[ TECHNOLOGY BRIEF ]

# MassLynx 制御の Xevo TQ-S タンデム四重極型質量分析計 および Skyline を用いた ペプチドの高感度 SRM/MRM 条件作成の自動化

## 目的

Skyline SRM/MRM ソフトウェアと Xevo® TQ-S MS を組み合わせることで、直感的で、迅速、そしてシームレスに多数のペプチド SRM/MRM トランジッションおよびメソッドの開発を行えることを示します。

## 背景

LC-MS/MS のターゲット SRM/MRM の検証は、タンパク質のバイオマーカー探索からバリデーションへの潜在的な架け橋となり得ます。一般的に、マーカー候補タンパク質は、探索研究での小規模な相対定量によって同定されます。典型的なボトルネックとされているのは、SRM/MRM 定量に適した各タンパク質に特有のペプチドの選択と、タンデム四重極型質量分析計のための LC/MS メソッド開発にあります。特に複雑な試験の場合、ソフトウェアはターゲットタンパク質の代わりに、測定対象として的確なペプチドを選択するための重要な役割を担っています。ターゲットペプチドのトランジッションが計算され、それぞれのペプチドに対して最適化が行われます。このテクノロジーブリーフでは、Skyline を用いてペプチドとトランジッションの選択過程と Waters® Xevo TQ-S 質量分析計のメソッド開発について、複雑な合成マトリックス中にあるアレルギー誘発性ペプチド標準試料の分析結果も含めて、ご紹介します。Skyline は、ターゲットプロテオミクス分析のターゲット作成と分析のための、オープンソースの文書エディターです。[1]

**トランジッションの選択と MS メソッド作成の自動化、そして直感的に理解できるデータを得るために、信頼性と操作性を兼ね備えたソフトウェアで、プロテオミクスの探索から定量 SRM/MRM ベースのバリデーションまで迅速に展開**

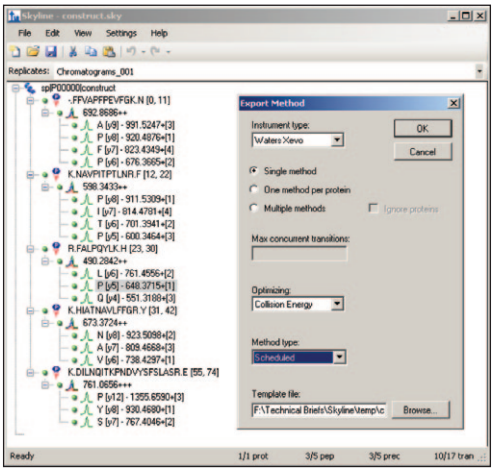


*図 1．アレルギー誘発性のタンパク質についてソフトウェア上で消化とフラグメントのシミュレーションを行い、候補となるトランジッションを生成。Skyline は、トランジッションの選択のために 1 つのペプチドに対し、3 または 4 つのプロダクトイオンを予測。5 つの全ペプチドに対して得られた最終的なトランジッションの数は、17。続いて、Skyline エクスポートメソッドエディターを使用して、最適な設定を見出すための異なるコリジョンエネルギーを設定した Xevo TQ-S のメソッドファイルを生成。*

## ソリューション

定量 SRM/MRM メソッドの構築と得られた質量分析データの解析に用いられる Skyline ソフトウェアを使用して、5 つのアレルギー誘発性ペプチド標準試料をマトリックスにスパイクして、最も良好なトランジッション候補を予測しました。ベンダーに中立な Skyline は、大規模な研究におけるターゲットメソッドを作成し、ブラッシュアップを繰り返すために開発されました。スケジュール SRM/MRM メソッドは、全てのペプチドに対し、個々にコリジョンエネルギーを最適化して作成されます。保持時間は、線形の予想保持時間と分布曲線の最適化 / 調整のために、入力された実際の保持時間を加味して、Skyline に組み込まれたモデルで予測されます。

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

図 1 は、アレルギー誘発性タンパク質の予測トランジッションと、取り込み時間範囲およびコリジョンエネルギーの最適化をした Xevo TQ-S メソッドを作成するための Skyline エクスポートメソッドエディターの画面を示しています。各ペプチドに対して、実験から得られた結果から最適なコリジョンエネルギーを予測するのではなく、1 セット 11 種類のコリジョンエネルギーが、-5 V から +5 V までの範囲で作成されます。作成されたメソッドは、図 2 の MassLynx® ソフトウェアの SRM/MRM メソッドエディターで、直接、読み込みや編集が可能です。Dwell 時間は、平均的なクロマトグラムのピーク幅を基準にして自動的に算出されます。分析を実行した後、その結果を MassLynx または Skyline ソフトウェアのどちらかでレビューすることができます。図 3 は、1 つのペプチドに対する 11 種類の SRM/MRM 条件の結果を重ねがきしたものです。この例では、最適なコリジョンエネルギーは予測された値よりも 2V 低い値で、ペプチド標準試料をインフュージョンして得られた MassLynx ソフトウェアデータの値とよく一致していることが分かりました。

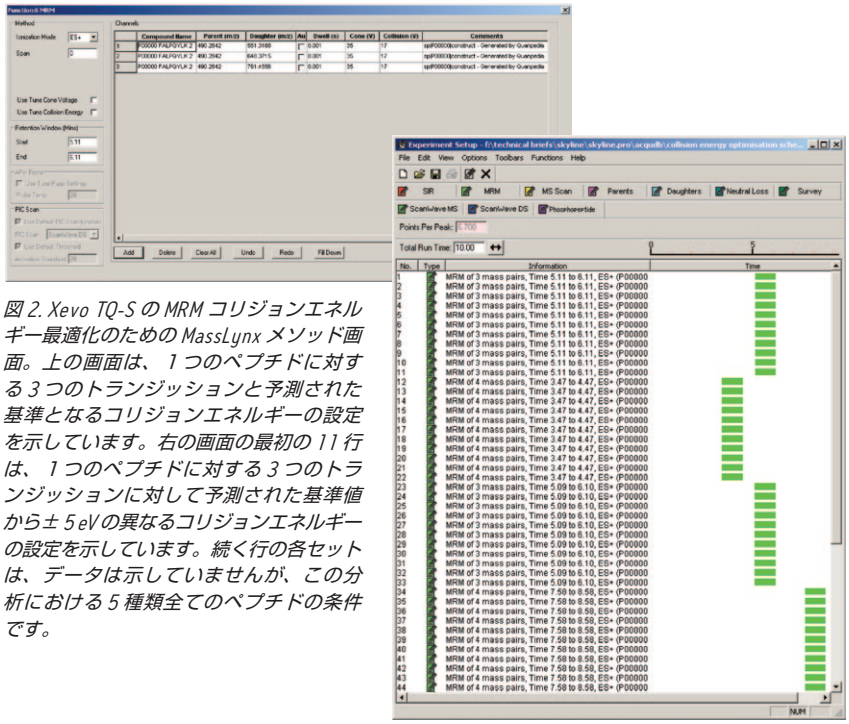

*図 2. Xevo TQ-S の MRM コリジョンエネルギー最適化のための MassLynx メソッド画面。上の画面は、1 つのペプチドに対する 3 つのトランジッションと予測された基準となるコリジョンエネルギーの設定を示しています。右の画面の最初の 11 行は、1 つのペプチドに対する 3 つのトランジッションに対して予測された基準値から± 5 eV の異なるコリジョンエネルギーの設定を示しています。続く行の各セットは、データは示していませんが、この分析における 5 種類全てのペプチドの条件です。*

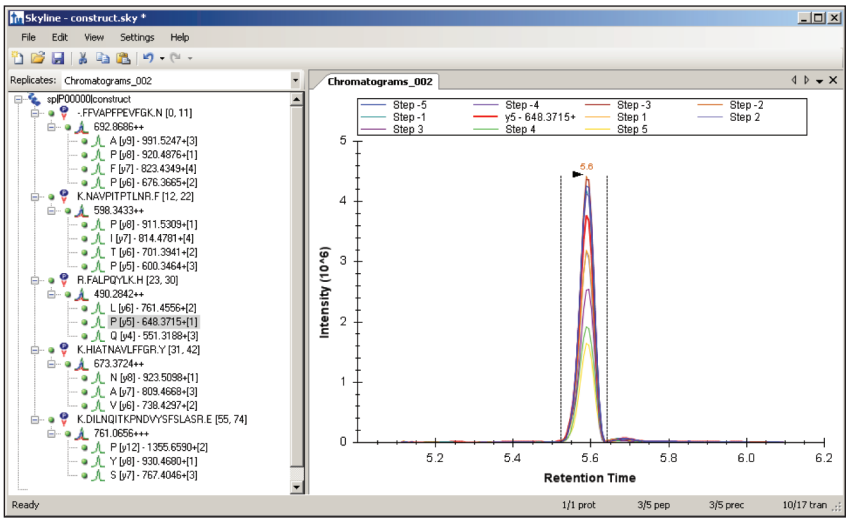


*図 3. Skyline トランジッション評価画面。図 2 で設定されたメソッドを用いてデータを取得した後、SRM/MRM の最も強度が得られるトランジッションとコリジョンエネルギー設定の SRM/MRM データを確認することができます。1 つのペプチドのトランジッションから関心のあるチャンネルとその 11 種類の異なるコリジョンエネルギーによる影響を MRM/SRM クロマトグラムで示しています。*

## まとめ

複雑な合成マトリックスに添加した 5 つのアレルギー誘発性ペプチド標準試料の Xevo TQ-S のための SRM/MRM メソッド開発に、オープンソースの Skyline ソフトウェアを用いる手法をご紹介しました。

## 参考文献

1. MacLean *et al.* Bioinformatics. 2010 Apr 1;26(7):966-8.

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

**日本ウォーターズ株式会社** www.waters.com
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12 第5小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 新大阪トヨタビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
サービス拠点 東京 大阪 札幌 福島 静岡 富山 名古屋 徳島 福岡

Waters、Xevo、MassLynx および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。
その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。
©2015 Waters Corporation. Produced in Japan. 2015 年 9 月 720004346JA PDF