基于SCX/SAX混合填料的集成化蛋白质组学样品前处理方法

孙秀杰^{1,2†}, 唐君^{2,3,4†}, 陈文东², 柯弥², 胡巢凤⁴, 许瑞莲³, 田瑞军^{2*}

1. 哈尔滨工业大学化学化工学院, 哈尔滨 150001;

2. 南方科技大学化学系, 深圳 518055;

3. 深圳市人民医院肿瘤研究所, 深圳 518020;

4. 暨南大学基础医学院病理生理学系, 广州 510632

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: tian.rj@sustc.edu.cn

收稿日期: 2017-08-17; 接受日期: 2017-09-26; 网络发表日期: 2018-01-29

国家自然科学基金(批准号: 21575057)、深圳市科技计划项目(批准号: JCYJ20150901153557178, JSGG20160301103415523, JCYJ20160229153100269)、广东省自然科学基金团队项目(批准号: 2016A030312016)和国家重点研发计划(批准号: 2016YFA0501404)资助

摘要 本文建立了一种基于强阳离子交换填料/强阴离子交换填料(SCX/SAX)混合填料的集成化蛋白质组学样品前处理方法. 本工作将前期已发展的离心式集成化蛋白质组学样品前处理技术SISPROT中的SCX填料替换成SCX和SAX混合填料, 以溶菌酶和牛血清白蛋白为模型蛋白, 研究了3种pH (3, 7.4, 12)条件下蛋白质在SCX/SAX混合填料上的保留行为; 应用BCA方法对SCX/SAX混合填料的比例进行了优化, 并应用SDS-PAGE法对酶解步骤中pH变化引起的蛋白质丢失情况进行了系统的考察. 实验结果发现, 在pH 7.4条件下, 质量比为1:1的SCX/SAX混合填料的富集效率最佳, 蛋白质富集容量为180 μg , 是SCX填料富集容量的两倍左右; 且酶解步骤的pH变化过程不会影响蛋白质在SCX/SAX混合填料上的保留. 最后应用改进的SISPROT方法对少量肠癌组织样品进行了集成化蛋白质组学样品前处理和分析, 并与传统的基于SCX填料的SISPROT方法进行了对比研究. 结果表明, 蛋白质鉴定量、特异性肽段数量和肽段谱图匹配数量均与基于SCX填料的SISPROT技术相当, 证实了该方法作为蛋白质反应器的可靠性. 鉴于该方法可以实现在生理pH条件下进行样品前处理, 且显著提高了上样容量和减少了样品损失, 该方法有望成为一种更为通用的集成化蛋白质组学样品前处理技术.

关键词 SISPROT, SCX, SAX, 蛋白质富集, 蛋白质组学样品前处理

近年来, 基于生物质谱的蛋白质组学技术已经被广泛地应用于蛋白质的大规模定性和定量表征^[1,2], 在基础生物学和生物医学等相关领域得到广泛的应用^[3-5]. 样品预富集是整个蛋白质组学分析流程中至

关重要的一步, 决定着整个样品分析的灵敏度和精确度^[6]. 越来越多的科研工作者致力于寻找更高效的蛋白质预富集方法, 以降低蛋白质在富集过程中的损失, 并提高整个蛋白质组学分析流程的性能.

引用格式: 孙秀杰, 唐君, 陈文东, 等. 基于SCX/SAX混合填料的集成化蛋白质组学样品前处理方法. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 188–194
Sun X J, Tang J, Chen W D, et al. Integrated proteomics sample pretreatment method based on SCX/SAX mixed packing (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2018, 48: 188–194, doi: 10.1360/N052017-00155

基于强阳离子交换填料(strong cation exchange, SCX)和强阴离子交换填料(strong anion exchange, SAX)的蛋白质预富集方法已经在蛋白质组学领域得到了成功的应用^[7]. 其中, 基于SCX填料的蛋白质预富集方法的原理是在酸性条件下大部分蛋白质的等电点因大于溶液pH而带正电荷, 从而被填料表面的SCX基团所富集; 而基于SAX填料的蛋白质预富集方法的原理是在碱性条件下大部分蛋白质的等电点小于溶液pH而带负电荷, 从而被填料表面的SAX基团所富集. 田等人^[8]发展了基于SCX毛细管整体柱的在线细胞样品处理方法. 通过整体柱上的SCX基团有效地富集蛋白, 结合集成化的还原, 烷基化和酶解等蛋白质组学前处理步骤, 这种方法大大减少了样品损失. 该方法可从50000个人类胚胎干细胞中成功地鉴定到2281个蛋白, 为微量细胞样品的蛋白质组学样品前处理提供了新方法. Chen等人^[9]开发了一种基于离心力的集成化的蛋白质组学分析技术(simple and integrated spin-tip-based proteomics technology, SISPROT); 该方法通过将SCX填料和C18填充在一个200 μ L枪头中, 完成蛋白质预富集等样品前处理过程, 方便地实现了高灵敏的蛋白质组学分析. 三维SISPROT技术(3D-SISPROT)是在SISPROT技术基础上发展起来的一种方法; 该方法将所有样品制备步骤整合到一个装有SAX离子交换填料和C18膜的枪头中, 并在SAX填料上完成蛋白质预富集、酶解和多肽分级操作^[10]. Zhao等人^[11]利用蛋白质在SCX和SAX材料上富集的互补性, 开发了基于SCX和SAX串联填充柱的双相微反应器, 并通过模型蛋白牛血清白蛋白, 肌红蛋白和细胞色素c的混合物评估该双相微反应器的富集效果, 结果证实该方法可有效地减少蛋白样品的损失.

本文根据SCX和SAX材料在蛋白质预富集性能的互补性, 提出一种改进的SISPROT的研究方法, 以溶菌酶和牛血清白蛋白为模型蛋白, 系统研究了蛋白质在SCX/SAX混合填料上的保留行为, 并与SAX填料和SCX填料的蛋白质富集性能进行了对比研究. 本工作对混合填料的比例以及上样pH以及酶解过程中pH改变对蛋白质在混合填料中富集的影响进行了优化. 最后应用改进的SISPROT方法对肠癌组织样品进行了蛋白质组学分析应用.

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与材料

EPOCH酶标仪购于BioTec (美国); EASY-nLC 1000液相色谱分离系统配1.9 μ m ReproSil-Pur C18树脂(Dr. Maisch, 德国)填充的带有喷雾头的毛细管分析柱(20 cm $\times$ 100 μ m); Q-Exactive 质谱仪(Thermo Fisher Scientific, 美国).

SCX和SAX均购于Agilent (美国); BCA Protein Assay Kit购于Thermo Scientific (美国); 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES, 分析纯)、柠檬酸钾(CAK, 分析纯)、氨水(28%)、甲酸(FA, HPLC级)、甲醇(MeOH, HPLC级)、乙腈(ACN, HPLC级)均购买于Sigma (美国); 牛血清白蛋白(BSA, 纯度>98%)购买于BBI Life Sciences (美国); 溶菌酶(LYZ, 纯度>98%)购买于Sigma; 碳酸氢铵(ABC, 纯度>98%)购买于Fluka (美国); 超纯水(18 M Ω cm)由MilliQ设备(Millipore, 美国)制得.

将BSA和LYZ分别溶于超纯水中配制成2 μ g/ μ L的储备液备用; 将SCX和SAX填料分别用甲醇配制成成为20 mg/mL的储备液备用. 称取1.298 g CAK溶于35 mL超纯水, 用浓盐酸调pH到3, 最后用超纯水定容到40 mL, 配制成100 mmol/L CAK 储备液备用; 称取0.381 g HEPES溶于30 mL超纯水中, 用氨水将pH调到7.4, 定容至40 mL, 配制成40 mmol/L HEPES储备液备用.

1.2 基于SCX/SAX混合填料的蛋白质富集pH优化

本文通过两种策略对SCX/SAX混合填料的蛋白质富集pH优化, 分别是BCA测试方法和SDS-PAGE方法.

(1) BCA测试方法. 基于SCX, SAX和SCX/SAX混合填料的蛋白质反应器装置如图1所示, 将枪头通过一个适配子置于1.5 mL离心管上. 将一块SCX膜(3M Empore, USA)置于枪头底部起固定填料的作用, 在SCX膜上分别填充50 μ L SCX (20 mg/mL), 50 μ L SAX (20 mg/mL)和50 μ L SCX/SAX (20 mg/mL)混合填料. 在对SCX填料的上样容量的测定实验中, 首先依次加入20 μ L 100 mmol/L柠檬酸钾(pH 3)和20 μ L 10 mmol/L柠檬酸钾(pH 3)对SCX填料进行预平衡; 然后置换新的1.5 mL离心管, 将BSA (2 μ g/ μ L)和LYZ (2 μ g/ μ L)储备液1:1混合, 并用1% FA (pH 3)将BSA和LYZ混合液1:1稀释成含BSA (0.5 μ g/ μ L)和LYZ (0.5 μ g/ μ L)的混合溶液. 取

图1 基于SCX, SAX和SCX/SAX混合填料的蛋白质预富集评价装置(网络版彩图)

120 μL 稀释后的BSA和LYZ的混合溶液进行上样, 离心5 min ($320\times g$), 收集1.5 mL离心管中流出液, 并应用BCA试剂盒测定蛋白浓度. 在对SAX填料的上样容量的测定实验中, 首先加入20 μL 3 mol/L氨水(pH 12)对SAX填料进行预平衡, 然后置换新的1.5 mL离心管, 将BSA (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)和LYZ (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)储备液1:1混合, 并用3 mol/L氨水(pH 12)将BSA和LYZ混合液1:1稀释成含BSA (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)和LYZ (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)的混合溶液. 取120 μL 稀释后的BSA和LYZ的混合溶液进行上样, 离心5 min ($320\times g$), 收集1.5 mL离心管中流出液, 并应用BCA试剂盒测定蛋白浓度. 在SCX/SAX混合填料的上样容量的研究实验中, 首先在填充有一块SCX膜的枪头中加入1 mg的1:1 SCX/SAX混合填料. 对SCX/SAX混合填料分别在酸性(pH 3), 中性(pH 7.4)和碱性(pH 12)条件的上样容量的测定实验中, 分别加入20 μL 10 mmol/L 柠檬酸钾(pH 3), 20 mmol/L HEPES (pH 7.4)和3 mol/L氨水(pH 12)对SCX/SAX混合填料进行预平衡; 然后置换新的1.5 mL离心管, 将BSA (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)和LYZ (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)储备液1:1混合, 并分别用1% FA (pH 3), 20 mmol/L HEPES (pH 7.4)和3 mol/L氨水(pH 12)将BSA和LYZ混合液1:1稀释成含BSA (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)和LYZ (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)的混合溶液. 取200 μL 稀释后的BSA和LYZ的混合溶液分别上样, 离心5 min ($320\times g$), 收集1.5 mL

离心管中流出液, 并应用BCA试剂盒测定蛋白浓度. 以上的pH优化实验, 每个样品重复3次, 取平均值.

(2) SDS-PAGE方法. 在对SCX填料的上样容量的测定实验中, 首先依次加入20 μL 100 mmol/L柠檬酸钾(pH 3)和20 μL 10 mmol/L柠檬酸钾(pH 3)对SCX填料进行预平衡. 然后置换新的1.5 mL离心管, 将BSA (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)和LYZ (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)储备液1:1混合, 并用1% FA (pH 3)将BSA和LYZ混合液1:1稀释成含BSA (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)和LYZ (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)的混合溶液. 取30 μL 稀释后的BSA和LYZ的混合溶液进行上样, 离心5 min ($320\times g$), 收集1.5 mL离心管中流出液; 再取30 μL 稀释后的BSA和LYZ的混合溶液进行上样, 离心5 min ($320\times g$), 收集1.5 mL离心管中流出液; 上样7次, 依次得到7份流出液. 应用SDS-PAGE方法测定7个流出液中BSA和LYZ含量, 并以30 μL BSA (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)和LYZ (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)的混合溶液作为对照, 其中所用SDS-PAGE分离胶的浓度为15%, 浓缩胶的浓度为5%. 用考马斯亮蓝染色, 用蒸馏水脱色. 类似的, 应用SDS-PAGE方法测定了SAX和SCX/SAX混合填料的上样容量.

1.3 基于SCX/SAX混合填料的蛋白质富集填料比例的优化

首先将SCX (20 mg/mL)和SAX (20 mg/mL)的储备液配制成为SCX/SAX分别为5:1, 3:1, 1:1, 1:3和1:5 (质量比)的SCX/SAX混合液. 向填充有一块SCX膜的200 μL 枪头中分别加入1 mg不同比例的SCX/SAX混合填料, 离心1 min ($1900\times g$); 然后分别加入20 μL 20 mmol/L HEPES (pH 7.4)活化SCX/SAX混合填料, 离心1 min ($1600\times g$); 换新的1.5 mL离心管, 向枪头中加入200 μL 20 mmol/L HEPES (pH 7.4)稀释后的含BSA (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)和LYZ (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)的混合溶液. 离心5 min ($320\times g$), 收集流出液, 用BCA法对该溶液进行蛋白质的浓度测定. 以上实验每种比例重复3次, 取平均值.

1.4 基于SCX/SAX混合填料的酶解pH变化对蛋白质富集的影响研究

向填充有一块SCX膜的200 μL 枪头中分别加入1 mg SCX, 1 mg SAX和1:1的SCX/SAX混合填料, 并对SCX, SAX和SCX/SAX填料进行预平衡; 将1:1的含BSA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)和LYZ (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)储备液分别用1% FA (pH 3), 3 mol/L氨水(pH 12)和20 mmol/L HEPES (pH

7.4) 1:1 稀释; 其后分别取 20 μL 上样, 离心 5 min (320 $\times g$), 收集流出液, 依次记为 SCX¹, SAX¹ 和 SCX/SAX¹. 置换新的离心管, 分别加入 20 μL 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8), 离心 5 min (320 $\times g$), 收集流出液, 依次记为 SCX², SAX² 和 SCX/SAX². 将 3 种填料的 6 份流出液用上述的 SDS-PAGE 的方法测定.

1.5 应用基于 SCX/SAX 混合填料的改进的 SIS-PROT 方法处理肠癌组织样品

向填充有 3 块 C18 膜 (3M Empore, USA) 的 200 μL 枪头中加入 50 μL 含 SCX (10 mg/mL) 与 SAX (10 mg/mL) 的混合填料, 离心 1 min (1900 $\times g$); 用 80 μL 甲醇预平衡 C18 膜, 分别用 20 μL 20 mmol/L HEPES (pH 7.4) 和 20 μL 10 mmol/L HEPES (pH 7.4) 对 SCX/SAX 填料进行预平衡. 应用已发展的 DDM 裂解液和组织样品裂解方法裂解肠癌组织^[9]. 将蛋白质含量为 10 μg 的肠癌组织裂解液样品与 20 mmol/L HEPES (pH 7.4) 1:1 混合上样, 离心并收集样品流出液, 重复上样一次; 然后用 20 μL 20% ACN, 10 mmol/L HEPES 进行清洗, 离心 1 min (1600 $\times g$); 加入 10 μL 含 50 mmol/L DTT 的 20 mmol/L NH_4HCO_3 溶液, 放在室温反应 30 min 还原二硫键; 用 20 μL 超纯水洗; 配制含 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 胰蛋白酶和 10 mmol/L IAA 的 50 mmol/L Tris-HCl 溶液, 取 6 μL 加入到枪头中, 放在黑暗中酶解反应 1 h; 然后分别加入 40 μL 20 mmol/L HEPES (pH 7.4) 和 20 μL 5 mmol/L 甲酸铵 (pH 10), 以将酶解多肽洗脱至 C18 膜上; 换用新的离心管, 加入 20 μL 含 80% 乙腈的 5 mmol/L 甲酸铵洗脱所富集的酶解多肽, 收集流出液. 用冻干机将流出液冻干, 用 10 μL 0.1% FA 复溶样品并进行 LC-MS/MS 分析.

1.6 LC-MS/MS 分析

所有样品均在由 EASY-nLC 1000 系统和 Q-Exactive 质谱组成的 LC-MS/MS 系统上分析. 液相色谱分离系统由 1.9 μm ReproSil-Pur C18 树脂填充的带有喷雾头的 100 μm i.d. $\times$ 20 cm 毛细管分析柱组成. 多肽分离采用了双流动相系统: A 相为含有 0.1% FA 的水溶液, B 相为含有 0.1% FA 的 ACN 溶液. 将样品的 1/2 体积上样到分析柱中, 然后以 250 nL/min 的流速在分析柱中进行分离和分析. 分析癌症样品的梯度设置如下: 0~2 min, 3% B~7% B; 2~52 min, 7% B~22% B; 52~62 min, 22% B~35% B; 62~64 min, 35% B~90% B; 64~70 min,

90% B; 70~72 min, 90% B~3% B; 72~80 min, 3% B. 分析 BSA 时的有效梯度缩短至 30 min, 即梯度设置为: 0~2 min, 3% B~7% B; 2~27 min, 7% B~22% B; 27~32 min, 22% B~35% B; 32~34 min, 35% B~90% B; 34~40 min, 90% B. 全质谱扫描是在 Q-Exactive 质量分析器上完成的, 扫描范围是 m/z 350~1550, 质谱分辨率为 1.2×10^5 . MS/MS 数据通过高能碰撞裂解的数据依赖性采集模式获取. 参数设置如下: 最大离子注入时间: 50 ms; 分离窗口: 2.0 m/z ; 归一化的碰撞能: 27%; 选取丰度最高且离子峰强度高于 2.0×10^4 的前 10 个离子进行 MS/MS 分析; 动态排除时间: 60 s.

1.7 数据分析

质谱原始数据由 Sequest HT (Proteome Discoverer, Version 1.4) 对 human Uniprot fasta 数据库 (包含 68485 个蛋白, 下载于 2015 年 4 月 14 日) 进行搜索. 数据库搜索参数: 母离子质量容忍度为 10 ppm, 碎片离子设置为 0.02 Da, 胰蛋白酶酶切, 最大漏切位点设为 2 个, 甲硫氨酸氧化、天冬酰胺和谷氨酰胺脱氨基设置为可变修饰, 半胱氨酸羧基甲基化设置为固定修饰, 肽段鉴定的错误发现率 (false discovery rate, FDR) 控制在 1% 以内.

2 结果

2.1 蛋白质富集 pH 条件的优化

SCX 和 SAX 填料的最佳蛋白质富集 pH 分别为 3 和 12, 而 SCX/SAX 混合填料的最佳蛋白质富集 pH 还未有报道, 所以本文在 3 种不同 pH 条件下 (3, 7.4 和 12) 对 SCX/SAX 混合填料进行蛋白质富集容量的考察. 采用的模型蛋白为 BSA 和 LYZ 的 1:1 混合液. 由于 BSA 的分子量约为 66000 Da、等电点约为 4.7, 而 LYZ 的分子量约为 14000 Da、等电点约为 11.4, 两个蛋白分子量跨度大, 并且分别是典型的酸性蛋白和碱性蛋白, 因而可以很好地模拟实际样品中不同分子量和不同等电点的蛋白质. 其中, SAX, SCX 填料以及 SCX/SAX 混合填料的量均为 1 mg. 如图 2A 所示, 在酸性 (pH 3) 条件下, SCX/SAX 混合填料与 SCX 填料的富集容量分别为 (63 $\pm$ 4) 和 (94 $\pm$ 4) μg ; SCX 的富集容量稍高, 说明酸性条件有利于 SCX 填料吸附蛋白, 而 SCX/SAX 混合填料中的 SCX 填料的量只是 SCX 填料的 1/2, 富集容量相应降低; 在碱性 (pH 12) 条件下, SCX/SAX 混合填料与 SAX 填料

图2 蛋白富集容量的测定(网络版彩图)

A: BCA方法测定的SAX, SCX和SCX/SAX混合填料在不同pH条件下的蛋白质富集容量; B: SDS-PAGE方法测定的SAX填料在pH 12条件下的蛋白质富集容量; C: SCX填料在pH 3条件下的蛋白质富集容量; D: SCX/SAX混合填料在pH 7.4条件下的蛋白质富集容量

的富集容量分别是(83±3)和(74±5) μg, 两者相差不多。在中性(pH 7.4)条件下, SCX/SAX混合填料的富集容量大大提高到(182±10) μg. 说明SCX/SAX混合填料的最佳上样pH为7.4, 所以在后续的实验中, SCX/SAX混合填料的上样pH均为7.4.

由于BCA方法无法对BSA和LYZ的保留行为进行单独评价, 应用SDS-PAGE方法对BSA和LYZ在SCX/SAX混合填料上的保留情况进行了进一步的考察. 如图2B~D所示, 在pH 12条件下LYZ比BSA在SAX上的结合量更多(图2B); 在pH 3条件下SCX填料的蛋白质富集研究结果则正好相反, BSA比LYZ在SCX填料上的结合量多(图2C); 而对于SCX/SAX混合填料, 在pH 7.4条件下BSA显著地比LYZ结合更多. 结合容量相较于SCX和SAX显著提高, 说明混合填料相较于SAX和SCX填料有更好的蛋白质富集效果. 考虑到pH 7.4是生理pH条件, 采用该pH条件进行蛋白质预富集更加有利于保持蛋白质的天然活性, 有望成为更为通用的蛋白质富集pH条件.

2.2 富集填料比例的优化

在pH 7.4条件下, 对不同比例混合的SCX/SAX填料的蛋白质富集容量进行了考察, 结果如图3所示. 当SCX:SAX为1:1时, SCX/SAX混合填料的吸附容量最大, 为(182±10) μg, 而随着SCX比例变高, 吸附容量逐渐降低, 同样的随混合填料中SAX比例变高, 混合填料的吸附容量逐渐降低. 说明当SCX与SAX比例为1:1时, 能够达到最佳的蛋白质吸附效果.

图3 不同比例的SCX/SAX混合填料中的蛋白质富集容量(网络版彩图)

2.3 酶解pH条件置换对蛋白质富集的影响

由于酶解最佳pH为8, 与上样pH不同, pH置换过程往往会引起蛋白质的损失, 因此对混合SCX/SAX填料在酶解pH变化过程中蛋白质的损失情况进行了考察, 并与SCX和SAX填料进行了比较. 如图4所示, 在3种填料的结合容量范围内选取20 μg的上样量, 蛋白质样品会得到完全保留. 在标准的SISPROT技术操作中, 一般使用1~2 μL 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8)酶解缓冲液对pH进行调节. 为了充分考察酶解缓冲液pH条件对蛋白富集的影响, 本文中采用20 μL 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8)缓冲液进行pH条件置换. 在洗脱后的流出液中, SCX填料中有一部分BSA损失, SAX填料有一部分LYZ损失, 而SCX/SAX混合填料在pH变化过程中没有蛋白质损失. 说明以SCX/SAX填料为载体的酶解过程中, pH变化几乎不会引起蛋白质样品在SCX/SAX填料上损失, 这说明SCX/SAX混合填料作为蛋白质反

应器方面有非常好的应用前景.

2.4 应用基于SCX/SAX混合填料的改进的SIS-PROT方法处理并分析肠癌肿瘤组织蛋白质组

从上述考察中可以看出, 混合SCX/SAX填料具有优秀的蛋白质富集效果, 并且受pH变化影响较小, 较基于SCX填料的SISPROT方法更适合用于蛋白质组学样品前处理. 所以本文应用基于SCX/SAX混合填料的改进的SISPROT方法处理了肠癌肿瘤组织样品, 并与基于SCX填料的SISPROT方法进行了对比. 结果如表1所示, 发现得到的蛋白质, 特异性肽段和肽段谱图匹配数(peptide spectrum matches, PSMs)的数量相当, 说明基于SCX/SAX混合填料的蛋白质处理方法是可靠的.

3 结论

本文建立了基于SCX/SAX混合填料的改进的SIS-PROT方法. 以溶菌酶和牛血清白蛋白为模型蛋白, 分别应用BCA蛋白质浓度测定方法和SDS-PAGE方法研究了3种pH (3, 7.4, 12)条件下, 蛋白质在SCX/SAX混合填料上的保留, 并对SCX/SAX混合填料的比例进行了优化. 研究发现在pH 7.4条件下, 质量比为1:1的SCX/SAX混合填料的富集效率最佳, 蛋白质富集容量为180 μg, 是SCX富集容量的两倍左右, 富集容量大大提高. 酶解步骤的pH变化过程不会影响蛋白质在SCX/SAX混合填料上的保留, 所以基于该方法的蛋白质组学研究更适用于微量样本的蛋白质组学分析. 基于此优化条件, 本文应用基于SAX/SCX混合填料的改进的SISPROT方法处理肠癌肿瘤组织样品, 并与传统的基于SCX填料的SISPROT方法进行对比研究. 结果表明, 蛋白质鉴定量, 特异性肽段数量和肽段谱图匹配数量均与基于SCX的SISPROT得到的结果相当, 证实了该方法作为蛋白质反应器的可靠性和通用性.

图 4 基于SCX/SAX混合填料的酶解pH置换对蛋白质富集的影响
含BSA和LYZ各10 μg; SCX¹, SAX¹和SCX/SAX¹分别表示以控制组相同的样品量在SCX, SAX和SCX/SAX混合填料中上样后的流出液; SCX², SAX²和SCX/SAX²分别表示的是用20 μL 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8)分别对上样后的SCX, SAX和SCX/SAX混合填料进行pH置换的样品流出液

表 1 基于SCX/SAX混合填料的改进的SISPROT方法与传统的SISPROT方法处理肠癌样品的对比研究

填料类型	蛋白质数量	特异性肽段数量	肽段谱图匹配数量
SAX/SCX beads	1690	6051	7504
	1917	8212	10047
	1845	7375	8812
SCX beads	2027	8336	9783
	1843	7783	9243
	1943	7861	9227

参考文献

- 1 Cravatt B F, Simon G M, Yates III J R. The biological impact of mass-spectrometry-based proteomics. *Nature*, 2007, 450: 991–1000
- 2 Mann M. The rise of mass spectrometry and the fall of edman degradation. *Clin Chem*, 2016, 62: 293–294
- 3 Bensimon A, Heck A J R, Aebersold R. Mass spectrometry-based proteomics and network biology. *Annu Rev Biochem*, 2012, 81: 379–405
- 4 Choudhary C, Weinert B T, Nishida Y, et al. The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15: 536–550
- 5 Scott J D, Pawson T. Cell signaling in space and time: where proteins come together and when they're apart. *Science*, 2009, 326: 1220–1224
- 6 Altelaar A F M, Heck A J R. Trends in ultrasensitive proteomics. *Curr Opin Chem Biol*, 2012, 16: 206–213
- 7 Zhou H, Hou W, Lambert J P, et al. Analysis of low-abundance proteins using the proteomic reactor with pH fractionation. *Talanta*, 2010, 80: 1526–1531
- 8 Tian R, Wang S, Elisma F, et al. Rare Cell Proteomic Reactor Applied to Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC)-based quantitative proteomics study of human embryonic stem cell differentiation. *Mol Cell Proteomics*, 2011, 10: M110.000679
- 9 Chen W, Wang S, Adhikari S, et al. Simple and integrated spintip-based technology applied for deep proteome profiling. *Anal Chem*, 2016, 88: 4864–4871
- 10 Chen W, Adhikari S, Chen L, et al. 3D-SISPROT: a simple and integrated spintip-based protein digestion and three-dimensional peptide fractionation technology for deep proteome profiling. *J Chromatogr A*, 2017, 1498: 207–214
- 11 Zhao Q, Liang Y, Yuan H, et al. Biphasic microreactor for efficient membrane protein pretreatment with a combination of formic acid assisted solubilization, oncolumn pH adjustment, reduction, alkylation, and tryptic digestion. *Anal Chem*, 2013, 85: 8507–8512

Integrated proteomics sample pretreatment method based on SCX/SAX mixed packing

SUN XiuJie^{1,2}, TANG Jun^{2,3,4}, CHEN WenDong², KE Mi², HU ChaoFeng⁴, XU RuiLian³ & TIAN RuiJun²

1 Harbin Institute of Technology, Harbin 150001, China;

2 Department of Chemistry, Southern University of Science and Technology, Shenzhen 518055, China;

3 Institute of Oncology, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen 518020, China;

4 Department of Pathophysiology, School of Basic Medical Sciences, Jinan University, Guangzhou 510632, China

An integrated technology for preparing proteomics samples was developed based on SCX/SAX mixed beads. Unlike previously reported SISPROT strategies, SCX/SAX mixed beads were used to replace SCX beads. A mixture of BSA and LYZ was chosen as the model protein to evaluate the protein retention behavior of the SCX/SAX beads at pH of 3, 7.4, and 12. The mass ratio of SCX/SAX was optimized using the BCA method. Further, the protein loss caused by pH replacement during digestion was systematically investigated by the SDS-PAGE method. The results indicated that at a pH of 7.4, the optimized mass ratio of SCX/SAX mixed beads was 1:1, and the loading capacity of SCX/SAX mixed beads with the mass ratio of 1:1 was 180 µg, which is almost twice that of SCX beads. Furthermore, pH replacement during digestion did not affect the protein retention behavior of SCX/SAX mixed beads. The improved SISPROT method was used for processing a limited quantity of colon cancer tumor samples. For comparison, the traditional SISPROT method based on SCX beads was used. The results indicated that the number of protein identification, unique peptides and peptide spectrum matching obtained from the two methods were comparable. These results confirmed the applicability of the method as a proteomics reactor. The method is expected to be a more generic sample preparation technology because it can be operated at physiological pH and exhibits significantly improved loading capacity and reduced sample loss compared with those of the traditional SISPROT method.

SISPROT, SCX, SAX, protein enrichment, proteomics sample preparation

doi: [10.1360/N052017-00155](https://doi.org/10.1360/N052017-00155)