

高灵敏度的特征性肽段MRM定量流程

SCIEX Triple Quad™ 7500 LC-MS/MS系统 - QTRAP® Ready, 配置SCIEX OS软件

Lei Xiong¹, Ian Moore²

¹ SCIEX, USA, ² SCIEX, Canada

生物基质中多肽/蛋白质制剂的定量分析对于新药研发来说至关重要。作为与传统的配体结合试验 (ligand binding assays, LBAs) 并行的分析技术, 液质联用技术已经发展成为生物分析实验室中蛋白质定量检测的日常手段。与现今的LBAs技术相比, 三重四级杆系统在检测小体积样品中的低浓度分析物方面的能力使其成为主要的分析手段。但是, 对于更低浓度检测时, 能获得更高的灵敏度以及更加优异的分析重现性和线性动态范围 (linear dynamic range, LDR) 仍将极大的有利于分析方法的开发。

尽管研究者们会使用不同的质谱分析方法, 但使用靶向的液质联用多重反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 策略, 以肽段作为替代物 (自下而上的蛋白质分析流程) 的定量方法仍然是最常用的。该方法不仅检测灵敏度高, 而且有较宽的LDR以及良好的分析重现性, 使得定量检测更加可靠。



使用SCIEX 7500系统对大鼠血浆中一系列的特征性肽段进行定量分析。在离子源和质量分析器前端的多种硬件功能的改进, 使得质谱检测系统在分析灵敏度和低浓度重现性方面都有显著的提高。可以达到5至39 fmol/mL这样相当低的定量检测限水平。分析方法具有良好的重现性、准确性、精密度和定量线性, 分析流程皮实可靠。

肽段定量检测流程的主要特点

- 通过硬件优化实现SCIEX 7500 系统肽段定量检测灵敏度的提高, 包括: OptiFlow Pro离子源和E Lens™技术提高离子的产生效率, 并结合D Jet™离子导向技术来提高离子的传输1
- 在生物基质中特征肽段检测的信噪比平均提高3倍, 并且具有良好的重现性、准确性和定量线性。
- SCIEX OS软件 — 简单易用, 软件合规, 集合数据采集、处理、管理于一体

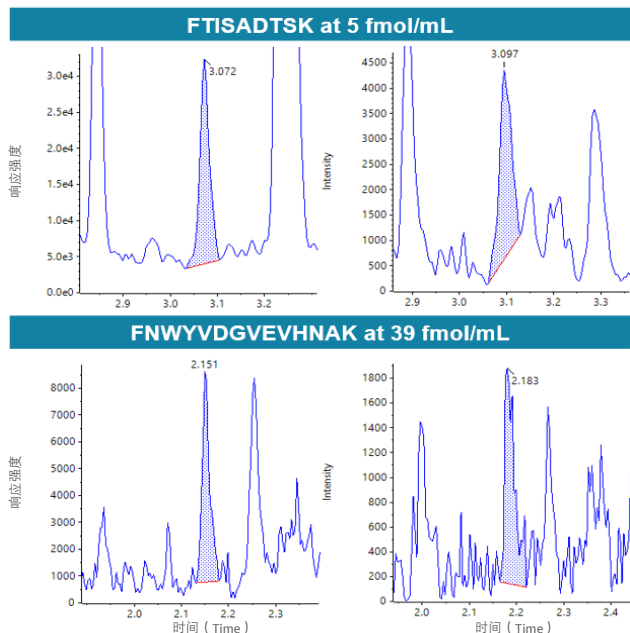


图1. 肽段定量检测的灵敏度对比。SCIEX 7500 系统 (左) 检测单抗特征性肽段在大鼠血浆中5 和39 fmol/mL水平时MRM提取离子流图情况。

实验方法

样品前处理: 用冰冻甲醇进行血浆蛋白沉淀。离心后, 去掉上清液。沉淀用含200 mM碳酸氢铵的甲醇/水 (10/90, v/v) 溶液复溶。经过胰蛋白酶水解。60°C反应1小时后, 加入甲酸进行溶液酸化终止反应。²酶解后的血浆样品用200倍的乙腈/甲酸/水 (5:1:94, v/v/v) 溶液稀释。合成的肽段 (见表1) 加入至酶解后的血浆样品溶液中, 并用基质进行连续稀释。最终进样体积为10 µL。

LC-MS条件: 样品通过ExionLC™系统串联SCIEX Triple Quad™ 7500 系统-QTRAP® Ready, 进行三次平行分析。详尽方法列于表2、3和4。

数据处理: 数据通过SCIEX OS 软件2.0中的定量功能 (点击“Analytics”) 进行处理。

特征肽段定量结果

SCIEX 7500系统整合了创新技术, 在离子产生和离子传输效率

表1. 检测肽段列表。

肽段序列	说明
FTISADTSK	曲妥单抗互补决定区 (CDR) 的肽段
FNWYVDGVEVHNAK	人免疫球蛋白G的保守序列
AGLIVAEGVTK*	C端K经过重同位素标记 (C13N15) 的合成肽段
LGLDFDSFR*	C端R经过重同位素标记 (C13N15) 的合成肽段

表2. 色谱条件

参数	数值
色谱柱	Phenomenex bioZen Peptide XB-C18 50 × 2.1 mm; 2.6 µm
流动相A	含0.1%甲酸的水
流动相B	含0.1%甲酸的乙腈
流速	500 µL/min
柱温	40 °C
进样体积	10 µL

表3. 梯度条件

时间 (min)	流动相A (%)	流动相B (%)
0	95	5
5.5	75	25
5.6	10	90
6.0	10	90
6.1	95	5
7.0	95	5

表4. SCIEX 7500系统的质谱参数

参数	数值	参数	数值
气帘气	42 psi	源温度	450 °C
雾化气	50 psi	辅助气	70 psi
碰撞诱导解离气	9	离子喷雾电压	1500 V

效率上显著提高。OptiFlow Pro离子源和E Lens技术提高了离子产生效率, D Jet离子导向对锥孔板后高速气流中的离子进行有效的捕获和传输。

相同的肽段样品在SCIEX 7500系统上进行分析以比较上述硬件创新带来的灵敏度的提高。实验发现峰面积平均提高6倍, 信噪比平均提高3倍。

基于SCIEX 7500系统对连续稀释的肽段样品进行分析以评价定量性能。如图2、3和4所示, 目标肽段的定量限为5~40 fmol/mL, 不使用内标校准LDR达到4个数量级。所有定量检测样品, 相对标准偏差小于10%, 准确度为94~106%。

结论

- 基于SCIEX Triple Quad 7500 LC-MS/MS系统-QTRAP Ready开发了高灵敏度的肽段定量检测流程。
- 通过具有E Lens技术的OptiFlow Pro离子源和D Jet离子导向的整合, 在生物基质中特征肽段定量检测时与以往产品相比, 灵敏度平均提高了3倍。

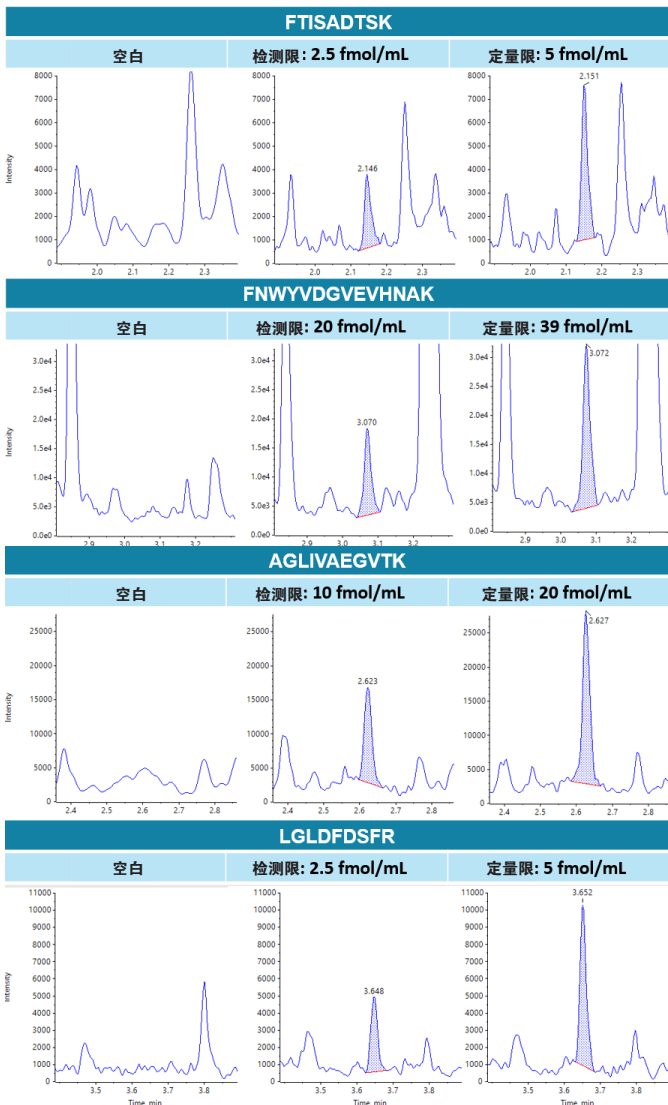


图2. 大鼠血浆中目标肽段定量的提取离子流图。从左至右为：基质空白、检测限、定量限。

化合物名称	实际浓度	进样针数	平均值	标准差	相对偏差	准确度
FTISADTSK	5.00	3 of 3	4.868e0	3.894e-1	8.00	97.36
FTISADTSK	10.00	3 of 3	9.419e0	1.550e-1	1.65	94.19
FTISADTSK	20.00	3 of 3	1.951e1	6.531e-1	3.35	97.56
FTISADTSK	39.00	3 of 3	3.967e1	5.048e-1	1.27	101.73
FTISADTSK	78.00	3 of 3	7.901e1	3.394e0	4.30	101.29
FTISADTSK	156.00	3 of 3	1.601e2	3.603e0	2.25	102.66
FTISADTSK	313.00	3 of 3	3.206e2	5.314e0	1.66	102.44
FTISADTSK	625.00	3 of 3	6.381e2	2.658e1	4.17	102.10
FTISADTSK	1250.00	3 of 3	1.272e3	5.123e1	4.03	101.75
FTISADTSK	2500.00	3 of 3	2.497e3	5.252e1	2.10	99.89
FTISADTSK	5000.00	3 of 3	4.930e3	1.015e2	2.06	98.60
FTISADTSK	10000.00	3 of 3	1.016e4	1.551e2	1.53	101.61
FTISADTSK	20000.00	3 of 3	1.967e4	3.129e2	1.59	98.34
FTISADTSK	40000.00	3 of 3	4.020e4	9.680e2	2.41	100.49

化合物名称	实际浓度	进样针数	平均值	标准差	相对偏差	准确度
FNWYVDGVEVHNAK	39.00	3 of 3	3.943e1	2.157e0	5.47	101.10
FNWYVDGVEVHNAK	78.00	3 of 3	7.691e1	2.047e0	2.66	98.60
FNWYVDGVEVHNAK	156.00	3 of 3	1.536e2	5.674e0	3.69	98.45
FNWYVDGVEVHNAK	313.00	3 of 3	3.104e2	2.079e1	6.70	99.16
FNWYVDGVEVHNAK	625.00	3 of 3	6.216e2	1.164e1	1.87	99.45
FNWYVDGVEVHNAK	1250.00	3 of 3	1.244e3	1.977e1	1.59	99.49
FNWYVDGVEVHNAK	2500.00	3 of 3	2.594e3	3.973e1	1.53	103.76
FNWYVDGVEVHNAK	5000.00	3 of 3	4.949e3	1.497e1	0.30	98.98
FNWYVDGVEVHNAK	10000.00	3 of 3	1.025e4	1.141e2	1.11	102.46
FNWYVDGVEVHNAK	20000.00	3 of 3	1.989e4	2.022e2	1.02	99.45
FNWYVDGVEVHNAK	40000.00	3 of 3	3.943e4	8.714e2	2.21	98.58
FNWYVDGVEVHNAK	80000.00	3 of 3	8.041e4	1.874e3	2.33	100.51

化合物名称	实际浓度	进样针数	平均值	标准差	相对偏差	准确度
AGLIAEGVTK	20.00	3 of 3	1.905e1	1.436e0	7.54	95.27
AGLIAEGVTK	39.00	3 of 3	4.116e1	4.313e-1	1.05	105.53
AGLIAEGVTK	78.00	3 of 3	8.045e1	1.473e0	1.83	103.15
AGLIAEGVTK	156.00	3 of 3	1.648e2	6.464e0	3.92	105.62
AGLIAEGVTK	313.00	3 of 3	3.248e2	1.000e1	3.08	103.78
AGLIAEGVTK	625.00	3 of 3	6.429e2	3.048e1	4.74	102.86
AGLIAEGVTK	1250.00	3 of 3	1.276e3	4.018e1	3.15	102.08
AGLIAEGVTK	2500.00	3 of 3	2.556e3	1.313e2	5.14	102.23
AGLIAEGVTK	5000.00	3 of 3	4.970e3	5.112e1	1.03	99.40
AGLIAEGVTK	10000.00	3 of 3	9.883e3	1.213e2	1.23	98.83
AGLIAEGVTK	20000.00	3 of 3	1.886e4	4.672e2	2.48	94.32
AGLIAEGVTK	40000.00	3 of 3	3.643e4	1.269e3	3.48	91.07
AGLIAEGVTK	80000.00	3 of 3	7.669e4	2.622e3	3.42	95.86

化合物名称	实际浓度	进样针数	平均值	标准差	相对偏差	准确度
LGLDFDSFR	5.00	3 of 3	5.058e0	4.337e-1	8.58	101.16
LGLDFDSFR	10.00	3 of 3	1.010e1	3.713e-1	3.68	100.96
LGLDFDSFR	20.00	3 of 3	1.890e1	9.260e-1	4.90	94.51
LGLDFDSFR	39.00	3 of 3	3.883e1	1.325e0	3.41	99.58
LGLDFDSFR	78.00	3 of 3	7.613e1	7.507e-1	0.99	97.60
LGLDFDSFR	156.00	3 of 3	1.530e2	3.346e0	2.19	98.10
LGLDFDSFR	313.00	3 of 3	3.138e2	9.416e0	3.00	100.25
LGLDFDSFR	625.00	3 of 3	6.195e2	9.281e0	1.50	99.12
LGLDFDSFR	1250.00	3 of 3	1.264e3	4.096e1	3.24	101.09
LGLDFDSFR	2500.00	3 of 3	2.506e3	1.276e2	5.09	100.25
LGLDFDSFR	5000.00	3 of 3	4.960e3	8.268e1	1.67	99.21
LGLDFDSFR	10000.00	3 of 3	1.025e4	3.253e2	3.17	102.53
LGLDFDSFR	20000.00	3 of 3	1.998e4	1.481e2	0.74	99.89
LGLDFDSFR	40000.00	3 of 3	4.230e4	1.816e3	4.29	105.76

图3. 定量结果汇总。

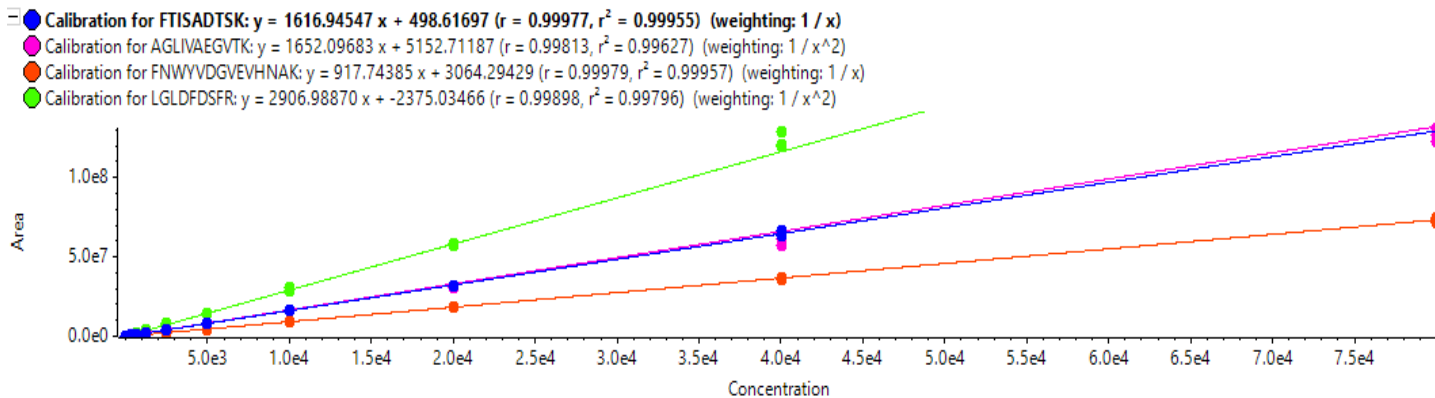


图4. 目标肽段的定量标准曲线，R²为0.996~0.999。

参考文献

1. Enabling new levels of quantification. SCIEX technical note RUO-MKT-02-11886-A.
2. Ouyang Z. et al. (2012) Bioanalysis 4(1): 17-28.

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd.

RUO-MKT-02-11882-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7200
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510-0200
传真：020-3876-0835
官方微信：[ABSciex-China](https://www.absciex.com.cn)