

27PB-am009

炎症のバイオマーカー候補である C 反応性蛋白の高感度高精度 LC/MS 定量
○佐々木 俊哉¹, Steven CALCIANO², Paula ORENS², Mary LAME², Erin CHAMBERS² (¹日本ウォーターズ, ²ウォーターズコーポレーション)

【目的】組織の損傷や炎症により血液中の C 反応性蛋白(CRP)濃度が 100 倍以上増加することが報告されている。そのため炎症や癌のバイオマーカーとして CRP に高い関心が集まっている。生体試料中の蛋白質定量において、従来から使用されているリガンドバインディングアッセイ(LBA)は、多成分測定が可能であることや、特異性、適用濃度範囲の広さ、短いメソッド開発時間などの利点から LC/MS 測定へ移り変わりつつある。この LC/MS 測定に使用される、タンパク質を酵素消化しペプチドとして定量するボトムアップアプローチは、高感度で正確な定量のために、オーバーナイト消化など長時間で複雑なワークフローで行われることが多い。本研究では市販されているキットと、その汎用プロトコールを使用し、消化及びペプチド精製まで 3 時間以内に完了し、血漿中 35 μ L の CRP を正確に定量できることを検証した。【方法】血漿 35 μ L を Waters 社から市販されている消化キットで直接トリプシン消化し、同じく市販されている精製キットで消化ペプチドを精製した。測定にはトリプル四重極 LC-MS/MS を使用し、2 μ m 以下の細孔径 300 Å パーティクルを充填した 2.1 mm x 50 mm カラムにより、0.1%ギ酸/アセトニトリルグラジエントで分離。CRP のトリプシンペプチド、AFVFPK, ESDTSYVSLK, 及び GYSIFSATK を用いて定量を行った。【結果と考察】血漿 35 μ L の酵素消化及び陽イオン交換-逆相ミックスモード固相によるペプチド精製までを 3 時間以内に完了。CRP を 0.025-100 μ g/mL の範囲で定量可能だった。平均 QC 精度は 5%未満、真度 89-106%。検量線は 4 桁に渡り直線性を持ち、検量線作成に用いた全ての濃度における測定値の平均真度は 94-105%の範囲だった。以上から本研究で検証した市販キットによる消化と精製は CRP の LC/MS 定量に有効であることが示唆された。