

Application note

# EVUSEP

## Evotip Pure simplifies workflows with excellent reproducibility, storage and recovery

### 1. 引言

Evosep One使临床蛋白质组学成为可能，并以强大、可重复和快速的方式检测大队列样本。Evotip是该技术的关键，因为它通过脱盐实现了无缝集成前端样品制备，与Evosep One上的样品加载和局部洗脱相结合，用于经典的自下而上蛋白质组学工作流程。在这里，我们评估了样品加载的可重复性，用60 SPD和Whisper 40 SPD进行靶向蛋白质组学检测Evotip载样的线性范围。我们的目标是指导在Evosep One用于常规测试环境，如靶向自下而上的蛋白质组学工作流程的应用。

此外，质谱分析前对样品进行存储通常是必要的，通常使用管子、板或液相进样瓶进行。然而，在处理样本时，特别是微量样本，额外的转移步骤和肽段粘附于塑料中，会导致不同程度的样品损失，特别是在处理微量样本时。为了进一步简化从微量样品制备到质谱分析的过程，我们评估了Evotip作为微量样品的存储容器的效果，并在加载样品后的14到28天内进行分析。

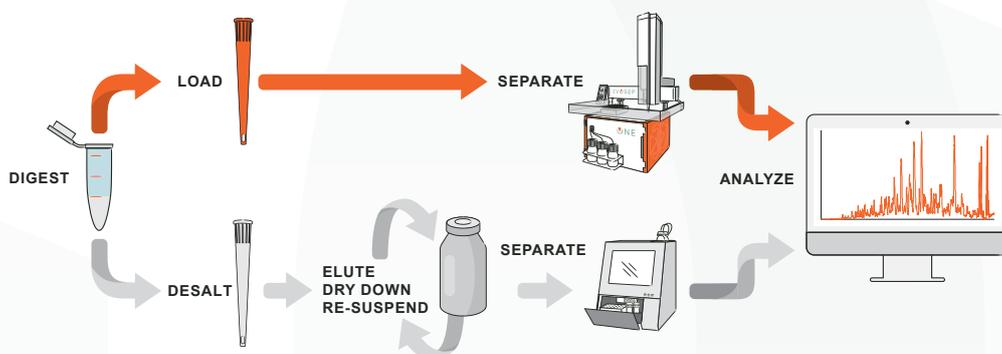


图1: Evotip Pure通过将肽纯化与样品装载和洗脱相结合，简化了蛋白质组学的工作流程。

## 2. 方法细节

牛血清白蛋白 (BSA) 酶解肽段购自Bruker Daltonics LabScape (8217498), 稀释至最终浓度为10 fmol/ $\mu$ l。HeLa酶解肽段是使用蛋白质富集捕获 (PAC) 珠, 进行蛋白质结合、清洗和酶解消化得到的, 用NanoDrop (Thermo Scientific) 定量。

对于线性实验, HeLa酶解肽段从1000 ng连续稀释到62 pg, 每个浓度的做了三个样本重复。

对于存储实验, HeLa酶解肽段在200 pg和50 ng上样量做了四个样本重复, Evotip浸泡在溶剂A中4 °C存储14天 (200 pg上样量), 28天 (50 ng上样量) 或在加载样品后立即分析。所有样品在同一天进行分析。

对于Evotip载样的可重复性实验, BSA酶解样品以随机顺序使用100 SPD方法搭配EV1109色谱柱 (Evosep) 进行检测。对于Evotip线性实验, 使用Whisper 40 SPD方法搭配EV1112色谱柱 (Evosep) 和60 SPD方法搭配EV1109色谱柱进行HeLa酶解肽段的检测, 两个色谱柱都在40 °C下使用。Agilent 6495C QQQ质谱仪以正离子模式运行, 气体温度为200 °C, 干燥气流流量为11 L/min。毛细管电压为1750 V, 高/低压射频电压分别为200/110 V, Delta EMV为200 V。Q1和Q3设置为Wide/Wide。最小和最大停留时间分别设置为2.61和497.83 ms。使用183个MRM的500 ms的周期时间。每个肽段监测了至少三次。使用Skyline (21.2.0.425) 提取原始数据, 并使用排名最高的响应峰来计算肽峰面积。对于存储实验, 使用Aurora Rapid75柱 (IonOpticks) 在50 °C下使用Whisper 80 SPD方法对200 pg肽段进行分析。样品在timsTOF Pro 2质谱仪上进行检测。对于dia-PASEF采集, 使用包含8个TIMS斜坡的窗口设置方案, 每个斜坡包含3个质量范围, 跨度从400-1000 m/z和从0.64-1.40 1/K0, 循环时间为0.95秒, 包含在一帧MS1。使用“dia-PASEF-短梯度方法”在timsTOF Pro 2质谱仪上使用100SPD方法搭配EV1109色谱柱, 柱温40 °C, 对50 ng的上样量进行测量。每个样本的数据都由DIA-NN (版本1.8) 在library-free模式下处理, 对经过审查的人类蛋白质组 (UniProt, 2021年11月, 20,360个不包括异构体的条目) 进行了微小修改, 其中错过的切割数为2, 氧化亚硫酸甲基为可变修饰。在技术重复中启用了MBR (match-between-runs), 并将蛋白质干扰设置为“Genes”。定量策略设置为“Robust LC (高精度)”。蛋白质数量表示来自DIA-NN报告的独特蛋白质组。

## 3. 可重复性

首先, 通过监测BSA酶解肽段中的六个肽段, 研究了Evotip Pure样品在一组96个样品上的可重复性。该测定中包括的肽段在100 SPD方法的完整梯度中均匀洗脱。在96个Evotips的六个监测的肽段中, 变异系数 (CV) 均在10%以下, 表现出高度的稳健性 (图2)。

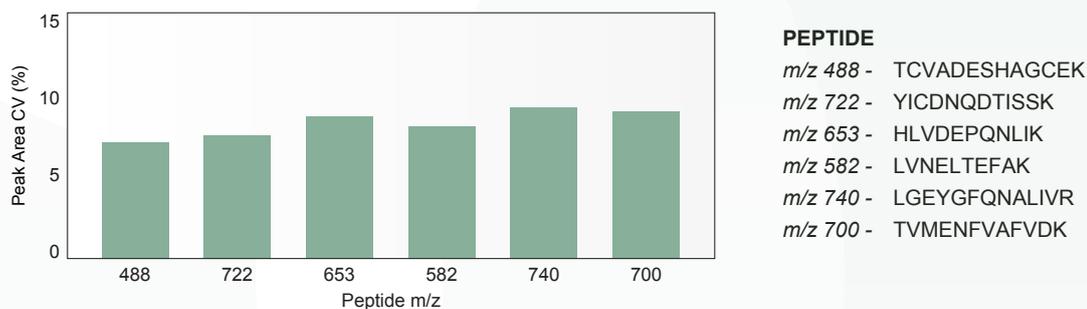


图2: 所有检测到的肽段 (n=96) 的肽段CV。

## 4. 线性

接下来, Evosep One与安捷伦6495C质谱仪连用, Evotip pure通过加载62 pg至100 ng范围内的HeLa酶解肽段来评估其线性响应。使用标准的60 SPD或Whisper 40 SPD方法靶向监测了两个HeLa代表肽段蛋白Actin (ACTB) 和Protein S100-A4 (S10A4)。计算校准曲线, 得到回归拟合 $R^2 > 0.99$  (图3)。使用Evotip Pure在0.125 ng到500 ng范围内生成的标准曲线也可以观察到100ng以上上样量的良好线性关系 (表1)。

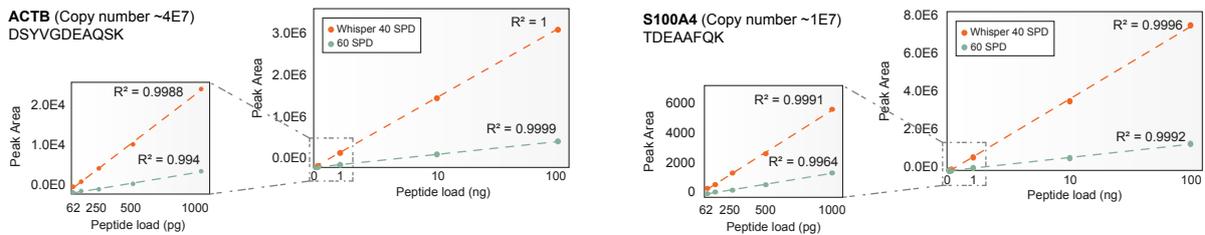


图3: ACTB和S100A4蛋白的HeLa浓度梯度稀释标准曲线。

DSYVGDEAQS				TDEAAFQK			
Conc. range (ng)	n	60 SPD	W 40 SPD	Conc. range (ng)	n	60 SPD	W 40 SPD
0.125 - 100	7	0.9964	0.9992	0.125 - 100	7	0.999	0.9995
0.125 - 200	8	0.9864	0.9880	0.125 - 200	8	0.9957	0.9897
0.125 - 500	9	0.9965	0.9964	0.125 - 500	9	0.9968	0.9962

表1: 从0.125-500ng标准曲线的不同范围内进行线性最小二乘回归拟合得到的 $R^2$ 值。

## 5. 载样量

最后, 通过加载62.5到1000 ng的酶解肽段并随后收集和重新注入洗脱液, 探讨了Evotip Pure的载样量。使用来自洗脱液的所有已识别前体的计算总强度以及来自Evotip尖端的残留物 (与尖端一起丢弃) 来估算检测到的未结合物质的量, 相对于加载了1、5和50 ng的Evotip。测得从加载了1000 ng的Evotip中回收了99.6%, 从加载了125 ng的Evotip中回收了100% (图4)。这些结果表明总损失低于0.45%, 对于低上样量而言将低于检测限。

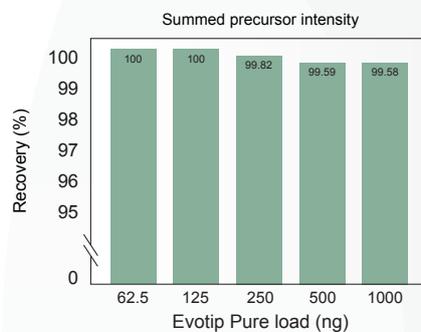


图4: 从Evotip Pure尖端加载的62.5-1000 ng中测得的百分比回收, 计算为与50 ng样品负载相比的所有已识别前体的总和。

## 6. 储存

为了评估Evotip作为质谱前的酶解肽段存储装置的实用性，我们进行了一个扩展的稳定性研究。Evotip Pure上样200 pg或50 ng HeLa酶解肽段。Evotip上样后立即进行14天（200pg）或28天（50ng）。为了尽量减少质谱仪的偏差，所有的样品都在同一天进行了分析。在第0、14和28天内，测量到的前体离子强度没有统计学差异。与储存了14或28天的Evotip相比，新鲜上样Evotip的CV低于20%，已识别前体和蛋白质的数量也相似（图5）。

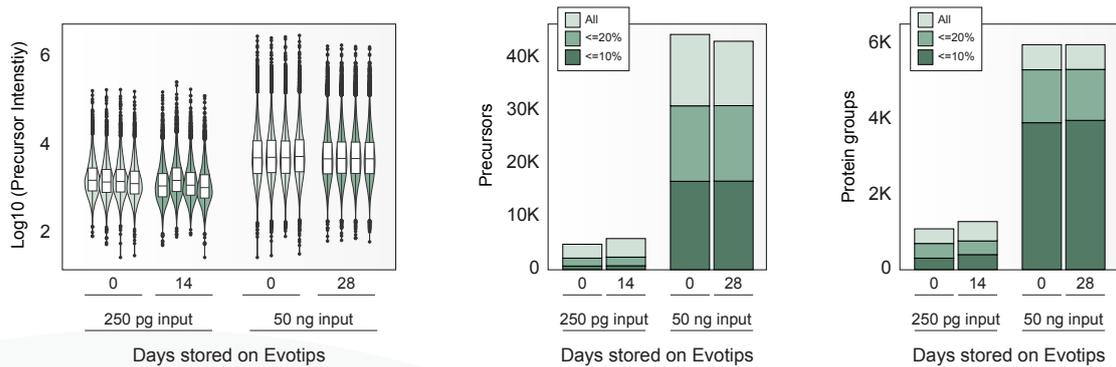


图5： 前体离子强度和前体和蛋白质基团的数量在Evotips上保存14天和28天的样品中进行定量。

## 7. 结论

Evotip是Evosep One工作流程的关键组成部分，它将前端样品制备与液相色谱相结合，而后进行质谱分析。在这项工作中进行的实验强调了Evotip上样可以以一种高度可重复性的方式完成。Evotip Pure可以用于灵敏的靶向分析，这里Evosep One与安捷伦6495C联用，其中可检测的肽的浓度范围很宽，从62 pg到100 ng，甚至可以扩展到500 ng。即使在1000 ng时，我们也可以测量到99%的酶解肽段被保留在Evotip上。综上所述，Evotip是一种极好的样品引入装置，具有极高的捕获率和回收率。结合微量和长期的样本存储，Evotip是集成 workflows 的关键组成部分。