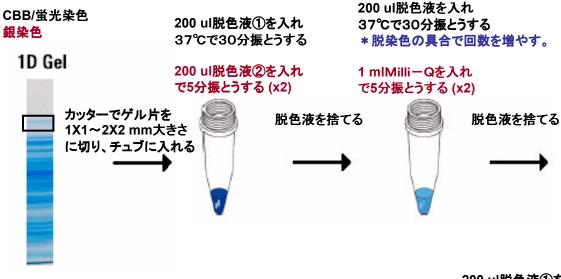
Agilent in-gel digestion kitを用いるタンパク質酵素消化法

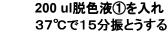
(部品番号5188-2749)







30 ul修飾液を加える





60℃10分保温

暗所室温1時間保温

ゲル片を洗浄する。2回

50 ulACNを加える



室温15分保温

10 ul活性化トリプシン液 を入れ室温15分保温



更に 25ul(2Dスポット)或いは 50 ul(1Dバンド)消化液を入れ 37℃、4時間或いは30℃12時間 保温する

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。

液を捨てる

- * 必要なら25uLまたは50u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。
- * 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。

ACNを捨てる

乾燥させる

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 NH4HCO3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(Na2S2O3)と50 mM 炭酸ナトリウム(Na2CO3)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 NH4HCO3): 10mg NH4HCO3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/ullになるように溶かす。数ul/tubeに小分けし、-20℃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/ullになるように溶かす。数ul/tubeに小分けし、-20℃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 (なければそのままでOK)
↓
DTT溶液を2 uL加え、ボルテックスで軽く混合し、37℃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:pH8)
↓
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℃で一晩反応
↓
消化物