

cIEF-MS 在负离子模式下对酸性寡糖的在线分析

目的

开发负离子模式下的毛细管等电聚焦与质谱联用 (cIEF-MS) 方法, 实现对低pI值糖胺聚糖 (GAGs) 类寡糖的在线分离和鉴定。

背景

糖胺聚糖 (GAGs) 是含有多种重复性二糖结构的线性阴离子多糖, 具有重要的生物学和药理学意义。对于这些聚糖的分析, 通常依赖于化学或者酶学手段将其降解成二糖单位, 随后通过色谱或电泳进行分离, 最后使用紫外 (UV)、荧光或者质谱 (MS) 进行检测。毛细管等电聚焦 (cIEF), 基于待分析物等电点的差异进行分离, 当与质谱联用时, 可以实现对分离后电泳峰的在线鉴定。cIEF-MS分析蛋白质和多肽多采用正离子模式, 而对于高度硫酸化的GAGs的分析, 则需探索负离子模式的分析方法。

在本研究中, 我们使用电渗流泵驱动鞘流液的EMASS-II型CE-MS联用离子源, 建立负离子模式的cIEF-MS方法, 对硫酸软骨素 (CS) 和硫酸肝素 (HS) 寡糖混合物进行分析。

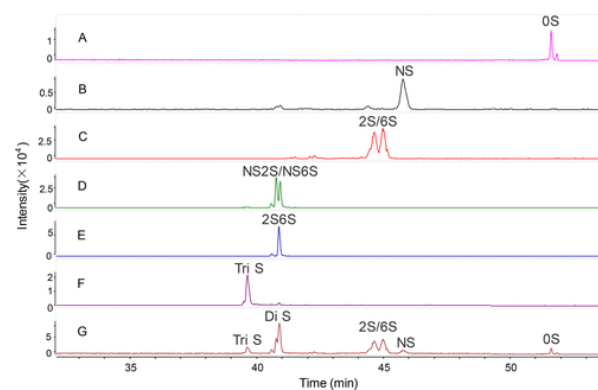
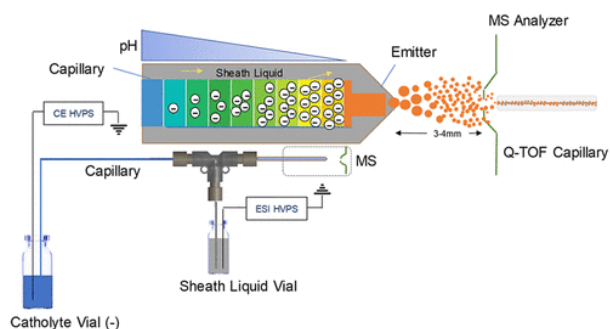


图1. 负离子模式cIEF-MS下分析8种HS二糖标准品。(A-F) 单个二糖提取离子电泳图结果。(G) 二糖混合物提取离子电泳图结果。0S代表无硫化二糖, NS、2S和6S代表单硫化二糖, NS2S、NS6S和2S6S代表二硫化二糖, Tri S代表三硫化二糖。

解决方案

仪器试剂:

CMP Scientific ECE-001 型毛细管电泳仪。EMASS-II 型 CE-MS 联用离子源 (CMP Scientific, P/N: EM3001-A)。75cm PS1 中性涂层毛细管 (CMP Scientific, P/N: E-SC-PS1-360/150-50-75-B1)。阴极电解质溶液为 0.2N 氢氧化铵与 50-70% 甲醇 (v/v) 混合溶液。阳极电解质溶液为 0.1-1% 甲酸和 50-70% 甲醇 (v/v) 混合溶液。鞘流液使用 10mM 醋酸铵与 80% 甲醇 (v/v) 混合液。

实验方法:

喷嘴外径1.0 mm, 内径0.75 mm, 末端开口15-25 μm 。喷嘴距质谱进样端距离3-4 mm。进样条件: 阳极电解质溶液冲洗毛细管 950mbar, 180 s; 样品进样950 mbar, 60 s。毛细管进样端施加电压-30 kV, 内部压力10-100 mbar。

质谱参数:

Vcap: 0 V。电喷雾电压 -1.5至-2.0kV。

结论

本实验基于分析物所带硫酸基团的差异, 建立了 cIEF-MS 在负离子模式下对HS和 CS 类聚糖进行在线分析的方法。实验结果表明 cIEF-MS 可以对低pI值的寡糖进行高效地分离和准确地鉴定。

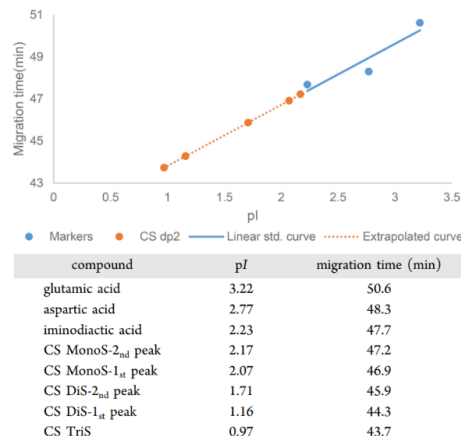


图2. cIEF-MS 负离子模式下分析物迁移时间和 pI 值呈现良好线性关系。

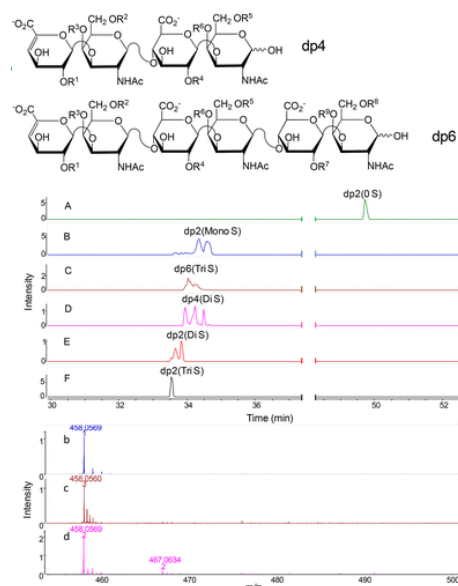


图3. 负离子模式 cIEF-MS 分析 CS 二糖混合物、四糖混合物和六糖混合物。(A/B/E/F) 分别代表二糖无硫酸化、二糖单硫酸化、二糖双硫酸化和二糖三硫酸化混合物的提取离子电泳图。(C) 六糖三硫酸化混合物的提取离子电泳图。(D) 四糖二硫酸化混合物的提取离子电泳图。(b/c/d) 分别代表B/C/D质谱图。