

# 利用安捷伦 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS 系统进行高通量、高效率的代谢物分析

## 应用报告

### 作者

Nicola Zamboni  
Institute of Molecular Systems Biology  
ETH Zurich, Switzerland

Steven M. Fischer  
Agilent Technologies, Inc.  
Santa Clara, CA USA

### 摘要

安捷伦 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS 系统 (6550 Q-TOF) 结合流动注射分析 (FIA) 方法对 96 个生物提取样品中的小分子化合物进行分析。本实验展示了这一仪器分析系统的优越性能, 与上一代 Q-TOF 仪器的检测结果相比, 本分析系统在检测离子数量方面增加了一个数量级。同时灵敏度和分辨率的大大提高, 使得大肠杆菌代谢组学研究的覆盖范围增加了六到七倍, 而且提供了更详细的代谢途径分析。



**Agilent Technologies**

## 前言

代谢组学的主要研究领域是生物系统中复杂小分子代谢物的综合表征。代谢表型是基于基因组与环境的相互作用而产生的，并且最好在代谢产物的水平对其进行监测。代谢物浓度不仅受到生物合成干扰因素的影响，而且作为酶的反应底物，它们也随着酶活性变化而变化。因此在对代谢过程有显著影响的调控环节（例如转录或变构调节）中，经常会检测代谢物。

代谢组学为研究基因型-表型的关系提供了独特的条件。因为代谢物的组合与有机体的基因型，生理条件和环境条件紧密相关。它可以很好的检测如基因缺失或插入这类基因调控引起的表型变化。因此通过比较缺失和插入已知基因后发生的代谢变化，代谢组学可以为推断未知基因的功能提供有力的支持。

基因敲除后的代谢分析需要高通量的实验方法，因为采用强大的实验设计，研究容量会很快扩大到成千上万个独立的实验样本。这些分析方法同样需要对上百种小分子化合物进行同步的定性定量分析。精确质量数的高解析质谱结合流动注射分析（FIA）是解决高通量分析的有效方法，同时还能通过测定质核比来实现目标分析物在复杂基质中的鉴别。然而质谱平台必须具备足够的灵敏度和质量分辨率来检测和定量低浓度样本中的大量代谢物。安捷伦 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS (6550 Q-TOF) 系统中应用的 iFunnel 技术可以为代谢组学研究人员提供比任何其他高分辨液质仪器更加低的检测限，同时达到亚飞克级的灵敏度，和高分辨率（40,000 的分辨力）以及精确的质量分析（< 1 ppm）。

这篇应用报告主要介绍了一种 FIA 串联 6550 Q-TOF 质谱仪用于分析小分子化合物的方法，其每天可以处理超过 1,400 个生物提取物。并且与之前的 FIA 安捷伦 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS 系统 (6520 Q-TOF) 进行了比较，实验中分析了超过 5,000 个化学意义的标准品和小范围培养的大肠杆菌细胞提取物。1 在测定大肠杆菌基因重组的代谢组学中列出的 400-800 个离子时，此方法提供了更精确的质量和相关性，因此获得的电信号具有更好可信度。本文采用的分析方法展示了 6550 Q-TOF 具有优异的性能，分析离子的数量增加了一个数量级。灵敏度与分辨率明显提高，对大肠杆菌代谢组学研究的覆盖能力提高了 6 到 7 倍。大肠杆菌缺失突变体的监测实验证明了在高通量情况下，FIA 6550 Q-TOF 平台对主要代谢物的离子信号响应具有优异的灵敏度。高灵敏度使得 MS/MS 即使在 0.006  $\mu\text{M}$  这种低浓度水平条件下，仍然可以准确鉴定化合物。

## 实验部分

### 标准品和试剂

80 种标准物质的纯品分别购于不同供应商。标准品经混合稀释之后，配制成浓度范围在 0.006  $\mu\text{M}$ -50  $\mu\text{M}$  的标样，用于优化分析条件。

### 仪器

本实验使用安捷伦 1290 系列 LC 泵，Wellplate 自动进样器并与安捷伦 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS 系统串联，MS 系统配有正负操作模式的双电喷雾离子源。本实验的仪器运行条件见表 1。

### 样品制备

大肠杆菌提取物经过高速离心，然后用热水原位提取细胞内极性代谢物得到。<sup>1</sup>

## 结果与讨论

### 标样分析

实验分析了浓度范围在 0.006  $\mu\text{M}$  - 50  $\mu\text{M}$ ，含有 80 种标准品的混合标样。根据已知组成和组分性质得到提取离子色谱图 (EICs)。简而言之，我们的实验结果显示使用 6550 Q-TOF 分析样品的 LOD (0.01 $\mu\text{M}$ ) 比安捷伦 6520 Q-TOF 的 LOD (2.0  $\mu\text{M}$ ) 低了近 10 倍。<sup>1</sup>

表 1. FIA-Q-TOF 仪器运行条件

FIA 条件	
进样量	1 $\mu\text{L}$
流速	150 $\mu\text{L}/\text{min}$
HPLC 流动相	60 % 异丙醇/40 % 水 5 mM 碳酸铵, pH 8.9 (v/v)
自动进样器洗针溶剂	50 % 异丙醇/50 % 水 (v/v)
进样循环参数	进样速度: 5 $\mu\text{L}/\text{s}$ 洗针速度: 5 $\mu\text{L}/\text{s}$ 进样前延迟: 500 ms 进样后延迟: 500 ms
Q-TOF MS 条件	
离子模式	负离子模式, 双 ESI
干燥气温度	325 $^{\circ}\text{C}$
干燥气流速	5 L/min (氮气)
雾化室压力	30 psig
毛细管电压	3,500 V
裂解电压	360 V
锥孔电压	65 V
Oct RF Vpp	750 V
采集参数	MS 模式 50-1,000 m/z 采集范围 1.4 张谱图/秒 713.3 毫秒/谱图 9,652 transients/谱图
Q-TOF MS/MS 条件	
质量过滤模式	高分辨率
采集参数	MS/MS 模式 25-1,000 m/z 采集 1.4 张谱图/秒

## 大肠杆菌提取物的分析

使用 6550 Q-TOF 分析 96 种大肠杆菌提取物时，在噪音水平接近的条件下，6550 Q-TOF 的响应值是 6520 Q-TOF 的 10 倍。信号和灵敏度的增强相结合使得检测离子的数量提高了 11 倍（扣除背景之后从 1,190 到 13,614）。6550 Q-TOF 具有更高的灵敏度，因此它可以检测数量可观的更多的离子。从原始图谱（如图 1）可以看出检测到的离子数量明显增多。先前使用 6520 Q-TOF 只能检测到一群紧密排列的波峰，现在用 6550 Q-TOF 可以清楚的分辨出来。尽管图谱响应增加了 10 倍，离子的比例和分布大致一样（如图 2）。正如预想的一样，6550 Q-TOF 的响应值（强度）平均提高了一个数量级。

## 代谢物覆盖范围

生物学分析应用的一个关键问题是要覆盖那些已知代谢物，这些代谢物是生物体内一些化合物的产物，而且可以通过仪器检测到。测定得到的代谢物的精确质量数用来在京都基因和基因组百科全书（KEGG）数据库中的大肠杆菌列表部分进行检索。迄今为止，这个列表包括了 3,223 个化合物。这个目录包括了许多在本试验中并不希望其出现的农药，脂类和抗生素。在两组数据中，我们寻找匹配离子，其中包括多种加合物，同位素和常见的中性缺失碎片。<sup>1</sup>质量公差设定为 0.001 个原子质量单位（amu）

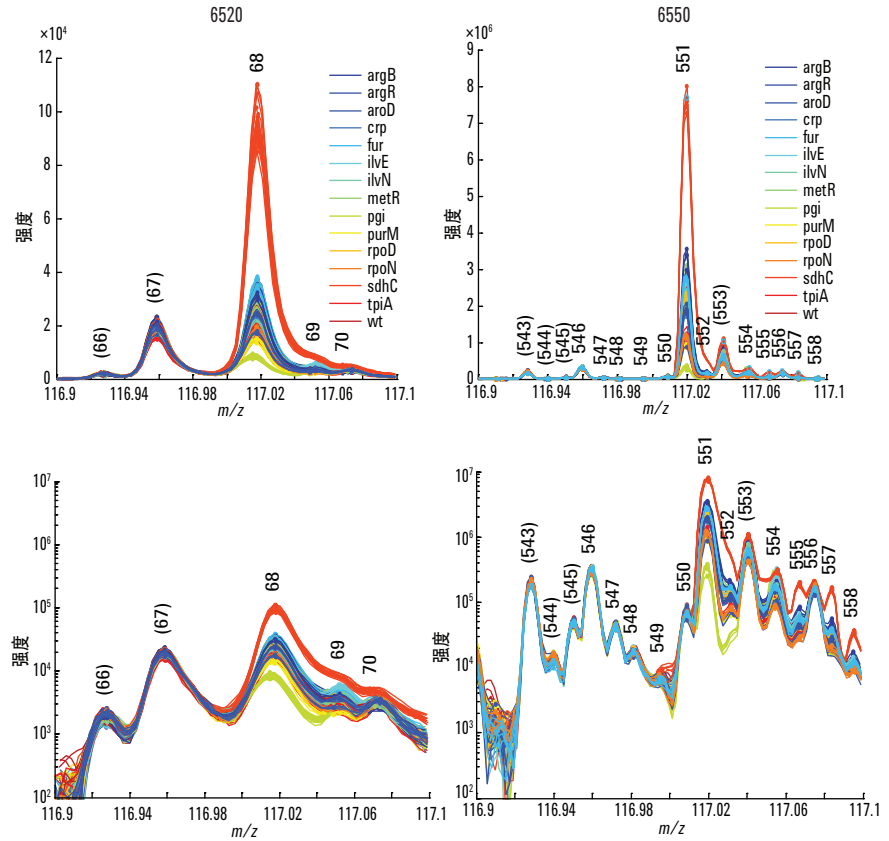


图 1. 安捷伦 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS 系统和安捷伦 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS 系统在流动注射分析条件下的原始图谱数据示例。使用安捷伦 6550 可以检测到更多数量的离子，同时具有很好的分辨能力。

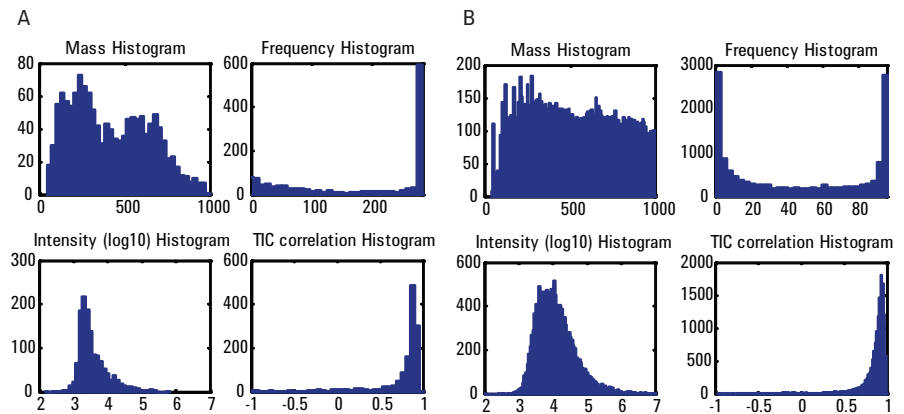


图 2. 通过 Agilent 6520 Q-TOF (A) 和 Agilent 6550 Q-TOF (B) 分析得到的离子统计柱状图展示了离子的统计分布，明显可以看出两个系统的相似性以及 6550 Q-TOF 具有更高的离子响应。

总而言之,使用 6550 Q-TOF 检测得到的可以在已知化合物数据库中鉴定的代谢物离子与 6520 Q-TOF 的检测结果十分近似 (大约 11–12 %)。然而从绝对数量来看, 大概有 1,600 个化合物可以被 6550 Q-TOF 检测到, 是 6520 Q-TOF 检测数量的 6-7 倍 (如表 2)。值得注意的是这一数量包括异构体化合物在内。在没有进行色谱分离的情况下, 这一分析方法不能区分异构体。因此在最好情况下有 1,600 个化合物可以被检测得到。然而如果在整个检测池中有可检出的代谢物存在有异常的同分异构变化, 那么这个方法就可以灵敏的分辨出。在这种情况下, 也可以用其他方法比如 LC/MS 或者 MS/MS 精确辨认不同的同分异构体。

图 3 中的 KEGG 全局代谢图可以直观的看出两种 Q-TOF 仪器对细胞代谢系统主要相关代谢途径所产生的代谢物覆盖程度差异。这些图谱并没有覆盖所有检测到的代谢物, 只是包括了主要代谢途径涉及的代谢物。

表 2. 在质量容差值为 0.001 amu 条件下, 使用 KEGG 生态数据库检索到的离子情况。

	6520	6550
<b>离子</b>		
总量	1190	13614
加注离子	130	1601
未知离子	1060	12013
<b>化合物</b>		
任何匹配度	305	1669
高匹配度	253	1608

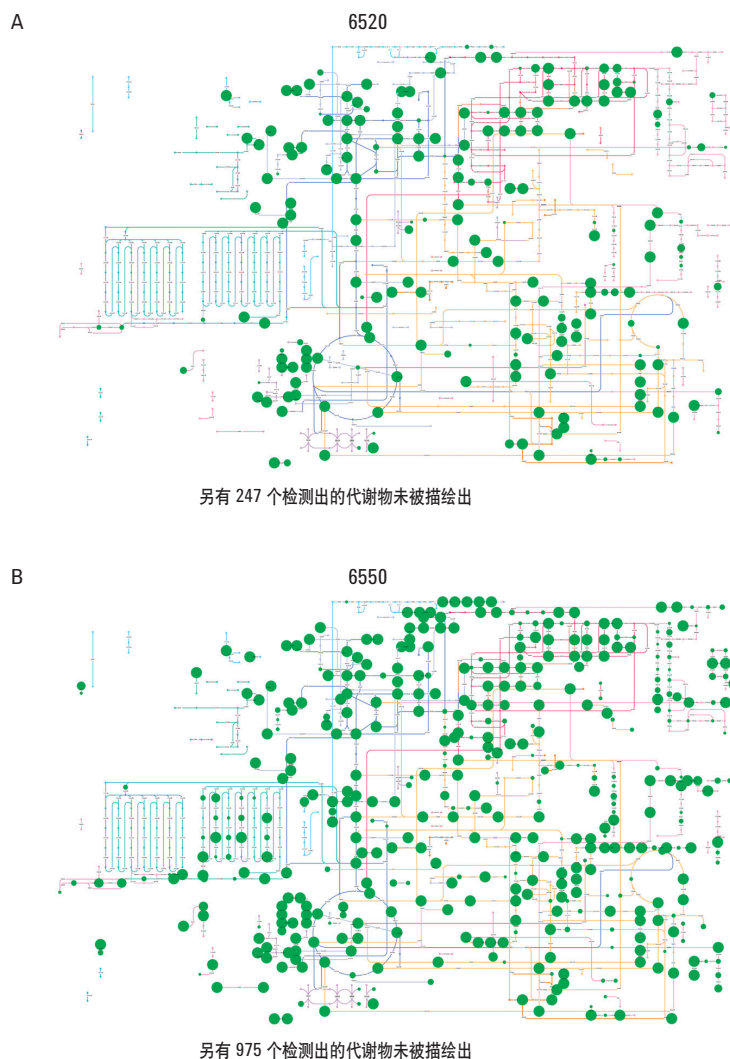


图 3. 图中展示的是通过标注发现的化合物, 可以直观看出安捷伦 6550 Q-TOF (B) 比安捷伦 6520 Q-TOF (A) 对代谢物的覆盖率提高了 6-7 倍。圆点的大小代表对标注的确信程度。

## 差异分析

使用 6550 Q-TOF 对一组大肠杆菌突变体的代谢变化进行检测以评价其分析能力，该检测之前使用 6520 Q-TOF 进行。对于所有的检测离子和每一个突变体，用突变体组和对照组（野生型）对比计算得到其差异系数（t 检验），如图 4 所示。在所有的分析结果中，使用 6550 Q-TOF 的主要优势包括它能迅速的检测出预期代谢物上游代谢过程中的损伤情况。

虽然使用 6550 Q-TOF 可以检测到更多的化合物，但是这并没有增加其假阳性的数量。统计学上是可比较的。这些结果总体上反应了 FIA 6550 Q-TOF 平台非常适合检测一体化的代谢反应或者功能性变化。

## 使用 MS/MS 鉴定化合物

依据经验来评价 6550 Q-TOF 碎片谱图的灵敏度和质量，即从低浓度的混合标准溶液 MS/MS 谱图中识别和检测出目标化合物的能力。可以利用靶向流动注射分析二级质谱联用（targeted FIA MS/MS）方法进行子离子扫描，其内含列表的每次进样中包含四个离子信息。数据处理软件使用 MassHunter Qualitative Analysis (B 04.00 版) 的靶向 MS/MS 检索 (Find by Targeted MS/MS) 功能对化合物进行定性分析, 同时配合使用安捷伦 METLIN 个人化合物数据库和图书馆 (PCDL) 进行检索。

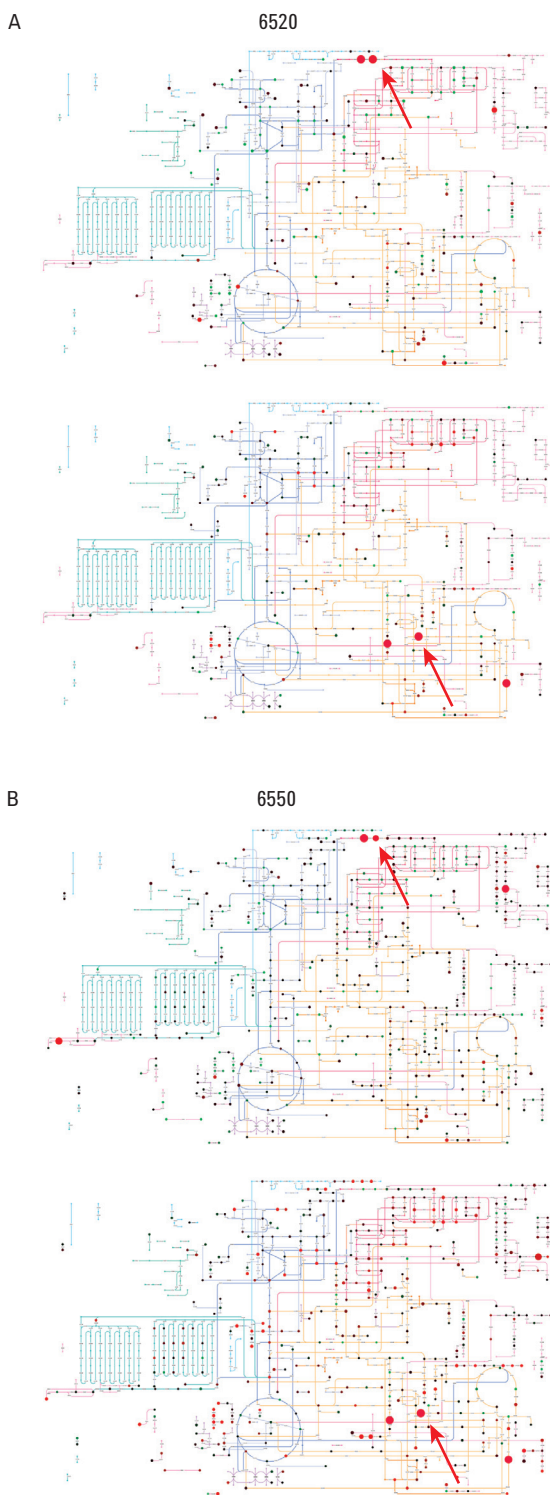


图 4. 大肠杆菌突变体的差异分析表明了方法对代谢反应和功能变化有着良好的适用性。圆点的大小代表p值，颜色代表变化趋势。红色=突变体增加，绿色=突变体减少，箭头代表突变的位置（上图为：purM；下图为：argB）

首先，在最大浓度（50  $\mu\text{M}$ ）条件下测定所有化合物的碎片离子进行初步鉴定。实际上所有已在数据库中存在的化合物几乎都可以检索到并进行鉴定，分析结果与数据库匹配之后或者完全一致或是存在结构相似的异构体。试验测定了 50 $\mu\text{M}$  到 0.006 $\mu\text{M}$  一系列浓度范围的四种化合物：琥珀酸，柠檬酸，二磷酸腺苷（ADP）和 6-P-葡萄糖的碎片离子谱图。在低浓度条件下 6550 Q-TOF 可以提供信息量更加丰富的质谱信息，而 6520 Q-TOF 在 0.1 $\mu\text{M}$  的浓度条件下却检测不到色谱峰。结合一些人为推测，6550 Q-TOF 对待测化合物的检测灵敏度可以达到 0.006  $\mu\text{M}$ 。

## 结论

与 Agilent 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS 系统相比，Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS 系统 (6550 Q-TOF) 提高了灵敏度，分辨率和质量准确度。从而 FIA Q-TOF 方法使得可检测的离子数量提高了 10 倍，并且重复性良好，离子响应值高度增加了 10 倍，主要代谢物的覆盖范围明显增大。最终得到了更为详尽的分析结果。灵敏度的提高解决了前面几代 Q-TOF 在检测突变体能力上的不足。例如，突变降低了代谢能力，就有可能被检测到，然而代谢物浓度的变化量却是微小的。因此利用 6550 Q-TOF 的优势可以快速对激酶，转录因子，酶抑制剂进行监测。同时灵敏度提高之后，离子强度随着增加，提高了二级质谱对化合物的鉴定能力。

本方法也有局限性，就是实施高通量处理时却不涉及样品的分离，因此不太可能有更多的代谢物出现在极性提取液中。因此 6550 Q-TOF 通过为已知代谢途径提供大量的数据，可以作为探究有机体内所有代谢产物的第一步。具有高灵敏度，高分辨率和高质量准确度等优势 的 6550 Q-TOF 仪器很好的解决了样品量受到限制研究领域的问题，因为在有些情况下细胞的培养必须是小量的。

## 参考文献

1. Fuhrer *et al.* High-Throughput, Accurate Mass Metabolome Profiling of Cellular Extracts by Flow Injection-Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Anal Chem*, **2011**, 83(18):7074-7080.

[www.agilent.com/chem/QTOF.cn](http://www.agilent.com/chem/QTOF.cn)

本资料仅限研究使用，不可用于诊断目的。本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2012.

中国印刷，2012年2月22日

5990-9762CHCN



**Agilent Technologies**