

質量分析法を用いた蛋白質定量、
及び翻訳後修飾プロファイリング解析

株式会社バイオシス・テクノロジーズ



Biosys Technologies, Inc.

Resource

Full Dynamic Range Proteome Analysis of *S. cerevisiae* by Targeted Proteomics

Paola Picotti,¹ Bernd Bodenmiller,¹ Lukas N. Mueller,¹ Bruno Domon,¹ and Ruedi Aebersold^{1,2,3,4,*}

¹Institute of Molecular Systems Biology, ETH Zurich, Zurich CH 8093, Switzerland

²Competence Center for Systems Physiology and Metabolic Diseases, Zurich CH 8093, Switzerland

³Institute for Systems Biology, Seattle, WA 98103, USA

⁴Faculty of Science, University of Zurich, Zurich CH 8057, Switzerland

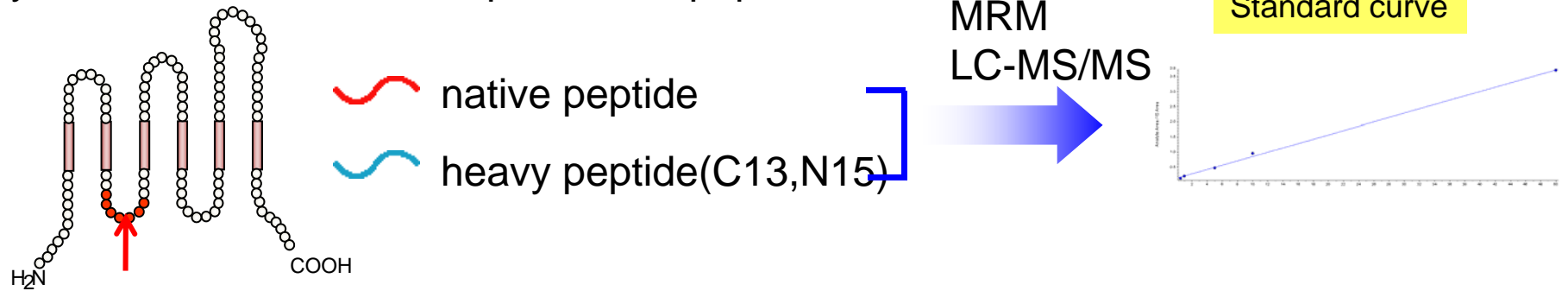
Target Proteomics

- ・検出器: 三連四重極型質量分析計
(Selected Reaction Monitoring: SRM)
- ・内部標準: 安定同位体標識ペプチド



安定同位体標識ペプチドによる定量分析

1) Synthesize native and isotope labeled peptide



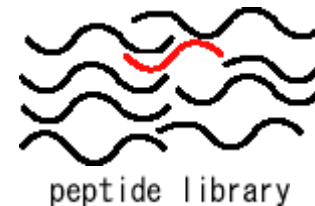
Target protein **selective** trypsin digested peptide

2) Sample preparations

Materials
• tissues
• cells

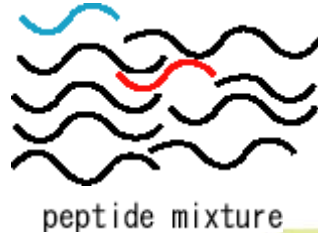
reduction
alkylation

Trypsin digestion

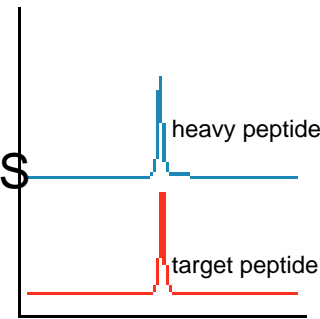


3) MRM LC-MS/MS analysis

heavy peptide
(C13, N15)



MRM
LC-MS/MS



Amount of protein is calculated from standard curve.

標識ペプチドによる定量分析の失敗例

● 標識ペプチド購入前の挫折

選択条件

- ・化学修飾を受ける、Cys, Metを含まない
- ・対象タンパク質に対して特異的である。
- ・翻訳後修飾やSNPを含まない。
- ・Miss Cleavageの可能性のある部分を含まない
-

} 分析に適した
ペプチドが選択できない

● 標識ペプチド購入後の怒り 標識ペプチドの価格: ~20万円/1ペプチド

- ・報告例のない未知の翻訳後修飾を含んでいることが、後から発覚
- ・疎水性が極端に高い、もしくは低いため、LCのカラムから出てこない、すべる。
- ・感度が低く、検出できない。

● 分析後の不安

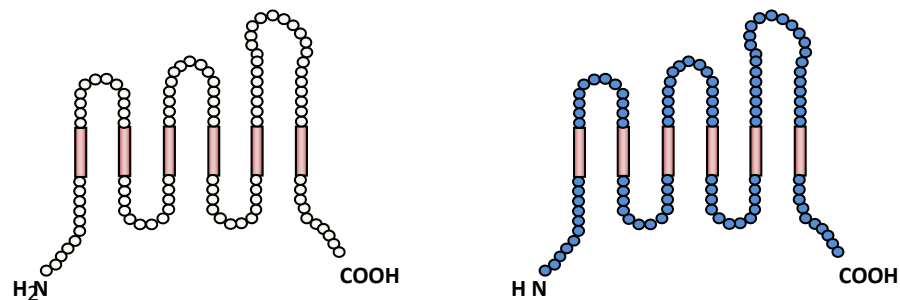
- ・前処理などの試料調製時の試料損失はない？
- ・酵素消化効率は100%？

} 定量値の過小評価

1タンパク質に対し、測定対象ペプチドはいくつ必要ですか？

安定同位体標識タンパク質による定量分析

1) Synthesize native and isotope labeled peptide



全てのアミノ酸を15N標識

→Cys, Metを含む部分も分析可能

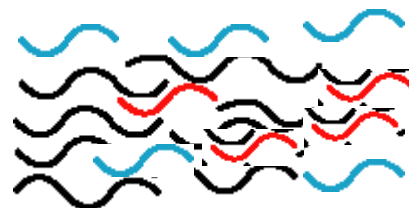
2) Sample preparations

Materials
• tissues
• cells

reduction

alkylation

Trypsin digestion



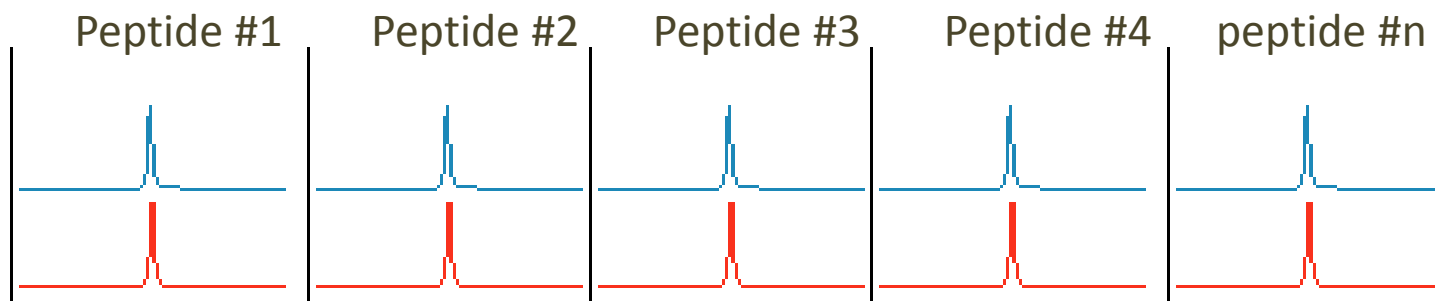
alkylation

前処理による試料損失、酵素消化効率の補正

3) MRM LC-MS/MS analysis

複数ペプチドを定量対象とすることが可能

SRM
LC-MS/MS



Biosys Technologies, Inc.