

Product Information

ProteoMass™ Protein MALDI-MS
Calibration Kit

製品番号 MS-CAL3

室温で保存して下さい。

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さまざまなスタンダードタンパク質です。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および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、ほとんどのタンパク質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:
 - タンパク質の組み合わせにより、linear mode の広範な質量範囲 (5,000~67,000 Da) において、キャリブレーションを行えます。
- MALDI 装置のチューニング:
 - タンパク質の組み合わせによって、linear mode で解像度を最適化できます。
- 感度:
 - 目的の質量範囲で、このキットに含まれるタンパク質の希釈系列を用いて装置の感度を検定することが可能です。

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、斜光状態なら室温で約1週間安定です。タンパク質ストック溶液は分注して冷凍できますが、3回を超えて凍結融解サイクルを行わないで下さい。スタンダードは溶解後、1ヵ月以内にご使用下さい。

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、それぞれ個別でもご購入いただけます。ProteoMass Peptide & Protein (製品番号 MS-CAL1) および ProteoMass Peptide (製品番号 MS-CAL2) MALDI-MS Calibration Kits もご購入いただけます。

スタンダードタンパク質

スタンダードタンパク質は、1.5 mL 透明チューブ 2 本に各 10 nmol 入っています。

製品コード [EC または CAS 番号]	製品	(M+H) ⁺ 平均
I6279 [11070-73-8]	Insulin (bovine)	5,734.51
C8857	Cytochrome c (equine)	12,361.96
A8971 [9008-45-1]	Apomyoglobin (equine)	16,952.27
A9096 [4.1.2.13]	Aldolase (rabbit muscle)	39,212.28
A8471 [9048-46-8]	Albumin (bovine serum)	66,430.09

質量は、NIST 標準原子量と同位体マスをを用いて NCBI¹ シーケンスを元に計算しています²。

マトリックス試薬

再結晶化マトリックス試薬は 2.0 mL 褐色チューブ 8 本に各 10 mg 入っています。

製品番号 [CAS 番号]	製品	一般名
S8313 [530-59-6]	3,5-Dimethoxy-4- hydroxycinnamic acid	Sinapinic acid

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	製品	量
T 3443 [76-05-1]	0.1% Trifluoroacetic acid (TFA) solution	30 mL
A 8596 [75-05-8]	Acetonitrile (ACN)	30 mL
T 3693 [76-05-1]	1% Trifluoroacetic acid (TFA) solution	4 mL

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、MALDI マススペクトル解析の linear positive ion mode 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 (negative ion mode 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。

希釈タンパク質溶液の取り扱い

タンパク質は接地面に付着する性質があるため、タンパク質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、キャリア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、最も希釈率の高い溶液 (100 fmol/μL および 10 fmol/μL) が使用可能な期間は 1 日です。

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-β-D-glucopyranoside (製品番号 O9882)^{3,4} 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

溶媒の調整

- 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整に使えます。
- 1% TFA 溶液はそのままウシ insulin 溶液の調整に使われます。
- 0.1% TFA 5 mL と ACN 5 mL を混ぜて、50% ACN を含む 0.05% TFA 溶液を作製して下さい。マトリックス試薬の調整にはこの溶媒をご使用下さい。

スタンダードストック溶液の調整

注: 必要に応じ、2 種類のスタンダード溶液調整法が用いられます。各スタンダードは、100 または 10 pmol/μL のスト

ック溶液として調整できます。0.1% TFA 溶液の量は、各調整法で、10 fmol/μL までの 10 倍段階希釈を 5 回調整するのに十分な量です。

- 100 pmol/μL のストック溶液を作製する際には、各スタンダードチューブの内容物を適切な溶媒 100 μL に溶かして下さい。(insulin は、1% TFA 溶液に溶かして下さい。その他のスタンダードは 0.1% TFA 溶液に溶かします。)
- 10 pmol/μL のストック溶液を作製する際には、各スタンダードチューブの内容物を適切な溶媒 1000 μL に溶かします。
- 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整

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標準溶液を調整します。

開始濃度	ストック溶液 (μL)	溶媒 (μL)	希釈標準溶液
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整

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整し、適切な濃度に希釈します。典型的なキャリブレーション溶液の濃度範囲は、各コンポーネントで 1~10 μM (pmol/μL) です。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、可能な場合には 3~4 種類の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マトリックス試薬の調整

マトリックス試薬 10 mg チューブの内容物を、50% ACN を含む 0.05% TFA 溶液 1 mL に溶かして下さい。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、sinapinic acid は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サンプル調整と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整法です。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。

サンプル調整法 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⁵。

1. 10 µL のマトリックス試薬溶液を小さいチューブに移して下さい。
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、ボルテックスします。
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. 液体の蒸発後、ターゲットを分析できます。

サンプル調整法 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⁶⁻⁹。

First layer 溶液 (マトリックス試薬のみ)

1. 蒸発速度を速めるため、濃縮した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) を調整します (溶媒は添付されていません)。

Second layer 溶液

1. 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) の比が 2:1 の溶媒系に溶かして 3~10 mg/mL の溶液を調整します。
2. ステップ 2 から 10 µL 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 µL のスタンダード/サンプルを加え、ボルテックスしてください。

サンプル沈着

4. MALDI ターゲットに 0.5~2 µL 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 µL 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。

サンプル調整法 3:

もうひとつのサンプル調整法として、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. 0.5 µL のマトリックス試薬を、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下さい。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 µL のスタンダード/サンプル溶液を滴下します。
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 µL 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、その乾燥後にターゲットを分析できます。

製品概要

製品	NCBI [†] Reference	化学式 (M+H) ⁺
Insulin	INS_BOVIN	C ₂₅₄ H ₃₇₈ N ₆₅ O ₇₅ S ₆
Cytochrome c	CYC_HORSE	C ₅₆₀ H ₈₇₆ N ₁₄₈ O ₁₅₆ S ₄ Fe
Apomyoglobin	MYG_HORSE	C ₇₆₉ H ₁₂₁₃ N ₂₁₀ O ₂₁₈ S ₂
Aldolase	ALFA_RABIT	C ₁₇₃₃ H ₂₇₇₄ N ₄₈₉ O ₅₂₅ S ₁₁
Albumin	ALBU_BOVIN	C ₂₉₃₅ H ₄₅₈₃ N ₇₈₀ O ₈₉₉ S ₃₉

結果

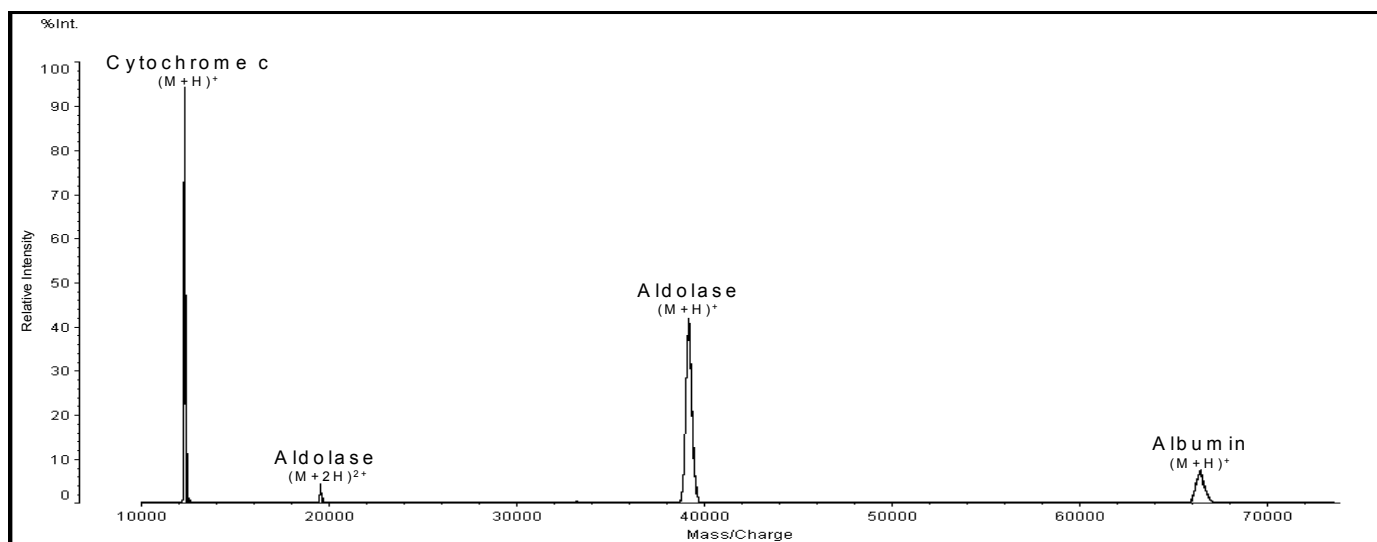


図 1. 1.0 μM cytochrome c, 2.0 μM aldolase, 10 μM albuminを含むタンパク質キャリブレーション溶液のMALDIマスペクトル。タンパク質溶液 10 μL を含む 0.1% TFA溶液を、10 μL の 10 mg/mL sinapinic acid溶液を含む 0.03% TFA溶液 (70% ACN中)と混合し、この混合液 0.8 μL をMALDIターゲット上にスポットした。データはShimadzu Biotech Kompact SEQシステムのlinear positive ion modeで得た。注: 1 μM =1 pmol/ μL

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., 41st 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).

HAH/MAM/LKB 11/01

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下さい。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。