

高速高分離分析の応用（その25） BSA消化物の高分離分析

High Speed with High Resolution Analysis (Part 25) High Resolution Analysis of BSA Digest

近年、2 μm 前後の微粒子充填剤による高速高分離分析が注目されています。このような微粒子径充填剤では高い理論段数が得られるため、カラム単位長さあたりの分離効率を高くすることができ、カラム長さを短くし分離を損なわないまま高速化をはかる、あるいはカラム長さを変えず、より分解能を追求した高分離分析をはかる、といった手法が可能となります。

ここでは、高速高分離用カラム“Shim-pack XR-ODS”（粒子径2.2 μm ）と超高速・高分離LC“Prominence UFLC_{XR}”およびイオントラップ質量分析計（QIT）/飛行時間型質量分析計（TOF）を複合した“LCMS-IT-TOF”を用いたBSA（ウシ血清アルブミン）消化物¹の高分離分析例についてご紹介します。

T.Yoshida

“Shim-pack XR-ODS”によるBSA消化物の高分離分析

High Resolution Analysis of BSA Digest by “Shim-pack XR-ODS II”

“Shim-pack XR-ODS”は粒子径2.2 μm の微粒子充填剤を充填したカラムであり、高分離分析のために長さ150 mmカラムが用意されています。

Fig.1に“Shim-pack XR-ODS”を用いて、BSA消化物を分離したトータルイオンクロマトグラムを示します。（分析条件は次頁Table 1を参照）

BSA消化物は分離能の目安として用いることができますが、そのパフォーマンスを定量的に表す数値として、Peak Capacity²があります。粒子径5 μm の汎用カラムにおけるPeak Capacityは300程度ですが、今回の“Shim-pack XR-ODS”によるデータでは、527と計算され、大幅に高分離分析が達成されていることがわかります。

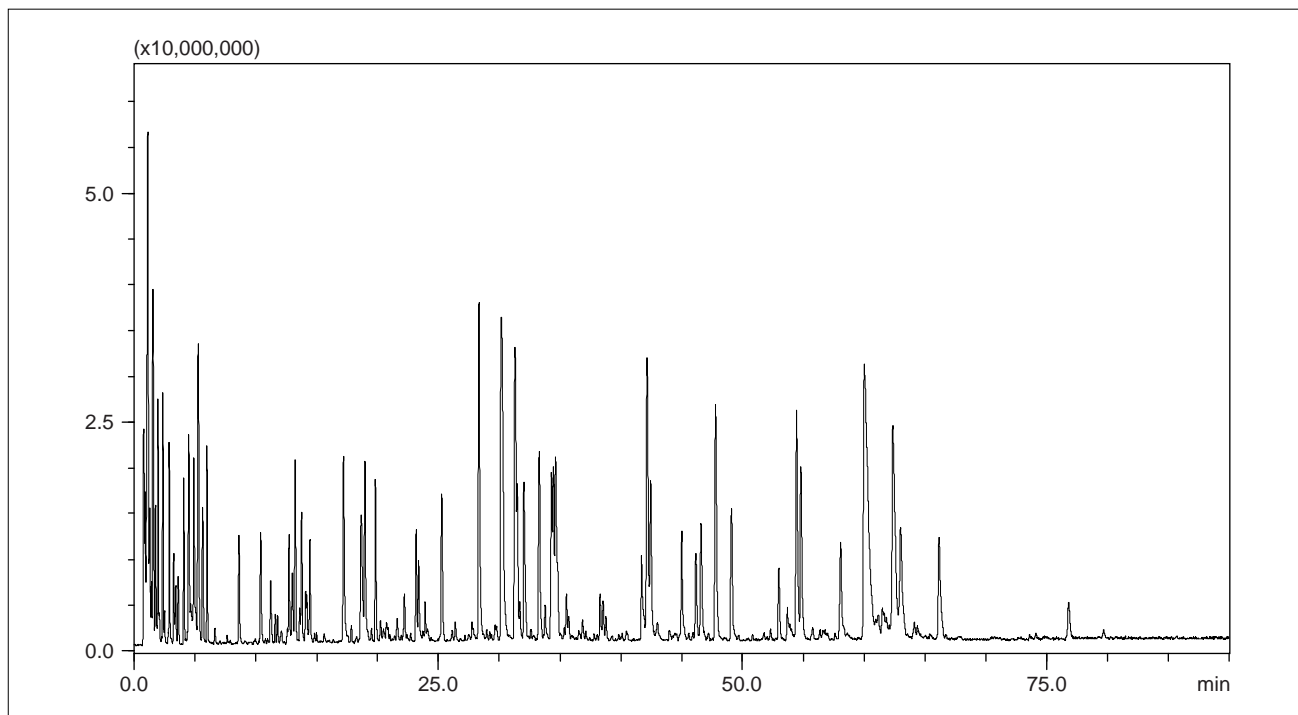


Fig.1 Shim-pack XR-ODS IIによるBSA消化物のトータルイオンクロマトグラム(TIC)
Total Ion Chromatogram (TIC) of BSA Digest on Shim-pack XR-ODS II

1 今回使用したBSA消化物は、大阪大学蛋白質研究所 李紹良先生からご提供いただきました。

2 グラジエント分離法において、そのパフォーマンスを定量的に表す数値です。

Peak Capacity = $1 + (t_g / t_w)$ t_g : グラジエント時間, t_w : ピーク幅（ここでは全ピークの平均を使用）

Peak Capacityの理論的な背景等については、以下の文献をご参照ください。

U. D. Neue: J.Chromatogr. A., 1097, 153 (2005)

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

< LC conditions >	< MS conditions >
Instrument : Prominence UFLC _{XR}	Instrument : LCMS-IT-TOF
Column : Shim-pack XR-ODS II (150 mm L. × 2.0 mm I.D., 2.2 μm)	Ionization Mode : ESI positive (Auto MS / MS functionality)
Mobile Phase : A; 5 mmol/L Ammonium formate + 0.1 % Formic acid in Water B; 0.1 % Formic acid in Acetonitrile B conc. 3 % (0 min) → 40 % (90 min)	Applied Voltage : + 4.5 kV Nebulizer Gas Flow : 1.5 L / min Drying Gas Pressure : 0.1 MPa
Flow Rate : 0.3 mL / min	BH Temperature : 200 °C
Column Temp. : 40 °C	CDL Temperature : 200 °C
Injection Vol. : 2 μL (20 pmol on column)	Scan : m/z 150-1500

配列解析

Sequence Coverage

タンパク質のキャラクタリゼーション法として、トリプシンなどを用いた酵素消化を行い、その消化物（ペプチド）をイオントラップ型LC-MS/MSで分析し、データベース検索を行うのが簡便な方法です。ここでは、イオントラップ質量分析計と飛行時間型質量分析計を複合した“LCMS-IT-TOF”を用い、より精度の高い分析を行いました。

データベース検索には、“MASCOT³”によるMS/MS Ion Searchを用いました。その検索結果をFig.2に示しますが、BSAをトップスコアでヒットすることができました。

“Shim-pack XR-ODS”による分離において、BSAを構成する酵素消化断片ペプチドのSequence Coverageは81%と非常に高いものでした。なお、粒子径5 μmの汎用カラムによる回収率は67%でした⁴。

このように、より多くピークを分離できる微粒子径充てんカラム“Shim-pack XR-ODS”およびそれを支える“Prominence UFLC_{XR}/LCMS-IT-TOFシステム”が、Peak Capacityの観点から高分離であることを証明し、またそれがSequence Coverageの観点からも非常に有効であることを確認しました。

```
Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
Variable modifications: Oxidation (M)
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Sequence Coverage: 81%
```

Matched peptides shown in **Bold Red**

```
1 MKWVTFISLL LLFSSAYSRG VFRRDTHKSE IAHRFKDLGE EHFKGLVLI A
51 FSQYLQQCPF DEHVKLVNEL TEFAKTCVAD ESHAGCEKSL HTLFGDELCK
101 VASLRETYGD MADCCEKQEP ERNECFLSHK DDSPDLPKLK PDPNTLCDEF
151 KADEKKFWGK YLYEIAARRHP YFYAPELLYY ANKYNGVFQE CCQAEDKGAC
201 LLPKIETMRE KVLTSARQR LRCASIQKFG ERALKAWSVA RLSQKFPKAE
251 FVEVTKLVTD LTKVHKECCH GDLLECADDR ADLAKYICDN QDTISSKLKE
301 CCDKPLLEKS HCIAEVEKDA IPENLPPLTA DFAEDKDVCK NYQEAKD AFL
351 GSFLYEYSRR HPEYAVSVLL RLAKYEATL EECCA KDDPH ACYSTVFDKL
401 KHLVDEPQNL IKQNC DQFEK LGEYGFQNAL IVRYTRKVPQ VSTPTLVEVS
451 RSLGKVGTRC CTKPESERMP CTEDYLSLIL NRLCVLHEKT PVSEKVTKCC
501 TESLVNRRPC FSALTPDETY VPKAFDEKLF TFHADICTLP DTEKQIKKQT
551 ALVELLKHKP KATEEQLKTV MENFVAFV DK CCAADDKEAC FAVEGPKLVV
601 STQTALA
```

Fig.2 MS/MS Ion Search 解析のまとめ
Sequence Coverage of BSA (Result of MS/MS Ion Search)

³ <http://www.matrixscience.com>

⁴ 通常こうしたペプチドマッピングには、内径50 μm程度のカラムを用いるnano-LC/MS/MSのシステムが使用されますが、抗体医薬など試料が比較的多く得られる場合には、今回ご紹介しましたセミマイクロLCによるペプチドマッピングも使いやすさを含め有効です。

初版発行：2009年7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。