

CZE-MS 方法对复杂蛋白质酶解产物实现快速、超灵敏在线分析

目的

采用电渗流泵驱动的同轴鞘流液 EMASS-II 型 CE-MS 联用离子源, 利用 CZE-MS 方法对大肠杆菌蛋白酶解产物实现快速、超灵敏地在线分析。

背景

自下而上的蛋白质组学已被广泛应用于复杂生物样本的定性和定量表征。但一般来说, 样本量越少, 通过自下而上的蛋白质组学得到的结果越差。目前已有不少利用 LC-MS/MS 对纳克级的样品进行自下而上的蛋白质组学分析的报道。在此, 本实验开发了一种超灵敏和快速的毛细管区带电泳串联高分辨质谱方法 (CZE-MS/MS), 该方法基于电渗流泵驱动的鞘流液接口, 通过提供稳定的、纳升级流量的鞘流液以辅助样品的离子化, 从而获得超高的灵敏度。在对超微量的样本进行自下而上的蛋白质组学分析时, CZE-MS/MS 可以获得比 LC-MS/MS 更好的实验结果。

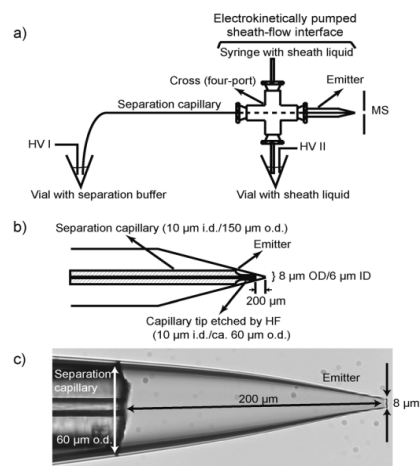


图1.a) CZE-ESI-MS/MS 系统工作原理示意图; b) 电喷雾喷嘴中蚀刻毛细管的示意图; c) 喷嘴中蚀刻毛细管的显微照片。

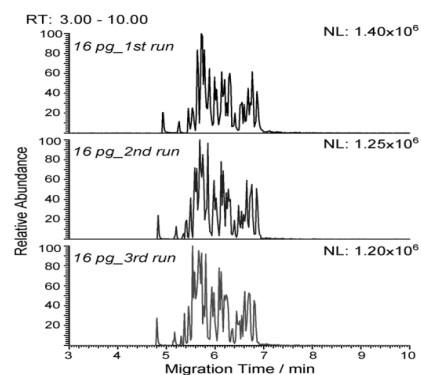


图2. CZE-MS/MS 对大肠杆菌酶解产物 (16pg) 3 针重复进样的结果, 图中显示的是 50 个最高强度多肽的提取离子电泳图。

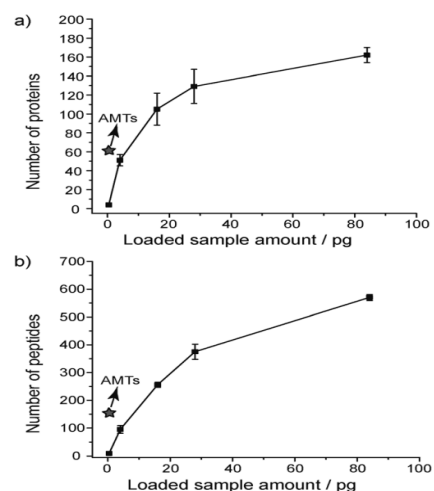


图3. 大肠杆菌酶解产物的进样量与蛋白质 (a) 和多肽 (b) 鉴定数量之间的关系图。

解决方案

仪器试剂:

CMP Scientific ECE-001 型毛细管电泳仪。EMASS-II 型 CE-MS 联用离子源 (CMPScientific, P/N: EM3001-T)。32cm 和 40cm BFS 毛细管 (CMP Scientific, P/N: E-SC-BFS-360/150-50-32-B1, P/N: E-SC-BFS-360/150-50-40-B1)。

实验方法:

样品注入量 16pg, 分离电压为 10kV。毛细管尖端到喷针尖端距离为 200 μ m。

结果

图1显示的是 EMASS-II 型 CE-MS 离子源接口的工作原理示意图及电喷雾喷针的详细参数, 喷针尖端开口为 8 μ m, 毛细管尖端到喷针尖端距离为 200 μ m。随着毛细管尖端与喷针尖端距离缩短, 系统的灵敏度会相应地提高。本实验还评估了分离电压对分析结果的影响, 发现 10kV 与 15kV 相比, 10kV 可获得更宽的分离子窗口, 能鉴定更多的蛋白质和多肽。CZE-MS/MS 系统对大肠杆菌酶解产物分析的重复性结果如图2。经过三次重复进样分析, 鉴定到了 105 \pm 17 个蛋白和 256 \pm 9 个多肽。从 1ng 样本中鉴定到 100 个蛋白质是目前 LC-MS/MS 对复杂蛋白酶解产物的检测极限。而本方法中可以在样本量低两个数量级时 (16 pg) 鉴定到相当数量的蛋白质, 由此证明本方法具有超高的灵敏度。图3 为大肠杆菌酶解产物的进样量与蛋白质(和多肽鉴定数量之间的关系图。大肠杆菌中丰度最高的蛋白质是延伸因子Tu, 占比约为 1%。在 400fg 的样本中, 含有 4fg 的该蛋白, 而通过本方法在 400fg 的样本中可以准确鉴

定到延伸因子Tu, 即鉴定所需的最小蛋白量小于 4fg, 这与现有 LC-MS/MS 方法相比, 检测灵敏度也提高了两个数量级。

总结

在本方法中, 使用 ECE-001 型毛细管电泳仪与基于电渗流泵驱动同轴鞘流液的 EMASS-II 型 CE-MS 联用离子源, 通过 CZE-MS/MS 方法实现了对大肠杆菌复杂的蛋白酶解产物在线分析。与传统 LC-MS/MS 方法相比, 本方法灵敏度更高, 分离效果更好, 所需的样本量更少。CZE-MS/MS 系统具有的超灵敏度适用于超微量样本的分析, 为单细胞蛋白组学的研究奠定了基础。



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