

AttractSPE® Disks Tips C18 による精製で 97% 超のタンパク質同定

Institut Curie Centre de Recherche, PSL Research University: Mass Spectrometry and Proteomics facility (LSMP), FRANCE の Florent DINGLI と Damarys LOEW の研究の抄訳編です。

複数の C18 固相抽出チップを用いて、HeLa 消化物 100ng の脱塩精製を行いました。各チップとも 5 併行で操作し、これらペプチドの MS 解析結果を精製無し試料(アッセイ 1)と比較しました。

AttractSPE®Disks Tips は、柔軟なメンブランに微細粒子を濃密均質に格納した Stage Tips (ステージチップ) で、タンパクやペプチドの精製、分画、脱塩や医薬品分析など幅広い領域でとても利用されています。また、AttractSPE®Disks Tips には異なるキャパシティの T1(=15 μ g)、T2(=30 μ g)、T3(=45 μ g) が用意されており、ここでは T1(アッセイ 2)、T2(アッセイ 3) を用いました。またいくつかのラボで利用されているように T1 ディスクの上に AttractSPE®C18 カラムの充填パウダーを 2 mg 付加したチップも用いました(アッセイ 4)。



AttractSPE®Disks Tips は特に遠心法や陽圧法が適していますが、ここでは遠心法を共通法として用います。主要な他社製品 (C18 チップ 100 μ L) とも比較しました。アッセイ 5 では AttractSPE®Disks tips と共通の遠心法で、アッセイ 6 ではサプライヤの推奨するピペッティング法で比較しました。

表 1 - 試験概要

アッセイ No.	チップ	操作
1	未精製 (参照用)	—
2	AttractSPE®Disks Tips C18 T1 (200 μ L)	遠心法
3	AttractSPE®Disks Tips C18 T2 (200 μ L)	遠心法
4	AttractSPE®Disks Tips C18 T1 + C18 充填剤 2mg 付加	遠心法
5	他社製 C18 tips (100 μ L)	遠心法
6	他社製 C18 tips (100 μ L)	ピペッティング法 (他社推奨法)

試験法

通液試料: Hela タンパク質消化物 100ng の準備

Hela タンパク質消化物(Fisher scientific (Pierce™ HeLa Protein Digest Standard; Cat: 88329))20 μ を 1mL の 1M Urea 100mM Tris HCl pH 8.5 に懸濁し、20ng/ μ L 懸濁液を得ました。

この懸濁液 5.5 μ L (110ng)を 0.1%ギ酸 100 μ L とともに各チップに負荷しました。

プロトコル

表 2 - アッセイ 1~アッセイ 5 の遠心法プロトコル。すべて手操作

ステップ	操作	遠心-回転数 時間
1 コンテ イソニンク*	100µL 70% ACN; 0.1% FA	3000 RPM (0.8 RCF) 2分
2 平衡化	100µL 0.1% FA	3000 RPM (0.8 RCF) 2分
3 通液負荷	110ng HeLa Digest (100µL 0.1% FA)	2000 RPM (0.8 RCF) 4分
4 洗浄	100µL 0.1% FA	3000 RPM (0.8 RCF) 2分
5 溶出	100µL 40% ACN; 0.1% FA	3000 RPM (0.8 RCF) 2分
6 乾燥	急速真空乾燥	
7 再懸濁	5.5µL(含 iRT)に懸濁し、5µL (100ng 相当) を LC-MS/MS に注入	

表 3 - アッセイ 6 のプロトコル

ステップ	操作
1 コンテ イソニンク*	100µL 50% ACN
2 平衡化	100µL 0.1% TFA
3 通液負荷	110ng HeLa Digest in 100µL 0.3% TFA
4 洗浄	100µL 0.1% TFA
5 溶出	100µL 50% ACN 0.1% FA
6 乾燥	急速真空乾燥
7 再懸濁	5.5µL に懸濁し、5µL (100ng 相当) を LC-MS/MS に注入

AC: アセトニトリル、FA: ギ酸

LC-MS/MS:

Chromatography: RSLCnano system (Ultimate 3000, Thermo Scientific) coupled online to an Orbitrap Exploris 480 mass spectrometer (Thermo Scientific). C18 column (75 µm inner diameter × 2 cm; nanoViper Acclaim PepMap™ 100, Thermo Scientific) with buffer A (2/98 MeCN/H₂O in 0.1% formic acid) at a flow rate of 3.0 µL/min over 4 min. Separation: 50 cm × 75 µm C18 column (nanoViper Acclaim PepMap™ RSLC, 2 µm, 100Å, Thermo Scientific) regulated to a temperature of 40° C with a linear gradient of 3% to 29% buffer B (100% MeCN in 0.1% formic acid) at a flow rate of 300 nL/min over 91 min. MS full scans: ultrahigh-field Orbitrap mass analyzer in ranges m/z 375–1500 with a resolution of 120 000 at m/z 200. The top 20 most intense ions were isolated (isolation width of 1.6 m/z) and fragmented (collision energy: 30%) by higher energy collisional dissociation with a maximum injection time of 60 ms, normalized automatic gain control target set to 100%, and 15000 resolution. Charge state from 2+ to 6+ were selected, and dynamic exclusion was set to 40s.

Software/Database:

Sequest HT through Proteome Discoverer (version 2.4) myProMS (PMID: 17610305, Institut Curie homemade web server) UniProt database, the Homo sapiens (UP000005640)

結果と検討

ペプチドにおける比較

図1と表4に各アッセイによる同定ペプチド数を、表4に参照の未精製試料（アッセイ1）と比較のロス率を示しました。AttractSPE®Disks Tipsの全アッセイにおいて、同定ペプチド数は参照試料の約34,400に対し32,000超と非常に近いものでした。

今回は溶出時の意図しない充填剤への滞留ロスを観察するために、100ngという低濃度で実施しました（ペプチドの濃度が低いほど、充填剤滞留ロスが可視化されやすい）。AttractSPE®Disks Tipsによる3つのチップは、T1、T2（=T1の2倍容量）、T1+パウダーで充填剤量が異なりますが、この量がロス率に影響せずほぼ同程度（5.1～6.1%）でした。この事は、ロスの主因が充填剤滞留によるものではなく、操作全般にあることを示唆しており、AttractSPE®Disks Tipsにおけるロス率が、手技によるものよりも許容されるレベルであることがわかりました。

他社製チップの同様の遠心試験法および他社推奨ピペッティング試験法では、プロトコルの違いは結果に影響せず、ロス率はいずれも22%超と高くなり、また低濃度にもかかわらずロス率は高いものでした。

図1ーペプチド同定数(PSM)

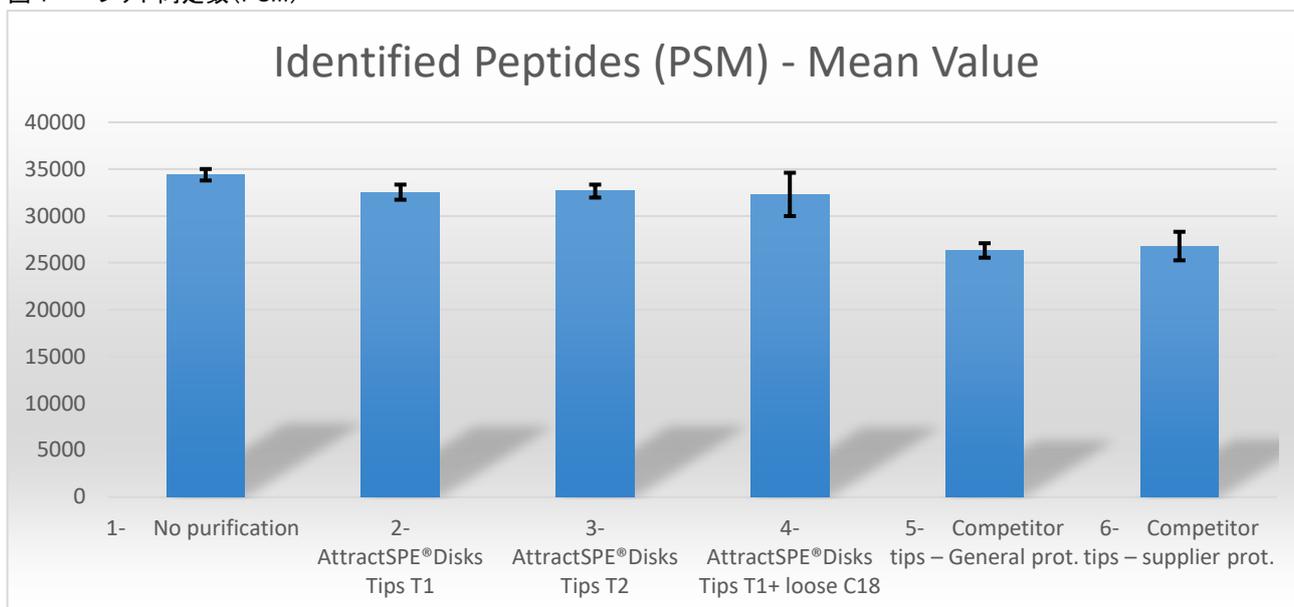


表4ー未精製参照試料と比較したペプチド同定数とロス率

アッセイ No.		ペプチド同定数(PSM)	ロス率
1	未精製（参照用）	34,398	—
2	AttractSPE®Disks Tips C18 T1	32,538	5.4%
3	AttractSPE®Disks Tips C18 T2	32,654	5.1%
4	AttractSPE®Disks Tips C18 T1+充填剤	32,300	6.1%
5	他社製 C18 tips	26,317	23.5%
6	他社製 C18 tips	26,787	22.1%

タンパクにおける比較

図2と表5に各アッセイによる同定タンパク数を、表5に参照の未精製試料（アッセイ1）と比較したロス率を示しました。AttractSPE®Disks Tipsによる全アッセイにおいて、同定タンパク数は参照試料の約4,200に対し4,000超で、3%未満のロス率という優れた性能を示しています。

他社製チップの同様の遠心試験法および他社推奨ピペッティング試験法では、プロトコルの違いは結果に影響せず、ロス率はいずれも12%超と高くなり、また低濃度にもかかわらずロス率は高いものでした。

図2ータンパク同定数

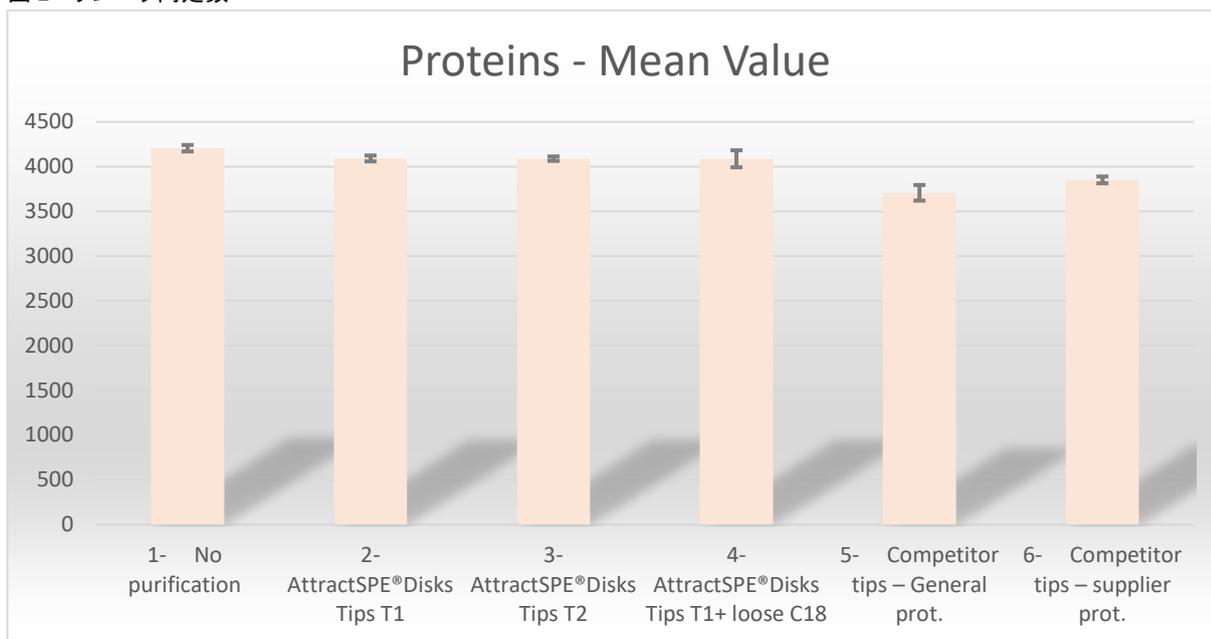


表5ー精製無し試料と比較したタンパク同定数とロス率

アッセイ No.		タンパク同定数	ロス率
1	未精製（参照用）	—	—
2	AttractSPE®Disks Tips C18 T1	遠心法	2.7%
3	AttractSPE®Disks Tips C18 T2	遠心法	2.8%
4	AttractSPE®Disks Tips C18 T1+充填剤	遠心法	2.8%
5	他社製 C18 tips	遠心法	11.9%
6	他社製 C18 tips	ピペッティング法	8.4%

Proteome Discoverer Software version 2.4 (Thermo) による結果の分析

図3および図4はリテンションタイムにおける PSM 数の累計と経時変化を示しています。

保持時間はペプチドの親水性により、短いほど親水性があります。AttractSPE®Disks Tips ではペプチドがその親水性によらず網羅的かつ均質に保持されたことが二つの図からわかります。

一方で、他社製のチップにおいては、ペプチドのロスが全域にわたっていることがわかります。

図3 リテンションタイムと PSM 数 累計

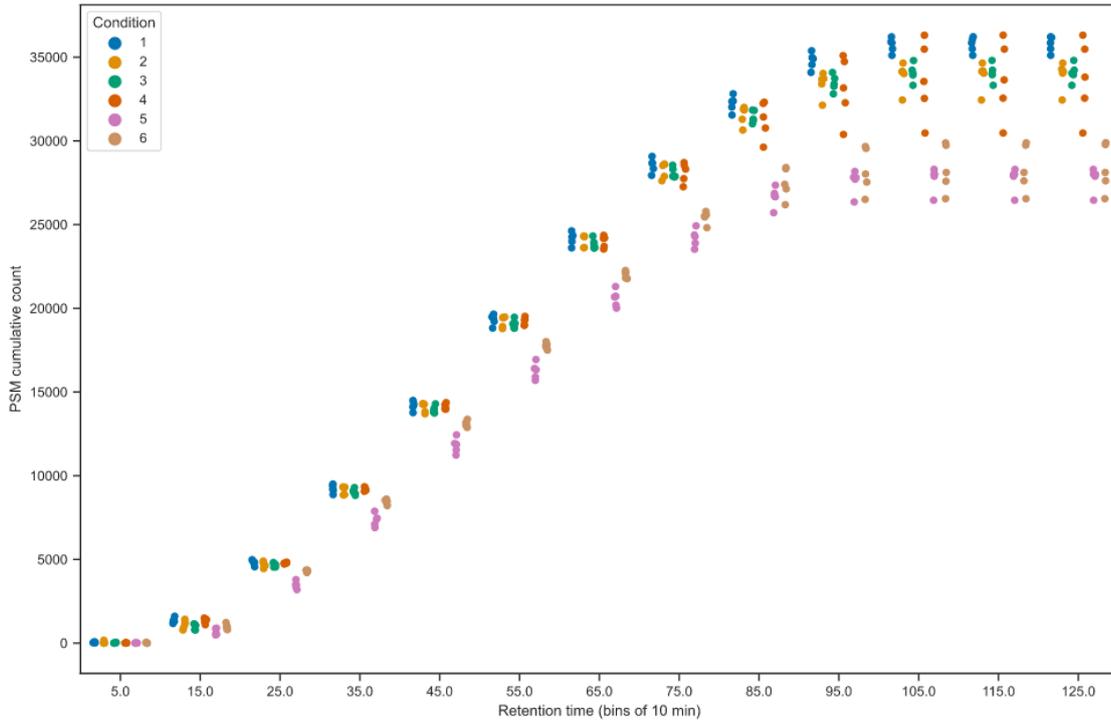


図4 リテンションタイムと PSM 数

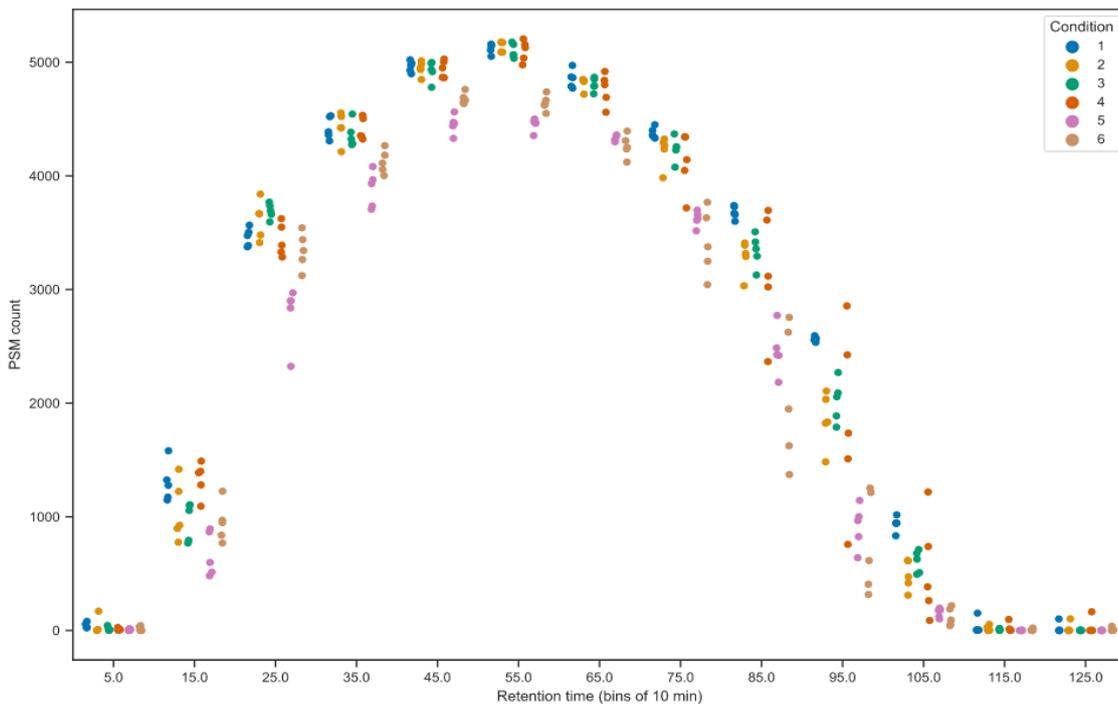
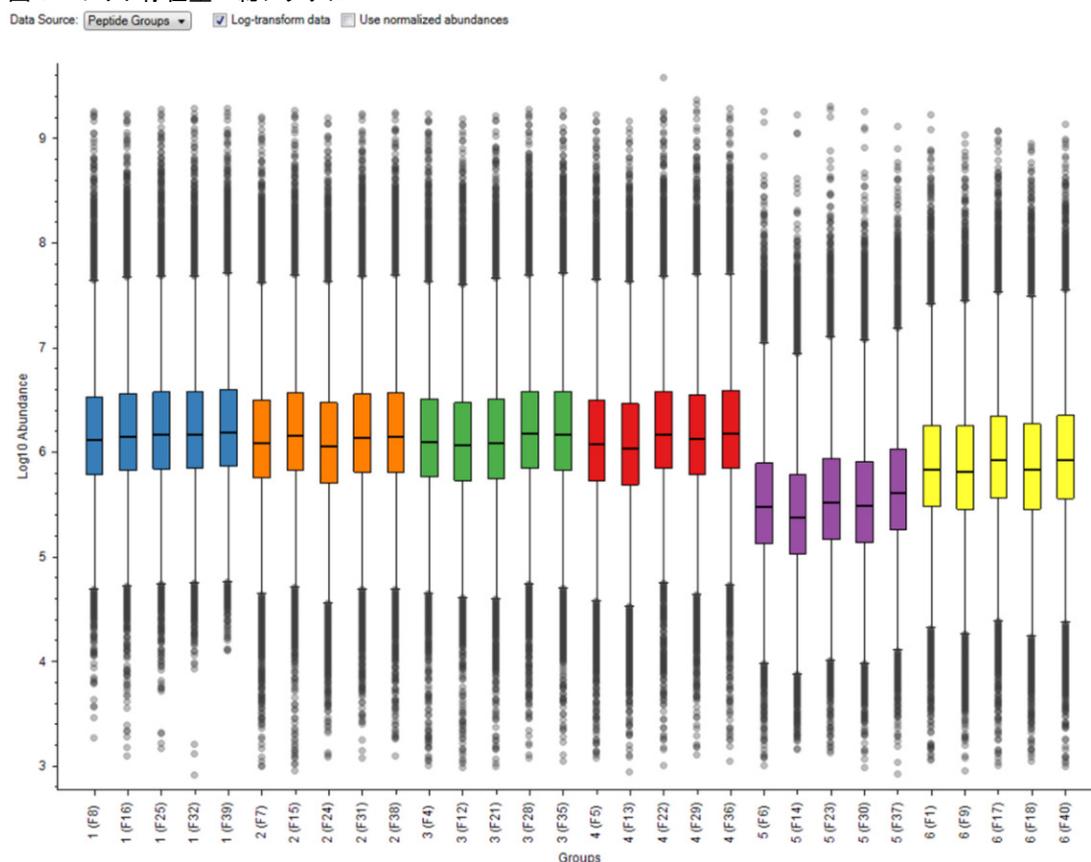


図5では、各チップにおけるペプチド存在量を示しています。各5 併行において変動は小さく、各実験の再現性が高く結果の信頼性も高いものといえます。

図5 ペプチド存在量—総シグナル



結論

このアプリケーションノートでは、HeLa 消化物 100ng を用いて脱塩精製の性能を比較しました。

AttractSPE®Disks Tips C18 の異なる保持容量 T1、T2、T1+C18 パウダー、および他社製 C18 チップについて、精製無しの試料と比較したものです。試験は原則、プロトコルに既述の遠心法を用いましたが、他社製チップの1 試験において他社推奨のピペッティング法を用いました。ペプチドの量は、充填剤による滞留を正確に推計するため、100ng となるよう調製しました。

結果、AttractSPE®Disks Tips C18 tips ではによらず全チップにおいて、ペプチドのロス是最小となりました（約 5%）。T1 と T2 では本来保持容量が異なるにもかかわらず、ペプチドやタンパクの同定数比率は同様であることから、ペプチドのロスが充填剤によるものでなく、滞留も少ないことを示しています。

他社製チップによる試験では 20%超のロスがありました。これは AttractSPE®Disks Tips で用いられる遠心法でも、他社推奨のピペッティング法でも同じでした。また、解析のリテンションタイム全域でペプチドのロスが見られました。

AttractSPE®Disks Tips C18 では全チップにおいて、97%超のタンパクが同定されました。また、intra でも inter でも変動は小さいものでした。

結果、AttractSPE®Disks Tips C18 の3つの保持容量チップに対して、ペプチドの脱塩精製についての評価を行いました。すべてペプチドのロスが最小で、タンパクの 97%を同定するという優秀な性能でした。またリテンションタイム全域でペプチドが効果的に脱塩され、これらのチップはペプチド精製を行うのに最適な高い性能を有していることがわかりました。