

プロテインシーケンサを用いたアミノ酸配列の長鎖分析 – グラジエントシステム –

栗木 智子

ユーザーベネフィット

- ◆ N末端からのアミノ酸配列を確実に同定することができます。
- ◆ ソフトウェアを用いたアミノ酸配列の自動推定を簡単に行うことが可能です。
- ◆ ゲノムデータベースに登録されていないタンパク質のアミノ酸配列も容易に決定することができます。

■はじめに

プロテインシーケンサ PPSQ-50A グラジエントシステムはエドマン分解を用いてアミノ酸を決定する装置です。高純度に精製されたタンパク質をサンプルとして調製し、分析を行うことで、簡単にアミノ酸配列を同定することが可能です。このシステムは、操作性もよく、高感度セルを用いてエドマン分解で得られたPTH-アミノ酸を検出するため、確実かつ信頼性の高いアミノ酸配列を得ることができます。

本稿では、N末端部からの長鎖配列分析を行った例を紹介いたします。



図1 プロテインシーケンサ PPSQ™-50Aシリーズ
グラジエントシステム

■ PPSQ-50A グラジエントシステム

PPSQ-50A グラジエントシステム (図1) は、エドマン分解で得られたPTH-アミノ酸をグラジエント溶離で分析するシステムです。PTH-アミノ酸の分析条件を表1に、PTH-アミノ酸のクロマトグラムを図2に示します。PPSQ-50Aグラジエントシステムには、アプリケーションニュース 01-00521で説明したイソクラティックシステムが持つ特長に加えて、さらに次の特長を有しています。

- ・ PTH-アミノ酸のピーク形状の改善
- ・ バックグラウンドの軽減

グラジエントシステムでは、イソクラティックシステムとくらべてPTHアミノ酸が溶出する順番が若干異なりますが、3倍から5倍程度高いピーク強度で検出することができます。またグラジエントシステムの場合は、分析時間が経つにつれ、PTH-アミノ酸の溶出力が高い移動相Bの濃度が高くなるため、疎水性の高いPTH-アミノ酸の分離も改善されています。クロマトグラム上に現れるPTH-アミノ酸以外のピークは、主にエドマン分解の副生成物としてはジメチルフェニルチオウレア (DMPTU)、ジフェニルチオウレア (DPTU) とジフェニルウレア (DPU)、およびエドマン試薬に含まれている物質が挙げられます。エドマン分解の副生成物は、反応試薬であるフェニルイソチオシアネートと塩基性雰囲気下をつくるトリメチルアミン (TMA) から生成されます。副生成物の生成およびクロマトグラム全体のベースラインを低減するため、塩基性雰囲気下をつくるために使用する試薬をTMAからN-メチルピペリジンに、さらにジチオスレイトールを減らした25% トリフルオロ酢酸を採用しました。プロテインシーケンサは、PTH-アミノ酸ピークの増減を前後のサイクルで比較し、特異的に検出されているPTH-アミノ酸の同定を行います。グラジエントシステムでは、検出されるピークの高さ、クロマトグラムのバックグラウンドの低下を実現することにより、ピークの変化が明確にわかるようになり、さらに微量のアミノ酸配列を同定することを実現できました。

表1 分析条件 (グラジエントシステム)

Column	: Wakopak Wakosil PTH-GR (S-PSQ) (250 mm x 2.0 mm I.D.)
Mobile phase A	: PTH-amino Acids Mobile Phase A (for Gradient Elution)
Mobile phase B	: PTH-amino Acids Mobile Phase B (for Gradient Elution)
Flow Rate	: 0.3 mL/min
Time program	: B Conc. 0%(0 min)- 0%(4 min)- 100%(17- 30 min)- 0%(30.01 - 45min)
Column temp.	: 35 °C
Detection	: UV 269 nm (SPD-M30A) High Sensitivity Flow Cell

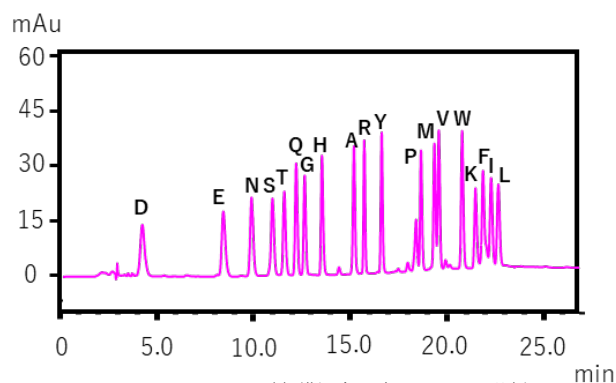


図2 PTH-アミノ酸標準混合物(各10 pmol)の分析

■ マウスIgG H鎖のアミノ酸配列分析

サンプルとして、PVDF膜にエレクトロブロットングしたマウスIgGのH鎖を用いました。IgG マウス血清由来 (SIGMA-ALDRICH cat#5381) の前処理を、図3に示します。電気泳動ゲルの各ウェルに30 pmolのIgGをアプライしました。H鎖とL鎖にそれぞれ分離した後、PVDF膜へエレクトロブロットング、CBB染色を行いました(図4)。染色されたH鎖のバンド 2片を切り出し、PPSQ-53Aグラジエントシステムで分析しました。その結果を図5に示します。46残基までのアミノ酸配列を同定することができました。プロテインシーケンサは、質量分析計を用いたアミノ酸配列解析手法と比べると、分析に必要なサンプル量が多い、スループットが悪いなどのデメリットもあります。

■ まとめ

プロテインシーケンサでの分析は、サンプルをアプライした後はほぼ全自動分析であるため、手間がかかりません。現在主流である質量分析計で得られる情報と補完的に使用することで、より確実なタンパク質・ペプチドのアミノ酸配列情報を得ることが可能です。

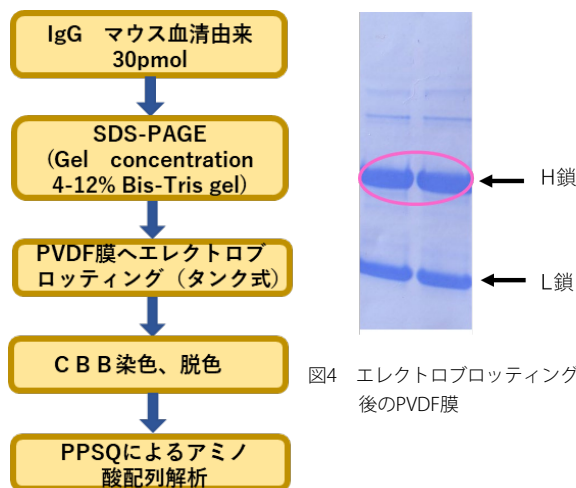


図3 IgGの前処理

図4 エレクトロブロットング後のPVDF膜

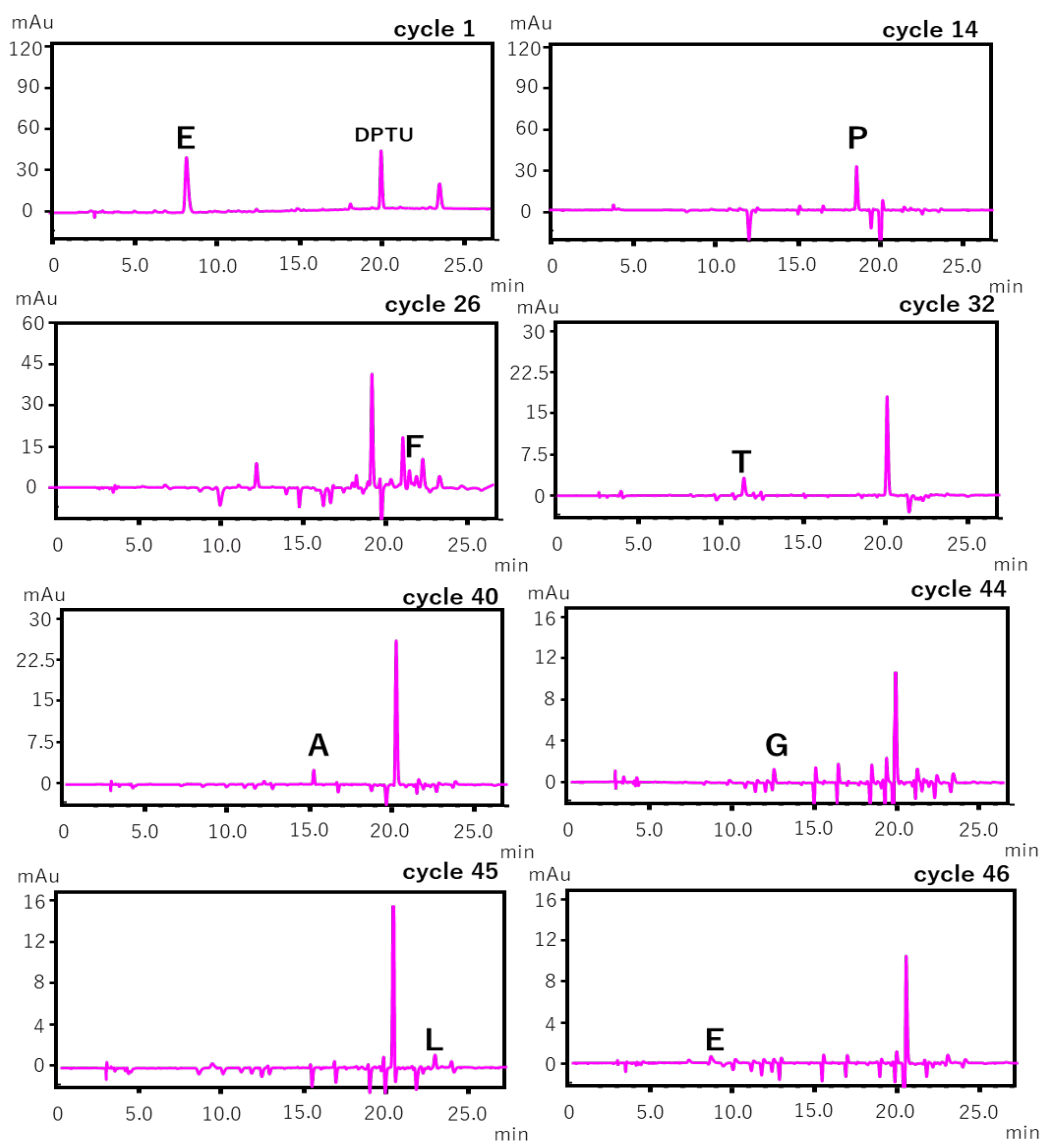


図5 モノクローナル抗体 IgG H鎖のアミノ酸配列分析のクロマトグラム

PPSQは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所

01-00549-JP 初版発行：2023年 4月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

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。本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

▶ アンケート

関連製品 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



▶ PPSQ-51A/53A
プロテインシーケンサ

関連分野

▶ ライフサイエンス

▶ プロテオミクス

▶ 価格お問い合わせ

▶ 製品お問い合わせ

▶ 技術お問い合わせ

▶ その他お問い合わせ