

バイオ解析チーム教育セミナー資料—質量分析9

「第九回 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：2011年10月6日(木) 15:00～16:10

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：ベンチトップ型四重極 Orbitrap "Q-Exactive" による Proteome 解析

セミナー参加者：24名

基幹研究所：5 研究室、4 チーム

脳科学総合研究センター：1 ユニット

所外：1 名

今回は昨年8月以来の教育セミナーを開催しました。今年度理研に来られた方がいたためか、初めて出ていただいた方が8名と多くの方がお見えになりました。

今回の内容は本年度の共同利用機器の新規整備希望装置である四重極型フーリエ変換質量分析装置の説明で、多くの方が興味を持たれたようです。アンケートでも是非欲しいと終われる方もいらっしゃいました。また、こんなことは分かるかなど具体的な質問も出るような活発な質疑応答があり、有意義なセミナーとなりました。

以上

バイオ解析チームHP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。

他の教育セミナーへの
リンクはココをクリック

ケミカルバイオロジー 研究基盤施設教育セミナー

第九回 生物系研究者のための 質量分析に関する教育セミナー

昨年度に引き続き、第九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を行います。今回は本年度のASMS Conferenceで発表された最新の電場型フーリエ変換質量分析装置で、今までのイオントラップ型と組み合わせから四重極型との組み合わせに変更されることで、プロテオミクス研究を大きく変える可能性があります。

本年度の共同利用機器新規整備の希望を出した機種でもあり、実際に講師の講演を聞いていただき、皆様のご研究にどのように役立つのかを御検討いただきたいと思います。



日時 2011年10月6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)

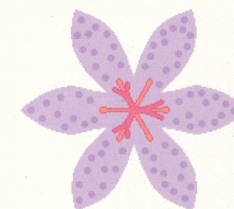
肥後 大輔 氏

内容 ベンチトップ型四重極 Orbitrap "Q-Exactive" による Proteome 解析
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。



ベンチトップ型四重極Orbitrap “Q-Exactive”によるProteome解析

サーモフィッシャーサイエンティフィック(株)
アプリケーション部
肥後 大輔

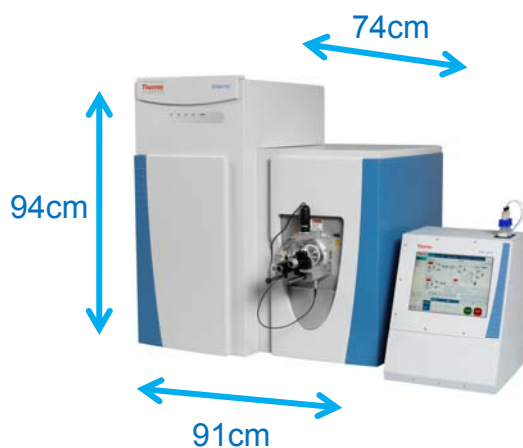


The world leader in serving science

Thermo Scientific: Mass Spectrometers



ベンチトップ型四重極Orbitrap “Q-Exactive”



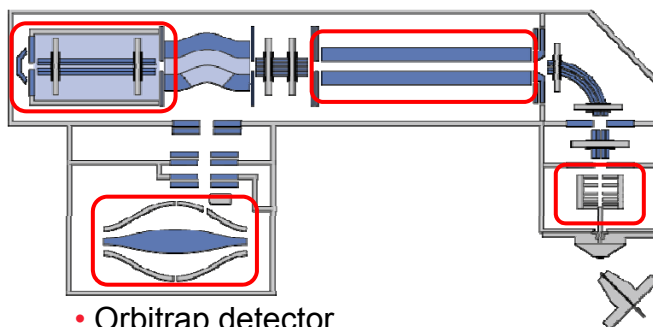
- MS scan : m/z 50-4,000
- Q1 isolation : $\sim m/z$ 2500
- Isolation width : >0.4 amu
- MS/MS : m/z 50-4,000
- 質量精度 : 1ppm(内部標準)
5ppm(外部標準)
- 分解能 : 17,500@12Hz
140,000@1Hz
- Pos/Neg切り替え測定(<1s)
- Data dependent MS/MS測定
- SIM測定

3

ThermoFisher
SCIENTIFIC

ベンチトップ型四重極Orbitrap “Q-Exactive”

- HCD collision cell
 - Predict AGC
 - Prefilling + HCD-MS/MS
 - 高感度/高速なMS/MS測定
- Quadrupole mass filter (Q1)
 - 円柱面ではなく双曲面の四重極
 - 高分解能モードでも透過効率を維持
 - SIMモードによる定量



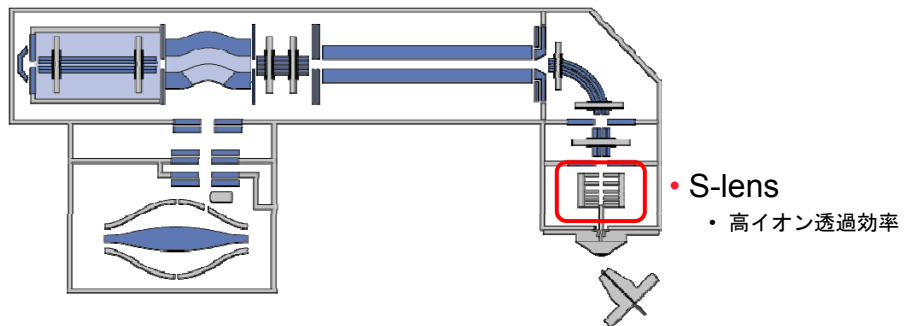
- Orbitrap detector
 - 新しいFTプログラム: Enhanced FT
 - 従来よりも1.8倍の高分解能 (or 高速化)

- S-lens
 - 高いオン透過効率

4

ThermoFisher
SCIENTIFIC

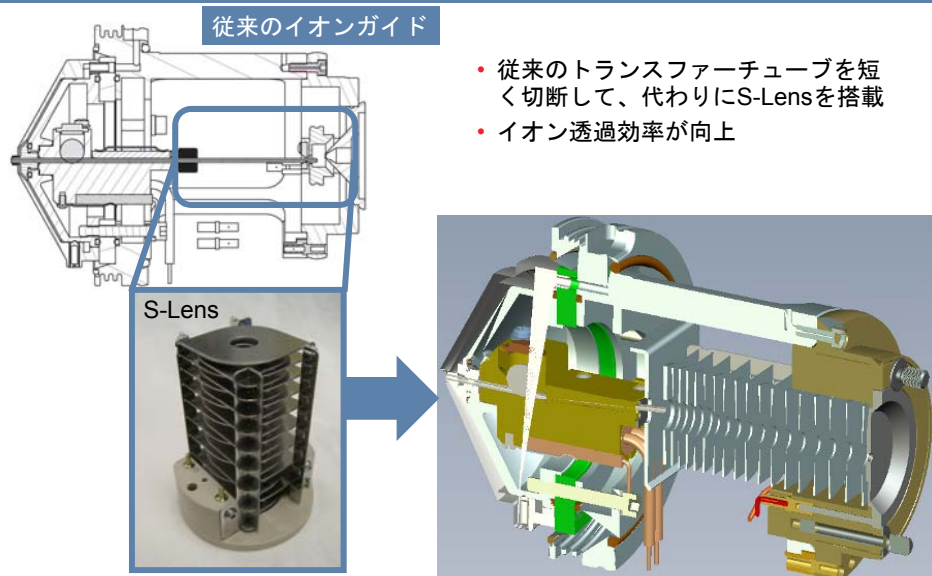
ベンチップ型四重極Orbitrap “Q-Exactive”



5

ThermoFisher
SCIENTIFIC

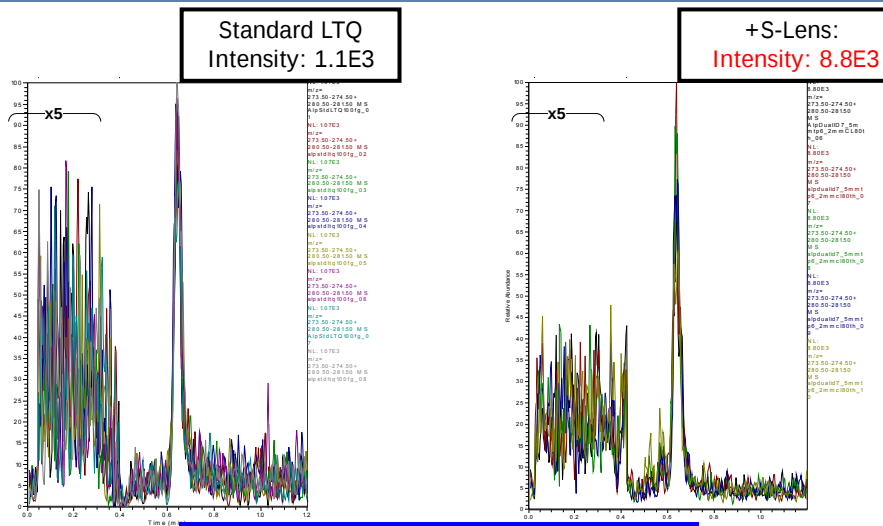
S-Lens: Stacked Lens



6

ThermoFisher
SCIENTIFIC

S-Lens: Stacked Lens

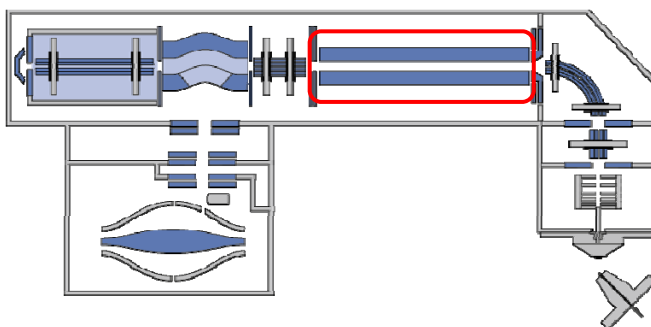


7 5 injections of Alprazolam

ThermoFisher
SCIENTIFIC

ベンチップ型四重極Orbitrap “Q-Exactive”

- Quadrupole mass filter (Q1)
 - 円柱面ではなく双曲面の四重極
 - 高分解能モードでも透過効率を維持
 - SIMモードによる定量



8

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Hyperbolic Rods (Q1)

双曲面を持つHyperbolic Rods

❖ 分解能を上げて高い透過効率を維持



円柱面を持つRound rod

• ユニット分解能

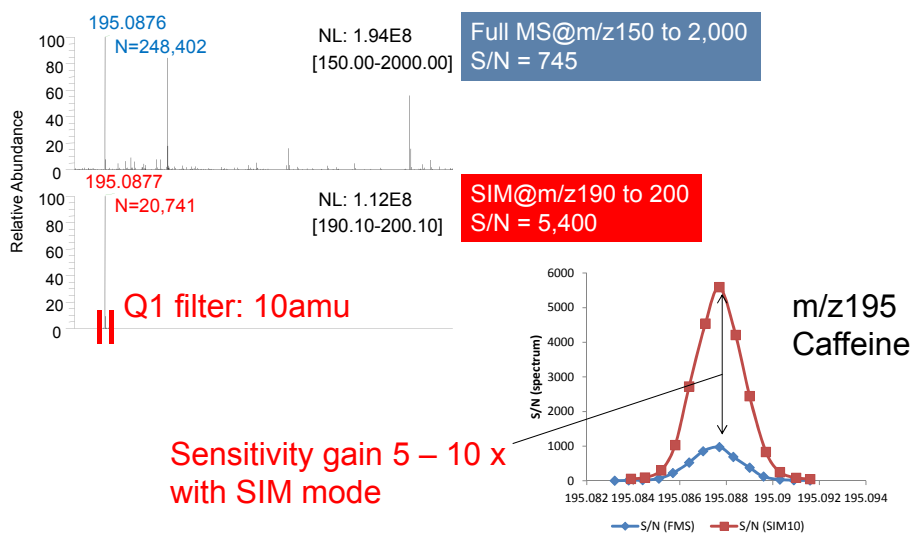


- プリカーサーイオンのアイソレーション：～ m/z 2,500まで対応
- SIMモードの測定：感度（S/N）とダイナミックレンジの向上
- HR/AMによるターゲット定量

9

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Selected ion monitoring: Q1 mass filter

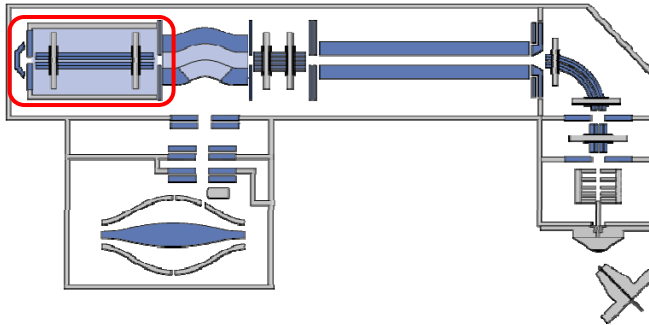


10

ThermoFisher
SCIENTIFIC

ベンチップ型四重極Orbitrap “Q-Exactive”

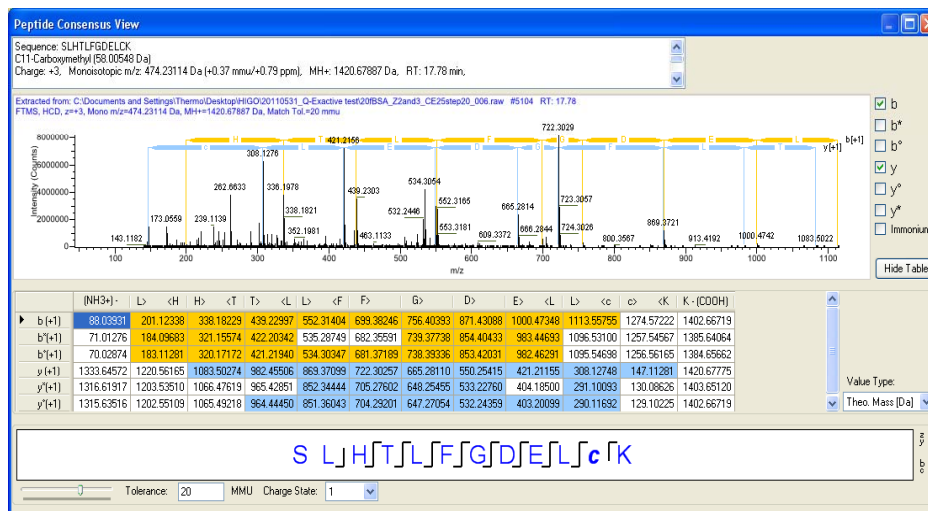
- HCD collision cell
 - Predict AGC
 - Prefilling + HCD-MS/MS
 - 高感度/高速なMS/MS測定



11

ThermoFisher
SCIENTIFIC

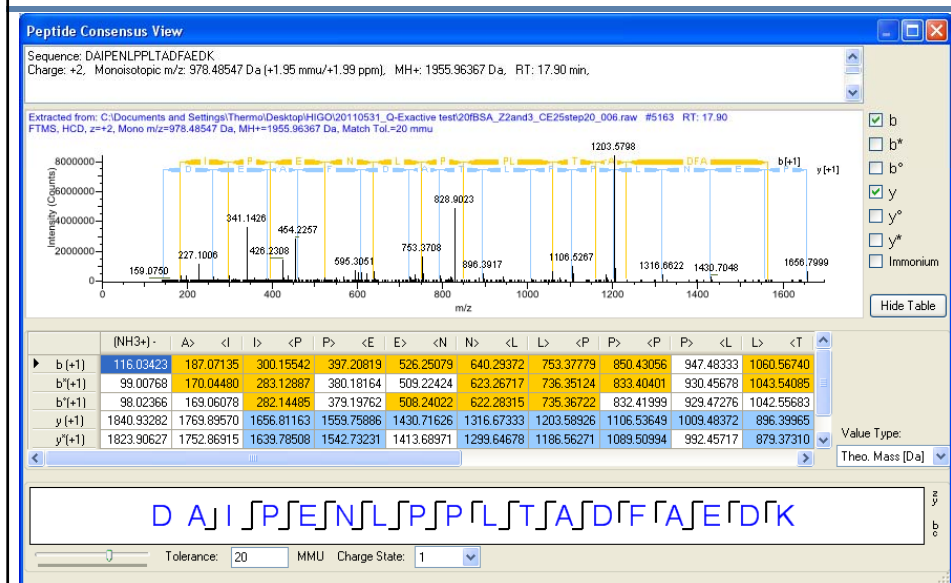
BSA 20fmol: m/z474.23 (0.79ppm), z=3, MS/MS



12 MASCOT search result: MS tol.=10ppm, MS/MS tol.=0.02Da

ThermoFisher
SCIENTIFIC

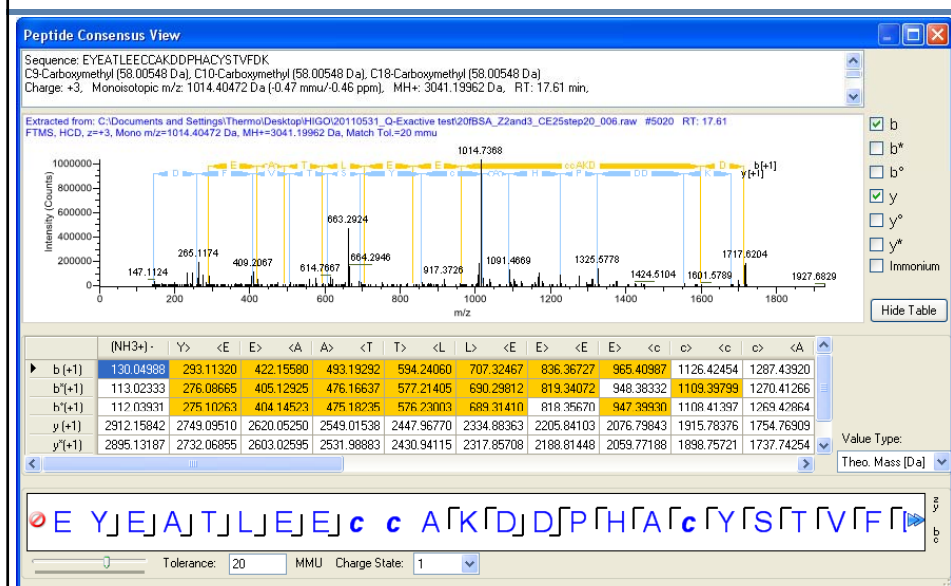
BSA 20fmol: m/z978.48 (1.99ppm), z=2, MS/MS



13 MASCOT search result: MS tol.=10ppm, MS/MS tol.=0.02Da

ThermoFisher
SCIENTIFIC

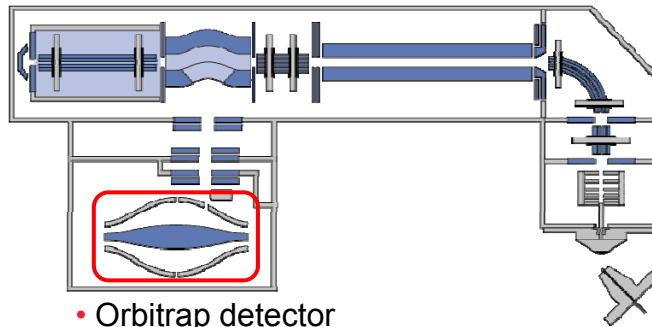
BSA 20fmol: m/z1014.40 (0.46ppm), z=3, MS/MS



14 MASCOT search result: MS tol.=10ppm, MS/MS tol.=0.02Da

ThermoFisher
SCIENTIFIC

ベンチップ型四重極Orbitrap “Q-Exactive”



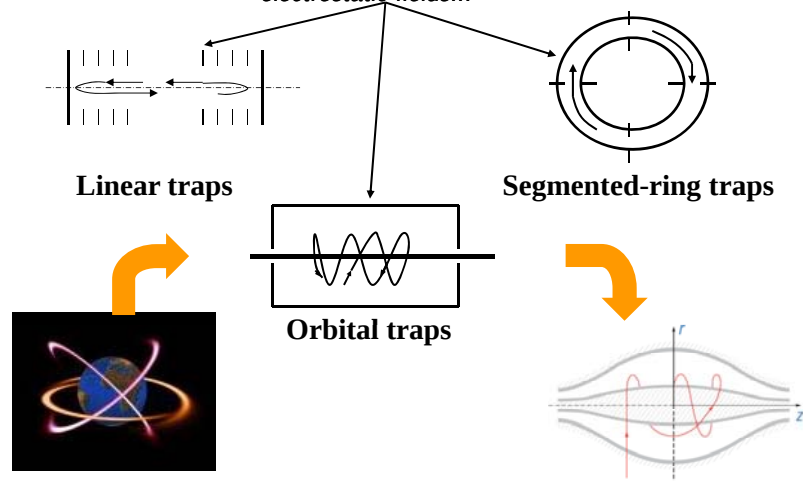
- Orbitrap detector
 - 新しいFTプログラム: Enhanced FT
 - 従来よりも1.8倍の高分解能 (or 高速化)

15

ThermoFisher
SCIENTIFIC

静電場によるイオンのトラップ

“...Static charges can not be stable in electrostatic fields...”



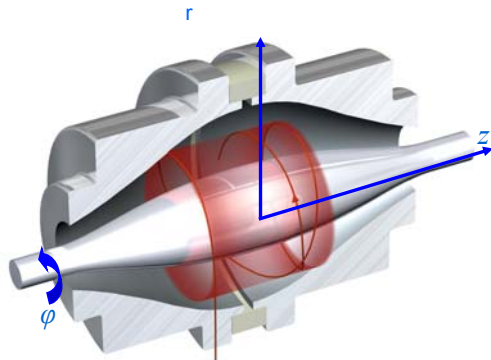
16

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Orbitrapでのイオンの軌道

- Characteristic frequencies:

- Frequency of rotation ω_ϕ
- Frequency of radial oscillations ω_r
- Frequency of axial oscillations ω_z



$$U(r, z) = \frac{k}{2} \cdot \{z^2 - r^2 / 2 + R_m^2 \cdot \ln(r / R_m)\}$$



$$\omega_\phi = \frac{\omega_z}{\sqrt{2}} \sqrt{\left(\frac{R_m}{R}\right)^2 - 1}$$

$$\omega_r = \omega_z \sqrt{\left(\frac{R_m}{R}\right)^2 - 2}$$

$$\omega_z = \sqrt{\frac{k}{m/q}}$$

17

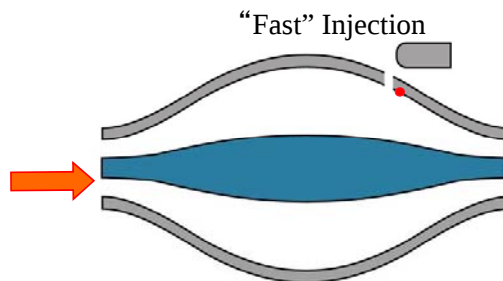
ThermoFisher
SCIENTIFIC

Lord of the ion rings: “リング”の形成



Electrodynamic Squeezing

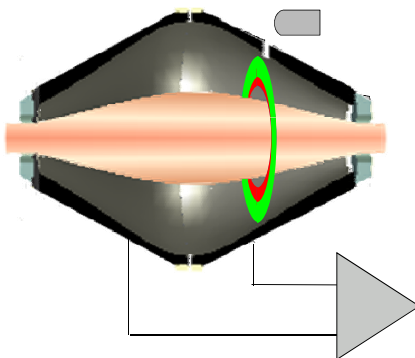
A.A. Makarov, *Anal. Chem.*, v.72
(2000), No.6, p.1156-1162.
A.A. Makarov, *US Pat.* 5,886,346,
1999.



18

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Lord of the ion rings: “リング”の維持



$$\omega = \sqrt{\frac{k}{m/z}}$$



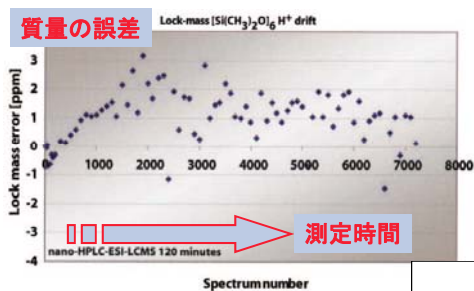
1. 周波数の決定はフーリエ変換を利用→質量の情報へ
2. 高感度かつ高分解能を得るためには、イオンを持続的に運動する必要がある
→さらなる高真空度を要求

19

ThermoFisher
SCIENTIFIC

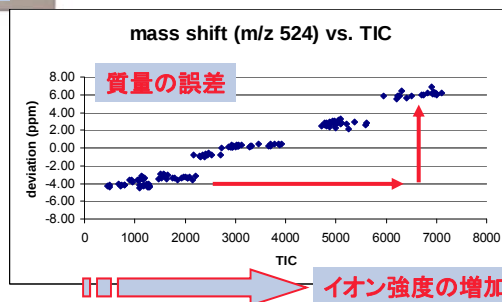
精密質量を妨害する要因

質量の誤差



- 1) 装置の温度変化に対する観測質量のシフト

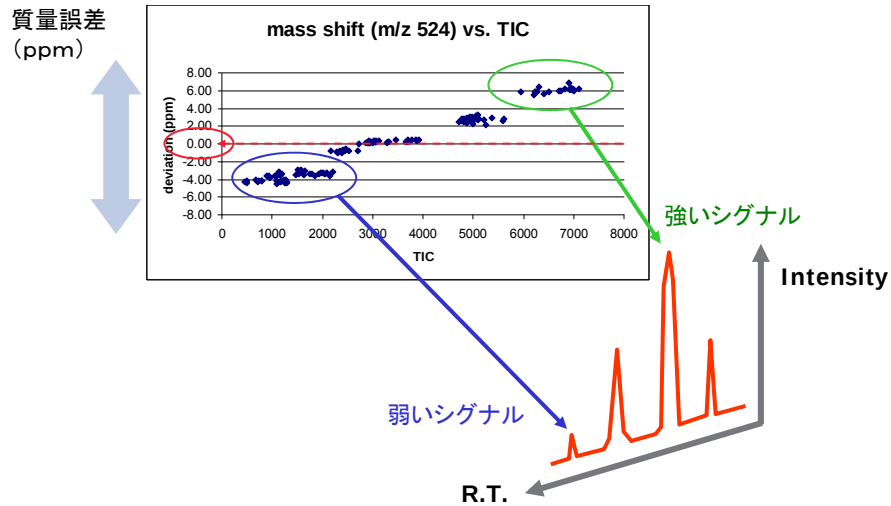
- 2) 検出器の飽和による観測質量のシフト



20

ThermoFisher
SCIENTIFIC

観測質量の精度はシグナル強度に依存



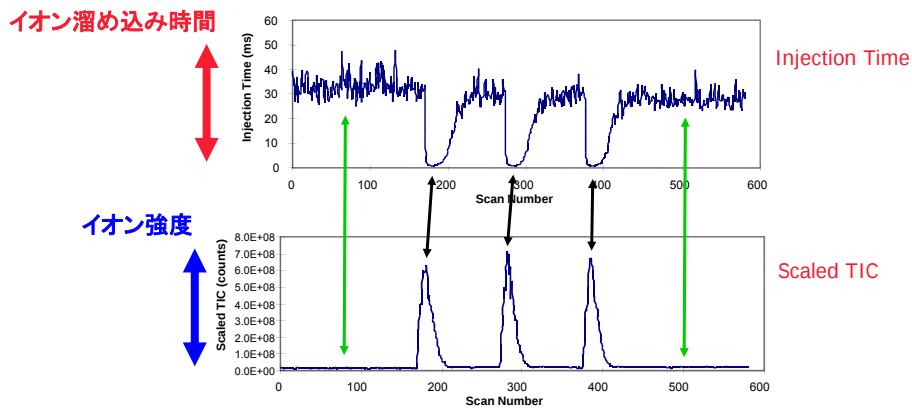
21

ThermoFisher
SCIENTIFIC

精密質量を妨害する要因の解決1 ～イオン量制御～

・Auto Gain Control (AGC)

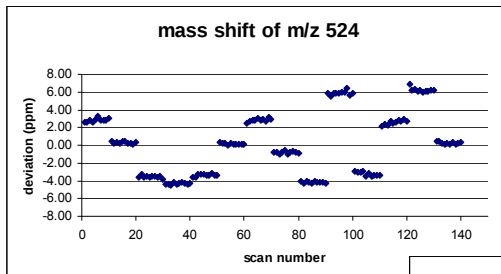
MSスペクトルの観測を行う前に、プレスキャン(~1msec)を行い、
予め溶出ピークのイオン量を確認し、観測を行う際には適切なイオン量を導入
ソフトウェアによる自動制御で、実際の操作では全く気が付きません。。。



22

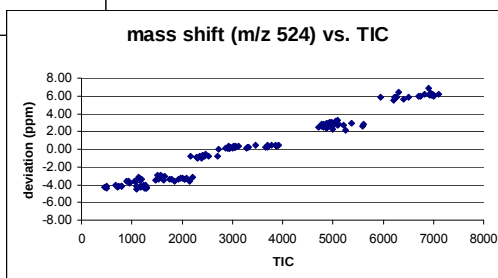
ThermoFisher
SCIENTIFIC

精密質量を妨害する要因の解決1 ～イオン量制御～



AGC OFF

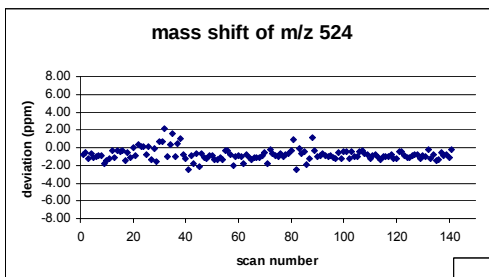
イオン量を制御していないと、その強度の増減に影響して観測質量の誤差が生じてしまいます。



23

ThermoFisher
SCIENTIFIC

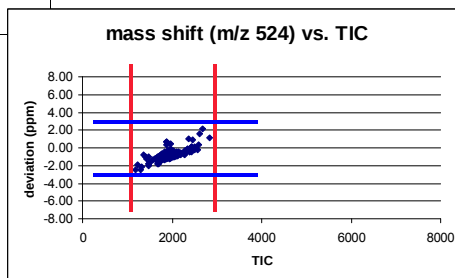
精密質量を妨害する要因の解決1 ～イオン量制御～



AGC ON

制御されたイオン量範囲

適切なイオン量によって
質量分析精度が向上

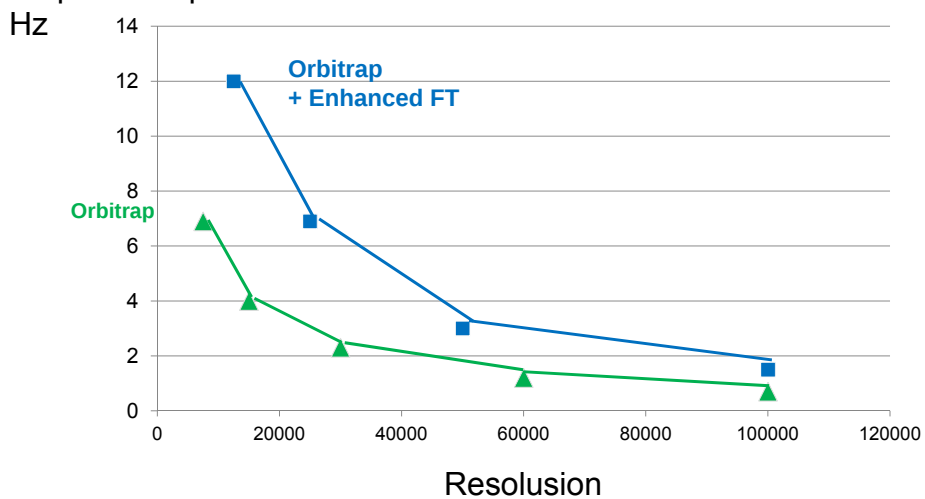


24

ThermoFisher
SCIENTIFIC

設定分解能と測定時間の比較

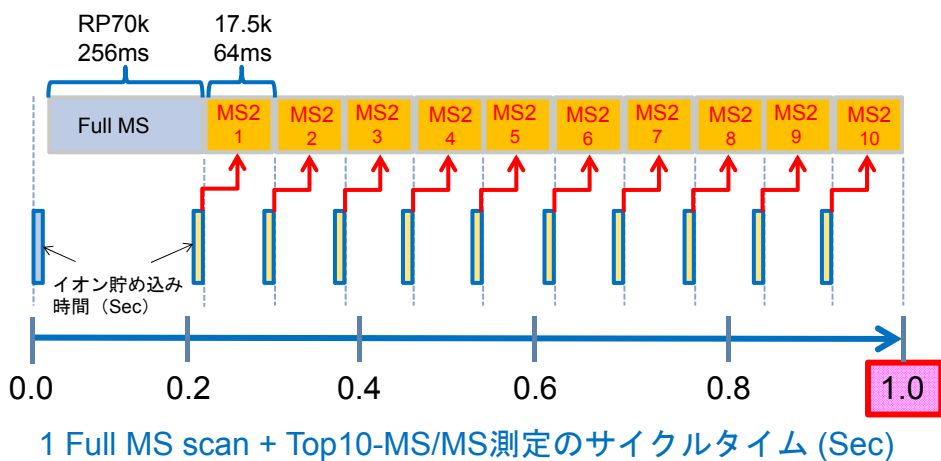
Acquisition speed



25

ThermoFisher
SCIENTIFIC

HCD-MS/MS: Prefilling in C-trap

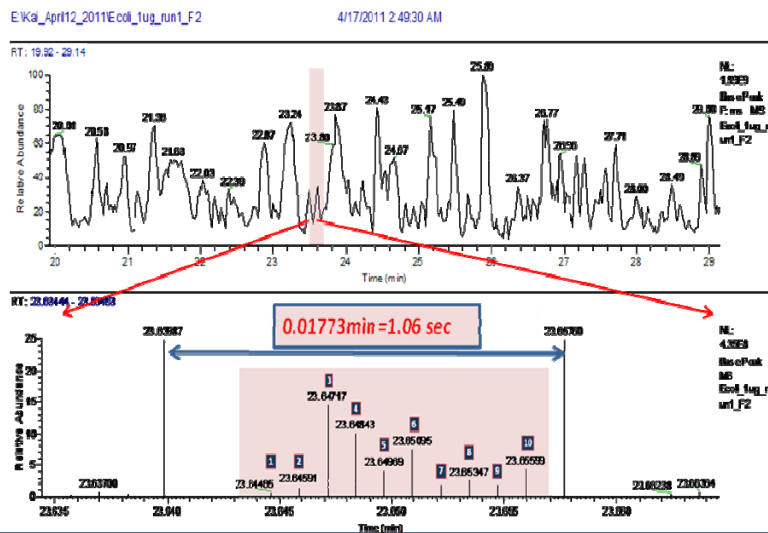


26

ThermoFisher
SCIENTIFIC

1 Full MS scan + Top10-MS/MS = 1 sec

E.Coli tryptic digested 1 ug : nanoLC-MS(30k)-ddTop10(17.5k)



27

ThermoFisher
SCIENTIFIC

サンプルおよび測定/解析Method

E.Coli / Yeastのタンパク質

- 還元アルキル化 (CAM)
- Trypsin消化

nanoLC : Easy nLC (Thermo scientific)

- Trap column : 0.1x10mm, ODS (Easy column, Thermo scientific)
- Analytical column : 0.075x100mm, ODS (日京テクノス)
- 移動相A : 水+0.1%ギ酸
- 移動相B : アセトニトリル+0.1%ギ酸
- グラジェント : 0-35%B(120min)
- Flow rate : 300nL/min

MS : Q-Exactive (Thermo scientific)

- Full MS scan : m/z300-1500 (RP70k)
- ddTop10 : HCD NCE30(RP17.5k)
- Charge state : Z=2 and 3
- Dynamic exclusion

Proteome Discoverer 1.3, MASCOT ver2.3

Count only rank1 peptide, FDR<1%

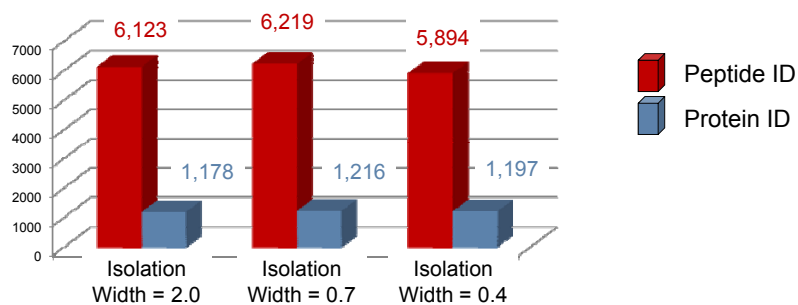
Parameters	
Show Advanced Parameters	
1. Input Data	
Protein Database	SwissProt
Enzyme Name	Trypsin
Maximum Missed Cleavage Sites	0
Instrument	Default
Taxonomy	 Escherichia coli
2. Tolerances	
Precursor Mass Tolerance	15 ppm
Fragment Mass Tolerance	0.02 Da
Use Average Precursor Mass	False
3. Dynamic Modifications	
1. Dynamic Modification	Deamidated (NQ)
2. Dynamic Modification	Gln->pyro-Glu (N-term Q)
3. Dynamic Modification	Oxidation (M)
4. Dynamic Modification	
5. Dynamic Modification	
6. Dynamic Modification	
7. Dynamic Modification	
8. Dynamic Modification	
9. Dynamic Modification	
4. Static Modifications	
1. Static Modification	Carbamidomethyl (C)
2. Static Modification	

28

ThermoFisher
SCIENTIFIC

四重極Q1によるIsolation widthの効果

E.Coli = 500 ng	Iso width=2.0	Iso width=0.7	Iso width=0.4
Input	51,746	51,644	52,012
PSM	10,851	10,838	10,043
Peptide	6,123	6,219	5,894
Protein	1,178	1,216	1,197
Average score	43.08	47.64	47.49



29

ThermoFisher
SCIENTIFIC

同定ペプチドの質量誤差 : Isolation width = 0.7

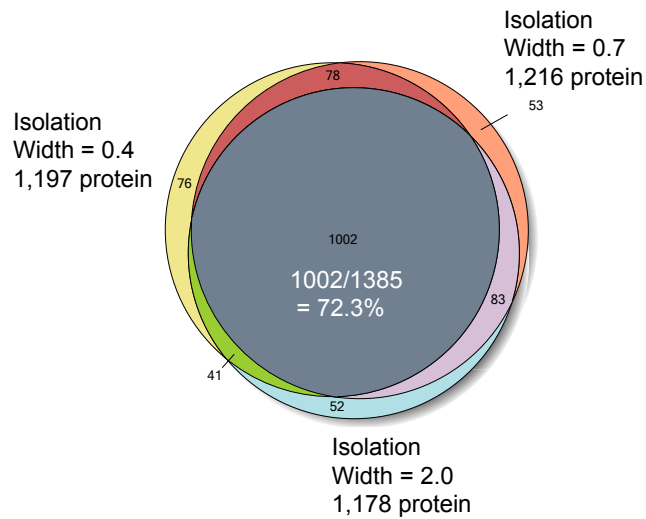
<15ppm : 10,838 (100%)
 <5ppm : 9,598 (88.56%)
 <3ppm : 8,658 (79.89%)



30

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Isolation widthによる同定タンパク質のオーバーラップ

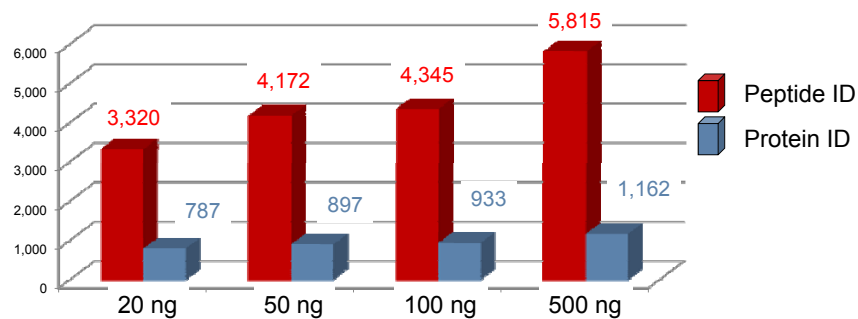


31

ThermoFisher
SCIENTIFIC

E.Coliタンパク質の同定結果

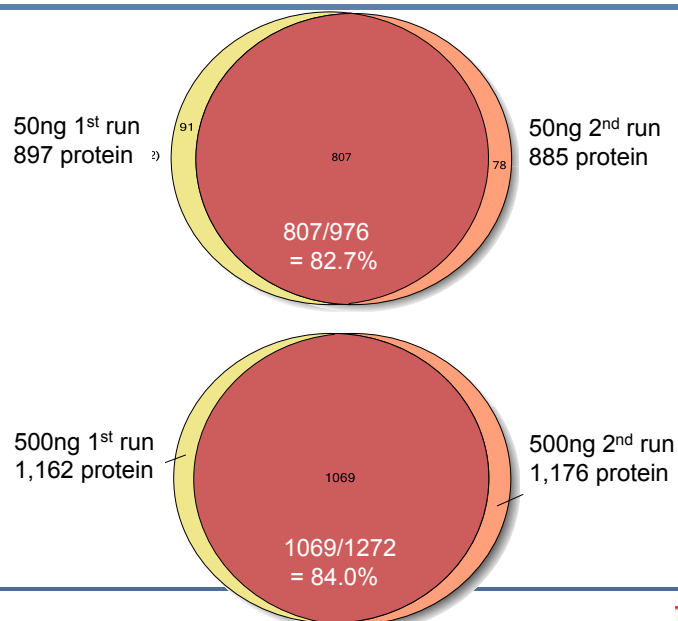
E.Coli	20 ng	50 ng	100 ng	500 ng
Input	42,056	45,724	46,437	54,276
PSM	5,045	6,515	6,902	11,013
Peptide	3,320	4,172	4,345	5,815
Protein	787	897	933	1,162
Average score	43.44	44.01	44.57	47.26



32

ThermoFisher
SCIENTIFIC

同定タンパク質の再現性

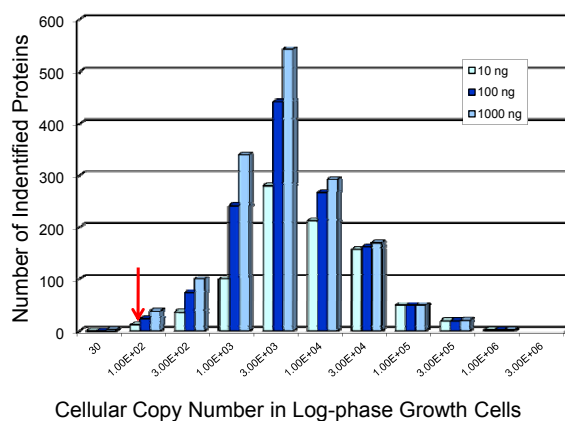


33

ThermoFisher
SCIENTIFIC

微量プロテオーム解析

Yeast protein with reported cellular copy number*



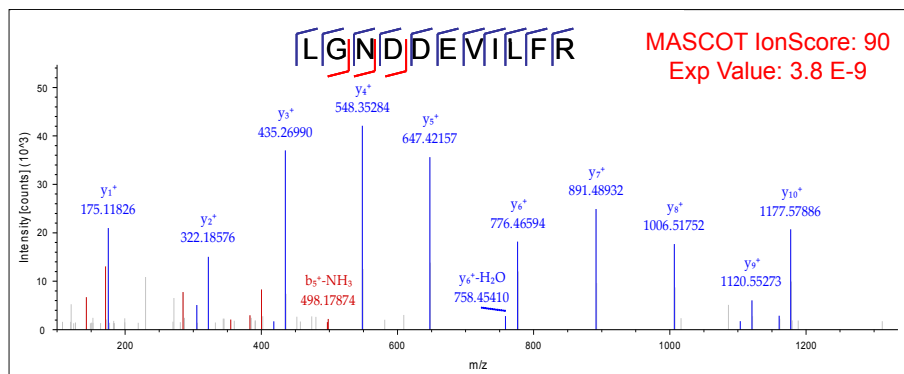
*Yeast cellular protein copy numbers are from Weissman and co-workers, Nature, 2003, 16, 737-41.

34

ThermoFisher
SCIENTIFIC

微量プロテオーム解析

High confidence identification from 10 ng of Yeast Digest



Peptide of YOR020C, **149** copy number, identified from **10 ng** yeast digest

35

ThermoFisher
SCIENTIFIC

測定条件

Method of Q Exactive

FULL MS / DD-MS² (TOPN)

General

Polarity

positive

Full MS

Microscans

1

Resolution

70,000

AGC target

1e6

Maximum IT

60 ms

Number of scan ranges

1

Scan range

300 to 1500 m/z

dd-MS² / dd-SIM

Microscans

1

Resolution

17,500

AGC target

5e5

Maximum IT

80 ms

Loop count

10

MSX count

1

TopN

10

Isolation window

2.0 m/z

Fixed first mass 140.0 m/z

NCE

30.0

Stepped NCE

dd Settings

Underfill ratio

0.1 %

Intensity threshold

6.3e3

Apex trigger

Charge exclusion

unassigned, 1, 4 - 8, >8

Peptide match

Exclude isotopes

on

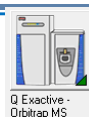
Dynamic exclusion

30.0 s

LOCK MASSES

445.12003 Positive

391.28429 Positive

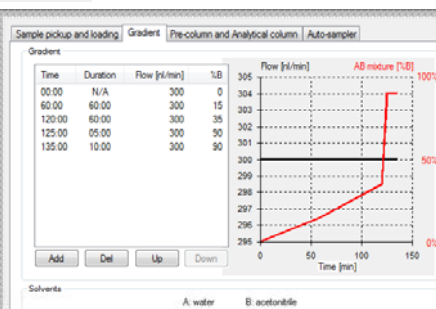


Q Exactive - Orbitrap MS



Thermo EASY-nLC

0.075x120mm ODS column (Nikkoy tech)



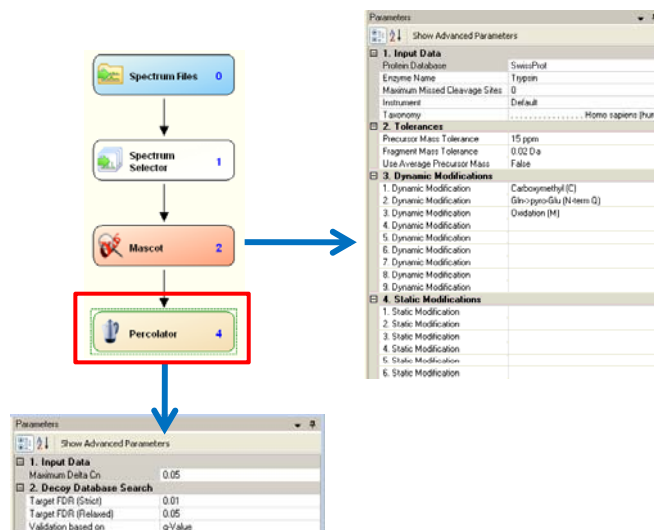
Sample

- サンプルは0.1ug/μLと0.01ug/μLとなるように0.1%FAIにて溶解・希釈しました。
- サンプルは設定濃度となるように注入量を変えて測定を行っています。

36

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Percolatorを使用したMASCOT検索

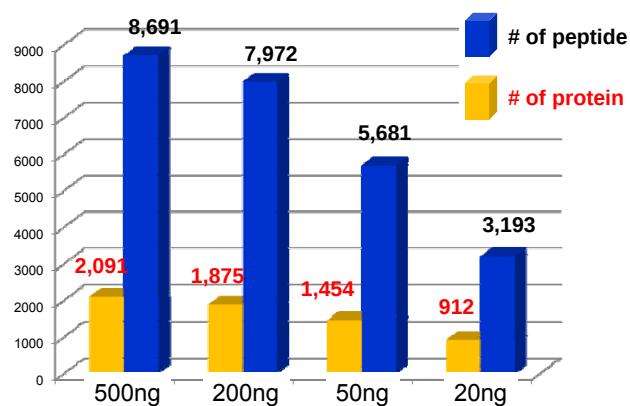


39

ThermoFisher
SCIENTIFIC

各サンプル濃度における同定結果の比較

THP-1	500ng	200ng	50ng	20ng
# of MS/MS	42,169	41,347	38,296	33,724
PSM	10,891	10,054	7,071	3,901
peptide hit	8,691	7,972	5,681	3,193
protein hit	2,091	1,875	1,454	912

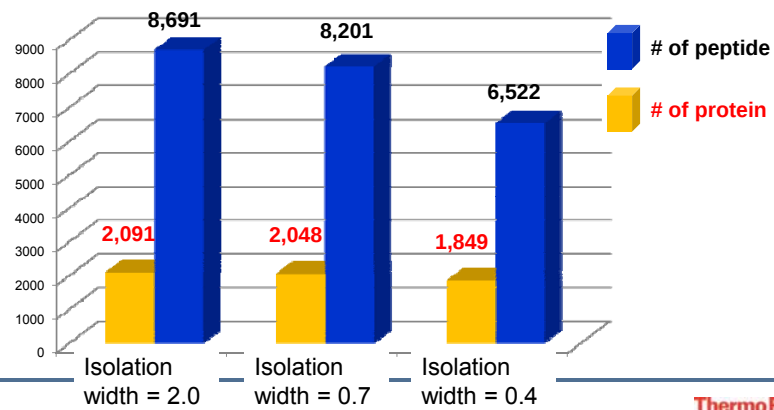


40

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Isolation widthにおける同定結果の比較

THP-1, 500ng	Isolation 2.0	Isolation 0.7	Isolation 0.4
# of MS/MS	42,169	42,269	41,718
PSM	10,891	10,435	8,062
peptide hit	8,691	8,201	6,522
protein hit	2,091	2,048	1,849



41

ThermoFisher
SCIENTIFIC

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Qual / Quan proteome解析
Target peptide quan



The world leader in serving science

比較定量の手法

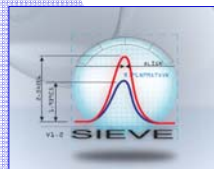
タンパク質同定 & 発現量変動解析

Label Free

SIEVE

ラベル試薬

TMT, SILAC, iTRAQ



43

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Pierce Biotechnology is Part of Thermo Scientific

TMT (Tandem Mass Tag)



TMT reagent (229Da)

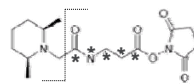
126-131

103-97

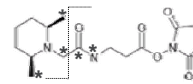
N-term
and K

Reporter

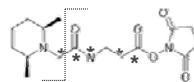
Balance



126 Da



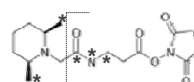
129 Da



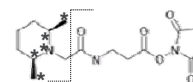
127 Da



130 Da



128 Da



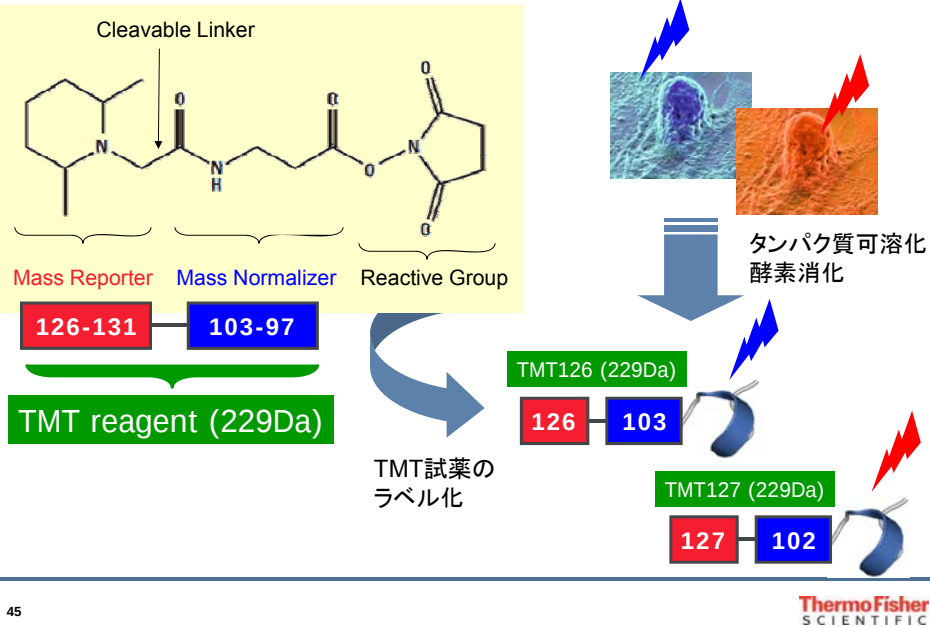
131 Da

- 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

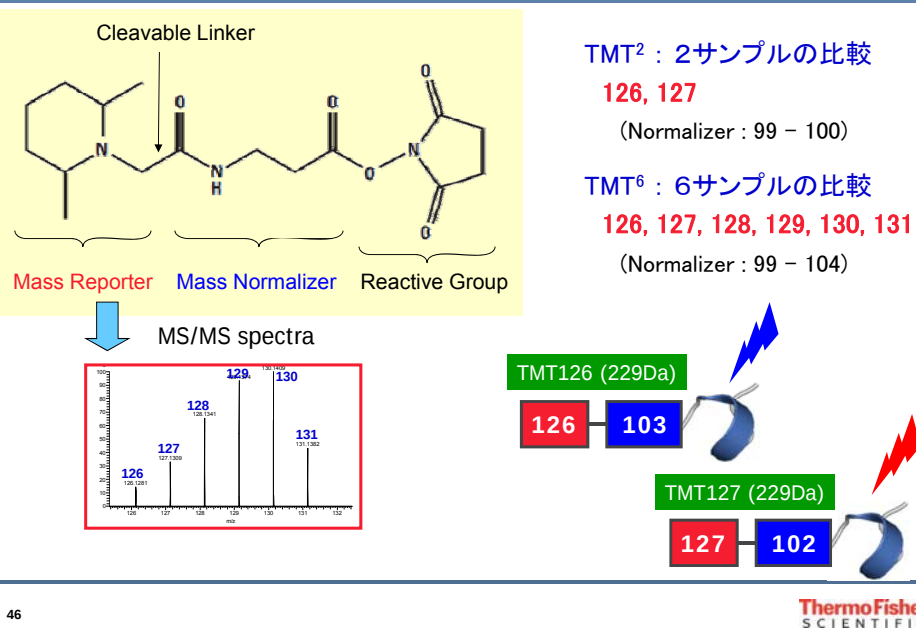
44

ThermoFisher
SCIENTIFIC

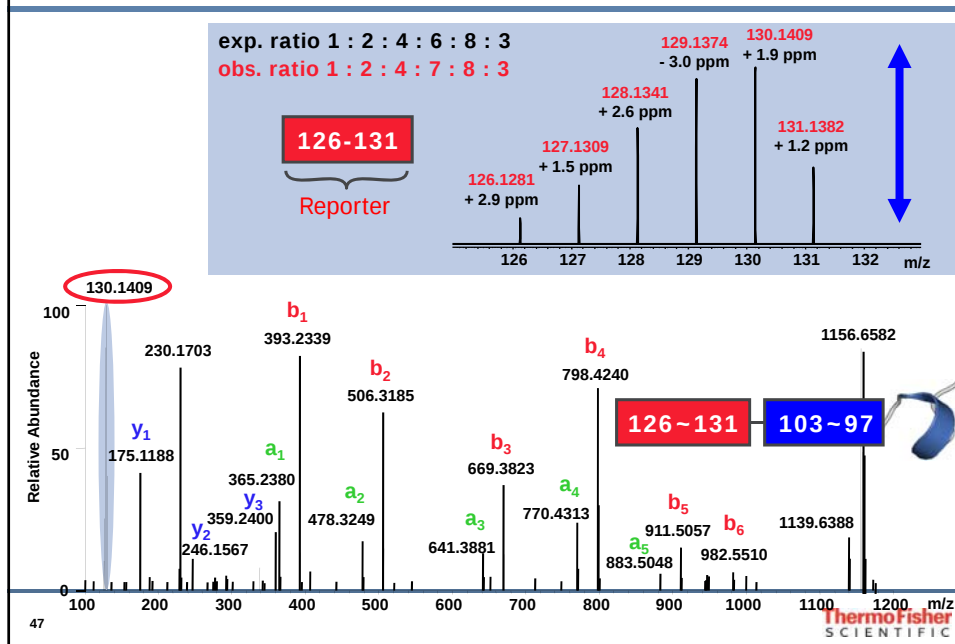
TMT試薬を用いたタンパク質発現変動解析



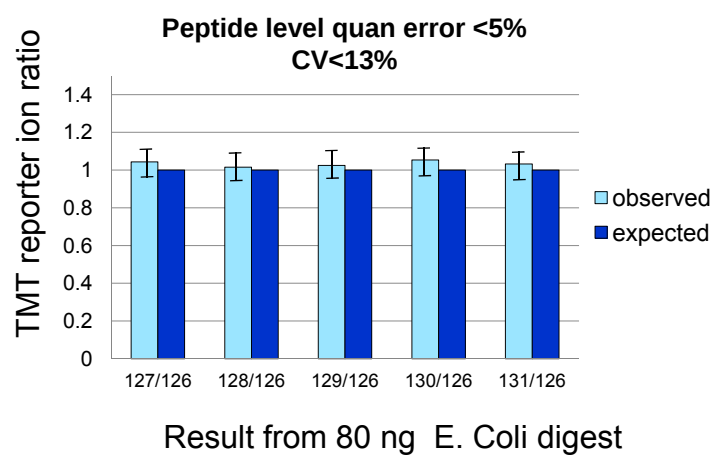
TMT試薬を用いたタンパク質発現変動解析



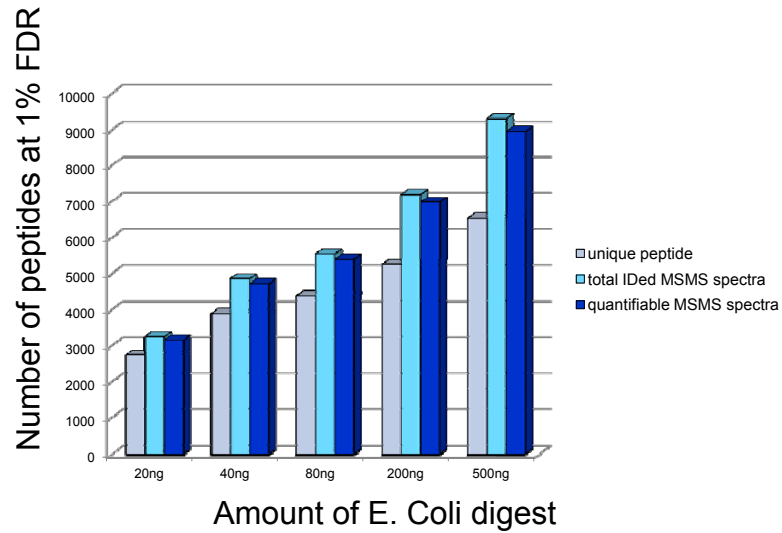
TMT試薬を用いたタンパク質発現変動解析



Discovery Quan (TMT) – accuracy and precision



Discovery Quan (TMT) - >97% of identified peptides were quantified

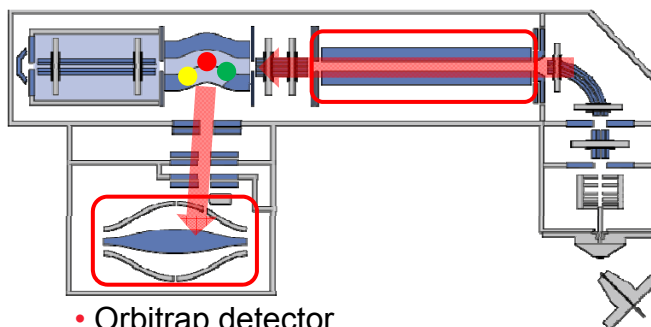


49

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Accurate mass / High resolution MSでのSIM定量

- Quadrupole mass filter (Q1)
- Multi plex SIM
 - ・ 同時に最大10チャンネルをQ1で選択

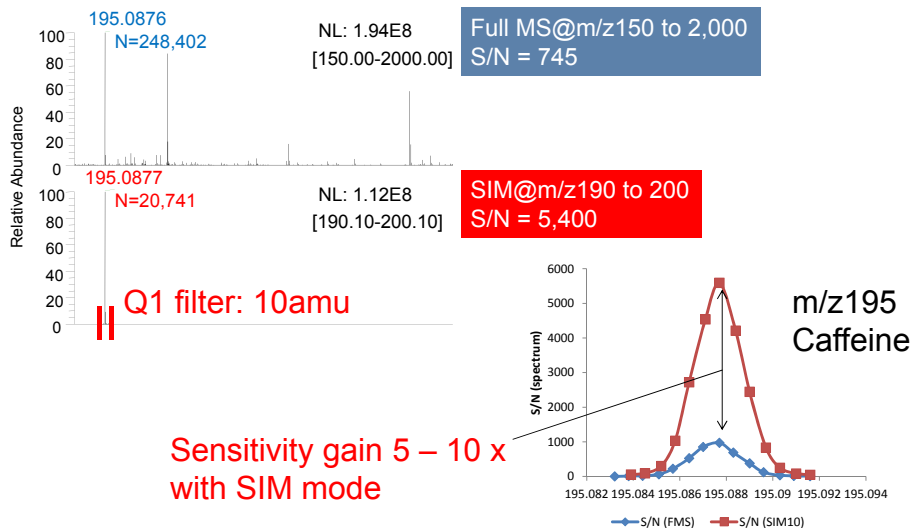


- Orbitrap detector
 - ・ 新しいFTプログラム: Enhanced FT
 - ・ 従来よりも1.8倍の高分解能 (or 高速化)

50

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Selected ion monitoring: Q1 mass filter

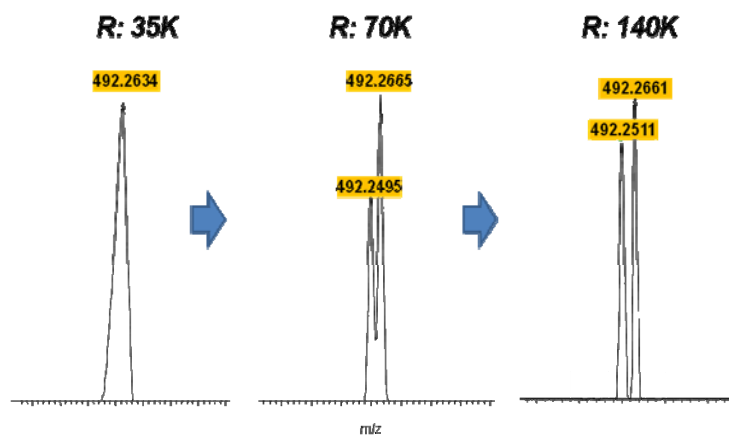


51

ThermoFisher
SCIENTIFIC

SIMによるペプチドターゲット定量

Qフィルターと高分解能MSによるSIMで高感度/高精度な定量



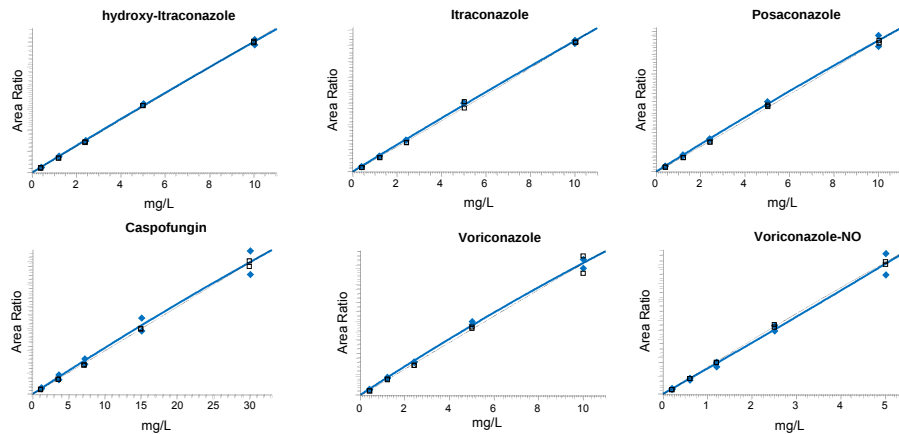
52

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Exactive vs. TSQ Ultra - Calibration Curves

◆ Antifungal drug curves : LC-ESI-TSQ Ultra - MS

■ Antifungal drug curves : LC-ESI Exactive - MS

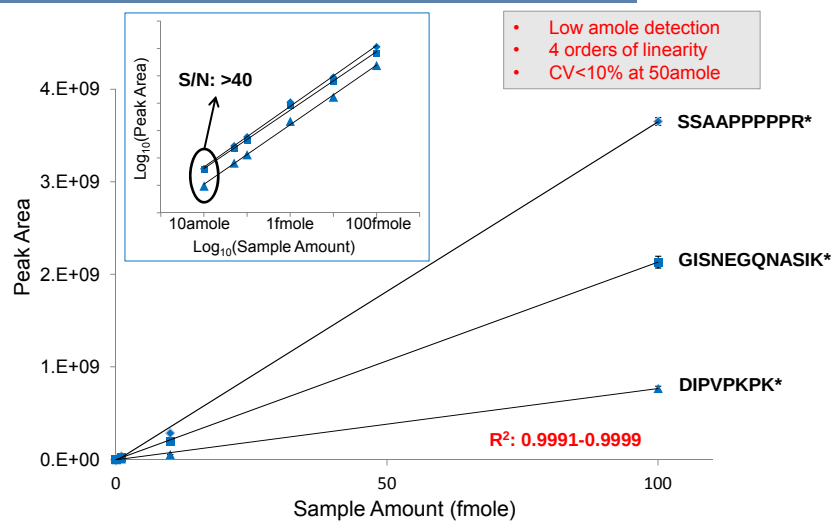


53

ThermoFisher
SCIENTIFIC

SIMによるペプチドターゲット定量 (Low matrix)

10 ng Yeastに添加したペプチド標品の検量線

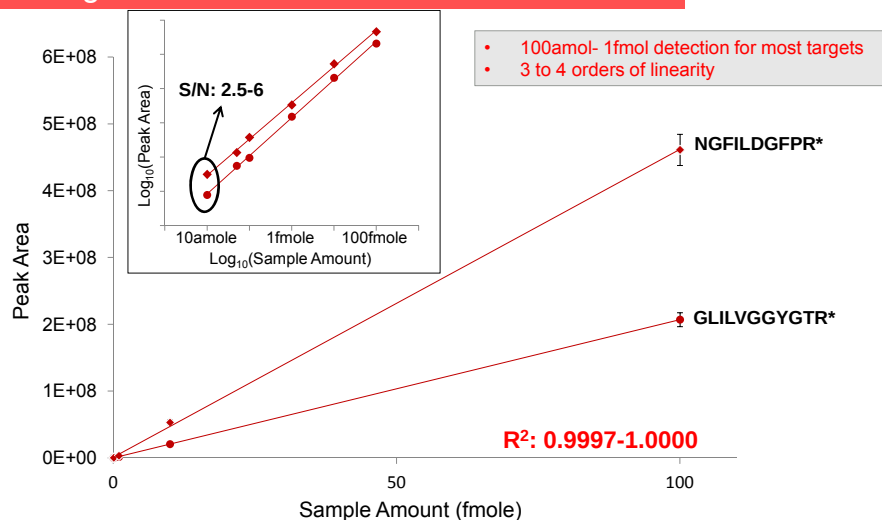


54

ThermoFisher
SCIENTIFIC

SIMによるペプチドターゲット定量 (High matrix)

1,000 ng Yeastに添加したペプチド標品の検量線



55

ThermoFisher
SCIENTIFIC

まとめ

- ベンチトップ型オービトラップ “Q-Exactive” によるタンパク質の大規模解析の評価を行いました
- 新しいFTプログラム「Enhanced FT」によって高速な測定が可能なり、1MS+10MS/MSを1秒で観測することが可能でした
- Orbitrapの水冷式から、Q-Exactiveでは空冷式に変更したものの、質量精度は安定している結果が得られ、<5ppmでの同定が可能でした。
- 繰り返し測定から同定されるタンパク質の再現性は80%以上である結果を得ました。
- より発現量の少ないタンパク質の同定が可能な高感度分析が可能でした。
- SILACやiTRAQ、TMTなどのラベル化試薬を利用することにより大規模な同定結果と同時に比較定量結果を得ることが可能でした。
- SIMでのターゲット定量では4桁のダイナミックレンジで良好な直線性が得られることが判りました。また、複雑なマトリクス条件下においてもamolオーダーでの定量が可能でした。

56

ThermoFisher
SCIENTIFIC