

Оценка протеомного профиля микровезикул В-лимфоцитов больных хроническим лимфолейкозом

Клюшова Л. С.

Новосибирский государственный университет

Внеклеточные везикулы играют ключевую роль в межклеточной сигнализации и являются специфичными признаками многих физиологических процессов – как нормальных, так и патологических, в том числе канцерогенеза. Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) – онкогематологическое заболевание, характеризующееся накоплением атипичных зрелых В-лимфоцитов. Выделяемые В-лимфоцитами везикулы могут выступать маркерами для диагностики и прогнозирования ХЛЛ. Они характеризуются различным протеомным составом, оценка которого имеет ряд методических трудностей.

Цель данной работы – подбор оптимальных условий пробоподготовки для масс-спектрометрического (МС) анализа микровезикул, включая выделение микровезикул, экстракцию белков, их ферментативный гидролиз и обессоливание проб, а также подбор условий для МС с предварительным разделением компонентов смеси на ВЭЖХ-системе.

На бычьем сывороточном альбумине было проведено сравнение условий для всех критических этапов протокола пробоподготовки In-solution Digestion. В качестве компонентов солиubilизации и денатурации белка сравнивались мочевины и дезоксихолат натрия (SDC). Было установлено, что протокол с мочевиной дает большее покрытие последовательности белка и большее количество пептидных идентификаций. Также была подобрана оптимальная концентрация трипсина для ферментативного гидролиза. Пробы обессоливали с помощью носиков ZipTip и экстрагирующих дисков C₁₈. Перед трипсинизацией использовали концентраторы для увеличения количества белка в пробе.

Микровезикулы были выделены из крови больных ХЛЛ последовательным центрифугированием и верифицированы методом вестерн-блот. С помощью МС/МС-анализа с предварительным разделением пептидов на ВЭЖХ-системе были получены масс-спектры. Белки, идентифицированные с использованием программы Mascot, согласно базе данных Gene Ontology принадлежат микровезикулам.

Таким образом, был получен протокол пробоподготовки, который позволяет качественно оценить протеомный состав микровезикул.

Научный руководитель – канд. мед. наук Воронцова Е. В.