

使用ACQUITY™ UPLC M-Class与SELECT SERIES™ Cyclic™ IMS联用系统来考察纳升级LC的重现性

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

Waters Corporation

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

纳升级液相色谱(LC)和质谱(MS)在分析大型样品组中以设定的时间间隔进样的质量控制样品时表现出优异的重现性，这些样品组是来自卵巢癌细胞系的胰蛋白酶酶解样品。将配备捕集柱和分析柱的ACQUITY UPLC M-Class系统与SELECT SERIES Cyclic IMS质谱仪联用，并在启用离子淌度的单圈数据非依赖型分析(DIA)模式下运行质谱仪。结果表明，纳升级色谱仪与质谱仪联用提供了优异的保留时间和信号强度重现性，这些因素使蛋白质鉴定水平在宽动态范围内保持一致，此外还保持了用于统计分析的数据可靠性。

优势

- 可靠的纳升级色谱
- 离子淌度分辨率
- 质谱仪光学模式
- 动态范围

简介

四极杆飞行时间(Q-ToF)质谱仪是一种成熟的工具，适用于发现蛋白质组学实验。这些仪器表现出良好的灵敏度、速度和高质量分辨率，这些特性对于成功分析棘手样品类型具有重要意义¹。

蛋白质组学研究通常将纳升级色谱与质谱联用作为理想的分析技术，尤其是在可用于分析的样品量有限的情况下。在一些情况下，例如需要研究与疾病有关的潜在生物标志物的实验，样品通常来自大量捐献者。在分析这些大型样品组时，对测量重现性和稳定性的要求是保持数据可靠性以在数据采集下游进行统计分析的关键所在。

本应用简报考察了纳升级色谱系统ACQUITY UPLC M-Class在标准大肠杆菌胰蛋白酶酶解物样品分析中的应用，该样品作为大型样品组中的质控样品进样使用，测量通过在启用离子淌度的DIA采集模式下运行SELECT SERIES Cyclic IMS完成。结果表明，液质联用(LC-MS)系统可提供所需性能，使更多研究的结果具有统计相关性。

实验

样品描述

将Waters MPDS大肠杆菌胰蛋白酶酶解物(P/N: [186003196 <https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186003196-massprep-e-coli-digest-standard.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186003196-massprep-e-coli-digest-standard.html))用1 mL水稀释制得溶液，使每次进样的进样量为100 ng。

方法条件

液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY UPLC M-Class系统
捕集柱:	Symmetry™ C ₁₈ , 5 μm, 180 × 20 mm (P/N: 186008821)
分析柱:	HSS T3, 1.8 μm, 75 μm × 250 mm (P/N:

	186008818)
柱温:	40 °C
样品温度:	10 °C
流速:	300 nL/min
流动相A:	0.1%甲酸的水溶液
流动相B:	乙腈 + 0.1 %甲酸
捕集条件:	2 min, 5 µL/min, 99%溶剂A
梯度:	流动相B在90 min内从5%增加到35%
色谱柱平衡时间:	30 min
质谱条件	
质谱系统:	SELECT SERIES Cyclic IMS
电离模式:	ESI+
质量分辨率:	50,000 FWHM
离子淌度分辨率:	单圈, 65 FWHM
采集模式:	HDMS ^E
采集质量数范围:	50–2000 amu

积分时间:	0.5 s
参比物质:	每120 s采样一次Glu-血纤维蛋白肽B
毛细管电压:	3.2 kV
传输CE, 功能通道2:	20-46 V
锥孔电压:	30 V
数据管理	
质谱软件:	MassLynx™
数据处理:	ProteinLynx Global Server, Tibco Spotfire®
数据库:	Uniprot大肠杆菌 - 仅经过审查的序列
错误发现率:	4%

结果与讨论

在癌细胞系样品每进样十次后分析大肠杆菌样品，使大肠杆菌进样之间的时间间隔为约24 h。一次此类进样的典型色谱图如图1所示，实验过程中大肠杆菌的总进样次数为23次。因此，整个实验总共只需23天。

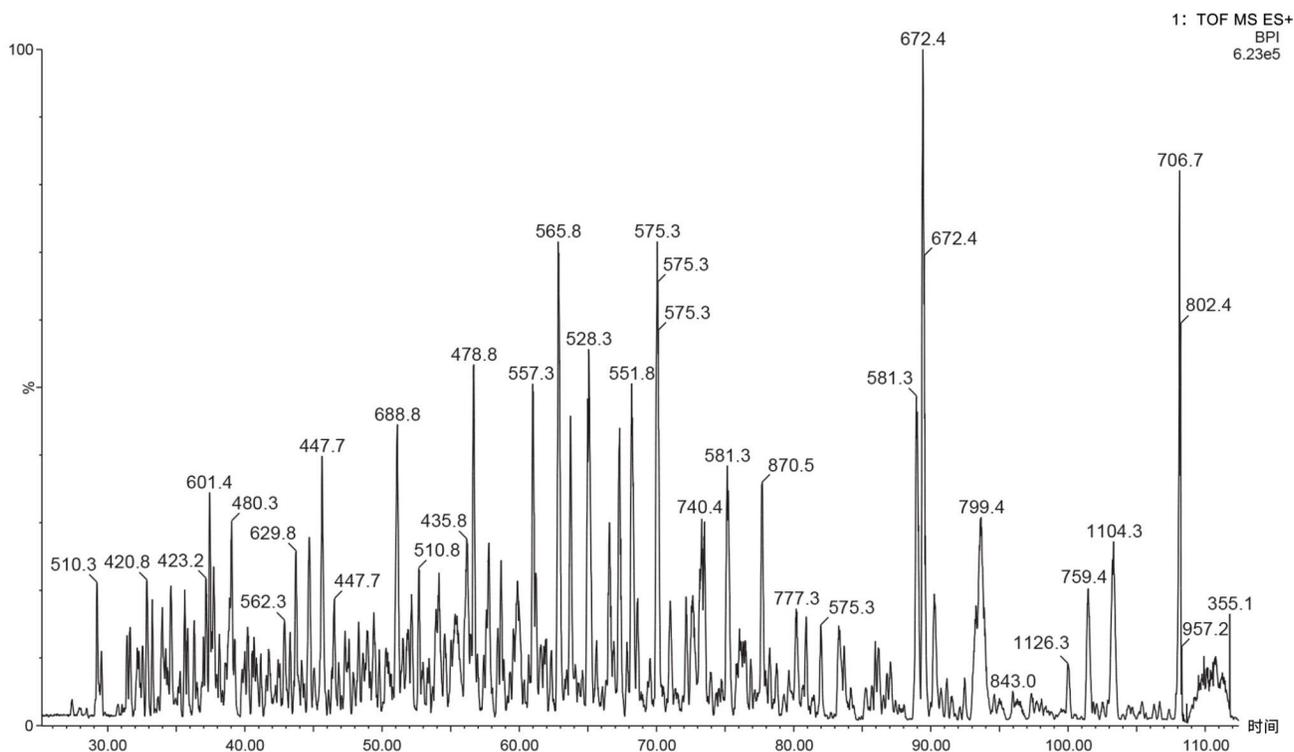


图1.大肠杆菌胰蛋白酶酶解物样品的典型纳升级色谱图

完成数据处理并在数据库中搜索每个原始数据文件后，可以分析的指标包括保留时间、信号强度和质量精度。通过证明这些指标都具有重现性和稳定性，可以对在更广泛的分析研究中获得的数据拥有更高的可信度，尤其是当从更广泛的研究中进行真实样品预期可能会产生负面影响时。

重点关注在95 min色谱洗脱空间的不同时间点洗脱的五种肽，图2显示常规获得的保留时间测量结果的变异系数(CV)为1%。将具有不同强度的各种肽的数据提取到箱线图(图3)中，强度重现性也与获得的CV(小于20%)一致。

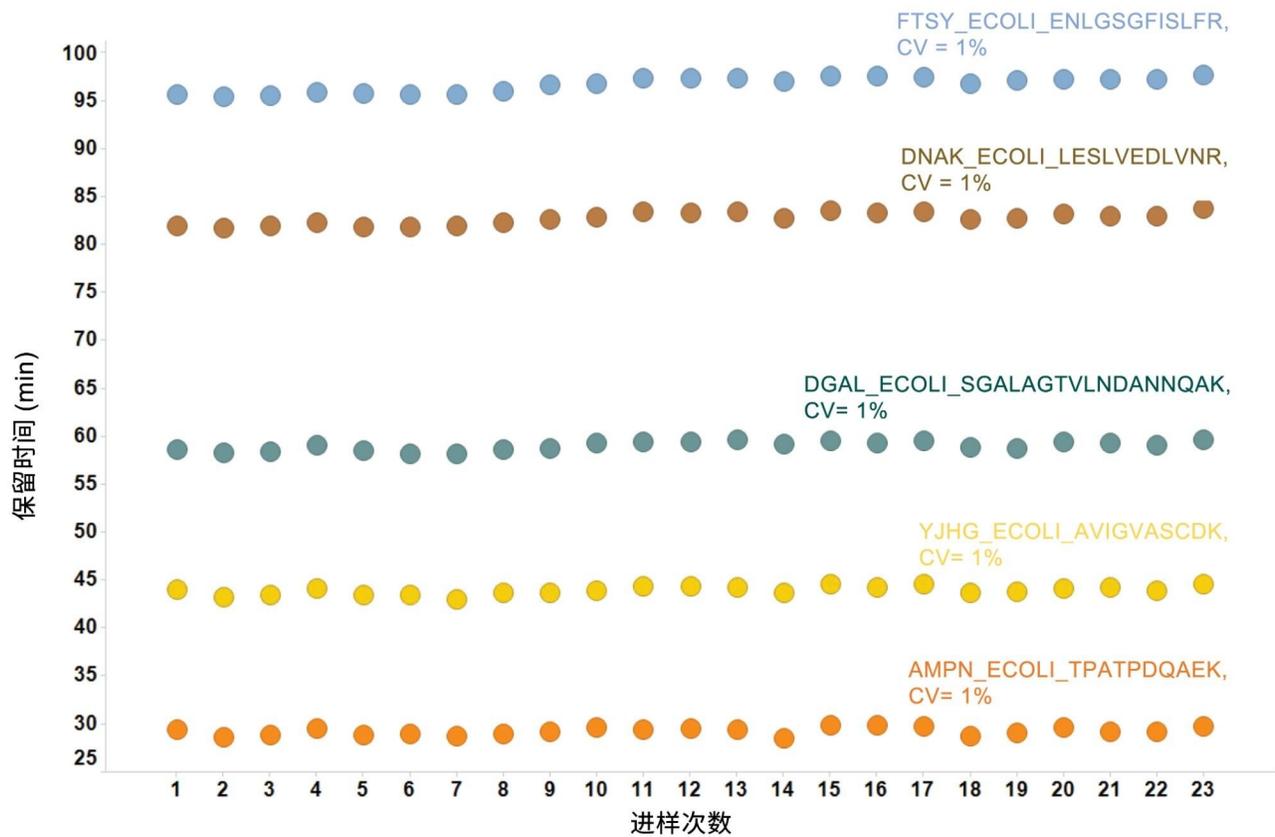
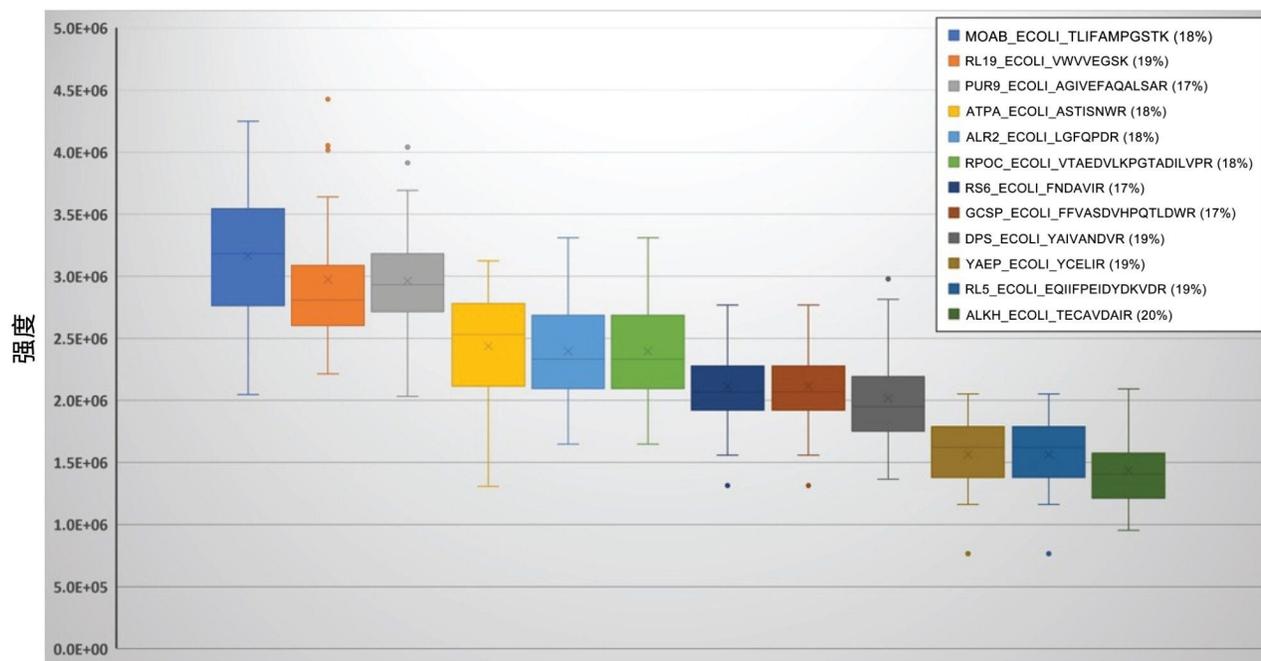


图2.五种大肠杆菌肽在色谱分离空间中的保留时间重现性，常规观察到1% CV。



12种肽的信号强度重现性箱线图

图3.12种大肠杆菌肽的信号强度重现性，常规观察到20% CV。

质谱仪性能突出体现在所有搜索结果中275,000个肽质量数测量值的质量精度分布上（图4），发现其中82%的结果都在理论质荷比值 ± 2 ppm的范围内。

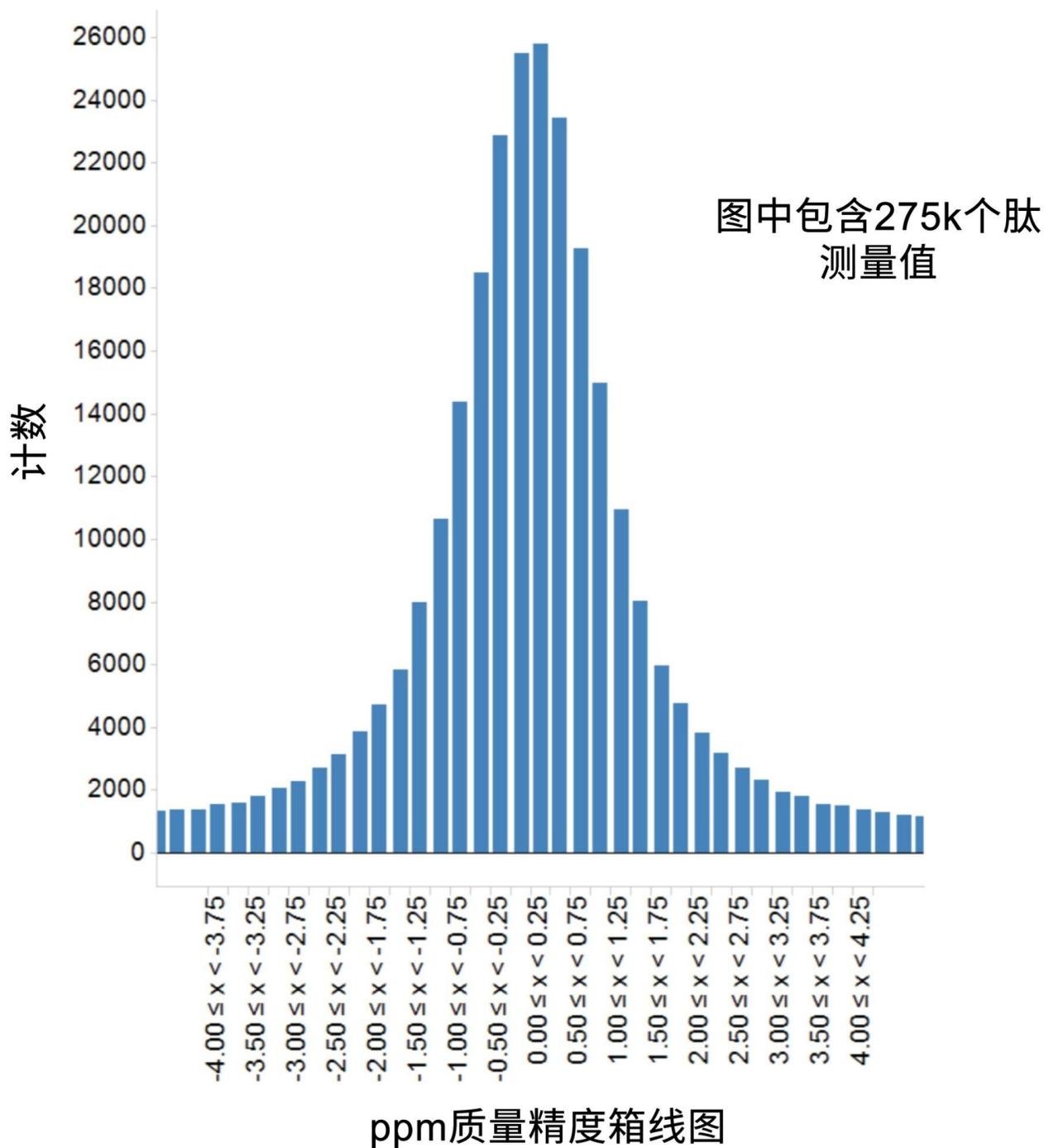


图4.275k个肽的质量精度测量值，82%的结果在 ± 2 ppm以内。

从数据库搜索结果得出的蛋白质和肽鉴定率对于测量的一致性很重要，特别是考虑到大规模研究中的进样时。图5突出显示了整个实验的鉴定结果，每次进样的蛋白质鉴定率约为1,100，肽编号约为22,000。蛋白质序列覆盖率是衡量肽鉴定重现性的指标，图6突出显示了12种蛋白质，覆盖率为55%~93%，但这些结果的变异系数在3%~5%的范围内。观察到优异的蛋白质鉴定重现性，在23次进样中，至少有17次观察到相同的1000种鉴定结果，如图7所示。我们发现，与这些蛋白质鉴定结果相关的碎片离子强度总和跨越四个数量级的强度动态范围，如图8所示。

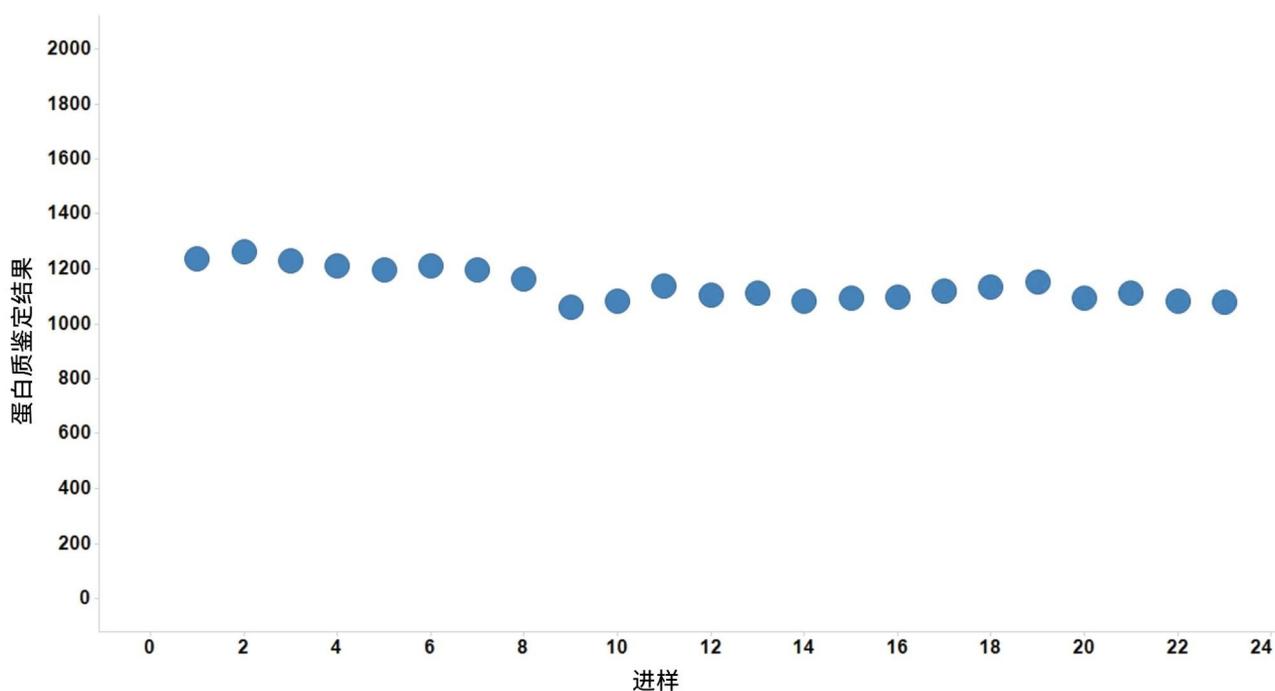
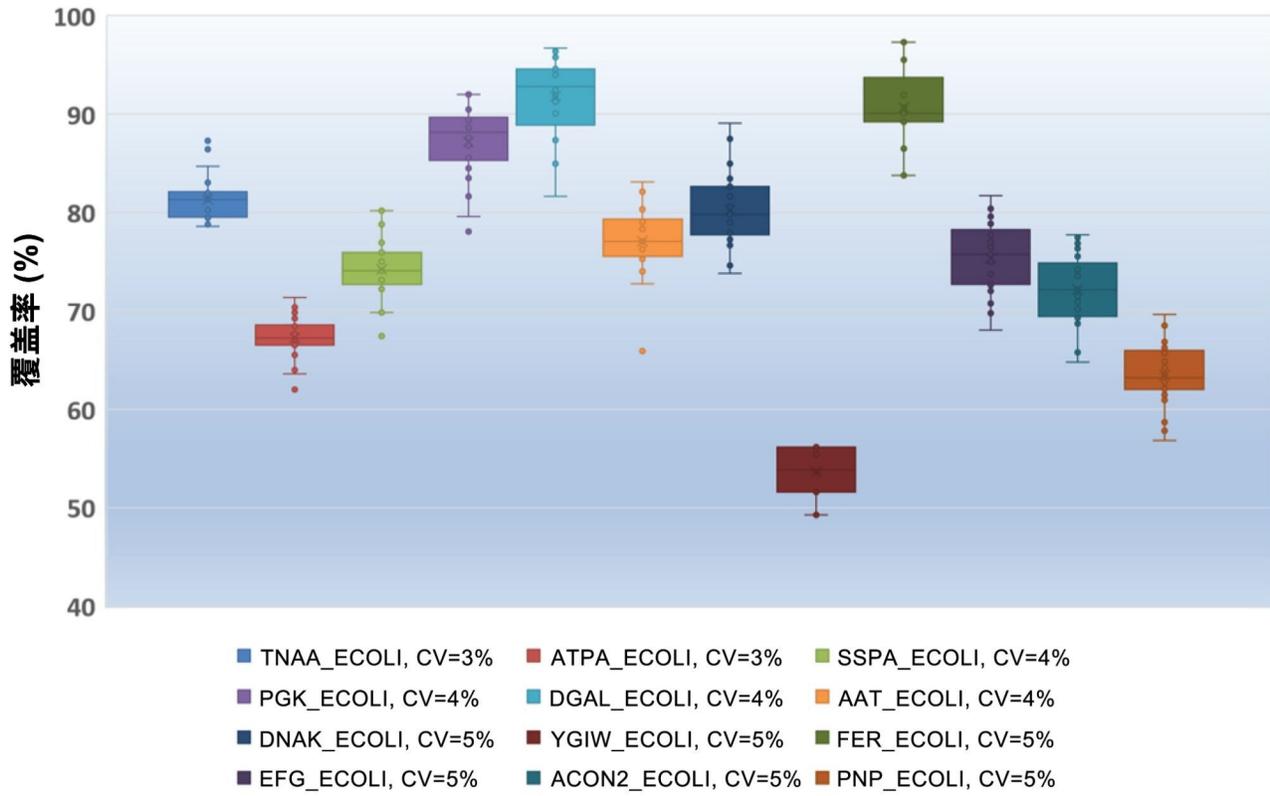


图5.23次进样中每次进样的蛋白质鉴定结果



12种蛋白质序列覆盖率重现性箱线图

图6.12种大肠杆菌蛋白质的序列覆盖率重现性，常规观察到5% CV。

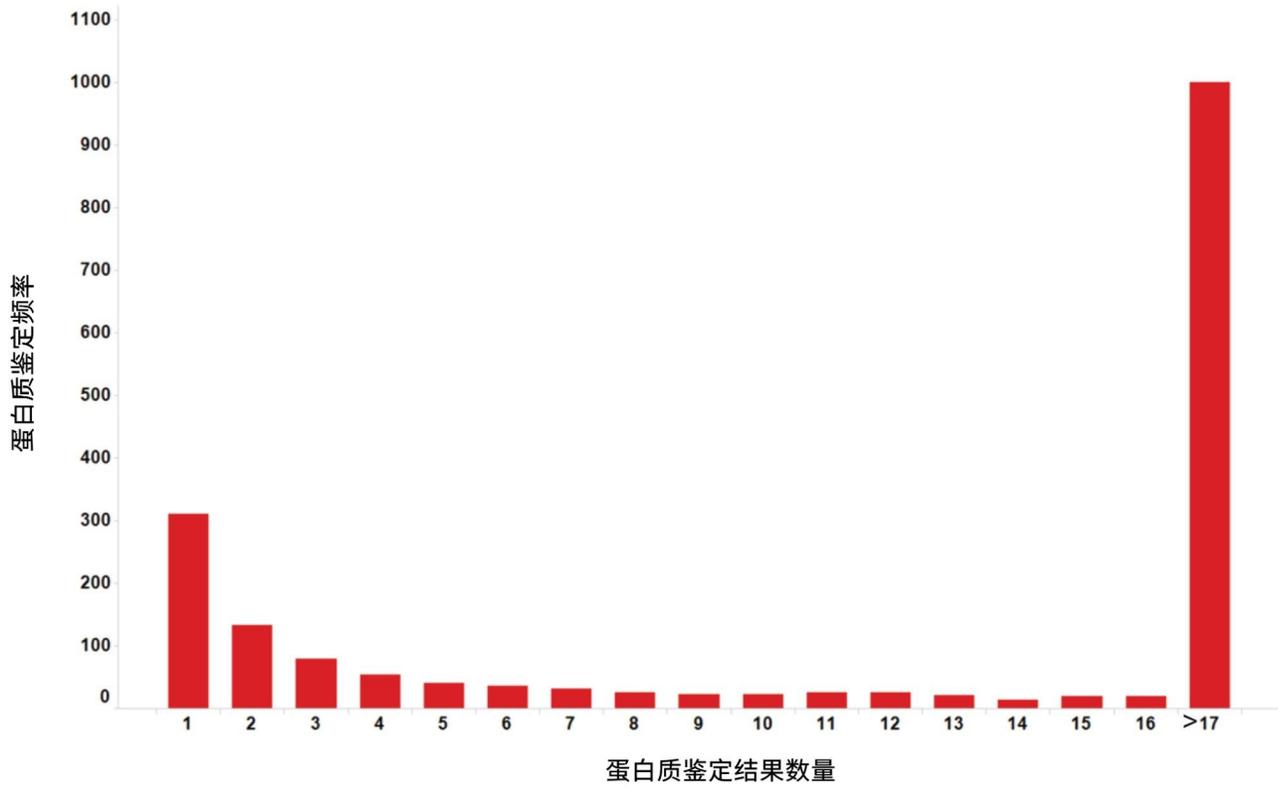


图7.蛋白质和肽鉴定的重现性，在75%的进样中出现1,000次相同结果。

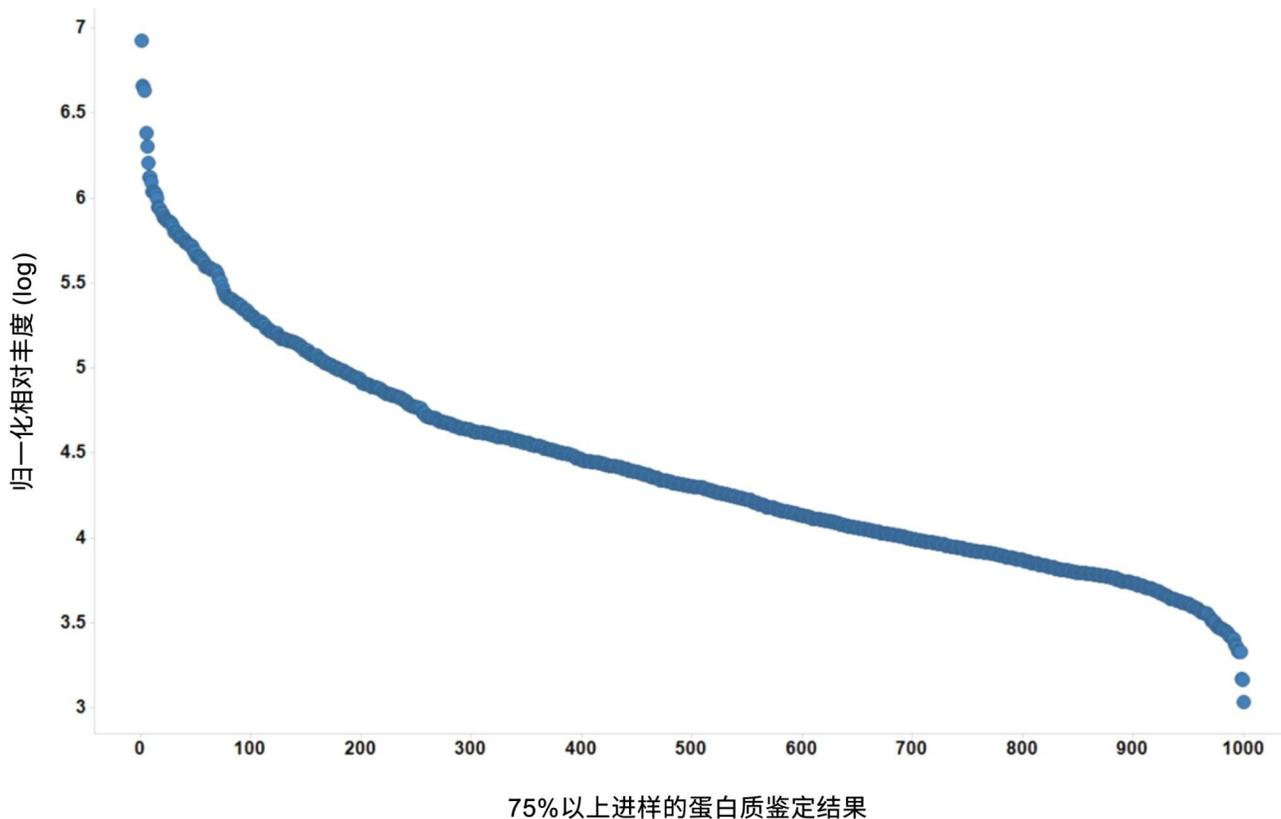


图8.代表在>75%的进样中鉴定出的蛋白质的样品内动态范围，涵盖4个数量级。

结论

配备纳升级色谱柱的ACQUITY UPLC M-Class系统与SELECT SERIES Cyclic IMS质谱仪联用经证明可提供优异的保留时间、信号强度重现性和质量精度。这些数据来自对23天实验过程中质量控制标准品进样所得数据的分析。这些因素的测量稳定性使宽信号强度动态范围内的蛋白质鉴定水平能够保持一致，并增强了更广泛的卵巢癌样品测量结果的统计相关性。

TIBCO Spotfire®是TIBCO software Inc.和/或其子公司在美国和/或其他国家/地区的注册商标或商标

参考资料

1. Chris Hughes, Lee A. Gethings, Robert S. Plumb. Cyclic IMS在纳升级蛋白质组学实验中的定性和定量性能. 沃特世应用纪要, [720007381ZH](#), 2021.

特色产品

ACQUITY UPLC M-Class系统 <<https://www.waters.com/134776759>>

SELECT SERIES Cyclic IMS <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135021297>>

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

720007691ZH, 2022年8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](#)