

# TSQ Quantiva 出色灵敏度提升 复杂基质中目标肽段定量能力

李静

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

## 关键词

TSQ Quantiva; 肽段定量; 灵敏度

## 前言

生物标志物的研究包括发现(Discovery), 验证(Verification), 确认(Validation)阶段, 最后进入临床检验(Clinical Utilization)等更深入的阶段。在研究生物标志物的过程中, 主要的挑战在于如何在成分复杂的生物样品中发现中等丰度或低丰度的蛋白质, 这就对仪器性能提出了很高的要求, 即仪器必须具备高灵敏度, 以保证低丰度蛋白质的检出。

TSQ Quantiva 是赛默飞世尔科技在 2013 年 ASMS 上推出的全新一代三重四级杆质谱仪。TSQ Quantiva 采用主动离子管控技术(Active Ion Management, AIM)(图 1)技术优化离子生成及从离子源至检测器的传输, 使这款仪器能够以最优异的灵敏度定量分析最复杂和最具挑战性的样品。本实验旨在考查 TSQ Quantiva 在复杂基质中针对目标肽段定量的灵敏度。

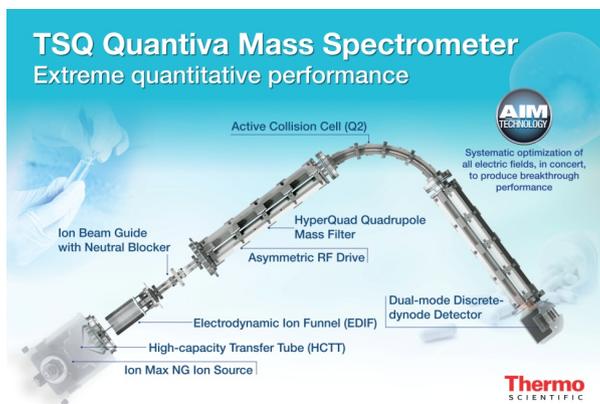


图 1. 主动离子管控技术 (AIM) 示意图

## 实验条件

### 材料与amp;方法

PIERCE Peptide Retention Time Calibration Mixture (货号: 88320), 内含 15 条不同疏水系数 (Hydrophobicity Factor, HF) 的重标肽段。采用 5ng/μL *E.coli* 酶解产物进行逐级稀释, 获得浓度为 0.0005 fmol/μL, 0.0025 fmol/μL, 0.005 fmol/μL, 0.05 fmol/μL, 0.5 fmol/μL, 5 fmol/μL, 50 fmol/μL 的样品。实验中通过 Pinpoint 1.3 软件进行离子对的选择 (图 2), 每个母离子选择 4 个子离子, 其中 1 个子离子作为定量离子, 3 个子离子作为定性离子。最终建立了 15 条目标肽段, 共计 60 个离子对的 SRM 方法, 其中加粗部分为定量离子 (表 1)。

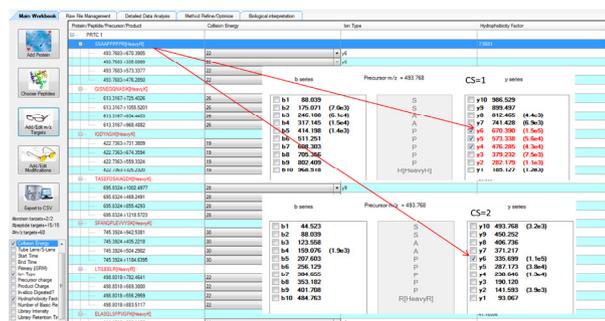


图 2. Pinpoint 1.3 软件进行离子对的选择

表 1. 15 条肽段信息

Peptide	HF	Q1	Q3	CE	Fragment Type
HVLTSIGEK*	15.52	496.3	<b>642.4</b>	22.2	y6
			541.3	22.2	y5
			755.4	22.2	y7
			454.3	22.2	y4
SAAGAFGPPELSR*	25.24	586.8	611.3	25.3	y5
			668.4	25.3	y6
			<b>815.4</b>	25.3	y7
			886.5	25.3	y8
ELGQSGVDTYLQTK*	28.37	773.9	975.5	31.6	y8
			<b>1032.5</b>	31.3	y9
			1119.6	30.4	y10
			876.5	31.6	y7
GLILVGGYGTR*	32.18	558.3	<b>620.3</b>	24.3	y6
			563.3	24.3	y5
			719.4	24.3	y7
			832.5	24.3	y8
GILFVGSGVSGGEEGAR*	34.52	801.4	928.4	32.6	y10
			1015.5	32.4	y11
			<b>1072.5</b>	31.8	y12
			871.4	32.6	y9
NGFILDGFPR*	40.42	573.3	<b>714.4</b>	24.8	y6
			601.3	24.8	y5
			827.5	24.8	y7
			974.5	24.8	y8
SSAAPPPPR*	7.57	493.8	670.4	22.1	y6
			<b>335.7</b>	22.1	y6
			573.3	22.1	y5
			476.3	22.1	y4
GISNEGQNASIK*	15.50	613.3	<b>725.4</b>	26.2	y7
			1055.5	25.6	y10
			854.4	26.2	y8
			968.5	26.2	y9
DIPVPKPK*	17.65	451.3	477.3	20.7	y4
			673.4	20.7	y6
			<b>337.2</b>	20.7	y3
			576.4	20.7	y5

IGDYAGIK*	19.15	422.7	<b>731.4</b>	19.7	y7
			674.4	19.7	y6
			559.3	19.7	y5
			325.2	19.7	y3
TASEFDSAIAQDK*	25.88	695.8	1002.5	28.9	y9
			<b>469.2</b>	28.9	y4
			855.4	28.9	y8
			1218.6	26.8	y11
SFANQPLEVVYSK*	34.96	745.4	<b>942.5</b>	30.7	y8
			405.2	30.7	y3
			504.3	30.7	y4
			1184.6	28.8	y10
LTILEELR*	37.30	498.8	<b>782.5</b>	22.3	y6
			669.4	22.3	y5
			556.3	22.3	y4
			883.5	22.3	y7
ELASGLSPVGFK*	41.19	680.4	555.3	28.4	y5
			<b>789.4</b>	28.4	y7
			1046.6	28.4	y10
			1117.6	27.3	y11
LSSEAPALFQFDLK*	46.66	787.4	<b>1086.6</b>	31.2	y9
			805.4	32.1	y6
			543.8	32.1	y9
			1157.6	30.5	y10

## 高效液相色谱分离

高效液相色谱仪：Thermo Scientific EASY-nLC 1000

预柱：Dionex PepMap C<sub>18</sub> 色谱柱（2cm, ID75μm, 3μm）

分析柱：Dionex PepMap C<sub>18</sub> 色谱柱（15cm, ID75μm, 3μm）

流动相：A, 含 0.1% 甲酸的水溶液；B, 含 0.1% 甲酸的乙腈溶液

梯度：2%-5% B 2 min, 2%-45% B 42min, 45%-90% B 3 min, 90%B 3min

流速：300 nL/min

上样量：2 μL

## 质谱分析

质谱仪：Thermo Scientific TSQ Quantiva

离子源：NanoFlex 离子源

离子模式：正离子

喷雾电压：2.0 kV

毛细管温度：275 °C

Q1 and Q3 resolution: 0.7 Da;

Cycle time: 2s

碰撞能量：通过公式  $CE=0.034 \times \text{母离子的 } m/z + 5.314$  计算得到相应肽段的碰撞能量，并在此基础上 CE 加减 2 进行进一步优化，选择最优碰撞能量。

## 实验结果

本实验采用全新一代三重四极杆质谱 TSQ Quantiva 对复杂基质中 15 条重标肽段进行定量分析，均可获得良好的色谱峰形和质谱响应（图 3）。以肽段 SSAAPPPPR\* 为例，检出限为（LOD）1amol，定量下限（LLOQ）为 5amol（图 4）。如图 5 标准曲线所示，在 5amol-100fmol 五个数量级浓度范围内，浓度与峰面积的线性相关系数在 0.99 以上，同时，在 amol 级水平仍可获得良好重复性（图 6）。15 条肽段的标准曲线和线性范围参见表 2。

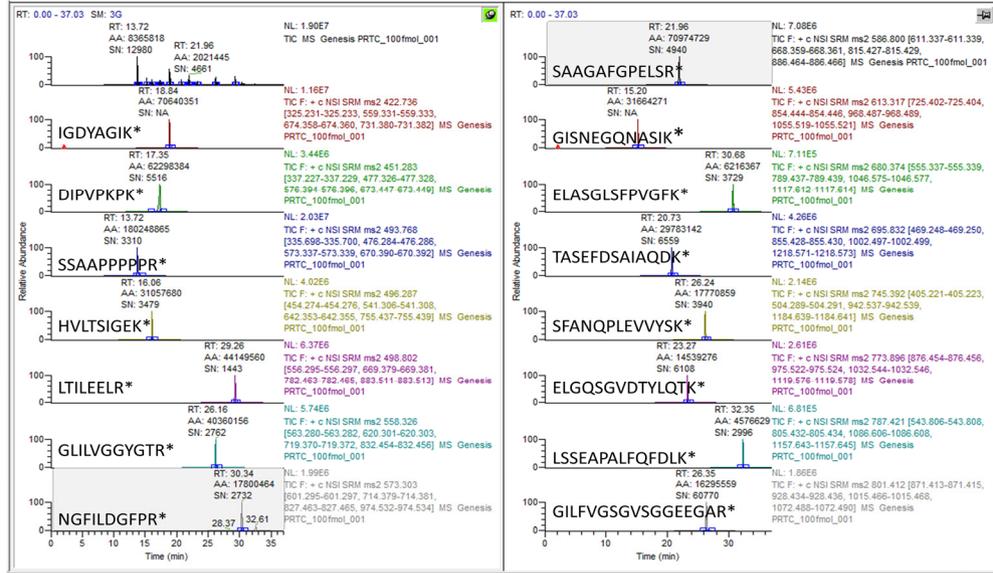


图 3. 15 条肽段总离子流图 (TIC) (上样量 100fmol)

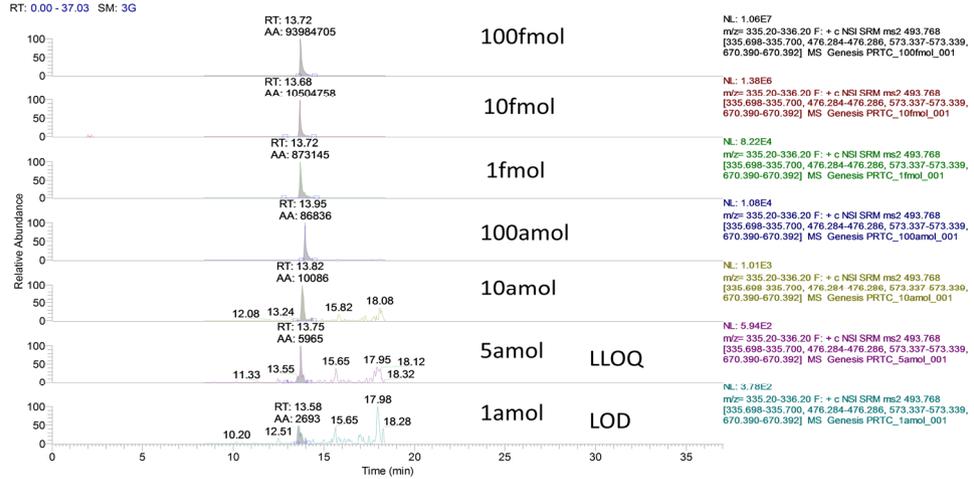


图 4. 肽段 SSAAPPPPR\* 不同上样量提取离子流图 (EIC) m/z493.8-> m/z 335.7

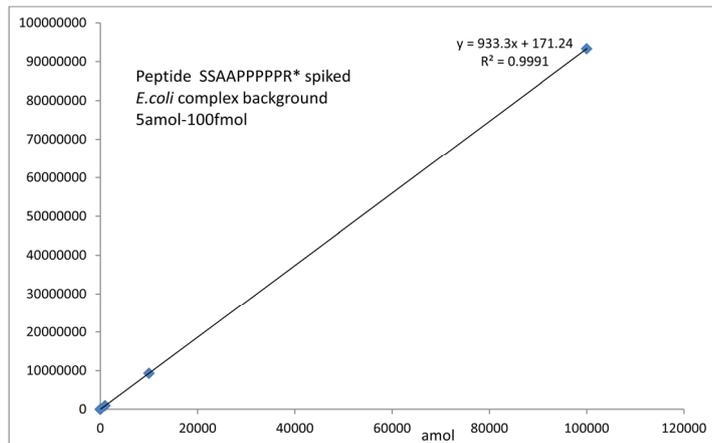


图 5. 肽段 SSAAPPPPR\* 标准曲线

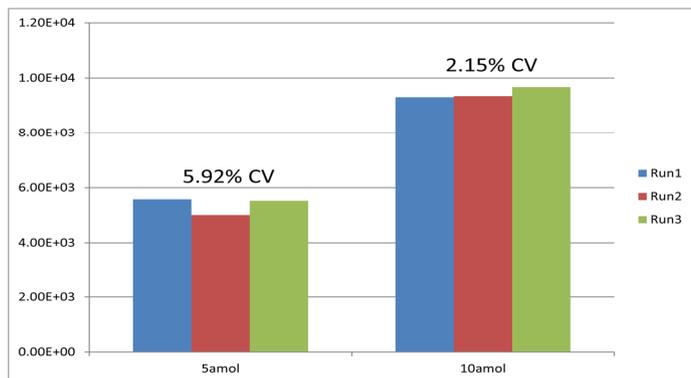


图 6. 肽段 SSAAPPPPR\* 在 amol 水平重复性

表 2. 15 条肽段标曲和线性范围

肽段	标准曲线	线性范围
HVLSIGEK*	$y=40.1x+1956.7$ $R^2 = 0.9997$ W: 1/X	100amol-100fmol
SAAGAFPELSR*	$y=256.7x+717.5$ $R^2 = 0.9994$ W: 1/X	5amol-100fmol
ELGQSGVDTYLQTK*	$y=36.5x+12.8$ $R^2 = 0.9994$ W: 1/X	5amol-100fmol
GLILVGGYGTR*	$y=198.9x+233.6$ $R^2 = 0.9993$ W: 1/X	5amol-100fmol
GILFVGSVSGGEEGAR*	$y=101.4x-358.7$ $R^2 = 0.9988$ W: 1/X	5amol-100fmol
NGFILDGFPR*	$y=72.6x-3284.6$ $R^2 = 0.9996$ W: 1/X	10amol-100fmol
SSAAPPPPR*	$y=933.3x+171.2$ $R^2 = 0.9991$ W: 1/X	5amol-100fmol
GISNEGQNASIK*	$y=153.9x-361$ $R^2 = 0.9995$ W: 1/X	5amol-100fmol
DIPVPKPK*	$y=276.2x-3206.7$ $R^2 = 0.9964$ W: 1/X	100amol-100fmol
IGDYAGIK*	$y=498.3x+82063.6$ $R^2 = 0.9998$ W: 1/X	100amol-100fmol
TASEFDSAIAQDK*	$y=94.5x+877.5$ $R^2 = 0.9989$ W: 1/X	10amol-100fmol
SFANQPLEVVYSK*	$y=102.6x-195.1$ $R^2 = 0.9989$ W: 1/X	5amol-100fmol
LTILEELR*	$y=151.5x-1340.4$ $R^2 = 0.9988$ W: 1/X	10amol-100fmol
ELASGLSFPVGFK*	$y=23.5x+297$ $R^2 = 0.9992$ W: 1/X	10amol-100fmol
LSSEAPALFQFDLK*	$y=29.9x-318.0$ $R^2 = 0.9953$ W: 1/X	10amol-100fmol

## 结论

实验表明，得益于主动离子管控技术（AIM），TSQ Quantiva 在复杂基质中针对目标肽段的定量灵敏度表现突出，极大

地提升了 TSQ 质谱平台定量复杂基质中目标肽段的能力，适用于复杂生物学样本中低丰度蛋白质的分析，可用于潜在生物标志物的确证工作。

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

免费服务热线：800 810 5118  
400 650 5118 (支持手机用户)

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC