

# AttractSPE®TipsC18 (Affinisep 社製) アプリケーションノート

## AttractSPE®Disks Tips による効率的なタンパク精製(他社製との比較)

Affinisep 社 (抄訳: 株式会社プラクティカル)

PISSARO Proteomic Facility, IRIB, FRANCE の Mohamed Amine BEN MLOUKA、Julie HARDOUIN、Pascal COSETTE との共同研究です。

ペプチド精製における性能について、AttractSPE®Disks Tips C18 と他の 2 社製の SPE チップとで比較しました。例として BSA をトリプシンでペプチドに分解、SPE C18 チップを用いて脱塩・精製濃縮し、nano LC-MS/MS で分析しました。集計により、他のチップと比較して、AttractSPE®Disks Tips が同等以上の素晴らしい性能を持ち、容易に信頼性の高いタンパク解析を可能にすることが示されました。

AttractSPE®Disks Tips は、柔軟なメンブランに微細粒子を濃密に格納した Stage Tips (ステージチップ) です。ディスク形状なのでフリットなどのデッドスペースがなく、溶出液量も小さくでき、回収率も高めることが可能です。従って、タンパクやペプチドの精製、分画、脱塩や医薬品分析など、幅広い領域でも有益といえます。


### 方法

#### ■ ペプチド精製プロトコル


BSA 10 $\mu$ g をトリプシンで分解、ペプチドを解析するため図のように脱塩、精製しました。SPE Tips C18 で固相抽出することで、保持分(Retained)と非保持分(Not Retained)とに分画し、それぞれのペプチドを nanoLC-MS/MS で解析しました (3 点併行)。性能比較のため AttractSPE®Disks Tips と他の 2 社製 Tips では同じプロトコルで操作しました。

#### ■ 試験で用いた SPE TIPS C18 による固相抽出プロトコル


##### 1. コンディショニング

- 
- (1) ACN / 0.1% FA (50/50) 10 $\mu$ L (3 回)
  - (2) 0.1% FA 10 $\mu$ L (3 回)
- \*各ステップ後に遠心分離 2000rpm 2 分

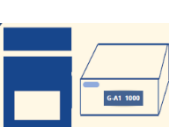
##### 2. 負荷通液

- 
- (1) マイクロチューブ交換
  - (2) 試料負荷 10 $\mu$ l (消化タンパク 10 $\mu$ g)
  - (3) 洗浄 0.1% FA 10 $\mu$ L (3 回)
  - (4) 非保持分 (Not Retained) を回収
- \*各ステップ後に遠心分離 2000rpm 2 分

##### 3. 溶出

- 
- (1) マイクロチューブ交換
  - (2) 溶出 ACN / 0.1% FA (50/50) 10 $\mu$ L (2 回)
  - (3) 溶出 ACN / 0.1% FA (80/20) 10 $\mu$ L (2 回)
  - (4) 保持分 (Retained) を回収
- \*各ステップ後に遠心分離 4000rpm 2 分

##### 4. LC-MS 分析

- 
- (1) 試料乾燥 (急速・真空)
  - (2) 0.1% FA 10 $\mu$ L に溶解
  - (3) 5 倍希釈し 1 $\mu$ L を MS に注入

ACN: アセトニトリル FA ギ酸

株式会社プラクティカル

〒263-0022 千葉県稲毛区弥生町 2-15 西千葉浪花ビル

TEL:043-306-1531 FAX:043-306-1541 mail@practical.jp http://www.practical.jp

## 結果

### ■ シーケンス

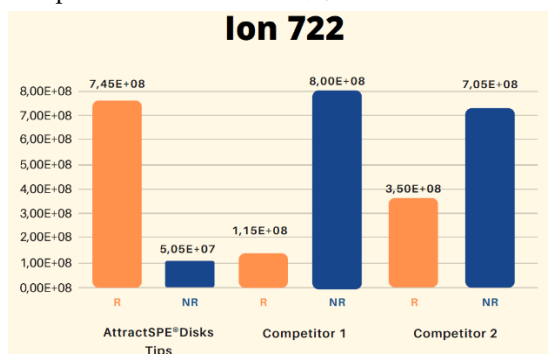
Table: 配列カバー率とペプチドスペクトラムマッチ(PSM)の比較

画分	AttractSPE®Disks Tips		B社製		C社製	
	Retained	Not Retained	Retained	Not Retained	Retained	Not Retained
配列カバー率	75±2%	63.0±0.2%	69±3%	72±1%	75±3%	71±4%
ペプチドスペクトラム マッチ(P S M)	161±9	70±4	125±19	167±9	146±6	166±1

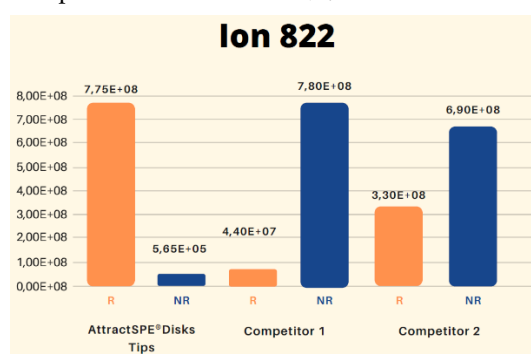
AttractSPE®Disks Tips は保持分(Retained)において他社製より高いペプチドスペクトラムマッチ(PSM)を得ました (AttractSPE 161, B:125, C:146)。これはタンパク同定に多くの情報を与えるので、複雑な混合物の識別にとっても重要な意味を持ちます。さらには、その配列カバー率が 75%であることも極めて重要かつ秀でた結果であり、ペプチドが効果的にディスクに保持されたことを示しています。一方で非保持分でのカバー率と PSM は AttractSPE®Disks Tips が最も低く、情報ロスも少ないことがわかります。

### ■ イオン強度

Graph 1. イオン 722 強度



Graph 2. イオン 822 強度



BSA の二つの主要なイオン 722 と 822 の強度を、保持・非保持それぞれの画分で測定し、これらペプチドの濃度を得ました。

AttractSPE®Disks Tips による保持分の両イオンの強度は、他社製品と比してかなり高く、722 においては、AttractSPE®Disks Tips での強度は B 社製の 5 倍、C 社製の 2 倍です。同じ傾向が 822 にも見られ、B 社製の 10 倍、C 社製の 2.3 倍です。一方、非保持分では、AttractSPE®Disks Tips のイオン強度は他社製と比して、722 で一桁オーダー、822 で三桁オーダーとかなり低くなりました。

すなわち、AttractSPE®Disks Tips は、保持分では BSA の 722 と 822 の両イオンでいずれもより高い強度でした。また非保持分ではいずれも低い強度であり、幾分かのパペチドが保持されなかったとしてもかなり少ないものでした。

結論として、AttractSPE®Disks Tips は他と比較して高い捕集能を有しており、このことは低濃度のペプチドでも検知して、より多くの情報を得られる可能性が示されました。

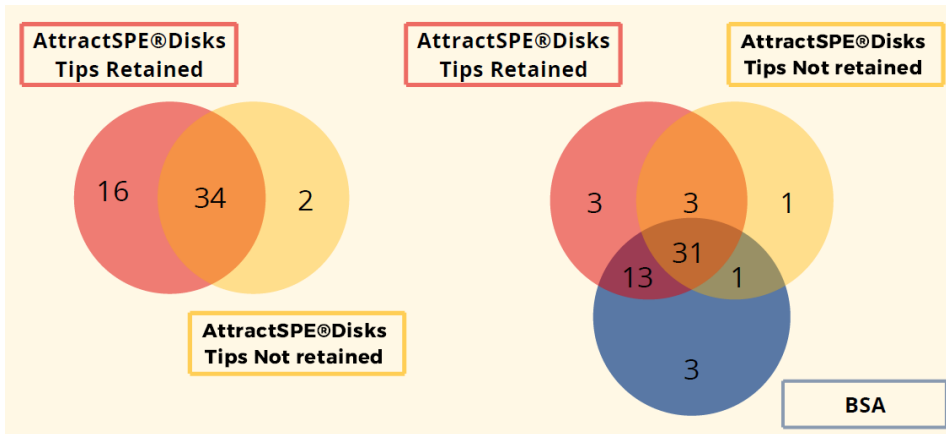
株式会社プラクティカル

〒263-0022 千葉県稲毛区弥生町 2-15 西千葉浪花ビル

TEL:043-306-1531 FAX:043-306-1541 mail@practical.jp http://www.practical.jp

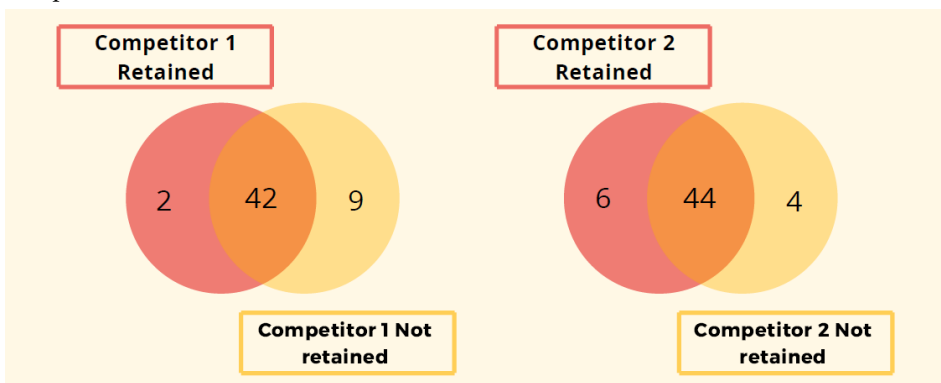
■ ペプチド解析 (n=2, 3 連)

Graph 3. AttractSPE®Disks Tips によるペプチド解析



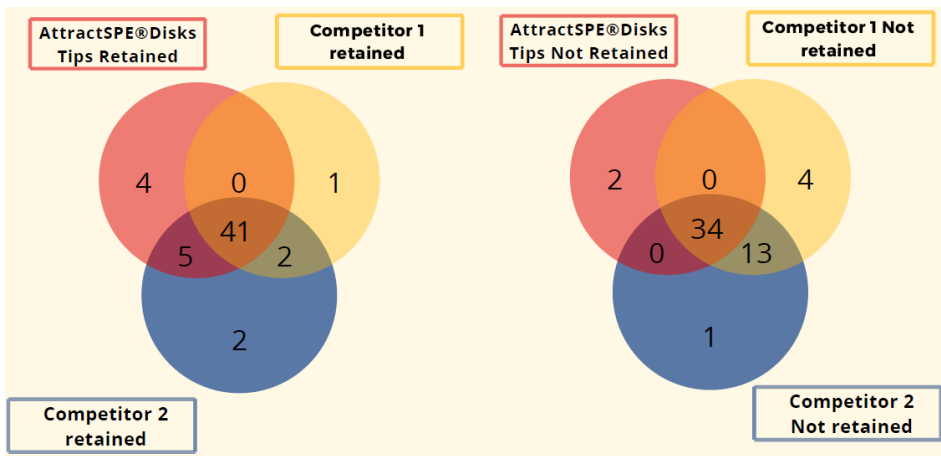
AttractSPE®Disks Tips では、保持分から 50 のペプチドが確認され、2 つが保持されませんでした(左図)。これは殆どすべてのペプチドが保持されて、タンパク同定に資していることを示しています。また、BSA からの直接解析 (48 以上のペプチドを確認) と比較すると、44 のペプチドが共通でした(右図)。従って 9 割以上のペプチドが効率的に保持されたことがわかりました。

Graph 4. 他社製チップによるペプチド解析



一方、B 社製で保持分から 44 を確認し 9 が漏出、C 社製で 50 を確認し 4 が漏出でした。

Graph 5. 3 社製チップにおけるペプチド解析の比較



## 結論

### ■ AttractSPE®Disks Tips の性能

ペプチド解析のデータ集計により、AttractSPE®Disks Tips はペプチド精製に優れた性能を有することがわかりました。

保持分においては高い配列カバー率とスペクトラムマッチ PSM を持ち、さらには BSA の主要イオンの強度から、ペプチドが漏出分に比してかなり高い濃度でした。また、非保持分のペプチド濃度は極めて低いので、ほとんどのペプチドが保持され、重要な情報がほぼ収集されていたと考えられました。

### ■ 他社製との比較

まず B 社製は、他の 2 つと比較して PSM や配列カバー率が低く、解析でも他と共通するペプチドが少ないことがわかりました。

また、AttractSPE®Disks Tips を C 社製と比較すると、配列カバー率やペプチド解析結果はほぼ同等ですが、PSM は 10% 高く、イオン強度も倍以上でした。これは AttractSPE®Disks Tips の保持能力が高く、低濃度のペプチドでも保持できることによるものと考えられました。

以上のことから、AttractSPE®Disks Tips C18 は、ペプチドを効率よく保持・精製出来るので、タンパク消化物の LC-MS 解析を最も容易かつ信頼性の高いものにします。AttractSPE®Disks Tips C18 は、被験チップ製品の中で最も高い性能を有し、最良のペプチド精製を行うことが出来ました。

株式会社プラクティカル

〒263-0022 千葉市稲毛区弥生町 2-15 西千葉浪花ビル

TEL:043-306-1531 FAX:043-306-1541 mail@practical.jp <http://www.practical.jp>