

使用 Agilent AssayMAP Bravo 大容量 色谱小柱在免疫多肽组学分析中进行 自动化 MHC 相关肽富集

作者

Samuel Pollock
Genentech,
美国加利福尼亚州南旧金山
Shuai Wu, Jerry Han 和
Steve Murphy
安捷伦科技有限公司
美国加利福尼亚州圣克拉拉

摘要

本应用简报介绍了使用 Agilent AssayMAP Bravo 平台和大容量色谱小柱 (25 μ L) 在免疫多肽组学分析中进行自动化 MHC-I 相关肽富集的方法。为配合 LC/MS 分析, 使用 Agilent Infinity UHPLC Nanodapter 在 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS 上实现纳流操作。该工作流程为 MHC-I 肽段分析提供了简单、可重现的富集方法。

前言

当存在病毒感染时，细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTLs) 可在通过 MHC-I 展示系统识别呈递病毒抗原的宿主细胞后被激活。这些抗原是病毒蛋白在细胞质中降解为多肽并转运到内质网 (ER) 后产生的，并在内质网中被装入 I 类主要组织相容性复合体 (MHC-I) 中，然后迁移到细胞表面。这些 MHC-I 复合体不仅在病毒防御领域备受关注，并且对癌症免疫治疗也很重要，因为 CTLs 也可以识别源自内源性突变蛋白的多肽^[1,2]。因此，表征 MHC-I 呈递的多肽（免疫多肽组）对于设计针对癌症和传染病的疫苗和免疫疗法具有重要意义^[3]。

一般认为免疫多肽组学更具挑战性，部分原因是大多数 MHC 相关肽与其他细胞肽相比丰度极低。解决该挑战的一种方法是使用与固相偶联的抗 MHC-I 抗体，从大量细胞裂解物中对 MHC-I 复合体进行免疫沉淀。然后从复合体中分离出 MHC 相关肽，并通过质谱法进行鉴定^[1-3]。

高质量的样品前处理对于获得良好的肽信号和高度可重现的结果至关重要。本工作流程采用 AssayMAP Bravo 平台进行自动化免疫亲和和纯化和肽段纯化。AssayMAP Bravo 平台主要由三大组件组成（图 1）：一个配备探针注射器的高精度液体处理器，可提供准确的流量控制；树脂床填充

小柱，其与探针注射器相连，以提供通过树脂床的正向液流；即装即用的用户友好型软件，提供针对具体应用的预置程序，只需进行极少的优化即可提供出色的结果。

除了高质量的样品前处理外，分析还需要高灵敏度且可重现的 LC/MS 系统。本研究采用 Infinity UHPLC Nanodapter 将标准液相色谱流速转换为纳流流速。然后使用数据依赖型采集 (DDA) 模式将纳流 LC 系统与 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS 联用以进行多肽分析。高质量的样品前处理和灵敏的 LC/MS 系统相结合，提供了可重现且可扩展的解决方案，能够应对 MHC-I 多肽组学研究面临的挑战。



图 1. 配备新型 AssayMAP 25 µL PAW 小柱（右）的 Agilent AssayMAP Bravo 平台

实验部分

材料

- 抗人 MHC-I 抗体 (w6/32) 的表达和纯化在 Genentech 完成
- GRANTA-519 细胞系从 Genentech 细胞库获得
- AssayMAP 25 μ L Protein A 小柱 (PAW) 和 5 μ L C18 小柱来自安捷伦科技公司 (Santa Clara, CA, USA) (图 1)
- 其余全部化学品均购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

抗体固定并交联至 25 μ L Protein A 小柱

使用 AssayMAP Bravo 上的亲和纯化软件应用程序将抗人 MHC-I 抗体固定在 25 μ L Protein A (PAW) 小柱上 (详见表 1, “固定”列)。步骤简述如下, 向 AssayMAP 25 μ L PAW 小柱中加入 pH = 7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 并平衡小柱。然后使用 20 μ L/min 的流速在其中 6 个小柱上平行上样 1 mg (1 mg/mL, 1000 μ L) 抗人 MHC-I 抗体 (w6/32)。最后, 用 250 μ L PBS (pH = 7.4) 清洗小柱一次。

通过 AssayMAP Bravo 上的亲和纯化应用程序, 使用交联试剂处理上述小柱 (详见表 1, “交联”列), 使 PAW 小柱的树脂

床含有与 Protein A 树脂交联的抗 MHC-I 抗体。步骤简述如下, 向 25 μ L 抗 MHC-I 小柱中加入 0.2 mol/L 三乙醇胺 (pH = 8.1) 并平衡小柱。将 200 μ L 5 mmol/L 庚二亚氨酸二甲酯 (DMP) (溶于 0.2 mol/L TEA) 以 5 μ L/min 的流速加入小柱中, 使抗体与 Protein A 交联。在 40 min 的上样过程中, 在室温下进行交联反应。使用 TBS 和 Tris 缓冲液洗去未反应的 DMP, 使用 1% 乙酸洗去未交联的抗体。然后将新交联的小柱在 TBS 缓冲液 (pH = 7.4) 中平衡, 并在 4 $^{\circ}$ C 下储存备用。使用 TBS 缓冲液 (pH = 7.4) + 0.025% 叠氮化钠作为储存缓冲液填充存放交联小柱的柱板孔。每个柱孔中添加大约 190 μ L 缓冲液。

表 1. 使用 Agilent AssayMAP Bravo 平台的亲和纯化和肽段纯化方案

	固定	交联	免疫亲和纯化	肽段纯化
树脂床体积	25 μ L	25 μ L	25 μ L	5 μ L
亲和介质	Protein A	Protein A + 抗体	Protein A + 交联抗体	C18
灌注缓冲液	PBS, pH = 7.4	0.2 mol/L 三乙醇胺, pH = 8.1	TBS, pH = 7.4	70% ACN/0.1% TFA 的水溶液
平衡缓冲液	PBS, pH = 7.4	0.2 mol/L 三乙醇胺, pH = 8.1	TBS, pH = 7.4	2% ACN/0.1% TFA 的水溶液
上样缓冲液	抗体储存缓冲液	5 mmol/L DMP, 溶于 0.2 mol/L TEA	3 mg/mL GRANTA 裂解物	1% 乙酸
上样体积	1000 μ L	200 μ L	1000 μ L	200 μ L
上样流速	20 μ L/min	5 μ L/min	20 μ L/min	5 μ L/min
清洗缓冲液 1	PBS, pH = 7.4	TBS, pH = 7.4	TBS, pH = 7.4	2% ACN/0.1% TFA 的水溶液
清洗溶液体积 1	250 μ L	250 μ L	250 μ L	50 μ L
清洗次数 1	1	1	1	1
清洗缓冲液 2	NA	25 mmol/L Tris, pH = 8.0	25 mmol/L Tris, pH = 8.0	NA
清洗溶液体积 2	NA	250 μ L	250 μ L	NA
清洗次数 2	NA	1	1	1
洗脱缓冲液	NA	1% 乙酸	1% 乙酸	30% ACN/0.1% TFA 的水溶液
洗脱体积	NA	50 μ L	50 μ L	50 μ L

MHC-I 复合体的免疫亲和纯化

根据之前所述步骤在非变性缓冲液中裂解 GRANTA-519 细胞团^[5]。使用 AssayMAP Bravo 上的亲和纯化软件应用程序从细胞裂解物中纯化 MHC-I 复合体（详见表 1，“免疫亲和纯化”列）。步骤简述如下，向交联有抗体的 PAW 小柱中加入 TBS 缓冲液 (pH = 7.4) 并平衡小柱。使用抗体交联小柱对 MHC-I 复合体进行免疫捕获。将大约 3 mg (3 mg/mL, 1 mL) GRANTA 裂解物以 20 μ L/min 的流速分别加入 6 根小柱中。然后连续清洗两次。第一次清

洗使用 250 μ L TBS 缓冲液 (pH = 7.4)，然后使用 250 μ L 25 mmol/L Tris 缓冲液 (pH = 8) 清洗。最后，用 50 μ L 1% 乙酸洗脱富集的 MHC 复合体。将 6 根小柱所得洗脱液合并获得样品 1（表 1，图 2）。在不同日期重复相同的实验以获得样品 2 和样品 3。

MHC-I 肽段纯化

使用 AssayMAP Bravo 系统上的肽段纯化应用程序软件将 MHC-I 肽段与 MHC 蛋白分离，并在 C18 小柱上脱盐（详见表 1，

“肽段纯化”列）。步骤简述如下，将 70% ACN/0.1% TFA 的水溶液加入小柱中。然后用 2% ACN/0.1% TFA 的水溶液平衡小柱。将 MHC 复合体（溶于 200 μ L 1% 乙酸中）上样至 C18 小柱，上样流速为 5 μ L/min。使用 50 μ L 2% ACN/0.1% TFA 的水溶液清洗小柱一次。使用 50 μ L 30% ACN/0.1% TFA 的水溶液洗脱 MHC-I 肽段（表 1，图 2）。适当合并样品并在室温下使用 Speed-Vac 干燥。将干燥样品储存于 -80 $^{\circ}$ C 下以待分析。

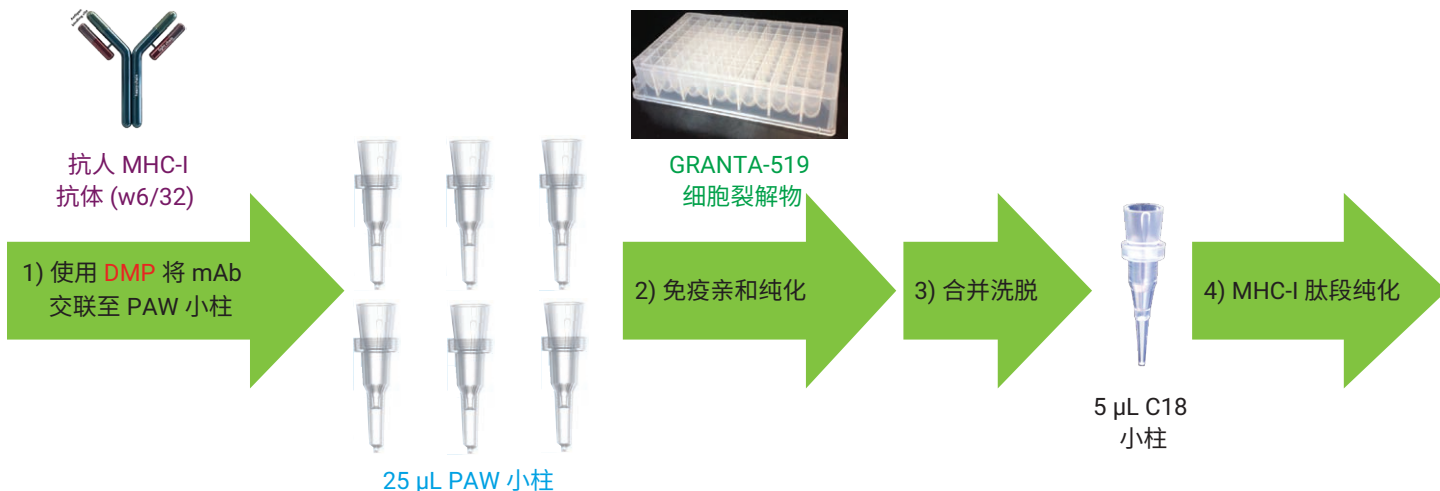


图 2. 使用 Agilent AssayMAP Bravo 平台富集和纯化 MHC-I 肽段

使用 DDA 进行肽段鉴定

将干燥样品复溶于 5 μL 10% ACN/0.1% FA 中。将样品瓶涡旋混合，并超声处理 2 分钟。用 5 μL 0.1% FA 进一步稀释样品，使最终样品溶于 10 μL 5% ACN/0.1% FA 中。

通过与 Agilent Infinity UHPLC Nanodapter 联用，将 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统转换为纳流液相色谱系统。将该纳流液相色谱系统连接至安捷伦纳流喷雾离子源，并与 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS 联用进行肽段鉴定（图 3）。LC 参数列于表 2。Nanodapter 配置为直接进样模式。将 75 $\mu\text{m} \times 25 \text{ cm}$ C18 色谱柱保持在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下，并在 120 分钟的液相色谱总运行时间中采用 90 分钟的梯度进行肽段分离^[2,6]。

对于肽段鉴定，每个样品进样一次 5 μL 复溶的 MHC-I 肽段样品。对前 20 种母离子进行数据依赖型采集。6550 iFunnel Q-TOF LC/MS 的详细设置列于表 3。对于 MHC-I 肽段分析，选择单电荷离子作为母离子，即使其优先级低于双电荷离子和三电荷离子。根据文献，许多 MHC-I 肽都会形成单电荷离子，这应在 DDA 实验中加以考虑。但是，相比多电荷离子，对单电荷离子应施加更高的碰撞能量^[2]。



图 3. Agilent Infinity UHPLC Nanodapter 联用 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS，将标准流速液相色谱系统转换为纳流液相色谱系统

表 2. 纳流液相色谱参数

液相色谱条件				
捕集柱	PepMap C18, 75 $\mu\text{m} \times 2 \text{ cm}$, 60 $^{\circ}\text{C}$			
分析柱	PepMap C18, 75 $\mu\text{m} \times 25 \text{ cm}$, 60 $^{\circ}\text{C}$			
溶剂 A	0.1% 甲酸水溶液			
溶剂 B	0.1% 甲酸的 90% 乙腈溶液			
流速	0.085 mL/min 主流速 300 nL/min 柱上流速			
梯度	时间 (min)	%B	时间 (min)	%B
	0	3	97	70
	90	35	100	3
	95	70	120	3
进样量	5 μL			

使用 Byos 工作流程进行定性和定量分析

使用 Protein Metrics Inc. 的 Byos 工作流程进行数据分析。Byos 工作流程包括使用 Byonic 搜索引擎进行肽段鉴定，以及使用 Byologic 软件进行肽段定量（图 4）。Byos 工作流程使用用户预设的参数连续进行肽段鉴定和定量。表 4 列出了 Byonic 和 Byologic 软件中用于 MHC-I 肽段分析的一些关键参数。使用 Byonic 在 Uniprot 人类蛋白质数据库中进行搜索，其无酶特异性且对漏切位点没有限制。将氧化 (M, W) 和脱酰胺基化 (N, Q) 设置为可变修饰。使用手动截止评分 150 来筛选已鉴定的肽段（表 4A）。然后在 Byologic 中通过特定的保留时间和 m/z 窗口提取已鉴定肽段的 MS 谱图。使用诱饵数 50 作为蛋白质和肽段鉴定的第二个筛选条件（表 4B）。在 Byologic 中对独特肽段进行了总结和定量。

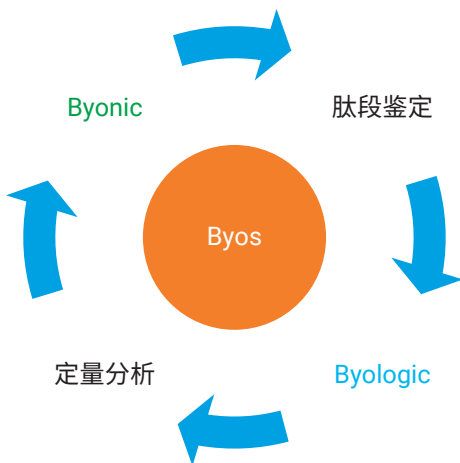


图 4. Byos 肽段分析工作流程

表 3. Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS 参数

参数	值	
喷雾针	新型 Objective 无涂层针头，内径 25 μm ，尖端内径 10 μm ，长 5 cm，正交放置	
气体温度	200 °C	
干燥气流速	11 L/min	
采集模式	扩展动态范围 (2 GHz) m/z 100–1700 高分析灵敏度	
	MS	MS/MS
质量数范围	m/z 300–1700	m/z 50–1700
采集速率	3 质谱图/秒	>3 质谱图/秒
分离峰宽	中 (~ m/z 4)	
碰撞能量	(斜率)*(m/z)/100+偏移 电荷 斜率 偏移 2 3.1 1 3 3.6 -4.8 1 4 6 >3 3.6 -4.8	
最大母离子/循环	20	
母离子阈值	1000 响应值和 0.01%	
主动排除	在 1 幅质谱图后排除 在 0.2 min 后释放	
同位素模式	肽	
母离子排序	先按电荷态，再按丰度进行排序；+2, +3, 1, >+3	
扫描速度根据母离子丰度而异	是	
目标	25000 响应值/质谱图	
使用 MS/MS 累积时间限	是	
纯度严格性	100%	
纯度临界值	30%	

表 4A. Byonic 搜索参数

Byonic 设置	
数据库	Uniprot 人类蛋白
酶解特异性	非特异性
裂解端	C 端
最多漏切位点	无限制
修饰	氧化 (M, W) 脱酰胺基化 (N, Q)
片段化类型	QTOF/HCD
质量容差	MS1 20 ppm MS2 40 ppm
手动截止评分	150

表 4B. Byologic 定量参数

Byologic 设置	
启用计算机模式	否
相关肽	所有类型
m/z 窗口	20 ppm
最大搜索窗口	2 min
XIC 区域窗口	2 min
启用锁定质量数校准	否
棒状图平滑宽度	0.02
诱饵	50

结果与讨论

MHC 肽段鉴定和定量

图 5 是三个样品的总离子流色谱图 (TIC)，使用 90 分钟的梯度，纳流液相色谱总运行时间为 2 小时。TIC 显示，样品之间的保留时间和峰丰度具有重现性。使用 Byos 工作流程分析串联 MS 数据，肽段鉴定结果如图 6 所示。各样品中鉴定的独特的 MHC I 类肽在 2284 至 2426 之间，CV% 为 3.0%。在所有 3 个样品中鉴定出的独特肽的数量为 3604。文氏图更详细地显示了样本之间鉴定出的肽之间的关系。在所有三个样品中均鉴定出的独特肽的数量约为 1351，在各样品中占比约 55.7% 至 59.2%。在两个样品之间鉴定出的相同肽段占各样品的 65.4%–71.3% (图 7)。

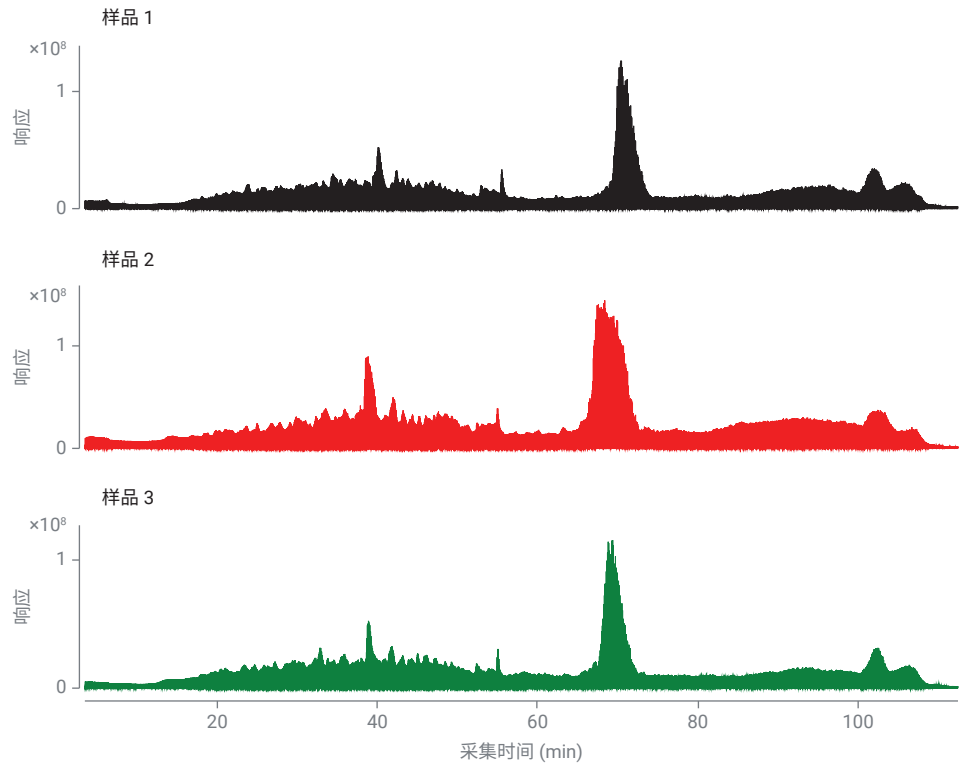


图 5. 使用 90 分钟梯度获得的 MHC-I 肽段的 TIC

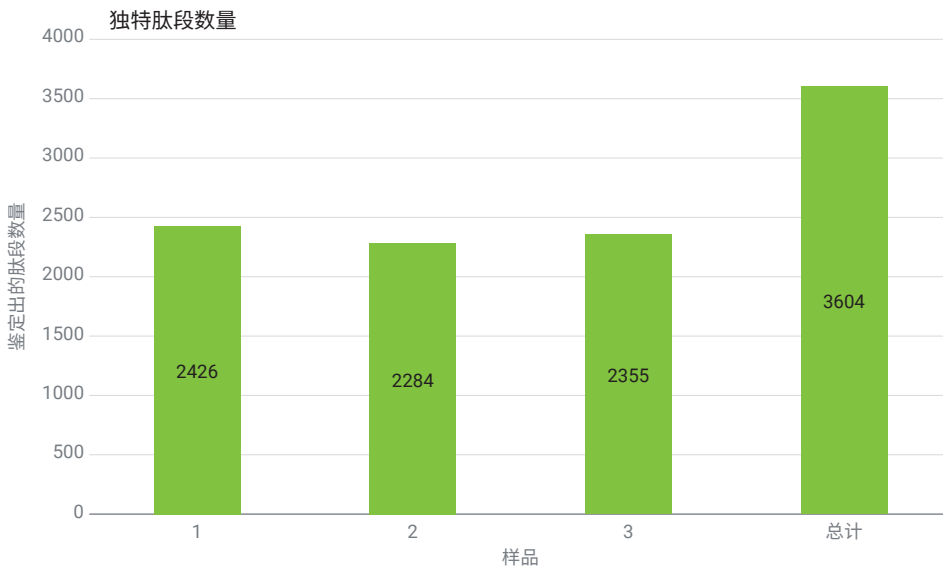


图 6. 使用 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS 鉴定的独特肽段数

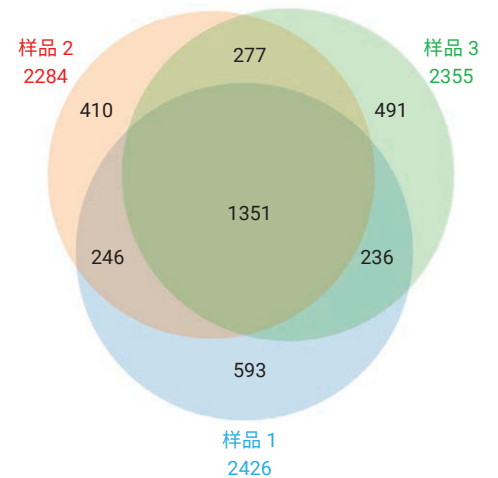


图 7. 在 3 个样品中鉴定出的独特肽段的文氏图

Byologic 根据每个已鉴定肽段的 MS1 扫描提取肽段丰度数据。将肽段丰度相加后，各样品中的肽段总丰度如图 8 所示，CV% 为 11.1%。这三个样品是使用相同的 6 根交联 PAW 小柱在三个不同的日期制备得到。样品制备过程涉及多个步骤，包括 mAb 与 PAW 的交联、将 GRANTA 裂解物上样至各小柱、合并洗脱液以及后续的 C18 纯化。因此，通过自动化样品前处理，样品之间的肽段总丰度 CV% 值显示出出色的日间重现性。实验还证明交联小柱可以重复使用并能保持良好的性能。

肽段长度分布

图 9 显示了肽段长度的频率分布，用于进一步确认 MHC I 类肽的鉴定结果。图 9 中显示的数据基于 Byos 工作流程分析中鉴定出的所有肽段。3604 个独特肽段（图 6 和 7）的长度范围为 3–17 个残基。然而，绝大多数肽段 (94%) 的长度为 8–11 个残基，且大多数 (75%) 为 9 个残基。此结果与文献所报告的结果高度一致^[2]。

MHC 肽结合基序分析

仔细评估 MHC 肽结合基序对于确保结果质量至关重要。一种常见方法是在免疫多肽组数据集中可视化残基偏好位置。这可以使用 Seq2Logo 等在线工具来实现：

<http://www.cbs.dtu.dk/biotools/Seq2Logo/>。

由于鉴定出的大多数肽长度都为 8-、9-、10- 和 11-mers，其中 9-mers 的肽段丰度最高 (>75%)，因此将所有 9-mer 序列都上传到 Seq2Logo 网站，生成图 10 中的 HLA 肽结合基序。HLA 基序的分析表明，在位置 9 (C 端) 和位置 2 具有较强的 L 或 V 偏好性^[2]。

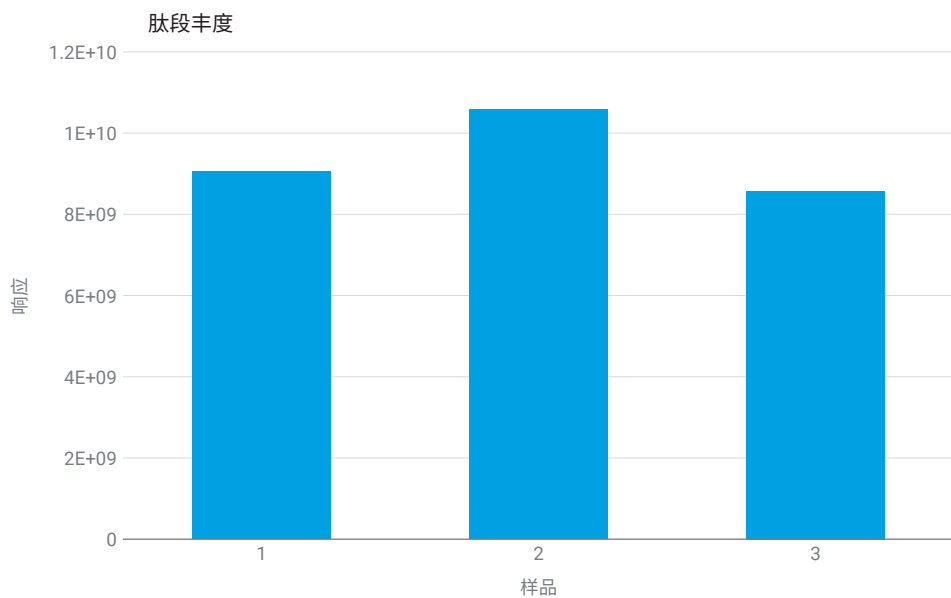


图 8. 各样品的 MHC-I 肽段丰度，CV% 约为 11.1%

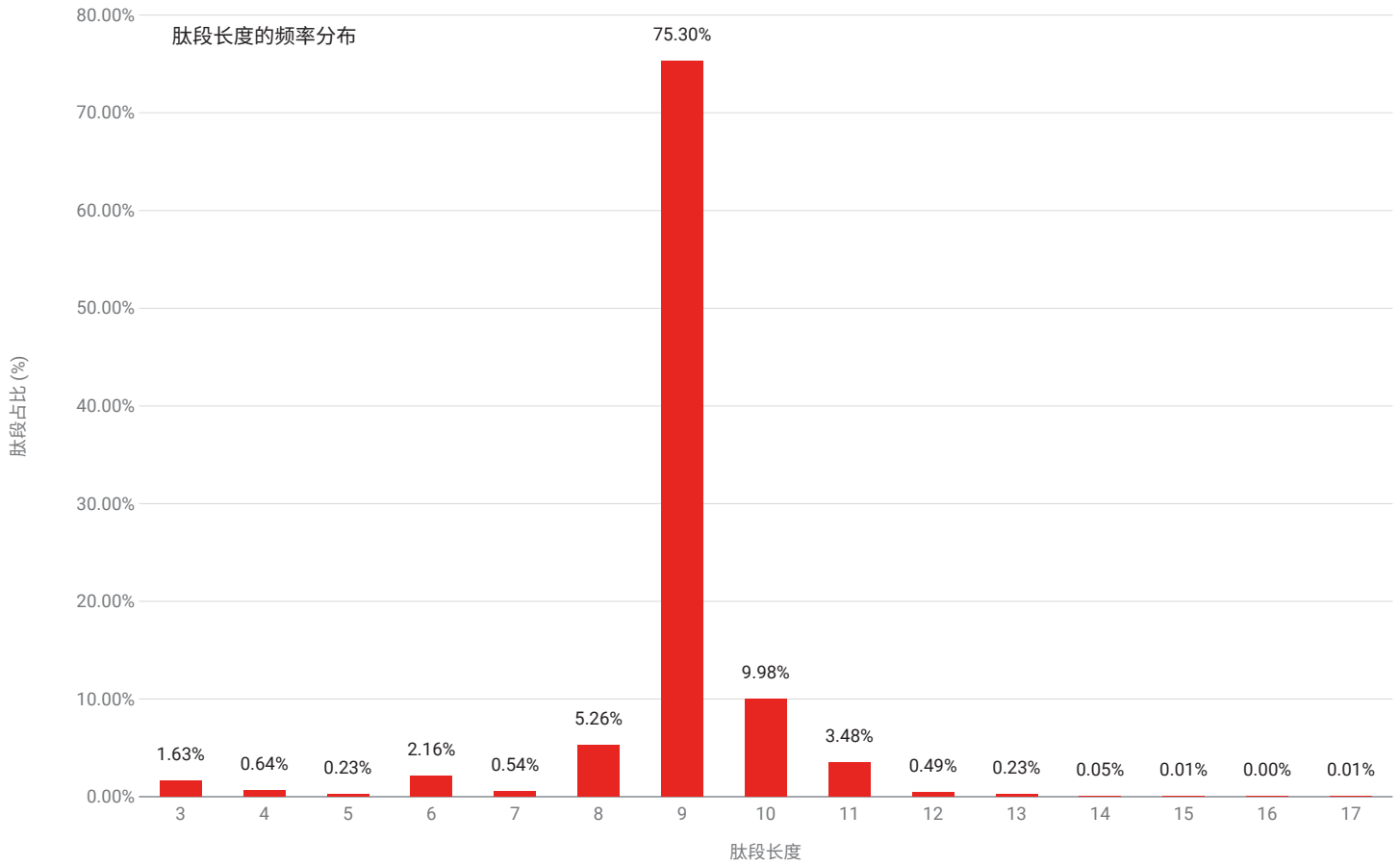


图 9. MHC I 类肽段长度的频率分布，取自 3 个样品的平均值



图 10. 基于 9-mer 肽构建的 MHC 肽结合基序 (由 Seq2Logo 生成)

结论

本研究开发了一种使用大容量 (25 μ L) PAW 小柱的自动化 MHC-I 相关肽富集方法，用于免疫多肽组学分析。该工作流程为 MHC 肽分析提供了可重现且易于操作的富集方法。

在 AssayMAP Bravo 上，可以逐步自动化进行 PAW 小柱的抗体交联、免疫亲和纯化和肽段纯化。AssayMAP 25 μ L PAW 小柱非常适合处理低浓度 MHC 复合物，上样速度快、富集效率高。5 μ L C18 小柱可从蛋白质复合物中高效分离并纯化肽段。在不同日期分别制备 3 个样品，从中鉴定出的独特 MHC-I 肽数量范围为 2284–2426，CV% 小于 3%，显示出高度一致的肽段鉴定结果。肽段定量结果表明，3 个样品的肽段丰度具有良好的重现性，CV% 约为 11.1%。比较不同日期制备的样品的分析结果表明，即使涉及多个样品前处理步骤，自动化工作流程也能实现出色的重现性。所有独特肽段的肽段长度分布显示，鉴定出的肽段中超过 94% 的肽段长度为 8–11 个残基，与文献一致。基于 9-mer 序列标识生成的 HLA 肽结合基序进一步证实在位置 9 和位置 2 具有 L 和 V 偏好性。

参考文献

1. Hunt, D. F. *et al.* Characterization of Peptides Bound to the Class I MHC Molecule HLA-A2.1 by Mass Spectrometry. *Science* **1992**, 255(5049), 1261-1263
2. Purcell, A. W.; Ramarathinam, S. H.; Ternette, N. Mass Spectrometry-Based Identification of MHC-Bound Peptides for Immunopeptidomics. *Nature Protocols* **2019**, 14, 1687–1707
3. Caron, E. *et al.* Analysis of Major Histocompatibility Complex (MHC) Immunopeptidomes Using Mass Spectrometry. *Mol. Cell Proteomics* **2015**, 14(12), 3105–3117
4. Wu, S.; Wu, L. F. Human Breast Cancer Cell Line Phosphoproteome Revealed by an Automated and Highly Selective Enrichment Workflow (利用自动化、高选择性富集工作流程揭示人乳腺癌细胞系磷酸化蛋白质组)，*安捷伦科技公司应用简报*，出版号 5994-0315EN，**2018**

www.agilent.com

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。

DE.5387962963
RA.4412615741

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司，2020
2020 年 9 月 18 日，中国出版
5994-2344ZHCN

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

