

ペプチドシーケンサー

PPSQ-31A

一般ユーザーマニュアル

分析計測分野

kikibun@okayama-u. ac. jp

目 次

○共同利用のルール	1
○分析機器の構成	2
○分析開始の前準備	3
○分析機器の起動	5
○測定の実行 (I. 試料のセットとリークチェック)	10
○測定の実行 (II. シーケンス分析の設定と開始)	15
○データ解析 (マニュアル解析は別冊子参照)	20
○データの印刷と持ち帰り	21
○終了操作	26
○トラブル発生時の連絡先	28
○参考資料	

持ってくるもの

- ・ 試料 (20~50pmol が望ましい) の染みた PVDF 膜小片
塩の混入が懸念される試料は、プロット後十分に UPW で塩を洗浄すること。
CBB の色が強い場合は CBB のピークが出てしまうので、カットした後脱色すると良い。
10 分以上自然乾燥させ、完全に水分を除く事。乾いた膜は、長期保存可能。

注意事項

- ・ 測定室は常時 24~25℃設定で空調しています。ドアの開放は厳禁です。
- ・ 通常はポンプのみ低流速で稼働、それ以外の電源は OFF になっています。
- ・ ポンプとデテクターは PC 制御されており、手動操作はできません。
- ・ PTH-アミノ酸標準品による溶出ピークとのずれが大きくなってきたら、塩川までご連絡下さい。
(内線 8748 あるいは 204 号室)

測定時間の目安 (start からの時間)

1 残基目の解析終了まで 2:30、 7 サイクルは 6:22

共同利用ルール

1. 利用講習会を受講するか監守者による操作訓練を受け、さらに**操作実技の認定を受けた後に、利用を開始**すること。
2. 利用前に監守者に連絡して、機器予約システムの利用承認を得ること。なお、利用者の機器使用に起因する一切の責は、利用者を登録した会計責任者が負うものとする。
3. **測定前には予約して、予約承認メールを確認すること。**機器の状態が悪い場合など、予約却下をする場合があります。
4. 操作は、「稼働状態の記録」に記入しながら行ない、測定終了時には「利用記録」に必要事項を記入すること。**測定終了後には、「最終残基のクロマトチャートのプリントアウト」を、監守者に提出して下さい。**
5. 測定前のチェックで、試薬や窒素ガスの残存量が必要量より少ない場合は、測定を開始せずに監守者へ連絡して下さい。試薬等の交換は、監守者か責任者が行ないます。
6. 測定後の PVDF 膜試料は、原則として次の測定者が取り出す事とする。装置内は常に窒素ガスで満たす必要があるため、**リアクタを解体した状態で長時間放置してはならない。**
7. 使用前に、本体・検出器・PC・プリンターの電源 OFF、窒素ポンベの元栓が閉じられていることを確認すること。ポンプのみは、常時低流速で稼働したままにして下さい。
8. 試料溶液や容器等、測定室に持ち込んだものは全て持ち帰り、測定室に物品を残さないこと。ゴミも持ち帰ること。測定に不要な靴やコートは前室かロッカーに置いて、測定室内に持ち込まないこと。
9. 測定室は常時 24~25℃設定で空調しているので、出入り口の開放は厳禁です。またクリーンな環境を維持するために、前室でスリッパに履き替えるなど、掲示の指示に従うこと。
10. **故障・トラブルの際は、直ちにセンター職員と所属教員へ故障・トラブルの経過および対応の経緯について連絡すること。**

2025 年 5 月 19 日

機器管理責任者・監守者 塩川つぐみ（内線 8748）

分析機器の構成

ペプチドシーケンサー(島津 PPSQ-31A)

● ペプチドシーケンサー本体

エドマン分解によってタンパク質あるいはペプチドの N 末端アミノ酸を順次切断し、その末端アミノ酸を HPLC(高速液体クロマトグラフィー)の流路に自動注入して分析する装置

ペプチドシーケンサー本体

制御用 PC

PDA 検出器

送液ユニット



● フォトダイオードアレイ (PDA) 検出器 / 送液ユニット

PDA 検出器

光路長 85mm のセルにより、従来より高感度な分析が可能

送液ユニット

ペプチドシーケンサー本体の HPLC に溶媒を送る装置

● 制御用 PC

装置の制御、設定、測定の実行、測定データの表示や解析などを行う

分析開始の前準備

本体電源投入前の「稼働状態の記録」記入

下記の各種の値が指定範囲外を示した時には、監守までご連絡下さい。

微量試料の場合は、別途あらかじめ監守者に機器の状態をご確認下さい。

1. 【カラム・溶離液・送液ユニット状態の確認】

送液ユニットの一番下の SLEEP ボタンを押し、スリープを解除する。

0.05mL/min に於ける LC ポンプ圧を記録し、前歴値 ± 0.2 MPa を確認。

連続運転の場合はこの確認操作を省略し、チェックリストには「cont」と記入する。

ポンプ、カラム、ループ周辺に漏れや塩の析出が無い事を確認する。
⇒ ポンプ圧の変動や液漏れ・析出がある場合には、監守へ連絡して下さい。

0.05mL/min に於ける LC ポンプ圧を記録し、前歴値 ± 0.2 MPa を確認



SLEEP ボタン

2. 【反応試薬残量の確認】

本体下側の扉を開けて、すべての試薬が必要量以上(>1.5cm)あることを確認する。

⇒ 液深が 1.5 cm 以下の場合は、液深を定規で測って記録するとともに、監守者へ連絡して下さい（内線 8748）。

監守者が、その試薬残量で測定可能なサイクル数を判断します。

すべての試薬が必要量以上
(>1.5cm)あることを確認



3. 【廃液ボトル貯留量の確認】

本体右側の廃液ボトル内液量を記録し、廃液量 1000mL 以下を確認する。

⇒ 1000mL 以上の場合は、監守者に連絡して下さい。ハロゲン廃液タンクへ廃液を捨てます。

廃液ボトル内液量を記録し、廃液
量 1000mL 以下を確認



4. 【窒素ガスボンベ残圧の確認】

制御 PC 後ろの窒素ガスボンベの残圧が、1MPa 以上であることを確認する。

⇒ 1MPa 以下の場合は、監守者に連絡して下さい。ボンベを発注します。



1 サイクルに使用する試薬量

記号	試薬	使用量(μL)
R1	5%PITC n-ヘプタン溶液	60
R2	12%トリメチルアミン溶液	40
R3	トリフルオロ酢酸	65
R4	25%トリフルオロ酢酸溶液	50
S2	酢酸エチル	2000
S3	1-クロロブタン	800
S4	37%アセトニトリル溶液	1000

分析機器の起動

装置の立ち上げ

1. 【電源投入】

左の HPLC デテクター前面の電源①を入れ、緑のランプが2つ点くまで待つ。(ブザーが1回鳴る)

続いて、本体右の主電源②、PC 電源③を入れ、電源投入時刻を記録する。

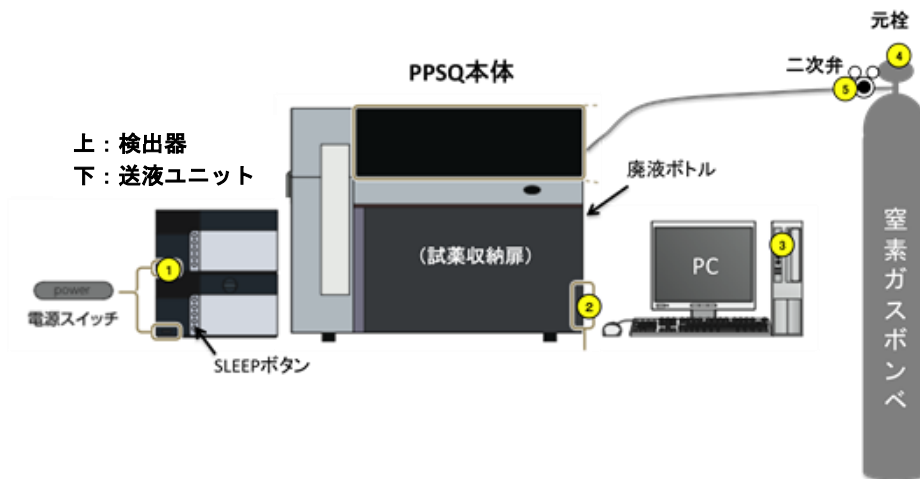
PC のログイン PW:

(装置近くのマニュアルをご確認下さい)

2. 【N2 ガスボンベの調整】

N2 ボンベ容器弁④を全開し、レギュレータ二次弁⑤を1.5回転開けた後、残圧を記録、2次圧 0.2MPa を確認して記録する。

(この条件で、流速 0.05mL/min)。

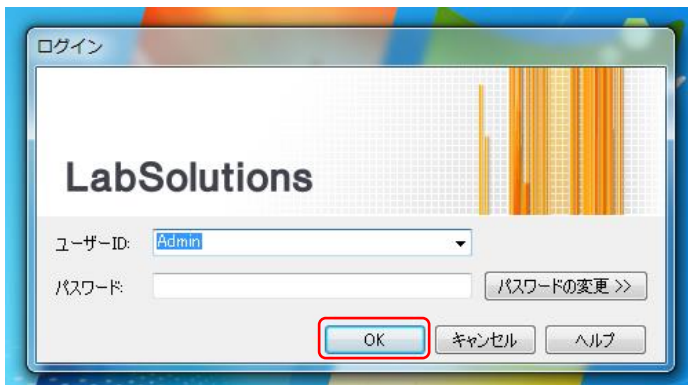


3. 【分析ソフト起動】

PC 画面で、LabSolutions アイコンをダブルクリックし、
LabSolutions メイン(System Administrator)を立ち上げる。



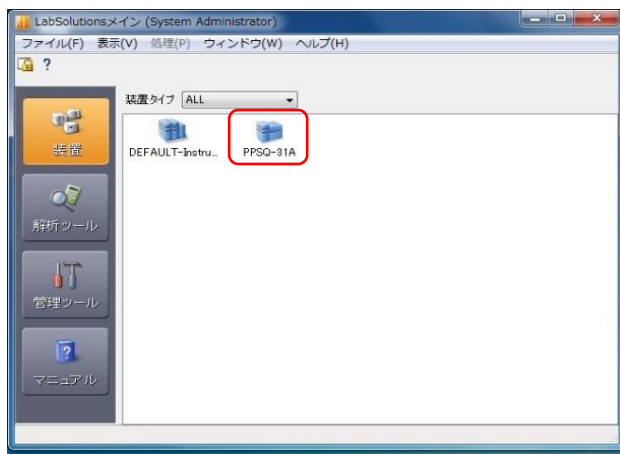
ログイン画面が開く



ユーザーID : Admin

パスワードは何も入力せず、「OK」をクリック

次に、左端上の「装置」を選択し、装置タイプを「ALL」で PPSQ-31A
をダブルクリックすると分析ソフトが起動する。

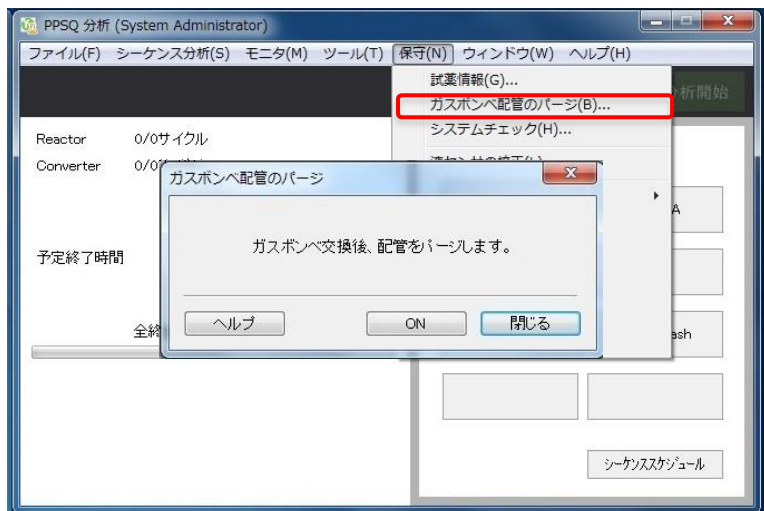


(N2 圧力や流速エラーが出た時は OK 又は×を押した後、すぐに次の N2
ガスページ)

正常に接続されると**ブザー2回鳴る**。

4. 【N₂ ガスパージ】

PPSQ 分析 (System Administrator) 画面のメニューバーより、**保守⇒ガスボンベ配管のパージ**



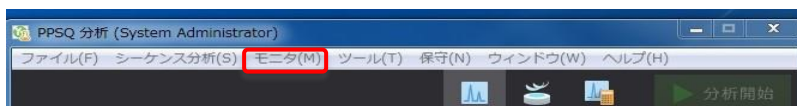
ガスボンベ配管のパージ画面で「ON」を押し、30秒パージした後(時計で確認)、「OFF」を押し(画面閉じる)。

5. 【LC 分析モニタ画面の表示】 (モニタ画面が消えている時のみ)

PPSQ 分析画面にて、

モニタ ⇒ ステータス画面 (PPSQ 本体と HPLC の LC 分析画面) 表示

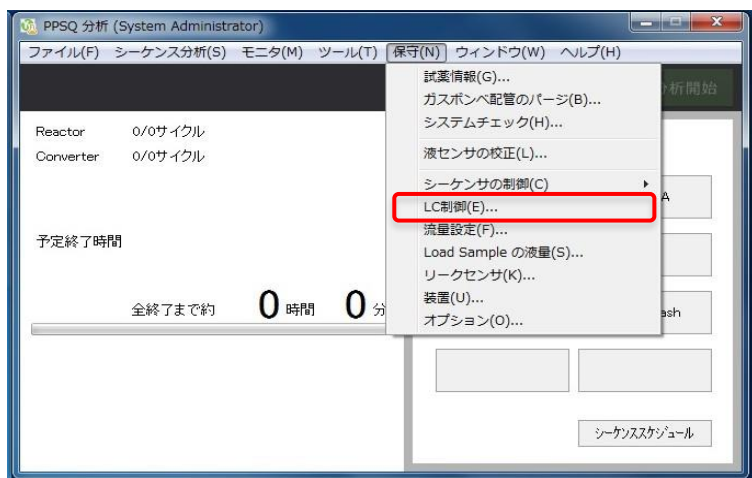
モニタ ⇒ 分析画面 (デテクター、カラム圧、カラム温度の経時変化) 表示



6. 【HPLC 設定】

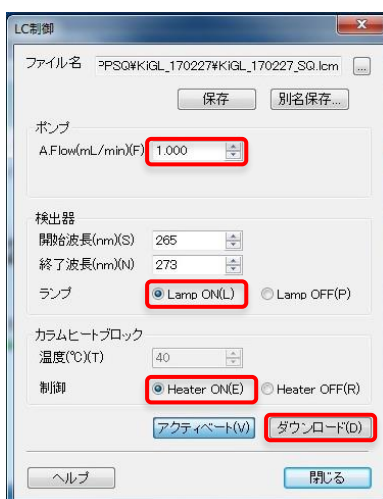
PPSQ 分析(System Administrator)画面のメニューバーより、

保守⇒LC 制御



下記表の条件に設定後、ダウンロード後、アクティベートも押す。

ポンプ流速	1.000 mL/min
検出器波長	開始 265nm 終了 273nm
ランプ	Lamp ON
カラム温度	40°C
制御	Heater ON



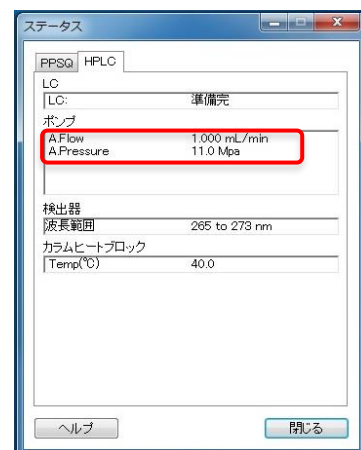
左側にあるポンプおよびステータス画面の流速表示が **1.000mL/min** に上がるので、直後の最高圧力を記録。(HPLC ラインの状態把握のため。高いとカラムが詰まっている)

LC 制御画面を閉じる。



*アクティベートが有効(青色)になっている場合は、ダウンロードのみ押す。

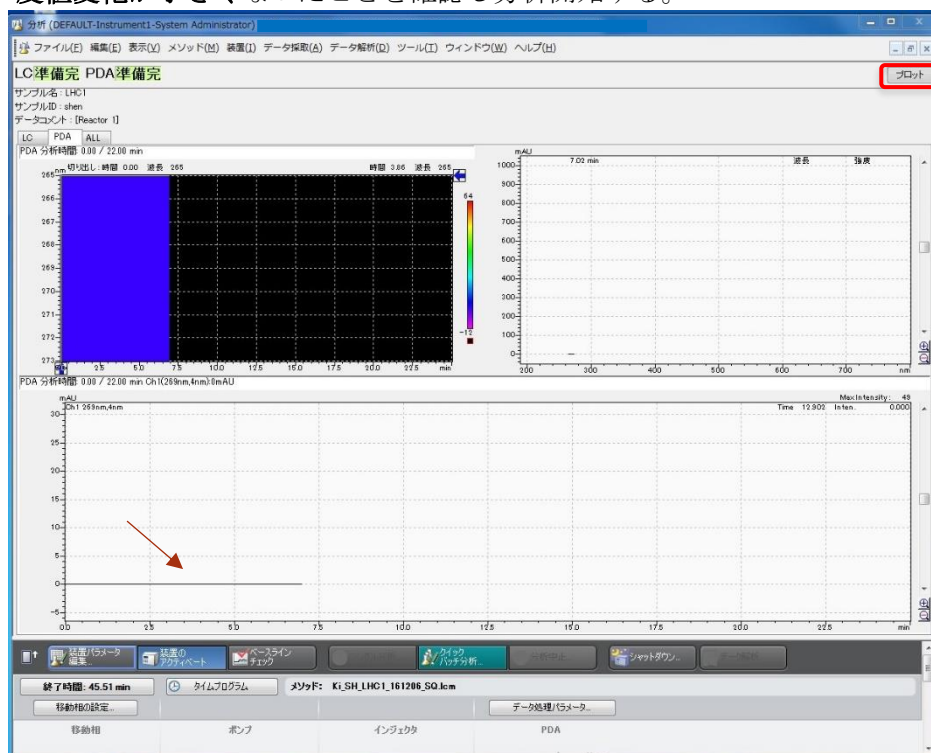
PC ステータス画面でも確認可能



7. 【カラムの温度安定待ち】

1 時間弱お待ちください！

PDA タグを選び、モニター画面の右上の「プロット」を押すと現在のベースラインが記録される。分析開始直前にベースラインをみて吸光度値変化が小さくなったことを確認し分析開始する。



測定の実行Ⅱの4【最終確認】

(17 ページ) に記載

*分析開始前に確認する。

安定待ち時間中に、乾燥させた PVDF 膜をリアクタへセットする（次頁）。

水分は副反応物生成の原因になり、感度を落とす原因となります。

必ず反応器内を窒素ガスで満たし直してから、反応を行って下さい。

測定の実行

I. 試料のセットとリークチェック

1. 【リアクタの解体】 注：手袋着用する事！ 順番厳守！

リアクタの組立て・分解順に注意！

■ リアクタの構造

- (A) 入口チューブ固定ねじ (白)
- (B) リアクタ固定ねじ
- (C) スペーサ
- (D) アッパーチャンバ
- (E) PTFE フィルタ
- (F) フィルタホルダ
- (G) ロウアーチャンバ
- (H) スペーサ
- (I) ヒートブロック
- (J) ガイド
- (K) 出口チューブ固定ねじ (白)

分解時	組立時
1) 白小ねじを外す	4) 締める
3) 外す	3) 締める
5) C~Fをまとめて取り出し、 スペーサを下にして置く	2) C~Fを重ねて置いて、 ゆっくり下げる (ガイド向きに注意)
4) ガイドを上げる	1) ガイドを上げる
2) 白ねじを緩める (1/2 回転)	5) 締める (1/2 回転)

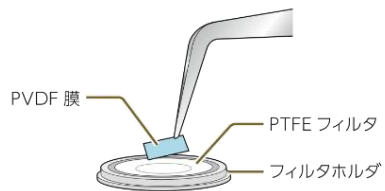
入口チューブの白ねじ⇒出口チューブの白ねじ⇒リアクタ固定ねじの順番で外す。横のガイドをそっと上に上げて、スペーサからフィルタホルダを取り外し、スペーサを下にしてキムワイブの上に置く。

作業前に使用ピンセットは、洗浄用エタノールで洗う。



フィルタホルダを外して、使用済みの試料を外す。

2枚の PTFE フィルタが完全に離れないようにしつつ、隙間からピンセットで上手に PVDF 膜を取り出すと、PTFE フィルタが密着した隙間から次の試料をセットすることができる。PTFE フィルタは丁寧に扱えば**複数回再使用**できる。



2. 【PVDF 膜のリアクタへのセット】

静電気が激しい場合は、特級エタノール等でピンセットを濡らしながら以下の操作を行う。

PTFE フィルタは、各研究室用のものを繰り返し使える。

新しい PTFE フィルタを使用した場合には、利用記録に枚数を記録すること（1枚 720 円）

PVDF サンプルには以下の 2 種類がある。

- ・液体試料をしみ込ませ、完全に乾燥させた直径 6mm の PVDF 膜
- ・電気泳動後のバンドを切り取った細い PVDF 膜小片(なるべく重ならないように)

いずれのサンプルも PTFE フィルタ 2 枚ではさみこむようにセットする。

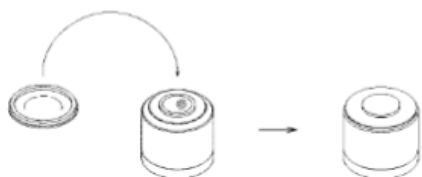


〈セット方法〉

アッパーチャンバの上に、型をつけた PTFE フィルタを 1 枚敷く。

その上に、PVDF 膜を置き、PVDF 膜の上にもう 1 枚の PTFE フィルタを乗せて、PVDF 膜を中央に挟んだ上から、フィルタホルダを押し付けて、固定する。

セット後、PVDF 膜片が円の中央に来ているか確認する。フィルタホルダがアッパーチャンバにしっかり取り付けられているかどうか、再度確認する。



○推奨されている PVDF 膜

(孔径 0.22 μm)

- ・ミリポア社 Immobilon-PSQ
- ・ポール社 フルオロトランス
- ・バイオラッド シーケ-ブロット

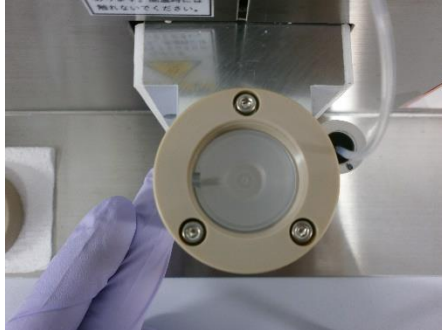
※ニトロセルロース膜は耐薬品性に問題があり使用できない。

○注意

- ・PVDF 膜が円周部にかからないようにする。
 - ・膜ができるだけ重ならないようにする。（重なり部分は、2～3 枚に）
- かなりの枚数が重なるとリークチェックでエラーが発生することがある。

3. 【リアクタの本体取り付け】

ガイドを左手で持ち上げておき、試料をセットしたアッパーチャンバを、試料側を下に向けて置き、ガイドをゆっくり降ろす。このとき、ガイド（スパーサの突起）が溝に収まるように入れる。

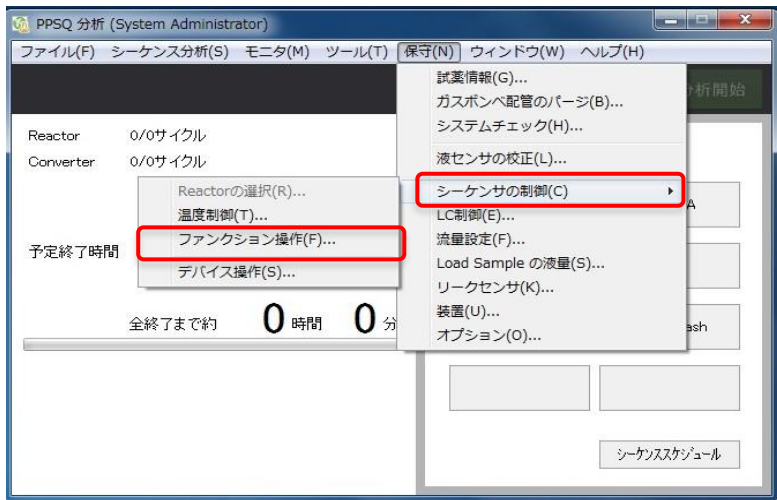


上部リアクタ固定ねじ⇒入口固定ねじ⇒出口チューブ固定ねじの順にしっかりと締める。（11頁「測定の実行」参照）

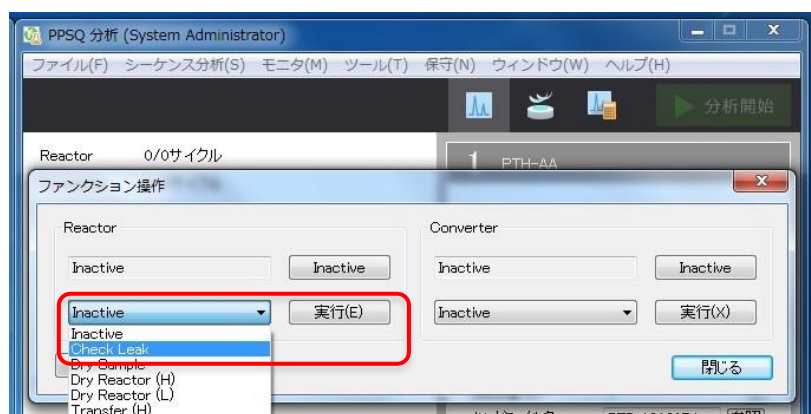
4. 【リークチェック】

PPSQ 分析画面のメニューバーより、

保守 (プルダウン) ⇒シーケンサー制御 (プルダウン) ⇒ファンクシ
ョン操作



ファンクション操作画面の左側の Reactor 欄⇒Check leak を選び「実
行」



1 分程度待って、何事も無く元に戻れば、OK、閉じる。

エラーが出た場合は、一度取り外してネジを締付け直し、もう一度リ
ークチェック。

それでも駄目な時は、PVDF 膜数を減らすか PTEF フィルタを交換。

測定の実行

II. シーケンス分析の設定と開始

1. 【シーケンス分析の選択】

PPSQ 分析画面にボタンリストが無い場合は、右下の「スケジュールに戻る」ボタンをクリックする。PPSQ 分析画面の左側のボタンリストの「PVDF」ボタンをクリック。

2. 【分析条件設定】 現れた PVDF 画面にて

※データファイル名: 研究室略称+サンプル名+日付

(例 KiGL - 161202)

↑研究室略称 ↑日付

(kikibunseki)

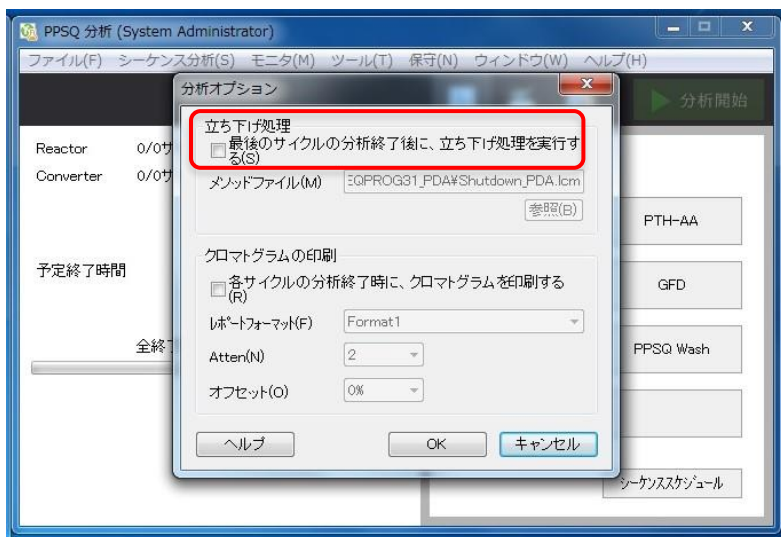
(同じファイル名を使うと、データが上書きされてしまうので注意。)

登録を押す。

3. 【立ち下げ条件等の設定】 重要！忘れずに！

PPSQ 分析画面メニューバーの

ツール (プルダウン) ⇒シーケンス分析のオプション



通常は、表示された画面にて

「立ち下げ処理実行」にチェックを入れ、OK。

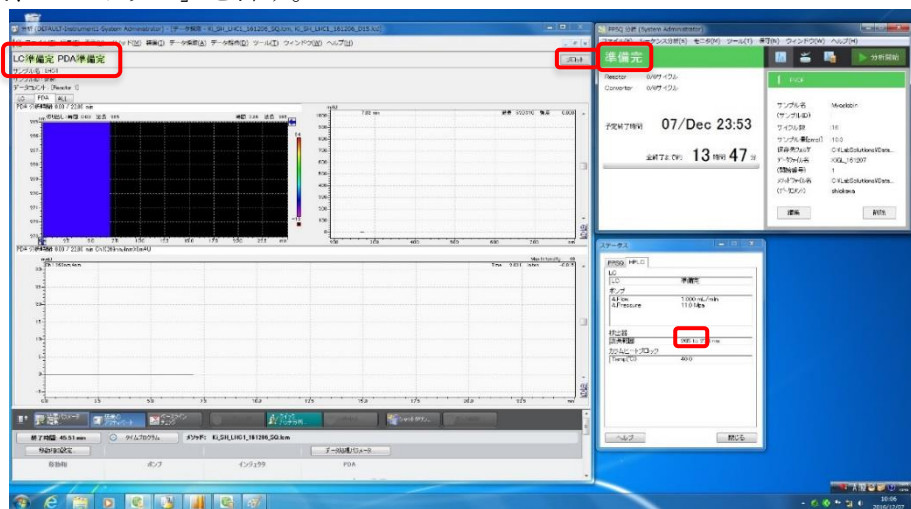
連続して分析を行う場合には、

「立ち下げ処理実行」のチェックを外す。

4. 【最終確認】

クロマトモニタ、PPSQ分析、ステータス画面で「準備完了」が出ているか確認。PDAタグで「プロット」を押し、ベースライン安定を再度確認後、「ストップ」を押す。

拡大して±2mAU以内の変動を確認する。

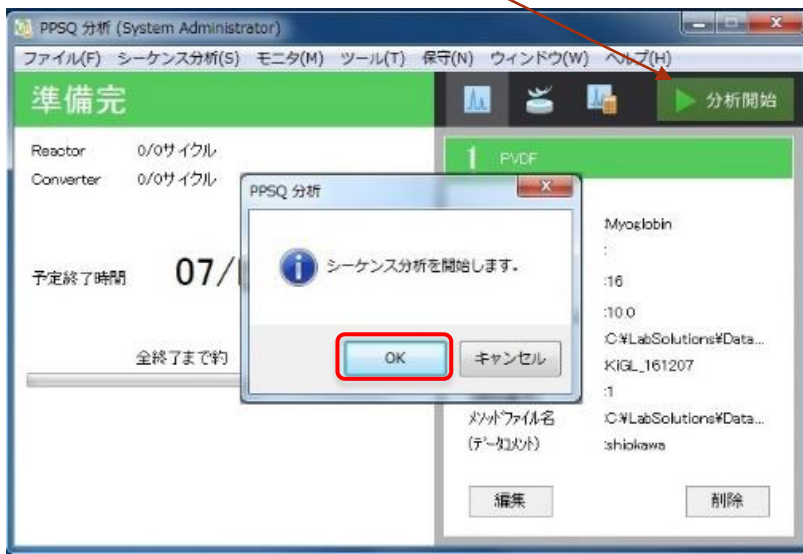


5. 【測定前状態の確認と記録】

分析開始直前に**試料量**と**流速 1mL/min**時の**ポンプ圧**等を確認し記録する。

6. 【分析開始】

PPSQ 分析画面の「**分析開始**」をクリックし「シーケンス分析を開始します」を OK⇒ **分析開始時刻を記録**



昼夜運転を行う際は、約3時間後、1残基目の結果を確認して、解析を継続するか判断することを推奨する。

!!!! 注意 !!!!

途中でやめたくても、**サイクル途中で「中止」してはいけません!**

通常シーケンス分析を中止する場合は、以下の方法で行って下さい。

PPSQ 分析画面のサイクル数横の「変更」を押す。

サイクル数の変更画面で中止したいサイクルを設定。

設定した サイクル終了後、現在実行中のシーケンス分析は終了します。



データ解析

(マニュアル解析は別冊子参照)

1. PPSQ 分析画面の「データを見る」を押すと、それまでに終了しているサイクルの結果を確認することができる。



2. (自動推定配列の信頼度が低い場合や、予想配列と一致しない場合は特に) クロマトグラムを目で見て、配列を確認する。

クロマトタブを開いて、クロマトグラムの特に見たいピークを大きく表示して、

1. スタンダードとピーク位置がずれていないか
2. ピーク同定が妥当か (前後のサイクルを交互表示するか、差クロマトグラム表示)
3. ベースラインが正しく引けているか(ピークがあるのに認識していない時)

を確認し必要に応じて、マニュアルで解析

3. 古いデータを呼び出して比較したい場合は、PPSQ 再解析画面から指定のデータファイルを表示する。

⇒ファイル open (または、ファイル open のアイコン) ⇒ 指定のデータファイルを選択して表示

※データ解析ソフトは、1つのファイルしか表示できません。



分析中でも解析可能だが、
解析の保存はせず、確認後は
解析ソフトを閉じておく。

*Asp, Glu はスタンダードと位置
が少しずれるので、直近のミオ
グロビン測定結果から溶出位置
を補正する。

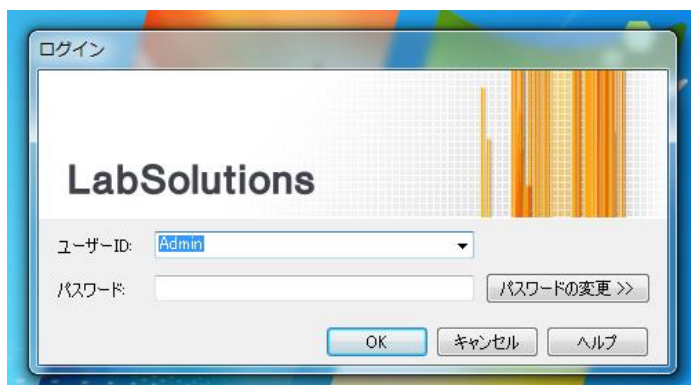
データの印刷と持ち帰り

1. 【PPSQ 再解析ソフトの立ち上げ】

PC画面で、LabSolutions アイコンをダブルクリックし、
LabSolutions メイン(System Administrator)を立ち上げる。



ログイン画面が開く

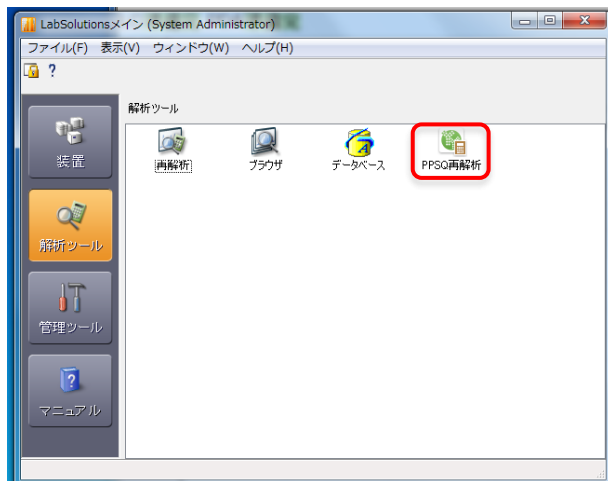


ユーザーID : Admin

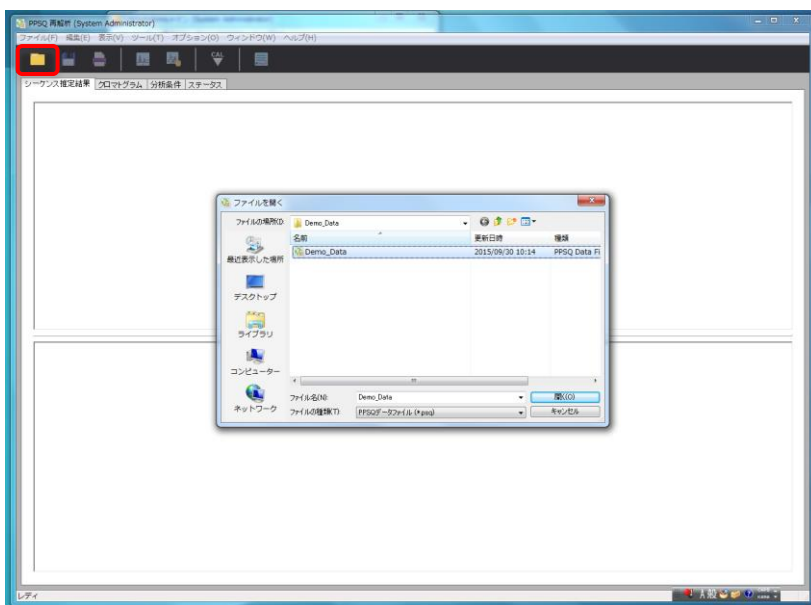
パスワードは何も入力せず、「OK」をクリック

(ここまでは【分析ソフト起動】と同様)

次に、左端上の「解析ツール」を選択し、PPSQ 再解析をダブルクリックすると解析ソフトが起動する。

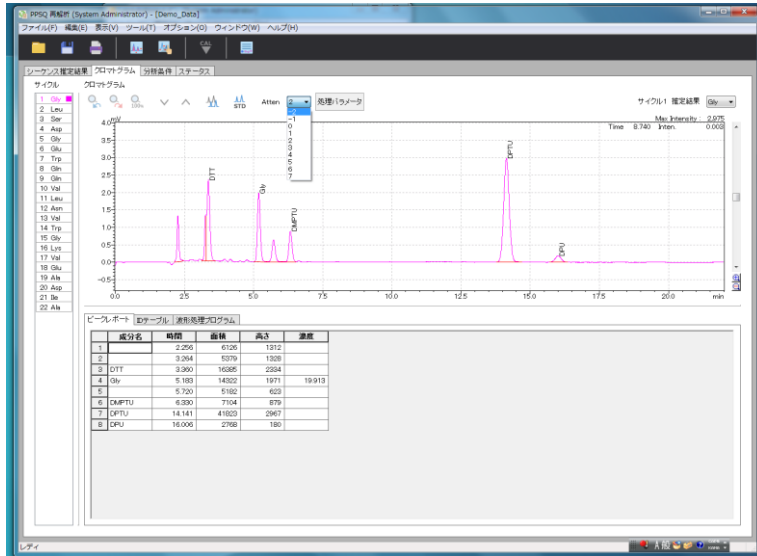


解析ソフトが起動したら、フォルダマークをクリックし、「ファイルを開く」で自分の測定データを選択し「開く」を押す。

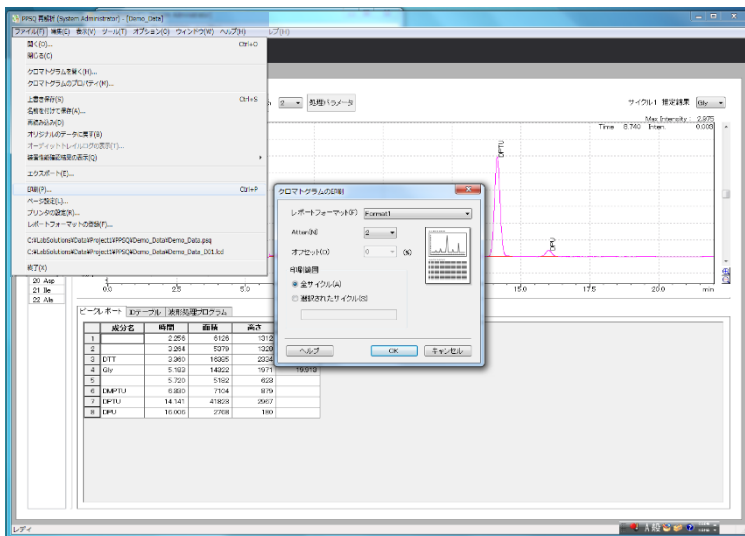


2. 【クロマトグラムの印刷】

PPSQ ファイルを開き、クロマトグラムの印刷を行いたい場合、「クロマトグラム」を選択し表示させる。ピーク強度により Atten を変更し必要なピークがクロマトグラムに収まるようにする。



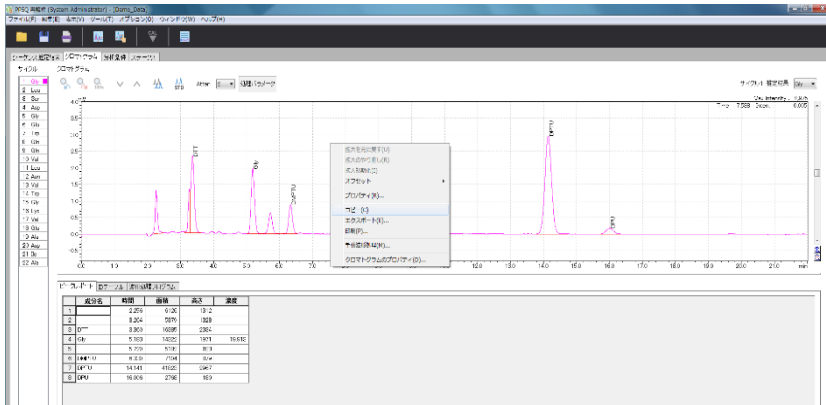
Atten を変更した後、「ファイル」→「印刷」をクリックすると以下の画面が表示される。



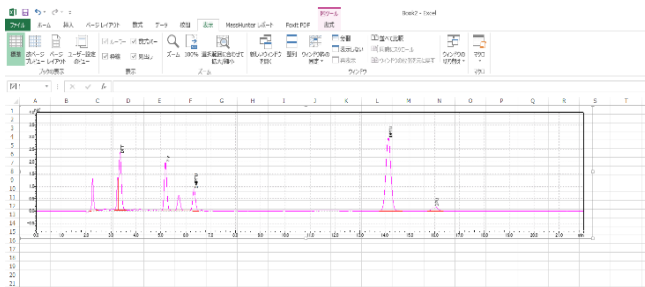
「レポートフォーマット」は各自選択し、「OK」を押すと印刷が開始される。

3. 【クロマトグラムのコピー】

クロマトグラムをコピーしたい場合、クロマトグラム上で右クリックし、「コピー」を選択

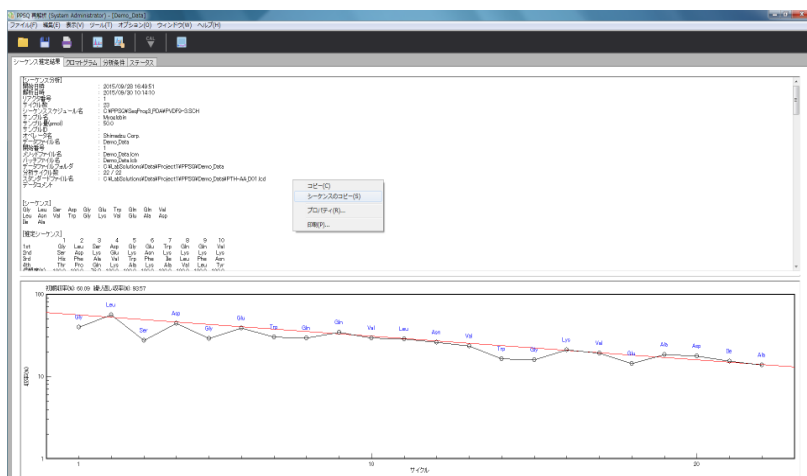


Excel 等にはりつける



4. 【シーケンス推定結果のコピー】

「シーケンス推定結果」をクリックし、この画面で右クリックする。



「シーケンスのコピー」を選択し、Excel ファイル等にはりつけると推定シーケンスのみがコピーできる。

「コピー」を選択し、Excel 等にはりつけるとシーケンスデータの全てがコピーできる。

終了操作

注： 分析ソフト終了前に PPSQ 本体の電源を落とさないこと！

注： 長期休業、停電時以外は、「短期立ち下げ状態」で終了すること

1. 【分析が終了していることを確認】

残り時間が 0 で、PPSQ 分析画面の PVDF バーが黒になっている。

2. 【短期立ち下げ条件の設定】

PPSQ 分析画面にて保守（プルダウン）LC 制御

⇒ 次の条件ポンプ流速を 0.05mL/min、検出器 OFF、カラム 40°C ON に設定後、アクティベートが ON になっていればダウンロードのみ。

（アクティベートが OFF の場合は、ダウンロードの後にアクティベートを押す）

⇒ 流速低下を確認する。

LC 制御画面を閉じる。

3. 【終了操作と記録】

(ポンプは0.05mL/minで稼働したまま、終了すること)

解析ソフトで最終残基の副生成物のピーク強度を確認・記録し、クロマト (Atten=7、Format1) を印刷する。 (印刷方法は23頁「データの持ち帰り」と印刷) 2. 【クロマトグラムの印刷】を参照)

必要であれば、解析ソフトは継続(起動させたまま)で、

⇒ 分析ソフトを終了 ⇒ 2つのブザー音が鳴る。

⇒ PPSQ 本体電源 OFF ⇒ デテクター電源 OFF

⇒ **ポンプの圧力を記録**した後、表示ポンプスリープ

⇒ N2 ボンベ1次と3次を締める

⇒ 本体電源 OFF 時間を記録する。

(解析終了後、)

⇒ 解析ソフト終了⇒ プリンター電源 OFF

4. 【終了後確認】

試薬残存量、ボンベ1次圧力をチェックし、記録する。

⇒ 1以下ならばすぐに監守へ報告

5. 【利用記録の記入】

PCの利用記録ファイルに使用時間、氏名等、必要情報を転記する。

⇒ PC 電源 OFF

試料やゴミはすべて持ち帰って、測定室には何も残さないで下さい。

トラブル発生時の連絡先

故障時には、分析計測分野と所属研究室の指導教員へまず連絡して下さい。

装置の不具合、ご不明な点等ございましたら以下にご連絡をお願い致します。

シーケンサー 監守者	分析計測分野 塩川つぐみ E-mail: shioka-t@okayama-u.ac.jp	内線 : 8748
故障修理業者	株式会社 島津アクセス	Tel : 06-6367-5171
代理店	新青山株式会社 兵団営業所	Tel : 086-238-3235

参考資料

(SHIMADZU プロテインシーケンサー 取扱説明書より抜粋)

塩の多いサンプルについて

プロテインシーケンサーで分析するサンプルに多量の塩が含まれている場合、得られるクロマトグラムのバックグラウンドが高くなったり、移動相が汚れたりする場合があります。その場合、下記の方法で簡単に脱塩を行い、シーケンス分析することが可能です。

1. サンプルを乾燥させた PVDF 膜を 10%エタノール 10mL 中に浸し、
2~3 分間超音波処理で脱塩を行う。超音波処理ができない場合は、ピンセットで PVDF 膜をつかみ、10%エタノール中ですすぐ。
2. PVDF 膜を 10%エタノール溶液から取り出し、リアクタ中で 10 分間自然乾燥させる。
3. リアクタをセットし、シーケンス分析開始

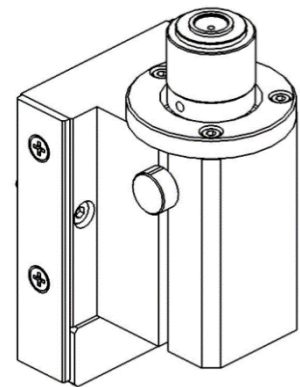


ペプチドの PVDF 膜での分析

通常、ペプチドの溶液サンプルについて、シーケンス分析を行う場合、ポリブレン処理されたガラスファイバディスクをサンプル支持体として分析を行います。PVDF 膜は、ペプチドサンプルの保持力が弱いためタンパク質と同じようにロードを行うだけでは、良い結果が得られないことがあります。PVDF 膜を用いてペプチドのシーケンス分析を行う場合、下記の方法でシーケンス分析することが可能です。

1. PPSQ のリアクタに入るようにカットした PVDF 膜をメタノールに浸す。
2. PVDF 膜をリアクタにセットし、サンプルをロードする。
3. サンプルを乾燥させる。(約 10 分)
4. ポリブレン溶液を調整する。

ポリブレン溶液	20 μ L (4 μ L)
0.1% TFA(Trifluoro acetic acid)	10 μ L (2 μ L)
メタノール	70 μ L (14 μ L)
合計	100 μ L (20 μ L)



注： この溶液は保存できないため、用時調整を行う

(5 分の 1 量 (括弧内) で試して問題ないことを確認しました。)

5. 10 μ L を PVDF 膜にロードし (リアクタ中で) 10 分間自然乾燥させる。
6. リアクタを組み立て、通常のシーケンス分析を行う。
1 サイクル目にポリブレンの影響によるピークが現れることがある。

シーケンス解析の要領

クロマト図が最も重要なデータになります。単一なサンプルが確実にあれば、明確なデータが得られ、正しく自動判別できます。しかし、サンプル量が少なく各サイクルのシグナルが小さいと、自動解析では間違った配列を出力します。必ず、前後のクロマト図を見比べてご自身でご判断下さい。

データを読むときの参考事項

PTH アミノ酸の種類により収率やバックグラウンドの高さが違うため、ピークの高さの絶対値ではなく、前後のサイクルでの変化量が配列を決める鍵です。前のサイクルより増えているピークの増加量=次のサイクルで減っているピークの減少量に注目してください。同じアミノ酸が配列に2つ続いている時、後のもののほうがピークが高くなります。

前のサイクルと比較できないため、特に微量のサンプルでは、1 サイクル目は以降のサイクルより判読が難しい。また、1 サイクル目にはコンタミ由来のピークが出やすい傾向があります。サイクルが進むにつれコンタミ由来のバックグラウンドは減少します。

量に大きく差がある複数のペプチドの混合物を分析したとき、一種類のペプチド断片から得られる PTH アミノ酸の量は各サイクルで大体同じくらいになることから、主なペプチドについて配列を読むことができます。

完全に切断されなかった未反応物が次サイクルに出てくることがあります。

反応効率などにより、シーケンサーで検出される PTH アミノ酸は、実際のサンプル量の 1 / 3 程度になります。さらに、サイクルが進むにつれ PTH アミノ酸の収量は減少します。

Ser、Thr、Arg、Trp、His は他の PTH アミノ酸より回収率が低く、Cys は検出されません。

水酸基などが修飾されたアミノ酸は、分解物しか検出されないことがあります。

N 末アミノ酸の修飾（アセチル化、ピログルタミル化など）されたサンプルはエドマン分解が進行しませんので配列決定はできません。

エドマン分解を繰り返すことでペプチド内部の非特異的な切断が徐々に進行し、分析サイクルが進んでから全体的にバックグラウンドが高くなることがあります（分子量の大きなペプチドで顕著です）。N 末アミノ酸が修飾されているのか、サンプルが少ないのかを見分ける目安になることがあります。

1、2 サイクル目で同じアミノ酸が配列としてあった場合、そのアミノ酸に対しバックグラウンド値が異常に高く設定されてしまうことがあります。

Asn-Gly という配列があり、Asn-Gly で環構造が形成されてしまうと、Asn 以降の分解反応が起こらないという報告があります（新生化学実験講座 1）。

配列によっては分解反応が進みにくく（Pro で顕著）、その配列のサイクル以降、直前のサイクルのピークが残って出てくるようになることがあります。このような場合、サンプル量を増やしても判読できる残基数が改善しないことがあります。

ペプチドシーケンサー 一般ユーザーマニュアル

島津 PPSQ-31A

発行者：岡山大学自然生命科学研究支援センター 分析計測分野

(本マニュアルファイルの無断での再配布は、ご遠慮下さい。)