

(大学院)平成20年度 基礎医学技術実習 (アドバンスコース)

『蛋白化学実習』

目的:質量分析計によるタンパク質同定の原理を理解し、実際に標準タンパク質をトリプシン消化して MALDI-TOF 型の質量分析計を用いた同定を試みる。

内容: MALDI-TOF/MS を用いてタンパク質同定の原理・手順を学ぶ。

1日目(11月12日)

- MALDI-TOF/MS の原理説明
- MALDI-TOF/MS のデモ
- 標準タンパク質のトリプシン消化開始

(試薬)

- A. 8M Urea 水溶液
- B. 100mM Ammonium Bicarbonate Buffer
- C. 200ng/ul trypsin / 50mM Acetic acid aq.

(手順)

1. サンプルに A を 10ul 加えてよく溶解する(vortex、sonication 等)。
2. B 溶液を 90ul 加えて vortex、その後サンプルの 1/20-50 量(w/w)に相当する trypsin が入るよう C 溶液を加え 37°C で 16 時間 incubate する。

2日目(11月13日)

- トリプシン消化物の前処理

3. 遠心エバポレーターで Dry up し、0.1%TFA/2% Acetonitrile / d.w で再溶解する。

- 標準ペプチドによる MS のキャリブレーションを行う。
- トリプシン消化物のマスコットサーチによる同定を行う。
- 結果について考察する。