

Quantificação de proteínas e peptídeos através da análise de aminoácidos por FIA-EMAR

Gabriel R. A. Carneiro^{1*} (PG), **Gustavo Monnerat**^{1,2} (PQ), **Fabio C.S. Nogueira**^{1,3} (PQ), **Gilberto B. Domont**³

*gabriel.carneiro@iq.ufrj.br

1. Laboratório de Proteômica, LADETEC, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro

2. Instituto Nacional de Cardiologia, Rio de Janeiro, Brasil

3. Unidade de Proteômica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Palavras Chave: Proteínas, aminoácidos, proteômica, espectrometria de massas

Introdução

A análise de aminoácidos é um método clássico e de referência para quantificação de proteínas com ampla aplicação em biotecnologia, química clínica, proteômica, biologia de sistemas e ciência de alimentos. Trata-se de uma técnica complexa, composta por duas etapas, hidrólise do proteica e separação cromatográfica/deteção. O método foi descrito pela primeira vez por Spackman, Moore e Stein em 1958 usando hidrólise ácida de proteínas por HCl¹. Desde então a técnica sofre modificações visando aprimorar tanto a hidrólise, como a deteção dos aminoácidos.

Neste sentido, o presente projeto tem como objetivo desenvolver e validar um método de quantificação de proteínas, peptídeos e misturas proteicas a partir da análise de aminoácidos, utilizando a injeção por fluxo acoplada a espectrometria de massa de alta resolução (FIA-EMAR), sem necessidade de modificação química nos aminoácidos (derivatização) ou processos cromatográficos.

Resultados e Discussão

O método desenvolvido baseia-se em uma primeira etapa de hidrólise utilizando HCl 6N e 0,01 % de fenol a 110°C durante 24 horas sob vácuo², seguida pela quantificação individual dos aminoácidos gerados na primeira etapa utilizando a técnica de FIA-EMAR. Foram otimizados os parâmetros instrumentais de análise incluindo a composição da fase móvel, parâmetros de fonte e experimento de massas utilizado.

O método foi validado sendo avaliados os seguintes parâmetros: acurácia, linearidade, precisão e reprodutibilidade. Durante os ensaios de validação o método, apresentou um coeficiente de variação (<10%) e acurácia (95-105%) satisfatórias. Os coeficientes de determinação (R-quadrado) para todos os aminoácidos ficaram maiores que 0,99. Sendo assim possível a validação método.

Com o método validado foram analisadas diferentes amostras com diferentes graus complexidades e os resultados foram comparados com o método de referência. Foram analisadas as seguintes amostras:

BSA, soro de rato, extrato de *Saccharomyces cerevisiae* e folha de *Jatropha curcas*, além dessas quatro amostras foram também avaliados peptídeos provenientes da digestão com tripsina das mesmas amostras a cima. Os resultados apresentados nos dois métodos foram estatisticamente similares, mostrando que o método desenvolvido é uma boa alternativa para a quantificação de proteínas, os resultados da quantificação podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1: Comparação entre o método desenvolvido e o clássico na quantificação proteica de diferentes amostras

Amostras	Método desenvolvido		Método clássico	
	Conc. (mg/ml)	CV(%)	Conc. (mg/ml)	CV(%)
BSA	2,2	2,6	2,1	2,9
Soro de rato	6,2	9,6	5,9	6,5
Folha	2	3,8	2,1	9,3
Extrato de S.cerevisiae	5,4	1,5	5,9	23

Conclusões

Foi possível desenvolver e validar um método de quantificação de proteínas com precisão calculada adequada e variação inferior a 10%. O método foi eficiente na quantificação de amostras em diferentes complexidades, desde proteínas purificadas como BSA até misturas complexas, como extrato de levedura e soro de rato, como mostrado neste trabalho. Os resultados da quantificação do método desenvolvido foram semelhantes ao método de referência, demonstrando que o FIA-EMAR é um método rápido e preciso para análise de aminoácidos, quantificação de proteínas e peptídeos, excelente para o campo da proteômica.

Agradecimentos

LADETEC, CNPQ, FAPERJ

1 Moore, S., Spackman, D. H., & Stein, W. H. (1958). Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. An improved system. *Analytical Chemistry*, 30(7), 1185-1190.

2 Højrup, P. Analysis of Peptides and Conjugates by Amino Acid Analysis. *Methods Mol. Biol.* 2015, 1348, 65-76.