

nanoESI / LCMS-IT-TOF によるヒト血清中ペプチドの解析

Analysis of Peptides in Human Serum Using nanoESI / LCMS-IT-TOF

ペプチドは分子量1万以下の低分子で、また組織や細胞が生産する生体内ペプチドの総体を一斉に解析する手法をペプチドミクスと呼びます。ある種のペプチドは生体内の調整物質としての活性を持ち、血液などを介して情報を伝達します。

ここでは、ナノフロー LC Prominence nano 1Dシステム、nanoESIインタフェース NES-100およびLCMS-IT-TOF質量分析計を組み合わせ、ヒト血清中の遊離ペプチドを解析した例をご紹介します。

サンプルの前処理方法と分析方法に関しては、まずシグマアルドリッチ社から購入したヒト血清標準品25 μ Lに0.1%ギ酸水溶液475 μ Lを加えました。100 $^{\circ}$ Cにて15分間

加熱した後、14000 \times g (4 $^{\circ}$ C下) で遠心して上清を回収しました。引き続き、分画分子量10000の遠心分子量カットフィルタ (microcon YM-10, 日本ミリポア) により、14000 \times g (4 $^{\circ}$ C下) にて遠心し、フロースルー画分をペプチド抽出液としました。抽出溶液を遠心乾固した後、55 μ Lの0.1%ギ酸に溶解したものを最終試験溶液とし、そのうち1 μ LをnanoESI / LCMS-IT-TOF分析に供与しました。

Fig. 1に、試料を逆相分離した際のMSクロマトグラムを示します。

T. Iida

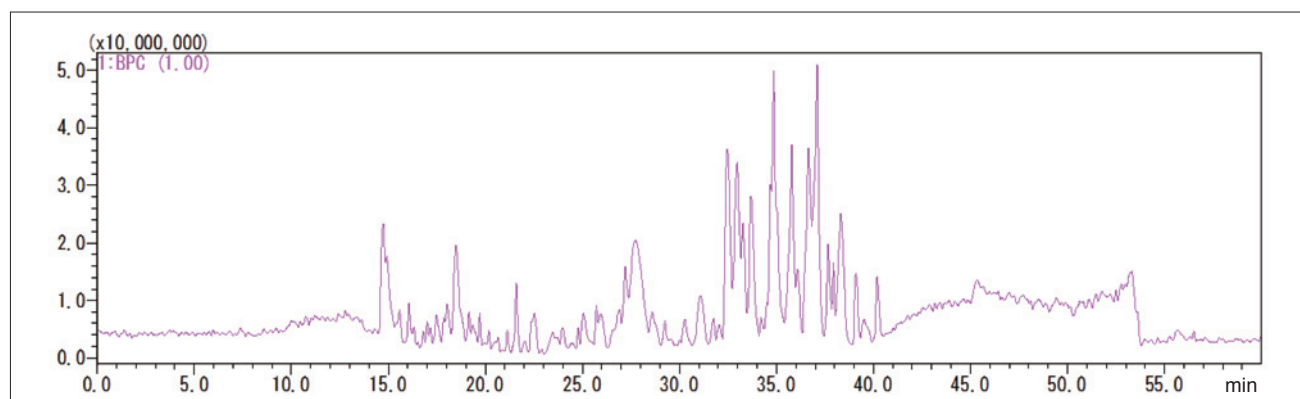


Fig. 1 ペプチド抽出画分のMSクロマトグラム (1 μ L 注入)
MS Chromatogram of Peptides Sample (1 μ L injected)

Table 1 nanoESI / LCMS-IT-TOF 分析条件
Analytical Conditions for nanoESI / LCMS-IT-TOF

< LC Conditions >	
Column	: picofrit column (0.075 mmI.D. \times 100 mmL., betabasic C18, 5 μ m, New Objective)
Mobile Phase	: A; 0.1% formic acid / 2% acetonitrile, B; 0.1% formic acid / 95% acetonitrile 2%B - 50%B (20 min) - 80%B (5 min) - 100%B(5 min) - 100%B (10 min)
Flow Rate	: 300 nL/min
Trapping Column	: L-column Micro (0.3 mmI.D. \times 5 mm, ODS, 5 μ m, CERI)
Trapping Solution	: 0.1% formic acid
Trapping Flow Rate	: 60 μ L/min
Trapping Time	: 5 min
Injection Volume	: 1 μ L from 55 μ L of peptides sample
< MS Conditions >	
Mode	: nanoESI - positive (data dependent MS/MS analysis)
Spray Voltage	: 2.8 kV
CDL Temperature	: 200 $^{\circ}$ C
Block Heater Temperature	: 200 $^{\circ}$ C
Scan Range	: MS; m/z 200 - 1500, MS/MS; m/z 50 - 2000

LCMS-IT-TOFは、飛行時間型質量分析計 (TOF) に四重極イオントラップ (QIT) を複合した構成になっており、高い質量精度にてMS/MS分析が可能です。本分析は、MS分析に加えて、強度の高いピークから自動的にMS/MS分析を行うモードにてデータを取得しました。さらにMascotデータベース検索エンジン (マトリックスサイエンス社)*1を用いて、得られたMS/MSスペクトルデータからMS/MSイオンサーチ法によりペプチド配列の帰属を試みました。

Fig. 2に解析結果を示します。例として、トップスコアに「Chain A, Human Serum Albumin Complexed With Myristate And Azapropazone」が同定され、10種類のペプチドの配列が帰属されました。これらペプチドは血清中で遊離されていたものと考えられます。また、プリカーシオンの理論値と測定値間の質量値誤差が4 ppm未満と、高い質量精度にてデータ取得できていることが確認されました。

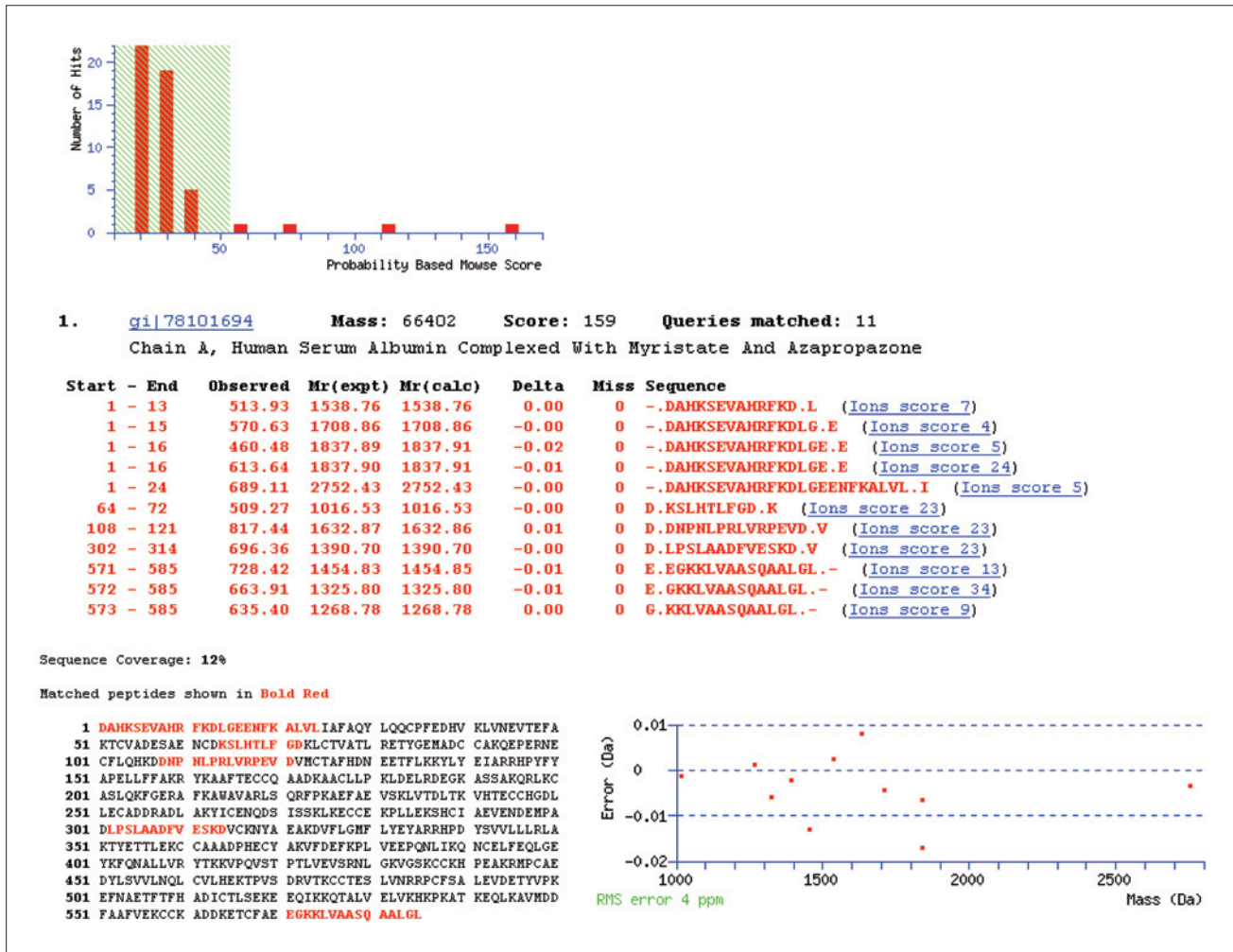


Fig. 2 MS/MSイオンサーチ法によるペプチド配列の推定結果
Result of Peptide Identification by MS/MS Ion Search Algorithm

*1 <http://www.matrixscience.com>

初版発行：2010年10月

島津製作所 分析計測事業部
応用技術部

島津分析コールセンター

● 0120-131691 (携帯電話不可)
● 携帯電話専用番号 (075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/>
会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。