

ZenoTOF 7600システムのスピード、感度、精度を活かして、エミッター一体型充填カラムによるタンパク質同定を強化。



著者

Sri H Ramarathinam¹, Aaron G Poth², Mohammadreza Dorvash¹, Patricia T Illing¹, Jarrod J Sandow², Anthony W Purcell¹
 所属: ¹モナシュ大学Purcell研究室, ²IonOpticks Pty Ltd

はじめに

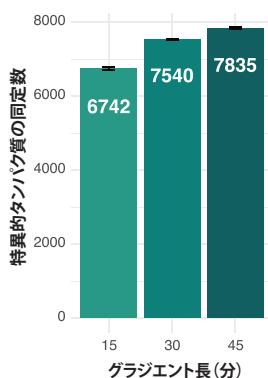
プロテオミクス分野では、包括的なタンパク質同定、高感度分析、信頼性の高い定量分析を達成するために、高性能の質量分析ツールが求められています。IonOpticksのAuroraシリーズSXエミッター一体型充填カラムは、ZenoTOF 7600質量分析計でのペプチドおよびタンパク質分析を最適化する独自の設計を採用しており、これにより、研究者は新たなレベルの感度を手にすることができます。この強化された感度により、複雑なサンプルからこれまでにはない精度でタンパク質を同定および定量化できるようになり、プロテオームカバレッジの深さが大幅に拡大されます。研究者は今や、複雑なプロテオミクスの世界を自信を持って探索し、これまで同定が困難であった新規バイオマーカーやタンパク質相互作用を発見することができます。

さらに、IonOpticksのAuroraシリーズSXカラムとZenoTOF 7600質量分析計の組み合わせにより、複数のサンプルにわたって安定した定量分析が可能となります。AuroraシリーズSXカラムは優れた再現性を示し、定量分析において一貫した結果を提供し、ばらつきを最小限に抑えます。ZenoTOF 7600質量分析計でAuroraシリーズSXカラムを使用することによって実現する高感度分析により、再現性のある定量化が可能となり、包括的なプロテオミクス研究のための強力なアプローチがもたらされます。私たちは、200ngのサンプルから、45分のグラジエントで1ランあたり7,300超のタンパク質を同定することに成功し、大部分のタンパク質のCVは10%未満でした。タンパク質同定の最大化、タンパク質発現の正確な定量化、および分析の再現性の維持が可能になったことで、科学者は複雑な生物学的プロセスを解明し、疾病メカニズム、薬物反応、細胞シグナル伝達経路についてより深い洞察を得ることができます。

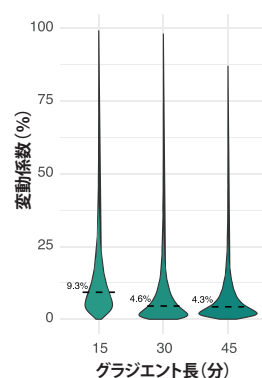


7,300+
 45分かけて200ngの
 サンプルから同定さ
 れたタンパク質

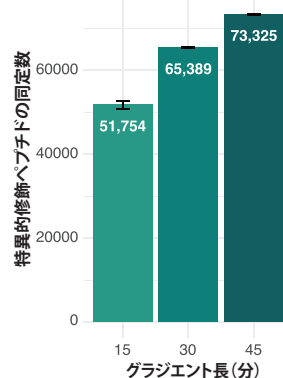
(A) グラジエント長別の特異的タンパク質の同定数



(B) グラジエント長別のCV



(A) グラジエント長別の特異的ペプチドの同定数



(B) 平均ピーク幅 - FWHM

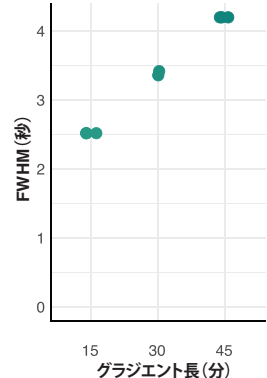


図1: (A) IonOpticks Aurora Elite SX 15 cm x 75 μ mカラムを接続したZeno SWATH DIAモードのSCIEX ZenoTOF 7600システムを用いて、K562細胞トリプシン消化物200ngを注入し、グラジエント長を変えながら特異的タンパク質を同定 (n = 3)。分析には、DIA-NN 1.8.1のLibrary-free search法を使用。(B) (A)で使用したグラジエント長での特異的タンパク質のCV分布を示すバイオリンプロット。破線とそこに付された文字は、各群のCV中央値を示す。

図2: (A) IonOpticks Aurora Elite SX 15 cm x 75 μ mカラムを接続したZeno SWATH DIAモードのSCIEX ZenoTOF 7600システムを用いて、K562細胞トリプシン消化物200ngを注入し、グラジエント長を変えながら特異的ペプチドを同定 (n = 3)。分析には、DIA-NN 1.8.1のLibrary-free search法を使用。(B) 投入されたサンプルごとの平均ペプチドFWHM (秒)の総括グラフ。各複製は1つの点で表されている。



メソッド

LC-MS

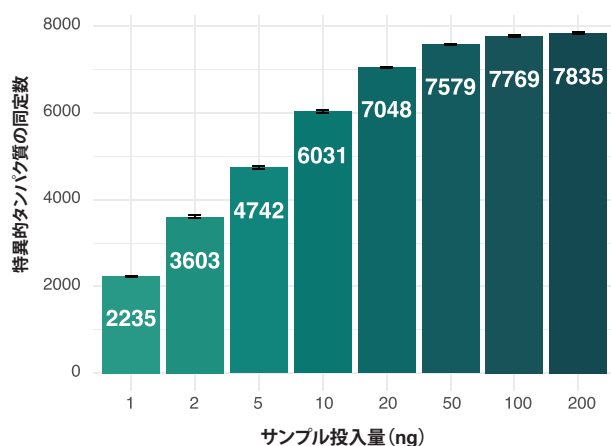
K562トリプシン消化物 (Promega) を2%ACN、0.1%FA水溶液で再構成しました。Waters M-Class UPLCを用いて必要量のサンプルを注入。サンプルグラジエントはグラジエントの長さを選択しながら300nL/minで実行しました。UPLCはIonOpticks Aurora Elite SXカラム (図2, 15 cm x 75 μm) に接続。ZenoTOF 7600システムは、ナノフロー構成のOptiFlow Turbo Vイオンソースを使用し、Zeno SWATH DIAで操作しました。

85の可変幅ウィンドウからなるZeno SWATH DIA法を使用し、MS/MS蓄積時間は18msとしました。CIDフラグメンテーションは、動的衝突エネルギーとZeno trap pulsingをオンにして使用。2200Vのイオンスプレー電圧を使用しました。

データ処理

HeLa細胞株およびK562細胞株の高pH分画スペクトルライブラリ (11,269タンパク質群、169,395ペプチド) を用いて、DIA-NNソフトウェア (1.8.1) でZeno SWATH DIAデータを処理しました。特異的タンパク質および特異的ペプチドの同定を計算するために、pg.matrix.tsvおよびpr.matrix.tsvの表を使用しました。

(A) サンプル投入量別の特異的タンパク質の同定数



(B) タンパク質のCV

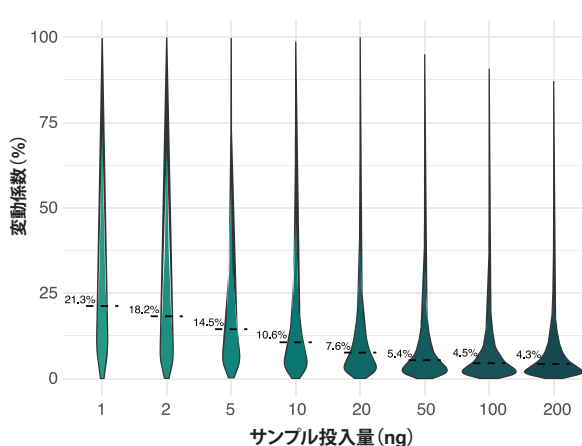
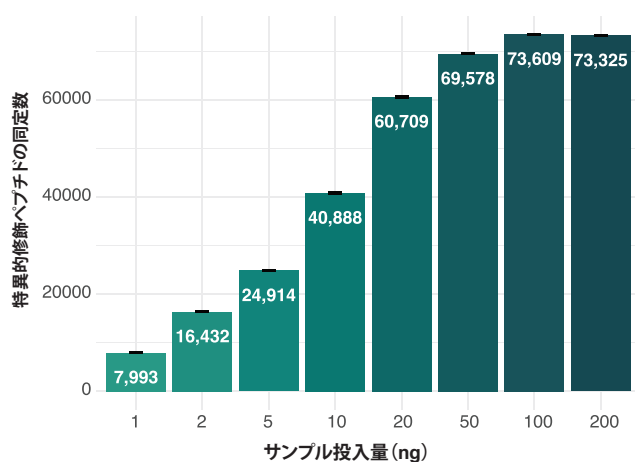


図2: (A) 45分のグラジエントで、IonOpticks Aurora Elite SX 15 cm x 75 μmカラムを接続したZeno SWATH DIAモードのSCIEX ZenoTOF 7600システムを用いて、K562細胞トリプシン消化物から得られたサンプルの投入量を変えながら特異的タンパク質を同定 (n = 3)。分析には、DIA-NN 1.8.1のLibrary-free search法を使用。 (B) (A)で使用したサンプル投入量での特異的タンパク質のCV分布を示すバイオリンプロット。破線とそこに付された文字は、各群のCV中央値を示す。

(A) グラジエント長別の特異的ペプチドの同定数



(B) 平均ピーク幅 - FWHM

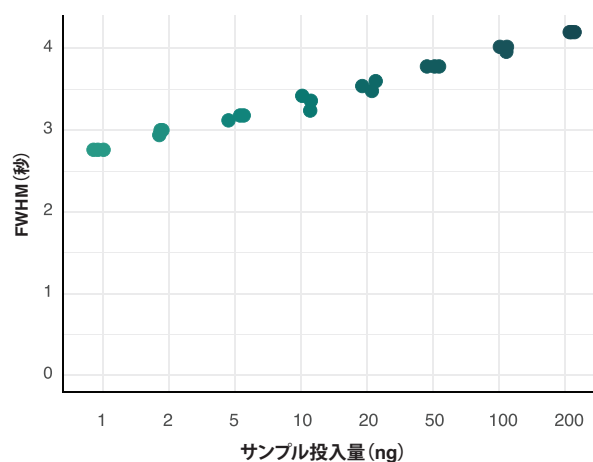
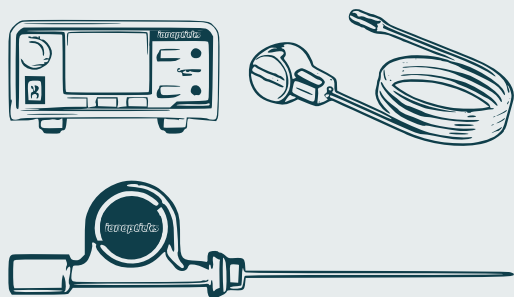
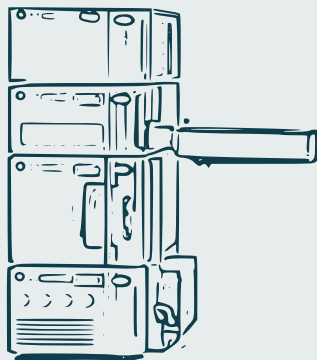


図3(上): (A) 45分のグラジエントで、IonOpticks Aurora Elite SX 15 cm x 75 μmカラムを接続したZeno SWATH DIAモードのSCIEX ZenoTOF 7600システムを用いて、K562細胞トリプシン消化物から得られたサンプルの投入量を変えながら特異的ペプチドを同定 (n = 3)。分析には、DIA-NN 1.8.1のLibrary-free search法を使用。

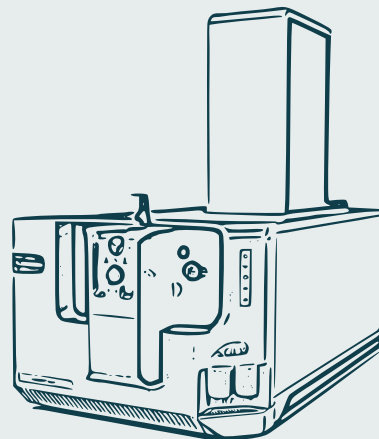
使用機器



Aurora Elite SX, IonOpticksカラムヒーター、
IonOpticksヒーターコントローラー



Waters Acquity M-Class UPLC



SCIEX ZenoTOF 7600
質量分析計

おわりに

IonOpticksのAuroraシリーズSXエミッター一体型充填カラムとSCIEX ZenoTOF 7600質量分析計を組み合わせることで、プロテオミクスにおけるタンパク質同定の最大化、高感度分析の実現、安定した定量分析の確保を可能にする変革的なソリューションが生まれます。この強力な組み合わせにより、質量分析の能力が強化され、タンパク質研究分野における画期的な発見への道が開かれます。

OptiFlow Turbo Vイオンソース用の「オールインワン」ナノフローソリューション。



簡単に取り付け。

市場で最もユーザーフレンドリーなナノフローカラムが、SCIEXユーザーも利用可能に。Aurora SXシリーズは、付属のアダプターと精密な取り付けツールにより、お使いのソースを簡単にナノフローに変換できます。



nanoZero®を内蔵。

定評あるnanoZeroフィッティングと一体型エミッターにより、カラム前後のデッドボリュームを除去。Aurora SXにより、時間とコストが節約でき、その両方を研究に費やすことができます。



シームレスでエレガント。

ソース部の加熱はこれ以上ないほど簡単です。IonOpticksカラムヒーターは、Aurora SXカラムの上部に設置され、当社のヒーターコントローラーユニットと組み合わせることで、ナノスプレーブロープの真正面で精密な温度管理を行うことができます。



Purcell研究室について

モナシュ大学のMonash Biomedicine Discovery Instituteの一組織であるPurcell研究室は、複雑な生物学的サンプルのターゲット定量プロテオミクスおよびグローバル定量プロテオミクスに焦点を当てて研究を行っています。研究の主な目的は、免疫反応の標的を特定し、宿主と病原体の相互作用を理解することです。研究室は免疫とがんに関する様々なプログラムに携わっており、生化学・分子生物学の下で運営されています。

その研究は、最先端のプロテオミクス技術とヒト免疫学、分子ウイルス学、構造・機能免疫学を組み合わせで行っています。この集学的なアプローチにより、基礎免疫学、トランスレーショナル医療、ワクチン接種、免疫療法における様々な問題に取り組んでいます。

この研究室を率いるのは、免疫プロテオミクス研究室の責任者を務めるAnthony (Tony) Purcell教授です。Purcell教授の専門知識とリーダーシップは、プロテオミクス分野における画期的な発見へと研究を導く上で極めて重要な役割を果たしてきました。同氏の研究は、特に複雑な生物学的システムという分野において、免疫反応の理解を深める上で大きな影響を与えています。