

EVUSEP+

Application Note



Лучшее покрытие последовательности белков в одиночном эксперименте с использованием расширенных методов

1. Введение

Система Evosep One создавалась с целью сделать клиническую протеомику более быстрой, снизить требования к чистоте образцов, а также уменьшить частоту проведения технического обслуживания. Система Evosep One снабжена 4 насосами низкого давления для градиентного элюирования соединений из одноразовой концентрирующей колонки, роль которой играет наконечник Evotip. Насосы продвигают образец (уже предварительно разделенный на компоненты) в градиенте растворителей в петлю, которая после того, как в ней оказывается образец, встраивается в поток от насоса высокого давления, и тот далее продвигает содержимое петли в аналитическую колонку. Благодаря простоте работы системы, с ее помощью можно анализировать от 30 до 300 образцов в день. Разработанный *расширенный метод* (Extended method) предназначен для задач, в которых требуется глубокое покрытие последовательности белков, получаемое в одиночном ВЭЖХ/МС эксперименте. *Расширенный метод* включает 88-минутный градиент, с его помощью можно анализировать почти 15 образцов в день.

Время между окончанием градиента и следующей инъекцией составляет всего 4 минуты благодаря тому, что подготовительные процессы для следующей инъекции (удаление использованного наконечника Evotip, промывка инъекционного порта и керамической иглы, перезаполнение насосов низкого давления, заполнение линий подвижной фазой нужного состава) идут одновременно с ВЭЖХ/МС анализом (рисунок 1). *Расширенный метод* это то, что нужно для получения максимального покрытия последовательности белков в одиночном эксперименте особенно при условии ограниченного количества образца. Воспроизводимость – ключевой аспект в клинической протеомике в контексте ограниченности технических различий между инъекциями-повторами и наличием неизбежных различий между разными приборами. Чтобы оценить воспроизводимость, мы проанализировали времена удерживания различных систем, а также повторили эксперименты с *расширенным методом* в двух различных лабораториях с различными процедурами пробоподготовки.

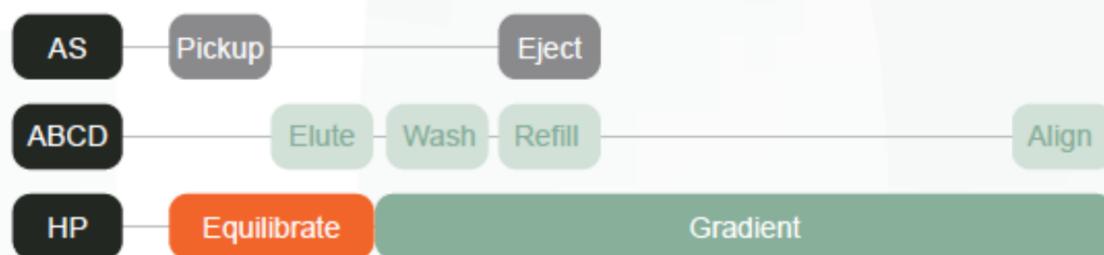


Рисунок 1: Шаги, выполняемые системой Evosep One при работе долгого метода

2. Описание метода

Расширенный метод разработан для глубокого исследования протеома в одиночном эксперименте при производительности системы около 15 образцов в день. В начале метода аналитическая колонка уравнивается при потоке 1,5 мкл/мин, в то же время пептиды элюируются из наконечника Evotip потоком от насосов А и В. Сразу же после этого насосы С и D изменяют процентное содержание органики в подвижной фазе, в которой находятся пептиды. В результате такого изменения пептиды, вышедшие из петли, удерживаются колонкой сразу на входе, фокусируясь в узкие пики.

Благодаря сужению пиков возрастает пиковая емкость колонки. Далее насос высокого давления продвигает градиент с предварительно разделенными пептидами через аналитическую колонку со скоростью потока 220 нл/мин (рисунок 2). Метод оптимизирован для работы с аналитической колонкой с внутренним диаметром 150 мкл, длиной 15 см и размером частиц 1,9 мкм (EV-1106) при комнатной температуре и с использованием эмиттера из нержавеющей стали (EV-1086).

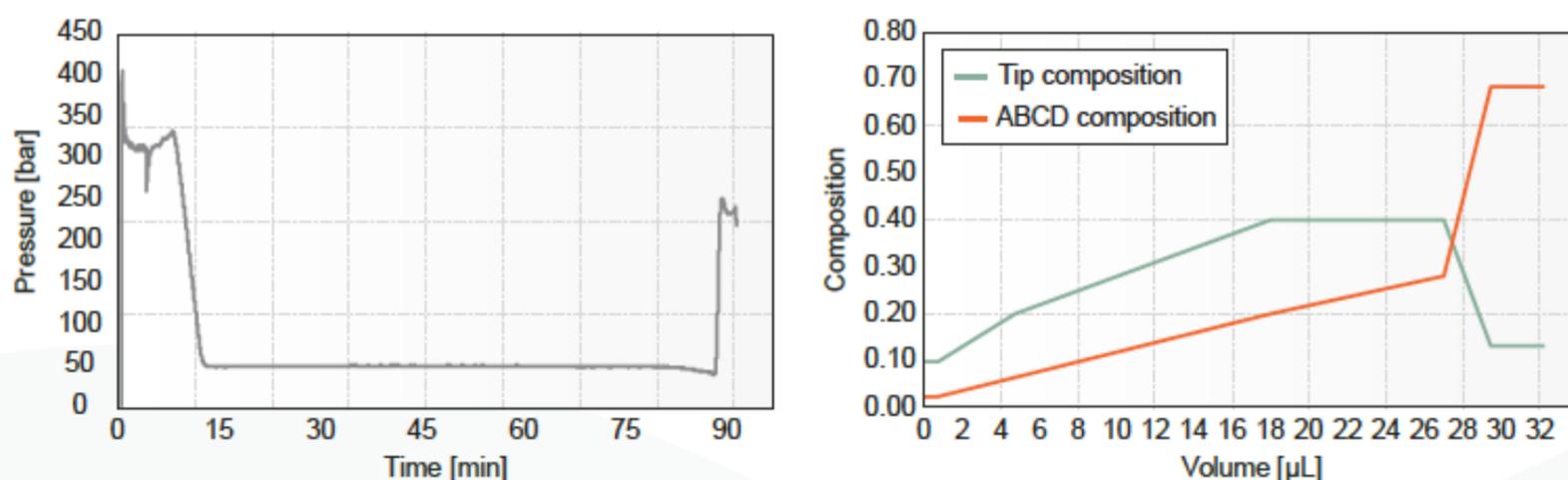


Рисунок 2: Слева: профиль давления в процессе градиента. Справа: состав градиента (по оси x отложен объем, входящий в петлю, а по оси y - содержание ацетонитрила).

3. Хроматографическая воспроизводимость

Для демонстрации высокой воспроизводимости результатов, полученных на разных системах Evosep, было выполнено по 10 инъекций триптических пептидов бычьего сывороточного альбумина (BSA) на трех различных системах при использовании одной и той же колонки и одного и того же масс-спектрометра. Для каждой системы оценивалась воспроизводимость времен удерживания от образца к образцу. Анализировались пять пиков, соответствующие различным пептидам бычьего

сывороточного альбумина, времена выхода которых равномерно распределены по всей протяженности градиента. Для этих пиков рассчитывалось стандартное отклонение времен удерживания для каждой из систем. При общем среднем значении стандартного отклонения равном 8 секундам наблюдалось незначительное смещение времен удерживания. Величины ошибок, отображенные на графике, соответствуют стандартному отклонению всех трех наборов измерений (рисунок 3).

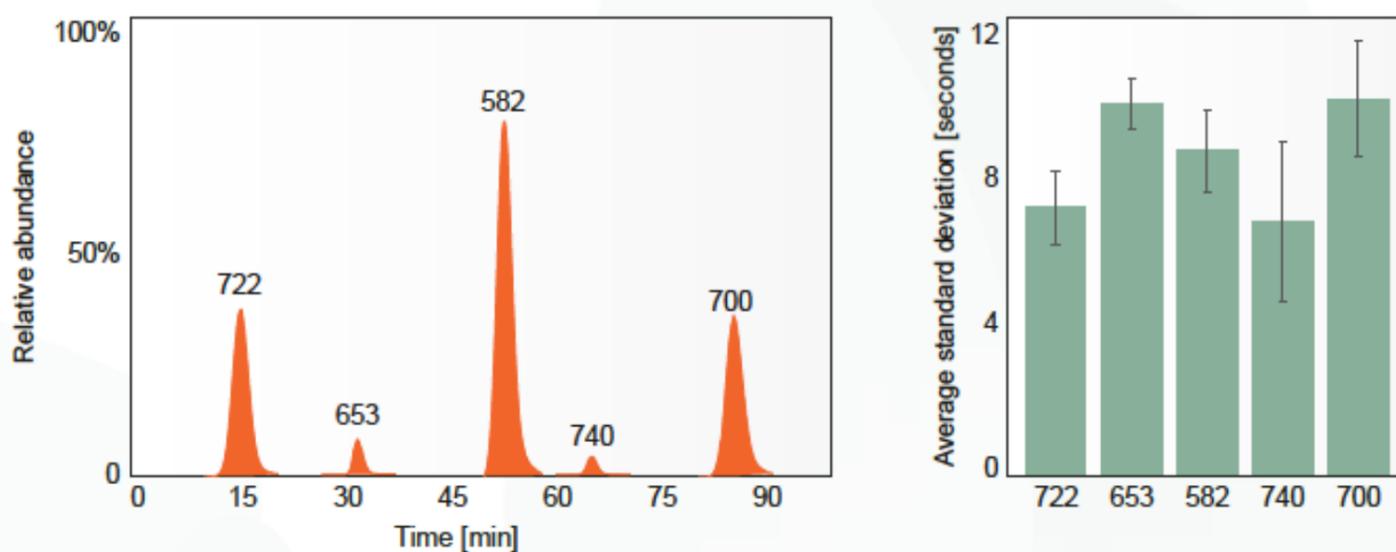


Рисунок 3: Пики пяти пептидов BSA и среднее стандартное отклонение для каждого набора измерений.

4. Результат использования метода в разных лабораториях

В сотрудничестве с двумя лабораториями мы провели оценку покрытия последовательности белков при использовании *расширенного метода*. Подготовка образцов белков клеточной линии HeLa, расщепленных трипсином, проводилась по стандартным протоколам лабораторий, отличающимся друг от друга. Пептиды растворяли, загружали в наконечники Evotips и не давали им высохнуть до начала анализа. Чтобы различия между экспериментами ограничивалось только различной работой *расширенного метода*, мы использовали в обеих лабораториях масс-спектрометр Orbitrap Exploris 480 (Thermo Scientific). Масс-спектрометр работал в режиме DDA (сканирование с автоматическим принятием решений на основании анализа предыдущих сканов) с использованием шаблона Top12. Разрешение устанавливалось на 60 000 для иона m/z 200, параметр MS AGC target составлял 300% со

временем накопления ионов (IT) 45 мс. Сканирование проводилось в диапазоне от 350 до 1400 m/z . Параметр AGC target для спектра дочерних ионов составлял 200%, а порог шума был установлен на $2E5$. Ширина окна изоляции составляла 1,3 m/z , нормированное значение энергии соударений было 30%. Опция совпадения пептидов была отключена, а опция исключения изотопов включена. Фрагментированные родительские ионы выключались из списка кандидатов на фрагментацию на 30 секунд. Фрагменты, полученные в результате высокоэнергетической столкновительной диссоциации (HCD), детектировались со скоростью сканирования 28 Гц с временем накопления ионов 22 мс и разрешением 15 000. Данные анализировались с помощью программного обеспечения SpectroMine, версия 2 (Biognisys). Время регистрации хроматограммы составляло 88 минут (рисунок 4).

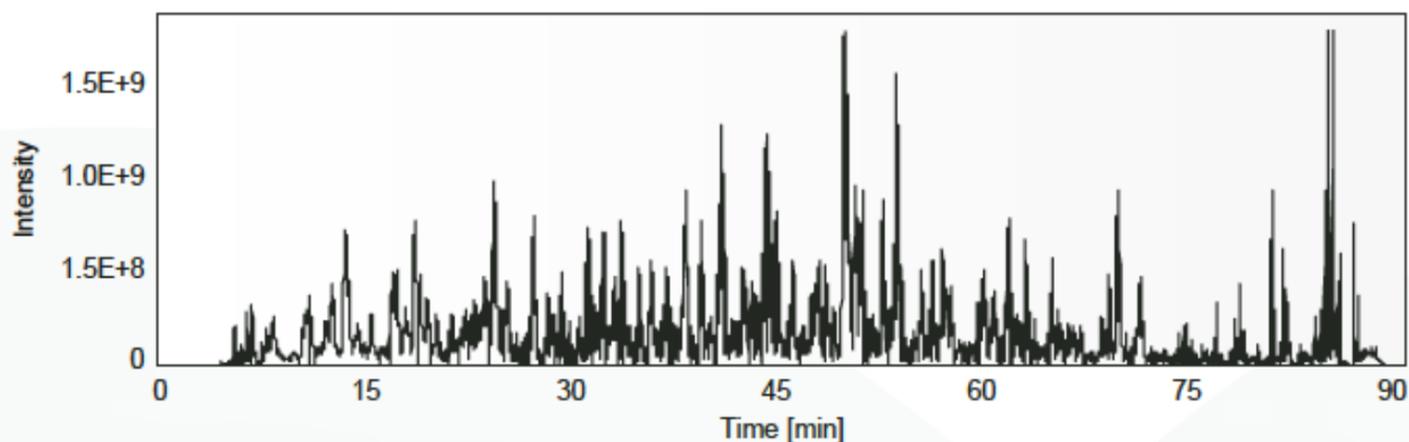


Рисунок 4: Хроматограмма, перестроенная по базовым пикам, образец: 500 нг пептидов, полученных в результате расщепления трипсином белков клеточной линии HeLa.

Для оценки качества и чувствительности *расширенного метода* мы использовали разные количества образца от 5 нг до 500 нг. Максимальная загрузка 500 нг дала примерно одинаковое протеомное покрытие в обеих лабораториях – около 35 000 уникальных пептидов и около 5000 белков, тогда как меньшие количества образца (5 и 50 нг) показали некоторое различие, которое можно

объяснить различиями в процедуре расщепления белков клеточной линии HeLa. Важно отметить прекрасную воспроизводимость повторных инъекций с коэффициентом корреляции 0.95 (рисунок 5) и то, что в целом результат работы двух лабораторий оказался схожим.

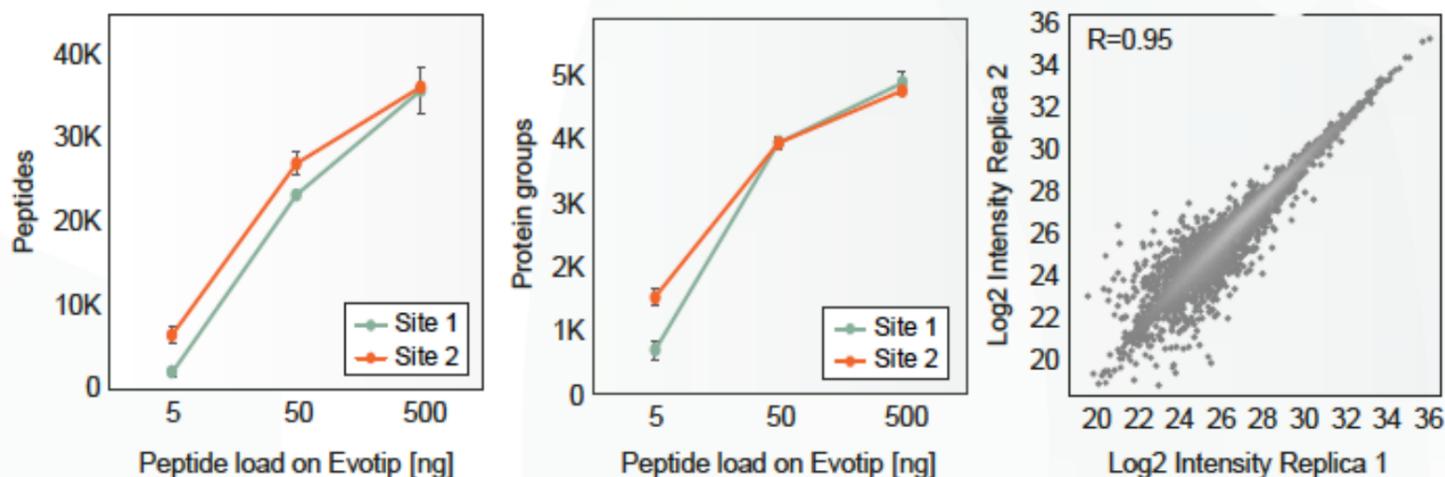


Рисунок 5: Идентификация и корреляция между инъекциями-повторами серии разбавлений пептидов, полученных из белков клеточной линии HeLa.

5. Заключение

Расширенный метод является последним пополнением нашего арсенала. Он специально разрабатывался для анализов, в которых требуется максимальное покрытие последовательности белков, получаемое в одиночном эксперименте, при сохранении таких известных преимуществ системы Evosep One как чувствительность, скорость и минимальные требования к обслуживанию. Мы оценили воспроизводимость времен

удерживания на разных системах Evosep One и обнаружили, что общее стандартное отклонение составляет 8 секунд. Мы протестировали результаты анализов, выполненных с использованием *расширенного метода* в двух разных лабораториях и выяснили, что метод позволяет рутинно идентифицировать 5000 белков из образца, содержащего 500 нг пептидов, не зависимо от процедуры получения пептидов из белков клеточной линии *HeLa*.

Ссылки

1. Bache N., Geyer PE., Bekker-Jensen DB., Hoerning O., Falkenby L., Treit PV., Doll S., Paron I., Müller JB., Meier F., Olsen JV., Vorm O., Mann M. (2018) A novel LC system embeds analytes in preformed gradients for rapid, ultra-robust proteomics. *Mol Cell Proteomics.*, mcp.TIR118.000853

Данные предоставлены

Johannes Müller², Fabian Coscia³, Lisa Scheizer², Karolina Sulek³, Andreas-David Brunner², Lylia Drici³, Jesper V. Olsen³ and Matthias Mann^{2,3}

² Max Planck Institute for Biochemistry, München, Germany

³ Novo Nordisk Foundation Center for Protein Research, Proteomics Program, University of Copenhagen, Denmark

Добавление долгого метода в систему Evosep One



В меню Windows Start выберите плагин Evosep One.



Выберете опцию изменения приложения Evosep One и следуйте инструкциям по установке.



Долгий метод теперь доступен в том же меню, где и стандартные методы.