BioSPE™ PurePep SPE Tip (S) の適用量評価

試験方法や製品版のプロトコルなどの詳細は別途、お問合せください。

はじめに

Affinisep 社が提供する AttractSPE™ Disk Tip（通称 Stage-Tips）は、ペプチドの脱塩や分画、インタクトプロテインの精製など、多岐にわたるプロテオミクス分野で優れた性能を発揮します。柔軟で均一、高密度に粒子を埋め込んだ小さなメンブランディスクを装填したチップデバイスなので、無駄となる通液量を大幅に削減するとともに、高い抽出能力を備えています。BioSPE™ PurePep Tips – 200µL は、標準容量(S)および高容量(H)の 2 種類があり、それぞれ 15µg と 50µg の負荷キャパシティがあります。

以前のアプリケーションノートでは、容量の異なる AttractSPE™ Disk Tip を他の市販ブランドと比較し、ペプチド脱塩性能の評価を行いました。その結果、AttractSPE™ Disk Tip はペプチドの損失を最小限に抑え、トリプシン消化物中に存在するタンパク質の 97%を効率的に同定できることが確認されています。

このアプリケーションノートでは、BioSPE™ PurePep Tips 200µL(S) を使用してペプチド脱塩の適用量の範囲を評価しています。HeLa 消化物を 1ng から 10µg までの範囲で SPE Tips に負荷し、脱塩処理を実施しました。なお、110ng 以上の負荷では、バイアスを避けるためにペプチド 100ng を LC-MS/MS で分析しました。実験は手動で実施されています。

方法

- HeLa Digest※1 20µg を 1mL※2 に溶解。原液濃度 20ng/µL
- #2, #4, #6, #7 は適宜希釈して 100µL 溶液から精製。#8, #9 は 20ng/µL 原液を必要量精製。
- 各試料を BioSPE™ PurePep Tips 200µL(S)で 3 点ずつ処理。
- #1, #3, #5 は無処理。HeLa Digest 粉末を 0.3% TFA で溶解のみ

※1：Pierce™ HeLa Protein Digest Standard; Cat: 88329　※2：1M Urea 100mM Tris HCl(pH 8.5)

試料番号 #	BioSPE PurePep Tip200(S) への HeLa Digest 負荷量	LC-MS/MS への HeLa Digest 量	
# 1	脱塩処理無	1 ng	（参照）
# 2	1.1 ng	1 ng	
# 3	脱塩処理無	10 ng	（参照）
# 4	11 ng	10 ng	
# 5	脱塩処理無	100 ng	（参照）
# 6	110 ng	100 ng	
# 7	1 µg	100 ng	
# 8	5 µg	100 ng	
#9	10 µg	100 ng	

脱塩プロトコル

ステップ	操作	遠心時間 / 回転速度
1 コンディショニング	100µl 70% ACN; 0.1% FA	1 分 / 2000 rpm
2 平衡化	100µl 0.1% FA	1 分 / 2000 rpm
3 ローディング	X ng HeLa Digest	1 分 / 2000 rpm
4 洗浄	100µl 0.1% FA	1 分 / 2000 rpm
5 溶出	100µl 40% ACN; 0.1% FA	1 分 / 2000 rpm
6 エバポレーション	高速真空	―
7 再溶解 試料 #2, #4, #6 は、5.5µL の溶液に再懸濁、それぞれ 5µL（1ng, 10ng, 100ng）を LC-MS/MS へ 試料 #7, #8, #9 は濃度 20ng/µl に調整され、5µl（100ng に相当）が注入され LC-MS/MS へ		

略語: ACN : アセトニトリル　FA : ギ酸

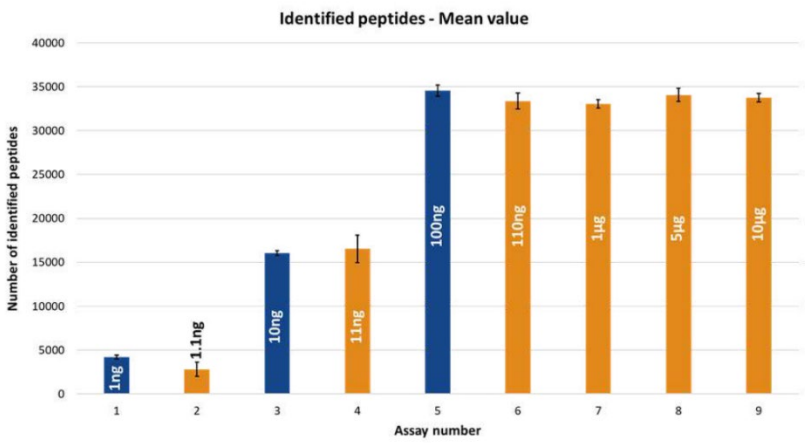
LC-MS/MS メソッド

利用システム：Ultimate 3000 RSLCnano システム＋Orbitrap Exploris 480 質量分析計（Thermo Scientific 社）
ペプチドトラップ：C18 カラム（75µm × 2 cm、nanoViper Acclaim PepMap™ 100、Thermo Scientific）、緩衝液 A（0.1% FA 2/98 ACN/H2O）、流速 3.0 µL/分、4 分間。
分離： C18 カラム（75 µm × 50 cm、nanoViper Acclaim PepMap™ RSLC、粒径 2 µm、細孔径 100Å、Thermo Scientific）。40° C、緩衝液 B（0.1% FA 100% ACN） 3%～29% グラジエント、流速 300 nL/分、91 分間。
質量分析（MS）：超高分解能 Orbitrap 質量分析フルスキャン、m/z 375‑1500 、m/z 200 分解能 120,000。
最強度イオン 20 個を選択、正規化衝突エネルギー 30% による高エネルギー衝突解離（HCD）活性化により、さらに断片化。分解能 15,000、AGC ターゲットは 100%。電荷状態 2+ ～ 6+で選択、動的除外は 40 秒間。

結果と考察

データ解析: タンパク質の同定には、Homo sapiens (UP000005640) UniProt データベースから、Proteome Discoverer（バージョン 2.4）内の Sequest HT を通じてデータを検索、さらに myProMS（PMID: 17610305、Institut Curie 製ウェブサーバー：https://github.com/bioinfo-pf-curie/myproms) により処理。

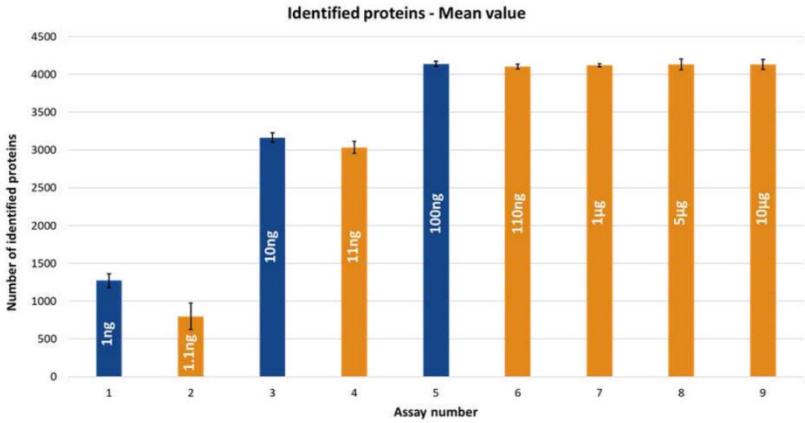
図 1: 各アッセイで同定されたペプチド数



橙色は、BioSPE™ PurePep Tips で脱塩した試料から同定されたペプチド数を示し、青色は参照試料（1ng、10ng、100ng を前処理せず直接注入）の同定結果を示しています。

BioSPE™ PurePep Tips を使用した 10ng 以上のアッセイでは、参照試料とほぼ同等のペプチド数が確認されています。一方、1ng のアッセイでは、参照溶液では操作が少ないのに比して、消耗品の壁面や、蒸発および再溶解工程で損失が発生する可能性があり、また脱塩対象のペプチド量が極めて少ないにもかかわらず、多くのペプチドが同定されており、性能の高さを示しています。また、100ng 以上の試料では、RSD（相対標準偏差）が 3%未満と非常に高い再現性が得られています。RSD は、ペプチド量が 10ng、1ng となるにつれて、RSD に増加傾向が見られますが、量が極めて少ないため、妥当なものといえます。

図 2: 各アッセイで同定されたタンパク質数



橙色は、BioSPE™ PurePep Tips で脱塩した試料から同定されたタンパク質数を示し、青色は参照試料（前処理せず直接注入）の結果を示しています。

BioSPE™ PurePep Tips を使用した 10ng 以上のアッセイでは、同定されたタンパク質の数が参照試料と非常に近いことが確認されています。1ng のアッセイでも、量が非常に少ないにもかかわらず、同定されたタンパク質の数は依然として非常に高い値を示しています。また、10ng 以上のサンプルでは、RSD（相対標準偏差）が 3%未満と非常に高い再現性が得られています。一方で、1ng のペプチドでは RSD に増加が見られますが、量が極めて少ないため、妥当なものといえます。

図 3: ペプチドグループの存在量 – 総シグナル

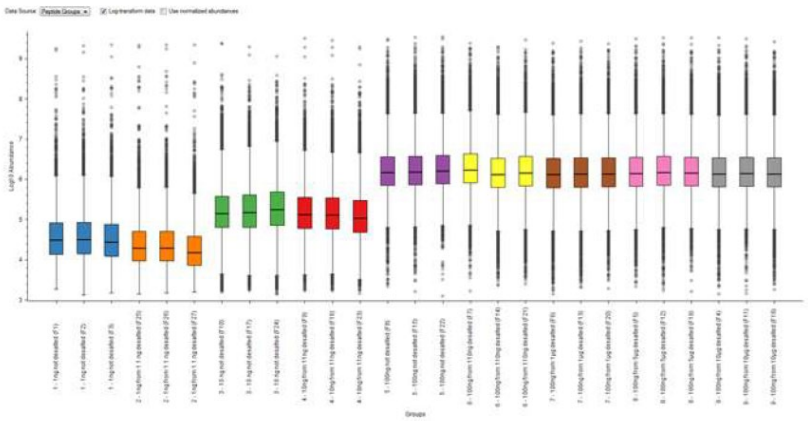


図 3 では、各チップにおけるペプチドグループの総存在量を示しています。3 回繰返し間で観察された変動は非常に小さく、各実験の再現性が高いことが確認されました。この結果は、得られたデータの信頼性が高いことを示す重要な指標となります。

まとめ

この稿では、BioSPE™ PurePep Tips(S)を用いたペプチド脱塩の作業範囲を探求しています。

1ng から 10µg のペプチド（10,000 倍の範囲）が SPE チップにロードされ、脱塩後に、1ng、10ng、100ng の参照溶液と比較されました。可能な場合には 100ng のペプチドを注入しました。

1ng の結果は、処理プロセスを考慮すると非常に良好でした。このような微量のペプチドを扱うことは、消耗品の壁面や蒸発・再溶解ステップでの損失の可能性があるため非常に難易度が高いですが、この結果は BioSPE™ PurePep Tips(S) が単一細胞レベルの分析にも使用可能であることを示しています。

10ng から 10µg の範囲では、同定されたペプチドおよびタンパク質数からその性能が非常に優れており、再現性も非常に高いことが確認されました。このことから、BioSPE™ PurePep Tips(S) は、この範囲内での脱塩ツールとして非常に有効であることが示されています。10µg のペプチド量においても性能の低下は見られず、このツールはさらに多量のペプチドにも使用可能であることを意味しています。

本アプリケーションノートで使用された製品

BioSPE™ PurePep SPE Tips 200µL (Standard)