

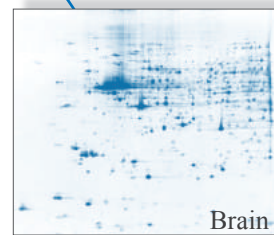


いであ株式会社

タンパク質

Guide for Protein Analysis Services

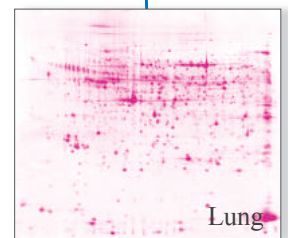
受託解析カタログ



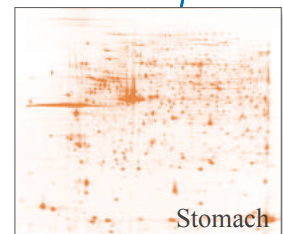
Brain



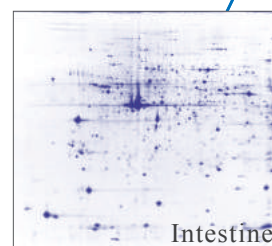
Heart



Lung



Stomach



Intestine

食品・生命科学研究所

プロフェニックス事業部

〒559-8519

大阪市住之江区南港北1-24-22

TEL: 06-7659-2803

e-mail: proteome@ideacon.co.jp

目次

1. Outline

- 1-1 プロテオーム解析サービス概要 ————— 01

2. 2-D Electrophoresis

- 2-1 二次元電気泳動のご依頼について ————— 02
2-2 二次元電気泳動用サンプル調製法 ————— 03
2-3 二次元電気泳動 Q&A ————— 05

3. MS Analysis

- 3-1 タンパク質同定のご依頼について ————— 06
3-2 質量分析計によるタンパク質同定のプロセス ————— 07
3-3 タンパク質同定 Q&A ————— 08

4. Focused Proteome

- 4-1 タンパク質相互作用（インタラクトーム）解析 ——— 09
4-2 DNA結合タンパク質の網羅的解析サービス ——— 10
4-3 血清タンパク質の解析サービス ————— 11
4-4 リン酸化タンパク質の網羅的解析 ————— 12
4-5 リン酸化サイト同定解析 ————— 13

5. Another Analysis

- 5-1 ウェスタンブロット解析 ————— 14
5-2 食品に含まれている食肉の生物種判定サービス ——— 15
5-3 ペプチドプロファイリング(ClinProt™) ————— 16

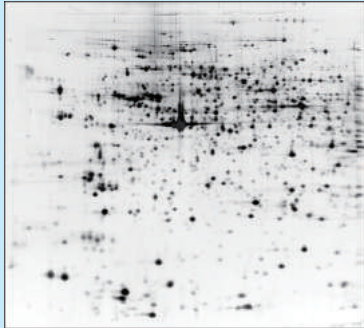
- 業績 ————— 17

1. Outline



プロテオーム解析サービス概要

二次元電気泳動解析サービス

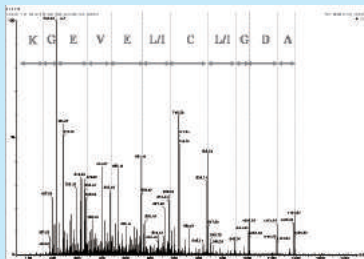


お客様からタンパク質溶液を送付していただき、当社にて等電点電気泳動(一次元)からSDS-PAGE(二次元)を行い、複数サンプル間の比較解析を実施いたします。

18X20 cmもしくは24X20 cmのゲルを使用しますので、数千種類のタンパク質を分離することが可能です。

泳動像のスポットパターンを比較することで、ある生命現象に対応して特異的に変化するタンパク質を発見できます。

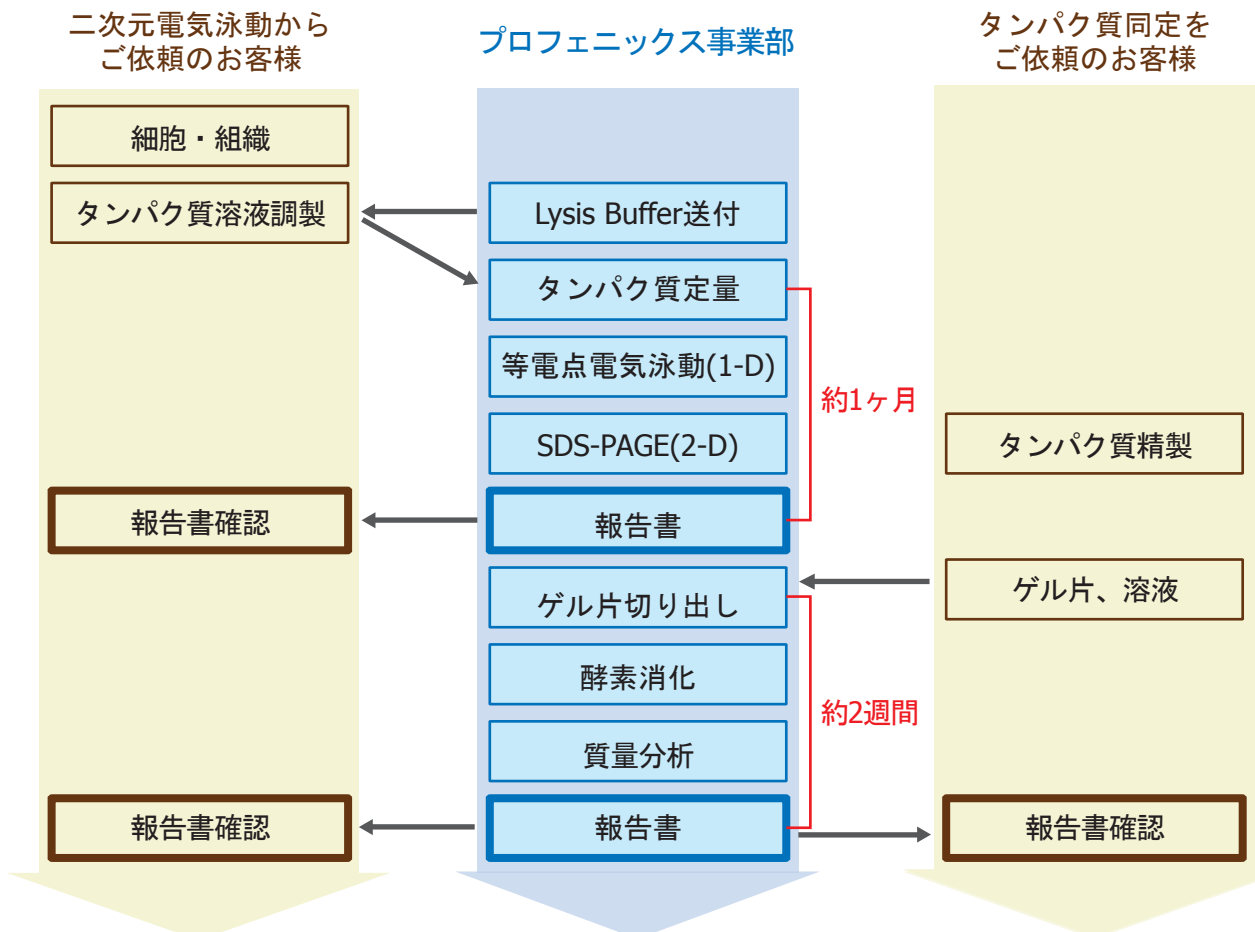
タンパク質同定サービス



MALDI-MS/MSタイプの質量分析計を使用することで、エドマン法より高感度に解析することが可能です。

ゲルから切り出したバンドやスポットをお送りいただき、当社でのゲル内消化、ペプチド抽出を経て、質量分析による高精度のタンパク質同定解析(MASCOTによる同定、内部配列解析)を行います。

解析サービスの流れ



2. 2-D Electrophoresis

2-1

二次元電気泳動のご依頼について

タンパク質の抽出 ※分解のリスクを避けるため、お客様側での調製をおすすめします

当社よりタンパク質抽出用の溶解溶液と抽出プロトコルをお送りしますので、サンプルの調製にご利用ください。当社にタンパク質抽出をお任せ頂く場合は、作業内容に応じて料金が設定されておりますのでお問い合わせ頂けますようお願いいたします。

総タンパク質： 1 mg以上を推奨
サンプル濃度： 1~5 mg/mL
塩濃度： 10 mM以下※

※感染性が疑われるサンプルの受け入れは、ウイルスチェックを行って頂いた後になります。詳しくはお問合せください。

※イオン濃度が高いとスポットのフォーカスが悪くなります。サンプル溶液の塩濃度は、10 mM以下(NaCl換算)でご調製ください。

二次元電気泳動の仕様

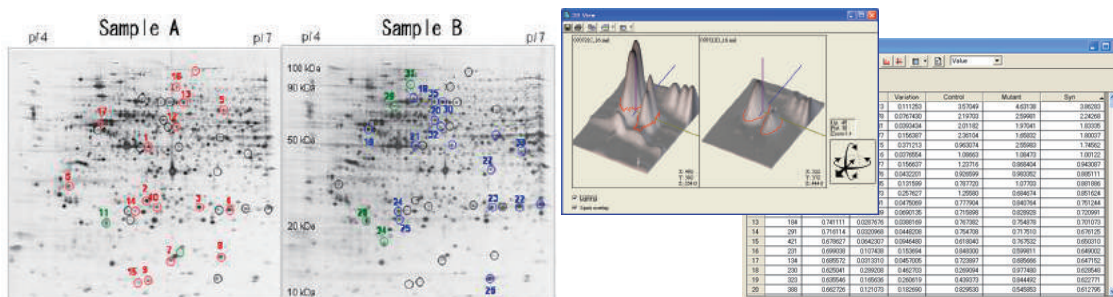
お預かりしたサンプルは、最初にタンパク質量と電気伝導度測定を行います。タンパク質量が泳動の必要量に満たない場合はご連絡いたします。また、電気伝導度が高く、泳動を阻害する塩の混入が疑われる場合は、限外ろ過または有機溶媒沈殿による脱塩濃縮をご提案させていただきます。

ゲルサイズ： 18×20 cm(標準), 24×20 cm(大型), 9×8 cm(ミニゲル)
等電点領域： 4-7, 3-10, 6-9, 6-11 ほか
分子量の分離レンジ： 10-200 kDaまで
アプライ量： 100-200 μg (18×20 cmゲルの場合)
染色： SYPRO Ruby, Pro-Q Diamond, 銀, CBB など

※等電点領域は、分離能と展開幅のバランスが良いpI 4-7と、広い領域をカバーするpI 3-10をおすすめしております。

二次元電気泳動像の比較解析と報告書の返却

取得した二次元電気泳動像の比較解析を行います。大型ゲルによる高分解能の二次元電気泳動像を解析する場合、サンプル間のスポットの比較を目視で行うには限界があります。膨大なスポット情報から有用な情報を引き出すため、画像解析ソフトウェアによる定量解析を行います。刺激の有無や経時変化に対応したスポットの出現・消失・増加・減少の情報を高い精度で得ることで、信頼性の高い解析結果をご提供いたします。報告書は、閾値を超える濃度変化が起こったスポットに印を付けた分かりやすい体裁で納品いたします。報告書末尾には濃度差が大きいスポットを順に並べた同定候補リストを記載し、お客様とのディスカッションののちに質量分析のステージに進みます。



接着性培養細胞

1. 装置と器具

セルスクレイパー

2. 試薬

◆ タンパク質溶解溶液 (Lysis Buffer)

- ・ 6 M 尿素
- ・ 2 M チオ尿素
- ・ 2% CHAPS
- ・ 1% Triton X-100
- ・ 1% DTT

*分注して冷凍保存(短期では-20℃、長期では-80℃)

◆ PBS(-)

※ヒト皮膚由来のケラチンの混入を防ぐため、実験操作の際には清浄な手袋をご着用ください。

3. 方法 (直径10 cmシャーレの場合)

1. 培養細胞の培地をアスピレーションで除き、PBS(-)10 mLをすばやく入れます。通常は氷冷PBS(-)が推奨されますが、温度は実験の目的にあわせてご検討ください。PBS(-)を入れるときは、細胞がはがれないように注意しながらシャーレの側面から入れてください。はがれやすい細胞の場合にはPBS(+))のご利用をご検討ください。
2. 手で軽くゆらしながら、まんべんなく細胞表面を洗い、PBS(-)を捨ててください。この操作を3~5回繰り返します。残ったPBS(-)はシャーレを傾け、アスピレーターもしくはピペットを使って完全に除去します。PBS(-)は塩を含むので、なるべく残らないように気をつけてください。
3. シャーレ1枚につきタンパク質溶解溶液0.5 mL加え、セルスクレイパーでかき混ぜて細胞を溶解します。
4. 複数枚のシャーレを調製する場合は、まず枚数分のタンパク質溶解溶液を最初のシャーレに加えます。2枚目のシャーレの細胞を洗浄後、最初のシャーレに加えたタンパク質溶解溶液を2枚目に移していきます。
5. チューブに回収後、遠心して不溶物を除去します(遠心20,000 x g、30分、20℃)。
6. 遠心後の上清をサンプルとし、ペレットを加えないように注意して新しいチューブに移します。冷凍保存(短期では-20℃、長期保存では-80℃)のうえ、冷凍の宅配便で当社へご送付ください。

※目安として、10⁶個のヒト真皮由来正常繊維芽細胞から、約0.5 mgのタンパク質が得られます。

参考文献
Rabilloud, T., Electrophoresis, 18, 307 (1997)

動物組織

1. 試薬

- ◆ タンパク質溶解溶液 (Lysis Buffer)
左項参照

※ヒト皮膚由来のケラチンの混入を防ぐため、実験操作の際には清浄な手袋をご着用ください。

2. 操作

1. 麻酔した動物から目的の臓器あるいは組織を採取します。
2. 必要であれば切除した臓器あるいは組織を氷冷PBS(-)で脱血します。タンパク質の分解を防ぐため手早く行うように注意してください。
3. 組織をはさみで切り刻み、PBS(-)で洗浄します。
4. 組織の重さ(A g)の5倍量のタンパク質溶解溶液 (5 x A mL)を加え、ホモジナイズします(当社ではポリトロンを使用)。ガラスホモジナイザーを使った場合には、組織の残渣が見られる場合があるので、残渣が見られた場合にはソニケーターで可溶化させます。
5. 可溶化後、20,000 x g、20℃で30分間遠心し、上清を取って電気泳動のサンプルとします。溶解液は高濃度の尿素/チオ尿素を含むため、4℃で遠心操作を行うと析出しますのでご注意ください。冷凍保存(短期では-20℃、長期保存では-80℃)のうえ、冷凍の宅配便で当社へご送付ください。

※組織によって異なりますが、動物由来の組織では概算で湿重量の約2-8%がタンパク質となります。

参考文献

1. 「図説 動物実験の手技手法」、緒方 規矩雄 監、1981 (共立出版、ISBN 4-320-05255-2)
2. Rabilloud, T., Electrophoresis, 18, 307 (1997)

液体培養細菌

細菌の種類や培地によって最適な抽出方法は異なります。一例をご紹介します。

1. 試薬

◆ タンパク質溶解溶液 (Lysis buffer) 前頁参照

◆ 10 mMリン酸バッファー (pH 7.4)

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.77 g
- NaH_2PO_4 0.27 g
- →MilliQ水で1,000 mLとする

※ヒト皮膚由来ケラチンの混入を防ぐため、実験操作の際には清浄な手袋をご着用ください。

2. 方法

1. 培養液を8,000 rpm、10 min、4°Cで遠心分離を行い、菌体をペレットにします^{※1,2}。
2. 上清を完全に除いた後、培養液の半量の10 mMリン酸バッファー (pH 7.4) を加えて菌体を再懸濁し、再び遠心分離でペレットにします。この操作を3回繰り返して洗浄を行います^{※3}。
3. 上清を完全に除き、タンパク質溶解溶液 1 mLを加え、ピペティングまたはボルテックスで完全に懸濁して溶液を均一化させます。溶解液を20,000 x g、30 min、20°Cで遠心分離し、不溶性物質を沈殿させます^{※4}。
4. 上清を回収して新しいチューブに移します。冷凍保存（短期では-20°C、長期保存では-80°C）のうえ、冷凍の宅配便で当社へご送付ください。

※1 集菌条件は、実験の目的にあわせてご検討ください。

※2 培養液量は下記資料(3.菌体数とサンプル量について)を参考にしてください。

※3 洗浄用バッファーの組成や温度は実験の目的にあわせてご検討ください。

※4 冷却すると尿素等が析出しますので、室温で遠心してください。

3. 菌体数とサンプル量について

二次元電気泳動に最低限必要な量は約100 μg ですが、タンパク質定量やタンパク質同定分析、複数回の二次元電気泳動分析に備えるため、1 mg以上のタンパク質をご用意ください。

【1 mgのタンパク質の調製に必要な菌体数（大腸菌の場合）】

大腸菌細胞1個の体積： 1×10^{-15} Liter,

細胞内タンパク質濃度：200~320 mg/mL

$1 \text{ mg protein} = 3.1 \times 10^9 \sim 5.0 \times 10^9 \text{ Cells}$ ^{※5}

※5 カナダ アルバータ大学 Project Cyber Cell, E. coli Statisticsより
http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca/CCDB/cgi-bin/STAT_NEW.cgi

植物組織／植物細胞

植物の種類や組織によって最適な抽出方法は異なります。一例をご紹介します。

1. 試薬

◆ タンパク質溶解溶液 (Lysis buffer) 前頁参照

◆ 抽出Buffer

- 0.5 M Tris-HCl Stock 5.0 mL (50 mM)
- EDTA 18.6 mg (1 mM)
- 100 mM PMSF Stock 0.5 mL (1 mM)
- DTT 7.7 mg (1 mM)

→MilliQ 水で50 mLとする

◆ 0.5 M Tris-HCl Stock

- Tris base 3.03 g
- →HClでpH 7.5に調製
- →MilliQ水で50 mLとする

◆ 100 mM PMSF Stock

- PMSF 0.17 g

→メタノール 10 mLに溶解する

※ヒト皮膚由来のケラチンの混入を防ぐため、実験操作の際には清浄な手袋をご着用ください。

2. 操作

1. 液体窒素を入れた乳鉢に試料組織(1~2 g)を入れ、凍結状態で粉状になるまで破碎します。この際、3% (w/v)になるようにPVP (Polyvinylpyrrolidone)を加えます。
2. 試料が溶け始める前に、氷冷した抽出Buffer(試料重量に対し10倍量)を添加してよく混和します。
3. 液状になったところでマイクロチューブ等に移し、20,000 x g、30 min、4°Cで遠心分離後、上清を回収します。
4. 得られた上清を0.45 μm フィルターもしくはミラクロスに通してろ過し、混入した残渣等を完全に除去します。
5. 上清を少量取ってタンパク質定量を行います。
6. 泳動量ごとにチューブに分注し、等量の20% (v/v) TCAを加えて混和後、氷上で30分間静置します。
7. 20,000 x g、30 min、4°Cで遠心分離後、上清を除去します。
8. 得られた沈殿に冷アセトン1 mLを加え、軽くボルテックスした後20,000 x g、15 min、4°Cにて遠心します。この操作をもう一度繰り返します。
9. アセトンを除去した後、タンパク質溶解溶液適量に溶解します。
10. 冷凍保存(短期では-20°C、長期保存では-80°C)のうえ、冷凍の宅配便にて当社へご送付ください。

二次元電気泳動解析に関して、お客様から多く寄せられたご質問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？

二次元電気泳動の比較解析には、最低100 μ gのタンパク質が必要です。再現性の確認や、同定分析用のゲルを別に用意する場合に備えて、1 mg以上のサンプルをご用意ください。

2. サンプルの調製はどのようにするのですか？

当社からご送付するLysis bufferを用いてサンプルをご調製ください。培養細胞、組織、微生物からの抽出プロトコルをご用意しております。特殊なサンプルの場合はご相談ください。

3. サンプルの送付方法について教えてください。

冷凍の宅配便で平日18時までに弊社プロフェニックス事業部へ到着するようにお送りください。ドライアイスをご利用いただくことをおすすめいたします。分析依頼書をお送りしますので、サンプルに同封するかFAX、e-mail添付でご返送ください。

〒559-8519

大阪市住之江区南港北1-24-22

いであ株式会社 食品生命科学研究所

プロフェニックス事業部

電話:06-4703-2865 FAX:06-4703-2856

e-mail:proteome@ideacon.co.jp

4. サンプルの濃度はどのくらいが適当ですか？

サンプルのタンパク質濃度は1 mg/mL以上になるように調製してください。濃度が0.3 mg/mL 以下ですとサンプルを濃縮する必要があります。

5. どのpIレンジで泳動を行うべきでしょうか？

注目するpIレンジがない場合は、pI 4-7 かpI 3-10 をおすすめしております。pI 4-7 は泳動像の展開幅と再現性のバランスが良いレンジです。pI 3-10 はpI 4-7 に比べ分離能がやや劣りますが、酸性から塩基性まで幅広いスポット情報を得ることができます。

6. 二次元電気泳動像の定量的分析とは？

二次元電気泳動解析ソフトウェアによって電気泳動イメージからスポットを検出し、各スポット強度を数値化します。複数の泳動ゲルイメージを重ね合わせて各スポットのマッチングを行います。各スポット強度を表やグラフによって出力することができます。例えば、2倍以上の強度差を持つスポットなど、研究者の希望にそったスポット選出が可能です。

7. サンプルや泳動したゲルは保管できますか？

残ったサンプル溶液は -80°Cで保存します。銀染色やCBB染色後のゲルは乾燥させて、SYPRO Ruby染色のゲルはシールバックで保存します。保存期間は、泳動日より3ヶ月です。

8. 染色方法について教えてください。

二次元電気泳動の比較解析には、高感度かつダイナミックレンジが広く定量性が高いSYPRO Ruby染色で行います。タンパク質同定が目的の場合は、銀染色やCBB染色を行います。

9. リン酸化タンパク質の二次元電気泳動分析とは？

リン酸化タンパク質に結合する蛍光色素による染色(Pro-Q Diamond染色)を行います。リン酸基に対して色素が結合するため定量性はありませんが、定量性の高いSYPRO Rubyで二重染色することでサンプル間のリン酸化の程度を解析します。

10. 転写因子などの微量タンパク質は検出できますか？

SYPRO Ruby染色の検出限界は1 ng程度です。60 kDaのタンパク質を例にしますと、1 ngは 1.0×10^{10} 個のタンパク質分子に相当します。微量タンパク質が1細胞に 10^3 分子存在する場合は、 10^7 個の細胞(約5 mg protein)を分析する必要があります。この場合、1枚のゲルに泳動するのは難しいので、目的のタンパク質だけを部分精製するなどの処理が必要になります。

11. 異なる位置のスポットが同じタンパク質と同定されましたが、なぜですか？

リン酸化や糖鎖付加などの翻訳後修飾や、配列が異なるアイソフォームなど、同じタンパク質でも等電点と分子量が異なるvariantsが存在します。等電点方向に並んでいるスポットはリン酸化の修飾などが、斜めに並んでいるスポットは糖鎖付加が考えられます。大きく異なる位置に分解産物のスポットが観察されることもあります。

12. スポット濃度に変化があったタンパク質の遺伝子発現を調べると、遺伝子の転写量に変化がないのですが、なぜでしょうか？

二次元電気泳動におけるスポットの変化は、タンパク質の存在量の変化だけを示すものではありません。リン酸化などの翻訳後修飾や部分的切断によってタンパク質の等電点と分子量が変化し、結果的にスポットの座標や濃度の変化として観察されます。二次元電気泳動分析では、遺伝子解析では得られない情報にも着目されることをおすすめいたします。

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

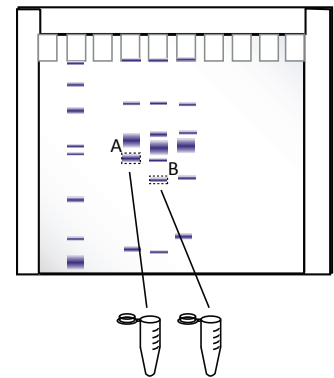
銀染色の場合、**グルタルアルデヒド(架橋性固定剤)を含まない**処方での固定・染色してください。質量分析に阻害的ではないキットには、ATTO EzStain Silver(AE-1360)、コスモ・バイオ 2D-銀染色試薬・Ⅱ(423413)、和光 Negative Gel Stain MS Kit (293-57701)などがあります。CBB染色の場合、脱色が難しいほど染まっているスポットは同定成功率が低下します。長時間の染色はお避けください。

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NCBIInr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

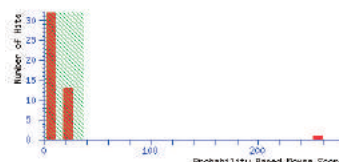
弊社の質量分析関連機器はクローズドLANで運営されています。NCBIInr等の配列情報は一度クローズドLAN内にデータをダウンロードして検索を行いますので、お客様の解析データが外部に漏れる心配はございません。

Mascot Search Results

User : RatLiverTest-100kDa50p1
Email : Test
Search title :
MS data file : DATA.TXT
Database : NCBIInr 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 lists.

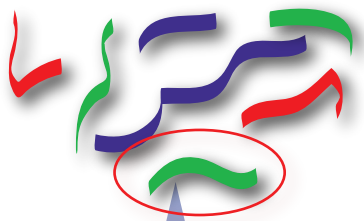


タンパク質全体



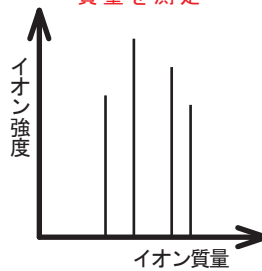
酵素消化

酵素消化ペプチド



PMF
(Peptide Mass Fingerprinting)

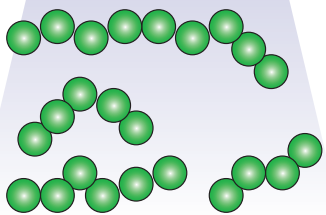
トリプシン消化ペプチドの質量を測定



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。

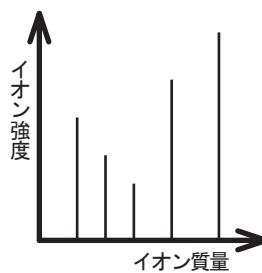
ペプチドの単離と分解

ペプチド分解物



MS/MS Ion Search

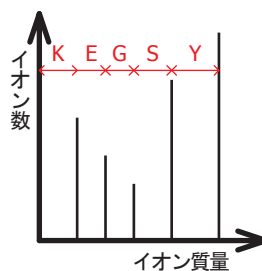
ペプチド分解物の質量を測定



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



de novo シーケンス

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。

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時までに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。NCBIInr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？

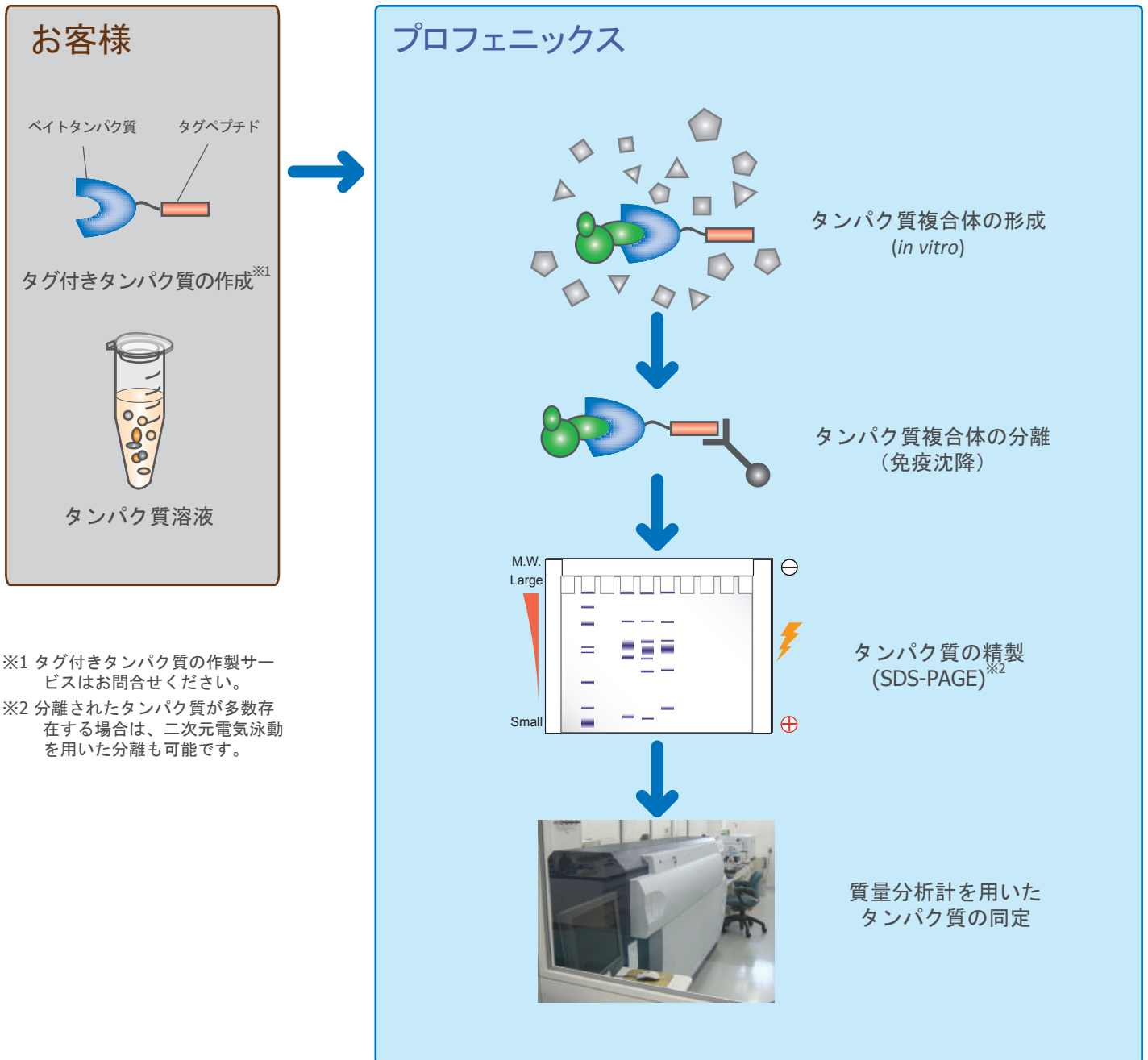
複数のタンパク質が含まれていても、各タンパク質の消化ペプチドのピークが観察されれば、それぞれ同定が可能です。しかし、複数のタンパク質のうち、どれが相対的に高濃度であったかは決定できません。

4. Focused Proteome

4-1

タンパク質相互作用(インタラクトーム)解析

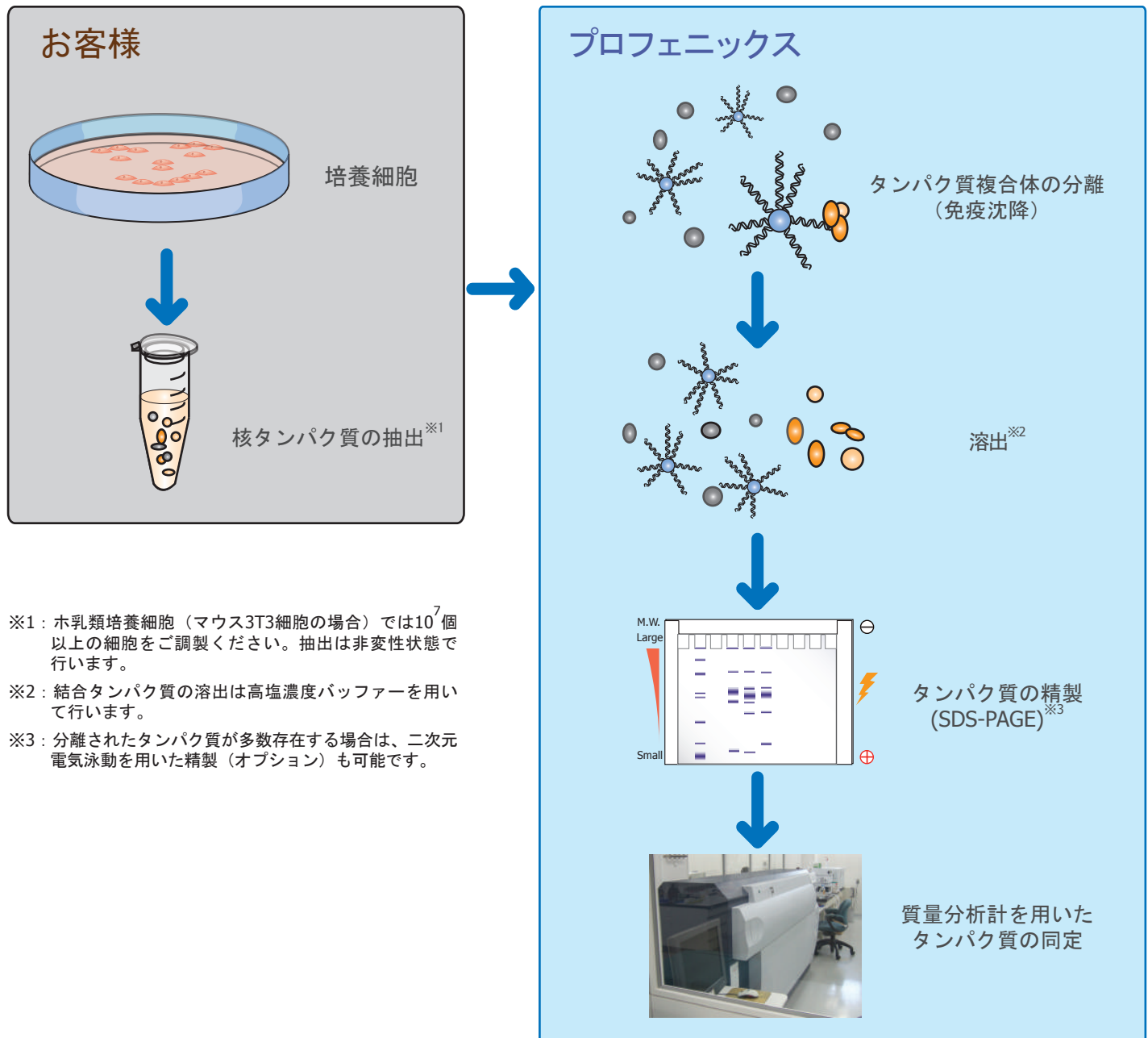
Pull-down法は特定のタンパク質に対して相互作用するタンパク質(interactome)を探索する技術として有効な解析手法のひとつです。タグペプチドを結合させたベイトタンパク質と相互作用するタンパク質を免疫沈降で分離し、得られたタンパク質を質量分析計を用いて同定します。



特徴

- タグ付きタンパク質の作製から質量分析による同定までトータルで実験をサポートします。
- 核内転写因子複合体などの解析にも最適です。
- 目的に応じてタンパク質の発現系 (in vitro・大腸菌・真核細胞・カイコなど) を選択できます。
- 部分的なコース解析も選択可能です。

DNA結合タンパク質の多くは、遺伝子の発現調節やクロマチンの高次構造形成に関与しており、細胞の機能や生理現象を研究する上で非常に重要な分子だと考えられています。このサービスでは細胞から核タンパク質を非変性条件で抽出し、DNAに親和性のあるタンパク質をDNA結合ビーズを用いて分離します。分離されたDNA結合タンパク質は、高感度の質量分析計を用いて同定します。



特徴


- 核タンパク質の抽出から質量分析によるタンパク質の同定までトータルで実験をサポートします。
- 細胞内タンパク質の分画とDNA親和性に基づく濃縮の両方を行うため、低発現量タンパク質の解析にもご利用できます。
- それぞれのステップごとの解析も承ります。
- 標準プロトコルでは、ビーズに結合させるDNAにはウシ胸腺DNAを使用しますが、その他の特異的配列を有するDNAも対応可能です。詳細はお問い合わせください。

4-3

血清タンパク質の解析サービス

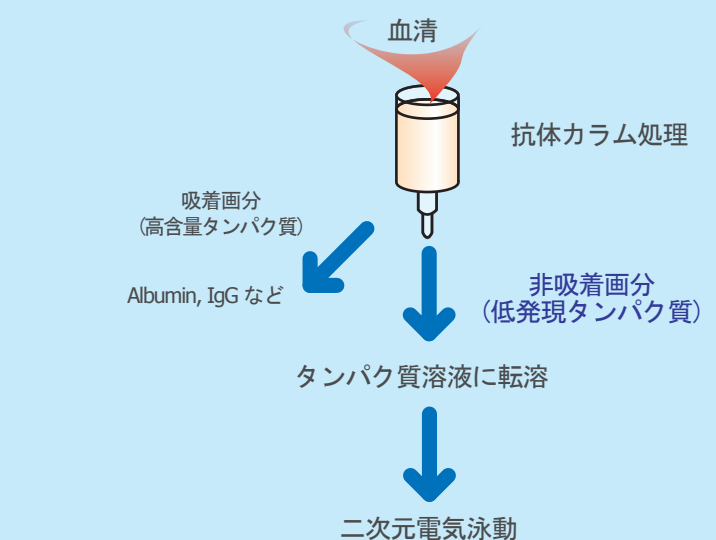
疾病の指標となるバイオマーカーは、創薬プロセスで重要な役割を果たします。血清にはタンパク質バイオマーカーが必ず含まれ、採取の際の侵襲性が低いことから研究・診断の対象となっています。しかし、アルブミンをはじめとする含量が極めて高いタンパク質の存在が分析の障害になってきました。このサービスでは、抗体カラムを用いて血清中の高含量タンパク質を取り除き、バイオマーカーとなる低発現タンパク質を解析します。処理後のサンプルは、高い分解能を持つ大型二次元電気泳動でプロファイルされ、微量のバイオマーカーの検出を可能にします。

お客様



採血と血清処理

プロフェニクス



泳動条件

サンプル： 左 ヒト血清 (除去前)
右 ヒト血清 (除去後)

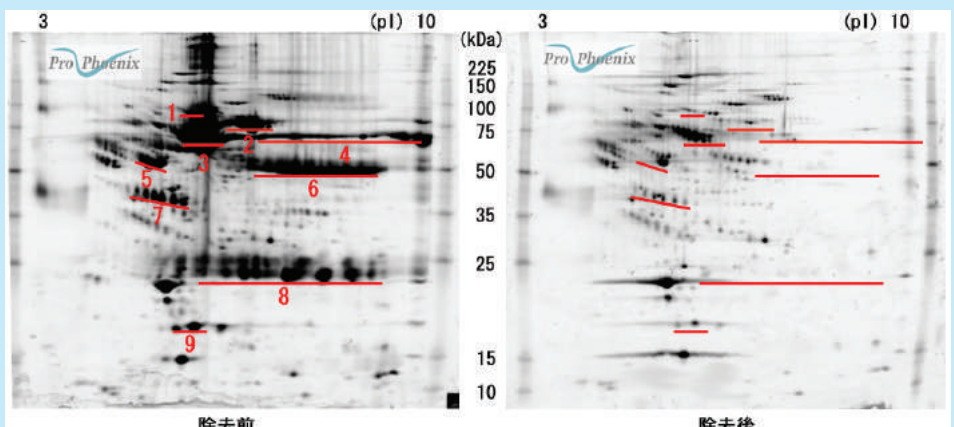
サンプル量： 10 μ L (0.816 mg)

一次元： pI 3-10, 18cm IPG strip gel

二次元： 18 cmアクリルアミド濃度勾配ゲル

染色： SYPRO Ruby染色

解析例



除去前

除去後

※ヒト由来サンプルの場合にはサンプルの安全性に関する情報提供をお願いします。

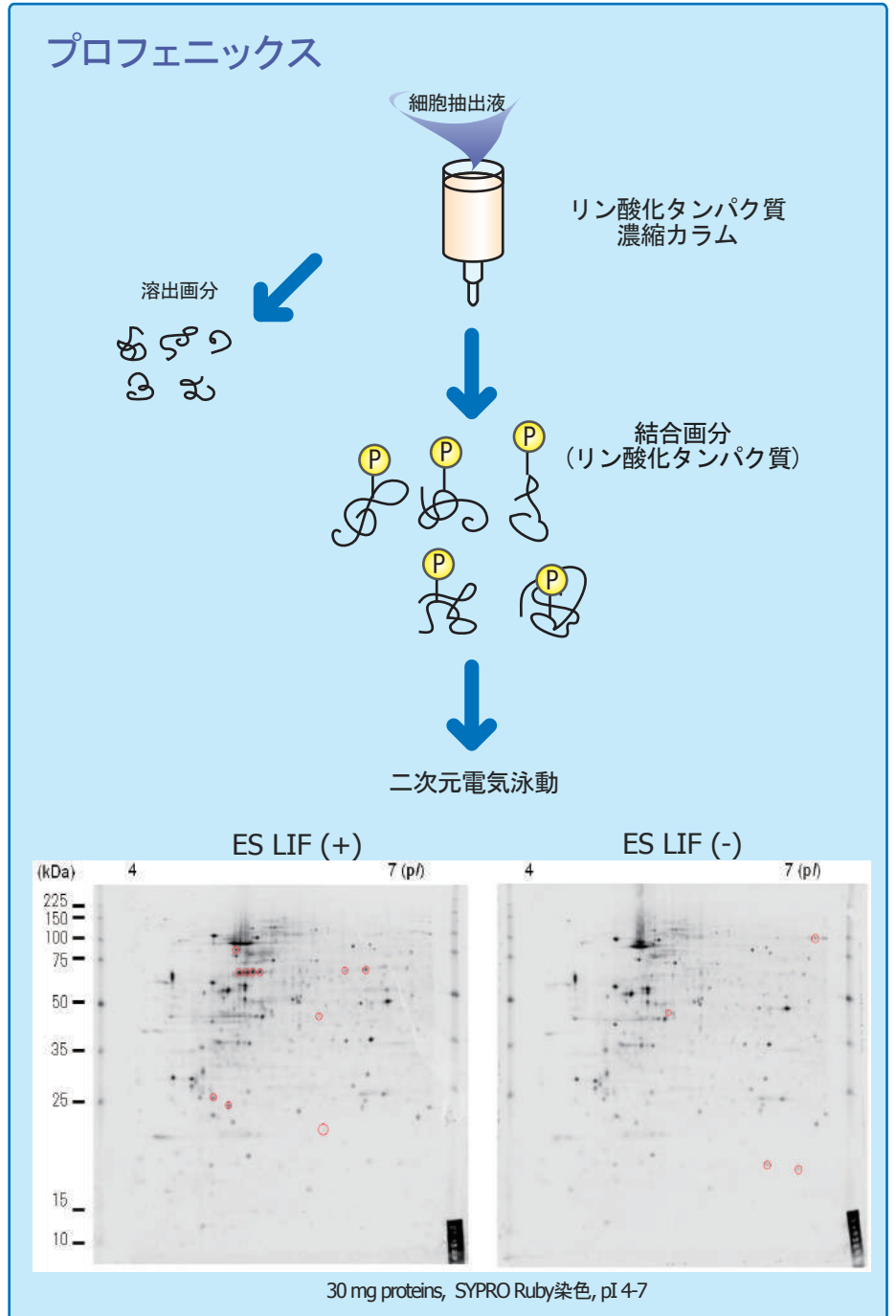
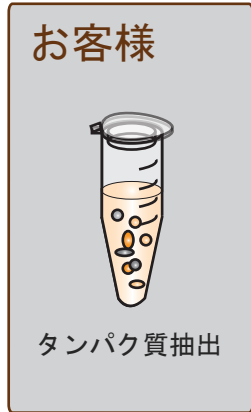
特徴

- 抗体カラム処理を行うことにより、アルブミン、トランスフェリン、IgG、IgA、ハプトグロビン、アンチトリプシンなどの高含量タンパク質を血清サンプルから取り除きます。
- 処理後の血清サンプルはご指定の条件で二次元電気泳動分析いたします。
- 血清タンパク質の90%が取り除かれ、血清中の微量タンパク質を約10倍濃縮する効果が得られます。
- 血清以外にも関節液、脳脊髄液などの組織液への適用が可能です。
- 対応生物種は、ヒトおよびマウス・ラットとなります。他の生物種につきましてはご相談ください。

4-4

リン酸化タンパク質の網羅的解析

リン酸化タンパク質を精製濃縮することで、細胞中に微量に発現したリン酸化タンパク質を網羅的に解析します。



解析例

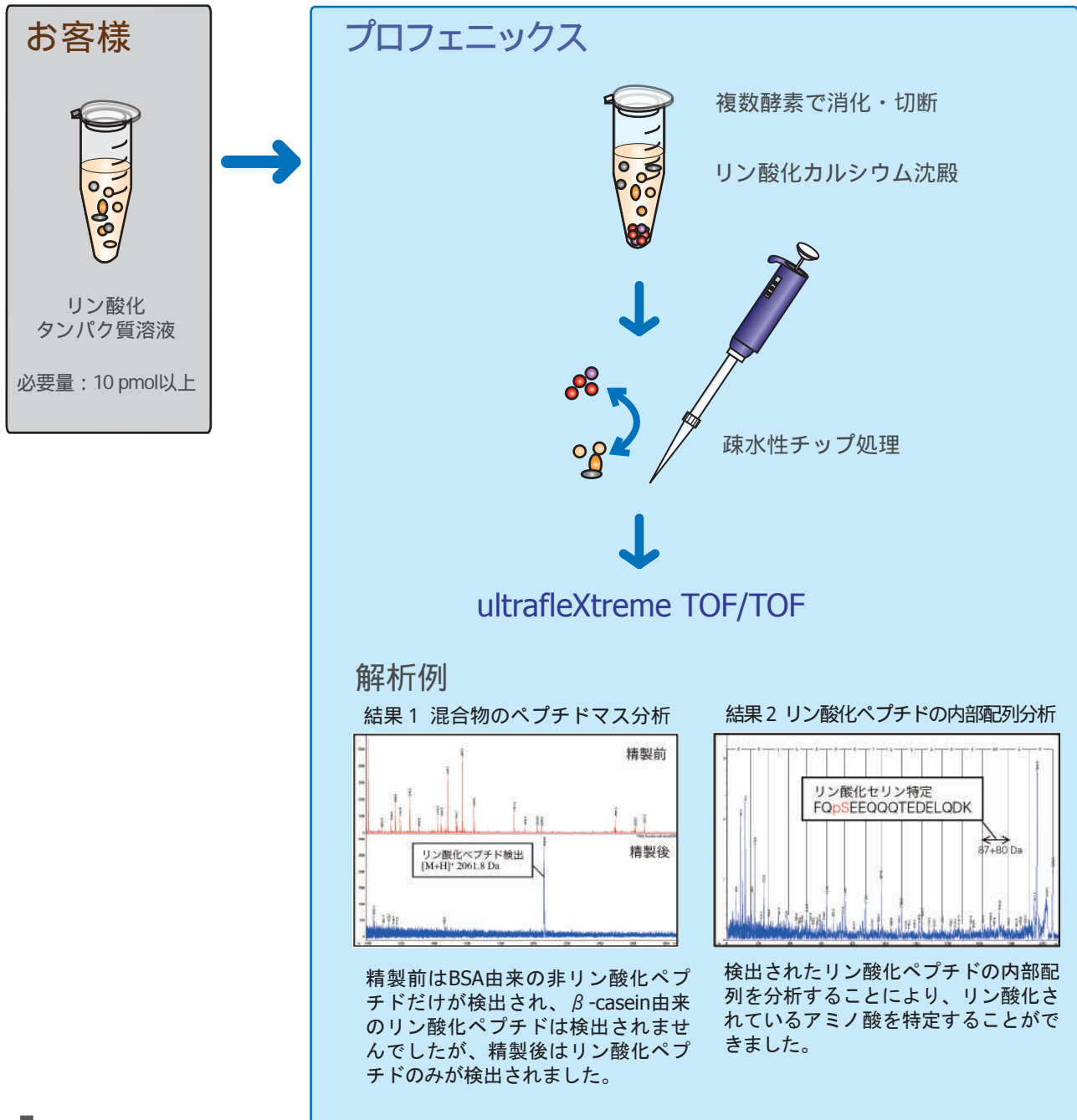
マウスES細胞は増殖因子の一種である Leukemia inhibitory factor (LIF)の添加によって、多能性を維持した状態で培養が可能です。この機構にはJAK-STAT3シグナル伝達系の活性化が重要であることがわかっていますが、それ以外のシグナル系も重要と考えられています。そこで、LIFを添加することでES細胞内のリン酸化タンパク質がどのように変動するか、リン酸化タンパク質に親和性のあるカラムと二次元電気泳動・質量分析計を用いて、網羅的な解析をおこないました。

- ※カラム濃縮により全タンパク質の約10%がリン酸化タンパク質画分として回収されました。
- ※リン酸化タンパク質画分を二次元電気泳動したところ、LIFの有無によって変動するスポットを多数検出することができました(右図○)。
- ※本研究は広島大学大学院理学研究科発牛生物学研究室との共同で行われました。(2002-2004年)

特徴

- リン酸化タンパク質と非リン酸化タンパク質を分離します。
- 濃縮することで、発現量の低いリン酸化タンパク質が検出可能です。
- 濃縮後は大型二次元電気泳動で網羅的に解析いたします。
- リン酸化サイトの決定に関しては、次頁をご覧ください。

タンパク質は様々な翻訳後修飾を受けることによって本来の機能を発揮します。なかでも、リン酸化は細胞の増殖の調節や酵素の活性、細胞内シグナル伝達などに関わる重要な生命現象です。しかし、リン酸化のような翻訳後修飾は遺伝子解析では推定することが出来ず、タンパク質を直接解析する必要があります。本サービスでは、高感度質量分析計 ultrafleXtreme TOF/TOF (Bruker Daltonics社製)を用いて、リン酸化サイト同定解析を行います。



特徴

リン酸化タンパク質を数種のタンパク質分解酵素 (Trypsin, Asp-N, Glu-Cなど) で切断することにより、検出ペプチドのカバー率を高めます。

リン酸化ペプチドの精製が成否のカギです。蓄積したノウハウを用いて、リン酸化ペプチドを多段精製します。

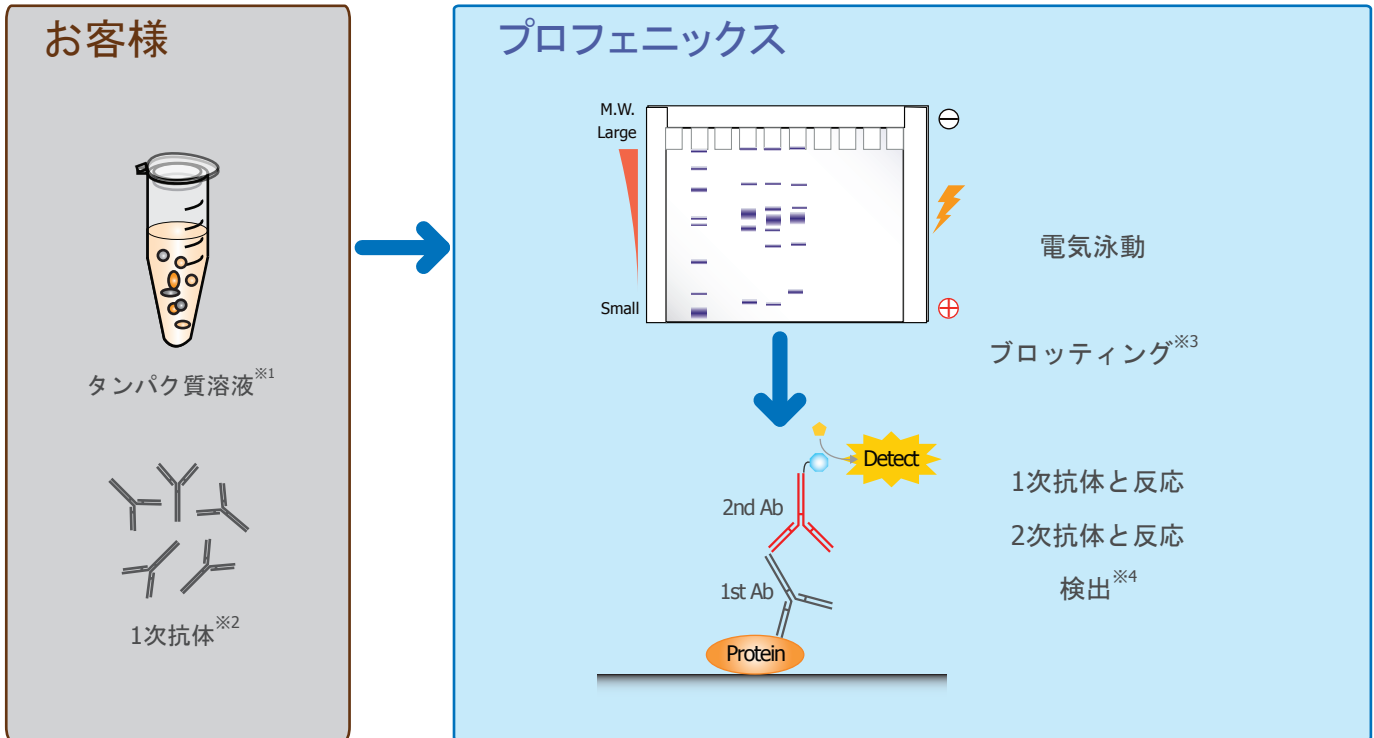
最適な解析プロセス (適切な濃縮精製ステップと酵素選択) をご提案するために、解析対象の配列情報を提供していただく必要があります。守秘契約の雛形をご用意しておりますので、お問い合わせください。

5. Another Analysis

5-1

ウェスタンブロット解析

ウェスタンブロット解析では、抗体濃度、S/N比、非特異的シグナルの判断などの条件検討が不可欠です。綿密な文献調査を行いますので、タンパク質抽出法や抗体の選定についてもご相談ください。



※1 ヒトの未変性サンプルの場合は、感染性がないことを証明していただく必要があります。この場合、先にタンパク質濃度を測定し、SDS+DTTのボイル処理などで完全に失活させてあれば問題ありません。

※2 1次抗体はお客様でご用意ください。

※3 ブロッキングは転写効率の良いタンク式で行います。

※4 検出は化学発光法(ECL)を採用しております。

○解析料金はゲル1枚あたりの価格です。12検体まで同一料金で承ります。

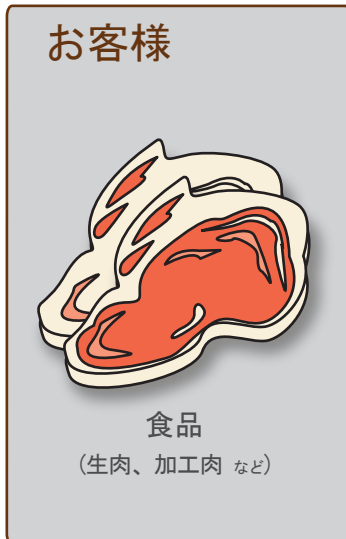
○サンプル溶液と抗体のマッチングから、全ての実験系で検出が可能になるわけではないことをご了承ください。

○感度を上げるとS/N比が悪くなる場合があります。

特徴

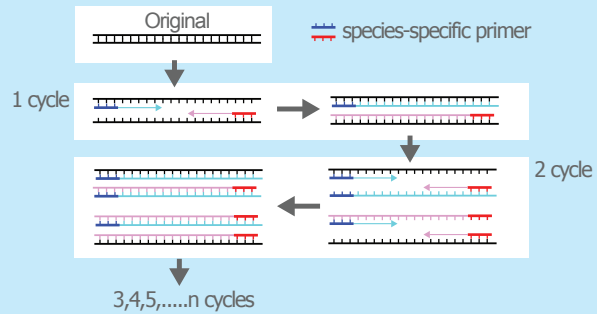
- ご用意いただくものは調製済みのタンパク質溶液と1次抗体です。
- 条件を変更しながら数度にわたり試験し、最適な条件を検討します。
- ラージゲルによる二次元電気泳動のブロッキングも可能です。

近年の食肉部位偽装・産地偽装などに対応するべく、食品中の食肉の生物種を判定します。このサービスは複数の解析法をご用意しておりますので、下記のいずれかをご選択いただけます。

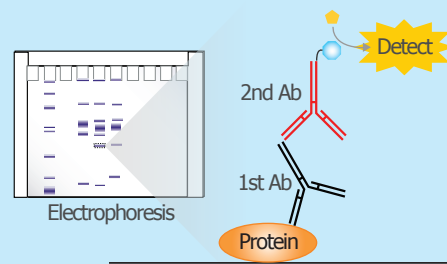


プロフェニックス

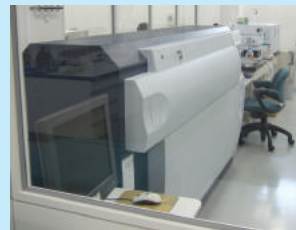
(1) PCRによる食肉動物種別DNA検査



(2) ウェスタンブロットによる食肉動物種識別抗体検査



(3) プロテオーム解析による食肉動物種識別タンパク質検査



特徴

(1) PCRによる食肉動物種識別DNA検査

- 超高感度、低コスト
- ご指定生物種の混在確認（陰性／陽性）
- 偽装以外にも、生産設備共用あるいは動物由来油脂の使用などによる微量の混入が検出される可能性があります。検出のエンドポイントについてはご相談ください。

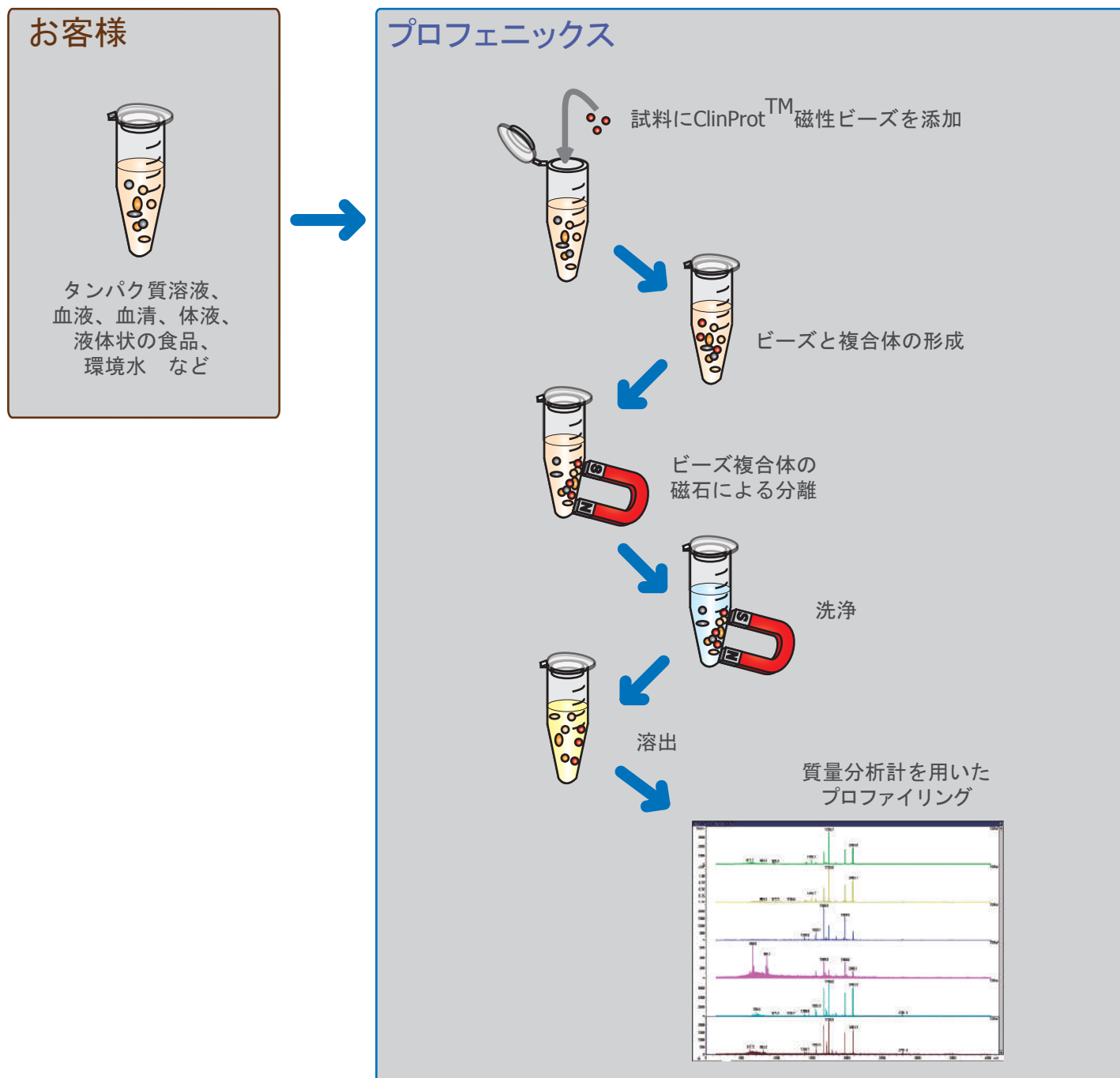
(2) ウェスタンブロットによる食肉動物種識別抗体検査

- 高感度
- ご指定生物種の混在確認（陰性／陽性）
- 内臓肉の判定も可能です。

(3) プロテオーム解析による食肉動物種識別タンパク質検査

- 高感度
- 事前の種の指定が不要です。検出した種の全てをリストアップできます。
- 内臓肉の判定も可能です。

ClinProt™システム (Bruker Daltonics)を用いたバイオマーカーの探索サービスです。ペプチドに特化して多検体統計解析をすることで短時間でプロファイルを作成し、バイオマーカーとなるタンパク質を発見します。ClinProt™磁性ビーズは、特殊な機能表面を有する微粒子で、体液や組織、細胞培養液中にある目的のタンパク質やペプチドを物理的特性に基づいて選択的に結合します。結合した物質は、質量分析計(ultrafleXtreme ToF/ToF)を用いて比較解析します。



特徴

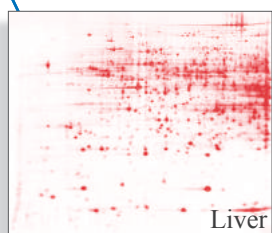
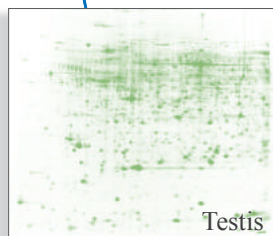
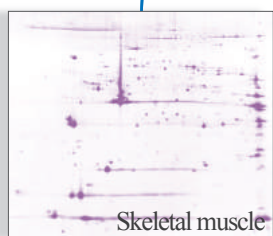
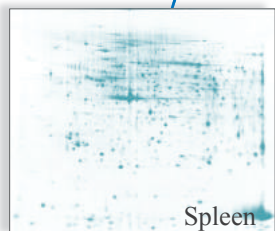
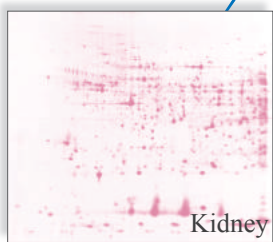
- ビーズ機能表面には、逆相 (C8)、金属イオンアフィニティー(Cu)、イオン交換(弱陰イオン) のバリエーションがあり、様々な分画が可能です。
- 臨床検体のパターン解析・プロファイリングを始め、多彩な解析に応用できます。
- 多検体における統計的解析を専用ソフトウェアで実施します。

Original Papers

01. Yamazaki H, Suemizu H, Kazuki Y, Oofusa K, Kuribayashi S, Shimizu M, Ninomiya S, Horie T, Shibata N, Guengerich FP. Assessment of Protein Binding of 5-Hydroxythalidomide Bioactivated in Humanized Mice with Human P450 3A-Chromosome or Hepatocytes by Two-Dimensional Electrophoresis/Accelerator Mass Spectrometry. *Chem Res Toxicol.* 2016 Aug 15;29(8):1279-81
02. Yamazaki H, Kuribayashi S, Inoue T, Honda T, Tateno C, Oofusa K, Ninomiya S, Ikeda T, Izumi T, Horie T., Zone analysis for in vivo protein bindings of idiosyncratic hepatotoxicant troglitazone and flutamide bioactivated in chimeric mice with humanized liver by two-dimensional electrophoresis with accelerator mass spectrometry. *Toxico. Res.*, 2015 Apr:4: 106-111.
03. Tateno C, Yamamoto T, Utoh R, Yamasaki C, Ishida Y, Myoken Y, Oofusa K, Okada M, Tsutsui N, Yoshizato K., Chimeric Mice with Hepatocyte-Humanized Liver as an Appropriate Model to Study Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α . *Toxicologic Pathology.* 2015 Feb;43(2):233-48.
04. Kobayashi T, Yokoyama T, Ito S, Kobayashi D, Yamagata A, Okada M, Oofusa K, Narita I, Murasawa A, Nakazono K, Yoshie H., Periodontal and Serum Protein Profiles in Patients With Rheumatoid Arthritis Treated With Tumor Necrosis Factor Inhibitor Adalimumab. *J Periodontol.* 2014 May 26:1-12.
05. Yokoyama T, Kobayashi T, Ito S, Yamagata A, Ishida K, Okada M, Oofusa K, Murasawa A, Yoshie H., Comparative analysis of serum proteins in relation to rheumatoid arthritis and chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2014. 85(1):103-12.
06. Yokoyama T, Kobayashi T, Yamamoto K, Yamagata A, Oofusa K, Yoshie H., Proteomic profiling of human neutrophils in relation to immunoglobulin G Fc receptor IIIb polymorphism. *J Periodontol Res.* 2010 Dec;45(6):780-7.
07. Kohta R, Kotake Y, Hosoya T, Hiramatsu T, Otsubo Y, Koyama H, Hirokane Y, Yokoyama Y, Ikehoshi H, Oofusa K, Suzuki M, Ohta S., 1-Benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline binds with tubulin beta, a substrate of parkin, and reduces its polyubiquitination. *J Neurochem.* 2010 Sep 1;114(5):1291-301.
08. Yamazaki H, Kuribayashi S, Inoue T, Tateno C, Nishikura Y, Oofusa K, Harada D, Naito S, Horie T, Ohta S., Approach for in vivo protein binding of 5-n-butyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidine bioactivated in chimeric mice with humanized liver by two-dimensional electrophoresis with accelerator mass spectrometry. *Chem Res Toxicol.* 2010 Jan;23(1):152-8.
09. Kawase T, Okuda K, Kogami H, Nakayama H, Nagata M, Nakata K, Yoshie H. Characterization of human cultured periosteal sheets expressing bone-forming potential: in vitro and in vivo animal studies. *J Tissue Eng Regen Med.* 2009 Mar 5;3(3):218-229.
10. Kayoko Ito, Saori Funayama, Yasumasa Hitomi, Shuichi Nomura, Kouji Katsura, Mikiko Saito, Takefumi Hayashi, Noboru Kaneko, Kaname Nohno, Atsuko Igarashi. Proteome Analysis of Gelatin-Bound Salivary Proteins in Patients with Primary Sjogren's Syndrome-Identification of Matrix Metalloproteinase-9f. *Clinica Chimica Acta*, In Press, Accepted Manuscript, Available online 18 March 2009.
11. Atsuko Igarashi, Kayoko Ito, Saori Funayama, Yasumasa Hitomi, Akihiro Ikui, Minoru Ikeda, Shuichi Nomura. The salivary protein profiles in the patients with taste disorders: The comparison of salivary protein profiles by two-dimensional gel electrophoresis between the patients with taste disorders and healthy subjects. *Clinica Chimica Acta*, Volume 388, Issues 1-2, February 2008, Pages 204-206.
12. Bogdan I. Gerashchenko, Akira Yamagata, Ken Oofusa, Katsutoshi Yoshizato, Sonia M. de Toledo, Roger W. Howell. Proteome analysis of proliferative response to bystander cells adjacent cells exposed to ionizing radiation. *Proteomics*, 7, p.2000-2008, 2007.
13. Yasushi Goto, Shigeyuki Kitamura, Keiko Kashiwagi, Ken Oofusa, Osamu Tooi, Katsutoshi Yoshizato, Jin Sato, Shigeru Ohta, and Akihiko Kashiwagi, Suppression of Amphibian Metamorphosis by Bisphenol A and Related Chemical Substances, *J. Health Sci.*, 52 (2), 160-168, 2006.
18. Sawada, T., Oofusa K., and Yoshizato, K. In vivo thyroid hormone-responsiveness of a thyroid hormone response element-like sequence in 5'-upstream promoter region of anuran MMP1 gene. *J. Endocrinol.* 169, 477-486, 2001.
19. Oofusa, K., Tooi, O., Kashiwagi, A., Kashiwagi, K., Kondo, Y., Watanabe, Y., Fujikawa, K., and Yoshizato, K. Expression of thyroid hormone receptor beta A gene assayed by transgenic *Xenopus laevis* tadpoles carrying its promoter sequences. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 181, 97-110, 2001.
20. Okuyama, H., Shimahara, Y., Kawada, N., Seki, S., Kristensen, D.B., Yoshizato, K., Uyama, N., Yamaoka, Y., Regulation of cell growth by redox-mediated extracellular proteolysis of platelet-derived growth factor receptor beta. *J. Biol. Chem.*, 276, 28274-28280, 2001.
21. Kawada, N., Kristensen, D.B., Asahina, K., Nakatani, K., Miyamoto Y., Seki, S., Yoshizato, K., Characterization of a stellate cell activation-associated protein (STAP) with peroxidase activity found in rat hepatic stellate cells. *J. Biol. Chem.*, 276, 25318-25323, 2001.
22. Kristensen, D.B., Kawada, N., Imamura, K., Miyamoto, Y., Tateno, C., Seki, S., Kuroki, T., Yoshizato, K., Proteome analysis of rat hepatic stellate cells. *Hepatology*, 32, 268-277, 2000.
23. Kristensen, D.B., Imamura, K., Miyamoto, Y., Yoshizato, K., Mass spectrometric approaches for the characterization of proteins on a hybrid quadrupole time-of-flight (Q-TOF) mass spectrometer. *Electrophoresis*, 21, 430-9, 2000.
24. Sato, H., Funahashi, M., Dan Bach Kristensen, Tateno, C., and Yoshizato, K., Pleiotrophin as a Swiss 3T3 Cell-Derived Potent Mitogen for Adult Rat Hepatocytes. *Exp. Cell Res.*, 246, 152-164, 1999.
25. Kristensen, D.B., Inamatsu, M., Yoshizato, K., Elution concentration of proteins cut from two-dimensional polyacrylamide gels using pasteur pipettes. *Electrophoresis*, 18, 2078-2084, 1997.

和文(総説を含む)

1. 大房健、戸笈修、柏木啓子、近藤雅志、吉里勝利、"トランスジェニックカエルの作成方法" (分担執筆)、*実験医学*, 18, 795-801, 羊土社, 2000.
2. 吉里勝利. "肝臓再生のプロテオーム解析—星細胞のプロテオーム—", *遺伝子医学* 4, 49-54, 2000.
3. 吉里勝利. "臓器再生のプロテオーム解析—非活性化および活性化ラット肝星細胞を例として—プロテオミクス・タンパク質の系統的・網羅的解析", 91-103, 中山書店, 2000.
4. 山縣彰、吉里勝利: プロテオーム解析技術、*酵素工学ニュース*, Vol. 46, 2001.
5. 山縣彰、吉里勝利: プロテオーム解析法、*日本血栓止血学会誌*, Vol. 12, 2001.
6. 山縣彰、朝比奈欣治、吉里勝利: 第1章 基礎医学/生物学研究、5 幹細胞・再生研究、34-40、フローチャートで見る先端バイオ研究の進め方、羊土社、2001.
7. 山縣彰: プロテオーム解析、細胞、特集・広島県組織再生プロジェクト産官学連携の推進 (吉里勝利編) Vol. 34, No. 1, ニューサイエンス社、2002.
8. 山縣彰、吉里勝利: 活性化肝星細胞のプロテオミクス、*医学のあゆみ*, Vol. 202, 2002.
9. 山縣彰、吉里勝利: 活性化肝星細胞のプロテオーム解析、*現代化学増刊42「プロテオミクス—方法とその病態解析への応用—*」、東京化学同人、2002.
10. 妙見(宮本)夕佳、山縣彰: 肝星細胞のプロテオーム解析、細胞、Vol. 34, ニューサイエンス社、2002.
11. 山縣彰、大房健: 脱リン酸化酵素と二次元電気泳動によるリン酸化蛋白質の解析、「プロテオミクスの最新技術」シーエムシー出版、2002.
12. 大房健、山縣彰、吉里勝利: "遺伝子組み換えとプロテオミクス"、*生化学* 第76巻 第10号 pp.1283-1288, 2004.
13. 大房健、山縣彰、吉里勝利: 「ゲノムからプロテオームへ—ヒトプロテオミクスの目指すもの—」: 「遺伝子組み換えとプロテオミクス Proteome analysis of transformed cells and transgenic animals.」*生化学会誌「生化学」*, 2004年10月号
14. 大房健、山縣彰、武田善子、妙見夕佳: 「ポストゲノム時代のタンパク質解析—リン酸化プロテオミクス」月間バイオインダストリー特集号「バイオテクノロジーのイノベーション」2004年12月号.
15. 大房健: 「電気泳動 (Electrophoresis)」*日経バイオビジネス* 2005年5月号
16. 大房健、吉里勝利: 「プロテオミクス研究とそれに注目した動機及びその発展について」*細胞 The Cell*, Vol. 38, No. 11, ニューサイエンス社、2006.
17. 安西尚彦、加国雅和、大房 健、遠藤 仁: 「ヒト肝細胞メラマウスにおける血中ヒアルブミン値と血清尿酸値の相関性」*Gout and Nucleic Acid Metabolism* Vol. 33, No. 1, 2008.
18. 田澤立之、山本尚、阿部修一、山縣彰、大房健、中田光: 「GM-CSFの肺における機能とは?—GM-CSF欠損マウス、GM-CSF過剰産生マウスの気管支肺胞洗浄液(BALF)のプロテオーム解析を通じてわかったこと」*分子呼吸器病*, Vol. 67, 2009.



いであ株式会社

- 本カタログの受託サービスを臨床診断用には使用しないようご注意ください。
- 本カタログの一部または全てを無断で複製することをご遠慮ください。
- 本カタログに記載されている商品名などは、特に記載がない場合でも各社の商標または登録商標です。