

DG2017-31

LC-MSによる 内因性高分子の定量

***Quantitative analysis of
endogenous large molecule substance
by LC-MS***

- 新井 浩司 (LSIメディアイン)
Koji Arai
 - 明石 知也 (田辺三菱製薬)
Tomoya Akashi
 - 上野 聡子 (味の素)
Satoko Ueno
 - 落合 尚子 (大日本住友製薬)
Shoko Ochiai
 - 平本 昌志 (アステラス製薬)
Masashi Hiramoto
 - 水落 正慶 (シミックファーマサイエンス)
Masayoshi Mizuochi
 - 若松 明 (グラクソミスクライン)
Akira Wakamatsu
- Observer
- 酒井 和明 (帝人ファーマ)
Kazuaki Sakai

背景（内因性高分子の定量：昨年と今年の活動）

DG2016-25
（昨年度）

- 前処理方法を中心とした議論
Pretreatment of large molecules
- 絶対定量か、相対定量か？ Absolute or relative
- 酵素消化の方法 Enzyme digestion
- クリーンアップのタイミング Timing of cleanup
- I.S.添加のタイミング Timing of IS spiking

DG2017-31
（今年度）

- データベース&ソフトウェアの活用
Utilizing databases and software
- アミノ酸配列の検索・確認
Searching and confirming the amino acid sequence
- 測定対象ペプチドの選択 Select target peptide fragment
- プレカーサー／プロダクトイオンの選択 Selection of Q1/Q3
- LC-MSとLBA Comparison between LC-MS and LBA

◆ May 2017

- ✓ メンバー募集 Members application

◆ 20 June 2016

- ✓ キックオフ会議 Kick off Face to Face meeting (Waters品川)

◆ July 2017~Jan 2018

- ✓ TC と E-mailの議論 (1 time/Month, TC Total 7 times)
- ✓ Large molecule LC-MSに関するアンケート (Sep 2017) Survey

◆ Nov 2017~Feb 2018

- ✓ アンケート集計 Summarize survey
- ✓ ポスター準備 Posters preparation



解説（公共データベース）

名称	用途・その他
UniprotKB	<input type="checkbox"/> タンパク質の配列DB
Peptide Atlas	<input type="checkbox"/> LC-MS/MSで同定された断片ペプチドのDB
DrugBank	<input type="checkbox"/> 医薬品のDB ⇒抗体医薬品のアミノ酸配列確認

解説（公共のツール）

名称	用途・その他
NCBI Blast	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> アミノ酸配列の相同性検索 <input type="checkbox"/> 定量に用いるペプチドがそのタンパク質に固有のものかどうかを調べることが可能 <input type="checkbox"/> UniprotのBlastより動作が速い（DGメンバー意見）
Peptide Mass	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> タンパク質の理論的消化断片の計算
Protein Prospector	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> タンパク質の理論的消化断片の計算 <input type="checkbox"/> ペプチドの理論的開裂の計算など
ExPasy Proteomics	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 各種データベース、ツールへのリンク集

解説 (ソフトウェア)

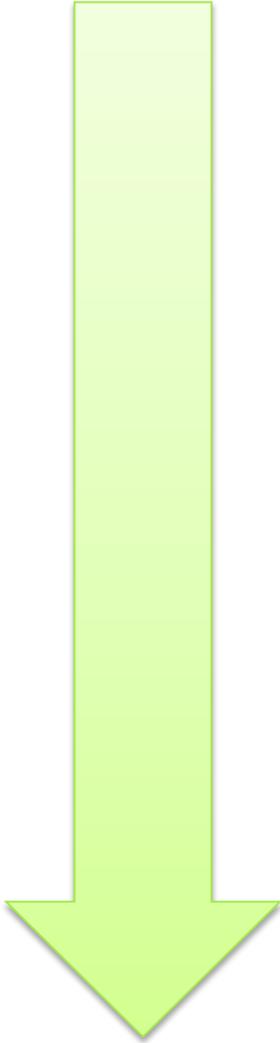
名称	用途・その他
Skyline	<ul style="list-style-type: none"> ❑ SRM/MRM分析支援ソフト (フリーソフト) ❑ タンパク質やペプチドの配列からMRMメソッドの作成など
Mascot Server (Matrix Science)	<ul style="list-style-type: none"> ❑ Data-dependent scanで測定したタンパク質消化物のペプチド配列同定 ❑ タンパク質標品の消化結果から定量対象ペプチドを決定 ❑ Mascot Serverは各質量分析機器メーカーに対応 (フリー試用可能)
Protein Pilot (SCIEX)	
Proteome discoverer (Thermo Fisher Scientific)	
ProteinLynx Global SERVER (Waters)	



アミノ酸配列の検索・確認

Search and confirm amino acid sequence

測定対象ペプチド選択までの流れ



目的タンパク質のアミノ酸配列の確認

- データベースの活用（内因性タンパク質／抗体医薬）

酵素消化で断片化されるペプチド配列の確認

- データベースやソフトウェアの活用

測定に適したペプチド配列の選定

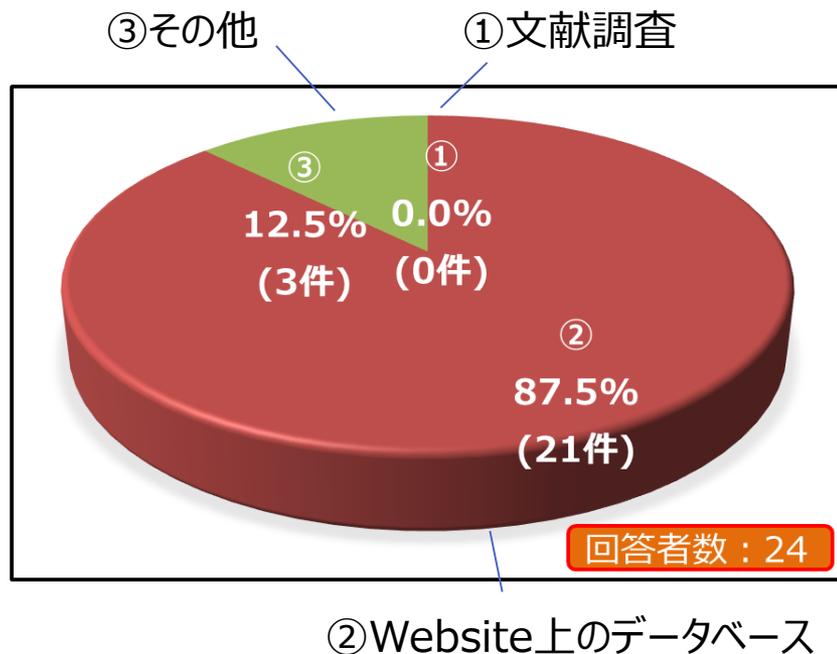
- 構成アミノ酸からの選定
- データベースの活用

実際に測定してみても絞り込み

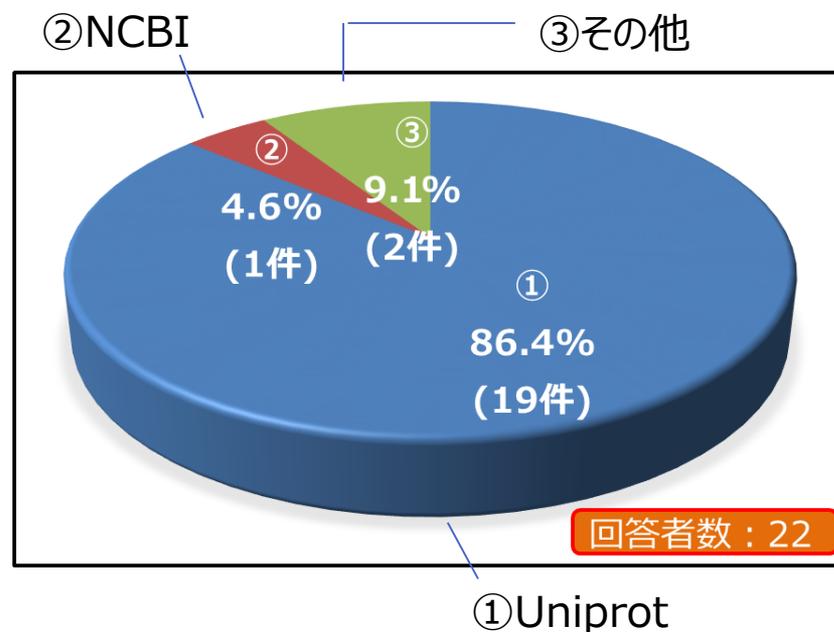
- 感度や保持時間、妨害ピークの確認

内因性タンパク質の場合

アミノ酸配列の確認方法



よく利用するデータベース



<アンケート結果より>

- データベースを活用することがほとんど
- Uniprotが大多数

アンケートQ10 & Q11より

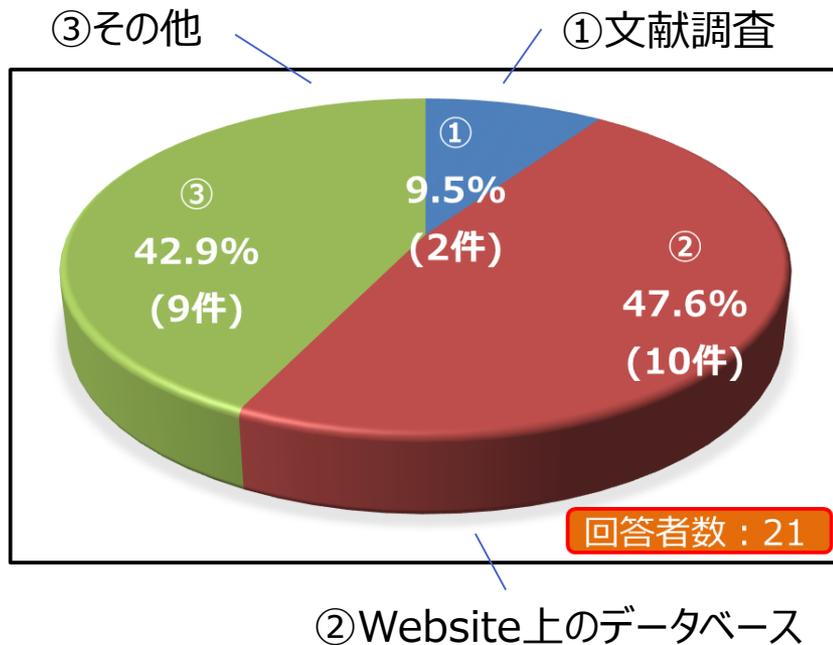
アミノ酸配列確認方法（内因性）

ほとんどの人がデータベースを活用

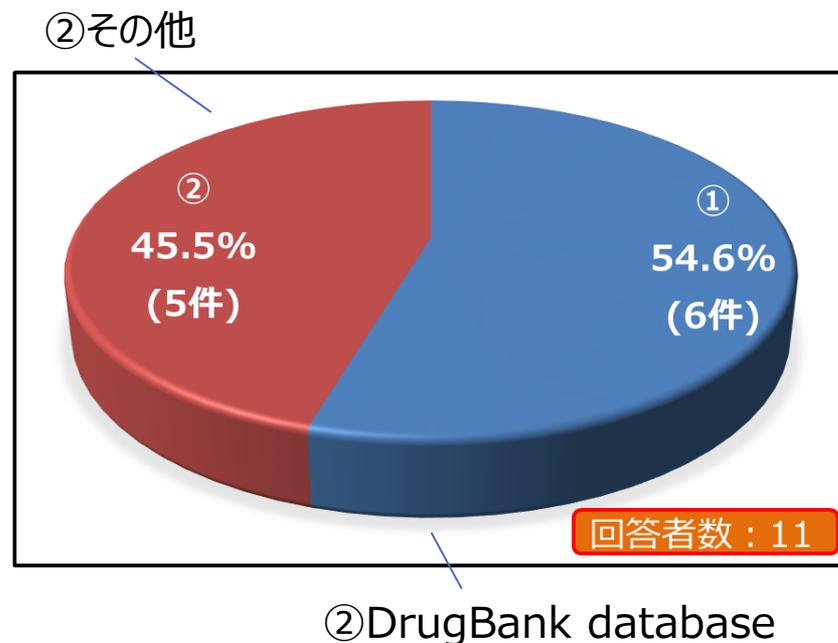
確認によく用いるデータベース	理由
Uniprot	<ul style="list-style-type: none"> ❑ 主にスタンダードなデータベースとして用いられており、汎用性がある ❑ Protein IDがそのまま、多くの別のデータベースや、解析ソフトウェアなどで用いることが出来る ❑ 信頼性、網羅性が高い
NCBI	<ul style="list-style-type: none"> ❑ 他のデータベースを使った経験がないから

抗体医薬品の場合

アミノ酸配列の確認方法



よく利用するデータベース



<アンケート結果より>

- データベース活用がほとんど（その他は社内データベース等）
- DrugBank databaseを活用することが多い

アンケートQ14 & Q15より

社内データベースを除けば
DrugBank databaseを利用している人が多い

DRUGBANK Browse ▾

Sequences

>Anti-HER2 Light chain (1 and 2)
 DIQMTQSPSSLSASVGRVITICRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS
 RFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
 SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>Anti-HER2 Heavy chain (1 and 2)
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKLEWVARIYPTNGYTRY
 ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSS
 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEVPPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
 ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
 WQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

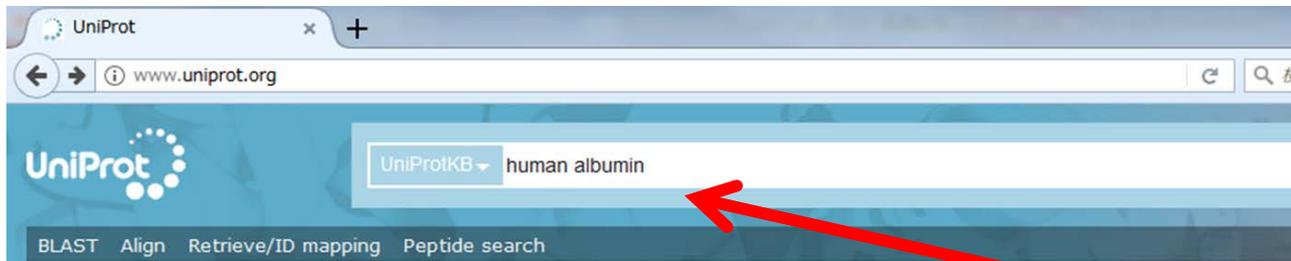
Download FASTA Format

Trastuzumabの
検索結果画面

<http://bioanalysisforum.jp/>

URL: <https://www.drugbank.ca/>

Uniprotの説明・操作画面



The mission of UniProt is to provide the scientific community with a comprehensive, high-quality and freely accessible resource of prote

<p>UniProtKB UniProt Knowledgebase</p> <p>Swiss-Prot (555,594) Manually annotated and reviewed.</p> <p>TrEMBL (90,050,711) Automatically annotated and not reviewed.</p>	<p>UniRef Sequence clusters</p>	<p>UniParc Sequence archive</p>	<p>Proteomes</p>
<p>Supporting data</p> <p>Literature citations</p> <p>Cross-ref. databases</p> <p>Taxonomy</p> <p>Diseases</p> <p>Subcellular locations</p> <p>Keywords</p>			

タンパク質名を入力
(例 : albumin)

URL: <http://www.uniprot.org/>

【Entry】中のコードをクリック

UniProtKB human albumin

Results

1 to 25 of 239 Show 25

Entry	Entry name	Protein names	Gene names	Organism	Length
P02768	ALBU_HUMAN	Serum albumin	ALB GIG20, GIG42, PRO0903, PRO1708, PRO2044	Homo sapiens (Human)	609
P02649	APOE_HUMAN	Apolipoprotein E	APOE	Homo sapiens (Human)	317
P02647	APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	APOA1	Homo sapiens (Human)	267
P02770	ALBU_RAT	Serum albumin	Alb	Rattus norvegicus (Rat)	608

Uniprotの説明・操作画面

配列情報取得

Isoform 1 (identifier: P02768-1) [UniParc] [FASTA](#) [Add to basket](#)

This isoform has been chosen as the 'canonical' sequence. All positional information in the downloadable versions of the entry.

◀ Hide

```

      10           20           30           40           50
MKWVTFISLL FLSSAYSRG VFRDAHKSE VAHRFKDLGE ENFKALVLI
      60           70           80           90          100
FAQYLQQCPF EDHVKLVNEV TEFAKTCVAD ESAENCDKSL HTLFGDKLCT
     110          120          130          140          150
VATLRETYGE MADCCAKQEP ERNECFLQHK DDNPNLPRIV RPEVDVMCTA
     160          170          180          190          200
FHDNEETFLK KYLYEIARRH FYFYAPELLF FAKRYKAAFT ECCQAADKAA
     210          220          230          240          250
CLLPKLDELK DEGRKASSAK RLKCSLQKF GERAFKAWAV ARLSQRFPKA
     260          270          280          290          300
EFAEVSKLVT DLIKVHTECC HGDLLCADD RADLAKYICE NQDSISSKLE
     310          320          330          340          350
ECCEKPLLEK SHCIAEVEND EMPADLPSLA ADFVESKDVC KNYAEAKDVF
     360          370          380          390          400
LGMFLYEYAR RHPDYSVLL LRLAKTYETT LEKCCAAADP HECYAKVFDE
     410          420          430          440          450
FKPLVEEPQN LIKQNCELFE QLGEYKFNQA LLVRYTKRVP QVSTPTLVEV
     460          470          480          490          500
SRNLGKVGSK CCKHPEAKRM PCAEDYLSVV LNQLCVLHEK TPVSDRVTIC
     510          520          530          540          550
CTESLVNRRP CFSALEVDET YVPKEFNAET FTFHADICTL SEKERQIKKQ
     560          570          580          590          600
TALVELVKHK PKATKEQLKA VMDDFAAFVE KCKKADDRET CFAEEGKLV
AASQAALGL
  
```

【FASTA】ファイルをダウンロード

```

>sp|P02768|ALBU_HUMAN Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2
MKWVTFISLLFLSSAYSRGVFRDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPF
EDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEP
ERNECFLQHKDDNPNLPRIVRPEVDVMCTAFHDNEETFLK KYLYE IARRHPYFYAPELLF
FAKRYKAAFT ECCQAADKAA CLLPKLDEL RDEGRKASSAKRLKCSLQKFGERAFKAWAV
ARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECC HGDLLCADD RADLAKYICE NQDSISSKLE
ECCEKPLLEKSHCIAEVEND EMPADLPSLA ADFVESKDVC KNYAEAKDVF LGMFLYEYAR
RHPDYSVLL LRLAKTYETT LEKCCAAADP HECYAKVFDEFKPLVEEPQN LIKQNCELFE
QLGEYKFNQALLVRYTKRVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVV
LNQLCVLHEKTPVSDRVTICCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTL
SEKERQIKKQ TALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKLV
AASQAALGL
  
```

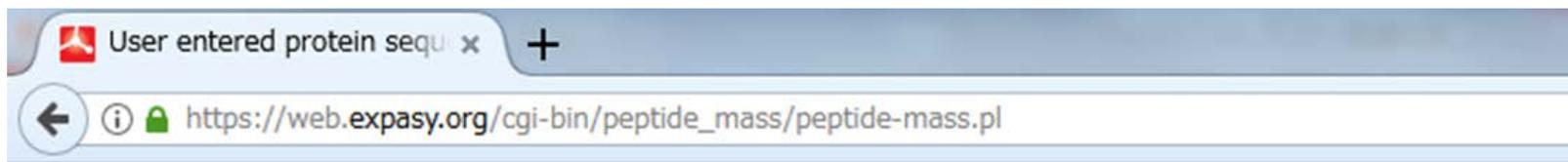
消化ペプチドの配列確認方法

確認方法	補足
Peptide mass	<input type="checkbox"/> タンパク質の理論的消化断片の計算
Peptide Atlas	<input type="checkbox"/> LC-MS/MSで同定された断片ペプチドの <input type="checkbox"/> データベース
Skyline	<input type="checkbox"/> タンパク質・ペプチドの配列からMRMメソッドの作成など
標品を実際に消化して実測	<input type="checkbox"/> 標品が入手可能な場合に限る (抗体医薬の場合など)
手作業でアミノ酸配列から理論消化断片を決定	<input type="checkbox"/> アミノ酸残基数が少ないものであれば可能

データベースやソフトウェアを活用すると便利

消化ペプチドの配列確認例

<PeptideMassを用いた方法>

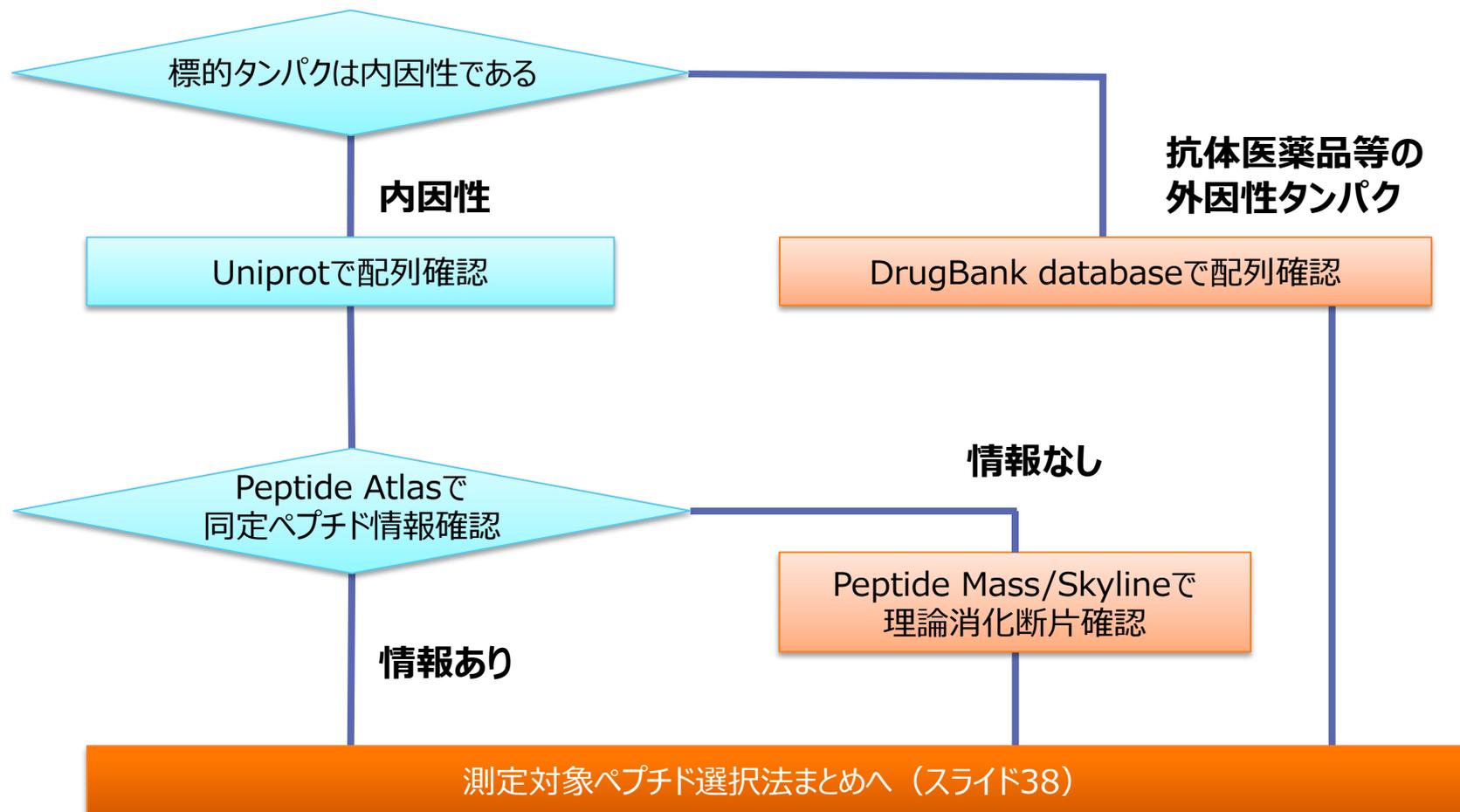


[Theoretical pI: 5.92 / Mw (average mass): 69366.68 / Mw (monoisotopic mass): 69321.49]

mass	position	#MC	modifications	peptide sequence
2917.3229	311-337	0		SHCIAEVENDEMPADLPSLA ADFVESK
2593.2425	139-160	0		LVRPEVDVMCTAFHDNEETF LK
2433.2635	45-65	0		ALVLIAFAQYLQQCPFEDHV K
2404.1709	470-490	0		MPCAEDYLSVVLNQLCVLHE K
2203.0012	525-543	0		EFNAETFTFHADICTLSEK
2045.0953	397-413	0		VFDEFKPLVEEPQNLIK

トリプシン消化断片配列

アミノ酸配列確認方法のまとめ





測定対象ペプチドの選択

Select target peptide fragment

測定対象ペプチドの選択

段階		
(1) 候補抽出 スライド 23-32	定量対象とする ペプチド配列候補を抽出する。 優先順に 右の①～③を用いる	① タンパク質標品を消化し、LC-MSで分析する
		② データベースの参照 実際にLC-MSでペプチドを測定した結果をDBで参照する
		A) 目的タンパク質のLC-MS定量例を文献調査 B) Peptide Atlasを参照する
(2) 適格性の判断 スライド P33-35	抽出したペプチド配列候補が 定量に適するかを判断する	③ <i>in silico</i> での抽出 タンパク質のアミノ酸配列から、理論的な消化断片を発生させる BLASTサーチ等による配列特異性の確認 化学的性質上の適性の確認

候補抽出① 標品の消化

タンパク質標品が入手できるなら、実際に消化してみるのが一番良い

(方法)

タンパク質標品 ➡ 還元&アルキル化 ➡ トリプシン消化

➡ LC-MS/MS (Data-dependent scanで測定)

➡ アミノ酸配列解析

(Mascot等のソフトがあると簡便, なければ理論的トリプシン断片一覧表と照合)

つまり、プロテオミクスで行われる測定を行い、MSクロマトグラム上のピークのペプチド配列をアサインする

強度が一番高いピークが適当な鎖長であれば、それを選べばほぼ問題ない。

念のため、選んだ配列が定量したいタンパク質に特異的な配列かどうか調べる

Peptide Atlas (<http://www.peptideatlas.org/>)

LC-MSで同定されたペプチドのデータベースで、各タンパク質ごとにどのような断片ペプチドが良く分析されたのを推測することができる

Peptide Atlas is a multi-organism, publicly accessible compendium of peptides identified in a large set of tandem mass spectrometry proteomics experiments. [More...](#)

PeptideAtlas Chromosome Explorer (Human only)

SRMAtlas interface for selection of best available SRM transitions

PeptideAtlas Raw Data Repository

PeptideAtlas SRM Experiment Library (PASSEL)

PeptideAtlas and the Chromosome-Centric Human Proteome Project

Top画面から
タンパク質名称を入力
(Uniprotで最も適切な
名称を選ぶ)
Input protein name
(refer uniprot)

Search All Builds Current Build Queries SRMATlas PTPAtlas Submission SWATH/DIA

Example: CCL2 protein



Input protein name (Uniprot)
&
Choose appropriate entry

CCL2 QUERY

Build type: Any

- Exact Match
 Tabular Results
 Advanced Search

(e.g. [ENSP00000374576](#), [IPI00807403](#), [NP_001366](#), [Hs.232375](#), [RBP](#), [RBP4](#), [helicase](#), [P06634](#), [MCCC2](#), [PAp00000097](#), [AAVEEGIVLGGGCALLR](#))

Exact search results:

Protein hits

⊕ Human: CCL2 - find 4 identifiers in 25 builds , observed <= 53 times

⊖ Mouse: CCL2 - find 2 identifiers in 1 build , observed <= 154 times

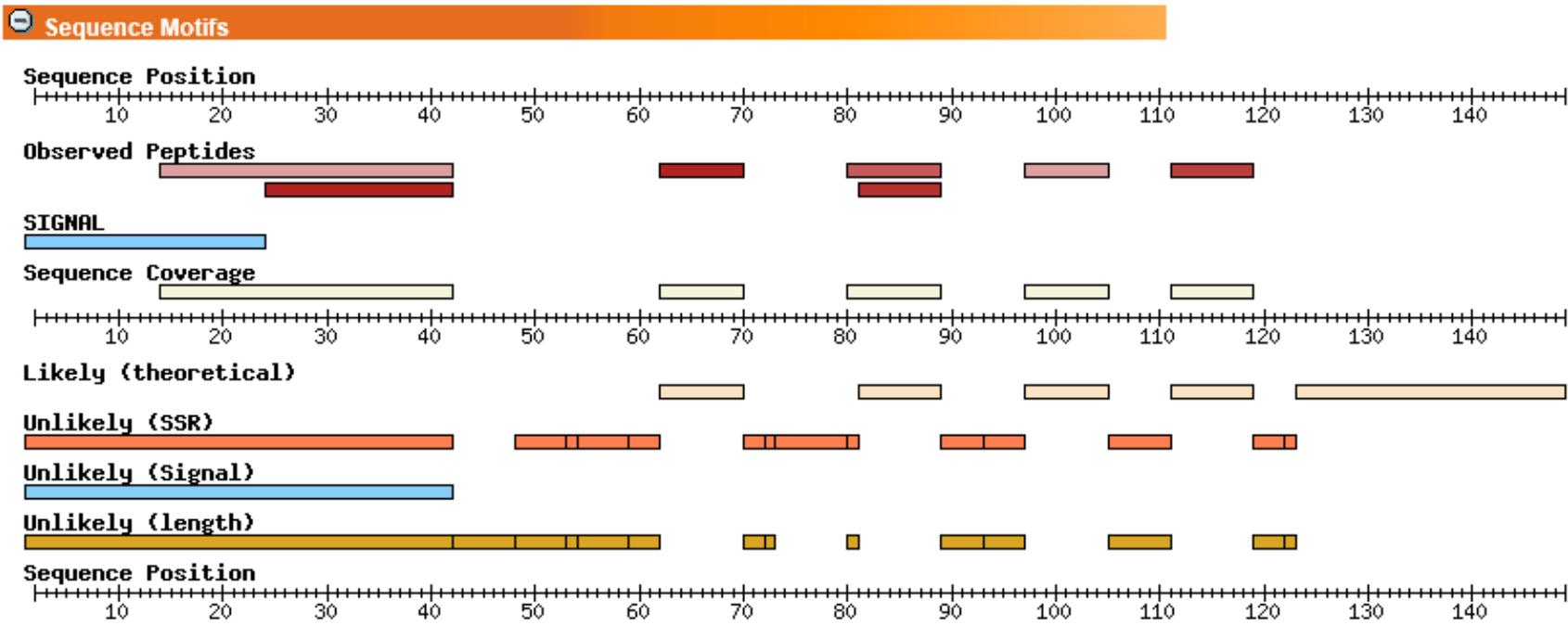
Search Key	Build Type	Identifier	resource_type	N PSM obs	Protein Level
Ccl2	Mouse	ENSMUSP00000000193	Ensembl Protein	154	identical to Q5SVU3
Ccl2	Mouse	P10148	UniProt	85	NTT subsumed by

⊕ Rat: CCL2 - find 2 identifiers in 1 build , observed 0 time

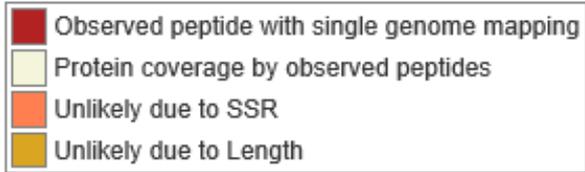


候補抽出② DB情報参照

Sequence motifs view



Peptides observed by LC-MS/MS (red bar)



<http://bioanalysisforum.jp/>

Sequence view

Sequence

Sequence Display Mode: Trypsin

MQVPVMLLGLLFTVAGWSIHVLAQPDVAVNAPLTCCYSFTSK MIPMSR LESYK R ITSSR CPK EAVVFVTK LK
 R EVCADPK K EWVQTYIK NLDNR NQMR SEPTTLFK TASALR SSAPLNVK LTR K SEANASTTFSTTTSSSTSVGVTSVTVN

Peptide observed by
 LC-MS/MS is shown in red.

Annotated Variants from Swiss Prot (see [neXtProt](#) annotations)

Type	Num	Start	End	Info
Signal	1	1	23	
Chain	1	24	148	C-C motif chemokine 2
SNP	1	50	50	S -> G (in strain: SJL/J)
SNP	2	92	92	R -> Q (in strain: SJL/J)

Annotations in Sequence Context:

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110

Primary: MQVPVMLLGLLFTVAGWSIHVLAQPDVAVNAPLTCCYSFTSKMIPMSRLESYKRITSSRCPKEAVVFVTKLKREVCADPKKEWVQTYIKNLDNRNMRSEPTTLFKTASALRSS

Signal_1: MQVPVMLLGLLFTVAGWSIHVLA

Chain_1: -----QPDVAVNAPLTCCYSFTSKMIPMSRLESYKRITSSRCPKEAVVFVTKLKREVCADPKKEWVQTYIKNLDNRNMRSEPTTLFKTASALRSS

SNP_1: -----LEGYK-----

SNP_2: -----NLDNRNMRSEPTTLFK-----

ModifiedResidues: MQVPVMLLGLLFTVAGWSIHVLAQPDVAVNAPLTCCYSFTSKMIPMSRLESYKRITSSRCPKEAVVFVTKLKREVCADPKKEWVQTYIKNLDNRNMRSEPTTLFKTASALRSS

TrypticSites: -----K-----R---KR---R-K-----K-KR-----KK-----K--R--R-----K---R---

Protein Coverage = 41.2% (51.2% of likely observable sequence)

100 110 120 130 140

-----|-----|-----|-----|-----|

EPTTLFKTASALRSSAPLNVKLTRKSEANASTTFSTTTSSSTSVGVTSVTVN

-----|-----|-----|-----|-----|

EPTTLFKTASALRSSAPLNVKLTRKSEANASTTFSTTTSSSTSVGVTSVTVN

-----|-----|-----|-----|-----|

In the web, you can scroll this
 bar to see entire sequence.



候補抽出② DB情報参照

Distinct Observed Peptides (7)

Peptide information

show column descriptions

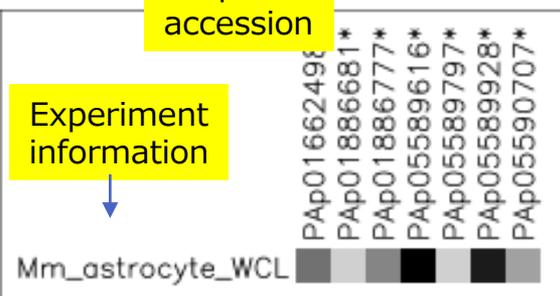
Accession	Pre AA	Sequence	Fol AA	ESS	NET	NMC	Best Prob	Best Adj Prob	N Obs	EO
PAP05589616	-	QPDAVNAPLTCCYSFTSK	M	1.00 [ntt]			1.000		41	1.00
PAP05589928	K	EAVFVTK	L	0.89 [ntt]			1.000		27	1.00
PAP01662498	K	EWVQTYIK	N	0.72 [ntt]			1.000		7	1.00
PAP01886777	R	SSAPLNVK	L	0.71 [ntt]			1.000		5	1.00
PAP01886681	R	SEPTTLFK	T	0.65 [ntt]			0.993		1	1.00
PAP05590707	K	KEWVQTYIK	N	0.46 [mc,ntt]			1.000		3	1.00
PAP05589797	T	VAGWSIHVLAQPDAVNAPLTCCYSFTSK	M	0.13 [ntt]			0.994		1	1.00

Number of Observation by LC-MS

Sample peptide map:

Per-experiment expression for 40 most highly observed peptides

Peptides listed by accession, * denotes single genome mapping)



Density means No. of observation
In this case, animal and organ is shown (left),
link to reference is also shown (below)

Sample ID	Sample Title	Publication
6480	Mm astrocyte WCL	Han et al. (2014)

http://bioanalysisforum.jp/



候補抽出② DB情報参照

Information of each peptide

PAp05589928

Peptide Accession	PAp05589928
Peptide Sequence	EAVVFVTK
Best Probability	1.00
Times Observed:	27

Link to Product ion spectrum

Individual Spectra

show column descriptions
[\[Show more rows\]](#)

MS instrument

Fragmentation

Download as: [TSV](#)

Modified Sequence	Chg	Smpl	Instr	Prob	Spectrum Name	Avg Eval	Fragmentation Type	Spectrum
EAVVFVTK	2	6480	QExactive	1	20130530_C8D1A_secretome_set1_F3_1.06763.06763.2	n/a	HR HCD	
EAVVFVTK	2	6480	QExactive	0.997	20130530_C8D1A_secretome_set1_F3_2.06975.06975.2	n/a	HR HCD	
EAVVFVTK	2	6480	QExactive	1	20130530_C8D1A_secretome_set1_F3_2.06990.06990.2	n/a	HR HCD	

http://bioanalysisforum.jp/



候補抽出② DB情報参照

Product ion spectrum

EAWFVTK, MH+ 892.5138, m/z 446.7606

File: 20130530_C8D1A_secretome_set1_F3_1.06763.06763.2, Scan: 6763, Exp. m/z: 446.76054896688, Charge: 2

Ions:

a 1+ 2+ 3+

b 1+ 2+ 3+

c 1+ 2+ 3+

x 1+ 2+ 3+

y 1+ 2+ 3+

z 1+ 2+ 3+

[\[Deselect All\]](#)

Neutral Loss:

NH₃ (*)

H₂O (o)

H₃PO₄ (p)

Immonium ions

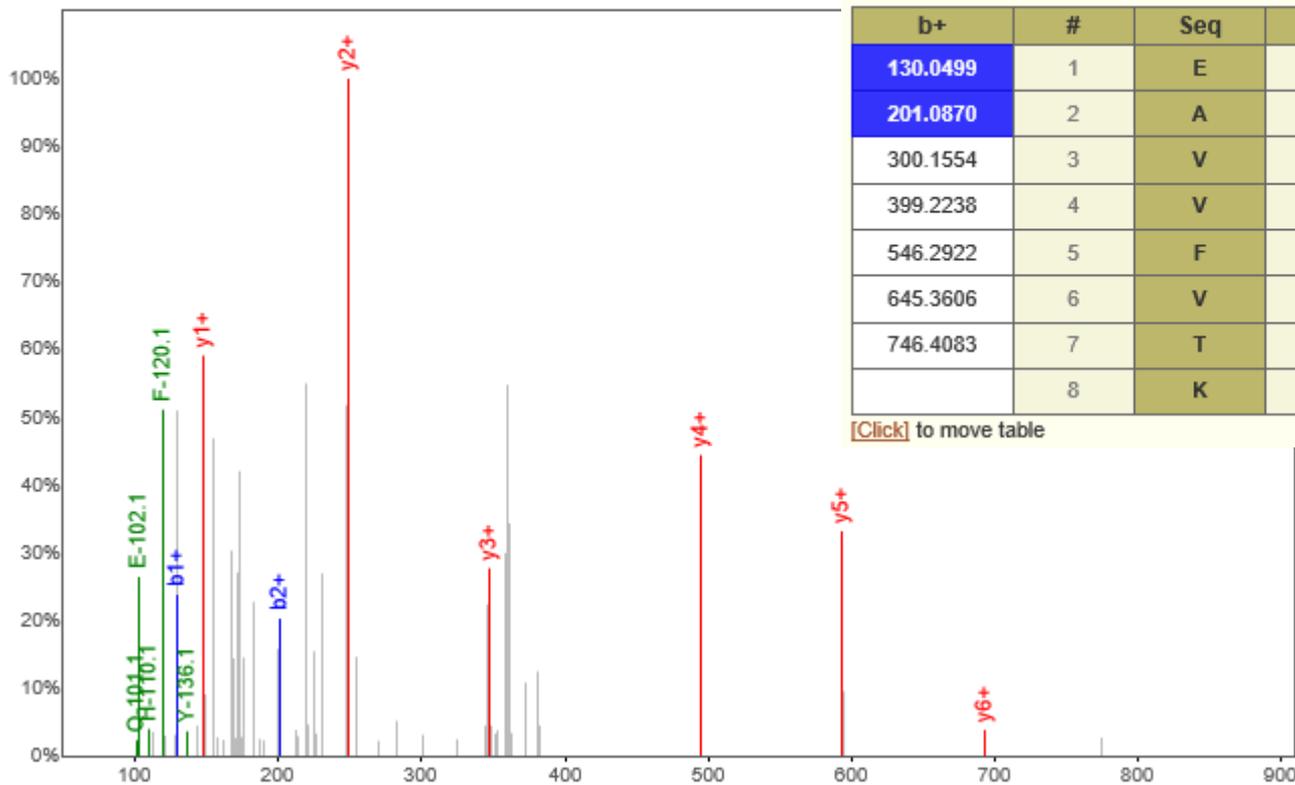
Reporter ions

Mass Type:

Mono Avg

Mass Tol:

Peak Assignment



b+	#	Seq	#	y+
130.0499	1	E	8	
201.0870	2	A	7	763.4713
300.1554	3	V	6	692.4341
399.2238	4	V	5	593.3657
546.2922	5	F	4	494.2973
645.3606	6	V	3	347.2289
746.4083	7	T	2	248.1605
	8	K	1	147.1128

[\[Click\]](#) to move table

<http://bioanalysisforum.jp/>

候補抽出③ *In Silico*抽出

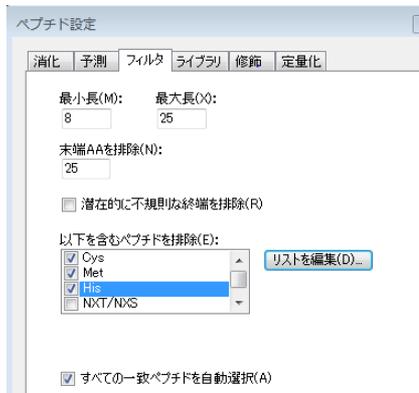
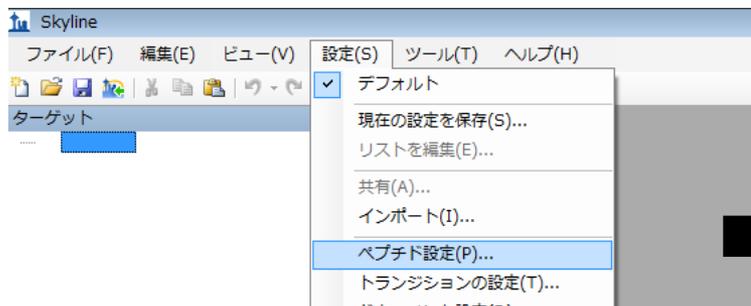
Skyline (free software)

is the most favorable among many other method and tools

https://skyline.ms/wiki/home/software/Skyline/page.view?name=tutorial_method_edit_ja

- 「ペプチド設定」・「トランジション設定」にてクライテリアを設定

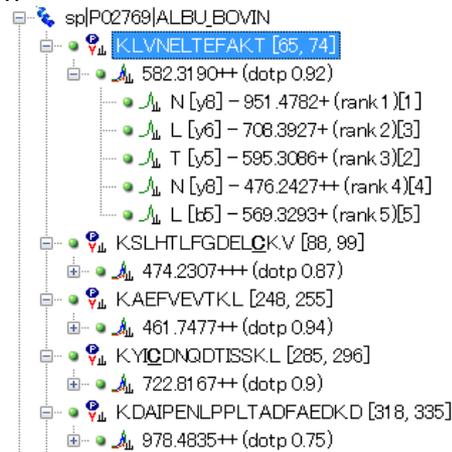
Fix the criteria to select peptide and transition



- FASTA形式のタンパク配列を貼り付けると消化産物とそのトランジションが表示される。

Input the protein sequence in FASTA format, peptide sequence and its transition will be shown

```
>sp|P02769|ALBU_BOVIN Serum albumin OS=Bos taurus GN=ALB PE=1 SV=4
MKVWVTFISLLLLFSSAYSRGVFRDRDTHKSEIAHRFKDLGEEHFHGLVLIASFQYLQQCPF
DEHVKLVNELTEFAKTCVADESHAGCEKSLHTLFGDELCKVASLRETYGDMADCEKQEP
ERNECFLSHKDDSPDLPKLKPDPNTLCDEFKADEKFFWGYKLYEARRHPFYAPELLEY
ANKYNGVFQECQAEDKGACLLPKIETMREKVLASSARQLRCASIQKFGGERALKAWSV
RLSQKFPKAEFVEVTKLVDLTKVHKCECHGDLLECCADDRADLAKYICNDQDTISSKLE
CCDKPILLEKSHCIAEVEKDAIPENLPLTADFAEDKDVCKNYQEAQDAFLGDFLYEYSRR
HPEYAVSVLLRLAKEYEATLECCAKDDPHACYSTVFDKHLKLVDEPQNLIKQNCQDFEK
LGEYGFQNALIVRYTRKVPQVSTPTLVEVSRSLGKVGTRCCTKPESEMRMPCTEDYLSLIL
NRLCVLHEKTPVSEKVTCCCTESLVNRRPCFSALTPDETYVPKAFDEKLFTFHADICTLP
DTEKQIKQTALVELLKHKPKATEEQLKVTVMENFVAFVDKCCAADKKEACFAVEGPKLVV
STQTALA
```



適格性の判断 配列特異性

定量するペプチドが目的のタンパク質に固有なことの確認方法

How to confirm the peptide for quantitation is characteristic to the target protein

BLAST Search (NCBI)

を用いる方法

PubmedのWeb下方
Blastへのリンクから
"Protein Blast"

右赤字部を入力して
BLASTボタン押下

BLAST[®] >> blastp suite

Standard Protein BLAST

blastn blastp **blastx** tblastn tblastx

BLASTP programs search protein databases using a protein query sequence

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) [Clear](#)

VATVSLPR|

Input peptide sequence

Query subrange

From

To

Or, upload file

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search

Align two or more sequences

Define the database (Uniprot will be fine)

Choose Search Set

Database

Organism Exclude

Optional Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown.

Exclude Models (XM/XP) Uncultured/environmental sample sequences

Optional

Entrez Query [YouTube](#) [Create custom database](#)

Optional Enter an Entrez query to limit search

http://bioanalysisforum.jp/



適格性の判断 配列特異性

BLAST result

Ident (Identity of residue)

Query cover (Identity of length)

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	RecName: Full=Trypsin; Flags: Precursor	26.9	26.9	100%	0.097	100%	P00761.1
<input type="checkbox"/>	RecName: Full=Anionic trypsin; Flags: Precursor	24.8	24.8	100%	0.55	88%	P06872.1
<input type="checkbox"/>	RecName: Full=Cationic trypsin-3; AltName: Full=Cationic trypsin III; AltName: Full=Pretrypsinogen III; Flags: Precursor	24.4	24.4	100%	0.79	88%	P08426.1
<input type="checkbox"/>	RecName: Full=Trypsin-4; AltName: Full=Pretrypsinogen IV; AltName: Full=Trypsin IV; Flags: Precursor	24.4	24.4	100%	0.79	88%	P12788.1
<input type="checkbox"/>	RecName: Full=DENN domain-containing protein 4C	21.0	21.0	87%	13	86%	A6H8H2.1
<input type="checkbox"/>	RecName: Full=Anionic trypsin-2; AltName: Full=Anionic trypsin II; AltName: Full=Pretrypsinogen II; AltName: Full=Serine	21.0	21.0	87%	13	86%	P00763.2

“Query cover” と “Ident” 両方100%のものが1つしかなければ、その配列は1つのタンパク質に固有である。

When there is only one entry shows 100% both “Query cover” and “Ident”, the sequence is characteristic to the target protein

Isoformがいくつかヒットしても、元のタンパク質が同じ名前なら固有配列と考えてよい (Isoformそのものを区別したい場合を除く)

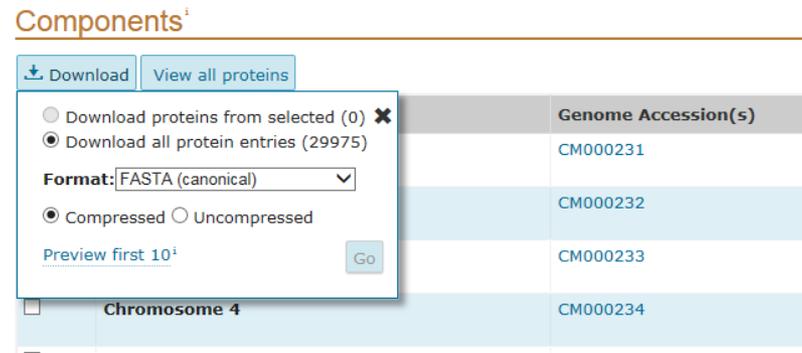
If some isoforms are shown we can consider “characteristic” as long as protein names are same except that we want to distinguish the isoforms.

適格性の判断 配列特異性

<Skylineを用いた方法>

https://skyline.ms/wiki/home/software/Skyline/page.view?name=tutorial_method_edit_ja

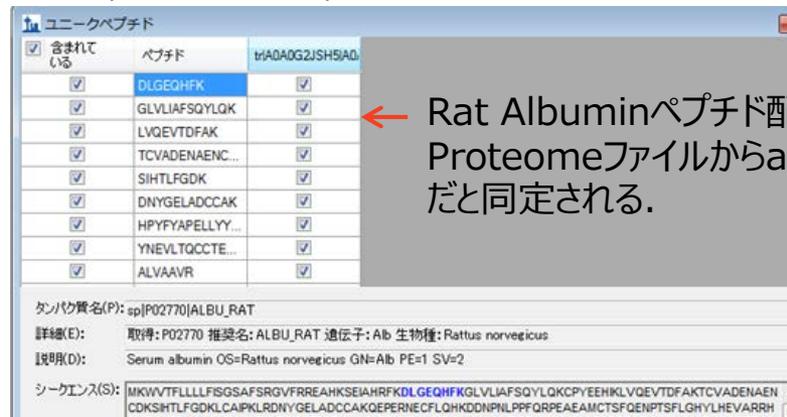
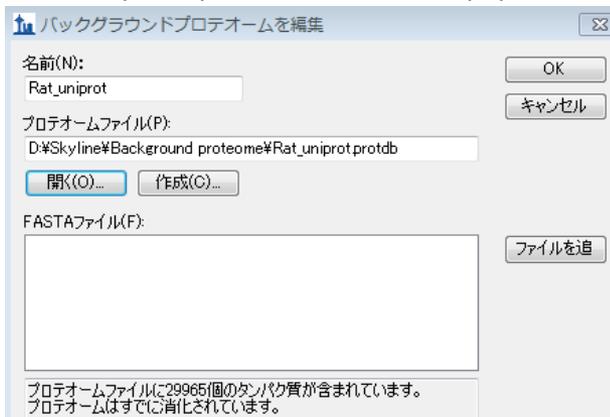
- Uniprotから目的動物種のproteomeファイル入手する。 <http://www.uniprot.org/proteomes/>
Get proteome files of target species from uniprot



<http://bioanalysisforum.jp/>

- Proteomeファイルをskylineにて取り込み、編集→ユニークペプチドを選択すると、タンパクとproteomeのタンパクリストとの配列の一致を確認できる。

We can compare quantitate candidate peptide with protein sequence from the proteome files



<Necessary conditions>

- アルギニンまたはリジン残基がC末端である、trypsin消化ペプチド断片
- 6～16アミノ酸のペプチド配列
- メチオニンまたはシステイン残基を含まない
- 翻訳後修飾およびSNPを含まない
- アルギニン、リジン残基が連続しない(RR, KK, RK, KR)
- プロリン残基がC末端のアルギニン、リジン側に存在しない(KP,RP)
- 膜貫通領域に存在しない（膜タンパク）

<Sufficient conditions>

- ヒスチジン残基を含まない
- グリシン・プロリン残基を含む
- LCの溶出時間が構成アミノ酸の脂溶性から予測可能
- 構成されるアミノ酸のうち、脂溶性アミノ酸が40%以下

Fluids Barriers CNS. 2013 Jun 8;10(1):21

測定対象ペプチドの選択（抗体医薬品）

抗体医薬品の場合は標品を用いることができる。標品の消化しペプチドの検出・ブランクマトリックスを用いた特異性確認が可能。

可変領域

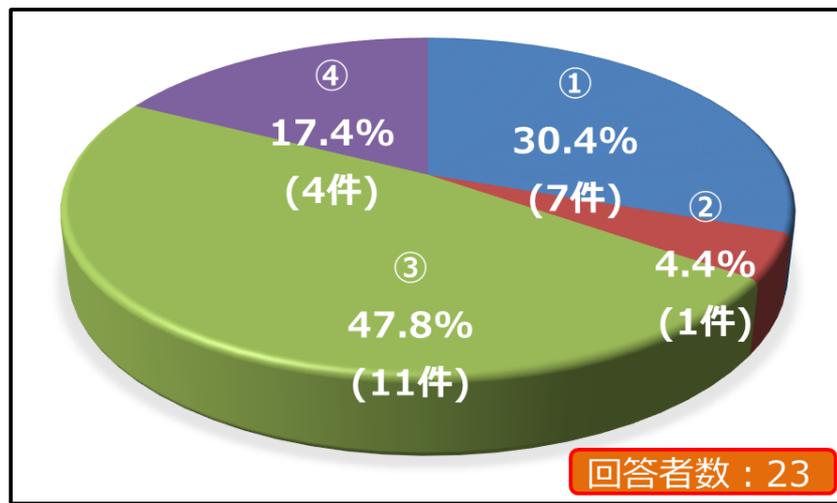
- マトリックス・抗体医薬品が同種由来の場合でも特異性を持たせられる。
- 特異性を確認するためのBLAST検索・ブランクマトリックスを用いた検討が必要。

定常領域

- 種が異なる場合には好適。
- 定量に適した配列情報がある。
- マトリックス・抗体医薬品が同種由来の場合は定量対象抗体に対するアフィニティー精製が必要である。（コスト高）
- 高感度なペプチド配列の報告あり。 *Bioanalysis*. Jun;5(11):1363-76 (2013)

測定対象ペプチドの選択（抗体医薬品）

抗体医薬品定量で使用する定量部位

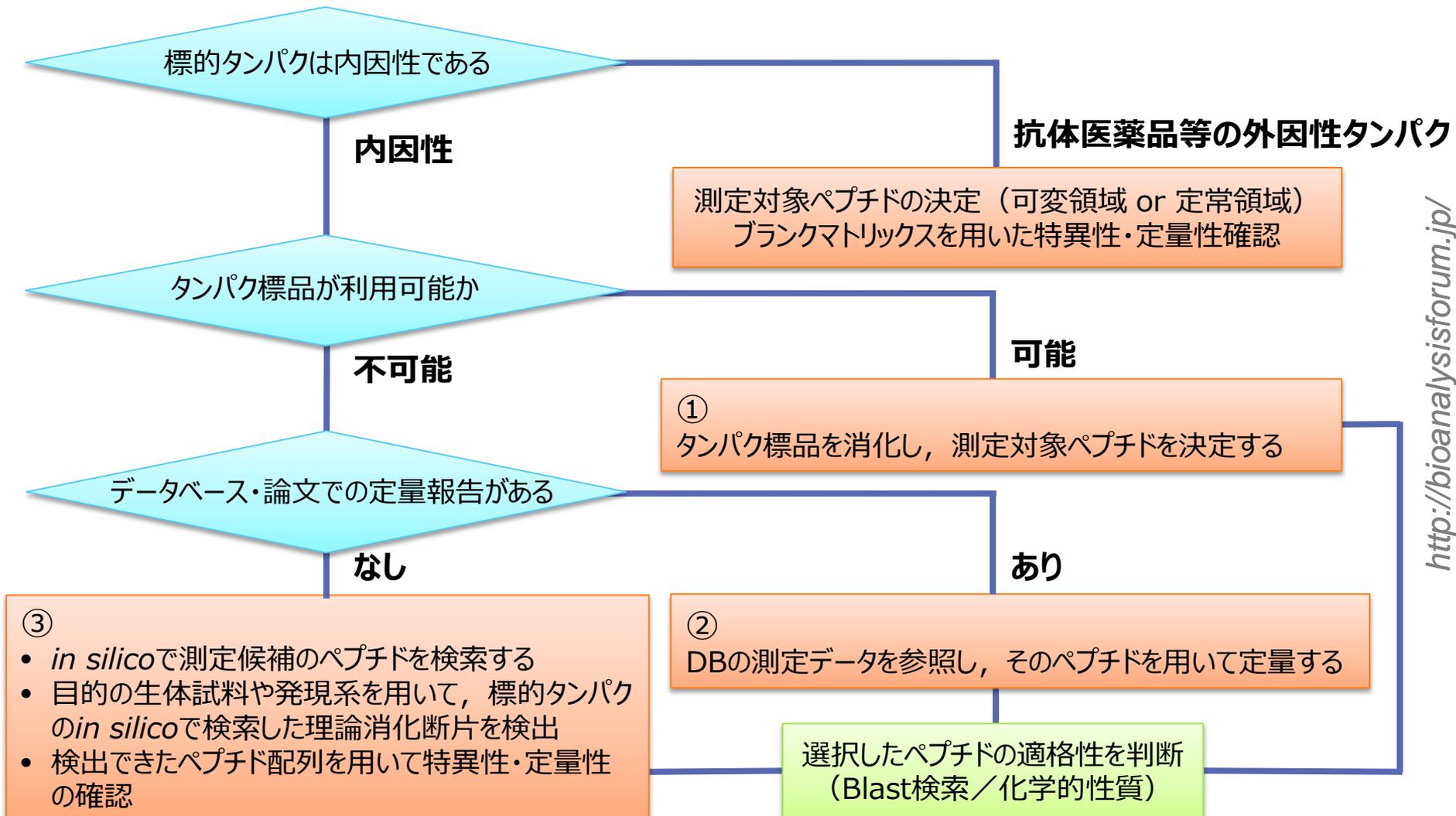


- ① 可変領域
- ② 定常領域
- ③ 可変領域・定常領域、両方
- ④ その他

➤ 特異的である可変領域の選択が多い。

アンケートQ16より

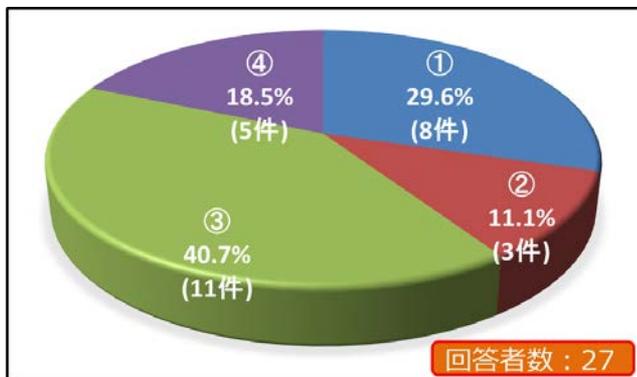
測定対象ペプチド選択方法のまとめ



測定対象ペプチドの候補数

標的タンパク定量情報	候補数	補足
既知情報がない場合	3～5本程度	ペプチドの合成品を購入し、測定条件設定後実マトリックスを消化・測定してみる。
既知情報がある場合	1本でも可	Peptide atlasや参考文献のデータに載っていれば、1本で十分定量が可能。

定量で用いるペプチド本数



- ① 1本
- ② 2本
- ③ 目的により変更する
- ④ その他

➤ 複数本使用するという回答では、定量性・特異性を担保するために複数ペプチドをモニターするという意見が多かった。

アンケートQ25より

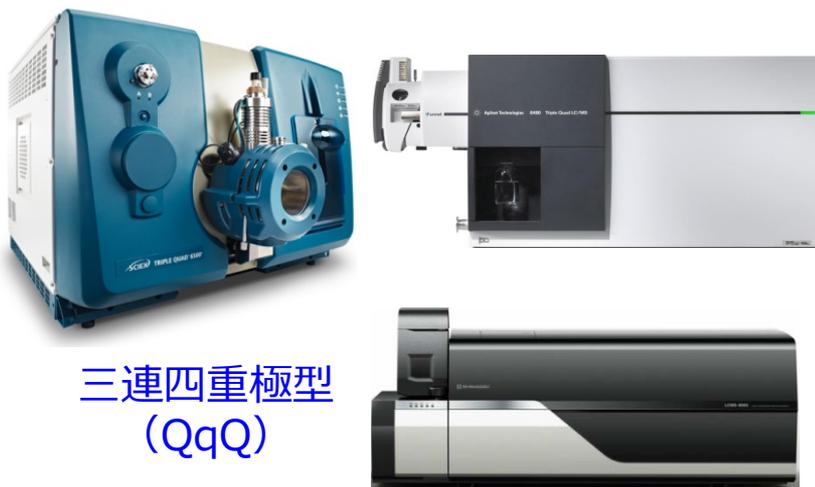


プレカーサー／プロダクトイオンの選択

Selection of precursor / product ions

定量に使用するMSの種類

四重極MS



三連四重極型
(QqQ)

m/zによりイオンを選択的に透過するマスフィルターとしての四重極2本の間には衝突室としての四重極1本を配置したタイプの質量分析計

高分解能MS



飛行時間型
(TOF)

Kingdon trap型・
Orbital trap型

m/zの違いによる検出器までの到達時間の違いを利用するTOF型や電場や磁場により発生させた周回運動の周期からm/zを検出するKingdon trap型, フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴 (FT-ICR) など

Scanモードの解説

- **SIM (Selected ion monitoring)** :
特定の m/z をもつイオンのみを検出するモード。 Precursor ion scanとも呼ばれます。
- **SRM (Selected reaction monitoring)** :
Precursor ionから生成した特定のProduct ionを検出するモード
- **MRM (Multiple reaction monitoring)** : SRMに同じ
- **Product ion scan** :
特定の m/z を持つイオン (Precursor ion) から生成したイオンのspectrum (Product ion spectrum) を得るモード
- **PRM (Parallel reaction monitoring)** :
Product ion scanの一種でscan (掃引, スイープ) ではなく同時に全 spectrumを得る機種 (主に高分解能MS) に対して用いる用語

Scanモードの解説

- **Data dependent analysis (DDA, Data dependent scan, Data dependent MS/MS)** :
 - ① LCで分離したペプチドイオン全てを設定した m/z 範囲で高分解能Full scan
 - ② ①で強度が高かった上位数個のprecursor ionを四重極で選択しコリジョンセルに導入し、各々のProduct ion spectrumを取得する。以降①②を繰り返す。強度が弱いprecursor ionは取りこぼす可能性がある。
- **Data independent analysis (DIA, Data independent MS/MS, SWATH, All ion fragmentation)** :

予め決めた観測範囲を数Da幅に区切り、その範囲のprecursor ionを全てコリジョンセルに導入しproduct ion spectrumを得る。区切り順にScanし観測範囲の全precursor ionに対するproduct ion spectrumが得られる。ただし、Product ion spectrumには複数のprecursor ionから生じたfragmentが記録されるため、解析には予めDDA法で取得したproduct ion spectrumのライブラリが必要である。観測できた全てのペプチドを一度に定量できるが、解析は複雑になる。

質量分析装置の特徴：タンデム型四重極

Pros

- データポイント不足の恐れが少ない
⇒1transitionあたりのscanが短い
- 普及度が高い
⇒低分子化合物の定量で利用されている
- 高分解能MSより高感度
- 異なる装置間でほぼ同様に定量可能

Cons

- 設定したtransition以外の情報は取得できない
⇒測定後にフラグメントの確認ができない
- m/z の上限が低い
⇒高感度な装置でも m/z 2000程度が限界
- 分解能が低い
⇒1.0~0.3程度のため、価数違いの夾雑が重なりやすい
- バックグラウンドが高い傾向にある
- LCやMS条件検討が必須

質量分析装置の特徴：高分解能MS

Pros

- m/z レンジが広い
- 精密質量定量
⇒高選択性
- Full scan定量が可能
⇒測定後にフラグメント確認が可能
- メソッドの構築が容易
⇒プレカーサーのみ選択すればよい
- PRMやSIMでも定量が可能
- Data dependent scanが可能
- S/Nが高いため、Transitionの合算がしやすい

Cons

- データ容量が大きい
- Scan速度が遅い
⇒Kingdon trap型の特徴
⇒データポイント数が少なくなる
- 定量性に懸念あり
⇒ダイナミックレンジとして、 10^4 が限界、 10^5 は飽和領域

プレカーサーイオンの選択

1. ホールタンパク質/ホールタンパク質合成品を使用する場合
酵素消化等の前処理を行い, MS分析を行う.

着目点	タンDEM四重極	高分解能MS
強度の高いペプチドを選択する	<ul style="list-style-type: none"> ➤ データベースや文献から想定したトランジションを設定して確認する ➤ 2価のプレカーサーイオンが優先的に検出されることを想定してトランジションを組む ➤ 価数違いで複数のトランジションを設定して確認する ⇒ 選択性が悪いため 	Data dependent scanから確認する

プレカーサーイオンの選択

1. ホールタンパク質/ホールタンパク質合成品を使用する場合（続き）

着目点	タンDEM四重極	高分解能MS
保持時間が適当なペプチドを選択する	親水性が高いペプチド，疎水性が高いペプチドは候補から外す ⇒ 逆相系の保持時間は，親水性が早く，疎水性が遅いため ⇒ ペプチド中の疎水性アミノ酸含有率から判断することもある	
長さが妥当なペプチドを選択する	分子量の目安は800～2000程度 ⇒ 装置のm/zレンジ内に入るようにする	
価数が低いペプチドを選択する	2価 > 3価 > 4価の順に選択する ⇒ 価数が大きいものはプロダクトイオンが複雑化し，強度が分散するため，感度が落ちる傾向にある ⇒ チューニングを行い，2価イオンの強度を上げる ⇒ 装置により，検出価数が異なることがある	

プレカーサーイオンの選択

2. 合成ペプチドを使用する場合

測定するタンパク質の標品が入手できないときの対策

- 着目点は、「ホールタンパク質/ホールタンパク質合成品を使用する場合」と同様
- 合成ペプチドは複数用意することが望ましい
 - 測定候補のペプチドの実測の感度を確認して、選定するため
 - 予備検討を効率的に実施するため
 - 1つずつの購入の場合、合成→納品に時間がかかってしまう
 - 実マトリックスの影響を確認するため
 - マトリックス効果や夾雑物の影響などを判断する
- 価数違いで確認を行う
 - 保持時間とスペクトルパターンから目的物質であることを確認

プロダクトイオンの選択

1. トランジションの選定方法

着目点	確認事項及び理由
強度が高いプロダクトイオンを選択する	プロダクトイオンの実測データから判断する
プレカーサーイオンの m/z よりも大きいプロダクトイオンを選択する	S/N比が高くなり、ベースラインが低くなるため、特異性が高くなる
アミノ酸の帰属が可能なものを選択する	帰属不可のピークは選択しない
yイオンを選択する	<ul style="list-style-type: none"> イオントラップ型や高分解能型はyイオンを検出しやすい KもしくはRをラベル化したISを用いる場合には、ISとAnalyteのプロダクトイオンが異なるので干渉しにくい

プロダクトイオンの選択

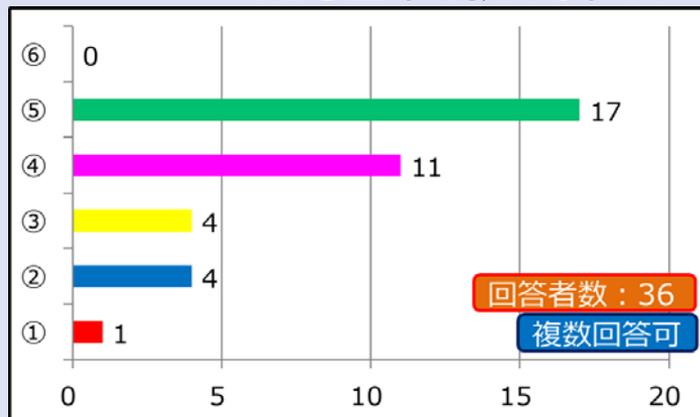
2. トランジションの設定数

ステージ	着目点
メソッド構築	<ul style="list-style-type: none"> • 可能な限り, たくさんのトランジションを設定した方がよい • ピークのデータポイント数は気にしない • Skylineなどのソフトを上手に活用し, 手間を省く
実マトリックスを用いた検討	<ul style="list-style-type: none"> • 定量に使用するモノも含めて, 最低3トランジションを設定する ただし, バリデーションを実施し, 1トランジションでも測定可と判断した場合, 1トランジション設定でも構わない • 複数トランジションの保持時間、強度比パターンから Analyte であることを確認する • 高分解能MSは測定後に検証できることから複数トランジションを設定する必要はない

測定法の検証

- 標品を添加した実マトリックスや代替マトリックスを前処理し、分析を行う
- 感度, 夾雑物質との分離, ピーク形状, キャリーオーバー, 保持時間や S/N比などを総合的に判断してトランジションを決定する
- 測定法の妥当性評価は, BMVガイドラインに倣って目的に応じた評価を実施する

アンケートQ13より： LC-MS/MSにて抗体医薬品の定量分析を実施した時の目的、
適応基準を教えてください。（複数回答可）



- ① GLP適用の定量試験
(バリデーション試験含む)
- ② 信頼性基準適用の定量試験
(バリデーション試験含む)
- ③ 適応規制なしの定量試験
(バリデーション試験含む)
- ④ 探索、検討レベル
- ⑤ 経験なし
- ⑥ その他

I. 使用する装置を選択

II. プレカーサーイオンの選択

- ① 強度
- ② 保持時間
- ③ 長さ
- ④ 価数

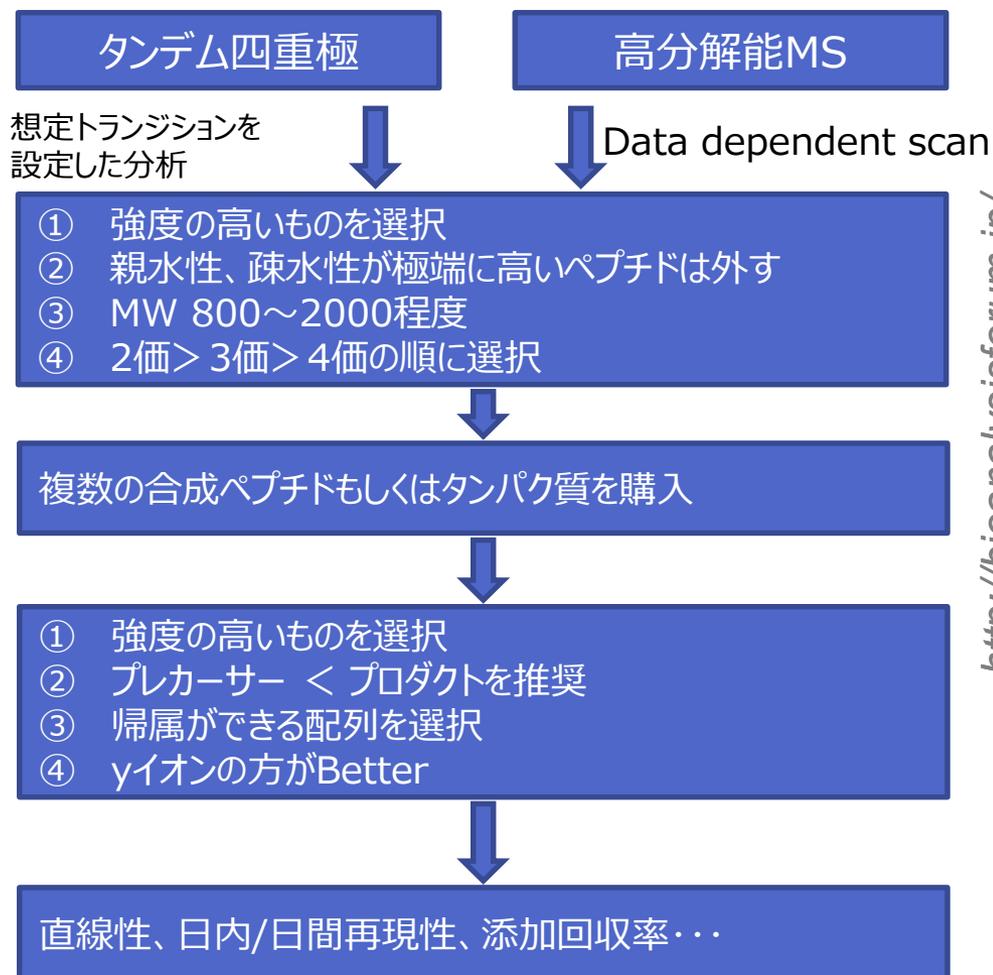
III. タンパク質・合成ペプチドの購入

IV. プロダクトイオンの選択

- ① 強度
- ② m/z
- ③ アミノ酸帰属
- ④ yイオン or bイオン

V. 測定法の検証

LC-BMVを参考



- 消化せずにホールタンパク質を定量

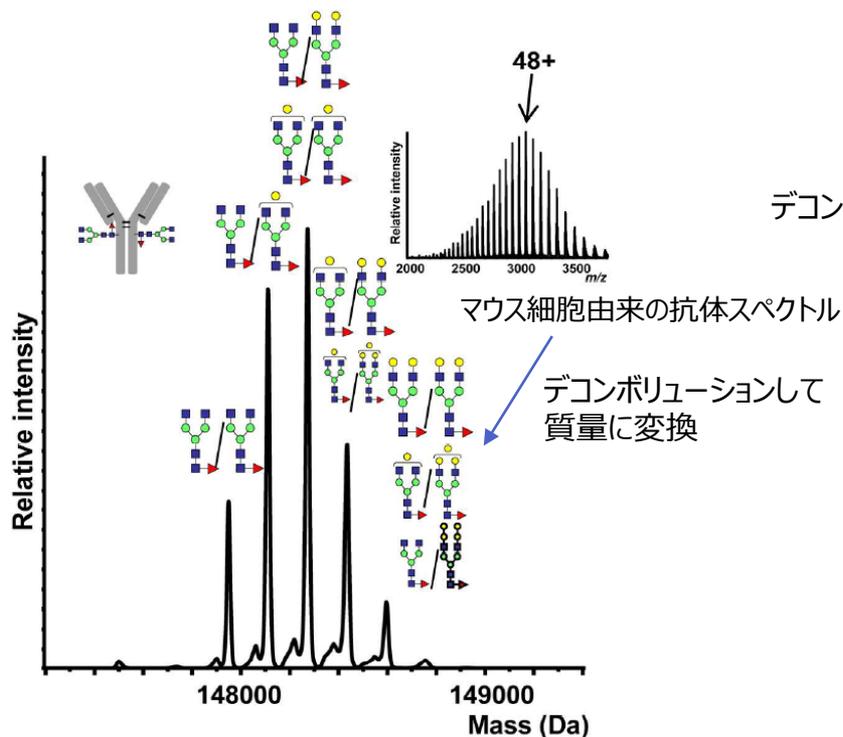
Q : 10kDa程度のタンパク質を消化せずにホールで分析したい。
(標準品と生体中のAnalyteが同一である場合)

A :

- ① 高分解能MSを使用装置に選択する
- ② Deconvolution*を行う
⇒ 分子量が単一であることを確認する
⇒ 修飾を受けていないことを確認する
- ③ 価数が低いものから強度の高いイオンを選択する
- ④ CIDスペクトルから強度の高いフラグメントを選択する

* : ESIでイオン化して分析を行う場合, 多価イオンが生じることにより1つの化合物に対して複数の m/z のスペクトルが観測されます. 観測された多価イオンに対して, PCを用いて数学的な処理を行うことにより, 元の化合物の分子量または1価における m/z を算出することができます. この値と化合物データを比較することにより, 観測しているピークが化合物由来であることを確認します.

デコンボリューションとは



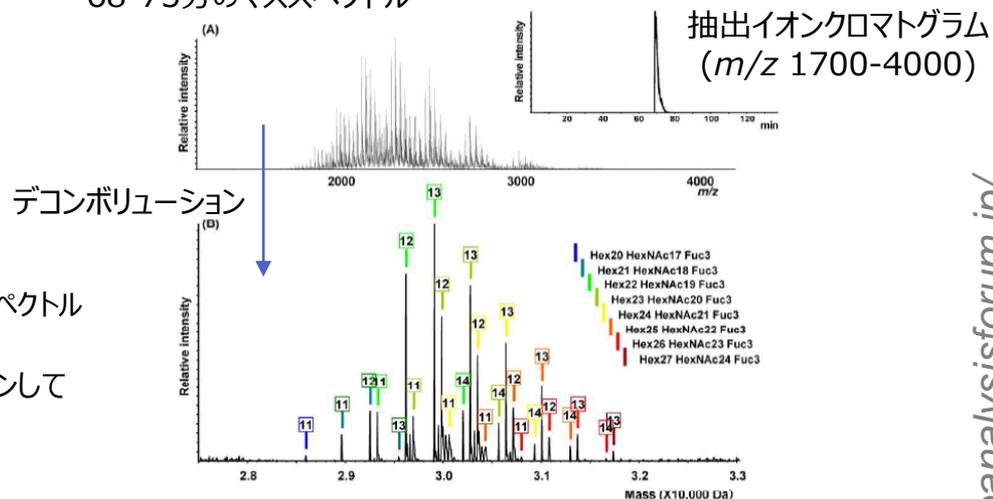
抗体医薬品のマススペクトル

抗体の質量およびその分布により、

- 目的のタンパク質が生合成されていること
- ガラクトース付加の大きな分布

が推察される

68-75分のマススペクトル



エリスロポエチンのインタクトMS

非常に複雑なマススペクトルが得られているが、ほぼすべてのピークが糖鎖構造の違いとして帰属される。

- 結合するシアル酸の分布や糖鎖の分岐
- ラクトサミン構造の付加の程度

J. Mass Spectrom. Soc. Jpn Vol. 64, No.3, 2016

- プロダクトイオンの選択

Q : ISでラベルした箇所のプロダクトイオンの選択は必須なのか

A : 必須ではないが、分子量差が小さいものがある場合は価数違いで重なる可能性が高いので留意する必要がある

- 解析

Q : 感度が低い場合, 設定した複数トランジションの強度を合算した解析を行うべきか

A : 合算しなければならぬようでは正確な定量が難しい. 定量下限やマトリックスの量などを見直した方がよい (DG内での意見より)
四重極型MSよりも高分解能MSの方がS/N比が高いため, 合算の恩恵が得られやすい

合算解析をする前に...

- 定量下限域にて, 真度精度が改善するかを確認する
- クロマトグラムのS/N比が改善するかを確認する



LC-MSとLBA

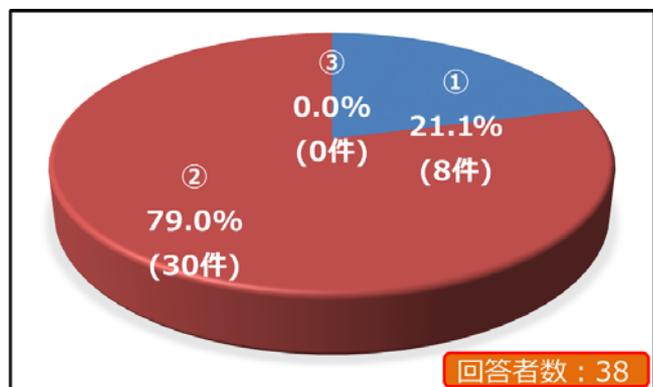
Comparison between LC-MS and LBA

	LC-MS	LBA
検出	○ 直接的 (ただし消化断片)	△ 間接的
感度	△ LBAよりは低感度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 前処理なしの場合	○ 高感度 (pg/mL)
分析対象	○ 多成分同時定量可能	△ 単一成分分析
抗体の必要性	○ 抗体は不要	△ 良い抗体が必要 (抗体作成に要6か月)
測定系構築難 易度	比較的容易	抗体作成に6か月の期間と 作製費用
スループット	△ スループットは低い	○ 高スループット
機器の価格	△ 高額	○ 比較的安価
標品	○ 合成ペプチドは安価・品質が安定	△ 高価・Lot間差のおそれ

LC-MSとLBAは相補的に用いることが出来る

アンケート結果より

Q35. タンパク質をLC-MSとLBA
の両方で定量した経験



- ① YES
- ② No
- ③ others

Q36. LC-MSとLBAの結果が
異なった経験及びその考察

結果	考察
異なった	タンパクの部分分解が示唆された
異なった	原因不明。交差性や修飾の差異がみられたのか、断片の選定が良くなかったのか不明
異なった	プログラム全体で特定の測定方法が用いられていれば特に問題はない
異なった	測定法のダイナミックレンジや前処理含め考察
異なった	抗体の特異性に起因
同じ	
異なった	抗抗体, トータルフリー議論

DG2017-31

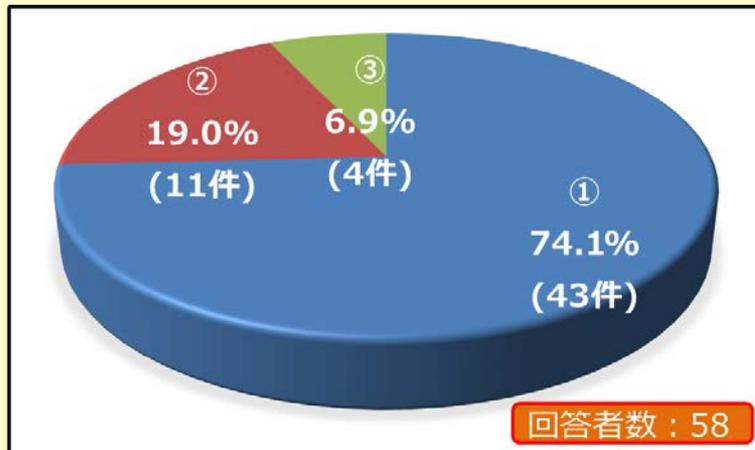
高分子のLC-MS定量分析 アンケート結果

Summary of a questionnaire for quantitative analysis for large molecules by LC-MS

実施期間 :	2017年10月8日～10月20日
配布先 :	DGサポーター (213名) JBFパートナー(38社)
有効回答数 :	58名
Term	8 Oct 2017 to 20 Oct 2017
Distributed to	DG supporters (213), JBF partners (38)
Valid responses	51

Q1 所属について教えてください。

Working at?



- ① 製薬
- ② CRO
- ③ その他

- ① Pharmaceuticals
- ② CRO
- ③ Others

その他 (全4件)
③ Others

・食品 (3件)
Food products

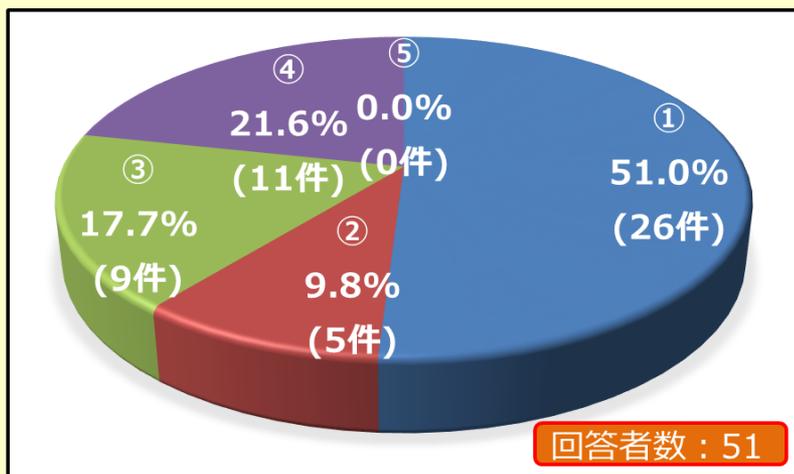
・未記入 (1件)
No comments

タンパク質のLC-MS/MSによる分析経験

Experience of quantitative analysis for proteins by LC-MS/MS

Q2 LC-MS/MSでのタンパク質定量分析の実施経験について教えてください。

Do you have experience of quantitative assay for proteins by LC-MS/MS?



- ① 経験あり
- ② これから実施予定
- ③ 経験はないが興味はある
- ④ 経験なし
- ⑤ その他

- ① YES
- ② No but have plans in the near future
- ③ No but interested in it
- ④ No experience
- ⑤ Others

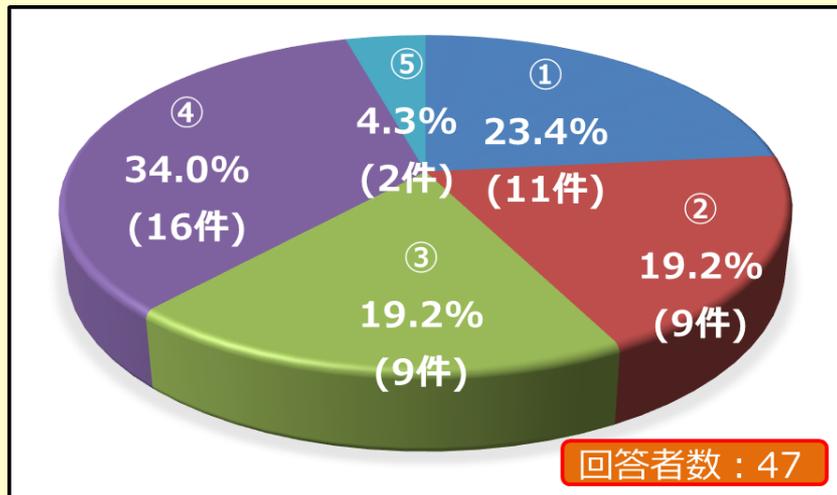
タンパク質のLC-MS/MSによる分析経験

Experience of quantitative analysis for proteins by LC-MS/MS

Q3 LC-MS/MSにて定量分析を実施した経験のあるタンパク質はどのようなものがありますか（前の設問で「②これから実施予定」を選択された方は今後の予定をご回答ください、以下同様）

What kinds of proteins have you analyzed quantitatively by LC-MS/MS?

(For person to select “②No but have plan in the near future”, select your plan.)



- ① 内因性成分
- ② 抗体医薬
- ③ 内因性成分と抗体医薬どちらも
- ④ 経験なし
- ⑤ その他

- ① Endogenous substance
- ② Antibody drug
- ③ Both ① and ②
- ④ No experience
- ⑤ Others

その他（全2件）
⑤ Others

- ・内因性物質、抗体以外のタンパク医薬（1件）
- ・微生物由来タンパク質（1件）

Endogenous substance and protein drug other than antibody,
microorganism-derived proteins

タンパク質のLC-MS/MSによる分析経験

Experience of quantitative analysis for proteins by LC-MS/MS

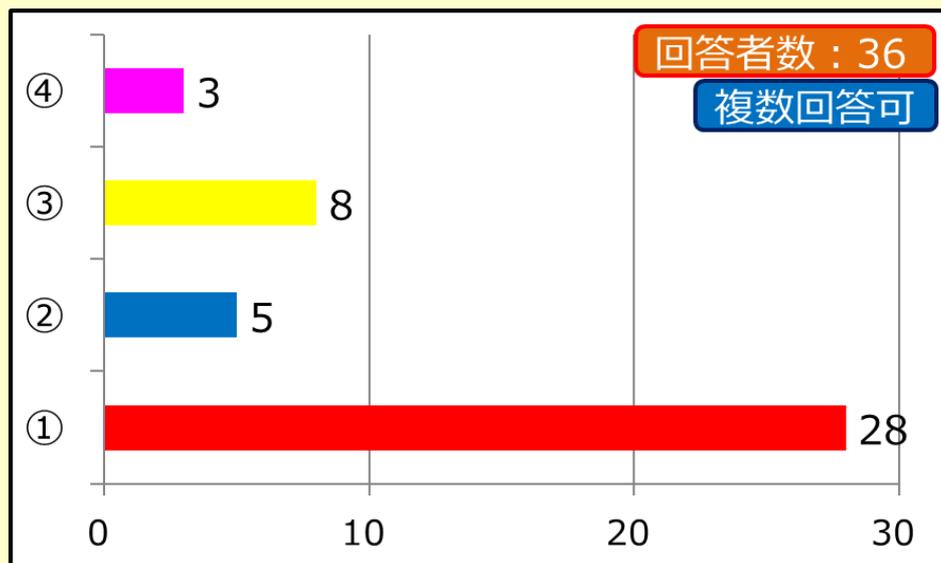
Q4 LC-MS/MSにてタンパク質を定量分析を実施した経験のある試料は（血漿，尿，組織，細胞）どのようなものがありますか。
（自由記述）

What kind of matrices (plasma, urine, tissue, cells etc) have you analyzed to determine protein concentrations by LC-MS/MS?

	# of answers
Plasma	19
Cells	9
Tissue/Tissue homogenate	10
Serum	5
Urine	3
Tears	1
No experience/No	2

Q5 タンパク質MS定量分析に使用しているHPLCを教えてください。
(複数回答可)

What kinds of HPLC do you use for quantitative analysis of protein by LC-MS?



- ① コンベンショナル
- ② マイクロフロー
- ③ ナノフロー
- ④ その他

- ① Conventional
- ② Microflow
- ③ Nanoflow
- ④ Others

コメント (1件)
Comment

・ 2D-LC (カラムスイッチング) (①を選択された方)
2D-LC (Column Switching)

その他 (3件)
④ Others

・ 経験なし (2件) ・ 未記入 (1件)
No experience No comments

HPLC for quantitative analysis of proteins

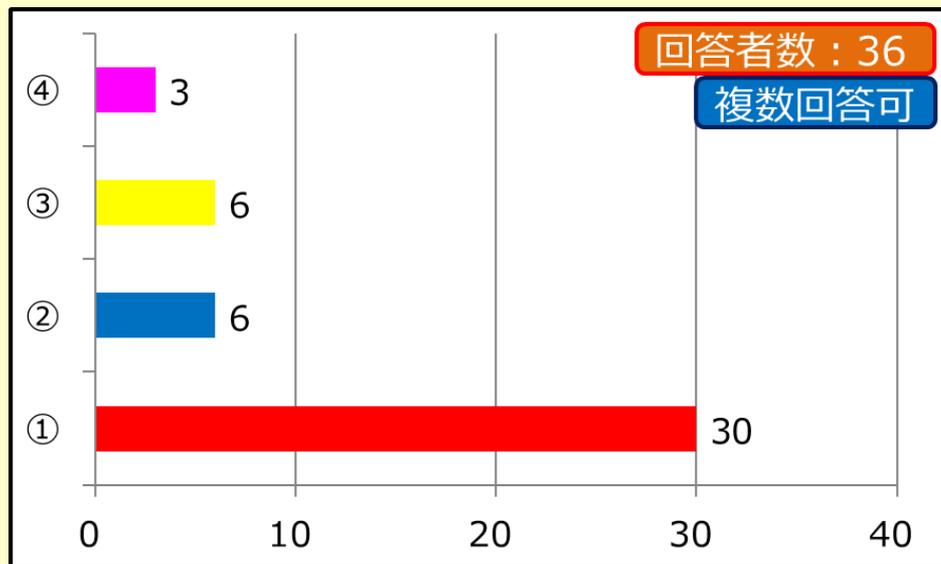
Q6 前の設問で回答いただいたHPLCを使用している理由があれば教えてください。

Reasons to use the HPLC selected in Question 5

HPLC	Reasons	# of answers
Conventional	ナノフローやマイクロフローはイオン化に対しては効果的ではあるが、注入量の制限やクロマトグラムへの影響がありますので、状況に応じてバランスを取る必要があると考えております。 Nanoflow and microflow works efficiently for ionization. But it has limitation of injection volume and long analysis time. Choice HPLC case by case	1
	Throughput	3
	No reasons	3
	Stability/Nexcera	1 each
	Only conventional LCs are in my facility	1
	定量はコンベンショナル、探索・同定はナノを基本としていますが、マイクロ、ナノでの定量の必要がある場合は変更可能 Basically, conventional is used for quantitative analysis, and nanoflow is used for detection and identification (qualitative analysis)	1
	コンベンショナルはサンプルの注入量を増やすことにより感度が稼げる場合がある。Sensitivity of analysis with conventional can be achieved by increasing injection volume	1
Microflow	コンベンショナルより感度が良く、取扱いがナノフローほど手間が掛からない。 More sensitive than conventional and takes less time than nanoflow	1
	Sensitivity	1
Nanoflow	Sensitivity	6
2D-LC (column switching)	Purification of digestive peptides	1

Q7 タンパク質分析に使用している質量分析計を教えてください。
(複数回答可)

What kinds of mass spectrometer do you use for analysis of proteins?



- ① タンデム四重極 (QqQ)
- ② orbital trap (電場型/磁場型)
- ③ TOF MS / Q-TOF MS
- ④ その他

- ① Triple quadrupole (QqQ)
- ② Orbital trap
- ③ TOF MS / Q-TOF MS
- ④ Others

その他 (3件)
④ Others

・ 経験なし (2件) ・ 未記入 (1件)
No experience No comments

MS for quantitative analysis of proteins

Q8 前の設問で回答いただいた質量分析計を使用している理由があれば教えてください。

Reasons to use the mass spectrometer answered in Question 7

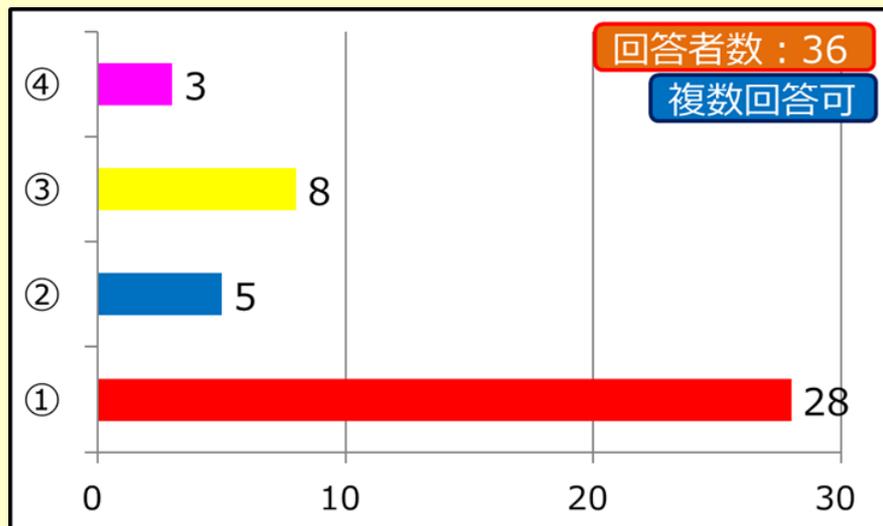
MS	Reasons	# of answers
QqQ, orbi trap, and TOF MS/Q-TOF MS	分析対象や目的に応じて Depending on analyte or purpose	1
QqQ and orbi trap	アイソバリックタグを用いた相対定量分析ではQ-Exactive、安定同位体ペプチドを用いた定量分析ではQqQを使用。Q-Exactive for relative quantitation with isobaric tag, QqQ for quantitation with peptides of SI	1
QqQ and TOF MS/Q-TOF MS	No reasons	1
	QQQでの定量が難しい場合は精密質量分析計を使用。精密質量分析計は主に断片検索、網羅解析等に使用。TOF MS/ Q-TOF MS for qualitative assay when it's difficult to measure target peptides quantitatively with QqQ.	1
	TOF-MSでペプチド断片検索し、四重極で定量分析している TOF-MS : qualitative (peptide fragment) , QqQ : quantitative analysis	1
QqQ	Stability/QTRAP6500/dynamic range/improvement of quantitative performance	1 each
	Sensitivity	3
	Only QqQs are in my facility	1
Orbi trap	High resolution	2

試験目的と適応基準 (内因性タンパク質の定量分析)

The purpose and criteria of the studies (analysis of the endogenous protein)

Q9 LC-MS/MSにて内因性タンパク質の定量分析を実施した時の目的、適応基準を教えてください。(複数回答可)

What's the purpose and criteria when performing quantitative analysis of endogenous proteins by LC-MS/MS



コメント (1件)
Comment

- ・測定法開発時④、実測定時②
- ④ for Method Development
- ② for sample analysis

- ① GLP適用の定量試験 (バリデーション試験含む)
- ② 信頼性基準適用の定量試験 (バリデーション試験含む)
- ③ 適応規制なしの定量試験 (バリデーション試験含む)
- ④ 探索、検討レベル
- ⑤ 経験なし、⑥ その他

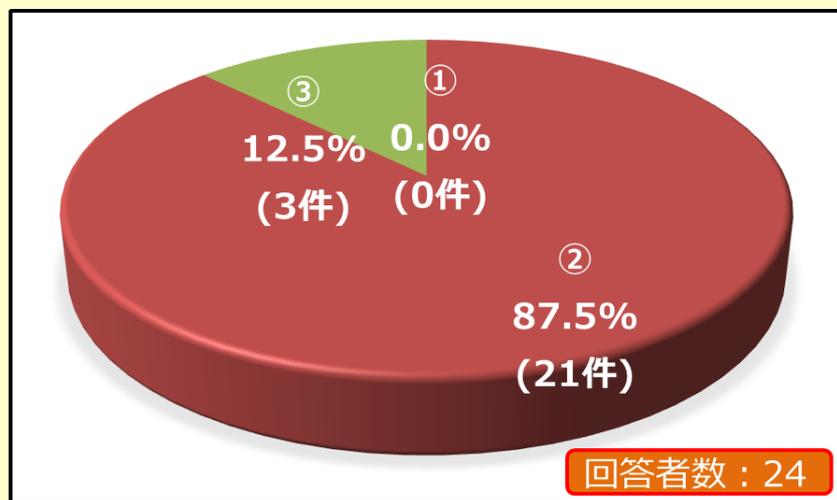
- ① Quantification for GLP (include validation)
- ② Quantification for reliability standard (include validation)
- ③ Quantification without regulatory requirement (include validation)
- ④ Research or method development
- ⑤ No experience, ⑥ Others

アミノ酸配列確認（内因性タンパク質の定量分析）

How to confirm amino acid sequence of the target endogenous protein

Q10 内因性タンパク質を定量する場合，目的タンパク質のアミノ酸配列はどのように確認していますか。

How do you confirm amino acid sequence of the target protein for quantitative analysis for endogenous protein?



- ① 文献調査
- ② Website上のデータベースを利用
- ③ その他

- ① Literature survey
- ② Database on the Website
- ③ Others

コメント1
Comments

- ・ 既報があれば文献から（②を選択された方）
From literatures if possible

コメント2
Comments

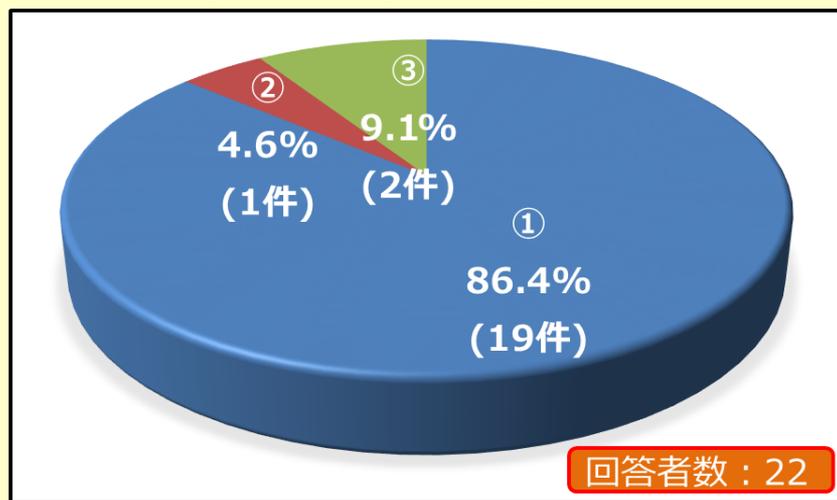
- ・ 経験なし（③選択2名、コメントのみ入力1名）
No experience

アミノ酸配列確認（内因性タンパク質の定量分析）

how to confirm amino acid sequence of the target endogenous protein

Q11 前の設問にて「Websiteのデータベースを利用」と回答された方のみ
ご回答下さい。タンパク質のアミノ酸配列の確認によく利用する
データベースを教えてください。

For person to select “②Database on the Website” in Q10,
What database on Web do you utilize to confirm amino acid sequence of the
target endogenous protein would be measured?



- ① Uniprot
- ② NCBI
- ③ その他

- ① Uniprot
- ② NCBI
- ③ Others

その他（2件）
③ Others

・経験なし（2件）
No experience

アミノ酸配列確認（内因性タンパク質の定量分析）

How to confirm amino acid sequence of the target endogenous protein

Q12 前の設問で回答いただいたデータベースをよく利用する理由があれば教えてください。

The reason to utilize its data base on Webs. - continued Q10 and Q11.

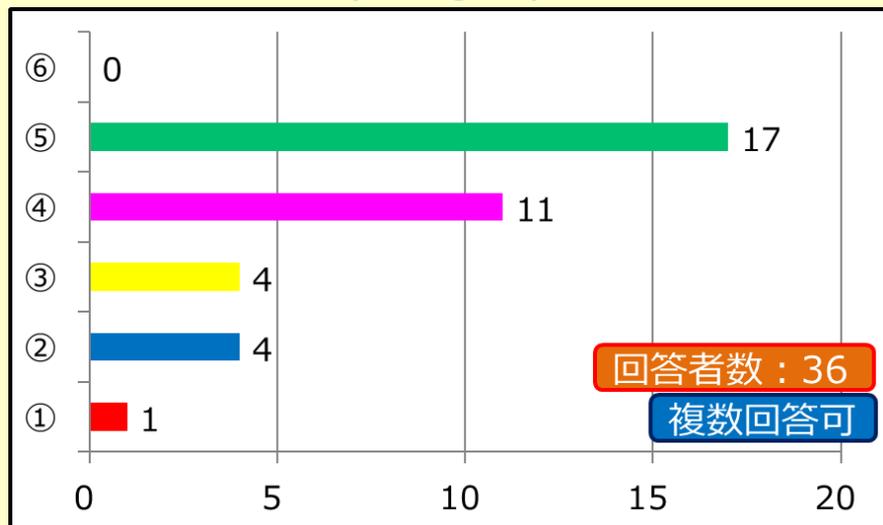
Data base	Reasons	# of answers	
① Uniprot (18件)	① 他のデータベースを使った経験がないから No experience to utilize another data base on Webs.	12	
	②他と比べて 気に入っている ところがある More favorite than another data base	信頼性 Reliable	6
		見やすさや機能 Visible and function	
		主にスタンダードなデータベースとして用いられており、汎用性がある。Versatility Protein IDがそのまま、多くの別のデータベースや、解析ソフトウェアなどで用いることができる。 It is possible to use Protein ID at a lot of another database and analysis systems.	
網羅性が高い Completeness			
	内容が詳しい Detailed content		
② NCBI (1件)	① 他のデータベースを使った経験がないから No experience to utilize another data base on Webs	1	

試験目的と適応基準

The purpose and criteria of the studies

Q13 LC-MS/MSにて抗体医薬品（注：内因性タンパク質でなく抗体医薬品、以下の質問も同様）の定量分析を実施した時の目的、適応基準を教えてください。（複数回答可）

What's the purpose and criteria when performing quantitative analysis of antibody drugs by LC-MS/MS



- ① GLP適用の定量試験
(バリデーション試験含む)
- ② 信頼性基準適用の定量試験
(バリデーション試験含む)
- ③ 適応規制なしの定量試験
(バリデーション試験含む)
- ④ 探索、検討レベル
- ⑤ 経験なし、⑥ その他

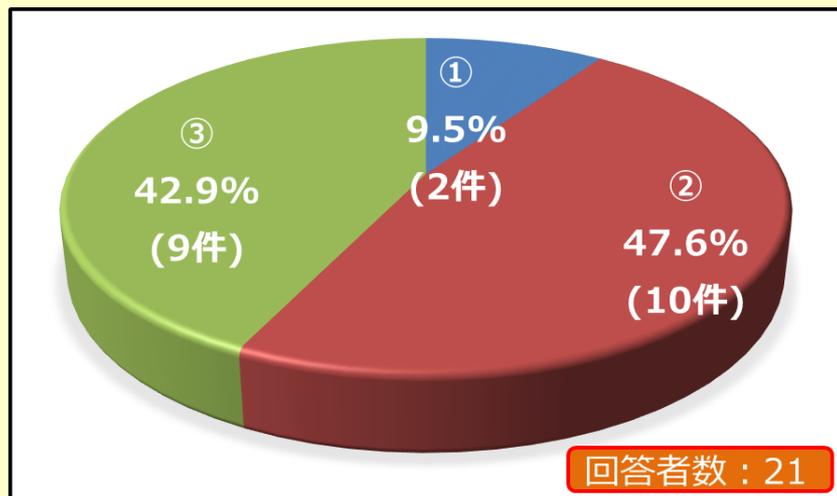
- ① Quantification for GLP (include validation)
- ② Quantification for reliability standard
(include validation)
- ③ Quantification without regulatory requirement
(include validation)
- ④ Research or method development
- ⑤ No experience, ⑥ Others

アミノ酸配列確認 (抗体医薬品の定量分析)

How to confirm amino acid sequence of the target antibody drug

Q14 抗体医薬品を定量する場合、目的抗体のアミノ酸配列はどのように確認していますか。

When quantitating antibody drugs, How do you confirm the amino acid sequence of the target antibody for quantitative analysis of antibody drugs?



- ① 文献調査
- ② Website上のデータベースを利用
- ③ その他

- ① Literature search
- ② Database on the website
- ③ Others

その他 (9件)

③ Others

- ・社内データベース (2件) ・開発品目であり、実際にアミノ酸配列は調べられている
- ・合成している人に確認すると思う。 ・ケースバイケース ・経験なし (3件)

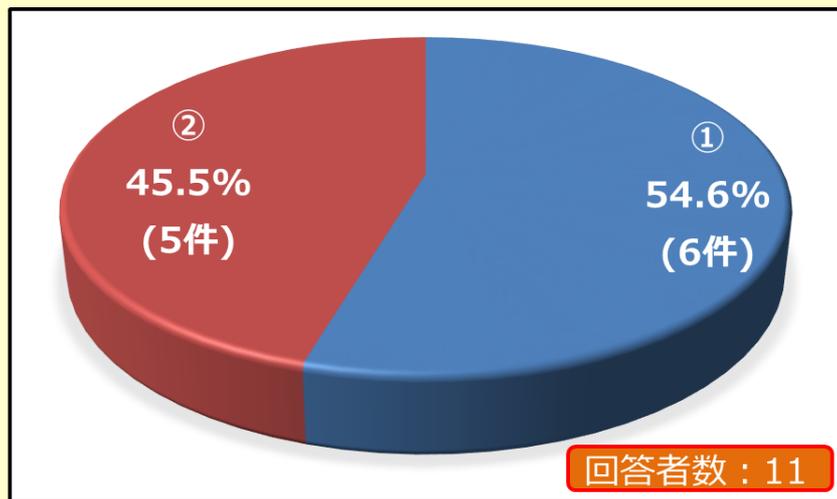
In-house database, Already known because of new chemical entities, ask to the synthesis group, case by case, ...

アミノ酸配列確認（抗体医薬品の定量分析）

How to confirm amino acid sequence of the target antibody drug

Q15 前の設問にて「Websiteのデータベースを利用」と回答された方のみご回答下さい。抗体医薬品のアミノ酸配列の確認によく利用するデータベースを教えてください。

For person to select “②Database on the Website” in Q14, what database on the Web are frequently used to confirm the amino acid sequence of antibody drugs?



① DrugBank database

② その他

① DrugBank database

② Others

その他の具体的回答（全5件）

② Others

- ・ 利用しない
- ・ 経験なし
- ・ 意見無し（2件）
- ・ Skyline

Not use, no experience, no comments, Skyline (software)

コメント
Comments

- ・ 便利（だが一部間違いもある）（①を選択された方）

Convenient (but a part of incorrect is existed)

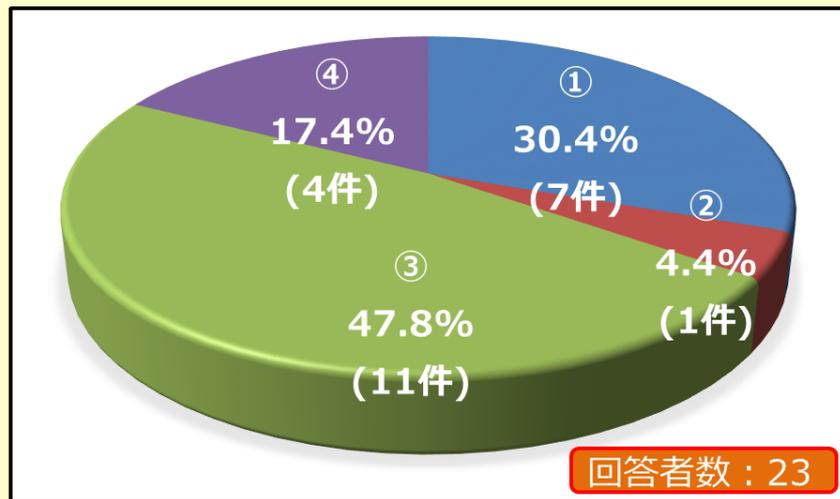
9th JBF Symposium, DG2017-31

抗体医薬品の定量部位

Region of antibody drugs to use for quantitative analysis

Q16 抗体医薬品の定量で使用する定量部位について教えてください。

Which region is used for quantitative analysis of antibody drugs?



- ① 可変領域
- ② 定常領域
- ③ 可変領域・定常領域、両方
- ④ その他

- ① Variable regions
- ② Constant regions
- ③ Both variable / Constant regions
- ④ Others

その他の具体的回答 (全4件)

④ Others

・ 経験なし (3件) No experience

・ 意見無し (1件) No comments

コメント
Comments

・ 基本は可変領域をねらいます (1件) (③を選択された方)
Targeted variable regions basically

Q17 前の設問にて，その定量部位を選択する理由を教えてください。

Why the region was selected for the quantitation in Q16?

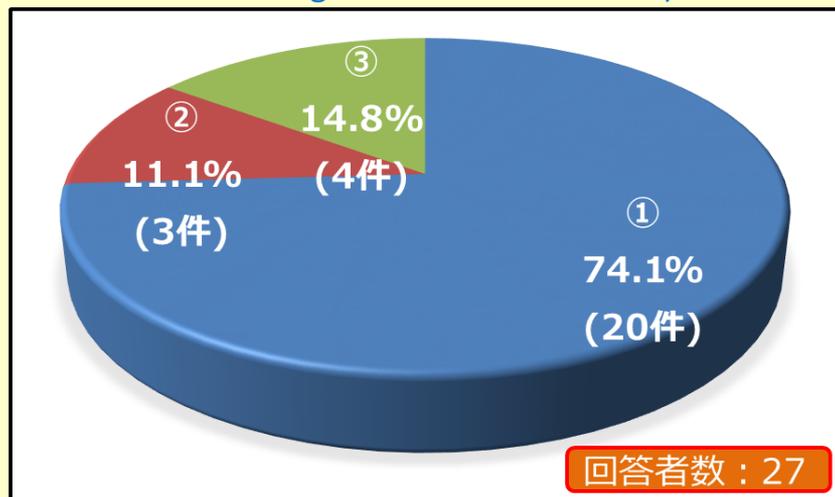
定量部位	Reasons
①可変領域 Variable regions	<p>選択性が高いため (同様3件) Highly selectivity (3 same answers)</p> <p>マトリックスが動物血漿であったため Matrix was animal plasma</p>
③可変領域・ 定常領域、両方 Both regions	<p>部位にこだわらずターゲットペプチドのアミノ酸配列薬物に応じて分析上頑健と思われる配列を選択する Regardless of the regions, the sequence which was suitable for analysis was selected.</p> <p>測定だけなら選択性などの状況が優先されるが，抗体の構造や何を捉える必要があるかによってわけている。 The target region was selected according to the purpose of the analysis.</p> <p>特異性、感度等を注意深く評価 From the score of sensitivity, selectivity, etc.,</p> <p>定常領域は他抗体医薬品にも応用可能だから。可変領域は臨床試験を想定して実施。 The Constant region was also can be used for other antibody drugs. The variable region was selected for clinical trials.</p> <p>特異性がとれれば、どちらでも選択可能だと考えているため。 Both regions can be selected if selectivity would be confirmed</p> <p>可変領域は臨床、定常領域は非臨床（ただし特許が絡むので研究目的） Variable regions are used in clinical studies, and constant regions are used in nonclinical studies (only research purpose).</p> <p>可能であれば可変領域のペプチド，特異的な抗体などがあれば定常領域のペプチドで。 Use peptides from variable regions if possible, otherwise use peptide from constant regions with affinity purification.</p> <p>定常領域は、普遍的に抗体を定量できる。可変領域は特異的な抗体の定量ができる。 Constant regions can be applied for various antibodies. Variable regions can be used for quantitation of specific antibodies.</p> <p>特異性（基本は可変領域を狙います） Specificity (Basically variable regions are targeted.)</p>

測定対象ペプチド配列の検索

How to search target peptide fragments

Q18 内因性タンパク質を酵素消化して、ペプチド断片にて定量する場合、定量候補ペプチドはどのように検索していますか。LC-MS測定文献がなく、タンパク質標品が入手が難しい場合のアプローチ方法を教えてください。

How to search target peptides when endogenous protein concentration would be determined quantitatively as peptide fragment after digestion? (In case it is difficult to obtain the whole protein standard or get literature of LC-MS.)



① アミノ酸配列から酵素による理論的断片を作成して選択

② Website上のデータベース

③ その他

① Select by making a theoretical fragment from the amino acid sequence when enzymatically digested

② Databases on the website

③ Others

コメント (2件)
Comments

・ ②と併用することも (①を選択の方) 、
Both 1 and 2, skyline ...

・ Skyline (①を選択の方)

その他 (4件)
③ Others

・ ①と②の両方 + Blast
Both 1 and 2 + Blast

・ 経験なし (3件)
No experience

測定対象ペプチド配列の検索

How to search target peptide fragments

Q19 前の設問にて「Websiteのデータベースを利用」と回答された方のみご回答下さい。酵素消化後のペプチド断片検索によく利用するデータベースを教えてください。（記述式）

For person to select “②Database on the Website” in Q18, which databases do you use frequently to search for fragmented peptides.

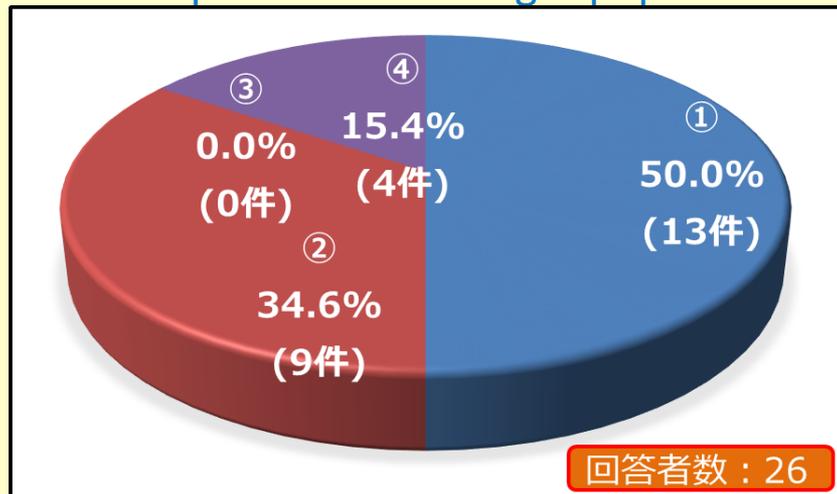
PeptideMass
SRMAtlas (2)、peptide atlas
Proteomics DB
Uniprot
iMPACT

測定対象ペプチド配列の選択 (BLAST検索)

How to select target peptide fragments (BLAST search)

Q20 候補ペプチド断片の絞り込みとして、そのペプチドのアミノ酸配列がユニークな配列であるかをBLAST検索する場合、どのプログラムを使用していますか。

Which program do you use when using BLAST to determine if the amino acid sequence of the target peptide is unique?



- ① BLAST (UniProt)
 - ② BLAST (NCBI)
 - ③ BLAST (PBIL)
 - ④ その他
- ① BLAST (UniProt)
 - ② BLAST (NCBI)
 - ③ BLAST (PBIL)
 - ④ others

コメント (1件)
Comments

• combination (①を選択された方)

その他 (4件)
④ Others

• Protein prospector • Skyline
• 経験なし (2件)
No experience

測定対象ペプチド配列の選択 (BLAST検索)

How to select target peptide fragments (BLAST search)

Q21 前の設問で回答いただいたデータベースをよく利用する理由があれば教えてください。

Why do you often use the database that you answered in the previous question ?

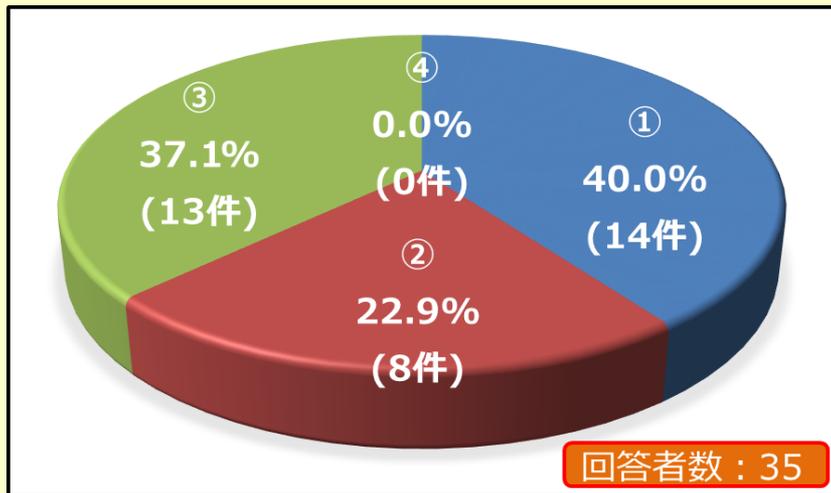
定量部位	Reasons	# of answers	
①BLAST (UniProt)	①他のデータベースを使った経験がないから No experience to utilize another data base on Webs.	10	
	②他と比べて気に入っているところがある More favorite than another data base	見やすい。FASTAファイルが作りやすい。 It's easy to see and create FASTA files	3
		UniProtをメインで使用しているため Mainly use Uniprot	
		個人的に使いやすい (併用することもある) Easy (Sometimes used together)	
②BLAST (NCBI)	①他のデータベースを使った経験がないから No experience to utilize another data base on Webs.	7	
	②他と比べて気に入っているところがある More favorite than another data base	検索が早い Search fast	1
④その他 others (protein prospector)	①他のデータベースを使った経験がないから No experience to utilize another data base on Webs.	1	
④その他 others (Skyline)	意見無し No opinion	1	

測定対象ペプチド配列の選択 (skyline)

How to select target peptide fragments (skyline)

Q22 ターゲットペプチドの絞り込みの際、Skylineというソフトウェアの使用経験はありますか。

Have you used software called "Skyline" for selecting target peptide?



- ① ある
 - ② 使用経験はないが存在は知っている
 - ③ ない
 - ④ その他
- ① Yes
 - ② No, but I know the software
 - ③ No
 - ④ others

測定対象ペプチド配列の選択 (skyline)

How to select target peptide fragments (skyline)

Q23 前の設問にて「①ある」に回答された方のみご回答下さい。
Skylineの使用用途を教えてください。

For person to select “①Yes” in Q22, what is intended use of Skyline?

パラメータ最適化 Parameter optimization

様々な用途に使用しているが、予測候補断片の確認 (2nd Opinion) Confirm target peptide fragment and various propose

トランジションの作成、ピーク抽出など Creation of transition, peak detection

タンパク質のアミノ酸配列から酵素消化により得られるペプチド断片のSRMトランジション作成

Creation of SRM transition using digested peptides

定量ペプチドの選定とMRM/SRM条件の設定 (同様2件) Selection of target peptides and setting MRM/SRM conditions

ユニーク検索, アミノ酸配列のm/z情報 Unique search and obtaining m/z information on sequence of amino acid

自動的なMSMS条件設定 Setting MS/MS conditions automatically

フラグメンテーションパターンからSRM Transitionの設定、定量解析 (同様2件)

Setting SRM transition form fragmentation pattern and Quantitative analysis

消化断片予測、候補ペプチドの選定、ユニークペプチドの確認 (全生物種のFASTAを入れて参照する)、検量線作成、

定量値算出 Predictive digested peptides, selection of target peptides, confirmation of unique peptide (reference of all species FASTA file), creation of calibration curve and calculation of quantitative values.

比較定量 Comparative quantitation

Q24 内因性タンパク質の定量を行う際に他に使用しているソフトウェアと、その使用用途を教えてください。

Frequently used software and the intended use for quantitative analysis of endogenous proteins?

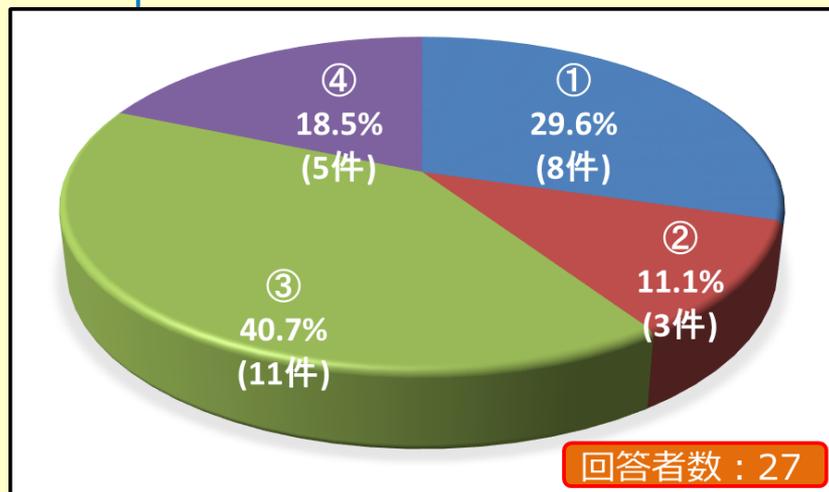
Software	Intended use
PeakView	プロダクト確認 Confirmation of product ion
MultiQuant	定量値算出・精密質量MS定量 (同様3件) Calculation of quantitation value Quantitation by high-resolution MS
shimadzu Insight	定量解析 Quantitative analysis
Skyline	定量解析 Quantitative analysis
Analyst	定量 (同様2件) Quantitation
MS Quant Manager	精密質量MS High-resolution MS

測定対象ペプチド配列の選択 (測定ペプチド数)

How to select target peptide fragments (number of monitored peptides)

Q25 内因性タンパク質を定量する場合、定量に用いるペプチドは何本が適切だと思いますか。

How many peptides should be used for quantitative analysis for endogenous proteins ?



- ① 1本
- ② 2本
- ③ 目的により変更する
- ④ その他

- ① one
- ② two
- ③ case by case
- ④ others

その他 (5件)

④ Others

- ・ 3,4本から絞り込んでいく。 Select form 3 or 4 peptides
- ・ 3個は目標にします It is there 3 peptides as a goal
- ・ 3本以上 3 or more ・ 経験なし (2件) No experience

コメント (1件)

Comments

- ・ 3個は目標にします (③を選択の方) It is there 3 peptides as a goal

測定対象ペプチド配列の選択 (測定ペプチド数)

How to select target peptide fragments (number of monitored peptides)

Q26 前の設問にて「2本以上」または「目的により変更する」と回答された方のみご回答下さい。定量に複数のペプチドを使用する時の理由を差支えない範囲で教えて下さい。

For a person to select “②2” or “③case by case” in Q25, why multiple peptides are used for ?

断片により違う定量値を返すので。 Each peptide shows different value

目的に応じて、対象を決めている。1本だけだと定量性の問題点を把握しにくい（何が正なのかが掴みにくい）。
Depends on the purpose of quantitation. It's difficult to confirm the quality of quantitation with single peptide only.

検証と定量性の担保目的 To guarantee the quantitativity and validity

特異性の担保(同様3件)/ 検出しているものが測定対象であることを確認したい To ensure the quantitated target is right.

データの信頼性を高めるため / 念のため To enhance reliability of data

基本的に3本以上設定することが多いが、定量に適したペプチドが少ない場合などは1本で実施することもある。

Basically more than three peptides Run with single peptide when suitable peptide are limited

修飾の影響、夾雑物の影響 It depends on the post-translational modification or contaminant

トリプシン消化効率が十分であるか否かを確認する指標の一つとして To confirm the efficiency of trypsin digestion.

定量性の担保 (特に特異的なペプチドを使用しない場合は必要と考えている) To guarantee the quantitativity
(Especially the peptide is not specific)

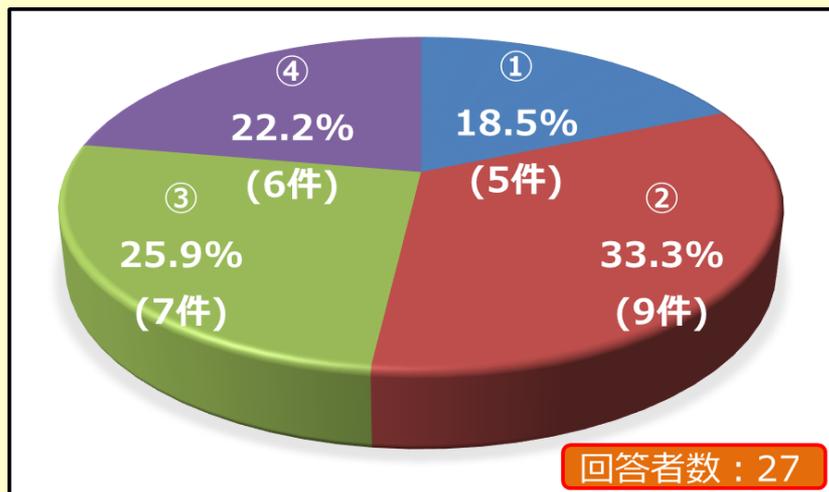
同定のため / タンパク質配列全体的に定量できるから For target identification / Quantitate the protein as a whole

測定対象ペプチド配列の選択 (トランジション数)

How to select target peptide fragments (number of transitions)

Q27 内因性タンパク質を定量する場合、定量に用いるペプチド1本あたりのトランジション数はいくつが適切だと思いますか。

How many transitions should be used to quantitate endogenous protein ?



- ① 1トランジション
- ② 2トランジション
- ③ 目的により変更する
- ④ その他

- ① one
- ② two
- ③ case by case
- ④ others

コメント (2件)
Comments

その他 (6件)
④ Others

- ・ 5つくらいを目標 (②を選択された方) ・ 3トランジションを目標としているが、ペプチドの特性上難しい場合は減らしている (③を選択された方)
- ・ Preferably up to five ・ Three, if possible
- ・ 最初3つ以上設定し、絞り込んでいく ・ 3 transition以上 three or more
- ・ 5つくらいを目標 about five
- ・ 定量には1本、ただ、複数のトランジションをモニター ・ 経験なし (2件)

Monitor one transition for quantitation and others for confirmation

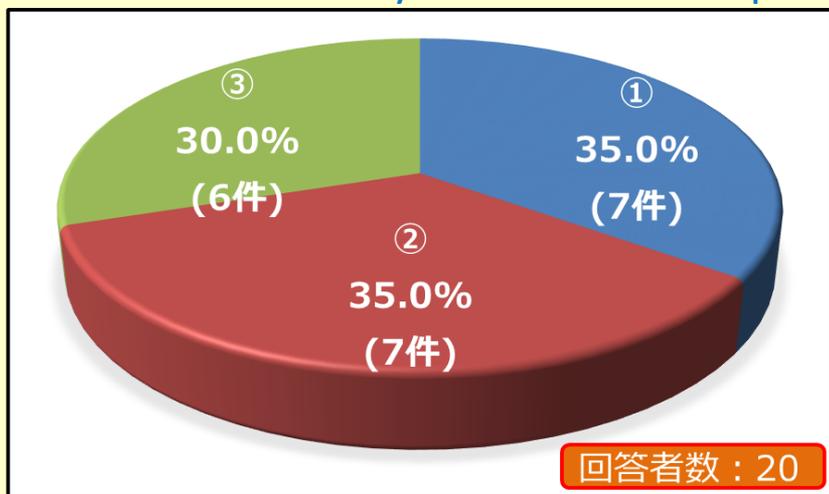
No experience

測定対象ペプチド配列の選定 (トランジション数)

How to select target peptide fragments (number of transitions)

Q28 前の質問で、複数のトランジションを設定して分析すると回答された方、定量値をどのように算出していますか

How do you calculate the quantitative result of multiple transition ?



- ① トランジションを合算
 - ② 各トランジションから得られた平均値
 - ③ その他
- ① Sum of analytical result of each transition
 - ② Mean of analytical result of each transition
 - ③ others

コメント (1件) [Comments](#)

- ・網羅的に測定する際には、ある程度決めますが、少数のタンパク質であれば、定量性の高い方法を設定すると思います。

Define calculation method for multiple target analysis. The most quantitative method will be chosen for a few target analysis.

その他の回答 (6件) ③ Others

- ・基本的には感度の高い一つを選択もしくは合算 Basically the most abundant transition only, sometimes summed.
- ・最も高感度なものを採用他は確認程度 (同様3件) The most abundant transition only, others are used for confirmation.
- ・用途によるが、QQQでのトランジションの合算は可能であれば避けたい (特異性が不安)。1トランジションを定量値とする場合もあれば (残り2トランジションは特異性確認)、3ペプチドの平均値 (+cv) を定量値とする場合もある Depend on the purpose, and avoid the adding up. Some case one transition for quant, and others for confirm. Other case mean and CV value of three transition is used

- ・経験なし No experience

測定対象ペプチド配列の選定 (トランジション数)

How to select target peptide fragments (number of transitions)

Q29 2つ前の設問にて「2トランジション以上」または「目的により変更する」と回答された方のみご回答下さい。複数トランジションを設定する理由を差支えない範囲で教えて下さい。

For a person to select “②2” or “③case by case” in Q27, why multi transitions are used for if possible.

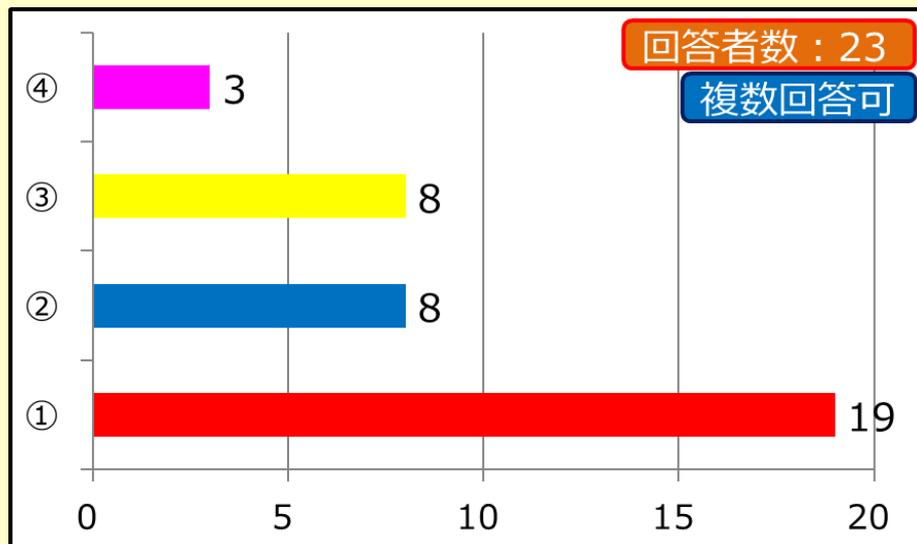
内因性夾雑物のかぶりを評価 (同様4件)	To confirm no other contaminants are overlapped
不安定であるため	In case target peptide (or signal) is not stable
感度が足りないときに合算するため (同様4件)	Sum up transitions when the sensitivity is deficient
検証目的です。すべてのトランジションを定量に使う必要はないと思っています	Only for confirmation No need to sum up all transition
データの信頼性を高めるため	To ensure the reliability of data
ターゲットペプチドの分析の特異性担保のため	To ensure the specificity of the target peptide
ノイズピークによる定量結果のばらつきの影響を考慮して	To consider the variation of result depends on noise peaks
特異性の確認	To confirm the specificity of the target peptide
定量性の担保	To ensure the quatitativity
同定精度を上げるため	To ensure the identification

実測定による検出確認

Detection and confirmation of the target peptide in samples

Q30 定量候補ペプチドの検出確認のために使用したことがある試料を教えてください。（複数回答可）

What kind of samples do you use for the target peptide detection



- ① タンパク質標品
- ② 強制発現細胞
- ③ 分析標的の組織
- ④ その他

- ① Standard protein
- ② Target forcibly expressing cell
- ③ Target Organs
- ④ Others

その他の回答

④ Others

・普通の（強制発現もしていない）細胞
Normal cells (not forcibly expressed)

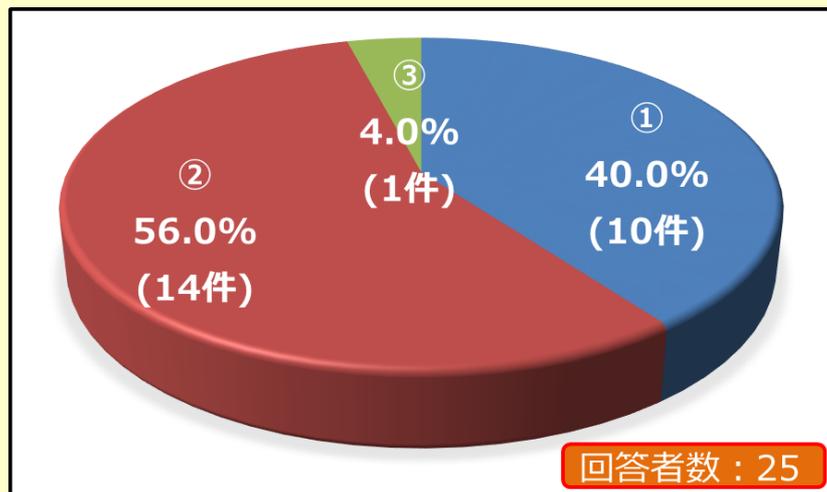
・経験なし（2件）
No experience

実測定による検出確認

Detection and confirmation of the target peptide in samples

Q31 定量候補ペプチドの検出確認のために実施する分析法を教えてください。

What method do you use for the detection of target peptide ?



- ① サーベイスキャン法 (Data dependent scan) による検出
- ② 候補ペプチドの複数トランジションを指定し検出
- ③ その他

- ① Survey scan (Data-dependent scan)
- ② SRM, with multiple transitions for the target peptide defined
- ③ others

その他の回答
③ Others

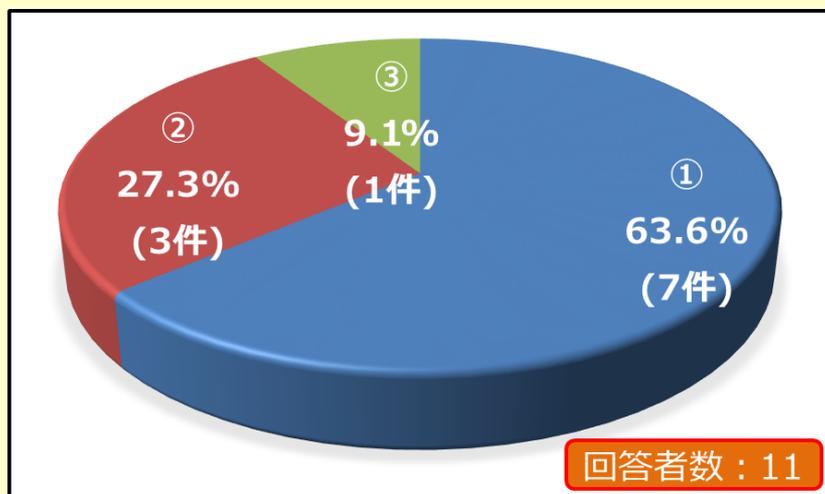
- ・ 経験なし (1件)
No experience

実測定による検出確認

Detection and confirmation of the target peptide in samples

Q32 前の質問にて「①サーベイスキャン法 (data dependent scan) による検出」と回答された方のみご回答下さい。検出されたピークをどのようにアミノ酸配列に帰属させていますか

For a person to select “①Survey scan (Data-dependent scan)” in Q31, how do you attribute the detected peaks to amino acid sequences ?



- ① アミノ酸配列解析ソフトウェアを使用
- ② プロダクトイオンスペクトルをDBと比較
- ③ その他

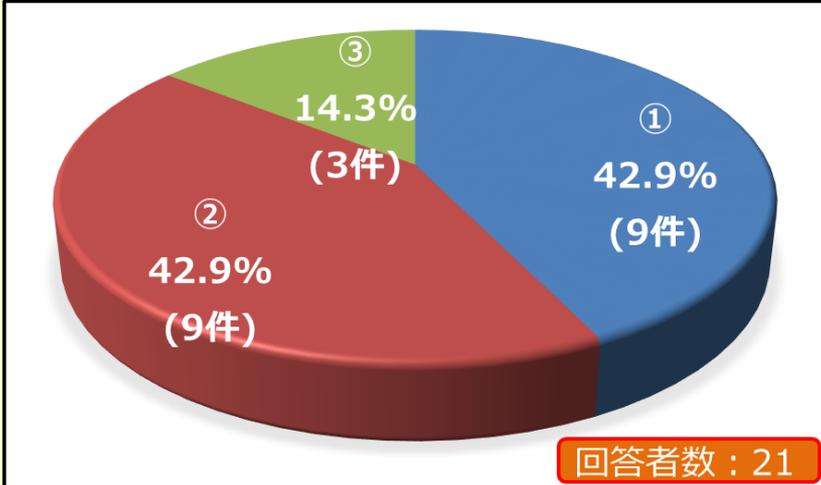
- ① Use amino acid sequence analysis software
- ② Compare product spectrum with DB
- ③ Others

その他の回答
③ Others

- ・ 経験なし (1件)
No experience

Q33 内因性タンパク質定量に用いるLC分析法について教えてください。

What LC method do you use to quantitate endogenous protein by LC-MS/MS?



- ① ペプチドに拘らずGenericなmethodを使用
- ② ペプチド毎にmethodを最適化する
- ③ その他

- ① Generic method
- ② Optimized method to quantitate specific peptide
- ③ Others

コメント (1件)
Comments

・ 経験なし (②を選択の方)
No experience

その他 (3件)
③ Others

- ・ ①or② depend on target
- ・ ② if ① is not possible
- ・ 経験なし

No experience

http://bioanalysisforum.jp/

Q34 Generic methodで分析できない場合には、どのようなことが原因となりますでしょうか。経験がありましたら教えてください

What is the cause why peptide quantitative analysis by “Generic method” doesn’t work?

ペプチドの物性が異なるものを同時に測定することが出来ない場合がある。 *Cannot determine simultaneously when deferent characterization of peptides*

選択性が悪い（夾雑成分が重なるなど、同様6件） *Poor selectivity*

イオンサプレッションの程度がひどい *large ion suppression*

できなかったことはない。ペプチドごとに特徴的なメソッドを設定できれば高感度が狙えるかと思う。 *Not have any experience*

多価イオンとpHの相性が悪い時 *Incompatible multi-charged ion of analyte and the generic method pH*

ピーク形状不良の時 *Peak shape*

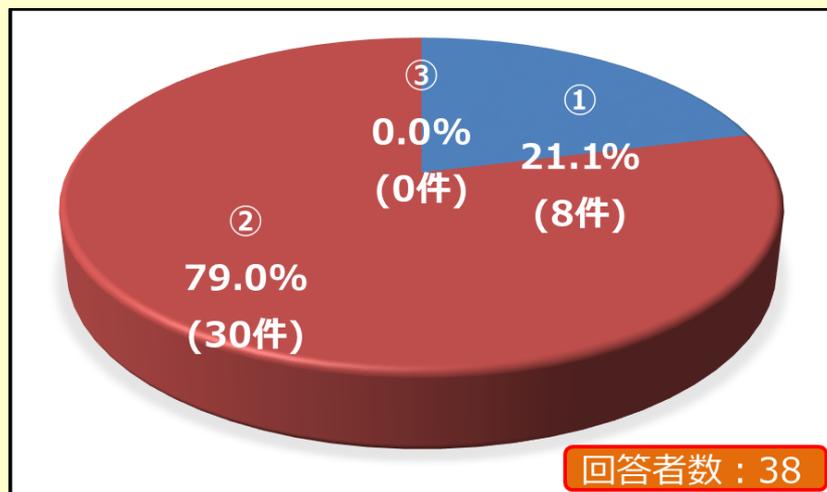
カラムから溶出しないor保持されない（同様2件） *Column separation*

親水性または疎水性が強すぎる場合 *Hydrophilic or hydrophobic*

JBF LC-MS vs LBA

Q35 タンパク質をLBAとLC-MSの両方で定量した経験がありますか？

Have you perform quantitative analysis of proteins both by LBA and LC-MS ?



- ① ある
- ② ない
- ③ その他

- ① YES
- ② No
- ③ others



JBF LC-MS vs LBA

Q36 前の設問で「①ある」と回答した方、結果や解釈が異なった経験があれば差支えない範囲で考察のなど含めて教えてください。

For a person to select “1, YES” in Q35,
have you got the different results by using LBA and LC-MS?

タンパクの部分分解が示唆される結果が得られたことがある。 Partially degraded

原因は正確には掴めていない。抗体でキャプチャーする部位や箇所の数などによって、交差性や修飾の差異がみられたのか、断片の選定が良くなかったのかは不明 Not know the reason. Cross-reactivity or modification may be happened or peptide selection is not good.

一定の差異が認められたが、プログラム全体で特定の測定方法が用いられていれば特に問題はない。 Different results were got but it is not the problem if the specific method is used in the whole program

あります。測定法のダイナミックレンジや前処理含め考察しました。 Yes. Considered about dynamic range and sample preparation in that situation

LBAの方が定量値が高くなった。抗体の特異性に起因すると考察 The quantitated result from LBA is higher because of antibody specificity

同等であった The quantitated results of both are the same.

抗抗体, トータルフリー議論 Because of anti-antibody or total and free antibody

Q37 高分子LC-MS定量に関して「これが知りたい」と思うものがあれば記載をお願いします。

Do you have any other questions for large molecule analysis by LC-MS?

レギュレーション（ガイドライン構想、規制下分析での対策と問題点）（2件） [Regulation](#)

ペプチド断片による定量値への影響の要因や対策方法(2件) [Effect and countermeasure of peptide fragment](#)

低分子LC-MSと比較して高分子LC-MSで気を付ける点 [Cautions in large molecule analysis](#)

安価で安定供給できる内標準物質 [Internal standard, can be supplied continuously at low cost](#)

定量値の算出方法（複数のペプチドから定量する方法、ばらつきの程度、MSパラメータの設定）
[How to calculate quantitative results](#)

高分子LC-MS定量で十分と考える / 抗体医薬品のLC-MS分析の実績件数 / MSで実施の場合ELISAの必要性
[Enough to use LC-MS/MS / The number of experiment to quantitate antibody using LC-MS / Necessity of ELISA if the quantitation is already performed using LC-MS](#)

多くの情報から選択破棄する際の判断基準 [Criteria to select the target peptide](#)

免疫系を用いない高感度化 [High sensitivity not using immuno-assay](#)

タンパク質標品を合成して検量線に用いている実例
[Actual examples to prepare calibration standards using synthetic protein analyte](#)

検出上の工夫、イオンモビリティ [Good ingenuity for detection, ion mobility](#)



ご協力有難う
ございます