

· 论著 ·

基于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术无需抗体富集直接检测血清 M 蛋白方法的建立

1 2 3 2 2 2 3 2 2
1 046000²
100020³ 266109
Email zr189169@163.com

【摘要】目的 基于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术(MALDI-TOF MS)技术建立一种无需抗体富集直接检测血清 M 蛋白的方法,并评估其检测效能。**方法** 方法学建立。收集在首都医科大学附属北京朝阳医院申请 M 蛋白鉴定检测的患者检验后剩余血清标本 712 份。用 TCEP 还原剂处理 IgG、IgA 纯品获得免疫球蛋白轻链,初步确定检测方法。收集 20 名健康体检人群检验后剩余血清标本,确定 κ 和 λ 轻链离子峰荷比范围。设置 8 个平行管和 8 个批次进行批内和批间重复性评价;选取 23 例 M 蛋白阳性标本进行 10 倍、100 倍和 200 倍稀释,采用所建 MALDI-TOF MS 方法检测 M 蛋白,评价灵敏度;采用 IFE、SPE 和 MALDI-TOF MS 3 种方法同时检测 M 蛋白,计算 MALDI-TOF MS 方法与 IFE 和 SPE 的符合率。**结果** 批内和批间重复性均为 100%;对 23 份 M 蛋白阳性标本的原倍、10 倍、100 倍和 200 倍稀释标本进行测定, MALDI-TOF MS 对 M 蛋白的检测限为 0.06~0.18 g/L;在 712 份标本中,以 IFE 为金标准, SPE 与 MALDI-TOF MS 总的符合率分别为 85.9% 和 92.3%, SPE 与 MALDI-TOF MS 的阳性符合率分别为 72.8% 和 99.7%;在 M 蛋白的不同型别中, MALDI-TOF-MS 在 IgA、IgD、IgM、游离轻链型和双克隆组中对 M 蛋白的检出率为 100%,而 SPE 对 IgM、IgA 和游离轻链型标本的检出率分别只有 66.7%、58% 和 19.5%;IgG 组有 1 份阳性标本 MALDI-TOF MS 未检出。对 23 份 M 蛋白阳性标本进行原倍、10 倍、100 倍和 200 倍稀释后,10 倍稀释时 MALDI-TOF MS 的检出率为 100%, IFE 为 96%;100 倍和 200 倍稀释时, IFE 的检出率分别为 MALDI-TOF MS 的 28% 和 23%。**结论** 本研究成功建立了血清 M 蛋白的 MALDI-TOF MS 检测方法,该法检测通量高、速度快,具有良好的灵敏度、特异性和符合率。

【关键词】 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; M 蛋白; 多发性骨髓瘤; 血清蛋白电泳; 免疫固定电泳

基金项目:北京市临床重点专科卓越项目(检验科);首都医科大学附属北京朝阳医院科技创新基金(ZZKJJZD-7)

Establishment of a direct detection method for serum M-proteins without antibody enrichment based on MALDI-TOF MS technology

Cui Ruifang¹, Zhang Shunli², Sun Dehui³, Wang Mo², Zhai Yuhua², Yue Yuhong², Zhou Xiaoguang³, Wang Qingtao², Zhang Rui²

DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20220505-00265

收稿日期 2022-05-05 本文编辑 唐栋

引用本文:崔瑞芳,张顺利,孙德慧,等.基于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术无需抗体富集直接检测血清 M 蛋白方法的建立[J].中华检验医学杂志,2022,45(10):1087-1092. DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20220505-00265.



¹Department of Clinical Laboratory, Heping Hospital Affiliated to Changzhi Medical College, Changzhi 046000 Shanxi, China; ²Department of Clinical Laboratory, Beijing Chaoyang Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100020, China; ³Intelligene Biosystems (Qingdao) Co., Ltd., Qingdao 266109, China

Corresponding author: Zhang Rui, Email: zr189169@163.com

【Abstract】 Objective To establish a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) method for the direct detection of serum M protein without antibody enrichment, and to assess its detection performance. **Methods** Method establishment. A total of 712 waste serum samples were collected from patients who applied for the M protein identification test in Beijing Chaoyang Hospital affiliated to Capital Medical University. The immunoglobulin light chain was obtained by reduction of IgG and IgA by TCEP, and the detection method was preliminarily determined. The waste serum samples from 20 healthy people were collected to determine the range of mass-to-charge ratios of κ and λ light chain ions. 8 parallel tubes and 8 batches were set up for intra- and inter-batch reproducibility evaluation. 10-fold, 100-fold and 200-fold diluted M protein from 23 positive samples were detected by established MALDI-TOF MS method, and its sensitivity was evaluated. 3 methods of IFE, SPE and MALDI-TOF MS were used to detect M protein simultaneously, and the coincidence rate between MALDI-TOF MS and IFE and SPE was calculated. **Results** The repeatability within and between batches was 100%, respectively. The original, 10-, 100- and 200-fold dilutions of 23 M protein-positive samples were determined, and the detection limit of MALDI-TOF MS for M protein was 0.06–0.18 g/L. IFE as the gold standard, the overall coincidence rates of SPE and MALDI-TOF MS were 85.9% and 92.3%, respectively, and the positive coincidence rates of SPE and MALDI-TOF MS were 72.8% and 99.7%, respectively, of the 712 samples. Among the different types of M-proteins, MALDI-TOF-MS agreed 100% with IFE M-protein results for IgA, IgD, IgM, free light chain type and biclonal group, while the agreements of SPE for IgM, IgA and free light chain samples were only 66.7%, 58% and 19.5%, respectively. One positive sample in the IgG group was not detected by MALDI-TOF MS. 23 M-proteins positive samples were diluted by original, 10, 100 and 200 times to access the sensitivity of MALDI-TOF MS method. The coincidence rate of MALDI-TOF MS was 100% and IFE was 96% at 10-fold dilution. The coincidence rate of IFE was 28% and 23% of MALDI-TOF MS at 100-fold and 200-fold dilution, respectively. **Conclusions** A MALDI-TOF MS method for the detection of serum M-proteins was successfully established. This method has the advantages of high detection throughput, fast speed, good sensitivity, specificity and coincidence rate.

【Key words】 Matrix-assisted laser desorption ionization tandem time-of-flight mass spectrometry; M-proteins; Multiple myeloma; Serum protein electrophoresis; Immunofixation electrophoresis

Fund program: Beijing Key Clinical Specialty Excellence Project (Clinical Laboratory); Science and Technology Innovation Fund of Beijing Chaoyang Hospital of Capital Medical University (ZZKJJD-7)

多发性骨髓瘤是血液系统第二大恶性肿瘤,以单克隆浆细胞在骨髓中恶性增殖并分泌大量异常单克隆免疫球蛋白及其片段(monoclonal protein, M蛋白)为特点^[1-2]。血清中出现 M 蛋白是多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)的突出特点,且 M 蛋白浓度与临床症状严重程度相关,故可作为 MM 的血清学肿瘤标志物^[3]。早期鉴定 M 蛋白,进行及时有效干预,并追踪疾病进程和治疗反应,是降低 MM 发病率和死亡率的重要手段^[4]。血清蛋白电泳(serum protein electrophoresis, SPE)和免疫固定电泳法(immune fixation electrophoresis, IFE)是多发性骨髓瘤的一线检测方法^[5-6],其在疾病诊断、监测和疗效评估方面发挥了重要作用。每个 M 蛋白都来

自克隆 B 细胞的重链和轻链位点的重组和体细胞过度突变产生。因此, M-蛋白既具有独特的氨基酸序列,又具有独特的分子量。常规的 M 蛋白检测方法如电泳法,无法依靠这些独特的 M 蛋白特征区分,主要是根据电泳迁移的区域进行判定,而基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术(matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)是基于蛋白质独特的分子量进行检测,且具有高通量、检测速度快及无携带污染等特点,非常适合作为 M 蛋白的理想测定方法^[7-9]。

近年来,随着质谱技术的快速发展及在临床检验中的广泛应用,采用质谱技术检测 M 蛋白成为研



究热点,应用 MALDI-TOF MS 技术进行 M 蛋白的测定已越来越受到人们的关注^[10-12]。为降低检测成本,简化检测流程,本研究拟建立一种无需抗体富集直接检测血清 M 蛋白的 MALDI-TOF MS 测定方法,用于多发性骨髓瘤的诊断和监测,并结合经过化疗等相关治疗的病例,初步探讨该法在疾病疗效评估中的临床价值。

材料与方法

一、材料

1. 血清标本:收集首都医科大学附属北京朝阳医院申请 M 蛋白鉴定检测的患者检验后剩余血清标本 712 份。这 712 份标本中 M 蛋白电泳阳性标本 367 份(其中 100 份仅为 IFE 阳性)和电泳阴性标本 345 份。M 蛋白阳性标本中 IgG 209 份、IgA 81 份、IgD 13 份、IgM 12 份、轻链 λ 型 25 份、轻链 κ 型 16 份,双克隆型 11 份。本研究已通过首都医科大学附属北京朝阳医院伦理委员会批准(伦理第 2021-科-263-1)。

2. 试剂:三(2-甲酰乙基)膦盐酸盐 [Tris-(2-carboxyethyl)-phosphine hydrochloride, TCEP]、Tris 缓冲液、三氟乙酸、HPLC 级乙腈、HPLC 级 4-乙酰氧基-3-甲氧基肉桂酸和 IgA、IgG 纯品购自美国 Sigma-Aldrich 公司,Optilite Freelite Kappa/Lambda 游离轻链检测试剂盒购自英国 Binding Site 公司,免疫球蛋白全组分抗血清试剂盒购自法国 Sebia 公司。

3. 仪器:本研究使用的主要分析系统包括 Quan TOF 宽谱定量飞行时间质谱仪(青岛融智生物)和 Optilite 特种蛋白分析仪(英国 Binding Site 公司)以及 Sebia HYDRASYS 全自动电泳仪(法国 Sebia 公司)和 Beckman IMMAGE 800 特种蛋白分析仪(美国 Beckman 公司)。

二、检测方法

1. M 蛋白的选择与鉴定:本研究对单克隆免疫球蛋白进行还原水解,将总的单克隆轻链作为最佳的 M 蛋白标志物。使用 IgA 纯品对标本中的 κ 和 λ 轻链进行鉴定和识别,确定待测物的相对分子质量范围。

2. 标本前处理:(1)稀释:血清标本 80 倍稀释;(2)还原:0.4 mol/L TCEP 溶液还原 20 min,标本稀释液与还原剂体积比为 4:1;(3)基质液复溶:10 g/L 的 4-乙酰氧基-3-甲氧基肉桂酸溶液(50% 乙腈+50% 0.1%TFA 水溶液)5 倍复溶。

3. MALDI-TOF MS 分析:(1)将上述 2.5 μl 基质

复溶液点于 96 孔靶板,每个标本点样时重复 2 次,靶板加热至结晶。(2)将点样好的靶板放入 MALDI-TOF MS 质谱仪,进行靶板位置校正,设置参数为:源电压 20 kV,激光频率 1 kHz,激光能量 9 μJ,采用线性阳离子模式,相对分子质量扫描范围 5 000~80 000,扫描速度 0.5 mm/s,样本分析时间 40 s/孔。(3)使用校准品对质谱仪进行校正,校正通过后进行标本质谱检测,使用 QuanTOF 软件进行谱图分析。

三、方法学评价

1. 轻链的鉴定:将免疫球蛋白纯品溶液 IgA 及 IgG 和健康人血清标本用 TCEP 还原剂处理后获得总轻链,进行 MALDI-TOF MS 检测,确定 κ 和 λ 轻链单电荷和双电荷离子质谱峰。选择 20 名健康人血清标本,按上述检测方法,进行 MALDI-TOF MS 测定,将 20 份 κ 和 λ 轻链单电荷和双电荷离子峰谱图叠加,验证 Kohlhagen 等提出的 κ 和 λ 轻链离子的质荷比范围。

2. 重复性评价:(1)批内重复性试验:将所选 M 蛋白阳性、弱阳性和阴性标本重复处理 8 次,即每个标本设 8 个平行管,每管于靶板点样 2 次,用建立的 MALDI-TOF MS 方法测定 3 份血清标本 8 个平行管中 M 蛋白,通过 8 次谱图结果叠加,评价方法的批内重复性。(2)将所选 M 蛋白阳性、弱阳性和阴性标本处理 8 个批次,即每批次处理 3 份标本,每份标本于靶板点样 2 次,用建立的 MALDI-TOF MS 方法测定 3 份血清标本 8 个批次中 M 蛋白,通过 8 次结果谱图叠加,评价方法的批间重复性。

3. 质量控制:每批次标本测定时设置阴性质控和阳性质控。阴性质控为经 IFE 和 SPE 检测为 M 蛋白阴性的健康人混合血清;阳性质控为经 IFE 和 SPE 检测为 M 蛋白阳性的 MM 患者混合血清。质控标准:阳性质控判读以在阴性对照背景下轻链单电荷质荷比范围出现明显尖峰为阳性在控;阴性质控判读以在上述条件下出现圆润高斯分布峰为阴性在控。

4. 灵敏度评价:选取 23 份经 IFE 和 SPE 检测为 M 蛋白阳性的标本,对每份标本进行 10 倍、100 倍和 200 倍稀释,采用 MALDI-TOF MS 对每份标本的原倍和不同稀释倍数的标本进行检测,评价所建 MALDI-TOF MS 方法对 M 蛋白的检测限。

5. 方法学比对:对收集的 712 份血清标本,分别采用 IFE、SPE 和 MALDI-TOF MS 3 种方法进行 M 蛋白检测,进行结果比对,计算 MALDI-TOF MS 方法与 IFE 和 SPE 的符合率。



结 果

一、M 蛋白的鉴定

总的单克隆轻链可能来源于游离轻链也可来源于完整的免疫球蛋白,需要充分检测所有单克隆成分,以保证方法学足够的灵敏度和特异性,故本研究选择总的单克隆轻链作为 M 蛋白进行检测。依据 20 份健康人血清标本的 κ 和 λ 轻链单电荷和双电荷离子峰叠加谱图,确定 κ 和 λ 轻链的单电荷和双电荷的 m/z 范围,见表 1,用于鉴定 M 蛋白。将健康对照和待测标本进行还原处理,测定游离和与重链结合的总轻链,将健康样本与待测标本谱图进行叠加,在轻链多克隆背景处见到显著的单克隆尖峰即为 M 蛋白阳性,否则为阴性,见图 1。

表 1 κ 和 λ 轻链 $[M+H]^+$ 和 $[M+2H]^{2+}$ 的质荷比范围

轻链类型	m/z	电荷状态
κ 链	23 100~24 400	$[M+H]^+$
	11 550~12 200	$[M+2H]^{2+}$
λ 链	22 400~23 100	$[M+H]^+$
	11 200~11 550	$[M+2H]^{2+}$

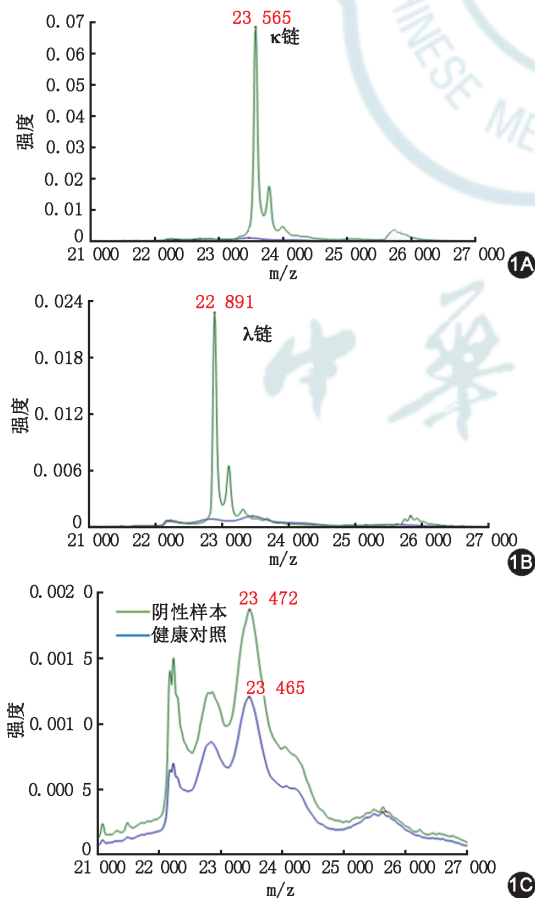


图 1 M 蛋白阳性和阴性标本谱图(1A 为 κ 型 M 蛋白质谱图,1B 为 λ 型 M 蛋白质谱图,1C 为阴性标本谱图)

二、方法学评价

1. 重复性:批内重复性:阳性、弱阳性和阴性样本的批内重复性一致率为 100%,将每份标本的 8 次重复测定结果进行叠图,目标峰重合性良好,峰型一致,符合要求。

批间重复性:阳性、弱阳性和阴性标本的批间重复性一致率达 100%,将每份样本的 8 次批间重复测定结果进行叠图,目标峰重合性良好,峰形一致,符合要求。

2. 灵敏度:采用 MALDI-TOF MS 和 IFE 方法分别对 23 例 M 蛋白阳性标本的原倍、10 倍稀释、100 倍稀释和 200 倍稀释样本进行测定,结果显示 MALDI-TOF MS 在每种稀释度下相较 IFE 都能以较高百分比鉴定出 M 蛋白,见图 2。其中,原倍时,100% 的标本都能被 MALDI-TOF MS 和 IFE 鉴定出来;10 倍稀释时,IFE 可以鉴定出 96% 的标本;100 倍稀释时,MALDI-TOF MS 和 IFE 对 M 蛋白的检出率分别是 91% 和 26%;200 倍稀释时,IFE 对 M 蛋白的检出率不到 MALDI-TOF MS 的 25%。其中,初始标本的 M 蛋白浓度范围为 12~79 g/L。基于血清 M 蛋白的初始值,MALDI-TOF MS 和 IFE 对 M 蛋白的检测限分别为 0.06~0.18 g/L 和 0.14~0.40 g/L。

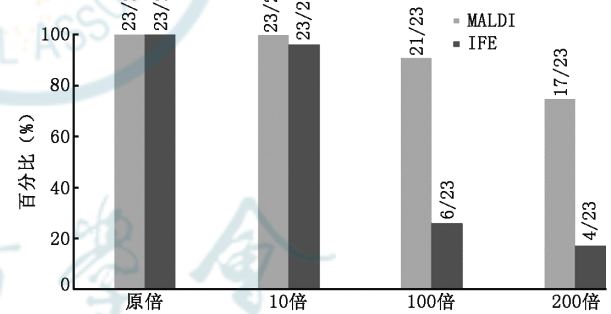


图 2 MALDI-TOF MS 和 IFE 对 23 份 M 蛋白阳性系列稀释标本的检出结果

三、方法学比对

对收集的 712 份血清标本,分别采用 IFE、SPE 和 MALDI-TOF MS 3 种方法进行 M 蛋白检测,比对结果见表 2。以 IFE 为金标准,SPE 的敏感度和特异度分别为 72.8% 和 100%,符合率为 85.9%;MALDI-TOF MS 的敏感度和特异度分别为 99.7% 和 84.3%,符合率为 92.3%。在 M 蛋白的不同亚型中,MALDI-TOF-MS 在 IgA、IgD、IgM、游离轻链型和双克隆组中对 M 蛋白的检出率为 100%,而 SPE 对 IgM、IgA 和游离轻链型标本的检出率分别只有 66.7%、58% 和 19.5%;IgG 组有 1 份阳性标本

表 2 MALDI-TOF MS 与 IFE、SPE 结果比对

IFE/SPE 组合	MALDI+	MALDI-	符合率(%)
IFE+/SPE+	266	1	99.6
IFE+/SPE-	100	0	100
IFE-/SPE-	54	291	84.3

MALDI-TOF MS 未检出。

四、M 蛋白检测方法的临床应用

在对 MM 随访患者的样本检测后经查阅病历发现,其中 1 例患者于 2018 年 4 月 10 日确诊 MM,SPE 和 IFE 检测 M 蛋白均为阳性;经 7 个月治疗后,M 蛋白水平明显下降,临床评估疗效为非常好的部分缓解,即 VGPR;后续患者经自体骨髓移植后,疗效进一步好转;1 年半后,患者自行停药;停药 1 个月后复查 M 蛋白,SPE 和 IFE 结果仍为阴性,此时临床评估疗效为严格意义的完全缓解,即 SCR,但 MALDI-TOF MS 结果为阳性;约 2 个半月后即 2020 年 10 月 10 日该患者再次复诊时 IFE 和 SPE 检测结果均转阴,临床评估为生化进展,MALDI 检测仍为阳性。可以看出,在病情变化时常规方法虽检测不到 M 蛋白,但 MALDI-TOF MS 能够检测到,可以提前预警 M 蛋白的出现,MALDI-TOF MS 可以比 IFE 和/或 SPE 更早的检测到 M 蛋白转阳(图 3),这从临床上验证了 MALDI-TOF MS 的检测灵敏度高于常规电泳技术。

讨 论

本研究建立了一种无需抗体富集直接检测血清 M 蛋白的 MALDI-TOF MS 方法,该法简易、灵敏、快速、通量高、成本低,所需标本量少(仅需 2 μl),便于在实验室推广应用。多发性骨髓瘤发病隐匿,

由于缺乏典型特异症状,常出现漏诊、误诊或就诊时已到疾病晚期^[13]。M 蛋白是其特异性生物标志物,在疾病早期对其进行准确测定对预后效果具有重要意义。选择总轻链测定作为 M 蛋白的代表标志物,比检测游离轻链更具可行性。采用 20 名健康人群进行 κ 和 λ 轻链的质荷比范围测定,与 Kohlhagen 等^[11]报道的结果相近。批间和批内重复性试验均显示本方法结果稳定、重复性好。对 23 份 M 蛋白阳性的样本进行不同倍数稀释,结果显示 MALDI-TOF MS 对 M 蛋白的检测灵敏度高于 IFE,这也解释了我们在对 712 份标本进行检测并与 IFE 结果比对时,有 54 份 IFE 结果为阴性的标本 MALDI-TOF MS 检测为阳性的现象。以 IFE 为金标准,比较 MALDI-TOF MS 和 SPE 对 M 蛋白的检测能力后发现,MALDI-TOF MS 的检出率为 99.7%,远高于 SPE 的 72.8%。尤其对于轻链型和 IgA 型 M 蛋白,SPE 的检出率明显低于 MALDI-TOF MS。这与文献[14-16]报道的 SPE 的方法学局限性是一致的,说明本研究所建方法可能弥补 SPE 对 IgA 和轻链型 M 蛋白漏检率高的缺陷。在对 1 例经治疗达到非常好的部分缓解患者的复诊时发现,SPE 和 IFE 持续保持阴性,在后续临床评估为严格意义的部分缓解时,SPE 和 IFE 依旧是阴性,而采用 MALDI-TOF MS 检测为阳性,该患者在 2 个多月后复诊,SPE 和 IFE 结果均为阳性,临床评估为生化进展,此时 MALDI-TOF MS 仍为阳性,提示本研究所建方法可以提前预警 M 蛋白,由于其检测灵敏度更高,所以可能比 IFE 和 SPE 更早地检测到 M 蛋白,这将为临床及时调整诊疗方案提供更有价值的诊断信息。

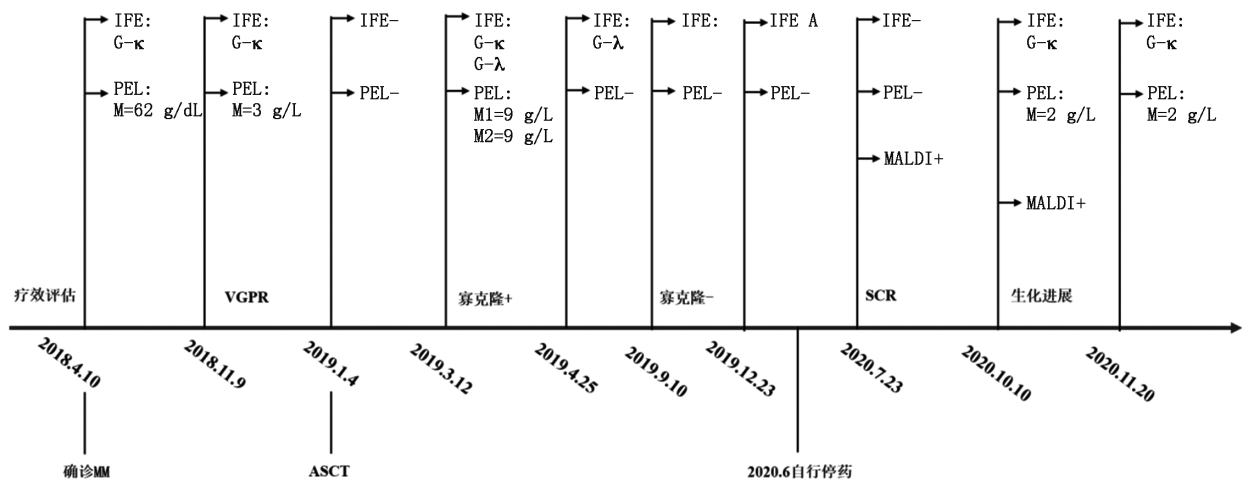


图 3 其中 1 例经治疗达到非常好的部分缓解患者后续 M 蛋白转阳(MALDI-TOF MS 比 SPE 和 IFE 提前 2 个半月检测到 M 蛋白转阳)

本研究无需抗体富集采用 MALDI-TOF MS 方法直接检测血清 M 蛋白与梅奥 Murray^[11] 学者团队通过抗体富集的方法定性检测血清 M 蛋白的方法学评价结果相近,甚至更优,这大大降低了检测成本、简化了检测流程,适于在临床进行 M 蛋白筛查的推广应用,但由于该方法为定性检测,使其在临床诊疗中发挥的应用价值有限。为此,本研究也曾尝试使用抗体富集进行相对定量研究,但选用多种抗体均效果不佳,文献[12]报道的抗体因无商品化供应限制了定量研究和比对研究,后续实验中会研究其他定量方法实现对 M 蛋白的相对或绝对定量,为临床疗效评估提供更准确的实验室信息。

综上所述,本研究建立了一种基于 MALDI-TOF MS 技术检测血清 M 蛋白的方法,该法无需抗体富集、直接检测血清中还原后的总轻链,每份标本谱图采集不到 1 min,1 次可以检测 96 份标本,远远高于 IFE 和 SPE 的检测容量,大大降低了检测成本、操作流程简易、对人员操作技术要求低、检测结果准确可靠、结果判读标准清晰,非常适合在实验室推广应用。同时,由于该方法相比 IFE 和 SPE 具有较高的灵敏度和特异性,因此在临床早期诊断、治疗监测、疗效评估和预后判断方面显示出潜在的应用价值。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 崔瑞芳:实验设计和实施、实验研究、采集数据、分析数据、撰写文章及统计分析;张顺利:实验研究、采集数据和分析数据;孙德慧:技术支持、采集数据和分析数据;王默:技术支持;翟玉华:采集数据和材料支持;岳育红:经费及材料支持;周晓光:实验设计、材料支持;王清涛:实验设计、经费及行政支持;张瑞:实验研究、经费及材料支持

参 考 文 献

- [1] van de Donk N, Pawlyn C, Yong KL. Multiple myeloma[J]. *Lancet*, 2021, 397(10272): 410-427. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00135-5.
- [2] Kumar SK, Rajkumar V, Kyle RA, et al. Multiple myeloma [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 3: 17046. DOI: 10.1038/nrdp.2017.46.
- [3] Landgren O, Morgan GJ. Biologic frontiers in multiple myeloma: from biomarker identification to clinical practice[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(4): 804-813. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2159.
- [4] Willrich MA, Katzmann JA. Laboratory testing requirements for diagnosis and follow-up of multiple

myeloma and related plasma cell dyscrasias[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2016, 54(6): 907-919. DOI: 10.1515/cclm-2015-0580.

- [5] Katzmann JA, Kyle RA, Benson J, et al. Screening panels for detection of monoclonal gammopathies[J]. *Clin Chem*, 2009, 55(8): 1517-1522. DOI: 10.1373/clinchem.2009.126664.
- [6] Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma[J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(12): e538-548. DOI: 10.1016/S1470-2045(14)70442-5.
- [7] Zajec M, Langerhorst P, VanDuijn MM, et al. Mass Spectrometry for Identification, Monitoring, and Minimal Residual Disease Detection of M-Proteins[J]. *Clin Chem*, 2020, 66(3):421-433. DOI: 10.1093/clinchem/hvz041.
- [8] Mills JR, Barnidge DR, Murray DL. Detecting monoclonal immunoglobulins in human serum using mass spectrometry[J]. *Methods*, 2015, 81:56-65. DOI: 10.1016/j.jmeth.2015.04.020.
- [9] Mills JR, Barnidge DR, Dispenzieri A, et al. High sensitivity blood-based M-protein detection in sCR patients with multiple myeloma[J]. *Blood Cancer J*, 2017, 7(8): e590. DOI: 10.1038/bcj.2017.75.
- [10] Barnidge DR, Dasari S, Botz CM, et al. Using mass spectrometry to monitor monoclonal immunoglobulins in patients with a monoclonal gammopathy[J]. *J Proteome Res*, 2014, 13(3):1419-1427. DOI: 10.1021/pr400985k.
- [11] Kohlhagen MC, Barnidge DR, Mills JR, et al. Screening Method for M-Proteins in Serum Using Nanobody Enrichment Coupled to MALDI-TOF Mass Spectrometry [J]. *Clin Chem*, 2016, 62(10): 1345-1352. DOI: 10.1373/clinchem.2015.253781.
- [12] Mills JR, Kohlhagen MC, Dasari S, et al. Comprehensive assessment of M-proteins using nanobody enrichment coupled to MALDI-TOF mass spectrometry[J]. *Clin Chem*, 2016, 62(10): 1334-1344. DOI: 10.1373/clinchem.2015.253740.
- [13] San Miguel JF, Gutiérrez NC, Mateo G, et al. Conventional diagnostics in multiple myeloma[J]. *Eur J Cancer*, 2006, 42(11):1510-1519. DOI: 10.1016/j.ejca.2005.11.039.
- [14] Snozek CL, Saenger AK, Greipp PR, et al. Comparison of bromocresol green and agarose protein electrophoresis for quantitation of serum albumin in multiple myeloma[J]. *Clin Chem*, 2007, 53(6): 1099-1103. DOI: 10.1373/clinchem.2007.088252.
- [15] Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance[J]. *N Engl J Med*, 2002, 346(8): 564-569. DOI: 10.1056/NEJMoa01133202.
- [16] Katzmann JA, Snyder MR, Rajkumar SV, et al. Long-term biological variation of serum protein electrophoresis M-spike, urine M-spike, and monoclonal serum free light chain quantification: implications for monitoring monoclonal gammopathies[J]. *Clin Chem*, 2011, 57(12): 1687-1692. DOI: 10.1373/clinchem.2011.171314.

