

## Product Information

ProteoMass™ Peptide & Protein MALDI-MS  
Calibration Kit

製品番号 MS-CALI

室温で保存してください。

## TECHNICAL BULLETIN (使用説明書)

## 製品概要

本キットは、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) マス スペクトロメーターのキャリブレーションおよびテスト用のスタンダードペプチドおよびタンパク質のセットです。装置のメーカーに関わりなくお使いいただけます。高純度の低アルカリ金属溶媒、再結晶化マトリックス試薬も添付されています。本キットは、初めてマスマススペクトルデータの解析を行うユーザーにも、プロテオミクス解析用のハイスループット実験を行う経験豊富な生化学者にも、ほとんどのペプチド分析用のスタンダードを提供できるよう、理想的にデザインされています。

## 適用例:

- MALDI 装置のキャリブレーション:
  - ペプチドの組み合わせにより、トリプシン消化断片の典型的な質量範囲 (800-3,000 Da) の範囲において、reflectron mode で良好なキャリブレーションを行えます。
  - タンパク質混合物は、タンパク質の組み合わせに応じて、linear mode (5,000-67,000 Da) の幅広い質量範囲でのキャリブレーションが可能です。
  - Angiotensin II および P<sub>14</sub>R は、さまざまな post source decay (PSD) データのキャリブレーション用として、PSD フラグメントイオンとして使用可能です。
- MALDI 装置のチューニング:
  - ペプチドの組み合わせによって、reflectron mode および linear mode で、解像度を最適化できます。
- 感度:
  - 装置の感度は、目的の質量範囲で、このキットに含まれるペプチドの希釈系列を用いて検定することが可能です。

## キット構成

キットに含まれるスタンダード、マトリックス試薬、溶媒は、以下の表に示した製品番号で、それぞれ別個にもご購入いただけます。

## スタンダードペプチドおよびタンパク質

スタンダードペプチドとタンパク質は 1.5 mL の透明チューブで供給され、各 10 nmol のスタンダードを含んでいます。

製品番号 [EC または CAS 番号]	製品	(M+H) <sup>+</sup> モノアイソトピック または平均
B4181 [23815-87-4]	Bradykinin fragment 1-7	757.3997 (モノ)
A8846 [68521-88-0]	Angiotensin II (ヒト)	1,046.5423 (モノ)
P2613	P <sub>14</sub> R (合成ペプチド)	1,533.8582 (モノ)
A8346 [53917-42-3]	ACTH fragment 18-39 (ヒト)	2,465.1989 (モノ)
I6154 [30003-72-6]	Insulin oxidized B chain (ウシ)	3,494.6513 (モノ)
I6279 [11070-73-8]	Insulin (ウシ)	5,730.6087 (モノ) 5,734.51 (平均)
C8857	Cytochrome c (ウマ)	12,361.96 (平均)
A8971 [9008-45-1]	Apomyoglobin (ウマ)	16,952.27 (平均)
A 9096 [4.1.2.13]	Aldolase (ウサギ筋肉)	39,212.28 (平均)
A8471 [9048-46-8]	Albumin (ウシ血清)	66,430.09 (平均)

質量は、NIST 標準原子量と同位体マスをを用いて NCBI<sup>1</sup> シーケンスを元に計算しています<sup>2</sup>。

### マトリックス

4 x 10 mg の再結晶マトリックスは、2.0 mL の褐色チューブ入りです。

製品番号 [CAS 番号]	製品	一般名
C8982 [28166-41-8]	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid	$\alpha$ -cyano CHCA
S8313 [530-59-6]	3,5-Dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid	シナピン酸

### 溶媒

溶媒は高密度ポリエチレン製ボトル入りです。

製品番号 [CAS 番号]	製品	量
T3443 [76-05-1]	0.1% Trifluoroacetic acid (TFA) solution	30 mL
A8596 [75-05-8]	Acetonitrile (ACN)	30 mL
T3693 [76-05-1]	1% Trifluoroacetic acid (TFA) solution	4 mL

ProteoMass Peptide (製品番号 MS-CAL2) および ProteoMass Protein (製品番号 MS-CAL3) MALDI-MS キャリブレーションキットも利用できます。

### 保存/安定性

キットは室温保存し、常温で輸送されます。マトリックス試薬は、溶媒に溶解後、遮光状態なら室温で約 1 週間安定です。ペプチドまたはタンパク質のストック溶液は分注して冷凍できますが凍結融解を 3 回以上繰り返さないでください。スタンダードは溶解後、1 ヶ月以内にご使用下さい。

### 注意事項および免責事項

全てのスタンダードは、Shimadzu Biotech Kompact SEQ および AXIMA-CFR でテスト済みで、正イオン MALDI マススペクトル解析の特定のモード (linear, reflectron、または PSD) において一定の性能基準を満たしています。これらのスタンダードは他のモード (負イオンモードなど) や他のメーカーの装置で使うことも可能です。これらの基準はガイドラインであり、他の装置メーカーのシステムでの性能を保証するものではありません。性能は、メーカーの規格と、装置の経年数およびメンテナンスによって異なります。

### 希釈ペプチド/タンパク質溶液の取扱い

ペプチドやタンパク質は接地面に付着する性質があるため、ペプチドの希釈系列を作製する際には注意が必要です。したがって、キャリーオーバーを避けるために、希釈ごとに新しいピペット チップをご使用下さい。また、サンプルがチューブ表面に吸着するため、最も濃度の低い溶液 (100 および 10 fmol/ $\mu$ L) は 1 日のみ使用可能です。MALDI マススペクトロメリーの性質により、チューブとチップをウシ血清アルブミンやウシ胎児血清でプレコートする必要はありません。溶液を安定化させるため、0.1% octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (製品番号 O9882)<sup>3,4</sup> などの非常に限られたグループの界面活性剤のうちの 1 種類を溶媒に加えることは可能ですが、MALDI マススペクトルのスタンダードの性能に何らかの影響を及ぼすことがあります。

### 使用前の準備

#### 溶媒の調製

- bradykinin、insulin oxidized B chain およびウシ insulin 以外は、0.1% TFA 溶液をそのまま全てのスタンダード溶液の調製に使えます。
- 0.1% TFA 5 mL と ACN 5 mL を混ぜて、50% ACN を含む 0.05% TFA 溶液を作製してください。bradykinin と insulin oxidized B chain 溶液およびマトリックス試薬の調製には、この溶媒をご使用ください。
- 1% TFA 溶液は、ウシ insulin 溶液の調製に使用します。

#### スタンダードストック溶液の調製

注: 必要に応じ、2 種類のスタンダード溶液調製法が用いられます。各スタンダードは、100 または 10 pmol/ $\mu$ L のストック溶液として調製できます。0.1% TFA 溶液の量は、各調製法で、10 fmol/ $\mu$ L までの 10 倍段階希釈を 5 回調製するのに十分な量です。

- 100 pmol/ $\mu$ L のストック溶液を作製するには、各スタンダードチューブの内容物を適切な溶媒 100  $\mu$ L に溶かします。(bradykinin と insulin oxidized B chain は、0.05% TFA 含有 50% ACN に溶解し、insulin は 1% TFA 溶液に溶解します。その他のスタンダードは 0.1% TFA 溶液に溶かします。)
- 10 pmol/ $\mu$ L のストック溶液は、各スタンダードチューブの内容物を適切な溶媒 1000  $\mu$ L に溶解します。
- 凍結保存して下さい。  
1 ヶ月以内に使用し、凍結融解サイクルは最高 3 回までとして、その後は廃棄することをお勧めします。

### 感度分析用溶液の調製

100 pmol/μL または 10 pmol/μL のストック溶液を、適切な溶媒で段階希釈し、以下の感度テスト用希釈スタンダード溶液を調製します。

開始濃度	ストック溶液 (μL)	溶媒 (μL)	使用溶液
100 pmol/μL	10 μL	90 μL	10 pmol/μL
10 pmol/μL	10 μL	90 μL	1 pmol/μL
1 pmol/μL	10 μL	90 μL	100 fmol/μL
100 fmol/μL	10 μL	90 μL	10 fmol/μL

### キャリブレーション用溶液の調製

100 pmol/μL または 10 pmol/μL ストック溶液を用いて、目的の質量範囲の適切なペプチド/タンパク質と混合してキャリブレーション用混合液を調製し、適切な濃度に希釈します。一般的なキャリブレーション用溶液の濃度範囲は、各成分につき 1-10 M (pmol/μL) です。ペプチド/タンパク質混合液中の、高分子の濃度が高い場合は、目的の質量範囲において、シグナル強度の最適化が必要となる場合があります。分析の精度を最適にするために、必要な質量範囲をブラケットし、可能な場合は、キャリブレーション用に 3~4 種類のペプチド/タンパク質をお使い下さい。必要に応じて前述の通り段階希釈して下さい。

### MALDIの調製マトリックス

マトリックス試薬チューブの内容物 10 mg を、50% ACN を含む 0.05% TFA 溶液 1 mL に溶かしてください。性能を最適にするため、溶かした後はマトリックス試薬を暗所で保存し、1 週間以内に使用して、その後は廃棄して下さい。50% ACN を含む 0.05% TFA 溶媒を用いた場合、α-cyano-4-hydroxycinnamic acid とシナピン酸はともに室温でほぼ飽和溶液となります。マトリックス試薬溶液には残留結晶がいくらか見えることがあります。ACN 濃度は必要に応じて調整できます。ACN 70% と 0.1% TFA 溶液 30% の混合液がよく使われます。

### 手順

#### MALDI 試液の推奨マトリックス

スタンダードペプチドまたはタンパク質	推奨されるマトリックス
Bradykinin fragment 1-7	α-cyano
Angiotensin II	α-cyano
P <sub>14</sub> R	α-cyano
ACTH fragment 18-39	α-cyano
Insulin oxidized B chain	α-cyano
Insulin	α-cyano または sinapinic acid
Cytochrome c	α-cyano または sinapinic acid
Apomyoglobin	α-cyano または sinapinic acid
Aldolase	sinapinic acid
Albumin	sinapinic acid

#### MALDI サンプル調製と MALDI ターゲットへの添加

以下の方法は、MALDI ターゲットへの添加のための、スタンダードまたはサンプルとマトリックス試薬を混合する調製法です。これらは一般的なガイドラインであり、さまざまな技術に推奨される全ての溶媒がキットに添付されているわけではありません。典型的なサンプル対マトリックス試薬のモル比は 1:100~1:10,000 です。

#### サンプル調製法 1:

この方法は、通常 dried-droplet 法と呼ばれ、オリジナルの MALDI 実験に基づき、マスペクトロメトリーにおいて最も多く用いられている方法です<sup>5</sup>。

1. 10 μL の適切なマトリックス試薬溶液を小さいチューブに移してください。
2. マトリックス試薬の入ったチューブに、1-10 μL のスタンダード/サンプルを加え、ボルテックスを行います。
3. この混合液 0.5-2 μL を MALDI ターゲットに添加し、乾燥させてください。
4. 液体が蒸発したら、ターゲットを分析できます。

### サンプル調製法 2:

Overlayer (またはtwo-layer) method と呼ばれるこの方法は、より均一にサンプルが滴下でき、特にペプチドとタンパク質に関して、分解能およびマス精度が改善されると考えられています<sup>6-9</sup>。

#### First layer 溶液 (マトリックス試薬のみ)

1. 蒸発速度を高めるため、濃縮した適切なマトリックス試薬のメタノールまたはアセトン溶液 (10-50 mg/mL) を調製します (溶媒は添付されていません)。

#### Second layer 溶液

1. 3-10 mg/mL の適切なマトリックス試薬を水 (または 0.1% TFA 溶液) と有機溶媒 (メタノールまたは ACN) の約 2:1 混合液の溶媒系を用いて調製します。

2. ステップ 2 から 10  $\mu\text{L}$  のマトリックス試薬溶液を小さいチューブに移します。
3. マトリックス試薬の入ったチューブに、1-10  $\mu\text{L}$  のスタンダード/サンプルを加え、ボルテックスを行います。

#### サンプル沈着

4. MALDI ターゲットに、0.5-2  $\mu\text{L}$  の first layer 溶液 (マトリックス試薬のみ) を滴下し、乾燥させて微細な結晶層を形成させます。
5. 結晶層の上層に、0.5-2  $\mu\text{L}$  の second layer 溶液を滴下し、乾燥させます。滴下の際、second layer 溶液に用いた溶媒系で first layer が完全に溶解してしまわないようにして下さい。
6. 液体が蒸発したら、ターゲットを分析できます。

### サンプル調製法 3:

もうひとつのサンプル調製法として、MALDI ターゲットへの添加前にサンプルとマトリックス試薬を混合させない方法を示します (Shimadzu Biotech の推奨法)。

1. 適切なマトリックス試薬溶液 0.5  $\mu\text{L}$  を、MALDI ターゲットのサンプル沈着領域またはウェルに滴下してください。1~2 秒後に余分なマトリックス試薬を取り除きます。ターゲット表面を乾燥させます。
2. サンプル沈着領域に 0.5  $\mu\text{L}$  のスタンダード溶液を滴下します。
3. サンプルが乾かないうちに、さらにマトリックス試薬 0.5  $\mu\text{L}$  を加え、自然に乾燥させます。
4. 全てのスタンダードとサンプルを滴下し、その乾燥後ターゲットが分析できます。

### 結果

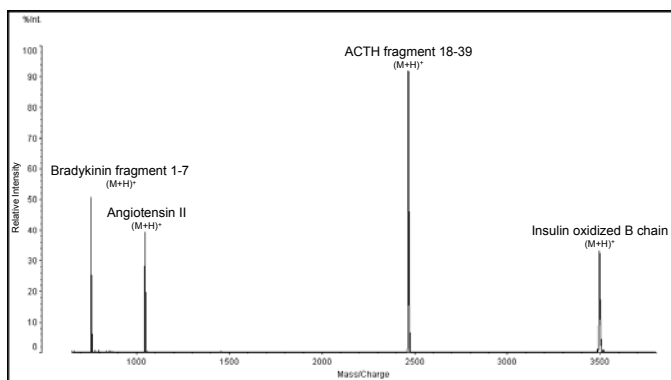


図 1. 1.5  $\mu\text{M}$  bradykinin fragment 1-7、1.0  $\mu\text{M}$  angiotensin II、0.5  $\mu\text{M}$  ACTH fragment 18-39、2.0  $\mu\text{M}$  insulin oxidized B chain を含むペプチドキャリブレーション溶液の MALDI マススペクトル。ペプチド溶液 10  $\mu\text{L}$  を 10 mg/mL の  $\alpha$ -cyano 溶液 10  $\mu\text{L}$  と混合しました。その混合液 0.8  $\mu\text{L}$  を MALDI ターゲット上にスポットしました。データは、Shimadzu Biotech Kompact SEQ システムの linear positive ion mode で得ました。

注: 1  $\mu\text{M}$  = 1 pmol/ $\mu\text{L}$

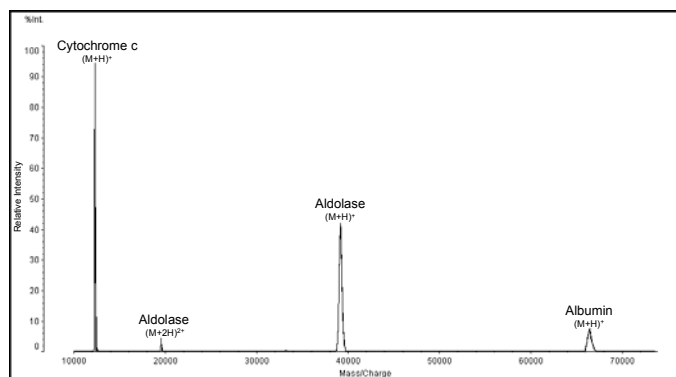


図 2. 1.0  $\mu\text{M}$  cytochrome c、2.0  $\mu\text{M}$  aldolase、10  $\mu\text{M}$  albumin を含むタンパク質キャリブレーション溶液の MALDI マススペクトル。タンパク質溶液 10  $\mu\text{L}$  を 10 mg/mL シナピン酸溶液 10  $\mu\text{L}$  と混合しました。その混合液 0.8  $\mu\text{L}$  を MALDI ターゲット上にスポットしました。データは、Shimadzu Biotech Kompact SEQ システムの linear positive ion mode で得ました。  
注: 1  $\mu\text{M}$  = 1 pmol/ $\mu\text{L}$

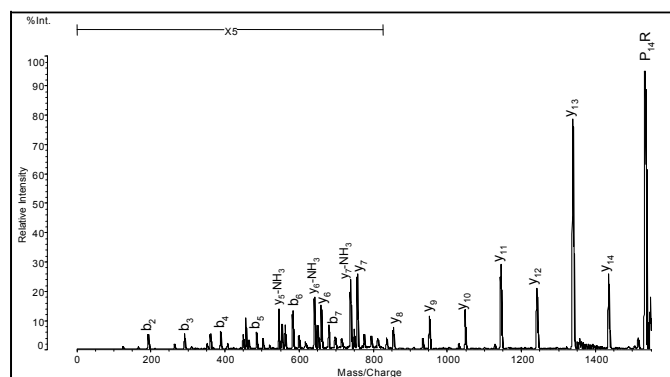


図 3. MALDI マトリックスとして  $\alpha$ -cyano を用いた P<sub>14</sub>R の Post Source Decay 解析。データは、Shimadzu Biotech AXIMA-CFR system の reflectron positive ion mode で得ました。PSD データは Shimadzu Biotech 提供。

## 製品プロフィール

製品	NCBI <sup>1</sup> Reference	分子式 (M+H) <sup>+</sup>
Bradykinin fragment 1-7	KNG_HUMAN	C <sub>35</sub> H <sub>53</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub>
Angiotensin II	ANGT_HUMAN	C <sub>50</sub> H <sub>72</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub>
P <sub>14</sub> R	N/A	C <sub>76</sub> H <sub>113</sub> N <sub>18</sub> O <sub>16</sub>
ACTH fragment 18-39	COLI_HUMAN	C <sub>112</sub> H <sub>166</sub> N <sub>27</sub> O <sub>36</sub>
Insulin oxidized B chain	INS_BOVIN	C <sub>157</sub> H <sub>233</sub> N <sub>40</sub> O <sub>47</sub> S <sub>2</sub>
Insulin	INS_BOVIN	C <sub>254</sub> H <sub>378</sub> N <sub>65</sub> O <sub>75</sub> S <sub>6</sub>
Cytochrome c	CYC_HORSE	C <sub>560</sub> H <sub>876</sub> N <sub>148</sub> O <sub>156</sub> S <sub>4</sub> Fe
Apomyoglobin	MYG_HORSE	C <sub>769</sub> H <sub>1213</sub> N <sub>210</sub> O <sub>218</sub> S <sub>2</sub>
Aldolase	ALFA-RABIT	C <sub>1733</sub> H <sub>2774</sub> N <sub>489</sub> O <sub>525</sub> S <sub>11</sub>
Albumin	ALBU_BOVIN	C <sub>2935</sub> H <sub>4583</sub> N <sub>780</sub> O <sub>899</sub> S <sub>39</sub>

## 参考文献

1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>
2. <http://physics.nist.gov/PhysRefData/contents.html>
3. Vorm, O. et al., 41<sup>st</sup> ASMS Conference Proceedings, 621, (1994).
4. Sutton, C. W. et al., Electrophoresis, **16**, 308-316, (1995).
5. Karas, M. and Hillenkamp, F., Anal. Chem., **60**, 2299-2301, (1988).
6. Dai, Y. et al., Anal. Chem., **68**, 2494-2500, (1996).
7. Dai, Y. et al., Anal. Chem., **71**, 1087-1091, (1999).
8. Edmondson, R. D. and Russell, D. H., J. Am. Soc. Mass Spectrom., **7**, 995-1001, (1996).
9. Onnerfjord, P. et al., Rapid Commun. Mass Spectrom., **13**, 315-322, (1999).

HH/JAB/MAM/LKB 10/03

Sigma ブランド製品は Sigma-Aldrich, Inc.を通じて販売されています。

Sigma-Aldrich, Inc.は同社製品がこの文書およびその他の Sigma-Aldrich 発行文書に含まれる情報に合致していることを保証します。お客様の個別の用途と製品の適合性についてはお客様にてご判断ください。掲載の品目、製品情報、価格などは予告なく変更される場合がございます。納品伝票または同梱の内容明細書の裏面をご覧ください。