

nanoLC-MS/MSによるタンパク質同定のための注入前サンプル処理法

未消化タンパク質や不溶物質がnanoLCの分離用カラム(C18)、トラップカラム(C18) および配管に詰まることを防止するため、また、チューブ可塑剤由来のポリマーを事前に除去するために、ゲル内消化後のサンプルは、ZipTip (C18) などのチップカラムまたはスピんカラムにより、あらかじめC18に吸着するペプチドのみを回収・溶出したものをnanoLCに注入するようにして下さい。この操作によりサンプルロスが少なからず起きますが、省略することによりnanoLCシステムを詰まらせた場合には、**利用者の費用負担によりカラム・トラップカラム等を交換していただきます**ので、あらかじめご了承下さい！

ゲル内消化後、減圧乾燥によりサンプルを乾固(※)しましたら、以下の手順で処理して下さい。

Protocolもご確認下さい。 https://www.merckmillipore.com/JP/ja/product/ZipTip-with-0.6-L-C18-resin,MM_NF-ZTC18S096#anchor_PR

- * ここで使う全てのチューブは、エッペンドルフ社製のエッペンチューブにしてください。
- * サンプルループへの輸送液とトラップカラムへのローディング液は、TFAを使っていますので、この処理においても、**ギ酸でなくTFA**を使用してください。酸性条件ではペプチドは塩基にチャージを持ちますが、TFAがペプチドのカウンターイオンとなって、チャージを相殺し、結果として疎水性度が上がるため、回収率が良くなります。(ただし、MSのイオン化においては、先の理由によりTFAよりギ酸の方が良いので、ナノポンプによるトラップカラムからの濃縮ペプチドの溶出およびMSへの導入(イオン化)には、ギ酸を使用します)



ゲル内消化後の減圧乾燥したサンプル(※)

← 0.1%TFA/水 10 μ L
溶解する



1.5mL-エッペンチューブ

← 0.1%TFA/50%*1アセトニトリル 10 μ L *1: 10~70%に変更可
ペプチドが吸着している樹脂をこの液中でup-downさせる (10回繰り返す)

減圧乾燥 (※) (依頼測定の方はこの段階で提出いただいても結構です)

← 0.1%TFA/水 10 μ L
ペプチドを溶解し、微量用バイアルへ移してnanoLCのオートサンプラーにセット



10 μ LにセットしたピペットマンにZip Tip (樹脂 : C18)を装着



【樹脂の洗浄・活性化】
アセトニトリル10 μ Lを吸って、捨てる (3回繰り返す)

【樹脂の平衡化】
0.1%TFA/水10 μ Lを吸って、捨てる (3回繰り返す)

【樹脂へのペプチドの吸着】
左で調製したペプチド溶液をup-downさせる (10回繰り返す)

【樹脂の洗浄 (非吸着ペプチド及び塩の除去)】
0.1%TFA/水10 μ Lを吸って、捨てる (3回繰り返す)

【ペプチドの溶出・回収】

監修
統合生命科学研究科
中の三弥子 先生

(※) 再溶解が難しいと思われるタンパク (膜タンパクなど) の場合、完全乾燥は避けて下さい