

iTRAQ™ Reagent(4plex)

For Labeling Peptides with an Amine-Modifying Labeling Reagent

日本語版簡易マニュアル



目次

ご使用の前に	2
iTRAQ™ KIT 操作手順	3
1) iTRAQ Reagent の構造	3
Method Development Kit および Multiple Kit 内容	5
ご用意いただくもの	8
2) サンプル調製の流れ	9
3) 操作手順	12
Appendix A キットに含まれる試薬の代替となる物質	19
Appendix B Six-Protein Mix.の内訳	20
Appendix C タンパク質抽出、アセトン沈殿、タンパク質定量	26

ご使用の前に

安全性ガイドライン : 化学物質による危険を最小限に抑える為に

- ◇ いくつかの化学物質または危険な物質の保管や取り扱いの前に化学物質等安全データシート(MSDS)を読み危険性について正しくご理解下さい。
- ◇ 化学物質との接触を最小限にします。化学物質を取り扱う際には適切な保護具(例えば保護眼鏡、保護手袋、保護着など)を装着します。取り扱いの前には安全基準の確認のため MSDS をお読み下さい。
- ◇ 化学物質の吸入を最小限にします。化学物質の容器を開けたまま放置しないようにします。十分な換気ができる場所(ドラフト等)でのみ取り扱います。取り扱いの前には安全基準の確認のため MSDS をお読み下さい。
- ◇ 定期的な化学物質の漏れやこぼれのチェック。もし漏れやこぼれが認められた場合、MSDS に推奨する製造者の清掃方法に従って清掃を行って下さい。
- ◇ 国、地方自治体または国際法と規定に基づき化学物質の保管、取り扱いおよび廃棄を行って下さい。

MSDSs : 製品安全データシート

- ◇ 化学物質製造業者が、危険な化学物質の出荷に伴い MSDSsをお客様へご提供しているものです。
- ◇ MSDSs は、以下の弊社 Web サイトからご自由にダウンロードして頂けます。

[http://www.absciex.com/downloads/safety-data-sheets/japan-msds-\(japanese\).html](http://www.absciex.com/downloads/safety-data-sheets/japan-msds-(japanese).html)

Cysteine Blocking Reagent : 可燃性の液体および気体です。
汚染は眼と呼吸器官の炎症と中枢神経系の抑制を引き起こします。

Denaturant (2% SDS) : 眼と皮膚の炎症を引き起こします。

Ethanol : 可燃性の液体および気体です。汚染は眼、皮膚および呼吸器官の炎症を引き起こします。
また、中枢神経系の抑制と肝臓の損傷を引き起こす可能性があります。

Reducing Reagent : 眼、皮膚および呼吸器官の炎症を引き起こします。

Trypsin : 眼、皮膚および呼吸器官の炎症を引き起こします。
汚染はアレルギー反応を引き起こす可能性があります。

<概要>

ABSCIEX iTRAQ™ (isobaric Tags for Relative and Absolute Quantiation) 試薬は 4 つの同質量試薬が用意されています。

iTRAQ™ Reagent 114

iTRAQ™ Reagent 115

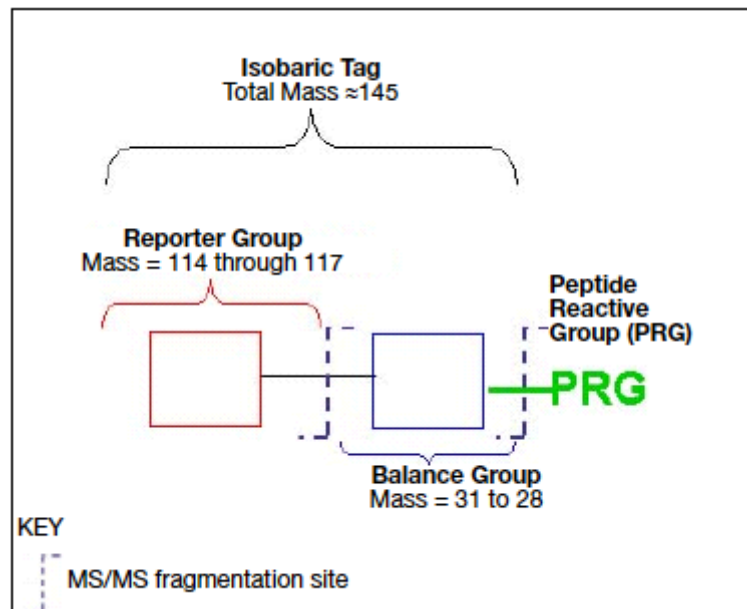
iTRAQ™ Reagent 116

iTRAQ™ Reagent 117

4 つの試薬を使用することにより singl LC/MS/MS による最大 4 つの異なったサンプルの混合物の測定が可能です。

iTRAQ™ KIT 操作手順

1) iTRAQ 試薬の構造



酵素消化されたサンプル中の各ペプチドの N 末端トリジン残基の PRG は iTRAQ 試薬等量タグと共有結合しています。

iTRAQ ラベルされた数種の酵素消化サンプルを混合した際、個々のサンプルに含まれる同一ペプチドは Reporter group の種類にかかわらず、同一質量を示します。

- Balance Group は、iTRAQ 試薬の 114、115、116 および 117 でラベルした iTRAQ ラベルペプチドが同じ質量になるようにデザインされています。
- 上図のようにフラグメンテーションが起こります。
フラグメンテーションの結果として Balance Group は neutral loss します。
生成した iTRAQ™ 試薬 reporter group のイオンは 113-119m/z の低分子領域にピークとして現れます。
この領域には他の一般的なフラグメントイオンがなく、この領域に見られるシグナルはラベルされた消化ペプチドのレポーターイオンのみです。
そのため、あるレポーターグループのピーク面積と他のレポーターグループのピーク面積を比較することにより定量が可能です。あるピーク面積と他のピーク面積との比率は寄与するサンプルの酵素消化物の各々の中のペプチドの相対量を表しています。

- 付加的にペプチドのyシリーズ、bシリーズが生成されタンパク質の同定に使われます。

Specification	Reagent 114	Reagent 115	Reagent 116	Reagent 117
Exact mass added to the peptide per primary amine	144.1059	144.0996	144.1021	144.1021
Monoisotopic MH ⁻ of the Reporter Group (fragment seen by MS/MS analysis)	114.1112	115.1083	116.1116	117.1150

Method Development Kit および Multiplex Kit内容

Reagents: 全て-15~-25℃保存

cap color	Item	Method Development kit P/N 4352160 (Volume/Qty)	Multiplex Kit P/N 4352135 (Volume/Qty)	Description
	iTRAQ™ Reagent Reagent 114	3 vials, 1unit/vial	5vials, 1unit/vial	アミン修飾ラベル試薬。 1unit あたり 100 μg の タンパク質をラベルする。
	iTRAQ™ Reagent Reagent 115	-	5 vials, 1unit/vial	
	iTRAQ™ Reagent Reagent 116	-	5 vials, 1unit/vial	
	iTRAQ™ Reagent Reagent 117	3 vials, 1unit/vial	5 vials, 1unit/vial	

Reagents: 全て-15~-25℃保存

cap color	Item	Method Development kit P/N 4352160 (Volume/Qty)	Multiplex Kit P/N 4352135 (Volume/Qty)	Description
	Six-Protein Mix.	2 vials	-	プロトコールのテストに使用。 以下のタンパク質を含む。 <ul style="list-style-type: none"> • Bovine serum albumin (22 μg) • α-lactalbumin (10 μg) • β-galactosidase (38 μg) • lysozyme (10 μg) • Apotransferrin (25 μg) • β-lactoglobulin (24 μg)
	Trypsin with CaCl ₂	3 vials	- <div style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black; padding: 2px;"> P/N 4352157 Trypsin 10-pack を 使用 </div>	Lys/Arg の C 末端側のペプチド 結合を切断する。 25 μg Trypsin と 222 μg CaCl ₂ を 含む。
	Dissolution Buffer (pH8.5)	3 vials 1.5mL/vial	3 vials 1.5mL/vial	サンプル溶解用緩衝液。 0.5M Triethylammonium bicarbonate を含む。
	Denaturant	1 vial 50 μ L/vial	1 vial 50 μ L/vial	タンパク質の水素結合、 疎水結合、静電的結合を分裂 する。2% SDS を含む。
	Reducing Reagent	1 vial 100 μ L/vial	1 vial 100 μ L/vial	タンパク質のジスルフィド結合を 還元する。 50mM tris-(2-carboxyethyl) phosphine(TCEP)を含む。
	Cystein-Blocking Reagent	1 vial 50 μ L/vial	1 vial 50 μ L/vial	可逆的にシステイングループを ブロックする。 200mM Methylmethanethiosulfonate (MTS)/Isopropanol

	Ethanol	1 vial 1.8mL/1vial	1 vial 1.8mL/1vial	HPLC グレードまたはそれ以上の純度。iTRAQ 試薬の溶解とラベルの最適化のために使用する。
--	---------	-----------------------	-----------------------	--

Documents: 室温保存




Item	Methods Development Kit (Volume/Qty)	Multiplex Kit (Volume/Qty)	Description
ABSCIEX iTRAQ™ Reagents Quick Reference Card	-	-	簡易マニュアルシート http://www.absciex.com/downloads/mass-spectrometry-literature.html こちらのサイトからダウンロードください
ABSCIEX iTRAQ™ Reagents Protocol	-	-	タンパク質を iTRAQ 試薬でラベルする方法の説明書 http://www.absciex.com/downloads/mass-spectrometry-literature.html こちらのサイトからダウンロードください
Certificate of Analysis	-	-	分析証明書 http://www.absciex.com/downloads/certificates-of-analysis/certificates-of-analysis-for-mtraq-kits こちらのサイトからダウンロードください

CEX バッファークラック P/N 4326747: すべて 4~8°C 保存

Item	Volume/Qty.	Description
Cation Exchange Cartridge	200 μ L カートリッジ ×1	POROS® 50HS, 50 μ m, 4.0mm ϕ × 1.5cm
Cation Exchange Buffer-Load (10 mM potassium phosphate(KH ₂ PO ₄) in 25% acetonitrile at pH 3.0)	100mL	アセトニトリルを含むリン酸バッファ。pH 調整と塩濃度を下げるために使用する。
Cation Exchange Buffer-Elute (10 mM KH ₂ PO ₄ in 25% acetonitrile/ 350 mM potassium chloride (KCl) at pH 3.0)	100mL	アセトニトリルと塩を含むリン酸バッファ。ペプチドの溶出のために塩濃度を上げる。
Cation Exchange Buffer-Clean (10 mM KH ₂ PO ₄ in 25%acetonitrile/ 1 M KCl at pH 3.0)	100mL	高濃度の塩とアセトニトリルを含むリン酸バッファ。ペプチド溶出後のカラム洗浄に使用。

Cation Exchange Buffer -Storage (10 mM KH ₂ PO ₄ in 25% acetonitrile at pH 3.0, + 0.1% sodium azide (NaN ₃))	100mL	アジ化ナトリウムとアセトニトリルを含むリン酸バッファ。微生物の発生を防ぎ、適切な pH を維持する。
--	-------	--

Accessories- Column Hardware

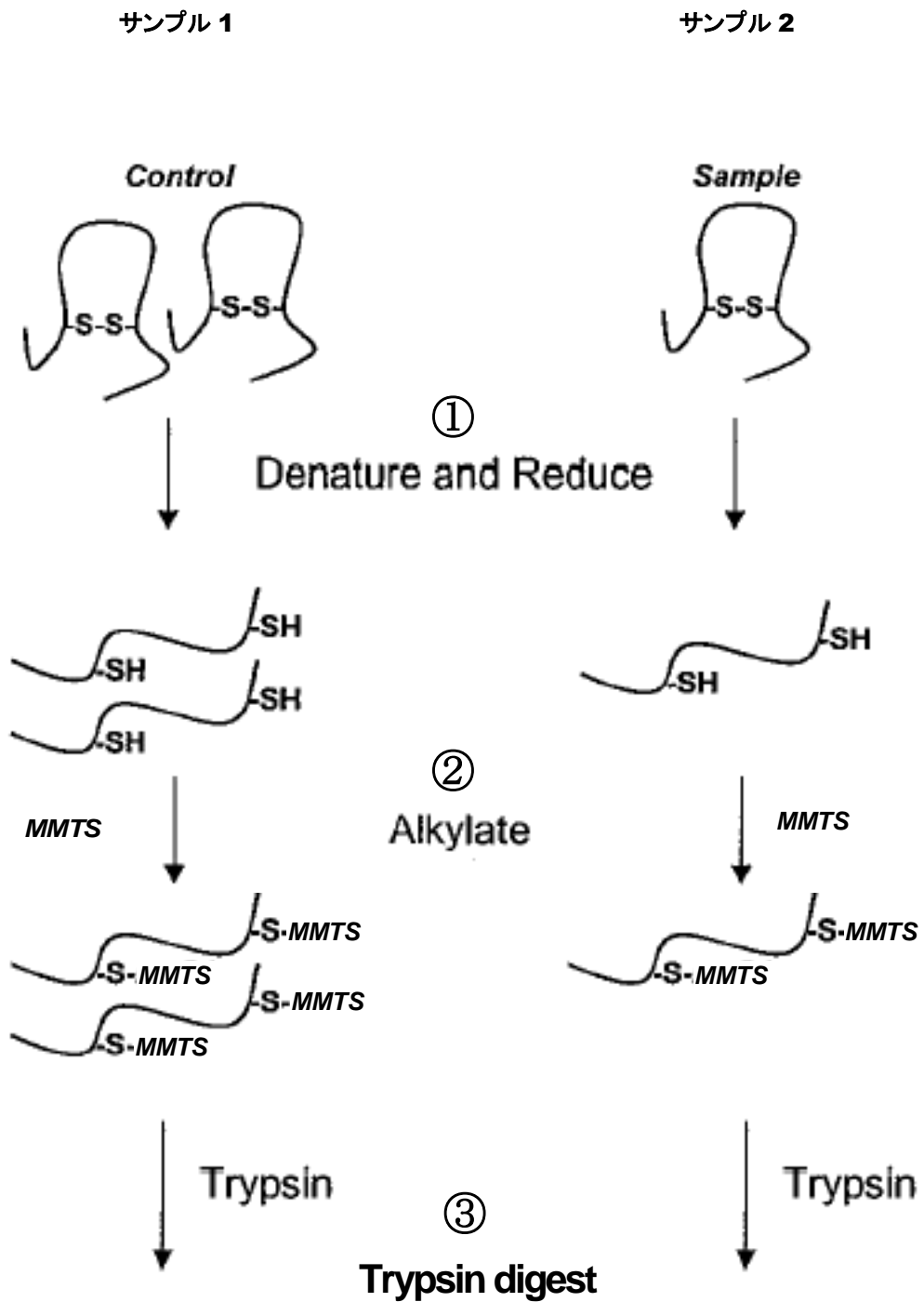
Item	Volume/Qty.	Description
カートリッジホルダー P/N 4326688	×1 (200 μL カートリッジ用)	
ニードルポートアダプター P/N 4326689 (3 つのパーツで構成されます)	×1	
ニードルアウトレットアダプター P/N 4326690 (3 つのパーツで構成されます)	×1	

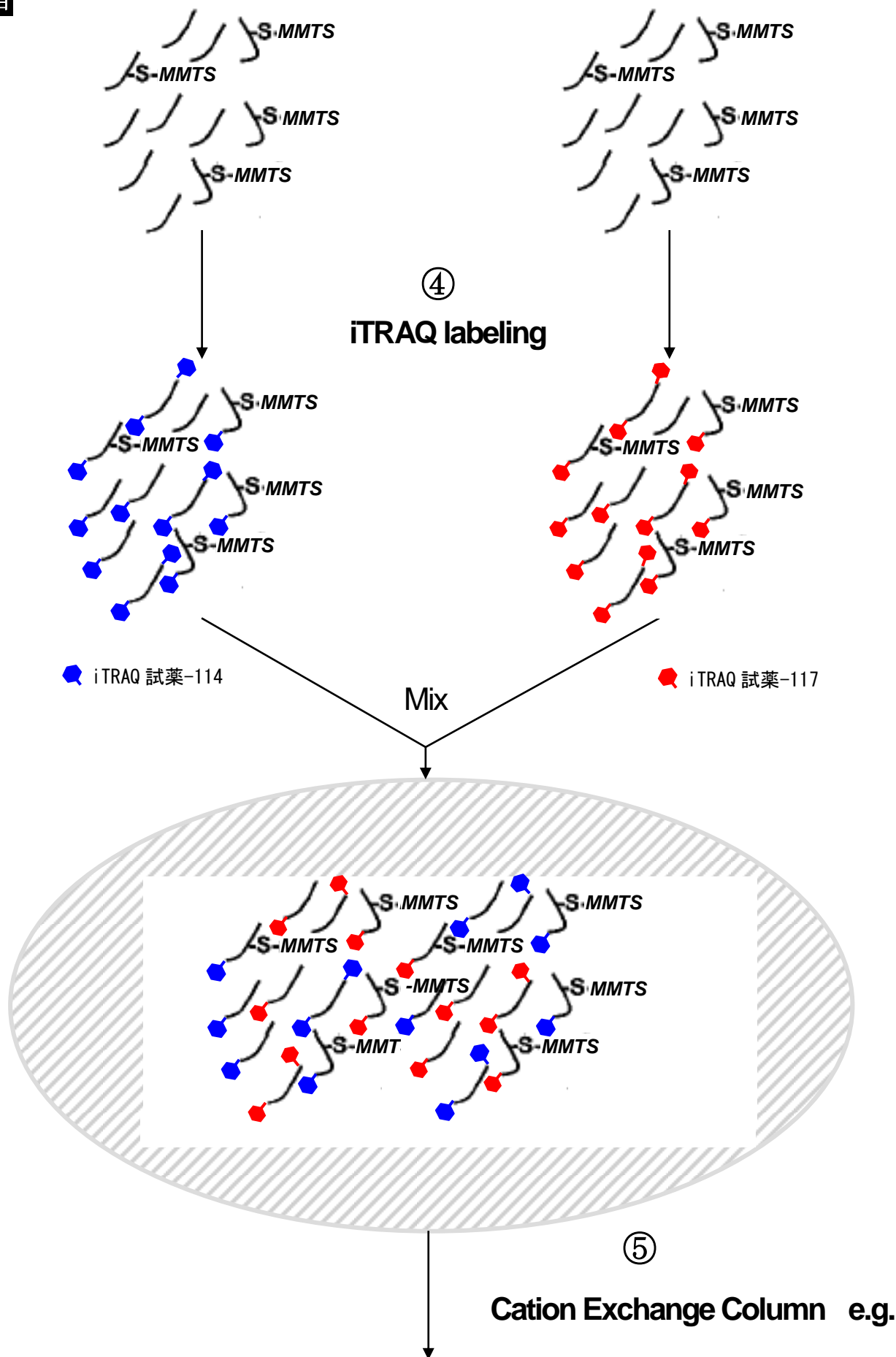
ご用意いただくもの

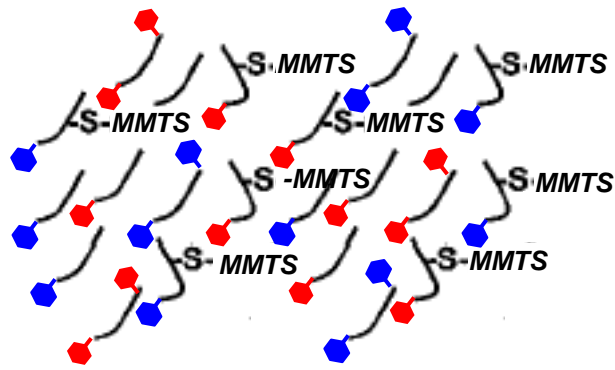
Item	数または量 / 1 assay
使い捨て手袋	必要量
サンプル 1 (Control: 例) 正常な状態の細胞)	5-100 μ g
サンプル 2 (Sample: 例) 異常細胞 最大 3 種類まで)	5-100 μ g
Trypsin with CaCl ₂ (P/N 4352157:10本入, ABSCIEX製)	サンプル 2 種類に対し 1 本
1~1000 μ L のピペッターとチップ	必要量
分画用チューブ と ラック 0.5-2.0mL キャップ付チューブ 1.5mL と >4mL チューブ (陽イオン交換ステップで使用)	1 アッセイに 3-6 本 必要量
シリンジ: 2 インチ, 22 ゲージで先端がフラットなニードル。 シリンジ容量 2.5mL	1
High-resolution cation-exchange column (ラベル化ペプチドのより良い分離が必要な場合に使用。 サンプル量にあわせてカラムサイズは選択。別途 HPLC 装置が必要。) 例) PolySULFOETHYL A™ Column, 5 μ m, 300 Å bead, 2.1 Φ × 220mm, PolyLC, Inc., P/N202SE0503	1
pH 試験紙 (陽イオン交換カラムにサンプルを導入する前に pH をチェックする。 pH レンジは 2.5-4.5)	必要量
Milli-Q® water (18.2Mohm 以上、電導度 0.05 μ S / 0.05 μ Mho 以下)	50mL
ヒートブロック (60°Cで使用)	1
インキュベーター (37°Cで使用)	1
遠心分離機	1
ボルテックス ミキサー	1
遠心減圧乾燥機	1
質量分析装置 (iTRAQ 解析ソフトウェア付) 例) ABSCIEX QTRAP®システムと ProteinPilot™ ソフトウェア	1
Reversed-phase HPLC system	1

2) サンプル調製の流れ(114と117の2種類のタグを用いた場合)

1 日目

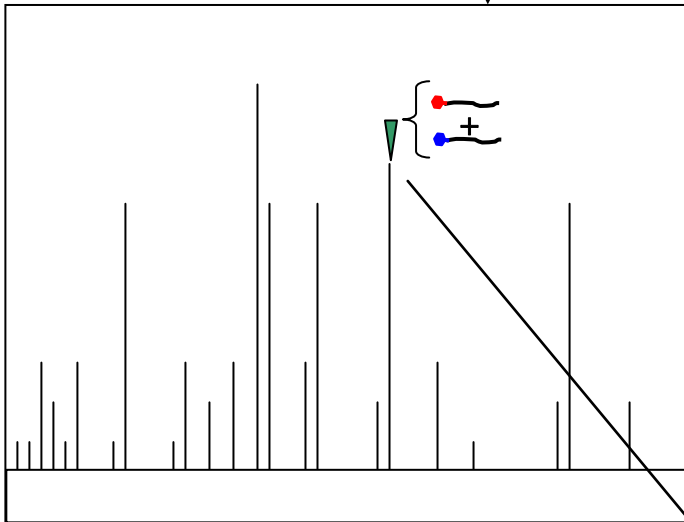




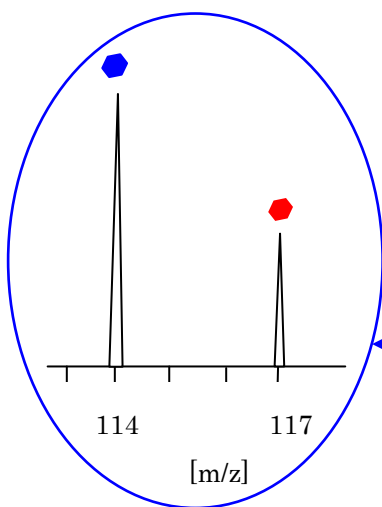
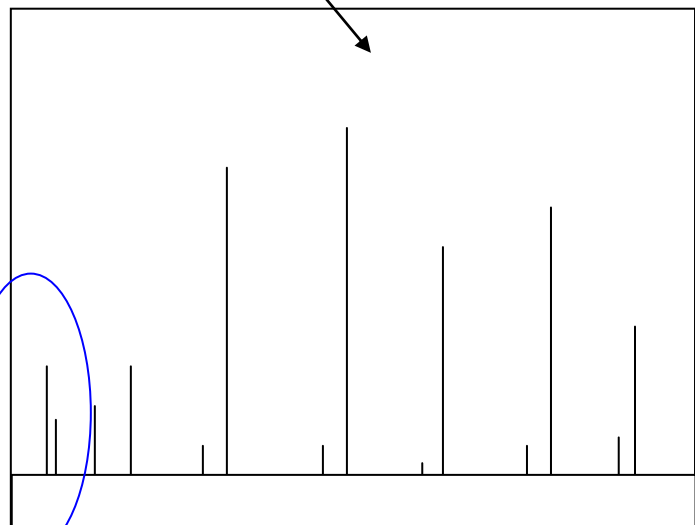


⑥
MS

MS



MSMS



3) 操作手順

サンプル調製

最初にサンプルの夾雑物を除きます。影響が考えられる夾雑物と予想される影響は次の通りです。

iTRAQ試薬のプロトコールを妨害する物質

可能性のある妨害物質	影響	アセトン沈殿を行うタイミング
チオール 例) •DTT •2-Mercaptoethanol	システインのブロックを妨げる	iTRAQラベルのプロトコール開始前
多量の界面活性剤と変性剤 (使用可能な界面活性剤と変性剤の種類と適正濃度は別表参照) 活性プロテアーゼ	トリプシンの不活性化	サンプルの可溶化に必要な場合はシステインの還元・アルキル化を行った後
一級アミン 例) •酢酸アンモニウム •重炭酸アンモニウム •クエン酸アンモニウム •酒石酸アンモニウム •AMPD [2-amino-2-methyl-1,3-propanediol] •重炭酸アミノグアニジン塩 •AMP[2-amino-2-methyl-1-propanol] •エタノールアミン •Gly-Gly •Tris	iTRAQ試薬と反応する。 ラベルを妨げる	トリプシン消化の前




サンプル溶液に1mM以上含まれるとiTRAQ試薬ラベルを妨害する物質

通称	正式名称
酢酸アンモニウム	—
重炭酸アンモニウム	—
クエン酸アンモニウム	—
酒石酸アンモニウム	—
AMPD	2-Amino-2-methyl-1,3-propanediol
重炭酸アミノグアニジン塩	Guanylhydrazine bicarbonate salt
AMP	2-Amino-2-methyl-1-propano
エタノールアミン	2-Aminoethyl alcohol
Gly-Gly	Diglycine
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol


もし高濃度の塩、酸または界面活性剤を含む場合は、クロマトグラフィー、透析、アセトン沈殿 (Appendix C 参照)、超遠心等用いて精製を行ってから操作を始めて下さい。

また、サンプル中のタンパク質含量が 5-100 μ g あることを BCA 法などの定量法を使って確認して下さい。


① Denature and Reduce : SDS による変性および TCEP 還元

- (1) 各 5-100 μ g (量は揃えて下さい)のサンプルを入れたチューブにそれぞれ 20 μ L の Dissolution Buffer  を加えます。
- (2) 1 μ L の Denaturant  を加え、Vortex で混合します。もし溶解しない場合は Appendix-A をご参照下さい。
- (3) 各チューブに 2 μ L の Reducing Reagent  を加えます。
- (4) 各チューブを Vortex で混合し遠心機にかけます。
- (5) 各チューブを 60°C で 1 時間インキュベートします。
- (6) 各チューブを遠心機にかけサンプル溶液をスピンドウンします。

② Alkylation : MMTS によるシステイン残基のアルキル化


- (7) 各チューブに 1 μ L の Cystein Blocking Reagent  を加えます。
- (8) 各チューブを Vortex で混合し遠心機にかけます。
- (9) 各チューブを室温で 10 分間インキュベートします。

③ Trypsin digest : 各サンプルの Trypsin 消化

- (1) Trypsin  のバイアルに Milli-Q® water 25 μ L を入れます。
(サンプル 2 種類につき 1 本の Trypsin を使用します。3 サンプルまたは 4 サンプルのラベルを行う場合は 2 本の Trypsin をご用意下さい。)
- (2) Vortex で混合し、遠心機にかけます。
- (3) 各サンプルチューブに Trypsin 溶液 10 μ L を加えます。
- (4) 各チューブを Vortex で混合して遠心機にかけます。
- (5) 37°C で 12~16 時間インキュベートします。
- (6) Vortex で混合し、遠心機にかけスピンドウンします。

注: iTRAQ ラベルの際、ラベル効率を最大限に引き出すためには液量を 50 μ L にする必要があります。もし、Trypsin 消化後の液量が 50 μ L を越えてしまった場合は、遠心濃縮機で乾燥させた後 30 μ L の Dissolution Buffer で再溶解してから以降の操作を行ってください。

④ iTRAQ labeling : iTRAQ 試薬による N 末端および Lys 残基のラベルとラベルサンプルの混合

- (1) 必要な iTRAQ Reagent のバイアルを室温に戻します。
- (2) 各 iTRAQ Reagent バイアルに 70 μ L のエタノール  を加えます。
- (3) 各バイアルを 1 分間 Vortex で混合し、遠心機にかけます。
- (4) 1 サンプルチューブに対し、1 種類の iTRAQ Reagent 溶液をすべて移します。
- (5) 個々に Vortex で混合し、遠心機にかけます。
- (6) 室温で 1 時間インキュベートします。
- (7) iTRAQ ラベルした各サンプルを、別の新しいチューブにまとめます。
- (8) Vortex で混合し、遠心機にかけます。

任意確認: 全てのサンプルを混合する前に、各サンプルの MSMS 測定を行い iTRAQ ラベルがされていることを確認します。このとき、使用した iTRAQ Reagent のレポーターイオン(114-117)が確認できればラベルは成功ですがもしそれぞれのレポーターイオンが確認できない場合にはラベル操作を再度行います。
尚、測定前にはサンプルの有機溶媒濃度を下げ、ZipTip®でサンプルの夾雑物を除いてください。

⑤ Cation Exchange Column : 陽イオン交換カラムによる精製 (シンプルなサンプルの場合。分画なし)

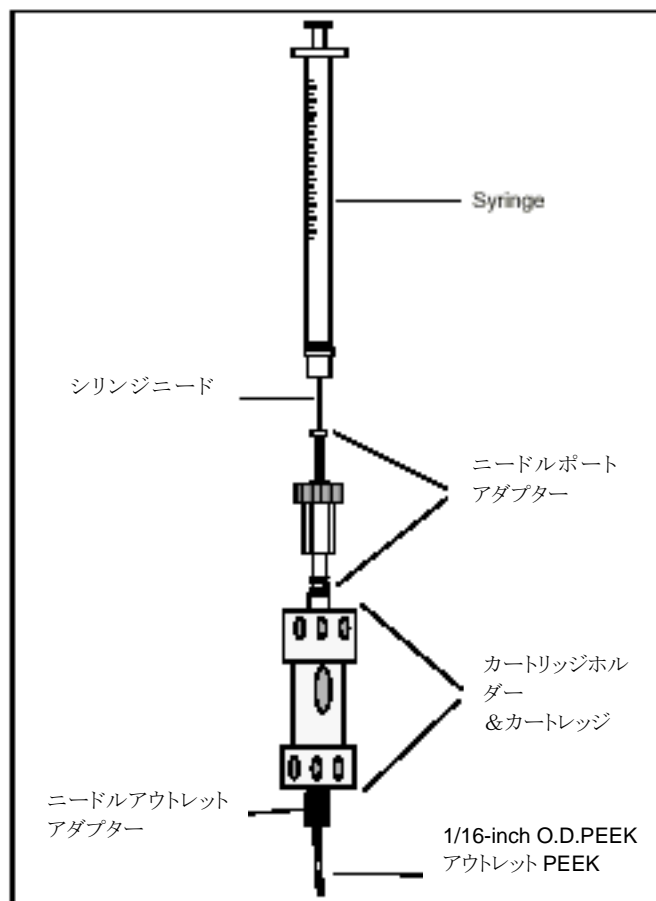
サンプルインジェクトの方法

- (1) 使用するバッファを 2.5mL のシリンジに満たします。
- (2) 気泡を除きます。
- (3) ニードルポートアダプターにシリンジのニードルを挿しこみ、液漏れがないようしっかりとアダプタを締めます。
- (4) シリンジのプランジャーを押してインジェクトします。

*: バッファ交換の際には必ずシリンジを Milli-Q® water で数回洗浄した後、これから使用するバッファで 1 回シリンジを置換します。

カラムの準備

- (1) カートリッジホルダーを組み立てます。
- (2) 次頁の図のように PEEK™ tube とニードルポートアダプターを取り付けます。
- (3) 陽イオン交換カラム(白ラベル)をホルダーにセットします。カラムの方向性はありませんが方向を決めて矢印を記入しておきます。
- (4) Cation Exchange Buffer-Clean を 1mL 流します。送液はシリンジにバッファを入れニードルポートアダプターにシリンジを固定して行います。この時の流速は、2~3 滴/秒でカラムの出口側から液が落ちる速度です。
- (5) Cation Exchange Buffer-Load を 2mL を (4) と同様にして流します。この時の流速は、2~3 滴/秒でカラムの出口側から液が落ちる速度です。



陽イオン交換カラムへのサンプルの導入とペプチドの回収

- (1) ④で調製したサンプル溶液を容量の大きいチューブに移します。
注: 2 種類のサンプルの場合 2mL 以上、4 種類のサンプルの場合 4mL 以上の最終液量になりますのでサンプルに合わせてチューブのサイズをご選択下さい。
- (2) (1)に Cation Exchange Buffer-Load をサンプル液量の 10 倍量加えます。
付記: サンプル溶液に揮発性バッファをご使用いただいている場合 (例:キットに含まれる Dessolution Buffer)、液量を 30 μ L 以下に濃縮した後 1mL の Cation Exchange Buffer-Load を加えることもできます。
- (3) Vortex で混合し、遠心機にかけます。
- (4) pH 試験紙で pH を確認します。
 もし pH が 2.5~3.3 の間にない場合は更に Cation Exchange Buffer-Load を加えて調整します。
- (5) カラム出口にチューブを置き、希釈したサンプルをゆっくり陽イオン交換カラムに流します。
 流速は~1 滴/秒です。カラムを通したバッファは 1 本のチューブに全て集めます。
- (6) 1mL の Cation Exchange Buffer-Load で洗浄します。これにより TCEP, SDS, 塩化カルシウム, 過剰分の iTRAQ 試薬がカラムから洗い出されます。カラムを通したバッファは(5)と同じチューブに集めます。
注: (6)のカラム溶出液 (flow-through) は、最後まで保存しておきます。もし最終サンプルを測定した際サンプルのピークが認められない場合は、flow-through をカラムに再吸着させます。
- (7) カラム出口に別の 1.5mL チューブを置き、ペプチドの溶出のため 500 μ L の Cation Exchange Buffer-elute をゆっくり陽イオン交換カラムに流します。流速は~1 滴/秒です。カラムを通したバッファは 1 本のチューブに全て集めます。

分画を行う場合の Elute buffer 1-6 の調製

以下に示す容量で、CEX バッファパック内の Load と Elution buffer を混合し、Elute buffer 1-6 を作成する。

	Loading buffer (mL)	Elution buffer (mL)	Total (mL)	KCl Conc. (mM)
Elution 1	1.70	0.05	1.75	10
Elution 2	1.30	0.10	1.4	25
Elution 3	1.50	0.25	1.75	50
Elution 4	1.00	0.40	1.4	100
Elution 5	1.00	1.00	2	175
Elution 6	0.00	2.00	2	350

* サンプル回収用に下図に示すチューブをご用意ください。



Flow through の回収:
サンプル液量+1mL
以上の容量のチューブ

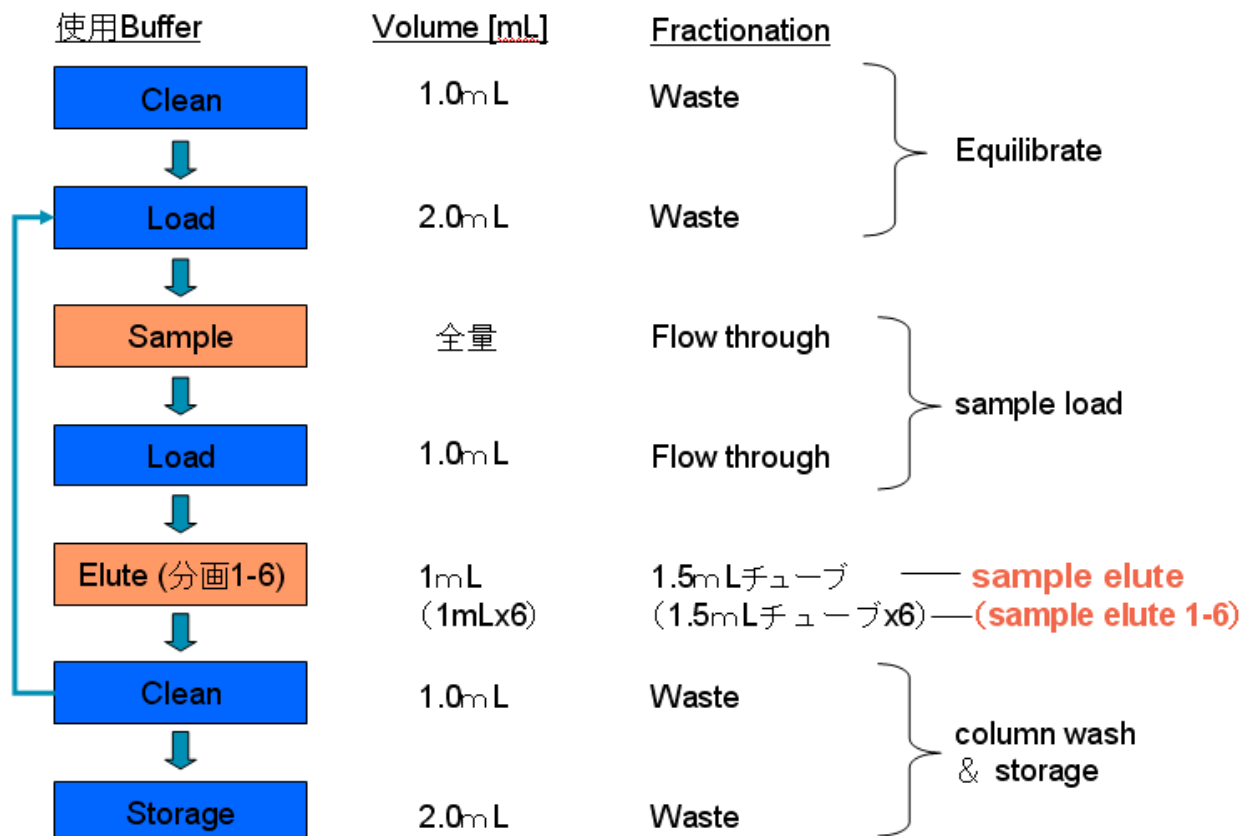


Sample の回収:
1.5mL エッペン型
チューブ

< 必要な試薬 >

Cation Exchange Buffer-Load ◦ (10 mM potassium phosphate(KH ₂ PO ₄) in 25% acetonitrile at pH 3.0)◦
Cation Exchange Buffer-Elute ◦ (10 mM KH ₂ PO ₄ in 25% acetonitrile/ 350 mM potassium chloride (KCl) ◦ at pH 3.0)◦
Cation Exchange Buffer-Clean ◦ (10 mM KH ₂ PO ₄ in 25%acetonitrile/ 1 M KCl at pH 3.0)◦
Cation Exchange Buffer -Storage◦ (10 mM KH ₂ PO ₄ in 25% acetonitrile ◦ at pH 3.0, + 0.1% sodium azide (NaN ₃))◦

⑤の CEX カラムを組み立て、以下のワークフローを則りサンプルを段階的に溶出させます。Elute の際に分画される場合は、()をご参照ください。



カラムの洗浄と保存

- (1) Trypsin を洗浄するため、Cation Exchange Buffer-Clean を 1mL 流します。流速は、2～3 滴/秒です。カラムを通したバッファは捨てます。
- (2) もし次のサンプルを続けて陽イオン交換カラムで精製する場合は、ここからカラムの準備 (5)に戻ります。精製を続けない場合は 2mL の Cation Exchange Buffer-Storage を流します。
- (3) カラムをホルダーから取り出し、両端にキャップをします。
- (4) カラムの使用回数を記録しておきます。
- (5) カラムを 2～8°C に保存します。
- (6) ニードルポートアダプター、ニードルアウトレットアダプター、およびシリンジを Milli-Q® water で洗浄します。かけます。

- * : 弊社 CEX バッファパックを用いた精製は、精製方法の一例です。
 少量の精製には ZipTip®を使用することも可能です。
 また複雑なサンプルは、High resolution カラムと HPLC を用いて複数の分画に分けることもできます。

有機溶媒の除去

- (1) Sample Elute(6fraction 分)を Speed Vac により 100uL 程度にまで濃縮する(Buffer に含まれるアセトニトリルの除去)
- (2) Total で約 1.5mL となるよう 0.1% ギ酸を加えます

脱塩処理

- (1) Sep-Pak(Waters: Sep-Pak Light C18)の再生と平衡化します
- (2) サンプルを送液し、Sep-Pak にタンパク質を吸着させます
- (3) 洗浄液(0.1% ギ酸)を 1.5mL 送液し、Sep-Pak を洗浄します
- (4) 溶出液(70% ACN, 0.1% ギ酸)を 1.5mL 送液し、溶出画分を回収します

有機溶媒の除去

- (1) 脱塩したサンプルを(Sep-Pak の溶出画分したサンプル)を Speed Vac により濃縮・乾固します
- (2) 0.1%ギ酸水を用いて 50uL 程度になるようにサンプル調製します
- (3) 目安として 1-5uL 程度を LC-MS にインジェクションします。(MS のスペクトル、TIC を確認して 2 回目以降の分析のインジェクション量を調節してください。)

Appendix-A

キットに含まれる試薬の代替となる物質

使用可能なバッファ	
<略称>	<正式名称>
•BES	N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid
•BICINE	N,N-Bis(2-hydroxyethyl)glycine
•ホウ酸	-
•CHES	2-(Cyclohexylamino)ethanesulfonic acid
•DIPSO	N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-3-amino-2-hydroxypropanesulfonic acid
•EPPS	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-propanesulfonic acid
•HEPBS	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(4-butanesulfonic acid)
•HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid
•HEPPSO	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-(2-hydroxypropanesulfonic acid)
•MOBS	4-(N-Morpholino)butanesulfonic acid
•MOPS	3-Morpholinopropanesulfonic acid
•PBS	Phosphate Buffered Saline
•PIPES	Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)
•POPSO	Piperazine-1,4-bis(2-hydroxypropanesulfonic acid) dihydrate

使用可能な界面活性剤と変性剤 (トリプシン消化が可能な限界濃度)
•SDS (0.05%)
•OG (Octyl B-D-glucopyranoside) (0.1%)
•NP®-40 (0.1%)
•Triton®-X-100 (0.1%)
•Tween® 20 (0.1%)
•CHAPS (0.1%)
•Urea (<1M)
* : Ureaを使用する際は用事調製します。
還元時、サンプルにUreaが含まれる場合は37°C×1hr. インキュベートします。

注) ご使用の際は、必ずテストを行ってから実際のサンプルを調製してください。

Appendix-B

Six-Protein Mix.の内訳

Table 1 Six-Protein Mix specifications

Protein	Accession Number	μg/tube	nmole/tube
Bovine serum albumin	P02769	22	0.30
β-Galactosidase	P00722	38	0.33
α-Lactalbumin	P00711	10	0.70
β-Lactoglobulin	P02754	24	1.31
Lysozyme	P00698	10	0.70
Apotransferrin	P02787	25	0.33

Table 2 Bovine serum albumin (P02769)

Sequence	Number of Labels	MH+	
		Native	Labeled 1000 to 4000 da
GACLLPK	2	747.3897	1035.6015
NYQEAK	2	752.3579	1040.5697
YLYEIAR	1	927.4940	1071.5999
LVTDLTK	2	789.4722	1077.6840
CCAADDK	2	817.2353	1105.4471
ATEEQLK	2	818.4260	1106.6378
LVVSTQTALA	1	1002.5835	1146.6894
DDSPDLPK	2	886.4158	1174.6276
LCVLHEK	2	887.4483	1175.6601
AEFVEVTK	2	922.4886	1210.7004
CCTESLVNR	1	1116.4310	1260.5369
DLGEEHFK	2	974.4583	1262.6702
QTALVELLK	2	1014.6199	1302.8317
NECFLSHK	2	1023.4392	1311.6510
QNCDQFEK	2	1057.4083	1345.6201
SHCIAEVEK	2	1061.4760	1349.6878
EACFAVEGPK	2	1096.4807	1384.6925
HPEYAVSVLLR	1	1283.7112	1427.8171
CCTKPESER	2	1144.4259	1432.6377
LVNELTEFAK	2	1163.6312	1451.8430
HLVDEPQNLIK	2	1305.7167	1593.9285

Table 2 Bovine serum albumin (P02769) (continued)

Sequence	Number of Labels	MH+	
		Native	Labeled 1000 to 4000 da
LG EYGFQNALIVR	1	1479.7960	1623.9019
VPQVSTPTLVEVSR	1	1511.8433	1655.9492
TVMENFVAFVDK	2	1399.6932	1687.9050
SLHTLFGDELCK	2	1408.6605	1696.8723
ECCDKPLLEK	3	1269.5351	1701.8529
DAFLGSFLYEYSR	1	1567.7433	1711.8492
YICDNQDTISSK	2	1432.6088	1720.8207
TCVADESHAGCEK	2	1441.5220	1729.7338
ETYGDMADCCEK	2	1456.4563	1744.6681
EYEATLEECCA K	2	1480.5468	1768.7587
DDPHACYSTVFDK	2	1543.6197	1831.8316
MPCTEDYLSLILNR	1	1713.8014	1857.9073
ECCHGDLLECADDR	1	1716.5618	1860.6678
LKPDPNTLCDEFK	3	1565.7344	1998.0521
YNGVFQECCQAEDK	2	1725.6381	2013.8499
RPCFSALTPDETYVPK	2	1869.8879	2158.0997
HPYFYAPELLYYANK	2	1888.9274	2177.1392
LFTFHADICTLPDTEK	2	1896.8876	2185.0994
DAIPENLPPLTADFAEDK	2	1955.9602	2244.1720
GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK	2	2481.2310	2769.4429

Table 3 β -Galactosidase (P00722)

Sequence	Number of Labels	MH+	
		Native	Labeled 1000 to 4000
SLNGEWR	1	861.4219	1005.5278
YWQAFR	1	870.4262	1014.5322
FNDDFSR	1	900.3852	1044.4911
LTAACFDR	1	942.4177	1086.5236
LNVENPK	2	813.4470	1101.6589
QNNFNAVR	1	962.4808	1106.5867
WLPAMSER	1	989.4879	1133.5938
WVGYGQDSR	1	1067.4910	1211.5969
GDFQFNISR	1	1083.5223	1227.6282

Table 3 β -Galactosidase (P00722) (continued)

Sequence	Number of Labels	MH+	
		Native	Labeled 1000 to 4000
IDPNAWVER	1	1099.5536	1243.6595
TDRPSQQLR	1	1100.5812	1244.6872
TPHPALTEAK	2	1064.5740	1352.7859
LAAHPPFASWR	1	1252.6591	1396.7650
HQQQFFQFR	1	1265.6180	1409.7239
ELNYGPHQWR	1	1299.6234	1443.7294
LWSAEIPNLYR	1	1361.7218	1505.8277
LPSEFDLSAFLR	1	1394.7320	1538.8379
DWENPGVTQLNR	1	1428.6872	1572.7931
QFCMNGLVFADR	1	1446.6332	1590.7391
TMITDSLAVVLQR	1	1446.7990	1590.9049
APLDNDIGVSEATR	1	1457.7236	1601.8295
IGLNCQLAQAER	1	1460.7354	1604.8413
VDEDQPFPAVPK	2	1341.6691	1629.8809
YSQQQLMETSHR	1	1507.6964	1651.8023
YHYQLWCQK	2	1413.6448	1701.8566
AVLEAEVQMCGELR	1	1593.7439	1737.8498
QSGFLSQMWIGDK	2	1496.7208	1784.9326
LSGQTIEVTSEYLFR	1	1742.8965	1887.0024
VNWLGLGPQENYPDR	1	1757.8611	1901.9670
WSDGSYLEDDQDMWR	1	1787.7335	1931.8394
IENGLLLLNGKPLLIR	2	1776.1111	2064.3229
IIFDGVNSAFHLWCNGR	1	1994.9369	2139.0428
LQGGFWDDWVDQSLIK	2	1890.9754	2179.1872
CSHYPNHPLWYTLCDR	1	2096.8603	2240.9662
YGLYWDEANIETHGMVPMNR	1	2408.1379	2552.2438

Table 3 β -Galactosidase (P00722) (continued)

Sequence	Number of Labels	MH+	
		Native	Labeled 1000 to 4000
DVSL LHKPTTQISDFHVATR	2	2265.1992	2553.4110
YDENG NPWSAYGGDFGDTPNDR	1	2446.9812	2591.0871
AWELHTADGTLIEAEACDVGFR	1	2462.1696	2606.2755
IDGSGQMAITVDVEVASDTPHPAR	1	2466.1935	2610.2994
WDLPLSDMYTPYVFPSENGLR	1	2500.1859	2644.2918
QLIELPELPQPESAGQLWLTVR	1	2517.3717	2661.4776
VVQPNATAWSEAGHISAWQQWR	1	2522.2329	2666.3388
NHPSVIIWSLGNESGHGANHDALYR	1	2744.3293	2888.4352
VTVSLWQGETQVASGTAPFGGEIIDER	1	2847.4165	2991.5224
HEHHPLHGQVMDEQTMVQDILLMK	2	2866.3802	3154.5921
SVDPSRPVQYEGGGADTTATDIICPMYAR	1	3116.4127	3260.5186
WLSLPGETRPLILCEYAHAMGNSLGGFAK	2	3177.5688	3465.7806
HSDNELLHWMVALDGKPLASGEVPLDVAPQGK	3	3423.7371	3856.0548
LAENLSVTLPAASHAIPHLLTSEMDFCIELGNK	2	3568.7490	3856.9608

Table 4 α -Lactalbumin (P00711)

Sequence	Number of Labels	MH+	
		Native	Labeled 1000 to 4000
LDQWLCEK	2	1080.4858	1368.6976
VGINYWLAHK	2	1200.6530	1488.8648
FLDDDLTDDIMCVK	2	1688.7222	1976.9340
DDQNP HSSNICNISCDK	2	1981.7512	2269.9631

Table 5 β -Lactoglobulin (P02754)

Sequence	Number of Labels	MH+	
		Native	Labeled 1000 to 4000
IDALNENK	2	916.4740	1204.6858
LIVTQTMK	2	933.5443	1221.7561
VLVLDTDYK	2	1065.5832	1353.7950
WENGECAQK	2	1110.4348	1398.6467
TPEVDDEALEK	2	1245.5851	1533.7969
LSFNPTQLEEQCHI	1	1704.7726	1848.8785
VYVEELKPTPEGDLEILLQK	3	2313.2594	2745.5771
VAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLR	1	2707.3765	2851.4824
YLLFCMENS AEPESLACQCLVR	1	2785.1660	2929.2719

Table 6 Lysozyme (P00698)

Sequence	Number of Labels	MH+	
		Native	Labeled 1000 to 4000
HGLDNYR	1	874.4171	1018.5230
WWCNDGR	1	982.3664	1126.4723
CELAAMK	2	882.3887	1170.6006
GTDVQAWIR	1	1045.5431	1189.6490
FESNFNTQATNR	1	1428.6508	1572.7567
GYSLGNNVCAAK	2	1314.5975	1602.8093
IVSDGNGMNAWVAWR	1	1675.8015	1819.9074
NTDGSTDYGIQINSR	1	1753.8357	1897.9416
NLCNIPCSALLSSDITASVCAK	2	2475.0884	2763.3002

Table 7 Apotransferrin (P02787)

Sequence	Number of Labels	MH+	
		Native	Labeled 1000 to 4000
SCHTGLGR	1	876.3820	1020.4879
SCHTAVGR	1	876.3820	1020.4879
EACVHK	2	732.3173	1020.5291
GDVAFVK	2	735.4041	1023.6159
KPLEK	3	614.3877	1046.7055
APNHAVVTR	1	964.5328	1108.6387
NPDPWAK	2	827.4052	1115.6170
ASYLDCIR	1	986.4439	1130.5499
DSAHGFLK	2	874.4423	1162.6541
DDTVCLAK	2	910.4014	1198.6132
DGAGDVAFVK	2	978.4896	1266.7015
YLGEEYVK	2	1000.4991	1288.7110
KPVDEYK	3	878.4624	1310.7801
WCALSHHER	1	1184.5093	1328.6153
DSGFQMNQLR	1	1195.5530	1339.6589
EGYYGYTGAFR	1	1283.5697	1427.6756
HQTVPQNTGGK	2	1166.5918	1454.8036
DYELLCLDGTR	1	1343.5975	1487.7035
SASDLTWDNLK	2	1249.6065	1537.8183
CDEWSVNSVGK	2	1269.5244	1557.7362
HSTIFENLANK	2	1273.6541	1561.8659
EFQLFSSPHGK	2	1276.6326	1564.8444
WCAVSEHEATK	2	1306.5560	1594.7678

Table 7 Apotransferrin (P02787) (continued)

Sequence	Number of Labels	MH+	
		Native	Labeled 1000 to 4000
MYLGYEYVTAIR	1	1478.7354	1622.8413
CSTSSLLEACTFR	1	1509.6210	1653.7269
DQYELLCLDNTR	1	1528.6776	1672.7835
SVIPSDGPSVACVK	2	1404.6867	1692.8985
CGLVPVLAENYNK	2	1465.7183	1753.9301
DCHLAQVPSHTWAR	1	1678.8158	1822.9217
FDEFFSEGCAPGSK	2	1566.6245	1854.8363
KPVEEYANCHLAR	2	1575.7412	1863.9530
TAGWNIPMGLLYNK	2	1577.8150	1866.0268
EDPQTFYYAVAVVK	2	1629.8164	1918.0283
LCMGSGNLNCEPNNK	2	1684.6989	1972.9108
IECVSAETTEDCIAK	2	1703.7000	1991.9119
EGTCPEAPTDECKPVK	3	1795.7375	2228.0552
SAGWNIPIGLLYCDLPEPR	1	2160.0622	2304.1681
SDNCEDTPEAGYFAVAVVK	2	2060.8945	2349.1063
EDLIWELLNQAQEHFGK	2	2070.0296	2358.2414
IMNGEADAMSLDGGFVYIAGK	2	2159.0153	2447.2271
QQQHLFGSNVTDCSGNFCLFR	1	2493.0572	2637.1631

Appendix-C

タンパク質の抽出

プロトコールの一例:

抽出液を調製する

1. 抽出液を調製する
2. 破碎した組織に対し、10-20 倍量(weight/volume)の抽出液を加える
3. サンプルをホモジネートする
4. サンプル溶液を 10,000 x g、30min 4°Cで遠心し、上清を回収する

<必要な試薬>

サンプル抽出液(一例)

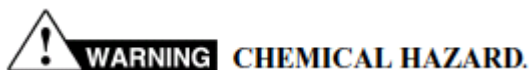
Urea8M 又は NP-40 0.1%/TEAB(Triethylammonium bicarbonate)500mM

又は

タンパク質抽出キット(T-PER Tissue Protein Extraction Reagent(PIERCE))、
MPEX PTS Reagents などなど、各キットの説明書を参考に調製してください。
必要に応じて Protein inhibitor を添加してください。

アセトン沈殿

重要:トリプシン消化後にアセトン沈殿を行わないで下さい!



アセトンは可燃性の液体および蒸気です。アセトンの暴露は眼、皮膚、上気道炎症の原因となります。長期間または繰り返しの接触は皮膚の乾燥の原因となります。更にアセトンの暴露は中枢神経系の抑制の原因となります。熱源、火花、炎から遠ざけて保管してください。MSDS を読み、取扱説明書に従ってご使用ください。適切な保護眼鏡、保護手袋、保護着を装着してご使用ください。

アセトン沈殿によるサンプルの精製

1. アセトンは-20°Cに、サンプルはサンプルチューブに入れ 4°Cで冷却します。
2. 冷やしたサンプルチューブに、サンプル溶液量の 6 倍容量の冷アセトンを加えます。
3. サンプルチューブを 3 回上下反転させます。
4. 沈殿ができるまで-20°Cでインキュベートします(30 分から一晚)。
5. 遠心機にかけた後、アセトンを静かに除きます。乾燥させないで下さい。
6. 沈殿したペレットをサンプルとして使用します。

タンパク質定量

プロトコールの一例:

1. サンプルの一部を取り、MilliQ 水のより TEAB の濃度を 5mM まで希釈
2. ProteinAssay 用キット(Pierce BCA Protein Assay Kit など)を用いてタンパク質定量を行う。詳しくは各キットの説明書を参照ください。
 - ・BCA によりタンパク質定量をする場合は、562nm の吸収波長を測定する分光光度計が必要です
 - ・検量線用標準溶液の希釈しはサンプル溶液と同じ組成 (5mM TEAB) を使用してください
3. タンパク質定量の結果から、Buffer 置換したサンプル溶液の一部を 100ug/20uL containing 500mM TEAB(in 可溶化試薬) の濃度に調製
 - ・タンパク質量が 100ug に満たない場合は、比較したいサンプル総重量が同じになるように調製する (iTRAQ ラベル化サンプルの場合、各サンプル 5-100ug のタンパク質量が必要)

<必要な試薬>

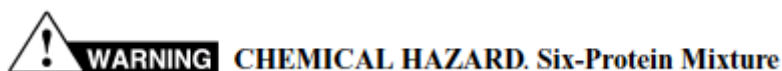
1M TEAB

BCA Protein Assay Kit など

Protein Assay Kit の種類によって、使用が困難な試薬類 (Buffer や界面活性剤) がありますので、各キットの説明書をご参照ください

実験における注意事項

1. 手袋をつける
2. 試薬は室温に戻してから開封する
3. チューブに入っている場合には、必ずスピンドルさせて内容物を下に集めてから開封する
4. 実験ノートをつける→試薬等の計算履歴、ロット、サンプル前処理履歴を終えるようにする
5. ラベル前にならずタンパク質定量を行う。定量時に使用する検量線は Buffer 組成のもので作成すえう
6. iTRAQ 試薬のラベル化するサンプル量 (5-100ug) を用いる (適切でない量でのラベル化は、反応効率を悪くし、定量的な評価を行うことができません)
7. 各プロセスの pH や温度を確認する



Six-Protein Mixture はアレルギー反応の原因となります。粉末や蒸気を吸い込むこと、目や皮膚に接触することを避けます。MSDS を読み、取扱説明書に従ってご使用ください。適切な保護眼鏡、保護手袋、保護着を装着してご使用ください。

iTRAQ ラベルされたコントロールサンプルの分析の成功により、お客様のサンプル調製プロトコールが Trypsin 消化と iTRAQ 試薬ラベル反応を妨げないことをご確認いただけます。

研究用にのみ使用できます。診断目的およびその手続き上での使用は出来ません。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners.

AB SCIEX™ is being used under license.

詳細な説明や知的所有権等に関しては付属のマニュアルを必ずご確認ください。

© 2010 K.K. AB SCIEX.