

定量 CZE-MS 技术对脊椎动物胚胎发育中N-聚糖变化的研究

目的

采用 BFS 裸管毛细管, 通过电渗流驱动的同轴鞘液 EMASS-II 型 CE-MS 联用离子源, 建立定量 CZE-MS 方法, 对非洲爪蛙胚胎发育过程中 N-聚糖的变化进行分析。

背景

N-聚糖在细胞表面表达, 并在广泛的生物过程中发挥重要作用, 包括炎症、细胞粘附、神经细胞相互作用和神经系统发育, 但目前对脊椎动物发育过程中N-聚糖的表达知之甚少。由于聚糖的结构复杂, 并且不具备被光学检测的结构特性, 其研究具有一定的挑战性。本方法通过使用电渗流驱动的同轴鞘液 EMASS-II 型 CE-MS 联用离子源, 建立了毛细管区带电泳 (CZE) 与高分辨质谱联用技术, 对非洲爪蛙受精卵细胞中 TMT (串联质谱标签) 标记的 N-聚糖进行定量分析, 揭示了 N-聚糖在胚胎发育中的表达变化。

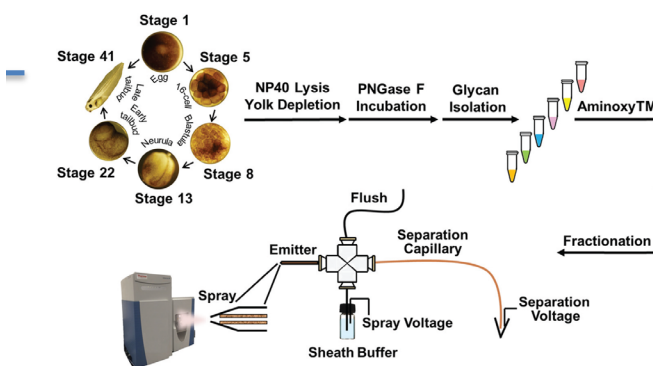


图1. 使用电渗流驱动的同轴鞘液 EMASS-II 型 CE-MS 联用离子源, 通过 CZE-ESI-MS/MS 分析平台对非洲爪蛙胚胎发育过程中 N-聚糖的变化进行定量分析。

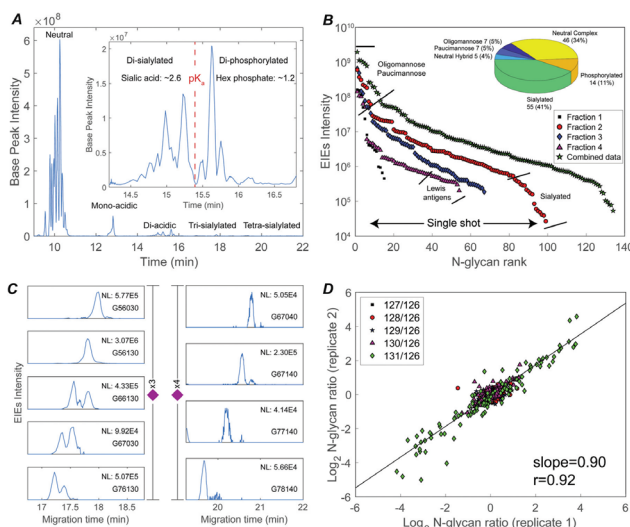


图2. 使用 CZE-MS/MS 对TMT六标处理的样品进行 N-聚糖深度分析。A 图为组分 2 的基峰电泳图 (对应 图B 中的红色圆圈所表示的组分 2), 放大图显示了双唾液酸化和双磷酸化聚糖的分离情况。B图 呈现的是 N-聚糖的动态范围, 在四个组分的单次 CZE-MS/MS 分析中, N-聚糖丰度覆盖了 3-4 个数量级的动态范围。饼图为已鉴定到的各类聚糖的占比。C图 为低丰度的三唾液酸化和四唾液酸N-聚糖提取离子电泳图 (EIE)。D图 为样品重复进样时N-聚糖丰度的重现性结果。

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-T)。60cm BFS 型无涂层分离毛细管 (CMP Scientific, P/N: E-SC-BFS-360/150-50-60-B1)。BGE 为 25mM 醋酸铵, SL 为 10% 甲醇和 0.5% 甲酸。

实验方法:

样品进样 30psi, 1s。分离电压 20kV。电喷雾电压 2kV。

质谱参数:

扫描范围 500-2,000m/z。一级质谱分辨率 30,000, AGC 目标值 3E6, 最大离子注入时间 50ms。二级质谱分辨率 15,000, AGC 目标值 3E6, 最大离子注入时间 50ms。

结果

使用 ECE-001 型毛细管电泳仪与基于电渗流驱动的同轴鞘流液 EMASS-II 型 CE-MS 联用离子源, 通过 CZE-ESI-MS/MS 分析平台对非洲爪蟾胚胎发育过程中N-聚糖的变化进行定量分析, 实验的工作流程见图1。图2为使用 CZE-MS/MS 对 TMT 六标处理的样品进行 N-聚糖深度分析的结果总结。A图 为组分 2 的基峰电泳图 (对应图B 中的红色圆圈所表示的组分 B); 放大图显示了双唾液酸化和双磷酸化聚糖的分离度。B图 呈现的是N-聚糖的动态范围, 在四个组分的单次 CZE-MS/MS 分析中, N-聚糖丰度覆盖 3-4 个数量级的动态范围。饼图为已鉴定到的聚糖各种类的占比。C图 为低丰度的三唾液酸化和四唾液酸化N-聚糖提取离子电泳图 (EIE)。(D) 样品重复进样时N-聚糖丰度的重现性结果。

总结

在本方法中, 采用 ECE-001 型毛细管电泳仪与 EMASS-II 型 CE-MS 联用离子源, 通过 CZE-MS 对非洲爪蛙胚胎细胞样品中低丰度的N-聚糖进行分析。本方法可以对N-聚糖进行高效分离并准确鉴定, 并能对含量在四个数量级的动态范围内的N-聚糖进行定量分析。实验结果表明 CZE-MS 技术对于发育生物学所涉及到的复杂糖蛋白质组学分析有巨大的应用潜力。