

HILIC LC/MS 및 RP-LC/MS에 의한 당단백질 Erythropoietin 펩타이드 맵핑

응용 자료

바이오제약

저자

Alex Zhu, James Martosella, and
Phu T Duong
Agilent Technologies, Inc

서론

펩타이드 맵핑은 단백질 바이오치료제의 특성을 종합적으로 규명하기 위해 중요한 기법입니다. 일상적으로 역상(RP) UHPLC/HPLC를 사용하지만, 소화물이 친수성 펩타이드를 함유한 경우 귀중한 정보를 놓칠 수 있습니다. 이 응용 자료에서는 RP 펩타이드 분석법에 대한 보완적인 접근법으로, HILIC 크로마토그래피를 사용하여 소화된 당단백질 erythropoietin(EPO)의 펩타이드 맵핑을 설명합니다. EPO 단백질을 맵핑하기 위해 Agilent ZORBAX Rapid Resolution High Definition 300-HILIC 1.8 μ m LC 컬럼 및 Agilent AdvanceBio Peptide Mapping RP 컬럼을 TOF 질량 분석법과 함께 사용하였습니다. HILIC(친수성 상호작용 크로마토그래피)을 위한 높은 유기 용매 시스템의 이동상을 활용하여, 이러한 분석에서 소화된 펩타이드를 평가하고 시퀀스 커버리지 및 펩타이드 식별에 대해 비교하였습니다. 이 응용 자료는 펩타이드 분석에서 RP LC/MS를 보완하는 직교적 접근법으로서 HILIC의 유용성을 입증합니다.



Agilent Technologies

실험

시료 제조

트립신 분해한 EPO 당단백질 시료를 Bio Creative(Shirley, NY)에서 구입하였습니다. 시료(2mg/mL) 100 μ L를 HILIC 또는 RP 용리액 A 용매 100 μ L와 혼합하였습니다.

작동 조건

실험은 Agilent 1290 Infinity LC 및 dual ESI 소스 accurate-mass 6224 TOF LC/MS 구성의 UHPLC/TOF 시스템을 이용하여 양이온 모드로 수행하였습니다. 트립신 분해한 EPO 단백질의 펩타이드를 서로 다른 HILIC 및 RP 조건에서 분리하였습니다.

HILIC 조건

컬럼: Agilent ZORBAX Rapid Resolution High Definition 300-HILIC, 2.1 \times 100mm, 1.8 μ m(p/n 858750-901)

용리액: A, 95% ACN + 5% water; B, 50mM ammonium formate, pH 4.0

유속: 0.4mL/분

그레디언트:	시간(분)	% B
	0	0
	15	100
	15.1	0
	20	0

온도: 55°C

역상(RP) 조건

컬럼: Agilent AdvanceBio Peptide Mapping, 2.1 \times 250mm, 2.7 μ m(p/n 653750-902)

용리액: A, 100% water, 0.1% formic acid; B, 100% ACN, 0.1% formic acid

유속: 0.4mL/분

그레디언트:	시간(분)	% B
	0	3
	3	3
	33	45
	38	60

온도: 55°C

MS 조건

가스 온도: 350°C

가스 유량: 10L/분

Nebulizer: 45psi

캐필러리 전압: 3,500V

Fragmentor: 170V

스캔 속도: 2spec/초

질량 범위: 400 ~ 3,200m/z

결과 및 토의

역상 및 소수성 상호작용 크로마토그래피의 용리 순서는 직교적입니다. 역상 분리에서는 EPO 단백질의 분해된 펩타이드가 소수성이 증가하는 순서대로 용리됩니다. 반면, 친수성 상호작용 크로마토그래피의 경우는 소수성이 가장 낮은 펩타이드(친수성)가 컬럼에 가장 강하게 머물러 용리 순서는 반대가 됩니다. 단백질의 효소 소화물을 통해 획득한 펩타이드 분석에 HILIC 컬럼을 사용하면 RP 컬럼과 비교했을 때 글리코펩타이드류를 포함한 친수성 펩타이드의 머무름 및 분리능이 향상될 것으로 예상할 수 있습니다. 따라서 RP로는 머무르게 하지 못하고 분리할 수 없는 분해된 펩타이드를 HILIC를 통해 확인할 수 있습니다.

바이오표제 당단백질인 EPO는 작은 단백질로, 분자량이 약 34,000Da입니다. 이것은 상당히 글리코실화된 것으로 알려져 있어, 그 트립신 소화물은 친수성 펩타이드 및 글리코 펩타이드류를 비롯한 다양한 펩타이드를 포함할 것으로 예상됩니다.

그림 1A 및 1B는 ZORBAX RRHD 300-HILIC 컬럼 및 AdvanceBio Peptide Mapping RP 컬럼을 사용하여 EPO 당단백질의 분해 펩타이드를 질량 분석법으로 비교 분석한 결과를 보여줍니다.

Agilent MassHunter molecular feature extractor를 사용하여 HILIC LC/MS 결과를 추출한 다음, 분해된 EPO 단백질 시퀀스와 매칭한 결과, 100%의 시퀀스 커버리지를 나타냈습니다(그림 1A). 분리는 15분 미만이 소요되었습니다.

그 다음, 같은 시료를 AdvanceBio Peptide Mapping RP 컬럼으로 분석하였습니다. 이 경우에도 역시 EPO 분해 펩타이드와 매칭한 추출 화합물에서 100% 시퀀스 커버리지를 나타냈습니다(그림 1 B).

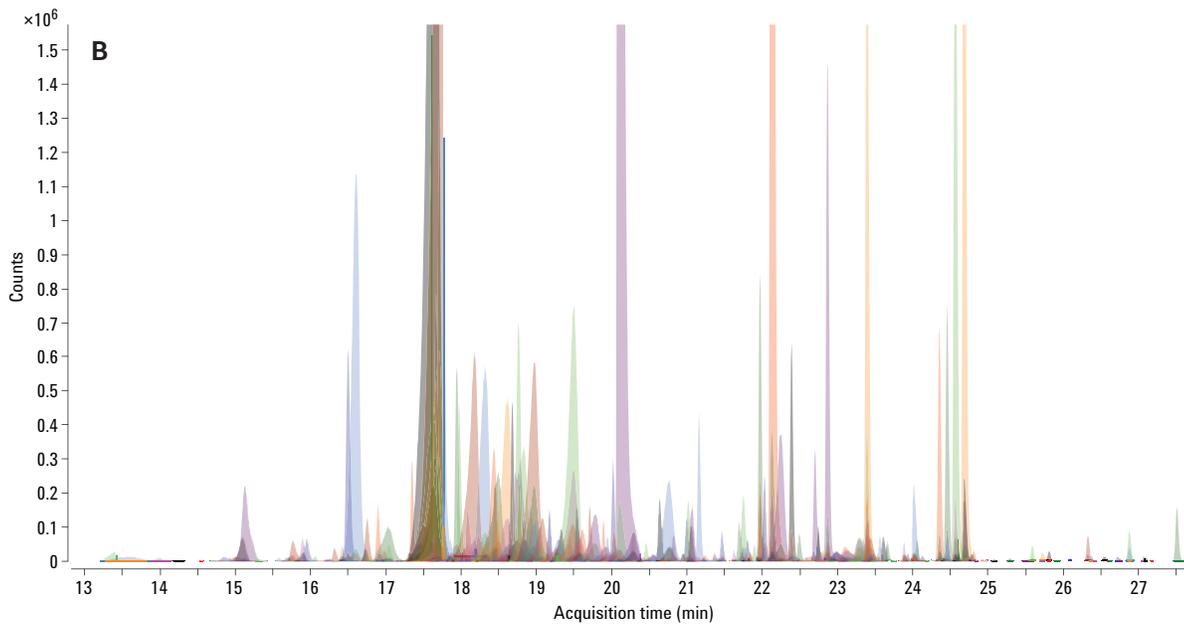
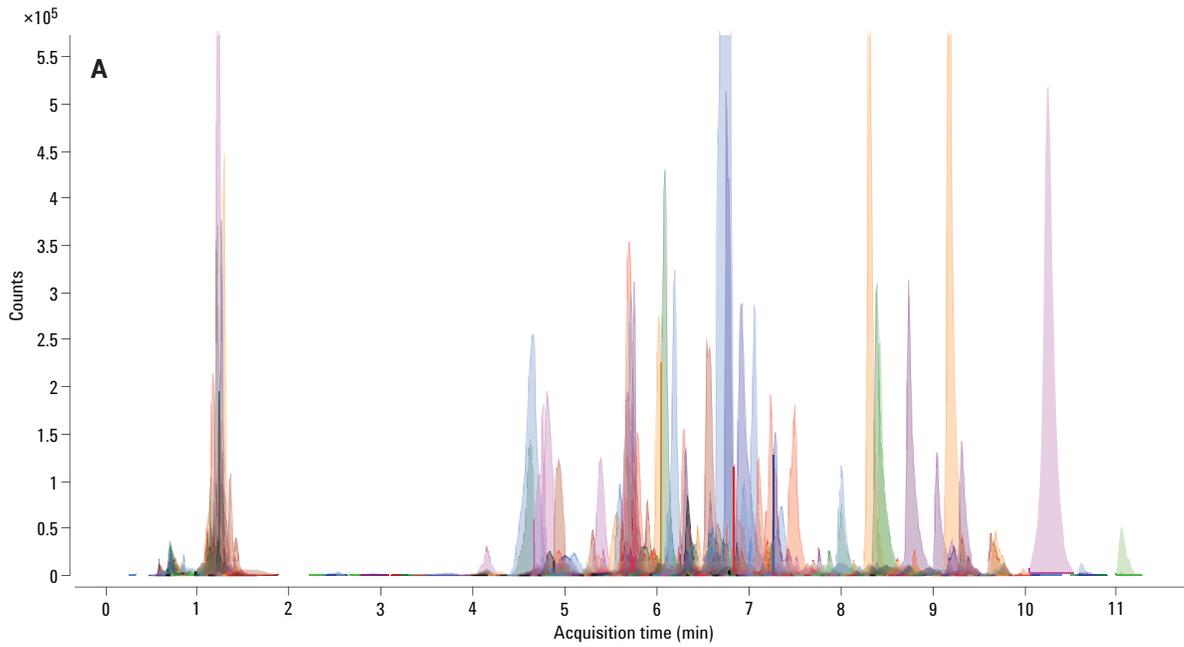


그림 1. EPO 분해 펩타이드와 매칭한 (A) Agilent ZORBAX RRHD 300-HILIC 컬럼 및 (B) Agilent AdvanceBio Peptide Mapping RP 컬럼에서의 추출 화합물 크로마토그램(2 가지 모두 Agilent MassHunter molecular feature extractor 사용)

HILIC 및 RP에 공통적인 펩타이드

데이터를 비교한 결과 2 가지 컬럼 모두에서 8개의 펩타이드가 존재하였습니다. 이것은 이러한 펩타이드가 두 크로마토그래피 모드에 모두 친화성을 가졌다는 것을 의미합니다 (표 1). 항상은 아니지만, 일반적으로 HILIC 프로파일의 용리 순서는 RP 프로파일의 용리 순서와 반대이며, 이러한 용리 순서는 (펩타이드의)소수성 및 전하에 따라 달라집니다. 따라서 그림 2에서 확인할 수 있는 것처럼, HILIC 순서가 반드시 8에서부터 1로 가는 것은 아닙니다.

그림 2는 펩타이드 P1 ~ P4가 ZORBAX RRHD 300-HILIC 컬럼에서 더 잘 분리되었음을 보여줍니다. 이 펩타이드는 역상 컬럼에서 함께 용리되었습니다.

표 1. 2 가지 컬럼에서 공통적인 펩타이드

펩타이드	시퀀스	소수성	RP 머무름 시간(분)	HILIC 머무름 시간(분)
P1	APPR	1.83	2.103	10.259
P2	GKLK	3.84	2.118	8.437
P3	ALGAQK	4.57	2.119	9.181
P4	AVSGLR	9.15	2.13	8.316
P5	YLLEAK	19.64	15.698	8.014
P6	VYSNFLRGK	23.14	18.742	6.583
P7	SLTTLLR	24.79	20.109	7.492
P8	VNFYAWKR	27.64	22.87	0.587

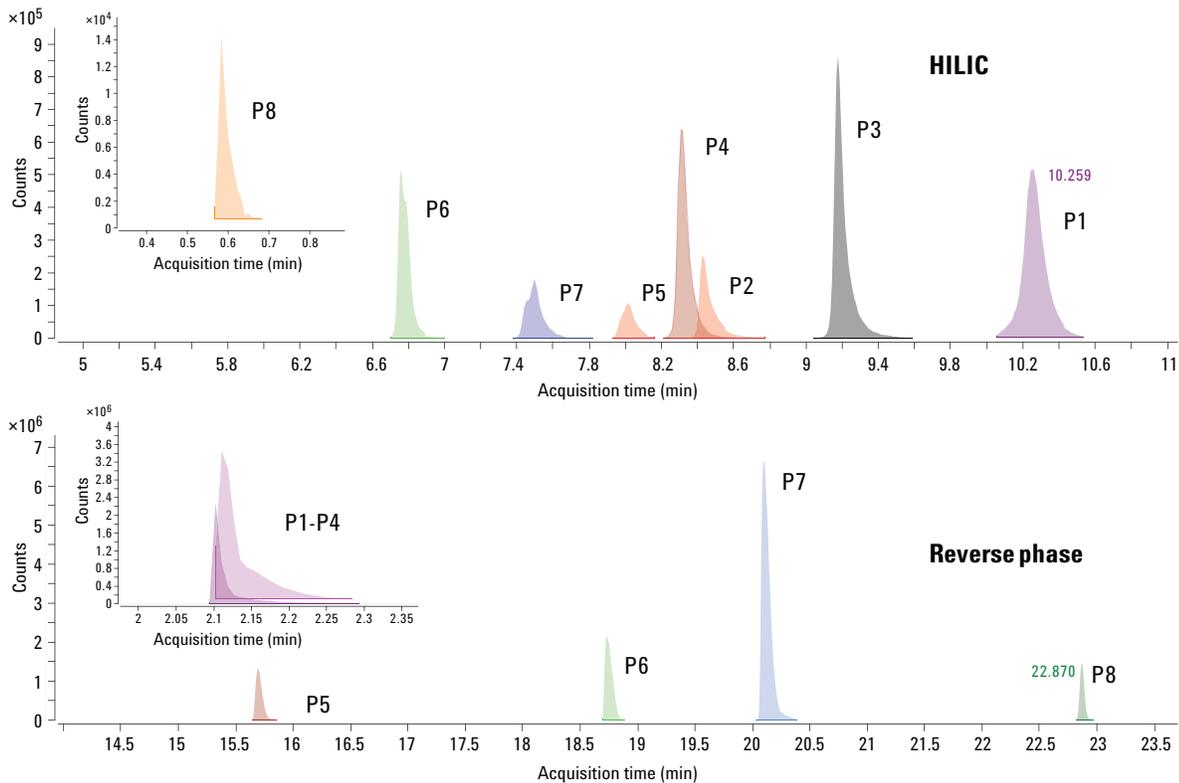


그림 2. 머무름 시간 및 분리능 관련 2 개 컬럼의 8가지 펩타이드 비교

HILIC에서만 발견된 펩타이드

일반적으로 RP 조건에서는 가장 소수성이 낮은 펩타이드 (친수성)가 조기에 용리되기 때문에 MS 분석에 의한 정량이 더욱 어렵습니다. 일부 소수성이 매우 높은 펩타이드는 RP LC/MS 분석에서 보통 사용하는 수용액 조건에 잘 용해되지 않습니다. 이로 인해 분석 감도 또한 낮아집니다.

따라서 시료를 높은 함량의 유기 용매로 혼합하고, HILIC 컬럼에서 높은 유기 용매 이동상을 사용하면 일부 강한 소수성의 펩타이드를 더욱 잘 용해하고 분리할 수 있습니다. 표 2의 데이터는 오직 HILIC LC/MS에서만 확인된 친수성 펩타이드의 예를 보여줍니다.

표 2. HILIC 컬럼에서만 확인된 펩타이드

번호	시퀀스	소수성	머무름 시간(분)	높이
1	VLER	6.24	6.747	1396603
2	LKLYTGEACRTGDR	18.13	9.175	2192
3	ALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFR	37.09	11.059	5263
4	APPRLICDSRVLER	27.7	6.493	1485
5	GQALLVNSSQPWEPLQLHVDK	40.19	9.103	1995
6	KLFRVYSNFLR	36.51	4.629	3745
7	LFRVYSNFLR	35.24	4.945	1972

HILIC 컬럼에서 발견된 트립신 분해 EPO 단백질의 글리코펩타이드

표 2의 데이터는 5번 펩타이드가 HILIC 컬럼에서만 발견된 글리코펩타이드임을 보여줍니다. 이것의 시퀀스 위치, 머무름 및 글리코실화 확인은 표 3에 나타나 있습니다. ZORBAX RRHD 300-HILIC 컬럼을 사용하여 EAENITTGCAEHCSLNENITVPDTK의 시퀀스를 갖는 추가적인 글리코펩타이드 하나가 4가지 다른 글리코형을 가지는 것을 확인하였습니다(표 3).

EPO 당단백질은 시퀀스 위치 24, 38 및 83에 3개의 N-글리코실화 부위를 가지고 있습니다. HILIC 컬럼을 통해 확인한 글리코펩타이드는 표 3에 정리되어 있으며, 글리코실화 부위는 빨간색으로 표시하였습니다. MS 크로마토그램의 머무름 시간(그림 1A)을 바탕으로 볼 때 이 글리코펩타이드는 친수성이 매우 강한 펩타이드입니다. 이와 마찬가지로 글리코펩타이드 EAENITTGCAEHCSLNENITVPDTK의 4가지 글리코형을 RP 컬럼으로 확인해 보았습니다. 하지만, 이러한 글리코형은 분리되지 않고 RP 컬럼의 틸새 부피에서 용리되었습니다.

표 3. Agilent ZORBAX RRHD 300-HILIC 컬럼을 사용하여 확인한 트립신 분해 EPO 당단백질의 글리코펩타이드

번호	시퀀스	시퀀스 위치	머무름 시간(분)	글리코실화
1	EAENITTGCAEHCSLNENITVPDTK	21-45	9.425	1111 0A 1G (+1710.5977)
2	EAENITTGCAEHCSLNENITVPDTK	21-45	9.392	3022 2A 0G (+2407.8518)
3	EAENITTGCAEHCSLNENITVPDTK	21-45	9.425	3021 1A 0G (+2407.8518)
4	EAENITTGCAEHCSLNENITVPDTK	21-45	9.500	3020 0A 0G (+1825.6610)
5	GQALLVNSSQPWEPLQLHVDK	77-97	9.103	0100 0A 0G (+1038.3751)

결론

AgilentZORBAX Rapid Resolution High Definition 300-HILIC의 사용은 RP 크로마토그래피에서 분리되지 않는 친수성 펩타이드를 맵핑하고 식별하는 데 도움이 될 수 있습니다. 따라서 MS와 이 컬럼을 함께 사용하면 RP LC/MS에 대한 보완적이고 직교적인 접근법으로서 글리코 펩타이드를 포함하는 친수성 펩타이드의 더 나은 머무름을 제공하여 잠재적으로 시퀀스 커버리지 및 단백질 특성 규명을 개선할 수 있습니다.

자세한 정보

이러한 데이터는 일반적인 결과를 나타냅니다. 애질런트 제품과 서비스에 대한 보다 자세한 정보는 www.agilent.com/chem을 방문하십시오.

www.agilent.com/chem

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지 않습니다.

애질런트는 이 문서에 포함된 오류나 이 문서의 제공, 이행 또는 사용과 관련하여 발생한 부수적인 또는 결과적인 손해에 대해 책임을 지지 않습니다.

이 발행물의 정보, 설명 및 사양은 사전 공지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2017
한국에서 인쇄
2017년 11월 2일
5991-2085KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr



Agilent Technologies