

DG2016-25 内因性物質の定量

- LC-MS課題検討 -

*Quantitative analysis of endogenous
substance*

- LC/MS -

-
- 高分子内因性物質のLC-MSによる定量-
 - 代替標準物質を使用した測定法-
 - Large molecule endogenous substance &
Surrogate analyte-

背景 (内因性物質の定量：過去2年間と今年の活動)

DG2014-08

- アンケート現状分析 Survey situation in Japan
- バリデーション実施法の提案 Proposed Validation strategy
 - LC-MS (Small molecules)
 - Dosed endogenous substance (like vitamin)

DG2015-15

- 代替マトリックスの選択法 Selection of "Alternative matrix"
 - 推奨選択法 Recommendable selection strategy
 - 妥当性確認法 Appropriateness of selected matrix
 - LBA (Large molecules)
 - LC-MS (Small molecules)

LC-MS
DG2016-25

LBA
DG2016-26

FACS etc
DG2016-27

高分子LC-MS Large molecules LC-MS

加藤望 Nozomu Kato
(Mitsubishi Tanabe)

野田巧 Takumi Noda (Ono)

保坂信哉 Shinya Hosaka (Kaken)

新井浩司 Koji Arai (LSI Medience)



代替標準物質 Surrogate Analyte

落合美登里 Midori Ochiai (Towa)

林善治 Yoshiharu Hayashi
(CMIC Pharma Science)



若松明 Akira Wakamatsu (GSK) : Leader

酒井和明 Kazuaki Sakai (TPM) : Advisor



- 高分子のLC-MS分析 Large molecules analysis
 - 絶対定量か、相対定量か？
Absolute or relative quantification
 - 酵素消化の方法 Enzyme digestion
 - クリーンアップのタイミング Timing of cleanup
 - I.S.添加のタイミング Timing of IS spiking

- 代替標準物質 Surrogate analyte
 - 安定同位体選択のポイント Selection stable isotope
 - 定量値妥当性の保証方法 Verification of assay results

◆ May 2016

- ✓ メンバー募集 Members application

◆ 25 Jul 2016

- ✓ キックオフ会議 Kick off Face to Face meeting (Waters品川)
- ✓ (DG2016-26, DG2016-27と合同 collaborate with 26 & 27)

◆ Aug 2016~Jan 2017

- ✓ TC と E-mailの議論 (2times/Month, Total 10 times)
- ✓ Large molecule LC-MSに関するアンケート (Dec 2016)
Survey

◆ Jan 2017~Feb 2017

- ✓ アンケート集計 Summarize survey
- ✓ ポスター準備 Posters preparation

用語	定義
Protein A/G/L	<p>細菌由来の抗体結合タンパク質.</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ Protein A:免疫グロブリン（特にIgG）のFc領域に特異的に結合 ・ Protein G:免疫グロブリン（特にIgG）のFc領域に特異的に結合し, Fabフラグメントとも弱く結合 ・ Protein L:免疫グロブリン（特にIgG）のκ軽鎖と特異的に結合
リコンビナント蛋白質	<p>遺伝子組み換え技術によって人工的に作製された蛋白質.</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 検量線試料及びQC試料の調製時の標準物質 ・ 内因性物質を投与するPK/TK試験の被験物質として利用.

用語	定義
アバンドント蛋白	マトリックス中に大量に存在する蛋白。アルブミン、グロブリン等。
Target peptide	分析対象タンパク質を酵素消化後の、当該タンパク質特異的なアミノ酸配列を持つペプチド。高分子のようにダイレクトにLC-MSで測定することが困難な場合、本ペプチド配列のレスポンスを基に当該タンパク質の定量を行う。
Flanking peptide	Target peptideのC末/N末の片方あるいは両方を数アミノ酸残基伸長したペプチド。酵素消化時の消化効率の補正を意図。
Surrogate peptide	Target peptideと同義。
カルタヘナ（法）	遺伝子組換え生物などの取扱いの規制に関する国際的条約「カルタヘナ議定書」の国内での実施に必要な取扱いを定めた法律。

用語	定義
たんぱく質への処理に関する用語	
翻訳後修飾	翻訳後のタンパク質の化学的な修飾。これは多くのタンパク質の生合成の後方のステップの1つ。 例（アシル化, アセチル化, アルキル化, アミド化, グルタミル化, リン酸化, . . . etc）
変性	タンパク質の高次構造を破壊すること。酵素消化効率を上げる目的で実施。
還元	ジスルフィド結合を切断すること。酵素消化効率を上げる目的で実施。
アルキル化	ジスルフィド結合切断後に生成するチオール基を保護すること。ジスルフィド結合の再形成を抑制する目的で実施。

用語	定義
マトリックス	分析のために選択された全血，血漿，血清，尿又は他の体液や組織。
実マトリックス	対象生物由来のマトリックス。
代替マトリックス	実マトリックスの代わりとして用いるマトリックス
非生体マトリックス	代替マトリックスのうち，実マトリックスを含まないマトリックス（水，緩衝液，artificial CSF，synthetic urineなど）。
除去マトリックス	代替マトリックスのうち，実マトリックスから分析対象物質を除去したマトリックス。
低値実マトリックス	性差，日内変動，個体間変動，年齢，食事などの制限により内因性物質濃度を低値に抑えた実マトリックス。このDGでは代替マトリックスに含めない。
実試料	PK/TK試験等で分析のために得られた試料。

用語	定義
マトリックス効果	<p>試料中のマトリックス由来成分による分析対象物質のレスポンスへの影響。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ LC/MS：分析対象物質のイオン化への影響 ・ LBA：分析対象物質のシグナル強度に対する影響
ブランクマトリックス	<p>検量線試料やQC試料の調製に用いるマトリックス。用途や内因性物質レベルに応じて、代替マトリックス、実マトリックスから選択する</p>
安定同位体	<p>同一原子番号を持つものの中性子数が異なる核種のうち、放射線を出さない安定な核種。同一元素の同位体の化学的性質は（ほぼ）同等であるが、質量数が異なるため質量分析計で分離が可能。LC-MS分析では^2H、^{13}C、^{15}N等で標識した内標準物質（Stable Isotope Labeled-Internal Standard; SIL-IS）や代替標準物質が利用される。</p>



高分子LC-MS分析

Large Molecule LC-MS analysis

<http://bioanalysisforum.jp/>

定量法が絶対なのか？

サンプル中濃度が
絶対なのか？

絶対定量

Absolute quantitation

相対定量

Relative quantitation

オミックス
Omix

- 検量線必要
Need Calib Std
- 検体中の濃度
Actual concentration

- 検量線不要
Not need Calib Std
- 時間ゼロに対する相
対比 Relative ratio to
time zero

分析化学
Analytical
Chemistry

- 検量線不要
Not need Calib Std
- 滴定法等 Titration
容量分析 Gravimetric
重量分析 Volumetric

- 検量線必要
Need Calib Std
- 絶対検量線法
Absolute calib
- 内標準法 Internal Std

容量分析：滴下容量から物質量を定量、重量分析：沈殿物の重量から物質量を定量

絶対定量と相対定量の定義と関係性

分析化学

定量分析

絶対定量法

自身による

検量線も比較標準も必要としない精確で絶対的な定量法（ものさしが不要な方法）

Ex. 重量分析, 容量分析, クーロメトリー*, など

相対定量法

一般的に標準試料を用いて検量線を作成し, 得られた検量線から逆推定により, 未知試料中の測定対象物質の濃度を推定する定量法（ものさしが必要な方法）

ライフサイエンス（オミクス）分野

絶対定量	サンプル中の物質数の絶対値を定量する解析 ※濃度既知のサンプルを用いた検量線等は必要!
相対定量	相対定量は性質の異なるサンプル間の遺伝子の発現比を求める Ex. 培養細胞などに刺激を加えその変化を非刺激サンプルと比較

*) クーロメトリー :

電流量を時間積分して電荷量として測定する手法。電荷量は分子量に比例するので分子の絶対量がわかる。

絶対定量：分析化学とオミクス分野での認識

絶対定量（法）はオミクス分野では分析化学用語と異なる観点で用いられている

分析化学用語：

化合物の物理的・化学的性質によって**分子の絶対量が分かる分析法**

オミクス分野の用例：

検量線等を使って化合物濃度を定量することにより**試料中の絶対濃度**を算出する評価法

参考文献

金沢大学理工学域物質化学類化学コース、分析化学研究室HP (2017.2.28確認)

<http://chem.s.kanazawa-u.ac.jp/anal/research/area3.html>

「検量線に関わる理論と評価方法について」北村 恭朗, 農薬調査研究報告 (7), 101-106, 2015 農林水産消費安全技術センター

https://www.acis.famic.go.jp/acis/chouken/chouken/ronbun07_2014.pdf

「フロー分析法の滴定への応用」田中 秀治 1, 中野 恵文 2.1 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部：2 鳥取大学地域学部, 愛知工業大学 研究用サイトHP (2017.2.28確認)

http://aitech.ac.jp/~jafia/english/jfia/contents/21_2/Taanaka_Nakano.pdf

ロシュ・ライフサイエンスHP(2017.2.28確認)


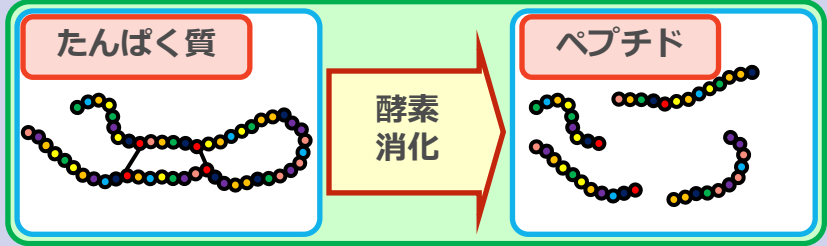
<https://roche-biochem.jp/support/lets-start-qpcr/04.html>

絶対/相対定量に対する本DGの考え方

- ✓ 厳密な分析化学の定義の中で議論をすると、低分子であれ、高分子であれ、検量線を用いて定量する以上、「相対定量」の範疇となる
- ✓ しかし、「相対定量」の中でも定量性に幅があり、真値（「絶対定量」）に近くなるように対策を講じることは可能
- ✓ 特にMSを用いた高分子分析では、消化効率、翻訳後修飾などの定量性の不確実性が低分子分析と比較して多い
- ✓ 発表内容における定量性は、「低分子と比較して、高分子の定量性はどうか」といった観点で述べる

**本DGではMSを用いた高分子分析特有の
不確実性を小さくするアプローチ法を提案する**

低分子定量と高分子定量の比較 (LC-MS)

	低分子定量	中～高分子定量
特徴	<p>100 < MW < 1000 そのものを分析</p> 	<p>MW < 10000 (酵素消化なし) : 中分子 MW > 10000 (酵素消化あり) 翻訳後修飾が存在 (既知, 未知)</p> 
Pros	<ul style="list-style-type: none"> ・ サンプル前処理が比較的簡易 ・ 情報 & 経験が豊富 ・ 分析感度が比較的高感度 	<ul style="list-style-type: none"> ・ ELISAなどの別の方法との比較が可能 ・ 複数のターゲットペプチドによる複数の測定の可能性
Cons	<ul style="list-style-type: none"> ・ 分析カラムに保持しなければ測定困難 ・ MW < 100のものは検出するのが困難 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 経験値不足 ・ 不確実性要素が大きい ・ 分析難易度が高い ・ 前処理方法が画一化されていない

高分子分析特有の不確実性とは

- 酵素消化の方法について
- クリーンアップのタイミングについて
- I.S.添加のタイミングについて



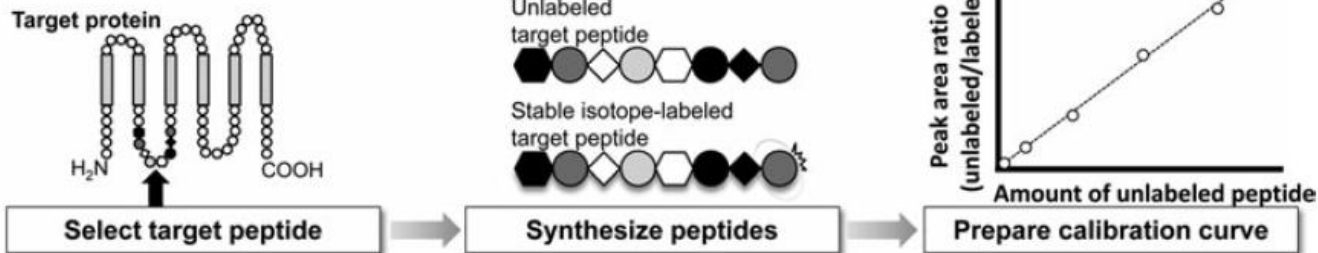
ここまで

- 非特異的な修飾について
- 特異性 & 選択性の担保について
- 定量に用いるペプチドの数について
- . . .

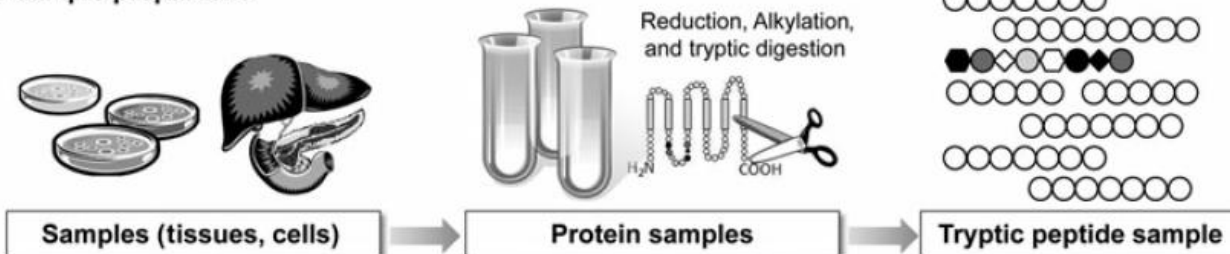
MSを用いた高分子分析特有の不確実性を小さくするアプローチ法として、酵素消化、クリーンアップのタイミング、I.S.添加のタイミングを議論した。

タンパク質定量分析の流れ

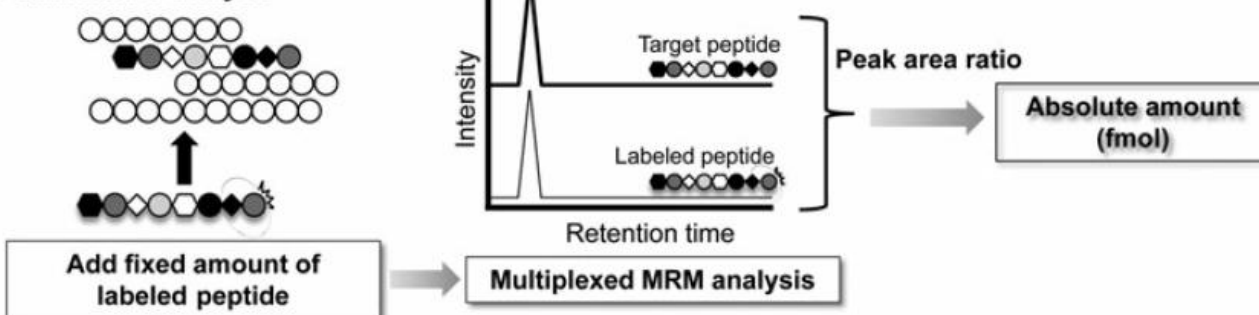
1. Select target peptide and prepare calibration curve.



2. Sample preparation



3. Quantitative analysis



参考 Ohtsuki *et al.*, *J Pharm Sci.*, **100**: 3547-3559 (2011)
8th JBF Symposium, DG2016-25

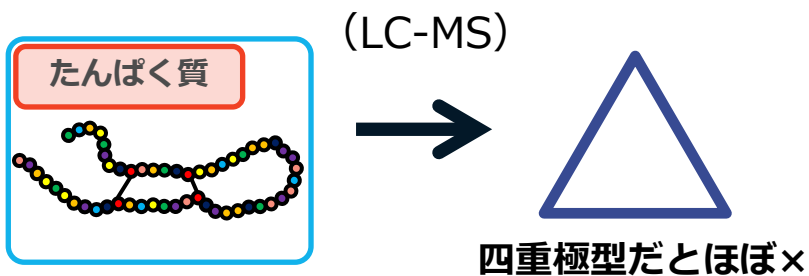


酵素消化の方法

Enzyme Digestion

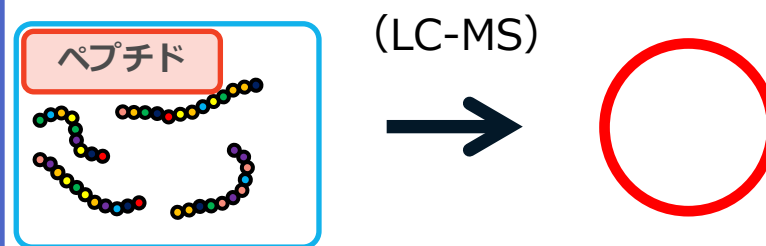
酵素消化の目的

- 分子量の大きなタンパク質をダイレクトにLC-MSで定量分析することは難しい



(感度や分解能の問題で難易度が高い)

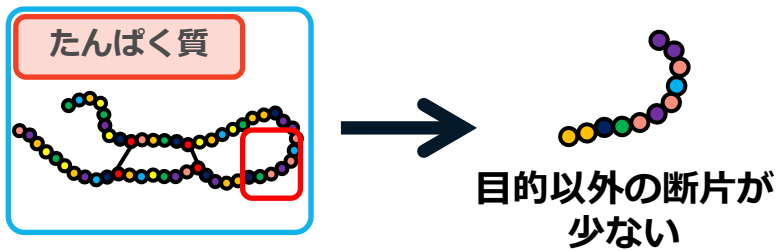
- 酵素消化により断片化したペプチドであればLC-MSで定量分析可能となる



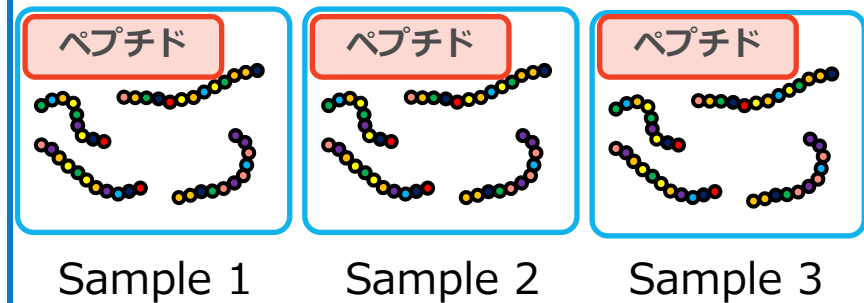
(ほぼ低分子と同様に扱える)

定量向きの消化反応の条件

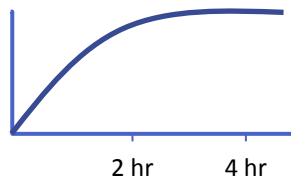
- 特異性が高いこと



- 再現性が良好であること



- 高効率な酵素を用いること



- 短時間でプラトーに達する
- 必要な酵素の量が少ない
(実験上取り扱いやすい)

- その他

- 反応条件の許容が広い (ぶれない)
- 生成する目的のペプチドが安定
- トータルのコストが安い . . . など

酵素消化に関わる主な工程



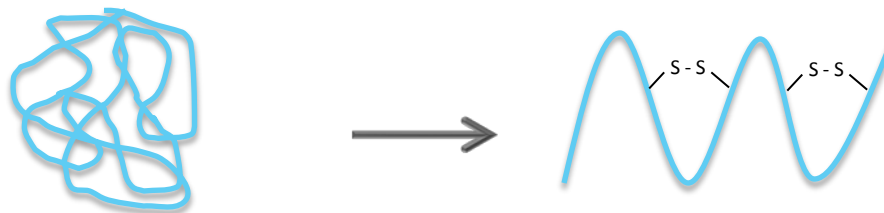
酵素消化に関わる主な工程

アンケート: Q5

酵素消化までの一般的な工程

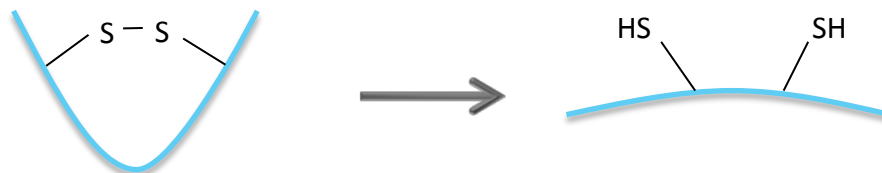
変性 *denaturation*

タンパク質高次構造の破壊



還元 *reduction*

ジスルフィド結合の還元



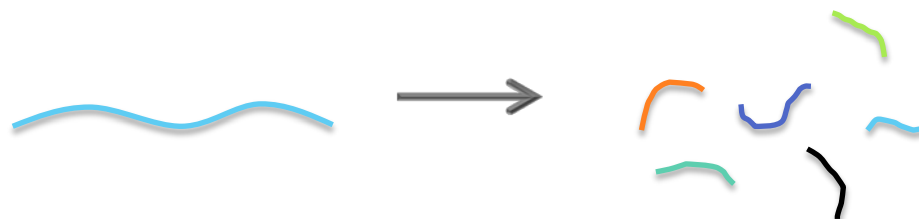
アルキル化 *alkylation*

ジスルフィド再形成の抑制

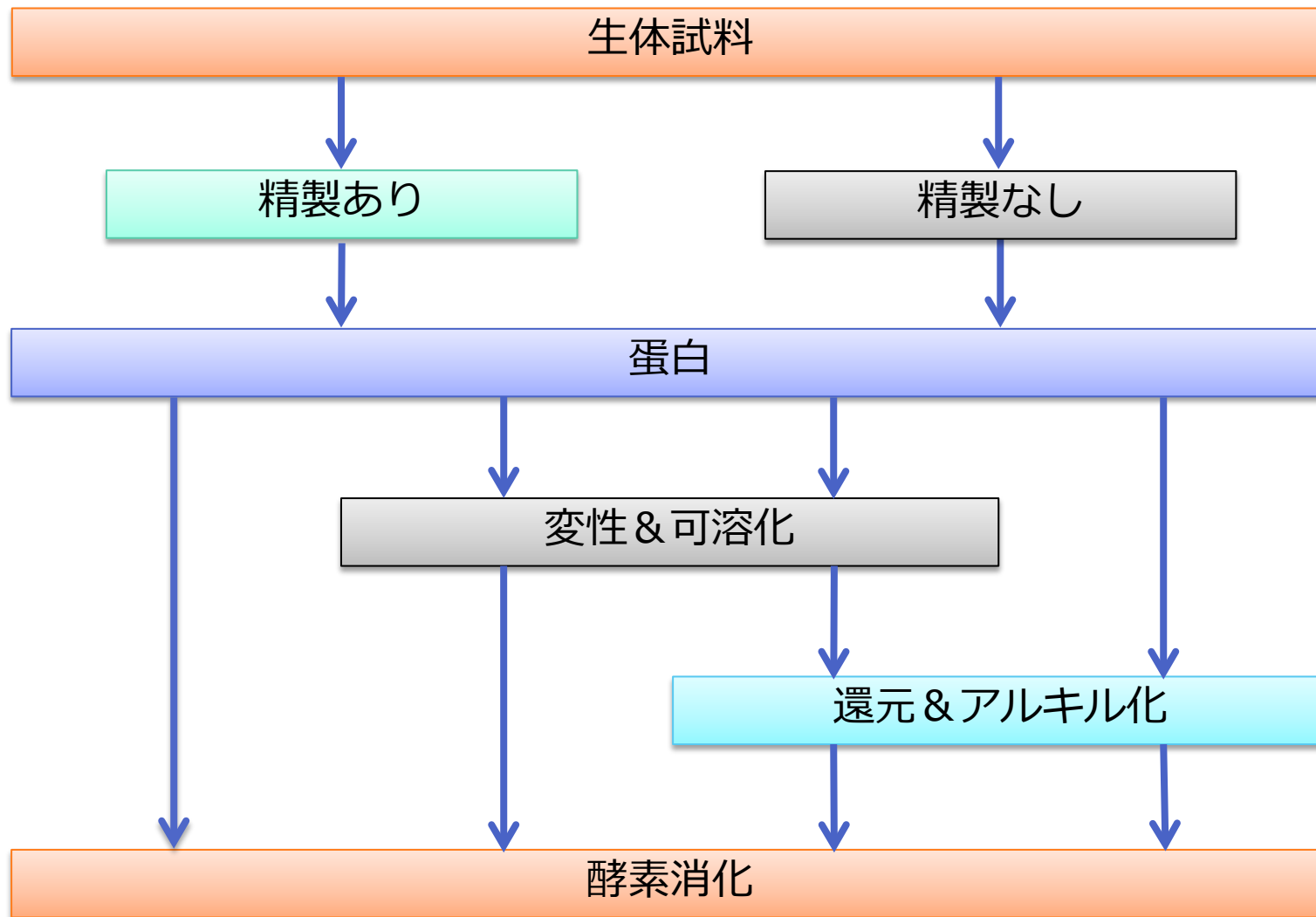


酵素消化 *enzyme digestion*

ペプチドへの断片化



酵素消化までの処理パターン



処理パターンの比較

	変性&還元アルキル化後に消化	(変性なし)還元アルキル化後に消化	変性後消化(還元アルキル化なし)	直接消化(変性&還元アルキル化なし)
消化効率	高い	中程度	中程度	低い
作業工程	多い	中程度	中程度	少ない
目的外のペプチド等夾雑物の生成	多い	中程度	中程度	少ない

✓ 変性→還元・アルキル化→酵素消化の手順が一般的ではあるが・・・

感度が十分 → **作業工程を減らしてみる**
夾雑物が多い → **消化効率をあえて低くする**

} という選択肢もあり

アンケート: Q13-16

変性剤の種類・比較

	Urea	DOC (Sodium Deoxycholate)	SDS	MeOH
Pros	参考文献が多い	LC-MS分析前の除去が容易	<ul style="list-style-type: none"> ・タンパクを修飾しない ・Trypsin消化中も使用可能 	簡便で脱塩が不要
Cons	熱分解によりシアン酸生成 (一級アミンをカルバミル化)	酵素消化時の濃度に注意が必要	イオン化抑制の影響が大きい	酵素消化時の有機溶媒濃度に注意が必要

参考 Jennifer L. Proc et al. *J Proteome Res.* 2010, October 1; 9(10): 5422–5437
 Yuhuan Ji et al. *Anal Chem.* 2015 June 2; 87(11): 5500-5504

アンケート: Q25

還元剤の種類・比較

	DTT :Dithiothreitol	TCEP :Tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride
Pros	<ul style="list-style-type: none"> ・ 参考文献が多い ・ 安価 	<ul style="list-style-type: none"> ・ pH<8の場合はDTTより還元効率が高い ・ 無臭でチオール非含有
Cons	<ul style="list-style-type: none"> ・ 酸化を受けやすい ・ pH>7の場合にのみ還元剤として働く ・ 還元力がTCEPよりも低い 	<ul style="list-style-type: none"> ・ DTTに比べ価格が高い ・ 塩酸塩なので, Trypsin消化時のpHに注意が必要

参考 : http://www.gelifesciences.co.jp/technologies/protein_preparation/chapter2_3.html

消化酵素（第一選択）

	Trypsin	Lys-C
Pros	<ul style="list-style-type: none"> ・最も一般的に用いられている ・C末端がLys 又はArgとなり、ペプチド断片の感度が上昇 	<ul style="list-style-type: none"> ・TrypsinよりもpH許容範囲が広い ・自己消化が少ない ・C末端がLysとなりペプチド断片の感度が上昇 ・Lys-Pro配列も切断可能
Cons	<ul style="list-style-type: none"> ・自己消化に注意が必要 ・切断されないLys部位が残ることがある 	<ul style="list-style-type: none"> ・切断後のペプチド配列が長い

**消化したい位置に応じて使い分ける
Trypsin/Lys-C mixの選択肢もある**

アンケート: Q11

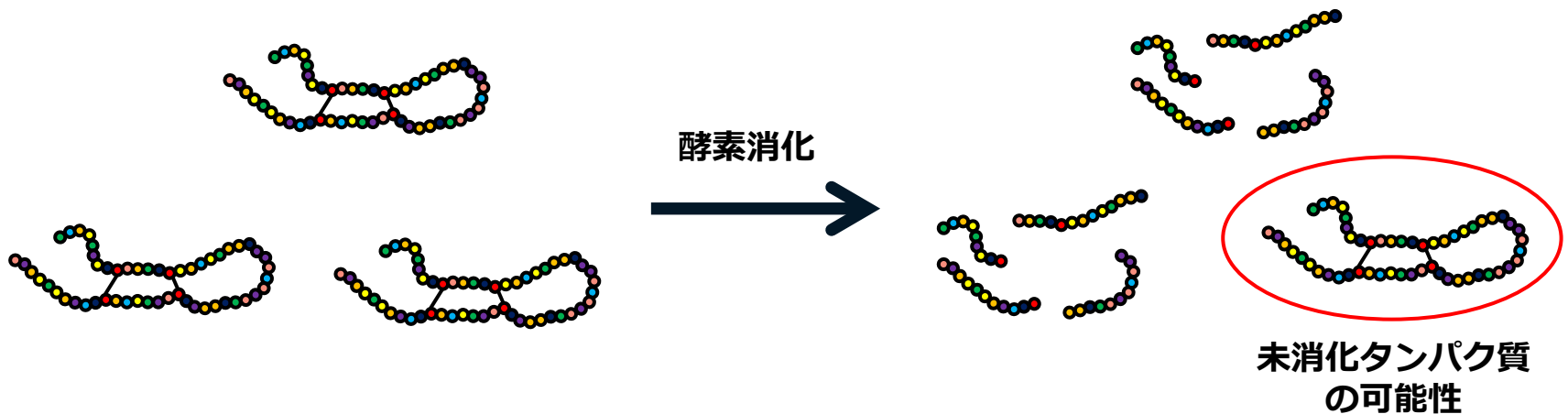
その他の消化酵素の種類

	Chymotrypsin 切断部位： 芳香族アミノ酸 (Tyr, Phe, Trp) のC末端	Asp-N 切断部位： AspのN末端,および CysのN末端	Glu-C 切断部位： GluのC末端および AspのC末端
Pros	Trypsinとの組み合わせでシーケンス カバー率向上		
Cons	反応効率が低い C末端が塩基性アミノ酸とならないのでターゲットペプチドの感度が低い場合あり		

TrypsinやLys-Cと比較すると反応効率が低い傾向があるため定量には向かない印象

消化効率を確認する意味①

- ✓ 例えば目的のタンパク質が100%消化できていれば理想だが、特に内因性物質の場合、それを確認することは難しく、消化反応の終点を見極めることができない。

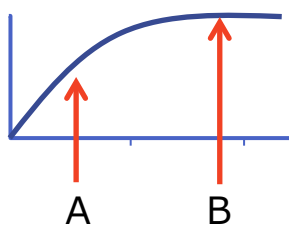


- ✓ そのため結果の再現性が悪かったり、目標感度が得られない場合、消化効率を確認することでよりよいメソッドの作成が可能

アンケート: Q17-20

消化効率を確認する意味②

- 高分子特有の不確実性を小さくするため



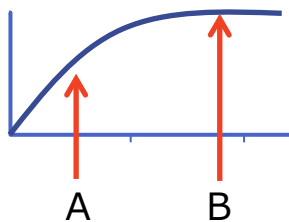
AよりBの位置の方がより真値に近い

- 試薬の種類など、条件検討の比較のため



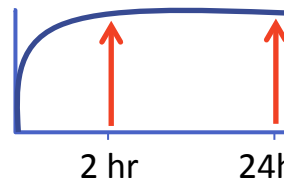
A Aの試薬が最も効率が良い
B 目的のペプチドの生成量も多い
C

- 良好な再現性を得るため



AよりBの位置の方がより実験誤差が少ない

- 余計な反応を避けるため



・目的外の夾雑物の生成や目的ペプチドの分解を防げる
・無駄な時間の消費を防げる

消化効率の確認方法（例）

✓ Trypsin量と反応時間を検討し、消化効率をしたグラフ例

Serum digestion condition (Trypsin 1 μ g, Incubation at 37°C)

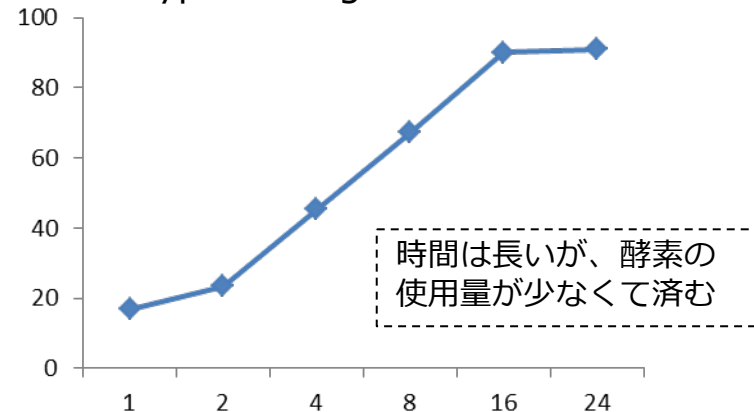
Sample Name	P.A.R	SD	Digestion (%)
Control	2.23	-	-
0.5 hr	0.374	0.155	16.8
1 hr	0.522	0.321	23.4
2 hr	1.01	0.18	45.3
4 hr	1.50	0.11	67.3
16 hr	2.01	0.04	90.1
24 hr	2.03	0.05	91.0

Serum digestion condition (Trypsin 5 μ g, Incubation at 37°C)

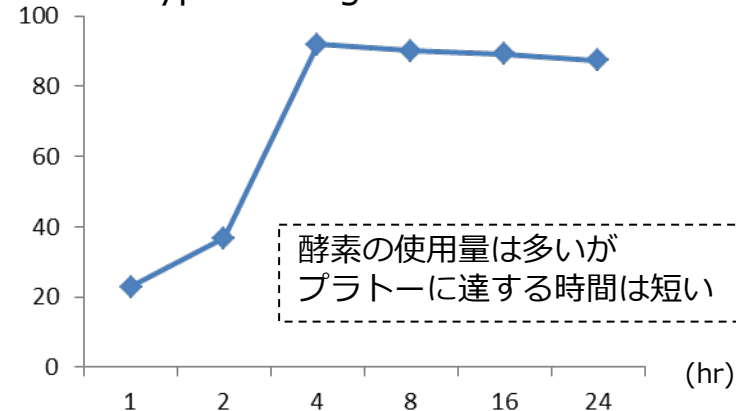
Sample Name	P.A.R	SD	Digestion (%)
Control	2.23	-	-
0.5 hr	0.512	0.145	23.0
1 hr	0.821	0.255	36.8
2 hr	2.05	0.03	91.9
4 hr	2.01	0.04	90.1
16 hr	1.99	0.05	89.2
24 hr	1.95	0.03	87.4

(%)

Trypsin: 1 μ g



Trypsin: 5 μ g



酵素消化のまとめ

- 目的は分子量が大きなタンパク質をLC-MSで測定可能とすること
- 変性, 還元, アルキル化は, 目的に応じてカスタマイズが可能
- 高効率かつ再現性の優れた酵素の選択が必要
- 消化効率の検討は, 目的の試験条件に合った形で実施.

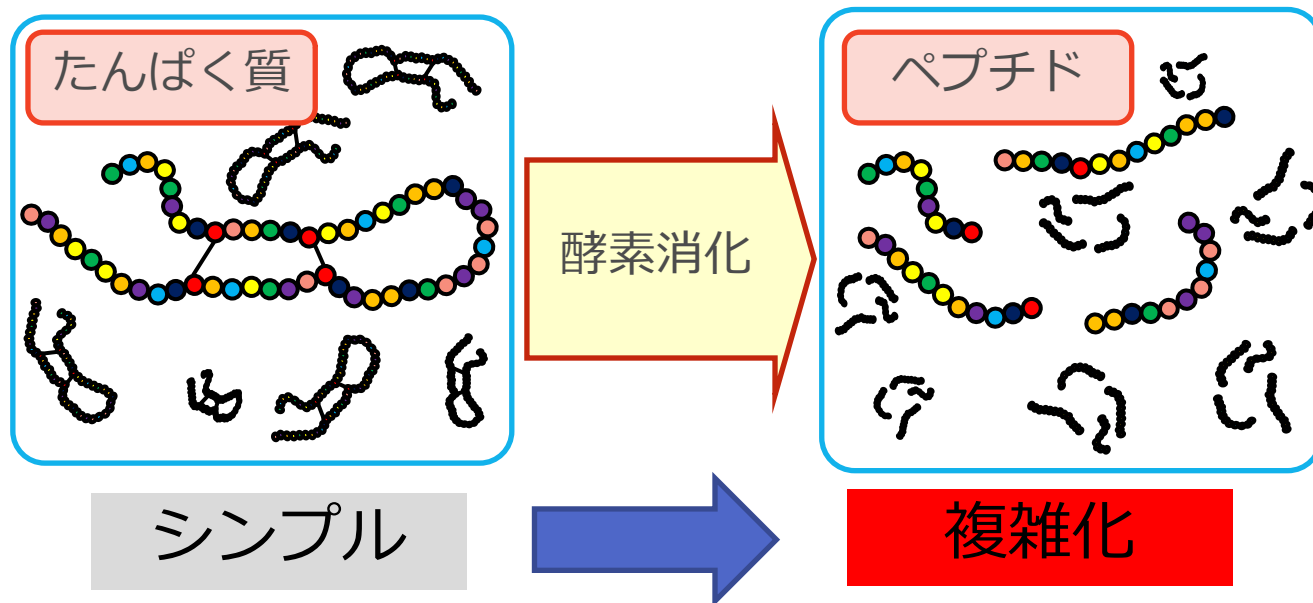


クリーンアップのタイミング

Timing for Cleanup

クリーンアップの目的

高分子特有の問題の一つ



感度獲得を目的として酵素消化を行うため、サンプルが複雑化

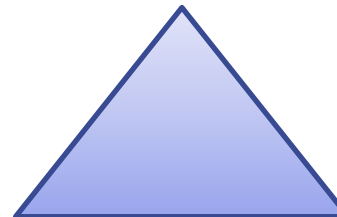
クリーンアップの重要性が高い

クリーンアップのタイミング



酵素消化前

アルブミン除去
 Protein A/G/L
 ターゲット蛋白精製抗体
 蛋白沈殿法による脱塩
 分子量サイズ除去



使用傾向は
 酵素消化後

酵素消化後

固相抽出
 液々抽出
 除蛋白 (有機溶媒, 酸)

クリーンアップの定量性の担保

酵素消化前

Recombinant Protein

によるバリデーション

- 回収率評価, 濃度依存性
- 再現性 (酵素消化含む)
- 真度 & 精度

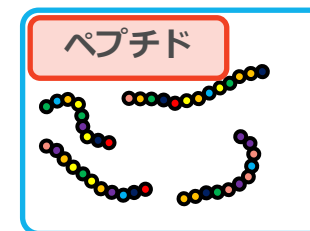
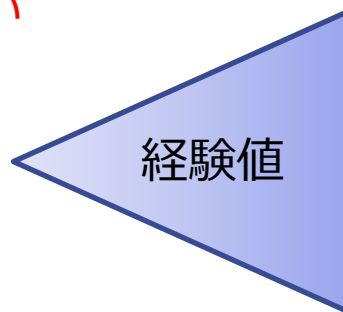
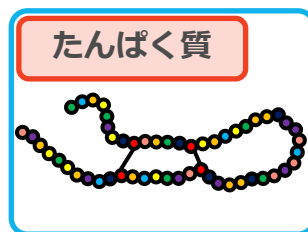
酵素消化後

Target peptide

によるバリデーション

- 回収率評価, 濃度依存性
- 再現性
- 真度 & 精度

全体として経験が少ない



各クリーンアップの難易度

酵素消化前

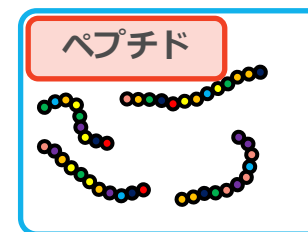
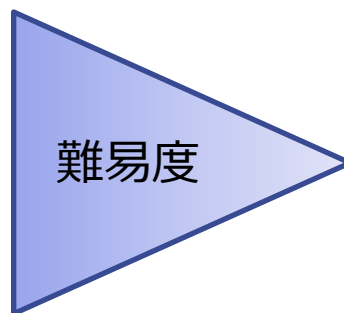
難易度高い

- 蛋白特有の手法が必要
- 濃度依存性の担保が難
- 条件検討に多くの時間
(未知の場合が殆ど)

酵素消化後

難易度低い

- 低分子の手法と同じ
- 濃度依存の担保が容易
- 条件検討が既に画一化



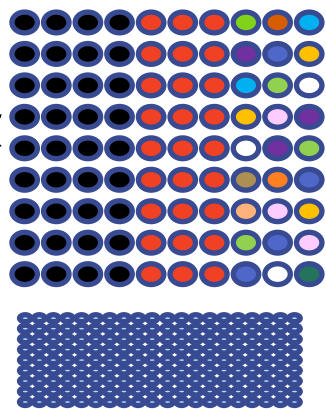
標準物質の選択によって難易度が異なる

酵素消化前の前処理

	アバンドント蛋白の除去 (ProteinG, フィルターなど)	ターゲット蛋白抗体による精製 (特異抗体など)	蛋白沈殿法による脱塩 (アセトン沈殿など)
特徴	大量に存在する蛋白の除去 分子量による蛋白の抽出	特定の蛋白のみを抽出	塩の除去 蛋白の濃縮

構成成分

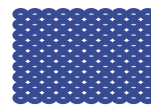
蛋白
塩類



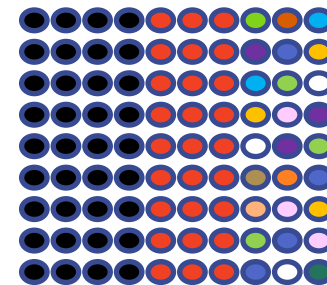
アルブミン,
グロブリンなどの除去



目的蛋白以外の除去



塩の除去



酵素消化前の前処理のPros/cons

	アバンドント蛋白の除去 (ProteinG, フィルターなど)	ターゲット蛋白抗体による精製 (特異抗体など)	蛋白沈殿法による脱塩 (アセトン沈殿など)
Pros	<ul style="list-style-type: none"> ・ 簡便 ・ 安価 ・ スループットが高い 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 精製度が高い ・ 消化効率の向上 (効果：中) 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 簡便 ・ 安価 ・ 消化効率の向上 (効果：大)
Cons	<ul style="list-style-type: none"> ・ ターゲット以外の蛋白が多く残存 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 抗体が高価あるいは入手困難 ・ 濃度依存性評価が必要 ・ 回収率が低い 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 蛋白選別は不可 ・ スループットが低い ・ 回収率が低くなる傾向あり

共通課題 : 回収率の補正が必要

酵素消化後の前処理

	除蛋白 (有機溶媒, 酸)	固相抽出	液々抽出 (水相回収)
Pros	<ul style="list-style-type: none"> ・ 簡便 ・ 安価 ・ スループットが高い ・ 補正の必要性が低い 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 自動化が可能 ・ 低分子と同じ原理 ・ 特異性の高い抽出が可能 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 簡便 ・ 安価 ・ 疎水性相互作用以外の抽出
Cons	<ul style="list-style-type: none"> ・ 物性による回収率の低下 ・ 希釈に伴う感度低下 ・ 精製度が低い ・ 特異性が低い 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 補正が必要 ・ 対象物によって最適化が必要な場合あり 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 補正が必要 ・ スループットが比較的低い ・ 特異性が低い

共通利点 : ターゲット蛋白に関わらず設定可能

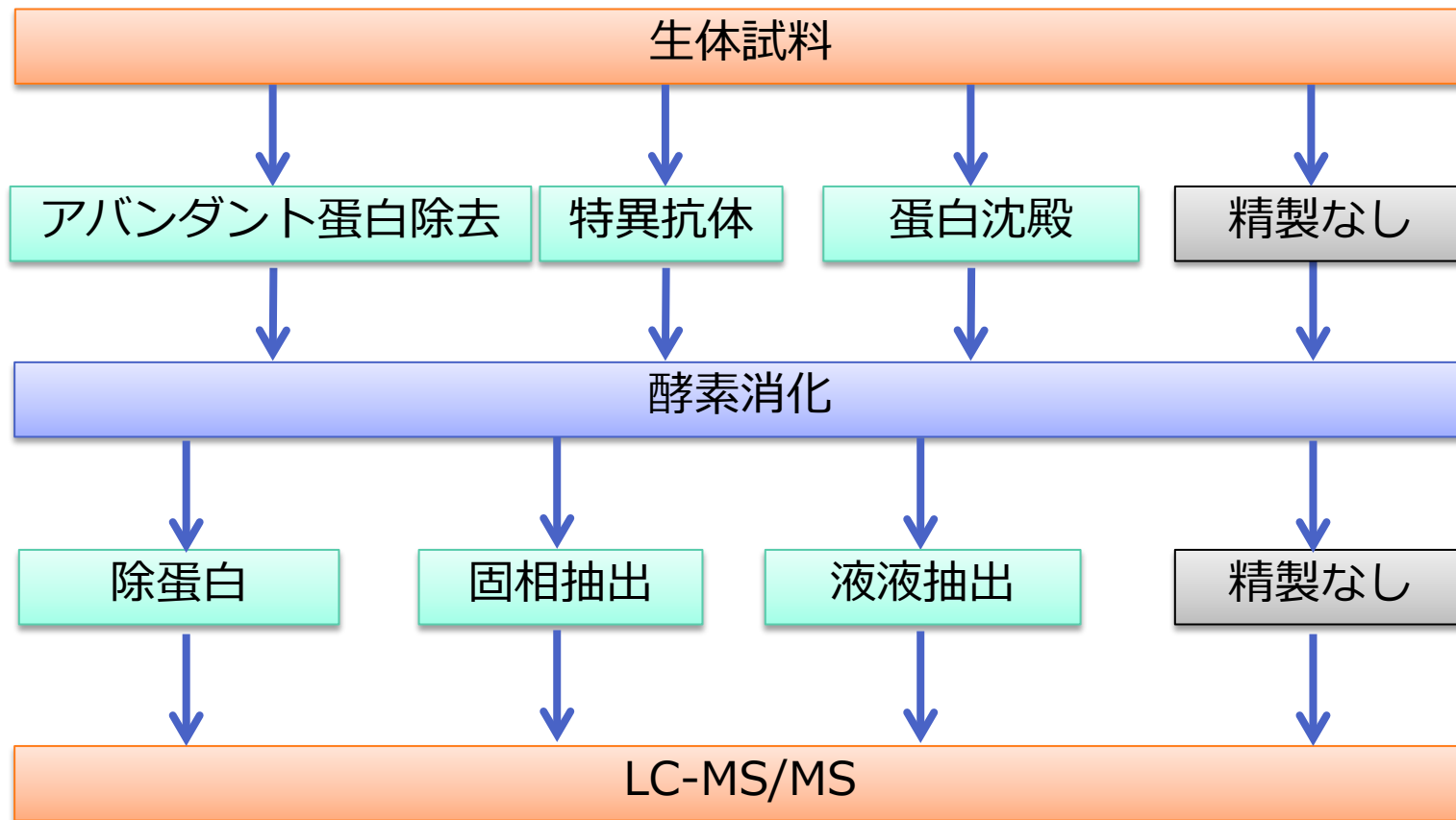
共通課題 : ターゲット蛋白特異的な精製ではない

中分子（10kDa未満）の前処理

	酵素消化しない	酵素消化する
Pros	<ul style="list-style-type: none"> そのまま測定可能 バリデーション評価が低分子と同じ 	<ul style="list-style-type: none"> 感度の向上 高分子量蛋白と同じメソッドが使用可能
Cons	<ul style="list-style-type: none"> 感度の確保が難 	<ul style="list-style-type: none"> 特異的ペプチドの存在有無 前駆体（プロセッシング前）などとの区別

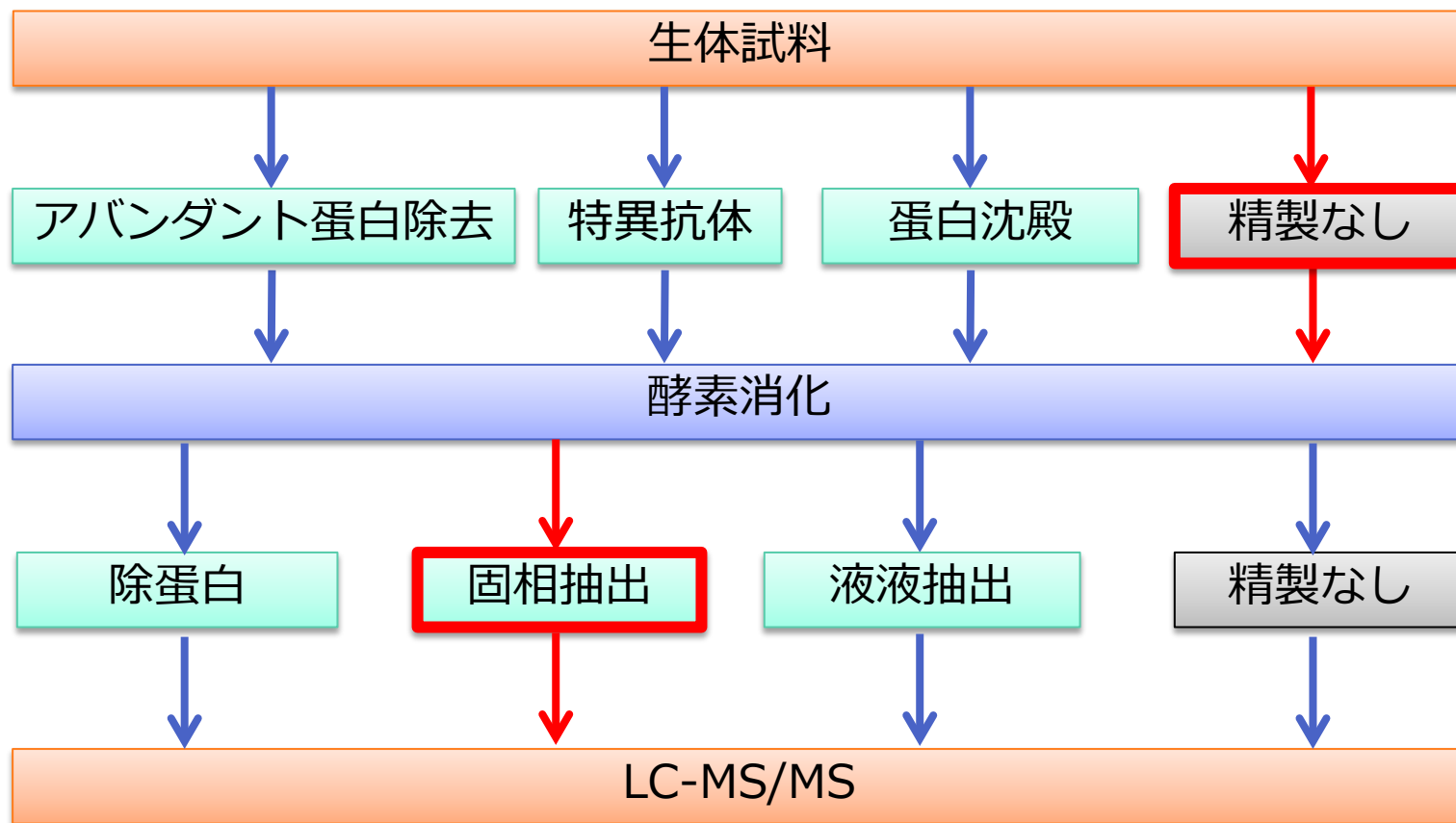
クリーンアップは高分子に準じる

クリーンアップのパターン



堅牢性, 感度および効率を考慮して,
組み合わせる必要あり

クリーンアップパターン (DGの傾向)



選択理由：作業効率，脱塩および濃縮

各項目の経験はあるが，結局上記に落ち着くことが多い

標準品とクリーンアップタイミングの関係

標準品	酵素消化前 クリーンアップ	酵素消化後 クリーンアップ	考察
Recombinant Protein	◎	◎	各クリーンアップのバリデーションが可能
Flanking peptide	×	○	酵素消化前に関しては別途検討が必要*
Target peptide	×	○	酵素消化前に関しては別途検討が必要*

*酵素消化前のクリーンアップを併用する際は、クリーンアップの再現性および用量依存評価のために、Recombinant Proteinがあると良い。

選択する標準品にも配慮が必要

内部標準品との関係は、I.S.添加タイミングで考察

クリーンアップのタイミングのまとめ

- 議論理由は、酵素消化によるサンプルの複雑化があるため、クリーンアップの重要性が高い
- 酵素消化前のクリーンアップは、低分子では使用しない方法があり、Pros/Consの考慮が必要.
- 酵素消化後のクリーンアップは、低分子の経験が活用可能.
- クリーンアップ手法の選択は、標準品の選択も考慮.



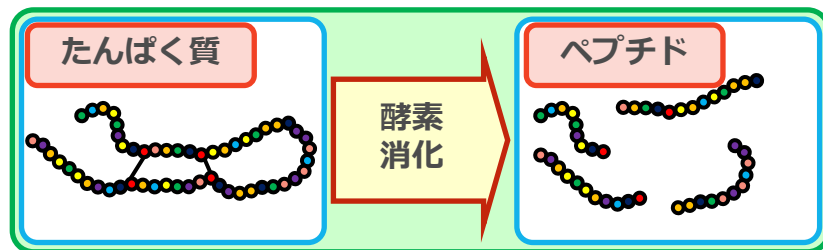
I.S.添加のタイミング

Timing of I.S. spiking

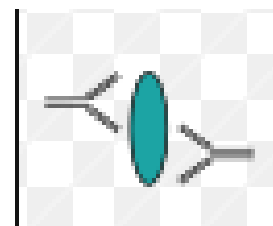
I.S.添加タイミングについて

	I.S.の役割
低分子	<ul style="list-style-type: none"> ・クリーンアップ補正 ・MS分析補正
高分子	<ul style="list-style-type: none"> ・酵素消化補正 ・クリーンアップ補正（高分子特有の目的あり） ・MS分析補正

酵素消化



蛋白の抽出



低分子とは別の視点で、
I.S.の添加タイミングを考察する必要がある

I.S.の種類と添加タイミング

Therapeutic protein (antibody) in serum / plasma

*Heavy-isotope labeled peptide

アンケート: Q6 - 10

Whole SIL-IS*



Affinity capture (immuno, ProteinA)

精製

Flanking Peptide SIL-IS*



Digestion (by trypsin)

酵素消化
(還元, アルキル化等含)

Target Peptide SIL-IS*



LC-MS/MS of signature peptides

消化以降の操作
(前処理, 測定等)

酵素
消化前

酵素
消化後

Anal. Chem. 2012, 84, 1267-1273 一部改編

<http://bioanalysisforum.jp/>

**Whole SIL-ISが最も真度が高い。
使用するI.S.の種類によって添加タイミングは異なる。**



どのような種類のI.S.を用いても課題は存在するため、
どの目的でI.S.を添加しているかを明確にする必要性

各I.S.の特徴

	Pros	Cons
Whole SIL-IS	<ul style="list-style-type: none"> ・ サンプル前処理の全ての補正（酵素消化&クリーンアップ&MS補正） 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 高価 ・ 未販売のものあり ・ カルタヘナに該当する場合も
物性類似蛋白 （種差を利用）	<ul style="list-style-type: none"> ・ サンプル前処理の全ての補正（酵素消化&クリーンアップ&MS補正） 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 比較的高価 ・ 消化効率補正が不完全 ・ MS補正が不完全 ・ カルタヘナに該当する場合も
Flanking Peptide SIL-IS	<ul style="list-style-type: none"> ・ 酵素消化とMS補正 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 消化効率補正が不完全
Target Peptide SIL-IS	<ul style="list-style-type: none"> ・ MS補正 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 消化効率の補正は不可
内部標準なし	<ul style="list-style-type: none"> ・ 簡易 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 消化効率およびMS補正が不可

JBF Case study 1

生体試料

蛋白の抽出

蛋白

変性 & 可溶化

還元 & アルキル化

酵素消化

ペプチド

脱塩 & 濃縮

質量分析計

クリーンアップ（特異抗体を除く）での
回収率を補正したい！

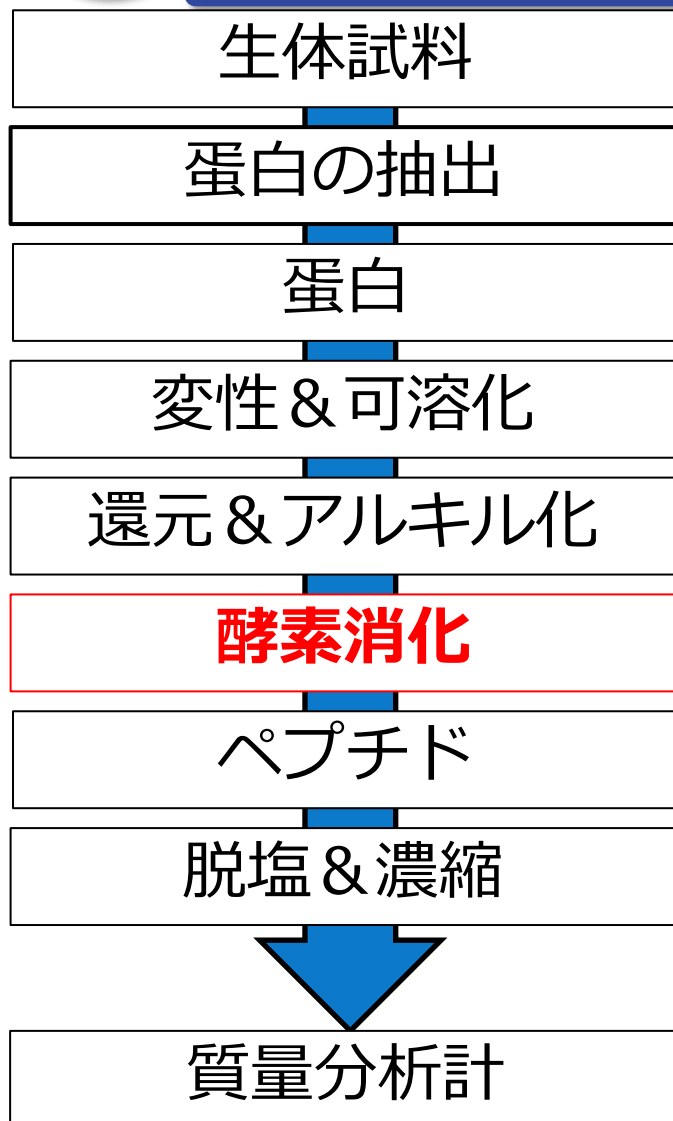
注：whole_I.S.を準備できない場合

Target peptideを酵素消化前に添加

WholeあるいはFlankingと定量値が
同一となることを確認
(確認はSILでなくてよい)

Wholeでは問題ないが、Targetでは吸
着が発生する場合もある

JBF Case study2



試料中の酵素消化を確認したい！

物性類似タンパクの
利用

Wholeの代用として安価に
入手できる可能性

抽出, 酵素消化に限定的に
使用し, 測定の補正に関し
てはTargetを用いる

消化効率を把握した
タンパク質を添加

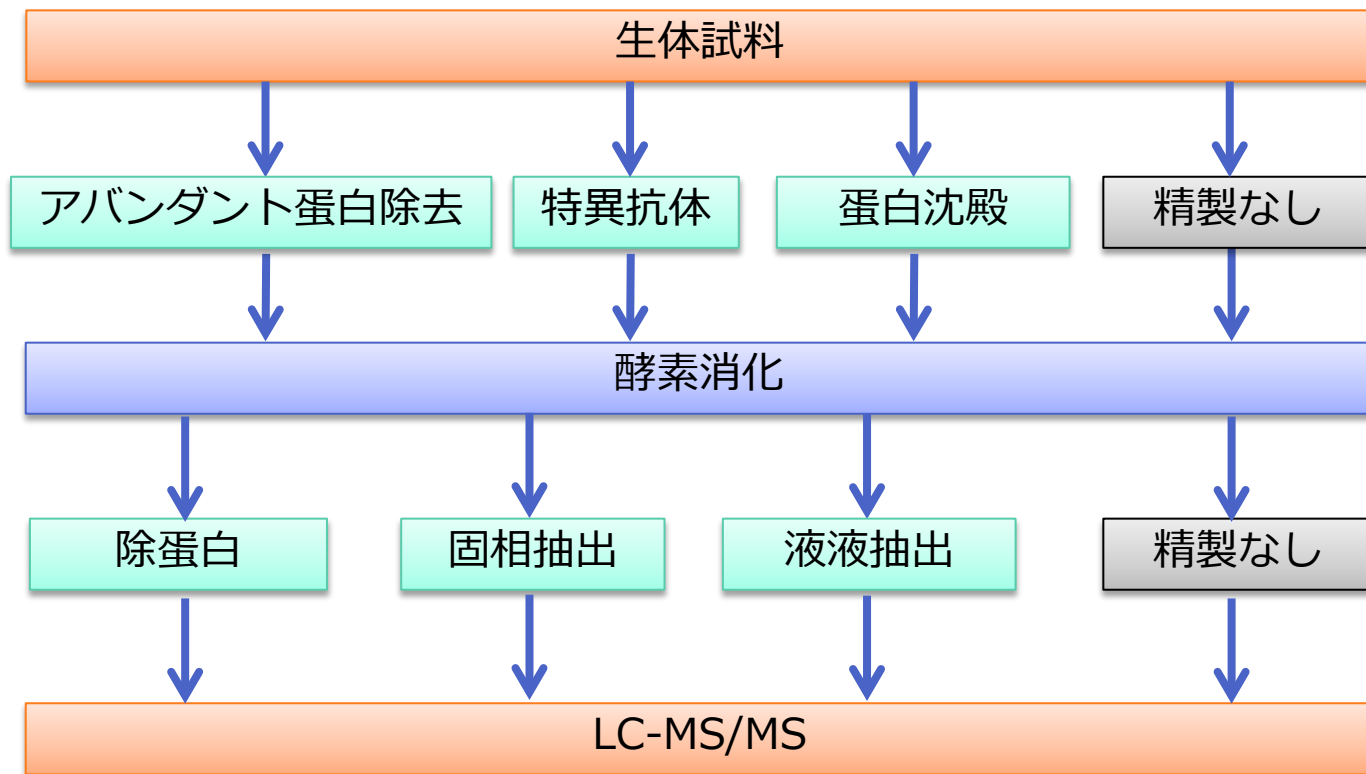
酵素消化率が既知のタンパ
クの消化を実試料中で確認
し, 操作における酵素消化
のポジコンとして利用

あくまでも酵素消化操作が
問題ないことの確認程度

<http://bioanalysisforum.jp/>

内部標準品

Whole SIL-IS

Flanking Peptide
SIL-ISTarget Peptide
SIL-IS<http://bioanalysisforum.jp/>

I.S.添加のタイミングのまとめ

- 議論理由は、酵素消化および高分子特有のクリーンアップなどがあり、考察が必要なため。
- I.S.の種類は大きく3つに分類可能。それぞれの特徴を理解して、サンプルおよび創薬ステージに合った方法を選択。
- 目的に応じて、適切なI.S.を追加することで、分析法の定量性は向上。



Tips

- 標準溶液の調製媒体に関して
 - 有機溶媒比率とpHを一定にする
 - DMSOで調製
- 代替マトリクスとして他動物種のマトリクスの使用に関して
 - 吸着防止対策として使用
 - 代替マトリクス（生食など）に溶解性が悪かったため，そのタンパクを持ち合わせていない動物種を使用

標準物質の選択

	リコンビナント蛋白	合成ペプチド
Pros	<ul style="list-style-type: none"> ・ ターゲットの立体構造を反映 ・ 酵素消化効率補正が可能 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 複数の準備が可能 ・ 安価 ・ 扱いやすい（安定性, 吸着など）
Cons	<ul style="list-style-type: none"> ・ 内因性とリコンビナントは完全には一致しない ・ 高価 ・ 扱いにくい（安定性, 吸着など） 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 立体構造を反映しない ・ 酵素消化後の補正のみ

I.S.の選択と同様に求める分析の精度によって、標準物質の選択を行う

ペプチド選択条件

- ペプチドの分子量が2000未満
- 目的蛋白でのみ存在する配列
- 高感度
- Cysを含まない（還元アルキル化の影響を受ける）
- Metを含まない（酸化）
- N末端がGlnやGluでない（ピログルタミル化）
- 修飾されにくい配列
- その他



今後の議論内容（例）

Future discussion (example)

定量に用いるペプチドの本数

ペプチド本数	1本	2本以上
Pros	<ul style="list-style-type: none"> ・ 定量値が一定 ・ 感度面を重視可能 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 蛋白全体を考慮した定量が可能 ・ スプライシングバリエーションなどの区別が可能
Cons	<ul style="list-style-type: none"> ・ 真の値であるかどうかの判断が不可 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 候補ペプチドを複数選ぶことが困難な場合も ・ 選択した各ペプチドで定量値が異なることがあり、複数の測定値から真値の選択が困難

トランジション数	1つ	2つ以上
Pros	<ul style="list-style-type: none"> ・ 定量値が一定 ・ 感度重視の選択が可能 	<ul style="list-style-type: none"> ・ ターゲットペプチドの配列情報をサポート ・ 特異性の確認が可能
Cons	<ul style="list-style-type: none"> ・ 真の値であるかどうかの判断が不可 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 選択した各トランジションで定量値が異なることがあり, 複数の測定値から真値の選択が困難



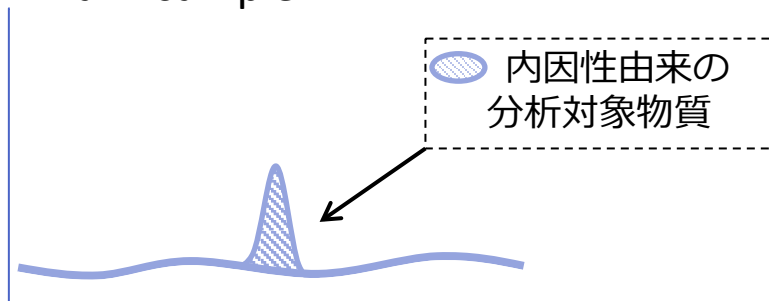
代替標準物質

Surrogate Analyte

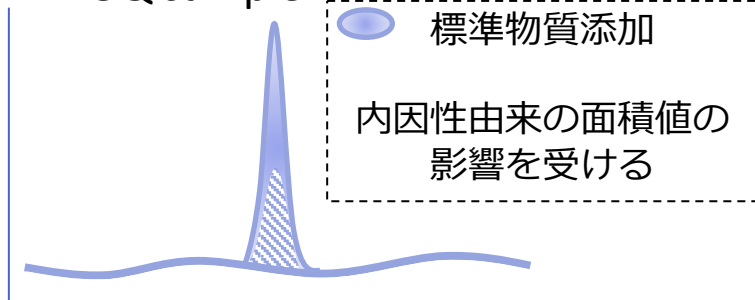
代替標準物質定量法とは

- 標準物質を用いた定量
(内因性物質のモニタリングイオン
= 標準物質のモニタリングイオン)

Blank sample*

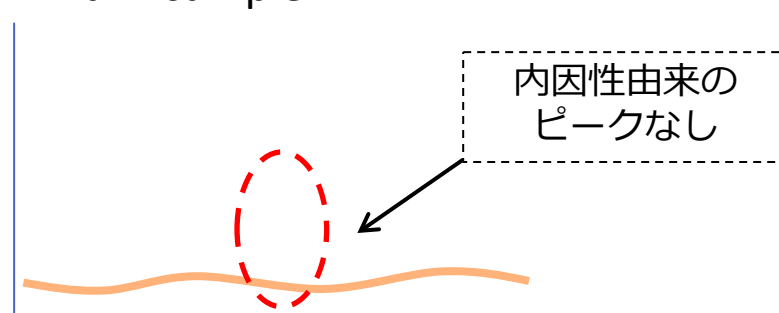


LLOQ sample

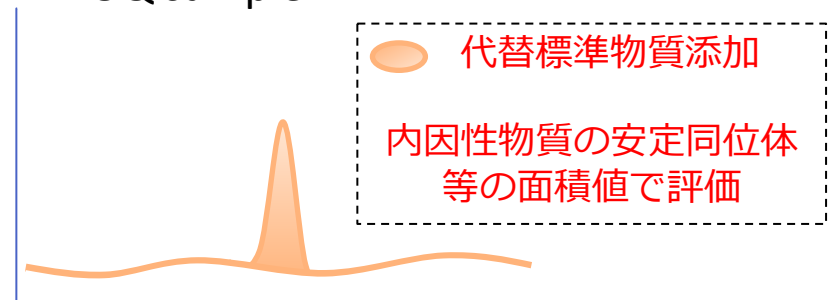


- 代替標準物質を用いた定量
(内因性物質のモニタリングイオン
≠ 代替標準物質のモニタリングイオン)

Blank sample



LLOQ sample



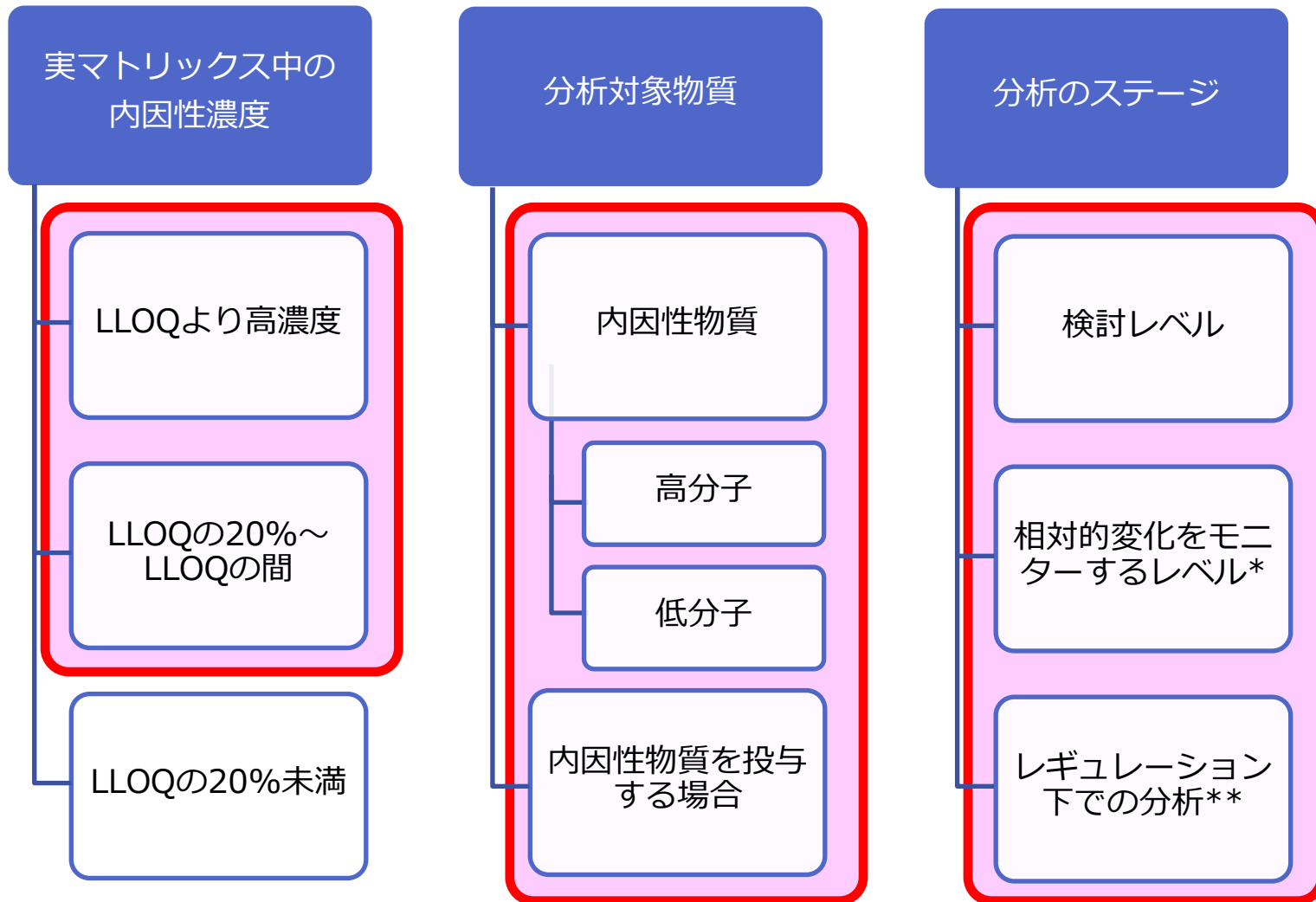
* : 実マトリックスに標準物質を添加せずに調製したサンプル

標準物質	マトリックス	分析対象	
標準物質	実マトリックス	一般化合物 内因性化合物*	—
標準物質	代替マトリックス	内因性化合物	DG2015-15
代替標準物質	実マトリックス	内因性化合物	DG2016-25
代替標準物質	代替マトリックス	内因性化合物	

*低値マトリックス入手可能な場合



議論の範囲



DG2016-25での議論の範囲

*Within Validation
**Full Validation

代替標準物質vs代替マトリックス

	代替標準物質	代替マトリックス ¹⁾
pros	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 実マトリックス中の内因性成分濃度より低濃度域の検量線を作成可能 ◆ 実マトリックスを用いて評価可能 ◆ 変動するファクターを加味した評価が可能 <ul style="list-style-type: none"> →実マトリックスの変動 →前処理時の変動 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 組成の単純な代替マトリックス <ul style="list-style-type: none"> →安定供給可能 ◆ 除去マトリックス <ul style="list-style-type: none"> →マトリックス効果/回収率が実マトリックスと近い
cons	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 適切な代替標準物質入手時に限る。 ◆ 安定的な入手が困難 ◆ クロストークの考慮が必要 ◆ 逆回帰計算をマニュアルで実施 <ul style="list-style-type: none"> →解析ソフトを使用できない ◆ 希釈時の計算が煩雑 <ul style="list-style-type: none"> →実マトリックス由来の内因性成分濃度の考慮が必要 ◆ マトリックス中安定性 <ul style="list-style-type: none"> →Analyteと異なる場合あり 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 組成の単純な代替マトリックス <ul style="list-style-type: none"> →マトリックス効果, 回収率, 吸着等が実マトリックスと異なる ◆ 除去マトリックス <ul style="list-style-type: none"> →ロット間差が大きい、安定的な入手が困難 <p style="text-align: right;">1)DG2015-15から引用</p>

代替標準物質の使いどころ

□ 平常時の濃度よりも低い推移をするバイオマーカーの定量

実マトリックスで定量範囲全域の試料調製が可能.

→マトリックス効果を加味した真度・精度の評価が可能

□ 代替マトリックスと実マトリックスで溶解性や
前処理回収率が異なる場合

□ 代替マトリックス中で容器への吸着が大きい場合

実マトリックス中の生体由来タンパク質が溶解性, 前処理回収率, 容器吸着
を改善する可能性がある



代替標準物質の選択のポイント

理想の代替標準物質:

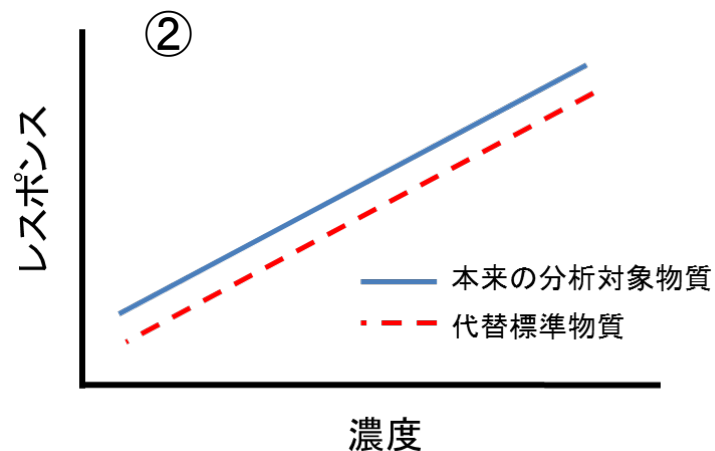
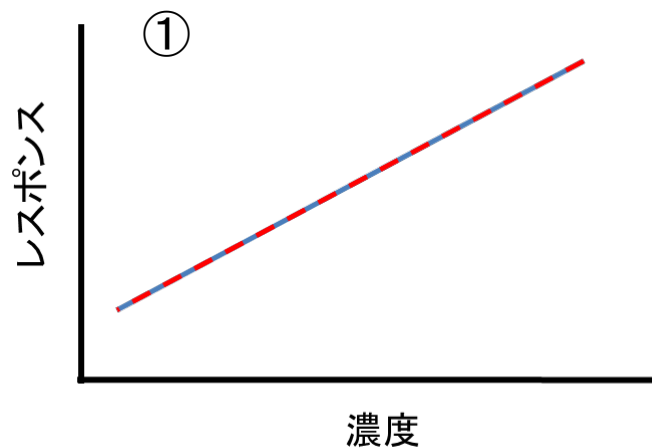
本来の標準物質のレスポンスと一致する①の化合物

Ideal surrogate analyte :

The response is equal to that of authentic analyte

本来の標準物質とレスポンスが比例する②の化合物も候補

Compound ② also should be candidate as surrogate analyte



本来の標準物質と代替標準物質のresponseの関係性のイメージ

推奨する代替標準物質

◆分析対象物質の安定同位体

^{13}C , ^{15}N など（重水素以外）

【理由】

- 分析対象物質と近似した物性
 - 近似したレスポンスが得られやすい。
（ピーク強度, R.T, 回収率, ME等の近似性）
 - 重水素体は以下の欠点あり
 - 水素置換、リテンション変化¹⁾、置換数↑に伴うLCピーク割れ
- 1) Nico, Trend in Analy Chem 27(10) 924-933, 2008.

- 分析対象物質と近似したレスポンスが得られる場合
下記も利用可能
 - 重水素ラベルの安定同位体
 - 類縁物質（安定同位体以外）

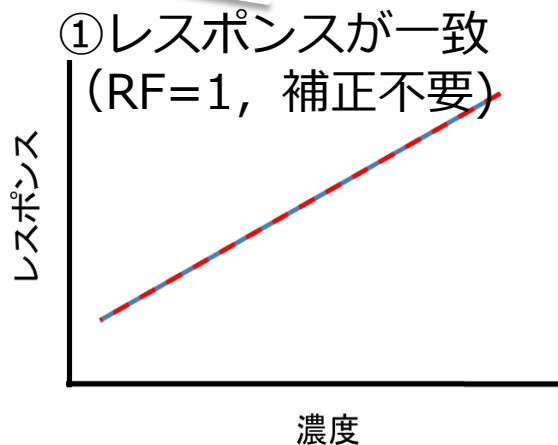
Response Factor 評価の課題①

□ Response Factor (RF)

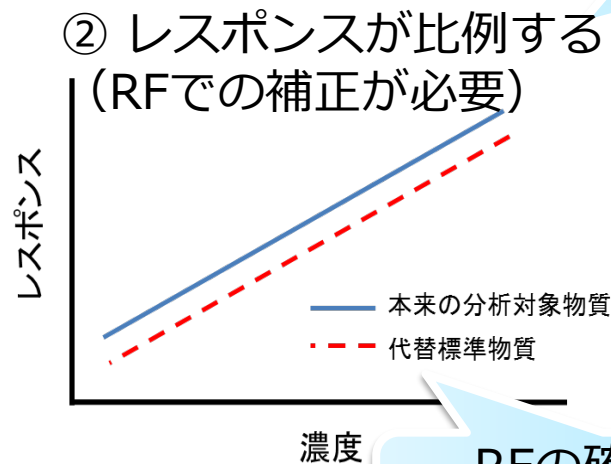
“本来の標準物質のレスポンス” vs “代替標準物質のレスポンス”

- ✓ 分析法の構築には“本来”と“代替”のRF算出が不可欠.
- ✓ 分析目的に応じてRFの評価法の検討が必要.

“一致”の判断基準は？



補正した定量値の
算出法は？



RFの確認頻度？
(分析バッチごと?)

Response Factor 評価の課題②

① レスポンスを
完全一致させる？
(RF=1)

MS条件を揃える手間

一致の定義（判断基準）の
検討など

② RFで補正する？

定量値の補正の煩雑さ

補正係数の評価法の検討
など

どちらを選択
すべき？

???



RFの評価の実例

RFの確認頻度	RFの評価方法	RFの判断基準
<ul style="list-style-type: none"> 分析バッチの前¹⁾ 分析バッチの前後³⁾ 	<ul style="list-style-type: none"> “本来”と“代替”のmixtureを測定. MSレスポンスを比較¹⁾ 	<ul style="list-style-type: none"> “本来”と“代替”のMSレスポンス比が±10%以内¹⁾
	<ul style="list-style-type: none"> 検量線の各濃度でMSのレスポンスを比較²⁾ (サンプルは“本来”と“代替”のmixture) 	<ul style="list-style-type: none"> 分散分析を実施し, バラツキが無いことを確認²⁾
	<ul style="list-style-type: none"> “代替”を用いて検量線を作成. “本来”の濃度と理論値との乖離を確認³⁾ 	<ul style="list-style-type: none"> 乖離が±5%以内³⁾

1) M. Leahy. al., ASMA 2016

2) W. Li, et. al., *Analytical Chemistry* 2003;75(21):5854-5859.3) L Liu. Al., *J Chromatogr B* 2016;1011:69-76

レギュレーション下での分析における 分析法バリデーション項目の案

バリデーション項目	本来の標準物質	代替標準物質
選択性	○	◎
定量下限	×	◎
直線性	×	◎
真度・精度	○	◎
マトリックス効果	○	◎
キャリーオーバー	×?	◎
希釈の妥当性	△	△
安定性	○	△
	○	◎
回収率	○	◎
RFの評価	必須 (実施基準はPoster73参照)	

- ◎：必須. BMVガイドラインの評価基準に従い実施
 ○：可能な範囲で実施.
 △：必要に応じてBMVガイドラインの評価基準に従い実施.
 ×：不要

Poster74の追加説明

フルバリデーション

- 代替標準物質+実マトリックスで実施
 - ✓ 代替標準物質の分析法の妥当性を検証する。
本来の標準物質+実マトリックスについても可能な範囲で実施し、代替標準物質の利用の妥当性を検証する。

安定性

- 本来の標準物質+実マトリックスで実施
 - ✓ 実マトリックス中の内因性由来濃度を利用するなど可能な限り実試料に近い試料で評価する。

選択性

- 実マトリックス中の内因性由来濃度で実施
 - ✓ 内因性由来ピークが分析対象物質なのか評価する。

レギュレーション下での分析における 実試料分析時の分析バッチ毎の妥当性確認案

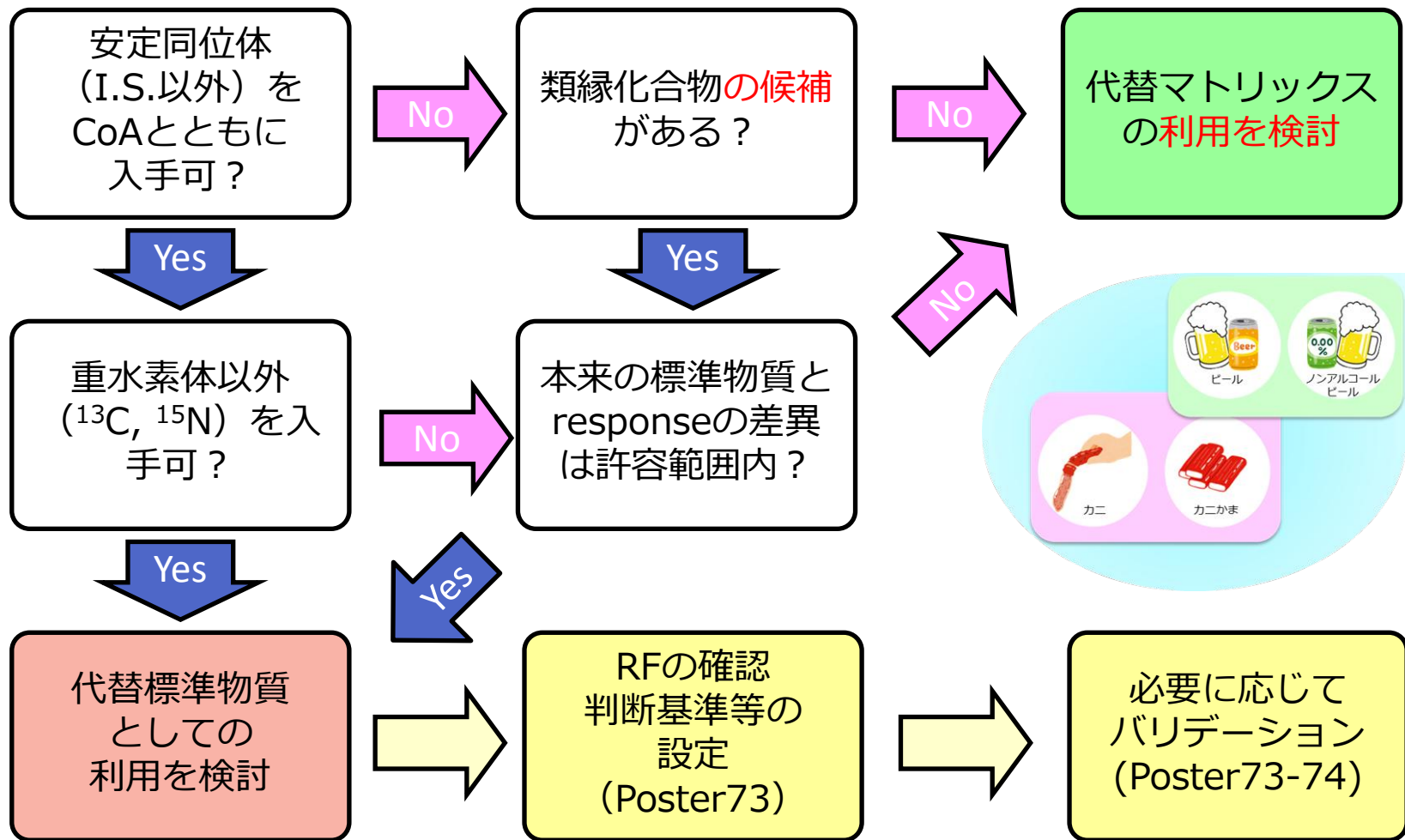
項目	本来の標準物質	代替標準物質
検量線 (ブランク・ゼロ試料も含む)	×	◎
QC試料	×	◎
RFの評価 *	必須 (実施基準はPoster73参照)	

◎ : 必須, BMVガイドラインの評価基準に従う

× : 不要

- *)
- RFは装置感度により変動するため分析バッチ毎に評価することが望ましい.
 - 異なる装置を使用する場合, 同一型式の装置であっても装置毎にRFの評価をすることが望ましい.
 - RF評価は, 検量線の濃度間で変動を確認するため, 低濃度・中濃度・高濃度付近を含む最低3濃度以上で評価することが望ましい.

代替標準物質/代替マトリックス選択のフロー



内因性物質はLCガイドラインの対象外であるが、代替標準物質を使用する場合は、経験や事例が少ないことから目的に応じてバリデーション実施を提案

□代替標準物質

- 実試料と同じマトリックスの影響の評価が可能
- 実マトリックス中の内因性濃度より低濃度域の検量線試料作成可能

□課題

- 試験目的ごとに評価基準等の設定が必要.
- 利用できる条件が限定的で情報・経験者が少ない.
- 文献調査や継続議論が必要？

アドバイザーからの一言

□レスポンス比較（標準物質 vs 代替標準物質）

“標準物質”と“代替標準物質（安定同位体）”のレスポンスは常に一致するのでしょうか？

・そもそも「**同じ濃度**」に調製できる？

多くの安定同位体は

- 高価
- 少量合成
- 不純物含量が不明
(正確な同位体置換率不明)



正確に秤量しても、含量や純度を考慮しないと**正確な濃度の溶液は調製できない？**



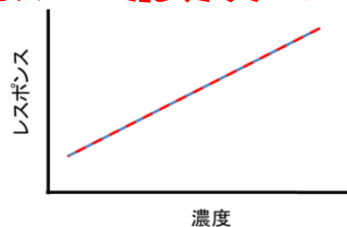
アドバイザーからの一言

□レスポンス比較（標準物質 vs 代替標準物質）

極微量の
正確な秤量



調製した代替標準物質
溶液の濃度を測定



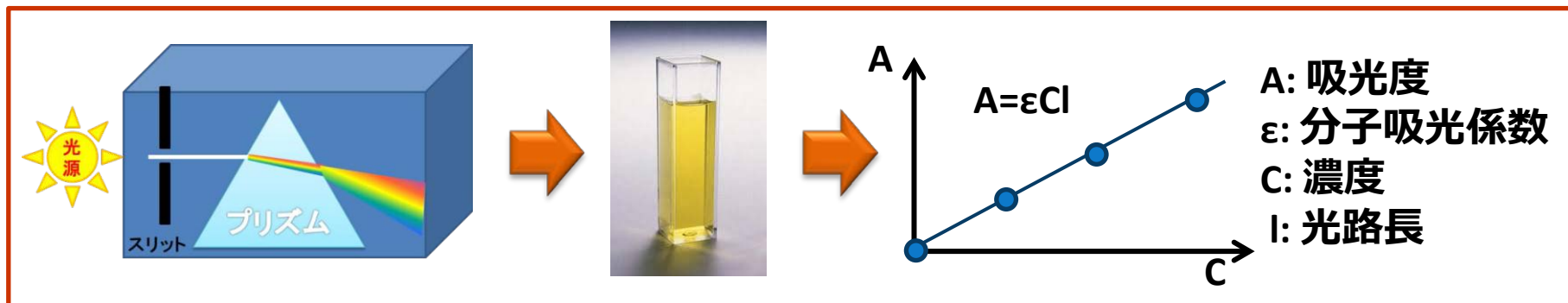
➤ 標準物質と代替標準物質の分子吸光係数は同じ

- 代替標準物質の標準原液の濃度はHPLC-UV法で規定
- 類縁物質, 塩, 水分含量, 揮発性成分 (有機溶媒等) なども補正可
- もし類縁物質量が僅かであれば、吸光度測定のみでも対応可



□レスポンス比較（標準物質 vs 代替標準物質）

- 調製濃度を厳密に揃えてもLC-MSのレスポンスが一致しなければ、多分イオン化でレスポンスを調整するしかない。
- 逆に濃度が一致していないのに、イオン化の調整でレスポンスを一致させるのは難しいのでは？



<http://bioanalysisforum.jp/>



低分子/高分子で
分子吸光係数を利用して
濃度を合わせた経験があります



DG2016-25

高分子のLC-MS定量分析 アンケート結果

Summary of a questionnaire for quantitative analysis for large molecules by LC-MS

実施期間： 2016年12月12日～12月16日

配布先： DGサポーター（195名）

JBFパートナー(38社)

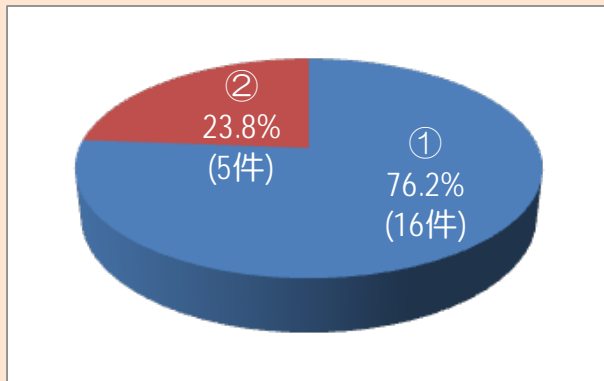
有効回答数： 21名

Term 12 Dec 2016 to 16 Dec 2016

Distributed to DG supporters (195), JBF partners (38)

Valid responses 21

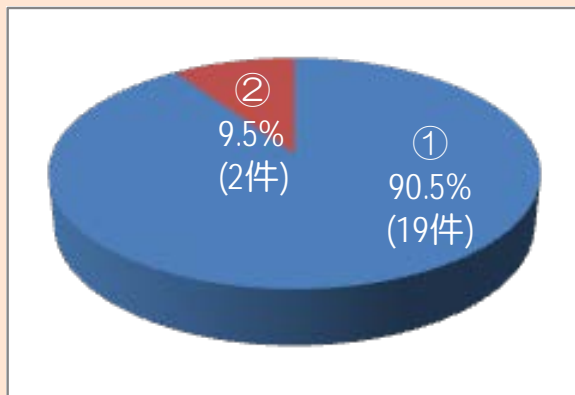
Q1 所属について教えてください。



Working at

- | | |
|-------|-------------------|
| ① 製薬 | ① Pharmaceuticals |
| ② CRO | ② CRO |
| ③ その他 | ③ Others |

Q2 LC-MS/MSによる高分子の定量経験の有無について教えてください。

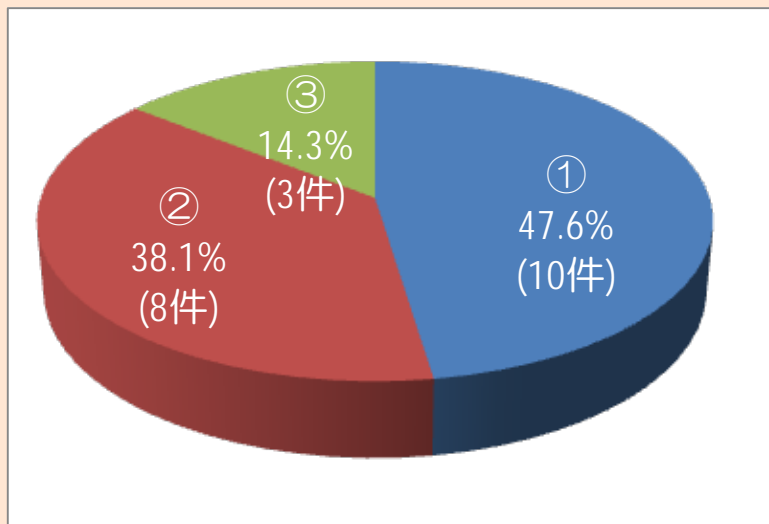


Do you have an experience quantitative assay for Large molecules by LC-MS/MS?

- | |
|-------|
| ① Yes |
| ② No |

Q3 LC-MS/MSにて定量分析を実施した経験のある高分子はどのようなものがありますか？

What kinds of large molecules do you have experience of quantitative assay by LC-MS/MS?

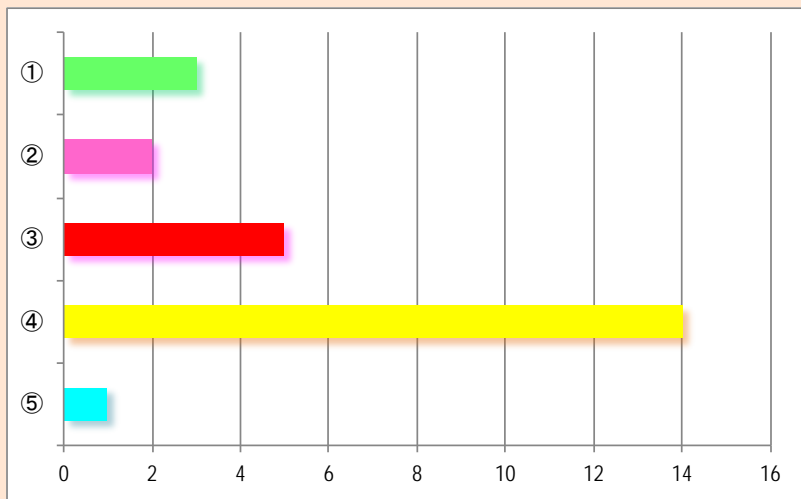


- ① 内因性成分
- ② 抗体医薬
- ③ 内因性成分と抗体医薬どちらも
- ④ その他

- ① Endogenous substance
- ② Antibody drug
- ③ Both ① and ②
- ④ Others

Q4 LC-MS/MSにて高分子の定量分析を実施した時の目的、
適応基準を教えてください。（複数回答可）

The purpose and criteria when performing quantitative analysis of large molecules by LC-MS/MS



- ① GLP適用の定量試験
(バリデーション試験含む)
- ② 信頼性基準適用の定量試験
(バリデーション試験含む)
- ③ 適応規制なしの定量試験
(バリデーション試験含む)
- ④ 探索、検討レベル
- ⑤ その他

- ① Quantification for GLP (include validation)
- ② Quantification for reliability standard
(include validation)
- ③ Quantification without regulatory requirement
(include validation)
- ④ Research or method development
- ⑤ Others

その他の回答

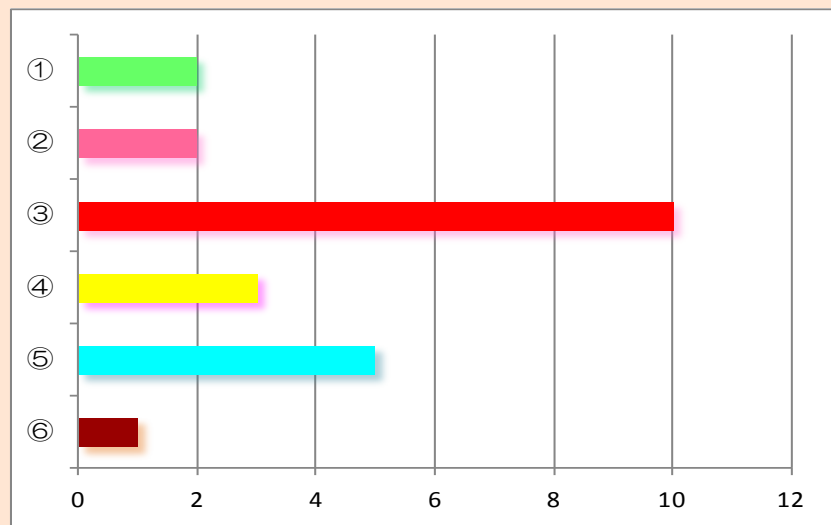
⑤ Others

・技術検討

For technical investigation

Q5 酵素消化前のサンプル処理方法はどのような手順が多いですか？（複数回答可）

Most frequent sample treatment procedures before enzyme digestion



- ① 変性、還元、アルキル化なし
- ② 変性→酵素消化
- ③ 変性→還元→アルキル化→酵素消化
- ④ 還元→アルキル化→酵素消化（変性なし）
- ⑤ 精製→変性→還元→アルキル化→酵素消化
- ⑥ その他

- ① Nothing
- ② Denaturation only
- ③ Denaturation, reduction, and alkylation
- ④ Reduction and alkylation
- ⑤ Purification, denaturation, reduction, and alkylation
- ⑥ Others

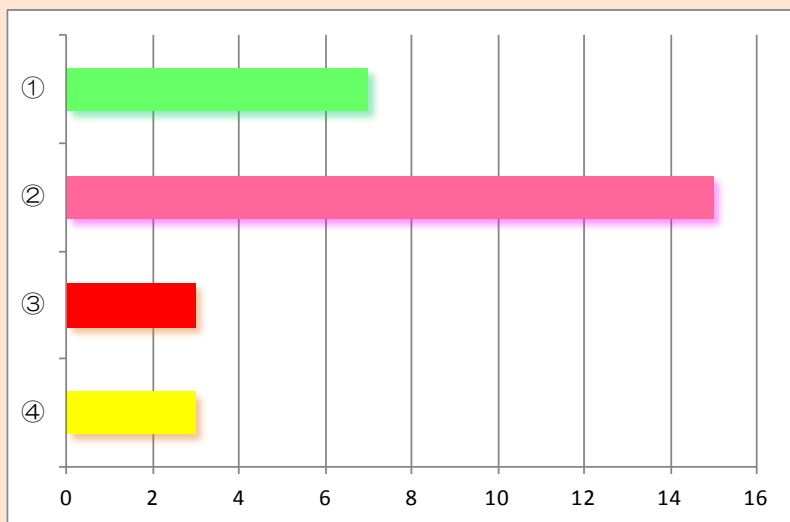
その他の回答

⑥ Others

- ・ 酵素消化後に精製
Purify after enzyme digestion

Q6 内標準物質として用いるものはどれですか？（複数回答可）

Most frequently used Internal standards?



- ① 安定同位体標識したWholeのタンパク質
- ② 安定同位体標識したターゲット配列のペプチド
- ③ 安定同位体標識したターゲット配列のペプチドを数アミノ酸残基延長したペプチド
- ④ その他

- ① Stable-isotope-labeled whole protein
- ② Stable-isotope-labeled target peptide
- ③ Stable-isotope-labeled flanking peptide
- ④ Others

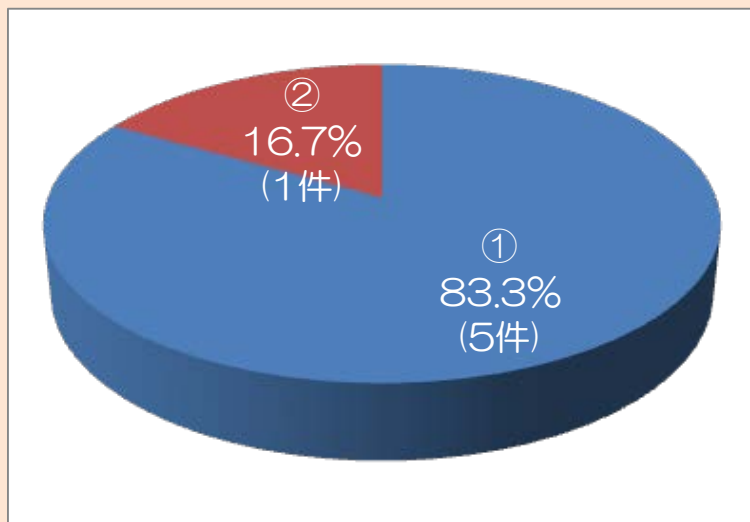
その他の回答

④Others

- ・ ターゲット配列ではない適当なペプチド
Peptide sequence irrelevant to target peptide
- ・ 入手可能なもの
Available peptide

Q7 設問6で「①安定同位体標識したWholeのタンパク質」を選択された方に質問です。内標準物質の添加のタイミングはいつですか？（複数回答可）（精製→変性→還元→アルキル化→酵素消化のフローで実施した場合でお答え下さい。）

For a person chose “①Stable-isotope-labeled whole protein” in Q6. When do you add I.S. in the workflow of purification, denaturation, reduction, alkylation, and enzyme digestion?

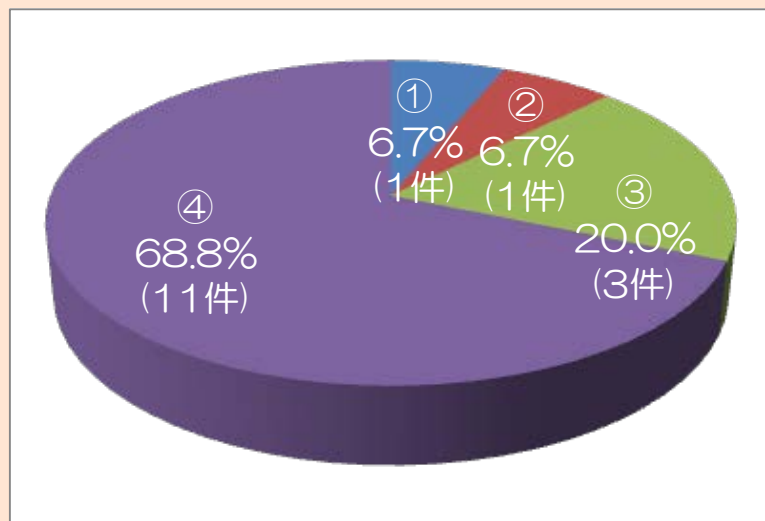


- ① 精製前
- ② 精製後、変性前
- ③ 還元・アルキル化後、酵素消化前
- ④ 酵素消化後
- ⑤ その他

- ① Before purification
- ② After purification, before denaturation
- ③ After reduction/alkylation, before enzyme digestion
- ④ After enzyme digestion
- ⑤ Others

Q8 設問6で「②安定同位体標識したターゲット配列のペプチド」を選択された方に質問です。内標準物質の添加のタイミングはいつですか？（複数回答可）（精製→変性→還元→アルキル化→酵素消化のフローで実施した場合でお答え下さい。）

For a person chose “②Stable-isotope-labeled target peptide” in Q6. When do you add I.S. in the workflow of purification, denaturation, reduction, alkylation, and enzyme digestion?

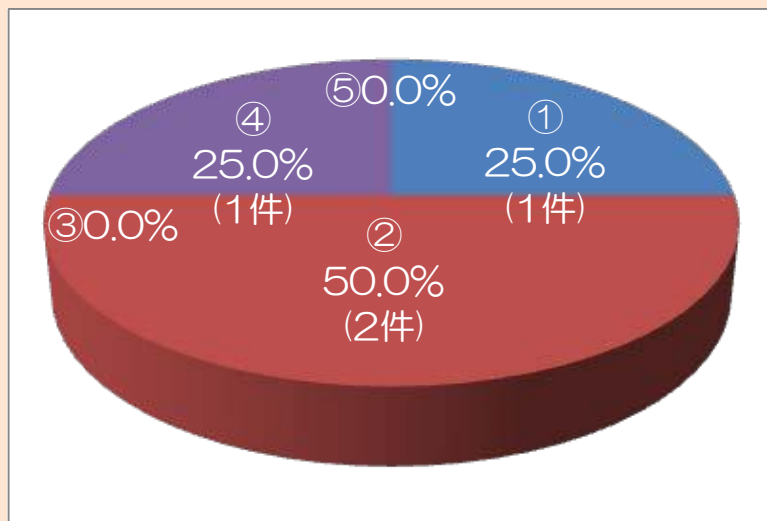


- ① 精製前
- ② 精製後、変性前
- ③ 還元・アルキル化後、酵素消化前
- ④ 酵素消化後
- ⑤ その他

- ① Before purification
- ② After purification, before denaturation
- ③ After reduction/alkylation, before enzyme digestion
- ④ After enzyme digestion
- ⑤ Others

Q9 設問6で「③安定同位体標識したターゲット配列のペプチドを数アミノ酸残基延長したペプチド」を選択された方に質問です。内標準物質の添加のタイミングはいつですか？（複数回答可）（精製→変性→還元→アルキル化→酵素消化のフローで実施した場合でお答え下さい。）

For a person chose “③Stable-isotope-labeled flanking peptide” in Q6. When do you add I.S. in the workflow of purification, denaturation, reduction, alkylation, and enzyme digestion?

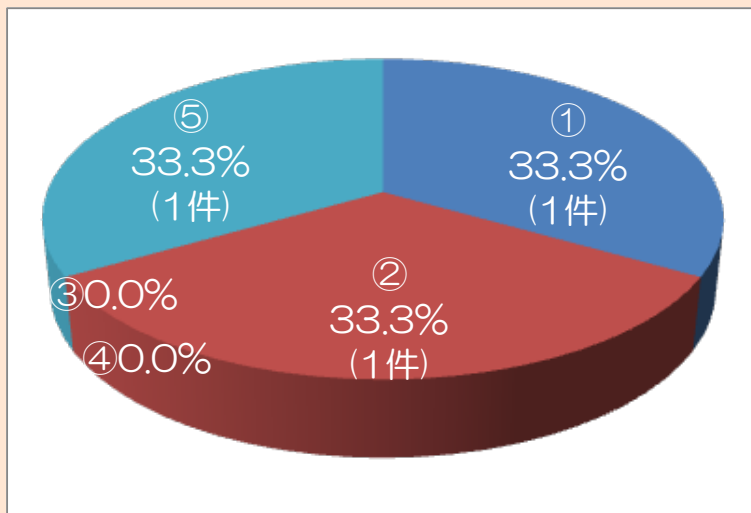


- ① 精製前
- ② 精製後、変性前
- ③ 還元・アルキル化後、酵素消化前
- ④ 酵素消化後
- ⑤ その他

- ① Before purification
- ② After purification, before denaturation
- ③ After reduction/alkylation, before enzyme digestion
- ④ After enzyme digestion
- ⑤ Others

Q10 設問6で「④その他」を選択された方に質問です。内標準物質の添加のタイミングはいつですか？（複数回答可）（精製→変性→還元→アルキル化→酵素消化のフローで実施した場合でお答え下さい。）

For a person chose “④Others” in Q6. When do you add I.S. in the workflow of purification, denaturation, reduction, alkylation, and enzyme digestion?



- ① 精製前
- ② 精製後、変性前
- ③ 還元・アルキル化後、酵素消化前
- ④ 酵素消化後
- ⑤ その他

- ① Before purification
- ② After purification, before denaturation
- ③ After reduction/alkylation, before enzyme digestion
- ④ After enzyme digestion
- ⑤ Others

その他の回答

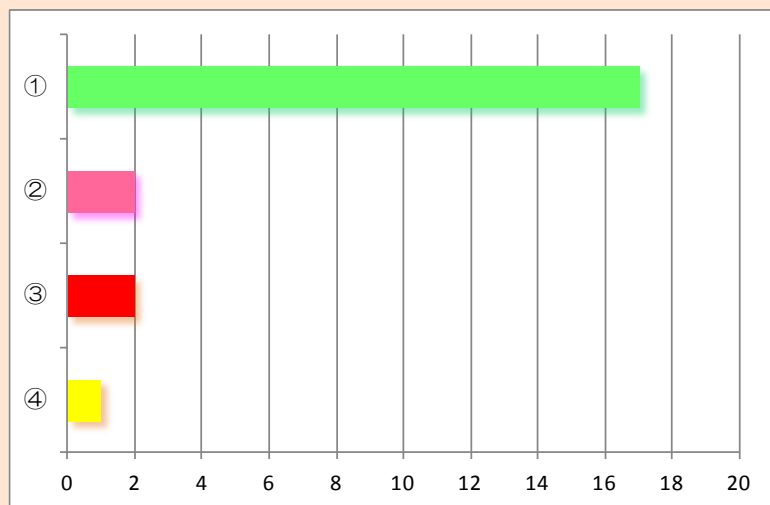
⑤ Others

・利用するI.S.によって変える

The timing depends on the kinds of I.S.

Q11 よく使用する酵素をお教え下さい。(複数回答可)

Most frequently used enzyme for digestion?



- ① Trypsin
- ② Lys-C
- ③ Trypsin/Lys-C Mix
- ④ Others

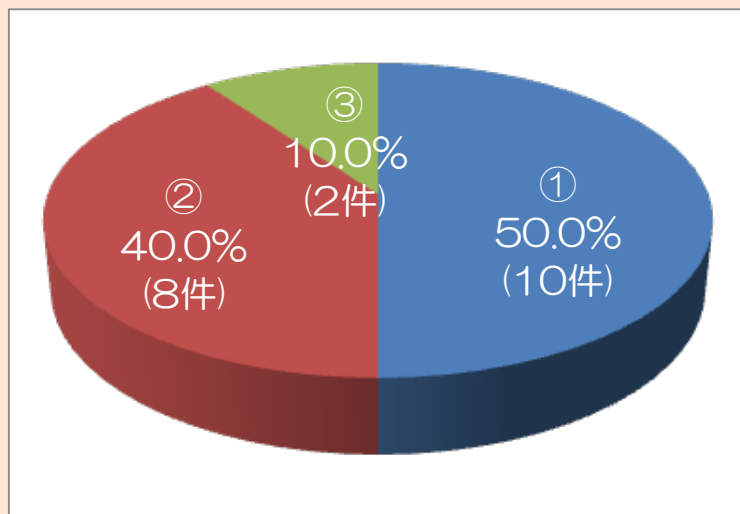
その他の回答

④ Others

- ・ 酵素消化はしません
Omit enzyme digestion process

Q12 酵素消化前のサンプル精製は実施していますか？
(複数回答可)

Do you purify the sample before enzyme digestion?



- ① していない
- ② アフィニティ精製を実施している
- ③ その他

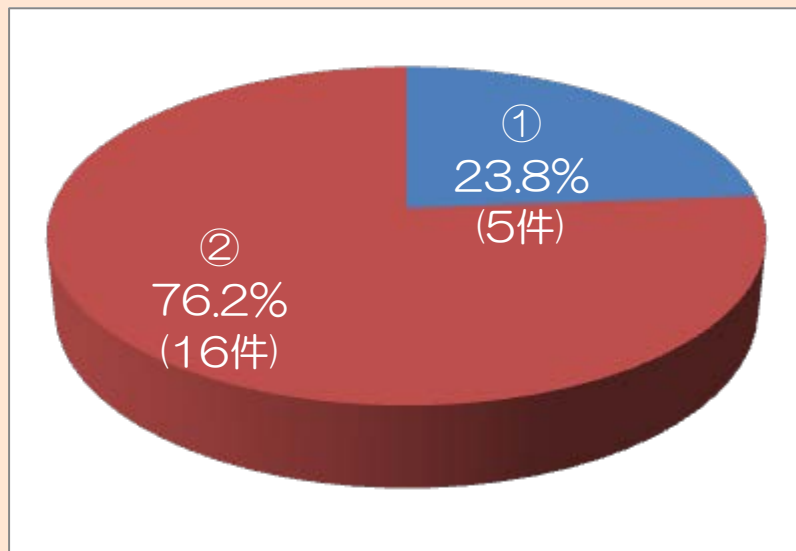
- ① No
- ② Yes (affinity purification)
- ③ Others

その他の回答
③ Others

・ 限外濾過
Ultrafiltration

Q13 サンプルを変性させずに，酵素消化をした経験はありますか？

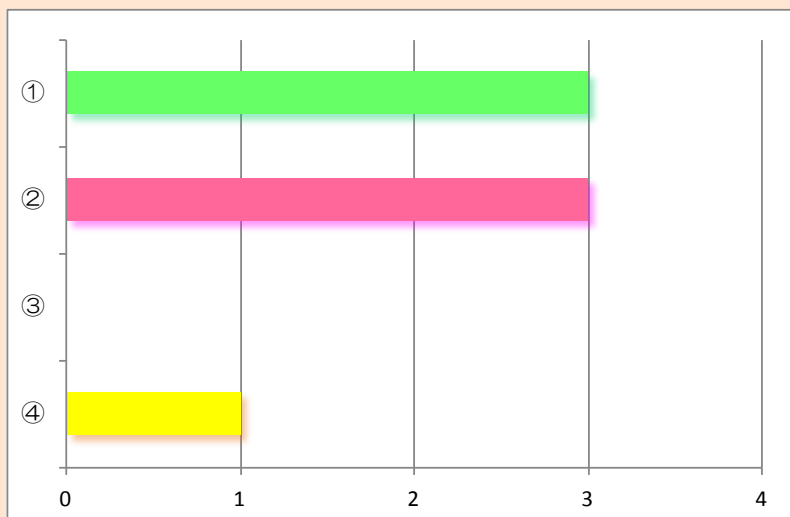
Do you have an experience of enzyme digestion without denaturation process?



- ① Yes
- ② No
- ③ Others

Q14 設問13にて「ある」と回答された方のみご回答ください。サンプルを変性させた方が一般的に酵素消化効率が上がると思いますが、実施しない理由をお教えてください。（複数回答可）

For a person chose “①Yes” in Q13. Why did you omit denaturation process which is expected to improve enzyme digestion efficacy?

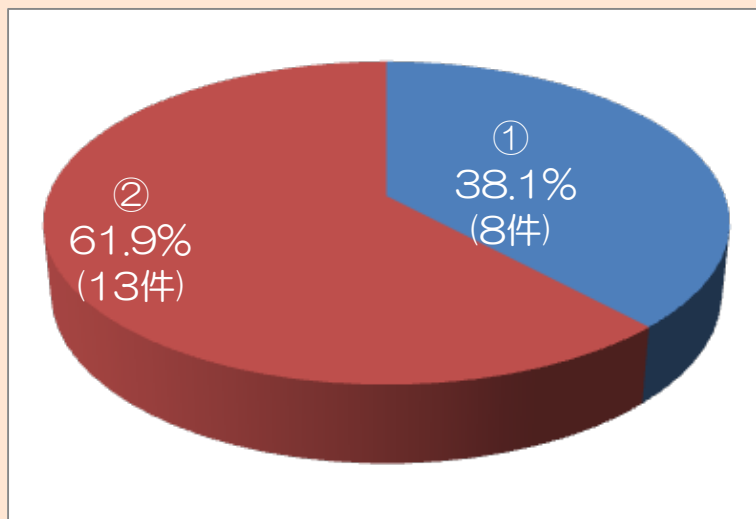


- ① 実施しなくても測定可能であったため
- ② 作業効率を上げるため
- ③ 測定対象以外の夾雑物を極力抑えるため
- ④ その他

- ① Analyte was measurable without denaturation
- ② Improve operating efficiency
- ③ Suppress production of interfering substances
- ④ Others

Q15 還元・アルキル化の工程を実施せずに，酵素消化をした経験はありますか？

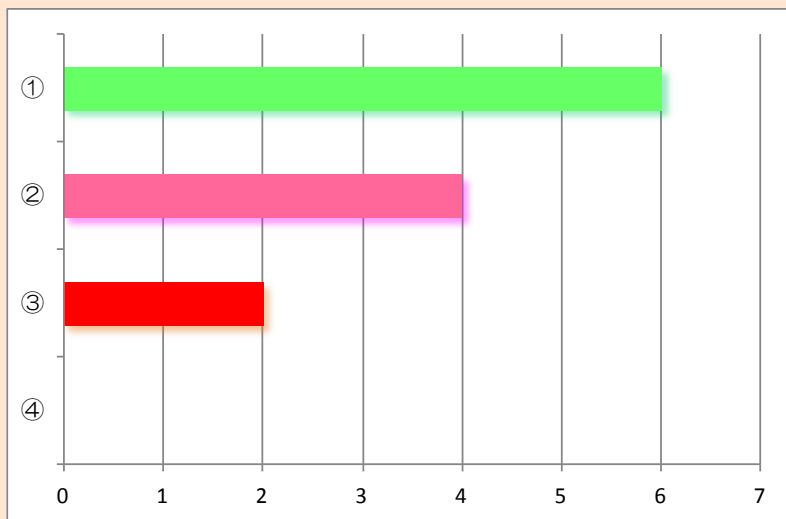
Do you have an experience of enzyme digestion without reduction/alkylation process?



- ① Yes
- ② No
- ③ Others

Q16 設問15にて「ある」と回答された方のみご回答ください。還元・アルキル化の工程を実施した方が一般的に酵素消化効率が上がるとは思います、実施しない理由をお教えてください。（複数回答可）

For a person chose “①Yes” in Q15. Why did you omit reduction/alkylation process which is expected to improve enzyme digestion efficacy?

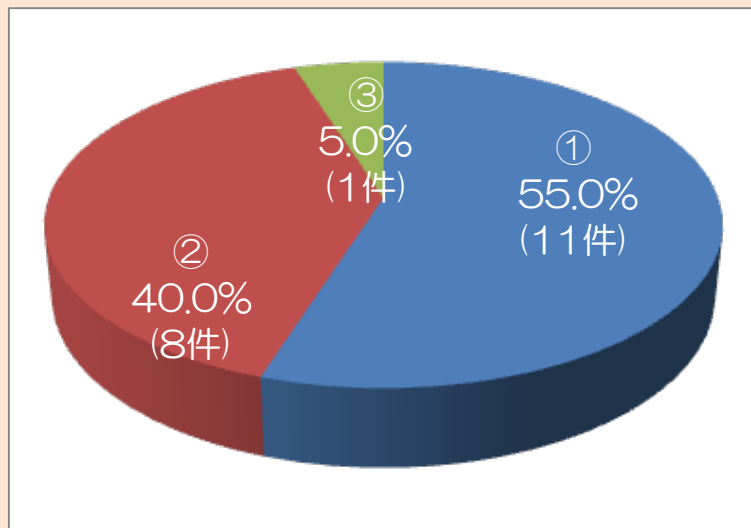


- ① 実施しなくても測定可能であったため
- ② 作業効率を上げるため
- ③ 測定対象以外の夾雑物を極力抑えるため
- ④ その他

- ① Analyte was measurable without denaturation
- ② Improve operating efficiency
- ③ Suppress production of interfering substances
- ④ Others

Q17 高分子を酵素消化して分析する場合、検討時に消化効率を確認しますか？

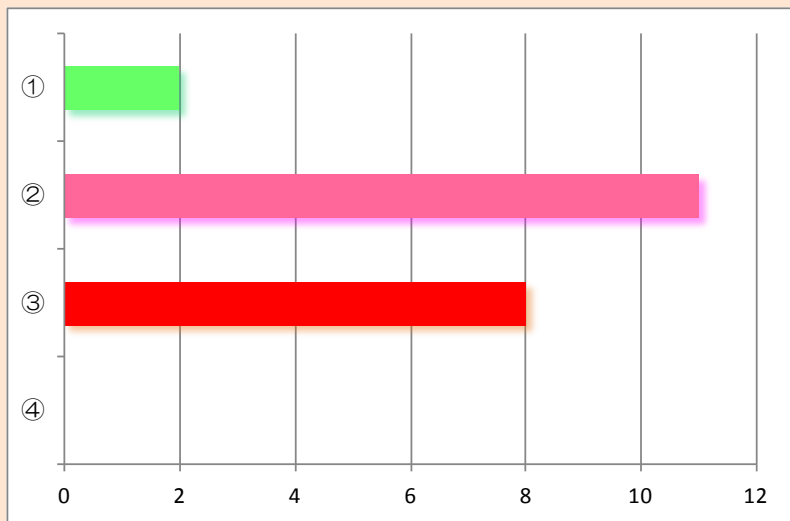
Do you verify enzyme digestion efficiency?



- ① Verify
- ② Not verify
- ③ Depend on purpose of assay

Q18 消化効率を確認する場合、その目的についてお教え下さい。(複数回答可) 設問17で「②確認しない」と回答された方は設問20へお進み下さい。設問17で「③分析の目的による」と回答された方は取り組まれている内容に応じて回答ください。

For a person chose “②Not verify or ③Depend on purpose of assay” in Q17.
What is the purpose of verifying the enzyme digestion efficiency?



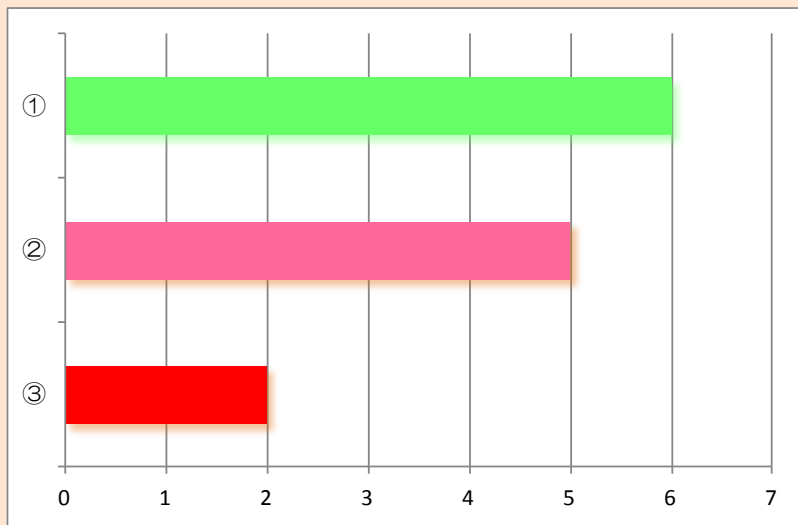
- ① 100%に近い方が、定量値がより真値に近づくと思うから
- ② 確認した方が再現性の良いデータを得られると思うから
- ③ 感度不足の場合、問題解決の一助となるから
- ④ その他

- ① If the efficiency is approximately 100%, it means the quantitative value is near to the true value
- ② It contributes to obtain reproducible data
- ③ This information is helpful for improving the sensitivity of analysis
- ④ Others

Q19 消化効率がほぼ100%となったと判断する方法についてお教え下さい。(複数回答可) 設問17で「②確認しない」と回答された方は設問20へお進み下さい。設問17で「③分析の目的による」と回答された方は取り組まれている内容に応じて回答ください。

For a person chose “②Not verify or ③Depend on purpose of assay” in Q17.

How do you judge the enzyme digestion efficiency reached to approximately 100%?



- ① 測定するペプチドの面積値が頭打ちになることで確認
 - ② 安定同位体ペプチドを内標準物質に用いて、面積比が頭打ちになることで確認
 - ③ その他
- ① Peak area of target peptide reached to plateau
 - ② Peak area ratio of target peptide/I.S. reached to plateau
 - ③ Others

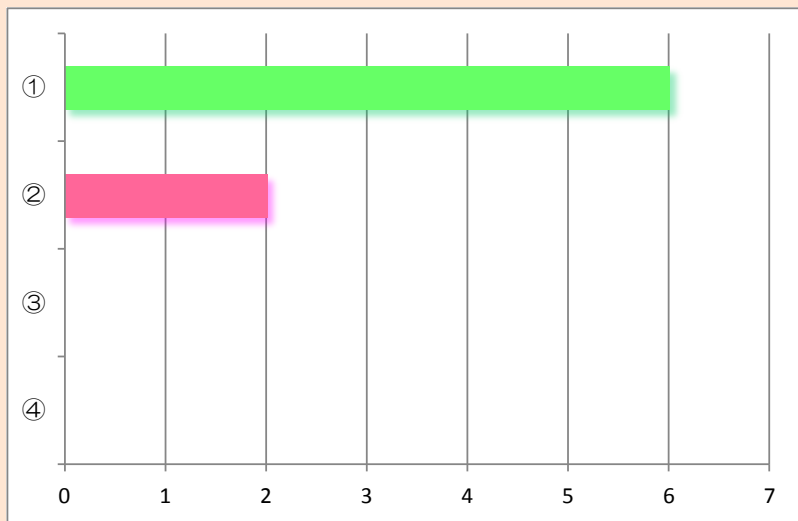
その他の回答
(抜粋)

③ Others

- ・ 既知量のリコンビナントタンパク質をサンプルに添加しその回収率を以てサンプルの消化効率を評価するという間接的な方法
Recovery of spiked recombinant protein (known amount) is used for evaluation of digestion efficacy.
- ・ 非標識ペプチドを空白に添加した際の面積値と同等の値となることで確認
Confirm the peak area of standard peptide and target peptide from digested protein are same.

Q20 消化効率を確認しない場合、その理由についてお教え下さい。（複数回答可）設問17で「②確認する」と回答された方は回答不要です。設問17で「③分析の目的による」と回答された方は取り組まれている内容に応じて回答ください。

For a person chose “②Not verify or ③Depend on purpose of assay” in Q17.
Why don't you verify enzyme digestion efficiency?

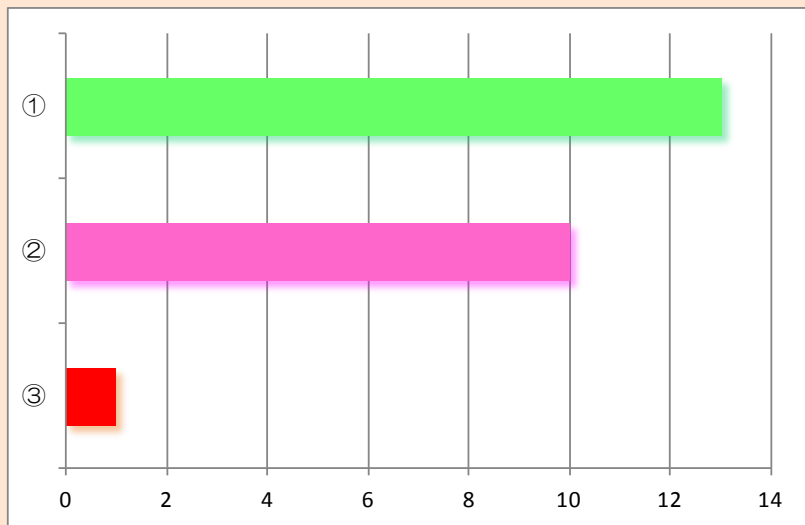


- ① 再現性や濃度依存性が見られれば確認する必要はないから
- ② 確認方法がわからないから
- ③ 内標準物質で補正をかけているから
- ④ その他

- ① If reproducibility and/or concentration dependency is observed, there is no necessity for confirming the enzyme digestion efficiency
- ② How to confirm it is unclear
- ③ Enzyme digestion efficiency is corrected by internal standard
- ④ Others

Q21 標準溶液調製の際，容器への吸着はどのようにケアしていますか？（複数回答可）

How do you care about adsorption of analyte to container when preparing working solution?

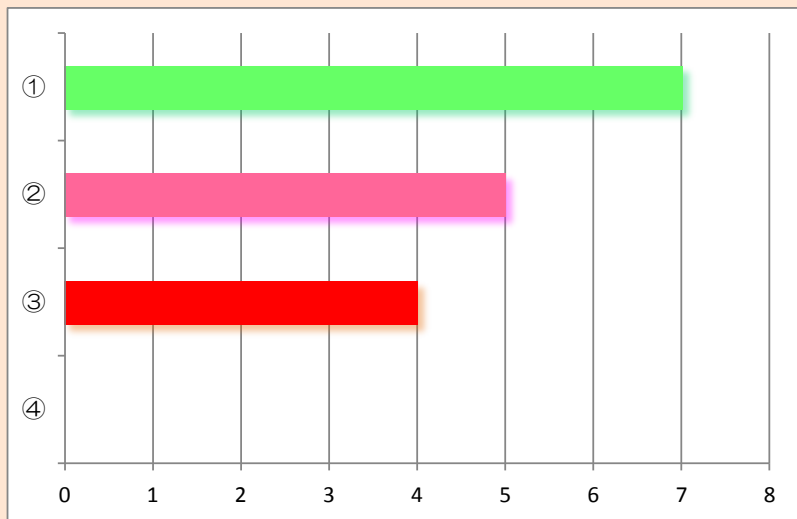


- ① マトリックス試料（血清など）を調製し、マトリックスで段階希釈
- ② 溶媒と容器をいくつか試して、容器吸着の検討を実施
- ③ その他

- ① Dilute with matrix
- ② Search best combination of solvent and container
- ③ Others

Q22 設問21にて「②溶媒と容器をいくつか試して、容器吸着の検討を実施」と回答された方のみご回答ください。溶媒は何を試すことが多いですか？（複数回答可）

For a person chose “②Search best combination of solvent and container” in Q21.
What kind of solvent do you usually use?



- ① 水と有機溶媒の混液
- ② 水と有機溶媒と酸の混液
- ③ 界面活性剤を添加した溶媒
- ④ その他

- ① Mixture of water and organic solvent
- ② Mixture of water, organic solvent, and acid
- ③ Solvent containing some surfactant
- ④ Others

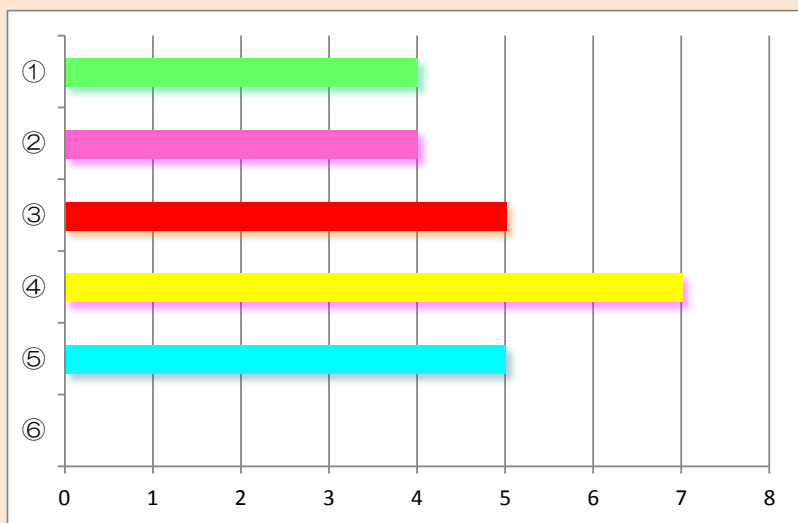
Q23 設問21にて「②溶媒と容器をいくつか試して、容器吸着の検討を実施」と回答された方のみご回答ください。よく使用する溶媒の組成を、答えられる範囲でご回答下さい。

For a person chose “②Search best combination of solvent and container” in Q21.
What kind of solvent and composition do you usually use?

- 水/メタノール (50:50) 他ケースバイケース
Water/MeOH (50:50), case by case
- 0.1%BSA, Tweenなど
0.1%BSA, Tween, etc.
- 水/エタノール
Water/EtOH

Q24 設問21にて「②溶媒と容器をいくつか試して、容器吸着の検討を実施」と回答された方のみご回答ください。容器は何を試すことが多いですか？

For a person chose “②Search best combination of solvent and container” in Q21.
What kind of container do you usually use?



- ① ガラス製チューブ
- ② 不活性化処理したガラス製チューブ
- ③ 通常のポリプロピレン製チューブ
- ④ 低吸着のポリプロピレン製チューブ
- ⑤ シリコナイズ処理したポリプロピレン製チューブ
- ⑥ その他

- ① Glass
- ② Glass with deactivation treatment
- ③ Polypropylene
- ④ Polypropylene with low adsorption treatment
- ⑤ Siliconized polypropylene
- ⑥ Others

Q25 よく使用する変性剤の種類を，答えられる範囲でご回答下さい。

What kind of denaturing reagent do you most frequently use?

	# of answers
Rapigest (Waters)	4
Urea	3
Deoxycholic acid,	2
Guanidinium chloride	2
DTT, SDS, MTBE	1

Q26 LC-MS/MSでの高分子定量分析を実施するにあたり，ご意見・悩み等あればご記載下さい。

Comments

- surrogate peptideの選択
[How to choose surrogate peptide?](#)
- タンパク標品が販売されていない場合の対応が悩ましい
[How to take action when the whole protein is not available?](#)
- ターゲットペプチドの選択（選択性）
[How to choose target peptide which have sufficient selectivity?](#)
- トリプシンの中に含まれるキモトリプシン量はメーカー等によって異なると思われるが，トリプシンは複数メーカー検討が必要かどうか気になります。精製なしで実施をした方が感度が得られると聞いたことがあるが，その場合の酵素量等を聞いてみたい。
[Manufacturer of trypsin is important \(e.g. chymotrypsin content\)?](#)
[Appropriate amount/concentration of enzyme when digest protein without purification?](#)