

Factores limitantes

- Los tampones salinos concentrados y las aminas primarias pueden interferir con alguno de los pasos de la reacción química de Edman.
- Las muestras transferidas a PVDF siempre contienen, en mayor o menor medida, Tris y glicina. El Tris interfiere con la química de Edman y la glicina con el análisis de los datos cromatográficos.
- El glicerol y la sacarosa, añadidos frecuentemente a los tampones diseñados para la manipulación y conservación de proteínas, son muy viscosos y nada volátiles, características que inciden desfavorablemente en el funcionamiento adecuado del secuenciador.
- El SDS dificulta el correcto funcionamiento del secuenciador y favorece la pérdida de cantidades significativas de muestra.
- La presencia de aminoácidos libres, péptidos o cualquier otra molécula con alta absorbancia en el UV o capaz de reaccionar con el PITC (ej. aminas primarias) generan un alto "background" en los cromatogramas iniciales que entorpece el análisis de los datos e incluso puede imposibilitar la asignación de los primeros residuos.
- Las cisteínas que no han sido alquiladas previamente no se detectan, dan un ciclo conocido como blanco.
- Los aminoácidos fosforilados, glicosilados, o con otras modificaciones pueden dar lugar a un ciclo en blanco o a picos cromatográficos de menor intensidad o con un tiempo de retención alterado.
- **Bloqueo N-terminal.** Las proteínas o péptidos cuyo extremo N-terminal está bloqueado no pueden secuenciarse. Aproximadamente el 50% de todas las proteínas tienen el extremo amino bloqueado, bien de forma natural (ej. grupo amino acetilado, formilado...) o bien porque se bloquea durante la manipulación, purificación o conservación. En este segundo caso, la modificación del extremo N-terminal puede deberse a alguna de las siguientes causas: manipulación de la muestra a pH básico (> 9.0), uso de agua o reactivos de baja calidad, exposición a temperaturas elevadas (glutamina N-terminal), exposición a inhibidores de proteasas (algunos inhibidores pueden reaccionar con grupos amino), uso de ácido fórmico (ej. digestión con CNBr) que puede formilar el extremo amino (utilizar 50-70% de TFA como alternativa), o exposición a urea que no ha sido desionizada previamente con una resina de intercambio iónico (ej. Amberlite) (los iones cianato derivados de la urea carbamilan las proteínas).

Existen diferentes métodos para intentar desbloquear el extremo N-terminal, aunque generalmente todos ellos requieren cantidades relativamente grandes de proteína y el

éxito alcanzado tras su aplicación es muy variable, especialmente si se desconoce la naturaleza del grupo de bloqueo.

Protocolos de desbloqueo: Joseph W. Leone, Brian Hampton, Elizabeth Fowler, Mary Moyer, Radha G. Krishna, and Christopher C.Q. Chin. Removal of N-Terminal Blocking Groups from Proteins. *Current Protocols in Protein Science* 11.7.1-11.7.20, Published online February 2011 in Wiley Online Library. DOI:10.1002/0471140864.ps1107s63 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471140864.ps1107s63/full>