



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103102388 A

(43) 申请公布日 2013. 05. 15

(21) 申请号 201110358286. 7

(22) 申请日 2011. 11. 11

(71) 申请人 中国科学院大连化学物理研究所
地址 116023 辽宁省大连市中山路 457 号

(72) 发明人 李秀玲 郭志谋 梁鑫淼

(74) 专利代理机构 沈阳科苑专利商标代理有限公司 21002

代理人 马驰

(51) Int. Cl.

C07K 1/20 (2006. 01)

C07K 1/18 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

一种顺序富集多磷酸化肽和单磷酸化肽的方法

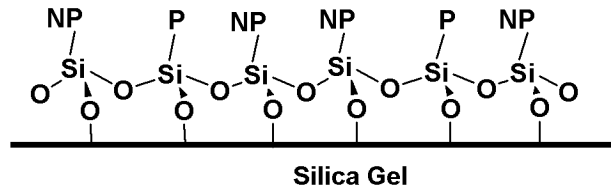
(57) 摘要

本发明涉及生化分析领域,公开了一种分离富集磷酸化肽的方法。本方法使用反相/强阳离子交换混合模式材料为富集材料,通过优化缓冲盐类型和浓度,有机溶剂种类和浓度等参数,首次实现了多磷酸化肽和单磷酸化肽的顺序洗脱和选择性富集。和常规的金属氧化物富集方法相比,反相/强阳离子交换混合模式材料富集磷酸化肽具有更高的灵敏度,更高的选择性,更高的多磷酸化肽回收率。此外,富集可在固相萃取(SPE)模式或者分散固相萃取模式下进行,操作简单,通量高,可重复性好,适用于复杂体系中磷酸化肽的选择性分离富集,结合质谱,该材料在翻译后修饰蛋白质组学研究等领域具有广阔的实用前景。

1. 一种顺序富集多磷酸化肽和单磷酸化肽的方法,其特征在于:

采用反相/强阳离子交换混合模式材料与磷酸化蛋白酶解物接触,然后顺序富集多磷酸化肽和单磷酸化肽;

所述反相/强阳离子交换混合模式材料是由两种或两种以上硅烷试剂在硅胶表面经过共聚反应形成,其结构式如下:



其中, Silica Gel 为硅胶;NP 为碳原子数为 4~18 的正链烷基;P 为含有负离子的极性基团,包括以碳原子数为 1~8 的正链烷基相连接的氯原子、溴原子、氰基、苯磺酸基、磺酸基或羧基。

2. 按照权利要求 1 所述方法,其特征在于:富集材料为反相/强阳离子交换混合模式材料,材料的粒径是 2-50 μm ,孔径为 50-300 \AA ;

所述两种或两种以上硅烷试剂为非极性硅烷试剂和/或极性硅烷试剂。

3. 按照权利要求 1 所述方法,其特征在于:

具体操作采用柱固相萃取模式或分散固相萃取模式;

在柱固相萃取(SPE)模式下采用反相/强阳离子交换混合模式材料顺序富集磷酸肽时,将磷酸化蛋白酶解物上到以反相/强阳离子交换混合模式材料为填料的 SPE 柱上,采用洗脱溶剂梯度,分别先后富集出多磷酸化肽和单磷酸化肽;

或在分散固相萃取模式下采用反相/强阳离子交换混合模式材料顺序富集磷酸肽时,将磷酸化蛋白酶解物上直接与富集材料混合,采用洗脱溶剂,使用离心方式、台阶梯度洗脱条件,分别先后富集出多磷酸化肽和单磷酸化肽。

4. 按照权利要求 3 所述方法,其特征在于:样品的上样量为反相/强阳离子交换混合模式材料与磷酸化蛋白酶解物质量比例为 10-200 : 1,富集温度为 15-60 $^{\circ}\text{C}$;磷酸化蛋白为 α -酪蛋白、 β -酪蛋白或卵清蛋白。

5. 按照权利要求 3 所述磷酸化肽分离富集方法,其特征在于:

富集多磷酸化肽时采用的洗脱溶剂是体积浓度为 10-50% 的乙腈、甲醇或乙醇溶液, pH 2-6;洗脱溶液的用量为 3-40 倍柱体积的多磷酸化肽洗脱溶液。

6. 按照权利要求 3 所述磷酸化肽分离富集方法,其特征在于:

洗脱单磷酸化肽时采用的洗脱溶剂为下述溶剂之一,

1) 含有 2-50mM 甲酸铵的体积浓度为 10-50% 乙腈、甲醇或乙醇溶液, pH 2.2-4.3;

2) 含有 2-50mM 乙酸铵的体积浓度为 10-50% 乙腈、甲醇或乙醇溶液, pH 4.3-5.0;

3) 含有 2-50mM 磷酸二氢钾的体积浓度为 10-50% 乙腈、甲醇或乙醇溶液, pH 2.2-4.3;

洗脱溶液的用量为 3-40 倍柱体积的单磷酸化肽洗脱溶液。

7. 按照权利要求 3 所述磷酸化肽分离富集方法,其特征在于:

采用分散固相萃取模式,

1) 磷酸化蛋白酶解物直接与富集材料孵化时间 0.5 分钟-12 小时,离心,收集上清液;

- 2) 离心后富集材料与洗脱液孵化时间 0.5 分钟-12 小时,离心,收集上清液;
- 3) 重复步骤 2) 的孵化、离心和收集过程 1-10 次。

8. 按照权利要求 1 或 3 所述磷酸化肽分离富集方法,其特征在于:

当采用反相/强阳离子交换混合模式材料富集出单磷酸化肽后,采用含有 20-200mM 甲酸铵、乙酸铵或磷酸二氢钾的体积浓度 60-90%乙腈、甲醇或乙醇溶液,pH 2-6,将富集材料上的非磷酸化肽洗脱出来。

一种顺序富集多磷酸化肽和单磷酸化肽的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及磷酸化肽的富集,具体地说是一种采用反相/强阳离子交换混合模式材料顺序富集多磷酸化肽和单磷酸化肽的方法。

背景技术

[0002] 可逆的蛋白质磷酸化在细胞生命活动中发挥着重要的调控作用,因此研究生物样品中的磷酸化蛋白对于揭示生命过程的调节机制是非常有意义的。生物质谱是解析磷酸化肽段结构的强有力工具,但是质谱在鉴定磷酸化蛋白方面仍然面临着巨大的挑战,主要是由于磷酸化肽的丰度低和质谱中大量非磷酸化肽段的信号抑制作用。因此,在质谱分析检测前对磷酸化肽进行选择富集是十分必要的。目前,固定化金属亲和色谱(IMAC)和二氧化钛(TiO_2)是最常用的磷酸化肽的分离富集材料。其中IMAC是目前使用最广泛最传统的富集方法,但是与磷酸化肽共流出的酸性非磷酸化肽降低了此方法的选择性。 TiO_2 方法因其此较高的磷酸化肽选择性在磷酸化蛋白组学中应用越来越多,但是多磷酸肽难于从 TiO_2 材料上洗脱下来。

[0003] 近年来混合模式材料受到科研工作者的广泛关注,如反相/弱阴离子交换材料、亲水/阳离子交换材料和反相/强阳离子交换混合模式材料。这些材料中反相/强阳离子交换混合模式材料被填装在色谱柱中用于分离富集磷酸化肽。但是该方法富集磷酸化肽存在两点不足:不能有效分离多磷酸化肽和单磷酸化肽;柱色谱操作费时。

[0004] 将反相/强阳离子交换材料与柱固相萃取模式或分散固相萃取模式有机的结合,可实现复杂混合物中磷酸化肽快速、简单、可重复、高通量地富集。因此,利用此材料的不同色谱作用机理,结合柱固相萃取模式或分散固相萃取模式的快速和简单等特性,实现多磷酸化肽和单磷酸化肽的选择性富集,可推动磷酸化蛋白组学的进步。

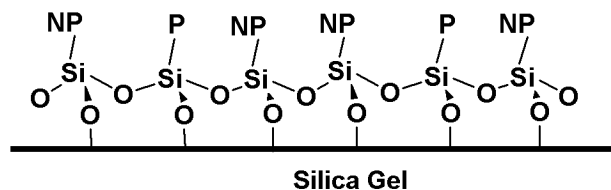
发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种具有高选择性、高通量、简单、重复性好的磷酸化肽的分离富集方法,能对痕量多磷酸化肽和单磷酸化肽进行顺序选择性富集。

[0006] 采用反相/强阳离子交换混合模式材料与磷酸化蛋白酶解物接触,然后顺序富集多磷酸化肽和单磷酸化肽;

[0007] 所述反相/强阳离子交换混合模式材料是由两种或两种以上硅烷试剂在硅胶表面经过共聚反应形成,其结构式如下:

[0008]



[0009] 其中, Silica Gel 为硅胶, NP 为碳原子数为 4~18 的正链烷基, P 为极性基团,

包括以碳原子数为 1 ~ 8 的正链烷基相连接的氯原子、溴原子、氰基、苯磺酸基或磺酸基、羧基。

[0010] 富集材料为反相 / 强阳离子交换混合模式材料, 材料的粒径是 2-0 μm , 孔径为 50-300 \AA 。

[0011] 具体操作采用柱固相萃取模式或分散固相萃取模式;

[0012] 采用柱固相萃取 (SPE) 模式用反相 / 强阳离子交换混合模式材料顺序富集磷酸化肽时, 将磷酸化蛋白酶解物上到 SPE 柱上, 采用洗脱溶剂台阶梯度, 分别先后富集出多磷酸化肽和单磷酸化肽;

[0013] 或采用分散固相萃取模式用反相 / 强阳离子交换混合模式材料顺序富集磷酸化肽时, 将磷酸化蛋白酶解物上直接与富集材料混合, 采用洗脱溶剂, 使用离心方式、台阶梯度洗脱条件, 分别先后富集出多磷酸化肽和单磷酸化肽。

[0014] 上样量为富集材料与蛋白酶解物质量比例为 10-200 : 1, 富集温度为 15-60 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0015] 本发明具有如下优点:

[0016] 1. 本发明制备的反相 / 强阳离子交换混合模式材料在分离富集磷酸化肽时表现出了高选择性和高通量等特点, 可以实现多磷酸化肽和单磷酸化肽的有效分离和富集;

[0017] 2. 本发明制备的反相 / 强阳离子交换混合模式材料既可以方便的装填成不同长度, 不同内径的柱子, 又可以直接添加与离心管, 操作简单, 易于重复。特别适合微量生物样品中磷酸化肽段的分离富集;

[0018] 3. 本发明富集得到的磷酸化肽可直接用于电喷雾 - 质谱分析 (ESI-MS) 或者基质辅助激光解吸电离 - 飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS), 提高了质谱的检测限和灵敏度。

附图说明

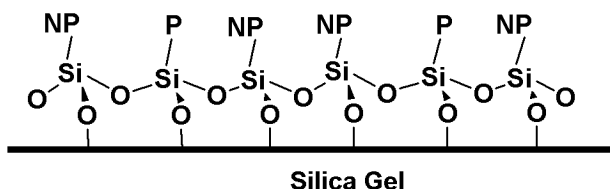
[0019] 图 1 为萃取模式模式下对标准磷酸化蛋白 α -casein (80pmol) 酶解产物中磷酸化肽经过不同方法富集后的 ESI-MS 谱图。(a) α -casein 酶解产物经 TiO_2 富集后的磷酸化肽馏分;(b) α -casein 酶解产物经反相 / 强阳离子交换混合模式材料富集后的单磷酸化肽馏分;(c) α -casein 酶解产物经反相 / 强阳离子交换混合模式材料富集后的多磷酸化肽馏分;(d) α -casein 酶解产物直接去盐后的质谱图。

[0020] 图 2 为反相 / 强阳离子交换混合模式材料在离心模式下对标准磷酸化蛋白 α -casein (80pmol) 酶解产物中磷酸化肽富集前后的 MALDI-TOF 质谱图。(a) α -casein 酶解产物经反相 / 强阳离子交换混合模式材料富集后的多磷酸化肽馏分;(b) α -casein 酶解产物经反相 / 强阳离子交换混合模式材料富集后的单磷酸化肽馏分;(c) α -casein 酶解产物经反相 / 强阳离子交换混合模式材料富集后的非磷酸化肽馏分。

具体实施方式

[0021] 一种反相 / 强阳离子交换混合模式材料 (郭志谋; 梁图; 金高娃; 梁鑫淼, 基于硅胶表面共聚反应的色谱分离材料及其制备, CN200910012845.1, 2009), 是由两种或两种以上硅烷试剂在硅胶表面经过共聚反应形成, 其结构式如下:

[0022]



[0023] 其中, Silica Gel 为硅胶, NP 为碳原子数为 4 ~ 18 的正链烷基, P 为极性基团, 包括以碳原子数为 1 ~ 8 的正链烷基相连接的氯原子、溴原子、氰基、苯磺酸基或磺酸基、羧基。

[0024] 其制备过程为:

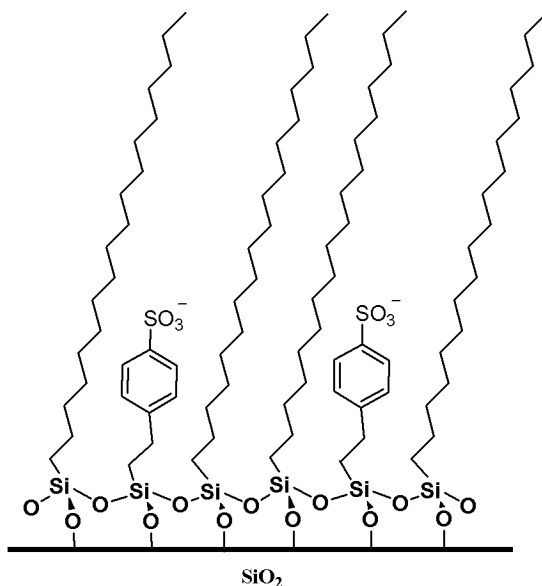
[0025] 1) 硅胶加入浓度为 1% ~ 38% 的盐酸或硝酸溶液中, 加热回流搅拌 1 ~ 48 小时, 过滤, 水洗至中性, 于 100 ~ 160°C 下干燥至恒重。

[0026] 2) 步骤 (1) 所得干燥硅胶置于湿度为 20% ~ 80% 的气氛中 24 ~ 72 小时, 使硅胶吸水增重 0.5% ~ 10%。

[0027] 3) 硅胶表面共聚: 将步骤 (2) 所得水合硅胶置于玻璃或者聚四氟乙烯反应容器中, 氮气氛围下加入有机溶剂, 搅拌均匀, 滴加非极性硅烷试剂和极性硅烷试剂混合物, 保持温度为 20 ~ 200°C 条件下搅拌 2 ~ 48 小时。

[0028] 本发明以下实施例所使用的一种反相 / 强阳离子交换混合模式材料结构式为:

[0029]



[0030] 制备方法: 称取 80g 球形硅胶 (粒径为 40 μm, 孔径为 80nm, 比表面积 400m²/g), 置于 2000mL 玻璃烧瓶中, 加入 1200mL 浓度为 10% 的盐酸溶液, 加热回流 24 小时, 冷却至室温, 过滤, 水洗至中性, 150°C 干燥 12 小时。将干燥后的硅胶置于 1500mL 三口玻璃瓶中, 连续通入湿度为 50% 的氮气 48 小时, 得到水合硅胶 84g。在通入干燥的氮气的条件下, 往水合硅胶中加入 1000mL 干燥的甲苯, 搅拌均匀, 然后滴加 200mmol (80.0mL) 十八烷基三氯硅烷和 20mmol (12mL) 对磺酸基苯乙基三氯硅烷混合物, 60°C 室温下搅拌反应 24 小时。反应体系过滤, 依次用甲苯, 二氯甲烷, 甲醇, 水, 四氢呋喃, 甲醇洗涤, 产物在 80°C 条件下干燥 12 小时即得结构式所示固定相。

[0031] 本发明可在固相萃取 (SPE) 模式或者离心模式下进行, 具有操作简单, 通量高和重复性好等优点。下面结合附图通过具体实施例对本发明作进一步说明, 但本发明不受这

些实施例的限制。

[0032] 样品溶液的制备:1mg 的 α -酪蛋白溶解在 1mL 碳酸氢铵溶液中 (50mM, pH 8.0), 按照胰蛋白酶与 α -酪蛋白的质量比 1 : 30(w/w) 的比例加入胰蛋白酶进行酶解, 37°C 反应 12 小时, 得蛋白酶解液进行下述实验操作。

[0033] 实施例 1

[0034] 将 1mg 反相 / 强阳离子交换混合模式材料装入凝胶吸头中, 2 μ L (80pmol) 蛋白酶解液上样后, 分别用 30 μ L 的体积浓度 30% 乙腈 / 0.1% 甲酸 (pH 3) 洗脱两次; 然后用 30 μ L 含有 5mM 的甲酸铵的体积浓度 50% 乙腈 / 0.1% 甲酸 (pH 3) 溶液洗脱两次; 最后用 30 μ L 含有 20mM 的甲酸铵的体积浓度 80% 乙腈 / 0.1% 甲酸溶液 (pH 3) 洗脱两次。洗脱液直接在质谱上进行分析。

[0035] 由图 1b、1c 和 1d 可见, α -酪蛋白酶解产物中的多磷酸化肽和单磷酸化肽可以被顺序从反相 / 强阳离子交换混合模式材料上洗脱下来, 而非磷酸化肽被最后洗脱出来, 说明反相 / 强阳离子交换混合模式材料能特异性的富集和纯化磷酸化肽。

[0036] 实施例 2

[0037] 调整富集的操作模式为离心, 将 1mg 反相 / 强阳离子交换混合模式材料装入离心管中, 2 μ L (80pmol) α -酪蛋白酶解液溶于 30 μ L 的 30% CH_3CN / 0.1% 甲酸 (pH 3) 并与材料混合, 孵化 5min, 离心后收集上清液, 沉淀再用 30% CH_3CN / 0.1% 甲酸 (pH 3) 孵化 5min, 离心后合并上清液。沉淀与 30 μ L 含有 5mM 的甲酸铵的 50% CH_3CN / 0.1% 甲酸溶液 (pH 3) 孵化 5min, 离心后收集上清液, 重复此孵化和离心步骤, 离心后合并上清液; 最后沉淀与 30 μ L 含有 20mM 的甲酸铵的 80% CH_3CN / 0.1% 甲酸 (pH3) 孵化 5min, 离心后收集上清液。各上清液直接在 MALDI-TOF 分析。

[0038] 由图 2a、2b 和 2c 可见, α -酪蛋白酶解产物中的多磷酸化肽没有被反相 / 强阳离子交换混合模式材料保留, 直接被洗脱出来 (图 2a); 单磷酸化肽可以被反相 / 强阳离子交换混合模式材料保留, 在较低浓度的盐可以洗脱出 (图 2b); 而非磷酸化肽与材料的作用最强最后被洗脱出来 (图 2c), 说明反相 / 强阳离子交换混合模式材料能特异性的富集和纯化磷酸化肽。

[0039] 实施例 3-6

[0040] 调整富集材料的重量为 2mg、3mg、4mg、5mg, 其他条件同实施例 1, 富集后得到的磷酸化肽进行质谱分析, 实验结果表明在萃取模式操作模式下 1mg 的材料可以有效地保留和富集 80pmol 的 α -酪蛋白中的磷酸化肽。

[0041] 实施例 7-9

[0042] 调整 α -酪蛋白酶解液的上样量为 20pmol、40pmol 和 160pmol, 其他条件同实施例 1, 富集后得到的磷酸化肽进行质谱分析, 实验结果表明在萃取模式操作模式下 1mg 的材料可以有效地保留和富集 80pmol 的 α -酪蛋白中的磷酸化肽。

[0043] 实施例 10-12

[0044] 调整洗脱溶液的 pH 为 3、4 和 5, 其他条件同实施例 1, 进行选择性富集和质谱分析。

[0045] 实施例 13-16

[0046] 调整富集材料的重量为 2mg、3mg、4mg、5mg, 其他条件同实施例 2, 富集后得到的磷

酸化肽进行质谱分析,实验结果表明在离心操作模式下 1mg 的材料可以有效地保留和富集 80pmol 的 α -酪蛋白中的磷酸化肽。

[0047] 实施例 17-19

[0048] 调整 α -酪蛋白酶解液的上样量为 20pmol、40pmol 和 160pmol,其他条件同实施例 2,富集后得到的磷酸化肽进行质谱分析,实验结果表明在离心操作模式下 1mg 的材料可以有效地保留和富集 80pmol 的 α -酪蛋白中的磷酸化肽。

[0049] 实施例 20-22

[0050] 调整洗脱溶液的 pH 为 3、4 和 5,其他条件同实施例 2,进行选择性富集和质谱分析。

[0051] 本发明反相 / 强阳离子交换混合模式材料对于多磷酸化肽和单磷酸化肽具有很好的选择性富集性能,和常规的金属氧化物相比,反相 / 强阳离子交换混合模式材料富集磷酸化肽具有更高选择性,更高多磷酸化肽回收率和更好的重复性。利用反相 / 强阳离子交换混合模式材料对于磷酸化肽的高效的特异性吸附能力,可以将其应用于复杂体系中磷酸化肽的选择性分离富集,结合质谱,该材料在翻译后修饰蛋白质组学研究等领域具有广阔的应用前景。

[0052] 表 1ESI-MS 和 MALDI-TOF 检测到的胰蛋白酶酶解 α -酪蛋白后的磷酸化肽

[0053]

No.	肽序列	磷酸根个数	MALDI - TOF 检测到得分子量	ESI - MS 检测到得分子量
1	EQLSTSEENSK	2	1411.53	706.24 (z = 2)
2	TVDMESTE VFTK	1	1466.63	733.78 (z = 2)
3	TVDMESTE VFTKK	1	1594.72	797.84 (z = 2)
4	VQLEIVNSAEER	1	1660.81	830.87 (z = 2) 554.25 (z = 3)
5	YLGEYLIVNSAEER	1	1832.86	916.90 (z = 2)
6	DIGSESTEDQAMEDIK	1	1847.74	924.33 (z = 2)
7	DIGSESTEDQAMEDIK	2	1927.72	964.31 (z = 2)
8	YKVQLEIVNSAEER	1	1951.97	976.45 (z = 2)
10	NTMEHVSSEESIISQET YK	4	2618.96	1309.93 (z = 2)
11	yroQMEAESISSSEEIVNS VEQK ^[c]	4	2624.00	1312.45 (z = 2)
12	QMEAESISSSEEIVNSVE QK	4	2641.01	1320.95 (z = 2)
13	NTMEHVSSEESIISQET YKQ	3	2666.98 96	1333.99 (z = 2)

[0054]

14	VNELSKDIGSESTEDQA MEDIK	3	2678.07	1339.48 (z = 2)
16	QMEAEISISSEEIVNSVE QK	5	2720.98	1360.92 (z = 2)
17	QMEAEISISSEEIVNSVE QK	5	2737.99	1368.91 (z = 2) 912.94 (z = 3)
18	NTMEHVSSEESIISQET YKQ	4	2747.02	1373.95 (z = 2)
19	EKVNELSKDIGSESTED QAMEDIK	3	2935.18	1468.08 (z = 2)
20	NANEEYYSIGSSSEESA EVATEEVK	4	3008.09	1504.49 (z = 2) 1003.32 (z = 3)
21	NANEEYYSIGSSSEESA EVATEEVK	5	3088.07	1544.46 (z = 2) 1029.97 (z = 3)

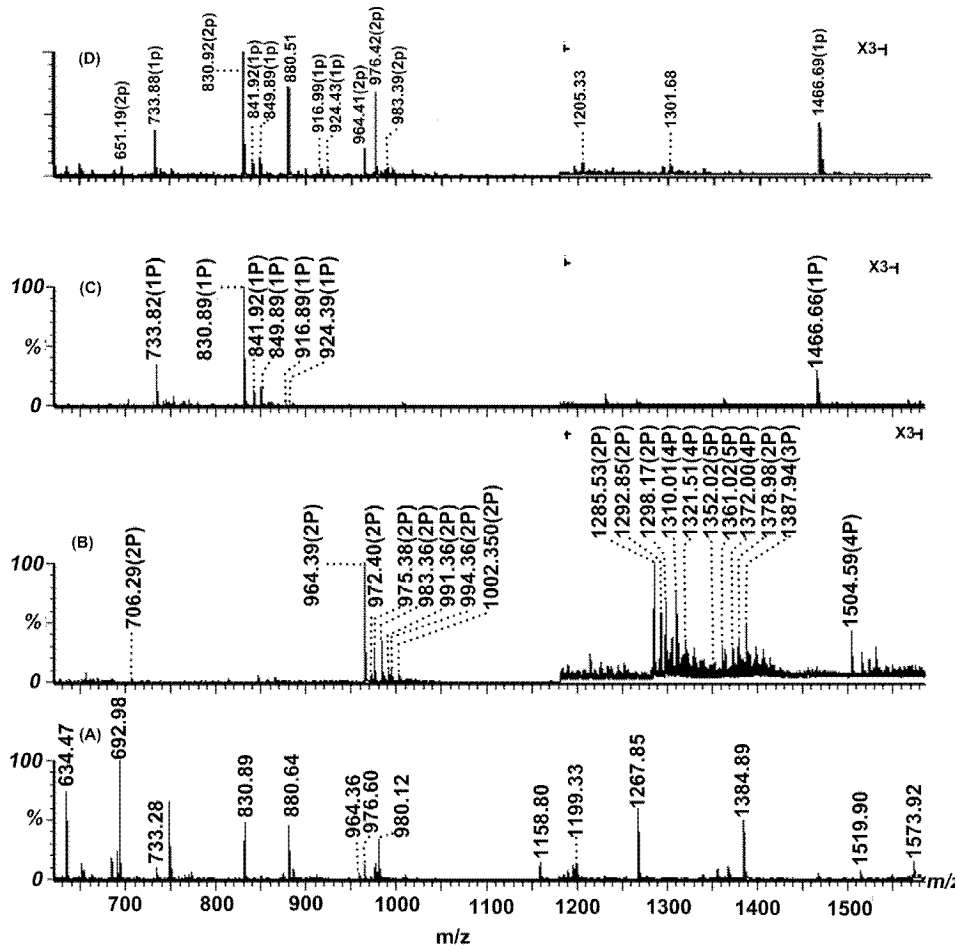


图 1

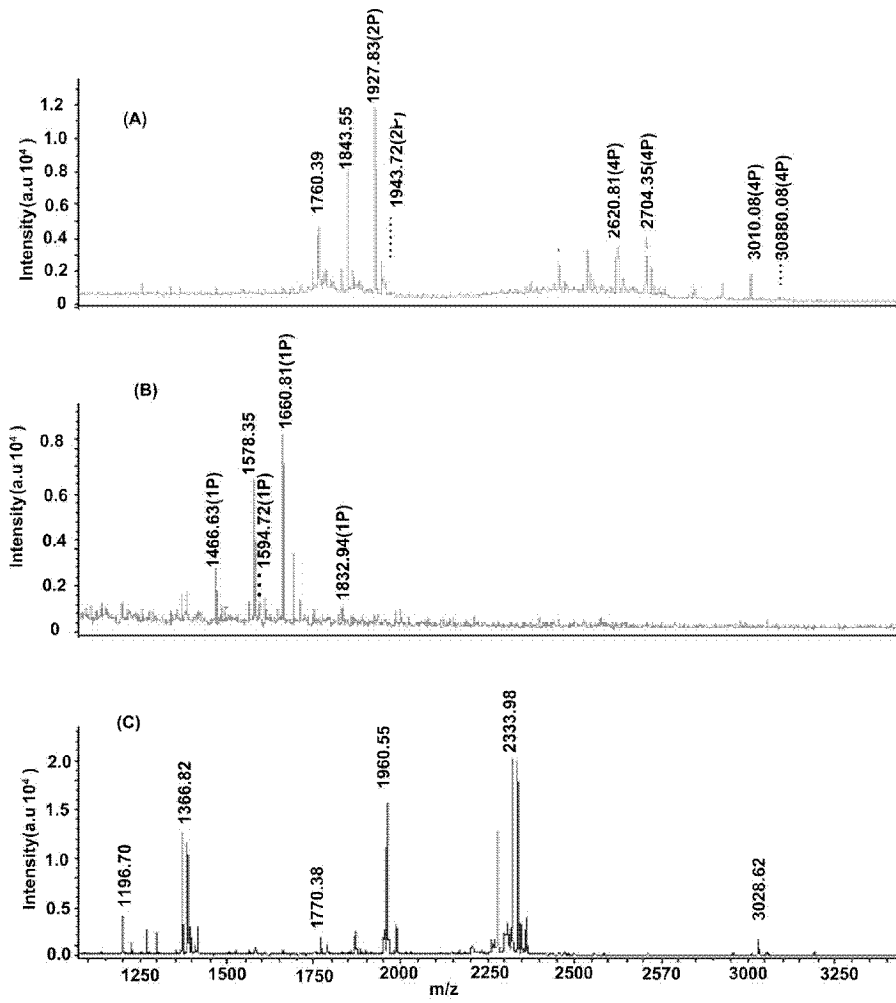


图 2