

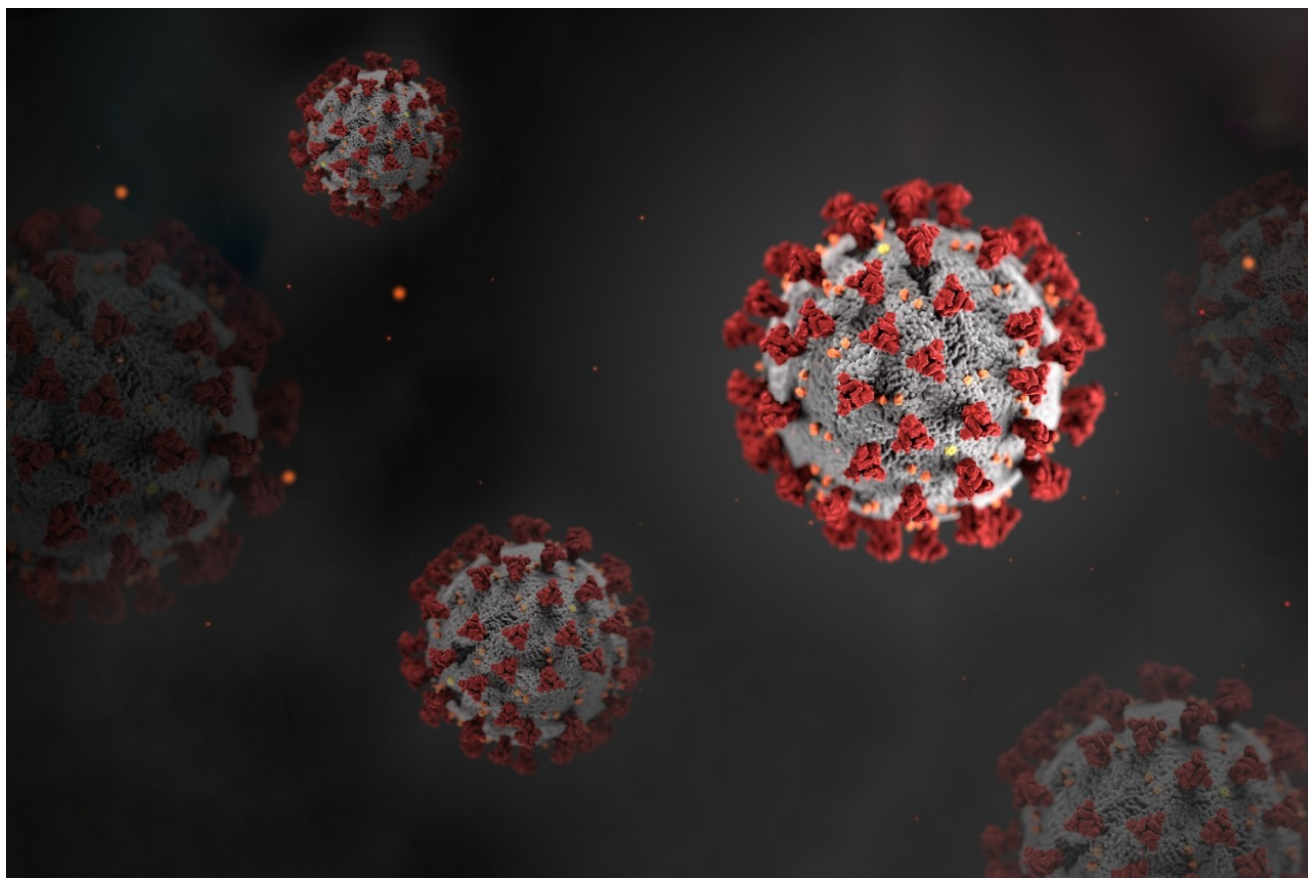
Waters™

应用纪要

剖析新型冠状病毒病(COVID-19): 尽可能拓宽以多反应监测技术进行的SARS- CoV-2分析中LC-MS检测的动态范围

Laurence Van Oudenhove, Jan Claereboudt, Rowan Moore, Hans Vissers, Bart Van Puyvelde, Simon Daled, Dieter Deforce, Katleen Van Uytfanghe, Steve Silvester, Sally Hannam, Donald Jones, Dan Lane, Pankaj Gupta, Leong Ng, Maarten Dhaenens





仅供研究使用，不适用于诊断。

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

靶向MS法有望从各种类型的COVID-19患者生物基质中特异性检出SARS-CoV-2蛋白。本文旨在论证精心选择的填料与消耗品组合与ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统和Xevo TQ-XS串联四极杆质谱仪配合使用能够对鼻咽拭子（使用病毒采样管保存）中的SARS-CoV-2蛋白实现检出和定量。该方法在重组突刺糖蛋白和核蛋白的5个含量水平下均获得了线性响应（每个肽段至少使用两个通道），同时在检测的动态范围内可保持良好的重现性。

优势

- 通过优化消耗品和MRM选择尽可能拓宽定量分析的动态范围
- 可对鼻咽拭子中的SARS-CoV-2蛋白实现基于特征性肽段的定量分析

剖析新型冠状病毒病(COVID-19):

尽可能拓宽以多反应监测技术进行的SARS-CoV-2分析中LC-MS检测的动态范围

简介

由SARS-CoV-2病毒引起的新型冠状病毒病(COVID-19)正在全球流行。本次疫情爆发刺激科研人员着力开发高通量靶向蛋白质组学方法，意在直接检测临床呼吸道样本（例如鼻咽拭子和含漱液）中的SARS-CoV-2蛋白，作为聚合酶链式反应(PCR)检测的替代或补充方法。每个病毒颗粒中有许多不同的病毒蛋白，其拷贝数也各不相同^{1,2}。重组突刺糖蛋白(SPIKE)和核蛋白(NCAP)是SARS-CoV-2病毒颗粒的两种主要蛋白质成分，和其他冠状病毒一样³均是致使病毒颗粒质量数中蛋白质百分数升高的原因，本研究将其酶解并加标至健康受试者样本的鼻咽拭子中，然后使用病毒采样管(Universal Transport Medium, UTM)保存，并采用基于特征性肽段的方式进行定量，此定量分析方法属于业界协作开发的“一种可普遍采用的冠状病毒多反应监测分析方法”的组成部分⁴。

实验

LC条件

LC系统:	ACQUITY UPLC I-Class PLUS
样品瓶:	采用MaxPeak HPS技术的QuanRecovery样品瓶
色谱柱:	ACQUITY PREMIER BEH C ₁₈ 300 Å, 2.1 mm x 50 mm, 1.7 μm肽分析专用柱
柱温:	40 °C
样品温度:	10 °C
进样体积:	5 μL
流速:	0.6 mL/min
流动相A:	0.1%甲酸水溶液

流动相B: 0.1%甲酸的乙腈溶液

MS条件

MS系统: Xevo TQ-XS

电离模式: ESI+

采集模式: MRM

毛细管电压: 0.5 kV

碰撞能量: 经过肽段/通道优化

锥孔电压: 35 V

梯度

时间(min)	溶剂B (%)
0.0	5
5.5	33
5.6	85
7.0	85
7.1	5
8.0	5

数据管理

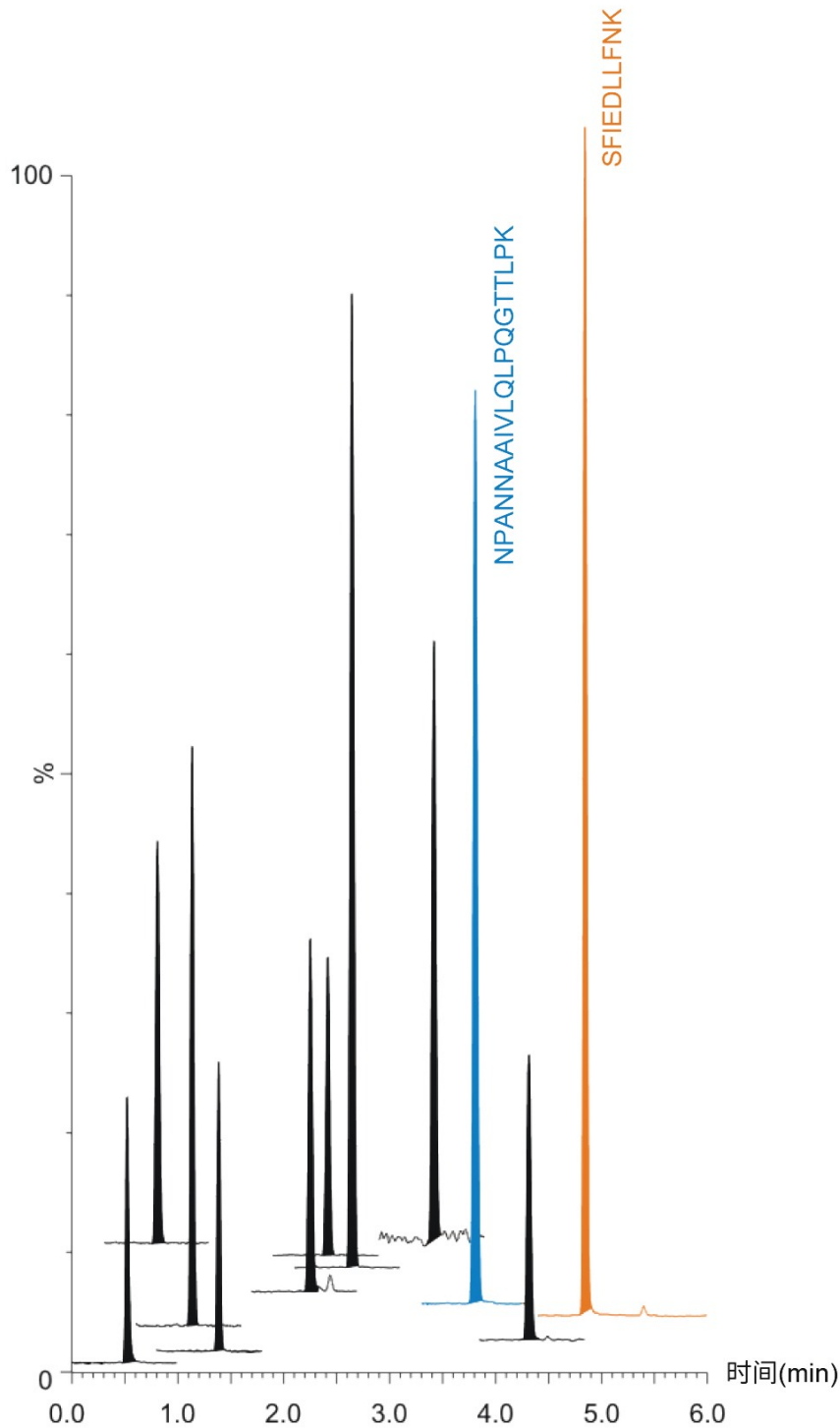


图1.P0DTC2|SPIKE_SARS2和

P0DTC9|NCAP_SARS2定量分析的选定MRM色谱图汇总。两张彩色标记MRM色谱图的定量响应详见图3和4。

借助精选消耗品（即样品瓶/SPE收集板和色谱柱填料）以及重悬溶剂组成大幅提升定量响应。上述组成要素的累加效果见图2下半部，其中展示了采用Cov-MS原创标准操作程序(SOP)获得的平均基本水平MRM响应，以及通过样品瓶选择(+15%)、重悬溶剂组成(+20%)和色谱柱填料(+10%)额外获得的信号，共使信号响应提升大约55%。

剖析新型冠状病毒病(COVID-19):

尽可能拓宽以多反应监测技术进行的SARS-CoV-2分析中LC-MS检测的动态范围

各加标水平的通道CV%示例值见图2上半部，结果表明该方法具有良好的重现性和稳定性。

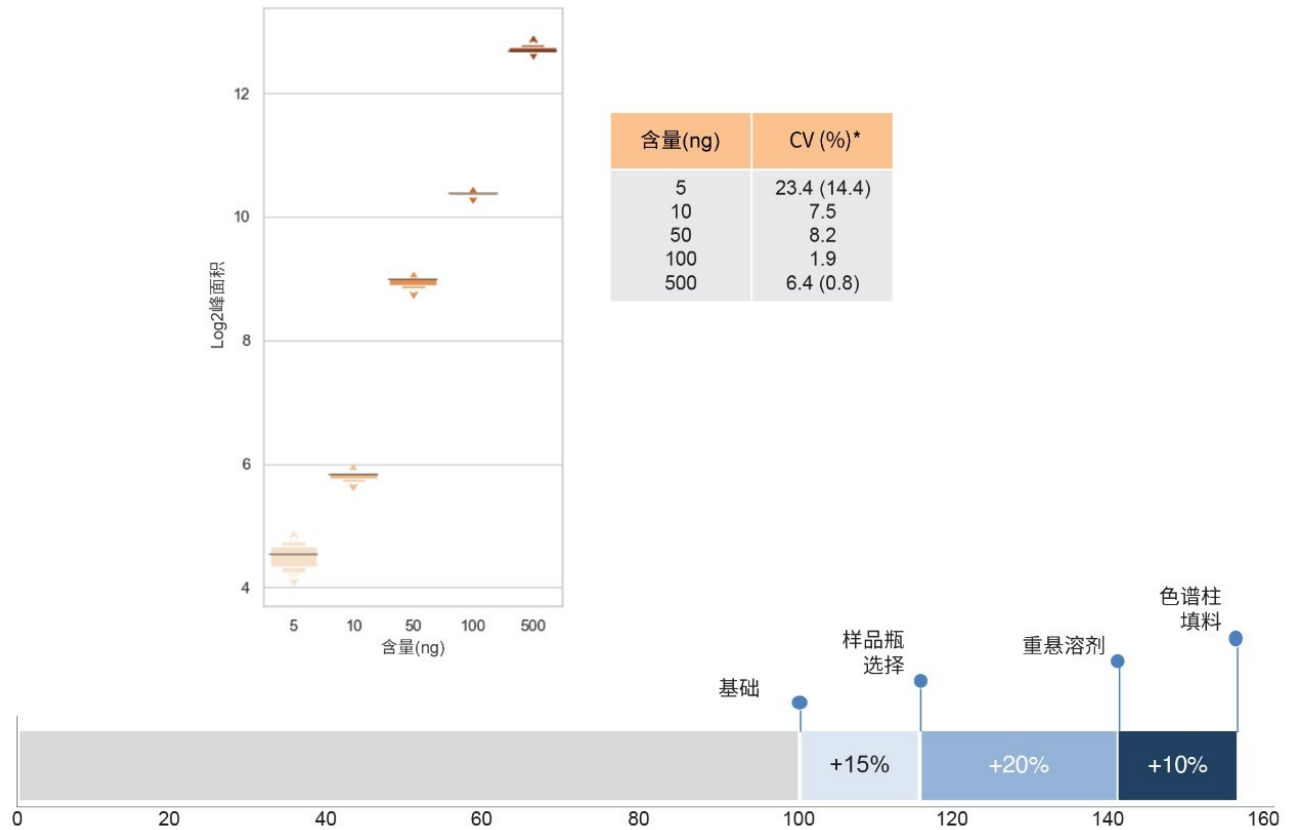


图2.采用特定消耗品和/或溶剂进行肽分析后得到递增的MRM信号（下图）以及平均CV%（MRM重现性）随SFIEDLLFNK（来自P0DTC2|SPIKE_SARS2）加标量的变化（上图；* = 已排除离群数据）。样品制备按照Cov-MS SOP⁴执行，其中规定先用250 μL UTM基质溶解重组SARS2蛋白，然后使用50 μL溶剂重悬，再进样5 μL。图3显示了SFIEDLLFNK（来自P0DTC2|SPIKE_SARS2，上图）和NPANNAIVLQLPQGTTLPK（来自P0DTC9|NCAP_SARS2）这两种肽段的表征定量图，均覆盖5个UTM基质中的SARS-CoV-2蛋白酶解物加标水平，结果表明该方法具有良好的线性，R²值≥ 0.998，残差小于15%。NPANNAIVLQLPQGTTLPK检测可使用单个MRM通道进一步扩展额外的样品加标水平（1 ng，相当于0.088 fmol NCAP/μL UTM基质溶液，假设UTM基质中重组NCAP与SPIKE等量），但本研究未对其做进一步研究。在无UTM基质的情况下观察到检测下限(LLOD)显著降低，这表明方法的动态范围主要受限于基质，因此提倡使用替代拭子类型并且/或者开发更加有效的净化/富集技术以进一步强化分析方法。

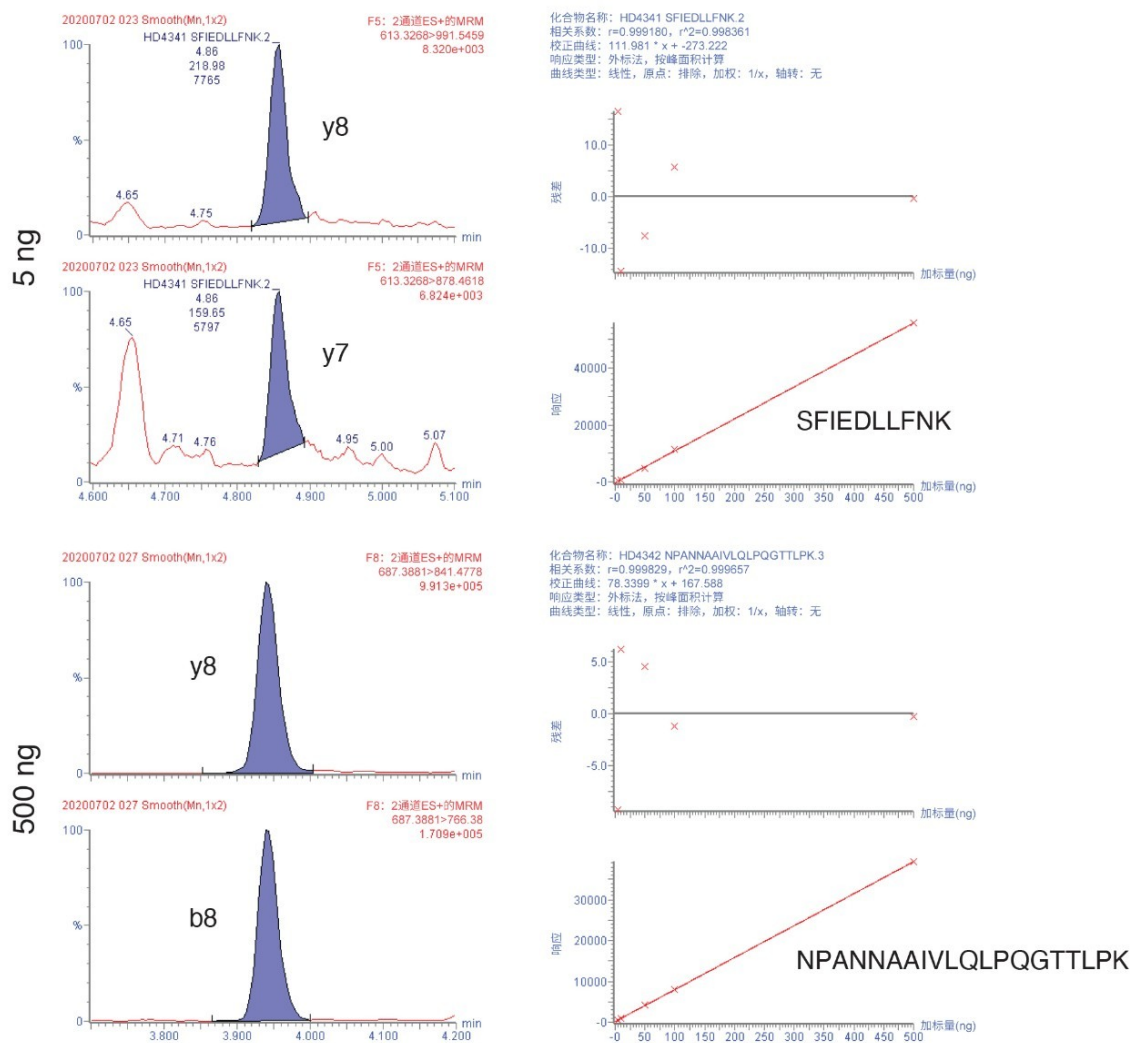


图3.SFIEDLLFNK（来自P0DTC2|SPIKE_SARS2，上图）和NPANNAIVLQLPQGTTLPK（来自P0DTC9|NCAP_SARS2）的定量分析结果，表明该方法在两种目标蛋白的5个含量水平下均获得了良好的线性响应（每个肽段至少采用2个通道）。图中分别显示了SFIEDLLFNK最低加标水平(5 ng)和NPANNAIVLQLPQGTTLPK最高加标水平(500 ng)下各通道的MRM色谱图。

半定量结果汇总见图4，表明最终MRM方法可以在至少3个加标水平下检出全部目标肽段。在两种蛋白质的全部肽段范围内，可检出加标水平的平均数量为4个，其中部分肽段的可鉴定加标水平数量可达到5个。在UTM基质中，两种蛋白质SPIKE_SARS2和NCAP_SARS2的可鉴定加标水平均可达到5 ng。

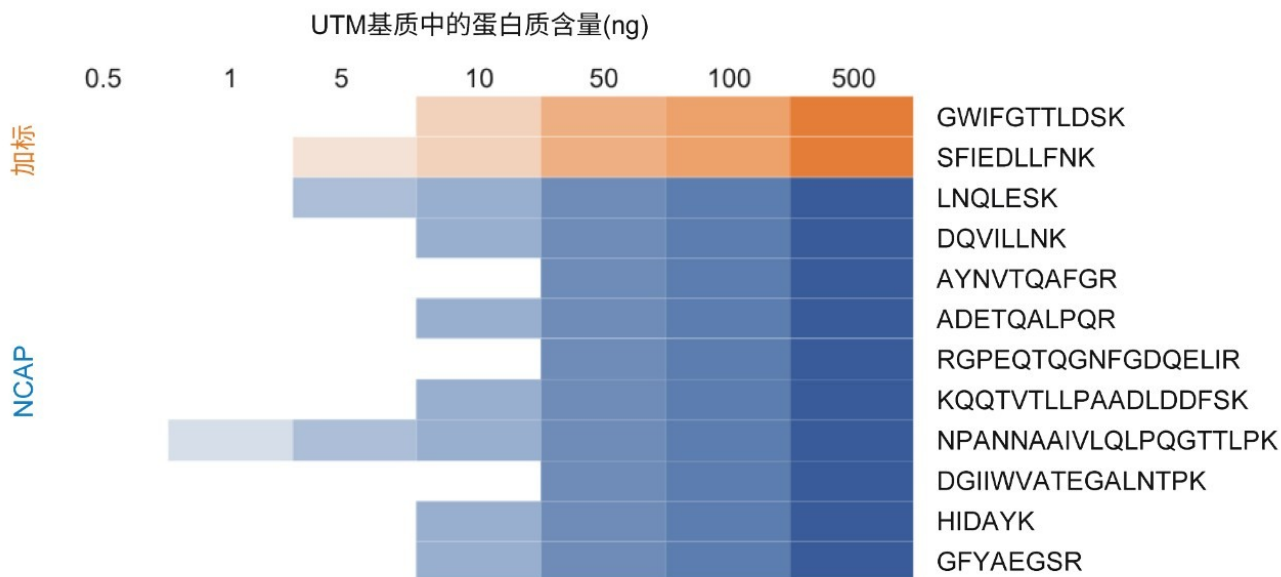


图4.UTM基质中SPIKE_SARS2（橙色）和NCAP_SARS2（蓝色）检测的定量结果汇总，表明重组SARS-CoV-2蛋白的可检出加标水平数量的平均值为4个。

结论

使用LC-MS技术对COVID-19研究进行MRM实验的临床研究和开发需要对方法进行全面分析表征。LC-MS技术的关键点具体包括：专属性、定量动态范围和方法稳定性/重现性。与新型冠状病毒相关的分析难题已通过精选的LC-MS消耗品得到解决，这样可优化线性动态范围、减少非特异性结合，在应用专属MRM通道的同时保持方法通量、提供可重现的MRM测定结果以及改善LLOD。所开发的MRM方法已成功在Xevo TQ-XS串联四极杆质谱仪上应用和评价，结果表明该方法可对鼻咽拭子（使用病毒采样管保存）中的SARS-CoV-2蛋白实现检出和定量。

参考文献

1. JM Parks and JC Smith.How to Discover Antiviral Drugs Quickly.*N Engl J Med*.2020 Jun 4;382(23):2261-2264.doi: 10.1056/NEJMcibr2007042.
2. K Bezstarosti, MM.Lamers, BL Haagmans, JAA Demmers.Targeted Proteomics for the Detection of SARS-CoV-2 Proteins, <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.23.057810v1> <
<<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.23.057810v1>>

3. M Surjit and SK.Lal. “The Nucleocapsid Protein of the SARS Coronavirus: Structure, Function and Therapeutic Potential.” *Molecular Biology of the SARS-Coronavirus* 129–151.22 Jul. 2009.
4. M Dhaenens *et al.* http://genesis.ugent.be/uvpublicdata/Cov-MS_launch.mp4 <http://genesis.ugent.be/uvpublicdata/Cov-MS_launch.mp4> and <https://www.youtube.com/watch?v=yV8WJAR1Lc&t=2724s> <<https://www.youtube.com/watch?v=yV8WJAR1Lc&t=2724s>>

致谢

感谢Cov-MS联盟在SARS-Cov-2 MRM方法设计的业界通力协作内容中提供评价试剂盒。

Laurence Van Oudenhove、Jan Claereboudt、Rowan Moore和Hans Vissers（沃特世公司）；Bart Van Puyvelde、Simon Daled、Dieter Deforce和Maarten Dhaenens（根特大学医药生物技术实验室）；Katleen Van Uytfanghe（根特大学生物分析系）；Steve Silvester和Sally Hannam（Alderley Analytical）；Donald Jones、Dan Lane、Pankaj Gupta和Leong Ng（van Geest MS-Omics实验室和莱斯特大学医学与化学病理学系）。

特色产品

- [ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统](https://www.waters.com/134613317) <<https://www.waters.com/134613317>>
- [MassLynx MS软件](https://www.waters.com/513662) <<https://www.waters.com/513662>>
- [Xevo TQ-XS三重四极杆质谱仪](https://www.waters.com/134889751) <<https://www.waters.com/134889751>>

720006968ZH, 2020年8月



© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.