



Proteonavi におけるタンパク質の挙動

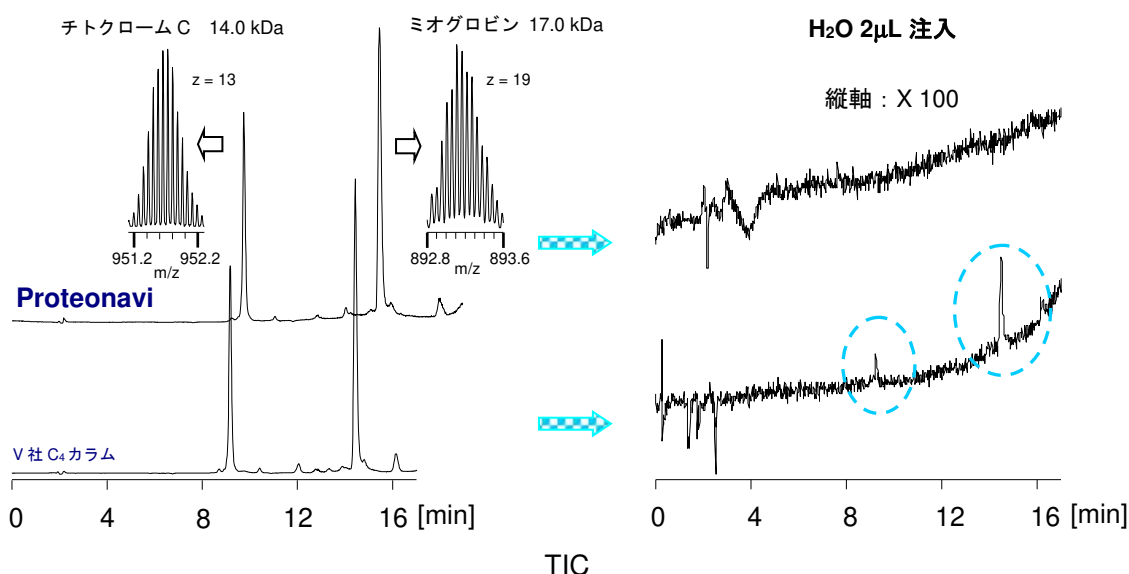
Keywords : LC-MS、タンパク質、酢酸

① カラム由来のキャリアオーバー

30 nm 程の細孔を持つ逆相充填剤はタンパク質の分析によく用いられます。弊社ではこの目的に開発されたカラム、Proteonavi (C₄) の優位性をこれまでいくつかのデータを基に説明してきました。ここでは更に“LC-MS におけるキャリアオーバー”という新たな概念を議論します。

一般に、第一のキャリアオーバー源としてはオートサンプラーが挙げられます。事実、弊社ではオートサンプラーの改良により薬物分析のキャリアオーバーを極限まで削減させてきました。しかし、タンパク質のような高次構造を持つ高分子では、その一部が固定相表面への不可逆的に近い吸着を起こし、そこからの脱離に付いては制御できない状態となった結果、後に脱離した成分がカラム由来のキャリアオーバーとして観測されます。

Proteonavi はタンパク質の不可逆的な吸着を極限まで抑えるよう設計されており、カラム由来のキャリアオーバーも抑えられることが期待されます。以下に市販のタンパク用カラムと Proteonavi のキャリアオーバーの比較を示しました。評価には中性タンパク質のミオグロビン、塩基性タンパク質のチトクローム C を用いました。Proteonavi の優位性が示唆されます。



【HPLC 条件】

カラム : Proteonavi ; 2.0 mm i.d. x 150 mm (5 μm)
 V 社 C₄ ; 2.1 mm i.d. x 150 mm (5 μm)
 移動相 : (A) 0.1 vol% TFA / H₂O
 (B) 0.1 vol% TFA / CH₃CN
 B 20% (0 min) → 70% (25 min) → 70% (30 min)
 → 20% (30.1 min) → 20% (40 min) Gradient
 流速 : 200 μL/min

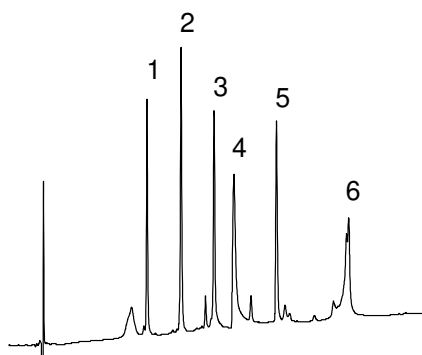
温度 : 40 °C
 検出 : LTQ ORBITRAP
 試料 : チトクローム C
 (167 μg/mL 等電点 10.1)
 ミオグロビン
 (167 μg/mL 等電点 7.0)
 注入量 : 試料 10μL , Blank H₂O 2μL

②酢酸系移動相下での分離挙動

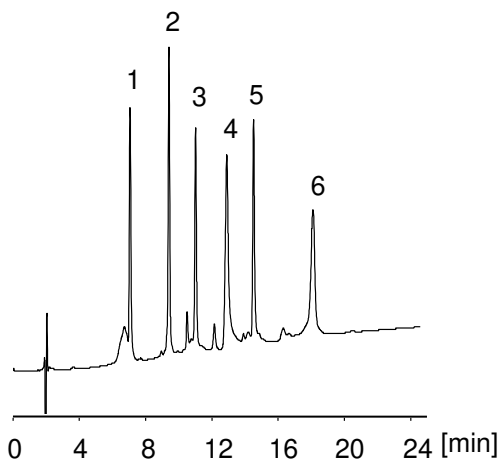
一般に LC-MS では、トリフルオロ酢酸 (TFA) は ESI でのイオン化を妨げる性質を持つため使用されない傾向にあります。しかし分離の立場からは塩基性アミノ酸残基側鎖のイオンペア生成には最良の試薬といえます。今回、LC-MS でギ酸とともに多用されるよりマイルドな酢酸を使用した移動相による 6 種のタンパク質の分離を試みました。イオンペア剤として不十分な酢酸では、タンパク質分子に中和されない多くの陽電荷が存在することになります。二本の異なるカラムを比較すると Proteonavi ではこの状態でもピークが認識されます (リゾチームは分子会合を起こし t_0 以前にサイズ排除されています)。もう一方のカラムでは全タンパク質が不可逆的に充填剤表面に吸着されている様子が示唆されます。この比較で二本のカラムに用いられる充填剤表面の不活性さの差が顕著に現れました。

① TFA 系移動相

Proteonavi

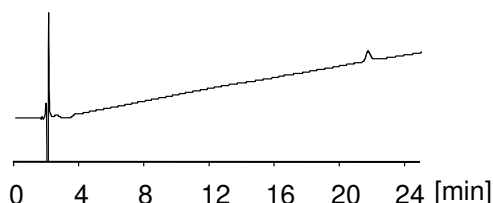
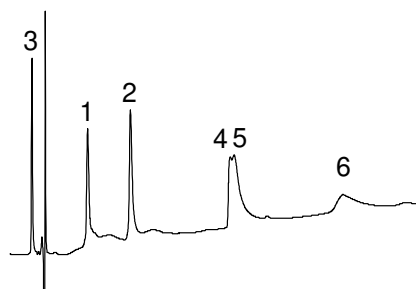


V社 C₄ カラム



② 酢酸系移動相

1. リボヌクレアーゼ A
2. チトクローム C
3. リゾチーム
4. ウシ血清アルブミン
5. ミオグロビン
6. 卵白アルブミン



クロマトグラム

【HPLC 条件】

カラム	: Proteonavi ; 2.0 mm i.d. x 150 mm (5 μm)	流速	: 200 μL/min
	: V社 C ₄ ; 2.1 mm i.d. x 150 mm (5 μm)	温度	: 40 °C
移動相	: ① (A) 0.1 vol% TFA in H ₂ O (B) 0.1 vol% TFA in CH ₃ CN	検出	: UV 220 nm
	: ② (A) 0.1 vol% CH ₃ COOH in H ₂ O (B) 0.1 vol% CH ₃ COOH in CH ₃ CN	注入量	: 2 μL
	B 20% (0 min) → 70% (25 min) → 70% (30 min)		
	→ 20% (30.1 min) → 20% (40 min) Gradient		



株式会社大阪ソーダ
ヘルスケア事業部営業部
〒550-0011 大阪市西区阿波座一丁目 12 番 18 号
TEL: 06-6110-1598 FAX: 06-6110-1612
E-mail: silica@osaka-soda.co.jp
HP: <https://sub.osaka-soda.co.jp/HPLC/>



アプリケーションの検索はこちら。

<https://sub.osaka-soda.co.jp/HPLC/sys/ap>