

CZE-MS/MS 对 E.coli 进行深度 Top-down 蛋白组学分析

目的

通过联合使用体积排阻色谱和反相液相色谱进行组分收集后, 结合先进的 EMASS-II 型毛细管电泳与质谱在线联用技术, 构建多维 SEC-RPLC-CZE-MS/MS 分析平台, 对 E.coli 开展全面深入的自上而下 (Top-down) 蛋白组学研究。

背景

传统的 top-down 蛋白组学研究手段, 是从细胞中提取的完整蛋白分子后, 首先通过液相色谱 (LC) 和电泳进行馏分收集, 随后进行反相液相与串联质谱联用 (RPLC-MS/MS) 分析。通过得到的 MS/MS 图谱匹配蛋白质数据库, 进行蛋白质变体 ID 鉴定。目前最先进的 RPLC-MS/MS 工作流程可以鉴定到 3,000-5,000 个蛋白质变体 ID, 对应约 1,000 个蛋白质。

在本篇应用中我们展示了一个新型的正交的多维分离平台, 它结合了体积排阻色谱 (SEC) 和 RPLC, 对 E.coli 蛋白质样品进行预先馏分收集, 随后将馏分送入 EMASS-II 型毛细管电泳与质谱在线联用系统, 采用 CZE-MS/MS 方法进行做深度 Top-down 蛋白组学分析。通过这个平台, 对于完整蛋白质分析时可以达到 4,000 的峰容量, 并从中鉴定出 5,700 个 E.coli 蛋白质变体。相比于之前仅仅使用 CZE-MS/MS 分析, 该数据在蛋白质变体鉴定数目方面提升了 10 倍, 是目前对细菌进行 Top-down 蛋白组学研究获得的最大数据组。该多维串联平台— SEC-RPLC-CZE-MS/MS, 在蛋白质变体鉴定数目和分析花费时间方面, 与目前最先进的 RPLC-MS/MS 平台相当。

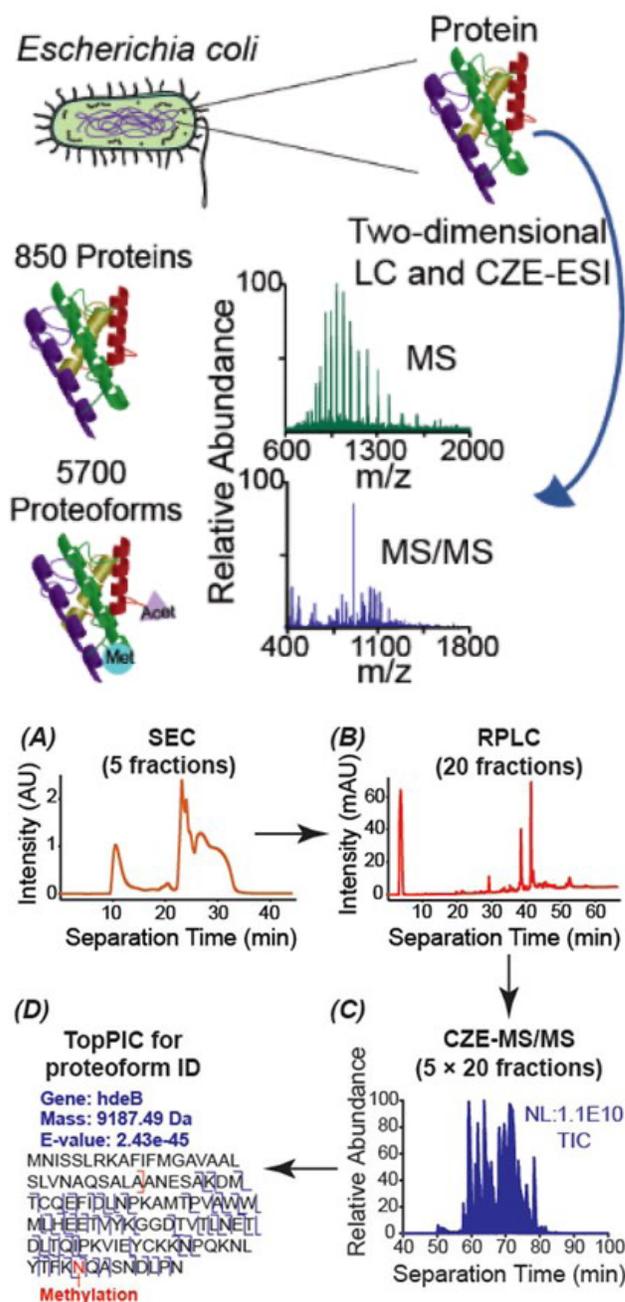


图1. 多维分离平台串联帮助 CZE-MS/MS 提高对复杂蛋白组完整蛋白鉴定的峰容量。(A) E.coli 裂解产物经 SEC 分离色谱图。(B) SEC 分离后的馏分进入 RPLC 分离色谱图。(C) RPLC 分离后的馏分进入 CZE-MS/MS 分析得到的总离子流电泳图。(D) hdeB 基因编码的蛋白质变体之一经 TopPIC 软件搜库后碎裂模式展示。

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)。70 cm CC1 型阳离子涂层分离毛细管 (CMP Scientific, P/N: E-SC-CC1-360/150-50-70-B1), 背景电解质溶液 (BGE) 使用 10% 醋酸, 鞘流液由 0.2% 甲酸 FA (v/v) 和 10% 甲醇 MeOH (v/v) 组成。

实验方法:

样品进样压力为 5 psi, 进样 95 s。CE 进样端施加电压 30 kV。离子源所用外接电源电压 2-2.3 kV。喷针外径 1.0 mm, 内径 0.75 mm, 末端开口 20-40 μm。

质谱参数:

Q-Exactive HF 质谱采用数据依赖性采集模式 (DDA), 标准碰撞能 (NCE) 设定为 20%。离子传输毛细管温度为 320°C, S-LensRF 值设定为 55。对于全 MS 模式, microscans 数值设置为 3, 分辨率为 240,000, AGC target 值为 1E6, 最大注入时间为 50 ms, 扫描范围为 600-2,000 m/z。对于 MS/MS 模式, microscans 数值设置为 1 或 3, 分辨率为 120,000, AGC target 值为 1E5, 最大注入时间为 200 ms。

样本制备:

用水将单抗稀释到 0.8 mg/mL。

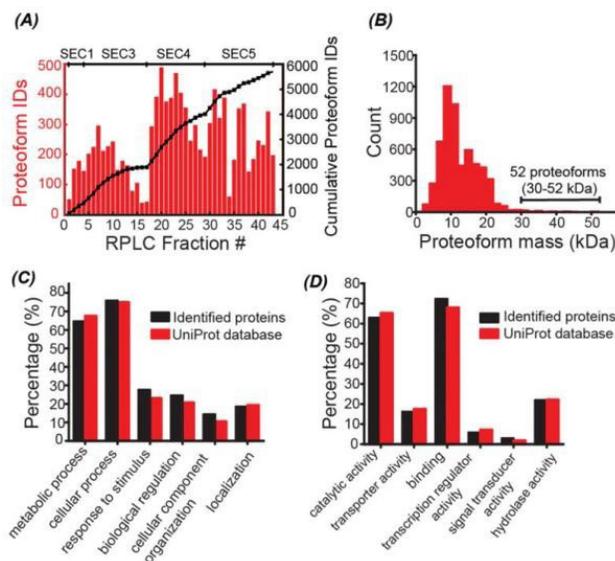


图2. 对从 E.coli 鉴定出的蛋白质和蛋白质变体总结。(A) 每个 RPLC 馏分中鉴定出蛋白质变体ID的数目 (红色条形图); 累计蛋白质变体鉴定数目 (黑色方块表示)。(B) 鉴定出的蛋白质变体分子量大小的质量分布。

(C) 本报道中鉴定出的蛋白质和 UniProt 的 E.coli 数据库中的蛋白质参与的生物过程分布。(D) 本报道中鉴定出的蛋白质和 UniProt 的 E.coli 数据库中的蛋白质所发挥的分子功能分布。

总结

多维分离平台联用, 极大提高了 CZE-MS/MS 对于 Top-down 蛋白组学鉴定能力, 使 CZE-MS/MS 发展成为蛋白组学研究的强力工具。



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