

3. MS Analysis

3-1

タンパク質同定のご依頼について

電気泳動について

お客様のご研究室で電気泳動を行う場合は、プレキャストゲルを使用されることをおすすめいたします。器具類をよく洗浄しケラチンなどのコンタミネーションにご注意ください。特に冬季の乾燥する時期は、**静電気によるウール製品からのコンタミネーション**にもご配慮ください。

染色キットについて

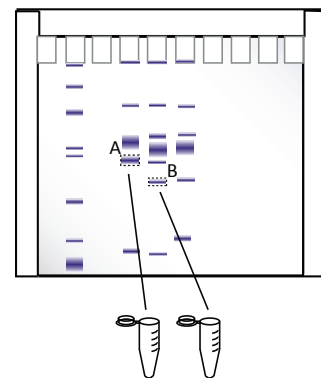
銀染色の場合、**グルタルアルデヒド(架橋性固定剤)を含まない**処方で固定・染色してください。質量分析に阻害的ではないキットには、ATTO EzStain Silver(AE-1360)、コスモ・バイオ 2D-銀染色試薬・Ⅱ(423413)、和光 Negative Gel Stain MS Kit (293-57701)などがあります。CBB染色の場合、脱色が難しいほど染まっているスポットは同定成功率が低下します。長時間の染色はお避けください。

必要なサンプル量について

確実な同定結果をお返すため、**CBB染色で染まる程度の量(1 pmol以上)**をご用意いただくことをおすすめいたします。

ゲルから切り出す際の手順と注意

ヒトケラチンのコンタミネーションを防ぐために清浄な手袋を付け、泳動用ガラス板、泳動槽、染色バットなどを十分に洗浄してください。清浄なメスもしくはカミソリを用いて解析ご希望のバンドを切り出してください。その際、余分なアクリルアミドゲルが存在しますとペプチドの抽出効率が下がりますので、できるだけ**染色されたバンドのみを切り抜いてください。**



サンプルのご送付

- (1)乾燥させたゲル片
微量遠心チューブに入れて室温でお送りください。
 - (2)ウェットなゲル片
ゲル片だけを微量遠心チューブに入れて、4℃の冷蔵宅配便でお送りください。
 - (3)液体のタンパク質溶液
微量遠心チューブに入れていただき、輸送中の飛散防止のため-20℃の冷凍宅配便でお送りください。
- ※質量分析計による同定可能性をお見積もりますので、サンプルの推定量と泳動像をお知らせください。**

報告書の返却

報告書は電子ファイル(PDF, HTMLなど)をメールに添付してお返しいたします。ファイルにはNCBItr等データベース検索の結果を掲載します。de novo解析の場合は推定配列と根拠となるMS/MSスペクトルデータを掲載します。

情報漏えいのリスクについて

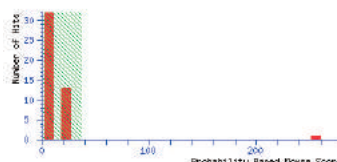
弊社の質量分析関連機器はクローズドLANで運営されております。NCBItr等の配列情報は一度クローズドLAN内にデータをダウンロードして検索を行いますので、お客様の解析データが外部に漏れる心配はございません。

Mascot Search Results

User : RatLiverTest-100kDa50p1
Email : Test
Search title :
MS data file : DATA.TXT
Database : NCBItr 20080615 (6581543 sequences; 2249442158 residues)
Taxonomy : Rodentia (Rodents) (221703 sequences)
Timestamp : 5 Sep 2008 at 09:00:03 GMT
Significant hits: [q116793863](#) tumor rejection antigen gp96 [Mus musculus]

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 > 57 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.

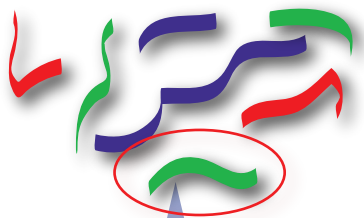


タンパク質全体



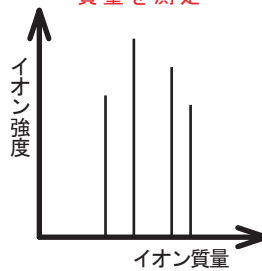
酵素消化

酵素消化ペプチド



PMF
(Peptide Mass Fingerprinting)

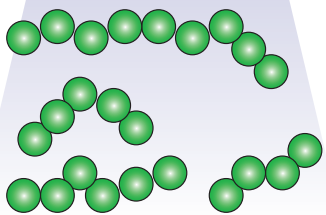
トリプシン消化ペプチドの質量を測定



タンパク質を酵素(トリプシンなど)で消化したときに生成する予想ペプチドのデータベース上の質量リストと、得られた測定結果を比較します。

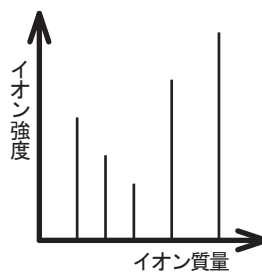
ペプチドの単離と分解

ペプチド分解物



MS/MS Ion Search

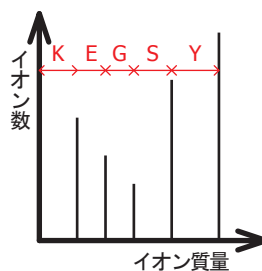
ペプチド分解物の質量を測定



ペプチド結合をランダムな位置で崩壊させた分解物の質量を測定します。データベース上の予想ペプチド分解物の質量リストと測定結果を比較します。

※DNAデータベースがない場合

ペプチド分解物の質量ピーク差を計算



MS/MS Ion search分析と同じスペクトルデータを使用します。各ペプチド分解物の質量ピークの差はアミノ酸残基の質量と一致するため、そのピークの差を一つずつ確認することによってアミノ酸配列を決定していきます。

de novo シーケンス

当社ではMS/MS Ion Searchによる解析を標準で行っております。一部のサンプルにつきましては、PMF解析を併用することによって確実な同定結果をお返ししています。

タンパク質同定分析に関して、お客様から多く寄せられた事項についてお答えいたします。

1. サンプルの量はどのくらい必要ですか？

分析は100 fmol以上からお受けいたします。確実な同定結果を得るために、1 pmol以上をご用意頂くことをおすすめします。特に、ゲノム解析が終了していない生物種の場合は、アミノ酸配列決定のためにS/N比の高いデータを取得する必要がありますので、サンプルはできるだけ多くをご用意ください。

2. サンプルの送付方法について教えてください。

SDS-PAGEによって分離されたバンドの染まっている部分だけを切り抜いてお送りください。切り出す時には、ケラチンの混入にご注意ください。ゲル片は、1.5 mLのチューブに入れて、冷蔵の宅配便で平日の18時まで当社に到着するようにご手配ください。液体のサンプルは冷凍してください。お送りした分析依頼書に必要事項をご記入のうえ、サンプルに同封するかFAX、eメールでご返送ください。

3. PMF分析について教えてください。

PMF(ペプチドマスフィンガープリント)分析は、タンパク質を酵素(トリプシンなど)で消化した際に生成したペプチド群の質量と、データベースの登録配列から予測した仮想消化ペプチドの質量とを照合してタンパク質を同定する手法です。

4. MS/MSイオンサーチ分析とは何ですか？

質量分析計内部で単離したペプチドをアルゴンガスに衝突させると、ペプチド結合の任意の位置で壊れるためアミノ酸配列に応じた分解物が得られます。登録配列から予測した分解物の予測質量と分解物の実測値を照合してタンパク質を同定する手法です。PMF分析に比べると、同定の蓋然性が極めて高くなります。

5. アミノ酸配列決定分析とは何ですか？

ペプチド分解物を測定したマスペクトルのピーク幅と並びを読むことで、既知の配列データを必要とせずにアミノ酸配列を決定できます。このため、デノボ(de novo)解析とも呼ばれます。配列の決定に際しては、S/N比の高いスペクトルを得る必要があります。十分なサンプル量(pmolオーダー)が必要になります。

6. MASCOTとは何ですか？

PMF分析やMS/MSイオンサーチ分析の際に実測値と予測値を照合させるためのソフトウェアで、Matrix Science社の製品です。NCBI InrやSWISS-PROT等の登録配列から計算した消化ペプチドやその分解物の質量の予測値と実測値を比較します。

7. Mowse Scoreとは何ですか？

MASCOT検索を行うと、レポート上部に"Mowse Score"が記載されています。これは実測配列と登録配列がどのくらい一致するかを確率的に表したものです。Mowse Scoreが高いほど、データの蓋然性が高まります。

8. サンプル量が少ない場合は？

サンプル量が少ない場合は、複数のレーンから該当バンドを切り抜くことによって量を確保してください。基本的には1レーンに泳動する量を増やして濃いバンドをご用意いただけますようお願いいたします。ゲルの体積が増えるとゲル由来の夾雑物も増えますので、5レーンまでを目安にしてください。

9. 膜に転写しても大丈夫ですか？

膜に転写されたサンプルも解析可能ですが、漏出ポリマーによる悪影響が生じやすいため、ゲル片からの分析をおすすめします。

10. N末端/C末端の配列分析は可能でしょうか？

タンパク質をトリプシン消化したあとに、C末やN末を含む消化ペプチドがイオン化して質量分析計で検出できれば可能です。しかしながら、それらのペプチドの検出可能性を事前に推定することはできません。

11. 翻訳後修飾の解析は可能でしょうか？

修飾されたペプチドがイオン化して観察できれば、修飾基や修飾部位の特定が可能です。しかし、リン酸化修飾ペプチドなどはイオン化しにくくなるため、修飾ペプチドだけを濃縮する操作が必要になります。

12. バンドに複数のタンパク質が含まれている場合、解析できますか？

複数のタンパク質が含まれていても、各タンパク質の消化ペプチドのピークが観察されれば、それぞれ同定が可能です。しかし、複数のタンパク質のうち、どれが相対的に高濃度であったかは決定できません。