

## 结合低流速LC和串联四极杆(QqQ)质谱仪的内源性激酶定量分析

---

Matthew E. Daly, Lisa Reid, Lee A. Gethings, Robert S. Plumb

Waters Corporation

仅供研究使用，不适用于诊断。

---

### 摘要

本研究针对27种人内源性激酶开发了一种特定的靶向分析方法（根据其生物学意义和普遍性来进行选择）。

该分析旨在评估每个酶类别的多个独特的靶向MS/MS通道，确保每种蛋白质的鉴定准确度。这些通道包括经实验确认的天然肽的母离子和子离子质量数（使用纯标准品），以及理论推导的任何已知可能含有磷酸化残基的肽的母离子和子离子质量数。通过选择使用每种非磷酸化肽的标准品来创建标准曲线，我们可能可以为每种肽生成半定量浓度值，从而提高实验结果的可信度。

方法优化和随后创建的标准曲线结果表明，有23种肽的柱上LOD < 100 pg，还有32种肽的柱上LOD < 1 ng。其余25种肽的LOD范围为柱上1.1~28.9 ng。然后分析了一组由癌细胞系组成的样品组，作为可行性实验。结果表明，该方法能够以与常规分析一致的色谱流速，使用多种肽段标记区分两种细胞系（即，有/无突变），而无需事先进行样品富集。

这种靶向激酶分析方法设计用于帮助蛋白质组学研究、制药药物发现项目、研究型临床医生以及其他从事疾病生物标志物研究或定制化药物研究的人员。

### 优势

---

- 快速、高通量采集
- 基于多个独特的通道进行靶向蛋白分析
- 使用定量曲线实现半定量分析
- 提供可轻松定制的通道，支持客户根据需要修改目标
- 数据可在MassLynx™、TargetLynx™中分析或导入SkyLine

---

## 简介

激酶已被证明是不同人类疾病的重要生物标志物。尤其对于某些癌症，例如肾癌和肝细胞癌，其水平的升高可能预示着有利或不利的预后结果<sup>1</sup>。因此，它们成为了转化医学中的有用靶点，有望为某些癌症的疾病发展提供预后生物标志物。为此，可以追踪两条肽靶向途径：测量总激酶蛋白形态的表达，或磷酸化（活化）激酶蛋白形态的表达。具体的疾病通路决定了哪种定量方法可以提供有关预后的最有用信息。然而，由于这些激酶在细胞质中的相对浓度较低，可能难以实现定量，因此，目前的方法采用预先富集步骤来选择性地富集目标激酶，或者通过纳升级谱操作，但这不利于高通量分析。因此，我们推出了一套全面的肽段标记（结合实验中实际观察到的和理论推断的标记子集），可用于鉴定特定的激酶类别，并且这些肽段标记可用于通过毛细管级色谱区分两种癌细胞，无需事先富集。

---

## 实验

本研究选购了28种人类激酶标准品，溶于UHQ水中，浓度在900 fmol/μL到25.4 pmol/μL之间。将含1 μg各标准品的总混合物放在含有0.1% w/v RapiGest™的碳酸氢铵溶液（最终浓度为50 mM，pH 7.8）中，用二巯基苏糖醇（最终浓度为5 mM）在60 °C下还原15分钟，用碘乙酰胺（最终浓度为15 mM）进行烷基化反应30分钟，然后使用测序级胰蛋白酶以1:50的蛋白酶:蛋白质比例极性酶解。加入甲酸至最终浓度为0.1% v/v来淬灭酶解。细胞系样品也采用类似的制备方案。

## 液相色谱条件

液相色谱系统:

ACQUITY™ Premier FTN

色谱柱:	ACQUITY Premier Peptide CSH™ C <sub>18</sub> (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm)
柱温:	40 °C
进样体积:	5 μL (标准曲线) 或15 μL (癌细胞系样品)
流速:	0.5 mL/min
流动相A:	水 + 0.1%甲酸
流动相B:	乙腈 + 0.1 %甲酸
梯度:	初始5%流动相B, 0~2 min内5%流动相B, 在2~25 min从5%增加至30%, 25~27 min从30%增加至60%, 27~29 min内60%流动相B, 29~35 min重新平衡初始条件。

## 质谱条件

质谱系统:	Xevo™ TQ-XS
离子源:	ZSpray™ ESI
电离模式:	正离子模式
毛细管电压:	0.5 kV
采样锥孔电压:	35
离子源温度:	150 °C
脱溶剂气温度:	500 °C

锥孔气流速: 150 L/h

脱溶剂气流速: 1000 L/h

碰撞能量: 针对特定肽段在13.5~29.8 V之间

扫描时间: 根据特定肽段有所不同

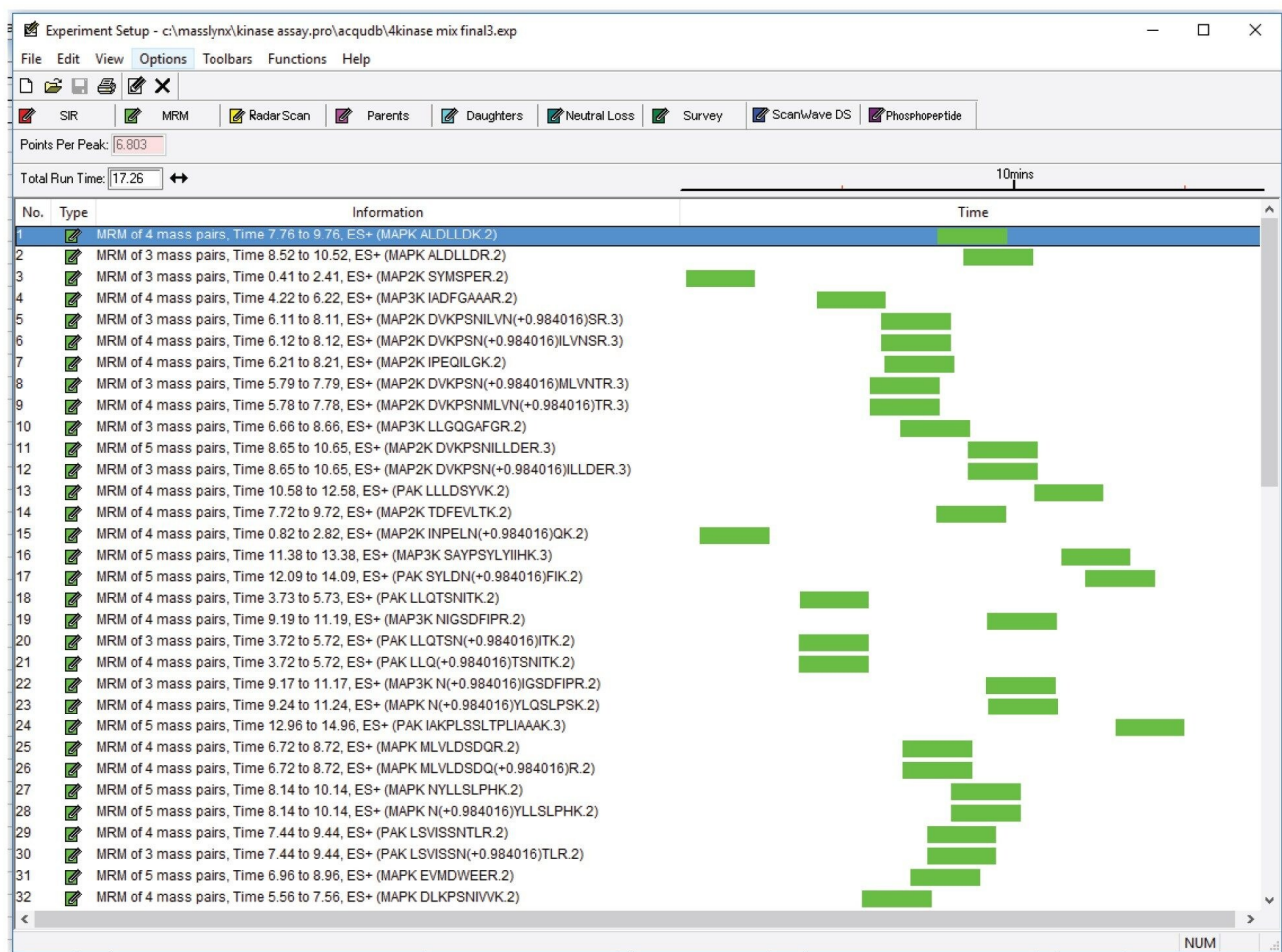


图1. MS实验设置示例，其中显示了MassLynx实验文件中的MS/MS通道。

---

## 结果与讨论

这种靶向激酶分析方法可对血液制品、细胞系或组织匀浆中的27种激酶进行筛查和半定量分析。这些激酶的选择依据是它们与人类生物学（特别是癌症诊断和预后）的相关性以及它们作为标准品的适用性。目前在该分析中可用的27种激酶，通过实验得到的通道为：

- PAK：1、2、3、4、5和6
- MAPK：1、3、7、8、9、10、11、12、13和14
- MAP2K：1、2、3、4、5、6和7
- MAP3K：1、2、3、8

每种激酶标准品均以未活化的形式购买，并按照典型的蛋白质组学工作流程用胰蛋白酶进行酶解。每种酶解后的激酶随后进样到与SELECT SERIES™ Cyclic™ IMS联用的ACQUITY™ M-Class系统中，进行所有肽的非靶向筛查。将采集到的数据导入PLGS软件，进行肽鉴定、评估并获取碎片离子谱图信息（图2）。目标肽根据它们对单一激酶蛋白形态的独特性，或一类激酶（例如MAPK）的独特性进行了评估。

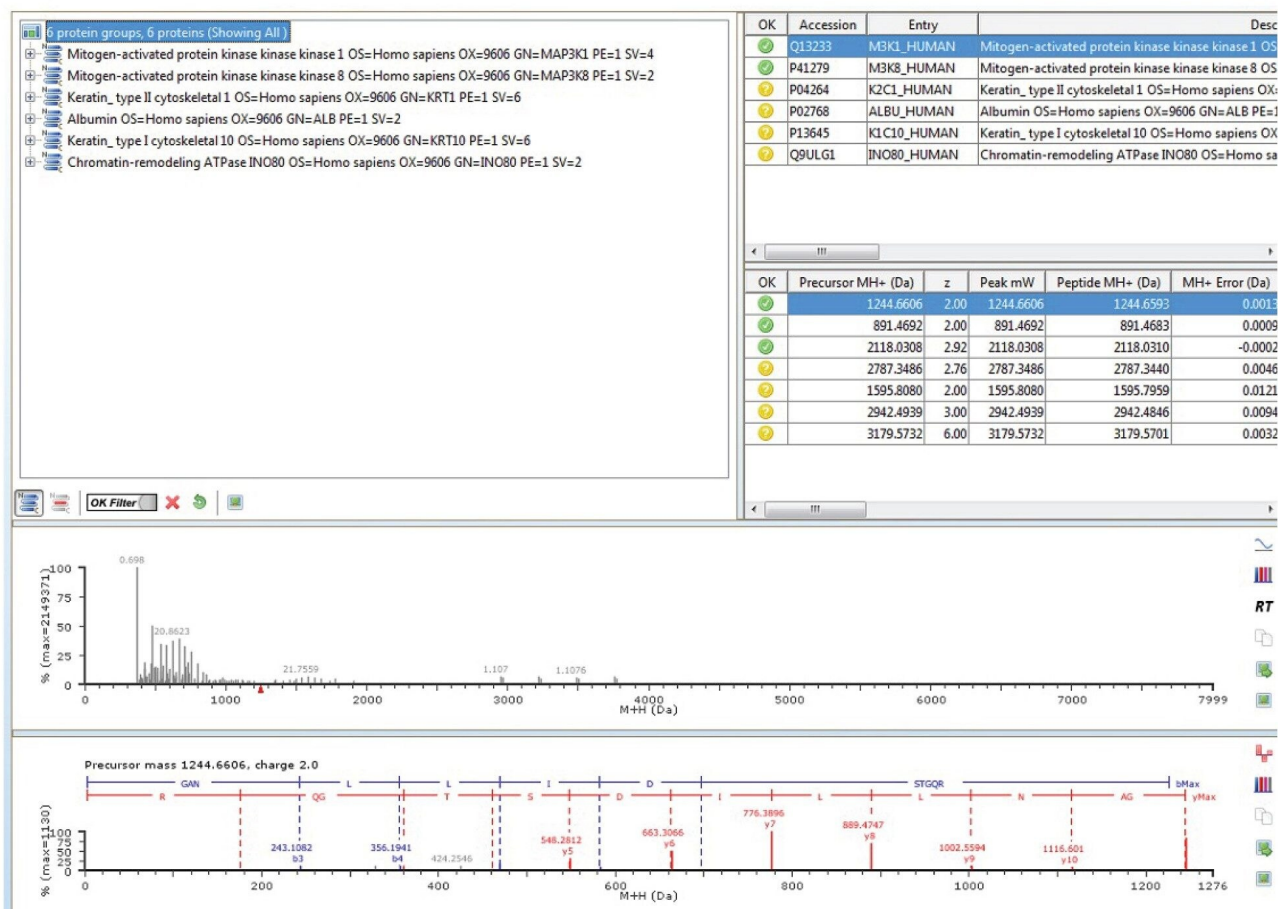


图2.PLGS视图示例：展示了单一激酶酶解肽(MAP3K1)的搜索示例，其中发现并鉴定出了其中7种单独的肽，突出显示的肽（对应于(K)GANLLIDSTGQR(L)）的碎片离子（b和y离子）可在视图底部看到。

研究中根据最小序列长度等标准选择了目标肽，然后使用串联四极杆质谱仪进行进一步的方法开发。随后对肽进行研究，确保每种肽都能被观察到，研究评估并选择了能产生最强信号的电荷态和碎片离子。图3展示了典型的肽信号，其中显示了组合TIC（运行分析时的典型视图），以及以XIC形式显示的生成TIC所包含的三个通道。

对于每种肽，该方法都包含3到8个通道。该分析共包含47个非冗余单个实验衍生肽，总共80个目标（包括翻译后修饰）。由于市售标准品为非活化形式，通常情况下，观察到的磷酸化残基（活化后）为非磷酸化状态。文献检索结果表明，分析中包括的80种肽中，有26种可能会发生磷酸化（一个或多个残基）。磷酸化肽的理论通道也包含在实验文件中。

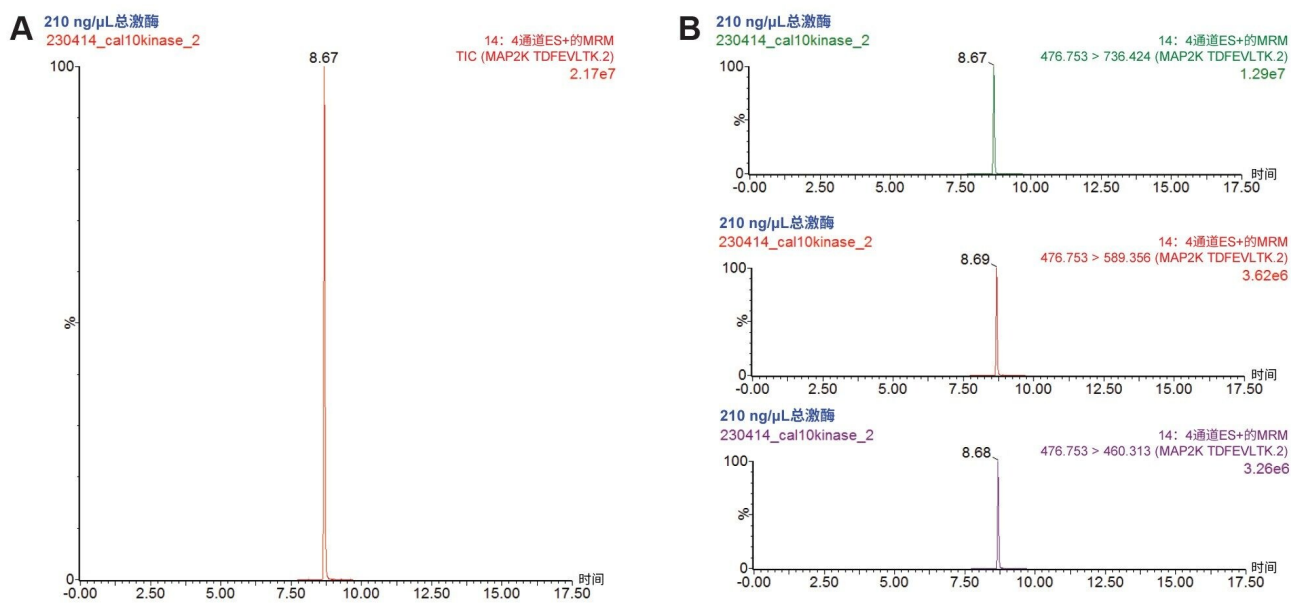


图3. MassLynx视图示例：(A) 合并所有信号（三个选定的通道）产生的TIC，用于确认样品中是否存在MAP2K7。(B) 三个单独通道的XIC。

仅使用纯化标准品创建标准曲线不足以模拟“现实”样品的复杂性，也没有考虑竞争性电离对肽响应的影响。因此，为模拟“真实”样品，用MassPREP™大肠杆菌酶解物标准品（P/N: [186003196 < https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186003196-massprep-e-coli-digest-standard.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186003196-massprep-e-coli-digest-standard.html)）连续稀释总激酶混标，获得总激酶柱上进样量范围为10.5 pg~210 ng的一系列样品。创建标准曲线，并计算每种肽的检测限（空白值 + 3 × SD），其中，GANPLAIDLLGR肽（代表MAPK类别）的LOD最低，为柱上35.38 pg (29 fmol)。这种肽的标准曲线在至少3.5个数量级范围内保持线性。总的来说，有23种肽的柱上LOD < 100 pg，还有32种肽的柱上LOD < 1 ng。对于PAK肽段标记IGEGSTGIVCIATVR，其余25种肽的LOD范围为柱上1.1~28.9 ng。

由于患者样本之间的异质性以及复杂网络级联中的作用，很难将计算出的检测限与生理水平相互关联。此外，疾病状态的变化不仅可以通过活性蛋白激酶（即，磷酸化）的增加或减少来显现，还可以通过总丰度的增加或减少来揭示<sup>2,3</sup>。因此，为了评估肽段标记在靶向分析中的适用性，我们在磷酸酶抑制剂存在的条件下裂解癌细胞系并用胰蛋白酶进行了酶解。研究中未完成其他样品富集工作。

使用上述色谱条件对细胞系进行分析，结果表明，四种肽段标记之间仅根据强度就可以区分所分析的细胞系（图4）。因此，这项分析证明了该分析方法及相关肽段标记在相对定量一些与癌细胞系一致水平的蛋白激酶方面具有

实用性。通过进一步的样品富集，有可能检测到其他肽段标记，并且通过磷酸肽特异性富集也可以提供相对活化/磷酸化的测量值。

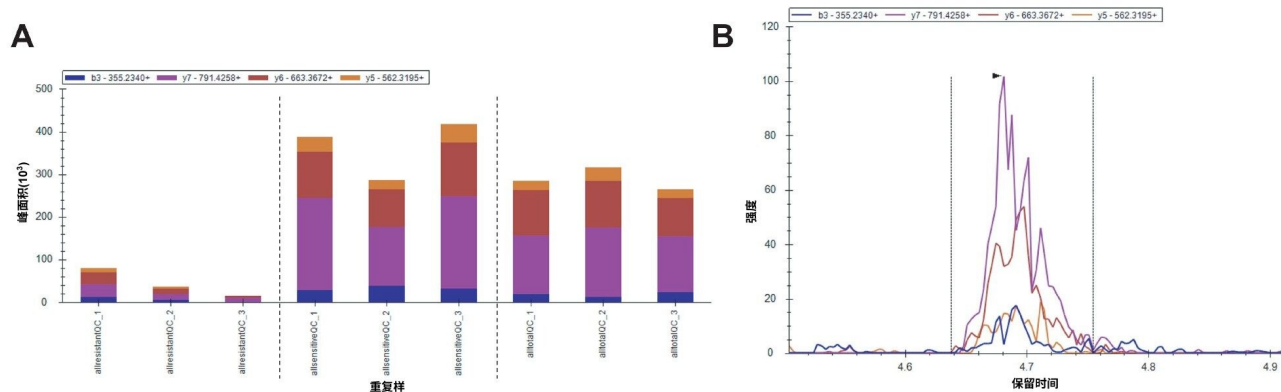


图4.(A) PAK标记肽段LLQTSNITK的离子丰度比，展示了非突变细胞系（低丰度）、突变细胞系（高丰度）和两者的混合物（中等丰度）之间的峰面积差异。(B) 突变细胞系分析监测的四种碎片离子中每一种的提取离子流色谱图，其中每种碎片离子都在预期保留时间4.7分钟处洗脱。

## 结论

将Xevo TQ-XS与稳定的肽段标记相结合，无需样品富集即可在高色谱流速下对生理水平的蛋白激酶进行相对定量，为常规分析开辟了新的可能。在定义的肽段标记中，有四种能够仅凭其丰度差异区分两种癌症细胞系，其中两种标记的灵敏度位于前十，柱上LOD > 50 pg。本应用纪要中定义的肽段标记不仅可用于揭示总激酶丰度的差异，还可用于测量磷酸化程度。

## 参考资料

1. Bhullar, K.S., Lagarón, N.O., McGowan, E.M. *et al.* Kinase-targeted Cancer Therapies: Progress, Challenges and Future Directions. *Mol Cancer* 17, 48 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0804-2> <<https://doi.org/10.1186/s12943-018-0804-2>>



2. Duong-Ly KC, Peterson JR. The Human Kinome and Kinase Inhibition. *Curr Protoc Pharmacol*. 2013 Mar; Chapter 2: Unit 2.9. doi: 10.1002/0471141755.ph0209s60 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23456613/>> . PMID: 23456613; PMCID: PMC4128285.
3. Lu Z, Hunter T. Degradation of Activated Protein Kinases by Ubiquitination. *Annu Rev Biochem* .2009;78:435–75. doi: 10.1146/annurev.biochem.013008.092711 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19489726/>> . PMID: 19489726; PMCID: PMC2776765.
4. Pillay N, Tighe A, Nelson L, Littler S, Coulson-Gilmer C, Bah N, Golder A, Bakker B, Spierings DCJ, James DI, Smith KM, Jordan AM, Morgan RD, Ogilvie DJ, Foiijer F, Jackson DA, Taylor SS. DNA Replication Vulnerabilities Render Ovarian Cancer Cells Sensitive to Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase Inhibitors. *Cancer Cell*. 2019 Mar 18;35(3):519–533. e8. doi: 10.1016/j.ccell.2019.02.004 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30889383/>> . PMID: 30889383; PMCID: PMC6428690.

---

## 特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

ACQUITY Premier系统 <

<https://www.waters.com/nextgen/global/products/chromatography/chromatography-systems/acquity-premier-system.html>>

ACQUITY UPLC M-Class 色谱系统 <

<https://www.waters.com/nextgen/global/products/chromatography/chromatography-systems/acquity-uplc-m-class-system.html>>

Xevo TQ-XS 三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134889751>>

SELECT SERIES Cyclic IMS <<https://www.waters.com/waters/global/SELECT-SERIES-Cyclic-IMS-ion-mobility-mass-spectrometer/nav.htm?cid=135021297>>

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

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

720008020ZH, 2023年9月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)