

提高靶向宿主细胞蛋白肽段定量分析灵敏度的策略

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

Ian Moore¹, Lei Xiong²

¹ SCIEX, Canada, ² SCIEX, USA

宿主细胞蛋白 (Host cell proteins, HCPs) 是与重组生物药剂生产过程相伴产生的主要杂质种类。其含量与制剂的安全性和有效性密切相关, 因此从制剂开发到质量控制整个过程都非常需要对HCPs进行定量测定。

在下游生产和质量控制阶段, 需要靶向定量的HCPs通常是预先制定好的, 它们在最终制剂或之后纯化步骤中痕量存在。这使得对于建立更高灵敏度、更快速分析、更皮实耐用、更具复合分析能力 (一针进样定量更多的分析物) 的靶向HCP分析方法的需求更加强烈。三重四极杆和QTRAP液质联用系统由于其优异的定量分析能力, 是开展这项工作的理想平台。

此策略是基于SCIEX Triple Quad 7500 LC-MS/MS系统-QTRAP Ready开发了靶向HCP的分析流程。在离子源和质量分析器前端部分的多重硬件提升, 使得仪器灵敏度得到显著提高。¹

通过分时间段多重反应监测模式算法 (Scheduled MRM™ 算法) 2的使用可以完成8 min内同时定量48个蛋白质 (每个蛋白4个检测通道) 的液质联用分析, 定量下限为0.02~4.54 ppm。

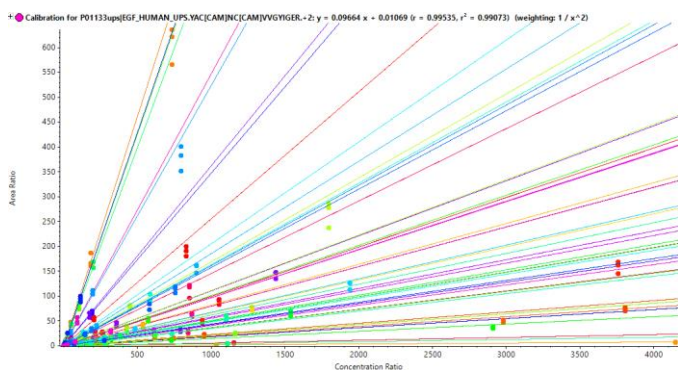


图1. 48个宿主细胞蛋白中选择的代表性的肽段标准曲线。



靶向HCP定量分析流程的主要特点

- 较以往检测系统灵敏度的提升, 使得信噪比有4倍的提高¹
- 在离子生成 (结合E Lens™技术的OptiFlow™ Pro离子源) 和离子传输 (D Jet™离子导向) 方面的硬件提升
- SCIEX OS软件用于数据采集和数据处理 —方便使用, 集合数据采集、处理、管理于一体的平台
- 通过分时间段MRM算法实现高复合分析, 一针8 min液质联用方法检测超过200个通道, 提高工作效率
- 分析方法具有优异的灵敏度、准确性和定量线性, 使得定量检测更加可靠。

实验方法

样品前处理: 通过Sigma-Aldrich公司购置NIST单克隆抗体 (NISTmAb) 和通用蛋白组学标准品 (Universal Proteomics Standard, UPS)。实验中, NISTmAb作为生物制剂分子, 而UPS混合物中48个人源蛋白质模拟靶向的HCPs进行定量检测。牛血清

蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 作为内标。将UPS蛋白质和BSA加入NISTmAb溶液中配置成高浓度的标准样品。用含有BSA的NISTmAb溶液进行连续稀释。在所有样品中NISTmAb和BSA的浓度保持一致。³

样品加入N-辛基葡萄糖苷 (OGS) 孵育变性, 二硫苏糖醇 (DTT) 进行还原, 碘代乙酰胺 (IAM) 烷基化处理。按酶-蛋白质1:25比例加入胰蛋白酶/赖氨酸-C 37°C消化反应过夜。样品12000 g离心后进样分析。

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1、2和A1。

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。

表1. MRM分析的色谱条件

参数	数值
色谱柱	Phenomenex Kinetex C18 3 × 50 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
梯度	5 min内流动相B从12%变为32%
总分析时间	包括柱平衡时间共8 min
流速	0.5 mL/min
柱温	40 °C
进样体积	20 μL
切换阀设定	1-6.2 min进入质谱系统

表2. SCIEX 7500系统的源气参数

参数	数值	参数	数值
气帘气	40 psi	源温度	550°C
雾化气	50 psi	辅助气	70 psi
碰撞诱导解离气	11	离子喷雾电压	1500 V

特征肽段的选择和MRM方法开发

在以前的文献中, 阐述了特征肽段的选择和MRM方法开发的过程。¹ 基于TripleTOF™ 6600+ LC-MS/MS系统对酶解后的NISTmAb-UPS蛋白混合物进行数据依赖性采集 (IDA) 模式分析。IDA数据基于NISTmAb、UPS蛋白和BSA序列利用ProteinPilot™软件5.0进行处理。数据库搜索结果文件 (作为肽段库) 和蛋白序列一同导入Skyline软件。基于肽段/通道设置和肽段库匹配生成MRM检测通道列表。

将MRM检测通道列表导入SCIEX OS软件, 经过8 min梯度的试验进样确定每个肽段的保留时间 (图2)。保留时间数据上传至分时间段MRM算法进行方法优化运算, 优化每个MRM检测通道的驻留时间。分时间段采集的方法用于所有定量分析数据的分析。

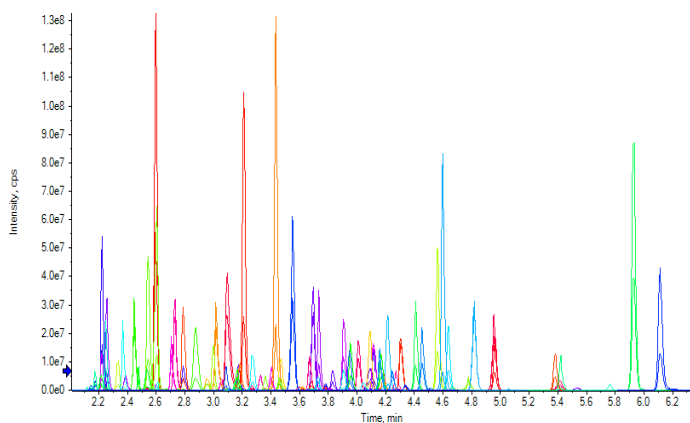


图2. 获得高质量的色谱图。基于液质联用的靶向HCP定量分析流程的48个目标蛋白质 (~200个检测通道) 的提取离子流图。

基于SCIEX Triple Quad 7500 LC-MS/MS系统-QTRAP Ready的HCP定量分析

SCIEX 7500系统通过离子生成和传输效率的优化提高了检测灵敏度。为了表征对宿主细胞蛋白定量流程的影响, 利用SCIEX 7500系统对UPS蛋白连续稀释的样品进行分析。信噪比平均提高了4倍 (图3)。

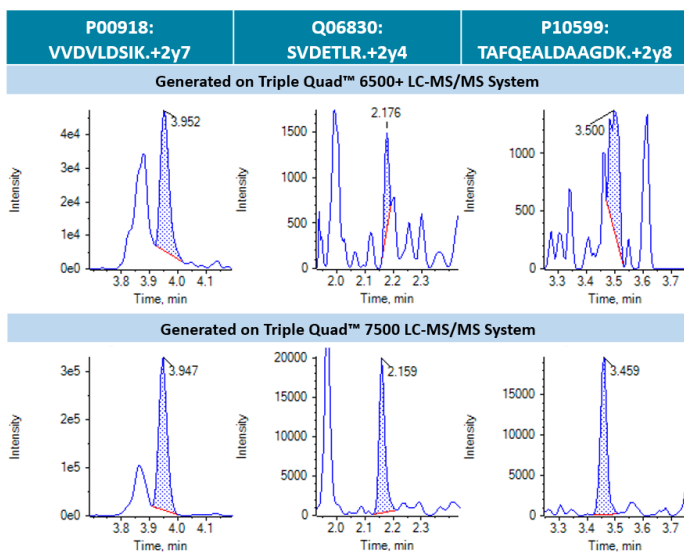


图3. 检测灵敏度。代表性肽段通过SCIEX 7500系统（底部）检测的MRM提取离子流图比较。

在保持NISTmAb每一针进样量为20 μg的情况下，UPS蛋白（HCPs）的定量限水平用ppm表示。所有48个蛋白通过每个蛋白2个肽段、每个肽段两个检测通道进行检测确认和定量分析。定量限为0.02-4.54 ppm，其中2/3的蛋白为0.02-1 ppm。其余的为1-4.54 ppm（图4）。所有肽段的准确度为85-115%，相对标准偏差不超过15%。UPS蛋白在定量限水平的代表提取离子流图和定量结果见图1，4和5。

结论

- 靶向HCP定量分析流程的建立体现了SCIEX 7500系统的高灵敏度、高分析通量、高耐用性以及高复合分析能力
- 信噪比平均提高4倍
- 具有极其优异的灵敏度，其中2/3的目标蛋白为0.02-1 ppm。其余的为1-4.54 ppm
- 在高确信度（每个蛋白4个检测通道）的情况下，所有48个蛋白质的定量用8 min的液质联用分析方法完成

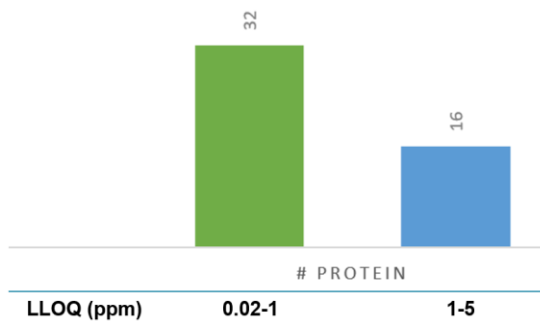
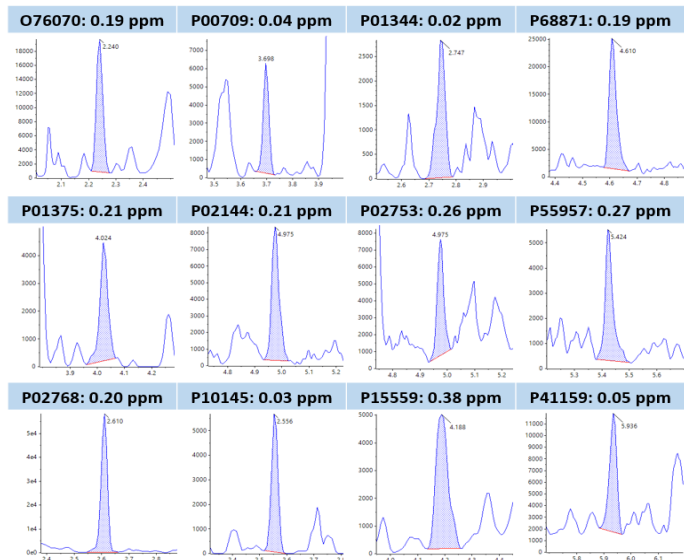


图4. UPS蛋白定量限汇总。（顶部）HCPs在定量限水平的肽段MRM离子提取流图，并列出了各自的Uniprot注册号和定量限浓度。（底部）48个蛋白中32个（67%）的定量限为0.02-1 ppm。48个蛋白中16个（33%）定量限为1-5 ppm。

参考文献

1. Enabling new levels of quantification. SCIEX technical note RUO-MKT-02-11886-A.
2. The Scheduled MRM™ Algorithm Pro. SCIEX Technical note RUO-MKT-02-8539-A.
3. Highly sensitive LC-MS/MS workflow for targeted quantification of host cell proteins. SCIEX technical note RUO-MKT-02-11418-A.

图 5. 代表性的5个蛋白质定量结果汇总。列出了浓度范围（单位为ppm）、相对标准偏差和准确度。

Component Name	Actual Conc...	Num. Values	Mean	Standard Deviation	Percent CV	Accuracy
P01344ups IGF2_HUMAN_UPS.GIVEEC[CAM]C[CAM]FR.+2y6.	0.02	3 of 3	2.191e-2	2.346e-3	10.71	95.28
P01344ups IGF2_HUMAN_UPS.GIVEEC[CAM]C[CAM]FR.+2y6.	0.09	3 of 3	1.087e-1	8.379e-3	7.71	119.40
P01344ups IGF2_HUMAN_UPS.GIVEEC[CAM]C[CAM]FR.+2y6.	0.37	3 of 3	3.563e-1	2.084e-2	5.85	97.63
P01344ups IGF2_HUMAN_UPS.GIVEEC[CAM]C[CAM]FR.+2y6.	1.46	3 of 3	1.471e0	8.870e-2	6.03	100.73
P01344ups IGF2_HUMAN_UPS.GIVEEC[CAM]C[CAM]FR.+2y6.	5.84	3 of 3	5.192e0	6.381e-2	1.23	88.90
P01344ups IGF2_HUMAN_UPS.GIVEEC[CAM]C[CAM]FR.+2y6.	23.36	3 of 3	2.345e1	1.417e0	6.04	100.38
P01344ups IGF2_HUMAN_UPS.GIVEEC[CAM]C[CAM]FR.+2y6.	93.44	3 of 3	9.126e1	1.041e1	11.41	97.67
Component Name	Actual Conc...	Num. Values	Mean	Standard Deviation	Percent CV	Accuracy
P01375ups TNFA_HUMAN_UPS.VNLLSAIK.+2y7.light	0.21	3 of 3	2.131e-1	3.175e-2	14.89	100.54
P01375ups TNFA_HUMAN_UPS.VNLLSAIK.+2y7.light	0.85	3 of 3	8.228e-1	2.495e-2	3.03	97.15
P01375ups TNFA_HUMAN_UPS.VNLLSAIK.+2y7.light	3.39	3 of 3	3.493e0	4.035e-1	11.55	103.07
P01375ups TNFA_HUMAN_UPS.VNLLSAIK.+2y7.light	13.56	3 of 3	1.318e1	1.560e0	11.84	97.21
P01375ups TNFA_HUMAN_UPS.VNLLSAIK.+2y7.light	54.23	3 of 3	5.784e1	4.111e0	7.11	106.66
P01375ups TNFA_HUMAN_UPS.VNLLSAIK.+2y7.light	216.91	3 of 3	2.262e2	1.523e1	6.74	104.26
P01375ups TNFA_HUMAN_UPS.VNLLSAIK.+2y7.light	867.65	3 of 3	7.906e2	4.000e1	5.06	91.12
Component Name	Actual Conc...	Num. Values	Mean	Standard Deviation	Percent CV	Accuracy
P02144ups MYG_HUMAN_UPS.HGATVLTALGGILK.+3b5.light	0.21	3 of 3	2.083e-1	2.865e-2	13.76	100.15
P02144ups MYG_HUMAN_UPS.HGATVLTALGGILK.+3b5.light	0.83	3 of 3	8.232e-1	2.467e-2	3.00	98.82
P02144ups MYG_HUMAN_UPS.HGATVLTALGGILK.+3b5.light	3.33	3 of 3	3.369e0	4.529e-1	13.44	101.15
P02144ups MYG_HUMAN_UPS.HGATVLTALGGILK.+3b5.light	13.32	3 of 3	1.369e1	1.248e0	9.12	102.74
P02144ups MYG_HUMAN_UPS.HGATVLTALGGILK.+3b5.light	53.29	3 of 3	5.852e1	6.625e-1	1.13	109.81
P02144ups MYG_HUMAN_UPS.HGATVLTALGGILK.+3b5.light	213.16	3 of 3	2.070e2	2.198e1	10.62	97.10
P02144ups MYG_HUMAN_UPS.HGATVLTALGGILK.+3b5.light	852.65	3 of 3	7.694e2	9.460e1	12.30	90.23
Component Name	Actual Conc...	Num. Values	Mean	Standard Deviation	Percent CV	Accuracy
P05413ups FABPH_HUMAN_UPS.LILTLTHGTAVC[CAM]TR.1	0.18	3 of 3	1.802e-1	1.528e-2	8.48	100.13
P05413ups FABPH_HUMAN_UPS.LILTLTHGTAVC[CAM]TR.1	0.72	3 of 3	7.108e-1	7.111e-2	10.00	98.86
P05413ups FABPH_HUMAN_UPS.LILTLTHGTAVC[CAM]TR.1	2.88	3 of 3	2.913e0	3.641e-1	12.50	101.28
P05413ups FABPH_HUMAN_UPS.LILTLTHGTAVC[CAM]TR.1	11.51	3 of 3	1.186e1	7.617e-1	6.42	103.11
P05413ups FABPH_HUMAN_UPS.LILTLTHGTAVC[CAM]TR.1	46.02	3 of 3	4.889e1	4.387e0	8.97	106.24
P05413ups FABPH_HUMAN_UPS.LILTLTHGTAVC[CAM]TR.1	184.09	3 of 3	1.858e2	1.482e1	7.98	100.95
P05413ups FABPH_HUMAN_UPS.LILTLTHGTAVC[CAM]TR.1	736.35	3 of 3	6.585e2	3.983e1	6.05	89.43
Component Name	Actual Conc...	Num. Values	Mean	Standard Deviation	Percent CV	Accuracy
P41159ups LEP_HUMAN_UPS.VTGLDFIPGLHPILTLSK.+3y11+2	0.05	3 of 3	4.938e-2	6.649e-3	13.46	100.78
P41159ups LEP_HUMAN_UPS.VTGLDFIPGLHPILTLSK.+3y11+2	0.20	3 of 3	1.934e-1	2.484e-2	12.84	98.18
P41159ups LEP_HUMAN_UPS.VTGLDFIPGLHPILTLSK.+3y11+2	0.79	3 of 3	7.431e-1	1.537e-2	2.07	94.18
P41159ups LEP_HUMAN_UPS.VTGLDFIPGLHPILTLSK.+3y11+2	3.16	3 of 3	3.230e0	1.070e-1	3.31	102.33
P41159ups LEP_HUMAN_UPS.VTGLDFIPGLHPILTLSK.+3y11+2	12.62	3 of 3	1.224e1	2.971e-1	2.43	96.94
P41159ups LEP_HUMAN_UPS.VTGLDFIPGLHPILTLSK.+3y11+2	50.49	3 of 3	5.442e1	8.632e-1	1.59	107.78
P41159ups LEP_HUMAN_UPS.VTGLDFIPGLHPILTLSK.+3y11+2	201.98	3 of 3	2.016e2	7.902e0	3.92	99.80

表 A1. UPS蛋白 (包括蛋白名称和Uniprot注册号) 列表

Uniprot注册号	Uniprot蛋白名称[同义名]	Uniprot注册号	Uniprot蛋白名称[同义名]
P00915	Carbonic anhydrase 1	P55957	BH3 Interacting domain death agonist [BID]
P00918	Carbonic anhydrase 2	O76070	Gamma-synuclein
P01031	Complement C5 [Complement C5a]	P08263	Glutathione S-transferase A1 [GST A1-1]
P69905	Hemoglobin alpha chain	P01344	Insulin-like growth factor II
P68871	Hemoglobin beta chain	P01127	Platelet-derived growth factor B chain
P41159	Leptin	P10599	Thioredoxin
P02768	Serum Albumin	P99999	Cytochrome c[Apocytocrome c]
P62988	Ubiquitin	P06396	Gelsolin
P04040	Catalase	P09211	Glutathione S-transferase P [GST]
P00167	Cytochrome b5	P01112	GTPase HRas [Ras protein]
P01133	Epidermal Growth Factor	P01579	Interferon gamma (IFN-gamma)
P02144	Myoglobin C	P02787	Serotransferrin [Apo transferrin]
P15559	NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1 [DT Diaphorase] C	O00762	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 C [UbcH10]
P62937	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A [Cyclophilin A]	P51965	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 E1 [UbcH6]
Q06830	Peroxiredoxin 1	P08758	Annexin A 5
P63165	Small ubiquitin-related modifier 1 [SUMO-1]	P02741	C-reactive protein
P00709	Alpha-lactalbumin	P05413	Fatty acid-binding protein
P06732	Creatine kinase M-type [CK-MM]	P10145	Interleukin-8
P12081	Histidyl-tRNA synthetase [Jo-1]	P02788	Lactotransferrin
P61626	Lysozyme C	P10636	Microtubule-associated protein tau [Tau protein]
Q15843	Neddylin [Nedd8]	P00441	Superoxide dismutase [Cu-Zn]
P02753	Retinol-binding protein	P01375	Tumor necrosis factor [TNF-alpha]
P16083	Ribosylidihyronicotinamide dehydrogenase [quinone] [Quinone oxidoreductase 2] [NQO2]		
P63279	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 I [UbcH9]		
P01008	tithrombin-III		
P61769	Beta-2-microglobulin		

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-02-11820-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)