

应用纪要

利用1 mm级色谱技术进行高速蛋白质组学分析以满足大规模群体研究的通量要求

Sarah Lennon, Christopher J. Hughes, Robert S. Plumb, Lee A. Gethings

Waters Corporation

仅供研究使用，不适用于诊断。

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

本应用简报展示了1 mm级色谱技术在蛋白质组学分析方面的适用性，该技术与纳升级色谱相比，通量提高六倍的同时保持了类似的鉴定结果。

优势

1 mm级色谱技术与采用HDMSE分析的SYNAPT XS联用进行复杂的蛋白质组学样品分析

简介

如今，临床蛋白质组学及其在大规模群体分析中的应用得到了越来越多的关注。传统蛋白质组学研究通常采用纳升级色谱（使用75 μm 内径色谱柱，流速范围0.2~0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ ），此方法对复杂的蛋白质组学酶解物具有高灵敏和高覆盖率。但缺点是梯度时间和平衡时间较长。1份样品的总运行时间范围通常在60~180 min。尽管LC技术在易用性方面的设计已大幅改进，例如采用了手紧配件（即，Waters ZenFit手拧式接头），但纳升级色谱在使用和

故障排除方面仍存在极大挑战，因此限制了其在大规模群体分析领域的适用性。近年来，随着质谱分析分辨率和灵敏度的提升，微升级色谱技术（色谱柱内径300 μm ，流速7~12 $\mu\text{L}/\text{min}$ ）已被应用于人血浆样品酶解物的大规模群体分析^{1,2,3}。本研究展示了1 mm级色谱技术与SYNAPT XS质谱仪联用可在更短的时间范围（即15-min梯度）完成中等复杂程度样品（例如大肠杆菌和人血浆酶解物）的分析，同时仍能获得类似的蛋白质/肽鉴定结果。

结果与讨论

使用两种样品评估1 mm级色谱技术的性能：人血浆和沃特世酶解大肠杆菌胞质提取物（部件号：186003196）。

按照Waters ProteinWorks方案（部件号：176003688），对7种条件对应的人血浆样品和1个合并液对照品(QC)进行还原、烷基化、胰蛋白酶酶解以及固相萃取(SPE)浓缩。在50 μL 样品中加入1 μL iRT肽(Biognosys)作为内部参比。将大肠杆菌酶解物制成浓度为1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 和100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 的溶液。

使用的不同色谱级别见表1。流动相包括0.1%甲酸水溶液（流动相A）和0.1%甲酸的乙腈溶液（动相B）。使用流动相B按照从3%增加至35%的梯度对肽进行洗脱；重复进样三次3.5 μg 血浆（仅1 mm设置条件下）。不同尺寸色谱柱的大肠杆菌进样量如表1所示。

色谱柱级别	LC系统	色谱柱	色谱柱尺寸	流速($\mu\text{L}/\text{min}$)	梯度时间(min)	大肠杆菌进样量(μg)
1 mm	ACQUITY UPLC I-Class PLUS	ACQUITY UPLC Peptide CSH C ₁₈ (部件号: 186006934)	130 Å, 1.7 μm , 1 mm $\times$ 100 mm	70	15	5
300 μm	ACQUITY UPLC M-Class	nanoEase M/Z Peptide (部件号: 186009255)	130 Å, 1.7 μm , 300 μm $\times$ 100 mm	7	45	1
75 μm	ACQUITY UPLC M-Class	nanoEase M/Z HSS T3 (部件号: 186008818)	100 Å, 1.8 μm , 75 μm $\times$ 250 mm	0.35	90	0.1

表1. 色谱配置及相应梯度条件和大肠杆菌上样量

数据采集使用HDMS^E（正离子模式）下运行的SYNAPT XS质谱仪，数据处理使用Progenesis QI for Proteomics v4.2和Skyline v20.1（美国华盛顿大学MacCoss实验室）。

在15 min梯度范围内提取处不同保留时间处的3种大肠杆菌肽，表明1 mm级色谱技术具有出色的分离度。半峰全

宽(FWHM)和10%峰高处峰宽分别为0.03~0.04 min和0.05~0.07 min (图1)。各种色谱柱内径条件下的代表性色谱图见图2。每根接受评估的色谱柱鉴定的大肠杆菌蛋白和肽数量如图3所示。有趣的是,随着色谱柱内径增加,蛋白鉴定的数量差异却很小,同时展示出通量提升的优势,梯度时间从90 min (75 μ m)减少至15 min (1 mm),是原来的1/6。

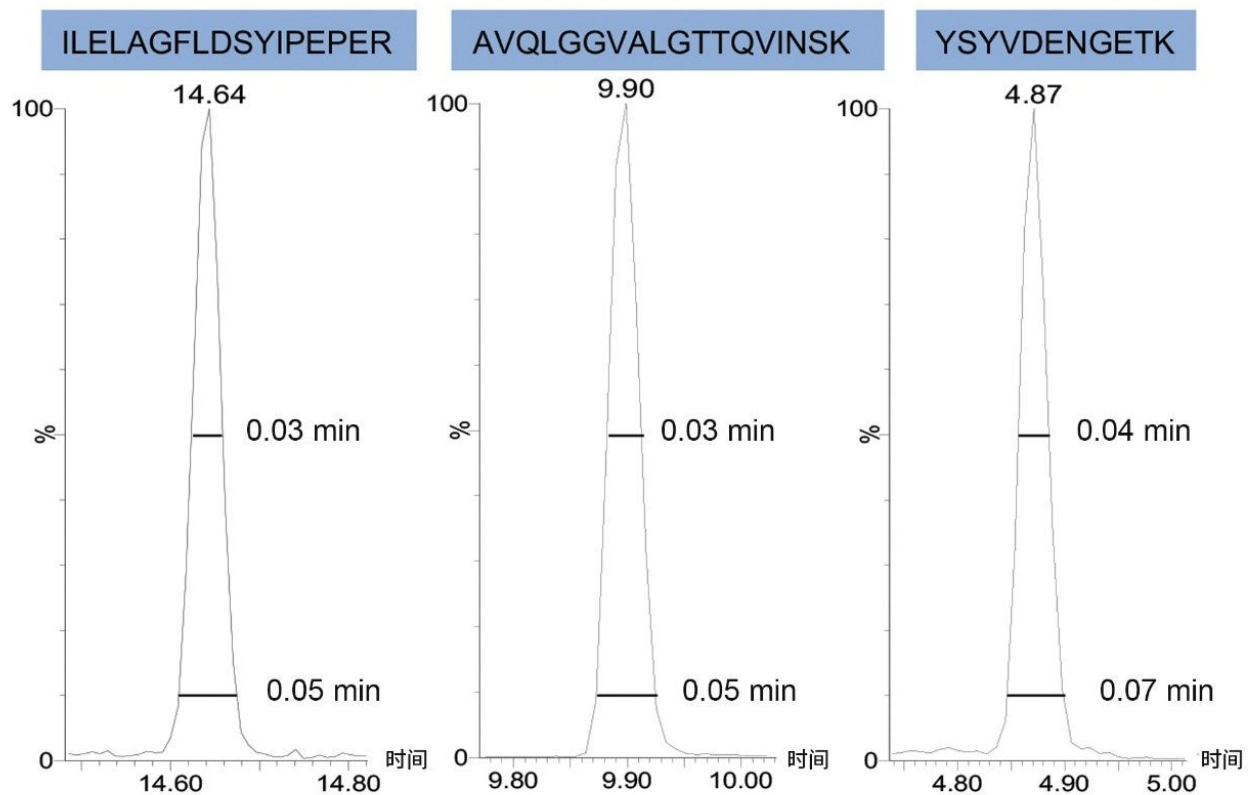


图1. 展示1 mm色谱柱设置条件下3种大肠杆菌肽的半峰全宽和10%峰高处峰宽的提取色谱图

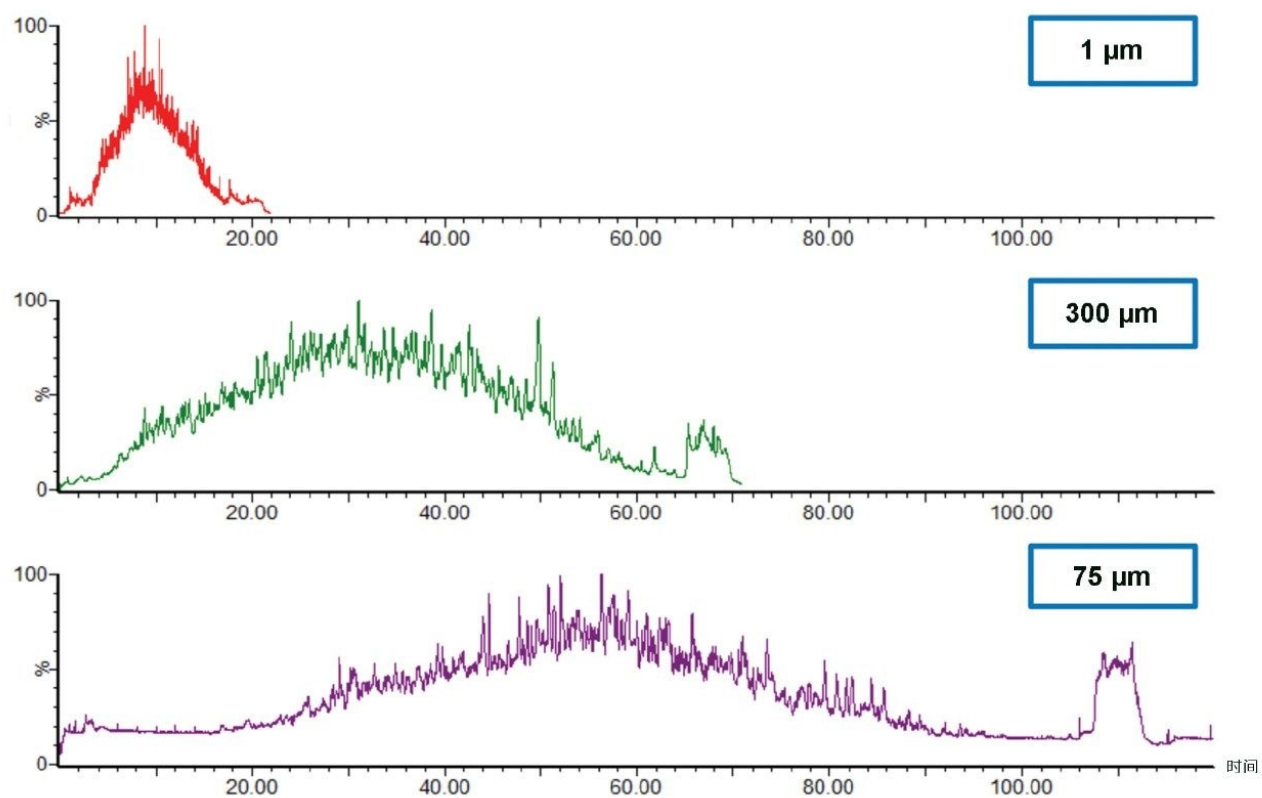


图2. 3种色谱柱分析大肠杆菌酶解物得到的色谱图，梯度时间范围90 min (75 μm)~15 min (1 mm)

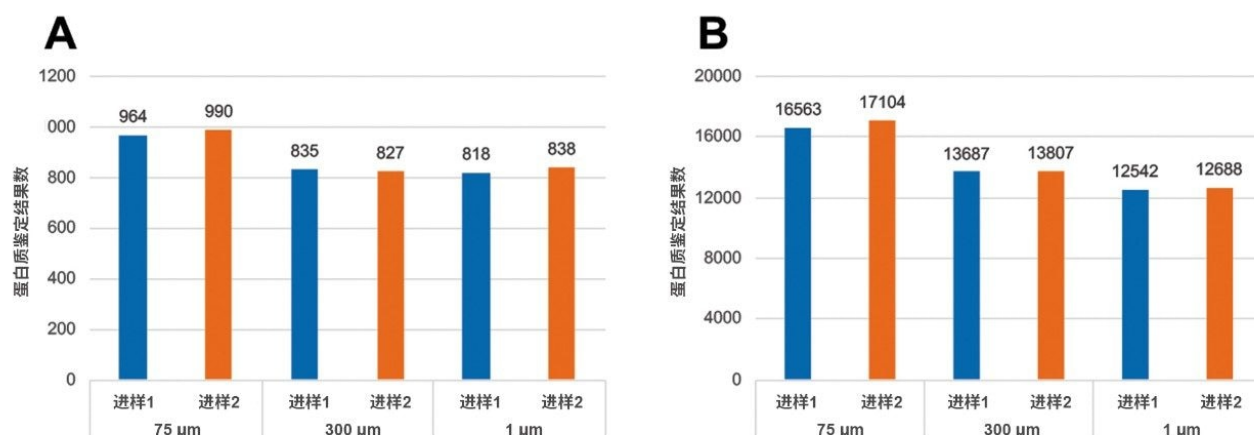


图3.使用3种内径（75 μm 、300 μm 和1 mm）的色谱柱进行两次重复分析得到的大肠杆菌蛋白(A)和肽(B)鉴定结果的数量。在所有情况下，数据处理均采用*Progenesis Q1 for Proteomics* (FDR <1%)。

五次进样混合QC样品的叠加色谱图表明1 mm级色谱技术在血浆样品分析中获得了出色的重现性（图4）。观察到所有样品中11个iRT肽的保留时间中值变异系数(CV)为0.05%（图5）。此外，对于大多数肽，各样品类型中每种iRT肽的峰面积CV均小于20%（图6）。共鉴定出533种血浆相关蛋白，错误发现率(FDR) <1%。

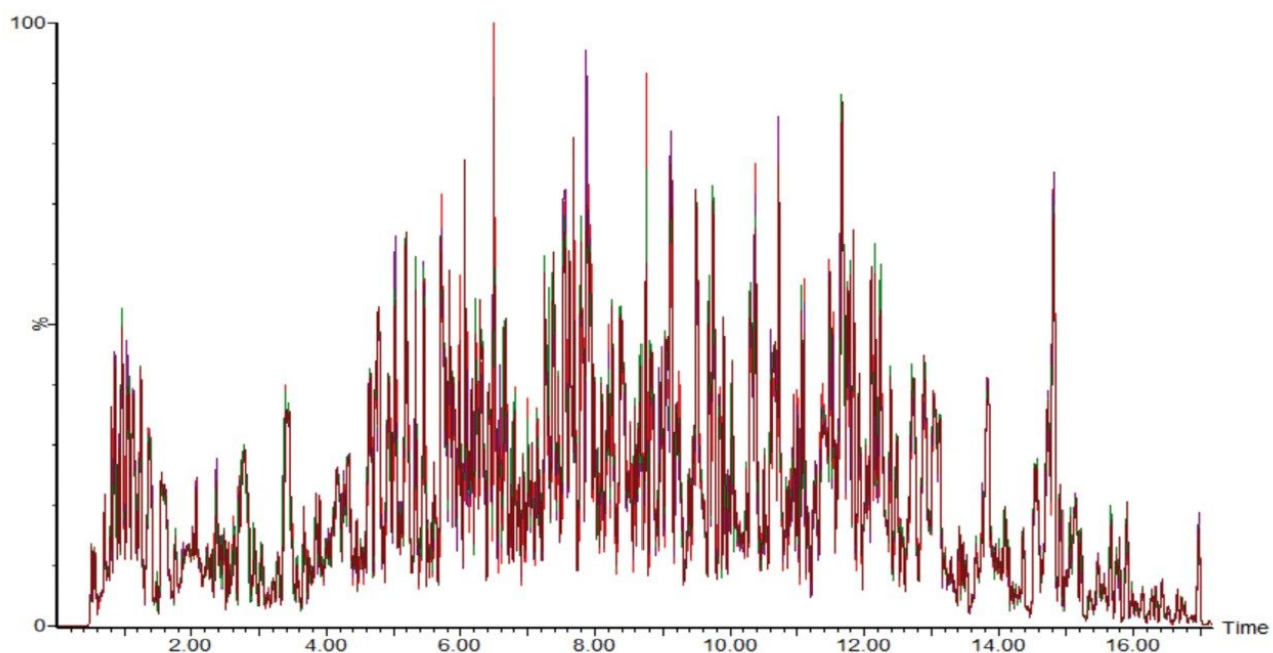


图4.使用1 mm级色谱设置五次进样血浆混合QC样品得到的叠加色谱图

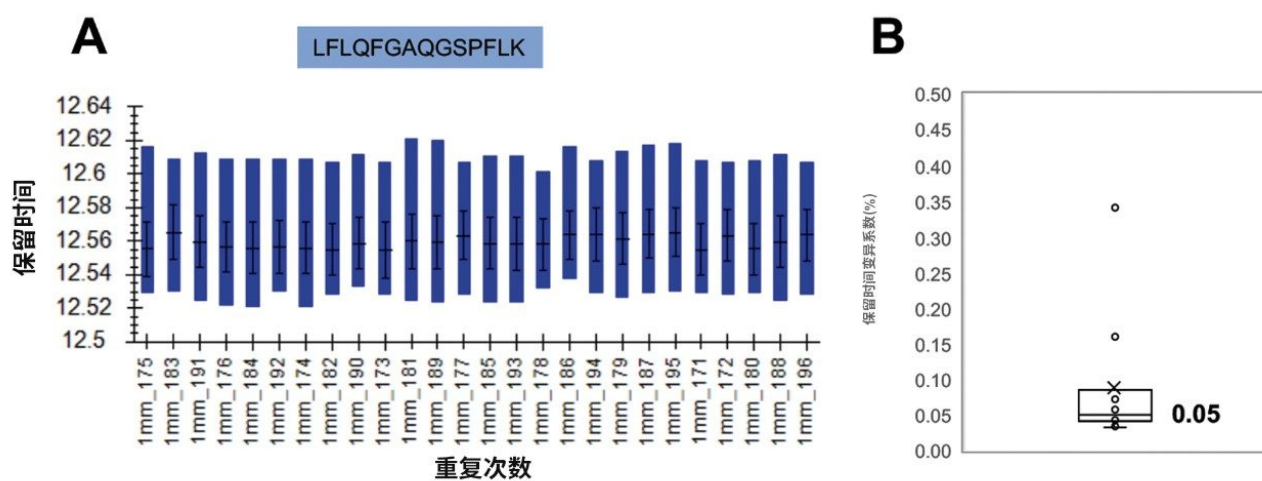


图5. *iRT*肽LFLQFGAQGSPFLK的重复进样保留时间比较结果示例(A)，以及整个分析中全部11个*iRT*肽段的保留时间变异系数的箱线图(B)。图中显示中位值为0.05%。

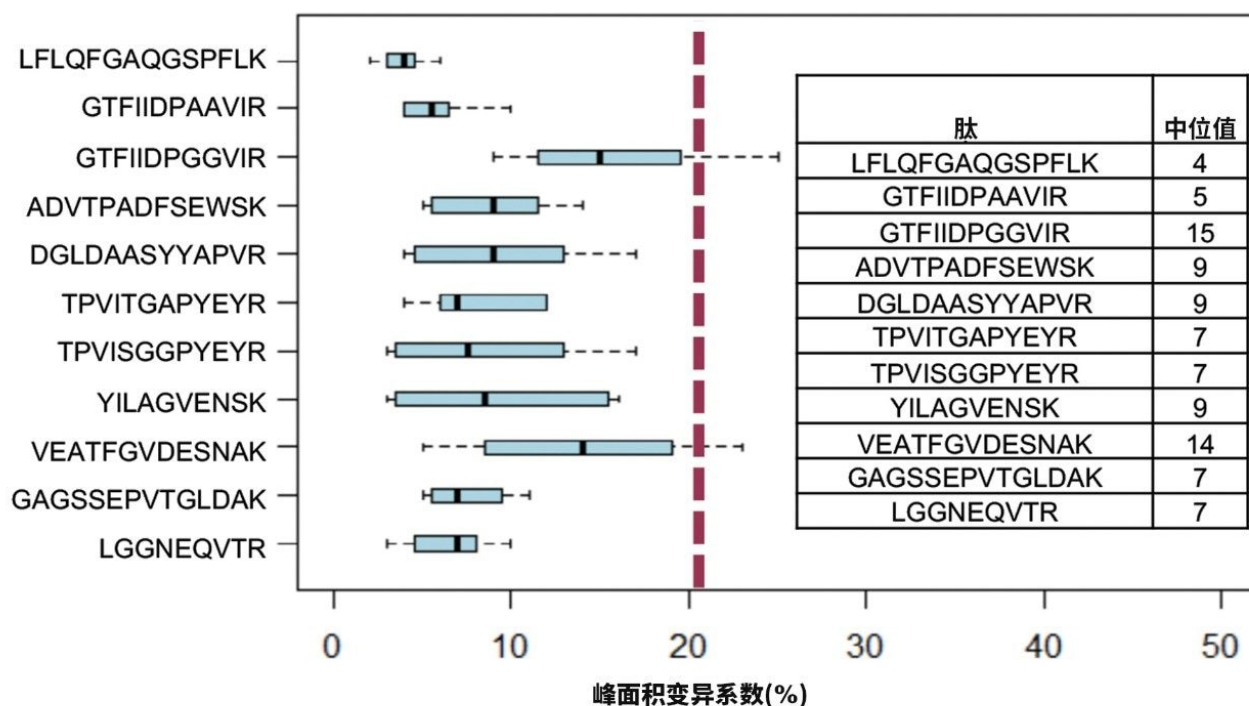


图6. 各样品类型中11种*iRT*肽的面积变异系数箱形图。每种肽的中位值见图中表格。

结论

结果表明，1 mm级色谱技术与SYNAPT XS质谱仪联用能够为中等复杂程度的蛋白质组学分析（即大肠杆菌和血浆酶解物分析）提供优质数据。蛋白质和肽的鉴定结果数量与纳升级配置相当。数据采集时间从90 min (75 μ m)大幅缩短至15 min (1 mm)，使样品通量提升至近6倍，适用于大规模群体研究。此外，该设置在保留时间和峰面积方面具有高度可重现性。

参考文献

1. Bruderer, R. et al. Analysis of 1508 plasma samples by capillary flow data-independent acquisition

profiles proteomics of weight loss and maintenance. *Mol. Cell. Prot.*, 2019, 18 (6), 1242–1254.

2. Bennike, T.B. et al. A Cost-Effective High-Throughput Plasma and Serum Proteomics Workflow Enables Mapping of the Molecular Impact of Total Pancreatectomy with Islet Autotransplantation. *J. Proteome Res.*, 2019, 17 (5), 1983–1992.
3. Hughes, C. et al. Rapid Qualitative Analysis and Absolute Quantification of Plasma Proteins Using SONAR with Biognosys PQ500 for Proteomic Clinical Research Studies. Waters Application Note, 720006388EN, 2018.

特色产品

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

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

720006833ZH, 2020年4月

©2019 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