

# Agilent in-gel digestion kitを用いるタンパク質酵素消化法

(部品番号5188-2749)

CBB/蛍光染色  
銀染色

1D Gel



カッターでゲル片を  
1X1~2X2 mm大き  
さに切り、チューブに入れる

200 ul脱色液①を入れ  
37°Cで30分振とうする

200 ul脱色液②を入れ  
で5分振とうする (x2)

200 ul脱色液を入れ  
37°Cで30分振とうする

\* 脱染色の具合で回数を増やす。

1 ml Milli-Qを入れ  
で5分振とうする (x2)

脱色液を捨てる

脱色液を捨てる

30 ul還元液を加える

30 ul修飾液を加える

200 ul脱色液①を入れ  
37°Cで15分振とうする

還元液を捨てる

修飾液を捨てる

液を捨てる

60°C10分保温

暗所室温1時間保温

ゲル片を洗浄する。2回

50 ul ACNを加える

10 ul 活性化トリプシン液  
を入れ室温15分保温

ACNを捨てる

スピンドウン

消化液を新しいチューブ  
に移し、1 ulの1%ギ酸を加  
え反応を止める。

室温15分保温

乾燥させる

\* 必要なら25ulまたは50ulの  
0.1% ギ酸を加え5分間保  
温 回収し上記の消化液に  
加える。

更に 25ul(2Dスポット) 或いは  
50 ul(1Dバンド) 消化液を入れ  
37°C、4時間 或いは 30°C12時間  
保温する

\* 以下行うことが望ましいが、  
行わなくても分析可

SpeedVacで消化液を乾燥  
し、更に100 ulのMilliQ水  
を加え、もう一度乾燥させる。  
消化物を10~20 ulの  
0.1% ギ酸で溶かし、不溶  
物がないことを確認して  
LC/MS分析に供する。

**注意: 実験中手袋、マスクの使用が望ましい。**

## 試薬:

脱色液: ①CBB染色、蛍光染色の場合

20 ml acetonitrile (ACN)と20 ml MilliQ waterと混合し、50%ACN液を作り、そこに80 mg  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ を溶かし、脱色液を作製する。

: ②銀染色 (LCMS用)、ネガティブ染色の場合

100 mM チオ硫酸ナトリウム( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )と50 mM 炭酸ナトリウム( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )を作製する。

\* 和光純薬のMass Spectrometry用銀染色キットを購入すると、脱色液も付属しています。

消化液 (25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ): 10mg  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ を5 ml MilliQ waterに溶かす

還元液 (50 mM): 3.3 ul TCEPを30 ul消化液に加える。使用前に調製する。

修飾液 (alkylation液 100 mM): 7 mg iodoacetamide (IAA)を350 ul消化液に溶かす。使用前に調製する

トリプシン:

保存液: 粉末を消化液で1 ug/ulになるように溶かす。数ul/tubeに小分けし、 $-20^\circ\text{C}$ 1年保存可

中間液: 保存液を消化液で10倍希釈する。

活性化トリプシン液 (10ng/ul): 中間液を消化液で10倍希釈する。氷上で保存。使用前に調製する

詳細はキットの使用説明を参照してください。

## 液中消化:

還元用溶液: 8 M 尿素/0.5 M Tris-HCl (pH 8.5)/25 mM EDTA

還元液: 40 mg/mL DTT in 還元用溶液

修飾液: 40 mg/mL IAA in 還元用溶液

## トリプシン:

保存液: 粉末を消化液で1 ug/uLになるように溶かす。数uL/tubeに小分けし、 $-20^{\circ}\text{C}$ 1年保存可

タンパク質を還元用溶液、13 uLに溶解する。

(試料が溶液のときは上記の濃度になるように試薬を加える。)

↓

チューブ内の空気を窒素で置換 (なければそのままOK)

↓

DTT溶液を2 uL加え、ボルテックスで軽く混合し、 $37^{\circ}\text{C}$ で90分保温

↓

IAA溶液を5 uL加え、ボルテックスで軽く混合し、暗所で30分保温  
(pH測定: pH 8)

↓

Milli-Qで2M 尿素まで希釈

↓

酵素溶液をE/S=1/50になるように加える。

↓

$37^{\circ}\text{C}$ で一晩反応

↓

消化物