

**ANVENDELSE AV ZIC-HILIC I OFFLINE
TODIMENSJONAL VÆSKEKROMATOGRAFI
FOR ANALYSE AV TRYPTISK KLIPPET
PROTEINER I URIN**



Thien Duc Nguyen

AVDELING FOR FARMASØYTISK KJEMI

FARMASØYTISK INSTITUTT

MATEMATISK-NATURVITENSKAPELIG FAKULTET

UNIVERSITETET I OSLO

2008

ANVENDELSE AV ZIC-HILIC I OFFLINE TODIMENSJONAL VÆSKEKROMATOGRAFI FOR ANALYSE AV TRYPTISK KLIPPET PROTEINER I URIN

Thien Duc Nguyen

Masteroppgaven ble utført ved Faggruppen for Legemiddelanalyse,
Avdeling for Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt ved
Universitetet i Oslo i perioden januar 2007 til juni 2008.

Veiledere:

Professor Léon Reubsaet, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.
Stipendiat Håvard Loftheim, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.
Post Doc Trine Grønhaug Halvorsen, Kjemisk Institutt, Universitetet i Oslo.

FORORD

Først og fremst vil jeg takke professor Léon Reubsæet og stipendiat Håvard Loftheim for meget god og omfattende veiledning. Begge har vært inspiratorer og har vært til uvurderlig hjelp under forsøkene og skrivningen av masteroppgaven.

Videre vil jeg takke resten av de ansatte ved Faggruppen for Legemiddelanalyse for godt miljø og de minneverdige fredagskakene. Spesielt takk til post doc Trine Grønhaug Halvorsen for betydningsfull rettleiding under skriveprosessen.

En stor takk til Mats, Torunn, Inger Johanne, Hilde og Silje for å ha bidratt til å holde humøret oppe på lesesalen under hele perioden.

Jeg vil også takke mine foreldre for den tilliten de har gitt meg og motivert meg gjennom hele utdannelsen. Til slutt vil jeg takke Huyen for beroligende ord og støtte.

Oslo , juni 2008

Thien Duc Nguyen

INNHALDSFORTEGNELSE

FORORD	3
1. SAMMENDRAG	6
2. FORKORTELSER	7
3. INNLEDNING OG PROBLEMSTILLING	9
3.1 INNLEDNING.....	9
3.2 PROBLEMSTILLING.....	9
4. TEORI	11
4.1 MULTIDIMENSJONAL SEPARASJON.....	11
4.1.1 2D-kromatografi.....	11
4.1.2 Ortogonalitet.....	12
4.2 VALG AV KOLONNER.....	13
4.2.1 HILIC.....	13
4.2.2 RPC.....	14
4.3 OFFLINE VS ONLINE.....	15
4.3.1 Inndamping.....	16
4.4 MOBILFASE EGENSKAPER.....	16
4.4.1 HILIC.....	16
4.4.2 RPC.....	17
4.5 DETEKSJON.....	17
4.5.1 UV.....	17
4.5.2 MS.....	18
4.6 TRYPSIN OG CYTOKROM C.....	22
4.6.1 Trypsin.....	22
4.6.2 Cytokrom C.....	22
5. MATERIALER OG METODER	24
5.1 KJEMIKALIER, ANALYTTER OG UTSTYR.....	24

5.2 TILLAGING AV LØSNINGER OG BUFFERE.....	27
5.2.1 Buffere.....	27
5.2.2 Mobilfaser.....	27
5.2.3 Peptidløsninger.....	28
5.3 OPPSETT AV APPARATUR.....	29
5.3.1 Første dimensjon HILIC.....	30
5.3.2 Andre dimensjon RPC (kvadrupol).....	31
5.3.3 Andre dimensjon RPC (ionefelle).....	32
6. RESULTATER OG DISKUSJON.....	33
6.1 INNLEDENDE FORSØK.....	33
6.1.1 Identifisering av cytokrom C klipprodukter.....	33
6.1.2 SIM modus.....	38
6.1.3 Inndamping.....	39
6.1.4 Effekt av ACN på utbytte etter inndamping.....	40
6.1.5 Peptidløselighet.....	43
6.2 OPTIMALISERING AV HILIC.....	45
6.2.1 Ulike typer gradient.....	45
6.2.2 Repeterbarhet.....	48
6.3 OFFLINE FRAKSJONERING.....	50
6.4 TODIMENSJONAL ANALYSER.....	53
6.4.1 2D-HILIC-RPC.....	53
6.4.2 Retensjonsrekkefølge av peptider i HILIC og RPC.....	55
6.4.3 Ortogonalitet.....	56
6.5 ANALYSE AV PASIENTPRØVE.....	57
7. KONKLUSJON.....	58
8. REFERANSELISTE.....	60

1. SAMMENDRAG

Ved analyse av komplekse prøver som for eksempel urinprøver fra nyretransplanterte pasienter, kreves det en metode som har tilstrekkelig separasjonsevne til å separere prøver med komponenter med stor variasjon i fysiokjemiske egenskaper. Dette er vanskelig å oppnå med en endimensjonal væskechromatografisk metode. En mulig løsning for dette kan være bruk av et multidimensjonalt system. Hensikten med oppgaven er å utvikle og implementere et todimensjonalt system med MS-deteksjon som har god separasjonsevne og robusthet for analyse av tryptisk klippet modellprotein. For å oppnå gode resultater ved todimensjonal analyse er det nødvendig å kombinere metoder med to forskjellige ortogonale separasjonsprinsipper. I denne oppgaven ble det valgt å arbeide med et offline 2D ZIC-HILIC-RPC-system, som ser ut til å være relativt ortogonal. Videre arbeides det med identifisering av peptidprodukter av modellproteinene med hensyn til retensjonstid og MS/MS-spekter av peptidene. Det ble valgt 11 peptider på dette grunnlaget som markører for deteksjon av modellprotein i prøver.

I dette offline todimensjonale systemet ble peptider først separert på en ZIC-HILIC-kolonne, hvor peptidene ble separert etter hydrofile egenskaper. For så separeres etter hydrofobe egenskaper på en C8-RPC-kolonne. Ved utviklingen av dette offline 2D-LC-MS-systemet ble det først laget atskilte endimensjonale metoder på HILIC og RPC. Målet var at disse metodene skulle tilpasses slik at urinprøve fra pasienter kunne analyseres.

I særlig grad ble det lagt vekt på å arbeide med optimalisering av HILIC-metoden, og metodens robusthet ble bedømt med hensyn til repeterbarhet. Det ble fokusert på overføringen av fraksjonene fra første dimensjon HILIC til andre dimensjon RPC. Som en del av prøveopparbeidelsen og overføringstrinnet mellom dimensjonene ble effekten av ACN etter inndampingsprosessen kartlagt, og forskjellige inndampings- og overføringsteknikker ble sammenlignet med hensyn til utbytte. Peptidløselighet og retensjonsrekkefølge av peptider ble undersøkt. Peptidene ble testet i løsninger av forskjellige ACN-konsentrasjoner for å få vite mer om peptidløseligheten.

Til slutt ble den utviklede ZIC-HILIC-metoden brukt for analyse av urinprøve fra en nyretransplantert pasient og metoden utgir seg til å være en egnet separasjonsmetode for denne type analyser.

2. FORKORTELSER

2D	Todimensjonal (Two-dimensional)
ABC	Ammonium bikarbonat
AC	Affinitetskromatografi (Affinity Chromatography)
ACN	Acetonitril
amu	Atomisk masseenhet (Atomic Mass Unit)
CID	Kollisjon induisert dissosiasjon (Collision Induced Dissociation)
ESI	Elektrospray ionisering (Electrospray Ionization)
HILIC	Hydrofil interaksjon væskekromatografi (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography)
IEX	Ionebytter (Ion Exchange)
LC	Væskekromatografi (Liquid Chromatography)
MeOH	Metanol
MS	Massespektrometri (Mass Spectrometry)
m/z	Forholdet masse/ladning
NH ₄ Ac	Ammoniumacetat
NPC	Normalfase kromatografi (Normal Phase Chromatography)
RPC	Omvendt fase kromatografi (Reversed Phase Chromatography)
SCX	Sterk kationbytter kromatografi (Strong Cationic Exchange)
SEC	Eksklusjonskromatografi (Size Exclusion Chromatography)
SIM	Selektiv ionemonitorering (Selektive Ion Monitoring)
TIC	Total ionestrøm (Total Ion Current)
t _R	Retensjonstid
UV	Ultrafiolett
ZIC-HILIC	Zwitterionisk hydrofil interaksjon væskekromatografi (Zwitterionic Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography)
A	Alanin
C	Cystein
D	Aspartat
E	Glutamat
F	Fenylalanin
G	Glysin
H	Histidin
I	Isoleucin

K	Lysin
L	Leucin
M	Metionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Treonin
V	Valin
W	Tryptofan
Y	Tyrosin

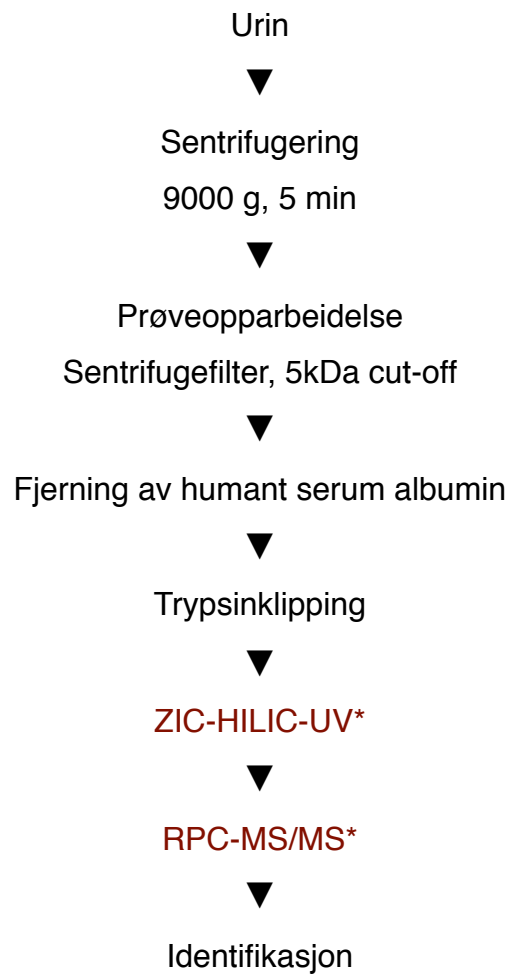
3. INNLEDNING OG PROBLEMSTILLING

3.1 INNLEDNING

Proteomikk er fagområdet som omhandler det totale proteinuttrykket (proteomet) dannet av genene i en organisme. Proteiner og peptider i biologiske matriser spiller en sentral rolle i fysiologien. Forandringer i konsentrasjon kan reflektere en patofysiologisk prosess. Disse proteinene og peptidene kan dermed være potensielle biomarkører for spesifikke sykdommer og vil følgelig forbedre både diagnostikk og terapikontroll [1]. Ved å gi raskere og sikker diagnostikk, og bedre monitorering av terapieresponsen. Biologiske matriser er komplekse og inneholder en rekke komponenter med stor variasjon i fysiokjemiske egenskaper. Analyse av proteiner og peptider er en analytisk utfordring på grunn av det rike antallet og den komplekse sammensetningen. Derfor er multidimensjonal kromatografi ofte nødvendig for å få bedre separasjonsevne og oppløsningsevne sammenlignet med konvensjonell endimensjonal kromatografi. Multidimensjonale kromatografiske analyser vil kombinert med sensitiv deteksjon kunne bidra til identifikasjon og kvantifisering av potensielle diagnostiske markører. Kombinasjon av sterk kationbytter kromatografi (SCX) og omvendt fase kromatografi (RPC) er den vanligste kombinasjonen i todimensjonal væskechromatografi (2D-LC) for å separere peptider. I den senere tid har det vist seg at hydrofil interaksjon væskechromatografi (HILIC) kan være et godt alternativ for SCX [2].

3.2 PROBLEMSTILLING

Målet med oppgaven var å utvikle og implementere et todimensjonalt HILIC-RPC-system med massespektrometri (MS) deteksjon. Første dimensjon var en ZIC-HILIC-kolonne og andre dimensjon en RPC-kolonne. Dette prosjektet var et delprosjekt i et prosjekt kalt "Identifikasjon av ukjente biomarkører i urin ved hjelp av LC-MS". Det todimensjonale HILIC-RPC-systemet vil inngå i analyse av peptidblandingen som dannes etter tryptisk klipp av proteiner i urin fra nyretransplanterte pasienter, se figur 3.1. I denne oppgaven blir det fokusert på å konstruere en HILIC-metode med god separasjon og robusthet for analyser av peptider. Følgende parameter skal undersøkes for 2D-HILIC-RPC-systemet; ortogonalitet og repeterbarhet. En av utfordringene var å unngå tap av prøver i prøveopparbeidelses- og fraksjoneringstrinnet. Denne oppgaven har tatt utgangspunktet i analysemetoden i artikkelen "Evaluation and optimization of ZIC-HILIC-RP as alternative MuDPIT strategy" av Paul J. Boersema [3].



Figur 3.1 viser prosedyren i prosjektet “Identifikasjon av ukjente biomarkører i urin ved hjelp av LC-MS” fra begynnelsen med pasientprøve og til den siste delen som er identifikasjon av peptider. I denne oppgaven skal det arbeides med analysetrinnene ZIC-HILIC-UV og RPC-MS/MS.

4. TEORI

4.1 MULTIDIMENSJONAL SEPARASJON

I kromatografisk separasjon skilles stoffer fra hverandre ved at de får forskjellige hastighet når de transporteres av mobilfasen gjennom stasjonærfasen. Hastigheten påvirkes av hvor godt stoffene fordeler seg mellom stasjonærfasen og mobilfasen [4]. For å analysere komplekse biologiske prøver er analysesystemer med høy oppløsningsevne nødvendig. En mulig løsning kan være bruk av multidimensjonale systemer, hvor dimensjonene er basert på forskjellige separasjonsmekanismer. I væskekromatografi finnes det mange forskjellige separasjonsmekanismer, som normalfase kromatografi (NPC), omvendt fase kromatografi (RPC), eksklusjonskromatografi (SEC), ionebytter (IEX) og affinitetskromatografi (AC), alle karakterisert med forskjellige selektivitet. I teorien kan ulike metoder med forskjellige separasjonsmekanismer kombineres i et 2D system for å forbedre toppkapasitet, selektivitet og oppløsningsevne. Men når man i praksis kombinerer metoder av ulike prinsipper, vil det vise seg at det er mange hinder å overkomme. En kombinasjon er ikke alltid mulig. Eksempel på dette kan være at mobilfasene i de to dimensjonene ikke er blandbare, eller at mobilfasen i første dimensjon og stasjonærfasen i andre dimensjon er inkompatible.

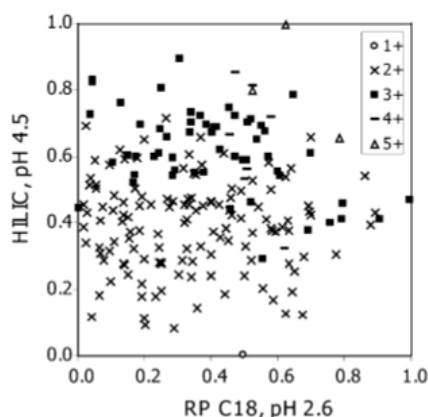
4.1.1 2D-kromatografi

2D-LC kan utføres enten offline eller online. Offline systemer kan være enklere, men er mer tidkrevende, vanskeligere å automatisere og reprodusere, og sjansen er større for tap og kontaminering av prøver. Online metoder er raskere og mer reproduserbare, men sammenkoblingen av dimensjonen er da et hinder man må overkomme [5]. Overføringen av fraksjonene kan enten gjennomføres som en såkalt konvensjonell “heart cutting”-teknikk der bare utvalgte fraksjoner fra første separasjon blir overført til det neste systemet. Dersom hele prøven også blir overført til neste dimensjon, kalles det “comprehensive” multidimensjonal kromatografi. Anvendelsen av 2D system gir bedre separasjon og reduserer prøvekompleksiteten. Per i dag er det ingen separasjonsmetode som er god nok til å separere alle komponentene fra en proteomikk studie med et endimensjonalt analysesystem [6]. Det er to arbeidsmetoder bruk i 2D systemer, “profiling” og “target” metoder. Ved profiling fraksjonerer alle komponentene i en kompleks blanding

og analyseres. Target metoder brukes til å isolere en eller flere grupper av komponenter fra en kompleks blanding [7].

4.1.2 Ortogonalitet

Kolonneselektivitet er det viktigste kriteriet når man skal sette opp en 2D separasjon, fordi det påvirker 2D-systemets ortogonalitet. Det beste resultatet som kan oppnås er et så kalt ortogonalt system, det vil si at det ikke er korrelasjon i retensjonstiden til analyttene mellom dimensjonene. Et system som gir perfekt ortogonalitet er sjelden å finne i praksis [5]. Multidimensjonal kromatografisystemer separerer proteiner og peptider basert på forskjellige egenskaper som pI, relativ molekylmasse, størrelse, ladningsforhold og hydrofobisitet [7]. Separasjonseffektiviteten i væskechromatografi under gradientforhold vil beskrives best med toppkapasitet, det vil si antall komponenter som kan teoretisk separeres på en gitt væskechromatografisk-kolonne og innenfor en gradientvarighet. RPC-kolonner vil ha toppkapasitet på noen hundre, avhengig av lengden av kolonnen og stigningen til gradienten. Med et 2D-LC system vil separasjonsevnen øke dramatisk. Toppkapasitet til et 2D-LC system vil defineres som en lineær sammenheng av toppkapasiteten i begge dimensjonene. Eksempelvis når to separasjonssystem som er ortogonale kombineres og toppkapasiteten er henholdsvis 50 og 100 vil det resultere i en teoretisk 2D kapasitet på 5000. I realiteten er 2D-systemets toppkapasitet avhengig av ortogonaliteten, hvis selektiviteten til dimensjonene ikke er ortogonale (uavhengige), vil den reelle toppkapasiteten være lavere enn forventet. Figur 4.1 viser et ortogonalitetsplott for et 2D-HILIC-RPC-system [7].

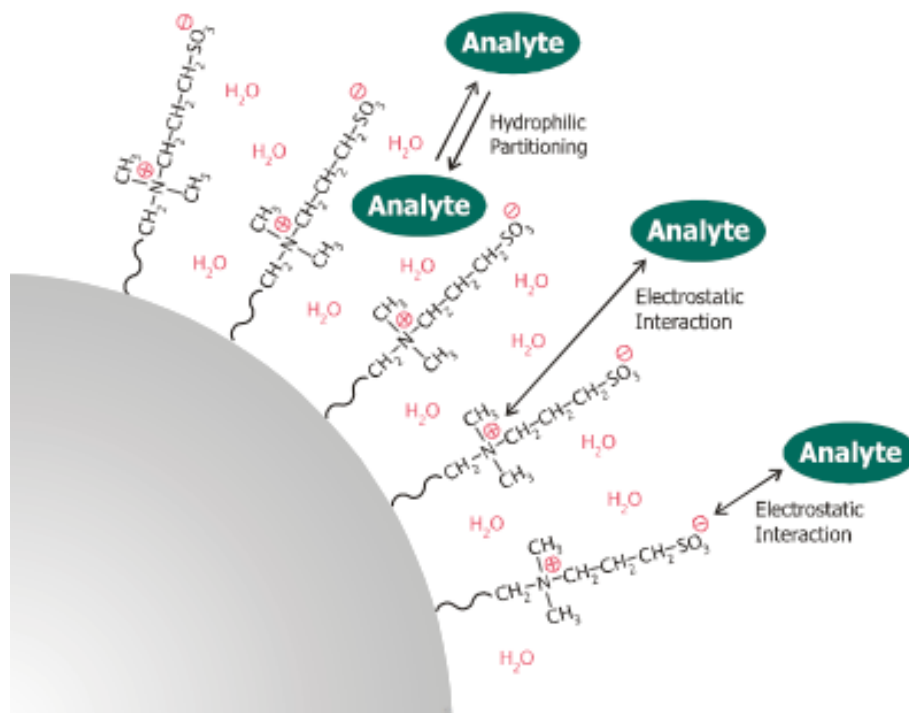


Figur 4.1 Ortogonalitetsplott av 2D-HILIC-RPC

4.2 VALG AV KOLONNER

4.2.1 HILIC

Den senere tid har behovet for å analysere polare forbindelser som retarderes dårlig på RPC økt og prøvene har blitt stadig mer komplekse. I tillegg har det vært en stor økning i bruk av væskekromatografi-elektrospray-ionisering-massespektrometri (LC-ESI-MS) noe som har ført til utvikling av andre stasjonære faser. I denne utviklingen ble det blant annet sett at buffersammensetningen som blir brukt i HILIC er kompatibel med MS, og at det høye innholdet av organisk modifikator i bufferen har vist seg å øke sensitiviteten i ESI-MS. HILIC kjennetegnes ved bruk av hydrofil stasjonærfase og upolare organisk mobilfase. Stoffer retarderes på HILIC ved hydrofile interaksjoner, som hydrogenbindinger og elektrostatiske interaksjoner. Retensjonen avtar etter som stasjonærfasen blir mer hydrofob. I en blanding av stoffer vil det minst hydrofile stoffet få dårligst retensjon og kortest retensjonstid. Dette kan sammenlignes med NPC. Forskjellen er at i HILIC benytter man kun vannblandbare løsninger og eluering oppnås med vanngradient. Det har blitt utviklet mange typer funksjonelle grupper til stasjonærfasen i HILIC. Populære typer med uderivatisert silika som siloxaner, silanoler med eller uten små mengder av metall, derivatisert silika som kationbytter (polysulfoetyl A), svak kationbytter (Polycat A), svak anionbytter (PolyWax), TSKgel amid 80, "click" sakkarider og zwitterionisk (ZIC-HILIC). Hver av disse materialene har forskjellig separasjonsselektivitet og krever forskjellige buffersammensetninger for å få optimalt resultat. Figur 4.2 illustrerer retensjonsmekanikene på ZIC-HILIC-kolonne som benyttes i denne oppgaven [8]. Stasjonærfasen er kovalent bundet til en permanent zwitterionisk funksjonell gruppe av sulfobetain type. Med zwitterionisk stasjonærfase vil det være tilstedeværende motioner, for å balansere de elektrostatiske kreftene. Den ioniske interaksjonen på HILIC er svakere sammenlignet med ionebytter interaksjonen. Dette medfører svakere elueringsstyrke (høyere konsentrasjon av organiske stoffer) i mobilfasen som gir høy sensitivitet ved massespektrometrisk deteksjon [9]. Hypotesen er at vann i mobilfasen danner et vandig lag på den hydrofile stasjonærfasen. Dette tillater hydrofile analytter til å fordele seg mellom det hydrofile laget og den upolare elueringsbufferen. Eluering skjer ved økning av hydrofilisitet i mobilfasen ved å øke vannmengden [2].



Figur 4.2 Illustrasjon av retensjonsmekanisme på ZIC-HILIC

4.2.2 RPC

Siden RPC-kolonne gir høy effektivitet og er kompatibel med elektropray ionisering (ESI)-MS analyse, blir den ofte valgt som andre LC-dimensjon [6]. I RPC er stasjonærfasen hydrofob. I dette prosjektet blir det brukt en C8-kolonne. Analyttene blir retardert av hydrofobe mekanismer. Van der Waals-krefter er de viktigste kreftene, som øker med molekylstørrelsen. I en blanding av stoffer vil retensjonen øke med økende hydrofobe egenskapene til stoffene. For stoffer med ioniserbare funksjonelle grupper vil retensjonen være avhengig av om disse gruppene er ionisert eller ikke. Retensjonen avtar med økende ionisering.

4.3 OFFLINE VS ONLINE

Offline og online 2D-LC har blitt mye brukt i proteomikkanalyser. Det er både fordeler og ulemper med begge metodene. For et online system er det vanskelig å manipulere prøven i overføringstrinnet til andre dimensjon men det er også mindre mulighet for tap av prøver i dette trinnet. Et slik system krever også et mer sofistikert instrumentelt oppsett med tilleggspumpe, switching-mekanisme og trapping-kolonner. Kravet til mobilfasens kompatibilitet for direkte overføring av fraksjonene til andre separasjonsdimensjon vil snevre inn valgmuligheten til LC metoder. Siden analyse av den overførte fraksjonen i andre dimensjon må være fullført før den neste fraksjonen kan bli injisert, fører dette til at den første analysen må være relativt langsom mens den andre analysen må være relativt rask. Dette medfører at toppkapasiteten i 2D-LC online ikke blir optimal. Uaktsomhet kan føre til at det blir overloading på andre dimensjon [10]. Dette kan unngås ved bruk av flere trapping-kolonner der fraksjonene blir "mellomlagret". Men dette vil føre til et svært komplekst systemoppsett. Det er enklere å implementere et offline system, for eksempel via en fraksjonssamler. Fraksjonene kan videre oppkonsentreres og/eller kjemisk modifieres før analysen på de andre dimensjon. Selv om fraksjoneringen reduserer prøve kompleksiteten, kan LC-MS analyse av alle fraksjonene likevel være tidskrevende. Et offline 2D-LC har færre problemer med mobilfase kompatibiliteten og gir mer frihet til å tilpasse analysen. Ulemper som kan oppstå ved et offline system er tap av flyktige komponenter, oksidering, fotokjemiske reaksjoner eller kontaminering av fraksjoner på grunn av fuktighet i omgivelsen [6, 10].

Mobilfasene til HILIC-dimensjonen og RPC-dimensjonen er kompatible. Men på grunn av høyt innhold av organisk løsemiddel i mobilfasen til HILIC, må fraksjonene fortynnes eller inndampes for å unngå at elueringsstyrken i prøven blir for høy i RPC-dimensjonen.

Vurdering av fordeler og ulemper til et online- og offline-system førte til at et offline system ble valgt i denne oppgaven.

4.3.1 Inndamping

Det høye innholdet av ACN fra første dimensjon vil gi kraftig elueringsstyrke på RPC-kolonnen i andre dimensjon. En måte å unngå dette problemet på er å dampe av mobilfasen fra første dimensjon og deretter reløse eller oppkonsentrere med mobilfasen til andre dimensjon. En mulighet er å bruke Speedvac sentrifugering. Teknikken kombinerer sentrifugekrefter, vakuum og varme (35°C) for å redusere eller dampe bort løsningen. En annen teknikk som kan brukes er inndamping under en strøm av nitrogen. Her varmes løsningen opp (60°C) på en varmeblokk og i tillegg blåses nitrogengass over løsningen. Nitrogengassen fjerner damp fra løsningen slik at likevekten mellom væske og gass blir forskjøvet og inndampingsprosessen går raskere. Inndampingstiden for begge teknikkene er avhengig av hvor mye løsning som skal dampes vekk, i tillegg er Speedvac også avhengig av antall prøveløsninger som inndampes samtidig.

4.4 MOBILFASE EGENSKAPER

4.4.1 HILIC

Valg av salter i buffer til HILIC er begrenset. På grunn av det høye innholdet av organiske løsninger i bufferen, blir det vanskeligere å løse opp saltet og et lettløselig salt bør velges. Ammoniumacetat (NH₄Ac) er det som brukes mest, fordi det er kompatibelt med MS, men ammonium bikarbonat (ABC), trietylamin fosfat, natrium perklorat og natrium metylfosfat blir også brukt [2]. Tilsetning av salter kan påvirke interaksjonene både mellom analytten og stasjonærfasen og/eller mobilfasen. Forklaringen kan være at salter i en rikelig vandig mobilfase, genererer økt hydrofilisitet i vannlaget rundt stasjonærfasen. Dette vil kunne redusere retensjonen til analytten. En annen faktor som også påvirker retensjonen i HILIC er pH i buffer, pH under eller over analyttens pK_a-verdi, vil avgjøre om analytten er i ionisert form eller ikke. Dette påvirker hydrofilisiteten til analytten og dens interaksjon med stasjonærfasen. For eksempel vil sure peptider være protonert ved pH 3, slik at hydrofilisiteten av peptidene er nedsatt, noe som fører til dårligere retensjon av disse peptidene.

4.4.2 RPC

Mobilfasen er typisk en vandig bufferløsning tilsatt en organisk løsning som metanol (MeOH) eller acetonitril (ACN). For å få godt signal i massespektrometeret er det viktig at stoffene er i ionisert form. Dette betyr i praksis at pH i mobilfasen må være justert slik at stoffene er ladet. Et annet viktig moment er at alle komponentene er flyktige, slik at disse transporteres mest mulig effektivt vekk fra tørkegassen. Eksempel på andre flyktige komponenter kan være ammoniumformiat, ammoniakk og maursyre [4].

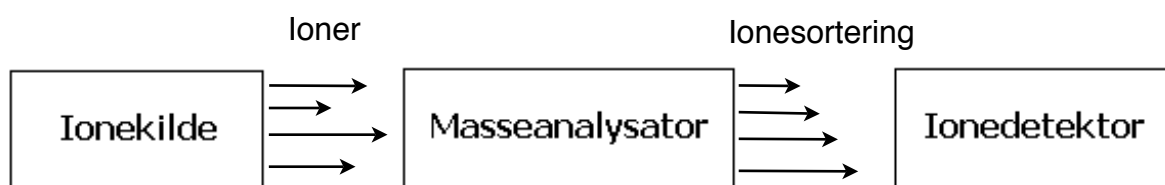
4.5 DETEKSJON

4.5.1 UV

Stoffer som kan absorbere ultrafiolett (UV) stråling vil gi respons i UV-detektoren. Responsen er proporsjonal med konsentrasjonen av stoffet i mobilfasen. For å få optimal følsomhet ved deteksjonen detekteres stoffene normalt ved den bølgelengden som gir maksimal respons. UV-deteksjon ble brukt i første dimensjonen i denne oppgaven og deteksjon ble gjort ved bølgelengdene 214 nm og 254 nm fordi proteiner og peptider inneholder mange konjugerte bindinger som absorberer godt med UV-stråling [4, 11]. UV responsen øker når bølgelengden reduseres. Viktig her er å være i et område høyere en UV-cutoff. UV-cutoff er den laveste bølgelengden som kan benyttes sammen med løsemiddelet. Bølgelender lavere enn UV-cutoff kan ikke benyttes fordi løsemidlene vil gi for høy UV respons. MeOH og ACN har lav UV-cutoff og viskositet, derfor har disse blitt mye brukt som organisk modifikatorer i LC [12].

4.5.2 MS

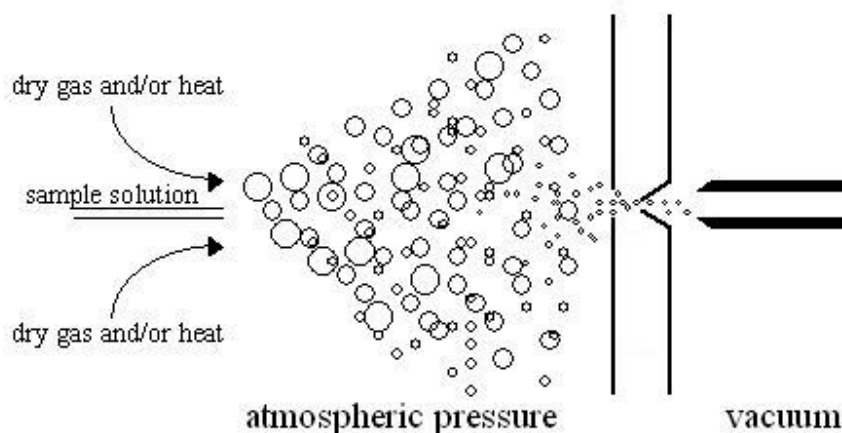
Massespektrometeret består av 3 hoveddeler; ionekilden, masseanalysatoren og ionedetektoren (figur 4.3). I MS separeres ioniserte proteiner og peptider etter forholdet mellom masse og ladning (m/z). MS/MS (tandem MS) er to massespektrometer koblet sammen, og dette har revolusjonert proteomikkverden. Ved MS/MS selekteres massene, fragmenteres og analyseres i to stadier. I første stadiet ved hjelp av MS1 blir molekylionet generert i ionekilden. Dette blir så selektert og fragmentert i kollisjon induisert dissosiasjon (CID). Fragmenteringen resulterer i produksjon av fragmentioner som blir analysert i MS2. Fragmentioner som dannes ved MS/MS skjer ved at peptidioner kolliderer med nøytral helium gassatomer i ionefellen. Dette fører til økt kinetisk energi og peptidionene fragmenterer. De vanligste fragmentionene i MS/MS er b- og y-ioner. Det karakteristiske fragmenteringsmønsteret av et forløpermolekylion og fragmenterte ioner er svært spesifikk for et enkelt molekylion. Ut fra disse b- og y-ionene kan sekvenser til peptider indikeres. På grunn av dette er MS/MS et svært nyttig verktøy til analyse og identifisering av komplekse proteinprøver. Andre fordeler som gjør at MS foretrekkes i forhold til konvensjonelle analytiske metoder er lav deteksjonsgrense (pg nivå, UV er i ng nivå), kort analysetid, god presisjon og nøyaktighet. Men den har også sine begrensninger, minimal kontaminering kan påvirke kvantifiseringen. Mobilfasen må bestå av flyktige komponenter. Acetonitril, metanol, vann, maursyre, eddiksyre, ammoniumacetat, trifloroacetatsyre er de vanligste å bruke [13].



Figur 4.3 Skjematisk presentasjon av et massespektrometer

ESI

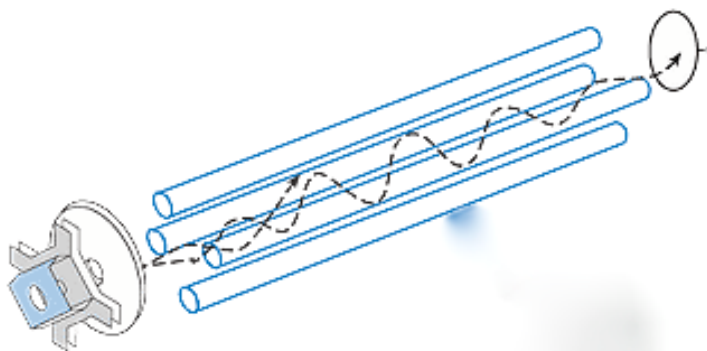
Elektrosprayionisasjon (ESI) kan ionisere enten i positiv eller negativ modus for å danne henholdsvis positive eller negative ioner. I positiv modus vil man få dannet $[M+H]^+$ ioner og i negativ modus $[M-H]^-$ ioner. Ioniseringen foregår under atmosfærisk trykk og den er en myk ioniseringsteknikk (figur 4.4). Det siste betyr at ionene som dannes i ESI, ikke fragmenteres videre. For å få bra signal i massespektret er det viktig at stoffene er ioniserte i væskestrømmen. Dette betyr i praksis at pH må være justert slik analyttene er ladet. Væskestrømmen av peptidløsningen passerer gjennom et trangt kapillær. Ved utgangen av kapillæret er det påsatt et elektrisk felt. Ved hjelp av dette feltet og nitrogen (tørkegass) dannes en aerosol, som består av et stort antall dråper. Dråpestørrelsen blir redusert ved hjelp av tørkegassen. De flyktige komponentene i væsken vil fordampe og fjernes ved hjelp av tørkegassen. Etersom mobilfasen fordamper, øker den frastøtningsspenningen i dråpen og man får en Coulombeksplosjon av dråpene, som medfører ytterligere reduksjon i størrelse. Denne prosessen gjentar seg inntil det oppnås emisjon av ioner fra dråpene. Ionene ledes videre inn i masseanalytoren ved hjelp av elektrisk spenning.



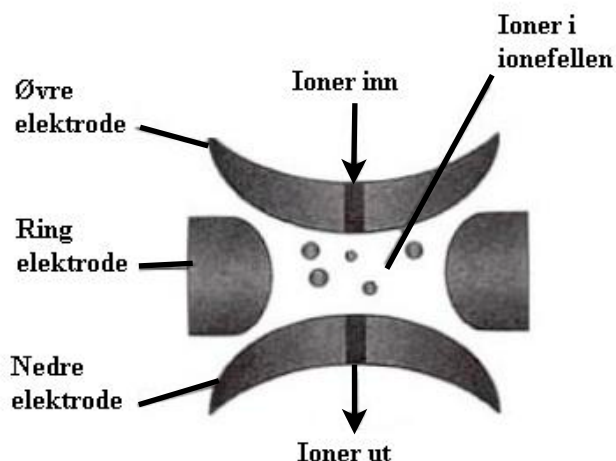
Figur 4.4 Skjematisk illustrasjon av ESI

Masseanalysator

I masseanalysatoren blir ionene separert etter masse og ladnings forholdet (m/z). Masseanalysatorer som ble brukt i denne sammenhengen er kvadrupol og ionefelle. Prinsippet bak kvadrupolen er basert på fire parallelle stenger (figur 4.5). Avhengig av den elektriske feltstyrken og frekvensen vil ioner med forskjellige masse kunne passere gjennom kvadrupolen og registreres av detektoren. Ionefellen består av to end-cap-elektroder og en ringelektrode som ikke er i kontakt med hverandre (figur 4.6). Ioner passerer gjennom den øvre delen av end-cap-elektroden og blir avkjølt ved tilstedeværelse av helium. Ioner som har bestemte m/z verdier vil oscillere i en stabil bane i rommet i ionefellen. Ved å øke spenningen blir de letteste ionene destabilisert, slik at 50% av ionene vil forlate via øvre og andre 50% nedre end-cap-elektroden. Bak nedre end-cap-elektroden plasseres ionedetektoren. I en MS/MS kjøring med ionefelle vil ionet av interesse bli isolert ved å destabilisere alle de andre ionene i ionefellen. MS/MS-ionet bli videre aktivert ved øke spenningen i elektrodene. På denne måten vil MS/MS-ionet få økt kinetisk energi og kolliderer med helium som fører til fragmentering.



Figur 4.5 Kvadrupol



Figur 4.6 Ionfelle

Deteksjonsmuligheter i MS: SCAN og SIM

SCAN er et deteksjonsprinsipp hvor hele massespektret for et ønsket m/z -verdi område blir tatt opp. Dersom man ønsker mye strukturinformasjon om analyttene eller har en ukjent forbindelse er det vanlig å benytte SCAN prinsippet. Massespekteret som man får er den totale intensitetene til alle ionene. Det plottes fortløpende som funksjon av retensjonstiden (t_R) og gir et totalstrømskromatogram (Total Ion Current, TIC). Dersom man ønsker å analysere stoffer ved svært lave konsentrasjoner eller gjøre kvantitative bestemmelser er det vanlig å foreta selektiv ionemonitorering (SIM). Massespekteret innstilles slik at det tar opp kun en eller flere bestemte m/z -verdier. Sensitivitet for SIM er oftest bedre enn SCAN, dermed blir deteksjonsgrensene lavest ved bruk av SIM prinsippet [2,10,11].

4.6 TRYPSIN OG CYTOKROM C

Et protein er en kjede sammensatt av aminosyrer ved hjelp av kovalente peptidbindinger. Det finnes 20 ulike aminosyrer som inngår som byggestener i protein og hver av dem har forskjellige kjemiske egenskaper. På grunn av interaksjoner mellom aminosyrer, vil det være forskjellige tredimensjonale strukturer av proteiner som er bestemt av aminosyrerekkefølgen i kjeden. Hvert proteintype har en unik sekvens av aminosyrer, vanligvis er de mellom 50 og 2000 aminosyrer [15].

4.6.1 Trypsin

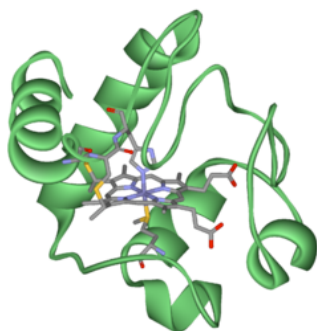
Trypsin er en protease som klipper proteiner ved spesifikke aminosyrer og gir produkter som er kompatibel med MS analyse. Produkter mellom 6-20 aminosyrer er ideell for MS analyse og database sammenligning. Egenskaper som er viktig for en protease er; stabilitet, vel karakterisert enzym som klipper ved spesifikke aminosyrer. Mange tusen forskjellige proteaser har blitt funnet eventuelt identifisert, men bare noe få tilfredsstillende disse kravene. I proteomikk er trypsin den desidert mest brukte proteasen [11]. Trypsin finnes i bukspyttkjertelen og kutter peptidbindinger etter lysin og arginin, med et unntak når prolin står etter en av de to aminosyrene. Den klipper i c-terminal retning. Antall arginin og lysin aminosyrer i et protein er høy. Dette resulterer til at det blir generert mange peptider ved bruk av trypsin. Et 50 kDa protein vil gi rundt 30 peptider [11]. Trypsin har veldig spesifikk klipping, og aktiviteten er god i løsning. Det optimale forholdet for trypsin er i pH 8 og temperatur rundt 37°C .

4.6.2 Cytokrom C

Cytokrom C er et hemoprotein funnet i pattedyr, og består av 104 aminosyrer (molekylvekten er cirka 12000 dalton). Den er stabil og kovalent bundet til hem-c gruppen. Den er lokalisert i mitokondriens indre membran og er en del av elektrontransportkjeden, og i tillegg er involvert i apoptose [16]. I denne oppgaven ble cytokrom C brukt som modellprotein. Proteinet har 21 klippesteder for trypsin, og aminosyresekvens til cytokrom C inneholder 19 lysin og 2 arginin [17]. Figur 4.7 viser tredimensjonalstrukturen til cytokrom C, mens figur 4.8 viser aminosyresekvensen til cytokrom C. Cytokrom har blitt mye brukt som modellprotein i andre analyseprosjekter. Dette skyldes at prosedyre for tryptisk klipp av cytokrom C er enkel, og at det er et godt dokumentert protein [18].

Tabell 4-1 Oversikt over de 20 aminosyrene

Aminosyre	Forkortelse
Glysin	G
Alanin	A
Serin	S
Prolin	P
Valin	V
Treonin	T
Cystein	C
Leucin	L
Isoleucin	I
Asparagin	N
Aspartat	D
Lysin	K
Glutamin	Q
Glutamat	E
Metionin	M
Histidin	H
Fenylalanin	F
Arginin	R
Tyrosin	Y
Tryptofan	W



Figur 4.7 Tredimensjonalstruktur av cytokrom C

MGDVEKGKKIFVQKCAQCHTVEKGGKHKTGPNLHGLFGRKGQAPGFSYTDANKNKGITWKE
 ETLMEYLENPKKYIPGTKMIFAGIKKKTEREDLIAYLKKATNE

Figur 4.8 viser aminosyresekvensen til cytokrom C og klippsteder (K, R) for trypsin

5. MATERIALER OG METODER

5.1 KJEMIKALIER, ANALYTTER OG UTSTYR

Tabell 5.1: Liste over kjemikalier

Kjemikalie	Kvalitet	Leverandør
Acetonitril	HPLC-kvalitet	Merck, Darmstadt, Tyskland
Ammonium bikarbonat	Analysekvalitet	Fluka, Buchs SG, Sveits
Ammoniakk-løsning 25 %	Analysekvalitet	Merck, Darmstadt, Tyskland
Eddiksyre (konsentrert)	Analysekvalitet	Prolabo, Manchester, England
Ionebyttet vann	Renset med EASYpure™	
Maurisyre	>98%	Fluka, Buchs SG, Sveits
Metanol	HPLC-kvalitet	Merck, Darmstadt, Tyskland

Tabell 5.2: Liste over proteiner

Analytt	Kvalitet	Leverandør
Cytokrom C	Renstoff	Sigma, St. Louis, MO, USA
Trypsin, fra bovin pankreas	Renstoff	Sigma, St. Louis, MO, USA

Tabell 5.3: Liste over utstyr i oppsettet ZIC-HILIC-UV

Utstyr	Modell	Produsent
Autosampler/injektor	Ultimate WPS-300TSL	Dionex Corporation, Sunnydale, CA, USA
Kolonne	ZIC-HILIC, Dim (mm) 150x2,1 Particle Size (μm) 5	SeQuant, Umeå, Sverige
Pumper	Ultimate HPG-3200M	Dionex Corporation, Sunnydale, CA, USA
Programvare	Chromeleon Version 6.8	Dionex Corporation, Sunnydale, CA, USA
UV-detektor	Ultimate VWP-3400	Dionex Corporation, Sunnydale, CA, USA

Tabell 5.4: Liste over utstyr i oppsettet LC-MS (Kvadrupol)

Utstyr	Modell	Produsent
Autosampler/injektor	SIL-10ADVVP	Shimadzu, Kyoto, Japan
Blandekammer	FCV-10ALVP	Shimadzu, Kyoto, Japan
Degasser	DGU-14A	Shimadzu, Kyoto, Japan
Kolonne	BioBasic-C8, Dim (mm) 50x1 Particle Size (μm) 5	Thermo Electron corporation, Cheshire, UK
Programvare	LCMS-solution	Shimadzu, Kyoto, Japan
Pumper	LC-10ADVP	Shimadzu, Kyoto, Japan
System controller	SCL-10AVP	Shimadzu, Kyoto, Japan
Detektor	LC-MS-2010 A	Shimadzu, Kyoto, Japan

Tabell 5.5: Liste over utstyr i oppsettet LC-MS/MS (Ionefelle)

Utstyr	Modell	Produsent
Autosampler/injektor	Ultimate WPS-300TSL	Dionex Corporation, Sunnydale, CA, USA
Detektor	Finnigan LCQ	Thermo Electron corporation, Cheshire, UK
Kolonne	BioBasic-C8 ,Dim (mm) 50x1 Particle Size (μm) 5	Thermo Electron corporation, Cheshire, UK
Programvare	Xcalibur™ version 2.0	Instrument-Teknikk AS, Østerås, Norway
Pumper	Ultimate LPG-3000M	Dionex Corporation, Sunnydale, CA, USA

Tabell 5.6: Liste over øvrig utstyr

Utstyr	Modell	Produsent
Automatpipetter Thermo	Finnpipette	Labsystems, Helsinki, Finland
Eppendorfrør	Microtubes 1,5 ml, transparent	Plastibrand, Wertheim, Tyskland
Inkubatorovn	Termax	Termax, Bergen, Norge
pH-meter	E 632 Digital pH-meter	Metrohm, Herisau, Sveits
Magnetrorer	Ikamag REO	Drehzahl electronic, Straufen i.Br., Tyskland
SpeedVac, inndamping med vakuum	SPD121P RVT4T04	Thermo Electron corporation
Vannrenseanlegg	EASY pure UV D7402	Barnstead, Dubuque, IA, USA
Varmeblokk	Reacti-Therm III™	Pierce, Rockford, USA
Vekt	XS205	Metler, Greifensee, Sveits
Vortex-mikser	Vibrofix VP1	Janke & Kunkel, Staufen, Tyskland

5.2 TILLAGING AV LØSNINGER OG BUFFERE

5.2.1 Buffere

- **Ammonium bikarbonat 100 mM, pH ca. 7,8:**

Det ble utveid 0,079 g ABC i en 10 ml målekolbe. Deretter ble 10 ml ionebyttet vann målt opp i målekolen. Fersk løsning med 100 mM ABC ble laget for hvert forsøk, grunnet dårlig stabilitet.

- **Ammoniumacetat 20 mM, pH ca. 5,5:**

Det ble tilsatt 1,144 ml konsentrert eddiksyre i et begerglass med ionebyttet vann nær 1 l, pH ble justert med ammoniakkløsning 25% ved hjelp av magnetrører og pH-meter. Blandingen ble så overført til 1 l målekolbe og målt opp til målestreken.

- **Maursyre 10 mM, pH ca. 2,8:**

Det ble tilsatt 377 µl konsentrert maursyre i 1 l målekolbe og deretter ble det fylt opp med ionebyttet vann til målestreken.

5.2.2 Mobilfaser

- **Mobilfaser til HILIC, 5% vandig buffer (v/v)**

Mobilfase A:

5% 20 mM NH₄Ac, 95% ACN

Mobilfase B:

60% 20 mM NH₄Ac, 40% ACN

I 2D-LC-MS forsøkene for identifisering av cytokrom C klipprodukter (avsnitt 6.1.1 og 6.1.2), repeterbarhet (6.2.2) og ortogonalitet (6.4.3) ble det brukt mobilfase A (5%) i HILIC-dimensjonen. Mobilfasen ble brukt tidlig av oppgaven, men ble byttet med mobilfase A (20%) på grunn av peptidløseligheten for de senere forsøkene.

- **Mobilfaser til HILIC, 20% vandig buffer (v/v)**

Mobilfase A:

20% 20 mM NH₄Ac, 80% ACN

Mobilfase B:

60% 20 mM NH₄Ac, 40% ACN

- **Mobilfaser til RPC, 5% vandig buffer (v/v)**

Mobilfase A:

95% 10 mM maursyre, 5% ACN

Mobilfase B:

5% 10 mM maursyre, 95% ACN

5.2.3 Peptidløsninger

- **Trypsinløsning**

Det ble veid ut 1 mg trypsin tørrstoff og ble løst i 1 ml ABC-buffer (pH 7,8). Fra stamløsningen på 1 mg/ml i ABC buffer ble det laget fortynningsrekke i ABC buffer på 100 µg/ml, 10 µg/ml og 1 µg/ml. Ny trypsin ble laget til hvert forsøk for å sikre maksimal aktivitet av trypsin.

- **Cytokrom C løsning**

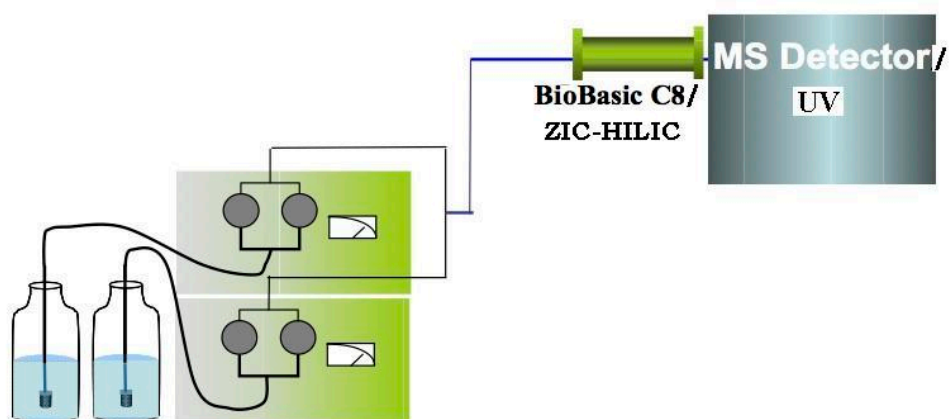
Cytokrom C stamløsning på 2 mg/ml ble laget ved å tilsette 5 ml i en beholder med 10 mg cytokrom C tørrstoff. Deretter ble det laget fortynningsrekke i ionebyttet vann på 1 mg/ml 100 µg/ml, 10 µg/ml og 1 µg/ml. Stamløsningene ble oppbevart i fryser ved -32°C og kun tatt ut ved behov.

- **Tryptisk klipp av cytokrom C**

Tryptisk klipp av cytokrom C ble utført ved å bruke trypsin i forhold omtrent 1:40 (trypsin : cytokrom C). Peptidløsningen ble forberedt ved å tilsette 12,5 µl av trypsin 100 µg/ml i ABC opp i 500 µl av cytokrom C løsning på 100 µg/ml i ionebyttet vann. Blandingen ble deretter inkubert i varmeskap ved 37°C over natt. Dersom det var behov for å lage fortynningsrekke etter inkubasjonen, ble det fortynnet med ionebyttet vann. Det ble benyttet ulike cytokrom C konsentrasjoner i forskjellige forsøk, men den samme fremgangsmåten med identisk blandingsforhold ble brukt.

5.3 OPPSETT AV APPARATUR

Apparaturen ble satt opp som vist i figur 5.1. Systemet bestod av mobilfasereservoarer, pumper, blandekammer, autoinjektor, kolonne (BioBasic C8 eller ZIC-HILIC) og detektor (MS eller UV). Analysene av klipt Cytokrom C løsningen ble utført med et gradient program som er godt egnet til peptidanalyse, som vises i tabellene 5.7, 5.9 og 5.11. For hvert gradientprogram er det lagt inn rekondisjonerings tid av kolonnen. Omtrent 5 kolonnevolumer ble beregnet som tilstrekkelig for å rekondisjonere kolonnen. For å spare MS detektoren for forurensinger ble ikke peptidløsningen detektert før etter 3 min da har fronten passert hvor mye av forurensningene kan være passert.



Figur 5.1 Skjematisk oppsett av HILIC/RPC

5.3.1 Første dimensjon HILIC

UV-detektor ble brukt til HILIC ved bølgelengden 214 nm og 254 nm, hvor peptider har god absorbans.

Injeksjonsvolum: 20 μ l

Manuell fraksjonering: 5 minutters fraksjoner fra 0-30 minutter. Ved fraksjonering ble det brukt en cirka 50 cm lang tubing, som ble koblet fra utgangen til UV-detektoren og til oppsamling i eppendorfrør.

Tabell 5.7: Totrinnsgradientprogram i HILIC

Tid (min)	Flow (μ L/min)	Mobilfase A (%)	Mobilfase B (%)
0	200	100	0
12.5	200	82.5	17.5
30	200	35	65
31	200	35	65
32	200	100	0
50	200	100	0

5.3.2 Andre dimenjon RPC (kvadrupol)

- Her ble det brukt 2 “scan events” for å detektere:
 1. SCAN 200-1000 m/z, scanhastighet: 4000 amu/sek
 2. SIM for 11 m/z-verdier (peptider), se avsnitt 6.1.2, scanhastighet: 500 amu/sek
- Injeksjonsvolum: 10 µl
- Scantid: 3-35 minnutter

Tabell 5.8: Tabellen viser betingelser for MS (kvadrupol)

ESI-mode	Positiv
Tørkegass	Nitrogen
Tørkegass hastighet	10 l/min - 20 l/min
Forstøvergass	Nitrogen
Forstøvergass hastighet	15 l/min
Kildespenning	4,5 kV
Linsespenning	10 V
Kapillærspenning	24 V
Kapillærtemperatur	200°C
Blokktemperatur	200°C

Tabell 5.9: Gradientprogram i RPC (kvadrupol)

Tid (min)	Flow (µL/min)	Mobilfase A (%)	Mobilfase B (%)
0	50	100	0
35	50	60	40
36	50	60	40
37	50	100	0
37.1	100	100	0
49.5	100	100	0
49.9	50	100	0
50	0	100	0

5.3.3 Andre dimensjon RPC (ionefelle)

- Deteksjon ble foretatt som 2 “scan events”:
 1. SCAN 300-1000 m/z
 2. MS/MS, for mest intense ion fra 1.
- Dynamisk eksklusjon av allerede fragmentert m/z-verdier ble brukt for å få maksimalt informasjon. Dette vil si at det mest intense ionet vil bli ekskludert og satt på en ekskluderingsliste etter et visst antall målinger. Dette bidrar til at de mindre intense ionene også blir fragmentert. Etter en gitt tid vil ionet bli fjernet fra ekskluderingslisten og syklusen vil gjentar seg under analysen. Dynamisk eksklusjon betingelser var:

Repeat count: 1

Repeat duration: 0,3 min

Exclusion list size: 25

Exclusion duration: 0,5 min

Exclusion mass width: 2

- Injeksjonsvolum: 30 µl

- Scantid: 3-48 minutter

Tabell 5.10: Tabellen viser betingelser for MS/MS (ionefelle)

ESI-mode	Positiv
Forstøvergass	Nitrogen
Forstøvergass hastighet	20 arbitrære enheter (Finnigan)
Kildespenning	4,5 kV
Linsespenning	10 V
Kapillærspenning	34 V
Kapillærtemperatur	200°C

Tabell 5.11: Gradientprogram i RPC (ionefelle)

Tid (min)	Flow (µL/min)	Mobilfase A (%)	Mobilfase B (%)
0	100	100	0
35	100	60	40
36	100	0	100
38	100	0	100
39	100	100	0
56	100	100	0

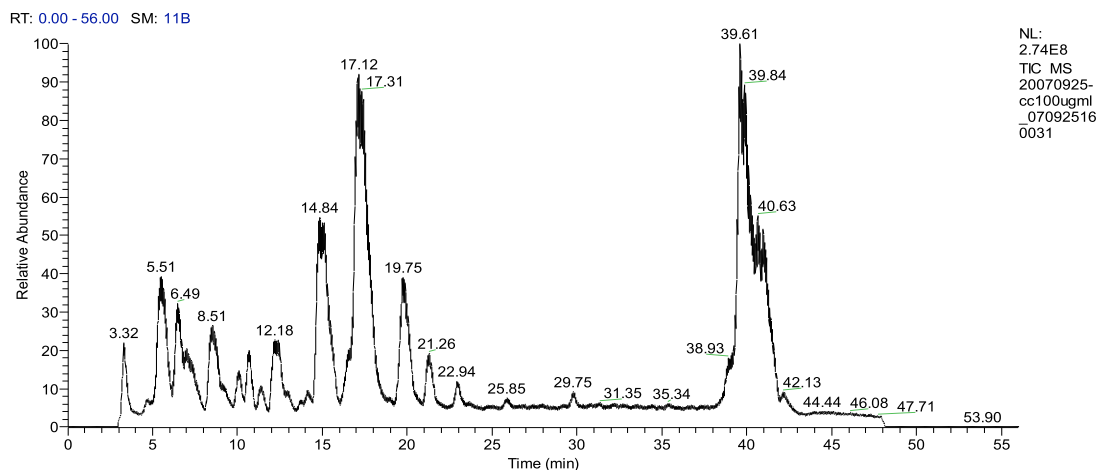
6. RESULTATER OG DISKUSJON

6.1 INNLEDENDE FORSØK

Metodene i oppgaven har tatt utgangspunktet i arbeidet til Paul J. Boersema [3]. I det arbeidet som ble utført av Boersema ble det brukt en offline 2D LC-MS med ZIC-HILIC som første dimensjon og RPC som andre dimensjon. Betingelsene i denne artikkelen ga gode resultater for Boersema. Komponentene som ble brukt i 2D LC-MS var kompatible. Ved utviklingen av den offline 2D LC-MS-metoden i denne oppgaven ble det først laget atskilte endimensjonale metoder på HILIC og RPC. Målet var at disse metodene skulle tilpasses slik at de kunne analysere urinprøver fra pasienter. Det ble lag mest fokus på arbeid med HILIC, siden RPC er et relativt etablert prinsipp i forhold til HILIC.

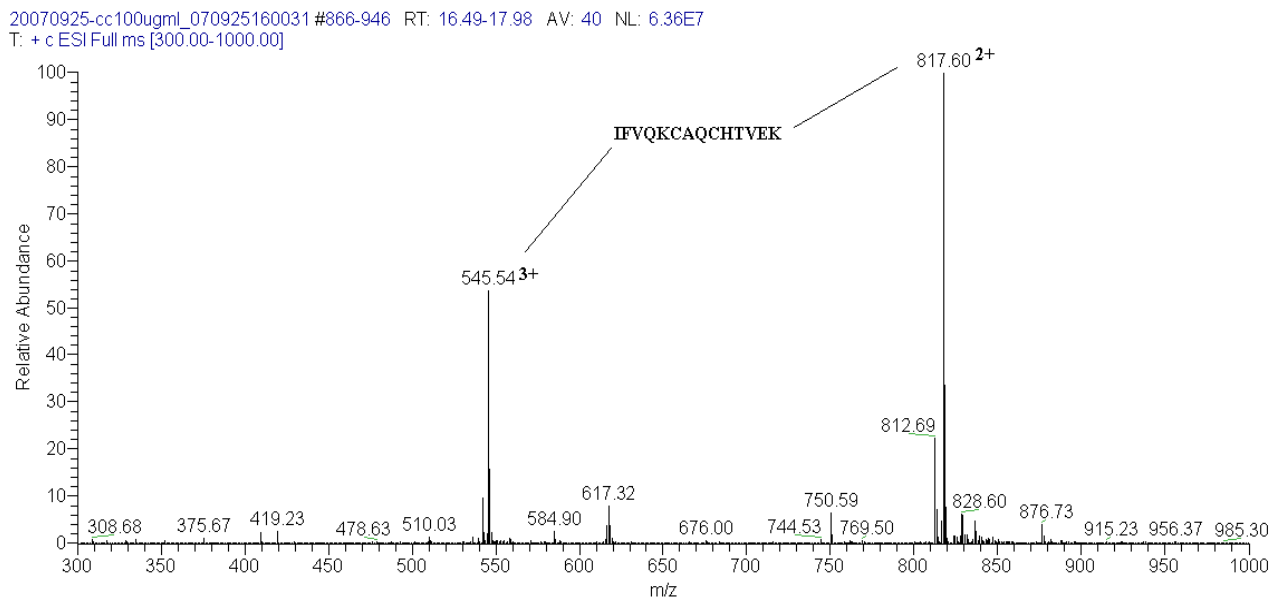
6.1.1 Identifisering av cytokrom C klipprodukter

Cytokrom C er et velkjent protein som har blitt mye brukt i proteomikk. Det har velkjente peptidprodukter og rikelige klipprodukter og ble derfor valgt som modellprotein i denne oppgaven. Proteinblandingen ble alltid laget og klippet med trypsin dagen før forsøkene. Hensikten med første del av oppgaven var å velge ut peptidprodukter (m/z) av cytokrom C som skulle monitoreres for proteinet. Peptidene skulle brukes som markører for proteinet. Strategien var å kartlegge klipprodukter til cytokrom C med hensyn til retensjonstid (t_R) for m/z -verdiene (peptidene) og deres MS/MS massespekter. Massespekterene til peptidene ble sammenlignet med data fra ProteinProspector databasen (<http://prospector.ucsf.edu/>). Dette forsøket ble utført med ionefelle, da denne hadde MS/MS funksjon i seg, i motsetning til en singel-kvadrupol. Figur 6.1 viser et TIC-kromatogram av tryptisk klippet cytokrom C i SCAN modus.



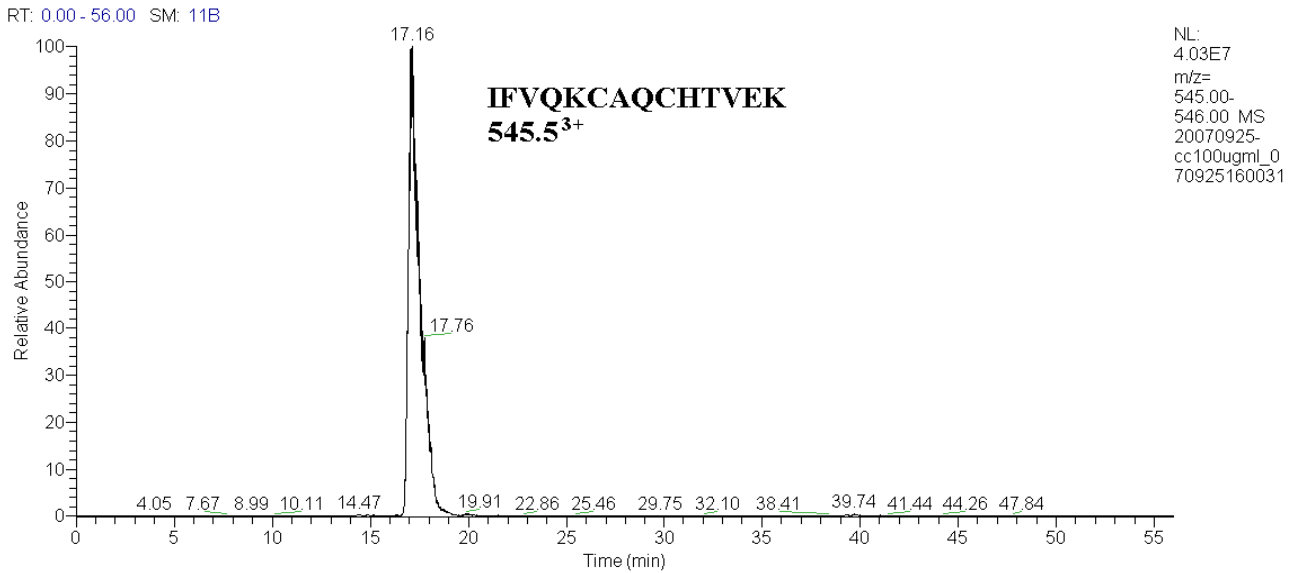
Figur 6.1 Kromatogram av 100 $\mu\text{g/ml}$ cytokrom C etter tryptisk klipp

For å få oversikt over alle peptidene som ble generert etter tryptisk klipping, ble det undersøkt hvilke peptider som ble eluert i de forskjellige topper i et kromatogram. Dette ble gjort på følgende måte: For eksempel figur 6.2 viser massespekteret (MS) til toppen ved tid lik 17,12 minutter i kromatogrammet vist i figur 6.1. Her fremgår det at signalene 545.5 m/z og 817.6 m/z har høyest intensitet. Disse m/z-verdiene hører til samme peptid men har ulik ladning. Ved å beregne om laddingsforholden, kan det bekreftes om det er samme peptid med forskjellige ladninger. Laddingsforholdet stemte, det viser seg at 545.5 m/z er 3 ganger ladet og 817.6 m/z er 2 ganger ladet. Datasøking ved hjelp av ProteinProspector [19] viser at 545.5 m/z og 817.6 m/z verdiene hadde amniosyresekvensen IFVQKCAQCHTVEK.



Figur 6.2 Massespekter av toppen som elueres ut rundt tidspunktet 17 min

Ioneuttrekk for følgende verdier 545.5 m/z og 817.6 m/z, viser at begge elueres ut på samme tidspunkt, 17.16 min, se figur 6.3 og 6.4. Bare peptider med lik sekvens eller med veldig like kjemiske egenskaper kan elueres ut samtidig. Dette er med på å bekrefte at m/z verdiene tilhører det samme peptidet.



Figur 6.3 Kromatogram av ioneuttrekk for 545.5 m/z



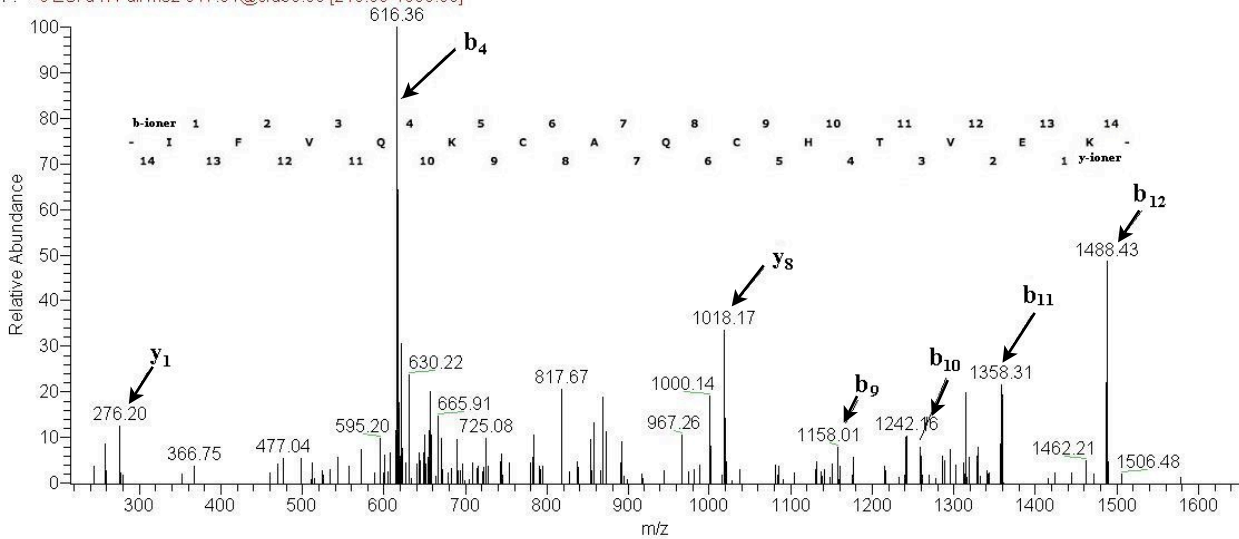
Figur 6.4 Kromatogram av ioneuttrekk for 817.6 m/z

Neste trinn er å bekrefte peptidsekvenser ved hjelp av MS/MS. Det ble generert teoretiske fragmentioner for peptidet FVQKCAQCHTVEK med hjelp av databasen ProteinProspector [19] for så sammenligne med de observerte fragmentionene. Tabell 6.1 viser de teoretiske b- og y-ionene og observerte b- og y-ionene fra forsøket for peptidet IFVQKCAQCHTVEK. Det ble observert 5 b-ioner ($b_4=616.4$, $b_9=1158.0$, $b_{10}=1259.7$, $b_{11}=1358.3$ og $b_{12}=1488.4$) og 2 y-ioner ($y_1=276.2$ og $y_8=1018.2$). Figur 6.5 viser MS/MS massespekter av 817.6 m/z for peptidet IFVQKCAQCHTVEK. Det kan dermed konkluderes med at peptidet er IFVQKCAQCHTVEK. Identifikasjon er mer pålitelig når lange peptidsekvenser kan identifiseres. Jo lengre aminosyrekjede peptidet består av, jo mer spesifikt er det for proteinet [11]. Denne identifikasjonsfremgangsmåten ble gjennomført for alle peptidene som ble funnet. Tabell 6.2 viser de identifiserte peptidene for cytokrom C.

Tabell 6.1 Oversikt over teoretiske og observerte b- og y-ionene for peptidet FVQKCAQCHTVEK

	Teoretiske b-ioner	Observerte b-ioner		Teoretiske y-ioner	Observerte y-ioner
b_1	261.2		y_1	276.2	276.2
b_2	360.2		y_2	375.2	
b_3	488.3		y_3	476.3	
b_4	616.4	616.4	y_4	613.3	
b_5	719.4		y_5	716.3	
b_6	790.4		y_6	844.4	
b_7	918.5		y_7	915.4	
b_8	1021.5		y_8	1018.4	1018.2
b_9	1158.6	1158.0	y_9	1146.5	
b_{10}	1259.6	1259.7	y_{10}	1274.6	
b_{11}	1358.7	1358.3	y_{11}	1373.7	
b_{12}	1487.7	1488.4	y_{12}	1520.7	

20070925-cc100ugml_070925160031 #996 RT: 19.04 AV: 1 NL: 9.86E4
 F: + c ESI d w Full ms2 817.51@cid35.00 [215.00-1650.00]



Figur 6.5 MS/MS massespekter av 817.6 m/z for peptidet IFVQKCAQCHTVEK

Tabell 6.2 Oversikt over identifiserte peptidene i RPC etter separasjon i HILIC av tryptisk klippet cytokrom C.

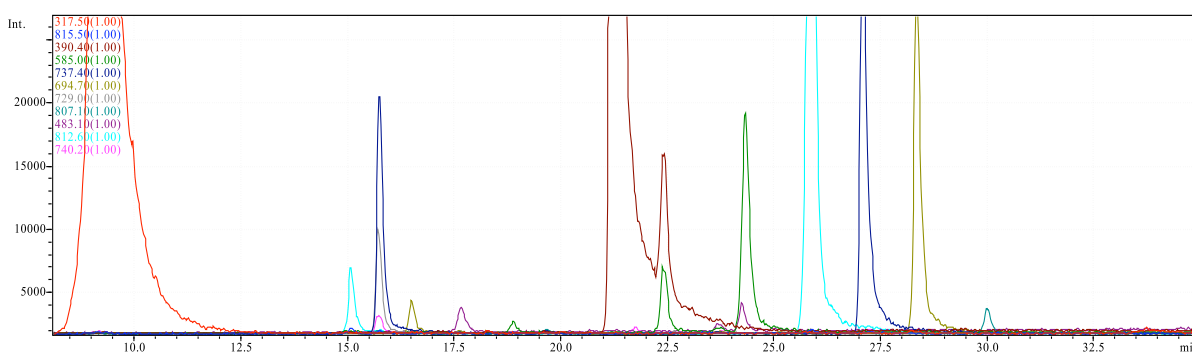
Observerte m/z-verdier i RPC	t _R i RPC (min)	Identifisert med MS/MS	Sekvens
634.4	3.72	x	IFVQK
604.4	6.66		GITWK
493.9	10.87		TEREDLIAYLKK
493.9	10.87		KTEREDLIAYLK
817.6	12.86		IFVQKCAQCHTVEK
542.5	13.60		EETLMEYLENPKK
779.4	13.29	x	MIFAGIK
390.4	13.22	x	MIFAGIK
585.1	14.72	x	TGPNLHGLFGR
390.4	14.74	x	TGPNLHGLFGR
817.5	18.45	x	IFVQKCAQCHTVEK
545.5	18.41		IFVQKCAQCHTVEK
737.4	20.43	x	GITWKEETLMEYLENPKK
553.4	20.43		GITWKEETLMEYLENPKK
694.7	21.61	x	GITWKEETLMEYLENPK
807.1	23.07		KYIPGTK

6.1.2 SIM modus

Ut fra de innledende forsøkene og etter samråd med veileder, ble det valgt ut 11 m/z verdier som skulle monitoreres videre i SIM modus, se tabell 6.3. Disse utvalgte verdiene ble valgt på grunnlag av at de ga tilstrekkelig signalintensitet i detektoren og at de har blitt identifisert som peptider av cytokrom C. Det er viktig at m/z verdiene som skal monitoreres er spesifikke for cytokrom C, fordi andre forbindelser kan være tilstede i prøven, eksempelvis autolyseprodukter av trypsin. Kvadrupol masseanalysatoren ble benyttet som første valg for de neste forsøkene. Dette skyldes signalresponsen i SIM modus var bedre i kvadrupolen enn ionefellen. Figur 6.6 viser kromatogram av de 11 utvalgte m/z-verdiene i SIM modus.

Tabell 6.3 Utvalgte m/z-verdier til analyse i SIM modus

	m/z	Sekvens
1	317.5	IFVQK
2	390.4	MIFAGIK
3	483.1	EDLIAYLK
4	585.0	TGPNLHGLFGR
5	694.7	GITWKEETLMEYLENPK
6	729.0	TGQAPGFSYTDANK
7	737.4	GITWKEETLMEYLENPKK
8	740.2	KTEREDLIAYLK
9	807.1	KYIPGTK
10	812.6	EETLMEYLENPKK
11	817.5	IFVQKCAQCHTVEK

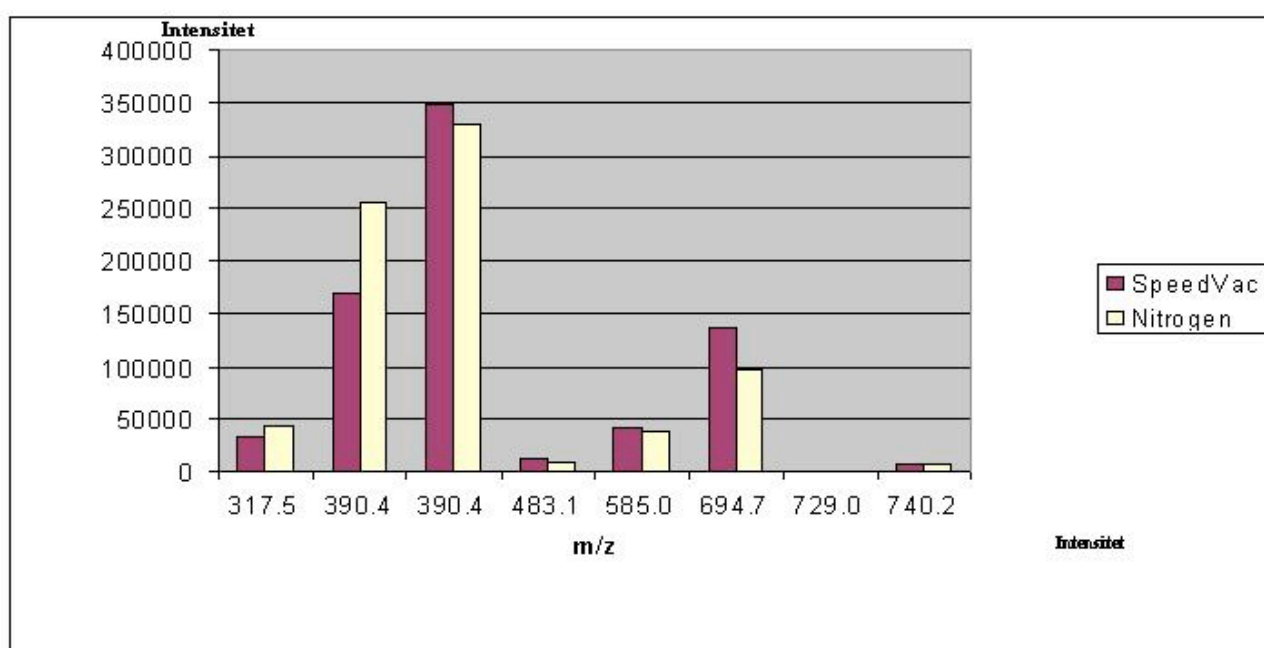


Figur 6.6 viser kromatogram av de 11 utvalgte m/z-verdiene i SIM modus

6.1.3 Inndamping

Inndamping var et sentralt steg i offline 2D-LC. Etter at cytokrom C hadde blitt klippet i vandig løsning over natt, måtte løsningen inndampes og reløses i en løsning som ikke hadde for høyt vanninnhold. Grunnen til dette var at prøven skulle separere på ZIC-HILIC-kolonne før fraksjonering og vann er et sterkt elueringsmiddel i HILIC. Et annet steg hvor inndamping kunne være nødvendig var overføringen av fraksjonene fra første dimensjon HILIC og til andre dimensjon RPC. Dette var fordi fraksjonene inneholdt mye ACN som er et sterkt elueringsmiddel i RPC. Også andre muligheter ble vurdert i dette trinnet se avsnitt 6.3.

Det var to måter å utføre inndampingen på, enten ved nitrogen- eller SpeedVacinndamping. Begge metodene er beskrevet i avsnitt 4.3.1. Ved bruk av "nitrogen-metoden" var det en utfordring å kontrollere alle parametrene, som konstant temperatur og hastigheten til nitrogengassen. Ble temperaturen for høy kunne det ødelegge peptidene. Ble gasshastigheten for høy ville væske i løsningen kunne sprute opp langs veggen på beholderen (eppendorfrør). Dette vil igjen føre at peptider kunne sette seg høyt oppe på veggen og ikke kom i kontakt med væsken ved reløsning. Mulighet for kontaminering ble også større fordi metoden ble gjort i et åpent system. I SpeedVac ble prøvene plassert i et lukket system. I tillegg ble væskeinnholdet presert nedover i beholderen når væsken fordampes, dette føre til at prøven konsentreres i bunnen av beholderen. Ulempen med Speedvac var at under vakuumsentrifugeringsprosessen ble prøveløsningen frosset. Slike forhold kunne påvirke egenskapene til prøvene, og dermed også resultatet. Det ble undersøkt om det var stor forskjell i utbytte mellom metodene. Prøver ble inndampet og intensitetene til peptidene ble målt og sammenlignet. Fremgangsmåten var følgende; 1 ml av 10 µg/ml klippet cytokrom C ble inndampet og reløst i 100 µl i mobilfase A til RPC. Metodene var omtrent like tidskrevende og figur 6.7 viser peptidintensitetene for SpeedVac- og nitrogeninndamping, og ingen stor forskjell på utbytte ble registrert mellom metodene. Selv om det var både fordeler og ulemper med begge metodene, ble det besluttet å benytte SpeedVac videre i oppgaven. Dette skyldtes at parametrene lettere kunne kontrolleres, slik at repeterbarheten ble bedre.

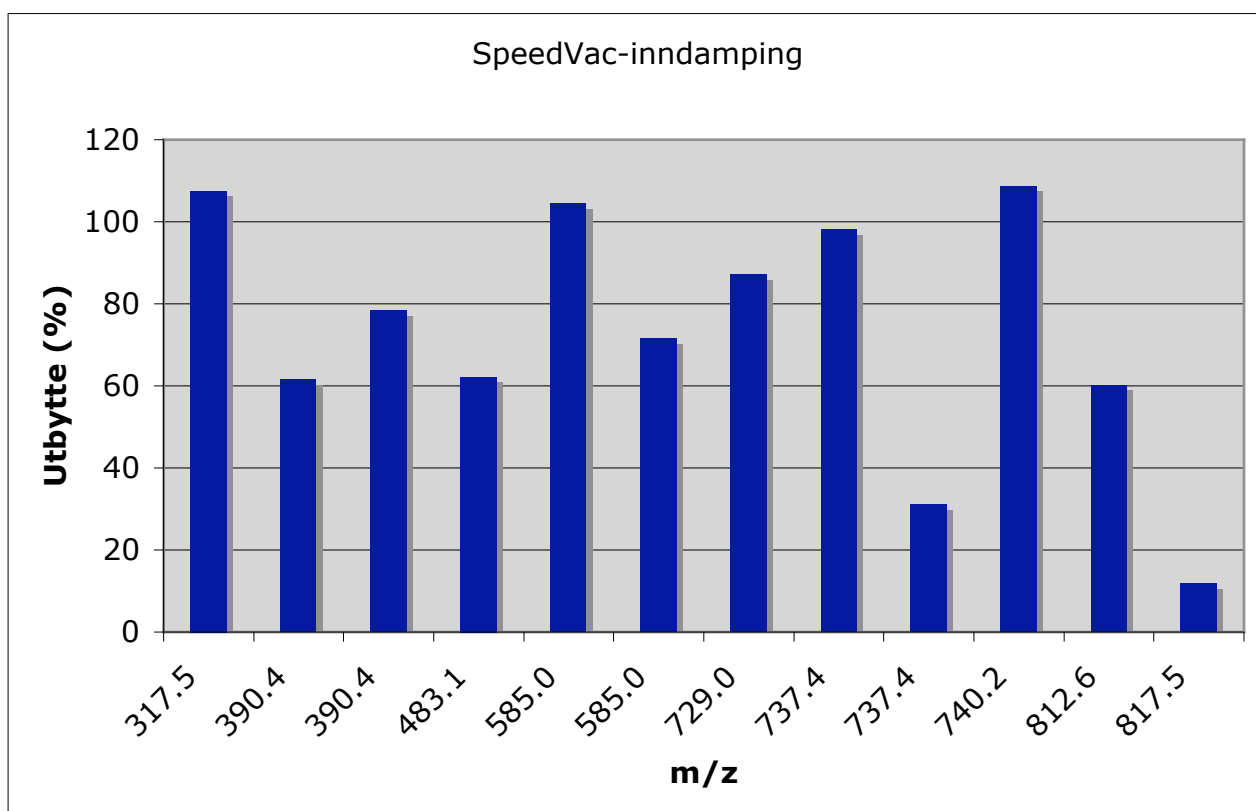


Figur 6.7 Diagram over intensitetene av peptidene etter SpeedVac- og nitrogeninddamping

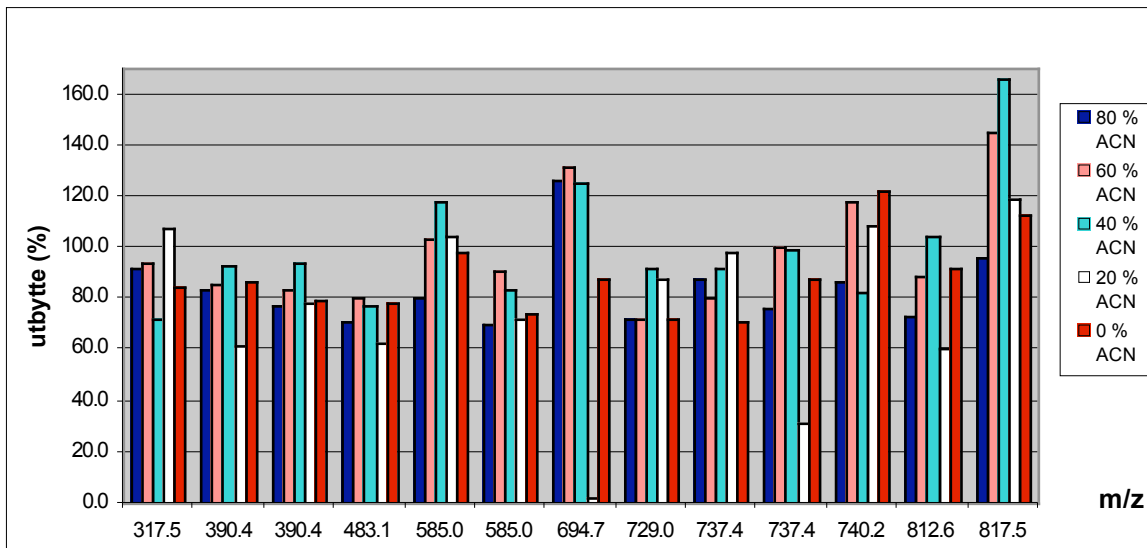
6.1.4 Effekt av ACN på utbytte etter inndamping

Prøver med høyt innhold av ACN som ble inndampet med SpeedVac hadde en tendens til å gi lavt utbytte (figur 6.8). Det ble derfor undersøkt om dette var på grunn av ACN-innholdet i prøven. Forsøkene ble utformet slik at peptidløsningen ble tilsatt i forskjellige løsninger av ulike konsentrasjoner av ACN og vann. Løsningene bestod av 0%, 20%, 40%, 60% og 80% ACN. Figur 6.9 viser utbyttet for de ulike ACN konsentrasjonene etter inndamping. Utbyttet ble beregnet ved å ta forholdet av intensiteten til prøve- og en referanseløsningen. Referanseløsning var en direkte injeksjon av tryptisk klippet cytokrom C i samme konsentrasjon som prøveløsningen. Peptidløsningene som ble brukt til direkte injeksjon og fraksjonering kom fra samme peptidløsningen, slik at resultatene var sammenlignbare. Resultatene fra forsøkene viste at løsninger med høyt innhold av ACN som 80%, hadde en tendens til å gi dårligere utbytte. Det kan være flere grunner til at ACN bidro til lavere utbytte. Prøvene kunne ha frosset under inndampingsprosessen og dette vil kunne ha ført til at ACN endret peptidenes struktur. Slik at peptidene fikk dårligere løselighet eller at de lettere adsorberes på veggen av eppendorfrørerne. Det kan ha også ha vært en kombinasjon av frysing og høy konsentrasjon av ACN. Prøver med lavere ACN konsentrasjon enn 80% viste bedre utbytte sammenlignet med 80% konsentrasjon. I forsøkene ble det benyttet prøver på 200 µg/ml peptidløsninger. Ut fra figur 6.9 ser det ut som at det er en tendens til at høyt ACN innhold (80 % og oppover) kan påvirke prøven i

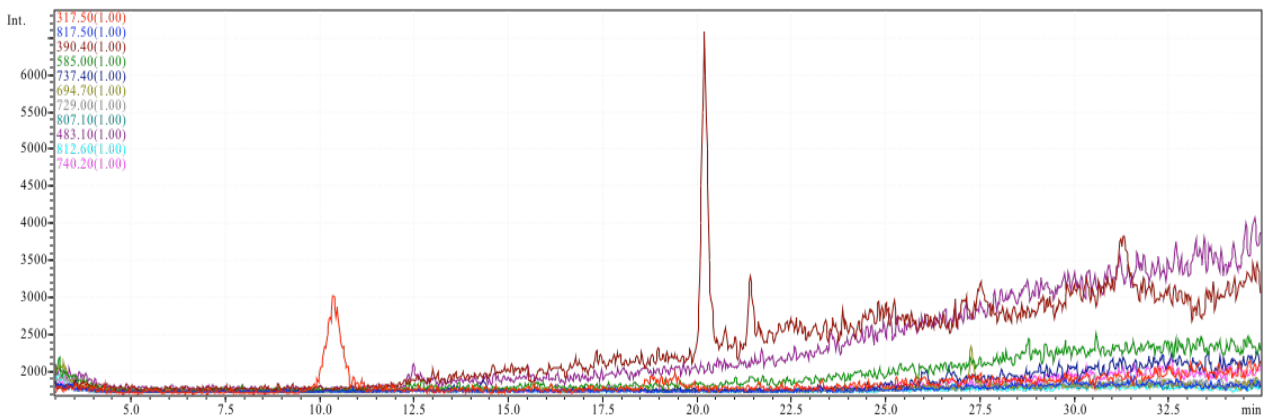
inndampingsprosessen slik at utbytte blir redusert. Det kan tenkes at hvis forsøket hadde blitt utført med lavere konsentrasjon vil det kanskje registreres en større nedgang av utbytte. Dette kan skyldes at eppendorfrøren som prøvene ble oppbevart oppi, kunne ha en kapasitet på hvor mye peptid som kunne adsorberes. Prøver med høy konsentrasjon av peptider vil overstige kapasiteten, og mengden som blir adsorbent er ubetydelig i forhold til den totale mengden i prøven. I prøver med lav peptidkonsentrasjon, ville det gir mye større utslag på utbyttet. Figurer 6.10 og 6.11 viser peptidprøver av tryptisk klippet cytokrom C etter Speedvac-inndamping på 4 mg/ml og 0,4 mg/ml. For peptidprøven på 0,4 mg/ml (figur 10) registreres det kun tre topper, mens i peptidprøven på 4 mg/ml (figur 6.11) registreres 11 topper og intensitene til toppene er mye kraftigere enn ved 0,4 mg/ml. Dette gir støtte for at eppendorfrørene har enn kapasitet og for peptidprøven på 4 mg/ml ble kapasiteten overskridet.



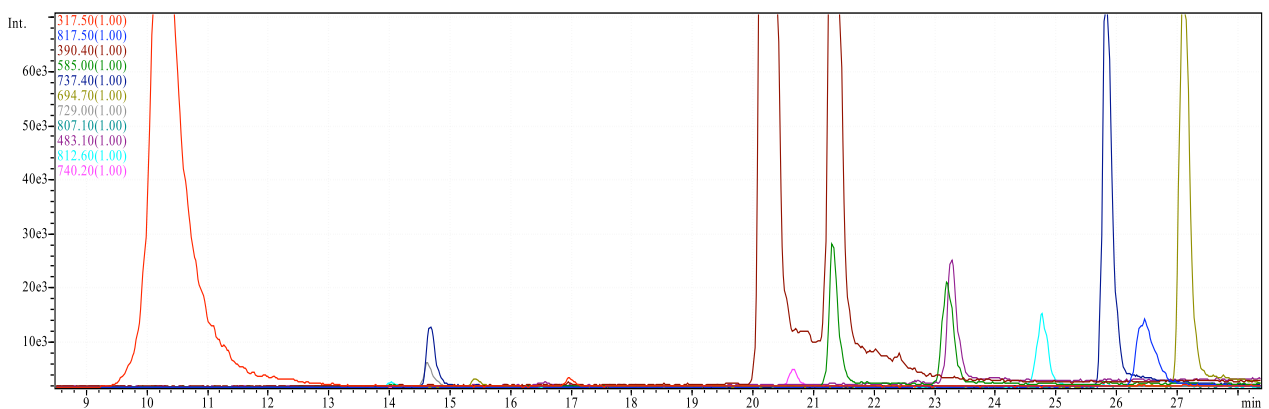
Figur 6.8 viser tryptisk klippet cytokrom C utbytte i 20 % ACN etter SpeedVac-inndamping. (For m/z verdier: 390.4, 585.0 og 737.4 er det to signalresponser for samme m/z verdi, dette skyldes at 2 peptider har samme m/z verdi).



Figur 6.9 Diagram av tryptisk klippet cytokrom C utbytte til ulike ACN-konsentrasjoner etter SpeedVac-inndampning.



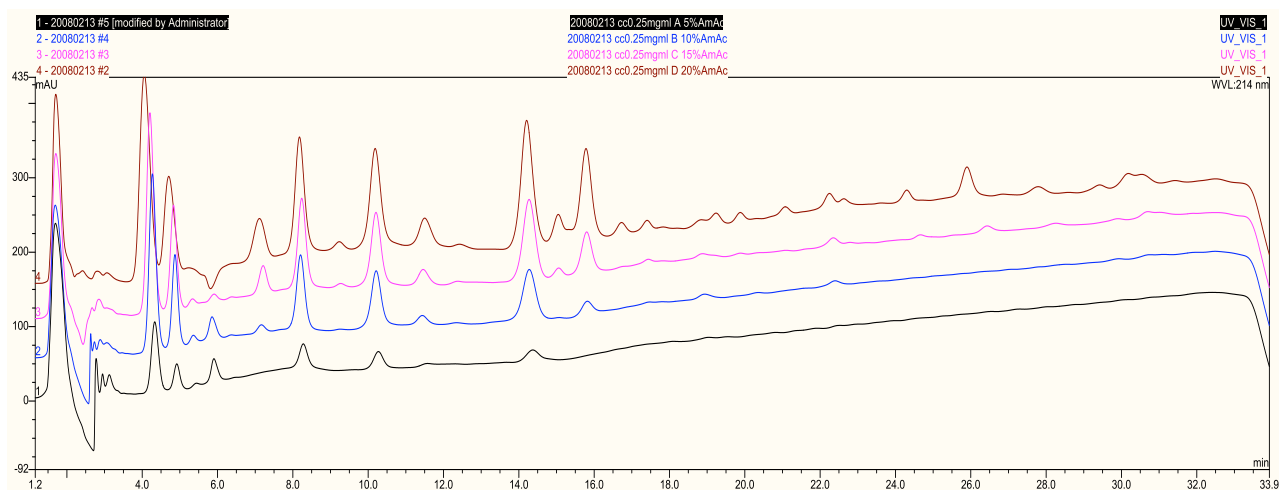
Kromatogram av klippet cytokrom C prøve på 0,4 mg/ml etter SpeedVac-inndampning



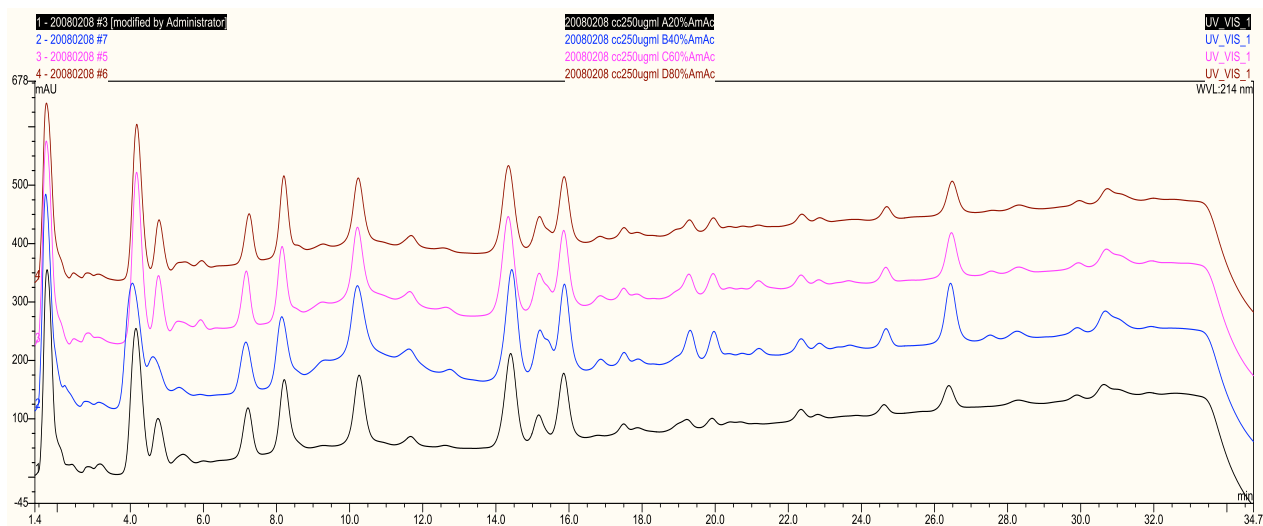
Kromatogram av klippet cytokrom C prøve på 4 mg/ml etter SpeedVac-inndampning

6.1.5 Peptidløselighet

I utgangspunktet ble peptidløsningen reløst i mobilfase A som i Boersemas artikkel [3] etter inndampingstrinnet. Mobilfase A inneholdt 20% vandig buffer (NH₄Ac) og 80% ACN. For at peptidløsningen kunne separeres på ZIC-HILIC-kolonnen må det reløses i en løsning som ikke hadde for høyt konsentrasjon av vann. Hensikten med dette forsøket var å finne ut om 20% buffer var nok til å løse opp alle peptidene i prøven. Det kan være at peptidene trenger høyere konsentrasjon enn 20% vann for å la seg løses. Forsøket ble utført på følgende måte; 50 µl av en 100 µg/ml klippet cytokrom C-løsning ble inndampet på SpeedVac, reløst i 200 µl løsning med forskjellig forhold av buffer og ACN. Buffer og ACN ble blandet før de ble brukt til reløsning. Blandingsforholdene som ble testet var 5%, 10%, 15%, 20%, 40%, 60% og 80% av vandig buffer. Resultatene på HILIC med UV-deteksjon er vist i figur 6.12 og 6.13. I kromatogrammet i figur 6.12 viser det stor forbedring i løselighet av peptidene fra 5-20% vandig buffer. Toppene i 20%-kromatogrammet er større, i tillegg til at flere topper ble observert. Alle prøvene inneholdt samme mengde peptid og ble reløst i samme volum. Siden signalresponsen (toppene) i UV-deteksjon er proporsjonal med mengde eller konsentrasjon av stoffet i løsningen, vil bedre respons si at det var større mengde peptider løst i løsningen. Dermed kunne det konkluderes med at peptidløselighet økte med økt vanninnhold i løsningen. For kromatogrammene med 20%, 40%, 60% og 80% (figur 6.13), ble det ikke observert noe betydelige forbedringer. Toppene var relative like i størrelse og de fleste samme toppene ble observert i alle fire kromatogrammene. Dette innebærte at peptidene hadde nådd sin maksimale løselighet i 20%-løsningen, når løsningsvolumet var på 200 µl. Ut fra disse resultatene ble mobilfase A (20% vandig buffer) videre brukt til reløsning i forkant av analyse på HILIC.



Figur 6.12 Kromatogram av peptider løst i 5%, 10%, 15% og 20% løsning av 20 mM NH₄Ac buffer, ved bølgelengden 214 nm.

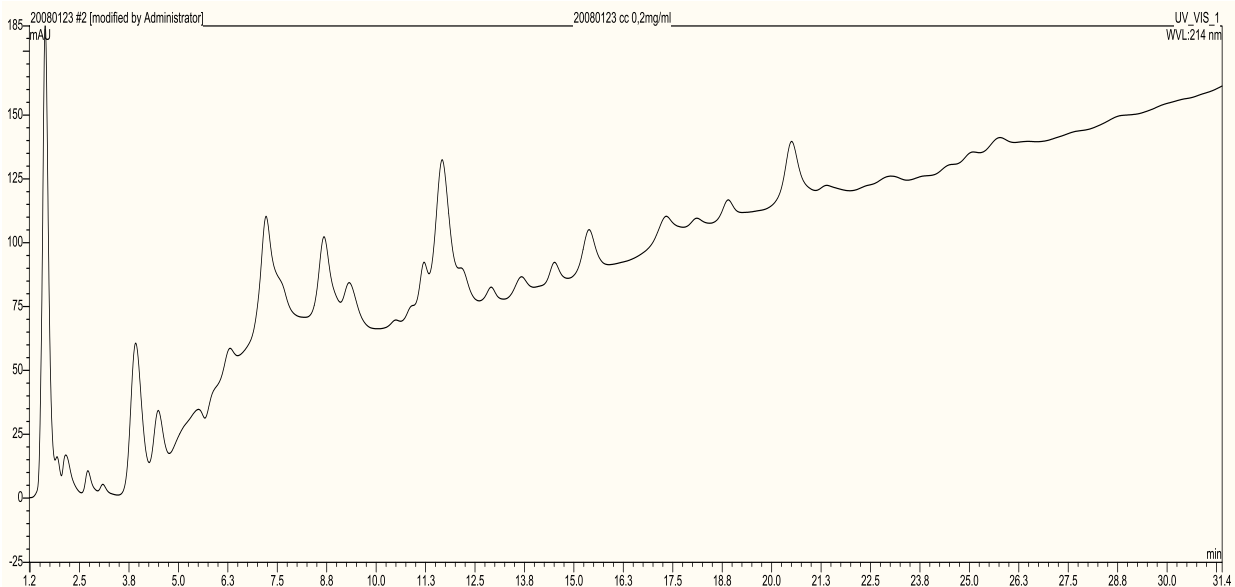


Figur 6.13 Kromatogram av peptider løst i 20%, 40%, 60% og 80% løsning av 20 mM NH₄Ac buffer, ved bølgelengden 214 nm.

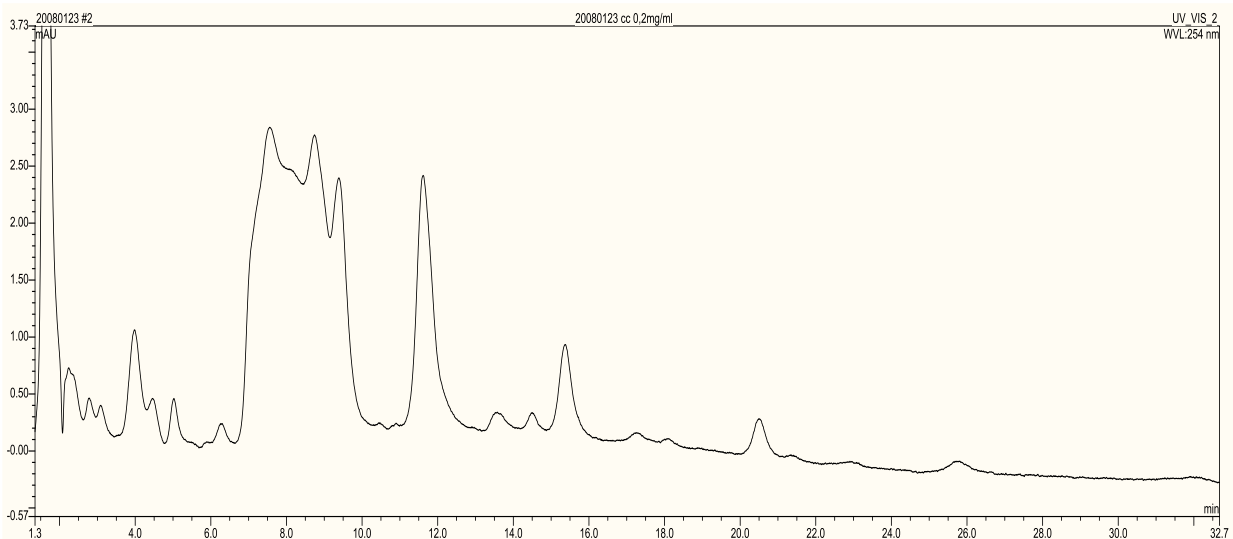
6.2 OPTIMALISERING AV HILIC

6.2.1 Ulike typer gradienter

I startfasen ble det brukt en lineær gradient som bestod av 0 til 80% mobilfase B (20% 20 mM NH₄Ac buffer) over 30 minutter. Figur 6.14 og 6.15 viser kromatogrammet av cytokrom C som ble kjørt med denne gradienten. Denne metoden ga en tilstrekkelig separasjon på 30 min, men det var likevel ønskelig å få til en separasjon hvor toppene ble fordelt helt ut i gradienten. Arbeidet med å utvikle andre gradienter ble derfor startet. Ut fra kromatogrammet ser det som om peptidene i hovedsak elueres ut før 24 min, ved dette tidspunktet var det 65% mobilfase B. Denne konsentrasjon av mobilfase B ble endepunktet for de senere gradientene.



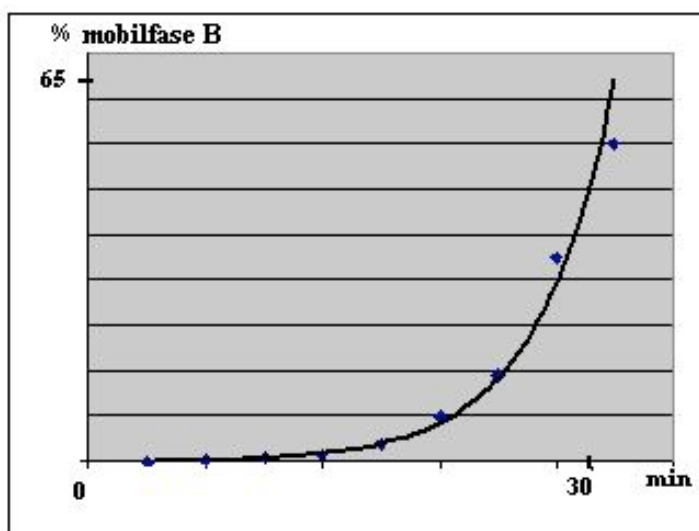
Figur 6.14 Kromatogram av lineær gradient ved 214 nm



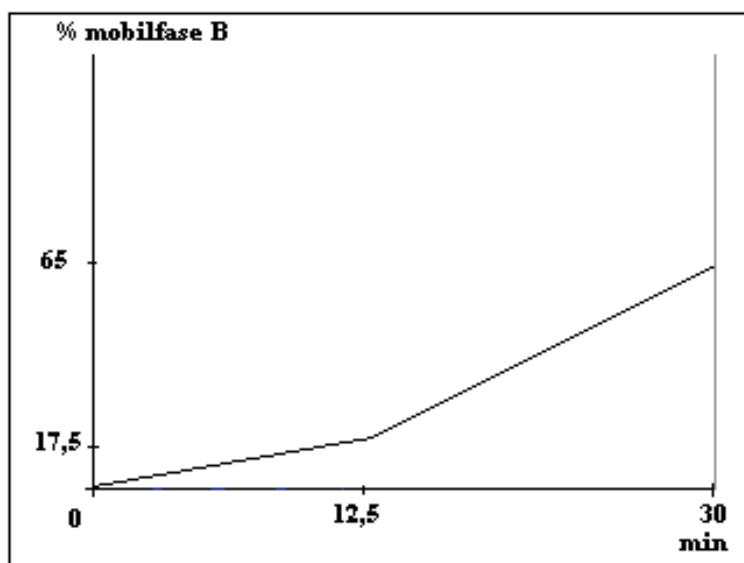
Figur 6.15 Kromatogram av lineær gradient ved 254 nm

Kromatogrammene med 214 nm eller 254 nm som vises i figurer 6.14 og 6.15 var veldig ulike. Det ble observert flere og større toppe i 214 nm enn i kromatogrammet ved 254 nm. Peptidene absorberte altså UV-stråling bedre ved 214 nm enn 254 nm. Toppene som ble observert i et 254 nm kromatogram ble også funnet i tilsvarende kromatogram ved 214 nm. Selv om de senere forsøkene ble utført med begge bølgelengder vil det kun fokuseres på resultatene ved 214 nm.

To ulike gradienter ble testet. Først ble det forsøkt med en eksponentiell gradient fra 0-65% mobilfase B på 30 min. Denne er illustrert i figur 6.16. Den andre var en lineær tottrinnsgradient. I trinn 1 gikk fra 0-17,5% mobilfase B på 12,5 min, og trinn 2 fra 17,5-65% mobilfase B på 17,5 min. Figur 6.17 viser tottrinnsgradienten.

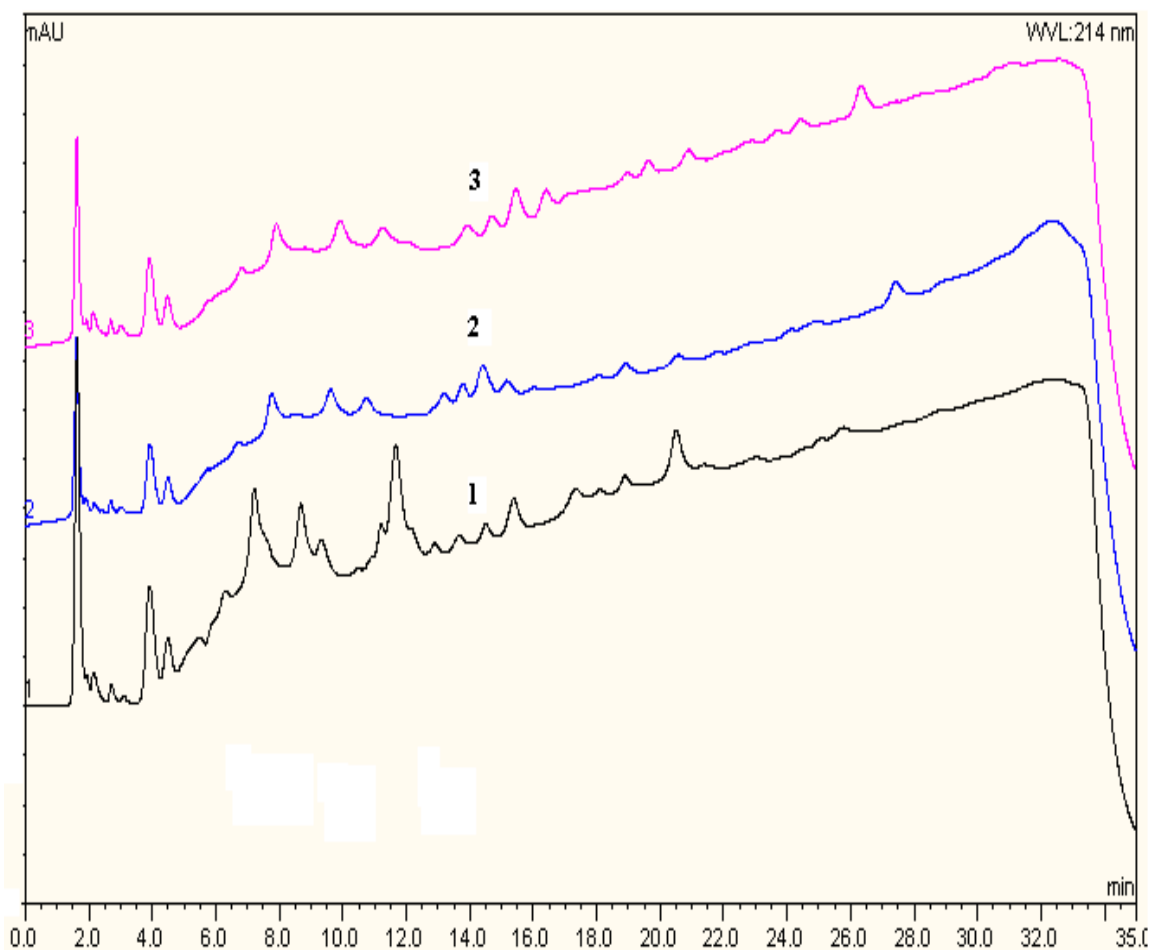


Figur 6.16 Eksponentiell gradient



Figur 6.17 Tottrinnsgradient

Kromatogrammene av de forskjellige gradientene viste at peptidene ble fordelt over større del av gradienten. Figur 6.18 viser de tre gradientene på ZIC-HILIC kolonne. Toppene ble dratt utover for de nye gradientene og dette gir en bedre separasjon enn den utgangspunkte lineære gradienten. Det var ingen merkbare forskjeller i separasjonsevne mellom den eksponentielle og totrinnsgradient. Totrinnsgradienten ble vurdert som noe enklere enn eksponentiell gradienten, og at det sannsynligvis la seg lettere og reproducere. Ut fra dette kriteriet ble totrinnsgradienten benyttet videre i oppgaven.

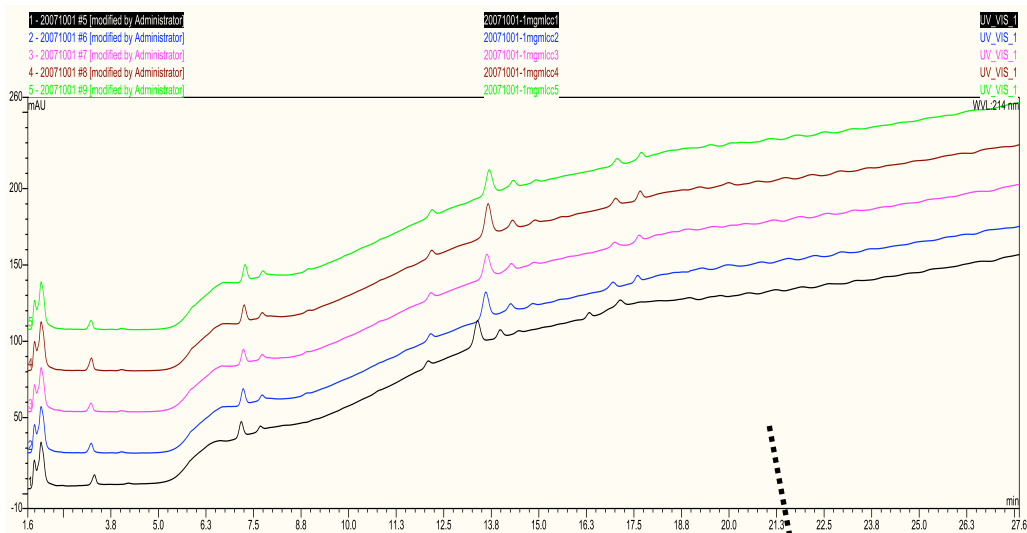


Kromatogram av gradientene på ZIC-HILIC kolonne; (1) er lineær gradient, (2) er eksponentiell og (3) er totrinnsgradient.

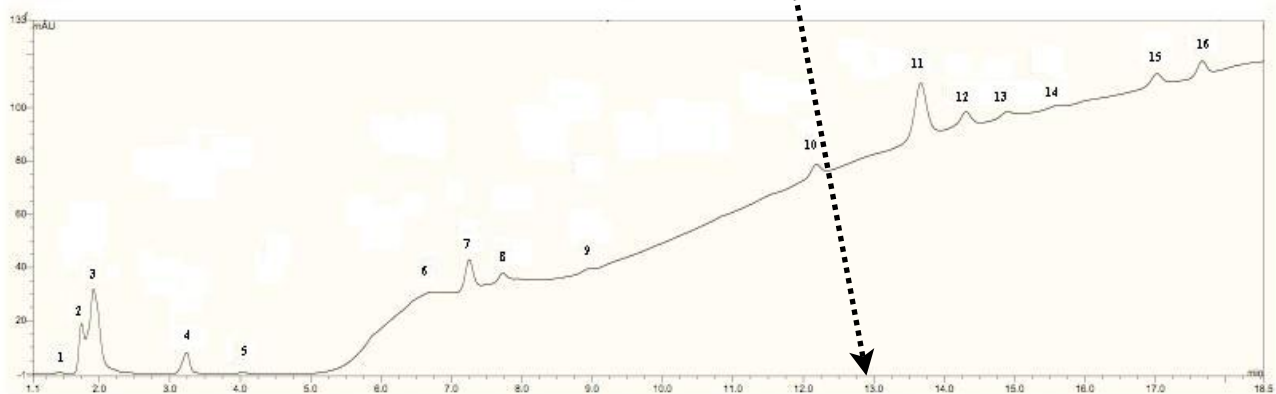
6.2.2 Repeterbarhet

For å teste repeterbarhet av analysene med hensyn til retensjonstid, ble det kjørt 5 paralleller med konsentrasjon 1 mg/ml klippet cytokrom C på HILIC. Figur 6.19(A) viser 5 parallelle prøver. Toppene ser ut til og elueres ut relativt likt, utenom det ene prøven

(nederste prøven i figur 6.19(A)), hvor toppene etter 12 minutter elueres ut litt før i kromatogrammet i forhold til de andre prøvene. I tabell 6.4 og 6.5 viser de observerte toppenes retensjonstid og intensitet. Fgur 6.19(B) viser kromatogram av toppnummerene brukt i tabell 6.4 og 6.5. Ikke alle topper ble observert i alle prøvene. Toppene med høy intensitet hadde mindre avvik i retensjonstid og intensitet enn topper med mindre intensitet. Standardavviket varierte fra 0,3-18,4 sekunder for retensjonstiden, mens standardavviket varierte fra 4-43% for intensiteten. Ut fra dataene for retensjonstiden viser at systemet er robust og gir tilstrekkelig repeterbarhet i prøver med høy konsentrasjon av analytt eller kvalitative analyse. I kvantitative analyse vil ikke dette systemet være tilstrekkelig hvis analytten er i lav konsentrasjon. Bruk av mer sensitiv detektor som kunne bedret deteksjonen behøves.



Figur 6.19(A) Kromatogram av 5 paralleleprøver



Figur 6.19(B) Kromatogram av toppnummerene brukt i tabell 6-4 og 6-5

Tabell 6.4 Retensjonstid (min) for toppene i figur 6.19

Topppnummer	Gjennomsnitt	Standardavvik	Standardavvik (sek.)
1	1.43	0.01	0.54
2	1.75	0.01	0.35
3	1.91	0.01	0.33
4	3.25	0.04	2.36
5	3.98	0.13	7.65
6	6.7	0.07	4.17
7	7.23	0.04	2.19
8	7.73	0.02	1.31
9	8.92	0.03	1.83
10	12.17	0.04	2.35
11	13.6	0.12	7.39
12	14.23	0.14	8.34
13	14.81	0.19	11.22
14	15.59		
15	16.87	0.31	18.41
16	17.56	0.23	13.94

(For topper som hadde mindre enn 3 observasjoner, ble det ikke beregnet standardavvik av.)

Tabell 6.5 Intensitet for toppene i figur 6.19

Topppnummer	Gjennomsnitt	Standardavvik	Relativ standardavvik (%)
1	0.70	0.10	13.83
2	18.29	0.73	4.01
3	30.41	1.14	3.76
4	6.37	1.06	16.64
5	0.59	0.25	42.96
6	0.96	0.30	30.80
7	9.59	0.80	8.37
8	3.12	0.77	24.73
9	0.73	0.07	9.86
10	3.50	0.47	13.30
11	16.62	2.20	13.27
12	4.43	0.36	8.21
13	1.51	0.22	14.28
14	0.70		
15	3.56	0.55	15.46
16	4.11	0.62	14.98

(For topper som hadde mindre enn 3 observasjoner, ble det ikke beregnet standardavvik av.)

6.3 OFFLINE FRAKSJONERING

Det ble startet med å fraksjonere i 5 minutters fraksjoner i 30 minutter. Ut fra resultatene fra forsøket, ble det observert at de mest intense peptider elueres ut i mellom 4 og 19 minutter. Fraksjonene fra HILIC kunne ikke direkte overføres til RPC uten bearbeiding på grunn av høyt ACN innhold. Fraksjonen med høyest ACN innhold kan i teorien inneholde 80% ACN. Injeksjon med prøveløsning med 80% ACN på RPC kan føre til at prøven ikke blir retardert tilstrekkelig og dermed blir eluert ut i front. Tre fremgangsmåter ble vurdert for å redusere det høye ACN-konsentrasjonen i fraksjonene.

1) Inndamping av fraksjoner

Slik det er beskrevet i avsnitt 6.1.3 kunne fraksjonene inndampes, og deretter reløses i mobilfase A til RPC. Fordelen med denne metoden var at prøven kan oppkonsentreres ved å reløse prøven i et mindre volum en utgangsvolumet. Dette kan være nyttig når det er lave konsentrasjoner i prøven. Ulempen var inndampingsprosessen krevde lang tid i forhold til de andre fremgangsmåtene.

2) Delvis inndamping

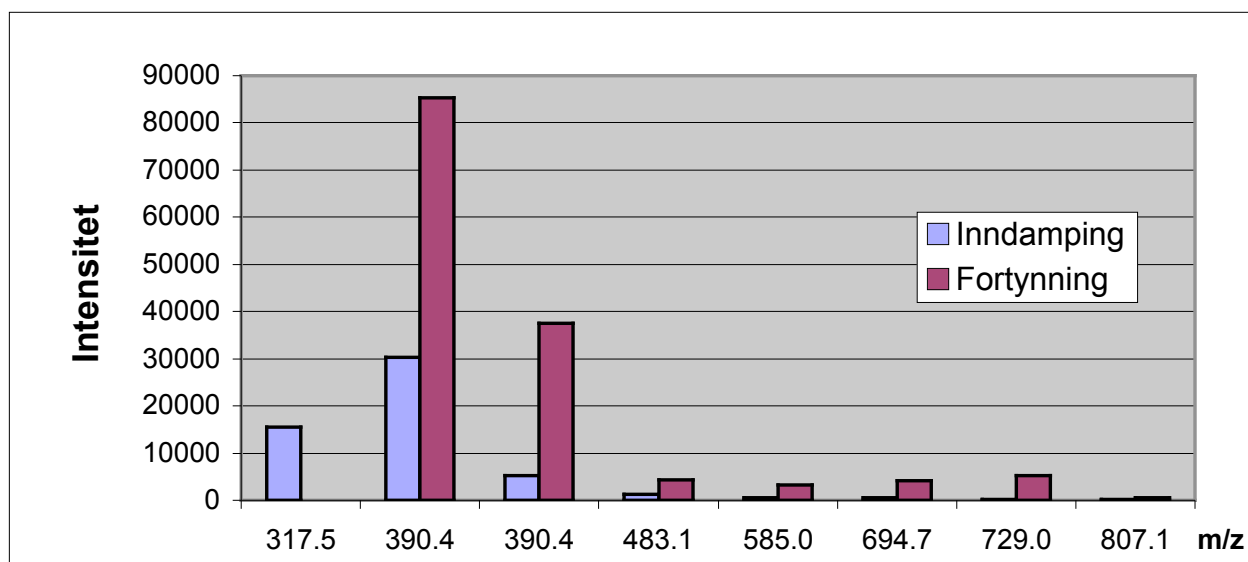
For å spare tid kan det utføres delvis inndamping, etterfulgt av injeksjon på RPC. Denne metoden innebar at prøven ikke ble fordampet helt. Tanken var at ACN ville dampe bort først på grunn av ACN hadde lavere kokepunkt enn vann. Dermed ville den resterende løsningen inneholde mye vann og lite ACN. Ulempen var at prøven ikke ble oppkonsentrert tilstrekkelig og at ACN innhold vil kunne variere fra gang til gang. Denne metoden ble ikke testet i denne oppgaven.

3) Fortynning

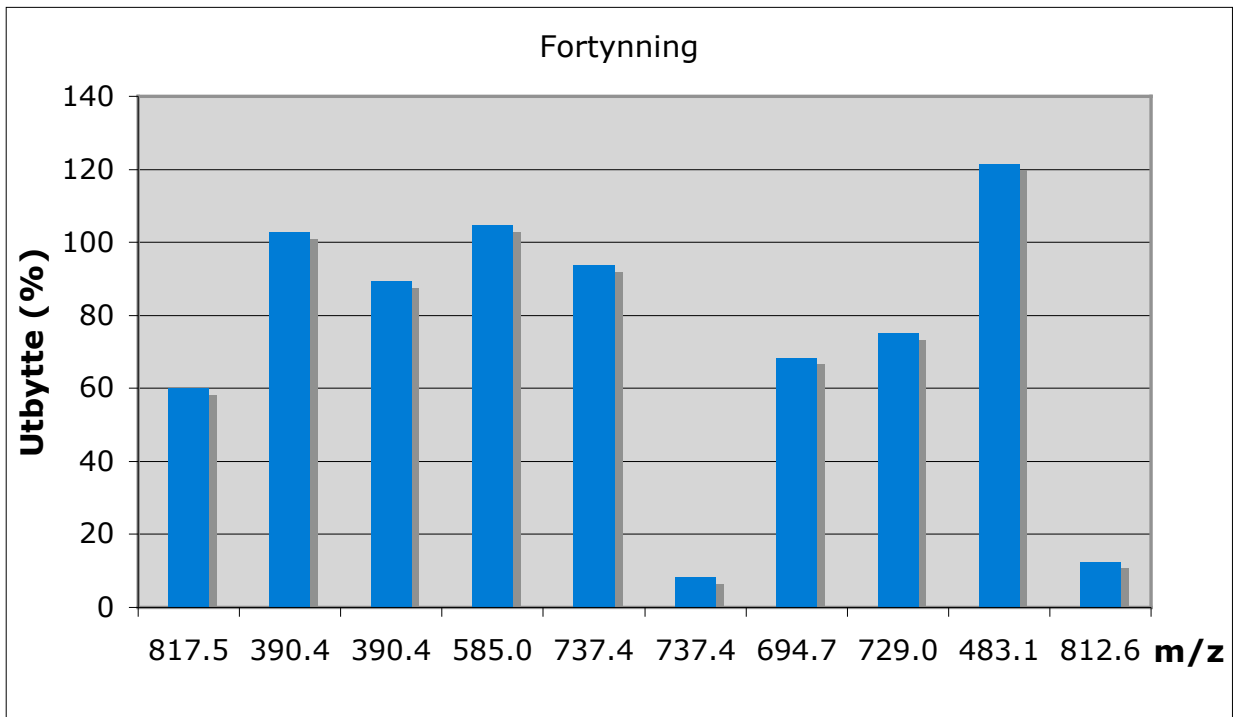
Dette var den minst tidskrevende metoden. Ulempen var at konsentrasjonen av prøven ble redusert. Ved å fortynne fraksjonene 10 ganger, ville den fraksjonen med mest ACN kun inneholde 8% ACN. En slik konsentrasjonen av ACN i prøven ville ikke påvirke retensjon av peptidene i RPC. Fortynningsløsningen kunne dermed injiseres direkte i RPC uten mer bearbeiding.

Det ble gjort forsøk med inndamping og fortytning, og metodene ble sammenlignet med hensyn til utbytte. Prøvene ble separert og fraksjonert på ZIC-HILIC, deretter ble halvparten av fraksjonen fordelt til inndamping og den andre halvparten til fortytning. Det ble tatt ut 100 µl av hvert inndampingsfraksjon og blandet med 900 µl ionebyttet vann (tilsvarte 10 ganger fortytning), slik at resultatene lett kunne sammenlignes. Figur 6.20 viser peptidenes intensitet ved SpeedVac-inndamping og fortytning. Dette forsøket viste at inndamping metoden ga dårligere utbytte en fortytningen. Dette ga støtte for teorien om at ACN påvirket inndampingsprosessen slik det ble nevnt i avsnitt 6.1.4.

Figur 6.21 viser utbytteforholdet mellom fortytning og direkte injeksjon (referansen). Ut fra figur 6.21 lå utbytteforholdet til fortytning til de mest intense toppene på mellom 70-100%. Ved høye konsentrasjoner var det en fordel å benytte fortytningsmetoden, fordi det tok kortere tid og utbyttet ble bedre enn inndampingsmetoden. Likevel ble inndampingsfremgangsmåten foretrukket, da prøven kan oppkonsentreres. Ved reløsing av prøver i et mindre volum enn det prøven var opprinnelig vil det kunne bli mange ganger mer konsentrert. På denne måten kan mengde prøve som blir injisert være mye større enn ved fortytning i samme injeksjonsvolum. Oppkonsentreringsgraden er avhengig av volumet til fraksjonen og volumet det reløses i.



Figur 6.20 Intensitet av peptidene ved fortytning og inndamping

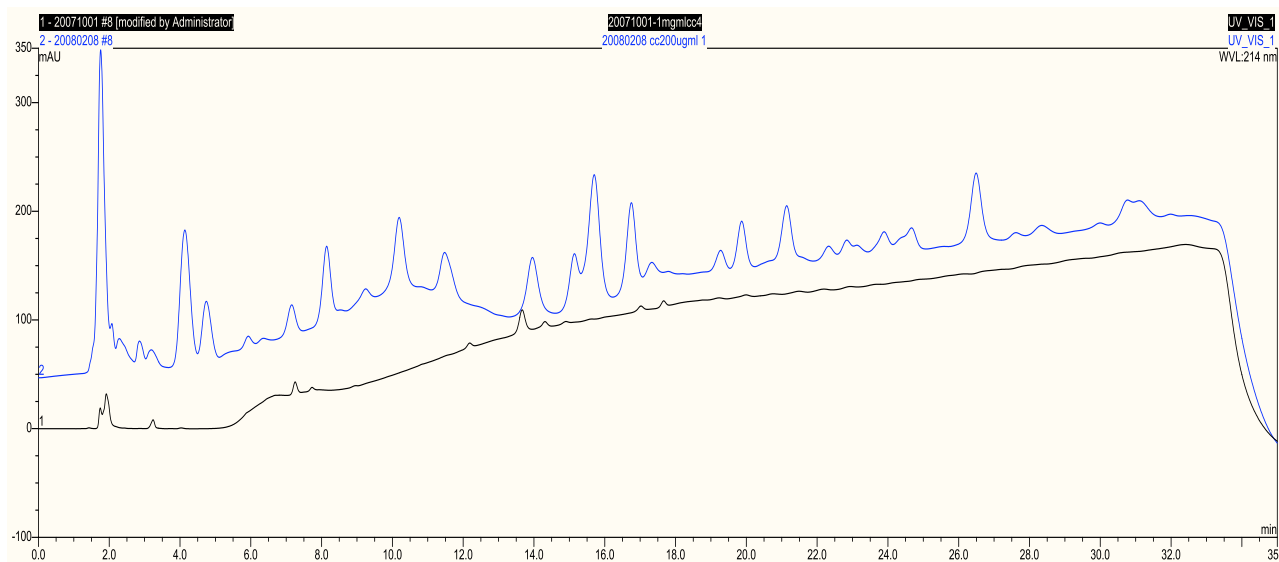


Figur 6.21 Utbytte av klippet cytokrom C peptidene ved fortynning i forhold til direkte injeksjon

6.4 TODIMENSJONALE ANALYSER

6.4.1 2D-HILIC-RPC

Peptidløsning på 1 mg/ml ble injisert på HILIC etter tryptisk klipping og fraksjonert i 6 fraksjoner på 5 minutter hver. Fraksjonene ble samlet i eppendorfrør og ble inndampet på SpeedVac. I dette forsøket ble det brukt mobilfase A som bestod av 5% vandig buffer til å reløse prøven i forkant av HILIC analyse. Selv med 1 mg/ml peptidløsning ble det ikke observert mange topper i forhold til en peptidløsning på 0,2 mg/ml i mobilfase A (20% vandig buffer). Dette skyldes at peptidene hadde dårlig løselighet i mobilfase A (5% vandig buffer). Figur 6.22 viser kromatogram av 1 mg/ml kjøring med mobilfase A (5% vandig buffer) og 0,2 mg/ml i mobilfase A (20% vandig buffer). I forkant av injeksjon på RPC ble fraksjonene reløst i 200 µl mobilfase A til RPC. Fraksjonen ble kjørt etter hverandre i den rekkefølgen de ble samlet opp. Tabell 6.6 viser oversikt over peptider og deres retensjonstid på RPC og HILIC (fraksjonsnummer). Hvis fraksjonsintervallet i første dimensjon hadde vært mindre, ville dette kunne føre til en mer presis observasjon av peptidenes retensjonstid i første dimensjonen. I teorien kan identifisering av en biomarkør gjøres i første dimensjon hvis biomarkøren er kjent, med kjent retensjonstid og kraftig signalrespons.



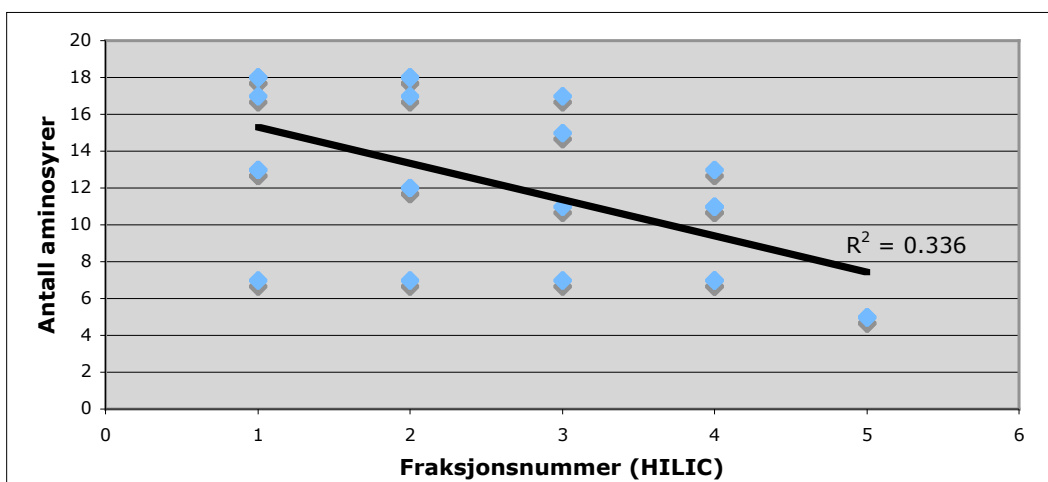
Figur 6.22 Kromatogram av 1 mg/ml kjøring med mobilfase A (5% vandig buffer) og 0,2 mg/ml i mobilfase A (20% vandig buffer)

Tabell 6.6 Oversikt over peptider og deres fraksjonsnummer i første dimensjon (HILIC) og retensjonstid i andre dimensjon (RPC)

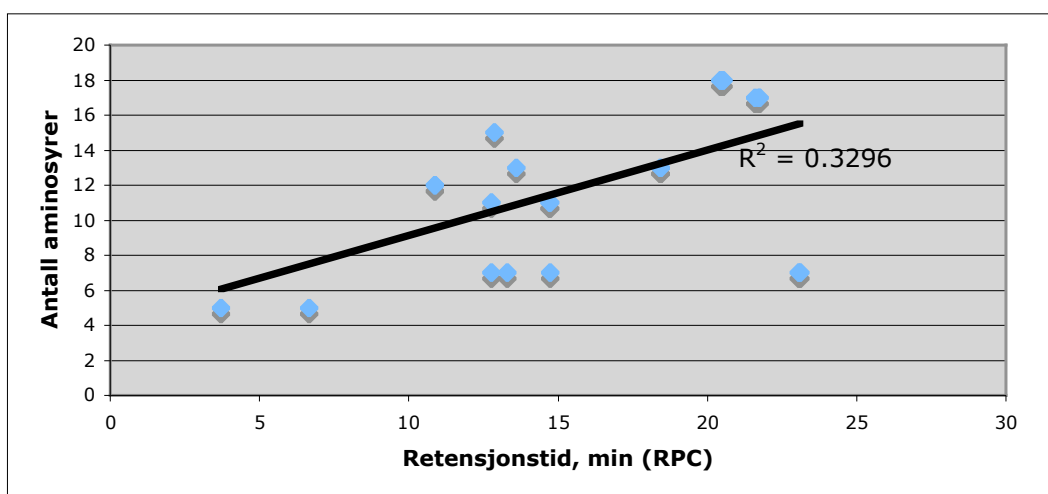
m/z	HILIC fraksjonsnummer	HILIC fraksjonsintervall	RPC t _R (min)	Sekvens	Antall aminosyrer
817.5	1	0-6min	18.45	IFVQKCAQCHTVEK	13
545.5	1	0-6min	18.41	IFVQKCAQCHTVEK	13
737.4	1	0-6min	20.29	GITWKEETLMEYLENPKK	18
553.4	1	0-6min	20.34	GITWKEETLMEYLENPKK	18
694.7	1	0-6min	21.61	GITWKEETLMEYLENPK	17
807.1	1	0-6min	23.07	KYIPGTK	7
737.4	2	6-10min	20.53	GITWKEETLMEYLENPKK	18
553.4	2	6-10min	20.51	GITWKEETLMEYLENPKK	18
694.7	2	6-10min	21.72	GITWKEETLMEYLENPK	17
807.1	2	6-10min	23.12	KYIPGTK	7
779.4	3	10-15min	13.63	TGPNLHGLFGR	11
390.4	3	10-15min	13.76	TGPNLHGLFGR	11
390.4	3	10-15min	12.63	MIFAGIK	7
817.6	3	10-15min	12.86	IFVQKCAQCHTVEK	15
694.7	3	10-15min	21.76	GITWKEETLMEYLENPK	17
542.5	4	15-20min	13.6	EETLMEYLENPKK	13
779.4	4	15-20min	13.29	MIFAGIK	7
390.4	4	15-20min	13.22	MIFAGIK	7
585.1	4	15-20min	14.72	TGPNLHGLFGR	11
390.4	4	15-20min	14.74	TGPNLHGLFGR	11
634.4	5	20-25min	3.72	IFVQK	5
604.4	5	20-25min	6.66	GITWK	5

6.4.2 Retensjonsrekkefølge av peptider i HILIC og RPC

I HILIC blir hydrofile stoffer mest retardert. Ut fra hvilket fraksjonsnummer peptidene ble eluert ut i (tabell 6.6), kan det ser ut som peptider med økende lengde av aminosyrekjede eluerte ut tidligere i HILIC. Øket antall aminosyrer i peptidkjeden vil gi en reduisering i hydrofile egenskaper, noe som kan forklare hvorfor lange peptider eluerte ut tidligere enn korte peptider i HILIC. I RPC blir stoffer med økende hydrofobe egenskaper retardert i høyere grad. Peptidenes retensjonstid i RPC i tabell 6.6 viser at med økende aminosyrekjede lengde øker også retensjonstid. Figur 6.23 og 6.24 viser antall aminosyrer i peptidkjeder og peptidenes retensjonstider i HILIC (fraksjonsnummer) og RPC. Ut fra resultatene kan det konkluderes med at separasjonsprinsipper i HILIC og RPC er i overensstemmelse med teorien som ble beskrevet tidligere.



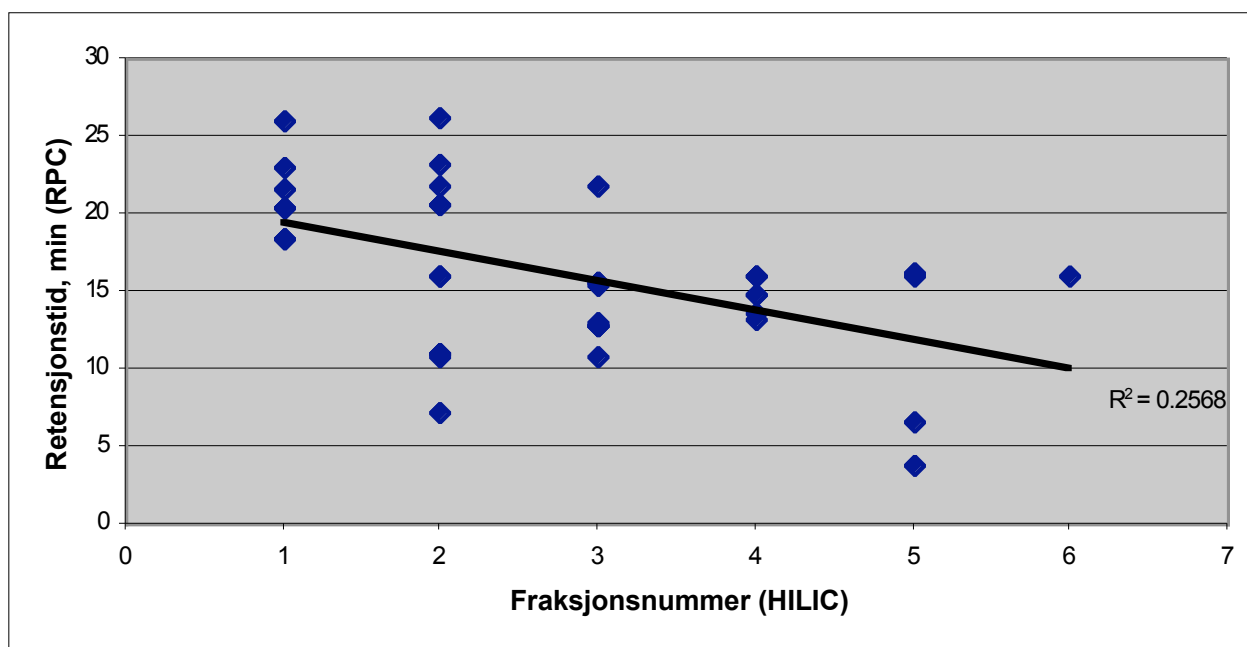
Figuret viser antall aminosyrer i peptidkjeden og retensjonstid til peptider (fraksjonsnummer) i HILIC



Figuret viser antall aminosyrer i peptidkjeden og retensjonstid til peptider i RPC

6.4.3 Ortogonalitet

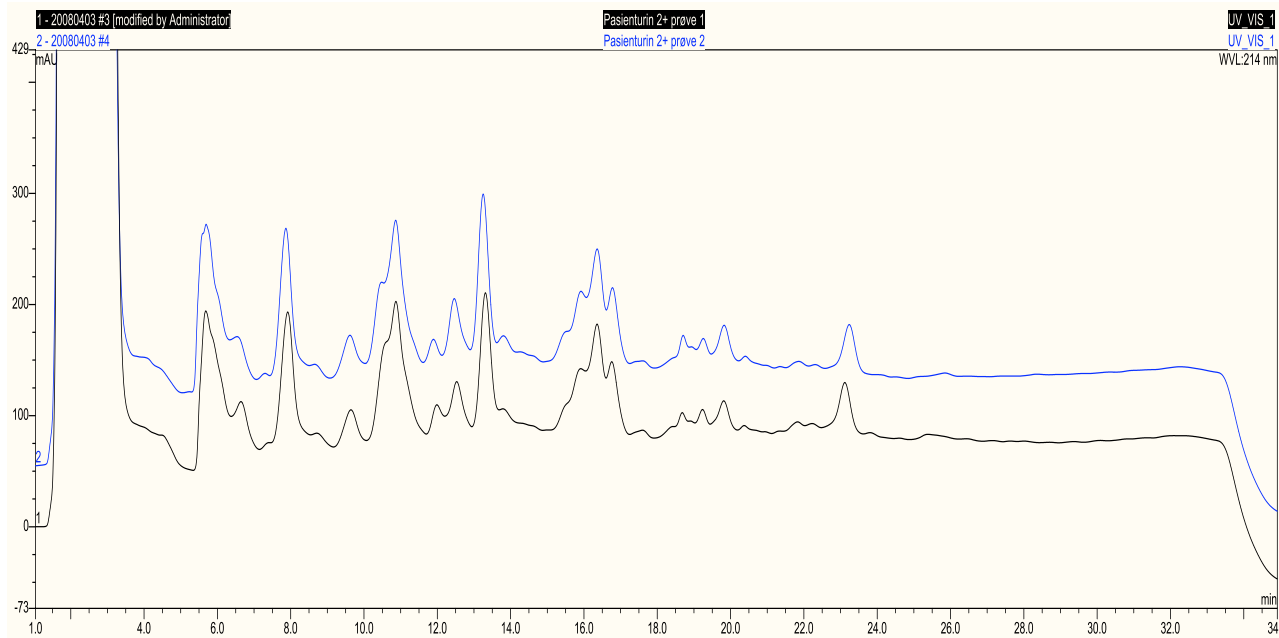
I 2D separasjon er det vanlig å benytte to uavhengig fysikalske egenskaper til peptider for å separere peptidene fra hverandre. Når egenskapene er virkelig uavhengige da er metoden ortogonal. Ved å plote retensjonstiden (fraksjonsrekkefølge) for peptidene i første dimensjon mot retensjonstiden i andre dimensjon, vil dette gi et ortogonalitetsplott. Figur 6.25 viser ortogonalitetsplott for peptidene i tabell 6.6. Ut fra regresjonslinjen viser en svak helning mot nedre høyre. Dette betyr at peptider som elueres tidlig ut i HILIC har en liten tendens til å elueres ut sent i RPC, og omvendt. Retensjonstidene viser en svak korrelasjon mellom de to dimensjonene. Dette har negativ innflytelse på ortogonaliteten for dette 2D systemet. Utenom det viser plottet relativt god spredning av peptidenes retensjonstid. Spredningen hadde trolig blitt enda mer tydelig hvis det hadde vært flere målingspunkter. Plottet hadde blitt mer komplett hvis fraksjonsintervallet ble redusert, da hadde retensjonstiden i første dimensjon blitt mer nøyaktig. Det kan konkluderes med at 2C-ZIC-HILIC-RPC ikke gir perfekt ortogonalitet, men det er godt nok for å gi en tilstrekkelig separasjon i denne type analyser.



Figur 6.25 Orgonalitetsplott for 2D-ZIC-HILIC-RPC

6.5 ANALYSE AV PASIENTPRØVE PÅ HILIC

Håvard Loftheim som arbeider med prosjektet med å finne biomarkør i urin, har benyttet HILIC metoden med totrinnsgradienten i denne oppgaven for å analysere urinprøver fra pasient. Prøven var bearbeidet med de forskjellige trinnene illustreres i figur 1, i forkant av analysen. Det ble kjørt to paralleller av prøven. Figur 6.26 viser kromatogram av pasientprøven. Kromatogrammet viser god separasjon for peptider. Prøven var fra en nyretransplantert pasient med urin som inneholdt veldig mye proteiner. Det ble registrert mange toppene og intensitetene på toppene var kraftige. Dette tyder på at metoden vil kunne ha en akseptabel deteksjonsgrense for pasienter med denne patologiske tilstanden. Metodens gradient ser ut til å være tilstrekkelig for separere de fleste toppene. Det er jevn separasjon opp til 24 minutter. Injeksjonsfronten er kraftig. Det kan skyldes at peptider eller andre forbindelser med begrensede hydrofile egenskaper er tilstede i fronten. Gradienten har fortsatt forbedringspotensial slik at toppene blir fordelt enda mer ut i gradienten. Repeterbarheten ser ut til å være lovende. Toppene ser relative like ut og de fleste toppene kan observeres i begge kromatogrammene. Det kan derfor konkluderes med at metoden er egnet for urinprøver fra nyretransplanterte pasienter.



Figur 6.26 Kromatogram av pasientprøve på HILIC

7. KONKLUSJON

I denne oppgaven ble det utviklet og implementert et offline todimensjonalt ZIC-HILIC-RPC-system med MS deteksjon for analyse av urinprøver fra pasient. Cytokrom C ble valgt som modellprotein. For å kunne bestemme klipprodukter til cytokrom C, ble proteinet klippet med trypsin og spesifikke klipprodukter til cytokrom C ble identifisert ved hjelp av spesifikke MS/MS-spekter. Det ble så valgt ut 11 m/z-verdier (markører) som skulle monitoreres videre i SIM modus, med hensyn til signalintensitet og peptidspesifisitet.

Det ble startet med å lage separate metoder for de to dimensjonene.

HILIC ble optimalisert ved å teste ut tre forskjellige gradientprogrammer; lineær-, eksponentiell- og totrinnsgradient. Eksponentiell og totrinnsgradient ga mest tilfredsstillende separasjon av peptider, men totrinnsgradienten ble valgt til videre bruk fordi den sannsynligvis vil kunne gi bedre repeterbarhet enn en eksponentiellgradient.

Det ble sammenlignet forskjellige inndampingsmetoder og overføringsteknikker av fraksjonene fra første dimensjon til andre dimensjon. Det viste seg at ingen merkbare forskjeller ble registrert mellom SpeedVac- og nitrogen-metoden. Selv om begge metoder ga både fordeler og ulemper, ble SpeedVac foretrukket videre i oppgaven, på grunn av at parametrene lettere kunne kontrolleres i forhold til nitrogen-metoden. Det kan også ser ut til at ACN har en effekt på utbytte ved inndamping av prøver med høyt innhold av ACN. Prøver med 80% ACN innhold viser en tendens til å gi dårligere utbytte i forhold til prøver med lavere ACN innhold. Ut fra peptidløselighetsforsøket ser det ut som peptidene hadde nådd sin maksimale løselighet i 20% vandig buffer.

Det var flere overføringsteknikker som kunne blitt benyttet i denne oppgaven, men det var bare inndampings- og fortynningsmetoden som ble testet. Ved høye konsentrasjoner var det en fordel å benytte fortynningsmetoden, fordi det tok kortere tid og utbyttet ble bedre. Likevel ble inndampingsfremgangsmåten foretrukket, fordi ved oppkonsentrering kan mengde prøve som blir injisert være mye større enn i samme injeksjonsvolum ved fortynning. Dette kan være nødvendig hvis prøven er i lav konsentrasjon.

Videre ble ZIC-HILIC-RPC-system testet for separasjonsevne med tanke på ortogonalitet. Det viste at det ikke gir perfekt ortogonalitet, men separasjonen var relativt god og tilstrekkelig for denne type analyser. Retensjonsrekkefølge av peptider i HILIC og RPC ble

undersøkt. I HILIC blir hydrofile stoffer mest retardert. Det ser ut som lange peptider eluerte ut tidligere enn korte peptider i HILIC. I RPC blir stoffer med økende hydrofobe egenskaper retardert i høyere grad og resultatet viste at retensjonsprinsippet var omvendt i forhold til HILIC.

ZIC-HILIC-metoden med totrinngradienten ble testet på urinprøve fra en nyretransplanterte pasient. Det observeres kraftige signalresponser og metoden ser ut til å ha god repeterbarhet. Separasjonen var relativ god men det kan være nødvendig med en bearbeiding av metoden for å få enda bedre utnyttelse av gradienten.

Denne oppgaven gir et godt utgangspunkt for videre arbeid i analyse av proteiner i urinprøver, og bruk av ZIC-HILIC i 2D-LC-MS. Like fullt er det nødvendig for optimalisering av separasjonsmetodene og fraksjoneringsprosessen, før systemet kan benyttes til kvantifisering av peptider i urinprøver, og som diagnostisk verktøy.

8. REFERANSELISTE

1. Mischak, H., Julian, B., A., et al., High-resolution proteome/peptidome analysis of peptides and low-molecular-weight proteins in urine, *Proteomics - Clinical applications*, 2007: 794-804
2. Boersema, P., J., Mohammed, S., et al., Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics, *Analytical and Bioanalytical chemistry*, 2008
3. Boersema, P., J., et al., "Evaluation and optimization of ZIC-HILIC-RP as alternative MuDPIT strategy", *Journal of Proteome Research*, 2007, 6: 937-946
4. Pedersen-Bjergard S, K.E Rasmussen: *Legemiddelanalyse*, Fagbokforlaget, 2004
5. Dugo, P., Cacciola, F., et al., Comprehensive multi-dimensional liquid chromatography: Theory and applications, *Journal of Chromatography A*, 2008: 353-68.
6. Gilar, M., Olivova, P., et al., Two-dimensional separation of peptides using RP-RP-HPLC system with different pH in first and second separation dimensions, *Journal of Separation Science*, 2005, 28: 1694-1703
7. Wang, H., Hanash, S., Multi-dimensional liquid based separation in proteomics, *Journal of Chromatography B*, 2003: 11-18
8. Sequant, Umeå, Sverige (2008) <http://www.sequant.com/>
9. Nezirevic, D., Årstand, K, et al., Hydrophilic interaction liquid chromatographic analysis of aminohydroxyphenylalanines from melanin pigments, *Journal of Chromatography A*, 2007, 1163: 70-79
10. Marchetti, N., Fairchild, J.,N., et al., Two-dimensional separation of peptides using RP-RP-HPLC system with different pH in first and second separation dimensions, *Journal of Separation Science*, 2005, 28(14): 1694-703
11. Liebler, D., C., *Introduction to proteomics: Tool for New Biology* Liebler DC, Humana Press Inc, 2002
12. Stoll, D., R., Li, X., Fast, comprehensive two-dimensional liquid chromatography, *Journal of chromatography A*, 2007, 1168: 3-43
13. *Farmasøytisk Bioanalyse kompediet i FRM5310*
14. Tannau, N.,S., Hemby, S., E., *Methods for proteomics in neuroscience*, Progress in brain research, 2006, 158: 41-82
15. Alberts, B., et al., *Molecular biology og the cell* (fourth edition), Garland science, 2002
16. Skulachev, V., P., *Cytochrome c in the apoptic and antioxidant cascades*, Federation of European Biochemical Societies, 1998, 423(3):275-80

17. Duan, J., Liang, Z., et al., Rapid protein identification using monolithic enzymatic microreactor and LC-ESI-MS/MS, *Proteomics*, 2006, 6: 412-419
18. Qiao, L., Liu, Y., et al., A nanoporous reactor for efficient proteolysis, 2008, 14 (1): 151-157
19. ProteinProspector (2008) <http://prospector.ucsf.edu/>