

罕见病弗里德赖希共济失调的血液生物标记物共济蛋白-M 的定量分析

使用 Agilent 6495 三重四极杆液质联用系统

作者

Nicolas Eskenazi,
Teerapat Rojsajakul,
Clementina Mesaros,
Ian A. Blair
Penn/CHOP Friedreich's
Ataxia Center of Excellence
and Department of
Systems Pharmacology and
Translational Therapeutics,
Perelman School of Medicine,
University of Pennsylvania

Linfeng Wu
安捷伦科技有限公司

摘要

弗里德赖希共济失调 (FRDA) 是一种遗传病，涉及由线粒体成熟共济蛋白 (共济蛋白-M) 表达不足引起的进行性神经系统损伤和运动问题。共济蛋白-M (81-210) 源自线粒体加工肽酶 (MPP) 对全长共济蛋白 (1-210) 的两步蛋白酶切。共济蛋白-M 不分泌到循环系统中，因此无法在血浆或血清中分析。但共济蛋白-M 存在于血细胞（例如具有线粒体的血小板和人外周血单个核细胞 (PBMCs)）中。

质谱 (MS) 与免疫沉淀 (IP) 和稳定同位素稀释方法相结合，能够以高精密度和准确度定量分析共济蛋白-M。这种定量分析方法主要涉及与纳流液相色谱（纳流 LC）系统联用的高分辨率 MS，不仅耗时，而且需要进行严格的质量控制以维持纳流 LC/MS 系统性能。与单位分辨率三重四极杆 LC/MS (LC/TQ) 系统联用的标准流速液相色谱系统通常不用于低丰度蛋白质（例如共济蛋白-M）的定量分析。本应用简报表明，Agilent 6495 LC/TQ 采用标准 HPLC 流速，在多反应监测 (MRM) 采集模式下能够提供更出色的共济蛋白-M 定量分析。与在平行反应监测 (PRM) 采集模式下运行的与高分辨率轨道阱质谱仪联用的捕集-洗脱纳流 LC/MS 系统相比，该系统具有更出色的灵敏度、精密度、准确度和仪器运行时间。因此，使用标准流速 HPLC 的 6495 LC/TQ 平台比捕集-洗脱纳流 LC/MS 系统更适合用于血液样品中的高通量共济蛋白-M 定量分析。

前言

尽管 FRDA 被视为一种罕见病，但它是美国人群中最常见的遗传性共济失调。由于其具有进行性，大多数患者在疾病发作 15.5 ± 7.4 年后需要依靠轮椅^[1]。但是，心脏病是导致死亡的主要原因^[2]。目前，尽管发现 NRF-2 激活剂 Omaveloxolone 是安全的并在治疗剂量下能够改善神经功能，从而提供了一种潜在的未來治疗策略，但是针对 FRDA 仍然缺少有效的治疗方法^[3]。大多数 FRDA 病例的遗传基础是两个等位基因（GAA1 和 GAA2）上共济蛋白（FXN）基因的第一个内含子的 GAA 三核苷酸重复扩增，会造成表观遗传转录沉默和全长共济蛋白表达下降^[4]。少数 FRDA 患者（< 3%）为复合杂合子，在一个等位基因上具有点突变或小突变，在另一个等位基因上具有 GAA 重复扩增^[5]。在典型 FRDA 病例中，GAA1 的长度（最短扩增）与疾病严重程度相关，而较长的 GAA 扩增导致发病更早且进展更快^[6]。

人全长共淀粉蛋白（同种型 1，MW = 23135 Da）表示为具有 N 末端线粒体靶向序列的 210 个氨基酸前体蛋白（图 1）。通过线粒体加工肽酶（MPP）的两步蛋白酶切导致线粒体共济蛋白-M 的形成（81–210；MW = 14268 Da）。许多证据强烈表明，共济蛋白-M 是一系列通路（包括铁-硫簇组装、铁储存、血红素生物合成、呼吸链以及细胞对氧化应激的反应）中的功能成分^[7–10]。相比之下，线粒体外共济蛋白同种型 E（共济蛋白-E）（76–210；MW = 14953 Da）在红细胞中被发现，缺乏线粒体靶向序列。它通过

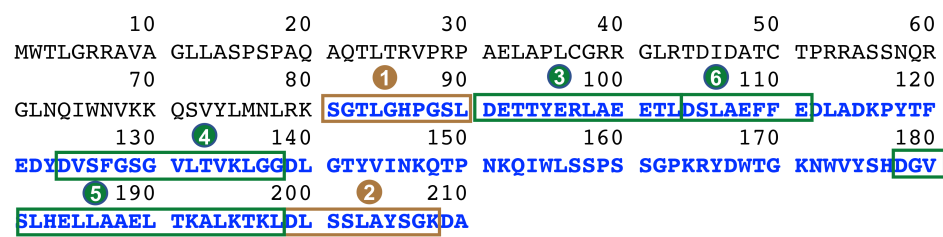


图 1. 全长共济蛋白和共济蛋白-M（以蓝色显示）的氨基酸序列。Asp-N 酶解的肽 1 和 2（棕色框）用于定量，肽 3 至 5（绿色框）用于确认蛋白质检测结果

选择性剪接及之后翻译过程中的 N-末端乙酰化产生^[11]；其在 FRDA 中的表达被 DNA 高甲基化下调^[12]。尚无功能被归因于共济蛋白-E。

共济蛋白不分泌到循环系统中，因此无法在血浆或血清中分析。过去，其水平通常通过对蛋白质印迹法或酶联免疫吸附测定（ELISA）或来自 FRDA 成纤维细胞、淋巴细胞、肌肉活检和 PBMCs 的电化学发光来测量^[13]。有关仅共济蛋白-E 存在于红细胞中的发现，使得可以在全血样品中而不是在单一细胞（例如血小板或 PBMCs）中分析共济蛋白^[14]。这一发现表明，共济蛋白-M 仅位于具有线粒体的血细胞（例如血小板和 PBMCs）中。此外，质谱（MS）与稳定同位素稀释相结合的方法能够以高精密度和准确度定量分析共济蛋白-M。该分析主要涉及使用纳流液相色谱分离与高分辨率 MS 联用系统（纳流 LC/MS），不仅耗时，而且需要进行严格的质量控制并具备较强的专业知识以维持分析仪器性能^[13]。疾病和生物标记物研究（例如本研究所述）通常需要分析较大的样品队列，以确保得到统计上可信的结果，这使得通量成为关键考虑因

素。与标准流速液相色谱系统联用的单位分辨率三重四极杆仪器（LC/TQ）的设计更稳定，且能够实现更高的通量，尤其是在大型队列研究的背景下。

为确定标准流速 6495 LC/TQ 仪器能否改善当前的捕获-洗脱纳流 LC/MS 系统对共济蛋白-M 的常规定量分析，在两种系统上都运行了样品。向来自 FRDA 受试者的全血样品中添加共济蛋白-M 的稳定同位素类似物，然后通过免疫沉淀（IP）富集，再用 Asp-N 蛋白酶进行酶解。在两种 LC/MS 仪器上对酶解的肽进行分析。在 6495 LC/TQ 系统上，线性标准曲线回归线的相关系数、检测限（LODs）和定量下限（LLOQs）结果更出色。这些结果在柱上载样量少于基于捕集-洗脱的纳流 LC/MS 系统所需的柱上载样量的条件下获得。此外，两种 LC/MS 平台上的仪器运行时间也存在显著差异。就单次分析总运行时间而言，在 6495 LC/TQ 系统上需要 11 分钟，而在纳流 LC/MS 系统上则需要 105 分钟。因此，来自 10 个对照和 30 个 FRDA 受试者血液样品的典型分析的样品可以在一天内完成，而在纳流 LC/MS 系统上则需要 8 天以上。这些数

据表明，标准流速 6495 LC/TQ 平台比捕获-洗脱纳流 LC/MS 系统更适合用于血液样品中的高通量共济蛋白-M 定量分析。

实验部分

化学品和材料

除非另有说明，否则所有试剂和溶剂均为 LC/MS 级。 $[^{13}\text{C}_6]$ -亮氨酸购自购自 Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA)。抗共济蛋白抗体（克隆 1D9）购自 LifeSpan Biosciences, Inc. (Seattle, WA)。庚二亚氨酸二甲酯二盐酸盐 (DMP)、乙二胺四乙酸 (EDTA)、cOmplete Mini 不含 EDTA 的蛋白酶抑制剂混合片、胞内蛋白酶 Asp-N 测序级、DL-二硫苏糖醇 (DTT)、牛血清白蛋白 (BSA)、人溶菌酶、咪唑、甘油、苯甲基磺酰氟 (PMSF)、三乙醇胺、乙醇胺和 M9 基础盐 5X 粉末基础微生物生长培养基 (M9 培养基) 购自 MilliporeSigma (Billerica, MA)。Ni-NTA 琼脂糖树脂购自 Qiagen (Germantown, MD)。HPLC 级水和乙腈购自 Burdick and Jackson (Muskegon, MI)。碳酸氢铵和乙酸购自 Fisher Scientific (Pittsburgh, PA)。Protein G 磁珠 Dynabeads 购自 Life Technologies Corporation (Grand Island, NY)。

全血样品

从两例未受影响的健康对照受试者和 38 例纯合 FRDA 受试者获得血液样品。所有受试者均同步入组美国费城儿童医院正在进行的一项自然史研究。获得了每一例参与研究的受试者的书面知情同意书。如果受试者未满 18 岁，则书面知情同意书从其父母或法定监护人处获得。该研究得到

费城儿童医院机构审查委员会 (IRB) 的批准 (IRB 方案编号 01-002609)。抽取静脉血至 8.5 mL 紫色盖 Vacutainer EDTA 管中，并轻轻倒置混合。立即将所有样品分装到 Eppendorf 管中，并在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下冷冻等待分析。

未标记和稳定同位素标记的共济蛋白-M 的表达和纯化

如前所述，在大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) BL21 DE3 中进行未标记和通过细胞培养条件下稳定同位素标记技术 (SILAC) 标记的成熟共济蛋白的表达^[15]。简而言之，从 FXN cDNA 质粒 (pTL1) 扩增人成熟共济蛋白 (81-210) 的编码序列，然后克隆到 pET21b 质粒中并与 6× 组氨酸 (His) 序列相连。在含有 1 mmol/L MgSO_4 、10 $\mu\text{mol/L}$ CaCl_2 和 0.5% 葡萄糖与 100 mg/L 氨苄青霉素的 M9 培养基中，在大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) BL21 DE3 中表达共济蛋白的 6× His 标签融合物。为表达未标记的共济蛋白，向 M9 培养基中补充 0.025% 亮氨酸。为表达 SILAC 标记的共济蛋白，向 M9 培养基中补充 0.025% $[^{13}\text{C}_6]$ -亮氨酸。收集细胞沉淀，并将其在含有 100 $\mu\text{g/mL}$ 人溶菌酶的裂解缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、500 mmol/L NaCl、10 mmol/L 咪唑、10% 甘油、2 mmol/L β -巯基乙醇、2× 蛋白酶抑制剂混合物、1 mmol/L PMSF) 中裂解。将裂解液在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以 $20000 \times g$ 离心 30 分钟，并将上清液用 Ni-NTA 树脂纯化。通过 SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色证实未标记的共济蛋白-M 和 SILAC 标记的共济蛋白-M 的纯度高于 95%。

IP 前的全血样品前处理

将所有血液样品在室温下解冻，并将 500 μL 各样品与含有蛋白酶抑制剂混合物的 750 μL NP-40 裂解缓冲液 (150 mmol/L NaCl、50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5、0.5% Triton X-100、0.5% NP-40、1 mmol/L DTT、1 mmol/L EDTA) 混合。将相同量的 SILAC 标记的共济蛋白-M (20 ng) 作为内标添加至各样品（校准品、QC 和全血）中。使用超声波破碎机 (Fisher, Pittsburgh, PA)，通过以功率 5 的 30 次脉冲的冰上探针超声处理将样品裂解，然后在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以 17000 g 离心 15 分钟。从沉淀中移取上清液，并与预先制备的 DMP 交联抗共济蛋白 Protein G Dynabeads 一起孵育以进行免疫沉淀 (IP)。

免疫沉淀 (IP) 和 Asp-N 酶解

如前所述，将小鼠单克隆抗共济蛋白抗体 (4 μg) 通过 DMP 与 Protein G 磁珠 (0.5 mg) 交联^[15]。简而言之，将小鼠单克隆抗共济蛋白抗体首先与 Protein G 磁珠 Dynabeads 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜，以形成抗体偶联磁珠。将 mAb 偶联磁珠与 13 mg/mL DMP 溶液在室温下孵育 1 小时，形成稳定的交联抗共济蛋白 Protein G 磁珠 Dynabeads。交联 Protein G 磁珠可在 PBS 中于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存 1 周。将处理后的全血样品 (1.25 mL) 加入 0.5 mg 抗共济蛋白 Protein G 磁珠 Dynabeads 中，在旋转搅拌下于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 进行过夜 IP。将磁珠用含 0.02% 吐温 20 的 PBS 清洗三次，并用 100 μL 洗脱缓冲液 (含 10% 乙腈的 100 mmol/L 乙酸水溶液) 洗脱出共济蛋白-M。将洗脱液转移至经过去活处理

的玻璃内插管 (Waters, Milford, MA) 中，并在真空浓缩器 (Jouan RC 10.22, Fisher, Pittsburgh, PA) 中干燥。将样品溶于 50 µL 含有 100 ng Asp-N 的 25 mmol/L 碳酸氢铵水溶液中，并在 LC/MS 分析前于 37 °C 孵育过夜。

LC/MS 分析

标准流速超高效液相色谱与多反应监测质谱仪 (UHPLC-MRM/MS) 分析采用与 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统联用的 6495 三重四极杆液质联用系统。液相色谱条件详见表 1。纳流超高效液相色谱与平行反应监测质谱仪 (UHPLC-PRM/MS) 分析采用第三方与高分辨率轨道阱质谱仪联用的捕集-洗脱纳流液相色谱系统，在 PRM 采集模式下运行。UHPLC-PRM/MS 条件如表 2 所示。

数据分析

使用 Skyline (MacCoss Laboratory, University of Washington, Seattle, WA) 进行数据分析。每种未标记/轻 (L) 肽与带标记/重 (H) 肽的每个 MRM 或 PRM 离子对的峰面积比通过 Skyline 软件进行计算，并用于绝对定量分析。肽比率通过 S⁸¹GTLGHPGSL⁹⁰ Asp-N 肽的 y₄⁺ 离

子与 D¹⁹⁸LSSLAYSGK²⁰⁸ Asp-N 肽的 y₈⁺ 离子的 PRM 离子对的 L/H 比进行计算。共济蛋白-M 含量根据每种肽的标准曲线进行计算。然后根据获得的两种肽的平均浓度来计算共济蛋白-M 水平。监测其他三

种肽以进一步确认存在共济蛋白-M。使用 Prism 9 for macOS 9.3.1 版 (GraphPad Software, LLC) 中的线性回归模型来考察 GAA 重复序列与共济蛋白水平之间的相关性。

表 1. UHPLC-MRM/MS 条件

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱条件	
分析柱	Agilent ZORBAX RRHD 超高压快速高分离度色谱柱，2.1 × 50 mmol/L, 1.8 µm (货号 959757-902)
柱温	35 °C
溶剂 A	0.1% 甲酸水溶液
溶剂 B	0.1% 甲酸的乙腈溶液
分析液相色谱流速	0.4 mL/min
梯度	0 min 时，5% B 1.00 min 时，10% B 2.75 min 时，24% B 3.50 min 时，36% B 5.00 min 时，95% B 6.50 min 时，95% B 7.00 min 时，5% B 8.50 min 时，5% B
进样量	2 µL
进样器温度	4 °C
进样针清洗	5 s 冲洗
针头清洗溶剂	30% 甲醇
Agilent 6495 LC/TQ 条件	
气体温度	230 °C
气体流速	13 L/min
离子极性	正离子
雾化器	40 psi
鞘气温度	300 °C
鞘气流速	10 L/min
毛细管电压	4500 V
喷嘴电压	500 V

结果与讨论

样品前处理

在方法开发过程中，发现使用抗共济蛋白小鼠 mAb 与磁珠 Dynabeads 的共价键合的免疫沉淀对于分析全血样品中的低丰度蛋白共济蛋白-M 必不可少。与 Dynabeads 的键合有助于大幅减少来自高丰度蛋白质的背景干扰。此外，由于样品富集和蛋白酶酶解过程中的变化，在蛋白酶酶解步骤后使用标记的肽内标不足以实现精密且准确的蛋白质定量。因此，分别制备并纯化了带有轻和重稳定同位素标记的共济蛋白-M。重标记的共济蛋白-M 中重亮氨酸的掺入率高于 99.0%。在 IP 步骤之前，将纯化的重标记的共济蛋白-M 作为内部对照添加至血液样品中。整个实验工作流程如图 2 所示。

表 2. 纳流 UHPLC-PRM/MS 条件

纳流 UHPLC 条件	
捕集柱	Acclaim PepMap C18 小柱, 0.3 mmol/L × 5 mmol/L, 100 Å (Thermo Scientific)
分析柱	C18 AQ 毛细管柱, 带 10 μm 拉制喷头, 75 μm × 25 cm, 填料粒径 3 μm (Columntip, New Haven, CT)。
柱温	25 °C
上样溶剂	含 0.1% 甲酸的水/乙腈 (99.5:0.5; v/v)
溶剂 A	含 0.1% 甲酸的水/乙腈 (99.5:0.5; v/v)
溶剂 B	含 0.1% 甲酸的乙腈/水 (98.0:2.0, v/v)
上样至捕集柱	10 μL/min, 持续 4 min
分析液相色谱流速	400 nL/min
梯度	0 min 时, 2% B 10 min 时, 2% B 30 min 时, 35% B 35 min 时, 60% B 53 min 时, 98% B 73 min 时, 80% B 74 min 时, 2% B 100 min 时, 2% B
进样量	8 μL
进样器温度	4 °C
进样针清洗	5 s
针头清洗溶剂	10% 甲醇
轨道阱质谱仪条件	
喷雾电压	2500 V
离子传输毛细管温度	275 °C
离子极性	正离子
S 透镜 Rf 水平	55
源内 CID	2.0 eV
分辨率	60000
AGC 目标	2.00E+05
最大 IT	80 ms

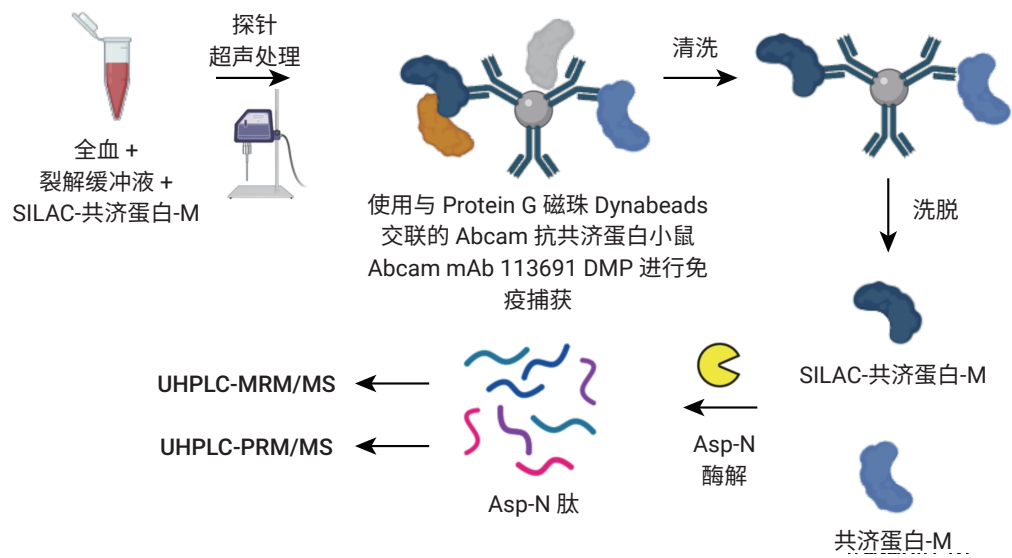


图 2. 用于共济蛋白-M 样品前处理和 LC/MS 分析的实验工作流程示意图

MRM vs. PRM 离子对

所监测的来自共济蛋白-M 的肽序列、它们对应的 MRM 和 PRM 离子对以及在两种 LC/MS 系统上的肽洗脱时间如表 3 所示。

对于 UHPLC-MRM/MS，母离子和子离子均使用标称质量。相比之下，对于 UHPLC-PRM/MS，母离子使用标称质量，子离子则使用精确质量。尽管与高分辨率 LC/MS 系统相比，单位质量 LC/TQ 系统在原则上可能存在一些背景干扰，但在 6495 LC/TQ 上进行血液共济蛋白-M 分析时未观察到这一问题。因此，在初始蛋白质发现和方法开发之后，对分析速度快得多的 UHPLC-MRM/MS 方法在常规分析中的定量准确度和精密度进行了评估。

肽分离

用于共济蛋白-M 定量 (SGTLGHPGSL) 和总共济蛋白定量 (DLSSLAYSGK) 的 Asp-N 酶解肽以及用于检测确认的其他三种肽 (DETTYERLAEETL、

DGVSLHELLAAELTKALKTKL 和 DSLAEFFE) 彼此完全分离。分离同时采用标准流速 UHPLC-MRM/MS 和纳流 UHPLC-PRM/MS 方法 (图 3)。

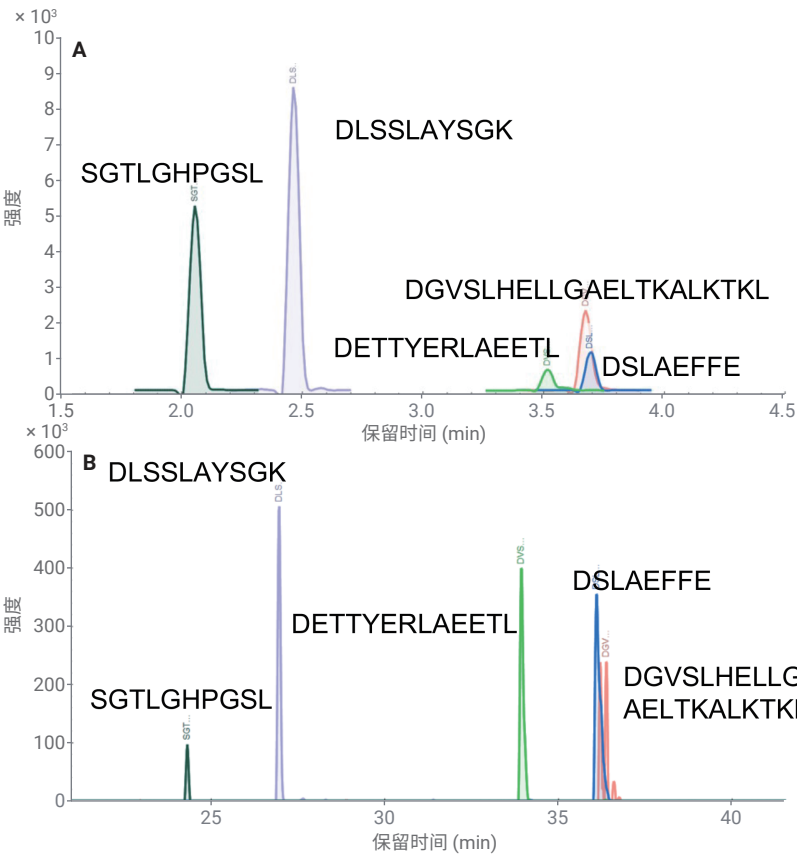


图 3. 靶肽的 LC/MS 色谱图: S⁸¹GTLGHPGSL⁹⁰ (肽-1)、D¹⁹⁸LSSLAYSGK²⁰⁸ (肽-2)、D⁹¹ETTYERLAEETL¹⁰³ (肽-3)、D¹⁷⁶GVSLHELLAAELTKALKTKL¹⁹⁸ (肽-4)、D¹⁰⁴SLAEFFE¹¹¹ (肽-5)。 (A) 标准流速 UHPLC-MRM/MS。 (B) 纳流 UHPLC-PRM/MS

表 3. 用于共济蛋白-M 分析的 MRM/MS 和 PRM/MS 离子对。使用带阴影的肽进行定量，并将标称质量用于 MRM/MS。L = [¹³C₆]-亮氨酸，L = 轻，H = 重

编号	开始	结束	肽	L 或 H	母离子	母离子 (m/z)	子离子 1	子离子 1 (m/z)	子离子 2	子离子 2 (m/z)	子离子 3	子离子 3 (m/z)	RT UHPLC (min)	RT 纳流-UHPLC (min)
1	81	90	SGTLGHPGSL	L	MH ₂ ²⁺	463.24	y ₇ ⁺	680.373	y ₆ ⁺	567.289	y ₄ ⁺	373.208	2.02	24.05
1	81	97	SGTLGHPGSL	H	MH ₂ ²⁺	469.26	y ₇ ⁺	692.413	y ₆ ⁺	573.309	y ₄ ⁺	379.229	2.02	24.05
2	198	208	DLSSLAYSGK	L	MH ₂ ²⁺	520.77	y ₈ ⁺	812.415	y ₇ ⁺	725.383	y ₃ ⁺	291.166	2.44	26.85
2	198	208	DLSSLAYSGK	H	MH ₂ ²⁺	527.79	y ₈ ⁺	818.435	y ₇ ⁺	731.403	y ₃ ⁺	291.166	2.44	26.85
3	91	103	DETTYERLAEETL	L	MH ₃ ³⁺	523.91	b ₁₂ ⁺⁺	719.820	b ₁₁ ⁺⁺	669.296	b ₁₀ ⁺⁺	604.775	3.26	32.25
3	91	103	DETTYERLAEETL	H	MH ₃ ³⁺	527.93	b ₁₂ ⁺⁺	722.830	b ₁₁ ⁺⁺	672.307	b ₁₀ ⁺⁺	607.785	3.26	32.25
4	178	198	DGVSLHELLAAELTKALKTKL	L	MH ₄ ⁴⁺	563.33	y ₁₂ ⁺⁺	643.906	y ₁₁ ⁺⁺	608.387	b ₂ ⁺	173.056	3.66	37.05
4	178	198	DGVSLHELLAAELTKALKTKL	H	MH ₄ ⁴⁺	563.33	y ₁₂ ⁺⁺	652.936	y ₁₁ ⁺⁺	617.417	b ₂ ⁺	173.056	3.66	37.05
5	104	111	DSLAEFFE	L	MH ₂ ²⁺	479.21	b ₄ ⁺	387.187	b ₃ ⁺	316.150	y ₂ ⁺	295.129	3.68	36.05
5	104	111	DSLAEFFE	H	MH ₂ ²⁺	482.22	b ₄ ⁺	393.208	b ₃ ⁺	316.150	y ₂ ⁺	295.129	3.68	36.05

尽管 MRM/MS 系统上进样的样品 (2 μ L, 表 1) 少于 PRM/MS 系统 (8 μ L, 表 2), 但在两种系统上获得的 MS 信号都足以用于检测和定量。SGTLGHPGSL ($\text{MH}_2^{2+} \rightarrow y_4^+$) 和 DLSSLAYSGK ($\text{MH}_2^{2+} \rightarrow y_8^+$) 的标准曲线在 0.5–60 ng 的范围内呈线性。在标准流速 UHPLC-MRM/MS 系统上, 标准曲线的 R^2 分别为 0.9985 和 0.9985 (图 4A)。采用纳流 UHPLC-PRM/MS 系统得到的标准曲线的 R^2 分别为 0.9622 和 0.9951 (图 4B)。与纳流 UHPLC-PRM/MS 系统相比, 采用 6495 LC/TQ 系统得到的标准曲线表现出更高的精密度和准确度。结果表明, 在标准流速 UHPLC-MRM/MS 系统上, 两种肽的 LOD 和 LOQ 都更加出色 (图 4)。

运行时间也存在显著差异: 所有五种肽在标准流速 UHPLC 系统上在 4 分钟内洗脱, 而在纳流 UHPLC 上则需要 38 分钟 (图 3)。这些差异意味着, 就单次分析总运行时间而言, 在标准流速 UHPLC 系统上需要 11 分钟, 而在纳流 UHPLC 系统上则需要 105 分钟 (图 5)。共济蛋白-M 的典型检测包括 10 个标准品和 30 个来自 FRDA 受试者的血液样品。在标准流速 UHPLC-MRM/MS 对这些样品进行三次重复分析所需的时间为 23 小时, 而在纳流 UHPLC-PRM/MS 系统上则需要 8 天 18 小时 (图 5)。使用标准流速 UHPLC-MRM/MS 显著缩短了仪器运行时间并提高了定量分析质量, 还能够实验室中完成其他几项高通量共济蛋白研究^[11, 12]。

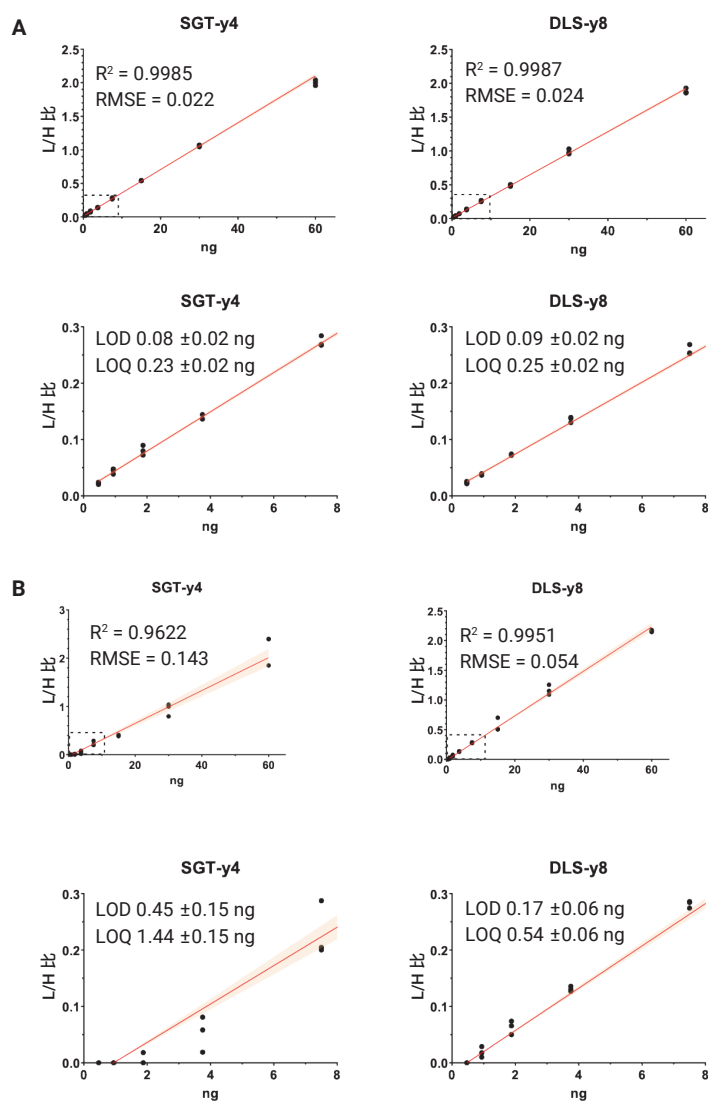


图 4. 肽 SGTGLGHPGSL.D ($\text{MH}_2^{2+} \rightarrow y_4^+$) 和 L.DLSSLAYSGK.D ($\text{MH}_2^{2+} \rightarrow y_8^+$) 的校准曲线。(A) UHPLC-MRM/MS。(B) 纳流 UHPLC-PRM/MS 上图显示了 0–80 ng 的浓度范围内的校准曲线及其相关系数 (R^2) 和均方根误差 (RMSE) 的校准曲线, 下图显示了 0–8 ng 的较低浓度范围内的校准曲线及其相应的 LOD 和 LOQ

健康对照和 FRDA 受试者血液样品

两个健康对照组的共济蛋白-M 的血液水平分别为 4.5 和 5.2 ng/mL（图 6），与先前研究中发现的水平相似。相比之下，在 FRDA 受试者中发现的血液共济蛋白-M 水平在 0.3–3.8 ng/mL 的范围内。在 FRDA 受试者样品中发现的最高浓度来自平均只有 200 次 GAA 重复的受试者，与其较温和的疾病表现一致。最低浓度来自平均有 1000 次 GAA 重复的受试者，与其最严重的疾病表现一致。有趣的是，共济蛋白-M 水平与平均 GAA 重复次数之间存在良好的相关性 ($R^2 = 0.8547$)（图 6）。这种相关性与之之前使用纳流 UHPLC-PRM/MS 所发现的相关性一致^[13]。Y 轴的截距对应于在健康对照受试者的血液中发现的平均共济蛋白-M 水平。

结论

使用共价连接的抗共济蛋白小鼠 mAb 开发免疫沉淀 (IP) 方法，用于富集全血样品中的共济蛋白各蛋白型。在 IP 步骤之前，将稳定同位素标记的重共济蛋白-M 作为内标添加至血液样品中。然后用 Asp-N 蛋白酶对所有 IP 样品进行酶解。最初使用纳流 UHPLC-PRM/MS 系统进行靶肽定量分析。然后，使用 Agilent 6495 LC/TQ 系统开发出分析速度快得多的标准流速 UHPLC-MRM/MS 方法，无需进行柱上样品浓缩。本应用简报展示了这两种 LC/MS 系统在全血样品中共济蛋白-M 定量分析中的分析性能比较。使用 6495 LC/TQ 系统的方法快得多，并具有优异的线性、精

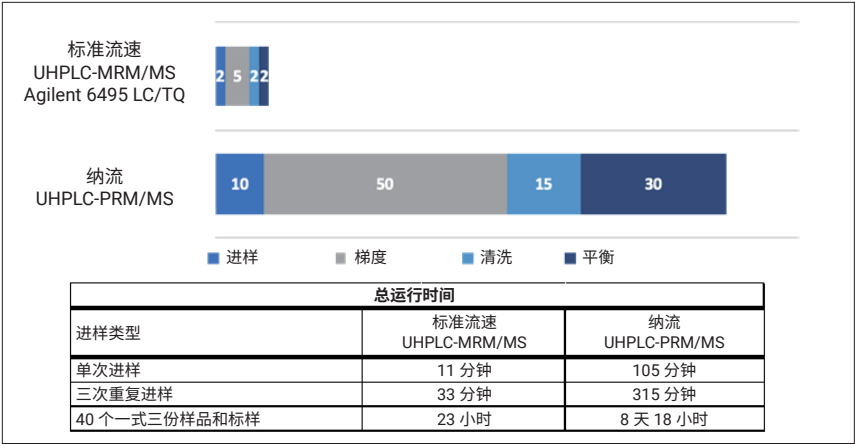


图 5. 标准流速 UHPLC-MRM/MS 方法与纳流 UHPLC-PRM/MS 方法之间的 LC/MS 运行时间比较。对于这两种方法，均包括三次清洗（在校准后和样品后开始）

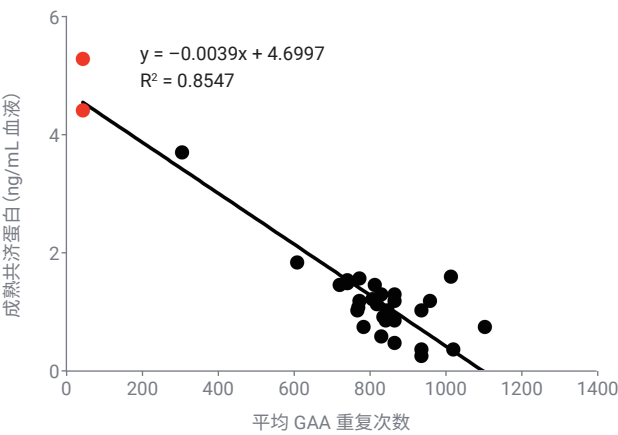


图 6. 基于 Agilent 6495 LC/TQ 分析结果，血液样品中共济蛋白-M 浓度与疾病受试者对基因中的平均 GAA 重复次数高度相关。健康对照受试者显示为红色

密度和准确度，由此表明可以用分析速度快得多的标准流速 UHPLC-MRM/MS 方法替代先前的纳流 UHPLC-PRM/MS 方法。

参考文献

1. Evans-Galea, M. V. *et al.* Cell and Gene Therapy for Friedreich Ataxia: Progress to Date. *Hum. Gene Ther.* **2014**, 25(8), 684–93. Epub 2014/04/23. doi: 10.1089/hum.2013.180. PubMed PMID: 24749505
2. Pousset, F. *et al.* Durr A. A 22-Year Follow-up Study of Long-term Cardiac Outcome and Predictors of Survival in Friedreich Ataxia. *JAMA Neurol.* **2015**, 72(11), 1334–41. Epub 2015/09/29. doi: 10.1001/jamaneurol.2015.1855. PubMed PMID: 26414159
3. Lynch, D. R. *et al.* Safety, Pharmacodynamics, and Potential Benefit of Omaveloxolone in Friedreich Ataxia. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **2019**, 6(1), 15–26. Epub 2019/01/19. doi: 10.1002/acn3.660. PubMed PMID: 30656180; PMCID: PMC6331199
4. Santos, R. *et al.* Friedreich Ataxia: Molecular Mechanisms, Redox Considerations, and Therapeutic Opportunities. *Antioxid. Redox. Signal* **2010**, 13(5), 651–90. Epub 2010/02/17. doi: 10.1089/ars.2009.3015. PubMed PMID: 20156111; PMCID: PMC2924788
5. Gellera, C. *et al.* Frataxin Gene Point Mutations in Italian Friedreich Ataxia Patients. *Neurogenetics* **2007**, 8(4), 289–99. Epub 2007/08/19. doi: 10.1007/s10048-007-0101-5. PubMed PMID: 17703324
6. Sacca, F. *et al.* A Combined Nucleic Acid and Protein Analysis in Friedreich Ataxia: Implications for Diagnosis, Pathogenesis and Clinical Trial Design. *PLoS One* **2011**, 6(3), e17627. Epub 2011/03/18. doi: 10.1371/journal.pone.0017627. PubMed PMID: 21412413; PMCID: PMC3055871
7. Rotig, A. *et al.* Aconitase and Mitochondrial Iron-Sulphur Protein Deficiency in Friedreich Ataxia. *Nat. Genet.* **1997**, 17(2), 215–7. doi: 10.1038/ng1097-215. PubMed PMID: 9326946
8. Delatycki, M. B.; Bidichandani, S. I. Friedreich Ataxia- Pathogenesis And Implications for Therapies. *Neurobiol Dis.* **2019**, 132, 104606. Epub 20190905. doi: 10.1016/j.nbd.2019.104606. PubMed PMID: 31494282
9. Doni, D. *et al.* The Displacement of Frataxin from the Mitochondrial Cristae Correlates with Abnormal Respiratory Supercomplexes Formation and Bioenergetic Defects in Cells of Friedreich Ataxia Patients. *FASEB J.* **2021**, 35(3), e21362. doi: 10.1096/fj.202000524RR. PubMed PMID: 33629768
10. Monfort, B. *et al.* Recent Advances in the Elucidation of Frataxin Biochemical Function Open Novel Perspectives for the Treatment of Friedreich's Ataxia. *Front Neurosci.* **2022**, 16, 838335. Epub 20220302. doi: 10.3389/fnins.2022.838335. PubMed PMID: 35310092; PMCID: PMC8924461
11. Guo, L. *et al.* Characterization of a New N-Terminally Acetylated Extra-Mitochondrial Isoform of Frataxin in Human Erythrocytes. *Sci. Rep.* **2018**, 8(1), 17043. Epub 2018/11/20. doi: 10.1038/s41598-018-35346-y. PubMed PMID: 30451920; PMCID: PMC6242848
12. Rodden, L. N. *et al.* DNA Methylation in Friedreich Ataxia Silences Expression of Frataxin Isoform E. *Sci. Rep.* **2022**, 12(1), 5031. Epub 20220323. doi: 10.1038/s41598-022-09002-5. PubMed PMID: 35322126; PMCID: PMC8943190
13. Wang, Q. *et al.* Simultaneous Quantification of Mitochondrial Mature Frataxin and Extra-Mitochondrial Frataxin Isoform E in Friedreich's Ataxia Blood. *Front. Neurosci.* **2022**, 16, 874768. Epub 20220428. doi: 10.3389/fnins.2022.874768. PubMed PMID: 35573317; PMCID: PMC9098139
14. Blair, I. A. *et al.* The Current State of Biomarker Research for Friedreich's Ataxia: a Report from the 2018 FARA Biomarker Meeting. *Future Sci. OA.* **2019**, 5(6), FSO398. Epub 2019/07/10. doi: 10.2144/fsoa-2019-0026. PubMed PMID: 31285843; PMCID: PMC6609901
15. Guo, L. *et al.* Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry Analysis of Platelet Frataxin as a Protein Biomarker for the Rare Disease Friedreich's Ataxia. *Anal. Chem.* **2018**, 90(3), 2216–23. Epub 2017/12/23. doi: 10.1021/acs.analchem.7b04590. PubMed PMID: 29272104; PMCID: PMC5817373

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278，400-820-3278（手机用户）

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。

RA44930.5725

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2023
2023 年 1 月 26 日，中国出版
5994-5608ZHCN