

搭载微升液相Eksigent®M5的SWATH®血清蛋白质组学平台的稳定性评价

Stability Evaluation of MicroFlow-SWATH® Serum Proteomics Strategy Based on Eksigent®M5 Liquid Chromatography

赵颖华, 罗继, 郭立海

Zhao Yinghua, Luo Ji, Guo Lihai

SCIEX中国 应用支持中心 (SCIEX China)

Key Words: M5, SWATH®, Serum, Proteomics

前言

蛋白质组学在精准医疗研究领域具有重要地位,但目前常用的蛋白质组学方法并不能适应精准医疗研究的大样本、高通量的需求。SCIEX推出的搭载微升液相的SWATH®蛋白质组学解决方案^[1],可以为精准医疗相关蛋白质组学研究提供高通量、高灵敏度、高稳定性的液质联用平台,更好地为精准医疗研究服务。

SCIEX微升流速液相M5实现了灵敏度与稳定性的平衡,具有1-200 µL/min 的流量设置范围,比常规分析型液相更灵敏,比纳升流速液相更加灵活稳定,功能多样,不仅需要的样品少,还有助于节省成本、空间。SWATH®采集技术是复杂样品分析物鉴定和定量分析的首要质谱采集策略之一,结合 SCIEX TripleTOF®系列仪器可以实现高灵敏度和高速MS/MS 采集,并且样品中所有可检测的分析物均进行碎裂和鉴定。SWATH® 2.0技术通过可变窗口采集^[2],可以根据离子密度变化调节Q1采集窗口大小,使每个窗口的离子密度分布合理,提供全面的分析物覆盖,有助于进一步检测样品中的低丰度化合物。

本文采用M5联合TripleTOF® 5600+系统,对血清样本进行了SWATH®蛋白质组学分析和系统稳定性评价。本实验在23天内稳定采集300例重复样品,实现了高通量的数据采集;通过IDA建库得到418 个蛋白,300例SWATH®样本共定量到236 个蛋白,1634 个肽段,并且高中低丰度肽段的表达量和保留时间均能保持稳定;连续5针SWATH®样品中共定量到309 个蛋白,1083 个肽段,其中变异系数小于20%的蛋白和肽段的比例分别为70%和73%,说明本系统具有很高的灵敏度和稳定性。

实验材料

SPE柱: Agela, Cleanert® PEP-2。

水、乙腈、甲醇购自 Fisher。二巯基苏糖醇 (DTT)、碘乙酰胺 (IAA)、甲酸、尿素、碳酸氢铵购自Sigma。

人血清为客户惠赠。

仪器设备

Eksigent® M5液相系统 + TripleTOF® 5600+高分辨质谱系统



样品制备

1. 蛋白酶切

取100 µL血清,加入300 µL 8M 尿素溶液变性,之后加入50 mM DTT, 37°C孵育1h进行还原,还原完成后加入100 mM IAA避光30 min进行烷基化,之后加入3 ml 50 mM 碳酸氢铵溶液进行稀释,根据酶/蛋白=1/50的比例加入胰酶,37°C过夜酶切。

2. SPE除盐

活化: 4 ml 甲醇
平衡: 4 ml 水
上样: 3.4 ml 酶切样品
淋洗: 2 ml 水
洗脱: 4 ml 甲醇

3. 色谱分级

色谱柱: XBridge BEH C18 peptide column, 4.6 × 150 mm
流动相: A: , pH 10; B: 乙腈, pH 10
流速: 0.7 mL/min
馏分: 12个

色谱条件

预柱: ChromXP C18CL, 5 µm, 10 mm
分析柱: ChromXP C18, 3 µm, 150 mm
流动相 A: 98% 水, 2% 乙腈 (含 0.1% 甲酸)
流动相 B: 98% 乙腈, 2% 水 (含 0.1% 甲酸)
预柱流速: 10 µL/min
分析柱流速: 5 µL/min
柱温: 40 °C
进样量: 4 µg
梯度:

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	95	5
1	94	6
40	72	28
50	50	50
50.5	20	80
55	20	80
55.5	95	5
60	95	5

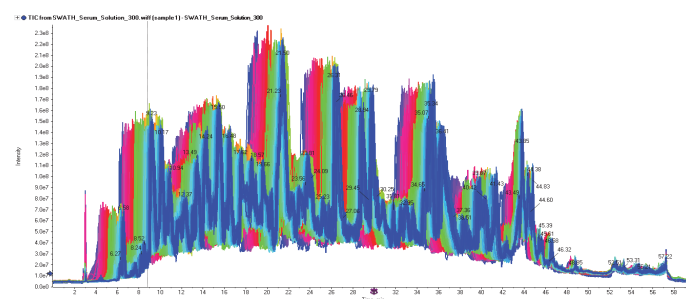
质谱条件

离子源: ESI源, 正离子模式
离子源参数:
IS电压: 5500 V 气帘气 CUR: 30 psi
雾化气 GS1: 20 psi 辅助气 GS2: 20 psi
源温度 TEM: 330 °C

SWATH®数据采集窗口数量: 70 个, 可变窗口由SWATH® Variable Window Calculator计算得出。所有数据采集均使用Analyst TF 1.7软件进行, IDA数据使用 ProteinPilot™软件进行搜库, SWATH®数据使用PeakView™内的 SWATH® Acquisition™ MicroApp和 MarkerView™软件进行分析。

实验结果

本实验中利用Eksigent® M5+TripleTOF® 5600+系统, 采用60 min 总梯度进行SWATH®样品的分析, 在23 天内连续采集了300例重复样品, 实现了高通量采集。由图1可见, 300 例样品可以达到非常好的信号强度和重现性。



利用IDA数据通过ProteinPilot® 软件建库, 共得到481 组蛋白, 22102 个肽段。通过SWATH® Acquisition MicroApp分析, 300例样品中共定量到236个蛋白, 1634个肽段, 从定量的蛋白中选取高中低丰度的蛋白各两个, 其中每个蛋白各选取一个肽段, 评价其在不同样品中表达量和保留时间的变化。这六个肽段的丰度值跨两个数量级, 相对标准偏差均低于15 % (表1)。从图2可以看到, 不同丰度的肽段在300 例样本中的表达量和保留时间基本保持稳定, 说明系统稳定性良好。

表1. 高中低丰度肽段在300例重复样品中的平均丰度值, 标准差及相对标准偏差。

肽段	平均丰度值	标准差 (SD)	相对标准偏差 (RSD)
P02647-m/z 615.86	1.39E+07	6.03E+05	4.3%
P01857-m/z 593.83	1.29E+07	3.50E+05	2.7%
P19823-m/z 1061.57	2.02E+05	2.52E+04	12.5%
P20851-m/z 695.99	1.78E+05	1.02E+04	5.7%
P01344-m/z 585.26	4.34E+04	3.07E+03	7.1%
P07359-m/z 520.83	2.40E+04	3.51E+03	14.7%

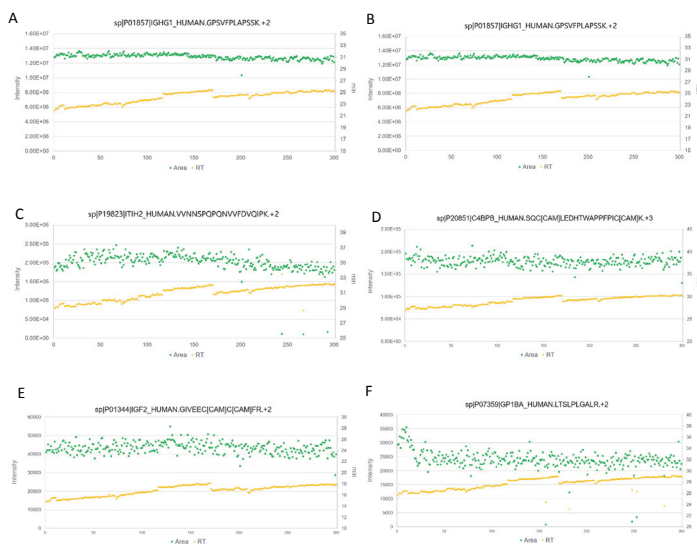


图2. 高中低丰度肽段表达量及保留时间在300例重复样本中的变化。

取连续5针SWATH®样品进行分析, 可以定量到309个蛋白, 1083个肽段(表2), 其中RSD低于20%的蛋白为218个(70.6%), 肽段为793个(73.2%), 说明超过70%的蛋白和肽段可以得到稳定定量, 进一步证明了系统的高稳定性。

表2. 连续5针样品中蛋白和肽段的定量数目以及不同RSD范围内蛋白肽段的数量及比例。

	定量数目	RSD<10%的数量 (比例)	RSD<20%的数量 (比例)	RSD<30%的数量 (比例)	RSD<50%的数量 (比例)	RSD<100%的数量 (比例)
蛋白	309	166 (53.7%)	218 (70.6%)	246 (79.6%)	273 (88.3%)	302 (97.7%)
肽段	1083	684 (63.2%)	793 (73.2%)	833 (76.9%)	916 (84.6%)	1048 (96.8%)

结论

基于M5液相与TripleTOF® 5600+质谱平台的MicroFlow-SWATH®蛋白质组学解决方案具有高通量、高灵敏度、高稳定性等优点, 能够非常好的胜任精准医疗项目中对于大批量样本的高通量数据采集的任务, 并且可以在长时间的运行中提供稳定的高质量定量数据, 是精准医疗领域中蛋白质组学研究和应用的有力工具。

参考文献

1. Microflow SWATH® Acquisition for Industrialized Quantitative Proteomics, SCIEX Technical note RUO-MKT-02-3637-B.
2. Improved Data Quality Using Variable Q1 Window Widths in SWATH® Acquisition, SCIEX Technical note RUO-MKT-02-2879-A.

For Research Use Only. Not for use in Diagnostic Procedures.

Trademarks and/or registered trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd., or their respective owners, in the United States and/or certain other countries.

RUO-MKT-02-10474-ZH-A

AB SCIEX™ is being used under license.

© 2019 DH Tech. Dev. Pte. Ltd.



SCIEX中国公司

北京分公司
地址: 北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话: 010-5808 1388
传真: 010-5808 1390

全国免费垂询电话: 800 820 3488, 400 821 3897

上海公司及中国区应用支持中心
地址: 上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话: 021-2419 7200
传真: 021-2419 7333

网址: www.sciex.com.cn

广州分公司
地址: 广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话: 020-8510 0200
传真: 020-3876 0835

微博: @SCIEX