

1. Native-PAGE活性染色法

泳動ゲル中のでんぷんをアミラーゼが分解するので
数種類のアミラーゼを一斉分析できる方法

ポリアクリルアミドゲル(マルトデキストリン含有)
限外ろ過後の試験溶液+サンプルバッファー



電気泳動 200V 定電圧 (氷水中)



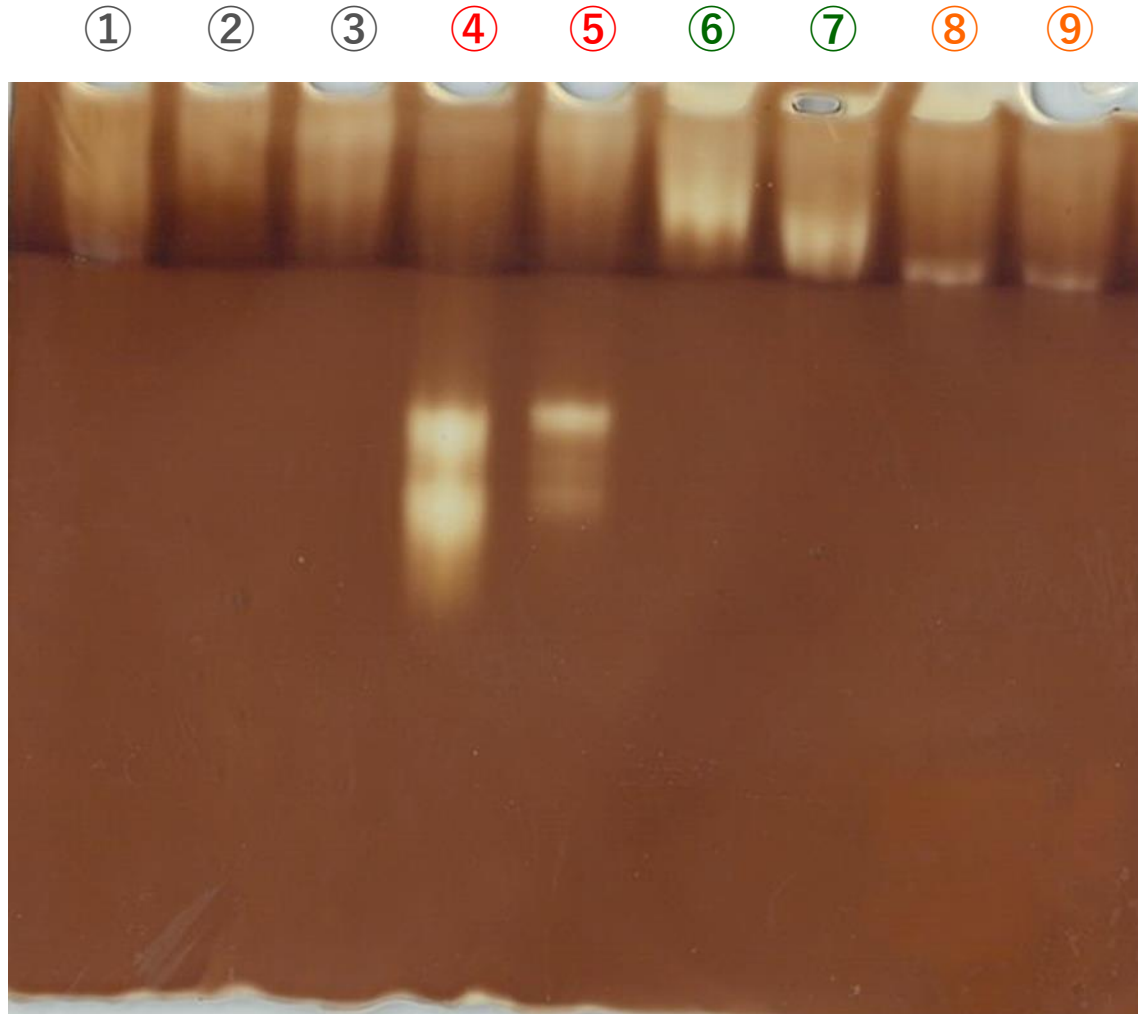
ゲルを反応液に浸して40°Cで保温

反応液：可溶性でんぷんを含む酢酸緩衝液及び
塩化ナトリウム溶液の混液



ヨウ素溶液に変えて発色させる

Native-PAGEの活性染色 ～結果例～



- ① } Mitsubachiアミラーゼのみ
- ② } Mitsubachiアミラーゼのみ
- ③ } Mitsubachiアミラーゼのみ
- ④ } アスペルギルス由来
- ⑤ } アミラーゼ検出
- ⑥ } ゲオバチルス由来
- ⑦ } アミラーゼ検出
- ⑧ } バチルス由来
- ⑨ } アミラーゼ検出

2. LC-qTOF/MS-タンパク質解析ソフトによる確認

蜂蜜をリン酸緩衝液に溶解後、遠心分離で不溶物を除去



限外ろ過膜で糖などの低分子化合物を除去



タンパク分解酵素で断片化



LC-MS/MSで網羅的にペプチドを測定



タンパク質解析ソフトで検出したタンパク質を特定

LC-qTOF/MS-タンパク質解析ソフト ～結果例～

データベース：amylase UniProtKB/TrEMBL
 プロテインパイロット（信頼度99%以上）：unused \geq 2.0, Peptides(95%) \geq 2

ミツバチ由来アミラーゼのみ

| N | Unused | Total | %Cov | %Cov(50) | %Cov(95) | Accession | Name | Species | Peptides(95%) |
|----------|--------------|--------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------------------|---|--------------|---------------|
| 1 | 52.19 | 52.19 | 70.19000053 | 64.8999989 | 61.37999892 | tr Q25BT6 Q25BT6_APIME | Alpha-glucosidase OS=Apis mellifera OX=7460 GN=hbg3 PE=4 SV=1 | APIME | 79 |
| 2 | 28.48 | 28.48 | 49.11000133 | 36.2599987 | 34.799999 | tr Q9U8X6 Q9U8X6_APIME | Glucose oxidase OS=Apis mellifera OX=7460 GN=406081 PE=2 SV=1 | APIME | 43 |
| 3 | 10.92 | 10.92 | 39.7599995 | 30.6300014 | 28.7999988 | tr Q8N0N7 Q8N0N7_APIME | Alpha-amylase OS=Apis mellifera mellifera OX=44477 PE=3 SV=1 | APIME | 11 |

アスペルギルス由来アミラーゼ検出

| N | Unused | Total | %Cov | %Cov(50) | %Cov(95) | Accession | Name | Species | Peptides(95%) |
|----------|--------------|--------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------------------|---|--------------|---------------|
| 1 | 37.43 | 37.43 | 59.96000171 | 54.50000167 | 50.97000003 | sp Q17058 MAL1_APIME | Alpha-glucosidase OS=Apis mellifera OX=7460 PE=1 SV=1 | APIME | 28 |
| 2 | 23.46 | 23.46 | 50.999999 | 45.7800001 | 39.1600013 | tr Q76CT3 Q76CT3_ASPKA | Alpha-amylase OS=Aspergillus kawachii OX=1069201 GN=amyA PE=3 SV=1 | ASPKA | 34 |
| 3 | 8.61 | 8.61 | 18.26000065 | 16.84000045 | 12.37000003 | tr Q9U8X5 Q9U8X5_APIME | Alpha-amylase OS=Apis mellifera OX=7460 GN=406114 PE=2 SV=1 | APIME | 4 |
| 4 | 4.21 | 4.21 | 16.75000042 | 10.40999964 | 8.455000073 | tr Q9U8X6 Q9U8X6_APIME | Glucose oxidase OS=Apis mellifera OX=7460 GN=406081 PE=2 SV=1 | APIME | 5 |

ゲオバチルス由来アミラーゼ検出

| N | Unused | Total | %Cov | %Cov(50) | %Cov(95) | Accession | Name | Species | Peptides(95%) |
|----------|--------------|--------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------------------|---|--------------|---------------|
| 1 | 30.05 | 30.05 | 46.6300011 | 43.3499992 | 41.8900013 | tr O31193 O31193_GEOSE | Alpha amylase OS=Geobacillus stearothermophilus OX=1422 GN=ami PE=3 SV=1 | GEOSE | 19 |
| 2 | 14.56 | 14.56 | 23.10000062 | 20.46000063 | 18.87000054 | tr Q25BT6 Q25BT6_APIME | Alpha-glucosidase OS=Apis mellifera OX=7460 GN=hbg3 PE=4 SV=1 | APIME | 12 |
| 3 | 7.52 | 7.52 | 16.23000056 | 13.39000016 | 11.55999973 | tr Q9U8X5 Q9U8X5_APIME | Alpha-amylase OS=Apis mellifera OX=7460 GN=406114 PE=2 SV=1 | APIME | 4 |