

MALDI TOF MS 解析用サンプル調製

試薬の準備

- 1M 重炭酸アンモニウム (冷暗所で1~2ヶ月保存可)
重炭酸アンモニウム 8 g を純水 100 ml に溶解する。
- 還元処理液 (用事調製) (10 mM DTT)
DTT 1.5 mg を 100 mM 重炭酸アンモニウム 1ml に溶解する。
- アルキル化処理液 (用事調製)
ヨードアセトアミド 10 mg を 100 mM 重炭酸アンモニウム 1 ml に溶解する。
- 脱色液 A (用事調製)
メタノール (HPLC グレード) と 100 mM 重炭酸アンモニウムを等量混合する。
- 脱色液 B (用事調製)
アセトニトリル (HPLC グレード) と 100 mM 重炭酸アンモニウムを等量混合する。
- トリプシン保存液 <分注して凍結保存> (100 μ g/ml)
トリプシン(Promega 社: Trypsin Gold, Mass Spec Grade(V5280)) 20 μ g を 50 mM 酢酸 (2.86 μ g/ml) 200 μ l で溶解する。
- トリプシン消化液 (用事調製)
トリプシン保存液をトリプシン消化緩衝液 (30%(v/v)アセトニトリル、50mM 重炭酸アンモニウム)で 10 倍に希釈する。
- A 溶媒 (2%アセトニトリル + 0.1%TFA)
- 0.1 % TFA

ゲル内消化

<CBB, Sypro Ruby 染色した場合>

酢酸が残っている場合は純水で 30min 振とう。

↓

染色した SDS-PAGE あるいは 2D Gel から目的分子量のゲルを切り出し、1~2mm 程度の小片にし、チューブに入れる。

↓

還元処理液 100 μ l/mm³ を加え、56°C で 30 min 1 回

↓

液を除去し、アルキル化処理液 100 μ l/mm³ を加えて遮光し RT で 30 min 振とう 1 回

↓

液を除去し、脱色液 A を 100 μ l/mm³ を加え 15 min 振とう 2 回繰り返す。

↓

液を除去し、脱色液 B を 100 μ l/mm³ を加え 10min 振とう 3 回繰り返す。

↓

液を除去し、アセトニトリル(HPLC グレード)を 100 μ l/mm³ を加え 5min 振とう 1 回

↓

Air Dry



トリプシン消化液 $12.5 \mu\text{l}/\text{mm}^3$ を加え、氷上でゲルを膨潤させる。トリプシン消化緩衝液をさらに $12.5 \mu\text{l}/\text{mm}^3$ 加え、 30°C の気相インキュベーターで **8~16h** 静置。



液を回収し、50% アセトニトリル+ 1% TFA を $30 \mu\text{l}$ 加えて、ソニケーション 10 min かける。



液を回収し、Speed Vac で $2\sim 3 \mu\text{l}$ まで濃縮し、チップで脱塩する場合は 0.1% TFA $10 \mu\text{l}$ で懸濁する。Nano-LC をかける場合は $40 \mu\text{l}$ の A 溶媒 (2%アセトニトリル+0.1%TFA) で懸濁する。

MALDI TOF MS 解析用サンプル調製

〈SDS-PAGE 前に還元処理とアルキル化処理を行う方法〉

試薬の準備

- 1M 重炭酸アンモニウム (冷暗所で1~2ヶ月保存可)
重炭酸アンモニウム 8 g を純水 100 ml に溶解する。
- 還元処理液 (-80°C保存) (1M DTT in DW)
- アルキル化処理液
50%アクリルアミド
- 脱色液 A (用事調製) (30%ACN-0.1M NH₄HCO₃)

アセトニトリル	1.5 ml
1M 重炭酸アンモニウム	0.5 ml
DW	3 ml
	5 ml
- 脱色液 B (用事調製) (50%ACN-0.1M NH₄HCO₃)

アセトニトリル	2.5 ml
1M 重炭酸アンモニウム	0.5 ml
DW	2 ml
	5 ml
- トリプシン保存液 〈分注して凍結保存〉 (100 μg/ml)
トリプシン(Promega 社: Trypsin Gold, Mass Spec Grade(V5280)) 20 μg を 50 mM 酢酸
200 μl で溶解する。
- トリプシン消化液 (用事調製)
トリプシン保存液をトリプシン消化緩衝液 (30%(v/v)アセトニトリル、50mM 重炭酸アンモニウム)で 10 倍に希釈する。
- A 溶媒 (2%アセトニトリル + 0.1%TFA)
- 0.1 % TFA

SDS-PAGE 前のサンプル処理の方法

Sample にメルカプトエタノール抜きの 6×SB を加える。

Sample 30 μl + 6×SB 5 μl

↓

1M DTT を final 50mM になるように(1/20 量)加え、37°C 30min 静置。

↓

チューブを冷まし、50% アクリルアミド(bisなしの Acrylamide monomer を使用する)を 1/10 量加えて電気泳動する。この時 Sample は Boil しないこと！！

↓

酢酸のないっていい染色液でゲルを染色し、バンドを切り出し、1 mm ぐらいに切る。この時のゲルの体積を覚えておくこと！！

ゲル内消化

〈CBB 染色した場合〉

脱色液 A を $100 \mu\text{l}/\text{mm}^3$ を加え 15 min 振とう。CBB が抜けるまで 2~4 回繰り返す。

↓

液を除去し、脱色液 B を $100 \mu\text{l}/\text{mm}^3$ を加え 15min 振とう 3 回繰り返す。

↓

液を除去し、アセトニトリル(HPLC グレード)を $100 \mu\text{l}/\text{mm}^3$ を加え 5min 振とう 1 回

↓

Air Dry

↓

トリプシン消化液 $12.5 \mu\text{l}/\text{mm}^3$ を加え、氷上でゲルを膨潤させる。トリプシン消化緩衝液をさらに $12.5 \mu\text{l}/\text{mm}^3$ 加え、 30°C の気相インキュベーターで 8~16h 静置。

↓

液を回収し、50% アセトニトリル+ 1% TFA を $30 \mu\text{l}$ 加えて、ソニケーション 10 min かける。

↓

液を回収し、Speed Vac で $2\sim 3 \mu\text{l}$ まで濃縮し、チップで脱塩する場合は 0.1%TFA $10 \mu\text{l}$ で懸濁する。Nano-LC をかける場合は $40 \mu\text{l}$ の A 溶媒 (2%アセトニトリル+0.1%TFA) で懸濁する。

OMIX(ZIP TIP の代替品)での精製

〈手順〉

50% アセトニトリル/0.1% TFA で平衡化



0.1% TFA で平衡化



Sample を吸着



0.1% TFA で平衡化



50% アセトニトリル/0.1%TFA で溶出

〈用意するもの〉

- ・ 溶出用に 50% アセトニトリル/0.1%TFA を 3 μ l ずつ分注した 1.5ml チューブ
 - ・ 1.5ml チューブを 4 本用意してそれぞれに
- ① 50%アセトニトリル/0.1%TFA (平衡化用) 200 μ l
 - ② 0.1% TFA (平衡化用) 1 ml
 - ③ 0.1% TFA (Wash 用) 1 ml
 - ④ Wash 液排液用チューブ

〈方法〉

ピペットの目盛りを 10 μ l にあわせてチップをつける。



①のチューブでピペッティング 3~5 回 (この時完全に液は出し切らないこと!! レジンがすぐに乾燥してしまう。)



②のチューブで同様にピペッティング 3~5 回



サンプルでも同様に 10 回程度ピペッティング



③のチューブから液を吸って④のチューブに捨てる。

これを 5~6 回繰り返す。



最後は全部出し切る。



溶出用チューブで数回ピペッティングしてペプチドを溶出する。

最後は出し切る。

マトリックス溶液の調製

- 10 mg / ml CHCA (α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸) in 50% アセトニトリル / 0.1% TFA

〈方法〉

10 mg の CHCA を 1.5ml チューブにとり、500 μ l のアセトニトリル、499 μ l のミリ Q 水、1 μ l のトリフルオロ酢酸を加えてボルテックスし、溶解する。遮光して4℃ストック。

スポットの仕方

〈方法〉

プレート上に脱塩済みのサンプルを 0.5~1 μ l のせ、乾く前に等量のマトリックスを加える。風乾する。