

網羅的

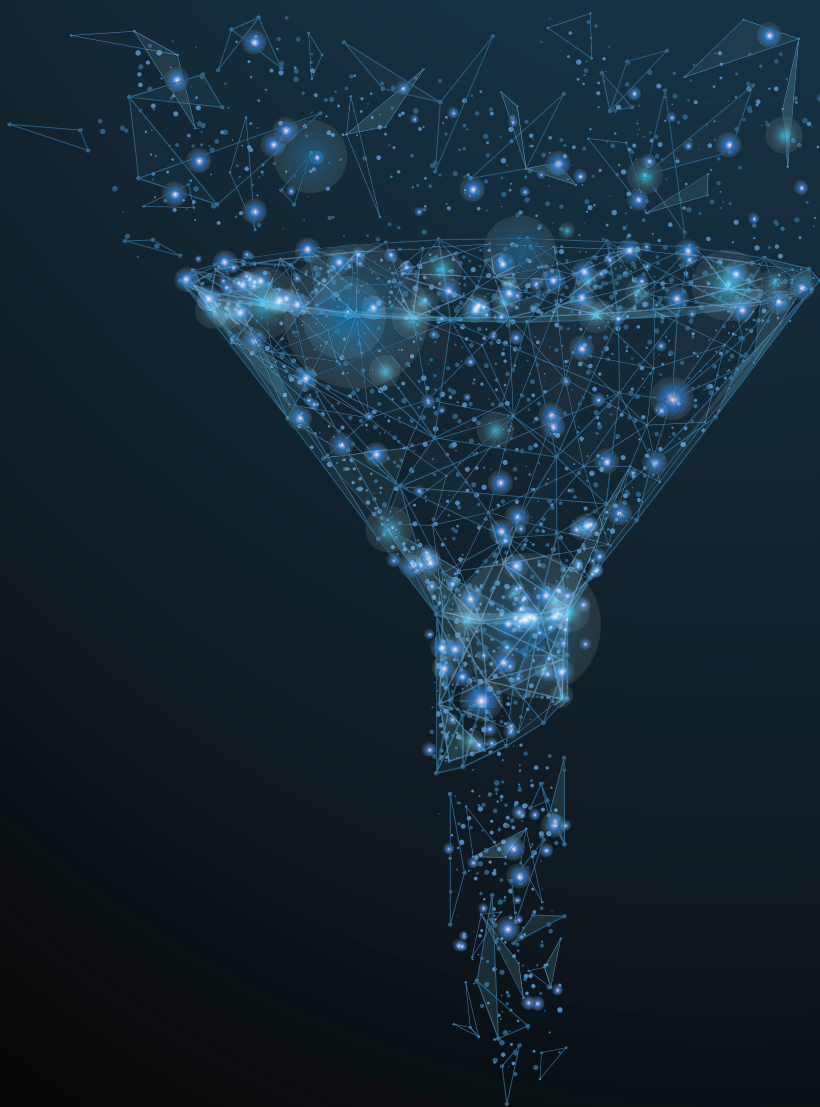
探索

質量分析を用いた

2024年4月改訂版

網羅的・探索 プロテオーム解析

受託サービス



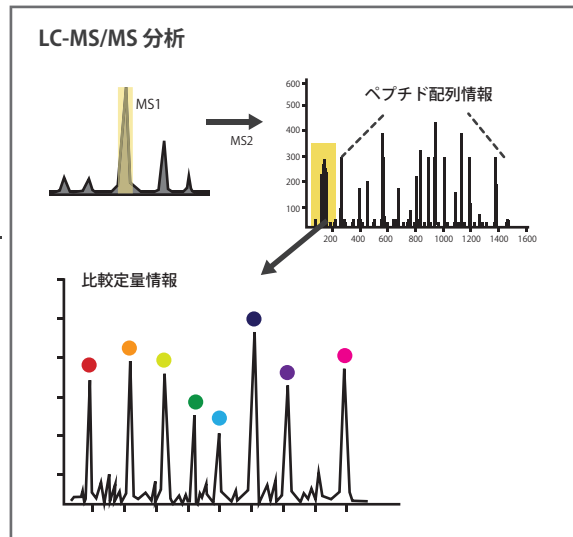
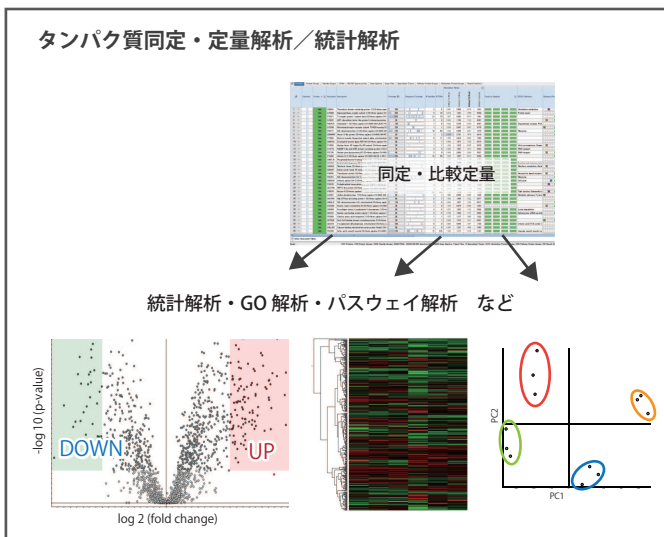
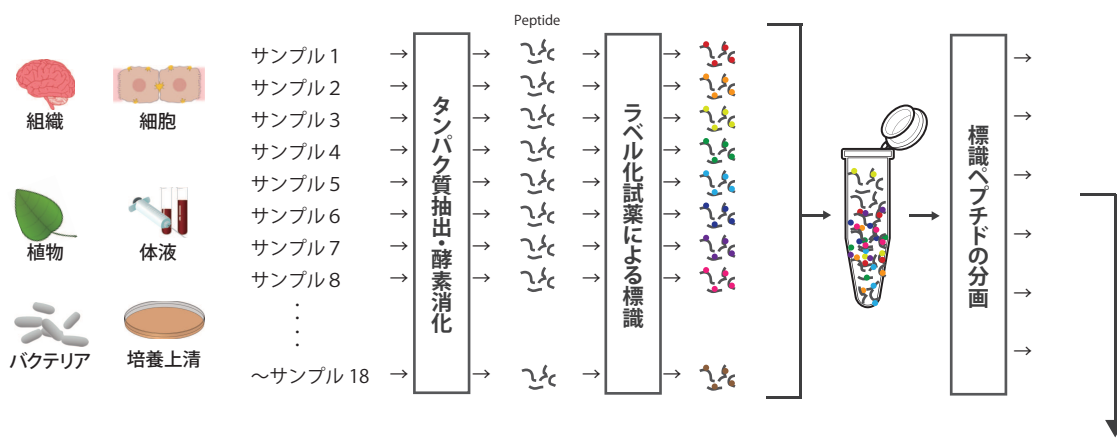
APRO
アプロサイエンス

定量プロテオーム解析

iTRAQ®/TMT™ 試薬を用いた相対定量プロテオーム解析

組織や細胞、培養上清などのサンプル中に含まれるタンパク質の網羅的な同定を行うと同時に、比較定量データを取得する解析手法です。ラベル化試薬を用い、ペプチド配列情報と検体間での比較定量値を同時に取得し、それらを統合することで、どのような種類のタンパク質が存在しているか、また、その量が検体間で何倍であるのか、という情報が得られます。

検体によって異なるので一概には言えないのですが、1,000~5,000種類のタンパク質の情報が得られます。最大で18種類のサンプルを同時に同定・比較定量することができるため、薬剤投与からのタイムコースや、病態変化に伴うタンパク質の発現変動解析などに応用することが可能です。また、定量的なプロテオーム解析の結果を安定的に得るためには、再現性よくタンパク質を抽出し、ペプチド化すること（分析に供する前の処理）も大変重要です。弊社では、これまでに様々な検体を取り扱ってきました。各種組織、培養上清等の希薄なタンパク質溶液、植物など夾雑物の多いサンプルなど、それぞれに前処理のコツがあります。それらのノウハウを活かして、ユーザー様それぞれの検体に最適な分析・解析を行います。



Point

ラベル化試薬を用いた比較定量プロテオーム解析でできること

- ▶ 一度の分析で1000~5000タンパク質を同定・比較定量
- ▶ 同時に18検体の分析が可能。
- ▶ 組織・細胞・培養上清など様々な種類の検体に適応可能。

▶価格

検体数	価格 (税別)
5～18検体の場合	¥ 220,000 × 検体数
2～4検体の場合	検体数に関わらず ¥ 1,100,000/一式
19検体以上の場合	都度お見積り

費用例

6検体 (2群, 各n=3) : ¥ 1,320,000 (税別)
 15検体 (5群, 各n=3) : ¥ 3,300,000 (税別)

※ 特別な前処理 (リン酸化ペプチド濃縮等) は別途お見積。

▶推奨サンプル形態

組織、細胞、培養上清、抽出液等
 ※ 組織片の場合は数 mm角 程度、
 培養細胞の場合は細胞数 10⁶ 個 程度を目安にご準備ください。
 ※ 溶液量は、数百 μL 以内を目安にご提供下さい。

▶必要サンプル量

タンパク質 50 μg 程度
 ※ 上記より少なくても対応できる場合がありますので、ご相談ください。

▶納期

サンプルをお受け取りした日から、1.5ヶ月程度
 ※ サンプルを受け取るタイミングによっては、前後する場合があります。

▶サービス内容

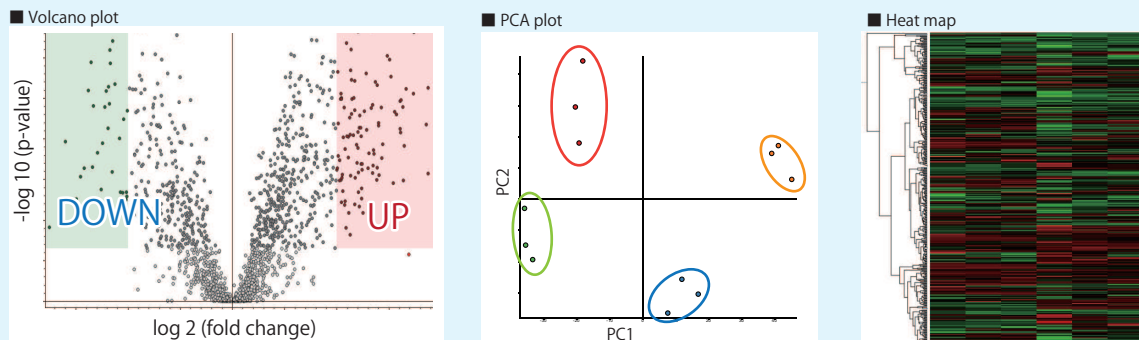
- サンプル前処理
 - ↳ 組織等からのタンパク質抽出・精製
 - ↳ サンプルQC (タンパク質定量・SDS-PAGE)
 - ↳ 酵素消化・ラベル化・分画・精製
- LC-MS/MS分析
- データ解析

▶使用する機器

- 質量分析装置
 - ↳ Orbitrap Exploris 480 (Thermo Fisher Scientific)
- HPLC
 - ↳ Vanquish Neo UHPLC (Thermo Fisher Scientific)
- 解析ソフトウェア
 - ↳ Proteome Discoverer (Thermo Fisher Scientific)

→Q 相対定量プロテオーム解析の結果をどのような図で見ると分かりやすいか？

例えば、Volcano plot は、群間比 (fold change) と p 値 (有意差) の散布図ですが、この図のように、「有意に存在比が変化したタンパク質を網羅的に可視化する」ことで、Up-regulated、Down-regulated の判別が容易になります。このプロットを描くためには、『p 値』の算出が必要となりますので、N=3 以上での分析が必要です (2 群間比較の場合、検体数は合計 6 となります)。
 この他にも、ヒートマップや PCA Plot (主成分分析) など、視覚的に比較できる図を適宜作成可能です。
 また、DAVID (無料で利用できるデータベースシステム) で、アノテーション情報を解析し、興味のあるタンパク質がパスウェイのどこに位置しているか等を解析することも可能です。



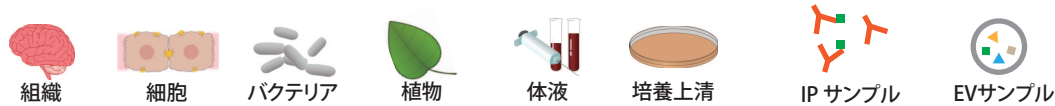
→Q 得られたタンパク質リストには、どんなアノテーションが付くのか？

GeneSymbol、GO 情報、Description などが付随します。アノテーションの中で、よく利用されるのは、GO 情報です。GO とは gene ontology のことで、遺伝子の生物学的プロセス、細胞の構成要素および分子機能に着目して、遺伝子に付けられるアノテーションです。生物種に関係なく網羅的に生物学的現象を捉えるように設計されており、細胞死や細胞分化、防御応答などの biological process、ミトコンドリア・核・リボソームなどの Cellular component、抗酸化活性や DNA 結合、転写調節活性などの Molecular function の 3 つのサブカテゴリーに分類されています。
 たとえば、「コントロール群と疾患群を比較して、2 倍以上多くなったタンパク質では、防御応答や細胞シグナル伝達に関与するタンパク質が多く同定されている」というように、生体内の現象を把握する事ができます。

定性プロテオーム解析

LC-MS/MSによるショットガン解析

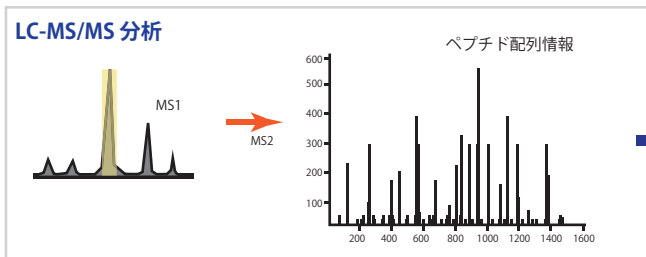
組織・細胞や培養上清などから抽出した粗精製タンパク質画分を質量分析計を用いて、網羅的にタンパク質を同定する分析方法です。組織、細胞や培養上清に含まれるタンパク質について、一度の分析で網羅的に「顔ぶれ」を見たい場合や、タンパク質複合体のコンポーネントを網羅的に見たい場合などにご活用いただけます。目安として、一度の解析で、数100~3,000程度のタンパク質が同定できます。



タンパク質抽出・酵素消化

peptide

LC-MS/MS 分析



- ・同定タンパク質リスト
- ・GO 情報 (SwissProt をデータベースに使用した場合)
- ・サンプル間で共通したタンパク質の確認 (複数のサンプルを統合して解析を行った場合)

▶ 価格

検体数	価格 (税別)
~5 検体の場合	¥ 220,000 × 検体数
6 検体以上の場合	都度お見積り

▶ 推奨サンプル形態

組織、細胞、培養上清、抽出液等

- ※ 組織片の場合は数 mm角 程度、
- 培養細胞の場合は細胞数 10^6 程度を目安にご準備ください。
- ※ 溶液量は、数百 μ L 以内を目安にご提供下さい。

▶ 必要サンプル量

タンパク質 10 μ g 程度

- ※ 上記より少なくとも対応できる場合がありますので、ご相談ください。

▶ 納期

サンプルをお受け取りした日から、1.5ヶ月程度

- ※ サンプルを受け取るタイミングによっては、前後する場合があります。

▶ サービス内容

- サンプル前処理
 - └ 組織等からのタンパク質抽出・精製
 - └ サンプルQC (タンパク質定量・SDS-PAGE)
 - └ 酵素消化・精製

- LC-MS/MS分析

- データ解析

▶ 使用する機器

- 質量分析装置
 - └ Orbitrap Exploris 480 (Thermo Fisher Scientific)
- HPLC
 - └ Vanquish Neo UHPLC (Thermo Fisher Scientific)
- 解析ソフトウェア
 - └ Proteome Discoverer (Thermo Fisher Scientific)

Point

ショットガン解析でできること

- ▶ 一度の分析で数100~3000タンパク質を同定
- ▶ 組織・細胞・培養上清・IPサンプル、EVサンプルなどに適応可能。

→Q サンプル量がどうしても足りない…。規定量に満たなくても分析できる？

ショットガン解析に必要なタンパク質量としては、10ug 程度をお願いしております。実際に分析に供するタンパク質（ペプチド）の量としては、2ug 程度でよいのですが、通常、検体受け入れ時に電気泳動を実施し、その後、プロテオーム解析に適したバッファーに置換を実施、バッファー置換後に再度、電気泳動やタンパク質量を行って、と工程を経てから分析を行います。最適な分析を実施する目的で、このようなクオリティチェックを行っており、そのために、実際に最低限必要な量より多くご提供をお願いしているところです。

ただ、限られた量しかない検体の場合は、クオリティチェックを最低限にして（あるいは実施せずに）、お送り頂いた検体すべてを分析に供するような対応も可能ですので、ぜひご相談ください。

なお、分析に供する量が、標準として設定している量より少ない場合にどのような影響が考えられるか、という点についてもご質問を頂く事がございますが、特に、検出限界ぎりぎりの微量にしか含まれないタンパク質では、分析に供する量が減った事で同定されなくなる、などの影響はあると思われます。有用な情報を得て頂くためにも、出来る限りサンプル量を確保頂ければと思います。

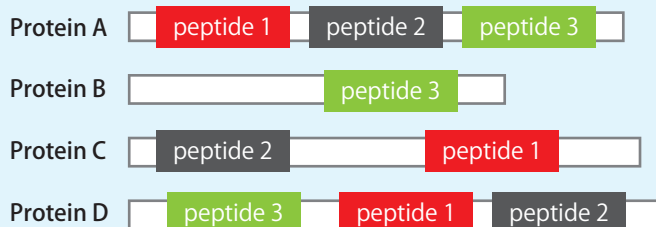
→Q アミノ酸置換が起こっていると想定される。考慮した検索は可能??

プロテオーム解析では、得られたデータと登録したデータベースを照合し、配列を決定いたします。そのため、基本的な考え方としては、データベースにないものは同定できません。もし、どのアミノ酸がどの変異を受けるか、という情報があれば、それらも含めてデータベース登録し、それらに対して検索を行う事で、得られたデータにその変異ペプチドが含まれるか照合する事はできます。

また、予測できないアミノ酸置換がある場合には、「Error tolerant 検索」という手法が使える場合もあります。Error tolerant 検索は、検索ソフト Mascot の機能のひとつで、同定されたタンパク質に対して、Mascot Server が持っている全ての修飾を使ってマッチングの判定を行います。これにより、例えば、『アミノ酸置換』『予期せぬ修飾』『予期せぬ非特異的なペプチド切断』など、データベースとサンプルの配列が一致しない場合に有効です。この手法を用いれば、予想外の変異があっても同定できる可能性もあります。ただし、同じペプチド上に複数の変異や修飾が重なって生じている場合、同定が難しくなる場合もございます。

→Q 相同性の高いタンパク質がある場合、きちんと同定できるのか？

質量分析によるタンパク質の同定とは、実際には一番もっともらしいペプチドの割り当て（アサイン）であり、その結果から推定したタンパク質を出力しています。そのため、ペプチドが同定基準を超えていても同定されたタンパク質が試料内に必ず存在するとは限りません。また、コンタミタンパク質由来のペプチド、例えば培養細胞をサンプルとした場合の培地成分、など他生物種のペプチドであっても相同配列がアサインされることによって実際には含まれていないタンパク質が同定される場合もあります。



Peptide 1 ~ 3 が同定された場合、Protein A、D が存在する可能性が最も高いですが、Protein B や C についてはあるともないとも言いきれません。Protein A とペプチドのヒットの仕方が同じである Protein D については区別がつけられません。

FFPE組織からのショットガン解析

臨床現場等で採取された FFPE 組織は、サンプルが良好な状態で保存されており、また、疾患の進行度などの臨床的情報が付随しています。これらのプロテオーム解析を行うことで、新しいバイオマーカーの発見につながる可能性があるとして、注目されています。アプロサイエンスでは、FFPE からのペプチド回収法を独自に確立しています。この方法により、ホルマリンによるクロスリンクを効率よく外し、ペプチドを高収率で回収します。また、FFPE サンプルでは、さまざまな修飾を受けている可能性があります。それらを考慮した解析を行う事で、貴重な検体から最大限の情報を引き出します。

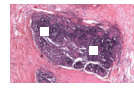
▶ 推奨サンプル形態／サンプル量

体積80 nL (例: 厚さ 10 μm, 2 mm x 4 mm) 以上のFFPE組織切片 (HE染色を推奨。その他の染色方法についてはご相談ください)

▶ 納期

サンプルをお受け取りした日から、1.5ヶ月程度

※ サンプルを受け取るタイミングによっては、前後する場合があります。



FFPE 組織切片
(HE 染色)

タンパク質抽出・酵素消化 & トリプシン消化

LC-MS/MS 分析

- 同定タンパク質リスト
- GO 情報
- サンプル間比較 (複数のサンプルの場合)

▶ 価格

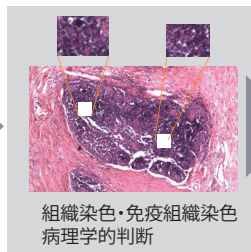
検体数	価格 (税別)
~5 検体の場合	¥ 220,000 × 検体数
6 検体以上の場合	都度お見積り

分析・解析オプションのご案内 ~ 目的部位によりフォーカスした解析のために

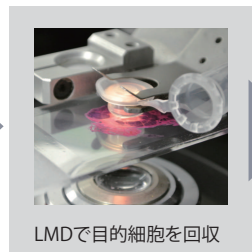
FFPE切片からプロテオーム解析をお考えになる場合、併せてぜひご検討いただきたいのが、レーザーマイクロダイセクションを用いて特定部位を切り出し、その部位のみのプロテオーム解析を実施する事です。レーザーマイクロダイセクション (LMD) は、目的の組織・領域を顕微鏡下で観察・確認しながら、レーザーで切り出して回収する手法です。摘出した臓器から、必要な領域のみを切り出して解析に使用することで、周辺領域に由来するバックグラウンドを低減し、特異性の高いデータを取得することが可能になります。



臓器の摘出・固定、
ブロック作製、切片作製



組織染色・免疫組織染色
病理学的判断



LMDで目的細胞を回収



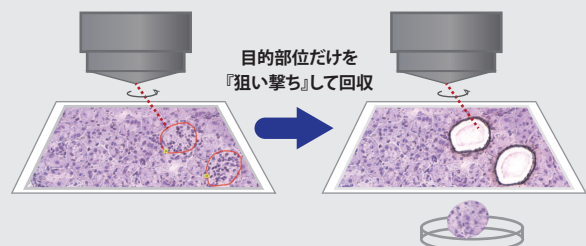
プロテオーム前処理

プロテオーム解析

■ レーザーマイクロダイセクション ¥ 148,000~

切り出したい領域を画像や図でご指定ください。弊社提携先の熟練の作業者が、薄切・染色したスライドを観察・画像取得し、ご希望の切り出し領域を確認いたします。

切り出し領域が確定しましたら、最適な切片の厚さやレーザー強度を検討し、本試験を実施いたします。切り出した断片をプロテオーム解析の前処理に最適な溶液に回収し、以降の操作を進めます。



目的部位だけを
『狙い撃ち』して回収

LC-MS/MSによるゲル内タンパク質同定

電気泳動で分離したタンパク質を同定する分析サービスです。SDS-PAGEゲル内のタンパク質をプロテアーゼ処理し、得られたペプチドを質量分析計で検出します。質量分析計により得られたペプチドの質量、およびフラグメントイオンのスペクトル(MS/MSデータ)をデータベース検索(Mascot サーチ)することによりタンパク質を同定します。

仕様

▶ 必要サンプル量

- ゲル片 (タンパク質 25 fmol 以上)
- ゲル片量の目安: 5,6 レーン以下(12ウェルのミニゲルの場合)
- 推奨染色法: CBB染色、銀染色(質量分析用)、蛍光染色

▶ 納期

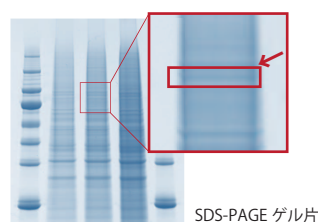
- サンプルをお受け取りした日から、3~4週間程度
- ※ サンプルを受け取るタイミングによっては、前後する場合があります。

▶ サービス内容

- サンプル前処理
 - ↳ 酵素消化・精製
- LC-MS/MS分析
- データ解析
 - ↳ 同定タンパク質リスト

▶ 価格

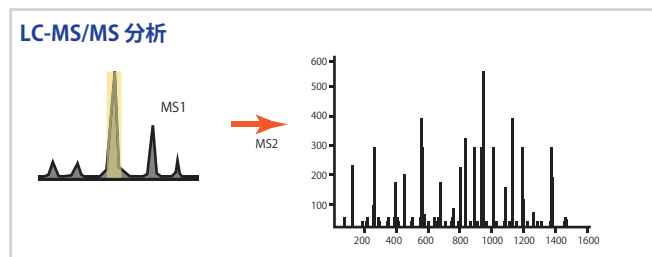
検体数	価格 (税別)
~5 検体の場合	¥ 110,000 × 検体数
6 検体以上の場合	都度お見積り



タンパク質抽出・酵素消化

peptide

LC-MS/MS 分析

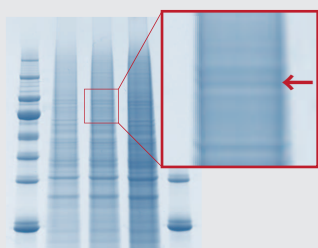


- ・ 同定タンパク質リスト
- ・ GO 情報
- ・ サンプル間比較 (複数のサンプルの場合)

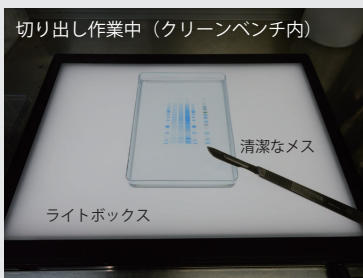
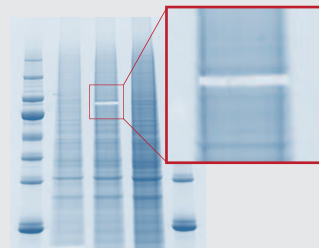
サンプル調製について

レーン幅 4mm 程度、切り出すバンドの高さ 1~2mm 程度とした場合に、ゲル片 5 個以内を目安にしてください。ただし、ゲルの量は少なければ少ないほど良好な結果が得られる可能性が高くなります。『余分なゲル』が酵素消化の効率を下げ、また、ゲル由来の夾雑物の影響により解析が難しくなるからです。余分なゲルが出来る限り含まれないように、切り出してください。どうしてもバンドが薄い場合、同じバンドを複数集める事でサンプル量の確保はできますが、可能であれば、サンプルを濃縮して電気泳動に供する等の工夫をし、酵素消化に供するゲルの量をできる限り少なくしてください。

切り出し前の SDS-PAGE ゲル



切り出し後の SDS-PAGE ゲル



ゲルの切り出し作業中の様子です。ライトボックスの上で作業すると、細いバンドまで視認しやすくなります。

プロテオーム解析のことならアプロサイエンスへご相談ください

多様な検体に 豊富なノウハウで対応。

- 組織や細胞 ホールライゼート
- 液性検体(血清・血漿、各種体液)
- FFPE組織
- 免疫沈降サンプル
- SDS-PAGE ゲル内タンパク質

最適な分析方法をご提案

- より定量的な分析方法
- TMTラベル試薬を用いた方法
 - ラベルフリー定量
 - タンパク質同定・セミ定量
- より定性的な分析方法

解析データの解釈をお手伝い

- Volcano plot や PCA plot の作成
 - クラスター解析
 - GO解析 等
- 取得されたデータを最大限活用するためのサポートをいたします。

この冊子に掲載している受託サービス項目は、言わば『代表的な仕様』です。目的やサンプルの状況、ご予算、スケジュール等をお伺いして最適な組合せでご提案いたします。

興味はあるけど・・・という方へ。

—□ 『プロテオーム解析個別オンラインセミナー』

プロテオーム解析にご興味をお持ちの方を対象にした『プロテオーム個別オンラインセミナー』を実施しています。実際に分析・解析を行う技術担当者から、個別対話型でご説明いたしますので、ご研究内容に必要な情報を効率よく収集して頂けます。ぜひご活用ください！

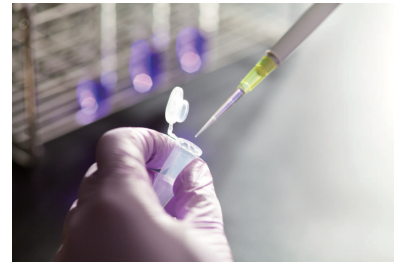
『自分の研究テーマにおいて、プロテオーム解析で何が分かるのか？』
『まだ具体的ではないけど、プロテオーム解析するなら、どんな準備を進めたらよいか知りたい』

私たちも、通り一遍の説明ではなく、個別対話型のセミナーならではのご要望に沿った内容で、濃い話をできるように準備いたしますので、ぜひお申込みください。



—□ 『無償トライアル試験』

こちらは、ご依頼を前提とした場合のご提案とはなりますが、分析を正式にご依頼いただく前の「無償トライアル試験」を承っております。これは、サンプルの一部をお預かりして SDS-PAGE 等を実施し、その結果を踏まえ、最適な分析仕様や必要なサンプルの量について、コメントさせていただくものです。特に初めてご依頼頂く場合などにはご活用いただければと思います。お気軽にご相談ください。



APRO
Science group

株式会社ファーマフーズ アプロサイエンスグループ

- Url: <https://apro-s.com/>
 - Tel: 088-678-6372
 - Mail: bio@apro-s.com
- 〒770-0865 徳島県徳島市南末広町4-53 エコービル4階
《本社》
〒615-8245 京都府京都市西京区御陵大原1-49

販売店