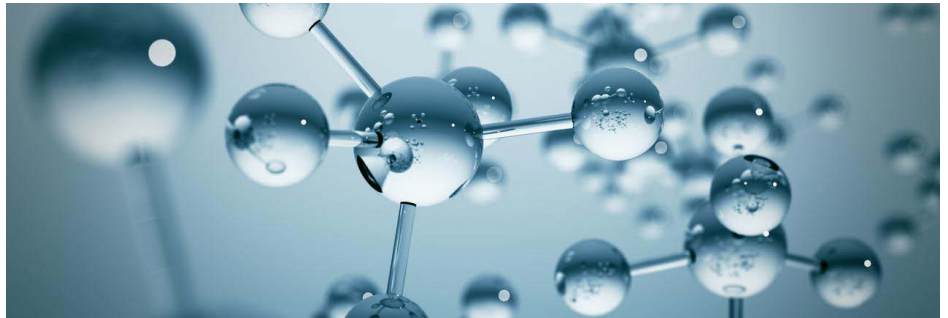


Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 시스템에서 전자 포획 해리(ECD)를 이용한 아미노산 이성질체 식별



저자

Rachel Franklin 및
Joseph Meeuwsen
Agilent Technologies, Inc.

개요

단백질의 구조와 기능을 이해하려면 아미노산 서열을 정확하게 결정하는 것이 중요합니다. 그러나 류신(Leu)과 이소류신(Ile)을 구별하기란 쉽지 않습니다. 이 두 가지는 위치 이성질체로, 기존의 충돌 기반 조각화 기술로는 구별할 수 없기 때문입니다. 전자 기반 조각화는 Leu/Ile과 아스파르트산(Asp) 및 이소아스파르트산(isoAsp)과 같은 다른 isobaric을 구별할 수 있는 side chain 조각을 생성하여 최적의 솔루션을 제공합니다. 이 응용 자료에서는 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF에 장착된 ExD 셀을 사용한 전자 포획 해리(ECD)로 펩타이드 및 원형(intact) 단백질에서 isobaric 잔기를 식별하는 방법을 보여줍니다. Agilent ExDViewer 소프트웨어를 사용하면 Q-TOF 데이터 세트의 side chain 조각을 직관적으로 분석하여 isobaric 아미노산을 더 확실하게 구별할 수 있습니다.

소개

인간 프로테오믹의 약 6분의 1은 isobaric 아미노산인 Leu 또는 Ile로 구성되어 있습니다.¹ 이들 아미노산과 관련된 서열 변이는 단백질의 구조와 기능에 상당한 영향을 미칠 수 있습니다. 예를 들어, 항체의 상보적 결정 영역 내에서 Ile과 Leu 사이의 변이는 표적 결합 강도에 영향을 미칩니다.² 또한, Asp가 isoAsp로 자발적으로 이성질화되는 현상은 단백질 노화 및 다양한 질병과 관련이 있습니다.³⁻⁵ 따라서 단백질 기능과 질병 메커니즘을 이해하기 위해 isobaric 아미노산을 정확하게 식별하여 단백질 서열 분석의 모호성을 줄이는 것이 중요합니다.

애질런트의 혁신적인 전자 해리 솔루션인 ExD 셀은 충돌 유도 해리(CID)만을 사용하는 경우에 비해 단백질 서열에 대한 더욱 포괄적이고 보완적인 특성 분석을 가능하게 합니다. 라디칼 z-이온은 아미노산 side chain의 2차 조각화를 겪으면서 w-이온을 생성하는데, 이를 이용해 Leu와 Ile을 구별할 수 있습니다.^{1,6} Asp에서 isoAsp로의 이성질화는 카르복실기 그룹의 이동을 일으키며, 이는 예상되는 c 및 z-이온에서 57Da의 변화로 감지될 수 있습니다.⁴⁻⁶

이 응용 자료에서는 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF에 장착된 ExD 셀을 사용한 전자 포획 해리(ECD)로 펩타이드 및 단백질을 빠르고 효율적으로 조각화하는 방법을 설명합니다. 합성 펩타이드와 원형(intact) 유비퀴틴을 사용하여 MS/MS 스펙트럼에서 isobaric 아미노산을 식별했습니다. Isobaric 잔기를 식별할 수 있는 무료 도구는 거의 없지만, ExDViewer를 사용하면 펩타이드와 단백질 스펙트럼에서 side chain 조각을 간단하고 쉽게 해석할 수 있습니다.⁷ 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF의 감도와 조각화 기능, ExDViewer를 사용한 분석을 결합함으로써, isobaric 아미노산을 식별하는 것을 포함한 단백질 서열의 포괄적인 특성화를 위한 효과적인 솔루션을 제공합니다.

실험

화학 및 표준물질

- Melittin/tune mix tuning standard formic acid, 99.0+%, Optima LC/MS grade(제품 번호 A-117-50), Fisher Chemical
- 아세트ونی트릴, LCMS grade, 99.9%+, OmniSolv(제품 번호 AX0156-6), Supelco
- REALLYisoD 합성 펩타이드(제품 번호 4144889), Bachem
- Bovine ubiquitin (제품 번호 U6253), Sigma
- Agilent Tuning Mix (G1969-85000)

시료 전처리

동결 건조된 시료를 분석 전 -20 °C에서 보관했습니다. 분석 전, 15% 아세트ونی트릴과 0.01% 포름산으로 시료를 재용해했습니다. 시료의 최종 농도는 REALLYisoD 펩타이드의 경우 1μM이고 유비퀴틴의 경우 10μM이었습니다.

기기

- [Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF](#)
- [Agilent ExD 셀\(G1997AA\)](#)

소프트웨어

- Agilent ExDControl 소프트웨어 버전, v 3.6
- LC/TOF 및 LC/Q-TOF용 Agilent MassHunter Acquisition 소프트웨어, 버전 11.0
- [Agilent ExDViewer 소프트웨어, v 4.5.14](#)

질량 분석법

모든 시료는 500 μ L 시린지를 사용하여 20 μ L/분의 속도로 직접 주입했습니다. New Era 시린지 펌프(모델 번호 300)를 주입에 사용했습니다. 핑거타이트 폐물로 Agilent Dual Jet Stream(AJS) 이온화원 네블라이저 주입구에 연결한 PEEK 튜빙을 사용하여 시료를 주입했습니다. ExD 셀이 장착된 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF를 사용하여 질량 분석을 수행했습니다. MassHunter Acquisition v11.0에서 표적 수집 분석법을 설정했습니다. ExDViewer v4.5.14를 사용하여 조각화 결과를 분석했습니다. 6545XT LC/Q-TOF의 세부 기기 파라미터는 표 1에 있습니다.

표 1. Q-TOF LC/MS 데이터 수집 파라미터.

파라미터	값
Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 시스템	
이온화원	Agilent Dual Jet Stream 전자분무 이온화원
극성	양이온
가스 온도	325°C
건조 가스 유속	5L/분
네블라이저	20psi
Sheath 가스 온도	275°C
Sheath 가스 유속	11L/분
캐필러리 전압	4,000V(유비퀴틴), 3,200V(펩타이드)
노즐 전압	2,000V
Fragmentor	175V
Skimmer	45V
수집 속도	1스펙트럼/초
Isolation Window	Wide (9m/z)
MS1 스펙트럼 범위	100~3,200m/z
MS2 스펙트럼 범위	120~3,200m/z(유비퀴틴) 120~2,400m/z(펩타이드)

ExD 셀 작동

ExD 셀은 6545XT Q-TOF LC/MS 시스템용 추가 장치로, 전자 포획 해리(ECD) 기능을 제공합니다. ExD 셀은 ExDControl 소프트웨어를 사용하여 제어됩니다. 이 소프트웨어는 MassHunter Acquisition과 함께 작동하여 ExD 셀 전압과 필라멘트 가열 전류를 제어하는 독립형 소프트웨어입니다. ExDControl은 transmission 또는 전자 포획 해리(ECD) 기능을 최적화하기 위해 ExD 셀 전압을 자동으로 조정하는 autotune 알고리즘을 갖추고 있습니다.

다음의 단계에 따라 ExD 셀 isobar 분석을 설정했습니다. 먼저, 적절한 필라멘트 가열 전류를 설정하고 20분 동안 예열시켰습니다. 다음으로, melittin/tune mix standard를 B병에서 주입했습니다. tune mix 이온에서 ExDControl autotune을 수행하여 MS1 transmission을 최대화하는 방향으로 ExD 셀 렌즈 전압을 조정했습니다.

transmission을 최적화한 후, melittin 3+ 전구체(949 m/z)가 분리되었습니다. melittin 조각 질량에 autotune을 수행하여 ExD 셀 전압을 조각화에 최적화했습니다. melittin의 ECD에 최적화된 셀 전압 프로파일은 대부분의 펩타이드에 효과적으로 작동하지만, 단백질에 최적화된 ECD를 위해서는 추가적인tuning standards가 필요할 수 있습니다. 유비퀴틴의 경우, 유비퀴틴 ECD 조각의 내장된 질량 목록에 대해 autotune 을 수행하여 유비퀴틴 조각의 강도를 최대화했습니다(표 2). ExDControl에서 MS1 transmission과 MS2 ECD 프로파일을 설정한 후, MassHunter를 수집 컨텍스트로 전환하고 표적 수집 분석법을 생성했습니다.

표 2. Transmission또는 ECD를 위한 ExD 셀 렌즈 전압을 최적화하는 데 사용되는 tune standard의 요약 정보입니다. ExDControl autotune 알고리즘은 tune mix, melittin, 유비퀴틴에 대한 질량을 포함하여 여러 개의 내장된 질량 목록과 함께 설치됩니다. 그러나 맞춤형 질량 목록을 만들어 사용자 맞춤 질량 목록의 강도를 최적화할 수도 있습니다.

ExD 셀Tuning Standards		
	MS1 Transmission	MS2 ECD 조각화
REALLYisoD(1.9kDa)	Tune mix	Melittin
Ubiquitin(8kDa)	Tune mix	Ubiquitin

ExDViewer를 사용한 표적 분석

ExDViewer는 Q-TOF MS/MS 데이터에서 모든 폴리펩타이드 조각 유형을 확실하게 분석할 수 있게 해주는 무료 소프트웨어 도구입니다. ExDViewer는 펩타이드나 큰 원형(intact) 단백질의 복잡한 조각 패턴을 빠르고 직관적으로 분석할 수 있는 방법을 제공합니다. 이 소프트웨어의 주요 기능은 side chain 조각 패턴과 isoAsp 이온을 표시하는 것입니다.

표적 디콘볼루션 워크플로는 알려진 서열과 대조해 조각 패턴을 일치시키는 데 사용됩니다. 표적 시퀀스는 target editor를 사용하여 정의되며, 시퀀스와 최소, 최대 전하 상태가 지정됩니다. 표적을 정의한 후 .d 파일을 ExDViewer에 직접 로드하여 표적 디콘볼루션을 수행할 수 있습니다. 그림 1은 표적 디콘볼루션 워크플로의 입력 페이지를 보여줍니다. 이 문서에 나와 있는 프로파일 데이터는 중첩 이온에 대한 반복적 다중 패스(multi-pass) 매칭과 함께 ExD 조각 분석을 위한 제한적인 matching preset을 사용하여 처리했습니다.

Input | Spectrum Selection | Peak Picking | Deconvolution | Matching

Buttons: < Previous, Next >, Run Now, Cancel

Add Spectra: ☒ From file ☐ From instrument ☐ From manual entry

Input File: .d .raw .mzML .mgf .txt .raw (dir)

Agilent, Thermo, and Waters vendor formats are supported along with open-source and text-based formats.

Input data type: ☒ profile ☐ centroid ☐ read from file

Add Target: ☒ From Target Editor ☐ From MZID ☐ No Target

☐ Variable Modification Search
☐ Batch Analysis

BAD peptide: BclBADp_complex; bcl-XL Search targets...

<input type="checkbox"/> Target name	Sequence	Monoisotopic Weight
<input type="checkbox"/> N protein SR domain	.SGSRGGSQASSRSSRSRNSSTPGSSRGTS ParmagNGGDAALALLLDRLNQLESKMSGKQQQGGQTGTENLVFQ.	8271.03809
<input type="checkbox"/> bcl-XL	.SASQSNRELVDFLSYKLSQKGYWSQFSDVEENRTEAPEGTESEMETPSAINGNPSWHLADSPAVNGATAHSSSLDAREVIPMAAVKQALREAGDEFELRYRRFSDLSQ	23393.2793
<input type="checkbox"/> REALLY ISO D	.REALLYDELIGHTFLK.	1917.03601
<input type="checkbox"/> Protein G	.MDPYLPKTDYKLIUNGKTLKGETTTEAVDAATAEKVFKQYANDNGVDGEWYDDATKFTFTVTEKPEVIDASELTPAVTTYKLVINGKTLKGETTTKAVDAETA EKAFKQYANI	21429.7598
<input type="checkbox"/> IGF	.MFPAMPLSSLFVNGPRTL C(Dehydro)GAELVDALQFVC(Dehydro)GDRGFYNKPTGYGSSRRAPQTGIVDEC(Dehydro)C(Dehydro)FRSC(Dehydro)DLRRLEMYC(I	9105.34863
<input type="checkbox"/> Thioredoxin	.TTFNIODGPDFODRVVNSETPVVDFHAQWC(Dehydro)GPC(Dehydro)KILGPRLEKVMVAKOHGKVVMAKVDIDDHTDLAIEYEVSAVPTVLAMKNGDVVDKFGVGIKD	11858.0439

MS1 m/z Tolerance (ppm) 20.0 MS2 m/z Tolerance (ppm) 20.0

Add Tasks and Presets:

☒ Average Spectrum ☐ MS1 ☒ MS2

RT tolerance (seconds) 5.0

☒ Peak picking ☐ Use centroids and noise threshold from input file

☐ Run baseline filter

☒ Correct precursor m/z and charge if un-reacted precursor found during deconvolution

☒ Re-calibrate m/z based on high-confidence MS/MS fragmentation ions

☒ Use presets **[Deconvolution and Matching Settings are now locked]**

Ion Identification Quality ☐ Restrictive ☒ Default ☐ Permissive

Fragmentation ☐ CID ☒ ExD

Iterative Matching ☐ Single-pass ☒ Multi-pass (for overlapping ions)

그림 1. ExDViewer의 표적 디콘볼루션 입력 페이지. Preset match setting은 펩타이드 및 단백질 분석의 넓은 범위에서 효과적입니다.

결과 및 토의

Leu/Ile 및 Asp/isoAsp 식별

라디칼에 의한 side chain 조각화는 w-이온을 생성하고, 이를 통해 Leu/Ile의 구분이 가능해집니다. Leu의 w-이온은 이소프로필(z-43Da) 그룹의 라디칼 손실로 형성되는 반면, Ile의 해당 w-이온은 에틸 라디칼(z-29Da)의 손실을 수반합니다.

이와 대조적으로 isoAsp 형성은 펩타이드 백본과 관련된 구조적 변화로 인해 Asp의 해당 c 또는 z 이온에서 57Da의 이동(c + 57Da, z - 57Da)이 발생함에 따라 감지됩니다.

여기서는 REALLYisoDELIGHTFLK 시퀀스를 갖는 합성 펩타이드를 사용하여 전자 기반 조각화로 Leu/Ile 및 Asp/isoAsp를 식별하는 방법을 보여주었습니다(그림 2).

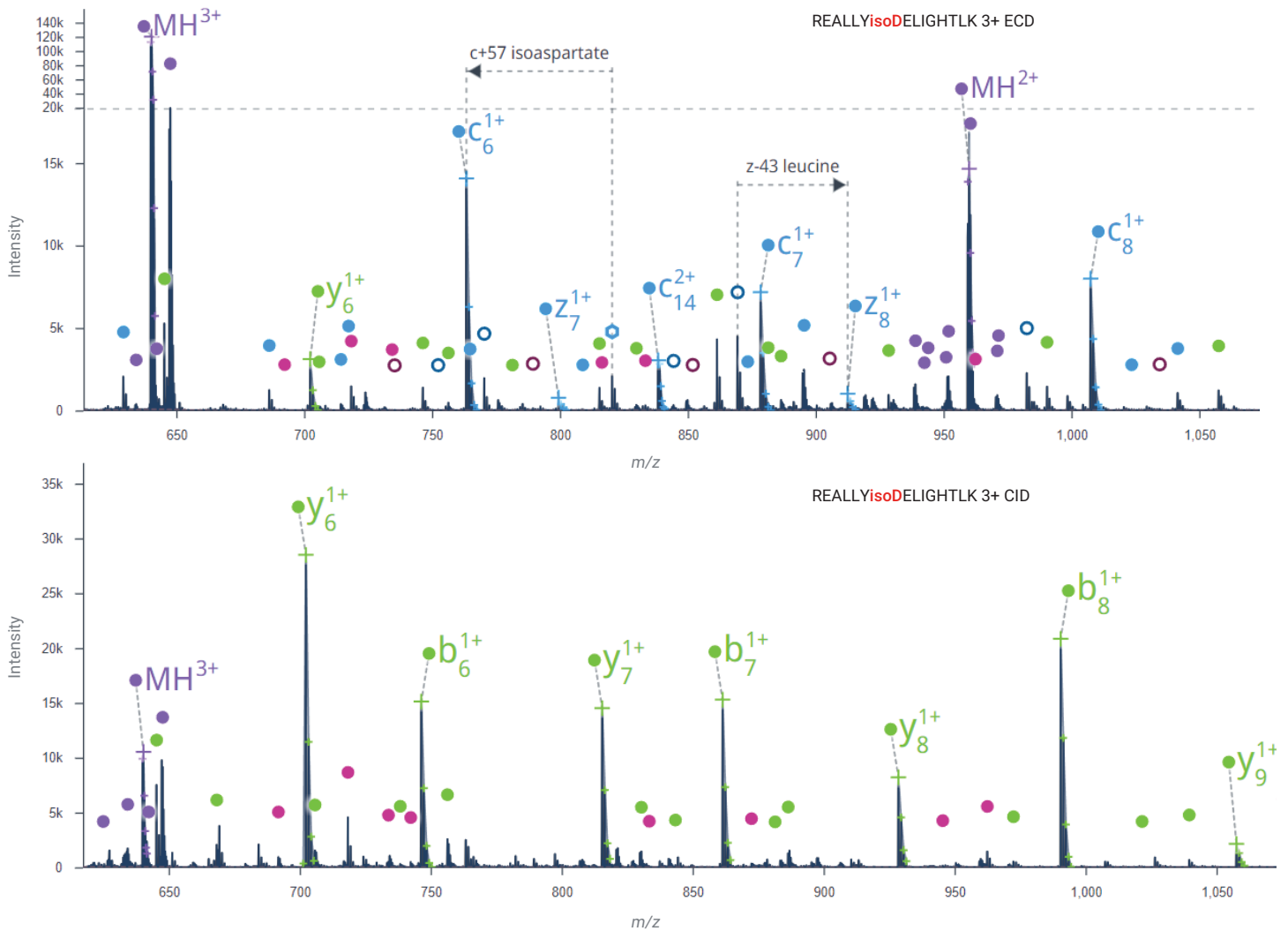


그림 2. 상단 질량 스펙트럼은 합성 펩타이드 REALLYisoDELIGHTFLK(1 μ M)의 ECD 조각 스펙트럼입니다. Asp는 isoAsp로 엔지니어링되었으며 빨간색으로 하이라이트 되어 있습니다. Isobar 조각의 증거는 스펙트럼에 텍스트 주석으로 표시됩니다. 하단 그림은 동일한 펩타이드의 CID 질량 스펙트럼을 보여줍니다. ECD 조각은 파란색으로, CID 조각은 녹색, 전구체 이온은 보라색, a-이온은 분홍색으로 표시됩니다.

REALLYisoDELIGHTFLK에는 5개의 isobaric Leu/Ile 잔기와 하나의 엔지니어링된 isoAsp가 있는데, 이에 따라 이론적으로 동일한 CID 스펙트럼을 갖는 64개 이상의 isobaric 서열이 만들어질 수 있습니다. 전자 기반 조각화를 통해 검출되는 side chain 조각화는 isobar 특이성을 통해 정확한 펩타이드 서열을 식별하는 독특한 방법을 제공합니다. 그림 2는 ECD 또는 CID 조각화를 사용한 3+ REALLYisoDELIGHTFLK 전구체의 MS/MS 스펙트럼을 비교한 내용입니다. ExDViewer를 사용하면 Leu, Ile 및 isoAsp의 진단 이온이 스펙트럼에 직관적으로 표시 됩니다. 전하가 감소된 전구체도 표시됩니다.

ECD 전 충돌 활성화가 Leu/Ile 및 isoAsp에 대한 진단 이온의 검출에 미치는 영향을 조사한 결과를 그림 3에 나타내었습니다. 전자 포획 전에 3+ REALLYisoDELIGHTFLK 전구체에 다양한 충돌 에너지가 적용되었습니다. 전반적으로, 이온 강도는 충돌 에너지가 증가함에 따라 낮아졌습니다. 4+ 전구체는 충돌 활성화에 더 민감했고, 이에 비해 3+ 전구체의 강도는 더 점진적으로 감소했습니다. 이러한 결과는 ECD를 단독으로 사용하는 것이 이 예시 펩타이드의 진단 이온을 검출하는 데 가장 효과적임을 시사했습니다.

Top-down MS/MS isobar 측정

전통적인 펩타이드 분석과 달리, top-down 질량 분석법에는 사전 효소 분해 과정 없이 전체 단백질의 시퀀싱이 수반됩니다. 효소 분해를 피함으로써 시료 전처리 단계가 줄어들어 시간을 절약하고 인위적 산물의 도입 위험을 최소화할 수 있습니다. 중요한 점은, top-down 분석은 분해된 펩타이드 혼합물 분석에서는 정의할 수 없는 고유한 프로테오폼을 특성화할 수 있습니다. 여기서는 top-down 분석을 통해 원형(intact) 유비퀴틴의 isobar를 특성화했습니다. 10 μ M 유비퀴틴을 직접 주입하고 표적 수집 분석법을 사용하여 분석했습니다. 분리를 위해 11+ 전구체를 선택하고 ExD 셀에서 ECD를 적용했습니다. 데이터는 초당 1스펙트럼으로 총 1분 동안 수집했습니다. 11+ 전구체의 높은 효율의 조각화로 인해 99%의 시퀀스 커버리지와 16개 중 10개의 isobaric Leu 및 Ile 잔기의 차별화가 가능했습니다. 또한, isoAsp c 이온과 z 이온이 식별되었는데, 이는 아미노산 위치 39와 52에 isoAsp가 존재함을 알려줍니다. 그림 4는 ExDViewer에서 생성된 시퀀스 커버리지 맵을 보여줍니다. 이를 통해 사용자는 표적 시퀀스를 지원하는 조각 증거를 상호작용적으로 탐색할 수 있습니다. 그림 5는 Leu와 Asp 식별을 위한 풍부한 ECD 이온과 w-이온을 특징으로 하는 유비퀴틴 조각 스펙트럼의 350 m/z 폭 슬라이스를 보여줍니다.

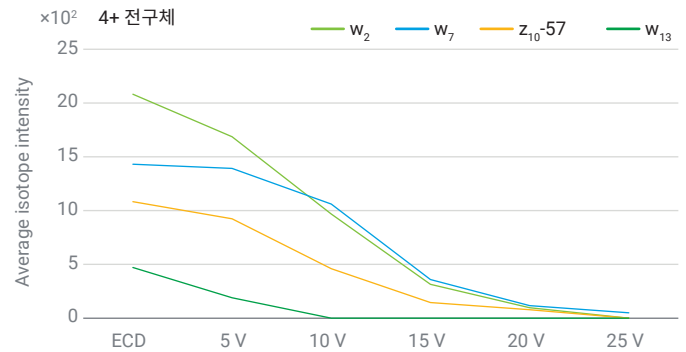
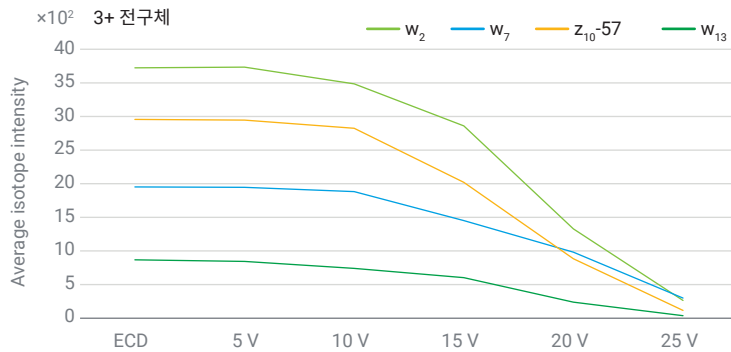


그림 3. REALLYisoDELIGHTFLK isobar 진단 이온 강도. w₂, w₇, z₁₀-57 및 w₁₃에 대한 평균 이온 강도를 충돌 에너지의 함수로 나타내었습니다.

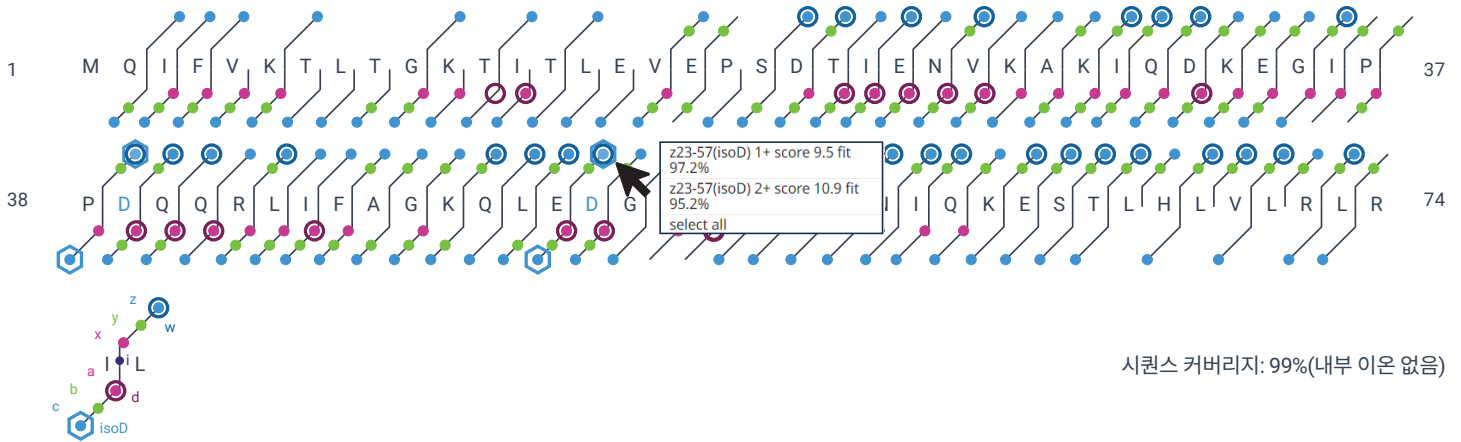


그림 4. ExDViewer에서 생성된 시퀀스 커버리지 맵. 각 색깔 점은 서로 다른 유형의 이온을 나타냅니다. CID 및 ECD 백본 조각 이온은 side chain 조각화 및 c/z isoAsp 이온과 함께 주석이 추가됩니다. 감지된 각 조각에 대한 이온의 유형, 전하 상태 및 스코어가 Informative tool tip(박스)에 표시됩니다. 여기 tool tip에서 z₂₃-57 isoAsp 이온에 대해 두 가지 전하 상태가 감지되었음을 나타냅니다.

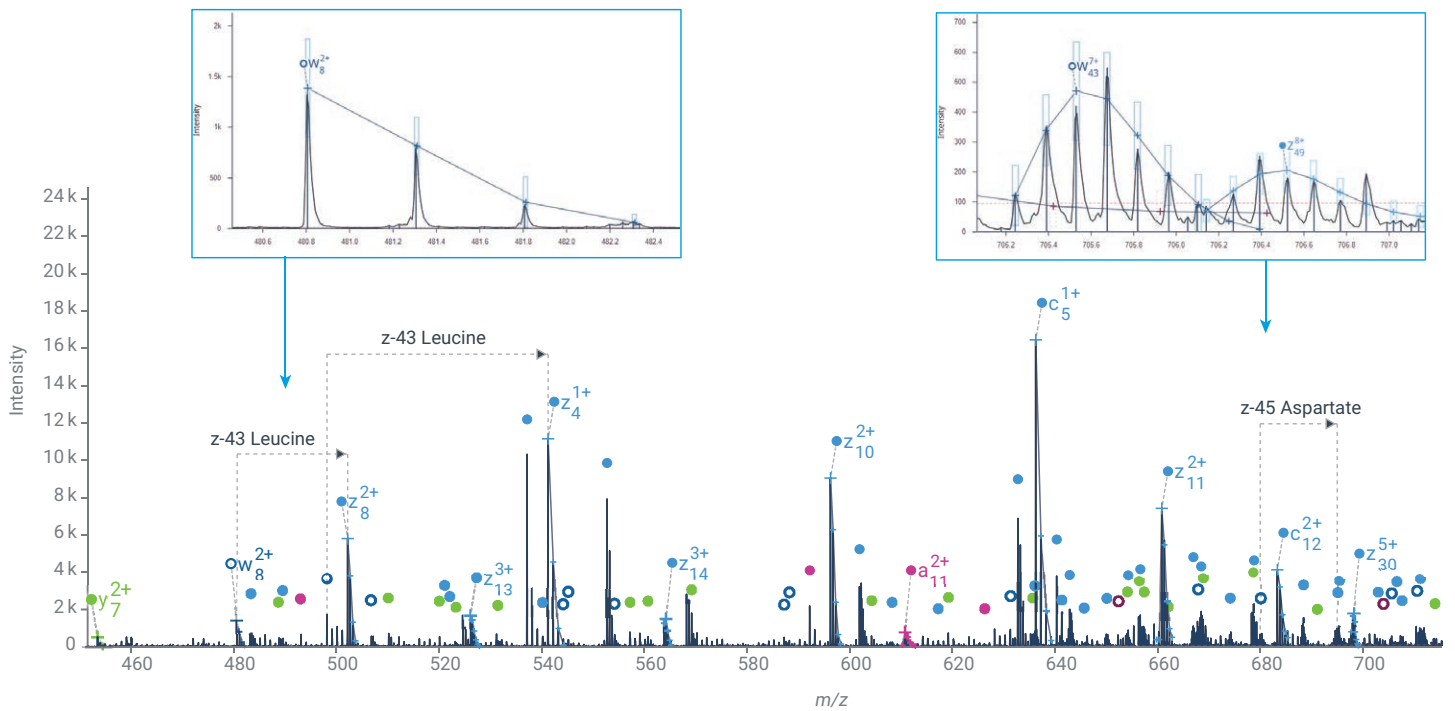


그림 5. 11+ 유비퀴틴의 ExD 조각 스펙트럼. 삽입된 그림은 Leu와 Asp를 식별하는 side chain 조각의 증거를 나타냅니다. Isobar 증거는 자동으로 점선과 라벨로 주석이 달립니다.

결론

이 응용 자료에서는 Agilent ExD 셀과 분석용 Agilent ExDViewer 소프트웨어 도구로 구성된 Agilent 6545XT AdvanceBio Q-TOF LC/MS 시스템을 사용하여 isobaric 아미노산을 분석하는 방법을 설명했습니다. 전자 포획 해리(ECD)는 CID 조각화에 보완적인 정보를 제공하는 강력한 조각화 기술입니다. 이러한 분석법은 다양한 분자의 펩타이드 백본과 side chain 조각을 조사하는 데 적용하여 단백질 서열 분석의 모호성을 줄일 수 있습니다. ECD 조각을 검출하는 Q-TOF의 감도와 조각 분석용 ExDViewer를 통해 표적 isobar 아미노산 식별을 위한 효과적인 솔루션을 제공합니다.

참고 문헌

1. Kjeldsen, F.; Haselmann, K. F.; Sørensen, E. S.; Zubarev, R. A. Distinguishing of Ile/Leu Amino Acid Residues in the PP3 Protein by (Hot) Electron Capture Dissociation in Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2003**, 75(6), 1267–1274.
2. Wakankar, A. A.; Borchardt, R. T.; Eigenbrot, C.; Shia, S.; Wang, Y. J.; Shire, S. J.; Liu, J. L. Aspartate Isomerization in the Complementarity-Determining Regions of Two Closely Related Monoclonal Antibodies. *Biochemistry* **2007**, 46(6), 1534–44.
3. Wang, J.; Mukherjee, S.; Zubarev, R. A. Isoaspartate and Neurodegeneration. *Aging* **2022**, 14(22), 8882–8883.
4. Geiger, T.; Clarke, S. Deamidation, Isomerization, and Racemization at Asparaginyl and Aspartyl Residues in Peptides. *J. Biol. Chem.* **1987**, 262(2), 785–794.
5. Yang, H.; Zubarev, R. A. Mass Spectrometric Analysis of Asparagine Deamidation and Aspartate Isomerization in Polypeptides. *Electrophoresis* **2010**, 31, 1764–1772.
6. Han, H.; Xia, Y.; McLuckey, S. A. Ion Trap Collisional Activation of c and z' Ions Formed via Gas-Phase Ion/Ion Electron-Transfer Dissociation. *J. Prot. Res.* **2007**, 6(8), 3062–3069.
7. Beckman, J. S.; Voinov, V. G.; Hare, M.; Sturgeon, D.; Vasil'ev, Y.; Oppenheimer, D.; Shaw, J. B.; Wu, S.; Glaskin, R.; Klein, C.; et al. Improved Protein and PTM Characterization with a Practical Electron-Based Fragmentation on Q-TOF Instruments. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2021**, 32(8), 2081–2091.

www.agilent.com

DE52891173

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2024
2024년 8월 7일, 한국에서 발행
5994-7506KO

한국애질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com