

COVID-19 を理解する：UniSpray およびエレクトロスプレーイオン化を用いた、タンパク質分解後の SARS-CoV-2 タンパク質の検出

Stuart Oehrle, Laurence Van Oudenhove, Jan Claereboudt, Hans Vissers, Bart Van Puyvelde, Simon Daled, Katleen Van Uytfanghe, Dieter Deforce, Maarten Dhaenens



GHENT
UNIVERSITY

支援をご希望ですか？ ウォーターズでは、新型コロナウイルスに対抗するための取り組みを支援しています。支援の要請は、以下にご連絡ください。 [新型コロナウイルスイノベーション対応チーム](#)

本書はアプリケーションブリーフであり、詳細な実験方法のセクションは含まれていません。

研究目的のみに使用してください。診断用には使用できません。

要約

新型コロナウイルス感染症の大流行により、ウイルス感染を検出し、ウィルス量を測定するための現在の検査を補完するものとして、LC-MS ベースの方法の開発が促進されました。タンパク質分解後の体液中のウイルスタンパクの検出によるターゲット質量分析法が、追加の SARS-CoV-2 検査法の 1 つとして提案されています。ここで紹介する研究は、Xevo TQ-XS タンデム四重極型質量分析計を用いた SARS-CoV-2 トリプシン消化ペプチドの検出における UniSpray およびエレクトロスプレーイオン化ソースの適用を説明しています。

アプリケーションのメリット

- 鼻咽頭拭い液中の SARS-CoV-2 タンパク質のサロゲートペプチドベースの定量における UniSpray およびエレクトロスプレーの相補的な性質
- UniSpray イオン化インターフェースによるイオン化や選択性特性の向上による、特定のペプチドを使用した定量のダイナミックレンジの最適化

はじめに

新型コロナウイルス感染症は、SARS-CoV-2 によって引き起こされる病原性の強いウイルス感染症であり、現在進行しているパンデミックの原因です。SARS-CoV-2 のウイルス粒子にはタンパク質が多く含まれており、スパイク糖タンパク質 (SPIKE) と核タンパク質 (NCAP) の 2 つが主要な構成要素です。そのため、ターゲット LC-MS 分析法による SARS-CoV-2 タンパク質の検出および定量が、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) ベースの新型コロナウイルスのウイルス量測定法を補完する代替テクノロジーになると考えられます^{1,2}。そこで、「一般的に利用できるコロナのマルチプルリアクションモニタリングアッセイ」を開発するためのコミュニティーベースの取り組みが開始されました³。本研究では、新規のイオン化手法である UniSpray とエレクトロスプレーイオン化を比較して、特定の SPIKE および NCAP のトリプシン消化ペプチドの LC-MS 検出法 (720006967 <

<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/comprehending-covid-19-multiple-reaction-monitoring-transition-selection-and-optimization-strategies-for-lc-ms-based-sars-cov-2-detection.html>> および 720006968 <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/comprehending-covid-19-maximizing-lc-ms-detection-dynamic-range-for-multiple-reaction-monitoring-based-sars-cov-2-analysis.html>>) をさらに最適化し、この LC-MS 分析法のダイナミックレンジと選択性を向上させる可能性について調査しました。

実験方法

組換え SARS-CoV-2 SPIKE タンパク質および NCAP タンパク質の組み合わせ消化手順で得られるトリプシン Lys C ペプチドは、それぞれ個別の標準試料または汎用輸送培地（Universal Transport Medium、UTM）マトリックスにスパイクした状態で、Cov-MS から凍結乾燥の形で入手しました³。得られたペプチドを、Xevo TQ-XS タンデム四重極型質量分析計に接続した ACQUITY UPLC I-Class PLUS システムを使用して MRM モードで分析しました。

LC 条件

LC システム:	ACQUITY UPLC I-Class PLUS
バイアル:	MaxPeak HPS を採用した QuanRecovery バイアル
カラム:	ACQUITY Premier Peptide BEH C ₁₈ 300 Å、 2.1 mm × 50 mm、1.7 μm
カラム温度:	40 °C
サンプル温度:	10 °C
注入量:	5 μL
流速:	0.6 mL/分
移動相 A:	0.1% ギ酸水溶液
移動相 B:	0.1% ギ酸アセトニトリル溶液

MS 条件

MS システム:	Xevo TQ-XS
イオン化モード:	UniSpray および ESI ポジティブ
測定モード:	MRM

キャピラリー電圧 (ESI+) :	0.5 kV
インパクター電圧 (US+) :	0.7 kV
コリジョンエネルギー:	ペプチド/トランジション最適化済み
コーン電圧:	35 V

グラジエント

時間 (分)	%B 溶媒
0.0	5
5.5	33
5.6	85
7.0	85
7.1	5
8.0	5

データ管理

ソフトウェア:	MassLynx
	TargetLynx

結果および考察

「COVID-19 を理解する: マルチプルリアクションモニタリングに基づく SARS-CoV-2 分析のために LC-MS 検出のダ

イナミックレンジを最大化」(720006968JA)に記載したコミュニティベースの取り組みの一環として、Cov-MS コンソーシアムと共同で開発したマルチプルリアクションモニタリング (MRM) メソッドを本研究にも適用しました³。このメソッドでは、デューティサイクルとシグナル対ノイズ比を最大化するためにペプチドごとに2つのトランジションを使用し、頑健性とスループットを維持するために通常の LC メソッドと条件を使用します。UniSpray とエレクトロスプレーのイオン化インターフェースを両方適用し、元の Cov-MS 標準作業手順 (SOP) の記載に従って、同じ希釈系列のサンプルを分析しました。

図1に示すのは典型的なクロマトグラムで、UniSpray を適用すると、エレクトロスプレーと比較して、シグナル強度が強くなっています。一方、この例では、UniSpray では、エレクトロスプレーと比較して、S/N 比も向上していました。この量のタンパク質消化物をオンカラムで注入した場合に、このペプチドについて得られた S/N のゲインは約 2.5 であり、この値は以前に報告されたペプチドについての性能基準と一致しています⁴。S/N 向上の利点を図2に示します。ここでは、UniSpray およびエレクトロスプレーのインターフェースで、P0DTC9|NCAP_SARS2 由来のペプチド ADETQALPQR について定量的レスポンスが得られていることが示されています。ペプチド ADETQALPQR は、中程度から良好なレスポンスを示したペプチドの1つとして以前に同定されたもので、4つの量レベルでオンカラム注入しました。このペプチドとマトリックスの場合、UniSpray を使用することにより、もっと量レベルを増やしても、残差と線形回帰に関する定量性能を損なうことなく測定を達成できる可能性があります。

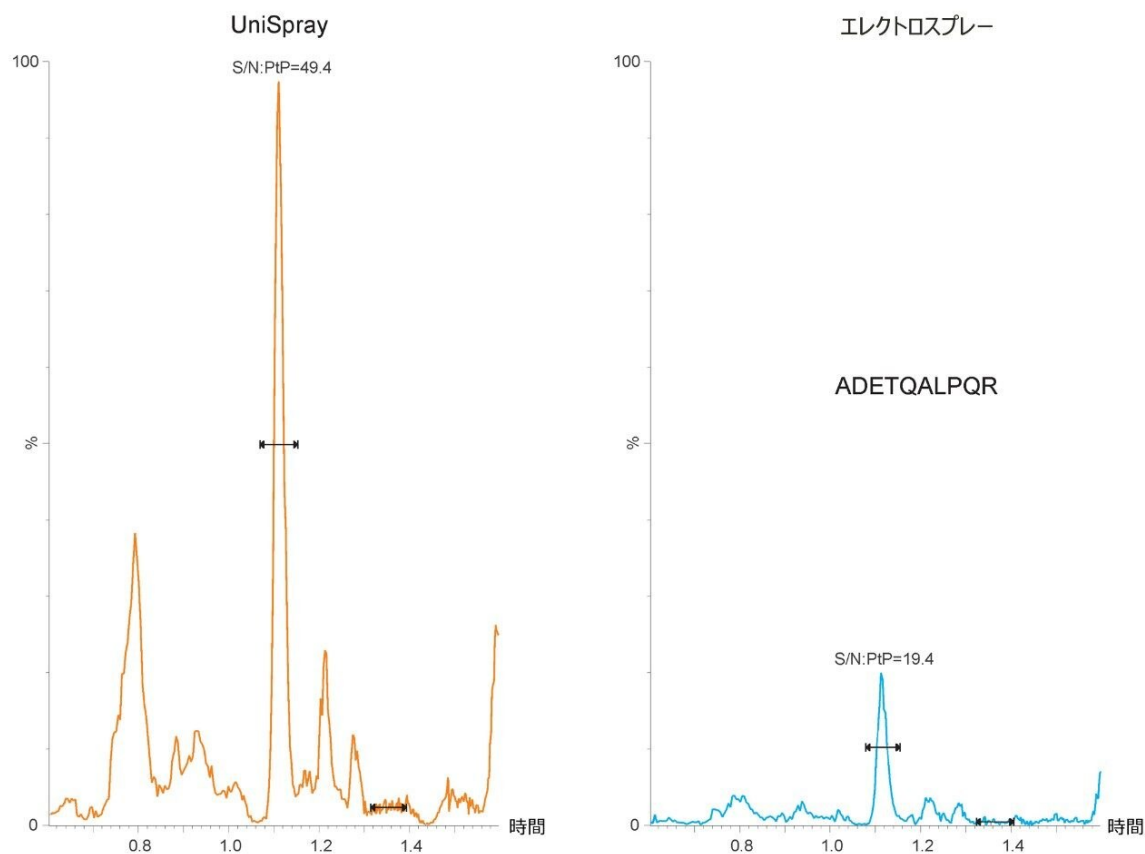


図 1. *UniSpray* (左) およびエレクトロスプレー (右) *LC-MS* インターフェースを使用して得た *NCAP* 由来のペプチド *ADETQALPQR* の合計トランジション ($564.8 > 400.2$ および $564.8 > 584.4$) *MRM* クロマトグラム。相対レスポンス (%) 軸は、同一の相対レベル (*UniSpray*) にスケーリングしています。

ADETQALPQR

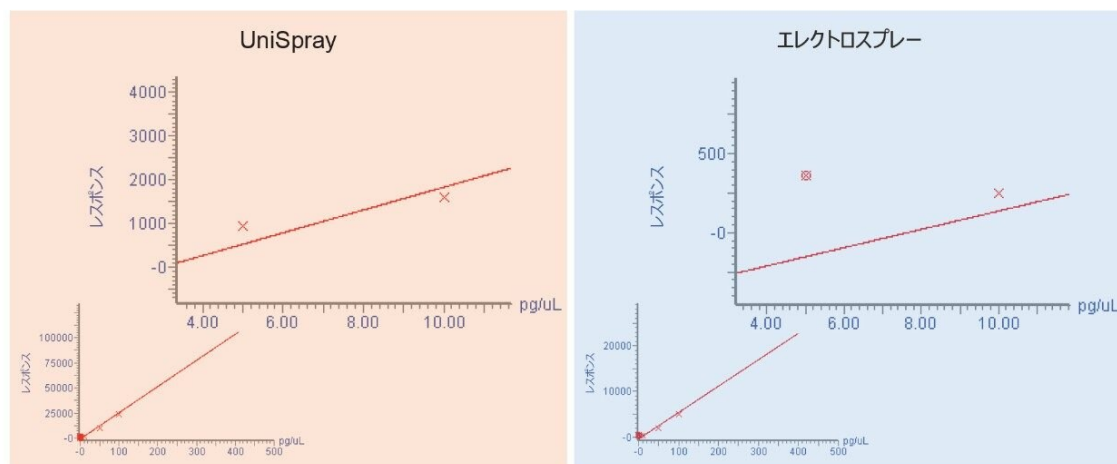


図 2. UniSpray（左）およびエレクトロスプレー（右）インターフェースを使用した P0DTC9|NCAP_SARS2 由来の ADETQALPQR の定量分析。ペプチドごとに 2 つのトランジションを使用して、NCAP ターゲットタンパク質について少なくとも 4 段階の量レベルにわたって良好な直線的レスポンスが示されています。挿入図に示しているのは、定量曲線で使用した 2 つの最低の量レベルです（エレクトロスプレーの場合、十分な分析定量性能を維持するために、円で示した最低レベルは使用しませんでした）。

比較結果のまとめを図 3 に示します。Cov-MS SOP に明記されている NCAP および SPIKE SARS-Cov-2 タンパク質由来のペプチドについての MRM クロマトグラムすべてのピークの S/N と面積を比較することで、UniSpray およびエレクトロスプレーのインターフェースが相補的な性質を有していることが分かります。一定の量レベルの特定のペプチドの S/N を表し、同じ量レベルの同じペプチドの S/N と対比させることにより、各ペプチドの平均 S/N 比および範囲を計算しました。次に、ペプチドが検出されたすべての量レベルについてのすべての S/N 比の値の平均と信頼区間を、図 3 の左側の比率値のセットに示す四分位分布で表しました。UniSpray を使用した場合、平均でほぼ 3 種のペプチドに S/N の向上が見られ、エレクトロスプレーを使用した場合もほぼ同数のペプチドに S/N の向上が見られました。ただし、特定のマトリックス（鼻咽頭拭い液、唾液、うがい液など）では、より高い信頼度で特定の SARS-Cov-2 ペプチドを検出できるようにするためには、代替のテクノロジーを選択/使用するオプションがあることが重要になります。図 3 の右側に示す分布は、両方のイオン化手法で得られたピーク面積比で、図 2 に示す測定結果、および UniSpray インターフェースの適用によりピーク面積が全体的に大きくなる（エレクトロスプレーと比較して平均 4 倍に増加）という以前の研究結果を確認しており、より優れたイオン統計が得られるため、シグナルレベルが低いデータの再現性が向上する可能性があります（データは表示されていません）⁴。

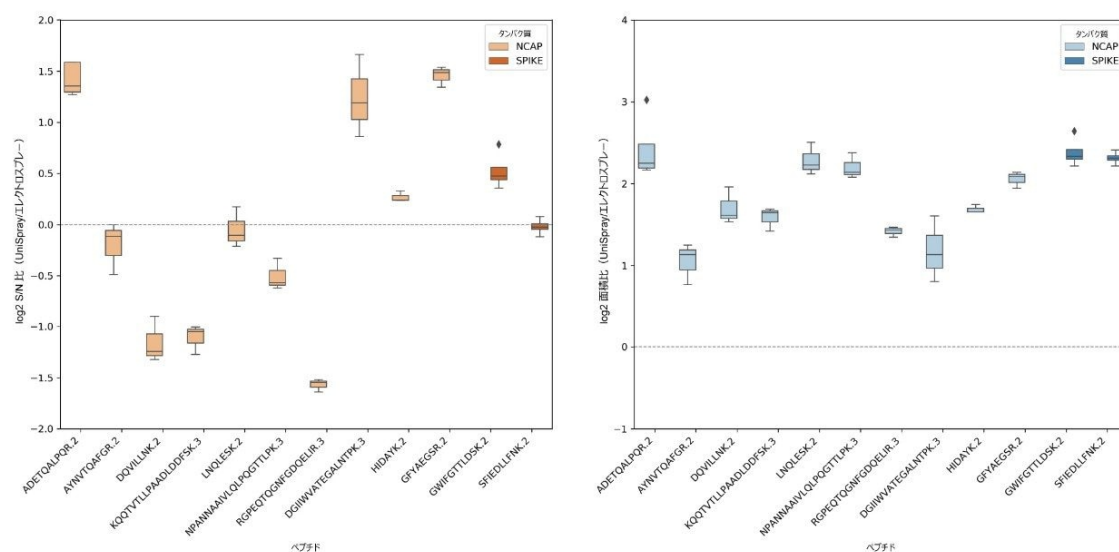


図 3. UniSpray およびエレクトロスプレーでの相対レスポンス。オンカラムで注入した UTM マトリックス中の組換え NCAP および SPIKE タンパク質消化物の、UniSpray とエレクトロスプレーを用いた MRM LC-MS 分析結果を、元の CovMS SOP に明記されているペプチドについて比較したピーク S/N 比（左）およびピーク面積比（右）値の平均の中央値の正規化した $\log_2$ 比を示しています。

結論

NCAP および SPIKE タンパク質は、ウイルス SARS-CoV-2 補体の重要な構成要素で、ウイルス量の直接的な目安であるため、生物学的マトリックス中の量と濃度を LC-MS ベースのテクノロジーを使用して測定することが検討されています。この研究では、UTM マトリックス中に検出される NCAP および SPIKE 由来の多数のトリプシン消化ペプチドのリニアレスポンスと LLOD を調査し、UniSpray およびエレクトロスプレーのイオン化源の相対レスポンスを理解するとともに、Cov-MS コンソーシアムが開発している MRM 分析メソッドがさらに特徴づけられています。得られた結果は、UniSpray とエレクトロスプレーがタンパク質分解ペプチドの相補的なイオン化法であり、鼻咽頭拭い液中および汎用輸送培地中に保管された SARS-CoV-2 タンパク質を検出・定量するために開発された Xevo TQ-XS タンデム四重極型質量分析計を用いた分析法が、ペプチドのサブセットを使用してさらに改良できる可能性があることを示しています。

参考文献

1. WHO Laboratory Testing for 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) in Suspected Human Cases. Interim Guidance. Jan 17, 2020. <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>. <<https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>>
2. N. Subbaraman, Coronavirus Tests: Researchers Chase New Diagnostics to Fight the Pandemic, *Nature*, 2020 Mar 23. doi: 10.1038/d41586-020-00827-6.
3. M Dhaenens *et al.* M Dhaenens *et al.* <https://www.youtube.com/watch?v=-yV8WJAR1Lc&t=2724s>. <<https://www.youtube.com/watch?v=-yV8WJAR1Lc&t=2724s>>
4. A Comparative Study of UniSpray and Electrospray Sources for the Ionization of Neuropeptides in Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. J Bongaerts, K Segers, L Van Oudenhove, Y Van Wanseele, M Van Hulle, D De Bundel, D Mangelings, I Smolders, Y Vander Heyden, A Van Eeckhaut. *J Chromatogr A*. 2020 Sep 27;1628:461462. doi: 10.1016/j.chroma.2020.461462.

謝辞

SARS-Cov-2 MRM メソッドを設計するためのコミュニティベースの取り組みの一環として、評価キットをご提供いただいた Cov-MS コンソーシアムの皆様に対して、感謝を申し上げます。

Stuart Oehrle, Laurence Van Oudenhove, Jan Claereboudt, and Hans Vissers (Waters Corporation); Bart Van Puyvelde, Simon Daled, Dieter Deforce, and Maarten Dhaenens (Pharmaceutical Biotechnology, University of Ghent); Katleen Van Uytanghe, (Department of Bioanalysis, University of Ghent).

ソリューション提供製品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS システム <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQ-XS タンデム四重極型質量分析計 <<https://www.waters.com/134889751>>

MassLynx MS ソフトウェア <<https://www.waters.com/513662>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#) [プライバシー](#) [商標](#) [サイトマップ](#) [キャリア](#) [クッキー](#) [クッキー](#)
[環境設定](#)