

用SCIEX 7500系统的多通路MRM策略进行可重复的靶向肽谱分析

Christie L Hunter

SCIEX, USA

多反应监测 (MRM) 是基于三重四极杆质谱系统上用于靶向蛋白定量和生物标志物验证/验证研究的可靠工具, 此策略是由质谱系统的高灵敏度和选择性属性驱动的。由于需要在多个样本中对大量蛋白质组分进行靶向性监测, 多通路MRM离子对策略在高通量蛋白分析中变得至关重要。在生物标记物研究项目中, 运行更多样本的需求日益增长, 这也推动了从纳升液相长梯度转换为微升液相的短梯度分析, 从而满足快速分析的要求。

但在定量分析时, 系统的稳定性仍然是关键, 以确保大样本组中, 各种大分析和小分子的生物变化都能得到准确的测量。生物基质中具有非常广泛的蛋白质丰度变化, 这就要求LC-MS/MS系统具有高灵敏度和宽的线性动态范围。



我们进行了一项模拟研究, 通过分析大规模靶向肽定量的工作流程, 以测试SCIEX Triple Quad™ 7500 LC-MS/MS 系统 - QTRAP® Ready的性能。微升液相色谱用来探索长梯度和短梯度对分析结果的影响。此方法采用超过4000个 MRM离子对策略进行定量重现性评估。

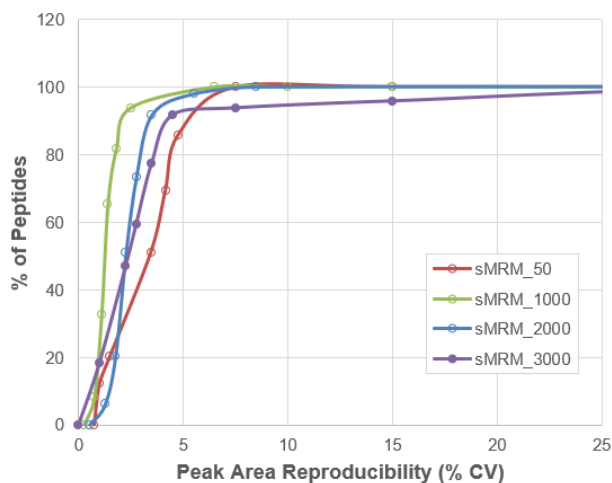


图1. 5分钟梯度条件下, 多通路分析的卓越定量精度。在微升液相联用SCIEX 7500系统上进行10次重复进样分析时, 在复杂基质中加入3个蛋白酶解液 (1 μg柱上进样), 用50个MRM多肽离子对MRM策略进行重现性评价。使用sMRM算法可获得高达3000多个MRM离子对的高重现性, 有超过90%肽段的CV%低于4.5%。

SCIEX 7500系统多通路多肽MRM离子对策略的主要特点

- SCIEX Triple Quad™ 7500 LC-MS/MS系统 - QTRAP Ready提供了多肽定量的高灵敏度, 配置的OptiFlow™Pro离子源使用E Lens™技术改善了离子化效率, 采用D Jet™离子引入技术可有效地利用离子¹
- OptiFlow Pro离子源提供了系统的灵活性和易用性, 可互换的探头和喷雾针, 这些技术更大限度地降低了用户优化系统的要求
- 可以非常方便地切换到微升液相色谱系统
- SCIEX OS 软件 2.0使用智能sMRM™算法, 可自动分配MRM的驻留时间, 允许在一次运行中分析更多的目标物
- sMRM算法使用多肽保留时间, 可自动计算出一个优化好采集方法, 而用户仅需提供很少的几个关键参数即可²

方法

样品制备: 将PepCalMix和酶解的β-半乳糖苷酶 (SCIEX) 简单混合, 并加入已酶切的牛血清白蛋白, 浓度为1 fmol/μL。样品制备在缓冲液中, 并添加到酶切的人K562细胞系样品中。

色谱条件: 使用NanoLC™425系统, 流速为5 μL/min, 采用富集洗脱 (trap elute) 模式进行样品分离; 色谱柱是Phenomenex C18柱 (Luna Omega Polar, 150 × 0.3mm, PHX P/N 00F-4760-AC), 30分钟的线性梯度分离肽段。色谱柱温度为30°C。上样量为6 μL。

质谱条件: 配置SCIEX OS软件的SCIEX Triple Quad 7500 LC-MS/MS 系统- QTRAP Ready进行数据采集。OptiFlow Pro离子源配置微升探头和微升E Lens。数据采集方式是sMRM; MRM采集模式中, 设置了大量离子对, 以评估增加多通路MRM结果的重现性。

数据处理: 所有数据利用SCIEX OS软件中的“AutoPeak”算法进行处理。

良好的色谱分离是多通路MRM策略的关键

为了在单一靶向MRM分析中分析越来越多的分析物, 高质量, 高重复性的色谱分离是必不可少的。sMRM策略之一是用户输入相应的保留时间区间。在这里, 使用基峰宽度和每个肽段的保留时间方差来计算保留时间的耐受区间。当然, 每个肽的色谱峰越窄, 该方法的保留时间耐受性就越小。使用微升色谱, 可以获得非常高质量的色谱图 (图2和图5)。在5分钟和30分钟的梯度洗脱中, 每种方法分别重复10针进样和15针进样, 其平均保留时间偏差 (%RSD) 分别为0.13%和0.2%。这意味着大多数色谱峰的保留时间偏移都不超过2秒。

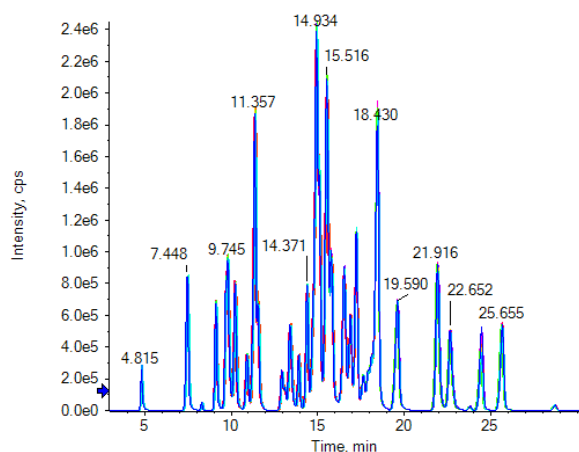


图2. 30分钟梯度洗脱的色谱重现性。 缓冲液中的3个蛋白酶切液样品, 重复进样15次, 其峰面积和保留时间稳定性方面都取得了很好的重现性。

图3所示是30分钟的梯度洗脱时, 模拟的增加MRM数量的并行策略 (并行策略是在任何时间点都要监控MRM)。由于色谱分离非常好, 在单一方法中可以运行多达4000个MRM离子对, 并且仍然保持较低的并行性 (图上部) 和较高的驻留时间 (图下部)。在SCIEX OS软件的sMRM Summary功能中计算并显示出每个MRM的驻留时间, 以帮助方法开发²。每个MRM的驻留时间在5或10毫秒左右, 确保定量数据是高质量的, 特别是对于低丰度蛋白更为重要。

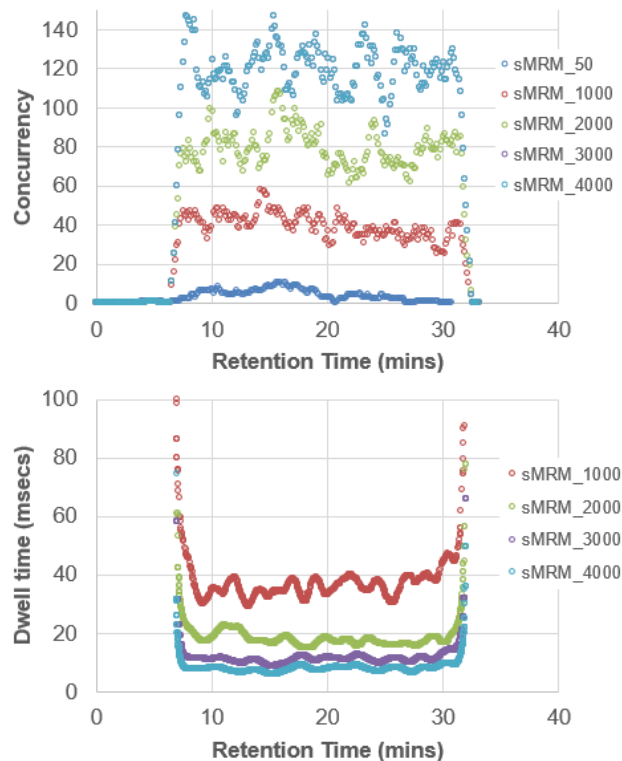


图3. sMRM策略对MRM检测窗口的影响。 30分钟的液相梯度, 将更多MRM离子对添加到采集方法中, 并绘制MRM并行性 (上) 和驻留时间 (下) 与保留时间的相关图。因为窄的色谱峰保留时间区间, 需要更高重现性的色谱分离, 因此保持足够长的驻留时间以保证高质量的定量结果。

sMRM策略对定量重现性的影响

我们设计了一个实验来评估多通路MRM策略对SCIEX 7500 系统分析重现性的影响 (图4)。我们建立了50个胰蛋白酶肽的MRM离子对, 来测试了其重现性 (sMRM_50)。接下来, 随机设置更多的MRM离子对和保留时间, 并将其添加到50个真实MRM离子对方法中, 使用sMRM策略算法创建包含1000、2000、3000和4000个MRM离子对的分析方法。通过重复进样, 计算每种方法的50个真实MRM离子对的重现性, 用来评价每种采集方法中每个色谱峰的峰面积和保留时间的重现性。

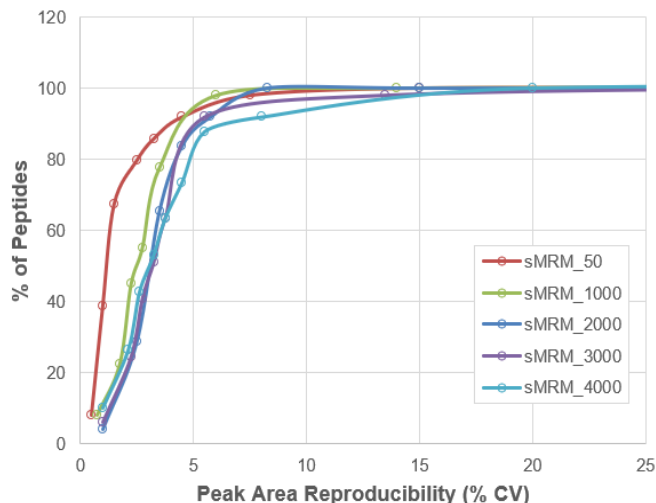


图4. 用sMRM采集策略评价多通路的定量准确性。微升液相（30分钟梯度）联用SCIEX 7500系统，采集方法是设置50个多肽MRM离子对（3个蛋白酶切样品），重复进样15次，对数据进行重现性评价。每一种方法采用4000个MRM离子对策略，其结果都有很高的重现性，重现性置信区间为：85-90%之间，重现性偏差都小于（CV%）5%。

每次实验中，15次重复样品进样，计算50个胰蛋白酶肽的峰面积和保留时间来检测这些分析方法的重现性（图4）。通过绘制叠加的%CV曲线，就可以方便地显示每次分析增加MRMs数量的影响。在30分钟的梯度中，大约85-90%的肽段显示了小于5%的变异偏差。表1给出了平均MRM峰面积的偏差值，保留时间的重现性以及每个MRM的平均驻留时间。

表1. 实验中获取的平均重现性

	平均峰面积变异系数%	平均保留时间相对标准偏差%	平均驻留时间(毫秒)
30分钟梯度			
sMRM_50	2.46	0.24	250.0
sMRM_1000	3.20	0.20	39.1
sMRM_2000	3.81	0.19	25.6
sMRM_3000	4.31	0.25	15.6
sMRM_4000	4.53	0.20	12.4
5分钟梯度			
sMRM_50	4.01	0.11	148
sMRM_1000	1.94	0.13	12
sMRM_2000	2.72	0.10	4.4
sMRM_3000	3.81	0.17	3

快速色谱策略

除了使用sMRM策略来增加多通路MRM，也可以使用提高洗脱速度来进行定量实验。实验使用5分钟的梯度洗脱，并增加MRM离子对数量进行数据采集（图1，表1）。在这种情况下，3种蛋白质酶切样品添加到酶切人细胞裂解液中，来考察基质效应的影响。同样，在5分钟的梯度内，采集策略中增加到3000个MRM离子对，且平均峰面积偏差（CV）都低于5%，也获得良好的数据重现性。由于SCIEX 7500系统的高灵敏度性能，获取这种高质量的数据是成为可能；SCIEX 7500系统和重现性良好色谱分离能力，允许使用窄的保留时间区间（图5）。

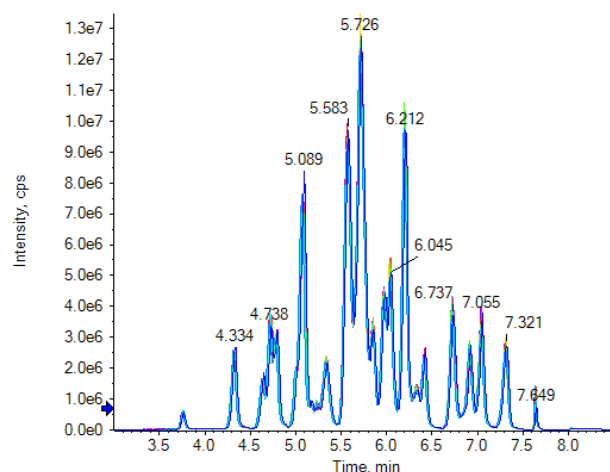


图5. 5分钟梯度洗脱的色谱重现性。同样，在对复杂基质中3种蛋白质酶切样品的重复分析（n=10）中，在峰面积和保留时间稳定性方面都取得了非常好的重现性。

强大的MRM数据处理软件

SCIEX OS软件在大规模MRM策略中，对肽段定量数据的采集和处理提供了一个全面的软件包。如上所述，此方法可查看对整个方法设置驻留时间的影响，试验开发得到了简化。使用分析模块进行数据处理，使用AutoPeak功能中的MRM峰面积积分，都可非常自动化的完成，并能够简化和快速的定量数据处理5。由于该软件能够支持多样本和多通路的肽段MRM实验，因此非常适合用于生物标志物验证分析、跟踪不同样本中翻译后修饰（如磷酸化）的变化、生物通路分析和其它靶向肽定量分析。

结论

利用sMRM策略构建MRM采集方法，为MRM方法的生成和使用提供了巨大的优势。它允许并行监视更多的离子对，而不必使用更短的驻停时间或更长的循环时间。这确保了在一次液相运行中，即使用4000个MRM离子对同时采集数据，也能获取良好的数据重现性。

SCIEX Triple Quad 7500 LC-MS/MS系统-QTRAP Ready的灵敏度和定量重现性使得即使在单个方法中有非常多的MRM离子对，也可以获取到非常好的峰面积重现性。与高重现性的微升液相结合，LC-MS/MS系统为靶向生物标志物研究提供了一个强大的大规模多肽定量平台。

参考文献

1. Enabling new levels of quantification. SCIEX technical note RUO-MKT-02-11886-A.
2. Using Scheduled MRM™ Algorithm in SCIEX OS Software. SCIEX community post RUO-MKT-18-11941-A.
3. Controlling SCIEX microflow LC Systems using contact closure in SCIEX OS Software. SCIEX community post RUO-MKT-18-11908-A.
4. High Sensitivity MRM workflow for signature peptide quantification. SCIEX technical note RUO-MKT-02-11882-A.
5. AutoPeak Integration Algorithm. SCIEX community post RUO-MKT-18-10329-A.

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-02-12094-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)