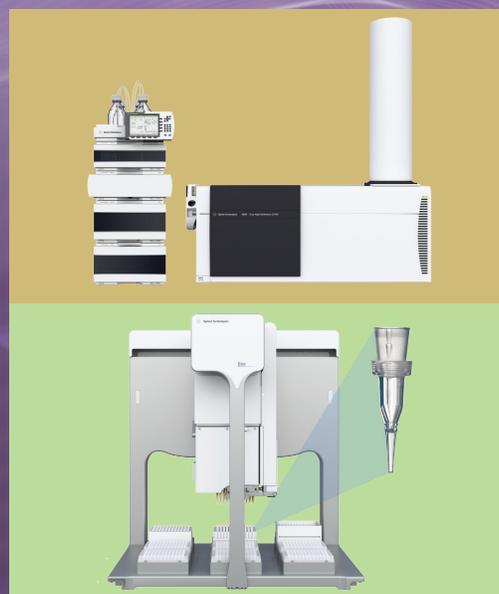


蛋白（肽段）定量的原理及 安捷伦的解决方案



Agilent Technologies

蛋白（肽段）定量的意义及出现 MRM 质谱技术平台的缘由

蛋白质作为所有生命周期的直接参与者，是生命现象和生物规律变化的标志物，在生命科学的大环节中占据着举足轻重的地位。从蛋白质的角度去描述生物的变化，业已成为研究生命科学的主要手段。处于不同时期、不同条件下的功能性蛋白质，其表现形式及丰度水平千变万化、生理功能模块和介导信号通路纷繁复杂，因此，深入研究蛋白质乃至对生物标志物监测充满着艰辛与挑战。与早期关注蛋白质的发现过程不一样，目前生物化学家越来越重视功能性蛋白质在表达量上的变化，蛋白丰度的变化更能体现出生命变化的多样性。

生化实验室最根本的分析任务之一就是蛋白的定量分析，但以往的抗体免疫化学法 (Western Blot) 表现出较差的特异性和较高的测量误差 ($CV > 20 - 40\%$)。串联质谱多反应监测 (MRM/SRM) 定量方法，一直以来就是定量的黄金标准，在小分子定量上早已成熟使用，随着液相色谱和串联质谱技术的提高，越来越多的生

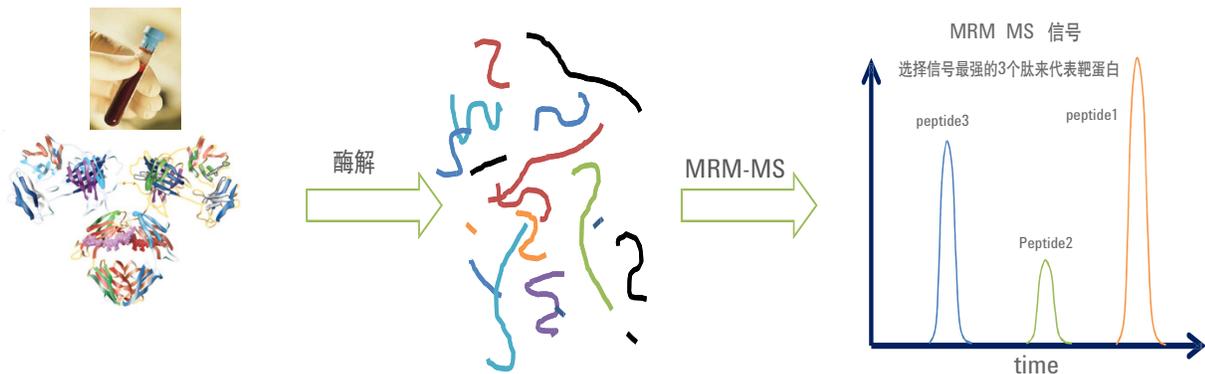
化实验室开始大量采用串联质谱技术为基础的蛋白（肽段）定量流程。MRM 肽段定量方法的优点很多，它利用蛋白专属的肽段序列完成定量分析，一次运行可同时分析几十到几百种的蛋白，具备高通量的定量分析能力。特别是 2012 年，方法论领域的权威期刊《Nature Methods》将基于三重四极杆质谱 (QQQ) 平台的 MRM/SRM 定量思路的靶向蛋白质组学 (Targeted proteomics) 技术列为当年的年度方法，确立了目标蛋白定量分析的权威策略。近年来该杂志陆续发表了多篇论文，对 QQQ-MRM/SRM 思路成功应用于目标蛋白定量分析进行了持续报道。随着质谱灵敏度的大幅提高，以大流速常规液相色谱 (LC) 取代纳流液相色谱 (Nano-LC) 所组成的 MRM 肽段定量方法，代表着蛋白定量分析的最高技术标准，极大地促进生物化学及各种新应用快速向前发展，广泛应用在蛋白质组学、生物制药等研究领域，并迅速朝着诸如食品、环境、临床等更宽的应用范围发展。

MRM 肽段定量的基本原理

MRM 方法作为一种成熟的定量技术，已经广泛用于食品安全检测和制药行业以及肽段的检测。以制药为例，MRM 方法被用来监测血样中药物浓度或药物代谢产物随时间的变化。基于质谱技术的蛋白质组学常用的一种分析策略是采用特异性蛋白酶将蛋白质酶切形成肽段，生成的肽段经过液相色谱分离后进入质谱分析，通过鉴定蛋白对应的唯一性肽段 (Unique Peptides) 来鉴定相应的蛋白，该方法被称为鸟枪法 (Shotgun)，是蛋白质组学经典的非靶向方法。该方法被广泛用于复杂生物样本，如血浆、细胞、组织中蛋白的大规模鉴定，采用标记或非标记的方式通过相对定量比较对照组和样品组的差异可以发现具有诊断、预警或治疗有意义的潜在蛋白质，即生物标记物。仅以癌症为例，目前文献报道的潜在生物标记物就超过 1261 个^[1]。然而，这其中几乎没有一个潜在生物标记物能满足临床生物标记物的高标准而被认可，这一点从美国 FDA 批准蛋白类生物标记物的进度就能证实。过去 15 年，美国 FDA 批准的针对所有疾病的生物标记物平均下来每年不超过 1.5 个蛋白^[2]。在临床上，目前使用的生物标记物的体内浓度低、动态范围宽，浓度分布能跨越 11 个数量级；在分析方法上又缺少一种能对大量不同样品进行精准定量的高通量分析方法。而 MRM 方法能弥补鸟枪法的不足，提供了一种高灵敏度、高精度、高重现性和高通量的分析方法，非常适用于生物标记物的验证及系统生物学研究^[3]。

MRM 方法充分发挥了 QQQ 定量的优势。在 MRM 方法中，通过采用 Q1 和 Q3 分别选择目标肽段的母离子和子离子来实现对应目标蛋白的精确定量。两级四极杆筛选为 MRM 方法提供了极高的选择性，降低了复杂样品中共流出物的背景干扰^[4]。同时，QQQ 方法采用选择离子通过模式，相比于鸟枪法的传统全扫描模式，方法的灵敏度提高了 1 - 2 个数量级。另外，MRM 具有五个数量级的线性动态范围，能够检测复杂样品中的低丰度蛋白，这在系统生物学定量研究中至关重要。MRM 检测肽段方法建立后，在不同的实验室里重复实验具有非常好的重现性；一个方法内可包含上千个 MRM 离子对，能够实现高通量的检测^[5]。通过加入稳定同位素标记内标肽段 (Stable Isotope-labeled internal standards, SIS)，可以大大降低离子抑制、基质效应和样品前处理过程的误差造成的影响，得到更准确的定量结果。对于一组给定的待测蛋白质，如信号通路上蛋白质、一组生物标记物，MRM 方法能够进行一致的、可重复的、高通量的精准定量分析^[6]。相比于亲和方法，MRM 不受到抗体种类及特异性的限制，能够很方便的进行大规模研究。

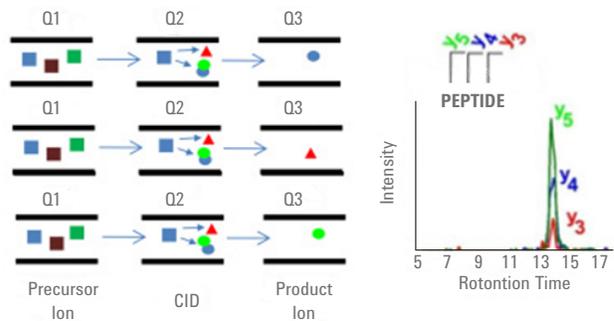
目前靶向肽段定量的蛋白测定法，可以开展大规模的蛋白质组学定量分析项目，以及在大规模地开发、系统性地验证蛋白质生物标志物；加之快速成熟的分析方法和软件，以及广泛接受和普遍使用的质谱仪器，为生物化学家提供了系统、可靠、革命性的蛋白定量平台，极大地促进了系统生物学、临床研究、生物制药及其它相关应用领域的高速发展。



胰酶水解蛋白生成许多肽段，选择专属肽段做 MRM 靶蛋白定量分析

具体实验通常选择胰蛋白酶来降解消化蛋白，也接受选择其它有特异性消化酶来做酶解。在 QQQ 中，每个肽离子会被碰撞碎裂以产生特征 b- 和 y- 碎片离子，它们是分别含有 N- 和 C- 末端的肽离子碎片。选择与靶蛋白对应的、具有专属序列的肽段来进行蛋白分析。完整的肽离子（母离子）和所得到的特定碎片离子（子离子）的离子对组合，可监测靶蛋白。通过检测由这些离子对所产生的肽信号，积分 MRM 离子的峰面积就可以测定肽的丰度，并以此为基础转换成蛋白定量结果。这个过程被称作多反应监测 (MRM)，其定量分析概念流程如靶向蛋白质 MRM 定量分析原理一览图所示。

MRM 技术简单可靠，它通过两次选择离子，排除复杂生物基质中大量的干扰离子，降低了化学背景，显著提高目标检测肽的信噪比，从而实现检测的高灵敏度，并具有动态范围大、重现性好、准确度高特点，特别适合验证已知序列的蛋白质表达量的差异及检测低丰度靶蛋白。



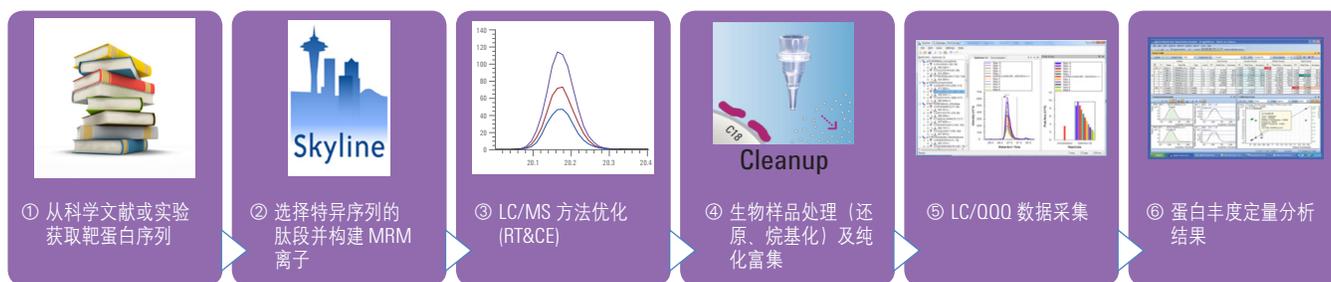
靶向蛋白质 MRM 定量分析原理一览图：(1) Q1 选择对应靶蛋白的专属性肽段片段；(2) Q2 碰撞碎裂肽段产生更小的子片段，序列特异性的肽段碎片离子和子离子构成 MRM 离子对供 Q3 选择监测；(3) 用已知浓度的稳定同位素标记的内标肽画制标准曲线，将肽段样品的 y 离子峰面积积分，对比标准曲线就可获得靶向肽段的丰度

安捷伦 MRM 肽段定量的完整定义

安捷伦 MRM 肽段定量的完整流程包含如下 6 个模块：① 获取靶蛋白序列，② 选择特异序列肽段（Skyline 软件），③ 构建 MRM 离子对及参数优化（Skyline 软件或安捷伦 optimizer 软件），④ 样品处理及制备，⑤ LC/QQQ 数据采集及 ⑥ 分析结果（安捷伦 MassHunter 定量软件或 Skyline 软件）。

简单介绍一下这六大模块。首先，① 从实验或科学文献着手获得已知蛋白的序列列表，实验的关键点就是要选择出靶蛋白的典型肽段。MRM 最希望检测的是稳定的肽段，所以为了减少可能的误差，要尽量避免用容易发生人为修饰的残基肽段，比如：蛋氨酸（易发生氧化反应）和半胱氨酸（易发生脲甲基化和氧化反应）等。② 选出来的肽段序列应该是唯一对应其蛋白质，越能提高检测的特异性，就越能减少对结果干扰，由于生物样本的复杂性，每一个肽段往往需要选择三个离子对（母离子-子离子）所

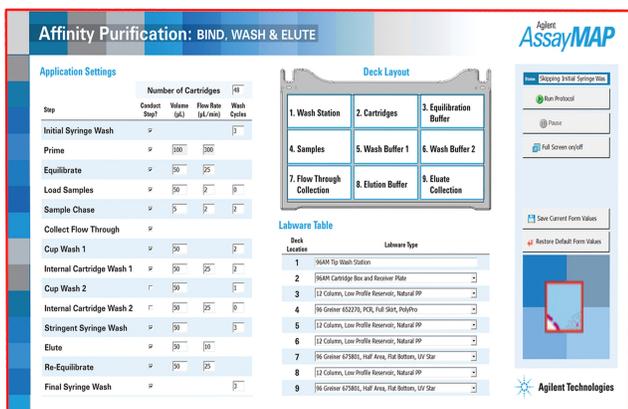
产生的信号。利用 Skyline 软件可以便捷地从特异性的肽段构建 MRM 离子对做定量分析。③ 配适 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱/6495 三重四极杆液质联用系统 (1290 LC/6495 QQQ) 的 Skyline 专业软件可以智能优化肽段的保留时间、碰撞能量，并采集出优化后的实验结果供科学家审核，最终自动生成分析实际样品的实验方法。④ 蛋白定量的实验要求苛刻，且基质复杂肽段碎片众繁，因此蛋白样品制备就成为能否成功的关键一步，安捷伦 AssayMAP 可以实现对样品精准、高通量而且可靠耐用的自动处理。⑤ 样品通过液相的分离和串联质谱的 MRM 测量，⑥ 最终结果可利用 MassHunter 定量软件或 Skyline 软件分析并计算蛋白丰度。从六大模块流程中可以看出，安捷伦肽段定量流程的设计理念和软件支持有独特之处，其流程特点及技术优势在下文详述。



MRM 肽段定量的完整流程的 6 个模块

AssayMAP 系统技术特点

生物样品特别复杂，其共流出物的干扰范围甚至可高达9个数量级，严重影响生物体液中蛋白质、多肽准确定量。安捷伦专门为生化样品前处理推出了 AssayMAP 智能纯化系统，其最大的特点就是高度的灵活性和准确性——震荡、清洗、加热/冷却等多种处理模式可灵活配置，一次处理样品的数量可以在 1536 个以内任意选取，配备了多种填料的小柱头基本满足所有生化样品的处理需求，操作界面直观又简单，已成为安捷伦配备蛋白定量实验室的首选装备。



1) 用户的语言智能管理样品，直通 Mass Hunter 软件，具备多种处理模式

- 亲和（蛋白质）纯化
- 溶液中消化
- 多肽清洗（脱盐）和磷酸肽富集
- IMAC 小柱订制
- 流分收集
- 样品浓度的归一化
- 其它液体处理功能

2) 多种选择的微量色谱柱头
定量吸附 & 洗脱具备很多模式
蛋白纯化

- PA-W (protein A)
- PG-W (protein G)
- SA-W (streptavidin)

反相清洗:

- C18 (peptide)
- RP-S (peptide)
- RP-W (denatured mAbs)

多肽流分收集:

- SCX
- RP-S
- C18

磷酸肽富集:

- TiO2
- Fe(III)-NTA

3) 正压过柱淋洗移液头

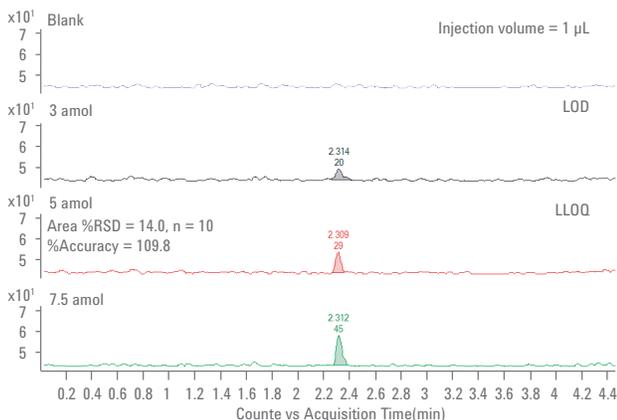
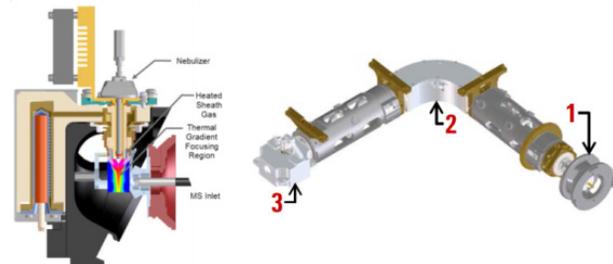
注射头直接连接带填料的小柱，精准控制液流，无气泡干扰样品吸附

安捷伦 AssayMAP 生化样品前处理设备

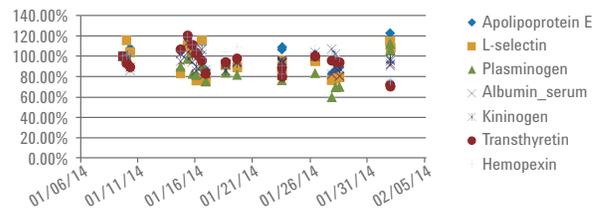
LC/QQQ 系统仪器技术特点

安捷伦三重四极杆质谱 (1290 LC/6495 QQQ) 具有极高的灵敏度、公认的可靠性以及稳定性，为生化实验室提供高通量、快速分析及可靠运行的仪器，帮助客户显著提升分析效率。

- 1290 Infinity II 行业领先的 HPLC 系统，高精度，稳定耐用，灵活易用
- 直角喷射、高温雾化低温电离接口，最适合电离蛋白、多肽等生物分子
- Q1 前置离子透镜和 90° 弯曲碰撞池，快速且低噪
- 温控双曲面四极杆质量范围宽展到 m/z 2250，质量稳定
- 高能电子倍增器和可靠的真空系统，灵敏并耐用
- 简单易用的操作系统获取优异的蛋白定量结果

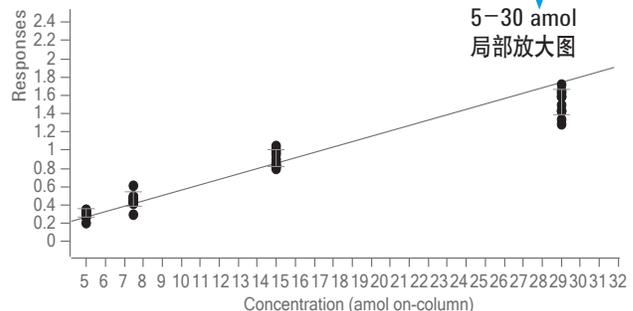
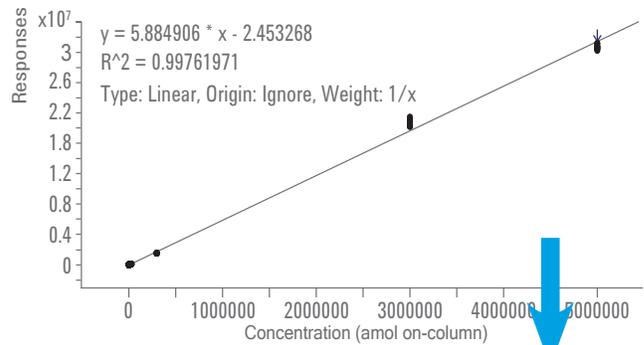


高性能的 Agilent 6495 QQQ AJS 离子源和质谱结构图；在常规 LC 流速下，检测基质中的合成肽段，丰度低至 amol，线性动态范围 6 个数量级，甚至是在 LLOQ 水平也保持优异的重现性和定量精度



QC 肽段标样加入血浆未经任何净化直接进样，完成 853 针历时一个月的耐用重现性实验

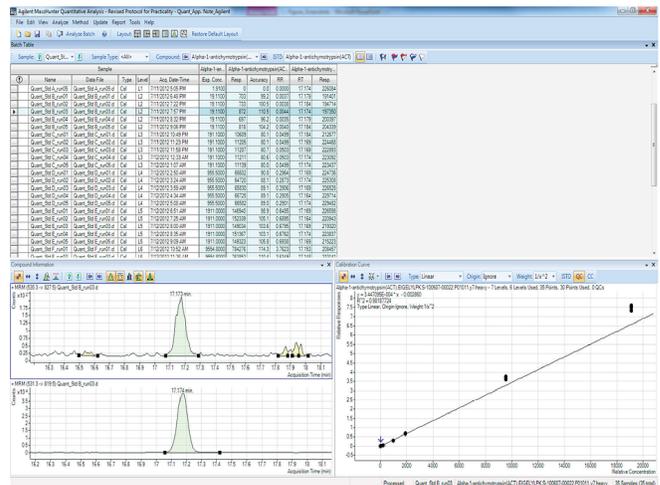
Levels	%RSD (n=10)	% Accuracy	RT%RSD (n=100)
5 amol	14.0	109.8	
7.5 amol	16.0	108.7	
15 amol	9.4	105.0	
30 amol	9.0	87.1	
300 fmol	1.6	85.2	
3 pmol	1.2	81.4	0.12
3 fmol	0.6	86.4	
300 fmol	0.7	87.4	
30 fmol	2.1	105.6	
5 pmol	10.0	97.5	



定量报告软件技术特点

Agilent MassHunter 工作站可快捷便利地处理和报告定量数据。直观的数据结果浏览、多种定量曲线拟合、关联结果动态链接、离子比例验证计算等诸多方便客户的功能一应俱全，主要如下：

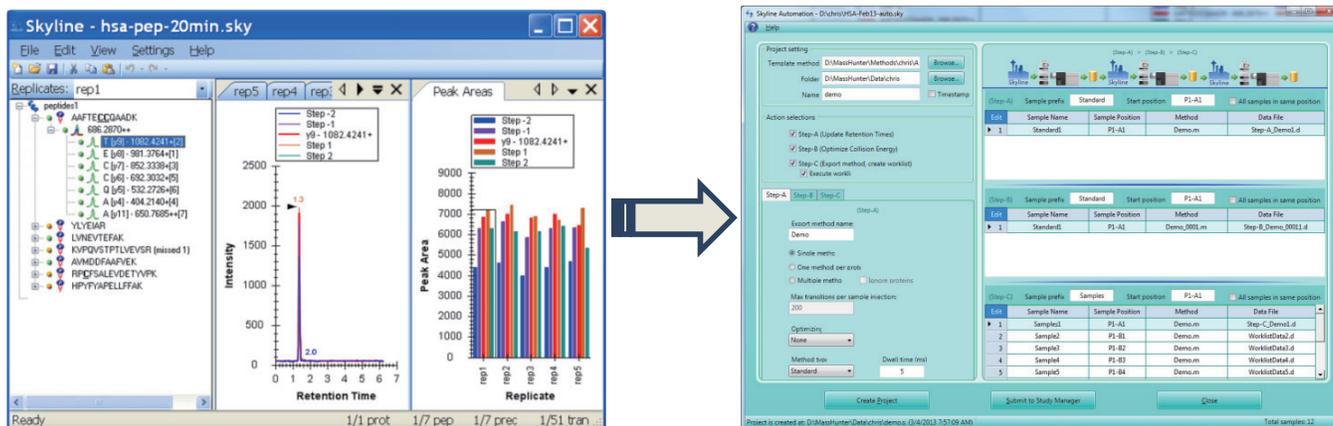
- 1) 全自动、批处理积分数据及报告定量结果，简便且高效；
- 2) 积分计算时免积分参数设置，完美报告定量结果，减少了人为干预带来的误差；
- 3) GLP/GMP 和 21 CFR Part 11 审核追踪、用户权限设置及多用户登录保障安全、电子签名等，在严格的法规要求条件下轻松运行及提供运行认证服务；
- 4) 可将数据以 XML 和 Excel 以及客户定制宏指令等格式存储，生成各种模板的应用报告；
- 5) 内置峰比例验证及多种异常值标示，让用户直观发现有问题的结果，最大限度减少误判；
- 6) 与 Skyline 无缝对接，提供前所未有的分析效率，满足自动化肽段定量工作流程；



Agilent MassHunter 工作站直观简单地处理和报告定量结果，图为 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶 EIGELYLPK 肽段的 MRM 肽段定量实验结果

MRM 肽段定量的 Skyline 软件平台技术特点

Skyline 是专门针对蛋白质定量的软件平台，它不仅支持实验设计(选择肽段和优化 MRM)，还可以做下游的数据分析。Skyline 创建一个第三方的中立平台，整合和共享了不同仪器的方法和结果，这个有趣的、多元互交支持的软件本身就是蛋白质组学领域最重要的创新之一。从蛋白质的序列和数据库录入的条目出发，Skyline 利用在线的 MS/MS 数据库或通过质谱所构建的数据库，可以生成 提炼出蛋白的肽段列表，所生成的 MRM 列表可以直接导入仪器方法供采集之用。Skyline 还提供了丰富的图标与工具，方便数据审核，实现了跨越多个分析平台的数据质量评估。最后，Skyline 还支持导出自定义报表格式，兼容后续的分析，版面编排和数据库存储。Skyline 是蛋白质组学中的一个革命性的创新，它提供了一个广泛使用的开放性分析平台，与安捷伦 LC/QQQ 软、硬件无缝对接。



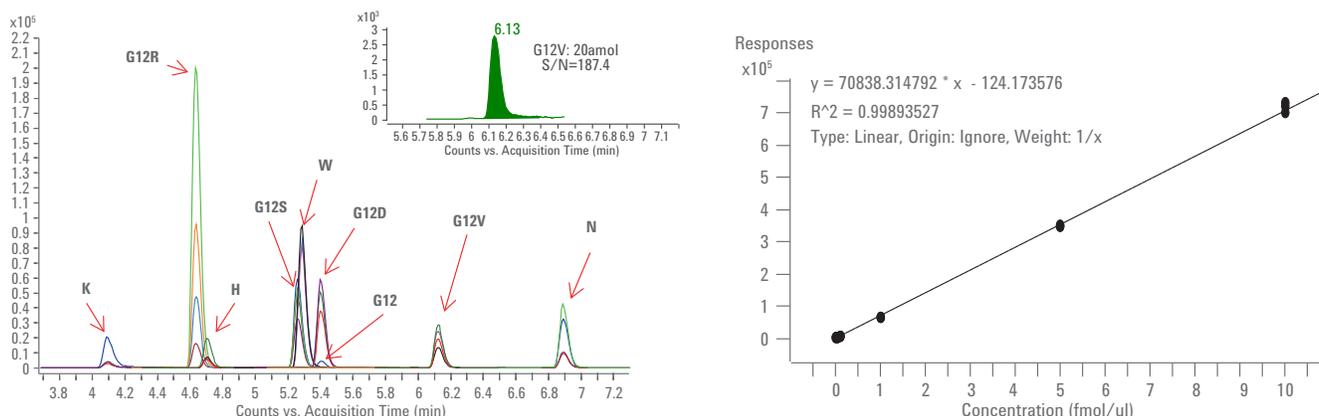
安捷伦 LC/QQQ 仪器无缝对接多元互交支持的蛋白定量 Skyline 软件，包含自动优化保留时间和碰撞能量 (Automation Tool)

安捷伦公司是唯一一家全面提供 MRM 肽段定量完整解决方案的仪器厂家，六大环节衔接紧密，天衣无缝！全系统具备灵敏度高、重现性好、自动化程度高、容易使用，符合生化实验室的高通量、精准定量的要求，是从生化实验室实际出发完成肽段定量的最好的技术平台。

安捷伦 LC/QQQ 肽段定量应用实例

生物类似药物的质控及定量分析

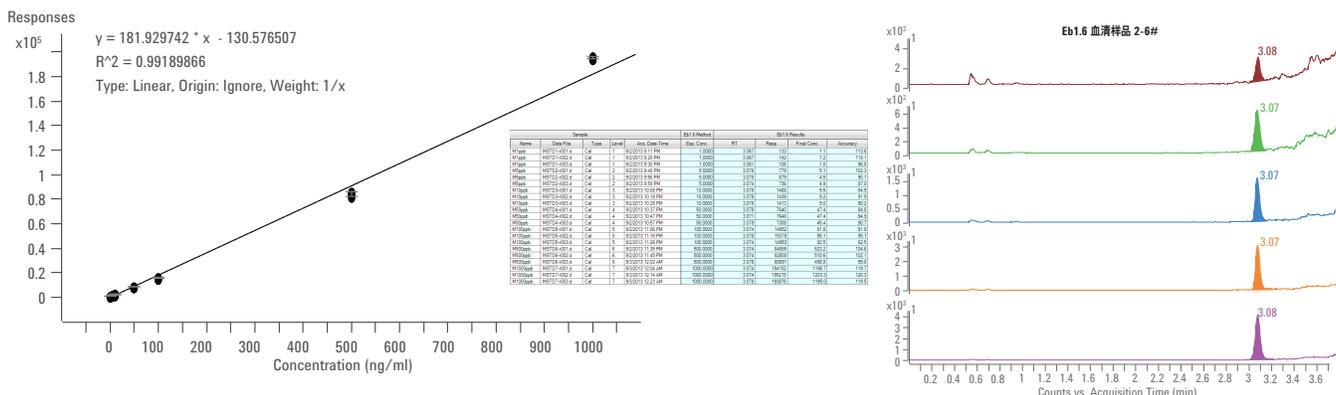
生物技术药物在治疗重大疾病时已显示出明显的临床优势，随着一些原研生物药专利的到期及生物技术的不断发展，越来越多的生物类似药如雨后春笋面向市场，提高了生物药的普及性并降低了用药成本，满足广大群众的用药需要。因而，以原研生物药为标准对生物类似药的质量监管应运而生且日趋严格，以保证其具有足够的安全性和有效性，安捷伦 MRM 肽段定量技术正好大显身手。



安捷伦开发的肽段定量方法，测定 12 种生物药肽段的丰度，表现出高灵敏度、宽线性范围及优异的重现性

生物大分子蛋白药物的 DMPK

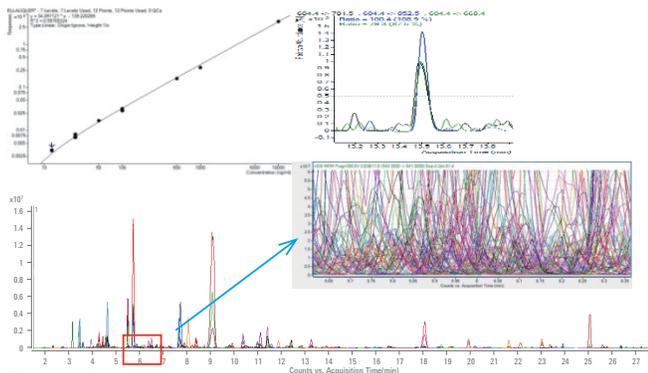
α -芋螺毒素是从中国南海西沙群岛黑星芋螺克隆得到的新型多肽药物，该肽含有 16 个氨基酸，两对二硫键。研究表明，该肽对神经病理性疼痛具有很强的镇痛作用，其镇痛活性显著高于目前已进入临床阶段的镇痛药 Vc1.1，作用时间更长且不成瘾。Eb1.6 给药方便，肌肉注射或静脉注射均可，可用于局部及全身镇痛。对 Eb1.6 的大规模合成和质量分析，为其进一步做临床 DMPK 实验奠定基础。



安捷伦开发出的 α -芋螺毒素 MRM 肽段定量方法，高灵敏度 (1.2fmol, S/N > 90:1) 和宽线性范围 (超过 10^3)，应用于生物药的 DMPK 研究

蛋白质组学中肽段定量分析

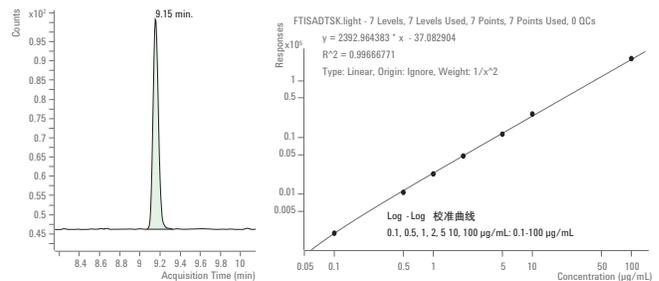
蛋白质组学的深入发展，带来了数量庞大的蛋白质丰度测定的需求。安捷伦为客户提供全自动的、稳定重现的样品富集纯化与蛋白分离平台，并结合高灵敏度、高通量的 LC/QQQ 仪器，携手生物科学家一道进入“蛋白质组学新时代”。安捷伦应用工程师用 MRM 技术定量分析了酵母中 63 个蛋白和人体精子中 76 个蛋白，该蛋白质组学的丰度测定实验共包含了 862 个 MRM，在一分钟内（保留时间 5.5 - 6.5 分钟）就集中测定 108 对 MRM 的肽段的丰度。下图是不孕症的生物标记蛋白，细胞外基质蛋白 1 (ECM-1, extracellular matrix protein 1) 的分析结果，证明了安捷伦仪器良好的灵敏度、精密度和宽的动态范围。



酵母 (BY4741) 和人体精子蛋白 (含部分 O18-标记) 共 862 对 MRMs，利用不孕症的生物标记蛋白，细胞外基质蛋白 1 (ECM-1, extracellular matrix protein 1)，展现了出色的灵敏度、精密度和线性范围

单抗药物的定量分析

临床结果表明，单克隆抗体在治疗肿瘤、自身免疫疾病、心脑血管疾病、眼科疾病等方面都显示出卓越的优势，是目前生物制药领域的研究热点。对单克隆抗体进行准确定量，是临床 PK/PD 研究的重要环节。传统的免疫分析手段由于在选择性、准确性、重复性等方面存在局限性，逐步被精准的质谱定量方法所取代。下图是基于 1290 Infinity II 液相色谱/6495 三重四极杆液质联用系统平台，建立的用于治疗 HER2 阳性的转移性乳腺癌 mAb-A 的 MRM 肽段定量方法。

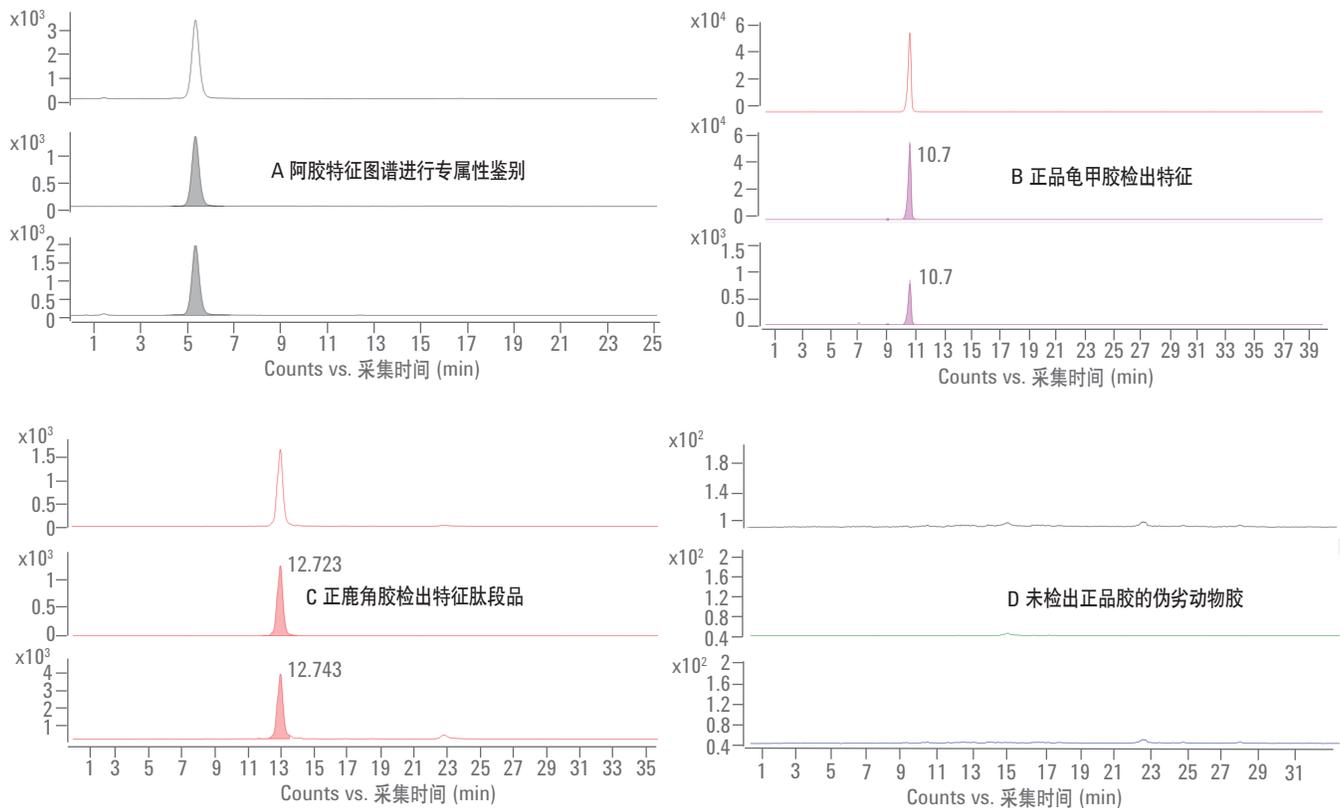


Protein	Peptide	校准曲线 (µg/mL)	R ²	平均准确度
mAb-A	FTISADTSK	0.1-100	0.997	100%

安捷伦开发出的高灵敏度、高准确性的 MRM 肽段定量方法，用于检测治疗 HER2 阳性的转移性乳腺癌 mAb-A，完全满足生物制药行业的高标准要求

天然动物药物的高灵敏度鉴定分析

动物胶类药材是我国传统中药中一类特殊的动物药，是由动物的皮、骨骼等经特殊工艺加工而成，常见的有阿胶、鹿角胶、龟甲胶及其相关中成药制剂。近年来，随着胶类药物用量增长，原料资源供不应求，一些不法生产企业为降低成本，采用其它动物杂皮投料，给消费者的健康带来严重隐患，新闻媒体也曝光了这一违法行为。为了保障公众用药安全有效，基于《中国药典》2015年版的方法，安捷伦应用工程师建立了稳定、快速、灵敏的 LC/QQQ 鉴定方法，可有效地辨别出阿胶、鹿角胶、龟甲胶等药物的真假伪劣，同时还开拓了 QQQ 肽段定量的新用途。

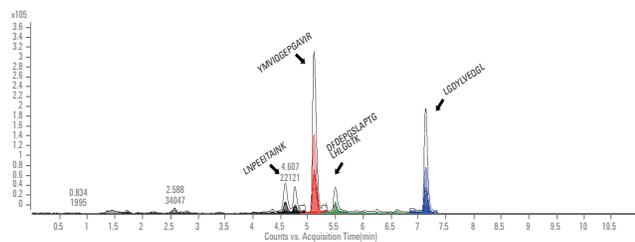


基于 2015 版药典开发出的阿胶、鹿角胶和龟甲胶特征肽段 LC/QQQ 鉴定方法，图 A, B, C 分别为药典标示的正品阿胶、龟甲胶和鹿角胶的特征肽段图谱，图 D 为伪劣动物药物样品

食品安全分析（蛋白鉴别，乳品分析，过敏原分析等）

1) 分析芒果水果中的过敏原蛋白质

有些人食用芒果后会出现过敏的现象，嘴唇肿胀，脸部皮肤出现皮疹，口腔起泡。芒果有四个主要过敏原蛋白质：肌动蛋白抑制蛋白 (Profilin 1)，乙酰-CoA C-半乳糖苷酶， β -D-半乳糖苷酶和核酮糖-1,5-二磷酸羧。安捷伦选择 Profilin 1 为芒果过敏原的标志性蛋白来检测，利用前人的研究获知了 Profilin 1 的三个专属性肽段，通过 Skyline 的构建和智能优化，得到了肽段的保留时间和 MRM 信息，建立了安捷伦高灵敏的芒果过敏原的实测方法。

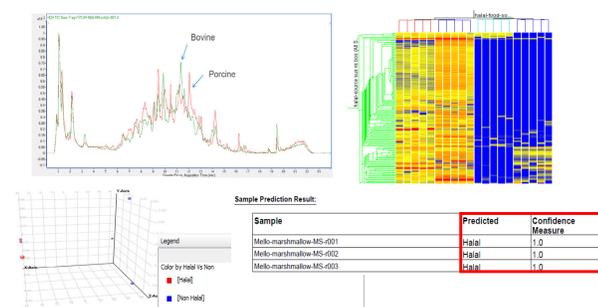


Protein Name:profilin1		Species:Mangifera indica								
NCBI Accesion#:8241221		Masses are:pl of protein=4.89								
mswqayvdeh lmcdieghl taaivglg swvaqsanf kinpeitai nkdfdepgsl aptghlgge kymviqgepg avirgkkpg gvtvktnma fvigiyeprm tpgqcnmive rigdyivegg_1										
Name	Precurser	m/z (pred.)	Start	RT	End	Height	Width	Area	CE	Algorithm
LDYLVVEGDL	552.7089	546.293	7.078	7.136	7.259	89758	0.063	363557	9	MRM
LNPETTRANK	621.241	291.1567	4.458	4.589	4.667	22125	0.074	104348	37	MRM
DEPEPSLAPTGLHGGT	637.987	507.1722	5.289	5.5	5.641	18992	0.067	105317	13	MRM
YWVDDGPEAVR	716.885	788.4468	5.052	5.113	5.224	158022	0.073	717659	21	MRM

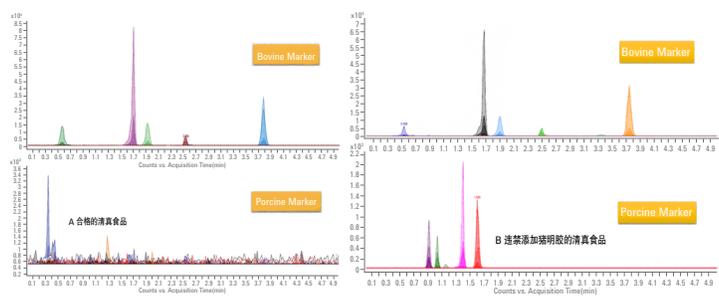
6495 QQQ 定量分析果汁中过敏原 — 肌动蛋白抑制蛋白 (Profilin 1) (1.3nM)

2) 蛋白食品的真伪鉴别 — 清真食品（肉、奶等）掺假鉴别解决方案

在肉、奶中掺假、制假、售假会酿成重大的食品安全事件，掺假问题一直以来威胁着中国的食品安全，目前主要的掺假手段是用猪肉、鸭肉伪造牛羊肉，其中牛肉掺假主要是熟牛肉制品，而羊肉掺假的重灾区则是火锅。由于鸡、鸭肉已经很便宜，所以几乎不可能掺假；当熟牛肉用香料掩盖住原有味道后，感官上就很难辨别成品了；火锅中本来就有大量香料，羊肉卷涮过之后感官上也难以鉴别。还有一种造假行为更为恶劣，那就是用非食用肉类伪装食用肉类，比如欧洲马肉事件、沃尔玛狐狸肉事件等，我们统称为“经济利益驱动的掺假” (EMA, economically motivated adulteration)。由于穆斯林在饮食方面有着严格的宗教特色禁忌，讲究“卫生与纯正”，因此对清真食品的纯洁性检测也是目前重要的课题。安捷伦利用食品组学方法，鉴定出牛肉和猪肉蛋白质的专属性肽段，通过 MRM 肽段定量方法成功建立了清真食品的鉴别方法。



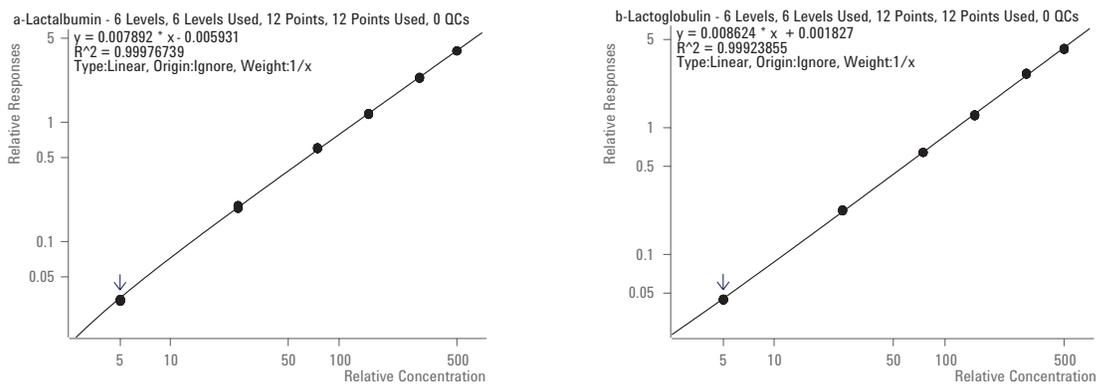
MPP 软件查找出猪、牛差异性蛋白质，获得肽序列（左图），利用 Skyline 和安捷伦完整的肽段定量流程，鉴定市售清真食品（左下，合格清真食品 A，右下，违禁添加猪明胶的清真食品 B）



通过食品组学鉴定出猪、牛的差异性蛋白质，通过安捷伦 MRM 肽段定量分析流程，成功检测市售清真食品的结果

3) 奶粉中乳清蛋白分析

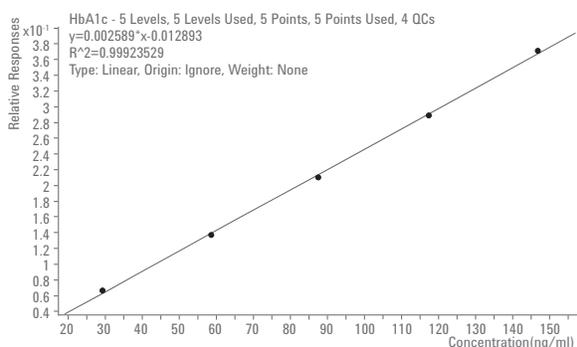
乳清蛋白的营养价值是最高，其氨基酸种类和含量齐全，并能提供人体所需要的蛋白质，是优质蛋白质，主要含 β -乳球蛋白， α -乳白蛋白，免疫球蛋白和乳铁蛋白。前两种蛋白目前是评估乳制品质量优劣的标志，安捷伦紧跟市场需求，利用上述的安捷伦全流程建立的对应的分析乳清蛋白的 MRM 肽段定量方法。



安捷伦建立乳清蛋白 MRM 肽段定量流程，准确、重现、灵敏的成熟方法 (3.9 fmol/uL~ 500 fmol/uL)，Log-Log 曲线显示出优异的定量准确性

糖化血红蛋白 (HbA1c) 临床诊断研究

糖尿病患者进行的糖化血红蛋白检测特别具有临床意义，这是因为每天的血糖测定仅仅反映了检测当时的血糖变化，而糖化血红蛋白的测定反映出过去 2 - 3 个月的时间内患者整体的血糖控制情况。因此医学专家建议，如果糖尿病患者血糖控制已经达到标准，并且血糖控制状态较为平稳，每年至少应该接受两次糖化血红蛋白检测；而对于那些需要改变治疗方案，或者血糖控制状态不稳定的糖尿病患者，应该每三个月进行一次糖化血红蛋白测定。安捷伦开发出了高准确性的糖化血红蛋白 MRM 肽段定量方法，准确度 98 - 110%，可快速获得可靠的分析结果。



MRM 肽段定量法测定糖尿病患者的糖化血红蛋白 (HbA1c)

Data File	Type	Level	HbA1c Method		HbA1c Results			HbA1c (ISTD) Results	
			Exp. Conc.	RT	Resp.	Final Conc.	Accuracy	RT	Resp.
A.d	Cal	1	0	3.35	2820	30.9	105.5	3.22	43332
B.d	Cal	2	29.3	3.35	5223	88.3	88.0	3.22	42031
C.d	Cal	3	87.5	3.35	8375	148.2	88.6	3.22	38021
D.d	Cal	4	117.4	3.35	10873	118.4	89.1	3.22	39707
E.d	Cal	5	146.9	3.35	13713	149.2	101.6	3.22	37636
F.d	Cal	6	146.9	3.35	13713	149.2	101.6	3.22	36628
D1.d	QC	2	29.3	3.35	2777	32.5	110.9	3.22	38039
M8.d	QC	4	87.5	3.35	7737	82.3	84.1	3.22	38578
1.d	Sample			3.35	2696	32.6		3.22	37734
2.d	Sample			3.35	5899	65.5		3.22	37580
3.d	Sample			3.35	6051	48.7		3.22	53375
4.d	Sample			3.35	9895	67.8		3.22	41094
5.d	Sample			3.35	5178	58.5		3.22	37331
6.d	Sample			3.35	5735	53.2		3.22	45905
7.d	Sample			3.35	7565	85.5		3.22	38222
8.d	Sample			3.35	6958	75.2		3.22	37537
9.d	Sample			3.35	3445	40.1		3.22	37854
10.d	Sample			3.35	3532	41.5		3.22	37339
C1-1.d	QC	2	29.3	3.35	2657	31.7	108.3	3.22	38394
B8.d	QC	4	87.5	3.35	6861	81.2	92.8	3.22	34700
A.d	Cal	1	0	3.35	2820	30.9	105.5	3.22	44257
R8.d	Cal	2	29.3	3.35	2839	30.7	104.8	3.22	42868
IC.d	Cal	3	87.5	3.35	5262	57.8	88.7	3.22	38485
IC.d	Cal	4	87.5	3.35	8435	86.0	88.3	3.22	40138
IE.d	Cal	5	117.4	3.35	10940	118.4	89.2	3.22	37834
IF.d	Cal	6	146.9	3.35	13723	147.9	100.7	3.22	36966
S1.d	Sample			3.35	3715	59.5		3.22	28266
S2.d	Sample			3.35	2096	40.7		3.22	22851
S3.d	Sample			3.35	2317	32.8		3.22	32180
S4.d	Sample			3.35	3451	48.8		3.22	30366
S5.d	Sample			3.35	5546	83.2		3.22	27342

Scan segments											
Compound Group	Compound Name	ISTD?	Precursor Ion	M1 Res	Production Ion	M2 Res	Dwell	Fragmentor	Collision Energy	Col Accel/Ret Voltage	Polarity
	HbA1c	T	4292	Unit	245	Unit	200	380	10		3 Positive
	HbA1c	T	3482	Unit	110	Unit	200	380	20		3 Positive

总结

基于 QQQ 平台的 MRM 肽段定量方法灵敏、精确，同时具有高重现性和高通量。随着蛋白质组学不断发展，在实验室的纯理论研究已经不断向各个应用领域渗透，越来越广泛地应用于以蛋白质研究为基础的多种新兴应用分析领域，诸如：生物药物的临床使用、抗体药物偶联物 (ADC) 的研究、蛋白药物的毒性预测等；甚至是原来的传统小分子分析领域，像食品安全分析（蛋白质鉴别，过敏原分析等）、临床疾病诊断（发现并鉴定大量功能蛋白质和潜在疾病蛋白质标志物）、环境保护（生物毒素监测，暴露组学等）、能源化工（生物燃料质量控制），也都出现了对生物大

分子丰度测定的需要。安捷伦在 AssayMAP 样品自动化前处理和 QQQ 平台基础之上，巧妙借助生物肽段序列的质谱信息数据库和数据分析设计软件，开发出了系统性的 MRM 肽段定量方法，从而可以高灵敏、高精密度和高效地定量分析蛋白质及其衍生出的肽段生物分子，获得这些蛋白质的表达丰度，为蛋白质差异分析提供了更可靠、动态范围更广的技术手段，方便生命科学家深入了解细胞、组织或生物体的整体蛋白质动力学，为人类健康的福祉服务。

安捷伦 QQQ 用户发表的部分文献

肽段定量 (Peptide Quan) 经常涉及到复杂生物基质中的痕量肽段分析, 作为高灵敏度定量检测的金标准 (Gold Criterion), 三重四极杆质谱 (QQQ) 起着举足轻重的作用。安捷伦有着丰富的 QQQ 产品线, 尤其高端产品 (6495 QQQ 和 6490 QQQ), 能够进行超痕量分析的同时保证出色的定量重复性。很多国际实验室针对不同的研究领域, 不断扩展和丰富多肽定量的内容 (包括疾病诊断、临床治疗、药物研发、细胞分析、生物标记物的发现), 其中安捷伦高端的 QQQ 产品功不可没。

1. Vojtech Tambor, Marie Vajrychova, Marian Kacerovsky, Potential Peripartum Markers of Infectious-Inflammatory Complications in Spontaneous Preterm Birth, BioMed Research International, 2015, Article ID 343501, 13 pages. 论文运用 1260 LC/6490 QQQ 对孕妇羊水水中的蛋白标志物进行表征和定量分析, 研究了细菌感染和导致的炎症对自主性早产分娩的影响
2. Andrew J Percy, Yassene Mohammed, Juncong Yang, Christoph H Borchers, A standardized kit for automated quantitative assessment of candidate protein biomarkers in human plasma, Bioanalysis, 2015, 7 (23), 2991-3004. 论文运用 1290 LC/6495 QQQ, 采用多重反应监控 MRM 和稳定同位素标记 SIS, 建立了人血浆中 76 种目标蛋白标志物的定量方法。所建立的蛋白定量方法重复性好、动态范围宽、自动化和流程标准化, 适用于疾病诊断中标志物的发现和评估
3. Katharina Bluemlein, Markus Ralser, Monitoring protein expression in whole-cell extracts by targeted label- and standard-free LC-MS/MS, Nature Protocols, 2011, 6 (6), 859-869. 论文综述了全细胞提取物中目标蛋白的定量方法和流程, 其中论述了 6490 QQQ 做为重要的 QQQ 技术用于 Peptide Quan 的应用
4. Andrew G. Chambers, Andrew J. Percy, Juncong Yang, Multiplexed Quantitation of Endogenous Proteins in Dried Blood Spots by Multiple Reaction Monitoring - Mass Spectrometry, Molecular & Cellular Proteomics, 2013, 12 (3), 781-791. 论文采用 1290 LC/ 6495 QQQ, 以 Dried Blood Spots 作为高效的血浆样品采集技术, 结合多重反应监控 MRM, 能够对内源性蛋白进行高灵敏度定量分析。所建立的方法动态范围宽 (> 104); 25 分钟完成生物样品中 65 个多肽的定量分析, 适用于临床诊断的高通量要求
5. Gabriela V. Cohen Freue, Christoph H. Borchers, Multiple Reaction Monitoring (MRM) Principles and Application to Coronary Artery Disease, Proteomics, 2012, 5 (3), 378-387. 论文运用 1290 LC/ 6490 QQQ, 采用多重反应监控 MRM 技术, 建立了人血浆中 44 种高峰蛋白的定量方法, 其中 5 种蛋白作为与冠心病相关的标志性蛋白。所建立的方法灵敏度出色、分析通量高, 适用于临床诊断相关的定量蛋白质组学研究

- 
6. Xiao-jun Li, Lik Wee Lee, Clive Hayward, An integrated quantification method to increase the precision, robustness, and resolution of protein measurement in human plasma samples, *Clinical Proteomics*, 2015, 12, 3-19.
论文运用 1290 LC/ 6490 QQQ, 通过对肺癌病人血浆中 16 种标志性蛋白的定量分析, 发展了 Integrated Quantification (InteQuan) 技术用于人血浆中多肽定量分析方法。和传统的稳定同位素标记技术 SISQuan 相比, 有着更加出色的重复性和准确度, 非常适用于常规的临床检测

 7. Andrew J. Percy, Andrew G. Chambers, Juncong Yang, Advances in multiplexed MRM-based protein biomarker quantitation toward clinical utility, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, 1844, 917-926.
论文运用 1290 LC/ 6490 QQQ, 采用多重反应监控 MRM 技术结合稳定同位素标记技术 SISQuan, 建立了与心血管疾病和糖尿病相关的 142 种蛋白标志物的定量方法, 所涉及的蛋白标志物含量差异大, 浓度范围 31 mg/mL - 44 ng/mL; 血浆基质复杂。所建立的方法灵敏度高、分析通量大、重复性好, 能够满足临床诊断的要求

参考文献

- [1] Polanski M, Anderson NL (2006) A List of Candidate Cancer Biomarkers for Targeted Proteomics. Biomarker Insights 2: 1-48.
- [2] Emily S. Boja and Henry Rodriguez (2012) Mass spectrometry-based targeted quantitative proteomics: Achieving sensitive and reproducible detection of proteins. Proteomics 2012, 12, 1093–1110.
- [3] Ruedi Aebersold (2013) Analysis of a preselected group of proteins delivers more precise, quantitative, sensitive data to more biologists. Vivien Marx reports. Nature methods | VOL.10 NO.1 | JANUARY 2013,19.
- [4] Vinzenz Lange, Paola Picotti, Bruno Domon and Ruedi Aebersold (2008) Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. Molecular Systems Biology 2008:1-14
- [5] Paola Picotti, Oliver Rinner, Robert Stallmach, Franziska Dautel, Terry Farrah, Bruno Domon, Holger Wenschuh & Ruedi Aebersold High-throughput generation of selected reaction-monitoring assays for proteins and proteomes . Nature methods | vol.7 No.1 | January 2010 :43-48
- [6] Paola Picotti & Ruedi Aebersold Selected reaction monitoring–based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions. Nature methods | VOL.9 NO.6 | JUNE 2012:555-566

查找当地的安捷伦客户中心：

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

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

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，2016

2016年06月01日，中国出版

5991-6988CHCN



Agilent Technologies