

ゲル内消化プロトコル

1) 電気泳動後のゲルを milli-Q 水で数回タップ中で洗浄する

2) ゲルをピッキングする。(メス、カッター等で)

3) ゲル片をカッター等で細かく切り刻んでおく

- * ゲルを切る取る時の注意点ですが、実際には、ゴム手袋、マスク、髪の毛のネットをかぶります。また、メスは100%メタノールで毎回拭きながら行います。また、落下ケラチンも大敵なので、できれば、クリーンベンチで行うことが望ましいです。

*

4) 脱色

銀染色の場合

400uL の milli-Q 水を加えた後、上清を取り除きゲル片を洗浄 (2 回ほど行う)

CBB染色の場合

400uL の脱色液 (50%ACN、25mM 重炭酸アンモニウム) を加え室温で 10 分間振とう
脱色液をピペットで取り除く ゲル片をすわないように注意
ゲル片から青色が消えるまで繰り返す。色がおちない場合は ACN 濃度を 80% くらいに。

5) 脱水

ゲル片 (tube) に 200uL の ACN をいれてゲル片を収縮させた後、遠心してゲル片を沈殿させた後、沈殿物のゲル片を遠心エバポレーターにて ACN を取り除く。

6) 還元アルキル化

Tube に 100ul の還元液 (10mM DTT, 25mM 重炭酸アンモニウム) を入れ 56°C で 1 時間反応させる。

還元液を取り除き 100ul の 25mM 重炭酸アンモニウムをいれ室温で 10 分間振とう (DTT の除去のため)

100ul のアルキル化液 (55mM ヨードアセトアミド、25mM 重炭酸アンモニウム) を入れ、遮光し室温で 45 分間振とうすることにより SH 基をアルキル化して空気酸化による S—S 結合の再形成を防ぐ。

液を取り除き、100ul の洗浄バッファー (25mM 重炭酸アンモニウム) を入れて室温 10 分間

振とう。

還元アルキル化を行わない場合、脱水、還元アルキル化の工程を省略。

*この方法で還元アルキル化をした場合、システインがカルボキシアミドメチル化されるのでその情報を MASCOT サーチの際に、Fixed modification で選択する。

7) ゲル内消化

ゲル片 (tube) に 400uL の脱水液 (50%ACN、25mM 重炭酸アンモニウム) を加え室温で 10 分間振とう。2~3 回繰り返してゲルを脱水する。

200uL の ACN をいれてゲル片を収縮させ、遠心してゲル片を沈殿させた後、ピペットで ACN を取り除き、沈殿物のゲル片を遠心エバポレーターにて残存する ACN を取り除く。

枯湯したゲル片にトリプシン溶液 (10ng/ul、25mM 重炭酸アンモニウム) を 15~80ul 添加して 37°C で一晩反応させる。

8) 抽出

消化したゲル片に 50%ACN/5%TFA 溶液 (MALDI の場合) (ESI-MS の場合は 50%ACN/5%HCOOH 溶液) 100ul 添加して vortex した後、5000rpm で遠心して、ゲル片を沈殿させ、上清を収集した。この操作を 2 回ほど繰り返した後、最後に 200ulACN で溶出させ上清を集める。得られた上清 (約 400ul) が約 40ul 位になるよう遠心エバポレーターで濃縮して得られた溶液をサンプルとする。

その他

プロトコール全体として、ゲル片を吸い込まないように注意してください。

ネガティブコントロール : スポットの無い部分のゲルを切り出して、同様の操作を行ってください

使用した溶液

洗浄用バッファー (25 mM 重炭酸アンモニウム)

1 M 重炭酸アンモニウム 75ul
水 3ml

還元液 10 mM DTT, 25 mM 重炭酸アンモニウム

ストック溶液

1 M DTT(771mg を 5 ml の水に溶かす) (-20度保存)
1 M 重炭酸アンモニウム (7.9g を 100ml の水に溶かす)

1 M DTT 10ul
1 M 重炭酸アンモニウム 25ul
水 965ul で希釈
使用直前に混合する。

アルキル化溶液 (55 mM ヨードアセトアミド、25 mM 重炭酸アンモニウム)

ヨードアセトアミド 10mg
洗浄用バッファー (25 mM 重炭酸アンモニウム) 1 ml で溶かす。
遮光して冷蔵保存。

脱水液

100%ACN 2ml
1 M 重炭酸アンモニウム 100ul
水 1.9ml

トリプシン溶液 (10ng/ul、25mM 重炭酸アンモニウム)

トリプシン GOLD (100ug) を 50 mM 酢酸 1 mL に溶かす。
溶解したトリプシンは適当に分注して-80℃にて保存。

トリプシン溶液 (100ug/ml) 20ul
50 mM 重炭酸アンモニウム 180ul で希釈 使用直前に混合し、氷上で保存。

使用した試薬 (HPLCグレードかそれ以上のグレードものをご使用ください。)

水 mili-Q

アセトニトリル(ACN) merck 社製

蟻酸 (HCOOH) Fluka 社製

重炭酸アンモニウム Wako 社製

ジチオスレイトール(DTT) Wako 社製 SH 基酸化防止用 045-08974

ヨーソアセトアミド(IAA) Wako 社製 生化学用 095-02151

トリプシン Promega 社製

(modified, Mass Spectrometry grade: Trypsin Gold V528A Gold)

酢酸 Wako 社製

TFA (Trifluoroacetic acid) sigma 社製 spectrophotometric grade

* 参考図書

生命科学のための最新マスペクトロメトリー 講談社

タンパク質実験ノート 羊土社

プロテオミクス実験プロトコール 秀潤社

上記プロトコールに関するお問い合わせは

ブルカー・ダルトニクス株式会社

アプリケーション・エンジニア 山田 孝之

e-mail: takayuki.yamada@bruker-daltonics.jp

までお願い致します。