

使用 CZE-MS/MS 进行纳克级别 Top-down 蛋白质组学研究

目的

通过延长分离窗口和增加上样体积，提高 CZE-MS/MS 对纳克级别原核生物和真核生物 Top-down 蛋白质组学分析覆盖度。

背景

毛细管区带电泳-电喷雾电离-串联质谱 (CZE-ESI-MS/MS) 在自上而下 (Top-down) 蛋白质组学研究中备受关注，因为它可以实现高效分离和非常灵敏的蛋白质检测。然而由于存在低样品载量和较窄分离窗口的原因，CZE-MS/MS 对复杂蛋白质样品进行大规模 Top-down 蛋白质组学研究的优势受到限制。增加分离毛细管长度，可以明显降低毛细管电场强度，引起蛋白质样品电泳速度减慢，从而延长分离窗口。另外，更长的毛细管长度允许更多的样品载量，帮助获得更多 MS/MS 谱图进行蛋白质组学鉴定。

本应用简报展示了通过使用 1.5 米长的中性涂层分离毛细管，CZE-MS/MS 系统能够从 250 ng 大肠杆菌 (*E.coli*) 蛋白样品中鉴定到 797 ± 21 个蛋白质变体和 258 ± 7 个蛋白质 ($n=2$)。即使将 *E.coli* 蛋白样品进样量降低至 25 ng，CZE-MS/MS 系统仍能从中鉴定出 449 ± 40 个蛋白质变体和 173 ± 6 个蛋白质 ($n=2$) (图1)。另外，通过对 500 ng 斑马鱼小脑蛋白样品以及 500 ng 视顶盖蛋白样品进行分析，CZE-MS/MS 系统分别鉴定出 $1,730 \pm 196$ 个蛋白质变体 ($n=3$) 和 $2,024 \pm 255$ 个蛋白质变体 ($n=3$) (图2)。

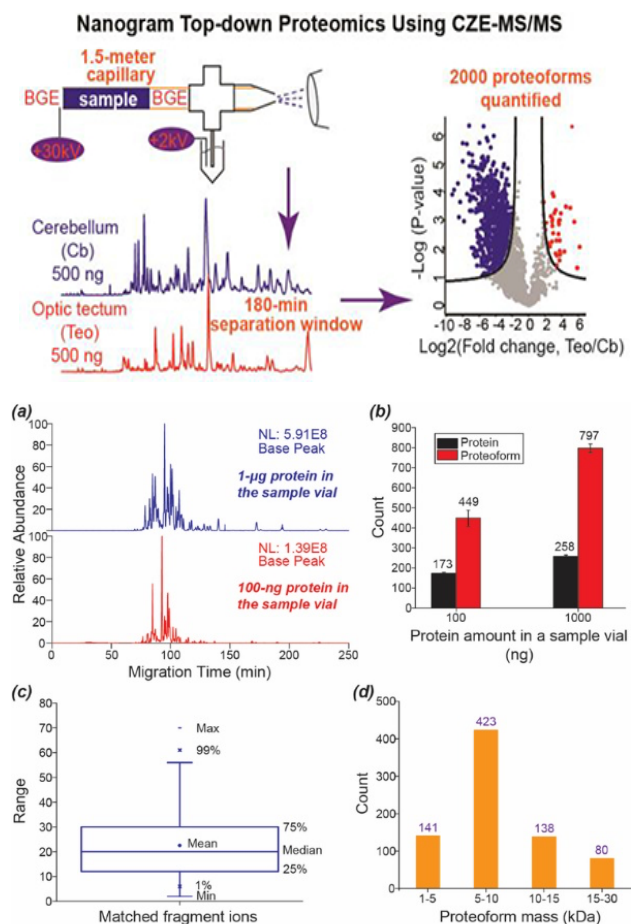


图1. CZE-MS/MS 对 *E.coli* 蛋白样品进行蛋白质组学分析。(a) 分别以 $1 \mu\text{g}$ 和 100 ng 蛋白样品作为起始材料，并分别上样 $1/4$ 毛细管长度所产生的基峰电泳图。(b) 分别从 250 ng 和 25 ng 上样蛋白样品中鉴定到的蛋白质变体和蛋白质数目。(c) CZE-MS/MS 系统对 250 ng *E.coli* 上样蛋白分析，得到碎片离子匹配蛋白质变体数目的箱形图。(d) CZE-MS/MS 系统对 250 ng *E.coli* 上样蛋白分析鉴定到的蛋白质变体分子质量大小的分布。

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 (CMP Scientific, P/N: EM3001-TA)。背景电解质溶液使用 10% (v/v) 醋酸 (pH 2.2), 鞘流液为 0.2% (v/v) 甲酸和 10% (v/v) 甲醇。

实验方法:

进样压力为 5-10 psi, CE 电泳电压为 30 kV, 离子源所用外接电源电压为 2-2.2 kV。喷嘴外径 1.0 mm, 内径 0.75 mm, 末端开口 30-40 μm 。

质谱参数:

Q-Exactive HF 对蛋白样品进行 MS 一级质谱分析时质谱分辨率设定为 240,000, AGC target 设置为 1E6, 最大注入时间为 50 ms, 质荷比范围设定在 600-2,000 m/z。MS/MS 分析时分辨率为 120,000, microscans 数目为 3, AGC target 设置为 1E5, 最大注入时间为 300 ms, 标准碰撞能 (NCE) 为 20%。MS 质谱中前 8 丰度的离子进入四极杆进行分离并进行高能碰撞解离 (HCD)。

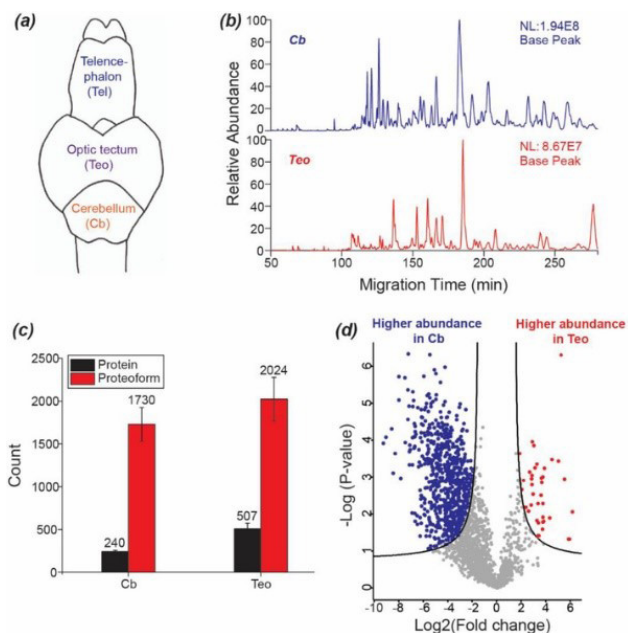


图2. CZE-MS/MS 对 500 ng 斑马鱼小脑和视顶盖蛋白样品进行蛋白组学分析。(a) 成熟斑马鱼脑部结构示意图。(b) CZE-MS/MS 对斑马鱼小脑和视顶盖蛋白样品分析基峰电泳图。(c) 分别鉴定到的斑马鱼小脑和视顶盖蛋白质变体和蛋白质数目。(d) 定量蛋白质变体火山图分布。

总结

利用延长长度的中性涂层毛细管, CZE-MS/MS 系统实现了对 E.coli 大肠杆菌细胞和斑马鱼小脑及视顶盖蛋白样品大规模 top-down 蛋白组学分析, 表明 CZE-MS/MS 系统对组织样品、循环肿瘤细胞、甚至单个哺乳动物细胞蛋白样品进行 top-down 质谱分析时, 具有巨大潜力。



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