

電気泳動により分離した蛋白質のバンドもしくはスポットの切り出し

↓

バンドは完全に脱色した後、純水中4°CでO/N保存

### 1. 還元アルキル化

チューブから蒸留水を完全に除去する

↓

100% アセトニトリル(ACN) 200  $\mu$ L を加えて、室温でインキュベートする。

↓インキュベーションの間、還元用溶液 [10 mM EDTA/10 mM DTT(ジチオスレイトール)/100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ]を調製

↓ 10 mM EDTA/100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ は予め調製しストックしておく。

↓ 500 mM DTT : DTT 77 mg/還元用溶液1 mL

↓↓ 50倍希釈

↓ 10 mM DTT : 500 mM DTT 20  $\mu$ L/還元用溶液980  $\mu$ L

ゲルが収縮し白くなったらACNを除去する。

↓

還元用溶液100  $\mu$ Lを加える。

↓チューブの口にパラフィルムを巻き、50°Cで1 hインキュベート。

還元用溶液を除去する。

↓

100% ACN 200  $\mu$ L を加えて、室温でインキュベートする。

↓この間アルキル化溶液 10 mM EDTA/40 mM ヨードアセトアミド(IAA)/100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ を調製

↓溶液は遮光保存 (アルミホイル等を利用する)

↓ 10 mM EDTA/100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ を予め作製してストックしておく。

↓ 400 mM IAA : IAA 74 mg/アルキル化溶液1 mL

↓↓ 100倍希釈

↓ 40 mM IAA : 400 mM IAA 100  $\mu$ L/アルキル化溶液900  $\mu$ L

ゲルが収縮し白くなったらACNを除去する。

↓チューブの口をアルミホイルで巻いて遮光しておく

アルキル化溶液100  $\mu$ Lを加える

↓実験台の引き出しの中に入れる等で遮光する。

↓暗所、室温で30 min

アルキル化溶液を除去する

↓

Wash (純水1 mLを加えて室温で3 minインキュベートした後に水を除く)、2回行う。

↓

水を除いたゲルにACN 200  $\mu$ Lを加えて、室温でインキュベートする

### 2. 酵素消化

バイアル中のトリプシン(50  $\mu$ g/vial)を予め氷冷しておいた100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  2 mL で溶かしておく

ゲルが収縮して白くなっていたら、ACNを除去する

↓

ゲルが入ったチューブを氷上に置き、温度が下がってから酵素溶液を20  $\mu$ Lゆっくり加える

↓しばらくおいてゲルを膨潤させる

100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  30  $\mu$ Lを加え、さらに膨潤させる。ゲルに吸入されなかった溶液を取り除く。

↓

チューブの口にパラフィルムを巻き、37°Cで15 hインキュベートする。チューブ全体が加温されるような装置を用い、水滴がフタに溜まるようなことが無いように留意する。

### 3. ペプチドの抽出

消化処理後のゲルに5% 酢酸 (FA)溶液 50  $\mu$ Lを加える

↓ 10 min室温でインキュベーション、可能であれば超音波処理を行う。

上清をTPX製のチューブなど低吸着のチューブに回収する (on ice)

↓

50% ACN/5% FA溶液 50  $\mu$ Lを加える

↓ 10 min室温でインキュベーション、可能であれば超音波処理を行う。

5% FA溶液を回収したチューブに上清を回収する (on ice)

↓

100% ACN/5% FA溶液50  $\mu$ Lを加える

↓ 10 min室温でインキュベーション、可能であれば超音波処理を行う。

上清を同じチューブに回収する (on ice)

↓

チューブの口にパラフィルムを巻き、注射針で15個程度穴をあける。

↓

10  $\mu$ L程度に容量が減るまで減圧遠心濃縮を行う。

脱塩濃縮処理

↓

質量分析計による測定

↓

データベース検索

↓

蛋白質同定