

Product Information

PHOS-Select™ Iron Affinity Gel

製品番号 P9740

保存温度 0~ -20 °C

TECHNICAL BULLETIN (使用説明書)

製品概要

リン酸化はタンパク質の重要な翻訳後修飾の1つで、細胞調節に重要な役割を果たしています。このため、リン酸化部位の同定と性質決定はシグナル伝達を理解する上で、きわめて重要です。トリプシン消化によって得られたリン酸化ペプチドのマススペクトロメリー (MS) は、性質決定の強力なツールとなっています¹。しかし、低濃度、低イオン化、抑制効果を補うためにリン酸化ペプチドを濃縮する必要があります²。

金属固定化アフィニティークロマトグラフィー (IMAC) は、一般的にリン酸化化合物の精製に用いられます。鉄(III)キレートとガリウム(III)キレートで最高のアフィニティーと選択性が示されています²。この場合には、リン酸酸素と金属イオンの配位が関係しています。鉄(III)-ニトリロ酢酸 (NTA) タイプのキレートは、鉄(III)-イミノニ酢酸 (IDA) タイプのキレートより、リン酸化ペプチドに対する特異性が高いことが明らかにされています³。これはおそらく、鉄(III)-NTA タイプ複合体の全体的正電荷 (+1) が IDA 複合体 (+2) よりも低いためと考えられます。さらに、鉄(III)-NTA タイプのキレートは、ガリウムキレートよりリン酸化ペプチドに対する結合性が強いことも明らかにされています²。

PHOS-Select™ Iron Affinity Gel は、当社特許品 NTA アナログキレートリガンドをベースとした新しい鉄(III)キレートマトリクスを採用しています。このマトリクスは、リン酸基を持つ分子に対して高いアフィニティー結合能を持ちます。

アフィニティーによる単離プロセスでは、リン酸化ペプチド成分が顕著に濃縮されますが、リン酸化ペプチドの同定には別の試験法が必要です。

一般的な質量分析法に基づく試験法として、マトリクス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法 (MALDI-TOF) および post-source decay (PSD) を用いたエレクトロスプレーイオン化 (ESI)、イオントラップ、アルカリホスファターゼ処理があります。これらの試験法はいずれも、リン酸体のシグネチャー損失を同定することで行います (表 1)^{4,5}。

表 1.
シグネチャー量の損失

シグネチャー量の損失の計算方法	ホスホセリン/スレオニンシグネチャーペプチド量の損失 (m/z)	ホスホセリンシグネチャーペプチド量の損失 (m/z)
Positive Ion PSD/CID	98 Da (H_3PO_4^-) 選択的または 80 Da (HPO_3^-)	80 Da (HPO_3^-) 選択的
Negative Ion PSD/CID	79 Da (PO_3^-) または 63 Da (PO_2^-)	79 Da (PO_3^-) または 63 Da (PO_2^-)
アルカリホスファターゼ処理	80 Da (HPO_3^-)	80 Da (HPO_3^-)

結合能

本製品を用いて行う飽和結合試験では、25 °C で 30 分インキュベーションしたとき、ゲル 1 mL あたりリン酸ペプチド 4 μM 以上の結合が見られます。

βカゼインのトリプシン消化で得られた、分子量 2,062 Da の monophosphopeptide を本試験に使用します。

注意事項と免責事項

本製品は研究目的にのみ使用し、診断目的には使用しないでください。PHOS-Select Iron Affinity Gel は、効率的に再生することができないことがあります。このため、使い捨てでの使用に最も適しています。Technical bulletin (使用説明書) を一通りお読みになり、作業を始めてください。

保存/安定性

レジンは約 50% 懸濁液 (50% グリセロール含有バッファー pH 5.0) 中で提供されます。

本品の適正な性能を保つため、0~−20 °C で保存してください。供給された状態での保存条件下で 2 年間以上安定です。グリセロールを含む安定化バッファーを洗浄して取り除いた後は、4 時間以内にご使用ください。

手順

リン酸化合物の結合はきわめて pH に依存します。有効 pH 範囲は 2.5~3.0 ですが、2.0~5.5 の範囲で結合することができます。正確な結果を得るためにには、できれば低イオン強度 (250 mM 酢酸の最終濃度) のサンプルをご使用ください。このためには、アフィニティーゲルに結合する前にバッファーを交換したり、サンプルを脱塩する必要があります。さらに、クルドの混合液を脱塩することで、他に干渉する混入物質を取り除き、性能を向上させることもできます³。非特異的な相互作用を最小限にするには、30% アセトニトリルを含む 250 mM 酢酸溶液をお勧めします。

特異性を改善させる目的で、ペプチドのカルボキシル基の完全なメチルエステル化を試みた研究者によって成功の報告がされています⁶。このステップは将来が期待できるものですが、エステル化が不完全で他の分解プロセスも考えられるために解釈が難しいことから、本手順には採用していません。この推奨手順は、酸性ペプチドの結合を最小限とするよう最適化されています。

PHOS-Select Iron Affinity Gel は、バッチ方式またはカラム方式で用いることができます。本手順では、SigmaPrep™ Spin Columns (製品番号 SC1000) を用いたカラム方式について説明します。このキットには collection tube に入れられた、フリツツ付きの SigmaPrep Spin Column 25 本 (製品番号 H6787) が含まれています。追加の collection tube (製品番号 T7813) 50 本と end cap 25 個 (製品番号 V2014) もあります。

リン酸ペプチドや他のリン酸化合物の結合と溶出

1. タンパク質のトリプシン分解で得られるサンプルの調製

最高 250 mM の酢酸と 30% アセトニトリルを用いてサンプル液を調製し、必要があれば 1 M HCl 溶液で pH 2.5~3.0 に調整します。充填ゲル 1 mL あたり最高 1 μモルのリン酸ペプチドのサンプルが適当です。

2. アフィニティーゲルの洗浄/平衡化:

PHOS-Select Iron Affinity Gel ビーズを、完全かつ均一な懸濁液になるまで慎重に混和します。直ちに、collection tube 内において清浄な SigmaPrep Spin Column に 50% スラリー 80 μL (40 μL ゲル) を添加します (製品番号 H6787)。ビーズの分注には広口のピペットチップを使うか、通常のピペットチップの先端を約 1 mm 切断して、ビーズ懸濁液の流れが制限されないようにします。

チューブに 500 μL の洗浄/平衡化溶液 (30% アセトニトリル含有 250 mM 酢酸) を加え、ボルテックスして、8,200 × g で 30 秒間遠心します (エッペンドルフ® 5415C マイクロチューブで 10,000 rpm)。フロースルー液を捨てます。ステップ 2 を 2 回繰り返します。Collection tube はステップ 4 と 5 のためにとっておきます。

3. サンプルのローディング

カラムの出口側に end cap (製品番号 V2014) をはめ、カラムを新しい collection tube (製品番号 T7813) 内におきます。平衡化したゲルにサンプル溶液を加え最高 500 μL にします。混和しながら 15~30 分間インキュベートします (上下回転式をお勧めします)。インキュベーション後、end cap をはずしてステップ 2 のように遠心します。Collection tube 中のフロースルー液には未結合ペプチドが含まれ、これはステップ 4 からの洗浄液と集めて、さらに分析することができます。

4. アフィニティーゲル洗浄液: 洗浄/平衡化溶液

ステップ 2 からとっておいた collection tube 内にカラムをおきます。チューブに 500 μL の洗浄/平衡化溶液 (30% アセトニトリル含有 250 mM 酢酸) を加え、ボルテックスし、マイクロ遠心機で 8,200 × g で 30 秒間遠心します。Collection tube 中のフロースルー液には未結合ペプチドが含まれますが、これは廃棄するか、ステップ 3 からのフロースルー液と一緒に集めてさらに分析することができます。

5. アフィニティーゲル洗浄液: 脱イオン水

ゲルを水 500 μL で一度洗浄し、残った洗浄/平衡化溶液を除去してから溶出を行います。

6. サンプルの溶出:

カラムの出口部にend cap を付け、新しい collection tube にカラムを入れます。溶出液 (400 mM 水酸化アンモニウム) 100~500 μ L を加えます。代りとなる溶出液については、表 2 をご覧ください。混和しながら約 5 分間インキュベートします (上下回転式をお勧めします)。インキュベーション後、end cap をはずしてステップ 2 のように遠心し、フロースルー液はリン酸ペプチドの解析のためにとっておきます。最適な溶出条件は経験的に定める必要があります。

表 2.
代替的な溶出条件

溶出液	コメント
200 mM リン酸ナトリウムバッファー溶液, pH 8.4	競合的置換となります。 MALDI-TOF-MS に脱塩が必要です ³ 。
150~400 mM 水酸化アンモニウム	リン酸化化合物が非常に多く回収されます。MALDI-TOF-MS に相当します ³ 。
25% アセトニトリル含有 150 mM 水酸化アンモニウム	リン酸化化合物が非常に多く回収されます。MALDI-TOF-MS に相当します。

レジンの有効性

Phosphopeptide Positive Control Set (製品番号 P9615) を用いれば、レジンの性能を効率的に確認することができます。リン酸化ペプチドの結合および溶出の確認は、次の手順で行ってください。溶出は 400 mM 水酸化アンモニウムで行うことができます。このセットには、精製した 1 リン酸化ペプチドおよび 4 リン酸化ペプチドの双方が含まれ、能力と回収率は HPLC-MS で評価することができます。

結果の最適化

結合の選択性、結合能、および対象分子の回収率は、次の推奨にしたがって最適化することができます。

非特異的結合

非特異的結合に影響し得る要因は、イオン性および疎水的相互作用です。この金属キレートのリガンドは正電荷 (+1) を帶びています。酸性ペプチドの結合を避けるには、サンプルの pH を 2.5~3.0 に調整します。これによって大多数のグルタミン酸およびアスパラギン酸の残基がプロトン化します。ロードし、推奨濃度 (250 mM) の酢酸で洗浄します。非特異的結合を最小限とするため、サンプルと洗浄液中のアセトニトリルは 30%までとすることをお勧めします。

ゲルの結合性

リン酸化ペプチドのレジンに対する結合性は、時間と濃度に依存します。15 分間のインキュベーションは十分と思われますが、複合体の混合液からリン酸ペプチドを効率よく結合させるために、18~30 °C で最高 2 時間までのインキュベーションを行ってもよいでしょう。

ゲルの結合能が過剰な場合、1 リン酸化化合物ではなく複数のリン酸化化合物が結合する傾向があります。すべてのリン酸化化合物を適正に捕捉するためには、様々な濃度のサンプルを添加することをお勧めします。

捕捉分子の回収率

溶出パラメータの最適化によって、リン酸化分子が効率的に回収されます。ゲルと 5 分間混和する間に溶液をインキュベートすることで、最高の回収率が得られます。塩基性溶液中で長時間インキュベートすると、回収率が低下してしまうことがあります。

400 mM 水酸化アンモニウムで溶出すると、1 リン酸化分子および多リン酸化分子のいずれも効率的に回収できます。

MALDI-TOF-MS で直接分析する場合、高濃度 (150 mM 以上) の水酸化アンモニウムで溶出した化合物は、ぎ酸で中和してもかまいません。

参考文献

1. Stensballe, A., et al., Electron Capture Dissociation of Singly and Multiply Phosphorylated Peptides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **14**, 1793-1800, (2000).
2. Zhou, W., et al., Detection and Sequencing of Phosphopeptides Affinity Bound to Immobilized Metal Ion Beads by Matrix-Assisted Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **11**, 273-282, (2000).
3. Neville, D., et al., Evidence for Phosphorylation of Serine 753 in CFTR Using a Novel Metal-Ion Affinity resin and Matrix-assisted Laser Desorption Mass Spectrometry. *Protein Sci.*, **6**, 2346-2445 (1997).
4. Chen, S., et al., Mass Spectrometry-based Methods for Phosphorylation Site Mapping of Hyperphosphorylated Proteins Applied to Net1, a Regulator of Exit from Mitosis in Yeast. *Mol. Cell. Proteomics*, **1**, 186-196 (2002).
5. McLachlin, D. and Chait, B., Analysis of phosphorylated proteins and peptides by mass spectrometry. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5**, 591-602 (2001).
6. Ficarro, S., et al., Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Biotechnol.*, **19**, 301-305 (2002).

関連製品	製品番号
SigmaPrep Spin Columns	SC1000
ProteoPrep™ Kits	
Total Extraction Sample	PROT-TOT
Membrane Protein Extraction	PROT-MEM
Universal Extraction	PROT-TWO
ProteoPrep Reduction and Alkylation Kit	PROT-RA
Proteomics Grade Trypsin	T6567
重炭酸アンモニウム	A6141
ProteoMass™ MALDI-MS Calibration Kits	
タンパク質およびペプチド	MS-CAL1
ペプチド	MS-CAL2
タンパク質	MS-CAL3
ホスファターゼインヒビターカクテル I	P2850
ホスファターゼインヒビターカクテル II	P5726
ぎ酸	F0507

EppendorfはEppendorf-Netheler-Hinz GmbHの登録商標です。

JM/JD/MH/MAM 6/04