

## 用于富集低分子量糖蛋白的多功能磁性纳米材料的制备

窦 鹏<sup>§</sup>, 向玉苗<sup>§</sup>, 梁 靓<sup>§</sup>, 刘 震<sup>\*</sup>

(南京大学化学化工学院, 生命分析化学国家重点实验室, 江苏 南京 210023)

**摘要:**低分子量糖蛋白被认为是发现疾病生物标志物的宝库。特异性的萃取吸附剂对这一类化合物的萃取和富集是必不可少的。硼亲和材料在近年来取得了很大的发展,但专门用于选择性富集低分子量糖蛋白的硼亲和材料目前鲜有报道。该文提出了具有多种功能的磁性纳米颗粒(MNPs),用于低分子量糖蛋白的选择性捕获。该多功能磁性纳米颗粒是用硼酸功能化聚合物网络包裹的磁性纳米复合物。该多功能磁性纳米材料是利用磁性的纳米颗粒内核通过在其表面修饰苯硼酸功能团的聚丙烯酸高分子网络链制备得到。该材料不仅具有常规磁性材料在磁分离方面的基本优势,还能提供三重预先设计的先进功能:1)尺寸排阻效应,去除高分子量蛋白质的干扰;2)对低分子量糖蛋白的选择性萃取;3)保护捕获到的低分子量糖蛋白不被降解和污染。该材料的选择性萃取功能来自于硼酸配基与糖蛋白的顺式二醇部分的亲和性,而尺寸限制效应和保护功能则依赖于磁性纳米颗粒表面修饰的聚合物网络,允许低分子量化合物选择性通过。通过实验验证了这些预设的功能,且通过改变聚合物链长可以调节限径效应的阈值。这种多功能磁性纳米复合物可以进一步发展成有前景的纳米探针,不仅可以选择性捕获低分子量糖蛋白,还可以选择性捕获核苷和聚糖等其他具有重要生物学意义的顺式二醇分子。因此,该文报道的材料制备策略为从复杂样品中选择性萃取靶标化合物的多功能吸附剂的设计和合成提供了新思路。

**关键词:**硼亲和;糖蛋白;分子识别;纳米材料;尺寸排阻

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2021)10-1102-09

## Preparation of multi-functional magnetic nanoparticles for harvesting low-molecular-weight glycoproteins

DOU Peng<sup>§</sup>, XIANG Yumiao<sup>§</sup>, LIANG Liang<sup>§</sup>, LIU Zhen<sup>\*</sup>

(State Key Laboratory of Analytical Chemistry for Life Science, School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210023, China)

**Abstract:** Low-molecular-weight glycoproteins (LMW-GPs) are considered promising candidates for disease biomarker discovery. Selective sorbents are essential for the extraction and enrichment of this class of compounds. Boronate affinity chromatography is a unique separation mode in liquid chromatography. It enables the selective separation and isolation of *cis*-diol-containing compounds such as glycoproteins and saccharides. Recent years have witnessed the rapid development of boronate affinity materials, particularly for use as selective sorbents in proteomics and metabolomics. However, studies are scarce on the specific design of such materials for the selective extraction of LMW-GPs. Herein, we present multifunctional magnetic nanoparticles (MNPs) for selectively harvesting LWM-GPs. The multifunctional MNPs were rationally designed and prepared by wrapping magnetic core nanoparticles with a phenylboronic acid-grafted poly(acrylic acid) (PAA) network. In addition to fulfilling the primary function of conventional MNPs in magnetic separation, multifunctional MNPs can offer three pre-determined

收稿日期:2021-07-31

\* 通讯联系人.Tel:(025) 89685639, E-mail: zhenliu@nju.edu.cn.

§ 现工作单位:窦鹏,龙沙生物技术有限公司;向玉苗,仙桃职业学院;梁靓,唐山海港经济开发区北京理工大学机械与车辆学院转化研究中心。

基金项目:国家自然科学基金面上项目(21075063);江苏省自然科学基金滚动项目(KB2011054)。

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 21075063); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. KB2011054).

advanced functions: 1) the size-restriction effect, which enables the elimination of the interference of high-molecular-weight proteins and other species; 2) the selective extraction of LMW-GPs; and 3) protection of the harvested LMW-GPs against degradation and contamination. The multifunctional MNPs enable selective extraction due to the affinity of the boronic acid ligand to the *cis*-diol moieties of the glycoproteins. The size-restriction effect and protection function depend on the polymer network on the surface of the MNPs, which allows the selective passage of low-molecular-weight molecules. Transmission electron microscopy (TEM) characterization showed that the MNPs were well-shaped nanoparticles, with a diameter of approximately 60 nm. The size-restriction effect was first predicted by a thermogravimetric analysis-based theoretical calculation, where for MNPs prepared using PAA with an average molecular weight of 240 kDa, the estimated pore size of the network was 0.9 nm. The boronate affinity and size-exclusion effect were verified by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and capillary zone electrophoresis (CZE). To investigate the dependence of the selectivity of the MNPs to LMW-GPs in a complex environment and the size-restriction threshold for the PAA chain length, nano-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (nano-LC-MS/MS) was performed to analyze the molecular mass of fragments harvested by the MNPs from the tryptic digest of horseradish peroxidase (HRP, a typical glycoprotein). The polymer chain length or the molecular weight of the PAA used played a critical role in determining the molecular weight thresholds of proteins above which the size exclusion effect will occur. The threshold values were found to be 5.0, 9.3, 4.1, 5.1, and 2.7 kDa for MNPs prepared using PAA with average molecular weights of 2, 5, 15, 100, and 240 kDa, respectively. This dependence enabled adjustment of the threshold value for inducing the size-exclusion effect of the multifunctional MNPs by changing the PAA chain length. The multifunctional MNPs can be further developed into promising nanoprobes for selectively harvesting not only LMW-GPs, but also other *cis*-diol-containing biomolecules of biological importance, such as nucleosides and glycans. Thus, the material preparation strategy reported herein offers new insights for the rational design and synthesis of multifunctional-affinity sorbents to selectively extract target compounds from a complex sample matrix.

**Key words:** boronate affinity; glycoproteins; molecular recognition; nanoparticles; size exclusion

蛋白糖基化是生物体中普遍发生且重要的生物学过程,其参与多种分子生物学的功能和途径<sup>[1,2]</sup>,是临床诊断重要的生物标志物。研究表明,体液中低分子量蛋白质(LMWP)和多肽含有丰富的生物学信息,能从中发现大量的生物标志物<sup>[3]</sup>。因此,低分子量糖蛋白质(LMW-GP)是生物标志物研究的重点。然而,低分子量糖蛋白在生物样品中丰度很低,糖肽/糖蛋白在质谱检测时容易被其他非糖蛋白抑制,因此需要发展高效的低糖蛋白分离富集方法。

对于富集低分子量蛋白质,目前已有的方法包括超滤<sup>[4]</sup>、尺寸排阻色谱<sup>[5,6]</sup>、尺寸限制性材料萃取<sup>[7,8]</sup>,基于纳米孔道的膜或颗粒的萃取也发展成一种新的替代方案<sup>[9,10]</sup>。近期,纳米材料在富集低丰度生物标志物方面具有巨大的潜力<sup>[11]</sup>。目前糖蛋白的分离富集方法主要有凝集素亲和色谱法<sup>[12-14]</sup>、固相脲化学富集方法<sup>[15,16]</sup>、磁性纳米材料硼亲和萃取<sup>[17-19]</sup>、硼亲和色谱<sup>[20,21]</sup>、亲水相互作用色谱法<sup>[22,23]</sup>等。然而,就作者所知,目前还没有专

引用本文:窦鹏,向玉苗,梁靓,刘震. 用于富集低分子量糖蛋白的多功能磁性纳米材料的制备. 色谱,2021,39(10):1102-1110.

DOU Peng, XIANG Yumiao, LIANG Liang, LIU Zhen. Preparation of multi-functional magnetic nanoparticles for harvesting low-molecular-weight glycoproteins. Chinese Journal of Chromatography, 2021, 39(10): 1102-1110.

门用来富集低分子量糖蛋白的方法。

硼亲和材料在近年来取得了很大的发展<sup>[19]</sup>。特别是,将功能化磁性纳米材料(MNPs)作为微萃取探针用于选择性富集生物样品的研究越来越受到科研工作者的重视<sup>[24-28]</sup>。相比于常规方法,磁性纳米材料的优势是比表面积大,萃取容量高,可操控性强,生物兼容性好。同时,硼酸已经成为很有前途的特异性富集糖蛋白的亲配体<sup>[20,21]</sup>。硼酸亲和法的原理为:硼酸分子与含顺式二羟基结构的化合物在碱性条件下形成五、六元环脂的复合物结构,而在酸性条件下,该复合物发生水解,从而释放出靶标分子。和凝集素亲和色谱相比,硼亲和色谱具有以下优势:首先,硼亲和色谱对糖蛋白具有广泛的选择性,不仅可以富集 *N*-糖蛋白,也可以富集 *O*-糖蛋白;其次,硼亲和色谱可以通过简单地改变环境 pH 值来控制糖蛋白的捕获和释放,最后,硼亲和色谱可以通过挥发性酸性溶液洗脱被萃取的物质,因此是完全质谱兼容的,但专门用于选择性富集低分子量糖蛋白的硼亲和材料目前鲜有报道。

本文报道一种可以选择性富集低分子量糖蛋白的多功能磁性纳米材料。该多功能磁性纳米材料有特殊的外部结构,它的表面修饰了硼酸功能团高分子网络链,除了具有磁性纳米材料的普遍特性外,该纳米粒子具有如下 3 个特性:1) 尺寸排阻性能,消除高分子量蛋白质和其他物种的干扰;2) 特异性萃取低分子量糖蛋白,3) 保护萃取到的低分子量的糖蛋白不被酶解和污染。多功能磁性纳米材料的结构和尺寸排阻原理如图 1 所示。磁性纳米材料的表面修饰了聚丙烯酸高分子网络,缠绕的线性聚合物链覆盖在磁性纳米材料的表面,形成了一个尺寸排阻

的网络链,使得只有低分子量的分子才能通过。聚丙烯酸(PAA)链上的聚丙烯酸的部分羧基上键合了苯硼酸配基,因为羧基具有亲水性,而苯基硼酸具有一定的疏水性,在水溶液中,高分子链上的羧基处于高分子网络外侧保证表面很好的亲水性,而苯硼酸基团相对疏水,处于高分子网络内侧,因此只有通过高分子网络的低分子量分子中的糖蛋白才能被特异性萃取,另外,被捕获的低分子量的糖蛋白由于处于高分子网络内部,高分子网络的空间位阻使得低分子量糖蛋白周围没有适合酶相互作用的空间,因此起到了保护富集到的低分子量糖蛋白不受酶解的作用。本文对该材料的结构和性能进行了表征和验证,并考察了 PAA 链的分子量对材料的尺寸排阻效应的影响。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器、试剂、材料和方法

*N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)购自阿拉丁试剂公司(上海)。牛血清白蛋白(BSA)、辣根过氧化物酶(HRP)和平均分子质量为 100 kDa、15 kDa、5 kDa、2.1 kDa 的 PAA 购自美国 Sigma 公司。丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺预混液( $C=2.6\%$ )、四甲基乙二胺(TEMED)和溴酚蓝购自美国 Bio-Rad 公司。1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC)、间氨基苯硼酸(APBA)和平均分子质量 240 kDa 的 PAA 购自 Alfa Aesar 公司(天津)。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)相对分子量标准品购自 Promega 公司(上海),胰蛋白酶购自 Promega(北京)。其他试剂购自南京化学试剂公司,均为分析纯。HRP 酶解方法参照文献<sup>[29]</sup>,将 50  $\mu\text{g}$

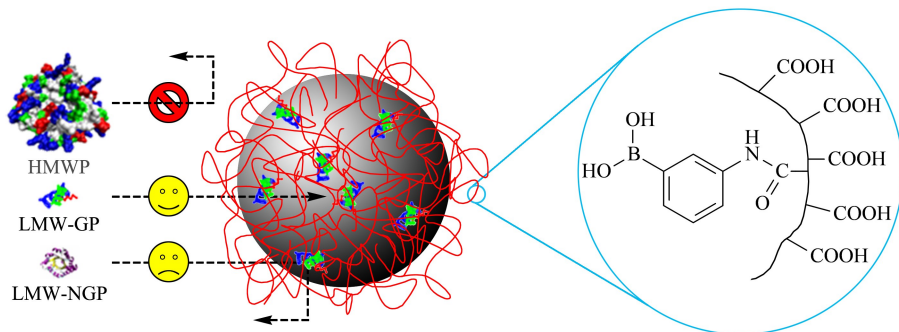


图 1 间氨基苯硼酸嫁接聚丙烯酸链修饰的磁性纳米颗粒(APBA-PAA-MNPs)的尺寸排阻效应和聚合物链的结构示意图

Fig. 1 Schematic of the size exclusion effect and polymer chain structure of 3-aminophenylboronic acid-grafted poly(acrylic acid) chain-modified magnetic nanoparticles (APBA-PAA-MNPs)

HMWP: high-molecular-weight protein; LMW-GP: low-molecular-weight glycoprotein; LMW-NGP: low-molecular-weight non-glycoprotein.

HRP 与 2  $\mu\text{g}$  胰蛋白酶混合溶于 25  $\mu\text{L}$  50 mmol/L 碳酸氢铵溶液中,在 37  $^{\circ}\text{C}$  下酶解过夜,产物存放于 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中。

材料的形貌表征采用日本 JEOL 公司的 JEM-1010 型透射电子显微镜,加速电压 100 kV。制样是将纳米材料均匀分散在水中后滴在铜网上,自然风干备用。红外光谱为美国 Thermo Fisher 公司的 Nicolet 6700 型傅里叶变换红外光谱仪。Zeta 电位测定采用英国 Malvern 公司的 Nano Z zeta 电位仪,测定时磁性纳米材料被分散在纯水中。SDS-PAGE 采用美国 Bio-Rad 公司的 Mini Protean 3 电泳槽,电源型号为 Powerpac HV。电泳结束后采用考马斯亮蓝 R-250 染料(购自美国 Bio-Rad 公司)进行染色,并用 Gel Doc XR documentation 凝胶成像系统进行记录。基质辅助激光诱导解离-飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)在德国 Bruker 公司的 Autoflex 质谱仪上完成。纳流液相色谱-质谱联用(nano-LC-MS)实验在美国 Thermo Fisher 公司的纳流 LC-LTQ-Orbitrap XL 系统上完成。毛细管电泳实验在美国 Beckman Coulter 公司的 P/ACE MDQ 毛细管电泳仪上完成。

## 1.2 功能化磁性纳米材料合成

### 1.2.1 氨基功能化磁性纳米材料(AMNPs)<sup>[30]</sup>

将 1.0 g 六水合三氯化铁、6.5 g 1,6-己二胺和 2.0 g 无水碳酸钠溶于 30 mL 乙二醇中,装入带有四氟乙烯内衬的 50 mL 高压水热釜中在 198  $^{\circ}\text{C}$  下反应 6 h。制得的氨基功能化磁性纳米材料用水和乙醇各清洗 3 次后在 50  $^{\circ}\text{C}$  下真空烘干备用。

### 1.2.2 多功能磁性纳米材料

将 500 mg AMNPs 分散于 50 mL 30 g/L 的 PAA 溶液中,并加入 500 mg EDC 和 1 g NHS。超声混合均匀,机械搅拌 2 h。制得的 PAA 活化磁性纳米材料(PAA-grafted AMNPs)用水和乙醇各清洗 3 次后在 50  $^{\circ}\text{C}$  下真空烘干备用。取 200 mg PAA-grafted AMNPs 分散在 40 mL 5 g/L 间氨基苯硼酸一水合物溶液中,并加入 400 mg EDC 和 800 g NHS。超声混合均匀,机械搅拌 2 h。制得的多功能磁性纳米材料(APBA-PAA-MNPs)用水和乙醇各清洗 3 次后在 50  $^{\circ}\text{C}$  下真空烘干备用。

### 1.2.3 间氨基硼酸功能化磁性纳米材料

将 400 mg AMNPs 分散于 40 mL 含 5% (v/v) 戊二醛的 100 mmol/L 磷酸钠缓冲溶液(pH 7.0)中机械搅拌 2 h。得到的戊二醛活化的磁性纳米材料

用 100 mmol/L 磷酸钠缓冲溶液清洗 3 次后分散于含 40 mL 5 g/L 间氨基苯硼酸一水合物和 1% (质量分数)的氰基硼氢化钠的 100 mmol/L 磷酸钠缓冲溶液中。反应 2 h 后,收集制得的间氨基硼酸功能化磁性纳米材料(APBA-GA-MNPs)用水和乙醇各清洗 3 次后在 50  $^{\circ}\text{C}$  下真空烘干备用。

## 1.3 萃取和解吸

**SDS-PAGE 分析** 将 HRP 和 BSA 溶解在含 500 mmol/L NaCl 的 50 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3\text{-NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (pH 10) 中,每种蛋白质各 1 g/L。取 2 mg MNPs 和 50  $\mu\text{L}$  上述蛋白质溶液,在一个 PCR 管中混匀,振荡萃取 1 h。随后将 MNPs 用外加磁场吸附于管壁,弃去上清液。MNPs 用含 500 mmol/L NaCl 的 50 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3\text{-NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (pH 10) 和 50 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3\text{-NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (pH 10) 各清洗 3 次后分散于 25  $\mu\text{L}$  50 mmol/L 醋酸中振荡解吸 1 h。最后将 MNPs 用外加磁场吸附于管壁,收集解吸后的醋酸溶液准备进一步分析。

**毛细管电泳分析** 萃取解吸步骤相同,唯一不同的是在萃取用的 HRP、BSA 混合溶液中加入 1 g/L 腺苷。

**nano-LC-MS 分析** 将 HRP 酶解产物与含 1 mol/L NaCl 的 100 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3\text{-NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (pH 10) 等体积混合后取 50  $\mu\text{L}$  用于萃取,其他步骤同上。

## 1.4 SDS-PAGE 分析

SDS-PAGE 分析采用 1 mm 厚度的凝胶。用于浓缩胶灌制的各种溶液的配比如下:15 mL 30% 的丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺预混液 ( $C=2.6\%$ ), 6.3 mL 0.5 mol/L Tris-甘氨酸缓冲液 (pH 6.8), 0.25 mL 10% SDS 溶液,15 mL 超纯水,0.125 mL 10% 过硫酸铵和 0.025 mL 四甲基乙二胺 (TEMED)。用于分离胶灌制的各种溶液的配比如下:4.0 mL 30% 的丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺预混液 ( $C=2.6\%$ ), 2.5 mL 1.5 mol/L Tris-甘氨酸缓冲液 (pH 8.8), 0.10 mL 10% SDS 溶液,3.35 mL 超纯水,0.050 mL 10% 过硫酸铵和 0.005 mL TEMED。制胶时采用 10 孔的制孔梳。样品与 5 $\times$ 的上样缓冲液(100 g/L SDS、10 mmol/L 二硫苏糖醇、20% (v/v) 甘油、0.2 mol/L Tris-HCl (pH=6.8), 0.5 g/L 溴酚蓝)按 4:1 (v/v) 的比例混合,在 100  $^{\circ}\text{C}$  下加热 3 min。等样品冷却到室温后取 20  $\mu\text{L}$  加入上样孔。在电泳过程中,前 25 min 电压为 100 V,而后将电压升高到

200 V 直至溴酚蓝条带运行到凝胶底部。

### 1.5 毛细管电泳分析

实验中使用的毛细管为 60 cm (有效长度 50 cm) × 75 μm I.D. × 375 μm O.D., 购自河北永年光纤厂。每天实验开始前, 均使用如下条件平衡毛细管: 1 mol/L NaOH 冲洗 20 min, 纯水冲洗 20 min, 背景缓冲溶液 (BGE) 冲洗 20 min。每两次实验之间, 用以下条件平衡毛细管: 0.1 mol/L NaOH 冲洗 2 min, 纯水冲洗 2 min, BGE 冲洗 2 min。BGE 组成为 35 mmol/L 硼砂缓冲液 (pH 10.0)。毛细管温度控制在 25 °C。进样方式采用压力进样, 进样压力 3.45 kPa (0.5 psi), 进样时间 3 s。分离电压设定在 20 kV。检测器的检测波长设定为 214 nm。

### 1.6 Nano-LC-MS 分析

LC-LTQ-Orbitrap XL 液相色谱-质谱联用系统配有两台四元梯度泵, 一个微量自动进样器和配有纳喷源的 LTQ-Orbitrap XL 高分辨质谱。实验中我们选用 Agilent 公司的富集柱 (5 mm × 0.3 mm, 填料为 Zorbax 300SB-C18 5 μm)。分析柱为自制的填充 C18 毛细管色谱柱, 内径 75 μm, 长度 12 cm。制作方法简述如下: 首先在一段石英毛细管 (75 μm I.D.) 的一端用丁烷火焰烧制拉出一个内径 5 ~ 10 μm 的喷针; 随后采用自制的压力容器将 C18 AQ 反向填料匀浆 (粒径 5 μm, 孔径 12 nm, 购自德国 Sunchrom 公司) 装填到拉制好的毛细管中, 装填压力约 4 MPa, 在填料长度达到 12 cm 时停止装填。

流动相组成为 (A) 0.1% (v/v) 甲酸水溶液, (B) 0.1% (v/v) 甲酸的乙腈溶液。实验中上样泵的流动相恒定为 98% A, 流速 60 μL/min。连接质谱仪的色谱梯度如下: 0 ~ 5 min, 2% B; 5 ~ 40 min, 2% B ~ 60% B; 40 ~ 45 min, 60% B ~ 90% B; 45 ~ 55 min, 90% B 保持 10 min; 55 ~ 75 min, 2% B。流动相在进入分析柱之前经过三通分流后的流速约为 200 nL/min。质谱检测方法设定如下: 喷雾电压设定为 1.8 kV, 每次扫描时, 在 Orbitrap 中进行一个 10 万分辨率的全扫描, 同时在 LTQ 中进行 6 个数据依赖性二级质谱扫描。每个全扫描和二级质谱扫描均含有一个 micro scan。全扫描的质荷比 ( $m/z$ ) 范围是 400 到 2 000, 二级质谱扫描时仪器自动选择全扫描中丰度最高的 6 个离子进行碰撞诱导解离碎裂, 归一化碰撞能量设定为 35%。Orbitrap 的目标离子强度设为  $2 \times 10^5$ , 最大采集时间设为 500 ms, LTQ 的目标离子强度设为  $3 \times 10^4$ , 最大采集时间设

为 100 ms。动态排除的设定方式如下: 重复 2 次, 重复时长 30 s, 排除时长 60 s。

### 1.7 MALDI-TOF MS 分析

MALDI-TOF MS 分析在 Autoflex MALDI-TOF/TOF 质谱仪上完成。实验采用正离子模式, 激光波长为 337 nm, 脉冲时间 250 ns, 加速电压 20 kV。实验中使用不锈钢靶, 基质为  $\alpha$ -氰-4-羟基肉桂酸 (CHCA) 的饱和溶液, 溶剂为 0.1% (v/v) 三氟乙酸-乙腈 (70:30, v/v)。每张谱图由 100 次激光发射产生的数据叠加而得。

## 2 结果与讨论

### 2.1 纳米材料表征

我们采用透射电子显微镜对合成的 APBA-PAA-MNPs 纳米材料的形貌进行了表征。如图 2a 所示, 该材料的形貌完好, 粒径均匀, 平均直径为  $60 \pm 15$  nm。随后, 我们通过红外光谱表征了表面的官能团 (见图 2b), 在 3 种纳米材料的红外光谱中, 在  $576 \text{ cm}^{-1}$  处均有一个很强的吸收峰, 对应的是 Fe-O 键的振动峰。同时在  $2855 \text{ cm}^{-1}$  和  $2927 \text{ cm}^{-1}$  处的双峰则对应着  $-\text{CH}_2-$  官能团。对 AMNPs,  $1623 \text{ cm}^{-1}$  和  $1048 \text{ cm}^{-1}$  处的双峰则对应了 C-NH<sub>2</sub> 的振动峰, 说明磁核纳米材料确实被  $-\text{NH}_2$  功能化了。对 PAA-grafted AMNPs,  $1407 \text{ cm}^{-1}$  处的峰证实了羧基的存在,  $1456 \text{ cm}^{-1}$  和  $1715 \text{ cm}^{-1}$  处的峰则对应着酰胺基团, 说明 PAA 确实是共价地连接到了纳米材料表面。对 APBA-PAA-MNPs,  $1811$ 、 $1783$  和  $1590 \text{ cm}^{-1}$  处的峰说明材料上有苯环存在, 而  $1208 \text{ cm}^{-1}$  处的峰则对应  $-\text{C}-\text{N}-$  苯基团, 这些都说明材料上已经连接了间氨基苯硼酸。

我们测量了 Zeta 电位的变化。AMNPs 的 Zeta 电位为 +2 mV, 修饰了 240 kDa PAA 的 MNPs 的 zeta 电位为 -25 mV, 而修饰了间氨基苯硼酸的 MNPs 的 Zeta 电位为 -20 mV。Zeta 电位由 +2 mV 变为 -25 mV, 说明材料表面被大量 PAA 覆盖, 而 Zeta 电位由 -25 mV 变为 -20 mV, 说明只有部分的羧基连接了间氨基苯硼酸。

我们估算了 PAA 网络的孔径和最大萃取容量。MNPs 的密度约为  $5 \text{ g/cm}^3$ <sup>[31]</sup>, 由于前面的电镜表征显示其直径约为 60 nm, 可以计算出每个纳米颗粒的平均质量约为  $4.5 \times 10^{-15} \text{ g}$ 。差热分析结果显示, PAA 链在 260 °C 时燃烧 (见图 2c)。进一步的热重分析 (见图 2d) 显示, PAA 链燃烧后导致的质

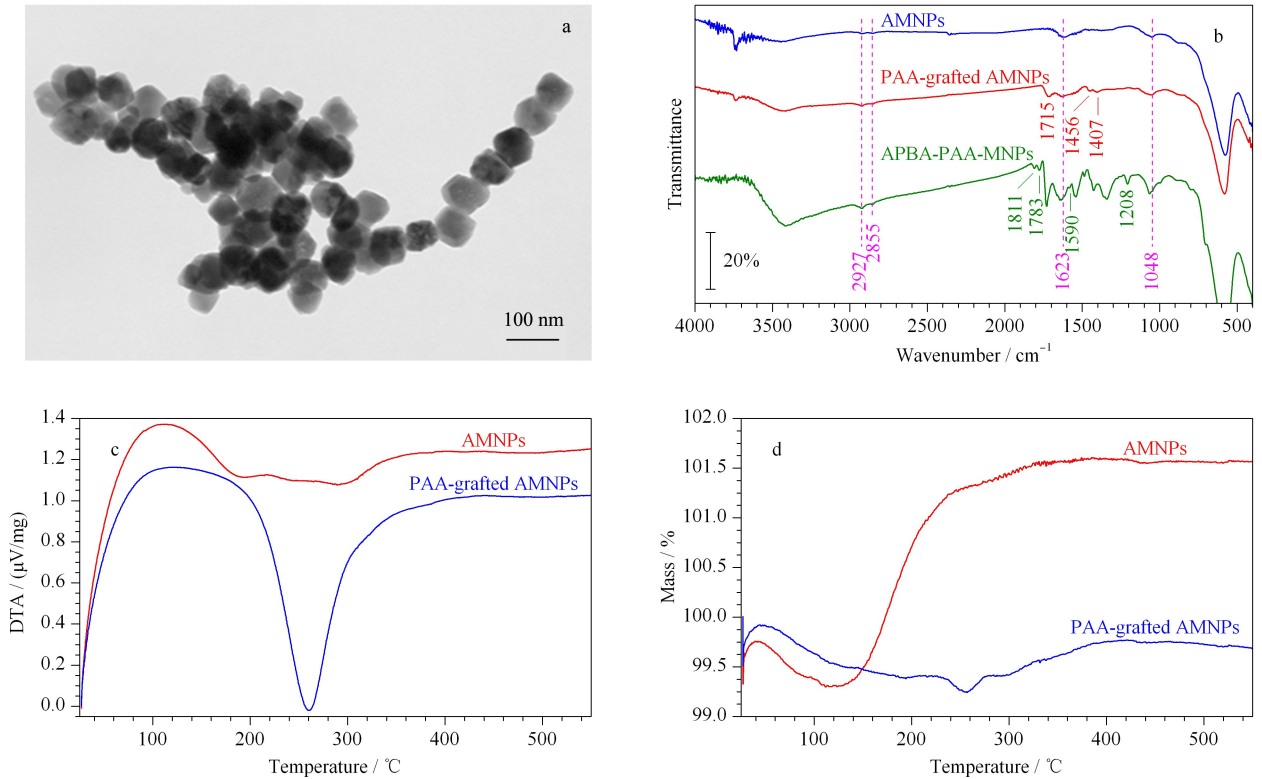


图 2 纳米材料的表征

Fig. 2 Characterization of the nanomaterials

a. TEM image of the APBA-PAA-MNPs. b. FTIR spectra of amino-functionalized magnetic nano particles (AMNPs), PAA-grafted AMNPs and APBA-PAA-MNPs. c. Differential thermal analysis (DTA) of AMNPs and PAA-grafted AMNPs. d. Thermo gravity analysis of AMNPs and PAA-grafted AMNPs. 240 kDa PAA was used.

量损失占总质量的 2%。这表明,在该 PAA 链修饰的 MNPs 上的高分子链的质量约占总质量的 2%,因此可以计算得到,每个纳米颗粒上的高分子链总质量平均约为  $1.1 \times 10^{-17}$  g。此处 PAA 链的平均分子质量为 240 kDa,则每条 PAA 链的质量约为  $4.0 \times 10^{-19}$  g,因此每个磁性纳米颗粒上大约接有 25 条 PAA(240 kDa)链。另外,根据分子量可以计算出 PAA 链的聚合度约为 3 300,而 C-C 键键长约为 0.15 nm,因此可知每条 PAA 链的平均长度约为 990 nm。我们假定 PAA 链可以均匀包裹在磁性纳米颗粒上,则由高分子构建出来的网络的孔径可以估算得到大约为 0.9 nm。由此,我们可以预期由 PAA 网络覆盖的 MNPs 具有尺寸排阻效应。由于在实际情况下高分子链是在水溶液环境中使用的,而且其空间排布上是相对松散的,因此其孔径可能更大一些。因此,实际的尺寸排阻效应的分子量阈值应以实验结果为准。

**2.2 多功能磁性纳米材料的选择性和尺寸排阻性能表征**

以 APBA-GA-MNPs 做对照,我们利用 SDS-PAGE 表征了 APBA-PAA-MNPs 的尺寸排阻性能。HRP 和 BSA 分别作为糖蛋白和非糖蛋白的代表用于表征。如图 3 所示,APBA-GA-MNPs 可以选择性地从 HRP 和 BSA 的混合物中萃取 HRP,而 APBA-

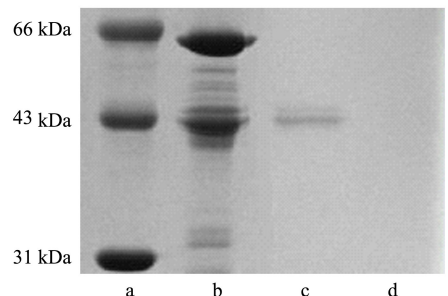


图 3 选择性和尺寸排阻效应的 SDS-PAGE 表征  
Fig. 3 Characterization of the selectivity and size-exclusion effect by SDS-PAGE

a. molecular weight markers; b. standard mixture of horseradish peroxidase (HRP) and bovine serum albumin (BSA); c. extract of the standard mixture of HRP and BSA with the APBA-GA-MNPs; d. extract of the standard mixture of HRP and BSA with the APBA-PAA-MNPs.

PAA-MNPs 则对两种蛋白质均不结合。该结果表明,由于 HRP(分子质量 44 kDa)的尺寸大于 APBA-PAA-MNPs 材料表面高分子网络形成的孔的直径,因此无法被 APBA-PAA-MNPs 富集。

为了进一步确证以上结论,将小分子顺式二醇化合物腺苷(分子质量 267 Da)与 HRP 和 BSA 混合后得到的溶液作为样品,经不同的材料萃取后得到的化合物用毛细管电泳进行分析。如图 4 所示,APBA-PAA-MNPs 材料只能捕获腺苷,而 APBA-GA-MNPs 材料则可以同时捕获腺苷和 HRP。由此就可以得出结论,APBA-PAA-MNPs 材料具有亲水和尺寸排阻双重选择性。

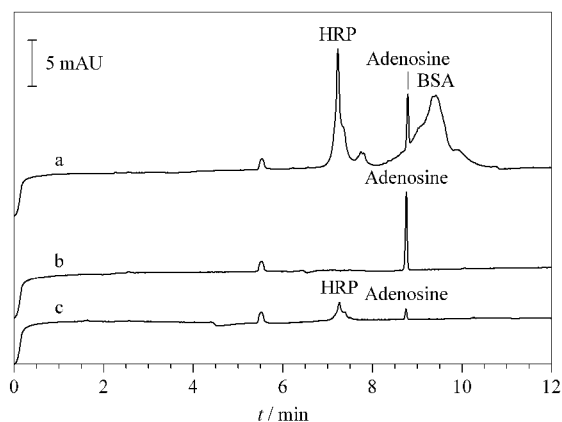


图 4 选择性和尺寸排阻效应的毛细管电泳表征

Fig. 4 Characterization of the selectivity and size-exclusion effect by capillary electrophoresis

a. mixture of HRP, BSA and adenosine; b. extract of the mixture of HRP, BSA and adenosine with the APBA-PAA-MNPs; c. extract of the mixture of HRP, BSA and adenosine with the APBA-GA-MNPs.

## 2.3 多功能磁性纳米材料的特异性和尺寸排阻性能与 PPA 链长的关系

为了考察 APBA-PAA-MNPs 在复杂环境中对低分子量糖蛋白的富集能力以及尺寸排阻阈值和 PAA 链长的关系,我们用 nano-LC-MS/MS 分析了不同链长 PAA 修饰的 APBA-PAA-MNPs 从 HRP 酶解产物中富集到的肽段。实验中通过二级质谱中的特征离子和糖基的中性丢失来确定富集到的肽段是否为糖肽<sup>[32]</sup>,通过如下步骤对得到的二级质谱图进行分析:首先确定哪个时间段得到的谱图中含有  $m/z$  为 366 ( $[Hex_1HexNac_1 + H]^+$ )、528 ( $[Hex_2HexNac_1 + H]^+$ )、690 ( $[Hex_3HexNac_1 + H]^+$ ) 和 822 ( $[Hex_2Pent_1HexNac_1 + H]^+$ ) 的特征离子,如果谱图中存在这些离子则认为是糖肽的二级质谱;当确定了糖肽的出峰时间窗口之后,将整个时间段内的所有全扫描质谱图用 Qual Browser 功能进行平均,然后用 Xtract 功能做去卷积,将所有多电荷离子转化为  $MH^+$  形式,Xtract 中  $S/N$  设为 10。单糖残基的中性丢失见表 1,如果某个肽段的二级质谱图中含有至少一个上述的特征离子,并有一系列规律的中性丢失则可认为其为糖肽,图 5 中以

表 1 寡糖中性丢失造成的质量减少

Table 1 Mass reduction due to glycan neutral loss

Sugar	Neutral loss under different charge states		
	+1	+2	+3
Hexose	162.1	81.0	54.0
Deoxyhexose	146.1	73.0	48.7
Pentose	132.0	66.0	44.0
<i>N</i> -Acetylhexosamine	203.1	101.6	67.7

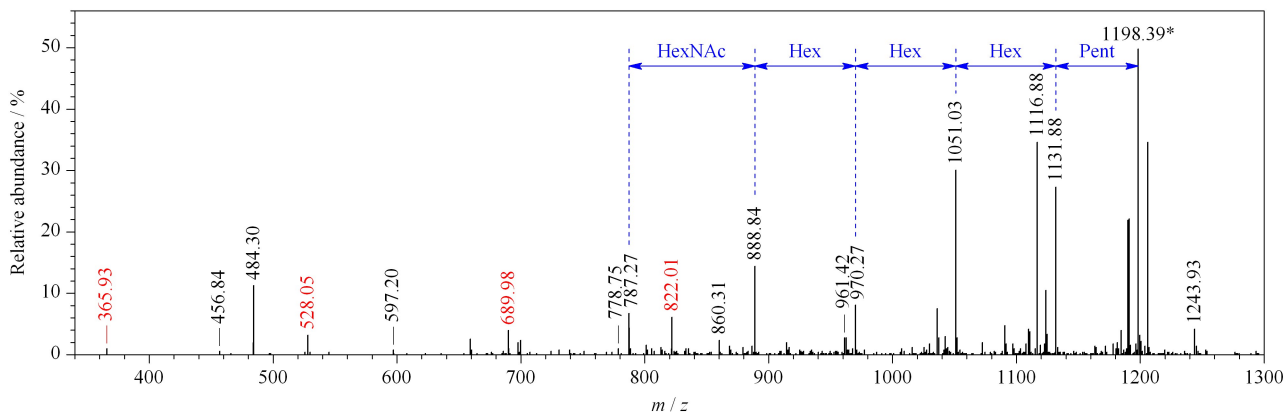


图 5 用于定性糖肽的特征离子的二级质谱图

Fig. 5  $MS^2$  spectrum for identification of a precursor ion as a glycosylated peptide

The peak at  $m/z$  1198.39 marked with an asterisk is produced through losing a deoxyhexose from double-charged precursor ion 1271.58. The diagnostic oxonium ions are highlighted in red and the neutral losses are indicated in blue lines. HexNac, Hex and Pent are the abbreviations for *N*-acetylhexosamine, hexose and pentose, respectively.

$MH^+ = 2\,542.15$  Da 的糖肽为例标明了各个特征离子和中性丢失。

由于绝大多数文献中报道的 HRP 酶解产物中糖肽的分子质量在 1 800 到 5 000 Da 之间<sup>[22,23]</sup>,因此我们首先考察了 1 800 到 5 200 Da 这个质量范围。图 6 中是不同 PAA 链长修饰的磁性纳米材料富集到的所有糖肽的去卷积质谱图。从 HRP 酶解

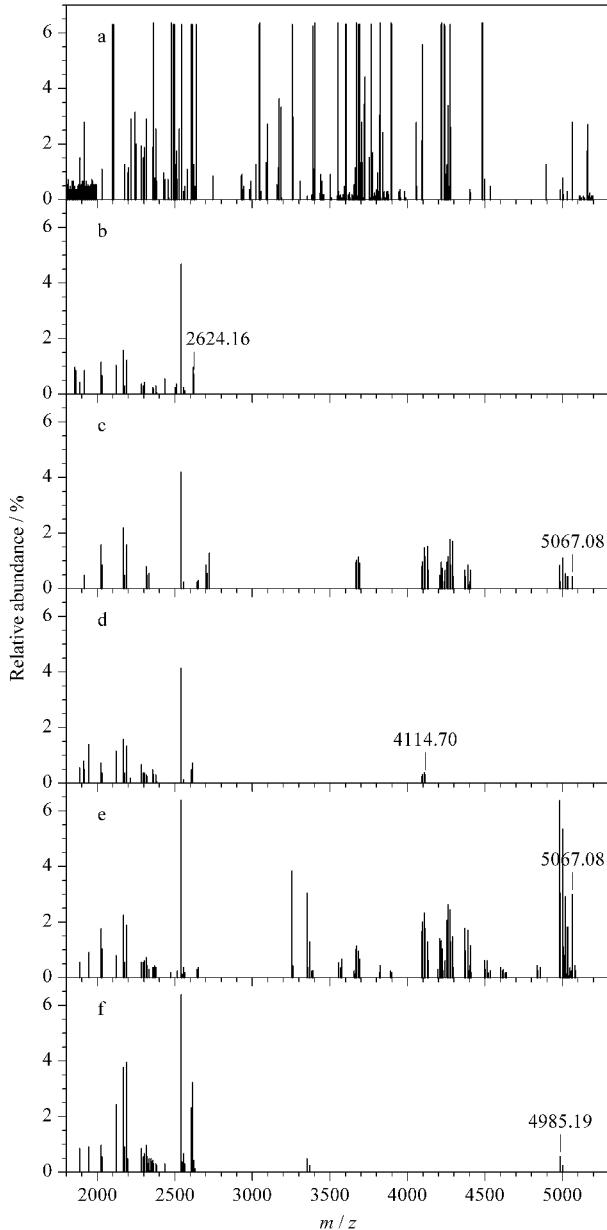


图 6 1800~5200 Da 糖肽的去卷积质谱图

Fig. 6 Deconvoluted averaged mass spectra of glycopeptides in the range of 1800–5200 Da

a. HRP tryptic digest; b–f: extract of the HRP tryptic digest with different APBA-PAA-MNPs (average molecular weights of PAA: 240 kDa (b), 100 kDa (c), 15 kDa (d), 5 kDa (e) and 2 kDa (f)). The spectra were integrated over the whole range of detected glycopeptides obtained from the nano-LC-MS/MS.

糖肽中鉴定到了 14 个非糖肽段和 35 个糖肽段(见表 2),而被 APBA-PAA-MNPs 富集到的肽段的数目要明显小于 HRP 酶解产物中的肽段数目。所有被 APBA-PAA-MNPs 富集到的肽段均为糖肽,非糖肽被全部排除在外,这说明 APBA-PAA-MNPs 在复杂体系中依然具有很高的选择性。用平均分子质量为 5 kDa 的 PAA 修饰的 MNPs 富集到的糖肽是所有材料中最多的,HRP 酶解产物中 76% 的肽段被该材料富集。而其他 4 种分子质量的 PAA 修饰的 MNPs 富集到的肽段数目均不足 HRP 酶解产物中糖肽数目的 50% (详见附表: <http://www.chrom-China.com>)。由图 6 可知,2、5、15、100 和 240 kDa PAA 修饰的 MNPs 能结合到的最大糖肽的分子质量分别为 4 985.19、5 067.08、4 114.70、5 067.08 和 2 624.16 Da。因此,这些 PAA 修饰的 MNPs 的尺寸排阻阈值应比这些分子质量略高。

另一方面,不同分子质量的 PAA 修饰的 MNPs 能够富集的最小的糖肽片段并不相同。由于有些糖肽段太过接近 5 200 Da 的上限,我们进一步研究了分子质量高于 5 200 Da 的肽段。通过 MALDI-TOF MS 实验发现,所有的 APBA-PAA-MNPs 均不能富集 RNase B(糖蛋白,分子质量约为 15 kDa)。因此我们进一步研究了 nano-LC-MS/MS 谱图中分子质量从 5 200 到 15 000 Da 的部分。由 2、15、100、240 kDa PAA 修饰的 MNPs 均无法富集任何肽段,仅有 5 kDa PAA 修饰的 MNPs 富集到了少量肽段,其中分子质量最大为 9 218.09 Da(见图 7)。经过二级质谱鉴定,该肽段为糖肽。由于 HRP 酶解产物中有大于 10 kDa 的糖肽段,我们认为,2、5、15、100 和 240 kDa PAA 修饰的 MNPs 的尺寸排阻阈值约为 5.0、9.3、4.1、5.1 和 2.7 kDa。因此,可以得出结

表 2 HRP 酶解糖肽中分子量在 1800 到 5200 Da 范围内鉴定到的非糖肽和糖肽

Table 2 Non-glycopeptides and glycopeptides identified for HRP tryptic digest in the range of 1800–5200 Da

Type	Molecular mass/Da	
Non-glycopeptides	2103.05, 2200.95, 2216.98, 2248.16, 2316.18, 2475.28, 2580.04, 2638.13, 2944.36, 2988.49, 3048.54, 3173.66, 3402.56, 3447.73	
	Glycopeptides	1887.84, 1916.74, 2029.82, 2173.88, 2286.98, 2363.01, 2436.23, 2542.615, 2612.20, 2932.24, 3021.20, 3095.30, 3184.27, 3257.52, 3354.41, 3390.46, 3553.52, 3591.65, 3606.62, 3673.71, 3726.63, 3753.65, 3766.64, 3776.73, 3825.67, 3840.65, 3895.66, 4057.71, 4114.70, 4223.85, 4276.77, 4482.99, 4895.19, 5067.08, 5165.36



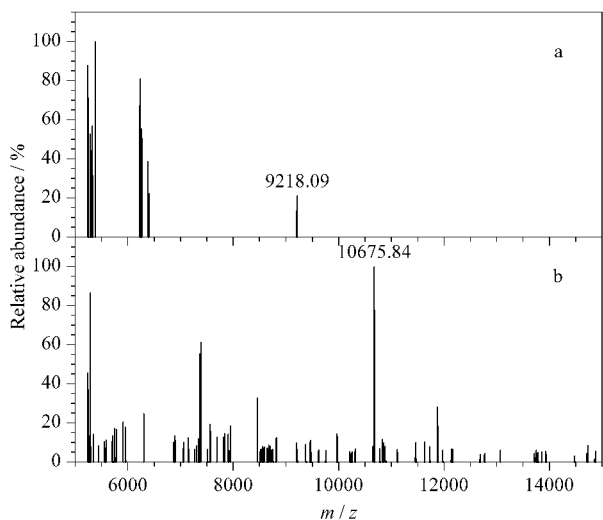


图 7 5200~15000 Da 糖肽的去卷积质谱图

Fig. 7 Deconvoluted averaged mass spectra of glycopeptides in the range of 5200–15000 Da

a. extract of the HRP tryptic digest with APBA-PAA-MNPs (5 kDa PAA); b. HRP tryptic digest.

The spectra were integrated over the whole range of detected glycopeptides obtained from the nano-LC-MS/MS.

论:可以通过调节 PAA 链长来调节多功能 MNPs 的尺寸排阻阈值。

### 3 结论

本文提出了多功能磁性纳米材料的概念并证明了其原理,由于其特殊设计的结构,这种磁性纳米材料可以成为高选择性萃取低分子量的糖蛋白的多功能纳米探针,尽管研究中主要测试的分子是低分子量糖蛋白,但是这种多功能磁性纳米材料同样可以选择性萃取其他低分子量顺式二羟基生物分子,如修饰核苷、多糖等,由于糖蛋白、核苷和聚糖是蛋白质组学、代谢组学和糖组学领域关注的研究焦点。若能进一步采用高亲和力配基,这种多功能磁性纳米材料可以发展成为一种很有前途的组学研究样品处理材料。

### 参考文献:

[1] Spiciarich D R, Nolley R, Maund S L, et al. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56(31): 8992

[2] Yu W H, Qi Y X, Jin Y. *Chinese Journal of Chromatography*, 2019, 37(5): 471  
于文皓, 祁艳霞, 靳艳. *色谱*, 2019, 37(5): 471

[3] Drake R R, Cazares L, Semmes O J. *Proteom Clin Appl*, 2007, 1(8): 758

[4] Chernokalskaya E, Gutierrez S, Pitt A M, et al. *Electrophoresis*, 2004, 25(15): 2461

[5] Hu L H, Li X, Jiang X N, et al. *J Proteome Res*, 2007, 6: 801

[6] David W G, Richard J S. *J Proteomics*, 2009, 73(3): 637

[7] Hu L H, Boos K S, Ye M, et al. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(28): 5377

[8] Machtejevas E, Marko-Varga G, Lindberg C, et al. *J Sep Sci*, 2009, 32(13): 2223

[9] Terracciano R, Gaspari M, Testa F, et al. *Proteomics*, 2006, 6(11): 3243

[10] Luchini A, Geho D H, Bishop B, et al. *Nano Lett*, 2008, 8(1): 350

[11] Liotta L A, Ferrari M, Petricoin E. *Nature*, 2003, 425(6961): 905

[12] Wu D, Li J, Struwe W B, et al. *Chem Sci*, 2019, 10(19): 5146

[13] Zhu F F, Clemmer D E, Trinidad J C. *Analyst*, 2017, 142: 65

[14] Shao W Y, Liang Y, Liang Z, et al. *Journal of Instrumental Analysis*, 2018, 37(40): 1212  
邵文亚, 梁玉, 梁振, 等. *分析测试学报*, 2018, 37(40): 1212

[15] Bai H, Pan Y, Qi L, et al. *Talanta*, 2018, 186: 513

[16] Bai J, Liu Z, Wang H Y, et al. *J Chromatogr A*, 2017, 1498: 37

[17] Dou P, Liang L, He J, et al. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(44): 7558

[18] Guo Z, Hai X, Wang Y, et al. *Biomacromolecules*, 2017, 19(1): 53

[19] Zhang L J, Xu Y W, Yao H, et al. *Chem Eur J*, 2009, 15(39): 10158

[20] Xiao H, Chen W, Smeekens J M, et al. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1692

[21] Yao J, Wang J, Sun N, et al. *Nanosoule*, 2017, 9(41): 16024

[22] Shu Q, Li M, Shu L, et al. *Mol Cell Proteomics*, 2020, 19(4): 672

[23] Chen C, Wang H X, Kang H J, et al. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2017, 45(8): 1149  
陈成, 王宏喜, 康虹健, 等. *分析化学*, 2017, 45(8): 1149

[24] Yang C, Yang S, Ho S, et al. *J Nanobiotechnol*, 2014, 12(1): 44

[25] Chen N, Souris J S, Cheng S, et al. *Nanomedicine*, 2017, 13(6): 1941

[26] Wang Y, Liu M, Xie L, et al. *Anal Chem*, 2017, 86(4): 2057

[27] He X, Liang X, Chen X, et al. *Anal Chem*, 2017, 89(18): 9712

[28] Li Y, Wang J, Sun N, et al. *Anal Chem*, 2017, 89(20): 11151

[29] Wührer M, Hokke C H, Deelder A M. *Rapid Commun Mass Sp*, 2004, 18(15): 1741

[30] Wang L Y, Bao J, Wang L, et al. *Chem Eur J*, 2006, 12(24): 6341

[31] Chen H M, Xu X Q, Yao N, et al. *Proteomics*, 2008, 8(14): 2778

[32] Wührer M, Koeleman C A M, Hokke C H, et al. *Anal Chem*, 2005, 77(3): 886