

LC-MALDIシステムによるタンパク質の同定

–Identification of Proteins by LC-MALDI System–

質量分析装置を用いたタンパク質の同定手法として Peptide Mass Fingerprinting (PMF) があります。PMFは、タンパク質のIn-gel消化⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾による酵素消化断片の質量スペクトル、データベース検索によってそのタンパク質を同定することができます。容易にかつ迅速にタンパク質を同定することができるため汎用されています。しかし、分子量が小さいタンパク質は得られる消化物のフラグメントの数が少ないためデータベースで帰属しに

くい、微量のタンパク質では十分な数のフラグメントが得られない、また目的のタンパク質が翻訳後修飾されている、などから同定が難しいことがあります。PMFで同定が難しい場合は、MS/MSイオンサーチを試みますが、本アプリケーションでは、さらにnano-LCと組み合わせたLC-MALDIシステム (Prominence nano-AccuSpot-AXIMA® Performance) を用いたMS/MSイオンサーチによるタンパク質の同定をご紹介します。

S.Kobayashi T.Minohata T.Kuriki

nano-LCを用いて分離・精製された酵素消化物をサンプルプレートの個々の位置にスポットングすることにより、MALDIにおけるイオンサブプレッションを低減することができ、高感度かつ自動でペプチドのMS/MSイオンサーチが行えます。試料濃縮プレートである μ Focus MALDI plate を併用することで更なる高感度かつ自動での分析が可能となり、PMFでは同定が難しかったタンパク質の高スコ

アでの同定が可能となりました。サンプルの調製は、HeLa細胞から抽出したタンパク質300 μ gをサンプルとし、二次元電気泳動を行いました。SYPRO® Rubyで染色後、複数のスポットを切り出し、PMFを行いました。その中のPMFで同定できなかったサンプルをLC-MALDIシステムを用いてMS/MSイオンサーチを行い、4サンプル全てを同定することが出来ました。

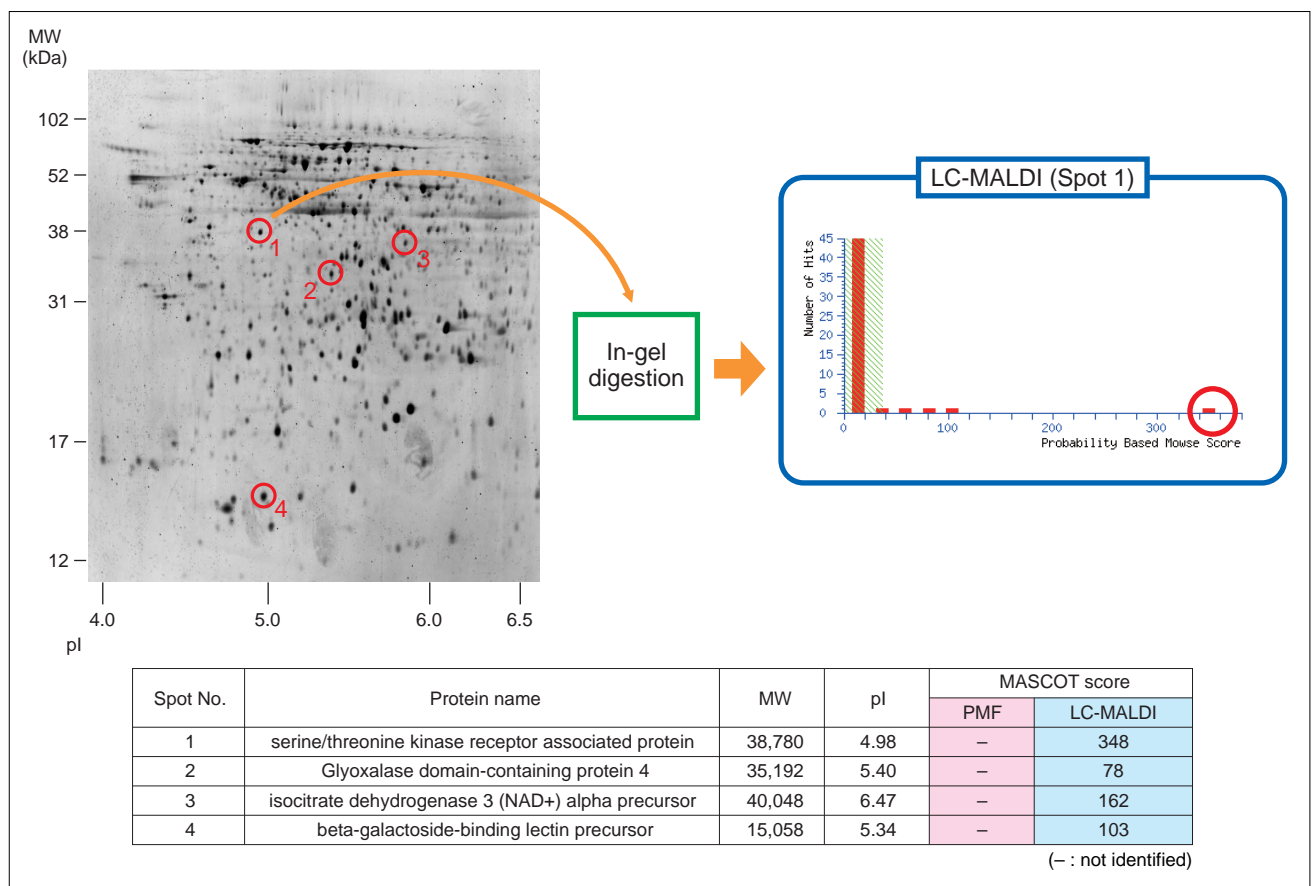


Fig.1 タンパク質の同定
Identification of Proteins by LC-MALDI system

PMFは迅速にタンパク質を同定するための有効な手法ですが、より微量なタンパク質、低分子量のタンパク質、翻訳後修飾されたタンパク質などの同定を行うには限界があります。このLC-MALDIシステムを用いた自動分析

によるMS/MSイオンサーチを行うことにより、同定が難しいタンパク質に対しても同定確度を高めることが可能です。今後のプロテオーム解析において、強力なツールとなり得るといえます。

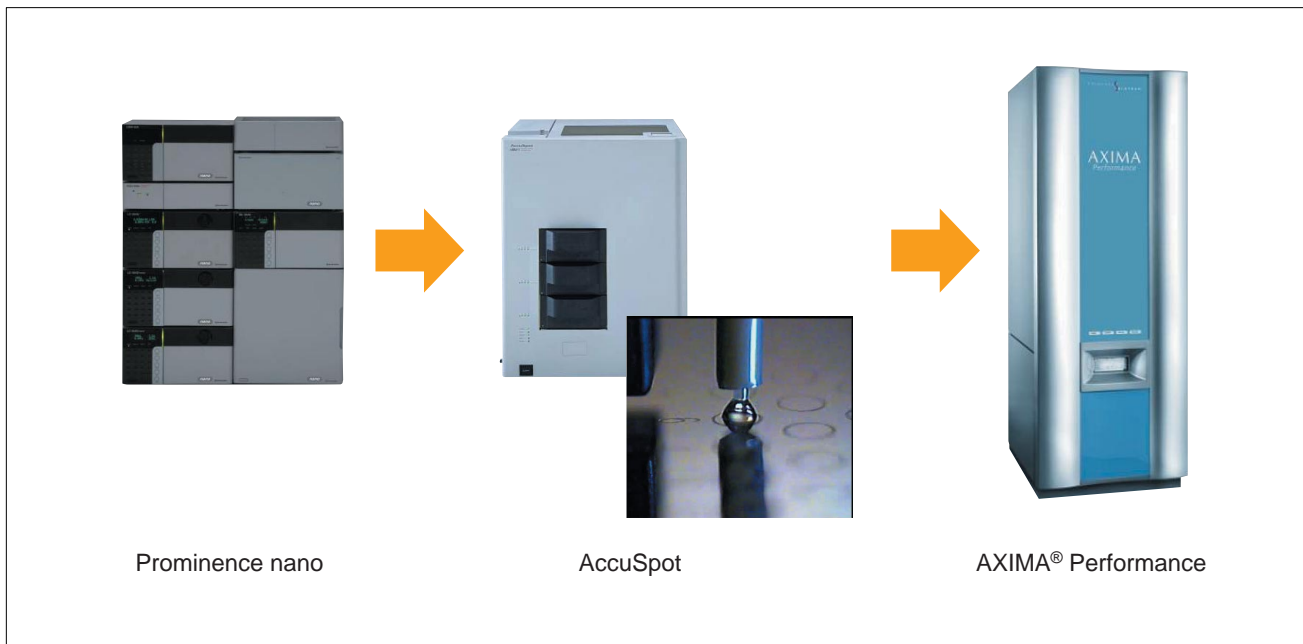


Fig.2 LC-MALDI システム
LC-MALDI System

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

• Electrophoresis	CoolPhoreStar® Two Dimensional Electrophoresis System (Anatech Corp.)
1st IEF	: Immobiline DryStrip pH 4-7, length 18 cm : Constant Voltage 500V - 3500 V, 9 stepwise, 18 hours
2nd SDS-PAGE	: Gel Concentration 12.5 %, size 18 cm × 18 cm : Constant Current 30 mA, 4 hours
Dyeing	: SYPRO® Ruby Protein Gel Stain Ex 280, 450 nm/Em 610 nm (Invitrogen)
Detection	: FluoroPhoreStar3000® (Anatech Corp) Ex 470 nm/Em 580 nm
• HPLC	Prominence nano
Column	: MonoCap® for Fast-flow (0.1 mmI.D. × 150 mm)
Mobile phase	: A; 0.1 % Trifluoro acetic acid, 5 % Acetonitrile, B; 0.1 % Trifluoro acetic acid, 90 % Acetonitrile 0 % B (0 min) → 45 % B (30 min)
Flow rate	: 1 µL/min
Column Temperature	: room temperature
Injection volume	: 90 µL
Detection	: 220 nm
Trapping column	: L-Column Micro (0.3 mmI.D. × 5 mm ; ODS, 5 µm)
• AccuSpot	Matrix : 0.5 mg/mL α-Cyano-4-hydroxycinnamic Acid (CHCA) Matrix solvent : Acetone : Ethanol = 1 : 2 Matrix flow rate : 1 µL/min Spotting interval : 18 sec
• Sample plate for MALDI TOF-MS	: µ Focus MALDI plate
• MALDI TOF-MS	: AXIMA® Performance

【参考文献】

- (1) Shevchenko A et al., Anal. Chem., 68, 850-858 (1996)
- (2) Katayama H et al., Rapid Communications in Mass Spectrometry, 15, 1416-1421 (2001)
- (3) Katayama H et al., Rapid Communications in Mass Spectrometry, 18, 2388-2394 (2004)

初版発行：2008年7月

 島津製作所 分析計測事業部
応用技術部

島津分析コールセンター

- 0120-131691(携帯電話不可)
- 携帯電話専用番号(075)813-1691

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。改訂版は下記の会員制Web Solutions Navigatorで閲覧できます。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/>
会員制Webの閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。