

Séparation et identification d'échantillons biologiques complexes par nano LC/MS/MS : une alternative aux gels 2D

M. Smoluch, G. Mitulovic, R. Swart, J.P. Chervet
LC Packings, a Dionex Company, Amsterdam (NL)

L'électrophorèse sur gel bidimensionnelle (2D-GE) est l'outil de prédilection pour la séparation de mélanges complexes de peptides ou de protéines. Cependant, ses limitations sont nombreuses : incapacité à détecter ou séparer les protéines membranaires et les protéines minoritaires, reproductibilité aléatoire, durée du protocole complet, et absence de couplage direct à la spectrométrie de masse.

La nanochromatographie multidimensionnelle constitue une méthode performante et complémentaire à la 2D-GE. En particulier elle permet la détection et la séparation rapide des protéines membranaires avec un couplage direct à la spectrométrie de masse.

En utilisant deux techniques chromatographiques complémentaires (ou davantage), la résolution d'un mélange complexe peut être obtenue en combinant exclusion stérique dans la première dimension, et lipophilie dans la seconde (SEC/RP), ou bien charge ou distribution de charge dans la première dimension, et lipophilie dans la seconde (IEX/RP), pour ne citer que les deux modes bidimensionnels les plus utilisés.

L'automatisation complète de la séparation bidimensionnelle implique l'utilisation d'une instrumentation adaptée : chromatographe en phase liquide capables de délivrer des débits aussi faibles que 200 nL/min pour un couplage LC/MS/MS optimal, injection sans perte d'échantillon, traitement automatique et dessalage de l'échantillon en ligne.

Ce poster décrit l'application de la chromatographie bidimensionnelle (SCX/RP) à la séparation de lysats tryptiques de mélanges protéiques complexes, avec détection et identification des peptides neutres ou chargés, et des protéines, par spectrométrie de masse tandem. Plus de 1000 protéines peuvent être identifiées à partir d'une seule injection, la durée du protocole complet avoisinant 16 heures.