



トリプル四重極 LC/MS による 高質量電荷比ペプチドイオンのルーチン分析

アプリケーションノート

ターゲットプロテオミクス

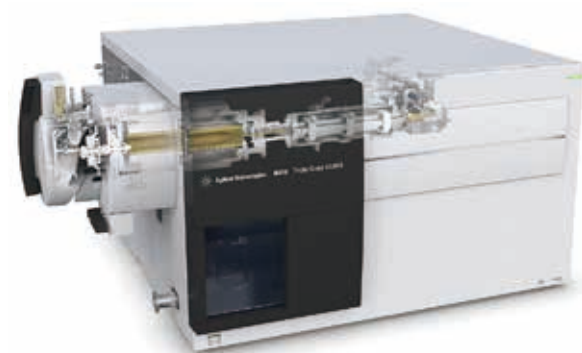
著者

Linfeng Wu, Christine A. Miller,
Jordy Hsiao, Te-wei Chu, Behrooz Zekavat, and
Anabel Fandino

概要

トリプル四重極 LC/MS によるタンパク質のルーチンのハイスループット定量分析では、該当するタンパク質の代用物としてペプチドを使用します。分析の成功は、特異的なペプチドの選択と各ターゲットペプチドに適した MRM トランジションの選択にかかっています。多くの場合、高 m/z のプリカーサイオンやプロダクトイオンを持つペプチドは機器の質量範囲の制限のために選択されません。しかし、生物学上の疑問に対処するために、これらの高 m/z のペプチドは重要な情報を提供したり、唯一の分析上の選択肢となる場合があります。これに該当する例として、広い疎水性膜貫通領域がある膜タンパク質、広範囲の翻訳後修飾のあるタンパク質、内因的に生成されるペプチドがあります。

このアプリケーションノートでは、高 m/z プロダクトイオンを持つペプチドに対する Agilent 6495B トリプル四重極 LC/MS の性能を示し、最大 m/z 3,000 の質量範囲があることの利点を示します。一般的な消化済みモノクローナル抗体 (mAb) 標準と HeLa 細胞膜濃縮抽出物をシンプルなサンプルおよび複雑なサンプルとしてそれぞれ使用しました。



Agilent Technologies

実験メソッド

タンパク質/ペプチドの選択

Agilent 6550 Q-TOF 質量分析システムを使用し、データ独立モードで anti-IL8 mAb 消化物および HeLa 膜濃縮タンパク質消化物に対して LC/MS データを取り込みました。高 m/z のプロダクトイオンを生成するペプチドを同定して Agilent 6495B トリプル四重極質量分析システムの性能をテストするために、Agilent Spectrum Mill (Rev B.05.00.181 SP1) を使用して適切なデータベースに対して生データを検索しました。

LC/MS/MS システム

Agilent 1290 Infinity UHPLC システムを質量範囲が 3,000 u の 6495B トリプル四重極 LC/MS に接続しました。LC/MS 実験は、Agilent Jet Stream (AJS) イオン源と Agilent Poroshell 120 EC-C18、2.1 × 100 mm 2.7 μm カラム (p/n 695775-902) を使用して行いました。mAb 消化物には 3.5 分 MRM メソッドを使用し、HeLa 膜消化物には 21 分 MRM メソッドを使用しました。

糖ペプチドの定量には、mAb 消化物を順次希釈し、各注入レベルについての信号応答を全 mAb 消化物量オンカラムに対してプロットしました。

HeLa 膜ペプチドの定量については、各プロダクトイオンの信号応答を相当する注入量オンカラムに対してプロットしました。

表 1. Agilent 6495 トリプル四重極 LC/MS メソッド

パラメータ	設定
イオンモード	AJS、ポジティブ
ガス温度	150 °C
乾燥ガス流量	15 L/min
ネブライザガス	30 psi
シースガス温度	200 °C
シースガス流量	11 L/min
キャピラリー電圧	3,500 V
ノズル電圧	0 V
高/低圧 RF 電圧	200/110 V
デルタ EMV	100 ~ 200 V
Q1 および Q3 分解能	ワイド/ユニット
フラグメンタ	380 V
セル加速電圧	4 V
サイクル時間	267 ~ 369 ms

表 2. LC/MS/MS テスト用に選択したペプチドとイオン。

タンパク質名	ペプチド	修飾	m/z プリカーサ	m/z MRM クオンティファイア	m/z MRM クオリファイア
Anti-IL8 mAb 抗体	EEQYN[+1606.6]STYR	N-グリカン G1F	932.7	204.1	366.1 1,392.6 2,065.8 2,227.9
ステロールO-アシルトランス フェラーゼ 1	SSTVPIPTVNVQYLYFLFAPTLIYR	なし	1,402.3	1,215.2	762.5 1,110.1 2,219.2 2,429.3
ATP シンターゼ サブユニット d, ミトコンドリア	NLIPFDQMTIEDLNFAFPETK	なし	1,233.1	1,063.0	228.1 341.2 474.3 2,125.0
ADP/ATP トランスロカーゼ 1	YFAGNLASGGAAGATSLC[+57FVYPLDFAR	カルバミドメチル化	1,398.7	718.4	175.1 881.5 1,915.9 2,060.0

結果と考察

ペプチドの同定と選択

ペプチドの同定とMRMメソッド開発のために、Anti-IL8 mAb 消化物と HeLa 膜消化物を使用して次の結果を得ました。

LC/MS/MS テストに、 m/z 204.1 ~ m/z 2,429.3 の範囲のプロダクトイオンを持つ mAb 消化物から1つのG1F N-糖ペプチドと HeLa 膜消化物から3種類のペプチドを選択しました (表 2)。

図 1 と図 2 は、この中の 2 種類のペプチドの MS/MS スペクトルと最適化された MRM クロマトグラフィーを示しています。MRM メソッド用に選択したプロダクトイオンには MS/MS プロット内に * のマークを付けています。

糖ペプチドは大きなグリカン鎖を持つ高 m/z のプロダクトイオンを生成します。これらのプロダクトイオンはグリカン構造を解釈するための有益な情報を提供します。

プロダクトイオンは m/z が高くなると、バックグラウンドノイズが小さくなる傾向があり、また複雑なサンプルでは S/N 比が大きくなる傾向があります。

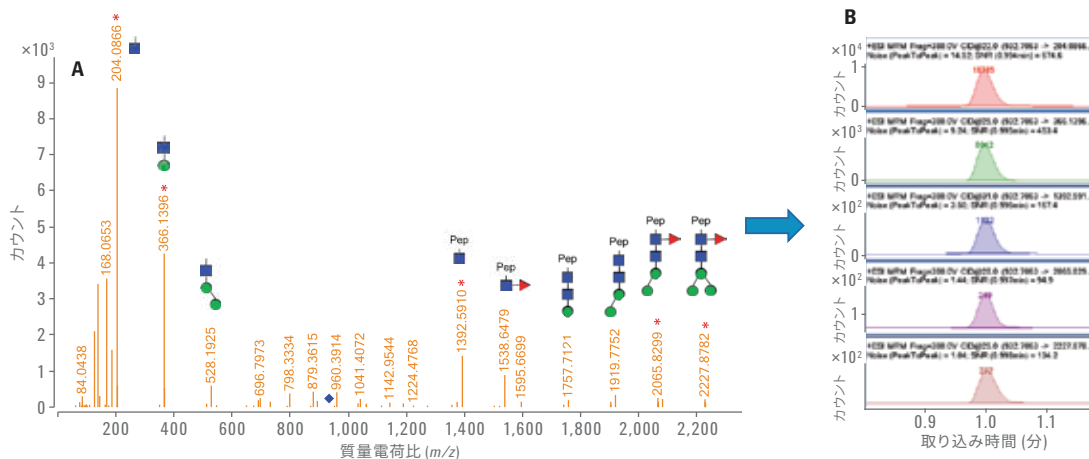


図 1. G1F 糖ペプチド EEQYNI+1606.6]STYR の MS/MS スペクトルと最適化された MRM クロマトグラフィー。

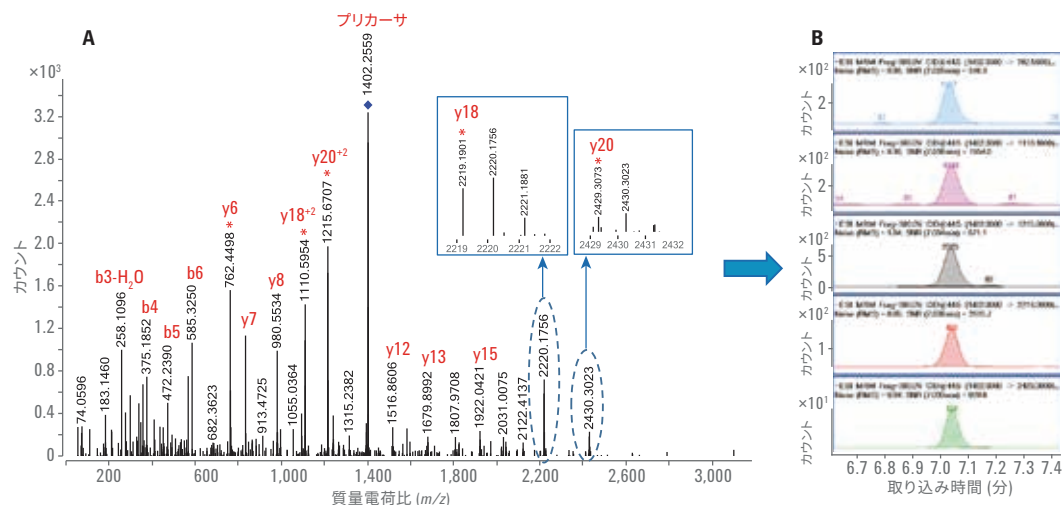


図 2. ペプチド SSTVPIPTVNQYLYFLFAPTLIYR の MS/MS スペクトルと最適化された MRM クロマトグラフィー。

糖ペプチドの定量

Agilent Jet Stream 技術を搭載した 1290 Infinity UHPLC システムとシステム質量範囲が 3,000 u の 6495B トリプル四重極 LC/MS を使用して、糖ペプチドを定量して次の結果を得ました (図 3)。

- 全 mAb 消化物オンカラムが 0.0197 ng (130 amol) の低い注入量も含めすべてのレベルで優れた精度と真度が得られました (18.5 % RSD、97.5 % の真度)。このターゲットペプチドは全タンパク質の約 10 % を示すものと推定されるため、この糖ペプチドの LOQ は約 13 amol オンカラムと推定されます。
- 広質量範囲 (m/z 204.1 ~ m/z 2,227.9) のプロダクトイオンについての再現性のある応答
- 優れたリテンションタイム (RT) 再現性 ($n = 90$ は RSD % = 0.47 %)
- 小さなシグナル値の低注入レベルにおいての優れた直線性 (0.0197 ng ~ 19.7 ng、 $R^2 = 0.998$)

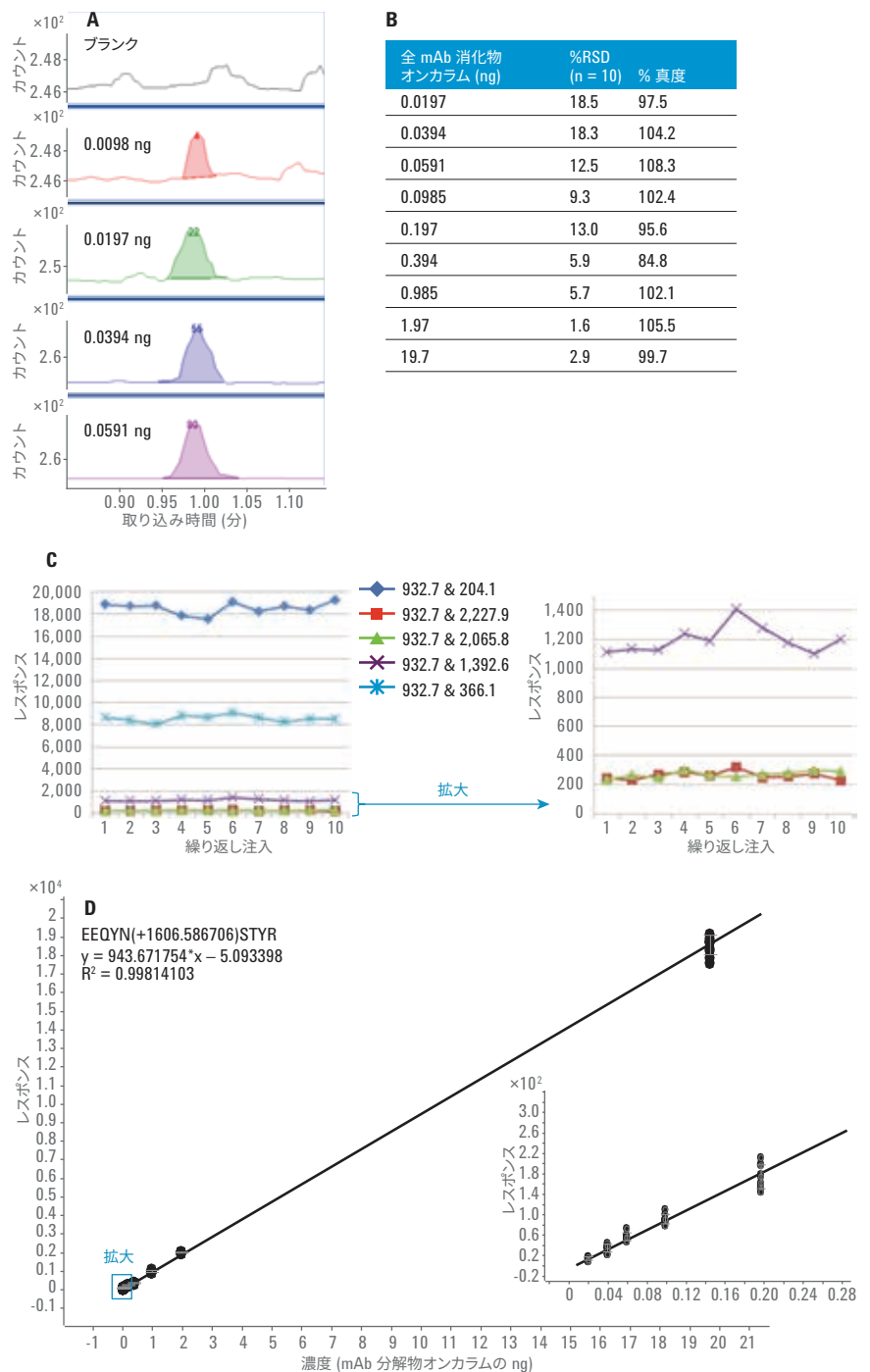


図 3. G1F 糖ペプチド EEQYN[+1606.6]STYR の定量。

HeLa 膜ペプチドの定量

HeLa 膜濃縮サンプル消化物からの 3 種類のペプチドを、糖ペプチドと同じ手順に従って定量し、高 m/z プロダクトイオンの挙動をテストしました (図 4)。

- サンプル中のペプチドの化学量論が未知のため、3 種類のペプチドそれぞれのクオンティファイア応答を相当する注入量オンカラムに対してプロットしました (左のプロット)。
- 良好な直線性が得られました ($0.989 \sim 0.997$ の R^2 範囲)。
- 広質量範囲 (最大 m/z 2429.3) を持つプロダクトイオンについて再現性のある応答が得られました (右のプロット)。

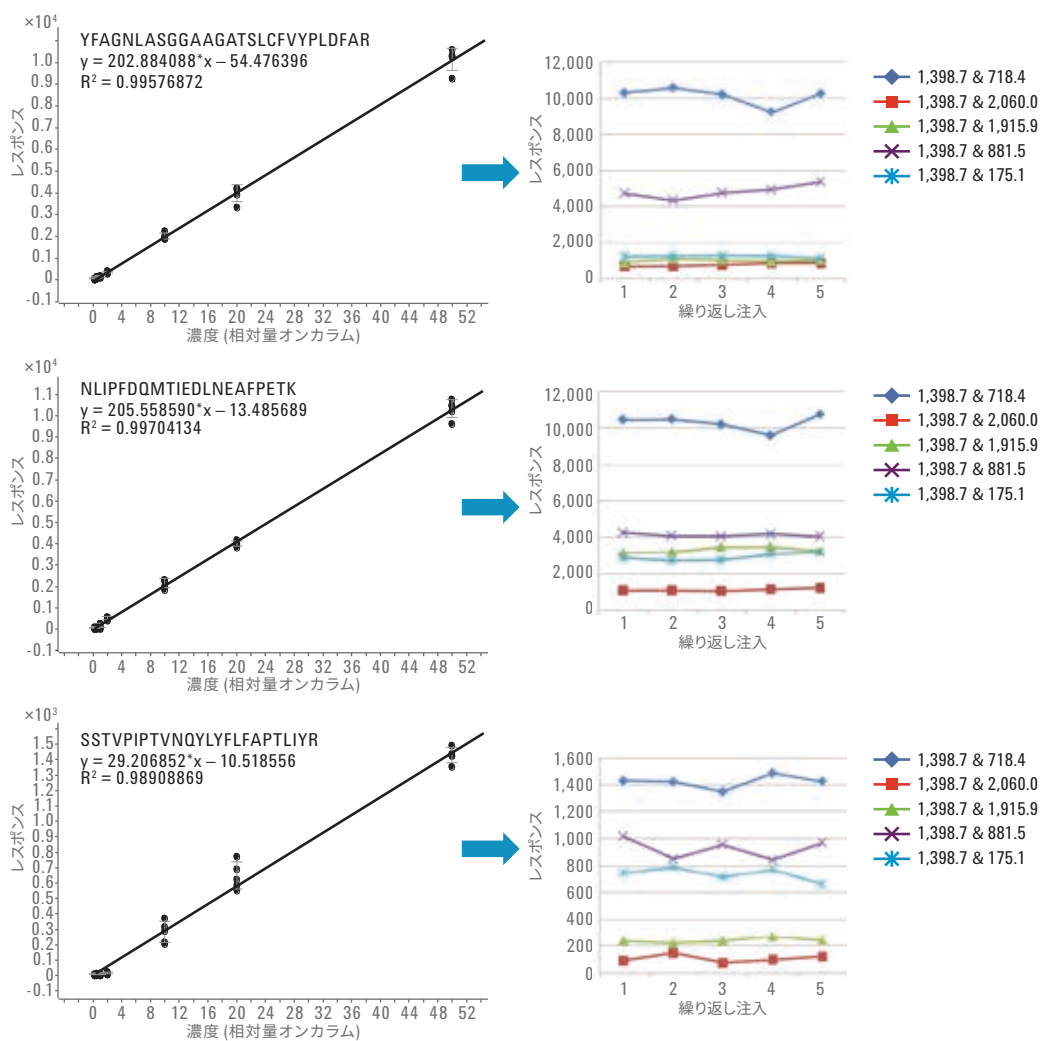


図 4. HeLa 膜消化物からのペプチドの定量。

結論

Agilent 6495B トリプル四重極 LC/MS システムは 3,000 u の質量範囲を備え、高 m/z のペプチドイオンの検出に威力を発揮します。高 m/z のプリカーサーやプロダクトイオンを特に複雑な消化物中で使用する 1 つの利点は、低 m/z のものよりもバックグラウンドノイズが低いことです。高 m/z プロダクトイオンの中には、例えば、グリコシル化のような翻訳後修飾の位置やサイズなどの重要な生体情報を提供するものがあります。

このアプリケーションノートは、Agilent 6495B トリプル四重極 LC/MS システムが実現する高 m/z プロダクトイオンによる MRM トランジションの優れた再現性を示しています。今回の分析では Agilent Jet Stream 技術を一般的な流量で使用して、糖ペプチドと HeLa 膜ペプチド両方の定量において優れた精度と真度を得ることができました。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等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. 2016

Printed in Japan, November 30, 2016

5991-7298JAJP



Agilent Technologies