

CZE-MS/MS 方法在磷酸化蛋白质组学分析中的应用

目的

采用电渗流驱动鞘流液的 EMASS-II 型 CE-MS 联用离子源, 利用 CZE-MS/MS 方法对从鼠脑中富集的磷酸化多肽实现高通量、高灵敏度的在线分析。

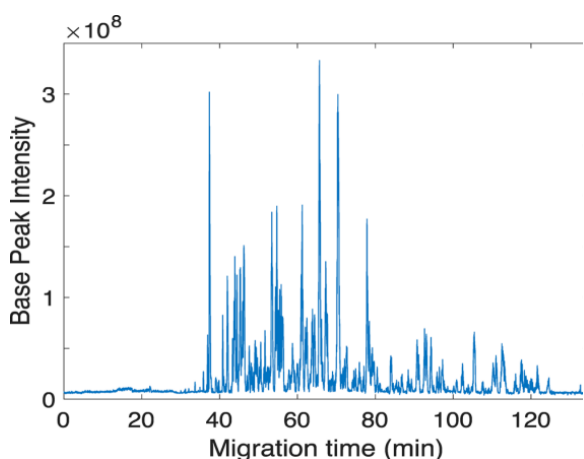


图1. 220ng 鼠脑的磷酸化多肽富集后经 CZE-MS/MS 分析得到的结果。

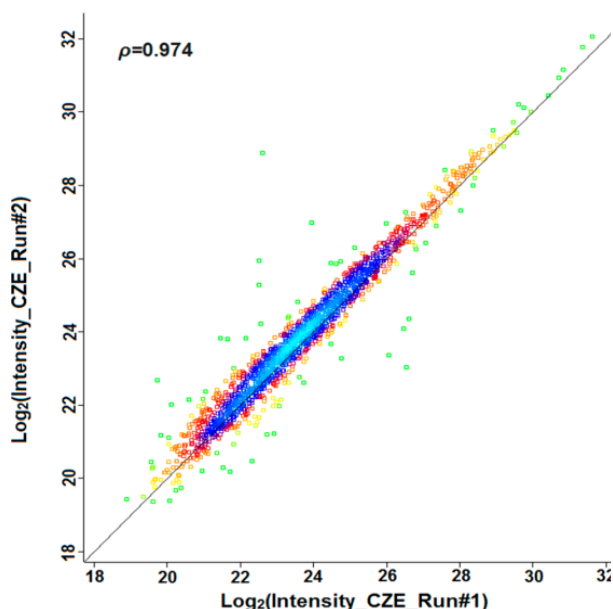


图2. CZE-MS/MS两次分析得到的重现性结果。

背景

蛋白质通常需要经过翻译后修饰 (PTM) 加工成为成熟蛋白方能行使其生物学功能。蛋白磷酸化是信号转导中最常见的 PTM, 会影响代谢、生长、分裂、分化、凋亡、膜转运和免疫等细胞功能。随着质谱 (MS) 技术的不断进步, 磷酸化蛋白质组学也取得突破性进展, 成千上万磷酸化多肽的鉴定已成为可能。目前, 反相液相色谱 (RPLC)-电喷雾 (ESI)-串联质谱 (MS/MS) 以其优异的分离性能而被广泛应用于磷酸化蛋白质组学研究中。然而, LC-MS/MS 的局限性也显而易见, 样品中非常短的极性多肽往往无法保留会从色谱柱中过早冲出, 与此同时, 高度疏水的多肽又很难从色谱柱中被洗脱出来。

毛细管区带电泳 (CZE) 对于磷酸化多肽的分离有着巨大的优势, 其分离机制是基于多肽之间荷质比的差异, 完全避免了 LC 对强极性和弱极性多肽无法有效分离的问题。另外, CZE 可以准确测得磷酸化多肽的迁移率, 而通过数据库检索鉴定到的磷酸化多肽可以通过数学模型进行理论迁移率的预测, 实测值跟理论值的比较有助于评估磷酸化多肽鉴定的可信度。本实验中在对富集的磷酸化多肽的鉴定分析中, 与 UPLC 相比, CZE 在 2-200ng 样品中鉴定到的磷酸化多肽和总的多肽数目显著优于 UPLC。

本实验通过电渗流驱动鞘流液的 EMASS-II 型 CE-MS 离子源, 将 CZE 与高分辨质谱联用, 进行磷蛋白质组学分析, 单次分析鉴定超过 27,000 个多肽。另外, 对磷酸化位点基序的研究发现, CZE-MS/MS 数据中出现了许多在 LC-MS/MS 中没有发现的基序, 表明 CZE-MS/MS 可作为磷酸化蛋白质组学分析的重要研究工具, 弥补常规 LC-MS/MS 分析的不足。

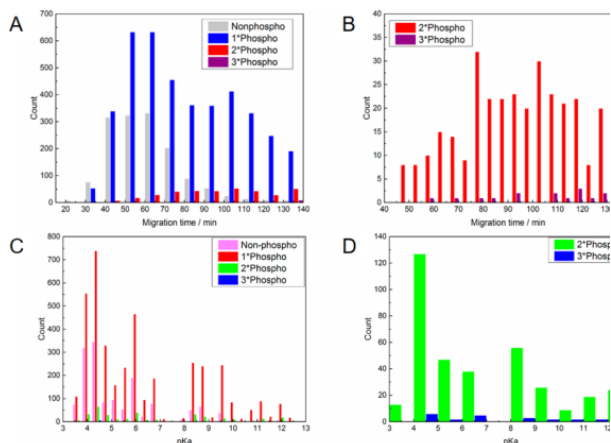


图3. 鉴定出的全部多肽 (A图 和 C图) 和具有两到三个磷酸化位点的多肽 (B图 和 D图) 的迁移时间分布图和 pKa 分布图。

解决方案

仪器试剂:

CMP Scientific ECE-001 到毛细管电泳仪。EMASS-II 型 CE-MS 联用离子源 (CMP Scientific, P/N: EM3001-T)。100cmPS2分离毛细管 (CMP Scientific, P/N: E-SC-PS2-360/150-50-100-B1)。BGE为1M醋酸, SL为0.5%甲酸和10%的甲醇。

实验方法:

样品压刀注入100-150nL。分离电压为23.8kV。

质谱参数:

采集范围300-1,350m/z。S-Lens60。加热毛细管温度300℃。分辨率60,000。全扫AGC目标值3E6, 最大填充时间为15ms。二级AGC目标值1E5, 最大填充时间110ms。质谱其它采集参数设置为默认值。

结果

通过 CZE 单次分析 220ng 富集到的鼠脑多肽, 从中鉴定出 4,405 个磷酸化多肽和 1,998 个蛋白质, 其磷酸化位点确定的概率高于 LC-MS/MS 分析 (图2)。两次分析的重复性结果如图3所示, 相关系数为 0.974, 表明 CZE 具有良好的重现性, 可以用于准确地非标记定量分析。在对磷酸化多肽的迁移时间和 pKa 分布进行分析时发现, 跟非磷酸化的多肽相比, 磷酸化多肽在 CZE 中迁移更慢, pI 值也更小。

总结

在本方法中, 使用 ECE-001 型毛细管电泳仪与 EMASS-II 型 CE-MS 联用离子源成功地将 CZE 与高分辨质谱联用, 实现了对从鼠脑中富集到的磷酸化多肽高通量、高灵敏度的在线 CZE-MS 分析。本方法从富集到的 220ng 多肽中鉴定出 4,405 个磷酸化多肽。CZE-MS/MS 具有高灵敏度, 高重现性, 高通量的特点, 并且所测得的迁移时间还可以辅助磷酸化多肽的鉴定, 因此, CZE-MS/MS 在磷酸化蛋白组学的研究中具有不可替代的技术优势。



扫一扫, 关注永道致远微信

www.evergauge.cn

www.cmpscientific.com

永道致远科学技术有限公司

上海市浦东新区康新公路3399弄26号楼218室