自动化肽段脱盐技术：基于分散移液萃取技术的IMCStips®在高通量蛋白质组学中的应用

Sunil Hwang; Todd Mullis; **Andrew Lee***
IMCS, Inc - Irmo, South Carolina

integrated micro-chromatography systems

摘要

肽段脱盐是优化LC-MS/MS分析的关键步骤[1-3]。目前脱盐主要依赖固相萃取（SPE）技术，传统采用柱式（cartridge）或微离心柱（microspin column）形式。这些形式虽能实现常规样本制备，且微离心柱通过小型化加速了脱盐流程，但均难以适配自动化液体处理系统。

本研究提出基于IMCStips®的分散移液萃取技术，可实现稳健的高通量蛋白质组学分析。我们系统比较了离心柱与分散移液两种SPE形式中不同树脂的性能[4]，通过监测特定肽段的载量及回收率，并结合细胞裂解液的全蛋白质组分析，评估了两种萃取流程的蛋白质鉴定总数。

材料与方法

HEK293T细胞采用8 M尿素、75 mM NaCl、50 mM NH_4HCO_3以及1×蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合液进行裂解。裂解样本与胰蛋白酶按1:200（胰蛋白酶:裂解液）的比例混合，37°C条件下消化过夜。为实现自动化样本处理，我们特别开发了适用于Integra VIAFLO 96及其他高通量自动化液体处理系统的方法（参见图1、图2）。

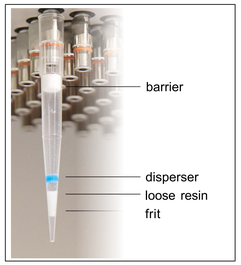


Figure 1. IMCSTips 组件

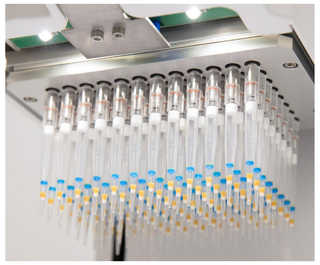


Figure 2. 在 Integra VIAFLO96 上使用 RP IMCStips 脱盐



为测定脱盐后肽段的含量，我们采用优化条件的UPLC-TSQ Endura三重四极杆质谱系统进行分析。通过对比富集样本与等量外标混合物的色谱峰面积（AUC）实现准确定量。

在脱盐后的全谱肽段鉴定方面，我们使用Q-Exactive质谱仪联用Ultimate 3000纳升超高效液相系统。质谱采集采用数据依赖性扫描模式（DDA），具体参数为：

- 全扫描选择前20个最强母离子进行MS/MS碎裂
- 动态排除时间设置为10秒
- 数据库检索通过Proteome Discoverer v2.1（Thermo Scientific）中的Sequest HT算法完成
- 匹配数据库为人类UniProt蛋白质FASTA数据库（2015年12月版，共20,193条序列）

	Quantification 定量分析	Identification 鉴定分析
Mass spectrometer	TSQEndure, Thermo Fisher	Q-Exactive Thermo Fisher
Liquid chromatography	Vanquish UPLC	Ultimate 3000 nano-UHPLC
Mobile phase A	0.1% formic acid (F.A.) in water	0.1% F.A. in water
Mobile phase B	0.1% F.A. in acetonitrile	0.1% F.A. in acetonitrile
LC gradient	5% - 35% B for 15 minutes	2% - 30% B for 170 minutes
Trap column	N/A	Acclaim PepMap 100 (C_{18}, 5 µm, 100 Å, 300 µm X 5mm)
Analytical column	Syncronis C_{18}, 100 X 2.1 mm, 1.7 µm	Acclaim PepMap RSLC (C_{18}, 2 µm, 100 Å, 75 µm X 15 cm)
Column oven temperature	40 °C	Room temperature

结果

我们采用 Integra 公司的 VIAFLO96 高通量自动化液体处理系统，针对1 mL IMCStips 中装载10 mg 或 20 mg 脱盐树脂的条件进行了优化，并与 Sigma-Aldrich 离心柱提取方法进行了对比研究。结果表明，基于 VIAFLO96 系统的全流程脱盐操作耗时不足 10 分钟，且人工操作时间极短（详见表1）。

Table 1. Desalting Protocol using 1 mL IMCStips

Steps	Process	Solvent	Aspiration µL	Volume µL	Repeat #	Duration minutes
1	Activation	100 % ACN	600	800	2	0.6
2	Condition	70% ACN, 0.1% F.A.	400	800	3	1.0
3	Equilibrate	1% TFA	400	800	3	1.0
4	Bind	1% TFA	400	500	10	3.3
5	Wash 1	0.1% TFA	400	800	3	1.0
6	Wash 2	0.1% F.A.	400	800	3	1.0
7	Elution 1	70% ACN, 0.1% F.A.	400	400	3	1.0
8	Elution 2	70% ACN, 0.1% F.A.	400	400	3	1.0
					Total	9.9

我们建立了TSQ Endura三重四极杆质谱的选择性反应监测（SRM）方法，用于测试外源性标准肽段在C18和二乙烯基苯（RP）IMCStips上的回收率（表2）。

表2. 标准肽段的选择性反应监测（SRM）质谱参数

Sequence	Name	Parent Mass m/z	Product Ion 1 m/z	Product Ion 2 m/z	Collision Energy V
RPPGFSPFR	Bradykinin	354.2	506.3	419.2	15.7
DRVYIHPFHL	Angiotensin I	432.9	647.4	619.4	18.7
DRVYIHPF	Angiotensin II	349.5	513.3	371.2	15.6
NVIQISNDLENLR	Leptin	509.9	644.4	531.3	21.7
RPVKVYPNGAEDESAEAFPLEF	ACTH18-39	822.4	505.3	981.0	33.5
DRVY*IHPF	Angiotensin II	376.2	371.2	756.3	15.0
IKNLQS*LDPSH	Cholecystokinin	444.6	340.2	455.2	25.0
DFNKFHT*FPQTAIGV	Calcitonin	601.3	757.8	814.4	15.0

*磷酸化氨基酸

首先，我们针对非磷酸化肽段，对比了五种离心柱（含两种竞品材料）与五种移液枪头（含两种1:1复合RP树脂材料）的性能（图3）。随后通过磷酸化肽段回收率实验发现，IMCStips方法的富集效果显著优于离心柱法（图4）。

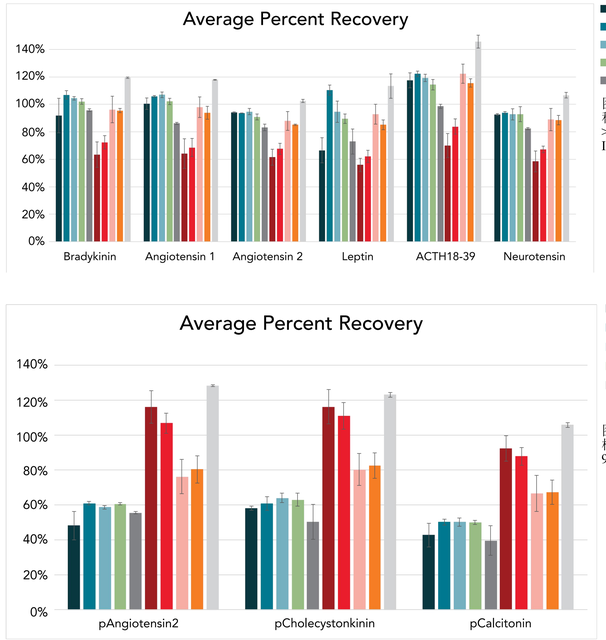


图3 6 种非磷酸化肽段的平均回收率。5 种离心柱对 6 种肽段的平均回收率 >85%，而 IMCStips 为 76%（使用 Integra 系统进行自动化处理）

图4 3 种磷酸化肽段的平均回收率。离心柱回收率为 45%-57%，IMCStips 达 78%-96%（采用Integra自动化系统）。

通过高通量自动化液体处理系统的优化流程，6 种组合型 IMCStips（含 C_{18}A1、C_{18}A3 和 RP 树脂）对 6 种非磷酸化肽段的平均回收率 >84%（图5）

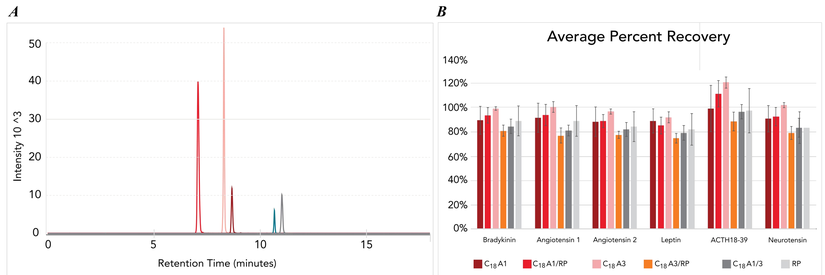


图5 6 种肽段的平均回收率。(A) Skyline软件自动积分目标肽段色谱峰面积；(B) 6 种肽段平均回收率>84%（基于高通量自动化处理系统）。

在全蛋白质组分析的脱盐效果评估中，我们对比了五种脱盐材料（C_{18}、C_{18}A1、石墨化碳黑-1、石墨化碳黑-2、RP）在离心柱与枪头两种形式中的表现。使用 10 mg 离心柱鉴定到 2358±187 个蛋白质（均值±标准差），而 10 mg RP IMCStips 鉴定到 2737个 蛋白质（图6）

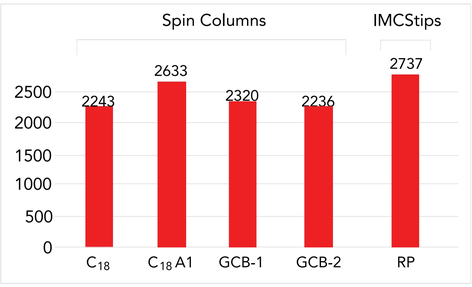


图6. 离心柱与RP IMCStips的蛋白质鉴定数量对比

为评估富集肽段的理化性质，我们比较了四种不同材料所获肽段的亲疏水平均值（GRAVY值）。结果显示，不同材料鉴定的肽段GRAVY值无显著差异（图7）。

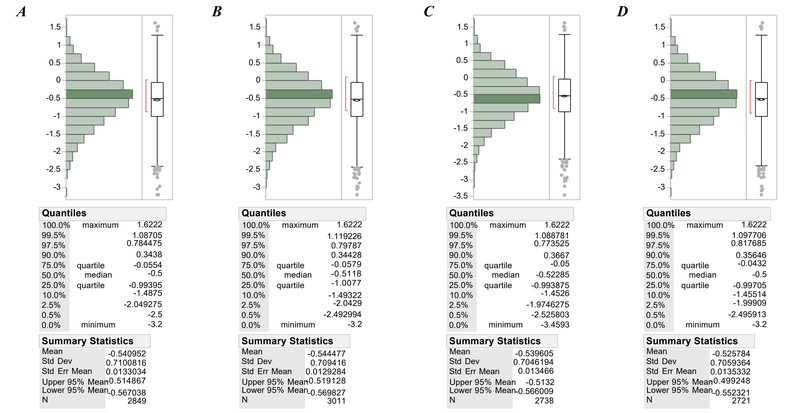


图7. 未经处理的天然肽段与三种 IMCS 脱盐枪头富集肽段的 GRAVY 亲疏水性值分布直方图。（A）天然肽段；（B）C_{18}A1树脂；（C）C_{18}A3树脂；（D）RP树脂

结论

质谱仪已成为广泛分析应用的主流工具。当前质谱分析的主要瓶颈在于如何实现大批量样本的高通量、高重现性处理。要确保这种一致性，需采用自动化液体处理系统来消除人工操作带来的误差。本研究基于自动化液体处理平台，结合分散移液萃取技术，系统评估了多种树脂材料的性能。该方法不仅较传统离心柱模式显著提升工作流程速度，更展现出更高的回收效率。

通过对多种反相树脂（包括C_{18}硅胶、石墨化碳黑及可湿性聚苯乙烯）的筛选，我们确定了最适合常规脱盐和肽段富集的树脂类型。实验表明，装载可湿性聚苯乙烯-二乙烯基苯交联树脂（简称RP）的 IMCStips，在标准肽段、磷酸化肽段回收率以及细胞裂解液蛋白质鉴定数方面均表现优异。通过 GRAVY 值分析证实，RP树脂与C_{18}树脂所获肽段的亲疏水性无显著统计学差异。IMCStips 在蛋白质组学应用中展现出卓越的灵活性和高通量优势，可轻松实现大批量样本处理，同时保持高度一致的操作稳定性。

REFERENCES

1. *Modular stop and go extraction tips with stacked disks for parallel and multidimensional Peptide fractionation in proteomics. Ishihama Y, Rappsilber J, Mann M.J Proteome Res. 2006 Apr;5(4):988-94.*
2. *Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y. Nat Protoc. 2007;2(8):1896-906.*
3. *Sample clean-up strategies for ESI mass spectrometry applications in bottom-up proteomics: Trends from 2012 to 2016. Tubaon RM, HaddadPR, Quirino JP. Proteomics. 2017 Mar 8. doi: 10.1002/pmic.201700011. [Epub ahead of print] Review.*
4. *Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. Kole PL, Venkatesh G, Kotecha J, Sheshala R. Biomed Chromatogr. 2011 Jan;25(1-2):199-217. doi: 10.1002/bmc.1560. Epub 2010 Dec 10. Review.*

Abbreviations:

ACN: Acetonitrile; AUC: Area under the curve; C_{18}A1: C_{18} 100 Å resin; C_{18}A3: C_{18} 300 Å resin; C_{18}N: C_{18} spin column from vendor N; C_{18}T: C_{18} spin column from vendor T; RP: wettable polystyrene cross linked with divinylbenzene; F.A.: Formic acid; GCB: Graphitized carbon black; TFA: Trifluoroacetic acid.

Contact: L. Andrew Lee - lee@imcstips.com

Artwork and layout created by Carmen Adamson.

© 2017 IMCS, Inc. All rights reserved. IMCStips® is a trademark of Integrated Micro-Chromatography Systems, Inc.