

抗体の糖ペプチド解析編 (Ver.2)

トリプシン消化によるペプチドマッピングは最も効率のよい、タンパク質の1次構造解析手法である。既知のアミノ酸修飾は、ペプチドマッピングにより解析可能であるが、糖鎖修飾を解析しようとする場合、いくつかの問題点に直面する。そもそも糖ペプチドはイオンサプレッションによる感度低下を招きやすく、主に、共溶出する他のペプチドや TFA, Tris 等の影響を受けるものと考えられる。また、ペプチドマッピングで通常用いられる C18 カラムの分離条件では、糖鎖の違いによる分離がほとんど期待できなことも主な問題点となっている。今回、これら問題点を克服し、糖ペプチドの解析を可能にするプロトコルを作成した。すなわち、糖ペプチドを濃縮する前処理を追加することにより、共溶出する成分による影響を抑え、かつ C18 カラムの分離条件を一部改変することにより、NISTmAb の糖鎖構造をペプチドレベルで解析する方法となっている。

NIST mAb は世界中のラボが測定対象としており、様々な糖鎖構造が報告されている。最近それらの情報をまとめ、NIST mAb の糖鎖を評価した総説が発表された(参考文献 1)。これによると NIST mAb にはおよそ 50 種類程度の糖鎖構造を含有している。本プロトコルでは、これら構造をデータベースとして質量分析結果を検索することにより、このうち 40 種類程度の糖ペプチドが検出可能であった。

<Tips>

2020 年に公開した Ver.1 からの主な変更点は、① 糖ペプチド濃縮処理をバッチ法からスピニングカラム法に変更したこと、② NIST mAb について、これまでに報告されている 57 種類の糖鎖構造に対して検索したこと、の 2 点である。

【材料】

微結晶セルロース : Alfa Aesar, Cat#A117730(Lot#102221810)

空スピンカラム : MobiSpinColumn" F", MoBiTec #M105010S

0.22 μm 遠心フィルター : Ultrafree HC-GV, Millipore, #UFC30GVNB

その他、抗体標品、分析カラム、移動相溶媒、トリプシン、グアニジン、ヨードアセトアミド、DTT、トリス緩衝液、脱塩カラム等は「ペプチドマッピング基礎編」と同じ。

【装置】

質量分析計、LC システム、遠心エバポレータは「ペプチドマッピング基礎編」と同じ。

【調製液】

80% アセトアミド, 3%ギ酸

100% アセトニトリル, 3%ギ酸

80% アセトニトリル

20% アセトニトリル

移動相液、トリプシン溶液、ヨードアセトアミド溶液、DTT 溶液等は「ペプチドマッピング基礎編」と同じ。

【酵素処理によるペプチドの調製】

「抗体のペプチドマッピング」と同様に還元変性トリプシン処理を行い、得られたトリプシン消化物について、微結晶セルロースを用いて糖ペプチドを濃縮する。

<Tips>

糖ペプチドが特異的にセルロースに吸着するわけではないことに留意する。

① 酵素処理方法

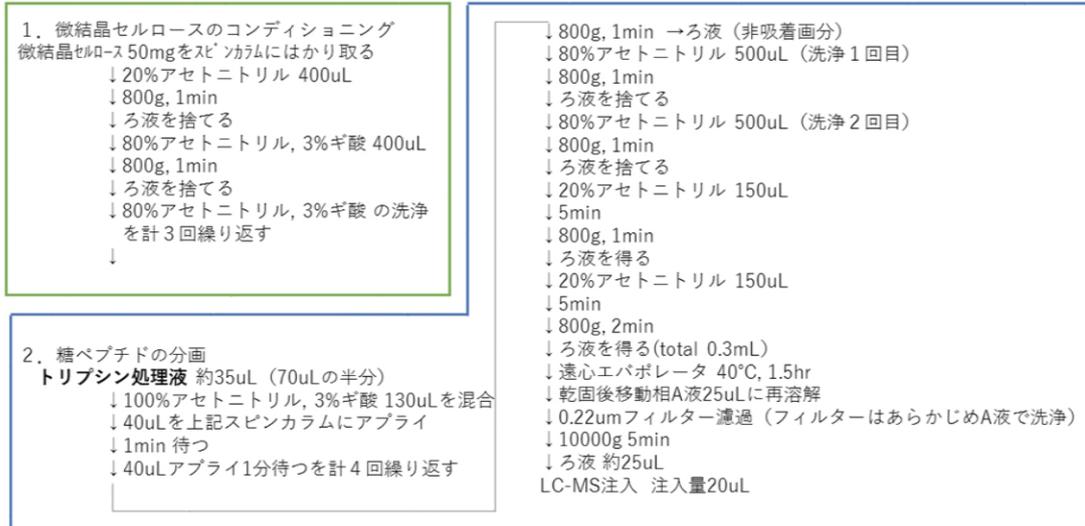
ペプチドマッピングと同じ操作を行い、トリプシン処理液約 70 μL を得る。(終タンパク濃度: 最大 50 $\mu\text{g}/70 \mu\text{L}$)。半分(35 μL)は通常のペプチドマッピング用試料として、残り半分(35 μL)を糖ペプチド解析用試料として用いる(−70°C 保存)。

② 微結晶セルロースによる糖ペプチドの濃縮

糖ペプチドの濃縮方法は  1 のフローチャートを参照。

図1

糖ペプチド濃縮処理のフローチャート（スピンカラム法）



【LC-MS 条件】

流速: 0.1 mL/min
カラム温度: 20°C
分析時間: 65 min
注入量: 10~20 µL

グラジエント

min	B%
0	2
0.5	4
15	6
30	20
50	40
51	98
58	98
59	2
65	2

➤52~52.3min のタイミングでキャリブレーション液に切り替える。

注意：本実験マニュアルは研究用であり、公的な試験方法を示すものではありません

<Tips>

カラム温度について、ペプチドマッピングの 55°C に比べて 20°C に下げることにより、わずかではあるが糖ペプチドが分離傾向を示す。ピークトップがわずかにずれるだけでもインソースフラグメンテーション^{a)}由来のシグナルと区別するには有効である。ただし、圧力は 50 MPa 程度まで上昇するので注意が必要。

Bruker TOF/MS (maXisII) の主要パラメータは「ペプチドマッピング基礎編」と同じ。

【データ解析】

データ解析方法はソフトウェアによって異なるため詳述しない。現在、我々が使用しているマニュアル用解析ソフト (Bruker 製 DataAnalysis[®]) による解析処理の流れは次のとおり。

1. 測定ごとのキャリブレーションデータを使って、測定データごとに再キャリブレーション。
2. ベースピーククロマトを表示させ全溶出ピークを確認。
3. モノアイソトピック質量の値と溶出時間から糖ペプチドを同定。

NISTmAb の N 結合糖鎖について、これまで報告されている糖鎖構造 (表 1) から (参考文献 1, 2)、糖ペプチドとしてのモノアイソトピック質量を算出した (図 2)。実際の測定において、NISTmAb 由来糖ペプチドのほとんどは 3 価イオンで検出された。一方、自動解析ソフト (Bruker 製 BiopharmaCompass[®]) では、検出量が小さい糖ペプチドを捉えることができなかったため、MS/MS フラグメントイオンについてもマニュアル解析でその妥当性を評価する必要があった。

表1

NISTmAb RM8671の糖鎖構造の種類

糖鎖構造	構造	C	M	N	O
GC	Hex3ManNAc(3)	50	82	4	35
GC-GlcNAc	Hex3ManNAc(3)	42	89	3	31
GP	Hex3ManNAc(4)Hex(1)	56	92	4	39
GP-NANA	Hex3ManNAc(4)Hex(1)NANA(1)	67	109	4	49
GP-NANA(2)	Hex3ManNAc(4)Hex(1)NANA(2)	79	125	6	55
G1	Hex4ManNAc(4)	56	92	4	43
G1-GlcNAc	Hex4ManNAc(4)	64	105	4	46
G1-NANA	Hex4ManNAc(4)NANA(1)	75	122	6	58
G1F	Hex4ManNAc(4)Hex(1)	62	102	4	44
G1F-GlcNAc (GP-N+H)	Hex4ManNAc(4)Hex(1)	60	99	3	44
G1F-NANA	Hex4ManNAc(4)Hex(1)NANA(1)	73	119	5	53
G2	Hex3ManNAc(3)	62	102	4	46
G2-NANA	Hex3ManNAc(3)NANA(1)	73	119	6	53
G2-GlcNAc	Hex3ManNAc(3)	70	115	5	50
GP	Hex3ManNAc(3)Hex(1)	68	112	4	49
GP-GlcNAc	Hex3ManNAc(3)Hex(1)	76	120	5	54
GP-Hex	Hex3ManNAc(3)Hex(1)	74	122	4	54
GP-DHex	Hex3ManNAc(3)Hex(1)	80	132	4	60
GP-NANA	Hex3ManNAc(3)Hex(1)NANA(1)	79	129	5	57
GP-ZNANA	Hex3ManNAc(3)Hex(1)NANA(2)	90	146	6	65
GP-NGNA	Hex3ManNAc(3)Hex(1)NGNA(1)	79	129	6	58
GP-GlcNAc-NANA	Hex3ManNAc(3)Hex(1)NANA(1)	87	142	6	63
GP-GlcNAc-ZNANA	Hex3ManNAc(3)Hex(1)NANA(2)	98	159	7	73
GP-GlcNAc	Hex3ManNAc(3)Hex(1)	48	79	3	34
GP-GlcNAc	Hex3ManNAc(3)Hex(1)	64	105	5	44
G1F-GlcNAc	Hex4ManNAc(4)Hex(1)	64	99	3	39
G1F-GlcNAc	Hex4ManNAc(4)Hex(1)	70	115	4	46
Man5	Hex5ManNAc(5)	46	75	2	30
Man6	Hex6ManNAc(6)	62	88	2	42
Man7	Hex7ManNAc(7)	58	95	2	45
G1F-GlcNAc-NGNA	Hex4ManNAc(4)Hex(1)NGNA(1)	69	106	4	48
G1F-NGNA	Hex4ManNAc(4)Hex(1)NGNA(1)	73	119	5	53
GP-Hex-NGNA	Hex3ManNAc(3)Hex(1)NGNA(1)	85	139	5	63
Man8F	Hex8ManNAc(8)	40	65	2	29
GP-GlcNAc-Hex	Hex3ManNAc(3)Hex(1)	82	135	5	59
G1-GlcNAc	Hex4ManNAc(4)	48	79	3	39
MSG1F-Hybrid	Hex3ManNAc(3)Hex(1)	65	109	5	49
GP-GlcNAc-DHex	Hex3ManNAc(3)Hex(1)	88	145	5	64
MSG1F-Hybrid-NGNA	Hex3ManNAc(3)Hex(1)NGNA(1)	71	118	4	53
MSG1-Hybrid	Hex3ManNAc(3)	60	99	3	45
G1-GlcNAc-Hex	Hex3ManNAc(3)	54	89	3	43
G1F-Hex	Hex3ManNAc(3)Hex(1)	60	102	4	50
MSG1F-Hybrid-NGNA	Hex3ManNAc(3)Hex(1)NGNA(1)	77	120	4	58
MSG1F-Hybrid-Hex	Hex3ManNAc(3)Hex(1)	72	119	3	54
G1F-GlcNAc-NANA	Hex4ManNAc(4)Hex(1)NANA(1)	65	105	4	47
G1F	Hex4ManNAc(4)	68	112	4	48
GP	Hex3ManNAc(3)Hex(1)	74	122	4	59
G1F-GlcNAc-NGNA	Hex4ManNAc(4)Hex(1)NGNA(1)	81	132	6	61
GP-Hex-NANA	Hex3ManNAc(3)Hex(1)NANA(1)	89	139	5	63
MSG1-Hybrid-H	Hex7ManNAc(7)	66	109	5	54
G2-GlcNAc	Hex3ManNAc(3)	68	95	3	43
Man3	Hex3ManNAc(3)	34	55	2	25
Man4	Hex4ManNAc(4)	40	65	2	30
G2-ZNANA	Hex3ManNAc(3)Hex(1)NANA(2)	84	135	6	68
Man5F	Hex5ManNAc(5)Hex(1)	42	69	3	29
Man5G1	Hex5ManNAc(5)NGNA(1)	71	118	4	52

図2A

NISTmAb由来糖ペプチドの構造



注意：本実験マニュアルは研究用であり、公的な試験方法を示すものではありません

図2B NISTmAb由来糖ペプチドのm/z値リスト

糖鎖種	ペプチド部分					糖部分					m/z	糖鎖種					m/z						
	C	H	N	O	S	C	H	N	O	S		C	H	N	O	S							
糖鎖なし	50	82	4	35	0	50	72	14	20	0	50	74	14	20	0	595.2602	80	78	14	20	0	787.1761	
G0	50	82	4	35	0	100	154	18	55	0	0	100	156	18	55	0	1244.498	100	157	18	55	0	830.0014
G1-GlcNAc	42	99	3	30	0	92	142	17	50	0	0	92	144	17	50	0	1142.908	92	141	17	50	0	792.2068
G2	56	92	4	39	0	106	164	18	59	0	0	106	166	18	59	0	1317.327	106	167	18	59	0	873.6819
G2F-GlcNAc	48	79	3	34	0	98	151	17	54	0	0	98	153	17	54	0	1215.987	98	154	17	54	0	812.9942
G2F-GlcNAc	64	105	5	44	0	114	177	19	64	0	0	114	179	19	64	0	1419.967	114	180	19	64	0	1448.3958
G2F-NANA	67	109	5	47	0	117	181	19	67	0	0	117	183	19	67	0	1463.078	117	184	19	67	0	978.7132
G2F-2NANA	78	126	6	55	0	128	198	20	75	0	0	128	200	20	75	0	1608.632	128	201	20	75	0	1072.759
G1	56	92	4	40	0	106	164	18	60	0	0	106	166	18	60	0	1329.928	106	167	18	60	0	984.6116
G1-GlcNAc	64	105	5	45	0	114	177	19	65	0	0	114	179	19	65	0	1427.084	114	180	19	65	0	991.7123
G1-NANA	67	109	5	48	0	117	181	19	68	0	0	117	183	19	68	0	1471.072	117	184	19	68	0	981.0903
G2F	62	102	4	44	0	112	174	18	64	0	0	112	176	18	64	0	1396.054	112	177	18	64	0	932.729
G2F-GlcNAc	54	89	3	39	0	104	161	17	59	0	0	104	163	17	59	0	1297.014	104	164	17	59	0	895.0118
G2F-NANA	70	115	5	49	0	120	187	19	69	0	0	120	189	19	69	0	1500.993	120	190	19	69	0	1002.298
G2F-2NANA	73	119	5	52	0	123	191	19	72	0	0	123	193	19	72	0	1544.001	123	194	19	72	0	1029.707
G2	62	102	4	45	0	112	174	18	65	0	0	112	176	18	65	0	1406.943	112	177	18	65	0	988.3958
G2F-NANA (G2-NANA)	73	119	5	53	0	123	191	19	73	0	0	123	193	19	73	0	1552.099	123	194	19	73	0	1026.068
G2-GlcNAc	70	115	5	50	0	120	187	19	70	0	0	120	189	19	70	0	1508.991	120	190	19	70	0	1025.73
G2F (G2F+)	68	112	4	49	0	118	184	18	69	0	0	118	186	18	69	0	1473.95	118	187	18	69	0	996.7223
G2F-GlcNAc+Hex (G2F-GlcNAc)	60	99	3	44	0	110	171	17	64	0	0	110	173	17	64	0	1378.04	110	174	17	64	0	913.9299
G2F-GlcNAc	76	115	5	54	0	126	197	19	74	0	0	126	199	19	74	0	1581.12	126	200	19	74	0	1054.429
G2F+Hex	74	112	4	54	0	124	194	19	74	0	0	124	196	19	74	0	1560.908	124	197	18	74	0	1027.18
G2F-2Hex	80	122	4	59	0	130	204	19	79	0	0	130	206	18	79	0	1641.838	130	207	18	79	0	1084.798
G2F-NANA	79	120	5	57	0	129	202	19	77	0	0	129	204	19	77	0	1623.228	129	204	19	77	0	1081.784
G2F-2NANA	90	146	6	65	0	140	218	20	85	0	0	140	220	20	85	0	1770.875	140	221	20	85	0	1180.768
G2F-NANA	79	120	5	58	0	129	201	19	78	0	0	129	203	19	78	0	1633.125	129	204	19	78	0	1089.088
G2F-GlcNAc-NANA	87	142	6	62	0	137	214	20	82	0	0	137	216	20	82	0	1728.687	137	217	20	82	0	1161.448
G2F-GlcNAc-2NANA	98	159	7	70	0	148	231	21	90	0	0	148	233	21	90	0	1872.318	148	234	21	90	0	1248.479
Man5	46	76	2	35	0	96	148	16	55	0	0	96	150	16	55	0	1203.472	96	151	16	55	0	822.8504
Man5	62	88	2	40	0	102	160	16	60	0	0	102	162	16	60	0	1284.498	102	161	16	60	0	859.658
Man7	58	96	2	45	0	108	168	16	65	0	0	108	170	16	65	0	1365.524	108	171	16	65	0	910.8998
G1F-GlcNAc-NGNA	65	106	4	48	0	115	178	18	68	0	0	115	180	18	68	0	1450.998	115	182	18	68	0	967.3784
G2F+Hex+NGNA	85	139	5	63	0	135	211	19	83	0	0	135	213	19	83	0	1714.932	135	214	19	83	0	1148.104
Man5F	40	68	2	39	0	90	138	16	49	0	0	90	140	16	49	0	1114.448	90	141	16	49	0	782.9312
G2F-GlcNAc+Hex	62	105	5	50	0	102	207	19	73	0	0	102	209	19	73	0	1462.446	102	210	19	73	0	1004.948
G1-GlcNAc	48	79	3	39	0	98	151	17	55	0	0	98	153	17	55	0	1223.988	98	154	17	55	0	816.9299
MS2F hybrid	86	109	3	49	0	116	181	17	69	0	0	116	183	17	69	0	1426.07	116	184	17	69	0	972.0471
G2F-GlcNAc-2Hex	68	145	5	64	0	108	217	19	84	0	0	108	219	19	84	0	1742.172	108	220	19	84	0	1145.451
MS2F hybrid+NGNA	71	116	4	53	0	101	188	18	73	0	0	101	190	18	73	0	1431.988	101	191	18	73	0	1021.389
MS2F hybrid	60	99	3	45	0	110	171	17	65	0	0	110	173	17	65	0	1386.088	110	174	17	65	0	824.9611
G1-GlcNAc+Hex	54	89	3	40	0	104	161	17	60	0	0	104	163	17	60	0	1306.911	104	164	17	60	0	870.9299
G2F+Hex	80	132	4	58	0	130	204	18	78	0	0	130	206	18	78	0	1633.838	130	207	18	78	0	1089.428
MS2F hybrid+NGNA	77	126	4	58	0	127	188	18	79	0	0	127	190	18	79	0	1512.912	127	201	18	79	0	1011.241
MS2F hybrid+Hex	72	119	3	54	0	122	191	17	74	0	0	122	193	17	74	0	1540.093	122	194	17	74	0	1027.048
G2F-GlcNAc+NANA	65	106	4	47	0	112	178	18	67	0	0	112	180	18	67	0	1442.952	112	181	18	67	0	982.0437
G1F2	68	112	4	48	0	118	184	18	68	0	0	118	186	18	68	0	1471.998	118	187	18	68	0	961.3958
G2F2	74	122	4	53	0	124	194	18	73	0	0	124	196	18	73	0	1552.609	124	197	18	73	0	1058.408
G1F-GlcNAc+NGNA	81	132	6	58	0	131	204	20	78	0	0	131	206	20	78	0	1653.838	131	207	20	78	0	1102.781
G2F+Hex+NANA	65	109	5	52	0	108	181	19	82	0	0	108	183	19	82	0	1706.184	108	214	19	82	0	1123.775
MS2F hybrid+H	66	109	3	50	0	116	181	17	70	0	0	116	183	17	70	0	1487.064	116	184	17	70	0	978.3787
G1-GlcNAc	58	95	3	40	0	108	167	19	60	0	0	108	169	19	60	0	1346.088	108	170	19	60	0	897.9948
Man3	34	56	2	25	0	84	128	16	45	0	0	84	130	16	45	0	1041.419	84	131	16	45	0	694.6121
Man5	40	68	2	30	0	90	138	16	50	0	0	90	140	16	50	0	1122.448	90	141	16	50	0	748.8329
G2-GlcNAc	64	106	6	53	0	104	208	20	83	0	0	104	210	20	83	0	1713.844	104	211	20	83	0	141.784
H2N3F1	42	69	3	29	0	92	141	17	49	0	0	92	143	17	49	0	1134.961	92	144	17	49	0	798.9758
H2N3F2	47	74	3	31	0	97	146	17	51	0	0	97	148	17	51	0	1162.982	97	147	17	51	0	804.0014

【結果】

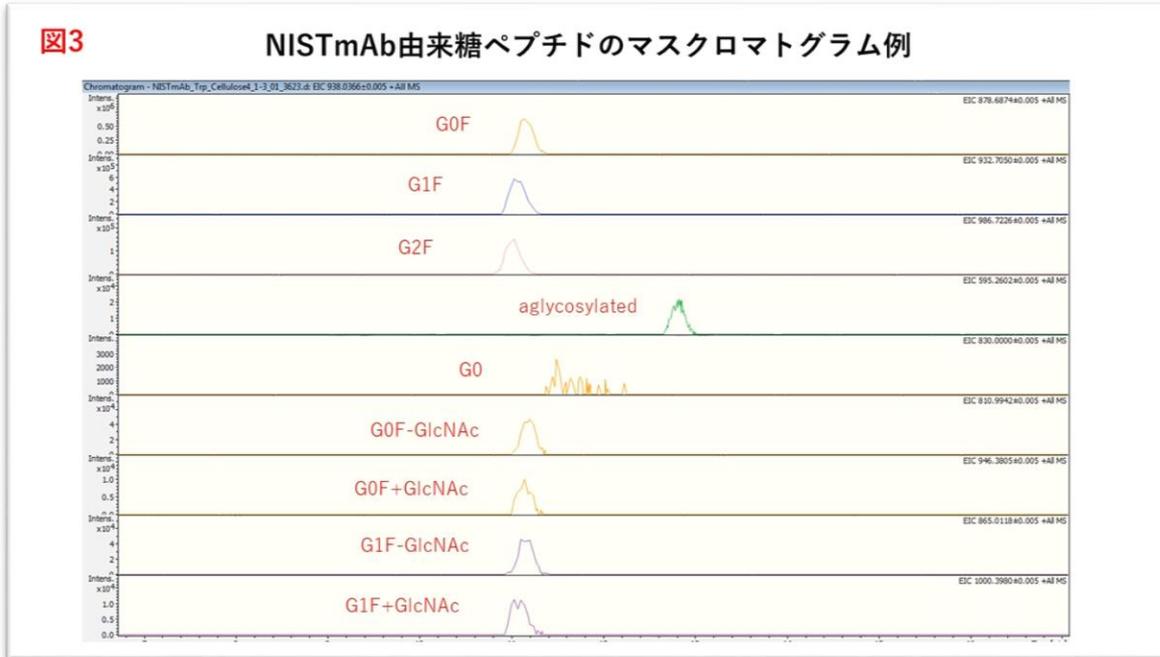
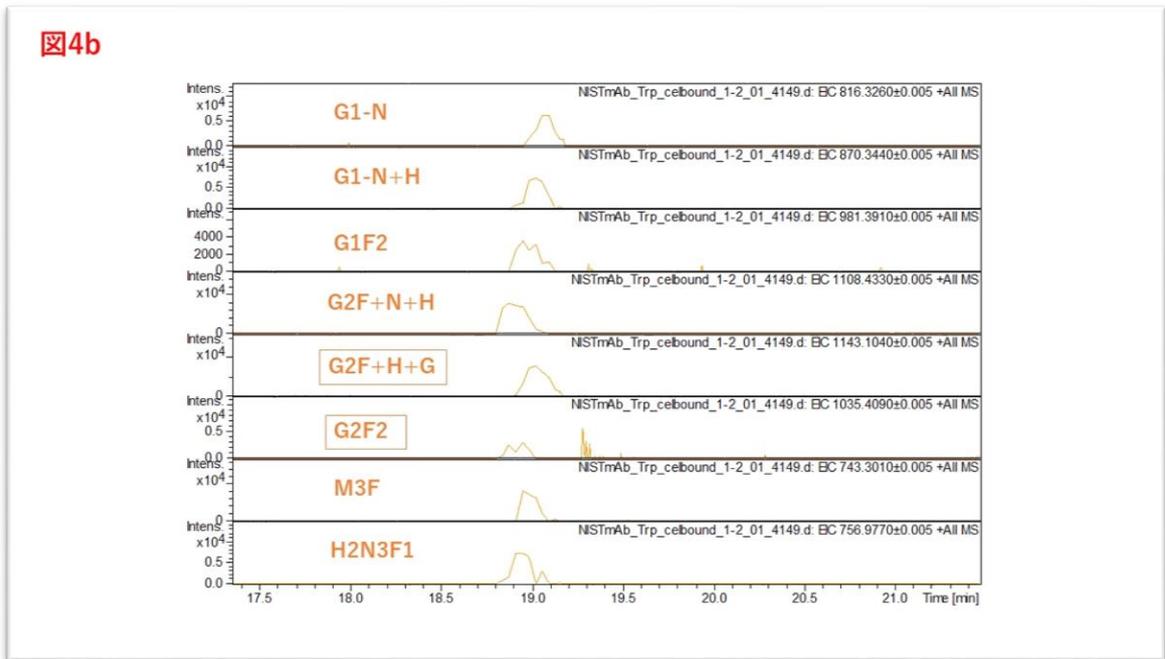
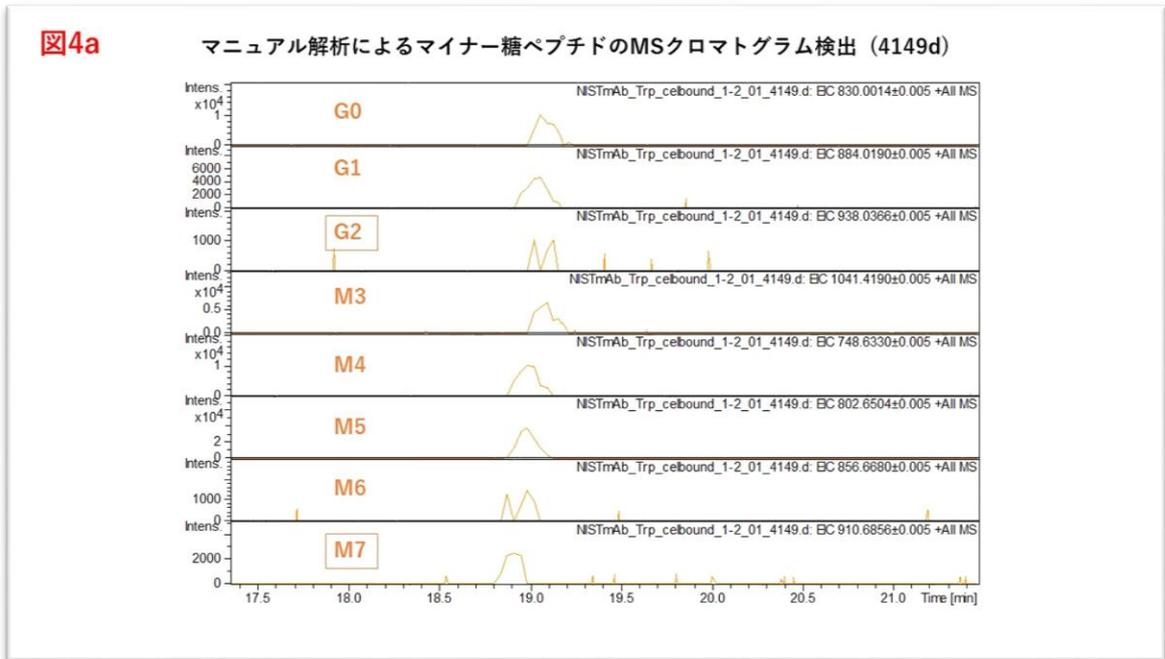


表2 Metaboscape®によるNISTmAb由来糖ペプチド検出 (4149d)

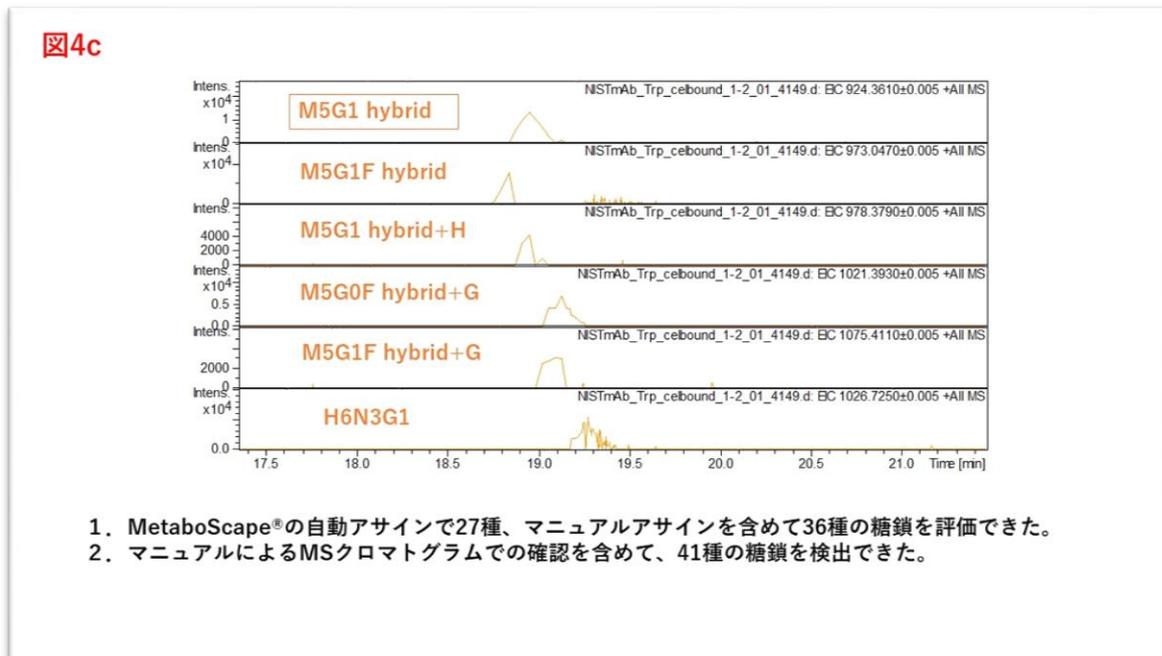
No.	RT [min]	m/z meas.	Δ m/z [mDa]	M meas.	mSigma	Ions	Name	Molecular Formula	Annotations	Area	%
1	18.95	878.5872	0.336	2833.04	35.9	[M+H+H2]3+	G0F	C106H164N18O59	Analyte List 201121	1786526	35.89405
2	18.88	932.7048	0.363	2795.093	32.4	[M+H+H2]3+	G1F	C112H174N18O64	Analyte List 201121	1685680	33.67919
3	18.84	986.7223	0.221	2957.145	33.9	[M+H+H2]3+	G2F (G1F+H)	C118H184N18O69	Analyte List 201121	457410	9.138864
4	18.92	1215.987	0.556	2429.96	16.5	[M+H+H]2+	G0F-N	C98H151N17O54	Analyte List 201121	158880	3.174357
5	18.95	865.0118	0.47	2592.013	39.1	[M+H+H2]3+	G1F-N	C104H161N17O59	Analyte List 201121	136236	2.70196
6	18.84	1040.739	-0.393	3119.196	44.9	[M+H+H2]3+	G2F+H	C124H194N18O74	Analyte List 201121	99538	1.989728
7	19.19	967.3754	0.685	2899.104	13.7	[M+H+H2]3+	G1F-N+G	C115H178N18O68	Analyte List 201121	90898	1.816105
8	19.82	595.26	0.319	1188.505	37	[M+H+H]2+	aglycosylated	C50H72N14O20	Analyte List 201121	78320	1.574791
9	18.88	919.0283	-0.574	2754.063	62.9	[M+H+H2]3+	G1F-N+H	C110H171N17O64	Analyte List 201121	60716	1.213081
10	18.8	1084.757	-0.459	3281.249	26.5	[M+H+H2]3+	G2F+2H	C130H204N18O79	Analyte List 201121	54184	1.082574
11	18.95	1203.472	0.965	2404.93	64.5	[M+H+H]2+	M5	C96H148N16O55	Analyte List 201121	53728	1.073463
12	19.06	1142.959	0.922	2283.903	140.7	[M+H+H]2+	G0-N	C92H141N17O50	Analyte List 201121	51176	1.022475
13	18.95	1000.398	0.113	2998.171	49.2	[M+H+H2]3+	G1F+N	C120H187N19O69	Analyte List 201121	36058	0.720424
14	19.16	1035.068	0.15	3102.182	40.8	[M+H+H2]3+	G2+A	C123H191N19O73	Analyte List 201121	29882	0.59703
15	18.92	1054.416	0.442	3160.225	50.1	[M+H+H2]3+	G2F+N	C126H197N19O74	Analyte List 201121	26722	0.533895
16	19.1	1089.086	0.137	3264.235	105.4	[M+H+H2]3+	G2F+G	C129H201N19O78	Analyte List 201121	24544	0.490379
17	18.95	946.3777	-2.263	2836.111	63.5	[M+H+H2]3+	G0F-N	C114H177N19O64	Analyte List 201121	23784	0.475195
18	18.90	1114.447	-0.266	2226.879	71.7	[M+H+H]2+	M3F	C90H138N16O49	Analyte List 201121	21256	0.424686
19	18.84	973.0416	-4.942	2916.103	109.7	[M+H+H2]3+	M5G1F hybrid	C116H181N17O69	Analyte List 201121	18582	0.371261
20	18.95	924.3995	-1.075	2770.057	90.5	[M+H+H2]3+	M5G1 hybrid	C110H171N17O65	Analyte List 201121	16420	0.328065
21	18.88	1108.433	0.331	3322.277	33.6	[M+H+H2]3+	G2F+N+H	C132H207N19O79	Analyte List 201121	12224	0.24423
22	19.1	830.0006	-0.244	2486.98	148.1	[M+H+H2]3+	G0	C100H154N18O55	Analyte List 201121	11256	0.22489
23	18.92	1134.961	0.278	2267.907	95	[M+H+H]2+	H2N3F1	C92H141N17O49	Analyte List 201121	11252	0.22481
24	19.13	1021.393	0.833	3061.158	66.5	[M+H+H2]3+	M5G0F hybrid+G	C121H188N18O73	Analyte List 201121	9070	0.181215
25	18.99	748.6329	0.708	2242.877	101	[M+H+H2]3+	M4	C90H138N16O50	Analyte List 201121	8322	0.16627
26	19.06	816.3265	1.121	2445.958	162.8	[M+H+H2]3+	G1-N	C98H151N17O55	Analyte List 201121	7166	0.143174
27	19.03	870.3429	0.968	2608.01	181.3	[M+H+H2]3+	G1-N+H	C104H161N17O60	Analyte List 201121	6170	0.123274
28	19.28	1026.725		1025.717		[M+H]+	H6N3G1 (3+)		Manual	5002	0.099938
29	19.06	884.0192		883.0119		[M+H]+	G1 (3+)		Manual	4748	0.094863
30	18.95	978.3784		977.3711		[M+H]+	M5G1 hybrid+H (3+)		Manual	4258	0.085073
31	18.95	981.3894		980.3821		[M+H]+	G1F2 (3+)		Manual	3638	0.072686
32	19.1	1075.409		1074.401		[M+H]+	M5G1F hybrid+G (3+)		Manual	3112	0.062176
33	19.1	694.6163		2080.827		[M+H+H2]3+	M3 (3+)		Manual	2204	0.044035
34	18.99	856.6662		1711.318		[M+H+H]2+	M6 (3+)		Manual	2016	0.040279
35	19.27	1539.586	4.042	3077.158	124.4	[M+H+H]2+	H6N3G1	C121H188N18O74	Analyte List 201121	1762	0.035004
36	19.4	1027.062		1026.054		[M+H]+	M5G1F hybrid+H (3+)		Manual	1704	0.034045
37	19.13	1102.763		3305.267		[M+H+H2]3+	G1F+N+G		Manual	1174	0.023456

N, GlcNAc; H, Hex; G, NGNA; A, NANA; 色分け: 緑= 値数自動判定; 青= マニュアル検索

注意：本実験マニュアルは研究用であり、公的な試験方法を示すものではありません



注意：本実験マニュアルは研究用であり、公的な試験方法を示すものではありません



【考察】

糖鎖の不均一性評価法として一般的に行われる遊離糖鎖解析では、糖鎖の結合位置が特定できないことや、糖鎖修飾の割合も明らかにできない等の限界がある。一方、糖ペプチドマッピングでは、結合位置やその修飾割合を明らかにできることから、極めて有効な手段と考えられている。ところが、通常のペプチドマッピングにおいて糖ペプチドを再現性良く測定することは困難であった。通常のペプチドマッピングでも糖ペプチドは検出されることがあるものの、サンプル溶解液や流路の長さ等、実験条件が変わると全く検出されなくなることがあった。今回提示したプロトコールを用いると、注入量を増しても再現よく糖ペプチドが検出されており、糖鎖構造の不均一性を糖ペプチドレベルで評価することが出来る。

【参考文献】

1. NIST interlaboratory study on glycosylation analysis of monoclonal antibodies: Comparison of results from diverse analytical methods. De Leoz et al., Mol. Cell. Proteomics, 2020, 19, 11-30.
2. Analysis of NIST monoclonal antibody reference material glycosylation using LC-MS/MS-based glycoproteomic approach. Zhao et al., J. Proteome Res., 2021, 20, 818-830.

* 用語説明

a) インソースフラグメンテーション：分子をイオン化するために高温、高電圧をかけたときに起こる分子のフラグメント化。MS/MS スペクトルを測定するために意図してフラグメント化させるのとは違い、熱等に弱い化合物が意図せずフラグメント化してしまう現象。