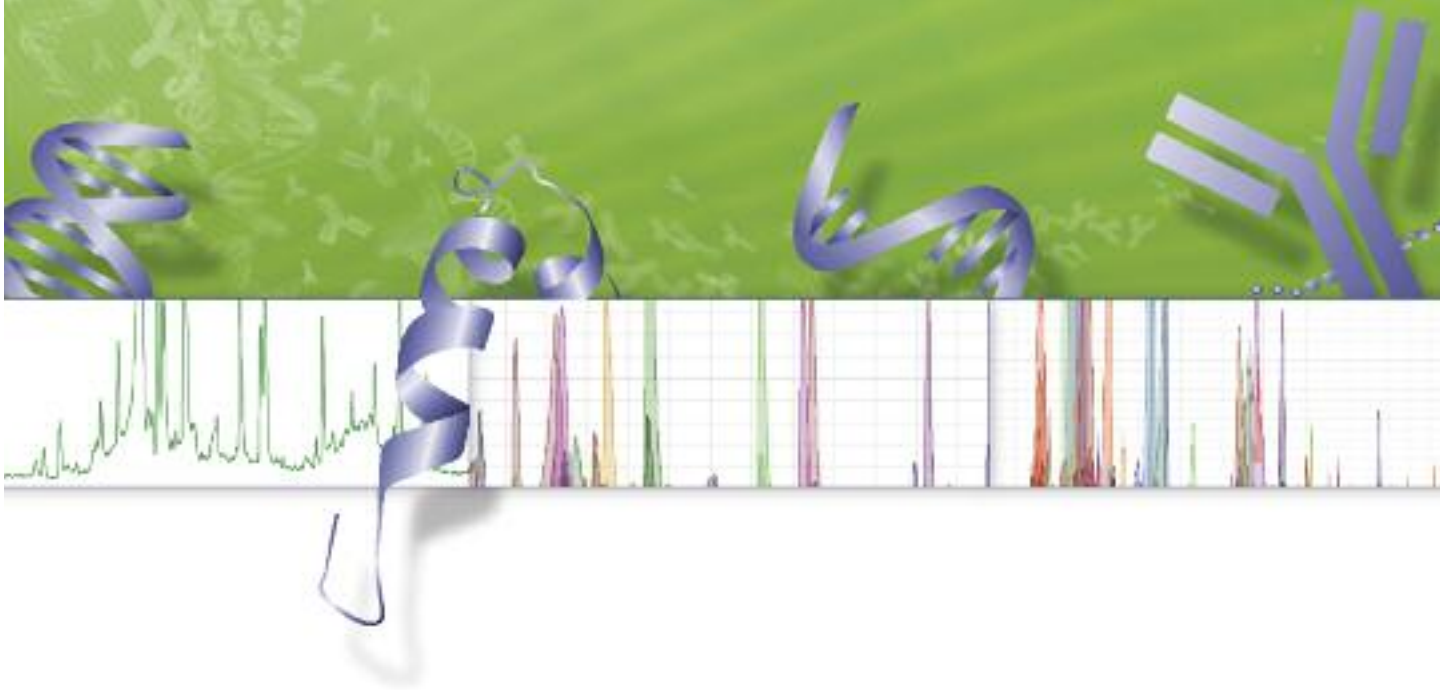




SCHLÜSSELSTRATEGIEN ZUR OPTIMALEN CHARAKTERISIERUNG VON PEPTIDEN:

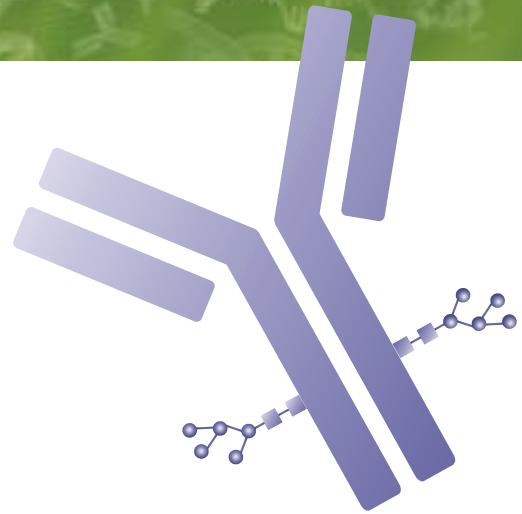
Ein praktischer Leitfaden für Peptid-Mapping

The Measure of Confidence



Agilent Technologies

EINFÜHRUNG



Peptid-Mapping, ein unverzichtbares Hilfsmittel für Biopharmazeutika, ist eine äußerst leistungsstarke Methode und das am häufigsten eingesetzte Testverfahren zur Identifizierung von Proteinen, insbesondere von Proteinen, die durch Rekombination erzeugt wurden. Zum Verfahren gehört üblicherweise der enzymatische Verdau eines Proteins (meist unter Verwendung von Trypsin), um Peptidfragmente zu erzeugen. Darauf folgt die Trennung und Identifizierung der Fragmente in reproduzierbarer Form, wodurch einzelne Aminosäureveränderungen, Oxidations- und Deamidierungsprozesse sowie weitere Zersetzungsprodukte ermittelt und verfolgt werden können. Gleichzeitig können häufige monoklonale Antikörpervarianten wie N-terminale Zyklierung, C-terminale Lysin-Verarbeitung und N-Glykosylierung sowie weitere posttranslationale Modifikationen direkt erkannt werden.

Eine Peptidmap ist ein Fingerabdruck eines Proteins und das Endprodukt mehrerer Prozesse, die umfassende Informationen über das analysierte Protein liefern. Dabei werden vier zentrale Schritte ausgeführt: Isolierung und Aufreinigung des Proteins, selektive Spaltung der Peptidbindungen, chromatographische Trennung der Peptide und validierte Analyse der Peptide.

Peptid-Mapping wird als komparatives Verfahren betrachtet, mit dem die primäre Struktur des Proteins bestätigt und Änderungen in der Struktur ermittelt werden. Darüber hinaus zeigt es Prozesskonsistenz und genetische Stabilität. Peptid-Mapping soll eine positive Identifizierung des Proteins, eine maximale Abdeckung der vollständigen Peptidsequenz sowie zusätzliche Informationen und Sequenzidentifizierungen liefern, die über die Informationen hinausgehen, die sich auf der Stufe des nicht verdauten Proteins ermitteln lassen.

Die Auswahl der am besten geeigneten Chromatographietechnik zur Trennung von Peptiden und zur Erstellung von Peptidmaps ist vom einzelnen Protein, den experimentellen Zielsetzungen sowie dem antizipierten Ergebnis abhängig. Das herausragende Auflösungsvermögen der Umkehrphasen-Chromatographie (RPC) macht diese Technik jedoch zur wichtigsten HPLC-Technik für Peptid-Mapping-Trennungen. Aufgrund der Verfügbarkeit von flüchtigen Eluenten als mobile Phase ist sie auch für analytische und präparative Trennungen ideal geeignet. Zu beachten ist, dass die bevorzugten Säulen für Peptid-Mapping-Trennungen den Säulen ähneln, die für niedermolekulare Verbindungen verwendet werden. Da jedoch die meisten Peptid-Mapping-Trennungen bei niedrigen pH-Werten und hohen Temperaturen durchgeführt werden, kommen routinemäßig Säulen mit hervorragender pH-Stabilität und minimalen Silanol-Effekten zum Einsatz.

Um ein erfolgreiches Peptid-Mapping zu gewährleisten, muss die gesamte Strategie der Charakterisierung sorgfältig geprüft werden. Ein Profil kann aus über 100 Peaks bestehen, die einzelne Peptide und ihre Derivate repräsentieren. Daher werden umfangreiche Kenntnisse der Probenvorbereitungsmethoden sowie leistungsstarke Trennungstechniken und validierte Protokolle benötigt. Wenn Sie über das entsprechende Fachwissen zur Entwicklung einer erfolgreichen Peptidmap verfügen, können Sie eine optimale Trennung von proteolytischen Verdauen und eine zuverlässige Peptidcharakterisierung erreichen.

Dieser praktische Leitfaden für Peptid-Mapping soll wichtige Bereiche für die Erstellung von Peptidmaps mithilfe der Umkehrphasen-Chromatographie erläutern. Darüber hinaus bietet er Informationen über grundlegende Techniken, die bei Peptid-Mapping-Verfahren eingesetzt werden, und zeigt auf, welche Aspekte zu berücksichtigen sind, damit Sie optimale Peptid-Mapping-Trennungen und bestmögliche Resultate erreichen.



Proteinverdau: Vorbereitung des Proteins zur Unterstützung der Peptid-Mapping-Trennung

Eine genaue Kenntnis der einzelnen Schritte für den Verdau des Proteins vor der Analyse ist eine wichtige Voraussetzung, um einen vollständigen, erfolgreichen Verdau zu gewährleisten und einen hohen Grad an Zuverlässigkeit für die ausgewählte Strategie zu erreichen. Häufig erfordert die Verdauermethode spezielle Entwicklungsprotokolle, um eine adäquate und stabile Probe für die LC-Injektion bereitzustellen. Um den Verdau zu optimieren, sind viele Optionen zu berücksichtigen. Es gibt jedoch eine

Reihe üblicher Vorgehensweisen, die befolgt werden sollten. Tabelle 1 zeigt eine Zusammenfassung der fünf Schritte des Proteinverdau: (1) Probenvorbereitung, (2) Auswahl des Spaltungsreagenzes, (3) Alkylierung/Reduktion, (4) Verdauprozess, (5) Anreicherung/Aufreinigung.

Tabelle 1

Die fünf Schritte des Proteinverdau

Verfahren	Beabsichtigter Effekt	Allgemeines Experiment
1. Vorbereitung der Probe	Vorbereitung der Probe für den Verdau	Abreicherung, Anreicherung, Dialyse, Entsalzung
2. Auswahl des Spaltungsreagenzes	Spezielle Spaltungsanforderungen	–
3. Reduktion und Alkylierung	Durch Reduktion werden Disulfidbindungen reduziert Durch Alkylierung werden SH-Gruppen modifiziert	Reduktion: DTT, 45 min, 60 °C Alkylierung: IAM, 1 Std., im Dunkeln
4. Verdauprozess	Spaltung der Proteine	Verdau: pH 8, 37 °C, über Nacht Quenching: TFA-Zugabe
5. Anreicherung/Aufreinigung	Vorbereitung der Probe für LC- oder LC/MS-Analyse	C18-Spitzen, Konzentration, Dialyse, Affinity-Säulen

Weitere Informationen über Agilent-Säulen für Peptid-Mapping finden Sie unter agilent.com/chem/advancebio

Schritt 1: Vorbereitung der Probe

In Abhängigkeit von der Größe bzw. der Konfiguration des Proteins gibt es verschiedene Herangehensweisen zur Vorbehandlung Ihrer Probe. Unter bestimmten Bedingungen kann es erforderlich sein, die Probe anzureichern oder das Protein von zugesetzten Substanzen und Stabilisatoren zu trennen, die bei der Formulierung des Produkts verwendet wurden, insbesondere, wenn diese den Prozess des Mappings beeinträchtigen. Es gibt eine Vielzahl von Methoden zur Durchführung dieser Verfahren, und für jedes Protein sind eigene Aufreinigungsmaßnahmen bzw. -prozesse erforderlich. Zu den häufig eingesetzten Herangehensweisen für die Proben-aufreinigung vor dem Verdau zählen jedoch die Abreicherung/Anreicherung, Dialyse und Entsalzung durch Gelfiltration.

Abreicherungs- und Anreicherungsstrategien wurden entwickelt, um hochkonzentrierte Proteine zu entfernen bzw. um Zielproteine in der Probe zu isolieren. Die Abreicherung wird in Proteomik-anwendungen häufiger eingesetzt, um die Komplexität biologischer Proben (z. B. Serum) zu reduzieren, die hohe Konzentrationen von Albumin und Immunglobulinen enthalten. Die HPLC-Säulen und Spin-Kartuschen des Agilent Multiple Affinity Removal Systems (MARS) ermöglichen die Identifizierung und Charakterisierung bedeutsamer, niedrig konzentrierter Proteine und Biomarker in Serum, Plasma und anderen biologischen Flüssigkeiten. Durch Abreicherung der 14 hoch konzentrierten Proteine mit MARS werden ca. 94 % der gesamten Proteinmasse entfernt. Der Abreicherungsprozess ist stabil, leicht automatisierbar und hoch effizient.



MARS ist in verschiedenen LC-Säulenabmessungen sowie Spin-Kartuschenformaten erhältlich. Zu den abgereicherten Proteinen zählen Albumin, IgG, Antitrypsin, IgA, Transferrin, Haptoglobin, Fibrinogen, Alpha-2-Makroglobulin, saures Alpha-1-Glykoprotein, IgM, Apolipoprotein AI, Apolipoprotein AII, C3-Komplement und Transthyretin.

Abreicherungsstrategien nutzen Immunitätsstechniken (z. B. Immunpräzipitation, Co-Immunpräzipitation und Immunitäts-Chromatographie). Alternativ isolieren Anreicherungstechniken Unterklassen von zellulären Proteinen basierend auf ihrer eindeutigen biochemischen Aktivität, posttranslationalen Modifikationen (PTMs) oder der räumlichen Lokalisation innerhalb der Zelle. Posttranslationale Modifikationen – wie Phosphorylierung und Glykosylierung – können angereichert werden, indem Affinitätsliganden wie Ionen-Metall-Affinitäts-chromatographie (IMAC) bzw. immobilisierte Lektine eingesetzt werden. Um eindeutige chemische Proteineigenschaften zu erreichen, setzen andere Techniken die metabolische oder enzymatische Einbindung von modifizierten Aminosäuren oder PTMs ein.

Ob einfach oder komplex – viele Proben erfordern Dialyse- oder Entsalzungsverfahren, um die Eignung und Optimierung für den Verdau zu gewährleisten. Da beispielsweise bei der Massenspektrometrie (MS) geladene Ionen gemessen werden, sollten Salze, insbesondere Natrium- und Phosphatsalze, vor der MS entfernt werden, damit diese die Detektion nicht beeinträchtigen. Dialyse- und Entsalzungsprodukte ermöglichen Pufferaustausch, Entsalzung oder die Entfernung niedermolekularer Verbindungen, um Beeinträchtigungen von nachfolgenden Prozessen zu vermeiden.

Die Dialyse ist ein etabliertes Verfahren zur Reduzierung der Salzkonzentration in Proben. Bei diesem Verfahren wird ein Dialysebeutel (Membranhülle mit definierter Porosität) gefüllt, abgebunden und in einem Wasser- oder Pufferbad platziert, in dem die Konzentration des Salzes durch Diffusion ausgeglichen wird. Höhermolekulare Verbindungen, die nicht durch den Beutel diffundieren können, verbleiben im Beutel. Wenn ein Wasserbad verwendet wird, nimmt die Konzentration der niedermolekularen Verbindungen im Beutel langsam ab, bis die Konzentration innerhalb und außerhalb des Beutels identisch ist. Sobald der Ausgleich erreicht ist, wird der Beutel aufgetrennt und die Lösung in ein Auffanggefäß abgegossen. Dialyse kann für Volumina bis zu einigen Litern eingesetzt werden, ist jedoch für große Probenvolumina weniger geeignet, da es mehrere Tage dauern kann, bis das Salz vollständig entfernt wurde.

Gelfiltration (GF) ist das praktischste Laborverfahren zur Entsalzung von Proben vor dem Verdau. Diese Methode ist eine nicht adsorptive Chromatographietechnik, mit der Moleküle anhand ihrer Molekulargröße getrennt werden. Entsalzung wird eingesetzt, um Salze vollständig aus der Probe zu entfernen oder die Konzentration von Salzen oder anderen Komponenten mit niedrigem Molekulargewicht zu senken, während beim Puffer-austausch der Probenpuffer durch einen neuen Puffer ersetzt wird.



Mit Agilent Bio SEC-Säulen lassen sich Proteinmischungen vor Peptid-Mapping-Anwendungen effektiv (nach Größe) klassifizieren und entsalzen.

Gelfiltration ist eine besonders einfach ausführbare Chromatographiemethode, da die Proben unter Verwendung einer isokratischen Elution verarbeitet werden. Mit der analytischen Form der Gelfiltration (auch als Größenausschluss-Chromatographie bezeichnet) kann zwischen Molekülen (z. B. Proteinen) mit einer Molekulargewichtsdifferenz von weniger als dem Faktor 2 unterschieden werden. Bei diesen Anwendungen ist die Größendifferenz zwischen den getrennten Substanzen sehr groß (d. h. Proteine gegenüber Salzen). Es wird ein Gelfiltrationsmedium ausgewählt, das die höhermolekularen Verbindungen vollständig ausschließt, während die niedermolekularen Verbindungen frei in alle Porenräume diffundieren können. Die Säule wird mit einem Puffer äquilibriert, der mit dem der Probe identisch oder ein anderer sein kann. Nach dem Applizieren der

Probe auf die Säule wird mehr Säulenpuffer (Elutionspuffer) zugesetzt, um die Probenmoleküle in der Säule nach unten zu tragen. Die höhermolekularen Verbindungen, die nicht in die Poren des Mediums eindringen können, eluieren zuerst aus der Säule, gefolgt von den niedermolekularen Verbindungen, die in die Poren diffundieren, wodurch diese gegenüber den höhermolekularen Verbindungen langsamer eluiert werden. Wenn der Elutionspuffer ein anderer ist als der der applizierten Probe, werden die höhermolekularen Verbindungen aus den ursprünglichen Salzen entfernt und eluieren in diesen neuen Puffer, vollständig getrennt vom ursprünglichen Probenpuffer.

Captiva Filter für niedrige Proteinbindung

Unabhängig davon, welche Art der Probenvorbereitung Sie durchführen, empfiehlt es sich, die Probe mit einem Filter mit niedriger Proteinbindung zu filtrieren.

Agilent PES-Filter sorgen für eine zuverlässige und konsistent niedrige Proteinbindung für die Filtration proteinhaltiger Proben. Für die meisten LC-Analysen sind PES-Filtermembranen besser geeignet als PVDF-Membranen. Agilent PES hat eine mit PVDF-Filtern vergleichbare Kompatibilität für übliche LC-Lösungsmittel und ist diesen hinsichtlich der Proteinbindung und Reinheit überlegen. Weitere Informationen finden Sie unter agilent.com/chem/filtration

Captiva PES-Filter

Durchmesser (mm)	Porengröße (µm)	Zertifizierung	Gehäuse	Bestellnummer
15	0,2	LC/MS	Polypropylen	5190-5096
4	0,45	LC	Polypropylen	5190-5095
4	0,2	LC/MS	Polypropylen	5190-5094
15	0,45	LC	Polypropylen	5190-5097
25	0,2	LC/MS	Polypropylen	5190-5098
25	0,45	LC	Polypropylen	5190-5099



Weitere Informationen über Agilent-Säulen für Peptid-Mapping finden Sie unter agilent.com/chem/advancebio

Schritt 2: Auswahl der Spaltungsreagenzien

Es gibt zwei Methoden zur Spaltung von Peptidbindungen – chemisch und enzymatisch. Die chemische Spaltung erfordert die Verwendung von nukleophilen, nicht-enzymatischen Reagenzien wie Cyanobromid (CNBr), um die Peptidbindung in einem bestimmten Bereich chemisch zu spalten, während proteolytische Enzyme wie Trypsin sich als äußerst nützlich für verschiedene lokationsspezifische Spaltungen erwiesen haben. Welche Spaltungsmethode und welches Spaltungsreagenz am besten geeignet sind, hängt vom zu testenden Protein und den Erwartungen an die Analyse ab. Darüber hinaus sollten während des Auswahlprozesses das gesamte Peptid-Mapping-Verfahren überprüft und die zugehörigen Charakterisierungen berücksichtigt werden. Aufgrund seiner gut definierten Spezifität wird Trypsin am häufigsten als Spaltungsreagenz für Peptid-Mapping eingesetzt. Trypsin hydrolysiert nur Peptidbindungen, bei denen auf die Carbonylgruppe entweder Arginin (Arg) oder Lysin (Lys) folgt.

In **Tabelle 2** sind verschiedene gebräuchliche Spaltungsreagenzien und ihre Spezifität dargestellt.

Tabelle 2

Spaltungsart		
Spaltungsart	Spaltungsreagenz	Spezifität
Enzymatisch	Trypsin	C-terminale Seite von Arg und Lys
	Pepsin	Nicht spezifisch
	Chymotrypsin	C-terminale Seite von hydrophoben Rückständen
	Glutamyl-Endopeptidase	C-terminale Seite von Glu und Asp
Chemisch	Cyanobromid	C-terminale Seite von Met
	Verdünnte Säure	Asp und Pro
	BNPS-Skatol	Trp

Schritt 3: Denaturierung, Reduktion und Alkylierung

Damit das proteolytische Enzym die Peptidketten effizient spaltet, müssen die meisten Proben unter Verwendung verschiedener Reagenzien denaturiert, reduziert und alkyliert werden. Denaturierung und Reduktion können oft gleichzeitig durchgeführt werden, indem eine Kombination aus Erhitzen und einem Reagenz, z. B. 1,4-Dithiothreitol (DTT), Mercaptoethanol oder Tris-(2-carboxyethyl)-Phosphin, eingesetzt wird. Am häufigsten wird DTT eingesetzt, ein stark reduzierendes Reagenz, das die Disulfidbindungen reduziert und die inter- sowie intramolekulare Disulfidbildung zwischen Cysteinen im Protein verhindert. Durch Kombination von Denaturierung und Reduktion kann Renaturierung aufgrund der Reduktion von Disulfidbindungen verhindert werden – ein Problem, das auftritt,

wenn Erhitzen als alleiniges Denaturierungsmittel eingesetzt wird. Nach der Proteindenaturierung und -reduktion ist die Alkylierung von Cystein erforderlich, um eine potenzielle Renaturierung weiter zu verhindern. Die am häufigsten eingesetzten Reagenzien für die Alkylierung von Proteinproben vor dem Verdau sind Iodacetamid (IAM) und Iodessigsäure (IAA).

Abbildung 1 zeigt ein gutes Beispiel für eine Trennmethode mit Umkehrphasen-Chromatographie, die zur Prüfung der Vollständigkeit der Reduktion und Alkylierung von monoklonalen Antikörpern vor dem Verdau verwendet wird.

Abbildung 1 – Reduktions-/Alkylierungsprofil mit Umkehrphasen-Chromatographie

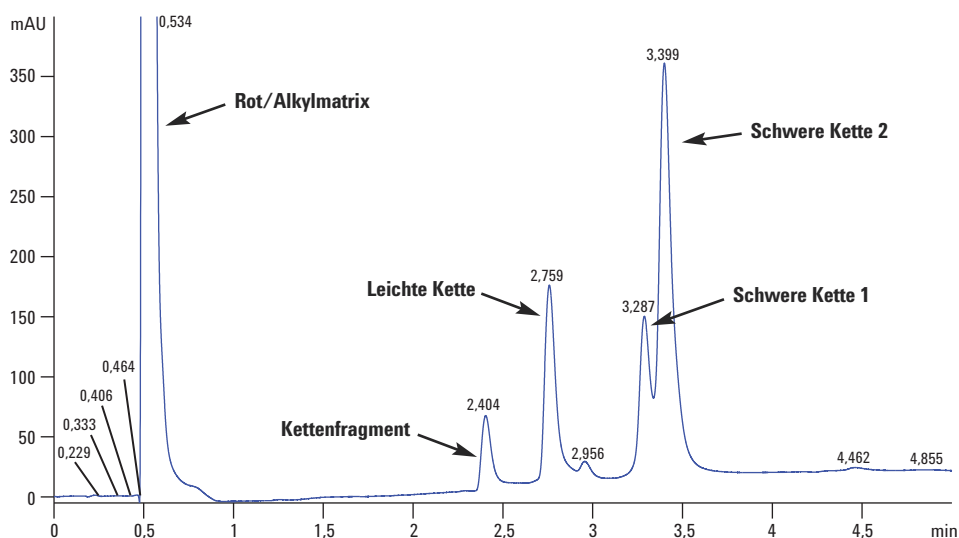


Abbildung 1 – Umkehrphasentrennung von reduzierten und alkylierten monoklonalen Antikörpern vor dem Verdauprotokoll unter Verwendung einer Agilent Rapid Resolution High Definition-Säule (RRHD) 300SB-C8, 2,1 x 50 mm (Agilent Best.-Nr. 857750-906). Die Trennung wurde bei 0,5 mL/min, 75 °C mit Wasser (0,1 % TFA)/ACN (0,08 %) unter multi-segmentierten Bedingungen auf Agilent 1290 Infinity LC ausgeführt.

Schritt 4: Verdau

Wie bereits erwähnt ist Trypsin aufgrund seiner gut definierten Spezifität die am häufigsten eingesetzte Protease für den Verdau. Da Trypsin ein Protein ist, kann es sich in einem als Autolyse bezeichneten Prozess selbst verdauen. Ca^{++} , das natürlich in den meisten Proben vorkommt, bindet jedoch am Ca^{++} -bindenden Ring in Trypsin und verhindert die Autolyse. In den meisten Laboren wird derzeit modifiziertes Trypsin eingesetzt. Dadurch wird Autolyse zusätzlich verhindert, sodass sie üblicherweise kein größeres Problem darstellt.

Der tryptische Verdau wird bei einem optimalen pH-Wert im Bereich von 7,5 bis 8,5 und üblicherweise bei 37 °C durchgeführt. Um einen optimalen pH-Wert für die enzymatische Spaltung zu erreichen, wird vor der Zugabe von Trypsin ein Puffer zugesetzt – üblicherweise 50 mM Triethylammoniumbicarbonat (tABC) oder 12,5 mM Ammoniumbicarbonat (ABC). Ein Puffer aus 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol (TRIS) kann ebenfalls zu diesem Zweck verwendet werden. Dabei sollte jedoch berücksichtigt werden, dass der TRIS-Puffer nicht für MS-Analyse geeignet ist, wie z. B. MALDI und ESI-MS, und durch Festphasenextraktion (SPE) oder ZipTips abgereichert werden muss. Um eine ausreichende – aber nicht zu große – Enzymmenge für die Durchführung des Verdau zu gewährleisten, ist das richtige Enzym-Protein-Verhältnis entscheidend.

Proteine können sich in verschiedenen Umgebungen unterschiedlich verhalten, und beim Verdau von Modellproteinen in einer Mischung wurden weniger effektive Ergebnisse beobachtet als beim separaten Verdau. Ein Grund hierfür könnte der erhöhte Wettbewerb um die Trypsin-Spaltstellen beim gemeinsamen Verdau der Proteine sein. Darüber hinaus können viele Faktoren und Bedingungsparameter vorliegen, die die Vollständigkeit und Effektivität des Verdau von Proteinen beeinflussen, wodurch eine Vielzahl antizipierter Ergebnisse möglich ist. Wenn diese Faktoren sorgfältiger untersucht und gesteuert werden, lassen sich die Ergebnisse des Verdau deutlich verbessern. Der pH-Wert der Reaktion, die Verdauzeit und -temperatur und die Menge des verwendeten Spaltungsreagenzes sind wichtige Faktoren für die Effektivität des Verdau.

- **Verdau-pH.** Im Allgemeinen wird der pH-Wert der Verdaumischung empirisch bestimmt, um die optimale Leistungsfähigkeit eines bestimmten Spaltungsreagenzes zu gewährleisten. Wenn beispielsweise Cyanobromid als Spaltungsreagenz verwendet wird, ist eine hoch saure Umgebung (z. B. pH 2, Ameisensäure) erforderlich. Wenn jedoch Trypsin als Spaltungsreagenz verwendet wird, ist eine leicht alkalische Umgebung (pH 8) optimal. Als allgemeine Regel gilt, dass der pH-Wert des Reaktionsmilieus die chemische Integrität des Proteins während des Verdau bzw. des Verlaufs der Fragmentierungsreaktion nicht verändern darf.
- **Verdauzeit und -temperatur.** Zeit und Temperatur sind für einen optimalen Verdau von entscheidender Bedeutung. Um chemische Reaktionen zu vermeiden, wird für die meisten Proteinverdau eine Temperatur von 25 °C bis 37 °C empfohlen. (Trypsinverdau werden z. B. üblicherweise bei 37 °C ausgeführt). Die Art und Größe des Proteins bestimmt jedoch schlussendlich die Reaktionstemperatur, bedingt durch die Proteindenaturierung mit steigender Reaktionstemperatur. Die Reaktionszeit ist ein weiterer Faktor, der bei der Optimierung des Verdauprotokolls zu berücksichtigen ist. Wenn ausreichend Probenmaterial zur Verfügung steht, sollte eine experimentelle Untersuchung erwogen werden, um die optimale Zeit zum Erhalt einer reproduzierbaren Map zu bestimmen und gleichzeitig unvollständigen Verdau zu vermeiden. Die Verdauzeit beträgt in Abhängigkeit von der Probengröße und -art zwischen 2 und 30 Stunden. Die Reaktion kann dabei durch Zugabe einer Säure, die das Mapping nicht beeinflusst, oder durch Gefrieren gestoppt werden.
- **Konzentration des Spaltenzym.** Die Konzentration des Spaltungsreagenzes sollte möglichst niedrig gehalten werden, um eine Beeinflussung der Mapping-Muster zu vermeiden. In vielen Fällen wird eine große Menge an Spaltungsreagenz eingesetzt, um eine hinlänglich schnelle Verdauzeit zu erreichen (d. h. 6 bis 20 Stunden). Die Verwendung erhöhter Mengen sollte jedoch sorgfältig abgewogen werden. Im Allgemeinen wird ein Protein-Protease-Verhältnis von 10:1 bis 200:1 verwendet, und es empfiehlt sich, das Spaltungsreagenz in mindestens zwei Schritten zuzusetzen, um die Spaltung zu optimieren. In vielen Standardverfahren für den Trypsinverdau wird Trypsin auf diese Weise zugesetzt. Dabei bleibt das finale Reaktionsvolumen dennoch klein genug, um die Trennung zu ermöglichen – der nächste Schritt im Peptid-Mapping. Um Verdauartefakte zu bereinigen, die die nachfolgende Analyse beeinträchtigen könnten, wird eine Blindwertbestimmung unter Verwendung eines Kontroll-Verdau mit allen Reagenzien mit Ausnahme des Testproteins durchgeführt.

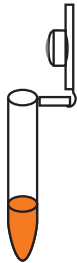
Weitere Informationen über Agilent-Säulen für Peptid-Mapping finden Sie unter

[agilent.com/chem/advancebio](https://www.agilent.com/chem/advancebio)

Die unten beschriebene und in den **Abbildungen 2 und 3** zusammengefasste Methode des Trypsinverdaus ist ein übliches Verfahren für die Reduktion, Alkylierung, den Verdau in Lösung und die Aufreinigung des Proteins (0,5 mg). Das Verfahren ist für kleinere Proteinmengen skalierbar. Zusätzlich ist eine nützliche Liste mit Agilent Reagenzien und Bestellnummern angegeben.

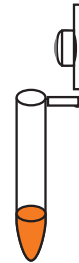
Abbildung 2 – Verfahren des Trypsinverdaus (Teil I-V)

0,5 mg Protein
25 µL Ammoniumbicarbonat-Stammlösung
25 µL TFE
1,0 µL DTT-Stammlösung



1. Protein resuspendieren, denaturieren und reduzieren.
 (Vortexen; 1 Std. bei 60 °C oder 20 Min. bei 90 °C erhitzen)

4,0 µL IAM-Stammlösung
zugeben



2. Alkylieren.
 Im Dunkeln durchführen.
 (1 Std. bei Raumtemp.)

1,0 µL DTT-Stammlösung
zugeben



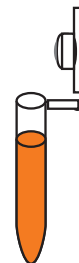
3. Überschüssiges IAM quenchen.
 Im Dunkeln durchführen.
 (1 Std. bei Raumtemp.)

300 µL Wasser + 100 µL
Ammoniumbicarbonat-Stammlösung
zugeben



4. Verdünnen und pH-Wert anpassen
 (pH 7–9).

Trypsin-Stammlösung **zugeben**



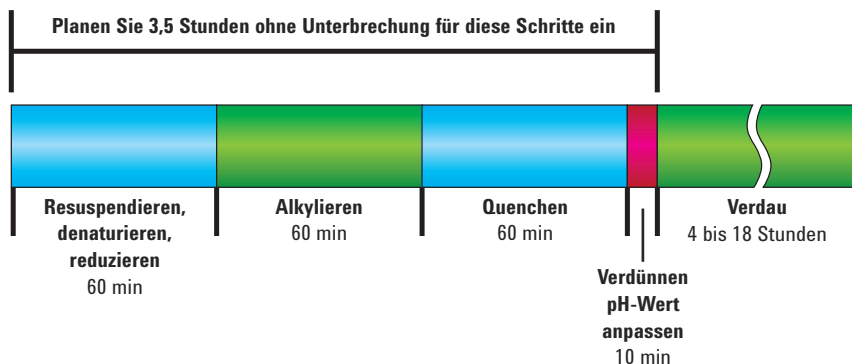
5. Verdau
 (4 bis 18 Std. bei 37 °C).

1 µL Ameisensäure oder
TFA **zugeben**



6. pH-Wert auf <4 reduzieren.

Abbildung 3 – Erwarteter zeitlicher Ablauf für das Verdauverfahren



Reduktion, Alkylierung, Vorbereitung der Verdauung: Zusammenfassung

100 mM Ammoniumbicarbonat: Geben Sie 100 mL Wasser zu 0,7906 g Ammoniumbicarbonat. Die Lösung kann im Kühlschrank bis zu zwei Monate lang bei 4 °C gelagert werden.

Trypsin-Stammlösung: Modifiziertes Trypsin ist erhältlich als: Agilent Trypsin, Proteomik-Qualität (Best.-Nr. 204310, siehe nächste Seite „Reagenzien und Ausrüstung“). Es ist lyophilisiert und kann in dieser Form über ein Jahr lang ohne wesentlichen Aktivitätsverlust bei -20 °C gelagert werden. Falls erforderlich, bereiten Sie die Trypsin-Stammlösung vor, indem Sie das lyophilisierte Trypsin in 100 µL 50 mM Essigsäure bis zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml hydratisieren. Um häufiges Einfrieren und Auftauen zu vermeiden und die Lagerstabilität zu erhöhen, teilen Sie das hydratisierte Trypsin auf vier separate Röhrchen von jeweils ca. 10 µL auf. Lagern Sie die Aliquots bei -20 °C in einem nicht selbstabtauenden Gefriergerät. Diese 1-µg/µL-Lösung wird verwendet, um die Trypsin-Zwischenlösung nach Bedarf vorzubereiten (siehe unten). Dem Agilent Trypsin in Proteomik-Qualität liegt Fachliteratur mit einer Beschreibung eines Alternativprotokolls für den tryptischen Verdau bei. Wir haben die nachstehende Methode angewendet und sie für effizient und zuverlässig befunden.

200 mM DTT: Geben Sie in einem 1,5-mL-Eppendorf-Röhrchen 1 mL Wasser zu 0,031 g DTT. Vortexen Sie. Teilen Sie die DTT-Lösung in geeignete Aliquots (von z. B. 100 µL) in Mikrozentrifugenröhrchen auf. Lagern Sie die Aliquots bis zu einen Monat lang bei -20 °C in einem nicht selbstabtauenden Gefriergerät. Nicht auftauen und wieder einfrieren.

200 mM IAM (direkt vor der Verwendung vorbereiten): Geben Sie in einem 1,5-mL-Eppendorf-Röhrchen 1 mL Wasser zu 0,037 g IAM. Vortexen Sie.

Protokoll für den Trypsinverdau

Resuspension, Denaturierung und Reduktion des Proteins

1. Geben Sie 0,5 mg Gesamtprotein in ein 0,5-mL-Eppendorf-Röhrchen.
2. Geben Sie 25 µL Ammoniumbicarbonat-Stammlösung zu.
3. Geben Sie 25 µL TFE-Denaturierungsmittel zu.
4. Geben Sie 1,0 µL DTT-Stammlösung zu.
5. Vortexen Sie, um zu mischen.
6. Erhitzen Sie die Mischung zur Denaturierung unter einer der folgenden Bedingungskombinationen:
 - ✓ 45 Minuten bis 1 Stunde bei 60 °C
 - ✓ 20 Minuten (hydrophile Proteine) bis 1 Stunde (hydrophobe Proteine) bei 90 °C
7. Kühlen Sie auf Raumtemperatur hinab.

Akylierung

1. Geben Sie 4,0 µL IAM-Stammlösung zu.
2. Vortexen Sie kurz.
3. Inkubieren Sie die Probe eine Stunde lang im Dunkeln (mit Folie bedecktes Gestell) und bei Raumtemperatur.

Quenching des überschüssigen IAM

1. Geben Sie 1,0 µL DTT-Stammlösung zu, um überschüssiges IAM zu zerstören.
2. Lassen Sie die Probe 1 Stunde im Dunkeln (mit Folie bedecktes Gestell) und bei Raumtemperatur stehen.

Verdünnung und Anpassung des pH-Werts

1. Geben Sie 300 µL Wasser zu, um das Denaturierungsmittel zu verdünnen.
2. Geben Sie 100 µL Ammoniumbicarbonat-Stammlösung zu, um den pH-Wert zu erhöhen.
3. Prüfen Sie ggf. den pH-Wert, indem Sie 0,5 bis 1 µL auf einen Streifen pH-Indikatorpapier geben. Der typische Wert liegt bei 7,5 bis 8,0. Es ist wichtiger, den pH-Wert zu überprüfen, wenn der pH-Wert der Anfangsprobe unbekannt ist.
4. Geben Sie mehr Basislösung zu (Ammoniumbicarbonat), wenn der pH-Wert nicht im Bereich von 7 bis 9 liegt.

Verdau

1. Bereiten Sie frische Trypsin-Stammlösung in Trypsin-Aufbewahrungslösung zu. Warten Sie 15 Minuten ab, um eine vollständige Resuspension zu erreichen.
2. Wenn Sie einen Verdau von weniger als 20 µg Gesamtprotein planen, bereiten Sie eine Trypsin-Zwischenlösung vor, indem Sie die Stammlösung 10-fach verdünnen. Geben Sie dazu 45 µg hochreines Wasser zu. Diese 100-ng/µL-Lösung kann bei -20 °C ohne wesentlichen Aktivitätsverlust zwei Monate lang gelagert werden.
ACHTUNG: Wenn IAM nicht zerstört wurde, wird Lysin langsam alkyliert.
3. Geben Sie Trypsin-Stammlösung in einem Gewichtsverhältnis Enzym:Substrat von 1:20 bis 1:50 zu. Geben Sie z. B. für 500 µg Protein zwischen 10 und 25 µg Trypsin zu (10 bis 25 µL Trypsin-Stammlösung).
4. Vortexen Sie kurz.
5. Platzieren Sie das Röhrchen in der Heizvorrichtung und inkubieren Sie 4 bis 18 Stunden lang bei 37 °C.
6. Kühlen Sie die Lösung.

Senkung des pH-Werts, um Trypsin-Aktivität zu stoppen

1. Geben Sie 1 µL unverdünnte Ameisensäure oder TFA zu, um den pH-Wert zu senken und die Trypsin-Aktivität zu stoppen.
Wenn Sie entsalzen möchten, verwenden Sie TFA, da diese die Peptidbindung an das Harz bei der Aufreinigung unterstützt.
2. Vortexen Sie kurz.
3. Optional können Sie den pH-Wert der Probe prüfen (üblicherweise 3,0 bis 3,3). Geben Sie mehr Säure zu, wenn der pH-Wert über 4 liegt.

Aufreinigung des Verdaus

1. Je nach Ursprung der Probe kann es notwendig sein, vor der MS-Analyse eine Entsalzung durchzuführen.
2. Wenn Entsalzen nicht notwendig ist, aber die Probe trüb erscheint, filtern Sie die Probe vor der MS. Verwenden Sie dazu Agilent Spin-Filter, Best.-Nr. 5185-5990.
Die Trübung kann durch Zellreste in der Probe verursacht werden.
3. Verdünnen Sie ein Aliquot der Probe je nach Notwendigkeit für die Analyse.
Wenn das Protein ein Molekulargewicht von 50 kDa hat und der Verdau vollständig abgeschlossen wurde, hat die Lösung etwa 20 pmol/µL.
Wenn Ihre Probe weniger komplex ist, verdünnen Sie sie, bis Sie eine Lösung mit 50 fmol/µL erhalten.

Weitere Informationen über Agilent-Säulen für Peptid-Mapping finden Sie unter [agilent.com/chem/advancebio](https://www.agilent.com/chem/advancebio)

Schritt 5: Aufreinigung und Anreicherung von Verdauen

Vor dem Peptid-Mapping ist üblicherweise eine Aufreinigung bzw. Anreicherung erforderlich, um die Peptidmaps erfolgreich analysieren zu können. Es gibt viele Methoden zur Durchführung der Aufreinigung und Anreicherung. Die richtige Wahl hängt von der Art der Probe und dem angestrebten Ziel ab. So wird z. B. die Anreicherung für bestimmte PTMs (z. B. Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Glykosylierung) durch Affinitätsreinigung unter Verwendung von PTM-spezifischen Antikörpern oder Liganden durchgeführt, während Phosphopeptide durch IP angereichert werden können, unter Verwendung von anti-phospho-spezifischen Antikörpern oder durch Pull-Down unter Verwendung von TiO₂, welches phosphoryliertes Serin, Tyrosin oder Threonin selektiv bindet.

Nach der Peptidanreicherung können Salze und Puffer entfernt werden, indem entweder Graphit- oder C-18-Spitzen oder -Säulen verwendet werden. Detergenzien können durch Verwendung von Affinity-Säulen oder mit Reagenzien, die Detergenzien ausfällen, entfernt werden. Verdünnte Proben können auch mithilfe von Konzentratoren mit unterschiedlichen Molekülmassen-Ausschluss-grenzen (MWCO) konzentriert werden. Nach der Reinigung sind die Peptidproben bereit für die finale Vorbereitung zur MS-Analyse, die sich nach der Art der Analyse richtet. Für LC/MS- und LC-MS/MS-Analysen ist eine sorgfältige Auswahl der mobilen Phasen und Ionenpaarreagenzien erforderlich, um gute LC-Auflösung und Analyseergebnisse zu erhalten. Für MALDI-MS muss die Peptidprobe mit bestimmten Matrices (kristalline, energieabsorbierende Farbmoleküle) kombiniert werden, die anschließend vor der Analyse auf MALDI-Platten getrocknet werden.

Reagenzien und Ausrüstung

Benötigtes Produkt	Beispiel
Ammoniumbicarbonat, Reagenzqualität	Sigma Katalog-Nr. A-6141
Dithiothreitol (DTT), >99+ %	Sigma Katalog-Nr. D-5545
Iodacetamid (IAM), 97 %	Sigma-Aldrich Katalog-Nr. I-670-9
Trifluorethanol (TFE), 99+ %	Sigma-Aldrich Katalog-Nr. T63002-100G
Trypsin, modifiziert	Agilent Trypsin, Proteomik-Qualität (Best.-Nr. 204310)
Wasser, 18 Megaohm oder äquivalent	Agilent Best.-Nr. 8500-2236
Ameisensäure, Analysequalität oder Trifluoressigsäure, Sequenzierungsqualität	Agilent Best.-Nr. G2453-85060
Eppendorf Safe-Lock-Mikrozentrifugenröhrchen, natürlich, nicht silikonisiert	Eppendorf Best.-Nr. 022363611 (0,5 mL, 500 St.) oder Best.-Nr. 022363204 (1,5 mL, 500 St.)
Mikropipettierer und Spitzen: Bereich 1–1.000 µL	
Temperiergerät	Eppendorf Thermomixer
pH-Indikatorstreifen, pH-Bereiche 2,5–4,5 und 7,0–9,0	EM Science ColorpHast-Streifen, Katalog-Nr. 700181-2
Analysenwaage	
Bond Elut OMIX-Spitzen, 10 µL (Elutionsvolumen 2–10 µL)	1x96 Spitzen (Agilent Best.-Nr. A5700310); 6x96 Spitzen (Agilent Best.-Nr. A5700310K)
Bond Elut OMIX-Spitzen, 100 µL (Elutionsvolumen 10–100 µL)	1x96 Spitzen (Agilent Best.-Nr. A57003100); 6x96 Spitzen (Agilent Best.-Nr. A57003100K)



Für die Aufreinigung kleiner Peptidvolumina: Bond Elut OMIX-Spitzen

Bond Elut OMIX-Methode (10-µL-Volumen) zur Peptidverdau-Aufreinigung

Vorbehandlung der Probe	Stellen Sie die Probe auf eine Konzentration von 0,5 % bis 1,0 % Trifluoressigsäure (TFA) ein, indem Sie eine 2,5 %ige TFA-Lösung verwenden.
Konditionierung und Äquilibration	10 µL von 50 % Acetonitril (ACN):Wasser ansaugen und Lösungsmittel verwerfen. Wiederholen. 10 µL von 1,0 % TFA-Lösung ansaugen und Lösungsmittel verwerfen. Wiederholen.
Applikation der Probe	Nehmen Sie bis zu 10 µL der vorbehandelten Probe in die OMIX-Spitze auf. Geben Sie diese ab und nehmen Sie die Probe für maximale Effizienz in drei bis fünf Zyklen auf. Für eine verbesserte Bindung können bis zu zehn Zyklen verwendet werden.
Spülen	Nehmen Sie 10 µL 0,1 %igen TFA-Puffer auf und verwerfen Sie das Lösungsmittel. Wiederholen Sie den Schritt.
Elution	LC/MS- oder LC/MS/MS-Analyse: Nehmen Sie 2 bis 10 µL 0,1 %ige Ameisensäure oder 0,1 %ige Essigsäure in 50- bis 75 %ige Acetonitril- oder 50- bis 75 %ige Methanollösung auf und geben Sie diese in eine Autosamplerflasche oder Well-Plate.

Um optimale Ergebnisse zu gewährleisten, stellen Sie die Pipette für die Äquilibration, Probenapplikation und für das Spülen so ein, dass sie dem Spitzenvolumen von 10 µL entspricht.

Für Peptidanwendungen mit hohem Durchsatz: Automatisierte Lösungen zur Probenvorbereitung für Peptid-Mapping

„Durch die Kombination von extrem konsistenten, parallelisierten Verdauen mit der automatisierten Umkehrphasen-Aufreinigung über AssayMAP... konnten wir kollaborative Studien für bislang unbekannte Größenordnungen und Durchsätze in Betracht ziehen.“

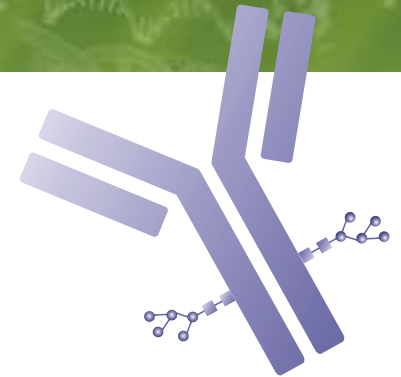
*Jacob D. Jaffe, Ph.D.
Assistant Director – Proteomics Platform*



Weitere Informationen zur automatisierten Probenvorbereitung für Peptid-Mapping finden Sie auf **Seite 22**.

Weitere Informationen über Agilent-Säulen für Peptid-Mapping finden Sie unter
agilent.com/chem/advancebio

Umkehrphasen-Chromatographie – Die erste Wahl für Peptid-Mapping



Die Auswahl der geeigneten Säule und Methode zur Erstellung von Peptidmaps ist letztlich vom kartierten Protein und den Zielsetzungen des Workflows abhängig. Die am häufigsten eingesetzte Säulenmethode für Peptid-Mapping, insbesondere in der biopharmazeutischen Branche, ist die Umkehrphasen-Chromatographie (RPC). Ihre hervorragende Auflösungsleistung und die Verwendung flüchtiger mobiler Phasen (kompatibel mit Massenspektrometrie) haben dazu geführt, dass diese Technik zur wichtigsten HPLC-Methode für die meisten Peptidtrennungen geworden ist. Sie ist anderen Verfahren der HPLC-Trennung in Geschwindigkeit und Effizienz überlegen. **Abbildung 4** zeigt eine gut aufgelöste Peptidtrennung unter Verwendung von Rinderalbumin (BSA). Gut sichtbar ist die Vielzahl der Peptid-Peakfragmente, die durch Verwendung von RPC für Peptid-Mapping aufgelöst werden können.

Abbildung 4 – Umkehrphasen-Peptid-Mapping-Trennung

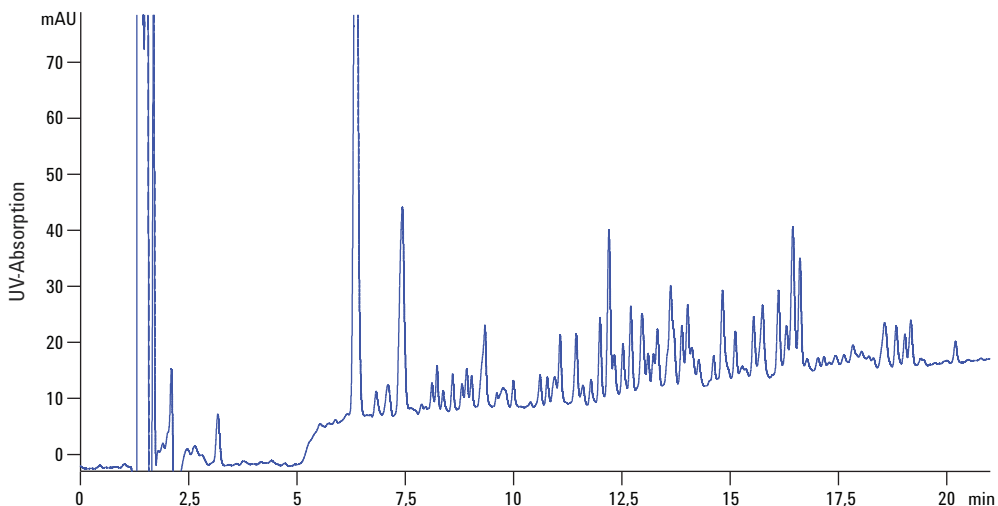
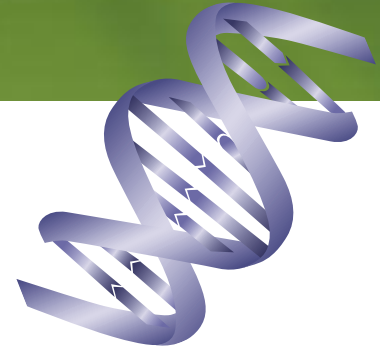


Abbildung 4 – Umkehrphasentrennung von BSA unter Verwendung einer Agilent Polaris C18-A Säule mit 2,0 x 150 mm (Agilent Best.-Nr. A2001150X020).

Anforderungen an eine erfolgreiche Peptid-Mapping-Trennung



Die allgemeine Herangehensweise zur Entwicklung einer praktischen RPC-Methode für Peptid-Mapping erfordert eine genaue Kenntnis der peptidspezifischen Säulenanforderungen und chromatographischen Methodenentwicklung. Für die Trennung von Peptiden gelten viele der chromatographischen Prinzipien, die auch bei der Trennung niedermolekularer Verbindungen zur Anwendung kommen. Gleichzeitig gibt es jedoch verschiedene konditionsspezifische Variablen, die wichtig

sind, um die Peptidmethode zu optimieren und eine reproduzierbare und stabile Trennung zu erreichen. Die Wahl der Säule, die Säulenqualität, die Wahl der mobilen Phase sowie die Detektionsanforderungen sind wichtige Faktoren für Peptid-Mapping-Trennungen, die die Qualität Ihrer Peptidmaps deutlich steigern können.

Auswahl der geeigneten Säule

Der wichtigste Aspekt für das Erreichen einer zuverlässigen, gut aufgelösten Peptid-Mapping-Trennung ist die Auswahl der passenden Säule. Die Porengröße der Säule, Partikeltyp und -größe, die Zusammensetzung der gebundenen Phase sowie die Stabilität (chemisch und gepacktes Säulenbett) sind Faktoren, die für die Durchführung der Peptid-Mapping-Trennung, die Optimierungsstrategie und die Spektrometrieanalyse eine entscheidende Rolle spielen. Für Peptidtrennungen liegt die bevorzugte Säulenporengröße bei 100 Å bis 120 Å. Die optimale Phasenauswahl ist üblicherweise C18. Einige im Handel erhältliche Säulen bieten Porengrößen für Peptide bis zu 60 Å. Diese sind jedoch üblicherweise für kleinere Peptidfragmenttrennungen oder Standardanalysen vorgesehen. Ebenso werden kürzere Kohlenstoffkettenlängen der gebundenen Phase verwendet, diese sind jedoch nur für bestimmte Methoden geeignet und nur begrenzt einsetzbar, um die Retention für ein breites Spektrum der Peptidhydrophobie zu erreichen.

Trennungen von Peptiden liefern aufgrund ihres höheren Diffusionskoeffizienten niedrigere Trennstufenzahlen. Günstig ist daher die Verwendung von vollständig porösen Säulenmaterialien mit kleinerem Durchmesser und langsameren Flussraten. Dies hat zu einer zunehmenden Nutzung von Sub-2 µm-Packungen geführt, um effizientere Peptidmaps zu erreichen. Seit einiger Zeit werden jedoch oberflächenporöse Säulen für biologische Trennungen – insbesondere in der biopharmazeutischen Branche – immer beliebter, da sie die Einschränkungen der Protein- und Peptid-massendiffusion berücksichtigen. Diese Säulen bieten einen kürzeren Diffusionspfad und erlauben damit die Trennung höhermolekularer Verbindungen bei hohen linearen Geschwindigkeiten ohne eine Zunahme des Systemrückdrucks, wie sie bei kleineren Partikeln auftritt. **Abbildung 5** zeigt ein Beispiel einer schnellen, hochauflösenden Peptidmap, die mit einer oberflächenporösen Säule erstellt wurde.



Weitere Informationen über Agilent-Säulen für Peptid-Mapping finden Sie unter agilent.com/chem/advancebio

Abbildung 5 – Schnelle und effiziente hochauflösende Peptid-Mapping-Sequenz für Rinderserum-Albumin (BSA)

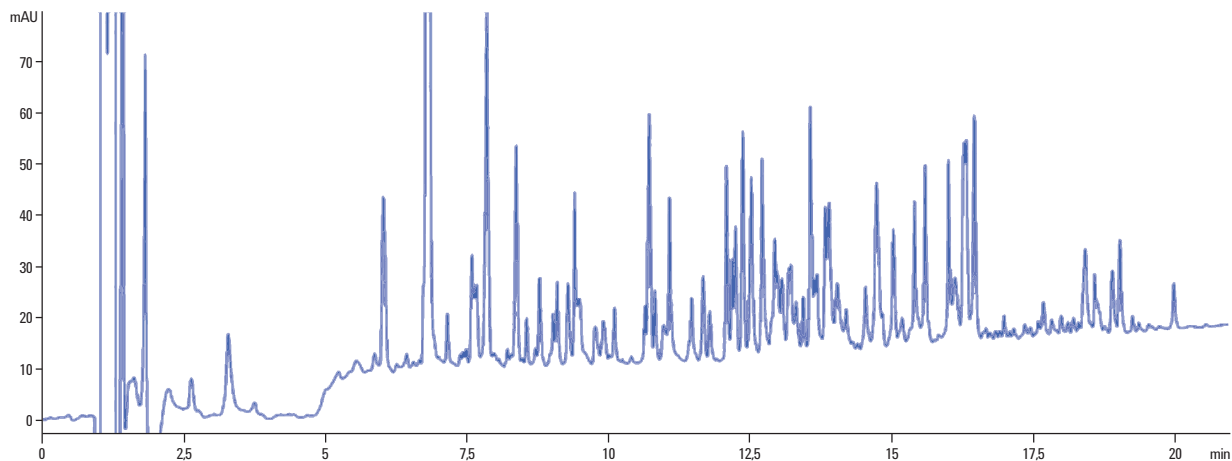


Abbildung 5 – Umkehrphasentrennung von BSA unter Verwendung einer Agilent AdvanceBio Peptid-Mapping-Säule mit 2,1 x 150 mm (Agilent Best.-Nr. 653750-902). Die Peptid-Mapping-Trennung wurde bei 0,3 mL/min und 40 °C unter Verwendung von Wasser (0,1 % TFA)/ACN (0,08 %) mit linearem Gradienten durchgeführt.

Die Säulenqualität, d. h. die Reproduzierbarkeit und Stabilität von Lauf zu Lauf, ist eine entscheidende und manchmal vernachlässigte Voraussetzung für reproduzierbare und zuverlässige Peptid-Mapping-Trennungen. Umkehrphasentrennungen von Peptiden werden üblicherweise mit einem niedrigen pH-Wert (pH 3) und erhöhten Temperaturen (40 °C) ausgeführt. Peptidmaps erfordern einen reproduzierbaren Betrieb der Säule, damit präzise Mapping-Fingerabdrücke und wiederholte Validierungsprotokolle erstellt werden können. Bei der Auswahl einer Säule für Peptid-Mapping sollte die Säulenqualität im Entscheidungsfindungsprozess oberste Priorität haben. **Abbildung 6** zeigt ein hervorragendes Beispiel für eine reproduzierbare Peptidmap eines tryptischen Verdau eines monoklonalen Antikörpers, der mit LC/MS-Analyse bei niedrigem pH-Wert und erhöhter Temperatur getrennt wurde.

Abbildung 6 – Peptid-Mapping-Reproduzierbarkeit bei LC/MS-Analyse

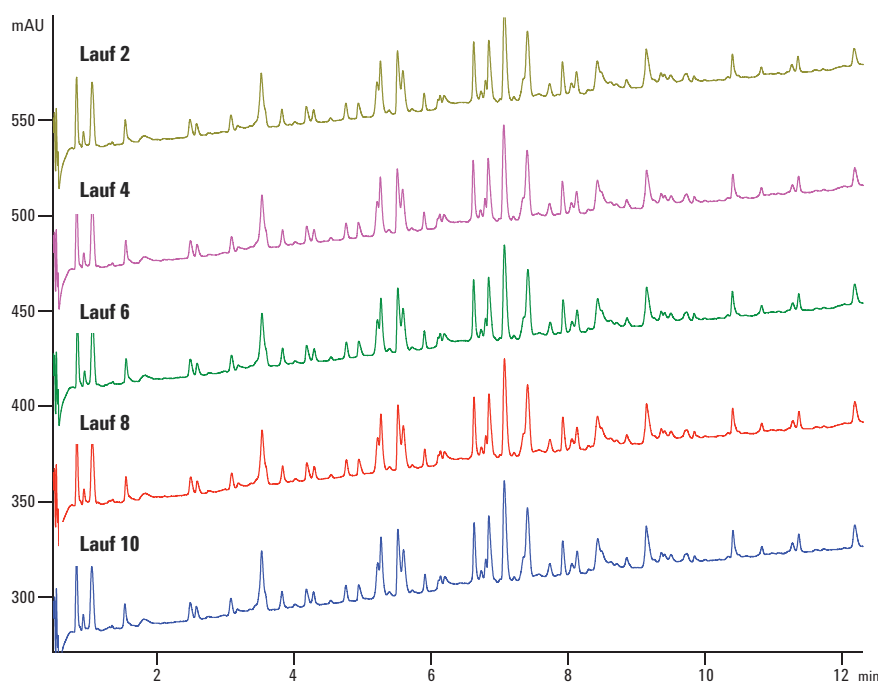


Abbildung 6 – Fünf replizierte Injektionen eines tryptischen Verdau eines monoklonalen Antikörpers unter Verwendung einer Agilent AdvanceBio Peptid-Mapping-Säule mit 3,0 x 150 mm (Agilent Best.-Nr. 653950-302) auf einem Agilent 1200 LC-System, das mit einem 6520 Q-TOF gekoppelt wurde. Die Trennung wurde bei 40 °C unter Verwendung von Wasser (0,1 % FA)/ACN (0,1 % FA), Gradient 0,3 mL/min durchgeführt.

Auswahl der mobilen Phase

Das am häufigsten verwendete Lösungsmittel beim Peptid-Mapping ist Wasser mit Acetonitril als organischem Modifizier. Dabei wird ein Anteil von höchstens 0,1 % des Ionenpaarreagenzes empfohlen. Unter bestimmten Umständen kann Propylalkohol oder Isopropylalkohol zugesetzt werden, um die Verdauungskomponenten zu lösen, unter der Voraussetzung, dass diese Zugabe die Viskosität der Komponenten nicht übermäßig erhöht. Gepufferte mobile Phasen mit Phosphat werden eingesetzt, um eine gewisse Flexibilität bei der Auswahl der pH-Bedingungen zu schaffen, da Verschiebungen des pH-Werts im Bereich von 3,0 bis 5,0 die Trennung von Peptiden unterstützen, die saure Rückstände enthalten (z. B. Glutaminsäure und Asparaginsäure). Natrium- oder Kaliumphosphate, Ammoniumacetat sowie Phosphorsäure bei einem pH-Wert zwischen 2 und 7 (oder höher für polymerbasierte Trägermaterialien) sind ebenfalls mit Acetonitril-Gradienten verwendet worden. Acetonitril mit Trifluoressigsäure wird recht häufig eingesetzt.

Mobile Phasen, die in der Umkehrphasen-Chromatographie zur Analyse von Proteinen und Peptiden verwendet werden, enthalten einen Zusatz, der als Ionenpaarreagenz wirkt. Diese Komponente erhöht die Hydrophobie der Peptide, indem sie mit ihren geladenen Gruppen Ionenpaare bildet. Infolgedessen wird die Interaktion der Peptide mit der hydrophoben stationären Phase und damit eine verbesserte Trennung durch erhöhte Retention ermöglicht. Die häufig verwendeten Zusätze wie Trifluoressigsäure (TFA), Ameisensäure (FA) und Essigsäure (AcOH) können sehr niedrige pH-Werte liefern und die Proteinfaltung und -denaturierung fördern. Dadurch eluieren Moleküle, z. B. Peptide, in schärferen und symmetrischeren Banden. Das am häufigsten eingesetzte Ionenpaarreagenz für die Trennung von Proteinen und Peptiden ist Trifluoressigsäure, bedingt durch die Kompatibilität (hohe Volatilität) mit Massenspektrometrie und die Affinität für das geladene Peptid.

Detektion

Die Detektion von Peptiden erfolgt üblicherweise bei 210 nm bis 220 nm bzw. 280 nm (**Abbildung 7**). Die Detektion bei 280 nm wird beim Peptid-Mapping oft parallel mit der Detektion bei 210 nm durchgeführt. Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin sind bei 280 nm empfindlich, während die Detektion bei 210 nm für viele andere biologische Substanzen in der Probenmatrix relativ unselektiv ist. Die Empfindlichkeit bei 210 nm und 220 nm ist jedoch zwei- bis viermal höher als bei 280 nm. Darüber hinaus ist für das Detektionsprofil von Peptidmaps die Zumischung von 0,1 % TFA in Wasser (A-Lösungsmittel) und 0,08 % TFA in ACN

(B-Lösungsmittel) wichtig. Dies wird eingesetzt, um Basisliniendrift zu vermeiden, die durch Veränderungen der Absorption im Verlauf des Elutionsgradienten verursacht wird. **Abbildung 7** zeigt einen Beispielvergleich einer Peptid-Mapping-Trennung bei Wellenlängen von 220 nm und 280 nm und zeigt die Differenzen in der Absorptionsempfindlichkeit und den UV-Peak-Profilen.

Abbildung 7 – Peptid-Mapping bei verschiedenen Wellenlängen

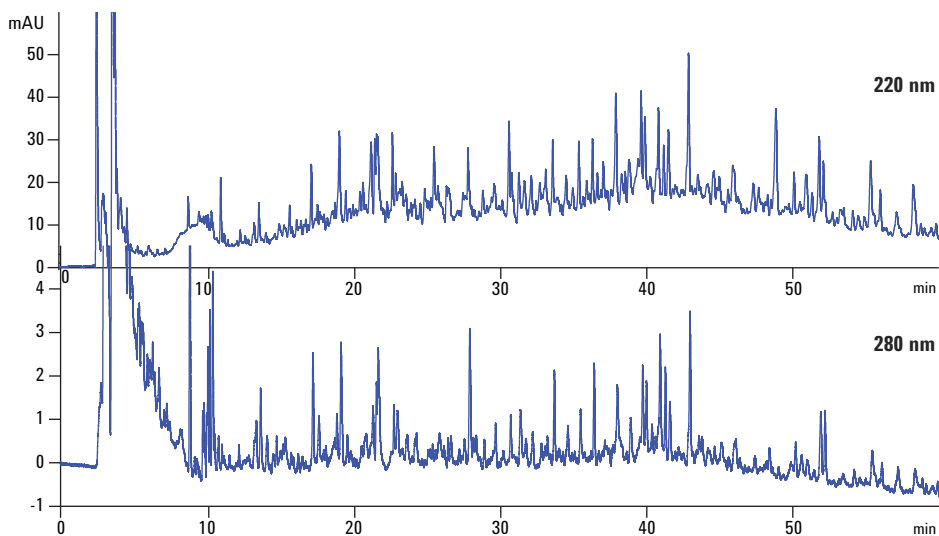
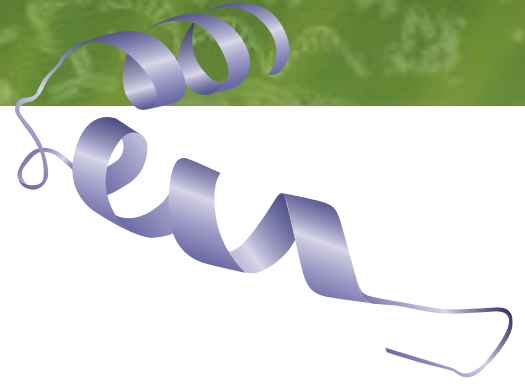


Abbildung 7 – AdvanceBio Peptid-Mapping-Säule mit 2,1 x 250 mm (Agilent Best.-Nr. 651750-902), Profil für E.-coli-Verdau bei 220 nm (oben) und 280 nm (unten) auf Agilent 1290 Infinity LC.

Weitere Informationen über Agilent-Säulen für Peptid-Mapping finden Sie unter

[agilent.com/chem/advancebio](https://www.agilent.com/chem/advancebio)

Entwicklung einer effizienten Peptid-Mapping-Methode



Die allgemeine Herangehensweise zur Entwicklung einer RPC-Methode für eine Peptid-Mapping-Trennung ist identisch mit der, die bei typischen Entwicklungsverfahren für RP-Methoden eingesetzt wird. Es gibt jedoch spezielle Anforderungen insbesondere für die Peptid-Mapping-Entwicklung. In diesem Kapitel wird eine empfohlene grundlegende Herangehensweise zur Vorbereitung einer gut aufgelösten Peptidmap erläutert. Dabei werden folgende Schritte beschrieben: (1) Optimierung

der Gradientenbedingungen für die Retention, (2) Variablen zur Änderung der Selektivität, (3) weitere Optimierung der Säulenbedingungen zur Verbesserung des Kompromisses zwischen Laufzeit und Auflösung. Bei jedem Schritt dieses Methodenentwicklungsprozesses sind der Probenotyp und das angestrebte Ziel des Peptid-Mapping-Experiments zu berücksichtigen.

(1) Optimierung der Gradientenbedingungen

Für die Trennung von Peptiden wird stets ein ACN-Puffergradient mit niedrigem pH-Wert dringend empfohlen, da dieser:

- die Trennung einer großen Bandbreite an Peptidarten und -strukturen ermöglicht.
- die Ionisierung von Silanolen unterdrückt, welche unerwünschte Interaktionen mit basischen Aminoseitenketten im Molekül bewirken kann, wodurch schlechte Peakformen entstehen.
- die Denaturierung des Peptidfragments unterstützt, wodurch Retention und Auflösung verbessert werden.
- eine UV-Detektion bei niedriger Wellenlänge ermöglicht (<210 nm), wodurch die Detektionsempfindlichkeit erhöht wird.
- engere Banden ermöglicht, bedingt durch die niedrigere Viskosität der mobilen Phase.
- die Retention von kleinen, schlecht retendierbaren Peptiden erhöht durch Ionenpaarbildung mit dem freien Amino-Terminus und basischen Aminosäuren (wenn TFA im Puffer verwendet wird).

Propanol oder Isopropanol (IPA) können anstelle von ACN als organische Modifizier eingesetzt werden, um eine bessere Wiederfindung hydrophober Peptide zu erreichen. Diese sind jedoch höher viskos, wodurch ein höherer Säulendruck und in einigen Fällen breitere Banden entstehen. Diese Lösungsmittel erfordern darüber hinaus eine höhere Wellenlänge für die Detektion (>220 nm) und bewirken einen Verlust an Detektionsempfindlichkeit.

Die meisten Peptide werden mit weniger als 60 % ACN eluiert, gelegentlich ist jedoch eine höhere ACN-Konzentration erforderlich. Ein guter Startpunkt für einen ersten Peptid-Mapping-Entwicklungslauf ist 0 bis 60 % in 45 Minuten (2 %/min). Häufig ist jedoch ein flacherer Gradient notwendig, um die gewünschte Auflösung zu erreichen. Die Steilheit des Gradienten (% B/min) bestimmt die durchschnittliche Retention (k') einer Probenbande bei der Migration durch eine Säule. Der Wert k' ist von den Säulenabmessungen, der Flussrate, dem Probengewicht und der Gradientensteilheit abhängig.

(2) Variablen zur Änderung der Selektivität (α) der Peptidmap

Chromatographienwender, die mit biologischen Proben arbeiten, ändern die Säulenbedingungen (N) üblicherweise erst dann, wenn der Bandenabstand (α) verbessert wurde. Änderungen der Temperatur und Gradientensteilheit lassen sich unaufwändig bewerkstelligen (keine Änderung der mobilen Phase oder Säule erforderlich) und sollten daher zunächst geprüft werden, um den Bandenabstand (α) zu verbessern und damit die Peptid-Mapping-Trennung zu optimieren.

Die Änderung der Temperatur ist ein sehr effektives Mittel zur Veränderung der Selektivität und kann zu einem Retentionswechsel für bestimmte Peptidrückstände führen. Wenn die Temperatur einer Peptid-Mapping-Trennung erhöht wird, entstehen engere Banden, der Systemrückdruck sinkt, und die Selektivität ändert sich. Es wird eine Anfangstemperatur von 30 bis 50 °C empfohlen. Die optimale Temperatur für eine bestimmte Mapping-Trennung ist jedoch von vielen Faktoren abhängig, bedingt durch den Verdautyp und die Zusammensetzung. Einige stark hydrophobe Peptide erfordern eine Temperatur von 60 bis 80 °C für maximale Wiederfindung. Die beste Selektivität für eine bestimmte Probe wird jedoch häufig bei einer bestimmten Temperatur im Bereich von 30 bis 60 °C erreicht.

Abbildung 8 zeigt einen Vergleich zwischen zwei identischen Gradientenregionen. Die Temperatur für einen tryptischen Myoglobin-Verdau wurde hier von 30 °C (oberes Chromatogramm) auf 60 °C (unteres Chromatogramm) erhöht. Bei der erhöhten Temperatur von 60 °C ändern sich die Eigenschaften des Trennungspfiles hinsichtlich der Bandenform und Peakposition, hervorgehoben durch die Peaks 1 bis 7. Deutlich erkennbare Änderungen in dieser Region des Chromatogramms sind die verbesserte Trennung zwischen den Peaks 1, 2 und 3 sowie die Differenzen der Bandenpositionierung (Selektivität) zwischen den Peaks 4 und 5.

Abbildung 8 – Auswirkung der Temperatur auf die Selektivität bei einem tryptischen Myoglobin-Verdau

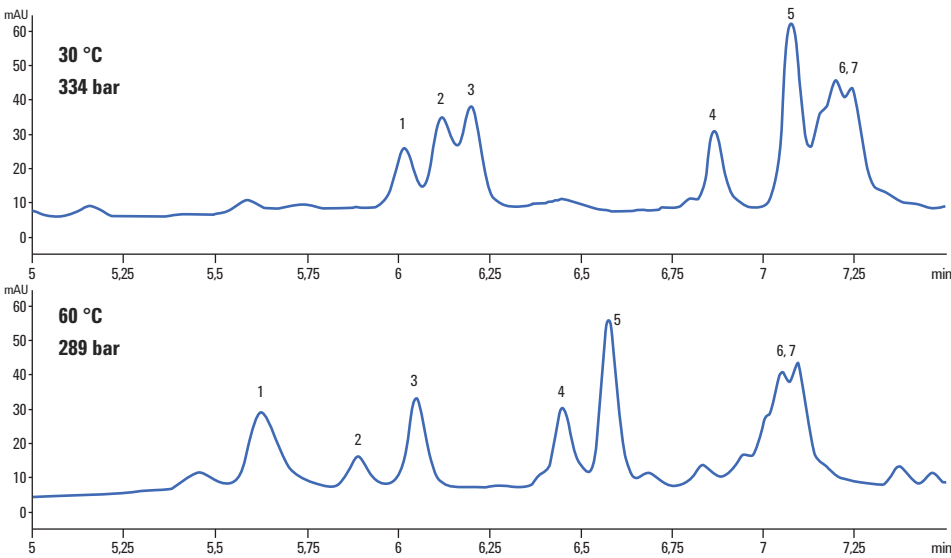


Abbildung 8 – Trennung für tryptischen Myoglobin-Verdau bei Minute 5,0 bis 8,0 eines 20-minütigen Gradienten bei Verwendung einer AdvanceBio Peptid-Mapping-Säule mit 2,1 x 150 mm (Agilent Best.-Nr. 653950-302). Beide Trennungen wurden unter Verwendung von Wasser (1,0 % TFA)/ACN (0,08 % TFA), linearer Gradient, mit 0,3 mL/min bei 215 nm auf einem Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC-System durchgeführt. Das obere Chromatogramm wurde bei einer Temperatur von 30 °C, das untere Chromatogramm bei einer Temperatur von 60 °C durchgeführt.



Weitere Informationen über Agilent-Säulen für Peptid-Mapping finden Sie unter agilent.com/chem/advancebio

Durch eine Änderung der Gradientensteilheit kann der Bandenabstand ebenfalls erheblich verbessert und die Selektivität der Peptid-Mapping-Trennung verändert werden. Die Gradientensteilheit kann auf zwei Arten variiert werden – entweder, indem die Flussrate konstant gehalten und die Elutionszeit auf eine kürzere Laufzeit (zunehmende Steilheit) oder eine längere Laufzeit (abnehmende Steilheit) gesetzt wird, oder indem die Laufzeit konstant gehalten und die Flussrate verändert wird.

Abbildung 9 zeigt, welche Selektivitätsveränderungen durch eine veränderte Gradientensteilheit erreicht wurden. Für einen tryptischen Myoglobin-Peptidverdau wurde eine steile Gradientenlaufzeit von 15 Minuten (oberes Chromatogramm) mit einer längeren Gradientenlaufzeit von 40 Minuten (unteres Chromatogramm) verglichen. Die Flussrate für beide Trennungen betrug konstant 0,6 mL/min bei 50 °C. Beim Vergleich der Chromatogramme, in denen gleiche Peaks für beide Trennungen mit Sternchen markiert sind, zeigen sich zahlreiche Änderungen in Bezug auf den Bandenabstand, den Peak-Count und die Peakform.

Abbildung 9 – Auswirkung der Gradientensteilheit bei der Trennung eines tryptischen Myoglobin-Verdaus

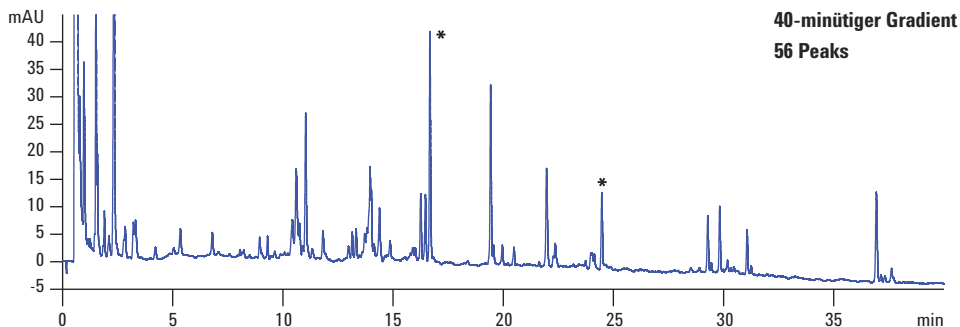
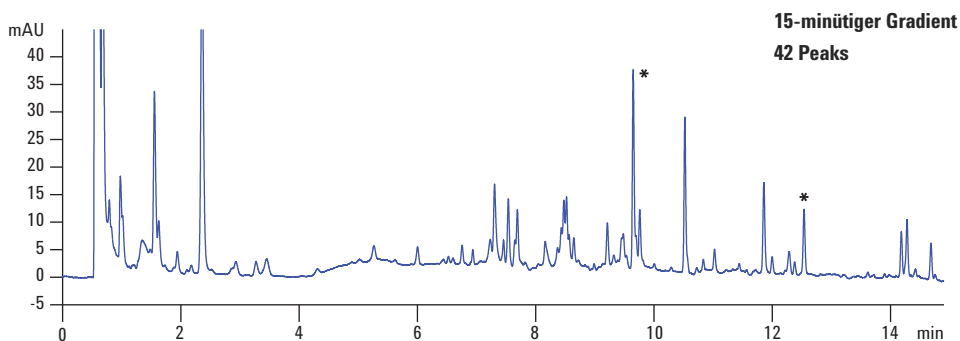


Abbildung 9 – Trennungen tryptischer Myoglobin-Verdaue mit einer AdvanceBio Peptid-Mapping-Säule mit 2,1 x 150 mm (Agilent Best.-Nr. 653950-302) auf Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC-System unter Verwendung von Wasser (1,0 % TFA)/ACN (0,08 % TFA), linearer Gradient, 0,6 mL/min bei 50 °C. Das obere Chromatogramm wurde in 15 Minuten abgeschlossen, während das untere Chromatogramm in 40 Minuten abgeschlossen wurde. Die Sternchen in den beiden Chromatogrammen markieren identische Peaks.



(3) Anpassung der Säulenbedingungen zur weiteren Optimierung

Nachdem der Gradient in Bezug auf die Retention (k') und die Selektivität (α) optimiert wurde, können durch Variation der Säulenlänge und Flussrate weitere Verbesserungen für die Trennung erreicht werden. Die Entscheidung, welche Säulenbedingung für die Gradientenelution variiert werden soll, folgt den gleichen Prinzipien wie bei einer isokratischen Trennung. In beiden Fällen können höhere Effizienzwerte (N) auf Kosten von längeren Laufzeiten erreicht werden. Für kleinere Verbesserungen in der Auflösung, bei denen eine Verlängerung der Laufzeit weniger wichtig ist, kann die Flussrate problemlos gesenkt werden. Wenn jedoch eine stärkere Erhöhung der Auflösung benötigt wird, ist in der Regel eine größere Säulenlänge zu bevorzugen. Wenn die Auflösung nach der Optimierung der Selektivität größer ist als benötigt, kann diese nicht benötigte Auflösung zugunsten einer kürzeren Laufzeit wieder eingeschränkt werden, indem die Flussrate erhöht und/oder die Säulenlänge reduziert wird. **Abbildung 10** zeigt ein Beispiel für eine verbesserte Peptid-Mapping-Auflösung für einen tryptischen Myoglobin-Verdau, bei dem die Säulenlänge von 150 mm auf 250 mm erhöht wurde. Bei diesem Vergleich wurden die Bedingungen und die Gradientenzeit konstant beibehalten, während die Säulenlänge von 150 mm auf 250 mm erhöht wurde. Der rote Rahmen markiert gleiche Trennungsbereiche und hebt die verbesserte Auflösung, die mit der Länge von 250 mm erreicht wurde, sowie die zusätzliche Peakkapazität pro Zeiteinheit hervor.

Die Gradientenelution, die nachfolgenden Variablen zur Optimierung der Selektivität und die oben unter Punkt (1), (2) und (3) erläuterten Optimierungen der Säulenbedingungen sind bewährte Strategien zur Verbesserung verschiedenster Trennungsstrategien einschließlich Peptid-Mapping. Die oben beschriebenen Methoden lassen sich in folgenden Schritten umreißen:

Schritte zur Entwicklung einer Peptid-Mapping-Methode

1. **Auswahl der Gradienten-Startbedingungen: Säulenlänge, Zusammensetzung der mobilen Phase, Flussrate, Temperatur und Detektion.** Die Trennung sollte zunächst in Bezug auf die Retention (k') optimiert werden. Dies erfordert einen nicht zu steilen Gradienten.
2. **Anpassung des Gradientenbereichs.** Dabei wird die Laufzeit verkürzt, indem ungenutzte Zeit am Anfang und Ende des Chromatogramms entfällt.
3. **Variation der Selektivität.** Wenn Banden auftreten, die sich überschneiden, oder die Laufzeit zu lang ist, können die erörterten Optionen der Selektivitätsanpassung erprobt werden.
4. **Prüfung der Gradientenform.** Größere Bandenabstände können durch Verwendung einer nicht linearen Gradientenform erreicht werden – eine Option für eine weitere Verbesserung der Trennung.
5. **Anpassung der Säulenbedingungen.** Nachdem Bandenabstände und Selektivität optimiert wurden, können Sie die Laufzeit und/oder Säulenlänge variieren, um die Auflösung bzw. Analysegeschwindigkeit zu verbessern.

Abbildung 10 – Auswirkung der Säulenlänge auf die Auflösung

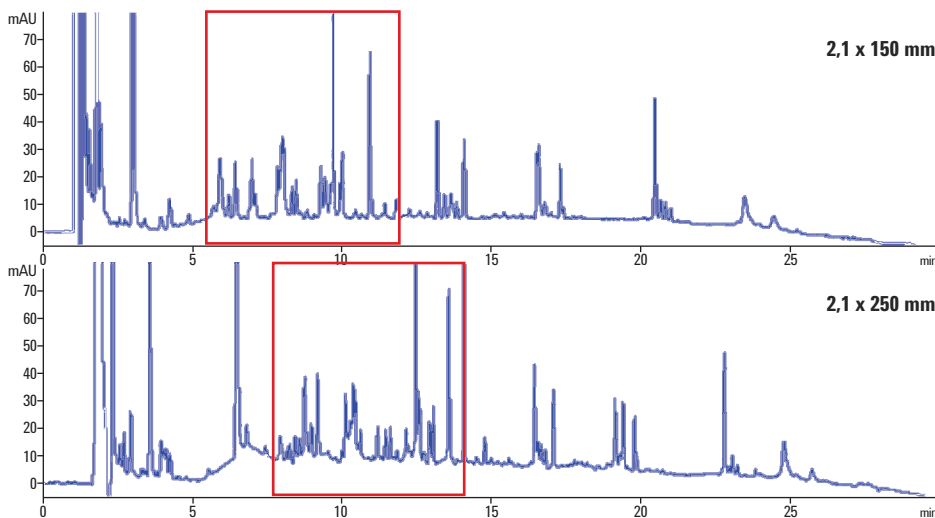


Abbildung 10 – Auswirkung der Säulenlänge auf die Auflösung: ein Peptid-Mapping-Vergleich unter Verwendung eines tryptischen Myoglobin-Verdau (Agilent Best.-Nr. 651750-902). Die rot markierten Ausschnitte sind äquivalente Trennungsbereiche und zeigen entsprechende Unterschiede in Auflösung und Peakform. Die Trennungen wurden unter Verwendung einer Agilent AdvanceBio Peptid-Mapping-Säule mit 2,1 x 150 mm (Agilent Best.-Nr. 651750-902) auf einem Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC-System durchgeführt, unter Verwendung von Wasser (1,0 % TFA)/ACN (0,08 % TFA), linearer Gradient, 10–60 % B in 30 Minuten bei 0,3 mL/min, 45 °C.

Weitere Informationen über Agilent-Säulen für Peptid-Mapping finden Sie unter

agilent.com/chem/advancebio

Peptid-Mapping-Charakterisierungen durch Massenspektrometrie



Die kombinierte Verwendung von Umkehrphasen-Chromatographie mit Massenspektrometrie ist zur Methode der Wahl für die Charakterisierung von Peptiden und Peptidmaps geworden. In der biopharmazeutischen Branche ist z. B. die Erhaltung und Überwachung der Sequenzidentität eines therapeutischen Zielmoleküls entscheidend, und die Stabilität eines biologischen Proteinpräparats ist ein wichtiger Aspekt in der Entwicklung von Therapeutika zur Überwachung von Modifikationen wie Oxidation, Reduktion, Glykosylierung und Trunkierung. MS kann als nicht-regulatorisches Reinheitstestverfahren eingesetzt werden, um die genetische Stabilität eines Produkts über den gesamten Lebenszyklus hinweg nachzuweisen.

Peptide werden bei der Massenspektrometrie durch Direktinfusion der isolierten Peptide analysiert (oder durch Einsatz der Online-LC/MS für die Strukturanalyse) und anschließend mit der Proteinamino-säuresequenz korreliert. Die identifizierten Peptide bestätigen auf diese Weise die spezifischen Aminosäure-sequenzen, die mit der Peptidmap abgedeckt werden, sowie die Identität des Proteins. Massenspektrometrie-Peptid-Mapping wird für Folgendes eingesetzt:

- Bestätigung der Identität eines bestimmten Proteins.
- Erreichen einer detaillierten Charakterisierung des Proteins, um z. B. N-terminale und C-terminale Peptide zu bestätigen, Peptidmaps mit hoher Sequenzabdeckung zu erhalten, Aminosäureaustausch zu ermitteln usw.
- Untersuchung und Identifikation von posttranslationalen Modifikationen (z. B. Glykosylierungen, Disulfidbindungen, N-terminale Pyroglutaminsäure, Methionin- und Tryptophanoxidierung usw.).

Im Allgemeinen werden als Techniken zur MS-Analyse Elektrospray und MALDI-TOF-MS sowie Fast Atom Bombardment (FAB) verwendet. Auch Tandem-MS wird eingesetzt, um modifizierte Proteine zu sequenzieren und die Art der aufgetretenen Aminosäuremodifikationen zu bestimmen. Bei Verwendung von Elektrospray-Ionisierung (ESI) oder MALDI-MS können proteolytische Peptide intakt in der Gasphase ionisiert und ihre Massen präzise gemessen werden. Die meisten Peptidtrennungen werden auf Elektrospray-Ionisierungs-LC/MS-Geräten (ESI) ausgeführt, bedingt durch die komfortable LC-Kopplung und höhere Qualität der Tandem-Massenspektren für eine zuverlässige Proteinidentifizierung. So liefern z. B. Quadrupol-Time-of-Flight-MS-Geräte (QTOF) in vielen Fällen aufgrund des hohen Auflösungsvermögens und der Massengenauigkeit mehr Strukturinformationen, insbesondere für größere Peptide.

Auf der Grundlage der MS-Informationen lassen sich Proteine einfach identifizieren, indem die gemessenen Massen mit den vorhergesagten Werten verglichen werden, die aus dem intakten Protein oder der Proteindatenbank abgeleitet werden, um Massen- und Sequenzabdeckungsinformationen zu erklären. Ziel der Charakterisierung eines Proteins durch Peptid-Mapping ist es, eine Sequenzabdeckung von mindestens 95 % der theoretischen Zusammensetzung der Proteinstruktur abzugleichen und nachzuweisen. **Abbildung 11** zeigt ein Beispiel für eine hoch optimierte Peptidmap für einen Erythropoetin (EPO)-Protein-verdau unter Verwendung von ESI-MS. Durch optimierte chromatographische Bedingungen und MS-Parameter wurden eine Sequenzabdeckung von 100 % und eine gut charakterisierte Peptid-Mapping-Trennung erreicht.

Abbildung 11 – Optimierte Peptidmap für EPO-Protein mit 100 %iger Sequenzabdeckung

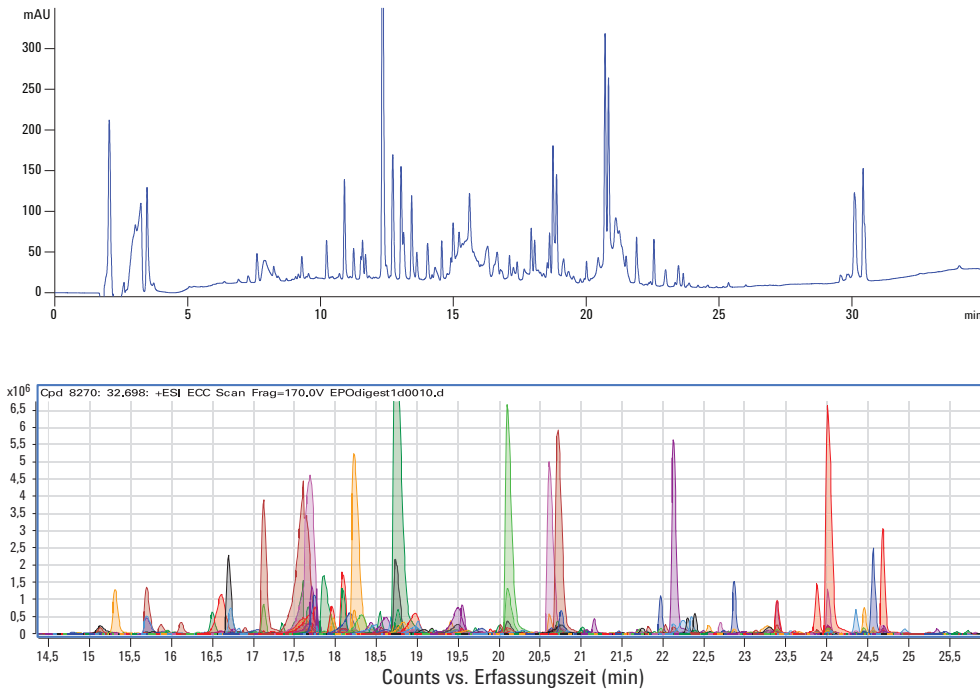


Abbildung 11 – Das obere Chromatogramm zeigt eine vollständig optimierte Peptid-Mapping-Trennung des EPO-Verdau, ausgeführt auf einer AdvanceBio Peptid-Mapping-Säule mit 2,1 x 150 mm. Das untere Chromatogramm zeigt die qualitative Analyse (unter Verwendung eines Molecular Feature Extractor) für die Sequenzabdeckung, erstellt mit einem Agilent Q-TOF-Gerät.



Bestellinformationen

Für Peptid-Mapping empfiehlt Agilent:

AdvanceBio Peptid-Mapping – erste Wahl für die meisten Anwendungen

Beschreibung	Bestellnummer	Fast Guard Best.-Nr.
4,6 x 150 mm, 2,7 µm	653950-902	850750-911
3,0 x 150 mm, 2,7 µm	653950-302	853750-911
2,1 x 250 mm, 2,7 µm	651750-902	851725-911
2,1 x 150 mm, 2,7 µm	653750-902	
2,1 x 100 mm, 2,7 µm	655750-902	

*Fast Guards verlängern die Lebensdauer von Analysensäulen, ohne die Trennung zu verlangsamen oder die Auflösung zu beeinträchtigen.

ZORBAX RRHD 300-C18 für unvollständigen Verdau oder Proben mit hydrophobem Kern

Beschreibung	Bestellnummer
2,1 x 50 mm, 1,8 µm	857750-902
2,1 x 100 mm, 1,8 µm	858750-902

ZORBAX RRHD 300-HILIC für zusätzliche Daten zu hydrophilen und Glycopeptiden

Beschreibung	Bestellnummer
2,1 x 50 mm, 1,8 µm	857750-901
2,1 x 100 mm, 1,8 µm	858750-901

Peptid-Qualitätskontrollstandard

Verwenden Sie Agilent's 10-Peptide-Qualitätskontrollstandard – denselben Standard, den Agilent für die Qualitätskontrolle der eigenen Säulen verwendet – um die Leistung Ihrer Säulen während der Nutzungsdauer zu prüfen. Der Standard kann für HPLC oder LC/MS eingesetzt werden. Etwa 20 Injektionen pro Flasche.

Beschreibung	Bestellnummer
Peptid-Qualitätskontrollstandard, 71 µg in 2-mL-Flasche	5190-0583

Weitere Informationen über Agilent-Säulen für Peptid-Mapping finden Sie unter

agilent.com/chem/advancebio

Peptidprobenvorbereitung für die Massenspektrometrieanalyse – intelligent automatisiert

Die manuelle Probenvorbereitung von Peptiden ist ein zeitaufwändiger Prozess. Wenn Sie Peptid-Mapping-Anwendungen auf MS durchführen, möchten Sie in der Regel einen höheren Durchsatz erreichen. Darüber hinaus benötigen Sie einen hoch reproduzierbaren, durchgängigen Workflow, um zu gewährleisten, dass Sie konsistente Resultate erhalten.

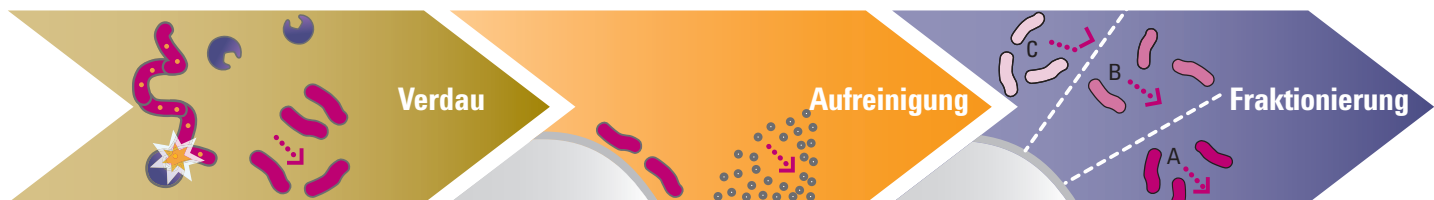
AssayMAP transformiert die Workflows für Verdauung, Aufreinigung und Fraktionierung und bietet eine bislang unerreichte Leistung in Bezug auf Präzision und Durchsatz:

- Verbesserte Reproduzierbarkeit durch Reduzierung von Bedienungsfehlern – 5 % VK
- Höherer Durchsatz – bis zu 384 Proben pro Tag
- Reduziert die praktische Arbeitszeit deutlich – Wissenschaftler haben mehr Zeit für analytische Arbeit
- Schnellere Methodenentwicklung – die automatisierte Plattform gibt Ihnen die Möglichkeit, Methoden schnell zu optimieren



Die AssayMAP Peptide Sample Prep Solution basiert auf der leistungsstarken Kombination miniaturisierter Packed-Bed-Chromatographie, der führenden Bravo Liquid Handling Plattform und einer einfachen, anwendungs-basierten Benutzerschnittstelle, die eine offene Zugriffsumgebung für Einsteiger ebenso wie für erfahrene Anwender bietet und selbst anspruchsvollste Probenvorbereitungs-Workflows vereinfacht.

AssayMAP Peptide Sample Prep Solution Für die Massenspektrometrieanalyse



Verdau:

- Verdau in Lösung mit Reagenzien, die der Benutzer bereitstellt
- Parallelprozess mit bis zu 4x96-Well-Plates
- 1 manueller Pipettierschritt

Vorteile:

- Reduzierte Benutzervariabilität
- Höherer Durchsatz und verbesserte Reproduzierbarkeit

Aufreinigung:

- Quantitative Trennmethode unter Verwendung von Umkehrphasenkartuschen
- Parallelprozess mit 1x96-Well-Plate

Vorteile:

- 10- μ L-Elution ermöglicht kurze Trockenzeiten oder Dilute-and-Shoot-Methode
- Prozesskontrolle – jede Probe wird identisch behandelt

Fraktionierung:

- Verdau in Lösung mit Reagenzien, die der Benutzer bereitstellt
- Parallelprozess mit bis zu 4x96-Well-Plates

Vorteile:

- Höherer LC/MS-Durchsatz, da Fraktionierung offline stattfindet, wodurch LC-Gradientenzeiten verkürzt werden
- Leistungsstarkes Anreicherungstool zur Vereinfachung von Proben und Isolierung von Zielpeptiden vor der Analyse

Vorteile für den gesamten Workflow:

- Standardisierte Benutzerschnittstellen für Workflows sorgen für einfache Anwendung und verknüpfte Workflow-Integration.
- Dank AssayMAP sind weniger Probenreplikate und weniger wiederholte Probenschritte erforderlich.

Vollständige Workflow-Reproduzierbarkeit mit der Agilent AssayMAP-Lösung zur Proben- vorbereitung vor der MS-Analyse

In diesem Beispiel wurde die AssayMAP Peptide Sample Prep Solution verwendet, um jeweils 64 Replikate von zwei Probentypen zu verdauen: BSA in Harnstoff und Guanidin-HCl. Die Proben wurden mit AssayMAP-Umkehrphasenkartuschen aufgereinigt und mit Agilent AdvanceBio Peptid-Mapping-Säule, Agilent 1290 Infinity LC und Agilent 6550 iFunnel Q-TOF-Massenspektrometer analysiert. Das Experiment wurde am zweiten Tag wiederholt, um die Reproduzierbarkeit zu prüfen. Der

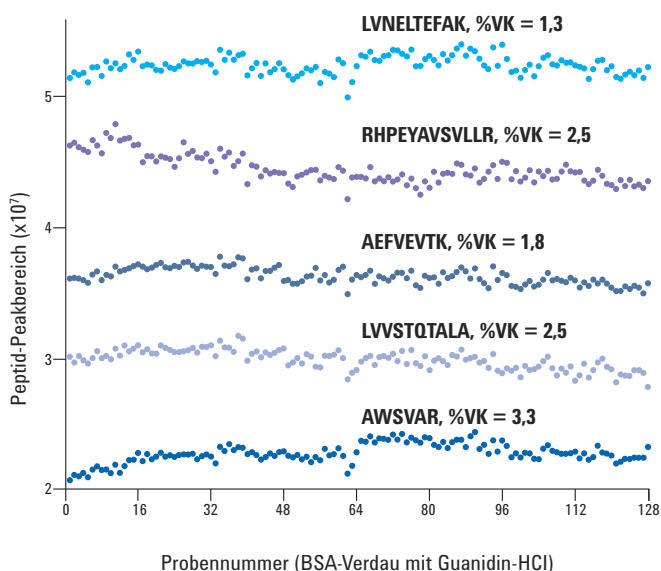


Abbildung 12 – Die Streuungs-Plots zeigen den Peakbereich von 4 Peptiden über 2 Tage.

Die Probenvorbereitung mit AssayMAP dauerte rund 4 Stunden pro Tag. Dabei waren nur zwei Stunden aktiver Arbeit pro Tag erforderlich. Die manuelle Probenvorbereitung für diesen Workflow würde etwa acht Stunden pro Tag erfordern, davon vier Stunden aktive Arbeit pro Tag.

Variationskoeffizient (%VK) wurde für 25 Peptide in jeder Probe ermittelt, wie in **Tabelle 1** dargestellt. Die verschiedenen %VK-Gruppen sind aufgeführt, die den jeweiligen Anteil am gesamten durchschnittlichen %VK zeigen. Zur weiteren Verdeutlichung der Reproduzierbarkeit sind die Peakbereiche für repräsentative Peptide in **Abbildung 12** dargestellt.

25 Peptide	Harnstoff (n=64, 62)		Guanidin-HCl (n=64, 64)	
	Tag 1	Tag 2	Tag 1	Tag 2
Durchschnittlicher Peakbereich %VK	3,3	3,7	2,3	2,6
Peptide mit VK<5 %	23	21	25	23
Peptide mit 5 %<VK>10 %	2	3		1
Peptide mit VK>10 %		1		1

Tabelle 1 – %VK pro Tag mit verschiedenen %VK-Gruppen.

Die VK für den gesamten Workflow lagen bei 4 %. Im Gesamt-Workflow kamen das AssayMAP Peptide Sample Prep System, eine Agilent AdvanceBio Peptid-Mapping-Säule, das 1290 Infinity LC System und ein Agilent 6550 iFunnel Q-TOF-Massenspektrometer zum Einsatz.

Weitere Informationen zu dieser Anwendung finden Sie in der Agilente-Publikation 4991-2474EN.

Weitere Informationen über Agilent-Säulen für Peptid-Mapping finden Sie unter
[agilent.com/chem/advancebio](https://www.agilent.com/chem/advancebio)

Ihr Partner für hochwertige Resultate

Für Ihre wachsenden Herausforderungen benötigen Sie bessere Lösungen. Mit unseren Produkten können biopharmazeutische Wissenschaftler die Erforschung von Krankheiten vorantreiben, die Entdeckung von Arzneistoffen beschleunigen und eine größere Zuverlässigkeit in der Entwicklung und Herstellung erreichen. Eine große Bandbreite an Lösungen von Agilent für die Genomforschung, Automatisierung, Trennung und Detektion sowie speziell auf Arbeitsabläufe zugeschnittene Softwareprodukte helfen, die nötigen Antworten zu liefern, um wirksame Therapeutika auf den Markt zu bringen.

Erfahren Sie mehr über Lösungen von Agilent für die Biopharma-Branche:

agilent.com/chem/togetherbiopharma



Ihr Weg zu erfolgreichen Resultaten

agilent.com/chem/navigator

Um den Überblick über die Vielzahl erhältlichlicher Biosäulen und kleiner Säulen zu erleichtern, hat Agilent den NAVIGATOR für LC-Säulen und Probenvorbereitung eingeführt. Dieser hilft Ihnen, die richtige Säule für Ihre Anwendung auszuwählen.

Der NAVIGATOR bietet vier einfache Suchoptionen:

- Nach Best.-Nr. – Querverweis für LC-Säulen und Probenvorbereitungsprodukte, um den besten Ersatz von Agilent zu finden
- Nach Säule – Empfehlungen anhand der Methode
- Nach Substanz – Dropdown-Liste
- Nach USP-Methode

Zusätzlich bietet der NAVIGATOR Unterstützung bezüglich der Säulenauswahl zur Optimierung der Chromatographie, Produktempfehlungen für die Probenvorbereitung und einen schnellen Zugriff auf die Ressourcen des technischen Supports sowie weitere Tools.

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2013
Gedruckt in den USA, 13. November 2013
5991-2348DEE



Agilent Technologies