

ThermoFisher
SCIENTIFIC

The world leader in serving science

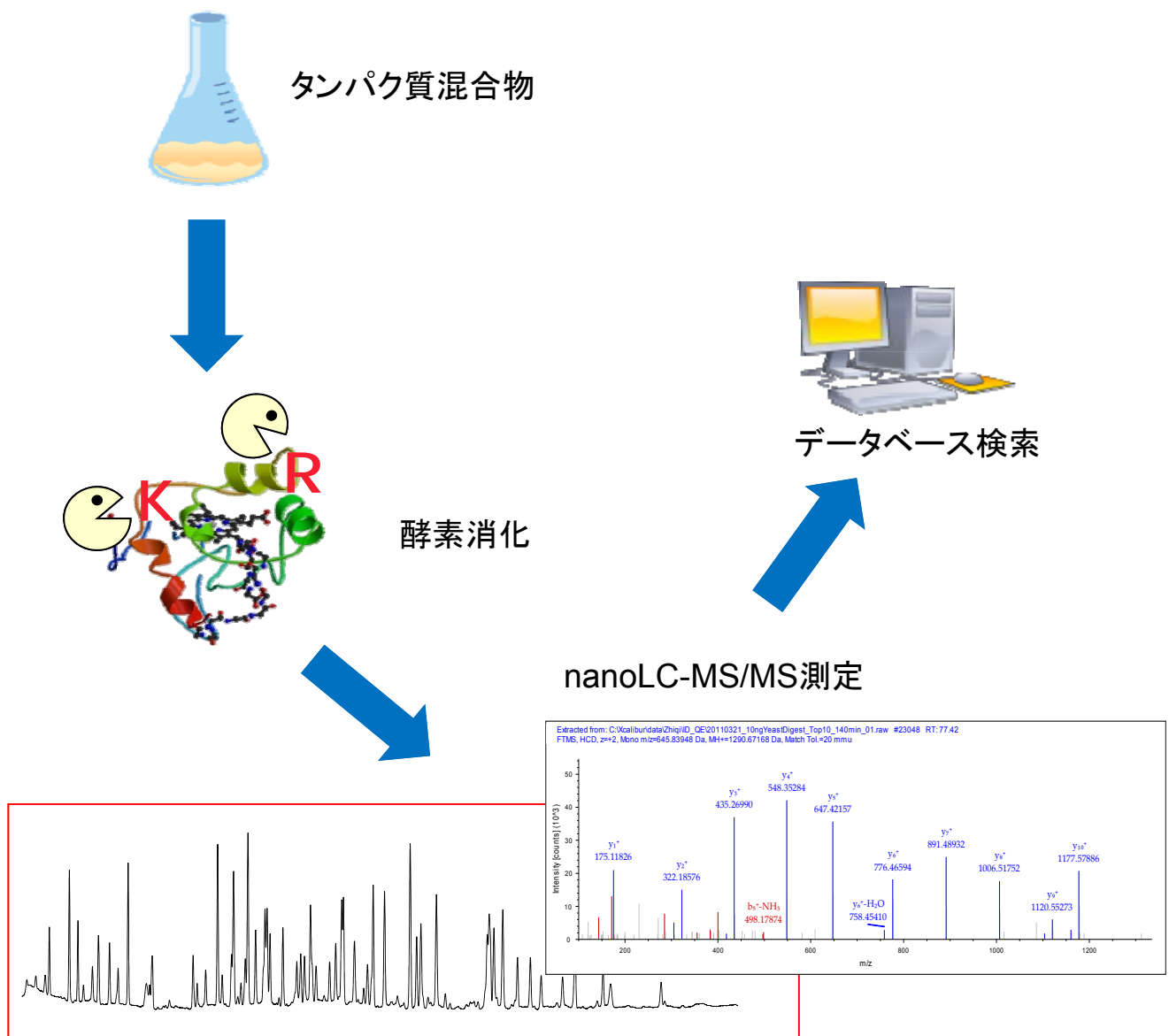
質量分析装置によるショットガン
プロテオーム解析のための前処理

溶液内酵素消化プロトコル

プロテオーム解析 ～溶液内消化プロトコル～

- 当プロトコルは、質量分析を用いたショットガンプロテオーム解析のためのサンプル調整についてご紹介したものです。混合タンパク質を溶液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。
- 実験に適したタンパク質の抽出法については以下のサイトを御参考下さい。

<http://www.thermoscientific.jp/bid/pierce/>



本プロトコルで使用する試薬



製品コード	製品名	包装
90034	Iodoacetamide	24 x 9.3 mg
100uLの水に溶解すると500mMとなります。		



製品コード	製品名	包装
20291	No-Weight DTT	48 x 7.7 mg
100uLの水に溶解すると500mMとなります。		



製品コード	製品名	包装
90057	Trypsin Protease, MS Grade	5 x 20 ug



製品コード	製品名	包装
84850	C18 Spin Tips	96 本入
20 μ Lあたり10 μ gまで処理できます。		



製品コード	製品名	包装
89870	C18 Spin Columns	25 本入
10 ng - 30 μ g; 10 - 150 μ Lまで処理できます。		



製品コード	製品コード	包装
TS-28904	Trifluoroacetic Acid (TFA), Sequanal Grade	10 x 1 mL

試薬の準備

還元アルキル化・酵素消化処理

- 重炭酸アンモニウム
10mgの重炭酸アンモニウムをH₂Oの2.5mLで溶解すると50mM (pH8.0)。
冷蔵庫(4°C)で保存して約2カ月使用可能。
- 還元剤: No-Weight DTT (7.7mg)
100uLの水に溶解すると500mMとなります。
冷凍庫(-20°C)で保存して下さい。小分けにすると融解に時間がかかりません。
- アルキル化剤: Iodoacetamide (9.3mg)
100uLの水に溶解すると500mMとなります。
! アルキル化剤の溶液はストック出来ませんので、適時調整が必要です。
! 調整後は暗中で保存し、使いきりにして下さい。
- 酵素: Trypsin Protease, MS grade (20ug)
50mM酢酸20uLで溶解(1ug/uL)、5uLに小分けして冷凍庫(-20°C)で約1年使用可能。
小分けしたTrypsin溶液5uLに45uL純水で希釈(100ng/uL)、冷凍庫(-20°C)で約二カ月使用可能。

ペプチド精製処理

- Activation solution
10mLの水に、同じく10mLのメタノールを加えます。
50% メタノール 水溶液。
- Equilibration & Wash solution
9.5mLの水に、0.5mLのアセトニトリルと0.05mLのTFAを加えます。
5% アセトニトリル・0.5% TFA 水溶液。
- Elution solution
0.6mLの水に、1.4mLのアセトニトリルを加えます。
70% アセトニトリル 水溶液

還元アルキル化・トリプシン消化

■ 還元アルキル化

1. サンプルチューブに、0.025～10 ugのタンパク質を50mM 重炭酸アンモニウム (pH8.0) 25.5uLに溶解した後、1.5uLの還元剤溶液を加えます。
2. サンプルチューブを95°Cで5分間、インキュベーションをします。

*溶液が蒸発して無くならないように、パラフィルムを巻いて下さい。
インキュベーションを行っている間にアルキル化剤の準備をします。
アルキル化剤は調製後、遮光して保存して下さい。

3. インキュベーション後、サンプルチューブを室温まで冷やした後、3 uLのアルキル化剤溶液を加えて、室温にて20分間、インキュベーションをします。
*本手法にて還元アルキル化を行った際、測定後のデータベース検索条件では、CysにCarbamidemethylをFix(Static)で考慮して下さい。

■ トリプシン消化

1. 冷凍保存したトリプシン溶液(100ng/uL)を、総タンパク質量に対して1/50重量となるように加えます(総タンパク質量が10ugのとき1uLのトリプシン溶液)。
サンプルチューブを37°Cで3時間、インキュベーションをします。

*総タンパク質の濃度が薄いときには、冷凍保存したトリプシン溶液を、50mM 重炭酸アンモニウム水溶液で希釈をしてお使い下さい。

2. さらにサンプルチューブに同量のトリプシン溶液を加えます。
サンプルチューブを30°Cで一晩、インキュベーションをします。

*溶液が蒸発して無くならないように、パラフィルムを巻いて下さい。

3. インキュベーション終了後TFA(ファイナル5%)を加えて反応を停止します。

ペプチド精製処理 (C18 Spin Columns)

- サンプル溶液の準備
 1. サンプル溶液は10-150uLで処理を行います。溶液の液量が足りないときには、Equilibration & Wash solution (5% アセトニトリル・0.5% TFA)を加えます。
- カラムの準備
 1. カラム上下にあるキャップを外し、カラムを1.5 mLチューブに入れます。
 2. カラムに200uLのActivation solutionを加えます。
 3. 1500 x g、一分間遠心機で溶媒を除きます。
 4. 2.-3.を繰り返します。
 5. カラムに200uLのEquilibration & Wash solutionを加え1500 x g、一分間遠心機で溶媒を除きます。
 6. 5.を繰り返します。
- サンプルのロード
 1. サンプル溶液をカラムに加えます。
 2. カラムを1.5 mLチューブに入れて、1500 x g、一分間遠心機で溶媒を除きます。
 3. チューブの溶媒を再びカラムへ戻し、1.-2.を繰り返します。
- 洗浄
 1. カラムに200uLのEquilibration & Wash solutionを加え1500 x g、一分間遠心機で溶媒を除きます。これを繰り返します。
- 溶出
 1. カラムに20uLのElution solutionを加え1500 x g、一分間遠心機で溶媒を除きます。これを繰り返します。
 2. SpeedVacでアセトニトリルを飛ばします。

*この際、熱をかけずに、また乾燥させないよう濃縮してください。
乾燥させた場合にはEquilibration & Wash solutionで再溶解して下さい。

サンプル溶液はそのまま質量分析の測定に使用します。