

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2021.07.01

· 临床研究技术 ·

电喷雾串联质谱法检测干血斑中谷氨酰胺、谷氨酸及其临床初步应用^{*}

王彦云,程威,洪冬洋,孙云,蒋涛(南京医科大学附属妇产医院 & 南京市妇幼保健院遗传医学中心,南京 210004)

摘要:**目的** 建立一种采用电喷雾串联质谱法(ESI-MS/MS)检测干血斑样品中谷氨酰胺(Gln)和谷氨酸(Glu)含量的方法,评价其用于筛查新生儿鸟氨酸氨甲酰转移酶缺乏症和氨甲酰磷酸合成酶缺乏症的可行性。**方法** 收集 2020 年 6—9 月新生儿筛查足跟血干血斑样品,用非衍生化串联质谱检测试剂盒萃取样品,完成常规串联质谱检测项目后,将残余样品作为 Gln 和 Glu 的检测对象,复溶后选择正离子扫描模式进行分析测定,统计分析 ESI-MS/MS 检测 Gln 和 Glu 的正确度、精密度和稳定性,并评价其临床应用。**结果** Gln 在 125~1 250 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内回收率和正确度均良好,回收率为 98.01%~107.24%,偏倚为 0.56%~4.8%;Glu 在 250~1 250 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内回收率良好,回收率为 102.06%~113.65%,在 250~1 250 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内正确度良好,偏倚为 0.09%~7.67%。Gln 精密度良好,Glu 精密度稍差。稳定性实验证实样品复溶前后,Gln 差异无统计学意义,但 Glu 差异有统计学意义。结合 Gln 和 Glu 检测结果,6 份鸟氨酸氨甲酰转移酶缺乏症确诊患儿干血斑样品检出率为 100%,并确定 Gln 的参考区间为<106.63 $\mu\text{mol/L}$,Glu 的参考区间为<188.24 $\mu\text{mol/L}$ 。**结论** 成功建立了检测 Gln 和 Glu 的 ESI-MS/MS 法,该方法操作简单、成本低,不影响临床常规检测。

关键词:电喷雾串联质谱;干血斑;谷氨酰胺;谷氨酸;鸟氨酸氨甲酰转移酶缺乏症;氨甲酰磷酸合成酶缺乏症

中图分类号:R446

文献标志码:A

Analysis of glutamine and glutamate in dry blood spots with electrospray ionization-tandem mass spectrometry and its clinical application

WANG Yanyun, CHENG Wei, HONG Dongyang, SUN Yun, JIANG Tao (Center for Genetic Medicine, Women's Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing Maternity and Child Health Care Hospital, Nanjing 210004, Jiangsu, China)

Abstract: **Objective** To establish a electrospray ionization-tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) method for the determination of glutamine (Gln) and glutamate (Glu) in dry blood spots, and provide its feasibility for screening of ornithine transcarbamylase deficiency and carbamoyl phosphate synthetase deficiency in neonatals. **Methods** The dry blood spots samples were collected from newborn during the period from June to September, 2020. The dry blood spots samples were processed with Non-derivatized MS/MS kit. Following the routine MS/MS detection, the residual sample was used for the detection of Gln and Glu. The residual samples were dissolved in extraction solution, then were detected by ESI-MS/MS with positive ion scanning mode. The accuracy, precision, stability of the method were verified and clinical application and evaluated. **Results** The recovery and accuracy of Gln were good in the range from 125 to 1 250 $\mu\text{mol/L}$ (recovery: 98.01% to 107.24%, bias: 0.56% to 4.8%). The recovery of Glu was good in the range from 250 to 1 250 $\mu\text{mol/L}$ (recovery: 102.06% to 113.65%). The accuracy of Gln was good in the range from 250 to 1 250 $\mu\text{mol/L}$ (bias: 0.09%~7.67%). The stability test confirmed that no statistically significant difference of Gln levels before and after reconstitution was found, but the difference of Glu levels was statistically significant before and after reconstitution. Combined with the results of Gln and Glu in 6 ornithine transcarbamylase deficiency positive dry blood spots samples, the diagnostic accuracy was 100%. The reference intervals of Gln and Glu were set as<106.63 $\mu\text{mol/L}$ and<188.24 $\mu\text{mol/L}$ respectively. **Conclusion** The research successfully established a method for detecting Gln and Glu by ESI-MS/MS in DBS, which is simple, low-cost and without interference in routine clinical detection.

Key words: electrospray ionization-tandem mass spectrometry; dry blood spots; glutamine; glutamic acid; ornithine transcarbamylase deficiency; carbamoyl phosphate synthetase deficiency

^{*} 基金项目:国家重点研发计划(2017YFC1001703,2018YFC1002402);南京市卫生局课题(YKK19118)。

作者简介:王彦云,1984 年生,女,主管技师,硕士,主要从事遗传代谢病的筛查和诊断工作。

通信作者:蒋涛,主任技师,E-mail:jiangtao6310@126.com;孙云,副主任医师,E-mail:sunyun80@126.com。

氨甲酰磷酸合成酶、鸟氨酸氨甲酰转移酶、精氨酸琥珀酸合成酶、精氨酸琥珀酸裂解酶、精氨酸酶和鸟氨酸- δ -转氨酶缺乏可导致先天性尿素循环障碍性疾病(urea cycle disorders, UCD)^[1]。鸟氨酸氨甲酰转移酶缺乏症(ornithine transcarbamylase deficiency, OTCD)是最常见的 UCD, 其发病率约为 1/56 500^[2]。氨甲酰磷酸合成酶缺乏症(carbamoyl phosphate synthetase deficiency, CPSD)与 OTCD 同属于 UCD。OTCD 和 CPSD 均表现为血浆氨、谷氨酰胺(Gln)增高, 精氨酸(Arg)和瓜氨酸(Cit)降低^[3]。CPSD 与 OTCD 致死、致残率较高, 患儿血液中 Cit 可作为筛查指标。2019 年《新生儿疾病串联质谱筛查技术专家共识》^[4]将 OTCD 和 CPSD 纳入新生儿遗传代谢病筛查病种。

电喷雾串联质谱(electrospray ionization-tandem mass spectrometry, ESI-MS/MS)技术可以同时检测干血滤纸片样品中的 11 种氨基酸, 分别为丙氨酸(Ala)、Arg、Cit、甘氨酸(Gly)、亮氨酸(Leu)、蛋氨酸(Met)、鸟氨酸(Orn)、苯丙氨酸(Phe)、脯氨酸(Pro)、酪氨酸(Tyr)、缬氨酸(Val)。国内大部分新生儿筛查中心当前均采用串联质谱技术, 通过检测干血斑中 Cit 浓度来筛查新生儿 OTCD 和 CPSD, 暂未见用 ESI-MS/MS 技术检测干血斑中 Gln 和谷氨酸(Glu)^[5]。在实际临床应用中, 依赖 Cit 浓度筛查 OTCD 和 CPSD 的灵敏度不足 50% 且假阳性率高^[6]。本研究拟建立一种用 ESI-MS/MS 技术检测 Gln 和 Glu 的方法, 该方法不影响常规临床检测、不额外消耗干血斑样品量。本研究将该方法应用于筛查新生儿 OTCD 和 CPSD, 并初步制定本地区新生儿 Gln 的参考区间, 为 OTCD 和 CPSD 的新生儿

筛查提供依据和参考。

1 材料与方法

1.1 标本来源 2020 年 6—9 月南京市新生儿遗传代谢病筛查足跟血干血斑样品。本研究获得南京市妇幼保健院医学伦理委员会批准(文号: 宁妇伦字[2018]93 号), 新生儿的监护人均签署知情同意书。

1.2 主要试剂与仪器 非衍生化串联质谱检测试剂盒(美国 PE 公司); 甲醇(色谱级, 货号 1060075000, 德国默克公司); XTQD 电喷雾串联质谱检测系统(美国 Waters 公司); 8 通道微量移液器(Thermo 公司); 纯水仪(杭州万洁公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本前处理 非衍生化串联质谱检测试剂盒内含流动相、萃取液、11 种氨基酸内标、琥珀酰丙酮内标和 13 种酰基肉碱内标。首先用该试剂盒进行标本前处理, 然后进行常规串联质谱检测, 再用萃取液进行复溶后用 ESI-MS/MS 技术检测 Gln 和 Glu。ESI-MS/MS 技术检测干血斑 Gln 和 Glu 的流程见图 1。

将 3 mm 干血滤纸片(相当于 3.2 μ L 全血)置于温育用 96 孔 U 形板中, 每孔加入 100 μ L 萃取液和内标混合液, 密封后 45 $^{\circ}$ C 恒温震荡 45 min, 然后将上清液(约 75 μ L)转移至检测用 96 孔 V 形板中, 铝膜覆盖, 室温静置 2.5 h, 即可上样进行常规检测, 每份样品进样量为 15 μ L。常规检测流程结束后, 每孔残余样品中加入 60 μ L 萃取液, 铝膜覆盖, 室温震荡 10 s 混匀后即可上样检测 Gln 和 Glu。每份样品进样量为 30 μ L。

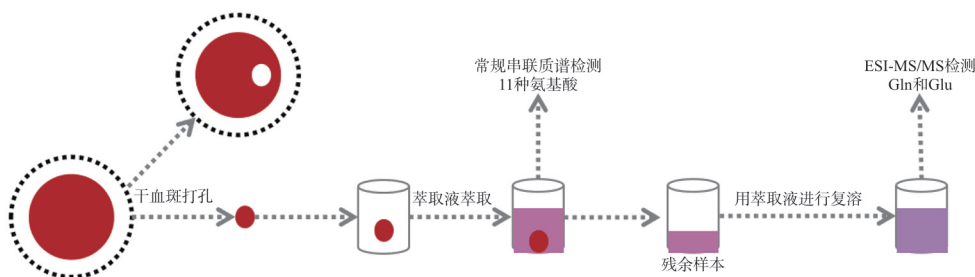


图 1 ESI-MS/MS 技术检测干血斑 Gln 和 Glu 的流程

1.3.2 质谱条件 采用 XTQD 电喷雾串联质谱检测系统, 采用正离子扫描模式, 扫描时间为 1.5 min, 离子源温度设定为 150 $^{\circ}$ C, 脱溶剂气温度 500 $^{\circ}$ C, 脱溶剂气流速 850 L/h, 锥孔反吹气 50 L/h, Leu、Gln 和 Glu 离子采集通道分别为 135.1 $\rightarrow$ 89.1 m/z、

147.1 $\rightarrow$ 84.2 m/z、148.02 $\rightarrow$ 84.02 m/z。

1.3.3 内标选择 由于本研究直接使用残余样品溶液, 不再另行添加 Gln 和 Glu 的内标, 因此直接使用试剂盒中已经预添加的内标。当分析物没有相应的同位素内标时, 可参考“内标物的峰应尽可

能接近待测物的峰”原则^[4],本研究选定 Leu 内标 d3-Leu 为 Gln 和 Glu 的参考内标。

1.3.4 标准曲线 准确称取 1.845 mg Gln 和 1.839 mg Glu 溶解于 5 mL 纯水中,制备成 2.5 mmol/L 的混合工作液,加入适当体积的全血,最终工作浓度分别是 1 250、500、250、125、50 μmol/L。以待测物和内标物的浓度比作为横坐标,待测物和内标物的离子响应强度比作为纵坐标,绘制标准曲线,要求 R^2 不小于 0.990。

1.4 方法学评价 非衍生化串联质谱检测试剂盒可常规检测 11 种氨基酸,但只有 9 种氨基酸有商品化质控品,另外 2 种氨基酸均采用样本均数法作为室内质控的补充^[7]。因此,本研究也采用样本均数法对复溶后样品检测进行室内质控。在室内质控在控的情况下评价方法学性能。

1.4.1 加样回收率实验 取 2 份健康人的全血,以及加入 50、125、250、500、1 250 μmol/L Gln 和 Glu 的全血,均按照上述方法测定,计算回收率。回收率=(换算后测定浓度-基础浓度)/加样浓度×100%,回收率可接受标准为 70%~130%。

1.4.2 正确度 参考 CLSI EP15-A2 指南,检测 50、125、250、500、1 250 μmol/L 干血斑样品,计算检测值与理论值的相对偏倚。偏倚=(测定值-理论值)/理论值×100%,偏倚≤±30%为中国疾病预防控制中心(CDC)室间质控可接受水平。

1.4.3 精密度 参考 CLSI EP15-A2 指南,选高、低浓度水平样品,分别测定 20 次,后续每批实验重复测定 2 个浓度样品 2 次,验证精密度性能,以变异系数(CV)表示,CV<10%为可接受水平。

1.4.4 稳定性 通过常规串联质谱检测后剩余样品中 Gln 和 Glu 的检测,可以降低假阳性率。但剩余样品可能面临残留量偏少问题,因此需用试剂盒自带的萃取液进行复溶后检测。由于 Gln 不稳定,需明确未复溶样品和复溶后样品中 Gln 的差异。采用 2020 年 7 月连续编号的 255 份样品,完成常规串联质谱检测后,立即检测 Gln 和 Glu,检测完成后的样品立即进行复溶,每孔中直接加入 60 μL 萃取液,铝箔膜密封覆盖,室温震荡 10 s 混匀后进样。比较复溶前后样品中 Gln 和 Glu 的稳定性。

1.5 临床初步应用 检测 612 例复溶样品的 Gln 和 Glu,观察检测值的分布情况;确诊 OTCD 阳性样本共计 6 例,其中 3 例为患儿陈旧性初筛干血斑样品,另外 3 例是将患儿的冻存抗凝静脉血溶解后滴于空白滤纸片上,制备成干血斑样品后进行检测。

1.6 统计学分析 用 SPSS 22.0 统计软件进行。

2 结果

2.1 标准曲线 见图 2、3。在 50~1 250 μmol/L 范围内,Gln 标准曲线为 $Y=0.081\ 3X+0.330\ 8$, $R^2=0.998\ 6$;Glu 标准曲线为 $Y=0.076\ 1X+0.19$, $R^2=0.999\ 6$ 。

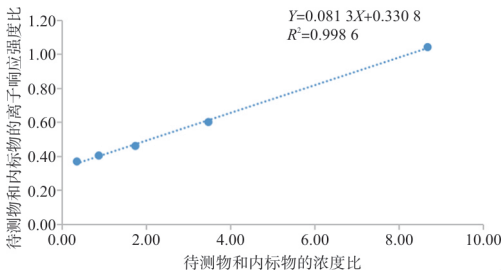


图 2 ESI-MS/MS 检测 Gln 的标准曲线

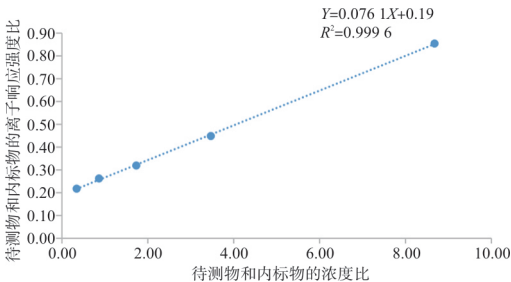


图 3 ESI-MS/MS 检测 Glu 的标准曲线

2.2 回收率 50、125、250、500、1 250 μmol/L Gln 的回收率分别为 170.90%、107.24%、98.16%、98.01%、101.15%,Gln 在 125~1 250 μmol/L 浓度范围内回收率良好。50、125、250、500、1 250 μmol/L Glu 的回收率分别为 191.22%、129.18%、113.65%、103.87%、102.06%,Glu 在 250~1 250 μmol/L 浓度范围内回收率良好。

2.3 正确度 50、125、250、500、1 250 μmol/L Gln 的偏倚分别为 56.16%、1.33%、4.80%、3.46%、0.56%,Gln 在 125~1 250 μmol/L 浓度范围内正确度良好。50、125、250、500、1 250 μmol/L Glu 的偏倚分别为 37.45%、7.67%、2.90%、1.50%、0.09%,Glu 在 125~1 250 μmol/L 浓度范围内正确度良好。

2.4 精密度 见表 1。Gln 精密度良好。

表 1 Gln 和 Glu 测定的重复性和期间不精密度

质控品	Gln		Glu	
	重复性* (n=38)	期间不精密度* (n=76)	重复性* (n=38)	期间不精密度* (n=76)
低浓度	7.07%	6.58%	11.28%	10.59%
高浓度	4.59%	4.33%	10.83%	9.84%

注:*,以 CV 表示。

2.5 复溶样品的稳定性 用 Mann-Whitney *U* 检验分析 255 例样品复溶前、后 Gln、Glu 检测结果, *P* 值分别为 0.148、0.000, 表明可用复溶样品检测 Gln。

2.6 临床初步应用 检测 612 例复溶样品的 Gln 和 Glu, 测定值呈偏态分布, 鉴于在 OTCD 和 CPSD 患儿中, Gln 均表现为增高, 因此偏态分布数据单侧参考区间取 *P*₉₅ 参考限, Gln 参考区间为 <106.63 μmol/L, Glu 参考区间为 <188.24 μmol/L。

表 2 中, 样品 1~3 是将低温保存的阳性静脉血样品复溶, 颠倒混匀后直接滴于空白滤纸片, 制备成干血斑后检测, Gln 明显增高, Glu 在参考区间内; 样品 4~6 均为 -20 ℃ 保存的陈旧性、阳性干血斑样品, 检测结果中 Gln 未见明显增高, 但 Glu 均明显增高。

表 2 OTCD 阳性样品 Gln 和 Glu 检测结果

编号	Gln(μmol/L)	Glu(μmol/L)
1	583.24	153.34
2	709.67	70.54
3	703.55	69.81
4	25.34	490.29
5	47.83	292.30
6	50.51	291.88

3 讨论

目前国内暂未发布针对尿素循环障碍的专家共识。根据国外 2002 年尿素循环障碍的指南^[8]以及 2012 年^[3]、2019 年^[9] 专家共识, Gln 筛查 OTCD 和 CPSD 的特异性、敏感性高于 Cit。但国内一些针对 OTCD、CPSD 的案例报道中, 描述为 Glu 增高。因此, 本研究除了检测 Gln, 还同步检测干血斑中 Glu。

根据 OTCD 阳性新鲜干血斑样品与陈旧干血斑样品对比结果, 新鲜样品中 Gln 升高, Glu 正常, 与国外指南描述一致; 而陈旧性样品中 Glu 升高, Gln 正常。结合文献分析, Gln 稳定性比 Glu 弱, Gln 的分解又称谷氨酰胺异化或谷氨酰胺降解, 是通过一系列的生化反应过程, 将 Gln 降解为 Glu、天门冬氨酸、二氧化碳、丙酮酸、乳酸、丙氨酸、柠檬酸等产物。因此, 陈旧样品中大量的 Gln 降解为 Glu, 导致了 Glu 异常增高; 提示在实际应用中, 应同时检测 Gln、Glu, 避免因干血斑样品保存不当而导致 Gln 表现为假阴性, 同步检测 Glu 可防止漏检。

采用完成常规质谱检测后的干血斑样品进行复溶, 在复溶样品中检测 Gln 与 Glu 还存在以下优

势: (1) 节约干血斑样品量和缩短检测时间。所有新筛样品均必须进行常规串联质谱检测, 用一次实验的成本已经同步将 Gln 和 Glu 成功从干血斑中萃取出来, 后续只需要用微量且极低成本的萃取液复溶后即可进样检测。采用剩余溶液复溶后立即检测 Gln, 可以在不增加干血斑样本量和试剂成本的前提下迅速完成 Cit 的二级筛查; (2) 降低假阳性率、提高阳性预测值。常规临床筛查工作中, 以 Cit 低于 6.0 或 Cit/Phe 低于 0.1 为界限统计, 初次筛查阳性率接近 1/100, 实际工作中 OTCD 与 CPSD 的发病率远低于该界限, 过高的阳性率会加重新生儿家属的心理负担并增加实验室的检测成本, 因此通过原始样品检测残留物进行二级筛查, 可以降低假阳性率、提高阳性预测值和降低检测成本。

本研究中虽然已经初步建立 Gln 和 Glu 的参考区间, 鉴于当前阳性样本例数过少, 后续工作中仍需积累阳性样本, 进一步评估该方法的性能。

4 参考文献

[1] Matsumoto S, Häberle J, Kido J, *et al.* Urea cycle disorders-update [J]. J Hum Genet, 2019, 64(9): 833-847.

[2] Silvera-Ruiz SM, Arranz JA, Häberle J, *et al.* Urea cycle disorders in Argentine patients: clinical presentation, biochemical and genetic findings [J]. Orphanet J Rare Dis, 14(1): 203.

[3] Häberle J, Boddaert N, Burlina A, *et al.* Suggested guidelines for the diagnosis and management of urea cycle disorders [J]. Orphanet J Rare Dis, 2012, 7: 32.

[4] 卫生部临床检验中心新生儿遗传代谢疾病筛查室间质量评价委员会. 新生儿疾病串联质谱筛查技术专家共识 [J]. 中华检验医学杂志, 2019, 42(2): 89-97.

[5] 吴波, 张玉琴. 鸟氨酸氨甲酰转移酶缺乏症的治疗及管理 [J]. 实用器官移植电子杂志, 2018, 6(6): 489-492.

[6] 杨艳玲, 常俊霞, 袁云, 等. 迟发型尿素循环障碍的临床与实验室研究 [J]. 中华神经科杂志, 2004, 37(2): 158-161.

[7] 洪冬洋, 王彦云, 孙云, 等. 患者数据移动均值法在新生儿遗传代谢病筛查项目室内质控的应用 [J]. 中华临床实验室管理电子杂志, 2019, 7(3): 169-172.

[8] Merritt JL 2nd, Brody LL, Pino G, *et al.* Newborn screening for proximal urea cycle disorders: Current evidence supporting recommendations for newborn screening [J]. Mol Genet Metab, 2018, 124(2): 109-113.

[9] Häberle J, Burlina A, Chakrapani A, *et al.* Suggested guidelines for the diagnosis and management of urea cycle disorders: First revision [J]. J Inheret Metab Dis, 2019, 42(6): 1192-1230.

(收稿日期: 2020-10-21)
(本文编辑: 王海燕)