

cIEF-MS 方法对膜性肾病患者尿液白蛋白电荷异质性的在线分析

目的

采用电渗流驱动鞘流液的 EMASS-II 型 CE-MS 联用离子源, 结合 CR3520 型 cIEF-MS 联用试剂盒, 对膜性肾病患者的尿白蛋白电荷异质性实现快速、准确的在线 cIEF-MS 分析。

背景

膜性肾病 (MN) 是成人肾病综合征的主要原因, 每百万人口中就有 5-10 例患病。m型磷脂酶A2 受体 (PLA2R) 是一种目前被用于临床诊断膜性肾病 (MN) 的生物标志物, 能在 70% 以上的特发性膜性肾病 (IMN) 病例中检测到其表达。虽然 PLA2R 的表达在膜性肾病MN的病例中很常见, 但通过 PLA2R 来鉴别原发性或继发性 MNs 并不总是有效。另一方面, 尿白蛋白水平检测已被广泛用作MN疾病以及其他形式的肾脏疾病的临床检测方法。基于电渗流驱动鞘流液的 EMASS-II 型 CE-MS 联用离子源, 解决了传统毛细管电泳和质谱联用时的灵敏度和稳定性问题, 使毛细管电泳等电聚焦与质谱联用 (cIEF-MS) 技术可以广泛应用于电荷异质体的分析。cIEF-MS 方法具有常规 LC-MS 方法无法实现的分离能力, 能够分离出患者中微小的尿白蛋白变异, 可以获得患者尿液中白蛋白的 pI 分布信息, 并对分离到的白蛋白进行鉴定。尿液本方法通过 cIEF-MS, 实现对不同病型 MN 患者尿液白蛋白的在线质谱分析。

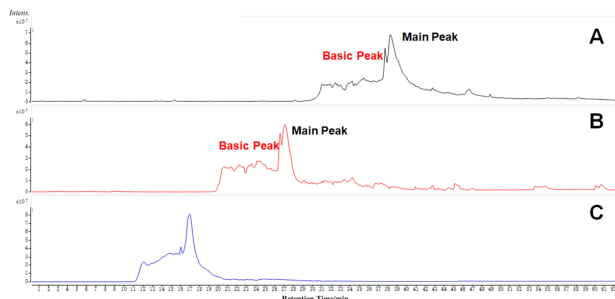


图1. 在毛细管入口端施加不同压力得到的 cIEF-MS 总离子流电泳图。A-C 分别为 15mbar、25mbar 和 50mbar 下得到的结果。

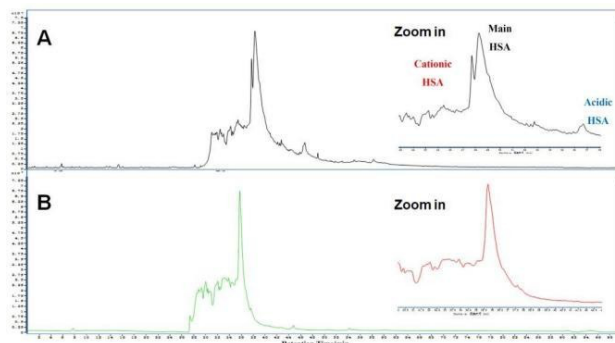


图2. 通过 cIEF-MS 对MN患者尿蛋白进行在线分析的结果。A 为患者A的尿液分析结果; B 为病人 B 的尿液分析结果。

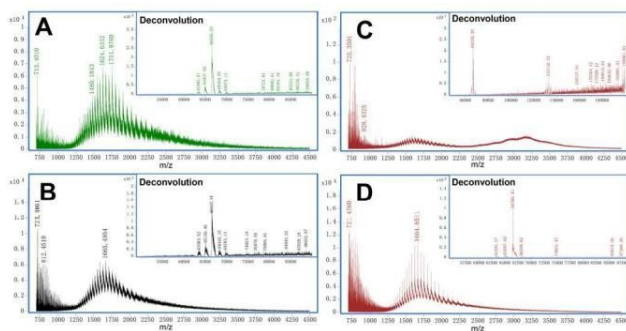


图3. cIEF-MS 鉴定到的尿液中白蛋白的平均质谱图。A、B 和 C: 分别为病人 A 的尿液中白蛋白酸峰, 主峰和碱峰的平均质谱图。D 为病人 B 的尿液中白蛋白平均质谱图。插图显示的是每张质谱图卷积的结果。

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-A)。75cm PS2型分离毛细管 (CMP Scientific, P/N: E-SC-PS2-360/150-50-75-B1)。CR3520型cIEF-MS在线联用试剂盒。样本浓度0.1-1.0 mg/ml, 1.5% 3-10两性电解质。

实验方法:

Buffer B 在 950mbar 下注入 20s。样品在 950mbar下注入 45s。施加电压为 250V/cm。电泳时间 60 分钟, 施加 5-35mbar 的压力。喷针尖端到质谱仪的距离为 4mm。电喷雾电压 2.4 kV。

质谱参数:

毛细管电压 0V。干燥气体 350°C, 2L/min。Fragmentor 200V。采集范围 700-4,500 m/z。采集频率 1Hz。

结果

实验对 cIEF-MS 的关键实验参数进行了优化。图1显示了不同的毛细管入口压力下得到的总离子流图的比较。当施加 50mbar 压力时, 分析可以在 20 分钟内完成。而在 15mbar 条件下, 整个分析需要超过 50 分钟。然而, 快速分析会导致分离度的下降。因此, 在整个实验中, 我们采用的进样压力为 15mbar。在最优的参数下通过 cIEF-MS 对尿液中的蛋白进行分析。在两例患者 (患者A为继发性膜性肾病, 患者B为原发性膜性肾病) 的尿液中检测到的主要蛋白成分均为白蛋白(图2)。两例患者的尿液白电

荷异质性存在明显差异。患者A的尿白蛋白以三种电荷形式存在: 一个碱峰、一个主峰和一个酸峰。作为比较, 在患者B的尿液中只检测到一个白蛋白的主峰。图3 显示了每个被鉴定白蛋白的平均质谱图。患者A尿液中的三种白蛋白电荷变体具有接近的m/z, 解卷积后的白蛋白分子量约 66,555Da。患者B尿液中的白蛋白分子量为 66,560Da。这些观察结果可能表明蛋白的错误折叠和翻译后修饰的存在与原发性和继发性膜性肾病的病理具有相关性。

总结

通过 ECE-001 型毛细管电泳仪、电渗流驱动鞘流液的 EMASS-II 型 CE-MS 联用离子源、以及 CR3520 型 cIEF-MS 联用试剂盒, 实现 cIEF-MS 对尿液中白蛋白电荷异质性的在线分析。通过对原发性和继发性膜性肾病患者尿液的比较分析, 揭示了尿液白蛋白电荷异质性在膜性肾病分型中的潜在应用。与常规LC-MS 相比, cIEF 分析蛋白变体时具有更高的分离度。研究表明, 基于 CR3520 试剂盒的 EMASS-II 型 cIEF-MS 联用技术对尿液白蛋白电荷异质性的表征可作为区分原发性和继发性膜性肾病患者的重要诊断工具, 并可以用于辅助医生的决策。



扫一扫, 关注永道致远微信

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