



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114369187 A

(43) 申请公布日 2022.04.19

(21) 申请号 202210084147.8

(22) 申请日 2022.01.21

(71) 申请人 杭州惟宸生物科技有限公司

地址 310000 浙江省杭州市西湖区三墩镇  
金蓬街368号3幢407室

(72) 发明人 张虹 卢延斌 张鹏

(51) Int. Cl.

C08F 120/06 (2006.01)

G01N 27/62 (2021.01)

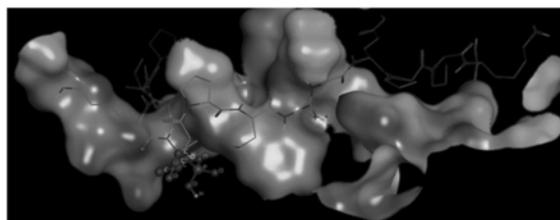
权利要求书2页 说明书6页 附图3页

### (54) 发明名称

一种用于磷酸化肽的富集材料制备方法及应用

### (57) 摘要

本发明公开了一种用于磷酸化肽的富集材料制备方法及应用,首先采用分子对接、计算机模拟的方法,针对待富集的特异性磷酸化多肽,考虑模板化合物对pH值、温度的稳定性,印迹聚合物形成时间和空间立体结构等因素的影响,虚拟合成磷酸化肽富集分子印迹材料,以此选择最佳的模板化合物;以选择出具有特异性磷酸化蛋白、肽模板化合物作为模板,甲基丙烯酸为功能单体,应用分子印记技术结合微波辅助合成方法,制备与模板化合物所对应的分子印迹纳米颗粒、磁性分子印记纳米颗粒;将制备的磷酸化肽的富集纳米材料,用于血清样品中的特异性磷酸化蛋白、肽的富集提取,并将其应用于质谱法定性、定量检测血清中的特异性的特异性磷酸化蛋白、肽中。



1. 一种用于磷酸化肽的富集材料制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

步骤一、模板分子选择:首先采用分子对接、计算机模拟的方法,针对待富集的特异性磷酸化多肽,考虑模板化合物对pH值、温度的稳定性,印迹聚合物形成时间和空间立体结构等因素的影响,虚拟合成磷酸化肽富集分子印迹材料,以此选出最佳的模板化合物;

步骤二、富集磷酸化肽的分子印迹纳米颗粒制备:以步骤一中选择出的最佳模板化合物,以甲基丙烯酸为功能单体,在氮气保护下混合改性硅胶纳米颗粒,应用分子印记技术结合微波辅助合成方法,制备磷酸化肽的分子印迹纳米颗粒。

2. 根据权利要求1所述的一种用于磷酸化肽的富集材料制备方法,其特征在于:步骤二中所述应用分子印记技术结合微波辅助合成方法,制备磷酸化肽的富集材料,具体方法包括:

(1) 将模板化合物和功能单体甲基丙烯酸分散在乙腈溶液中充分混合、静置;在该混合溶液中加入交联剂,充分摇匀,模板化合物与交联剂的摩尔比为1:32~1:12,持续静置6~10小时,制得预聚合溶液;

(2) 在氮气保护下,将改性硅胶纳米颗粒与预聚合溶液,搅拌混合,再加入引发剂,混合均匀后,微波辅助聚合反应;反应结束后,停止加热,产物冷却至室温、离心分离;产物用甲醇-酸水混合液反复超声清洗,直至液相色谱检测不到模板化合物;然后将其至于在35~55℃下真空干燥,制得特异性磷酸化肽的分子印迹纳米颗粒。

3. 根据权利要求2所述的一种用于磷酸化肽的富集材料制备方法,其特征在于:所述改性硅胶纳米颗粒的制备方法包括:

将SiO<sub>2</sub>颗粒与硅胶改性剂混合,氮气保护下充分搅拌,使之均匀分散于甲苯中,并去除溶液中的氧气,混合物于70℃±10℃条件下持续充氮回流反应过夜,待反应完成后,离心分离,产物用乙醇和去离子水顺序洗涤,真空或冷冻干燥,得到改性硅胶纳米颗粒;其中SiO<sub>2</sub>颗粒与硅胶改性剂的质量比为1:6~1:24。

4. 根据权利要求2所述的一种用于磷酸化肽的富集材料制备方法,其特征在于:所述改性硅胶纳米颗粒的制备方法包括:

A、将FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O和FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O混合溶液,加入氨水调节溶液pH值至11.5~12.5,在氮气保护下搅拌,微波辅助合成得到Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>磁性纳米颗粒;

B、将步骤A中Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>磁性纳米颗粒超声分散于质量浓度80~90%的乙醇溶液中,Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>磁性纳米颗粒在乙醇溶液中浓度为1.5g/L~3g/L,在每200mL的分散液中依次加入氢氧化铵1~5mL和正硅酸乙酯1~2mL,混匀后置于40~50℃下搅拌反应12~24h,反应结束后,在外加磁场作用下进行分离,固体水洗至洗液透明,并于40~60℃下真空干燥,制得Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>复合粒子;

C、将步骤B中Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>复合颗粒与硅胶改性剂混合,氮气保护下充分搅拌,使之均匀分散于甲苯中,并去除溶液中的氧气,混合物于70℃±10℃条件下持续充氮回流反应过夜,待反应完成后,在磁场的作用下进行分离,产物用乙醇和去离子水顺序洗涤,真空或冷冻干燥,得到改性后的磁性硅胶纳米颗粒;其中Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>复合粒子与硅胶改性剂的质量比为1:6~1:24。

5. 根据权利要求4所述的一种用于磷酸化肽的富集材料制备方法,其特征在于:所述微波辅助合成的条件为:35℃~75℃保持10min,升温至75~85℃保持30~60min,反应完成后

停止加热,自然冷却至室温采用外加磁场分离、产物依次用乙醇和去离子水超声清洗至中性,真空干燥箱内干燥。

6. 根据权利要求2所述的一种用于磷酸化肽的富集材料制备方法,其特征在于:所述微波辅助聚合反应的条件:40~50℃保持2~5min,升温至50~60℃保持2~5min,再加热到60~75℃保持35~50min。

7. 一种根据权利要求1-6任一项所述的用于磷酸化肽的富集材料在血清样品中特异性磷酸化蛋白、肽的富集提取领域的应用。

8. 根据权利要求1所述的一种用于磷酸化肽的富集材料的应用,其特征在于:具体包括以下步骤:

A、样品预处理:

血清样品:收集血液样品5mL于室温下凝结1h,离心,保留上清液并分装;

称取1.00mg标准磷酸化蛋白,溶解于500ml,25mmol/L碳酸氢铵溶液,按照酶与蛋白质量比1:50的比例加入胰蛋白酶,于37℃酶解18h,酶解结束后,分装冻干,再依次进行其他蛋白的酶解;

使用C18固相萃取小柱或超滤离心的方式脱盐,得到样本溶液;

B、分子印迹纳米颗粒分离富集磷酸肽:

将样品溶液用上样液稀释至所需浓度,加入0.50mg分子印迹纳米颗粒,室温下振荡30min,于8000r/min下离心5min,弃去上清液,依次用上样液和80%乙腈溶液进行清洗,前者洗2次,后者洗1次,加入15%氨水洗脱2次,收集洗脱液,待用;

C、质谱检测富集后的磷酸肽:

1). 基质辅助激光解析—飞行时间质谱仪(MALDI-TOF):取0.5微升洗脱液在MALDI-TOF质谱仪样品盘上点板,室温自然挥干,再将0.5微升的DHB基质溶液点覆于样品表面,室温下自然挥干;将制备好的样品送入MALDI-TOF质谱仪进行定性、定量分析;

2). 高分辨液质联用仪:采用Ultimate 3000与Q-Exactive联用的高分辨液质联用仪检测富集后的磷酸肽。其中质谱仪参数经过最佳条件优化,以产生最佳检测灵敏度和重现性;设置较大的分离窗口(如用10m/z),以便同时分离<sup>14</sup>N/<sup>15</sup>N同位素异构体离子;高分辨率的质谱可使检测到的目标碎片离子具有高分辨率/精确质量数;获得的数据采用Pinpoint软件(或同类软件)分析Tau等相关蛋白肽。

## 一种用于磷酸化肽的富集材料制备方法及应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于蛋白质技术领域,具体涉及一种用于磷酸化肽的富集材料制备方法及应用。

### 背景技术

[0002] 蛋白质的磷酸化修饰由蛋白激酶催化而成,根据磷酸化修饰位点的区别,将蛋白激酶大致分为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶和酪氨酸蛋白激酶,也有部分磷酸化可能发生在天冬氨酸、谷氨酸和组氨酸上。因此对磷酸化蛋白质及其特异性的磷酸化位点的分析具有非常重要的意义。质谱技术是磷酸化多肽结构鉴定与解析最有力的工具之一,但由于磷酸化肽的丰度极低,且大量非磷酸化肽段在质谱检测中对信号产生强烈的抑制作用,这给质谱鉴定磷酸化蛋白带来巨大的困难,因此,必须在质谱分析前对磷酸化肽进行选择性富集。

[0003] 目前常用的磷酸化多肽富集方法,一般不注重区分不同的磷酸化形态和位点,对特异性磷酸化肽类物质的富集,主要依赖于抗体的应用。但特异性抗体的开发时间周期比较长,在大批量的磷酸化肽的富集应用时成本也比较高。开发对不同形态或位点的磷酸化多肽的选择性富集有着重要的应用价值。

[0004] 目前分子印迹技术在小分子物质富集、分离和消除方面虽然已经取得显著的成绩,但在蛋白翻译后修饰产物的富集方面应用较少,特别是在为提高富集产物的专一性、提高模板分子的高度有效性方面的研究和应用方面未见报道。筛选对特异的磷酸化肽具有专一性、高亲和性模板化合物,开发相应分子印迹材料非常必要。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种用于磷酸化肽的富集材料制备方法及应用,克服了现有技术的不足。

[0006] 为解决上述问题,本发明所采取的技术方案如下:

[0007] 一种用于磷酸化肽的富集材料制备方法,包括以下步骤:

[0008] 步骤一、模板分子选择:首先采用分子对接、计算机模拟的方法,针对待富集的特异性磷酸化多肽,考虑模板化合物对pH值、温度的稳定性,印迹聚合物形成时间和空间立体结构等因素的影响,虚拟合成磷酸化肽富集分子印迹材料,以此选出最佳的模板化合物;

[0009] 步骤二、富集磷酸化肽的分子印迹纳米颗粒制备:以步骤一中选择出的最佳模板化合物,以甲基丙烯酸为功能单体,应用分子印记技术结合微波辅助合成方法,制备磷酸化肽的分子印迹纳米颗粒。

[0010] 进一步,步骤二中所述应用分子印记技术结合微波辅助合成方法,制备磷酸化肽的分子印迹纳米颗粒,具体方法包括:

[0011] (1) 将模板化合物和功能单体甲基丙烯酸分散在乙腈溶液中充分混合、静置;在该混合溶液中加入交联剂,充分摇匀,模板化合物与交联剂的摩尔比为1:32~1:12,持续静置6~10小时,制得预聚合溶液;

[0012] (2) 在氮气保护下,将改性硅胶纳米颗粒与预聚合溶液,搅拌混合,再加入引发剂,混合均匀后,微波辅助聚合反应;反应结束后,停止加热,产物冷却至室温、离心分离;产物用甲醇-酸水混合液反复超声清洗,直至液相色谱检测不到模板化合物;然后将其至于在35~55°C下真空干燥,制得特异性磷酸化肽的分子印迹纳米颗粒。

[0013] 进一步,所述改性硅胶纳米颗粒的制备方法包括:

[0014] 将SiO<sub>2</sub>颗粒与硅胶改性剂混合,氮气保护下充分搅拌,使之均匀分散于甲苯中,并去除溶液中的氧气,混合物于70°C±10°C条件下持续充氮回流反应过夜,待反应完成后,离心分离,产物用乙醇和去离子水顺序洗涤,真空或冷冻干燥,得到改性硅胶纳米颗粒;其中SiO<sub>2</sub>颗粒与硅胶改性剂的质量比为1:6~1:24。

[0015] 根据权利要求2所述的一种用于磷酸化肽的富集材料制备方法,其特征在于:所述改性硅胶纳米颗粒的制备方法包括:

[0016] A、将FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O和FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O混合溶液,加入NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O调节溶液pH值至11.5~12.5,在氮气保护下搅拌,微波辅助合成得到Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>磁性纳米颗粒;

[0017] B、将步骤A中Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>磁性纳米颗粒超声分散于质量浓度80~90%的乙醇溶液中,Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>磁性纳米颗粒在乙醇溶液中浓度为1.5g/L~3g/L,在每200mL的分散液中依次加入氢氧化铵1~5mL和正硅酸乙酯1~2mL,混匀后置于40~50°C下搅拌反应12~24h,反应结束后,在外加磁场作用下进行分离,固体水洗至洗液透明,并于40~60°C下真空干燥,制得Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>复合粒子;

[0018] C、将步骤B中Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>复合颗粒与硅胶改性剂混合,氮气保护下充分搅拌,使之均匀分散于甲苯中,并去除溶液中的氧气,混合物于70°C±10°C条件下持续充氮回流反应过夜,待反应完成后,在磁场的作用下进行分离,产物用乙醇和去离子水顺序洗涤,真空或冷冻干燥,得到改性后的磁性硅胶纳米颗粒;其中Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>复合粒子与硅胶改性剂的质量比为1:6~1:24。

[0019] 进一步,所述微波辅助合成的条件为:35°C~75°C保持10min,升温至75~85°C保持30~60min,反应完成后停止加热,自然冷却至室温采用外加磁场分离、产物依次用乙醇和去离子水超声清洗至中性,真空干燥箱内干燥。

[0020] 进一步,所述微波辅助聚合反应的条件:40~50°C保持2~5min,升温至50~60°C保持2~5min,再加热到60~75°C保持35~50min。

[0021] 本发明还保护了一种用于磷酸化肽的富集材料在血清样品中特异性磷酸化蛋白、肽的富集提取领域的应用。

[0022] 进一步,具体包括以下步骤:

[0023] A、样品预处理:

[0024] 血清样品:收集血液样品5mL于室温下凝结1h,离心,保留上清液并分装;

[0025] 称取1.00mg标准磷酸化蛋白,溶解于500ml,25mmol/L碳酸氢铵溶液,按照酶与蛋白质量比1:50的比例加入胰蛋白酶,于37°C酶解18h,酶解结束后,分装冻干,其它蛋白的酶解,参照上述酶解方法;

[0026] 使用C18固相萃取小柱或超滤离心的方式脱盐,得到样本溶液;

[0027] B、分子印迹纳米颗粒分离富集磷酸肽;

[0028] 将样品溶液用上样液(80%乙腈/0.1%甲酸,或1.0%甲酸)稀释至所需浓度,加入

0.50mg材料,室温下振荡30min,于8000r/min下离心5min,弃去上清液,依次用上样液和80%乙腈溶液进行清洗,前者洗2次,后者洗1次,加入15%氨水洗脱2次,收集洗脱液,待用;

[0029] C、质谱检测富集后的磷酸肽:

[0030] 1. 基质辅助激光解析—飞行时间质谱仪 (MALDI-TOF):取0.5微升洗脱液在MALDI-TOF质谱仪样品盘上点板,室温自然挥干,再将0.5微升的DHB基质溶液点覆于样品表面,室温下自然挥干;将制备好的样品送入MALDI-TOF质谱仪进行定性、定量分析;

[0031] 2. 高分辨液质联用仪:采用Ultimate 3000与Q-Exactive联用的高分辨液质联用仪检测富集后的磷酸肽。其中质谱仪参数经过最佳条件优化,以产生最佳检测灵敏度和重现性;设置较大的分离窗口(如用10m/z),以便同时分离 $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ 同位素异构体离子;高分辨率的质谱可使检测到的目标碎片离子具有高分辨率/精确质量数;获得的数据采用Pinpoint软件(或同类软件)分析Tau等相关蛋白肽。

[0032] 本发明与现有技术相比较,具有以下有益效果:

[0033] 1、本发明采用分子对接、计算机模拟的方法虚拟合成磷酸化肽富集分子印迹材料,用来选择最佳的模版化合物;应用分子印记技术结合微波辅助合成方法,制备了分子印迹纳米颗粒、磁性纳米颗粒,用于提取血清样品中的磷酸化蛋白肽。

[0034] 2、本发明以特异性磷酸化蛋白、肽为模板,甲基丙烯酸为功能单体,制备了分子印迹聚合物,采用微波辅助合成方法合成了相应的纳米颗粒和磁性碳纳米颗粒,制备的这些纳米颗粒对磷酸化蛋白肽表现出高选择性、高特异性的识别能力,可成功应用于血清样品中磷酸化蛋白肽的富集,并且磁性碳纳米颗粒还可以通过外部磁场分离和收集,该材料可富集生物样本包括人体的组织及体液等中的磷酸化蛋白、肽,用于检测其存在性,或累积质量,为这些蛋白磷酸化肽的分析提供了新的方法。

## 附图说明

[0035] 图1为本发明的Tau蛋白三维结构图。

[0036] 图2为本发明的过氧化物酶-5蛋白(Peroxiredoxin-5)三维结构图。

[0037] 图3为本发明的真核生物翻译起始因子蛋白(Eukaryotic translation initiation factor)三维结构图。

[0038] 图4为本发明的RNA输出的磷酸化适配子蛋白(Phosphorylated adaptor for RNA export)三维结构图。

[0039] 图5为本发明的76个序列相似性家族成员中的B蛋白(Family with sequence similarity 76member B)三维结构图。

[0040] 图6为本发明分子印迹纳米颗粒富集磷酸化Tau<sup>181</sup>(Tau pThr<sup>181</sup>)。

## 具体实施方式

[0041] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0042] 实施例1

[0043] 本实施例公开了一种用于磷酸化肽的富集材料制备方法,包括以下步骤:

[0044] 步骤一、模板分子选择:首先采用分子对接、计算机模拟的方法,针对待富集的特异性磷酸化多肽,考虑模板化合物对pH值、温度的稳定性,印迹聚合物形成时间和空间立体结构等因素的影响,虚拟合成磷酸化肽富集分子印迹材料,以此选出最佳的模板化合物。

[0045] 具体包括:针对待富集的磷酸化蛋白中特异性磷酸化位点肽为主要目标,选取多种相似结构的磷酸化肽为模板分子(模板分子包括但不限于图1-图5所列举的结构),分别以甲基丙烯酸功能单体,乙腈、氯仿和四氢呋喃为致孔剂,采用分子对接和量子化学方法模拟模板与不同功能单体的分子印迹聚合物的构型。

[0046] 步骤二、富集磷酸化肽的分子印迹纳米颗粒制备:以步骤一中选择出的最佳模板化合物,以甲基丙烯酸为功能单体,应用分子印记技术结合微波辅助合成方法,制备磷酸化肽的分子印迹纳米颗粒。

[0047] 具体步骤为:

[0048] (1) 将 $\text{SiO}_2$ 颗粒与硅胶改性剂混合,氮气保护下充分搅拌,使之均匀分散于甲苯中,并去除溶液中的氧气,混合物于 $70^\circ\text{C} \pm 10^\circ\text{C}$ 条件下持续充氮回流反应过夜,待反应完成后,离心分离,产物用乙醇和去离子水顺序洗涤,真空或冷冻干燥,得到改性硅胶纳米颗粒;其中 $\text{SiO}_2$ 颗粒与硅胶改性剂的质量比为1:6~1:24。

[0049] (2) 将模板化合物和功能单体甲基丙烯酸分散在乙腈溶液中充分混合、静置;在该混合溶液中加入交联剂,充分摇匀,模板化合物与交联剂的摩尔比为1:32~1:12,持续静置6~10小时,制得预聚合溶液。

[0050] (3) 在氮气保护下,将改性硅胶纳米颗粒与预聚合溶液,搅拌混合,再加入引发剂,混合均匀后,微波辅助聚合反应,微波辅助的条件:40~50°C保持2~5min,升温至50~60°C保持2~5min,再加热到60~75°C保持35~50min;反应结束后,停止加热,产物冷却至室温、离心分离;产物用甲醇~酸水混合液反复超声清洗,直至液相色谱检测不到模板化合物;然后将其至于在35~55°C下真空干燥,制得特异性磷酸化肽的分子印迹纳米颗粒(参照图6)。

[0051] 实施例2

[0052] 本实施所采用的制备方法与实施例1基本一致,唯有区别的是:为了用于制备不同材质类型的分子印迹聚合物,改性硅胶纳米颗粒的制备方法为:

[0053] A、将 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 混合溶液,加入 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 调节溶液pH值至11.5~12.5,在氮气保护下搅拌,微波辅助合成得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性纳米颗粒;

[0054] B、将步骤A中 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性纳米颗粒超声分散于质量浓度80~90%的乙醇溶液中, $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性纳米颗粒在乙醇溶液中浓度为1.5g/L~3g/L,在每200mL的分散液中依次加入氢氧化铵1~5mL和正硅酸乙酯1~2mL,混匀后置于40~50°C下搅拌反应12~24h,反应结束后,在外加磁场作用下进行分离,固体水洗至洗液透明,并于40~60°C下真空干燥,制得 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ 复合粒子;

[0055] C、将步骤B中 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ 复合颗粒与硅胶改性剂混合,氮气保护下充分搅拌,使之均匀分散于甲苯中,并去除溶液中的氧气,混合物于 $70^\circ\text{C} \pm 10^\circ\text{C}$ 条件下持续充氮回流反应过夜,待反应完成后,在磁场的作用下进行分离,产物用乙醇和去离子水顺序洗涤,真空或冷冻干燥,得到改性后的磁性硅胶纳米颗粒;其中 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ 复合粒子与硅胶改性剂的质量比为1:6~1:24。

[0056] 实施例3

[0057] 本实施例公开了通过实施例1或实施例2制备的用于磷酸化肽的富集材料在血清样品中特异性磷酸化蛋白、肽的富集提取领域的应用。

[0058] 该应用方法具体包括以下步骤：

[0059] A、样品预处理：

[0060] 血清样品：收集血液样品5mL于室温下凝结1h，离心，保留上清液并分装，存储于-20℃冰箱备用；

[0061] 称取1.00mg标准磷酸化蛋白，溶解于500ml，25mmol/L碳酸氢铵溶液，按照酶与蛋白质量比1:50的比例加入胰蛋白酶，于37℃酶解18h，酶解结束后，分装冻干，存储于-20℃冰箱备用，其它蛋白的酶解，参照上述酶解方法；

[0062] 使用C18固相萃取小柱或超滤离心的方式脱盐，得到样本溶液。

[0063] B、分子印迹纳米颗粒分离富集磷酸肽；

[0064] 将样品溶液用上样液(80%乙腈/0.1%甲酸，或1.0%甲酸)稀释至所需浓度，加入0.50mg材料，室温下振荡30min，于8000r/min下离心5min，(在使用实施例2制备的富集材料时，在外加磁场的存在下进行分离)；弃去上清液，依次用上样液和80%乙腈溶液进行清洗，前者洗2次，后者洗1次，加入15%氨水洗脱2次，收集洗脱液，待用。

[0065] C、MALDI-TOF质谱仪检测富集后的磷酸肽：

[0066] 取0.5微升洗脱液在MALDI-TOF质谱仪样品盘上点板，室温自然挥干，再将0.5微升的DHB基质溶液点覆于样品表面，室温下自然挥干；将制备好的样品送入MALDI-TOF质谱仪进行定性、定量分析。

[0067] 实施例4

[0068] 本实施例公开了通过实施例1或实施例2制备的用于磷酸化肽的富集材料在血清样品中特异性磷酸化蛋白、肽的富集提取领域的应用。

[0069] 该应用方法具体包括以下步骤：

[0070] A、样品预处理：

[0071] 血清样品：收集血液样品5mL于室温下凝结1h，离心，保留上清液并分装，存储于-20℃冰箱备用；

[0072] 称取1.00mg标准磷酸化蛋白，溶解于500ml，25mmol/L碳酸氢铵溶液，按照酶与蛋白质量比1:50的比例加入胰蛋白酶，于37℃酶解18h，酶解结束后，分装冻干，存储于-20℃冰箱备用，其它蛋白的酶解，参照上述酶解方法；

[0073] 使用C<sub>18</sub>固相萃取小柱或超滤离心的方式脱盐，得到样本溶液。

[0074] B、分子印迹纳米颗粒分离富集磷酸肽；

[0075] 将样品溶液用上样液(80%乙腈/0.1%甲酸，或1.0%甲酸)稀释至所需浓度，加入0.50mg材料，室温下振荡30min，于8000r/min下离心5min，弃去上清液，依次用上样液和80%乙腈溶液进行清洗，前者洗2次，后者洗1次，加入15%氨水洗脱2次，收集洗脱液，待用。

[0076] C、高分辨液质联用仪分析与检测：

[0077] 采用Ultimate 3000与Q-Exactive联用的高分辨液质联用仪检测富集后的磷酸肽。其中质谱仪参数经过最佳条件优化，以产生最佳检测灵敏度和重现性；设置较大的分离窗口(如用10m/z)，以便同时分离<sup>14</sup>N/<sup>15</sup>N同位素异构体离子；高分辨率的质谱可使检测到的

目标碎片离子具有高分辨率/精确质量数;获得的数据采用Pinpoint软件(或同类软件)分析Tau等相关蛋白肽。

[0078] 对于本领域技术人员而言,显然本发明不限于上述示范性实施例的细节,而且在不背离本发明的精神或基本特征的情况下,能够以其他的具体形式实现本发明。因此,无论从哪一点来看,均应将实施例看作是示范性的,而且是非限制性的,本发明的范围由所附权利要求而不是上述说明限定,因此旨在将落在权利要求的等同要件的含义和范围内的所有变化囊括在本发明内。不应将权利要求中的任何附图标记视为限制所涉及的权利要求。



图1



图2

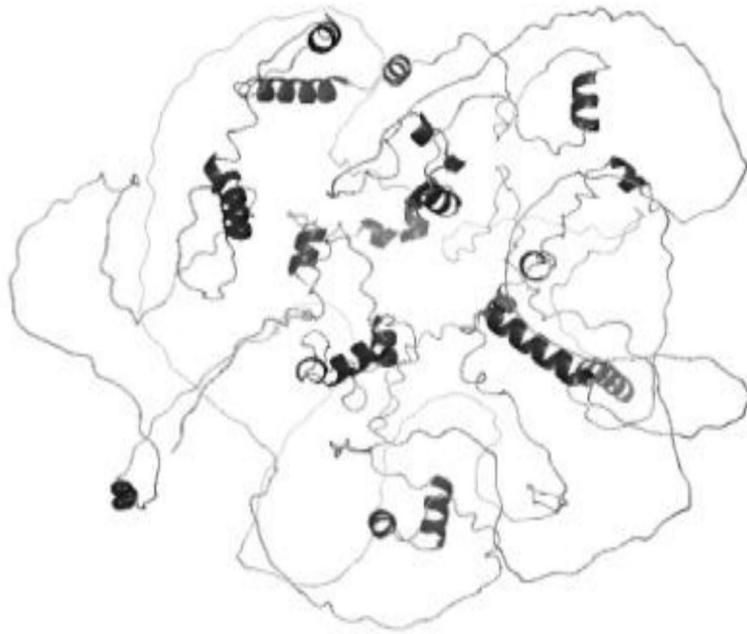


图3

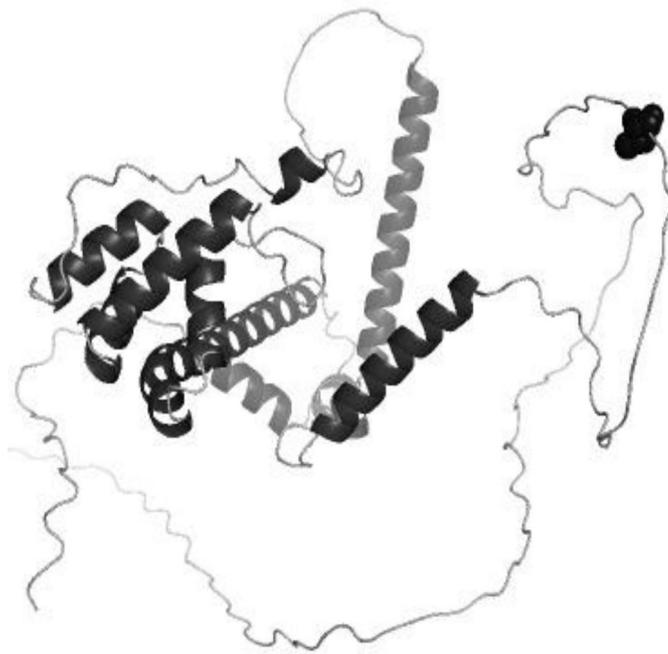


图4

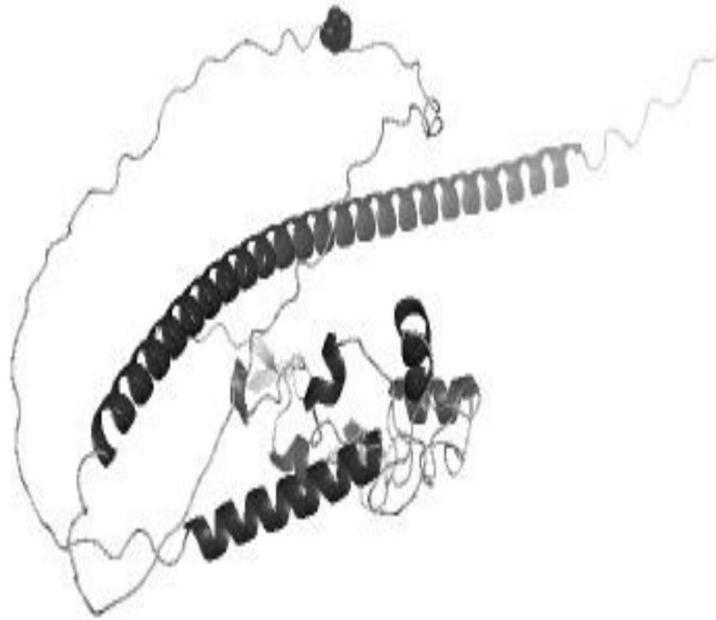


图5

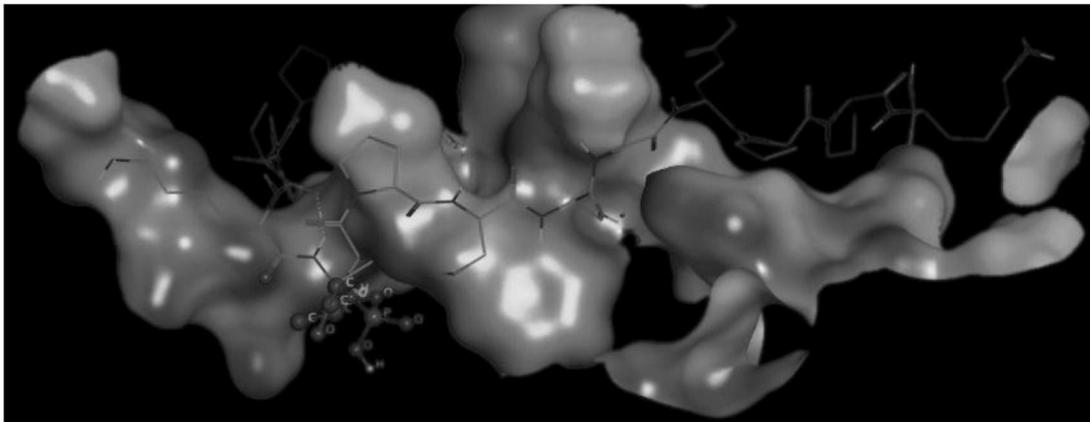


图6