

MASTEROPPGAVE I LEGEMIDDELANALYSE FOR GRADEN MASTER I FARMASI

Vannløselig *dried blood spots*-materiale i proteinanalyse

Utvikling av en LC-MS/MS-metode for bestemmelse av bovint serumalbumin

Quang Tien Huynh



Seksjon for farmasøytisk kjemi
Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Vår 2016

Vannløselig *dried blood spots*-materiale i proteinanalyse

Utvikling av en LC-MS/MS-metode for bestemmelse av bovint serumalbumin

Quang Tien Huynh

Seksjon for farmasøytisk kjemi
Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Vår 2016

Veiledere:

Førsteamanuensis Trine Grønhaug Halvorsen, Farmasøytisk institutt, Universitet i Oslo

Førsteamanuensis Astrid Gjelstad, Farmasøytisk institutt, Universitet i Oslo

Stipendiat Cecilie Rosting, Universitet i Oslo

Copyright Quang Tien Huynh

2016

Vannløselig *dried blood spots*-materiale i proteinanalyse

Utvikling av en LC-MS/MS-metode for bestemmelse av bovint serumalbumin

Quang Tien Huynh

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Forord

Jeg vil først og fremst takke mine tre veiledere: Cecilie Rosting, Trine Grønhaug Halvorsen og Astrid Gjelstad, for all hjelpen og god veiledning under oppgaveskrivingen. En spesiell takk til Cecilie for all hjelp med små og store laboratorieproblemer under hele året, og alle gangene du oppmuntret meg og sa at det alltid ordner seg til slutt.

Tusen takk til alle på analyseavdelingen for et hyggelig arbeidsmiljø og super samhold. Jeg er veldig glad for at jeg fikk oppleve kakefredags-tradisjonen.

Til de andre masterstudentene på avdelingen: Katharina, Magnus, Hilde-Merete og Sazan, takk for et fantastisk år sammen med masse latter, lange kaffepauser og gode (faglige og mindre faglige) samtaler. Masteråret hadde ikke vært det samme uten dere.

En stor takk til mine foreldre og broren min som har støttet og motivert meg gjennom disse fem årene. Takk til alle på kull 2016 for mange uforglemmelige stunder sammen.

Sist men ikke minst vil jeg takke Marius som har vært tålmodig og støttende i den travle perioden, det blir bedre tider nå.

Oslo, mai 2016

Quang Tien Huynh

Sammendrag

Dried blood spot (DBS) er en teknikk for innsamling av blodprøve som baserer seg på at en liten mengde blod blir avsatt på et filterpapir og tørkes, før det blir transportert til laboratoriet for analyse. Kommersielle DBS-kort består som oftest av ren cellulose, og ulemper med bruk av disse kortene er at det gir ufullstendig eluering i tillegg til lang elueringstid. For å unngå disse ulempene ble det i 2012 introdusert av en gruppe på Farmasøytisk institutt i Oslo å bruke vannløselige polymerer som DBS-materiale. Fra 2013 har polymeren karboksymetylcellulose (CMC) blitt brukt som vannløselig DBS-materiale, og dette materialet har vist seg egnet til analyse av mindre legemidler og større proteiner. Videre arbeid med CMC var ønsket for å få mer kunnskap om CMC som DBS-materiale.

I denne oppgaven ble bovint serumalbumin (BSA) brukt som modellanalytt, og i første trinn ble det utviklet en LC-MS metode for å analysere BSA i vannløselig DBS. En enkel prøveopparbeidelse ble benyttet, med tryptisk klipp av proteinet over natt og proteinfelling med acetonitril for å fjerne matrikskomponenter og uklippede proteiner. Prøveopparbeidelsen var ikke robust som forventet, og ga variasjon i signalintensitet i forsøkene. Det ble prøvd å optimalisere prøveopparbeidelsen for å stabilisere standardavvikene, men den endelig metoden var ikke robust som ønsket. Den ufullstendige metoden ble videre brukt til å undersøke effekt av hematokrit, stabilitet og utbytte på det vannløselige materialet.

Det ble sett at blodet med økt hematokritverdi ga en høyere toppareal for BSA og motsatt ved lav hematokritverdi. På grunn av høyt standardavvik var det vanskelig å konkludere resultatet med effekten av hematokrit på det vannløselige materialet, men det viste en trend. Stabilitet av BSA på CMC ble undersøkt ved å sammenlikne DBS lagret over 2,5 uke mot nylig spottet blodflekker med lik konsentrasjon av BSA. Det ble testet for to ulike BSA konsentrasjoner. Stabilitetstesten viste en reduksjon av analytt over tid.

Utbytte av BSA fra CMC ble vurdert ved sammenligning av spiket blod med BSA avsatt på det vannløselige materiale med oppløst DBS tilsatt BSA etter oppløsning med tilsvarende konsentrasjon av BSA i blodflekken. Dette ble gjort for to konsentrasjoner (100 µg/mL og 500 µg/mL) og resultatet viste et utbytte på 133,8 % for 100 µg/mL og 127,5 % for 500 µg/mL.

Innholdsfortegnelse

1	Forkortelser	1
2	Innledning.....	2
2.1	Bakgrunn	2
2.2	Hensikt.....	3
3	Teori	5
3.1	<i>Dried blood spots</i>	5
3.1.1	DBS på vannløselige materialer	5
3.1.2	Karboksymetylcellulose	6
3.2	Separasjon og deteksjon v.h.a væskekromatografi og massespektrometri.....	6
3.2.1	Væskekromatografi	6
3.2.2	Massespektrometri	7
3.2.3	Matrikseffekter	11
3.3	Aminosyrer, peptider og proteiner.....	11
3.3.1	Modellanalytt: Bovint serumalbumin.....	12
3.4	Analyse av proteiner vha LC-MS/MS	12
3.4.1	Bottom-up-strategi	12
3.4.2	Prøveopparbeidelse av proteiner i vannløselig DBS.....	13
3.4.3	Proteinfelling.....	14
4	Materialer	15
4.1	Kjemikalier, analytter og utstyr	15
4.2	Blod	16
4.3	Materiale for dried blood spots.....	16
4.4	Løsninger.....	17
4.4.1	Løsninger.....	17
4.4.2	Løsninger til tryptisk proteolyse	17
4.4.3	Mobilfase.....	18
5	Metoder	19
5.1	Prøvepåsetting og oppløsning av spot	19
5.1.1	Prøvepåsetting på materiale	19
5.1.2	Oppløsning av DBS.....	19
5.2	Proteolyse	19

5.2.1	<i>In-solution</i> -proteolyse	19
5.2.2	Proteolyse av <i>DBS</i>	20
5.2.3	Matriksfelling	20
5.2.4	Tillaging av blod med BSA	21
5.2.5	Tillaging av hematokritblod til hematokritforsøk	21
5.3	LC-MS analyse av BSA	22
5.3.1	Instrumentelle betingelser	22
5.3.2	MS-parametere	23
5.4	Databaser og dataverktøy	24
5.4.1	ProteinProspector	24
5.4.2	BLAST	25
5.4.3	Proteome Discover	25
6	Resultater og diskusjon	26
6.1	Kartlegging av potensielle signaturpeptider	26
6.1.1	Potensielle signaturpeptid	26
6.2	Utvikling av trippelkvadropol-metode	29
6.2.1	Productscan	29
6.2.2	SRM	30
6.2.3	Kalibreringskurve BSA in-solution	31
6.3	Analyse av BSA fra <i>DBS</i>	32
6.3.1	Innledende forsøk	33
6.3.2	<i>DBS</i> Kalibreringskurve	34
6.3.3	Repeterbarhet	36
6.4	Optimalisering av metode	36
6.4.1	Forlengelse av gradient	36
6.4.2	Monitorering av de ulike trinnene i prøveopparbeidelse	37
6.4.3	Endring av inndampingsmetode	39
6.5	Evaluering av vannløselig <i>DBS</i>	40
6.5.1	Utbytte av oppløsningstrinnet	40
6.5.2	Stabilitet	41
6.5.3	Effekt av hematokrit	42
7	Konklusjon	44
8	Videre arbeid	45

Litteraturliste	46
9 Vedlegg	51

1 Forkortelser

ABC	Ammoniumbikarbonat
ACN	Acetonitril
BSA	Bovint serumalbumin
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CID	<i>Collision induced dissociation</i> / kollisjonsindusert dissosiasjon
CMC	<i>Carboxymethyl cellulose</i> / karbokymetylcellulose
DBS	Dried Blood Spot
DTT	1,4-dithiothreitol
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> / etylendiamintetraacetat
ESI	<i>Electrospray ionization</i> / elektroprayionisering
hCG	<i>Human chorionic gonadotropin</i> / humant koriongonadotropin
IAA	2-jodeddiksyre
LC	Væskekromatografi
LC-MS	<i>Liquid chromatography–mass spectrometry</i> / væskekromatografi koblet til massespektrometri
MeOH	Metanol
MS	<i>Mass spectrometry</i> / massespektrometri
<i>m/z</i>	Masse/ladning
rcf	Relative centrifugal force
rpm	<i>Revolutions per minute</i> / omdreininger per minutt
RSD	<i>Relative standard deviation</i> / relativt standardavvik
SPE	<i>Solid-phase extraction</i> / fast-fase ekstraksjon
SRM	Selected reaction monitoring
(v/v)	volum/volum
qQq	Trippelkvadrupol

2 Innledning

2.1 Bakgrunn

Dried blood spots (DBS) er en teknikk som går ut på å avsette et lite volum blod på et filterpapir. Blodet tørkes på dette papiret og oppbevares før det skal analyseres. Denne teknikken ble først introdusert i 1963 av Guthrie og Susi for screening av metabolske sykdommer [1], og har siden da vært en populær metode for prøvetaking for mer enn 30 forskjellige sykdommer hos nyfødte barn. Teknikken har derfor vært med på å redde mange liv [2]. I prinsippet kan alle analytter som blir analysert fra fullblod, serum, eller plasma også bli målt fra DBS på et filterpapir [3].

Fordelen med DBS er at metoden er mindre invasiv og relativt smertefri og er spesielt egnet for prøvetaking av blod hos nyfødte og eldre [3]. Andre fordeler med DBS er at det også kan utføres av personer som ikke har spesialopplæring, i motsetning til vanlig blodprøvetaking. De fleste analyttene har også økt stabilitet i tørket form, i tillegg til at de er enkle å transportere [4].

Tross for den økende populariteten i bruken av DBS, har metoden en del utfordringer som må tas i betraktning. Blodets hematokritverdi påvirker viskositeten av blodet, og ved høy hematokrit vil viskositeten i blodet være høy, og motsatt ved lav hematokrit [5]. Viskositet av blodet vil påvirke flyten av blod på DBS-materialet, og likt volum blod med ulik hematokritverdi kan gi forskjellig størrelse av blodflekk.

DBS-filterpapiret består som oftest av uløselig cellulose, og en utfordring med dette er å få fullstendig eluering fra materialet. Dette er et avgjørende trinn for videre prøveopparbeidelse med tanke på det begrensede prøvevolumet som er tilgjengelig [6]. På bakgrunn av dette ble det i 2012 introdusert bruk av vannløselige prøvetakingsmateriale på Farmasøytisk institutt Universitet i Oslo [7]. Fordelen med bruk av vannløselige materiale er at hele analytten i den stansede blodflekken blir tilgjengelig fra oppløsning og videre til prøveopparbeidelse [8]. I tillegg er elueringstiden raskere sammenlignet med de kommersielle tilgjengelige DBS-kortene [7]. Det vannløselige cellulosemateriale blir oppløst i løpet av 20 minutter, sammenlignet med cellulosebaserte DBS som tar lengre tid [7]. Tidligere har vannløselig materiale av typen karboksymetylcellulose (CMC) blitt brukt som DBS-materiale til analyse

av små legemidler og store proteiner [9]. Bruk av CMC til DBS er fortsatt i et tidlig stadiet og det trenges dermed mer kunnskap om vannløselig DBS i proteinanalyse.

2.2 Hensikt

Målet med denne oppgaven var å utvikle og optimalisere en metode for å bestemme modellanalytten bovint serumalbumin (BSA) i DBS på det vannløselige materialet karboksymetylcellulose.

Følgende delmål ble satt:

- Utvikle en analysemetode for BSA på LC-MS basert på bestemmelse av signaturpeptider.
- Utvikle og optimalisere en enkel prøveopparbeidelse for BSA fra vannløselig DBS basert på tryptisk klipping og matriksfelling.
- Bruke metoden til å gjøre innledende evaluering av materialet med tanke på:
 - Effekt av hematokrit
 - Stabilitet av proteiner på materialet
 - Utbytte fra materialet

Innledning

3 Teori

3.1 *Dried blood spots*

Dried blood spot (DBS) har lenge vært en teknikk som er blitt brukt for å analysere prøver. Det er flere fordeler med bruk av DBS, for det første så kreves det minimalt med blod sammenlignet med blodtaking fra venepunksjon. Vanligvis trengs det ikke mer enn 100 µL blod [4], derfor er DBS en godt egnet analysemetode for testing av analytter innen prekliniske studier av små dyr der volumblod er begrenset [10]. De fleste analyttene er stabile over tid på filterpapiret, men degradering av analytter kan oppstå i DBS [4].

Prøvetaking for DBS er enkel og det kreves lite opplæring for å ta disse prøvene. Et stikk på fingeren eller på hælen er nok for å få tak i bloddråpen [4]. Etter blodet er påsatt på kortet, blir det lagt og tørket i romtemperatur i 2-3 timer. Ved analyse av DBS blir det stanset ut en disk fra den tørkede blodflekken, og analytten blir ekstrahert fra filterpapiret i en blanding av organisk løsemiddel og vann[11].

En kjent utfordring med DBS er påvirkningen av blodets hematokritverdi, dvs. den volumfraksjon av fullblod som utgjøres av røde blodceller. Hematokritverdien varierer mellom individer med ulik kjønn og alder, og med forskjellige sykdomstilstand, som for eksempel anemi og polycytemi. Den normale hematokritverdien for friske mennesker ligger på 35 % - 50 % [12].

3.1.1 DBS på vannløselige materialer

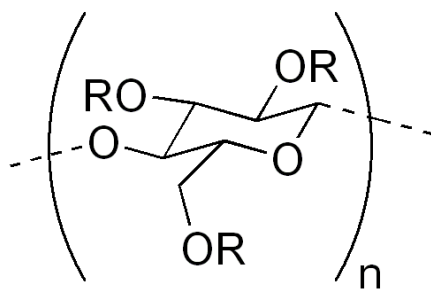
Tidlige har vannløselige materialer i form av alginat- og kitosanskum blitt brukt som materiale for DBS. Disse materialene En av årsakene til at det er ønsket å bruke vannløselige materialer til DBS er å få fullstendig eluering av blodflekken og raskere oppløsningstid [7].

3.1.2 Karboksymetylcellulose

Karboksymetylcellulose (CMC) er et cellulosederivat med karboksymetylgrupper (-CH₂-COOH) bundet til hydroksylgruppen av glukopyranose-monomeren som til sammen utgjør cellulose ryggraden [13]. Struktur av CMC er vist i figur 3.1.1. Egenskapen til CMC er avhengig lengden på cellulosekjedene og graden av forgreininger av karboksymetylgrupper.

Løseligheten av CMC er avhengig av den gjennomsnittlige substitusjonsgraden av hydroksylgrupper per glukoseenhet. Ved en substitusjonsgrad under 0,4 vil CMC ikke løses opp, men bare svulle. Når substitusjonsgraden er over 0,4 er CMC fullstendig løselig. Kommersielle produkter av CMC har typisk en substitusjonsgrad mellom 0,65 – 1,45 [14].

CMC blir ofte brukt i sårbehandling og som stabilisator i mat og kroppspleieprodukter, og som farmasøytisk hjelpestoff [15].



Figur 3.1.1: Struktur av CMC, R=H eller R=CH₂COOH.

3.2 Separasjon og deteksjon v.h.a væskekromatografi og massespektrometri

3.2.1 Væskekromatografi

Et HPLC-apparat inneholder vanligvis et reservoar av mobilfase, pumpe, en injektor, en separasjons kolonne, og en detektor. Omvendt fase væskekromatografi er den mest brukte metoden til å separere komplekse peptidprøver [16]. I omvendt-fase-kromatografi er den stasjonære fasen hydrofob, og mobilfasen er en vandig løsning. Ved hydrofobe interaksjoner

mellom peptider og den stasjonære fasen, vil forskjellige peptider kunne bli separert ut ifra ulik hydrofobisitet.

NanoLC-MS er et viktig steg innen identifisering av peptider, og i det siste har utviklingen gjort det lettere å analysere mer komplekse prøver [16]. Fordeler med nedskalering av LC systemet er at det gir økt sensitivitet i separasjon i forhold til konvensjonelle HPLC i tillegg til reduksjon av mengde mobilfase som trengs for analyse [17, 18].

3.2.2 Massespektrometri

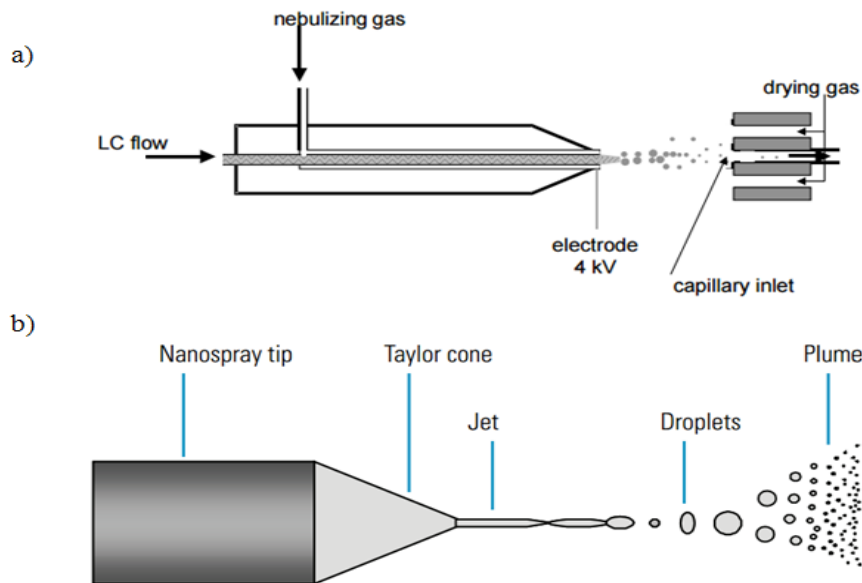
Massespektrometri er en analytisk metode der analytter blir ionisert og omdannet til ladede ioner, som deretter blir separert og detektert ut ifra deres forhold mellom masse (m) og ladning (z). Et massespektrometer består av tre hovedkomponenter: en ionekilde hvor stoffet blir introdusert ladede ioner fra LC til MS, en masseanalysator hvor stoffene blir separert etter m/z -verdier og en detektor som produserer signaler basert på ioner som blir fanget opp. Det finnes mange typer massespektrometere, men felles for alle er at det brukes et magnetisk- og/eller elektriskfelt for å drive de ladede ionene videre.

Ionekilde – elektroprayionisering

Etter at analyttene er separert fra HPLC, føres prøven videre inn i ionekilden i en flyktig væskestrøm for å ioniseres [19]. Elektroprayionisering (ESI) er en myk ioniseringsteknikk som ofte blir brukt i massespektrometri for å ionisere makromolekyler til små dråper ved bruk av en elektropray som genererer høy spenning for å lage en aerosol fra en væske [20, 21]. Prinsippet bak ESI er at væskestrømmen fra HPLC-kolonnen passerer gjennom et trangt kapillærrør med høy spenning (2-5 kV) slik at det dannes en sky av små dråper med elektrisk ladning der væsken etter hvert fordampes (figur 3.2.1). I dette prosjektet blir det brukt nanoESI.

Konvensjonell ESI brukes i kombinasjon med kapillær og konvensjonell HPLC brukes en høyere flowhastighet (10 $\mu\text{L}/\text{min}$ – 1 ml/min) i sammenligning med nanoESI [22]. Det høye volumet av væske trenger dermed mer tørkegass og varme til fordamping før det kan ioniseres. I nanoESI er flowhastigheten lavere (vanligvis 10 nL/min til 1 $\mu\text{L}/\text{min}$) dermed

kreves det ikke like mye tørkegass til fordamping av mobilfasen før ioniseringen. Fordeler med bruk av nanoESI er at sammenlignet med konvensjonelle ESI er det er et mindre væske som kommer inn til elektroprayen, og dermed vil det kunne dannes mindre aerosoldråper. NanoESI er mer effektiv enn konvensjonelle ESI ved at det gir en økt sensitivitet av signalrespons til massespektrometeret. Analyttmolekylene dyttes videre inn til masseanalysatoren ved hjelp av elektrisk spenning [23].

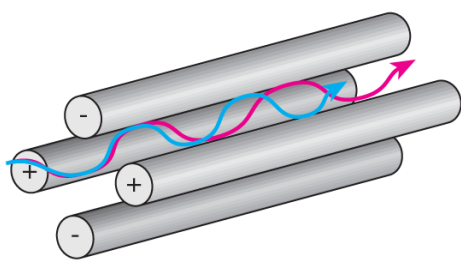


Figur 3.2.1: a) Prinsipp for elektroprayionisering, b) dannelse aerosol fra en nanoESI. Hentet fra [23].

Etter at ioniseringen har skjedd, vil ionene bli ledet inn i en masseanalysator der ionene vil bli separert ut i fra forskjeller i m/z [24]. En masseanalysator har som oppgave å separere ioner. Det finnes flere forskjellige typer masseanalysatorer og i denne oppgaven ble det brukt trippelkvadrupol og lineær ionefelle kombinert med orbitrap som masseanalysator.

Masseanalysator - Trippelkvadrupol

En kvadrupol består av fire parallelle metallstaver som står i hvert hjørne i et kvadrat, der to og to metallstaver er koblet sammen med lik verdi (figur 3.2.2). Ved tilføring av strøm gjennom metallstavene blir det dannet et elektrisk kvadrupolfelt. Det elektriske feltet virker som et filter slik at kun visse ioner passerer gjennom feltet, basert på deres m/z -verdier [25, 26]. Ved å variere på spenningen vil ioner med forskjellig masse kunne slippe igjennom kvadrupolfeltet og registreres av detektoren [19].

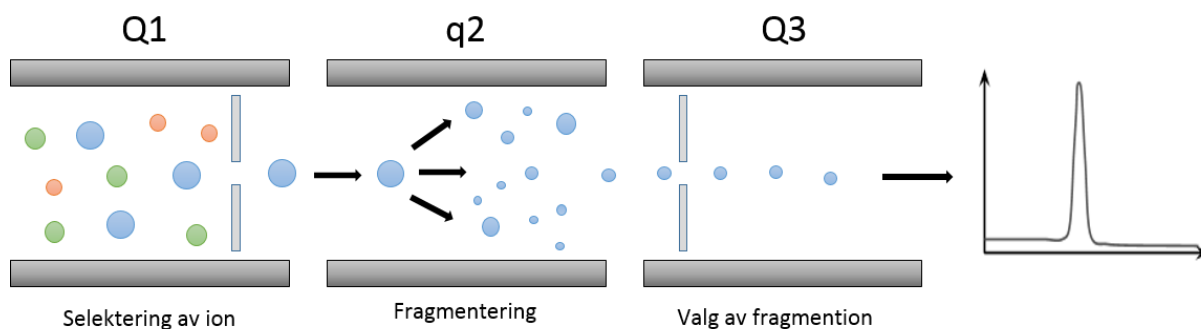


Figur 3.2.2. Skisse av kvadrupol hentet fra [27].

I en trippelkvadrupol ligger tre kvadrupoler etterfulgt av hverandre, der den første kvadrupol (Q1) og den tredje kvadrupol (Q3) selekterer og filtrerer ioner. Den andre kvadrupol (q2) virker som en kollisjonscelle, der valgte precursor-ioner fra Q1 blir fragmentert til produktioner. Ionene blir filtrert i Q3 og utvalgte ioner føres videre til detektor [26].

SRM

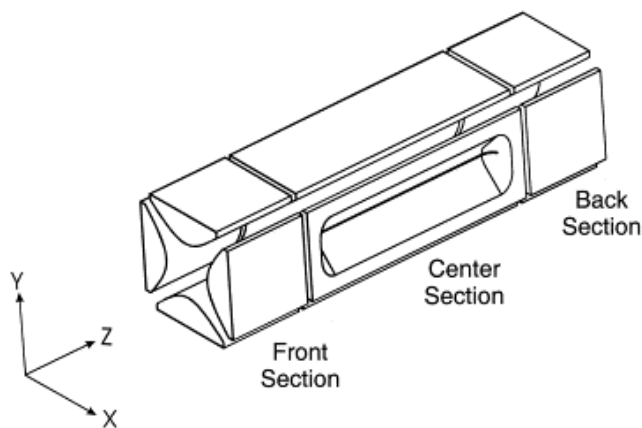
Valgte analytt blir separert i LC og ført videre til masseanalysatoren for fragmentering og selektering. Selected reaction monitoring (SRM) er den mest selektive og sensitive metoden som kan brukes ved analyse på en trippelkvadrupol. I en SRM-metode blir et ion valgt ut i Q1 som precursor, og i Q3 velges fragmenter som spesifikk tilhører ionet som er blitt valgt i Q1 [28] (Figur 3.2.3).



Figur 3.2.3: *Selective reaction monitoring* (SRM). Valg av ion som precursor i Q1 og fragmenteres i Q2. Valg av fragmention i Q3 som skal analyseres.

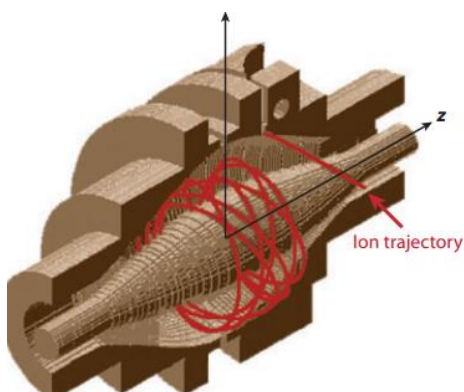
Masseanalysator – Lineær ionefelle-orbitrap

Masseanalysatorer av typen kvadrupol og ionefelle brukes sjeldent alene som eneste masseanalysator, men ofte i kombinasjon med en masseanalysator. LTQ orbitrap er et system som består av to masseanalysatorer plassert etter hverandre, en lineær ionefelle og en orbitrap, der orbitrapen er har en høyere oppløsning og bedre massenøyaktighet [29]. Utformingen av en lineær ionefelle er lignende som en kvadrupol, bestående av fire parallelle metallstenger med vekselspanning gjennom stengene for å holde igjen ionene (se figur 3.2.4). Fordelen med en lineær ionefelle sammenlignet med en standard ionefelle er at den har en større lagringskapasitet av ioner [30].



Figur 3.2.4: Enkel skisse av en linear ionefelle [31].

I orbitrap blir ionene fanget i et elektrostatisk felt der ionene sirkulerer rundt elektroden på grunn av sentrifugalkreftene fra spindelen og den tiltrekkende kraften fra elektroden, og beveger seg i bane fram og tilbake rundt aksen (Figur 3.2.5) [32, 33].



Figur 3.2.5 Skisse av orbitrap, hentet fra [34].

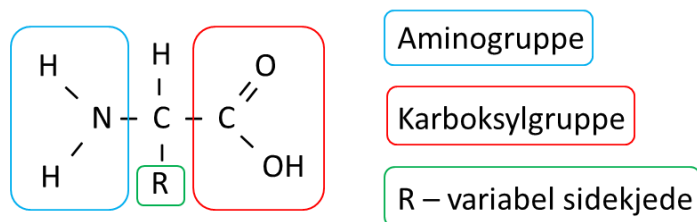
3.2.3 Matrikseffekter

Matrikseffekter er en uønsket effekt som oppstår når komponenter i prøven som ikke tilhører analytten blir analysert. Denne effekten kan påvirke prøvekvaliteten og kan enten vises som en ionesuppresjon eller ioneforsterkning [35, 36].

Matrikseffekter kan unngås ved utførelse av korrekt prøveopparbeidelse for å fjerne urenheter som koeluerer sammen med analytten. Det er ved bruk av elektroprayionisering at matrikseffekter er mest utsatt for å oppstå [35]. Den eksakte mekanismen bak matrikseffekter er ennå ikke fullstendig forstått [37].

3.3 Aminosyrer, peptider og proteiner

Aminosyrer er byggemateriale i alle levende celler. Aminosyrer er organiske syrer som består av en aminogruppe, en karboksylsyre og en sidekjede (R-gruppe), og det finnes totalt 20 ulike aminosyrer der sidekjedene er forskjellige (Figur 3.3.1). Sammenkobling av aminosyrer til peptider skjer mellom amino- og karboksylsyregrupper, der det oppstår en peptidbinding mellom to aminosyrer.

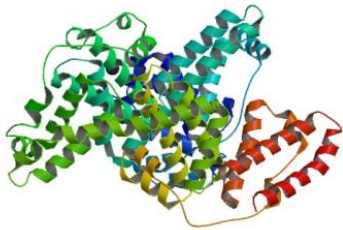


Figur 3.3.1 Generell struktur for aminosyrer.

Alle proteiner er bygget opp av aminosyrer, og lengden på aminosyresekvensen avgjør om det er et protein eller et peptid. Lengden på aminokjeden for peptider er kortere og er begrenset til å inneholde rundt 50 aminosyrer.

3.3.1 Modellanalytt: Bovint serumalbumin

Bovint serumalbumin, også kjent som BSA eller fraction V, blir ofte brukt som standard i forsøk fordi det ikke påvirker andre funksjoner hos proteiner og er et rimelig produkt å produsere, da store mengder blir utvunnet fra bovint blod. Struktur av BSA er vist i Figur 3.3.2.

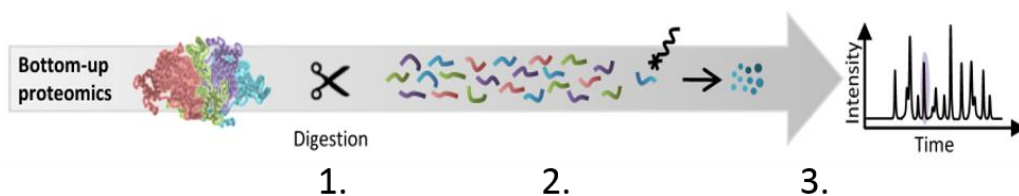


Figur 3.3.2: Tredimensjonal struktur av BSA, hentet fra [38].

3.4 Analyse av proteiner vha LC-MS/MS

3.4.1 Bottom-up-strategi

I prinsippet finnes det to metoder å utføre en proteinanalyse på, enten ved å analysere hele proteinet intakt, eller ved å utføre en proteolyse, der proteinet blir brutt ned til mindre peptider ved bruk av enzymer. Den sistnevnte metode blir ofte kalt for «bottom-up»-analyse, og er den mest brukte metoden for analyse av komplekse proteinprøver (Figur 3.4.1) [39]. Forskjellige typer enzymer (proteaser) har ulik spesifisitet og effekt, og i det fleste «bottom-up»-analyser blir trypsin brukt som enzym, pga. av dets spesifisitet. En av fordelene med en «bottom-up»-prinsippet er at det gir en bedre «FRONT-END» separasjon av peptidene og høyere sensitivitet, sammenlignet med å analysere hele proteinet intakt. En ulempe ved utførelse av «bottom-up» er at det ikke alle peptider blir detektert på grunn av modifikasjoner under proteolysen, i tillegg kan klipping ved feil posisjon på proteinet oppstå [32].



Figur 3.4.1: Fremgangsmåte for utførelse av «bottom-up»-strategi: 1. Tryptisk klipp av proteinet, 2. separasjon av peptider, 3. MS analyse av spesifikke peptider. Figur modifisert fra [39].

Før et protein kan spaltes til peptider, må proteinet gjennom en prosess for å klargjøres til klipping. Dette involverer redusering og alkylering av disulfidbindinger. For at trypsin skal være tilgjengelig ved klippestedet, må den tredimensjonale strukturen av proteinet bli brutt opp. For å bryte disulfidbindinger blir det som oftest brukt ditiotretiol (DTT) som reduseringsreagens, ofte i kombinasjon med høy temperatur. For at disulfidbindingene ikke skal gjendannes blir det tilsatt et alkyleringsreagens for å mette sulfhydryl-gruppene. Ofte benyttes 2-jodeddiksyre (IAA) som alkyleringsreagens. Trypsin spalter ved karboksyl-terminalen (C-terminalen) av aminosyren arginin og lysin, men ikke hvis aminosyren prolin kommer etter [40].

3.4.2 Prøveopparbeidelse av proteiner i vannløselig DBS

Prøveopparbeidelse er et viktig trinn innen LC-MS-basert proteianalyse på grunn av biologiske prøvematrikser ofte inneholder komplekse blandinger av proteiner og peptider. Ved oppløsning av CMC, vil løsningen inneholde blodkomponenter, analytt og oppløst cellulose, dermed trengs det å utføre en prøveopparbeidelse før prøveløsningen er klar til injisering i LC-MS.

Det har tidligere blitt gjort to forsøk med CMC som vannløselig DBS-medium. I det ene arbeidet ble humant koriongonadotropin (hCG) brukt som modellanalytt [6]. Etter oppløsning av CMC ble det gjort en omfattende prøveopparbeidelse med fokus på immunoaffinitet før klipping av proteinet. Det ble deretter utført en oppkonsentrering av prøveløsningen ved bruk av SPE før injeksjon.

I det andre forsøket ble det brukt insulin som proteianalytt på CMC [9]. Insulin er et lite protein som ikke trenger å klippes før injisering. Her ble en enkel prøveopparbeidelse med proteinfelling med acetonitril brukt til fjerning av CMC-materialer og matrikskomponenter. I tillegg har CMC vist å ha fordeler med å fremme effekten av proteinfellingen og gitt renere prøver [9].

3.4.3 Proteinfelling

Blod er en kompleks blanding som består av 55 % plasma, 45 % røde blodceller og ca. 1 % hviteblodceller. Resterende er proteiner, små uladete forbindelser og ioner. Proteinfelling er en prøveopparbeidelsesmetode som kan fjerne proteiner og andre forbindelser i en prøve før analyse. Dersom prøveløsninger blir injisert direkte uten å ha utført proteinfelling, vil kolonnen lettere bli tett og signalene for analysen bli mer utsatt for matrikseffekter.

Det finnes fire hovedgrupper av reagenser som kan brukes til å felle proteiner, syrer, organiske løsningsmidler, mettede saltløsninger og ved bruk av metallioner [41]. Eksempler på reagenser som ofte blir brukt til felling er metanol, acetonitril og trikloreddiksyre [19]. Acetonitril er funnet til å være den mest effektive organiske løsningsmiddelet til bruk ved proteinfelling [41].

Proteinfelling er en rask og enkel prøveopparbeidelse for opprensning av prøveløsninger for fjerning av uønskede forbindelser fra blodet. En ulempe med proteinfelling er at i blodet finnes det albumin, som er en kjent bærer av enkelte proteiner og hormoner, og ved fjerning av disse proteinene kan det føres til tap av ønsket biomarkør [42].

4 Materialer

4.1 Kjemikalier, analytter og utstyr

Tabell 4.1 til og med 4.5, lister opp kjemikalier, analytter og utstyr benyttet i denne oppgaven.

Tabell 4.1: Kjemikalier

Kjemikalier	Kvalitet	Produsent	By/land
Acetonitril	Hypergrade for LC-MS	Merck	Darmstadt, Tyskland
Ammoniumbikarbonat (ABC)	Bioultra $\geq 99,8$ %	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Bovint Serumalbumin (BSA)	≥ 96 %	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
DTT (1,4-ditiotretiol)	≥ 99 %	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
IAA (2-jodeddiksyre)	~ 99 %	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Maursyre	~ 98 %, for mass spectrometry	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Metanol	Hypergrade for LC-MS	Merck	Darmstadt, Tyskland
Trypsin fra bovin pankreas	TPCK behandlet	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA

Tabell 4.2: Utstyr til trippelkvadrupol

Utstyr	Modell	Produsent	By/ land
Autosampler/-injektor	WPS-3000 TPL-RS	Thermo Scientific	Germring, Tyskland
Filter	Screen 1/16" OD 1 μ m	Technolab	Florida, USA
Masseanalysator	TSQ Quantiva	Thermo Scientific	Sunnyvale, CA, USA
Oppkonsentreringskolonne	C18 Pepmap 300 μ m x 5mm, 5 μ m, 100 A	Thermo Scientific	Sunnyvale, CA, USA
Programvare	Xcalibur v. 2.0.7 SP1 Chromeleon v. 6.80 SR6	Dionex corp.	Sunnyvale, CA, USA Thermo scientific, Rockford, IL, USA
Pumpe	MCS 3500 RS NANO	Thermo Scientific	Sunnyvale, CA, USA
Separasjonskolonne	Acclaim PepMap™, nanoViper C18, 75 μ m x 15 cm, 3 μ m, 100 A	Thermo Scientific	Amsterdam, Nederland

Tabell 4.3: Utstyr til LTQ oritrap

Utstyr	Modell	Produsent	By/ land
Autosampler/-injektor	WPS-3000TRS	Thermo Scientific	Sunnyvale, CA, USA
Detektor	LTQ XL / LTQorbitrap discovery	Thermo Scientific	Rockford, IL, USA
Loadingpumpe	ISO-3100	Thermo Scientific	Sunnyvale, CA, USA
Mikropumpe	LPG-3400 M	Thermo Scientific	Sunnyvale, CA, USA
Oppkonsentreringskolonne	C18 Pepmap 300 μ m x 5mm, 5 μ m, 100 A	Thermo Scientific	Sunnyvale, CA, USA
Orbitrap	LTQ Orbitrap Discovery	Thermo Scientific	Sunnyvale, CA, USA
Programvare	Xcalibur v. 2.0.7 SP1 Chromeleon v. 6.80 SR6	Dionex corp.	Sunnyvale, CA, USA Thermo scientific, Rockford, IL, USA
Separasjonskolonne	Acclaim PepMap™, nanoViper C18, 75 μ m x 15 cm, 3 μ m, 100 A	Thermo Scientific	Amsterdam, Nederland

Materialer

Tabell 4.4: Utstyr, ikke forbruksmateriell

Utstyr	Modell	Produsent	By/land
Analysevekt	Toledo XS205 Dual Range	Mettler Toledo	Oslo, Norge
Automatpipette	m10, m20, m100, m200, m1000, m5000	Sartorius/Biohit	Helsinki, Finland
Hematokrit-sentrifuge	Hematokrit 4	Dan Meszansky AS	Oslo, Norge
Liten sentrifuge	Galaxy mini	VWR	Radnor, PA, USA
Mikser	Thermomixer comfort	Eppendorf	Hamburg, Tyskland
Nitrogenavdamper	Dri-Block® DB-30	Techne	Staffordshire, Storbritania
Sentrifuge	Centrifuge 5804	Eppendorf	Hamburg, Tyskland
SpeedVac Vapor trap	Spd121p Rvt4104	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
Ultralydbad	Ultrasonic Cleaner	VWR	Radnor, PA, USA
Vannrenseanlegg	Integral 3	Millipore	Molsheim, Frankrike
Vekt	AE200	Mettler Toledo	Oslo, Norge

Tabell 4.5: Utstyr, forbruksmateriell

Utstyr	Modell	Produsent	By/land
Eppendorfrør, LoBind (for proteiner)	Protein LoBind tube 1,5 mL og 2,0 mL	Eppendorf AG	Hamburg, Tyskland
Hematokrit-kapillærrør	Baxter	Baxter Scientific	Deerfield, IL, USA
Korker til vialer	Hvite	Nerliens Meszansky	Oslo, Norge
Micro-insert	31x6mm, 0,1 mL, clear glass	VWR International	Leuven Belgia
Pipettespisser	Optifit (10 µL, 200 µL) Finntip® (5 mL)	Sartorius Thermo Scientific	Helsinki, Finland Vantaa, Finland
Sentrifugerør	15 mL med skrukork	VWR International	Leuven, Belgia
Vialer	32x11,6 mm	Nerliens Meszansky	Oslo, Norge

4.2 Blod

Fullblod ble donert av friske, frivillige fra Farmasøytisk institutt. Blodet ble tappet i rør tilsatt antikoagulasjonsmiddelet EDTA. Blodet ble porsjonert i mindre eppendorfrør og lagt til frysing, og ble tint før bruk. Nytt tappet blod ble brukt til hematokrit-forsøket.

4.3 Materiale for dried blood spots

Blod ble avsatt på Aquacel® Hydrofiber®, fra ConvaTec, Deeside Storbritannia.

4.4 Løsninger

4.4.1 Løsninger

50 mM ABC-buffer

39.53 mg av tørrstoff veies ut, og løses i 10 mL ionebyttet vann. Bufferen lages ny for hver laboratoriedag.

20 mM maursyre

En kolbe fylles nesten helt fylt med ionebyttet vann, deretter tilsettes 75,4 μL konsentrert maursyre. Kolben fylles til 100 mL med ionebyttet vann.

BSA-løsning

1 mg/mL: 1 mg av tørrstoff veies ut, og løses i 1 mL ABC-buffer.

100 $\mu\text{g/mL}$: Tas ut 100 μL av 1 mg/mL løsning av BSA og blandes med 900 μL ABC-buffer.

4.4.2 Løsninger til tryptisk proteolyse

Reduseringsagens

Utveid tørrstoff oppbevares i kjøleskap, løsningen lages rett før bruk.

50 mM: 7.7125 mg av tørr DTT veies ut, og løses i 1 mL ABC-buffer.

500 mM: 7.7125 mg av tørr DTT veies ut, og løses i 100 μL ABC-buffer.

Alkyleringsreagens

Utveid tørrstoff oppbevares mørkt i fryser, og løsningen lages rett før bruk

200 mM : 37.19 mg av tørr IAA, som ble løst i 1 mL ABC-buffer rett før bruk.

2000 mM: 37.19 mg av tørr IAA, som ble løst i 100 μL ABC-buffer rett før bruk

Trypsinløsning

Bruker 50 $\mu\text{g/mL}$ trypsin til *in-solution*-proteolyse, og 1 mg/mL trypsinløsning i oppløsningsmediumet av DBS.

1 mg/mL: Veier ut 1 mg trypsin i eppendorfrør og tilsetter 1 mL ABC-buffer.

50 $\mu\text{g/mL}$: tar ut 50 μL av trypsinløsning 1 mg/mL og tilsetter 950 μL ABC, blander godt.

4.4.3 Mobilfase

Det ble benyttet 4 løsninger i denne oppgaven: 3 mobilfaser og loading buffer.

Mobilfase A bestod av 95 % 20 mM maursyre og 5 % ACN, mobilfase B bestod av 95 % ACN og 5 % maursyre, vaskeløsning bestod av 70 % MeOH og 0.02 % maursyre, og loading buffer bestod av 98 % 20 mM maursyre og 2 % ACN.

Mobilfase A: Lagde 100 mL av 20 mM maursyre, tok ut 5 mL av løsningen og erstattet med 5 mL ACN.

Mobilfase B: Målte opp 95 mL ACN, og tilsatte 5 mL 20 mM maursyre.

Vaskeløsning: 20 mM maursyre i 75 mL i ionebyttet vann, fylte 175 mL med metanol.

Loading buffer: Lagde 250 mL 20 mM maursyre, 5 mL tas ut og erstattet med 5 mL ACN.

Løsningene settes på ultralydbad i 5-10 minutter for å fjerne luftbobler.

5 Metoder

5.1 Prøvepåsetting og oppløsning av spot

5.1.1 Prøvepåsetting på materiale

En dråpe fullblod på 5 μL blir avsatt på CMC prøven tørkes i romtemperatur i minst 2 timer.

5.1.2 Oppløsning av DBS

Hele blodflekken klippes ut og overføres til eppendorfrør. 180 μL ABC-buffer tilsettes, og prøven ristes på mikser ved 2000 rpm til blodflekken er oppløst.

5.2 Proteolyse

5.2.1 *In-solution*-proteolyse

Konsentrasjon av BSA som skal klippes er 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$

1. Tar ut 10 μL av 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA-løsningen, og tilsetter 990 μL ABC-buffer.
2. 3 μL 50 mM DTT-løsningen tilsettes og prøven ristes på mikser i 15 minutter ved 60 $^{\circ}\text{C}$.
3. Prøven avkjøles før 5 μL 200 mM IAA tilsettes og prøven settes mørkt i 15 minutter.
4. 10 μL trypsin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) tilsettes og prøven settes til proteolyse i mikser over natt ved 37 $^{\circ}\text{C}$.

5.2.2 Proteolyse av DBS

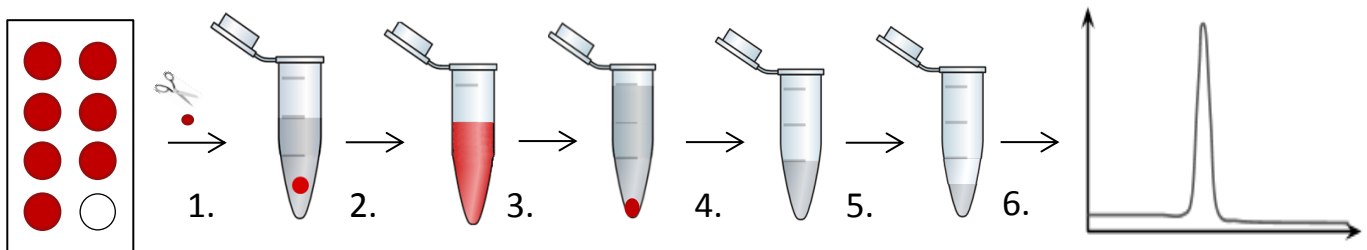
1. Etter oppløsning av blodflekker, tilsettes 4 μL 500 mM DTT, og ristes på mikser i 15 minutter ved 60 °C.
2. Prøvene avkjøles til romtemperatur og tilsettes 6 μL 2000 mM IAA. Prøvene settes mørkt i 15 minutter.
3. 10 μL 1 mg/mL trypsin tilsettes og prøvene ristes på 37 °C over natt.

5.2.3 Matriksfelling

Etter proteolyse, settes prøvene i kjøleskap for avkjøling. Deretter ble prøvene rensset opp med følgende prosedyre.

1. 1000 μL iskaldt ACN tilsettes prøven, og ristes godt, deretter settes prøven i fryser i 15 minutter.
2. Prøvene sentrifugeres 14000 rpm i 10 minutter. 500 μL av supernatant overføres til nytt eppendorfrør, og dampes inn på SpeedVac ved 40 °C.
3. Prøvene reløses i 50 μL 20 mM maursyre, ristes godt, og deretter sentrifugert ved 14000 rpm i 10 minutter. 30 μL prøve overføres til vial og analyseres.

Hele prosedyren for prøveopparbeidelse av DBS er vist i Figur 5.2.1:



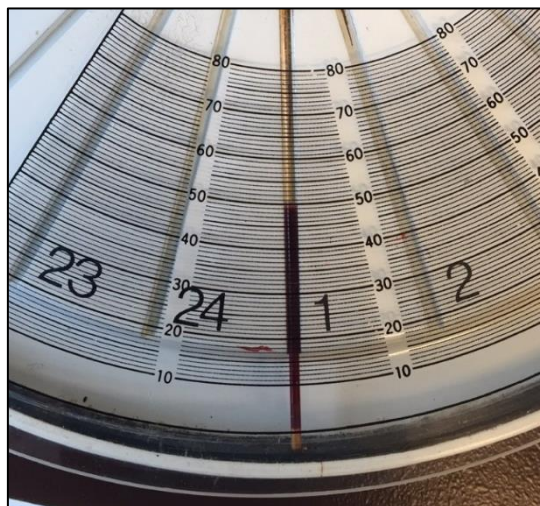
Figur 5.2.1: 1. De tørkede blodflekkene klippes ut og overføres til eppendorfrør tilsatt 180 μL ABC-buffer 2. DBS løses opp og 4 μL DTT tilsettes og legges i 60 °C i 15 minutter. 6 μL IAA tilsettes og legges mørkt i 15 minutter. 10 μL trypsin tilsettes og legges i 37 °C over natt 3. 1000 μL iskald ACN tilsettes, og sentrifugeres 14 000 rpm i 10 minutter 4. 500 μL supernatant overføres til nytt rør, og dampes inn i vakuum i 40 °C 5. Prøven reløses i 50 μL maursyre og sentrifugeres 14 000 rpm i 10 minutter 6. 30 μL av prøven injiseres til analyse på LC-MS.

5.2.4 Tillaging av blod med BSA

Det frosne blodet ble tint opp før bruk og tilsatt analytt til ønsket konsentrasjon. Det ble tatt i utgangspunktet tillaging av blod spiket med BSA til en konsentrasjon på 500 µg/mL. Det ble veid ut 5 mg BSA og løst i 1 mL ABC-løsning. 40 µL BSA 5 mg/mL ble tilsatt 360 µL blod og ristet godt på mikser.

5.2.5 Tillaging av hematokritblod til hematokritforsøk

Det ble først målt hematokritnivået i fullblodet. Dette ble gjort ved å fylle et kapillarrør med blod, deretter sentrifugeres røret i hematokrit-sentrifugen i 2 minutter. Ut i fra forholdet mellom plasma og røde blodceller, kunne blodets hematokritverdi bestemmes ved hjelp av tilhørende måledisk (Figur 5.2.2). Blodet som ble målt hadde en hematokritverdi på ca. 0,48. For å regulere blodets hematokritverdi til å bli 0,2, 0,4 og 0,6, ble plasma fjernet eller tilsatt[43].



Figur 5.2.2: Hematokritmåling ved hjelp av linjalskive.

Plasma som skulle tilsettes blod for å redusere hematokritverdien ble tilgjengelig ved å sentrifugere 5 mL fullblod i et sentrifugerør i 5 minutter med en hastighet på 2000 rcf. Blodet ble skilt i to lag, med plasma liggende på toppen, og røde blodceller på bunnen.

Metoder

Hematokrit 0,6: 1,5 mL fullblod ble overført til et eppendorfrør, og deretter sentrifugert i 5 minutter med 2000 rcf. For å lage blod med et hematokritnivå på 0,6 fra fullblodet med hematokritverdi på 0,48, måtte 300 μ L plasma fjernes. Til slutt ble eppendorfrøret ristet godt for å blande blodet.

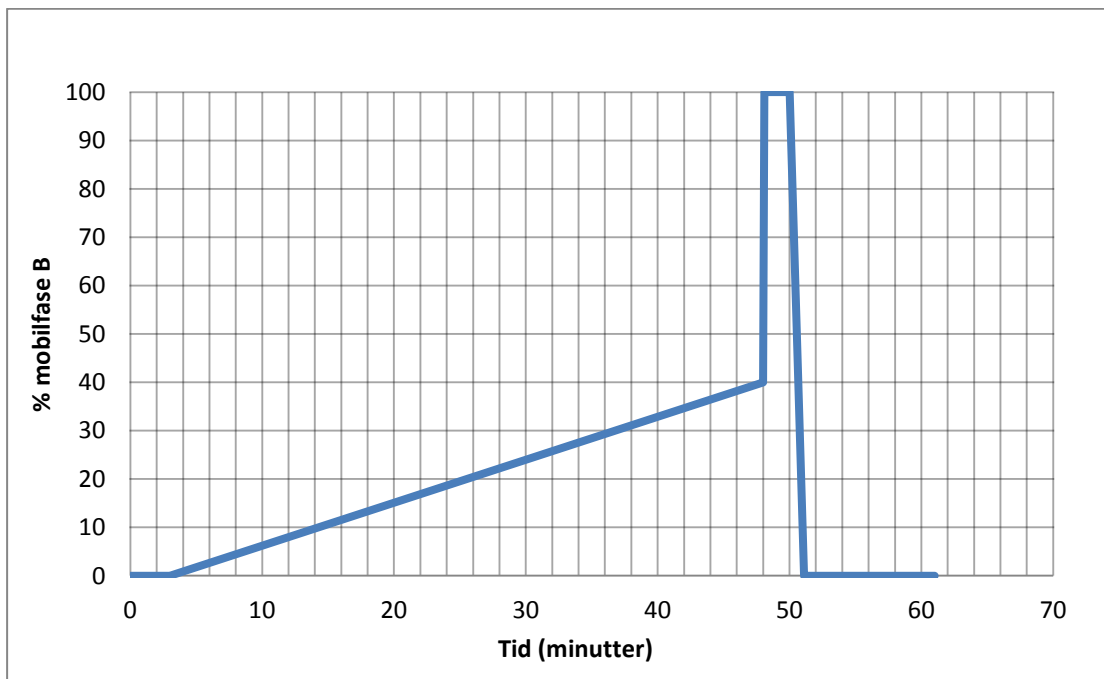
Hematokrit 0,4: 1 mL fullblod med hematokritnivå på 0,48 ble pipettert over et eppendorfrør, og deretter tilsatt 200 μ L plasma. Eppendorfrøret ble ristet godt. Blodet hadde da en hematokritverdi tilsvarende 0,4.

Hematokrit 0,2: 0,5 mL fullblod ble pipettert over på et eppendorfrør, og deretter tilsatt 700 μ L plasma for å lage ny hematokritnivå på 0,2.

5.3 LC-MS analyse av BSA

5.3.1 Instrumentelle betingelser

Nano LC- Trippelkvadrupol



Figur 5.3.1: Fremstilling av gradienteluering: Analysen startet med 0 % mobilfase B i 3 minutter, med en flowhastighet på 0,300 μ L/min. Etter 3 minutter økes mengde mobilfase B lineært fra 0 % til 40 % i løpet av 48 minutter. Deretter økes til 100 % B på 0,1 min og holdes så konstant i 2 min, før det går tilbake til 0 % B og forblir slik ut analyse tiden. Total analysetid 61 minutter.

5.3.2 MS-parametere

Trippelkvadrupol

Disse betingelsene ble brukt ved analyse på trippelkvadrupol:

Ionisering:	NSI, Positive
Spray voltage:	1800 V, positive mode
Kapillærtemperatur:	350 °C
Kollisjonsgass:	Argon
Kollisjonsgasstrykk:	1.5 mTorr
Q1 oppløsning:	0.7
Q3 oppløsning:	0.7

Oversikt over valgte precursor og produkter er vist i Tabell 5.3.1.

Aminosyresekvens	Precursor (m/z)	Produkt (m/z)	Kollisjonsenergi (V)
LVNELTEFAK	582.3	213.2; 596.4; 951.5	17 V
HLVDEPQNLIK	653.3	841.5; 956.5; 956.5	17 V
LGEYGFQNALIVR	740.4	387.3; 813.5; 1017.6	23 V
DAFLGSFLYEYSR	784.4	334.1; 717.3; 1121.5	23 V

Tabell 5.3.1: SRM-metode for analyse av BSA på trippelkvadrupol. Tidsrom for scanning av SRM-overgangene var lik for alle sekvensene, start på 3. minutt og slutt ved 58. minutt.

LTQ Orbitrap

Ionisering:	Positive mode
Kapillærtemperatur:	275 °C
Forstøvergass:	Nitrogen (N ₂)
Forstøvergasshastighet:	9 units
Tørkegass:	Nitrogen (N ₂)

Metoder

CID-energi: 35 V

Kollisjonsgass: Helium (He)

Deteksjon av spesifikke peptider på lineær ionefelle ble gjort med full scan i området m/z 250-2000, samtidig ble det gjort datadependent MS/MS-scan for peptidene som hadde signalintensitet over $1,0 \times 10^5$.

5.4 Databaser og dataverktøy

5.4.1 ProteinProspector

For å finne ut av hvilke fragmenter som BSA i teorien kan bli spaltet til, blir det gjort en in-silico fragmentering ved hjelp av proteomikkverktøyet ProteinProspector (v 5.16.0). Resultatet vises i en tabell for de teoretiske mulige aminosyresekvenser og tilhørende m/z -verdier for peptidene.

Fremgangsmåte for utførelse av søk:

1. Velger *MS-digest*, under Peptide/Proteon MS utility programs
2. Under *Database* velges SwissProt.2015.3.5
3. Velger *Trypsin* under *Digest*
4. Under *Max. Missed cleavages* velges 0
5. Under *Constant Mods* velges *Carboxymethyl (C)*
6. Ved *List of entries* legges inn ID-nummeret til peptide, P02769 for BSA
7. Under Peptid mass legges inn ønsket intervall for m/z -verdier (f.eks 800-4000)
8. Hakes for *Report Multiple Charges*
9. Trykk *Perform Digest*

5.4.2 BLAST

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) er en programvare som ved bruk av algoritmer kan sammenligne aminosyresekvenser fra ulike organismer søkt opp mot proteindatabaser. Algoritmen gir statistiske verdier (E-verdi og bit score) som viser hvor selektiv og spesifikk aminosyresekvensen er for proteinet, og dermed en måte å finne mulige signaturpeptider for proteinet. E-verdi sier om sannsynligheten for at aminosyresekvensen ved en tilfeldighet forekommer i peptidet. Lavere e-verdi indikerer på at treffet er mer signifikant. Bit score viser likheten mellom søkesekvensen med en kjent sekvens fra databasen, høy score indikerer på høy spesifisitet [44].

Fremgangsmåte for utføring av søk:

1. Trykker på *protein blast*
2. Legger inn proteinsekvensen under *Enter accession number*
3. Velger organisme for søk, under *Organism* (f.eks. *Human, Bovine, Mouse*)
4. Trykker *BLAST*

5.4.3 Proteome Discover

Proteome Discover er en programvare fra Thermo Scientific™ som brukes til å sammenligne råmaterialet fra massespektrometeret til å identifisere og kvantifisere proteiner som er blitt fragmentert fra proteolysen.

6 Resultater og diskusjon

6.1 Kartlegging av potensielle signaturpeptider

Valg av signaturpeptid er det mest kritiske steget ved utvikling av en metode. Et signaturpeptid skal være et unikt peptid for det proteinet som skal analyseres og det må kunne detekteres på MS [45]. Det er fordel at signaturpeptidene som blir valgt ikke inneholder aminosyrer som er lett utsatt for post-translasjonsmodifikasjoner, eksempler på aminosyrer som er ekstra utsatt for PTM er cystein, metionin og tryptofan [45]. Sekvens av BSA er vist i figur 6.1.1.

Figur 6.1.1: Aminosyresekvens av BSA.

```
MKWVTFISLLLLFSSAYS RGVFR RDTHKSEIAHRFKDLGEEHFKGLVLI AFSQYLQ
QCPFDEHVKLVNELTEFAKTCVADESHAGCEKSLHTLFGDELCKVASLRETYGD
MADCCEKQEPERNECFLSHKDDSPDLPKLPDPNTLCDEFKADEKKFWGKLYEI
ARRHPYFYAPELLYYANKYNGVFQECCQAEDKGA CLLPKIETMREKVLASSARQ
RLRCASIQKFGERALKAWSVARLSQKFPKAEFVEVTKLVTDLTKVHKECCHGDL
LECADDRADLAKYICDNQDTISSKLKECCDKPLLEKSHCIAEVEKDAIPENLPPLT
ADFAEDKDVCKNYQEAKDAFLGSFLYEYSRRHPEYAVSVLLRLAKEYEATLEEC
CAKDDPHACYSTVFDK LKHLVDEPQNLIKQNC DQFEKLGEYGFQNALIVRYTRK
VPQVSTPTLVEVSRSLGKVGTRCCTKPESERMPCTEDYLSLILNRLCVLHEKTPVS
EKVTKCCTESLVNRRPCFSALTPDETYVPKAFDEKLFTFHADICTLPDTEKQIKKQ
TALVELLKHKPKATEEQLKTVMENFVAFVDKCCAADDKEACFAVEGPKLVVSTQ
TALA
```

6.1.1 Potensielle signaturpeptid

Det ble gjort en in-solution-proteolyse av BSA med konsentrasjon på 5 µg/mL som ble kjørt på LTQ orbitrap. Dette for å kunne finne alle peptider som stammer fra BSA. Ved bruk av Proteome Discover kan vi se hvilke peptider som er blitt funnet. Peptidsekvensene ble også lagt inn på BLAST, og på denne måten finne ut om hvor spesifikke peptidene er for BSA. Oversikt over bit-score og E-verdi for aktuelle peptider er vist i Tabell 6.1.1. Potensielle signaturpeptider måtte ikke inneholde «missed cleavage» og det var viktig at signaturepeptidene som ble valgt måtte gi høy signalintensitet, dette for å oppnå lavest mulig LLOQ.

Tabell.6.1.1: Oversikt over sette signaturpeptid med intensitet, med tilhørende signalintensitet. 4 mulige signaturpeptider er markert i rødt. Bit score og E-verdi er hentet fra BLAST, og er forklart i avsnitt 5.4.2.

Aminosyresekvens	MH+	<i>m/z</i> (ladning)	Missed cleavage	Signal-intensitet	Bit score	E-verdi
AEFVEVTK	922.48693	461.747 (+2)	0	2,87*10 ⁵	28.2	0,58
YLYEIAR	927.49285	464.250 (+2)	0	9,29*10 ⁶	27.4	0,98
DLGEEHFK	974.45624	974.456 (+1)	0	8,08*10 ⁴	29.5	0,23
LVVSTQTALA	1002.58287	501.795 (+2)	0	9,47*10 ⁵	32.0	0,042
QTALVELLK	1014.61882	507.813 (+2)	0	6,19*10 ⁶	30.3	0,13
KQTALVELLK	1142.71477	571.861 (+2)	1	1,02*10 ⁷	33.3	2,9
LVNELTEFAK	1163.63237	582.319 (+2)	0	5,75*10⁷	34.6	6,0*10⁻³
FKDLGEEHFK	1249.61894	625.313 (+2)	1	7,50*10 ⁵	36.3	0,30
HPEYAVSVLLR	1283.71123	642.359 (+2)	0	1,12*10 ⁶	38.4	4,0*10 ⁻⁴
HLVDEPQNLIK	1305.71623	653.361 (+2)	0	5,14*10⁷	39.2	2,0*10⁻⁴
TVMENFVAFVDK	1399.69341	700.350 (+2)	0	7,11*10 ⁵	43.1	1,0*10 ⁻⁵
RHPEYAVSVLLR	1439.81133	720.409 (+2)	1	4,45*10 ⁶	41.8	4,0*10 ⁻³
LGEYGFQNALIVR	1479.79570	740.401 (+2)	0	7,03*10⁷	44.8	4,0*10⁻⁶
VPQVSTPTLVEVSR	1511.84221	756.424 (+2)	0	8,59*10 ⁵	46.0	2,0*10 ⁻⁶
DAFLGSFLYEYSR	1567.74297	784.375 (+2)	0	2,58*10⁷	46.0	3,0*10⁻⁶
KVPQVSTPTLVEVSR	1639.93938	820.473 (+2)	1	1,67*10 ⁷	49.0	3,0*10 ⁻⁵
HPYFYAPPELLYYANK	1888.92961	944.968 (+2)	0	1,22*10 ⁶	55.4	1,0*10 ⁻⁹
DAIPENLPPLTADFAEDK	1955.96050	978.483 (+2)	0	1,43*10 ⁵	60.4	3,0*10 ⁻¹¹
RHPYFYAPPELLYYANK	2045.02750	682.347 (+3)	1	1,32*10 ⁶	55.4	1,0*10 ⁻⁹

Valg av signaturpeptider ble først og fremst basert på signalintensiteten til peptidene, men også at peptidene var spesifikke for BSA. Peptidene måtte ikke finnes i human matriks, for modellanalytten vil bli analysert fra humant blod.

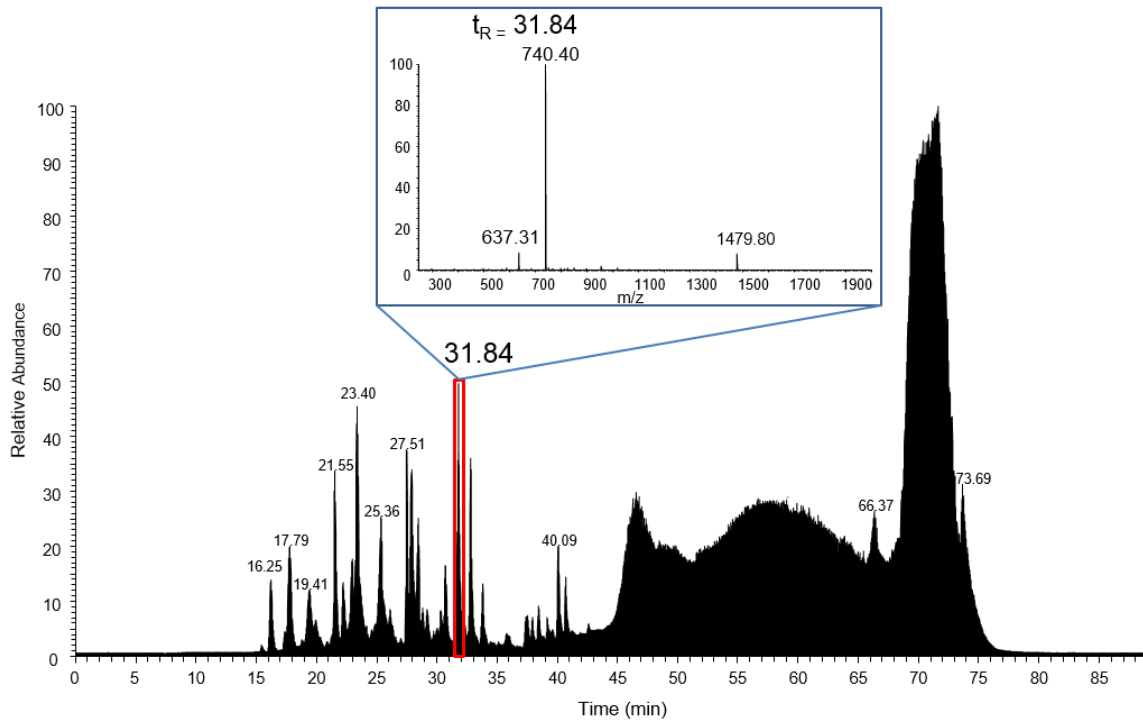
Blant de mulige peptidene ble det funnet 4 mulige signaturpeptider som tilfredsstilte kriteriene:

Peptidsekvens	<i>m/z</i>
LVNELTEFAK	582.319
HLVDEPQNLIK	653.361
LGEYGFQNALIVR	740.401
DAFLGSFLYEYSR	784.375

Det var disse fire peptidene med *m/z* 582.3, 653.3, 740.4, 784.4, som ble brukt i arbeidet videre.

Resultater og diskusjon

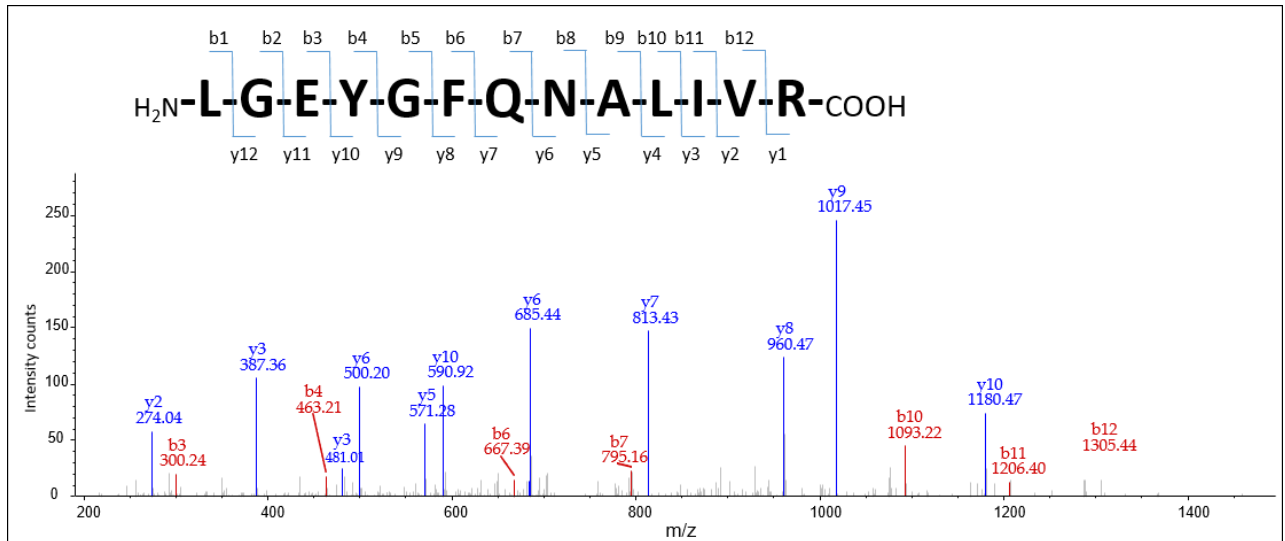
Figuren under (figur 6.1.2) viser bekreftelse av peptidet med $m/z=740.4$, tilsvarende framgangsmåte for signaturpeptid 582.3, 653.3, 784.4 ligger i vedlegg 1.



Figur 6.1.2: Kromatogram for tryptisk klipp av BSA in-solution løsnings analysert på LTQ orbitrap.

Figur 6.1.2 og 6.1.3 viser fremgangsmåte for identifisering av valgte signaturpeptid. Fra figur 6.1.2 vises kromatogram av BSA in-solution proteolyse på LTQ orbitrap, med signal ved $t_R=31.84$ med høyest intensitet markert i rødt. I samme figur blir det vist massespekteret til signal ved $t_R=31.84$.

I figur 6.1.3 blir det vist MS/MS-spekteret til m/z 740.4, fra peptidet som ga det høye signalet ved $t_R=31.84$. Fragmentene stemte overens med de teoretiske fragmenter for m/z 740.4 fra ProteinProspector, dette bekrefter at peptidet som er blitt indentifisert stammer fra BSA.



Figur 6.1.3: MS/MS-spekteret og aminosyresekvensen for LGEYGFQNALIVR (m/z 740.4). Peptidryggraden og mulige fragmenteringsområder er vist øverst.

6.2 Utvikling av trippelkvadrupol-metode

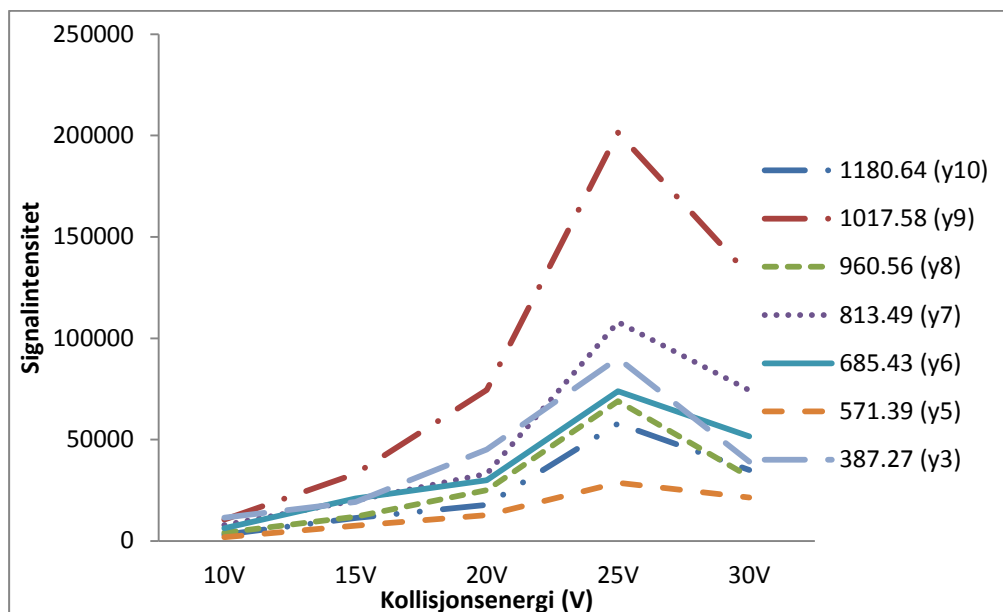
De fire peptidene med høyest signalintensitet og god spesifisitet fra LTQ orbitrap-kjøringene ble tatt med videre til trippelkvadrupol for å utvikle en analysemetode av BSA på TSQ Quantiva.

6.2.1 Productscan

En in-solution-proteolyse av BSA ble analysert med productscan på TSQ for å undersøke om valgte signaturpeptider ga samme fragmenteringsmønster på TSQ som i LTQ-orbitrap. Fordelen med å utføre en product ion scan er at dette gir alle mulige ioner som fragmenteres fra et spesifikt peptid som blir valgt ut i første kvadrupol. Det ble valgt 7 fragmentioner med høyest intensitet på TSQ for å optimalisere. Det ble forsøkt å variere kollisjonsenergien fra 10V – 30V for å se hvilken spenning som ga best fragmentintensitet.

Ut ifra productscan resultatet fra figur 6.2.1, ble det valgt ut tre fragmentioner for signaturpeptid 740.4 som ga høyest signalintensitet: 1017.6 (y9), 813.5 (y7), og 387.3 (y3).

Resultater og diskusjon



Figur 6.2.1: Signalintensitet til sju utvalgte ioner fra signaturpeptid 740.4, analysert i productscan med 5 ulike kollisjonsenergi, $n=3$.

Optimal kollisjonsenergi for peptid 740.4 ble funnet til å ligge mellom 20V - 30V. Lignende forsøk ble også gjort for de tre andre signaturpeptidene (vedlegg 2). Resultatet av denne optimaliseringen er vist i Tabell 6.2.1.

Tabell 6.2.1: Oversikt over signaturpeptidene med 3 tilhørende fragmenter, og optimal kollisjonsenergi.

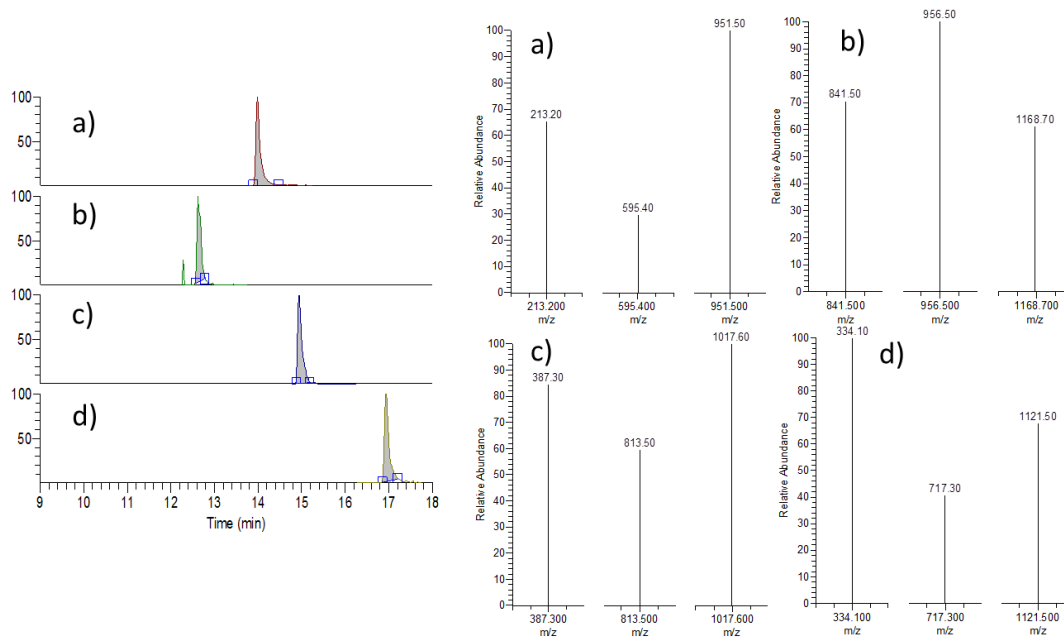
Precursor (m/z)	Produkt (m/z)			Optimal kollisjonsenergi (V)
582.3	213.2	596.4	951.5	10 V – 20 V
653.3	841.5	956.5	1168.7	10 V – 20 V
740.4	387.3	813.5	1017.6	20 V – 30 V
784.4	334.1	717.3	1121.5	20 V – 30 V

6.2.2 SRM

Fra arbeidet med productscan, ble det valgt ut 3 tilhørende fragmenter til signaturpeptidene, og en SRM-metode ble optimalisert. Finjustering av kollisjonsenergien ble gjort for å finne optimal energi. For peptidene 582.3 og 653.3 ble 14 V-19 V testet og for peptidene 740.4 og 784.4 ble et intervall på 23 V-28 V undersøkt.

Fra SRM-finjustering ble det funnet at for peptidene 582.3 og 653.3 ga 17 V høyest signalintensitet. For peptidene 740.4 og 784.4 var optimal kollisjonsenergi på 23 V. Oversikt over valgte kollisjonsenergi er i tabell 5.3.1 fra kapittel 5.3.2.

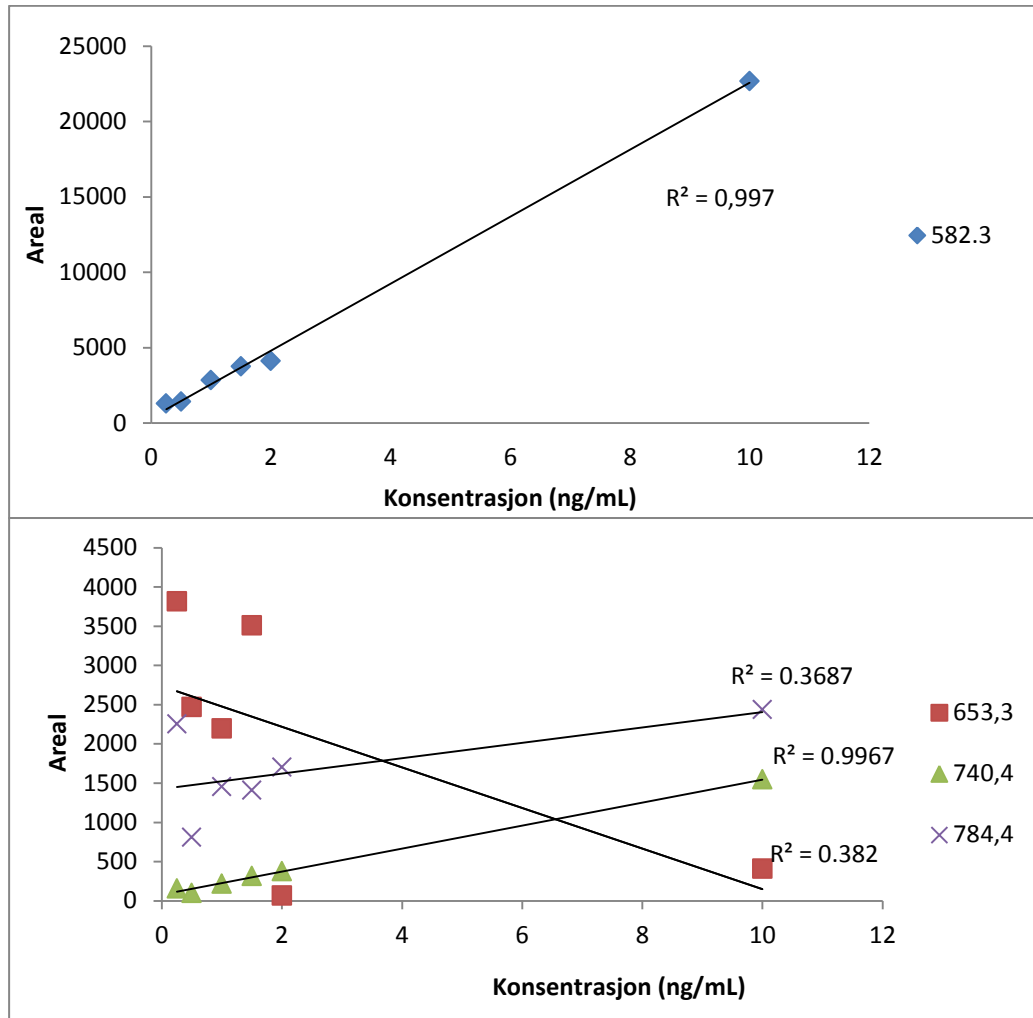
Figur 6.2.2 viser deteksjon av alle 4 signaturpeptidene med tilhørende fragmenter. Fragmentforholdet som er blitt funnet i BSA in-solution proteolysen vil være en retningslinje for hvordan fragmentene for signaturpeptidene skal se ut i en DBS-prøve.



Figur 6.2.2: Kromatogram av signaturpeptidene i en BSA in-solution 10 ng/mL, med tilhørende fragmentmønster for hvert av peptidene. a) peptid 582.3, b) peptid 653.3, c) peptid 740.4, d) peptid 784.4.

6.2.3 Kalibreringskurve BSA in-solution

For å finne hvilke nedre grenser av BSA-konsentrasjon som er mulig å detekteres i en ren prøve, ble det lagd en kalibreringskurve. Figur 6.2.3 viser kalibreringskurve for signaturpeptidene som ble analysert i konsentrasjonene 0,25 ng/mL, 0,50 ng/mL, 1,0 mg/mL, 1,5 ng/mL, 2,0ng/mL, 10 ng/mL (n=2).



Figur 6.2.3: Kalibreringskurve for peptidene i konsentrasjonsområdet 0,25-10 ng/mL (n=3).

BSA kunne detekteres ned til 0,5 ng/mL. For signaturpeptid 582.3 og 740.4 viste det en god linearitet ($r^2 \geq 0,997$) og for peptid 653.3 og 784.4 var linearitet $r^2 \leq 0,382$.

6.3 Analyse av BSA fra DBS

Etter utviklingen av analysemetode av BSA i en in-solution løsning, var neste steg å bruke metoden til å detektere BSA fra en DBS-prøve. Ved bruk av vannløselig DBS-materiale ble hele blodflekken sammen med materialet løst opp i den vandige bufferløsningen, og hele prøven ble tilgjengelig for videre prøveoppbehandling. Ved tilsetning av acetonitril som fellingsreagens, ble det forventet at både komponenter fra blod og det vannløselige materialet ble fjernet [8].

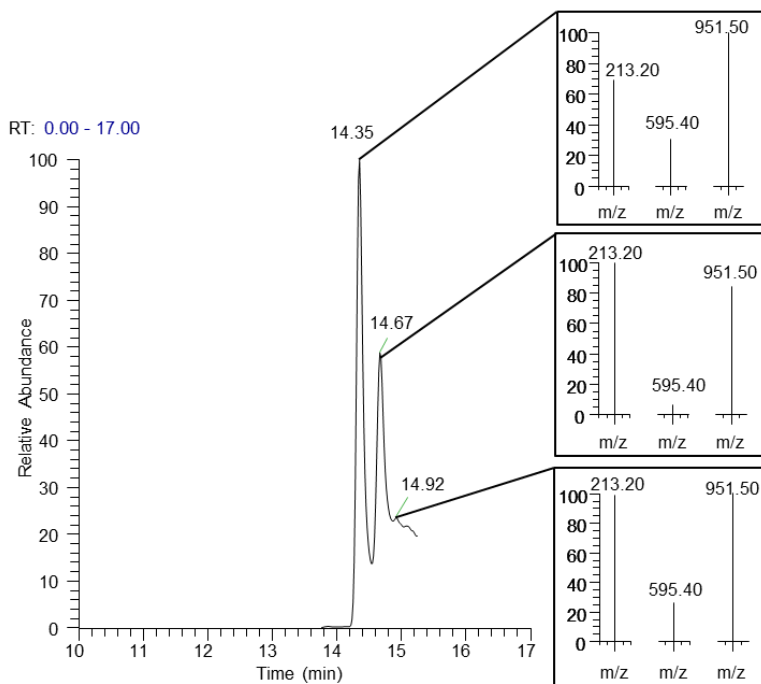
Tidligere ble det bestemt hvilken konsentrasjon fra BSA in-solution som er den nedre grense for kvantifisering. I blod vil det være høy konsentrasjonen av såkalte «high-abundance»

proteiner, og disse vil undertrykke signaler for «lower-abundance» proteiner [46]. Dermed ble en høyere konsentrasjon av BSA brukt i de tørkede blodflekkene for å garantere deteksjon av BSA.

6.3.1 Innledende forsøk

Innledende forsøk ble utført med 100 ng/mL BSA. Denne konsentrasjonen ga ikke tilfredsstillende signaler for signaturpeptidene og konsentrasjonen ble dermed økt til 100 µg/mL. Det ble detektert signaler ved bruk av BSA 100 µg/mL, men for å sikre en god deteksjon av signalene ble bestemt å øke konsentrasjonen i DBS betraktelig til 500 µg/mL.

Ved analyse av BSA i DBS (figur 6.3.1) ble det detektert tre topper for peptid 582.3. Fragmentmønsteret for den ene toppen er lik som i BSA in-solution figur 6.2.2, men de andre toppene hadde ulik fragmentmønster enn tilsvarende for BSA in-solution. I tillegg overlapper toppene for peptid 582.3 en viss grad.

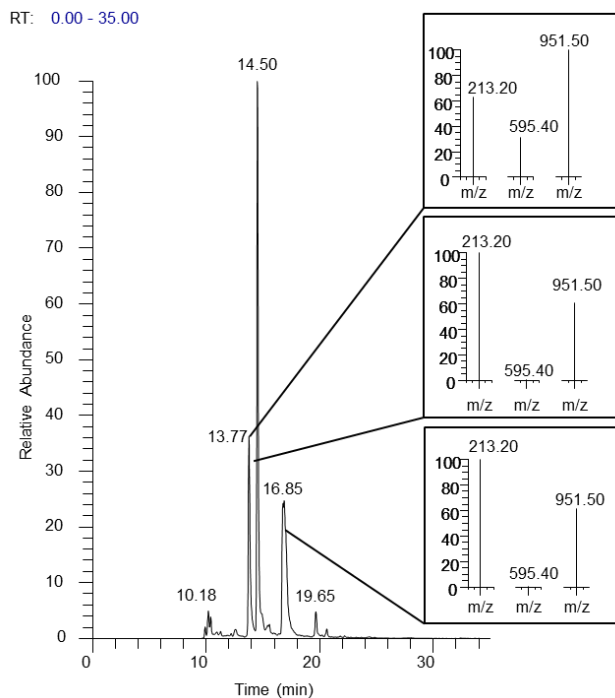


Figur 6.3.1: TIC kromatogram av DBS med BSA 100 µg/mL for peptid 582.3 Tre topper detektert for peptid 582.3 med ulik fragmentmønster.

Resultater og diskusjon

For å få oversikt over retensjonstiden for signaturpeptidene og om LC/MS-en fungerte som normalt, ble det før hvert forsøk analysert en BSA in-solution standard 0,25 µg/mL for å bekrefte retensjonstiden. I tillegg ble samme standardprøve analysert på slutten av sekvensen, for å kontrollere om det har oppstått variasjon.

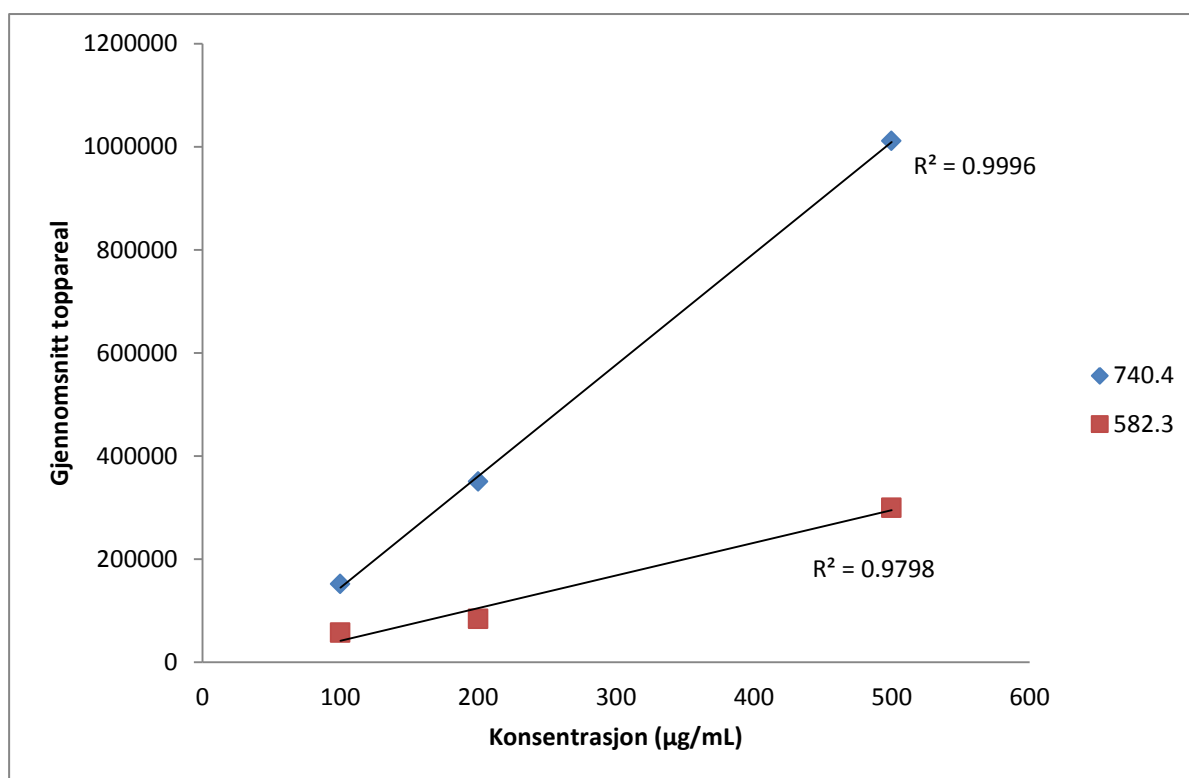
For å eliminere risikoen for at de uønskede toppene skulle komme ut samtidig som signaturpeptid 582.3, ble det forsøkt å forlenge gradienten fra 17 min til 35 min. Endring av gradient ga en bedre separasjon av forurensingene for topp 582.3 fra hovedtoppen, og dermed enklere å skille disse fra hverandre (Figur 6.3.2). For å selektere riktig toppareal for peptid, ble fragmentmønsteret til toppene sammenlignet med fragmentmønsteret og t_R for peptid 582.3 fra en BSA in-solution løsning som ble analysert på samme dag.



Figur 6.3.2: Kromatogram av DBS med BSA 0,500 µg/mL DBS for peptid 582.3, tre topper detektert med ulike fragmentmønstre.

6.3.2 DBS Kalibreringskurve

For å finne hvilke konsentrasjoner av analytt som må være til stede for å kunne detekteres, ble det prøvd å lage en standardkurve for DBS med BSA i konsentrasjoner: 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, og 500 µg/mL (n=2). Resultatet for kalibreringskurven for BSA i DBS er vist i Figur 6.3.3.



Figur 6.3.3: Kalibreringskurve for signaturpeptid 582.3 og 740.4 i DBS, BSA konsentrasjon 50 µg/mL – 500 µg/mL (n=2).

Kalibreringskurven viser kun resultater for konsentrasjonene 100 µg/mL, 200 µg/mL og 500 µg/mL. For konsentrasjoner under 100 µg/mL var støyen like stor som signaltoppene, og analytten var vanskelig å detektere. Korrelasjonskoeffisienten, r^2 , for linjen til peptid 740.4 ble beregnet til 0,9996 (fra Figur 6.3.3). Selv om regresjonslinjen var tilnærmet lineær, viste det en stor variasjon mellom toppareal for de to parallellene (Tabell 6.3.1). Det ble videre undersøkt hvor denne variasjonen kunne oppstå.

Tabell 6.3.1: Toppareal for peptid 740.4 for konsentrasjonen 100 µg/mL, 200 µg/mL, 500 µg/mL (n=2).

Toppareal for peptid 740.4	Parallell 1	Parallell 2
100 µg/mL	72520	232063
200 µg/mL	348766	352156
500 µg/mL	876741	1146281

Etter arbeidet med å finne signaturpeptid og arbeid med DBS, ble det bestemt å ikke bruke resultatet fra peptid 653.3 og 784.4 i og med at resultatene var varierende. Det er kun peptid 740.4 som gir klare signaler i alle forsøk, og det er dette peptidet som blir brukt som hoved peptid ved tolking av resultater. Samme analysemetode med alle 4 signaturpeptidene ble brukt videre for å kontrollere resultatene.

6.3.3 Repeterbarhet

Repetierbarhet, målt i RSD (%), sier noe om i hvilken grad av spredning for en måling av gjentatte analyser som blir utført med samme betingelser. I FDA (Food and Drug Administration) sine krav til validering av analytiske metoder, er den godkjente RSD variasjonen for en metode på 15 %. Ved enkelte forsøk med måling av BSA fra vannløselig DBS har RSD for signaturpeptidene variert fra 15,5 % til 60,2 %. Derfor var det ønskelig å optimalisere prøveopparbeidelsen slik at metoden for analyse av DBS på det vannløselige materialet blir mer robust.

6.4 Optimalisering av metode

Det var mistenkt at problemet med varierende RSD enten kunne oppstå under prøveopparbeidelsen, eller som et problem som matrikseffekter. Det ble derfor videre fokusert på optimalisering av både prøveopparbeidelse og analysemetode for å få mer reproduerbare resultater.

6.4.1 Forlengelse av gradient

Prøven som analyseres inneholder proteiner og andre komponenter fra blod som kan påvirke deteksjonen av analytten. Et forsøk på å bedre RSD var å forlenge gradienten for å få en bedre separasjon av peptidene fra forurensingene. Gradienten var opprinnelig på 17 min og ble forlenget til 35 min for å separere koeluerende topper som diskutert i avsnitt 6.3.1. Gradienten ble nå ytterligere forlenget til 60 min for å bedre standardavvikene. Det virket ikke som om at endring av gradient ga bedre repeterbarhet for metoden. Den nye gradienten ble brukt videre fordi det var mer gunstig å bruke en lengre gradient for å bedre separasjonen av peptidene og koeluerende forurensninger [47]. En artikkel fra en annen forskningsgruppe som arbeider med DBS og proteiner har også en lang gradient for å separere peptidene [48].

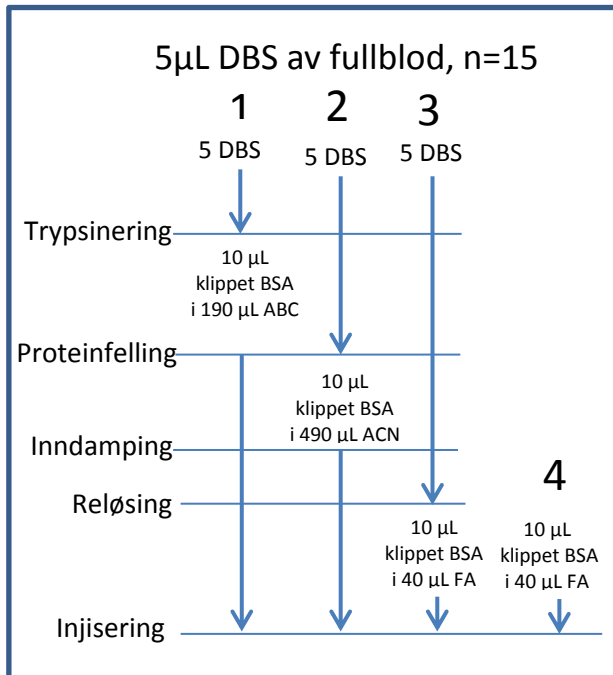
6.4.2 Monitorering av de ulike trinnene i prøveopparbeidelse

For å finne ut av hvor problemet med varierende RSD lå, ble det forsøkt å endre når tilsetningen av BSA i de forskjellige trinnene av prøveopparbeidelsen. Vanligvis ble uklippet BSA tilsatt blodet før spotting av DBS, men i disse forsøkene ble klippet BSA tilsatt i 4 forskjellige stadier av prøveopparbeidelsen (Figur 6.4.1):

1. BSA tilsatt etter tryptisk klipp.
2. BSA tilsatt etter proteinfelling.
3. BSA tilsatt etter inndamping.
4. BSA tilsatt til maursyre rett før injeksjon.

Mengde av BSA som ble tilsatt i de ulike trinnene ble satt til å være lik den teoretiske konsentrasjonen i prøveløsningen ved 100 % utbytte. Det ble tatt i utgangspunktet i at konsentrasjonen av BSA i spiket blod avsatt på DBS var 500 µg/mL BSA. Ved tilsetning av teoretisk mengde BSA i hvert av trinnene, kan resultatene fra trinnene sammenlignes og dermed gi en antydning til hvilket trinn av prøveopparbeidelsen som fører til størst variasjon i resultatene. Dette kan gi indikasjon på hvilke trinn i prøveopparbeidelsen som gir eventuell tap av analytt. Prosedyren for prøveopparbeidelse er forklart i kapitel 5, avsnitt 5.2.3.

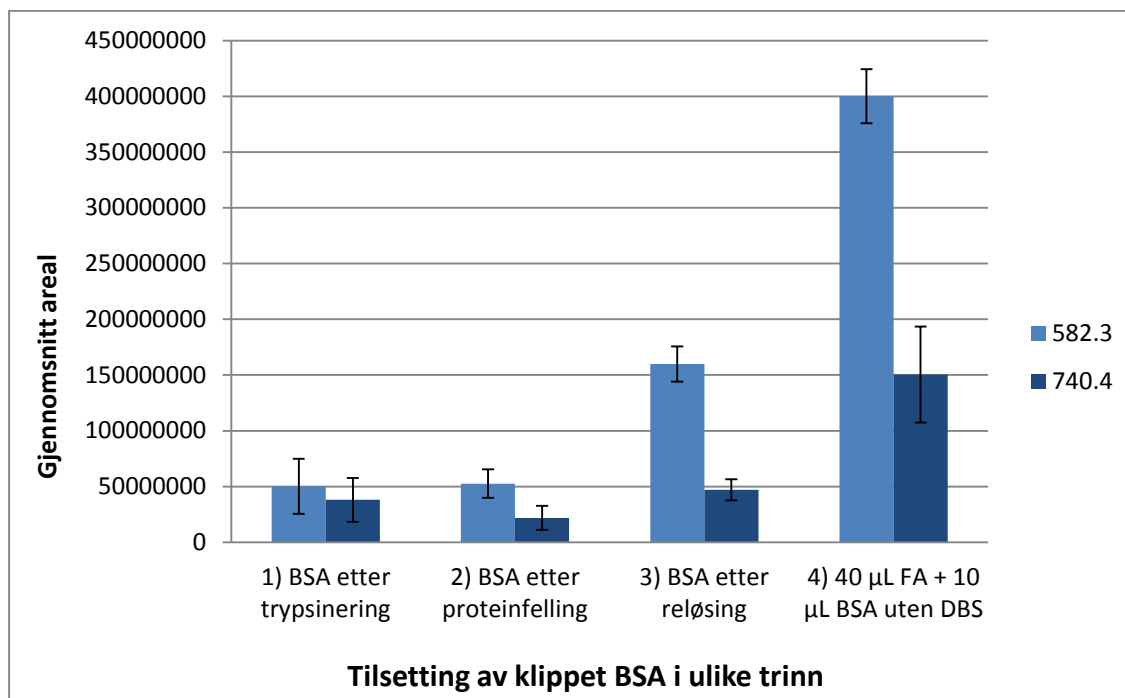
Resultater og diskusjon



Figur 6.4.1: Oversikt over når BSA ble tilsatt i de ulike forsøkene.

Det ble spottet 15 blank DBS, som skulle bli spiket med BSA i trinn 1-3. I hvert av trinnene ble det tilsatt 10 µL klippet BSA med en konsentrasjon tilsvarende mengde spiket fullblod på 500 µg/mL som er blitt spottet i en 5 µL blodflekk. Det ble gjort 5 paralleller for hvert trinn.

Ut i fra resultatet om hvor problemet med robustheten ligger (Figur 6.4.2), kan de se ut som at mengde BSA minker i trinn 1 og 2 når analytt er tilsatt før inndampingstrinnet. En mulig årsak til dette kan være at analytten blir degradert av varmen under inndampingen. Det er ikke blitt testet om analytten er stabil ved høy temperatur, men det er mulig å undersøke dette ved endring av inndampingsmetode, der lavere temperatur blir brukt.



Figur 6.4.2: Gjennomsnittlig toppareal for BSA tilsatt ved forskjellige tidspunkt av prøveopparbeidelsen, ulike trinnene er nummerert 1-4. (n=5).

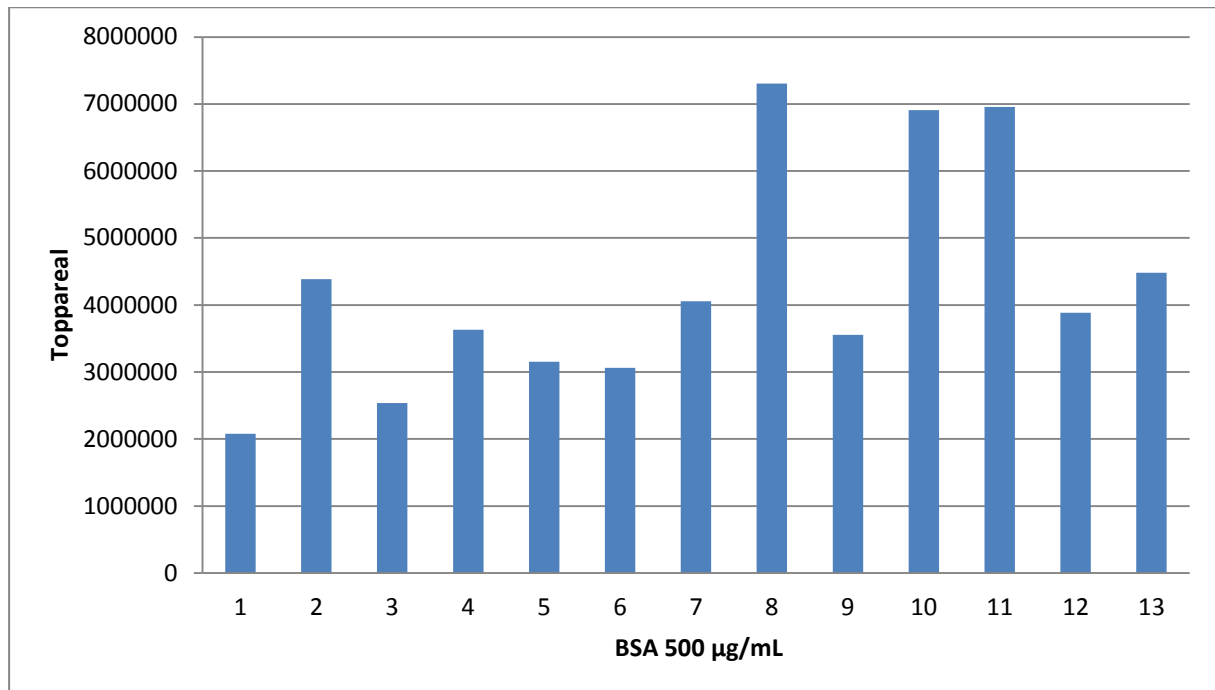
Sammenligning av resultatet av trinn 3 og 4 (Figur 6.4.2) ser det ut som at ved det er mer BSA som er blitt detektert når analytt er tilsatt i 20 mM maursyre i forhold til ved tilsetning i blank prøvematriks med oppløst DBS. Dette kan tyde på at det er ionesuppresjon til stedet. Sammenligning av trinn 3 og 4 kan også benyttes til monitorering av matrikseffekter. Det ser også ut til at noe analytt forsvinner under inndampingstrinnet (fra trinn 2 til trinn 3). Det er antatt at det er flere trinn som bidrar til at robustheten av metoden svekkes.

6.4.3 Endring av inndampingsmetode

Da det så ut som om inndampingstrinnet førte noe av variasjon i dataene i tillegg til noe tap av analytt, ble det sett nærmere på dette trinnet i prosedyren. Ved inndamping av supernatanten, blir det brukt varme opptil 50 °C i vakuum. Det ble tenkt at denne varmen kunne degradere BSA, og dermed redusere mengde tilgjengelig analytt injisering. Samme prøveopparbeidelsesmetode ble utført (beskrevet i kapittel 5, avsnitt 5.2.3), i stedet for å dampe av supernatanten med varme i vakuum, ble nitrogen gass brukt som inndampingsmetode med en lavere temperatur på 40 °C. Etter inndamping ble prøvene reløst i

Resultater og diskusjon

50 μL maursyre, sentrifugert 14000 rpm i 10 min, før 30 μL av supernatanten ble injisert for analyse. Figur 6.4.3 viser resultatet for prøver inndampet med nitrogengass (n=13).



Figur 6.4.3: 500 $\mu\text{g/mL}$ BSA i 5 μL DBS, dampet inn med nitrogengass, toppareal for peptid 740.4 (n=13).

Resultatet fra endring av inndampingsmetode viste en RSD på 39.7 % for peptid 740.4 og 58,0 % for peptid 582.3. Dette viste at endring av inndampingsmetode til nitrogengass ikke var med på å stabilisere RSD, og at ikke inndampingsstrinnet ikke var hovedproblemet.

6.5 Evaluering av vannløselig DBS

Selv om metoden ikke var robust slik som ønsket, ble den brukt til å teste ut utbytte, stabilitet og påvirkning av hematokrit på det vannløselige materialet. Det var kun brukt peptid 740.4 til tolkning av resultatene.

6.5.1 Utbytte av oppløsningstrinnet

Det ble undersøkt utbytte av analytt etter oppløsning av vannløselige DBS. Det er ønskelig å sjekke dette fordi disse materialene er vannløselige og kan i teorien gi 100 % utbytte.

For å undersøke utbytte av BSA fra vannløselig DBS, ble det lagd 3 DBS med blod spiket med BSA 100 $\mu\text{g/mL}$ og 3 spots med 500 $\mu\text{g/mL}$. Dette ble sammenlignet med 3 blankt blod,

der tilsvarende mengde BSA for hver av konsentrasjonene skulle tilsettes etter at DBS hadde blitt oppløst. Resultat fra utbyttetesten er vist i tabell 6.5.1.

Tabell 6.5.1 : Utbytte for peptid 740.4 fra CMC (n=3)

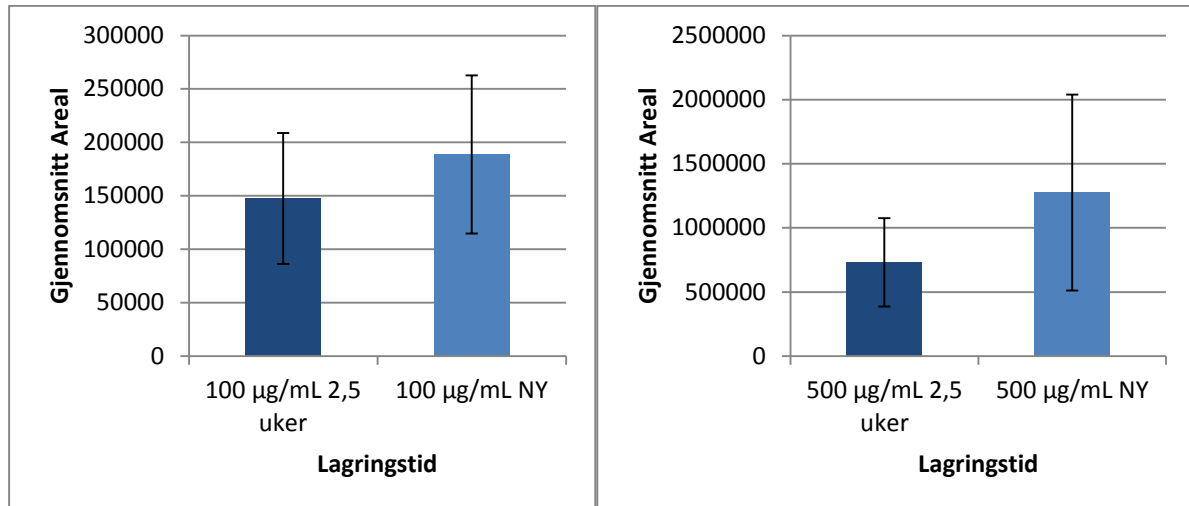
Peptid	Utbytte 100 µg/mL	Utbytte 500 µg/mL	RSD 100 µg/mL DBS	RSD 500 µg/mL DBS
740.4	133,8 %	127,5 %	16,70 %	6,23 %

Resultat fra utbyttetesten (Tabell 6.5.1) viser et utbytte på 133,8 % for 100 µg/mL og 127,5 % for 500 µg/mL. Dette indikerer på at det vannløselige materialet gir 100 % utbytte fra oppløsningstrinnet, men siden utbytte er noe høyere enn 100 % bør forsøket gjentas for et sikrere resultat.

6.5.2 Stabilitet

Det ble undersøkt for stabilitet av DBS lagret over lengre tid på det vannløselige materialet. Det ble spottet 5 spotter på 5µL blod for 100 µg/mL BSA og 5 spotter for 500 µg/mL BSA. Disse ble tørket på benken i romtemperatur i 2 timer, før de ble overført i hver sin lufttette pose inneholdende 1 g silica gel som tørkemiddel. Posene med DBS ble lagret i romtemperatur i 2,5 uke, før spottene ble klippet ut og opparbeidet som beskrevet tidligere.

De lagrede DBS ble sammenlignet med nylig spottet BSA blod med samme konsentrasjon, 100µg/mL og 500 µg/mL, og som også skulle gjennom lik prøveoppbehandling. Ut ifra resultatet (Figur 6.5.1) kan det se ut som at mengde analytt minker over tid. Det kan være flere faktorer påvirker resultatet, enten at analytten faktisk degraderes på det vannløselige materialet, eller at unøyaktigheter ved utførelse av de to forsøkene kan påvirke resultatet. RSD for DBS som er blitt lagret 2.5 uker 47,1 % og RSD på 59,8 % for ny DBS (n=5). Høyt RSD for DBS er blitt vist fra andre forskningsgrupper som også har arbeidet med proteiner og DBS [48]. Denne gruppen har analysert 97 proteiner på DBS, og godkjente et RSD på under 35 % ved bruk av DBS med integrert internstandard i metoden.



Figur 6.5.1: DBS med BSA lagret over tid (2,5 uke) og ny spottet DBS i samme konsentrasjon, 100 µg/mL og 500 µg/mL (n=5).

6.5.3 Effekt av hematokrit

Hematokritverdien kan variere fra person til person, som diskutert i teoridelen vil dette også påvirke viskositeten. Hematokritverdien vil føre til at mengde analytt i punchet disk fra DBS kan variere.

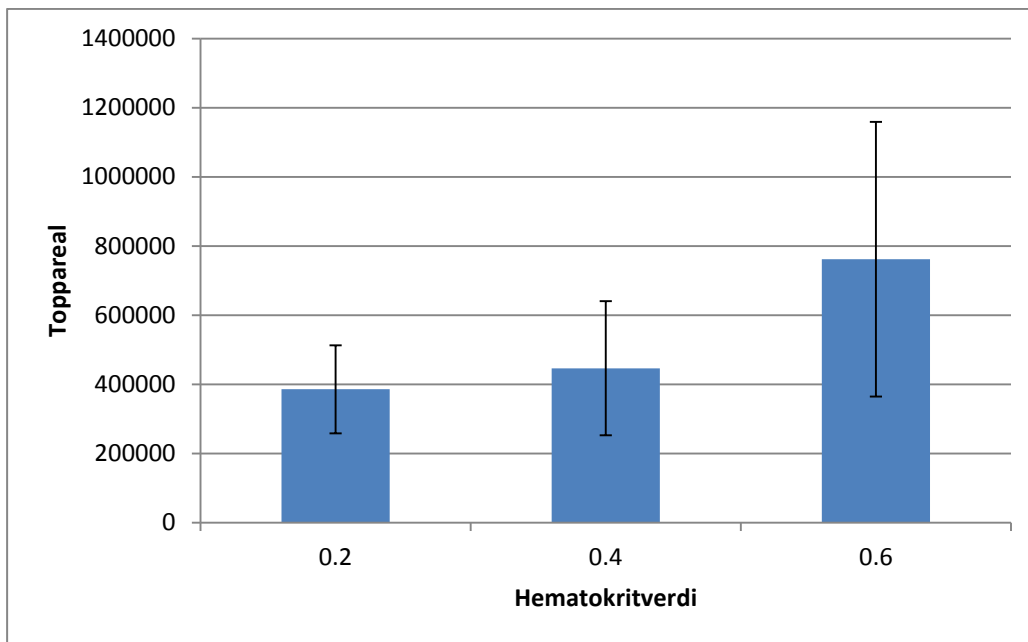
Det ble satt opp et forsøk der det ble tillaget blod med hematokritverdi (v/v) i prosent på ca. 0,2, 0,4 og 0,6. Disse verdiene dekker litt over og litt under normal referanseverdi for vanlig hematokritverdi for friske mennesker [49].

Det ble målt hematokritnivå på det tillagede blodet for å sjekke at hematokritnivået faktisk var lik det som skulle lages, forklart i kapittel 5, avsnitt 5.2.5.

Det ble først forsøkt å spike blodet med BSA til en konsentrasjon på 500 µg/mL som tidligere, men denne konsentrasjonen ga varierende signaler, så dermed ble forsøket gjentatt med økt konsentrasjon til 1000 µg/mL BSA.

Det ble spottet 30 µL blod på det vannløselige materialet. Det ble brukt 30 µL i stedet for 5 µL da 5 µL er mindre enn diameter på puncheren, og dermed vil dette ikke kunne gi info om effekt av hematokrit. Blodflekken ble løst opp i 180 µL ABC, og deretter ble det utført samme prøveopparbeidelse som tidligere (kapitel 5. avsnitt 5.2.3).

Ut ifra resultatet (Figur 6.5.2) ser det ut som at det er mindre analytt til stedet ved lav hematokritverdi, sammenlignet med blod med høyt hematokritverdi. Det er forventet at hematokrit har en påvirkning på DBS [50], men det er litt tidlig å konkludere om hematokrit har en effekt på det vannløselige materialet, da standardavvikene er høye. Resultatene viser likevel en trend.



Figur 6.5.2: Blod med hematokritverdi 0,2, 0,4, og 0,6 spiket med BSA til konsentrasjon på 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. DBS på 30 μL , punchet 3 mm disk (n=5). for peptid 740.4.

Hematokritforsøket bør gjentas etter utvikling av en mer robust analysemetode for et mer sikkert resultat.

7 Konklusjon

I denne oppgaven har det blitt utviklet en analysemetode for tryptiske peptider av BSA på LC-MS. Metoden ble benyttet til å detektere BSA fra DBS på det vannløselige materialet. Den valgte prøveopparbeidelsen var ikke slik som ønsket, og ga en del variasjon av signalintensitet for forsøkene. Det ble dermed forsøkt å optimalisere analysemetoden og prøveopparbeidelsen ved forlengelse av gradient og testing av ulike trinn av prøveopparbeidelsen.

Selv om metoden ikke var robust som forventet, ble det forsøkt å teste ut utbytte, stabilitet og effekt av hematokrit på CMC. Utbyttet fra oppløsningstrinnet av det vannløselige materialet viste et resultat over 100 %. Det høye utbytte fra det vannløselige materialet må bekreftes ved flere gjentakende forsøk. For stabilitet av analytt på det vannløselige materialet ble det vist at etter lagring i 2,5 uke i romtemperatur hadde mengde analytt blitt redusert. Resultatene for hematokritforsøket viste en påvirkning av ulik hematokritverdi på det vannløselige materialet, men det kunne ikke trekkes klare konklusjoner grunnet av høyt standardavvik.

Forsøkene om effekt på det vannløselige materialet bør gjentas etter utvikling av en mer robust prøveopparbeidelsesmetode for å kunne få et mer sikkert resultat.

8 Videre arbeid

I videre arbeid bør fokuset ligge på utvikling av en robust prøveopparbeidelsesmetode. Dette kan gjøres ved integrering av isotopmerket internstandard inn i metoden, slik at det lettere oppdages hvilket trinn av prøveopparbeidelsen som medvirker til ustabilitet. I tillegg kan flere signaturpeptider bli valgt for å sikre metoden.

Det kan også utvikles tilsvarende metode for flere proteiner med ulike fysiokjemiske egenskaper, som f.eks. størrelse, hydrofobisitet og isoelektrisk punkt, for å få bedre kunnskap om det vannløselige materialet.

For å få en renere prøve kunne det vært fordel å rense prøveløsningen ved å utføre SPE før injisering for å redusere matrikseffekter. Det må tas i betraktning at ønsket prøveopparbeidelse skal være rask og enkel å utføre.

Litteraturliste

1. Guthrie, R. and A. Susi, *A Simple Phenylalanine Method for Detecting Phenylketonuria in Large Populations of Newborn Infants*. *Pediatrics*, 1963. **32**: p. 338-43.
2. Demirev, P.A., *Dried Blood Spots: Analysis and Applications*. *Analytical Chemistry*, 2013. **85**(2): p. 779-789.
3. Lakshmy, R., *Analysis of the Use of Dried Blood Spot Measurements in Disease Screening*. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 2008. **2**(2): p. 242-243.
4. McDade, T.W., S. Williams, and J.J. Snodgrass, *What a drop can do: dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research*. *Demography*, 2007. **44**(4): p. 899-925.
5. Li, F., et al., *Perforated dried blood spots: a novel format for accurate microsampling*. *Bioanalysis*, 2011. **3**(20): p. 2321-33.
6. Rosting, C., A. Gjelstad, and T.G. Halvorsen, *Water-Soluble Dried Blood Spot in Protein Analysis: A Proof-of-Concept Study*. *Anal Chem*, 2015. **87**(15): p. 7918-24.
7. Eibak, L.E., et al., *Alginate and chitosan foam combined with electromembrane extraction for dried blood spot analysis*. *Anal Chem*, 2012. **84**(20): p. 8783-9.
8. Ask, K.S., S. Pedersen-Bjergaard, and A. Gjelstad, *Dried Blood Spots on Carboxymethyl Cellulose Sheets: Rapid Sample Preparation Based on Dissolution and Precipitation*. *Chromatographia*, 2016. **79**(7): p. 509-514.
9. Rosting, C., et al., *Evaluation of water-soluble DBS for small proteins: a conceptual study using insulin as a model analyte*. *Bioanalysis*, 2016. **8**(10): p. 1051-1065.
10. Burnett, J.E., *Dried blood spot sampling: practical considerations and recommendation for use with preclinical studies*. *Bioanalysis*, 2011. **3**(10): p. 1099-107.
11. Hansen, S. and S. Pedersen-Bjergaard, *Bioanalysis of pharmaceuticals : sample preparation, separation techniques, and mass spectrometry*. pages cm.

12. *Composition of Blood and its Functions*. [accessed 04.05.2016]; Available from: <http://fbt.cz/en/skripta/v-krev-a-organy-imunitniho-systemu/1-slozeni-krve/>.
13. Abdul Kareem, J.A.-B. and S. Nadia Hussein, *Study Of Some Mechanical Properties Of High Viscosity Carboxy Methyl Cellulose Using Ultrasonic Wave System*. Journal of Babylon University *مجلة جامعة بابل لعلوم بابل*, 2013. **21**(4): p. 1439-1446.
14. Waring, M.J. and D. Parsons, *Physico-chemical characterisation of carboxymethylated spun cellulose fibres*. *Biomaterials*, 2001. **22**(9): p. 903-912.
15. *Usage of carboxymethyl cellulose*. [accessed 09.05.2016]; Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Carboxymethyl_cellulose#cite_note-2.
16. *Advanced LC-MS applications for proteomics*. [accessed 12.04.2016]; Available from: <http://www.bioanalysis-zone.com/series/lcmsproteomics/>.
17. Gaspari, M. and G. Cuda, *Nano LC-MS/MS: A Robust Setup for Proteomic Analysis*, in *Nanoproteomics: Methods and Protocols*, A.S. Toms and J.R. Weil, Editors. 2011, Humana Press: Totowa, NJ. p. 115-126.
18. Gama, M.R., C.H. Collins, and C.B.G. Bottoli, *Nano-Liquid Chromatography in Pharmaceutical and Biomedical Research*. *Journal of Chromatographic Science*, 2013.
19. Pedersen-Bjergaard, S and .R. K. E., *Legemiddelanalyse*, ed. Fagbokforlaget. 2004.
20. Ho, C., et al., *Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications*. *Clin Biochem Rev*, 2003. **24**(1): p. 3-12.
21. Banerjee, S. and S. Mazumdar, *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte*. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2012. **2012**: p. 40.
22. *Advantages of NanoESI*. [accessed 14.05.2016]; Available from: http://www.newobjective.com/electrospray/nano_advantages.shtml.
23. *Nanospray Ion Source user guide*. [accessed 14.05.2016]; Available from: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Man-97055-97046-Nanospray-User-Man9705597046-C-EN.pdf>.

24. *Massespektrometer*. [accessed 04.05.2016]; Available from: <https://snl.no/massespektrometer>.
25. *Kvadrupol* [accessed 02.05.2016]; Available from: <https://snl.no/kvadrupol>.
26. Kicman, A.T., M.C. Parkin, and R.K. Iles, *An introduction to mass spectrometry based proteomics—detection and characterization of gonadotropins and related molecules*. Molecular and cellular endocrinology, 2007. **260**: p. 212-227.
27. *Kvadrupol figur*. [accessed 02.05.2016]; Available from: http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/2011_0001_524_Biofizika/ch10s07.html.
28. Picotti, P. and R. Aebersold, *Selected reaction monitoring-based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions*. Nat Meth, 2012. **9**(6): p. 555-566.
29. Tipton, J.D., et al., *Analysis of Intact Protein Isoforms by Mass Spectrometry*. The Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(29): p. 25451-25458.
30. Krutchinsky, A.N., H. Cohen, and B.T. Chait, *A novel high-capacity ion trap-quadrupole tandem mass spectrometer*. International journal of mass spectrometry, 2007. **268**: p. 93-105.
31. Schwartz, J.C., M.W. Senko, and J.E.P. Syka, *A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2002. **13**(6): p. 659-669.
32. Yates, J.R., C.I. Ruse, and A. Nakorchevsky, *Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications*, in *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2009, Annual Reviews: Palo Alto. p. 49-79.
33. Scigelova, M. and A. Makarov, *Orbitrap mass analyzer--overview and applications in proteomics*. Proteomics, 2006. **6 Suppl 2**: p. 16-21.
34. Hu, Q., et al., *The Orbitrap: a new mass spectrometer*. J Mass Spectrom, 2005. **40**(4): p. 430-43.
35. Annesley, T.M., *Ion suppression in mass spectrometry*. Clin Chem, 2003. **49**(7): p. 1041-4.

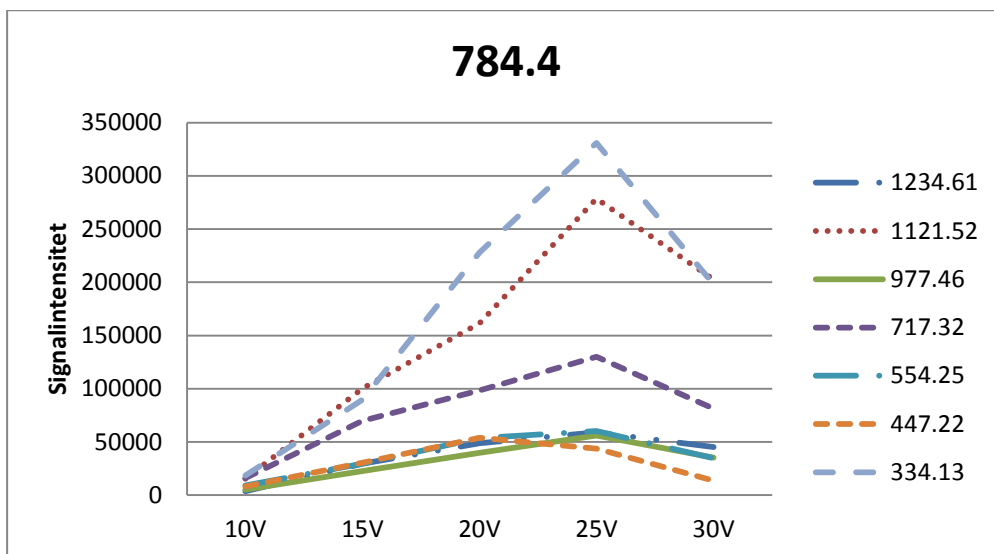
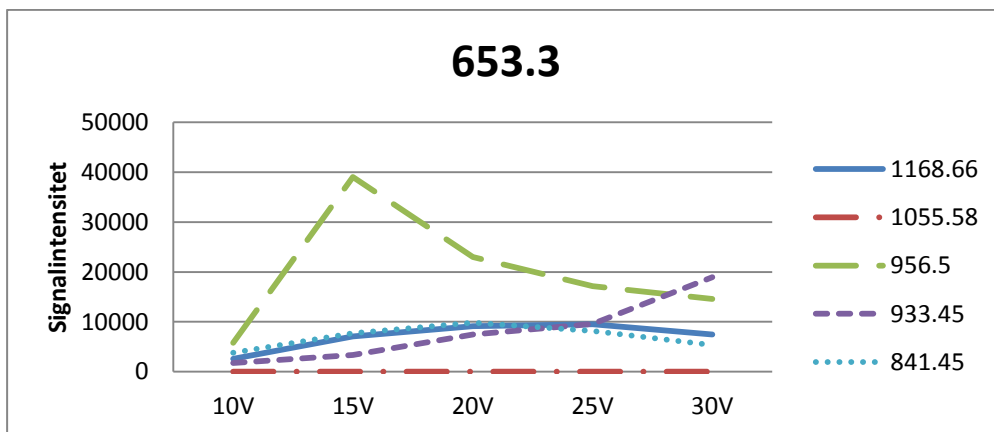
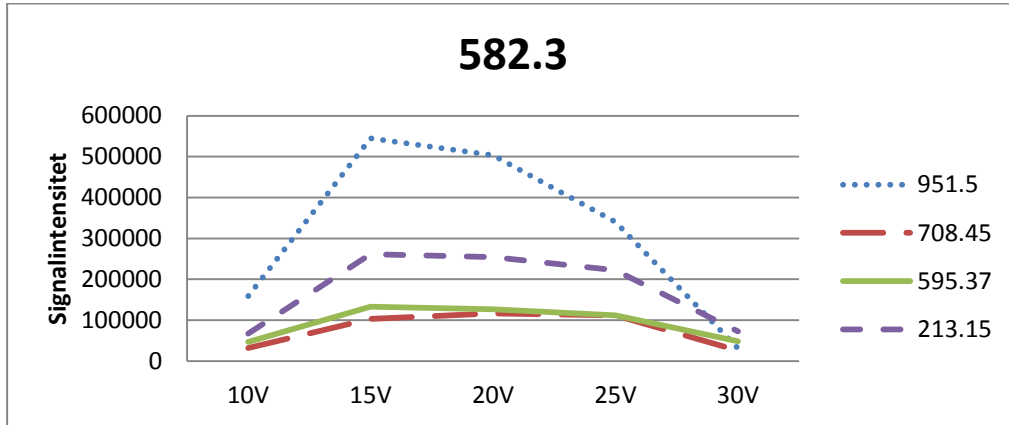
36. Taylor, P.J., *Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry*. *Clinical Biochemistry*, 2005. **38**(4): p. 328-334.
37. Matuszewski, B.K., M.L. Constanzer, and C.M. Chavez-Eng, *Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS*. *Anal Chem*, 2003. **75**(13): p. 3019-30.
38. *Structure of BSA*. [accessed 27.02.2016]; Available from: <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=3V03>.
39. Switzar, L., M. Giera, and W.M. Niessen, *Protein digestion: an overview of the available techniques and recent developments*. *J Proteome Res*, 2013. **12**(3): p. 1067-77.
40. Vandermarliere, E., M. Mueller, and L. Martens, *Getting intimate with trypsin, the leading protease in proteomics*. *Mass Spectrometry Reviews*, 2013. **32**(6): p. 453-465.
41. Polson, C., et al., *Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2003. **785**(2): p. 263-75.
42. Kay, R., et al., *Enrichment of low molecular weight serum proteins using acetonitrile precipitation for mass spectrometry based proteomic analysis*. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2008. **22**(20): p. 3255-60.
43. Koster, R.A., et al., *What is the right blood hematocrit preparation procedure for standards and quality control samples for dried blood spot analysis?* *Bioanalysis*, 2015. **7**(3): p. 345-51.
44. *E-verdi og bit score*. [accessed 09.03.2016]; Available from: http://homepages.ulb.ac.be/~dgonze/TEACHING/stat_scores.pdf.
45. Halquist, M.S. and H. Thomas Karnes, *Quantitative liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of macromolecules using signature peptides in biological fluids*. *Biomed Chromatogr*, 2011. **25**(1-2): p. 47-58.
46. Fountoulakis, M., et al., *Depletion of the high-abundance plasma proteins*. *Amino Acids*, 2004. **27**(3-4): p. 249-59.

47. Khan, N.A., *HPLC of peptides and proteins: methods and protocols*, edited by Marie-Isabel Aguilar (methods in molecular biology, volume 251, series editor J. M. Walker). Humana Press, Totowa, NJ, 2003, 413 pp, ISBN: 0-86903-977-3. Biomedical Chromatography, 2004. **18**(7): p. 475-475.
48. Chambers, A.G., et al., *Multiple Reaction Monitoring Enables Precise Quantification of 97 Proteins in Dried Blood Spots*. Mol Cell Proteomics, 2015. **14**(11): p. 3094-104.
49. Denniff, P. and N. Spooner, *The effect of hematocrit on assay bias when using DBS samples for the quantitative bioanalysis of drugs*. Bioanalysis, 2010. **2**(8): p. 1385-95.
50. Fan, L. and J.A. Lee, *Managing the effect of hematocrit on DBS analysis in a regulated environment*. Bioanalysis, 2012. **4**(4): p. 345-7.

9 Vedlegg

Vedlegg 1

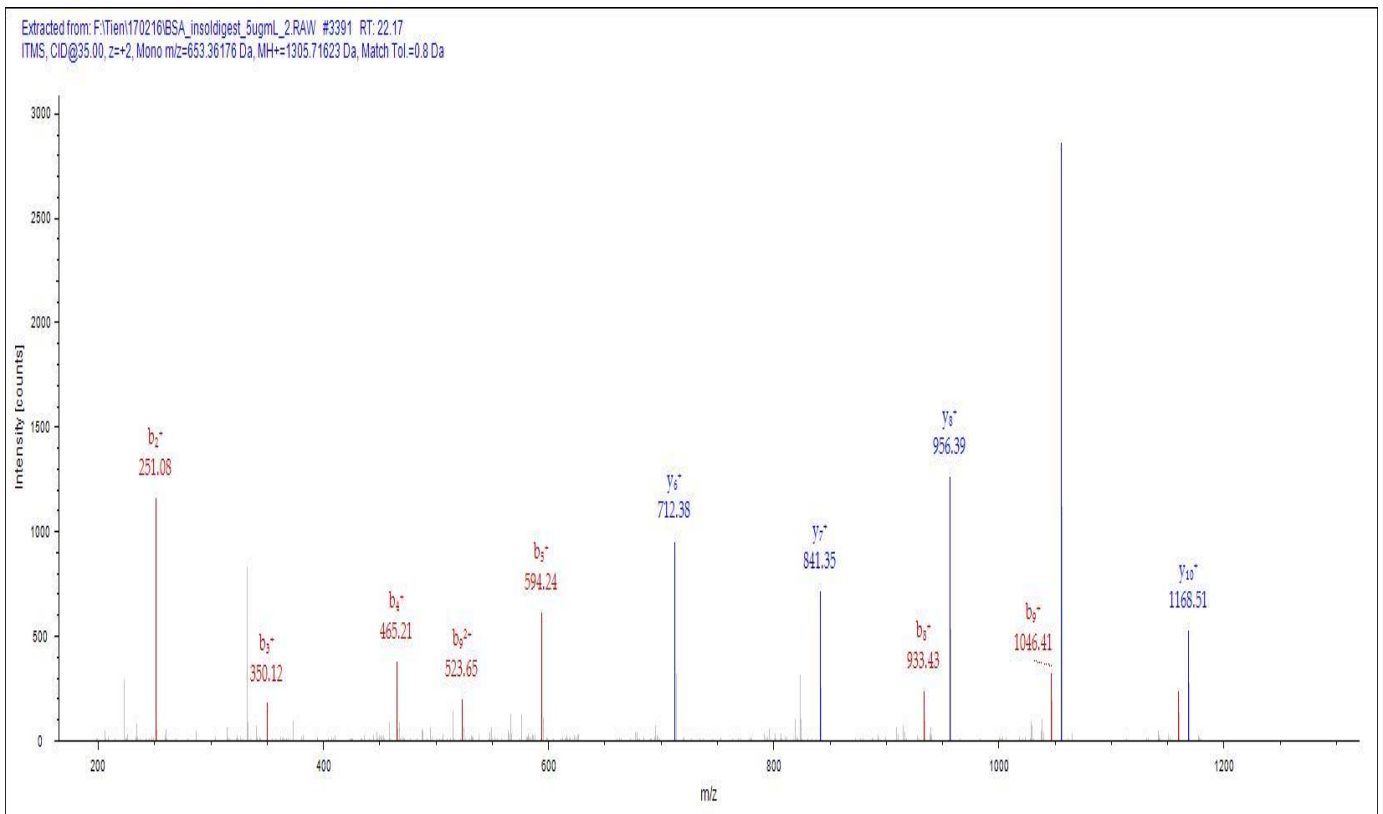
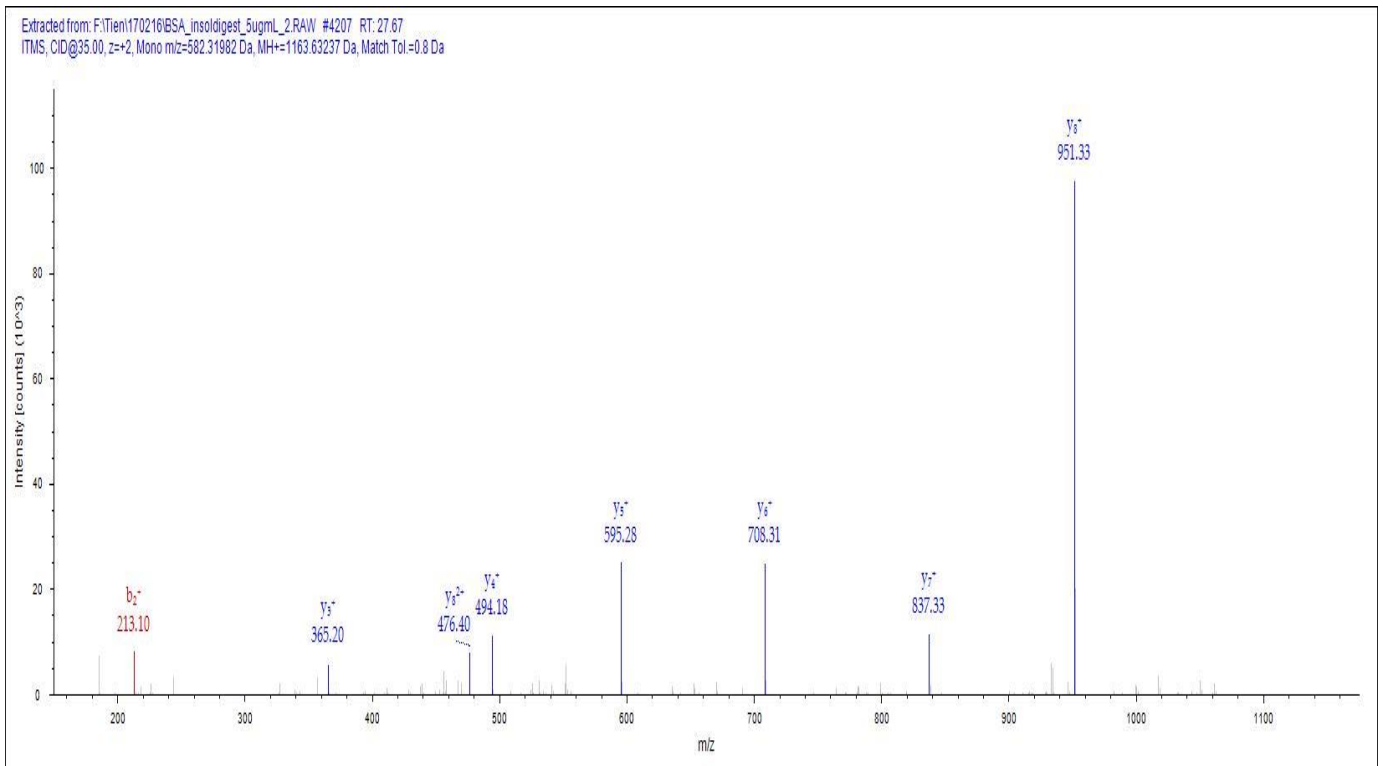
Figurene under viser productscan av signaturpeptidene 582.3, 653.3 og 784.4 for å finne optimal kollisjonsenergi for peptidene og hvilke ioner som gir høyest signalintensitet.



Vedlegg

Vedlegg 2

Figurene under viser MS/MS-spekteret for peptidene 582,3, 653,3 og 784,4



Extracted from: F:\Tien\170216\BSA_insoldigest_5ugmL_2.RAW #6415 RT: 43.17
ITMS, CID@35.00, z=+2, Mono m/z=784.37512 Da, MH+=1567.74297 Da, Match Tol=0.8 Da

