

Agilent 6550 Q-TOF 質量分析装置を使用したインタクトタンパク質の分析

アプリケーションノート

著者

Ravindra Gudihal and Suresh Babu CV
Agilent Technologies India Pvt. Ltd.
Bangalore India

Ning Tang
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA USA

Madhavi H.N and Uma Maheshwari
GangaGen Biotechnologies Pvt. Ltd,
Bangalore, India

はじめに

LC/MS は、バイオ医薬品業界で医薬品用タンパク質の分子量の確認に広く使用されてきました。LC/MS は高速で高精度の比較定量が可能で、精密質量測定は、予想される翻訳後修飾 (PTM) が目的のタンパク質配列上に発現しているかを確認するうえで役立ちます。また、同じサンプル内のさまざまなタンパク質や PTM の相対存在量も確認できます。高い分離能と高い感度を備えた質量分析装置を使用すれば、このような分析を簡単に行うことができます。このアプリケーションノートでは、Agilent 6550 Q-TOF 質量分析装置を使用したインタクトタンパク質の分析について説明します。



Agilent Technologies

実験方法

サンプル

3 % アセトニトリル (ACN) および 96.9 % 0.1 % ギ酸 (FA) を使用してモノクローナル抗体 (mAb) を 100 µg/mL に希釈しました。サンプル注入量は 1 µL (100 ng) に設定しました。精製したタンパク質サンプル (P128) を GangaGen Biotechnologies Pvt. Ltd から購入し、3 % アセトニトリル (ACN) および 96.9 % 0.025 % トリフルオロ酢酸 (TFA) を使用して分析しました。

機器

LC システム

Agilent 1290 Infinity LC システム

MS システム

Agilent JetStream を搭載した

Agilent 6550 iFunnel Q-TOF

結果と考察

タンパク質は、エレクトロスプレーイオン化では多価イオンを形成します。モノクローナル抗体などの高分子タンパク質では、図 1 に示すような電荷分布を示します。この分布の中心は電荷 48 です。それぞれのピークを拡大すると、複数のピークが観察されますが、これらは mAb に結合した異なるグリコフォームの存在を表しています。Agilent MassHunter BioConfirm ソフトウェアのピークモデリングデコンボリューションアルゴリズムを用いて、スペクトルのデコンボリューションを行います。この結果、複数の電荷スペクトルが電荷ゼロの質量スペクトルに変換されます。図 2 にその結果を示します。

LC/MS 条件

パラメータ	Agilent 1290 LC システム
カラム	Agilent Poroshell 300SB C8 1.0 × 75 mm、5 µm または Agilent ZORBAX RRHD 300 Diphenyl、2.1 × 100 mm、1.8 µm (p/n 858750-944)
カラム温度	80 °C または 60 °C
サンプルのサーモスタット	5 °C
移動相 A	0.1 % ギ酸水溶液または 0.025 % TFA 水溶液
移動相 B	90 % アセトニトリル水溶液 + 0.1 % ギ酸
グラジエント	0~1 分 3 % B 1~5 分 3~90 % B 5~6 分 90 % B 6~7 分 3 % B
ストップタイム	7 分
流速	0.4 mL/min
イオンモード	ポジティブイオンモード、ESI (プロファイル)
乾燥ガス温度	290 °C
乾燥ガス流量	14 L/min
シースガス温度	400 °C
シースガス流量	12 L/min
ネブライザ	20 psi
キャピラリの電圧	5,000 V
ノズル	2,000 V
データ解析	LC/MS で取得したデータを、Agilent MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェア B.06 および Agilent MassHunter BioConfirm ソフトウェア B.06 を使用して分析

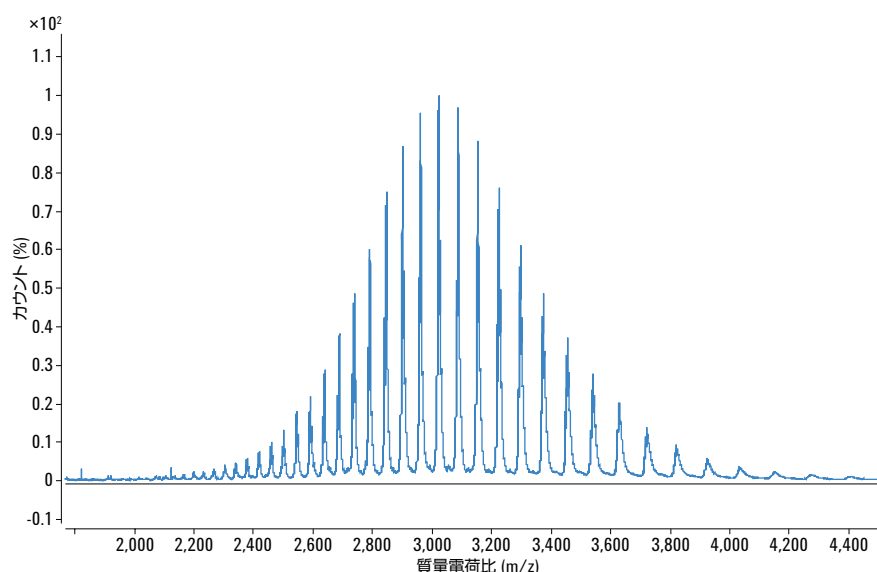


図 1. インタクト mAb の電荷分布の LC/MS 生データ

この mAb では 5 つの主なグリコフォームが観察されました。図 3 および 4 に、分子量 26,490 Da の医薬品用タンパク質 P128 の別の例を示します。

結論

- Agilent 1290 Infinity LC システムを Agilent 6550 iFunnel Q-TOF と結合して使用した医薬品用タンパク質の分析について説明しました。
- Agilent 1290 Infinity LC システムは高速で優れた分離力を、Agilent 6550 iFunnel Q-TOF は優れた分離能と感度を提供します。
- Agilent MassHunter BioConfirm ソフトウェアによりデータの自動抽出、デコンボリューション、およびタンパク質の確認を行いました。

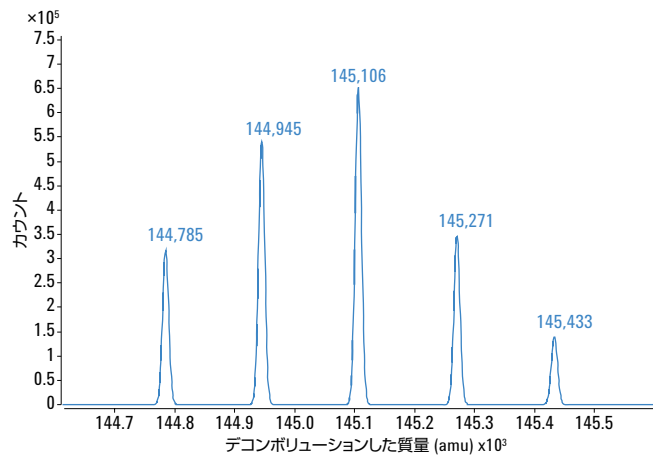


図 2. インタクト mAb をデコンボリューションしたスペクトル。主なピークは mAb の主要なグリコフォームです。

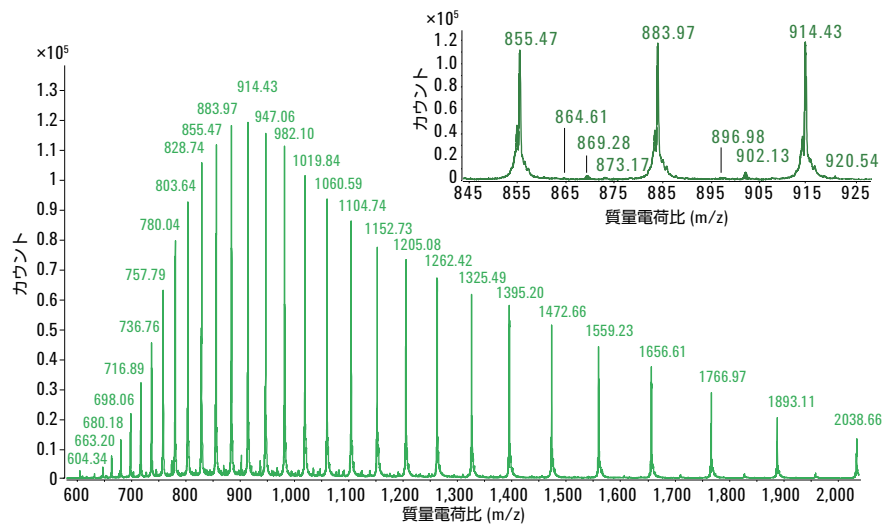


図 3. P128 の電荷分布の LC/MS 生データ。挿入図は P128 の電荷状態を拡大したもの

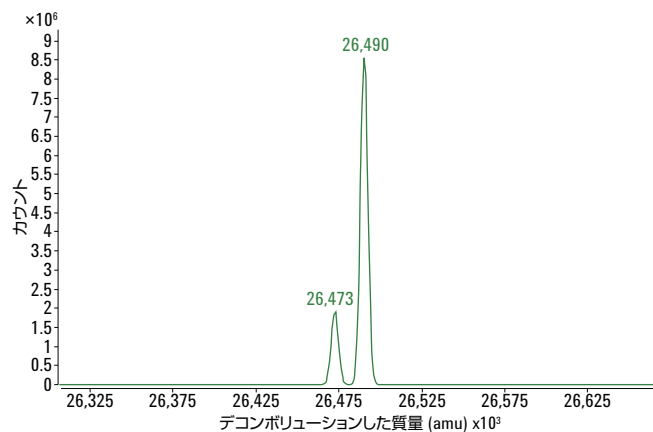


図 4. P128 をデコンボリューションしたスペクトル

www.agilent.com/chem/jp

本製品は薬事法に基づく医療機器の登録を行って
おりません。
本資料記載の情報は予告なしに変更されることが
あります。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2013
Published in Japan , March 29, 2013
5991-2116JAJP



Agilent Technologies