

Evosep One と Agilent 6495 トリプル四重極 LC/MS による 堅牢性と再現性に優れた 血漿中のタンパク質の定量

著者

Linfeng Wu
Agilent Technologies, Inc.,
Santa Clara, CA, USA

Nicolai Bache and
Dorte B. Bekker-Jensen
Evosep Biosystems, Odense,
Denmark

概要

このアプリケーションノートでは、ヒト血漿タンパク質の MRM ベースの LC/MS 分析に、Agilent 6495 トリプル四重極 LC/MS と Evosep One LC システムを用いた場合の再現性、堅牢性、感度について説明します。結果は、12 日間の分析期間を通してリテンションタイムの再現性が優れていること、さらに堅牢性テストの前後において感度が同等であることを示しており、ハイスループットのタンパク質定量に対してこのシステムが最適であることがわかりました。

はじめに

マルチプルリアクションモニタリング (MRM) ベースのメソッドを用いた、タンパク質バイオマーカー検証のターゲットワークフローがより一般的になりつつありますが、サンプルが複雑で濃度が低い特定のタンパク質は、依然として非常に分析が困難です。したがって、MRM ベースの分析メソッドの開発では、生体サンプルでのターゲット定量プロテオミクスのための安定した同位体標識標準 (SIS) ペプチドを用いており、メソッドの再現性、感度、堅牢性の向上に重点が置かれています。ナノフロー液体クロマトグラフィー / 質量分析法 (LC/MS) では、内径の小さいカラムで最高レベルのイオン化効率を達成することにより、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) のサンプル濃度効果を利用します。ただし、ナノフロー LC/MS では通常、高度なメンテナンス作業が必要になり、複雑なサンプルの場合、ナノカラムの容量が限定されていることにより、クロマトグラフィーの堅牢性が低下します。iFunnel

技術を搭載した Agilent 6495 トリプル四重極 LC/MS と Agilent Jet Stream 技術を組み合わせることにより、標準フロー LC/MS を用いた複雑なマトリックス中のターゲットタンパク質の定量において、非常に優れた感度と堅牢性を実現しました。^{1, 2}しかし、サンプル量が限定されたアプリケーションでは、依然としてナノフロー LC/MS のスループットと堅牢性に関する一般的な課題を克服する必要があります。Evosep One と呼ばれる新しい概念のクロマトグラフィーシステムでは、4 台の低圧ポンプを並列に使用して、使い捨てトラップカラムの Evotip からサンプルを溶出すると同時に、臨床研究アプリケーションに必要な堅牢性とスループットを実現するように特化して設計された、事前に構成したグラジエントも使用します。³このアプリケーションノートでは、Evosep One 機器、Agilent ナノスプレーイオンソース、および Agilent 6495 トリプル四重極 LC/MS を組み合わせたシステムの堅牢性、再現性、および分析感度の性能について示します (図 1)。

分析困難な状況下での機器の堅牢性について示すために、平衡 SIS ペプチド混合物をヒト血漿分解物にスパイクして Evotip に直接ロードしました。LC/MS プラットフォームで、連続した 574 回の繰り返し注入を分析しました。タンパク質定量の精度と真度を評価するために、堅牢性テストの前後で検量線分析を実施しました。分離には事前に構成したグラジエントを使用して、両方の実験で 1 日あたり 60 回のサンプル注入を実施しました。機器は 12 日間連続して稼働させ、その間クリーニング、調整、およびチューニングは実施しませんでした。結果は、血漿中のターゲット定量タンパク質分析において、優れた堅牢性、再現性、および感度性能を示しています。

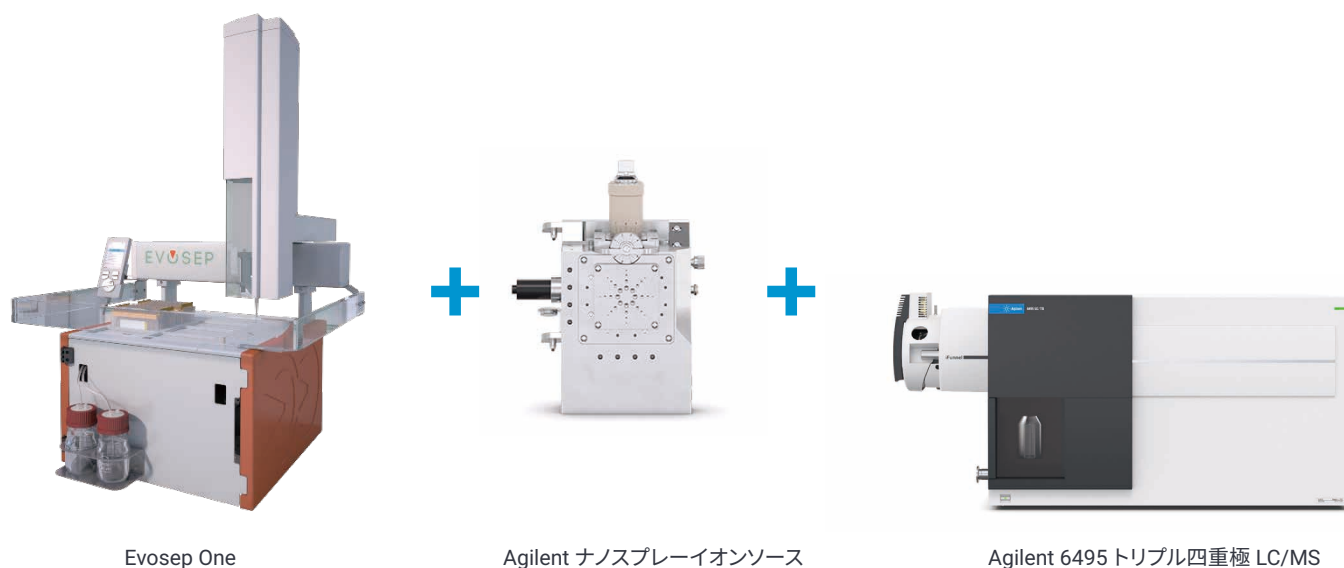


図 1. Evosep One、Agilent ナノスプレーイオンソース、Agilent 6495 トリプル四重極 LC/MS を組み合わせたシステム

実験方法

装置構成

- Evosep One
- Agilent ナノスプレーイオンソース (G1992A)
- Agilent 6495 トリプル四重極 LC/MS (G6495B)

試料調製

ヒト血漿は Bioreclamation から購入しました (カタログ番号 HMPLEDTA2)。PeptiQuant バイオマーカー評価キット (BAK-A6495-76) は Cambridge Isotope Laboratories から購入しました。

サンプル前処理

ヒト血漿を変性、還元、アルキル化、トリプシン消化して前処理し、次に Speedvac により凍結乾燥しました。血漿分解物を再溶解して平衡 SIS ペプチド混合物をスパイクし、次に段階希釈して検量線分析を実施しました。最終的な SIS ペプチド濃度は、元の血漿サンプルに対して 280 fmol/mL ~ 7 nmol/mL の範囲でした。0.7 nmol/mL の同じ SIS ペプチド混合物をスパイクした大量の血漿サンプルも前処理して、堅牢性テストを実施しました。測定を開始する前に、12 日間の連続測定用サンプルをすべて Evtip にロード (~ 1 µg ロード) し、分析を実施するまで冷却しました。

LC/MS 分析

標準化し事前に構成した 21 分グラジエント、および 3 µM C18 ビーズが充填された Pepsep カラム (100 µm × 8 cm) を用いて、すべてのサンプルを Evosep One で分離し、1 日あたり 60 回のサンプル注入を実施しました (表 1)。Agilent ナノスプレーイオンソースのニードルホルダ (コラムシェル) にステンレス製エミッタを組み込みました。LC/MS データの取り込みには、dMRM モードの Agilent 6495 トリプル四重極 LC/MS を用いました。最終的な dMRM メソッドでは、33 ペアの重い内因性ペプチド (198 トランジション、31 のタンパク質バイオマーカーに一致する 66 のペプチド) のトランジションリストを選択しました。

データ処理

Agilent MassHunter ワークステーションソフトウェア (v10.0) と Skyline ソフトウェア (v19.1.0.193) を使用して、ターゲットペプチド定量のためのデータ解析を実行しました。

表 1. LC/MS 取り込みパラメータ

| Evosep One LC システム | |
|---------------------------|-------------------|
| 分析カラム (長さ/内径/C18 ビーズサイズ) | 8 cm/100 µm/3 µm |
| 流量 | 1 µL/min |
| グラジエントの長さ | 21 分 |
| サイクル時間 | 24 分 |
| スループット | 60 (サンプル数/日) |
| Agilent 6495 トリプル四重極質量分析計 | |
| イオンモード | ナノ ESI、ポジティブ |
| ガス温度 | 200 °C |
| ドライガス流量 | 11 L/min |
| キャピラリー電圧 | 1750 V |
| 高/低圧 RF 電圧 | 200/110 V |
| デルタ EMV | 200 V |
| Q1 および Q3 分解能 | Unit/Unit |
| サイクル時間 | 500 msec |
| 最小/最大ドウェルタイム | 5.90 ms/80.589 ms |
| MRM 総数 | 198 |

結果と考察

堅牢性テスト：複雑なサンプル分析

システムの堅牢性を評価するために、平衡 SIS ペプチド混合物をスパイクした 1 µg のヒト血漿分解物を連続して 574 回注入（注入ごとにオンカラム 10 fmol の SIS ペプチド混合物）しました。EvoTip を使い捨てトラップカラムとして使用し、SPE をそれ以上クリーンアップせずに血漿サンプルを直接このカラムにロードしました。21 分の LC-dMRM メソッドにより、サンプルを分離しました。574 回連続し

て注入したターゲットの 33 ペアの重い内因性ペプチドのリテンションタイム (RT) アライメントは、ターゲットペプチドのすべての注入を通して良好で一貫した再現性を示しました (図 2)。この結果は、ハイスループットの研究での Evosep One の優れた再現性と堅牢性を示しています。堅牢性テスト時のすべてのターゲットペプチドに対するピーク面積の相対標準偏差 (RSD) の分布により、MS 信号が高い再現性と堅牢性を示していることがわかります。66 のペプチド中の 62 (93.9%) に対する中央値 RSD は 8.5 % であり、RSD

は 16 % を下回っています。2 つのペアの重い内因性ペプチドのみが、16 % を上回る RSD を示しています。1 つのペアは親水性ペプチド (RT = 2.6 分) であり、溶液中で不安定な状態です。これは、冷蔵庫で一晩保管した後に信号の低下 (> 50 %) が観察されました。他のペアは極度のマトリックス干渉を受けたため、ピーク積分にばらつきがあります。結果として、これら 2 つのペアのペプチドの RSD が高い原因が、機器によるばらつきではないことがわかりました (図 3)。

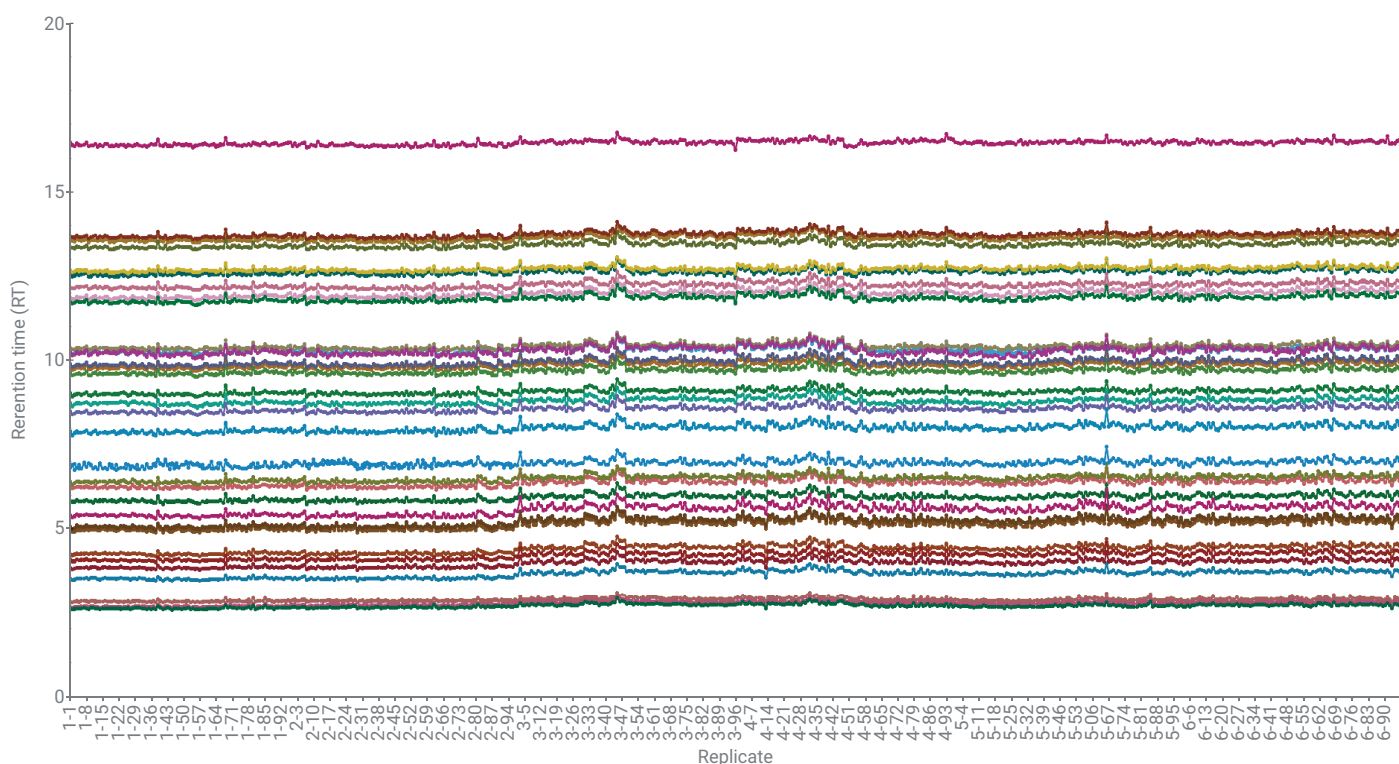


図 2. 堅牢性テスト時の 574 回繰り返し注入による、すべてのターゲットの 33 ペアのペプチドのリテンションタイム分布。ペプチドごとに色分けしています。

4つのタンパク質バイオマーカーに一致している4つの選択したペプチドのMRMピーク面積は、分析プラットフォーム全体の顕著な堅牢性を示しました（図4）：

- LC/MSシステムの調整なしで非常に安定したMSレスポンス（MRMピーク面積のRSDはそれぞれ6.5、7.0、7.9、6.0%、n = 574に対して）
- 良好なRT再現性（RSDはそれぞれ0.69、0.80、1.04、0.59%、n = 574に対して）

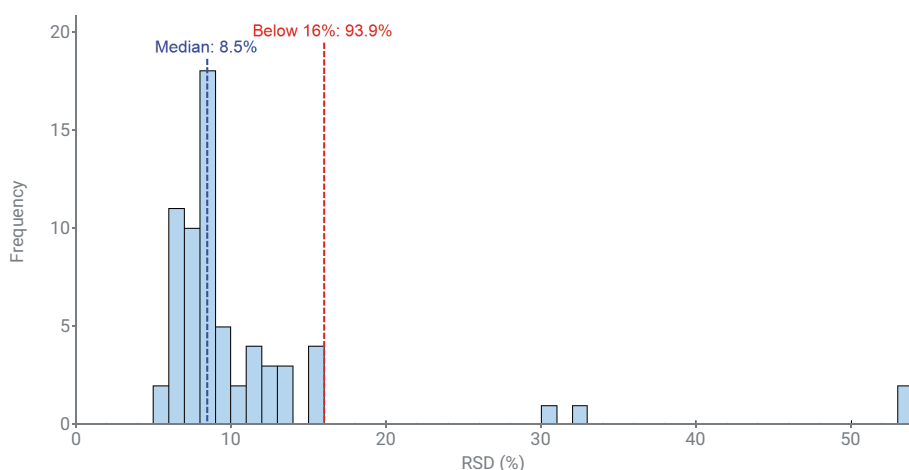
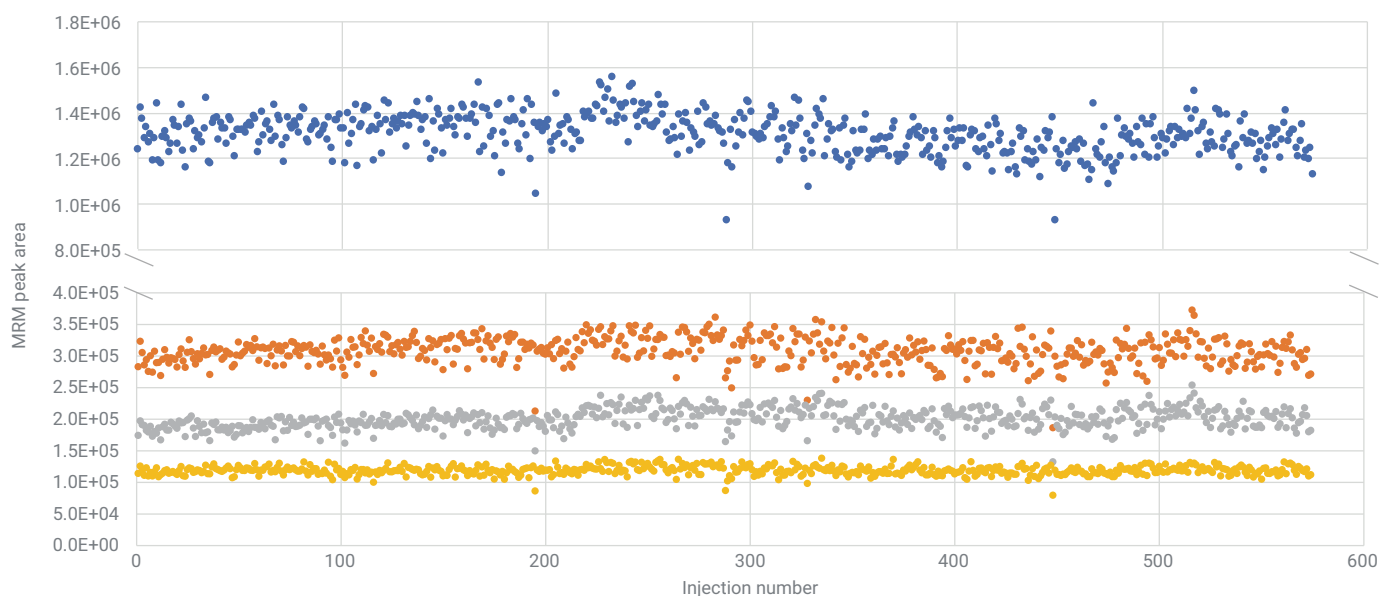


図3. 574回繰り返し注入による、すべてのターゲットペプチドのピーク面積RSD分布。青色の破線は、中央値RSD 8.5%を示しています。赤色の破線は、RSDが16%を下回る93.9%のペプチドを示しています。



- 補体 C3
- ヘモベキシン
- セロトランスフェリン
- アルファ-1B-糖タンパク質

| タンパク質 | ペプチド | 平均 MRM ピーク面積 | MRM ピーク面積 %RSD (n = 574) | 平均 RT (分) | RT %RSD (n = 574) |
|----------------|-----------------|-----------------|-----------------------------|-----------|----------------------|
| 補体 C3 | SGIPIVTSFYQHFTK | 1.31E+06 | 6.5 | 12.2 | 0.69 |
| ヘモベキシン | NFSPVDAAFR | 3.08E+05 | 7.0 | 10.4 | 0.80 |
| セロトランスフェリン | EGYGYTGAFR | 2.00E+05 | 7.9 | 8.8 | 1.04 |
| アルファ-1B-糖タンパク質 | LETPDFQLFK | 1.18E+05 | 6.0 | 13.4 | 0.59 |

図4. 堅牢性テスト時の574回繰り返し注入による、選択した4つのSISペプチドのMRMピーク面積

ヒト血漿中のペプチド標準の定量

血漿中のタンパク質定量の分析感度を評価するために、元の血漿サンプルに対して 280 fmol/mL ~ 7 nmol/mL の範囲の 8 つの異なる濃度において、SIS ペプチド混合物をヒト血漿分解物にスパイクしてから、EvoTip に直接ロードしました (~ 1 µg 血漿分解物)。堅牢性テストの前後に EvoTip からの各注入で検量線を測定しました。EvoTip は堅牢性テストを開始する前に並列にロードして分析を実施するまで冷却保存しました。堅牢性テストの前後に各希釈で 5 回の繰り返し注入を測定し、堅牢性テスト前および堅牢性テストの影響による定量の精度と正確度を評価しました。

補体 C3 由来の SIS ペプチド

SGIPIVTSPTYQHFTK に対して、堅牢性テスト

の前後に測定した 2 つの検量線の結果を以下に示します：

- 両方の検量線に対して定量基準 RSD < 15% および正確度 80 ~ 120% を用いた場合、重いマトリックスのオンカラム検出下限 (LOD) 4 amol およびオンカラム定量下限 (LLOQ) 10 amol という低 amol レベルの感度 (図 5 および表 2)
- 重いマトリックスで 4 桁を超えるダイナミックレンジ (オンカラム 4 amol ~ 100 fmol)、2 つの検量線でそれぞれ $R^2 = 0.9987$ および 0.9998 という優れた検量線フィッティング (図 5A および 5B)

- 定量下限 (LLOQ) の濃度を含め、テストしたすべての濃度において非常に優れた精度と正確度 (表 2)
- 良好な RT 再現性 (RSD はそれぞれ 0.43, 0.32%, n = 40 に対して)

2 つの検量線間での非常に再現性の高い結果は、低 amol ペプチドの場合でも EvoTip における優れた機器の堅牢性とサンプル保管の安定性を示しています。堅牢性テスト後に測定した検量線のサンプルは、4 °C で約 10 日間冷蔵保存してから LC/MS に導入しました。それにもかかわらず、堅牢性テスト前の分析直前にロードして新しく調製した EvoTip に関しては、LOD が 4 amol、LLOQ が 10 amol で同じでした。

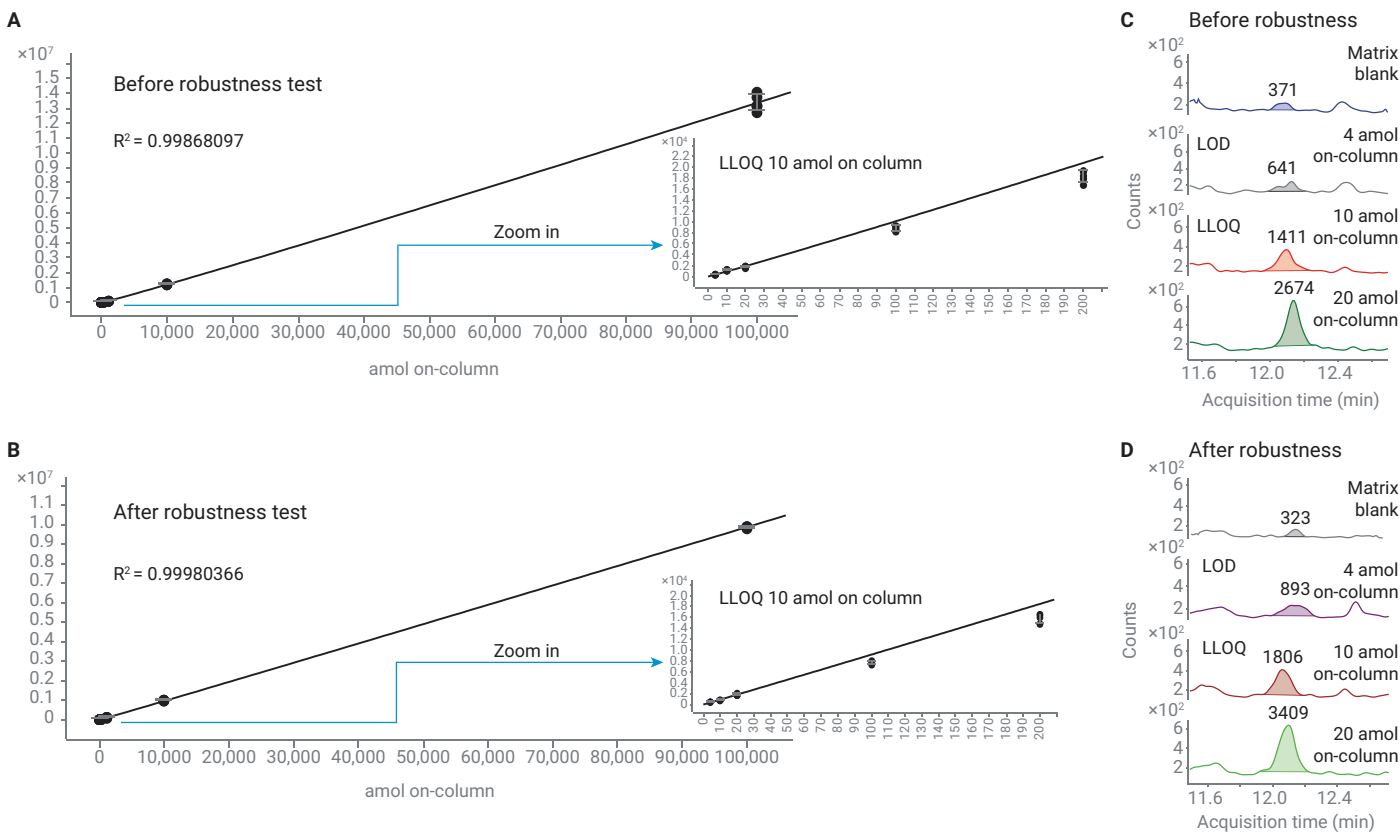


図 5. 堅牢性テスト前後における血漿中の補体 C3 由来の SIS ペプチド SGIPIVTSPTYQHFTK の検量線分析。A、B) 堅牢性テスト前後の検量線 C、D) LOD と LLOQ を示す抽出イオンクロマトグラムの重ね合わせ表示

堅牢性テストおよび検量線評価での LC/MS 分析はすべて単一の分析カラムで実施しており、交換はしませんでした。カラムは、クラムシェル内部のステンレス製エミッタで結合されていましたが、このクラムシェルは室温の変動からカラムの温度を保護しています。12 日間のテスト全体を通して、分析カラムの背圧は増大しませんでした。MS 信号は、スプレーノードルの交換、スプレー電圧の調整、および質量分析計のチューニングを実施しなくても、優れた安定性を示しています。つまり、これらの結果はすべて、分析困難な状況下でのハイスループットの研究において、今回の LC/MS プラットフォームの感度、堅牢性、および再現性が非常に優れていることを示しています。

結論

生体サンプル中のペプチド定量に使用する MRM ベースの LC/MS メソッドの再現性、堅牢性、および分析感度は、ハイスループットのタンパク質バイオマーカー定量の研究において重要な考慮事項です。このアプリケーションノートでは、ヒト血漿中のタンパク質定量において、Evosep One LC システムを Agilent ナノスプレーイオンソースおよび Agilent 6495 トリプル四重極 LC/MS と組み合わせた際の性能評価について説明しています。12 日の長期間にわたる複雑な血漿分解物マトリックスの分析において、LC/MS システムはクリーニング、調整、およびチューニングを実施しなくても、優れたレスポンスの安定性と RT の再現性を維持しました。分析感度を評価した結果、LOD と LLOQ は堅牢性テストの前後で同じでした。これらの結果はすべて、複雑なマトリックス中のハイスループットのタンパク質定量に対して、今回の高性能 LC/MS システムが最適であることを示しています。

表 2. トリプシン処理済みヒト血漿中の補体 C3 の重いペプチド標準 SGIPIVTSPYQIHFTK の検量線分析の精度と正確度

| オンカラム量 (amol) | 堅牢性テスト前 | | 堅牢性テスト後 | |
|---------------|---------------|-------|---------------|-------|
| | % RSD (n = 5) | % 正確度 | % RSD (n = 5) | % 正確度 |
| 4 | 17.7 | 96.4 | 11.5 | 126.0 |
| 10 | 10.5 | 119.5 | 10.3 | 87.2 |
| 20 | 11.2 | 91.0 | 11.4 | 97.9 |
| 100 | 5.6 | 87.3 | 4.4 | 83.2 |
| 200 | 5.8 | 88.5 | 5.5 | 84.9 |
| 1,000 | 4.7 | 97.3 | 6.2 | 94.7 |
| 10,000 | 3.3 | 101.2 | 1.4 | 102.2 |
| 100,000 | 4.0 | 99.9 | 0.6 | 99.9 |

参考文献

1. The Agilent 6495 Triple Quadrupole LC/MS: Peptide Quantitation Performance. Agilent Technologies technical overview, publication number 5991-6898EN, **2016**.
2. Jet Stream Proteomics for Sensitive and Robust Standard Flow LC/MS. Agilent Technologies technical overview, publication number 5991-5687EN, **2015**.
3. Bache, N et al. A Novel LC System Embeds Analytes in Pre-formed Gradients for Rapid, Ultra-robust Proteomics. *Mol. Cell Proteomics* **2018**, 17(11), 2284–2296.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンター

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. 2020
Printed in Japan, May 15, 2020
5994-1928JAJP
DE.4748032407

