

1. PROTEÓMICA CUANTITATIVA

HPLC-Chip/MS: una nueva herramienta de Agilent Technologies para mejorar la cuantificación y expresión diferencial de péptidos y proteínas mediante nano-LC/MS.

Masana I.

Agilent Technologies

Introducción

La sensibilidad y robustez de los sistemas analíticos utilizados es un aspecto clave para la cuantificación y evaluación de niveles de expresión diferencial. Los actuales sistemas de nano-cromatografía (columnas 50-100 μ m de diámetro interno) acoplada a espectrometría de masas mejoran muy considerablemente la sensibilidad con respecto a los sistemas con columnas de mayor diámetro (0.2-4.6mm d.i.), pero su robustez es bastante delicada y requiere de usuarios con experiencia.

Descripción tecnología HPLC-Chip/MS

La nano-tecnología HPLC-Chip/MS desarrollada por Agilent Technologies, solventa los inconvenientes descritos y proporciona una muy eficiente y robusta separación e ionización de la muestra. Utiliza la tecnología de microfluídica desarrollada por HP/Agilent para impresoras de chorro de tinta, y consigue incluir en un Chip (del tamaño similar de una tarjeta de crédito):

- Nano-columna (75 μ m.) y pre-columna para preconcentración de la muestra.
- Punta emisora para la formación del nano-Spray e ionización de la muestra.
- Todas las conexiones microfluídicas y eléctricas necesarias.

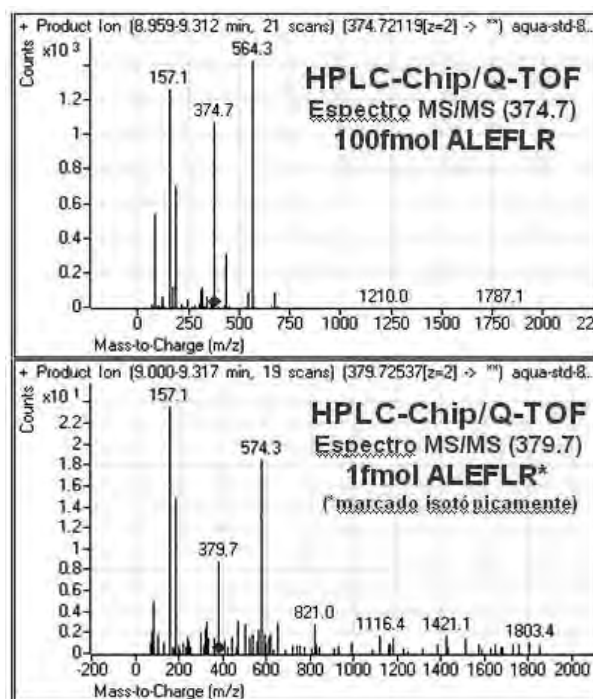
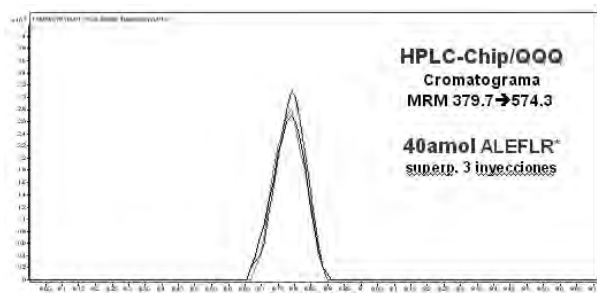
La eliminación de volúmenes muertos y utilización de un material muy inerte, proporcionan picos muy simétricos que mejoran la calidad de la separación cromatográfica, su sensibilidad y repetitibilidad cuantitativa (asociada también a una excelente estabilidad del nano-Spray formado y a una excelente respuesta incluso con eluyentes acuosos). La

automatización del proceso de establecimiento de conexiones fluídicas y de la inserción del Chip en la fuente Nano-Electrospray incorporada proporcionan una fácil y robusta operación del mismo. El sistema también permite la utilización de nano-columnas convencionales o la infusión de la muestra.

Resultados

El acoplamiento del HPLC-CHIP a un espectrómetro de masas tipo QTOF permitirá obtener espectros de MS y MS/MS con “masa exacta” a muy bajos niveles de femtomoles inyectados en columna. Como se puede observar en la comparación del espectro MS/MS de 1 fmol de un péptido marcado isotópicamente con respecto a 100 fmol del péptido sin marcar. No obstante, si el objetivo es el conseguir la máxima sensibilidad en la cuantificación de péptidos concretos en digestiones de complejas mezclas de proteínas, el acoplamiento HPLC-Chip/QqQ permitirá detectar niveles bajos de atomoles con una buena repetitibilidad, como se puede observar en la superposición adjunta de 3 cromatogramas MS/MS a nivel de 40 atomoles.





Bibliografía

- H. Yin, K. Killeen, R. Brennen, D. Sobek, M. Werlich, T. Goor. 2005. *Anal. Chem.* 2005, 77, 527-533.
- H. Molina, D. M. Horn, N. Tang, S. Mathivanan, A. Pandey. 2007. *PNAS*, 2007, vol. 104, n.º. 7, 2199-2204.

Quantification of ceramide molecular species in total lipid extracts of white adipose tissue by shotgun lipidomics

Bonzon-Kulichenko E^{1*}, Schwudke D², Ejsing CS², Sampaio J², Gallardo N¹, Andres A¹, Shevchenko A².

¹Biochemistry Section, Faculty of Chemistry, and Regional Centre for Biomedical Research (CRIB), University of Castilla-La Mancha, 13071 Ciudad Real, Spain. ²Max Plank Institute of Molecular Cell Biology and Genetics, 01307 Dresden, Germany. *current address: Protein Chemistry and Proteomics Laboratory, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC, Madrid, Spain.

Introduction

Ceramides are low abundant lipids that mediate diverse biological processes such as cell cycle, differentiation and apoptosis. Ceramides usually consist of a long-chain amino alcohol generally referred to as a “sphingoid base” and an amide-linked long-chain fatty acid (Merrill & Sweeley, 1996). ESI/MS has been widely used to directly quantitate molecular species of many classes in lipid extracts of biological samples (Han & Gross, 2003). However, the quantification of low abundant lipids is still a challenge. Herein we present a shotgun lipidomic approach for the characterization and quantification of ceramide lipids in total extracts of white adipose tissue (WAT).

Material and methods

Total lipid extracts were obtained out of 20 mg rat WAT by Folch. Acylglycerides, which constitute more than 90% of the lipid contents of this tissue and interfere with the ESI-MS analysis of the mixture by suppressing the signal, were removed from the total lipid extracts by TLC, and ceramides were extracted from TLC bands by Folch (Fig.A, Inset). Ceramide molecular species precursors were then readily identified in positive ion mode by the 18-carbon sphingosine base specific product ions m/z 252.27, 264.27 and 282.27 (Gu et al., 1997) (Fig.B) on a hybrid QSTAR pulsar *i* instrument equipped with an automated nanoflow ion source NanoMate HD System. Six endogenous