MS 用ゲル内酵素消化キット

XL-Tryp Kit

Cat No. ST-3010

使用説明書

【目的・用途】

ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離されたタンパク質をトリプシンによりゲル内消化するためのキットです。
独自の Ex 試薬により、効率的にペプチド断片を得ることができるため、ゲル内消化後、MALDI-MS や LC-MS で分析を行うのに適しています。添付のトリプシンは自己消化を抑制するため、還元アルキル化によって修飾されています。また、TPCK 処理とアフィニティー精製により擬似トリプシンを除去しています。
本キットには 150～200 サンプルを処理する試薬が含まれています。
※電気泳動後のゲルの染色は CBB 染色または蛍光染色に限ります。その他の染色方法、例えば銀染色などは、本品使用前に別途、脱色しておく必要があります。

【特徴】

1) 独自の Ex 試薬による高いペプチド回収率
2) 洗練されたプロトコールによる簡便な操作
3) 高いコストパフォーマンス

【キット内容・保存方法】

内容	容量	保存方法	使用期限
Tris-HCL溶液	1.05mL×2	-20°C※1	1 年（未開封）
Ex試薬	200 uL		
トリプシン粉末	20 ug		
トリプシン溶解液	200 uL		

※1 溶液試薬は凍結融解を繰り返さず、融解後は 4°Cで保存してください。

【本品以外に準備するもの】

試薬は全て特級グレード以上を使用して下さい。

- 超純水(比抵抗値 18MΩ以上)
- アセトニトリル
- 1.5mL チューブ
- 清浄で密栓可能なガラス容器(脱色液、反応液の保存容器として)
- ゲル切り出し用の清浄なメス
- 卓上遠心分離機
- 35°Cの恒温槽またはヒートブロック
- ディスポーザブルの手袋
- クリーンベンチ

必要に応じてご用意ください。

- 還元アルキル化試薬
- 酸性化用のトリフルオロ酢酸(TFA)またはギ酸
- 脱塩濃縮用の固相抽出チップ

【操作上の注意】

- 全ての操作はクリーンベンチなどの清浄な環境下にて手袋着用で作業し、使用する器具等も清浄なものを使用して下さい。
- 添付のトリプシンは自己消化を抑制するため修飾されていますが、それでも自己消化断片がある程度生成されます。(裏面をご覧ください)
- 電気泳動後のゲル染色は CBB 染色または蛍光染色されたものに限ります。銀染色をご使用の場合は脱銀してから操作を行ってください。
- ゲル量が多く完全に浸らない場合は適宜量を増やしてください。

【トリプシン自己消化断片について】

タンパク質を含まないアクリルアミドゲルをサンプルとし、本品プロトコールに従ってゲル内トリプシン消化を行いました。
トリプシン消化後の溶液を TFA を用いて酸性化した後、C18 ピペットチップを用いて脱塩濃縮を行いました。
その後、マトリックス溶液で MALDI ターゲットプレートに溶出し、自然乾燥後 MALDI-MS 分析を行いました。

【方法】

A. ゲルの洗浄

● 準備するもの

・ 脱色液 (4°C保存)

超純水	30mL
Tris-HCl 溶液	1mL
アセトニトリル	30mL
	61mL

1）ゲル片を清浄なメス等で 1-1.5mm 厚程度にスライスし、新しい 1.5mL チューブに移します。
※電気泳動後のゲル染色は CBB 染色または蛍光染色されたものに限ります。銀染色をご使用の場合は脱銀してから次の操作を行ってください。
2）超純水 100uL 加え、ボルテックスしスピンダウンします。
※ゲル量が多く完全に浸らない場合は適宜量を増やしてください。
3）室温・10 分間静置し、超純水を除きます。
4）2)、3)をもう一度繰り返します。
5）脱色液 100uL 加え、ボルテックスしスピンダウンします。
6）室温・10 分間静置し、脱色液を除きます。
7）5)、6)をもう一度繰り返します。
8）チューブの蓋を開けた状態で室温・10 分間静置し、乾燥します。

B. 酵素消化

● 準備するもの

・ 反応液 (4°C保存)

超純水	40mL
Tris-HCl 溶液	670uL
Ex 試薬	163uL
	40.833mL

・ トリプシンストック(-80°C保存)

トリプシン粉末	20ug
トリプシン溶解液	100uL
	100uL

適量ずつ分注し、-80°C保存

※トリプシンストックの調製は失活防止のため、操作は氷上で行ってください。
また、凍結融解は 5 回まで可能です。

1）トリプシンストックを反応液で 5 倍希釈します。(活性化トリプシン溶液)
※活性化トリプシン溶液は使用直前に調製してください。
2）乾燥させたゲルに反応液 97.5uL 加えます。
3）1)で調製した活性化トリプシン溶液を 2.5uL 加え、軽く撹拌してからスピンダウンします。
4）35°C・4 時間～O/N インキュベートします。
5）溶液のみを新しい 1.5mL チューブに移し、その後の実験に使用します。
※必要に応じて、酸性化や精製を行います。(下記参照)

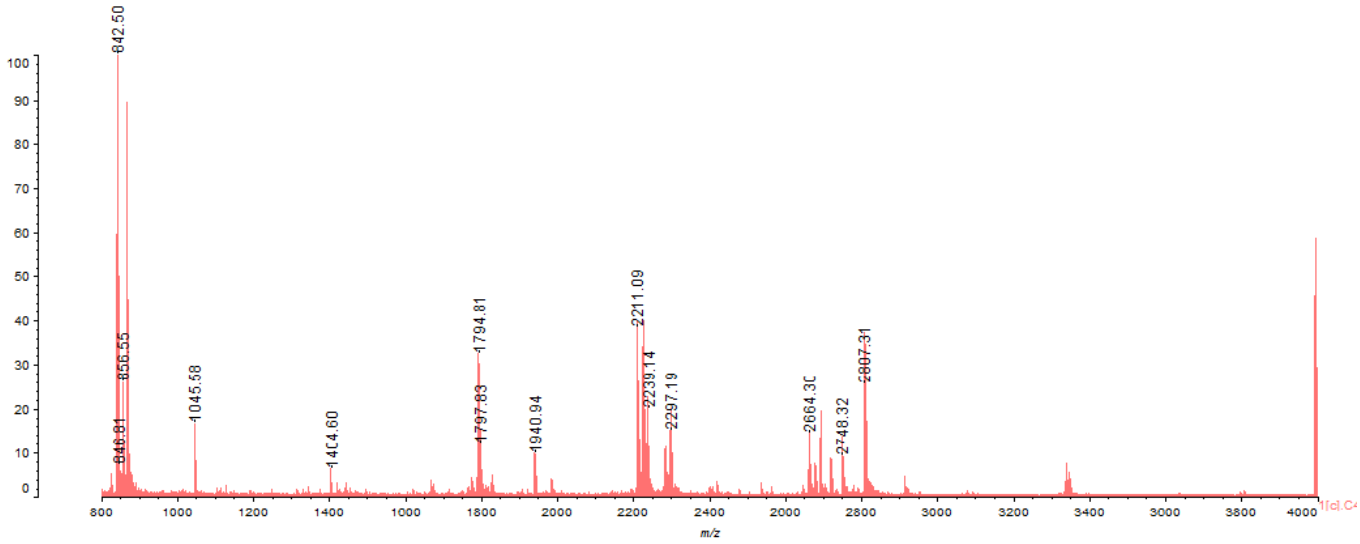
酸性化について

100uL の酵素消化済みサンプルに対して 2.5% TFA を 10uL 加えます。
pH 試験紙で pH<4 であることを確認します。

ペプチドの精製について

C18 カラムや C18 ピペットチップ等を用いてペプチドの精製を行います。

株式会社ファーマフーズ アプロサイエンスグループ
〒770-0865 徳島県徳島市南末広町 4-53 エコービル 4 階
■Tel:088-678-6372 ■Mail:bio@apro-s.com
■Url:https://apro-s.com/
本社 〒615-8245 京都府京都市西京区御陵大原1-49



株式会社ファーマフーズ アプロサイエンスグループ
〒770-0865 徳島県徳島市南末広町４-53 エコービル４階
■Tel：088-678-6372 ■Mail：bio@apro-s.com
■Url：https://apro-s.com/
本社 〒615-8245 京都府京都市西京区御陵大原1-49