

使用Andrew+™移液机器人与ACQUITY™ Premier UPLC™和Xevo™ TQ Absolute在明胶形态分析中进行自动化ProteinWorks™样品前处理

Yin Ling Chew, Jun Xiang Lee, Ruvindya Hansani Hettige Don

Waters Corporation

摘要

明胶因其独特的凝胶特性成为食品和药品中一种常见的成分。但是，猪源明胶被视为非清真成分，不得存在于供穆斯林社区消费的产品中。因此，明胶形态分析对于确定明胶来源非常重要。在之前的研究中，我们使用ProteinWorks试剂盒进行蛋白质酶解，确立了明胶形态分析工作流程。ProteinWorks三步方案涉及多个重复的试剂添加步骤和大量手动移液操作，是适用于自动化转型的理想方案。在本研究中，我们使用Andrew+移液机器人对改良版ProteinWorks三步方案进行自动化，进一步提高了样品前处理流程的效率。使用LC-MS/MS（ACQUITY™ Premier UPLC与Xevo TQ Absolute串联四极杆质谱仪联用）测定肽段标记。经过改良的方法具有良好的灵敏度（猪标志物的LOD和LOQ分别为0.01%和0.025%）、重复性(% RSD < 8%)和重现性。

优势

- 使用Andrew+移液机器人通过自动化方案大幅提高生产率和效率
- 采用人为干预较少的自动化方案，大幅减少样品前处理过程中的错误
- 利用ACQUITY Premier UPLC解决方案和Xevo TQ-Absolute大幅提升肽检测灵敏度

简介

明胶是一种常用成分，可用于各种食品和药品，其生产的主要来源为牛或猪¹。出于健康和宗教原因，用于制备明胶的动物物种通常受到限制和监管，例如，来自猪的明胶被视为非清真明胶，穆斯林社区禁止食用。

在之前的研究中，我们使用Auto-Express ProteinWorks试剂盒，通过简单的三步样品酶解方案对明胶进行了形态分析²。然后对获得的胰蛋白酶肽进行LC-MS/MS分析。该酶解方案虽然简单易懂，但需要执行多个重复的试剂添加步骤，这些步骤可能非常繁琐，尤其是在待处理的样品数量很大的情况下。

在本应用纪要中，我们通过Andrew+移液机器人将改良版ProteinWorks三步酶解方案进行自动化，进一步提高了样品前处理的生产率和效率。借助Peltier+，Andrew+可以快速主动地控制附件的加热和冷却。这一点很重要，因为三步酶解方案需要在变性和酶解步骤使用两个不同的温度。该系统能够快速自动完成样品加热和冷却过程，进一步减少了人为干预，并节省了总体处理时间。

实验方案的设计和执行均使用一款云软件 — OneLab软件完成。该软件具有直观的界面，即使没有编程知识也可以快速学习。OneLab软件具有多种参数设置，支持用户根据待处理液体的特性灵活定制方案。OneLab软件平台还具有可追溯性，能够将方案步骤记录为脚本。每次执行方案后都会生成一份实验报告，其中提供了诸如步骤所用设置、样品信息和执行时间戳等详细信息，以便于管理。

此外，我们将方法转移至由ACQUITY Premier UPLC和Xevo TQ Absolute串联四极杆质谱仪组成的系统，以尽可能提高牛和猪肽段标记的检测灵敏度。通过分析清真标记糖果确定新方法的性能。

实验

使用50 mM碳酸氢铵对市售猪明胶参比标准品(Sigma Aldrich)和10个含明胶的不同食品样品进行预处理。然后在80 °C下加热标准品，获得15 mg/mL标准品溶液。在酶解之前，将猪明胶标准品加入到不含猪源成分的清真标记糖果中，以提供0.01%~1%的程序校准系列。

使用Andrew+移液机器人，将ProteinWorks Auto-eXpress Low 3快速酶解试剂盒（P/N: [176004077 <https://www.waters.com/nextgen/global/shop/application-kits/176004077-proteinworks-auto-express-low-3-digest-kit.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/application-kits/176004077-proteinworks-auto-express-low-3-digest-kit.html)）的改良版三步方案进行自动化，如图1所示。实验方案的设计和执行均使用一款云软件 — OneLab™软件完成。

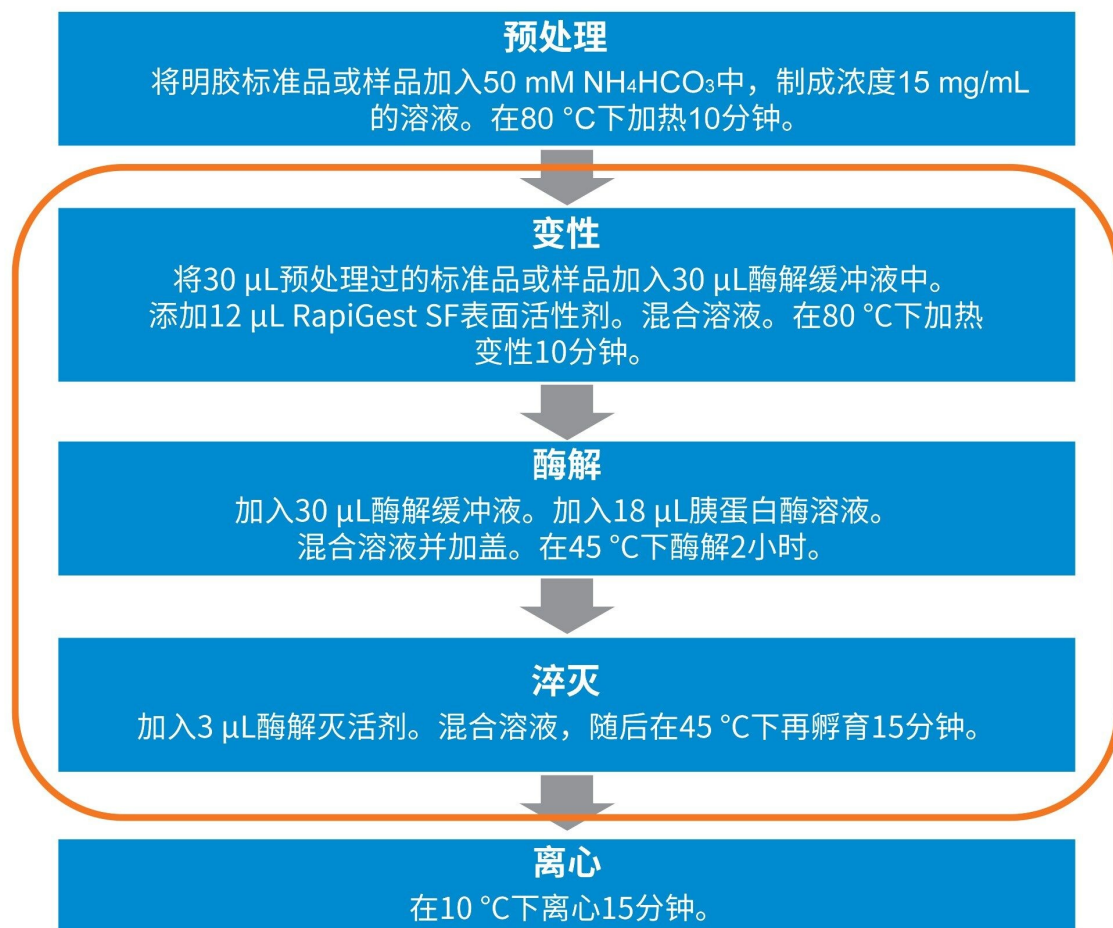


图1.使用ProteinWorks Auto-eXpress Low 3快速酶解试剂盒的三步酶解方案。橙色框中突出显示了Andrew+移液机器人的自动化步骤。

液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY Premier UPLC,
色谱柱:	ACQUITY Premier UPLC HSS T3色谱柱, 1.8 μm, 2.1 mm x 100 mm (P/N: 186009468)
柱温:	40 °C

进样体积: 2 μ L

流速: 0.40 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

梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.40	95	5	初始
0.5	0.40	95	5	6
12.0	0.40	75	25	6
12.1	0.40	25	75	6
14.0	0.40	25	75	6
14.1	0.40	95	5	6
16.5	0.40	95	5	6

质谱条件

MS系统: Xevo TQ Absolute

电离模式: ESI+

毛细管电压: 1 kV

离子源温度: 130 °C

脱溶剂气温度: 600 °C

锥孔气流速:	150 L/h
脱溶剂气流速:	1000 L/h
雾化气流速:	7.0 bar

数据管理

色谱软件:	MassLynx™ v4.2
质谱软件:	MassLynx v4.2
信息学软件:	TargetLynx™ v4.2

MRM通道

使用先前研究中列出的相同MRM通道收集数据²。

结果与讨论

自动化样品前处理

在校准标样的制备和酶解方案中，添加试剂和稀释剂等步骤之前需要进行大量的重复移液操作。这些步骤费时费力，对于样品量较大的情况尤其如此。借助Andrew+移液机器人的自动化功能，实验室分析人员可以节省原本用于手动移液的时间，从而完成价值更高的任务。

○ 窄



图2.使用Andrew+移液器和Domino模块制备标准品和样品的Andrew+工作台布局：1.吸头盒（5~120 μL Optifit吸头）；2.吸头盒（0.2~10 μL Optifit吸头）；3.微孔板；4.微量离心管；5.96-PCR板Peltier+

图3显示了Andrew+与典型实验室分析人员完成三步酶解方案中移液步骤所需的时间比较（不含加热和冷却步骤）。Andrew+完成移液任务的速度大约是手动移液的两倍。Andrew+可以提高工作流程效率，同时减少潜在的人为错误。



图3.Andrew+与手动移液所需时间比较

三步酶解方案所需的加热和冷却步骤也可由Andrew+自动完成，只需添加Peltier+（一种能够快速加热和冷却消耗品的互联装置）。Peltier+的冷却速率为9 °C/min，几分钟内即可从80冷却到45 °C，而典型的加热模块需要更长的时间才能达到被动冷却。此功能还省去了使用两个加热器来满足两个不同温度要求的需求，从而节省了时间。

本研究中的三步酶解方案已根据之前的研究进行了改良。胰蛋白酶的使用体积从24 μL减少到18 μL。由于胰蛋白酶体积减少了25%，因此使用相同含量的胰蛋白酶储备液可以处理更多样品，从而降低了每个样品的分析成本。

方法性能

绘制清真标记糖果中猪明胶的程序校准曲线(0.025%~1%)。使用Andrew+在两天分别制备两组程序校准品，以评估使用机器人时的重现性。使用稳定的猪标记物的保留时间鉴定峰，RSD在0.04%以内。

图4显示了四个猪标记物的校准曲线和残差百分比。两天的实验结果相当，每个浓度下重复进样三次，决定系数 $r^2 > 0.998$ ，残差百分比 $< 21\%$ （表1）。良好的线性和准确度表明该方法适用于定量分析。

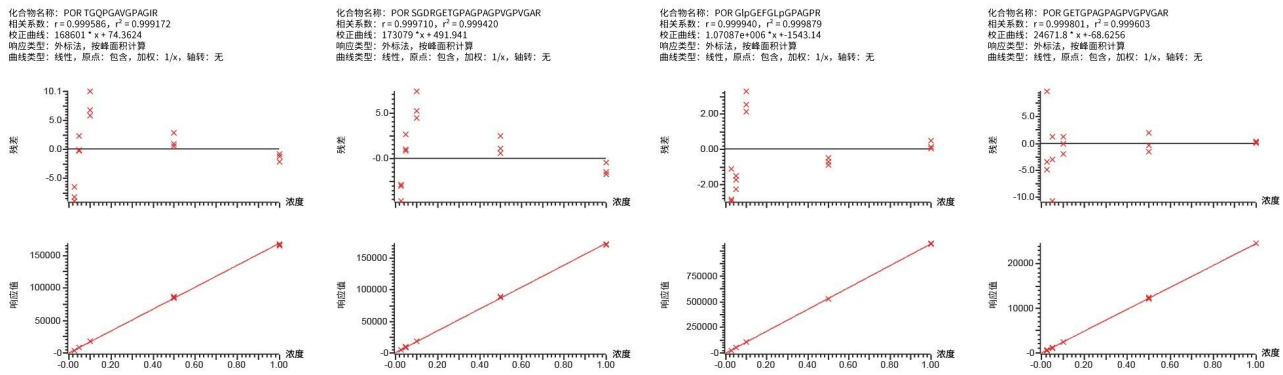


图4.对使用Andrew+在清真标记糖果中制备的猪明胶标准品进行分析得到的四种猪标志物的程序校准曲线和残差图。

猪标记物	线性		残差 (%)		RT RSD (%)
	第1天	第2天	第1天	第2天	
GETGPAGPAGVGPVGAR	0.999	0.998	10.7	21.3	0.04
GlpGEFGLpGPAGPR	0.999	0.999	3.3	5.1	0.02
SGDRGETGPAGPAGVGPVGAR	0.999	0.999	7.4	5.8	0.01
TGQPGAVGPAGIR	0.999	0.999	10.1	8.6	0.04

表1.在两天使用Andrew+在清真标记糖果中制备猪明胶标准品，对其进行分析获得的四种猪标志物的校准曲线特征

根据分析加标糖果和空白糖果的色谱图评估信噪比，确定该方法的灵敏度。经测定，检测限(LOD)和定量限(LOQ)分别为0.01%和0.025%猪明胶。图5显示了含有和不含猪掺假物的清真标记糖果基质的MRM色谱图。

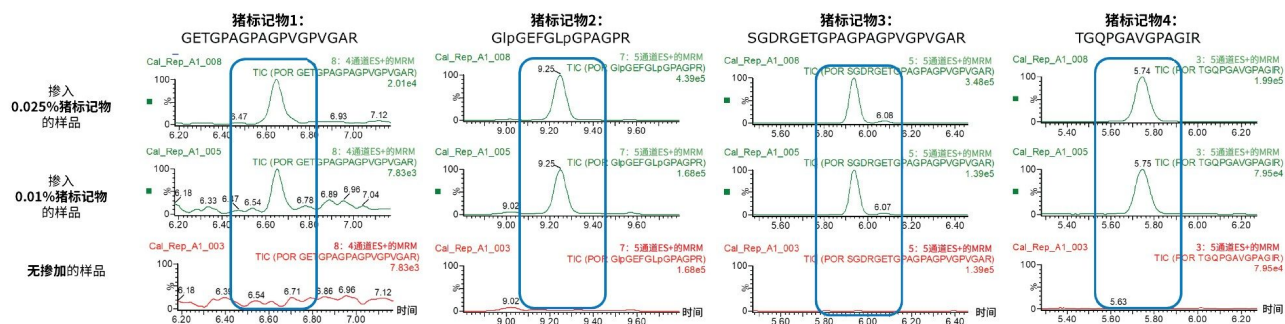


图5.在添加和未添加猪明胶标准品的情况下，清真标记糖果中四种猪标记物的MRM色谱图比较。

此外，还通过评估加标0.025%和0.1%猪明胶的清真标记糖果重复分析(n = 6)得到的数据评估了方法的重复性。结果显示出良好的重复性，峰面积的RSD < 8.1%。

猪标记物掺假比例(%)	面积RSD% (n=6)	
	0.025%掺假	0.1%掺假
GETGPAGPAGPVGVPVGAR	8.1	4
GlpGEFGLpGPAGPR	0.9	1.2
SGDRGETGPAGPAGPVGVPVGAR	2	1.7
TGQPGAVGPAGIR	1.9	1.6

表2.清真标记糖果中0.025%和0.1%浓度的四种猪肽段标记测定的重复性(% RSD) (n=6)

糖果样品分析

我们使用确立的方法分析了十种市售含明胶糖果样品，结果列于表3。对于待检肽段，至少三个MRM通道的信噪比不得低于3，同时必须确定至少两种肽段标记用于物种归属³。

样品	清真声明	检测到的肽段标记数量	
		牛	猪
样品1	是	5	ND
样品2	是	5	ND
样品3	是	5	ND
样品4	是	5	ND
样品5	是	5	ND
样品6	是	5	ND
样品7	否	1	4
样品8	否	ND	4
样品9	否	3	4
样品10	否	5	4

表3.十种市售糖果样品的筛查结果

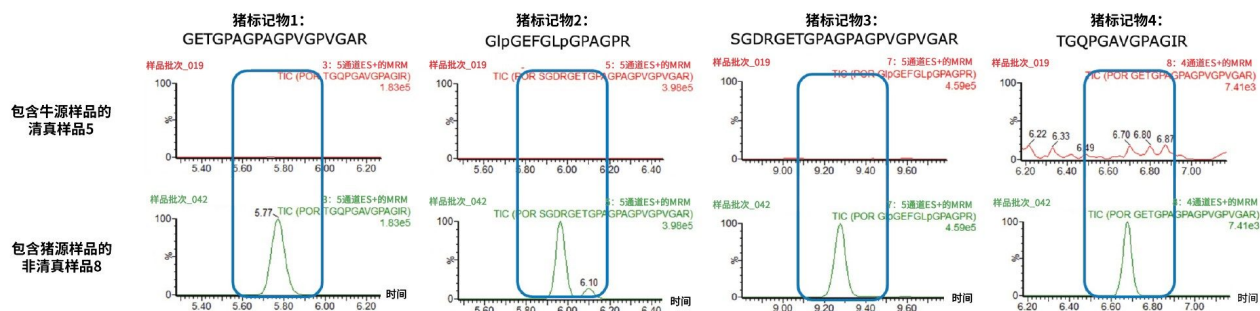


图6.使用Andrew+移液机器人制备的清真标记和非清真标记糖果样品分析所得的四个猪肽段标记的MRM色谱图比较

结论

本研究使用Andrew+移液机器人演示了ProteinWorks Auto-eXpress Low 3快速酶解试剂盒在明胶形态分析中实

现的样品前处理工作流程自动化。通过改良样品前处理工作流程中使用的胰蛋白酶体积，可以更经济有效地使用ProteinWorks试剂盒。Andrew+机器人完成移液任务的速度大约是手动移液操作的两倍。该方法使用基于Xevo TQ Absolute的LC-MS/MS系统以及使用Andrew+实现自动化，具有良好的灵敏度（猪样品的LOD和LOQ分别为0.01%和0.025%）、重复性(% RSD < 8%)和重现性。

参考资料

1. Guo S, Xu X, Zhou X and Huang Y. A rapid and simple UPLC-MS/MS Method Using Collagen Marker Peptides for Identification of Porcine Gelatin. *RSC Adv.* 2018, 8: 3768–3773.
2. Yin Ling Chew, Jun Xiang Lee, 在常规分析中使用ProteinWorks™ Auto-eXpress快速酶解试剂盒和Xevo™ TQ-XS鉴别明胶来源物种的完整解决方案. 沃特世应用纪要, 720007667ZH, 2022年。
3. Song E, Gao Y, Wu C, Shi T, Nie S, Fillmore T L, Schepmoes A A, Gritsenko M A, Qian W, Smith R D, Rodland K D, Liu T. Targeted Proteomic Assays For Quantitation of Proteins Identified by Proteogenomic Analysis of Ovarian Cancer. *Sci.Data* (2017), 1–13.

特色产品

ACQUITY Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

Xevo TQ Absolute三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/nextgen/global/products/mass-spectrometry-systems/xevo-tq-absolute.html>>

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

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

720007894ZH, 2023年5月



© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)