

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4527619号
(P4527619)

(45) 発行日 平成22年8月18日(2010.8.18)

(24) 登録日 平成22年6月11日(2010.6.11)

(51) Int.Cl.

F 1

GO 1 N 27/447	(2006.01)	GO 1 N 27/26	301C
GO 1 N 27/62	(2006.01)	GO 1 N 27/26	301A
GO 1 N 30/02	(2006.01)	GO 1 N 27/26	315K
GO 1 N 30/84	(2006.01)	GO 1 N 27/26	331E
GO 1 N 30/88	(2006.01)	GO 1 N 27/62	F

請求項の数 13 外国語出願 (全 9 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願2005-193598 (P2005-193598)

(22) 出願日

平成17年7月1日(2005.7.1)

(65) 公開番号

特開2006-17731 (P2006-17731A)

(43) 公開日

平成18年1月19日(2006.1.19)

審査請求日 平成18年1月27日(2006.1.27)

(31) 優先権主張番号 04015701.8

(32) 優先日 平成16年7月3日(2004.7.3)

(33) 優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(73) 特許権者 591003013

エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
F. HOFFMANN-LA ROCHE
E AKTIENGESELLSCHAFT

スイス・シーエイチ-4070バーゼル・

グレンツアーヘルストラツセ124

(74) 代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔

(74) 代理人 100096183

弁理士 石井 貞次

(74) 代理人 100118773

弁理士 藤田 節

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】液体クロマトグラフィーをキャピラリー電気泳動に接続する予備濃縮インターフェース

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1 次元目の分離用の第 1 の分離装置として液体クロマトグラフィーカラム；2 次元目の分離用の第 2 の分離装置としてキャピラリーゾーン電気泳動(CZE)チャネル；および該第 1 の分離装置と該第 2 の分離装置との間のインターフェイス域であって、該インターフェイス域は、試料画分または試料成分の該第 2 の分離装置への導入前に該第 1 の分離装置から流出する個々の試料画分または試料成分を濃縮するために 2 個以上の電極を備える濃縮区画を備えかつキャピラリーゾーン電気泳動の前に緩衝剤を変更しないことを特徴とする、インターフェイス域、を備える、複雑な分析混合物の二次元分離のための装置。

【請求項 2】

前記電極が、ナフィオンポリマーまたは別のイオン選択性材料で充填されたマイクロチャネルからなることを特徴とする、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 3】

前記マイクロチャネルが、2 ~ 3 μ m 程度の極めて狭い開口部によって前記CZEチャネルと接触していることを特徴とする、請求項 2 に記載の装置。

【請求項 4】

前記インターフェイス域が、さらに少なくとも一つの濃縮区画を備えることを特徴とする、請求項 1、2 または 3 に記載の装置。

【請求項 5】

ナノ逆相液体クロマトグラフィー(nano-RPLC)およびその後続のキャピラリーゾーン電

気泳動(CZE)において複雑な分析混合物を分離する工程を含み、該ナノRPLCと該CZEとの間のインターフェイス域において該ナノRPLCから流出する画分を、該CZEへの導入前に2個以上の電極を備える濃縮区画で濃縮すること、およびキャピラリーゾーン電気泳動の前に緩衝剤を変更しないことを特徴とする、二次元ナノ逆相液体クロマトグラフィー(nano-RPLC) / キャピラリーゾーン電気泳動(CZE)法。

【請求項6】

前記ナノRPLCからの全ての溶出物が、一定の流量で前記CZEへ流入することを特徴とする、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記電極が、ナフィオンポリマーまたは別のイオン選択性材料で充填されたマイクロチャネルからなることを特徴とする、請求項5または6に記載の方法。 10

【請求項8】

前記画分が、少なくとも一つの電場をかけることによって濃縮され、そして該濃縮された画分が、該少なくとも一つの電場の非存在下または反転の間に前記CZEに導入されることを特徴とする、請求項5、6または7に記載の方法。

【請求項9】

流体力学的流れの掃流力に打ち勝つのに十分な強度で、前記画分の成分の電荷と反対の極性を有する電圧を前記電極間に印加することによって、前記ナノRPLCから流出する画分を濃縮し、該電極間の電位差をなくすことによって該画分を前記CZEに導入することを特徴とする、請求項5～8のいずれか1項に記載の方法。 20

【請求項10】

前記濃縮区域が、イオン交換材料をさらに備え、電場の非存在下で前記ナノRPLCから流出する試料材料が蓄積され、流れと同じ方向の極性を有する電圧を前記電極間に印加することによって試料が脱離し前記CZEへ導入されることを特徴とする、請求項5、6または7に記載の方法。

【請求項11】

前記CZEによって分離された前記画分の個々の成分が質量分析計に噴霧されることを特徴とする、請求項5～10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項12】

プロテオミクスにおける二次元分離として意図される、請求項5～11のいずれか1項に記載の方法。 30

【請求項13】

ペプチド混合物の二次元分離のための請求項1～4のいずれか1項に記載の装置の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、例えばペプチドの複雑な混合物の液体クロマトグラフィーによる二次元分離用装置および方法に関する。特に、本発明は、質量分析計に直接噴霧するキャピラリー電気泳動(CE)の前段にある逆相液体クロマトグラフィー(RPLC)に関する。 40

【背景技術】

【0002】

2Dポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)にとって重大な制約の一部が2D LCによって克服されることが判明したことから、二次元液体クロマトグラフィー法/質量分析法(LC/M S)は、プロテオミクス研究および応用において重要な役割を果たし始めている。詳細な総説については[文献1]を参照されたい。主な利点は、自動化、分析時間の短縮、高感度化、および再現性の向上である。希釈サンプルをカラム上で濃縮することができ、より迅速な同定および定量が可能となるUV、LIFおよび特にMSのような様々な検出システムと接続することができる。

【0003】

ペプチドレベルでの分析は、いくつかの理由のために好ましいが、主として、ペプチドが初期に多種多様な溶媒により容易に溶解し、親タンパク質よりも分離が容易であるために好ましい。しかし、ペプチドを扱う際には、溶解しなければならない種の数が増加する欠点がある。したがって、分離中にはより高い分解能が必要とされ、利用可能な予備分画技術を使用することがより重要になる。

【0004】

オンライン2D-LCシステムの基本的な考え方は、1次元目に徐々に分離し、2次元目に迅速に分離することである。試料採取速度を落とさずに、または1次元目を減速せずに、2次元目における高分解能要件を満たすためには、少なくとも2本の2次元用カラムを並行して溶出させる必要がある。報告が最も多く、最も多く適用され商用化された2D-LC手法は、イオン交換クロマトグラフィー(IEX)にRPLCが後続するものである。これら2つの技術は全く異なり、最初の技術は電荷分離機構(塩溶出ステップ)に基づいており、第2の技術は疎水性(有機溶媒による勾配溶出)に基づいている。IEXは、MSとは両立せず、したがって、1次元目に使用される。IEXから得られる画分は、1本または2本の平行濃縮カラムで捕捉され洗浄された後に、一般にESIインターフェースを介してMSに直接接続することができるRPLC(1本または2本の平行カラム)による第2の分離にかけられる。この手法の制約は、全体の分析時間が依然として長いということである。理論的に、利点が最も多い組合せの1つは、LCとそれに後続するキャピラリーゾーン電気泳動(CZE)であるが、これまで、この特定の組合せは1つも商用化されておらず、文献にもほとんど見当たらない。これら2つの技術も異なり、互換性があり、質量分析法と両立する。これらはどちらも高分解能であり、全ピーケ容量が増加し、組み合わせると、他のいかなる2D組合せよりも迅速になり得る。CZE分離を実施することができる速度は、第1のカラムから第2のカラムへの溶出物の連続採取を可能とし、RPLC分離を実施するのに要する時間である1次元目を終了するのに要する時間内に2D分析を終了することができる。この方策の進展を歴史的に遅らせてき決定的な問題は、おそらく、これら2つの分離技術のインターフェースであろう。興味深い考え方には、必ずしもこの特定の組合せを意図したものではないが、ある程度有効な解決法である。少数の別法が、機械弁に基づく特許文献(米国特許第5,240,577号A)、およびフローゲート(米国特許第5,496,460号A)または光学的ゲート概念(米国特許第5,269,900号A)に基づく特許文献に記載されている。米国特許第6,192,768号B1に記載されているとおり、例えば、CE用キャピラリーへの連続流から得られる規定体積の液滴をいくつかの手段のうちの1つによって分配することに基づく別の概念を使用することもできる。例えばEOF(電気浸透流)制御に基づく別の概念が、米国特許第6,475,363号B1に記載されている。しかし、すべての場合において、個々の制約に加えて、溶出物の大部分が情報損失のリスクをかかえたまま廃棄され、感度が確実には改善されないという共通欠点が依然として残っている。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

したがって、本発明の目的は、第1の分離とそれに続く分離ステップとのインターフェース段階における制約を、提案された考え方に関して報告されている欠点を伴わずに克服する解決法を提案することである。

【0006】

特に、本発明の一目的は、RPLC分離とそれに続くCE分離とのインターフェースを提案することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、請求項1または請求項10の文言によって、それぞれ装置および方法を提案する。

【0008】

本発明は、主として、第1のカラムから第2のカラムへの溶出物を採取することにより、

10

20

30

40

50

連続流からの混入なしに、注入画分のキャピラリーゾーン電気泳動分離に対して十分な時間が得られる方法を開示する。第1のカラムから溶出する画分は、2個の電極によって画定される1個の短いセグメント中で、第2の分離と他のもう1つとの間に次の注入の前に濃縮される。これによって、1次元目の分離において含まれる全情報が保存されるだけでなく、2次元目における感度および分解能が大きく増加する。キャピラリー電気泳動法におけるカラム上での予備濃縮は新規ではない[文献10～11]が、これら公知の方法は、例えば等速電気泳動および電場増幅のための不連続な緩衝システム、または脱着のための移動相もしくは緩衝剤の変更も一般に必要とする吸着材料もしくは結合材料の使用を必要とする。界面動電捕捉も、最近、米国特許第6,428,666号B1に報告されており、タンパク質は、印加された電場下でシリカ粒子上に捕捉され、電場の非存在下で圧力をかけて溶出される。ごく最近、本発明とは無関係に並行して、流体力と電気力の平衡に基づく流体電気捕捉(fluidic electrocapture)装置が開発され、発表された[文献11～12]。しかし、これは、例えばマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法(MALDI-MS)前のペプチドおよびタンパク質の1段階試料精製、またはキャピラリー電気泳動法による一次元オフライン分析前の予備濃縮用であり、実際、本発明のインターフェースに基づく原理を証明するのに役立つだけである。10

【0009】

本発明による方法においては、例えばCEなどの第2のステップの分離中のEOF値、またはあらゆる原因、例えば閉塞もしくは気泡によるシステム内の圧力降下に拘わらず、流れは決して止められず、例えばRPLCなどの第1の分離を実施する速度(例えば、100 nL/min)で一定に保たれる。これは、例えば、Agilent TechnologiesおよびDionex LC Packingsによって商用化されたナノポンプ技術の最近の進歩のお陰で可能になり得る。この効果によって、MS-分析のための安定なエレクトロスプレーも確実に行うことができる。20

【0010】

したがって、具体的には、本発明は、マイクロRPLCの代わりのナノRPLCとCZEの併用に関する。マイクロRPLCは、通常、内径が0.3～3 mmであり、典型的な流量が1～500 μL/minであるカラムに基づいている。一方、ナノRPLCは、内径が75～100ミクロンであり、典型的な流量が0.1～1 μL/min(100～1000 nL/min)であるカラムに基づいている。その結果、LCに適用される流量(<200 nL/min)は、今や第1のカラムと完全に連結され、他方ではESIインターフェースを介してMSに接続されるCZEの分離速度と適合する。換言すれば、RPLCからの全溶出物は、バルブもデッドボリュームもなくCZEチャネルをそのまま流れ、廃棄されるものがなく、希釈もされない。30

【0011】

RPLC分離とCZE分離の両方、および質量分析法とも適合する条件を見出すことができる。このことはいくつかの実験によって証明され、20%アセトニトリル(ACN)/0.4%トリエチルアミン(TEA)/0.3%トリフルオロ酢酸(TFA)からなる緩衝剤中のペプチド混合物(30種のペプチドを産生するIgGのトリプシン消化産物)のCZEによって得られる分解能は(図1c)、塩含量が高く、尿素などの添加剤が存在するために、MSおよびRPLCとは適合しない最適で特徴の明らかな緩衝剤系において得られる分解能と同等である(図1aおよび1b)。図1aによれば、緩衝剤1は、イミノ二酢酸(IDA)50mM、ヒドロキシエチルセルロース(HEC)0.5%、および7Mウレアからなる。緩衝剤2は、50mM IDA/10%トリフルオロエタノール(TFE)/0.5%HECからなる。図1cのグラフに、本発明から得られる2次元目での分離を示す。40

【0012】

1次元目の分離としてキャピラリー通電クロマトグラフィー(CEC)を使用することもできる。

【0013】

内部電極を使用するときに起こる電気分解および気泡形成の問題は、[文献12～13]に記載の塩橋電極または導電膜を代わりに組み込むことによって防止することができる。本発明の一部として、可能な実施例によれば、例えば2～3 μm程度の極めて狭い開口部によっ50

てCEチャネルと接触しているマイクロチャネルからなり、例えばナフィオン(登録商標)ポリマーまたは他のイオン選択性材料が充填された2個の微小電極が予備濃縮に使用される。ナフィオン(登録商標)は、スルホン酸基がその中に分散された基本的にテフロン(登録商標)であり、水に対して極めて高い親和性を有する。各スルホン酸は、最高13個の水分子を結合することができ、水和の水として吸引される。各スルホン酸基が相互に連結することによって、ナフィオン(登録商標)を通る水、したがってプロトンの移動が極めて速くなる。実際、ナフィオン(登録商標)の主な応用例の1つは、ポリマー電極燃料電池におけるプロトン交換膜である。最終的に、他の小さな陽イオンは通過することができるが、ペプチドサイズの分析物は通過することができない。これによって、クロマトグラフィーピークにおいて共溶出するペプチドを、流体力学的流れの掃流力(dragging force)に打ち勝つのに十分な強度の電圧をペプチドの電荷(この場合、正)と反対の極性で印加することによって、これらの電極の2個に挟まれた短い区間内で濃縮することが可能になる。CEへの注入は、2個の電極間の電位差をなくし、第2の電極を通過し濃縮区間から流出するのに必要な時間、圧縮試料プラグが流れにより運ばれることによって実施される。分離のために第2の電極とカソードの間に印加される電圧は常にオンであり、2個の濃縮電極間に印加される電圧は注入中のみ遮断される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

本発明を、例えば、本発明の略図である図2を参照してさらに詳細に述べる。

【0015】

例えばRPLCカラムなどの第1の分離装置の後に、分離された試料または画分は、それぞれ、中間区間11内に導入される。中間区間は例えばCE分離チャネルなどの前方の別の分離装置3と繋がっている。試料は、分離チャネル3を出ると、質量分析装置5に進み、注入または噴霧される。

【0016】

中間区間11は、いわゆる予備濃縮区間13が画定される距離で配列された2個の電極E1とE2を含む。

【0017】

RPLCカラム1から流出した画分は、まず、画分中の分析物が電極E2を通過できないような電位差に2個の電極E1とE2を維持することによって、予備濃縮区間13において予備濃縮される。それぞれある時間または予備濃縮時間が経過した後に、予備濃縮された分析物画分が電極E2を通過し、例えばCE分離チャネルである第2の分離装置3に流入するように、電極をオフにし、または極性を反転させる。電極E₀とE₁によって画定される予備・予備濃縮(pre-preconcentration)区間を導入することによって、RPLC装置から流出したさらに別の成分が、CE区間3への注入が終了する前に予備濃縮区間13に注入するのをさらに防止することができる。

【0018】

図2が本発明による設計の一例に過ぎないことは言うまでもない。さらに別の予備濃縮区間を画定するために、さらに別の電極を配置できることは言うまでもない。

【0019】

本発明の装置の大きな利点は、流れ自体は中断されず、あらゆる溶媒または輸送液の流れが一定であることである。また、溶出物が情報損失のリスクをかかえたまま廃棄されることはない。

【0020】

本発明の方法の寸法および値、流量、分析電圧および時間の見当をつけるために、例として以下の計算を行うことができる。

【0021】

RPLCとして、長さ15cm×ID(内径)75 μmのC18カラムを使用することができ、勾配溶出の流量を100 nL/minとすることができます。RPLC溶出物が流れるCEチャネルを50 μm IDとすることができ、電気泳動が起こる有効長を5 cmとすることができます。CE分離前の予備濃縮区

10

20

30

40

50

間は1 mm長である。

【0022】

この系においては、線流速(v_f)は0.085 cm/sである。上記緩衝系における分離から計算されるペプチドの電気泳動移動度(μ)は、一般に、 $1.0 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1} \text{ V}^{-1} \sim 1.6 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1} \text{ V}^{-1}$ である。式 $v_e = \mu E$ (式中、 v_e は電気泳動速度であり、 E は電場である)から、2kV/cm、すなわち10 kV/5 cmの電場によって、 v_e は0.2 cm/s ~ 0.36 cm/sになる。したがって、 v_f と v_e の合計である全速度(v_{tot})は、0.285 cm/sec ~ 0.445 cm/secの範囲になり、検出時間は第1のピークの10秒 ~ 最終ピークの18秒の間になる。一方、クロマトグラフィーのピークの場合には、推定30秒が妥当である。これは、電気泳動をかける時間が十分にあり、次のクロマトグラフィーのピークが次の注入の前に濃縮されることを意味する。電圧が高いためにジュール効果によって熱が発生し、分解能が減少することは、液体系のイオン強度が低く、チャネル寸法が小さく、流速により新しい液体が常時運び込まれるために大きな問題ではない。10

【0023】

捕捉電場の値は、 v_f と最低ペプチド移動度の比、すなわち850 V/cm、85 V/mmよりも大きくなければならない。この電場をゼロにして注入を可能にする時間は1.2秒である。

【0024】

極めて高い濃縮係数を実現することができる。

【0025】

このインターフェースの別の種類においては、やはり1 mm × 50 μmの濃縮区間は、陽イオノン交換材料で充填されており、この区間における電場の非存在下で試料が蓄積される。次いで、流れと同じ方向に極性を有する十分な電圧を印加することによって試料が脱着される。この場合に必要な電場は、使用する最終固定相に左右されるので推定されないが、pHを低くし、TFAなどのイオン対形成剤を存在させることによって、この電場を低くすべきである。上述の実施例および図2の略図は、本発明をさらに詳細に説明するのに使用され、本発明がこの実施例および図2の略図に何ら限定されないことは言うまでもない。20

【0026】

文献リスト

参考文献

[1]. Sarka Beranova-Giorgianni. Proteon analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. Trends in Anal. Chem. 2003、22、273 ~ 81。30

【0027】

[2]. Opiteck等 Comprehensive two-dimensional high-performance liquid chromatography for the isolation of overexpressed proteins and protein mapping. Anal. Bioch. 1998、258、349 ~ 61。

【0028】

[3]. Opiteck等 Comprehensive on-line LC/LC/MS of proteins. Anal. Chem. 1997、69、1518 ~ 24。

【0029】

[4]. Washburn等 Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. Nature Biotech. 2001、19、242 ~ 47.40

【0030】

[5]. Wolters等 An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. Anal. Chem. 2001、73、5683 ~ 90.

【0031】

[6]. Wagner等 An automated on-line multidimensional HPLC system for protein and peptide mapping with integrated sample preparation. Anal. Chem. 2002、74、809 ~ 820.

【0032】

50

[7]. Moore等 Rapid comprehensive two-dimensional separations of peptides via RPLC-optically gated capillary zone electrophoresis. *Anal. Chem.* 1995、67、3448 ~ 55。

【0033】

[8]. Lewis等 Comprehensive on-line RPLC-CZE-MS of peptides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1997、8、495 ~ 500.

【0034】

[9]. Han等 Quantitative profiling of differentiation-induced microsomal proteins using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry. *Nature Biotech.* 2001、19、946 ~ 51。

10

【0035】

[10]. Damon等 On-line preconcentration methods for capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2000、21、2768 ~ 79.

【0036】

[11] Miguel Valcarcel等 Coupling continuous separation techniques to capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*、924 (2001) 3 ~ 30.

【0037】

[12]. Astorga-Wellis等 A microfluidic electrocapture device in sample preparation for protein analysis by MALDI mass spectrometry. *Anal. Chem.* October 1、2003、75、5213 ~ 19.

20

【0038】

[13]. Astorga-Wellis等 Fluidic preconcentrator device for capillary electrophoresis of proteins. *Anal. Chem.* October 1、2003、75、5207 ~ 12.

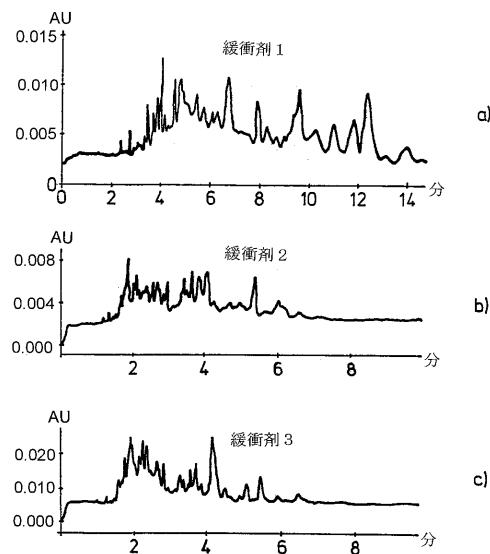
【図面の簡単な説明】

【0039】

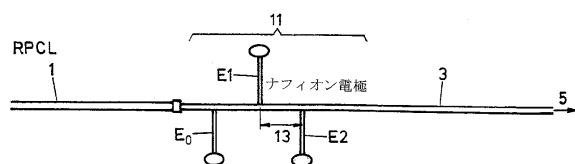
【図1】緩衝剤1、2又は3中のペプチド混合物におけるCZE分析の分解能を示す図である。

【図2】本発明に係る装置を模式的に示す構成図である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

G 0 1 N	27/62	V
G 0 1 N	30/02	L
G 0 1 N	30/84	J
G 0 1 N	30/88	J

(72)発明者 マリオ クルチオ

スイス国 ツェーハー- 6048 ホルブ カスターニエンバウムシュトラーセ 1

審査官 河野 隆一郎

(56)参考文献 特開2003-254955 (JP, A)

特開2003-149218 (JP, A)

特開2004-101477 (JP, A)

特開2001-296275 (JP, A)

特開2003-066005 (JP, A)

特開2004-157096 (JP, A)

Haleem J.Issaq, King C.Chan, George M.Janini, and Gary M.Muschik, A simple two-dimensional high performance liquid chromatography/high performance capillary electrophoresis set-up for the separation of complex mixtures, Electrophoresis, 1999年 6月, Vol. 20, No.7, P.1533-1537

Yufeng Shen, and Richard D.Smith, Proteomics based on high-efficiency capillary separations, Electrophoresis, 2002年 9月, Vol.23, No.18, P.3106-3124

Haleem J.Issaq, Thomas P.Conrads, George M.Janini, and Timothy D.Veenstra, Methods for fractionnation, separation and profiling of proteins and peptides, ELECTROPHORESIS, 2002年 9月, Vol.23, No.17, P.3048-3061

Hongbin Liu, Dayin Lin, and John R.Yates III, Multidimensional Separations for Protein/Peptide Analysis in the Post-Genomic Era, BioTechniques, 2002年 4月, Vol.32, No.4, P.898,900,902,904,906,908,910-911

John P.Larmann Jr., Anthony V.Lemmo, Alvin W.Moore Jr., and James W.Jorgenson, Two-dimensional separations of peptides and proteins by comprehensive liquid chromatography-capillary electrophoresis, Electrophoresis, 1993年 5月, Vol.14, No.5/6, P.439-447
Vladislav Dolnik, and Katarina M.Hutterer, Capillary electrophoresis of proteins 1999-2001, Electrophoresis, 2001年 11月, Vol.22 No.19, P.4163-4178

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 27 / 447

G 0 1 N 30 / 02

G 0 1 N 30 / 88

G 0 1 N 27 / 62

G 0 1 N 30 / 84

G 0 1 N 30 / 46

J S T P l u s (J D r e a m I I)

J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I)