



Application Note

EVUSEP

End-to-end, fully automated digestion protocol and Evotip Pure workflow on the Opentrons OT-2

1. 介绍

由于技术进步与变革，蛋白质组学领域正朝着高效快速的方向发展，其中高通量与其它卓越性能的结合为各个领域开展新型蛋白质组学打下了基础。Evosep One提供了一个标准化且友好的平台，可实现每台仪器每天检测分析数百个样品，这将实现高通量蛋白质组学的瓶颈转向了样品前处理。

为了解决样品前处理的问题，我们开发了一种完全自动化的Evotip样品上样流程。它是基于一种独特的“分层三明治”方法，这是自动化策略的核心组成部分，在这个过程中可以添加其他前处理功能模块，例如酶解和富集步骤等。接下来，我们将介绍一种快速高效的样品前处理自动化流程。利用Opentrons OT-2（OT-2）上的蛋白质富集捕获（PAC）技术，结合磁性微粒，实现了从蛋白质裂解物酶解成肽段而后到加载在Evotips上，整个过程是标准化的无人操作工作流程。在制备后，整个样品被有效地装载在Evotip中，通过减少不必要的样品处理步骤将样本损失率降至最低。此外，Evotip是一种高效的临时存储部件，可以在机器人上完成样品处理，并将准备好的Evotip转移到LC/MS仪器。

该现有方法能够在不到八小时的时间内完成酶解酶解并将高达192个样本到加载到Evotips中，从而实现每天处理高达384个样本的通量。该方法旨在酶解起始微量的蛋白质，即从1到20 μ g。这使其成为一种非常经济高效的深度蛋白质组学样品前处理策略，仅使用100ng的上样量即可识别出超过7,000种蛋白质，同时表现出卓越的灵敏度。该方法以便捷的HTML形式提供，可生成完整脚本，用户可以从Evosep网站下载并直接导入Opentrons应用程序。

2. 方法详解

有关如何在OT-2上设置方法的信息，包括样品盘位置、溶剂盘位置和液体处理，请参阅该方法的详细指南，“IN-003A 23/05”，可在 www.evosep.com/support/automation 网站上在线找到。HeLa细胞在DMEM培养基中培养，而后在沸腾的5%十二烷基硫酸钠（SDS）缓冲液中灭活。将1 μ g的HeLa裂解物、5 μ L的MagReSyn Hydroxyl（Resyn Biosciences）和80%的乙腈移液至样品板的每个孔中。然后进行两次混合步骤，以促进在磁珠上富集，持续10分钟，然后在乙腈中进行单次洗涤。在室温下以1:100的Lys-C:蛋白质和1:25的胰蛋白酶:蛋白质进行酶解（时间为4小时）。酶解后，对样品进行稀释并加载到EvoTIPS中。肽段上样量是基于蛋白质的初始量进行计算，假定100%的回收率。

酶解时间和可重复性实验采用标准的100 SPD方法，色谱柱使用EV1109

（Evosep），柱温为40°C。蛋白深度探索实验采用30 SPD方法，使用EV1137（Evosep），柱温为40°C。灵敏度检测实验采用Whisper 40 SPD方法，使用Aurora Elite色谱柱（IonOpticks, AUR3-15075C18-CSI），柱温为50°C。所有样品均在timsTOF Pro 2质谱仪（Bruker）上进行分析，采用dia-PASEF，并使用DIA-NN（版本1.8.1）在library-free模式下对经过审查的人类蛋白质组（Uniprot, 2020年10月, 20,570条无同型异构体的条目）进行数据分析，以胰蛋白酶/P作为酶解酶，允许2个错失切割位点。所有条件在同一条件下的不同重复中启用了跨样本匹配，分别进行搜索。

3. 酶解时间

我们最初评估了该方案的酶解效率和蛋白质组覆盖率，其中酶解时间分别设置为1、2、3和4小时，温度为环境温度来进行标准的过夜酶解。我们酶解了8份1 μ g HeLa裂解物，并在EvoTIPS上加载了每个样品20%的肽段（基于体积计算相当于理论上200ng的肽段量），所有样品均按照100 SPD方法的随机顺序进行检测分析。根据已识别的前体数、蛋白质组数以及以前体水平的未酶解位点数来评估不同酶解时间的效果。随着酶解时间的增加，酶解效率和回收率也在增加。在酶解时间为4小时时，已识别的前体数和酶解效率达到与过夜酶解相似的水平（图1）。因此，自动化方案的酶解时间被确定为4小时，完整工作流程来处理192个样品仅需要7.5小时，通过运行两个连续的工作流程，一天内可能达到384个样品的通量。

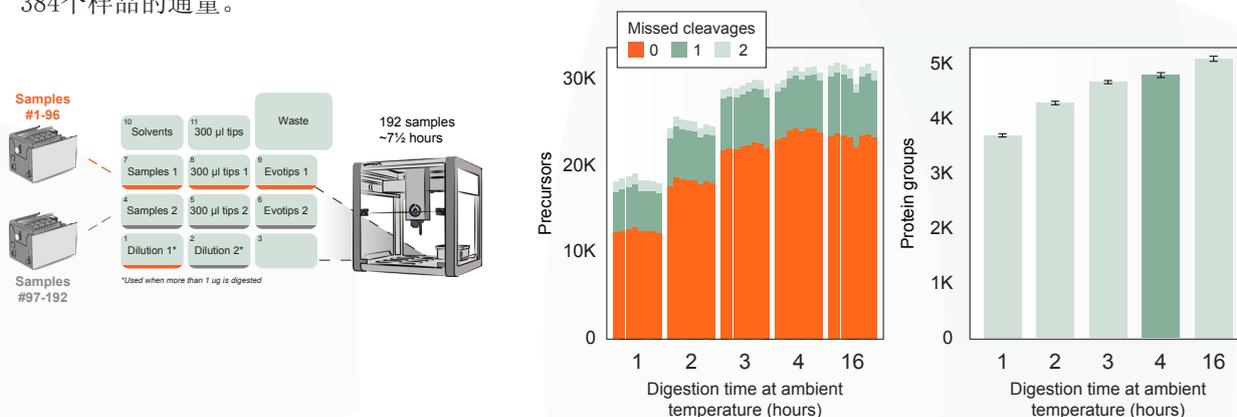


图1: OT-2的功能区域。基于1 μ g酶解肽段起始量，在不同时间点测得的鉴定和酶解效率。~20%的产物肽加载到EvoTIPS上，并使用100 SPD进行分析。

4. 重复性

自动PAC流程设计的优势之一是每个样品可以仅使用一个移液枪头进行所有样品处理步骤，并使用四列常规溶剂和缓冲液。这种策略确保了一种经济环保的样品制备方法，同时降低了样品之间的交叉污染风险。通过对一整板样品进行酶解，评估了重复性和样品之间的交叉残留，包括八个随机的空白样品。准确地鉴定了所有样品中超过30,000个前体和73%的完全裂解的肽段（图2）。每个空白样品的鉴定结果少于500个肽段，验证了该方法。样品数据的精度在前体和蛋白质组水平中值CV分别为22%和13%。最后，在Evotip加载后，来自相同酶解系统的样品在4℃保存10天，并进行分析，以证明肽段在Evotip Pure上加载后的稳定性（图2）。Evotip Pure的这一特性对于高通量蛋白质组学至关重要，因为它可以确保样品在样品制备到LC/MS分析时间段内保持稳定。

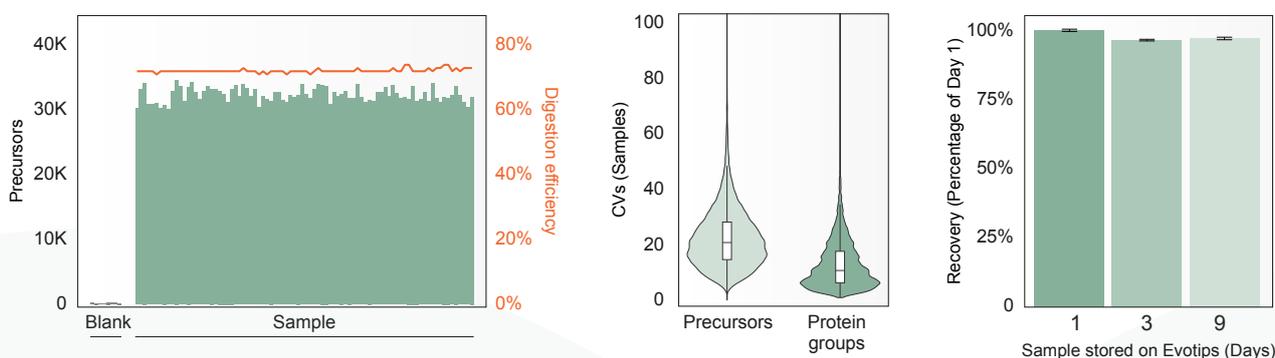


图2： 1 μ g HeLa酶解肽段重复样本的鉴定结果、CV值以及肽段存储在Evotip时长的影响。每个肽酶解物的约20%被加载到Evotip上，并使用100 SPD进行分析。根据前体总数与第1天的关系计算了回收率。

5. 最大深度

该流程经过优化，具有出色的蛋白质组深度，同时将样品加载量保持在1 μ g至20 μ g的范围内。为了评估在低样品上样量下可实现的蛋白质组深度，我们对1 μ g、5 μ g和15 μ g的HeLa酶解肽段分别做了三个重复样本。

从1 μ g的起始物质中，加载了约20%（低量）和约50%（较高量）的肽段到Evotip上。从5 μ g和15 μ g的酶解肽段中，根据体积加载了相对比例的量。所有样品均使用30 SPD方法进行分析。当上样较低的肽段时，酶解更多的物质是有吸引力的，而当分析较高的肽段上样量时，这种效应就会得到平衡（图3）。这种差异是由所鉴定的前体强度较低引起的，可能是由于在检测过程时，肽段丢失，

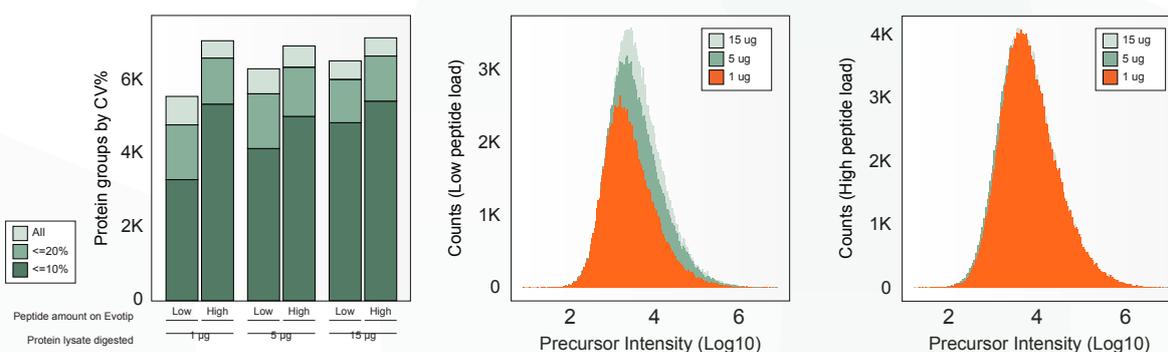


图3： 蛋白组覆盖和前体丰度分布，使用30 SPD从1 μ g、5 μ g和15 μ g蛋白起始量进行分析。

对非特异性结合的影响增加导致的。因此，这使得有相似的深度蛋白质组覆盖，尽管蛋白质的起始量不同。值得注意的是，每个样本酶解1 μ g的成本比酶解15 μ g的成本低10倍，这使得该方法在分析大样本队列时非常具有成本效益。

6. 灵敏度

最后，将125 ng HeLa裂解物通过一系列稀释将其降低到0.98 ng HeLa裂解物，所有这些都做了4个重复样本。约70%的肽段被加载在Evotip上，并用Whisper 40 SPD方法进行分析。在1 ng和125 ng上样量下分别鉴定了超过1,000和7,000种蛋白质，该方案在灵敏度检测应用中表现出出色的性能(图4)。在梯度稀释的样品中鉴定的前体也在梯度上呈现均匀地减少，表明在降低上样量时，性能不偏向具有特定化学性质的肽段。这些结果表明，该方案具有高灵敏度应用的潜力，所有酶解超过1 ng的样本中位CV低于25%，证明了该方案具有稳健定量的能力。

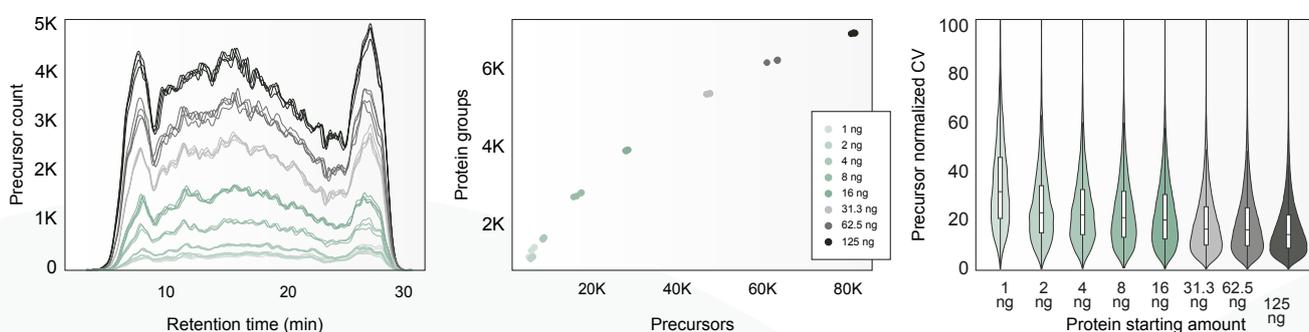


图4: 蛋白质裂解物稀释曲线的鉴定和CV。~70%的肽是使用Whisper 40 SPD进行分析得到的。

7. 结论

我们已经成功地开发了一个快速、可靠的End to End的蛋白质组学流程，用PAC酶解和在Evotips上加样，即使是在价格不高的OT-2液体处理平台，每天也可以制备384个样品。该流程在室温下使用了4小时的酶解时间，虽然时间短，但提供了与过夜酶解相当的性能。低蛋白质起始量提供了显著的蛋白质组深度，1 μ g的蛋白起始量可鉴定7,000个蛋白质。此外，该方法的灵敏度可达到1 ng蛋白，并可通过Whisper 40 SPD方法进行分析。重要的是，该方法具有良好的重现性，确保了可靠的蛋白质定性和定量。总的来说，这一 workflows 的成功是由Evotip的关键特性驱动的，其中可以在机器人上直接将大体积样本浓缩并储存到Evotip上，直到进行分析。值得注意的是，通过降低蛋白质起始量和耗材使用，成本可以显著降低，因此该工作流程完全可以实现对10,000个样本队列的检测分析。

Opentrons-2自动化PAC酶解流程的文件和相关信息可在www.evosep.com/support/automation上找到。