

Application News

MALDI-TOF 質量分析計 MALDI-8020/MALDI-8030

MALDI-TOF MSを用いたA1/A2ミルクの識別ートリプシン消化法の最適化ー

Milaan Thirukumaran¹、Francine Yanchik-Slade¹、山口 久美子

¹ Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD, USA

ユーザーベネフィット

- ◆ MALDI-TOF MSとトリプシン消化法の併用により、A2ミルクとA1/A2混合ミルクを迅速に識別できます。
- ◆ オンプレート消化法を採用することにより、サンプル調製から分析までの所要時間を大幅に削減できます。
- ◆ MALDI-TOF MSによる分析時間は短く、大規模なサンプル分析にも対応可能なハイスループット分析法が可能です。

■はじめに

牛乳市場は時間と共に多様な変化を遂げています。約20年前には、従来のミルク（A1/A2混合ミルク）に代わる選択肢としてA2ミルクが市場に登場しました。A2ミルクは、A1/A2混合ミルクと同等の栄養価を持ちつつ、より良い消化性を有し、他の疾患へのリスクも低いとされています。「A1」と「A2」は、ミルク中に含まれるβ-caseinの変異体を指しています。A1とA2のβ-caseinは、67番目のアミノ酸が異なることで区別されます（A1のβ-caseinはHistidine、A2のβ-caseinはProline）（図1）。

現在、牛がA2ミルクだけを生産するか、A1/A2混合ミルクを生産するかを判断する一般的な方法は、牛がどの対立遺伝子を持つかを識別する遺伝子検査です。この遺伝子検査は、群れ全体の遺伝的構造を完全に理解するためには時間と費用がかかるプロセスです。

A1とA2のβ-caseinをミルク中で試験する技術の開発は、最終製品でのより迅速な識別方法を可能にします。MALDI-TOF MSは、最小限のサンプルからペプチドやタンパク質を即時に検出できる技術で、この目的に適しています。トリプシン消化は、大きなタンパク質のペプチドマスマフィンガープリンティング法に広く用いられ、タンパク質をイオン化しやすい小さなペプチドに分解します。A1とA2の2つのβ-casein間のアミノ酸一残基の違いは、トリプシン消化と組み合わせると識別可能になります（表1および表2）。トリプシンは、アルギニンとリジンのC末端でペプチドを選択的に分解します。この選択的な分解により、アミノ酸一残基の違いによって質量が異なるβ-casein断片ペプチドが生成されます。MALDI-TOF MSとトリプシン消化を併用することで、最終製品中にどちらのβ-caseinが存在するかを迅速に特定する手法として活用することができます。

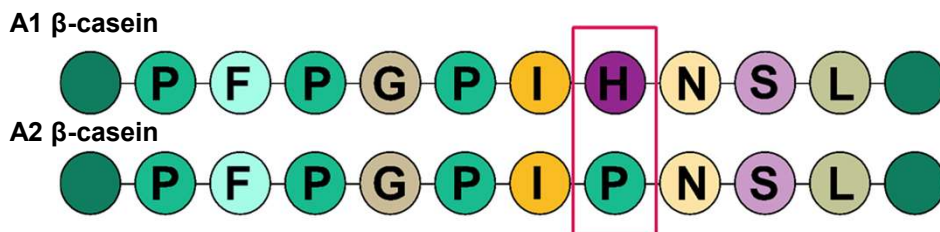


図1 A1およびA2 β-caseinの61-70番までのアミノ酸配列
(67番目のアミノ酸残基が異なる)

表1 A1 β-caseinから生成されるトリプシン消化物
(49-97番のペプチドがA2 β-caseinとは異なる)

Mass	Position	Peptide Sequences for A1 β-Casein
6363.3300	114-169	YPVEPTESQSLTLDVENLHPLPLQSWMHQHPQLPPTVMFPQSVLSLSQSK
5360.2816	49-97	IHPFAQTQSLVTPFPGPIHNSLPQNIPLTQTPVVVPFLQPEVMGVSK
2647.8494	2-25	ELEELNVPGEIVESLSSEESITR
2187.6045	187-202	DMIPQAFLLYQEPVLPVPR
1983.0088	33-48	FQSEEQQTDELDQDK
830.8617	171-183	AVPYPQR
780.9855	170-176	VLPVPQK
748.9149	108-113	EMPPFK
742.9360	203-209	GPFPPIV
646.7792	100-105	EAMPK

表2 A2 β-caseinから生成されるトリプシン断片
(49-97番のペプチドがA1 β-caseinとは異なる)

Mass	Position	Peptide Sequences for A2 β-Casein
6363.3300	114-169	YPVEPTESQSLTLDVENLHPLPLQSWMHQHPQLPPTVMFPQSVLSLSQSK
5320.2572	49-97	IHPFAQTQSLVTPFPGPIHNSLPQNIPLTQTPVVVPFLQPEVMGVSK
2647.8494	2-25	ELEELNVPGEIVESLSSEESITR
2187.6045	187-202	DMIPQAFLLYQEPVLPVPR
1983.0088	33-48	FQSEEQQTDELDQDK
830.8617	171-183	AVPYPQR
780.9855	170-176	VLPVPQK
748.9149	108-113	EMPPFK
742.9360	203-209	GPFPPIV
646.7792	100-105	EAMPK

■ 前処理および分析条件

タンパク質の調製

ミルクは近くの食料品店で購入しました。まず、A1/A2混合ミルクとA2ミルクの違いを明らかにするため、ミルクからタンパク質を抽出しました。目的とする β -caseinは、溶液のpHを下げてタンパク質を不溶性にし、沈殿させることで容易に分離できます。標準的なタンパク質抽出法を使用して β -casein及び他の関連するタンパク質を単離しました。

トリプシン消化

抽出したタンパク質は、溶液内トリプシン消化を行い、50 mM Tris - HCl (pH 8.0) 中で5 mg/mLの溶液にしました。抽出したタンパク質50 mgを用いて溶液中でトリプシン消化を行いました。トリプシンはタンパク質/プロテアーゼ比25:1で添加し、得られた溶液を37°Cで一晩静置した後、TFAを添加して消化を終了させました。溶液を遠心分離し、上清をMALDI-TOF MSにより分析しました。シナピン酸をMALDIマトリックスとして使用し、0.1%TFAを含む50%アセトニトリル水溶液を20 mg/mLで調製しました。

■ 溶液内トリプシン消化による目的ペプチドの検出

通常のトリプシン消化プロトコルでは、酵素の自己消化を防ぐために低濃度のトリプシンを用い、一晩の消化時間が必須です。まず目的のトリプシン消化断片を確実に検出するために、溶液中でのトリプシン消化を行いました。この方法により、A1およびA2の β -caseinから得られる2つの重要なトリプシン消化断片を確認できました(図2)。A1およびA2の β -caseinの違いはMALDI-TOF MSによって識別可能です。A1/A2混合ミルクとA2ミルクの識別には可能でしたが、一晩かける消化処理はハイスループットな大規模サンプルの分析には適していません。

■ オンプレート消化法 (抽出タンパク質使用)

そこで、サンプル調製時間を含む一連の分析所要時間を改善するために、オンプレート消化法を開発しました。この方法では、抽出した乳タンパク質を添加する前にプレート上でトリプシンを乾燥させます。乳タンパク質を添加し、プレートを湿潤環境で15分間置きます。TFAを添加後、クエンチしMALDI-TOF MSで分析しました。この方法で、特徴的なA1およびA2の β -caseinのピークを容易に同定できました(図3)。この手法により、乳タンパク質の抽出を含む識別時間を1日からわずか1時間余りに短縮しました。

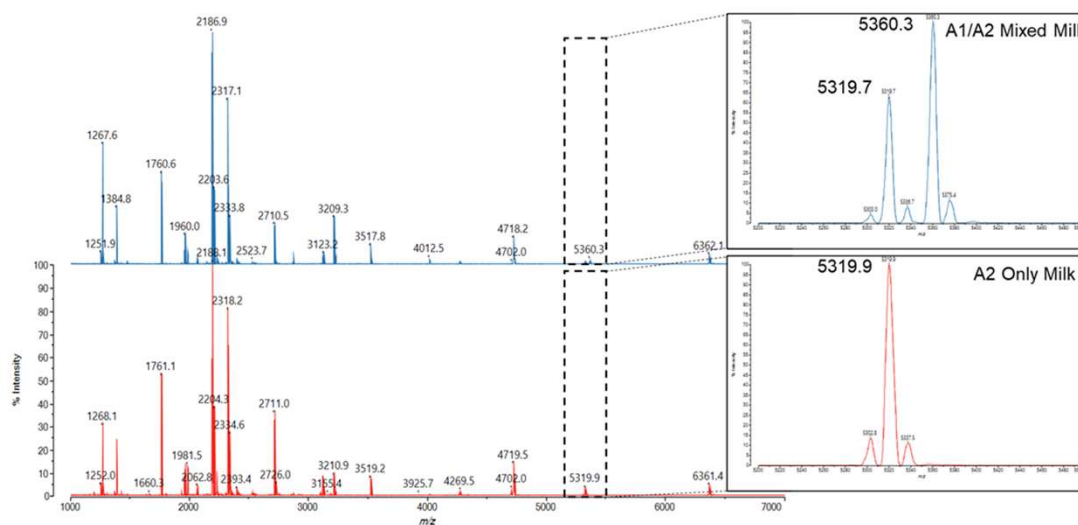


図2 A1/A2混合ミルクとA2ミルクの溶液中トリプシン消化物のMALDI マススペクトル

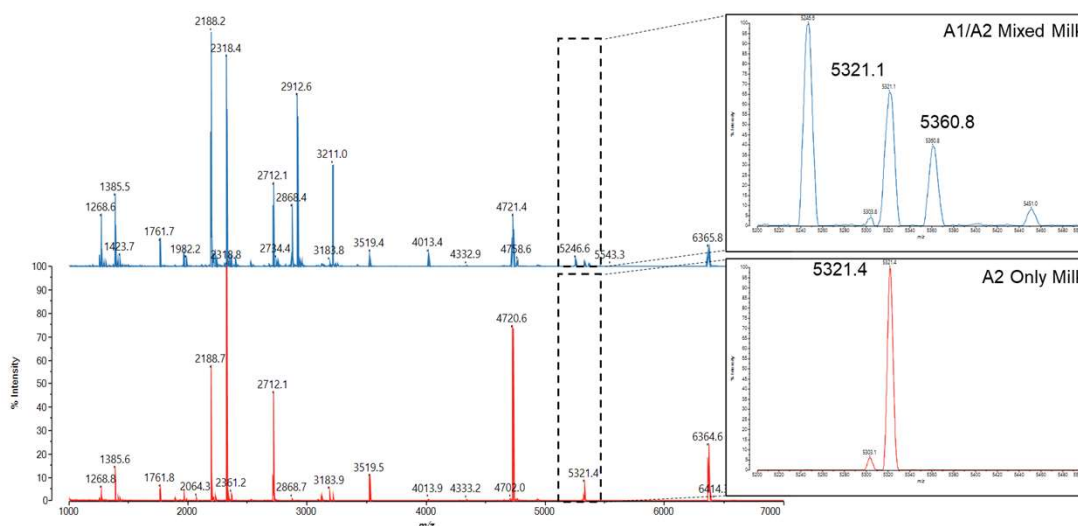


図3 A1/A2混合ミルクとA2ミルクのタンパク質抽出物を用いたオンプレート消化物のMALDI マススペクトル

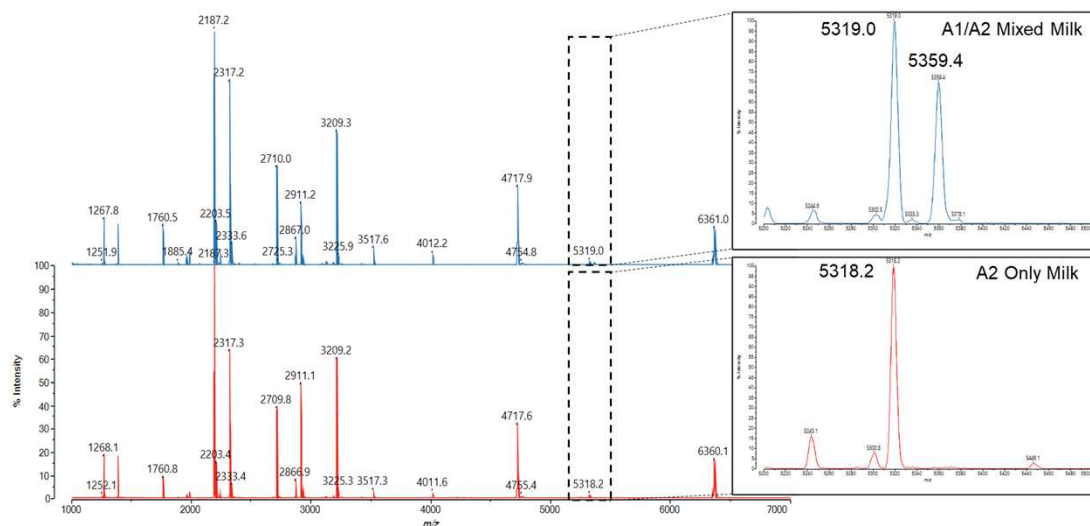


図4 A1/A2混合ミルクとA2ミルクの希釈サンプルを用いたオンプレート消化物のMALDI マススペクトル

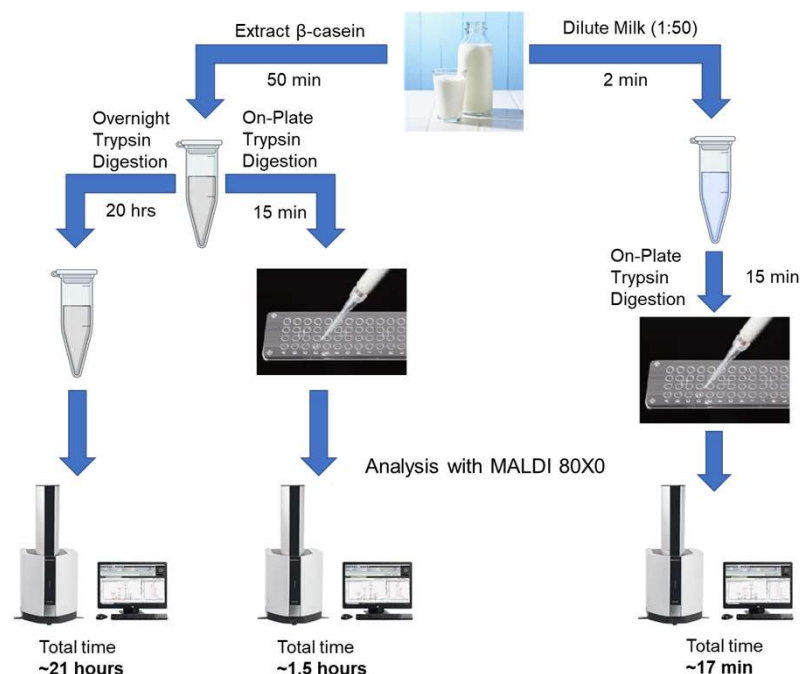


図5 各手順の全体的な所要時間を含むサンプル調製の概要

■ オンプレート消化法（生乳使用）

さらに識別プロセスを簡素化・迅速化するために、50 mM Tris-HCl (pH 8.0) で50倍に希釈した生乳サンプルを用いて同じ手順を試し、その手順を20分未満に短縮しました。この最小限のサンプル調製法により、A2ミルクからA1/A2混合ミルクを識別できるスペクトルを取得できました（図4）。各サンプル調製の概要は図5に示しています。

■ まとめ

トリプシン消化とMALDI-TOF MS分析の併用は、A2ミルクからA1/A2混合ミルクを識別するための強力な手段となる可能性があります。オンプレートでのトリプシン消化と最小限のサンプル調製を導入することで、迅速な識別法を実現しました。

本アプリケーションニュースでは、様々なサンプル調製法とトリプシン消化プロトコルを用いて、MALDI-TOF MSを使用してA1/A2混合ミルクとA2ミルクの違いを明らかにできることを示しました。

＞ 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。



＞ MALDI-8030

マトリックス支援レーザー脱離イオン化
飛行時間型質量分析計



＞ MALDI-8020

マトリックス支援レーザー脱離イオン化
飛行時間型質量分析計

関連分野

＞ 食品・飲料

＞ 栄養・機能性成分

＞ 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