Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

特发性肾病综合征患儿尿液的蛋白质组和代谢组的高清晰质谱定性定量分析

Lee Gethings[1]; Sandra Kraljević Pavelić[2]; Mirela Sedic[2]; John Shockcor[3]; Stephen McDonald[3]; Johannes Vissers[1]; Maja Lemac[4]; Danica Batinić[4]; James Langridge[1]

[1]沃特世公司(英国曼彻斯特)；[2]克罗地亚里耶卡市里耶卡大学生物技术系；
[3]沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德)；[4]克罗地亚萨格勒布市萨格勒布大学中心医院

应用收益

这是一种用来分析特发性肾病综合征(INS)患者尿液的无标记型复合组学方法，可在一项试验中同时得出定性和定量信息。这样有可能开发出适用于INS患者的诊断和治疗解决方案。

沃特世提供的解决方案

ACQUITY UPLC® 系统

nanoACQUITY UPLC® 系统

SYNAPT® G2 质谱仪

Oasis® HLB 萃取柱芯

ProteinLynx GlobalSERVER™

Markerlynx™ XS

TransOmics™ 平台和信息学软件

MS^E/$HDMS^E$

TriWave® 技术

关键词

特发性肾病综合征(INS)、代谢组学、临床蛋白质组学、复合组学方法

简介

特发性肾病综合征(INS)因肾小球过滤器功能障碍引起，是儿童最常见的肾小球疾病。尽管取得了一些进展，但INS的发病机理仍然未知并且治疗方法局限于总体免疫调节。目前已有该病的多种诊断和治疗方法；然而，由于对INS的发病机制缺乏了解，因此这些方法的疗效较差并且存在副作用。在这篇应用纪要中，我们介绍了一种复合组学方法，用以揭示参与INS发病机理并可能具有诊断和治疗意义的新的分子因素。

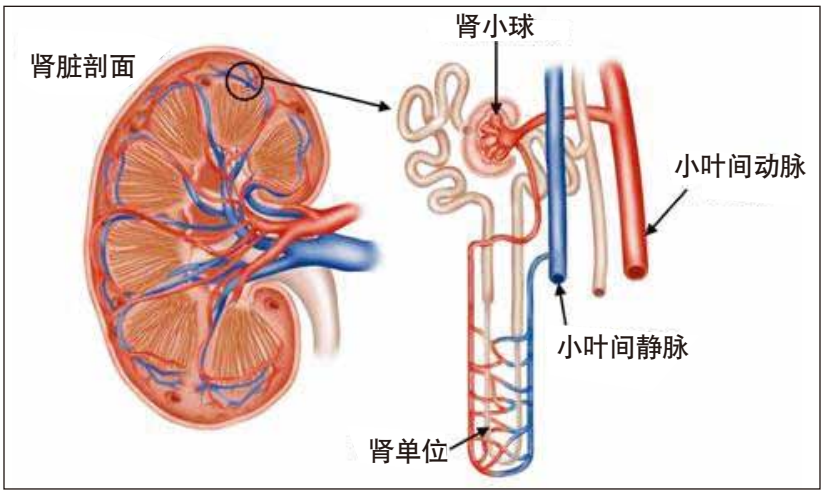

图1. 肾脏切片，着重显示一个肾单位。存在功能障碍的肾小球是INS的发病部位(由Wellcome Images友情提供)。

试验

样品制备

对于拟用于肽分析而定期采集的尿样按照之前文章1所述进行配制以用于LC/MS分析。样品在进行还原和烷基化之前先使用1% RapiGest™ SF进行处理。小份样品使用抗HAS树脂进行孵育，然后再用Vivaspin 5000 MWCO过滤器进行离心。接着用水进行一系列冲洗，以确保回收充分。由此得到的上清液使用胰蛋白酶酶解过夜，如图2所示。代谢物分析样品使用Oasis HLB固相萃取柱进行纯化，使用水/甲醇(90/10)进行冲洗，然后再使用甲醇洗脱分析物。由此得到的残渣在200 µL流动相内进行复溶并涡旋混合，然后进行LC/MS分析。

LC/MS分析条件

LC/MS用于多肽的定性和非标记定量分析。在300 nL/min的流速下，从5%到40%乙腈(含0.1%甲酸)的90分钟提度以及采用nano ACQUITY UPLC系统和BEH 1.7 µm C_{18} 75 µm x 20 cm纳升级LC色谱柱进行。

代谢物鉴定的LC/MS试验采用ACQUITY UPLC系统(500 µL/min流速)从0%到50%乙腈(含0.1%甲酸)提度洗脱10分钟，色谱柱为BEH 1.7 µm C_{18}反相2.1 x 10 cm LC柱。

数据采集通过复合型IM-oa ToF SYNAPT G2质谱仪在非数据依赖(DIA)模式下进行采集。离子倘度(IM)与两种采集方案联合使用，如图3所示。

生物信息技术

LC/MS肽数据使用ProteinLynx GlobalSERVER进行处理和搜索。正态化的非标记型定量分析通过使用TransOmics软件而实现。由此获得的代谢物组学数据使用MassLynx®软件进行处理并使用EZInfo进行多元统计分析。

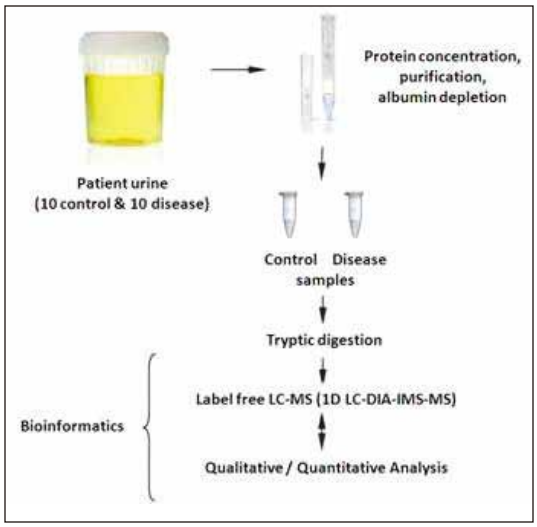

图2. 尿蛋白分析实验设计图。

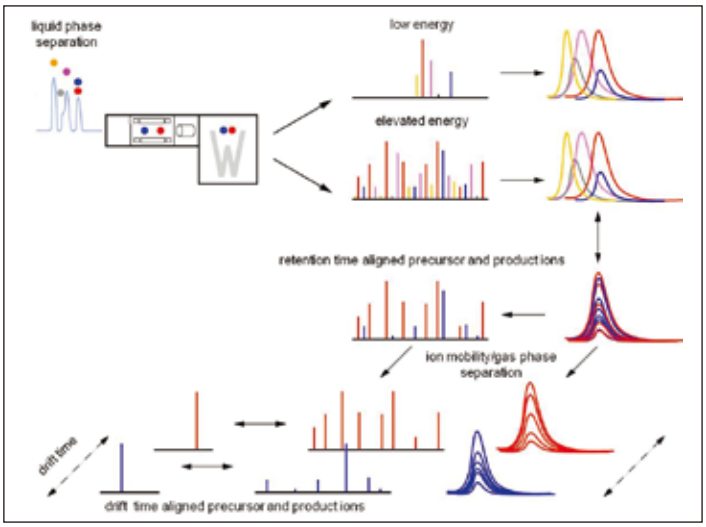

图3.非数据依赖的高清晰质谱分析(IM-DIA-MS/HDMS^E)工作流程。

结果与讨论

我们分析了纯化后的少量尿液，进行定性、定量分析并研究对照受试者和经过预先治疗的受试者之间在蛋白质组学和代谢组学方面的差异。

主成分分析(PCA)显示了对照样品组和经预先治疗患者样本组之间存在的明显变化，如图4所示。蛋白质和代谢物数据集均观察到类似的分布模式。

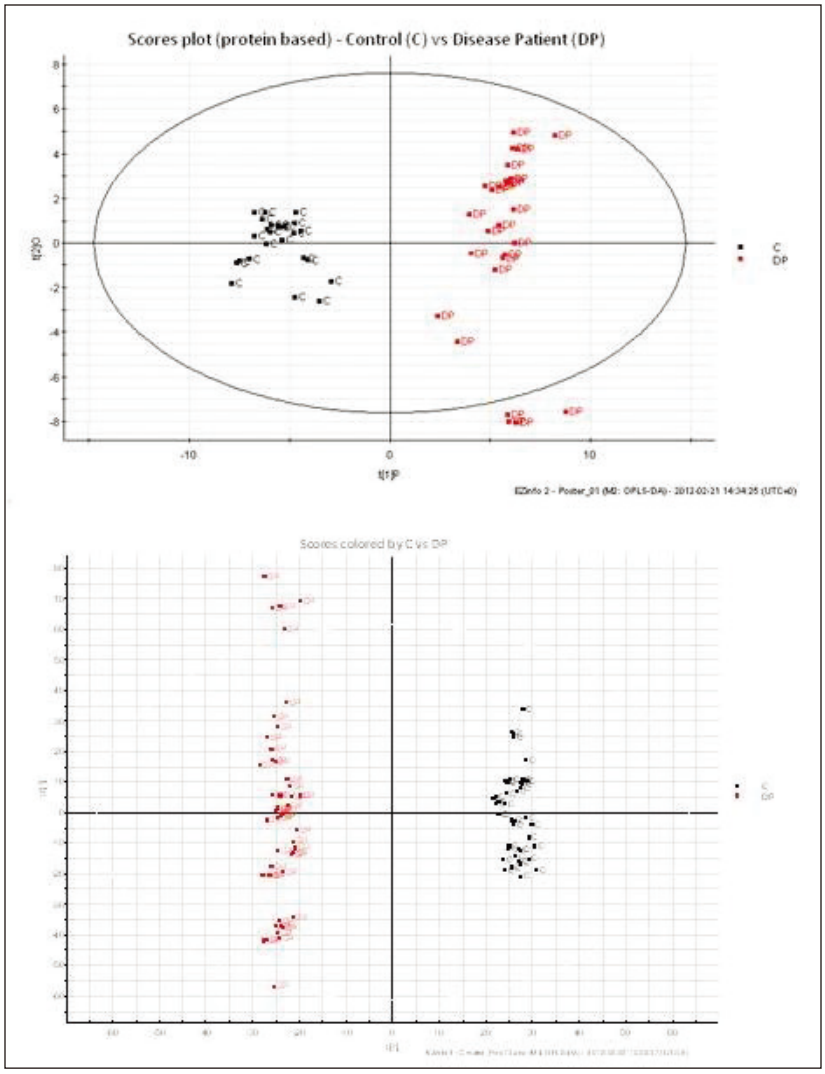

图4. 通过对预先治疗患者组(红色)和对照组(黑色)进行OPLS-DA分析而得到的得分图表。

我们对蛋白质组学数据进行了校准、正态化处理和定量分析。已鉴定的较大比例蛋白质均被糖基化，超过总量80%的蛋白质得以鉴定并呈现出显著的量的变化。图5着重显示出两个样品组之间存在两倍以上变化的蛋白质。肽水平的变化可使用三维剪辑图像进行直观显示。图5显示出其中一种目标肽的电荷状态特征。

代谢物组学工作流程得出的结果见图6。使用代谢物对比载荷图，可在极限水平下较好的鉴定代谢物(蓝色阴影表示)。其中也显示出可引起最显著差异的化合物示例。

图7给出一种常见途径，以谷氨酸盐受体[NMDA]亚基为例说明。NMDA属于谷氨酸盐门控离子通道蛋白家族并作用于神经元系统途径。谷氨酸盐也位于相同的途径内。突触后Ca(2+)被认为可通过NMDA受体而增加，从而激活包括Erk/MAP激酶和cAMP调节途径在内的几种信号传导分子。

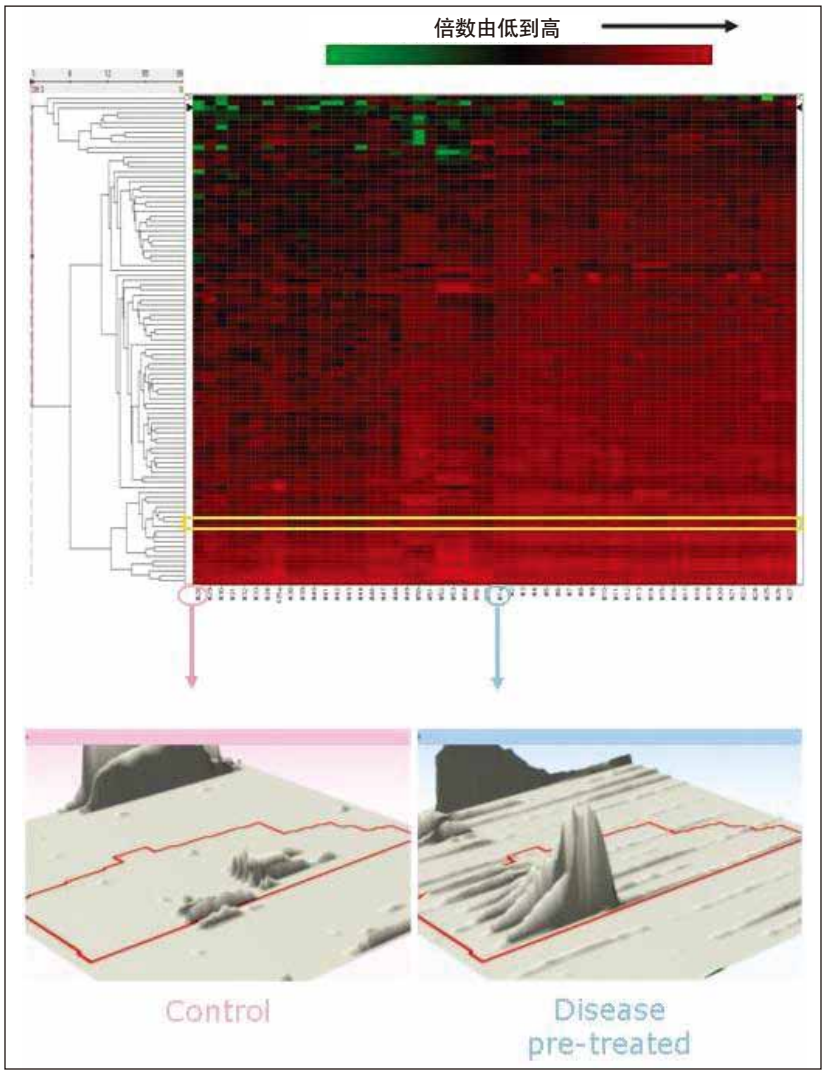

图5. 对包含至少三种已鉴定肽并且两种以上肽存在显著变化的受调控蛋白进行分级簇状分析。高亮显示区代表前列腺素以及TMLLQPAGSLGSYSYR肽的相关三维剪辑图像。

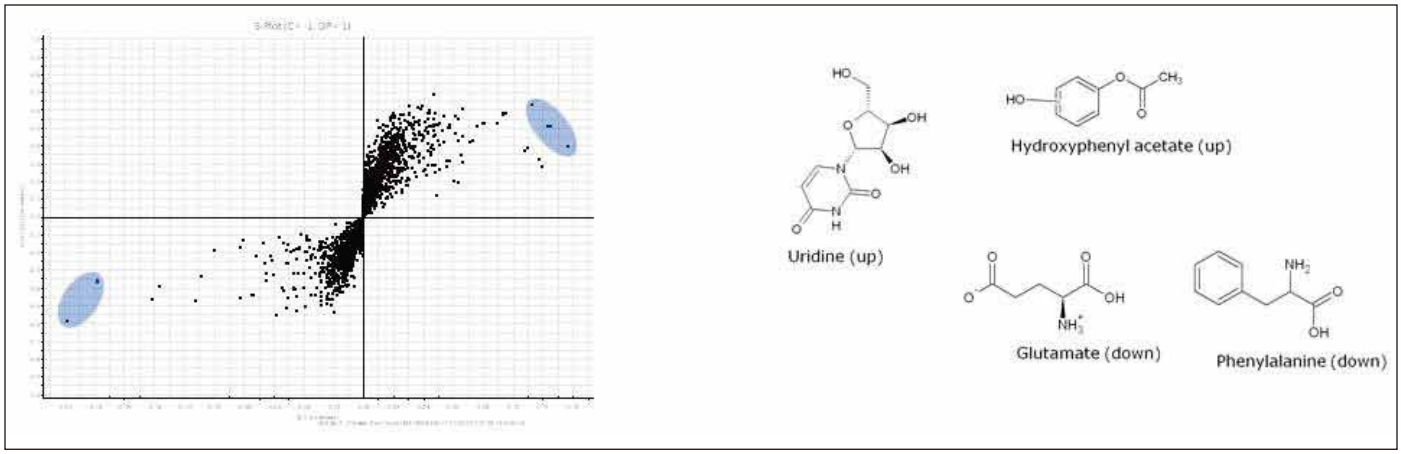

图6. 通过在阳离子模式下对预先治疗患者组和对照受试者组进行OPLS-DA分析而得出的代谢物载荷图。引起最大变异的代谢物在蓝色阴影区内用所提供的示例进行表示。

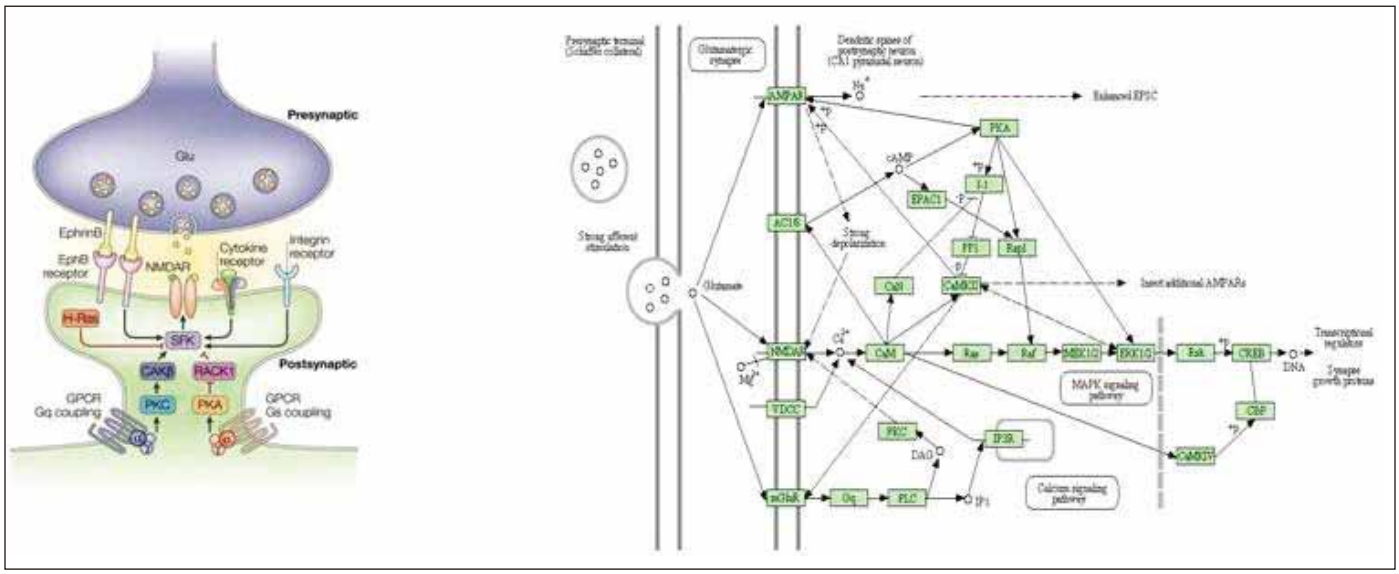

图7. 神经元系统途径，特别强调说明谷氨酸盐[NMDA]受体亚基和谷氨酸盐对突触后细胞下游传输的作用。

结论

- 鉴定了80%的蛋白质，其中30%的蛋白质发生了2倍以上的变化，且ANOVA (p) 值≤0.05。
- 大多数已鉴定的蛋白质均被糖基化，其中多种蛋白质的相对丰度出现变化。
- PCA分析表明蛋白质和代谢物数据均是有价值的。
- 多种化合物导致代谢物分析出现差异。
- 神经元系统途径内使用谷氨酸盐和NMDA，可从代谢物和蛋白质分析中得出补充性信息。
- 一种无标记型复合组学方法现已应用于分析INS患者的尿液 (HDMS^E)，可在一项试验中同时得出定性和定量信息。

参考文献

1. Vaezzadeh AR, Briscoe AC, Steen H, Lee RS. One-step sample concentration, purification and albumin depletion method for urinary proteomics. J Proteome Res. 2010;9(11):6082-89.
2. Li GZ, Vissers JP, Silva JC, Golick D, Gorenstein MV, Geromanos SJ. Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. Proteomics. 2009 Mar;9(6):1696-719.
3. Han CL, Chien CW, Chen WC, Chen YR, Wu CP, Li H, Chen YJ. A multiplexed quantitative strategy for membrane proteomics: opportunities for mining therapeutic targets for autosomal dominant polycystic kidney disease. Mol Cell Proteomics. 2008 Oct;7(10):1983-97.
4. Salter MW, Kalia, LV. Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation. Nature Reviews Neuroscience, 2004 April; 5: 317-328.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Waters、ACQUITY UPLC、nanoACQUITY UPLC、Oasis、SYNAPT和MassLynx是沃特世公司的注册商标。The Science of What's Possible、ProteinLynx GlobalSERVER、RapiGest和MetaboLynx是沃特世公司的商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

©2012年 沃特世公司 中国印刷

2012 年 5 月 720004329ZH AG-PDF

沃特世科技（上海）有限公司
北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 6555
成都：028 - 6554 5999

沃特斯中国有限公司
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com