W1230-03-017

用于目标LC-MS/MS定量的胰岛素样生长因子1的自动化高通量样品制备

Sunil Hwang[1]; Todd Mullis[2]; Andrew Lee[1]

[1]Integrated Micro-Chromatography Systems, Irmo, SC; [2]University of South Carolina, Department of Chemistry, Columbia, SC

CONTACT INFORMATION: sunil.hwang@imcstips.com

目的

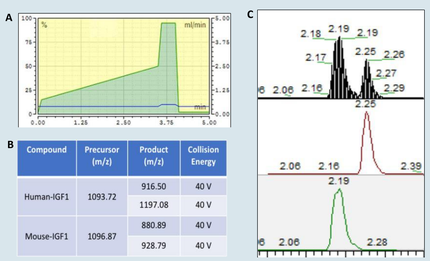
胰岛素样生长因子1（IGF-1）是一种由70个氨基酸组成的激素，在儿童生长和成人的合成代谢中起关键作用。临床实验室通常通过检测IGF-1水平来监测激素异常，这可能提示发育障碍或垂体功能障碍。IGF-1与癌症、衰老、神经病变和中风的关联也引发了学术界和工业界的广泛研究。传统上，IGF-1通过免疫分析法检测，但近期研究对商业免疫检测的跨实验变异性提出了质疑。这些研究展示了基于亲和富集结合多种质谱检测的方法。本文提出一种替代方案：利用传统固相树脂化学技术，在自动化液体处理系统上实现无需离线样品处理（如离心）的样本制备，并结合低分辨率LC-MS/MS监测IGF-1亚型、变体和类似物。

目标

- 使用INtip化学技术实现血浆样本中IGF-1的定量回收。
- 在自动化液体处理系统上建立经济高效的富集流程。
- 消除离心步骤，实现全自动样本制备。

方法

实验采用 Fisher Scientific 购买的混合人血浆，EDTA 和肝素处理的血浆样本用于方法开发。健康男性和糖尿病男性的血浆样本各 5 份购自 BioIVT，精密度和准确性检测使用 Bio-rad 的 Liquichek™ 肿瘤质控品。IMCS 为 Hamilton STAR Microlab 工作站设计的自动化方法采用 1 mL 阳离子交换（CX）和 300 µL 反相（RP）IMCStips。所有溶剂为质谱级购自 Fisher Scientific。采用 Vanquish UHPLC 和 TSQ Endura 三重四极杆质谱仪（Thermo Scientific）优化选择反应监测（SRM）以检测完整IGF-1。



Compound	Precursor (m/z)	Product (m/z)	Collision Energy
Human-IGF1	1093.72	916.50	40 V
		1197.08	40 V
Mouse-IGF1	1096.87	880.89	40 V
		928.79	40 V

图1. 完整 IGF-1 的 LC-MS 定量优化：
(A) 5 分钟LC梯度分离小鼠与内源人 IGF-1
(B) TSQ Endura质谱仪上100 pg小鼠和人IGF-1的SRM跃迁
(C) 提取离子流色谱图

结果

分散移液萃取是一种新型固相萃取技术，利用移液头内的湍流混合（图2）。液体样本吸入时，移液头内的松散树脂分散（图2）。通过移液过程实现快速高效萃取，尤其避免孔板移动和中间样本处理。

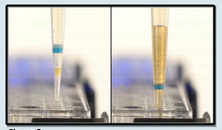


Figure 2

在这里，我们报道了INtip固相萃取法，它比以前报道的方法更快，成本也比报道的方法更低。整个富集过程使用传统的离子交换和反相树脂，通过自动化，该过程每96个样品花费不到1小时，最大限度地减少了实际操作时间(工作流程1)。

此前MALDI-TOF MS或LC-MS/MS检测需免疫亲和树脂或离心富集。一项研究显示，两台96头机器人系统可在9小时内处理超1,000样本（流程2）。

(**Workflow 2**).

然而，根据这项研究，样品预处理和培养时间需要更长的准备时间将批次准备时间延长至约两小时。此外，特异于IGF-1的抗体将样品制备成本提高到可能不利于临床操作的水平。使用高有机溶剂的血清蛋白破碎的传统方法在试剂成本方面与INtip方法相当，但工作流程时间是后者的两倍(工作流程3)。

关于离心有两个问题。首先，如果没有使用自动板夹具，则需要手动干预。手动干预是不连续的，必须有人将样品从操作间移动到离心机，然后将样品放回液体处理器。这种中断的工作流程可能会延迟处理过程或导致样品处理不当(例如，孔板掉落、孔板/转子不平衡、离心后孔板返回方向错误)。但是，如果使用印版夹持器，则可能会不正确地夹持和掉落印版，或者无法拾取印版。离板离心机也需要更多的空间，并且使离心机与机器人液体处理器的核心软件同步是可能的错误的附加层。INtip过程不需要科学家干预，确保阳性样本识别，从而避免错误处理患者样本。

我们利用强阳离子交换和反相INtip化学来富集人血浆样品中的多肽激素，以便通过LC-MS/MS进行可靠的分析。

样品前处理工作流程可以用一根液相色谱柱分析超过5000份样品。

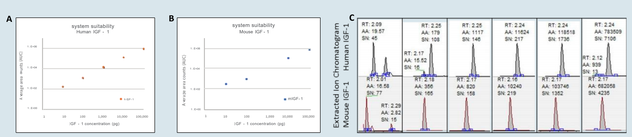


图3.使用含有胰蛋白酶消化的BSA的合成基质中的重组人IGF-1和重组小鼠IGF-1来确定TSQ Endura仍的系统适用性。
人IGF-1 (A)和小鼠IGF-1 (B)在色谱柱上从10 pg 到 100 ng 都显示出线性相关性，相当于血清中0.2 - 2,000 ng/mL 。虽然平均IGF-1水平可以根据年龄显著变化，但生理相关范围为 50 ng/mL 至 800 ng/mL 。该系统对检测下限的灵敏度至少高2个数量级，对检测上限的灵敏度至少高1个数量级。替代基质(C)中人类和小鼠 IGF-1 的提取离子色谱图显示 LOD为10 pg，ULOD为100 ng.

通过向人血浆样品中添加不同量的重组小鼠IGF-1来评估提取效率。

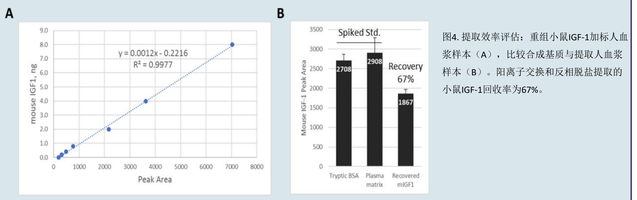


图4. 提取效率评估：重组小鼠IGF-1加标人血浆样本（A），比较合成基质与提取人血浆样本（B）。阳离子交换和反相脱盐提取的小鼠IGF-1回收率为67%。

小鼠IGF-1在人血浆中的线性测量范围为0.2 ng/mL至200 ng/mL（图4A）。随后，我们通过优化IMCStips的提取流程，实现了高效且可重复的富集效果（图4B）。
使用胰酶消化BSA结合人IGF-1作为替代基质，与经提取的人血浆样本进行基质匹配对比，结果显示两者信号等效，表明提取样本不存在基质效应（图4B）。为评估提取效率，将小鼠IGF-1加标至人血浆样本中，同时富集人源与小鼠IGF-1（图4B）。
采用添加小鼠IGF-1作为内标的单一人血浆样本验证了方法的重复性（图5）。通过高、低两种浓度的小鼠IGF-1评估重组内标是否影响内源人IGF-1的定量，结果显示无显著差异（图5A）。

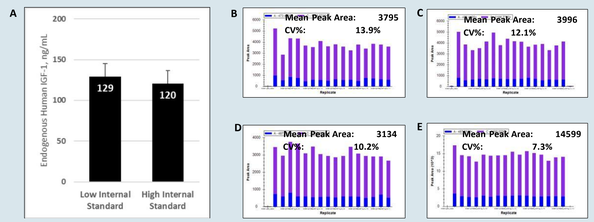


图5. 使用高浓度（20 ng）和低浓度（5 ng）小鼠IGF-1作为参考标准对单一人血浆样本进行定量分析。两种不同浓度的小鼠IGF-1内标计算得到的IGF-1平均值无显著差异（A）。内源性人IGF-1的原始峰面积（B、C）在两种小鼠IGF-1浓度下的变异性也无显著差异（D、E）。

INtip方法的准确性通过3份Liquichek™肿瘤质控品进行验证（图6A）。使用小鼠IGF-1内标计算内源性人IGF-1的相对含量，每次检测代表四次生化重复的平均值（图6B）。同时采用商业ELISA试剂盒（R&D Systems）对三份Liquichek质控品进行交叉验证（图6C）。

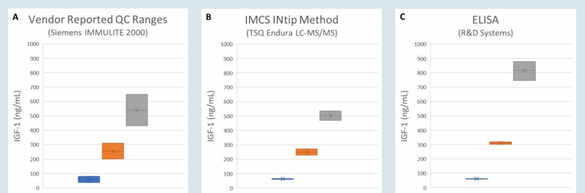
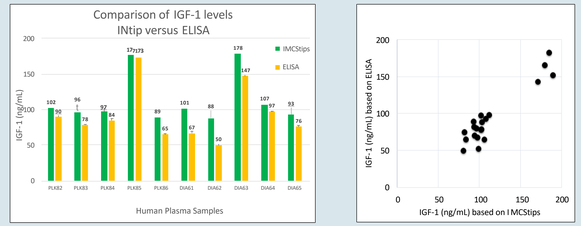


图6. IGF-1 水平的检测结果与市售ELISA试剂盒进行了对比分析。INtip方法的检测值完全符合供应商提供的标准范围，且平均值差异小于10%（A、B）。而ELISA试剂盒对QC2和QC3样本的检测值则出现偏高现象（C）。

图7显示，通过对10份人血浆样本（5份健康男性与5份糖尿病男性）进行INtip方法与ELISA试剂盒的进一步对比，结果显示两者呈相反趋势——INtip方法计算的IGF-1水平普遍高于ELISA检测结果。



我们将开展进一步研究以确定INtip方法的精密度和准确度，但基于商业质控品的初步结果表明，该方法可能比ELISA更具准确性。使用单份人血浆样本进行16次重复检测（分别采用两种不同浓度的小鼠IGF-1作为内标，各8次重复），结果显示变异系数（CV）小于15%，符合系统性能的预期变异范围。

结论

本研究结果证实了一种稳健的自动化血浆样本制备方案，可实现高通量IGF-1富集用于靶向LC-MS/MS分析。该样本前处理方法将有效提升临床检测效率，实现对IGF-1亚型、变异体及类似物的精准定量。与传统方法相比，这一新工作流程具有以下显著优势：

- 完全消除离心步骤
- 实现全自动化、"零手动"的样本制备过程
- 通过INtip技术确保样本标识准确性
- 从根本上避免患者样本的误操作风险

REFERENCES

1. Bielohuby, M., Zarkesh-Esfahani, S.H., Manolopoulou, J., Wirthgen, E., Walpurgis, K., Toghiany Khorasgani, M., Aghili, Z.S., Wilkinson, I.R., Hoeflich, A., Thevis, M., et al. (2014). Validation of serum IGF-I as a biomarker to monitor the bioactivity of exogenous growth hormone agonists and antagonists in rabbits. Dis Model Mech *7*, 1263–1273.
2. van den Broek, I., Blokland, M., Nessen, M.A., and Sterk, S. (2015). Current trends in mass spectrometry of peptides and proteins: Application to veterinary and sports-doping control. Mass Spectrom Rev *34*, 571–594.
3. Ketha, H., and Singh, R.J. (2015). Clinical assays for quantitation of insulin-like-growth-factor-1 (IGF1). Methods *81*, 93–98.
4. Kirsch, S., Widart, J., Louette, J., Focant, J.-F., and De Pauw, E. (2007). Development of an absolute quantification method targeting growth hormone biomarkers using liquid chromatography coupled to isotope dilution mass spectrometry. J Chromatogr A *1153*, 300–306.
5. Such-Sanmartín, G., Bache, N., Callesen, A.K., Rogowska-Wrzesinska, A., and Jensen, O.N. (2015). Targeted mass spectrometry analysis of the proteins IGF1, IGF2, IBP2, IBP3 and A2GL by blood protein precipitation. J Proteomics *113*, 29–37.
6. Thomas, A., Kohler, M., Schänzer, W., Delahaut, P., and Thevis, M. (2011). Determination of IGF-1 and IGF-2, their degradation products and synthetic analogues in urine by LC-MS/MS. Analyst *136*, 1003–1012.
7. https://www.aacc.org/publications/cln/articles/2016/january/are-mass-spectrometry-assays-for-igf-1-worth-it
8. Oran, P., Trenchevska, O., Nedelkov, D., Borges, C., Schaab, M., Rehder, D., Jarvis, J., Sherma, N., Shen, L., Krastins, B., Lopez, M., Schwenke, D., Reaven, P., Nelson, R. (2014). Parallel Workflow for High-Throughput (>1,000 Samples/Day) Quantitative Analysis of Human Insulin-Like Growth Factor 1 Using Mass Spectrometric Immunoassay. *PLoS One*. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092801