

リン酸化ペプチド選択的な抽出法のご紹介

タンパク質の可逆的なリン酸化は、生体内でシグナル伝達などの様々な役割を担っていることが知られています。リン酸化タンパク質の解析においては、酵素消化後にリン酸化ペプチドのみを抽出・分析する方法が多く用いられていますが、一般にリン酸化ペプチドの含量は少ないために効果的な精製方法が必要となります。

本報では、リン酸基と特異的に結合することが知られているチタニア(二酸化チタン)がチップカラムに充填さ

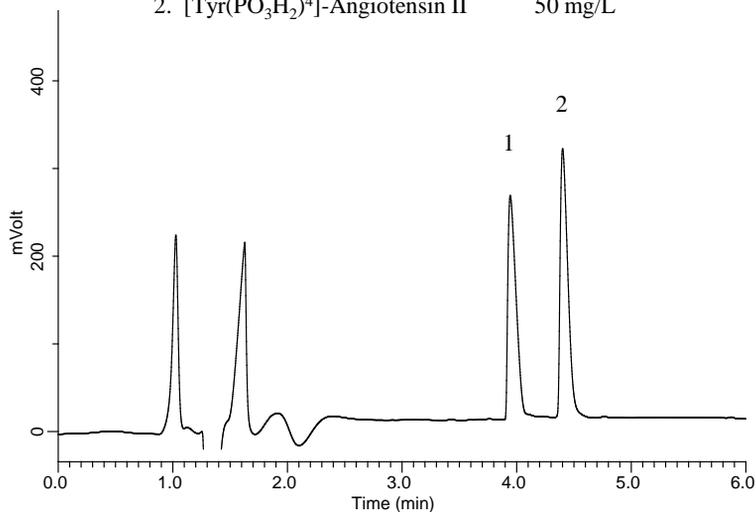
されている、Titansphere Phos-TiOを用いたリン酸化ペプチドの抽出法を紹介いたします。40分程度の前処理により、2種類のアンジオテンシンIIが含まれた溶液からリン酸化されたもののみを選択的に回収することができました。なお、HPLCカラムには不活性度の高いInertSustain C18を用いることで、ギ酸が含まれた水とアセトニトリルのグラジエント溶出により良好なピーク形状が得られています。(C. Aoyama)

HPLC条件

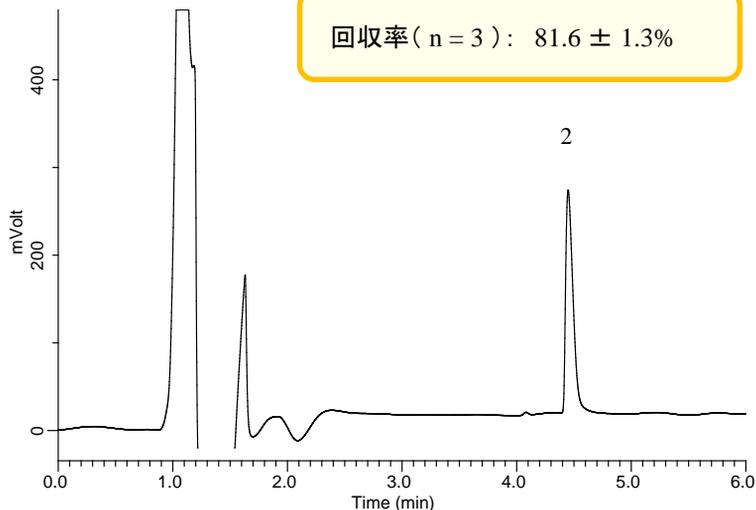
システム	: LC800 system
カラム	: InertSustain C18 HP (3 μ m, 150 \times 2.1 mm I.D.)
溶離液	: A) 0.1% HCOOH in H ₂ O B) 0.1% HCOOH in CH ₃ CN A/B = 85/15 – 5 min – 70/30, v/v
流量	: 0.3 mL/min
カラム温度	: 40 $^{\circ}$ C
検出	: UV 210 nm
注入量	: 10 μ L

標準液測定例

1. Angiotensin II 50 mg/L
2. [Tyr(PO₃H₂)⁴]-Angiotensin II 50 mg/L



Phos-TiOでの前処理後

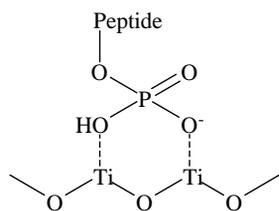


Phos-TiOによる前処理のプロトコル

チップカラムに廃液用チューブを取りつける
 ↓ + Buffer A* 20 μ L
 遠心 (3000 g, 2 min)
 ↓ + Buffer B* 20 μ L
 遠心 (3000 g, 2 min)
 廃液用チューブに回収された溶液を除去する
 ↓ + ペプチドサンプル 50 μ L
 ↓ + Buffer B 100 μ L
 ピペッティングしてよく混合する
 遠心 (1000 g, 10 min)
 チューブに回収された溶液を再度アプライする
 遠心 (1000 g, 10 min)
 廃液用チューブに回収された溶液を除去する
 ↓ + Buffer B 20 μ L
 遠心 (3000 g, 2 min)
 ↓ + Buffer A 20 μ L
 遠心 (3000 g, 2 min)
 ↓ + Buffer A 20 μ L
 遠心 (3000 g, 2 min)
 廃液用チューブを外し、回収用チューブをセットする
 ↓ + 5% アンモニア水溶液 50 μ L
 遠心 (1000 g, 5 min)
 ↓
 回収された溶液をHPLCシステムにインジェクト

* Buffer Aは、Titansphere Phos-TiOキットに含まれているSolution Aに4倍量のアセトニトリルを加えることにより作製しました。Buffer Bも、同じくキットに含まれているSolution Bに6倍量のBuffer Aを加えたものを使用しました。

Phos-TiOによるリン酸化ペプチド抽出の原理



チタニアは、リン酸化ペプチドが持つリン酸基と左図のような相互作用を示すと考えられています。この相互作用は酸性条件下で強く、アルカリ性条件下では弱くなります。本法ではこの原理に基づき、アンモニア水溶液を加えることでリン酸化ペプチドをチタニアカラムから溶出しています。なお、高濃度のリン酸塩を含む溶液を流すことでリン酸化ペプチドを脱着させることができます。

Titansphere Phos-TiO製品は、京都大学 薬学部 石濱泰先生のご協力により開発されました。

Structures are created using Chemistry 4-D Draw which is provided by ChemInnovation Software, Inc.



Titansphere Phos-TiO Kit

Cat. No. 5010-21300	1 mg / 10 μL	24回分	} 今回はこちらを使用しました。
Cat. No. 5010-21301	1 mg / 10 μL	96回分	
Cat. No. 5010-21305	3 mg / 200 μL	24回分	
Cat. No. 5010-21306	3 mg / 200 μL	96回分	

- アフィニティーに優れたチタニア充填剤をチップカラムに成形しています。
- 専用のアダプターと組み合わせることで、1.5 mLチューブ等の上セットでき、遠心機で各操作を行うことができます。
- 精製にかかる時間はわずか40分ほどです。
- 各工程は全て遠心操作で行うため、人的誤差はほとんどありません。

Titansphere Phos-TiO (シリンジパレルタイプ)

Cat. No. 5010-21290	50 mg / 3 mL	25本
Cat. No. 5010-21291	100 mg / 3 mL	25本

遠心可能なカートリッジにチタニアが充填されています。大量のサンプルを扱う場合にはこちらが便利です。

Cat. No. 5020-14415 InertSustain C18 HP (3 μm, 2.1 x 150 mm)

充填剤が高度に不活性化されているので、吸着性の成分でも良好なピーク形状が得られるHPLC用カラムです。また耐アルカリ性にも優れており、アンモニア溶液のサンプルなどをそのまま注入したい場合にも適しています。

Cat. No. 5010-21700	MonoSpin C18	50 pk
Cat. No. 5010-21701	MonoSpin C18	100 pk

Phos-TiOと同様に遠心のみでの操作が可能な前処理用スピнкаラムです。ペプチドの脱塩処理に最適です。



ジエールサイエンス株式会社

〒163-1130 東京都新宿区西新宿 6-22-1 新宿スクエアタワー 30F
TEL.03-5323-6611 FAX.03-5323-6622

※各試験法は、変更される場合がありますので、分析の前に確認されることをお勧めします。

データに起因し、直接的または間接的に生じたいかなる損害に対しても、当社が責任をおうものではありません。また、記載事項につきましては、予告無しに改訂する場合がありますので、あらかじめご了承ください。

カスタマーサポートセンターでは、ノウハウのご提供と分析に関するフォローを行なっております。お困りの際には、カスタマーサポートセンターまでお気軽にお問い合わせください。

カスタマーサポートセンター (土・日・祝除く 9:00-17:00)

☎ 04-2934-1100 ✉ info@glsc.co.jp



【アプリケーションの検索はこちら】

https://www.glsc.co.jp/technique/app/app_search.html