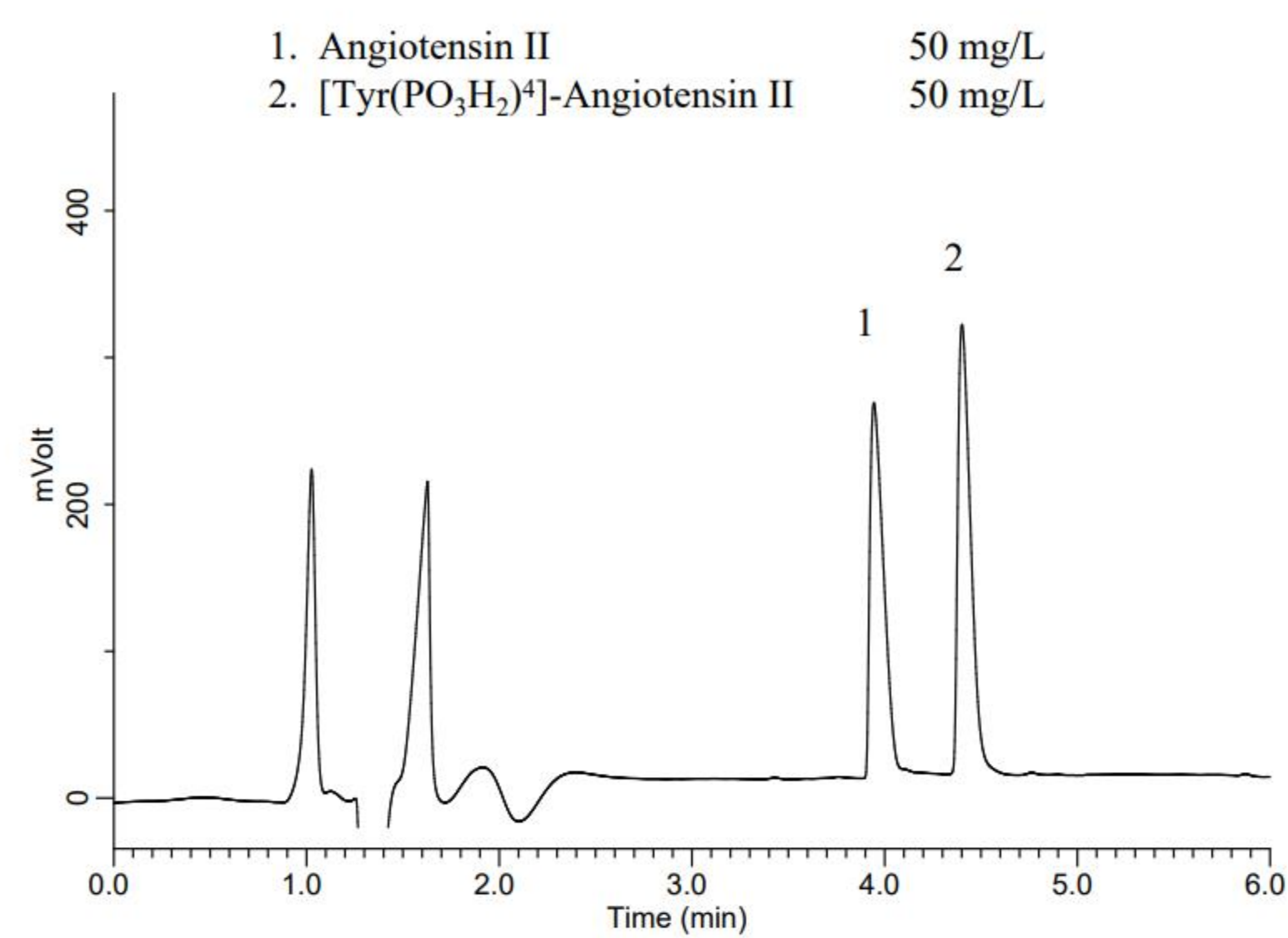


蛋白质的可逆性的磷酸化，在生体内起着各种各样的作用，比如传达信号。在磷酸化蛋白质的分析中的大多数方法是在酶消化后仅提取和分析磷酸化肽，但是由于磷酸化肽的含量很少，所以需要有效的纯化方法。在本篇指南中，我们将介绍一种使用Titansphere Phos-TiO提取磷酸化肽的方法。

二氧化钛是选择性提取或富集磷酸化肽有效和有效的吸附剂。从血管紧张素II和磷酸化血管紧张素II的混合物中，仅用40分钟即可选择性地提取磷酸化物。

此外，由于使用了惰性高的InertSustain C18, 通过含甲酸的水和乙腈的梯度洗脱获得了良好的峰形。
(C. Aoyama)

标准溶液测定例



HPLC条件

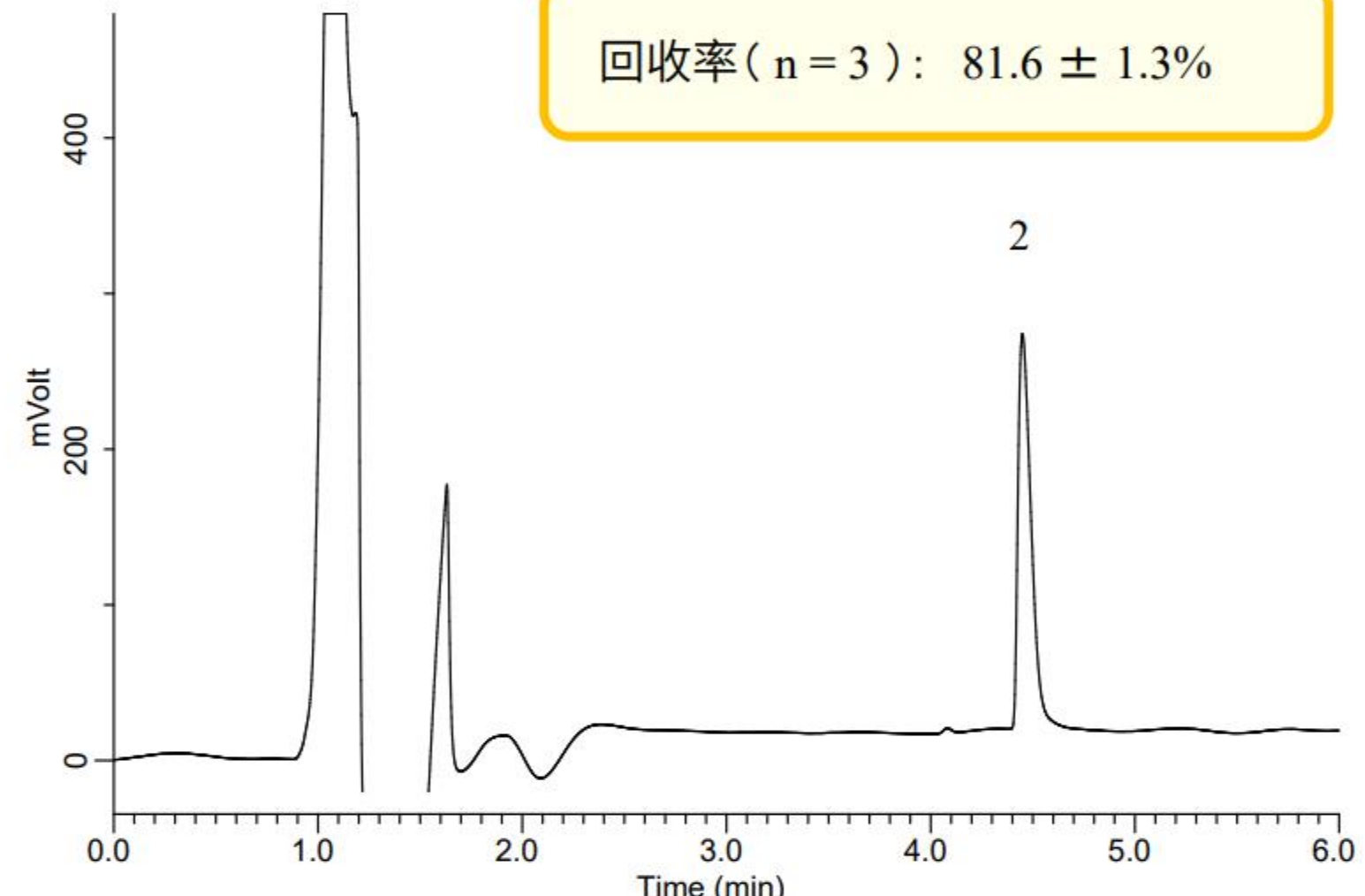
系统 : LC800 system
色谱柱 : InertSustain C18 HP (3 μm, 150×2.1 mm I.D.)
流动相 : A) 0.1% HCOOH in H₂O
 B) 0.1% HCOOH in CH₃CN
 A/B = 85/15 – 5 min – 70/30, v/v
流速 : 0.3 mL/min
色谱柱温度 : 40 °C
检测器 : UV 210 nm
注入量 : 10 μL

用Phos-TiO的前处理步骤

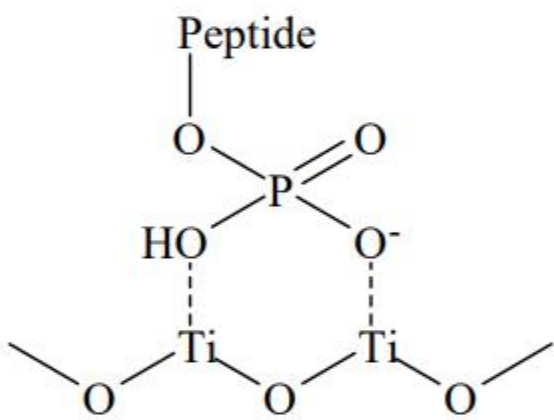
在 Phos -TiO 上接上废液管↓ + Buffer A* 20 μL
离心 (3000 g, 2 min)
↓ + Buffer B* 20 μL
离心 (3000 g, 2 min)
去除回收溶也
↓ + 肽样本 50 μL ↓
+ Buffer B 100 μL
移液并充分混合
离心 (1000 g, 10 min)
再次应用回收的溶液
离心 (1000 g, 10 min)
去除废液管回收的溶液
↓ + Buffer B 20 μL
离心 (3000 g, 2 min)
↓ + Buffer A 20 μL
离心 (3000 g, 2 min)
↓ + Buffer A 20 μL
离心 (3000 g, 2 min)
移除废液管，装置回收管↓
+ 5%氨水溶液 50 μL
离心 (1000 g, 5 min)
↓
回收液注入HPLC

*Buffer A : 加入4倍于Titansphere Phos-TiO试剂盒中所含的溶液A(v / v)的乙酸乙酯。
※ Buffer B : 加入3次含有Titansphere Phos-TiO试剂盒中的溶液B(v / v)的缓冲液A

用Phos-TiO前处理后



用Phos-TiO提取磷酸化肽的原理



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

假设二氧化钛(TiO₂)具有作用在磷酸基上的功能，如左图所示。这种相互作用在酸性条件下较强，在碱性条件下较弱。此文中的方法就是基于这个原理，通过添加氨水溶液从二氧化钛柱中洗脱磷酸化肽。此外，高浓度磷酸盐溶液可用于从Phos-TiO柱洗脱磷酸化肽

Titansphere Phos-TiO是由京都大学 药学部 石濱泰老师的帮助下开发完成的。

Titansphere Phos-TiO Kit

Cat. No. 5010-21300	1 mg / 10 μL	24次
Cat. No. 5010-21301	1 mg / 10 μL	96次
Cat. No. 5010-21305	3 mg / 200 μL	24次
Cat. No. 5010-21306	3 mg / 200 μL	96次

此次分析中使用的。

- 使用亲和性优异的二氧化钛填料。
- 可以使用专用的离心适配器连接到1.5mL微型管
- 纯化时间仅用40分钟即可。
- 各步骤均为离心操作，避开人为误差。

Titansphere Phos-TiO (Syringe barrel type)

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

在可以离心的小柱填充二氧化钛。处理大量样品时十分便利。

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

由于此款色谱柱的填料是高度灭活的， 因此即使是吸附性的成分也能得出良好的峰形。而且， 它的耐碱性也很好可以直接注入氨溶液。

Cat. No. 5010-21700 MonoSpin C18 50 pk
Cat. No. 5010-21701 MonoSpin C18 100 pk
肽脱盐的理想选择。