

Application note

EVUSEP

Evosep One solves the proteomics dilemma - covering high throughput analysis and proteome depth

1. 引言

基于质谱的蛋白质组学正在快速发展，目前市场上有一套强大的技术体系有潜力彻底改变医疗健康并实现精准医学。这一切得益于质谱精度的提高、质谱仪扫描速度、鉴定深度显著增加以及灵敏度大幅提升等的影响。为了进一步将这项技术运用到临床中，Evosep One采用了一种新颖且极其稳健的方法，预设6种不同的洗脱梯度。相应的六种标准方法确保了高通量、稳健性、可重复性和便捷性。它们涵盖了一系列应用，从每天分析500个样本的超高通量到每天分析30个样本的深度蛋白质组应用（图1）。

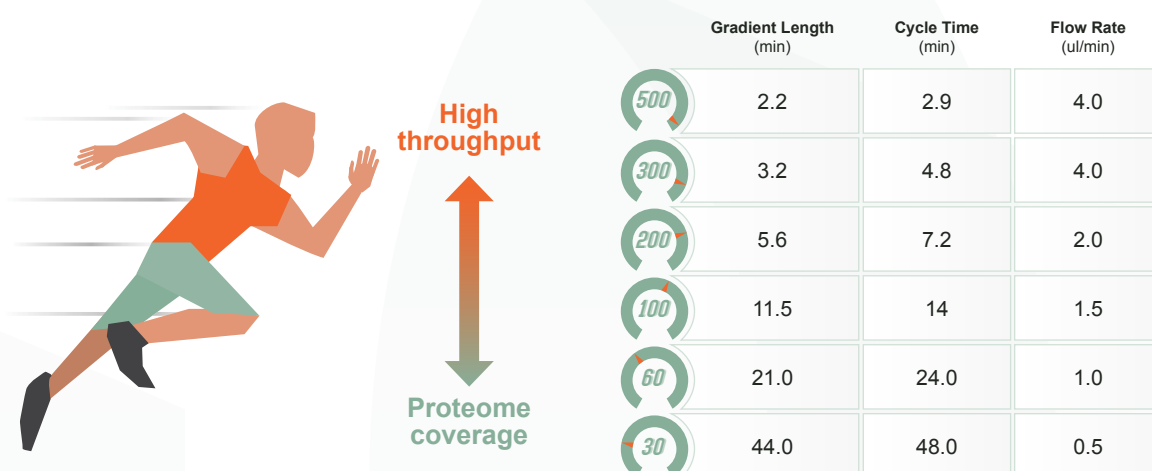


图1：六种标准方法，高达每天500个样本。

2. 极短的系统等待时间

Evosep One专为高通量和稳健性设计，同时保持了对样本检测的灵敏度。低压泵（AB）从一次性耗材Evotip中洗脱样品，CD泵形成额外的梯度，产生梯度偏移，同时形成色谱梯度，储存在Loop环中。以确保在高压泵（HP）推动分析柱分离之前，肽段有效地预分离，然后高压泵将预分离肽段推入分析柱实现峰形优化。这种简化的设计使其能够在数万个样品分析中稳健运行。此外，仪器的不同步骤是同时运行的，将系统等待时间降低到仅为最短方法的0.7 min和更长梯度的4min，从而提高质谱利用率（图2）。



图2：不同步骤同时运行，以减少系统等待时间

3. 高分离能力

峰容量是评价色谱性能最常见的衡量标准，定义为在梯度内可容纳的最多峰个数。在这里，我们将峰容量定义为在洗脱窗口（从第一个到最后一个被识别前体的保留时间），最高峰半峰宽（FWHM）线所包含的峰总数。通常使用更长的梯度和更长的色谱柱来增加峰容量（图3），但这并没有线性关系，而更长的梯度时间会降低样品通量，这是临床研究中的关键因素。对于复杂样品的高通量分析，以最短时间内获得最高的峰容量作为相关的度量标准。通过采用超快速方法，使用短的色谱柱和高流速来提供最佳分离能力（图3），在较短的时间实现经济性和高效性。重要的是，较窄的峰大大减少了多余采样，从而表明采用更快的标准方法可以提高分析的灵敏度

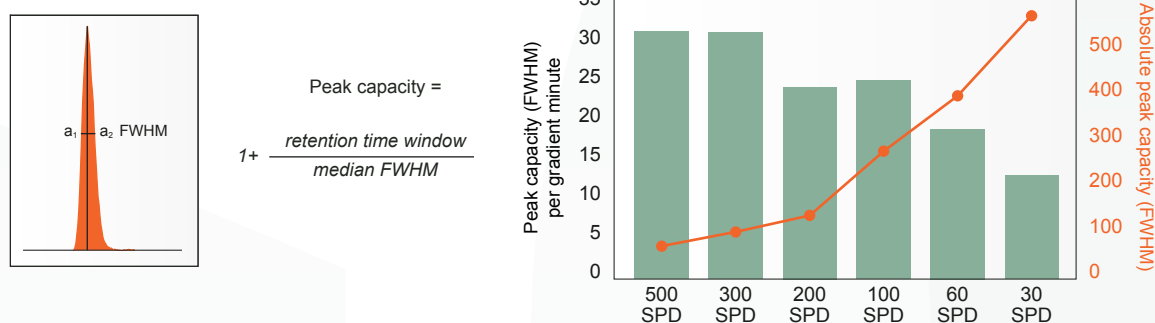


图3 每种方法下的每梯度分钟峰容量（绿色）和绝对峰容量（橙色）。

4. 方法

使用基于磁珠上蛋白富集捕获（PAC）HeLa细胞裂解物，通过NanoDrop检测肽段浓度。Evotips以200 ng的上样量进行四次样本重复，并使用所有标准方法进行分析。500、300和200 SPD方法使用EV1107 Endurance色谱柱在室温（在本例中为23° C）下运行。EV1109 Performance色谱柱用于100和60 SPD方法，EV1137 Performance柱用于30 SPD方法，两种Performance色谱柱均在40° C下运行。样品在timsTOF Pro 2（Bruker）质谱仪上使用“dia-PASEF短梯度法”进行检测。每个样本的数据使用DIA-NN（版本1.8.1）以library-free模式，对已审查的人类蛋白质组（UniProt，2021年11月，20,360个无亚型条目）进行独立处理，并在重复样本中启用MBR（运行之间匹配的功能）。鉴定结果表示为蛋白质组和前体蛋白，如pr_matrix.tsv和pg_matrix.tsv文件中所述。

5. 出色的蛋白质组深度

良好的色谱性能至关重要，特别是要充分利用MS/MS的高扫描速率。虽然质谱仪负责质量精度和循环时间，但色谱性能决定了用于电离的肽段数量。肽段数量也影响了电喷雾电离（ESI）的效率，因为它们在空间和电荷上竞争，导致抑制效应。所有这些因素会直接影响检测到的肽段数量，因此影响可识别蛋白质的数量。使用30 SPD方法在timsTOF Pro 2（Bruker）上分析200 ng HeLa肽段，检测到接近70,000个前体同时鉴定出数量较多的肽段，说明通过dia-PASEF和更长的梯度时间可以增加前体的数量（图4）。然而，在过去，实验目标通常是更高的蛋白质鉴定量，更快速的仪器优先转向了具有更多生物学重复来提高通量。这体现了蛋白质组深度与样品通量之间的潜力。在仅2.2分钟的梯度时间（500 SPD）内鉴定了超过8,000个前体。当采用稍长的300 SPD方法时，前体深度显著增加了156%，而采用200 SPD方法鉴定出额外30%的前体。在整个标准方法中观察到线性趋势（图4）。这呈现了蛋白质组鉴定的相应趋势，其中采用500 SPD方法鉴定了略高于2,000个蛋白质组，然后随着通量降低到30 SPD方法，逐渐增加到超过7,000个蛋白质组（图5）。100和200 SPD方法都鉴定了超过6,000个蛋白质组。这一数据表明，在整个SPD方法范围内的总体蛋白质组覆盖率是稳定的，在大型筛选实验中，快速方法检测一定量的蛋白质组具有较高的吸引力。这些鉴定量通过library-free搜库，可以通过使用特定的数据库进一步提升。得注意的是，变异系数（CVs）表现出色，对于所有方法，中值CV都在10%以下，而30 SPD方法对所有已识别的蛋白质组实现了CV显著低于5%（图5）。

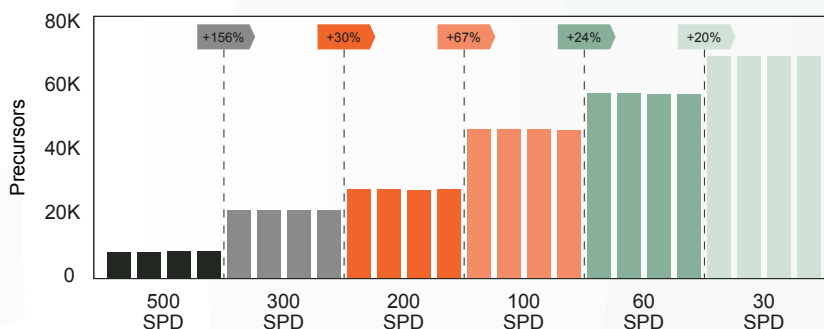


图4：在200 ng肽段的四个重复样本中识别的前体。百分比表示相对于前一方法的增加量。

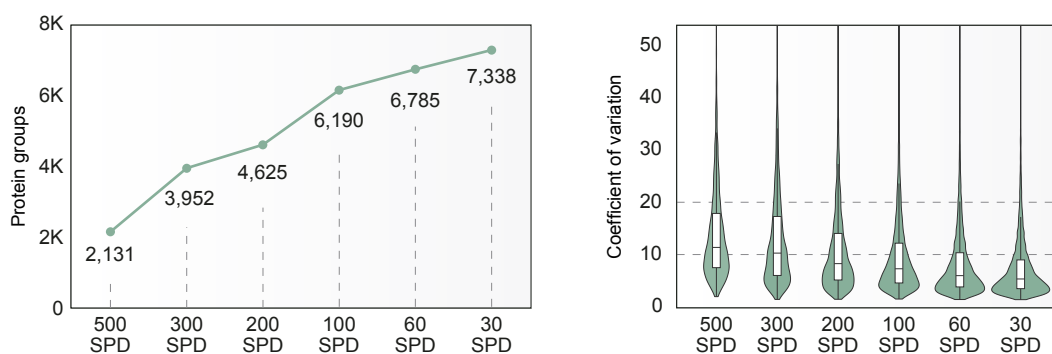


图5：使用200 ng肽段在不同方法下的蛋白质组鉴定量和CV值。

为了在较短的LC-MS时间内获得最高的蛋白质鉴定量，可以采用最快的标准方法进行多馏分跑样策略。一般来说，短梯度上运行是仪器使用时间和鉴定深度之间的最有选择。对于高通量应用，每天300个样本的方法是快速的绝佳选择，这反映在每分钟识别的前体和蛋白质的数量上(图6)。

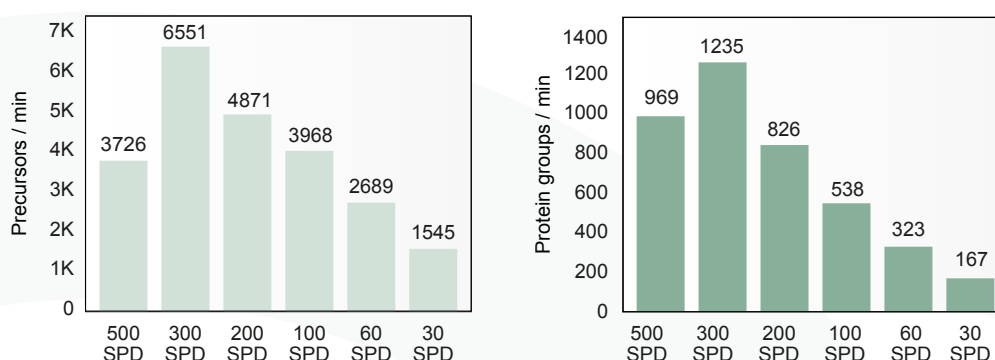


图6：200 ng肽段样本在不同方法下的前体和蛋白质鉴定数。

6. 结论

通过六种标准方法，Evosep One涵盖了从长梯度的蛋白质组分析到超高通量的一系列应用。由于每一种方法在识别前体和蛋白质方面相互关联，在开始一系列实验之前，研究人员仔细审查与样本通量相关的最佳蛋白质组覆盖水平至关重要。由于质谱仪在未来可能变得更快、更灵敏，我们期望短方法每分钟有更高的峰容量使高通量方法越来越普遍