

在LC-MS研究中利用MaxPeak高性能表面技术大幅提高磷酸肽的回收率

Chris Hughes, Lee A. Gethings, Robert S. Plumb

Waters Corporation

仅供研究使用，不适用于诊断。

摘要

色谱系统中的过渡金属会与含磷酸基团的分析物发生相互作用，可能导致色谱性能不佳或分析物损失。沃特世开发出一项新技术，称为MaxPeak高性能表面(HPS)，并已在新型液相色谱系统ACQUITY Premier的开发中加以应用。当用于液相色谱系统和色谱柱的组件时，MaxPeak HPS可提供高效的表面屏障，缓解分析物与金属表面的不良相互作用，对于某些化合物的分析非常有用，磷酸肽就是其中之一。这项新技术同时应用于色谱系统的接液组件和色谱柱外壳时，可明显提高磷酸肽的回收率。本研究中分析的某些肽在标准系统上无法检出，但采用HPS流路能够获得非常强的信号。

本应用纪要所描述的数据比较了常规系统与经HPS处理的系统在研究磷酸肽响应中的性能。对 α -酪蛋白和 β -酪蛋白的胰蛋白酶酶解物以及合成的PhosphoMix标准品进行分析，结果表明，回收率随磷酸化位点的数量和氨基酸残基的数量而变化。在极端情况下，使用经HPS处理的系统时，在常规配置中根本无法检出的某些肽获得了非常大的离子计数。

优势

- 增强磷酸肽检测

- 观察到多位点修饰的肽
- 修饰肽的色谱峰形明显改善

简介

质谱分析技术虽然在不断进步，但利用液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)检测磷酸肽仍然是蛋白质组学领域的一大棘手应用。其中一个主要难点是，磷酸肽存在一个或多个酸性磷酸基团，无法有效地进行质子化，因此难以检测¹。此外，还有其他重要机制也导致利用LC-MS难以分析磷酸肽。

从液相色谱系统的接液组件中回收不完全是导致磷酸肽检测效率不佳的另一个主要原因。金属离子通过路易斯酸/路易斯碱相互作用与磷酸基团发生相互作用，导致磷酸肽部分甚至完全保留，峰形较差。研究人员认为，肽包含的磷酸基团越多，其回收率和色谱峰形越差。目前用于提高LC-MS分析中磷酸肽回收率的策略包括向样品中添加EDTA或柠檬酸盐（两者均用作金属螯合剂），或多次进样这些溶液，以尝试在样品分析之前对流路进行钝化²。但这些策略均有一定缺陷，它们可能导致色谱性能和质谱测量灵敏度下降。

本应用纪要研究了MaxPeak HPS技术在磷酸肽分析中的优势。MaxPeak HPS硬件利用无机/有机杂化硅胶表层，在化学性质上类似于亚乙基桥杂化硅胶颗粒。当应用于液相色谱分离过程中的接液金属表面（例如色谱柱和液相色谱流路）时，MaxPeak HPS可提供弹性屏障，但不参与样品成分的分离。在实验中使用常规系统和经HPS改进的系统测量多种磷酸肽的回收率响应。

实验

样品

制得 α -酪蛋白和 β -酪蛋白的胰蛋白酶酶解物溶液，并在不使用液相色谱系统的情况下以5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速将溶液注入ESI离子源，确认所制样品中存在大多数预期的磷酸肽。通过注样发现酶解物中存在大型多磷酸化肽：QMEAESI SSSEEIVPN $\underline{\text{S}}$ VEQK和RELEELNVPGEIVES $\underline{\text{L}}$ SSSEESITR，但含量非常低。从标准合成磷酸肽混合物1和3（购自Sigma-Aldrich）中获得更多磷酸肽物质，包括单磷酸化、二磷酸化、三磷酸化和四磷酸化合成肽。将样品溶于0.1%甲酸水溶液中，每种肽的浓度为1 pmol/ μL 。每次分析时，将1 pmol样品注入色谱柱。

液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY UPLC I-Class (常规) 和ACQUITY Premier (HPS)
色谱柱:	CSH 2.1 mm × 100 mm (常规和HPS)
柱温:	55 °C
样品温度:	8 °C
流速:	150 µL/min (2.1 mm)
流动相A:	水 + 0.1%甲酸
流动相B:	乙腈 + 0.1 %甲酸
梯度:	15 min内流动相B从1%升至40%

质谱条件

质谱系统:	SYNAPT XS
电离模式:	电喷雾正离子模式
采集模式:	ToF MS ^E
采集范围:	50-2000 Da
碰撞能量:	捕集CE梯度(14-40 eV)
毛细管电压:	2.2 kV

锥孔电压：	30 V
实时校正标准液：	Glu血纤维蛋白肽B (2+, <i>m/z</i> 785.8426)

数据管理

色谱软件：	MassLynx v4.2
质谱软件：	MassLynx v4.2
信息学软件：	PLGS 3.0.3, SkyLine (华盛顿大学)

结果与讨论

通常情况下，使用HPS色谱柱能够大幅提高大多数肽的回收率。表1中的数据突出显示了所分析的所有样品中预期磷酸肽的结果。最右侧两个有色列表表示使用MassLynx中原始数据的重构离子色谱图和Skyline软件中的数据提取，基于信号和峰形得到的肽的回收率。使用HPS色谱柱获得的磷酸肽回收率提升示例见图1，其中展示了1 pmol α -酪蛋白进样得到的原始数据色谱图，上图为HPS系统得到的数据。可以明显看出，对于样品中未经修饰的肽，改用HPS对峰响应几乎没有影响。但是，如果将大约8.5分钟至10.5分钟保留时间范围的小区域放大显示，可以看到在常规系统上几乎无响应的两个峰在HPS系统中获得了很高的信号响应。使用Skyline提取数据以作进一步检查（图2），显示出另一种单磷酸化肽VPQLEIVPNSAEER，采用常规系统未检出相关信号，但采用HPS系统-色谱柱获得了很强的信号和优异的峰形。提取离子为2+和3+母离子。具有多个磷酸化位点的示例肽ADEPSSEES DLEIDK如图3所示。采用常规配置时，多磷酸化肽（例如该化合物）的回收率通常非常差。相比之下，HPS系统使这些多磷酸化物质的回收率显著提高。图4显示了使用常规系统和经HPS处理的系统分析 β -酪蛋白酶解物得到的ProteinLynx Global Server (PLGS)搜索报告。蛋白质序列覆盖图突出显示了修饰肽所在的蛋白质序列区域。从图中可以看出，当使用常规配置进行分析时，未检出FQSEEQQTEDELQDK；而采用经HPS处理的设置进行分析时，则清晰显示这一序列。还显示了这种肽的PLGS匹配的氨基酸序列。

蛋白质/Sigma混合物	肽(mod)	m/z (2+, 3+)	常规系统	高性能表面
α	VPQLEIVPNSAEER	830.90, 554.27	■	■
α	DIGSESTEDQAMEDIK	964.35, 643.24	■	■
α	QMEAESISSSEEEIVPNSVEQK	1360.96, 907.64	■	■
α	YKVPQLEIVPNSAEER	976.48, 651.32	■	■
α-S2	TVDMESTEVFTK	733.81, 489.54	■	■
β	FQSEEQQTDELQDK	1031.42, 687.95	■	■
β	RELEELNVPGEIVESLSSSEESITR	1561.64, 1041.43	■	■
1_1	VLHSGSR	418.19	■	■
1_2	RSYSRSR	536.21	■	■
1_3	RDSLGTYSR	611.27, 407.85	■	■
1_4	TKLITQLRDAK	723.86, 482.91	■	■
1_5	EVQAEQPSSSPR	741.32, 494.55	■	■
1_6	ADEPSSEESDLEIDK	872.35, 581.90	■	■
1_7	ADEPSSEESDLEIDK	912.33, 608.56	■	■
1_8	FEDEGAGFEESSETGDYEEK	1167.93, 778.95	■	■
1_9	ELSNSPLENSFGSPLEFR	1170.01, 780.34	■	■
1_10	SPTEYHEPVYANPFYRPTTPQR	1405.60, 937.41	■	■
3_1	SLSYSPVER	639.22, 426.78	■	■
3_2	LQSGVSLASK	643.75, 429.50	■	■
3_3	PPYSRVITQR	728.79, 486.20	■	■
3_4	SRSRSYTPYR	861.28, 574.52	■	■
3_5	ADEPSSEESDLEIDK	952.31, 635.21	■	■

■ 检出，具有良好的信号和峰形

■ 检出，但信号和/或峰形不佳

■ 未检出

表1.分析的所有样品中的磷酸肽序列、m/z和回收率说明。彩色图例描述了检出的基于信号和峰形的响应。

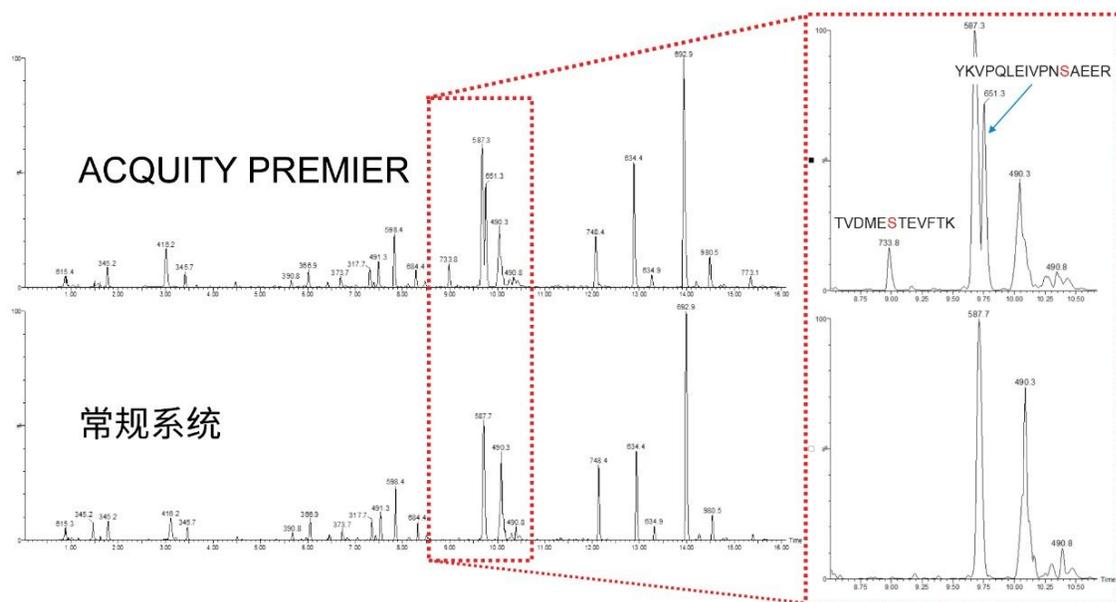
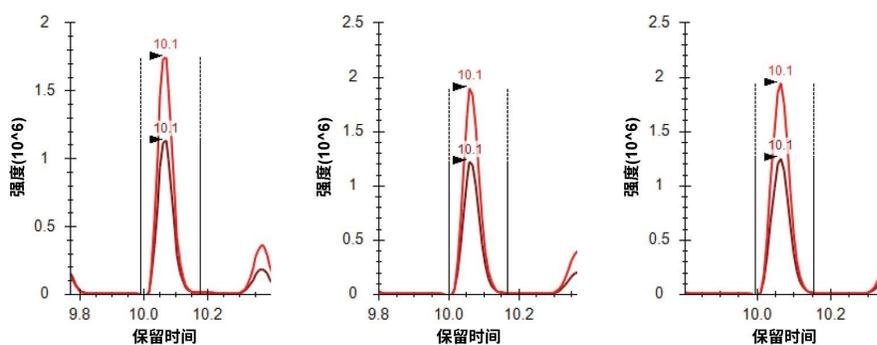


图1.进样1 pmol α -酪蛋白得到的色谱图，右侧突出显示了保留时间8.5~10.5 min的放大区域。观察到磷酸肽得到明显回收，而未经修饰的肽的响应则没有明显改变。

ACQUITY Premier



进样1

进样2

进样3

常规系统

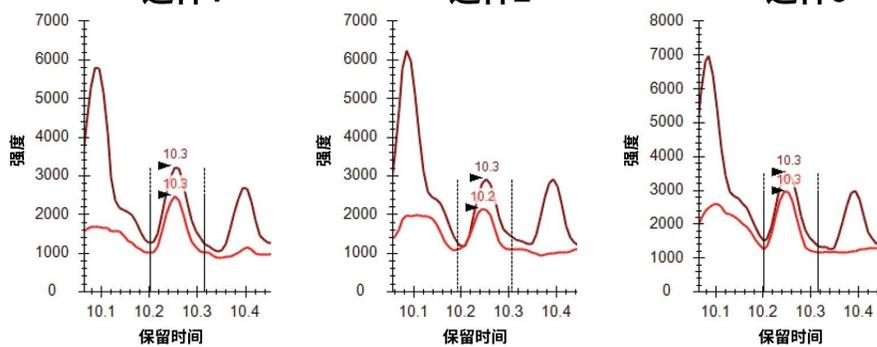


图2. α -酪蛋白胰蛋白酶酶解物中磷酸肽VPQLEIVPNSAEER的峰面积改善。提取离子为母离子2+和3+离子的 m/z 。

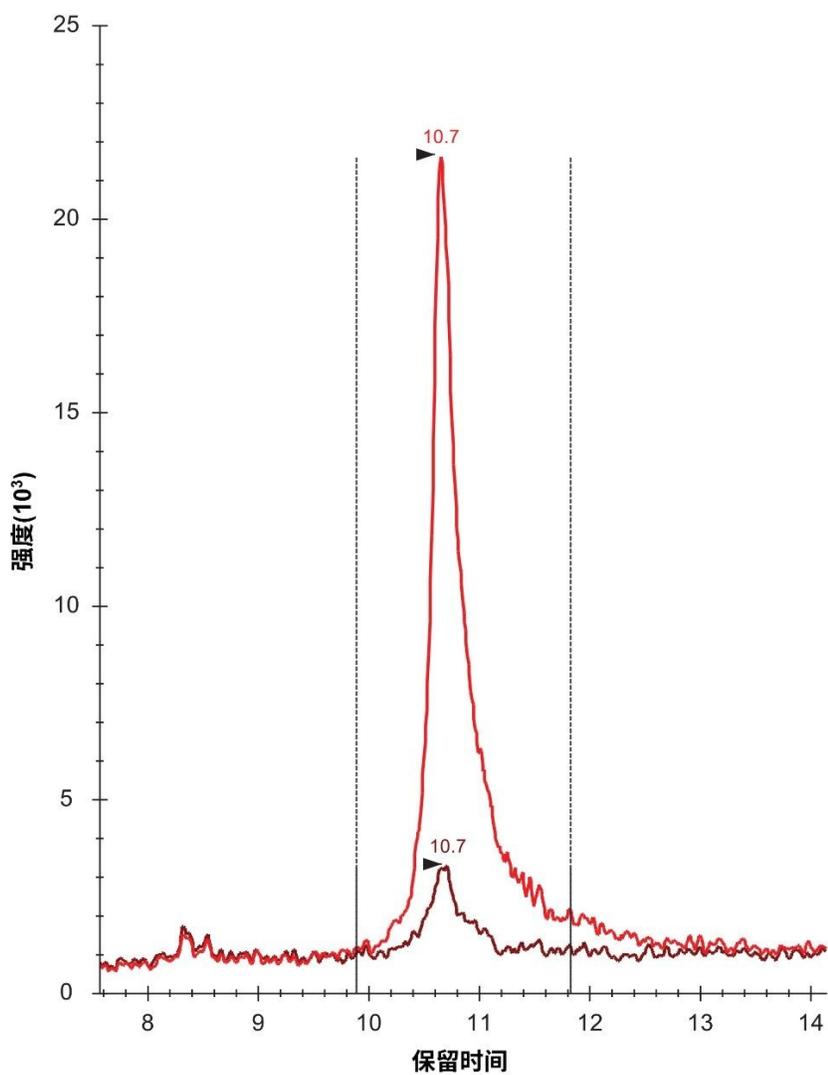


图3. Sigma混合物3中三磷酸化肽ADEPSSEESDLEIDK的峰形。采用常规配置时，未检出这种肽，但在HPS配置下，观察到回收率显著提高。

参考资料

1. Liu *et al*, *Rapid Commun Mass Spectrom*.2005;19(19):2747–56.
2. Winter *et al*, *J Proteome Res*.2009 Jan;8(1):418–24.

特色产品

ACQUITY Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

ProteinLynx Global SERVER (PLGS) <<https://www.waters.com/513821>>

720007025ZH, 2020年10月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie](#) [设置](#)

沪 ICP 备06003546号-2

京公网安备 31011502007476号