

LC/MS 用サンプル前処理の自動化: 溶液中酵素消化と脱塩処理の 自動化を可能にするハイスループット型 試料前処理システム Agilent AssayMAP Bravo プラットフォーム

アプリケーションノート

著者

Jason D. Russell, Zachary Van Den Heuvel, Michael Bovee, and Steve Murphy Agilent Technologies, Inc. Madison, WI USA

概要

LC/MS 分析のためのタンパク質およびペプチドの試料前処理は、依然として手作業 による個別の操作に頼ったワークフローで行われているため、作業効率が劣り、大規 模解析への対応を困難にしています。多くの場合、手作業によるワークフローでは、 妥当な再現性を得るためには、スキルの高い分析者に頼る必要があります。また、た いていのケースでは、ワークフローに内在するものとして、大きな測定誤差も許容 せざるを得ないのが現状です。このような問題に対処するために、一般的に LC/MS プロテオミクスワークフローにおいて利用されているルーチン試料前処理作業を、 AgilentAssayMAP Bravo プラットフォームを用いて自動化しました。

このプラットフォームとツールは、LC/MS 分析のための試料前処理において、再現性 の向上、大規模解析への拡張性、プロトコル編集の柔軟性、および使いやすさを実現 できるように設計されています。このプラットフォームは、クラス最高のリキッドハン ドラ、一回使い切りのマイクロクロマトグラフィーカートリッジ、およびユーザーによる カスタマイズが可能なシンプルなプロトコルで構成されており、タンパク質酵素消化 および脱塩作業を迅速化することが可能です。本自動化法の有用性は、25 種類のウシ 血清アルブミン (BSA) 酵素消化ペプチドの日間再現性の変動係数 (CV) が 5 % 未満で あることで証明されました。また、脱塩処理における AssayMAP RP-S および C18 逆 相カートリッジの特性についても紹介します。



はじめに

タンパク質およびペプチドの分析法は、 近年大きく進歩してきました。その要因 は、タンデム質量分析、ソフトイオン化 法、バイオインフォマティクス、およびク ロマトグラフィー分離などの技術革新に あります。こうした分析上の革新的技術 と情報処理力の向上の相乗効果により、 液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/ MS) を用いたワークフローによるタンパ ク質の動態解析が可能となり、定量にお いては高感度と高精度分析ができるよ うになっています。LC/MS による定量プ ロテオミクス解析の応用範囲の拡大に 伴い、求められる分析精度が高くなり、 作業効率の向上が求められています。し かし、プロテオミクスにおける LC/MS 技術が飛躍的に進歩した一方で、試料前 処理の進歩は、他の重要な技術に遅れ をとっています。定量プロテオミクス解 析における試料前処理の進歩の遅れが もっとも顕著に表れている分野が、バイ オマーカーの発見およびバリデーション です。数百に及ぶ疾患特異的なタンパク 質バイオマーカー候補が LC/MS 解析に より明らかにされ、報告されています。 しかし、そうしたバイオマーカー研究の 多くは、少数の患者試料を用いた初期分 析の域を出ていません。臨床応用のため に利用されるアッセイ法のバリデーショ ンでは、桁違いの試料数を用いて検証 する必要があります。大規模解析を実施 する場合、すべての患者試料を多段階の 前処理ステップで調整する必要がある ワークフローで、個別に、あるいは少ス ケールでのバッチ処理を行うと、各段階 での些細なハンドリングの違いが累積 され、分析精度の低下をもたらすことに なります。そのような分析精度の低下は、 ディスカバリー研究の段階で示唆され た病態や応答性の指標として生物学的 に有用なタンパク質の発現変化を再現 できない可能性があります。

LC/MS による定量プロテオミクス解析 の試料前処理は、依然として手作業に よる多段階の操作を必要とするワーク フローでおこなわれているため、スルー プットや大規模解析への対応性が劣り、 技術者間での誤差が生じる原因になっ ています。LC/MS の臨床応用やハイス ループットスクリーニングおよびプロセ ス管理のためには、これらのワークフ ロー特性は不可欠な要素です。多くの 場合、このような手作業によるワークフ ローでは、妥当な再現性を得るために、 一部の習熟度の高い分析者に頼る必要 があります。このことは、要求される再 現性を維持し、かつ多数の試料を処理 するための障壁となっています。LC/MS によるタンパク質分析の成功の鍵は、再 現性の高い試料前処理にかかっていま す。これまで、高い操作性と信頼性を備 えた、大規模解析に適用できる自動化 法が存在しなかったために、多検体の 迅速試料処理が必要な研究への LC/MS の導入は、さらに大きな制約を受けてい ました。 試料前処理法は、仮説にもとづ く小規模スクリーニングから臨床応用の ためのバリデーションや大規模臨床研 究にまで適用可能なものでなければな りません。 タンパク質研究者の要求に対 応できるタンパク質試料の前処理専用 に設計された自動化システムが利用で きれば、そうした大規模解析が可能とな ります。

このアプリケーションノートでは、タ ンパク質の大規模解析のために、LC/ MS の試料前処理における高い実験再 現性および効率化を実現した、Agilent AssayMAP Bravo 自動化プラットフォー ムとプロテオミクスツールを紹介しま す。このプラットフォームは、精密な流量 コントロールを可能にする 96 プローブ シリンジを備えたクラス最高の分注機 と、ベッドボリューム 5 µL の充填済カー トリッジカラム、さらには高い操作性を 有するユーザーインターフェースを備え たカスタマイズが可能なソフトウェアで 構成されています。また、マイクロタイ タープレートフォーマットでのハイスルー プット処理を可能とするタンパク質の自 動消化および脱塩に対応できます。ここ では、BSA の酵素消化および脱塩にお ける AssavMAP Bravo の利用について 紹介し、統合したワークフローの有用性 について、さまざまな評価指標をもとに 報告します。

実験方法

溶液中酵素消化法

溶液中酵素消化法では1枚から4枚ま での96ウェルプレートを処理でき、1枚 のプレート中でも1~12列の試料数(8 ~96試料/プレート)を並行して処理を 行うことができます。今回の実験では プレート1枚当たり32試料を処理しま した。このプロトコルは、ユーザーイン ターフェースで入力されたパラメーター をもとに、順番にソースプレート中の試 薬溶を試料液に加えて混合します(図 2)。ユーザーインターフェースの各ステッ プを ON または OFF することや、種々の 試薬液の組成を反応条件に合わせて変 更することで、システムにフレキシビリ ティーを持たせています。

図1と表1に、それぞれプレートレイア ウトと試薬液のリストを示します。BSA を濃度が15 µg/µLとなるように水で溶 解し、その15 µL(225 µg)を0 底のマイ クロタイタープレートの1列目から4列 目までの各ウェルに分注しました。こ の分注操作は、他の3枚のプレートに ついても同様に行い、4枚のサンプルプ レートを作成し、合計128サンプルを消 化に用いました。Denaturation mixture plateには、変性剤と還元剤の混合溶液 を分注しました。変性剤は、グアニジン 溶液を1列目と2列目に分注し、尿素溶液

表 1. サンプル、試薬、分析機器

デッキ上のサンプルと試薬	
溶液内分解 v1.0	
サンプル	ウシ血清アルブミン (BSA)、15 μg/μL を水に溶解
変性混合液	25 mM TCEP と 150 mM トリスを含む 8 M グアニジン HCI (pH 8) 25 mM TCEP と 150 mM トリスを含む 9 M 尿素 (pH 8)
アルキラント	300 mM ヨードアセトアミド
希釈混合液	50 mM トリス (pH 8)
プロテアーゼ	トリプシン (50 mM 酢酸中で 1 μg/μL)
洗浄ステーション	脱イオン水
ペプチド精製 v1.1	
サンプル	TFA で酸性化した BSA のトリプシン消化物 (pH ~ 2.6)、0.75 μg/μL
プライミングバッファ	50 % ACN/0.1 % TFA
ユーティリティ (平衡化) バッファ	0.1 % TFA
溶出バッファ	70 % ACN/0.1 % ギ酸
洗浄ステーション	脱イオン水
分析機器	
自動化	
コア自動化プラットフォーム	Agilent AssayMAP Bravo (G5542A)
Agilent AssayMAP 分解 および 精製スターターキット	分解および精製用の 96 RP-S カートリッジおよびラボウェア (G6596-60034) 分解および精製用の 96 C18 カートリッジおよびラボウェア (G5496-60013)
Agilent AssayMAP Bravo アクセサリ	ライザー、146 mm (G5498B#055) ペルチェ式サーマルステーション、STC コントローラ搭載 (G5498B#035) カスタムプレートネスト (G5498B#017) PCR プレートインサート (G5498B#013)
その他のアクセサリ	Agilent PlateLoc サーマルマイクロプレートシーラー (G5402A)
LC/MS	
質量分析計	Agilent 6550 iFunnel QTOF LC/MS デュアル Agilent Jet Stream ESI
LC システムおよびカラム	Agilent 1290 Infinity LC システム Agilent AdvanceBio Pepide Mapping カラム (C18) : 分析カラム : 2.1 × 250 mm、2.7 µm (651750-902) ガードカラム : 2.1 mm Fast Guard (851725-911)



図 1. BSA のマルチプレート消化のためのマイクロタイタープレートレイアウト。Sample Plateには BSA (15 µg/µL) を分注。Denaturation Mixture Plate には グアニジンベースの変性還元剤溶液 (橙色) および尿素ベースの変性還元剤溶液 (紫色) を分注。Alkylant Plate にはヨードアセトアミド溶液を分注。Diluent mixture Plateには Tris バッファーを分注。Protease Plate にはトリプシンを分注

を 3 列目と 4 列目に分注しました。ヨー ドアセトアミド溶液は Alkylant plate の 1 列目から 4 列目までに分注しました。ト リスバッファーは Diluent mixture plate (ディープウエル) の 1 列目から 4 列目ま でに各 1 mL を分注しました。トリプシ ンは Protease plate の 1 列目から 4 列目 までに分注しました。

溶液中酵素消化プロトコルにある Plate Stacking ユーティリティは、各試料やプ ロテアーゼのプレートの"リッド"として 使用する 5 枚のプレートを AssayMAP Bravo デッキの Location 2 に積み重ねる ために使用します。これらのプレートは アルキル化ステップでの遮光や、環境中 の埃等によるコンタミネーションのリス クを低減します。これらのプレートはま た、各リキッドハンドリングステップ間 のシリンジの洗浄液のリザーバーとして 用いられます (今回の実験ではこの洗 浄液を用いたシリンジの洗浄は行って いません)。各試薬液と試料プレートの 配置を図 2 に示します。アプリケーショ

ン設定は図 2 に示した値を In-Solution Digestion ユーザーインターフェースに入 力しました。プロトコルが開始されると、 まず変性剤溶液が試料に添加され混 合されます。 サンプルプレートをデッキ 上から取り出すために、プロトコルは自 動的に一時停止します。サンプルプレー トを取り出し、PlateLoc (プレートシー ラー)を用いてシール後、インキュベー ターに移し、変性還元処理 (60°C、1 時 間)を行いました。その後、プレートを 遠心し、シールをはがし、Bravo デッキ 上に戻しました。プロトコルを再開し、 アルキル化溶液の添加後、45分間の反 応、希釈液の添加(酵素消化のための変 性剤希釈) およびトリプシン消化までの 工程を自動で実施しました。プロトコル 終了後、サンプルプレートをデッキから 取り出し、PlateLoc を用いてシールした 後、37 °C で一晩かけて消化を行いまし た。サンプルをインキュベーターから取 り出し、遠心した後、30 μL の 10 % TFA を Single Liquid Addition ユーティリティ を用いて添加しました。この In-Solution Digest プロトコルを同条件で翌日繰り返 し行いました。BSA 消化物を含む酸性 溶液は次の Peptide Cleanup プロトコル による脱塩ステップに供しました。

脱塩処理

AssayMAP では逆相精製のために2種 類のカートリッジが用意されています。

- ・C18 固相担体 (カーボン含有率:16%、 ポアサイズ:150Å) を充填したカート リッジ
- ・ポリスチレン ジビニルベンゼン固相担体 (RP-S、ポアサイズ: 100Å)を充填したカートリッジ

これら2種類のカートリッジには微妙 な選択性の違いがあるため、サンプル と使用する試薬の性質をもとに選択し ます。C18カートリッジはpH2~8で安 定したパフォーマンスを示し、R~13)に 対応します。Peptide Cleanup プロトコ ルはWorkflow Navigator から開くこと ができます。表1に示すバッファーを





Syringe Wash (priming) Buffer プレート、 Utility (equilibration/washing) プレート、 Elution Bufferプレートの各プレートの1 列目から 4 列目に分注しました。空のU 底プレートまたは PCR プレートを Flow Through Collection プレートと Eluate Collection プレートとして使用しました。 Cartridge Transfer ユーティリティーを使 用して AssayMAP C18 (1 日目) もしく は RP-S (2 日目) の各カートリッジラックに ある1列目から4列目のカートリッジ を Bravo デッキのLocation 2 に置いた Cartridge Seating Station に移しました。 Bravo デッキは図3 に示すように設定 し、BSA 消化物を含む酸性の溶液が入っ たプレートをデッキ4に置きました。 Peptide Cleanup ユーザーインターフェー スにアプリケーションの設定を入力し、 図 3 に示すLabware Table からラボウェ アの種類を選択しました。プロトコルが スタートすると、カートリッジの初期化 と平衡化を行った後、100 µL の BSA 消 化物 (75 µg) を各カートリッジへロード しました。Peptide Cleanup プロトコルを 用い、In-Solution Digest プロトコルで処 理を行った他の3枚のプレートについて も同様に処理しました。脱塩処理され た溶出液は乾固し、-80°Cで保存しまし た。脱塩処理後の各試料を再溶解した のち、1.25μg相当量をLC/MS分析に供 しました。LC/MSで検出された25種の ペプチドについて評価しました。

脱塩処理 - 回収率

脱塩処理の回収率を評価するために、 In-Solution Digest プロトコルで作成され た BSA 消化物を含む酸性溶液 (0.75 μg/ μL) を混合し、次に示す濃度系列を作成 するために希釈しました。

濃度系列:0.75,0.50,0.25,0.125,0.0625, 0.03125 µg/µL.

サンプルは図3に示した設定を用いて Peptide Cleanup を実施しました。各濃度 のサンプル100 μL を並行処理 (n = 3) に て AssayMAP C18 カートリッジへロード しました。溶出したサンプルは乾固し、 -80 °C で保存しました。脱塩処理後の試 料は再溶解後、各濃度の 0.5 μg 相当量 を LC/MS 分析に供しました。LC/MS で 検出された 25 種のペプチドについて、 オンライン LC 精製を行った各濃度の消 化物 0.5 µg 相当量と比較しました (BSA 濃度の最大と最小で 0.67 µL から 16 µL の範囲の注入量で評価)。

脱塩処理 – ロード量の違い

脱塩処理におけるロード量の影響を調 べるために、バルク処理の溶液内消化に より得られた酸を添加した BSA 消化物 (4.75 μg/μL)を希釈し、次の濃度系列を 作成しました。

濃度系列: 4.0, 3.0, 2.0, 1.0,0.75, 0.50, 0.25, 0.10 μg/μL.

サンプルは図3に示した設定を用いて 脱塩処理を実施しました。各濃度のサ ンプル(100 μL)を並行処理(n = 2)にて、 AssayMAP RP-S およびC18 カートリッ ジへロードしました、なお、すべての実 験は並行して実施しました。溶出したサ ンプルは乾固し、-80 °C で保存し、使用 時に再溶解し各濃度の1.0 μg 相当量を LC/MS 分析に供しました。

Peptide Cleanup: BIND, WASH, ELUTE

A. Application Settings				
	Number of Full Columns of Cartridges		4	
Step	Conduct Step?	Volume (µL)	Flow Rate (µL∕min)	Wash Cycles
Initial Syringe Wash	V			3
Prime	শ			
Equilibrate	v	50	10	0
Load Samples	V	100	5	3
Cup Wash	V	50		2
Internal Cartridge Wash	V	50	10	3
Stringent Syringe Wash	V	50		1
Elute	V	20	5	0
Re-Equilibrate		50	25	
Final Syringe Wash	2			3

B. Deck Layout 3. Organic Waste Plate 1. Wash Station 2. Cartridges 5. Syringe Wash Buffer Plate 6. Elution Buffer 4. Sample Plate Plate 7. Flow Through 8. Utility Buffe 9. Eluate Collection Plate Collection Plate Plate C. Labware Table Deck Location Labware Type 1 96AM Tip Wash Station 2 96AM Cartridge Seating Station • 3 12 Column, Low Profile Reservoir, Natural PP 96 Greiner 650207, U-Bottom, White PolyPro • • 5 12 Column, Low Profile Reservoir, Natural PP 12 Column, Low Profile Reservoir, Natural PP • 6 7 96 Greiner 650201, U-Bottom Standard, PolyPro • 12 Column, Low Profile Reservoir, Natural PP • 9 96 Eppendorf 30129300, PCR, Full Skirt, PolyPro •







結果と考察

溶液中消化と脱塩処理

1日目 (C18) と2日目 (RP-S)の BSA 消 化物を LC/MS で分析しました。各 LC/ MS 分析について、25 種類の BSA トリ プシン消化ペプチドの抽出イオンクロマ トグラム (EIC) を作成し、各ペプチドの ピーク面積をプロットしました。図4(上) は、両日にわたって実施した 128 試料の 消化および脱塩操作によって得られた5 種類の BSA トリプシン消化ペプチドの ピーク面積 (グアニジン変性) を示して います。これらのペプチドの CV 値は、す べての繰り返し実験を通して 1.3~2.5 % の範囲内でした。図4の表に、25種類の ペプチドの CV 値分布を日別および変性 剤別にまとめています。25 種類の BSA 消化ペプチドの平均 CV 値はいずれの日 でも、尿素の場合は 3.7 % 未満、またグ アニジンの場合は 2.6 % 未満でした。こ の結果から、消化から脱塩および LC/ MS 分析までのワークフロー全体におい て、きわめて再現性の高いペプチドのシ グナル強度が得られていることが明ら かとなりました。複数のデータで示され た再現性は、この溶液中消化プロトコル が、384 試料を同時処理できる能力を有 しており、ハイスループットでの試料前 処理が可能であることを示しています。 同様に、脱塩処理も96サンプルで同時 に迅速に実行できます。いずれのケース でも、1週間あたり数千までの試料を処 理でき、迅速分析に簡便に対応すること ができます。

評価対象とした大部分のペプチドでは 低い CV 値を示しましたが、これらの消 化条件において、すべての BSA 消化ペ プチドが良好な結果を示したわけでは ありません。これは、タンパク質消化の 複雑さを反映しているものと考えられ ます。タンパク質の酵素消化では、消化 条件が特定のペプチドの遊離に影響を 及ぼします。 たとえば、ペプチド FKDLGEEHFK では、 アスパラギン酸残基に隣接するリジン 残基の C 末端側が切断されていませ ん。この配列モチーフは、一部のタンパ ク質においてトリプシン消化の効率を 低下させることがあります。このような ペプチドは、LC/MS による特定タンパ ク質の定量に適するものではありませ んが、ほかに定量の選択肢が無い場合 に有用となります。この例では、ペプチ ド FKDLGEEHFK は、完全消化ペプチド DLGEEHFK に比べて、4~5 倍のシグナル 強度を示します。また、y イオンの m/z も高くなるため、マルチプルリアクショ ンモニタリング (MRM) 分析における特 異性が高くなります。尿素変性の場合、 ピーク面積の日間 CV 値は 39.2 % でし たが、日内 CV 値は5.5 % および 8.8 % と なりました。一方、グアニジン変性の場 合、ピーク面積の日間 CV 値は 5.8 %で、 日内 CV 値 は 2.5 % および 1.9 % でした。 以上の結果から、グアニジンは変性剤と して尿素より優れていることがあきらか になりました。AssayMAP Bravo プラッ



尿素	1日目	2日目	グアニジン HCI	1日目	2日目
サンプル数	64	62	サンプル数	64	64
	25	25	モニタリングしたペプチド数	25	25
平均ピーク面積 % CV	3.3	3.7	平均ピーク面積%CV	2.3	2.6
%CV <5 のペプチドの数	23	21	%CV <5 のペプチドの数	25	23
5 > % CV < 10 のペプチドの数	2	3	5 > % CV < 10 のペプチドの数	0	1
% CV > 10 のペプチドの数	0	1		0	1

図 4. BSA の溶液内消化およびクリーンナップにおける日差およびプレート間の比較結果。BSA はIn-Solution Digestion プロトコルを使用して 2 日にわたり尿素もしくはグアニジンの両変性剤を用いた消化を繰り返し行いました。Peptide Cleanup プロトコルは C18 (1 日目) または RP-S (2 日目) カートリッジ を使用して行いました。溶出液は乾固後、再溶解し、1.25 μg 相当量を LC/MS で測定した。25 種類のペ プチドについてシグナルをモニターし、Extracted ion chromatograms のピーク強度を評価指標としました。グアニジン変性による 5 種類のペプチドのピークエリア CV 値を示します。全 128 サンプルにわた り CV 値は 3.3 % 以下でした。表は日差および変性剤の違いによるペプチドピークエリアの CV 値です。 トフォームは、複数試料の同時処理が可 能であることから、複数の変性条件を同 時に評価することにより、ミスクリベー ジペプチドであっても定量性のある変 性条件を見つけることができます。個々 のタンパク質から定量的にターゲットペ プチドが遊離する最適な変性条件を迅 速に突きとめるために、複数の変性剤を 異なる濃度で Denaturation Mixture プ レートに分注することが可能です。また、 試料前処理が異なるプレートで同時に おこなわれるため、サンプルプレートご とに変性条件を評価し、メソッド開発を 迅速化します。

脱塩処理 – 回収率とロード量の 関係

溶液中消化プロトコルで得られた BSA 消化物を含む酸性溶液の希釈系列を作 成し、同一試料を用いて C18 カートリッ ジとオンライン LC 精製でのペプチド回 収率を比較し評価しました。25 種類の ペプチドのピーク面積を解析し、相対疎 水性 (Relative Hydrophobicity; RH)の理 論値をもとに、次の 3 つのグループに分 類しました。

- RH < 22.5、低い疎水性、10 ペプチド
- 22.5 < RH < 35、中程度の疎水性、 8ペプチド
- RH > 35、高い疎水性、7 ペプチド

図 5 (上段) に示すように、低疎水性のペ プチド LKECCDKPLLEK (RH = 14.5) およ び AEFVEVTK (RH = 22.2) は、広いロー ド量にわたって定量的な回収率が得ら れています。このグループのほかの 8 種 類のペプチドでも、同等の回収率が得 られました。中程度の疎水性のペプチド LVNELTEFAK (RH = 32.0) の回収率は、3 ~75 μ g のロード量において、オンライ ン LC 精製と同等もしくはより高い結果 がえられました。しかし、中程度の疎水 性のペプチド LVVSTOTALA (RH = 25.5)

の回収率は、50 µg を超えるロード量で は 94.5% 以上であったが、もっとも少な いロード量では 21.8 % となりました (図 5、中段)。 このグループのほかの 6 ペプ チドについては、すべてのロード量で高 い回収率が得られました。一般的にペプ チドの回収率は、相対疎水性値と強い相 関性を有しますが、この例で示されてい るように、すべてのペプチドにその傾向 があてはまるわけではありません。極め て疎水性が高い2種類のペプチドであ る TVMENFVAFVDK (RH = 45.1) および GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK (RH =52.4) は、同等の疎水性を有するほかの5種類 のペプチドと同様に、12.5 μg を超える ロード量では 70% を超える回収率が得 られました (図 5、下)。 きわめて疎水性 の高いペプチドは、ロード量が少ないと 回収率が低くなりますが、低い回収率で

も再現性は保たれています。これらの結 果は、中程度以下の相対疎水性を有す るペプチドにおいて、幅広いロード量で 安定した回収率が得られることを示して います。25 種類すべてのペプチドの平 均回収率および CV値 (カッコ内に記載) は、3.125 µg、6.25 µg、12.5 µg、25 µg、 50µg、75 µg のロード量でそれぞれ 87.5 % (2.6 %)、92.7 % (1.1 %)、93.0 % (2.1 %)、 96.8 % (1.3 %)、100.0 %(1.1 %)、99.7 % (1.4 %) でした。



図 5. BSA ロード量に対するペプチド回収率。BSA 消化物を希釈し、0.03125~0.75 µg/µL の濃度の溶 液を作成しました。C18 カートリッジを用いたペプチド精製プロトコルにより、サンプル 100 µL を処理 し (n = 3)、各溶出液の 0.5 µg を分析しました。ペプチド回収率を、各濃度の消化物 0.5 µg のオンライン LC 精製に対して標準化しました。25 種類のペプチドをモニタリングし、相対疎水性をもとに、次の 3 つ のグループに分類しました:低い疎水性 (上段、10 ペプチド)、中程度の疎水性 (中段、8 ペプチド)、高い 疎水性 (下段、7 ペプチド)。全体的に見て、低~中程度の相対疎水性 (RH) のペプチドにおいて、高い回 収率が得られました。しかし、2 つのペプチド LVVSTQTALA および LVNELTEFAK (中段) で示されてい るように、回収率が常に RH に相関するわけではありませんでした。25 種類すべてのペプチドの平均回 収率および CV 値 (カッコ内に記載) は、3.125 µg、6.25 µg、12.5 µg、50 µg、75 µg の各カートリッ ジロード量でそれぞれ 87.5 % (2.6 %)、92.7 % (1.1 %)、93.0 % (2.1 %)、96.8 % (1.3 %)、100.0 % (1.1 %)、 99.7 % (1.4 %) でした。全体では、すべてのロード量の平均回収率と CV 値は、94.9 % および 1.6 % でした。

脱塩処理 – 分析対象ペプチドの RH とロード量の関係

BSA 消化ペプチドの 10-400 µg 相当量 をロードしたカートリッジからの溶出液 (BSA 1µg 相当量) を分析し、AssayMAP C18 および RP-S カートリッジの BSA消 化物の負荷許容量を評価しました。図 6 では、RP-S および C18 溶出液のトー タルイオンクロマトグラム (TIC) のオー バーレイを相対疎水性の理論値 (RH、 SSRCalc を用いて算出)¹にもとづき分割 し、ロード量ごとに示しています。ロード 量が 10 から 200µg の範囲では、低~中 程度の疎水性ペプチド (RH = ~8-48)の TIC シグナルはほぼ同一でした。RH 値が 14.5~48 のペプチドの TIC シグナルは、 300 µg まで安定しています。400 µg で、 これらのペプチドは負荷許容量を超過 しました。親水性のきわめて高いペプチ ド (RH < ~8) は、ロード量が 100 µg を超 えると、カートリッジへの保持が弱くな りました。また、ロード量 10 μg では、疎 水性のきわめて高いペプチド (RH > 48) の非特異的吸着に起因すると考えられ るロスが生じました。C18 および RP-S の 保持許容量はほぼ同様でしたが、C18 で は、ロード量が 100 µg を超える場合で も、親水性ペプチドの保持力が若干高く なりました。AssayMAP 逆相カートリッ ジへのサンプル保持能および負荷許容 量は、試料量、試料マトリクスの複雑さ、 試料ロード時の流速といった種々の試 料条件の影響を受けます。注目すべき点 は、AssayMAP Bravo Peptide Cleanup プ ロトコルでは、カートリッジへの負荷許 容量および保持能を迅速に評価し、サン プルの脱塩条件を最適化できることで す。



図 6. ペプチドクリーンナップの負荷許容量。Peptide Cleanup プロトコルを用いて RP-S および C18 カート リッジに 10 から 400 µg の範囲の BSA 消化物をロードしました。溶出物を乾固し再溶解後、1.0 µgを LC/ MS にて分析した。25 から 100 µg のロード量では相対疎水性に関係なく偏りのないペプチドの回収が確 認されました。ロード量が 100 µg を超えると、親水性ペプチドの保持能は、より疎水性の強いペプチド との競合関係により低下し、ロード量が 25 µg 未満では疎水性の高いペプチドの回収が減少しました。

結論

Agilent AssayMAP Bravo と LC/MS サ ンプル前処理ツールを使えば、ほかのプ ラットフォームでは不可能なレベルの再 現性、拡張性、柔軟性、使いやすさを備 えた自動化が実現します。この技術によ り、手作業に要する時間が最小限に抑え られ、作業効率を最大限に高めること ができるため、定量プロテオミクスにお いて重要な試料前処理作業の高い再現 性および迅速化を実現できます。 溶液中 消化プロトコルを使えば、8~384 試料 の同時処理が可能であり、ペプチド精製 プロトコルでは、8~96 試料を同時に処 理できます。この2つのプロトコルを利 用することにより、容易に大規模解析へ の対応ができ、一台の AssayMAPBravo で1週間あたり数千のサンプルに対応 することができます。AssayMAP の溶液 中消化プロトコルとペプチド精製プロト コルを組み合わせることにより、2 種類 の変性剤を用いた複数日、複数プレー トの分析において、25 種類の BSA 消化 ペプチドで平均ピーク面積 CV 値は 2.3 ~3.7 % でした。AssayMAP RP-S および C18 逆相カートリッジの特性を詳細に検 討、BSA トリプシン消化物の負荷許容 量、保持能、およびペプチド回収率といっ た重要な指標を評価しました。低~中程 度の疎水性のペプチドでは、低負荷量(3 µg) においても高い回収率が得られまし た。また、親水性の高いペプチドの保持 能が維持される 100 µg までの BSA 消化 物をロードすることが可能です。

本実験で用いた BSA の場合、グアニジ ン変性が有効であり、酵素消化におけ る高い再現性を示した5種のペプチド には、バイアスの原因となりうる Met や Cys 残基を含んでいません。また、定量 的な脱塩法開発には、相対疎水性が重 要な指標の一つとなることが示されま した。LC/MS 法によるタンパク質バイ オマーカーの臨床応用を実現するため には、高い多様性を有する標的タンパク 質消化ペプチドの中から定量に最適な ペプチドを実験的に選別する必要があ ります。Agilent AssayMAP Bravo と LC/ MS サンプル前処理ツールは、これらの 検討を驚異的な速さ、簡便さで実現する 唯一の方法であると言えます。

参考文献

 V. Spicer, et al., "Sequence-specific retention calculator.A family of peptide retention time prediction algorithms in reversed-phase HPLC:Applicability to various chromatographic conditions and columns", Anal.Chem., 79 (22), 8762-8768, 2007.

www.agilent.com/chem/jp

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, August 20, 2013 5991-2957JAJP

