

MaxPeak高性能表面技术使高通量蛋白质组学应用具备重现性和更加优良的实验稳定性

Chris Hughes, Lee A. Gethings, Robert S. Plumb

Waters Corporation

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

摘要

稳定、可重现是大规模临床蛋白质组学实验对LC-MS的基本要求，这类实验的样品量使其适合使用内径较大的色谱柱（相较于传统蛋白质组学实验）。

本研究将复杂的胰蛋白酶酶解物质量控制样品进样至采用MaxPeak高性能表面技术的LC系统（ACQUITY Premier，装配CSH 2.1 mm内径色谱柱）近200次，并将洗脱液接入SYNAPT XS质谱仪。按照大规模临床蛋白质组学研究设定的时间间隔将大肠杆菌酶解物上样至CSH色谱柱。利用原始数据和经过处理的数据展示本实验所采用液相色谱(LC)和质谱仪(MS)在多项特征参数方面出色的重现性和稳定性 – 该信息对研究的QC以及在扩大临床蛋白质组学研究规模方面的适用性均至关重要。

色谱参数（峰宽和保留时间重现性）评估是基于800余个蛋白质的全部进样以及超过100万个单独肽测定的结果。得益于肽信号强度测定结果的一致性以及蛋白质序列覆盖率，大部分总蛋白在长达6周的实验中均得到鉴定。

优势

- HPS技术解决了与金属吸附物质相关的所有问题

- 常规、稳定且可重现的分析级LC-MS
- 适用于大规模临床蛋白质组学分析

简介

由于样品量不受限制的临床蛋白质组学领域得到越来越多的关注，许多研究开始探索用大规模色谱分析取代原本通常采用更加传统的纳流技术的蛋白质组学实验。相较于有时只能由专家用户操作的传统纳升级蛋白质组学设置，大规模色谱分析使用户操作更简便、稳定性和重现性更高¹。

沃特世开发出一项新技术，称为MaxPeak高性能表面(HPS)，并已在新型液相色谱系统ACQUITY Premier的开发中加以应用²。该技术主要用于限制某些化合物吸附到金属表面，从而提升对这些化合物的检测效果；研究表明，用户可能完全没有意识到他们在分析任何样品时都存在信息丢失的问题。此问题在非靶向发现型分析中尤为突出，MaxPeak HPS也因此成为所有实验程序的首选技术。

本研究执行了涉及500余个样品（每个进样3次）的大规模血浆蛋白质组学实验，在分析期间每运行8个样品便进样1次大肠杆菌胰蛋白酶酶解物质量控制样品。通过分析这些QC结果可以得出整个实验的重现性和稳定性指标。本应用简报旨在展示色谱和质谱分析在长达6周的研究过程中观察到优异的重现性和稳定性。

实验

样品描述

在为扩大临床蛋白质组学实验规模而进行的血浆胰蛋白酶酶解物进样分析期间，每4 h进样一次2 μg的MPDS大肠杆菌(186003196 <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--%20reagents/186003196-massprep-e-coli-digest-standard.html>>)样品。在为期6周的整个实验期间，大肠杆菌样品共进样180余次，使用Progenesis QIP和PLGS处理数据，使用Spotfire数据可视化软件查看数据。

液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY Premier (HPS)
色谱柱:	ACQUITY UPLC CSH 2.1 mm x 100 mm (HPS)
柱温:	55 °C
样品温度:	8 °C
流速:	150 μ L/min
流动相A:	水 + 0.1%甲酸
流动相B:	乙腈 + 0.1 %甲酸
梯度:	流动相B在16 min内由1%增加至35%，然后进行再平衡

质谱条件

质谱系统:	SYNAPT XS
电离模式:	电喷雾正离子模式
采集模式:	ToF HDMS ^E
采集范围:	50–2000Da
碰撞能量:	根据查找表确定传输CE梯度 ³
毛细管电压:	2.2 kV
锥孔电压:	30 V

实时校正标准液：

Glu血纤维蛋白肽B (2+, m/z 785.8426)

数据管理

色谱软件：

MassLynx 4.2版

质谱软件：

MassLynx 4.2版

信息学软件：

Progenesis QI for Proteomics (PQIP)、PLGS
3.0.3、Spotfire (Tibco)

结果与讨论

重现性 – 色谱

图1A所示为2次进样（间隔30天）的原始数据色谱图，图1B所示为5~8.5 min的保留时间窗口。图2显示了所有已鉴定肽的色谱峰宽分布，大多数流出肽段的FWHM为3 s以上。此外，图3还展示了在与色氨酸酶（P0A853; TNAA_ECOLI）相关的所有进样中，选定母离子保留时间测定结果的出现频率。结果显示变异系数(CV)小于等于1%，清楚表明色谱保留时间在整个实验期间均保持出色的重现性。

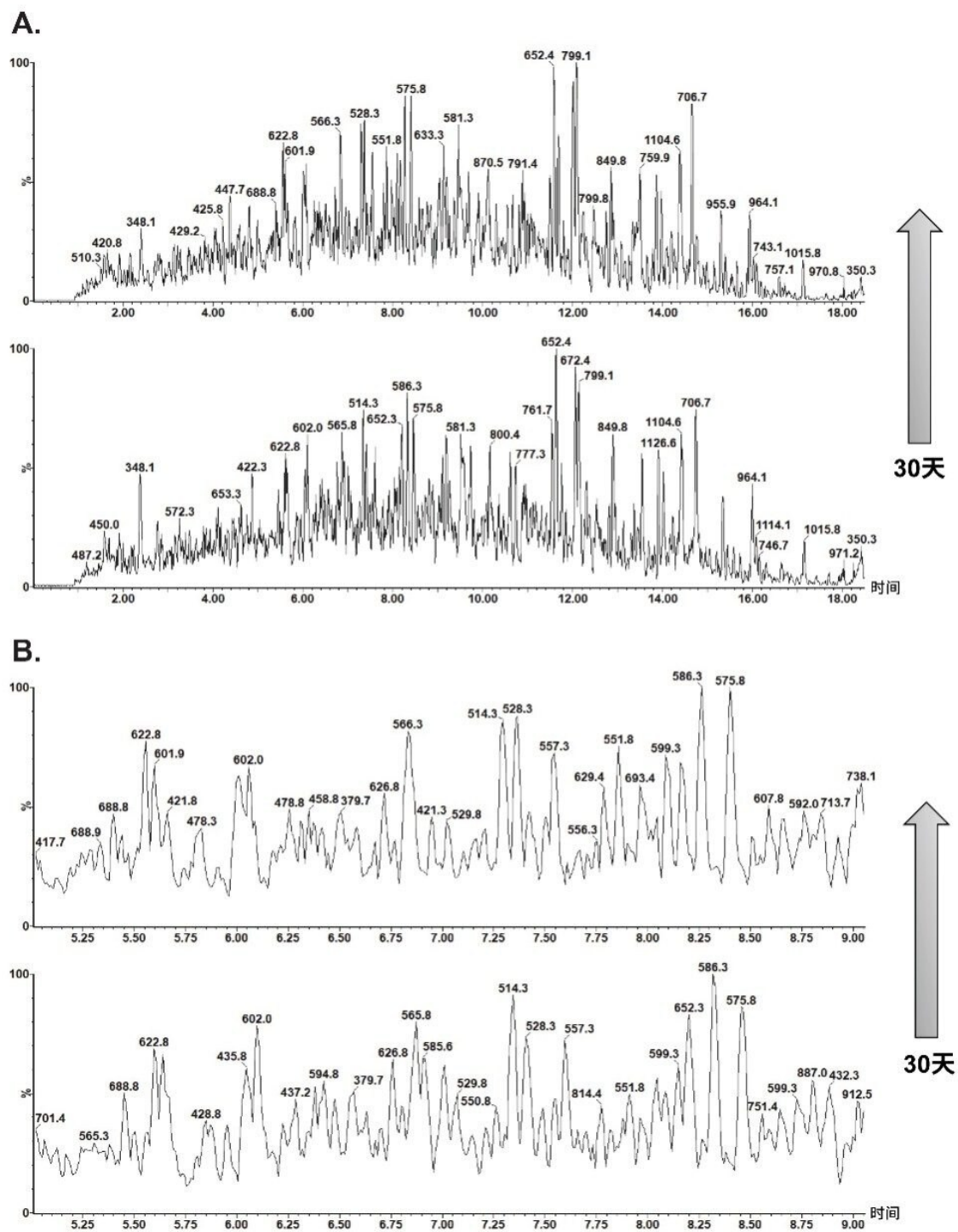


图1.(A)间隔约30天进样2 μg 大肠杆菌得到的原始数据基峰离子(BPI)色谱图。(B)缩小保留时间窗口范

围后放大的原始数据BPI色谱图。

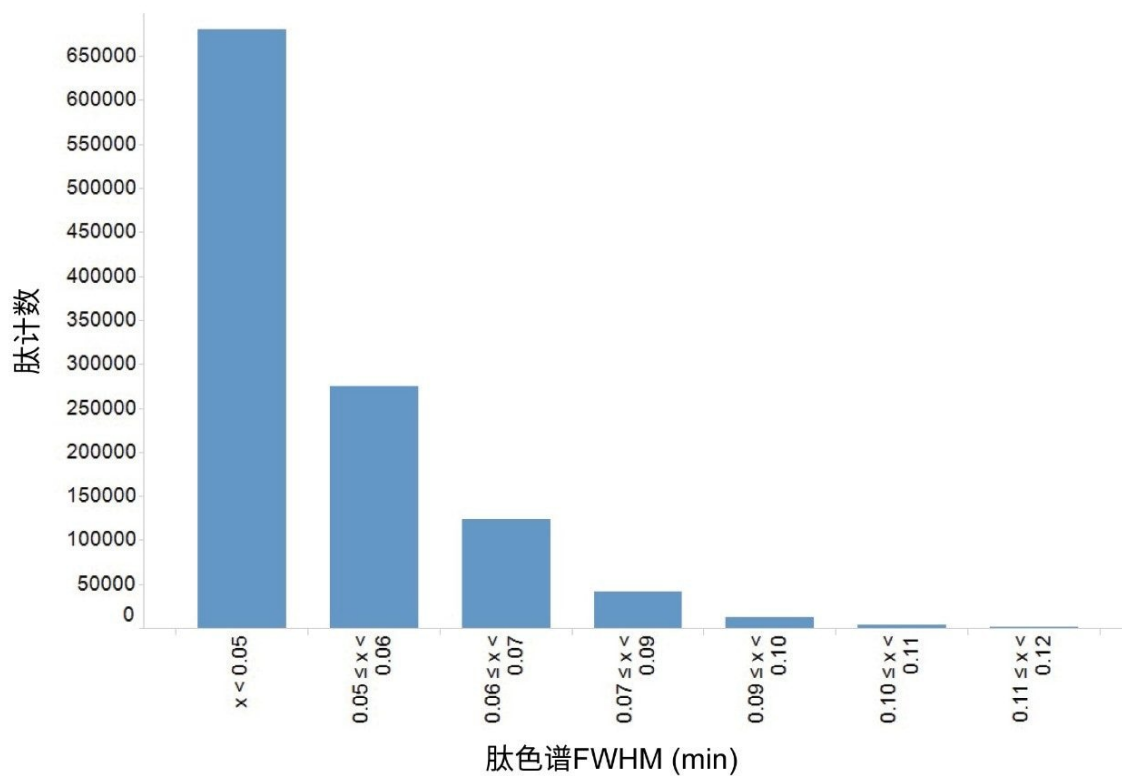


图2.所鉴定肽的母离子色谱峰宽分布。该数据涵盖整个实验中超过100万个单独的测定结果。

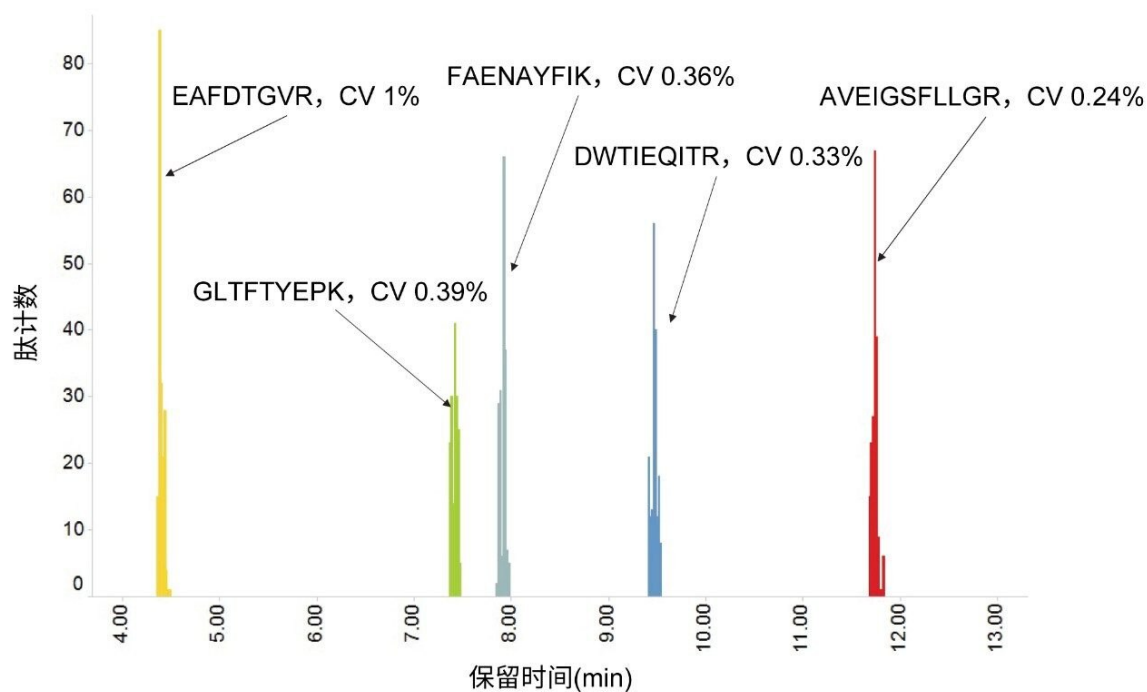


图3.5种色氨酸酶相关选定母离子保留时间测定结果的出现频率。突出显示了每种肽的测定结果变异系数。

LC-MS稳定性 – 肽段信号强度和质量精度

利用PQIP和PLGS处理所鉴定的蛋白质和肽时，生成的输出结果中有一项是每种肽的子离子强度总和，该结果可用作监测强度稳定性的参数。图4所示为3种大肠杆菌相关蛋白质的输出结果，其中离子来自信号最强的蛋白质色氨酸酶(TNAA_ECOLI)，以及2种信号强度次之的蛋白质苹果酸脱氢酶 (P61889; MDH_ECOLI) 和醛醇脱氢酶(P0A9Q7; ADHE_ECOLI)。肽段母离子质量精度数据进一步证明了该实验的稳定性，其中95%以上肽段的实测值均在理论值±5 ppm的范围内，如图5所示。

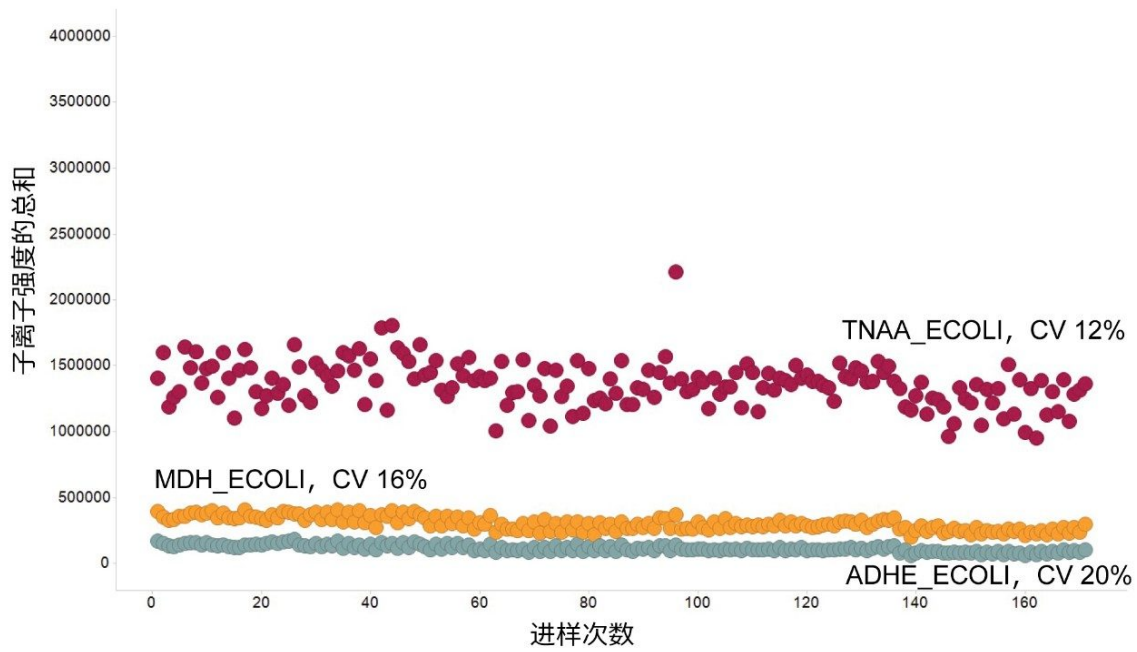


图4.根据3种蛋白质的肽段子离子强度总和与进样次数的关系图监测整个实验的强度稳定性。

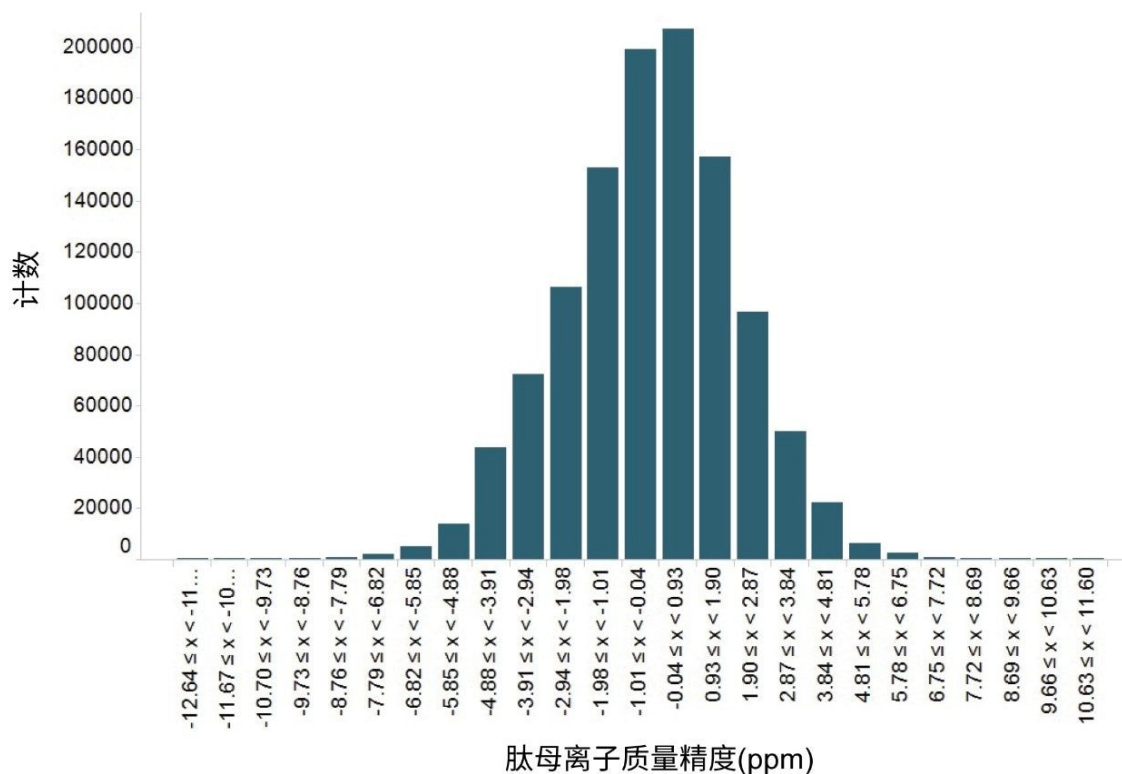


图5.肽段母离子质量精度的频率

MS稳定性 – 蛋白质序列覆盖率和鉴定结果

根据每种蛋白质的肽鉴定结果确定的蛋白质序列覆盖率是一项衍生参数。对于其中一种蛋白质TNA_A_ECOLI，观察到其在整个实验范围内的平均序列覆盖率为76% (CV 2.8%)，如图6A所示。图6B是所有已鉴定蛋白质的序列覆盖率范围分布图，结果显示模态范围为40%~49%。许多蛋白质组学实验的目标是先鉴定蛋白质，再通过比较不同的样品/条件确定任何与这些蛋白质相关的调节。但QC分析时注入的是相同的样品，因此测定了5周内鉴定结果的重现性。图7的文氏图结合并比较了三次进样的鉴定结果，分别对应实验前期（5天）、中期（18天）和后期（38天）。该结果表明整个实验过程的进样能够鉴定出大约76%的蛋白质。

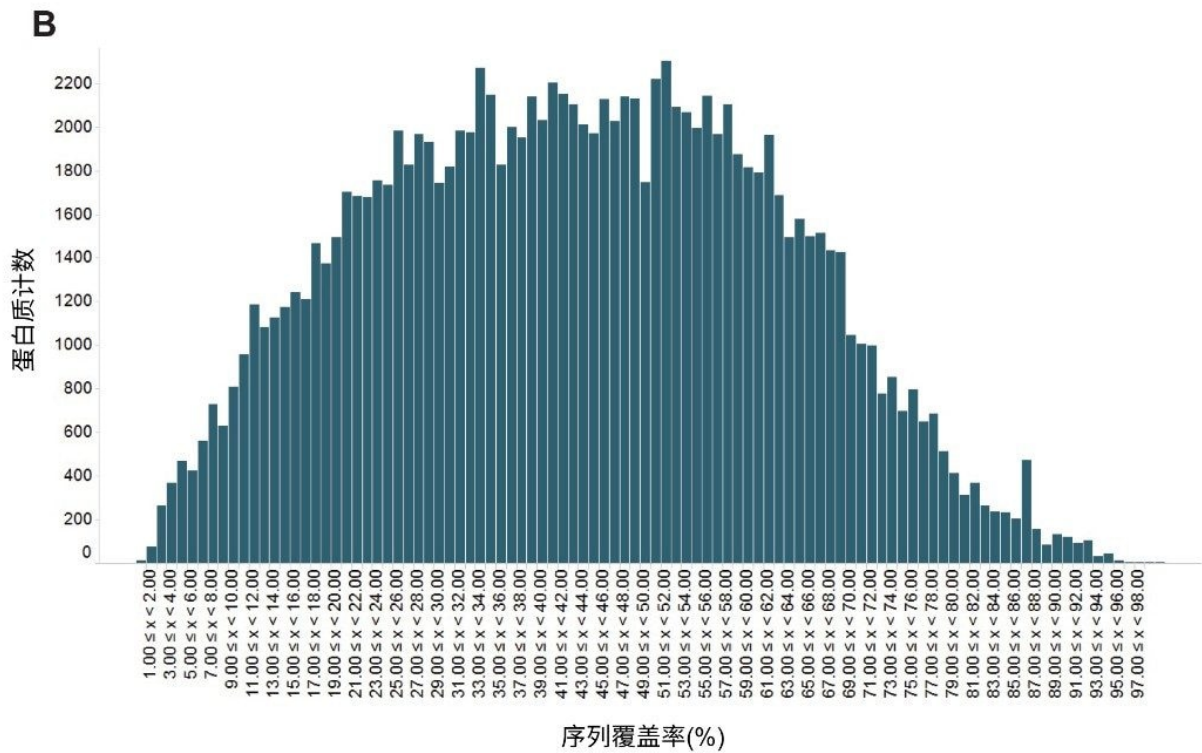
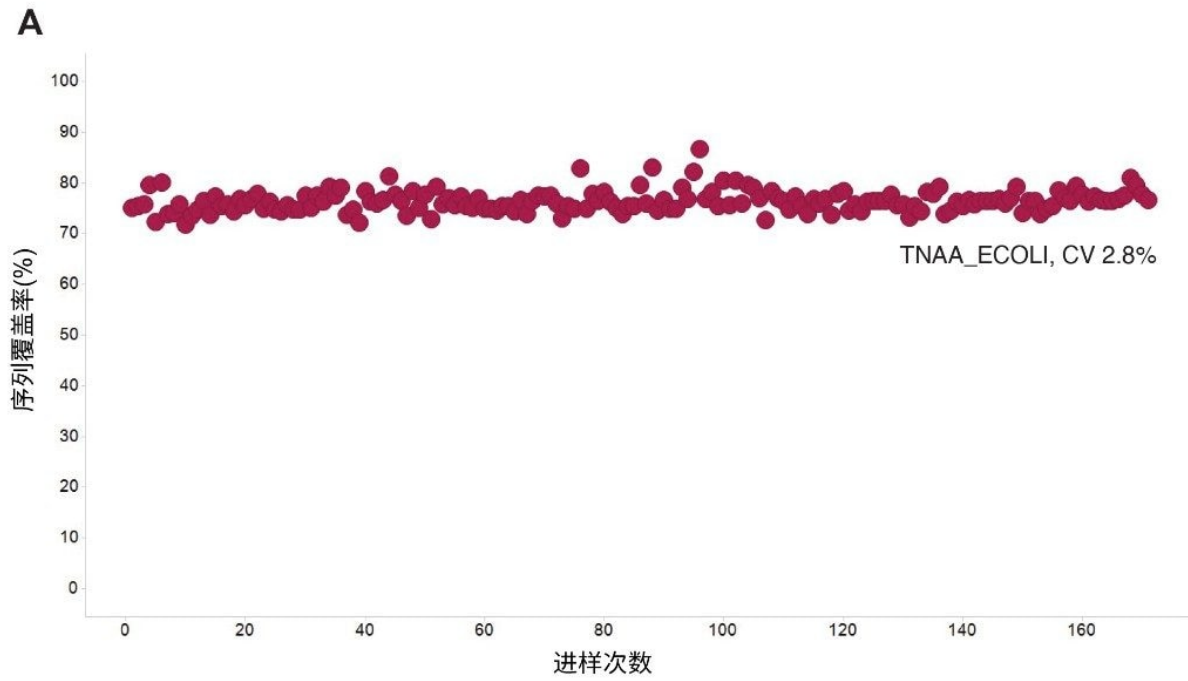


图6.(A)蛋白质色氨酸酶的序列覆盖率重现性。(B)实验中鉴定的所有蛋白质的序列覆盖率分布。

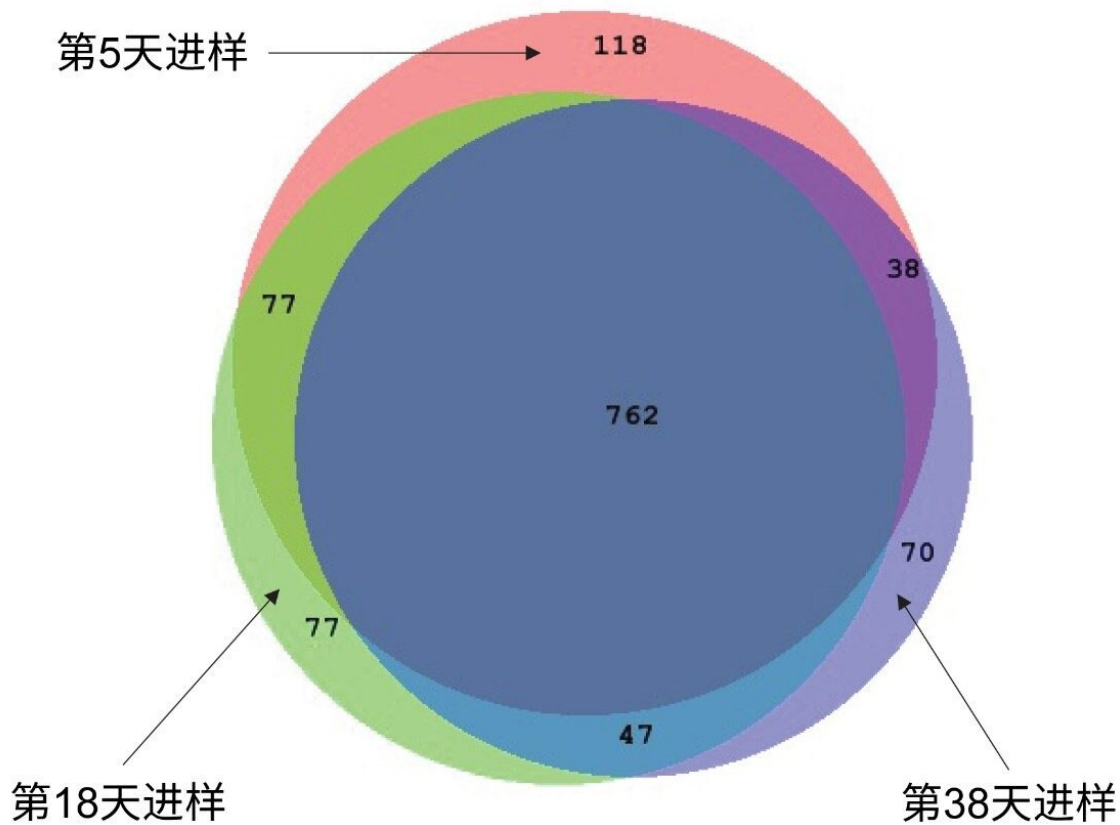


图7.不同实验阶段进样的大肠杆菌蛋白质鉴定结果。

结论

MaxPeak HPS技术能够大幅降低色谱柱硬件材料的吸附作用。分析级色谱的常规特性表明，只要解决了样品限制问题，就可以将其作为高通量分析的一种实验手段。本研究在大规模蛋白质组学实验中使用已经过MaxPeak高性能表面技术处理的LC系统和色谱柱分析注入的QC样品，结果表明该LC-MS配置（配合SYNAPT XS）具有出色的稳定性和重现性。在为期6周的LC-MS研究中，穿插QC分析所得出的数据指标表明，肽段强度和母离子保留时间分析结果具有出色的重现性。此外，研究还表明蛋白质鉴定结果及其序列覆盖率在整个研究期间均得以保持。

参考资料

1. Lennon, S, Hughes, CJ, Muazzam, A, Townsend, PA, Gethings, LA, Wilson, ID, Plumb, RS. High-Throughput Microbore Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography-Ion Mobility-Enabled-Mass Spectrometry-Based Proteomics Methodology for the Exploratory Analysis of Serum Samples from Large Cohort Studies. *J. Proteome Res*, 10.1021/acs.jproteome.0c00821.
2. Mathew DeLano, Thomas H. Walter, Matthew A. Lauber, Martin Gilar, Moon Chul Jung, Jennifer M. Nguyen, Cheryl Boissel, Amit V. Patel, Andrew Bates-Harrison, Kevin D. Wyndham. *Anal. Chem.* 2021, 93, 5773-5781.
3. Distler, U, Kuharev, J, Navarro, P, Levin, Y. Drift Time-Specific Collision Energies Enable Deep-Coverage Data-Independent Acquisition Proteomics. *Nature Methods*, volume 11, pages 167–170 (2014).

特色产品

ACQUITY Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

SYNAPT XS高分辨率质谱仪 <<https://www.waters.com/135020928>>

Progenesis QI软件 <<https://www.waters.com/134790655>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

720007221ZH, 2021年4月

© 2023 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](#)