

采用Transcend II TLX-4系统对类胰岛素生长因子1进行高通量分析

唐家澍, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司

关键词

类胰岛素生长因子 (IGF-1), 四通道高通量分析, 临床检测, 在线前处理

前言

类胰岛素生长因子 (insulin-like growth factor 1, IGF-1) 在临床上是一个非常重要的肽段类激素, 通常用于评估由于生长激素的紊乱所导致的青少年生长发育的异常。目前国内类胰岛素生长因子1的检测方法主要为免疫法, 但采用免疫法检测类胰岛素生长因子1已经被长期的临床实践证明存在以下的不足。第一, 各个厂家生产的类胰岛素生长因子1的抗体对目标蛋白的亲能力和不完全一致, 因此导致难以形成统一的参考范围^[1]。第二, 类胰岛素生长因子1在血液中会与类胰岛素生长因子结合蛋白3 (Insulin-like growth factor binding protein 3, IGFBP3) 结合, 而不同厂家的免疫法对于类胰岛素生长因子结合蛋白3所带来的干扰也不尽相同^[2]。第三, 最近的基于质谱检测的研究结果表明, 在病人人群中, 约有0.6%的病人存在类胰岛素生长因子1的蛋白质单点突变^[3], 而通常免疫法对于蛋白质的蛋白突变是无法区分的。

采用质谱法进行IGF-1的检测已经越来越被临床实验室所接受。基于质谱的检测方法目前主要依赖三重四级杆质谱仪进行选择反应监控 (selected reaction monitoring, SRM) 的扫描方式, 这种扫描方式对于绝大多数小分子化合物, 肽段和蛋白质都获得了良好的检测效果。然而IGF-1的三对二硫键非常靠近自身的N端和C端, 因此难以碎裂产生特异性高的碎片离子来对完整的IGF-1分子进行定量。若要使用三重四级杆来定量IGF-1则必须将IGF-1进行酶解^[4-6], 但这样的话极大的复杂化了样品前处理的流程。从2011年开始, 美国的大型第三方独立医学实验室就开始探讨利用高分辨质谱定量IGF-1的可能性^[3,7], 并在长期的临床实践中证明了其的可靠性。在之前的工作中我们使用Vanquish液相和QE超高分辨质谱建立了在线SPE的IGF-1的检测方法, 在这篇文章中我们进行了多通道的扩展, 实现了一分钟一个样品的高通量检测。

实验方法

1. 样品前处理

为了消除血清中类胰岛素生长因子结合蛋白3对类胰岛素生长因子的干扰, 我们采用了经典的酸性乙醇沉淀法, 并在中和后采用冷沉淀的方法进一步减少基质干扰^[8]。实验结果显示, 采用这种前处理方法可显著排除基质干扰, 并使得IGF-1的回收率稳定在85%-90%。

2. 使用Transcend II TLX系统进行在线样品前处理

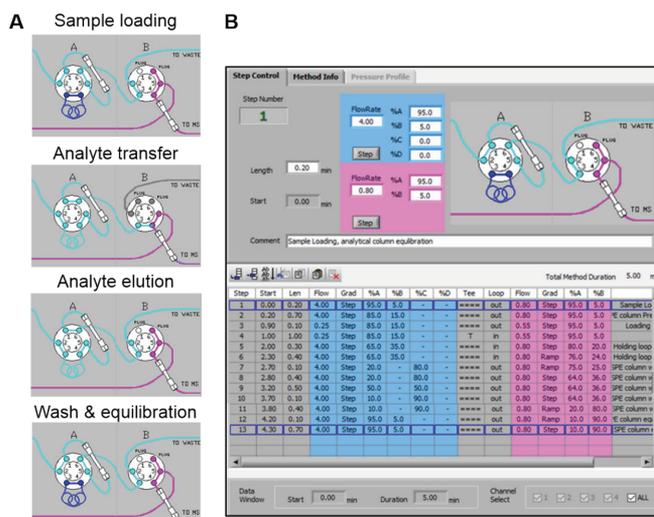


图1. IGF-1分析的Focus模式在线前处理液相方法

在之前的工作中，我们发现在蛋白沉淀后采用离线固相萃取（off-line solid phase extraction, off-line SPE），目标化合物人的IGF-1和¹⁵N标记的人IGF-1均发生了不可忽略的氧化，而采用在线SPE的方法可以有效的避免这一情况的发生。Transcend II TLX系统提供了一种Focus模式可以进行非常简单有效的在线样品前处理。Focus模式的工作流程如图1A所示，主要包含四个步骤：1) 样品上样至SPE小柱；2) 切A阀，使用holding loop里的高有机相将SPE小柱上的IGF-1洗下；同时切B阀，经过在线稀释后IGF-1将会结合到分析柱上。3) 切B阀，这时仅eluting pump流路经过分析柱，使用梯度洗脱将分析柱上的IGF-1洗脱进入质谱进行分析，同时Loading pump流路会将高有机相充满holding loop，为下一次分析做准备。4)切A阀，SPE小柱和分析柱进行清洗和平衡。通过实验发现，holding loop里存储35%的B相（0.2%FA/ACN）即可充分的将IGF-1从SPE小柱上洗脱下来，达到90%以上的回收率，整个在线前处理的液相方法见图1B。

3. 质谱条件

Source parameters		Mass spectrometry parameters	
Sheath gas	50	SIM Scan	
Aux gas	15	Resolution	70K
Sweep gas	1	Isolation window	36Da
Spray voltage	3.8Kv	Central Mass	1091.5
Capillary temp	320	AGC target	1e5
Probe heater temp	300	MaxIT	200ms
S-lens RF	60	MicroScan	1
Probe height	B	Data type	Profile
Ion channels		Software	
Human IGF1 quantitative ion	1093.520	Data acquisition	Xcalibur
Human IGF1 qualitative ion 1	1093.378	Quantitative analysis	TraceFinder 4.1
Human IGF1 qualitative ion 2	1093.664	XIC mass window	15ppm
Internal standard ion (¹⁵ N IGF1)	1101.248		

表1. IGF-1分析质谱条件

4. 从单通道向四通道的扩展

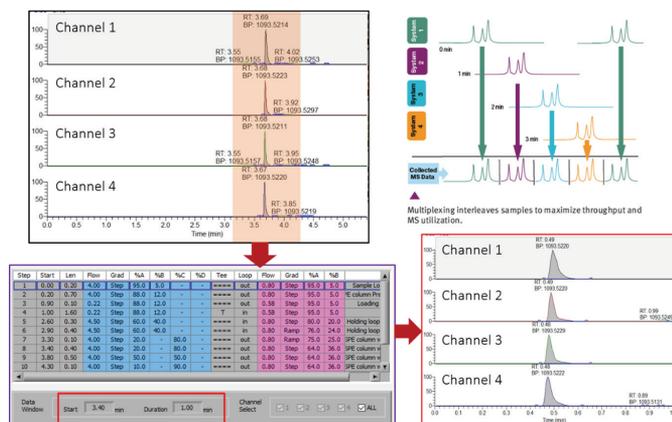


图2. IGF-1分析从单通道转移至四通道

我们发现整个在线前处理的液相方法的总梯度为5.5分钟，而被分析物和内标的出峰时间不足20秒，提示我们使用多通道液相可以极大的增加分析的通量（图2）。Transcend II系统所使用的AriaMX软件可以实现非常智能快速的多通道方法扩展。我们仅需要在液相方法中填入质谱采集的起始和终止时间即可非常快速的实现将单通道方法扩展至多通道。Transcend II系统最多支持四通道的分析，实现了在线前处理的四通道液相为Transcend II TLX-4系统，其实物外观如图3所示，包含4个loading

pump, 4个eluting pump, 一个双臂Triplus自动进样器和一个阀箱（Valve Interface Module, VIM）。



图3. Transcend II TLX-4四通道在线前处理液相实物图

阀箱中一共包含10个切换阀，如图4所示。每个通道包含一个A阀和B阀，另外还有四个通道的通道选择阀和连接废液的切换阀。在方法编辑的过程中，我们仅需要注意液相方法本身，AriaMX软件会自行计算各个阀的切换时间，使得方法开发大大简化。由此可见阀箱和AriaMX软件是整个多通道液相系统的核心。

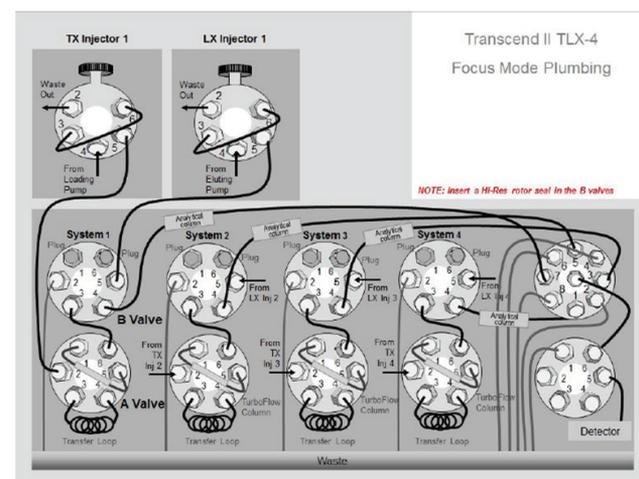


图4. Transcend II TLX-4四通道在线前处理液相流路示意图

实验结果和讨论

1. 对TLX-4系统进行的改动和优化

为了使Transcend II TLX-4系统能够更好的适应生物大分子的分析，我们对系统进行了一系列的优化。首先Transcend II系统的默认管线连接均为不锈钢，为了使得系统具有更优秀的生物兼容性，我们将所有管线替换为了PEEK材质。随后由于PEEK管线的耐压一般只能到250Bar，因此我们选择了背压很低的整体柱作为SPE小柱和分析柱，同时满足系统背压和生物兼容性的要求。第三，由于蛋白沉淀后上清液中含有很高的有机相比比例（约60%乙醇），因此进行大体积进样时会产生非常明显的溶剂效应而导致IGF-1不能结合在SPE小柱上。为了克服溶剂效应我们在进样阀和SPE小柱之间加装了一个250uL的PEEK材质的在线混匀器来实现样品的在线稀释，从而使得IGF-1可以很好的结

合在SPE小柱上。最后，在transfer阶段，为了使得从SPE小柱上洗脱下来的IGF-1能够更好的进行在线稀释，我们在B阀的出口使用了50uL的线性混匀器使得从SPE小柱上洗脱下来的IGF-1能够更好的进行在线稀释并结合在分析柱上，使得最终的峰型更加尖锐。

2. 各通道间保留时间和信号相应的一致性

将单通道液相方法拓展到多通道时，最为重要的考察项目即为各个通道间被分析物的保留时间和信号强度的一致性。我们最终将每个通道的质谱采集时间定为一分钟，在整个液相方法的3.4分钟开始进行质谱的采集，这样各通道内目标人IGF-1和内标15N IGF-1的出峰时间正好都在0.48分钟左右，通道间的误差不超过0.02分钟（图5A, B）。除了保留时间外，各通道目标和内标化合物的信号响应也呈现出高度的一致性，同一样品用四个通道进行分析，其目标和内标IGF-1峰面积的偏差均在7%以内（图5A, B）。我们在每个通道上都采集了一套标准曲线数据，发现采用外标法的话各个浓度点的目标IGF-1的峰面积的RSD均在15%以内，而使用内标法的话RSD更是都能保证在10%以内（图5C）。

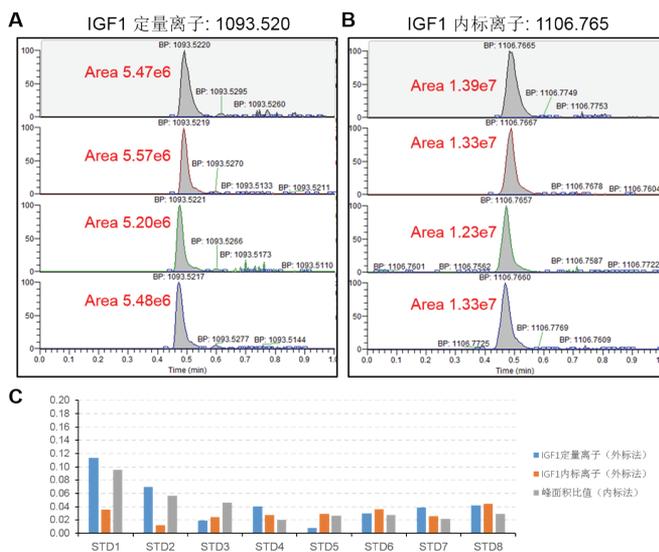


图5. 各通道间保留时间和峰面积响应的一致性

3. 线性范围，准确度和精密度

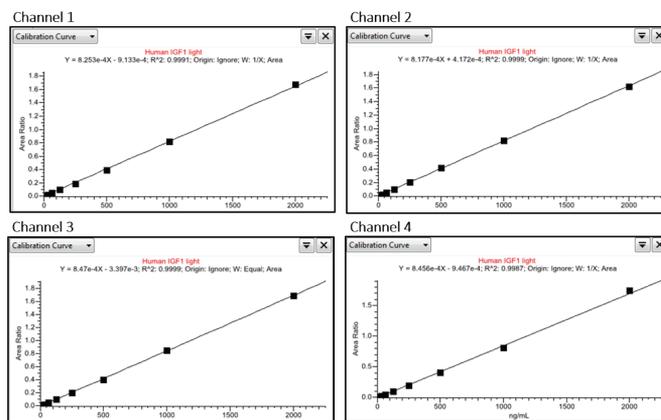


图6. 四个通道独立的标准曲线

美国最大第三方独立医学实验室Quest的长期临床数据显示，人群中IGF-1的参考范围为14ng/mL - 800ng/mL（高分辨质谱法检测），该数值跟年龄和性别相关。因此我们将标准曲线的范围定为15.6ng/mL - 2000ng/mL，考察LLOQ为10ng/mL。四个通道的标准曲线均显示出了极佳的线性，并且标准曲线各点和实际偏差均小于10%（图6，表2，表3）。对内标的峰面积采用外标法进行考察，可见每个通道的内标响应均高度稳定（RSD < 10%），体现出了方法的强健性（表2）。

	标准曲线线性范围	r ² , 线性拟合, 1/x权重	LLOQ	内标CV%
通道1	15.6 - 2000ng/mL	0.9991	10ng/mL	4.55
通道2	15.6 - 2000ng/mL	0.9999	10ng/mL	1.26
通道3	15.6 - 2000ng/mL	0.9999	10ng/mL	7.83
通道4	15.6 - 2000ng/mL	0.9987	10ng/mL	2.48

表2. 每个通道标准曲线范围和r²

	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	STD7	STD8
浓度 (ng/mL)	15.625	31.25	62.5	125	250	500	1000	2000
通道1 回收率 (%)	99.3	103.2	107.1	99.4	94.2	95.3	99.6	101.9
通道2 回收率 (%)	98.4	98.4	98.7	102.5	100.5	102.2	100.2	99.2
通道3 回收率 (%)	114.7	87.2	106.3	95.2	97.6	97.1	101.5	100.5
通道4 回收率 (%)	112.4	98.8	98.6	97.4	95.8	97.9	96.0	103.2

表3. 每个通道标准曲线各点回收率

由图7可见，LLOQ点（10ng/mL）的定量离子依旧展现出了良好的色谱峰型和极佳的信噪比（均未进行平滑），且各通道间的信号响应也高度一致。而基质空白中则基本观察不到目标化合物的响应，表明15N标记的IGF-1是一个非常合适的内标。

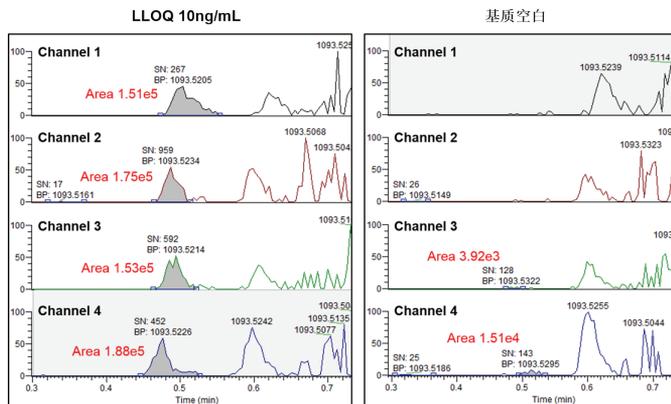


图7. 各通道LLOQ和基质空白IGF1定量离子的提取离子流图

结论

本文通过使用Transcend II TLX-4四通道在线前处理液相系统建立了高通量的完整IGF-1分析方法。该方法的前处理非常简单，仅有两步沉淀，可在3小时内完成样品的前处理，四通道液相的使用极大的提升了分析通量，实现了1分钟一个样品的检测。由于各通道间被分析物的保留时间和信号强度高度一致，因此标准曲线可以在四个通道上合并采集完成，进一步增加分析通量。当然为了得到更为严谨的结果，也可以把四通道系统当做四套独立的液相分别建立标准曲线，以最大程度保证定量的准确性。

参考文献

1. Bredehoft, M., W. Schanzer, and M. Thevis, Quantification of human insulin-like growth factor-1 and qualitative detection of its analogues in plasma using liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2008. 22(4): p. 477-85.
2. Frystyk, J., P. Freda, and D.R. Clemmons, The current status of IGF-I assays--a 2009 update. *Growth Horm IGF Res*, 2010. 20(1): p. 8-18.
3. Hines, J., et al., Detection of IGF-1 protein variants by use of LC-MS with high-resolution accurate mass in routine clinical analysis. *Clin Chem*, 2015. 61(7): p. 990-1.
4. Bronsema, K.J., et al., A quantitative LC-MS/MS method for insulin-like growth factor 1 in human plasma. *Clin Chem Lab Med*, 2018. 56(11): p. 1905-1912.
5. Cox, H.D., et al., Interlaboratory agreement of insulin-like growth factor 1 concentrations measured by mass spectrometry. *Clin Chem*, 2014. 60(3): p. 541-8.
6. Kay, R., et al., A novel mass spectrometry-based method for determining insulin-like growth factor 1: assessment in a cohort of subjects with newly diagnosed acromegaly. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2013. 78(3): p. 424-30.
7. Bystrom, C.E., S. Sheng, and N.J. Clarke, Narrow mass extraction of time-of-flight data for quantitative analysis of proteins: determination of insulin-like growth factor-1. *Anal Chem*, 2011. 83(23): p. 9005-10.
8. Breier, B.H., B.W. Gallaher, and P.D. Gluckman, Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I: solutions to some potential problems and pitfalls. *J Endocrinol*, 1991. 128(3): p. 347-57.



赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC