

펩타이드 정량분석 안내서

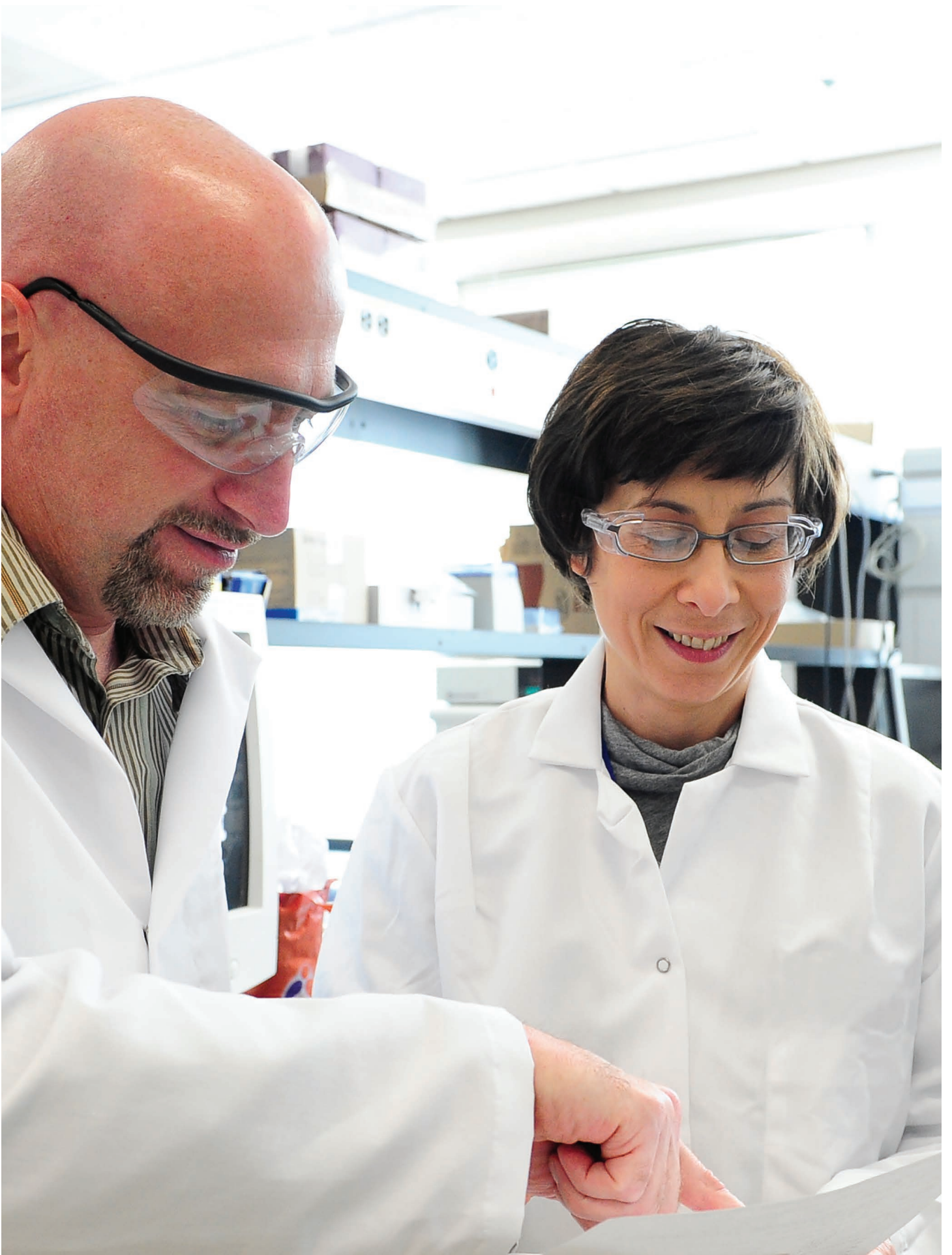
애질런트 임상 연구



The screenshot displays the Agilent software interface for peptide quantification. It features a workflow table with columns for Step, Sample Name, Sample Position, Method, and Data File. Below the table, a 3D model of a sample tray is shown, illustrating the physical layout of the samples.

Step	Sample Name	Sample Position	Method	Data File
1	Standard	P1-A1	MRM_0001.m	Step-A_MRM_0001
2	Standard	P1-A1	MRM_0002.m	Step-A_MRM_0002
3	Standard	P1-A1	CE-egt_0001.m	Step-B_CE-egt_0001
4	Standard	P1-A1	CE-egt_0002.m	Step-B_CE-egt_0002
5	Standard	P1-A1	CE-egt_0003.m	Step-B_CE-egt_0003
6	Standard	P1-A1	CE-egt_0004.m	Step-B_CE-egt_0004
7	Standard	P1-A1	CE-egt_0005.m	Step-B_CE-egt_0005





임상 연구 실험실을 위한 펩타이드 정량분석

과학자들이 기초적 연구에서 식별된 펩타이드 바이오마커를 임상 연구와 실제 응용으로 전환함에 따라, 임상 연구에서 펩타이드 정량분석의 필요성이 급속도로 성장하고 있습니다. 이 정량 방법은 사전 정보에 근거해 임상 연구 시료 내에 존재할 것으로 예상되는 단백질 고유의 펩타이드를 측정합니다. 사전 정보라 함은 Genomic 및 Proteomic 연구 또는 혼합형 Proteogenomic 분석 문헌 정보를 말합니다.

귀하가 임상 연구에 적용할 펩타이드 정량 분석법을 개발할 때, 애질런트는 시료 전처리, 액체 크로마토그래피(컬럼, 소모품, 분리 분석법), 고감도 Triple Quadrupole 기기를 이용한 펩타이드 질량 분석기, 믿을 수 있는 소프트웨어를 이용한 데이터 분석 등 매 단계에서 전문가 조언을 제공해드립니다.

애질런트는 귀하의 펩타이드 정량분석 여정에서 믿을 수 있는 유능한 파트너가 되어드립니다.



펩타이드 정량분석을 위한 애질런트 솔루션: 애질런트 AssayMAP Bravo 액체 처리 시스템, Agilent 1290 Infinity II 액체 크로마토그래피 시스템, Agilent 6495 Triple Quadrupole LC/MS 시스템, 애질런트 AdvantBio Peptide Mapping 컬럼

저분자 대 고분자 분석

저분자 분석 방법과 고분자(예, 펩타이드) 분석 방법은 완전히 다릅니다. 전통적인 저분자 분석의 시료 전처리에서는 분석 대상 성분에 따라 추출, 단백질 침전과 같은 다양한 기술이 필요합니다. 한편 펩타이드 분석은 상대적으로 표준 프로토콜을 따르는 것이 대조적입니다. 용액 내 단백질은 변성, 환원 반응, 알킬화 반응을 거친 후 효소에 의해 분해됩니다. 펩타이드 분석은 저분자 분석과 동일한 종류의 액체 크로마토그래피와 유사한 이동상을 사용하고 얇은 기울기가 적용되며 실행 시간은 시료 복잡성으로 인해 더 길어질 수 있습니다.



질량 분석기를 이용한 펩타이드 분석법을 개발할 때에는 단일 펩타이드가 다중 하전 상태로 존재할 수 있다는 것, 많은 product ion이 있을 것이라는 점, 그 중 일부는 precursor ion보다 높은 m/z 를 가질 것이라는 점 등을 고려해야 합니다.

또한 간섭으로 인해 abundant가 가장 높은 product ion이 최선의 선택이 아닐 수 있다는 점도 염두에 두어야 합니다. 최고의 MRM transition은 선택성과 분석 감도를 모두 제공합니다. 전통적인 저분자 분석에서 데이터 수집은 시작에

불과합니다. 데이터 분석에는 실험 결과로부터 가장 중요한 정보를 추출할 수 있는 정교하고 직관적인 소프트웨어가 필요합니다.

질량 분석을 위한 자동화된 펩타이드 시료 전처리

임상 연구에서 시료 전처리의 재현성은 언제나 중요한 요인입니다. 펩타이드 시료 전처리에는 분석 재현성에 영향을 줄 수 있는 타이밍이 중요한 여러 단계와 시약 추가 절차가 포함됩니다. 이 절차를 자동화한다면 변동성을 낮추고 시료 추적이 가능한 무오류 운영을 가능케 합니다. 애질런트 AssayMAP Bravo 플랫폼은 LC/MS 분석에 사용되는 단백질과 펩타이드 시료를 효율적으로 준비합니다. 귀하의 임상 연구 요건을 충족시키기 위해, 이 플랫폼은 실험실에서 테스트된 펩타이드 및 단백질 시료 전처리 프로토콜을 포함한 간소화된 사용자 인터페이스를 제공합니다.

애질런트 AssayMAP Bravo를 이용한 펩타이드 시료 전처리 자동화



펩타이드 정량분석을 위한 시료 전처리에는 일련의 단계가 필요하며, 그 중 일부는 선택 사항입니다. AssayMAP Bravo 플랫폼의 소프트웨어 인터페이스 내에서 Peptide Sample Prep Workflow Navigator는 간소화된 인터페이스를 통해 최적의 펩타이드 시료 전처리 워크플로를 선택하고 사용할 수 있도록

합니다. 각 워크플로에는 원하는 경우 수정 가능하고 따르기 쉬운 프로토콜, 시약 계산기, 워크플로 안내서가 포함되어 있습니다. 용액 내 분해 워크플로는 변성, 환원, 이황화 결합의 알킬화, 효소 분해 등 절차가 언제나 수행됩니다. 펩타이드 Cleanup 워크플로는 LC/MS 분석 전에 시료를 탈염하는 단계로, 선택

사항입니다. 애질런트는 이들 각각의 워크플로를 위한 AssayMAP Bravo 응용 프로그램을 개발하였으며, 따라서 임상 연구 실험실에서는 자동화된 시료 전처리에 따른 특정 요건을 충족하는 워크플로 조합을 생성할 수 있습니다.



애질런트 AssayMAP Bravo 액체 처리 시스템

크로마토그래피 분리

시료 전처리가 끝나고 분석 준비가 완료된 후, 다음 단계는 표적 펩타이드에 알맞는 효율적인 크로마토그래피 분석법을 개발하는 것입니다. Agilent 1290 Infinity II 액체 크로마토그래피 시스템은 놀라운 신뢰성과 견고함으로 까다로운 분리도 수행할 수 있는 성능을 제공합니다. Agilent 1290 Infinity II LC 시스템의 UHPLC 성능은 다양한 유속과 컬럼 선택권을 제공하여, 복잡한 매트릭스(예, biofluid) 내 표적 펩타이드를 위한 크로마토그래피를 최적화할 수 있게 해 줍니다.



"높은 유속에서 Triple Quadrupole 분석을 실행할 수 있기 때문에 더 우수한 완건성과 재현성을 얻을 수 있습니다. 1290 Infinity II LC 시스템의 높은 유속을 사용함으로써 머무름 시간의 정확성과 재현성을 달성할 수 있으며, 시각적으로 피크를 검토하지 않고도 피크 영역의 통합이 거의 가능합니다. 임상 테스트로 진행해 나가는 과정에서 대부분의 데이터를 자동으로 추출하는 것이 매우 중요한 과제가 됩니다. 애질런트 기기가 제공하는 도구, 재현성, 소프트웨어는 그것을 가능케 해줍니다."

- **Stephen R. Pennington**, University College Dublin Conway Institute의 생분자 및 생의학 연구 Proteomics 담당 교수 및 선임 연구자. Atturos Ltd.의 창립자, CEO, CSO.

펩타이드 분리에 쓰이는 크로마토그래피 컬럼은 고분자 분석을 위해 보통 큰 pore를 갖고 있으며, 분석물의 비특이적 결합을 최소화해 회수율을 향상시키는 크로마토그래피 매질을 포함하고 있습니다. 애질런트 AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼은 펩타이드 분리 및 특성화를 위해 일관되고 탁월한 성능을 제공합니다.

이 컬럼은 표면 다공성 컬럼으로 pore 크기는 120 Å이며, 이는 단백질의 효소 분해로 생성된 펩타이드 분석에 최적입니다. 2.7µm의 입자 크기는 더 빠른 유속과 복잡한 혼합물 내 표적 펩타이드에 대한 뛰어난 분리능을 제공합니다. 질량 분석기와 함께 사용

시 크로마토그래피 성능이 향상되어 간섭이 줄어들고, 더 선명한 크로마토그래피 피크로 감도가 향상되며, 결과적으로 데이터 처리가 더 쉬워지며 결과에 대한 신뢰성도 향상됩니다. 또한 AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼은 믿을 수 있는 펩타이드 크로마토그래피 분리 및 컬럼 간 재현성을 보장할 수 있도록 특별히 까다로운 펩타이드 혼합물로 테스트되었습니다. 다수의 펩타이드 정량분석이 머무름 시간 창을 이용해 복합화되므로, 안정적인 머무름 시간은 견고한 분석법과 높은 처리량 성취에 핵심적인 요소입니다.

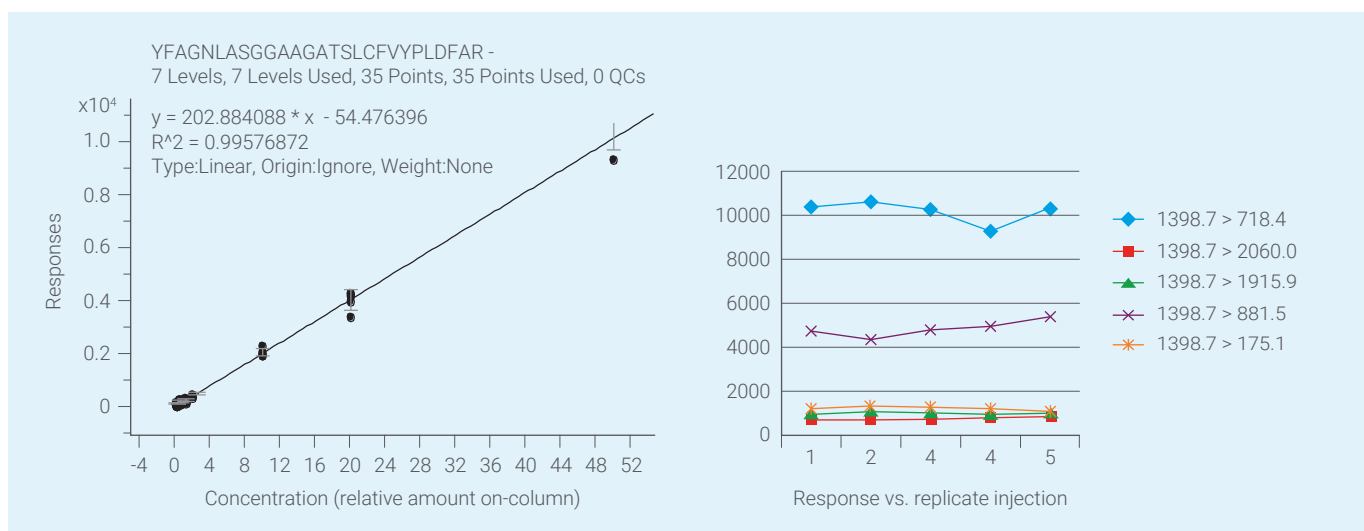
또는 포름산 사용 시에는 애질런트 AdvanceBio Peptide Plus 컬럼이 좋은 선택입니다. 이 컬럼은 120 Å의 표면 다공성 입자 컬럼이면서 하전된 표면의 C18 하이브리드 컬럼입니다. 이 특성은 포름산 사용 시 탁월한 피크 모양 및 대안적인 선택성을 제공하여 탈아미노 성분과 같이 인접해서 용출되는 post-translational modification에서 더 우수한 분리 성능을 자랑합니다. 두 컬럼 모두 뛰어난 완전성으로 질량 분석에서 컬럼 전환 및 컨디셔닝과 관련된 가동 중단 발생을 감소시켜, UHPLC에 가까운 결과를 냅니다.



Agilent 1290 Infinity II 액체 크로마토그래피 시스템과 애질런트 AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼

질량 분석 검출

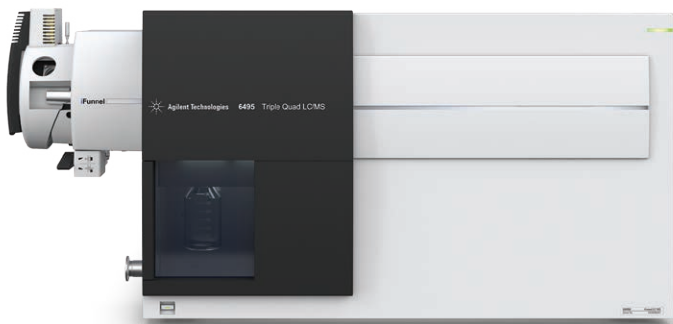
펩타이드 정량분석에서 biofluid 내 단백질 농도가 수백에서 수천배까지 넓게 분포될 수 있기 때문에 높은 감도와 넓은 측정 범위(dynamic range)가 중요합니다. iFunnel 기술을 채택한 Agilent 6495 Triple Quadrupole LC/MS 시스템 iFunnel 기술을 애질런트 Jet Stream Ion Source와 결합하여 사용하면 이온 샘플링을 대폭 향상시켜 더 낮은 검출 한계를 보입니다. 6495는 뛰어난 감도, 신뢰성 및 전반적인 시스템 견고성을 요구하는 정량 응용 분야에 검증된 선택입니다. 유지보수가 필요할 경우, 새로 포함된 게이트 밸브가 가동 시간과 생산성을 향상시켜주며, 기기를 배출할 필요 없이 캐필러리를 교환할 수 있습니다.



6495의 확장된 질량 범위(최대 m/z 3000)는 더 다양한 종류의 precursor ion과 product ion을 선택할 수 있게 함으로써, 단백질 정량분석에서 펩타이드,

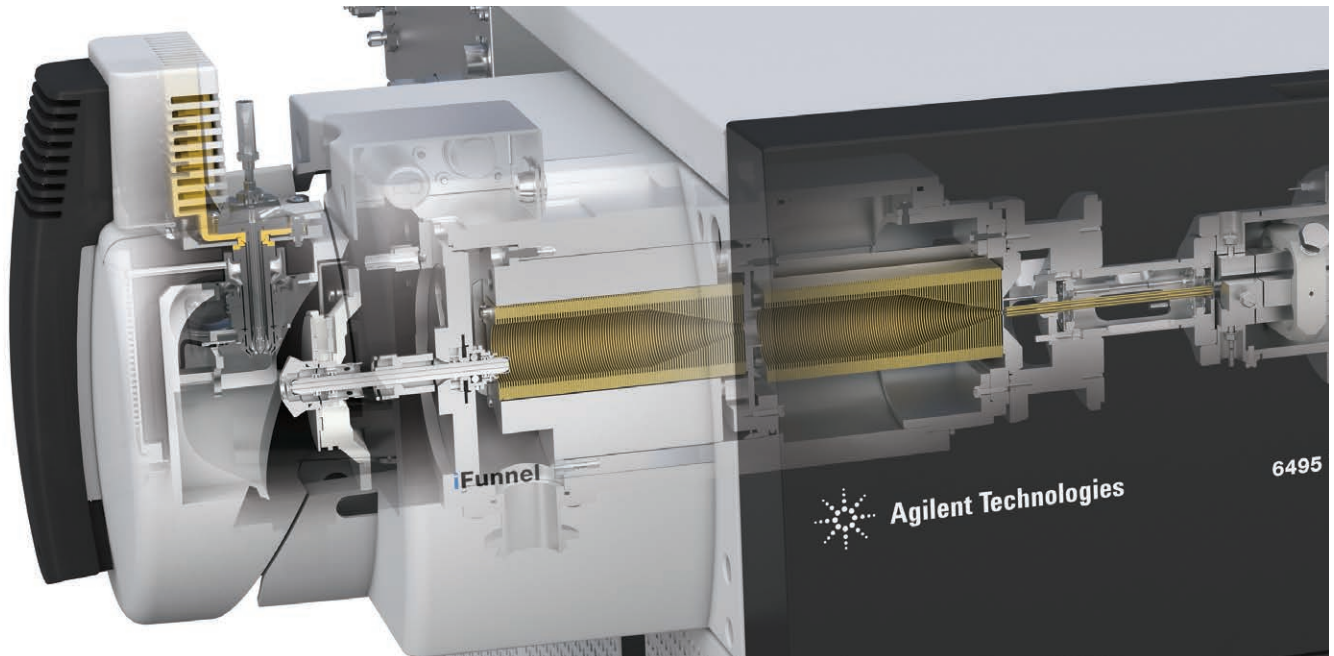
MRM transition 선택의 폭을 넓혀줍니다. 위의 사례는 선택된 2개의 product ion의 m/z 가 1900보다 높을 경우의 정량분석 결과를 보여줍니다. 이렇게 m/z 가 높은

product ion은 표적 펩타이드를 확인할 때 높은 특이성을 제공합니다.



Agilent 6495 Triple Quadrupole LC/MS 시스템은 iFunnel 기술과 애질런트 Jet Stream Ion Source가 결합된 시스템입니다.

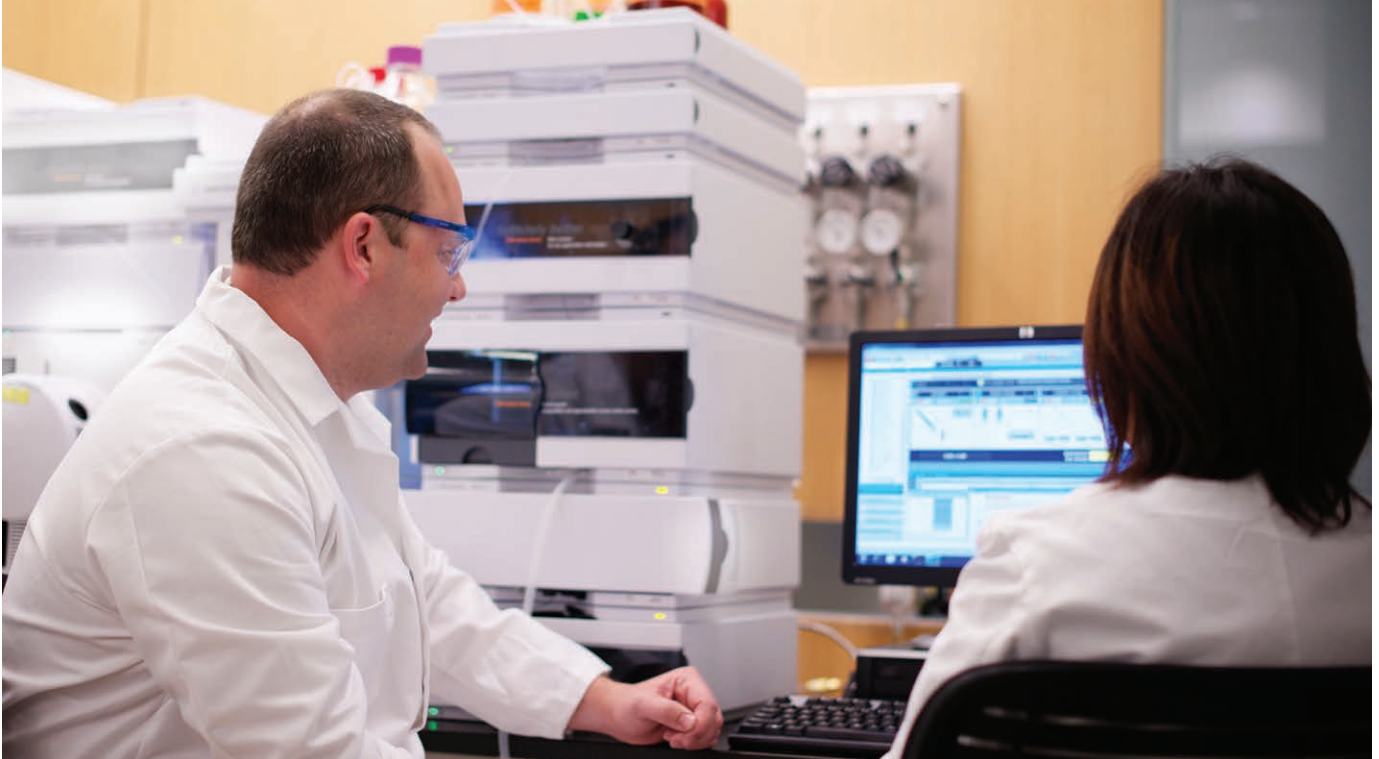
애질런트의 독보적인 Jet Stream Ion Source는 표준 전자분무 이온화보다 3~5배 높은 감도를 자랑하는 인터페이스를 제공하며, 농도의 영향을 받지 않습니다. 따라서 실험실에서는 표준 2.1mm id 컬럼과 더 높은 LC 유속을 사용하면서, 보통 이러한 방법 사용 시 뒤따르는 감도 손실을 피할 수 있습니다. 펩타이드 정량분석에서 시료 제한을 받지 않는 임상 연구자들은 conventional-flow HPLC와 Jet Stream 소스를 사용함으로써 nanoflow HPLC 분석에 근접한 감도를 얻을 수 있습니다. 결과적으로 복잡한 Proteomics 시료의 LC/MS 분석에서 빠르고 안정적이며 재현성 있는 결과를 얻을 수 있습니다.



애질런트 Jet Stream은 전자분무에 비해 3~5배 높은 펩타이드 신호를 제공합니다.

MassHunter 소프트웨어

애질런트 MassHunter Workstation 소프트웨어는 기기 제어를 위한 수집 모듈, 정량 및 정성 데이터 분석을 포함하고 있습니다. 데이터는 MassHunter Quantitative Analysis 도구로 자동 처리되어 펩타이드 정량분석 결과를 더욱 빠르게 제공할 수 있습니다. 이러한 도구를 이용하여 사용한 결과 항목을 맞춤 작성하고, 결과를 강조 표시하여 추가 검토를 할 수 있습니다.



또한 MassHunter Workstation 소프트웨어는 Laboratory Information System(LIS)과 직접 통합되어, 분석 시료 리스트를 가져오고 최종 결과를 내보낼 수 있습니다.

Skyline 소프트웨어

애질런트 MassHunter 소프트웨어는 Skyline 소프트웨어와 긴밀하게 통합 가능합니다. Proteomics 연구자들을 위해 설계된 Skyline 소프트웨어(워싱턴 대학교의 MacCoss Group 제작)는 MassHunter 에서 MRM, dynamic MRM(dMRM), triggered MRM(tMRM) 모드를 지원하여, 매우 복잡한 시료에서도 원하는 quantifier와 qualifier 신호를 얻을 수 있습니다.

애질런트 Skyline Automation 도구를 사용한 3가지 간단한 자동 MRM 단계

1 RT 결정

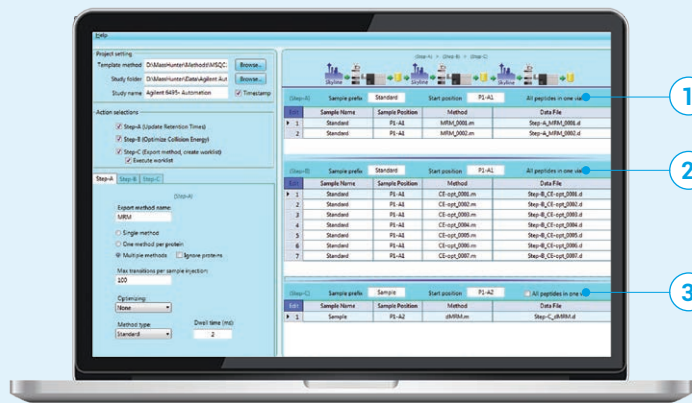
- Skyline 문서 생성
- 단백질/펩타이드 첨가
- MRM 분석법 내보내기
- MRM 분석 실행

2 CE 최적화

- MRM 결과 가져오기
- CE 최적화 분석법 내보내기
- CE 최적화 실행

3 최종 분석법 생성

- CE 최적화 결과 가져오기
- 최종 dynamic MRM 분석법 내보내기
- 최종 분석법 실행



애질런트의 Skyline Automation 도구는 중요한 분석법 개발과 프로세스 최적화를 자동화하여 새로운 분석법을 생성하는 과정을 간소화합니다. Skyline과 MassHunter를 결합하여 사용하면 분석 작업이 한결 쉬워집니다. 시료를 바이알에 넣고 파라미터를 설정한 후 소프트웨어가 나머지 최적화를 진행하도록 하기만 하면

됩니다. 몇 시간 후에 돌아오면 분석법은 시료 분석을 실행할 준비가 되어 있습니다. 컬럼이나 분석법을 변경할 때, 복잡한 분석법의 경우에는 머무름 시간 조정에 많은 시간이 소모될 수 있습니다. MassHunter의 머무름 시간 검량 (calibration) 도구는 머무름 시간의 변화에 대응하기 위해 분석법을 쉽게

조정하도록 설계되었습니다. Skyline에는 또한 펩타이드 머무름 시간을 저장하고 예측할 수 있는 iRT 기능이 있습니다. 요컨대, 애질런트 MassHunter 및 Skyline 소프트웨어는 귀하의 펩타이드 정량분석이 더 빠르고 쉽고 효율적으로 진행될 수 있도록 합니다.

애질런트는 시료 전처리, LC/MS 분석, 데이터 처리 등 펩타이드 정량분석 워크플로의 모든 단계에서 솔루션을 제공합니다. 애질런트는 임상 연구를 위한 펩타이드 정량분석에서 귀하의 파트너가 된 것을 영광으로 생각합니다.

추가 정보:

www.agilent.com/chem/clinicalresearch

온라인 구매:

www.agilent.com/chem/store

애질런트 고객 센터 찾기:

www.agilent.com/chem/contactus

미국 및 캐나다

1-800-227-9770

agilent_inquiries@agilent.com

유럽

info_agilent@agilent.com

아시아 태평양

inquiry_lsca@agilent.com

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지 않습니다.

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2018
2018년 6월 7일, 한국에서 발행
5991-9412KO

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

