

In Gel Digestion of Silver-stained Polyacrylamide Gel for MALDI/TOF-MS
(Gharahdaghi F, et al.,1999, Electrophoresis, partially modified)

2007-8-3 version By Takahiro Isono, Ph. D. (CRL, SUMS)

1. ゲルから目的のスポットを切り出し、200 μ L PCR チューブに入れる。
2. 30mM Potassium ferricyanide と 100mM Sodium thiosulfate を 1:1 に混合したものを 50 μ L 入れる。
3. 遮光して室温 10 分間振盪すると、ゲルが脱色され透明になる。液を捨てる。
4. DW を 50 μ L 加え洗浄、室温 3 分間振盪し液を捨てる。3 回繰り返す。
5. 200mM Ammonium bicarbonate (NH_4HCO_3) を 50 μ L 加え、室温 20 分間振盪、液を捨てる。
6. 25 μ L の 50% acetonitrile in 100mM NH_4HCO_3 を加える。
7. 室温 15 分間振盪し、液を捨てる。もう一度繰り返す。
8. 25 μ L の 10mM DTT (1.54mg/mL, R 保存) in 100mM NH_4HCO_3 を加える。
9. 摂氏 56 度で 1 時間インキュベート。液は捨てる。
10. 25 μ L の 50mM iodoacetamide (10.2mg/mL, R 保存) in 100mM NH_4HCO_3 を加える。
11. 遮光して室温 40 分振盪、液を捨てる。
12. 25 μ L の 50% acetonitrile in 100mM NH_4HCO_3 を加え、室温 10 分間振盪し洗浄。
液は捨てる。2 回おこなう。
13. SpeedVac (Low) で 15 分間乾燥させる。この間にアイスバケツを用意。
14. 30 μ L の trypsin (0.01 μ g/ μ L) in 100mM NH_4HCO_3 液を加え、ゲルに再吸収させる。
氷上で 45 分置き、過剰の液を捨てる。
15. 30 μ L の 100mM NH_4HCO_3 を加える。パラフィルムを巻く。
16. 摂氏 37 度で一晩インキュベートする。
17. アイスバケツを用意し、氷上に 200 μ L の PCR チューブを準備し液を回収する。
18. 30 μ L の 50% acetonitrile 0.5% trifluoroacetic acid (TFA) を加え、室温 15 分振盪。
液は 17. で用意したチューブに回収する。2 回洗浄する。
19. 摂氏 -80 度の冷凍庫に 15 分間入れ、凍らせる。
20. SpeedVac (Low) で 1 時間以上完全に濃縮する。

TOF-MS

21. 80 μ L の 0.1% TFA を加える。
22. Zip chip (C18) をおこなう。方法は Zip chip の説明書参照。
23. 最後は 4 μ L の 50% acetonitrile 0.1% TFA に溶出する。
24. マトリックスと混じり TOF-MS に用いる。保存する場合は摂氏 -80 度の冷凍庫へ。

LC/MS/MS

- 30 μ L の 2% acetonitrile 0.1% TFA を加え振盪して溶出する。

(注) SYPRO Ruby 等の染色の場合は、5. から行う。