

葡萄糖-6-磷酸功能化亲水磁探针： 有效分离富集糖肽/磷酸肽的 双用途亲和材料

王柏纯, 袁雨欣, 闫迎华, 丁传凡, 唐科奇

(浙江省先进质谱技术与分子检测重点实验室, 宁波大学材料科学与化学工程学院
质谱技术与应用研究院, 宁波 315211)

摘要 在 Fe_3O_4 磁芯上通过逐层修饰构建了葡萄糖-6-磷酸(G6P)功能化亲水磁探针 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PDA}@\text{TiO}_2@\text{G6P}$ 。聚多巴胺(PDA)可以作为偶联连接剂进一步接枝二氧化钛(TiO_2)；接枝的 TiO_2 除作为G6P的锚定位点外, 还可通过金属氧化物亲和层析技术有效富集磷酸肽；G6P的官能化赋予了纳米球高亲水性的表面, 并利用亲水作用液相色谱法实现了糖肽的捕捉。实验结果表明, 探针对糖肽具有低的检出限(0.1 fmol/ μL)、高的选择性 [$m(\text{HRP}):m(\text{BSA})=1:1000$]、良好的重复性(10次循环)和高的负载量(300 mg/g)；对磷酸肽具有低的检出限(0.02 fmol/ μL)和高的选择性 [$n(\beta\text{-casein}):n(\text{BSA})=1:1000$]。此外, 这种双用途亲和材料具有同时富集糖肽和磷酸肽的能力, 可从人唾液中鉴定出34个糖肽和36个磷酸肽, 表明其在多种翻译后修饰的蛋白质组学分析中具有巨大的应用前景。

关键词 双用途亲水磁探针；葡萄糖-6-磷酸；糖肽/磷酸肽；质谱检测

中图分类号 O657

文献标志码 A

蛋白质翻译后修饰 (PTMs), 特别是糖基化和磷酸化^[1,2], 在许多重要的生物学过程中发挥着关键作用, 而一个特定的生物过程通常由不同类型的PTMs共同调控^[3], 即PTM交互作用。糖基化和磷酸化之间的相互作用就是这种PTM交互作用的典型例子。例如, 糖蛋白糖链的末端经常会发生唾液酸化修饰^[4], 而越来越多证据表明在肿瘤细胞表面这种唾液酸化糖蛋白的表达增加。唾液酸化修饰水平的变化与磷酸化存在着相互作用^[5,6], 因此, 糖基化和磷酸化的高效分离分析研究将有助于阐明相关疾病的发病机理^[7]。质谱 (MS) 是目前应用最广泛的准确识别和定位糖基化/磷酸化位点的平台^[8]。然而, 由于大量未修饰肽的共存, 直接利用MS进行这2种PTMs的研究存在极大的限制, 需要在MS分析前对生物样品中的糖肽/磷酸肽进行有效富集^[9,10]。

金属氧化物亲和层析 (MOAC)^[11]和固定化金属亲和层析 (IMAC) 是目前最主要的捕捉磷酸肽的策略^[12,13]。其中, 基于MOAC技术的二氧化钛 (TiO_2) 由于比其它金属氧化物具有更强的磷酸肽富集能力而被广泛使用^[14,15]。亲水作用液相色谱法 (HILIC) 具有无偏富集糖肽的性能且易于与MS联用, 因此也成为糖肽富集最常用的方法之一^[16,17]。迄今, 已开发出诸多亲水探针用于糖肽的浓缩研究^[18]。碳水化合物是自然界中最丰富的物质, 也是人体主要营养物质中最廉价的一种^[19], 具有优良的生物相容性和亲水性^[20]。壳聚糖^[21]、葡萄糖和葡萄糖-6-磷酸 (G6P) 等碳水化合物^[22,23]已被成功用于制备亲水探针。作为一种容易获得的生命代谢物, 具有优异亲水性的G6P可以通过其磷酸基团和金属阳离子之间的亲和原理

收稿日期: 2021-04-16. 网络出版日期: 2021-08-13.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 21927805)、国家重点研发计划项目(批准号: 2016YFF0102900)、宁波市自然科学基金(批准号: 2018A610180)和宁波大学王宽诚基金资助。

联系人简介: 闫迎华, 女, 博士, 副教授, 主要从事蛋白质组学方面的研究. E-mail: yanyinghua@nbu.edu.cn

丁传凡, 男, 博士, 教授, 主要从事分析化学方面的研究. E-mail: dingchuanfan@nbu.edu.cn

与金属氧化物(如TiO₂)结合,以构建能够同时高效富集糖肽/磷酸肽的功能化探针^[24].

多巴胺可以沉积在各种有机或无机基底表面,从而形成具有独特亲水性的天然胶黏剂聚多巴胺(PDA)^[25,26].此外,在水热反应中,PDA中的质子化氮原子可以与金属离子结合并介导其水解过程,充当有机或无机基底与纳米氧化物颗粒之间的偶联连接剂^[27].因此,这种具有独特亲水性的天然胶黏剂因其多功能的表面改性和加工性能而被用于开发新型功能化材料^[28,29].

本文在Fe₃O₄磁芯上利用逐层修饰法构建了新型G6P功能化亲水磁探针Fe₃O₄@PDA@TiO₂@G6P.易修饰的Fe₃O₄对外磁场具有较强的响应性,能够简化固液分离过程;PDA可以作为偶联连接剂在探针表面修饰金属氧化物TiO₂;引入的TiO₂不仅可以作为后续官能化G6P的锚定位点,而且能够通过MOAC技术有效富集磷酸肽;G6P的官能化赋予了纳米球高亲水性的表面,从而可实现糖肽的捕捉.这种结合MOAC和HILIC技术所构建的双用途功能化亲水磁探针能够实现糖肽/磷酸肽的同时分离富集,将在多种PTMs的蛋白质组学分析中显示出巨大的应用前景.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

六水合氯化铁(FeCl₃·6H₂O,纯度97%)、无水乙酸钠(纯度99%)、多巴胺盐酸盐(纯度98%)、碳酸氢铵(NH₄HCO₃,纯度>99%)和氨水(35%)均购自J&K Scientific百灵威科技公司;三羟甲基氨基甲烷(纯度≥99.9%)、乙醇(A.R.级,纯度95%)、异丙醇(Isopropanol,纯度≥99.5%)、三氟乙酸(TFA,纯度99%)、磷酸(H₃PO₄,A.R.级,纯度≥85%)和乙二醇(A.R.级,纯度98%)均购自Macklin公司;钛酸四丁酯(TBOT,纯度97%)、β-酪蛋白(β-casein)、乙腈(ACN,纯度≥99.9%)、牛血清白蛋白(BSA,纯度>98%)、碘乙酰胺(IAA,纯度98%)、辣根过氧化物酶(HRP)、胰蛋白酶(Trypsin)、葡萄糖-6-磷酸(G6P,纯度≥98%)、二硫苏糖醇(DTT,纯度≥95%)和2,5-二羟基苯甲酸(DHB,纯度≥99%)均购自美国Sigma Aldrich公司.所有溶液均采用Milli-Q超纯水配制.

XL-30型扫描电子显微镜(荷兰Philips公司);JEOL 2011型透射电子显微镜(日本电子株式会社);D/MAX2500型X射线衍射仪(日本Rigaku公司);Nicolet 6700型傅里叶变换红外光谱仪(美国尼高力公司);Autoflex maX MALDI-TOF MS质谱仪(德国Bruker公司).

1.2 Fe₃O₄@PDA@TiO₂@G6P的合成

1.2.1 Fe₃O₄磁芯的合成 将FeCl₃·6H₂O(2.7 g)加入乙二醇(150 mL)中,经超声获得黄色透明液体;加入无水乙酸钠(7.2 g)并搅拌30 min;将混合物转移至带有聚四氟乙烯内衬的不锈钢高压水热反应釜中,于200 °C加热16 h;将溶液冷却至室温,通过磁分离技术收集获得的Fe₃O₄磁芯,用去离子水和乙醇各洗涤3次,于50 °C下真空干燥过夜.

1.2.2 Fe₃O₄@PDA的合成 将多巴胺盐酸盐(400 mg)加入去离子水(25 mL)中得到溶液A;将三羟甲基氨基甲烷(30.25 mg)和Fe₃O₄(100 mg)加入去离子水(25 mL)/乙醇(25 mL)混合溶液中得到溶液B.将溶液A和B混合,常温下搅拌16 h;通过磁分离技术收集获得的Fe₃O₄@PDA,用去离子水和乙醇各洗涤3次,于70 °C下真空干燥过夜.

1.2.3 Fe₃O₄@PDA@TiO₂的合成 在超声作用下将Fe₃O₄@PDA(100 mg)分散于异丙醇(80 mL)中;加入三乙胺(0.06 mL)并搅拌2 min;加入TBOT(3.6 mL)后,将混合物转移至带有聚四氟乙烯内衬的不锈钢高压水热反应釜中,于200 °C加热24 h;通过磁分离技术收集获得的Fe₃O₄@PDA@TiO₂,用乙醇洗涤,于50 °C下真空干燥过夜.

1.2.4 Fe₃O₄@PDA@TiO₂@G6P的合成 将Fe₃O₄@PDA@TiO₂(80 mg)分散于含ACN(25 mL)、去离子水(25 mL)和TFA(50 μL)的混合溶液中;加入G6P(50 mg)并于25 °C反应6 h;通过磁分离技术收集获得的Fe₃O₄@PDA@TiO₂@G6P,用去离子水和乙醇各洗涤3次,于50 °C下真空干燥过夜.

1.3 标准蛋白的酶解和实际样品的预处理

1.3.1 HRP及β-casein的酶解 将HRP或β-casein(各1 mg)加入到去离子水(100 μL)中,于100 °C变

性 10 min; 待混合物冷却到室温, 加入 NH_4HCO_3 缓冲溶液 (50 mmol/L, 100 μL) 和 Trypsin (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 25 μL), 将混合溶液在 37 $^\circ\text{C}$ 下酶解 16 h; 将蛋白酶解物于 -20 $^\circ\text{C}$ 储存待用.

1.3.2 BSA 的酶解 将 BSA (2 mg) 和 NH_4HCO_3 缓冲溶液 (50 mmol/L, 385 μL) 的混合物于 100 $^\circ\text{C}$ 变性 5 min; 加入 DTT (200 mmol/L, 5 μL) 并于 60 $^\circ\text{C}$ 放置 30 min; 将 IAA (400 mmol/L, 10 μL) 加入混合物中, 并于 37 $^\circ\text{C}$ 黑暗条件下反应 60 min; 加入 Trypsin (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 50 μL), 将混合溶液于 37 $^\circ\text{C}$ 酶解 16 h; 将蛋白酶解物于 -20 $^\circ\text{C}$ 储存待用.

1.3.3 唾液样品的前处理 在低温环境下将人唾液 (2 mL) 加入到含 TFA (0.2%) 的水溶液 (2 mL) 中; 在 5438g 转速下离心 10 min 并收集上层清液; 将上层清液于 -20 $^\circ\text{C}$ 保存待用.

1.4 $\text{Fe}_3\text{O}_4@PDA@TiO_2@G6P$ 对糖肽/磷酸肽的富集实验

将 500 μg $\text{Fe}_3\text{O}_4@PDA@TiO_2@G6P$ 分散于 200 μL 含有 HRP 酶解物 (1.25 pmol/ μL) 的上样缓冲液 [$V(\text{ACN}):V(\text{H}_2\text{O}):V(\text{TFA})=90:9:1$], 在恒温混匀仪上于 37 $^\circ\text{C}$ 振动 30 min. 随后, 用洗涤缓冲液 [$V(\text{ACN}):V(\text{H}_2\text{O}):V(\text{H}_3\text{PO}_4)=85:14.5:0.5$] 冲洗材料 3 次后, 加入 10 μL 脱附缓冲液 [$V(\text{ACN}):V(\text{H}_2\text{O}):V(\text{TFA})=30:69.9:0.1$] 并于 37 $^\circ\text{C}$ 振动 30 min, 将捕捉到糖肽的洗脱. 然后, 取上层清液待检测.

磷酸肽的富集过程与糖肽类似. 将 500 μg $\text{Fe}_3\text{O}_4@PDA@TiO_2@G6P$ 分散于 200 μL 含有 β -casein 酶解物 (1 pmol/ μL) 的上样缓冲液 [$V(\text{ACN}):V(\text{H}_2\text{O}):V(\text{TFA})=50:49.9:0.1$] 中, 在恒温混匀仪上于 37 $^\circ\text{C}$ 振动 30 min; 用洗涤缓冲液 [$V(\text{ACN}):V(\text{H}_2\text{O}):V(\text{TFA})=50:49.9:0.1$] 冲洗材料 3 次后, 加入 10 μL 脱附缓冲液 (0.4 mol/L 氨水溶液) 并于 37 $^\circ\text{C}$ 振动 15 min, 将捕捉到的糖肽洗脱. 然后, 取上层清液待检测.

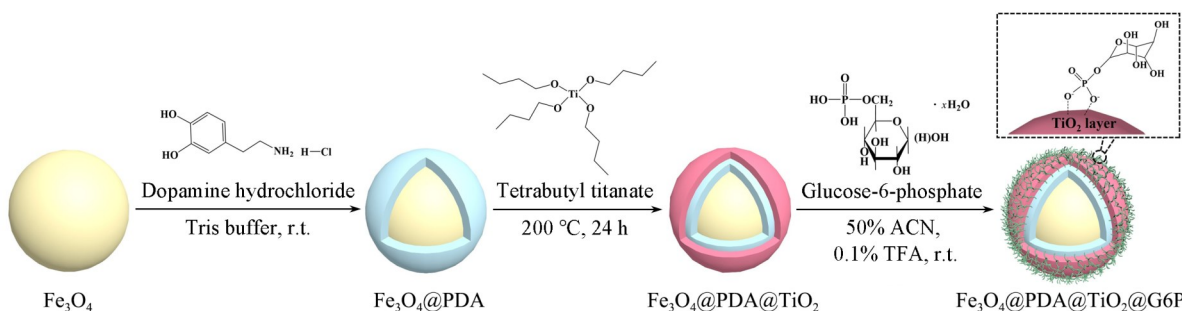
1.5 基质辅助激光解吸-飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 分析

将 DHB (1 mg) 溶解于含 ACN (20 μL)、去离子水 (79.9 μL) 和 TFA (0.1 μL) 的混合溶液中制得糖肽的基质; 将 DHB (2 mg) 溶于含 ACN (50 μL)、去离子水 (49 μL) 和 H_3PO_4 (1 μL) 的混合溶液中制得磷酸肽的基质. 将洗脱液 (1 μL) 和基质 (1 μL) 混合, 进行 MALDI-TOF MS 分析 [Nd:YAG 激光 (383 nm), 正离子模式, 加速电压 20 kV, 重复频率 1000 Hz].

2 结果与讨论

2.1 探针的合成及表征

$\text{Fe}_3\text{O}_4@PDA@TiO_2@G6P$ 探针的合成路线如 Scheme 1 所示. 通过水热反应合成 Fe_3O_4 磁芯; 随后, 在室温碱性条件下, 在 Fe_3O_4 表面包裹 PDA 层; 然后, 以修饰的 PDA 层为偶联连接剂接枝 TiO_2 ; 最后, 以接枝的 TiO_2 为锚定位点官能化 G6P, 成功构建了新型功能化亲水磁探针 $\text{Fe}_3\text{O}_4@PDA@TiO_2@G6P$.



Scheme 1 Synthetic path of $\text{Fe}_3\text{O}_4@PDA@TiO_2@G6P$

$\text{Fe}_3\text{O}_4@PDA@TiO_2@G6P$ 探针的扫描电子显微镜 (SEM)、透射电子显微镜 (TEM)、能量色散 X 射线谱 (EDX) 和 X 射线粉末衍射 (XRD) 分析结果如图 1 所示. 由图 1(A) 可见, 获得的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@PDA@TiO_2@G6P$ 粒径均匀, 约为 350 nm, 且纳米球表面粗糙, 证明 PDA 和 TiO_2 已成功修饰. 从图 1(B) 中可以观察到纳米球的核壳结构, Fe_3O_4 磁芯的粒径约为 220 nm, PDA 层厚度约为 35 nm, TiO_2 层厚度约为 30 nm, 且 PDA 和 TiO_2 层均匀涂附在 Fe_3O_4 表面, 表明纳米球已成功构建. 在纳米球的 EDX 谱图 [图 1(C)] 中可以观察到碳 (C)、氮 (N)、氧 (O)、磷 (P)、钛 (Ti) 和铁 (Fe) 元素, 其中 Fe, N, Ti 和 P 的存在分别说明了

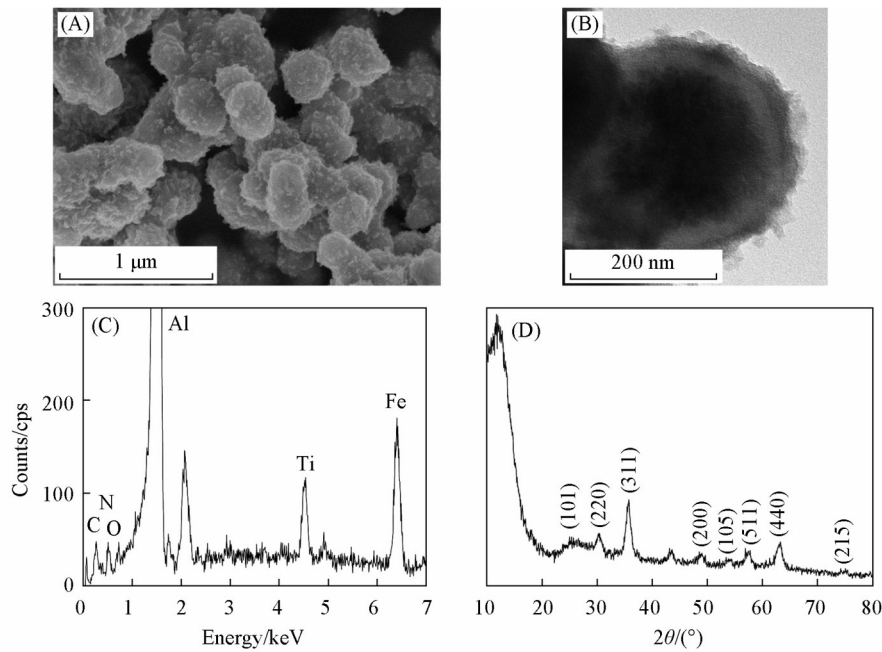


Fig. 1 SEM image(A), TEM image(B), EDX spectrum(C) and powder XRD pattern(D) of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PDA}@\text{TiO}_2@\text{G6P}$

Fe_3O_4 , PDA, TiO_2 和G6P的存在. 在 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PDA}@\text{TiO}_2@\text{G6P}$ 的XRD谱图[图1(D)]中, $30.1^\circ(220)$, $35.5^\circ(311)$, $57.0^\circ(511)$ 和 $62.4^\circ(440)$ 处的峰表明存在 Fe_3O_4 ; $25.2^\circ(101)$, $47.6^\circ(200)$, $54.0^\circ(105)$ 和 $75.4^\circ(215)$ 处的峰表明存在 TiO_2 .

$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PDA}@\text{TiO}_2@\text{G6P}$ 探针的傅里叶变换红外光谱(FTIR)如图2所示. 586 和 1630 cm^{-1} 处的峰分别归属于 $\text{Fe}-\text{O}-\text{Fe}$ 和 $\text{C}=\text{N}$ 的振动, 证明 Fe_3O_4 和PDA的成功制备; 在接枝 TiO_2 后, $500\sim 700\text{ cm}^{-1}$ 之间增强的宽带是由 $\text{Ti}-\text{O}-\text{Ti}$ 的伸缩振动引起的, 证明 TiO_2 的成功引入; 进一步官能化G6P后, 在 1085 cm^{-1} 处出现了1个新的归属于 $\text{P}-\text{O}$ 的伸缩振动峰, 证明G6P的成功修饰. FTIR结果进一步说明了 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PDA}@\text{TiO}_2@\text{G6P}$ 探针的成功构建.

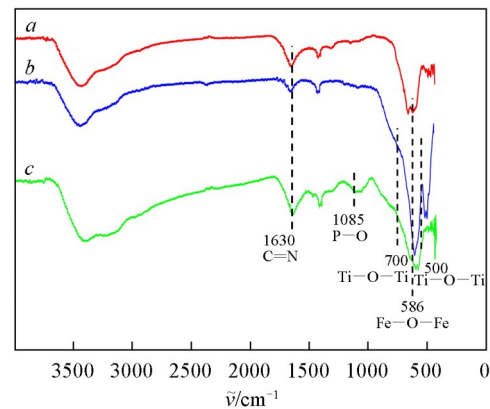
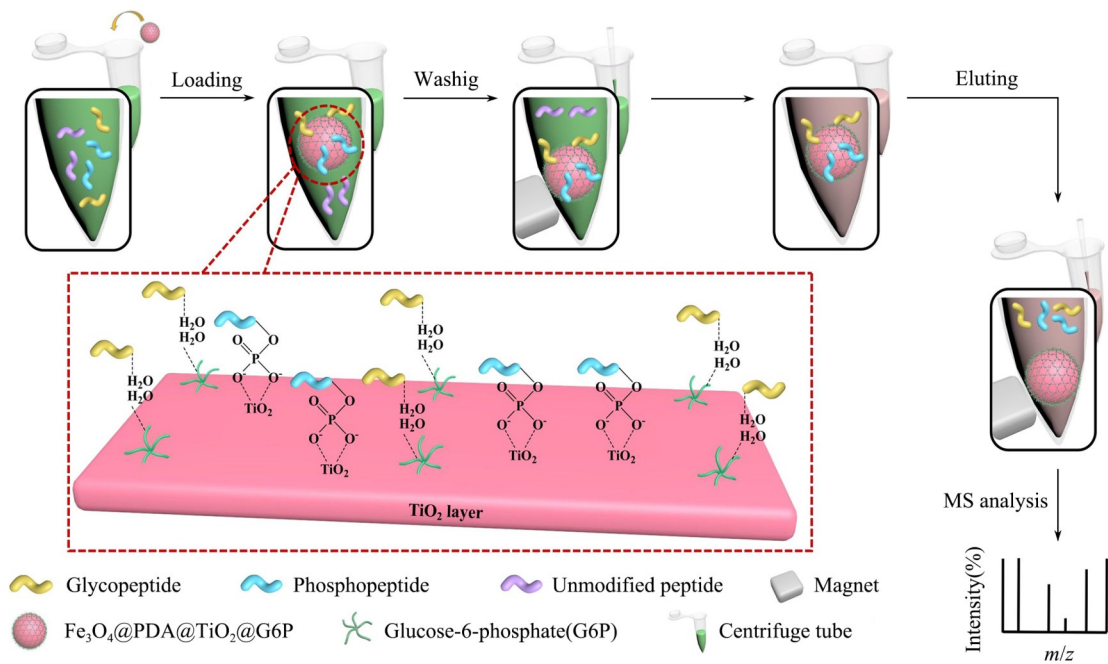


Fig. 2 FTIR spectra of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PDA}$ (a), $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PDA}@\text{TiO}_2$ (b) and $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PDA}@\text{TiO}_2@\text{G6P}$ (c)

2.2 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PDA}@\text{TiO}_2@\text{G6P}$ 探针富集糖肽的性能

利用HRP评估了该探针富集糖肽的能力, 具体富集流程如Scheme 2所示. 可见, 该材料通过G6P与糖肽之间的亲水相互作用实现对糖肽的捕捉, 通过 TiO_2 与磷酸根之间强的作用实现磷酸肽的选择性富集. 在未经富集便直接检测的情况下, 从 $1.25\text{ pmol}/\mu\text{L}$ 的HRP酶解物中仅检测到5个糖肽的信号[图3(A)], 且非糖肽信号占据主导谱, 极大地抑制了糖肽的信号. 而在使用该探针特异性富集糖肽后, 出现了23个属于糖肽的信号[图3(B)], 且糖肽信号占据主导谱, 富集的糖肽的详细信息示于表S1(见本文支持信息)中. 质谱图中几乎不存在非糖肽的信号, 表明 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PDA}@\text{TiO}_2@\text{G6P}$ 探针具有优异的富集糖肽的能力.

通过从不同含量的HRP酶解物中富集糖肽研究了该探针的检出限. 当将HRP酶解物的含量稀释至 $10\text{ fmol}/\mu\text{L}$ 时[图S1(A), 见本文支持信息], 可检测到12个属于糖肽的信号且占据主导谱; 进一步将含量稀释至 $1\text{ fmol}/\mu\text{L}$ 时[图S1(B), 见本文支持信息], 质谱图中仍出现7个糖肽信号且几乎不存在非糖肽信号; 即使含量低至 $0.1\text{ fmol}/\mu\text{L}$ [图S1(C), 见本文支持信息], 探针依旧能捕捉到5个糖肽, 表



Scheme 2 Workflow of the enrichment of glycopeptides/phosphopeptides by $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PDA}@\text{TiO}_2@\text{G6P}$

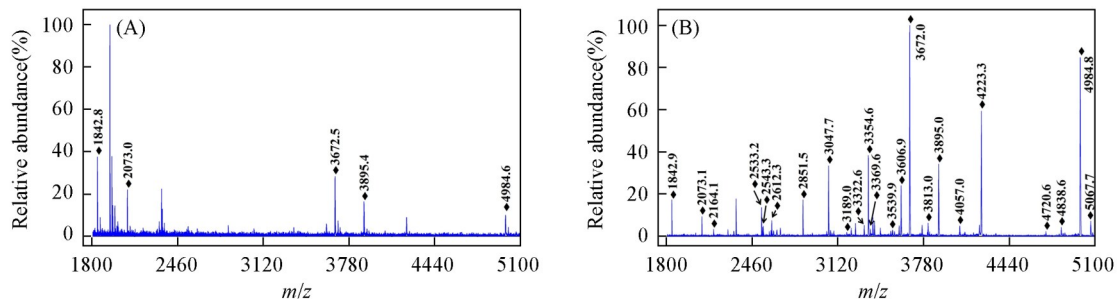


Fig. 3 MALDI-TOF mass spectra of HRP digests

(A) Direct analysis; (B) after enrichment by $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PDA}@\text{TiO}_2@\text{G6P}$. \blacklozenge represents glycopeptide.

明 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PDA}@\text{TiO}_2@\text{G6P}$ 对糖肽具有较低的检出限。

通过改变 HRP 酶解物和 BSA 的质量比研究了探针的选择性。当 HRP 酶解物与 BSA 的质量比为 1:100 时[图 S2(A), 见本文支持信息], 质谱图显示了 13 个属于糖肽的信号, 且非糖肽信号极低; 当二者质量比增加到 1:250 和 1:500 后[图 S2(B)和(C), 见本文支持信息], 虽然非糖肽信号的干扰增强了, 但仍分别检测到了 6 个和 5 个糖肽的信号且占据主导谱; 在质量比增加到 1:1000 时[图 S2(D), 见本文支持信息], 纳米球依旧富集到了 3 个糖肽, 表明该探针对糖肽具有良好的选择性, 并且可以从半复杂样品中捕获糖肽。

通过从 1.25 pmol/ μL 的 HRP 酶解物中富集糖肽研究了探针的可重复利用性, 该实验共重复 10 次。在每个循环之前, 使用脱附缓冲液和上样缓冲液洗涤纳米球。由图 S3(A)~(D) (见本文支持信息) 可知, 尽管探针已经重复使用 10 次, 但其富集能力几乎与最初时相同, 表明该纳米材料具有良好的可重复利用性。在控制合成纳米球的条件完全相同的情况下, 重新制备了 2 份不同批次的材料用于从 1.25 pmol/ μL 的 HRP 酶解物中富集糖肽, 考察了材料的制备重现性。由图 S3(A), (E) 和 (F) (见本文支持信息) 可知, 新合成的 2 批纳米球的富集能力与第一批纳米球的富集能力几乎相同, 表明 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PDA}@\text{TiO}_2@\text{G6P}$ 具有较强的可重复制备性。

通过使用不同量的纳米材料 (25~150 μg) 从相同量的 HRP 酶解物 (30 μg) 溶液中富集糖肽研究了探针的负载量。随着 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PDA}@\text{TiO}_2@\text{G6P}$ 纳米材料用量的增加 (图 S4, 见本文支持信息), 5 种纳米球捕获糖肽的强度缓慢增至稳定值, 即当纳米材料的用量为 100 μg 时达到饱和。通过计算得到此时纳米

球对糖肽的负载量约为 300 mg/g, 表明该探针具有较大的负载量.

2.3 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PDA}@\text{TiO}_2@\text{G6P}$ 探针富集磷酸肽的性能

利用 β -casein 评估了 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PDA}@\text{TiO}_2@\text{G6P}$ 探针富集磷酸肽的能力. 未经纳米球富集时, 从 1 pmol/ μL 的 β -casein 酶解物中仅能检测到 1 个强度极低的磷酸肽的信号[图 4(A)], 而非磷酸肽的信号占据主导谱. 在使用纳米球特异性富集磷酸肽后, 质谱图由磷酸肽的信号占据主导谱且出现了 8 条磷酸肽的信号[图 4(B)], 说明该探针具有优异的富集磷酸肽的能力, 富集到的磷酸肽的详细信息示于表 S2 (见本文支持信息).

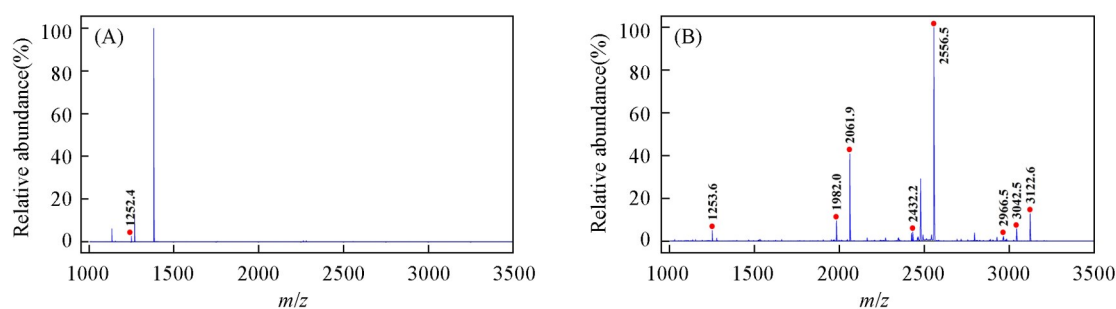


Fig. 4 MALDI-TOF mass spectra of β -casein digests

(A) Direct analysis; (B) after enrichment by $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PDA}@\text{TiO}_2@\text{G6P}$. • represents phosphopeptide.

采用与糖肽类似的方法研究了该探针对于磷酸肽的检出限和选择性. 当将 β -casein 酶解物的含量稀释至 2 fmol/ μL 时, 虽然质谱图的信号强度有所下降, 但几乎不存在非磷酸肽的信号, 且显示了 7 条磷酸肽的信号[图 S5(A), 见本文支持信息]; 进一步将含量稀释至 0.2 fmol/ μL 时, 依旧出现了 6 个属于磷酸肽的信号且几乎不存在非磷酸肽信号[图 S5(B), 见本文支持信息]; 即使 β -casein 酶解物的含量低至 0.02 fmol/ μL , 纳米球依然捕捉到了 4 个磷酸肽[图 S5(C), 见本文支持信息], 表明 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PDA}@\text{TiO}_2@\text{G6P}$ 对磷酸肽具有较低的检出限. 当 β -casein 酶解物与 BSA 的摩尔比为 1:100 时, 检测到 8 条属于磷酸肽的信号, 质谱图几乎不存在非磷酸肽的信号[图 S5(D), 见本文支持信息]; 当两者的摩尔比增加到 1:500 时, 质谱图中磷酸肽信号减少到 5 条, 但谱图几乎不存在非磷酸肽的信号[图 S5(E), 见本文支持信息]; 在将摩尔比增加到 1:1000 后, 虽然存在较强的非磷酸肽的干扰, 但纳米球仍捕捉到了 4 个磷酸肽[图 S5(F), 见本文支持信息], 表明 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PDA}@\text{TiO}_2@\text{G6P}$ 探针对磷酸肽具有良好的选择性.

通过从 1 pmol/ μL 的 β -casein 酶解物中富集磷酸肽研究了探针的可重复利用性. 在每次循环前均使用磷酸肽富集过程中使用的脱附缓冲液和上样缓冲液洗涤纳米球, 共进行了 10 次循环. 由图 S6(A)~(C)(见本文支持信息)可知, 在经过 10 次重复使用后, 探针对磷酸肽的富集能力几乎与第一次循环的结果相同, 表明探针具有良好的可重复利用性. 随后, 将进行过 10 次磷酸肽富集循环的纳米球再次用于选择性捕捉糖肽[图 S6(D), 见本文支持信息], 结果与未进行磷酸肽富集而直接选择性捕捉糖肽的结果类似[图 4(B)], 表明探针表面的 G6P 在磷酸肽富集的洗脱过程中并未被洗掉. 同时, 利用重新制备的 2 份不同批次的材料从 1 pmol/ μL 的 β -casein 酶解物中富集磷酸肽研究了探针的制备重现性. 新合成的 2 批纳米球的富集能力[图 S6(E)和(F), 见本文支持信息]与第一批纳米球的富集能力[图 S6(A)]几乎相同, 表明探针具有较强的可重复制备性.

2.4 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PDA}@\text{TiO}_2@\text{G6P}$ 探针用于同时富集糖肽/磷酸肽

通过从含有 HRP 酶解物和 β -casein 酶解物混合物中捕捉糖肽/磷酸肽研究了探针同时富集糖肽/磷酸肽的能力. 参考文献[11, 25, 30]报道, 选择可能利用 HILIC 和 MOAC 机制同时富集糖肽/磷酸肽的最佳条件, 即在吸附过程中采用上样缓冲液 [$V(\text{ACN}):V(\text{H}_2\text{O}):V(\text{TFA})=90:7:3$], 在洗涤过程中采用洗涤缓冲液 [$V(\text{ACN}):V(\text{H}_2\text{O}):V(\text{H}_3\text{PO}_4)=85:14.5:0.5$], 在分步脱附过程中先后采用体积比为 30:70 的 ACN/ H_2O 组成的洗涤缓冲液和 0.4 mol/L 氨水溶液进行洗脱, 在同时脱附过程中采用 0.4 mol/L 氨水溶液进行洗脱. 在直接检测含有 HRP 酶解物和 β -casein 酶解物混合物的情况下, 质谱图中仅出现了 1 个

磷酸肽和2个糖肽的峰且丰度极低[图5(A)]. 在经过探针同时富集并分步脱附后, 出现23个糖肽和8个磷酸肽的信号并占据主导谱[图5(B)和(C)], 与上述单独富集糖肽/磷酸肽时的结果吻合. 在研究该探针同时富集及脱附的能力时, 共捕捉到21个糖肽和6个磷酸肽[图5(D)]的信号, 说明探针具有良好的同时富集糖肽和磷酸肽的能力.

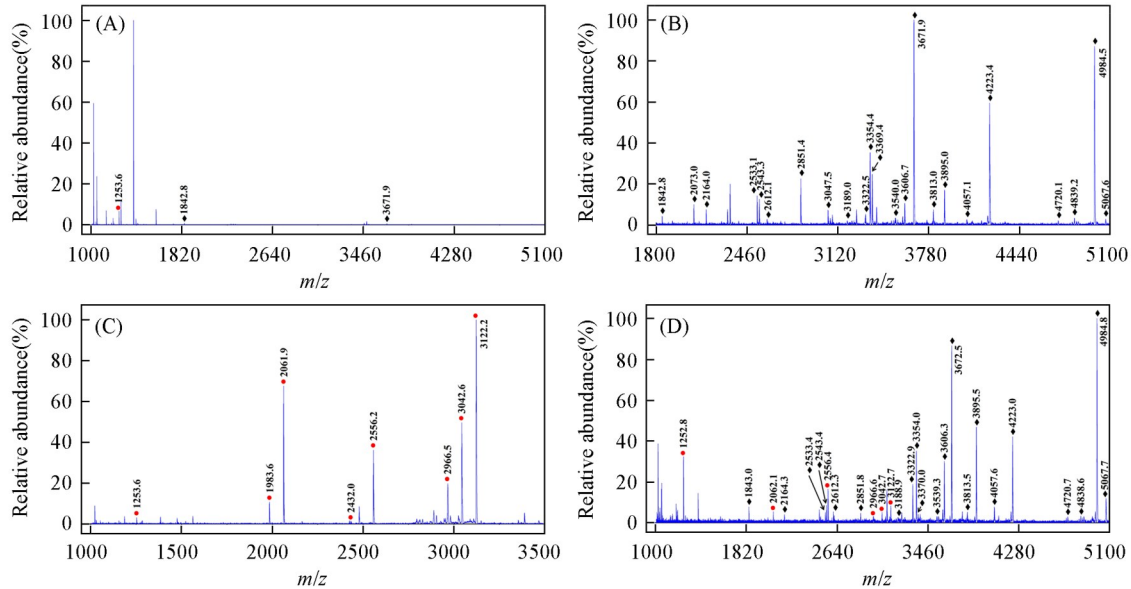


Fig. 5 MALDI-TOF mass spectra of the mixture of HRP and β -casein digests

(A) Direct analysis; (B) after enrichment by $\text{Fe}_3\text{O}_4@PDA@TiO_2@G6P$ with 90% ACN, 7% H_2O and 3% TFA(volume ratio) mixed solution as the binding buffer and 30% ACN and 70% H_2O (volume ratio) mixed solution as the elution solution for the first-step elution; (C) 0.4 mol/L ammonia aqueous solution as the elution solution for the second-step elution; (D) after enrichment by $\text{Fe}_3\text{O}_4@PDA@TiO_2@G6P$ with 90% ACN, 7% H_2O and 3% TFA(volume ratio) mixed solution as the binding buffer and 0.4 mol/L ammonia aqueous solution as the elution solution. \blacklozenge represents glycopeptide, \bullet represents phosphopeptide.

2.5 $\text{Fe}_3\text{O}_4@PDA@TiO_2@G6P$ 对唾液中糖肽/磷酸肽的富集和检测

唾液是一种便于采集和无创的良好生物样本, 其中含有大量内源性糖肽和磷酸肽. 使用该探针捕获唾液样品中的糖肽和磷酸肽, 以探究其实际应用潜力. 在对唾液样品中内源性的糖肽进行富集之前, 质谱图中非糖肽的信号占主导地位[图6(A)]. 利用探针处理后, 共鉴定出34个糖肽[图6(B)和(C)], 富集到的糖肽的详细信息列于表S3(见本文支持信息). 此外, 磷酸肽的富集结果与糖肽类似, 即对唾液样品中内源性的磷酸肽进行富集前, 谱图中非磷酸肽的信号占主导地位[图6(D)]; 在使用纳米球进行富集后, 质谱图显示出36个属于磷酸肽的信号[图6(E)和(F)], 富集到的磷酸肽的详细信息列于表S4(见本文支持信息). 上述结果表明, 该探针在实际生物样品的应用中具有广阔的前景.

综上所述, 本文构建了一种结合HILIC和MOAC技术的葡萄糖-6-磷酸功能化双用途亲水磁探针 $\text{Fe}_3\text{O}_4@PDA@TiO_2@G6P$, 并通过SEM, TEM, EDX, XRD和FTIR对其进行了表征. 所制备的探针平均粒径约为350 nm, 修饰的PDA和 TiO_2 层均匀涂附在 Fe_3O_4 表面形成良好的核壳结构, 具有强磁感应及高亲水性等优点. 基于HILIC技术官能化的G6P适用于高选择性捕获糖肽, 显示出低的检出限(0.1 fmol/ μL)、高的选择性[$m(\text{HRP}):m(\text{BSA})=1:1000$]、良好的重复性(10次循环)和高的负载量(300 mg/g); 基于MOAC技术接枝的 TiO_2 不仅可以作为G6P的锚定位点, 而且可以高效捕捉磷酸肽, 显示出低的检出限(0.02 fmol/ μL)和高的选择性[$n(\beta\text{-casein}):n(\text{BSA})=1:1000$]. 研究结果还表明, 该探针具有同时富集糖肽和磷酸肽的能力. 使用 $\text{Fe}_3\text{O}_4@PDA@TiO_2@G6P$ 探针选择性地从复杂的生物样品(唾液)中富集糖肽/磷酸肽时, 共鉴定出34个糖肽和36个磷酸肽, 表明该双用途纳米材料具有适用于实际样品分析的能力, 将在多种PTMs的蛋白质组学分析中显示出巨大的应用前景.

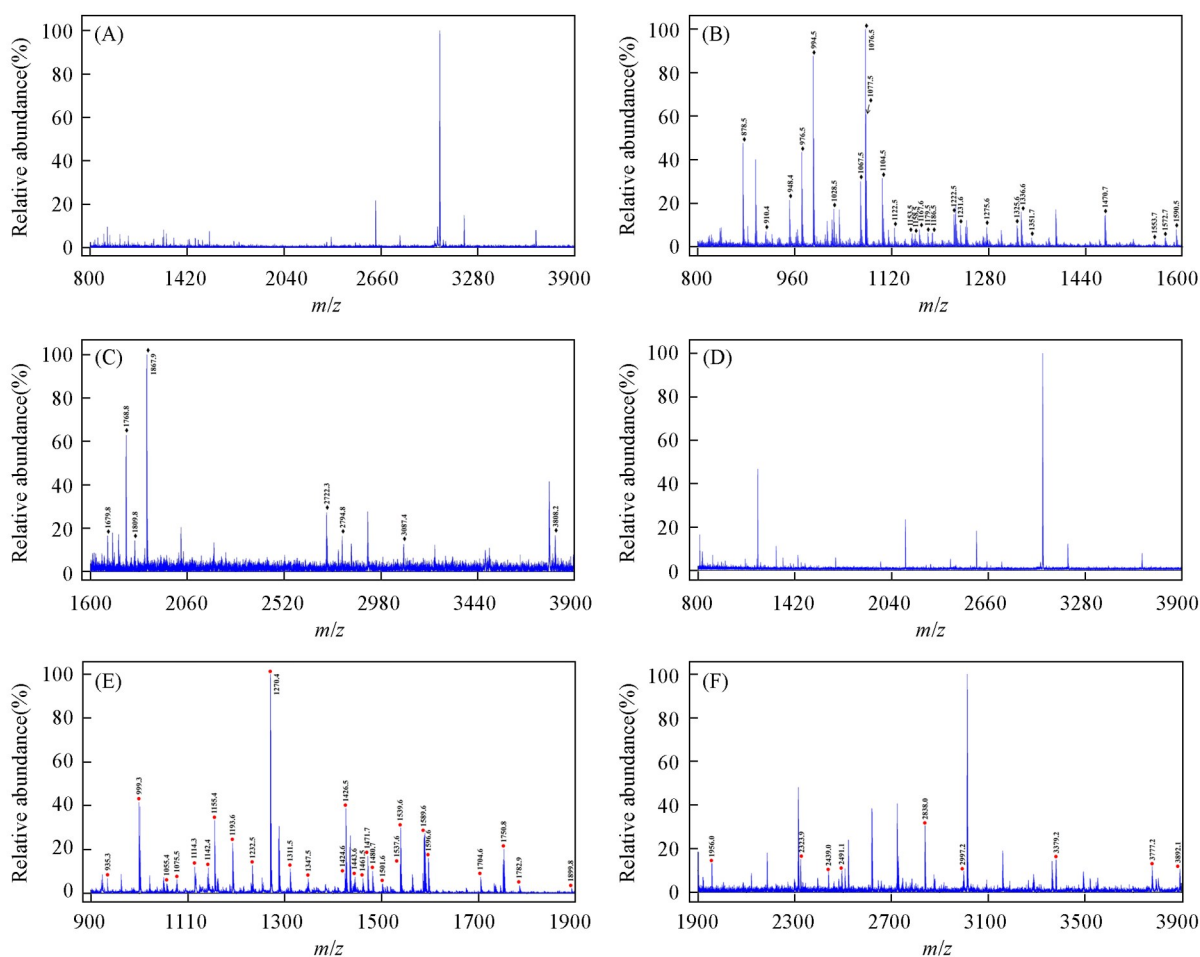


Fig. 6 MALDI-TOF mass spectra of glycopeptides(A—C) and phosphopeptides(D—F) captured from human saliva (A, D) Direct analysis; (B, C, E, F) after enrichment by $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@PDA@TiO}_2\text{@G6P}$. * represents glycopeptide, • represents phosphopeptide.

支持信息见 <http://www.cjcu.jlu.edu.cn/CN/10.7503/cjcu20210256>.

参 考 文 献

- [1] Zou X. J., Jie J. Z., Yang B., *Anal. Chem.*, **2017**, 89(14), 7520—7526
- [2] Zheng H. J., Jiang L. Y., Jia Q., *Chem. J. Chinese Universities*, **2021**, 42(3), 717—724 (郑海娇, 姜丽艳, 贾琼. 高等学校化学学报, **2021**, 42(3), 717—724)
- [3] Hong Y. Y., Zhan Q. L., Zheng Y., Pu C. L., Zhao H. L., Lan M. B., *Talanta*, **2019**, 197, 77—85
- [4] Perdicchio M., Ilarregui J. M., Verstege M. I., Cornelissen L. A. M., Schettler S. T. T., Engels S., Ambrosini M., Kalay H., Veninga H., den Haan J. M. M., van Berkel L. A., Samsom J. N., Crocker P. R., Sparwasser T., Berod L., Garcia-Vallejo J. J., van Kooyk Y., Unger W. W. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2016**, 113(12), 3329—3334
- [5] Liu F., Iqbal K., Grundke-Iqbal I., Gong C. X., *FEBS Lett.*, **2002**, 530(1—3), 209—214
- [6] Loney A. C., El Atmioui D., Wu W., Ovaia H., Heck A. J. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2017**, 114(35), E7255—E7261
- [7] Luo B., Chen Q., He J., Li Z. Y., Yu L. Z., Fang L., Wu Y., *ACS Sustainable Chem. Eng.*, **2019**, 7(6), 6043—6052
- [8] Yi L., Shi T. J., Gritsenko M. A., Chan C. Y. X., Fillmore T. L., Hess B. M., Swensen A. C., Liu T., Smith R. D., Wiley H. S., Qian W. J., *Anal. Chem.*, **2018**, 90(8), 5256—5263
- [9] Sun N. R., Wu H., Shen X. Z., *Microchim. Acta*, **2020**, 187(3), 195
- [10] Lu Q., Chen C., Xiong Y. T., Li G. D., Zhang X. F., Zhang Y. H., Wang D. D., Zhu Z. C., Li X. L., Qing G. Y., Sun T. L., Liang X. M., *Anal. Chem.*, **2020**, 92(9), 6269—6277
- [11] Sun N. R., Wang Z. D., Wang J. W., Chen H. M., Wu H., Shen S., Deng C. H., *J. Chromatogr. A*, **2019**, 1595, 1—10
- [12] Zheng H. J., Jia J. X., Li Z., Jia Q., *Anal. Chem.*, **2020**, 92(3), 2680—2689
- [13] Zhao Y. Y., Zhang L. H., Zhang L. Y., *Chinese J. Anal. Chem.*, **2020**, 48(2), 233—239 (赵艳艳, 张丽华, 张丽媛. 分析化学, **2020**, 48(2), 233—239)
- [14] Xu D. P., Yan G. Q., Gao M. X., Deng C. H., Zhang X. M., *Talanta*, **2017**, 166, 154—161

- [15] Lin H. Z., Yuan K. P., Deng C. H., *Talanta*, **2017**, *175*, 427—434
- [16] Chen C., Wang H. X., Kang H. J., Yao Y., Qing G. Y., Li X. L., Liang X. M., *Chinese J. Anal. Chem.*, **2017**, *45*(8), 1149—1154(陈成, 王宏喜, 康虹健, 姚要, 卿光焱, 李秀玲, 梁鑫森. 分析化学, **2017**, *45*(8), 1149—1154)
- [17] Hong Y. Y., Zhao H. L., Pu C. L., Zhan Q. L., Sheng Q. Y., Lan M. B., *Anal. Chem.*, **2018**, *90*(18), 11008—11015
- [18] Wu Y. L., Sun N. R., Deng C. H., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2020**, *12*(8), 9814—9823
- [19] Li Y. L., Wang J. W., Sun N. R., Deng C. H., *Anal. Chem.*, **2017**, *89*(20), 11151—11158
- [20] Li Y. L., Deng C. H., Sun N. R., *Anal. Chim. Acta*, **2018**, *1024*, 84—92
- [21] Xiong Z. C., Qin H. Q., Wan H., Huang G., Zhang Z., Dong J., Zhang L. Y., Zhang W. B., Zou H. F., *Chem. Commun.*, **2013**, *49*(81), 9284—9286
- [22] Fang C. L., Xiong Z. C., Qin H. Q., Huang G., Liu J., Ye M. L., Feng S., Zou H. F., *Anal. Chim. Acta*, **2014**, *841*, 99—105
- [23] Zheng J. N., Xiao Y., Wang L., Lin Z., Yang H. H., Zhang L., Chen G. N., *J. Chromatogr. A*, **2014**, *1358*, 29—38
- [24] Hu X. F., Wu Y. L., Deng C. H., *Microchim. Acta*, **2020**, *187*(11), 616
- [25] Sun N. R., Wang J. W., Yao J. Z., Chen H. M., Deng C. H., *Microchim. Acta*, **2019**, *186*(3), 159
- [26] Liu Y. L., Ai K. L., Lu L. H., *Chem. Rev.*, **2014**, *114*(9), 5057—5115
- [27] Yan Y. H., Sun X. N., Deng C. H., Li Y., Zhang X. M., *Anal. Chem.*, **2014**, *86*(9), 4327—4332
- [28] Lin L. S., Cong Z. X., Cao J. B., Ke K. M., Peng Q. L., Gao J. H., Yang H. H., Liu G., Chen X. Y., *ACS Nano*, **2014**, *8*(4), 3876—3883
- [29] Yan Y. H., Lu Y. J., Wang B. C., Gao Y. Q., Zhao L. L., Liang H. Z., Wu D. P., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2018**, *10*(31), 26539—26545
- [30] Wang Z. D., Wang J. W., Sun N. R., Deng C. H., *Anal. Chim. Acta*, **2019**, *1067*, 1—10

Glucose-6-phosphate Functionalized Hydrophilic Magnetic Probe : a Dual-purpose Affinity Material for Effective Separation and Enrichment of Glycopeptides/Phosphopeptides[†]

WANG Baichun, YUAN Yuxin, YAN Yinghua*, DING Chuanfan*, TANG Keqi

(Key Laboratory of Advanced Mass Spectrometry and Molecular Analysis of Zhejiang Province, Institute of Mass Spectrometry, School of Material Science and Chemical Engineering, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract Glucose-6-phosphate (G6P) functionalized hydrophilic magnetic probe Fe₃O₄@PDA@TiO₂@G6P was constructed by the layer-by-layer modification on the surface of the magnetic core Fe₃O₄. Polydopamine (PDA) not only enhanced the hydrophilicity of the probe, but also acted as the coupling linker for the further grafting of titanium dioxide (TiO₂). In addition to serving as the anchor point of G6P, the grafted TiO₂ could also effectively enrich phosphopeptides through the metal oxide affinity chromatography technology. The functionalization of G6P gave the nanospheres a highly hydrophilic surface and used the hydrophilic interaction liquid chromatography technology to achieve the goal of capturing glycopeptides. The results showed that this dual-purpose affinity probe had a low detection limit (0.1 fmol/μL), a high selectivity [$m(\text{HRP}) : m(\text{BSA}) = 1 : 1000$], a good repeatability (ten cycles) and a high loading (300 mg/g) for glycopeptides. Besides, as for phosphopeptides, the obtained G6P functionalized hydrophilic magnetic probe exhibited a low detection limit (0.02 fmol/μL) and a high selectivity [$n(\beta\text{-casein}) : n(\text{BSA}) = 1 : 1000$]. At the same time, this dual-purpose affinity material had the ability to simultaneously enrich glycopeptides and phosphopeptides, and 34 glycopeptides and 36 phosphopeptides were identified from human saliva, indicating that it will show great application prospects in proteomics analysis of a variety of post-translational modifications.

Keywords Dual-purpose hydrophilic magnetic probe; Glucose-6-phosphate; Glycopeptide/phosphopeptide; Mass spectrometry detection (Ed.: N, K)

[†] Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.21927805), the National Key Research and Development Program of China (No.2016YFF0102900), the Ningbo Natural Science Foundation, China (No.2018A610180) and the K. C. Wong Magna Fund in Ningbo University, China.