

## Ti-SBA-15 介孔材料用于磷酸化肽的高效富集

张宇, 秦洪强, 吴仁安, 邹汉法\*

(中国科学院大连化学物理研究所, 中国科学院分离分析化学重点实验室, 辽宁大连 116023)

**摘要** 结合基质辅助激光解吸飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)检测技术,考察了Ti-SBA-15介孔材料对 $\beta$ -酪蛋白酶解产物中磷酸化肽的选择性富集性能。实验结果显示,含Ti和Si物质的量比为0.08的Ti-SBA-15介孔材料可选择性地对 $\beta$ -酪蛋白酶解产物中的磷酸化肽进行选择富集;对于 $\beta$ -酪蛋白和牛血清白蛋白物质的量比为1:100的蛋白质酶解混合液,Ti-SBA-15仍能实现对其磷酸化肽的有效富集。上述结果表明,作为一种多孔、高比表面积的磷酸化多肽的选择性吸附材料,Ti-SBA-15有望在磷酸化蛋白质组的分析中得到广泛的应用。

**关键词** Ti-SBA-15介孔材料;磷酸化肽;选择性富集;基质辅助激光解吸飞行时间质谱

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2010)02-0123-05

## Applications of Ti-SBA-15 mesoporous material in high performance enrichment of phosphopeptides

ZHANG Yu, QIN Hongqiang, WU Ren'an, ZOU Hanfa\*

(Dalian Institute of Chemical Physics, Key Laboratory of Separation Science for Analytical Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

**Abstract**: A titanium-incorporated SBA-15 mesoporous material (Ti-SBA-15) was synthesized via the co-condensation of tetraethyl orthosilicate (TEOS) and tetrabutyl titanate using surfactant P123 as the template. Due to the existence of Ti in the framework of SBA-15, the synthesized Ti-SBA-15 was applied as the selective adsorbent of phosphopeptides from the complex tryptic digest of  $\beta$ -casein. The matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) analysis showed that the phosphopeptides of  $\beta$ -casein digest could be selectively enriched by the Ti-SBA-15 with Ti/Si molar ratio of 0.08, even under the interference of bovine serum albumin (BSA) with the molar ratio of  $\beta$ -casein to BSA up to 1:100. It can be concluded that the Ti-SBA-15 showed the specific adsorption toward the phosphorylated peptides, which provides great potential in the specific capture of phosphopeptides.

**Key words**: titanium-incorporated SBA-15 mesoporous material (Ti-SBA-15); phosphopeptides; selective enrichment; matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)

蛋白质的磷酸化过程是指蛋白质在激酶的作用下将三磷酸腺苷(ATP)或三磷酸鸟苷(GTP)上的磷酸基团转移到底物蛋白质上的过程,是生物体内一种非常重要的蛋白质翻译后修饰方式<sup>[1-5]</sup>,也是蛋白质组学研究的热点之一。目前,蛋白质组学研究的主要技术手段是基于蛋白质酶解技术的多肽离子质谱检测方法。然而,由于非磷酸化多肽对磷酸化多肽质谱离子化的抑制作用以及磷酸化蛋白质

的含量相对较低,使得对磷酸化蛋白质的检测较为困难<sup>[6]</sup>。因此,发展基于新型吸附材料的磷酸化肽的选择性富集方法,避免蛋白质酶解产物中大量非磷酸化肽对磷酸化肽鉴定的干扰,对于实现规模化磷酸化蛋白质组的分析具有重要意义。

利用金属氧化物(TiO<sub>2</sub>和ZrO<sub>2</sub>)或固定化金属亲和色谱(IMAC)材料对磷酸化肽进行选择富集的研究已见报道<sup>[7-11]</sup>,然而,这些材料有限的比表

\* 通讯联系人: 邹汉法, 研究员, 博士生导师。Tel: (0411) 84399610, E-mail: hanfazou@dicp.ac.cn.

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 20735004).

收稿日期: 2009-09-10

面积在一定程度上限制了其在磷酸化多肽富集中的应用。介孔材料由于具有巨大的比表面积和 2 ~ 50 nm 的中孔结构,已被广泛地用作催化剂和吸附载体。前期研究也表明,利用介孔材料(MCM-41)的高比表面积,在其介孔表面引入  $Ti^{4+}$  或  $Zr^{4+}$  等金属离子可实现磷酸化肽的有效富集和选择性富集<sup>[12]</sup>。由于介孔材料在合成过程中可直接加入含 Ti 或 Zr 的无机单体,因而可一步合成出 Ti 或 Zr 均匀分布在硅骨架中的介孔材料。目前,此类金属介孔材料对磷酸化肽的选择性富集研究尚未见报道。本文系统地考察了内含 Ti 金属的介孔材料 Ti-SBA-15 对磷酸化肽的选择性富集作用。经基质辅助激光解吸飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)检测证明,Ti-SBA-15 不仅合成简单,而且具有很好的对磷酸化肽的选择性分离富集性能。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

仪器:Autoflex MALDI-TOF MS 购自德国 Bruker Daltonics 公司。

试剂:聚氧乙烯-聚氧丙烯-聚氧乙烯三嵌段共聚物(P123,  $EO_{20}PO_{70}EO_{20}$ )购自德国 BASF 公司;醋酸(HAc)、醋酸钠(NaAc)、硅酸钠和四乙氧基硅烷(TEOS)购自中国医药集团上海化学试剂公司;钛酸正丁酯( $Ti(O-n-Bu)_4$ )购自 Alfa-Aesar 公司;乙酰丙酮购自中国医药集团上海化学试剂公司;牛  $\beta$ -酪蛋白( $\beta$ -casein)、牛胰蛋白酶(trypsin)、牛血清白蛋白(BSA)和 2,5-二羟基苯甲酸(2,5-DHB)均购自美国 Sigma-Aldrich 公司;尿素、碳酸氢铵、二硫苏糖醇(DTT)和碘代乙酰胺(IAA)购自美国 Bio-Rad 公司;乙腈(ACN)和三氟乙酸(TFA)购自德国 Merck 公司。实验用水由美国 Millipore 公司 Milli-Q 超纯水系统制备。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 Ti-SBA-15 的合成<sup>[13]</sup>

在 10 mL 的小瓶中加入 8.53 g (3 mmol)  $Ti(O-n-Bu)_4$  和 3.06 g (3 mmol) 乙酰丙酮,在室温条件下搅拌成均一的黄色溶液,即得钛前驱体  $Ti(O-n-Bu)_3(acac)$ 。称取 1.00 g P123 表面活性剂和 1.69 g 乙醇于 28 mL HAc-NaAc 缓冲溶液(0.52 mol/L HAc, 0.27 mol/L NaAc, pH 4.4)中,在室温条件下搅拌至溶液澄清。然后在剧烈搅拌下,将 2 mL 硅酸钠溶液(200 mg/L  $SiO_2$ (Si 的物质的量为 8.50 mmol), 60 mg/L  $Na_2O$ )加至上述表面活性剂溶液中。将表面活性剂溶液在室温条件下继续搅

拌 10 min 后,加入含有 8.50 mmol TEOS 和一定量  $Ti(O-n-Bu)_3(acac)$  的乙醇溶液 1.69 g。立即将此得到的溶液移入 40 °C 油浴中,继续搅拌 24 h。然后将得到的固液相混合物装入高压釜中,放入 100 °C 烘箱中静置晶化 24 h。待冷却至室温后过滤,将所得固体在 100 °C 烘箱中干燥 3 h,然后在 550 °C 的静态空气中灼烧 10 h 脱除 P123 模板剂。最后得到的样品即为 Ti-SBA-15(*n*),其中 *n* 为 Ti-SBA-15 中钛(前驱体中的钛)和硅的物质的量比。

#### 1.2.2 Ti-SBA-15 孵育液的配制

称取 10 mg 合成的 Ti-SBA-15,并加入 1 mL 含 50% (体积分数,以下不做注明的均同此)ACN 和 6% TFA 的混合溶液。振荡 10 min 后,在 10 500 r/min (13 500 g)的速率下离心 10 min,移除上清液。再加入 1 mL 含 50% ACN 和 6% TFA 的混合溶液配成 10 mg/L 孵育液,振荡混匀后备用。

#### 1.2.3 蛋白质酶解

称取一定量的  $\beta$ -酪蛋白(或 BSA),溶解于含 8 mol/L 尿素的 100 mmol/L 的碳酸氢铵缓冲液(pH 8.3)中;蛋白质的最终浓度为 10  $\mu$ mol/L。取 1 mL 蛋白质溶液,加入 10  $\mu$ L 1 mol/L DTT 后在 37 °C 水浴中加热 2.5 h。然后加入 50  $\mu$ mol 的 IAA,在暗处于室温下静置 0.5 h。随后,将该蛋白质溶液用 100 mmol/L 的碳酸氢铵缓冲液稀释 4 倍,按  $m(\beta$ -酪蛋白或 BSA): $m$ (胰蛋白酶)=25:1 的比例加入胰蛋白酶。在 37 °C 下酶解 16 h 后,加入 0.5% 甲酸终止反应。分装后,在 -30 °C 条件下冻存储用。

#### 1.2.4 磷酸化肽的富集

将  $\beta$ -酪蛋白(或 BSA)的酶解产物用含 50% ACN 和 6% TFA 的混合溶液稀释至 1 pmol/ $\mu$ L 后取 1  $\mu$ L 加至 50  $\mu$ L 的 Ti-SBA-15 溶液中。振荡 30 min 后,以 10 500 r/min (13 500 g)的速率离心 10 min,移去上清液。向底部沉淀物中加入 150  $\mu$ L 含 50% ACN 和 6% TFA 的 500 mmol/L NaCl 溶液,振荡 5 min 后,以 10 500 r/min (13 500 g)的速率离心 10 min,移去上清液。向底部沉淀物中再加入 150  $\mu$ L 含 50% ACN 和 0.1% TFA 的混合液,振荡 5 min 后,再以 10 500 r/min (13 500 g)的速率离心 10 min,移去上清液。最后,将底部沉淀物用 25  $\mu$ L 10% 氨水超声洗涤 10 min,再以 10 500 r/min (13 500 g)的速率离心 10 min 后,收集上清液至离心管中,冻干后保存。

#### 1.2.5 MALDI-TOF MS 检测

在上述离心管中加入 5  $\mu$ L 质量浓度为 10 ~ 50 mg/mL 的 2,5-DHB 溶液(含 1% 磷酸)。取该溶液

0.5  $\mu\text{L}$  沉积于 384 孔点的抛光不锈钢 MALDI 靶上,形成共结晶。MALDI-TOF MS 分析时采用氮气激光波长为 337 nm,加速电压范围为  $\pm 20$  kV,于正离子线性模式下检测。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同 Ti/Si 比的 Ti-SBA-15 对磷酸化肽选择性富集的影响

Ti-SBA-15 中 Ti 和 Si 的物质的量比(以下称 Ti/Si 比)是影响该介孔材料对磷酸化肽选择性富集能力的重要参数之一。在实验中采用 Ti/Si 比分别为 0, 0.01 和 0.08 的 Ti-SBA-15 介孔材料进行考察。根据文献报道, $\beta$ -酪蛋白的胰蛋白酶解产物中 3 个常见的磷酸化肽段分别是  $m/z$  2 061( $\beta_1$ )、 $m/z$

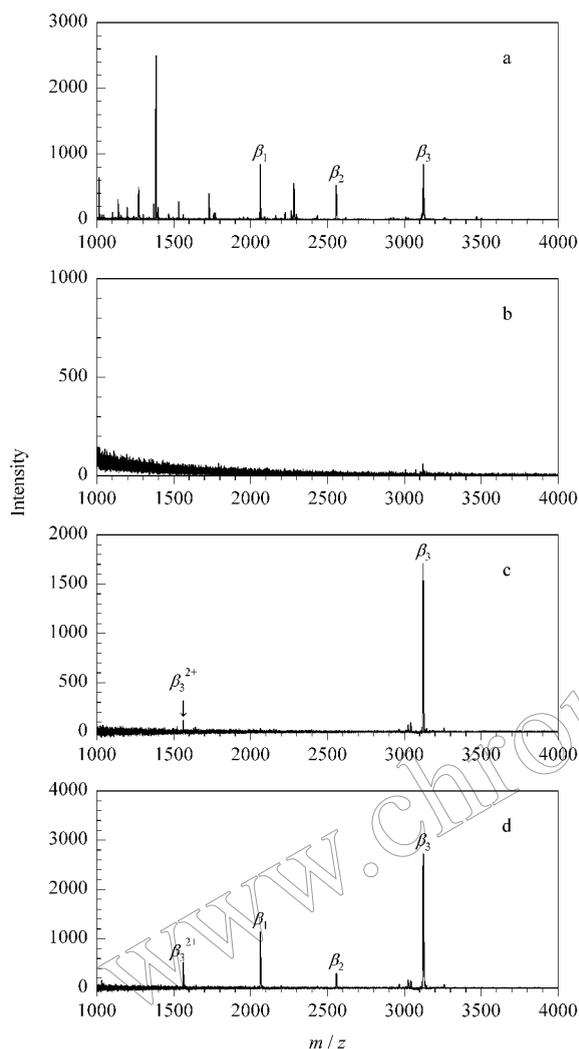


图 1  $\beta$ -酪蛋白酶解产物( a )未经任何富集和经 Ti/Si 比分别为( b )0, ( c )0.01 和( d )0.08 的 Ti-SBA-15 富集后的 MALDI-TOF MS 谱图( 孵育液用量为 50  $\mu\text{L}$  )

Fig. 1 MALDI-TOF MS spectra of  $\beta$ -casein digests ( a ) without and with enrichment by Ti-SBA-15 with Ti/Si molar ratio of ( b ) 0, ( c ) 0.01 and ( d ) 0.08 ( incubation solution, 50  $\mu\text{L}$  )

2 556( $\beta_2$ )和  $m/z$  3 122( $\beta_3$ ),其中  $\beta_1$  和  $\beta_2$  分别有一个磷酸化位点,  $\beta_3$  有 4 个磷酸化位点<sup>[12]</sup>。从图 1a 可以看出,在未经富集的  $\beta$ -酪蛋白酶解产物中存在大量的非磷酸化肽的峰。当采用 Ti/Si 比为 0 的 Ti-SBA-15 介孔材料富集  $\beta$ -酪蛋白酶解产物时,图 1b 中既无磷酸化肽的峰,也无非磷酸化肽的峰。这说明在样品处理过程中,没有发生肽段的非特异性吸附。当采用 Ti/Si 比为 0.01 的介孔材料进行富集时,在  $\beta$ -酪蛋白酶解液中只检出  $\beta_3$  和  $\beta_3^{2+}$  的峰(见图 1c)。当 Ti/Si 比增加到 0.08 时,可检出  $\beta$ -酪蛋白酶解液中全部 3 个磷酸化肽的峰(见图 1d)。这说明 Ti-SBA-15 骨架中的 Ti 对磷酸化肽的选择性富集起到决定性作用,且对多磷酸化肽的富集效果更佳。在以下实验中,均采用 Ti/Si 比为 0.08 的介孔材料。

### 2.2 孵育液用量对磷酸化肽选择性富集的影响

采用含 Ti/Si 比为 0.08 的 Ti-SBA-15 介孔材料的孵育液,考察了孵育液用量对  $\beta$ -酪蛋白的酶解产物中磷酸化肽富集效果的影响。从图 2 可看出,将

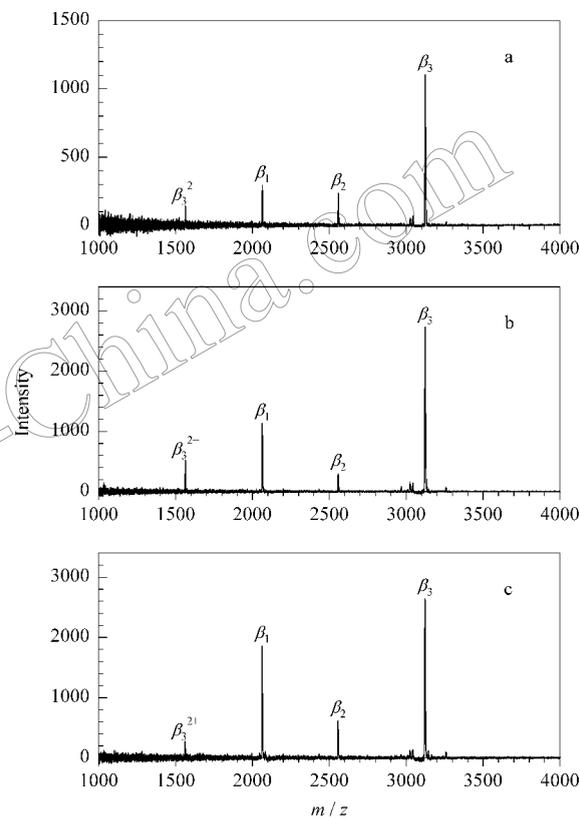


图 2 孵育液用量不同时 Ti-SBA-15( Ti/Si 比为 0.08 )富集  $\beta$ -酪蛋白酶解产物中磷酸化肽的 MALDI-TOF MS 谱图

Fig. 2 MALDI-TOF MS spectra of phosphopeptides from  $\beta$ -casein digests enriched by Ti-SBA-15 ( Ti/Si molar ratio of 0.08 ) with different volumes of the incubation solution

Incubation solution volumes : a. 25  $\mu\text{L}$  ; b. 50  $\mu\text{L}$  ; c. 100  $\mu\text{L}$ .

孵育液用量从 25  $\mu\text{L}$  增加到 50  $\mu\text{L}$   $\beta$ -酪蛋白酶解产物中富集到的 3 个磷酸化肽的峰强度有所增加 ;但是将孵育液用量继续增加到 100  $\mu\text{L}$  时 ,磷酸化肽的峰强度没有太大变化。这说明利用 Ti-SBA-15 介孔材料富集时 ,用 50  $\mu\text{L}$  的孵育液可以完全富集  $\beta$ -酪蛋白酶解产物中的磷酸化肽。

### 2.3 应用 Ti-SBA-15 富集检测蛋白质酶解产物中磷酸化肽的最低检出限

进一步考察 Ti-SBA-15 介孔材料( Ti/Si 比为 0.08 )对 500 ,100 和 10  $\text{fmol}/\mu\text{L}$  的  $\beta$ -酪蛋白酶解产物中磷酸化肽的富集能力。如图 3 所示 ,MALDI-TOF MS 可以检测出 100  $\text{fmol}/\mu\text{L}$   $\beta$ -酪蛋白酶解产物中的 3 个磷酸化肽 ;当  $\beta$ -酪蛋白浓度降低至 10

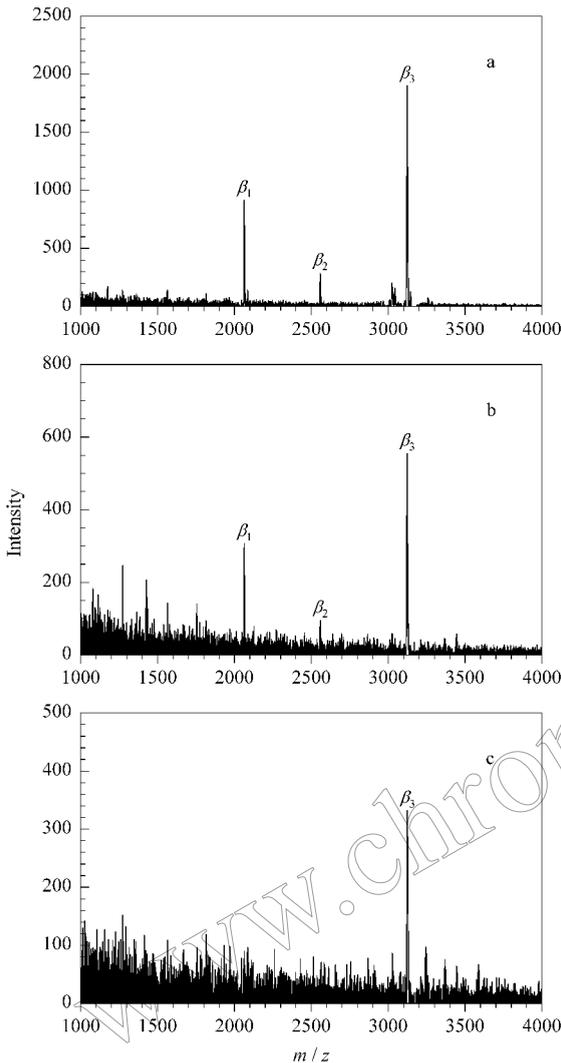


图 3 Ti-SBA-15( Ti/Si 比为 0.08 )富集( a ) 500  $\text{fmol}/\mu\text{L}$ 、( b ) 100  $\text{fmol}/\mu\text{L}$  和( c ) 10  $\text{fmol}/\mu\text{L}$   $\beta$ -酪蛋白酶解产物中磷酸化肽的 MALDI-TOF MS 谱图

Fig. 3 MALDI-TOF MS spectra of phosphopeptides enriched from ( a ) 500  $\text{fmol}/\mu\text{L}$  , ( b ) 100  $\text{fmol}/\mu\text{L}$  and ( c ) 10  $\text{fmol}/\mu\text{L}$  of  $\beta$ -casein digests by Ti-SBA-15 ( Ti/Si molar ratio of 0.08 )

$\text{fmol}/\mu\text{L}$  时 ,质谱图上只有  $\beta_3$  峰。因此 ,当用  $\beta_3$  峰来定义检出限时 ,应用 10  $\text{mg}/\text{mL}$  Ti-SBA-15 ( Ti/Si 比为 0.08 )可富集检出浓度最低为 10  $\text{fmol}/\mu\text{L}$  的蛋白质酶解液中的磷酸化肽。

### 2.4 Ti-SBA-15 对磷酸化肽富集的特异性

采用 Ti-SBA-15 介孔材料对  $\beta$ -酪蛋白和 BSA 物质的量比分别为 1:50 和 1:100 时组成的酶解液混合物中磷酸化肽的富集特异性进行考察。从图 4a 可以看出 ,在没有经介孔材料处理的样品中 ,磷酸化肽几乎完全被非磷酸化肽掩盖 ;而采用 Ti-SBA-15 处理样品后 ,磷酸化肽被高选择性地富集而得到检测( 见图 4b ,c ) ,表明 Ti-SBA-15 对磷酸化肽有高选择性富集能力。

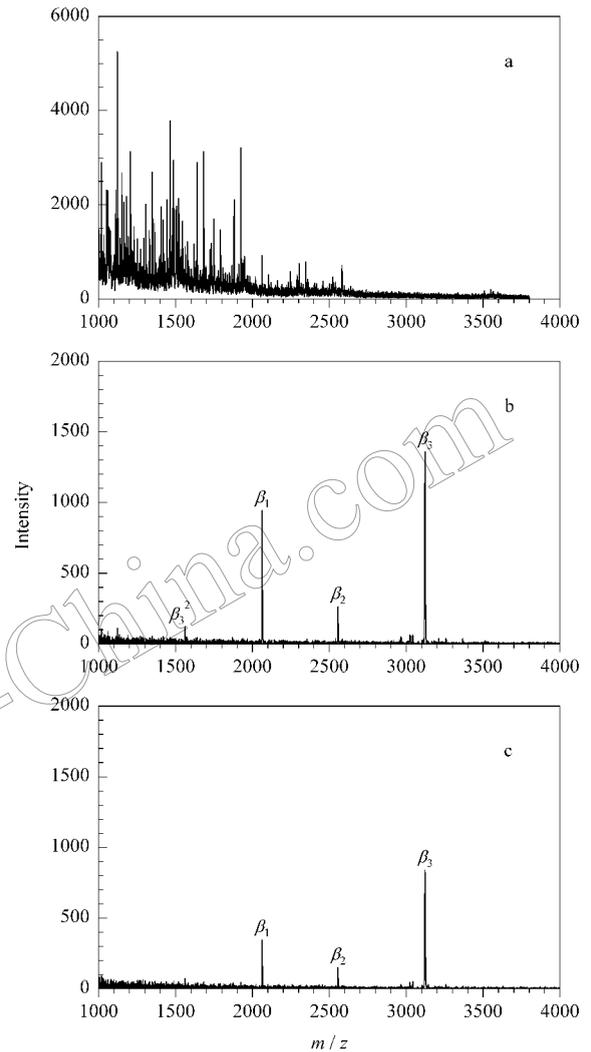


图 4 ( a )未经和( b ,c )经 Ti-SBA-15( Ti/Si 比为 0.08 )富集的  $\beta$ -酪蛋白和 BSA 酶解混合液的 MALDI-TOF MS 谱图

Fig. 4 MALDI-TOF MS spectra of the digest mixtures of  $\beta$ -casein and BSA ( a ) without and ( b , c ) with enrichment by Ti-SBA-15 ( Ti/Si molar ratio of 0.08 )

The digest mixtures of  $\beta$ -casein and BSA : a and b.  $n(\beta\text{-casein}) : n(\text{BSA}) = 1 : 50$  ; c.  $n(\beta\text{-casein}) : n(\text{BSA}) = 1 : 100$ .

## 2.5 尿素和 DTT 对磷酸化肽富集的干扰

在进行蛋白质样品预处理中,经常会使用尿素和 DTT 溶液。因此,在实验中考察了分别向孵育液中添加 2 mol/L 尿素和 50 mmol/L DTT 时,Ti-

SBA-15 对磷酸化肽的选择性富集能力。从图 5 可以看出,即使在这两种干扰物存在的情况下,Ti-SBA-15 也能从多肽混合物中高选择性地富集磷酸化肽。

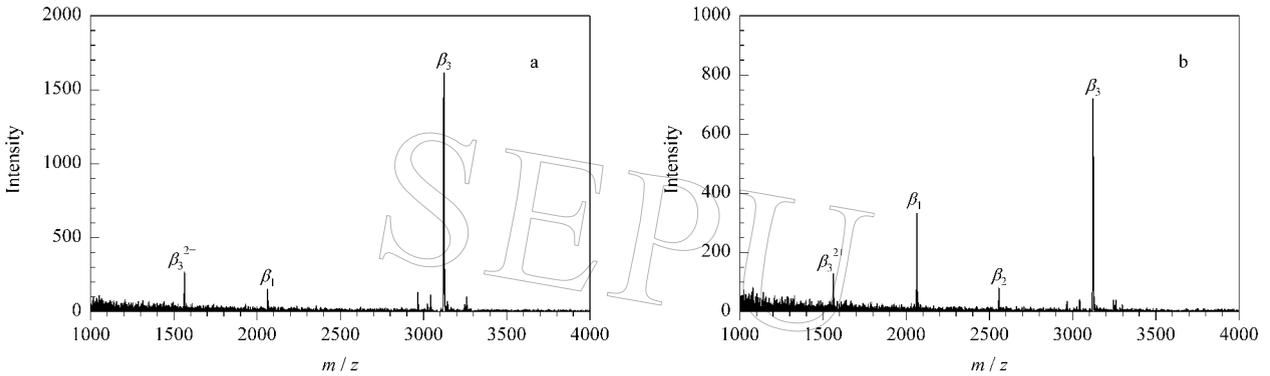


图 5 ( a ) 2 mol/L 尿素和 ( b ) 50 mmol/L DTT 存在条件下采用 Ti-SBA-15( Ti/Si 比为 0.08 )富集的  $\beta$ -酪蛋白酶解产物中磷酸化肽的 MALDI-TOF MS 谱图

Fig. 5 MALDI-TOF MS spectra of phosphopeptides from  $\beta$ -casein digests enriched by Ti-SBA-15 ( Ti/Si molar ratio of 0.08 ) in ( a ) 2 mol/L urea and ( b ) 50 mmol/L DTT

## 3 结论

和传统的基于螯合作用的介孔材料相比,骨架含钛的 Ti-SBA-15 介孔材料不仅制备简单,可以有效地避免传统固载金属离子亲和色谱材料合成过程中二次反应嫁接金属离子的过程,而且也表现出对磷酸化肽的高选择性富集能力。因此,该材料有望在磷酸化蛋白质组的研究中发挥重要作用。

### 参考文献:

[ 1 ] Xue Y, Li A, Wang L R, et al. BMC Bioinformatics, 2006, 7 : 163  
 [ 2 ] Xue Y, Ren J, Gao X J, et al. Mol Cell Proteomics, 2008, 7 : 1598  
 [ 3 ] Xue Y, Zhou F F, Zhu M J, et al. Nucleic Acids Res, 2005,

33 : 184

[ 4 ] Zhou F. F, Xue Y, Chen G L, et al. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 325 : 1443  
 [ 5 ] Ptacek J, Devgan G, Michaud G, et al. Nature, 2005, 438 : 679  
 [ 6 ] Fields S. Science, 2001, 291 : 1221  
 [ 7 ] Wang W H, Bruening M L. Analyst, 2009, 134 : 512  
 [ 8 ] Feng S, Ye M L, Zhou H J, et al. Mol Cell Proteomics, 2007, 6 : 1656  
 [ 9 ] Zhou H J, Tian R J, Ye M L, et al. Electrophoresis, 2007, 28 : 2201  
 [ 10 ] Li Y, Xu X Q, Qi D W, et al. J Proteome Res, 2008, 7 : 2526  
 [ 11 ] Rinalducci S, Larsen M R, Mohammed S, et al. J Proteome Res, 2006, 5 : 973  
 [ 12 ] Hu L H, Zhou H J, Li Y H, et al. Anal Chem, 2009, 81 : 94  
 [ 13 ] Tang J T, Liu J, Yang J, et al. J Colloid and Interface Sci, 2009, 335 : 203