

# Phosphopeptide 식별 및 Phosphosite 로컬라이제이션을 위한 새로운 선택성이 높은 자동화 Phosphopeptide 농축

## 저자

Valery G. Voinov &  
Joseph S. Beckman  
e-MSion Inc.  
Corvallis, OR, USA

Shuai Wu, Kenneth Newton,  
Linfeng Wu, Jordy J. Hsiao  
Agilent Technologies Inc.,  
Santa Clara, CA, USA

## 서론

Phosphopeptide 농축은 LC/MS 분석에서 가장 어려운 시료 전처리 단계 중 하나입니다. 수동 시료 전처리로 인해 야기되는 재현성 및 선택성의 변화 때문입니다. Phosphopeptide 시료의 LC/MS 분석은 다음과 같은 어려움이 따릅니다.

- HPLC 시스템 표면 또는 용매 내의 금속 이온이 Phosphopeptide-금속 이온 복합체를 형성하여 Phosphopeptide 피크의 심각한 억제를 야기합니다. 이 효과는 Phosphopeptide 식별, 특히 다중인산화 펩타이드의 식별 능력을 현저하게 떨어뜨립니다.
- Phosphopeptide의 이온화 효율성 역시 자주 논의되었던 문제입니다. 비인산화 펩타이드의 복잡한 혼합물에서 Phosphopeptide는 훨씬 낮은 이온화 효율성을 보입니다.
- Phosphoryl 기는 불안정한 PTM(post-translational modification) 형태로, 일반적으로 CID를 이용한 조각화에서 인산 형태로 제거됩니다. 이 인산의 neutral loss는 보통 주요한 조각화이고, 이는 펩타이드 백본 조각의 부위 특이적 정보 누락으로 이어져 Phosphopeptide 내 phosphosite의 로컬라이제이션을 어렵게 합니다.

인간 단백질체 프로젝트(HPP)의 Phosphopeptide 과제에서, 모든 참여 실험실들은 2개의 시료 바이알을 받았습니다. "Phosphopeptide"로 표지된 바이알에는 인간의 합성된 Phosphopeptide 시퀀스가 다양한 농도로 비인산화 대응 물질과 함께 혼합된 세트를 포함하고 있었습니다. 일부 펩타이드에는 2개 이상의 인산화 형태가 있습니다. "Phosphopeptide-Yeast"로 표지된 두 번째 바이알에는 트립신으로 분해된 효모 용해물 6μg에 동일한 펩타이드가 포함되어 있었습니다. 각 바이알은 건조 상태로 제공되었습니다. 이 연구는 HUPO 멤버들이 다른 분석법을 사용해 펩타이드 시퀀스 분석을 수행하도록 요구합니다. 각 실험실들은 시료 내 펩타이드를 식별하고, 각 펩타이드의 phosphosite 수와 위치를 파악해야 합니다. 또한 각 실험실이 모든 변형 부위에서 인산화의 상대 존재비를 비인산화 대응 물질과 비교해서 확정해야 합니다. 3번째 요구는 효모 매트릭스가 포함된 시료로부터의 Phosphopeptide 농축 및 MS를 이용한 재분석입니다(그림 1). 이 연구를 위해 HUPO는 89종 인간 펩타이드 시퀀스 목록을 펩타이드 식별, phosphosite 로컬라이제이션, 상대 정량 및 농축 등을 기록하기 위한 워크시트와 함께 제공하였습니다.

Agilent AssayMAP Bravo 플랫폼은 고용량 Fe(III)-NTA 카트리지를 사용하는, 완전히 자동화된 선택성이 높은 Phosphopeptide 농축 워크플로를 제공하였습니다. 사용자는 이 자동화 플랫폼에서 마이크로크로마토그래피 카트리지를 사용해 시료가 소량으로 제공되는 경우에도 일상적 워크플로로 Phosphopeptide를 쉽게 농축할 수 있습니다. 시료 분석은 Agilent 1290 Infinity II LC 및 electromagnetostatic(EMS) ECD 셀을 갖춘 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS를 이용해 수행하였습니다. Phosphopeptide의 피크 모양과 회수율을

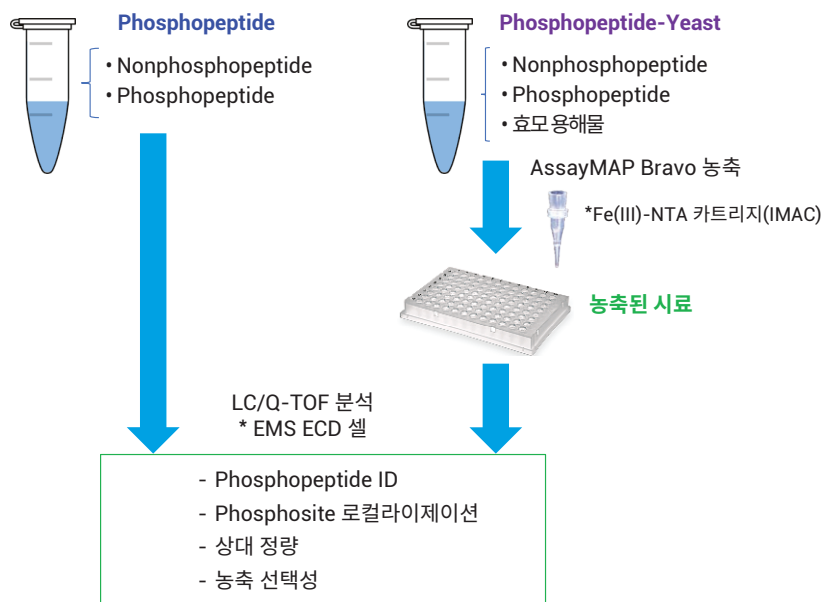


그림 1. HUPO phosphopeptide challenge 실험 설계

향상시키기 위해 Agilent InfinityLab 비활성화 첨가제가 HPLC 이동상에 첨가되었습니다. 펩타이드 식별은 데이터 의존적 수집(DDA)을 이용해 수행되었으며, 데이터는 Agilent Spectrum Mill B.06 소프트웨어로 분석되었습니다. DDA를 이용한 펩타이드 식별 후, 표적 MS/MS 및 ECD를 이용해 phosphosite 로컬라이제이션 분석을 하였으며, 데이터는 HUPO 시퀀스 목록에 기반하여 Byonic 소프트웨어(Protein Metrics, Cupertino, CA, USA)로 처리되었습니다. Phosphopeptide의 상대적 정량은 단일 MS1 스캔, DDA와 Skyline 소프트웨어(MacCoss Group, University of Washington, Seattle, WA, USA)로 생성한 스펙트럼 라이브러리를 사용해 수행되었습니다. 농축 선택성은 전반적인 특수 Phosphopeptide 수와 HUPO 시퀀스 목록에서의 Phosphopeptide 수 모두에 기반하여 평가되었습니다.

## 실험

### 재료

HUPO에서 받은 2개의 시료 바이알:

- **"Phosphopeptide"**에는 인간의 합성 인산화(Ser, Thr, Tyr) 펩타이드 세트가 비인산화 대응 물질과 함께 혼합하여 다양한 농도로 포함되어 있습니다. 일부 펩타이드에는 2개 이상의 인산화 형태가 있습니다. HUPO에서는 89개의 펩타이드 시퀀스를 제공했습니다.
- **"Phosphopeptide-Yeast"**에는 6μg의 트립신 분해 효모 용해물로 구성된 백그라운드 매트릭스 내에 동일한 펩타이드가 포함되어 있습니다.

AssayMAP Fe(III)-NTA 카트리는 Agilent Technologies Inc.(Santa Clara, CA, USA) 제품입니다. 기타 모든 화학물질은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)사 제품을 사용하였습니다.

## AssayMAP Bravo를 사용한 Phosphopeptide 농축 및 cleanup

"Phosphopeptide-Yeast" 시료 바이알은 100μL의 80% ACN, 0.1% TFA로 재현탁시켰습니다. 시료는 2분간 초음파 처리 후 포지션 A1의 96-well PCR 플레이트로 옮겨졌습니다.

Agilent AssayMAP Phosphopeptide Enrichment v2.0 App으로 Fe(III)-NTA 카트리지를 사용해 자동화된 Phosphopeptide 농축을 수행하였습니다. 그림 2는 사용자 인터페이스와 응용 설정을 보여줍니다. 한 Fe(III)-NTA 카트리지를 A1의 데크 위치 2로 사전에 옮겼습니다. Labware는 labware 표에 따라 선정되었고, 데크 위치 4 및 9에서 사용된 LoBind 96 Eppendorf 플레이트만이 예외였습니다. 카트리지는 300μL/분의 빠른 유속에서 100μL, 50% ACN, 0.1% TFA로 프라이밍 되었습니다. 그 후 카트리는 바인딩 완충액과 동일한 용매인 0.1% TFA를 포함한 80% ACN을 사용해 평형화 되었습니다(표 1). 시료를 카트리지에 로딩하는 단계는 매우 중요합니다. 애질런트의 이전 연구에 따르면, 충분한 시간을 들여 Phosphopeptide를 효과적으로 바인딩하기 위해 유속을 3.0μL/분으로 설정하였습니다. 로딩 후 0.1% TFA를 포함한 80% ACN으로 내부 카트리지를 세척하는 단계를 수행합니다. 농축된 Phosphopeptide는 20μL의 1% ammonium hydroxide(대략 pH 11)로 2.5% 포름산 80μL를 포함한 LoBind PCR 플레이트에 직접 용리되었습니다(표 1 및 그림 2)<sup>1</sup>.

그림 2. AssayMAP Bravo Phosphopeptide Enrichment v2.0 App

표 1. AssayMAP Bravo를 사용한 Phosphopeptide 농축 및 cleanup 프로토콜

	Phosphopeptide 농축	펩타이드 cleanup
Affinity 배지	IMAC	역상
레진 부피	5μL	5μL
지원체	Fe(III)-NTA, 100nmol Fe(III)	C18
프라이밍 완충액	50% ACN, 0.1% TFA in water	50% ACN, 0.1% TFA in water
평형화 완충액	80% ACN, 0.1% TFA in water	0.1% TFA in water
로딩 완충액	80% ACN, 0.1% TFA in water	Ammonium formate in water
로드 부피	100μL	100μL
로드 유속	3μL/분	3μL/분
세척 완충액 1	80% ACN, 0.1% TFA in water	0.1% TFA in water
세척액 부피 1	50μL	50μL
세척 횟수 1	1	1
용리 완충액 1	1% Ammonium hydroxide	70% ACN, 0.1% TFA in water
용리 부피 1	20μL	20μL
기존의 수집 부피	80μL	0μL

Agilent AssayMAP Peptide Cleanup v2.0 App을 사용해 C18 카트리지로 농축된 Phosphopeptide를 탈염하였습니다(그림 3). 한 C18 카트리지를 A1의 데크 위치 2로 사전에 옮겼습니다. Labware는 labware 표에 따라 선정되었고, 데크 위치 9에서 사용된 LoBind 96 Eppendorf 플레이트만이 예외였습니다. 농축된 Phosphopeptide 플레이트는 데크 위치 4에 설정되었습니다. C18 카트리지에는 100µL의 50% ACN, 0.1% TFA 수용액으로 프라이밍 되었고, 50µL의 0.1% TFA로 평형화되었으며, 유속 3µL/분에서 농축된 Phosphopeptide 시료를 로딩하고, 50µL의 0.1% TFA로 세척하였으며, 5µL/분의 유속에서 20µL의 70% ACN, 0.1% TFA로 용리되었습니다.

SpeedVac 진공 농축기(Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) 내에서 실온 조건 하에 시료를 건조시키고, 25µL의 10% ACN, 0.1% FA 내에서 재현탁한 후 2분간 초음파 처리했습니다. 시료를 25µL의 0.1% FA 수용액으로 추가 희석하여, 50µL의 5% ACN, 0.1% FA 내에 포함된 최종 시료를 얻습니다.

### 데이터 의존적 수집을 사용한 펩타이드 식별

"Phosphopeptide" 시료는 25µL의 10% ACN, 0.1% FA 내에서 재현탁되었습니다. 시료 바이알은 vortex 처리한 후 2분간 초음파 처리하였습니다. 시료를 25µL의 0.1% FA 수용액으로 추가 희석하여, 50µL의 5% ACN, 0.1% FA 내에 포함된 최종 시료를 얻습니다.

1290 Infinity II LC 시스템은 Agilent Infinity UHPLC Nanodapter와의 조합을 통해 Nanoflow LC로 전환하였습니다. 이 Nanoflow LC는 Agilent NanoSpray ESI 이온화원과 연결되어 있고, Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS와 결합하여 펩타이드 식별을 수행했습니다(그림 4).

**Peptide Cleanup: Using AssayMAP v2.0**

#### Application Settings

Step	Conduct Step?	Volume (µL)	Flow Rate (µL/min)	Wash Cycles
Number of Full Columns of Cartridges: 1				
Initial Syringe Wash	<input checked="" type="checkbox"/>			3
Prime	<input checked="" type="checkbox"/>	100	300	1
Equilibrate	<input checked="" type="checkbox"/>	50	10	1
Load Sample	<input checked="" type="checkbox"/>	100	3	3
Collect Flow Through	<input checked="" type="checkbox"/>			
Cup Wash	<input checked="" type="checkbox"/>	25		1
Internal Cartridge Wash	<input checked="" type="checkbox"/>	50	10	3
Collect Flow Through	<input type="checkbox"/>			
Stringent Syringe Wash	<input checked="" type="checkbox"/>	50		1
Elute	<input checked="" type="checkbox"/>	20	5	1
Elute Discard	<input type="checkbox"/>	0		
Add to Flow Through	<input type="checkbox"/>			
Existing Collection Volume		0		
Final Syringe Wash	<input checked="" type="checkbox"/>			3

#### Deck Layout

1. Wash Station	2. Cartridges	3. Organic Waste
4. Sample	5. Priming & Syringe Wash Buffer	6. Elution Buffer
7. Flow Through Collection	8. Equilibration & Cartridge Wash Buffer	9. Eluate Collection

#### Labware Table

Deck Location	Labware Type
1	96AM Wash Station
2	96AM Cartridge & Tip Seating Station
3	12 Column, Low Profile Reservoir, Natural PP
4	96 Eppendorf 30129300, PCR, Full Skirt, PolyPro
5	96 Greiner 650201_U-Bottom, Clear PolyPro
6	96 Greiner 650201_U-Bottom, Clear PolyPro
7	96 Eppendorf 30129300, PCR, Full Skirt, PolyPro
8	96 Greiner 650201_U-Bottom, Clear PolyPro
9	96 Eppendorf 30129300, PCR, Full Skirt, PolyPro

그림 3. Agilent AssayMAP Bravo Peptide Cleanup v2.0 App

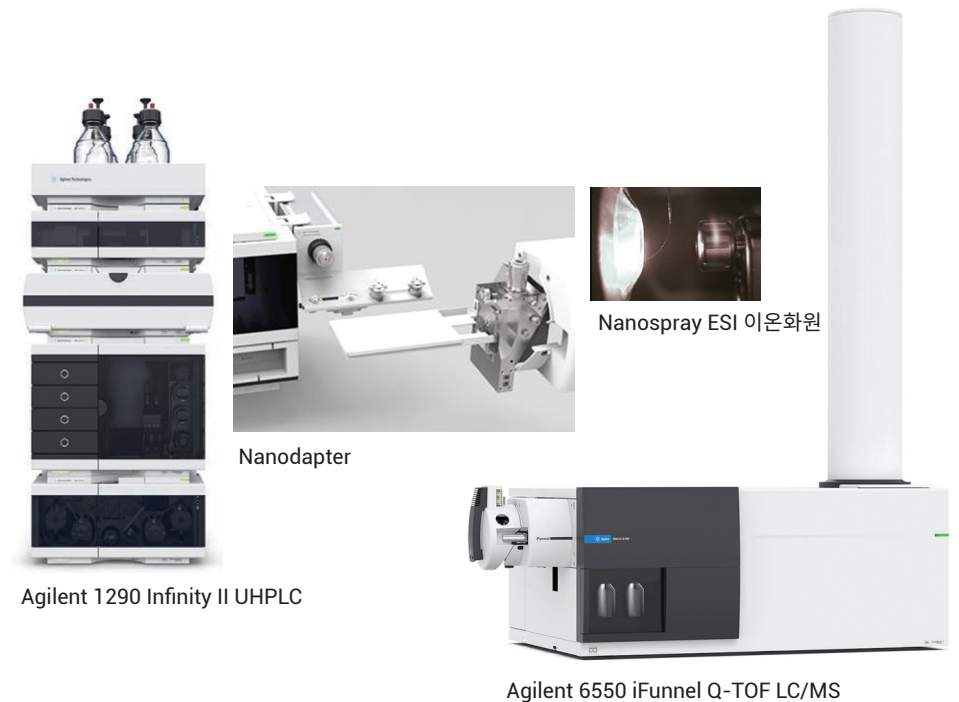


그림 4. Nanodapter는 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC와 결합하여 표준 유속 LC를 Nanoflow LC로 전환

표 2는 LC 파라미터를 보여줍니다.

Nanodapter는 직접 주입 모드로 구성되었습니다. 75µm × 25cm C18 컬럼은 60°C로 유지되었고 90분간의 그레디언트가 포함된 총 120분간의 LC 분석 시간으로 펩타이드 분리를 수행하였습니다<sup>2</sup>. 최소한의 이온 억제로 Phosphopeptide의 크로마토그래피 성능을 강화하기 위해, 0.1% InfinityLab Deactivator 첨가제를 용매 A에 첨가하였습니다<sup>3</sup>. 펩타이드 식별을 위해, 2µL의 "Phosphopeptide" 및 농축된 "Phosphopeptide-Yeast" 시료가 각각 3회씩 반복 주입되었습니다. 선택된 톱 15종 전구체 이온에 대해 데이터 의존적 수집을 사용하였습니다. 표 3은 CID를 이용한 DDA용 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS 설정의 상세한 정보를 보여줍니다.

표 2. Nano-LC 파라미터

LC 조건		
Nanodapter 구성	직접 주입 모드	
가드 컬럼	PepMap C18, 75µm × 2cm	
분석 컬럼	PepMap C18, 75µm × 25 cm	
컬럼 온도	60°C	
용매 A	0.1% formic acid, 0.1% deactivator in water	
용매 B	0.1% formic acid in 90% acetonitrile	
유속	0.085mL/분 1차 유속 300nL/분 온-컬럼 유속	
Q-TOF 그레디언트	시간(분)	B(%)
	0	3
	90	37
	95	70
	97	70
	100	3
중지 시간	115	
사후 시간	5	
주입 부피	CID에서 2µL, ECD에서 4µL, MS1에서 1µL	

표 3. Agilent 6550 iFunnel Q-TOF 파라미터

파라미터	값		
스프레이 니들	새로운 objective 비코팅 니들, 25μm id, 10μm 팁 id, 5cm 길이, 직교 배치		
가스 온도	200°C		
건조 가스	11L/분		
수집 모드	확장된 측정 범위(2GHz) m/z 100~1700 높은 분석 감도		
	MS	MS/MS	
질량 범위	m/z 300~1700	m/z 50~1,700	
수집 속도	3스펙트럼/초	>3스펙트럼/초	
분리 폭	중간(약 4m/z)		
충돌 에너지	(기울기)*(m/z)/100+Offset 전하      기울기      Offset 2          3.1          1 3          3.6          -4.8 >3        3.6          -4.8		
최대 전구체/사이클	15		
전구체 임계값	1,000 카운트, 0.01%		
능동 배제	1 스펙트럼 후 배제 0.2분 후 분리		
동위원소 모드	펩타이드		
전구체 정렬	존재비별로만, +2, +3, >+3		
전구체 존재비에 기반해 변화하는 스캔 속도	예		
표적	25,000 카운트/스펙트럼		
MS/MS 누적 시간 제한 사용	예		
순도 엄격도	100%		
순도 한계값	30%		

Swiss-Prot 인간 단백질 데이터베이스의 검색을 위해 Spectrum Mill을 사용했으며, 오발견율은 1.5%였습니다. 트립신은 소화 효소로, 최대 2개의 누락 절단 부위를 허용합니다. Carbamidomethylation을 고정 변형으로 설정하는 한편, serine(S), threonine(T) 및 tyrosine(Y)의 N-term Acetyl, 탈아미드화(N) 및 인산화를 가변 변형 사항으로 설정하였습니다. 표 4에는 상세한 검색 파라미터가 나열되어 있습니다.

### ECD를 사용한 인산화 부위 로컬라이제이션

ECD 셀은 더 짧은 hexapole collision cell과 결합하여, Agilent Q-TOF 시스템 내 기존의 hexapole collision cell을 대체하였습니다. 더 짧은 collision cell과 결합된 ECD 셀의 길이는 기존 collision cell과 동일했습니다 (그림 5). 펩타이드 표준 물질인 P를 ECD 신호 튜닝에 사용하여 +2 전하 상태에 대해 대략 1%의 전환 효율을 얻었습니다. 수집은 0 충돌 에너지가 추가된 상태에서 진행되었으나, ECD 실험에 사용된 설정은 대략 적용된 충돌 에너지의 5eV와 유사했습니다.

DDA 실험에서 식별된 Phosphopeptide 목록을 사용해  $m/z$ , 전하 상태, 머무름 시간, 델타 머무름 시간, 분리 폭 및 수집 시간 등을 포함한 전구체 이온의 표적 목록을 생성하였습니다. 충돌 에너지는 0eV로 설정되었으며, 동일한 전구체 이온은 한 번의 분석에서 4~5회 조각화되었습니다. 데이터는 Byonic 소프트웨어로 분석하였습니다. 첫 번째 분석에서 특정 규명된 Phosphopeptide는 표적 MS/MS 목록에서 제거되었으며, 식별되지 않은 Phosphopeptide를 위한 후속 실험이 추가 주입과 함께 진행되었습니다.

표 4. Spectrum Mill 검색 파라미터

Spectrum Mill 검색 파라미터		
데이터베이스	Swiss-Prot 인간 단백질	
효소	트립신	
최대 누락 절단 부위	2	
변형	고정 Carbamidomethylation	가변 Acetyl(N-term) Deamidated(N) Phosphorylated(S) Phosphorylated(T) Phosphorylated(Y)
질량 허용 오차	MS1 15ppm	MS2 30ppm
최대 모호 전구물질 전하	5	
역 데이터베이스 스코어 계산	예	
다이내믹 피크 임계값	예	
펩타이드 FDR	1.50%	
전구 전하 범위	2~7	

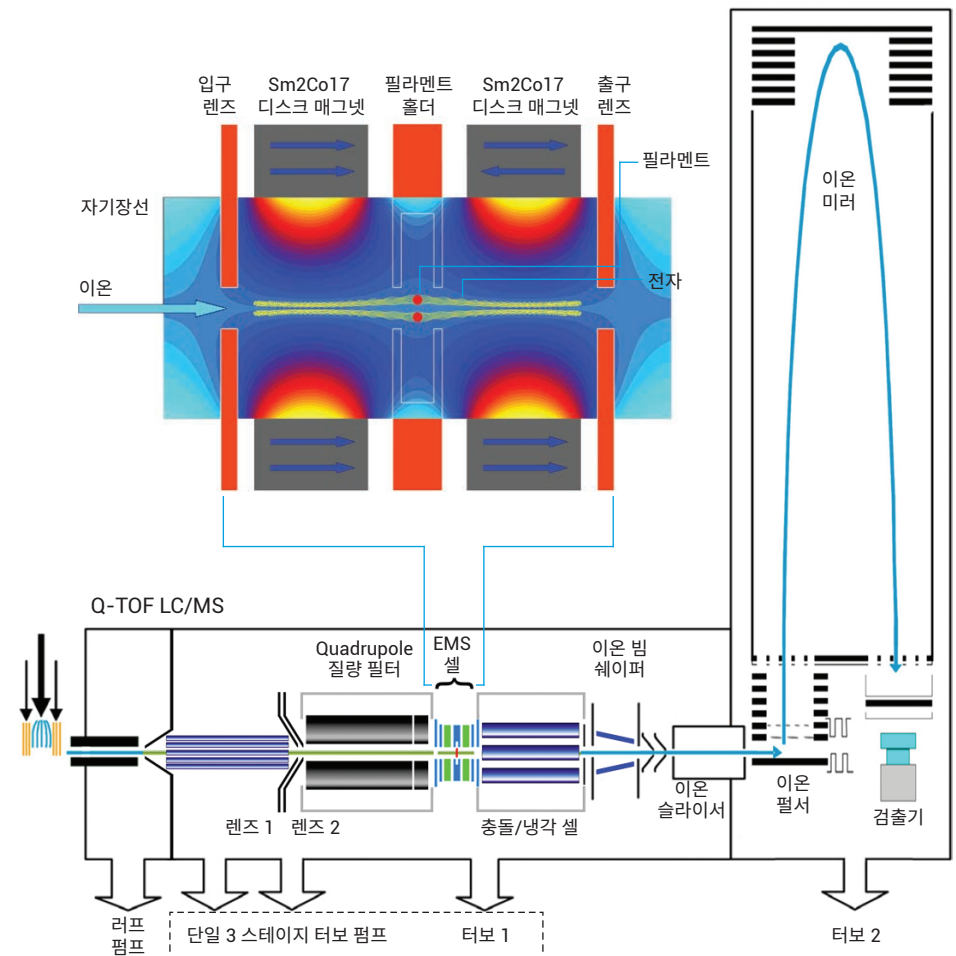


그림 5. Electromagnetostatic(EMS) ECD 셀 및 Agilent Q-TOF LC/MS에서의 그 위치에 대한 개요도

ECD 스펙트럼 분석에는 Byonic 소프트웨어가 사용되었습니다. 동일한 Swiss-Prot 인간 단백질 데이터베이스는 트립신을 효소로 사용하고 최대 2개의 누락 절단 부위를 허용합니다. Carbamidomethylation을 고정 변형으로 설정하는 한편, serine(S), threonine(T) 및 tyrosine(Y)의 탈아미드화(N, Q) 및 인산화를 가변 변형 사항으로 설정하였습니다.

### 각 변형 부위에서 Phosphopeptide의 상대적 정량

동일한 LC 그레디언트와 1μL의 주입량으로 "Phosphopeptide" 시료에 대해 MS1 실험을 3회 반복 수행하였습니다. 우선 DDA 데이터를 Skyline으로 불러와 펩타이드 CID 스펙트럼 라이브러리를 생성하였습니다. 그런 다음 전체 MS1 데이터를 Skyline으로 불러오고, MS1 스캔에 기반해 식별한 펩타이드 피크를 적분하였습니다.

피크 면적(또는 +2 및 +3 전구체 이온 모두의 이온 강도)을 Excel로 불러와 nonphosphopeptide와 Phosphopeptide 및 그들의 탈아미드화 형태의 피크 면적의 합을 계산하였습니다. 각 인산화 부위에서의 Phosphopeptide/nonphosphopeptide 비율은 이온 강도 비율에 기반해 계산되었습니다.

## 결과 및 토의

### Spectrum Mill 소프트웨어를 이용한 DDA 데이터 분석

그림 6A는 90분간의 그레디언트를 이용한 "Phosphopeptide" 시료의 총 이온 크로마토그램(TIC)을 보여줍니다. DDA를 사용해 시료를 3회 반복 주입한 후, Spectrum Mill에서 437종 특수한 펩타이드와 294종 특수한 Phosphopeptide를 식별하였습니다(표 5). HUP0는 분석

결과를 평가하기 위해 89개 펩타이드 시퀀스의 목록을 제공하였습니다. 89개 nonphosphopeptide는 모두 "Phosphopeptide" 시료로부터 식별되었습니다. 또한 CID를 사용해 대부분의 phosphosite 부위 확인 없이 그들의 인산화 대응 물질을 식별하였습니다. 농축된 "Phosphopeptide-Yeast" 시료 또한 동일한 방법으로 분석하였습니다. 그림 6B는 90분간의 그레디언트를 사용한 농축된 "Phosphopeptide-Yeast" 시료의 TIC를 보여줍니다. 표 5는 "Phosphopeptide"와 농축된 "Phosphopeptide-Yeast" 모두에 대한 상세한 검색 결과와 각 반복 주입 및 통합된 검색 결과를 보여줍니다. 농축 후, 총 287종 특수 펩타이드 및 264종 특수 Phosphopeptide가 식별되었습니다. 전체 펩타이드 ID 수에서의 농축 선택성 (Phosphopeptide/펩타이드)은 대략 92%였습니다.

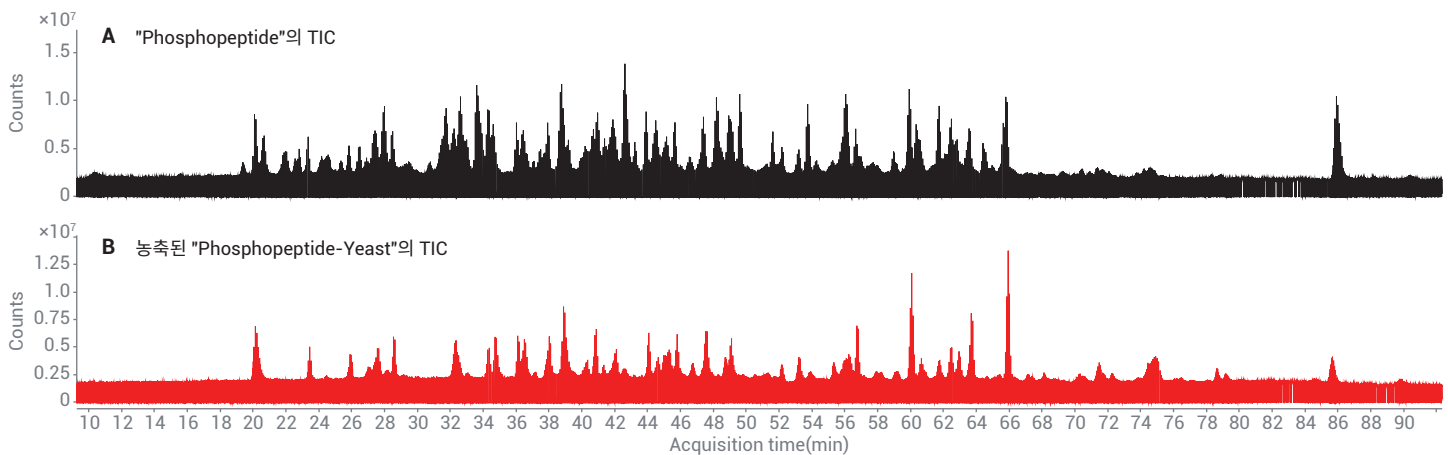


그림 6. A) 90분간의 그레디언트를 이용해 분석한 "Phosphopeptide" 시료의 TIC. B) 90분간의 그레디언트를 이용해 분석한 농축된 "Phosphopeptide-Yeast" 시료의 TIC



표 5. Spectrum Mill 검색 결과

	"Phosphopeptide"				농축된 "Phosphopeptide-Yeast"			
	반복 분석 1	반복 분석 2	반복 분석 3	조합	반복 분석 1	반복 분석 2	반복 분석 3	조합
총 특수 펩타이드 수	316	297	308	437	193	203	203	287
총 특수 Phosphopeptide 수	195	182	193	294	179	192	189	264
Monophosphopeptide	123	125	127		117	127	123	
Diphosphopeptide	63	50	58		52	56	53	
Triphosphopeptide	8	6	7		8	8	12	
Tetraphosphopeptide	1	1	1		2	1	1	
% Phosphopeptide/총 펩타이드	61.7	61.3	62.7	67.3	92.7	94.6	93.1	92.0
총 Phosphosite	277	247	268		253	267	269	
할당된 부위 %	63	61.9	63.7	62.9	62.4	63.4	62.4	62.7
할당되지 않은 부위	102	94	97		95	98	101	

## Byonic 소프트웨어를 사용한 ECD 스펙트럼 분석

펩타이드 VVEAVNSDSDSEFGIPK 분석의 결과를 phosphosite의 로컬라이제이션 정도를 보여주는 사례로 사용하였습니다. 그림 7A는 비인산화 펩타이드 VVEAVNSDSDSEFGIPK의 CID 스펙트럼을 보여줍니다. Spectrum Mill을 이용하여 전구체 이온  $m/z$  896.93( $z = +2$ , 질량 오차 = 1.1ppm)을 식별하였고, 이 펩타이드에서는 phosphosite가 없었습니다. 시퀀스 매칭 결과는 이 펩타이드에 대한 b, y 유형 이온의 완전한 커버리지를 보여줍니다.

그림 7B, 7C 및 7D는 동일 시퀀스를 가지지만, monophosphorylation, diphosphorylation, triphosphorylation을 가진 펩타이드의 ECD 스펙트럼을 보여줍니다. 그림 7B에서 Byonic를 이용하여 전구체 이온  $m/z$  936.92( $z = +2$ , 질량 오차 = -0.07ppm)를 식별하였고, 이 펩타이드에는 1개의 phosphosite가 있었습니다. 진단 이온  $c6(m/z = 629.36)$ 과  $c7(m/z = 796.37)$ 은 이 펩타이드에서 serine 7의 phosphosite를 확인하였습니다. 그림 7C에서 Byonic를 이용하여 전구체 이온  $m/z$  651.60( $z = +3$ , 질량 오차 =

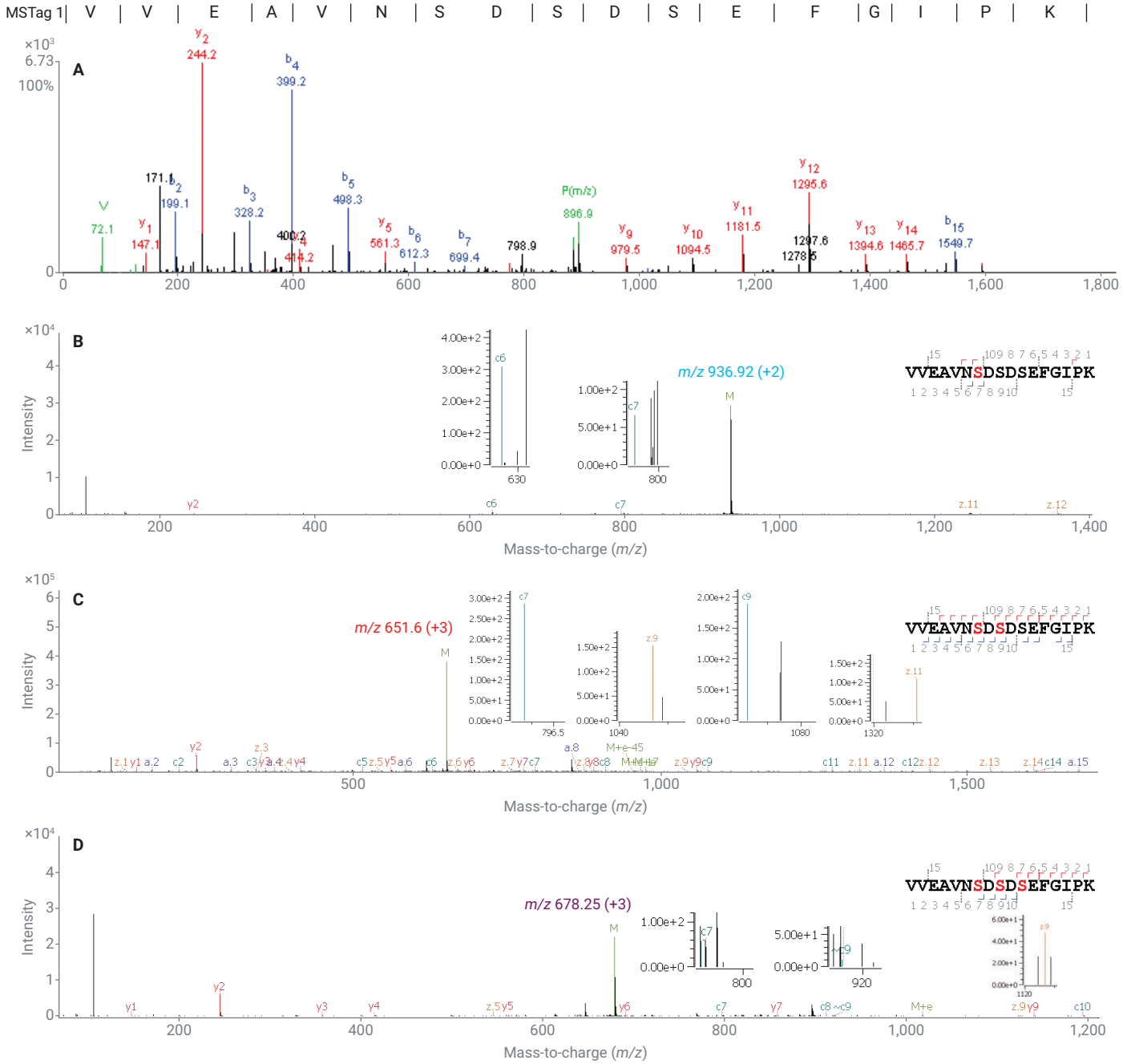
-3.69ppm)을 식별하였고, 이 펩타이드에는 2개의 phosphosite가 있었습니다. 진단 이온  $c7(m/z = 796.35)$ ,  $z11(m/z = 1325.45)$ ,  $c9(m/z = 1078.37)$ ,  $z9(m/z = 1043.40)$ 는 이 펩타이드에서 serine 7과 9의 2개 phosphosite를 확인하였습니다. 그림 7D에서 Byonic를 이용하여 전구체 이온  $m/z$  678.25( $z = +3$ , 질량 오차 = -11.54ppm)을 식별하였고, 이 펩타이드에는 3개의 phosphosite가 있었습니다. 진단 이온  $c7(m/z = 796.37)$ ,  $c9(m/z = 918.42)$ ,  $z9(m/z = 1123.40)$ 은 이 펩타이드에서 serine 7, 9, 11의 3개 phosphosite를 확인하였습니다. 다른 인산화 정도를 가진 펩타이드 VVEAVNSDSDSEFGIPK의 CID 스펙트럼(나타내지 않음)은 phosphosite의 위치 확인 없이 갯수만 식별될 수 있습니다.

그림 7B와 7C를 비교해 보면, Phosphopeptide의 크기가 커질 때, +3 전하 상태의 전구체 이온의 존재비가 증가되어 보다 높은 시퀀스 커버리지에 대해 더 우수한 ECD 스펙트럼이 나타났습니다(그림 7C). +2 전하 상태 및 보다 낮은 존재비를 가진 전구체 이온은 더 적은 조각 이온을 생성했으나, 여전히 phosphosite의 위치를 확정할 수 있었습니다(그림 7B). 그림 7C와

7D를 비교해 보면, 여러 phosphosite( $\geq 3$ )를 가진 펩타이드는 일반적으로 양이온 모드에서 더 낮은 이온화 효율을 보였습니다. 같은 전하 상태(+3)의 존재비가 더 높은 전구체 이온 역시 더 우수한 ECD 스펙트럼으로 이어졌습니다(그림 7C). 그림 7B와 7D를 비교해 보면, 2개의 전구체 이온이 거의 같은 존재비로 존재합니다. +3 전하 상태의 이온은 여전히 +2 전하 상태에 비해 더 많은 조각 이온을 생성합니다.

본 연구에서, HUPO는 89개의 펩타이드 시퀀스 목록을 제공하였습니다. "Phosphopeptide" 시료 내에 존재하는, 이 시퀀스 목록에 기반하고 ECD로 확인된 특수 Phosphopeptide의 총 수는 96 개였습니다. 또한 효모 용해물에 스파이킹된 96개 Phosphopeptide 중 95개는 농축된 "Phosphopeptide-Yeast" 시료 내에서 여전히 식별 가능했습니다. 이 결과는 농축을 통해 많은 수의 Phosphopeptide를 회수할 수 있음을 보여줍니다. 한편 "Phosphopeptide-Yeast" 시료의 농축 후 89종의 nonphosphopeptide 중 9종이 여전히 검출되었습니다. 펩타이드 시퀀스 목록에 기반한 농축 선택성 (Phosphopeptide/펩타이드)은 대략 91.3%였습니다.





**그림 7.** A) b, y 유형 이온의 완전한 시퀀스 커버리지를 보여주는 펩타이드 VVEAVNSDSEFGIPK의 CID 스펙트럼. B), C), D) c, z 유형 이온으로 로컬라이제이션 된 monophosphorylation, diphosphorylation, triphosphorylation와 VVEAVNSDSEFGIPK 펩타이드의 ECD 스펙트럼. ECD 스펙트럼 내 대부분의 시퀀스 이온들의 존재는 낮은 전하 상태에서 낮은 효율성을 보일 것으로 기대된다는 점을 주의하십시오.

## 펩타이드 인산화의 상대적 정량

그림 8은 다양한 인산화 정도를 보유한 펩타이드 VVEAVNSDSDSEFGIPK의 추출 이온 크로마토그램(EIC)을 보여줍니다. 모든 펩타이드는 C18 컬럼과 90분간의 그레디언트를 이용해 잘 분리되었습니다. Diphosphopeptide와 triphosphopeptide에서 탈아미드된 Phosphopeptide의 이온 강도를 기존의 Phosphopeptide와 합하였습니다. Phosphopeptide/nonphosphopeptide의 상대 존재비는 이온 강도에 기반해 계산되었습니다. 펩타이드 VVEAVNSDSDSEFGIPK에서, nonphosphopeptide의 존재비가 1.00이라면 monophosphopeptide, diphosphopeptide, triphosphopeptide의 비율은 각각 0.03, 4.71, 0.02였으며, 이는 그림 8에 나타나 있습니다. 각 변형된 부위의 인산화에 대한 상대 존재비는 Phosphopeptide/nonphosphopeptide 비율에 기반하여 "Phosphopeptide" 시료 내의 모든 96종 Phosphopeptide에 대해 계산되었습니다. 이 상대적 정량은 서로 다른 펩타이드 종의 다양한 이온화 효율을 고려하지 않았습니다. 이는 다양한 펩타이드의 이온 강도에 대한 단순 비교입니다.

## 결론

HUPO Phosphopeptide Challenge를 위해 Agilent AssayMAP Bravo 플랫폼 및 LC/Q-TOF 시스템을 이용한 자동화된 Phosphopeptide 농축 및 정성과 정량 분석을 수행하였습니다.

CID 실험을 수행하여 "Phosphopeptide" 시료 내에서 294종 Phosphopeptide를 포함한 437종 특수 펩타이드를 식별하였습니다. HUPO 시퀀스 목록 내의 모든 89종 nonphosphopeptide가 식별되었습니다. ECD 실험을 통해 89개 nonphosphopeptide 시퀀스에 기반해 96개 Phosphopeptide의 phosphosite 위치를 측정하였습니다. 시퀀스 목록에 없는 나머지 펩타이드들 역시 HUPO에 보고되었습니다.

농축된 "Phosphopeptide-Yeast" 시료 내에서 287종 특수 펩타이드가 식별되었으며, 그 중 264종은 특수 Phosphopeptide였습니다. 농축의 전반적인 선택성은 약 92.0%였습니다.

또한 효모에 스파이킹된 96개 Phosphopeptide 중 95개는 농축된 "Phosphopeptide-Yeast" 시료 내에서 여전히 식별 가능했습니다. 애질런트는

이 연구를 수행하는 다른 실험실보다 농축 시료로부터 더 많은 수의 Phosphopeptide를 회수하였습니다.

## 참고문헌

1. Russell, J. D.; Murphy, S. Agilent AssayMAP Bravo Technology Enables Reproducible Automated Phosphopeptide Enrichment from Complex Mixtures Using High-Capacity Fe (III)-NTA Cartridges, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-6073EN, **2016**.
2. Wu, S.; Wu, L. Human Breast Cancer Cell Line Phosphoproteome Revealed by an Automated and Highly Selective Enrichment Workflow, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5994-0315EN, **2018**.
3. Hsiao, J. J. et al., Improved LC/MS Methods for the Analysis of Metal-Sensitive Analytes Using Medronic Acid as a Mobile Phase Additive. *Anal. Chem.* **2018**, 90(15), 9457-9464.

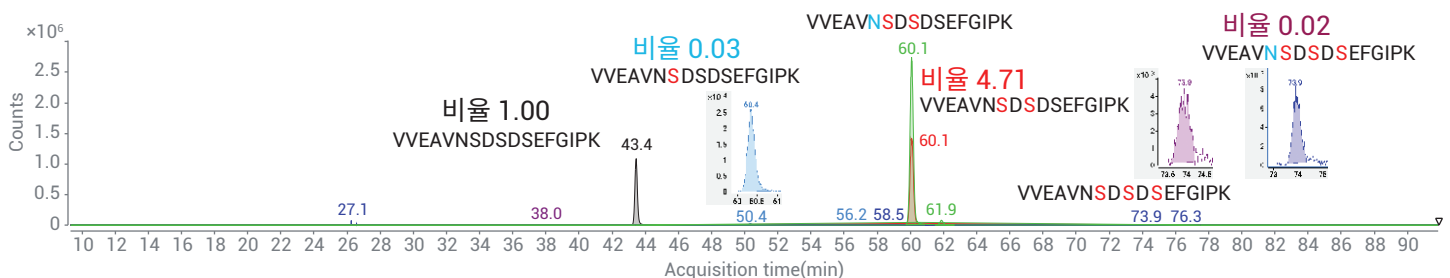


그림 8. 모든 VVEAVNSDSDSEFGIPK 펩타이드의 EIC, 그 중 Phosphopeptide/nonphosphopeptide 비율 표시

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지 않습니다.

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2019  
2019년 8월 26일, 한국에서 인쇄  
5994-1235KO

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

 **Agilent**  
Trusted Answers