

一种用于磷酸肽鉴定和磷酸化位点定位的新型自动化、高选择性磷酸肽富集方法

作者

Valery G. Voinov 和
Joseph S. Beckman
e-MSion Inc.
美国俄勒冈州科瓦利斯基

Shuai Wu, Kenneth Newton,
Linfeng Wu, Jordy J. Hsiao
安捷伦科技有限公司,
美国加利福尼亚州圣克拉拉市

前言

由于手动样品前处理的重现性和选择性容易变化，因此磷酸肽富集是 LC/MS 分析中最具挑战性的样品前处理步骤之一。多种因素导致磷酸肽样品的 LC/MS 分析可能具有挑战性，其中包括：

- HPLC 系统表面或溶剂中的金属离子可能形成磷酸肽-金属离子络合物，这将严重抑制磷酸肽峰。这种效应会严重影响磷酸肽鉴定，尤其是多磷酸化肽的鉴定
- 磷酸肽的电离效率是另一个经常论及的问题。在与非磷酸化肽的复杂混合物中，磷酸肽的电离效率要低得多
- 磷酸基团是不稳定的翻译后修饰 (PTM)，在使用 CID 进行碎裂时通常以磷酸形式被消除。这种磷酸中性丢失通常是主要的碎裂模式，导致肽主链碎裂中缺少位点特异性信息，使得磷酸肽中的磷酸化位点难以定位

在人类蛋白质组计划 (HPP) 的磷酸肽挑战赛中，参与的每个实验室都收到两个样品瓶。标有“磷酸肽”的样品瓶中含一组带有不同浓度的人类序列的合成磷酸肽，它们与各自对应的非磷酸化形式混合。某些肽存在不止一种磷酸化形式。第二个样品瓶标有“磷酸肽-酵母”，其中含处于 6 μ g 胰蛋白酶酶解的酵母裂解液中的相同肽。每个样品瓶均以干燥形式提供。这项研究要求 HUPO 成员使用不同的方法进行肽序列分析。每个实验室需要鉴定样品中的肽，并确定每种肽上磷酸化位点的数量和位置。每个实验室需要通过与非磷酸化对应物的比较，来确定每个修饰位点磷酸化的相对丰度。第三项要求包括从包含酵母基质的样品中富集磷酸肽，并利用 MS 进行重新分析（图 1）。根据这项研究，HUPO 提供了一个包含 89 种人类肽序列的列表以及一个用于记录肽鉴定、磷酸位点定位、相对定量和富集结果的工作表。

Agilent AssayMAP Bravo 平台使用高容量 Fe(III)-NTA 小柱提供了一种全自动化的高选择性磷酸肽富集工作流程。该自动化平台使用微量色谱柱，使用户在样品量很少的情况下，仍然能够在常规工作流程中轻松富集磷酸肽。利用 Agilent 1290 Infinity II LC 联用配备静电磁 (EMS) ECD 检测池的 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS 进行样品分析。为改善磷酸肽的峰形和回收率，在 HPLC 流动相中加入

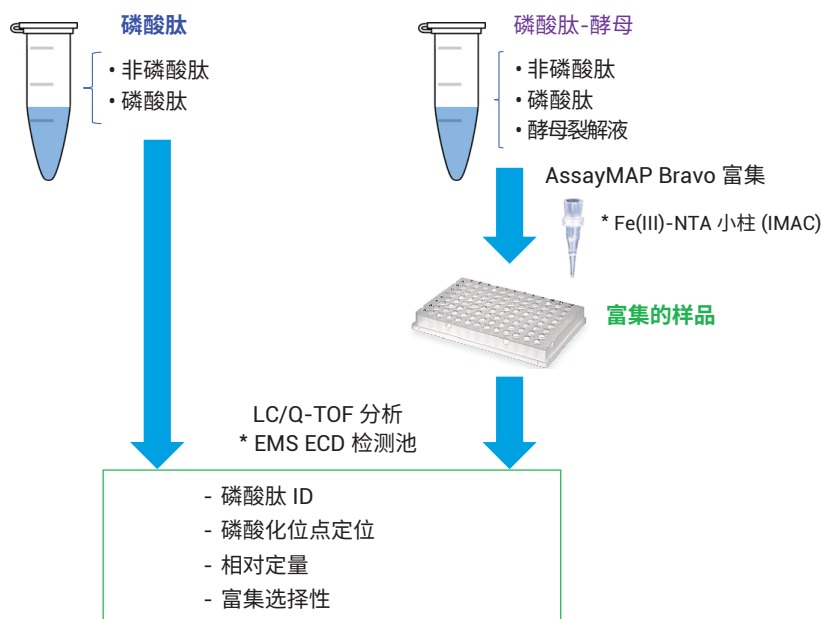


图 1. HUPO 磷酸肽挑战赛实验设计

Agilent InfinityLab 去活剂添加剂。使用数据依赖型采集 (DDA) 进行肽鉴定，并利用 Agilent Spectrum Mill B.06 软件分析数据。通过 DDA 完成肽鉴定后，使用配备 ECD 的靶向 MS/MS 分析磷酸位点定位，并采用 Byonic 软件 (Protein Metrics, Cupertino, CA, USA) 根据 HUPO 序列列表对数据进行处理。使用单次 MS1 扫描、由 DDA 生成的质谱库以及 Skyline 软件 (MacCoss 团队，华盛顿大学，美国华盛顿州西雅图) 进行磷酸肽相对定量。基于总体的特有磷酸肽数量与 HUPO 序列表中的磷酸肽数量，对富集选择性进行评估。

实验部分

材料

两个样品瓶来自 HUPO：

- “磷酸肽”包含一组以不同浓度合成的人类序列来源的磷酸化 (Ser、Thr 或 Tyr) 肽，它们与其非磷酸化对应物混合。某些肽存在不止一种磷酸化形式。HUPO 提供了 89 个肽序列
- “磷酸肽-酵母”在背景基质中包含相同的肽，该基质由 6 μ g 胰蛋白酶酶解的酵母裂解液组成

AssayMAP Fe(III)-NTA 小柱购自安捷伦科技有限公司（美国加利福尼亚州圣克拉拉市）。其余全部化学品均购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。

使用 AssayMAP Bravo 进行磷酸肽富集和净化

将“磷酸肽-酵母”样品瓶复溶于 100 µL 80% ACN（含 0.1% TFA）中。将样品超声处理 2 分钟，然后转移至 96 孔 PCR 板的位置 A1。

利用 Agilent AssayMAP 磷酸肽富集 2.0 版应用程序，通过 Fe(III)-NTA 小柱进行自动化磷酸肽富集。图 2 显示了用户界面和应用程序设置。将一根 Fe(III)-NTA 小柱预转移至 A1 的台板位置 2。根据实验室器皿表选择实验室器皿，不同的是在台板位置 4 和 9 处使用 LoBind 96 Eppendorf 板。在 300 µL/min 的高流速下，用 100 µL 50% 的 ACN（含 0.1% TFA）灌注小柱。随后，使用含 0.1% TFA 的 80% ACN（与结合缓冲液的溶剂相同）对小柱进行平衡（表 1）。将样品加载到小柱上是至关重要的一步。根据我们之前的研究，将流速设置为 3.0 µL/min，以便提供足够长的时间高效结合磷酸肽。上样后，采用包含 0.1% TFA 的 80% ACN 对内部小柱进行洗脱。用 20 µL 1% 氢氧化铵（pH 约 11）将富集的磷酸肽直接洗脱到包含 80 µL 2.5% 甲酸的 LoBind PCR 板中（表 1 和图 2）^[1]。

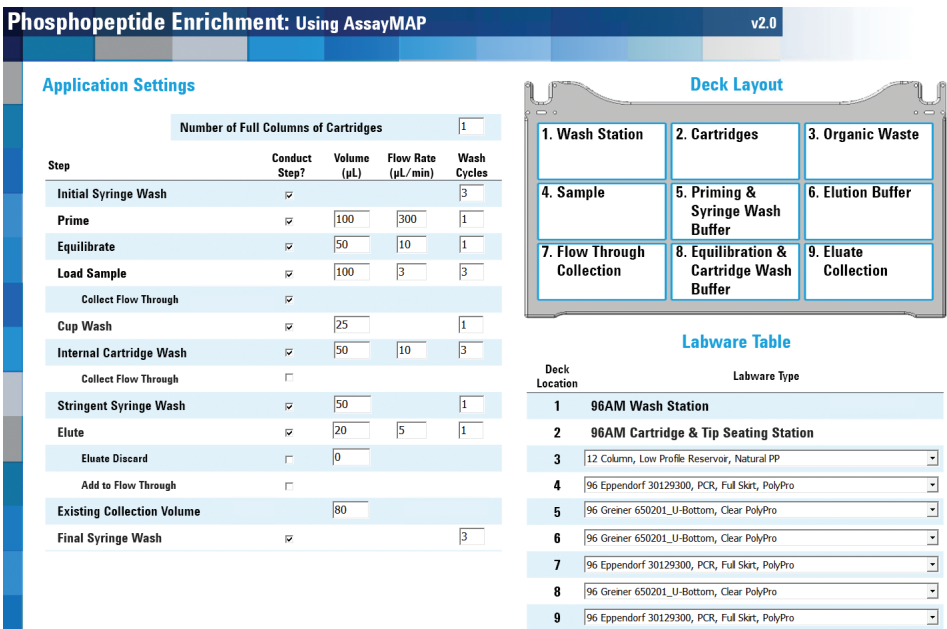


图 2. AssayMAP Bravo 磷酸肽富集 2.0 版应用程序

表 1. 使用 AssayMAP Bravo 的磷酸肽富集和净化方案

	磷酸肽富集	肽段净化
Affinity 基质	IMAC	反相
树脂体积	5 µL	5 µL
担体	Fe(III)-NTA, 100 nmol Fe(III)	C18
灌注缓冲液	50% ACN（含 0.1% TFA）水溶液	50% ACN（含 0.1% TFA）水溶液
平衡缓冲液	80% ACN（含 0.1% TFA）水溶液	0.1% TFA 水溶液
上样缓冲液	80% ACN（含 0.1% TFA）水溶液	甲酸铵水溶液
上样体积	100 µL	100 µL
上样流速	3 µL/min	3 µL/min
清洗缓冲液 1	80% ACN（含 0.1% TFA）水溶液	0.1% TFA 水溶液
清洗体积 1	50 µL	50 µL
清洗次数 1	1	1
洗脱缓冲液 1	1% 氢氧化铵	70% ACN（含 0.1% TFA）水溶液
洗脱体积 1	20 µL	20 µL
现有采集体积	80 µL	0 µL

利用 Agilent AssayMAP 肽净化 2.0 版应用程序对 C18 小柱富集的磷酸肽进行脱盐（图 3）。将一根 C18 小柱预转移至 A1 的台板位置 2。根据实验室器皿表选择实验室器皿，不同的是在台板位置 9 处使用 LoBind 96 Eppendorf 板。将富集的磷酸肽板设置在台板位置 4 处。用 100 μ L 50% ACN（含 0.1% TFA）的水溶液灌注 C18 小柱，用 50 μ L 0.1% TFA 进行平衡，在 3 μ L/min 的流速下加载富集的磷酸肽样品，用 50 μ L 0.1% TFA 进行清洗，然后在 5 μ L/min 的流速下用 20 μ L 70% ACN（含 0.1% TFA）进行洗脱。将样品置于 SpeedVac 真空浓缩仪（赛默飞世尔科技有限公司，美国马萨诸塞州沃尔瑟姆）中在室温下干燥，复溶于 25 μ L 的 10% ACN（含 0.1% FA）中，并超声处理 2 分钟。用 25 μ L 0.1% FA 水溶液进一步稀释样品，使最终样品处于 50 μ L 5% ACN（含 0.1% FA）中。

使用数据依赖型采集进行肽鉴定

将“磷酸肽”样品复溶于 25 μ L 10% ACN（含 0.1% FA）中。将样品瓶涡旋混合，并超声处理 2 分钟。用 25 μ L 0.1% FA 进一步稀释样品，使最终样品处于 50 μ L 5% ACN（含 0.1% FA）中。

通过与 Agilent Infinity UHPLC Nanodapter 联用，将 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 ESI 离子源，并与 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS 联用进行肽鉴定（图 4）。

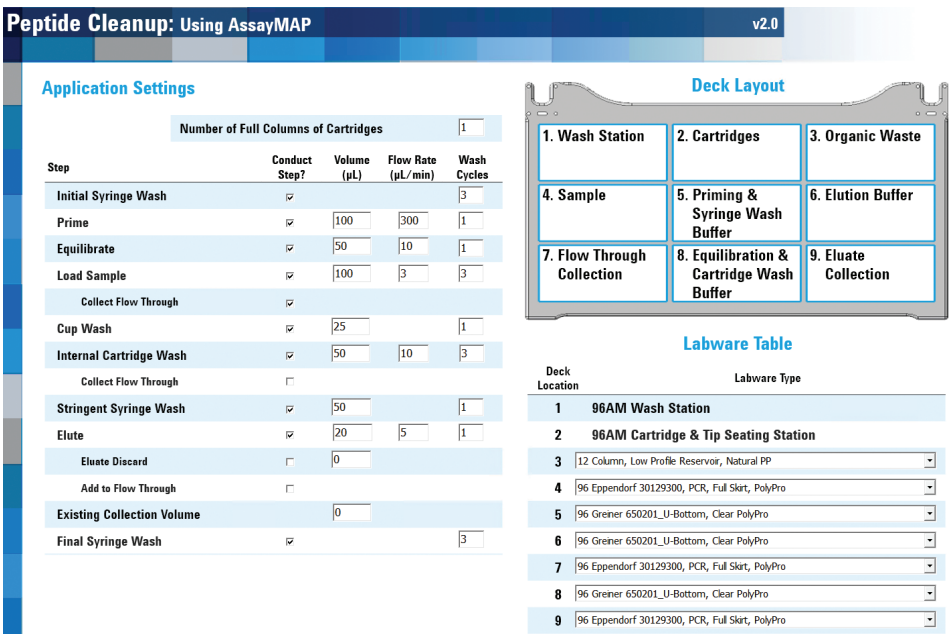


图 3. Agilent AssayMAP Bravo 肽净化 2.0 版应用程序



图 4. 借助 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC，Nanodapter 将标准流速液相色谱系统转换为纳流液相色谱系统

表 2 列出了 LC 参数。Nanodapter 配置为直接进样模式。75 μm \times 25 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 分钟的梯度进行肽分离^[2]。为增强磷酸肽的色谱性能并最大程度减小离子抑制，将 0.1% InfinityLab 去活剂添加剂加入溶剂 A 中^[3]。为实现肽鉴定，进样分析 2 μL 的“磷酸肽”和富集的“磷酸肽-酵母”样品，且每个样品重复进样三次。对一系列前 15 种母离子进行数据依赖型采集。表 3 列出了使用 CID 进行 DDA 的 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS 的详细设置。

表 2. 纳流液相色谱参数

液相色谱条件													
Nanodapter 配置	直接进样模式												
保护柱	PepMap C18, 75 μm \times 2 cm												
分析柱	PepMap C18, 75 μm \times 25 cm												
柱温	60 $^{\circ}\text{C}$												
溶剂 A	0.1% 甲酸（含 0.1% 去活剂）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												
Q-TOF 梯度	<table> <tr> <th>时间 (min)</th><th>B (%)</th></tr> <tr> <td>0</td><td>3</td></tr> <tr> <td>90</td><td>37</td></tr> <tr> <td>95</td><td>70</td></tr> <tr> <td>97</td><td>70</td></tr> <tr> <td>100</td><td>3</td></tr> </table>	时间 (min)	B (%)	0	3	90	37	95	70	97	70	100	3
时间 (min)	B (%)												
0	3												
90	37												
95	70												
97	70												
100	3												
停止时间	115												
后运行时间	5												
进样量	2 μL （用于 CID），4 μL （用于 ECD），1 μL （用于 MS1）												

表 3. Agilent 6550 iFunnel Q-TOF 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		
干燥气温度	200 °C		
干燥气	11 L/min		
采集模式	扩展动态范围 (2 GHz) <i>m/z</i> 100–1700 高分析灵敏度		
	MS	MS/MS	
质量数范围	<i>m/z</i> 300–1700	<i>m/z</i> 50–1700	
采集速率	3 幅谱图/秒	> 3 幅谱图/秒	
分离峰宽	中等 (约 4 <i>m/z</i>)		
碰撞能量	(斜率)•(<i>m/z</i>)/100+ 偏移 电荷 斜率 偏移 2 3.1 1 3 3.6 –4.8 > 3 3.6 –4.8		
最大母离子/循环	15		
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	仅按丰度进行排序；+2，+3，> +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%		

利用 Spectrum Mill 搜索 Swiss-Prot 人类蛋白质数据库，假阳性率为 1.5%。胰蛋白酶是消化酶，最多允许两个漏切位点。将氨甲酰甲基化设置为固定修饰，而将丝氨酸 (S)、苏氨酸 (T) 和酪氨酸 (Y) 的 N-端乙酰基、脱酰胺基化 (N) 以及磷酸化设置为可变修饰。表 4 列出了详细的搜索参数。

使用 ECD 进行磷酸化位点定位

ECD 检测池设计为与较短的六极杆碰撞池合并，以取代安捷伦 Q-TOF 系统中的原始六极杆碰撞池。短碰撞池结合的 ECD 检测池长度与原始碰撞池的长度相同（图 5）。利用肽标准物质 P 对 ECD 信号进行调谐，使 +2 电荷态的转化率为 1% 左右。尽管采集在零外加碰撞能量下完成，但 ECD 实验所用的设置相当于施加的碰撞能量约为 5 eV。

使用由 DDA 实验鉴定出的磷酸肽列表，生成包含 *m/z*、电荷态、保留时间、Δ 保留时间、分离宽度和采集时间的母离子的目标列表。将碰撞能量设为 0 eV，并在一次运行中将相同的母离子碎裂四至五次。利用 Byonic 进行数据分析。从目标 MS/MS 列表中删除首次运行中鉴定出的磷酸肽，并通过更多次进样对未鉴定的磷酸肽开展进一步的实验。

表 4. Spectrum Mill 搜索参数

Spectrum Mill 搜索参数		
数据库	Swiss-Prot 人类蛋白质	
酶	胰蛋白酶	
最多漏切位点	2	
修饰	固定 氨甲酰甲基化	可变 乙酰基 (N-端) 脱酰胺基化 (N) 磷酸化 (S) 磷酸化 (T) 磷酸化 (Y)
质量容差	MS1 15 ppm	MS2 30 ppm
最大不明确的母离子电荷	5	
计算出的反向数据库得分	是	
动态峰阈值	是	
肽 FDR	1.50%	
母离子电荷范围	2-7	

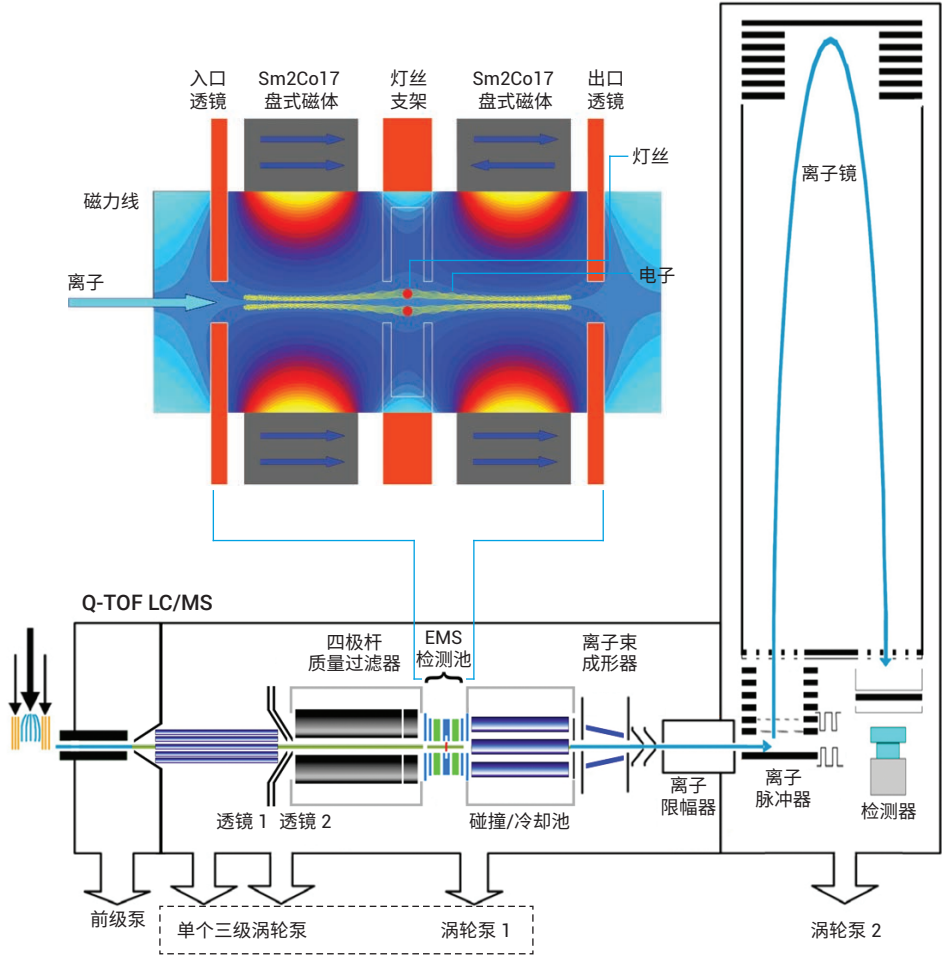


图 5. 静电磁 (EMS) ECD 检测池及其在安捷伦 Q-TOF LC/MS 中的位置示意图

利用 Byonic 软件分析 ECD 质谱图。将相同的 Swiss-Prot 人类蛋白质数据库与胰蛋白酶一起用作酶，最多允许两个漏切位点。将氨甲酰甲基化设置为固定修饰，而将丝氨酸(S)、苏氨酸(T)和酪氨酸(Y)的脱酰胺基化(N、Q)以及磷酸化设置为可变修饰。

每个修饰位点的磷酸化的相对定量

在进样量为 1 μL 的情况下，使用相同的 LC 梯度对“磷酸肽”样品实施三次重复的 MS1 实验。首先将 DDA 数据导入 Skyline 中，并创建肽 CID 质谱库。然后将完整的 MS1 数据导入 Skyline 中，并基于 MS1 扫描对鉴定出的肽峰进行积

分。将峰面积（或 +2 和 +3 母离子的离子强度）导出至 Excel 中，并对非磷酸肽和磷酸肽（包括其脱酰胺基形式）的峰面积求和。根据离子强度比计算每个磷酸化位点的磷酸肽/非磷酸肽比率。

结果与讨论

利用 Spectrum Mill 分析 DDA 数据

图 6A 显示了采用 90 分钟梯度获得的“磷酸肽”样品的总离子流色谱图(TIC)。在三次重复进样后，利用 Spectrum Mill 通过 DDA 鉴定出 437 种特有肽段，其中包含 294 种特有磷酸肽（表 5）。为评估分析结果，HUPO 提供了 89 个肽序列的

列表。从“磷酸肽”样品中鉴定出 89 种非磷酸肽。使用 CID 还能鉴定出它们的磷酸化对应物，但未确认大多数磷酸化位点。使用相同方法对富集的“磷酸肽-酵母”样品进行了分析。图 6B 显示了使用 90 分钟梯度获得的富集“磷酸肽-酵母”样品的 TIC。表 5 列出了“磷酸肽”和富集的“磷酸肽-酵母”样品的详细搜索结果，其中包括每次重复测定的搜索结果以及合并的搜索结果。经过富集后，共鉴定出 287 种特有肽段和 264 种特有磷酸肽。相对于总体肽 ID 数量，富集的选择性（磷酸肽/肽）约为 92%。

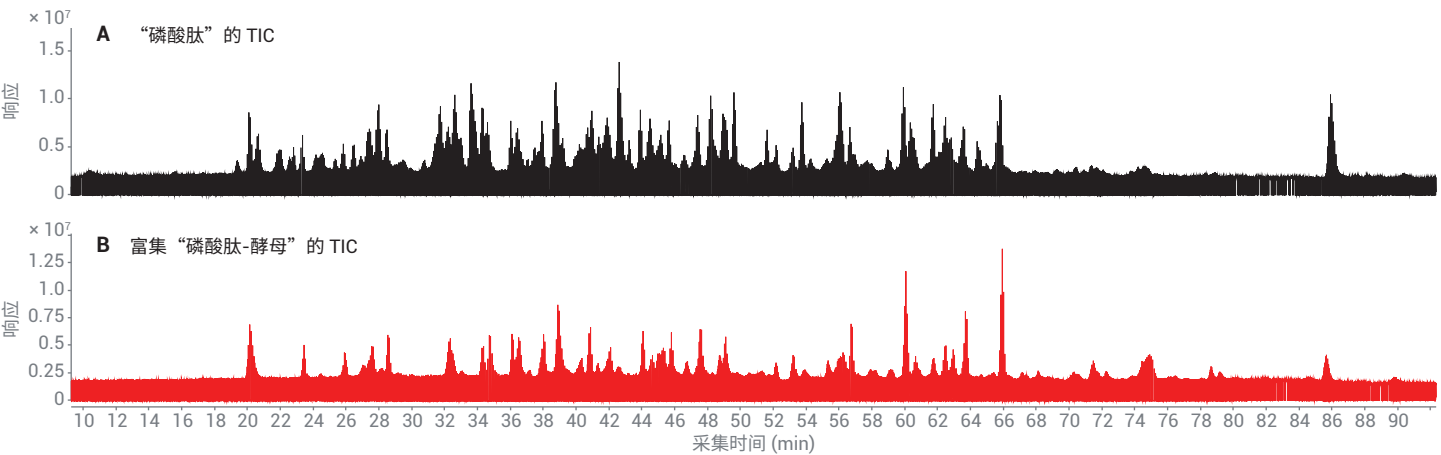


图 6. A) 使用 90 min 梯度得到的“磷酸肽”样品的 TIC，B) 使用 90 min 梯度得到的富集的“磷酸肽-酵母”样品的 TIC

表 5. Spectrum Mill 搜索结果

	“磷酸肽”				富集的 “磷酸肽-酵母”			
	重复测定 1	重复测定 2	重复测定 3	组合	重复测定 1	重复测定 2	重复测定 3	组合
特有肽段总数	316	297	308	437	193	203	203	287
特有磷酸肽总数	195	182	193	294	179	192	189	264
单磷酸化	123	125	127		117	127	123	
二磷酸化	63	50	58		52	56	53	
三磷酸化	8	6	7		8	8	12	
四磷酸化	1	1	1		2	1	1	
磷酸肽/肽总数 (%)	61.7	61.3	62.7	67.3	92.7	94.6	93.1	92.0
磷酸化位点总数	277	247	268		253	267	269	
已归属的位点 (%)	63	61.9	63.7	62.9	62.4	63.4	62.4	62.7
未归属的位点	102	94	97		95	98	101	

使用 Byonic 分析 ECD 质谱图

以肽 VVEAVNSDSDSEFGIPK 分析的结果为例，说明如何定位磷酸化位点。图 7A 显示了非磷酸化肽 VVEAVNSDSDSEFGIPK 的 CID 质谱图。Spectrum Mill 鉴定出母离子 m/z 896.93 ($z = +2$ ，质量数误差 = 1.1 ppm)，该肽段不含磷酸化位点。序列匹配结果显示了 b、y 型离子对该肽段的完整序列覆盖。

图 7B、7C、7D 显示了具有相同序列但含有单磷酸化、二磷酸化和三磷酸化肽的 ECD 质谱图。在图 7B 中，Byonic 鉴定出母离子 m/z 936.92 ($z = +2$ ，质量数误差 = -0.07 ppm)，该肽段包含一个磷酸化位点。诊断离子 c6 ($m/z = 629.36$) 和 c7 ($m/z = 796.37$) 确认该肽段的磷酸化位点在丝氨酸 7 处。在图 7C 中，Byonic 鉴定出母离子 m/z 651.60 ($z = +3$ ，质量数误差 = -3.69 ppm)，该肽段包含两个磷酸化位点。诊断离子 c7

($m/z = 796.35$) 和 z11 ($m/z = 1325.45$) 以及 c9 ($m/z = 1078.37$) 和 z9 ($m/z = 1043.40$) 确认该肽段的两个磷酸化位点在丝氨酸 7 和 9 处。在图 7D 中，Byonic 鉴定出母离子 m/z 678.25 ($z = +3$ ，质量数误差 = -11.54 ppm)，该肽段包含三个磷酸化位点。诊断离子 c7 ($m/z = 796.37$)、c9 ($m/z = 918.42$) 和 z9 ($m/z = 1123.40$) 确认三个磷酸化位点在丝氨酸 7、9、11 处。具有不同磷酸化程度的肽 VVEAVNSDSDSEFGIPK 的 CID 质谱图（未显示）只能识别磷酸化位点的数量，而无法确认磷酸化位点的位置。

比较图 7B 与图 7C，发现当磷酸肽的大小增加时，具有 +3 电荷态的母离子的丰度增加，从而得到具有更高序列覆盖率的更好的 ECD 质谱图（图 7C）。具有 +2 电荷态和较低丰度的母离子产生的碎片离子较少，但我们仍能确认磷酸化位点的位置（图 7B）。比较图 7C 与图 7D，发现

在正离子模式下，具有多个磷酸化位点 (≥ 3) 的肽通常具有较低的电离效率。具有相同电荷态 (+3) 和更高丰度的母离子也得到了更好的 ECD 质谱图（图 7C）。比较图 7B 与图 7D，两种母离子具有几乎相同的丰度。具有 +3 电荷态的离子仍然比具有 +2 电荷态的离子产生更多的碎片离子。

在本研究中，HUPO 提供了 89 个肽序列的列表。在“磷酸肽”样品中，基于该序列列表以及由 ECD 确认的特有磷酸肽的总数为 96 种。此外，从富集的“磷酸肽-酵母”样品中仍鉴定出加入酵母裂解液中 96 种磷酸肽中的 95 种。该结果表明，从富集样品中回收得到大量磷酸肽。相反，富集“磷酸肽-酵母”样品后，仍然检测出 89 种非磷酸肽中的 9 种。基于肽序列表得到的富集（磷酸肽/肽）的选择性约为 91.3%。

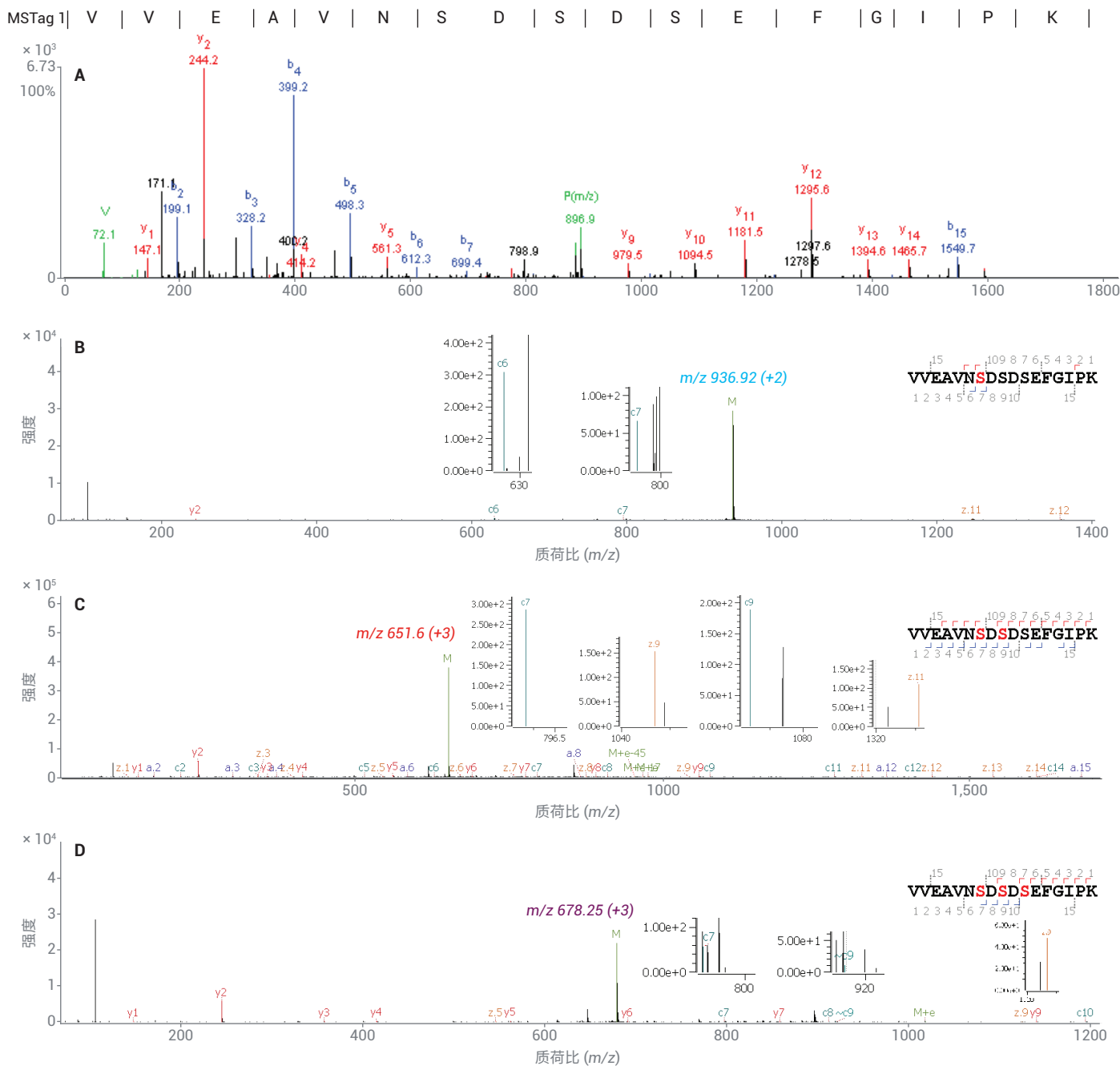


图 7. A) 肽 VVEAVNSDSDSEFGIPK 的 CID 质谱图, 显示了 b、y 型离子的完整序列覆盖。B)、C)、D) 肽 VVEAVNSDSDSEFGIPK ECD 质谱图, 其中利用 c、z 型离子定位了单磷酸化、二磷酸化和三磷酸化位点。请注意, 尽管预期低电荷态离子的电离效率较低, 但 ECD 质谱图中仍显示出大多数序列离子

肽磷酸化的相对定量

图 8 显示了具有不同磷酸化程度的肽 VVEAVNSDSDSEFGIPK 的提取离子色谱图 (EIC)。使用 C18 色谱柱和 90 分钟梯度，所有肽均得到充分分离。对于二磷酸肽和三磷酸肽，将脱酰胺化磷酸肽的离子强度与原始磷酸肽的离子强度加和。基于离子强度计算磷酸肽/非磷酸肽的相对丰度。对于肽 VVEAVNSDSDSEFGIPK，如果非磷酸肽的丰度为 1.00，则单磷酸肽、二磷酸肽和三磷酸肽的比率分别为 0.03、4.71 和 0.02，如图 8 所标注。基于磷酸肽/非磷酸肽的比率，计算“磷酸肽”样品中所有 96 种磷酸肽的每个修饰位点的磷酸化相对丰度。注意，这一相对定量未考虑到不同肽种类的不同电离效率。它仅仅比较了不同肽的离子强度。

结论

针对 HUPO 磷酸肽挑战赛，使用 Agilent AssayMAP Bravo 平台和 LC/Q-TOF 系统进行自动化磷酸肽富集以实现定性和定量分析。

执行 CID 肽鉴定实验，在“磷酸肽”样品中鉴定出 437 种特有肽段，其中包括 294 种磷酸肽。鉴定出 HUPO 序列中的所有 89 种非磷酸肽。ECD 实验基于 89 个非磷酸肽序列确定了 96 种磷酸肽的磷酸化位点。还将序列表中未列出的其余肽返回给 HUPO。

在富集的“磷酸肽-酵母”样品中，鉴定出 287 种特有肽段，其中包括 264 种特有磷酸肽。富集的总体选择性约为 92.0%。

此外，从富集的“磷酸肽-酵母”样品中仍鉴定出加入酵母中 96 种磷酸肽中的 95 种。与开展本研究中的其他实验室相比，安捷伦从富集样品中回收的磷酸肽数量最多。

参考文献

1. Russell, J. D.; Murphy, S. Agilent AssayMAP Bravo Technology Enables Reproducible Automated Phosphopeptide Enrichment from Complex Mixtures Using High-Capacity Fe (III)-NTA Cartridges (Agilent AssayMAP Bravo 技术采用高容量 Fe (III)-NTA 小柱实现复杂混合物中可重现的自动化磷酸肽富集)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-6073EN，**2016**
2. Wu, S.; Wu, L. 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**
3. Hsiao, J. J. et al., Improved LC/MS Methods for the Analysis of Metal-Sensitive Analytes Using Medronic Acid as a Mobile Phase Additive. *Anal. Chem.* **2018**, 90(15), 9457-9464

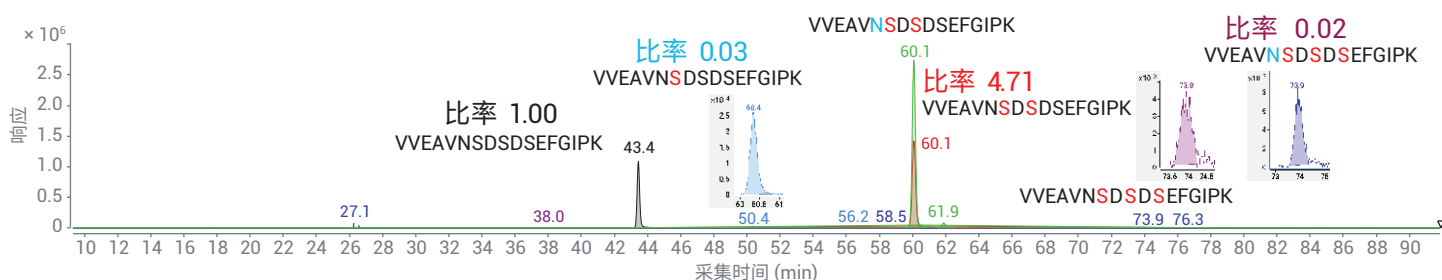


图 8. 所有 VVEAVNSDSDSEFGIPK 肽的 EIC，其中标注出磷酸肽/非磷酸肽的比率

www.agilent.com

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

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, 2019
2019 年 8 月 26 日, 中国出版
5994-1235ZHCN

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

 **Agilent**
Trusted Answers