

## ゲル内消化法

### 準備する試薬類

- ・脱 CBB 液 (50% Acetonitrile、25mM Ammonium bicarbonate)
- ・脱銀染液 (15mM フェリシアン化カリウム、50mM チオ硫酸ナトリウム)

<ストック溶液 (遮光して3ヶ月間4℃保存可能)>

\* 30mM フェリシアン化カリウム

\* 50mM チオ硫酸ナトリウム

使用直前にストック溶液を1:1で混合して使用する。

- ・還元溶液 (10mM DTT、50mM 重炭酸アンモニウム)

<ストック溶液>

\* 1M DTT (50 $\mu$ l 分注して-20℃で保存可能、使い捨て使用)

\* 使用直前に混合

- ・アルキル化溶液 (55mM ヨードアセトアミド、50mM 重炭酸アンモニウム)

\* 使用直前に混合

- ・洗浄液 (25mM 重炭酸アンモニウム)

- ・脱水液 (50%アセトニトリル、50mM 重炭酸アンモニウム)

\* 当日調製

- ・トリプシン溶液 (10 $\mu$ g/ml、50 mM 重炭酸アンモニウム)

<ストック溶液>

Sequencing Grade Modified Trypsin (プロメガ、V5111) 20 $\mu$ g を添付バッ

フアー (50mM 酢酸) 200 $\mu$ l に溶かす (100 $\mu$ g/ml)。これを 20 $\mu$ l ずつ分注して-20 $^{\circ}$ Cで保存 (基本的に使い捨て)。

使用直前に混合希釈して使用する。

・抽出液 (50%アセトニトリル、5%ギ酸)

\* 当日調製

\* ここで用いる水、アセトニトリル、ギ酸などは、できるだけ HPLC 用を使用する

## 使用する機器類

- ・メス
- ・ピンセット
- ・ディスポ手袋
- ・エッペンチューブ（タンパク質低吸着チューブを使用）
- ・ライトボックス（CBB、銀染色した場合）



- ・イルミネーター（蛍光染色した場合）感度は悪いが安価

Invitrogen, Safe Imager Blue-Light Transilluminator (S37102)



- ・蛍光ゲルピッカー（蛍光染色した場合）

Anatech, フルオロフォレスター3000



- ・ 減圧濃縮遠心機



- ・ 恒温槽（カバーがあり、振とうできるタイプ）

TAITEC Deep Well Maximizer (M・BR-022UP)など



- ・ チューブミキサー



## 実験方法

- ・ゲルの切り出し

### CBB 染色、銀染色の場合

- 1-1、ライトボックス上にアクリル板、ガラス版、OHP シートなど透明な物を置き、その上に染色したゲルを乗せて、バンドやスポットをメスで切り出す。
- 1-2、切り出したゲルをエッペンチューブに入れる。

### 蛍光染色の場合

- 1-1、フルオロフォレスター3000 でスポットを切り出すか、Invitogen、 Safe Imager Blue-Light Transilluminator のようなイルミネーター上にアクリル板、ガラス版など透明な物を置き、その上に染色したゲルを乗せて、バンドやスポットをメスで切り出す（OHP シートはイルミネーター表面を傷つける可能性があるため使用しない方が無難）。
- 1-2、切り出したゲルをエッペンチューブに入れる。

- ・切り出したゲルの脱色

### CBB 染色した場合

- 2-1、500  $\mu$ l の脱 CBB 液（50% Acetonitrile、25mM Ammonium bicarbonate）を加え、10 分間振とうする。
- 2-2、脱 CBB 液を取り除き、脱色が不十分な場合は 1、の脱 CBB 液の 50% Acetonitrile を 30% Acetonitrile に変更し、ゲルが透明になるまで繰り返す（3、へ）。

### 銀染色した場合

- 2-1、100  $\mu$ l の脱銀染液（15mM フェリシアン化カリウム、50mM チオ硫酸ナトリウム）を加え、10 分間振とうする。
- 2-2、脱銀染液を取り除き、脱色が不十分な場合は 1、の操作をゲルが透明になるまで繰り返す。
- 2-3、脱銀染液を取り除き、500  $\mu$ l の水を加え、15 分間振とうする。
- 2-4、この操作を 2 回繰り返す（黄色い色が抜けるまで）（3、へ）。

### 蛍光染色した場合

脱色の必要なし（3、へ）。

- 3、100  $\mu$ l の 100%アセトニトリルを加え、室温で 15 分間振とう後、アセトニトリルを除く（この操作で脱水される）。
- 4、真空遠心機でゲルがカラカラになるまで乾燥させる（15 分程度）。

#### ・還元、アルキル化

- 5、100  $\mu$ l の還元溶液（10mM DTT、50mM 重炭酸アンモニウム）を加え、56°C で 45 分間振とうする。
- 6、サンプルを冷ました後、還元溶液を取り除き、100  $\mu$ l のアルキル化溶液（55 mM ヨードアセトアミド、50mM 重炭酸アンモニウム）を加え、アルミホイルで遮光しながら、室温で 30 分間振とうする。

#### ・洗浄

- 7、アルキル化溶液を取り除き、100  $\mu$ l の洗浄液（25mM 重炭酸アンモニウム）を

加え、室温で 10 分間振とうする。

- 8、洗浄液を除き、200  $\mu$ l の脱水液（50%アセトニトリル、50mM 重炭酸アンモニウム）を加え、室温で 10 分間振とうする。
- 9、この操作を 2 回繰り返す。
- 10、真空遠心機でゲルがカラカラになるまで乾燥させる（15 分程度）。

・トリプシン処理

- 11、10~20  $\mu$ l（ゲルが完全にかくれる程度）のトリプシン溶液（10  $\mu$ g/ml トリプシン、50 mM 重炭酸アンモニウム）を加え、氷上で 30 分間放置する（ゲルがすべてのトリプシン溶液を吸収していたら、さらにトリプシン溶液を加える）。
- 12、ゲルが吸いきらなかつた余分なトリプシン溶液を捨て、37 度で一晩反応させる。

・回収

- 13、30  $\mu$ l の回収液を加え、室温で 30 分間振とうする。
- 14、溶液を新しいチューブに回収し、さらにゲルの入ったチューブに 30  $\mu$ l の回収液を加え、室温で 30 分間振とうする。
- 15、溶液をさきほどと同じチューブに回収し、5~10  $\mu$ l 程度になるまで真空遠心機で乾燥する。
- 16、乾燥しきってしまった場合は、5~10  $\mu$ l の抽出液で再溶解する。

・ ごみ除去 (LC-MS で解析する場合)

17-1、ペプチドサンプルを  $0.45\ \mu\text{m}$  のウルトラフリー (ミリポア、Ultra free-MC  $0.45\ \mu\text{m}$  Filter Unit、UFC30HVN) でフィルターろ過を行い、細かなゲル辺を取り除いたあと、バイアル (Waters、Glass screw neck vial 12x32mm、186000384C) に移す。



・ Zip-Tip による脱塩操作 (MALDI-TOF/MS で解析する場合)

18-1、20 ml 用のピペットマンに Zip Tip をつけ、以下の操作を行う。

- A、50 % アセトニトリル溶液を数回アップダウン
  - B、0.1 % TFA 溶液で平衡化
  - C、16、の調製したサンプルの吸着
  - D、0.1 % TFA、5 % MeOH で洗浄
  - E、0.1 % TFA、50 % アセトニトリルでサンプルの溶出
- 以上の操作はゆっくりと行うこと。