

# 使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 96 孔板进行生物体液样品的蛋白质沉淀

## 作者

Limian Zhao 和 Megan Juck  
安捷伦科技公司

## 摘要

蛋白质沉淀技术 (PPT) 是适于 LC/MS/MS 分析的生物体液样品前处理的最常用技术之一。将蛋白质沉淀应用于生物体液样品，可以从基质中有效去除蛋白质。本应用简报讨论了生物体液样品 PPT 的重要步骤、考虑因素和注意事项。本文重点介绍使用 Captiva EMR-Lipid 96 孔板的孔内 PPT，包括合适的沉淀溶剂、比例、添加剂、生物体液基质、生物体液样品等分和沉淀溶剂的板上添加顺序、内标 (IS) 添加，以及板中的样品混合。最后，对使用离心的传统 PPT 和用 Captiva EMR-Lipid 净化后 PPT 的对比结果进行了详细讨论，包括时间、方法性能以及对仪器的影响。

## 前言

蛋白质沉淀 (PPT) 已广泛用于 LC/MS/MS 分析的生物体液样品前处理<sup>1</sup>。将生物体液样品与 3-5 倍体积可与水混溶的溶剂 (如乙腈 (ACN)、甲醇 (MeOH) 或二者的混合物) 混合, 来实现蛋白质的有效去除。有机溶剂的添加破坏了蛋白质的水化层, 降低了蛋白质分子间的排斥力, 显著降低了蛋白质的溶解度, 从而使蛋白质沉淀出来。之后, 可通过离心或过滤去除沉淀, 并将上清液用于分析。即使由于蛋白质结合或受蛋白质结合影响的分析物稳定性, 导致某些目标分析物可能发生损失, PPT 方法学仍然提供了快速、简单、经济的样品前处理方法, 适用于高通量样品分析。

Captiva EMR-Lipid 96 孔板可以进行孔内 PPT, 然后进行高效过滤以去除沉淀。此外, EMR-Lipid 吸附剂可在样品过滤期间与基质中的脂类发生相互作用, 得到更洁净的洗脱液, 同时去除了蛋白质和脂类。本应用简报重点讨论了使用 Captiva EMR-Lipid 96 孔板的这一重要样品前处理技术的关键步骤。

## 沉淀溶剂与比例

可与水混溶的有机溶剂通用于沉淀蛋白质, 通常是 ACN、MeOH 或二者的混合物<sup>1</sup>。之前的研究中对采用 ACN 或 MeOH 的 PPT 进行了全面对比<sup>2</sup>。使用 ACN 进行 PPT 通常会产生大量黄色凝结沉淀, 而 MeOH 通常会产生更细的白色凝结沉淀 (图 1)。上清液的澄清度通常是 PPT 效率的良好指标, 浑浊的上清液表明仍然存在未沉淀的蛋白质。图 1A 表明, 使用 MeOH 和 ACN 的最小沉淀比分别为 3:1 和 2:1 时, 可以获得澄清的上清液。

图 1B 表明, 样品在 10 °C 下储存 24 小时后, 以 3:1 的比例使用 ACN 可获得澄清的上清液。结果清晰表明, ACN 可比 MeOH 实现更有效的蛋白质沉淀, 如需实现有效的蛋白质去除, 有必要将最小沉淀比设为 3:1。然而, 更大的沉淀比也会导致样品更多的稀释。因此, 通常推荐采用 3:1-5:1 的沉淀比, 在实现有效蛋白质去除的同时仍保持样品的适当稀释。

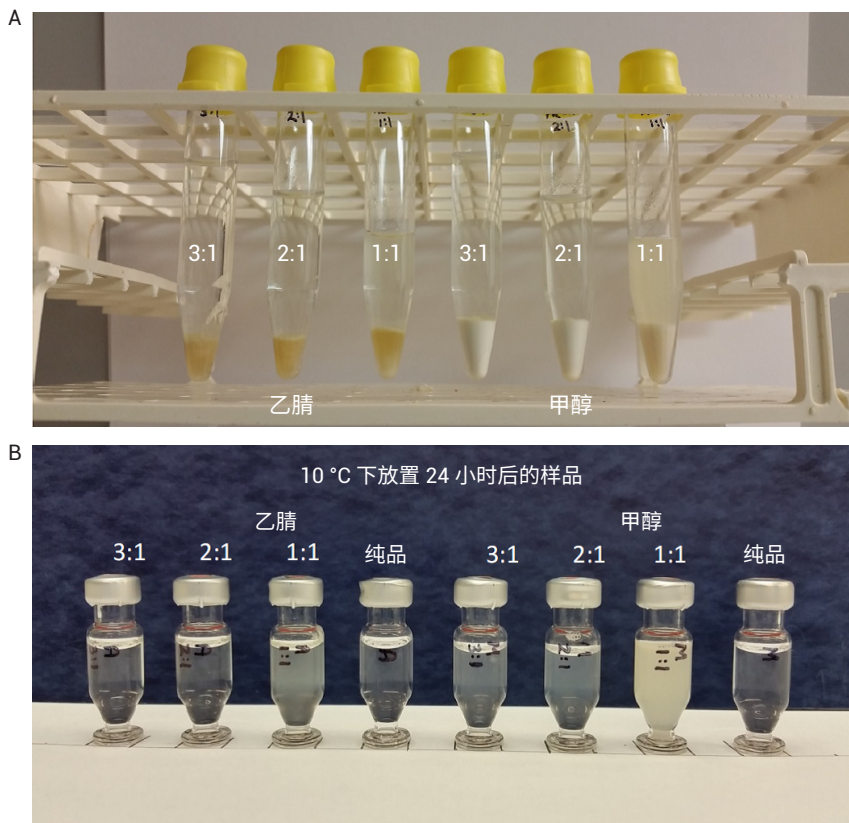


图 1. ACN 与 MeOH 用于 PPT 的对比。A) 混合和离心后的上清液外观; B) 10 °C 下放置 24 小时后的上清液外观。由 Russ Grant 提供<sup>2</sup>

沉淀溶剂的另一个考虑因素是目标分析物的溶剂萃取。ACN 和 MeOH 可对不同化合物表现出不同的萃取能力。在需要调节目标分析物的溶剂可萃取性时，可以添加少部分的 MeOH（通常为 5%–15%）。而需要了解的是，即使沉淀溶剂中如此少量的 MeOH，也会导致蛋白质沉淀呈现出不同的视觉效果（图 2A 和图 2B）。与沉淀溶剂混合的 MeOH 越多，沉淀就越细，过滤去除沉淀时所需的压力也就越大。鉴于 MeOH 的蛋白质沉淀效率低于 ACN，过量 MeOH 会对 PPT 效率产生不利影响。因此，建议沉淀溶剂中的 MeOH 含量不超过 15%。

使用 ACN（或主要是 ACN）作为沉淀溶剂的第三点考虑因素应是易于通过过滤去除蛋白质沉淀。采用 ACN 的 PPT 可产生较大颗粒的蛋白质沉淀，这种沉淀不易堵塞滤芯/滤膜，可更轻松地进行过滤。采用 MeOH 的 PPT 可产生更多更细的沉淀，这种沉淀易于堵塞滤芯/滤膜，因此过滤时需要明显更大的压力。

为减少蛋白质结合，通常将甲酸 (FA) 或氢氧化铵 (NH<sub>4</sub>OH) 等添加剂加入沉淀溶剂中，其中 1% FA 是最常用的添加剂。而在全血 PPT 中，应谨慎添加酸，因为酸可以提取出更多的血红蛋白颜色，PPT 后会得到棕色/红色上清液。

图 2C 和图 2D 显示采用中性沉淀溶剂、酸化溶剂（含 1% FA）和碱性溶剂（含 1% NH<sub>4</sub>OH）进行 PPT 后的上清液外观。酸化 PPT 的上清液呈深棕色/红色。因此，请仔细考虑或避免使用酸化沉淀溶剂来进行全血 PPT。

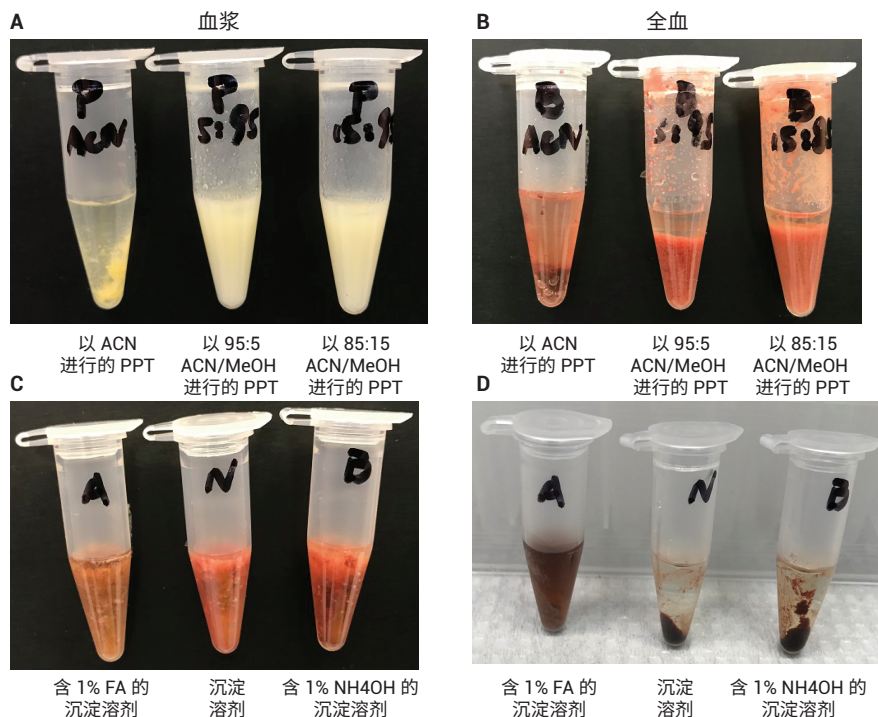


图 2. 使用不同沉淀溶剂在血浆 (A) 和全血 (B) PPT 中形成的蛋白质沉淀外观，以及采用添加剂不同的沉淀溶剂在沉淀离心前 (C) 后 (D) 得到的蛋白质沉淀外观

## 生物体液

生物体液包括全血、血浆、血清、尿液和其他体液。全血、血浆和血清是富含蛋白质的主要血液基质。因此，在 LC/MS/MS 分析之前有效去除这些蛋白质至关重要。

- 全血是含有抗凝血剂的血液，不会分离为液体部分和血细胞
- 血清是无抗凝剂时与血细胞分离的顶层澄清液体部分，因此血清中不含纤维蛋白原
- 血浆是与血细胞分离的液体部分，含有纤维蛋白原

在相同体积下，基质中的蛋白质含量遵循全血 > 血浆 > 血清，如 PPT 生成的蛋白质沉淀所示（图 3）。

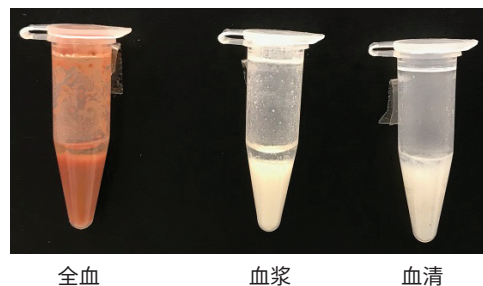
通常认为尿液和其他体液是低蛋白质含量基质，PPT 仍可广泛用于这类基质，但与血液基质相比，这类基质实现有效蛋白质去除的难度不大。因此，这类生物体液基质中采用的沉淀溶剂与沉淀比有更大的灵活性。通常，用于制备这类样品基质的 PPT 被称为稀释和上样。

## Captiva EMR-Lipid 板上的孔内 PPT

高通量批处理中可自动进行 PPT；因此，96 孔板形式得到广泛采用。在过滤型沉淀去除中，孔内 PPT 有利于简化工作流程。而避免由沉淀造成的堵塞对过滤非常重要。Agilent Captiva 增强型脂质去除 EMR-Lipid (EMR-Lipid) 吸附剂可在蛋白质沉淀后，高选择性而有效地去除生物体液中的磷脂和其他脂类。这款产品同时采用了深度过滤机制的设计，可实现无堵塞的高效蛋白质沉淀过滤，从而可以使用孔内 PPT 并简化工作流程。

血液基质（特别是全血）是高粘度液体。之前建议将血清或血浆样品加入 EMR-Lipid 板的沉淀溶剂中<sup>3,4</sup>。而将这一方法应用于全血样品，就会出现这个问题。全血的高粘度使其容易立即沉降在底部，导致样品混合均匀性过低。一小部分未沉淀的全血可能会流经 EMR-Lipid 过滤柱，造成样品间的显著差异。有效混合有助于实现完全的蛋白质沉淀<sup>5</sup>。而对于 96 孔板中的全血样品，由于产生大量沉淀、沉淀堵塞枪头的高风险以及孔间交叉污染，使样品抽取混合较为困难。

A 离心前的蛋白质沉淀



B 离心后的蛋白质沉淀

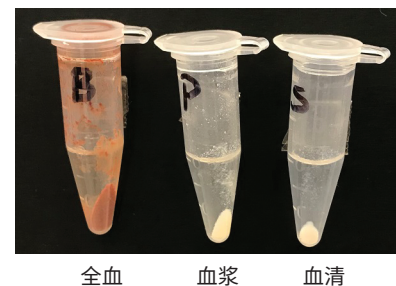


图 3. 离心前后不同血液基质（全血、血浆和血清）的蛋白沉淀形成

为解决这些问题，颠倒样品和沉淀溶剂的顺序，即将沉淀溶剂加入全血样品中。图 4 对比了两种不同添加顺序的样品混合均匀性和蛋白质的沉淀形成物。分别将沉淀溶剂加入全血（左）以及将全血加入沉淀溶剂（右），来混合相同量的沉淀溶剂和全血样品。将沉淀溶剂加入全血样品中得到了更好的样品混合均匀性，从而实现了更有效的蛋白质沉淀。采用这一改

进的加入顺序，在加入沉淀溶剂后将样品静置 5 分钟即可实现蛋白质沉淀；因此抽吸混合不是必要步骤，可以跳过。采用这一先样品、后沉淀溶剂的方法可获得更好的混合均匀性，也可很好地改善不同孔的样品洗脱一致性，避免未沉淀血液流经过滤柱，并实现更顺利、更轻松的洗脱。从工作流程的角度来看，将样品直接加入 Captiva EMR-Lipid 板，可以在添

加沉淀溶剂之前在 Captiva EMR-Lipid 板中实现内标 (IS) 的添加与混合。所有样品前处理步骤均可在 Captiva EMR-Lipid 板中完成，无需样品转移。这样可节省时间和成本，并降低样品交叉污染的风险。图 4 底部显示的两种不同方案对比，清楚地表明了简化流程的优势。建议使用孔内 PPT 接 Captiva EMR-Lipid 净化，对所有 96 孔板方案均采用这一添加顺序。

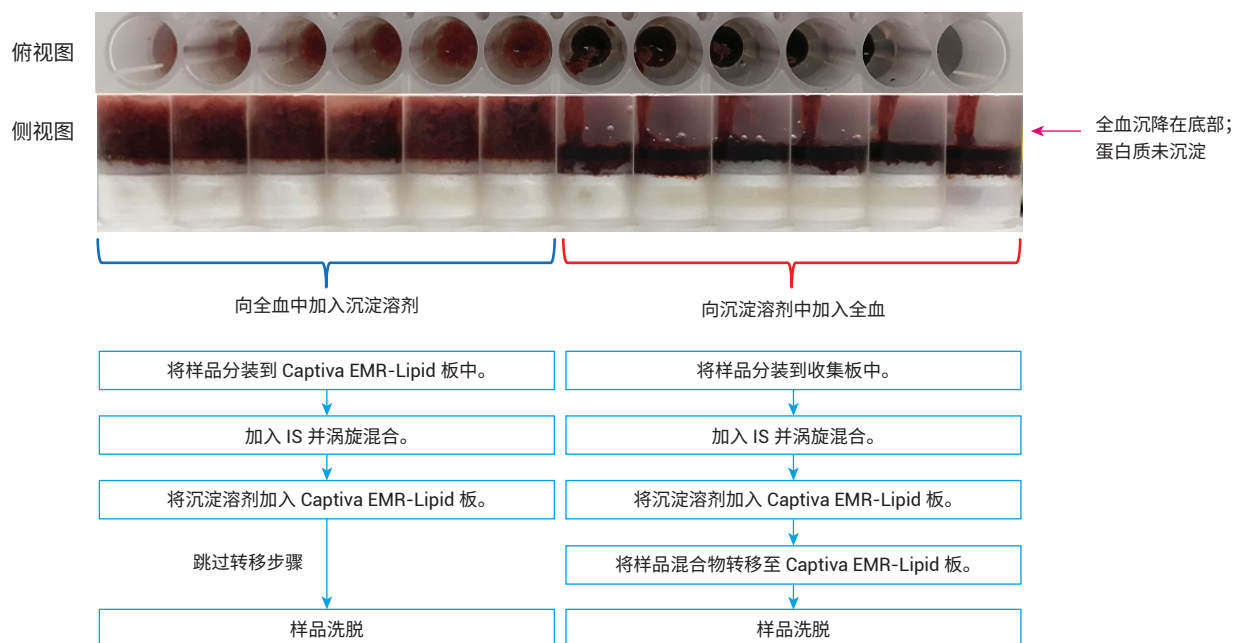


图 4. 人全血孔内蛋白质沉淀，展示了向全血中加入沉淀溶剂与向沉淀溶剂中加入全血的对比

## 样品等分、IS 和沉淀溶剂添加

由于生物体液更粘稠，样品分装可能具有挑战性。移液是准确移取所需样品体积的首选方法。除标准移液的预防措施外，重要的是分配生物液体样品，使枪头垂直于孔底插入（图 5A），而非倾斜到孔壁（图 5B）。这样可以避免样品粘附在孔壁上；否则，壁上的样品残留物可能不会有效沉淀。

IS 的使用是可靠定量分析的关键。将 IS 加标溶液直接加入样品基质而非沉淀溶剂中，这一点非常重要，以便 IS 化合物可以与样品基质相均衡，并追踪分析物在基质中的行为。样品分装后，第二步通常是添加 IS 加标溶液。一般来说，IS 溶液含有一些有机成分以保持化合物可溶性，但用于配制 IS 溶液的有机溶剂体积应尽可能低。应该调整 IS 加标溶液浓度，使 IS 加标溶液的添加体积仅为 5%–10%（相对于总样品体积）。以上所有注意事项均为了尽量减少 IS 添加带来的部分 PPT。通常使用重复用移液器简化向多个样品添

加 IS 加标溶液的过程。鉴于添加的 IS 加标溶液体积通常较低（10–20  $\mu\text{L}$ ），必须将 IS 加标溶液添加到样品中，而不沾到容器壁。为防止污染，请勿使重复用移液器的枪头接触样品或容器壁。彻底的涡旋混合是使 IS 进入基质并达到均衡的必需手段。

沉淀溶剂的添加量通常较大，并由于向多个样品添加同一种溶剂/溶液，通常使用重复用移液器。由于添加体积较大，添加溶剂时枪头与孔壁顶部的倾斜角度为  $60^\circ$  左右（图 5C），这一点很重要。避免枪头垂直添加溶剂（图 5D），否则溶剂可能溅出，并造成交叉污染。

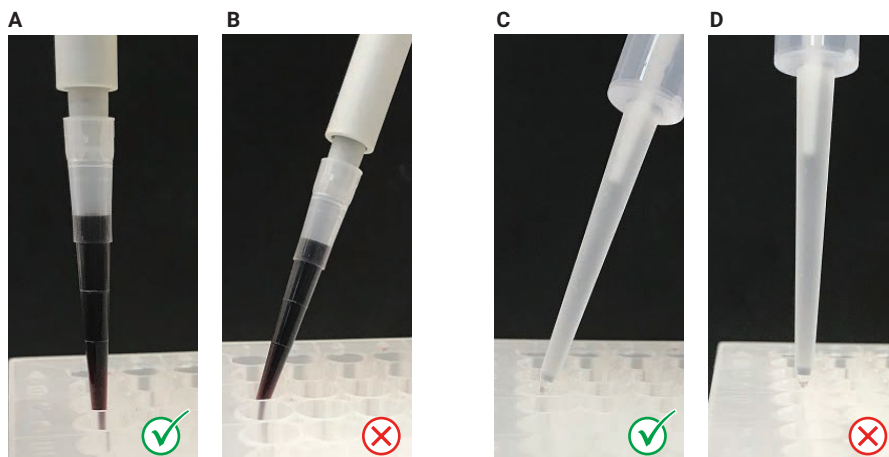


图 5. 生物样品等分 (A 和 B) 和沉淀溶剂添加 (C 和 D)

## 样品混合

将沉淀溶剂加入孔中的生物样品时，将发生明显的蛋白质沉淀。不过，要完成 PPT 并达到所需的 PPT 效率，建议采用主动混合（涡旋混合/抽吸混合）或被动混合（等待 5 分钟）。对于 96 孔板型 PPT，总体积小于 500  $\mu\text{L}$  时，可以使用涡旋混合进行样品混合。涡旋混合前，用板盖小心盖住 Captiva EMR-Lipid 板。由于高速会造成样品交叉污染，请谨慎设定涡旋混合速率。确保液体混合线在涡旋混合过程中不接触板盖，并且混合后板盖上未观察到样品残留（图 6A）。为实现有效混合，同时防止样品飞溅和随后的交叉污染，最好使用 1350 rpm 转速的多管涡旋仪。

对于超过 500  $\mu\text{L}$  的样品量，建议采用被动混合方式，将样品静置 5 分钟。向样品中加入沉淀溶剂已实现了有效的混合，样品放置 5 分钟即可实现有效的 PPT（图 6B）。需要主动 PPT 时，强烈建议使用广口枪头进行抽吸混合（图 6C）。广口枪头可避免沉淀在混合过程中堵塞枪头。

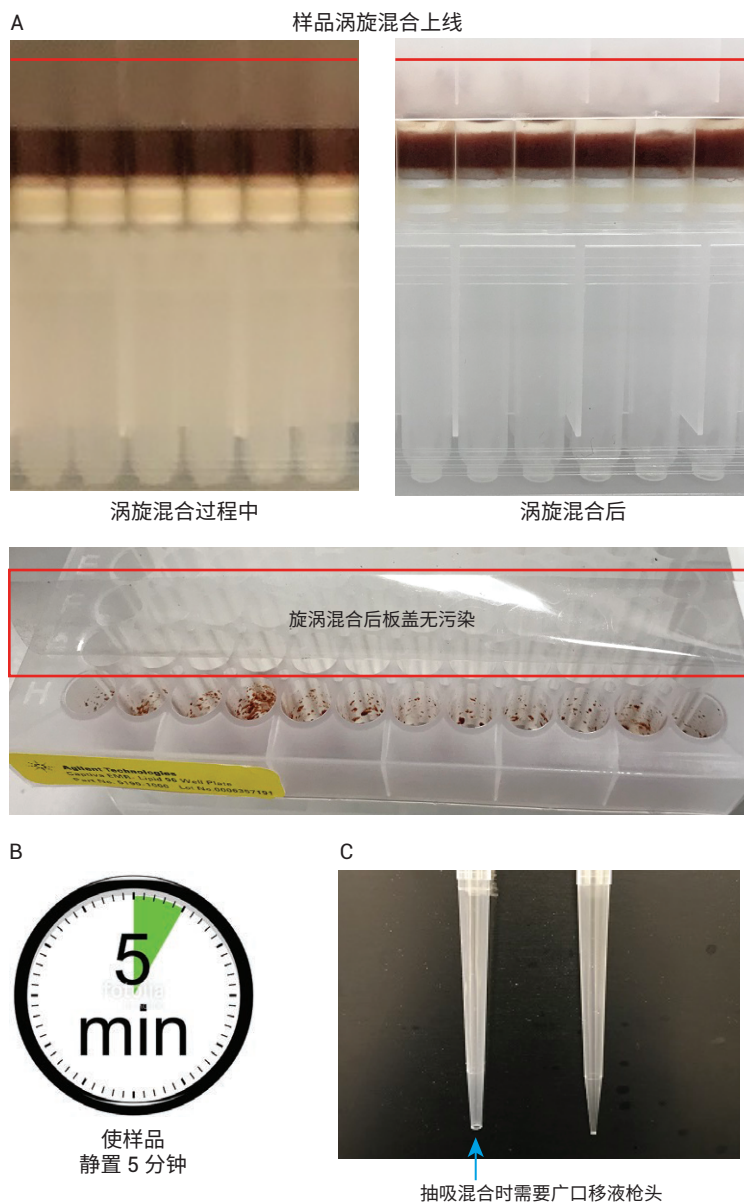


图 6. 以涡旋（样品体积  $\leq 500 \mu\text{L}$ ）或抽吸（样品体积超过  $500 \mu\text{L}$ ）的主动混合，以及将样品静置 5 分钟的被动混合完成 PPT 的效果

## 样品洗脱

在孔内 PPT 后，样品通过 Captiva EMR-Lipid 板洗脱，蛋白质沉淀在板中以过滤形式被去除，脂类在板上由 EMR-Lipid 吸附剂吸附。Captiva EMR-Lipid 板的特殊设计可实现无堵塞的顺利过滤。为了确保样品基质和 EMR-Lipid 吸附剂之间发生充分的相互作用以成功去除脂类，以每 3-5 秒一滴的速率缓慢而平稳地洗脱。洗脱可以用三种方式完成：

- 离心
- 正压洗脱
- 真空洗脱

使用离心时，可通过低速离心 (600–700 rpm) 进行 5–10 分钟的洗脱。洗脱后，需要进行 1 分钟左右的短时高速 (3000 rpm) 离心来排空过滤柱。使用正压歧管时，可施加约 5–10 分钟的低压 (2–5 psi) 进行洗脱，然后施加短时间高压 (6–9 psi) 排空过滤柱。使用真空歧管时，可施加约 5–10 分钟的低真空 (2–5" Hg) 进行洗脱，然后施加短时间高真空 (8–10" Hg) 排空过滤柱。

通常进行二次洗脱以确保完全洗脱。典型的二级洗脱使用 80:20 ACN/水；体积应为总载样体积的 20%–40% 左右，并在初次洗脱后、孔中无可见液体时加入。二次洗脱应采用相似洗脱条件。

图 7 显示了 96 孔 Captiva EMR-Lipid 板上的孔内 PPT + Captiva EMR-Lipid 净化的典型工作流程。

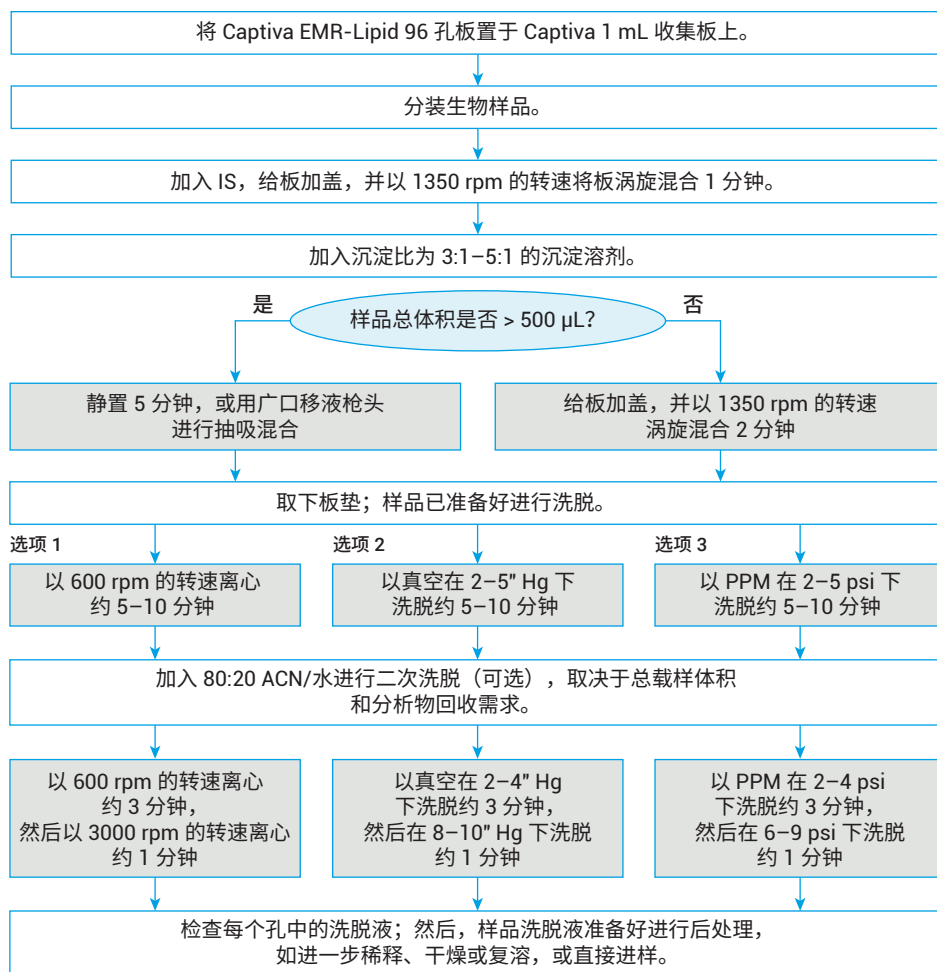


图 7. 典型的孔内 PPT + Captiva EMR-Lipid 96 孔板净化工作流程

## 传统 PPT 与 PPT + Captiva EMR-Lipid 净化的对比

过去，PPT 可以在 96 孔收集板或单个样品瓶中进行。离心去除沉淀后，将上清液移至另一个板或一组样品瓶中，用于后续处理。接着进行 Captiva EMR-Lipid 净化时，PPT 在 Captiva EMR-Lipid 板上实施，然后适当地洗脱以去除蛋白质沉淀和脂类。表 1 显示了传统 PPT 与 PPT + Captiva EMR-Lipid 净化之间的对比。

与传统 PPT 相比，PPT + Captiva EMR-Lipid 净化的第一项优势是简化的自动化工作流程。省略一个转移步骤即可节省大约 30% 的时间。该工作流程可提高分析效率，并减少样品损失和交叉污染风险。PPT + Captiva EMR-Lipid 净化的另一项重要优势是脂类去除。事实证明，Captiva EMR-Lipid 净化技术可以在生物基质中达到 > 99% 的磷脂去除率<sup>3-6</sup>。Captiva EMR-Lipid 净化实现的这一额外的脂类去除可显著减少基质离子抑制，并提高了方法可靠性和数据质量。PPT + Captiva EMR-Lipid 净化的第三项优势是在仪器上运行明显更洁净样品所产生的影响，这种

影响在高通量实验室中尤其突出。可以减少维护，防止仪器停机，从而进一步提高了实验室的分析效率和通量。

在运行传统 PPT 制备的样品时，基质（脂类）干扰会积聚在检测流路中，如进样口、液相色谱柱、质谱离子源等。如果不对检测系统进行有效清洁或冲洗，积聚的干扰将导致样品分析失败，并造成仪器停机。减少检测流路中基质干扰污染和积聚的传统方法有：使用更长的液相色谱梯度、更多的针清洗或实际样品进样后更多的空白进样。尽管这些方法有效，但它们都会延长运行时间，限制每日样品分析通量。

表 1. 离心型传统板上 PPT（96 孔板）与过滤型 PPT + Captiva EMR-Lipid 净化（96 孔板）的对比。以 96 孔板上的 96 个样品进行对比，提供所有实验室设备，所有试剂预先配制，并配备经验丰富的技术人员

传统 PPT (96 孔板) (离心)			PPT + Captiva EMR-Lipid 净化 (96 孔板) (过滤)		
步骤	所需时间 (min)	所需消耗品	步骤	所需时间 (min)	所需消耗品
板标签和样品等分	30	96 个枪头 (小尺寸) 1 个收集板	板标签和样品等分	30	96 个枪头 (小尺寸) 1 个收集板 1 个 EMR-Lipid 板
IS 添加	5	1 个重复用移液器枪头	IS 添加	5	1 个重复用移液器枪头
样品混合	2	板盖	样品混合	2	板盖
沉淀溶剂添加	5	1 个重复用移液器枪头	沉淀溶剂添加	5	1 个重复用移液器枪头
样品混合	5	板盖	样品混合或静置	5	仅用于混合的板盖
离心	10		洗脱	10	
上清液转移, 收集板标签	30	96 个枪头 (中尺寸) 1 个收集板	样品后处理	不同	1 块板垫
样品后处理	不同	1 块板垫			
所需总 SPP 时间	后处理 87 分钟		所需总 SPP 时间	后处理 57 分钟 (节省约 30% 的时间)	
仪器运行时间和溶剂用量	100%		仪器运行时间和溶剂用量	< 90% (时间和溶剂用量至少节省 10%)	
基质去除	仅蛋白质		基质去除	蛋白质和脂类	

图 8A 显示了使用 PPT + Captiva EMR-Lipid 净化 (顶部) 以及仅 PPT (底部) 制备的全血基质空白的色谱图示例。左上角的黑色曲线表示目标分析物色谱图。所有目标分析物在 6 分钟内洗脱。对于较为洁净的样品,液相色谱梯度可在 6 分钟内停止;而对于较脏的样品,需要额外的溶剂清洗以彻底洗脱基质垃圾,从而产生 12 分钟的运行时间。图 8B 显示了另一个试验结果,即在两种情况下采用相同的短液相色谱梯度 (6 分钟运行),随后进行试剂空白进样,以监测系统残留。

对于仅由 PPT 制备的样品,采用短梯度无法彻底冲洗基质磷脂,从而造成明显的系统污染,需要最多 10 次试剂空白进样才能完全清洁检测系统。如果没有这些空白进样,基质干扰将随更多基质样品的进样在检测系统中积聚。有时,使用较短的循环时间来完成序列,但必须用高浓度有机溶液定期对仪器进行更彻底的冲洗。为了减少检测系统的基质污染,任何一种解决方案都需要更多的时间和溶剂用量。

在进样由 PPT + Captiva EMR-Lipid 净化制备的清洁剂样品时,系统中的样品基质污染和积聚明显减少。缩短液相色谱梯度、减少进样口清洗并降低系统净化频率,有助于节省时间和溶剂。所有这些优势都有助于提高样品测试通量。即使保守估计仪器时间和溶剂用量节省 10%,对高通量实验室都非常明显。

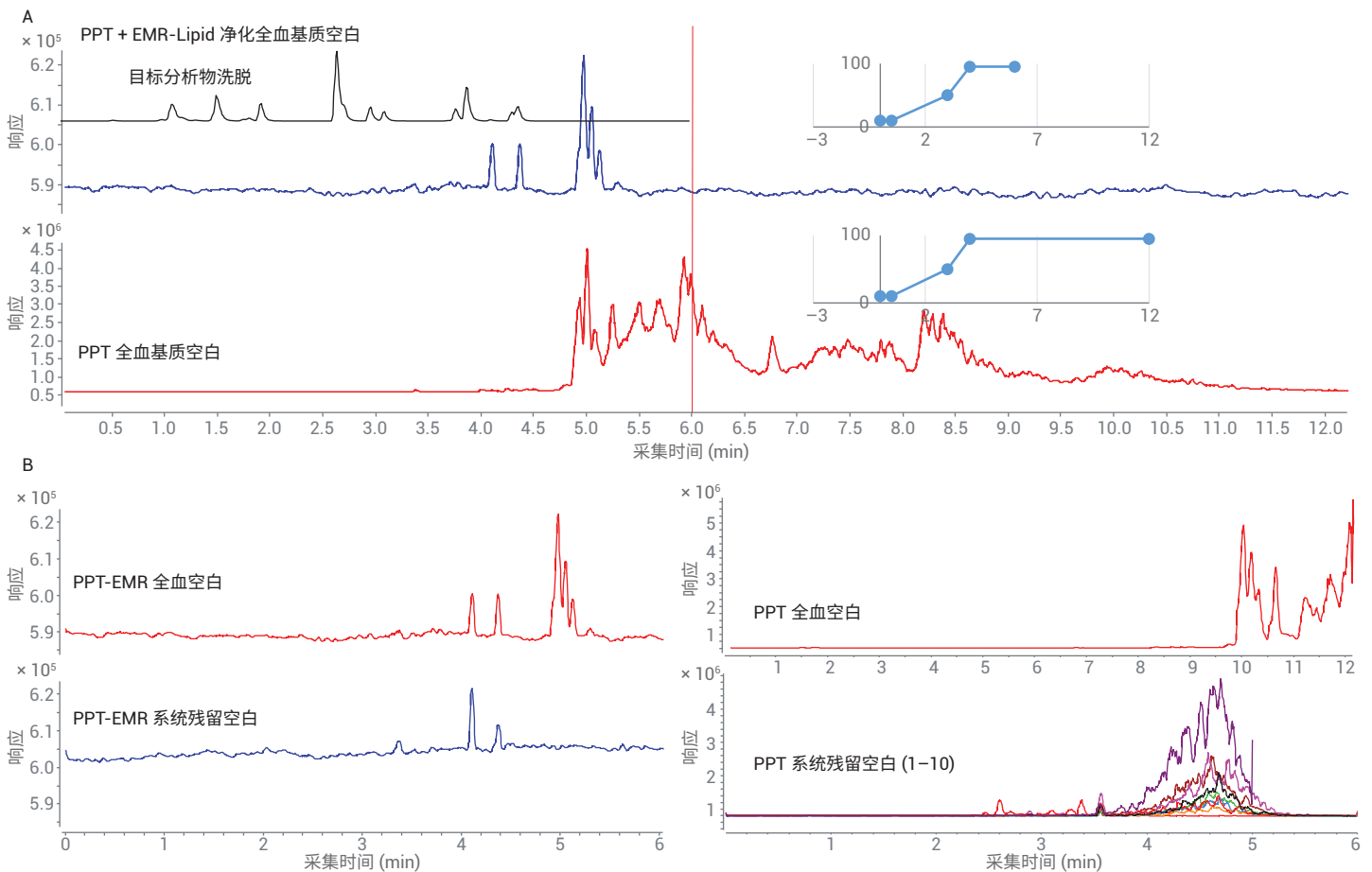


图 8. 更洁净的样品可缩短单个样品的分析周期 (A) 并减少系统污染 (B), 从而提高样品分析通量

## 结论

PPT 因其简便性和适用性，广泛用于制备 LC/MS/MS 分析的生物体液样品。使用 96 孔板形式的批处理提高了样品前处理效率，而得到广泛使用。孔内 PPT + Captiva EMR-Lipid 净化技术与传统 PPT 相比具有许多优势，包括简化的工作流程、蛋白质和脂类的同时去除，更高的方法可靠性、高质量数据以及对检测仪器更少的影响。根据分析要求，使用合适的沉淀溶剂类型、比例和添加剂至关重要。合适的溶剂和样品添加顺序（样品、IS 和沉淀溶剂）是达到有效均匀混合并防止绕过样品的重要因素。与传统的单个样品处理相比，96 孔板上的批处理通常具有更高的交叉污染风险；因此，适当的移液和混合十分关键。

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)

免费专线：

**800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)**

联系我们：

[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2018  
2018 年 8 月 9 日，中国出版  
5991-9222ZHCN

## 参考文献

1. Polson; *et al.*, Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* **2003**, 785(2), 263–275
2. Grant, R. Solutions Based Extraction Techniques, Presentation on Sample Preparation ASMS Fall Workshop, **2016**
3. Zhao, L.; Lucas, D. Efficiency of Biological Fluid Matrix Removal Using Agilent Captiva EMR-Lipid Cleanup (Agilent Captiva EMR-Lipid 净化的生物体液基质去除效率)，出版号 5991-8006EN, **2017**
4. Lucas, D.; Zhao, L. 使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 分析生物样品中的维生素 D 代谢物，出版号 5991-7956CHCN, **2017**
5. Stevens, J.; Zhao, L. Efficient Quantitative Analysis of THC and its Metabolites in Whole Blood Using Agilent Captiva EMR-Lipid and LC-MS/MS (使用 Captiva EMR-Lipid 和 LC-MS/MS 对全血中的 THC 及其代谢物进行高效定量分析)，出版号 5991-8635EN, **2017**
6. Zhao, L.; Lucas, D. 使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 净化对人血清中的药物进行 LC/MS/MS 定量分析，出版号 5991-8007CHCN, **2017**