



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109942667 A

(43)申请公布日 2019.06.28

(21)申请号 201910159146.3

(22)申请日 2019.03.04

(71)申请人 南京师范大学

地址 210000 江苏省南京市鼓楼区宁海路
122号

(72)发明人 沈健 古志远 杨世庶

(74)专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司 32200

代理人 沈进

(51) Int. Cl.

C07K 1/14(2006.01)

G01N 27/62(2006.01)

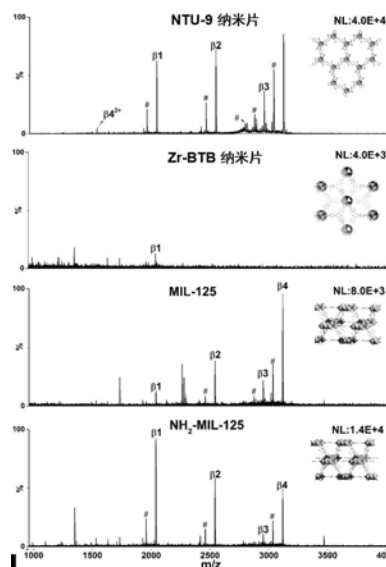
权利要求书1页 说明书6页 附图5页

(54)发明名称

二维金属有机骨架纳米片富集磷酸化肽段的方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种二维金属有机骨架纳米片富集磷酸化肽段的方法和应用,该方法通过将二维金属有机骨架纳米片与富集溶液混合分散,再加入磷酸化肽样品进行富集,富集后离心,除去上清液,后加入洗涤溶液,涡旋、离心,除去上清液;最后加入洗提溶液,超声、涡旋后进行洗提,得到富集的磷酸化肽段。本发明将该纳米片用于富集磷酸化肽段,其展现出高效的富集能力、极低的检测限和极高的抗干扰能力,相比于商业化的固定化金属离子亲和色谱法和金属氧化物亲和色谱法时,富集效率有了极大的提高;同时对于复杂样品的检测也展现出良好的效果,本发明提供的纳米片具有适用范围广、选择性好、灵敏度高优异性能,有利于大规模推广应用。



1. 一种二维金属有机骨架纳米片富集磷酸化肽段的方法,其特征在于:包括如下步骤:
 - (1) 将二维金属有机骨架纳米片与富集溶液混合后超声使其混合均匀,得到分散溶液;
 - (2) 将待分离的磷酸化肽样品加入到上述分散溶液中,涡旋30 min进行富集,二维金属有机骨架纳米片表面丰富的金属结合位点可以与磷酸化肽段中的磷酸基团通过配位作用而结合;
 - (3) 富集后离心,除去上清液,后加入洗涤溶液1,涡旋,离心,除去上清液,随后接着加入洗涤溶液2涡旋,离心,除去上清液;
 - (4) 加入洗提溶液,超声、涡旋后进行洗提,得到富集的磷酸化肽段。
2. 根据权利要求1所述二维金属有机骨架纳米片富集磷酸化肽段的方法,其特征在于:所述二维金属有机骨架纳米片与富集溶液按固液比0.5~1 mg:100~200 μ L的比例混合。
3. 根据权利要求1所述二维金属有机骨架纳米片富集磷酸化肽段的方法,其特征在于:所述磷酸化肽样品与分散溶液中二维金属有机骨架纳米片用量比为0.2~1 μ L:0.5~1 mg。
4. 根据权利要求1所述二维金属有机骨架纳米片富集磷酸化肽段的方法,其特征在于:所述二维金属有机骨架纳米片的厚度3~8 nm。
5. 根据权利要求1所述二维金属有机骨架纳米片富集磷酸化肽段的方法,其特征在于:所述富集溶液为乙腈、三氟乙酸和超纯水配制而成的混合溶液,其中乙腈和三氟乙酸的含量分别为40vol%和3vol%;所述洗涤溶液1为乙腈、三氟乙酸和超纯水配制而成的混合溶液,其中乙腈和三氟乙酸的含量分别为50vol%和4vol%;所述洗涤溶液2为乙腈、三氟乙酸和超纯水配制而成的混合溶液,其中乙腈和三氟乙酸的含量分别为30vol%和0.1vol%。
6. 根据权利要求1所述二维金属有机骨架纳米片富集磷酸化肽段的方法,其特征在于:所述洗提溶液为10 wt %氨水溶液。
7. 根据权利要求1所述二维金属有机骨架纳米片富集磷酸化肽段的方法,其特征在于:所述二维金属有机骨架纳米片由以下步骤制得:以钛酸异丙酯为金属源,2,5-二羟基对苯二甲酸为有机配体,在溶剂N, N-二乙基甲酰胺中,在密封条件下于200 $^{\circ}$ C反应20 h,金属源与有机配体自组装生成三维MOFs,自然冷却降至室温后,离心后用N, N-二甲基甲酰胺洗涤3~5次,室温干燥后在80 $^{\circ}$ C下真空活化处理5 h,之后在异丙醇溶液中进行超声剥离2天,随后先在3000 rpm下离心,除去下层沉淀的固体,得到上层悬浮液,然后上层悬浮液再在12000 rpm下离心,得到二维金属有机骨架纳米片。
8. 根据权利要求1~7任一项所述的方法在磷酸化肽段检测中的应用。

二维金属有机骨架纳米片富集磷酸化肽段的方法和应用

[0001]

技术领域

[0002] 本发明涉及磷酸化肽富集应用技术领域,具体涉及一种二维金属有机骨架纳米片富集磷酸化肽段的方法和应用。

[0003]

背景技术

[0004] 金属有机骨架材料 (Metal-Organic Frameworks, MOFs) 是一类多孔晶体材料,其具有一些独特的性质,例如超高的比表面积且孔容大,孔表面容易功能化改性等特点,因此常被用于气体吸附于分离,催化,能量存储和二氧化碳捕获。二维MOFs纳米片是目前研究的热点,而它们的应用却主要集中在能量存储,膜分离和传感等方面。二维MOFs纳米片的主要优点包括形态良好的二维片层结构,大的活性表面积和良好的分散性,因此其具有可被用于富集磷酸化肽的潜在可能性。

[0005] 蛋白磷酸化参与着许多细胞反应过程,其在调控蛋白活性和功能方面发挥着重要作用。基于质谱 (Mass Spectrometry, MS) 的蛋白质组学是一种有效的检测磷酸化蛋白/磷酸化肽的手段。但是,磷酸化肽的浓度很低 (低于 1×10^{-9} M),因此从复杂生物样品中检测磷酸化肽面临着巨大的挑战。检测磷酸化肽的灵敏度经常受到低的电离效率,高丰度的其他肽段的干扰,以及直接MS分析时磷酸化肽的信号被抑制等问题。为了解决这些问题,在蛋白质组研究中实现对磷酸化肽的高效富集吸引了越来越多的关注。

[0006] 截至目前,各种各样的方法技术和材料被用于选择性富集磷酸化肽,包括离子交换色谱法,免疫共沉淀法,化学衍生法,固定化金属离子亲和色谱法和金属氧化物亲和色谱法。IMAC方法的富集原理基于磷酸基团和固定化的金属离子的配位螯合作用,例如 Al^{3+} , Ti^{4+} 和 Zr^{4+} ,但是IMAC材料有时候可能需要复杂的合成过程。MOAC方法富集的原理是基于磷酸基团和金属氧化物表面形成桥连的二齿配体,例如 Al_2O_3 , TiO_2 和 ZrO_2 。但是MOAC材料特异性富集效果不佳,同时在富集过程中也会造成磷酸化肽的丢失。

[0007]

发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供一种二维金属有机骨架纳米片富集磷酸化肽段的方法和应用,所述的方法采用二维MOFs纳米片富集样品中的磷酸化肽段,纳米片材料合成过程简易,产量高,富集方法简单,解决现有技术中商业化亲和材料富集效率低的缺点,并展现出高效地富集能力 (磷酸化肽:非磷酸化肽=1:10000,磷酸化肽浓度为 $4 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$) 和极低的检测限 (1×10^{-10} M),有利于推广使用。

[0009] 为实现上述发明目的,本发明采用如下技术方案:

一种二维金属有机骨架纳米片富集磷酸化肽段的方法,包括如下步骤:

(1) 将二维金属有机骨架纳米片与富集溶液混合后超声使其混合均匀,得到分散溶液;

(2) 将待分离的磷酸化肽样品加入到上述分散的溶液中, 涡旋30 min进行富集, 二维金属有机骨架纳米片表面丰富的金属结合位点可以与磷酸化肽段中的磷酸基团通过配位作用而结合;

(3) 富集后离心, 除去上清液, 后加入洗涤溶液1, 涡旋, 离心, 除去含有非磷酸化肽段的上清液, 随后接着加入洗涤溶液2涡旋, 离心, 除去上清液;

(4) 洗涤后, 加入洗提溶液, 超声、涡旋后进行洗提, 得到富集的磷酸化肽段。

[0010] 优选的, 所述二维金属有机骨架纳米片与富集溶液按固液比0.5~1.0 mg:100~200 μ L的比例混合。

[0011] 优选的, 所述磷酸化肽样品与分散溶液中二维金属有机骨架纳米片用量比为0.2~1 μ L:0.5~1 mg。

[0012] 优选的, 所述二维金属有机骨架纳米片的厚度3~8 nm。

[0013] 优选的, 所述富集溶液为乙腈、三氟乙酸和超纯水配制而成的混合溶液, 其中乙腈和三氟乙酸的含量分别为40 vol%和3 vol%; 所述洗涤溶液1为乙腈、三氟乙酸和超纯水配制而成的混合溶液, 其中乙腈和三氟乙酸的含量分别为50 vol%和4 vol%; 所述洗涤溶液2为乙腈、三氟乙酸和超纯水配制而成的混合溶液, 其中乙腈和三氟乙酸的含量分别为30 vol%和0.1 vol%。

[0014] 优选的, 所述洗提溶液为10 wt%氨水溶液。

[0015] 优选的, 所述二维金属有机骨架纳米片由以下步骤制得: 以钛酸异丙酯为金属源, 2,5-二羟基对苯二甲酸为有机配体, 在溶剂N, N-二乙基甲酰胺中, 在密封条件下于200 $^{\circ}$ C反应20 h, 金属源与有机配体自组装生成三维MOFs, 自然冷却降至室温后, 离心后用N, N-二甲基甲酰胺洗涤3~5次, 室温干燥后在80 $^{\circ}$ C下真空活化处理5 h, 之后在异丙醇溶液中进行超声剥离2天, 随后先在3000 rpm下离心, 除去下层沉淀的固体, 得到上层悬浮液, 然后上层悬浮液再在12000 rpm下离心, 得到二维金属有机骨架纳米片。

[0016] 上述的方法在磷酸化肽段检测中的应用。

[0017] 本发明主要是基于二维片层材料来实现对磷酸化肽的特异性富集, 并借助于基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱仪 (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) 来进行检测。二维片层材料具有一些独特的优点, 包括形态良好的二维片层形貌, 大的比表面积, 表面富含可以与磷酸基团相互结合的位点, 从而达到富集的效果。通过实验结果得出其具有适用范围广、选择性好、抗干扰能力强、检测限低等优异性能, 此方法为磷酸化肽的高效富集提供了新的手段, 并且有望在未来的复杂生物样品蛋白质组的大规模分析研究中实现应用。

[0018] 有意效果: 与现有技术相比, 本发明提供了一种二维MOFs纳米片高效富集磷酸化肽段的方法。相比传统的商业化IMAC和MOAC法富集磷酸化肽段的方法, 二维MOFs纳米片材料具有较大的比表面积, 较高的孔隙率, 表面活性位点多, 溶解性好易于分散, 选择性好、灵敏度高等优异性质。本发明通过将二维MOFs纳米片在富集之前用盐溶液处理, 抑制非磷酸化肽的吸附, 再借助于稳定同位素二甲基标记的方法, 将此二维MOFs纳米片应用于检测糖尿病人血清中磷酸化肽的相对含量, 具有高效的富集能力、极低的检测限和极高的抗干扰能力。

[0019]

附图说明

[0020] 图1为本发明实施例4合成的NTU-9及剥离后二维NTU-9纳米片的扫描电镜图和透射电镜图；

图2为本发明实施例4剥离后的二维NTU-9纳米片的原子力显微镜图；

图3为运用MALDI-TOF MS,检测本发明实施例4制备的二维NTU-9纳米片及对照例1合成的Zr-BTB纳米片、对照例2合成的MIL-125和对照例3合成的NH₂-MIL-125对标准磷酸化蛋白(β -casein)酶解的磷酸化肽段富集对比的质谱图；

图4为运用MALDI-TOF MS,检测本发明实施例4制备的二维NTU-9纳米片富集不同浓度下标准磷酸化蛋白(β -casein)酶解后的磷酸化肽段的质谱图；

图5为运用MALDI-TOF MS,检测本发明实施例4制备的二维NTU-9纳米片富集不同比例下混合的标准非磷酸化蛋白(BSA)与标准磷酸化蛋白(β -casein)酶解后的肽段的质谱图；

图6为运用MALDI-TOF MS,检测本发明实施例4制备的二维NTU-9纳米片定量检测血清中磷酸化肽段的质谱图；

图7为运用MALDI-TOF MS,检测本发明实施例4制备的二维NTU-9纳米片富集小鼠不同组织样品中磷酸化肽段的对比图和磷酸化位点的WebLogo图。

具体实施方式

[0021] 为了使本领域技术人员更好地理解本发明方案,下面结合附图和实施方式对本发明作进一步的详细说明。

[0022] 实施例1

在本发明中,所述的用二维MOFs纳米片富集标准磷酸化蛋白酶解的磷酸化肽段具体过程如下:

首先配制实验过程中所用的富集溶液、洗涤溶液和洗提溶液,富集溶液为乙腈、三氟乙酸和超纯水配制而成的混合溶液,其中乙腈和三氟乙酸的含量分别为40vol%和3vol%;所述洗涤溶液1为乙腈、三氟乙酸和超纯水配制而成的混合溶液,其中乙腈和三氟乙酸的含量分别为50vol%和4vol%;所述洗涤溶液2为乙腈、三氟乙酸和超纯水配制而成的混合溶液,其中乙腈和三氟乙酸的含量分别为30vol%和0.1vol%,洗提溶液为10wt % NH₃·H₂O。

[0023] 实验所用溶液配制完毕后,吸取100 μ L 富集溶液与1.0 mg二维MOFs纳米片混合后超声分散15 min使其均匀,而后吸取1 μ L 酶解的标准肽段混合物(来自牛血清 β -酪蛋白,西格玛奥德里奇中国)加入上述分散的悬浊液中,涡旋30 min,离心,除去上清液,而后吸取100 μ L洗涤溶液1涡旋2 min,离心,除去上清液,随后接着吸取100 μ L洗涤溶液2涡旋2 min,离心,除去上清液,此两步的目的主要是洗掉非磷酸化肽段,洗涤步骤过后,吸取10 μ L的10 wt% NH₃·H₂O加入洗涤后的材料中,超声8 min,涡旋10 min进行洗提过程,得到富集的磷酸化肽段。最后吸取1 μ L富集的磷酸化肽段与1 μ L基质溶液(基质溶液是将5 mg DHB、125 μ L ACN、122.5 μ L H₂O和2.5 μ L H₃PO₄混合一起后超声20 min得到的混合溶液)进行混合点样后借助MALDI-TOF MS进行分析。

[0024] 实施例2

采用与实施例1相同的富集溶液、洗涤溶液和洗提溶液。

[0025] 吸取150 μL 富集溶液与0.5 mg二维MOFs纳米片混合后超声分散15 min使其均匀,而后吸取0.2 μL 酶解的标准肽段混合物(来自牛血清 β -酪蛋白,西格玛奥德里奇中国)加入上述分散的悬浊液中,涡旋30 min,离心,除去上清液,而后吸取100 μL 洗涤溶液1涡旋2 min,离心,除去上清液,随后接着吸取100 μL 洗涤溶液2涡旋2 min,离心,除去上清液,此两步的目的主要是洗掉非磷酸化肽段,洗涤步骤过后,吸取10 μL 的10 wt% $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 加入洗涤后的材料中,超声8 min,涡旋10 min进行洗提过程,得到富集的磷酸化肽段。

[0026] 实施例3

采用与实施例1相同的富集溶液、洗涤溶液和洗提溶液。

[0027] 吸取200 μL 富集溶液与0.75 mg二维MOFs纳米片混合后超声分散15 min使其均匀,而后吸取0.6 μL 酶解的标准肽段混合物(来自牛血清 β -酪蛋白,西格玛奥德里奇中国)加入上述分散的悬浊液中,涡旋30 min,离心,除去上清液,而后吸取100 μL 洗涤溶液1涡旋2 min,离心,除去上清液,随后接着吸取100 μL 洗涤溶液2涡旋2 min,离心,除去上清液,此两步的目的主要是洗掉非磷酸化肽段,洗涤步骤过后,吸取10 μL 的10 wt% $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 加入洗涤后的材料中,超声8 min,涡旋10 min进行洗提过程,得到富集的磷酸化肽段。

[0028] 实施例4

在20 mL的反应釜中依次加入475 mg 2,5-二羟基对苯二甲酸和1.5 mL N,N-二乙基甲酰胺,然后在室温下进行搅拌混合均匀,随后向上述混合物中加入180 μL 钛酸异丙酯,密封后,将其置于烘箱中,设置温度为200 $^{\circ}\text{C}$,反应时间为20 h,反应结束后,取出反应釜自然冷却降至室温,取出反应后的固体,用N,N-二乙基甲酰胺溶液洗涤3-5次,最后室温干燥,得到暗红色固体粉末NTU-9。

[0029] 取50 mg上述经室温干燥后在80 $^{\circ}\text{C}$ 下真空活化处理5 h的NTU-9固体粉末分散于50 mL的异丙醇溶液中,超声2天,随后先在3000 rpm下离心,除去下层沉淀的固体,得到上层悬浮液。然后上层悬浮液再在12000 rpm下离心得到二维NTU-9纳米片。该二维NTU-9纳米片具有超薄的厚度,有序的纳米孔结构,溶解分散性好等优异特点。

[0030] 对合成的NTU-9纳米片和剥离后的二维NTU-9纳米片进行相关测试,测试结果如下:

图1为合成的NTU-9扫描电镜图和剥离后的二维NTU-9纳米片的透射电镜图;从三维NTU-9的扫描电镜图可看出其具有明显的层状结构,从二维NTU-9纳米片的透射电镜图中可以看出剥离的纳米片具有明显的片层结构和较薄的厚度。

[0031] 图2为剥离后的二维NTU-9纳米片的原子力显微镜图;从其原子力显微镜图中可看出纳米片厚度是5 nm,且分散性好,有明显的丁达尔现象。

[0032] 图3为二维NTU-9纳米片及对照例1合成的Zr-BTB纳米片、对照例2合成的MIL-125和对照例3合成的 NH_2 -MIL-125对标准磷酸化蛋白酶解的磷酸化肽段富集对比的质谱图;标准磷酸化肽段的浓度为 4×10^{-6} M。4者富集标准磷酸化蛋白酶解的磷酸化肽段实验过程参照实施例1中所述过程。MALDI-TOF MS检测参数:正离子模式,电压+25 kV,激光脉冲频率200 kHz,激光照射次数500 shots,激光能量70%。二维NTU-9纳米片的富集效果如图3所示,在经过二维NTU-9纳米片富集之后,从质谱图上可看出其富集到 β -酪蛋白酶解液中的4条磷

酸化肽($\beta 1, \beta 2, \beta 3$ 和 $\beta 4$)且脱磷酸化肽(#)同样被检测到,磷酸化肽信号高,且质谱图背景清晰,没有检测到非磷酸化肽,由此推断出,二维NTU-9纳米片展现出对磷酸化肽良好的富集效果。

[0033] 图4为二维NTU-9纳米片富集不同浓度下标准磷酸化蛋白酶解后的磷酸化肽段的质谱图;标准磷酸化肽段的浓度分别为 1×10^{-7} M、 1×10^{-8} M、 1×10^{-9} M和 1×10^{-10} M。实验过程参照实施例1中所述过程。MALDI-TOF MS检测参数:正离子模式,电压+25 kV,激光脉冲频率200 kHz,激光照射次数500 shots,激光能量70%。通过图4的实验数据得出,随着标准磷酸化肽的浓度逐渐降低,二维NTU-9纳米片依然能富集到 α -酪蛋白和 β -酪蛋白混合酶解液中的磷酸化肽,表现出优良的富集能力,当磷酸化肽的浓度降低到 1×10^{-10} M时,如图4所示,依然可以富集到3条磷酸化肽,且脱磷酸化肽依然可以检测到。由此推断出二维NTU-9纳米片展现出高效的富集能力。

[0034] 图5为二维NTU-9纳米片富集不同比例下混合的标准非磷酸化蛋白与标准磷酸化蛋白酶解后的肽段的质谱图;比例分别为1:10、1:100、1:500、1:1000、1:5000和1:10000。二维NTU-9纳米片富集磷酸化肽段实验过程参照实施例1中所述过程。MALDI-TOF MS检测参数:正离子模式,电压+25 kV,激光脉冲频率200 kHz,激光照射次数500 shots,激光能量70%。通过图5的实验数据得出,随着标准非磷酸化肽的浓度逐渐升高,二维NTU-9纳米片依然能富集到混合酶解液中来自 β -酪蛋白中的4条磷酸化肽,表现出优良的抗干扰能力,当磷酸化肽与非磷酸化肽的浓度比降低到1:10000时,如图5所示,依然可以富集到 β -酪蛋白中的4条磷酸化肽,且脱磷酸化肽依然可以检测到。由此推断出二维NTU-9纳米片展现出极强的抗干扰能力。

[0035] 图6为二维NTU-9纳米片运用稳定同位素二甲基标记法定量检测血清中磷酸化肽段的质谱图和健康人与患糖尿病病人中血清中每条肽段的含量对比。实验过程参照实施例1中所述过程。MALDI-TOF MS检测参数:正离子模式,电压+25 kV,激光脉冲频率200 kHz,激光照射次数500 shots,激光能量70%。运用稳定同位素二甲基标记法实现了对糖尿病人血清中4条磷酸化肽的含量与健康人中的相对定量检测,通过图6的实验数据得出,HS1,HS3和HS4肽段含量在患病人中含量低于健康人,HS2肽段含量在患病人中含量高于健康人。

[0036] 图7为二维NTU-9纳米片富集小鼠三种不同组织样品中磷酸化肽段的对比图和磷酸化位点的WebLogo图。实验过程参照实施例1中所述过程。富集后的样品借助LC-MS/MS进行检测。LC-MS/MS检测参数:流动相A(3% DMSO,97% H_2O ,0.1% $HCOOH$)和流动相B(3% DMSO,97% ACN,0.1% $HCOOH$)用于建立100 min梯度,其过程如下:0 min 5% B,65 min 5-23% B,20 min 23-52% B,1 min 52-80% B,然后在80% B中保持4 min,然后0.1 min,80-5% B,最后一步在5% B中保持10分钟,恒定流速设定为 300 nL min^{-1} ,MS扫描范围在350到1500 amu,时间跨度为250 ms。通过图7的实验数据得出,在三种小鼠组织样品中分别鉴定到2235,2789和3315条磷酸化肽,表明二维NTU-9纳米片在复杂实际样品中同样展现出优良的富集效果。

[0037] 对照例1

在22 mL的玻璃直立小瓶中依次加入10 mg四氯化锆、10 mg 1,3,5-三(4-羧基苯基)苯、3 mL N,N-二甲基甲酰胺溶剂超声10分钟,再加入600 mg甲酸和250 μL 水,密封瓶子盖好盖子,将玻璃小瓶放置在120 $^{\circ}\text{C}$ 的烘箱加热48小时。降至室温后,用12000转速离心得到

白色纳米片,依次用N, N-二甲基甲酰胺和乙醇溶液浸泡后再洗涤,除去纳米片孔道中未反应的试剂。最后将产物放在80 °C温度下真空干燥6小时,将制备的纳米片标记为Zr-BTB纳米片。

[0038] 所述Zr-BTB纳米片富集效果如图3所示,在经过Zr-BTB纳米片富集之后,从质谱图上可看出其仅富集到 β -酪蛋白酶解液中的1条磷酸化肽($\beta 1$)且信号较弱,另外质谱图中也检测到一些非磷酸化肽,由此推断出,Zr-BTB纳米片对于磷酸化肽的富集效果较差。

[0039] 对照例2

在20 mL的反应釜中依次加入498 mg对苯二甲酸和0.6 mL钛酸四丁酯,混合均匀后加入15 mL N, N-二甲基甲酰胺,2 mL甲醇,然后在室温下进行搅拌20 min,密封后,将其置于烘箱中,设置温度为150 °C,反应时间为20 h,反应结束后,取出反应釜自然冷却降至室温,取出反应后的固体,用无水乙醇洗涤3次,纯水洗涤2次,最后室温干燥,再在150 °C真空干燥12 h,得到白色固体粉末MIL-125。

[0040] 所述MIL-125富集效果如图3所示,在经过MIL-125富集之后,从质谱图上可看出其富集到 β -酪蛋白酶解液中的4条磷酸化肽($\beta 1, \beta 2, \beta 3$ 和 $\beta 4$)且脱磷酸化肽($\#$)也被检测到,磷酸化肽信号较高,但质谱图中检测到许多非磷酸化肽,由此推断出,MIL-125对于磷酸化肽的富集效果较差。

[0041] 对照例3

在20 mL的反应釜中依次加入272 mg 2-氨基对苯二甲酸和0.13 mL钛酸四丁酯,混合均匀后加入4.5 mL N, N-二甲基甲酰胺,0.5 mL甲醇,然后在室温下进行搅拌20 min,密封后,将其置于烘箱中,设置温度为150 °C,反应时间为72 h,反应结束后,取出反应釜自然冷却降至室温,取出反应后的固体,用N, N-二甲基甲酰胺洗涤3次,甲醇洗涤2次,最后室温干燥,再在150 °C真空干燥12 h得到黄色固体粉末NH₂-MIL-125。

[0042] 所述NH₂-MIL-125富集效果如图3所示,在经过NH₂-MIL-125富集之后,从质谱图上可看出其富集到 β -酪蛋白酶解液中的4条磷酸化肽($\beta 1, \beta 2, \beta 3$ 和 $\beta 4$)且脱磷酸化肽($\#$)也被检测到,磷酸化肽信号较高,但非磷酸化肽同样被检测到,由此推断出,NH₂-MIL-125对于磷酸化肽的富集效果较差。

[0043] 将对照例1-3与实施例4进行对比,通过实验发现,所选取的三种对比材料Zr-BTB纳米片,MIL-125和NH₂-MIL-125在磷酸化肽富集方面展现出的效果差于二维NTU-9纳米片。

[0044] 综上所述,本发明提供了一种基于二维MOFs纳米片实现对磷酸化肽的特异性富集,并借助于基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱仪来进行检测。此方法为磷酸化肽的高效富集提供了新的手段,并且有望在未来的复杂生物样品蛋白质组的大规模分析研究中实现应用。新型二维MOFs纳米片富集磷酸化肽段方法,与传统商业化IMAC和MOAC方法相比,二维MOFs纳米片具有一些独特的优点,包括形态良好的二维片层形貌,大的比表面积,表面富含可以与磷酸基团相互结合的位点,从而达到富集的效果。通过实验结果得出其具有适用范围广、选择性好、抗干扰能力强、检测限低等优异性能。因此,本发明有效克服了现有技术中的种种缺点具有高度的产业利用价值。

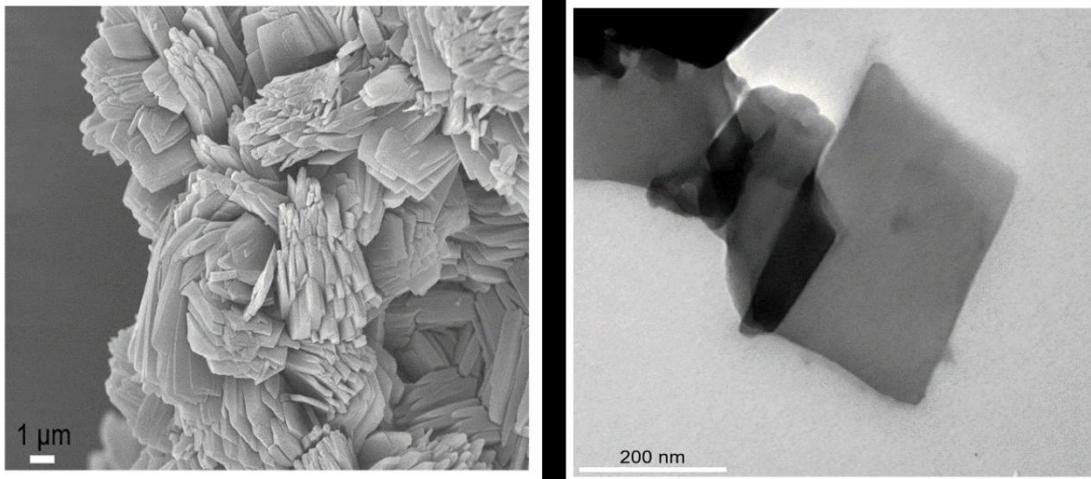


图1

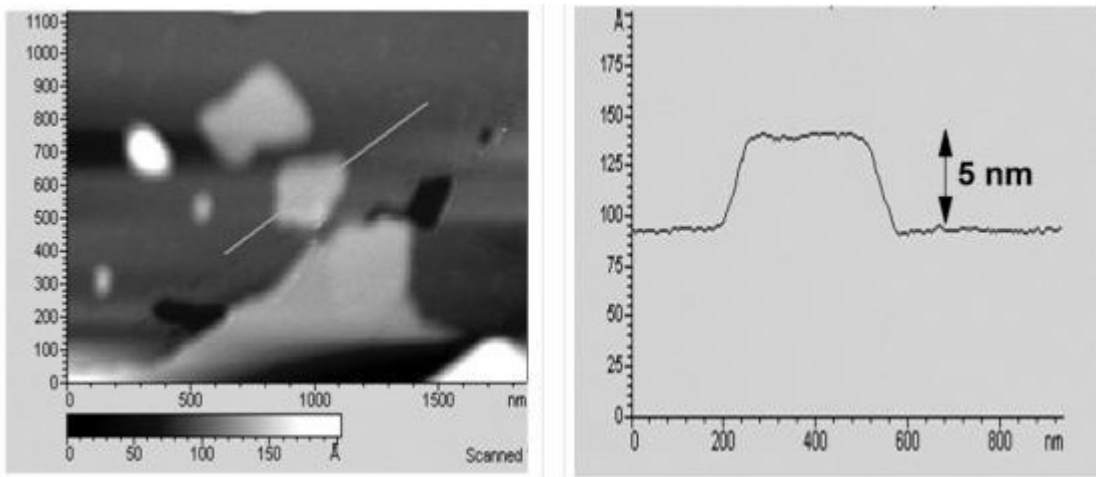


图2

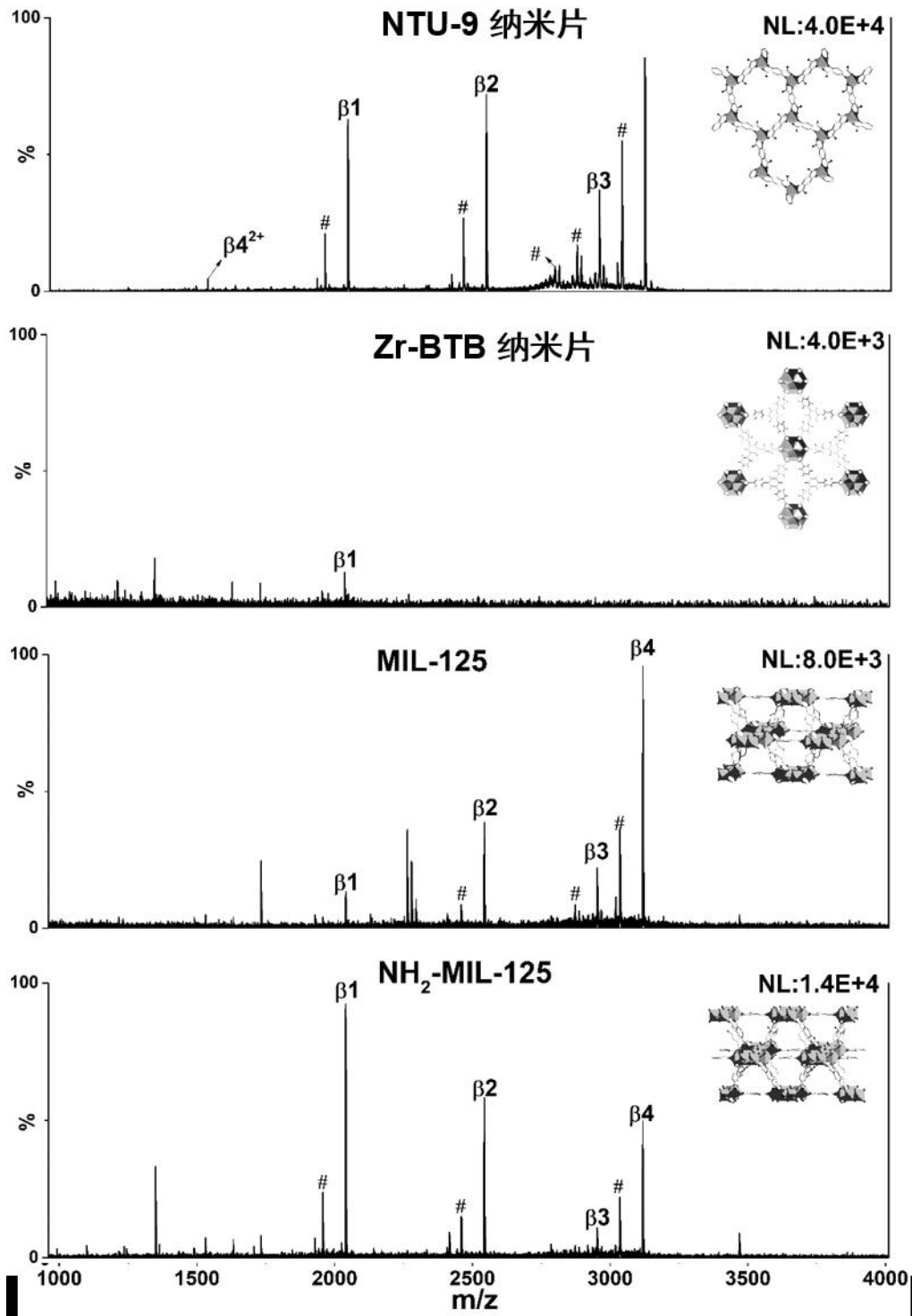


图3

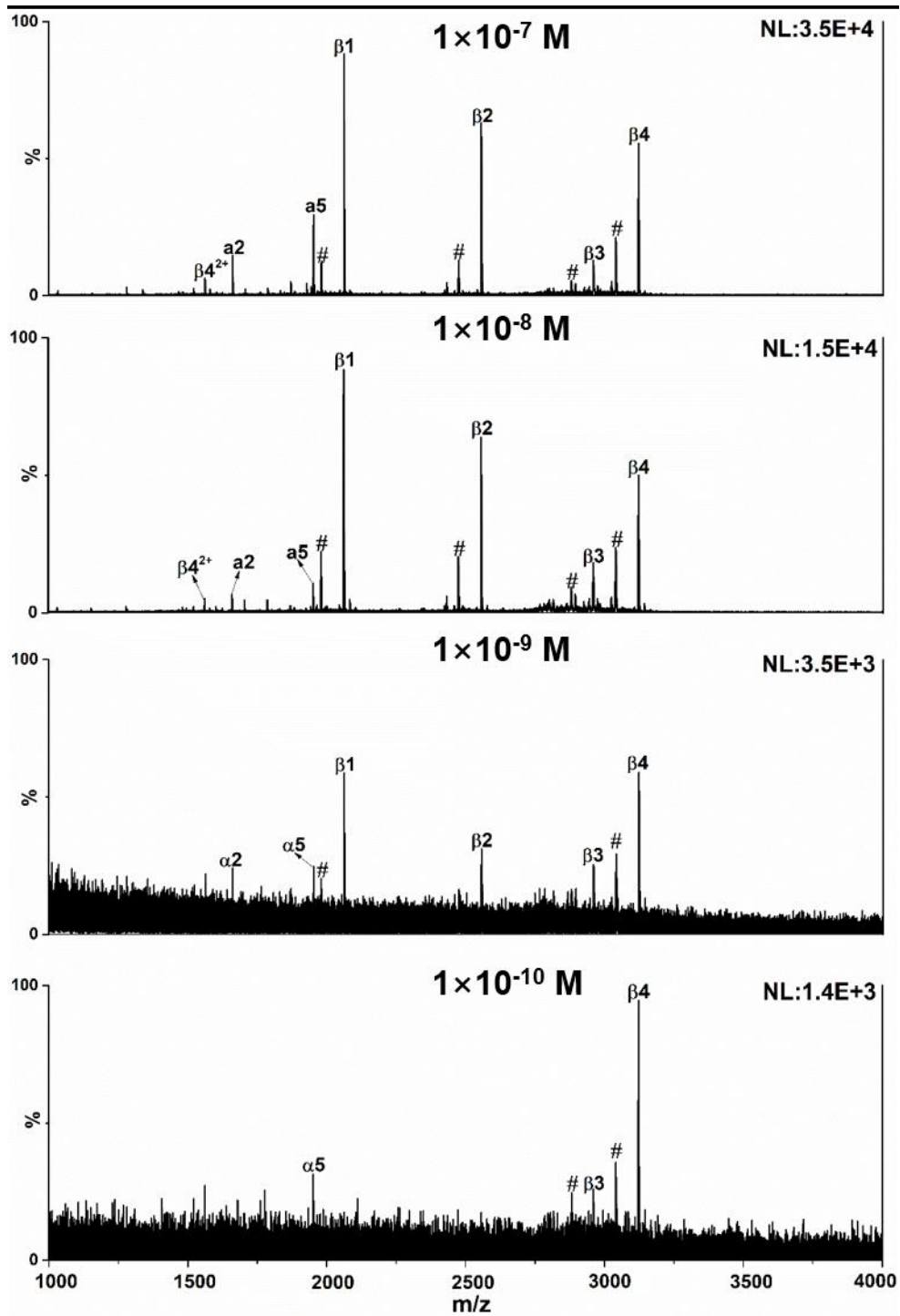


图4

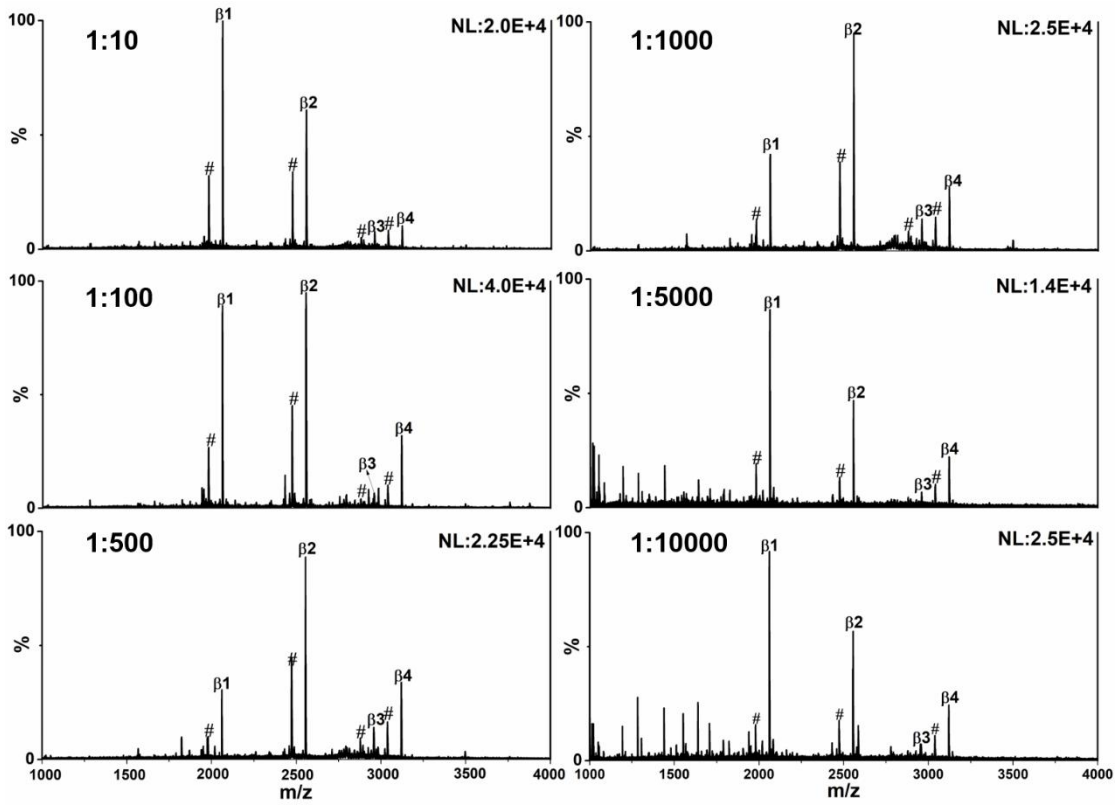


图5

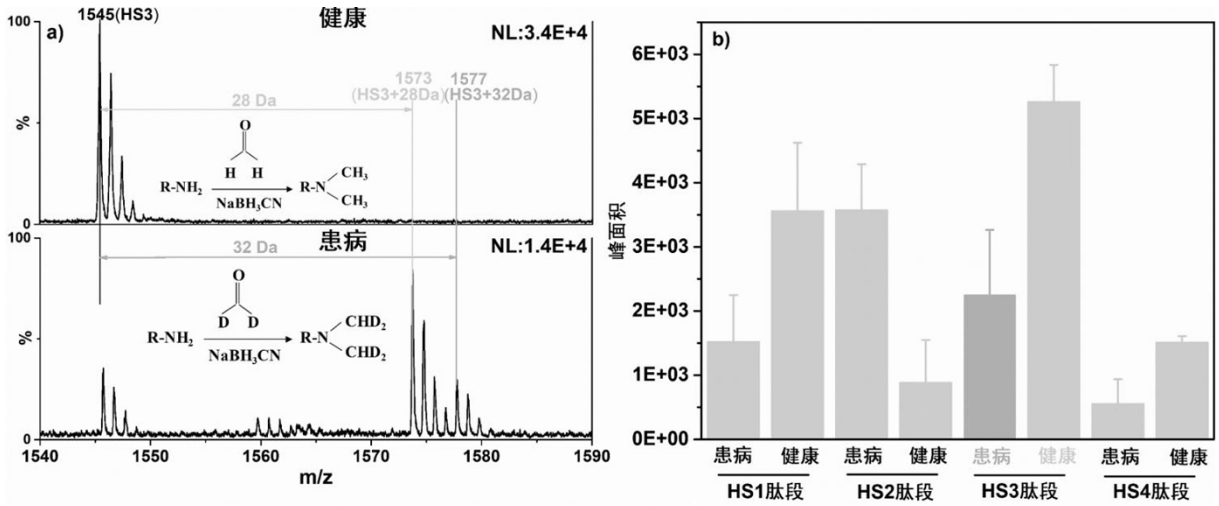


图6

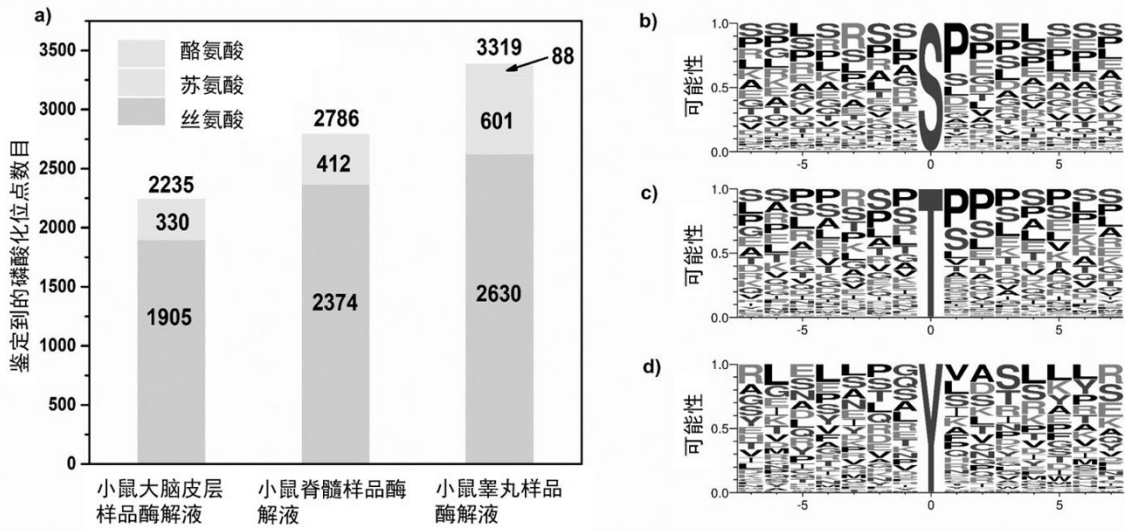


图7