

# 使用SCIEX QTRAP<sup>®</sup> 4500质谱系统测定血浆中人源IGF1 (Insulin-like Growth Factor I) 的含量

## Quantitation Analysis of Human Source IGF1 (Insulin-like Growth Factor I) in Serum by Using SCIEX QTRAP 4500<sup>®</sup> System

罗继, 郭立海, 靳文海

SCIEX, 亚太应用支持中心, 中国

**Key words:** IGF1, Protein Quantitation, MRM, 96-well plate SPE, Plasma Matrix, SCIEX QTRAP<sup>®</sup> 4500 System

**关键词:** 类胰岛素一号生长因子、蛋白定量、多反应监测、微量在线固相萃取、血浆基质、SCIEX QTRAP<sup>®</sup> 4500

### 引言

人源 IGF1 (Insulin-like Growth Factor I, 类胰岛素一号生长因子) 是一个含 195 氨基酸的蛋白, 属于分泌性蛋白质, 在体内经一系列酶的作用, 如切除信号肽、前肽等结构域后最终形成一段含 70 个氨基酸, 分子量约 7700 Da 的蛋白, 该含 70 个氨基酸的蛋白为具有生物学活性的功能蛋白 (以下简称该蛋白为 IGF1)。以往研究发现, IGF1 与多种疾病及生物学表像相关 (如自发性流产、某些肿瘤、老年痴呆、动脉粥样硬化、初生体重、骨骼发育等), 对其定量检测具有临床指导意义。根据性别、年龄、疾病状态等因素不同, IGF1 含量通常在 15-750 ng/mL 之间。以往通常采用免疫学方法进行测定。近年来 LC-MS/MS 技术在肽段 / 蛋白定量领域发展迅速, 与传统免疫学方法比较, 其主要特点为方法开发不受抗体限制、方法开发周期短、测定通量高、抗干扰能力强、定量结果准确等。

基于 LC-MS/MS 检测 IGF1 受离子化效率、二级碎裂效率低、非特异性吸附、与体内其他蛋白 (如 IGF1 受体蛋白) 结合的影响, 方法开发存在极大挑战。以往一些基于 LC-MS/MS 的检测方法通常使用免疫亲和、酶解、纳升液相分离等前处理及分离手段以提高灵敏度, 但同时却增加了样本处理的周期及操作难度。本文利用一种基于混合模式固相萃取的前处理方法, 开发了一种在 SCIEX QTRAP<sup>®</sup> 4500 质谱上的 LC-MS/MS 方法对人血浆中 IGF1 含量的检测方法。该方法定量线性范围为 10-2430 ng/mL, 且测定精度高、重现性好, 完全满足人血浆样本中 IGF1 蛋白的含量测定需求。

### 试剂及耗材

人源 IGF1 蛋白购自 Abnova 公司, 货号为 P4399。序列为: GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRRAPQTGIVDECCFR SCDLRRLEMYCAPLPAKSA。

人源 IGF1 内标蛋白购自 Abnova 公司, 货号为 P3452。序列为: MGPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRRAPQTGIVDECCFR SCDLRRLEMYCAPLPAKSA。

CHAPS、水、甲醇、乙腈、氨水、乙酸、甲酸购自 Sigma。大鼠血浆、人血浆为客户惠赠。

SPE 柱: Agela PAX 96-well plate 30 mg/2 mL

### 样本制备

#### 1、蛋白沉淀

分别取 100  $\mu$ L 人血浆、100  $\mu$ L 大鼠血浆 (加入 IGF1 标品浓度为 50 ng/mL)、100  $\mu$ L 大鼠血浆 (大鼠血浆中分别加入 10、30、90、270、810、2430 ng/mL 的 IGF1 标准品, 同时人血浆及大鼠血浆中均加入终浓度为 100 ng/mL 的 IGF1 内标蛋白) 与 100  $\mu$ L 0.01% CHAPS 溶液混合后于 37  $^{\circ}$ C 孵育 45 min, 随后加入 200  $\mu$ L 乙腈 (含 5% 乙酸) 室温放置 5 min, 15000 RPM 离心 5 min, 取上清后加入 900  $\mu$ L 5% 氨水溶液 (体积约 1.2 mL)。

#### 2、SPE 净化

活化: 500  $\mu$ L 甲醇

平衡: 500  $\mu$ L 5% 氨水溶液

上样: 1.2 mL 样品分两次上样, 每次 600  $\mu$ L

淋洗 1: 200  $\mu$ L 5% 氨水溶液

淋洗 2: 200  $\mu$ L 5% 甲醇水溶液 (含 1% 乙酸)

洗脱 1: 2x25  $\mu$ L 60:30:10 甲醇 : 水 : 乙酸

洗脱 2: 50  $\mu$ L 纯水

### 色谱条件

色谱柱: Waters ACQUITY UPLC CSH C18  
(2.1  $\times$  100 mm, 1.7  $\mu$ m)

流动相 A: 水 (含 0.1% 乙酸)

流动相 B: 甲醇 : 乙腈 1:3 (含 0.1% 乙酸)

流速: 0.3 mL/min

柱温: 50  $^{\circ}$ C

进样量: 20  $\mu$ L

梯度:

Time	Module	Event	Parameter
0.00	Pumps	Pump B Conc.	10
3.00	Pumps	Pump B Conc.	80
3.10	Pumps	Pump B Conc.	95
3.60	Pumps	Pump B Conc.	95
3.70	Pumps	Pump B Conc.	10
5.00	Pumps	Pump B Conc.	10

### 质谱条件

扫描方式: MRM

表1. IGF1及IGF1内标定量离子对信息。

ID	Q1	Q3	Dwell(ms)	CE	DP
IGF1-IS	973.5	473.5	80	48	60
IGF1	957.2	473.5	80	47	80

表2. 离子源参数。

CUR	30 psi
GS1	55 psi
GS2	55 psi
Temp	550 $^{\circ}$ C
ISV	5500
CAD	Medium

### 结果

本次实验采用 SCIEX QTRAP<sup>®</sup> 4500 质谱对血浆中 IGF1 浓度进行测定, 采用内标法定量, 定量线性范围为 10-2430 ng/mL。相关系数 R 为 0.99959, 权重为 1/x (如图 1 所示)。

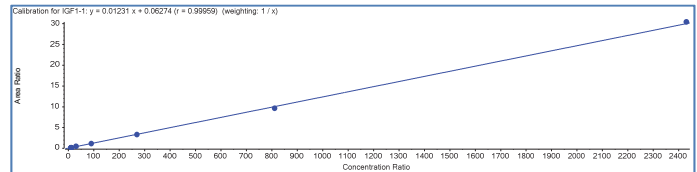


图1. IGF1标准曲线, 线性范围10-2430 ng/mL, 相关系数r = 0.99959。

平行制备的六个 LLOQ (10 ng/mL) 浓度点样品, 分别进样后测得 IGF1 峰面积 (图 2) CV 值为 5.57%, 方法检测稳定性和重现性良好。同时标准曲线中各浓度点精密度良好 (图 3)。

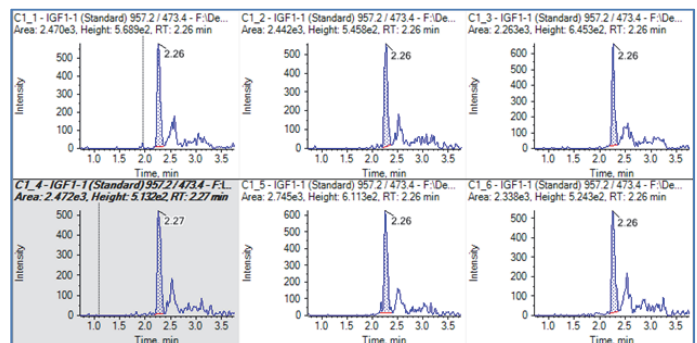


图2. 6个LLOQ浓度点平行样品峰面积比较。

Index	Sample Name	Sample ID	Sample Type	IS	Component Name	IS Name	Actual Concentration	Calculated Concentration	Accuracy
24	C1_1		Standard		IGF1-1	IGF1-IS-1	10.00	9.99	99.89
31	C1_2		Standard		IGF1-1	IGF1-IS-1	10.00	9.12	91.15
38	C1_3		Standard		IGF1-1	IGF1-IS-1	10.00	9.69	96.68
45	C1_4		Standard		IGF1-1	IGF1-IS-1	10.00	10.41	104.08
52	C1_5		Standard		IGF1-1	IGF1-IS-1	10.00	10.43	104.32
59	C1_6		Standard		IGF1-1	IGF1-IS-1	10.00	10.58	105.80

Row	Component Name	Actual Concentration	Num. Values	Mean	Standard Deviation	Percent CV	Accuracy	Val
1	IGF1-1	10.00	6 of 6	10.04	0.56	5.57	100.35	9.99

图3. 最低浓度点RSD及标曲中各浓度点准确度情况。

测得人血浆及人血浆加标 (加入量为 50 ng/mL) 样本中 IGF1 浓度分别为 81.9 ng/mL 和 149.3 ng/mL。加标样本测定结果准确度为 113.2% (图 4)。

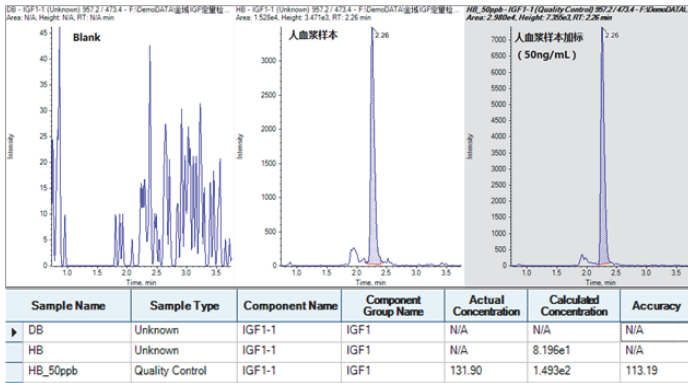


图4. 样品测定结果及人血浆加标样本测定准确度。

## 讨论

- 1、样品处理过程中IGF1蛋白容易与样品管产生吸附作用，因此强烈推荐采用低蛋白吸附样品管进行样本前处理操作。
- 2、样本处理过程中加入CHAPS作用是使蛋白变性从而破坏IGF1蛋白与其受体蛋白间的相互作用，同时也能有效降低其与样品管间的吸附。
- 3、IGF1内标蛋白序列与IGF1蛋白序列相比仅在N端多一个甲硫氨酸（M），因此该内标蛋白的理化性质与液质行为均与IGF1极为相似，适合当做内标蛋白。

## 结论

- 1、SCIEX QTRAP® 4500质谱系统拥有出色的灵敏度及稳定性，可进行高通量的蛋白定量分析。
- 2、检测方法建立过程中，充分考虑IGF1蛋白各方面性质，最终建立了基于混合模式固相萃取的LC-MS/MS测定方法。该方法定量线性范围为10–2430 ng/mL。
- 3、本实验体现了SCIEX在蛋白定量方法开发领域的优势，可提供高效、稳定、灵敏的蛋白定量解决方案。

## 参考文献

1. XU et al., Bioanalysis (2014) 6(24), 3311-3323
2. LI et al., J. Anal. Bioanal. Tech. 2013, S5
3. CHAMBERS et al., Anal. Chem. 2014, 86, 694-702



SCIEX中国  
官方微信



SCIEX  
客户服务



SCIEX  
毛细管电泳

For Research Use Only. Not for use in Diagnostics Procedures.

AB Sciex is operating as SCIEX.

© 2018. AB Sciex. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-8851-ZH-A



### SCIEX中国公司

北京分公司  
地址：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

全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897

上海公司及亚太区应用支持中心  
地址：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

网址：www.sciex.com.cn

广州分公司  
地址：广州市天河区珠江江西路15号  
珠江城1907室  
电话：020-8510 0200  
传真：020-3876 0835

微博：@SCIEX