

ABSTRAKT

Byla vypracována metoda pro studium fosforylačních míst fosfoproteinů. Tato metoda je založena na separaci fosfopeptidů po proteolytickém štěpení fosfoproteinů na nových IMAC magnetických sorbentech s imobilizovanými kovovými ionty a jejich následné identifikaci hmotnostní spektrometrií (MS). Neporézní hydrofilní poly(2-hydroxyethyl metakrylát-co-glycidyl metakrylátové) magnetické částice připravené disperzní kopolymerací a modifikované iminodioctovou kyselinou obsahující imobilizované Fe(III) nebo Ga(III) ionty byly použity k separaci fosfopeptidů z proteolytických směsí peptidů modelových fosfoproteinů: α -kaseinu a prasečího pepsinu A. Optimalizací adsorpčních a elučních podmínek se nám na připravených magnetických sorbentech podařilo selektivně separovat fosfopeptidy z proteolyticky rozštěpeného modelového fosfoproteinu, který obsahoval velké množství kyselých peptidů (prasečí pepsin A). Získané výsledky prokázaly, že připravené magnetické sorbenty jsou vhodné k separaci fosfopeptidů s jednou fosfátovou skupinou i vícenásobně fosforylovaných peptidů. Fosfopeptidy separované z proteolytických směsí peptidů modelových proteinů byly analyzovány MS na principu MALDI-TOF (matrix-assisted laserdesorption/ionization time-of-flight).

Pro imunochemickou separaci fosfoproteinů byla připravena imunoglobulinová frakce z vaječných žloutků od slepic imunizovaných proti KLH (Keyhole limpet hemocyanin) obsahující vázaný O-fosforyl-L-serin. Protilátky byly purifikovány afinitní chromatografií na imobilizovaném α -kaseinu a jejich přítomnost ověřena MS. Specifita získaných protilátek byla testována ELISA testy. Získané výsledky ukazují na nízkou specifitu izolovaných protilátek proti O-fosforyl-L-serin obsahujícím proteinům.

Klíčová slova:

IMAC separace fosfopeptidů, IDA-modifikované magnetické částice, slepičí protilátky