



doi: 10.12452/j.fxcxb.241008439

分离富集磷酸化/糖基化蛋白质/肽的磁固相萃取新材料

鲁艳, 张森, 张锋, 葛鸿延, 庄琬月, 乔俊琴, 练鸿振*

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

摘要: 蛋白质磷酸化和糖基化是蛋白质两种主要的翻译后修饰过程。磷酸化和糖基化蛋白质在细胞的各个生命周期内起着关键的作用, 对于临床疾病的早期诊断等也具有重要的意义。但由于它们在实际生物样品中含量低、基质干扰大, 选择合适的方法对其进行分离富集成为蛋白质组学研究中决定性的步骤之一。磁固相萃取(MSPE)是以磁性纳米颗粒为吸附剂的固相萃取技术(SPE), 较之常规SPE具有操作简单、环境友好、材料易于回收利用等优势, 因而被广泛应用于磷酸化和糖基化蛋白/肽段等分析前的分离富集。该文对近5年文献中用于磷酸化和糖基化蛋白质分离富集的MSPE材料进行系统的归纳和评述, 并对此类分离富集材料的未来发展方向进行了展望和探讨。

关键词: 磷酸化蛋白质; 糖基化蛋白质; 磁固相萃取; 磁性纳米颗粒

中图分类号: O657; G353.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2025)01-0001-11

Magnetic Solid Phase Extraction Materials for Separation and Enrichment of Phosphoproteins/Peptides and Glycoproteins/Peptides

LU Yan, ZHANG Sen, ZHANG Feng, GE Hong-yan, ZHUANG Wan-yue, QIAO Jun-qin, LIAN Hong-zhen*

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

Abstract: Protein phosphorylation and glycation are two of the most prevalent post-translational modification processes of proteins. Phosphoproteins and glycoproteins play an important role in the cell life cycle and are also of great significance for the early diagnosis of clinical diseases. However, due to the low content of them and large matrix interference in biological samples, finding an appropriate method for the separation and enrichment of phosphoproteins and glycoproteins is one of the decisive steps in proteomics research. Magnetic solid phase extraction (MSPE) is a solid phase extraction (SPE) technology with magnetic nanoparticles as adsorbent. Compared with conventional SPE, MSPE has the merits of simple operation and environmental friendliness, with its materials easy to recycle. Therefore MSPE has been widely applied for the separation and enrichment of phosphoproteins/peptides and glycoproteins/peptides before analysis. In this article, the MSPE materials used for separation and enrichment of phosphoproteins and glycoproteins in recent five years are systematically summarized and reviewed, and the future development trend of such materials is prospected and discussed.

Key words: phosphoproteins; glycoproteins; magnetic solid phase extraction; magnetic nanoparticles

翻译后修饰(PTMs)通过蛋白质水解裂解或在1个或多个氨基酸上添加修饰基团来改变蛋白质的性质。蛋白质的PTMs不仅起到修饰作用, 还会影响信号传导、蛋白的稳定与转换以及蛋白-蛋白间识别和相互作用等。蛋白质常见的翻译后修饰有磷酸化、糖基化、硫酸化、乙酰化、泛素化等。蛋白质磷

收稿日期: 2024-10-08; 修回日期: 2024-11-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(21874065, 22176085, 22304075); 国家重点研发计划(2021YFF0600800)

* 通讯作者: 练鸿振, 博士, 教授, 研究方向: 分析化学、色谱分离与分析、样品前处理, E-mail: hzlian@nju.edu.cn

酸化是指在磷酸化激酶的催化下,三磷酸腺苷(ATP)或三磷酸鸟苷(GTP)的 γ -磷酸基转移到蛋白质中特定氨基酸残基的过程^[1]。磷酸化蛋白质直接参与细胞增殖/分裂/分化、信号转导、内稳态和代谢维持,并在所有细胞整个生命周期内发挥作用。磷酸化调节异常已被证明在多种疾病的发病机制中起重要作用,如癌症^[2]、糖尿病^[3]、帕金森症^[4]和阿尔茨海默症等^[5]。蛋白质糖基化则是指在糖基转移酶的作用下,通过糖苷键将蛋白质分子与糖链分子进行连接,形成糖蛋白的过程。蛋白质的异常糖基化与致癌、肿瘤进展、神经系统疾病以及其他许多先天性疾病密切相关^[6]。此外,临床癌症的许多生物标志物都是糖基化蛋白质,因此糖蛋白的分析和检测在疾病诊断、鉴定新的生物标志物和开发新型治疗药物方面发挥着关键作用。由于在生物体内的含量低、基质干扰大,选择合适的分离富集方法对于磷酸化和糖基化蛋白质的分析检测极为重要。

蛋白质组学旨在识别和量化蛋白质组的所有蛋白质,包括表达、细胞定位、相互作用、翻译后修饰和作为时间、空间和细胞类型功能的转换。质谱技术由于其快速、高通量、高特异性和高灵敏度的优点,正成为蛋白质组学研究最有力的方法。然而,对于PTMs蛋白,由于其浓度较低、基质干扰大、电离效率低,直接质谱分析较为困难。因此,合适的样品制备和前处理技术对磷酸化/糖基化蛋白质组学的研究至关重要。近年来,离心、膜分离法、溶剂诱导沉淀、固相萃取(SPE)等各种不同的方法^[7-10]被用于磷酸化/糖基化蛋白/肽段的富集。固相萃取基于液-固色谱理论发展而来,通过对样品进行富集、分离和净化,可降低基质干扰,提高检测灵敏度,能够根据所使用固定相的性质而具有不同的策略,因此被广泛应用。磁性固相萃取(MSPE)是基于磁性纳米颗粒吸附剂的SPE技术,其一般流程是:首先,将磁性纳米颗粒添加到样品的溶液或悬浮液中,将目标分析物吸附到纳米材料表面;其次,将吸附了目标样品的纳米颗粒通过外部磁场转移到清洗溶剂中去除杂质;然后,将去除杂质的纳米颗粒再通过外部磁场转移到洗脱溶剂中洗脱,从而达到分离浓缩的作用。相较于传统的SPE,MSPE的优势在于:(1)通过外部磁场分离,操作简便;(2)减少有机溶剂的使用,绿色环保;(3)具有较高的比表面积,吸附效率高,适用于痕量分离。因此,MSPE方法在低丰度蛋白和翻译后修饰蛋白的分离富集中被广泛应用^[11-12]。图1是利用磁性氧化石墨烯($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$)同时分离富集低丰度肽和磷酸化肽的流程示意图^[13]。

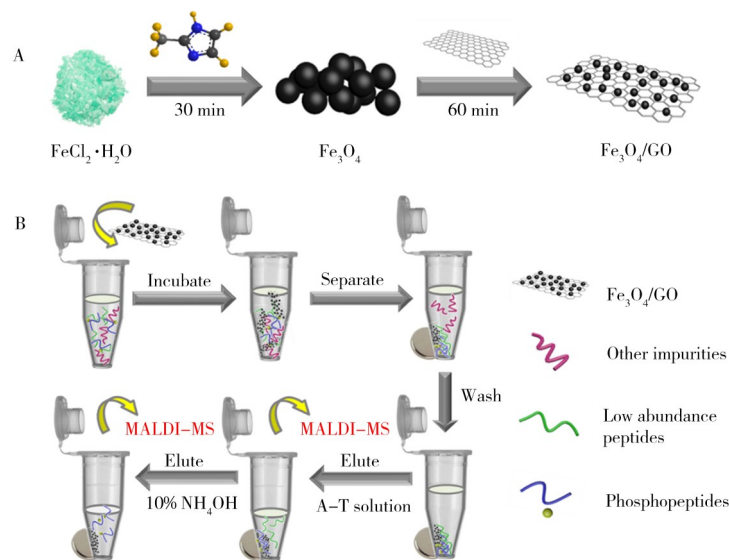


图1 磁性纳米复合物合成策略(A)和磁固相萃取法分离富集蛋白质/肽流程(B)示意图^[13]

Fig. 1 Schematic illustration of the synthesis (A) and the procedure for separation and enrichment of proteins/peptides by MSPE (B)^[13]

本文侧重于从不同的富集策略角度,对最近五年的文献中用于MSPE分离富集磷酸化和糖基化蛋白质/肽的各种新型磁性纳米材料进行综述,并对这类材料的未来发展方向进行展望和探讨。

1 研究进展

1.1 对于磷酸化蛋白/肽段的富集

用于磷酸化蛋白质/磷酸化肽富集的策略一般有:化学修饰法、免疫沉淀法、强阳/阴离子交换法

(SCX/SAX)、金属氧化物亲和色谱法(MOAC)、固定金属离子亲和色谱法(IMAC)等(见图2)^[14]。将上述策略与MSPE技术相结合,最常见的是利用基于MOAC和IMAC策略合成的磁性材料对磷酸化蛋白质/磷酸化肽进行分离富集。

1.1.1 基于MOAC策略的磁性材料 基于MOAC法富集磷酸化蛋白/肽段的机理尚未研究透彻,目前普遍的观点是其利用金属氧化物表面丰富的亲和位点和大量的金属离子进行富集。根据Lewis酸碱理论,金属阳离子通过静电或螯合作用与磷酸化蛋白/肽段中 PO_4^{3-} 中的氧进行结合,从而富集磷酸化肽。

基于MOAC策略广泛应用于磷酸化蛋白/肽段富集领域的常见材料,是以对磷酸化蛋白/肽段具有亲和作用的金属氧化物对 Fe_3O_4 磁核进行包覆形成的功能化核-壳结构磁性纳米颗粒。Deng课题组和Xie课题组^[15]合作开发了一种黑色介孔二氧化钛(B-mTiO_2)包裹的 Fe_3O_4 纳米粒子(B-mTiO_2 MNPs),并将其用于磷酸化肽的富集和表面辅助激光解吸离子化质谱(SALDI-MS)。所合成的 B-mTiO_2 MNPs具有高摩尔吸收系数、强磁响应、高比表面积和充足的磷酸化结合位点,展现出优异的磷酸化肽富集效率(检出限低至 5×10^{-10} mol/L)。Di课题组和Wang课题组^[16]合作制备了一种磁性介孔纳米材料 $\text{Fe}_3\text{O}_4@n\text{SiO}_2@m\text{SiO}_2@n\text{TiO}_2$ 。首先通过Stöber法在 Fe_3O_4 表面包裹一层 SiO_2 ,得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4@n\text{SiO}_2$,再在其表面合成一层介孔 SiO_2 ,得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4@n\text{SiO}_2@m\text{SiO}_2$,最后用多功能动力学控制包覆方法将 TiO_2 包裹在表面,得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4@n\text{SiO}_2@m\text{SiO}_2@n\text{TiO}_2$ 。合成的材料具有良好的选择性(β -CN:BSA=1:2 000)、灵敏度(0.5 fmol/ μL β -CN)和吸附能力(120 mg/g)。本课题组^[17]通过溶剂热法,在不同的反应时间下合成了两种磁性Ni基的Fe氧化物MNFOs。由于反应时间不同导致的结构差异,两种MNFOs(MNFO-S和MNFO-L)分别对全磷酸化肽和单磷酸化肽有更好的富集效果,检出限分别达到20 fmol和5 fmol,且表现出优异的选择性(α -CN: β -CN:BSA分别为1:1:1 000和1:1:2 000)。Buncherd课题组^[18]从粉煤灰(Fly ash)中提取出磁性组分,利用其中氧化铝的MOAC作用实现对磷酸化蛋白质的有效分离富集,并进一步将其应用于生物样品中磷酸化蛋白的分离,如从蛋清中分离卵清蛋白和从牛奶中分离酪蛋白等。以粉煤灰磁性组分为吸附剂的磁固相萃取效果好、操作简单、可重复利用、成本低。

近年来,出现了越来越多的其他基于金属-氧簇的用于磷酸化肽富集的材料,包括金属有机框架(MOF)、金属氢氧化物等,本文将机理也归为MOAC作用。Zhang Weibing课题组和Zhang Xiangmin课题组^[19]合作开发了一种核壳结构的磁性双金属有机框架 $\text{Fe}_3\text{O}_4@MIL(\text{Fe}/\text{Ti})$,将 Fe_3O_4 表面用 SiO_2 包覆并用巯基乙酸改性,然后依次循环在表面包覆MIL-100(Fe)和MIL-125(Ti),最终得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4@MIL(\text{Fe}/\text{Ti})$ 。双金属MOF涂层使材料具有较大的表面积和优异的亲水性,因而具有优异的磷酸化肽富集能力、高选择性(β -CN:BSA=1:500)、低检出限(3 fmol)、高回收率(85%)。Deng和Sun课题组^[20]先后用聚多巴胺(PDA)和UiO-66- NH_2 包覆 Fe_3O_4 磁性纳米粒子,得到亲水性MOF功能化的磁性纳米材料 $\text{Fe}_3\text{O}_4@PDA@UIO-66-\text{NH}_2$,并将其用于磷酸化肽和尿液中外泌体的富集。该材料从人尿外泌体的255个磷酸化蛋白中鉴定出707个磷酸化肽,有望应用于体液外泌体的生理分析。Lan和Wu课题组^[21]制备了一种二维磁性双金属MOF($\text{Fe}_3\text{O}_4@Zr-Ti$ BPDC纳米片),首先合成二维的Zr-MOF Zr BPDC(Zr-联苯二甲酸),通过阳离子交换反应,部分 Zr^{4+} 被 Ti^{4+} 置换,得到Zr-Ti BPDC,然后在纳米片表面原位沉积 Fe_3O_4 ,得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4@Zr-Ti$ BPDC纳米片,其中的Ti-O和Zr-O通过MOAC原理与磷酸化肽发生相互作用。该材料能成功应用于脱脂乳、人唾液和乳腺癌细胞裂解液中磷酸化肽的特异性检测。本课题组^[22]在 Fe_3O_4 表面修饰了一种 $\text{Hf}^{4+}/\text{Ti}^{4+}$ 双金属MOF,之后在表面修饰上胍基,得到胍基功能化的磁性双金属MOF纳米复合物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@Hf/Ti-MOF-Gua$ 。利用MOF的MOAC作用和胍基的静电相互作用高选择性地富集磷酸化肽,灵敏度达到20 fmol,并利用尺寸排阻作用除去大分子蛋白质。将该材料应用于人唾液中

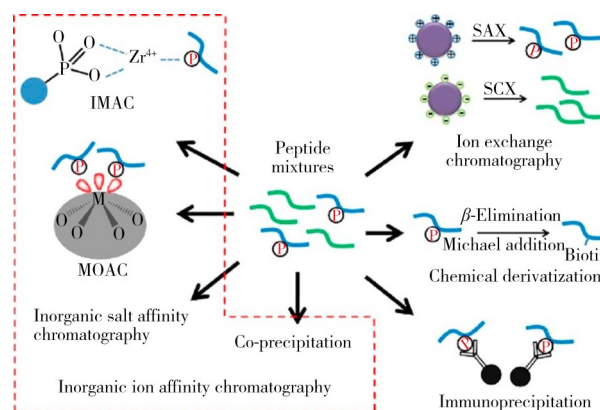


图2 常见的磷酸化蛋白质/肽分离富集策略^[14]

Fig. 2 Common strategies for phosphoproteins/peptides separation and enrichment^[14]

磷酸化肽的富集,能够鉴定出 15 条磷酸化肽及对应的位点。此外,本课题组^[23]还通过原位氧化生长法在 $\text{Ti}_3\text{C}_2\text{T}_x$ 纳米片上修饰四氧化三铁粒子,得到磁性 MXene 纳米片 $\text{Ti}_3\text{C}_2\text{-Fe}_3\text{O}_4$, 利用 Ti-O 和 Fe_3O_4 提供的 MOAC 作用以及亲水性的 $\text{Ti}_3\text{C}_2\text{T}_x$ 纳米片提供的亲水相互作用实现对磷酸化肽的分离富集。该材料具有 $66.1 \text{ m}^2/\text{g}$ 的比表面积,对磷酸化肽富集具有高灵敏度(0.5 nmol/L)和高选择性($\beta\text{-CN}:\text{BSA}=1:1000$)。以脱脂牛奶验证了其富集效率,并将其应用于中药注射液清开灵中磷酸化肽的分离富集,结果显示,该材料在复杂的基质条件下仍然得到了较好的富集效果。

石墨烯、碳纳米管、介孔碳等碳纳米材料近年来也被广泛用作 MOAC 材料的基底。碳基纳米复合材料因其超大的表面积、丰富的表面修饰位点以及对肽无非特异性吸附等优点,成为磷酸化蛋白质组学研究的热点。碳纳米材料在改性后表现出良好的稳定性,避免了纳米复合材料的聚集。本课题组^[13]采用有机小分子辅助法,通过 2-甲基咪唑(2-MIM)诱导制备了 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒。之后采用超声辅助法将 Fe_3O_4 均匀负载在氧化石墨烯(GO)表面形成 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 纳米复合材料。利用 GO 的亲水性和 Fe_3O_4 对磷酸根的高亲和力,可对样品中的低丰度肽以及磷酸化肽进行富集,该材料对磷酸化肽富集具有高灵敏度(2.5 fmol)和高选择性($\alpha\text{-CN}:\beta\text{-CN}:\text{BSA}=1:1:100$)。Jiang 等^[24]设计并开发了一种二维三氧化钼固定的磁性石墨化氮化碳 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{g-C}_3\text{N}_4/\text{MoO}_3$, 首先利用共沉淀法在剥落的石墨化氮化碳($\text{g-C}_3\text{N}_4$)上合成 Fe_3O_4 , 将产物与钼酸铵混合后通过灼烧在 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 上生成 MoO_3 , 得到的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{g-C}_3\text{N}_4/\text{MoO}_3$ 通过 MoO_3 提供的 MOAC 作用和 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 提供的阴离子交换色谱(AEX)作用实现对磷酸化肽的分离富集。由于 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 具有较好的分散性、丰富的亲和位点以及较大的比表面积,该纳米复合材料表现出优异的灵敏度(0.1 fmol)和选择性($\alpha\text{-CN}:\beta\text{-CN}:\text{BSA}=1:1:5000$)。

1.1.2 基于 IMAC 策略的磁性材料 IMAC 法主要是利用金属离子与磷酸化蛋白/肽段中 PO_4^{3-} 存在的静电吸引、配位等多种亲和作用实现对磷酸化蛋白质/肽的分离富集。基于 IMAC 法的亲和材料主要由材料基底、修饰配体及固定金属离子三部分组成,要求基底在溶液中具有很好的耐受性,富集过程中其结构不会被破坏,不能明显吸附样品中各种复杂的基质成分,且表面易于修饰各种配体,配体通常含有较多 N、O 原子,有利于配位各种金属离子。

以磷酸根为修饰配体固定金属离子的 IMAC 材料在磷酸化蛋白质/肽富集中得到广泛应用。赵艳艳等^[25]先合成了表面带有氨基的 Fe_3O_4 磁性纳米粒子,然后将戊二醛和三磷酸腺苷(ATP)先后在表面反应,再利用 ATP 中的磷酸根固定 Zr^{4+} , 得到 Zr^{4+} 固定化的磁性纳米粒子 $\text{Zr}^{4+}\text{-ATP-MNP}$ 。以 $\beta\text{-CN}$ 及其与 BSA 的酶解产物混合物为模型,考察了材料对磷酸化肽的富集选择性,并将其进一步应用于牛奶中磷酸化肽的高效富集,验证了材料对不同磷酸化程度的肽段均能达到一定的富集效果。Zhang 和 Liu 课题组^[26]先后用 SiO_2 、共价有机框架 TpPa-NO_2 (间苯三酚-2-硝基-1,4-苯二胺)包覆,得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{TpPa-NO}_2$, 然后将 $-\text{NO}_2$ 还原为 $-\text{NH}_2$, 再用三氯氧磷和 2,4,6-三甲氧基吡啶反应得到带磷酸根的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{TpPa-PO}_4^{3-}$ 纳米材料,最后用磷酸根固定 Ti^{4+} 。该材料具有较高的灵敏度($>0.2 \text{ fmol}/\mu\text{L}$)和选择性($\alpha\text{-CN}:\text{BSA}=1:500$)。在两次 LC-MS/MS 重复中鉴定出 1083 个磷酸化肽段,特异性为 91.8% (磷酸化肽/所有鉴定的肽)。Lei 等^[27]合成了一种 Ti^{4+} 固定化的 O-磷酸-L-酪氨酸(pY)修饰的磁性纳米粒子 $\text{Ti}^{4+}\text{-pY-MNPs}$, 首先通过溶胶-凝胶法在 Fe_3O_4 表面合成 SiO_2 , 再利用 3-缩水甘油醚氧基丙基三甲氧基硅烷(GLYMO)引入环氧基,然后通过 pY 的氨基与环氧基之间的开环反应将磷酸根引入到磁性纳米粒子表面,最后固定 Ti^{4+} , 得到 $\text{Ti}^{4+}\text{-pY-MNPs}$ 。通过 BCA 方法研究了材料的吸附等温线,计算出材料对 β -酪蛋白和 BSA 的饱和吸附量分别为 961.5 mg/g 和 72.5 mg/g 。之后利用合成的 Ti-IMAC 材料对完整的磷酸化蛋白质进行分离富集,通过 SDS-PAGE 进行检测,该材料对磷酸化蛋白具有高选择性($\beta\text{-CN}:\text{BSA}=1:1000$),用 ImageJ 软件分析洗脱液中磷酸化蛋白的纯度为 93.1% (磷酸化蛋白条带与总蛋白条带的灰度比),证明了材料对完整磷酸化蛋白具有较好的富集能力。本课题组^[28]合成了 Ti^{4+} 固定化的二磷酸果糖(FBP)修饰的磁性 Zr-基 MOF(mMOF-FBP-Ti^{4+}), 首先在 Fe_3O_4 表面包覆一层聚多巴胺,然后包覆一层 UiO-66-NH_2 , 得到磁性 MOF(mMOF), 用 FBP 修饰之后再固定 Ti^{4+} , 得到 mMOF-FBP-Ti^{4+} 。该材料利用 MOF 中 Zr-O 簇的 MOAC 作用和固定的 Ti^{4+} 的 IMAC 作用富集磷酸化肽。另外,丰富的氨基与羟基可以提高材料的亲水性,也有利于材料对磷酸化肽的富集。该材料在磷酸化肽富集中具有高灵敏度($0.2 \text{ fmol}/\mu\text{L}$)、高选择性($\alpha\text{-CN}:\beta\text{-CN}:\text{BSA}=1:1:500$)、高富集回收率(90.2%)等优点,应用于脱脂牛奶酶解液和人唾液中磷酸化肽的富集捕获,得到了较理想的富集效果。

除了磷酸基团之外，邻二酚羟基、羧基等基团也可作为IMAC的金属螯合基团。Lin课题组^[29]用温和的方法合成了一种Ti⁴⁺固定化的磁性共价有机框架Fe₃O₄@TAPTDHTA-Ti⁴⁺。首先制备Fe₃O₄，然后选择1, 3, 5-三-(4-氨基苯基)三嗪(TAPT)和2, 3-二羟基对苯二甲醛(DHTA)为构建单元，在表面包覆共价有机框架(COF)，得到核壳结构的Fe₃O₄@TAPTDHTA，最后利用酚羟基固定Ti⁴⁺，得到Fe₃O₄@TAPTDHTA-Ti⁴⁺。材料对于磷酸化肽具有低检出限(0.05 fmol/μL)、高选择性(β-CN:BSA=1:50 000)、高吸附量(62.9 μg/mg)和强尺寸排阻效应(β-CN酶解物:β-CN:BSA=1:250:250)。Ding和Yan课题组^[30]首先合成了磁性COF，然后逐步修饰，依次将3-缩水甘油醚氧基丙基三甲氧基硅烷(GLYMO)、ε-聚-(L-赖氨酸)、2, 3, 4-三羟基苯甲醛(THBA)和Ti⁴⁺修饰在材料上，最终得到mCOF@ε-PL@THBA-Ti⁴⁺。该磁性纳米复合材料具有较好的选择性(1:5000)、较低的检出限(2 fmol)和较高的负载能力(66.7 mg/g)。Dang课题组^[31]通过一步自组装在水溶液中将寡肽(Glu-Pro-Ala-Lys-Ala-Lys-Ala-Lys, EPAK-VI)包覆在具有羧基的Fe₃O₄-氧化石墨烯(GO)复合物(Fe₃O₄@GO)或Fe₃O₄@C微球表面，包覆步骤可在生理条件通过β-折叠和β-转角快速完成。再利用其中的脯氨酸(Pro)将Fe³⁺固定，得到Fe³⁺固定化的IMAC磁性材料。该材料对β-酪蛋白胰蛋白酶酶解产物的富集效率高(0.05 fmol/μL)，对磷酸化肽的选择性高(β-CN:BSA=1:500)、回收率高(80%以上)。Topel课题组^[32]使用核壳结构的二氧化硅包覆的Fe₃O₄为支撑材料，以4-羟基-2, 6-吡啶二甲酸(白屈氨酸)为螯合剂，镧系元素离子Ln³⁺(Er³⁺和Dy³⁺)为金属离子，合成了一种新型的磁性IMAC材料(Ln³⁺-Mag-IMAC)。采用制备的Ln³⁺-Mag-IMAC材料在25℃水溶液中进行磷酸盐吸附研究，模拟了其富集磷酸化肽的潜力，发现其具有良好的磷酸盐吸附能力，计算得每个Ln³⁺离子能够吸附1.2个磷酸根离子。

近年来，双金属IMAC材料逐渐发展，结合不同离子的优势，能够实现更全面的磷酸化肽富集。Ding和Yan课题组^[33]在Fe₃O₄表面先包覆介孔SiO₂(mSiO₂)，之后加入3-缩水甘油醚氧基丙基三甲氧基硅烷(GLYMO)硅烷偶联剂，使用氨甲基磷酸(APA)引入磷酸根，最后固定Ti⁴⁺、Nb⁵⁺，得到Fe₃O₄@mSiO₂@APA@Ti⁴⁺/Nb⁵⁺纳米球。该材料的比表面积大(151.1 m²/g)，具有高选择性(β-CN:BSA=1:1 500)、低检出限(0.05 fmol)、低相对标准偏差(RSD低于7%)、出色的磷酸化肽负载能力(330 μg/mg)，¹⁸O同位素标记法显示其回收率达到87%。Liu课题组和Deng课题组^[34]合作合成了一种具有介孔限制的双金属二氧化硅纳米材料Fe₃O₄@mSiO₂-PO₃-Ti⁴⁺/Zr⁴⁺。首先合成Fe₃O₄，然后包覆一层介孔二氧化硅mSiO₂，利用3-(三羟基甲硅烷基)丙基甲基磷酸酯(3-TPMP)在表面引入磷酸根，再利用磷酸根固定Ti⁴⁺/Zr⁴⁺，得到Fe₃O₄@mSiO₂-PO₃-Ti⁴⁺/Zr⁴⁺。制备的材料对β-CN酶解产物的灵敏度为1 fmol/μL，对β-CN和BSA酶解混合物的选择性为1:500(β-CN:BSA)。Ding和Yan课题组^[35]采用分层组装法引入亲水多羟基配体单宁酸(TA)，合成了一种双金属离子固定化的纳米材料Fe₃O₄@TA@Ti⁴⁺/Zr⁴⁺。首先将Fe₃O₄表面包覆单宁酸(TA)，然后用丁二酸酐修饰得到富含羧基的SA-Fe₃O₄@TA，随后用1-羟基苯并三唑、1-乙基-3-(3-二甲基丙胺)碳二亚胺(EDCI)、N,N-二异丙基乙胺活化，并与氨甲基磷酸反应得到磷酸根修饰的AMPA-Fe₃O₄@TA，最后利用磷酸根固定Ti⁴⁺和Zr⁴⁺。得益于其优异的离子固定能力和对磷酸化肽的精准富集，Fe₃O₄@TA@Ti⁴⁺/Zr⁴⁺表现出对磷酸化肽富集和鉴定的优异性能。该材料具有效率高、选择性好(β-酪蛋白与BSA的最大摩尔比为1:1 000)、检出限低(0.4 fmol/μL)的特点。此外，在脱脂牛奶和人唾液的样品富集中也表现出优异性能，分别成功捕获了13和31个磷酸化肽。

1.1.3 基于其他策略的磁性材料 其他富集磷酸化蛋白/肽段的策略还有基于氨基/胍基等的静电作用的策略、基于氢键相互作用的策略以及基于分子印迹技术的策略等。Lan和Wu课题组^[36]在具有羧基的Fe₃O₄表面先用聚多巴胺包覆得到Fe₃O₄@PDA，然后用2-溴异丁酰溴(BiBB)反应得到表面具有溴代异丙基的Fe₃O₄@PDA-Br，再用原子转移自由基聚合(ATRP)反应将甲基丙烯酸钠(NaMAA)聚合在表面得到Fe₃O₄@PDA@PMAA，最后将聚(丙烯酸甲酯-乙二胺)(PAMAM)树枝状聚合物修饰到表面，得到Fe₃O₄@PDA@PMAA@PAMAM。该材料对磷酸化肽具有高的检测灵敏度(1 fmol/μL)、优异的选择性(β-CN:BSA=1:500)和高的可回收性(5次循环)。通过调节上样-洗脱条件可选择性地富集单磷酸化肽、多磷酸化肽或全磷酸化肽。Jia课题组^[37]设计和制备了一种电荷变化可逆的罗丹明B(Rb)修饰的磁性纳米粒子Fe₃O₄@EDTA@TEPA@Rb，首先使用一锅法合成乙二胺四乙酸(EDTA)修饰的Fe₃O₄(Fe₃O₄@EDTA)，另外，将四亚乙基五胺(TEPA)和Rb通过酰胺键连接生成TEPA@Rb，再通过酯化反应将Fe₃O₄@EDTA

与TEPA@Rb连接,得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@EDTA@TEPA@Rb}$,通过静电作用富集磷酸化肽。利用该材料富集能够成功检测出 $0.4\text{ fmol}/\mu\text{L}$ $\beta\text{-CN}$ 酶解产物中的磷酸化肽段。将该材料应用于脱脂牛奶、人血清和唾液样本中磷酸化肽的富集,分别检测出26、4、39个磷酸化肽。Dai课题组和Yan课题组^[38]合作开发了一种胍基功能化的磁性COF复合物 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@COF@Au@PEI-GF}$,首先用2,5-二乙烯基对苯二甲醛(DVA)和1,3,5-三(4-氨基苯基)苯(TPB)在 Fe_3O_4 表面包覆一层COF,然后在表面合成Au纳米粒子,得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@COF@Au}$,再将聚乙烯亚胺(PEI)包覆在表面,最后利用O-甲基异脲硫酸盐与聚乙烯亚胺的氨基反应,得到胍基修饰的磁性纳米粒子 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@COF@Au@PEI-GF}$ 。该材料的检出限低(0.02 fmol)、尺寸排阻效果好($\beta\text{-CN}$ 酶解物:BSA蛋白=1:10 000)、重复性好(10个循环)、选择性高($\beta\text{-CN}$:BSA=1:10 000)。贾琼课题组^[39]首先在 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@SiO}_2$ 表面包裹一层壳聚糖(CS),然后利用3-氯-2-羟丙基三甲基氯化铵(GTA)修饰,得到季铵根修饰的磁性纳米材料CS-GTA@ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$,利用季铵根与磷酸根之间的静电相互作用富集磷酸化肽。富集后肽段通过MALDI-TOF MS检测,该方法对磷酸化肽的检出限达到 0.4 fmol 。Lan和Wu课题组^[40]合成了一种基于多氢键相互作用的磁性复合物微球SPION@ $\text{SiO}_2\text{@聚(N,N-二甲氨基-2-甲基丙烯酸酯-co-4-(3-(2-(甲基丙烯酰氧基)乙基)脲基)苯甲酸)}$ (P(DMAEMA-co-MUBA),SPMM)。首先合成超顺磁性磁性 Fe_3O_4 纳米粒子(SPIONs),然后在表面包裹 SiO_2 ,并用氨丙基三乙氧基硅烷(APTES)引入 $-\text{NH}_2$,再用溴代异丁酰溴(BiBB)将ATRP反应的引发剂溴代异丁基修饰在表面,用N,N-二甲氨基-2-甲基丙烯酸酯(DMAEMA)、4-(3-(2-(甲基丙烯酰氧基)乙基)脲基)-苯甲酸(MUBA)通过ATRP共聚生成SPMM。利用羧基与磷酸根的多氢键作用富集磷酸化肽。材料具有优良的选择性(BSA: $\beta\text{-CN}$ =5 000:1)、较高的富集灵敏度(2 fmol)和覆盖率,以及对多磷酸化肽的高捕获率。

1.2 对于糖基化蛋白/肽段的富集

磁性纳米材料凭借其快速磁分离、易于制备和良好的生物相容性等优点,在糖基化蛋白质/肽分离富集研究中也得到了广泛应用。糖蛋白/糖肽的富集策略通常有亲水相互作用(HILIC)、共价键形成、螯合作用、凝集素亲和层析等(见图3)^[41]。

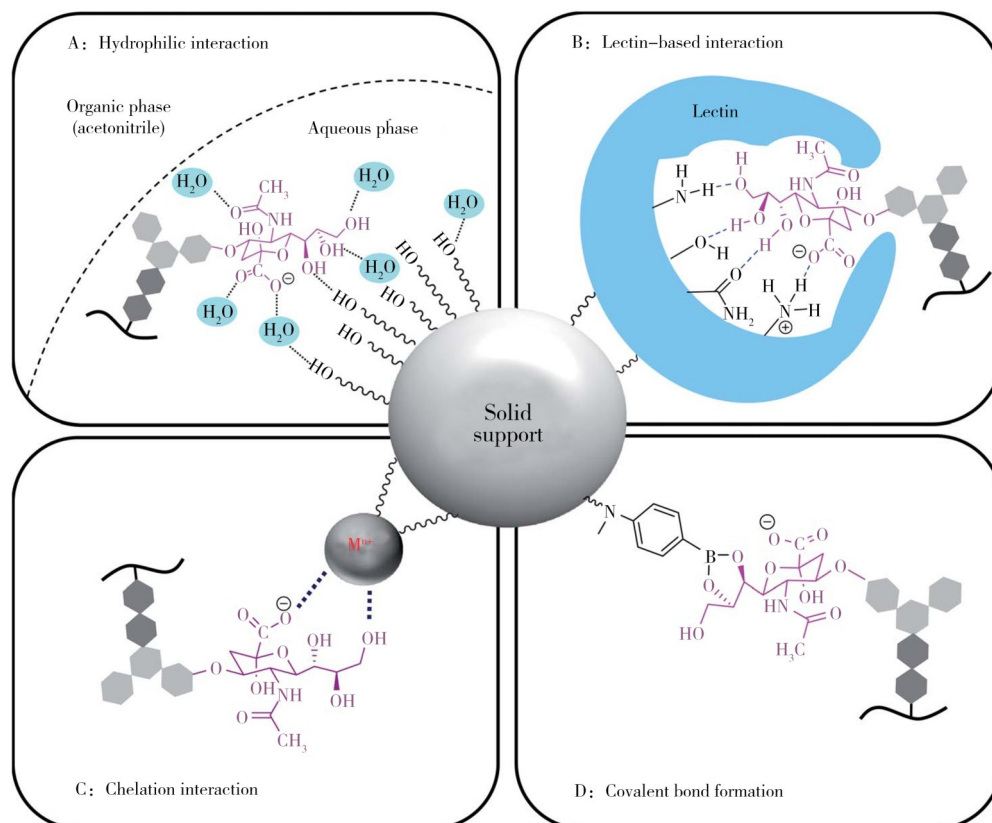


图3 常见的糖基化蛋白质/肽分离富集策略^[41]

Fig. 3 Common strategies for glycoproteins/peptides separation and enrichment^[41]

1.2.1 基于HILIC策略的磁性材料 HILIC是糖基化蛋白质组学分析中最常用的方法，HILIC策略利用成分在疏水性的有机流动相和亲水性的固定相中的不同保留率，将胰蛋白酶解产物中亲水性较强的含糖组分与亲水性较差的非糖蛋白和非糖肽分离。

Deng和Sun课题组^[42]采用亲水性的N-(3-三乙氧基甲硅烷基丙基)葡萄糖酰胺(TSG)通过一锅法合成了一种强亲水性介孔二氧化硅纳米材料 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2\text{-TSG}$ ，大大简化了合成过程。该材料达到了 $0.1\text{ fmol}/\mu\text{L}$ 的检测灵敏度，并具有较好的选择性(HRP:BSA=1:5 000)。利用其对健康人血清和乳腺癌患者血清中的内源性糖肽进行分离富集，通过nano-LC-MS/MS分别鉴定出来自71种糖蛋白的162个糖肽和来自70种糖蛋白的156个糖肽。该材料不仅能用于复杂基质样品的分析，而且可进一步应用于疾病相关的糖基化蛋白质组学分析。

在基于HILIC的纳米复合材料中，两性离子材料(ZIC)由于其与目标肽之间除亲水相互作用以外还存在静电作用而受到广泛关注。常用的两性离子有谷胱甘肽(GSH)与半胱氨酸(Cys)。Jia课题组^[43]以戊二醛为交联剂交联壳聚糖(CS)并将其涂覆在 Fe_3O_4 表面得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CS}$ ，再通过静电作用将金纳米粒子(Au NPs)修饰到 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CS}$ 表面得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CS}@Au$ ，最后通过静电作用将L-半胱氨酸(L-Cys)分子接枝到 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CS}@Au$ 上得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CS}@Au\text{-L-Cys}$ 。Yan课题组和Mao课题组^[44]合作，通过Fe-S相互作用加入L-Cys与GSH合成了超亲水双功能 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CG}$ 纳米球，然后加入十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)与四乙氧基硅烷(TEOS)在 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CG}$ 表面修饰介孔二氧化硅层，再移除CTAB后得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CG}@m\text{SiO}_2$ 。该材料的富集能力强、灵敏度高($5\text{ amol}/\mu\text{L}$)、尺寸排阻效果好(HRP酶解物:BSA蛋白=1:100 000)、可重复使用(至少10次)、回收率高($108.6\%\pm 5.5\%$)。Jia和Zhang课题组^[45]基于L-Cys与GSH衍生的金刚烷(Ada)与邻苯二酚基团修饰的 β -环糊精(β -CD)之间的主客体相互作用以及邻苯二酚与Fe之间的金属-酚相互作用，通过一锅法自组装制备了一种新型 β -CD基材料MCDC/MCDG。该磁性材料的检出限低(0.05 fmol/L)、选择性强(1:500)、可重复使用(8次)，能够从真实的人血清和唾液样本中特异性地富集糖肽。

Lan课题组^[46]先用溶剂热法合成的 Fe_3O_4 在其表面包覆聚乙烯吡咯烷酮(PVP)/PEI层，再将COF修饰到表面得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PVP/PEI}@COF$ ，最后将L-Cys接枝成功得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PVP/PEI}@COF\text{-L-Cys}$ 。Yang和Song课题组^[47]先用溶剂热法合成的 Fe_3O_4 在其表面修饰一层COF(TpBD)得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TpBD}$ ，再在其表面修饰Au原子得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TpBD}@Au$ ，最后利用Au与GSH的配位作用修饰上GSH得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TpBD}@Au@GSH$ 。所制备的材料具有高的灵敏度(0.1 fmol/L)、好的选择性(HRP:BSA=1:2 000)和大分子蛋白抗干扰能力(HRP酶解物/BSA蛋白=1:2 000)。此外， $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TpBD}@Au@GSH$ 具有优异的吸附容量(160 mg/g)、良好的长期储存能力和回收能力(至少6次)。该材料成功对生物样品中的糖肽进行富集，在 $5\text{ }\mu\text{L}$ 人血清和唾液样品中分别检测到492和160个糖肽，分别对应134和64个糖蛋白。

1.2.2 基于共价作用的磁性材料 糖肽富集可以通过利用与碳水化合物顺式二醇部分的非选择性共价键来完成，本文主要介绍基于硼酸亲和作用富集糖肽的MSPE方法。硼酸亲和作用富集糖蛋白/糖肽的主要机理是硼酸在碱性条件下与糖肽中的1, 2和1, 3-顺式二醇共价连接形成环硼酸酯。

Lan和Wu课题组^[48]首先将PEI和PVP涂覆在超顺磁性氧化铁纳米颗粒(SPIO)的表面，再采用多配体策略，以1, 3, 5-三(4-氨基苯基)苯、2, 5-羟基对苯二甲醛和4-甲酰基苯基硼酸作为配体一步制备硼酸官能化的共价有机框架材料，引入丰富的硼酸基团与选择的亲水性有机配体有利于糖肽的富集。该材料对N-糖肽的富集性能优良：选择性好(IgG:BSA=1:2 000)、检出限低($0.05\text{ fmol}/\mu\text{L}$)、尺寸排阻效果良好(IgG酶解物:BSA=1:500)。此外，从大鼠肝组织中鉴定出归属于1 154个糖蛋白的1 921个独特的完整糖肽，性能优于市售产品，还成功地应用于从健康个体和肾衰竭患者中提取的外泌体完整糖肽富集。

Ding和Yan课题组^[49]先合成磁性COF作为基底材料，再将3-缩水甘油氧基丙基三甲氧基硅烷(GLYMO)接枝到mCOF的表面，最后通过甲氧基与氨基的反应对4-甲氧基苯基硼酸进行修饰得到 $\text{mCOF}@PEI@B(\text{OH})_2$ 。富集前后的MALDI-TOF MS检测结果显示，材料具有良好的重复使用性能(10个循环)、低检出限($0.5\text{ fmol}/\mu\text{L}$)、良好的尺寸排阻效果、较高的负载量($80\text{ }\mu\text{g}/\text{mg}$)、较好的回收率($94.9\%\pm 2.8\%$)和选择性(HRP:BSA=1:500)。此外，利用该材料从人唾液中捕获37种内源性糖肽，证明了其从实际生物样品中捕获低丰度糖肽的能力。

Zhang 课题组和 Teng 课题组^[50]合作先采用溶剂热法制备 MnFe_2O_4 纳米颗粒, 再以 *d*-半乳糖为交联剂、 γ -环糊精(γ -CD)为致孔剂反应后, 通过碳化和羧化得到中空 MnFe_2O_4 @C(HMC), 最后用 3-氨基苯基硼酸(APBA)进行改性形成中空 MnFe_2O_4 @C@APBA(HMCAs), 利用硼酸亲和作用进行 MSPE 分离富集。结果表明, HMCAs 具有极好的富集性能: 极低的检出限(约 $0.5 \text{ fmol}/\mu\text{L}$)、极好的尺寸排除效果(HRP : BSA=1 : 800)、良好的通用性(HRP、IgG 和 RNase B)、高的负载量(150 mg/g)。为验证实用性, 将 HMCAs 用于 $2 \mu\text{L}$ 人血清实际样品的分析(3 次重复)中, 从 210 个糖蛋白中鉴定出 474 个糖肽。

1.3 对于磷酸化和糖基化蛋白/肽段的同时富集

有一些多功能材料由于自身可利用的相互作用种类较多, 可以用于磷酸化和糖基化蛋白/肽段的的同时富集, 这类材料已经开始得到应用并展现出良好的发展前景。

Zhang 课题组^[51]在 Fe_3O_4 @ SiO_2 - NH_2 表面修饰 Zr-MOF 后, 再修饰一层 Ti-MOF, 重复上述过程 10 次得到 Fe_3O_4 @ SiO_2 @(Zr-Ti-MOF)₁₀- NH_2 , 利用材料的 MOAC 作用富集磷酸化肽, 同时利用其表面丰富的 NH_2 的高亲水性富集糖肽。该材料能够实现磷酸化肽和糖肽的同时富集、顺序洗脱, 具有选择性好(β -CN : BSA=1 : 2 000, IgG : BSA=1 : 50)、灵敏度高(α -CN 和 IgG 均为 $1 \text{ fmol}/\mu\text{L}$)、容量高(α -CN 为 80 mg/g , IgG 为 200 mg/g)的优点。利用该材料从人血清和脱脂乳胰蛋白酶酶解液中分别捕获 4 个内源性磷酸化肽和 20 个内源性磷酸化肽, 从 $4 \mu\text{L}$ 人血清酶解液中富集并鉴定出 41 种 N-糖基化肽。还从 0.5 mg 的大鼠脑胰蛋白酶酶解液中, 分别富集和鉴定了来源于 127 个糖蛋白的 141 个 N-糖基化肽和来源于 397 个磷酸化蛋白的 918 个磷酸化肽。

本课题组^[52]先合成了磁性氧化石墨烯, 并将 mGO 悬浮液滴入液氮中, 通过低温冷冻模板法快速制备均匀的亲水磁珠, 然后将冷冻磁珠冻干, 再通过热反应交联获得了具有强亲水性、大孔结构和磁性的 mGO/CS 珠。mGO/CS 微球具有高灵敏度(N-糖肽检出限为 $1.0 \text{ fmol}/\mu\text{L}$, 磷酸化肽检出限为 $0.5 \text{ fmol}/\mu\text{L}$)和高选择性(IgG : BSA=1 : 100, β -CN : BSA=1 : 200)。结合 MALDI-TOF MS 方法, 分别从 mGO/CS 磁珠处理后的人血清和脱脂乳中鉴定出来源于 80 个 N-糖蛋白的 83 个 N-糖肽和 10 个磷酸化肽(见图 4)。

Deng 和 Sun 课题组^[53]先将 $\text{Zr}(\text{OH})_4$ 和 $\text{Ti}(\text{OH})_4$ 同时涂覆在所制备的 Fe_3O_4 纳米粒子的表面上, 之后通过水热反应得到 Fe_3O_4 @ ZrO_2 / TiO_2 , 最后通过 Zr-S 和 Ti-S 键将谷胱甘肽接枝到表面得到 FZT-GSH。该复合物能通过多种金属的 MOAC 作用富集磷酸化肽, 同时通过 GSH 的强亲水性对糖肽进行富集, 对磷酸化肽具有较低的检出限($0.5 \text{ fmol}/\mu\text{L}$)和较高的选择性(β -CN : BSA=1 : 50 000), 对糖基化肽也具有较好的富集效率(检出限为 $0.1 \text{ fmol}/\mu\text{L}$)和选择性(HRP : BSA=1 : 50 000)。利用该材料在 $100 \mu\text{g}$ 的 HeLa 细胞消化液中捕获了 1 177 个磷酸化肽和 438 个糖基化肽, 同时还检测到宫颈癌的标记蛋白。可以利用该材料快速识别和检测已报道的宫颈癌生物标志物, 从而进一步诊断宫颈癌或筛选潜在的生物标志物。

2 总结与展望

通过调研最近五年基于各类新型磁性材料为吸附剂的 MSPE 技术及其在磷酸化和糖基化蛋白质/肽富集方面的发展状况, 得出以下结论和展望。

① 新型磁性富集材料的开发对于磷酸化和糖基化蛋白质/肽的分离富集至关重要。以 MXene 为例, 其在电池与催化领域已被证实有良好的性能, 但之前鲜有报道将其应用于磷酸化蛋白分离富集。Ye 和 Ou 课题组^[54]开创了 MAX 和 MXene 在磷酸化蛋白/肽富集领域的应用, 但非磁性材料的富集过程涉及较繁琐的离心, 需要相对大量的吸附剂, 且虽然 MAX 材料表现出良好的磷酸化肽富集能力, MXene 的富集效果并不理想。本课题组^[23]通过原位氧化生长法制备了磁性 MXene 纳米片 Ti_3C_2 - Fe_3O_4 , 利用 Ti-O 和

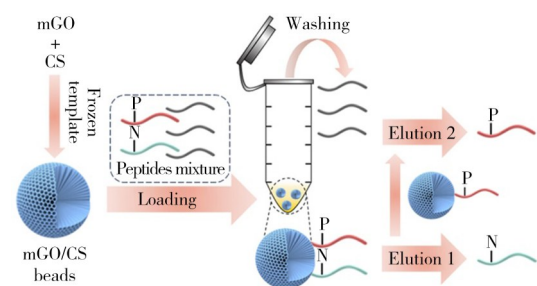


图 4 磷酸化和糖基化蛋白质/肽同时富集、顺序洗脱流程^[52]

Fig. 4 Simultaneous enrichment and sequential elution of phosphoproteins/peptides and glycoprotein/peptides^[52]

Fe₃O₄提供的MOAC作用以及亲水性的Ti₃C₂T_x纳米片提供的亲水相互作用实现对磷酸化肽的分离富集，成功实现了未修饰的MXene在磷酸化肽富集领域的应用。另外，在糖蛋白富集领域，近十年来基于HILIC作用的材料也在不断被开发，与传统的糖蛋白/肽段富集的策略相比，HILIC材料的可修饰亲水基团种类繁多，如酰胺、二醇、磺酸盐、叠氮基和氨基酸，结合葡萄糖、麦芽糖、琼脂糖、纤维素、壳聚糖和环糊精等不同的糖基配体，能够实现较高的富集效率。此外，HILIC分离富集策略具有操作简单、选择性高等优势。

② 磁性材料的尺寸、单分散性、溶解度等主要物理化学因素显著影响了其对蛋白富集的效率，而这些性质又直接受到材料合成和功能化方法的影响。合成不同材料的各种方法在时间、产率、成本和可扩展性方面各有优缺点。因此，需要系统地优化合成变量(起始反应物的浓度和类型、反应时间、压力、温度等)以合成出选择性高、效率高、稳定性好的磁性纳米材料。以IMAC法为例，磁性富集材料正向着简化配体的修饰过程、增加配体的修饰密度、增强金属离子固定能力等方面发展，一般选择高价态、高配位数的金属离子，这些离子与螯合基团具有较强的亲和能力，且未被占据的位点可与磷酸基团进行配位，进一步增加结合磷酸化蛋白/肽段的能力。

③ 前文提到，对于一些材料，其分离机理尚未研究透彻，因此对于这类材料未来需要加强机理研究。一方面，通过对材料本身的表征对其表面基团进行基本判断，对比材料吸附洗脱前后的表征结果进行机理研究；第二方面，可以选择不同的模型化合物，通过材料对不同模型化合物富集效果的变化来推测其作用机理；此外，还可将材料作为色谱固定相装入玻璃或不锈钢毛细管中，结合液相色谱，改变流动相的组成，通过观察液相色谱保留行为检验被分析物与固定相的相互作用。例如，本课题组^[55]将磁性纳米材料装入玻璃毛细管中，通过改变材料中成分比例、模型化合物和色谱条件，考察Fe₃O₄/C与多环芳烃的作用机理。

④ 利用两种材料组合或同种材料富集磷酸化和糖基化蛋白质甚至N-和O-磷酸化/糖基化蛋白质是目前基于磁固相萃取方法富集的热点研究方向之一，材料因而向着多功能化、多官能团化的复合亲和材料发展。然而，同时富集时的非特异性仍然是一个问题，需要通过富集方案的优化来进行顺序洗脱，特别是上样、洗涤和洗脱缓冲液。此外，近五年对于磷酸化和糖基化蛋白的磁固相萃取方法多是基于肽段层面的Bottom-up策略进行研究，而在蛋白质水平上的Top-down策略可以研究每个翻译后修饰之间的完整分子信息和干扰，富集完整磷酸化/糖基化蛋白的新型材料和方法还有待发展。

⑤ 开发磷酸化/糖基化蛋白/肽段富集的新应用领域也是其未来的重要发展趋势。如前文所述，大多富集的应用领域在于临床疾病的标志物筛查和早期诊断，磷酸化蛋白/肽段富集材料的实际应用多是针对脱脂乳或人血清，糖基化蛋白/肽段的富集材料则多是应用于人血清或人唾液样品。近年来，蛋白质组学与环境科学研究交叉形成了环境蛋白质组学的策略，其主要目标是界定环境污染物对人产生的毒性，研究污染物对机体蛋白的作用位点与方式。本课题组^[17]开发并利用MNFO-S和MNFO-L两种亲和探针，从大气细颗粒物PM_{2.5}刺激过的HL 7702细胞裂解液的酶解液中选择性分离和富集全/单磷酸化肽，并进行质谱分析。在较低的蛋白水平上，发现刺激后的细胞信号转导通路中磷酸化蛋白质的表达发生改变。此外，中药注射液在临床应用中的药物不良反应不容忽视，在所有可能引起不良反应的因素中，来自植物和动物的蛋白质残余物等大分子成分具有潜在的风险，特别是来自植物的蛋白质残余物。在对中药注射液样品的蛋白质研究中，如何从复杂基质中分离富集磷酸化蛋白/肽至关重要。本课题组^[23]利用开发的Ti₃C₂-Fe₃O₄材料实现了磷酸化肽在清开灵中药注射液中的有效富集，验证了该材料在中药的复杂基质中富集磷酸化肽的性能。

综上，作为蛋白质组学的重要组成部分，对于磷酸化和糖基化蛋白质的研究至关重要，合适的分离富集方法是对其进行深入研究的基础，期望未来对其分离富集的磁固相萃取方法能够得到进一步的发展，与各类检测方法、生物信息学技术等有机结合，以推动蛋白质组学研究的突破。

参考文献:

- [1] Huang B L, Liu Y, Yao H W, Zhao Y F. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2020**, 145: 53–63.
- [2] Liu X R, Zhang Y P, Wang Y J, Yang M W, Hong F F, Yang S L. *Biomolecules*, **2021**, 11(7): 1009.
- [3] Lubomirov L T, Gagov H, Schroeter M M, Wiesner R J, Franko A. *Physiol. Rep.*, **2019**, 7(3): e13975.
- [4] Junqueira S C, Centeno E G Z, Wilkinson K A, Cimarosti H. *Biochim. Biophys. Acta BBA–Mol. Basis Dis.*, **2019**, 1865(8): 2001–2007.
- [5] Stefanoska K, Gajwani M, Tan A R P, Ahel H I, Asih P R, Volkerling A, Poljak A, Ittner A. *Sci. Adv.*, **2022**, 8(27): eabl8809.
- [6] Austria E S, Lamorena R B, Arco S D. *Microchem. J.*, **2024**, 201: 110663.
- [7] Xie Z H, Feng Q S, Zhang S, Yan Y H, Deng C H, Ding C F. *Proteomics*, **2022**, 22(23/24): 2200070.
- [8] Wang B C, Yan Y H, Ding C F. *J. Chromatogr. A*, **2022**, 1671: 462971.
- [9] Jiang B, Gao B, Wei S X, Liang Z, Zhang L H, Zhang Y K. *Chin. J. Chromatogr.* (江波, 高博, 魏淑娴, 梁振, 张丽华, 张玉奎. 色谱), **2024**, 42(7): 623–631.
- [10] Liu L Y, Qin H Q, Ye M L. *Chin. J. Chromatogr.* (刘璐瑶, 秦洪强, 叶明亮. 色谱), **2021**, 39(10): 1045–1054.
- [11] Zheng H W, Lin H, Chen X F, Tian J J, Pavase T R, Wang R Q, Sui J X, Cao L M. *TrAC Trends Anal. Chem.*, **2020**, 129: 115952.
- [12] Zhu Z Y, Fu H, Zhao Y, Yan Q L. *J. Funct. Biomater.*, **2024**, 15(6): 158.
- [13] Li J Y, Long X Y, Sheng D, Lian H Z. *Talanta*, **2020**, 208: 120437.
- [14] Li X S, Yuan B F, Feng Y Q. *TrAC Trends Anal. Chem.*, **2016**, 78: 70–83.
- [15] Chang W Y, Ouyang X L, Zhong H, Liu D X, Deng D W, Xie Z Y. *Adv. Mater. Interfaces*, **2021**, 8(24): 2101157.
- [16] Gao L, Tao J, Qi L K, Jiang X Y, Shi H F, Liu Y H, Di B, Wang Y J, Yan F. *Anal. Chim. Acta*, **2022**, 1195: 339430.
- [17] Li J Y, Cao Z M, Hua Y, Wei G, Yu X Z, Shang W B, Lian H Z. *Anal. Chem.*, **2020**, 92(1): 1058–1067.
- [18] Thawornpan P, Jumpathong W, Thanapongpichat S, Tansila N, Win T A, de Jong L, Buncherd H. *Anal. Lett.*, **2021**, 54(11): 1826–1839.
- [19] Cao L C, Zhao Y M, Chu Z Y, Zhang X M, Zhang W B. *Talanta*, **2020**, 206: 120165.
- [20] Zhang N, Sun N R, Deng C H. *Chem. Commun.*, **2020**, 56(90): 13999–14002.
- [21] Yan S, Luo B, Cheng J, Yu L Z, Lan F, Wu Y. *J. Mater. Chem. B*, **2022**, 10(46): 9671–9681.
- [22] Li J Y, Zhang S, Gao W, Hua Y, Lian H Z. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **2020**, 8(44): 16422–16429.
- [23] Zhang S, Li J Y, Gao W, Qiao J Q, Lian H Z. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2023**, 15(13): 16505–16514.
- [24] Jiang D D, Lv S Q, Qi R X, Liu J H, Duan L M. *J. Chromatogr. A*, **2022**, 1678: 463374.
- [25] Zhao Y Y, Zhang L H, Zhang L Y. *Chin. J. Anal. Chem.* (赵艳艳, 张丽华, 张丽媛. 分析化学), **2020**, 48(2): 233–239.
- [26] Ding F J, Zhao Y M, Liu H Y, Zhang W B. *Analyst*, **2020**, 145(12): 4341–4351.
- [27] Lei Q, Murshed A, Ogbuehi A C, Peng Q, Zhang Y Q, Sun F Y, Zhong Q, Jin L, Wang H. *J. Sep. Sci.*, **2022**, 45(15): 3054–3062.
- [28] Gao W, Zhang F, Zhang S, Li J Y, Lian H Z. *Sep. Purif. Technol.*, **2023**, 305: 122426.
- [29] He Y T, Zhang S S, Zhong C, Yang Y X, Li G R, Ji Y, Lin Z A. *Talanta*, **2021**, 235: 122789.
- [30] Meng L Y, Wang B, Wang B C, Feng Q S, Zhang S J, Xiong Z, Zhang S, Cai T, Ding C F, Yan Y H. *Analyst*, **2023**, 148(19): 4738–4745.
- [31] Li N, Zhang L, Shi H L, Li J R, Zhang J, Zhang Z Q, Dang F Q. *Microchim. Acta*, **2020**, 187(2): 144.
- [32] Gök V, Topel Ö, Aksu S. *New J. Chem.*, **2022**, 46(30): 14466–14478.
- [33] Liu B, Wang B C, Yan Y H, Tang K Q, Ding C F. *Microchim. Acta*, **2021**, 188(2): 32.
- [34] Fang X W, Liu X G, Sun N R, Deng C H. *Talanta*, **2021**, 233: 122587.
- [35] Ouyang M L, Yan Y H, Wu J N, Ding C F. *Anal. Lett.*, **2023**, 56(6): 1016–1030.
- [36] Yu L Z, Luo B, Li Z Y, He J, Lan F, Wu Y. *J. Mater. Chem. B*, **2020**, 8(6): 1266–1276.
- [37] Zhang J F, Xu W H, Ma J T, Jia Q. *J. Chromatogr. A*, **2023**, 1697: 463992.
- [38] Wang B, Wang B C, Feng Q S, Fang X, Dai X H, Yan Y H, Ding C F. *Microchim. Acta*, **2022**, 189(9): 330.
- [39] Zhou S, Peng Y, Chen Y P, Jia Q. *Chin. J. Anal. Chem.* (周丝, 彭宇, 陈燕萍, 贾琼. 分析化学), **2023**, 51(6): 1051–1060.
- [40] Luo B, Yu L Z, Li Z Y, He J, Li C J, Lan F, Wu Y. *J. Mater. Chem. B*, **2020**, 8(36): 8414–8421.
- [41] Chen C C, Su W C, Huang B Y, Chen Y J, Tai H C, Obena R P. *Analyst*, **2014**, 139(4): 688–704.
- [42] Xu Z X, Wu Y L, Deng Z Q, Long J, Sun N R, Deng C H. *Talanta*, **2021**, 234: 122713.
- [43] Zhao B F, Xu W H, Ma J T, Jia Q. *Chin. Chem. Lett.*, **2023**, 34(3): 107498.
- [44] Yi L H, Wang B C, Feng Q S, Yan Y H, Ding C F, Mao H. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2023**, 415(9): 1741–1749.
- [45] Li P, Li Z, Zhang D W, Jia Q. *Chin. Chem. Lett.*, **2023**, 34(3): 107619.

- [46] Li Z Y, Gao Y C, An P, Lan F, Wu Y. *Mater. Des.*, **2022**, 217: 110584.
- [47] Su P, Li M, Li X, Yuan X Y, Gong Z, Wu L Q, Song J Y, Yang Y. *J. Chromatogr. A*, **2022**, 1667: 462869.
- [48] Luo B, Li G H, Li Z Y, He J, Zhou J, Wu L J, Lan F, Wu Y. *J. Mater. Chem. B*, **2021**, 9(32): 6377–6386.
- [49] Wang B C, Liu J M, Yan Y H, Ding C F, Tang K Q. *Microchim. Acta*, **2021**, 188(10): 336.
- [50] Zhang C, Jin X D, Wang L P, Jin C Z, Han X Q, Ma W F, Li X G, Teng G X. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2021**, 13(8): 9714–9728.
- [51] Pan Y N, Zhang C H, Xiao R L, Zhang L Y, Zhang W B. *Anal. Chim. Acta*, **2021**, 1158: 338412.
- [52] Gao W, Zhang F, Zhang S, Li J Y, Lian H Z. *ACS Appl. Nano Mater.*, **2023**, 6(17): 15563–15573.
- [53] Chu H M, Zheng H Y, Sun N R, Deng C H. *Anal. Chim. Acta*, **2022**, 1195: 338693.
- [54] Li X W, Zhang N, Tang R Z, Lyu J W, Liu Z, Ma S J, Ou J J, Ye M L. *Nanoscale*, **2021**, 13(5): 2923–2930.
- [55] Yang J, Li J Y, Qiao J Q, Lian H Z, Chen H Y. *J. Chromatogr. A*, **2014**, 1325: 8–15.

(责任编辑: 丁 岩)