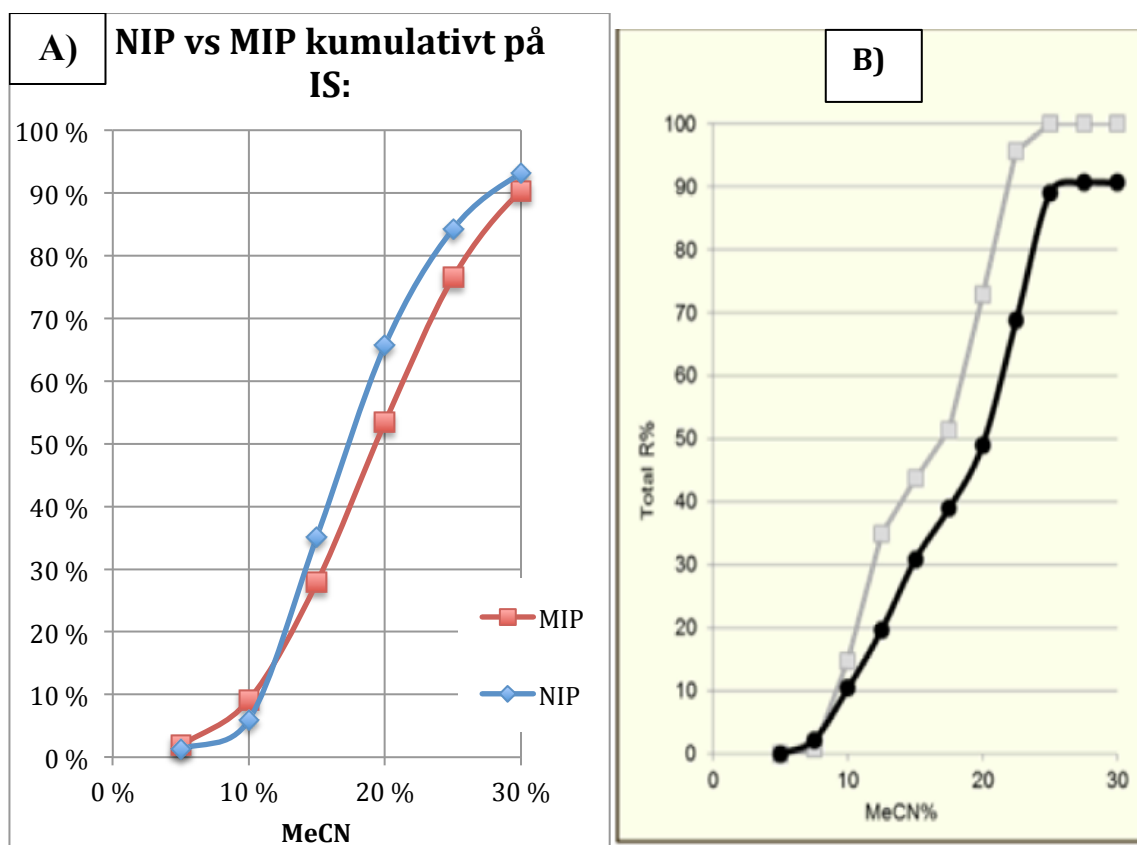


Figur 6.3.4 - Viser MIP og NIP sine konsentrasjoner i alle vasketrinnene til peptidet NLLGLIEA[K_13C6_15N2] (m/z 978,62). Bakgrunnen for figuren vises i tabellene 5.1 og 5.3 i appendiks 5.

Resultater & diskusjon

Figur 6.3.4 viser at kurvene til MIP- og NIP SPE nå er forskjøvet i forhold til hverandre. Selv om kurvene er forskjøvet i forhold til hverandre viser kurven for MIP- og NIP SPE samme toppkonsentrasjon av MeCN. Dette til tross for at det kan se ut til at toppene vil ligge på forskjellige MeCN konsentrasjoner. Om toppene vil ligge fra hverandre eller ikke kan jeg ikke si med sikkerhet siden det ikke er foretatt noen målinger av vask konsentrasjon mellom 15 % og 20 % .

For å tydeliggjøre den forskjellige retensjonsprofilen ble det foretatt en kumulativ sammenligning av NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂] (*m/z* 978,62) på MIP- og NIP SPE. Figur 6.3.5 A) viser tydelig kumulativ ekstraksjonsforskjell mellom MIP- og NIP SPE ved suksessiv og økende vask konsentrasjon av MeCN.



Figur 6.3.5 – A) Viser kumulativ ekstraksjons forskjell for MIP og NIP ved forskjellig vask for IS NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂]. Bakgrunn for de kumulative kurvene finnes i tabellene 5.2 og 5.4 i appendiks 5. IS er her NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂].

Figur 6.3.5 – B) er fra artikkelen Antibody-Free Biomarker Determination: Exploring Molecularly Imprinted Polymers... [25].

Begge figurene 6.3.5 A) og B) viser MIP- og NIP SPE sammenlignet kumulativt for NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂] (*m/z* 978,62) ved forskjellig vask. Som det kommer frem fra disse figurene kan man se at mine funn A) stemmer gått overens med artikkelens funn B) [25].

6.4 Kapasitet test av MIP SPE

Antall peptider som er brukt hittil har vært for lavt og av den grunn er flere peptider ønsket. Den beste løsningen for å få til dette er å øke konsentrasjonen av BSA slik at flere peptider blir synlige med MS. Det er viktig å foreta en kapasitet test når man skal øke konsentrasjonen, fordi andre peptider kan oppta plassen til NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂] slik at signaturpeptidet ikke får plass på sorbenten. Siden det ikke finnes noe data om metningsgrensen for denne MIP SPE ble det utført en kapasitet test. Kapasitet testen er foretatt for å sikre at det ikke foreligger noe metning av materialet når konsentrasjonen av BSA øker. Ved å se på utbyttet av NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂] (konstant konsentrasjon) når mengde med klippet BSA øker vil man kunne se om kapasiteten av MIP materialet ”brukes” av andre peptider enn NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂].

Kapasitet testen ble utført som beskrevet i materialer og metoder (kapittel 5.8.1) ved å beregnet et areal monitorert på innholdet av NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂] i elueringstrinnene flow through, vask og eluering. Ut i fra disse arealene ble det beregnet utbytte.

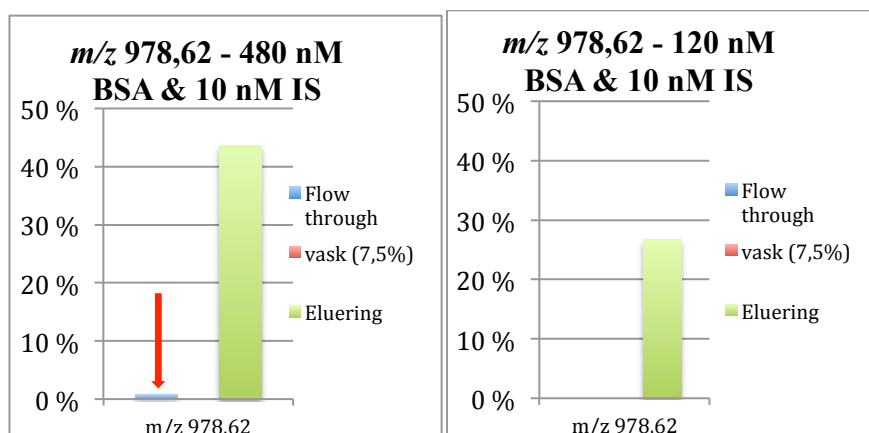
For et peptid beregnes utbytte ved å ta resultatet fra hvert eluerings trinn og deler dette på prøvens startkonsentrasjon. Tabell 6.4.1 viser både arealgjennomsnittet og utbyttet for NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂] (*m/z* 978,62) (IS) for de forskjellige konsentrasjonene til BSA.

Tabell 6.4.1 - Viser gjennomsnitt og utbytte for NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂] (*m/z* 978,62) ved de forskjellige konsentrasjonene til BSA.

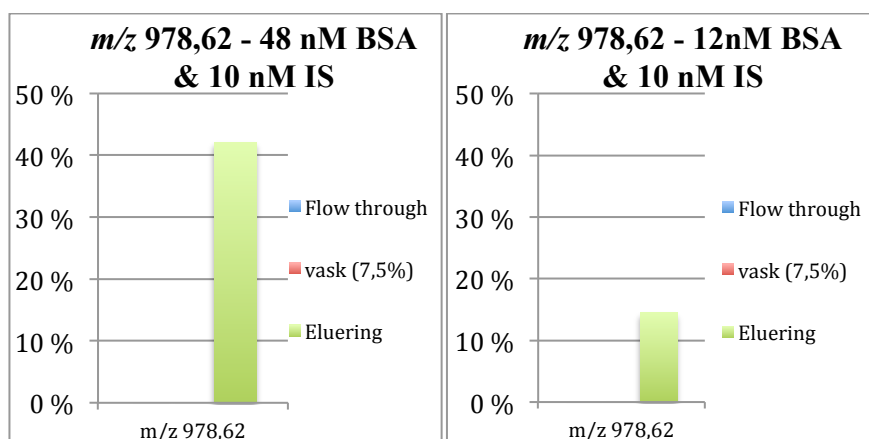
Gjennomsnitt		Utbytte	
	<i>m/z</i> 978,62		<i>m/z</i> 978,62
BSA & IS_480_10	7 864 626	BSA & IS_480_10	7 864 626
Flow through	57 510	Flow through	0,73 %
Wash gj (7,5%)	0	vask (7,5%)	0 %
Eluering gj	3 432 248	Eluering	43,64 %
	<i>m/z</i> 978,62		<i>m/z</i> 978,62
BSA & IS_120_10	4 412 063	BSA & IS_120_10	4 412 063
Flow through	0	Flow through	0 %
Wash gj (7,5%)	0	vask (7,5%)	0 %
Eluering gj	1 180 490	Eluering	26,76 %
	<i>m/z</i> 978,62		<i>m/z</i> 978,62
BSA & IS_48_10	1 902 859	BSA & IS_48_10	1 902 859
Flow through	0	Flow through	0 %
Wash gj (7,5%)	0	vask (7,5%)	0 %
Eluering gj	799 626	Eluering	42,02 %
	<i>m/z</i> 978,62		<i>m/z</i> 978,62
BSA & IS_12_10	1 519 667	BSA & IS_12_10	1 519 667
Flow through	0	Flow through	0 %
Wash gj (7,5%)	0	vask (7,5%)	0 %
Eluering gj	219 968	Eluering	14,47 %

Resultater & diskusjon

Figurene 6.4.1 og 6.4.2 viser utbytte i elueringstrinnene flow through, vask og eluering av NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂] (*m/z* 978,62) med forskjellig BSA konsentrasjoner.



Figur 6.4.1 - Viser flow through, vask og eluering av NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂] (*m/z* 978,62) (IS) for de respektive konsentrasjonene. Rød pil viser flow through.



Figur 6.4.2 - Viser flow through, vask og eluering av NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂] (*m/z* 978,62) (IS) for de respektive konsentrasjonene.

Figurene 6.4.1 og 6.4.2 viser at det ikke er antydninger til kapasitet problemer opptil 120 nM BSA. Figurene viser at det er et varierende utbytte, men det finnes ingen NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂] (IS) i *flow through* eller i vasken noe som tyder på at IS sitter på sorbenten selv ved høye BSA konsentrasjoner. Kapasitet problemet ser ut til å starte fra konsentrasjonen 480 nM BSA. Her er flow through på 0,73 %. Dette ser man i figur 6.4.1 hvor det er merket en rød pil på flow through. En konsentrasjon på 48 nM BSA og 10 nM NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂] (*m/z* 978,62) ga ønsket antall peptider og et godt utbytte for NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂]. Ut i fra disse resultatene ble de resterende forsøk utført med en prøvekonsentrasjon på 48 nM BSA og 10 nM NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂].

6.5 Multivariat analyse

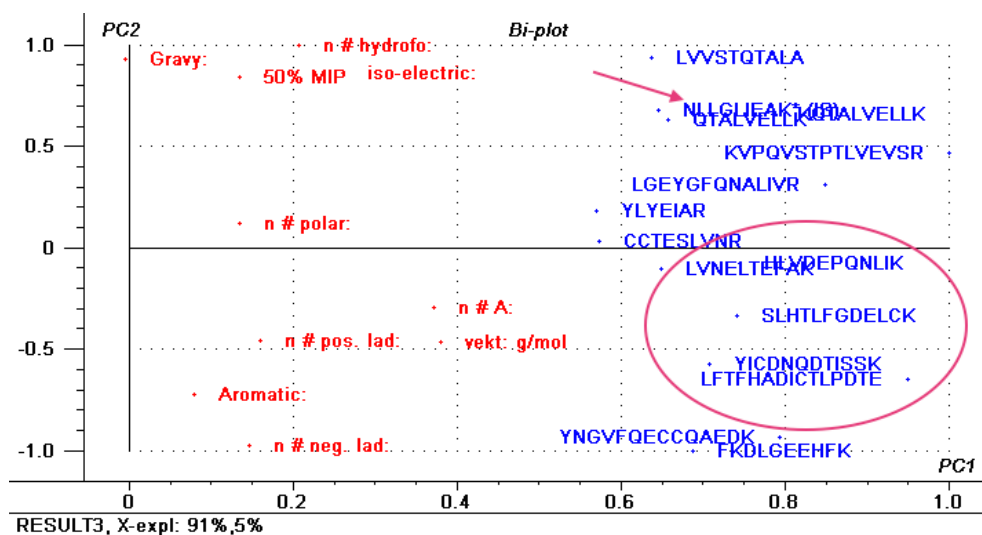
I dette forsøket ble det benyttet de statistiske data verktøy PCA og PLS får å kunne beskrive retensjons mekanismen i MIP SPE og til å se om det finnes noen forskjeller mellom MIP- og NIP SPE.

6.5.1 PCA

På bakgrunn av resultatene til kapasitet testen av MIP SPE (kapittel 6.4) ble det foretatt en nytt forsøk med konsentrasjon på 48 nM BSA og 10 nM NLLGLIEA[K₁₃C₆¹⁵N₂] (*m/z* 489,80). Som beskrevet i materialer og metoder (kapittel 5.9) ble alle vasketrinn (økende konsentrasjon MeCN fra 5 – 40 %) monitorert på innholdet av peptider. Tabellene til disse resultatene er å finne i appendiks 6 (tabell 6.1 – 6.4).

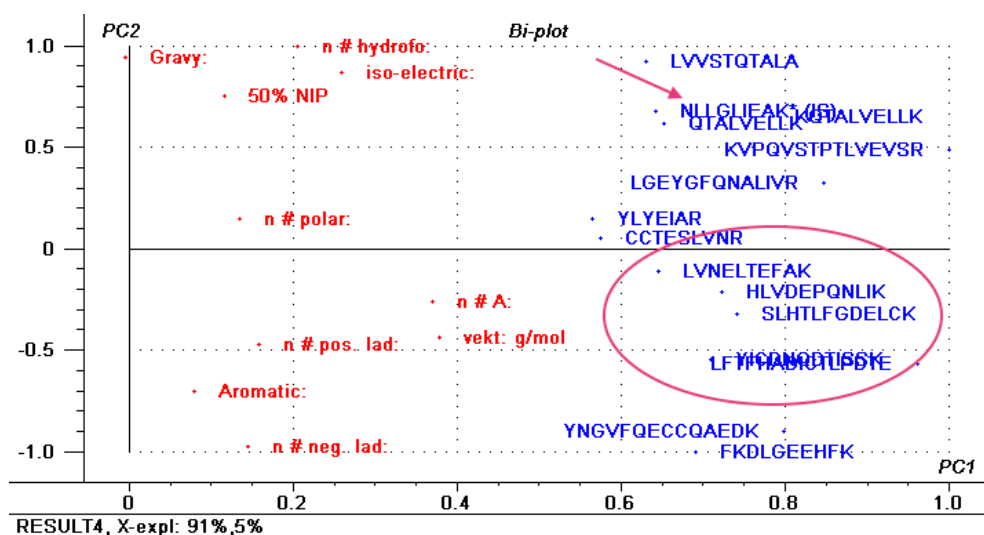
Etter å ha brukt de statistiske programmene i henhold til data og innstillinger som vist i materialer og metoder (kapittel 5.9) ble resultatene som vist nedenfor.

I en *score* plott vises hvordan observasjonene (peptidene) er fordelt på de brukte Principal Component (PC) linjene. Ved deteksjon av spesielle observasjoner kan grunnen til disse observasjonene ofte antydes ved å legge på *loading* (variablene som beskriver peptidenes egenskaper) over *score* plotten. Figurene 6.5.1 og 6.5.2 viser PCA bi-plott for MIP og NIP. En bi-plott inneholder både *loading* (rødt) og *scores* (blå).



Figur 6.5.1 - viser PCA bi-plott av MIP

Resultater & diskusjon

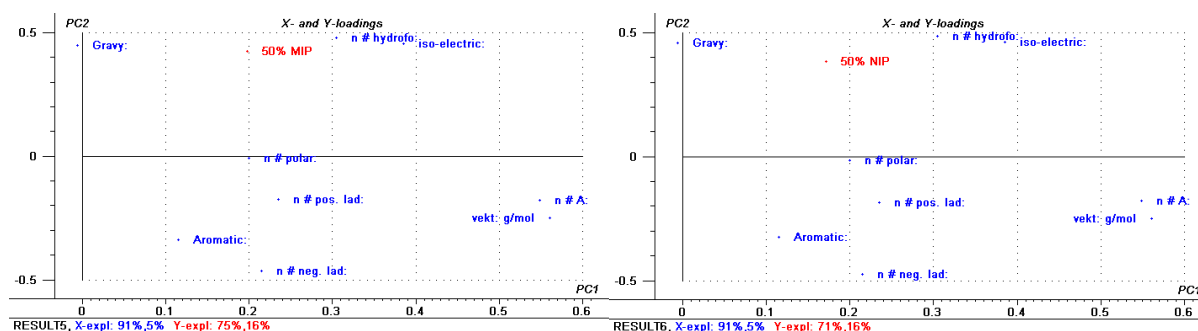


Figur 6.5.2 viser PCA bi-plott av NIP.

Både figur 6.5.1 og 6.5.2 indikerer at peptidene som ligger i nærheten av NLLGLIEAK* (se rød pil) har meget like egenskaper. Fordi disse peptidene også ligger nærme de isoelektriske og hydrofobiske punktene i figuren indikerer dette at de også har dette som felles egenskaper. Figurene viser også at det ikke er mye som skiller mellom MIP og NIP sine egenskaper (rødt merket). Det er allikevel noe forskjell i hvordan enkelte peptider er orientert i forhold til hverandre (rød sirkel i figurene).

6.5.2 PLS

Det neste steget er å ta i bruk PLS. PLS er en metode som brukes til å predikere en Y-verdi. Y-verdien for disse peptidene er den MeCN mengden hvor 50 % av peptidene er eluert. Derav navnet 50 % MIP og 50 % NIP.

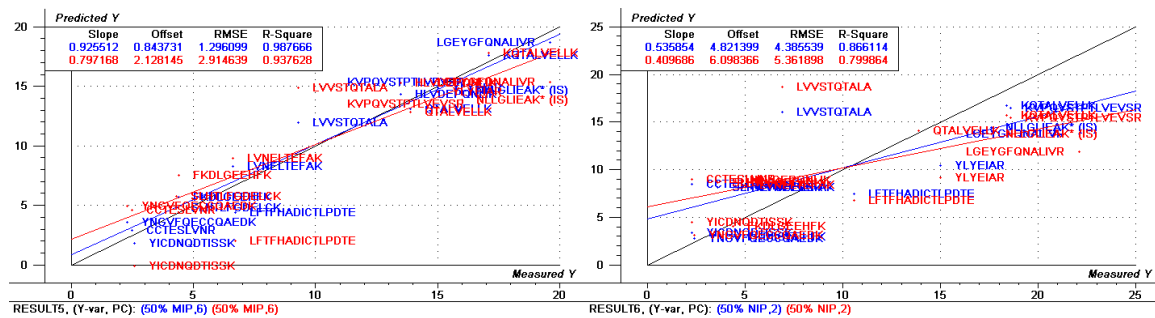


Figur 6.5.3 – Venstre: viser PLS over X- og Y-loadings for MIP. Høyre: viser X- og Y-loadings for NIP.

Figur 6.5.3 viser X- og Y-loadings for MIP og NIP. Plottene viser at det ikke er noen store forskjeller mellom MIP og NIP. I plotten til MIP er X-forklart med 91 % i PC1 og 5 % i PC2.

Dette er likt hos både MIP og NIP plotten. En liten forskjell ligger i forklaringsmodellen for Y. Her er Y-forklart med 75 % i PC1 og 16 % i PC2 hos MIP mot 71 % i PC1 og 16 % i PC2 hos NIP. Dette betyr at forklaringsmodellene er sammenlignbare siden de nesten er helt identiske.

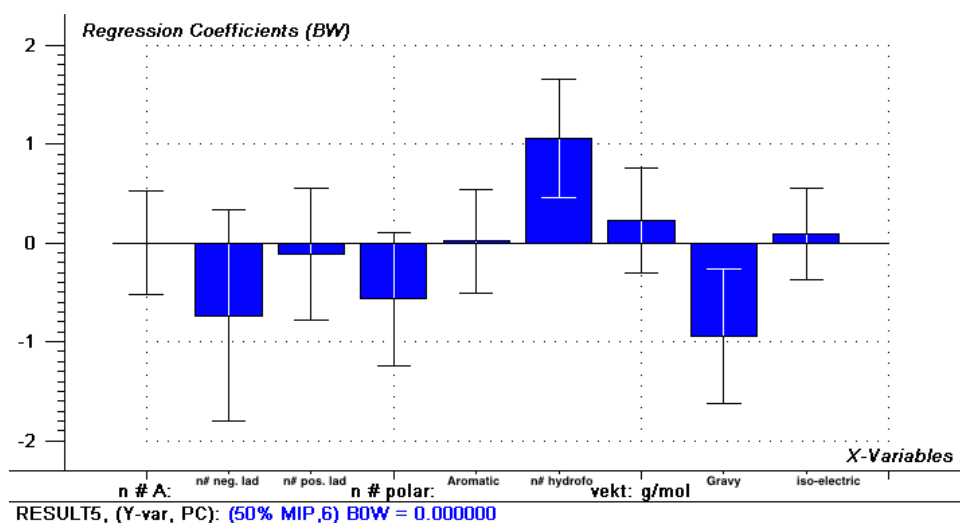
De neste plottene (figur 6.5.4) viser de predikert Y-verdien for MIP og NIP.



Figur 6.5.4 – Venstre: viser predikert Y-verdi for MIP. Høyre: viser predikert Y-verdi for NIP.

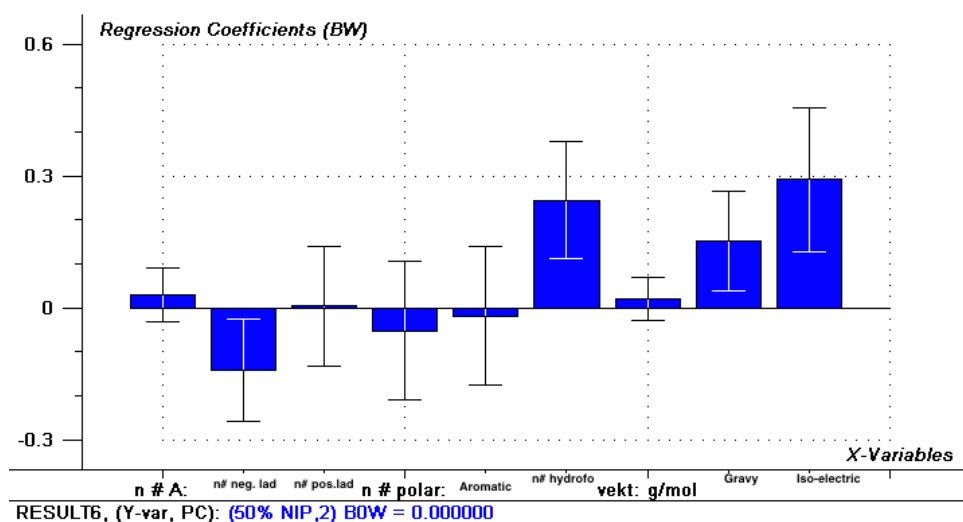
Resultatene for den predikerte Y-formelen viser at det er størst feil (RMSE) hos NIP. For MIP er $(y = a \times x + b \pm \text{feilmarginen})$; $y = 0,797168 \times x + 2,128145 \pm 2,914639$. For NIP er feilmarginen større; $y = 0,409686 \times x + 6,098366 \pm 5,361898$. I figurene ovenfor er også korrelasjons koeffisientene (R-Square) oppgitte. Korrelasjons koeffisienten sier noe om hvor godt den statistiske modellen samsvarer med en rett linje. Korrelasjons koeffisienten for MIP er på 0,937628, mens for NIP er den på 0,799864. Som begge verdiene og figurene viser er den statistiske modellen for NIP dårligere enn for MIP.

Disse verdiene for den predikerte Y-verdien forklarer lite om egenskapene for MIP og NIP. Plottene i figur 6.5.5 og 6.5.6 viser regresjonskoeffisienten. Disse vil gi en bedre indikasjon for hvilke egenskaper som er av størst betydning.



Figur 6.5.5 - Viser regresjons koeffisienten for MIP.

Regresjonskoeffisienten for MIP (figur 6.5.5) antyder at negativladning, polaritet, hydrofobisitet og gravity er av størst betydning for den predikerte Y-verdien for et peptid. Regresjonskoeffisienten for NIP (figur 6.5.6) antyder mye av det samme, men her er også den isoelektriske egenskapen til peptidet viktig.



Figur 6.5.6 - Viser regresjons koeffisienten for NIP.

Ut i fra dette kan man si at PLS indikerer et tosidig resultat. Den ene siden indikerer at gravity er viktig og ut i fra denne er derfor polariteten og hydrofobisiteten viktig. Dette siden gravity gir en indikasjon på peptidets polaritet og hydrofobisitet [60]. På den andre siden indikerer PLS resultatet at negativladning er av betydning. Det sistnevnte er logisk siden tryptiske peptider vil gi multiple protoneringer i et surt miljø og er derfor viktig for at det skal dannes en interaksjon mellom peptidet og polymeren.

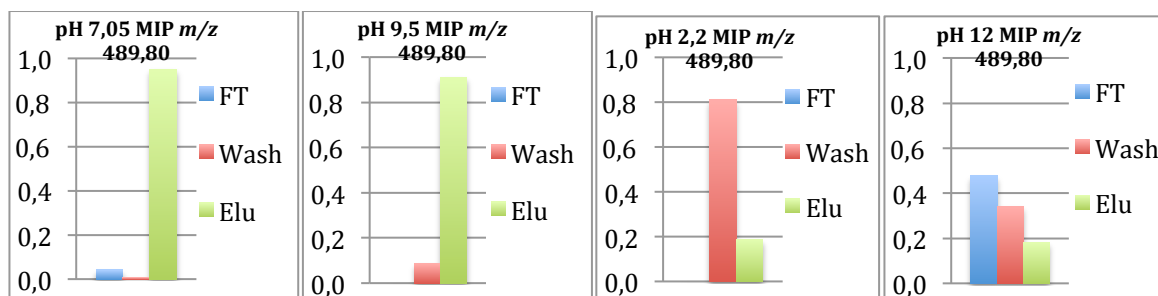
6.6 pH influens

PLS gir indikasjon på at negativladning, polaritet, hydrofobisitet og gravity er av betydning for interaksjoner mellom peptidet og polymeren. Peptidene og den funksjonelle monomeren kan bli påvirket av pH. Dette vil derfor avgjøre om det blir en elektrostatiskeinteraksjon mellom peptidet og polymeren eller ikke. Derfor ble det gjort forsøk på pH verdiens betydning på MIP og NIP.

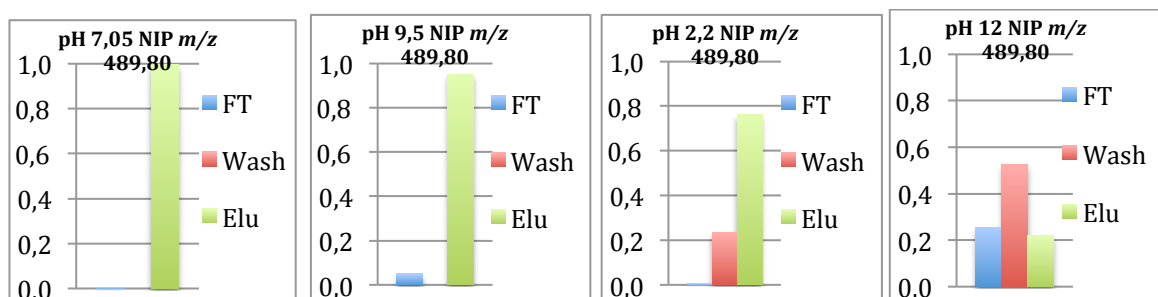
I dette pH forsøket ble det utført pH kontroll i trinnene: re-ekvilibrering, prøvopåsetting og vasken. I forsøket ble det brukt pH på 2,2; 7,05; 9,5 og 12. Elueringen ble likt utført med 80 % MeCN med 3 % FA.

6.6.1 Effekt av pH på NLLGLIEAK

Som beskrevet i materialer og metoder (kapittel 5.10) ble det beregnet et areal monitorert på innholdet av peptidene i elueringstrinnene flow through, vask og eluering. Ut i fra disse arealene ble det beregnet utbytte. Dataene ble så normalisert for lettere å kunne sammenligne resultatene. Normalisering ble utført ved å ta utbytte til hvert elueringstrinn for så å dele på totalelueringen. Tabeller over resultatene for MIP- og NIP SPE finnes i appendiks 7 (tabell 7.1 – 7.6). Figurene 6.6.1 og 6.6.2 viser normalisert utbytte for MIP- og NIP SPE i de forskjellige elueringstrinnene ved de forskjellige pH verdiene.



Figur 6.6.1 - Viser normalisert utbytte for NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂] (*m/z* 489,80) ved forskjellig pH for MIP. Bakgrunnen for kolonnene vises i tabellene 7.3 i appendiks 7.



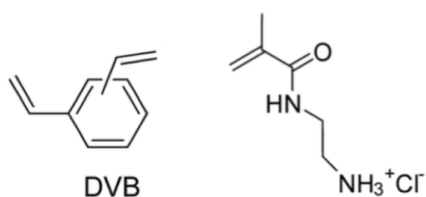
Figur 6.6.2 - Viser normalisert utbytte for NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂] (*m/z* 489,80) ved forskjellig pH for NIP. Bakgrunnen for kolonnene vises i tabellene 7.6 i appendiks 7.

Resultatene viser ingen store forskjeller av NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂] (*m/z* 489,80) mellom MIP og NIP i pH 7,05 og i pH 9,5, men forskjellen er tydelige ved pH 2,2 og pH 12. Ved pH 2,2 har MIP en større eluering i vasken i forhold til NIP, mens det i elueringstrinnet er klart størst nivå hos NIP. Ved pH 12 er det hos begge økt nivå av flow through (mindre fester seg i kolonnen). Det er størst nivå av flow through hos MIP. Deretter snur det seg med en størst nivå av vask i NIP. Elueringstrinnet ser ut til å være på et likt nivå. Resultatet kan tyde på at når vi nærmer oss isoelektriske punktet (pI) til EAMA ved pH på 12 vil EAMA miste de elektrostatiske kreftene og vi får derfor en økt flow through. Ved pH 12 er det en økt flow

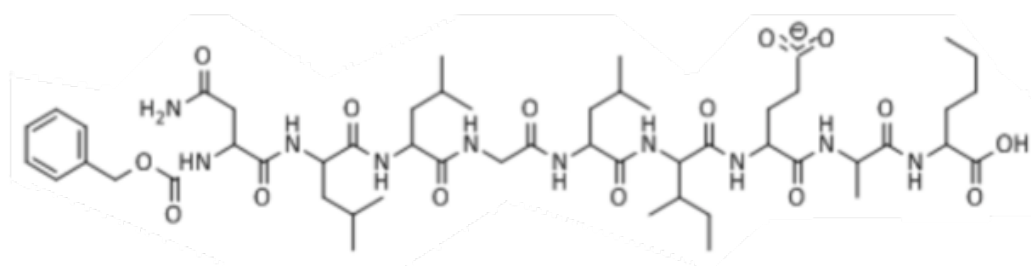
Resultater & diskusjon

through hos MIP i forhold til NIP. Dette kan skyldes at det er flere slike bindingssteder i hulrommet (*cavity*) til MIP.

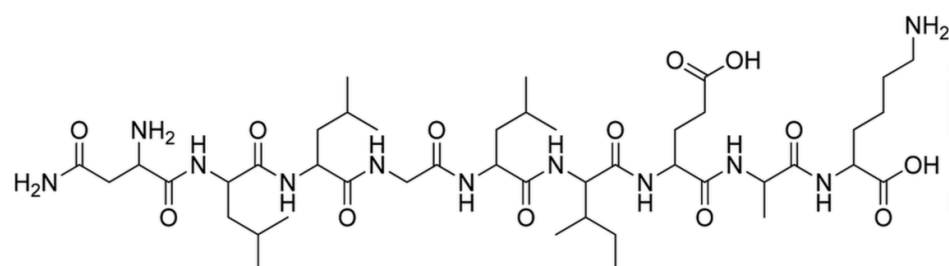
MIP er syntetisert via en RAFT modifisert mesoporøs silika, divinylbenzene (DVB) og N-(2-aminoethyl)-2-methacrylamide hydrochloride (EAMA) [25]. I tillegg er det brukt templatet Z-NLLGLIEA-Nle-OH [25]. Figur 6.6.3 viser DVB og EAMA, mens figur 6.6.4 viser templatet og figur 6.6.5 viser signaturpeptidet NLLGLIEAK.



Figur 6.6.3 – Venstre: DVB. Høyre: EAMA [24].

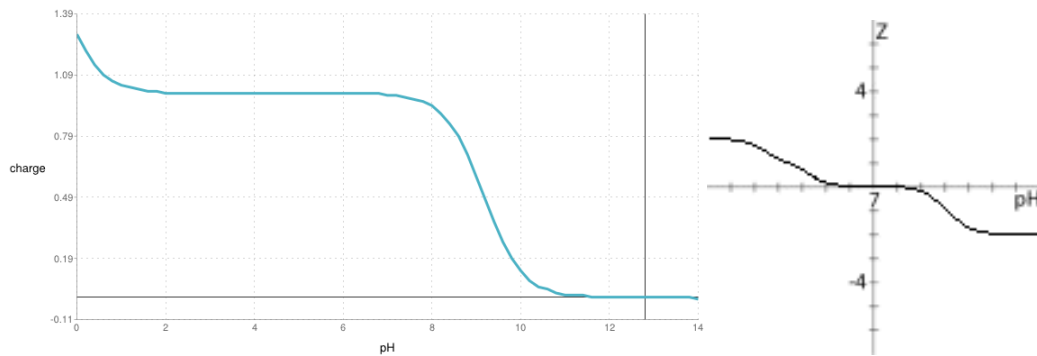


Figur 6.6.4 - Viser templatet Z-NLLGLIEA-Nle-OH.



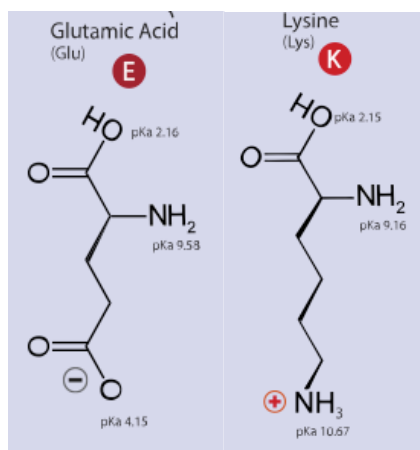
Figur 6.6.5 – Viser signaturpeptidet NLLGLIEAK [24].

DVB fungerer her som en hydrofob kryssbinder, mens EAMA fungerer som en funksjonell monomer. Template gir MIP sitt særegne egenskap i form av et hulrom (*cavity*) med bindingssteder noe NIP ikke har. Hos både MIP og NIP vil DVB kunne føre til hydrofobe bindinger til molekyler, mens EAMA vil kunne gi elektrostatiske bindinger ved bestemte pH verdier. Figur 6.6.6 viser det pI for EAMA og NLLGLIEAK.



Figur 6.6.6 – Venstre: viser det isoelektriske punktet for EAMA [64]. Høyre: viser isoelektrisk punkt for NLLGLIEAK [63].

EAMA har et pI på 12.71 [64] og i følge figur 6.6.4 er pKa verdien rundt 9,6. For NLLGLIEAK er pI på 6,94 [63]. Det betyr at for NLLGLIEAK vil den totale ladningen være 0 når pH for peptidet holdes rundt pI. I dette pH området vil syre delen av peptidet bestående av glutamin (E) med pKa verdi på 4,15 og enden av peptidet bestående av lysin (K) sin syre del med pKa verdi på 2,15 være ladet (se figur 6.6.7).



Figur 6.6.7 - Viser en deprotonert glutamin syre og en protonert lysin [65].

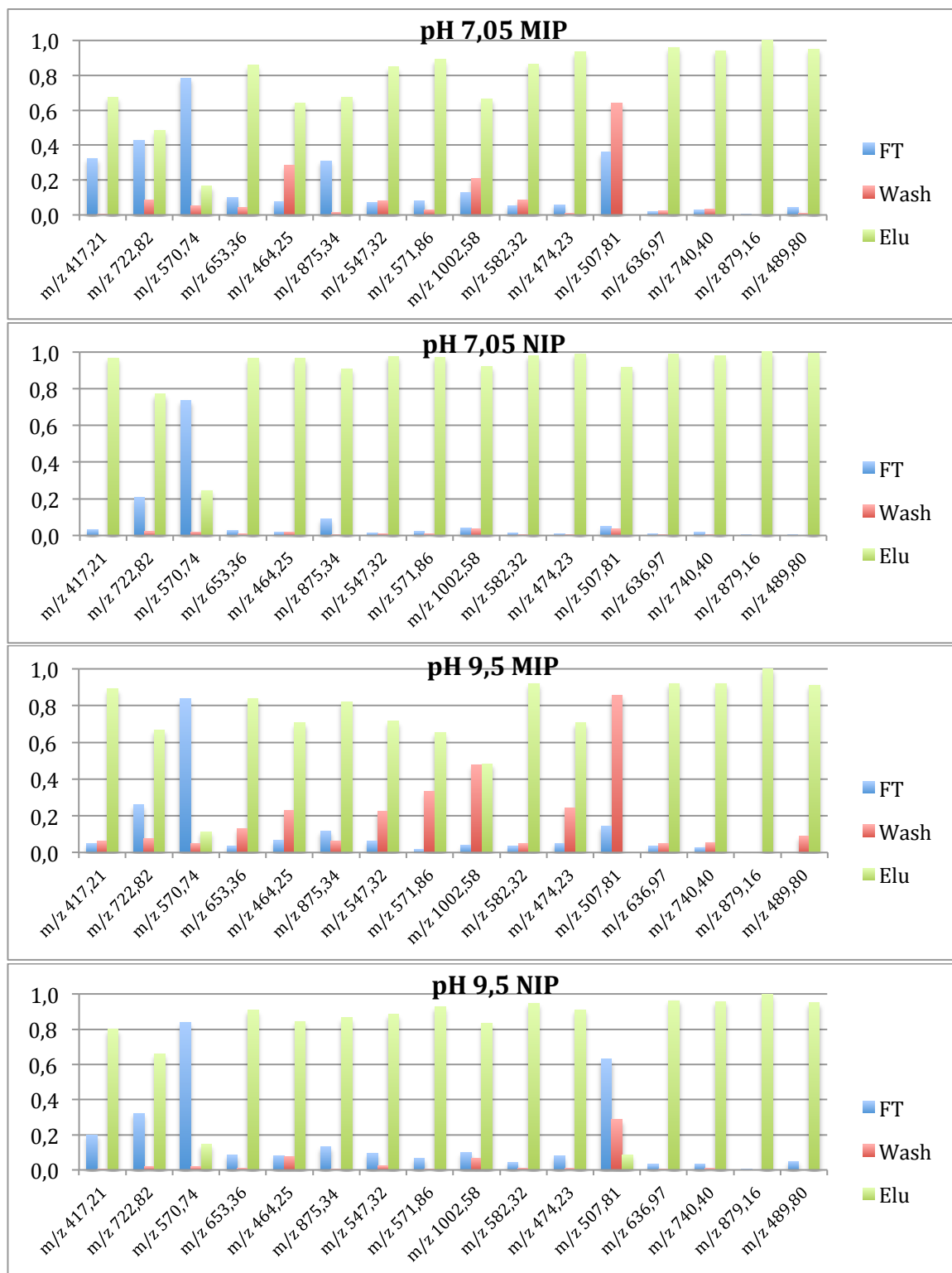
Hvis pH settes til 12 vil EAMA sin ladning nesten være uladet, dermed vil den elektrostatiske bindingen bli drastisk redusert. Det samme kan tenkes å skje hvis pH senkes under 2, men da vil den elektrostatiske bindingen bli redusert på grunn av redusert ladning på peptidene.

6.6.2 Effekt av pH på BSA peptider

I figur 6.6.8 er det vist hvordan alle de utvalgte peptidene reagerer ved de forskjellige pH nivåene (pH 7,05 og 9,5) for både MIP og NIP. Figuren for pH 7,05 og 9,5 viser at det er lite flow through og vask hos både MIP og NIP, men peptidet CCTESLVNR (m/z 570,74) har

Resultater & diskusjon

høy flow through for i hele dette pH området. For peptidet QTALVELLK (m/z 507,81) er det lite som blir eluert med unntak for NIP i pH 7,05.



Figur 6.6.8 - Viser flow through, vask og eluering for peptidene ved forskjellig pH for MIP og NIP. Bakgrunnen for kolonnene vises i tabellene 7.3 og 7.6 i appendiks 7.

Figur 6.6.9 viser hvordan alle de utvalgte peptidene reagerer ved de forskjellige pH nivåene (pH 2,2 og 12) for både MIP og NIP. Figuren for pH 2,2 viser en gjennomgang av økt vask for samtlige peptider, men ikke for peptidet



Figur 6.6.9 - Viser flow through, vask og eluering for peptidene ved forskjellig pH for MIP og NIP. Bakgrunnen for kolonnene vises i tabellene 7.3 og 7.6 i appendiks 7.

Resultater & diskusjon

SHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDKDVCK (m/z 879,16) som har ingen flow through eller vask kun eluering. Ved pH 12 endres bildet igjen ved at samtlige peptider for en flow through i tillegg til vask for både MIP og NIP, men peptidet

SHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDKDVCK (m/z 879,16) har i tillegg et høyt nivå med eluering. I tillegg har peptidet LFTFHADICTLPDTEK (m/z 636,97) også et høyt nivå med eluering for MIP, men ingen flow through eller vask for NIP kun eluering. Ved pH 12 ser det ut til at peptidet YNGVVFQECCQAEDK (m/z 875,34) sitter igjen på MIP og NIP siden det ikke er noen flow through, vask eller eluering.

For alle disse peptidene er det noen som peker seg ut. Peptidet

SHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDKDVCK (m/z 879,16) har 31 aminogrupeer med en gravity på -0,4097 som indikerer at peptidet er hydrofilt [60]. Videre har den 8 negativt ladede, 4 positivt ladede, 3 polare, 1 aromatisk og 10 hydrofobe aminosyregrupper. Dette kan derfor forklare hvorfor den får en økt flow through kun ved pH 12. Ved pH 12 vil som tidligere nevnt EAMA få redusert sine elektrostatiske krefter selv om peptidets negativ ladede aminosyrer vil være fullt deprotonert. Dermed vil det kun være hydrofobe bindingskrefter som kan holde igjen peptidet. Siden peptidet er hydrofilt blir resultatet økt flow through. Vasken på 7,5 % MeCN ser ikke ut til å være nok til å bryte de resterende hydrofobe kreftene. Ved elueringen er det brukt en konsentrasjon av MeCN på 80 % og det er i tillegg brukt 3 % FA. Ved bruk av 3 % FA vil de elektrostatiske kreftene bli brutt fordi peptidets negative ladede aminosyregrupper ikke lenger vil være deprotonerte. I tillegg vil konsentrasjonen på 80 % MeCN bryte de hydrofobe kreftene.

Neste peptidet som peker seg ut er YNGVVFQECCQAEDK (m/z 875,34). Ved pH 12 viser resultatet å være helt forskjellig i fra de andre pH verdiene i form av ingen flow through, vask eller eluering. Dette kan ikke forklares ut i fra peptidets egenskaper. Resultatene kan også skyldes feil som har skjedd i selve forsøket. Dette peptidet består av 14 aminosyregrupper med en gravity på -0,9143 som indikerer at peptidet er hydrofilt [60]. Peptidet har i tillegg 3 negativt ladede, 1 positivt ladet, 3 polare, 2 aromatiske og 2 hydrofobe aminosyregrupper.

7 Konklusjon

I denne masteroppgaven er det utført en mengde med analysestudier for å gi en bedre forståelse av de retensjonsmekanismene som finnes i MIP og NIP.

Sammenligningen mellom C18, MIP og NIP sine peptidelueringsprofiler viste en forskjell på retensjonsmekanismen mellom MIP og C18, men også en større retensjon av NLLGLIEAK på MIP i forhold til NIP.

Den økte konsentrasjonen av *digested* BSA som ble brukt til videre MIP SPE forsøk ga flere peptid elueringer og derfor kunne flere peptider med forskjellige egenskaper bli inkludert i sammenligningene. Dette muliggjorde statistiske analyser for å kunne korrelere peptidenes elueringer med peptidenes egenskaper.

Fra PCA analysen ble de samme peptidene distribuert på en bi-plott for både MIP og NIP. De peptidene som spesielt lå nærme NLLGLIEAK var de tryptiske peptidene QTALVELLK og KQTALVELLK som åpenbart har lignende isoelektrisk punkt, antall hydrofobiske grupper og antall aminosyrer som NLLGLIEAK. PLS analyse ble også brukt for å forutsi 50 % punktet for peptidenes eluering for både MIP og NIP ved å bruke peptidenes egenskaper. Regresjonskoeffisienten til MIP modellen antydte at negativladning, polaritet, hydrofobisitet og gravity er av størst betydning for kunne beskrive modellen. NIP modellen ble beskrevet med den samme regresjonskoeffisienten som for MIP, men med forskjell på det isoelektriske punktet. Det samlede resultatet fra de statistiske analysene indikerer at både hydrofobisiteten og polariteten sammen med negativladningen er av betydning for retensjonsmekanismen av peptidene.

For å bedre kunne forstå en slik mekanisme ble pH sin påvirkning studert ved å utføre forskjellige MIP- og NIP SPE eksperimenter ved pH verdiene: 2,2; 7,05; 9,5 og 12. Fra dette forsøket ble det vist hvilke betydning de elektrostatiske interaksjonene har og det har blitt demonstrert hvilken signifikant rolle den funksjonelle monomeren spiller.

Fra de utførte forsøkene kan det virke som at MIP SPE fungerer som en mix-mode SPE med et hulrom som har selektivitet mot NLLGLIEAK, men hulrommet ser ikke ut til å spille noen signifikant rolle på dette tidspunktet. Derfor er videre utvikling av MIP ønskelig.

Referanser

1. NHI. Lungekreft [cited 2015 13 April]. Available from: <http://nhi.no/pasienthandboka/sykdommer/kreft/lungekreft-2141.html>.
2. Korse CM, Holdenrieder S, et al. Multicenter evaluation of a new progastrin-releasing peptide (ProGRP) immunoassay across Europe and China. *Clin Chim Acta*. 2015;438:388-95.
3. Planchard D, Le Péchoux C. Small cell lung cancer: new clinical recommendations and current status of biomarker assessment. *European Journal of Cancer*. 2011;47:S272-S83.
4. Harmsma M, Schutte B, et al. Serum markers in small cell lung cancer: opportunities for improvement. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1836(2):255-72.
5. Molina R, Filella X, et al. ProGRP: a new biomarker for small cell lung cancer. *Clin Biochem*. 2004;37(7):505-11.
6. Winther B, Reubsaet JL. Determination of the small cell lung cancer associated biomarker pro-gastrin-releasing peptide (ProGRP) using LC-MS. *Journal of Separation Science*. 2007;30(2):234-40.
7. Ray S, Reddy PJ, et al. Proteomic technologies for the identification of disease biomarkers in serum: advances and challenges ahead. *Proteomics*. 2011;11(11):2139-61.
8. Javanbakht M, Shaabani N, et al. Novel molecularly imprinted polymers for the selective extraction and determination of metoclopramide in human serum and urine samples using high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2009;877(24):2537-44.
9. Lin Z, Lin Y, et al. One-pot preparation of a molecularly imprinted hybrid monolithic capillary column for selective recognition and capture of lysozyme. *J Chromatogr A*. 2013;1284:8-16.
10. Mulder GJ, Dencker L. *Pharmaceutical toxicology: safety sciences of drugs*. London: Pharmaceutical Press; 2006. xviii, 257 pages : illustrations p.
11. Næss O. *Sykdomslære og patologisk anatomi*. Høvik: Vett & Viten; 2012. 279 s. : ill. ; 27 cm p.
12. Joshi M, Ayoola A, et al. Small-cell lung cancer: an update on targeted therapies. *Adv Exp Med Biol*. 2013;779:385-404.
13. Cummings J, Ward TH, et al. Biomarker method validation in anticancer drug development. *Br J Pharmacol*. 2008;153(4):646-56.

14. Vitzthum F, Behrens F, et al. Proteomics: from basic research to diagnostic application. A review of requirements & needs. *J Proteome Res.* 2005;4(4):1086-97.
15. Nature. [cited 2015 05 Mai]. Available from: <http://www.nature.com/nrd/journal/v6/n4/glossary/nrd2176.html>.
16. Gonzalez N, Moody TW, et al. Bombesin-related peptides and their receptors: recent advances in their role in physiology and disease states. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2008;15(1):58-64.
17. Jensen RT, Battey JF, et al. International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian bombesin receptors: nomenclature, distribution, pharmacology, signaling, and functions in normal and disease states. *Pharmacol Rev.* 2008;60(1):1-42.
18. Reeve JR, Jr., Cuttitta F, et al. Multiple gastrin-releasing peptide gene-associated peptides are produced by a human small cell lung cancer line. *J Biol Chem.* 1989;264(4):1928-32.
19. Uchida K, Kojima A, et al. Expression of progastrin-releasing peptide and gastrin-releasing peptide receptor mRNA transcripts in tumor cells of patients with small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2002;128(12):633-40.
20. Torsetnes SB, Nordlund MS, et al. Digging deeper into the field of the small cell lung cancer tumor marker ProGRP: a method for differentiation of its isoforms. *J Proteome Res.* 2013;12(1):412-20.
21. Nordlund MS, Stieber P, et al. Characteristics and clinical validity of two immunoassays for ProGRP. *Tumour Biol.* 2012;33(4):1105-13.
22. Hoofnagle AN, Wener MH. The fundamental flaws of immunoassays and potential solutions using tandem mass spectrometry. *J Immunol Methods.* 2009;347(1-2):3-11.
23. Torsetnes SB, Levernaes MS, et al. Multiplexing determination of small cell lung cancer biomarkers and their isoforms in serum by immunocapture LC-MS/MS. *Analytical chemistry.* 2014;86(14):6983-92.
24. Qader AA, Urraca J, et al. Peptide imprinted receptors for the determination of the small cell lung cancer associated biomarker progastrin releasing peptide. *J Chromatogr A.* 2014;1370:56-62.
25. Rossetti C, Abdel Qader A, et al. Antibody-free biomarker determination: exploring molecularly imprinted polymers for pro-gastrin releasing peptide. *Analytical chemistry.* 2014;86(24):12291-8.
26. Store medisinske leksikon. Genom [cited 2015 05 April]. Available from: <https://sml.snl.no/genom>.

27. Madigan MT, Brock TD, et al. Brock biology of microorganisms. San Francisco, Calif.: Pearson/Benjamin Gummings; 2009. XXVIII, 1061, [66] s. : ill. p.
28. Zhou J. Microbial functional genomics. Hoboken, N.J.: Wiley-Liss; 2004. xxi, 590 s. : ill. p.
29. Matt P, Fu Z, et al. Biomarker discovery: proteome fractionation and separation in biological samples. *Physiological genomics*. 2008;33(1):12-7.
30. Vandermarliere E, Mueller M, et al. Getting intimate with trypsin, the leading protease in proteomics. *Mass Spectrometry Reviews*. 2013;32(6):453-65.
31. Lange V, Picotti P, et al. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial 2008 2008-01-01 00:00:00.
32. Zhao Y, Brasier AR. Applications of selected reaction monitoring (SRM)-mass spectrometry (MS) for quantitative measurement of signaling pathways. *Methods*. 2013;61(3):313-22.
33. van den Broek I, Sparidans RW, et al. Quantitative bioanalysis of peptides by liquid chromatography coupled to (tandem) mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2008;872(1-2):1-22.
34. Wysocki VH, Resing KA, et al. Mass spectrometry of peptides and proteins. *Methods (San Diego, CA, U S)*. 2005;35(3):211-22.
35. G-biosciences. [cited 2015 05 Mai]. Available from: <http://www.gbiosciences.com/researchproducts/protein-research/protein-electrophoresis/sample-preparation/protein-reduction-and-alkylation.aspx>.
36. Rodriguez J, Gupta N, et al. Does trypsin cut before proline? *J Proteome Res*. 2008;7(1):300-5.
37. Ashri NY, Abdel-Rehim M. Sample treatment based on extraction techniques in biological matrices. *Bioanalysis*. 2011;3(17):2003-18.
38. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE. Legemiddelanalyse. Bergen: Fagbokforl.; 2010. 505 s. : ill. p.
39. Hennion M-C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1999;856(1-2):3-54.
40. Lorenzo RA, Carro AM, et al. To remove or not to remove? The challenge of extracting the template to make the cavities available in Molecularly Imprinted Polymers (MIPs). *Int J Mol Sci*. 2011;12(7):4327-47.
41. Andersson LI. Molecular imprinting for drug bioanalysis. A review on the application of imprinted polymers to solid-phase extraction and binding assay. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 2000;739(1):163-73.

42. Khorrami AR, Mehrseresht S. Synthesis and evaluation of a selective molecularly imprinted polymer for the contraceptive drug levonorgestrel. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2008;867(2):264-9.
43. Koochpaei AR, Shahtaheri SJ, et al. Optimization of solid-phase extraction using developed modern sorbent for trace determination of ametryn in environmental matrices. *J Hazard Mater*. 2009;170(2-3):1247-55.
44. Turner NW, Jeans CW, et al. From 3D to 2D: A Review of the Molecular Imprinting of Proteins. *Biotechnol Prog*. 2006;22(6):1474-89.
45. Laboratory Journal. [cited 2015 02 April]. Available from: <http://www.laboratory-journal.com/applications/analytics/hplc-analysis>.
46. Han X, Aslanian A, et al. Mass spectrometry for proteomics. *Current opinion in chemical biology*. 2008;12(5):483-90.
47. Ahmed FE. Utility of mass spectrometry for proteome analysis: part I. Conceptual and experimental approaches. *Expert Review of Proteomics*. 2008;5(6):841-64.
48. VIB Department of Medical Protein Research. [cited 2015 03 April]. Available from: <http://penyfan.ugent.be/labo/joelv/Esquire.html>.
49. Kicman AT, Parkin MC, et al. An introduction to mass spectrometry based proteomics—Detection and characterization of gonadotropins and related molecules. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2007;260–262(0):212-27.
50. Lim CK, Lord G. Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis. *Biol Pharm Bull*. 2002;25(5):547-57.
51. Niessen WMA. Progress in liquid chromatography–mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening. *Journal of Chromatography A*. 2003;1000(1–2):413-36.
52. Scigelova M, Makarov A. Orbitrap mass analyzer--overview and applications in proteomics. *Proteomics*. 2006;6 Suppl 2:16-21.
53. Douglas DJ, Frank AJ, et al. Linear ion traps in mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*. 2005;24(1):1-29.
54. Schwartz JC, Senko MW, et al. A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2002;13(6):659-69.
55. Thermo Fisher Scientific Inc. LTQ XL Hardware Manual. Available from: http://sjsupport.thermofinnigan.com/manuals/manuals/97355-97043_LTQ_XL_Rev_A_HW.pdf.

Referanser

56. Makarov A, Denisov E, et al. Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Analytical chemistry*. 2006;78(7):2113-20.
57. Thermo Fisher Scientific Inc. LTQ Orbitrap XL Hardware Manual [cited 2015 05 April]. Available from: <http://www.thermoscientific.com/content/dam/tfs/ATG/CMD/cmd-support/ltq-orbitrap-xl/operations-and-maintenance/operators-manuals/LTQ-Orbitrap-XL-Hardware.pdf>.
58. Esbensen K, Schönkopf S, et al. *Multivariate analysis in practice*. [Ny utg.]. ed. Trondheim: Camo; 1996.
59. Thermo Fisher Scientific Inc. PSB-105: Dynamic Exclusion Technology [cited 2015 07 Mai]. Available from: http://sjsupport.thermofinnigan.com/public/docs/detail_doc.asp?manualID=669.
60. Farias SE, Kline KG, et al. Quantitative improvements in peptide recovery at elevated chromatographic temperatures from microcapillary liquid chromatography-mass spectrometry analyses of brain using selected reaction monitoring. *Analytical chemistry*. 2010;82(9):3435-40.
61. ProteinProspector. [cited 2015 16 Mars]. Available from: <http://prospector.ucsf.edu/>.
62. GRAVY CALCULATOR. [cited 2015 27 Mars]. Available from: <http://www.gravy-calculator.de>.
63. Innovagen. [cited 2015 19 Mars]. Available from: <http://www.innovagen.se/index.asp>.
64. Chemicalize. [cited 2015 19 Mars]. Available from: <http://www.chemicalize.org/structure/-!mol=N-%282-aminoethyl%29-2-methacrylamide&source=fp>.
65. Wikipedia. [cited 2015 19 Mars]. Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/Amino_acid.

Appendiks 1

LTQ Instrument Method

Creator: LTQ OT Discovery

Last modified: 3/25/2015 by LTQ OT Discovery

MS Run Time (min): 89.00

Sequence override of method parameters not enabled.

Divert Valve: not used during run

Contact Closure: not used during run

Syringe Pump: not used during run

MS Detector Settings:

Real-time modifications to method disabled

Stepped collision energy not enabled

Additional Microscans:

MS2	0	0
MS3	0	0
MS4	0	0
MS5	0	0
MS6	0	0
MS7	0	0
MS8	0	0
MS9	0	0
MS10	0	0

Segment 1 Information

Duration (min): 89.00

Number of Scan Events: 7

Tune Method: 130821_Tuneupdated

Scan Event Details:

1: FTMS + p norm !corona !pi res=30000 o(250.0-2000.0)
CV = 0.0V

2: ITMS + c norm !corona !pi Dep Wideband MS/MS Most intense ion from (1)
Activation Type: CID
Min. Signal Required: 100.0
Isolation Width: 2.00
Normalized Coll. Energy: 35.0

Appendiks 1

Default Charge State: 2
Activation Q: 0.250
Activation Time: 30.000
CV = 0.0V

- 3: ITMS + c norm !corona !pi Dep Wideband MS/MS 2nd most intense ion from (1)

Activation Type: CID
Min. Signal Required: 500.0
Isolation Width: 2.00
Normalized Coll. Energy: 35.0
Default Charge State: 2
Activation Q: 0.250
Activation Time: 30.000
CV = 0.0V

- 4: ITMS + c norm !corona !pi Dep Wideband MS/MS 3rd most intense ion from (1)

Activation Type: CID
Min. Signal Required: 500.0
Isolation Width: 2.00
Normalized Coll. Energy: 35.0
Default Charge State: 2
Activation Q: 0.250
Activation Time: 30.000
CV = 0.0V

- 5: ITMS + c norm !corona !pi Dep Wideband MS/MS 4th most intense ion from (1)

Activation Type: CID
Min. Signal Required: 500.0
Isolation Width: 2.00
Normalized Coll. Energy: 35.0
Default Charge State: 2
Activation Q: 0.250
Activation Time: 30.000
CV = 0.0V

- 6: ITMS + c norm !corona !pi Dep Wideband MS/MS 5th most intense ion from (1)

Activation Type: CID
Min. Signal Required: 500.0
Isolation Width: 2.00
Normalized Coll. Energy: 35.0
Default Charge State: 2
Activation Q: 0.250
Activation Time: 30.000
CV = 0.0V

- 7: ITMS + c norm !corona !pi Dep Wideband MS/MS 6th most intense ion from (1)

Activation Type: CID
Min. Signal Required: 500.0
Isolation Width: 2.00
Normalized Coll. Energy: 35.0
Default Charge State: 2
Activation Q: 0.250
Activation Time: 30.000
CV = 0.0V

Data Dependent Settings:

Use separate polarity settings disabled

Parent Mass List: (none)

Reject Mass List:

MS Mass	Name
355.07000	ambient air
371.10000	ambient air
391.28000	ambient air
429.09000	ambient air
445.12000	polysiloxane
462.14000	ambient air
503.11000	ambient air
519.14000	ambient air
536.16000	ambient air
593.16000	ambient air
610.18000	ambient air

Neutral Loss Mass List: (none)

Product Mass List: (none)

Neutral loss in top: 3

Product in top: 3

Most intense if no parent masses found not enabled

Add/subtract mass not enabled

FT master scan preview mode not enabled

Charge state screening not enabled

Monoisotopic precursor selection not enabled

Non-peptide monoisotopic recognition not enabled

Charge state rejection not enabled

Global Data Dependent Settings:

Use global parent and reject mass lists not enabled

Exclude parent mass from data dependent selection not enabled

Exclusion mass width relative to mass

Exclusion mass width relative to low (ppm): 10.000

Exclusion mass width relative to high (ppm): 10.000

Parent mass width by mass

Parent mass width low: 0.50000

Parent mass width high: 0.50000

Reject mass width relative to mass

Reject mass width relative to low (ppm): 10.000

Reject mass width relative to high (ppm): 10.000

Zoom/UltraZoom scan mass width by mass

Zoom/UltraZoom scan mass width low: 5.00

Zoom/UltraZoom scan mass width high: 5.00

FT SIM scan mass width low: 5.00

FT SIM scan mass width high: 5.00

Neutral Loss candidates processed by decreasing intensity

Neutral Loss mass width by mass

Appendiks 1

Neutral Loss mass width low: 0.50000
Neutral Loss mass width high: 0.50000
Product candidates processed by decreasing intensity
Product mass width by mass
Product mass width low: 0.50000
Product mass width high: 0.50000
MS mass range: 0.00-1000000.00
MSn mass range by mass
MSn mass range: 0.00-1000000.00
Use m/z values as masses not enabled
Analog UV data dep. not enabled
Dynamic exclusion enabled
 Repeat Count: 1
 Repeat Duration: 30.00
 Exclusion List Size: 500
 Exclusion Duration: 15.00
 Exclusion mass width relative to mass
 Exclusion mass width relative to low (ppm): 10.000
 Exclusion mass width relative to high (ppm): 10.000
 Expiration: disabled
Isotopic data dependence not enabled
Mass Tags data dependence not enabled

Custom Data Dependent Settings:
Not enabled

Program for Dionex Chromatography MS Link

ColumnOven.TempCtrl = Off
Column_1.ActiveColumn = Yes
Column_2.ActiveColumn = No
Column_3.ActiveColumn = No
Sampler.TempCtrl = On
LoadingPump.Pressure.LowerLimit = 0 [bar]
LoadingPump.Pressure.UpperLimit = 500 [bar]
LoadingPump.MaximumFlowRampDown = 9.998 [ml/min²]
LoadingPump.MaximumFlowRampUp = 6.000 [ml/min²]
MicroPump.Pressure.LowerLimit = 0 [bar]
MicroPump.Pressure.UpperLimit = 344 [bar]
MasterPressure.LowerLimit = 0 [bar]
MasterPressure.UpperLimit = 445 [bar]
MicroPump.MaximumFlowRampDown = 0.306 [µl/min²]
MicroPump.MaximumFlowRampUp = 0.306 [µl/min²]
MicroPump.%A.Equate = "5% ACN 20mM FA"
%B.Equate = "95% ACN 20mM FA"

```

%C.Equate =          "%C"
%D.Equate =          "%D"
DrawSpeed =          5.000 [µl/s]
DrawDelay =          3000 [ms]
DispSpeed =          20.000 [µl/s]
DispenseDelay =      0 [ms]
WasteSpeed =          32.000 [µl/s]
SampleHeight =       2.000 [mm]
InjectWash =         Both
WashVolume =          300.000 [µl]
WashSpeed =           25.000 [µl/s]
LoopWashFactor =     2.000
PunctureOffset =     0.0 [mm]
PumpDevice =          "LoadingPump"
InjectMode =          Normal
SyncWithPump =       Off
LoadingPump_Pressure.Step = Auto
LoadingPump_Pressure.Average =Off
ColumnOven_FC_BridgeFlow.Step =Auto
ColumnOven_FC_BridgeFlow.Average =On
ColumnOven_FC_Stepper.Step = Auto
ColumnOven_FC_Stepper.Average =On
MicroPump_MasterPressure.Step =Auto
MicroPump_MasterPressure.Average =On
ValveLeft =          1_2
Sampler.Temperature.Nominal = 4.0 [°C]
Sampler.Temperature.LowerLimit =4.0 [°C]
Sampler.Temperature.UpperLimit =45.0 [°C]
Sampler.ReadyTempDelta = 3.0 [°C]
LoadingPump.Flow =    0.010 [ml/min]

```

```

0.000 Wait          LoadingPump.Ready and ColumnOven.Ready and
Sampler.Ready and PumpModule.Ready
;Chromeleon sets this property to signal to Xcalibur that it is ready to start a run.
ReadyToRun =        1
;Xcalibur sets this property to start the run or injection.
Wait                StartRun
MicroPump.Flow =    0.300 [µl/min]
%B =                0.0 [%]
%C =                0.0 [%]
%D =                0.0 [%]
Wait                LoadingPump.Ready and ColumnOven.Ready and Sampler.Ready
and PumpModule.Ready
Inject
LoadingPump_Pressure.AcqOn
ColumnOven_FC_BridgeFlow.AcqOn
ColumnOven_FC_Stepper.AcqOn
MicroPump_MasterPressure.AcqOn
;Chromeleon sets this property to signal the injection to Xcalibur.

```



```

;UM3PUMP_Relay1.On Duration = 2.00
;Pump_Relay_1.Closed Duration =2.00
;UM3PUMP_Relay1.On Duration = 2.00
;Pump_Relay_1.Closed Duration =2.00
;UM3PUMP_Relay1.On Duration = 2.00
Relay_4.State On
MicroPump.Flow =      0.300 [µl/min]
%B =                  0.0 [%]
%C =                  0.0 [%]
%D =                  0.0 [%]

```

0.100 Relay_4.State off

4.000 ValveLeft = 10_1

```

60.000 MicroPump.Flow =      0.300 [µl/min]
%B =                  50.0 [%]
%C =                  0.0 [%]
%D =                  0.0 [%]
61.000 MicroPump.Flow =      0.300 [µl/min]
%B =                  100.0 [%]
%C =                  0.0 [%]
%D =                  0.0 [%]
64.000 MicroPump.Flow =      0.300 [µl/min]
%B =                  100.0 [%]
64.100 MicroPump.Flow =      0.300 [µl/min]
%B =                  0.0 [%]
74.000 MicroPump.Flow =      0.300 [µl/min]
%B =                  0.0 [%]
75.000 MicroPump.Flow =      0.400 [µl/min]
%B =                  0.0 [%]
85.000 MicroPump.Flow =      0.400 [µl/min]
%B =                  0.0 [%]
ValveLeft =          1_2
86.000 LoadingPump_Pressure.AcqOff
ColumnOven_FC_BridgeFlow.AcqOff
ColumnOven_FC_Stepper.AcqOff
MicroPump_MasterPressure.AcqOff
MicroPump.Flow =      0.300 [µl/min]
%B =                  0.0 [%]
%C =                  0.0 [%]
%D =                  0.0 [%]
89.000 MicroPump.Flow =      0.300 [µl/min]
%B =                  0.0 [%]
%C =                  0.0 [%]
%D =                  0.0 [%]
InjectResponse =      0

```

End

Appendiks 2

TSQ Quantum Instrument Method

Creator: Quantum

Last modified: 3/30/2015 10:30:09 AM by Quantum

TSQ MS Method Settings:

Method Type: EZ Method

MS Run Time (min): 40.00

Experiment Type: SRM

Chrom Filter Peak Width (s): Not used

Collision Gas Pressure (mTorr): 1.7

Use Tuned Tube Lens Value: Yes

Q1 Peak Width (FWHM): 0.70

Q3 Peak Width (FWHM): 0.70

Display Time Range for SRM table: Yes

Cycle Time (s): Not used

Skimmer Offset (V): Not used

SRM Table:

Parent	Product	CE	Time	Start	Stop	Pol	Trigger	Reference	Name
408.200	272.650	17	0.300	12.00	18.00		+ 1.000e+05	No	(empty)
408.200	544.400	14	0.300	12.00	18.00		+ 1.000e+05	No	(empty)
592.400	682.300	21	0.300	12.00	18.00		+ 1.000e+05	No	(empty)
592.400	795.400	23	0.300	12.00	18.00		+ 1.000e+05	No	(empty)
450.230	614.387	16	0.300	14.00	22.00		+ 1.000e+05	No	(empty)
450.230	685.424	16	0.300	14.00	22.00		+ 1.000e+05	No	(empty)
395.700	274.660	14	0.300	16.00	22.00		+ 1.000e+05	No	(empty)
395.700	548.320	14	0.300	16.00	22.00		+ 1.000e+05	No	(empty)
401.000	279.500	14	0.300	16.00	22.00		+ 1.000e+05	No	(empty)
401.000	558.300	14	0.300	16.00	22.00		+ 1.000e+05	No	(empty)
704.000	618.330	20	0.300	17.00	25.00		+ 1.000e+05	No	(empty)
704.000	938.480	20	0.300	17.00	25.00		+ 1.000e+05	No	(empty)
1090.000	645.500	34	0.300	17.00	37.00		+ 1.000e+05	No	(empty)
1090.000	959.300	19	0.300	17.00	37.00		+ 1.000e+05	No	(empty)
1111.500	752.400	68	0.300	17.00	37.00		+ 1.000e+05	No	(empty)
1111.500	881.200	61	0.300	17.00	37.00		+ 1.000e+05	No	(empty)
703.870	618.330	21	0.300	18.00	25.00		+ 1.000e+05	No	(empty)
703.870	710.372	21	0.300	18.00	25.00		+ 1.000e+05	No	(empty)
485.800	630.300	15	0.300	18.50	26.50		+ 1.000e+05	No	(empty)
485.800	743.200	16	0.300	18.50	26.50		+ 1.000e+05	No	(empty)
489.900	638.400	15	0.300	18.50	26.50		+ 1.000e+05	No	(empty)
489.900	751.400	16	0.300	18.50	26.50		+ 1.000e+05	No	(empty)
728.600	200.800	34	0.300	24.00	30.00		+ 1.000e+05	No	(empty)
728.600	228.800	29	0.300	24.00	30.00		+ 1.000e+05	No	(empty)

728.600 359.900 18 0.300 24.00 30.00 + 1.000e+05 No (empty)

Tune Method - Adjustable parameters:

Capillary Temperature: 270.0
 Vaporizer Temperature: 0.0
 Sheath Gas Pressure: 15.0
 Ion Sweep Gas Pressure: 0.0
 Aux Valve Flow: 2.0
 Spray Voltage: Positivie polarity - 4200.0 , Negative polarity - 3000.0
 Discharge Current: Positivie polarity - 4.0 , Negative polarity - 4.0

Divert Valve: in use during run

Divert Time (min) Valve State

```
=====
0.00      Inject \ Waste
12.00     Load \ Detector
39.59     Inject \ Waste
```

Program for Dionex Chromatography MS Link

```
ColumnOven.TempCtrl =      On
ColumnOven.Temperature.Nominal =30.0 [∞C]
ColumnOven.Temperature.LowerLimit =25.0 [∞C]
ColumnOven.Temperature.UpperLimit =31.0 [∞C]
ColumnOven.ReadyTempDelta =  2.0 [∞C]
Column_1.ActiveColumn =    No
Column_2.ActiveColumn =    No
Sampler.TempCtrl =         On
Pressure.LowerLimit =      0 [bar]
Pressure.UpperLimit =      350 [bar]
MaximumFlowRampDown =     900 [µl/min≤]
MaximumFlowRampUp =       900 [µl/min≤]
%A.Equate =                "%A"
%B.Equate =                "%B"
%C.Equate =                "%C"
%D.Equate =                "%D"
DrawSpeed =                5.000 [µl/s]
DrawDelay =                3000 [ms]
DispSpeed =                20.000 [µl/s]
DispenseDelay =           0 [ms]
WasteSpeed =               32.000 [µl/s]
```

Appendiks 2

SampleHeight = 0.500 [mm]
InjectWash = Both
WashVolume = 100.000 [µl]
WashSpeed = 20.000 [µl/s]
LoopWashFactor = 2.000
PunctureOffset = 0.3 [mm]
PumpDevice = "MicroPump"
InjectMode = Normal
SyncWithPump = On
MicroPump_Pressure.Step = Auto
MicroPump_Pressure.Average = On
Sampler.Temperature.Nominal = 4.0 [∞C]
Sampler.ReadyTempDelta = 10.0 [∞C]

```
0.000 Wait          ColumnOven.Ready and Sampler.Ready
;Chromeleon sets this property to signal to Xcalibur that it is ready to start a run.
ReadyToRun =      1
;Xcalibur sets this property to start the run or injection.
Wait              StartRun
Flow =            10 [µl/min]
%B =              0.0 [%]
%C =              0.0 [%]
%D =              0.0 [%]
Wait              ColumnOven.Ready and Sampler.Ready
Inject
MicroPump_Pressure.AcqOn
;Chromeleon sets this property to signal the injection to Xcalibur.
InjectResponse =  1
;Depending on your system configuration it might be necessary to manually insert
;a "Relay" command below in order to send the start signal to the MS.
;Typical syntaxes:
;Pump_Relay_1.Closed Duration =2.00
;UM3PUMP_Relay1.On Duration = 2.00
;Pump_Relay_1.Closed Duration =2.00
;UM3PUMP_Relay1.On Duration = 2.00
;Pump_Relay_1.Closed Duration =2.00
;UM3PUMP_Relay1.On Duration = 2.00
;Pump_Relay_1.Closed Duration =2.00
;UM3PUMP_Relay1.On Duration = 2.00
;Pump_Relay_1.Closed Duration =2.00
;UM3PUMP_Relay1.On Duration = 2.00
;Pump_Relay_1.Closed Duration =2.00
;UM3PUMP_Relay1.On Duration = 2.00
;Pump_Relay_1.Closed Duration =2.00
;UM3PUMP_Relay1.On Duration = 2.00
;Pump_Relay_1.Closed Duration =2.00
;UM3PUMP_Relay1.On Duration = 2.00
;Pump_Relay_1.Closed Duration =2.00
;UM3PUMP_Relay1.On Duration = 2.00
```



```

;Pump_Relay_1.Closed Duration =2.00
;UM3PUMP_Relay1.On Duration = 2.00
;Pump_Relay_1.Closed Duration =2.00
;UM3PUMP_Relay1.On Duration = 2.00
;Pump_Relay_1.Closed Duration =2.00
;UM3PUMP_Relay1.On Duration = 2.00
;Pump_Relay_1.Closed Duration =2.00
;UM3PUMP_Relay1.On Duration = 2.00
;Pump_Relay_1.Closed Duration =2.00
;UM3PUMP_Relay1.On Duration = 2.00
;Pump_Relay_1.Closed Duration =2.00
;UM3PUMP_Relay1.On Duration = 2.00
;Pump_Relay_1.Closed Duration =2.00
;UM3PUMP_Relay1.On Duration = 2.00
;Pump_Relay_1.Closed Duration =2.00
;UM3PUMP_Relay1.On Duration = 2.00
;Pump_Relay_1.Closed Duration =2.00
;UM3PUMP_Relay1.On Duration = 2.00
;Pump_Relay_1.Closed Duration =2.00
;UM3PUMP_Relay1.On Duration = 2.00
;Pump_Relay_1.Closed Duration =2.00
;UM3PUMP_Relay1.On Duration = 2.00
;Pump_Relay_1.Closed Duration =2.00
;UM3PUMP_Relay1.On Duration = 2.00
;Pump_Relay_1.Closed Duration =2.00
;UM3PUMP_Relay1.On Duration = 2.00
;Pump_Relay_1.Closed Duration =2.00
;UM3PUMP_Relay1.On Duration = 2.00
;Pump_Relay_1.Closed Duration =2.00
;UM3PUMP_Relay1.On Duration = 2.00
;Pump_Relay_1.Closed Duration =2.00
;UM3PUMP_Relay1.On Duration = 2.00
;Pump_Relay_1.Closed Duration =2.00
;UM3PUMP_Relay1.On Duration = 2.00
;Pump_Relay_1.Closed Duration =2.00
;UM3PUMP_Relay1.On Duration = 2.00
;Pump_Relay_1.Closed Duration =2.00
;UM3PUMP_Relay1.On Duration = 2.00
Relay_4.State On
;Pump_Relay_1.Closed Duration =2.00
;UM3PUMP_Relay1.On Duration = 2.00
Flow =          10 [µl/min]
%B =            0.0 [%]
%C =            0.0 [%]
%D =            0.0 [%]

```

0.100 Relay_4.State Off

```

Flow =          40 [µl/min]
%B =            0.0 [%]
%C =            0.0 [%]
%D =            0.0 [%]

```

1.000 Flow = 40 [µl/min]

```

%B =            0.0 [%]
%C =            0.0 [%]
%D =            0.0 [%]

```

Appendiks 2

30.000

MicroPump_Pressure.AcqOff

Flow = 40 [µl/min]

%B = 85.0 [%]

%C = 0.0 [%]

%D = 0.0 [%]

34.000 Flow = 40 [µl/min]

%B = 95.0 [%]

35.000 Flow = 40 [µl/min]

%B = 95.0 [%]

35.100 Flow = 10 [µl/min]

%B = 95.0 [%]

%C = 0.0 [%]

%D = 0.0 [%]

InjectResponse = 0

40.100 End

Appendiks 3

0,1 % Maursyre (FA):

30 μ L 100 % FA tilsettes ionebyttet vann til 30 mL.

50 mM Ammoniumbikarbonat-buffer (ABC-buffer):

40 mg ammoniumbikarbonat veies ut og løses i 10 mL ionebyttet vann.

Viktig at denne løsningen er fersk når den skal brukes til trypsinering.

100 mM Reduksjonsreagensen DL-Dithiothreitol (DTT):

7,7 mg DTT veies ut og løses i 500 μ L 50 mM ABC-buffer.

Viktig at stoffet holdes kaldt frem til bruk. Blandes umiddelbart før bruk.

400 mM Alkyleringsreagensen Iodoaceticacid (IAA):

37,2 mg veies ut og løses i 500 μ L 50 mM ABC-buffer.

Viktig at stoffet holdes fryst helt frem til bruk. Blandes umiddelbart før bruk.

Trypsinløsninger:

1 mg/mL Trypsinløsning:

1 mg trypsin veies ut og løses i 1 mL 50 mM ABC-buffer.

Viktig at stoffet holdes fryst helt frem til bruk. Blandes umiddelbart før bruk.

5 μ g/mL Trypsinløsning:

5 μ L av 1 mg/mL trypsinløsning tilsettes 995 μ L 50 mM ABC-buffer.

Blandes umiddelbart før bruk.

Tillagning av intern standard NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂]:

0,51 mM NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂] løsning:

1 mg NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂] veies ut og løses i 2 mL 0,1 % FA.

0,51 μ M NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂] løsning:

1 μ L av 0,51 mM NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂] tilsettes 999 μ L 0,1 % FA.

50 nM NLLGLIEA[K₂¹³C₆¹⁵N₂] løsnning:

196 µL av 0,51 µM NLLGLIEA[K₂¹³C₆¹⁵N₂] løsnning tilsettes 1804 µL 0,1 % FA.

Tillagning av BSA:

1 mg/ml BSA løsnning:

1 mg BSA veies ut og løses i 1 mL 50 mM ABC-buffer.

Viktig å bruke fersk ABC-buffer.

100 µg/ml BSA løsnning:

100 µL av 1 mg/mL BSA løsnning tilsettes 900 µL 50 nM ABC-buffer.

Viktig å bruke fersk ABC-buffer.

Tillagning av løsnninger som brukes til pH forsøket:

12,5 M NaOH løsnning:

5g NaOH veies ut og løses i 10 mL ionebyttet vann.

0,1 % FA løsnning (1:1000):

1 µL 100 % FA tilsettes 999 µL ionebyttet vann.

10 % FA løsnning (1:10):

10 µL 100 % FA tilsettes 90 µL ionebyttet vann.

2,5 % NH₃ løsnning (1:10):

10 µL 25 % NH₃ tilsettes 90 µL ionebyttet vann.

0,25 % NH₃ løsnning (1:100):

10 µL 25 % NH₃ tilsettes 990 µL ionebyttet vann.

0,025 % NH₃ løsnning (1:1000):

1 µL 25 % NH₃ tilsettes 999 µL ionebyttet vann.

Tilberedning til C18 SPE forsøket:**Prøveløsning med 12 nM BSA og 10 nM NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂]:**

200 µL 15 nM BSA tilsettes 50 µL 50 nM NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂] (totalt 250 µL).

Den tilberedte løsningene ble ristet på en vortex-mikser med en kort tur innom sentrifugen før den var klare til bruk.

Tilberedning til MIP- og NIP SPE forsøket:**Prøveløsning med 12 nM BSA og 10 nM NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂]:**

300 µL 15 nM BSA tilsettes 75 µL 50 nM NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂] (totalt 375 µL).

Den tilberedte løsningene ble ristet på en vortex-mikser med en kort tur innom sentrifugen før den var klare til bruk.

Tilberedning til kapasitet test av MIP SPE forsøket:**Tilberedning av løsninger:**

- 1) Løsning 1: 600 nM BSA.
- 2) Løsning 2: 150 nM BSA (totalt 200 µL).
 - a) 50 µL 600 nM BSA tilsettes 150 µL 50 mM ABC-buffer.
- 3) Løsning 3: 60 nM BSA (totalt 200 µL).
 - a) 80 µL løsning 2 tilsettes 120 µL 50 mM ABC-buffer.
- 4) Løsning 4: 15 nM BSA (totalt 100 µL).
 - a) 25 µL løsning 3 tilsettes 75 µL 50mM ABC-buffer.

Samtlige av de tilberedte løsningene ble ristet på en vortex-mikser med en kort tur innom sentrifugen før de var klare til bruk.

Tilberedning av prøveløsninger:

- 1) 480 nM BSA og 10 nM NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂] (totalt 125 µL).
 - a) 100 µL løsning 1 tilsettes 25 µL 50 nM NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂].
- 2) 120 nM BSA og 10 nM NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂] (totalt 125 µL).
 - a) 100 µL løsning 2 tilsettes 25 µL 50 nM NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂].
- 3) 48 nM BSA og 10 nM NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂] (totalt 125 µL).
 - a) 100 µL løsning 3 tilsettes 25 µL 50 nM NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂].
- 4) 12 nM BSA og 10 nM NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂] (totalt 125 µL).
 - a) 100 µL løsning 4 tilsettes 25 µL 50 nM NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂].

Appendiks 3

Samtlige av de tilberedte løsningene ble ristet på en vortex-mikser med en kort tur innom sentrifugen før de var klare til bruk.

Tilberedning til PCA og PLS forsøket:

Tilberedning av løsning på 60 nM BSA:

30 µL 600 nM BSA tilsettes 270 µL 50 mM ABC-buffer (totalt 300 µL).

Den tilberedte løsningene ble ristet på en vortex-mikser med en kort tur innom sentrifugen før den var klare til bruk.

Tilberedning av prøveløsning med 48 nM BSA og 10 nM NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂]:

300 µL 60 nM BSA tilsettes 75 µL 50 nM NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂] (totalt 375 µL).

Den tilberedte løsningene ble ristet på en vortex-mikser med en kort tur innom sentrifugen før den var klare til bruk.

Tilberedning til pH influens forsøket:

Tilberedning for første forsøk med pH 2,2:

- 1) Re-ekvilibrering løsning 1:
 - a) 2,5 µL 10 % FA tilsettes 497,5 µL 50 mM ABC-buffer.
- 2) Prøveløsning løsning 1:
 - a) 20 µL 600 nM BSA tilsettes 178,75 µL 50 mM ABC-buffer.
 - b) 50 µL 50 nM NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂] tilsettes a).
 - c) 1,25 µL 10 % FA tilsettes a).
- 3) Vask løsning 1:
 - a) 150 µL MeCN tilsettes 1840 µL ionebyttet vann.
 - b) 10 µL 100 % FA tilsettes a).

Alle prøveløsningene blir ristet på en vortex-mikser med en kort tur innom sentrifugen.

Tilberedning for første forsøk med pH 7,05:

- 1) Re-ekvilibrering løsning 2:
 - a) 5 µL 0,1 % FA tilsettes 495 µL 50 mM ABC-buffer.
- 2) Prøveløsning løsning 2:
 - a) 20 µL 600 nM BSA tilsettes 177,5 µL 50 mM ABC-buffer.
 - b) 50 µL 50 nM NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂] tilsettes a).
 - c) 2,5 µL 0,1 % FA tilsettes a).

- 3) Vask løsning 2:
- a) 150 μL MeCN tilsettes 1846 μL ionebyttet vann.
 - b) 4 μL 0,025 % NH_3 tilsettes a).

Alle prøveløsningene blir ristet på en vortex-mikser med en kort tur innom sentrifugen.

Tilberedning for første forsøk med pH 9,5:

- 1) Re-ekvilibrering løsning 3:
 - a) 2,5 μL 2,5 % NH_3 tilsettes 497,5 μL 50 mM ABC-buffer.
- 2) Prøveløsning løsning 3:
 - a) 20 μL 600 nM BSA tilsettes 178,75 μL 50 mM ABC-buffer.
 - b) 50 μL 50 nM NLLGLIEA[$\text{K}_-^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$] tilsettes a).
 - c) 1,25 μL 2,5 % NH_3 tilsettes a).
- 3) Vask løsning 3:
 - a) 150 μL MeCN tilsettes 1848 μL ionebyttet vann.
 - b) 2 μL 0,25 % NH_3 tilsettes a).

Alle prøveløsningene blir ristet på en vortex-mikser med en kort tur innom sentrifugen.

Tilberedning for fortynnet prøve fra første forsøk:

- 1) Fortynnet prøveløsning 1:
 - 4 μL 600 nM BSA tilsettes 36 μL 50 mM ABC-buffer.
 - 10 μL 50 nM NLLGLIEA[$\text{K}_-^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$] tilsettes 1).
 - 450 μL 0,1 % FA tilsettes 1).

Fortynnet prøveløsning 1 blir ristet på en vortex-mikser med en kort tur innom sentrifugen

Tilberedning for andre forsøk med pH 12:

- 1) Re-ekvilibrering løsning 4:
 - a) 4,5 μL 12,5 M NaOH tilsettes 495,5 μL 50 mM ABC-buffer.
- 2) Prøveløsning 4:
 - a) 20 μL 600 nM BSA tilsettes 177,75 μL 50 mM ABC-buffer.
 - b) 50 μL 50 nM NLLGLIEA[$\text{K}_-^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$] tilsettes a).
 - c) 2,25 μL 12,5 M NaOH tilsettes a).

Appendiks 3

4) Vask løsning 4:

- a) 150 μL MeCN tilsettes 1848 μL ionebyttet vann.
- b) 2 μL 12,5 M NaOH tilsettes a).

Alle løsningene blir ristet på en vortex-mikser med en kort tur innom sentrifugen.

Tilberedning for fortynnet prøve fra andre forsøk:

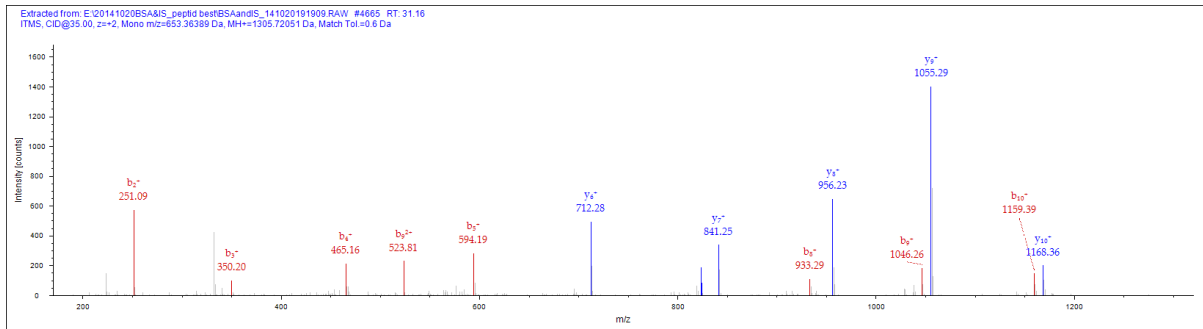
1) Fortynnet prøveløsning 2:

- 4 μL 600 nM BSA tilsettes 36 μL 50 mM ABC-buffer.
- 10 μL 50 nM NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂] tilsettes 1).
- 450 μL 0,1 % FA tilsettes 1).

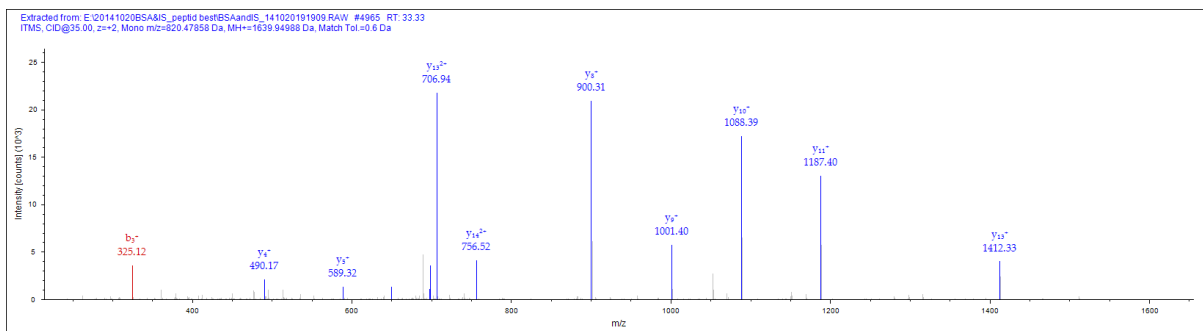
Fortynnet prøveløsning 2 blir ristet på en vortex-mikser med en kort tur innom sentrifugen.

Appendiks 4

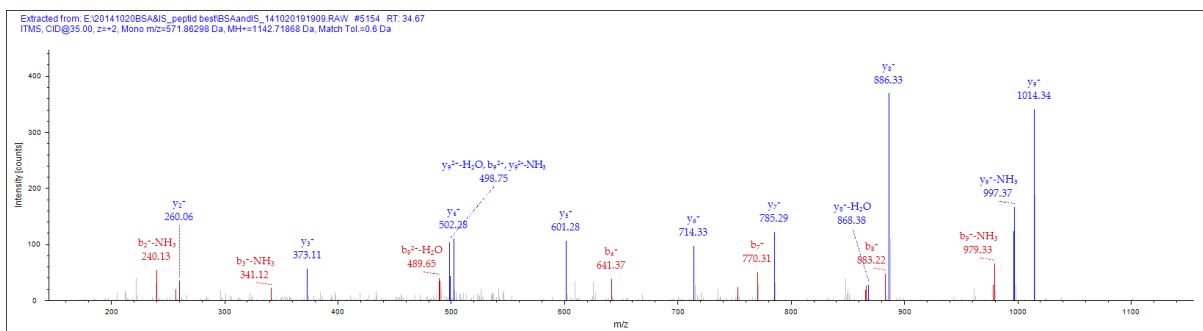
MS/MS kromatogram av de utvalgte peptidene fra den første tryptiske proteolyseringen. Disse peptidene ble brukt på C18 og MIP & NIP når konsentrasjon var på 12 nM BSA og 10 nM NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂].



Figur 4.1 - viser ms/ms av peptidet HLVDEPQNLIK (m/z 653,36)

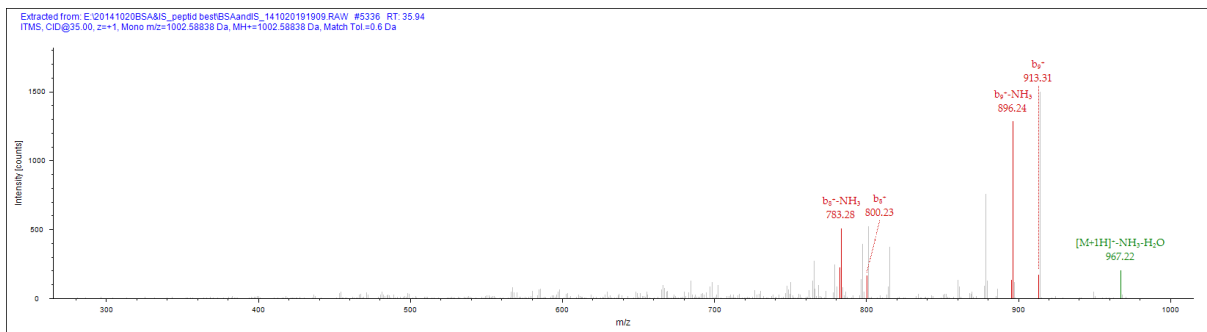


Figur 4.2 - viser ms/ms av peptidet KVPQVSTPTLVEVSR (m/z 820,47)

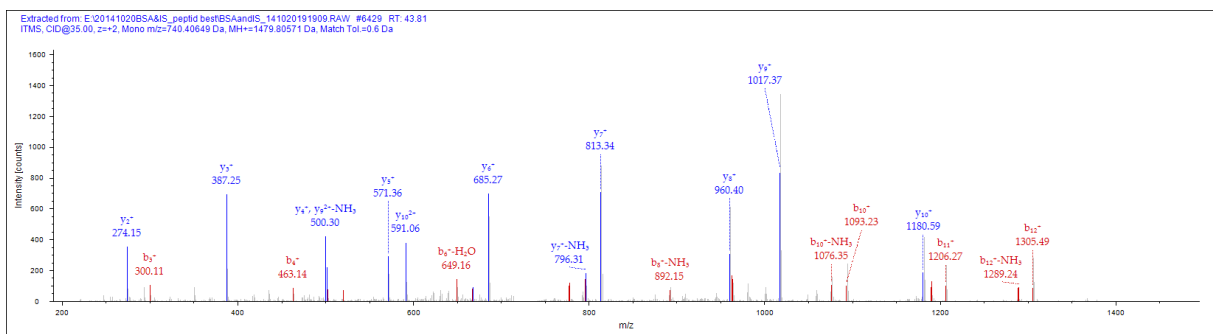


Figur 4.3 - viser ms/ms av peptidet KQTALVELLK (m/z 571,86)

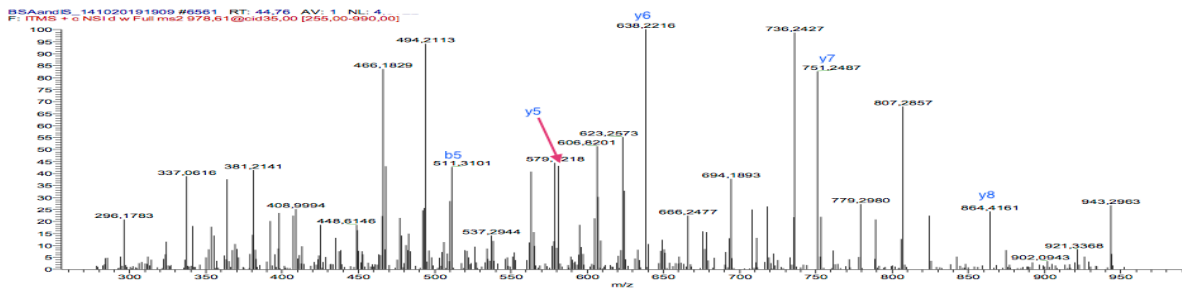
Appendiks 4



Figur 4.4 - viser ms/ms av peptidet LVVSTQATALA (m/z 1002,58)

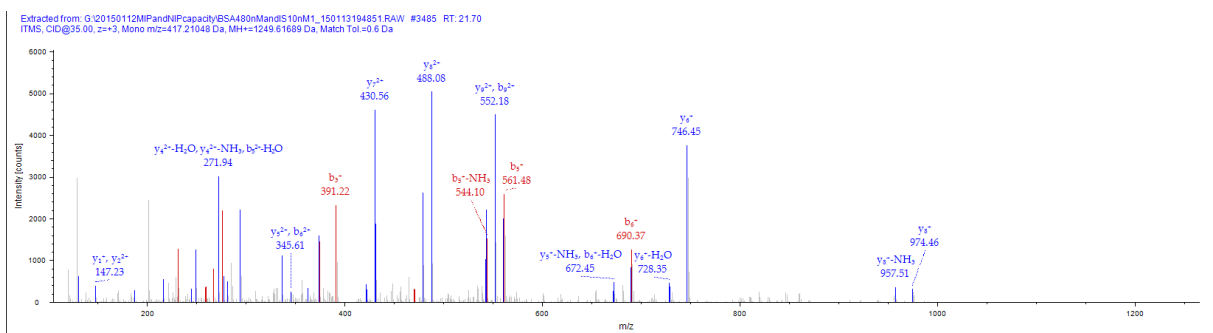


Figur 4.5 - viser ms/ms av peptidet LGEYGFQNALIVR (m/z 740,40)

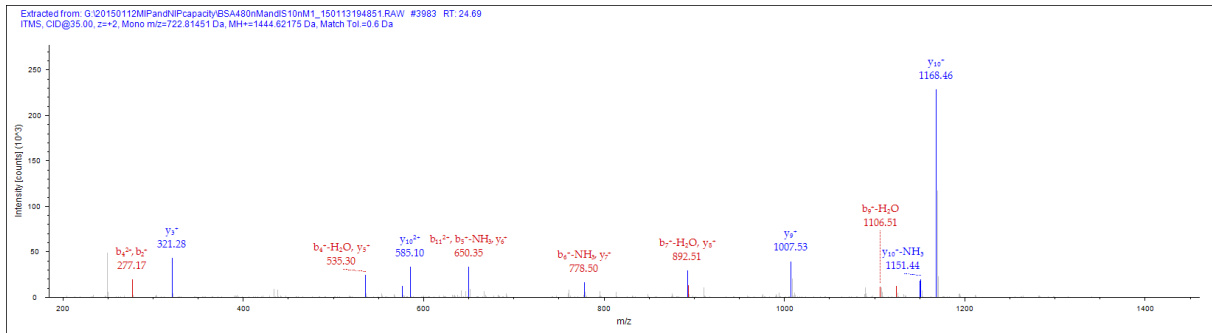


Figur 4.6 - viser ms/ms av peptidet NLLGLIEA[K_13C6_15N2] (m/z 978,62) (C-terminalen vil vise rundt 8 Da høyere)

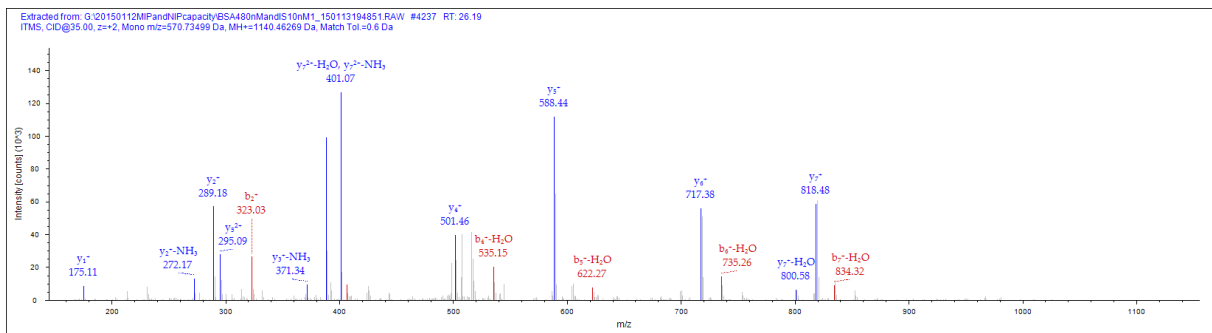
MS/MS av de utvalgte peptidene fra tryptisk proteolyse nummer to. Disse peptidene ble brukt på MIP & NIP når konsentrasjon var på 48 nM BSA og 10 nM NLLGLIEA[K_13C6_15N2].



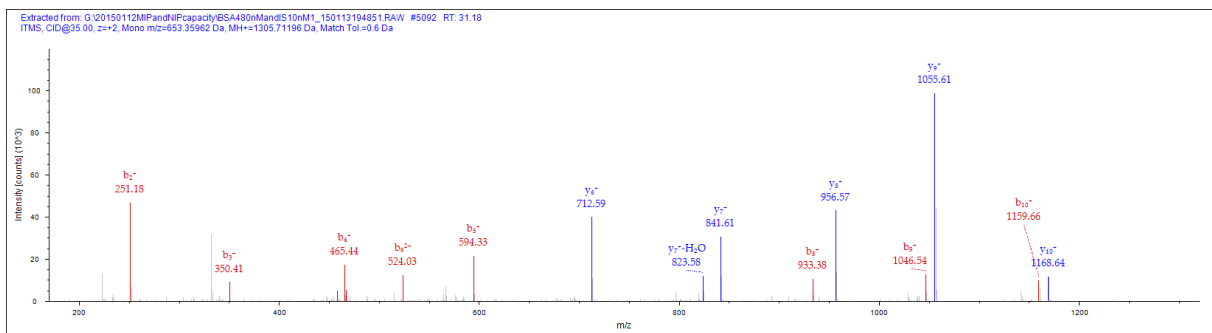
Figur 4.7 - viser ms/ms av peptidet FKDLGEEHFK (m/z 417,21)



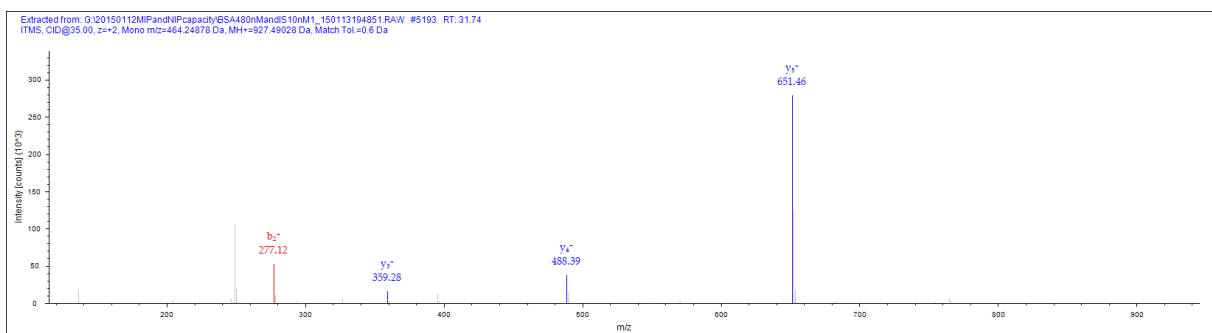
Figur 4.8 - viser ms/ms av peptidet YICDNQDTISSK (m/z 722,82)



Figur 4.9 - viser ms/ms av peptidet CCTESLVNR (m/z 570,74)

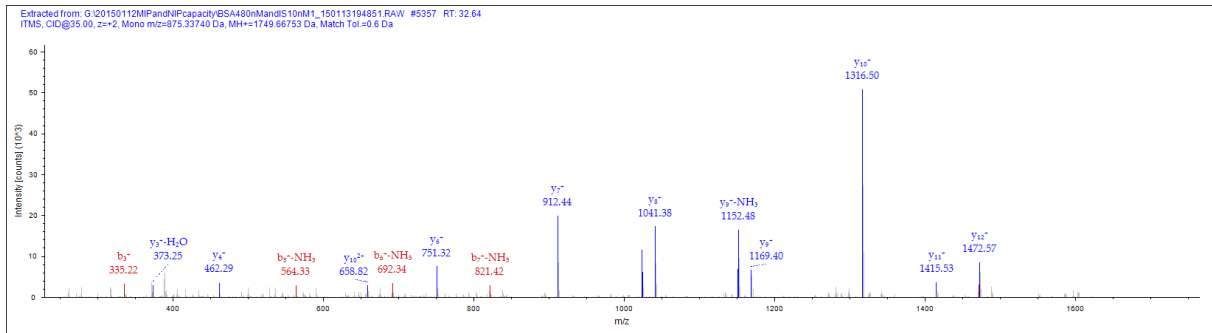


Figur 4.10 - viser ms/ms av peptidet HLVDEPQNLIK (m/z 653,36)

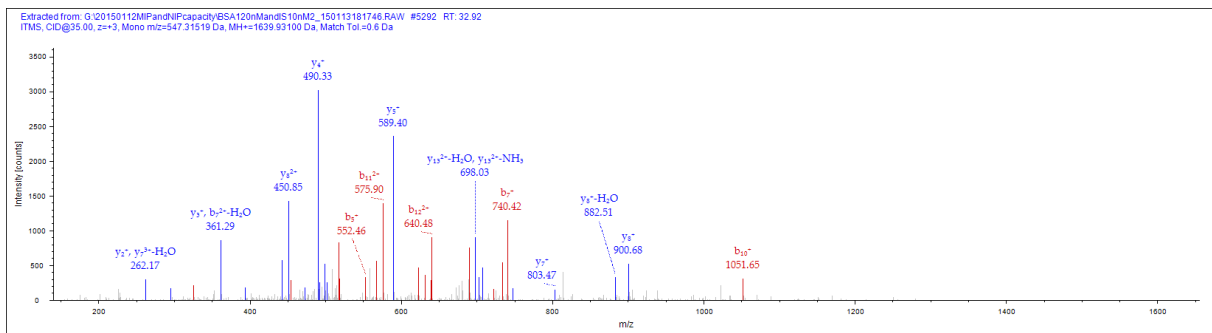


Figur 4.11 - viser ms/ms av peptidet YLYEIAR (m/z 464,25)

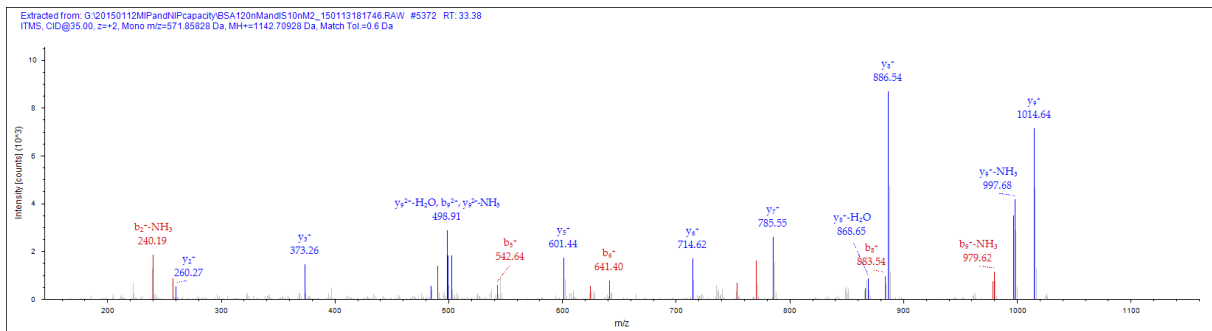
Appendiks 4



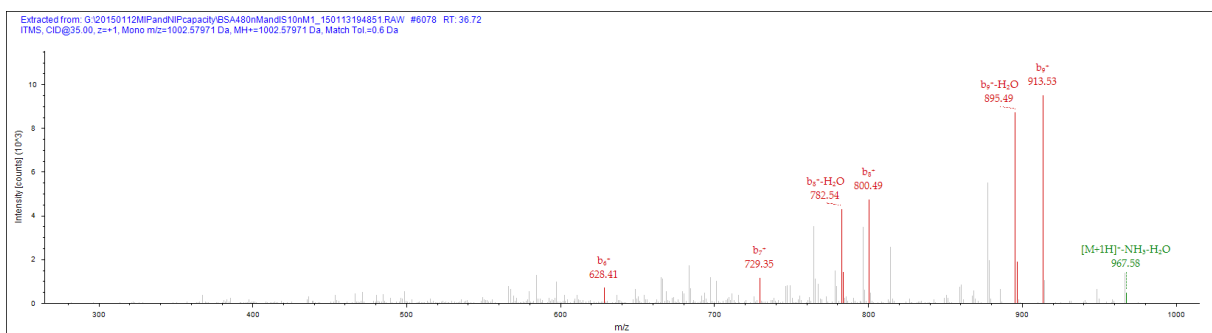
Figur 4.12 - viser ms/ms av peptidet YNGVFQECCQAEDK (m/z 875,34)



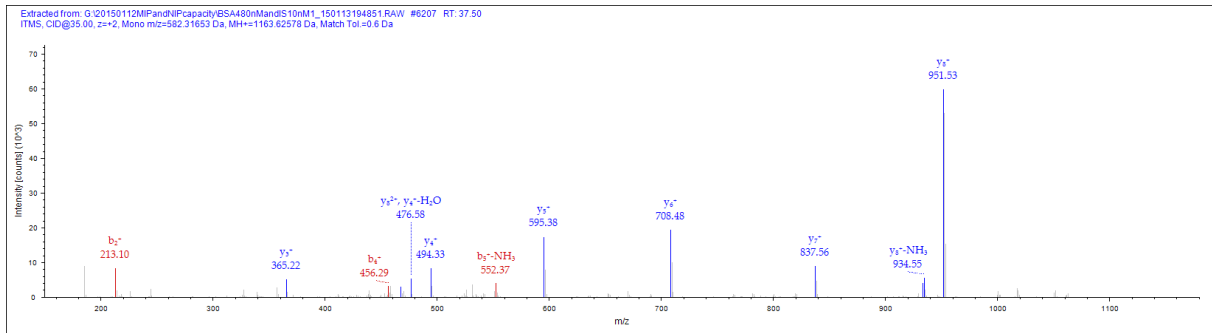
Figur 4.13 - viser ms/ms av peptidet KVPQVSTPTLVEVSR (m/z 547,32)



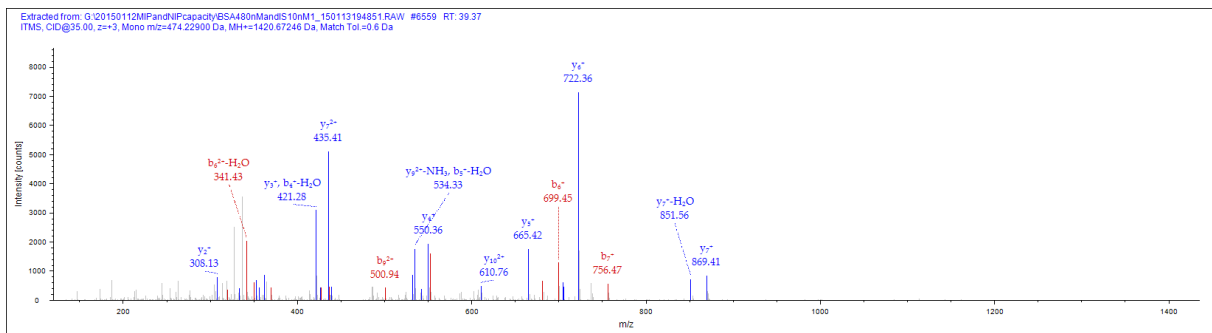
Figur 4.14 - viser ms/ms av peptidet KQTALVELLK (m/z 571,86)



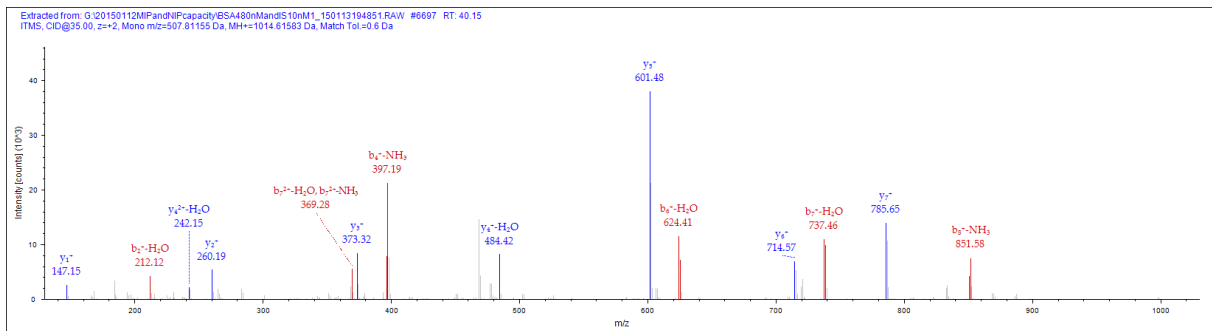
Figur 4.15 - viser ms/ms av peptidet LVVSTQTLA (m/z 1002,58)



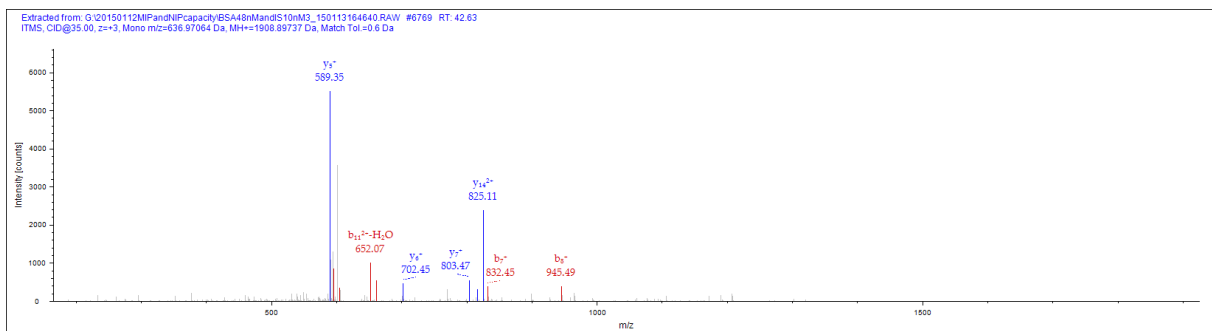
Figur 4.16 - viser ms/ms av peptidet LVNELTEFAK (m/z 582,32)



Figur 4.17 - viser ms/ms av peptidet SLHTLFGDELCK (m/z 474,23)

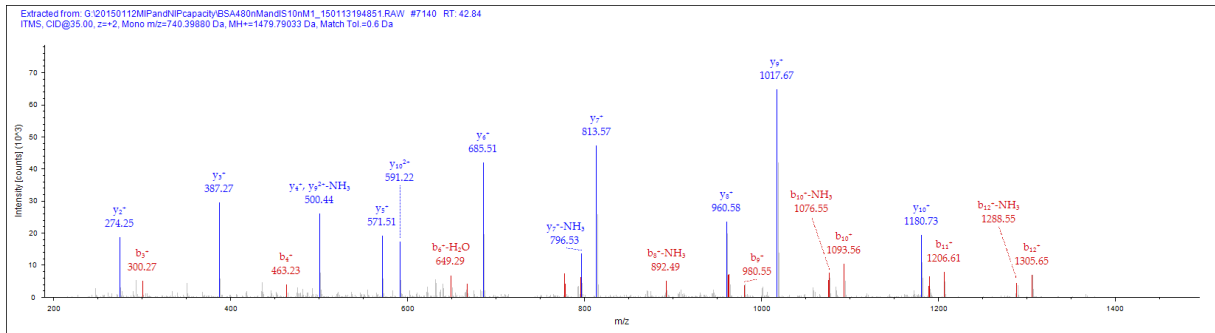


Figur 4.18 - viser ms/ms av peptidet QTALVELLK (m/z 507,81)

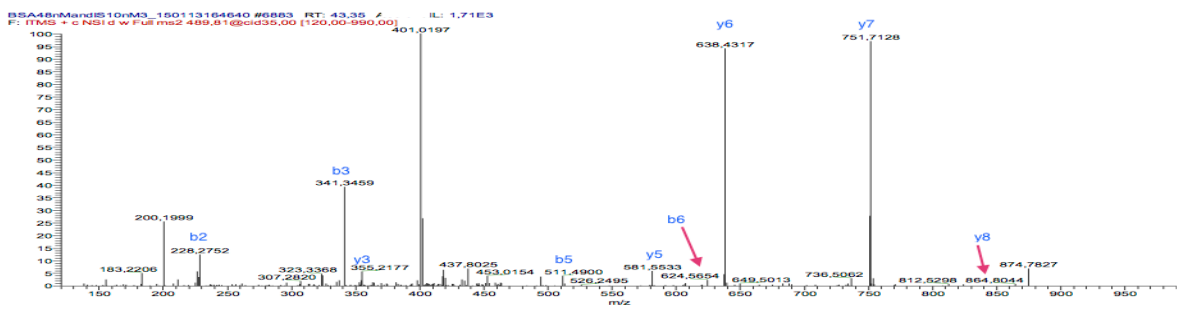


Figur 4.19 - viser ms/ms av peptidet LFTFHADICTLPDTEK (m/z 636,97)

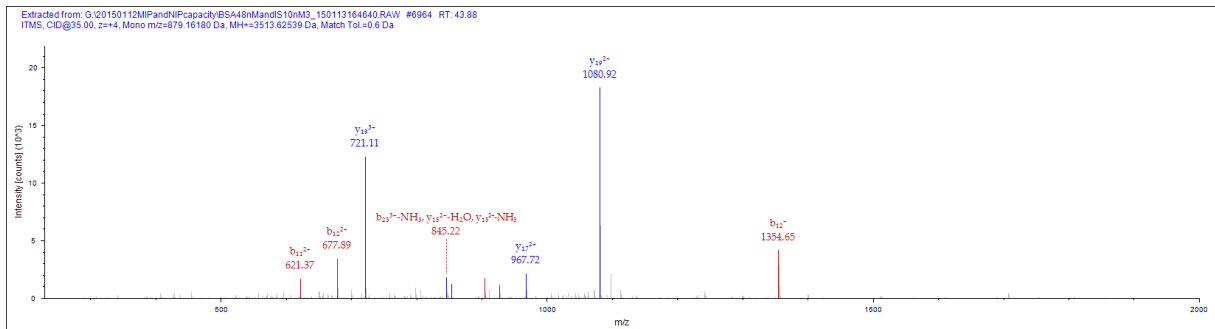
Appendiks 4



Figur 4.20 - viser ms/ms av peptidet LGEYGFQNALIVR (m/z 740,40)



Figur 4.21 - viser ms/ms av peptidet NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂] (m/z 489,80 (C-terminalen vil vise rundt 8 Da større verdi))



Figur 4.22 - viser ms/ms av peptidet SHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDKDVCK (m/z 879,16)

Appendiks 5

Tabell 5.1 - Gjennomsnitt for arealene for peptidene i MIP SPE forsøket.

Gjennomsnitt:	YICDNQDTISSK	HLVDEPQNLIK	KVPQVSTPTLVEVSR	LVVSTQTALA	NLLGLIEA[K- ¹³ C ₆ ¹⁵ N ₂]
BSA & IS	24 873 859	1 896 484	977 640	7 224 975	4 681 426 316
Flow through MIP	103 654	66 921	0	0	1 055 300
Eluering SPE MIP	21051960	3630226	960496	912953	765756733
Vask SPE MIP	YICDNQDTISSK	HLVDEPQNLIK	KVPQVSTPTLVEVSR	LVVSTQTALA	NLLGLIEA[K- ¹³ C ₆ ¹⁵ N ₂]
0 %	0	0	0	0	0
5 %	5 692 806	102 766	0	157 790	48 159 663
10 %	591 108	42 434	0	991 843	187 851 018
15 %	0	36 165	167 964	2 237 678	484 548 632
20 %	0	51 281	157 156	1 344 318	659 444 918
25 %	0	75 826	0	507 497	596 819 466
30 %	0	25 018	0	315 562	356 996 784
35 %	0	65 001	0	130 712	169 124 553
40 %	0	0	0	67 655	81 002 435
Sum	6 283 914	398 491	325 120	5 753 057	2 583 947 468

I tabellen er IS NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂].

Tabell 5.2 - Resultatene presentert kumulativt for MIP SPE.

Kumulativt	YICDNQDTISSK	HLVDEPQNLIK	KVPQVSTPTLVEVSR	LVVSTQTALA	NLLGLIEA[K- ¹³ C ₆ ¹⁵ N ₂]
0 %	0	0	0	0	0
5 %	0,90593	0,25789	0	0,02743	0,01864
10 %	1	0,36437	0	0,19983	0,09134
15 %	1	0,45513	0,51662	0,58878	0,27886
20 %	1	0,58382	1	0,82245	0,53407
25 %	1	0,77410	1	0,91067	0,76504
30 %	1	0,83688	1	0,96552	0,90320
35 %	1	1	1	0,98824	0,96865
40 %	1	1	1	1	1

Tabell 5.3 - Gjennomsnitt for arealene for peptidene i NIP SPE forsøket.

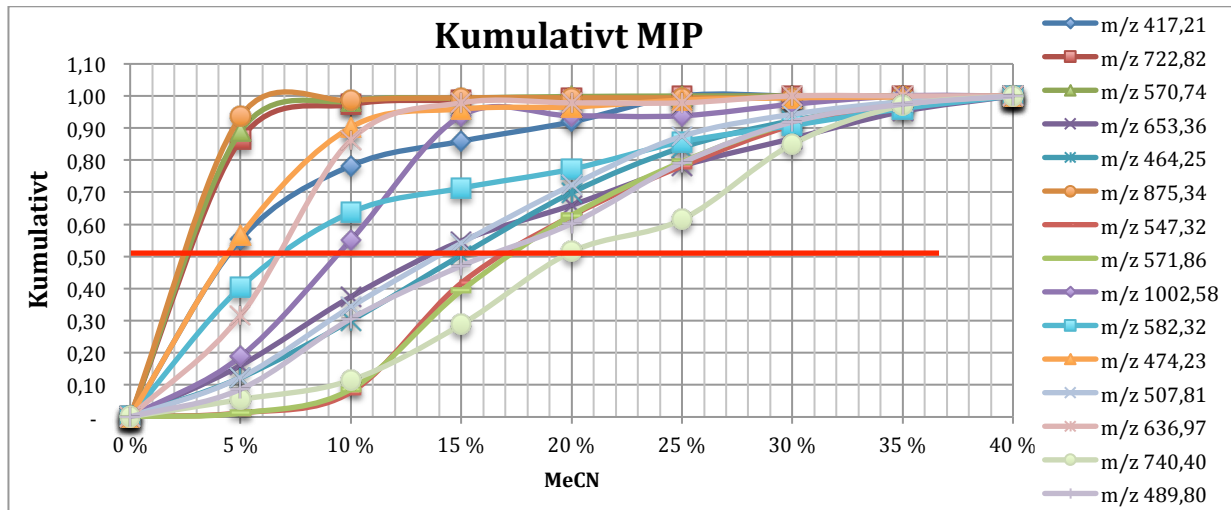
Gjennomsnitt:					
	YICDNQDTISSK	HLVDEPQNLIK	KVPQVSTPTLVEVSR	LVVSTQTALA	NLLGLIEA[K- ¹³ C ₆ ¹⁵ N ₂]
BSA & IS	24873859	1896484	977640	7224975	4681426316
Flow through NIP	0	83036	0	38838	1701712
Eluering SPE NIP	26267519	3876033	1020602	893503	671310360
Vask SPE NIP					
	YICDNQDTISSK	HLVDEPQNLIK	KVPQVSTPTLVEVSR	LVVSTQTALA	NLLGLIEA[K- ¹³ C ₆ ¹⁵ N ₂]
0 %	0	0	0	0	0
5 %	2 027 583	0	0	121 792	34 467 313
10 %	0	0	0	894 974	127 238 440
15 %	0	35 935	177 886	2 688 853	795 786 870
20 %	0	35 662	96 351	1 467 342	829 889 690
25 %	0	36 744	0	520 254	504 662 825
30 %	0	45 406	0	297 762	242 002 642
35 %	0	54 530	0	57 948	120 714 773
40 %	0	32 425	0	28 981	65 697 888
Sum	2 027 583	240 702	274 237	6 077 905	2 720 460 440

I tabellen er IS NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂].

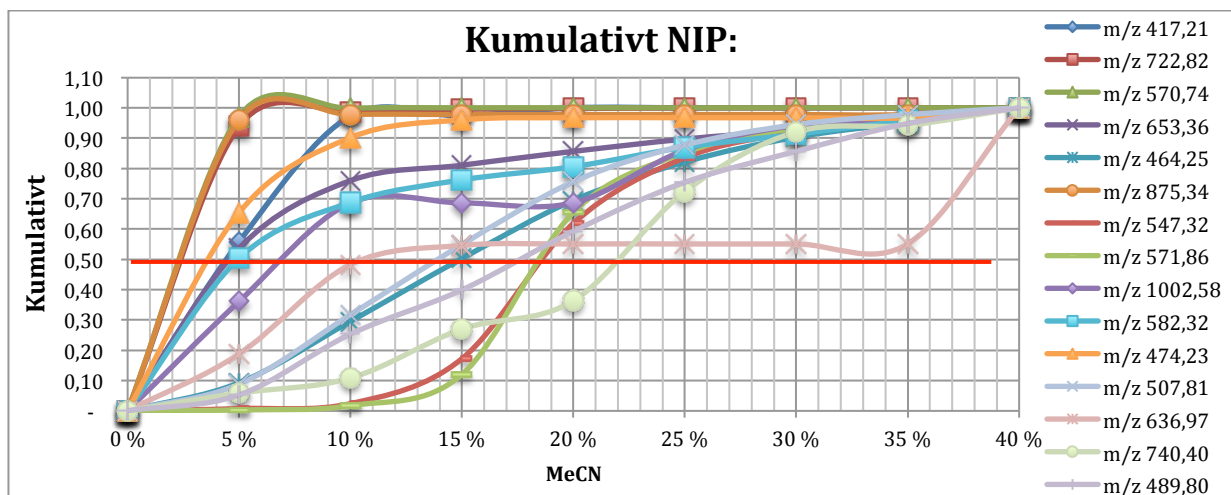
Tabell 5.4 - Resultatene presentert kumulativt for NIP SPE.

Kumulativt					
	YICDNQDTISSK	HLVDEPQNLIK	KVPQVSTPTLVEVSR	LVVSTQTALA	NLLGLIEA[K- ¹³ C ₆ ¹⁵ N ₂]
0 %	0	0	0	0	0
5 %	1	0	0	0,02004	0,01267
10 %	1	0	0	0,16729	0,05944
15 %	1	0,14929	0,64866	0,60969	0,35196
20 %	1	0,29745	1	0,85111	0,65701
25 %	1	0,45010	1	0,93671	0,84252
30 %	1	0,63874	1	0,98570	0,93148
35 %	1	0,86529	1	0,99523	0,97585
40 %	1	1	1	1	1

Appendiks 6



Figur 6.1 – Kumulativ kurve for MIP i fra PCA og PLS forsøket.



Figur 6.2 – Kumulativ kurve for NIP i fra PCA og PLS forsøket.

Appendiks 6

Tabell 6.1 – Gjennomsnitt av arealene for peptidene i PCA & PLS forsøket (MIP SPE).

Gjennomsnitt:	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
BSA & IS	2 162 684	223 818 073	98 465 967	170 743 181	22 780 264	15 321 370	25 809 511	43 751 166	32 049 023	185 930 564	6 855 955	33 218 665	19 367 156	132 010 577	1 300 861	6 334 793
Flow through MIP	185 785	29 849 441	56 887 581	6 747 892	1 062 198	1 935 542	1 448 672	1 490 963	1 202 808	8 583 023	446 697	1 618 088	1 209 650	6 637 688	0	0
Wash SPE MIP	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
5 %	526 245	64 131 498	25 396 489	14 088 564	7 126 158	2 975 721	752 880	400 227	6 170 492	65 457 554	2 450 953	6 745 685	1 162 219	3 226 550	0	1 131 206
10 %	218 888	8 119 903	2 704 873	18 787 925	10 385 349	158 557	3 784 288	2 478 891	11 932 309	37 758 174	1 469 018	12 046 264	2 013 629	3 572 403	0	2 877 009
15 %	72 650	967 866	254 733	15 254 318	11 878 817	27 219	20 024 520	10 271 404	12 713 985	12 262 508	246 854	10 881 907	425 705	10 290 872	0	2 158 846
20 %	57 539	486 147	139 125	9 790 121	11 341 881	0	12 329 330	7 858 364	0	9 580 680	27 468	9 891 654	0	13 475 359	0	1 724 968
25 %	76 886	402 323	45 284	10 715 728	8 205 721	0	9 143 437	5 575 710	0	13 798 372	92 024	8 349 305	0	5 957 819	0	2 476 215
30 %	0	75 915	9 166	7 529 559	4 880 177	0	7 460 035	4 084 417	1 175 124	8 240 024	32 458	3 743 163	79 000	13 943 631	0	1 669 692
35 %	0	55 359	0	7 403 190	2 974 329	18 818	3 982 590	2 222 424	853 295	8 532 721	10 522	2 137 819	0	7 122 212	0	723 464
40 %	0	0	0	4 246 580	1 511 809	0	1 421 141	565 675	0	6 362 342	14 350	1 003 800	0	1 795 799	0	341 340
Eluering SPE MIP	3 177 358	126 138 445	48 267 059	72 134 842	8 743 817	0	17 534 475	6 276 017	0	122 877 758	32 664 261	1 192 796	0	0	0	4 648 309

I tabellen er IS NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂].

Tabell 6.2 - Resultatene presentert kumulativt (MIP SPE).

Kumulativt:	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
0 %	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5 %	0,5527	0,8639	0,8896	0,1604	0,1222	0,9357	0,0128	0,0120	0,1879	0,4041	0,5643	0,1231	0,3158	0,0543	0	0,0863
10 %	0,7825	0,9732	0,9843	0,3744	0,3003	0,9855	0,0770	0,0861	0,5512	0,6372	0,9025	0,3429	0,8629	0,1145	0	0,3059
15 %	0,8588	0,9863	0,9932	0,5481	0,5041	0,9941	0,4170	0,3931	0,9382	0,7129	0,9593	0,5415	0,9785	0,2878	0	0,4707
20 %	0,9193	0,9928	0,9981	0,6596	0,6986	0,9941	0,6264	0,6279	0,9382	0,7720	0,9656	0,7220	0,9785	0,5147	0	0,6023
25 %	1,0000	0,9982	0,9997	0,7816	0,8394	0,9941	0,7816	0,7946	0,9382	0,8572	0,9868	0,8744	0,9785	0,6150	0	0,7913
30 %	1,0000	0,9993	1,0000	0,8673	0,9231	0,9941	0,9083	0,9167	0,9740	0,9081	0,9943	0,9427	1,0000	0,8498	0	0,9187
35 %	1,0000	1,0000	1,0000	0,9516	0,9741	1,0000	0,9759	0,9831	1,0000	0,9607	0,9967	0,9817	1,0000	0,9698	0	0,9739
40 %	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0	1,0000

Tabell 6.3 - Gjennomsnitt av arealene for peptidene i PCA & PLS forsøket (NIP SPE).

Gjennomsnitt:	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
BSA & IS	2 162 684	223 818 073	98 465 967	170 743 181	22 780 264	15 321 370	25 809 511	43 751 166	32 049 023	185 930 564	6 855 955	33 218 665	19 367 156	132 010 577	1 300 861	6 334 793
Flow through NIP	5 013	12 452 761	58 439 953	1 695 567	354 860	558 970	539 635	286 275	160 631	2 124 470	113 872	332 215	562 971	3 426 744	0	0
Wash SPE NIP	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
5 %	486 037	92 943 380	50 299 977	49 547 575	5 496 074	2 327 368	389 381	94 216	5 197 101	79 905 257	2 505 186	4 556 092	481 186	2 080 070	21 780	1 169 321
10 %	361 899	4 869 091	1 406 264	20 605 649	12 051 771	41 337	842 722	413 683	4 680 455	29 279 704	948 631	11 861 156	757 239	1 755 123	0	4 466 261
15 %	0	726 189	107 542	4 689 853	12 319 191	0	7 630 743	3 015 884	0	11 771 968	225 199	11 976 983	161 576	5 726 257	0	3 241 434
20 %	23 302	251 656	0	4 216 028	11 398 741	0	22 984 638	15 685 683	0	6 937 432	26 665	10 727 662	12 222	3 305 075	0	4 310 588
25 %	0	164 690	0	3 755 971	7 515 159	0	11 144 890	5 784 780	2 505 406	10 181 472	0	6 257 828	0	12 753 503	0	3 585 364
30 %	0	38 037	0	2 822 852	4 876 346	0	4 395 367	2 389 043	1 170 704	6 823 775	0	3 504 919	0	6 969 561	0	2 271 269
35 %	0	0	0	3 297 914	2 886 692	0	2 330 680	1 175 186	156 816	7 312 908	0	1 689 235	0	777 905	0	2 045 131
40 %	0	32 489	0	3 408 254	2 870 211	54 097	1 756 264	781 660	684 565	6 518 585	125 711	1 177 961	1 152 475	2 044 698	23 925	1 154 471
Eluering SPE NIP	1 863 963	94 526 231	28 573 103	75 576 415	9 799 020	11 183 694	12 236 221	5 578 193	3 855 771	130 276 241	29 447 876	8 021 615	25 821 351	10 676 215	846 402	13 875 206

I tabellen er IS NLLGLIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂].

Tabell 6.4 - Resultatene presentert kumulativt (NIP SPE).

Kumulativt:	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
Wash SPE NIP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0 %	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5 %	0,5579	0,9386	0,9708	0,5366	0,0925	0,9606	0,0076	0,0032	0,3610	0,5034	0,6539	0,0880	0,1876	0,0587	0,4765	0,0526
10 %	0,9733	0,9878	0,9979	0,7597	0,2953	0,9777	0,0239	0,0173	0,6862	0,6879	0,9015	0,3172	0,4829	0,1083	0,4765	0,2534
15 %	0,9733	0,9951	1,0000	0,8105	0,5027	0,9777	0,1722	0,1201	0,6862	0,7620	0,9602	0,5487	0,5459	0,2700	0,4765	0,3991
20 %	1,0000	0,9976	1,0000	0,8561	0,6945	0,9777	0,6187	0,6547	0,6862	0,8057	0,9672	0,7560	0,5506	0,3633	0,4765	0,5929
25 %	1,0000	0,9993	1,0000	0,8968	0,8210	0,9777	0,8352	0,8519	0,8602	0,8699	0,9672	0,8769	0,5506	0,7235	0,4765	0,7541
30 %	1,0000	0,9997	1,0000	0,9274	0,9031	0,9777	0,9206	0,9333	0,9416	0,9129	0,9672	0,9446	0,5506	0,9203	0,4765	0,8562
35 %	1,0000	0,9997	1,0000	0,9631	0,9517	0,9777	0,9659	0,9734	0,9524	0,9589	0,9672	0,9772	0,5506	0,9423	0,4765	0,9481
40 %	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000

Appendiks 7

Tabell 7.1 – Gjennomsnitt av arealene for peptidene i pH influens forsøket (MIP SPE).

Gjennomsnitt:	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
BSA & IS_1	28 839 833	203 155 397	131 026 776	155 806 744	60 925 486	11 115 682	76 582 604	37 687 183	53 502 705	213 575 997	32 633 282	56 160 693	16 239 412	89 569 638	3 949 395	19 772 506
Data pH 9,5:	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
FT MIP	222 812	56 781 063	118 571 464	4 500 369	1 899 796	1 360 658	2 014 689	420 397	1 637 478	5 825 226	780 436	913 904	711 858	3 311 814	0	0
Wash SPE MIP	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
7,5% MeCN + 9,5pH	283 888	16 318 950	7 002 398	17 427 013	6 769 718	735 758	7 508 140	9 257 480	19 226 028	8 176 415	3 875 325	5 418 340	1 025 455	6 558 443	0	834 230
Elu SPE MIP	4 142 932	146 371 804	16 146 949	111 815 795	20 753 182	9 628 325	23 889 623	18 175 157	19 487 582	158 640 576	11 211 267	0	19 717 242	112 981 920	39 539 954	8 678 085
Data pH 7,05:	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
FT MIP	2 356 841	87 219 742	89 652 044	15 010 064	2 971 696	3 279 466	3 143 970	2 114 611	5 174 412	11 227 063	1 125 412	2 888 606	557 325	3 786 042	40 716	619 329
Wash SPE MIP	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
7,5% MeCN + 6,5pH	27 873	17 503 615	5 790 460	6 022 515	11 103 260	156 998	3 576 565	821 110	8 597 878	18 970 538	167 133	5 166 105	660 163	4 718 035	0	140 900
Elu SPE MIP	4 925 833	99 046 758	18 891 872	126 286 939	25 158 121	7 119 707	37 287 523	23 704 791	27 308 356	194 270 214	18 128 453	0	28 785 539	131 793 538	42 773 791	14 048 189
Data pH 2,2:	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
FT MIP	4 630	8 072 961	37 727 062	1 285 165	486 498	208 230	562 850	136 384	735 569	2 070 100	224 322	272 725	230 684	1 534 668	0	0
Wash SPE MIP	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
7,5% MeCN + 1,8pH	10 784 278	271 598 023	97 281 248	193 834 065	58 219 105	11 067 133	78 352 623	39 295 533	33 097 723	253 220 643	23 721 865	59 865 858	5 355 858	45 621 118	0	16 739 235
Elu SPE MIP	205 885	2 765 653	689 686	4 495 641	3 497 621	644 649	7 894 753	1 693 105	1 728 422	20 448 781	4 515 650	4 961 739	12 296 493	46 976 457	16 875 736	3 862 324
Gjennomsnitt:	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
BSA & IS_2	16 512 428	210 638 105	131 490 791	163 076 465	74 228 163	11 815 089	101 333 142	38 434 598	25 901 080	264 138 399	28 978 547	61 006 590	13 144 918	123 580 621	1 743 550	11 859 435 443
Data pH 12:	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
FT MIP	19 662 331	82 765 449	21 238 033	85 466 979	55 936 411	0	22 189 931	18 202 713	5 014 617	91 399 215	20 542 583	27 307 506	4 416 079	29 356 390	4 204 046	6 541 946 486
Wash SPE MIP	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
7,5% MeCN + 12pH	1 435 185	2 918 325	0	31 026 990	5 092 585	0	13 754 993	8 366 123	5 787 973	71 609 895	5 580 670	15 916 670	0	22 493 930	0	4 654 479 585
Elu SPE MIP	3 148 378	674 062	11 555	15 191 309	517 058	0	8 481 822	11 187 295	1 039 507	24 029 744	4 774 466	6 220 224	2 901 684	2 786 599	3 677 369	2 482 733 200

I tabellen er IS NLLGLIEA[K₁₃C₆¹⁵N₂].

Tabell 7.2 – Utbytte for peptidene i pH influens forsøket (MIP SPE)

Utbytte:																
Data pH 9,5:	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
FT MIP	0,0077	0,2795	0,9049	0,0289	0,0312	0,1224	0,0263	0,0112	0,0306	0,0273	0,0239	0,0163	0,0438	0,0370	0	0
Wash SPE MIP	0,0098	0,0803	0,0534	0,1119	0,1111	0,0662	0,0980	0,2456	0,3593	0,0383	0,1188	0,0965	0,0631	0,0732	0	0,0422
Elu SPE MIP	0,1437	0,7205	0,1232	0,7177	0,3406	0,8662	0,3119	0,4823	0,3642	0,7428	0,3436	0	1,2142	1,2614	10,0116	0,4389
total:	0,1612	1,0803	1,0816	0,8584	0,4829	1,0548	0,4363	0,7391	0,7542	0,8083	0,4862	0,1128	1,3211	1,3716	10,0116	0,4811
Data pH 7,05:	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
FT MIP	0,0817	0,4293	0,6842	0,0963	0,0488	0,2950	0,0411	0,0561	0,0967	0,0526	0,0345	0,0514	0,0343	0,0423	0,0103	0,0313
Wash SPE MIP	0,0010	0,0862	0,0442	0,0387	0,1822	0,0141	0,0467	0,0218	0,1607	0,0888	0,0051	0,0920	0,0407	0,0527	0	0,0071
Elu SPE MIP	0,1708	0,4875	0,1442	0,8105	0,4129	0,6405	0,4869	0,6290	0,5104	0,9096	0,5555	0	1,7726	1,4714	10,8305	0,7105
Total:	0,2535	1,0030	0,8726	0,9455	0,6440	0,9497	0,5746	0,7069	0,7678	1,0510	0,5951	0,1434	1,8475	1,5664	10,8408	0,7489
Data pH 2,2:	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
FT MIP	0,0002	0,0397	0,2879	0,0082	0,0080	0,0187	0,0073	0,0036	0,0137	0,0097	0,0069	0,0049	0,0142	0,0171	0	0
Wash SPE MIP	0,3739	1,3369	0,7425	1,2441	0,9556	0,9956	1,0231	1,0427	0,6186	1,1856	0,7269	1,0660	0,3298	0,5093	0	0,8466
Elu SPE MIP	0,0071	0,0136	0,0053	0,0289	0,0574	0,0580	0,1031	0,0449	0,0323	0,0957	0,1384	0,0883	0,7572	0,5245	4,2730	0,1953
Total:	0,3812	1,3902	1,0357	1,2812	1,0210	1,0724	1,1336	1,0912	0,6647	1,2911	0,8722	1,1592	1,1012	1,0509	4,2730	1,0419
Data pH 12:	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
FT MIP	1,1908	0,3929	0,1615	0,5241	0,7536	0	0,2190	0,4736	0,1936	0,3460	0,7089	0,4476	0,3360	0,2375	2,4112	0,5516
Wash SPE MIP	0,0869	0,0139	0	0,1903	0,0686	0	0,1357	0,2177	0,2235	0,2711	0,1926	0,2609	0	0,1820	0	0,3925
Elu SPE MIP	0,1907	0,0032	0,0001	0,0932	0,0070	0	0,0837	0,2911	0,0401	0,0910	0,1648	0,1020	0,2207	0,0225	2,1091	0,2093
total:	1,4683	0,4100	0,1616	0,8075	0,8291	0	0,4384	0,9823	0,4572	0,7081	1,0662	0,8105	0,5567	0,4421	4,5203	1,1534

Tabell 7.3 – Normalisert utbytte for peptidene i pH influens forsøket (MIP SPE)

Normalisering:																
Data pH 9,5:	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
FT	0,0479	0,2587	0,8367	0,0336	0,0646	0,1161	0,0603	0,0151	0,0406	0,0337	0,0492	0,1443	0,0332	0,0270	0	0
Wash	0,0611	0,0744	0,0494	0,1303	0,2301	0,0628	0,2247	0,3324	0,4765	0,0474	0,2442	0,8557	0,0478	0,0534	0	0,0877
Elu	0,8910	0,6669	0,1139	0,8360	0,7053	0,8212	0,7150	0,6525	0,4830	0,9189	0,7066	0	0,9190	0,9197	1,0000	0,9123
total:	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
Data pH 7,05:	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
FT	0,3224	0,4280	0,7841	0,1019	0,0757	0,3107	0,0714	0,0794	0,1260	0,0500	0,0579	0,3586	0,0186	0,0270	0,0010	0,0418
Wash	0,0038	0,0859	0,0506	0,0409	0,2830	0,0149	0,0813	0,0308	0,2093	0,0845	0,0086	0,6414	0,0220	0,0336	0	0,0095
Elu	0,6738	0,4861	0,1652	0,8572	0,6412	0,6745	0,8473	0,8898	0,6647	0,8655	0,9334	0	0,9594	0,9394	0,9990	0,9487
Total:	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
Data pH 2,2:	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
FT	0,0004	0,0286	0,2780	0,0064	0,0078	0,0175	0,0065	0,0033	0,0207	0,0075	0,0079	0,0042	0,0129	0,0163	0	0
Wash	0,9809	0,9616	0,7169	0,9710	0,9359	0,9284	0,9026	0,9555	0,9307	0,9183	0,8335	0,9196	0,2995	0,4846	0	0,8125
Elu	0,0187	0,0098	0,0051	0,0225	0,0562	0,0541	0,0909	0,0412	0,0486	0,0742	0,1587	0,0762	0,6876	0,4990	1,0000	0,1875
Total:	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
Data pH 12:	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
FT	0,8110	0,9584	0,9995	0,6490	0,9089	0	0,4995	0,4821	0,4235	0,4887	0,6649	0,5523	0,6035	0,5373	0,5334	0,4782
Wash	0,0592	0,0338	0	0,2356	0,0827	0	0,3096	0,2216	0,4888	0,3829	0,1806	0,3219	0	0,4117	0	0,3403
Elu	0,1299	0,0078	0,0005	0,1154	0,0084	0	0,1909	0,2963	0,0878	0,1285	0,1545	0,1258	0,3965	0,0510	0,4666	0,1815
total:	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000

Tabell 7.4 - Gjennomsnitt av arealene for peptidene i pH influens forsøket (NIP SPE)

Gjennomsnitt:	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
BSA & IS_1	28 839 833	203 155 397	131 026 776	155 806 744	60 925 486	11 115 682	76 582 604	37 687 183	53 502 705	213 575 997	32 633 282	56 160 693	16 239 412	89 569 638	3 949 395	19 772 506
Data pH9,50:	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
FT NIP	804 876	64 508 141	91 986 690	9 938 590	2 149 461	1 414 550	2 654 484	1 471 874	2 818 831	7 549 493	852 658	1 676 066	705 306	4 309 508	104 402	430 202
Wash SPE NIP	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
7,5% MeCN + 9,5pH	4 973	3 706 214	1 919 251	1 050 590	1 933 853	41 189	664 187	118 676	1 922 538	2 062 272	95 762	761 269	108 663	1 000 082	0	0
Elu SPE NIP	3 213 599	131 828 178	15 911 639	109 073 948	22 140 603	9 359 777	25 375 632	20 145 167	23 587 068	168 550 992	9 796 657	225 505	21 507 558	117 486 818	37 089 346	8 301 084
Data pH 7,05:	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
FT NIP	507 829	42 664 202	86 171 658	5 205 880	1 227 180	1 059 010	1 289 901	781 397	1 882 147	4 426 942	522 299	1 060 180	351 001	2 435 225	4 659	185 480
Wash SPE NIP	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
7,5% MeCN + 6,5pH	0	4 287 763	2 361 822	1 388 532	1 255 568	13 919	1 032 585	300 247	1 542 477	1 493 547	28 894	763 903	101 959	785 170	0	0
Elu SPE NIP	15 040 064	157 684 722	28 771 860	178 280 122	66 198 404	10 678 547	94 009 108	35 337 434	40 774 630	313 354 230	55 232 870	20 327 009	39 235 929	149 276 125	47 157 113	30 246 736
Data pH 2,2:	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
FT NIP	285 437	32 338 459	67 267 153	3 294 258	1 005 970	550 665	1 115 923	526 913	819 831	3 094 297	271 903	774 167	260 936	1 858 101	0	65 587
Wash SPE NIP	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
7,5% MeCN + 1,8pH	1 915 872	47 031 618	11 611 022	38 067 586	10 448 224	2 117 150	13 443 260	7 571 161	6 658 124	48 234 361	3 633 897	10 485 608	1 389 615	10 844 598	0	2 873 804
Elu SPE NIP	264 117	3 461 803	764 193	9 073 330	6 748 849	1 821 962	18 585 547	3 472 787	2 795 006	51 657 152	15 100 225	11 648 967	23 057 925	101 885 351	39 844 970	9 368 471
Gjennomsnitt:																
	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
BSA & IS_2	16 512 428	210 638 105	131 490 791	163 076 465	74 228 163	11 815 089	101 333 142	38 434 598	25 901 080	264 138 399	28 978 547	61 006 590	13 144 918	123 580 621	1 743 550	11 859 435 443
Data pH 12:	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
FT NIP	12 802 750	77 551 280	19 948 896	62 674 777	55 872 429	0	8 043 259	7 772 225	2 353 921	49 898 580	10 438 947	16 520 256	0	11 522 088	1 080 052	3 255 927 231
Wash SPE NIP	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
7,5% MeCN + 12pH	1 639 795	2 688 065	0	51 960 725	4 994 190	0	23 376 763	15 221 360	10 085 960	109 285 888	7 187 218	24 652 778	0	36 198 753	0	6 727 874 293
Elu SPE NIP	3 420 649	754 585	0	16 906 106	321 958	0	10 925 907	13 151 307	1 221 136	30 063 615	5 431 087	6 726 636	3 776 812	3 641 745	5 198 855	2 811 118 098

I tabellen er IS NLLGLIEA[K₋¹³C₆¹⁵N₂].

Appendiks 7

Tabell 7.5 – Utbytte for peptidene i pH influens forsøket (NIP SPE)

Utbytte:																
Data pH 9,5:	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
FT NIP	0,0279	0,3175	0,7020	0,0638	0,0353	0,1273	0,0347	0,0391	0,0527	0,0353	0,0261	0,0298	0,0434	0,0481	0,0264	0,0218
Wash SPE NIP	0,0002	0,0182	0,0146	0,0067	0,0317	0,0037	0,0087	0,0031	0,0359	0,0097	0,0029	0,0136	0,0067	0,0112	0	0
Elu SPE NIP	0,1114	0,6489	0,1214	0,7001	0,3634	0,8420	0,3313	0,5345	0,4409	0,7892	0,3002	0,0040	1,3244	1,3117	9,3911	0,4198
Total:	0,1395	0,9847	0,8381	0,7706	0,4304	0,9730	0,3747	0,5767	0,5295	0,8342	0,3293	0,0474	1,3745	1,3710	9,4176	0,4416
Data pH 7,05:	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
FT NIP	0,0176	0,2100	0,6577	0,0334	0,0201	0,0953	0,0168	0,0207	0,0352	0,0207	0,0160	0,0189	0,0216	0,0272	0,0012	0,0094
Wash SPE NIP	0	0,0211	0,0180	0,0089	0,0206	0,0013	0,0135	0,0080	0,0288	0,0070	0,0009	0,0136	0,0063	0,0088	0	0
Elu SPE NIP	0,5215	0,7762	0,2196	1,1442	1,0865	0,9607	1,2276	0,9377	0,7621	1,4672	1,6925	0,3619	2,4161	1,6666	11,9403	1,5297
Total:	0,5391	1,0073	0,8953	1,1866	1,1273	1,0572	1,2579	0,9664	0,8261	1,4949	1,7094	0,3944	2,4440	1,7025	11,9415	1,5391
Data pH 2,2:	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
FT NIP	0,0099	0,1592	0,5134	0,0211	0,0165	0,0495	0,0146	0,0140	0,0153	0,0145	0,0083	0,0138	0,0161	0,0207	0	0,0033
Wash SPE NIP	0,0664	0,2315	0,0886	0,2443	0,1715	0,1905	0,1755	0,2009	0,1244	0,2258	0,1114	0,1867	0,0856	0,1211	0	0,1453
Elu SPE NIP	0,0092	0,0170	0,0058	0,0582	0,1108	0,1639	0,2427	0,0921	0,0522	0,2419	0,4627	0,2074	1,4199	1,1375	10,0889	0,4738
Total:	0,0855	0,4077	0,6078	0,3237	0,2988	0,4039	0,4328	0,3070	0,1920	0,4822	0,5824	0,4079	1,5215	1,2793	10,0889	0,6225
Data pH 12:	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
FT NIP	0,7753	0,3682	0,1517	0,3843	0,7527	0	0,0794	0,2022	0,0909	0,1889	0,3602	0,2708	0	0,0932	0,6195	0,2745
Wash SPE NIP	0,0993	0,0128	0	0,3186	0,0673	0	0,2307	0,3960	0,3894	0,4137	0,2480	0,4041	0	0,2929	0	0,5673
Elu SPE NIP	0,2072	0,0036	0	0,1037	0,0043	0	0,1078	0,3422	0,0471	0,1138	0,1874	0,1103	0,2873	0,0295	2,9818	0,2370
totalt:	1,0818	0,3845	0,1517	0,8066	0,8243	0	0,4179	0,9404	0,5274	0,7165	0,7957	0,7852	0,2873	0,4156	3,6012	1,0789

Tabell 7.6 – Normalisert utbytte for peptidene i pH influens forsøket (NIP SPE)

Normalisering:																
Data pH 9,5:	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
FT	0,2000	0,3225	0,8376	0,0828	0,0820	0,1308	0,0925	0,0677	0,0995	0,0424	0,0794	0,6294	0,0316	0,0351	0,0028	0,0493
Wash	0,0012	0,0185	0,0175	0,0088	0,0737	0,0038	0,0231	0,0055	0,0679	0,0116	0,0089	0,2859	0,0049	0,0081	0	0
Elu	0,7987	0,6590	0,1449	0,9085	0,8443	0,8654	0,8843	0,9268	0,8326	0,9461	0,9117	0,0847	0,9635	0,9568	0,9972	0,9507
Total:	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
Data pH 7,05:	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
FT	0,0327	0,2085	0,7346	0,0282	0,0179	0,0901	0,0134	0,0215	0,0426	0,0139	0,0094	0,0479	0,0088	0,0160	0,0001	0,0061
Wash	0	0,0210	0,0201	0,0075	0,0183	0,0012	0,0107	0,0082	0,0349	0,0047	0,0005	0,0345	0,0026	0,0051	0	0
Elu	0,9673	0,7706	0,2453	0,9643	0,9639	0,9087	0,9759	0,9703	0,9225	0,9815	0,9901	0,9177	0,9886	0,9789	0,9999	0,9939
Total:	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
Data pH 2,2:	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
FT	0,1158	0,3904	0,8446	0,0653	0,0553	0,1226	0,0337	0,0455	0,0798	0,0300	0,0143	0,0338	0,0106	0,0162	0	0,0053
Wash	0,7771	0,5678	0,1458	0,7548	0,5740	0,4715	0,4056	0,6543	0,6481	0,4684	0,1912	0,4577	0,0562	0,0946	0	0,2335
Elu	0,1071	0,0418	0,0096	0,1799	0,3708	0,4058	0,5607	0,3001	0,2721	0,5016	0,7945	0,5085	0,9332	0,8891	1,0000	0,7612
Total:	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
Data pH 12:	m/z 417,21	m/z 722,82	m/z 570,74	m/z 653,36	m/z 464,25	m/z 875,34	m/z 547,32	m/z 571,86	m/z 1002,58	m/z 582,32	m/z 474,23	m/z 507,81	m/z 636,97	m/z 740,40	m/z 879,16	m/z 489,80
FT	0,7167	0,9575	1,0000	0,4765	0,9131	0	0,1899	0,2150	0,1723	0,2637	0,4527	0,3449	0	0,2243	0,1720	0,2545
Wash	0,0918	0,0332	0	0,3950	0,0816	0	0,5520	0,4211	0,7383	0,5775	0,3117	0,5147	0	0,7048	0	0,5258
Elu	0,1915	0,0093	0	0,1285	0,0053	0	0,2580	0,3638	0,0894	0,1589	0,2355	0,1404	1,0000	0,0709	0,8280	0,2197
totalt:	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000

