

令和6年度 質量分析中級講習会 -LC-ESI-MS講習会-
PRM測定の実例紹介、メソッド構築

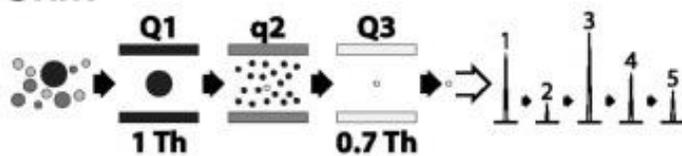
徳島大学
技術員 西野耕平

Parallel Reaction Monitoring (PRM)とは？

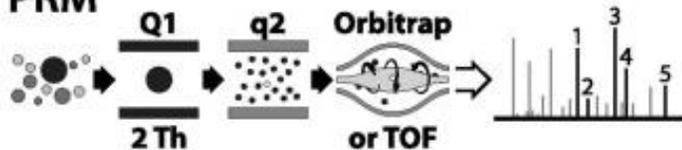
Parallel Reaction Monitoring for High Resolution and High Mass Accuracy Quantitative, Targeted Proteomics *[†]

Amelia C. Peterson [‡], Jason D. Russell [‡], Derek J. Bailey [‡], Michael S. Westphall [‡], Joshua J. Coon [‡]  

A SRM



B PRM



【原理、理論】

フラグメントイオンの取得に高分解能・高質量精度の質量分離部を使う。

【オペレータ観点】

Q-TofやQ-Orbitrapなどの装置でターゲット定量分析ができる。プリカーサーイオンの設定するだけなので、メソッド構築が楽

【研究で活用】

ショットガンプロテオミクスのバリデーション
低分子化合物のターゲット定量分析

(たぶん) 最初の論文

本日の話

技術的とか原理的な観点より実務的な話です。

- プロテオミクス研究支援でPRM活用事例
- メソッド構築の際は何を考えているか？
- 高選択性により区別できた事例
- アミノ酸抽出方法の紹介

本日の話

技術的とか原理的な観点より実務的な話です。

- プロテオミクス研究支援でPRM活用事例
- メソッド構築の際は何を考えているか？
- 高選択性により区別できた事例
- アミノ酸抽出方法の紹介

ショットガンプロテオミクス (DDA-LFQ) のバリデーション

プロテオミクスの一般的な研究の流れ

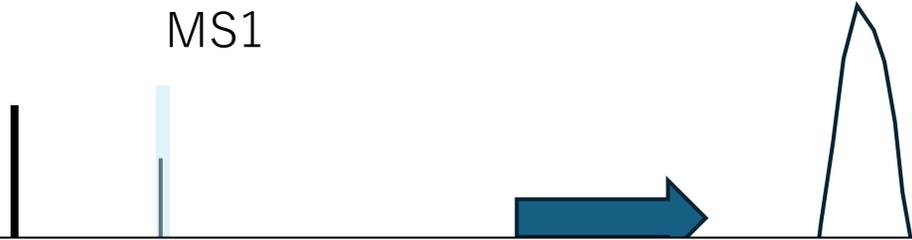
1. DDAのLFQでショットガンプロテオミクス
 2. 候補タンパク質の絞り込み
 3. ウェスタンブロットや別の実験でバリデーション
 4. 再現性取れたタンパク質に関してさらに解析
- 【コストの掛かる実験の前に
同一サンプルのPRMで再現性を取る】

ポイント

- DDAの結果を使用するので、対象ペプチドの絞り込みは不要
 - 同一装置を使うなら保持時間も揃いやすい
 - DDAの結果からスペクトルライブラリを構築するのは慣れないと大変
- やってみるとLFQで差は出たがPRMで測定すると、差がないという事例がある。

定量性とはなにか？ DDAよりPRMの方がいいのか？

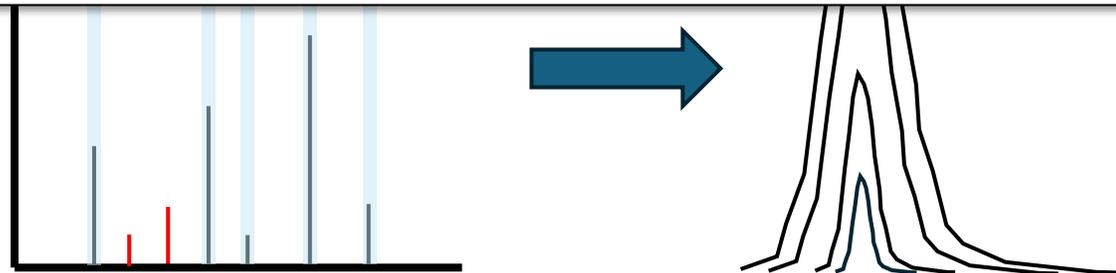
MS1



定量値が黒+赤になる可能性がある。

DDAのバリデーションにPRMを使うのは有効だと思います。

- 同一サンプルなので、前処理不要
- m/z 、保持時間の情報も得れている
- DDAのLFQより定量性は高い（と思う）



細かい話をすると「高選択性により、定量性が高くなる」ということです。
他にもC-Trapでイオンを貯められる、ポイント数が多いとかの関係していると思います。

本日の話

技術的とか原理的な観点より実務的な話です。

- プロテオミクス研究支援でPRM活用事例
- メソッド構築の際は何を考えているか？
- 高選択性により区別できた事例
- アミノ酸抽出方法の紹介

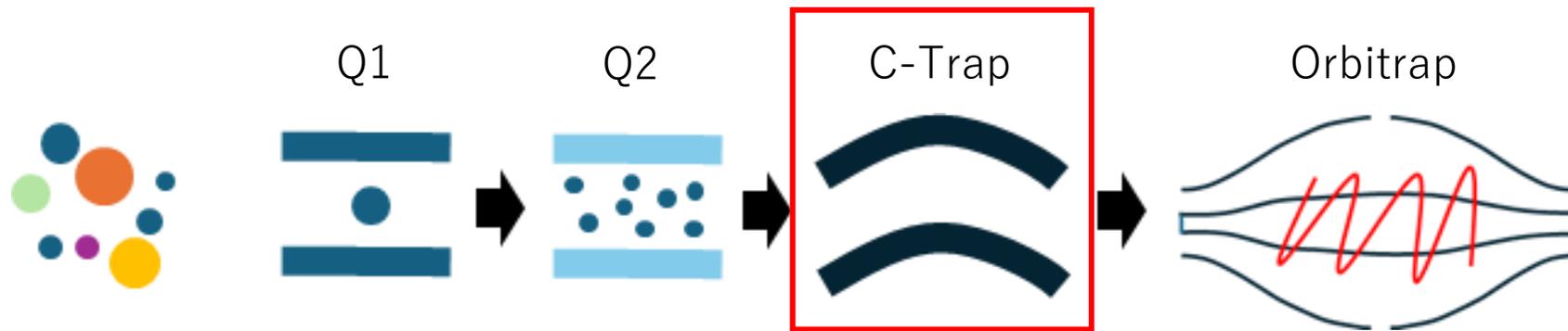
低分子化合物のターゲット分析

PRMメソッド構築時の主な注意点（私の場合）

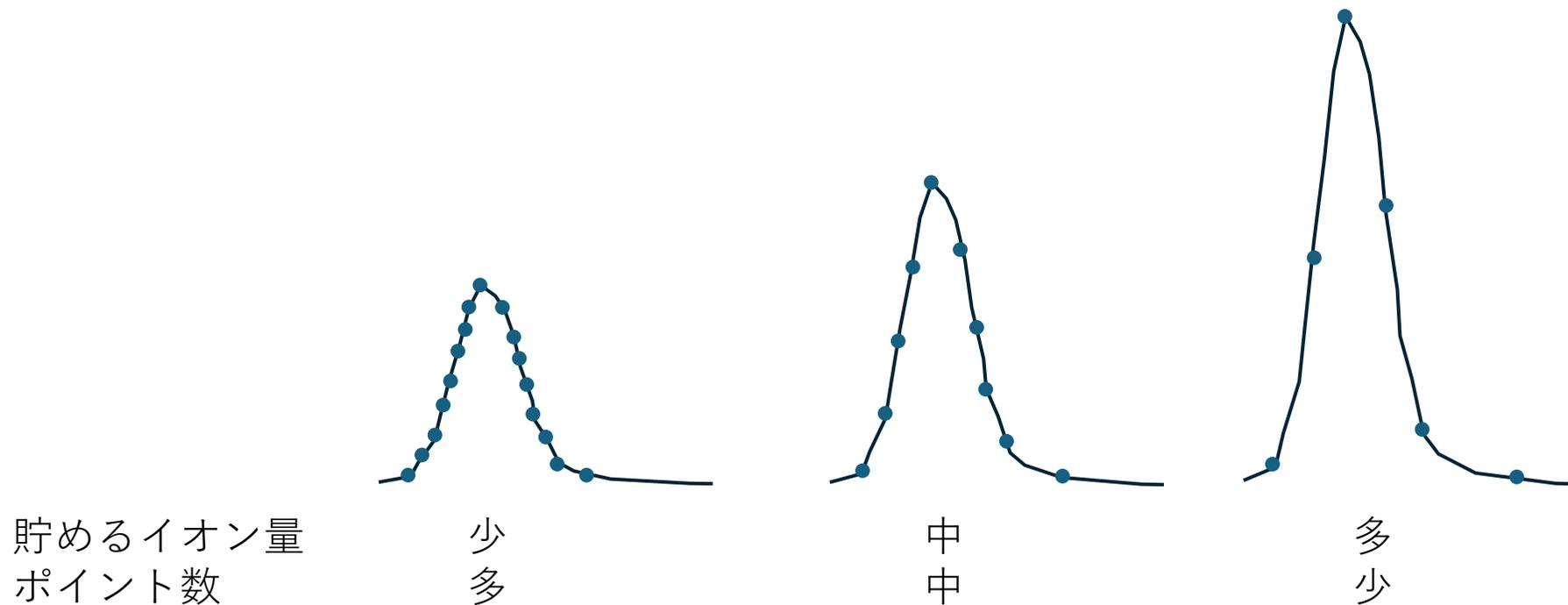
| | 注目している点 | 考え方 |
|----------|-----------------------|----------------------------|
| 確認する項目 | 保持時間 | |
| | 極性（Positive、Negative） | |
| | Precursor ionのm/z | アダクトイオンによって異なる。 |
| | Fragment ionのm/z | 強度の高いスペクトルが検出されればOK |
| 条件検討する項目 | Collision Energy | Fragment ionの強度が高くなるようにする |
| | AGC target | 数値を上げると感度上がるが、ピークポイント数は下がる |
| | Ion Injection Time | 数値を上げると感度上がるが、ピークポイント数は下がる |
| | Isolation Window | 夾雑物によって1-3くらいの幅に設定する |

Tuneのパラメーターを変更することもあります

C-Trapとイオン量とピークポイント数の関係性



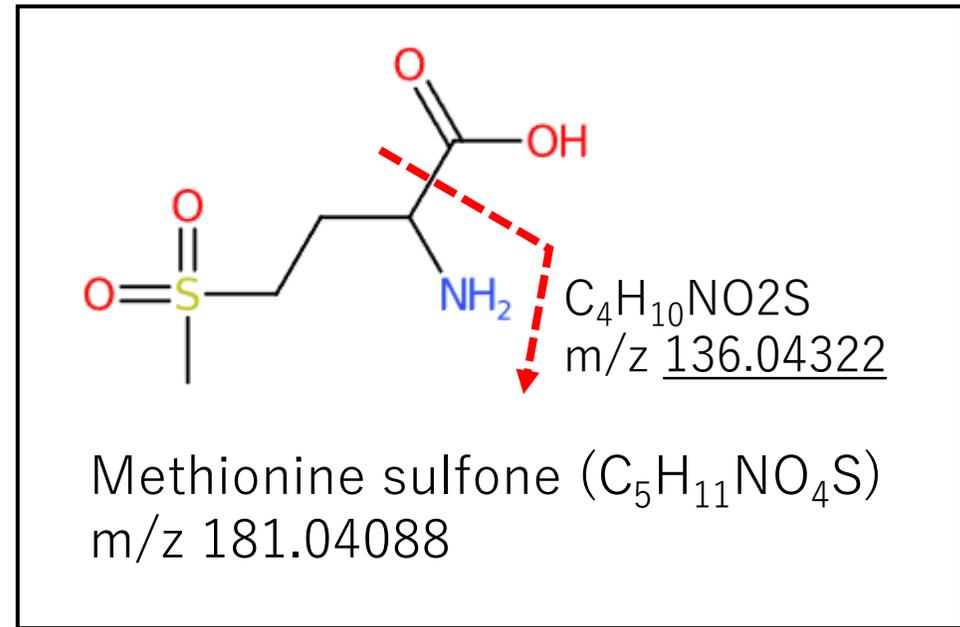
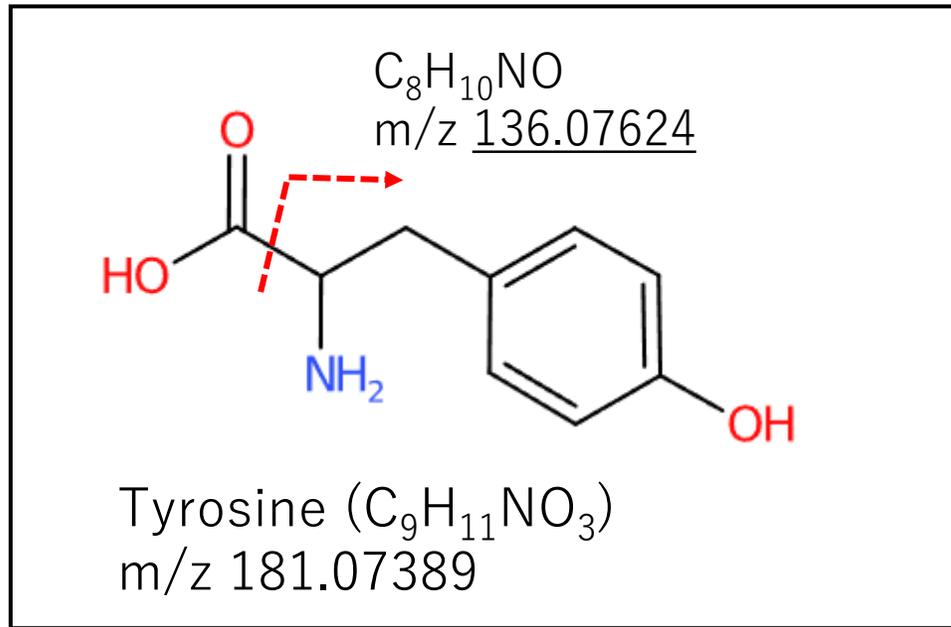
C-Trapの役割：イオンを貯め込む。
一定時間（Injection Time）、一定量（AGC target）
閾値となるイオン量を挙げたり、時間を挙げると貯めこむイオン量は増える。



本日の話

技術的とか原理的な観点より実務的な話です。

- プロテオミクス研究支援でPRM活用事例
- メソッド構築の際は何を考えているか？
- 高選択性により区別できた事例
- アミノ酸抽出方法の紹介

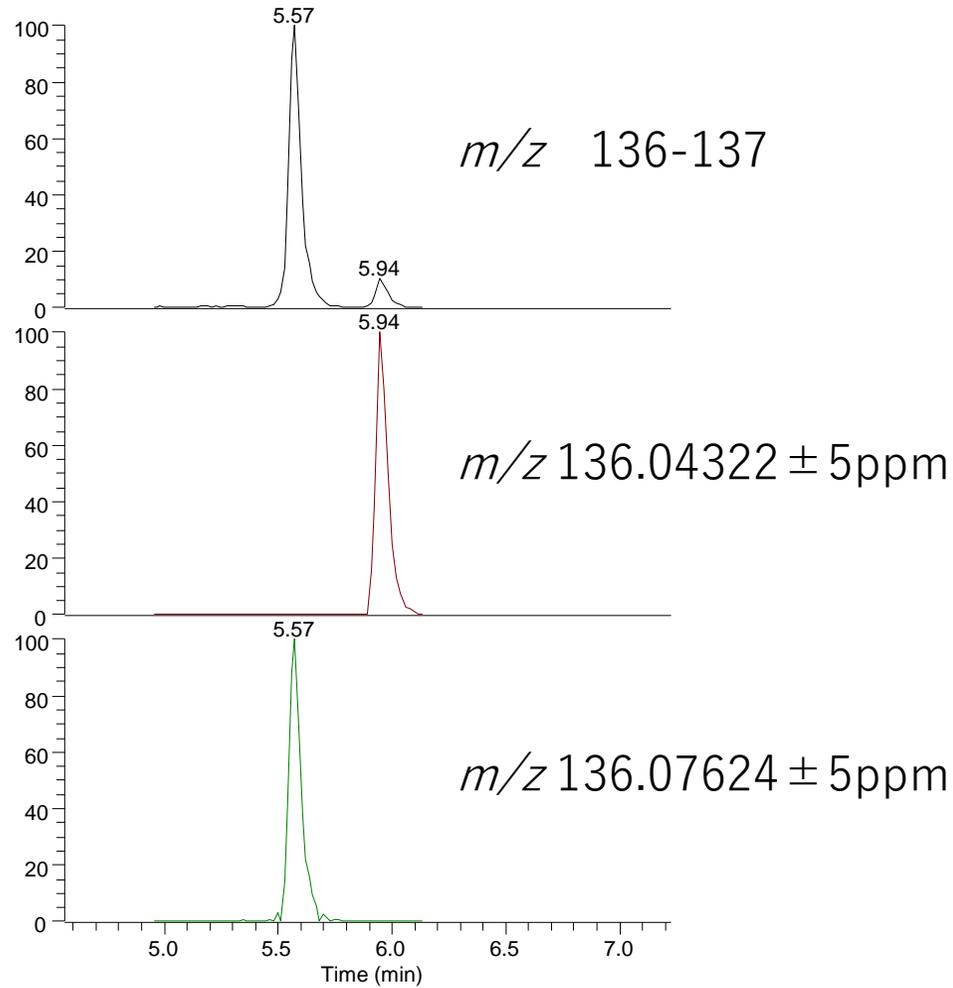


現場で経験したことです。

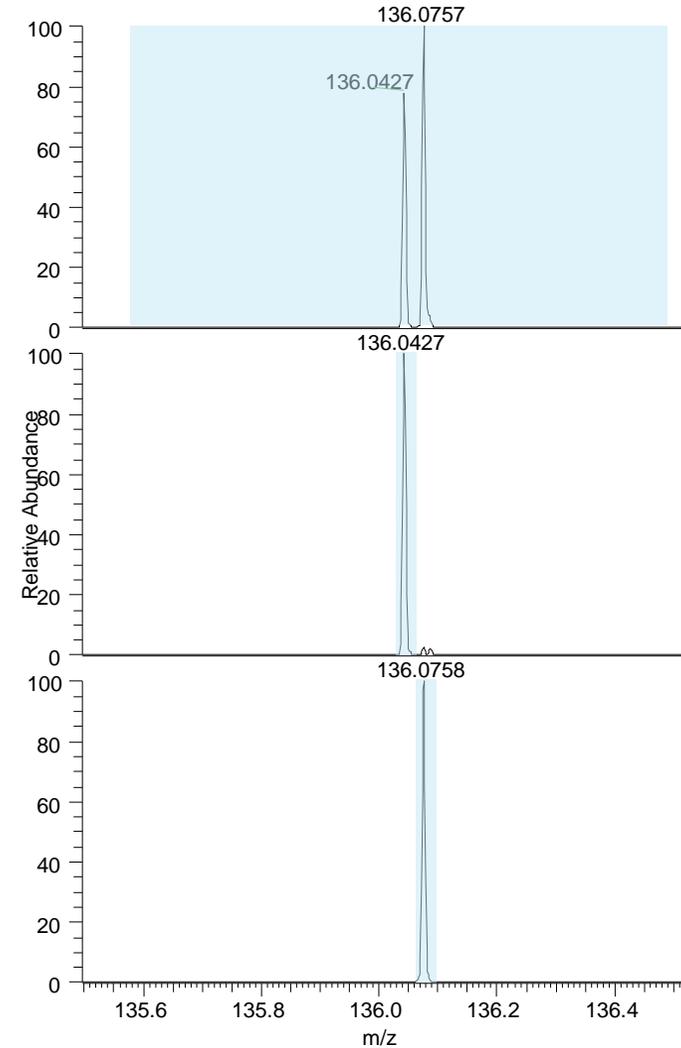
TyrosineとMethionine sulfoneは組成式は異なりますが、Precursor ionのm/zが近似しています。

さらに、どちらも近似したFragment ion (m/z 136)が出ますが、Orbitrapであれば区別できます。

下図は全て同じデータの抽出クロマトグラムです。
選択する際のm/zの設定により、2種類の化合物を区別できます。



スペクトルの観点で見るとこんな感じです。
青い部分が抽出クロマトグラムの範囲です。



本日の話

技術的とか原理的な観点より実務的な話です。

- プロテオミクス研究支援でPRM活用事例
- メソッド構築の際は何を考えているか？
- 高分解能により区別できた事例
- アミノ酸抽出方法の紹介

親水性代謝物抽出方法

ウニに1g当たり500 μL のMillQを加える

↓

ピペティングや超音波破碎機にサンプルを破碎

↓

3,000 \times gで遠心する(1)

(そのままは吸えなかった)

↓

上清50 μL を分取(2)

↓

450 μL のメタノールを添加し、ボルテックス(3)

↓

500 μL のクロロホルムを添加し、ボルテックス(4)

↓

200 μL のMillQを添加し、ボルテックス(5)

↓

15,000 \times g、4 $^{\circ}\text{C}$ 、5分間遠心(6)

↓

3層のうち上清200 μL を新しいチューブに移す(7)

↓

遠心エバポレーターで乾燥

↓

0.1M HClの溶媒に溶解し15,000 \times gで遠心

↓

上清をバイアルに移してLC-MSで測定

(今回は10-1000倍希釈しています)

(1)



(2)



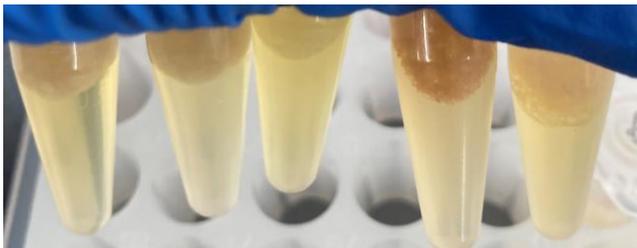
(3)



(4)



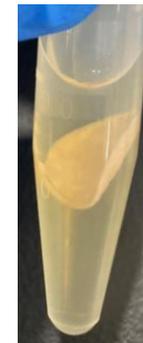
(5)



(6)



(6)



(7)

