Waters™

应用纪要

SARS-CoV-2 LC-MS试剂盒(RUO)助力推动研究进展

Dominic Foley, Robert Wardle, Samantha Ferries, Rebecca Pattison, Jennifer Warren, Lisa J. Calton

Waters Corporation

仅供研究使用，不适用于诊断。

摘要

在临床研究中，SARS-CoV-2的检测和定量对于了解SARS-CoV-2[1]的影响及病毒脱落时间延长的意义非常重要[2]。

SARS-CoV-2 LC-MS试剂盒(RUO)能够直接检测和定量SARS-CoV-2核衣壳(NCAP)肽。采用Andrew+移液机器人简化并自动完成样品前处理过程，大幅缩短手动制备时间并减少操作员误差。ACQUITY UPLC I-Class系统搭配ACQUITY Premier色谱柱可以快速分离目标肽（进样周期2.5 min），与Xevo TQ-XS质谱仪相结合，能够以出色的分析灵敏度、选择性和精密度检测浓度为3 amol/µL的病毒肽（日间精密度≤17.4% CV，日内精密度≤17.1% CV）。该方法在3–50,000 amol/µL范围内呈线性。

科学家可以利用UPLC-MS的灵活性和重现性来推动关键的SARS-CoV-2研究，借助SARS-CoV-2 LC-MS试剂盒(RUO)直接检测和定量SARS-CoV-2 NCAP特征肽段，无需扩增目标分析物以进行聚合酶链式反应(PCR)。

沃特世SARS-CoV-2 LC-MS试剂盒仅供研究使用(RUO)，不适用于诊断。

优势

- 一种临床研究试剂盒，其中所含全部组分有助于直接定量SARS-CoV-2 NCAP肽

- Andrew+移液机器人可自动完成样品前处理过程，尽可能提高通量并减小误差
- ACQUITY UPLC I-Class系统搭配Xevo TQ-XS质谱仪有利于缩短运行时间并实现高灵敏度、高选择性分析

简介

在临床研究中，SARS-CoV-2的检测和定量对于了解SARS-CoV-2[1]的影响及病毒脱落时间延长的意义非常重要[2]。

LC-MS已成功证明可以检测SARS-CoV-2蛋白的胰蛋白酶酶解肽[3]。 但是，这些研究也强调，由于病毒运输液(VTM)等样品基质所含组分会造成干扰，该技术会受到基质效应的影响，限制了方法的分析灵敏度。因此，为了提高检测水平，需要对样品进行净化和富集[4,5]。

稳定同位素标准和抗多肽抗体捕集(SISCAPA)是一种富集技术，在分析复杂基质中的SARS-CoV-2时具有三项优势：

- 通过样品浓缩并去除抑制目标肽（即胰蛋白酶解肽）MS离子化的干扰物质，提高分析灵敏度
- 通过选择性去除背景干扰（否则将导致色谱运行时间延长），增加LC-MS样品通量
- 通过净化样品进样，改善LC-MS方法稳定性、延长色谱柱寿命并缩短仪器停机时间

SARS-CoV-2 LC-MS启动方法包(RUO)如图1所示，其囊括了定量分析低浓度SARS-CoV-2核衣壳(NCAP)肽所需的所有试剂和消耗品。SARS-CoV-2 LC-MS试剂盒(RUO)中包含的试剂经过预先称重，不同批次间具有重现性，有助于整合SARS-CoV-2临床研究方法，为纵向研究过程中获得的结果提供可信度。

图1.*SARS-CoV-2 LC-MS*启动方法包(*RUO*)，适用于通过*LC-MS/MS*分析*SARS-CoV-2 NCAP*肽

Andrew+移液机器人可简化并自动完成样品前处理过程，大幅缩短手动制备时间并减少操作员误差。OneLab负责控制Andrew+移液机器人，这是一种云端软件，直观易用，有助于跨实验室快速部署自动化方法。

SARS-CoV-2 LC-MS试剂盒(RUO)有助于将病毒蛋白定量方法与感染生物标志物结合使用，鉴定潜在的预后生物标志物或考察病毒在研究中的影响。

沃特世SARS-CoV-2 LC-MS试剂盒仅供研究使用(RUO)，不适用于诊断。

实验

使用SARS-CoV-2 LC-MS RUO试剂盒按使用说明(IFU)执行本应用纪要中详述的研究。

试剂盒工作流程描述了三(3)种肽的变性、酶解、富集方法以及UPLC-MS/MS分析，这三种肽为：AYNVTQAFGR (AYN)、NPANNAAIVLQLPQGTTLPK (NPA)和ADETQALPQR (ADE)，由SARS-CoV-2 NCAP蛋白衍生而来。样品经变性并酶解处理后生成胰蛋白酶解肽。利用固定在磁珠上的抗多肽抗体选择性捕集三种SARS-CoV-2 NCAP肽及其相关的稳定标记内标，以促进富集过程。清洗多肽，去除未结合的基质/样品干扰物质，这些多肽作为洁净且浓缩的样品洗脱，以供UPLC-MS/MS分析。

样品描述

使用SARS-CoV-2肽校准品，用病毒运输液（VTM，Liofilchem，意大利）制备浓度范围为3~50000 amol/µL的肽校准品样品，并用VTM制备浓度为3 amol/µL、10 amol/µL、400 amol/µL和25000 amol/µL的质控品(QC)。

在Andrew+移液机器人上使用SARS-CoV-2 LC-MS试剂盒(RUO)进行样品前处理。

变性：

将180 µL校准品和QC样品加入96孔板中。向各样品中加入20 µL变性剂（用于SARS-CoV-2的RapiGest试剂），振摇样品板。然后将96孔板密封，并在56 °C下加热15 min。

酶解：

向每个孔中加入20 µL胰蛋白酶溶液，振摇样品板并置于培养箱或恒温混匀仪中，在37 °C下处理30 min。为抑制进一步酶解，向每个孔中加入20 µL TLCK溶液，并在室温下混合5 min。加入20 µL稳定同位素标记的(SIL) NCAP肽混合物，混合30 s。

富集：

将SARS-CoV-2 LC-MS富集套件(RUO)中的30 µL抗体磁珠偶联物加入各样品，其中含有等体积靶向AYN、ADE和NPA肽的磁珠偶联物。充分混匀96孔板以重悬磁珠，继续混合1 h，确保足够混匀，使磁珠在整个过程中保持悬浮状态。然后将96孔板转移到磁板阵列上，放置1 min，然后去除水溶液。向每个孔中加入150 µL清洗缓冲液，混合30 s，转移到磁板阵列上，放置1 min，然后去除清洗溶液。再次重复该清洗步骤。向每个孔中加入50 µL洗脱缓冲液，混合5 min。然后将孔板转移到磁板阵列，放置1 min，将洗脱溶液转移到QuanRecovery 96孔板。先将孔板置于自动进样器磁板上，再进样至UPLC-MS/MS系统。

方法条件

示例参数如下所示，也可参见SARS-CoV-2 LC-MS试剂盒(RUO)使用说明(IFU)。

液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY UPLC I-Class FTN
进样针：	30 µL
色谱柱：	ACQUITY Premier BEH C_{18}肽分析专用柱, 300 Å, 2.1 mm × 30 mm, 1.7 µm
柱温：	40 °C
样品温度：	8 °C
进样体积：	20 µL
流速：	0.8 mL/min
流动相A：	0.1%甲酸(v/v)的水溶液
流动相B：	0.1%甲酸(v/v)的乙腈溶液

运行时间：1.8 min

梯度

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.8	95	5	初始
0.15	0.8	95	5	6
0.35	0.8	85	15	6
0.60	0.8	85	15	6
1.00	0.8	75	25	6
1.20	0.8	10	90	11
1.50	0.8	95	5	11

质谱条件

质谱系统：Xevo TQ-XS质谱仪

电离模式：正ESI

毛细管电压：0.5 kV

MRM参数

肽	MRM		锥孔电压 (V)	碰撞电压 (V)	扫描窗口 (min)
ADE	564.8>400.2	定量离子	35	19	0.41–0.75
	564.8>584.4	定性离子	35	20	
	564.8>712.4	定性离子	35	24	
	569.8>410.2	SIL	35	19	
AYN	563.8>679.4	定量离子	35	19	0.76–1.1
	563.8>578.3	定性离子	35	18	
	563.8>892.5	定性离子	35	19	
	568.8>689.4	SIL	35	19	
NPA	687.4>841.5	定量离子	35	18	1.11–1.45
	687.4>766.4	定性离子	35	23	
	687.4>865.5	定性离子	35	23	
	690.4>849.5	SIL	35	18	

方法事件

时间 (min)	事件	操作
0.41	液流状态	LC
1.44	液流状态	废液

数据管理

质谱软件：　　带TargetLynx XS的MassLynx 4.2版

结果与讨论

三种肽在3~50000 amol/µL的校准范围内呈线性。使用$1/x^2$加权函数，通过五次单独分析获得的校准曲线相关系数(r^2)高于0.99。

三种合成肽分别以2、3、6、10和20 amol/μL的浓度添加至VTM中，评价该方法的分析灵敏度。三种肽均重复分析五次。测得AYN、ADE和NPA的定量下限(LLoQ)为3 amol/μL，浓度精密度<20%，偏差在±20%以内，S/N >10:1 (PtP)（图2A-B）。

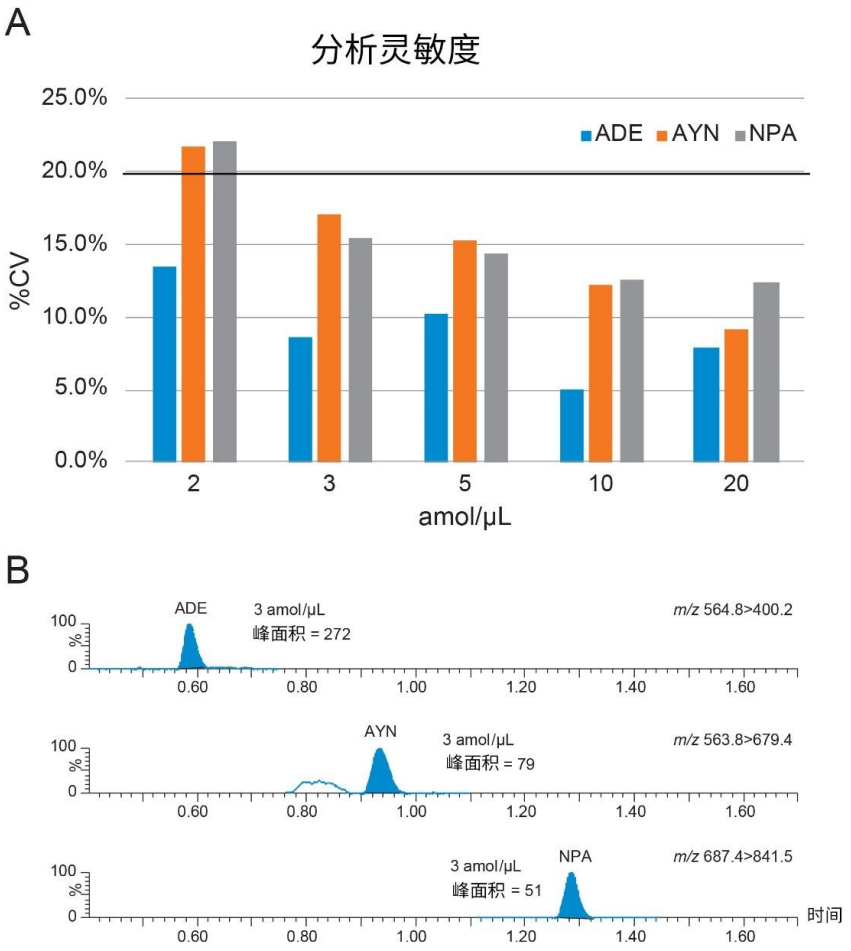

图2*A.*经抗体富集后，*VTM*中的*ADE*、AYN和*NPA*肽在2 *amol/μL*、3 amol/μL、5 amol/μL、10 amol/μL和20 *amol/μL*浓度下的分析灵敏度。2*B.*经抗体富集后，*VTM*中的*ADE*、AYN和*NPA*肽在3 *amol/μL*浓度下的色谱图。

将NCAP衍生肽及合成肽以3 amol/μL、10 amol/μL、400 amol/μL和 25000 amol/μL的浓度添加至VTM中，评价方法精密度。每个样品在五种浓度下每个浓度重复分析五次。结果表明，该方法的日间精密度和日内精密度均≤17.4%（图3）。

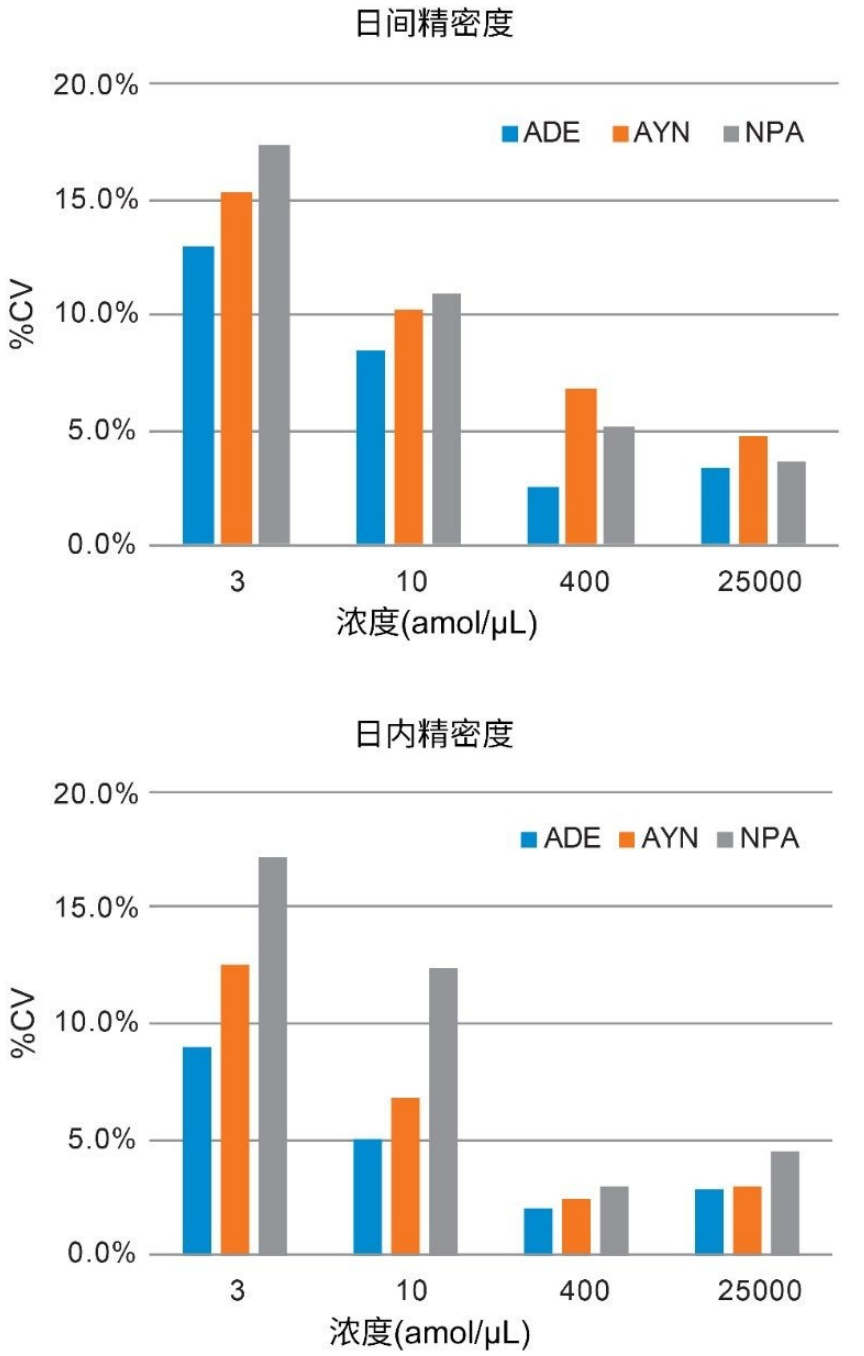

图3.富集后，*VTM*中的*ADE*、AYN和*NPA*肽在3 *amol/μL*、10 amol/μL、400 amol/μL和25000 *amol/μL*浓度下的日内精密度和日间精密度。

经过重新分析并与先前分析的校准曲线比较后发现，QC样品在自动进样器上可于10 °C稳定48 h以上。

结论

使用VTM作为示例样品基质，证明SARS-Cov-2 LC-MS试剂盒(RUO)能够定量分析3~50000 amol/µL浓度范围内的NCAP肽，精密度为≤17.4% CV，定量下限为3 amol/µL。

SARS-Cov-2 LC-MS试剂盒(RUO)可直接检测SARS-CoV-2 NCAP肽并完成定量，用于比较和整合不同LC-MS系统、甚至不同研究实验室之间的结果。 利用LC-MS分析的主要优势（即，每次能够检测并测量一种以上的分析物），该系统和试剂盒可直接检测和定量SARS-CoV-2肽，并在单次分析中监测生物标志物以开展研究。

参考资料

1. Fajnzylber, J., Regan, J., Coxen, K. *et al*.SARS-CoV-2 Viral Load is Associated with Increased Disease Severity and Mortality.*Nat Commun* 11, 5493 (2020).
2. Surkova, Elena *et al.* False-positive COVID-19 Results: Hidden Problems and Costs. *The Lancet Respiratory Medicine*, Volume 8, Issue 12, 1167–1168 (2020).
3. Cardozo KHM, Lebkuchen A, Okai GG, Schuch RA, Viana LG, Olive AN, *et al*.Establishing a Mass Spectrometry-Based System for Rapid Detection of SARS-CoV-2 in Large Clinical Sample Cohorts.*Nat Commun*.Nature Publishing Group; 2020 Dec 3;11(1):1–13.
4. Van Puyvelde B, Van Uytfanghe K, Tytgat O, Van Oudenhove L, Gabriels R, Bouwmeester R, *et al*.Cov-MS: A Community-Based Template Assay for Mass-Spectrometry-Based Protein Detection in SARS-CoV-2 Patients.*JACS Au*.*American Chemical Society*; 2021 May 3.
5. Renuse S, Vanderboom PM, Maus AD, Kemp JV, Gurtner KM, Madugundu AK, *et al*.Development of Mass Spectrometry-Based Targeted Assay for Direct Detection of Novel SARS-CoV-2 Coronavirus from Clinical Specimens.*medRxiv.Cold Spring Harbor Laboratory Press*; 2020 Aug 6;:2020.08.05.20168948.

致谢

由衷感谢南安普顿大学的Paul Skipp教授及其同事、伦敦大学学院的Kevin Mills教授及其同事、莱斯特大学的Donald Jones教授及其同事、曼彻斯特大学的Andrew Pitt教授及其同事、Viapath的Rachel Carling博士及其同事以及沃特世公司的Hans Vissers博士对本研究所做的重要贡献。

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <https://www.waters.com/134613317>

Xevo TQ-XS三重四极杆质谱仪 <https://www.waters.com/134889751>

MassLynx MS软件 <https://www.waters.com/513662>

TargetLynx <https://www.waters.com/513791>

SARS-CoV-2 LC-MS试剂盒(RUO) <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135083368>

720007266ZH，2021年5月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

使用条款 隐私 商标 网站地图 招聘 Cookie Cookie 设置

沪 ICP 备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号