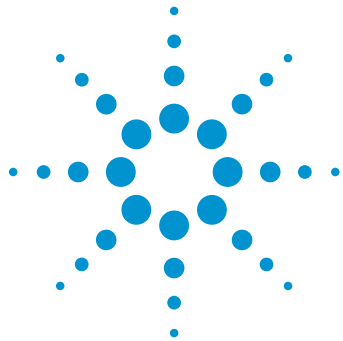




采用 Agilent 1290 Infinity LC 和 6490 三重四极杆 LC/MS 系统对血清载脂蛋白 A-I 和 B 进行准确测定

应用简报

作者

N.P.M. Smit, F.P.H.T.M. Romijn,
I. van den Broek, Y.E.M. van der Burgt,
C.M. Cobbaert

临床化学和检验医学部,
莱顿大学医学中心
荷兰莱顿市

M. Haex
安捷伦科技有限公司
荷兰阿姆斯特丹

摘要

本实验采用稳定同位素稀释法 (SID) 和多反应监测质谱法 (MRM-MS) 开发了一个用于同时测定血清中载脂蛋白 A-I 和 B 的液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 方法。方法联用 Agilent 1290 Infinity LC 和 Agilent 6490 三重四极杆 LC/MS 系统。采用如下样品处理过程进行血清消化：向 0.5 μ L 血清中加入 6 mol/L 尿素使蛋白变性，再加入 1 μ g 胰蛋白酶生成多个载脂蛋白 A-I 和 B 的特征肽。在正常和高甘油三酯血症血清中，都可以准确测出这些特征肽。

实验采用确定浓度、基质匹配的混合血清样品直接进行校准。载脂蛋白 A-I 多肽的运行间不精密度小于 8.6%，载脂蛋白 B 多肽的运行间不精密度小于 6.4%。总之，采用带 iFunnel 技术的 Agilent 6490 三重四极杆 LC/MS 系统，只需很少量的样品即可同时对血清载脂蛋白 A-I 和 B 进行准确的定量分析。



Agilent Technologies

前言

心血管临床研究中一个常见的主题就是血清胆固醇、高密度和低密度脂蛋白胆固醇 (HDLc 和 LDLc) 的测定。由于高密度脂蛋白 (HDL) 和低密度脂蛋白 (LDL) 颗粒存在异质性, 因此 HDLc 和 LDLc 测定的方法很难实现标准化。由于高甘油三酯血症样品产生的干扰, 这些分析的结果也时常不准确。实际存在一种潜在的替代型 HDLc 和 LDLc 测定方法, 即测定与其相应的载脂蛋白。载脂蛋白 (Apo) A-I 和 B 是 HDL 和 LDL 颗粒最重要的蛋白, Apo B/Apo A-I 的比率对于临床研究非常有价值¹。本应用简报将探讨采用 LC/MS/MS 实现血清 Apo A-I 和 B 的多成分定量分析。

通过联用液相色谱与质谱 (LC-MS/MS) 测定胰蛋白酶消化所得特征肽, 可实现载脂蛋白高灵敏度、高选择性的直接定量分析²⁻⁵。此外, LC-MS/MS 的高特异性可以防止在血脂异常血清中发生与其他类型分析一样的干扰。

实验采用 Agilent 1290 Infinity LC 系统和带 iFunnel 技术的 6490 三重四极杆 LC/MS 系统, 开发了用于 Apo A-I 和 B 定量的 LC-MS/MS 分析方法。此方法仅使用少量样品 (0.5 µL), 即可分析来自 Apo A-I 和 B 以及潜在其他载脂蛋白的多种特征肽。

实验部分

样品制备

采用 pH 8 的 50 mmol/L 碳酸氢铵 (ABC) 溶液将人血清样品稀释 28 倍 (5 µL + 135 µL)。采用 6 mol/L 尿素溶液将载脂蛋白从脂蛋白颗粒中溶出并使之变性。采用 9.1 mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT) 溶液还原二硫键, 并采用 21.5 mmol/L 碘乙酰胺 (IAA) 溶液进行烷基化。在添加 ABC 稀释尿素溶液至终浓度 0.76 mol/L 后, 使用 1 µg 测序级胰蛋白酶 (普洛麦格公司) 对每个样品进行消化 (表 1)。

表 1. 用于血清 Apo A-I 和 B 测定的样品制备步骤

正常混合血清/确定浓度的校准样品				
		混合物中的终浓度		
变性 — 还原 30 min, 56 °C		还原	烷基化	消化产物
	体积 (μL)	63	80	500
样品/ABC	14			
内标混合物* (A-I 和 B)	7	635 nmol/L A-I 和 32 nmol/L B		80 nmol/L A-I 和 4 nmol/L B
9 mol/L 尿素/ABC	37	6.0 mol/L 尿素溶液		
0.115 mol/L DTT/9 mol/L 尿素/ABC	5	9.1 mmol/L DTT 溶液		0.76 mol/L 尿素溶液
烷基化 30 min RT (黑暗环境下)				
0.101 mol/L 碘乙酰胺溶液	17		21.5 mmol/L	
消化 20 h, 37 °C				
50 mmol/L ABC	390			
胰蛋白酶	30			33.3 mg/L
总分析体积	500			
甲酸 10% (v/v)	15			
最终体积	515			

采用 pH 8 的 50 mmol/L 碳酸氢铵缓冲液 (ABC) 将血清样品稀释 28 倍。
*内标: 分别加入了终浓度分别为 80 nmol/L 和 4 nmol/L 的 Apo A-I 和 B SIS 肽。

胰蛋白酶将载脂蛋白从精氨酸 (R) 和赖氨酸 (K) 处裂解, 生成选择用于 Apo A-I 和 B 检测的特征肽 (表 2)。向每个样品中加入已知浓度、由稳定同位素标记的标准 (SIS) 肽 (由我们自己合成), 以校正样品检测中的任何损失。按照 CLSI C37-A 配制三种确定浓度、基于血清的校准样品, 用于血清中 Apo A-I 和 Apo B 的直接定量分析。校准样品可溯源到 WHO-IFCC 标准。目标值为: Apo A-I 的浓度为 1.15 g/L、1.60 g/L 和 1.60 g/L (浓度 2 和浓度 3 相同), Apo B 的浓度为 0.76 g/L、0.80 g/L 和 1.29 g/L。

数据采集

色谱分离在 Agilent 1290 Infinity 液相色谱 (UHPLC) 系统上进行, 采用一个 15 min 的梯度程序 (5% - 95% (v/v) 甲醇/水 + 0.05% (v/v) 甲酸), 色谱柱为 ZORBAX Stable

Bond C18 色谱柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm), 流速 0.2 mL/min。采用 Agilent 6490 三重四极杆 LC/MS 系统进行检测。我们建立了一个动态 MRM (dMRM) 方法, 用于检测所选特征肽保留时间范围内特定的母离子和子离子 (定量离子和定性离子)。除特定的 MRM 离子对外, 定量和定性离子的保留时间及其比值也被用来确保这些特征肽的特异性检测。此外, 还使用了触发式 MRM (tMRM) 检测额外的子离子, 用于同合成标准肽的数据库谱图进行比较, 比较结果以匹配分值 (MS) 表示 (表 2)。

特征肽从相关文献²⁻⁵ 和 Peptide Atlas Best SRM 离子对列表中选出。实验通过测定相对于 SIS 肽的内源性肽含量并采用基于血清的校准样品, 利用来自 Apo A-I 和 B 的四种不同特征肽对血清中的 Apo A-I 和 B 进行了定量分析。

方法性能

通过长达 28 h 的胰蛋白酶时程消化实验, 我们考察了正常和高甘油三酯血症样品中胰蛋白酶消化的完整度及其肽组成。将不同浓度的 Apo A-I (1.15、1.26、1.38、1.49 和 1.60 g/L) 和 Apo B (0.76、0.89、1.03、1.16 和 1.29 g/L) 与浓度 1 和浓度 3 基于血清的校准样品混合并分析, 评价方法的线性和回收率。

通过分别重复 5 次测定两个混合血清 NPS1 和 NPS2 中的一个样品, 对仪器的变异性进行评估。通过一天内独立测定 5 次样品 (n = 5), 以及在 5 天里每天制备并测定 3 个样品 (n = 15) 来确定运行内差异和运行间差异。

表 2. dMRM 模式下, Apo A-I 和 Apo B 所选特征肽 (包括 SIS 肽) 的定量离子 (子离子 1) 和定性离子 (子离子 2) 的 MRM 离子对

序列[氨基酸] ^a	母离子	子离子 1	子离子 2	CE	Rt	比值	MS
载脂蛋白 A-I				V	min	%	%
DYVSQFEGSALGK ^[52-64]	700.8	1023.5	808.4	19	7.9	70	99
DYVSQFEGSALGK ^[52-64]	703.8	1023.5	808.4	19	7.9	-	-
VQPYLDDFQK ^[121-130]	626.8	1025.5	228.1	18	5.3	95	92
VQPYLDDFQK ^[121-130]	629.8	1025.5	234.1	18	5.3	-	-
AKPALEDLR ^[231-239]	506.8	813.4	716.4	14	3.6	8	99
AKPALEDLR ^[231-239]	510.3	820.4	723.4	14	3.6	-	-
QGLLPVLESFK ^[240-250]	615.9	819.5	299.2	20	11.0	47	95
QGLLPVLESFK ^[240-250]	619.4	826.5	299.2	20	11.0	-	-
VSFLSALEEYTK ^[251-262]	693.8	940.5	853.4	20	11.0	41	98
VSFLSALEEYTK ^[251-262]	697.3	947.5	860.4	20	11.0	-	-
载脂蛋白 B							
FPEVDVLTK ^[3791-3799]	524.3	900.5	450.8	20	8.0	10	82
FPEVDVLTK ^[3791-3799]	527.4	906.5	453.8	20	8.0	-	-
TGISPLALIK ^[220-229]	506.8	741.5	654.5	13	10.0	46	95
TGISPLALIK ^[220-229]	510.3	748.5	661.5	13	10.0	-	-
SVSLPSLDPASAK ^[642-654]	636.3	1085.6	885.5	15	7.9	12	92
SVSLPSLDPASAK ^[642-654]	639.8	1092.6	892.5	15	7.9	-	-
TEVIPPLIENR ^[950-960]	640.9	838.5	443.2	15	8.5	38	97
TEVIPPLIENR ^[950-960]	644.4	845.5	443.2	15	8.5	-	-

^a 用稳定同位素标记的氨基酸残基用下划线突出: V = Val+6 (¹³C₆, ¹⁵N₁) 及 L = Leu+7 (¹³C₆, ¹⁵N₁); CE: 碰撞能量; Rt: 保留时间。比值表示了定性离子比上定量离子 (子离子 2/子离子 1*100) 的平均百分率, MS: 混合血清和校准样品参比谱图比较的匹配率。

结果

肽选择

使用文献中描述的 MRM 转换在正常混合血清消化产物中筛选 Apo A-I 和 B 特征肽。在 15 min 的色谱运行（CE 设置为 20 V 和 15 V）中，采用 MRM 模式对所有离子对进行连续检测，分析样品。根据对标准肽的优化结果，对于肽 VQPYL 和 DYVSQ (Apo A-I)，以及 VSALL 和 FPEVD (Apo B)，使用 18 V、19 V、24 V 和 20 V 的碰撞电压值。

选择响应强度最高的肽 DYVSQ、VQPYL、AKPAL、QGLLP 和 VSFLS (Apo A-I)，以及 FPEVD、TEVIP、TGISP 和 SVSLP (未显示) (Apo B) 进行 Apo A-I 和 B 定量分析的进一步评价。对于选中的肽，其最佳碰撞能量通过在 10 - 28 V 的范围内测定合成肽进行确定。dMRM 方法中选择使定量离子具有最佳响应的碰撞能量（表 2）。

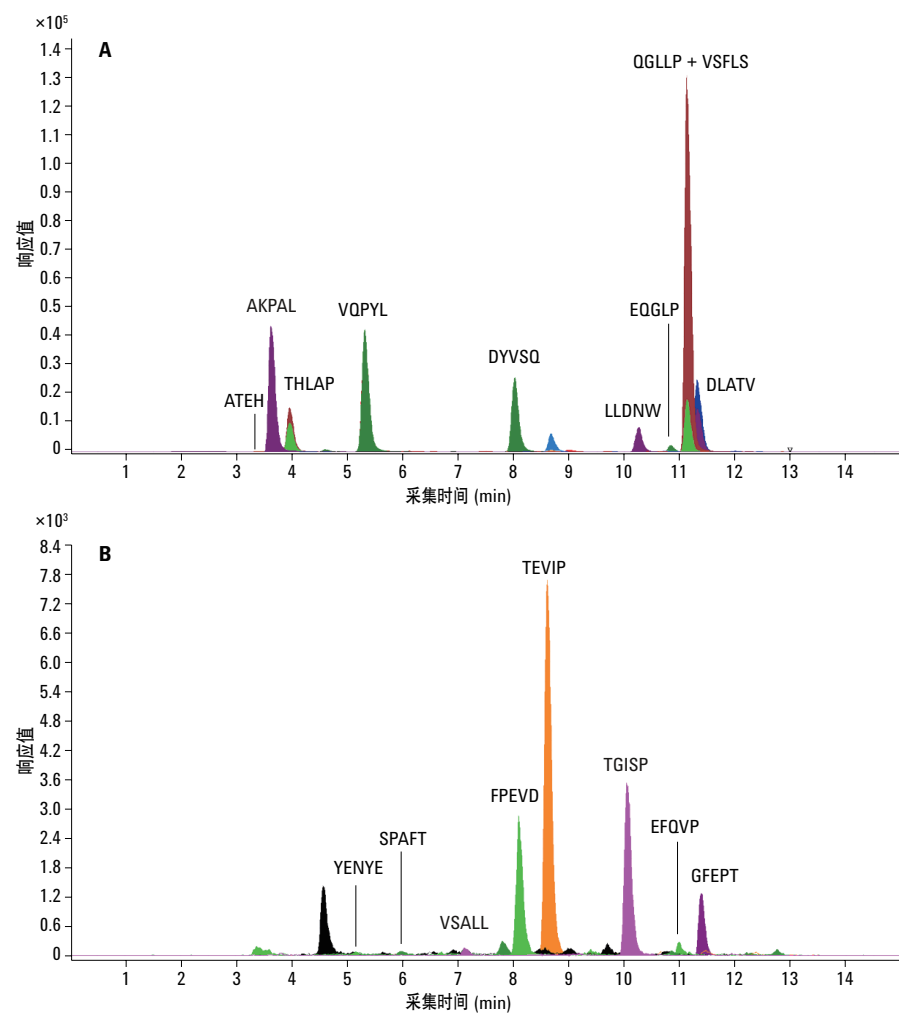


图 1. 在正常混合血清的胰蛋白酶降解产物中，通过其 MRM 离子对鉴定出 A) 10 个 Apo A-I 肽（满刻度 1.4×10^5 ）和 B) 8 个 Apo B 肽（满刻度 8.4×10^3 ）

肽生成的完整性

正常甘油三酯和高甘油三酯血症血清样品 (n = 2) 消化产物中肽的生成见图 2 和 3, 并展示了肽 AKPAL、TGISP、QGLLP 和 TEVIP 测定的实例。

高甘油三酯血症血清中 Apo A-I 和 B 肽的生成动力学与正常甘油三酯血清的类似。在 4–8 h 内, Apo A-I 的肽 AKPAL、QGLLP 和 VSFLS 得到了完全消化, 而 VQPYL 和 DYVSQ 则出现较慢。对于 Apo B, 4 h 内即出现肽 SVSLP、TEVIP 和 TGISP 的最大值, 而 FPEVD 则需要 20 h。没有使用 DYVSQ 是由于其重现性很差。

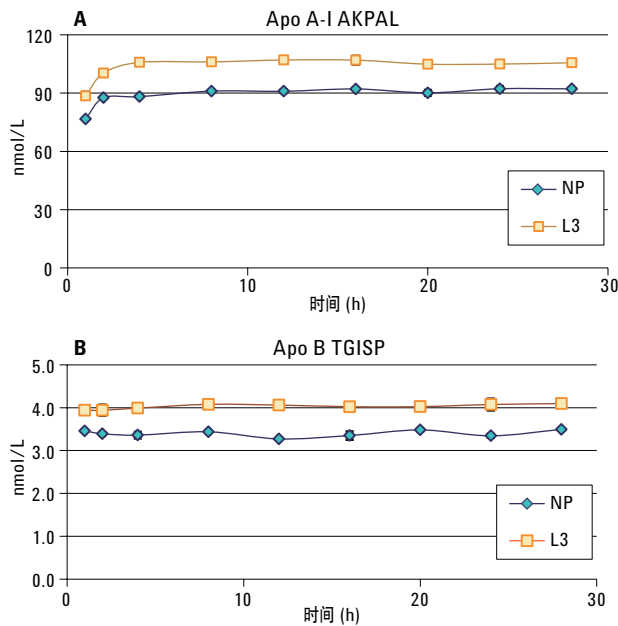


图 2. 对于正常混合血清 (NP) 和确定浓度的浓度 3 (L3) 校准样品的胰蛋白酶降解产物, 在不同时间点 A) 肽 AKPAL (Apo A-I) 和 B) TGISP (Apo B) 的浓度

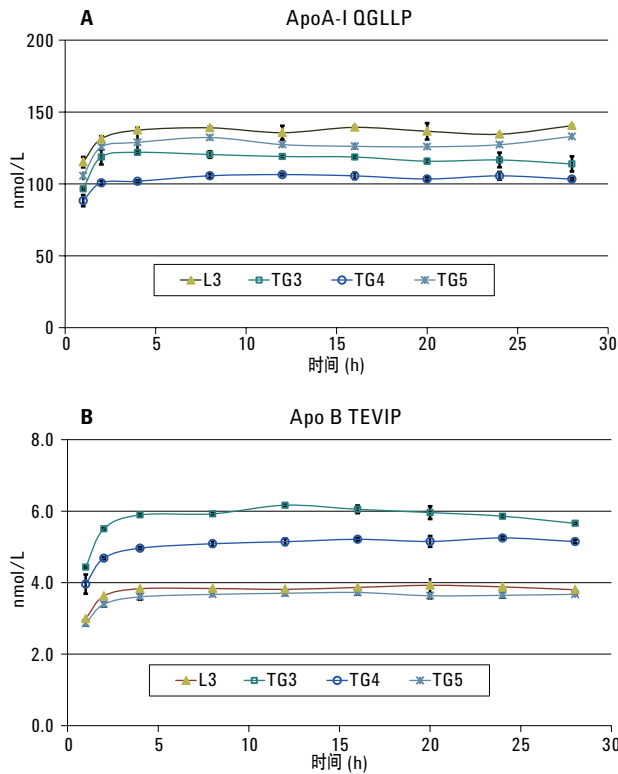


图 3. 高甘油三酯血清 TG 3、4 和 5, 以及浓度 3 (L3) 校准样品胰蛋白酶消化产物中, 不同时间点时 Apo A-I 和 B 肽 A) QGLLP 和 B) TEVIP 的浓度

线性和回收率

Apo A-I 和 B 肽的线性见表 3 和图 4。

Apo A-I 肽的回收率在 92.6% - 103.1% 范围内，而 Apo B 肽的则在 94.4% - 105.6 % 范围内（图 5）。

对于 Apo A-I 和 B 的 LC/MS/MS 定量分析，在正常混合血清和高甘油三酯血症样品的进一步分析中，均使用了所有三种浓度的确定浓度的校准样品。

重现性

正常混合血清 (NPS) 中 Apo A-I 和 B 测定的重现性见表 4。

对于 NPS 1 和 2，四种 Apo A-I 肽的运行间变异系数在 4.2% 到 8.6 % 之间，四种 Apo B 肽的则在 4.2% 到 6.4 % 之间 (n = 15)。

Apo A-I 肽 AKPAL，以及 Apo B 肽 TEVIP 和 TGISP 具有最小的运行间变异系数 (< 5%)。

表 3. 三次重复测定中样品特征肽的线性

蛋白质	肽	R ²
A-I	VSFLS	0.93
A-I	QGLLP	0.95
A-I	VQPYL	0.98
A-I	AKPAL	0.97
B	SVSLP	0.97
B	FPEVD	> 0.99
B	TEVIP	> 0.99
B	TGISP	> 0.99

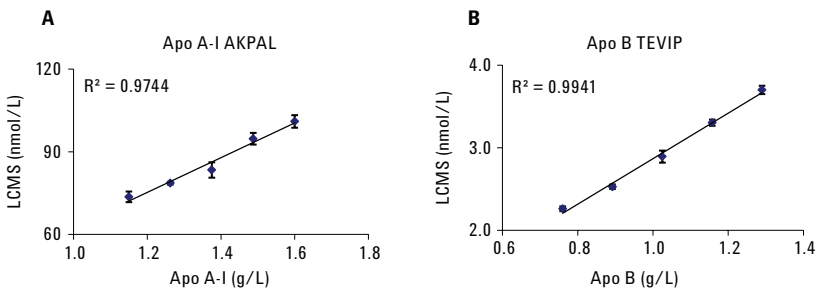


图 4. 对于 A) 1.15 g/L (L1) 和 1.60 g/L (L3) 之间的 Apo A-I，以及 B) 0.76 g/L (L1) 和 1.29 g/L (L3) 之间的 Apo B，分别展示了肽 AKPAL 和 TEVIP 测定的线性

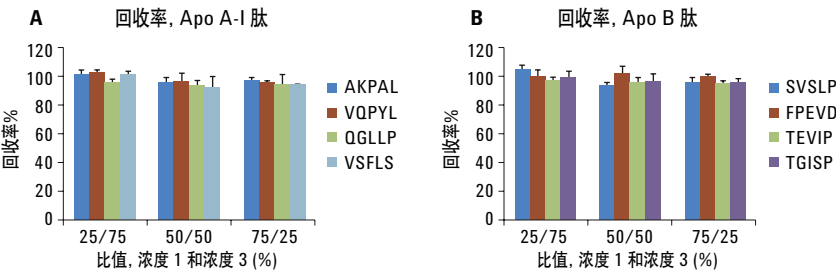


图 5. L1（浓度 1）和 L3（浓度 3）校准样品混合物中，A) Apo A-I 肽 AKPAL、VQPYL、QGLLP 和 VSFL，以及 B) Apo B 肽 SVSLP、FPEVD、TEVIP 和 TGISP 的回收率

表 4. 正常甘油三酯血清中 Apo A-I 和 Apo B 特征肽仪器的、运行内和运行间重现性数据

Apo A-I	变异系数 (%) 正常混合血清 (NPS 1)			变异系数 (%) 正常混合血清 (NPS 2)		
	仪器的	运行内	运行间	仪器的	运行内	运行间
AKPAL	0.9	2.9	4.2	1.6	3.3	4.9
VQPYL	1.7	2.7	4.9	1.5	4.6	7.2
QGLLP	5.1	3.2	8.6	3.2	5.6	7.1
VSFLS	3.5	4.3	7.8	3.8	5.6	8.2
Apo B						
SVSLP	3.8	3.1	6.4	5.4	1.0	4.5
FPEVD	2.3	0.8	5.2	1.0	3.3	5.6
TEVIP	3.0	1.8	4.2	0.1	1.4	4.6
TGISP	1.0	1.6	4.3	0.7	0.2	5.1

结论

联用 Agilent 1290 Infinity LC 和 Agilent 6490 三重四极杆 LC/MS 系统, 开发了一个用于多成分测定的 LC/MS/MS 方法, 实现了血清 Apo A-I 和 B 的准确定量分析。

开发了可以同时测定血清 Apo A-I 和 B 的样品制备方案, 该方案可以产生正常和高甘油三酯血症血清中这两种蛋白的具有相似动力学特性的特征肽, 并且仅需使用 5 μ L 样品 (该分析混合物中实际只有 0.5 μ L 血清) 和 1 μ g 测序级胰蛋白酶 (酶与蛋白的比例为 1:35)。

对于实现载脂蛋白准确而可靠的定量分析, 多种肽的细心选择至关重要。使用确定浓度、基质匹配的人血清校准样品进行 Apo A-I 和 B 的校准, 这些校准样品采用和待测样品同样的样品制备和测定程序。

运行间变异系数在 5%–10% 范围内, 说明方法具有稳定的分析性能。

我们采用 Agilent 1290 Infinity LC 和 Agilent 6490 三重四极杆 LC/MS 系统开发的 Apo A-I 和 B 的研究应用方法, 具有 Apo A-I 和 B 多成分同时定量分析的潜力。我们还需要对该应用进行更进一步的分析方法验证, 尤其是在高脂血症血清中, 以评价其将来在日常临床化学中可能的应用。

参考文献

1. M. Fernandez and D. Webb “The LDL to HDL cholesterol ratio as a valuable tool to evaluate coronary heart disease risk” *J. Am. Coll. Nutr.* 27:1-5 (2008).
2. L. Anderson and C. Hunter “Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins” *Molecular and Cellular Proteomics* 5: 573–588 (2006).
3. R. Kay, *et al.* “The application of ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry to the detection and quantitation of apolipoproteins in human serum” *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21: 2585–2593 (2007).
4. M. Kuzyk, *et al.* “Multiple Reaction Monitoring-based, Multiplexed, Absolute Quantitation of 45 Proteins in Human Plasma” *Molecular and Cellular Proteomics* 8: 1860–1877 (2009).
5. S. Agger, *et al.* “Simultaneous Quantification of Apolipoprotein A-I and Apolipoprotein B by Liquid-Chromatography–Multiple-Reaction–Monitoring Mass Spectrometry” *Clin. Chem.* 56: 1804–1813 (2010).

www.agilent.com/chem/qqq

仅用于研究。不用于诊断程序。

本信息如有变更，恕不另行通知。本信息如有变更，
恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2013

2013 年 10 月 4 日，中国印刷

5991-2901CHCN



Agilent Technologies