

毎号、テーマを絞って製品トレンドをお伝えします

はじめに：質量分析(MS)は創薬、医薬品開発、臨床研究、法医学、食品環境検査など様々な研究分野で用いられています。

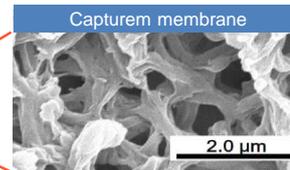
今回の「クロンテック通信」は、MS解析用サンプルを調製する際に行うタンパク質消化について、革新的な膜テクノロジーにより、わずか2分でトリプシン消化が完了する **Capturem Trypsin** に関する情報を、ユーザー様実施例とともにお届けします。

Capturem Trypsinの特長

- ✓ 数分以内にタンパク質サンプルを完全消化
 - 長時間の反応は不要
- ✓ トリプシンを固定化したスピンカラムを使用
 - 溶液中での反応に比べて効率的で確実
- ✓ 酵素自己消化断片の混入やタンパク質修飾の懸念が少ない



独自のポリマー構造で表面積大幅増



- ベッドポリウム： **小さい**
- カラム内でのタンパク質の拡散： **速やか**
- 分離速度： **速やか**



Capturem Trypsinの実験時間

一般的な反応ステップ

Prepare sample

数時間から数日

Denature, reduce & alkylate

2時間

Trypsin digestion

4時間～オーバーナイト

Capturem Trypsinを用いた場合、消化時間は2分です！



Activate

- Add 200 μ l Activation Buffer
- Spin for 1 min
- Discard flowthrough



Digest

- Add up to 80 μ g sample
- Spin for 1 min



Done

- Digested protein is in the flowthrough

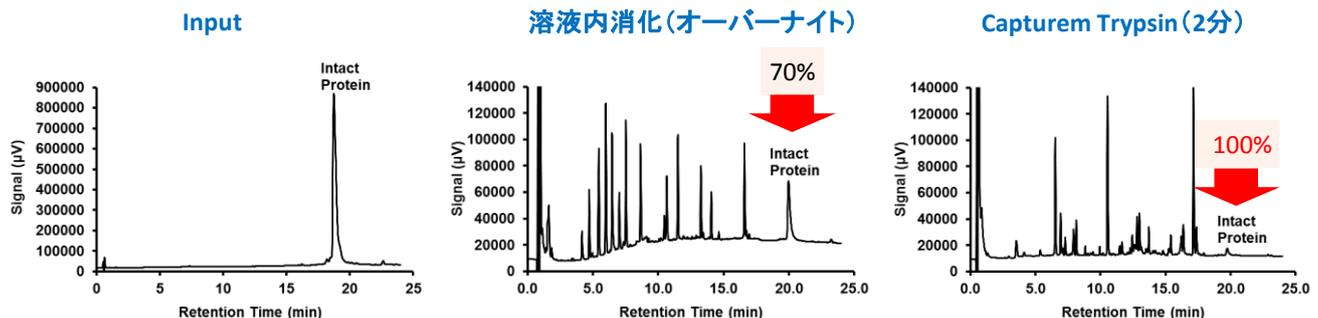


Capturem Trypsinを使えば消化時間はたった2分！オーバーナイトは必要ありません。

溶液中消化との比較

Capturem Trypsin (On Column) と溶液中消化 (In-solution)

トリプシン消化: Apomyoglobin (非変性条件)



溶液中消化よりもCapturem Trypsinを用いることで高い消化効率(100%)を実現しました！

裏面：ユーザー様実施例



『Capturem Trypsinを用いた目的タンパク質の迅速消化と標的ペプチドの解析』

名古屋大学大学院 生命農学研究科 分化情報制御研究室
森 仁志 教授

名古屋大学大学院 生命農学研究科 分化情報制御研究室 森 仁志 教授から、Capturem Trypsin (製品コード 635722)を用いた実施例をご提供いただきました。また、森 教授のご研究内容や植物タンパク質に関するお話を伺いましたのでご一読ください。

＜先生のご研究内容＞

森教授のラボは、植物ホルモン生成に関する酵素や、ホルモン処理によって誘導されるタンパク質の制御機構等について研究されています。植物由来タンパク質の解析に適する特異抗体は市販されていないため、自前で特異抗体を調製するしか方法はなかったようですが、LC/MS装置により検出、定量解析が可能になったようです。その解析のために、目的タンパク質を含む様々な組織の複雑な抽出タンパク質をTrypsinなどのプロテアーゼで消化する必要がでてきました。植物由来サンプルには核酸をはじめ、多糖類が多く含まれているので、Trypsin消化処理をする前に、SDSや尿素、フェノールなどの変性剤でタンパク質を調製することが効率的なタンパク質消化に重要なようです。

＜実施例＞

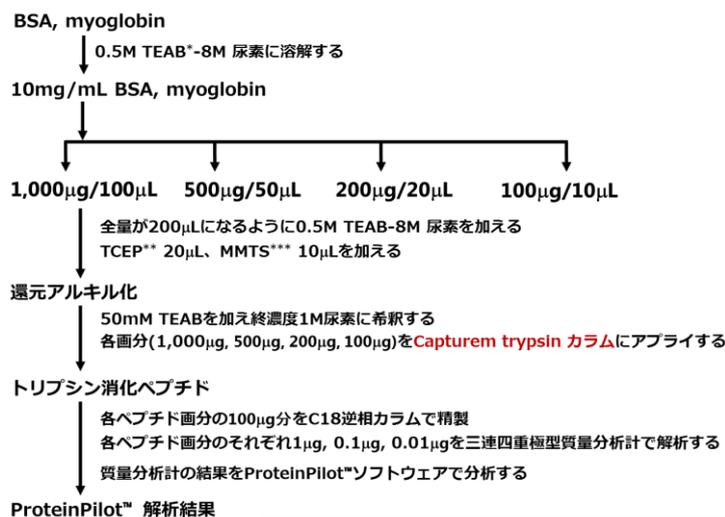
■ 実験の背景

今回、先生からご提供いただいたデータは、Capturem Trypsinを用いたタンパク質の消化効率の評価試験です。Capturem Trypsinの取扱説明書には、使用するタンパク質の推奨使用量の上限を80 μg (抗体の場合は20 μg)に設定していますが、先生のラボでは、組織から抽出した数100 μg程度の混合タンパク質から目的のタンパク質の検出や発現量の変動、定量などの解析に使用しています。その目的のためにCapturem Trypsinの上限が80 μgでは物足りないとのことで本実施例では、100 μg ~ 1,000 μgのタンパク質を使って性能評価をしています。

■ 実験プロトコール

右図は、市販のBSAとmyoglobinを使ったトリプシン消化実験の操作手順です。目的タンパク質を可溶化するために8M尿素を使用しています。プロトコールには記載していませんが、尿素に加え、市販のタンパク質可溶化剤(MおよびRと記載)についてもCapturem Trypsinの性能評価を実施しています。

Capturem™ Trypsin によるBSAとmyoglobinの消化



* TEAB : Triethylammoniumbicarbonate
** TCEP: 50mM Tris-(2-carboxyethyl)phosphine (還元剤)
*** MMTS: 200mM methyl methanethiosulfonate (SH基 blocker)

■ 実験結果

下表より、8M尿素で可溶化した目的タンパク質(100 μg ~ 1,000 μg)をCapturem Trypsinで処理することにより、標的ペプチドを高効率に検出できました。また、市販の可溶化促進剤を用いた実験においても、Capturem Trypsinで高い検出効率を示しました。

Capturem Trypsinカラムにアプライしたタンパク質量		BSA(mg)				myoglobin(mg)			
		100	200	500	1,000	100	200	500	1,000
8M Urea	Condition	Capturem Trypsin消化後の標的ペプチドの回収率(%)							
	Confidence 10%<	100	100	100	100	100	100	100	100
	Confidence 50%<	87.1	83.5	86.6	93.5	100	100	96.1	100
可溶化促進剤M	Confidence 95%<	85.4	81.0	82.7	87.7	100	90.9	96.1	92.2
	Confidence 10%<	99.8				100			
	Confidence 50%<	83.5				90.2			
可溶化促進剤R	Confidence 95%<	82.2				90.2			
	Confidence 10%<	99.5				100			
	Confidence 50%<	90.9				96.1			
	Confidence 95%<	87				96.1			

■ 先生からのコメント

タカラバイオ社のCapturem Trypsinを使う前は、他のTrypsin試薬により50°C、1時間の反応で目的タンパク質を消化、標的ペプチドを解析していた。Capturem Trypsinのことを初めて知ったのは、タカラバイオから定期的に受信する会員メールだった。「Trypsin消化が遠心2分で完了！」の宣伝文句には半信半疑だったが、実際に使用して、確かに2分でトリプシン消化できることに大変驚いた。今後も、「迅速さ」と「簡便さ」を兼ね備えたCapturem Trypsinを使用する予定である。また、Capturem Trypsinを使う場合は、市販の可溶化促進剤も有効であったが、処理する時間を考えると8M尿素で可溶化した方が簡便であった。なお、本実施例には詳しくは記載していないが、ペプシン消化用のCapturem Pepsin (製品コード 635728)についても、BSAとmyoglobinを使った評価をした(各100 μg)。こちらも標的ペプチドの回収率が>95%の信頼度でそれぞれ69.3%と70.5%であり、非常に満足の行く結果を得ている。