

马匹中生长激素滥用：IGF-1 质谱识别和定量程序的初步评价

Schalk S. de Kock*, John P. Rodgers and Beatrix C. Swanepoel

The Laboratory of the Jockey Club of Southern Africa, PO Box 74439, Turffontein 2140, South Africa

前面研究表明，类胰岛素生长因子1 (IGF-1) 是用于检测马匹生长激素 (GH) 滥用的一个很有前景的标记物。给药后 GH 浓度相对于本底浓度水平的大幅提高，意味着设定 IGF-1 的阈值来监测 GH 滥用是可能的。虽然免疫放射分析 (IRMA) 作为可靠的筛选方法已经被广泛认可，但需要开发一些特异的 IGF-1 的定量方法用于赛马管理机构的 GH 滥用起诉。本文描述了一个 LC-ESI-MS 方法，并对血清中低浓度 IGF-1 进行特异性分析，用于评价该方法。利用内源蛋白酶 Asp-N 酶解后，LC-MS 和 LC-MS/MS 表征，对 IGF-1 的结构识别进行了确认。接下来，通过内标法，把 IGF-1 作为未处理的分子进行了定量。

针对赛马中生长激素 (GH, 生长激素) 滥用的怀疑，目前已将更多的精力放到 GH 检测方法上，由于其半周期小于 15 min，这种激素的检测窗口非常短，因此需要识别其它可能的次级标记物进行研究。研究表明，对马或牛进行生长激素给药后，发现血浆中类胰岛素生长因子1 (IGF-1) 的浓度大大提高。IGF-1 是由 70 个氨基酸组成的、质量数为 7.5 kDa 的蛋白质，用于细胞生长和繁殖，在人体和马匹中其结构是相似的。相对于本底浓度，对纯种马 GH 给药后，IGF-1 浓度大大增加的重要性进行了研究。超过来自三个大洲的 2000 个赛马 (包含不同性别、年龄)，对 IGF-1 的浓度进行了检测，平均浓度为 310 ng/ml。通过 GH 处理过的受体，IGF-1 大大超过其本底浓度，平均超过 4 倍。这清楚表明，设定 IGF-1 的阈值是可能的，血浆中设定在 700 ng/ml 左右，超过这个值，就表明 GH 滥用。

对于 IGF-1 的研究，人体中 IGF-1 免疫放射分析 (IRMA) 方法 (DSL-2800, Diagnostic Systems Laboratories, Webster, TX, USA) 验证后也适用于马血浆的分析，表明这个可靠、耐用方法适合作为检测马血浆中 IGF-1 是否超过阈值的筛选方法。但是，马血浆中的其它受体也可能与人类 IGF-1 抗体显示某些交联反应，这时这种免疫诊断分析的特异性就很难进行评价，对于 GH 滥用的起诉，需要更特异、更准确的 IGF-1 定量方法，方法学上也要求证明被定量的物质就是 IGF-1，也就是具有高度的特异性。质谱被证明特别适合于这类分析，也经常用于检举和起诉的目的。

本文研究了一个 LC-ESI-MS 方法，用于血浆中低浓度 IGF-1 的定量，为了确保被定量的物质是 IGF-1，至少在部分上说明这个蛋白质的结构是必要的。选择的鉴定方法，包括蛋白质的酶解，酶解后的多肽大部分成为合适的小分子 (10 个氨基酸残基或更小)。串联质谱实验 (MS/MS) 得到更多碎片能够与酶解的肽结构关联起来。酶解肽的色谱分离的保留时间，结合分子量，必须与 IGF-1 标准品符合。另外，这些肽的 MS/MS 碎片质谱图也必须与期望的结构一致，必须与 IGF-1 标准品得到的结果一致。

与 IGF-1 相关的化合物，Arg³-IGF-1 作为内标，它是市场上可以买到的高纯度研究级蛋白质。利用精氨酸残基 (Arg³) 取代存在马体中 IGF-1 的一个氨基酸残基 (Glu³)。IGF-1 的多细胞抗体与这个内标具有高的交联反应，意味着可实现有效的亲和色谱分离，由于 IGF-1 与 Arg³-IGF-1 的结构不同，这个极性差别使 HPLC 分离成为可能，为 IGF-1 的定量提供了基础。

实验部分

试剂

重组 IGF-1 (受体级) 和重组 Arg³-IGF-1 (受体级) 来自于 GroPep (Adelaide, Australia)。内源蛋白酶 Glu-C (V8 蛋白酶) 和内源蛋白酶 Asp-N 均为测序级采购自 Roche Diagnostics (Mannheim, Germany)。乙腈和甲醇来自 Riedel-de Haen (Seelze, Germany)。二硫代苏糖醇和三氟乙酸来自

Sigma (St. Louis, MO, USA), 乙酸氨来自Merck (Darmstadt, Germany)。

IGF-1的内源蛋白酶Glu-C酶解

方法参考先前使用IGF-1酶解方法。将重组IGF-1 (20 ug) 溶解在500 ul乙酸氨缓冲溶液 (50 mM, pH 6.7) 中, 以1: 1 (酶/底物) 比例将内源蛋白酶Glu-C加入, 接下来在37°C培养40 h, 然后加入三氟乙酸使其最终浓度达到0.5% (终止酶解反应), 最后将样品保存在-8°C下。样品仅仅在需要定性分析前进行解冻。

IGF-1的内源蛋白酶Asp-N酶解

下面的酶解程序基于前面描述的方法。将重组IGF-1 (20 ug) 溶解在500 ul乙酸氨缓冲溶液中 (50 mM, pH 8.0), 以1: 200 (酶/底物) 的比例加入Asp-N, 接下来在37°C下培养15 h, 为了减少酶解肽中的二硫键合, 添加二硫代苏糖醇使其浓度达到4 mM, 30 min后加入三氟乙酸使其最终浓度达到0.5%, 最后保存在-8°C条件下。样品仅仅在需要定性分析前进行解冻。

液相色谱

HP 1090系列II型HPLC (Palo Alto, CA, USA), 每个研究使用不同的流动相组成, 这在相关的部分进行了描述。流速为250 ul/min, 在柱前利用Upchurch Scientific分流器 (Oak Harbor, WA, USA) 进行分流, 使进入Jupiter C18 250 x 1 mm i.d., 5 um, 300 Å色谱柱 (Phenomenex, Torrance, CA, USA) 的流速为50 ul/min, 色谱分离在40°C条件下进行。

质谱

HPLC流动相通过ESI接口引入到Finnigan LCQ离子阱质谱 (Thermo, San Jose, CA, USA), LCQ质谱具有MSⁿ分析能力, 利用Xcalibur软件控制。全部分析过程的离子源电压为4.50 kV, 毛细管温度为200°C。鞘气流为60 units、辅助气流为1 unit。离子捕获时间手动设定为100 ms、使用3个扫描时间段。对于MS/MS分析, 母离子隔离宽度为3 Th、碰撞能为35%。

IGF-1的定性分析方法

HPLC流动相: 1%甲酸的水溶液 (A) 和1%甲酸的乙腈溶液 (B)。梯度条件: 3%B运行5 min后, 在45 min内增加到60%, 然后在5 min内增加到90%, 最后保持5 min。对于两个IGF-1酶解样品, 分别进样5 ul进行分析。扫描范围 m/z 300- 1500进行全扫描分析, 利用Pepcut功能 (Xcalibur Bioworks, Thermo, San Jose, CA, USA) 分析内源蛋白酶酶解多肽的电荷状态和质量数。选择每个酶解肽的丰度最大的多电荷离子最为母离子, 进行碰撞研究进行MS/MS实验。利用Sequest软件 (Thermo Xcalibur Bioworks) 测定观察碎片和理论碎片的相关性。

IGF-1的定量分析方法

使用等度HPLC流动相: 1%甲酸水/乙腈 (73: 27, v/v)。IGF-1和Arg³-IGF-1的混合样溶解在流动相中最为校正样, 取2 ul注入HPLC, 用于测试结果中ng量的指示。 m/z 940- 1300的全扫描分析适用于IGF-1和Arg³-IGF-1, 利用Thermo的Xcalibur Bioworks蛋白质软件, 对多电荷蛋白质信号进行去卷积处理, 得到质谱的中性分子量。

结果和讨论

IGF-1的定性分析方法

对于低含量的IGF-1的酶解, 使用不同的水解酶并对结果进行了评价。对蛋白的消解来说, 胰岛素是最常使用的。然而结果表明: 酶解率低、无法识别的非特异性酶裂解。这些也能在胰凝乳蛋白酶和胃蛋白酶酶解方法中发现。氰溴酸处理导致蛋白质复性的低产率, 而嗜热菌蛋白酶酶解是不完全的。低的酶解产率和非特异性酶解可能是由于IGF-1的三个二硫键在空间上限制了蛋白分解酶接近理论分裂位点。没经过还原的衍生过程, 可观察到二硫键的重组现象。在接下来的研究中, 利用二硫代苏糖醇还原二硫键, 自由巯基利用碘乙酸进行乙酰基化, 或利用次乙亚胺进行乙氨基化, 或利用乙烯基

吡啶进行吡啶亚基化衍生。在典型低浓度IGF-1的血浆中，衍生是不完全的或者IGF-1衍生物的产率太低，以至于不能得到需要的灵敏度，样品也显示了很高的质谱分析背景。接下来研究集中在水解酶上，酶解未还原（二硫键未动）的IGF-1，得到具有高产率的几个酶解肽，然后未动的二硫键利用后水解进行还原。

研究采用IGF-1的内源蛋白酶Glu-C酶解，酶作用在谷氨酸残基的羧酸链进行断裂，利用内源蛋白酶Glu-C对非还原的IGF-1的酶解得到7个酶解物，这些可通过全扫描LC-MS观察到（表1）。除了预期得到的酶解产物，在IGF-1的Gly³²、Asp¹²、Asp²⁰和Asp⁵³位羧基端的非特异、重复断裂也能被观察到。其中的两个三肽，对于IGF-1仅仅给了有限的结构信息，而另外两个肽通过二硫键互相连接，正象在天然IGF-1观察到的一样。利用二硫代苏糖醇处理后，含自由巯基（还原的）肽的产率非常低，这些物质的MS/MS实验仅能得到有限的碎裂信息。

表1: IGF-1利用内源蛋白酶Glu-C酶解后LC-MS分析得到的肽段氨基酸序列

	Sequence Position	Assigned Sequence	Cleavage Site	LC/MS Rt (min)	[M + 1] ¹⁺	[M + 2] ²⁺	[M + 3] ³⁺	[M + 4] ⁴⁺
Peptide 1	1-3	GPE	Glu ³	7.39	302.5	—	—	—
Peptide 2	10-12	LVD	¹ Asp ¹²	22.68	346.2	—	—	—
Peptide 3	21-32	RGFYFNKPTGYG	¹ Gly ³²	39.36	1407.9	704.0	469.9	—
Peptide 4	33-46	SSRRAPQTGIVDE	Glu ⁴⁶	34.76	1503.3	752.0	502.2	—
Peptide 5	54-58	LRRLE	Glu ⁵⁸	29.54	686.4	343.9	—	—
Peptide 6	4-9 and 47-53	TLCGAE CCFRSCD	Glu ⁹ and ¹ Asp ²⁰	41.17	1423.6	711.2	474.7	—
Peptide 7	13-20 and 59-70	ALQFVCGD MYCAPLKPAKSA	¹ Asp ²⁰	41.13	—	1064.9	710.6	533.4

¹ Non-specific cleavage.

IGF-1利用内源蛋白酶Glu-C酶解后，给出IGF-1的一些结构信息，但这些特征仍不能满足现在研究需要，因此需要利用内源蛋白酶Asp-N对IGF-1进行酶解，这个酶能引起天冬氨酸残基的氨链断裂。接下来通过二硫代苏糖醇处理将二硫键还原。LC-MS分析表明，酶解和还原过程产生了7个含自由巯基的肽段，针对IGF-1序列的每个肽段，组合在一起代表了它的全序列（表2）。利用这些数据可以组建IGF-1的酶解图（见图1）。可以看到在Glu⁵⁸的氨基端具有非特异性断裂，而在其它的Glu残基上没有发现，可能是由于这个位置具有更易断裂的结构，因此得到了两个未预测到的肽段，肽段7是肽段6的一个Met⁵⁹氧化形态。150 ng酶解的IGF-1得到的LC-MS全扫描谱图（*m/z* 300- 1100）显示了很强的峰（图2a）。

表2: IGF-1利用内源蛋白酶Asp-N酶解后LC-MS分析得到的肽段氨基酸序列

	Sequence Position	Assigned Sequence	Cleavage Site	LC/MS Rt (min)	[M + 1] ¹⁺	[M + 2] ²⁺	[M + 3] ³⁺	[M + 4] ⁴⁺
Peptide 1	1-11	GPETLCGAELV	Asp ¹²	50.22	1088.3*	544.7	—	—
Peptide 2	12-19	DALQFVCG	Asp ²⁰	50.47	852.1*	426.6	—	—
Peptide 3	20-44	DRGFYFNKPTGYSSRRAPQTGIV	Asp ⁴⁵	44.63	—	1381.2*	921.4	691.4
Peptide 4	45-52	DECCFRSC	Asp ⁵³	40.02	962.2*	481.8	—	—
Peptide 5	53-57	DLRRL	¹ Glu ⁵⁸	37.29	672.3	336.8*	—	—
Peptide 6	58-70	EMYCAPLKPAKSA		41.33	—	705.0*	470.4	—
Peptide 7	58-70	² EMYCAPLKPAKSA		38.71	1424.2	713.0*	475.7	—

¹ Non-specific cleavage.

² Peptide oxidized at Met.⁵⁹

* Ions selected for LC/MS/MS experimentation.

IGF-1碎片峰的识别通过*m/z*信号相对预期得到的酶解肽段（图2b）的重组色谱图进行了确认，观察到的多电荷离子列在表2中，图3a和图3b分别显示了肽段3和肽段7的谱图。虽然肽段1和肽段2

北京绿绵科技有限公司

北京市北四环西路 68 号左岸工社 806-807 室
(100080)
Tel: 010- 8267 6061/2/3/4/5/6/7
Fax: 010- 8267 6068

沈阳市沈河区团结路 7-1 华府天地 1-8-11
(110001)
Tel: 024- 2387 8588/2387 3099
Fax: 024- 2387 3099

杭州市华星路嘉绿青苑 5 幢 3 单元 201 室
(310012)
Tel: 0571- 8765 8020/ 8717 8257
Fax: 0571- 8717 8257

在液相中没有实现基线分离（保留时间分别为50.22和50.47 min），但他们具有不同的质量数，因此在定量分析中不会影响结果。

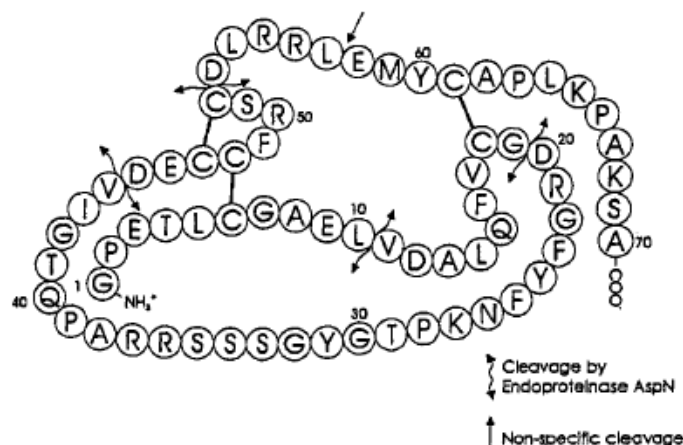


图1. 马匹中的IGF-1氨基酸序列，标示了内源蛋白酶Asp-N酶解位点（也包含非特异性酶解）

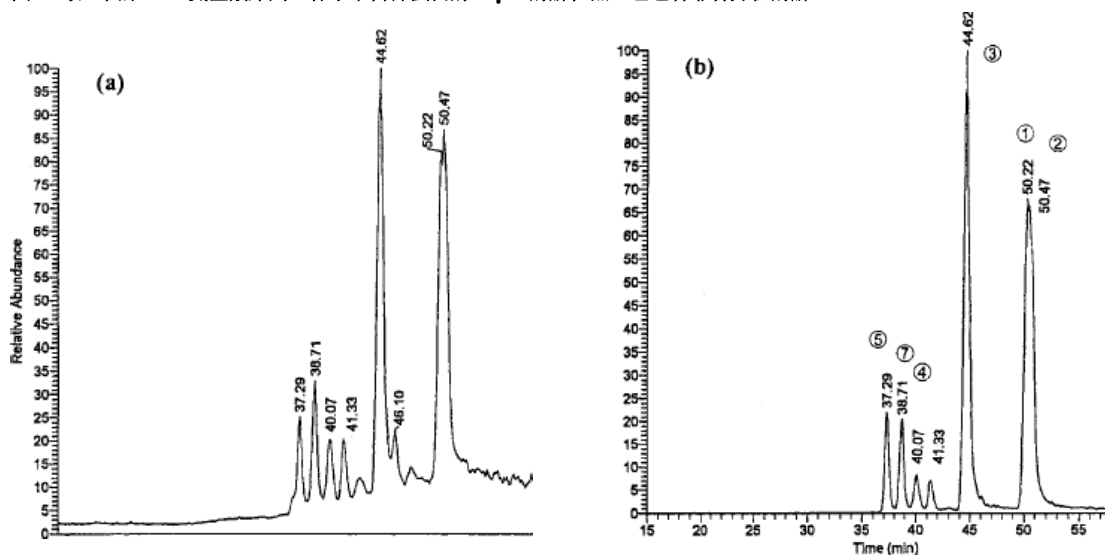


图2. (a) 150 ng IGF-1利用内源蛋白酶Asp-N酶解后的全扫描LC-MS图 (b) 7个酶解肽段的重组色谱图

就像前边利用MS/MS检测一样，接下来对还原的酶解物进行HPLC分析，对于每一个酶解肽段，双电荷离子（或者丰度更大的多电荷离子）被选择作为母离子，正象表2中列出的一样。MS/MS结果对于肽段的碎裂提供丰富的信息（表3）。既然肽段3（序列20-44，通过MS/MS得到结构信息通常分子尺寸是太大的）分析揭示了氨基酸残基在肽的羧基端。通过Xcalibur Bioworks Sequest软件，观察到的肽酶解碎片与IGF-1的理论碎片实现了很好的符合。肽段5和肽段1的碎片谱图作为例子显示在图4a和图4b。

IGF-1的定量分析方法

选择Arg³-IGF-1作为内标用于IGF-1的定量，该化合物在结构和分子量上与马中的IGF-1是高度相近的，它具有70个氨基酸残基，一个氨基酸残基（Glu³）被精氨酸残基（Arg³）取代。使用这个蛋白质作为内标，是由于它在分子尺寸上与IGF-1相似，而且IGF-1的多细胞抗体同Arg³-IGF-1也有很高的交联反应，当使用亲和色谱作为马血浆样品中IGF-1浓度检测的分离条件，这点是非常重要的方面。设计的IGF-1定量分析LC-MS方法，包含分析该蛋白质和未经任何处理的内标物。当分析复杂样品时，全扫描检测方法的选择性使共提取物的信号排除。然而，由于Arg³-IGF-1（7675.8）和IGF-1（7648.8）非常相近的分子量，这些蛋白的多电荷形式更加接近，因此这两个蛋白的色谱分离非常重要。由于内标在Arg³链端具有一个自由氨基（而IGF-1没有），因此这两个蛋白具有不同的极性。这个特点可通

过反相HPLC进行研究，实现了这两个相似化合物的基线分离，Arg³-IGF-1和IGF-1的保留时间分别为2.7 min和4.9 min。

表3. 内源蛋白酶Asp-N酶解肽段1-6得到的LC-MS/MS结果，理论离子碎片和仪器软件得到的理论结构

	Observed Ions	Theoretical Ions	Charge State		Software Assignment
Peptide 1	729.1	729.8	1	B ₉	GPETLCGA
	858.2	858.9	1	B ₉	GPETLCGAE
	971.1	972.1	1	B ₁₀	GPETLCGAEL
	1070.1	1071.2	1	B ₁₁	GPETLCGAELV
	711.1	711.8	1	B ₉₀	○GPETLCGA
	840.1	840.9	1	B ₉₀	○GPETLCGAE
	953.1	954.1	1	B ₁₀₀	○GPETLCGAEL
	1052.1	1053.2	1	B ₁₁₀	○GPETLCGAELV
	591.0	591.7	1	Y ₆ ⁺	CGAELV
Peptide 2	428.1	428.5	1	B ₄	DALQ
	575.1	575.6	1	B ₅	DALQF
	674.1	674.8	1	B ₆	DALQFV
	777.1	777.9	1	B ₇	DALQFVC
	834.1	835.0	1	B ₈	DALQFVCG
	656.2	656.8	1	B ₆₀	○DALQFV
	760.1	759.9	1	B ₇₀	○DALQFVC
Peptide 3	1323.3	1323.5	2	B ₂₄	DRGFYFNKPTGYGSSRRAPQTGI
	1372.2	1373.0	2	B ₂₅	DRGFYFNKPTGYGSSRRAPQTGIV
	1314.5	1314.5	2	B ₂₄₀	○DRGFYFNKPTGYGSSRRAPQTGI
	1363.3	1364.0	2	B ₂₅₀	○DRGFYFNKPTGYGSSRRAPQTGIV
Peptide 4	348.1	348.4	1	B ₃	DEC
	754.2	754.9	1	B ₆	DECCFR
	945.2	945.1	1	B ₈	DECCFRSC
	615.3	615.7	1	Y ₅ ⁺	CFRSC
	718.3	718.9	1	Y ₆ ⁺	C CFRSC
	847.2	848.0	1	Y ₇ ⁺	ECCFRSC
Peptide 5	271.3	271.3	2	B ₄	DLRR
	328.3	327.9	2	B ₅	DLRRL
	222.8	222.8	2	Y ₃ ⁺	RRL
	279.3	279.4	2	Y ₄ ⁺	LRRL
Peptide 6	695.8	695.8	1	B ₆	EMYCAP
	1104.4	1105.4	1	B ₁₀	EMYCAPLKPA
	1232.3	1233.5	1	B ₁₁	EMYCAPLKPAK
	473.2	473.5	1	Y ₅ ⁺	PAKSA
	811.3	812.0	1	Y ₆ ⁺	PLKPAKSA
	406.0	406.5	2	Y ₆ ⁺	PLKPAKSA
	882.4	883.1	1	Y ₉ ⁺	APLKPAKSA
	985.2	986.2	1	Y ₁₀ ⁺	CAPLKPAKSA
	1149.4	1149.4	1	Y ₁₁ ⁺	YCAPLKPAKSA

○ Loss of water.

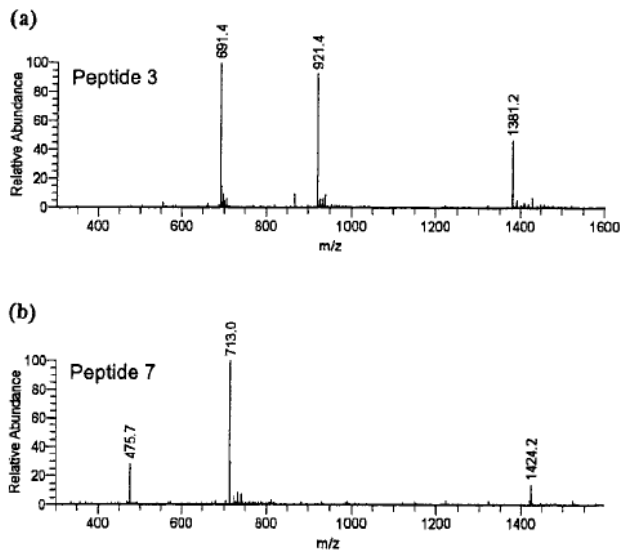


图3. IGF-1通过Asp-N酶解后得到的肽段3(a)和肽段(b)的全扫描质谱图

这些蛋白质的质谱图显示了6和8质子化作用（6-8个正电荷），最强峰是[M+7H]⁷⁺，观察到IGF-1

的质核比是 m/z 1093.4 (理论值 m/z 1093.5), Arg³-IGF-1的质核比是 m/z 1097.2 (理论值 m/z 1097.5)。这些蛋白的质量数通过软件的去卷积选项进行了确认。为了定量,选择 m/z 940-1300的扫描范围,谱图包含了[M+6H]⁶⁺、[M+7H]⁷⁺和[M+8H]⁸⁺物质的信号,确认这些峰确实是IGF-1和内标的信号。 m/z 1093.4 (± 0.5)和1097.2 (± 0.5)的信号分别被选择用于IGF-1和内标的定量。IGF-1在30-500 ng (柱上浓度) 浓度范围内,利用IGF-1/内标的比例、内标浓度为200 ng (柱上浓度),得到了很好的线性,相关系数(R²)为0.9974 (n=6),见图5a和图5b。定量限(LOQ)在柱上浓度为30 ng 时进行了测试,即使在这么低的浓度下,也可观察到IGF-1和内标物高度特征谱图(见图5c和图5d)。更低浓度的线性没有进行测试。应用这个方法用于马血浆中IGF-1的定量成为目前研究的基础。

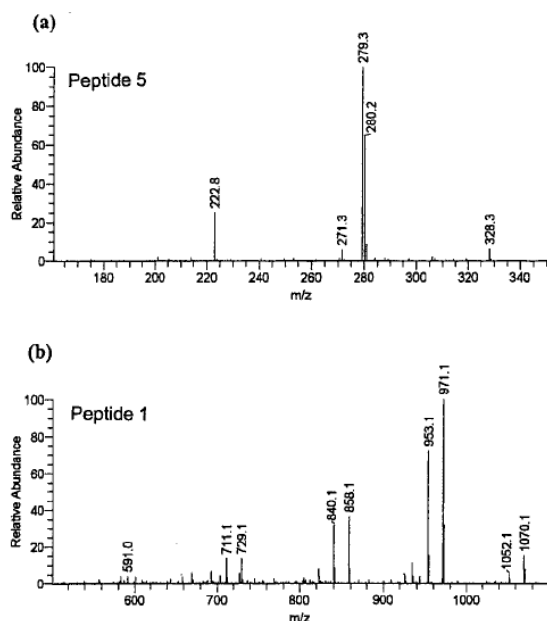


图4. 肽段5选择 m/z 336.8作母离子(a)和 肽段1选择 m/z 1088.3作为母离子(b)得到LC-MS/MS谱图

结论

本文开发了用于IGF-1定量的物质确定识别、IGF-1的定量方法。这包括在低浓度未还原(二硫键完好) IGF-1的酶解方法选择,为了得到自由巯基的酶解肽段,接下来进行酶解后还原这些二硫键 IGF-1利用内源蛋白酶Asp-N酶解后,接下来利用这种方式还原,然后进行全扫描LC-MS分析,可得到高度特征的色谱和质谱指纹谱图。为了清晰起见,给出了柱上浓度为150 ng (IGF-1)的分析结果,但浓度为20 ng得到的数据也很容易被解析。由于非特异的酶解反应,观察到两个酶解肽段,一个肽段也在蛋氨酸氧化态形式额外观察到,酶解肽段和预测的肽段是不一致的。酶解肽段的ESI-LC-MS/MS分析,表明得到的碎片与理论碎片(通过质谱计算机软件产生)具有很好的一致性。正确酶解肽段的关联技术,结合这些肽段的期望碎片,样品和IGF-1能被看作高度特异的识别方法。

开发了一个ESI-MS全扫描方法用于低浓度IGF-1的定量,使用Arg³-IGF-1作内标,在柱上浓度为30 ng (LOQ)到500 ng之间,得到了很好的线性。全扫描代替选择离子监测用于IGF-1和内标的定量,这不仅通过色谱保留时间,也通过特征的电喷雾质谱多电荷离子形式,使这些物质识别成为可能。

这个初级研究描述的方法,正被应用于马血浆中IGF-1的浓度检测。IGF-1的滥用阈值设定在700 ng/ml左右,并得到几毫升马血浆样品,这个方法很适用于IGF-1的高灵敏度定性分析与定量分析。

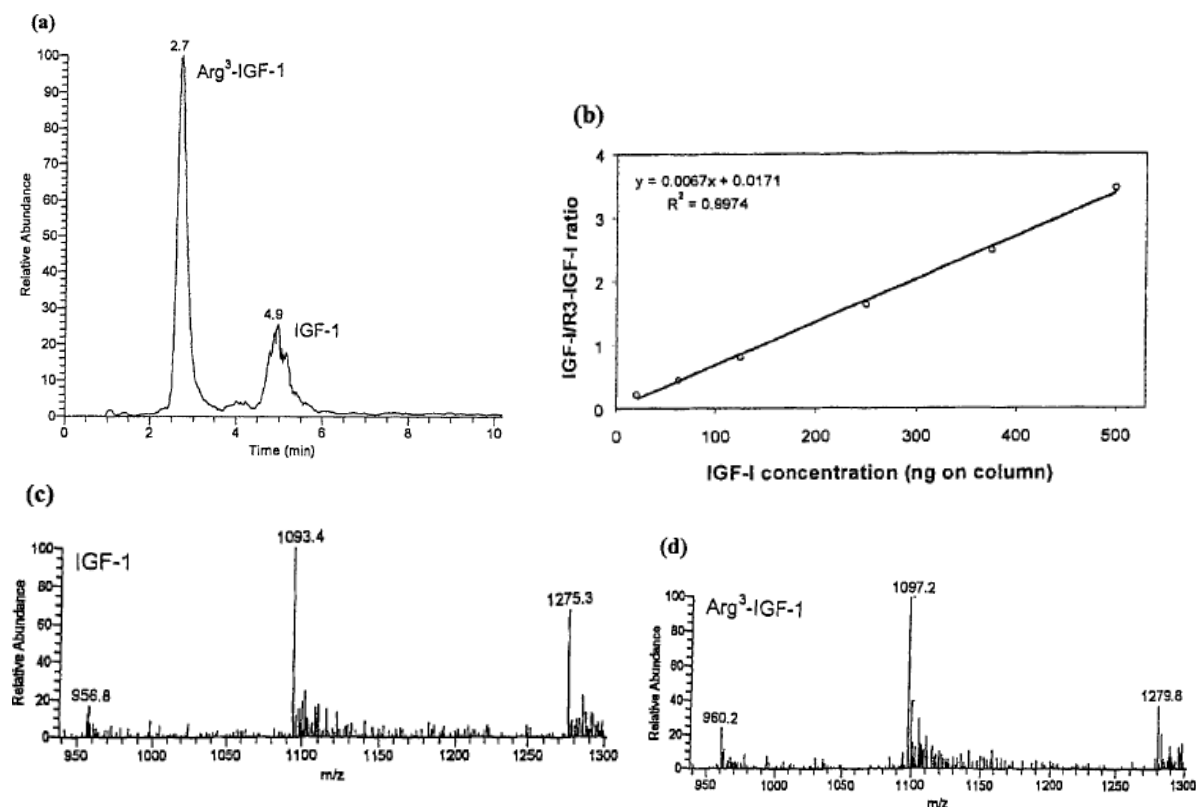


图5. Arg³-IGF-1(内标, 200 ng)和IGF-1标准品在LOQ为30 ng[M+7H]⁷⁺的LC-MS质谱图(a), IGF-1标准品的标准曲线(b), IGF-1在30 ng时的全扫描质谱图(多电荷离子峰)(c)和Arg³-IGF-1为200 ng时的全扫描质谱图(多电荷离子峰)(d)

参考文献

略