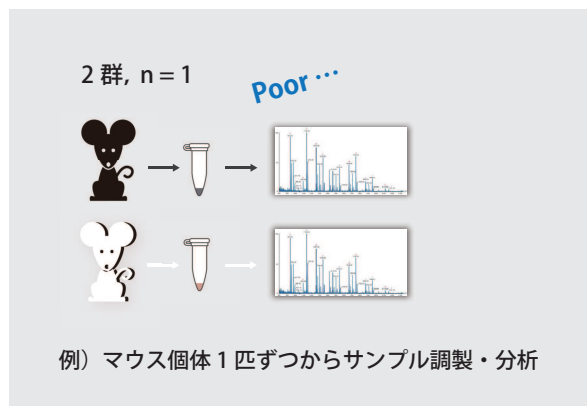


受託サービス プロテオーム解析 キャンペーン

統計解析に必要な
データポイント数を！
Replicate サンプルの分析を特価でご提案。

One More Replication キャンペーン

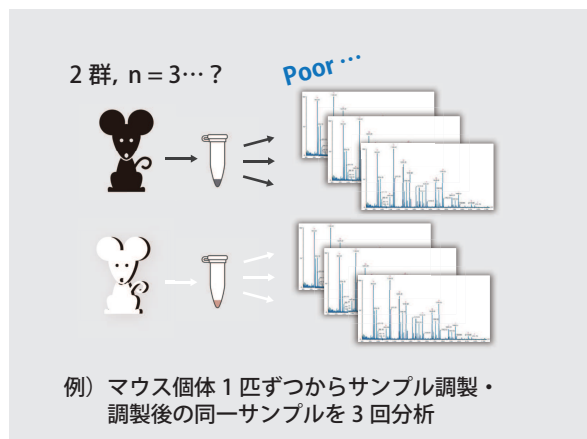
Replicate とは、N 数と呼ばれたりしますが、いくつか同じサンプルを準備して分析することを指しています。プロテオーム解析の実験計画を立てる上で、「Replicate をどう考えたらいいの?」「サンプル数はどのように考えて準備すればよいの?」「N=1 で実験してもよいの??」といった疑問を持つ方も多いのではないのでしょうか。



ヒトやマウスの臓器、植物、昆虫など“組織”をプロテオーム解析の対象として考えるなら、個体差がある前提で考えた方がよいです。2 群、n=1 の試験系を組んだ場合でも、検体間の比較は可能ですが、そういった個体差を考慮するためには、再試験や別の試験で再現性を確認しなければいけません。そのため、個体差が想定されるならば、n=3 (少なくとも n=2) 以上の試験系を計画する事をお勧めします。

なお、n=1 の試験例としては、「検体間差が小さい事を事前に確認している」「薬剤投与後のタイムポイントを多く取りたいので各ポイントは n=1 で実施する」「プレリミナリな“アタリ”を付ける実験である」といったケースがあり得ます。

『Technical Replicate』 or 『Biological Replicate』 ?

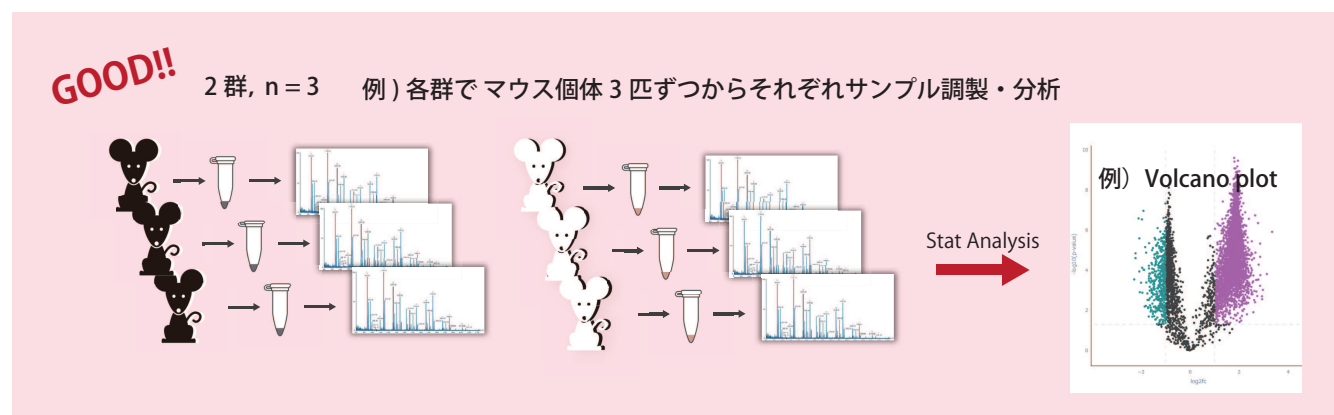


Replicate にも大きく 2 種類あります。一つは、Technical Replicate (技術的な繰り返し)、もう一つが Biological Replicate (生物学的な繰り返し) です。

左の図は Technical Replicate の一例です。同じマウス個体からサンプル調製をして、分析を 3 回実施しているものです。反復されているのは機器分析の部分だけです。

他の Technical Replicate としては、同一マウスの臓器から 3 つの組織片を切り出して、それぞれに前処理・分析を行うというようなケースです。これは、前処理・分析の部分を反復できています。こういった n=3 で統計解析をする事も可能ですが、あくまで分析誤差しか議論できず、マウス個体差によるブレ・再現性については何も言及できません。

一方、下の図は、Biological Replicate の一例です。マウス個体から 1 サンプルずつを調製し、それぞれに分析を行います。統計解析を実施し、有意な差異を抽出し、Volcano plot などの表現ができます。有意に抽出されたタンパク質について、機能解析 (Gene Ontology 解析、Pathway 解析等) を行うことによって、網羅的で膨大なデータをより活かす事が可能になるでしょう。

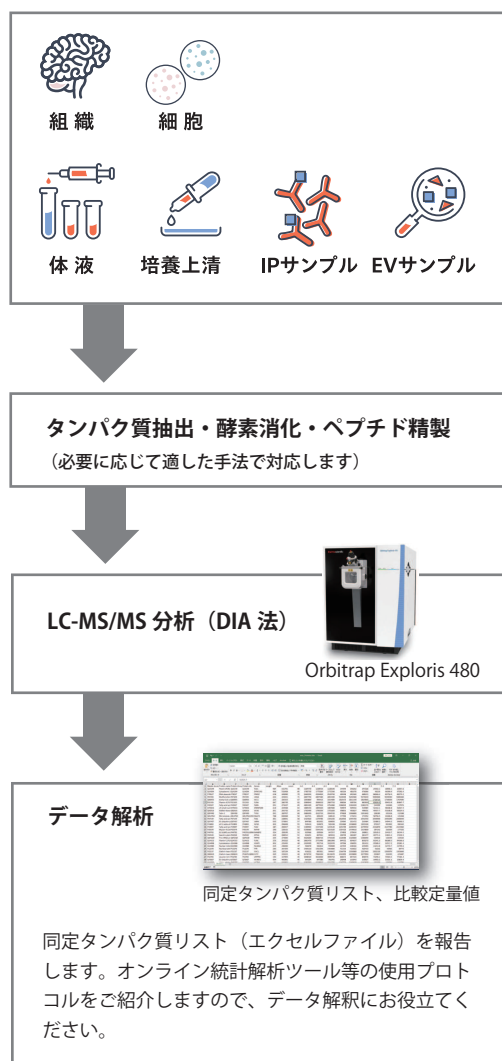


実験計画としては n 数が多い方が望ましいことは分かってる、でも、費用がその分かかりますよね…。2 群、n=3 (合計 6 検体) ならば、検体単価 × 6...! ? と躊躇されるのでは、、、そこで、今回、上記で Good と示したような実験計画をできるだけ安価に Replicate データを取ってもらうべく、One More Replication キャンペーンをご提案します。

DIA プロテオーム解析

組織・細胞や培養上清などから LC-MS/MS (DIA法) を用いて 網羅的にタンパク質を同定、検体間比較

組織や細胞サンプルの場合、一度の解析で、～8,000程度のタンパク質が同定できます。従来のDDA (Data dependent acquisition) 法を用いたLC-MS/MSショットガン解析においては、存在量の多いペプチドから順に検出・同定がされたため、微量なタンパク質が同定されにくい特徴がありました。DIA (Data independent acquisition) 法では、存在量によらず全てのMS/MSスペクトルを取得し、事前に構築されたスペクトルライブラリーと照合することで、より高感度で定量性の高いプロテオーム解析が可能です。



▶ 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 個 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

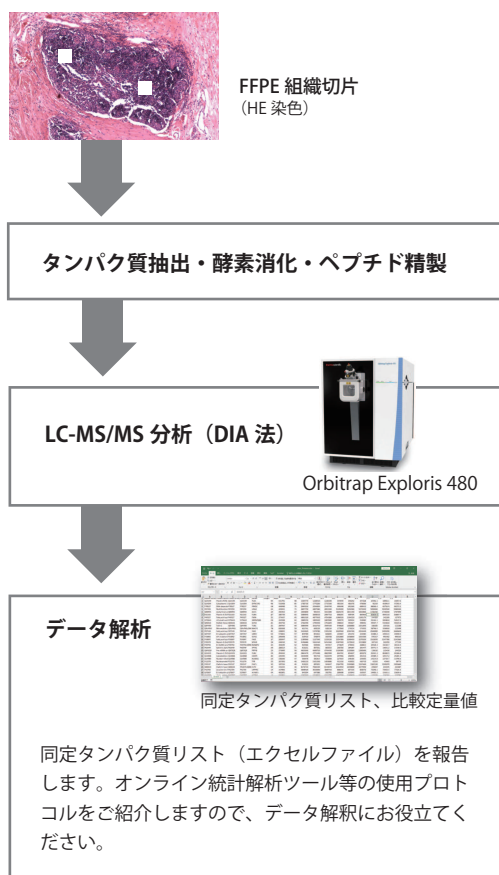
↳ DIA-NN

	価格 (税別)
DIAプロテオーム解析	¥ 160,000 /検体
DIAプロテオーム解析 / Replicate	¥ 80,000 /検体

例) 2 群, 各 n=3 の場合 (¥ 160,000 + ¥ 80,000 + ¥ 80,000) × 2 = ¥ 640,000

FFPE組織からDIAプロテオーム解析

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40 nL (例: 厚さ 10 μm, 2 mm x 2 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。

▶ サービス内容

- ・ サンプル前処理
 - ↳ FFPE組織からのタンパク質抽出・精製
 - ↳ 酵素消化・精製
- ・ LC-MS/MS分析
- ・ データ解析

▶ 使用する機器

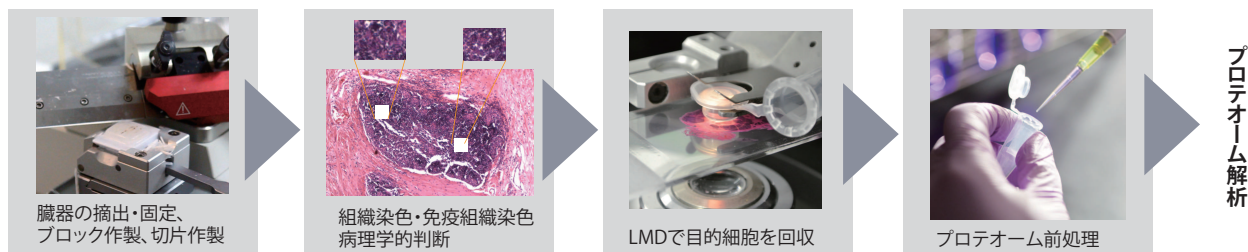
- ・ 質量分析装置
 - ↳ Orbitrap Exploris 480 (Thermo Fisher Scientific)
- ・ HPLC
 - ↳ Vanquish Neo UHPLC (Thermo Fisher Scientific)
- ・ 解析ソフトウェア
 - ↳ DIA-NN

	価格 (税別)
FFPE組織からのDIAプロテオーム解析	¥ 160,000 /検体
FFPE組織からのDIAプロテオーム解析 / Replicate	¥ 80,000 /検体

例) 2 群, 各 n=3 の場合 (¥ 160,000 + ¥ 80,000 + ¥ 80,000) × 2 = ¥ 640,000

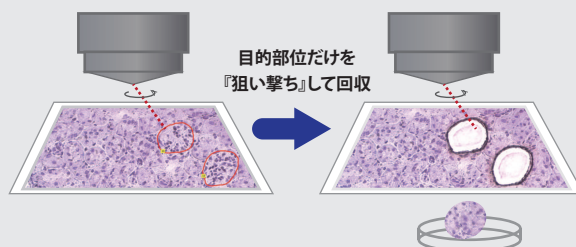
分析・解析オプションのご案内 ～ 目的部位によりフォーカスした解析のために

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。

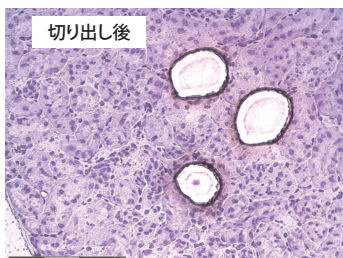
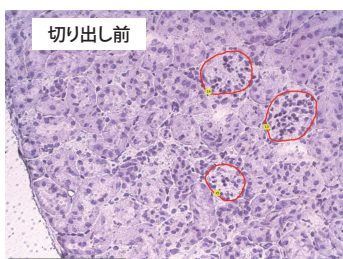


■ レーザーマイクロダイセクション

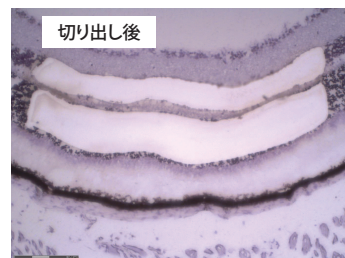
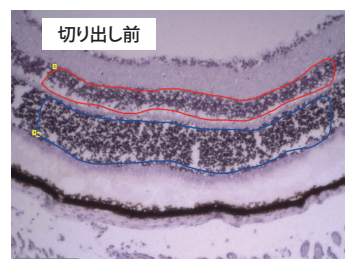
切り出したい領域を画像や図でご指定ください。弊社提携先の熟練の作業者が、薄切・染色したスライドを観察・画像取得し、ご希望の切り出し領域を確認いたします。切り出し領域が確定しましたら、最適な切片の厚さやレーザー強度を検討し、本試験を実施いたします。切り出した断片をプロテオーム解析の前処理に最適な溶液に回収し、以降の操作を進めます。



がん組織からがん細胞を回収する



腎臓から糸球体を回収する



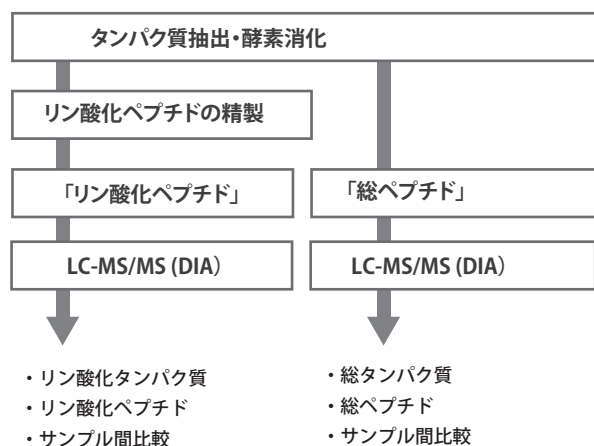
網膜から特定の領域を回収する

費用	
レーザーマイクロダイセクション	お問合せください

リン酸化 DIA プロテオーム解析

生体内で生成されたタンパク質は、リン酸化修飾を受け、その機能や局在が調整されていると考えられています。そのためタンパク質の機能を解明する上で、リン酸化修飾の解析は不可欠です。しかし、リン酸化ペプチドはイオン化されにくい上に存在量も微量であるため、通常の LC-MS/MS 解析では十分なリン酸化ペプチドの情報を得ることは容易ではありません。

本分析では、リン酸化ペプチドを濃縮・精製し、LC-MS/MS 解析に供することで、一度の分析で数百～数千のリン酸化ペプチドを同定することができます。



※ 総ペプチドも分析した方がよい理由

例えば・・・

リン酸化ペプチドの解析結果から、Protein X のリン酸化が検体間で差があると判断できた場合。

リン酸化ペプチドの情報のみからは、「Protein X の発現量が変動したのか」or 「Protein X の発現量は変わらないがリン酸化率が変動したのか」の判別はできません。

そのため、総ペプチド（リン酸化ペプチド & 非リン酸化ペプチド）の分析結果から、“タンパク質発現変動”も確認した方が望ましいと考えられます。

▶ 必要サンプル量

タンパク質 300ug 以上を目安にご準備ください。

▶ 納期

サンプルをお受け取りした日から、1.5ヶ月程度

▶ サービス内容

- ・サンプル前処理
 - ↳ 組織・細胞等からのタンパク質抽出・精製
 - ↳ 酵素消化・リン酸化ペプチド濃縮
- ・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
 - ↳ DIA-NN

	価格 (税別)
リン酸化 DIA プロテオーム解析 (リン酸化ペプチド & 総ペプチド)	¥ 270,000 /検体
リン酸化 DIA プロテオーム解析 (リン酸化ペプチド & 総ペプチド) / Replicate	¥ 135,000 /検体

例) 2 群, 各 n=3 の場合 (¥ 270,000 + ¥ 135,000 + ¥ 135,000) × 2 = ¥ 1,060,000

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することによりタンパク質を同定します。

▶ 必要サンプル量

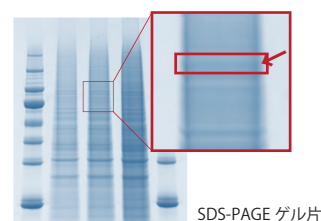
- ゲル片 (タンパク質 25 fmol 以上)
- ゲル片量の目安: 5,6 レーン以下 (12ウェルのミニゲルの場合)
- 推奨染色法: CBB染色、銀染色 (質量分析用)、蛍光染色

▶ 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



酵素消化

LC-MS/MS 分析

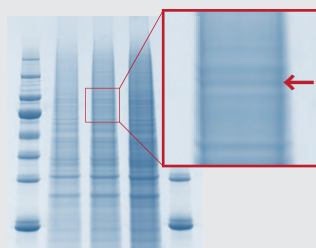
・ 同定タンパク質リスト

	定価 (税別)	キャンペーン価格 (税別)
LC-MS/MSによるゲル内タンパク質同定	¥110,000	1 ~ 5 検体 ¥ 99,000 /検体
		6 検体以上 ¥ 88,000 /検体

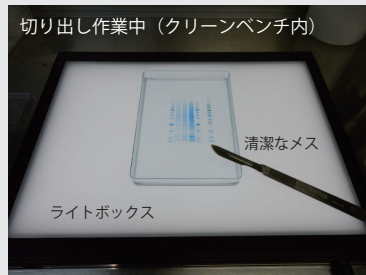
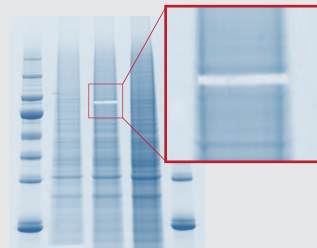
サンプル調製について

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。

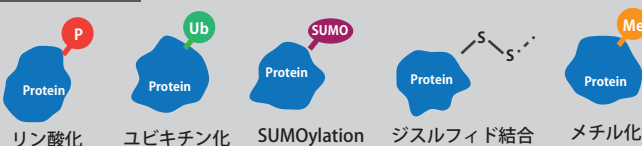
必要なサンプル量ですが、タンパク質同定を目的とした場合、必要なタンパク質サンプルの量の目安として 25fmol と規定していますが、細胞や組織のライセート、粗精製タンパク質などのクールドなサンプルを電気泳動した場合、1 本のバンドに見えても、そのバンドに複数のタンパク質が含まれている可能性が高いです。複数のタンパク質を合わせて 25fmol だった場合、各タンパク質は最低量に満たず、十分な解析が行えない可能性があります。クールドなサンプル由来の場合、100fmol 以上を目安にご準備ください。

プロテオーム解析で何ができる・・・？！

タンパク質の網羅的発現変動解析

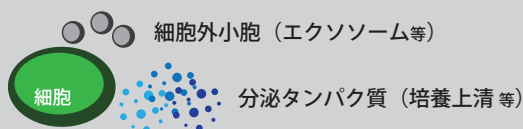
サンプル中に含まれるタンパク質の網羅的な同定を行うと同時に、比較定量データを取得。薬剤投与からのタイムコースや病態変化に伴うタンパク質の発現変動解析などに様々なサンプル・目的に向けて応用することが可能です。

PTM 解析 Post-Translational Modification



生体内で生成されたタンパク質は、リン酸化など多様な翻訳後修飾（Post-Translational Modification：PTM）を受け、その機能や局在が調整されていると考えられています。このような PTM による質量変化を網羅的に検出する事が可能です。

セクレトーム解析



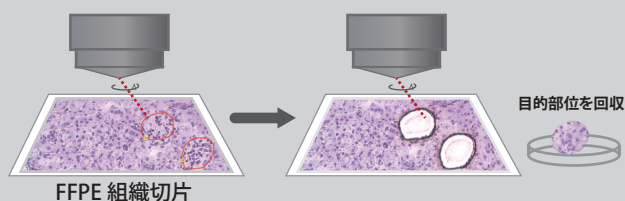
セクレトームとは、細胞より分泌される全てのタンパク質を指します。細胞培養上清のセクレトーム解析による疾患バイオマーカー探索等の利用が考えられます。また、細胞から放出される細胞外小胞（エクソソーム）には多種のタンパク質が内包され運搬されます。これらの解析にも質量分析は最適です。

インタラクトーム解析

(例) 近接依存性ビオチン標識法によるタンパク質相互作用解析
共免疫沈降法 (Co-IP) によるタンパク質相互作用解析

インタラクトーム解析の目的は、『interaction (相互作用) + ome (網羅的な) = 生体分子の相互作用を網羅的に理解する』事です。単純に網羅的タンパク質同定を行うだけでは得られないようなタンパク質 - タンパク質相互作用の情報も、前処理の工夫によって得られる可能性があります。

空間プロテオーム解析



組織切片からレーザーマイクロディセクション (LMD) によって微細な目的領域を切り出し、プロテオーム解析を実施します。このような領域特異的な解析によって、どの部位でどのようなタンパク質が発現変動しているのかを掴み、新しいバイオマーカー探索等に繋がる可能性があります。

『プロテオーム解析個別オンラインセミナー』



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！



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