

ThermoFisher
SCIENTIFIC

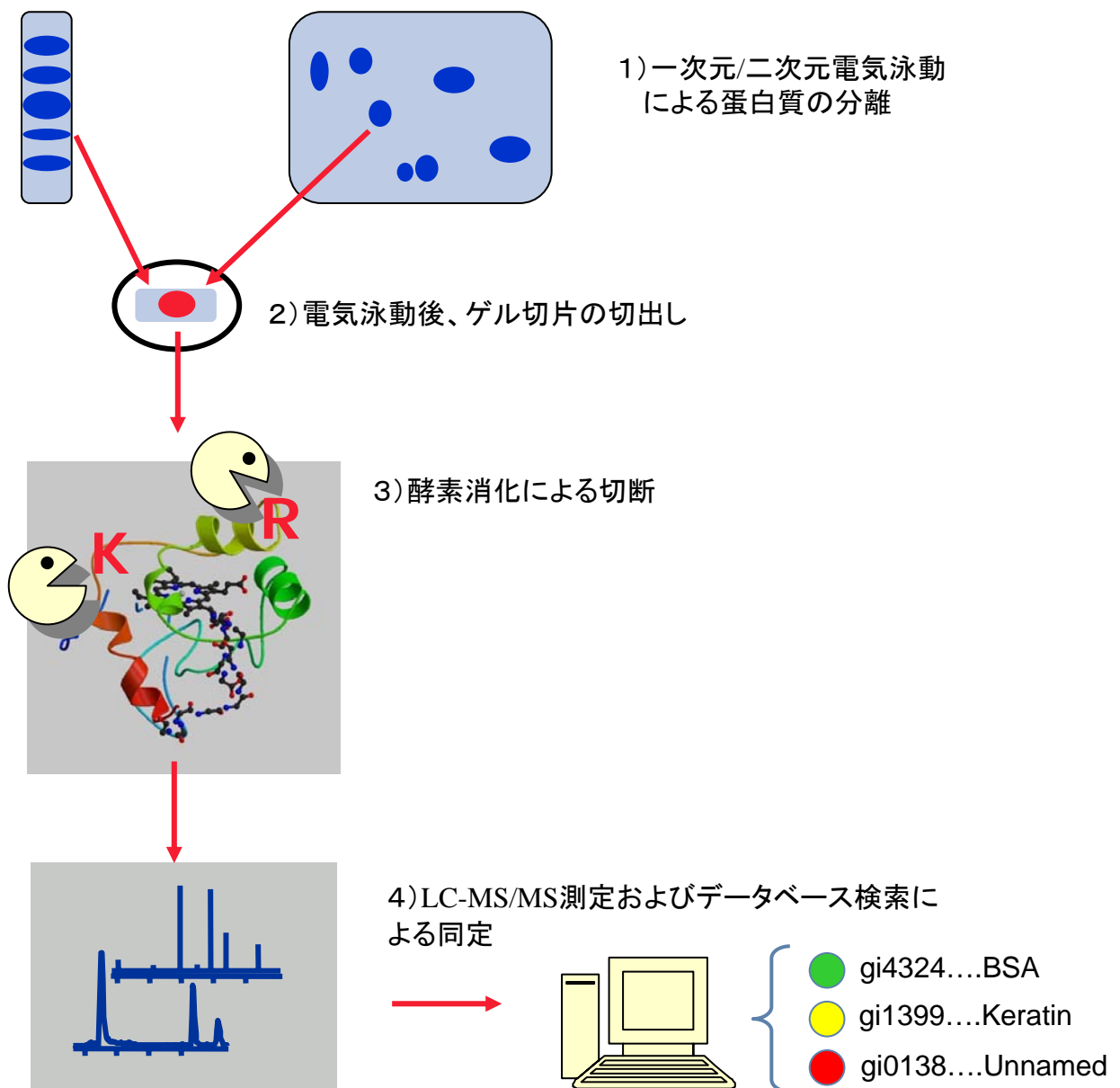
The world leader in serving science

質量分析装置による プロテオーム解析

ゲル内消化プロトコル

プロテオーム解析 ～ゲル内消化プロトコル～

当プロトコルでは、電気泳動をベースに質量分析を用いたプロテオーム解析のためのサンプル調整について、実験方法から使用している溶媒などについてご紹介したものです。電気泳動によって分離したタンパク質をゲル内にて酵素消化を行い、ペプチド断片にしたものをLC-MS/MS測定によって測定・同定を目的としたものです。



プロテオーム解析 ～ゲル内消化プロトコル～

1) 電気泳動後のゲルを純水で複数回、タッパウェア中にて洗浄を行う

2) ゲルからスポットの切り出す

ゲルから染色されたスポットを切り出します。

- * ゲルを切り取る際、ゴム手袋、マスク、頭髮ネットなどを着用して頂くと、ケラチンのコンタミを防止することができます。特に高感度測定の際には、重要になります。落下ケラチンなども高感度測定には妨害物質になりますので、クリーンベンチなどを使用して頂くと効果的に回避できます。染色されていないゲル部分は極力切り取らないようにし、染色の濃い部分のみを切り取る様にして、サイズとしては1mm四方を目安にしてください。

3) 染色剤をゲル片から脱色する

ゲル片をチューブに移し、300uLの脱色液#1 (25mM重炭酸アンモニウム/50%MeOH)を加え、40度で30min、インキュベートします。その後、軽く遠心してゲル片を沈殿させてから脱色液#1をピペットで取り除きます。さらに300uLの脱色液#2 (25mM重炭酸アンモニウム/50%アセトニトリル)を加えて40度にて30minインキュベートした後、脱色液#2をピペットで取り除きます。この操作の後、25mM重炭酸アンモニウムを加えて2回洗浄します。

4) ゲル片を脱水する

ゲル片の入ったチューブに200uLのアセトニトリルを加えてゲル片を収縮(ゲル片が白濁)させた後、アセトニトリルをピペットで取り除きます。さらに余分なアセトニトリルを取り除くため、SpeedVacに5分程度かけてください。

- * 還元アルキル化を行うと、サンプルのロスが生じて感度を低下させてしまうケースもあります。極微量サンプルの同定には、還元アルキル化を行わずに測定することをお勧めします。

5) 還元アルキル化を行う

チューブに50uLの還元液(10mM DTT、25mM重炭酸アンモニウム)を加えて、56°Cで45分間インキュベートする。インキュベートの際、液の蒸発を防ぐために、チューブをパラフィルムでシールしてください。

チューブを遠心してゲル片を沈殿させてから、ピペットで還元液を取り除き、50uLの洗浄液(25mM重炭酸アンモニウム)を加えて、5分間振とうし、余分なDTTの除去を行います。

プロテオーム解析 ～ゲル内消化プロトコル～

50uL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)を調整します。* 調整後は遮光して保存してください。これをチューブに加えて遮光して室温にて30分間振とうすることにより、SH基のアルキル化を行います。

チューブを遠心してゲル片を沈殿させてから、ピペットでアルキル化液を取り除き、500uLの洗浄液(25mM重炭酸アンモニウム)を加えて、ゲル片を洗浄し、再びチューブを遠心してからピペットで洗浄液を取り除きます。この洗浄を2回繰り返します。

チューブに200uLのアセトニトリルを加えてゲル片を完全に脱水させます。遠心してゲル片を沈殿後、ピペットでアセトニトリルを取り除き、さらに余分なアセトニトリルを取り除くためにSpeedVacを5分程度行います。

- * この方法で還元アルキル化を行った場合、システイン側鎖がカルバミドメチル化されるため、データベース検索の際には「Carbamidomethyl (C)」を選択してください。

6) ゲル内消化

トリプシン溶液(25mM重炭酸アンモニウム溶液)を調整し、これの適量(E:S = 1:20~30)を脱水したゲル片に加えて、Vortexなどを使用して十分にゲルに浸透させます。(白濁色の乾燥ゲル片に溶液が浸透すると、ゲル片の色が透明に変わります。5~10min程度が目安)

チューブを遠心してピペットにて余分なトリプシン溶液を取り除き、ゲル片が浸かる程度(~50uL)の25mM重炭酸アンモニウムを加えて37°Cで一晩反応させます。反応させている間、液の蒸発を防ぐためにチューブをパラフィルムでシールしてください。

7) 抽出

消化したゲル片に抽出液(50%ACN / 0.1%TFA)を50uL加えて、超音波処理を10分間行いペプチド断片の溶出を行います。

チューブを遠心して、ピペットにて溶液を新しいチューブに回収します。

再度ゲル片を同じ操作で、100%アセトニトリル/0.1%TFA、100%H₂O/0.1%TFAそれぞれにて処理・回収を行い、サンプル溶液とします。

SpeedVacでサンプル溶液を適量(LCに注入しやすい程度)まで濃縮をしてください。

- * サンプル溶液の濃縮の際、完全に乾燥しないように注意してください。一度乾燥させしまったサンプルはバッファーに再溶解できなくなるケースがあります。

プロテオーム解析 ～試薬調整方法～

試薬調整方法

[ストック溶液]

- ・アセトニトリル(LC-MSグレード以上)
- ・メタノール(LC-MSグレード以上)
- ・純水(LC-MSグレード以上)
- ・100mM 重炭酸アンモニウム溶液pH8.0(冷蔵4°C保存)
- ・1M DDT(771mgのDDTを5mLの純水で溶解、冷凍-20°C保存)
- ・Trypsin溶液(100ng/uL、10uL-0.05%酢酸溶液。冷凍-80°C保存)

[使用時調整]

- ・脱色液#1: 25mM重炭酸アンモニウム/50%MeOH
- ・脱色液#2: 25mM重炭酸アンモニウム/50%アセトニトリル
- ・還元液: 10mM DTT / 25mM重炭酸アンモニウム
1M DTT 10uL
1M重炭酸アンモニウム 25uL
純水 965uL
* 使用の直前に混和(還元液)
- ・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
10mgのヨードアセトアミドを洗浄液1mLで溶解する。
* 溶解は、使用の直前に行う(アルキル化液)。
- ・Trypsin溶液: 25mM重炭酸アンモニウムにて10倍に希釈(10ng/uL)
* 使用直前に調整し、氷上保存が望ましい
- ・抽出液: 0.1%TFA/100%H₂O
0.1%TFA/50%アセトニトリル
0.1%TFA/100%アセトニトリル

プロテオーム解析 ～使用試薬一覧～

1. 重炭酸アンモニウム (Ammonium bicarbonate)
SIGMA社製 (parts#: **A6141**)
7.9gを100mLのミリQ水に溶解。(1M、pH7.5～8.5)
2. **DTT**: ジチオトレイトール (Dithiothreitol)
WAKO社製 (parts#: **045-08974**、SH基酸化防止)
1mgを143uLのミリQ水に溶解、用時調整。(45mM)
3. **IAA**: ヨードアセトアミド (Iodoacetamide)
Wako社製 (parts#: **095-02151**、生化学用)
1mgを54uLのミリQ水に溶解、使用直前に調整。(100mM)
4. **Trypsin**: タンパク質消化酵素
Promega社製 (parts#: **V5280**、Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade)
0.05%酢酸にて溶解。(100ng/uL、Stock solution)
Trypsin溶液をチューブに小分けして冷凍-80°C保存。
5. **TFA**: トリフルオロ酢酸 (Trifluoroacetic acid)
関東化学 (parts#: 40578-1B、HPLC用、1mL/5アンプル)
SIGMA社製 (parts#: **T-6508**、1mL/10アンプル)
6. アセトニトリル (Acetonitril)
関東化学 (parts#: **01033-79**、LC/MS用、1L)
メルク (parts#: **1.00029.1000**、Hyper Grade、1L)
7. ギ酸 (Formic acid)
関東化学 (parts#: **16233-96**、HPLC用、1mL/5アンプル)
和光純薬 (parts#: **018-20061**、LC/MS用、50mL)
8. 酢酸 (Acetic acid)
関東化学 (parts#: **01021-96**、HPLC用、1mL/5アンプル)
和光純薬 (parts#: **067-04531**、LC/MS用、50mL)
9. メタノール (Methanol)
関東化学 (parts#: **25185-79**、LC/MS用、1L)

上記一覧は弊社にて実際に使用したものを記載したもので、反応を保証するものではありませんのでご了承ください