

SCIEX Triple Quad™ 6500+系统用于血浆中曲妥珠单抗含量的分析

The Application of Analysis of Trastuzumab in Plasma in SCIEX Triple Quad™ 6500+ System

陈晨¹, 罗继¹, 郭立海¹

Chen Chen¹, Ji Luo¹, Lihai Guo¹

¹ SCIEX中国 应用支持中心

Keywords: antibody, Triple Quad™ 6500+ System, Triple Quad™

1. 前言

曲妥珠单抗 (Trastuzumab) 是一种重组人源化单克隆抗体, 特异性地作用于人表皮生长因子受体-2(HER2)的细胞外部位, 在体外及动物实验中均显示可抑制HER2 过度表达的肿瘤细胞的增殖。作为临床上应用的抗乳腺癌药物, 其用药后在血浆中浓度的监测对于病人的诊断具有重要的意义。

2. 曲妥珠单抗检测的难点

曲妥珠单抗分子量约150 KD, 是一种蛋白类大分子, 常规检测方法, 比如酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 方法, 会面临灵敏度不佳, 重现性不稳定以及假阳性等问题。使用质谱检测时, 通常使用酶解法进行检测, 即使用胰蛋白酶 (Trypsin) 将蛋白分子酶切为肽段后, 挑选其特征性的肽段进行分析。目前主要的方法包括酶解后直接进行分析或使用对应抗体的抗抗体富集后再进行酶解和定量分析。前者灵敏度较低, 且酶解体系的溶液中存在大量盐类杂质的干扰。后者操作复杂且费用昂贵。

3. 本实验的优势及特点

使用基于超滤管的方法 (Filter aided proteome preparation, FASP)酶解法进行酶解, 第一能够通过离心有效的去除反应体系中的盐, 保障后续酶解的充分进行, 且无需在酶解后再进行固相萃取 (SPE)除杂质的步骤; 第二通过离心置换溶液的方式, 可以有效控制最终样品中的溶液体积。而使用FASP酶解后进行液质联用

对曲妥珠单抗进行分析, 是目前不使用抗体富集法的方法中, 最灵敏的液质联用的前处理方法。对曲妥珠单抗检测的检出限能够得到0.1 ng/mL。

4. 实验方法

4.1 样品前处理

FASP酶解

取15 mL待测血浆, 加入3倍体积的甲醇沉淀蛋白, 5000 × g离心5分钟, 弃掉上清。加入200 mL 7M 盐酸胍溶液溶解蛋白, 并加入20 mL 1M 二硫苏糖醇 (DTT), 55 °C反应1小时。样品冷却至室温后加入50 mL 1M 碘乙酰胺 (IAA), 避光反应30分钟。将样品溶液转移至30K的超滤管中, 通过离心将液体成分除去, 并重新加入100 mL 50 mM 碳酸氢铵溶液。加入1 mg/mL 胰蛋白酶溶液20 mL, 37 °C酶切6小时。取10 mL进样进行液质联用分析。

4.2 液相分离条件以及质谱条件

液相系统: SCIEX ExionLC™ AD

色谱柱: Phenomenex 1.6 mm C18 100A 100 mm × 2.1 mm

流动相: A相 0.1%甲酸水溶液;

B相 0.1%甲酸乙腈溶液;

流速: 0.4mL/min

柱温: 40 °C

进样体积: 10 微升

运行时间: 9 min

梯度洗脱条件详见表1

表1. 色谱分析梯度参数

时间(min)	流速(mL/min)	B相比例(%)
0.1	0.35	10
4.5	0.35	22
5	0.35	80
6	0.35	80
6.1	0.35	5
7	0.35	5
9	0.35	5

质谱仪: SCIEX Triple Quad™ 6500+系统

采集方式: 多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM)

质谱仪MRM模式下相关参数见表2

表2. MRM模式下离子源参数

离子源参数	数值
气帘气 (CUR)	30
喷雾电压 (IS)	5500
离子源温度 (TEM)	350
雾化气 (GS1)	55
辅助气 (GS2)	55

待检测的肽段及离子对信息见表3

表3. MRM采集离子对信息

离子对名称	母离子	子离子	驻留时间 (Dwell)	碰撞能量 (CE)
1FTISADTSK.+2y7	485.2	721.4	100	22.8
2FTISADTSK.+2y6	485.2	721.4	100	22.8

备注: 1定量离子; 2定性离子

5. 结果与讨论

方法验证结果

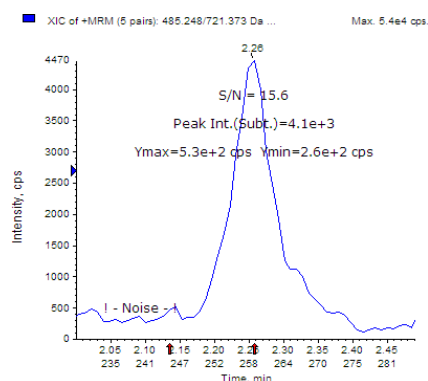


图1. 曲妥珠单抗最低检出限为0.1 ng/mL

最低检出限实验, 通过在空白样品中添加0.1 ng/mL的标准品, 经上述前处理流程, 能够得到信噪比为15.6的MRM离子对峰形。见图1。

重现性实验, 通过在空白样品中添加0.1 ng/mL, 3.3 ng/mL, 33.3 ng/mL的标准品, 经上述前处理流程, 针对每个浓度水平进行6次重复实验, 每种浓度下的重现性 (RSD%) 都在2.4%到4.8%范围内。见图2。

Row	Component Name	Sample Name	Num. Values	Mean	Standard Deviation	Percent CV
1	sp Herceptin_HC Herceptin.FTISADTSK.+2y7.light	0.1ppm_	6 of 6	1.486e4	3.588e2	2.42
2	sp Herceptin_HC Herceptin.FTISADTSK.+2y7.light	3.33ppm_	6 of 6	2.078e5	9.952e3	4.79
3	sp Herceptin_HC Herceptin.FTISADTSK.+2y7.light	33.3ppm_	6 of 6	1.873e6	6.991e4	3.73

图2. 重现性实验表现出该方法拥有良好的重现性

线性实验，在浓度0.1-100 ng/mL范围内进行实验，曲妥珠单抗的肽段拥有良好的线性关系，相关系数为0.999。最低检出限为0.1ng/mL。低于普通非抗体富集法对赫赛汀进行检测的检测限。见图3。

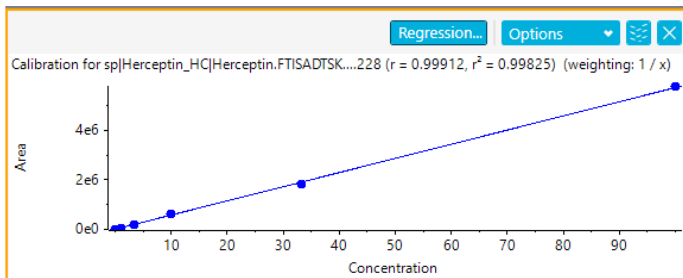


图3. 线性实验结果，其相关系数为0.999

6. 总结

本文针对抗体药物曲妥珠单抗在质谱检测上面临的灵敏度、费用以及前处理复杂的问题，通过FASP方法找到了一个低费用、处理简单且高灵敏度的方法。结合SCIEX Triple Quad™ 6500+系统的高灵敏度和很好的线性，能够很好胜任当前对曲妥珠单抗的检测要求。

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-02-12521-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)