

トマト本葉から抽出したタンパク質のプロテオーム解析

分析の特徴

- SCIEX 5500 QTrap nanoLC-MS で分析したペプチドサンプルをご提供いただき、本システムで分析しシステム特化を比較した。
- 本システムの検出感度は、nanoLC-MSシステムの1/100以下であったが、TICのピークは良く分離されていた。
- nanoLC-MSを用いた解析に比べ、データベース検索でヒットした分子の数は半減した。

協力

名古屋大学生命農学研究科
分化情報制御研究分野
森仁志教授

参考文献

1. Nature Protocols (2006) 2: 769-774.
2. J Proteome Res (2009) 8: 3944-3950.

問い合わせ先

物質・分析技術支援室
担当職員 小川直也、河合ゆかり
Email: ms-support@agr.nagoya-u.ac.jp

概要

トマト本葉組織に含まれるタンパク質の構造・機能を包括的に理解するため、プロテオーム解析を行った。植物組織からタンパク質を抽出、有機溶媒で分画、酵素消化することでペプチド試料を調製し¹、Orbitrap Exploris 240 LC-MSシステムで分析を行った。得られたMS、MS/MSデータをSCIEXのタンパク質検索ソフトProtein Pilotで解析し、同試料をSCIEX 5500 QTrap nanoLC-MSシステムで分析した結果を比較した。

タンパク質の分子数は低分子化学物に比べ微量であるため、プロテオーム解析にはnanoLC-MSを用いた高感度分析法が用いられるのが一般的である² (図1)。しかし、本システムは分析用LCを装備、タンパク質を同定する解析ソフトを搭載していない。このため、SCIEX 5500 QTrapの管理者である森先生のご厚意により、SCIEX Protein Pilotで本テスト分析の取得データを解析させて頂いた。

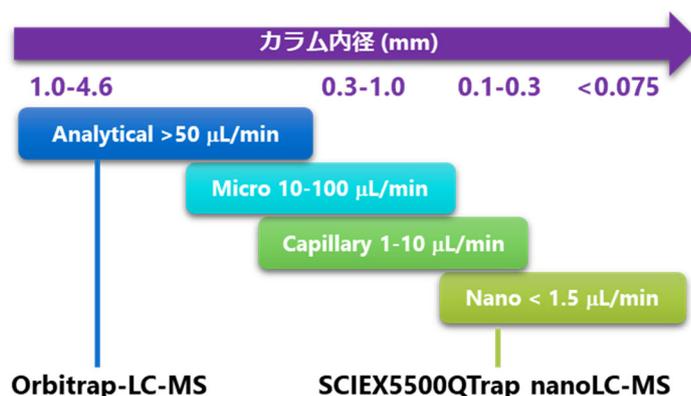


図1. LCの種類・流量と一般的なカラム内径
https://www.thermofisher.com/blog/learning-at-the-bench/low_flow_rate_lc/

トマト本葉から抽出したタンパク質のプロテオーム解析

試料調製

- トマト本葉
- | TEAB*, 1% SDSで抽出
- | メタノール / クロロホルムで二相分配
- | メタノール沈殿
- | 8 M Ureaで溶解
- | 還元アルキル化処理
- | トリプシン消化
- | C₁₈逆相スピカラムを用い精製
- | 乾燥、0.1% ギ酸 で再溶解
- | 4°C保存
- | 1回の測定につき試料 1/2 希釈液 4 μL使用

*TEAB: triethylammoniumbicarbonate)

LC分析

- Vanquish #27101-102130 C₁₈カラム
(粒径1.5 μm, 2.1 mm x 100 mm)
- カラムオープン : 50°C
- 流速 : 400 μL / min
- 移動相 A :
水 / 0.1% ギ酸 / 2% アセトニトリル
- 移動相 B :
アセトニトリル / 0.1% ギ酸
- 濃度勾配 0 → 35% B × 30 min
35 → 90% B × 15 min

MS条件

- イオン化法 : ESI 法
- 測定モード : ポジティブ
- スプレー電圧 : 3500 V
- 脱溶媒温度 350°C
- MSフルスキャン分解能 60,000
- フルスキャン範囲 400 - 1000 m/z
- MS/MS分解能 15,000

結果

Orbitrap LC-MSによって得られたTICでは、シグナル強度がnanoLC-MS(B)の1/100以下であったが、ベースラインは低く、ピークが良く分離された(A)。MS、MS/MS測定タンパク質データベースを検索したところ、446種の分子が同定された。この分子数は、同じ試料をnanoLC-MSで分析したデータで同定された分子数906のおよそ半数449であったが、Confidence値>99%の分子が282（全体449の63%）を占めていた。

TIC

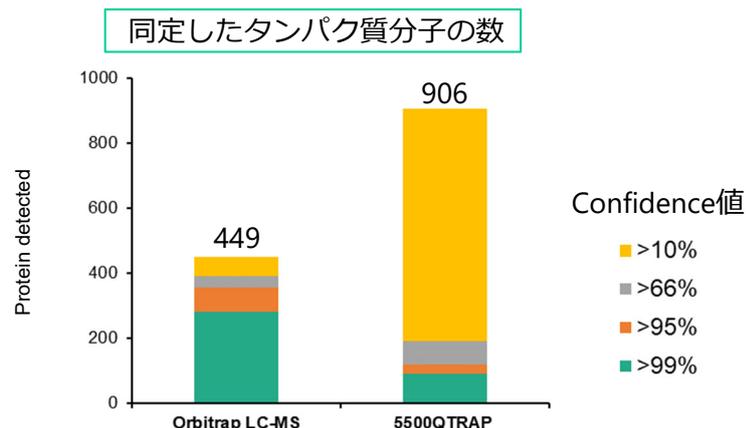
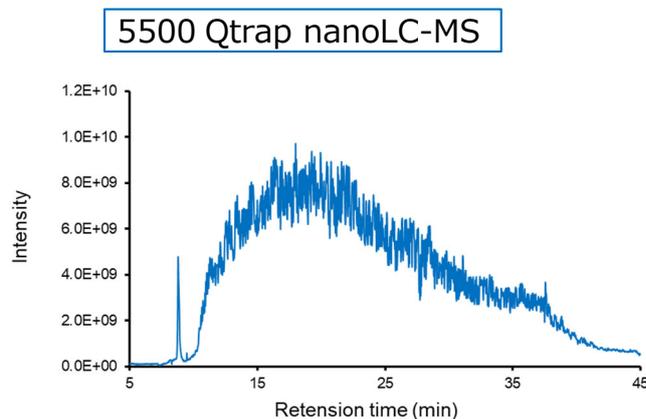
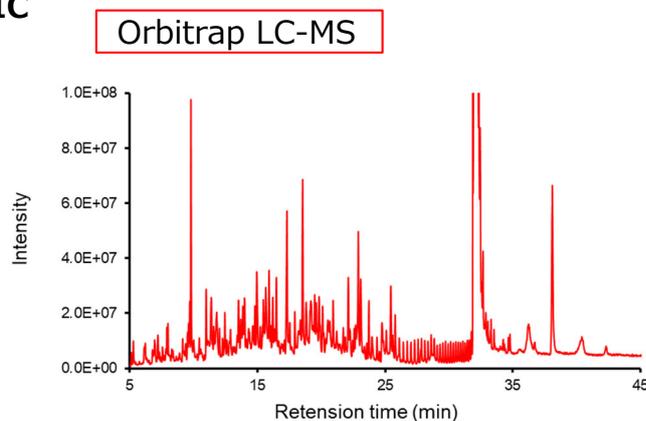


図2. 二つのシステムで同じペプチド試料を分析した結果