

CLAVES PARA CONSEGUIR CARACTERIZACIONES DE PÉPTIDOS ÓPTIMAS:

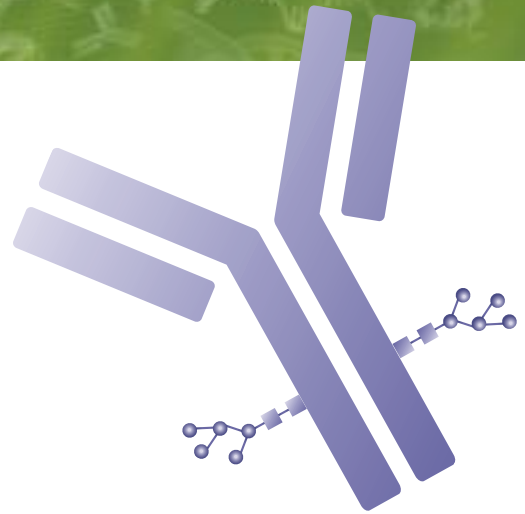
Una guía práctica de mapa de péptidos

The Measure of Confidence



Agilent Technologies

INTRODUCCIÓN



Mapa de péptidos, una herramienta inestimable para compuestos biofarmacéuticos, es un método muy potente además de la prueba de identidad más utilizada para proteínas, especialmente las que se producen por medios recombinantes. Por lo general, incluye la digestión enzimática (normalmente con el uso de tripsina) de una proteína para producir fragmentos de péptidos, seguida por la separación e identificación de los fragmentos en una forma reproducible; esto permite la detección y control de cambios de aminoácidos individuales, oxidación, deamidación y otros productos de degradación. También permite la detección directa de variantes comunes de anticuerpo monoclonal como la ciclización N-terminal, el procesamiento de lisina C-terminal y la N-glicosilación, así como otras modificaciones post-traslacionales.

Un mapa de péptidos es una identificación de una proteína, así como el producto final de varios procesos que proporcionan una comprensión completa de la proteína que se analiza. Incluye cuatro pasos principales: aislamiento y purificación de la proteína; división selectiva de los enlaces de péptidos; separación cromatográfica de los péptidos y análisis validado de los péptidos.

El mapa de péptidos se considera un procedimiento comparativo que confirma la estructura primaria de la proteína y detecta alteraciones en su estructura. De forma adicional, muestra consistencia en el proceso y estabilidad genética. Un mapa de péptidos debe incluir la identificación positiva de la proteína, maximizar la cobertura de la secuencia de péptidos completa y proporcionar información adicional, así como la identificación de la secuencia más allá de la que se obtiene al nivel de proteína no digerida.

La selección de una técnica cromatográfica para separar péptidos y generar mapas de péptidos depende de la proteína, de los objetivos experimentales y del resultado previsto. Sin embargo, la excelente potencia resolutoria de la cromatografía de fase reversa (RPC) hace que esta sea la técnica de HPLC predominante para separaciones de mapa de péptidos. También resulta ideal para separaciones analíticas y de preparación, debido a la disponibilidad de eluyentes de fase móvil volátil. Es importante tener en cuenta que las columnas preferidas para las separaciones de mapa de péptidos son similares a las que se usan para moléculas pequeñas; sin embargo, debido a que las separaciones de mapa de péptidos se realizan con un pH bajo y una temperatura elevada, se utilizan de forma rutinaria columnas con una estabilidad de pH excelente y efectos de silanoles mínimos.

Es necesaria una inspección cuidadosa de la estrategia de caracterización completa para generar mapas de péptidos correctos. Un perfil puede consistir en unos 100 picos que representan péptidos individuales y sus derivados; debido a ello, requiere conocimiento de métodos de preparación de muestras, técnicas de separación potentes y protocolos validados. La capacidad y la información necesarias para desarrollar un mapa de péptidos correcto le ayudará a conseguir la mejor separación posible de sus digestos proteolíticos, así como a conseguir un resultado de caracterización de péptidos correcto y fiable.

El objetivo de esta guía práctica de mapa de péptidos es destacar las áreas que son importantes para generar mapas de péptidos mediante cromatografía de fase reversa, compartir algunas de las técnicas fundamentales que se usan en procedimientos de mapa de péptidos y subrayar consideraciones para la optimización de sus separaciones de mapa de péptidos, con el fin de conseguir los mejores resultados posibles.



Digestión de proteínas: Preparación de proteína para mejorar la separación de mapa de péptidos

Para garantizar una digestión completa y satisfactoria, así como para proporcionar un alto grado de seguridad en la estrategia elegida, resulta útil tener un buen conocimiento de los pasos de la digestión de una proteína antes del análisis. Con frecuencia, el método de digestión requiere su propia serie de protocolos de desarrollo para proporcionar una muestra adecuada y estable para la inyección LC. Aunque hay muchas

opciones a tener en cuenta para la optimización de la digestión, deben seguirse algunos enfoques comunes. Los cinco pasos que se siguen para la digestión de proteínas, resumidos en la Tabla 1, son (1) preparación de muestra (2) selección de agentes de división (3) alquilación/reducción (4) proceso de digestión (5) enriquecimiento/limpieza.

Tabla 1

Cinco pasos para la digestión de proteínas

Procedimiento	Efecto previsto	Experimento general
1. Preparación de muestras	Preparación de la muestra para digestión	Reducción, enriquecimiento, diálisis, desalinización
2. Selección de agente de división	Requisito de división específico	Ninguno
3. Reducción y alquilación	La reducción reduce los enlaces de disulfuro La Alquilación inhibe los grupos SH	Reducción: DTT, 45 min, 60 °C Alquilación: IAM, 1 h, con oscuridad
4. Proceso de digestión	División de proteínas	Digestión: pH 8, 37 °C, durante la noche Atenuación: adición de TFA
5. Enriquecimiento/limpieza	Preparación de muestra para análisis de LC o LC/MS	Puntas de C18, concentración, diálisis, columnas de afinidad

Descubra más acerca de las columnas Agilent para mapa de péptidos en agilent.com/chem/advancebio

Paso 1: Preparación de muestras

En función del tamaño o de la configuración de la proteína, existen diferentes enfoques para el pretratamiento de su muestra.

En determinadas condiciones, puede ser necesario enriquecer la muestra o separar la proteína de las sustancias añadidas y los estabilizadores que se usan en la formulación del producto; esto es así especialmente si interfieren con el procedimiento del mapa. Existen muchos métodos para realizar estos procedimientos y cada proteína tiene su propia serie de medidas o procesos de limpieza. Sin embargo, algunos de los enfoques más habituales que se usan para la limpieza de muestras antes de la digestión incluyen reducción/enriquecimiento, diálisis y desalinización mediante filtración de gel.

Se han desarrollado estrategias de reducción y enriquecimiento para eliminar las proteínas de alta abundancia o aislar proteínas objetivo en la muestra, respectivamente. La reducción se usa más a menudo en aplicaciones de proteómica para reducir la complejidad de muestras biológicas, como por ejemplo el suero, que contiene concentraciones altas de albúmina e inmunoglobulinas. Las columnas HPLC y los cartuchos centrífugos del sistema de eliminación por afinidad múltiple (MARS, por sus siglas en inglés) de Agilent permiten la identificación y caracterización de proteínas de alto valor y baja abundancia, así como de biomarcadores que se encuentran en el suero, el plasma y otros fluidos biológicos. Se eliminó ~94 % de la masa proteica total mediante la reducción de 14 proteínas de alta abundancia con MARS. El proceso de reducción es sólido, fácil de automatizar y de gran eficacia.



MARS está disponible en una variedad de dimensiones de columna de LC y en formatos de cartucho centrífugo. Entre las proteínas reducidas se incluye la albúmina, IgG, antitripsina, IgA, transferrina, haptoglobina, fibrinógeno, macroglobulina alfa2, glicoproteína ácida alfa1, IgM, apolipoproteína AI, apolipoproteína AII, complemento C3 y transtiretina.

Las estrategias de reducción utilizan técnicas de inmunofinidad (como inmunoprecipitación, coimmunoprecipitación y cromatografía de inmunofinidad). De forma alternativa, las técnicas de enriquecimiento aíslan las subclases de proteínas celulares basadas en la actividad bioquímica única, las modificaciones post-traslacionales (PTM, por sus siglas en inglés) o la localización espacial dentro de una célula. Las modificaciones posteriores a la aplicación (como la fosforilación y la glicosilación) pueden enriquecerse con el uso de ligandos de afinidad como la cromatografía de afinidad de ión metálico (IMAC, por sus siglas en inglés) o lectinas inmovilizadas, respectivamente. Para introducir compuestos químicos de proteínas únicos, otras técnicas conllevan la incorporación metabólica o enzimática de aminoácidos o PTM modificados.

Ya sean simples o complejas, a menudo las muestras necesitan diálisis o desalinización para garantizar que son compatibles y están optimizadas para la digestión. Por ejemplo, debido a que la espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés) mide iones cargados y sales (especialmente sodio y sales de fosfato), deben retirarse antes de la MS para minimizar su interferencia con la detección. Los productos de diálisis y desalinización permiten el intercambio de tampones, la desalinización o la eliminación de moléculas pequeñas para evitar interferencias con los procesos posteriores.

La diálisis es un procedimiento establecido para reducir la concentración de sal en las muestras. Requiere el llenado de una bolsa de diálisis (envoltura de membrana de porosidad definida), anudar la bolsa y ponerla en un baño con agua o tampón, donde la concentración de sal se equilibrará mediante difusión. Las moléculas más grandes que no pueden difundirse en la bolsa permanecen en ella. Si el baño es de agua, la concentración de las moléculas pequeñas en la bolsa disminuirá lentamente hasta que la concentración dentro y fuera sea la misma. Una vez completado el equilibrio, la bolsa se rompe y la solución se vierte en un recipiente de recogida. La diálisis se puede usar para volúmenes de varios litros, pero no resulta práctica para volúmenes de muestra grandes, ya que pueden necesitarse varios días para completar la eliminación de sales.

Para desalinizar muestras antes de la digestión, la filtración por gel (GF, por sus siglas en inglés) es el procedimiento de laboratorio más práctico. Este método es una técnica de cromatografía de no absorción que separa moléculas en función del tamaño molecular. La desalinización se usa para eliminar por completo o para reducir la concentración de sal u otros componentes de bajo peso molecular en la muestra, mientras que el intercambio de tampones sustituye el tampón de muestra por un nuevo tampón.



Las columnas Bio SEC de Agilent pueden clasificar eficazmente (por tamaño) y desalinizar mezclas de proteínas antes de las aplicaciones de mapa de péptidos.

La filtración en gel es uno de los métodos de cromatografía más sencillos de realizar; esto se debe a que las muestras se procesan mediante una elución isocrática. En su forma analítica, la filtración en gel (también conocida como cromatografía de exclusión por tamaño) puede distinguir entre moléculas (como proteínas) con pesos moleculares que no difieran más del doble. En estas aplicaciones, la diferencia de tamaño entre sustancias separadas es muy grande (por ejemplo, proteínas frente a sales). Se elige un medio de filtración en gel que excluya por completo las moléculas de mayor tamaño, mientras que se permite que las moléculas más pequeñas se difundan libremente en todos los espacios porosos. La columna se equilibra con un tampón, que puede ser el mismo

o diferente al de la muestra. Después de la aplicación de la muestra a la columna, se añade más del tampón de columna (tampón de elución) para llevar las moléculas de la muestra por la columna. Las moléculas mayores (que no pueden introducirse en los poros del medio) se eluyen de la columna en primer lugar, seguidas por las moléculas más pequeñas que se difunden en los poros, volviéndolas más lentas en relación a las moléculas mayores. Si el tampón de elución es diferente de la muestra que se ha aplicado, las moléculas mayores se desplazan de las sales originales y se eluyen en este nuevo tampón, que está completamente separado del tampón de muestra original.

Filtros de unión baja de proteínas Captiva

Independientemente de la preparación de muestra que se esté realizando, siempre es buena idea filtrar la muestra con un filtro de unión baja de proteínas.

Los filtros de PES Agilent proporcionan uniones bajas de proteínas superiores y consistentes para el filtrado relacionado con proteínas. Las membranas del filtro de PES son una opción mejor que las membranas de PVDF para la mayoría de análisis de LC. La PES de Agilent tiene una compatibilidad similar a los filtros de PVDF para disolventes de LC comunes; también resulta superior en términos de unión de proteínas y limpieza. Descubra más en agilent.com/chem/filtration

Filtros de PES Captiva

Diámetro (mm)	Tamaño de poro (µm)	Certificación	Carcasa	Referencia
15	0,2	LC/MS	Polipropileno	5190-5096
4	0,45	LC	Polipropileno	5190-5095
4	0,2	LC/MS	Polipropileno	5190-5094
15	0,45	LC	Polipropileno	5190-5097
25	0,2	LC/MS	Polipropileno	5190-5098
25	0,45	LC	Polipropileno	5190-5099



Descubra más acerca de las columnas Agilent para mapa de péptidos en agilent.com/chem/advancebio

Paso 2: selección de agentes de división

Existen dos métodos para la división de enlaces de péptidos: el químico y el enzimático. La división química supone el uso de reactivos no enzimáticos nucleofílicos, como el bromuro de cianógeno (CNBr) para dividir químicamente la unión de péptidos en una región específica mientras que ha quedado demostrado que las enzimas proteolíticas, como la tripsina, son muy útiles para varias localizaciones de división específicas de una zona. El método y el agente de división dependerán de la proteína en prueba y de las expectativas de resultados concretos del análisis. De forma adicional, el proceso de selección conlleva la exploración minuciosa de todo el proceso de mapa de péptidos, así como consideraciones para caracterizaciones relacionadas. El agente de división más habitual que se utiliza para el mapa de péptidos es la tripsina, debido a su especificidad bien definida. La tripsina hidroliza solo los enlaces de péptidos en los que el grupo carbonilo va seguido por una arginina (Arg) o lisina (Lys). En la **Tabla 2** se muestran algunos agentes de división habituales y su especificidad.

Tabla 2

Tipo de división		
Tipo de división	Agente de división	Especificidad
Enzimático	Tripsina	Lado C-terminal de Arg y Lis
	Pepsina	No específico
	Quimotripsina	Lado C-terminal de residuos hidrófobos
	Glutamil endopeptidasa	Lado C-terminal de glu. y asp.
Producto químico	Bromuro de cianógeno	Lado C-terminal de Met
	Ácido diluido	Asp. y pro.
	BNPS-escatol	Trp

Paso 3: Desnaturalización, reducción y alquilación

Para que la enzima proteolítica divida eficazmente las cadenas de péptidos, la mayoría de las muestras deben desnaturalizarse, reducirse y alquilarse, con el uso de diversos reactivos. La desnaturalización y la reducción a menudo pueden realizarse de forma simultánea mediante una combinación de calor y un reactivo, como por ejemplo 1,4-ditiotreitol (DTT), mercaptoetanol o tris(2-carboxietil)fosfina. El más usado es el DTT, que es un agente reductor potente que reduce los enlaces disulfuro y evita la formación inter e intramolecular de disulfuro entre cisteínas en la proteína. Mediante la combinación de desnaturalización y reducción, puede evitarse la renaturalización (que es un problema cuando solo se usa calor como

agente de desnaturalización) debida a la reducción de enlaces disulfuro. Después de la desnaturalización y reducción de proteínas, la alquilación de cisteína es necesaria para reducir más aún una posible renaturalización. Los agentes más utilizados para la alquilación de muestras de proteínas antes de la digestión son la iodoacetamida (IAM) y el ácido yodoacético (IAA).

La **figura 1** muestra un buen ejemplo de un método de separación cromatográfica de fase reversa, usado para evaluar la integridad de la reducción y alquilación de un anticuerpo monoclonal antes de la digestión.

Figura 1: perfil de reducción/alquilación mediante cromatografía de fase reversa

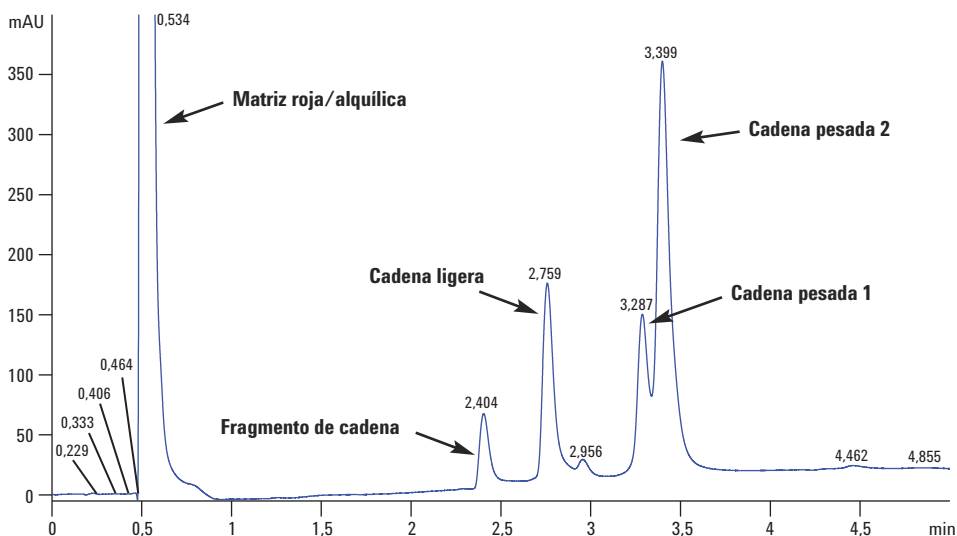


Figura 1: separación de fase reversa de un anticuerpo monoclonal reducido y con grupos alquilo antes del protocolo de digestión, con una columna de 2,1 x 50 mm Agilent 300SB-C8 de resolución rápida y alta definición (RRHD, por sus siglas en inglés), n.º de ref. Agilent 857750-906. La separación se realizó a 0,5 ml/min, a 75 °C con agua (0,1 % TFA)/ACN (0,08 %) en condiciones con multisegmento en un LC Agilent 1290 Infinity.

Paso 4: Digestión

Como ya se ha mencionado, la tripsina es la peptidasa más utilizada para la digestión, debido a su especificidad bien definida. Ya que la tripsina es una proteína, puede digerirse a sí misma en un proceso llamado autólisis. No obstante, Ca^{++} , presente de forma natural en la mayoría de muestras, se une en el bucle de unión de Ca^{++} en tripsina y evita la autólisis. Con la tripsina modificada que se utiliza ahora en la mayoría de laboratorios, la autólisis se reduce adicionalmente y no suele suponer un mayor problema.

La digestión triptica se realiza con un pH óptimo en el rango 7,5 – 8,5 y habitualmente a 37 °C. Para proporcionar un pH óptimo para la división enzimática, se añade un tampón, normalmente 50 mM de bicarbonato de amonio de trietilo (tABC), o 12,5 mM de bicarbonato de amonio (ABC) antes de la adición de tripsina. Un tampón de 2-amino-2-hidroximetil propano-1,3-diol (Tris) también se puede usar para este fin, pero se debe tener en cuenta que el tampón de Tris no es compatible con el análisis de MS, como MALDI y ESI-MS; por tanto, deberá reducirse mediante extracción de fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés) o ZipTips. Para garantizar una cantidad suficiente (pero no demasiado alta) de enzima en la realización de la digestión, es imprescindible tener la relación enzima-proteína correcta.

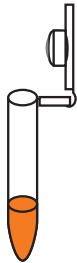
Las proteínas pueden actuar de forma diferente en diferentes entornos; cuando se digieren proteínas modelo en una mezcla, se observan digestiones menos eficaces que cuando se digieren de forma separada. Una razón que explica este hecho puede ser la competición creciente por zonas de división de tripsina, cuando se digieren más proteínas juntas. De forma adicional, puede haber muchos factores y parámetros condicionales que afecten a la integridad y eficacia de la digestión de proteínas, produciendo una variedad de resultados previstos. Si estos factores se comprenden o controlan mejor, los resultados de la digestión pueden mejorarse considerablemente. El pH de la reacción, el tiempo de digestión y la temperatura, así como la cantidad de agente de división empleado, son fundamentales para la eficacia de la digestión.

- **pH de digestión.** En general, el pH de la mezcla de digestión está empíricamente determinado para garantizar la optimización del rendimiento de un agente de división concreto. Por ejemplo, cuando se usa bromuro de cianógeno como agente de división, es necesario un entorno de acidez alta (p. ej., pH 2, ácido fórmico); no obstante, cuando se usa tripsina como agente de división, resulta óptimo un entorno ligeramente alcalino (pH 8). Como norma general, el pH del medio de reacción no debe modificar la integridad química de la proteína durante la digestión ni el proceso de la reacción de fragmentación.
- **Tiempo y temperatura de digestión.** El tiempo y la temperatura desempeñan una función importante en una digestión óptima. Para minimizar las reacciones químicas, es adecuada (y recomendada) una temperatura entre 25 °C y 37 °C para la mayoría de digestiones de proteínas (p. ej., las digestiones de tripsina se realizan habitualmente a 37 °C). No obstante, el tipo y tamaño de proteína determinará en última instancia la temperatura de la reacción debida a la desnaturalización de proteínas, a medida que la temperatura de la reacción aumenta. El tiempo de reacción también es un factor a tener en cuenta en la optimización del protocolo de digestión. Si hay una cantidad de muestra suficiente disponible, se considerará la realización de un estudio experimental para determinar el tiempo óptimo para obtener un mapa reproducible, al mismo tiempo que se evita una digestión incompleta. El tiempo de digestión varía de 2 h a 30 h, en función del tamaño y tipo de muestra, mientras que la reacción se detiene mediante la adición de un ácido, lo cual no interfiere en el mapa, o bien mediante congelación.
- **Concentración de enzima de división.** La concentración del agente de división debe minimizarse para evitar su contribución a los patrones de mapas. Con frecuencia se utiliza una cantidad excesiva de agente de división para lograr un tiempo de digestión razonablemente rápido (es decir, de 6 a 20 horas); sin embargo, debe tenerse mucho cuidado con este aumento en las cantidades. Por lo general se usa una relación proteína-peptidasa entre 10:1 y 200:1, y se recomienda que el agente de división se añada en dos o más fases para optimizar la división. La tripsina se añade de esta forma en muchos procedimientos estándar de digestión de tripsina. Sin embargo, el volumen de reacción final permanece lo suficientemente pequeño para facilitar la separación, que es el siguiente paso en el mapa de péptidos. Para resolver los artefactos de digestión que podrían interferir con el análisis posterior, se realiza una determinación en blanco; para ello se usa un control de digestión con todos los reactivos, excepto la proteína de prueba.

El método de digestión de tripsina que se describe a continuación, resumido en las **figuras 2 y 3**, es un procedimiento común que se utiliza de forma rutinaria para la reducción, alquilación, digestión en solución y limpieza de proteína (0,5 mg). Este procedimiento es escalable para pequeñas cantidades de proteínas y, además, proporciona una lista útil de reactivos Agilent y números de referencia.

Figura 2: procedimiento de digestión de tripsina (partes I-V)

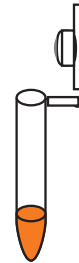
0,5 mg de proteína
25 µl de solución madre de bicarbonato de amonio
25 µl de TFE
1,0 µl de solución madre de DTT



1. Resuspender, desnaturar y reducir proteína.

(Vórtex; calentar 1 h a 60 °C o 20 min a 90 °C)

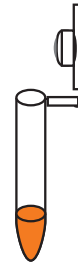
Añadir 4,0 µl de solución madre de IAM



2. Alquilato.

Realizar con oscuridad.
(1 h a temp. ambiente)

Añadir 1,0 µl de solución madre de DTT



3. IAM de exceso de atenuación.

Realizar con oscuridad.
(1 h a temp. ambiente)

Añadir 300 µl de agua + 100 µl de solución madre de bicarbonato de amonio



4. Diluir y ajustar pH.
(pH 7 – 9)

Añadir solución madre de tripsina



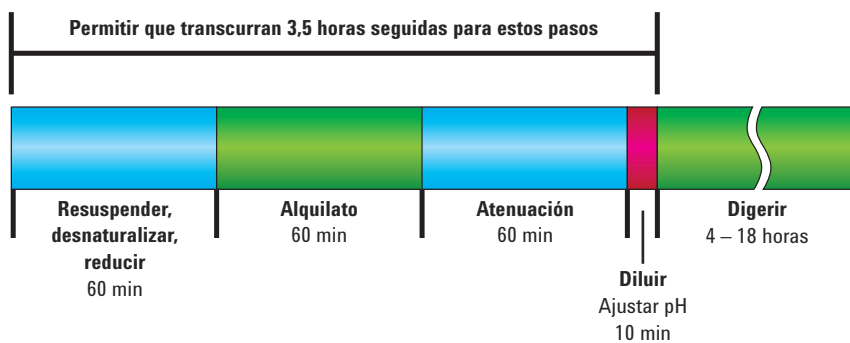
5. Digestión.
(37 °C durante 4 – 18 horas)

Añadir 1 µl de ácido fórmico o TFA



6. Reducir pH a <4.

Figura 3: cronograma esperado del procedimiento de digestión



Preparación de solución de reducción, alquilación y digestión: Resumen

100 mM de bicarbonato de amonio: añadir 100 ml de agua a 0,7906 g de bicarbonato de amonio. Almacenar en un refrigerador a 4 °C hasta 2 meses.

Solución madre de tripsina: Se puede adquirir tripsina modificada: Tripsina de calidad proteómica de Agilent (n.º de ref.: 204310, consulte en la siguiente página "Reactivos y equipo"). Está liofilizada y puede almacenarse bajo esta forma a -20 °C durante más de un año sin que haya una pérdida significativa de actividad. Cuando sea necesario, debe prepararse solución madre de tripsina mediante la hidratación de tripsina liofilizada en 100 µl de 50 mM de ácido acético hasta obtener una concentración final de 1 µg/ml. Para minimizar los ciclos de congelación-descongelación y aumentar la estabilidad de almacenamiento, debe dividirse la tripsina hidratada en cuatro tubos separados de ~10 µl cada uno. Debe almacenarse cada muestra exacta a -20 °C en un congelador sin No Frost. Esta solución de 1 µg/µl se utiliza para preparar la solución intermedia de tripsina según sea necesario (léase más abajo). Tenga en cuenta que la tripsina de calidad proteómica de Agilent incluye documentación técnica que proporciona un protocolo alternativo para la digestión triptica. Hemos utilizado el método que aparece a continuación y hemos concluido que es sencillo y fiable.

DTT 200 mM: añadir 1 ml de agua a 0,031 g de DTT en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Vórtex. Dividir la solución de DTT en muestras alícuotas según convenga (por ejemplo, 100 µl) en tubos de microcentrifugadora. Almacenar cada muestra exacta a -20 °C hasta un mes en un congelador sin No Frost. No descongelar y volver a congelar.

200 mM de IAM (preparar justo antes de su uso): añadir 1 ml de agua a 0,037 g de IAM en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Vórtex.

Protocolo de digestión de tripsina

Resuspensión, desnaturalización y reducción de proteína

1. Añadir 0,5 mg de proteína total a un tubo Eppendorf de 0,5 ml.
2. Añadir 25 µl de solución madre de bicarbonato de amonio.
3. Añadir 25 µl de agente de desnaturalización de TFE.
4. Añadir 1,0 µl de solución madre de DTT.
5. Vórtex para mezclar.
6. Calentar bajo una de las series de condiciones para desnaturalizar:
 - ✓ 60 °C entre 45 minutos y 1 hora
 - ✓ 90 °C entre 20 minutos (proteínas hidrofílicas) y 1 hora (proteínas hidrófobas)
7. Enfriar a temperatura ambiente.

Alquilación

1. Añadir 4,0 µl de solución madre de IAM.
2. Vórtex, brevemente.
3. Incubar muestra con oscuridad (gradilla cubierta con lámina) a temperatura ambiente durante 1 hora.

Atenuación de exceso de IAM

1. Añadir 1,0 µl de solución madre de DTT para destruir el exceso de IAM.
2. Dejar durante 1 hora con oscuridad (gradilla cubierta con lámina) a temperatura ambiente.

Dilución y ajuste de pH

1. Añadir 300 µl de agua para diluir el desnaturalizante.
2. Añadir 100 µl de solución madre de bicarbonato de amonio para elevar el pH.
3. De forma opcional, comprobar el pH poniendo entre 0,5 y 1 µl en una tira de papel indicador de pH. El valor normal está entre 7,5 y 8,0. Es más importante comprobar el pH cuando el pH de la muestra inicial es desconocido.
4. Añadir más base (bicarbonato de amonio) si el pH no se encuentra en el rango entre 7 y 9.

Digestión

1. Elaborar nueva solución madre de tripsina en solución de almacenamiento de tripsina. Dejar pasar 15 min para una resuspensión completa.
2. Si desea digerir menos de 20 µg de proteína total, preparar solución intermedia de tripsina diluyendo solución madre 10 veces mayor con la adición de 45 µl de agua ultrapura. Esta solución de 100 ng/µl puede almacenarse a -20 °C durante 2 meses sin pérdida de actividad significativa.
ADVERTENCIA: Si el IAM no se destruye, empezará a añadir grupos de alquilos lisinas lentamente.
3. Añadir solución madre de tripsina entre 1:20 y 1:50 según masa de enzima:sustrato. Por ejemplo, para 500 µg de proteína, añadir entre 10 y 25 µg de tripsina (entre 10 y 25 µl de solución madre de tripsina).
4. Vórtex, brevemente.
5. Colocar el tubo en el calentador e incubar a 37 °C entre 4 y 18 horas.
6. Enfriar solución.

Disminución del pH para interrumpir la actividad de tripsina

1. Añadir 1 µl de de ácido fórmico limpio o TFA para reducir el pH y detener la actividad de tripsina.
Si hay que desalinizar, usar TFA ya que ayuda en la unión de péptidos a la resina durante la limpieza.
2. Vórtex, brevemente.
3. Si el pH de la muestra original es algo a tener especialmente en cuenta, comprobar el pH (normalmente entre 3,0 y 3,3). Añadir más ácido si el pH es superior a 4.

Limpieza de digestión

1. En función del origen de la muestra, puede que sea necesario desalinizar antes del análisis de MS.
2. Si no es necesaria la desalinización, pero la muestra se muestra opaca, filtrar la muestra antes del MS. Usar filtros centrífugos Agilent, n.º de ref. 5185-5990.
La opacidad puede deberse a restos celulares en la muestra.
3. Diluir una muestra exacta según sea necesario para el análisis.
Si la proteína tiene un peso molecular de 50 kDa y si la digestión llegó a completarse, la solución es de unos 20 pmol/µl.
Si la muestra es menos compleja, diluir hasta conseguir una solución de 50 fmol/µl.

Descubra más acerca de las columnas Agilent para mapa de péptidos en agilent.com/chem/advancebio

Paso 5: limpieza y enriquecimiento de digestos

Antes del mapa de péptidos, la limpieza y/o enriquecimiento es a menudo necesaria para un análisis satisfactorio de mapas de péptidos. Existen muchos tipos de métodos para conseguir la limpieza y el enriquecimiento, en función del tipo de muestra y del objetivo en cuestión. Por ejemplo, el enriquecimiento de PTM específicos (p. ej., fosforilación, ubiquitinación y glicosilación) se realiza mediante purificación de afinidad con el uso de anticuerpos o ligandos específicos de PTM, mientras que los fosfopéptidos pueden enriquecerse mediante IP con el uso de anticuerpos anti-fosfo-específicos, o bien mediante despliegue con el uso de TiO₂, que une selectivamente la serina, tirosina o treonina fosforilada.

Después del enriquecimiento de péptidos, las sales y los tampones pueden eliminarse con el uso de puntas o columnas de grafito o C-18; los detergentes se pueden eliminar mediante el uso de columnas de afinidad o reactivos de precipitación de detergente. La dilución de muestras también puede concentrarse con el uso de concentradores de rangos de corte de peso molecular variable (MWCO, por sus siglas en inglés). Una vez purificadas, las muestras de péptidos están listas para la preparación final del análisis de MS, que varía según el tipo de análisis. Para análisis de LC/MS o LC-MS/MS, es necesaria una elección adecuada de fases móviles y reactivos de emparejamiento iónico para lograr una buena resolución de LC y unos buenos resultados analíticos. La MALDI-MS requiere la combinación de la muestra de péptidos con matrices específicas (moléculas de colorante de absorción de energía cristalina), que a continuación se secan en placas de MALDI antes del análisis.

Reactivos y equipo

Elemento necesario	Ejemplo
Bicarbonato de amonio, de pureza analítica	Catálogo de Sigma n.º A-6141
Ditiotreitol (DTT), >+99 %	Catálogo de Sigma n.º D-5545
Iodoacetamida (IAM), 97 %	Catálogo de Sigma-Aldrich n.º I-670-9
Trifluoroetanol (TFE), +99 %	Catálogo de Sigma-Aldrich n.º T63002-100G
Tripsina, modificada	Tripsina de calidad proteómica de Agilent (n.º de ref. 204310)
Agua, 18 megaohmios o equivalente	N.º de ref. Agilent 8500-2236
Ácido fórmico, pureza analítica o ácido trifluoroacético, grado de secuenciación	N.º de ref. Agilent G2453-85060
Tubos de microcentrifugadora con cierre de seguridad Eppendorf	N.º de ref. Eppendorf 022363611 (0,5 ml, caja de 500) o n.º de ref. 022363204 (1,5 ml, caja de 500)
Micropipetas y puntas: rango de 1 – 1000 µl	
Calentador/sellador de tubos	Agitador calentador Eppendorf
Tiras indicadoras del pH, rangos de pH 2,5 – 4,5 y 7,0 – 9,0	Tiras Science ColorpHast de EM, catálogo n.º 700181-2
Balanza analítica	
Puntas Bond Elut OMIX, 10 µl (volumen de elución 2 – 10 µl)	Puntas de 1 x 96 (n.º de ref. Agilent A5700310); Puntas de 6 x 96 (n.º de ref. Agilent A5700310K)
Puntas Bond Elut OMIX, 100 µl (volumen de elución 10 – 100 µl)	Puntas de 1 x 96 (n.º de ref. Agilent A57003100); puntas de 6 x 96 (n.º de ref. Agilent A57003100K)



Para la limpieza de volúmenes más pequeños de péptidos: Puntas Bond Elut OMIX

Método de Bond Elut OMIX (volumen 10 µl) para limpieza de digesto de péptidos

Pretratamiento de muestra	Ajustar la muestra a una concentración de ácido trifluoroacético (TFA) de 0,5 % – 1,0 % con el uso de una solución de TFA de 2,5 %
Acondicionamiento y equilibrado	Aspirar 10 µl de acetonitrilo al 50 % (ACN): introducir agua y descartar el disolvente. Repetir. Aspirar 10 µl de solución de TFA al 1,0 % y descartar el disolvente. Repetir.
Aplicación de muestra	Aspirar hasta 10 µl de muestra pretratada en punta OMIX. Dispensar y aspirar la muestra 3 – 5 ciclos para obtener la máxima eficacia. Pueden usarse hasta 10 ciclos para mejorar la unión.
Enjuagar	Aspirar 10 µl de tampón de TFA al 0,1 % y descartar el disolvente. Repetir.
Elución	Análisis de LC/MS o LC/MS/MS: aspirar 2 – 10 µl de ácido fórmico o ácido acético al 0,1 % en 50 – 75 % de acetonitrilo o 50 – 75 % de solución de metanol y dispensar en un vial de inyector automático o placa de pocillos.

Para obtener los mejores resultados, ajustar la pipeta para que coincida con el volumen de punta (10 µl) para los pasos de equilibrado, aplicación de muestra y enjuague. Para la elución, tomar una muestra del volumen exacto de solución de elución en un contenedor separado y mantener la pipeta en el ajuste máximo de volumen para que coincida con el volumen de punta, 10 µl.

Para aplicaciones de péptidos de alto rendimiento: Soluciones de preparación de muestras automatizada para mapa de péptidos

"El uso de la combinación de una digestión extremadamente consistente junto con la limpieza automatizada de fase reversa con AssayMAP, nos ha permitido contemplar estudios de colaboración de magnitud y resultados nunca antes vistos".

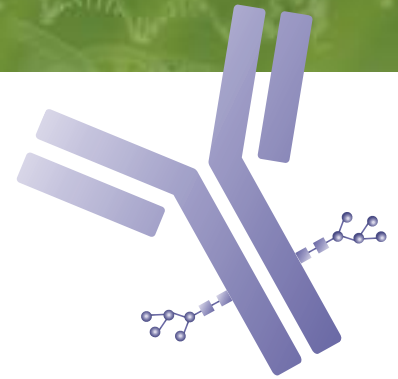
*Dr. Jacob D. Jaffe
Director Adjunto, Plataforma de
proteómica*



Obtenga más información sobre la preparación de muestras automatizada para mapa de péptidos en **la página 22**.

Descubra más acerca de las columnas Agilent para mapa de péptidos en agilent.com/chem/advancebio

Cromatografía de fase reversa: la mejor elección para mapas de péptidos



La selección de una columna y un método para generar mapas de péptidos depende, en última instancia, de la asignación de la proteína y de los objetivos del flujo de trabajo. El método de columna de mapa de péptidos más utilizado, especialmente en la industria biofarmacéutica, es la cromatografía de fase inversa (RPC). La excelente potencia resolutoria y el uso de fases móviles volátiles (compatibles con espectrometría de masas) han llevado a esta técnica a convertirse en el método de HPLC predominante para la mayoría de separaciones de péptidos. Es superior a otros modos de separaciones de HPLC con respecto a la velocidad y la eficacia. En la **figura 4** se muestra una separación de péptidos bien resuelta con el uso de albúmina de suero bovino; donde se demuestra la multitud de fragmentos de pico de péptidos que pueden resolverse mediante el uso de RPC para mapa de péptidos.

Figura 4: separación de mapa de péptidos de fase reversa

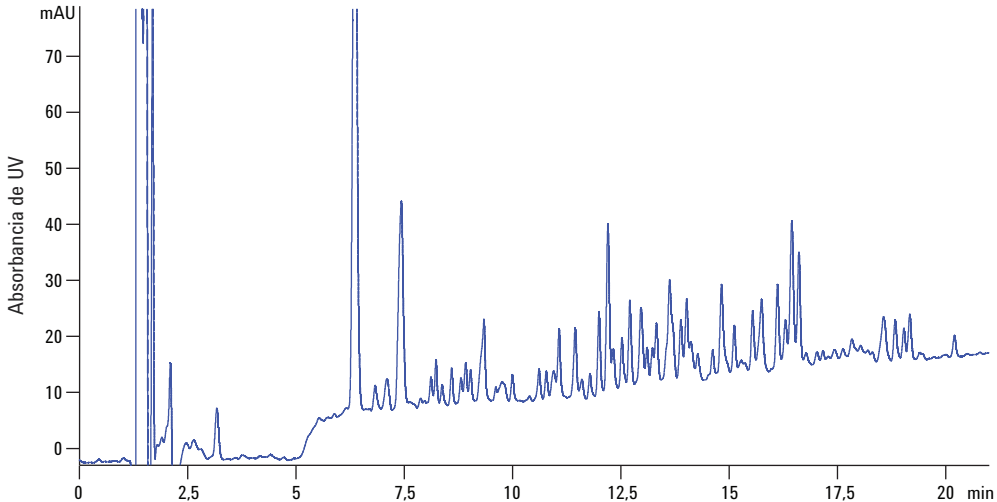
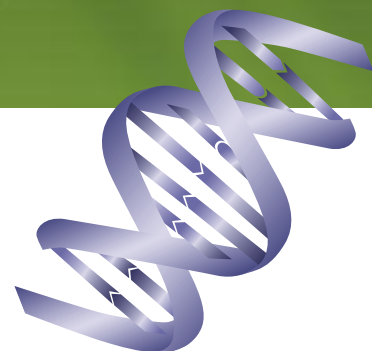


Figura 4: separación de fase inversa de BSA con una columna de 2,0 x 150 mm Agilent Polaris C18-A (n.º de ref. Agilent A2001150X020).

Requisitos para una correcta separación de mapa de péptidos



El enfoque general en el desarrollo de un método de RPC práctico para mapa de péptidos requiere una buena comprensión de los requisitos de columna específicos de péptidos y del desarrollo de métodos cromatográficos. Aunque muchos de los mismos principios cromatográficos se aplican a la separación de péptidos, en comparación con separaciones de moléculas pequeñas, hay algunas variables específicas de la condición para la optimización del método de péptidos,

así como para conseguir una separación reproducible y sólida.

La selección de columna, la calidad de columna, la selección de fase móvil y los requisitos de detección son todos componentes importantes en las separaciones de mapa de péptidos; estos componentes pueden mejorar considerablemente la calidad de sus mapas de péptidos.

Selección de columnas

El aspecto más importante para conseguir una separación de mapa de péptidos fiable y bien resuelta es la selección de una columna adecuada. El tamaño de poro de columna, el tipo y tamaño de partícula y la química y estabilidad de fase ligada (química y lecho compacto) tienen una función importante en la facilitación de la separación de mapa de péptidos, la estrategia de optimización y el análisis espectrométrico. Para separaciones de péptidos, los tamaños de poro de columna preferidos se sitúan entre 100Å y 120Å, mientras que la selección de fase óptima es normalmente C18. Aunque algunas columnas comerciales ofrecen tamaños de poro para péptidos de hasta 60Å, estos están normalmente relacionados con separaciones de fragmentos de péptidos más pequeños o análisis de patrones. Del mismo modo, se usan longitudes de cadena de carbono de fase ligada más pequeñas; sin embargo, estas tienen relación con métodos específicos y su funcionalidad es limitada para conseguir retención a lo largo de la amplia variedad de hidrofobicidad de péptidos.

Las separaciones de péptidos producen números de placa más pequeños debido a sus coeficientes de difusión más altos; también han favorecido el uso de materiales de columna totalmente porosos de menor diámetro con flujos más lentos. Esto ha generado un aumento en los envases por debajo de 2 µm para obtener mapas de péptidos más eficaces. Sin embargo, más recientemente, las columnas superficialmente porosas han ganado popularidad para las separaciones biológicas (especialmente en la industria biofarmacéutica), ya que resuelven las limitaciones de la difusión de masa de proteínas y péptidos. Estas columnas ofrecen una ruta de difusión más corta que permite las separaciones de moléculas mayores a velocidades lineales altas, sin los aumentos de contrapresión del sistema asociados con las partículas más pequeñas. En la **figura 5** se muestra el ejemplo de un mapa de péptidos de resolución alta rápida, con el uso de una columna superficialmente porosa.



Descubra más acerca de las columnas Agilent para mapa de péptidos en agilent.com/chem/advancebio

Figura 5: secuencia de mapa de péptidos de alta resolución rápida y eficaz de albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés)

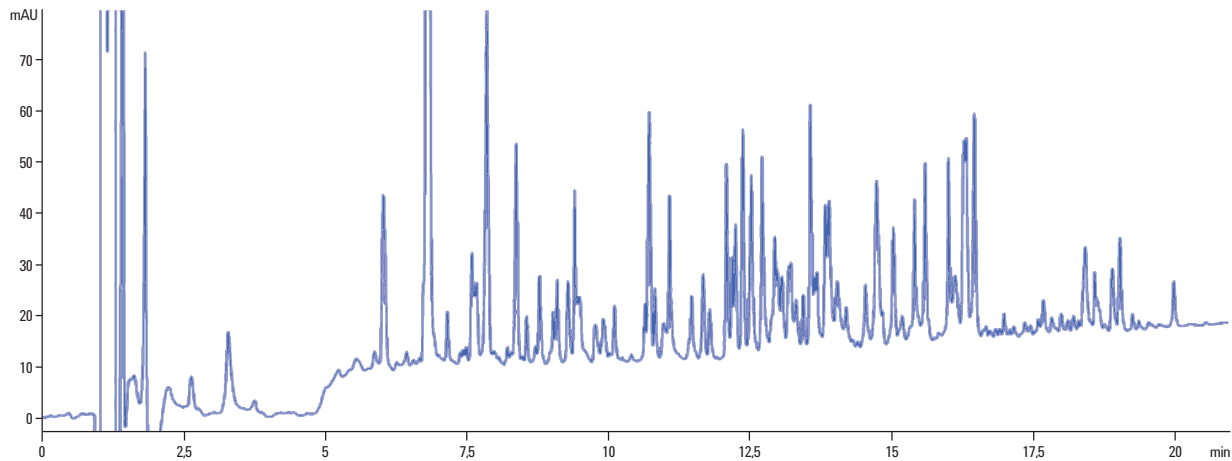


Figura 5: separación de fase reversa de BSA con una columna de 2,1 x 150 mm de mapa de péptidos Agilent AdvanceBio (n.º de ref. Agilent 653750-902). La separación de mapa de péptidos se realizó a 0,3 ml/min, a 40 °C con gradiente lineal de agua (0,1 % TFA)/ACN (0,08 %).

La calidad de columna (reproducibilidad y estabilidad de un análisis a otro) es un requisito esencial, que a veces se pasa por alto, para mantener separaciones de mapa de péptidos reproducibles y sólidas. Las separaciones de fase reversa de péptidos se realizan generalmente con pH bajo (pH<3) y a temperaturas elevadas (>40 °C). Los mapas de péptidos requieren una operación repetible para obtener identificaciones de mapa precisas, así como protocolos de validación repetidos. Al elegir una columna para mapa de péptidos, la calidad de la columna debe ser lo primero a tener en cuenta en la decisión. En la **figura 6** se muestra un ejemplo excelente de mapa de péptidos reproducible de un digesto triptico de anticuerpo monoclonal, separado en condiciones de pH bajo y temperatura elevada, durante un análisis de LC/MS.

Figura 6: reproducibilidad de mapa de péptidos durante análisis de LC/MS

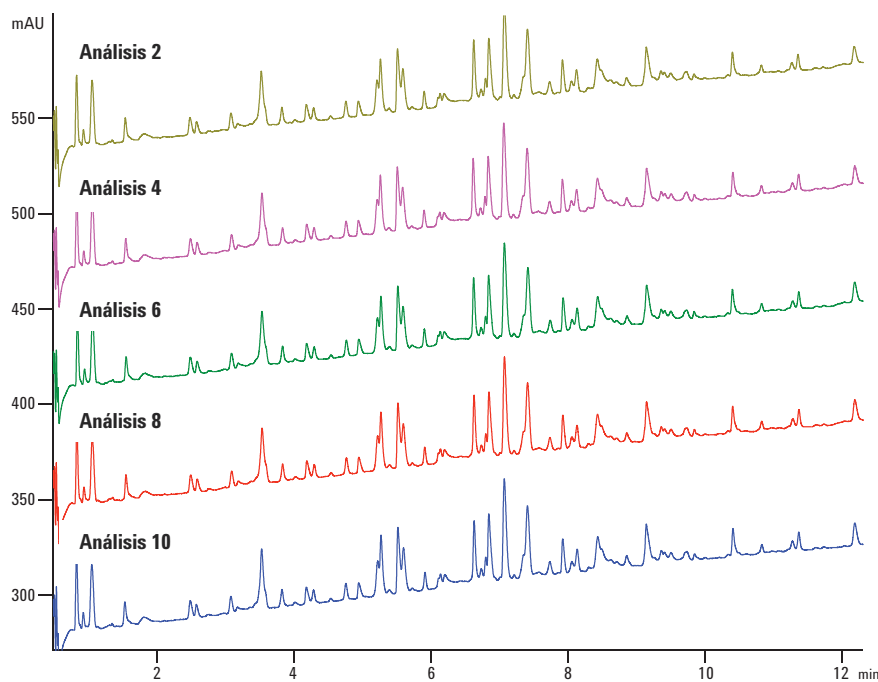


Figura 6: cinco inyecciones repetidas de un digesto triptico de anticuerpo monoclonal con una columna de mapa de péptidos de 3,0 x 150 mm Agilent AdvanceBio (n.º de ref. Agilent 653950-302) en un sistema LC Agilent 1200 combinado con un 6520 Q-TOF. La separación se realizó a 0,3 ml/min, a 40 °C con gradiente de agua (0,1 % FA)/ACN (0,1 % FA).

Selección de fase móvil

El disolvente usado con más frecuencia en el mapa de péptidos es agua con acetonitrilo como modificador orgánico, para el que no se recomienda más del 0,1 % de agente de emparejamiento iónico. En determinadas circunstancias, puede añadirse alcohol propílico o alcohol isopropílico para solubilizar los componentes de digesto, teniendo en cuenta que la adición no aumenta excesivamente la viscosidad de los componentes. Las fases móviles con una solución tampón que contienen fosfato se usan para dar algo de flexibilidad a la selección de condiciones de pH; esto se debe a que los cambios de pH en el rango 3,0 – 5,0 aumentan la separación de péptidos que contienen residuos ácidos (p. ej., ácidos glutámicos y aspárticos). Los fosfatos de sodio o potasio, el acetato de amonio y el ácido fosfórico con un pH entre 2 y 7 (o mayor en el caso de soportes basados en polímeros) se han usado también con gradientes de acetonitrilo. El acetonitrilo que contiene ácido trifluoroacético se usa con mucha frecuencia.

Las fases móviles que se emplean en la cromatografía de fase reversa (RPC, por sus siglas en inglés) para el análisis de proteínas y péptidos contienen un aditivo que sirve como agente de emparejamiento iónico. Este componente aumenta la hidrofobicidad de péptidos mediante la formación de emparejamientos iónicos con sus grupos cargados. Como consecuencia, la interacción de los péptidos con la fase estacionaria hidrófoba es posible y, por tanto, también lo es su separación mejorada mediante un aumento de retención. Otros aditivos habituales, como el ácido trifluoroacético (TFA), el ácido fórmico (FA) y el ácido acético (AcOH) pueden dar lugar a pH muy bajos y promover el despliegue y la desnaturalización de proteínas. De este modo las moléculas, como los péptidos, se eluyen en bandas más pronunciadas y más simétricas. El agente de emparejamiento iónico más usado para la separación de proteínas y péptidos es el TFA, tanto por su compatibilidad (volatilidad alta) con espectrometría de masas como por la afinidad del péptido cargado.

Detección

La detección de péptidos es normalmente de entre 210 nm y 220 nm y/o 280 nm (**figura 7**). La detección a 280 nm se realiza a menudo en paralelo con la detección a 210 nm en mapas de péptidos. El triptófano, la tirosina y la fenilalanina son sensibles a 280 nm, mientras que la detección a 210 nm es relativamente poco selectiva para muchas otras sustancias biológicas en la matriz de muestra. No obstante, la sensibilidad a 210 nm y 220 nm es entre dos y cuatro veces mayor que a 280 nm. De forma adicional, tiene cierta importancia para el perfil de detección de mapas de péptidos la

mezcla de 0,1 % de TFA en agua (disolvente A) y 0,08 % de TFA (disolvente B) en ACN, que se usa para minimizar la deriva inicial provocada por cambios en la absorbancia durante el curso del gradiente de elución. En la **figura 7** se muestra una comparación de ejemplo de una separación de mapa de péptidos con variación de longitud de onda entre 220 nm y 280 nm; se muestran en detalle las diferencias en los perfiles de sensibilidad de absorbancia y de pico de UV.

Figura 7: mapa de péptidos con diferentes longitudes de onda

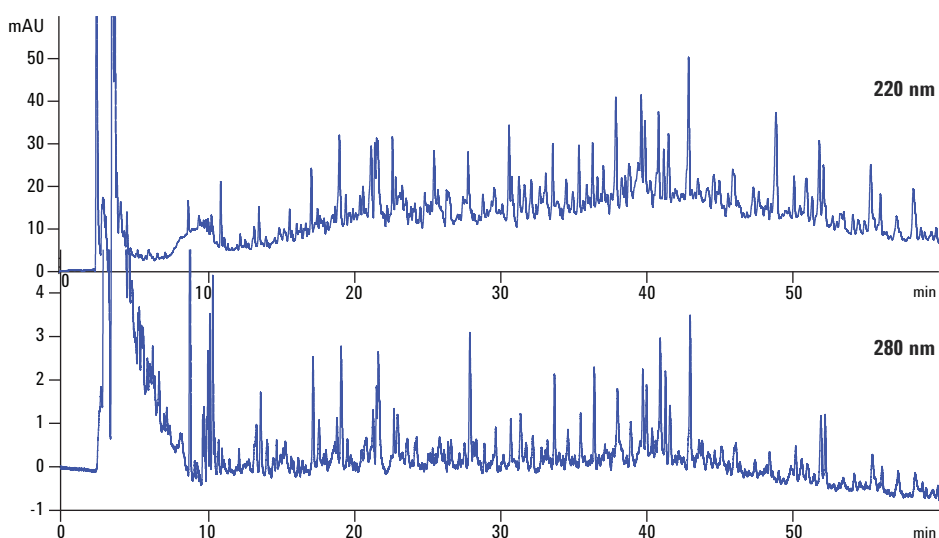
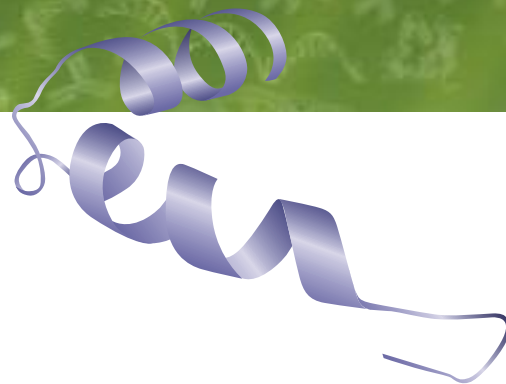


Figura 7: columna de mapa de péptidos AdvanceBio (n.º de ref. Agilent 651750-902), 2,1 x 250 mm, caracterización de digesto de e.coli con 220 nm (superior) y 280 nm (inferior) en un LC Agilent 1290 Infinity.

Descubra más acerca de las columnas Agilent para mapa de péptidos en [agilent.com/chem/advancebio](https://www.agilent.com/chem/advancebio)

Desarrollo de un método de mapa de péptidos eficaz



El enfoque general para el desarrollo de un método de RPC para una separación de mapa de péptidos es el mismo que se emplea con las prácticas de desarrollo típicas del método de fase reversa; sin embargo, existen requisitos especiales y específicos del desarrollo de mapa de péptidos. En esta sección se proporcionará un enfoque básico recomendado para la preparación de un mapa de péptidos bien resuelto

mediante (1) optimización de las condiciones del gradiente para retención, (2) variables para el cambio de selectividad y (3) mayor optimización de las condiciones de columna, con el fin de mejorar el equilibrio entre el tiempo de análisis y la resolución. Debe tenerse siempre mucho cuidado en cada paso de este proceso de desarrollo de métodos con el tipo de muestra y con el propósito previsto de su experimento de mapa de péptidos.

(1) Optimización de las condiciones de gradiente

Siempre se recomienda especialmente un gradiente de tampón de ACN de pH bajo para la separación de péptidos, ya que:

- Facilita la separación de una gran variedad de tipos y estructuras de péptidos.
- Suprime la ionización de silanoles, que pueden provocar interacciones no deseadas con cadenas laterales amino básicas en la molécula, lo que produce formas de pico insuficientes.
- Ayuda a desnaturalizar el fragmento de péptidos mediante una mejora en la retención y la resolución.
- Permite una detección de UV baja (<210 nm) para maximizar la sensibilidad de la detección.
- Proporciona bandas más estrechas debido a la viscosidad más baja de la fase móvil.
- Aumenta la retención de péptidos pequeños mal retenidos mediante emparejamiento iónico con aminoácidos básicos y aminoterminales libres (cuando se usa TFA en el tampón).

El propanol o el isopropanol (IPA) puede sustituirse por acetonitrilo (ACN) como modificador orgánico, así se proporciona una mejor recuperación de péptidos hidrófobos. Sin embargo son más viscosos, lo que produce una mayor contrapresión de columna y bandas un poco más anchas en algunos casos. Estos disolventes también requieren una longitud de onda más alta para la detección (>220 nm) y presentan una pérdida en la sensibilidad de detección.

La mayoría de péptidos se eluyen con menos del 60 % de ACN, pero en ocasiones es necesaria una concentración de ACN más alta. Un buen punto de partida para un análisis de desarrollo de mapa de péptidos es de 0 a 60 % en 45 minutos (2 %/min). Sin embargo, a menudo es necesario un gradiente más suave en el método final para obtener la resolución deseada. La pendiente del gradiente, o el %B/min, determina la retención media (k') de una banda de muestra durante su migración en una columna. El valor de k' depende de las dimensiones de la columna, el flujo, el peso de la muestra y la pendiente del gradiente.

(2) Variables para el cambio de selectividad (α) del mapa de péptidos

Los cromatografistas que trabajan con muestras biológicas, por lo general, posponen un cambio de las condiciones de columna (N) hasta que el espacio de bandas (α) ha mejorado. Los cambios en la temperatura y en la pendiente del gradiente resultan útiles (sin cambios en la fase móvil o columna) y deben explorarse en primer lugar para mejorar el espacio de bandas (α) para la optimización de una separación de mapa de péptidos.

Un cambio en la temperatura es un método potente de cambiar la selectividad que podría provocar un cambio de retención para residuos peptídicos concretos. La elevación de la temperatura de una separación de mapa de péptidos produce bandas más estrechas, reduce la contrapresión del sistema y cambia la selectividad. Se recomienda una temperatura inicial de 30 – 35 °C; sin embargo, la temperatura óptima para una separación de mapeo concreta dependerá de muchos factores según el tipo de digestión y la composición. Algunos péptidos muy hidrófobos requieren una temperatura de 60 – 80 °C para una recuperación máxima, mientras que la selectividad para una muestra concreta será a menudo mejor para una temperatura concreta entre 30 y 60 °C.

En la **figura 8** se detalla una comparación entre dos regiones de gradiente idéntico cuando se aumenta la temperatura de 30 °C (cromatograma superior) a 60 °C (cromatograma inferior) para un digesto triptico de mioglobina. A una temperatura elevada de 60 °C, el perfil de separación detalla cambios en la forma de banda y en la posición de pico que se resalta mediante los picos 1 – 7. Es evidente que algunos de los cambios destacados en esta región del cromatograma son la separación mejorada entre los picos 1, 2 y 3 y las diferencias de posicionamiento de banda (selectividad) entre los picos 4 y 5.

Figura 8: efecto de la temperatura sobre la selectividad para un digesto triptico de mioglobina

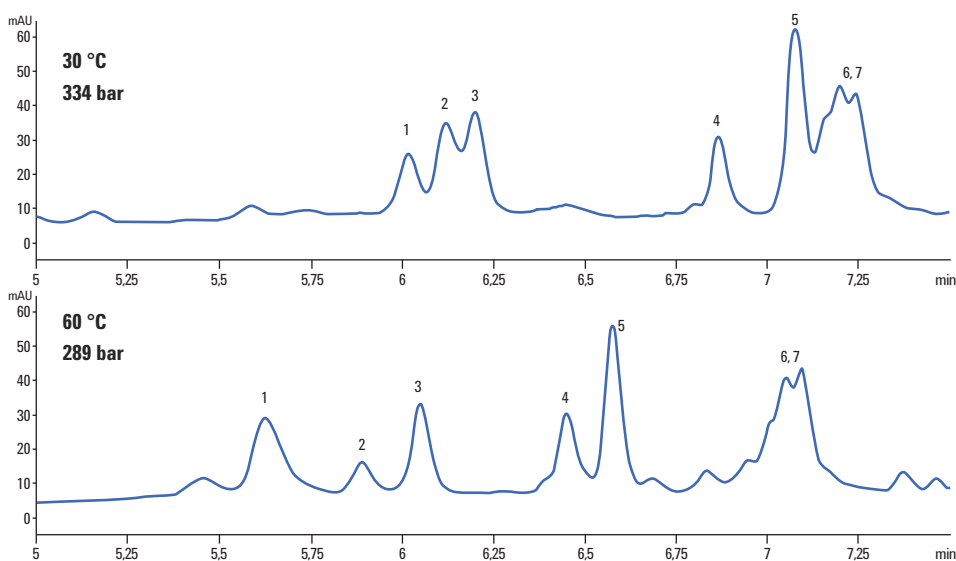


Figura 8: separación de gradiente de digesto triptico de mioglobina a 5,0 – 8,0 min de un gradiente de 20 min con una columna de mapa de péptidos AdvanceBio de 2,1 x 150 mm (n.º de ref. Agilent 653950-302). Las dos separaciones se completaron con un gradiente lineal de agua (1,0 % TFA)/ACN (0,08 % TFA), 0,3 ml/min con 215 nm en un sistema LC cuaternario bioinerte Agilent 1260 Infinity. El cromatograma superior se separó a una temperatura de 30 °C y el cromatograma inferior se completó a una temperatura de 60 °C.



Descubra más acerca de las columnas Agilent para mapa de péptidos en [agilent.com/chem/advancebio](https://www.agilent.com/chem/advancebio)

Los cambios en la pendiente del gradiente también pueden mejorar considerablemente el espacio de bandas y cambiar la selectividad de la separación de mapa de péptidos. La pendiente del gradiente puede variar de dos formas, ya sea manteniendo la velocidad de flujo constante y cambiando el tiempo de elución a tiempos de análisis más cortos (aumentando la pendiente) o más largos (disminuyendo la pendiente), o bien manteniendo el tiempo de análisis constante y cambiando la velocidad de flujo.

La **figura 9** muestra los cambios de selectividad resultantes de la variación de la pendiente del gradiente. Con el uso de un digesto de péptido triptico de mioglobina, un tiempo de análisis de gradiente brusco de 15 minutos (cromatograma superior) se comparó con un tiempo de análisis de gradiente más largo de 40 minutos (cromatograma inferior), mientras que ambas separaciones se mantuvieron a una velocidad de 0,6 ml/min a 50 °C. Una comparación de los cromatogramas y la identificación de los mismos picos (asteriscos) en cada separación, muestra numerosos cambios en el espacio de bandas, las cuentas de picos y la forma de pico.

Figura 9: efecto de pendiente del gradiente durante una separación de digesto triptico de mioglobina

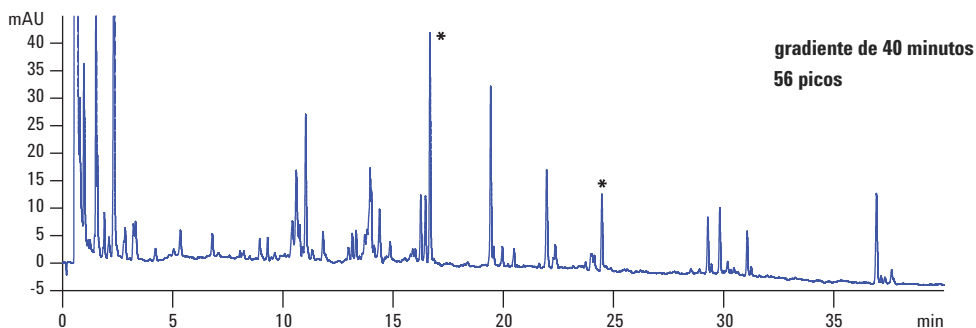
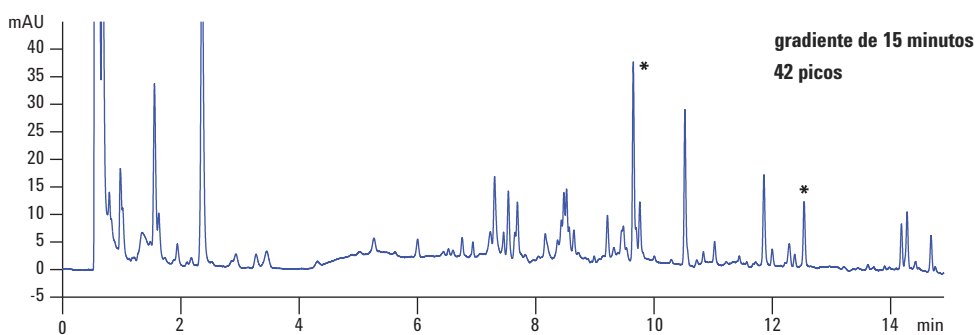


Figura 9: separaciones de gradiente de digesto triptico de mioglobina con una columna de mapa de péptidos de 2,1 x 150 mm AdvanceBio (n.º de ref. Agilent 653950-302) en un sistema LC cuaternario bioinerte Agilent 1260 Infinity, con gradiente lineal de agua (1,0 % TFA)/ACN (0,08 % TFA), 0,6 ml/min a 50 °C. El cromatograma superior se completó en 15 minutos, mientras que el cromatograma inferior se completó en 40 minutos. Los asteriscos en cada cromatograma representan los mismos picos.



(3) Ajustar las condiciones de columna para una mayor optimización

Una vez se ha optimizado el gradiente en términos de retención (k') y selectividad (α), son posibles más mejoras en la separación mediante la variación de la longitud de columna y de la velocidad de flujo. La elección de la condición de columna que se variará en la elución del gradiente es, fundamentalmente, la misma que para la separación isocrática. En ambos casos, los valores más altos de eficacia (N) pueden obtenerse a expensas de tiempos de análisis más largos. Para las mejoras en la resolución de poca importancia, en las que es menos importante un aumento en el tiempo de análisis, es recomendable reducir la velocidad de flujo. Sin embargo, cuando se necesita un aumento de resolución mayor, normalmente es preferible aumentar la longitud de la columna. Si la resolución es mayor de la necesaria después de optimizar la selectividad, esta resolución excesiva puede cambiarse por un tiempo de análisis más corto, mediante el aumento de la velocidad de flujo y/o la reducción de la longitud de columna. En la **figura 10** se muestra un ejemplo de resolución de mapa de péptidos mejorada para un digesto triptico de mioglobina, con una longitud de columna aumentada de 150 mm a 250 mm. En esta comparación, las condiciones y el tiempo del gradiente se mantuvieron constantes mientras se aumentaba la longitud de columna de 150 mm a 250 mm. Se añadió un recuadro rojo a las mismas áreas de las separaciones para indicar la mejora de resolución gracias a los 250 mm de longitud; así también se pusieron de manifiesto las ganancias en la capacidad de picos por unidad temporal.

Se ha demostrado que la elución del gradiente, las variables posteriores asociadas en la optimización de la selectividad y las optimizaciones de condición de columna mencionadas en (1), (2) y (3) son estrategias básicas para mejorar cualquier estrategia de separación, incluido el mapa de péptidos. Los métodos descritos anteriormente se describen mejor en los pasos a continuación:

Pasos del desarrollo de métodos de mapa de péptidos

1. **Seleccionar las condiciones de gradiente iniciales: longitud de columna, composición de fase móvil, velocidad de flujo, temperatura y detección.** La separación inicial debe optimizarse para la retención (k''). Esto requiere un gradiente que no sea demasiado brusco.
2. **Ajustar el rango de gradiente.** Esto se utiliza para minimizar el tiempo de análisis mediante la eliminación del espacio desperdiciado al comienzo y al final del cromatograma.
3. **Variar selectividad.** Si se observan bandas solapadas o el tiempo de ejecución es demasiado elevado, pueden probarse las opciones comentadas sobre ajustes de selectividad.
4. **Tener en cuenta la forma del gradiente.** Puede lograrse un espacio de banda adicional mediante el uso de una forma de gradiente no lineal de modo opcional; así se mejora aún más la separación.
5. **Ajustar condiciones de columna.** Cuando el espacio de bandas y la selectividad se optimicen, debe considerarse la variación del tiempo de análisis y/o de la longitud de columna; así se mejora la resolución y/o la velocidad del análisis.

Figura 10: efecto de la longitud de columna en la resolución

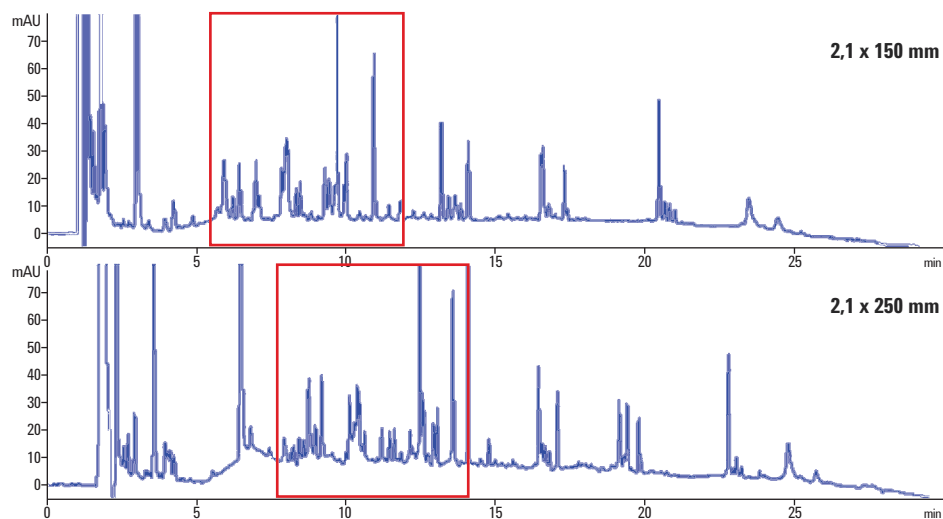


Figura 10: efecto de la longitud de columna en la resolución; comparación de mapa de péptidos con un digesto triptico de mioglobina (n.º de ref. Agilent 651750-902). Las áreas resaltadas en rojo indican áreas equivalentes de separación para mostrar claramente la resolución y la forma de pico. Las separaciones se realizaron con una columna de mapa de péptidos Agilent AdvanceBio, 2,1 x 150 mm (n.º de ref. Agilent 651750-902), en un sistema LC cuaternario bioinerte Agilent 1260 Infinity, con un gradiente lineal de agua (1,0 % TFA)/ACN (0,08 % TFA), 10 – 60 % B en 30 minutos, 0,3 ml/min, a 45 °C.

Caracterizaciones de mapa de péptidos mediante espectrometría de masas



El uso de RPC con espectrometría de masas ha hecho que esta técnica combinada sea el método predilecto para la caracterización de péptidos y los mapas de péptidos. Por ejemplo, en la industria biofarmacéutica, resulta esencial establecer y controlar la identidad de secuencia de un objetivo terapéutico. Además, la estabilidad de la biología de una proteína es un aspecto importante en el desarrollo terapéutico para controlar modificaciones como la oxidación, la reducción, la glicosilación y el truncamiento. Se puede emplear MS como prueba de pureza no reguladora; así se establece la estabilidad genética de un producto durante todo su ciclo de vida.

Los péptidos se analizan con espectrometría de masas mediante infusión directa de los péptidos aislados (o mediante el uso de LC/MS en línea para el análisis estructural y, a continuación, se correlaciona con la secuencia proteica de aminoácidos. De este modo, los péptidos identificados confirman las secuencias de aminoácidos específicas cubiertas con el mapa de péptidos, así como la identidad de la proteína. El mapa de péptidos de espectrometría de masas se aplica para:

- Confirmar la identidad de una proteína concreta.
- Obtener una caracterización detallada de la proteína, como la confirmación de péptidos N-terminales y C-terminales, mapas de péptidos de alta cobertura de secuencia, sustituciones de aminoácidos, etc.
- Cribar e identificar modificaciones post-translacionales (p. ej. glicosilaciones, enlaces disulfuro, ácido piroglutámico terminal del extremo N, oxidación de metionina y triptófano, etc.)

En general, los tipos de análisis de MS incluyen electrospray y MALDI-TOF-MS, así como bombardeo por átomos rápidos (FAB, por sus siglas en inglés). La MS en tándem también se ha usado para realizar la secuencia de una proteína modificada, así como para determinar el tipo de modificación de aminoácido que se ha producido. Con el uso de ionización de electrospray (ESI) o MALDI-MS, los péptidos proteolíticos se pueden ionizar de manera precisa en la fase gaseosa. La mayoría de las separaciones de péptidos se realizan con instrumentos LC/MS de ionización de electrospray (ESI), debido a la conveniencia del acoplamiento a LC y a la mejor calidad del espectro de masa en tándem para la identificación segura de proteínas. Por ejemplo, un instrumento de MS de tiempo de vuelo (QTOF) de cuadrupolo a menudo proporciona más información estructural, especialmente para péptidos de mayor tamaño, debido a su alta potencia resolutive y a la exactitud de masa.

Basándose en la información de MS las proteínas pueden identificarse fácilmente, en las que las masas medidas se comparan con los valores previstos derivados de la proteína intacta, o de la base de datos de proteínas, para determinar la información de cobertura de masa y secuencia. El objetivo de la caracterización de una proteína mediante mapa de péptidos es conciliar y registrar al menos el 95 % de cobertura de secuencia de la composición teórica de la estructura proteica. La **figura 11** muestra el ejemplo de un mapa de péptidos con optimización alta de digesto de proteína eritropoyetina (EPO) con el uso de ESI-MS. Las condiciones cromatográficas optimizadas y los parámetros de MS han permitido el 100 % de la cobertura de secuencia y resaltan una separación de mapa de péptidos bien caracterizada.

Figura 11: mapa de péptidos optimizado de proteína EPO que proporciona un 100 % de cobertura de secuencia

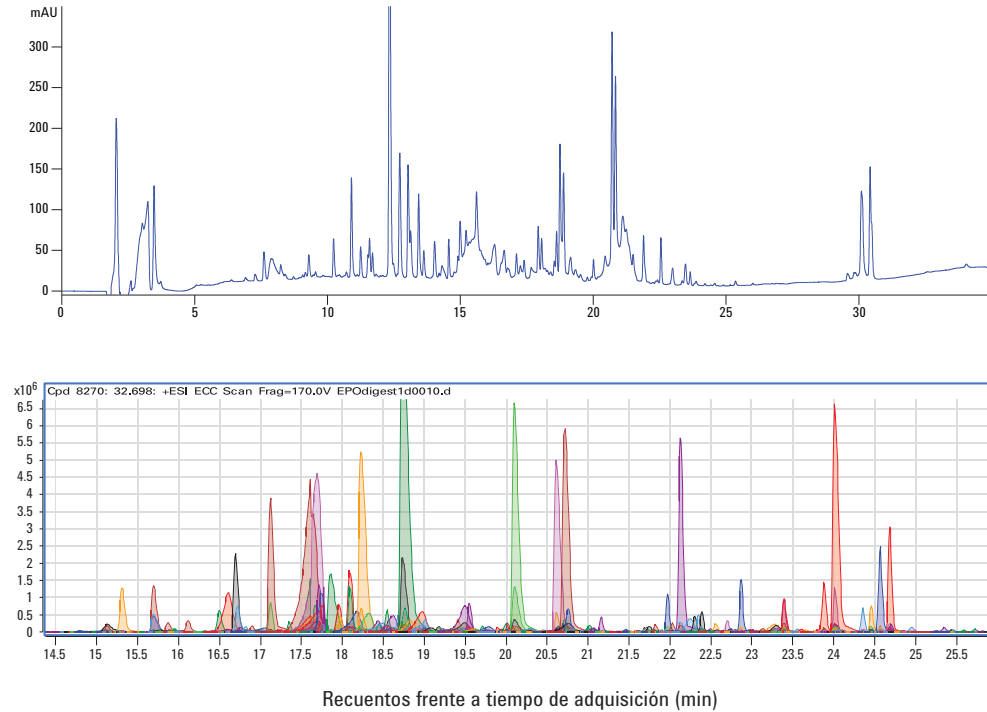


Figura 11: el cromatograma superior muestra una separación de mapa de péptidos de digesto de EPO, completamente optimizada, realizada en una columna de mapa de péptidos de 2,1 x 150 mm AdvanceBio. El cromatograma inferior muestra el análisis cualitativo (con un extractor de características moleculares) para la cobertura de secuencias generada mediante un Q-TOF de Agilent.

Información para pedidos

Para los mapas de péptidos, Agilent recomienda:

Mapa de péptidos AdvanceBio:
la primera elección para la mayoría de aplicaciones

Descripción	Referencia	Referencia Precolumna rápida
4,6 x 150 mm, 2,7 µm	653950-902	850750-911
3,0 x 150 mm, 2,7 µm	653950-302	853750-911
2,1 x 250 mm, 2,7 µm	651750-902	851725-911
2,1 x 150 mm, 2,7 µm	653750-902	
2,1 x 100 mm, 2,7 µm	655750-902	

*Las precolumnas rápidas prolongan la vida útil de las columnas sin retardar la separación ni afectar a la resolución.

ZORBAX RRHD 300-C18 para digesto incompleto o muestras que contienen un núcleo hidrófobo

Descripción	Referencia
2,1 x 50 mm, 1,8 µm	857750-902
2,1 x 100 mm, 1,8 µm	858750-902



ZORBAX RRHD 300-HILIC
para datos adicionales de hidrofílicos y glicopéptidos

Descripción	Referencia
2,1 x 50 mm, 1,8 µm	857750-901
2,1 x 100 mm, 1,8 µm	858750-901

Patrón de control de calidad de péptidos

Utilice el patrón de control de calidad de 10 péptidos de Agilent, el mismo que utiliza Agilent en el control de calidad de sus columnas, para evaluar el rendimiento de su columna durante su vida útil. Puede utilizarse para HPLC o LC/MS. Aproximadamente 20 inyecciones por vial.

Descripción	Referencia
Patrón de control de calidad de péptidos, 71 µg en vial de 2 ml	5190-0583

Descubra más acerca de las columnas Agilent para mapa de péptidos en agilent.com/chem/advancebio

Preparación de muestras de péptidos para análisis de espectrometría de masas, automatizada inteligentemente

La preparación manual de muestras de péptidos es un proceso que lleva mucho tiempo.

Si se dedica a realizar aplicaciones de mapas de péptidos en MS, es probable que desee aumentar el número de muestras analizadas. Y dependerá de un flujo de trabajo altamente reproducible de principio a fin para garantizar que sus resultados son coherentes.

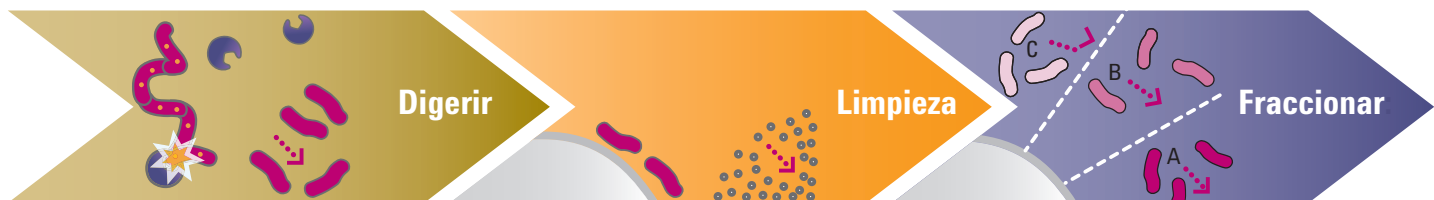
AssayMAP transforma los flujos de trabajo de digestión, limpieza y fraccionamiento para permitir una precisión y un número de muestras analizadas antes imposibles de alcanzar:

- Reproducibilidad mejorada gracias a que el error humano es menor: <5 % de CV
- Mayor número de muestras analizadas: hasta 384 muestras cada día
- Reduce significativamente el tiempo de preparación manual, dejando a los científicos libres para realizar tareas analíticas
- Desarrollo de métodos más rápido: la plataforma automatizada le permite optimizar métodos con rapidez



La solución de preparación de muestras de péptidos AssayMAP se basa en la potente combinación de cromatografía miniaturizada y de lecho compacto, la plataforma moderna de manipulación de líquidos Bravo y una interfaz de usuario sencilla basada en aplicaciones; todo ello crea un entorno de acceso abierto para usuarios expertos e inexpertos y, además, simplifica los flujos de trabajo de preparación de muestras más difíciles.

Solución de preparación de muestras de péptidos AssayMAP Para análisis de espectrometría de masas



Digestión:

- Digestión en solución con reactivos suministrados por el usuario
- Proceso paralelo hasta placas de pocillos de 4 x 96
- Un paso de pipeteo manual

Ventajas:

- Reducir variabilidad de usuario
- Mejorar número de muestras analizadas y reproducibilidad

Limpieza:

- Método de separación cuantitativa con cartuchos de fase reversa
- Proceso paralelo de placa de pocillos de 1 x 96

Ventajas:

- 10 µl de elución equivalen a tiempos de secado cortos o método "diluir e inyectar"
- Control del proceso: cada muestra se trata de forma idéntica

Fraccionamiento:

- Los cartuchos de intercambio catiónico fuerte (SCX, por sus siglas en inglés) generan hasta 6 fracciones para simplificar la muestra mediante elución por etapas con pH o sal
- Proceso paralelo de placa de pocillos de 1 x 96

Ventajas:

- Aumenta el número de muestras analizadas de LC/MS realizando el fraccionamiento fuera de línea, reduciendo tiempos de gradiente de LC largos
- Potente herramienta de enriquecimiento para simplificar muestras y aislar péptidos objetivo antes del análisis

Ventaja para el flujo de trabajo total:

- Las interfaces de usuario para flujos de trabajo se normalizan para ganar facilidad de uso y se vinculan para conseguir integración del flujo de trabajo.
- AssayMAP reduce la necesidad de duplicar muestras y requiere menos repeticiones de muestras.

Consiga reproducibilidad del flujo de trabajo total con la solución Agilent AssayMAP para preparación de muestras antes del análisis de espectrometría de masas

La solución de preparación de muestras de péptidos AssayMAP se usó para digerir 64 repeticiones de cada uno de los dos tipos de muestras: BSA en urea y HCL de guanidina. Las muestras se limpiaron con cartuchos de fase reversa AssayMAP y se analizaron con una columna de mapa de péptidos Agilent AdvanceBio, LC Agilent 1290 Infinity y espectrómetro de masas Q-TOF iFunnel Agilent 6550. El experimento se repitió en el día dos

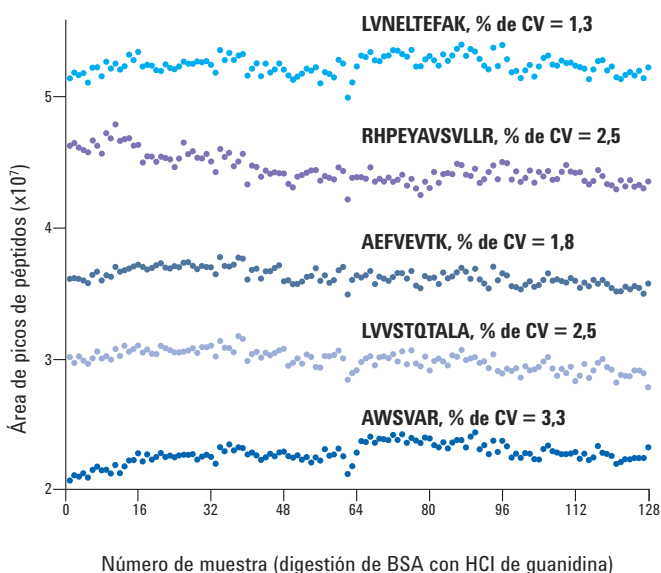


Figura 12: representaciones de dispersión que muestran el área de picos de 4 péptidos a lo largo de 2 días.

La preparación de muestras AssayMAP llevó unas cuatro horas diarias, con solo dos horas de actividad al día. La preparación de muestras manual para el mismo flujo de trabajo llevaría unas ocho horas diarias, con cuatro horas de actividad al día.

para examinar la reproducibilidad. El % de CV se determinó en 25 péptidos dentro de cada muestra, como puede observarse en la **Tabla 1**. Se muestran los diferentes intervalos de % de CV. Se ilustran las contribuciones de la media total de % de CV. Para mostrar la reproducibilidad, el área de pico para péptidos representativos se muestra en la **figura 12**.

25 péptidos	Urea (n=64, 62)		HCl de guanidina (n=64, 64)	
	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
% de CV de área media de picos	3,3	3,7	2,3	2,6
Péptidos con % de CV<5	23	21	25	23
Péptidos con 5>% de CV<10	2	3		1
Péptidos con % de CV>10		1		1

Tabla 1: % de CV al día con diferentes intervalos de % de CV.

El flujo de trabajo total de CV fue del <4 %. El flujo de trabajo completo incluyó el sistema de preparación de muestras de péptidos AssayMAP, una columna de mapa de péptidos Agilent AdvanceBio, el sistema LC 1290 Infinity y un espectrómetro de masas Q-TOF iFunnel Agilent 6550.

Para conocer más detalles sobre esta aplicación, consulte la publicación de Agilent 4991-2474EN.

Nos asociamos con usted para obtener unos resultados excelentes

Los retos cada vez más difíciles requieren mejores respuestas. Nuestras soluciones permiten a los científicos biofarmacéuticos innovar en la investigación de enfermedades, acelerar el descubrimiento de fármacos y tener una mayor seguridad durante todo el desarrollo y fabricación. La gran variedad de soluciones Agilent de tecnologías de investigación de genómica, automatización, separación y detección (junto con soluciones de software para flujos de trabajo) ayuda a proporcionar las respuestas necesarias para que los tratamientos eficaces lleguen al mercado.

Descubra más acerca de las soluciones Agilent para biofarmacia
agilent.com/chem/togetherbiopharma



Recorra el camino que le permite obtener resultados de éxito

agilent.com/chem/navigator

Con una variedad de bicolumnas y pequeñas columnas disponibles, Agilent ha introducido las columnas de LC y la preparación de muestras NAVIGATOR para ayudarle a elegir la columna adecuada para su aplicación.

NAVIGATOR presenta cuatro opciones de búsqueda sencillas:

- Por n.º de referencia: remisión a columnas LC y productos de preparación de muestras para encontrar el mejor repuesto de Agilent
- Por columna: recomendaciones basadas en el método
- Por compuesto: lista desplegable
- Por método USP

Además, la herramienta ofrece soporte de columna para optimizar la cromatografía, recomendaciones de productos para preparación de muestras y acceso rápido a fuentes de asistencia técnica, así como otras herramientas.

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2013
Impreso en EE. UU. 13 de noviembre de 2013
5991-2348ES



Agilent Technologies