

共价有机骨架功能材料及其在糖肽选择性富集中的应用

盛骞莹¹, 周 扬², 赵治全¹, 王耀慧¹, 李伟诚¹, 柯燕雄²,
蓝闽波^{1*}, 卿光焱^{3*}, 梁鑫淼^{2,3}

(1. 华东理工大学化学与分子工程学院, 上海 200237; 2. 华东理工大学药学院, 上海 200237; 3. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023)

摘要:蛋白质糖基化是生物体中最重要的翻译后修饰手段之一,糖蛋白/糖肽的有效分离和富集成为目前糖蛋白组学研究的首要问题。对于复杂的生物样本,糖蛋白的数量较少,酶解后大量高丰度非糖基化修饰肽的存在,使得低丰度糖肽的检测更加困难。因此,需要一些手段来有效地富集糖肽以提高其检测丰度,发展高选择性的糖肽富集材料及方法就成为在分子水平上有效地监测糖蛋白或糖肽的重要途径。相对于传统的糖肽富集材料,共价有机骨架材料具有比表面积大和可修饰位点丰富的优点,在糖肽富集领域具有很大的应用潜力。该文制备了一种新型的共价有机骨架材料(O-T-D-COFs),利用1,3,5-三(4-氨基苯基)苯和2,5-二甲氧基苯-1,4-二甲醛作为反应单体通过共聚缩合反应生成的席夫碱构成了材料的框架,对合成后的中间体材料进行氧化处理,从而提高材料的富集性能。利用扫描电镜、透射电镜、红外光谱和固体核磁等表征技术对材料的结构进行了表征,并将其应用于糖肽的选择性富集。分别对富集过程的上样条件、淋洗条件、洗脱条件进行了优化,结合质谱检测技术,从人血清免疫球蛋白G酶解液中观察到32个明显的糖肽信号峰。通过模拟复杂样本体系验证材料富集选择性,在人血清免疫球蛋白G和牛血清白蛋白的酶解液混合物摩尔比达到1:50时,该材料仍然保持了良好的选择性。此外,还考察了材料的检测限、富集容量、回收率等富集性能,及在实际样品中的应用潜力。以人血清免疫球蛋白G为评价对象,O-T-D-COFs具有较低检测限(2.5 fmol/ μ L)、较高的富集容量(120 mg/g),及较好的富集回收率(103.5% \pm 6.6%、101.5% \pm 10.4%)。在血清样品中富集到来自53个N-糖蛋白中的86个N-糖肽序列,并鉴定到了94个N-糖基化位点。这些结果都表明,该材料在糖肽富集领域有较好的应用前景。

关键词:质谱;共价有机骨架材料;功能化修饰;糖肽;选择性富集

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2021)06-0588-11

Covalent organic framework functional materials and their applications in glycopeptide enrichment

SHENG Qianying¹, ZHOU Yang², ZHAO Zhiquan¹, WANG Yaohui¹, LI Weicheng¹,
KE Yanxiong², LAN Minbo^{1*}, QING Guangyan^{3*}, LIANG Xinmiao^{2,3}

(1. School of Chemistry and Molecular Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai, 200237, China; 3. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Abstract: Protein glycosylation is among the most important post-translational modifications in living organisms and the research in the field of protein glycosylation continues to garner attention. Currently, the efficient separation and enrichment of glycoproteins and glycopeptides is the primary challenge of glycoproteomics research. The number of glycoproteins is small in complex biological samples. Moreover, the presence of highly-abundant, non-glycosylated, and modified peptides makes the detection of low-abundance glycopeptides more difficult.

收稿日期:2021-02-02

* 通讯联系人.Tel:(021)64253574,E-mail:minbolan@ecust.edu.cn(蓝闽波);Tel:(0411)84379050,E-mail:qinggy@dicp.ac.cn(卿光焱).

基金项目:国家自然科学基金(21775116,21804041,21922411,21934005).

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (Nos. 21775116, 21804041, 21922411, 21934005).

Therefore, efficient glycopeptide enrichment methods are required to improve the detection of these compounds. The development of highly selective glycopeptide enrichment tools is important to efficiently capture glycoproteins or glycopeptides at the molecular level. Compared with traditional glycopeptide-enriched materials, covalent organic framework materials have the advantages of large specific surface area and rich modification sites, thereby exhibiting great application potential in the field of glycopeptide enrichment. In this study, a novel covalent organic framework material (O-T-D-COFs) was prepared and applied for selective glycopeptide enrichment. We applied the solvothermal method, using 2,5-dimethoxy benzene-1,4-dialdehyde and 1,3,5-Tris(4-aminophenyl) benzene, to synthesize imino-based COFs. The Schiff base generated via copolymerization condensation reaction constitutes the framework of the material. Next, the synthesized intermediate material was oxidized to improve the enrichment performance of the material. The functional, specific glycopeptide-binding groups were modified on the COF channels and the structure of the material was characterized using scanning and transmission electron microscope, as well as infrared spectrum and solid-state nuclear magnetic resonance. The enrichment conditions comprised the loading and elution steps, including the optimization of the elution conditions. We could observe the clear profile of 32 glycopeptides derived from human serum immunoglobulin G (IgG) tryptic digests with a significantly improved signal-to-noise (S/N) ratio. We applied a complex sample system to verify the enrichment selectivity of the material when the molar ratios of the IgG and bovine serum albumin (BSA) tryptic digest mixtures reached 1:50. In addition, we investigated the enrichment performance of the detection limit, enrichment capacity, recovery rate of the material, and the application potential in glycopeptides enrichment using real samples. The material showed a good detection limit ($2.5 \text{ fmol}/\mu\text{L}$), an ideal enrichment capacity (120 mg/g), and enrichment recovery ($103.5\% \pm 6.6\%$ and $101.5\% \pm 10.4\%$). We identified a total of 86 glycopeptides derived from 53 glycoproteins with 94 *N*-glycosylation sites from only $1 \mu\text{L}$ human serum. The O-T-D-COFs exhibited a good glycopeptide separation and enrichment potential, indicating that the COF material has promising application potential in glycoproteomics.

Key words: mass spectrometry (MS); covalent organic framework (COF) material; functional modification; glycopeptides; selective enrichment

共价有机骨架材料 (covalent organic frameworks, 简称 COFs) 是有机单体通过共价键结合构成的一种新型的有序结晶聚合物^[1,2]。作为一种具有周期性网络结构的有机多孔材料, COFs 不仅具有多样的孔洞结构和大的比表面积, 以及优异的隔音性、隔热性和渗透性, 而且具有更加均一的孔洞尺寸与稳定的结构构型, 可进行合理的设计和组装^[3-5]。在其骨架上通过各种化学反应接枝上许多

功能基团, 可大大提升材料功能的多样性。目前, COFs 材料吸引了众多研究者的兴趣, 设计及合成了越来越多的 COFs 材料, 研究主要集中在合成不同连接方式和不同单体组成的 COFs 材料, 以及 COFs 材料功能化修饰等方面^[6,7]。

继基因组学之后, 蛋白质组学成为新的研究热点。作为生命活动的主要承担者, 蛋白质的多种翻译后修饰(糖基化、磷酸化、甲基化、泛素化修饰等)

引用本文: 盛莺莹, 周扬, 赵治全, 王耀慧, 李伟诚, 柯燕雄, 蓝闽波, 卿光焱, 梁鑫淼. 共价有机骨架功能材料及其在糖肽选择性富集中的应用. 色谱, 2021, 39(6): 588-598.

SHENG Qianying, ZHOU Yang, ZHAO Zhiquan, WANG Yaohui, LI Weicheng, KE Yanxiong, LAN Minbo, QING Guangyan, LIANG Xinmiao. Covalent organic framework functional materials and their applications in glycopeptide enrichment. Chinese Journal of Chromatography, 2021, 39(6): 588-598.

参与或者调控生物体内重要的生理、病理过程,并在人体不同的健康状况或生长时期发生改变^[8-10]。其中,蛋白质的糖基化修饰是上述几种修饰蛋白质中最常见、最重要的翻译后修饰之一^[11,12]。糖蛋白组学研究有几个任务,分别为发生糖基化的蛋白质的鉴定、糖肽结构的解析、糖基化位点的鉴定和研究糖基化对蛋白质功能的影响^[13-16]。生物质谱技术的发展使人们能在分子水平上进行糖蛋白或糖肽的有效监测^[17,18]。但是,和其他蛋白质相比,糖蛋白的数量较低,酶解后的糖肽丰度就更低了,因此,需要一些手段对糖肽进行有效的富集,以提高其检测丰度^[19-22]。开发新的富集方法和富集材料是糖蛋白组学领域的研究热点^[23-30]。

COFs 有序坚固的框架孔道结构,提供了作为糖肽富集材料载体的条件,同时基于载体骨架结构的功能化修饰也将大大提升糖肽富集分离效率^[31-34]。Zhang 课题组^[35]将一种新型 COF 功能化的磁性石墨烯复合物 (MagG@ COF-5) 作为超敏感基质用于识别糖肽,通过 LC-MS/MS 分析,成功地检测到了 232 个独特的 *N*-连接糖肽和 85 个特征糖蛋白。*N*-连接糖肽已被证明是治疗各种疾病的关键生物标志物,Zhang 课题组^[36]研究出的还原型谷胱甘肽功能化银纳米粒子修饰 COFs 材料应用于 *N*-连接糖肽的富集研究中,提高了 COFs 的富集选择性,并提供了一种新的方法。Wu 课题组^[37]使用磁性胶体纳米晶体簇 (MCNC) 作为核心,利用后修饰策略制备了另一种谷胱甘肽功能化的高亲水性磁性 COFs,用于人唾液中内源性 *N*-连接糖肽的富集,同样表现出优异的糖肽富集性能,如高灵敏度及选择性、良好的尺寸排阻效应和可重复使用性等。但目前将结构修饰功能化的 COFs 材料应用于糖蛋白组学的研究还在起步阶段,相关研究较少,也存在糖肽选择性不足、相互特异性作用不强等问题。

本文以开发新的糖肽富集材料为目的,结合 COFs 材料的功能化修饰,以 2,5-二甲氧基苯-1,4-二甲醛 (DMTA) 和 1,3,5-三(4-氨基苯基)苯 (TAPB) 为单体,通过溶剂热法,首先制备得 T-D-COF,再用亚氯酸钠溶液进行氧化,发展出一种新的材料 O-T-D-COF。将该材料进行糖肽的富集应用,在复杂体系验证富集选择性,以及考察富集检测限、富集容量和回收率。基于 COFs 功能化修饰的新材料,有望为开发糖肽富集新材料提供新的思路,为糖蛋白组学提供了一种选择性更优、可控性更好的糖肽富集

新思路。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

TAPB、DMTA、正丁醇、邻二氯苯、冰醋酸、碳酸氢铵、尿素购自麦克林生化科技有限公司(中国上海)。甲醇购自国药集团化学试剂有限公司(中国上海)。四氢呋喃、硼氢化钠、乙腈 (ACN)、三氟乙酸 (TFA) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司(中国上海)。人血清免疫球蛋白 G (IgG)、牛血清白蛋白 (BSA)、二硫苏糖醇 (DTT)、碘代乙酰胺 (IAA)、胰蛋白酶、*N*-糖苷酶 F (包含 Glycobuffer)、2,5-二羟基苯甲酸 (DHB) 购自 Sigma-Aldrich (美国)。此外,实验用水为 Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司)制备的超纯水。人血清样本采集自健康人,按照标准临床程序从上海交通大学附属第六人民医院获得。

扫描电子显微镜 (SEM) 的型号为 S-3400N (Hitachi, 日本),透射电子显微镜 (TEM) 的型号为 JEOL JEM-1400 (JEOL, 日本),固体核磁测试采用 500MHz 核磁共振波谱仪 (Bruker, 瑞士),红外光谱采用全反射傅立叶红外光谱仪 (ATR-FTIR) 型号为 Nicolet 6700 (Thermo Scientific, 美国)。

1.2 COFs 的制备

称取 TAPB 0.526 g (1.5 mmol), 装于 50 mL 三口烧瓶中;量取 10 mL 邻二氯苯和 10 mL 正丁醇,混合均匀后加入到三口烧瓶中,将烧瓶放在搅拌器上充分搅拌。接着,称取 0.436 g (2.25 mmol) DMTA, 倒入三口烧瓶中,用移液枪吸取 2 mL (6 mol) 冰醋酸,装入三口烧瓶中作为催化剂。用橡皮塞把三口烧瓶的两端塞紧,中间放上冷凝管,冷凝管的上方接上油封装置,将针头插入橡皮塞后插到液面以下,通入氮气作为保护,调节氮气流量为每秒一个气泡。将三口烧瓶放入油浴锅中,120 °C 冷凝回流,磁力搅拌。72 h 后停止搅拌和加热,待装置冷却到室温后,抽滤得到黄色的固体产物。产物用四氢呋喃重复洗涤 7 次,去除杂质。洗涤后的产物放入 30 °C 干燥箱隔夜烘干,得到黄色粉末,标记为 T-D-COF。称取 47.08 mg T-D-COF 粉末,溶于 4 mL 二恶烷中制成悬浮液。向悬浮液中依次加入 2.548 mL (24.0 mmol) 2-甲基-2-丁烯、400 μ L 浓度为 3.3 mol/L 的亚氯酸钠水溶液、137.6 μ L (2.4 mmol) 冰醋酸。所用的 T-D-COF、2-甲基-2-丁烯、亚氯酸钠

和冰醋酸的物质的量之比为 1:100:5.5:10。在室温避光的条件下,将两相悬浮液持续搅拌 20 h,所得产物为紫黑色固体。反应后的体系通过过滤分离,得到的固体依次用 40 mL 超纯水、40 mL 10%

(体积分数) 硫代硫酸钠、40 mL 超纯水和 40 mL 丙酮洗涤,产物置于 60 °C 真空干燥箱中干燥 10 h,得到紫色粉末,标记为 O-T-D-COF,制备过程如图 1 所示。

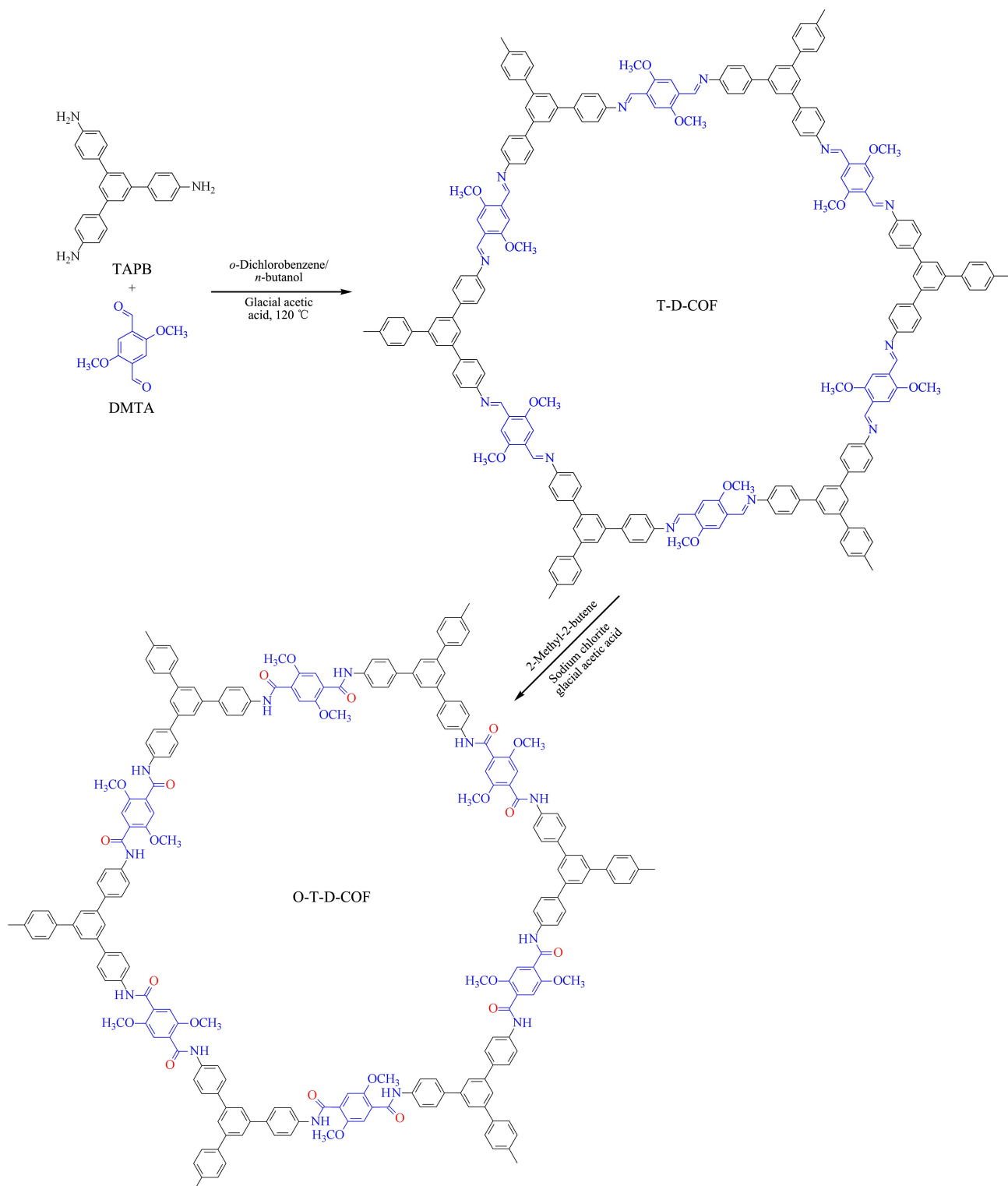


图 1 O-T-D-COF 的合成路线
 Fig. 1 Synthetic route of O-T-D-COF

1.3 蛋白酶解

称取 1 mg IgG (或 1 mg BSA), 用 100 μL 含有 8 mol 尿素的 50 mmol 碳酸氢铵的溶液将 IgG 完全溶解, 向溶液中加入 5 μL DTT (200 mmol), 在恒温 56 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下振荡 45 min。取 20 μL IAA (200 mmol) 避光条件下配制, 加入到振荡后的溶液中, 避光条件下静置 30 min。然后向溶液中继续加入碳酸氢铵溶液, 直至溶液体积达到 1 mL。向溶液中加入 20 μg 胰蛋白酶后, 将溶液放置在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的培养器中, 持续酶解 17 h 后向体系中加入 5 μL 甲酸 (FA) 使酶解反应停止。

1.4 糖肽的富集

使用离心法进行 O-T-D-COF 材料对糖肽的富集实验, 在离心管中加入 500 μg O-T-D-CO 材料, 加入 100 μL 上样液 (ACN:H₂O:TFA=90:5:5, v/v), 超声 1 min、振荡 5 min 进行润洗, 离心去除上清液; 取 IgG 样品 (之前已分装旋干) 6 μL , 用 180 μL 上样液重溶; 20 μL 上样液溶解 O-T-D-COF 材料, 将溶解了 O-T-D-COF 材料的上样液转移至 IgG 的溶液中, 超声 1 min、振荡 30 min 进行孵化, 离心去除上清液; 将上样后的材料分散在 200 μL 的淋洗液 (ACN:H₂O:TFA=90:9.9:0.1, v/v/v) 中, 超声 1 min、振荡 5 min 进行淋洗, 离心去除上清液, 重复该步骤 3 次; 取 10 μL 洗脱液 (H₂O:TFA=99:1, v/v) 加入离心管中, 超声 1 min、振荡 20 min 将富集在材料中的糖肽分离出来, 离心后保留上清液。复杂体系中的富集、富集检测限、富集容量和回收率操作参照以上操作流程。

1.5 脱糖基实验

人血清蛋白酶解液的富集按照 1.4 节进行操作, 将糖肽样品冻干后加入 17 μL 水和 2 μL Glycobuffer, 混匀, 再加入 1 μL *N*-糖苷酶 F (PNGase F)。37 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡 17 h 后, 离心浓缩, 重溶于 10 μL 含 0.1% (v/v) 的 FA 溶液中, 等待进一步进行分析。

1.6 分析条件

糖肽样品洗脱液的检测使用基质辅助激光解吸电离-飞行时间-质谱 (简称 MALDI-TOF/TOF-MS, AB Sciex, 美国), 在反射正离子模式下进行分析。取 1 μL 富集后的洗脱液, 点在靶上, 待溶液自然干燥后, 取 1 μL 质量浓度为 25 mg/mL 的 DHB 基质溶液 (ACN:H₂O:H₃PO₄=70:29:1, v/v/v) 覆盖在样品点上。质谱仪的检测范围是 m/z 2 000 ~ 3 500, 激光强度是 3 800 μJ 。得到的结果利用软件

Data Explorer (TM) Software 进行数据分析, 获得质谱图峰的信息, 其中峰的分辨率设置为 0.95, $S/N>3$ 。

人血清提取蛋白酶解液的糖基化肽段/蛋白质采用赛默飞高分辨液相色谱-质谱联用仪 Thermo EASY-nanoLC 1000 Nano HPLC System (Thermo Fisher Scientific, 德国) 分析, 该仪器配备了纳升液相色谱和 Q-Exactive plus 质谱仪。采用同公司纳米反相 C18 柱 (15 cm \times 75 μm)。流动相 A 为 ACN-FA (99.9:0.1, v/v), B 为 H₂O-FA (99.9:0.1, v/v)。洗脱方式如下: 0% B ~ 4% B, 2 min; 4% B ~ 35% B, 90 min; 35% B ~ 45% B, 10 min; 45% B ~ 90% B, 5 min; 90% B, 5 min; 最后用 100% A 冲洗柱子 15 min。流动相流速为 300 nL/min, 柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$, 进样量为 1 μL 。Q-Exactive plus 质谱的实验参数为: 电喷雾电压为 2.0 kV, 扫描范围为 m/z 400 ~ 2 000; MS/MS 采集在 Orbitrap 中进行, 分辨率为 35 000 (m/z 200)。数据处理: 采用搜索软件 Protein Discovery 1.4 对数据进行搜库, 搜索引擎为 Sequest HT, 该搜索引擎可搜索所有数据库包括人的 UniProtKB/SwissProt 数据库。

2 结果与讨论

2.1 O-T-D-COF 材料的合成

本实验用到的合成方法是溶剂热法。本实验合成的 O-T-D-COF 材料是一种具有二维 (2D) 结构的材料, 反应单体分别是 TAPB 和 DMTA。这两种单体中分别含有醛基和氨基, 通过共聚缩合反应生成的席夫碱构成了 T-D-COF 材料的框架, 每 6 份单体组合成一个六边形的大环, 这些大环再通过层层堆叠形成 2D 的管状结构。该反应对原料和产物的溶解性要求较高。在溶剂中, 原料慢慢溶解到溶剂中参与反应, 这样有利于合成的材料具有有序的结构, 并且能够最大限度地减少材料结构上的缺陷。因此本实验选择的溶剂是正丁醇和邻二氯苯, 这二种溶剂对上述两种单体的溶解性都较小, 有利于原料缓慢溶解到溶剂中。冰醋酸作为反应的催化剂可以活化反应物中的羰基, 有利于脱水缩合反应。然后对合成后的 COFs 材料进行氧化处理, 可以提高材料的富集性能。2D 层状的 O-T-D-COF 材料的结构稳定性来自于层与层的作用力, 夹层间的作用力是形成堆积结构的重要作用力, 直接影响到材料的孔隙率和结晶性。在材料中引入的甲氧基就很好地加

强了层与层之间的作用力,甲氧基处于苯基的边缘上,每个氧原子上的二对孤电子对转移到苯环中心,这就使得层与层之间电荷排斥力减小,从而增强了夹层间的作用力,改善了 O-T-D-COF 材料的稳定性和结晶性。

2.2 O-T-D-COF 材料的表征

通过扫描电镜观察 O-T-D-COF 材料的形貌,图 2a 和 2b 是材料 O-T-D-COF 在扫描电镜下成像的图片,从图中可以看到 O-T-D-COF 材料呈略规则状聚集在一起。放大倍数为 5 k 倍时,从图 2a 可以看出 O-T-D-COF 材料的空间分布很密集,单个单元尺寸较小。放大倍数为 18 k 倍时(见图 2b)可以看到每个单元之间结合比较紧密,结构较为规则。图 2c 是 O-T-D-COF 材料的固体核磁表征图,从图中的 1 号峰位置可以看出材料被部分氧化。红外光谱进一步表征 T-D-COF 与 O-T-D-COF 材料的特征峰差异(见图 2d)。在材料氧化后,谱图上 1668 cm^{-1} 附近的峰是酰胺键的 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动, 1515 cm^{-1} 出现新的伸缩振动峰,该峰为酰胺基带的峰,这一结果也说明了 COFs 材料已被成功制备。

通过透射电镜观测物质微观形貌时,能够看到其聚集状态,分辨率高时还能看到晶体的晶格条纹,从而可以测量材料的孔径大小。图 3 为 O-T-D-COF 材料在透射电镜中形成的图像,从图中可以看到,材料中单元的规则结构呈现密集状态,在高倍分辨率下能看到晶体的晶格条纹明暗对比,单元呈中空状态,表明该材料具有规则的孔道结构。

2.3 O-T-D-COF 材料的糖肽富集条件优化

IgG 是人体免疫系统中的一种保护物质,对 IgG 的研究在疾病诊断等领域有重要意义。IgG 主要分为 IgG 1 和 IgG 2 两个亚型,都具有糖基化的位点,且位点上均连接了一个以五碳作为核心的聚糖。本文利用 MALDI 技术测定富集洗脱液中的糖肽,通过谱图分析探讨富集效果。

在上样液酸度条件的优化中,使用了 4 种不同酸度的上样液进行实验。其中 TFA 的体积分数分别是:0.1%、1%、3%、5%,配制成乙腈体积分数为 90% 的酸性溶液。如图 4a 所示,当上样液中 TFA 的体积分数为 0.1%、1% 和 3% 时,6 条糖肽的信号峰都较弱;相比之下,在 TFA 体积分数在 5% 时,每

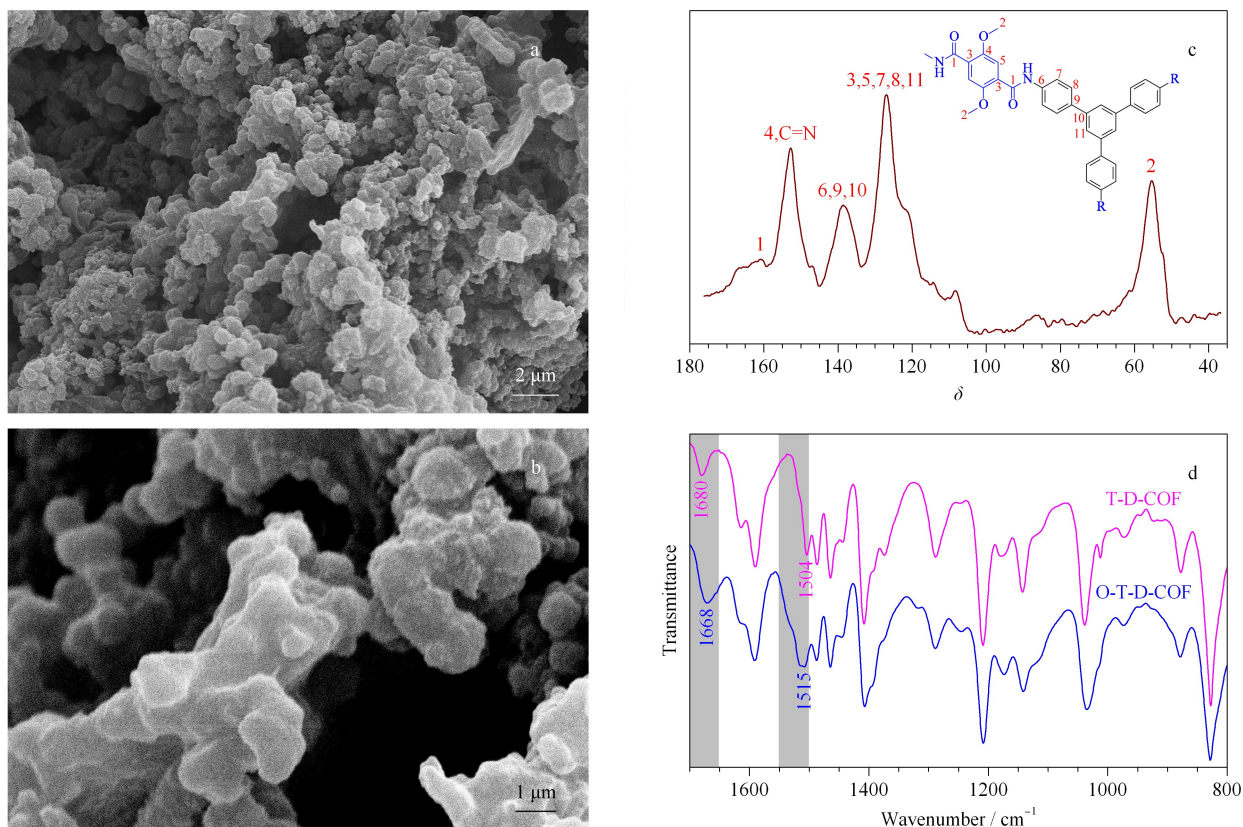


图 2 O-T-D-COF 材料放大 (a) 5 000 倍和 (b) 18 000 倍的 SEM 图及 (c) 固体核磁 ^{13}C 谱和 (d) 红外光谱图
Fig. 2 SEM images of O-T-D-COF at (a) 5 000 and (b) 18 000 magnifications, and (c) ^{13}C NMR spectra and (d) IR spectra of O-T-D-COF

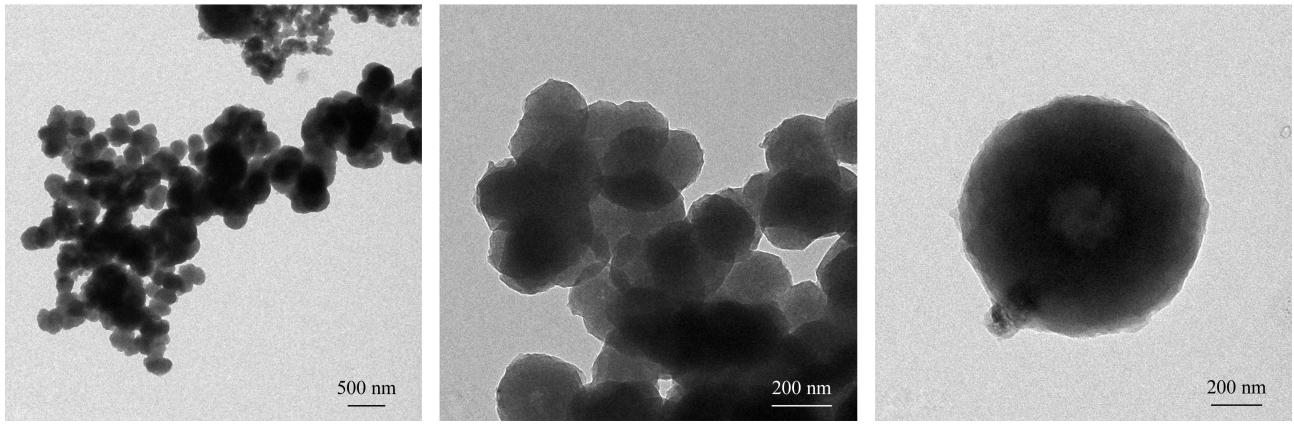


图 3 O-T-D-COF 材料的 TEM 图
Fig. 3 TEM images of O-T-D-COF

一个柱形都明显比前 3 组对应柱形的长度更长,说明此酸浓度下的上样条件更有利于富集,因此得出上样液中 TFA 的最佳体积分数为 5%。

考察上样液中的乙腈的体积分数,分别设为 85%、88%、90%、95%, TFA 的体积分数固定为 5%。如图 4b 所示,随着上样液中乙腈浓度的增加,信号强度先增加后减少。当乙腈达到 90% 时,6 条肽的信号均比其他 3 组的结果好,说明此时富集效果最好。这一结果可以说明,乙腈低于 90% 时,糖肽不

能很好地与 O-T-D-COF 材料结合,而乙腈高于 90% 时,糖肽在上样液中的溶解性较差,从而降低了富集效果。因此得出结论,上样液中最佳的乙腈体积分数为 90%。

为了更好地淋洗与分离材料上的非糖肽物质和其他杂质,进一步优化了淋洗液。考察不同酸度的淋洗液对富集效果的影响,分别配制了 TFA 体积分数为 0.1%、1%、3% 和 5% 的淋洗液,淋洗液中 ACN 的体积分数固定为 90%。从图 4c 可以看出,淋洗液

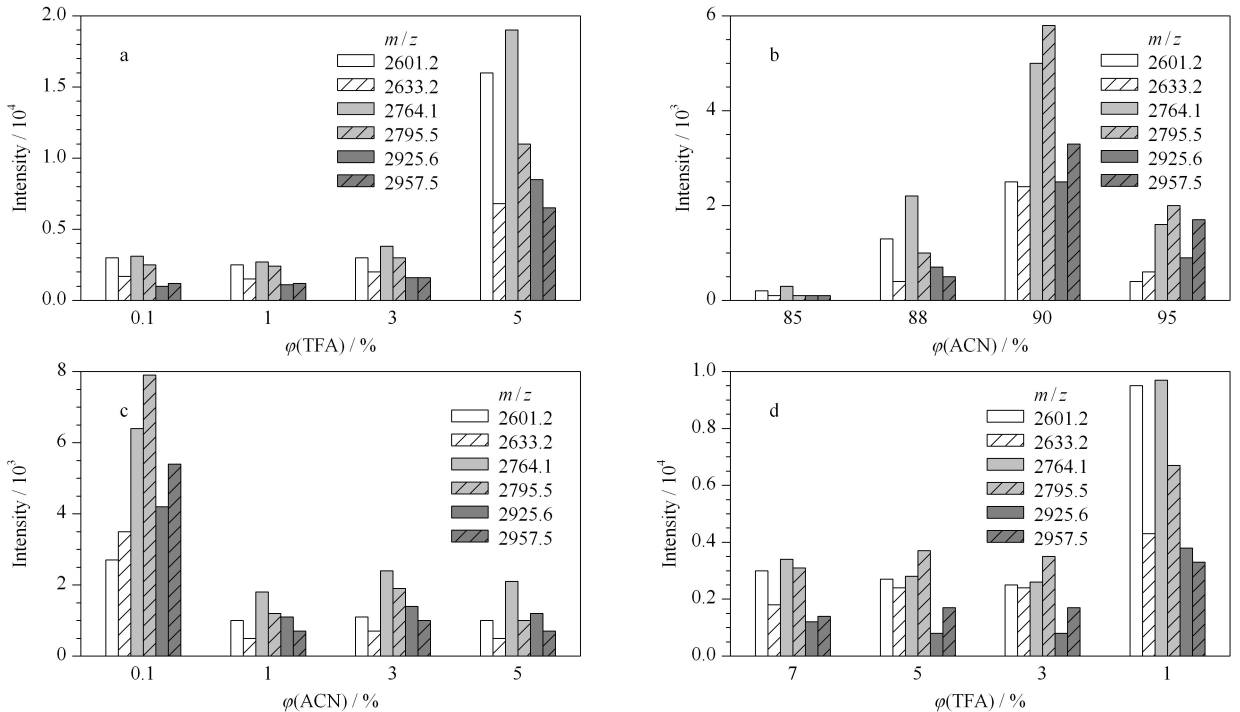


图 4 (a) 上样液的酸度、(b) 上样液中的乙腈体积分数、(c) 淋洗液的酸度、(d) 洗脱液的酸度对富集效果的影响
Fig. 4 Effects of (a) loading buffer acidity, (b) ACN volume percentage in loading buffer, (c) washing buffer acidity, and (d) eluent buffer acidity on enrichment
 m/z 2601.2, 2633.2, 2764.1, 2795.5, 2925.6, and 2957.5; six highly abundant glycopeptides of IgG digests.

中 TFA 的体积分数为 0.1% 时,糖肽的信号最好,随着淋洗液酸度的增加,糖肽信号强度逐渐降低。这一结果说明,淋洗液的酸度变高可能会造成糖肽的流失,不利于材料对糖肽的富集。

最后,为了考察洗脱液中酸浓度对富集效果的影响,分别配制了 4 种洗脱液条件,其中 TFA 的体积分数分别为 7%、5%、3%、1%。从图 4d 可以看出,只有第 4 组的 6 条信号峰信号较强,此时洗脱液中酸的体系分数为 1%。因此得出结论,洗脱液中 TFA 的最佳体积分数为 1%。

以上的优化实验表明,O-T-D-COF 材料对糖肽的保留是结合亲水作用和静电作用的结果。O-T-D-COF 对糖肽有较强的亲水作用,对糖肽有很强的保留。通过亲水模式的洗脱富集,以及淋洗操作条件优化,可以很好地去除非糖肽。图 5 是未经过材料富集的糖肽酶解液的质谱图和经材料在最优条件下富集的 IgG 糖肽样品的质谱图的对比。图 5a 中,由于糖肽酶解液中存在高丰度的非糖肽及杂质信号,这些物质在质谱检测中会严重干扰和抑制糖肽的信号,使得质谱仪不容易检测到糖肽的信号,未经材料富集的糖肽的信号峰只有 4 条,丰度低且选择性差。而图 5b 中,一共可以鉴定到 32 条糖肽的信号峰,并且几乎没有非糖肽信号的干扰,很好地提高了糖肽富集选择性与检测丰度。

2.4 O-T-D-COF 材料的富集选择性验证

为考察 O-T-D-COF 材料在复杂体系中对富集糖肽的选择性,将 IgG 和 BSA 的酶解液混合,以此为研究对象,考察 O-T-D-COF 材料在复杂体系中的糖肽富集情况。图 6a 为 IgG 和 BSA 酶解液物质的量之比为 1:10 的糖肽富集结果,可以鉴定到 30 条糖肽的信号峰,并且信号丰度佳。图 6b 为 IgG 和 BSA 酶解液物质的量之比为 1:50 的糖肽富集结果,可以鉴定到 24 条糖肽信号峰,依然保持了较好的富集丰度及富集选择性。以上结果都展示出 O-T-D-COF 材料在糖肽富集领域较好的应用潜力。

2.5 O-T-D-COF 材料的富集检测限

在糖肽富集实验中的检测限是指在满足实验要求的情况下,待测糖肽样品的最小浓度。O-T-D-COF 材料检测限的大小代表了材料在低丰度糖肽样品中,对糖肽的特异性吸附能力大小。因此,在富集检测限的研究中,分别配制了 5 fmol/ μL 和 2.5 fmol/ μL 的低浓度 IgG 酶解液溶液进行富集操作。图 7a 为 5 fmol/ μL 样品的富集结果,可以鉴定到 16 条糖肽的信号峰,其中 6 条高丰度糖肽的信号较强。图 7b 图为 2.5 fmol/ μL 样品的富集结果,仍能鉴定到 12 条糖肽信号峰,且 6 条高丰度糖肽的信号较强。从这一结果可以得出,当样品的浓度低至 2.5 fmol/ μL 时,依然可以进行糖肽信号的有效鉴

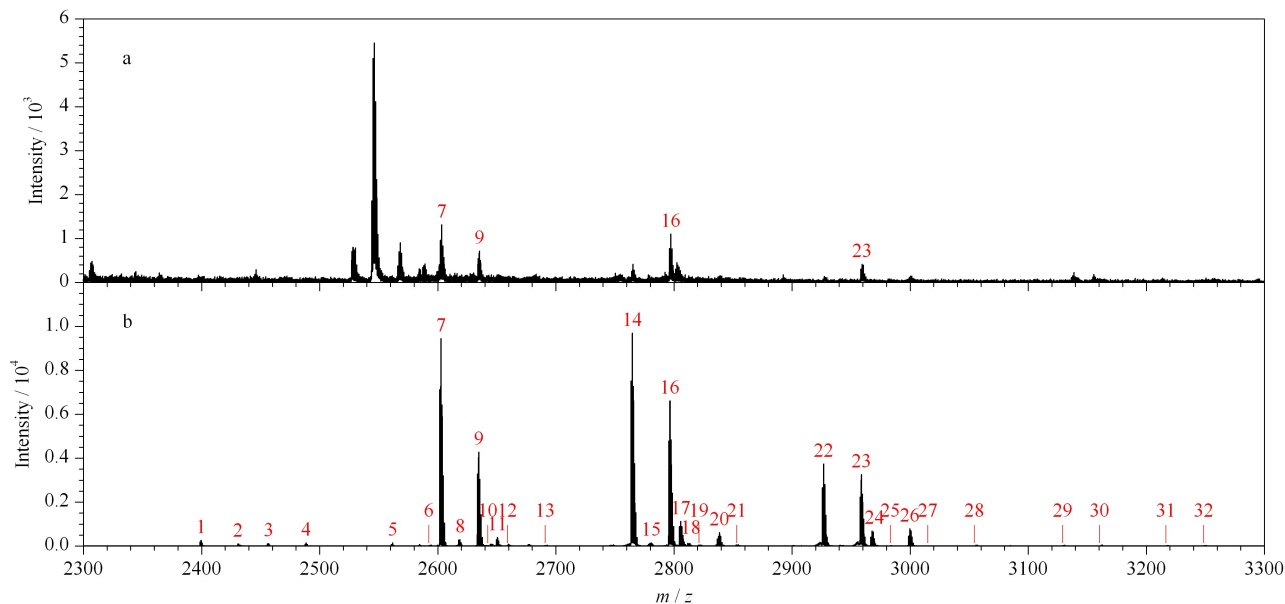


图 5 富集 (a) 前和 (b) 最优条件下富集的糖肽质谱图

Fig. 5 Mass spectra of the tryptic digest of IgG (a) before and (b) after enrichment under optimum conditions

m/z of glycopeptide peak No. 1; 2398.5; 2; 2430.4; 3; 2455.5; 4; 2487.5; 5; 2560.5; 6; 2592.5; 7; 2601.2; 8; 2617.5; 9; 2633.2; 10; 2642.4; 11; 2649.5; 12; 2659.0; 13; 2691.0; 14; 2764.1; 15; 2779.6; 16; 2795.5; 17; 2804.5; 18; 2811.5; 19; 2821.3; 20; 2836.5; 21; 2853.3; 22; 2925.6; 23; 2957.5; 24; 2966.6; 25; 2983.2; 26; 2998.5; 27; 3015.1; 28; 3054.5; 29; 3129.2; 30; 3160.5; 31; 3216.6; 32; 3248.6.

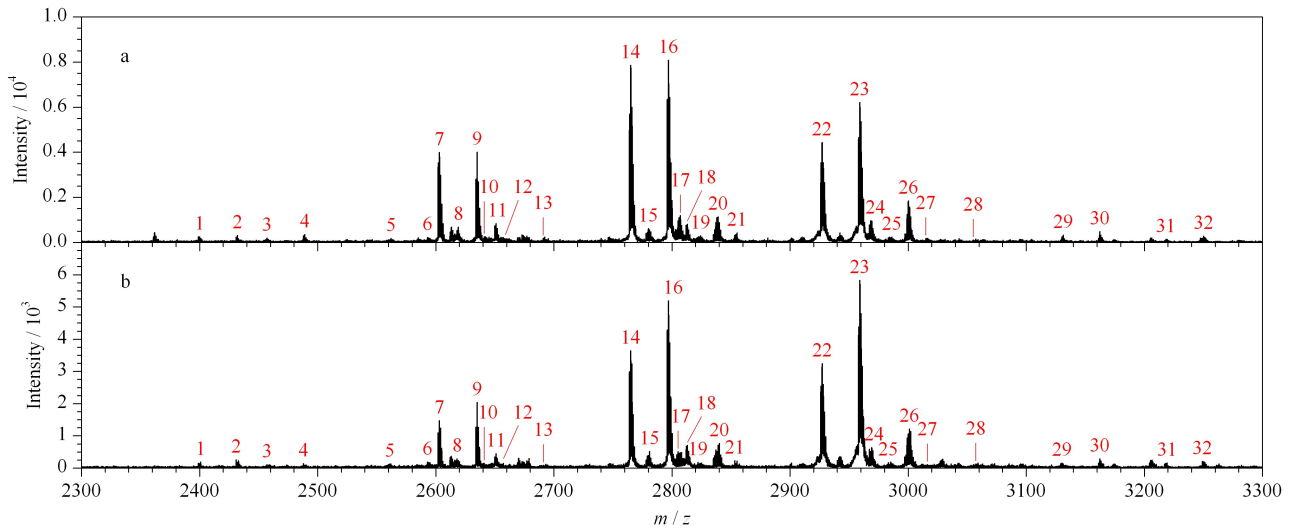


图 6 复杂体系的糖肽富集质谱图

Fig. 6 Mass spectra of the complex system for glycopeptides enrichment

Mixture of tryptic digests of human serum immunoglobulin G (IgG) and bovine serum albumin (BSA) at amount of material ratios of (a) 1:10 and (b) 1:50. Peak Nos.: see Fig. 5.

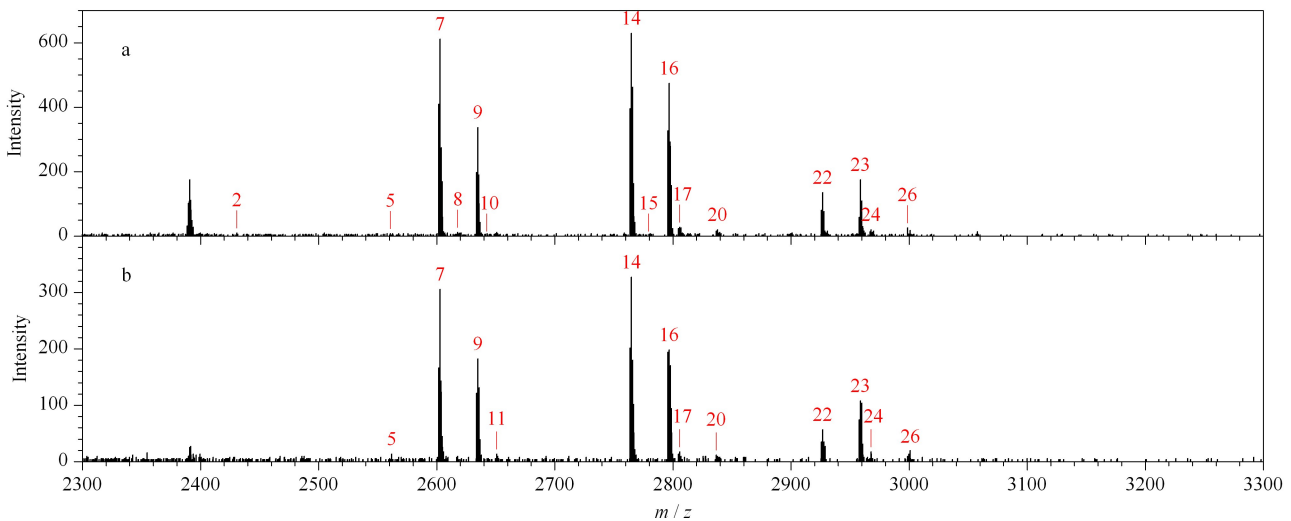


图 7 (a) 5 fmol/μL 和 (b) 2.5 fmol/μL 的 IgG 酶解液的富集质谱图

Fig. 7 Mass spectra of the tryptic digests of (a) 5 fmol/μL and (b) 2.5 fmol/μL IgG

Peak Nos.: see Fig. 5.

定,说明 O-T-D-COF 材料在低浓度的糖肽样品中仍然对糖肽有较好的特异性识别能力。

2.6 O-T-D-COF 材料的富集容量

O-T-D-COF 材料的富集容量是一项重要的考察指标,实验中固定糖肽样品的质量为 6 μg,以不同质量(10、20、30、40、50、100、150 和 200 μg)的材料进行富集。图 8 为不同材料用量的实验结果,纵坐标为质谱信号的强弱。从图 8 中可以看出,随着材料量的增加,质谱信号逐渐增加;当材料质量增至 50 μg 时 6 条信号峰的强度最强;此后,信号强度趋于平缓。因此,得出 O-T-D-COF 材料对糖肽的富

集容量为 120 mg/g。

2.7 O-T-D-COF 材料的富集回收率

通过稳定同位素二甲基标记的方法进行了 O-T-D-COF 材料富集回收率的考察。该实验需要通过两步进行,第一次富集的样品是 3 μg 氘代二甲基标记的 IgG 酶解液,将第一次实验所得洗脱液冻干,与 3 μg 二甲基标记的 IgG 酶解液混合得到第二次待富集样品。经第二次富集所得的洗脱液经过冻干,脱糖基后用于 MALDI 分析,本实验平行做 3 组进行对比。IgG 的两条糖肽序列分别为 EEQYN#STYR 和 EEQFN#STFR(N#为修饰位点)。经过脱

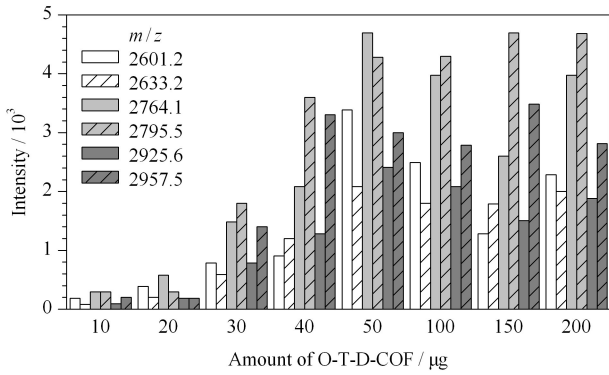


图 8 不同质量 O-T-D-COF 材料富集 6 μg IgG 酶解液的结果
Fig. 8 Results of enrichment of 6 μg IgG tryptic digest with different amount of O-T-D-COF materials m/z 2601.2, 2633.2, 2764.1, 2795.5, 2925.6, and 2957.5; glycopeptides.

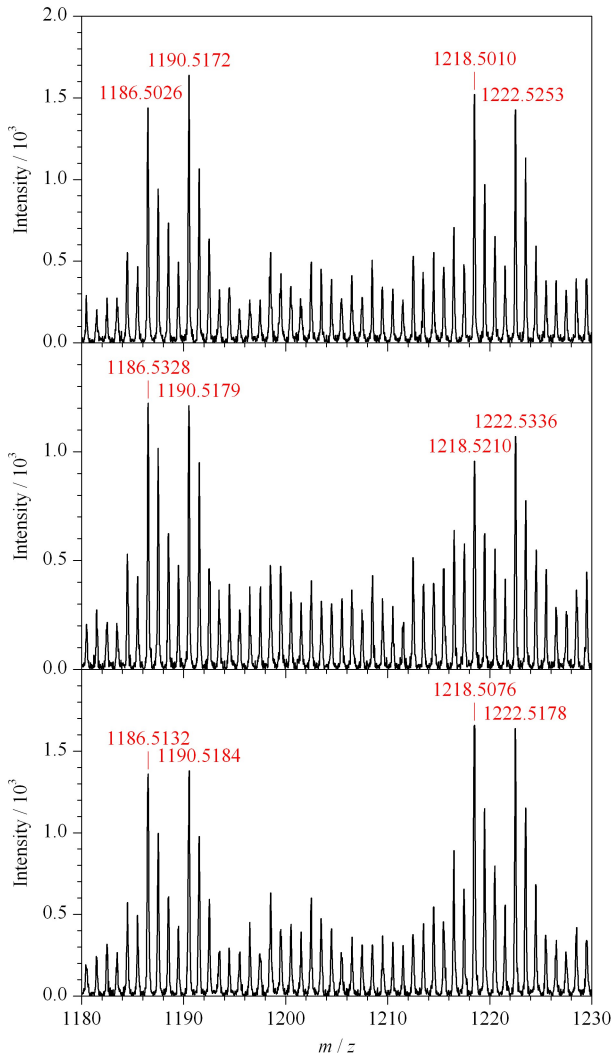


图 9 从 IgG 酶解液回收轻/重二甲基标记的去糖基化肽的 3 组平行试验
Fig. 9 Three paralleled experiments of the recovery of the light- and heavy-dimethyl labeled deglycosylated peptides from human IgG tryptic digest

糖基后的两条糖肽的 m/z 分别是 1158.5 和 1190.5, 由二甲基标记过的两条糖肽的 m/z 分别是 1186.6 和 1218.5 (标记为轻样); 用氘代二甲基标记后两条脱糖基肽段的 m/z 分别增加至 1190.6 和 1222.5 (标记为重样)。如图 9 所示, 轻样和重样的信号峰同时出现在谱图中, 同一条糖肽的轻样和重样信号峰的信号强度之比即为 O-T-D-COF 材料的回收率。

将 3 组平行实验的结果统计到表 1 中, 再计算其平均值分别为 103.5% 和 101.5%, 该值即为 O-T-D-COF 材料的回收率。

表 1 人 IgG 酶解液经 O-T-D-COF 材料富集后两个去糖基化肽的回收率 ($n=3$)

Table 1 Recoveries of two deglycosylated peptides from human IgG tryptic digest enriched by O-T-D-COF ($n=3$)

No.	Recoveries/%	
	EEQFN#STFR (m/z 1158.5)	EEQYN#STYR (m/z 1190.5)
1	110.1	93.8
2	99.0	111.9
3	101.4	98.8
Average	103.5 \pm 6.6	101.5 \pm 10.4

2.8 O-T-D-COF 材料在实际样品中的应用

从前期的结果可知, 该材料拥有良好的富集性能, 因此被进一步应用于人血清样品的糖肽富集。人血清样品是目前糖肽富集中研究最多的生物样品, 包含了丰富的生理和病理状况信息。但血清中, 糖蛋白的分析因其丰度低具有较大的难度, 需要用有效的样品富集前处理操作, 才能将其检测到。我们利用高分辨液相色谱-质谱联用仪对 O-T-D-COF 材料富集结果进行了检测与分析, 得到了血清中来自 53 个 N -糖蛋白中的 86 个 N -糖肽序列, 并鉴定到了 94 个 N -糖基化位点 (见附表 1, 详见 <http://www.chrom-China.com/>)。

3 结论

本文利用溶剂热合成法制备了一种 2D 层状、具有孔洞结构的 O-T-D-COF 材料, 结合 SEM 和 TEM 对其进行了表征。将制备的材料进行了氧化后处理以提高材料对糖肽富集的效率, 且成功应用于糖肽的选择性富集。建立了一个较为完整的体系, 探讨了富集过程中上样液条件、淋洗液条件、洗脱液条件等对富集结果的影响, 对富集条件进行了优化。并在复杂样品体系进行了富集选择性的验

证,表明 O-T-D-COF 材料在 IgG 和 BSA 酶解液物质的量之比为 1:50 时,具有良好的糖肽富集选择性。同时,具有较低的检测限(2.5 fmol/ μ L)、较高的富集容量(120 mg/g),及较好的富集回收率(103.5%、101.5%)。最后,我们将 O-T-D-COF 应用于实际样品中的糖肽富集,得到了血清中来自 53 个 N-糖蛋白中的 86 个 N-糖肽序列,并鉴定到了 94 个 N-糖基化位点。这些都展现了 O-T-D-COF 材料在糖肽富集领域的应用潜力。

参考文献:

- [1] Feng X, Ding X S, Jiang D L. *Chem Soc Rev*, 2012, 41(18): 6010
- [2] Geng K Y, He T, Liu R, et al. *Chem Rev*, 2020, 120(16): 8814
- [3] Ding S Y, Wang W. *Chem Soc Rev*, 2013, 42(2): 548
- [4] Huang N, Wang P, Jiang D. *Nat Rev Mater*, 2016, 1(10): 16068
- [5] Liang R R, Jiang S Y, Zhao X. *Chem Soc Rev*, 2020, 49(12): 3920
- [6] Wang X, Ye N S. *Electrophoresis*, 2017, 38: 3059
- [7] Chen X, Geng K, Liu R, et al. *Angew Chem Int Edit*, 2020, 59(13): 5050
- [8] Mann M, Jensen O N. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(3): 255
- [9] Huang J F, Wang F J, Ye M L, et al. *J Chromatogr A*, 2014, 1372: 1
- [10] Zhang Y, Zhang C, Jiang H C, et al. *Chem Soc Rev*, 2015, 44(22): 8260
- [11] Dube D H, Bertozzi C R. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4(6): 477
- [12] Hart G W, Copeland R J. *Cell*, 2010, 143: 672
- [13] Moremen K W, Tiemeyer M, Nairn A V. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2012, 13(7): 448
- [14] Ongay S, Boichenko A, Govorukhina N, et al. *J Sep Sci*, 2012, 35(18): 2341
- [15] Gaunitz S, Nagy G, Pohl N L B, et al. *Anal Chem*, 2017, 89(1): 389
- [16] Qing G Y, Yan J Y, He X N, et al. *Trend Anal Chem*, 2020, 124: 115570
- [17] Pan S, Chen R, Aebersold R, et al. *Mol Cell Proteomics*, 2011, 10(1): R110.003251
- [18] Liu S, Jiang X T, Shang Z, et al. *Anal Chim Acta*, 2020, 1123: 18
- [19] Witze E S, Old W M, Resing K A. *Nat Meth*, 2007, 4(10): 798
- [20] Cummings R D, Pierce J M. *Chem Biol*, 2014, 21(1): 1
- [21] Palaniappan K K, Bertozzi C R. *Chem Rev*, 2016, 116(23): 14277
- [22] Huang B Y, Yang C K, Liu C P, et al. *Electrophoresis*, 2014, 35(15): 2091
- [23] Qing G Y, Lu Q, Xiong Y T, et al. *Adv Mater*, 2017, 29(20): 1604670
- [24] Cai T P, Zhang H J, Rahman A F M M, et al. *Microchim Acta*, 2017, 184(8): 2629
- [25] Chen Y X, Sheng Q Y, Hong Y Y, et al. *Anal Chem*, 2019, 91(6): 4047
- [26] Chen C, Kang H J, Zhang X F, et al. *Chinese Journal of Chromatography*, 2019, 37(8): 845
陈成, 康虹健, 张小菲, 等. 色谱, 2019, 37(8): 845
- [27] Zheng H J, Jia J X, Li Z, et al. *Anal Chem*, 2020, 92(3): 2680
- [28] Lu Q, Chen C, Xiong Y T, et al. *Anal Chem*, 2020, 92(9): 6269
- [29] Zhang H Q, Lv Y Y, Du J, et al. *Anal Chim Acta*, 2020, 1098: 181
- [30] Zheng X T, Wang X, Zhang F S, et al. *Chinese Journal of Chromatography*, 2021, 39(1): 15
郑鑫彤, 王雪, 张福生, 等. 色谱, 2021, 39(1): 15
- [31] Ma Y F, Yuan F, Zhang X H, et al. *Analyst*, 2017, 142(17): 3212
- [32] Wang H P, Jiao F L, Gao F Y. *J Mater Chem B*, 2017, 5(22): 4052
- [33] Gao C H, Lin G, Lei Z X. *J Mater Chem B*, 2017, 5(36): 7496
- [34] Ding F J, Chu Z Y, Zhang Q Q, et al. *Anal Chim Acta*, 2019, 1057: 145
- [35] Wang J X, Li J, Gao M X, et al. *Nanoscale*, 2017, 9(30): 10750
- [36] Ma Y F, Wang L J, Zhou Y L, et al. *Nanoscale*, 2019, 11(12): 5526
- [37] Luo B, He J, Li Z Y, et al. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11(50): 47218