รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาวิธีการแยกสายเปปไทด์ที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตเพื่อใช้ศึกษารูปแบบการเติมหมู่ฟอสเฟตของโปรตีน

Development of enrichment method for phosphorylated peptides to study protein phosphorylation

คณะนักวิจัย

ดร.หาญศึก บุญเชิด	หัวหน้าโครงการ
ศ.ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา	ที่ปรึกษาโครงการ
ศ.ดร.มรว.ชิษณุสรร สวัสดิวัตน์	ที่ปรึกษาโครงการ

เรงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2557 รหัสโครงการ MET570540S

บทคัดย่อ

การศึกษาเพื่อหาตำแหน่งกรดอะมิโนที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตในโปรตีนนั้นช่วยให้สามารถเข้าใจการทำงานของโปรตีนในสิ่งมีชีวิตได้ดียิ่งขึ้น ในการศึกษานี้ผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีแยกบริสุทธิ์และวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของสายเปปไทด์ที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตโดยใช้ปฏิกิริยา β-elimination ควบคู่กับการใช้เทคนิค diagonal strong cation exchange (SCX) chromatography โดยในขั้นตอนแรก สายเปปไทด์ที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตที่กรดอะมิโนเซอรีนหรือทรีโอนีนจะถูกกำจัดหมู่ H_3PO_4 ด้วยปฏิกิริยา β-elimination อย่างจำเพาะและให้ผลผลิตในรูป dehydroalanine และ dehydroamino-2-butyric acid ตามลำดับ ในขั้นตอนที่สอง ผลผลิตในข้างต้นได้ถูกแยกบริสุทธิ์ด้วย diagonal SCX ออกจากสายเปปไทด์ที่ไม่ถูกดัดแปลงด้วยปฏิกิริยา β-elimination จากนั้นสายเปปไทด์ที่ถูกแยกบริสุทธิ์จะถูกวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS โดยการศึกษานี้สามารถแยกบริสุทธิ์และวิเคราะห์สายเปปไทด์ที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตจากเคซีนชนิด α_1, α_2 และ β ได้ 9, 12 และ 5 สายเปปไทด์ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการแยกบริสุทธิ์สายเปปไทด์ด้วยวิธีอื่น ๆ ในโปรตีนชนิดเดียวกันที่ได้มีการเผยแพร่ก่อนหน้านี้ เช่น monodisperse microsphere-based Ti(4+)-IMAC, isoelectric point-based technique, β-elimination/Michael addition และ Titanium dioxide microcolumns แสดงให้เห็นว่าวิธีที่ถูกพัฒนาขึ้นในการศึกษานี้มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน

Abstract

Information of phosphorylated residues in proteins obtained by mass spectrometric analysis provides knowledge about regulation of proteins at molecular level. We show that the use of β-elimination in combination with diagonal strong cation exchange (SCX) chromatography offers a solution for two major analytical problems of phosphopeptide study by peptide fragment fingerprinting, i.e., low abundance of protease-generated target peptides and lack of knowledge about position of phosphorylated residues due to losing of phosphate group during ionization. $Ba(OH)_2$ eliminates H_3PO_4 group on phosphoserine and phosphothreonine resulting to dehydroalanine and dehydroamino-2-butyric acid, respectively. $Ba(OH)_2$-induced reaction products were isolated by diagonal SCX from unmodified peptides. By reversed phase LC-MS/MS analysis of secondary SCX fractions, we identified 9, 12 and 5 $Ba(OH)_2$-induced residues from α_1, α_2 and β-Casein, respectively. Using the same protein models our results are in accordance with other phosphopeptide enrichment approaches e.g., monodisperse microsphere-based $Ti(^{4+})$-IMAC, isoelectric point-based technique, β-elimination coupled with Michael addition followed by tryptic digestion and Titanium dioxide microcolumns. The approach is promising for phosphopeptide analysis of more complex systems.