

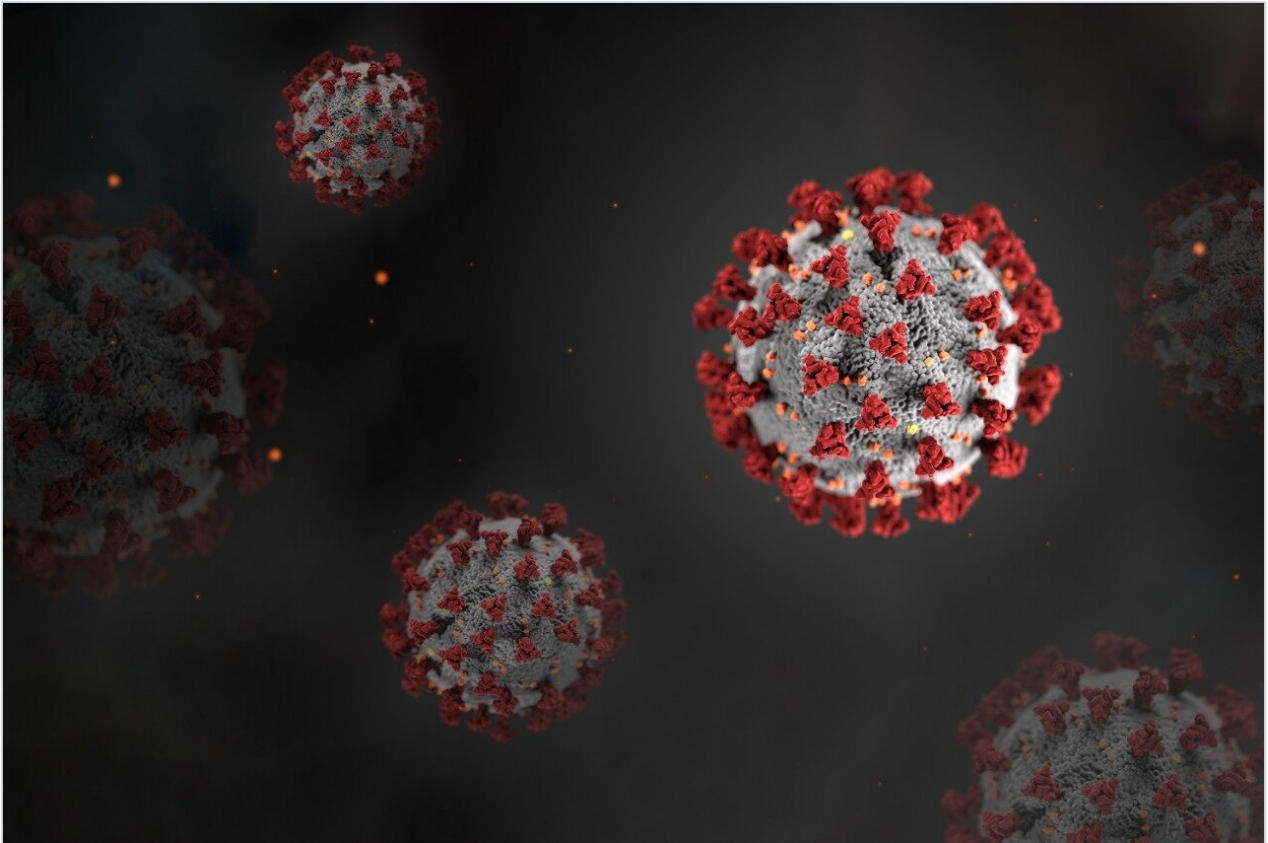
应用纪要

剖析新型冠状病毒病(COVID-19): 基于LC-MS的SARS-CoV-2检测中多反应监测通道的选择和优化策略

Laurence Van Oudenhove, Nikunj Tanna, Jan Claereboudt, Hans Vissers, Bart Van Puyvelde, Simon Daled, Dieter Deforce, Katleen Van Uytfanghe, Maarten Dhaenens



**GHENT
UNIVERSITY**



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

为应对COVID-19大流行疫情，研究人员着手开发质谱分析法对蛋白质进行表征、鉴定和定量。这些方法旨在了解SARS-CoV-2的结构生物学特征和相互作用机制，或用作相关标志物检测的补充方法。有研究者建议，将靶向质谱分析用于检测蛋白酶解后体液中的病毒肽段，作为SARS-CoV-2检测方法¹。本文展示了MassLynx Skyline Interface在使用Xevo TQ-XS串联四极杆质谱仪对肽段进行自动化多反应监测选择和优化中的应用。

优势

- 自动生成和优化MRM通道
- 可通过特征性肽段检测实现SARS-CoV-2蛋白的检测和定量

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。为克服目前标准聚合酶链式反应(PCR)诊断的检测能力存在局限性且面临相关试剂短缺的难题，研究人员开始不断寻求新的诊断技术^{2,3}。SARS-CoV-2病毒颗粒通常含有大量蛋白质，其中多数蛋白质为突刺糖蛋白(SPIKE)和核蛋白(NCAP)。SPIKE负责在感染初期识别人血管紧张素转化酶2。NCAP是病毒颗粒中参与基因组复制和转录的结构组成⁴。因此考虑将靶向LC-MS法用于SARS-CoV-2蛋白的检测和定量，作为COVID-19病毒载量测定的替代方法。业界正在通力协作以期能够开发出“一种可普遍采用的冠状病毒多反应监测分析方法”，目前的LC-MS方法开发是其中的一个组成部分⁵。本研究应用了多种补充手段进行特征性肽段的选择和鉴定（包括多反应监测(MRM)通道），以实现SARS-CoV-2蛋白的检测和定量。

实验

对重组SARS-CoV-2 SPIKE和NCAP蛋白（冻干品，由Cov-MS提供）进行联合酶解，并将得到的胰蛋白酶酶解Lys C肽段作为单独标准品分别加标至病毒采样管(Universal Transport Medium, UTM)基质中⁵。在MRM分析模式下，将ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统与Xevo TQ-XS串联四极杆质谱仪联用，分析得到的肽段。使用TargetLynx和Skyline进行定量数据分析⁶。

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 μ L |
| 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 |

| | |
|---------|---------|
| 时间(min) | 溶剂B (%) |
|---------|---------|

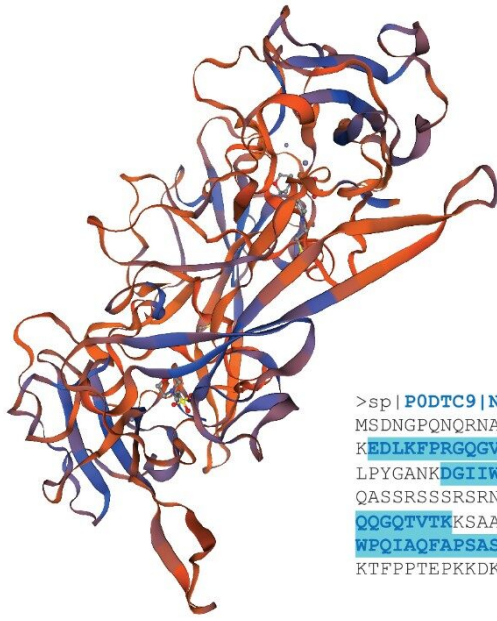
| | |
|-----|---|
| 8.0 | 5 |
|-----|---|

数据管理

| | |
|----|----------------------------|
| 软件 | MassLynx |
| | TargetLynx |
| | MassLynx Skyline Interface |
| | Skyline |

结果与讨论

根据Cov-MS原创标准操作程序(SOP)中的定义，NCAP氨基酸序列和覆盖范围见图1。结合SPIKE蛋白的一级氨基酸序列，一同构成MRM选择和优化处理的基础。通过MassLynx Skyline Interface (MSI)流程对串联四极杆MRM方法进行自动优化和精细调谐⁷，并检测任何附加的候选特征肽段。简言之，MSI将执行4步自动流程，借此首先确定肽段的保留时间。接下来，根据碰撞诱导解离(CID)碎裂能量的缺省计算结果确定各肽段中灵敏度最高的母子离子对（MRM通道）。本步骤在完成各通道碰撞能量优化后进行。最后，创建MRM方法以及适合的采集窗口。如图2左侧所示，Skyline文档中指定了适合的肽段和通道设置。接下来，如图2右侧所示，在MSI中指定文档及其他方法文件（调谐页面、采集方法和LC梯度）、样品位置和进样体积。



```
>sp|P0DTC9|NCAP_SARS2 Nucleoprotein
MSDNGPQNQRNAPRITFGGSDSTGSNNGERSGARSKQRRPQGLPNNTASWFTALTQHG
KEDLKFRGQGVPIINTNSPDDQIGYYRATRRIIRGGDGKMKDLSRWYFYLLGTGFEAG
LPYGANKDGIWVATEGALNTPKDHIGTRNPANNAIVLQLPQGTTLPGFYAEGSRGGS
QASSRSSRSRNSRNSTPGSSRGTSFARMAGNGGDAALALLLDRLNQLSKMSGKQQQ
QQGQTVTKKSAAEASKKPRQKRTATKAYNVTAQFGRRGPEQTQGNFGDQELIRQGTDYKH
WFOIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTYTGAIKLDDKDPNFKDQVILLNKHIDAY
KTFPPTEPKKDKKKKADETQALPQRQKQQQTVTLLPADLDDFSKQLQQSMSSADSTQA
```

图1.蛋白质结构

(<https://swissmodel.expasy.org/interactive/UfqxZJ/models/03>)和基于步进四极杆DIA的序列覆盖图（蓝色突出显示 = DIA鉴定结果） P0DTC9|NCAP_SARS2。

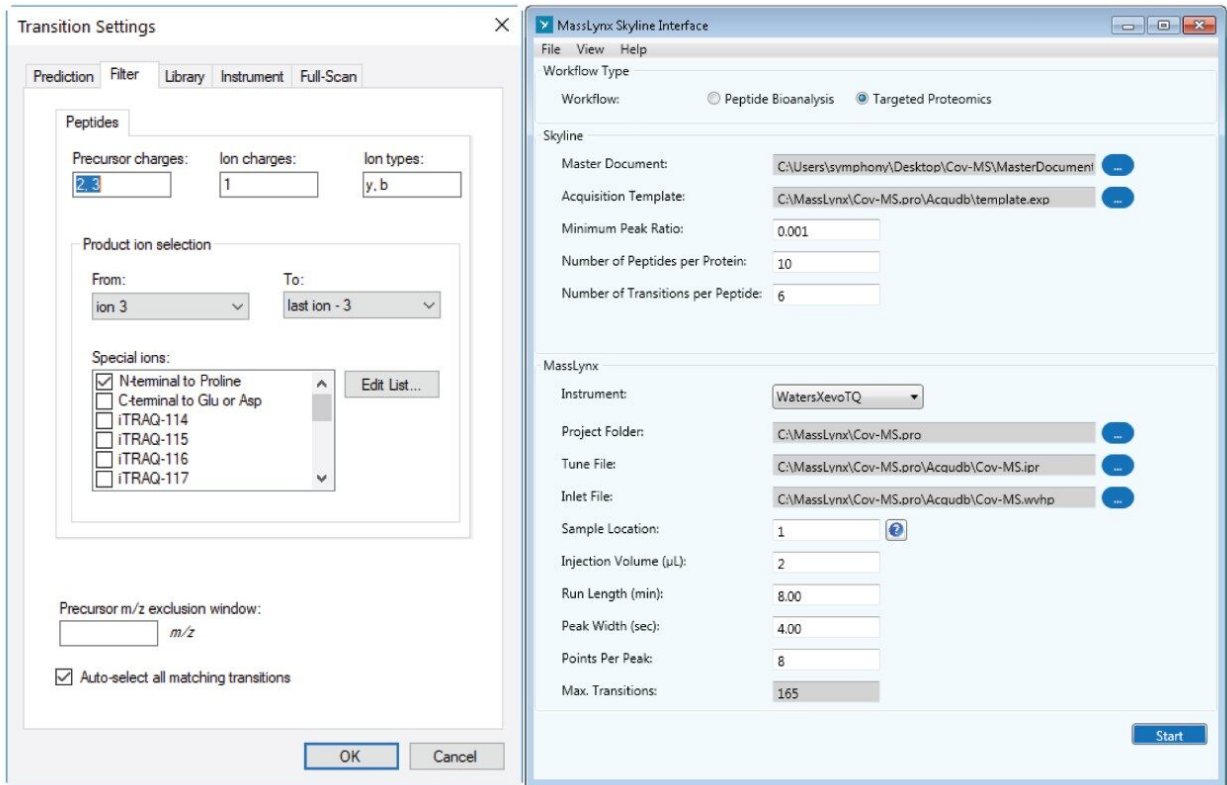


图2.Skyline主文档Transition Settings（通道设置）（左侧），和Mass Skyline Interface（右侧）。

对NCAP和SPIKE蛋白进行模拟酶解，并允许一个基序特异性漏切以优化MRM通道设置，旨在发现已鉴定肽段并且有可能鉴定任何其他相关肽段。在优化流程的这一阶段，将每个肽段的通道数设置为6，以便在下游的采集和定量实验中保留通道选择灵活性。检出的肽段见表1。表1中汇总的结果概述了(1) Cov-MS原创SOP中指定的肽段（鉴定方式：基于发现的非数据依赖型分析(DIA)方法，验证方式：MRM），(2) MSI流程鉴定出的SARS-CoV-2肽段，以及(3)通过最终MRM方法保留的肽段（基于LC-MS响应值和适用性/专属性）。

| 肽 | 电荷 | 发现/Cov-MS SOP* | MSI | 最终 MRM分析 |
|-----------------------|----|----------------|-----|----------|
| SPIKE_SARS2 | | | | |
| GWIFGTTLDSK | 2 | ✓ | ✓ | ✓ |
| SFIEDLLFNK | 2 | ✓ | ✓ | ✓ |
| RSFIEDLLFNK | 2 | ✓ | ✓ | |
| LNDLCFTNVYADSFVIR | 3 | | ✓ | |
| VYSTGSNVFQTR | 2 | | ✓ | |
| HTPINLVR | 2 | | ✓ | |
| IADYNYK | 2 | | ✓ | |
| GVYYPDK | 2 | | ✓ | |
| NCAP_SARS2 | | | | |
| GQQQQGQTVTK | 2 | ✓ | | |
| LNQLESK | 2 | ✓ | ✓ | ✓ |
| ADETQALPQR | 2 | ✓ | ✓ | ✓ |
| EDLKFPR | 2 | ✓ | ✓ | |
| RGPEQTQGNFGDQELIR | 2 | ✓ | ✓ | ✓ |
| AYNVTQAFGR | 2 | ✓ | ✓ | ✓ |
| DQVILLNK | 2 | ✓ | ✓ | ✓ |
| GQGVPIINTNSSPDDQIGYYR | 2 | ✓ | ✓ | |
| GQGVPIINTNSSPDDQIGYYR | 3 | ✓ | ✓ | |
| KQQTVTLLPAADLDDFSK | 3 | ✓ | ✓ | ✓ |
| NPANNAIIVLQLPQGTTLPK | 2 | ✓ | ✓ | |
| NPANNAIIVLQLPQGTTLPK | 3 | ✓ | ✓ | ✓ |
| DGIIWVATEGALNTPK | 2 | ✓ | ✓ | |
| DGIIWVATEGALNTPK | 3 | ✓ | ✓ | ✓ |
| IGMEVTPSGTWLTYTGAIK | 2 | ✓ | ✓ | ✓ |
| HWPQIAQFAPSASAFFGMSR | 2 | ✓ | ✓ | |
| MAGNGGDAALALLLLDR | 2 | ✓ | ✓ | |
| MAGNGGDAALALLLLDR | 3 | ✓ | ✓ | |
| ITFGGPSDSTGSNQNGER | 3 | | ✓ | |
| GFYAEGSR | 2 | | ✓ | ✓ |
| QQTVTLLPAADLDDFSK | 3 | | ✓ | |
| KADETQALPQR | 3 | | ✓ | |
| LDDKDPNFK | 3 | | ✓ | |
| MKDLSPR | 3 | | ✓ | |
| HIDAYK | 2 | | ✓ | ✓ |

*下划线 = 根据Cov-MS SOP在UTM基质中检测的肽MRM方法

表1. 候选目标肽段 (Cov-MS MRM方法配合发现方法和MSI/鉴定得出) 以及通过最终MRM

方法保留的肽段，定量分析结果见“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”(720006968ZH)。

为说明定量时采用合适数量的通道/碎片离子的重要性，本文展示了NCAP其中一个肽段的MRM色谱图，见图3。上方两张色谱图是在Cov-MS原创SOP中指定的第二高加标水平(100 ng)下针对每个肽段分别采用最大数量通道和2个最高丰度通道得到的MRM采集结果。从选择性、采集后处理以及最少干扰MRM通道（可能受基质和患者样品影响）的角度考虑，最大数量通道实验能够提供非常出色的灵活性。而使用2个最高丰度通道能够提供出色的串联四极杆占空比，还有可能提供优异的信噪比。后者可通过下方两张色谱图证明（见图3），所示为第二低的稀释系列溶液检测加标水平(10 ng)色谱图，结果表明对每个肽段使用最大数量通道时存在干扰，从而妨碍检测，最终导致性能降低，这体现在所能够达到的检测下限(LLOD)方面（相较于使用2个最高丰度的非干扰MRM通道）。

通道数量

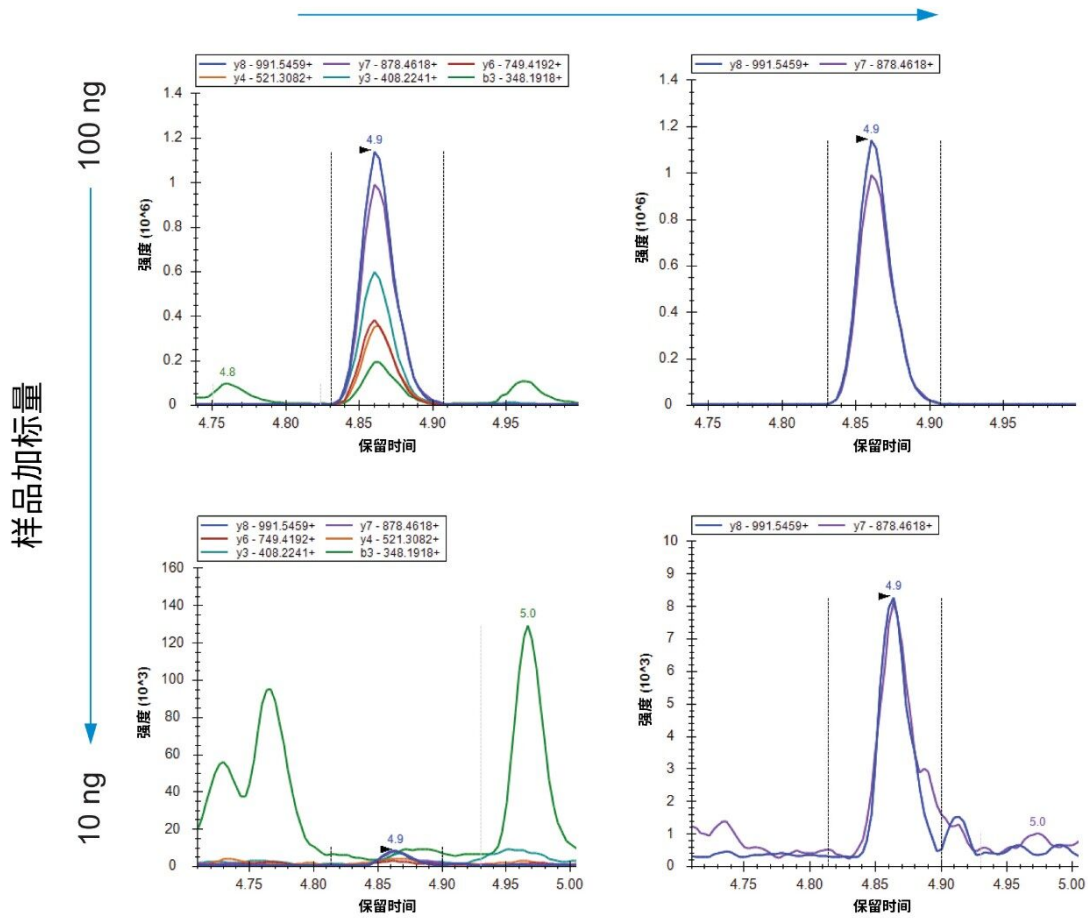


图3.SFIEDLLFNK (来自P0DTC2|SPIKE_SARS2, 加标至UTM基质)的MRM色谱图随通道数(水平方向)和样品加标量(垂直方向)的变化。

结论

要准确有效地开发MRM LC-MS方法, 如本临床研究简报所述, 需要借助可靠的自动化流程以根据专业知识标准、基于发现的鉴定结果或公共信息资源库中的信息对先前的肽段选择规则进行补充。为应对新型冠状病毒所带来的挑战, 本研究选择了易用并且精简的MRM选择和优化流程, 并将其纳入MSI之中。得到的MRM方法已成功在Xevo TQ-XS串联四极杆质谱仪上应用并通过测试。此外, 该方法还可轻松转换至其他LC-MS系统, 以便进行进一步优化并应用于SARS-CoV-2蛋白检测。

参考文献

1. BC Osburn, C Jenkins, SM Miller, BA Neely and, NN Bumpus In Silico Approach Toward the Identification of Unique Peptides from Viral Protein Infection: Application to COVID-19. <https://doi.org/10.1101/2020.03.08.980383> <<https://doi.org/10.1101/2020.03.08.980383>>
2. WHO Laboratory Testing for 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) in Suspected Human Cases. Interim guidance. 2020 Jan 17. <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117> <<https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>>
3. N. Subbaraman. Coronavirus Tests: Researchers Chase New Diagnostics to Fight the Pandemic, *Nature*, 2020 Mar 23 .doi: 10.1038/d41586-020-00827-6.
4. JM Parks, JC Smith. How to Discover Antiviral Drugs Quickly. *N Engl J Med*. 2020 Jun 4;382(23):2261-2264. doi: 10.1056/NEJMcibr2007042.
5. 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>>
6. B MacLean, DM Tomazela, N Shulman, M Chambers, GL Finney, B Frewen, R Kern, DL Tabb, DC Liebler, MJ MacCoss. Bioinformatics, Skyline: An Open Source Document Editor for Creating and Analyzing Targeted Proteomics Experiments. 2010 Apr 1;26(7):966-8.
7. N Tanna, C Dunning, B Molloy. MassLynx-Skyline Interface (MSI): A New Automated Tool to Streamline MRM Method Development and Optimization for Large Molecule Quantification ([720006813EN](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq068) <<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq068>> <https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=135053941&locale=en_MY>).

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、Nikunj Tanna、Jan Claereboudt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)

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>>

MassLynx Skyline Interface <<https://www.waters.com/135058435>>

720006967ZH, 2020年8月