

「第三回 生物系研究者のための質量分析に関する教育セミナー」報告

日時：2010年3月17日（水）15：00～16：30

場所：生物科学研究棟 3階大セミナー室（S311）

講師：（株）エービー・サイエックス 津幡 卓一 博士

内容：タンパク質の同定から定量解析まで — iTRAQ 試薬、MRM を用いて —

相互作用タンパク質の同定からリン酸化の定量解析、

MRM を用いたタンパク質の確認・定量まで

セミナー参加者：25名（エービー関係者：2名）

基幹研究所：5 研究室、1 ユニット、3 チーム

脳科学総合研究センター：1 チーム、1 ユニット

今回は年度末ということもあったため参加者は少なめではあったが、参加者はMSのことを良く知りたいという熱心な方が集まったようです。

内容は iTRAQ 試薬を用いた解析だったので、解析原理などが分かり、興味を持たれた方が多かったように思われます。

以上

ケミカルバイオロジー 研究基盤施設教育セミナー

第三回 生物系研究者のための 質量分析に関する教育セミナー

質量分析について、初歩から学ぶ教育セミナーを開催いたします。

日時 2010年3月17日（水）15：00～16：30
場所 生物科学研究棟 3階大セミナー室（S311）
講師 （株）エービー・サイエックス 津幡 卓一 博士
（旧 アプライドバイオシステムズジャパン（株））
内容 タンパク質の同定から定量解析まで

— iTRAQ試薬、MRMを用いて —

相互作用タンパク質の同定からリン酸化の定量解析、

MRMを用いたタンパク質の確認・定量まで

主催 ケミカルバイオロジー研究基盤施設
バイオ解析チーム

連絡先 バイオ解析チーム
渡辺 (kowashi@riken.jp)

* 参加に当たり事前予約が必要となりますので、
連絡先(渡辺)までご連絡ください。



今後の教育セミナーの予定

第四回 2010年4月15日（木）サーモフィッシャーサイエンティフィック（株）

第五回 2010年5月13日（木）日本ウオーターズ（株）

第六回 2010年6月 未定 マトリックスサイエンス（株）

第七回 2010年7月 未定 アジレント・テクノロジー（株）

バイオ解析チームHPへの
リンクはココをクリック

他の教育セミナーへの
リンクはココをクリック

著作権はRIKENにあります。
無断複製・転載を禁止します。



タンパク質の同定から定量解析まで
—iTRAQ試薬、MRMを用いて—

AB Sciex

津幡 卓一



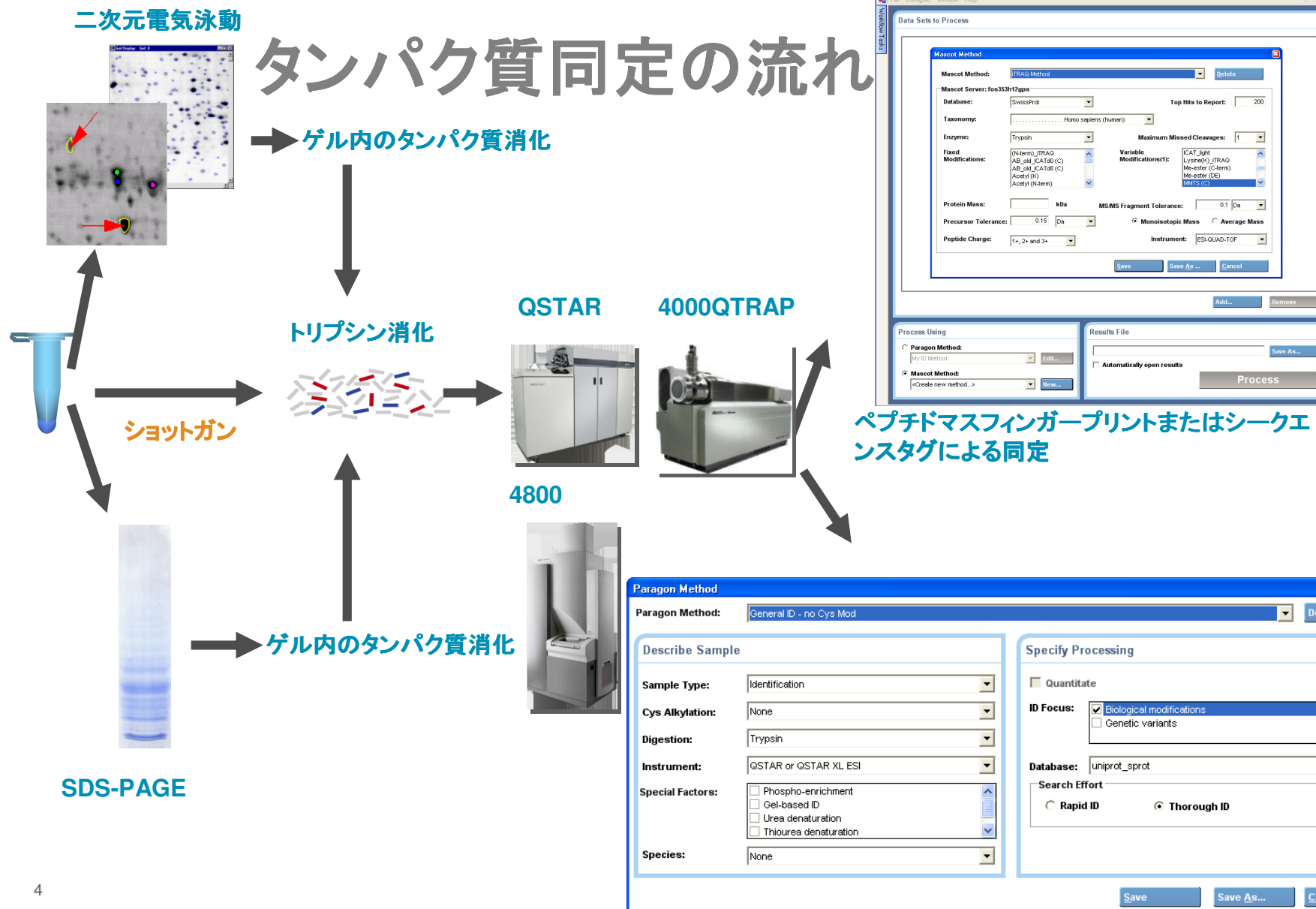
内容

- タンパク質同定の原理
 - 同定の原理と電気泳動からの同定及びショットガン解析、定量解析
- タンパク質の定量
- 4800、QSTAR、QTRAPによるプロテオミクス



タンパク質同定の原理 同定の原理と電気泳動からの同定及びショットガン解析、定 量解析

タンパク質同定の流れ





タンパク質の定量

iTRAQ™試薬のデザイン

等質量タグ
(全質量 = 145)

リポーター

電荷を有する
(質量 = 114から 117)

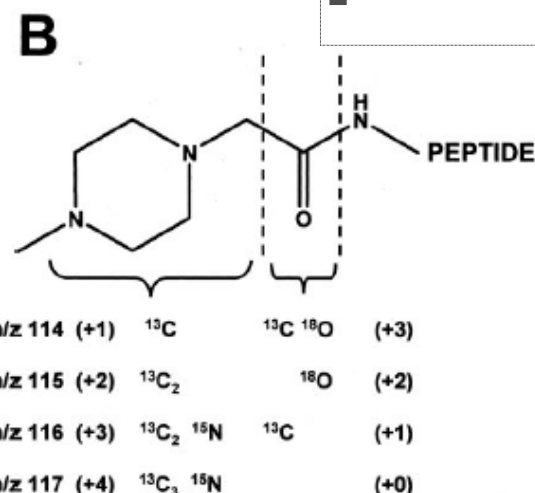
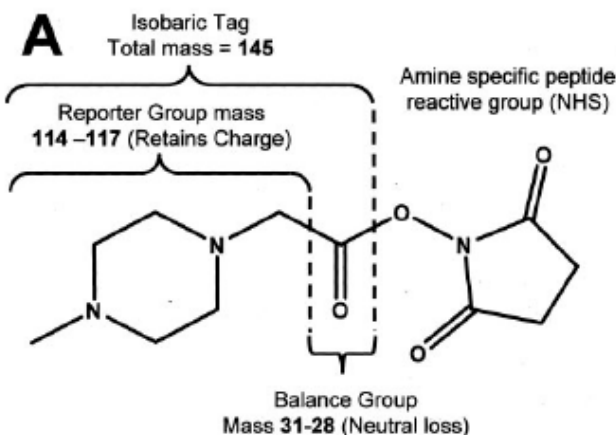
- ✓ MS/MSで強いシグナル
- ✓ b-とyイオンシリーズ
- ✓ 電荷状態を維持
- ✓ ペプチドのイオン化効率を維持
- ✓ スペクトル未検出域にリポーターを検出

バランス

ニュートラルロス
(質量 = 31から 28)

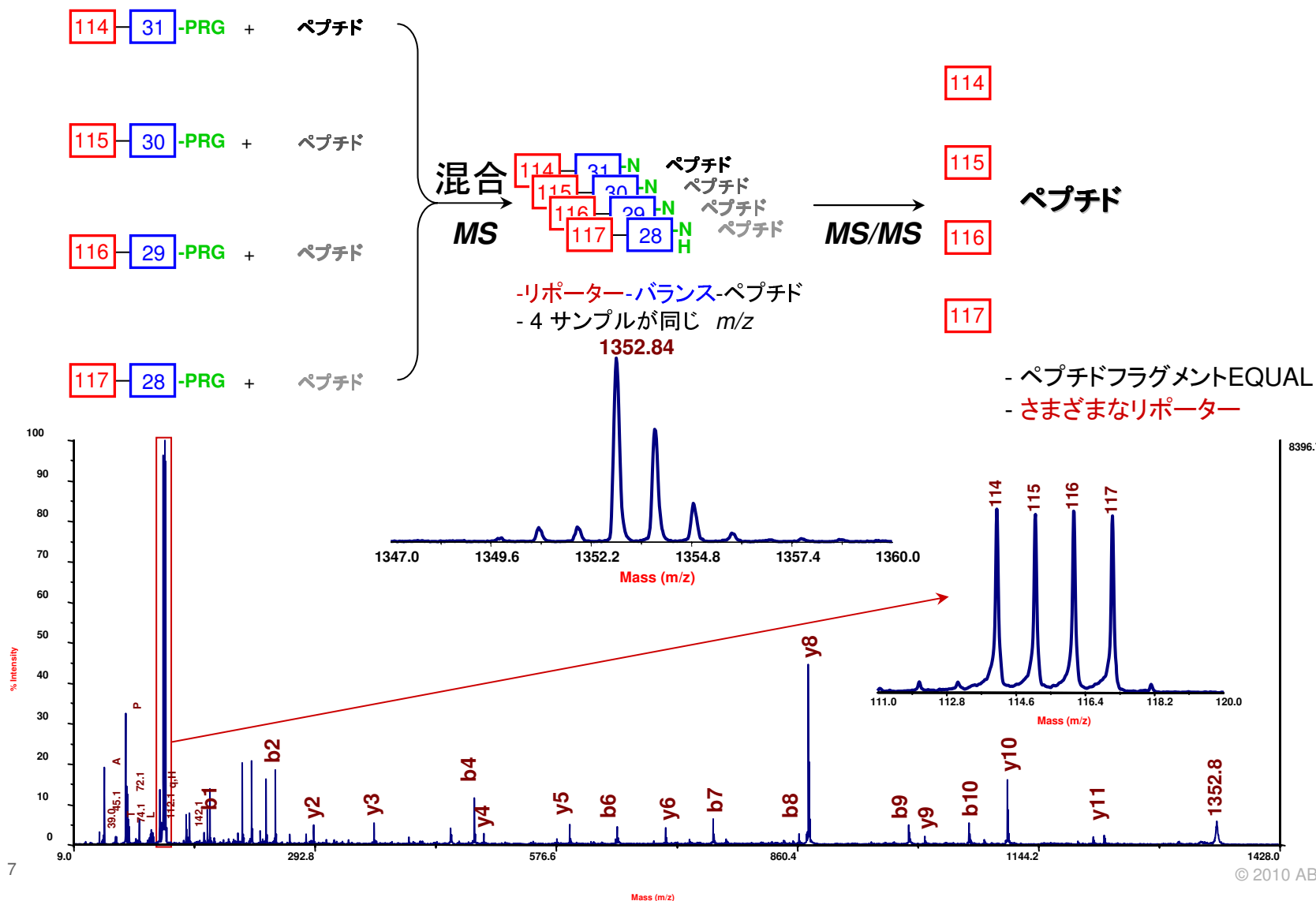
- ✓ リポーターとバランスを合わせて145
- ✓ MS/MSでニュートラルロス

タンパク質への反応基
アミンに結合



Mol. Cellular Proteomics, 3:1154-1169, 2004

iTRAQ™試薬 一般的方法 (4条件)



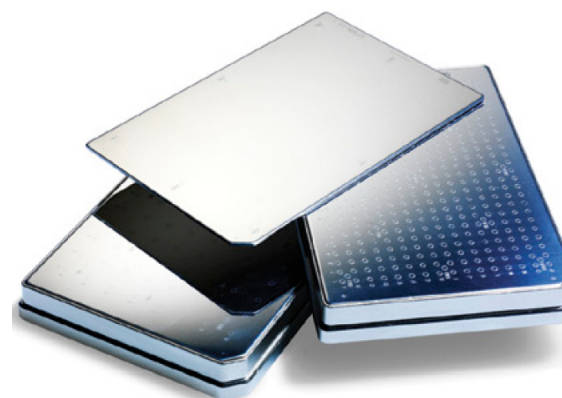
弊社質量分析計

- 4800 MALDI TOF/TOF (MALDI-TOF/TOF)
- Qstar Elite (ESI QqTOF)
- 4000QTRAP (ESI-QqIT)



4800 MALDI TOF/TOF

4800 MALDI TOF/TOF™ Analyzer



4800MALDI TOF/TOF™ Analyzerの特長

- 初心者が使いやすい
 - ウィザードによるパラメーター設定
 - 電気泳動などを用いなくとも複雑なタンパク質混合物の解析がLC/MALDIで容易
 - iTRAQ™試薬によるバイオマーカー検出
 - 翻訳後修飾解析をサポートするソフトウェア
- 優れたハードウェア
 - 感度が10倍以上向上
 - キャリブレーションなくとも質量精度20 ppm
 - MS/MSのためのイオン選択能の向上



Qstar Elite

AB SCIEX

QSTAR® Elite LC/MS/MS System とは？

- 新世代 QSTAR システムプラットフォーム
- Metabolomics、Metabolite ID、Proteomics、Biomarker Profiling といった研究に対して、最高の性能を提供する質量分析計
- **大きく向上した性能・機能**
 - 分解能
 - 質量精度
 - リニアダイナミックレンジ
 - データ取得スピード
 - IDA ワークフロー
- より洗練された手法でのデータ取得が可能となり、**新たなワークフローを提供！！**



Qstarで可能な分析

- 総質量測定でのタンパク質、脂質、糖の確認、構造の推定
- CIDによるタンパク質の同定
- 未知アミノ酸配列の決定
- 翻訳後修飾を有するペプチドの同定(プレカーサーイオンスキャン)
- 翻訳後修飾の部位同定
- 特定脂質(例えばPC)の検出
- タンパク質の定量解析



4000QTRAP

AB SCIEX

4000QTRAPが可能なスキャン

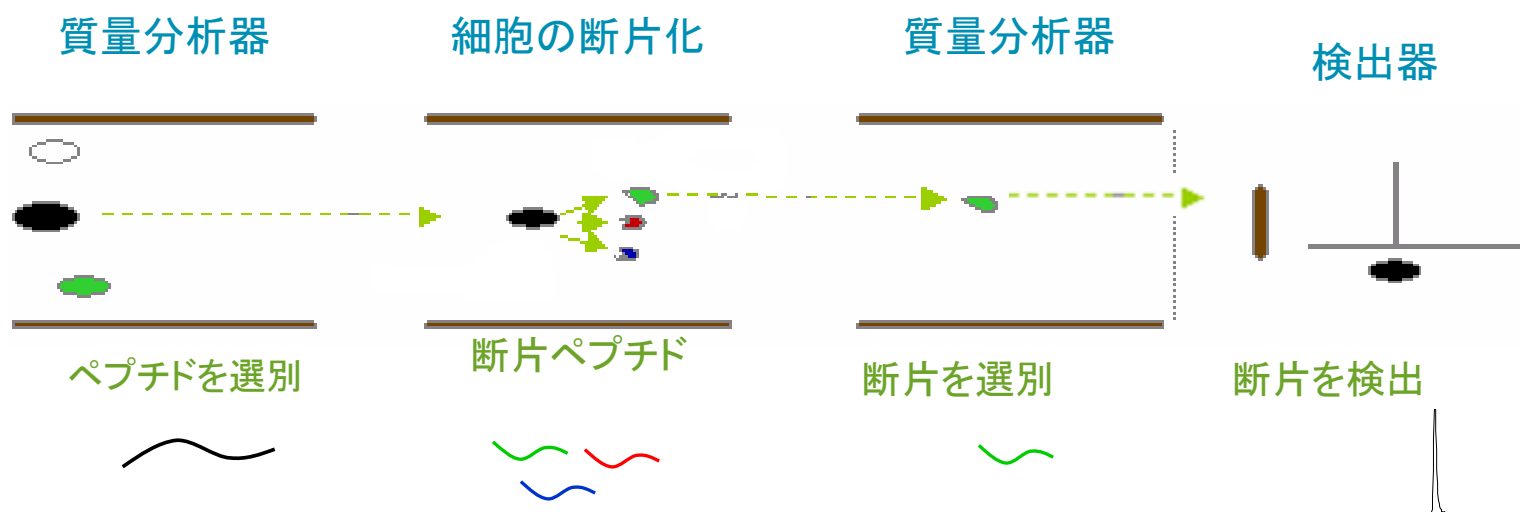
- Product Ion Scan
- Precursor Ion Scan
- Neutral Loss Scan

四重極 (quadrupole) が3つあるのでMRM (Multiple Ion Monitoring) が可能

- QSTARが可能なスキャン
 - Product Ion Scan
 - Precursor Ion Scan

MRMとは？

マルチプルリアクションモニタリング



- 複雑な混合物の成分を検出するための最高の特異度と感度
- 定量のための最大の直線的ダイナミックレンジ
- トリプル四重極MS性能が必要
- 定量のためのMS技術として広く受け入れられている(製薬業界)

MRMの有効性

1. ペプチド(タンパク質)のスコアが低く、サンプル中に存在するかどうかかわからない
→ Mascot scoreなどスコアが低く、しかし、重要なペプチドなどを再度検出、感度50－100倍
2. MRM assay
→ 特定のタンパク質を短時間で狙い撃ちして定量できる
3. Western Blot
→ 抗体がなくとも、特定のペプチドを認識、検出できる