

[1 日目] (準備)

- 50% メタノール, 50% アセトニトリル, 100% アセトニトリル, 50 mM Ammonium Bicarbonate Minimum (以下 ABM), 100 mM ABM を冷蔵庫から出す
- 超音波水槽に半分ほど水を入れる
- 5 L ビーカーに氷を用意
- バイオシェーカーの電源 ON、HEATER (37°C) に設定

1. スポットピッカーで切り取ったゲルを浸していた超純水を、8 連ピペットマンで液を吸い取り捨てる
2. 50% メタノール 100 μ L を加えて、プレートにアルミシールをして超音波 10 分、液を捨てる (洗浄) → 超音波は水温が高くならないように氷を入れる。合計 4 回繰り返し行う
3. 50% アセトニトリル 100 μ L を加えて、室温 10 分放置、液を捨てる (脱水)
4. 100% アセトニトリル 100 μ L を加えて、室温 10 分放置、液を捨てる (脱水)
5. 50 mM ABM 100 μ L を加えて、室温 10 分放置、液を捨てる (膨潤)
6. 100% アセトニトリル 100 μ L を加えて、室温 10 分放置、液を捨てる (脱水)
7. 50mM ABM 100 μ L を加えて、室温 10 分放置、液を捨てる (膨潤)
8. 50% アセトニトリル / 50 mM ABM (100% アセトニトリル 1mL + 100 mM ABM 1mL) を 100 μ L 加えて、室温 10 分放置、液を捨てる (脱水)
9. 100% アセトニトリル 100 μ L を加えて、室温 10 分放置、液を捨てる (脱水)、2 回行う
10. 最後にアセトニトリルをしっかりと除き、風乾 (20 分~1 時間)
11. トリプシン (20 μ g / 50 mM ABM 800 μ L) 5 μ L を加える (ゲルに吸収させる、チップは1サンプルずつ交換)
12. 乾燥防止のためにキャップをして、37°Cで一晩インキュベートする

[2 日目] (準備)

- 1% Trifluoroacetic acid (以下 TFA), 50% アセトニトリル, 蒸留水を冷蔵庫から出す
- 5L ビーカーに氷を用意

13. over night 処理したプレートの中に、45% アセトニトリル / 0.1% TFA (50% アセトニトリル 900 μ L + 1% TFA 100 μ L) を 10 μ L 加えて、プレートにアルミシールをして超音波 10 分、新しいプレートに液のみを回収する、2回繰り返し行う
14. 20~30 分間、減圧しながら遠心濃縮する
15. 0.1% TFA 15 μ L を加える
16. ボトルに No.を記入して、気泡が入らないように液を移し替えて、LC-MS/MS 用サンプルとする