

非対称フローFFFにICP-MSを接続した 血漿タンパク質の多元素分析と特性評価

Julien Heroult, Heidi Goenaga-Infante

LGC Limited, Middlesex, UK

一般情報

ID0025

アプリケーション：製薬、医療

テクノロジー：AF4-UV-MALS-ICP-MS

機器構成：AF2000 MT、PN3211 UV、PN3621 MALS、Agilent 7700 ICP-MS

キーワード：非対称フローFFF、ICP-MS、タンパク質

はじめに

ヒト血清アルブミン(HSA)とトランスフェリンは生体液中の金属イオンと結合して移動することが知られている血漿タンパク質です。金属タンパク質複合体はガンや糖尿病の治療のための金属ベースの薬剤など、多くの研究に関与しています。ICP-MSおよびMALDI-TOF-MS等を接続したクロマトグラフィーが金属の種分化と金属の結合速度を調査するために使用されて来ました。中でもFFFはサンプル回収率が高く、非変性で破壊性の低いサンプルに適応可能です[1]。

システム構成

AF2000マルチフロー常温フローFFF

- PN3211 UV/Vis-検出器
- PN3621 21角度 MALS-検出器
- スペーサー: 350 μ m
- 溶媒: 100 mM 酢酸アンモニア、pH 7

Agilent 7700x ICP-MS

- RF power: 1500 W
- Sampling depth: 7.2 mm
- Carrier gas flow rate: 12 L/min
- Dilution gas flow rate: Off
- Sampler/Skimmer cones: Ni/Ni
- Nebulizer: MicroMist
- Spray chamber Temperature: 2 °C
- Helium cell gas flow rate: 9 mL/min
- Monitored Isotopes and ^{34}S , ^{57}Fe , ^{63}Cu , ^{65}Cu , ^{66}Zn (at 0.5 sec/mass), ^{56}Fe (at 0.1 sec/mass)

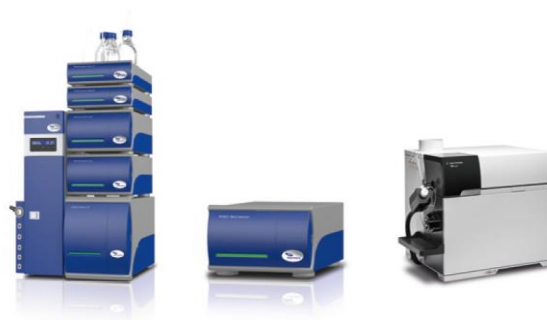


図 1 : AF2000 MT

PN3621 MALS

Agilent 7700 ICP-MS

サイズ評価/分布/定量と無機物種の同定

この研究では非対称フローFFF(AF4)を使用し、ヒト血清アルブミン(^{63}Cu イオンに結合)とトランスフェリン(^{56}Fe イオンに結合)の混合物を分離しました。AF4システムはタ

ンパク質をサイズで分離し、ICP-MSで金属イオンを検出し、タンパク質混合物中の金属分布を測定しました。図2の下の方の青線は分離されたHSAタンパク質を示し、赤線はトランスフェリンを示しています。ICP-MSの強度シグナルから両方のタンパク質は、モノマー(HSA：10～12分、トランスフェリン：11～13分)、ダイマー(HSA：12～14分、トランスフェリン：14～15分)、トリマー(HSA：15～16分)、それ以上の凝集体(16分以上)に分離しています。得られた結果はAF4-ICP-MSがヒト血清アルブミン(^{63}Cu 、青線)やトランスフェリン(^{56}Fe 、赤線)などの血漿タンパク質の元素を選択的に検出する技術であることを示しています。これは、2種の血漿タンパク質が同要素の結合剤として作用するアプリケーションで最も重要です。さらに、FFFとUV-VisおよびMALS検出の接続により、分子量の概算値はHSAが $6.6 \times 10^4 \text{ g/mol}$ 、トランスフェリンが $7.6 \times 10^4 \text{ g/mol}$ でした。これらのタンパク質についての値は、製造元の報告した分子量とほぼ一致しています。

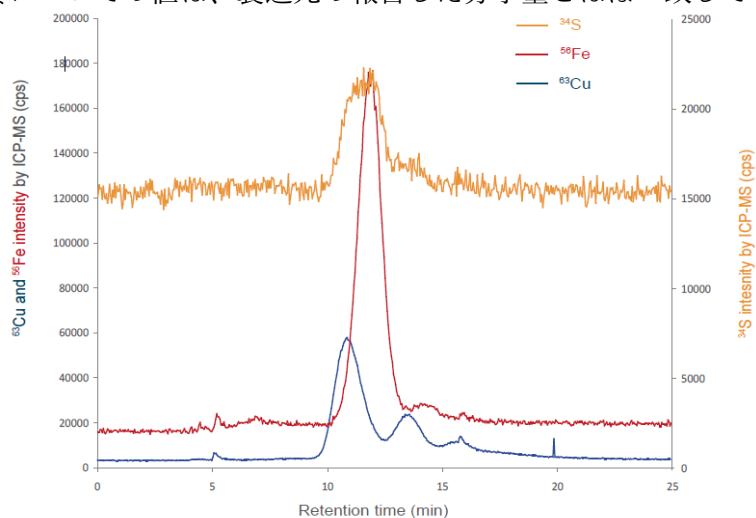


図2: HSAとトランスフェリンの混合物タンパク質、各 1 g/LのAF4-ICP-MSのフラクトグラム

FFF - ICP-MSの利点

- 血漿中の金属分布の同定により、患者個々の病態生理が可能
- 治療用タンパク質と抗体生成の調査と最適化
- タンパク質汚染の検出に適用可能
- 治療用タンパク質と抗体の品質管理

まとめ

この研究はFFF-ICP-MSが多くの医療研究に関係している、ヒト血清アルブミンやトランスフェリンなどのタンパク質の非変性、および元素の選択的な検出に有望なツールであることを示しています。これは2つの血漿タンパク質が同じ要素の結合物として機能するアプリケーション(たとえば糖尿病研究におけるバナジウム)で特に有効です。

ICP-MS検出によって提供される選択性と多元素機能のさらなる改善により、FFF-ICP-MSの生体サンプル中の金属含有タンパク質のより複雑な混合物の硫黄/金属種分化への将来の適用が見込まれます。

参考文献

- [1] Heroult, J., Havard, T., and Goenage Infante, H., The Column, 2012, 8(14), 11-15.