一种反相/弱阳离子交换混合模式色谱填料结合质谱在蛋白质组学中的应用

周珊珊^{1,2}, 刘佳玉¹, 张养军^{1*}, 钱小红^{1*}

1. 军事科学院军事医学研究院生命组学研究所, 蛋白质组学国家重点实验室, 北京蛋白质组学研究中心, 国家蛋白质科学中心(北京), 北京 102206;

2. 北京安必奇生物科技有限公司, 北京 100176

* 联系人, E-mail: 13683167093@163.com; qianxh1@163.com

收稿日期: 2017-09-16; 接受日期: 2017-10-26; 网络版发表日期: 2018-01-04

国家重点研发计划(批准号: 2017YFA0505002, 2016YFA0501403, 2016YFA0501300)、国家重大科学仪器设备开发专项(批准号: 2012YQ12004407, 2013YQ14040506)资助

摘要 为了提高蛋白质组的覆盖率, 色谱分离将发挥重要作用, 而色谱固定相更是关键. 为此, 本文采用“硫醇-烯”点击化学的方法制备了一种反相/弱阳离子交换混合模式色谱填料, 期望通过其对多肽混合物的高效分离提高蛋白质质谱鉴定的覆盖率. 为了对制备的混合物模式色谱填料的性能进行评价和应用, 首先采用小分子混合物对制备的混合模式色谱填料进行表征, 结果表明, 这种填料具有反相和弱阳离子交换两种分离机制; 再用这种混合模式色谱填料分离6条疏水性和理论等电点不同的标准肽段混合物, 可将这6条肽段完全分离, 而经典的C₁₈反相色谱柱则不能将它们完全分离, 说明对于疏水性质相似的肽段, 可以根据其等电点的差异得到更好的分离, 且由于在反相基团与基质间嵌合了具有亲水性质的基团, 减弱了固定相的疏水性质, 从而减弱了强疏水性肽段的不可逆吸附的作用. 最后将这种固定相用于全蛋白酶切物的混合模式色谱离线分离结合反相色谱-串联质谱分析, 对100 µg Hep-G2细胞全蛋白酶切物进行分析, 共鉴定到5924个蛋白, 表明这种混合模式的色谱填料可用于蛋白质组的分离分析中.

关键词 混合模式色谱, 肽段分离, 串联质谱, 蛋白质组学

蛋白质组学研究向深度覆盖定性鉴定和规模化的定量分析方向发展, 对蛋白质组学技术提出了新的要求. 蛋白质组学研究的核心技术之一是分离方法^[1], 并且液相色谱分离与质谱检测联用技术已经成为蛋白质组学研究中的常规分析方法. 面对生物样本的极端复杂性以及对分析系统本身在准确性、灵敏性、选择性、快速和自动化以及重现性方面越来越高的要求^[1],

传统的单一模式反相色谱分离方法已不能满足要求. 目前, 反相色谱与离子交换色谱联用是蛋白质组学中较为经典的分离方法^[1]. 例如, Zeng课题组^[2]将强阳离子交换柱与反相色谱柱在线联用分析鼠肝蛋白质组, Zhang课题组^[3]使用一维强阳离子交换色谱和二维阵列式反相色谱柱分析正常人肝组织蛋白质组, 均提高了蛋白质组的鉴定的覆盖度. 这种二维液相色谱分离

引用格式: 周珊珊, 刘佳玉, 张养军, 等. 一种反相/弱阳离子交换混合模式色谱填料结合质谱在蛋白质组学中的应用. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 195–206
Zhou S S, Liu J Y, Zhang Y J, et al. Novel reversed-phase/weak-cation-exchange mixed-mode chromatographic packing materials applied in mass-spectrometry-based proteomics (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2018, 48: 195–206, doi: 10.1360/N052017-00148

方法在磷酸化蛋白质组鉴定^[4]和高丰度蛋白的去除^[5]等方面也有很多应用。但这种方法通常需要两根或更多数量的色谱柱串联链接或装填不同模式色谱填料, 会因不同色谱柱之间的连接点死体积或装填困难, 给样本分离带来不便。

混合模式色谱(mixed-mode chromatography, MMC)的出现可有效解决这个问题。混合模式色谱是在一根色谱柱上能够实现两种或多种分离机理的分离技术^[6-8]。由于多种作用力的存在, 混合模式色谱可实现对复杂生物样品的高效分离。一种MMC的实现方式是将多种分离机理的色谱填料进行混合, 然后装填到色谱柱中, 但这种方法往往由于功能基团之间相距较远而导致分离效果不理想, 重复性差^[8]。而另一种方式是发展具有多种功能基团的色谱固定相, 与前一种方法相比这种填料是真正意义上的混合物模式色谱填料, 已经成为近年来研究的热点, 目前的研究主要集中在将两种正交性较好的色谱模式进行组合, 例如, 反相/离子交换作用混合模式色谱(reversed phase/ion-exchange mixed-mode chromatography, RPLC/IEX)^[9-15]、亲水/离子交换作用混合模式色谱(hydrophilic interaction/ion-exchange mixed-mode chromatography, HILIC/IEX)^[16-19]以及反相/亲水作用(reversed-phase/hydrophilic interaction mixed-mode chromatography, RPLC/HILIC)^[20-22]。

梁鑫淼课题组通过极性共聚的方法制备了C18WCX^[9,10]、C18SCX^[11]以及C18SAX^[12]反相/离子交换作用混合模式色谱(RPLC/IEX)填料, 这些混合模式色谱极大地提高了蛋白质与多肽的鉴定数量, 并且在磷酸化肽的富集中获得了更高的选择性。亲水/离子交换作用混合模式色谱(HILIC/IEX)作为反相色谱的前期分离方法越来越多地应用到了蛋白或多肽的分离和鉴定中^[16], 例如, 梁鑫淼课题组^[17-19]通过点击化学的方法制备了HILIC/IEX混合模式固定相, 显示出了极强的富集糖肽的能力。但由于他们制备的C18WCX^[9,10]混合模式色谱填料采用的是极性共聚的方法, 得到的填料表面反相分离机制的C₁₈基团和离子交换作用分离机制的羧基是间隔的, 且分布不均匀。为此, 本文提出制备一种反相/弱阳离子交换混合模式色谱(RPLC/WCX)填料方法: 采用点击化学的方法, 将半胱氨酸键合到硅球表面, 再通过异氰酸十八酯和半胱氨酸上氨基的反应键合上C₁₈链, 使填料表面具有反相色谱保留

机制的C18基团和离子交换保留机制的羧基分布更为均匀, 可通过反相色谱和离子交换保留机制提高多肽混合物的分离效率。另外, 由于半胱氨酸上的羧基以及氨基为亲水基团, S原子、氨基和羧基均为极性分子, 因此在分离蛋白质组酶切样品时, 可以减少疏水较强肽段的不可逆吸附。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

硅胶微球基质(粒径3 μm, 孔径100 Å)、乙烯基三氯硅烷、半胱氨酸、偶氮二异丁腈、异氰酸十八酯、二月桂酸二丁基锡、甲苯、甲醇、二氯甲烷、四氢呋喃、牛血清白蛋白(bovine albumin, BSA)、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、碘乙酰胺(iodoacetamide, IAA)、碳酸氢铵、乙腈、甲酸、甲酸铵和质谱冲热菌标准蛋白的合成肽段购自上海吉尔生化有限公司。

RIGOL L-3000高效液相色谱仪(北京普源精电科技有限公司); 毛细管高效液相色谱仪-电喷雾-线性离子阱质谱仪(cHPLC-ESI-LTQ MS, Thermo Fisher Scientific, 美国); Thermo Orion MODEL 818型pH计(Thermo Fisher Scientific); Sartorius BP211d分析天平(Sartorius, 瑞士); DHG-9240A型电热恒温鼓风干燥箱(上海浦东荣丰科学仪器有限公司)。

1.2 RPLC/WCX混合模式色谱填料的制备

如图1所示, 取15 g预处理硅胶微球基质分散于45 mL干燥甲苯中, 加入15 mL乙烯基三氯硅烷, 氮气保护下, 于40℃水浴中在100 r/min磁力搅拌速度下反应24 h。反应后, 分别用甲苯、甲醇和二氯甲烷清洗, 于80℃干燥6 h。然后将反应后的硅球分散于100 mL甲醇:水(V:V=1:2)中, 并加入15 g半胱氨酸以及0.15 g偶氮二异丁腈(2,2'-dicyano-2,2'-azopropane, AIBN), 于65℃水浴中磁力搅拌反应24 h, 分别用水和甲醇清洗硅胶, 于80℃干燥6 h。最后, 将反应好的硅球分散于100 mL四氢呋喃(tetrahydrofuran, THF)中, 加入10 mL异氰酸十八酯和10 μL二月桂酸二丁基锡, 于50℃水浴中磁力搅拌反应24 h, 分别用THF和甲醇清洗硅球, 于80℃干燥6 h。

1.3 样品制备

(1) BSA酶切肽段样品制备。移取100 μg牛血清白

图1 RPLC/WCX混合模式色谱填料制备流程

蛋白, 加入100 μ L 50 mmol/L pH 8.0的碳酸氢铵溶液, 混匀后, 加入DTT, 使其终浓度为10 mmol/L, 37°C反应4 h; 加入IAA, 使其终浓度为50 mmol/L, 暗处放置1 h. 还原烷基化后按酶与底物比为1:50 (质量比)加入胰酶, 37°C酶切16 h. 将BSA酶解产物分装后于-80°C冰箱中保存备用.

(2) Hep-G2蛋白样本制备. 细胞培养. 使用含有1%的双抗以及10%的胎牛血清的DMEM培养基培养人肝癌细胞株Hep-G2, 当细胞生长到覆盖80%~90%培养皿底壁时, 采用0.25% (w/v)胰蛋白酶-0.53 mmol/L EDTA的溶液消化, 按1:4比例传代后继续培养至细胞生长覆盖70%~80%培养皿底壁.

提取蛋白. 当细胞生长到覆盖70%~80%培养皿底壁时, 使用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS) 10 mL清洗细胞2次, 加入1.5 mL的0.25% (w/v)胰蛋白酶-0.53 mmol/L EDTA的溶液消化细胞1~2 min, 然后加入10 mL培养基中止消化. 将溶液转移至15 mL离心管中, 使用10 mL PBS缓冲液清洗细胞两次, 180×g离心后弃去上清. 加入1 mL PBS缓冲液后转移至1.5 mL离心管中, 用1 mL PBS缓冲液清洗1次, 500 g离心后弃

去上清, 加入1 mL细胞裂解液(8 mol/L尿素, 0.1 mol/L Tris-HCl, pH 8.5), 使用超声破碎仪工作2 s, 间隔2 s, 超声13 min. 14000×g离心取上清, 用Nanodrop定量仪测蛋白浓度.

FASP酶切: 取500 μ g提取蛋白至30 kD超滤管中, 加入终浓度为10 mmol/L DDT溶液于37°C变性4 h, 14000×g离心10 min, 接着加入200 μ L UA缓冲液(8 mol/L尿素, 0.1 mol/L Tris-HCl, pH 8.5), 14000×g离心10 min, 并重复此步骤一次. 然后加入终浓度为50 mmol/L IAA溶液避光反应40 min进行还原烷基化反应, 14000×g离心10 min后, 加入200 μ L 50 mmol/L碳酸氢铵溶液清洗, 14000×g离心10 min, 并重复此步骤1次. 更换接收套管, 并在超滤管中加入200 μ L 50 mmol/L碳酸氢铵溶液, 并按胰酶与底物质量比为1:100加入胰蛋白酶, 37°C酶切4 h, 继续按质量比1:100加入胰酶, 37°C酶切反应16 h. 14000×g离心10 min, 加入200 μ L水, 14000×g离心10 min, 并重复此步骤1次. 将收集到的洗脱液与45°C真空干燥, 保存在-80°C冰箱中备用.

1.4 高效液相色谱分析

采用高压匀浆法将制备的RP/WCX色谱填料装入4.6 mm×150 mm的不锈钢色谱柱中备用。

小分子标准物(甲苯、乙苯、正丙苯、正丁苯、正戊苯)分离的色谱条件: 样品浓度为2 μg/μL, 上样体积为5 μL, 流速为0.5 mL/min. A相: 水, B相: 甲醇, 等度洗脱: 80% B相. 检测波长: 254 nm.

肽段分离的色谱条件: 样品浓度为0.5 μg/μL, 上样体积为20 μL, 流速为0.5 mL/min. A相: 98%水(20 mmol/L 甲酸铵, pH 4.5, 6.5, 7.5)-2%乙腈; B相: 98%乙腈-2%水; 梯度洗脱: 0~30 min, 2%-95% B. 检测波长为214 nm.

采用Waters色谱柱(Waters XBridge™ BEH 300 C18 5 μm 4.6 mm×150 mm Column)分离肽段使用的流动相为: A相: 98%水-2%乙腈-0.1% FA (pH 2.6); B相: 98%乙腈-2%水-0.1% FA, 其他同上所述肽段色谱条件.

1.5 NanoLC-ESI-LTQ MS对BSA酶切肽段混合物分析

采用液压装柱法将制备好的RPLC/WCX装入15 cm×75 μm I.D. 直喷柱中备用。

毛细管液相色谱条件: 样品浓度为0.1 μg/μL, 上样体积为5 μL, 流速为300 nL/min. 流动相A: 2% ACN和0.1% FA水溶液; 流动相B: 98% ACN和0.1% FA水溶液; 洗脱梯度为: 0~5 min, 5%~8% B; 5~30 min, 8%~40% B; 30~35 min, 40%~95% B; 35~40 min, 95% B; 40~42 min, 95%~5% B; 42~52 min, 5% B.

质谱条件: 使用LTQ质谱仪进行检测时, 选用正离子模式采集数据, 质谱扫描范围设为m/z 400.0~1600.0, 采集时间为52 min. 在采用数据依赖模式(data depen-

dent acquisition, DDA)进行串联质谱分析时, 选取一级质谱中10个信号最强的离子进行二级质谱分析, 其碰撞能量设为35 V, 动态排除(dynamic exclusion)时间为30 s.

1.6 二维液相色谱分离-串联质谱分析

RP/WCX为第一维色谱离线分离条件. 样品浓度为1 μg/μL, 上样体积为100 μL, 流速为0.5 mL/min. A相: 98%水(20 mmol/L 甲酸铵, pH 2.5)-2% ACN; B相: 98% ACN-2%水(20 mmol/L 甲酸铵, pH 7.5); 梯度为: 0~5 min, 5%~8% B; 5~20 min, 8%~18% B; 20~70 min, 18%~40% B; 70~75 min, 40%~95% B; 75~80 min, 95% B; 80~85 min, 95%~5% B. 检测波长为214 nm. 馏分收集: 从洗脱开始后第7 min开始收集馏分到第72 min结束, 将每分钟得到的馏分分别收集到1.5 mL离心管中, 按照表1所示, 将不同时间收集到的馏分合并成为6个组分, 在45℃条件下真空离心浓缩组分体积至约0.5 mL.

脱盐. 使用Sep-Pak C18柱将合并浓缩得到的组分进行脱盐.

RPLC-串联质谱中反相色谱条件. 色谱柱为十八烷基反相毛细管直喷柱(150 mm ×150 μm i.d. 固定相粒径1.9 μm), 样品浓度为0.1 μg/μL, 上样体积为5 μL, 流速为600 nL/min. 流动相A: 0.1% FA水溶液; 流动相B: 0.1% FA的ACN溶液; 洗脱梯度为: 0~8 min, 6%~9% B; 8~24 min, 9%~14% B; 24~60 min, 14%~30% B; 60~75 min, 30%~40% B; 75~78 min, 40%~95% B; 78~85 min, 95% B; 85~90 min, 95%~6% B.

质谱条件. 使用Q-Exactive HF质谱仪(Thermo Fisher Scientific)进行检测时选用正离子模式采集数据, 采集时间为90 min. 喷雾电压为2 kV, 采用DDA进行串联质谱分析, 一级质谱扫描范围: m/z 300~1400, 分辨率

表 1 馏分合并

Fraction			Retention time (min)									
1	7	13	19	25	31	37	43	49	55	61	67	
2	8	14	20	26	32	38	44	50	56	62	68	
3	9	15	21	27	33	39	45	51	57	63	69	
4	10	16	22	28	34	40	46	52	58	64	70	
5	11	17	23	29	35	41	47	53	59	65	71	
6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72	

为120000, 动态排除(dynamic exclusion)时间为12 s.

1.7 质谱数据的蛋白质数据库搜索

采用Thermo Fisher Scientific的Proteome Discoverer (版本: 1.3.0.339)对质谱采集的raw文件进行蛋白质序列数据库检索. 参数设置: 母离子质量偏差(precursor tolerance)为15 ppm; 碎片离子质量偏差(fragment tolerance)为0.02 Da; 假阳性率(FDR)为1%; 蛋白质酶解选用胰蛋白酶, 选择2个漏切位点; 固定修饰: 半胱氨酸的烷基化修饰; 可变修饰: 甲硫氨酸氧化修饰; 蛋白质数据库分别为牛血清蛋白数据库(2014.12.30从<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=bsa>下载)和Uniprot蛋白序列数据库(2013.07.04从<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=bsa>下载).

2 结果与讨论

2.1 固定相的表征

制备的RPLC/WCX混合模式填料时表面键合的化学基团如图2所示, 其中C₁₈侧链在液相色谱分离中为反相色谱保留机制, 羧基则为弱阳离子色谱保留机制, 并且由于羧基以及羰基为亲水基团, 且S原子、N原子和羧基均为极性分子, 可减小了反相填料的疏水性, 因此在分离蛋白质酶切肽段样品时, 可以减少强疏水性肽段的不可逆吸附.

分别采用了有机元素分析、傅里叶转换红外分光光度法以及扫描电镜对合成的混合模式色谱填料进行了表征. 如图3所示, 通过扫描电镜可以观察到填料形状完整, 粒径均匀. 在表2中, RP/WCX混合模式色谱固定相元素分析结果为: 碳含量14.92%, 与商品化十八烷基反相固定相的碳含量(15.25%)接近, 说明RP/WCX混合模式色谱固定相表面键合了具有反相色谱保留行为的C₁₈基团; 进一步从RP/WCX混合模式色谱固定相与商品化十八烷基反相固定相氮元素含量的不同看出, 合成填料连接的基团符合本课题组的预想, 即具有弱阳离子性质的官能团. 在FT-IR分析结果(图4)中, 可以明显看到波数为2850, 2919 cm⁻¹处的C-H伸缩振动吸收峰, 但由于硅羟基的存在, 掩蔽了羧基的红外吸收峰, 因而从FT-IR结果图中看不到明显的羧基吸收峰. 另外, 从图4中可以明显看到反应后硅羟基峰强度大幅度减小, 说明绝大多数硅胶微球表面已被功

图2 C₁₈ WCX填料表面键合的化学基团

图3 裸硅球与RP/WCX混合模式色谱固定相扫描电镜图
A: 裸硅球; B: RP/WCX混合模式色谱固定相

能基团完全覆盖, 因而不需要封尾. 以上这些表征结果均表明, 本课题组成功制备了RP/WCX混合模式色谱固定相.

2.2 多环芳烃混合物的分离

采用RP/WCX以及商品化CAPCELL PAK C18

图 4 裸硅球与RP/WCX混合模式色谱固定相傅里叶转换-红外光谱图(网络版彩图)

表 2 元素分析结果

Stationary phase (3 μm)	Weight (mg)	C (%)	H (%)	N (%)
Spherical silica	1.973	0.00	0.97	0.08
RP/WCX	2.079	14.92	3.22	1.40
ODS (Commercial)	2.016	15.25	2.99	0.05

MGII S3色谱柱(ODS色谱柱, 资生堂公司, 北京)对多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH)混合物进行了分离. 如图5所示, 从色谱图中可以看出RP/WCX混合模式色谱固定相分离16种PAH混合物得到

了14个色谱峰, 而ODS色谱柱分离同样的混合物得到了14个色谱峰. 另外, RP/WCX色谱固定相可以将分离的化合物更加均匀地分布在一个分离周期内, 而在ODS色谱固定相分离的结果中色谱峰都集中在分离周期的后半部分. 该结果表明, 本课题组制备的RP/WCX混合模式色谱固定相具有较反相色谱更好的分离性能, 可以在分离复杂样本的时候具有更好的分离度.

2.3 弱阳离子交换分离机制考察

由于色谱填料中羧基官能团的存在, 制备的RP/WCX填料应具有弱阳离子交换色谱分离机制, 为此, 选择了6条合成的不同等电点标准肽段对此进行考察(表3). 以表3中2号肽段为例, 如图6所示, 在该肽段进行色谱分离时, 比较了在流动相中添加乙酸铵与不添加乙酸铵的流动相对色谱分离结果的影响, 分离结果表明, 加入乙酸铵后, 肽段的色谱峰峰形得到了明显的改善; 而采用ODS固定相分离2号肽段时, 流动相中加入乙酸铵对分离效果无影响(图7). 说明在分离的过程中RP/WCX固定相除了存在反相色谱保留机制, 还存在离子交换色谱保留机制.

另外, 如图8所示, 使用RP/WCX混合模式色谱固定相对所选6条肽段的混合物进行分离, 并与CAP-CELL PAK C18 MGII S3色谱柱的分离结果进行了比较.

从图8中可以看出, RP/WCX混合模式色谱固定相可以将6条肽段完全分离, 并且峰形较好. 而CAPCELL

图 5 RP/WCX色谱柱(A)以及ODS色谱柱(B)分离多环芳烃混合物的色谱图

1. 蔡; 2. 芴烯; 3. 芴; 4. 芴; 5. 菲; 6. 蒽; 7. 荧蒽; 8. 芘; 9. 苯并[a]蒽; 10. 屈; 11. 苯并[b]荧蒽; 12. 苯并[k]荧蒽; 13. 苯并[a]芘; 14. 二苯并[a, h]蒽; 15. 苯并[ghi]芘; 16. 茚并[1,2,3-cd]芘

图 6 RP/WCX固定相分离2号肽段的色谱图

A: 流动相中无乙酸铵; B: 流动相中添加50 mmol/L乙酸铵; 2号肽段: AGSNDANAEFVGK

图 7 ODS固定相分离2号肽段的色谱图

A: 流动相中无乙酸铵; B: 流动相中添加50 mmol/L乙酸铵; 2号肽段: AGSNDANAEFVGK

表 3 肽段列表

NO.	Amino sequence	Grand average of hydropathicity (GRAVY)	Theoretical pI
1	TLTDEEVNEVHAR	-0.969	4.40
2	AGSNDANAEFVGK	-0.546	4.37
3	TATVDDIDNIYR	-0.517	3.93
4	VLSIDAIEK	0.789	4.37
5	AFAAGVDLGR	0.740	5.88
6	FWGFGSDGTVGANK	-0.236	5.84

PAK C18 MGII S3色谱柱只得到了5个色谱峰, 其中的1号和2号肽段没能得到分离, 且色谱峰比较集中, 进一步说明混合模式色谱固定相分离多肽混合物时具有一定优势.

由于RP/WCX混合模式色谱固定相具有弱阳离子交换分离机制, 因此还考察了不同pH流动相对色谱分离度的影响. 分别采用pH 4.5, pH 6.0和pH 7.5的流动相对表3所列的标准肽段混合物进行分离, 如图9A所

图 8 RP/WCX混合模式色谱固定相(A)和CAPCELL PAK C18 MGII S3色谱柱(B)分离6条肽段混合物的色谱图

图 9 流动相pH对分离标准肽段混合物的影响

A: pH为4.5; B: pH为6.0; C: pH为7.5

示,当流动相pH较低时,RP/WCX混合模式色谱固定相不能将6条肽段完全分离,只能根据其疏水性质的不同

进行分离;随着pH增大,如图9B和C所示,色谱填料及肽段受到pH影响,此时可以将6条肽段完全分离,表明

混合物色谱保留机制发挥了作用。

2.4 对BSA酶切肽段混合物的分离分析

分别将RP/WCX混合模式色谱固定相以及ODS色谱固定相(粒径为3 μm , 孔径为100 $\text{\AA}$, 北京金欧亚公司)采用液压装柱法, 装填至15 cm $\times$ 75 μm i.d.的直喷

柱中, 与nanoLC-LTQ MS联用对BSA酶切肽段进行分离分析, 如图10所示, 从总离子流色谱图中可以看出混合模式色谱柱可对BSA酶切肽段混合物进行高效分离. 采用Mascot搜索引擎对质谱数据进行搜库, 得到BSA的覆盖率为52%, 与采用ODS填料分离BSA酶切肽段得到的蛋白覆盖率相当. 说明在相同的色谱条件

图 10 RP/WCX混合模式色谱固定相(A)以及十八烷基反相色谱固定相(B)分离BSA酶切肽段的nanoLC-LTQ MS总离子流色谱图

下, RP/WCX混合模式色谱固定相也可作为一种反相色谱填料用于多肽混合物的分离分析。

2.5 RP/WCX混合模式填料在Hep-G2细胞蛋白质组分析中的应用

为了考察RP/WCX混合模式填料在实际生物样本中分离效果, 建立了一种离线RP/WCX的色谱分离-反相色谱-串联质谱鉴定蛋白质组的分析方法(RP/WCX-RPLC-MS/MS), 并且在第一维液相分离中使用pH梯度洗脱, 即采用pH不同的流动相A和流动相B, 通过流动相A和流动相B混合形成pH梯度洗脱, 使肽段的分离不只根据其疏水性进行分离, 还可以根据肽段等电点的不同进行分离。通过一维RP/WCX离线分离与二维RPLC-MS/MS对100 μ g Hep-G2细胞全蛋白酶切物进行分离分析, 共鉴定到了将近5924个蛋白, 说明RP/WCX-RPLC-MS/MS分析方法可用于蛋白质组深度覆盖研究中。

3 结论

采用“硫醇-烯”点击化学的方法制备了一种反相/弱阳离子交换混合模式色谱填料。采用该填料对小分子混合物的色谱分离结果表明, 这种固定相具有反相和弱阳离子交换两种分离机制; 进一步用这种填料对6条疏水性和理论等电点不同的标准肽段混合物进行分离, 可以将这6条肽段完全分离, 而经典的C₁₈反相色谱柱则不能将它们完全分离, 说明对于疏水性质相似的肽段, 根据其等电点的差异可得到更好的分离结果, 且由于在反相基团与基质间嵌合了具有亲水性质的基团, 减弱了固定相的疏水性质, 从而减弱了强疏水性肽段的不可逆吸附的作用。最后将这种混合色谱模式离线分离结合反相色谱-串联质谱用于对100 μ g Hep-G2细胞全蛋白酶切物的分析, 共鉴定到5924个蛋白, 表明这种混合保留机理的色谱填料可在蛋白质组学研究中发挥重要作用。

参考文献

- 1 张养军, 张万军, 马岩, 等. 分离分析技术在蛋白质组学研究中的应用的新进展. 色谱, 2009, 27: 537-550
- 2 Dai J, Wang L S, Wu Y B, et al. Fully automatic separation and identification of phosphopeptides by continuous pH-gradient anion exchange online coupled with reversed-phase liquid chromatography mass spectrometry. *J Proteome Res*, 2009, 8: 133-141
- 3 Gu X, Deng C, Yan G, et al. Capillary array reversed-phase liquid chromatography-based multidimensional separation system coupled with MALDI-TOF-TOF-MS detection for high-throughput proteome analysis. *J Proteome Res*, 2006, 5: 3186-3196
- 4 Dai J, Shieh C H, Sheng Q H, et al. Proteomic analysis with integrated multiple dimensional liquid chromatography/mass spectrometry based on elution of ion exchange column using pH steps. *Anal Chem*, 2005, 77: 5793-5799
- 5 Gao M, Deng C, Yu W, et al. Large scale depletion of the high-abundance proteins and analysis of middle- and low-abundance proteins in human liver proteome by multidimensional liquid chromatography. *Proteomics*, 2008, 8: 939-947
- 6 McLaughlin L W. Mixed-mode chromatography of nucleic acids. *Chem Rev*, 1989, 89: 309-319
- 7 Yang Y, Geng X. Mixed-mode chromatography and its applications to biopolymers. *J Chromatogr*, 2011, 1218: 8813-8825
- 8 董雪芳, 蔡晓明, 沈爱金, 等. 混合模式色谱分离材料的研究及其应用进展. 色谱, 2013, 31: 297-302
- 9 Guo Z, Wang C, Liang T, et al. Polar-copolymerized approach based on horizontal polymerization on silica surface for preparation of polar-modified stationary phases. *J Chromatogr A*, 2010, 1217: 4555-4560
- 10 Cai X, Guo Z, Xue X, et al. Two-dimensional liquid chromatography separation of peptides using reversed-phase/weak cation-exchange mixed-mode column in first dimension. *J Chromatogr A*, 2012, 1228: 242-249
- 11 Wei J, Guo Z, Zhang P, et al. A new reversed-phase/strong anion-exchange mixed-mode stationary phase based on polar-copolymerized approach and its application in the enrichment of aristolochic acids. *J Chromatogr A*, 2012, 1246: 129-136
- 12 Li X, Guo Z, Sheng Q, et al. Sequential elution of multiply and singly phosphorylated peptides with polar-copolymerized mixed-mode RP18/SCX material. *Analyst*, 2012, 137: 2774
- 13 Lämmerhofer M, Nogueira R, Lindner W. Multi-modal applicability of a reversed-phase/weak-anion exchange material in reversed-phase, anion-exchange, ion-exclusion, hydrophilic interaction and hydrophobic interaction chromatography modes. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 400: 2517-2530

- 14 Davies N H, Euerby M R, McCalley D V. A study of retention and overloading of basic compounds with mixed-mode reversed-phase/cation-exchange columns in high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 2007, 1138: 65–72
- 15 Nogueira R, Lubda D, Leitner A, et al. Silica-based monolithic columns with mixed-mode reversed-phase/weak anion-exchange selectivity principle for high-performance liquid chromatography. *J Sep Sci*, 2006, 29: 966–978
- 16 Mant C T, Hodges R S. Mixed-mode hydrophilic interaction/cation-exchange chromatography (HILIC/CEX) of peptides and proteins. *J Sep Sci*, 2008, 31: 2754–2773
- 17 Dong X, Shen A, Gou Z, et al. Hydrophilic interaction/weak cation-exchange mixed-mode chromatography for chitooligosaccharides separation. *Carbohydr Res*, 2012, 361: 195–199
- 18 Shen A, Guo Z, Cai X, et al. Preparation and chromatographic evaluation of a cysteine-bonded zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phase. *J Chromatogr A*, 2012, 1228: 175–182
- 19 Shen A, Guo Z, Yu L, et al. A novel zwitterionic HILIC stationary phase based on “thiol-ene” click chemistry between cysteine and vinyl silica. *Chem Commun*, 2011, 47: 4550
- 20 Wu J Y, Bicker W, Lindner W. Separation properties of novel and commercial polar stationary phases in hydrophilic interaction and reversed-phase liquid chromatography mode. *J Sep Sci*, 2008, 31: 1492–1503
- 21 Guo Z, Jin Y, Liang T, et al. Synthesis, chromatographic evaluation and hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode behavior of a “Click β -cyclodextrin” stationary phase. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 257–263
- 22 Liu X, Pohl C. New hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode stationary phase and its application for analysis of nonionic ethoxylated surfactants. *J Chromatogr A*, 2008, 1191: 83–89

Novel reversed-phase/weak-cation-exchange mixed-mode chromatographic packing materials applied in mass-spectrometry-based proteomics

ZHOU ShanShan^{1,2}, LIU JiaYu¹, ZHANG YangJun¹ & QIAN XiaoHong¹

1 State Key Laboratory of Proteomics, National Center for Protein Sciences (Beijing), Beijing Proteome Research Center, Beijing Institute of Life-Omics, Beijing 102206, China;

2 Beijing Abace Biotechnology Co., Ltd., Beijing 100176, China

High efficiency separation plays a key role in deep-coverage proteomics studies. In this study, we investigate a mixed-mode chromatographic packing material and use “thiol-ene” click chemistry to prepare a novel reversed-phase/weak-cation-exchange mixed-mode chromatographic packing material. First, we used a mixture of chemical compounds with low molecular weights to characterize the packing material and the results showed that it has both reversed-phase and weak-cation-exchange chromatographic retention mechanisms. Next, we used the reversed-phase/weak-cation-exchange mixed-mode chromatographic stationary phase in the separation of a mixture of six standard peptides with similar hydrophobicities but with different theoretical isoelectric points. The experimental results showed that the packing materials have a mixed-mode retention performance. We also found that the hydrophilic properties of the embedded functional groups play an important role in decreasing the hydrophobicity of the packing material and therefore reduces the loss of some of the peptides due to the strong adsorption of very high hydrophobic peptides. Lastly, we selected an off-line RP/WCX column with a pH gradient elution as the first dimension for pre-separation and employed reversed-phase liquid chromatography (RPLC)-mass spectrometry analysis as the second dimension for the analysis of the protein mixture of 100-μg HepG2 cells. In total, we identified 5924 proteins. These results are similar to those obtained by the RPLC-mass spectrometry analysis commonly used in proteome research, which suggests that this mixed-mode chromatographic packing material can be used in proteomics research.

mixed-mode chromatography, peptide separation, tandem mass spectrometry, proteomics

doi: [10.1360/N052017-00148](https://doi.org/10.1360/N052017-00148)