

超高效液相色谱三重四极杆质谱法和 Skyline 软件联用在靶向蛋白组学上的应用 — MSQC 中 6 种蛋白液质分析定量方法开发

LCMSMS-230

摘要： 本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 与 Skyline 软件联用初步建立 6 种蛋白定量分析方法。通过 Skyline 软件完成 MRM 通道的设计和方法的输出，LabSolutions 基于 Skyline 导出的 MRM 分析方法，进行肽段筛选、碰撞能量优化，最终确认蛋白的特征肽段及其对应的 MRM 离子对。基于以上所建立的方法，本文完成 MS QC 混合物中 6 种蛋白线性关系的考察，以多肽轻链作为线性考察对象，浓度范围分别为 Carbonic Anhydrase I (P00915) 0.2~100 fmol/ μ L、Carbonic Anhydrase II(P00918) 0.2~100 fmol/ μ L、NAD(P)H dehydrogenase (P15559) 0.4~40 fmol/ μ L、C-reactive Protein (P02741) 0.2~40 fmol/ μ L、Peptidyl-Prolyl cis-trans isomerase A (P62937) 0.04~8 fmol/ μ L、Catalase(P04040) 0.04~8 fmol/ μ L。

关键词： 三重四极杆质谱 Skyline 蛋白定量 MSQC MSRT

基于质谱法的蛋白质组学技术在生物标志物的发现以及生物和临床应用的验证和转化中持续发挥越来越重要的作用，为了使定量蛋白质组学应用和临床检验更加紧密结合，岛津公司将其超快速液相色谱 - 质谱联用平台和强大的 Skyline 定量蛋白质组学软件集成一体。根据蛋白质序列和用户自定义，Skyline 软件可以用来设计，改善以及优化选择反应监测 (SRM)/ 多重反应监

测 (MRM)，全扫描质谱和串联质谱定量法。Skyline 软件不仅将结果和方法优化结合起来，也为定量蛋白质组学的研究工作提供了标准化的工作流程。本文基于岛津 LCMS-8060 液质联用系统，通过 Skyline 设计，完成 MRM 通道的优化，最终初步完成 6 种蛋白定量方法的开发。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD \times 2 输液泵，DGU-20A₅ 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8060 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.82 SP1 色谱工作站，Skyline Ver.3.5.0.9319 软件。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Waters BEH Peptide C18 2.0 mm I.D. \times 150 mm L., 1.7 μ m

流动相：A 相 -0.1% 甲酸水溶液
B 相 -0.1% 甲酸乙腈

流速：0.4 mL/min

柱温：40 $^{\circ}$ C

进样量：10 μ L

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 5%，洗脱程序见表 1。

表1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
3.00	Pumps	Pump B Conc.	5
35.00	Pumps	Pump B Conc.	40
37.50	Pumps	Pump B Conc.	95
45.00	Pumps	Pump B Conc.	95
45.50	Pumps	Pump B Conc.	5
50.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器: LCMS-8060

离子化模式: ESI(+)

离子源接口电压: 1.5 kV

加热气: 空气 15.0 L/min

雾化气: 氮气 3.0 L/min

干燥气: 氮气 5.0 L/min

碰撞气: 氩气

源温度: 300°C

DL 温度: 250°C

加热模块温度: 400°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 8~163 ms

延迟时间: 3 ms

MRM 参数: 见表 2

表2 MRM优化参数

蛋白	典型肽段	z (Q1)	前体离子	产物离子	碎片类型	Dwell Time (ms)	CE (V)
Carbonic Anhydrase I (P00915)	GGPFSDSYR _light	2	493.20	627.25*	y5	8.0	-19.2
				436.20	y7	8.0	-17.2
				774.35	y6	8.0	-21.2
	GGPFSDSYR _heavy	2	498.25	637.30	y5	8.0	-19.2
				441.20	y7	8.0	-17.2
				784.35	y6	8.0	-21.2
	VLDALQAIK _light	2	485.80	758.45*	y7	20.0	-16.9
				643.40	y6	20.0	-18.9
				871.50	y8	20.0	-16.9
	VLDALQAIK _heavy	2	489.80	766.45	y7	20.0	-16.9
				651.45	y6	20.0	-18.9
				879.55	y8	20.0	-16.9
Carbonic	AVQQPDGLAVLGIFLK _light	2	835.00	1242.75*	y12	38.0	-26.9
				860.55	y8	38.0	-28.9
				1030.65	y10	38.0	-32.9
	AVQQPDGLAVLGIFLK _heavy	2	839.00	1250.75	y12	38.0	-26.9
				868.55	y8	38.0	-28.9
				625.90	y12	38.0	-26.9

Anhydrase II (P00918)	SADFTNFDPR _light	2	585.25	749.35*	y6	17.0	-20.9
				648.30	y5	17.0	-18.9
				896.45	y7	17.0	-20.9
	SADFTNFDPR _heavy	2	590.25	759.35	y6	24.0	-20.9
				1021.45	y8	24.0	-18.9
				906.45	y7	24.0	-20.9
NDD(P)H Dehydrogenase (P15559)	EGHLSPDIVAEQK _light	3	474.90	475.25*	y4	24.0	-14.7
				574.30	y5	24.0	-14.7
	EGHLSPDIVAEQK _heavy	3	477.60	483.25	y4	24.0	-14.7
				582.35	y5	24.0	-14.7
	ALIVLAHSER _heavy	2	554.85	994.55	y9	24.0	-26.0
				599.30*	y5	10.0	-25.7
712.35				y6	10.0	-21.7	
811.45				y7	10.0	-23.7	
ALIVLAHSER _light	2	559.85	609.30	y5	10.0	-25.7	
			722.40	y6	10.0	-21.7	
			821.45	y7	10.0	-23.7	
			696.40*	y6	8.0	-22.1	
C-reactive Protein (P02741)	ESDTSYVSLK _light	2	564.75	609.35	y5	8.0	-20.1
				797.45	y7	8.0	-22.1
				704.40	y6	8.0	-22.1
	ESDTSYVSLK _heavy	2	568.80	617.35	y5	8.0	-20.1
				716.35*	y6	12.0	-20.2
				569.30	y5	12.0	-14.2
GYSIFS YATK _light	2	568.80	916.50	y8	12.0	-20.2	
			724.40	y6	12.0	-20.2	
			724.40	y6	12.0	-20.2	
			924.50	y8	12.0	-20.2	
GYSIFS YATK _heavy	2	572.80	837.45	y7	12.0	-18.2	
			878.45*	y7	28.0	-20.6	
			634.40	y5	28.0	-22.6	
			886.50	y7	28.0	-20.6	
Peptidyl-prolyl Cis-trans Isomerase A (P62937)	FEDENFILK_heavy	2	581.80	642.40	y5	28.0	-22.6
				869.45*	y7	24.0	-16.6
VSFELFADK _light	2	528.25	593.35	y5	24.0	-20.6	
			722.35	y6	24.0	-18.6	
			877.45	y7	24.0	-16.6	
			601.35	y5	24.0	-20.6	
VSFELFADK _heavy	2	532.30	964.50	y8	24.0	-18.6	

				565.25*	y4	80.0	-12.3
	TAENFR_light	2	369.20	636.30	y5	80.0	-16.3
				436.25	y3	80.0	-18.3
	TAENFR_heavy	2	374.20	575.30	y4	80.0	-12.3
				646.30	y5	80.0	-16.3
	GAGAFGYFEVTHDITK_light	2	571.60	792.90*	y14	12.0	-16.3
				728.85	y12	12.0	-16.3
				655.30	y11	12.0	-16.3
	GAGAFGYFEVTHDITK_heavy	2	574.30	796.90	y14	12.0	-16.3
				732.85	y12	12.0	-16.3
				659.35	y11	12.0	-16.3
Catalase (P04040)	VFEHIGK_light	2	415.25	730.40*	y6	163	-18.1
				583.30	y5	163	-14.1
				454.30	y4	163	-18.1
	DLFNAIATGK_light	2	525.30	821.45*	y8	28	-18.5
				674.40	y7	28	-16.5

注：*表示定量离子

1.3 标准品溶液的配制

标准物质：Sigma MS Qual/Quant QC Mix 标准品，Sigma MS RT Calibration Mix 冻干粉末。

溶液配制过程：10000×g 离心速度 1min，加入 10 μL 20% 乙腈（含 1.0% 甲酸），剧烈震荡 1 min，10000×g 离心速度 1 min，加入 90 μL 20% 乙腈（含 0.1% 甲酸），分别配制成 MSQC 和 MSRT 的储备液。采用 20% 乙腈（含 0.1% 甲酸）进一步稀释，配制系列标准溶液。

结果与讨论

2.1 蛋白特征肽段的筛选

根据软件设定导出 6 种蛋白中预测肽段及其重链对应的 MRM 方法，在 LabSolutions 软件中构建蛋白肽段筛选的 LCMSMS 方法，过程见图 1，并且对样品进行分析，分析结果见图 2，所得结果导入 Skyline 软件，如图 3 所示。逐一查看检测出的色谱峰，并且对未检出的肽段信息进行删除。所筛选出的肽段及 MRM 列表内容保存为新的 Skyline 文件。

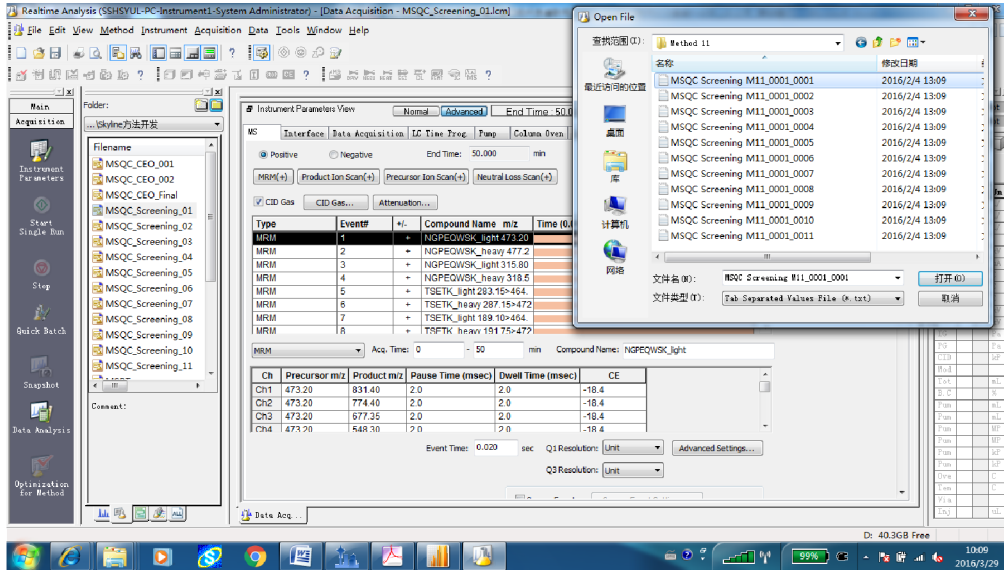


图1 利用Skyline导出的离子对列表信息构建LCMSMS肽段筛选方法

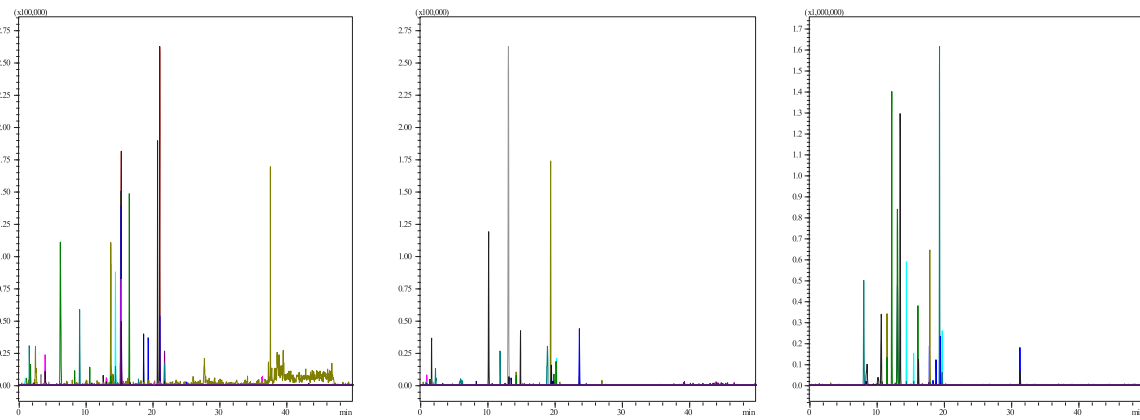


图2 肽段筛选获得的MRM色谱图

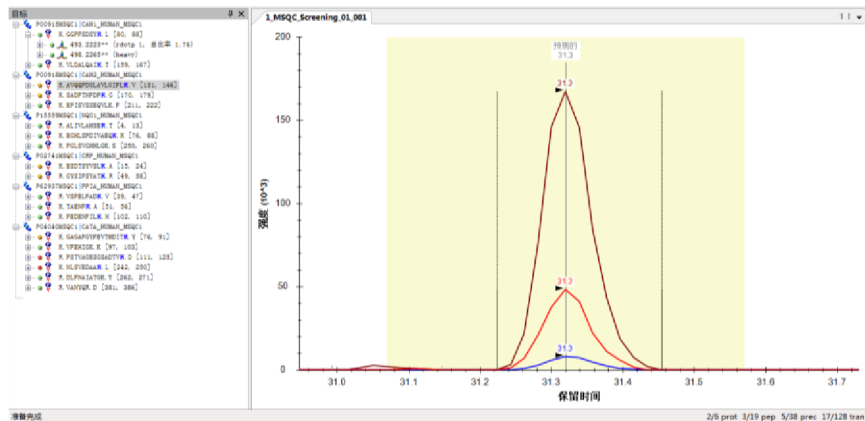


图3 筛选结果导入Skyline文件后的检出肽段确认

2.2 保留时间预测

利用 Skyline 软件构建相应的蛋白肽段及其相应的 MRM 通道。将 MSRT 混合肽段加入到蛋白酶解的混合肽段中，利用 1.2 的分析条件进行分析，获得色谱图如图 4 所示。利用 13 种肽段的保留时间建立保留时间预测公式，如图 5。结合所建立的保留时间预测公式对 MSQC 样品中 6 种蛋白所筛选出的肽段进行保留时间预测，使用“预定”模式导出碰撞能量优化方法。

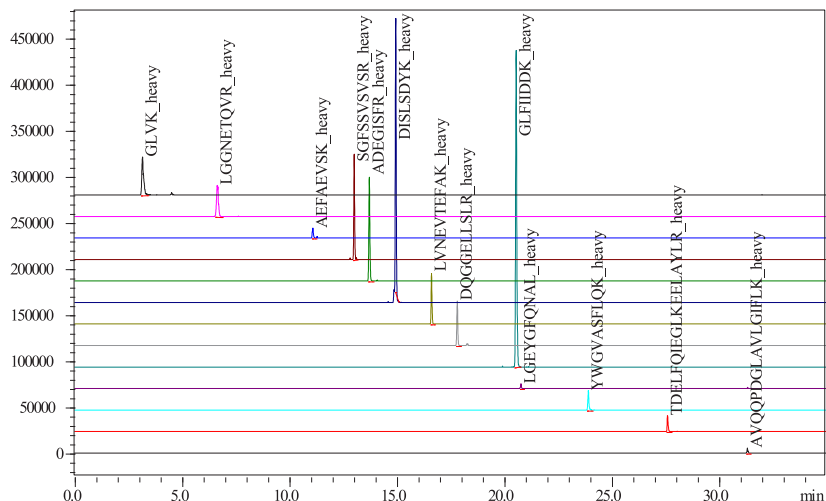


图4 1.2液质分析条件分析MSRT混合肽段的典型MRM色谱图

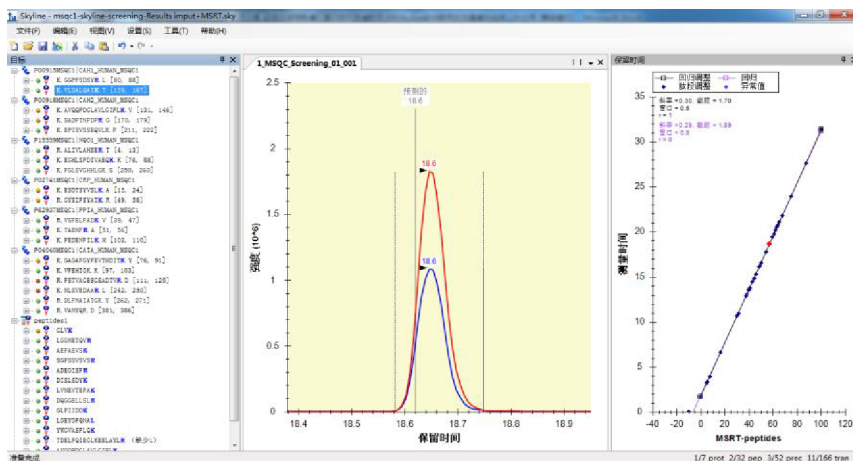


图5 根据MSRT中肽段保留时间所建立的保留时间预测器

2.3 碰撞能量优化

Skyline 软件采用“预定模式”、“碰撞能量优化”导出 MRM 列表，基于之前的液相分离条件，同步对 15 个肽段 MRM 通道进行碰撞能量优化，LCMS-8060 能够实现 Dwell time 最小 0.8 ms，Pause time 最小 1.0 ms 的设置，极大地提高了 MRM 通道的单次分析通量，使用一次进样即可同步完成 720 个通道的分析，对 6 种蛋白筛选出的候选多肽进行碰撞能量优化，结果见图 6。

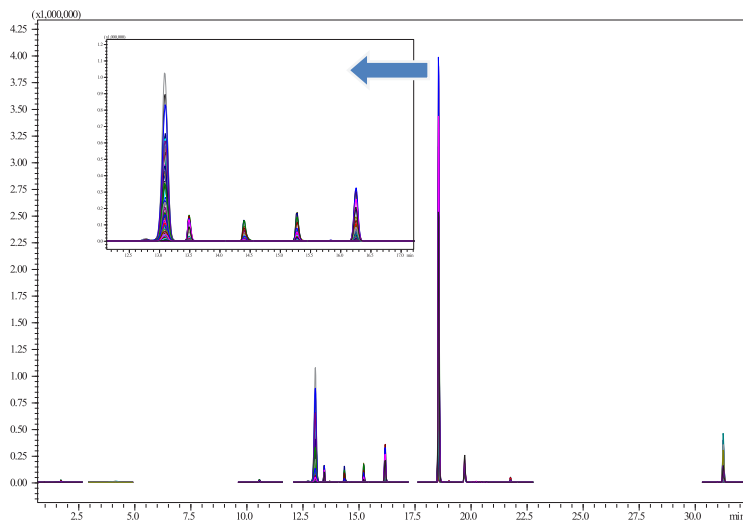


图6 碰撞能量优化的MRM色谱图

将 LabSolutions 的分析结果导入 Skyline 软件，对碰撞能量优化结果进行确认后，见图 7，最终导出含有最佳碰撞能量值的 MRM 列表。

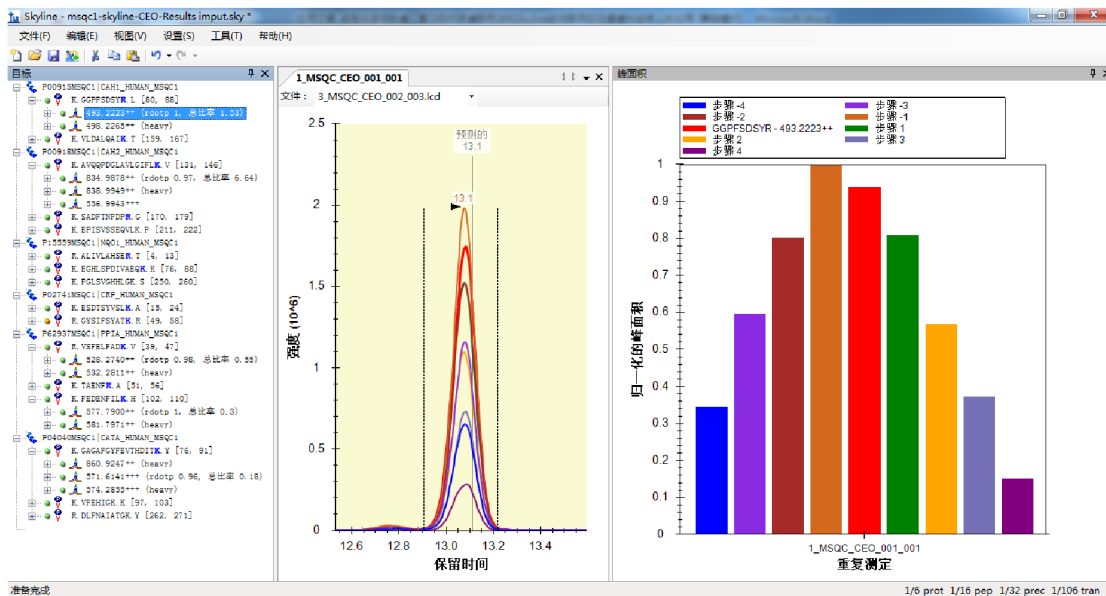
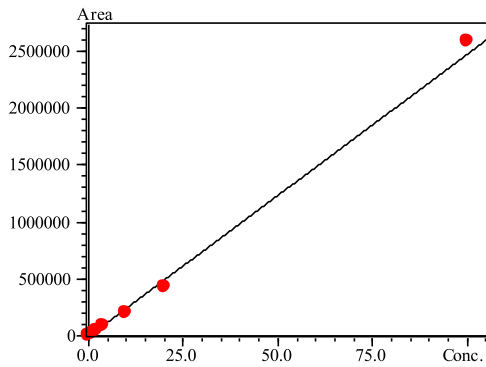


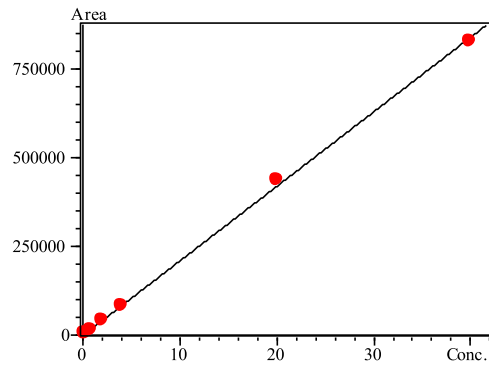
图7 Skyline软件进行碰撞能量优化结果查看

2.4 线性关系考察

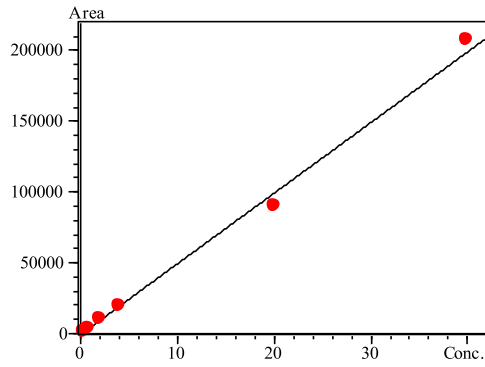
利用 Skyline 软件导出的含最佳碰撞能量的 MRM 列表，构建 LC-MS/MS 方法，并且利用 6 个目标蛋白的特征肽段对其进行定量分析，本文采用特征肽段轻链进行定量，典型色谱图见图 8。以多肽轻链作为线性考察对象，浓度范围分别为 Carbonic Anhydrase I (P00915) 0.2~100 fmol/ μ L、Carbonic Anhydrase II(P00918)0.2~100 fmol/ μ L、NAD(P)H dehydrogenase (P15559) 0.4~40 fmol/ μ L、C-reactive Protein (P02741) 0.2~40 fmol/ μ L、Peptidyl-Prolyl cis-trans isomerase A (P62937) 0.04~8 fmol/ μ L、Catalase(P04040) 0.04~8 fmol/ μ L。



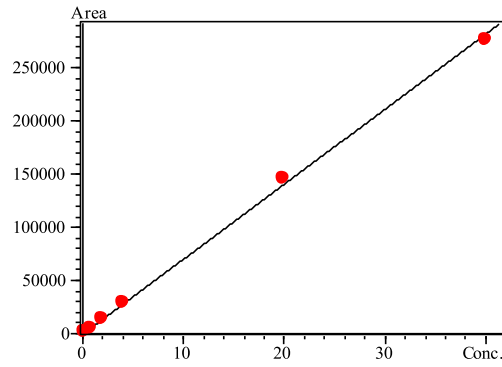
EPISVSSEQVLK_light (658.35>790.45)



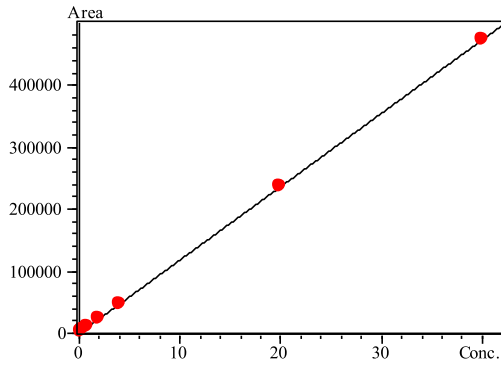
EGHLSPDIVAEQK_light (474.90>475.25)



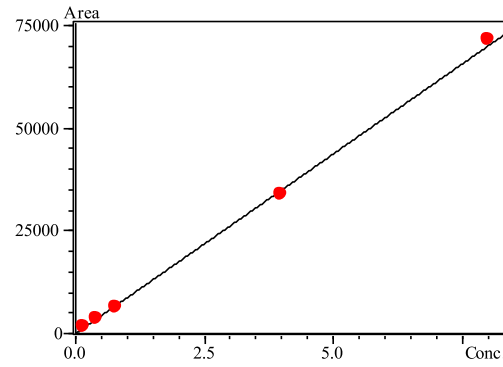
ALIVLAHSER_light (554.85>599.30)



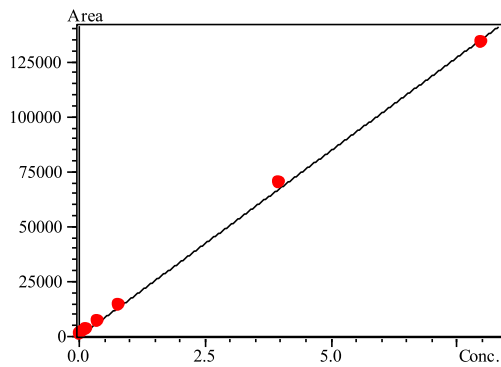
ESDTSYVSLK_light (564.75>696.40)



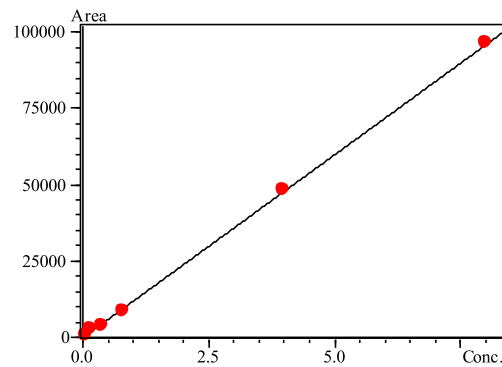
GYSIFSYATK_light (568.80>716.35)



VSFELFADK_light (528.25>593.35)



TAENFR_light (369.20>565.25)



FEDENFILK_light (577.80>878.45)

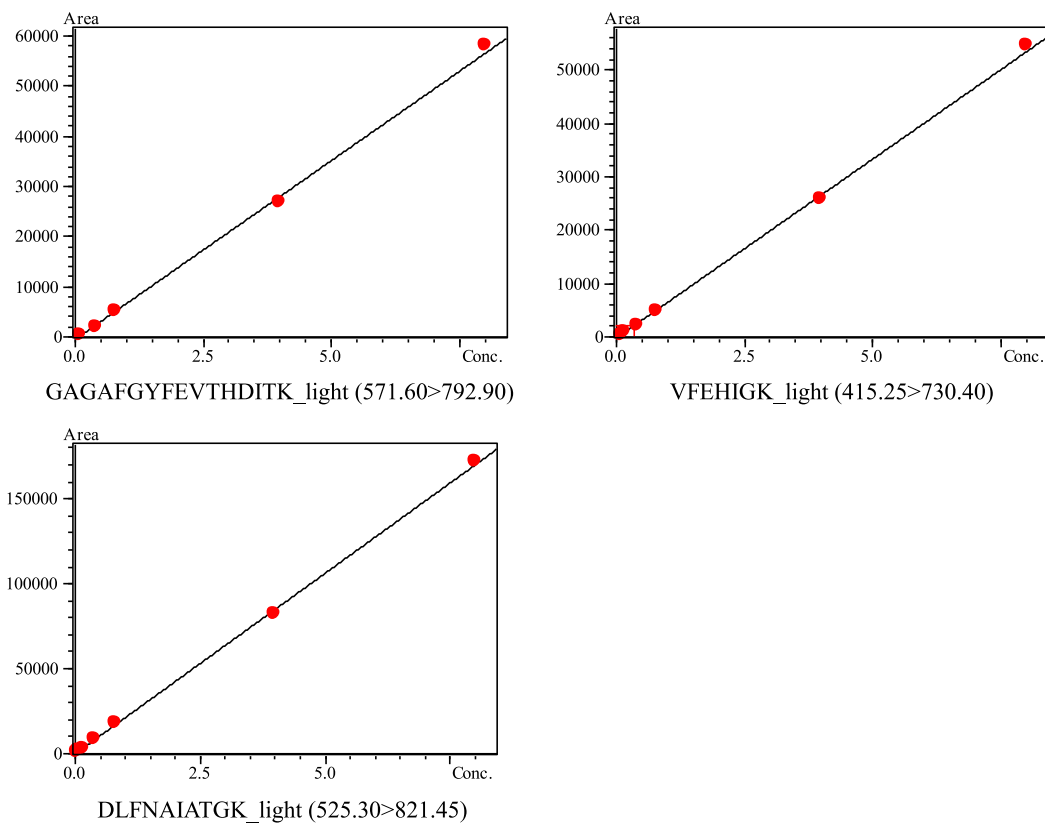


图9 6种目标蛋白的不同特征肽段对应的标准曲线

表3 6种目标蛋白的不同特征肽段对应标准曲线的线性方程和相关系数

蛋白名称	定量肽段信息	校准曲线	线性范围 (fmol/ μ L)	相关系数r	准确度(%)
Carbonic Anhydrase I	GGPFSDSYR_light	$Y = (11857.0)X + (-1495.62)$	0.2~100	0.9990	93.6~109.9
	VLDALQAIK_light	$Y = (114531)X + (-14091.7)$	0.2~100	0.9994	95.1~110.9
Carbonic Anhydrase II	AVQQPDGLAVLGIFLK_light	$Y = (3077.76)X + (-372.869)$	0.2~100	0.9982	91.4~112.2
	SADFTNFDPR_light	$Y = (5413.31)X + (-341.523)$	0.2~100	0.9992	89.8~112.1
	EPISVSSEQVLK_light	$Y = (24760.9)X + (-3734.86)$	0.2~100	0.9963	90.6~115.0
NAD(P)H dehydrogenase	ALIVLAHSER_light	$Y = (4989.59)X + (-544.819)$	0.4~40	0.9978	91.2~104.9
	EGHLSPDIVAEQK_light	$Y = (21038.8)X + (-1280.71)$	0.2~40	0.9995	85.6~108.8
C-reactive Protein	ESDTSYVSLK_light	$Y = (7065.28)X + (-532.929)$	0.2~40	0.9996	95.8~104.6
	GYSIFSYATK_light	$Y = (11836.0)X + (-72.8917)$	0.2~40	0.9998	99.2~102.0
Peptidyl-prolyl Cis-trans Isomerase A	VSFELFADK_light	$Y = (8757.32)X + (-33.0845)$	0.2~8	0.9989	89.0~107.0
	TAENFR_light	$Y = (16941.4)X + (-50.8496)$	0.04~8	0.9997	88.2~105.5
	FEDENFILK_light	$Y = (12000.7)X + (-171.480)$	0.08~8	0.9972	93.0~104.9
Catalase	GAGAFGYFEVTHDITK_light	$Y = (7124.60)X + (-472.129)$	0.08~8	0.9988	85.2~108.8
	VFEHIGK_light	$Y = (6701.47)X + (-207.610)$	0.08~8	0.9990	86.3~108.5
	DLFNAIATGK_light	$Y = (21260.0)X + (-25.4671)$	0.04~8	0.9990	89.1~105.9

■ 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 系统与 Skyline 软件联用初步建立了 6 种蛋白定量分析方法。通过 LabSolutions 软件与 Skyline 软件的配合，完成蛋白特征肽段 MRM 分析方法的预测及筛选，碰撞能量的预测和筛选，最终根据筛选出的结果，每种蛋白利用所优化的 2~3 个特征肽段及其对应的 3 对 MRM 离子对进行定量分析，完成线性关系的考察，以多肽轻链作为线性考察对象，浓度范围分别为 Carbonic Anhydrase I (P00915) 0.2~100 fmol/ μ L、Carbonic Anhydrase II(P00918) 0.2~100 fmol/ μ L、NAD(P)H dehydrogenase (P15559) 0.4~40 fmol/ μ L、C-reactive Protein (P02741) 0.2~40 fmol/ μ L、Peptidyl-Prolyl cis-trans isomerase A (P62937) 0.04~8 fmol/ μ L、Catalase(P04040) 0.04~8 fmol/ μ L。待实际生物基质分析时再进一步对所筛选多肽的选择性和灵敏度进行考察。