

应用说明

使用 NanoShield™ C18 捕集柱实现一流的蛋白质组覆盖率和媲美直接进样的性能

Dr Liang Chen, Dr Todd Blackburn, Dr Daniela-Lee Smith, Dr Veronica Cashin, Dr Jarrod Sandow

关键词

NanoShield, C18, 捕集柱, Aurora, IonOpticks, Thermo Scientific, Bruker, UHPLC 系统, nanoElute 2, 反相, 直接进样, 亲水性, 半峰全宽 (FWHM), 鉴定, DIA, DDA, 自下而上, 样品净化, timsTOF HT, Orbitrap, Fusion, Lumos, 高通量, 捕集-洗脱, 反冲洗

介绍

色谱捕集柱在蛋白质组学 UHPLC-MS 工作流程中至关重要, 它不仅能改善分析物聚焦, 还能通过在线样品净化实现快速上样, 从而保护分析柱免受堵塞和污染, 同时减少离子抑制。这些优势延长了色谱柱的使用寿命并减少了维护需求, 从而支持稳健、高通量和可重复的蛋白质组学分析。尽管有这些优势, 但与直接进样相比, 使用捕集柱传统上会牺牲肽段和蛋白质的鉴定数量。

NanoShield™ C18 5 cm × 100 μm 捕集柱极大地减小了这种折衷, 在仅有极少损失的情况下提供了接近直接进样的性能, 并且与其他捕集柱相比, 它在肽段鉴定、峰质量和亲水性肽段覆盖率方面表现更为优异。

色谱



NanoShield™ C18
5 cm x 100 μm
捕集柱

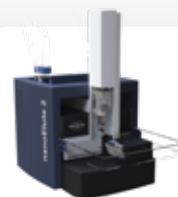


Aurora® Rapid™ CSI
8 cm x 75 μm
分析柱



Aurora® Ultimate™ CSI
25 cm x 75 μm
分析柱

LC/MS



Bruker
nanoElute 2 UHPLC



Bruker
timsTOF HT MS

Aurora 系列色谱柱的完美捕集柱搭档

我们使用反冲洗捕集-洗脱方法分析了 100 ng HeLa 胰蛋白酶酶解液, 并在两种工作流程中与直接进样进行了对比: 一是在 Aurora® Ultimate™ CSI (25 cm x 75 μm) 色谱柱上运行 37 分钟梯度, 二是在 Aurora® Rapid™ CSI (8 cm x 75 μm) 色谱柱上运行 14 分钟梯度。两种分析均在耦合了 Bruker timsTOF HT 质谱仪的 Bruker nanoElute 2 UHPLC 系统上进行。NanoShield™ 捕集柱 (5 cm x 100 μm, 3 μm C18 填料) 在所有指标上均展现了接近直接进样的性能, 同时显著优于竞品捕集小柱 (5 mm x 300 μm, 5 μm C18 填料)。在两根色谱柱上, 与直接进样相比, NanoShield™ 的蛋白质鉴定数量减少不到 1%, 母离子鉴定数量减少仅 1-3% (图 1)。峰质量指标同样保持稳健, 与直接进样相比, 半峰全宽 (FWHM) 仅有微幅增加, 峰形比率变化极小, 同时相对于竞品捕集小柱保持了显著的性能优势 (图 2)。

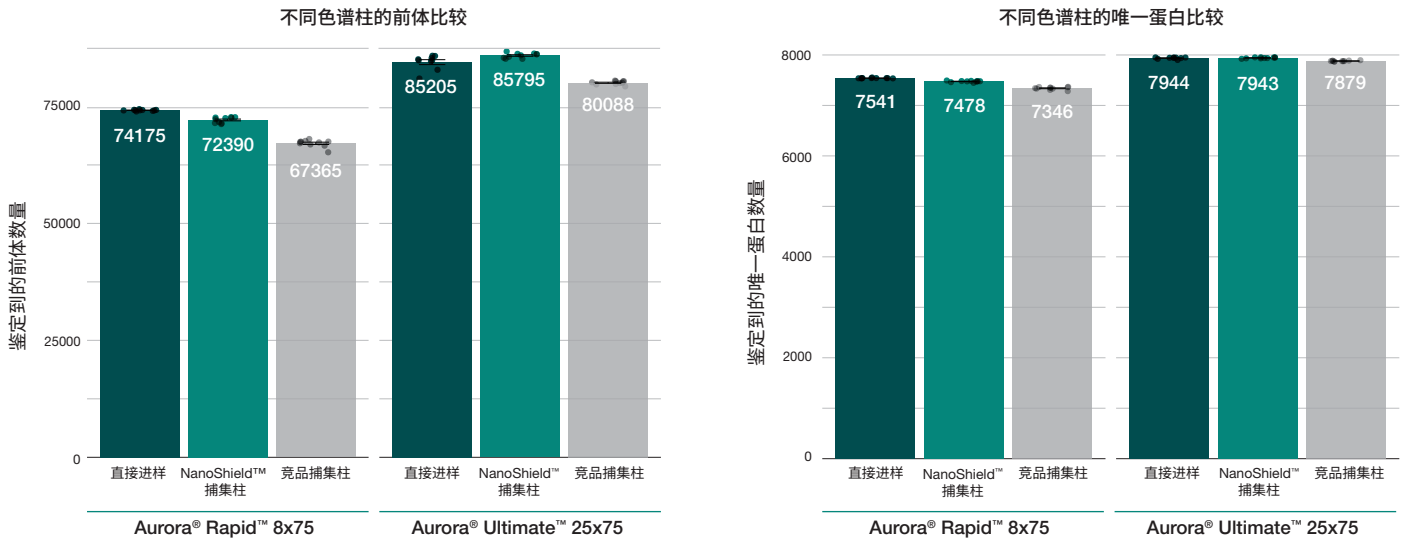


图 1: NanoShield™ 在不同色谱柱规格下保持了接近直接进样的鉴定率。对比了直接进样、5 cm NanoShield™ 捕集柱和竞品 C18 捕集小柱在 Aurora® Rapid™ 8 cm × 75 μm 色谱柱 (14 分钟梯度) 和 Aurora® Ultimate™ 25 cm x 75 μm 色谱柱 (37 分钟梯度) 上分析 100 ng HeLa 酶解液时的前体和唯一蛋白鉴定结果。数据使用 Spectronaut 20.2 进行分析。每个点代表一次独立样品进样的分析结果。

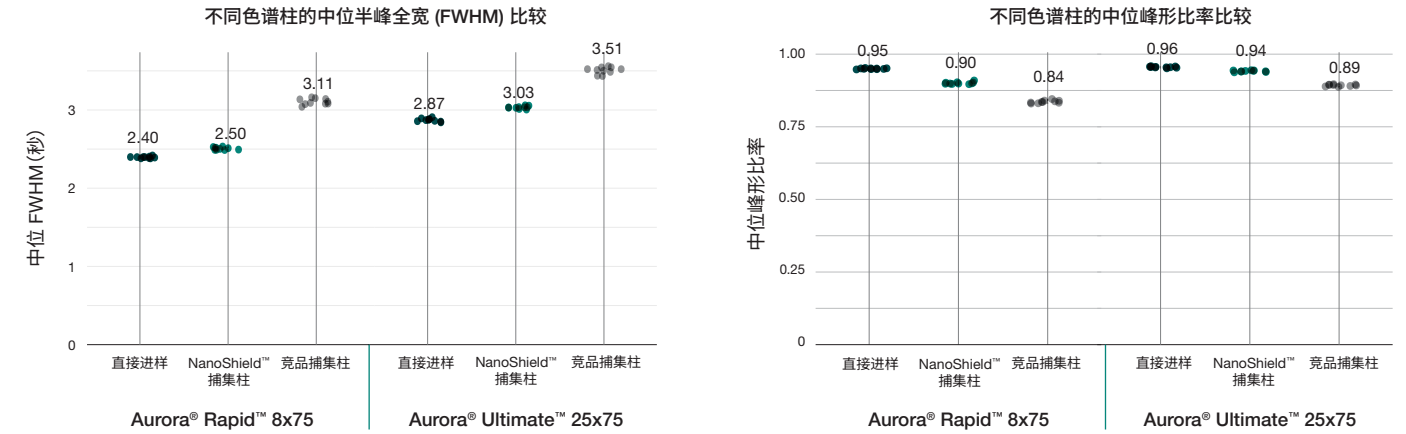


图 2: NanoShield™ 保持了峰质量, 性能损失极小。对比了直接进样、NanoShield™ 捕集柱和竞品 C18 捕集小柱在 Aurora® Rapid™ 8 cm × 75 μm 色谱柱 (14 分钟梯度) 和 Aurora® Ultimate™ 25 cm x 75 μm 色谱柱 (37 分钟梯度) 上的 FWHM 和峰形比率。数据使用 Spectronaut 20.2 进行分析。每个点代表一次独立样品进样的分析结果。

优异的肽段保留能力

使用传统捕集柱的一个劣势在于, 在样品上样过程中存在丢失亲水性肽段的危险。早洗脱肽段, 如通常具有更强亲水性的翻译后修饰肽段 (例如磷酸肽和糖肽), 可能会在上样和净化步骤中穿透传统捕集柱, 从而导致蛋白质组覆盖率出现缺失, 并降低整体鉴定数量。与直接进样工作流程所实现的全面分析相比, 这种亲水性肽段的损失代表了一种显著的性能折衷。NanoShield™ C18 捕集柱消除了这一障碍, 正如上文所示, 它提供了达到直接进样水平的蛋白质组覆盖率和鉴定结果。

为了量化整个梯度范围内的肽段保留情况, 我们从 Aurora® Ultimate™ 25 cm × 75 μm 直接进样分析结果中, 选取了一组按保留时间均匀分布的 100 个肽段作为参考集。为了确保检测的可靠性, 仅选取了高丰度肽段 (强度排名前 25%)。随后, 我们在 NanoShield™ 和竞品 C18 捕集小柱上对这些肽段进行了追踪分析。竞品捕集小柱未能保留大部分早洗脱肽段, 而 NanoShield™ 则成功捕获了直接进样中观察到的全部 100 个肽段 (图 3)。此外, NanoShield™ 在多次进样中展现了稳定的保留时间, 确保了可重复的肽段洗脱图谱 (图 4)。



图 3: NanoShield™ 捕集柱在整个色谱梯度范围内提供了优异的肽段保留能力。将直接进样与连接了 Aurora® Ultimate™ (25 cm × 75 μm) 色谱柱的 NanoShield™ 捕集柱及竞品 C18 捕集小柱进行对比, NanoShield™ 捕集柱完全保留了早洗脱肽段, 而这些肽段在竞品捕集小柱上则发生了丢失。

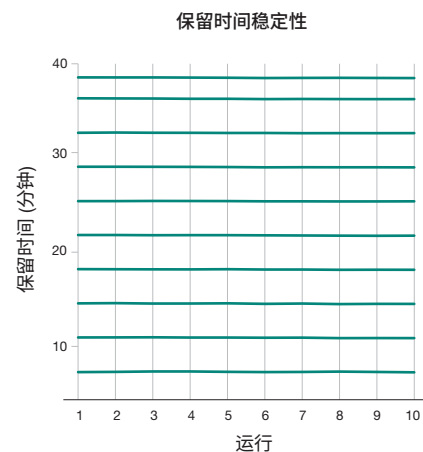


图 4: NanoShield™ 捕集柱的保留时间稳定性。展示了在 Aurora® Ultimate™ 25 cm × 75 μm 色谱柱上, 10 次进样中 10 个肽段的保留时间稳定性。

使用不同的
LC-MS 系统?
没问题。



我们使用反冲洗捕集-洗脱方法分析了 100 ng HeLa 胰蛋白酶酶解液, 并在 40 分钟梯度条件下与直接进样进行了对比。实验采用连接了 Thermo Scientific Orbitrap Fusion Lumos 质谱仪的 UltiMate 3000 UHPLC 系统, 并配备了 Aurora® Ultimate™ XT 25 cm × 75 μm 色谱柱。NanoShield™ 捕集柱 (5 cm × 100 μm, 3 μm C18 填料) 在所有指标上均展现了接近直接进样的性能, 与直接进样相比, 蛋白质和肽段鉴定数量的减少均不到 1% (图 5)。峰质量指标同样保持稳健, 与直接进样相比, 半峰全宽 (FWHM) 没有变化, 峰形比率仅下降了 2-4% (图 6)。

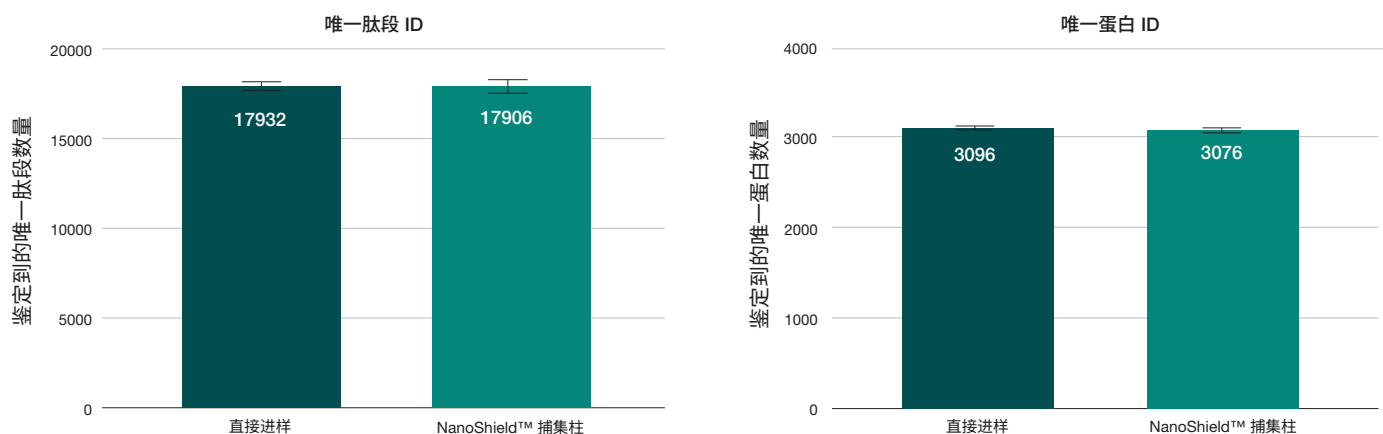


图 5: 在 Aurora® Ultimate™ XT 25cm x 75 μm 色谱柱 (40 分钟梯度) 上, 对比直接进样与 NanoShield™ 捕集柱分析 100 ng HeLa 酶解液的唯一肽段和蛋白质鉴定结果。原始 DDA 数据使用 FragPipe (版本 22.0) 和 MaxQuant (版本 2.6.7.0) 进行分析。

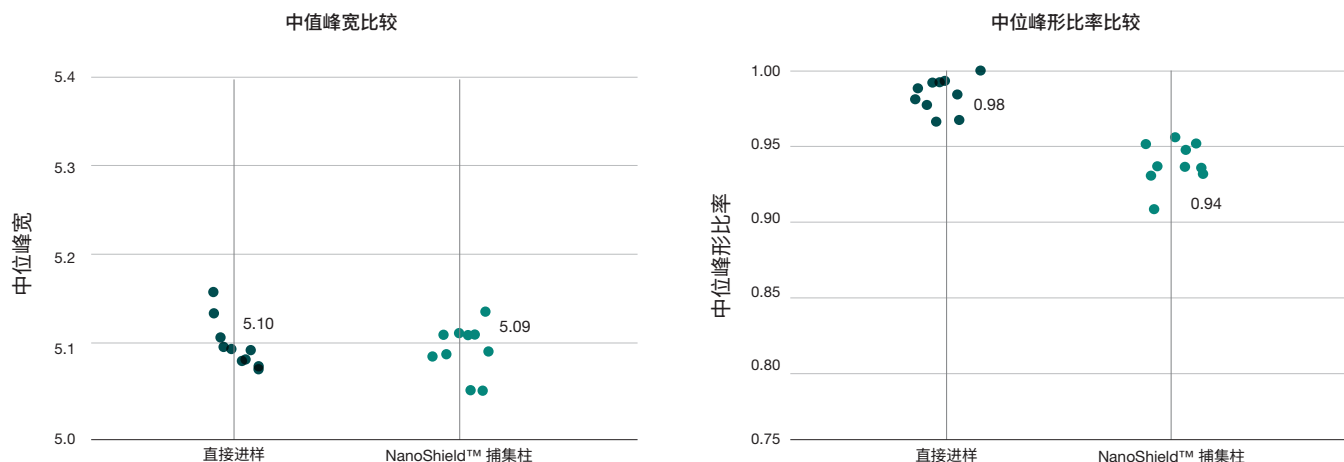


图 6: NanoShield™ 捕集柱保持了峰质量, 性能损失极小。对比了在 Aurora Ultimate XT 25 cm x 75 μm 色谱柱 (40 分钟梯度) 上进行直接进样和使用 NanoShield™ 分析时的 FWHM 和峰形比率。原始 DDA 数据使用 FragPipe (版本 22.0) 和 MaxQuant (版本 2.6.7.0) 进行分析。每个点代表一次独立样品进样的分析结果。

方法

LC-MS 分析

LC-MS/MS 分析分别在耦合至 nanoElute 2 系统的 timsTOF HT 质谱仪 (Bruker Daltonics) 上, 以及耦合至 UltiMate 3000 UHPLC 的 Orbitrap Fusion Lumos 质谱仪 (Thermo Scientific) 上进行。肽段分离使用了配备 CaptiveSpray 离子源 (Bruker Daltonics) 的 Rapid (8 cm $\times$ 75 μm , 1.7 μm C18 填料) CSI 和 Ultimate (25 cm $\times$ 75 μm , 1.7 μm C18 填料) CSI 分析柱 (IonOpticks), 以及配备 NanoSpray Flex 离子源 (Thermo Scientific) 和 NanoSpray Flex 适配器 (IonOpticks) 的 Ultimate (25 cm $\times$ 75 μm , 1.7 μm C18 填料) XT 分析柱。所有分析柱均加热至 50 $^{\circ}\text{C}$ 。Aurora XT 色谱柱使用 HeatSync 加热控制器和柱加热器 (IonOpticks) 进行加热, 而 Aurora CSI 色谱柱则在 Bruker Column Toaster 中加热。

对于捕集-洗脱工作流程, 采用反冲洗配置的 NanoShield™ C18 捕集柱 (5 cm $\times$ 100 μm , 3 μm C18 填料, IonOpticks) 和竞品 C18 捕集小柱 (5 mm $\times$ 300 μm , 5 μm C18 填料)。所有捕集柱均安装在阀上, 未加热, 处于室温环境。流动相由含 0.1% 甲酸 (FA) 的 LC-MS 级水 (流动相 A) 和含 0.1% FA 的 99.9% 乙腈 (流动相 B) 组成。对于 Rapid 和 Ultimate CSI 色谱柱, 使用两个柱体积的流动相 A 在 800 bar 压力下将样品加载到捕集柱上。对于 Ultimate XT 色谱柱, 使用流动相 A 以 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速将样品加载到捕集柱上, 持续 3 分钟。对于 Rapid CSI 色谱柱, 肽段分离采用的梯度为: 1–3% B (0–1 分钟), 随后为 3–35% B (1–14 分钟), 流速为 0.25 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。对于 Ultimate CSI 色谱柱, 梯度为: 1–3% B (0–1 分钟), 随后为 3–35% B (1–37 分钟), 流速为 0.4 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。

对于 Ultimate XT 色谱柱, 梯度设置为: 1% B (0–3 分钟), 随后为 1–3% B (3–4 分钟) 和 3–35% B (4–40 分钟), 流速为 0.4 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。对于所有类型的色谱柱, 流动相组成保持在 85% B 持续三个柱体积以清洗色谱柱, 随后在 1% B 下进行两个柱体积的再平衡。

对于 timsTOF HT, 数据在 dia-PASEF 模式下采集, MS1 扫描范围为 100–1700 m/z 。使用 21 个隔离 m/z 和离子淌度 (IM) 窗口进行串行 MS/MS 碎裂, 质量范围和 IM 范围分别覆盖 475–1000 m/z 和 0.85–1.27 Vs/cm^2 $1/\text{K0}$ 。对于 Orbitrap Fusion Lumos, 数据在 DDA 模式下采集, 全 MS 扫描范围为 350–1550 m/z , MS1 分辨率为 60,000, 循环时间为 1.5 s, AGC 目标值为 4e5, RF 透镜设置为 30%。串联质谱图在离子阱中采集, 强度阈值为 2.5e4, 采用“快速 (rapid)”离子阱扫描速率, 隔离窗口为 1.6 m/z , 归一化 HCD 碰撞能量为 30%。

所有实验均使用洁净的商业化 HeLa 酶解液进行。在没有预先样品净化的应用中, 捕集柱预计将通过去除污染物 (如可能在电喷雾电离过程中引起离子抑制的胰蛋白酶酶解缓冲液中的盐类) 来提高性能。

数据处理

DIA 数据使用 Spectronaut (版本 20.2) 进行分析。DDA 数据使用 FragPipe (版本 22.0) 和 MaxQuant (版本 2.6.7.0) 进行处理。进一步的数据处理和分析使用 R 语言完成。

结论

NanoShield™ C18 捕集柱 (5 cm $\times$ 100 μm , 3 μm C18 填料) 通过捕获亲水性肽段并提供接近直接进样的性能, 同时提供在线样品净化、分析物聚焦和快速上样等核心优势, 为基于捕集柱的蛋白质组学工作流程树立了新的性能标准。其性能在多个 LC-MS 平台上得到了验证: 在 nanoElute 2-timsTOF HT 系统上, 与直接进样相比, NanoShield™ 的蛋白质鉴定数量减少不到 1%, 前体鉴定数量减少 1–3%; 而在 Ultimate 3000 和 Orbitrap Fusion Lumos 系统上, 观察到蛋白质和前体的减少均不到 1%。在 Aurora® CSI 和 XT 色谱柱上进行的快速 (14 分钟) 和标准 (约 40 分钟) 梯度分析中, NanoShield™ 保持了卓越的峰质量, 半峰全宽 (FWHM) 增加极小, 且性能显著优于竞品捕集小柱 (5 mm $\times$ 300 μm , 5 μm C18 填料)。

ionopticks

仅供研究使用
© 2025 Ion Opticks Pty Ltd. 保留所有权利。

12 Gipps Street, Collingwood 3066, Victoria, Australia
www.ionopticks.com ABN 99 621 674 459

请访问 www.ionopticks.com/resource-hub
了解更多信息

“IonOpticks”及所有所示商标均为 Ion Opticks Research Pty Ltd 及其关联公司的财产, 除非另有说明。
Thermo Scientific、Dionex、Ultimate 3000、Orbitrap、Fusion Lumos 是 Thermo Fisher Scientific 的商标。timsTOF、
nanoElute 是 Bruker Daltonics 的商标。Spectronaut 是 Biognosys AG 的商标。