

安定同位体標識タグ試薬 質量分析用比較定量分析キット

研究用試薬

MJ-48(13, 12)2K, AE
発行 2013. 12



Cat.No. A132-0178

取扱説明書

- 本キットは試験研究用です。それ以外の用途では使用しないで下さい。
- ご使用にあたっては必ず本書をお読みください。
- 本書は、ご使用になるまでいつでも取り出せる場所に大切に保管してください。

- 本書の著作権は弊社に帰属するものです。本書の一部、または全部を弊社に無断で転載、複製、改変することを禁止します。
- 本書に記載された仕様、デザイン、文面等は改良のため、予告することなしに変更することがあります。
- 本書を作成するにあたり万全を期しておりますが、万一不明な点、記載漏れ等お気づきの点がございましたら、下記連絡先にお問い合わせください。

E-mail : Isotope.TNS@tn-sanso.co.jp



1. はじめに

このたびは、質量分析用比較定量分析キット「Py-Tag (ピーワイ・タグ) for PROTEINS」をお買い上げいただき、誠にありがとうございます。

「Py-Tag for PROTEINS」は、質量分析装置を用いて、タンパク質またはペプチドを高精度に同時解析するための試薬キットです。プロテオームの定量解析用としてご利用ください。

また、本書をよくお読みいただき、正しいお取り扱い方法を十分にご理解ください。

2. 安全上のご注意

以下の点につきましては特にご注意ください。

- 本キットは試験研究用です。
- 一般的な生化学実験経験者を対象としています。それ以外の方のご使用はご遠慮ください。
- 安全にご使用していただくために、特にご注意ください内容に下記注意事項を表示しております。本マークに併記される注意事項は必ずお守りください。

注意 取り扱いを誤った場合に、軽傷または軽微な物的損害の発生する恐れがあるリスク

- ご使用にあたっては安全ゴーグル、手袋、白衣等、適切な保護具を着用してください。万一、溶液等が眼や皮膚に付着した場合には、清潔な流水で洗浄してください。炎症が見られる場合には、医師の診察を受けてください。

注意 安全ゴーグル、手袋、白衣等の保護具を着用して操作してください。キット溶液が眼や皮膚に付着すると炎症の原因になる場合があります。

- 本書に記載されていないご使用方法により発生した安全上の問題については、弊社は責任を負いかねますので予めご了承ください。

3. 保証

保証内容

- 到着時、容器の破損、液漏れが確認された場合は、お問い合わせください。状況により、無償で交換いたします。

免責事項

- 保証期間内であっても以下のような場合には免責とさせていただきます。
 - 1) 誤った保存方法及びご使用方法による不具合
 - 2) 本キットの性能によらない不具合
- Py-Tag標識は化学反応によるものであり、キットの性能以外の様々な要因により、Py-Tag標識率が低下する可能性があります。そのため、全てのタンパク質及びペプチドへのPy-Tag標識を保証するものではありません。
- 本キットの不具合による逸失利益、または本キットを使用して得られたサンプルを分析したことによる質量分析装置の不具合等について、弊社では一切責任を負いかねますので予めご了承ください。

4. 保存方法

- 本キットは冷暗所で保管してください。
- 但し、試薬Aと試薬Bの混合液は、調製後、小分けし-80℃で保存してください。

5. キット内容

- 200 mM Py0水溶液 100 μ L (0.5 mLチューブ) 1本
- 200 mM Py6水溶液 80 μ L (0.5 mLチューブ) 1本
- 200 mM Py12水溶液 80 μ L (0.5 mLチューブ) 1本
- 試薬A (5 mLチューブ) 1本
- 試薬B (5 mLチューブ) 1本
- 分離用カラム (Phカラム) 10個
- 廃液用チューブ 10個
- 取扱説明書(本書) 1部

6. キット構成液主要成分

Py0/Py6/Py12 水溶液

Py0: 2,4,6 - トリエチル - 3,5 - ジメチルピリリウム トリフルオロメタンスルホン酸塩
Py6: 2,4,6 - トリエチル - 3,5 - ジメチルピリリウム - $^{13}\text{C}_6$ トリフルオロメタンスルホン酸塩
Py12: 2,4,6 - トリエチル - 3,5 - ジメチルピリリウム - $^{13}\text{C}_{12}$ トリフルオロメタンスルホン酸塩

試薬A/試薬B

試薬A: 7 M 尿素, 3 M チオ尿素, 2 % CHAPS
試薬B: 50 mM ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.5)

Py0/Py6/Py12水溶液は黄色に変色することがありますが、品質に問題はありません。

7. キットご使用に必要な器具・試薬類

ご使用の前に以下をご準備ください。

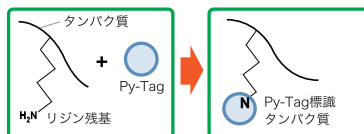
- 1) 蒸留水
- 2) 滅菌済み0.6 mLサンプルチューブ、1.5 mLサンプルチューブ
- 3) アルミブロックヒーター
- 4) ウォーターバス
- 5) マイクロピペット
- 6) 卓上遠心機
- 7) ボルテックスミキサー
- 8) 質量分析装置

8. Py-Tag 標識手順

Py-Tag 試薬 基本情報

- 本キットはタンパク質またはペプチドにPy-Tag試薬(Py0, Py6, Py12)を標識するキットです。
- タンパク質またはペプチドに含有するリジンに特異的に反応し、リジン残基1カ所につき質量差6または12を付与することができます。

Py-Tag試薬 反応機構



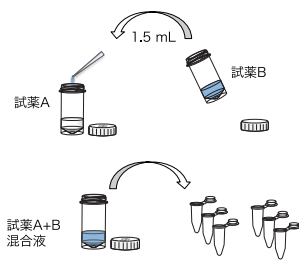
Py-Tag標識により増加する質量数

増加する組成式	増加する質量数 [M+H] ⁺ (m/z)
Py0使用時	$\text{C}_{13}\text{H}_{19}$ 175.15
Py6使用時	$\text{C}_7^{13}\text{C}_6\text{H}_{19}$ 181.17
Py12使用時	$\text{C}_1^{13}\text{C}_{12}\text{H}_{19}$ 187.19

8.1 タンパク質への Py-Tag 標識手順

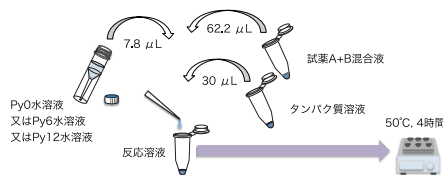
①試薬A+B混合液と測定サンプルの準備

- 1.5 mLの試薬Bを試薬Aのチューブに加え、ボルテックスミキサーで混合します。
- 30℃のウォーターバスで温めながら、15～20分間かけて完全に溶解させます。
- 試薬A+B混合液約3 mL分を、200～500 μL に小分けして-80℃で保存します。
*凍結融解を繰り返すと、性能が低下する恐れがあります。
- タンパク質を試薬A+B混合液で濃度1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ に調製します。



②タンパク質のPy-Tag標識

- タンパク質溶液 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
30 μL 、試薬A+B混合液 62.2 μL 、各Py-Tag試薬 7.8 μL を混合し、ヒートブロックで50℃、4時間反応させます。



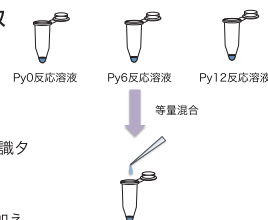
<反応溶液組成>

タンパク質溶液 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	30 μL
試薬A+B混合液	62.2 μL
Py0 or Py6 or Py12	7.8 μL
Total	100 μL

注意 加温部には触れないでください。

③Py-Tag標識反応の停止と標識タンパク質の回収

各反応液を任意の量で等量混合します。



アセトン沈殿法により、Py-Tag標識反応を停止させ、標識タンパク質を回収します。

*アセトン沈殿法の手順例

- 等量混合した溶液の1.5～2倍量の冷アセトンを加え、ボルテックスミキサーでよく混合します。
- 10分以上、氷冷します。
- 12,000 rpm、5分間、4℃で遠心分離します。
- 上清を除き、沈殿物を乾燥させます。

④

9.1 分離用カラム(Phカラム)を使用した精製手順

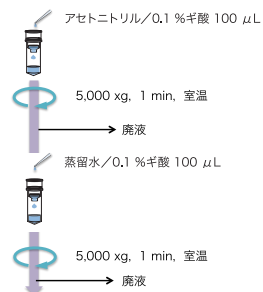
分離用カラム(Phカラム)の使用上の注意

- 本カラムは使い捨てです。再使用はできません。
- 実験は全て遠心操作で行い、Phカラムの蓋は開けた状態で使用してください。
- サンプルチューブ類が遠心機の蓋などに接触しないことを確認の上ご使用ください。
- 遠心機の取扱いは付属の取扱説明書に従ってください。

①分離用カラム(Phカラム)の平衡化

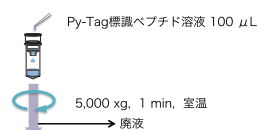
分離用カラム(Phカラム)を廃液用チューブにセットします。
アセトニトリル/0.1%ギ酸100 μL を添加し、5,000 xg、1分間、室温で遠心分離します。さらに、蒸留水/0.1%ギ酸を100 μL 添加し、5,000 xg、1分間、室温で遠心分離します。

注意 試薬の取扱いはMSDSに従ってください。



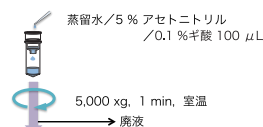
②サンプル吸着

Py-Tag標識ペプチド溶液100 μL を添加し、5,000 xg、1分間、室温で遠心分離します。



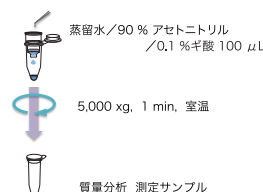
③カラム洗浄

蒸留水/5%アセトニトリル/0.1%ギ酸100 μL を添加し、5,000 xg、1分間、室温で遠心分離します。



④Py-Tag修飾ペプチドの溶出

1.5 mLチューブに分離用カラム(Phカラム)をセットします。
90%アセトニトリル/0.1%ギ酸100 μL を添加し、5,000 xg、1分間、室温で遠心分離します。



⑥

④酵素処理

回収したPy-Tag標識タンパク質を還元・アルキル化した後、トリプシン等で酵素処理します。
*Py-Tag修飾されたリジン残基はトリプシン消化を受けません。トリプシン消化で生じるペプチド断片はアルギニン末端となります。

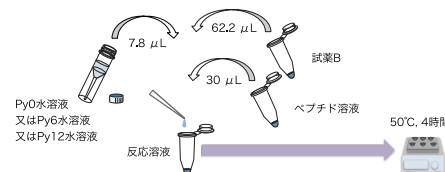
8.2 ペプチドへの Py-Tag 標識手順

①測定サンプルの準備

ペプチドを試薬Bで濃度1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ に調製します。
*試薬Aは使用しません。

②ペプチドのPy-Tag標識

ペプチド溶液 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
30 μL 、試薬B 62.2 μL 、各Py-Tag試薬 7.8 μL を混合し、ヒートブロックで50℃、4時間反応させます。



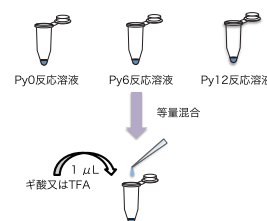
<反応溶液組成>

ペプチド溶液 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	30 μL
試薬B	62.2 μL
Py0 or Py6 or Py12	7.8 μL
Total	100 μL

注意 加温部には触れないでください。

③Py-Tag標識反応の停止

各反応液を任意の量で等量混合します。混合溶液100 mLに対してギ酸又はトリフルオロ酢酸(TFA)を1 μL 加え、Py-Tag標識反応を停止させます。



9. 前処理精製方法

本キットで作製したPy-Tag標識ペプチドは、カラムやSDS-PAGE等で精製できます。

本キット付属の分離用カラム(Phカラム:GLサイエンス社製)で、Py-Tag標識反応後に未反応ペプチドとPy-Tag標識ペプチドを分離できます。

更に精製が必要な場合は、別途市販の精製カラムを組み合わせるご使用ください。

⑤

10. 解析方法

本キットで作製したPy-Tag標識ペプチドは、質量分析計で、同定・定量できます。

質量分析計の操作方法及び解析ソフトの使用法は、それらに付属の取扱説明書に従ってください。

また、多試料同時解析を行われる際は、ご使用の質量分析計に付属の解析ソフト及びライセンスフリーのソフト(Skyline等)をご利用ください。

11. 廃棄方法

本キットの溶液及び溶液が付着した容器・器具等の廃棄は、各成分のMSDSをご参照の上、地域の条例等で指定された方法に従って行ってください。

12. FAQ

タンパク質濃度の適正値はありますか？

推奨値は1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ です。濃度が薄いとチューブへの吸着により、適正なサンプル量が確保できない可能性があります。

Py-Tag標識反応を阻害する物質はありますか？

アンモニウム塩を含む緩衝バッファーは、Py-Tag試薬と反応するため使用できません。

ペプチドのN末端とは反応しないのですか？

反応しません。タンパク質及びペプチドに含有するリジン残基のみ特異的に反応します。

中性付近でもPy-Tag標識反応ができますか？

中性付近でも反応は進むと推測されますが、標識率が低下する恐れがあります。pH 9.5での反応を推奨します。

試薬・カラムの追加購入はできますか？

いずれもご購入できます。お気軽にお問い合わせください。

■「Py-Tag for PROTEINS」お問い合わせ窓口

大陽日酸株式会社
メディカル事業本部SI事業部

E-mail : Isotope.TNS@tn-sanso.co.jp
URL : <http://stableisotope.tn-sanso.co.jp>
TEL : 03-5788-8550 FAX : 03-5788-8710

⑦