

LC/MS 法による 標的タンパク質定量分析のための 血漿前処理自動化

アプリケーションノート

著者

Lola Fagbami, Eric Kuhn, Susan E.
Abbatiello, and Steven A. Carr
Broad Institute of MIT and Harvard
Cambridge, MA USA

はじめに

タンパク質消化における再現性の低さは、安定同位体標識化合物を内部標準として用いるマルチプルリアクションモニタリング質量分析 (SID-MRM-MS ; Stable isotope dilution-multiple reaction monitoring-mass spectrometry) および抗体アフィニティー精製を利用する MRM-MS (SISCAPA ; Stable Isotope-labeled Standards with Capture on Anti-Peptide Antibodies) アッセイにおいて測定誤差を生じる主たる原因となります¹。本アプリケーションノートでは、分析間の再現性を向上させ、大規模解析を実施する上での作業効率を改善するために、Agilent Bravo リキッドハンドリングプラットフォームによる自動酵素消化法を紹介します。本実験は、Broad Institute において実施され、Bravo プラットフォームを用いて、患者と動物の血漿試料の還元アルキル化および酵素消化を実施し、本手法の妥当性を評価しました。Bravo プラットフォームを用いた 96 ウェルプレートでの血漿のトリプシン消化を自動および手作業で比較したところ、同等の結果が得られることがわかりました。Bravo を用いた自動化では、1 日あたり最大 96 サンプル (手作業の場合は 24 サンプル) を処理することが可能であり、その上、試薬溶液の同時添加が可能なためラボの作業効率が向上します。



Agilent Technologies

実験方法

血漿試料に、 ^{15}N 標識した 27 種のタンパク質 (“heavy proteins,” Argonne National Laboratories) を濃度が $0.33 \text{ pmol}/\mu\text{L}$ となるように添加しました。試料液の半量を 96 ディープウェルプレートに移し、Bravo プラットフォームによる酵素消化を行い、残りの半量は手作業による処理を行いました (図 1)。

タンパク質の変性および還元のために、尿素およびトリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン (TCEP) とを、それぞれ終濃度 6 M および 25 mM となるように添加し、試料液を加熱条件下混合 ($37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 800 rpm 、30 分) しました。次いで、ヨードアセトアミド (IAA) を終濃度 80 mM となるように添加し、室温暗所にて 30 分間静置しアルキル化しました。Bravo デッキは図 2 に示すように配置し、全工程 (還元、アルキル化、酵素消化) において遮光しました。

トリプシンとリシルエンドペプチダーゼは、自己消化を防止するために 50 mM 酢酸で溶解し、それぞれの濃度を $0.5 \text{ mg}/\text{mL}$ としました。この酵素液を、あらかじめ $4 \text{ }^\circ\text{C}$ に設定したペルチェサーユニット上のプレートに添加しました。酵素液を直接試料に添加する場合、反応溶液は $\text{pH } 8.1$ に維持する必要があります。図 2 に示すように Bravo プラットフォームに配置された温度制御シェーカーユニット上で、プレートを混合しながらインキュベーションしました。Bravo デッキポジションの構成は、以下に示す通りです。

- サンプルプレート: ポジション 5
- ピペットチップ: ポジション 1, 2, 3, 8
- 変性剤液、還元剤液、アルキル化剤液、反応停止液: ポジション 7 の 384 ウェルプレート
- トリス緩衝液: ポジション 9

加熱および混合は、ポジション 4 (Agilent Heating Shaking Station) 上で行われ、酵素溶液はポジション 6 (Agilent Peltier Thermal Station) の 384 ウェルプレートに用意されました。ポジション 4 および 6 のデバイスの温度調整は、MTC コントローラを用いて Agilent VWorks ソフトウェアでコントロールしました。一方、手作業では、サンプルチューブに分注した同じサンプルを、エッペンドルフサーモミキサー内で混合しました。

次に、質量分析グレードのリシルエンドペプチダーゼ lys-C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd. p/n 125-05061) を酵素と基質の量比が $1:50$ となるように添加した後、試料を加熱条件下混合 ($37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 800 rpm 、2 時間) しました。 0.2 M トリス緩衝液 ($\text{pH } 8.1$) を添加し、尿素濃度を 1 M 以下としました。次いで、シーケンシンググレードの修飾トリプシン (Promega p/n V5111) を酵素と基質の量比が $1:100$ となるように添加した後、加熱条件下混合 ($37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 800 rpm 、2 時間)

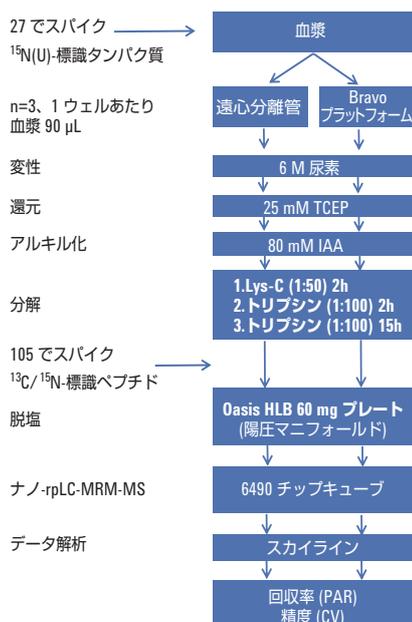


図 1. 酵素消化ワークフロー

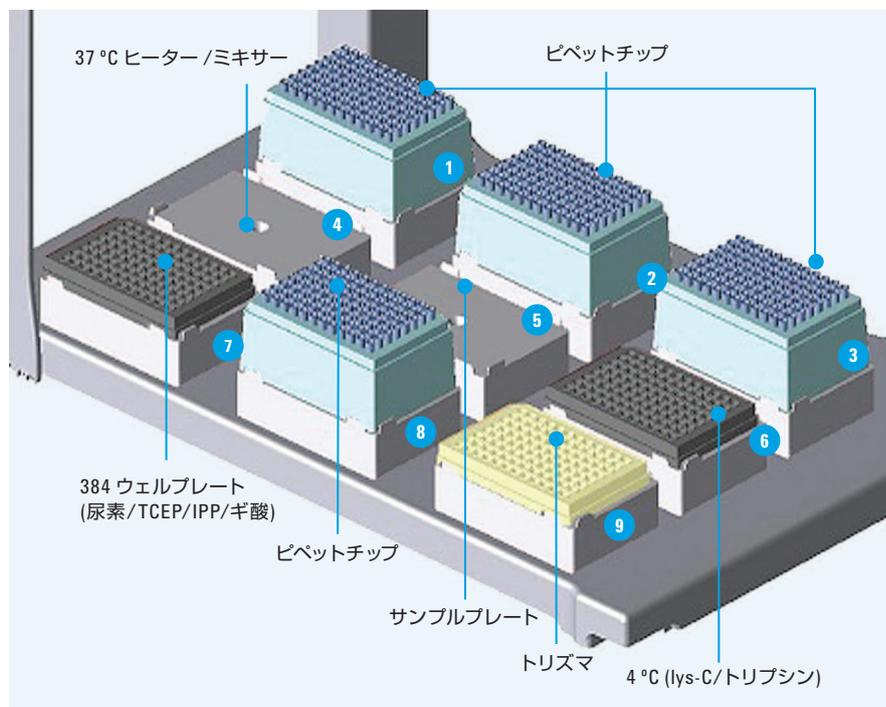


図 2. Agilent Bravo プラットフォームを用いた自動酵素消化のパッファおよびピペットチップのデッキ配置

しました。さらに、トリプシンを酵素と基質の量比が 1:100 となるように添加し、加熱条件下混合 (37 °C、800 rpm、15 時間) しました。酵素反応を停止させるために、ギ酸の終濃度が 1 % となるように 50 % ギ酸を加えました。

還元、アルキル化、酵素消化に続き、安定同位体標識合成ペプチドの混合物を、血漿に添加した ¹⁵N 標識タンパク質と同じモル濃度で各ウェルに添加しました。安定同位体標識合成ペプチド (¹³C/¹⁵N 標識) の添加は、SID-MRM-MS 測定における酵素消化効率および再現性の評価のために行いました。

次に、陽圧マニフォールドで Oasis HLB60 プレートを用いて、酵素消化後の血漿試料を脱塩処理しました。脱塩後の試料を 3 % アセトニトリルおよび 5 % 酢酸を含む希釈溶液 (3 % ACN、5 % HOAc) で再溶解し、5,000 x g で 5 分間遠心しました。上澄みを希釈溶液 (3 % ACN、5 % HOAc) で 10 倍希釈し、HPLC バイアルに移しました。試料液 1μL をトラップカラムと分析カラムを備えた Agilent HPLC-Chip に注入し、Agilent 6490 トリプル四重極 LC/MS システムで分析しました。

MRM-MS のために、実験で得られた消化ペプチド情報、公的データベース情報および ESP² を参考にして、1 種類のタンパク質あたり 1 から 5 本のトリプシン消化ペプチドを選択しました。ESP アルゴリズムは、エレクトロスプレー質量分析において高いイオン化効率を有するペプチドを選別するために有用です。各標識ペプチドについて固有の 3 つのトランジションイオンを選択し、ダイナミック MRM 分析に最適化した LC グラジエント条件で測定を実施しました。3 つのトランジションイオンの内、一つは安定同位体標識された C 末端アルギニンまたはリジンを含み、他の一つは ¹⁵N (U) 標識されたタンパク質消化ペプチドを検出するためのものです。

結果と考察

質量分析結果から、ペプチドの回収率と酵素消化の再現性を検討するために、安定同位体標識したタンパク質をトリプシン消化して得られたペプチド (¹⁵N- 標識) と対応する安定同位体標識合成ペプチド (¹³C-/¹⁵N- 標識) の量比を算出しました。例として、ピーク面積比 (PAR : Peak Area Ratio) が 0.8 であれば、消化回収率は 80 % となります。再現性の検討のために血漿の消化プロセスを 3 回繰り返し、HPLC-Chip を搭載した 6490 トリプル四重極 LC/MS システ

ムに注入し、ダイナミック LC-MRM-MS により分析しました。

回収率と測定精度を評価するために、分析した 105 のペプチドのうちの 102 のペプチドについて、PAR 値と CV 値を算出し (表 1)、ヒストグラムを作成しました (図 3)。自動および手作業による酵素消化で得られたペプチドの平均回収率は、いずれも約 50 % であり、ペプチドの回収率の幅を示すヒストグラムも、自動および手作業による酵素消化でほぼ同等の結果であることを示しました (図 3A)。消化プロセスの 3 回繰り返

表 1. 102 ペプチドの平均 PAR 値と CV 値 (3 トランジション/ペプチド)。Agilent 6490 トリプル四重極 LC/MS システムを用いて MRM により測定

サンプル処理	平均回収率 (PAR)	平均精度 (CV)
手作業 (チューブ)	50 %	5.9 %
Bravo プラットフォーム (プレート)	56 %	6.4 %

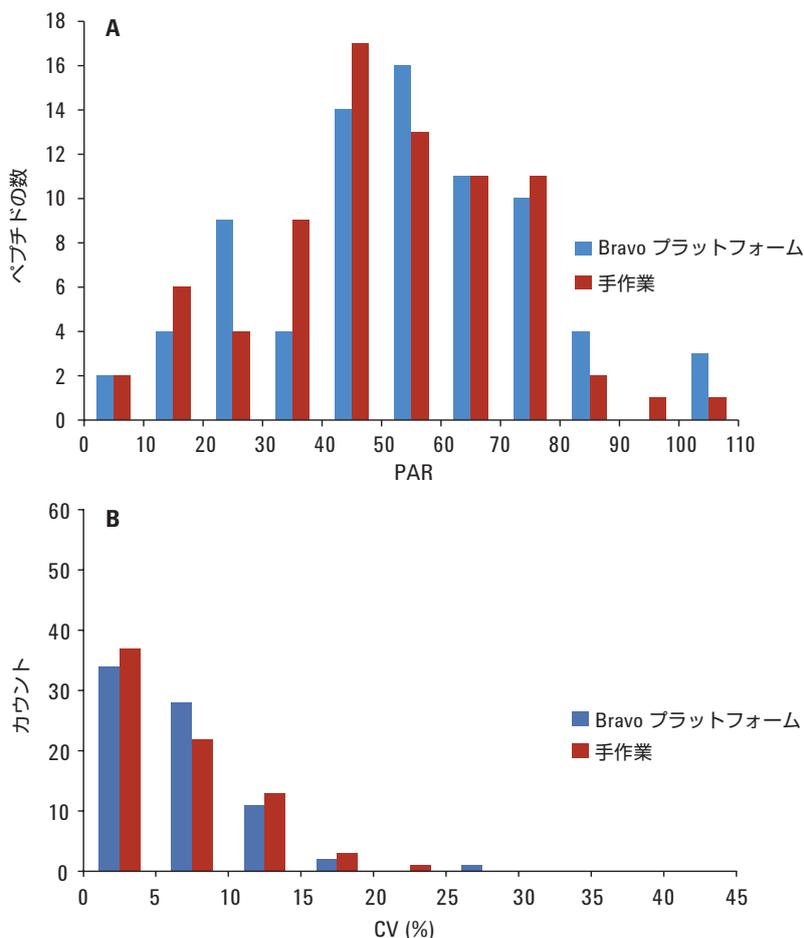


図 3. ヒストグラムプロット。(A) 安定同位体標識タンパク質 (¹⁵N- 標識) と安定同位体標識ペプチド (¹³C-/¹⁵N- 標識) のピーク面積比により算出した回収率 (PAR) および (B) 処理工程の再現性 (CV)

しによる再現性の平均 CV 値は、自動および手作業による消化のいずれについても約 6 % であり、ヒストグラムもほぼ同等の結果であることを示しました (図 3B)。このことから、ペプチドの回収率に関して、手作業および自動分解がほぼ同等であることを示しています (図 4)。

手作業および自動分解で得られた各ペプチドの回収率のプロットでは、きわめて強い相関性が見られました。このことは、ペプチド回収率という点について、手作業および自動分解がほぼ同様であることを示しています (図 4)。

結論

Agilent Bravo 自動リキッドハンドリングプラットフォームは、血漿試料の酵素消化処理を自動化することが可能であり、SID-MRM LC/MS 分析の結果から一定程度の熟練技術者による手作業と同等の分析再現性が示され、大規模解析における作業効率を高めることが示されました。さらに、本実験では、最大 96 サンプルを同時に処理することができ、手作業の 24 サンプル処理に比較して、4 倍の作業効率を実現しました。

このことは、大規模解析や一回の実験での多重試験を容易とし、試料の同時処理により試料間誤差の低減を可能とします。このアプリケーションノートで紹介した自動化ソリューションを利用することにより、研究者は手作業によるルーチン作業から解放され、ラボ全体の作業効率を高めることができ、さらに、信頼性の高い実験結果を得ることが可能となります。

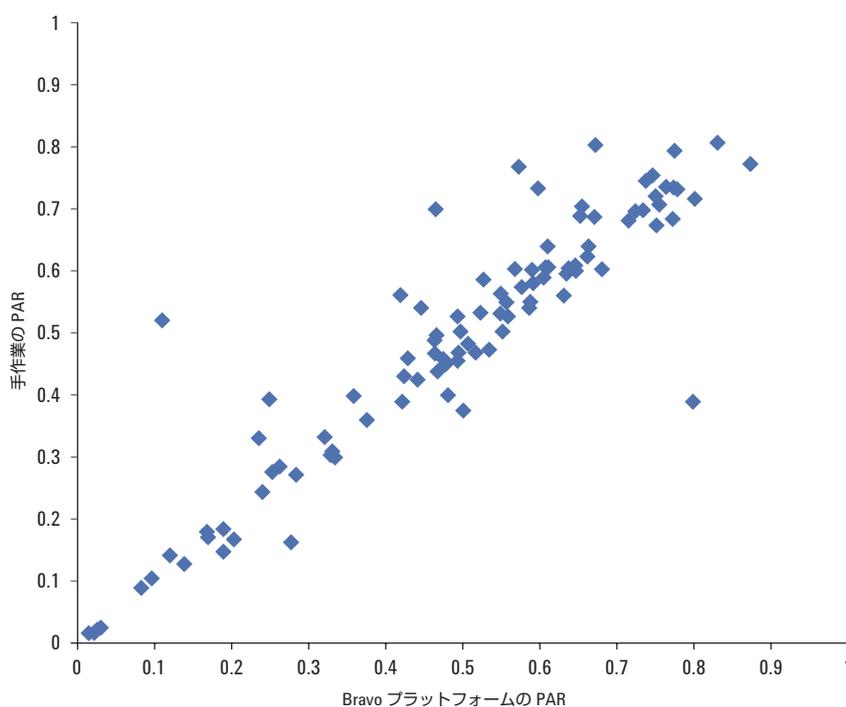


図 4. 血漿の酵素消化における自動化法と手作業法の相関性

参考文献

1. Kuhn, E., *et al.* Inter-laboratory Evaluation of Automated, Multiplexed Peptide Immunoaffinity Enrichment Coupled to Multiple Reaction Monitoring Mass Spectrometry for Quantifying Proteins in Plasma. *Mol Cell Proteomics*, **2011**, doi:10.1074/mcp.M111.013854.
2. Fusaro, V.A., *et al.* Computational Prediction of High Responding Peptides for Development of Targeted Protein Assays by Mass Spectrometry *Nat Biotechnol.*, **2009**, 27(2):190-8.

www.agilent.com/chem/jp

本資料に記載の情報は、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, August 8, 2013
5991-0972JAJP