

CE-MS 方法对 CAR-T 疗法中生物标志物的分析

目的

采用电渗流驱动鞘流液 EMASS-II 型离子源, 利用 CE-MS 技术对吲哚胺 2, 3-二氧化酶(IDO)生物标志物进行在线分析方法的开发。

背景

在嵌合抗原受体T细胞 (CAR-T) 治疗中, 吲哚胺2, 3-二氧化酶 (IDO) 能调节T细胞的反应, 影响肿瘤治疗的有效性。在色氨酸代谢途径中, IDO 将色氨酸分解成犬尿氨酸。色氨酸、犬尿氨酸和其他下游代谢物, 这些代谢物可以作为 CAR-T 细胞治疗中 IDO 活性的生物标志物。由于大多数色氨酸代谢物极性很大, LC-MS 方法用于色氨酸代谢物的检测具有很大挑战, 通常需要先经过复杂的衍生化步骤, 以增加其在 LC 色谱柱上的保留。

本方法采用在线毛细管电泳-质谱 (CE-MS) 联用技术, 无需复杂的衍生化步骤, 直接对 IDO 的潜在生物标志物进行定量分析。CE 是一种基于电泳迁移率的分离技术, 决定电泳迁移率的因素包括分子半径、分子电荷等, 因此, CE 适合于常规液相无法保留的强极性化合物的分析。与传统的 LC-MS 相比, CE-MS 采用 EMASS-II 型 CE-MS 联用技术, 通过在毛细管出口端施加纳升每分钟级别的超低流速的鞘流液, 大幅度提高电离效率从而获得超高的灵敏度。另外, 与传统方法相比, CE 还具有理论板数高, 分离速度快等优点, 对于强极性的生物活性分子而言, CE-MS 是最理想的分析工具。

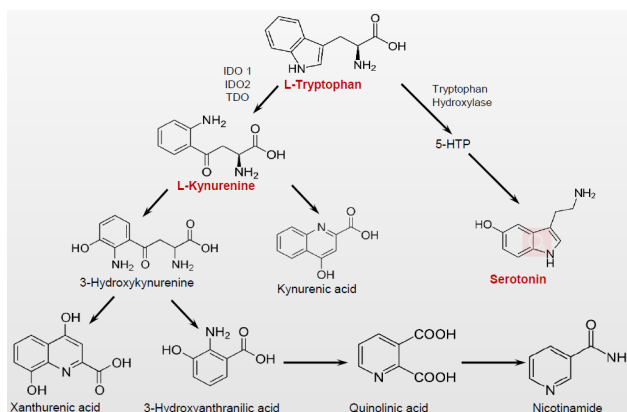


图1. 吲哚胺2, 3-二氧化酶 (IDO) 代谢通路及色氨酸的下游代谢产物。

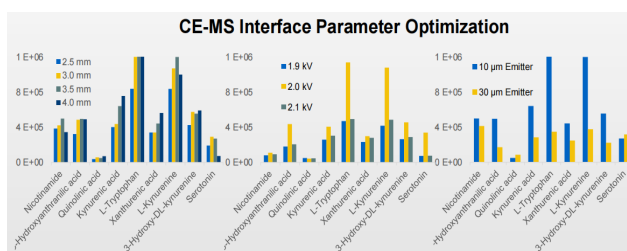


图2. 对 EMASS-II 离子源接口参数的优化结果。最终确定喷针到质谱接口的距离为 3mm, 喷针尖端口径为 10 μm, ESI 外接电源电压为 2kV 时质谱响应即灵敏度最佳。

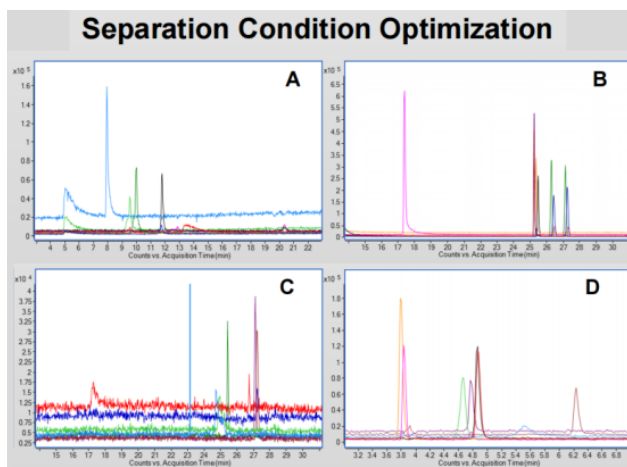


图3. 对分离缓冲液和分离毛细管柱的优化结果。以 100 μM 乙酸为分离缓冲液, 可获得最高的灵敏度。在毛细管柱筛选时可以发现, 分析物容易被裸管吸附, 而阳离子涂层毛细管可以获得有更高的灵敏度和更快的分离效率。

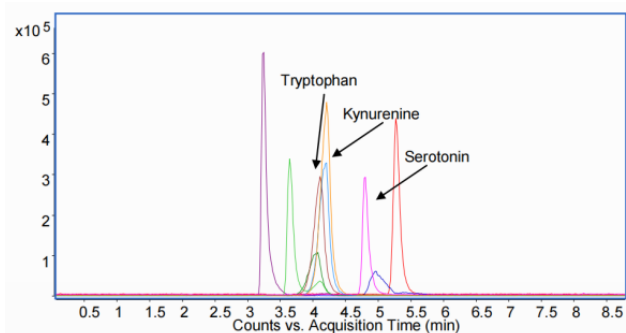


图4. 9种代谢物的提取离子电泳图 (10 μM)。

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)。70cm CC1 型阳离子涂层分离毛细管 (CMP Scientific, P/N: E-SC-CC1-360/150-50-70-B1)。BGE 为 15% 的乙酸。SL 为 0.5% 甲酸和 10% 异丙醇。

实验方法:

样品 100mbar 压力下进样 60 秒后, 施加分离电压 -30kV。ESI电压 2kV。喷针到质谱距离 3mm (喷针尖端口径10 μm)。其他质谱仪采集参数设置为质谱仪的默认值。

结果

图1为吲哚胺2,3-二氧化酶 (IDO) 代谢通路及色氨酸的下游代谢产物。图2 为对 EMASS-II 型 CE-MS 离子源参数的优化结果。最终确定喷针到质谱接口的距离为 3mm, 喷针尖端口径为 10 μm, ESI外接电源电压为 2kV 时质谱响应即灵敏度最佳。图3 显示的是对分离缓冲液和分离毛细管柱的优化结果。以 100 μM 乙酸为分离缓冲液, 可获得最好的灵敏度。在毛细管柱筛选时可以发现, 分析物容易被裸管吸附, 而使用 CC1 型阳离子涂层毛细管可以获得更高的灵敏度和更快的分离效率。图4 是 CE-MS 对 9 种 IDO 潜在的生物标志物进行检测的电泳图谱, 这些标志物包括色氨酸、犬尿氨酸、5-羟色胺、烟酰胺、3-羟基邻氨基苯甲酸、喹啉酸、犬尿喹啉酸、黄尿酸和 3-羟基犬尿氨酸。如图4 所示, IDO 的 9 种代谢物均可在 6 分钟内实现快速高效的分离。

总结

本实验通过 ECE-001 型毛细管电泳仪、电渗流泵驱动的同轴鞘流液 EMASS-II 型 CE-MS 联用离子源、以及 CC1 型阳离子涂层毛细管技术, 建立了吲哚胺 2,3-二氧化酶 (IDO) 生物标志物的CE-MS分析方法。本方法可以在 6 分钟内完成对 9 种标志物快速分离, 检出限可达到飞摩尔水平, 具有灵敏度高、分离能力强、分离速度快等优势。针对于强极性的生物活性分子的分析, CE-MS 具有传统分析方法不具备的独特而强大的技术优势。

www.evergauge.cn

www.cmpscientific.com

永道致远科学技术有限公司

上海市浦东新区康新公路3399弄26号楼218室