

重组人血清淀粉样蛋白 A 的同位素稀释质谱定量方法研究



张琦, 蒋泽琳, 宋德伟*

中国计量科学研究院, 北京 100029

【摘要】 血清淀粉样蛋白 A(SAA)是炎症临床诊断的四大生物标志物之一。目前,国际尚无 SAA 标准物质,无法实现临床诊断结果的溯源和标准化。选择大肠杆菌重组表达的人血清淀粉样蛋白 A 作为原料,对其进行定性和定量分析,开展溯源方法研究。采用凝胶电泳法、液相色谱法和质谱法分析 SAA 纯度与分子量,结果表明 SAA 原料纯度>98%,分子量 11 820.09 Da 与理论值一致。建立 SAA 的氨基酸分析-同位素稀释质谱绝对定量方法,在水解时间为 8 h 时测定水解样品中苯丙氨酸、异亮氨酸、脯氨酸的含量,计算得到 SAA 溶液的质量浓度为 9.32 $\mu\text{g/g}$ (RSD = 0.91%);建立 SAA 的特征肽-同位素稀释质谱绝对定量方法,在 SAA 与胰蛋白酶质量比为 1:1,酶解时间为 8 h 时测定酶解产物中特征肽 EANYIGSDK 和 GPGGVWAAEAISDAR 的含量,计算得到 SAA 溶液的质量浓度为 9.41 $\mu\text{g/g}$ (RSD = 0.49%)。两种方法的测定结果经统计学检验一致,无明显精密度差异,定值结果可溯源至 SI 单位,为 SAA 标准物质的研制奠定基础。

【关键词】 计量学;血清淀粉样蛋白 A;标准物质;同位素稀释质谱法;溯源

【中图分类号】

【文献标识码】 A

【文章编号】 2096-9015(2024)00-0001-08

DOI: 10.12338/j.issn.2096-9015.2024.0163

【引用本文】 张琦,蒋泽琳,宋德伟.重组人血清淀粉样蛋白 A 的同位素稀释质谱定量方法研究 [J]. 计量科学与技术,待出版.

Quantitative Analysis of Recombinant Human Serum Amyloid A by Isotope Dilution Mass Spectrometry

ZHANG Qi, JIANG Zelin, SONG Dewei

National Institute of Metrology, Beijing 100029, China

Corresponding author: SONG Dewei, Email: songdw@nim.ac.cn

【Abstract】 Serum amyloid A (SAA) is one of the four inflammation biomarkers in clinical diagnosis. At present, there is no SAA certified reference materials, which cannot achieve traceability and standardization in clinical SAA diagnosis. In this study, the recombinant human serum amyloid A expressed in *E. coli* was selected as the raw material, and it was qualitatively and quantitatively analysed to study the traceability method. The purity and molecular weight of SAA were analysed by gel electrophoresis, liquid chromatography and mass spectrometry. The results showed that the purity of SAA was >98%, and the molecular weight of 11 820.09 Da was consistent with the theoretical value. An absolute quantification method of amino acid analysis-isotope dilution mass spectrometry for SAA was established. The content of phenylalanine, isoleucine and proline in the hydrolysed sample was determined at 8 h of hydrolysis, and the mass concentration of SAA solution was 9.32 $\mu\text{g/g}$ (RSD = 0.91%). An absolute quantification method of signature peptide-isotope dilution mass spectrometry for SAA was established. Within the mass ratio of trypsin and SAA was 1:1 and digestion time was 8 h, the content of peptide EANYIGSDK, GPGGVWAAEAISDAR was detected by IDMS, and the mass concentration of SAA is calculated to 9.41 $\mu\text{g/g}$ (RSD = 0.49%). The results of the two methods were consistent by statistical test, and there was no

收稿日期:2024-05-20; 修回日期:2024-05-28

基金项目:国家重点研发计划(2022YFF0710301)。

作者简介:张琦(1998-),中国计量科学研究院研究实习生,研究方向:检验医学溯源,邮箱:zhangqi@nim.ac.cn;通讯作者:宋德伟(1976-),中国计量科学研究院研究员,研究方向:检验医学溯源,邮箱:songdw@nim.ac.cn。

significant difference shown. The quantitative results of this study are traceable to SI units, which lays a foundation for the development of SAA reference materials.

【Key words】 metrology, serum amyloid A, reference materials, isotope dilution mass spectrometry, traceability

0 引言

当机体受到感染、炎症和组织损伤等刺激时,细胞因子诱导肝脏合成大量急性期反应物释放于血液中,进而出现组织坏死和化脓等特异性变化,此过程称为急性期反应^[1]。血清淀粉样蛋白 A (serum amyloid A, SAA) 是在急性期反应中由肝脏细胞产生的一种分子量约为 12 kDa 的急性期蛋白家族,由人类不同基因编码的三个成员组成: SAA 1, SAA 2 和 SAA 4, 其中 SAA 1 和 SAA 2 是急性期亚型(A-SAA)^[2-6]。SAA 是炎症的一种非特异性急性时相反应蛋白(acute phase reaction protein), 其在血液中的浓度随着炎症刺激的增加而增加。与 C-反应蛋白类似, SAA 是人类急性期的主要蛋白^[7]。正常情况下, 血清中 SAA 浓度约为 1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。然而, 在急性期反应中, 浓度可以上升到 1 mg/mL 甚至更高^[8]。急性期反应通常持续数天, 在没有新刺激的情况下, SAA 的浓度逐渐降低。SAA 可用于炎症患者的诊断、预后预测和治疗效果评估^[9]。因此, SAA 是炎症临床诊断的重要生物标志物之一。

SAA 的临床检测方法主要有化学发光免疫分析法^[10]、胶体金免疫层析法^[11]和胶乳免疫比浊法^[12]等, 均是基于抗原抗体特异性结合反应进行检测, 量值均溯源至 WHO 国际标准品 NIBSC 92/680^[13]。然而, 该国际标准品的量值结果无法溯源至国际单位制(international system of units, SI), 而是溯源至医学效价单位 IU。目前国内外均无可溯源至 SI 单位的 SAA 标准物质和参考测量程序。

同位素稀释质谱法(isotope dilution mass spectrometry, IDMS) 是国际物质的量咨询委员会(consultative committee on the quantity of material, CCQM) 指定的基准测量方法之一^[14]。IDMS 因结合了质谱仪器的灵敏度与选择性和内部同位素校准物的精密度与准确性, 被广泛应用于多肽和蛋白质类生物标志物的绝对定量^[15-18]。基于 IDMS 的蛋白质定量方法主要是两种: 第一种是通过水解将蛋白质消化为氨基酸, 利用同位素稀释质谱技术检测酸解产物氨基酸的含量, 进而计算出目标蛋白质含量的氨基酸分析-同位素稀释质谱法(amino acids analysis-IDMS, AAA-IDMS)^[19-23]; 第二种是通过酶

解将蛋白质消化为数条多肽, 选择其中特有且稳定存在的一条或几条作为特征肽, 利用同位素稀释质谱技术检测特征肽含量, 进而计算目标蛋白含量的特征肽-同位素稀释质谱法(signature peptide-IDMS, SP-IDMS)^[24-25]。

本研究首先对重组人 SAA 样品的纯度与分子量进行定性分析, 随后建立氨基酸水解同位素稀释质谱法和特征肽同位素稀释质谱法对 SAA 样品进行绝对定量分析, 定量结果均可溯源至 SI 单位, 为 SAA 纯度标准物质的研制以及 SAA 参考测量方法的建立奠定基础。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器

Agilent HPLC-6410 三重四极杆液相色谱质谱联用仪(美国 Agilent 公司); Agilent 1200LC 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); UPLC Synapt G2 超高效液相色谱-串联飞行时间质谱仪(美国 Waters 公司); XP26 微量电子天平(瑞士苏黎世 Mettler Toledo 集团); Ultraflex 高分辨基质辅助激光解吸飞行时间质谱仪(德国 Bruker 公司); FD260 鼓风干燥箱(德国 Binder 公司); RVC 2-33 CDplus 真空离心浓缩干燥器(德国 Christ 公司); Mini-PROTEAN[®] Tetra 电泳槽、PowerPac[™] 基础电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.1.2 试剂

重组人血清淀粉样蛋白 A(SAA, 纯度>95%, 上海海肽生物科技有限公司); L-苯丙氨酸纯度标准物质(GBW09235, 纯度=99.8 \pm 0.4%, $k=2$, 中国计量科学研究院); L-异亮氨酸纯度标准物质(GBW09238, 纯度=99.7 \pm 0.3%, $k=2$, 中国计量科学研究院); 脯氨酸纯度标准物质(GBW(E)100084, 纯度=99.0 \pm 1.5%, $k=2$, 中国计量科学研究院); ¹³C₆、¹⁵N 同位素标记异亮氨酸(纯度>99%, 剑桥同位素实验室); ¹³C₉、¹⁵N 同位素标记苯丙氨酸(纯度>99%, 剑桥同位素实验室); ¹³C₅ 同位素标记脯氨酸(纯度>99%, 剑桥同位素实验室); 盐酸(电子纯, 37wt%, 日本多摩化学工业株式会社); 2,5-二羟基苯甲酸、甲酸(色谱纯,

美国 Sigma 公司); 乙腈(色谱纯, 美国 Thermo Fisher 公司); 碳酸氢铵(化学纯, 国药集团有限公司); 测序级胰蛋白酶(美国 Promega 公司); 4-20% RealDAGE Tris-Gly 预制胶、10-260 kD 彩虹预染宽分子量 Marker、5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、考马斯亮蓝 G250(中科瑞泰生物科技有限公司); 10×SDS-PAGE 电泳液(庄盟国际生物基因科技有限公司)。A-SAA 的特征多肽由金斯瑞生物科技股份有限公司合成, 同位素标记多肽由安徽国平药业有限公司合成。实验用水为去离子水。

1.2 SAA 定性分析

1.2.1 SDS-PAGE 纯度分析

取 8 μL 蛋白溶液与 2 μL 的 5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液混合均匀, 置于 95℃ 金属浴加热 10 min, 室温静置待用。垂直电泳槽内放入变性蛋白质电泳预制胶, 内槽加满 1×电泳缓冲液, 外槽加入一半即可, 充分浸泡待用。移液枪分别吸取 10 μL 样品和彩虹预染宽分子量 Marker 沿孔底加样, 其余空白泳道加入 1×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液补齐, 于电压 120 V 条件下进行电泳分析。分析结束后剥离预制胶于培养皿中, 加入考马斯亮蓝 G250 染色 45 min, 加入脱色液(甲醇:乙酸:水=1:1:8)震荡脱色至条带清晰可见。

1.2.2 HPLC 纯度分析

a. 样品准备

称取 SAA 冻干粉溶于去离子水中, 配置样品浓度为 1 mg/mL, 经 0.22 μm 滤膜过滤后进行高效液相色谱(HPLC)分析。

b. 色谱条件

色谱柱: GRACE Vydac 214 TP C4 4.6×250 mm, 5 μm; 流动相 A: 0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B: 0.1% 甲酸乙腈溶液; 流速: 0.5 mL/min; 柱温: 40℃; 进样量: 5 μL; 洗脱梯度: 0~5 min, 5~40% B; 5~35 min, 40~50% B; 35~40 min, 50~100% B。

1.2.3 MALDI-TOF 分子量测定

选取适用于小分子、多肽和蛋白的 2,5-二羟基苯甲酸(2,5-DHB)作为基质溶液, 取 10 μL 的基质溶液与相同体积的蛋白溶液(1 mg/mL)混合, 移液枪吹打混匀。选取 Ground steel target 靶板, 取 5 μL 混合溶液滴在靶板上, 平行点靶三次。自然风干靶上溶液, 在靶板上形成晶体层后进行检测。

1.2.4 肽质量指纹图谱分析

SAA 溶液经胰蛋白酶酶切后的多肽产物经超

高效液相色谱-串联飞行时间质谱仪检测, 并与理论氨基酸序列进行肽质量指纹图谱匹配。

1.3 氨基酸分析-同位素稀释质谱法(AAA-IDMS)定量分析 SAA

1.3.1 样品制备

a. 标准溶液的配制

氨基酸母液: 按照重量法准确称量氨基酸、同位素标记氨基酸和 0.1 mol/L 的盐酸溶液, 配置浓度为 1 mg/L 的苯丙氨酸(Phe)、同位素标记苯丙氨酸(IS-Phe)、异亮氨酸(Ile)、同位素标记异亮氨酸(IS-Ile)、脯氨酸(Pro)、同位素标记脯氨酸(IS-Pro)的母液待用。

同位素内标溶液: 按照重量法准确称量 IS-Phe、IS-Ile、IS-Pro 母液混合, 加入 0.1 mol/L 盐酸溶液稀释至与水解产物中各氨基酸浓度相同。

标准溶液: 准确称量各氨基酸与同位素标记氨基酸母液混合, 使其中氨基酸与同位素标记氨基酸的质量比分别为 0.9(低浓度标准溶液)和 1.1(高浓度标准溶液)。

b. SAA 样品的水解

按重量法将理论浓度为 1 mg/g 的 SAA 溶液稀释至 10 μg/g, 称量 300 mg 稀释液于安瓿瓶中, 等质量比加入同位素内标溶液。将样品和标准溶液于 60℃ 条件下真空离心干燥 15 min 至完全蒸干, 加入 800 μL 6 mol/L 的盐酸溶液, 通氮除氧后熔封瓶口, 置于 110℃ 鼓风干燥箱中水解若干小时。水解完成后取出, 氮气环境下吹干, 加入 1 mL 0.1% 甲酸水溶液复溶, 采用 0.22 μm 滤膜过滤待测。

c. 水解产物的 LC-MS/MS 分析

(1) 色谱条件

色谱柱: Phenomenex PEPTIDE XB-C18 column (3.6 μm, 2.1 mm×250 mm); 流动相 A: 0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B: 0.1% 甲酸乙腈溶液; 流速: 0.2 mL/min; 柱温: 25℃; 进样量: 5 μL; 洗脱梯度: 0~2 min, 2% B; 2~7 min, 2~7% B; 7~14 min, 7~35% B; 14~17 min, 35~2% B; 17~20 min, 2% B。

(2) 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源 ESI, 正离子模式; 检测模式: 多反应检测模式 MRM; 雾化气温度: 300℃; 雾化气气流: 11 L/min; 毛细管电压: 4000 V; 检测离子对 m/z : Ile(132.1>86.1); IS-Ile(139.1>92.0); Phe(166.0>120.0); IS-Phe(176.0>129.1); Pro(116.0>70.1); IS-Pro(121.0>74.0)。

1.4 特征肽-同位素稀释质谱法 (SP-IDMS) 定量分析 SAA

1.4.1 特征肽的选择

在 Peptide Cutter 软件中输入 SAA 的氨基酸序列, 模拟胰蛋白酶酶切得到的多肽产物。考虑蛋白修饰位点、多肽序列长度、疏水性、极性和可能出现的错误切割位点等因素后选择多肽 EK(EANYIGSDK) 和 GR(GPGGVWAAEAI SDAR) 作为 SAA 特征肽, 用于后续样品的定量分析。

1.4.2 基于特征肽 EK 定量分析 SAA

a. 标准溶液的配制

特征肽母液: 按照重量法准确称量 EK、同位素标记 EK(IS-EK)、GR、同位素标记 GR(IS-GR) 和去离子水, 配置浓度为 1 mg/L 的母液待用。采用 AA-IDMS 方法, 选择 Ile 作为定量氨基酸对配制的 EK 母液进行定量分析, 选择 Ile 和 Pro 作为定量氨基酸对配制的 GR 母液进行定量分析, 氨基酸水解实验过程参考 1.3.1。

同位素内标溶液: 按照重量法准确称量 IS-EK 和 IS-GR 母液, 加入去离子水稀释至与酶切产物中多肽浓度相同。

标准溶液: 准确称量多肽母液与同位素标记多肽母液混合, 使其质量比分别为 0.9(低浓度标准溶液) 和 1.1(高浓度标准溶液)。

b. SAA 样品的酶切

按重量法将理论浓度为 1 mg/g 的 SAA 溶液稀释至 10 μ g/g, 分装在离心管中, 每支 300 mg。样品在 37 $^{\circ}$ C 下真空干燥后用 20 μ L 去离子水复溶, 95 $^{\circ}$ C 金属浴变性 15 min 后加入适量的碳酸氢铵溶液调节体系 pH 值, 随后加入适量胰蛋白酶, 于 37 $^{\circ}$ C 进行酶解反应。若干小时后, 加入等质量比的同位素内标溶液和 20 μ L 的 0.1 vol% 甲酸水溶液停止酶解。样品与标准溶液经 0.22 μ m 滤膜过滤后上机检测。

c. 酶切产物的 LC-MS/MS 分析

(1) 色谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC peptide BEH C18(130 A, 1.7 μ m, 2.1 mm \times 100 mm); 流动相 A: 0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B: 0.1% 甲酸乙腈溶液; 流速: 0.2 mL/min; 柱温: 25 $^{\circ}$ C; 进样量: 20 μ L; 洗脱梯度: 0 ~ 5 min, 5 ~ 25% B; 5 ~ 25 min, 25 ~ 80% B; 25 ~ 40 min, 80 ~ 5% B; 40 ~ 45 min, 5% B。

(2) 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源 ESI, 正离子模式; 检测

模式: 多反应检测模式 MRM; 雾化气温度: 300 $^{\circ}$ C; 雾化气气流: 11 L/min; 毛细管电压: 4000 V; 检测离子对: EK(498.7>406.0); IS-EK(502.9>414.0)。

2 结果与讨论

2.1 SAA 定性分析结果

2.1.1 SDS-PAGE 纯度分析结果

SAA 的变性电泳凝胶成像结果如图 1 所示, 可见蛋白泳道均无杂带, 分子量为 12 kDa 左右, 与理论分子量一致。

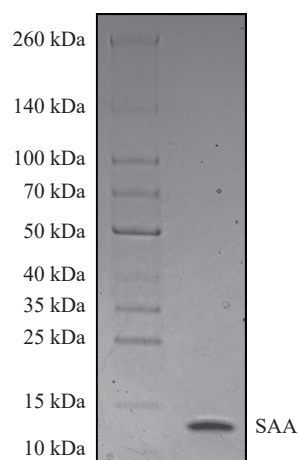


图 1 SAA 的 SDS-PAGE 纯度分析结果
Fig.1 SDS-PAGE analysis of SAA

2.1.2 HPLC 纯度分析结果

SAA 的 HPLC 纯度分析结果如图 2 所示, 二极管阵列检测器(DAD)监测样品在 210 nm 处的响应值, 对样品进行峰面积归一化计算, 得到 SAA 的样品纯度为 98.37%。

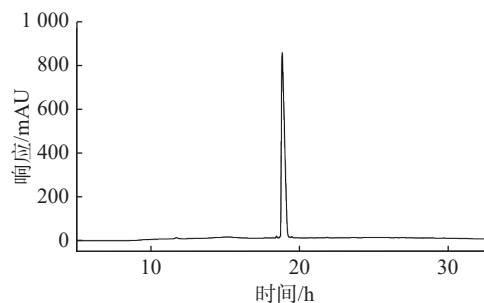


图 2 SAA 样品色谱图
Fig.2 Chromatogram of SAA

2.1.3 MALDI-TOF 分子量测定结果

SAA 的 MALDI-TOF 分子量测定结果如图 3 所示, 图中显示带一个和两个正电荷的质谱峰。测得 SAA 的平均分子量为 11 820.09 Da, 与理论分子量 11 814 Da 一致。

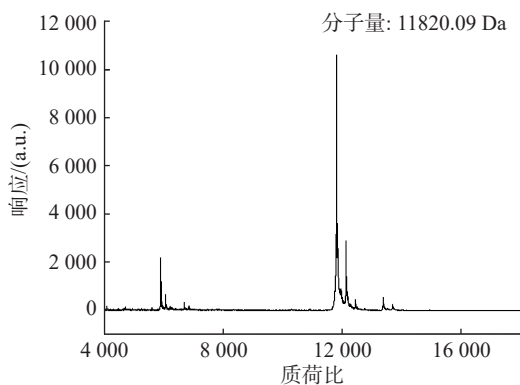


图3 SAA 样品 MALDI-TOF 分析结果
Fig.3 MALDI-TOF analysis result of SAA

2.1.4 肽质量指纹图谱分析结果

SAA 的胰蛋白酶酶切产物质谱数据与理论氨基酸序列匹配结果如图4所示, 序列覆盖率为98.1%, 与理论氨基酸序列一致。

SAA			
Control Coverage(%)	Combined Coverage(%)	Control Unique Coverage(%)	
98.1	98.1	98.1	
1 to 40	MR SFFSFLGE	AFDGARDMWR	AYSDMREANY IGSDKYFHAR
41 to 80	GNYDAAKRGP	GGVWAAEAI S	DARENIQRFF GHGAEDSLAD
81 to 104	QAANEWGRSG	KDPNHFRPAG	LPEKY

图4 SAA 的 MALDI-TOF
Fig.4 MALDI-TOF analysis of SAA

2.2 AA-IDMS 定量分析 A-SAA 结果

根据选择稳定性好、质谱响应高且在氨基酸序列中含量较多的氨基酸进行定量分析的原则, 选用Ile、Phe 和 Pro 定量 SAA。

在水解温度为 110℃, 盐酸浓度为 6 mol/L 的条件下, 优化水解时间以达到最优的水解效果。设置水解时间分别为 4、6、8、10、12、24、36、48 小时, 氨基酸与同位素标记氨基酸的质谱检测峰面积比随时间变化趋势如图5所示, 水解 8 h 后反应达到平台期, 可认为此时 SAA 水解完全。

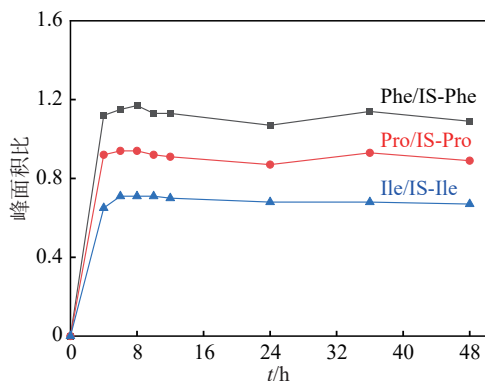


图5 SAA 水解氨基酸的时间变化趋势图
Fig.5 Time-changing trend diagram of SAA hydrolysis to amino acids

水解产物经 Agilent 6410 液质联用仪检测 3 种氨基酸与同位素标记氨基酸质谱峰面积, MRM 模式下采集的总离子流色谱图如图6所示, 根据式(1)、(2)计算 SAA 的含量。

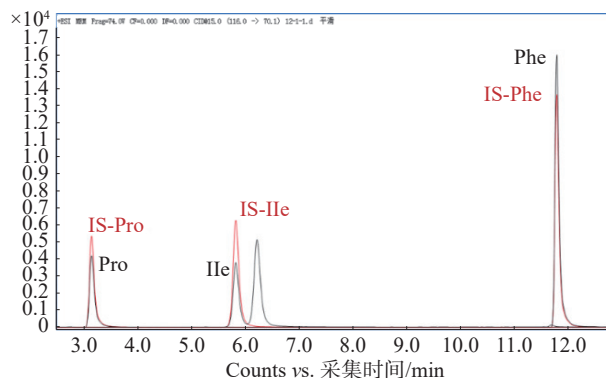


图6 氨基酸总离子流色谱图
Fig.6 Total ions chromatogram of amino acids

$$c_{AA} = \frac{p_{AA} m_{IS} [R_{\text{样}}(I_1 - I_2) - (I_1 R_2 - I_2 R_1)]}{m_{SAA} (R_1 - R_2)} \quad (1)$$

式中, c_{AA} 是定量氨基酸的浓度, g/g; p_{AA} 是氨基酸标准物质的纯度; m_{IS} 是样品中加入的同位素内标溶液的质量, g; $R_{\text{样}}$ 是样品中氨基酸与同位素标记氨基酸的峰面积比值; I_1 是低标溶液中氨基酸与同位素标记氨基酸的质量比; R_1 是低标溶液中氨基酸与同位素标记氨基酸的峰面积比; I_2 是高标溶液中氨基酸与同位素标记氨基酸的质量比; R_2 是高标溶液中氨基酸与同位素标记氨基酸的峰面积比; m_{SAA} 是 SAA 溶液的质量, g。

$$c_{SAA} = \frac{M_{SAA} c_{AA}}{n M_{AA}} \quad (2)$$

式中, c_{SAA} 是 SAA 溶液的浓度, g/g; M_{SAA} 是 SAA 的相对分子质量, Da; M_{AA} 是定量氨基酸的相对分子质量, Da; n 是 SAA 氨基酸序列中该定量氨基酸的个数。

SAA 的 AA-IDMS 定值结果如表1所示, 对4个平行样品重复测定3次, 结果取平均值为 9.32 μg/g, RSD 为 0.91%。

2.3 SP-IDMS 定量分析 A-SAA 结果

通过 AAA-IDMS 定量分析特征肽 EK 和 GR, 设置4个平行样本, 每个样本重复测定3次, 计算得到 EK 的质量浓度为 7.40 μg/g, GR 的质量浓度为 8.11 μg/g。优化特征肽 EK 和 GR 的质谱与液相检测条件, 质谱检测条件结果如表2所示, MRM 色谱图如图7所示, 两条特征肽色谱峰可以完全分离, 多

肽与同位素标记多肽色谱保留时间一致。

表 1 AAA-IDMS 定量分析 SAA 结果
Tab.1 Quantitative detection results of SAA by AAA-IDMS

序号	SAA 蛋白浓度(μg/g)			平均值
	Phe	Ile	Pro	
1	9.53	9.38	9.41	9.44
2	9.52	9.21	9.14	9.29
3	9.47	9.16	9.10	9.24
4	9.52	9.21	9.23	9.32
平均值	9.51	9.24	9.22	9.32
RSD	0.28%	1.04%	1.50%	0.91%

表 2 特征肽质谱检测条件
Tab.2 Mass spectrometry detection condition of signature peptides

多肽	母离子m/z	子离子m/z	碎裂电压V	碰撞能量eV
EK	498.7	406.0	154	12
IS-EK	502.9	414.0	123	11
GR	728.8	340.0	169	30
IS-GR	734.0	256.3	164	26

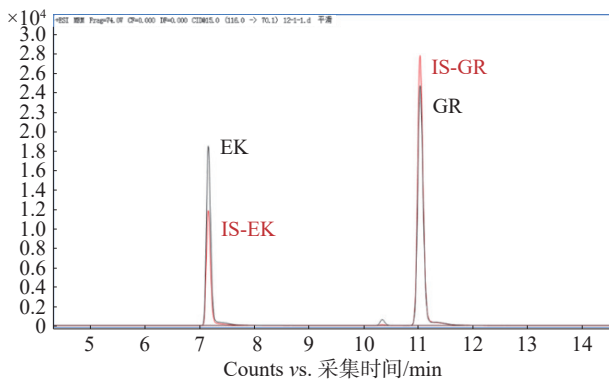


图 7 特征肽 EK 和 GR 的总离子流色谱图
Fig.7 Total ions chromatogram of signature peptides EK and GR

图 8(a) 和 (b) 分别为不同酶解时间和不同胰蛋白酶用量下特征肽与同位素内标的质谱积分峰面积比的变化趋势, 在胰蛋白酶与 SAA 的质量比为 1:1, 酶解时间为 8 h 时获得最大酶解效率。

SAA 酶解产物经 Agilent 6410 液质联用仪检测特征肽与同位素标记特征肽质谱积分峰面积, 根据式(3)、(4)计算 SAA 的含量。

$$c_{SP} = \frac{m_{IS}[R_{样}(I_1 - I_2) - (I_1R_2 - I_2R_1)]}{m_{SAA}(R_1 - R_2)} \quad (3)$$

式中, c_{SP} 是特征肽的浓度, g/g; m_{IS} 是样品中加入的同位素内标溶液的质量, g; $R_{样}$ 是样品中特征肽与同

位素标记特征肽的峰面积比值; I_1 是低标溶液中特征肽与同位素标记特征肽的质量比; R_1 是低标溶液中特征肽与同位素标记特征肽的峰面积比; I_2 是高标溶液中特征肽与同位素标记特征肽的质量比; R_2 是高标溶液中特征肽与同位素标记特征肽的峰面积比; m_{SAA} 是 SAA 溶液的质量, g。

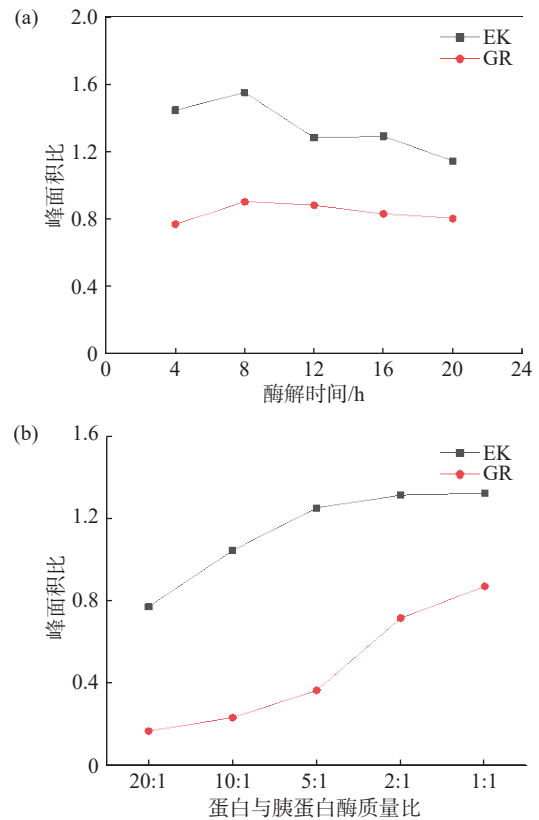


图 8 不同酶解时间 (a) 和胰蛋白酶 (b) 用量对 SAA 酶解效率的影响
Fig.8 Effect of different (a) reaction time and (b) trypsin usage on SAA digestion reactions

$$c_{SAA} = \frac{M_{SAA}C_{SP}}{M_{SP}} \quad (4)$$

式中, c_{SAA} 是 SAA 溶液的浓度, g/g; M_{SAA} 是 SAA 的相对分子质量, Da; M_{SP} 是特征肽的相对分子质量, Da。

SAA 的 SP-IDMS 定值结果如表 3 所示, 对 4 个平行样品重复测定 3 次, 结果取平均值为 9.41 μg/g, RSD 为 0.49%。

2.4 方法一致性评价

2.4.1 方差齐性检验——F 检验法

通过式(5)分析 AAA-IDMS 和 SP-IDMS 测定 SAA 浓度的方差齐性。

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2} \quad (5)$$

表 3 SP-IDMS 定量分析 SAA 结果
Tab.3 Quantitative detection results of SAA by SP-IDMS

序号	SAA 蛋白浓度(μg/g)		
	EK	GR	平均值
1	9.46	9.27	9.37
2	9.34	9.54	9.44
3	9.39	9.33	9.36
4	9.41	9.48	9.45
平均值	9.40	9.41	9.41
RSD	0.53%	1.34%	0.49%

式中, $S_1^2=0.0072$ 是 AAA-IDMS 定量 SAA 的组内方差; $S_2^2=0.0022$ 是 SP-IDMS 定量 SAA 的组内方差。

计算得 $F=3.27 < F_{0.01}(3,3)=29.5$, 表明两种方法测定 SAA 浓度结果等精度, 两组数据间无明显差异。

2.4.2 平均值一致性检验—— t 检验法

由 F 检验法已知 AAA-IDMS 和 SP-IDMS 测定 SAA 浓度得到的两组数据间精密密度不存在差异, 通过式(6)分析平均值一致性。

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}} \quad (6)$$

式中, \bar{x}_1 和 \bar{x}_2 分别为 AAA-IDMS 和 SP-IDMS 数据的平均值; n_1 和 n_2 分别为两组数据样本量。

计算得 $|t|=1.86 < t_{0.01}(6)=4.03$, 表明两种方法测定 SAA 浓度结果平均值具有一致性。

3 结论

本研究建立两种同位素稀释质谱法用于重组人 SAA 的准确定量。AAA-IDMS 通过对 SAA 水解产物中氨基酸 Phe、Ile、Pro 的检测, 计算得到 SAA 溶液的质量浓度为 $9.32 \mu\text{g/g}$ (RSD = 0.91%); SP-IDMS 通过对 SAA 酶解产物中特征肽 EK、GR 的检测, 计算得到 SAA 溶液的质量浓度为 $9.41 \mu\text{g/g}$ (RSD = 0.49%)。两种方法的定量结果一致, 精密密度无明显差异, 且均可通过所用的氨基酸标准物质溯源至 SI 单位。本研究为 SAA 参考测量程序的建立和纯度标准物质的研制奠定基础, 也为其他蛋白质标准物质的研制提供参考。

参考文献

[1] Kushner I. The phenomenon of the acute phase response[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1982, 399(1): 39-48.

[2] George H, Sack J. Serum amyloid A—a review[J]. *Molecular Medicine*, 2018, 24(1): 46-73.

[3] Uhlar CM, Whitehead AS. Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant[J]. *Eur J Biochem*. 1999, 265(2): 501-523.

[4] Yamada T. Serum amyloid A (SAA): a concise review of biology, assay methods and clinical usefulness[J]. *Clin Chem Lab Med*. 1999, 37(4): 381-388.

[5] Malle E, De Beer FC. Human serum amyloid A (SAA) protein: a prominent acute-phase reactant for clinical practice[J]. *Eur J Clin Invest*. 1996, 26(6): 427-435.

[6] Sellar G C, Jordan S A, Bickmore W A, *et al*. The human serum amyloid A protein (SAA) superfamily gene cluster: mapping to chromosome 11p15.1 by physical and genetic linkage analysis[J]. *Genomics*, 1994, 19(2): 221-227.

[7] Uhlar CM, Whitehead AS. Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur J Biochem*. 1999, 265(2): 501-523.

[8] Ye RD, Sun L. Emerging functions of serum amyloid A in inflammation. *J Leukoc Biol*. 2015, 98(6): 923-929.

[9] 中国中西医结合学会检验医学专业委员会. 血清淀粉样蛋白 A 在感染性疾病中临床应用的专家共识 [J]. *中华检验医学杂志*, 2019, 42(3): 186-192.

[10] 周齐洋, 黄建荣, 陈祥, 等. 血清淀粉样蛋白 A 化学发光免疫检测技术开发 [J]. *生物学杂志*, 2019, 36(4): 85-88.

[11] LIU X, YANG X, LI K. Fe₃O₄@Au SERS tags-based lateral flow assay for simultaneous detection of serum amyloid A and C-reactive protein in unprocessed blood sample[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2020, 320(17): 128350-128360.

[12] 姜剑巍, 杨宇, 应春妹. 乳胶增强免疫散射比浊法检测血清淀粉样蛋白 A 的应用评价 [J]. *检验医学*, 2015, 30(1): 49-52.

[13] Poole S, Walker D, Gaines Das RE, Gallimore JR, Pepys MB. The first international standard for serum amyloid A protein (SAA). Evaluation in an international collaborative study[J]. *J Immunol Methods*. 1998, 214(1-2): 1-10.

[14] 朱文, 倪鑫茹, 徐昇. 同位素稀释质谱法在蛋白质计量比中的应用 [J]. *计量测试与技术*, 2022, 49(7): 12-14.

[15] Liu J, Zhu W, Sun H, *et al*. Development of a primary reference material of natural C-reactive protein: verification of its natural pentameric structure and certification by two isotope dilution mass spectrometry[J]. *Anal Methods*. 2021, 13(5): 626-635.

[16] Wu J, Liu J, Sun H, *et al*. Absolute quantification methods for Prostate-Specific antigen by Isotope-Dilution mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2024 Apr 3;1240: 124112.

[17] 刘钰, 宋德伟, 张方彦, 等. 甲胎蛋白纯品的同位素稀释质谱法测定 [J]. *质谱学报*, 2017, 38(6): 7.

[18] 孙泽朋, 王洪彬, 陈金超, 等. 液相色谱-同位素稀释串联质谱法定量分析重组 N 末端 B 型利钠肽原 [J]. *分析化学*, 2023, 51(1): 120-129.

[19] Munoz A, Kral R, Schimmel H. Quantification of protein calibrants by amino acid analysis using isotope dilution mass spectrometry[J]. *Analytical Biochemistry*, 2011, 408(1): 124-131.

- [20] 李永利, 高艳秋, 薛民杰, 等. 基于液相色谱-同位素稀释质谱法测定氨基酸的蛋白质定量方法 [J]. [同位素](#), 2023, 36(6): 598-604.
- [21] 孙雪晴, 胡高飞, 宋德伟, 等. 高效液相色谱-同位素稀释-串联质谱法测定人源瘦素的含量 [J]. [质谱学报](#), 2015, 36(1): 7.
- [22] 燕茹, 林婧, 陈心硕, 等. 重组人白介素-2 标准品的表征及同位素稀释质谱法定量测定 [J]. [中国计量](#), 2023(11): 96-102.
- [23] 李佳乐, 武利庆, 金有训, 等. 人血清白蛋白纯品含量的同位素稀释质谱方法研究 [J]. [计量学报](#), 2016, 37(3): 328-332.
- [24] HUYNH H H, BŒUF A, DERBEZ-MORIN M, *et al.* Development of an antibody-free ID-LC MS method for the quantification of procalcitonin in human serum at sub-microgram per liter level using a peptide-based calibration[J]. [Analytical and Bioanalytical Chemistry](#), 2021, 413(19): 4707-4725.
- [25] 张春鹏, 宋德伟, 孙巍, 等. 重组 C-反应蛋白的纯化与肽标记的同位素稀释质谱测定 [J]. [生命科学仪器](#), 2016(1): 4.

本文编辑: 江迪