

肽段定量分析指南

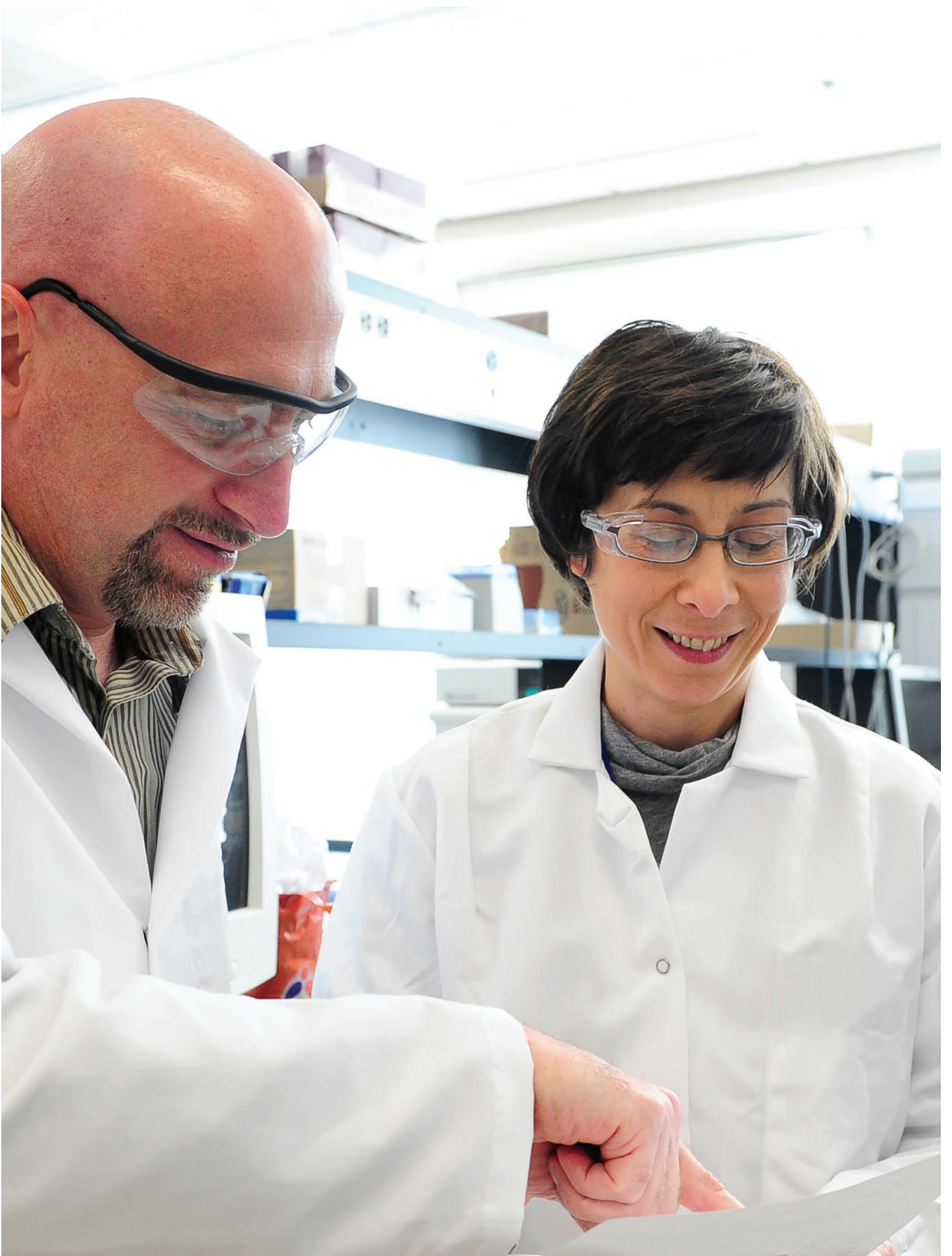
安捷伦临床研究



The screenshot displays the Agilent software interface for peptide quantification. It features a workflow table with columns for Step, Sample Name, Sample Position, Method, and Data File. The table is organized into three steps (A, B, and C), each with a 'Sample prefix' and 'Standard' dropdown menu. A 3D rendering of a sample tray is shown to the right of the table.

Step	Sample Name	Sample Position	Method	Data File	
(Step-A)					
	Sample prefix	Standard	Start position	P1-A1	All peptides in one
1	Standard	P1-A1	MRM_0001.m	Step-A_MRM_0001	
2	Standard	P1-A1	MRM_0002.m	Step-A_MRM_0002	
(Step-B)					
	Sample prefix	Standard	Start position	P1-A1	All peptides in one
1	Standard	P1-A1	CE-egp_0001.m	Step-B_CE-egp_0001	
2	Standard	P1-A1	CE-egp_0002.m	Step-B_CE-egp_0002	
3	Standard	P1-A1	CE-egp_0003.m	Step-B_CE-egp_0003	
4	Standard	P1-A1	CE-egp_0004.m	Step-B_CE-egp_0004	
5	Standard	P1-A1	CE-egp_0005.m	Step-B_CE-egp_0005	
6	Standard	P1-A1	CE-egp_0006.m	Step-B_CE-egp_0006	
7	Standard	P1-A1	CE-egp_0007.m	Step-B_CE-egp_0007	
(Step-C)					
	Sample prefix	Sample	Start position	P1-A2	All peptides in one
	Sample Name	Sample Position	Method	Data File	





临床研究实验室的肽段定量分析

随着科学家将基础研究中鉴定出的肽段生物标记物向临床研究和应用方面转化，肽段定量分析在临床研究中得到了快速发展。这种定量分析方法根据先验知识，测定来自临床研究样品预期存在的蛋白质中的独特肽段。先验知识来源于参考文献、基因组和蛋白质组研究，或蛋白质基因组学结合分析的结果。

当您在临床研究中开发肽段定量方法时，我们可以为您的每一步提供专业建议，包括样品前处理、液相色谱分析（分离所用的色谱柱、消耗品和分析方法）、使用灵敏三重四极杆仪器进行的肽段质谱分析，以及使用可靠软件进行的数据分析。

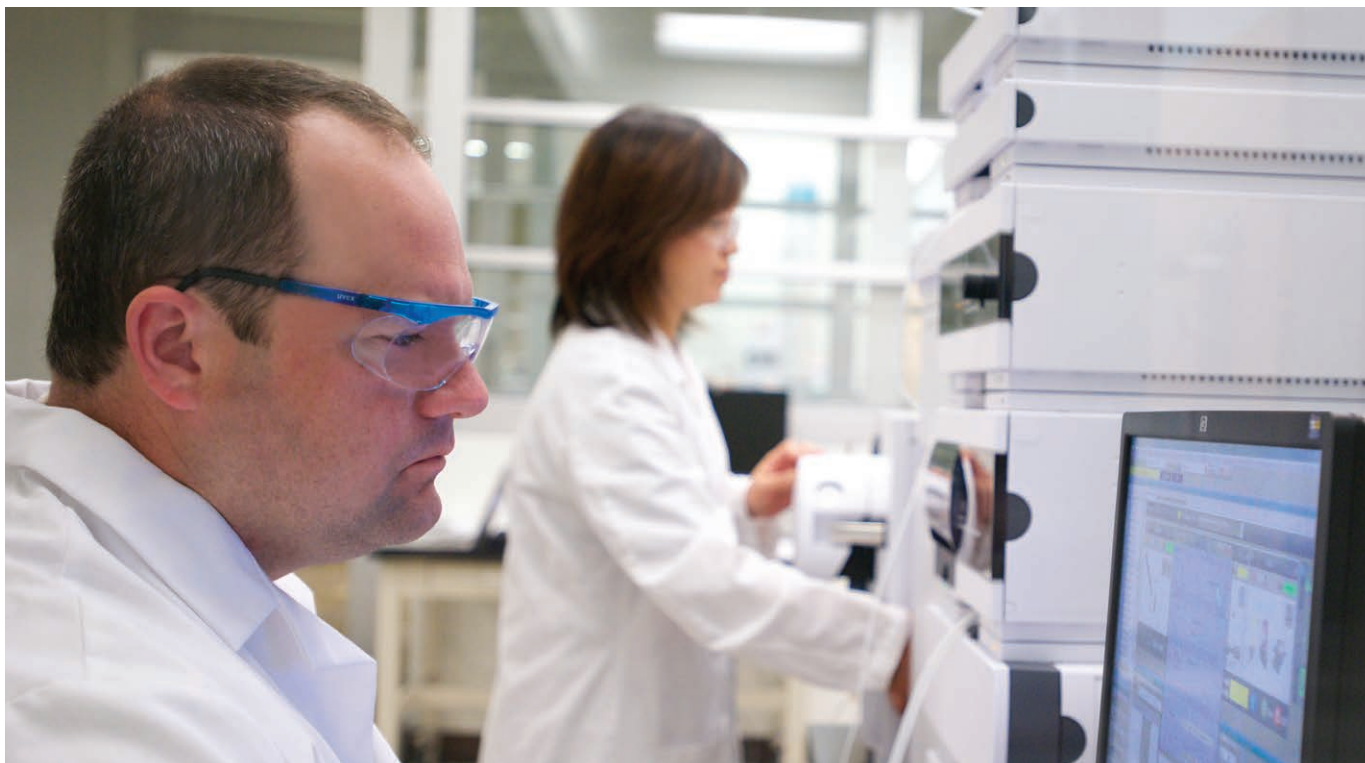
安捷伦有实力也非常荣幸能够帮助您进行肽段定量分析的方法开发。



安捷伦肽段定量分析解决方案：Agilent AssayMAP Bravo 液体处理系统、Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统、Agilent 6495 三重四极杆 LC/MS 系统和 Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱。

小分子与大分子的分析

小分子与大分子（如肽段）的分析方法截然不同。根据目标分析物不同，传统小分子的样品前处理涉及到多种技术，如提取和蛋白质沉淀等。相比之下，肽段分析则遵循一个相对标准的方案。先使溶液中的蛋白质变性，然后再进行还原和烷基化，最后进行酶解。虽然用同类型液相色谱和类似流动相来分析肽段，但由于肽段样品的复杂性，因此梯度更浅、运行时间更长。



当开发肽段的质谱分析方法时，您需要考虑到一种肽段可能存在多种电荷状态和多种子离子，其中一些子离子的 m/z 高于母离子。还要注意，丰度最高的子

离子由于干扰可能无法成为分析的最佳选择。最佳 MRM 离子对将同时具备高选择性和高灵敏度。与传统小分子分析相同，采集数据只是开始。数据分析需

要精密而直观的软件，以便从实验结果中提取出尽可能多的信息。

用于质谱分析的自动化肽段样品前处理

样品前处理中的重现性在临床研究中非常重要。肽段样品前处理过程涉及多个定时步骤和试剂添加，这些步骤可影响分析重现性。实现这一过程的自动化有助于降低变异性，并可以通过样品追踪实现无差错操作。Agilent AssayMAP Bravo 平台可以高效配制用于 LC/MS 分析的蛋白质和肽段样品。这一平台提供了简化的用户界面以及实验室检测肽段和蛋白质的样品前处理方案，以满足您的临床研究需求。

利用 Agilent AssayMAP Bravo 平台进行的自动化肽段样品前处理



配制用于肽段定量分析的样品需要一系列步骤，其中一些步骤是可选的。在 AssayMAP Bravo 平台的软件界面中，肽段样品前处理工作流程选择工具为选择和使用更适合的肽段样品前处理工作流程提供了简化界面。每个工作流

程都包含一个易于操作的方案（可根据需要进行修改）和一个带有工作流程指南的试剂计算器。在溶液内酶解工作流程中，二硫键的变性/还原/烷基化以及酶解是必需步骤。肽段纯化工作流程是 LC/MS 分析前用于样品脱盐的可选步

骤。安捷伦已经开发了针对每种工作流程的 AssayMAP Bravo 应用程序，因此您的临床研究实验室可以通过创建组合来满足自动化样品前处理的特定要求。



Agilent AssayMAP Bravo 液体处理系统

色谱分离

在样品已完成前处理并准备好进行分析后，下一步是开发一种用于目标肽段的有效色谱方法。Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统具有优异的可靠性和稳定性，能够帮助您实现高难度分离。Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统具有 UHPLC 功能，可以提供多种流速和色谱柱选择，便于您优化生物体液等复杂基质中目标肽段的色谱方法。



“能够在高流速下运行三重四极杆的灵活性能帮助我们获得稳定性和重现性。使用 1290 Infinity II 液相色谱系统的较高流速，我们能够确信保留时间的精度和重现性，我们几乎不用目视检查各个峰就可以对峰面积进行积分。当我们继续推进到临床试验应用时，对大多数数据实现自动提取无疑将变得越来越重要。我认为安捷伦仪器配备的工具、重现性能以及软件都有助于我们做到这一点。”

— **Stephen R. Pennington**，都柏林大学 Conway 生物分子与生物医学研究所蛋白质组学教授与高级研究员。Atturos Ltd. 的创始人、CEO 兼 CSO

用于肽段分析的色谱柱通常具有更大的孔径来容纳更大的分子，其中的色谱填料可大大减少分析物的非特异性结合，从而提高回收效率。Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱能够提供始终如一、出色的肽段分离和表征性能。

这种色谱柱为表面多孔型，孔径为 120 Å，是分析蛋白质酶解产生的肽段的理想选择。2.7 μm 的粒径可达到更高的流速，也可使复杂基质中的目标肽段获得更高分离度。与质谱联用时，更高的色谱分离度有助于减少干扰，更尖锐的色谱峰可改善灵敏度，从而简化数据处理并提

高结果的可信度。此外，AdvanceBio 肽谱分析色谱经过复杂多肽混标的特殊测试，确保获得可靠的肽段色谱分离与柱间重现性。由于许多肽段定量分析均使用保留时间窗口进行多重分析，稳定的保留时间是实现稳定分析方法乃至高通量环境的关键。

以上两款色谱柱均可以提供接近 UHPLC、稳定性更高的结果，从而缩短质谱分析中色谱柱切换和老化造成的停机时间。

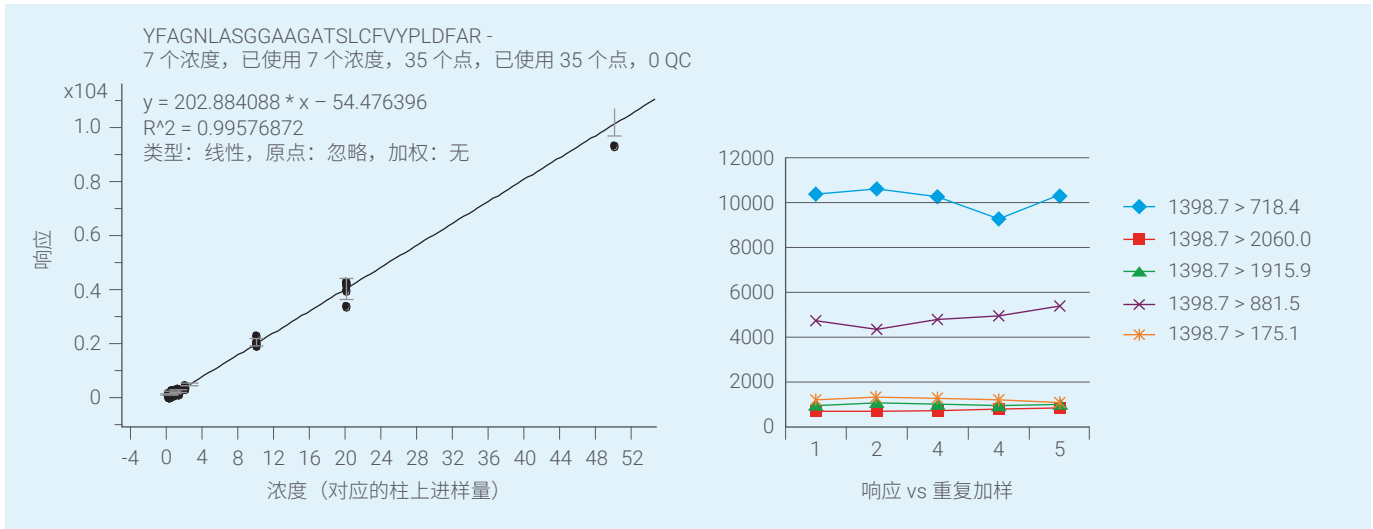
另外，在使用甲酸时，Agilent AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱是很好的选择，它不仅是一款 120 Å 表面多孔颗粒填料色谱柱，也是一款表面带电 C18 杂化色谱柱。在使用甲酸和不同选择性的条件下，这些特性提供了出色的峰形，从而对紧邻洗脱的翻译后修饰（如脱酰氨基修饰）实现更出色的分离。



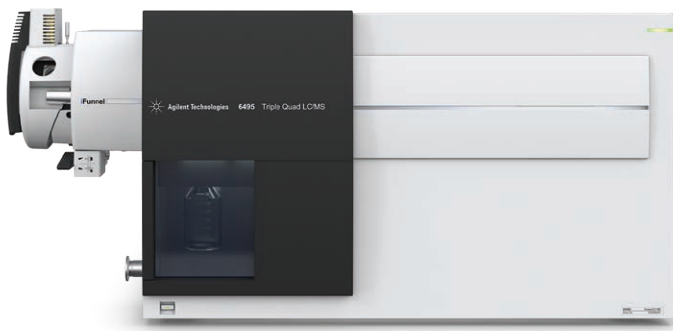
Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统和 Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱

质谱检测

对于肽段定量分析，生物体液中的蛋白质浓度可能跨越多个数量级，因此灵敏度和宽动态范围非常重要。Agilent 6495 三重四极杆 LC/MS 系统引入了 iFunnel 技术。iFunnel 技术与安捷伦喷射流离子源结合，大大提高了离子采样率，从而达到了更低的检测限。6495 是定量应用领域的可靠选择，具有出色的灵敏度、可靠性和整体系统稳定性。在需要维护时，新引入的插板阀无需放空仪器即可更换毛细管，从而延长正常运行时间并提高分析效率。

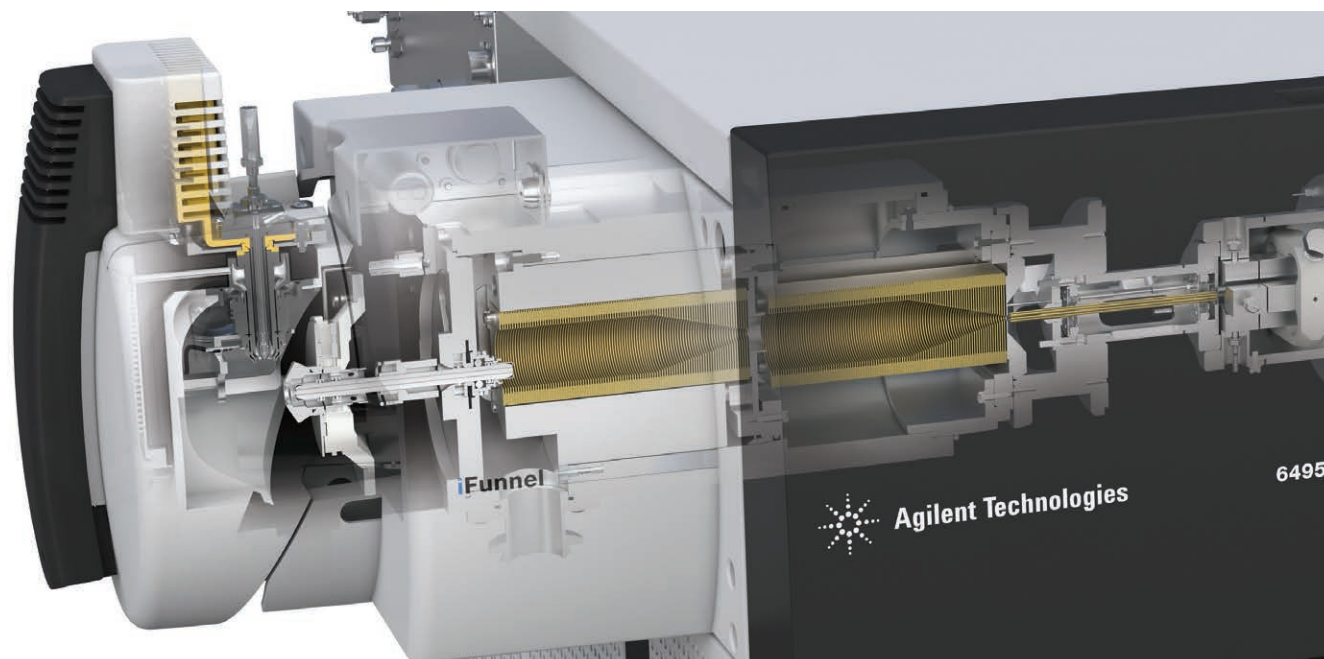


6495 的扩展质量数范围（高达 m/z 3000）允许您选择更大范围的母离子和子离子，从而在优化蛋白质定量分析方法时拓宽肽段和 MRM 离子对的选择范围。以上示例显示了一个肽段的定量分析，其中两个选定的子离子高于 m/z 1900。 m/z 如此高的子离子为目标肽段确认提供了很高的特异性。



Agilent 6495 三重四极杆 LC/MS 系统结合了 iFunnel 技术与安捷伦喷射流离子源

安捷伦独有喷射流离子源的接口灵敏度是标准电喷雾离子源的 3-5 倍，且与浓度无关。这使您的实验室可以使用标准 2.1 mm 直径色谱柱和更高的液相色谱流速，而不会损失这种方法通常具备的灵敏度。对于肽段定量分析，不受样品限制的临床研究人员可利用常规流速的 HPLC 结合喷射流离子源，获得接近纳流 HPLC 的分析灵敏度。因此，复杂蛋白质组学样品可快速获得稳定而重现的 LC/MS 分析结果。



与电喷雾相比，安捷伦喷射流使肽段信号增强了 3-5 倍

MassHunter 软件

Agilent MassHunter 工作站软件包括一个采集模块，可用于仪器控制以及定量和定性数据分析。MassHunter 定量分析工具可自动进行数据处理，从而快速获得肽段定量分析结果。这些工具使您能够自定义所用的结果标准，并将突出显示需要进一步查看的结果。



MassHunter 工作站软件还可以直接整合到您的实验室信息系统 (LIS) 中，以便导入样品列表进行分析，并最终导出结果。

Skyline 软件

Agilent MassHunter 软件可以与 Skyline 软件紧密集成。Skyline 软件专为蛋白质组学研究人员开发（由华盛顿大学的 MacCoss 团队开发），支持 MassHunter 中的 MRM、动态 MRM (dMRM) 和触发式 MRM (tMRM) 模式，因此在分析日益复杂的样品时可采集到理想的定量离子和定性离子信号。

使用 Agilent Skyline 自动化工具在三个简单步骤中自动运行 MRM 分析

1 确定 RT

- 创建 Skyline 文档
- 添加蛋白质/肽段
- 输出 MRM 方法
- 运行 MRM 分析

2 优化 CE

- 导入 MRM 结果
- 导出 CE 优化方法
- 运行 CE 优化方法

3 创建最终方法

- 导入 CE 优化结果
- 导出动态 MRM 的最终方法
- 运行最终方法



The screenshot shows the Skyline software interface with three numbered callouts: 1 points to the 'Project writing' section, 2 points to the 'Sample profile' table, and 3 points to the 'Method' table.

Sample profile	Standard	Start position	RT (s)	All peptides in one file
Sample Name	Sample Position	Method	Data File	
1 Standard	PS-A2	MRM_0000.m	Step-A_MRM_0000.d	
2 Standard	PS-A2	MRM_0000.m	Step-A_MRM_0000.d	

Sample profile	Standard	Start position	RT (s)	All peptides in one file
Sample Name	Sample Position	Method	Data File	
1 Standard	PS-A2	CE-opt_0000.m	Step-B_CX-opt_0000.d	
2 Standard	PS-A2	CE-opt_0000.m	Step-B_CX-opt_0000.d	
3 Standard	PS-A2	CE-opt_0000.m	Step-B_CX-opt_0000.d	
4 Standard	PS-A2	CE-opt_0000.m	Step-B_CX-opt_0000.d	
5 Standard	PS-A2	CE-opt_0000.m	Step-B_CX-opt_0000.d	
6 Standard	PS-A2	CE-opt_0000.m	Step-B_CX-opt_0000.d	
7 Standard	PS-A2	CE-opt_0000.m	Step-B_CX-opt_0000.d	

Sample profile	Standard	Start position	RT (s)	All peptides in one file
Sample Name	Sample Position	Method	Data File	
1 Sample	PS-A2	dtMRM.m	Step-C_dtMRM.d	

安捷伦独有的 Skyline 自动化工具可自动进行重要的方法开发和优化步骤，使方法的新建过程大大得到简化。Skyline 与 MassHunter 结合后可提供简单的解决方案：将样品置于样品瓶中，设置参数，让软件完成其余的优化。当您几小

时后回来，仪器方法即可准备好用于样品分析。

需要更换色谱柱或方法时，在复杂方法中调整保留时间可能会非常耗时。MassHunter 采集软件中的保留时间校准工具专为轻松调整方法而设计，

让您可以从容应对保留时间的变化。Skyline 同样具备 iRT 功能，可以保存并预测肽段的保留时间。总之，Agilent MassHunter 和 Skyline 软件能够让您的肽段定量分析更快速、更轻松、更高效。

安捷伦为肽段定量分析工作流程的所有步骤提供了解决方案，包括样品前处理、LC/MS 分析和数据处理。安捷伦很荣幸成为您临床研究中开展肽段定量分析的合作伙伴。

了解更多信息：

www.agilent.com/chem/clinicalresearch

查找当地的安捷伦客户服务中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278

400-820-3278（手机用户）

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2018
2018 年 6 月 7 日，中国出版
5991-9412ZHCN

