

## CZE-MS/MS 对结肠癌细胞系磷酸化蛋白组学的研究

### 目的

采用 PS1 中性涂层毛细管和电渗流驱动鞘流液的 EMASS-II 型 CE-MS 离子源，通过 CZE-MS/MS 对结肠癌 HCT116 细胞系的磷酸化蛋白质组学进行研究。

### 背景

蛋白质磷酸化是自然界中一种关键的可逆翻译后修饰，它参与了转录和翻译调控、细胞信号传导、代谢和细胞分化等多种细胞过程。对蛋白质磷酸化的更全面的位点特异性研究，能够深入理解磷酸化在生物学过程中的调控作用。磷酸化蛋白质组学需要更好地分离磷酸化多肽来提高磷酸化蛋白质组的覆盖率。CZE-MS/MS 在磷酸化蛋白质组学方面具有独特优势。首先，由于毛细管区带电泳 (CZE) 和反相液相色谱 (RPLC) 的分离机制截然不同(大小/电荷比 VS 疏水性)，CZE-MS/MS 和 RPLC-MS/MS 两种方法的结合可以显著提高磷酸化蛋白质组的覆盖率。其次，由于所带电荷存在的显著差异，磷酸化和非磷酸化的多肽可以通过 CZE 得到更好的分离。这一特性减少了对非磷酸肽段对磷酸肽段鉴定的干扰。另外，CZE 还可以容易准确地测得多肽的迁移时间，而对磷酸化多肽迁移时间的预测值跟实测值间的比对，可以用于评估鉴定结果的可信度，进而指导数据库检索。CZE-MS/MS 的这些独特优势使其成为磷酸化蛋白质组学的强大研究工具。

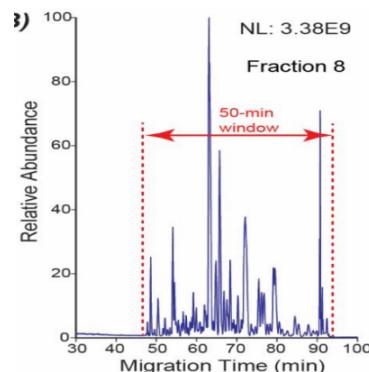


图1. RPLC 分离后进行组分收集（共 8 个组分），其中第 8 个组分经过 CZE-MS/MS 分析得到的基峰电泳图。

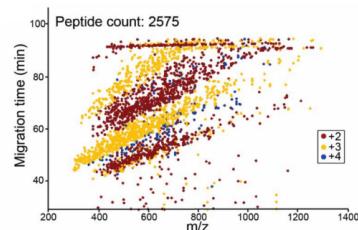


图2. CZE-MS/MS 从 RPLC 组分中鉴定到的多肽的统计图。横坐标为  $m/z$ ，纵坐标为迁移时间，不同颜色代表不同电荷数目。

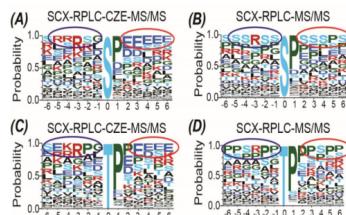


图3. SCX-RPLC-CZE-MS/MS 和 SCX-RPLC-MS/MS 两种方法对丝氨酸和苏氨酸磷酸化位点分析的结果对比。

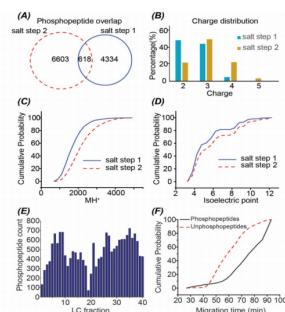


图4. SCX-RPLC-CZE-MS/MS 的磷酸肽鉴定结果

## 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-T)。95 cm PS1型中性涂层分离毛细管(CMP Scientific, P/N: E-SC-PS1-360/150-50-95-B1)。BGE为5%乙酸, SL为0.2%甲酸和10%甲醇。

### 实验方法:

喷针至质谱距离: 2.0 mm; 喷针到毛细管长度: 0.3 mm; 电离电压: 2.2 kV; 分离电压: 30 kV; 样品进样量为200 nL至300 nL。

### 质谱参数:

质谱采集模式为DDA, 扫描范围: 300–1,500m/z; 分辨率: 60,000; 自动增益MS和MS/MS扫描目标设置分别为3E6和1E5, 扫描最大注入时间为50 ms和110 ms。

### 样本制备:

HCT116结肠癌细胞进行细胞裂解后得到蛋白提取液, 经DTT还原, IAA烷基化, 用胰蛋白酶进行酶解。蛋白酶解液采用二氧化钛磁珠富集得到磷酸化多肽。通过SCX-RPLC分离和分段收集, 得到8个组分, 最后进行CZE-MS/MS分析。

## 结果

从 RPLC 收集 2 分钟时间的洗脱液通过 50 分钟的 CZE 进行分析, 所得结果如 图1 所示。图2为 CZE-MS/MS 对 RPLC 组分进行分离鉴定得到的多肽统计图, 在带相同数量的电荷时, m/z 越大的多肽在 CZE 中迁移越慢。图3 为 SCX-RPLC-CZE-MS/MS 和 SCX-RPLC-MS/MS 两种方法对丝氨酸和苏氨酸磷酸化位点分析的结果对比, 由结果可知 CZE-MS/MS 可以明显提高磷酸化蛋白质组学的覆盖率。SCX 通过两步盐洗脱可以很好地分离磷酸化肽段, 11,555 个磷酸化肽段中只有 618 个在这两个洗脱步骤中重叠, 结果见图4A。图 4B、4C 和 4D 比较了 SEC 不同洗脱条件对磷酸化多肽的影响。图 (4E) 显示大部分组分中磷酸多肽鉴定数量在 300 至 700 之间, 且分布较为均匀。在 CZE 分离中, 磷酸肽的迁移速度明显慢于非磷酸肽 (图4F)。这一特性有助于 CZE-MS/MS 在磷酸化蛋白质组学中分析时减少来自非磷酸化肽段的干扰。

## 总结

采用 EMASS-II 型 CZE-MS/MS 平台对 HCT116 细胞系进行大规模磷酸化蛋白质组学分析, 共鉴定了 11,555 个磷酸肽。CZE-MS/MS 适用于大规模磷酸化多肽的鉴定分析, 可进一步拓展磷酸化蛋白质组的研究深度。