

Application News

No. B66

MALDI-TOF 質量分析法

卓上型 MALDI-TOF MS を用いた PMF (Peptide mass fingerprinting) による 2次元電気泳動ゲルからのタンパク質同定

現在、細胞質などに存在する多種類のタンパク質を高スループットで同定する方法としては主に LCMS を用いたショットガンプロテオミクス手法が利用されています。しかしながら、全てのタンパク質研究においてこのような手法が有効というわけではありません。特に、2次元電気泳動などで分離したタンパク質を対象とする場合には、ゲル上で検出されるタンパク質スポットとタンパク質同定の結果がリンクしている必要があります。そのような分析では、ゲルから切り出したスポットを酵素処理した後に LCMS で分析するよりも MALDI-TOF MS で分析した方が効率的であるケースも多く存在します。

本稿では、2次元電気泳動と卓上型 MALDI-TOF MS を用いたタンパク質同定の一例をご紹介します。

S. Nakaya

■ 血清タンパク質の2次元電気泳動

0.5 μ L のヒト血清を 100 μ L の水で希釈し、メタノール：クロロホルム：水 (3:1:4) 溶液を加えて遠心することでタンパク質を析出させました。その後、析出したタンパク質をメタノールで洗浄して風乾させたものに、還元剤とアンフォライトを加えた 2次元電気泳動用バッファー (Working 膨潤液、シャープ) を加え、Auto2D (シャープ) を用いて 2次元電気泳動を行いました。尚、泳動時間は1次元目と2次元目を合わせて2時間弱で実施しました。

電気泳動終了後のゲルを InstantBlue (Expedeon Ltd.) を用いて CBB 染色し、タンパク質スポットを検出しました (図1)。

■ ゲルの切り出しと酵素処理および脱塩

得られた 2次元電気泳動ゲルから任意のスポットを切り出し、25 mM 重炭酸アンモニウム/50%アセトニトリル水溶液で脱染色した後、10 mM DTT (ジチオトレイトール)/50 mM 重炭酸アンモニウム水溶液で還元し、次いで 55 mM IAA (ヨードアセトアミド)/50 mM 重炭酸アンモニウム水溶液でアルキル化を行いました。その後、50 mM 重炭酸アンモニウム水溶液、25 mM 重炭酸アンモニウム/50%アセトニトリル水溶液、アセトニトリルの順でゲルを洗浄して過剰量の DTT および IAA を除きました。過剰試薬を除いたゲルを一度遠心乾燥し、その後 20 μ g/mL の Lys-C (Mass spec grade, Promega) を適量加えて、氷上でゲルを膨潤させました。膨潤したゲルが浸る程度に 50 mM 重炭酸アンモニウム水溶液を加えて 37 $^{\circ}$ C で一晩酵素処理を行いました。

酵素処理を行ったゲル片に 40 μ L の 50%アセトニトリル/0.1% TFA (トリフルオロ酢酸) 水溶液を加え、30分間振とうした後に溶液を回収し、さらにゲル片に 40 μ L の 75%アセトニトリル/0.1%TFA 水溶液を加えて 30分間振とうした後の溶液を回収しました。回収した溶液を合わせて遠心乾燥した後、10 μ L の 0.1%TFA 水溶液を加えて回収液に含まれているタンパク質消化物を再溶解し、ZipTip μ C18 (Merk Millipore) で脱塩処理を行いました。

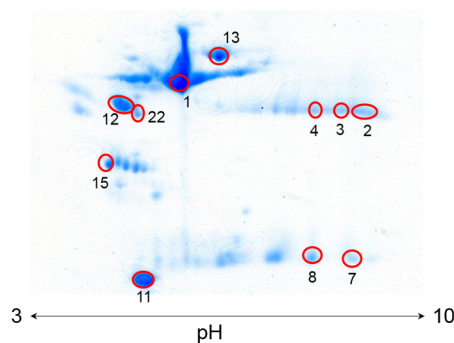


図1 ヒト血清タンパク質の2次元電気泳動ゲル画像
赤丸：切り出したスポット

■ 質量分析

脱塩処理したサンプル溶液を MALDI ターゲットプレートに搭載した後、0.5 μ L のマトリックス溶液を搭載して質量分析を行いました。尚、マトリックスには CHCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) を 5 mg/mL の濃度で 50%アセトニトリル/0.05% TFA 水溶液に溶解したものをしました。また質量分析には卓上型 MALDI-TOF MS “MALDI-8020” (図2) を用いました。



図2 卓上型 MALDI-TOF MS “MALDI-8020” 外観

任意に選択したスポットから抽出したタンパク質消化物を質量分析したところ、図3に例として示すように明瞭なマススペクトルが得られました。得られたマススペクトルからマスリストを抽出して Mascot PMF 検索を行ったところ、表1に示すタンパク質が同定されました。

このように、二次元電気泳動とポジティブリニアモード専用卓上型 MALDI-TOF MS "MALDI-8020" を組み合わせたシステムは、電気泳動でのタンパク質位置情報と質量分析によるタンパク同定結果をリンクさせた分析に利用することが可能です。

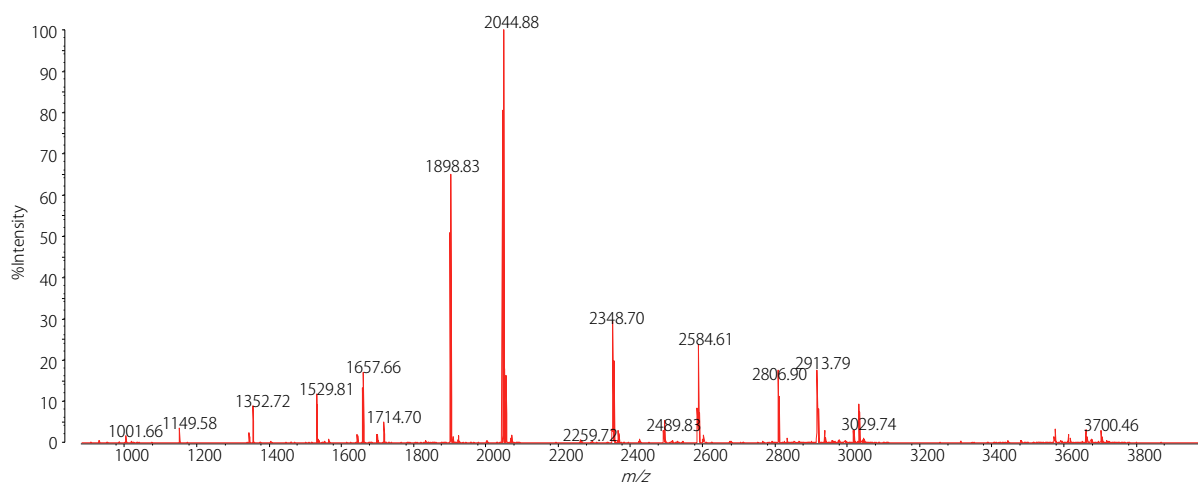


図3 スポット No. 1 のマススペクトル
測定モード：Positive Linear

表1 任意に選択したスポットのタンパク同定結果
(カッコ: 同定スコアが十分ではなかったもの)

Spot	Score	Description of protein
1	116	Serum albumin, human
2	90	Ig gamma-1 chain C region
3	68	Ig gamma-1 chain C region
4	68	Ig gamma-1 chain C region
7	60	Ig kappa chain C region
	59	Ig lambda-2 chain C region
8	60	Ig kappa chain C region
11	(50)	(Apolipoprotein A-1)
12	99	Alpha-1-antitrypsin
13	193	Serotransferrin
15	73	Complement C3
22	(47)	(Vitamin-D binding protein)