

内部標準としてユニフォームに標識された ^{13}C 化合物を使ったメタボロームの定量分析

概 要

植物細胞中のリコピン、キナ酸、ルテイン、ケルセチンなどの代謝産物濃度の定量と品質管理は、しばしば面倒で、能率が悪いものです。得られた結果の再現性は、サンプルの前処理とサンプル分析における（予想外の）変化によって、しばしば妨げられます。特に、不安定な代謝物質の濃度は、サンプルの前処理に大きく影響され、個人のやり方と実験室のプロトコールから生じているバリエーションに強く影響を受けます。結果の差異は異なる場所（研究所バリエーション、装置の違い）または、異なる時間（測定ごとのバリエーション、オペレーターバリエーション）に得られた結果の比較は、しばしば慎重を要するか、不可能でさえあります。他の問題点は、時間の消費（GC）と低い感度（HPLC/UV）です。

安定同位体によるソリューション：同位体希釈 Mass Spectrometry (IDMS)

これらの困難の多くは、安定同位体希釈技術（Wu 等、2005、Erk 等、2009）によって取り組まれてきました。ほとんど同一の化学特性を持つ代謝物のユニフォームに標識された分析成分がMS分析での内部標準(IS)として用いられる。違った分析者またはプロトコールにより分析されるサンプルの変異によるサンプル間の差異に関して、 ^{13}C 標識内部標準を用いることにより解決されます。これらの内部標準は、定量化するために植物中の代謝物質として適当な方法で培養されるというように植物に由来します。少量（例えばサンプル 10ng のキナ酸）で、先進的な品質管理、サンプル前処理の削減、他の有機酸によるキナ酸の同時溶出を防ぐことや、マトリックスや ionization 効果を克服することができます（Erk 等、(2009)）。

典型的結果

酵母の培養菌は、唯一の炭素源として U^{13}C -ブドウ糖で発酵、培養された。標識された培養抽出物は、解糖サイクルとTCAサイクルの中間体を分析するのに用いられた。図1は、中級の研究者ために、ユニフォームに ^{13}C 標識された代謝物が ^{12}C をベースにしたキャリブレーションテスト (Wu 等、(2004)) と比較された結果において大きく変異を減らすことを示しています。

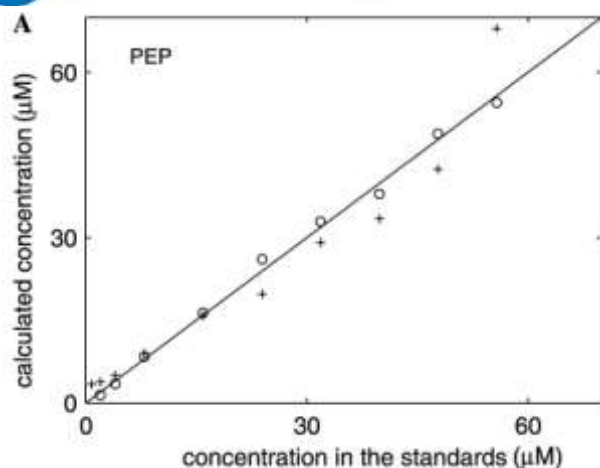


図1 PhosphoEnol ピルビン酸塩 (PEP) の分析。ISに基づくキャリブレーション (o) と ^{12}C に基づくキャリブレーション (+) を用いて計算された濃度 (y 軸) に対する既知の濃度 (内部標準、x 軸)。

表1の測定結果の係数は、いくつかの代謝物質について報告されています。ISに基づくキャリブレーションラインは、 ^{12}C に基づくキャリブレーションより、明らかに優れています。ピルビン酸塩 (PYR)、琥珀酸塩 (SUC) と phosphoenol ピルビン酸塩 (PEP) のような ^{12}C に基づくキャリブレーションラインのセットについての Outliers は、 U^{13}C で標識した内部標準で、きちんと誤りを正せます。

Table 1
Coefficients of determination (R^2 values) obtained from IS- and ^{12}C -based calibration lines

Metabolite	IS-based calibration line	^{12}C -based calibration line
PEP	0.9963	0.9340
G6P	0.9972	0.9928
F6P	0.9896	0.9724
F1,6bP	0.9986	0.9927
2PG + 3PG	0.9919	0.9695
PYR	0.9755	0.8592
CIT + iCIT	0.9927	0.9703
OGL	0.9937	0.9903
SUC	0.9978	0.9385
FUM	0.9933	0.9700
MAL	0.9900	0.9641

表1 ISに基づいたキャリブレーションと ^{12}C を基にしたキャリブレーションから得られた測定係数 (R^2 値)

ユニフォームに ^{13}C を標識した抽出物を使う方法は、より面倒でなくて、より強力で、メタボロームのより正確な分析が出来ます。著者はつぎのように結論付けました「内部標準としての標識された抽出物による IDMS は、高い精度で細胞内代謝物質濃度の正確な定量化を可能にして、将来のメタボロミクス研究への大きな可能性を持っています」(Wu 等、2005)。Erk 等 2009 は彼らが「新しい高感度で選択性がある SIDA 方法を確立した」そして、彼等が用いた内部標準である ^{13}C -キナ酸は「いろいろな食品でキナ酸のルーチンの定量分析に用いることができる」と結論付けた。

References

Erk T, H Bergmann, E Richling. 2009.

A novel method for the quantification of quinic acid in food using stable isotope dilution analysis.

Journal of AOAC International 92: 730-733.

Wu L, MR Mashego, JC van Dam, AM Proell, JL Vinke, C Ras, WA van Winden, WM van Gulik, JJ Heijnen. 2005.

Quantitative analysis of the microbial metabolome by isotope dilution mass spectrometry using uniformly ¹³C-labeled cell extracts as internal standards.

Analytical Biochemistry 336: 164-171.