

Multiple Reaction Monitoring (MRM)을 이용한 고효율 단백질 정량

응용 자료

저자

Ning Tang, Christine Miller, Joe Roark, Norton Kitagawa, Keith Waddell
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA USA

이 자료는 2009년 57회 ASMS 질량 분석 컨퍼런스에서 포스터 발표를 통해 전시되었습니다. 과학 컨퍼런스에서 포스터 발표된 연구는 상용화되기 전의 기기 또는 제품의 결과를 포함할 수 있습니다.

개요

Multiple Reaction Monitoring(MRM)을 이용한 정량 Proteomics는 바이오마커 검증을 위한 중요한 방법으로 떠올랐습니다. 삼중 사중극자(QQQ) 질량 분석기의 MRM은 복잡한 샘플 내 표적 펩티드에 대해 우수한 감도와 선택성을 제공합니다. MRM은 또한 정량에서의 높은 정밀성과 빠른 스캔 속도를 제공하기 때문에 고효율 방식의 바이오마커 검증에 이상적인 기술입니다. 이 응용 자료에서는 애질런트 테크놀로지스가 제공하는 MRM 및 통계 분석 소프트웨어를 함께 이용하는 바이오마커 검증의 전체 워크플로를 기술하고 있습니다. Agilent Q-TOF 및 Spectrum Mill MRM selector를 이용해 수천 가지의 펩티드 전이(transition)를 생성하였습니다. 전이 리스트는 다이내믹 MRM 기능이 장착된 MassHunter Acquisition 소프트웨어로 불러오기하여 한 번의 LC/MS 실행 내에서 모니터링하였습니다. 마지막으로, MRM 정량 결과는 주성분 분석(PCA), 계층적 군집분석 및 ANOVA 분석을 위해 Mass Profiler Pro를 이용하였습니다.



Agilent Technologies

소개

Multiple reaction monitoring (MRM)을 이용한 펩티드 정량은 바이오마커 검증을 위한 중요한 분석법으로 확립되어왔습니다. 정량 Proteomics에서는 종종 각 샘플당 수백 개의 표적 펩티드를 모니터링하고, 수천 개의 생물학적 샘플을 분석해야 하기 때문에 높은 처리량을 필요로 합니다. 다이나믹 MRM 알고리즘은 시스템으로 하여금 오직 각 펩티드 용리 시 머무름 윈도우 내에서만 전이 이온 데이터를 수집하도록 합니다. 이는 동시적 이온 전이의 개수를 줄임으로써 정량 성능과 감도를 향상시킵니다. 본 연구에서는 바이오마커 발굴부터 검증에 이르는 전체 워크플로우를 시연하기 위해 인간 혈장에 각기 다른 농도의 과산화효소(peroxidase)를 첨가하였습니다. 피크 존재비의 재현성 및 nanoflow 범위에서의 머무름 시간 재현성은 443, 2,000 및 3,293 개의 이온 전이에 대하여 nanoflow LC/MS 시스템에서 다이나믹 MRM 분석법으로 검토하였습니다.

실험

시료 전처리

인간 혈장 샘플은 Sigma(St. Louis, MO)에서 구입하였습니다. 샘플은 표준 프로토콜에 따라 Hu-14 immunoaffinity 컬럼(애질런트)을 이용해 14개의 다량 존재 단백질(high abundant proteins)을 제거하였습니다. 그 다음, 샘플을 bicarbonate 용액으로 완충액 교환하고, 환원시키며, 알킬화(IAA)한 뒤, 변성 조건 하에서 트립신으로 소화하였습니다. 호스래디시 과산화효소(HRP)는 Sigma(St. Louis, MO)에서 구입 후, 환원 및 알킬화한 뒤 트립신으로 소화하였습니다. 과산화효소 소화액을 인간 혈장 소화액 0.5µg당 500amol(A) 또는 5fmol(B)로 첨가하였습니다.

LC/MS 분석

전자 분무 LC/MS에서는 크로마토그래피의 용리 부피가 적을수록 피크 높이가 향상되어 더 우수한 감도로 이어집니다. 이를 위해 nanoflow LC/MS를 위한 독보적인 미세유체 Chip, 즉 HPLC-Chip을 개발하여 샘플 농축, 분리 컬럼, 마이크로밸브 및 nanospray 팁을 생체에 적합한 폴리아미드 Chip 내에서 통합하였습니다. 이 장치를 Triple Quadrupole 질량 분석기와 연결하면 사용이 쉽고, 믿을 수 있는 고감도 LC/MS 분석을 할 수 있습니다. 이 작업을 위해 HPLC-Chip을 Agilent 6410 Triple Quadrupole(QQQ) LC/MS 및 Agilent 6520 Accurate-Mass Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) LC/MS와 연결하였습니다.

HPLC-Chip 파라미터:

Chip 및 컬럼: 150 x 0.075mm 분석 컬럼과 40nL 농축 컬럼으로 구성된 단백질 ID Chip

시료 로딩: 서로 다른 양의 과산화효소 소화물을 첨가한 인간 혈장 소화물 0.5µg

주입량: 1µL

유량: 300nL/분 분석 펌프, 3µL/분 로딩 펌프.

이동상: A. 0.1% formic acid(FA), B. 90% acetonitrile(ACN), 0.1% FA.

그라디언트: 0분에 3% B, 3분에 10% B, 8분에 12% B, 42분에 30% B, 45분에 45% B, 50분에 70% B, 55분에 90% B, 55.1분에 3% B.

정지 시간: 60분

사후 시간: 10분

MS 조건:

건조 기체: 5mL/분, 325°C

충돌 에너지: 기울기 3.6, 오프셋 -4.8

캐필러리 전압: 1,800V

소프트웨어

Agilent Spectrum Mill MS Proteomics Workbench를 이용한 SwissProt 데이터베이스에서 Q-TOF 데이터를 검색하였습니다. Spectrum Mill 내의 새로운 도구인 MRM Selector를 이용하여 Q-TOF 데이터베이스 검색 결과에 기반을 둔 다이나믹 MRM 분석법을 직접 생성하였습니다. LC/MS 분석 후 결과는

MassHunter Quantitative Analysis 소프트웨어를 이용해 분석하였습니다. 여기에서 획득한 quant 배치 보고서 XML 파일을 질량 분석 데이터용으로 특별 설계된 계량분석화학 소프트웨어 패키지인 Mass Profiler Professional 소프트웨어로 불러들였습니다. 첨가된 펩티드의 특성은 주성분 분석(PCA) 분석을 통해 인간 혈장 펩티드의 관점에서 분석하였습니다. 또한 나이브(naive) 계층적 군집분석을 수행하였습니다.

결과 및 토의

바이오마커 검증 워크플로우는 **그림 1**에 묘사되어 있습니다. 첫 단계에서 샘플은 데이터 종속적 MS/MS 모드의 HPLC-Chip/ Q-TOF에서 분석하였습니다. HPLC-Chip은 5회 반복 주입의 BPC(base peak chromatograms) 오버레이(**그림 2**)가 보여주듯이 우수한 재현성을 나타냈습니다.



그림 1. 바이오마커 검증 워크플로우

1단계: Q-TOF

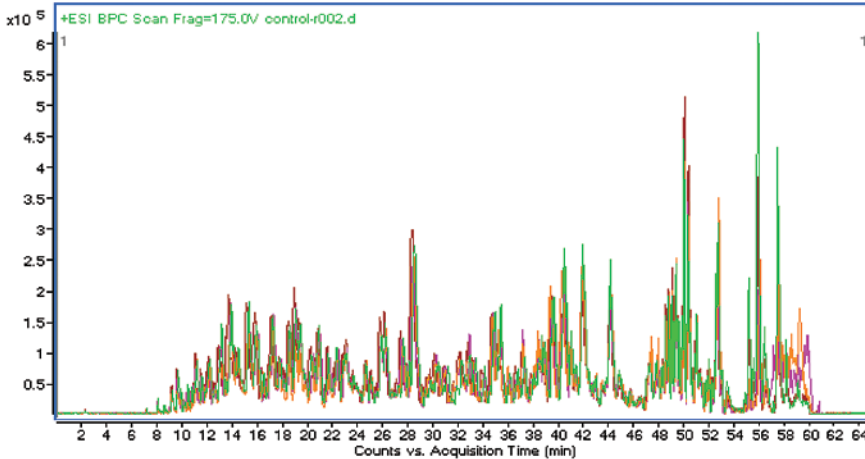


그림 2. HPLC-Chip/Q-TOF의 감소된(depleted) 인간 혈장 트립신 소화물 5회 반복 분석으로부터의 BPC 오버레이. 샘플은 단백질 식별을 위한 데이터 중속적 MS/MS 모드 내에서 분석됨

2단계: Spectrum Mill

Q-TOF 데이터는 Spectrum Mill을 이용해 검색하였습니다. 다이나믹 MRM 리스트는 입증된 펩티드 결과에 기반을 둔 MRM Selector를 이용해 생성하였습니다. MRM Selector는 사용자로 하여금 MS/MS 실험 데이터로부터 MRM 전이를 선택할 수 있도록 해주는 Spectrum Mill Workbench의 유용한 도구입니다. 사용자는 여러 파라미터(아래에 정리)를 입력하여 QQQ에서 모니터링하기 위한 이온 전이들을 필터링할 수 있습니다. MRM Selector 결과에는 단백질 서열 등록번호와 펩티드 시퀀스, 이온 전이 값, 머무름 시간(RT), 피크 너비, 충돌 에너지 및 fragmentor 값 등이 포함되어 있습니다. 저장된 리스트는 QQQ 수집 소프트웨어에 직접 불러넣기할 수 있습니다.

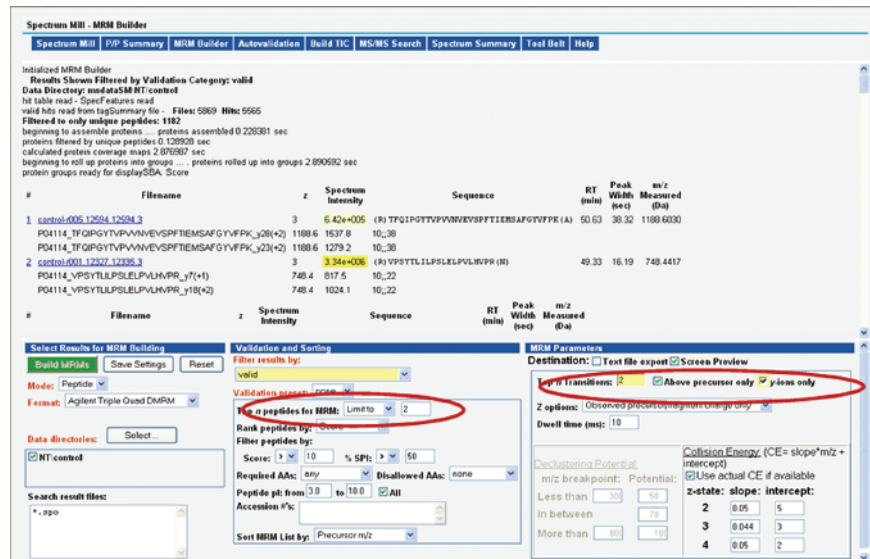


그림 3. MRM Selector는 Q-TOF 발굴 데이터로부터 다이나믹 MRM 분석법을 생성함

MRM Selector 파라미터:

- 단백질당 펩티드 수
- 펩티드당 생성 이온 수, 위의 전구 이온 및 y-이온 선택
- 펩티드 점수 및 %SPI
- 필수 AA 및 허용되지 않는 AA
- 펩티드 등전점(pI)
- 단백질 서열 등록번호

3단계: QQQ

수백에서 수천개의 이온 전이다이내믹 MRM 리스트를 QQQ 수집 분석법으로 불러왔습니다. 주기 시간은 하나의 피크 전체에 걸쳐 최소 15개의 데이터 포인트를 얻도록 설정하였습니다.

이온 전이의 수가 증가할 때의 MS 및 RT의 재현성을 평가하기 위해, MRM Selector를 사용하여 각 분석법 당 443, 2,000 및 3,293개 이온 전이에 대한 4 회의 다이내믹 MRM 실험을 설정하였습니다. 이온 전이 모니터링을 위한 머무름 시간(RT) 윈도우 또한 1~2분 사이에서 변화하여, 이에 따라 최소 측정 시간(dwell time) 및 최대 동시 MRM 수 또한 다르게 나타났습니다. 12개 과산화효소 펩티드 전이에 대한 MS감응 및 RT의 상대표준편차(RSD)를 계산하여 표 1에 정리 하였습니다. MS 감응의 %RSD가 5% 미만, RT의 RSD는 60분 분석에서 0.04분 미만이었습니니다.

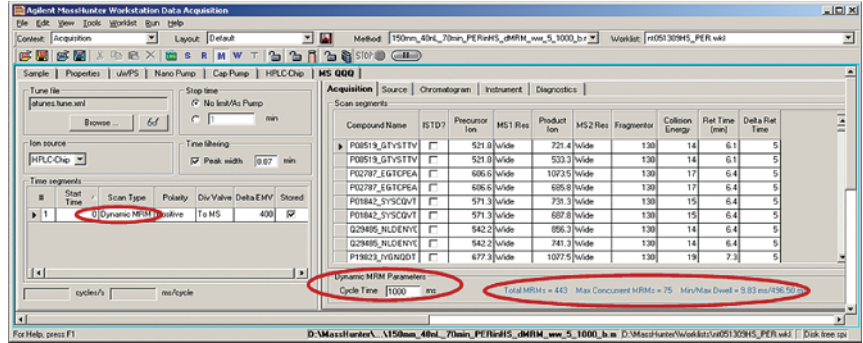


그림 4. 다이내믹 MRM 분석법의 예

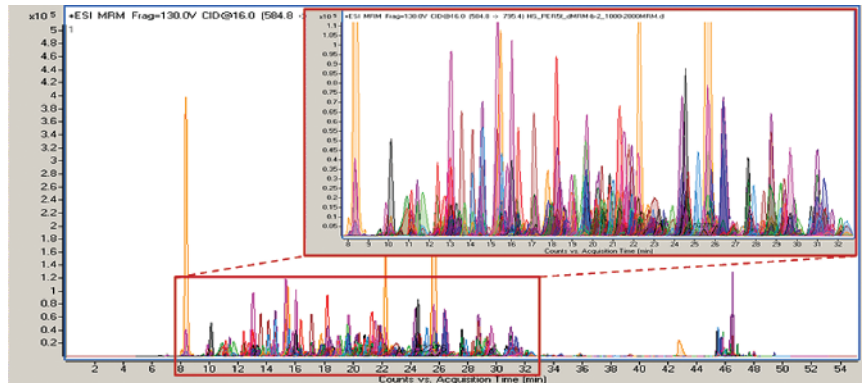


그림 5. 다이내믹 MRM을 이용하여 단일 분석으로 얻어진 2,000 개의 MRM 크로마토그램 오버레이

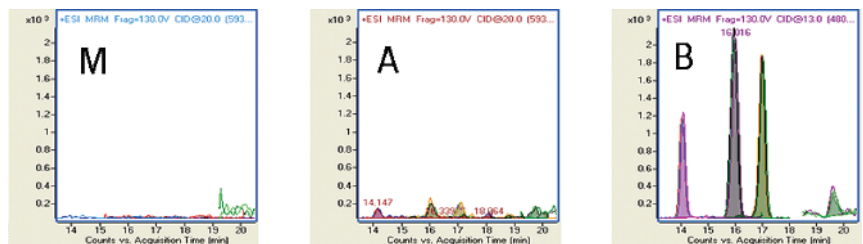


그림 6. 과산화효소 펩티드의 MRM 크로마토그램 오버레이가 머무름 시간 및 MS 감응의 탁월한 재현성을 보여줌. M: 인간 혈장 매질; A: 인간 혈장에 첨가된 500amol 과산화효소; B: 인간 혈장에 첨가된 5fmol 과산화효소

# MRM	RT 윈도우 (분)	주기 시간 (ms)	최소 측정(dwell) (ms)	최대 개수 동시 MRM	% RSD 면적	RSD RT (분)
443	2	1,000	16.5	50	2.5	0.038
443	1	1,000	29.83	30	3.2	0.016
2,000	2	1,000	2.75	160	4.5	0.030
3,293	1	1,050	2.18	185	4.7	0.025

표 1. MS 감응 및 RT 재현성

4단계: MassHunter Mass Profiler Pro

Mass Profiler Professional은 강력한 통계 및 수학적 모델을 결합하여 쉽게 샘플 그룹을 분류, 비교, 분석함으로써 복잡한 MS 데이터 세트를 분석할 수 있습니다. **그림 7**은 모든 샘플에 걸친 443개 이온 전이의 존재비를 보여줍니다(3개의 B 샘플, 3개의 A 샘플 및 2개 대조 샘플). 각 라인은 1개의 이온 전이를 나타내며, 색깔은 이온 전이의 상대적 강도를 보여줍니다(붉은색은 높은 수준, 회색은 낮은 수준). 과산화효소에서 유래한 4개의 펩티드 이온 전이를 녹색으로 하이лай트 처리하였습니다. 443개 존재비의 평균(검은색)은 혈장에서 유래한 펩티드가 샘플마다 다르지 않음을 보여주기 위해 표시하였습니다.

주성분 분석(PCA)은 비지도 방식(unsupervised, 그룹 할당을 알지 못한 상태에서 분류) 또는 지도 방식(supervised, 분석 전 반드시 그룹 분류 필요)으로 그룹 간 차이를 알아내는데 사용할 수 있습니다. **그림 8**에서 보듯이 과산화효소가 첨가된 혈장 2개의 농도가 모두 대조 샘플 혈장과 명백하게 구분되었습니다.

샘플 그룹에 의한 군집 분석은 성분 존재비 프로파일 유사성에 기반하여 관계를 조직합니다. Mass Profiler Professional의 계층적 군집분석으로 생성한 수형도(트리 다이어그램)는 한 차원의 질량 성분간 관계 및 다른 차원의 샘플 간의 관계를 보여줍니다. **그림 9**에서는 다른 과산화효소 농도의 기술적 반복 분석이 계층적 군집 분석을 이용하여 올바르게 그룹화되었습니다.

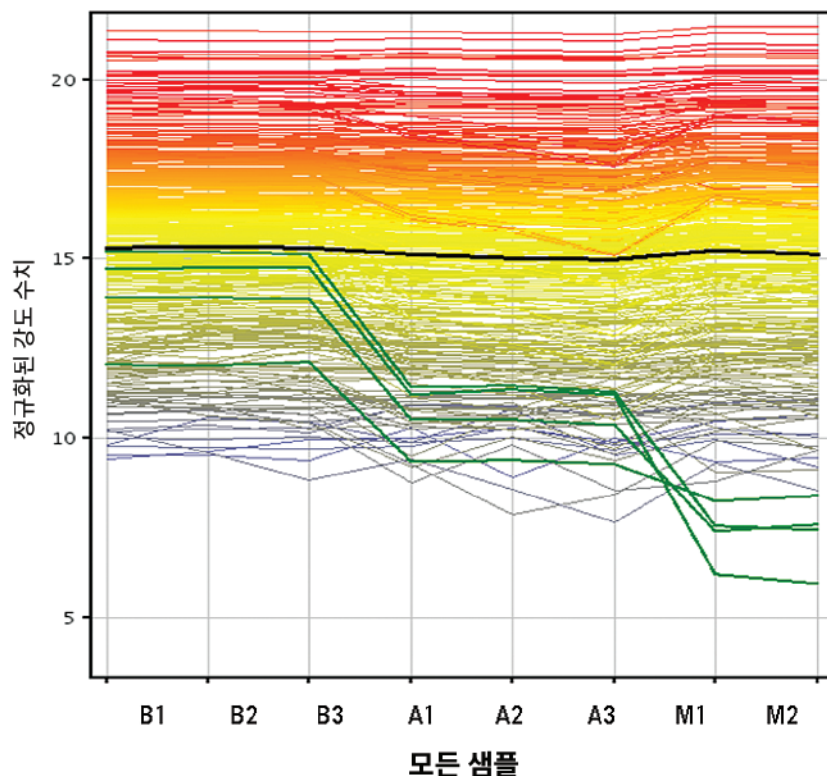


그림 7. 443 이온 전이의 모든 샘플에 걸친 존재비의 프로파일. 과산화효소의 4개 펩티드는 녹색으로 하이라이트 처리. 443개 존재비의 평균(검은색)은 혈장에서 유래한 펩티드가 샘플마다 다르지 않음을 보여주기 위해 표시하였음

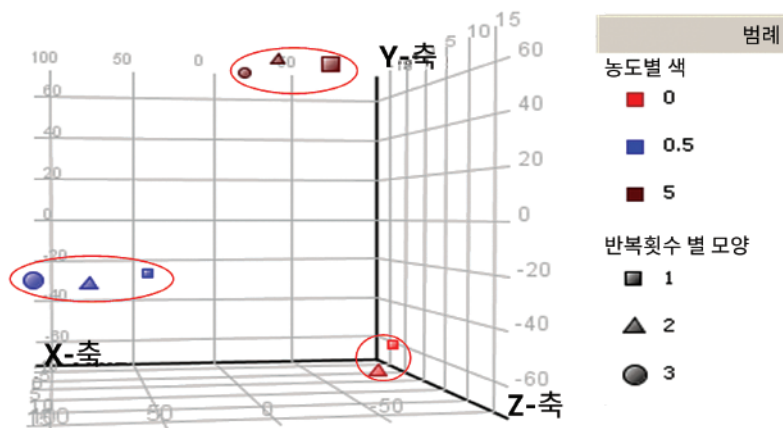


그림 8. 다른 샘플들에 대한 PCA 분석. 서로 다른 과산화효소 농도의 샘플이 올바르게 그룹화됨

결론

Q-TOF 발굴에서부터 QQQ 검증까지의 완전한 바이오마커 워크플로우를 인간 혈장의 첨가(spike-in) 연구를 이용하여 시연하였습니다. Q-TOF 발굴 데이터로부터 얻어진 단백질 데이터베이스 검색 결과를 Spectrum Mill 에서 개발된 새로운 도구, MRM Selector 를 통해 다이내믹 MRM 분석법을 생성하는 데 사용하였습니다. 이 다이내믹 MRM 분석법은 수백에서 수천 개에 이르는 펩티드를 한 번의 LC/MS 실행 안에서 모니터링하면서도 MS 존재비와 머무름 시간에서 여전히 우수한 RSD를 제공하였습니다. Mass Profiler Professional 소프트웨어는 샘플간 유의한 차이의 확인을 위한 정량 결과의 계량분석화학적 분석을 가능하게 하였습니다. 탁월한 재현성의 HPLC-Chip/MS 시스템은 생체분자에 대한 고효율 및 고감도 분석의 핵심 요소입니다.

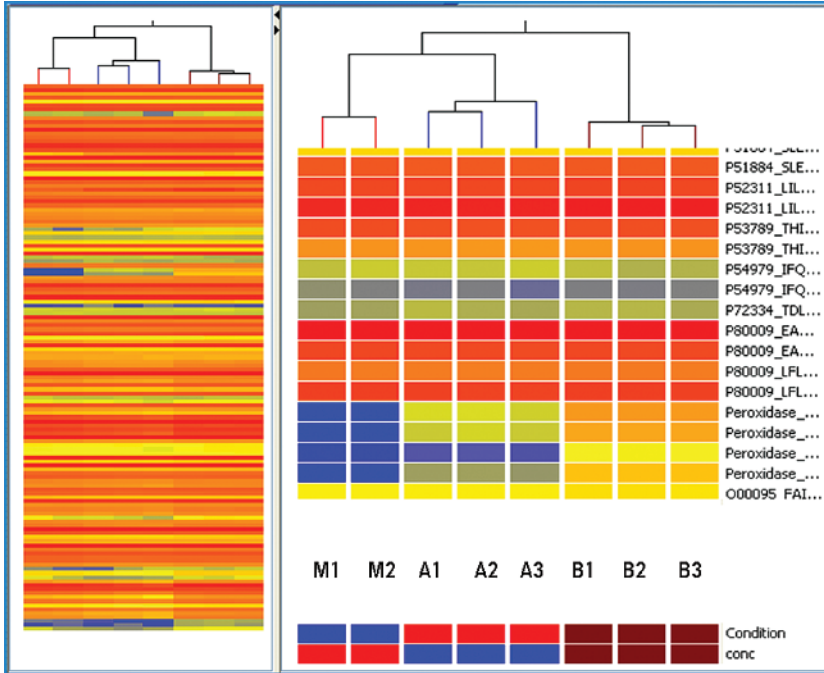


그림 9. 계층적 군집 분석이 다른 과산화효소 농도의 샘플을 성공적으로 군집화함. 그림 8에서와 같이, 수형도 가지에 색상으로 과산화효소 농도를 표시하는 조건이 생성되었으며 펩티드 특징이 각 열에 레이블됨. 열 지도는 푸른색에서 붉은색의 색깔로 표현되었으며, 푸른색은 낮은 존재비, 붉은색은 높은 존재비를 나타냄. 모든 특징의 전체 보기는 왼쪽에, 확대 보기는 오른쪽에 있음

화합물	보정 p값	p값	머무름 시간
과산화효소_DTI	0	0	15.952
과산화효소_GFP	0	0	16.999
과산화효소_YYV	0	0	14.034
과산화효소_SSD	0	0	19.595

표 2. 분산 분석. 농도에 대한 일원분산분석(one-way ANOVA)을 펩티드 존재비에 대해 수행. Benjamini-Hochberg 다중 검정 보정을 적용하였으며, 추가적으로 배율 변화(fold change) ≥ 5.0 필터를 리스트에 적용함. 4개 과산화효소 펩티드는 각각 0.0의 보정 p값을 나타냄

www.agilent.com/chem/proteomics

이 아이템은 연구용으로만 사용하실 수 있습니다. 진단 용도로는 사용하지 않습니다. 이 발행물의 정보, 설명 및 사양은 사전 공지 없이 변경될 수 있습니다.

애질런트 테크놀로지는 이 발간물에 포함된 오류나 이 발간물의 제공, 이행 또는 사용과 관련하여 발생한 부수적인 또는 결과적인 손해에 대해 책임을 지지 않습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2009

2009년 9월 10일, 한국에서 발행
5990-4276KO

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



Agilent Technologies