

「第四回 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4月15日（木）15：00～16：30

場所：生物科学研究棟 3階大セミナー室（S311）

講師：サーモフィッシャーサイエンティフィック（株） 肥後 大輔 氏

内容：Orbitrap によるタンパク質大規模解析（Shot-gun proteomics）

- 1) プロテオーム解析のためのサンプル前処理方法
- 2) 質量分析計および Orbitrap の基礎
- 3) Orbitrap によるタンパク質大規模解析
- 4) タンパク質解析の最新の応用例（ショットガン、発現変動解析から翻訳後修飾解析まで）

セミナー参加者：30名

基幹研究所：6 研究室、5 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、毎回来られている方が大勢いました。

内容は丁寧な原理説明や実際の実験方法（前処理を含む）、データの信頼性についての検証方法など、なかなか聞けない話もあり、有意義なセミナーでした。

以上

ケミカルバイオロジー 研究基盤施設教育セミナー

第四回 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4月15日（木）15：00～16：30
場所 生物科学研究棟 3階大セミナー室（S311）
講師 サーモフィッシャーサイエンティフィック（株）
肥後 大輔 氏
内容 Orbitrapによるタンパク質大規模解析（Shot-gun proteomics）
1) プロテオーム解析のためのサンプル前処理方法
2) 質量分析計および Orbitrap の基礎
3) Orbitrapによるタンパク質大規模解析
4) タンパク質解析の最新の応用例
（ショットガン、発現変動解析から翻訳後修飾解析まで）
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10日（木）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。

● LTQ Orbitrapによるタンパク質大規模解析 (Shotgun proteomics)

Large scale proteomics by orbitrap technology.

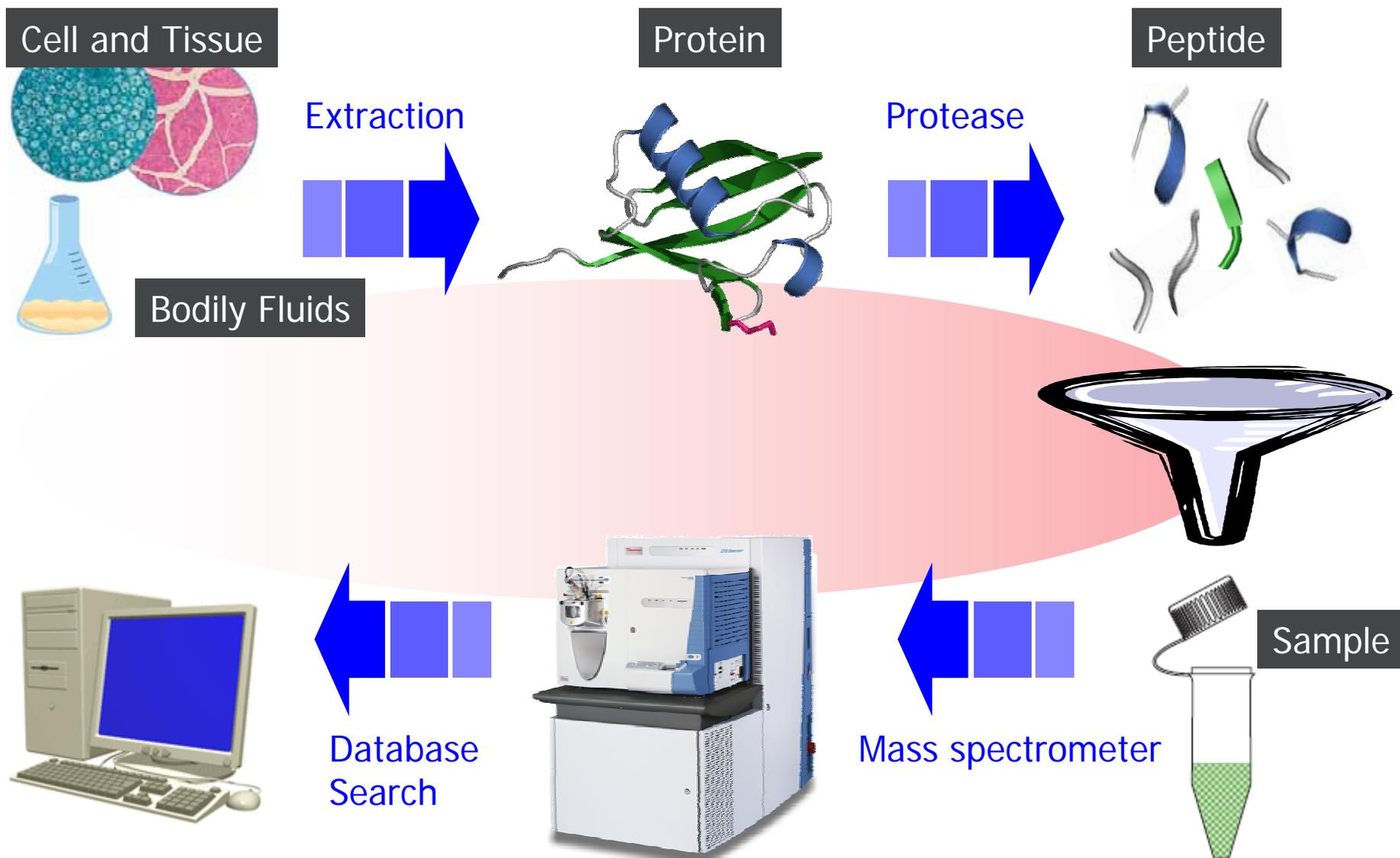
Thermo fisher scientific K.K
SID C&MS Application
OMICS Team

肥後 大輔

まとめ

- イオントラップ、オービトラップアナライザーを搭載した質量分析計では、複数のタンパク質を網羅的に同定するショットガンアプローチにその性能を発揮します
- ショットガンアプローチに必要なサンプル前処理試薬はキット化されており、必要に応じて調整して戴く事が可能になりました。
- 従来のイオントラップと比較をすると、オービトラップアナライザーを搭載した分析計では、より効率的なタンパク質の大規模解析が可能です。
- アイソバリック試薬「TMT」を用いることで、従来のショットガンアプローチの結果に、さらにタンパク質発現量変動結果を得ることが可能になります。

Proteome解析のためのサンプル前処理 測定・解析

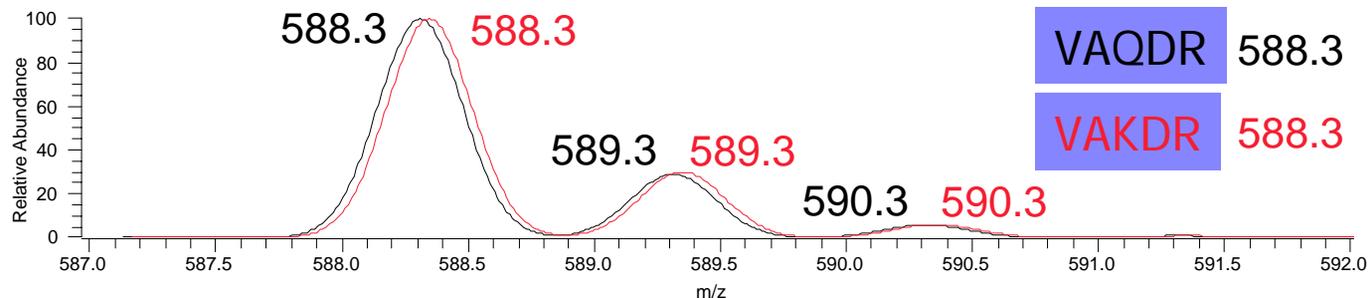


高速なLC-MS/MS質量分析計の大きな違い



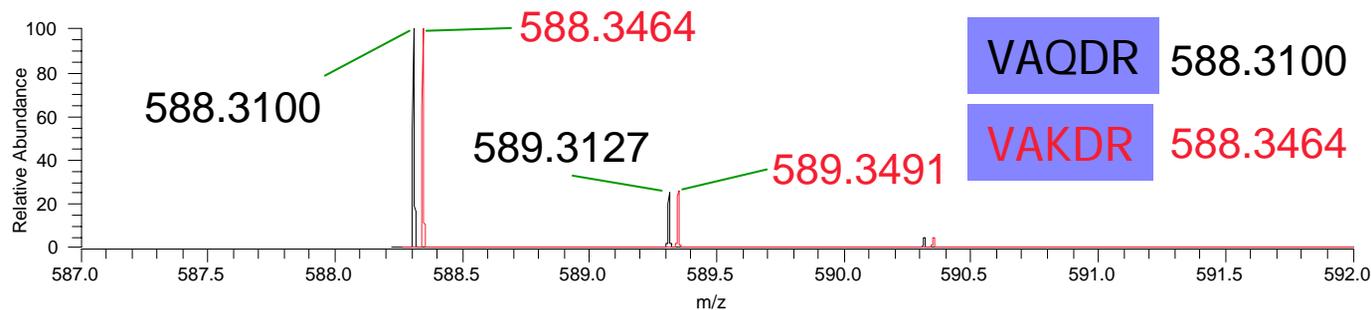
LTQ

- 質量精度: $m/z0.2$ (外部標準)
- 低分解能スペクトル



LTQ Orbitrap

- 質量精度: 3ppm (外部標準)
~ $m/z1000.000$ に対して $m/z0.003$ ~
- 高分解能スペクトル

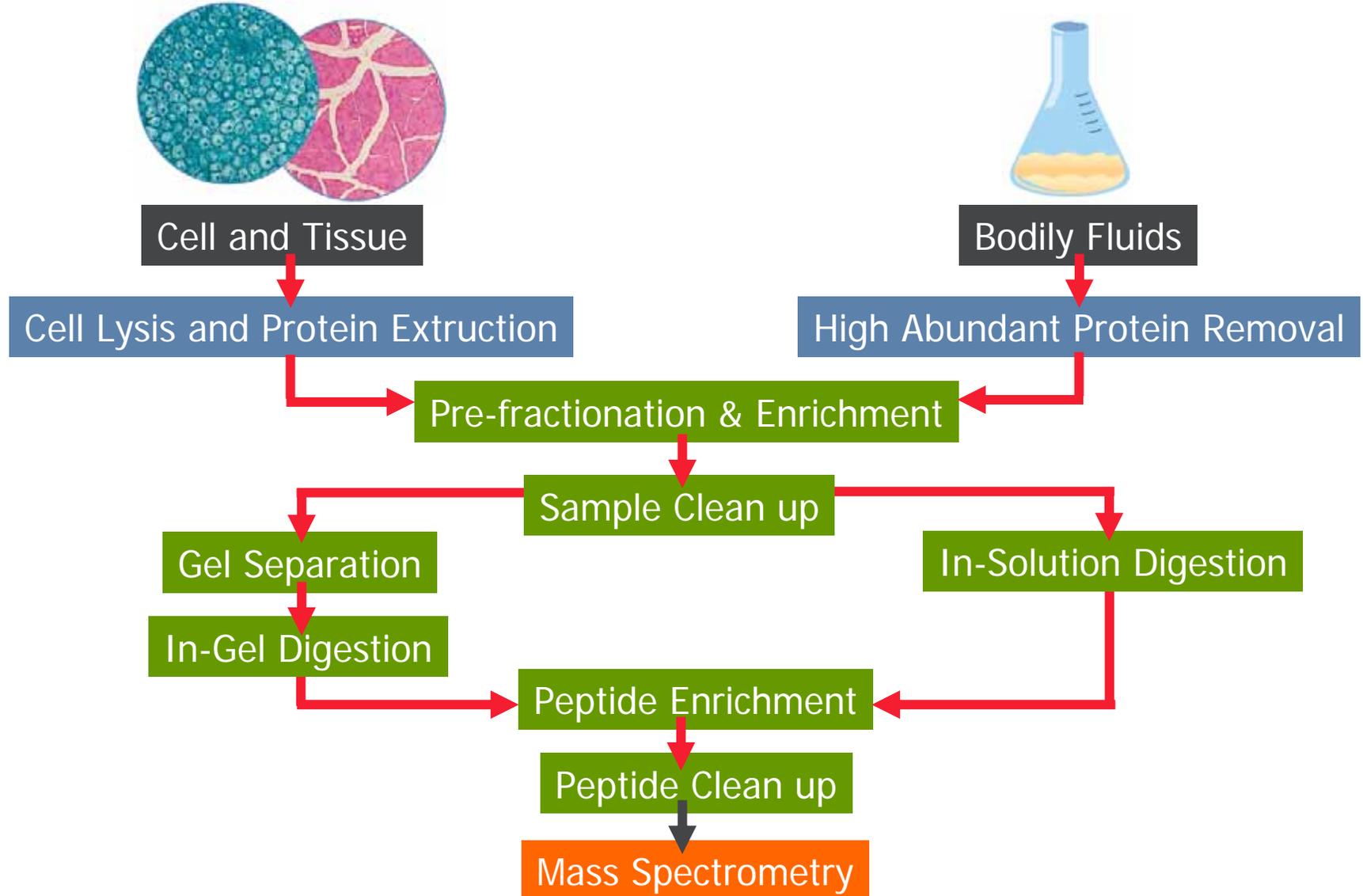




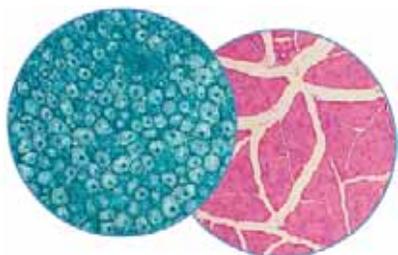
- タンパク質の抽出キット
- タンパク質の可溶化キット
- メジャータンパク質除去キット
- 二次元電気泳動の試薬etc.
- In-gel digestキット
- In-Solution digestキット
- サンプルクリーンアップキット
- SILAC, TMT etc.

上記キット化された試薬と一緒に、プロトコルも提供されています。
電話対応で、カスタマーサポートのスタッフも充実しています。

Thermo Scientific / Mass Spec Sample Handbook



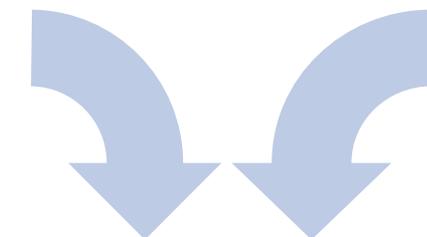
ショットガン・プロテオミクス



Cell and Tissue



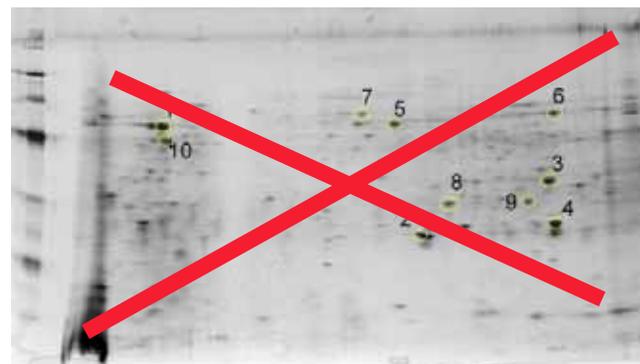
Bodily Fluids



In-Solution Digestion

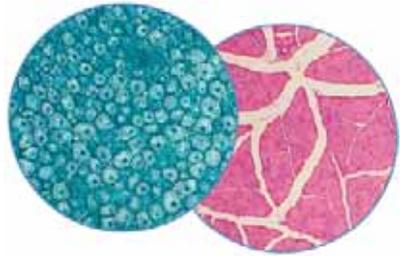
Mass Spec – Protein Tryptic Digestion

In-Solution Tryptic Digestion and Guanidination Kit



～ ショットガン・プロテオミクス～
電気泳動など蛋白質を単離精製せず、混合状態のまま酵素消化して、質量分析計で一気に測定・同定を行う手法

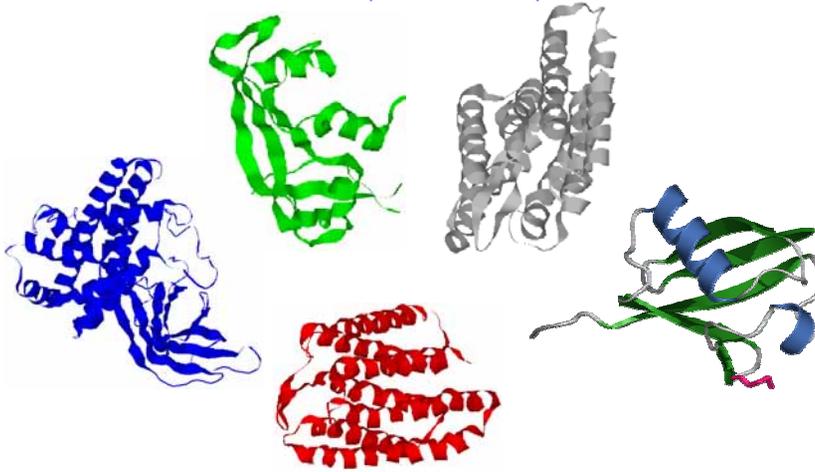
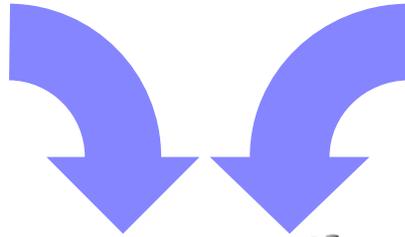
ショットガン・プロテオミクス



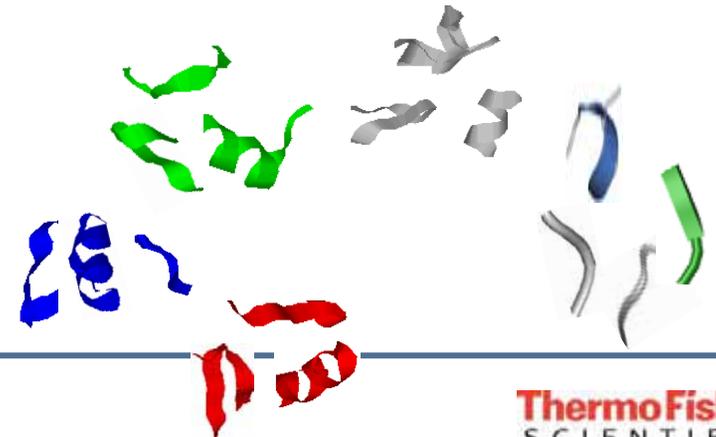
Cell and Tissue

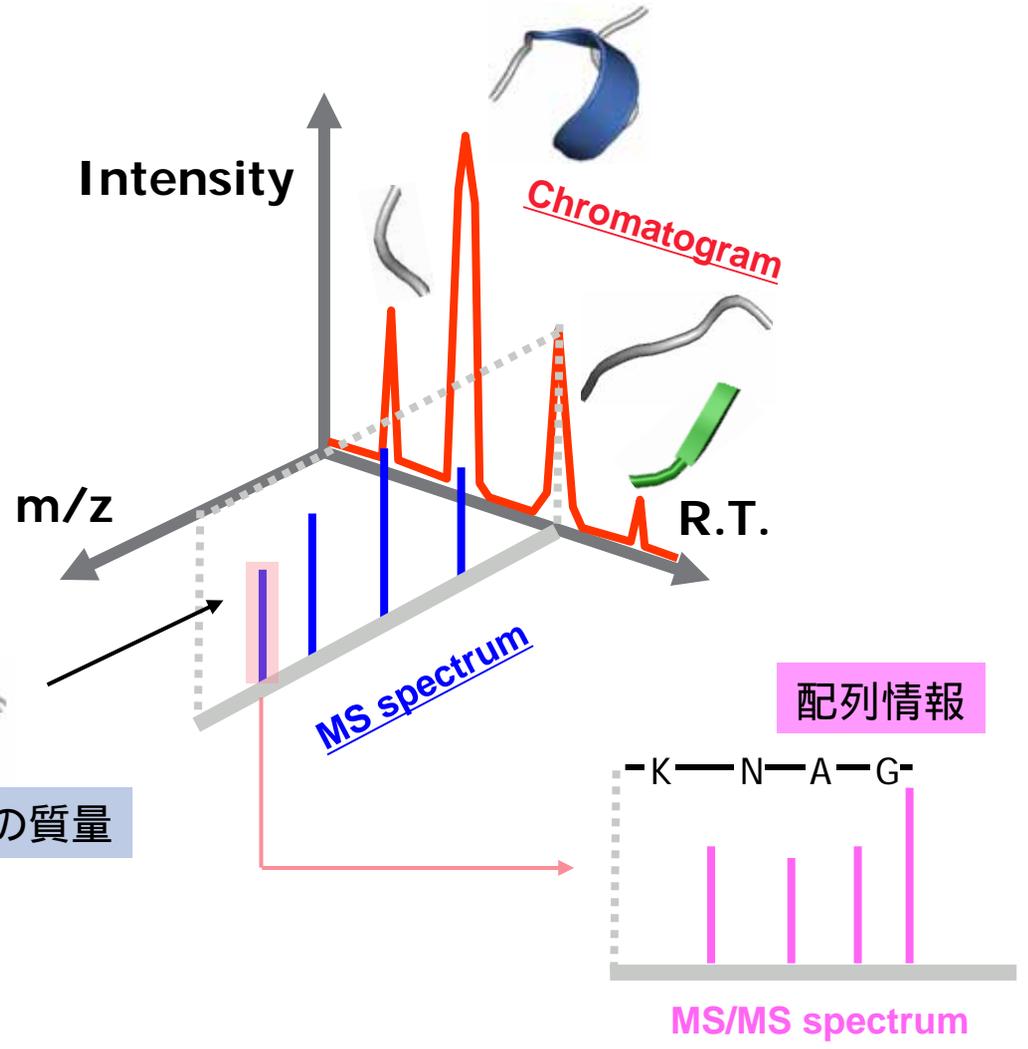


Bodily Fluids

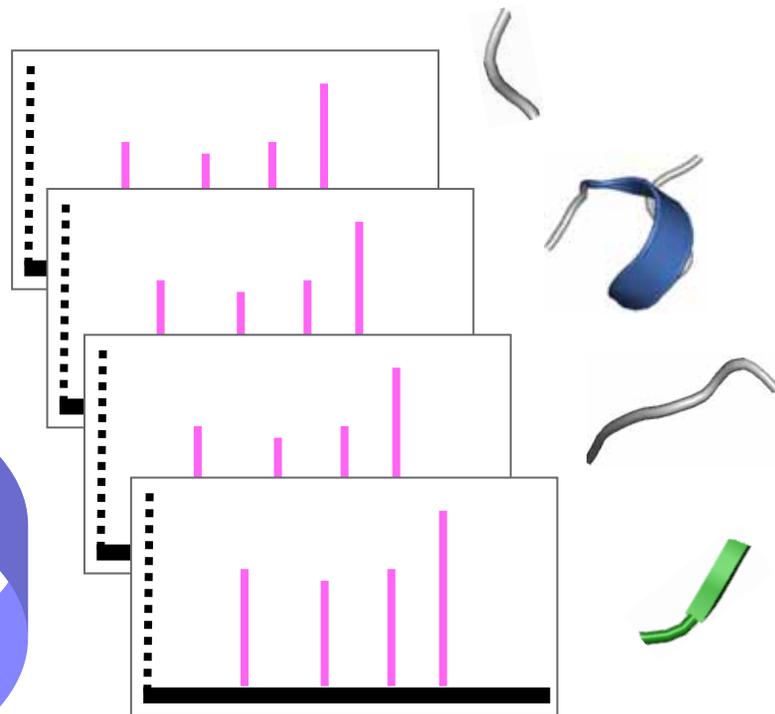


In-Solution Digestion

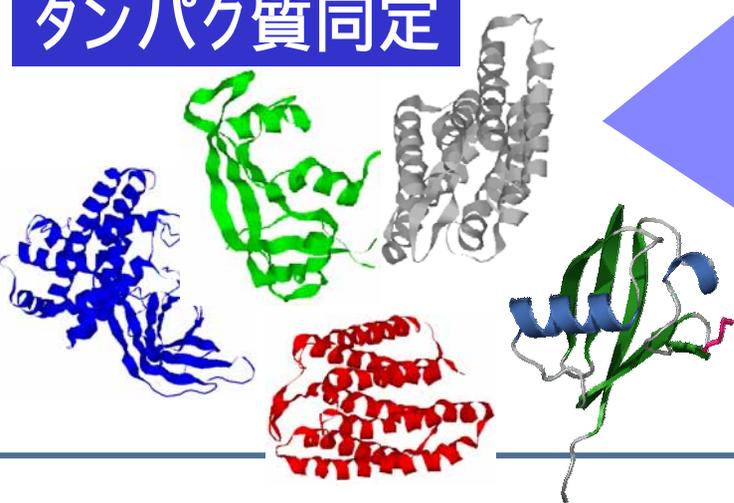




蛋白質/ペプチドの質量



網羅的な
タンパク質同定

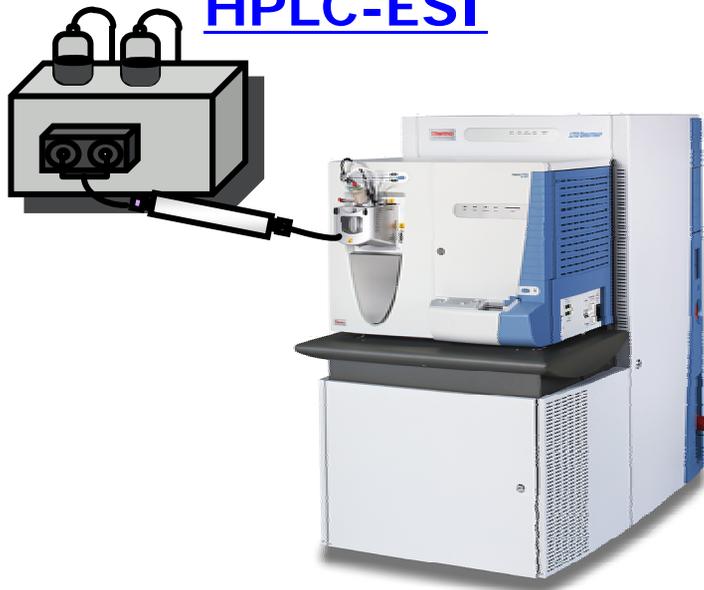


MS/MS測定結果から
データベース検索

目的に応じた前処理・目的に応じたシステムの選択

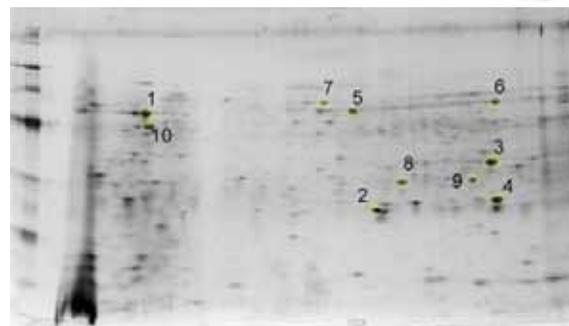
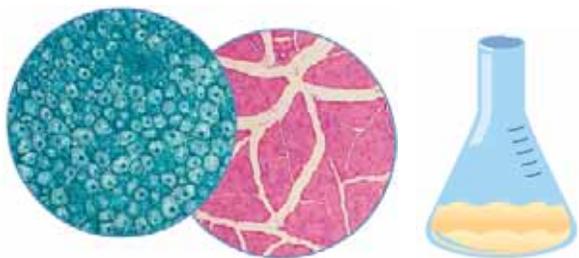
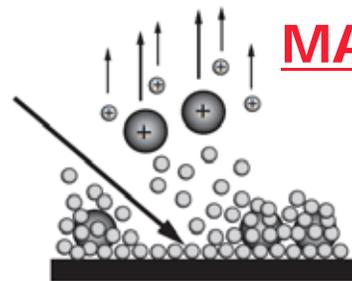
LC-ESI-MS/MS

HPLC-ESI



MALDI-MS or MS/MS

MALDI



タンパク質同定に対する質量精度の重要性

Mascot Search Results

User : daisuke.higo
 Email : daisuke.higo@thermofisher.com
 Search title :
 MS data file : C:\Xcalibur\data\export_DTA\merge.txt
 Database : NCBIInr 20070601 (4988250 sequences; 1724794729 residues)
 Taxonomy : Mammalia (mammals) (576926 sequences)
 Timestamp : 8 Jun 2007 at 07:54:20 GMT
 Protein hits : [gi|229552](#) albumin

Probability Based Mowse Score

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Individual ions scores > 27 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).
 Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking

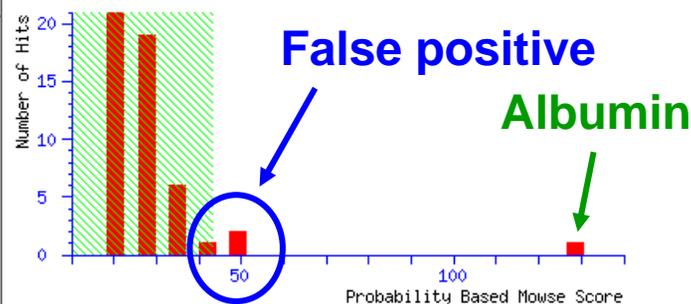


Mascot Search Results

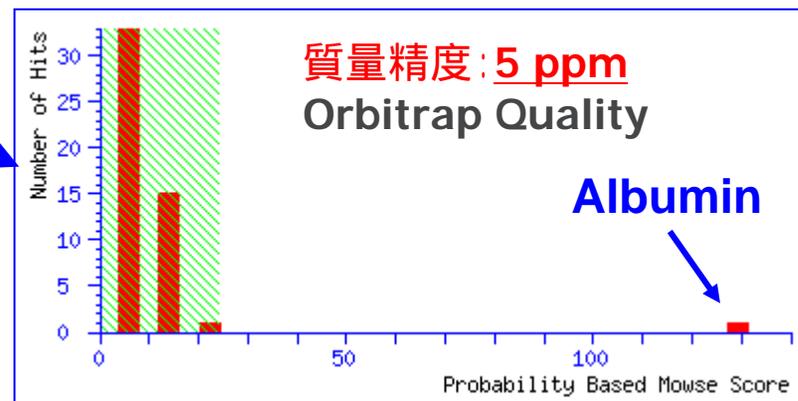
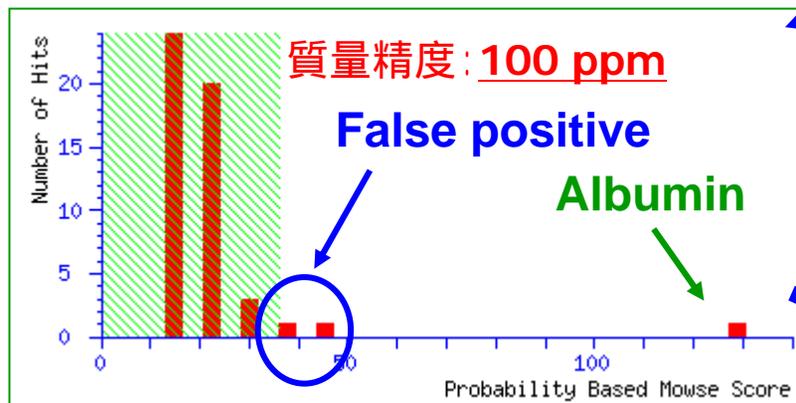
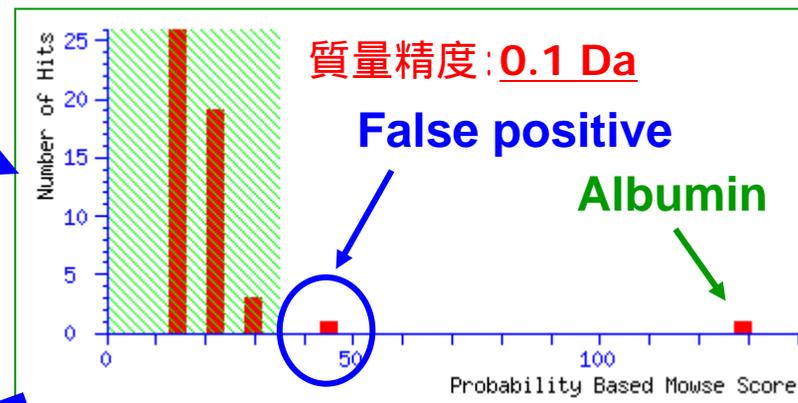
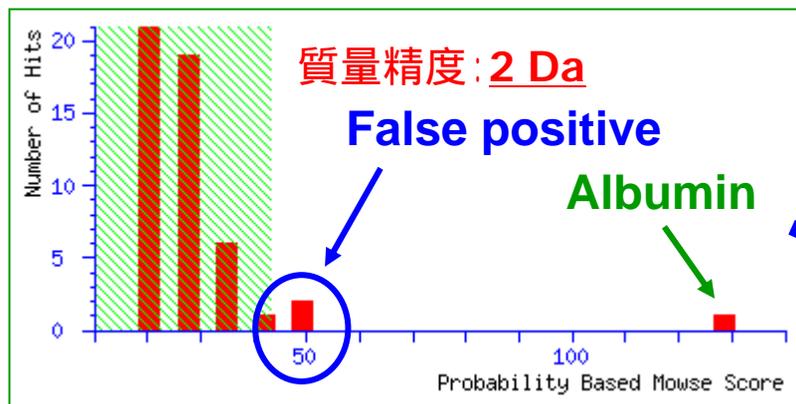
User : daisuke.higo
 Email : daisuke.higo@thermofisher.com
 Search title :
 MS data file : C:\Xcalibur\data\export_DTA\merge.txt
 Database : NCBIInr 20070601 (4988250 sequences; 1724794729 residues)
 Taxonomy : Mammalia (mammals) (576926 sequences)
 Timestamp : 8 Jun 2007 at 08:01:53 GMT
 Protein hits : [gi|229552](#) albumin
[gi|6753652](#) dynein, axonemal, heavy chain 11 [Mus musculus]
[gi|109502306](#) PREDICTED: similar to kinectin 1 [Rattus norvegicus]
[gi|126272811](#) PREDICTED: hypothetical protein [Monodelphis domestica]

Probability Based Mowse Score

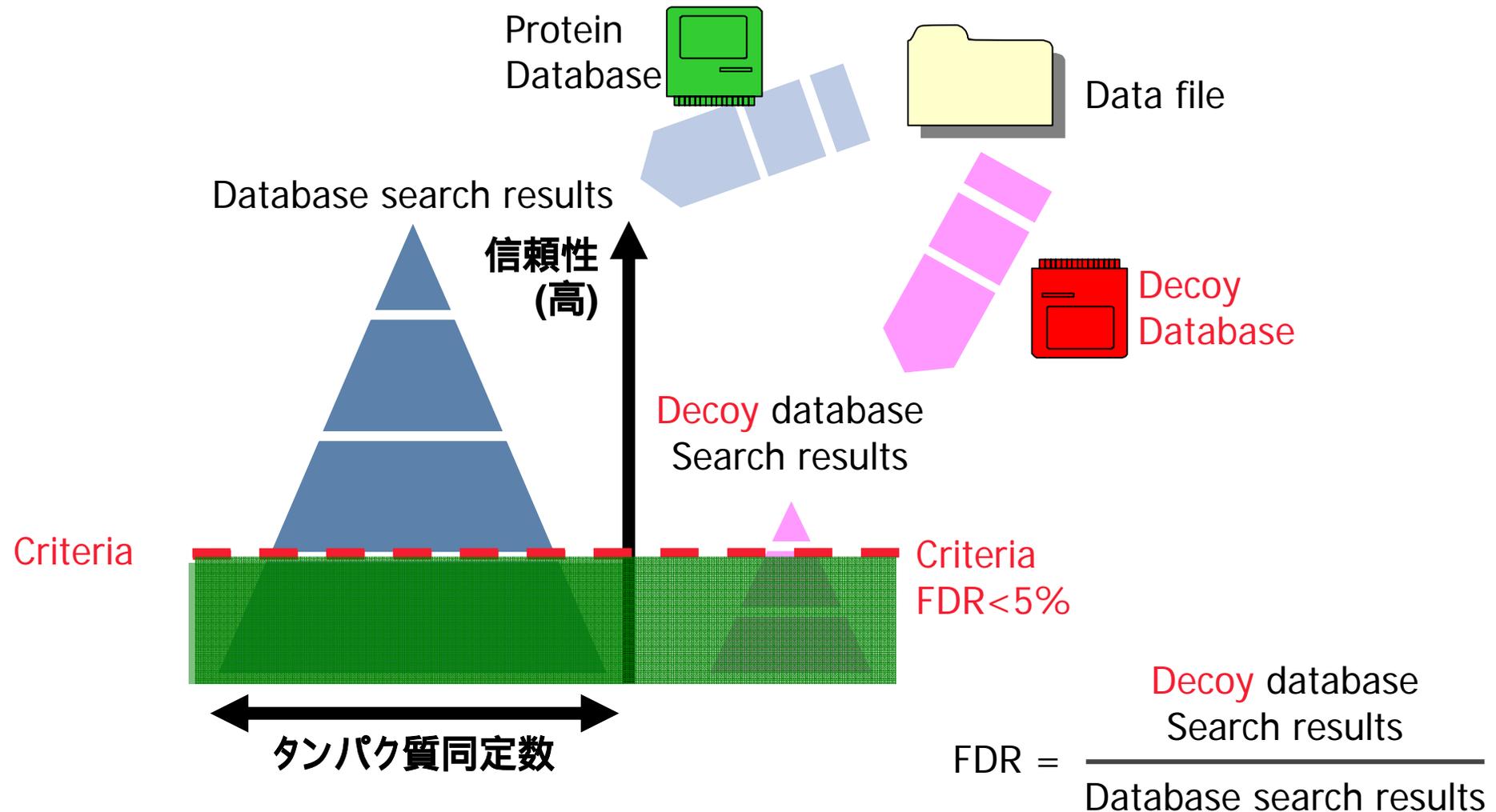
Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Individual ions scores > 43 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).
 Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



タンパク質同定に対する質量精度の重要性



大規模解析に求められる基準: False Discovery Rate (FDR)



Nature Methods 2, 667 - 675 (2005)

Published online: 23 August 2005; | doi:10.1038/nmeth785

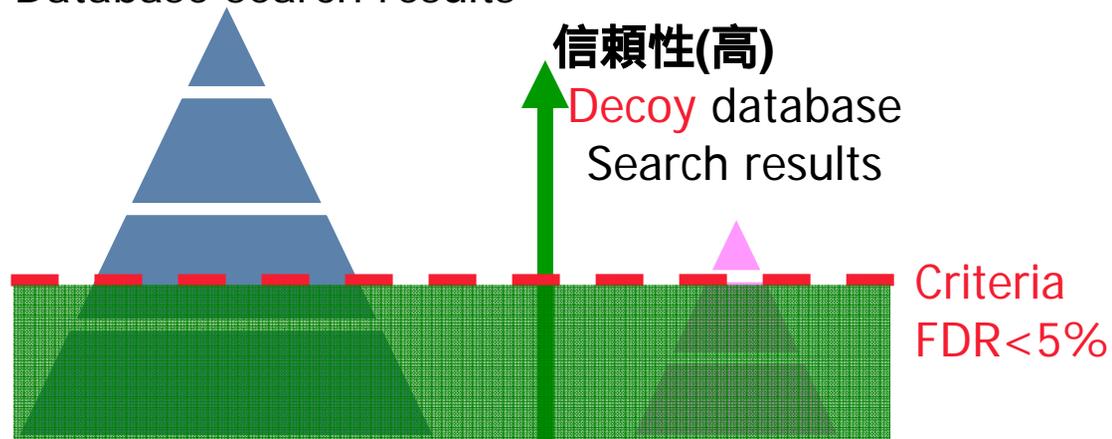
Comparative evaluation of mass spectrometry platforms used in large-scale proteomics investigations

高速なLC-MS/MS質量分析計の大きな違い



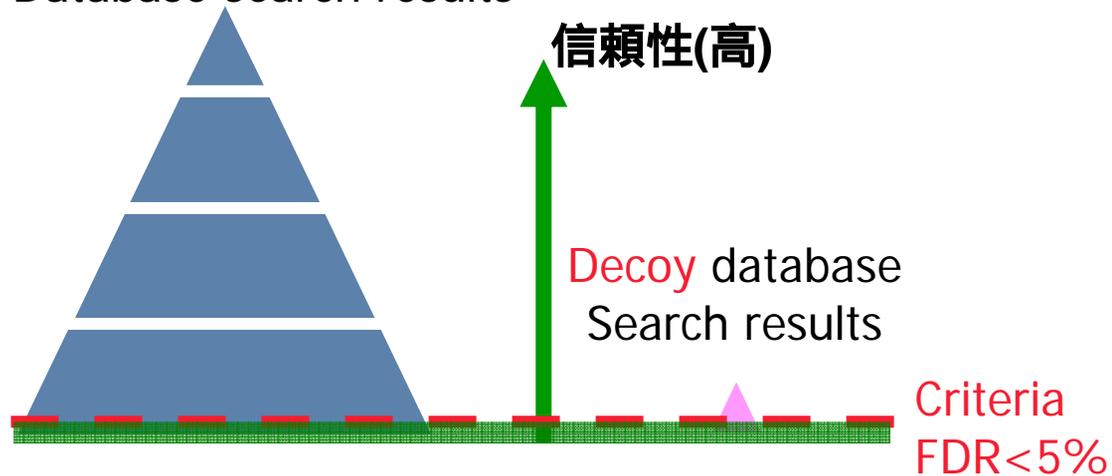
LTQ

Database search results



LTQ Orbitrap

Database search results



LTQとOrbitrap比較 (E.coli消化物100ng)

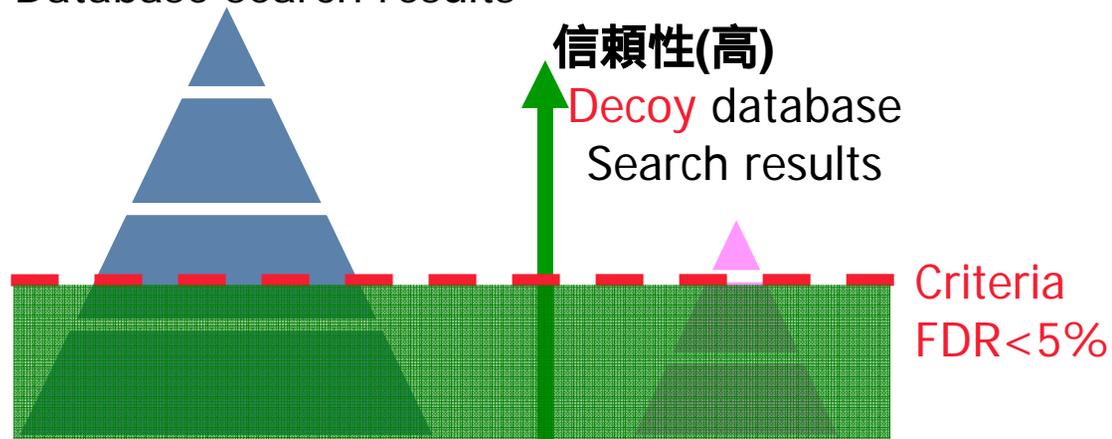


LTQ



LTQ Orbitrap

Database search results



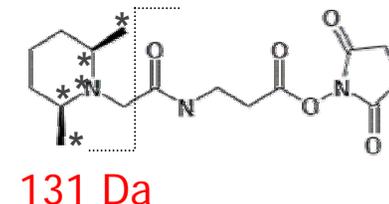
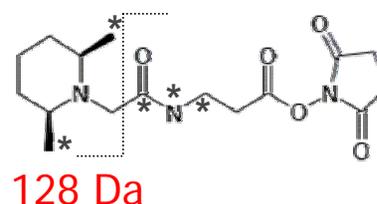
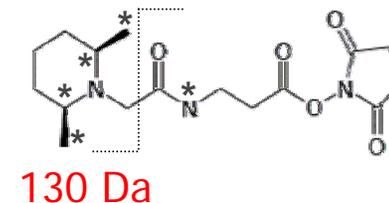
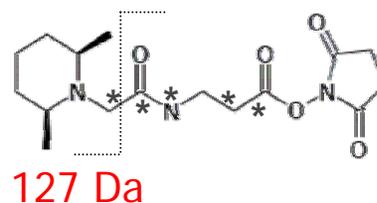
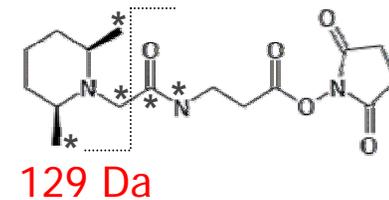
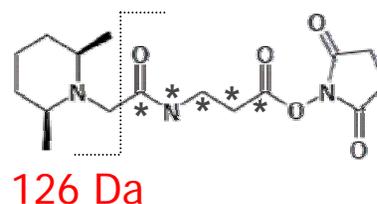
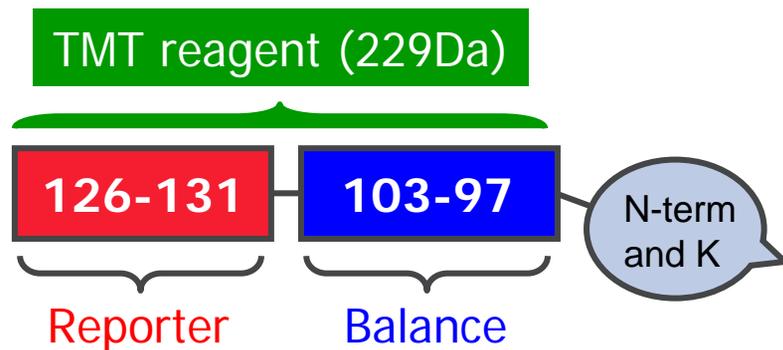
	LTQ	Orbitrap
MS/MS回数	90,498	37,883
同定ペプチド数	4,274	9,432
スコアCut off値	35.88	19.82
FDR	<5%	<5%

Pierce Biotechnology is Part of Thermo Scientific

TMT (Tandem Mass Tag)

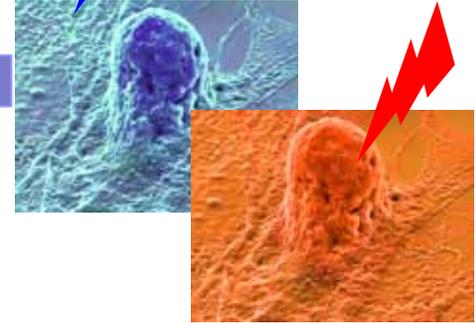
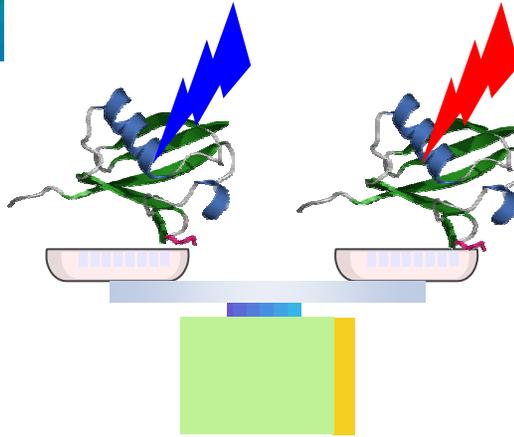


- ペプチドレベルでラベル化
- N-末端 / Kのアミノ基に結合
- 多群間での比較定量が一度の分析結果から解析可能
- 同定はMS/MSから、定量もMS/MSスペクトルから解析

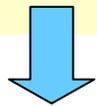
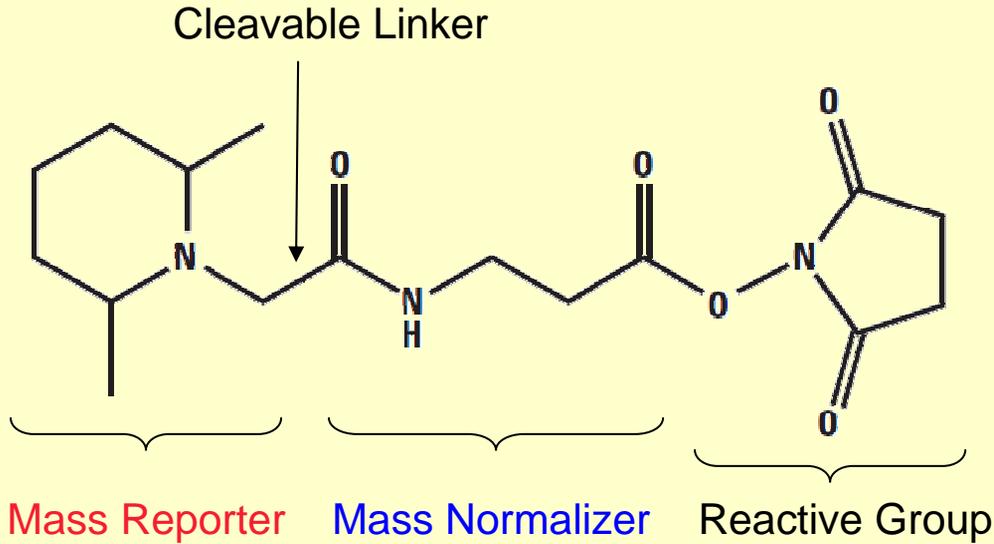


アイソバリックタグ試薬を用いた手法

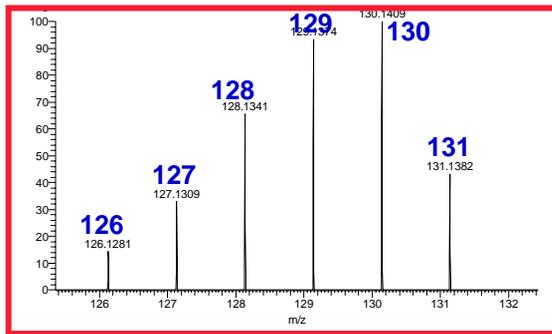
ラベル化試薬



TMT試薬を用いたタンパク質発現変動解析



MS/MS spectra



TMT² : 2サンプルの比較

126, 127

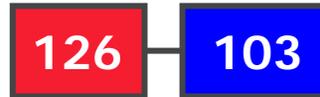
(Normalizer : 99 - 100)

TMT⁶ : 6サンプルの比較

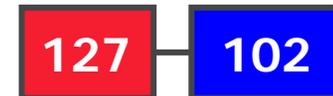
126, 127, 128, 129, 130, 131

(Normalizer : 99 - 104)

TMT126 (229Da)



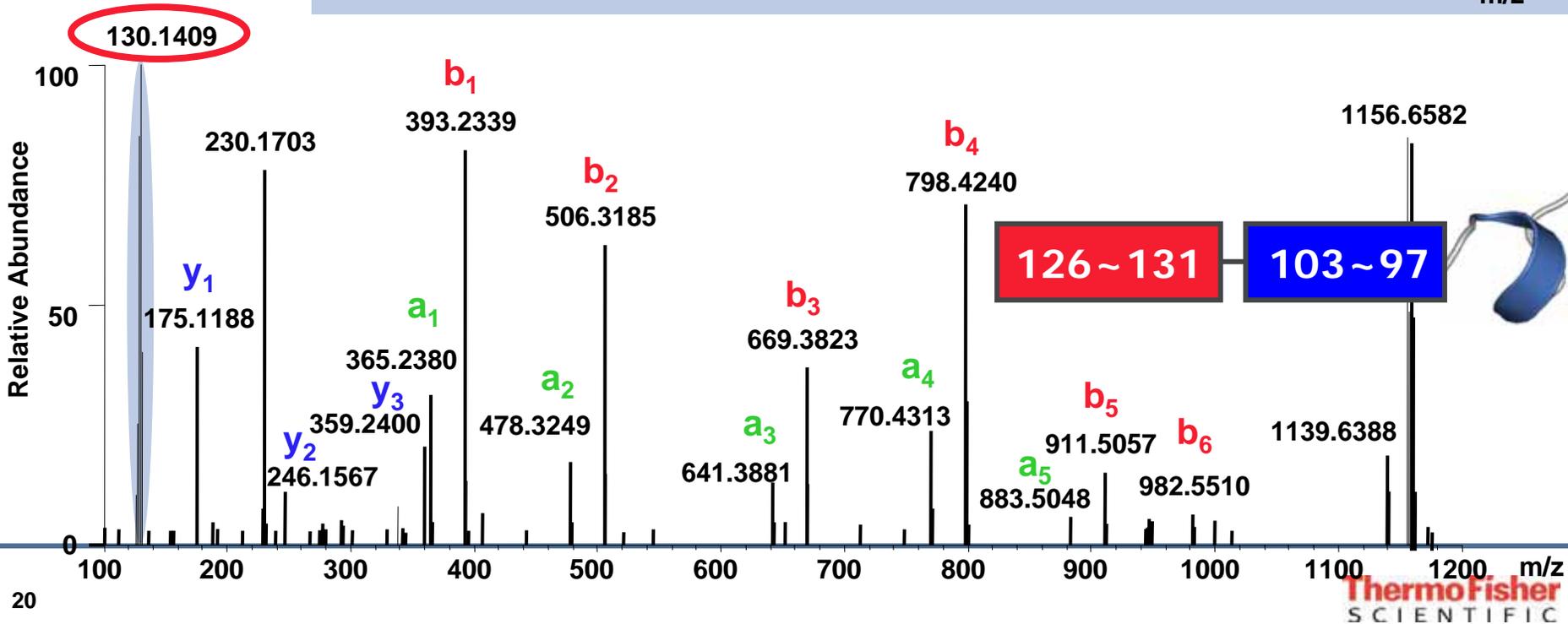
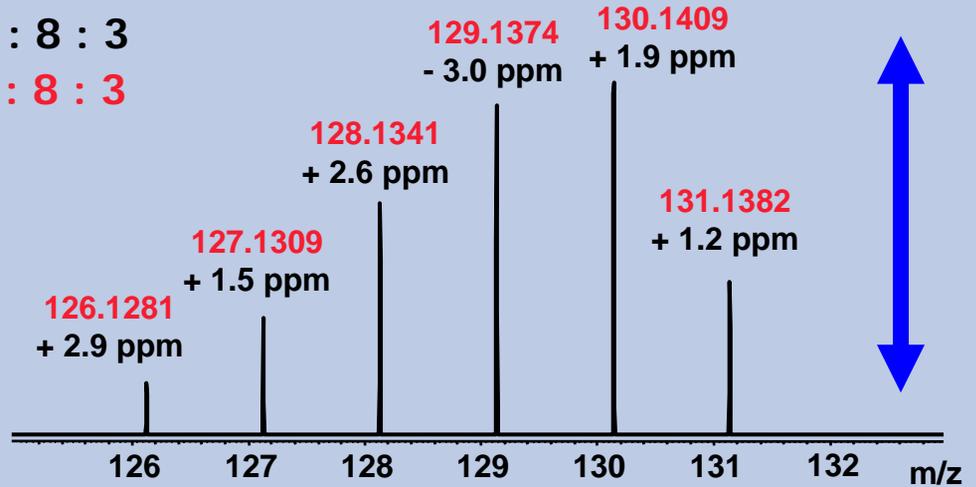
TMT127 (229Da)

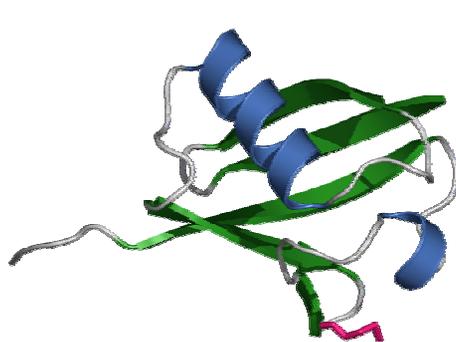
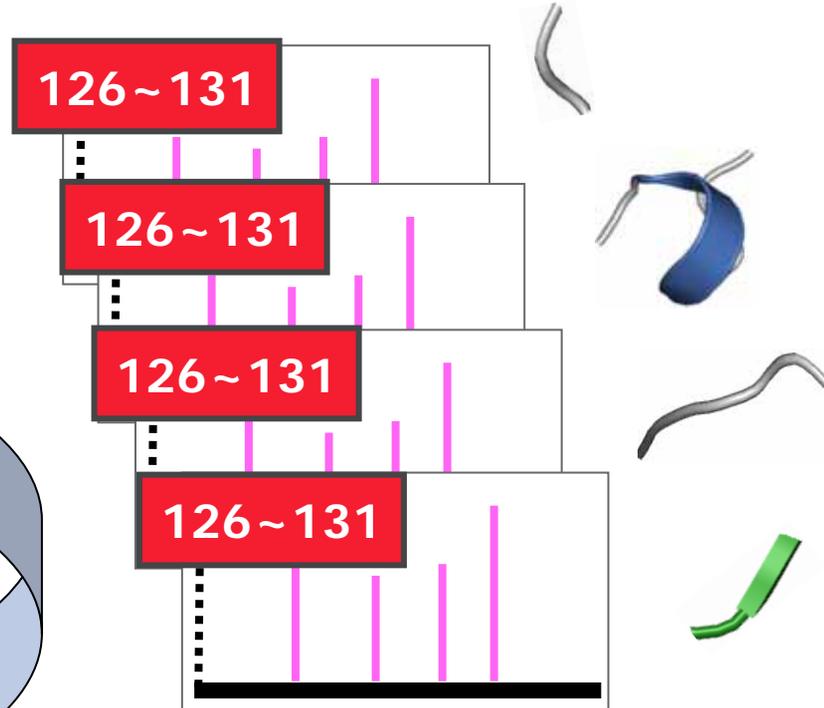


TMT試薬を用いたタンパク質発現変動解析

exp. ratio 1 : 2 : 4 : 6 : 8 : 3
 obs. ratio 1 : 2 : 4 : 7 : 8 : 3

126-131
 Reporter





タンパク質同定

+

比較定量



MS/MS検索