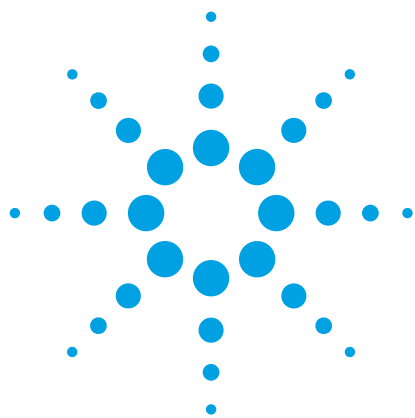




使用 Agilent 7200 系列 GC/Q-TOF 进行酵母类固醇的代谢轮廓分析

应用报告

代谢组学

作者

Manhong Wu, Robert St. Onge,
Sundari Suresh, Ronald Davis, and
Gary Peltz
医药和生物化学学院
基因研究中心
斯坦福大学
Stanford, CA
美国

Sofia Aronova and Stephan Baumann
安捷伦科技有限公司
Santa Clara, CA
美国

摘要

使用安捷伦 7200 系列 GC/Q-TOF 系统和 Mass Profiler Professional (MPP) 软件对酵母类固醇进行了代谢轮廓分析，用来精确测定新型潜在抗真菌药物的靶酶。将相对浓度的麦角甾醇生物合成中间体的靶标分析和非靶标分析相结合，再赋予精确质量的高分辨 GC/Q-TOF 技术，可以获得最全面的结果。电子电离 (EI) 的全采集模式质谱图结合 MS/MS 产物离子质谱数据，进一步确保了酵母中药物治疗蓄积化合物定性的准确性。

前言

芽殖酵母酿酒酵母因为其简单而且菌株可适用于基因组中所有基因的个体缺失而成为一种广受欢迎的模式生物。本研究使用酿酒酵母对新型抗真菌药物进行评价。这一药物家族以麦角甾醇，一种真菌细胞膜的重要组成部分为作用靶标。麦角甾醇和动物细胞中的胆固醇功能相似。虽然如此，但很多参与酵母类固醇生物合成的酶在结构和特异性上与哺乳动物细胞中相应的酶有很大的差别。因此，那些抑制麦角甾醇生物合成路径的药物通常具有抗真菌的治疗潜力。这些药物可以通过互补性遗传和分析方法确定。作为分析通量最高的方法，曾有文献进行过 Haploinsufficiency Profiling (HIP) 筛查 [1]。HIP 涉及了基因缺失的酵母对药物的生长，造成菌株灵敏度升高，表明杂合位点的产物可能是抑制剂的靶标。除此之外，还可使用精确质量高分辨气相色谱/四极杆-飞行时间质谱 (GC/Q-TOF) 联用进行酵母类固醇代谢物轮廓分析与遗传学相结合专用于潜在药物的靶酶鉴定。



Agilent Technologies

本应用报告描述了使用安捷伦 7890 气相色谱和 7200 系列 Q-TOF 质谱联用仪通过定性药物治疗后，蓄积的化合物对新兴抗真菌药物的靶标物进行可靠的鉴定。首先用两种明确效果的抗真菌药物对方法进行验证，接着对有潜在治疗特性的新兴药物进行测定。较宽的仪器线性范围允许在酵母细胞的浓度范围内同时量化脂类代谢产物。

以麦角甾醇生物合成路径中的靶中间体以及药物治疗蓄积的非靶代谢物对非治疗样本的相对水平为基础，提出了几种潜在抗真菌药物作用于酵母中固醇代谢的机理。此外，使用 MS/MS 产物离子的精确质量谱图结合 Molecular Structure Correlator (MSC) 工具对某些蓄积的代谢产物进行结构确认。

实验

试剂和标准品

标准品和试剂	来源
特比萘芬	Sequoia Research Products
氟康唑	Sigma-Aldrich
桃柞酮	Sigma-Aldrich
NCE 1181-0519	ChemDiv
MSTFA (N-甲基-N-三甲基硅烷-三氟乙酰胺) + 1% TMCS (三甲基氯硅烷)	Sigma-Aldrich
甲氧基胺盐酸盐	Sigma-Aldrich
无水吡啶	Sigma-Aldrich

仪器

本研究在 7890A 和 7200 系列 GC/Q-TOF 上进行。仪器条件列于表 1。

表 1. GC 和 MS 仪器条件

GC 条件	
色谱柱	HP-5 MS UI, 30 m × 0.25 mm, 0.25 µm (部件号 19091S-433UI)
进样量	1 µL
分流比	20:1
分流/不分流进样口温度	250 °C
柱箱程序升温	60 °C 保持 1 min, 以 10 °C/min 升至 325 °C, 保持 3.5 min
载气	氦气, 恒流, 1 mL/min
传输线温度	290 °C
MS 条件	
离子化模式	EI
离子源温度	230 °C
四极杆温度	150 °C
扫描范围	50 ~ 600 m/z
质谱采集速率	5 Hz, centroid 和 profile 模式
MS/MS 模式碰撞能量	15 V

样品制备

用抑制 10% 增长率的药物浓缩液对 6 个含有 5 mL 野生型酵母培养液 (BY4743) 的平行样进行培养, 当 OD₆₀₀ 值约为 1 时进行收集 (约 3 × 10⁷ 细胞/mL)。用 Folch 法提取酵母油脂 [2]。相当于原培养液 2.5 个 OD₆₀₀ 单位的下层有机相通过快速抽真空干燥, 用 40 mg/mL 甲氧基胺盐酸盐的吡啶溶液进行衍生化, 再用 MSTFA+1%TMCS 混合溶液进行硅烷化, 溶液的最终体积为 100 µL。取 1 µL 用于气相色谱进样。

数据分析

使用安捷伦 MassHunter B.05 进行定量。所有谱图均使用 Mass Hunter Qualitative Analysis B.05 进行解卷积, 感兴趣的代谢产物通过与 NIST11 谱库比对确定结构。

使用多元软件包 Mass Profiler Professional (MPP) 对解卷积后的数据进行统计评估 (数据过滤、统计学意义分析、确定痕量水平的特异性化合物和结果可视化)，测定药物治疗样本中浓度显著不同于对照样本的化合物。此软件可以进行多个非预期代谢产物的检测。

结果与讨论

数据分析

得益于精确的质量数信息，GC/Q-TOF 数据的谱图解卷积可以区分具有相同标称质量碎片离子的共流出化合物。MassHunter Qualitative Analysis 软件按以下 4 步进行解卷积：

1. 噪声分析：为每个离子的谱图计算噪声因子
2. 化合物预测：噪声分析结果和保留时间一起对每个谱图组分进行峰形模型预测
3. 谱图解卷积：用最小二乘法创建每个组分的质谱图
4. 化合物识别：对每个组分进行 EI 谱库检索和比对

无偏方法的优势之一是无需考虑目标离子进行解卷积。在“化合物预测”步骤中确定的色谱峰形可以识别相邻扫描中具有相似的峰形和峰顶的组分。

色谱峰解卷积还有助于区分具有相同经验公式的不同化合物。图 1 表明 3 种化合物的分子式均为 $C_{29}H_{48}O$ ，但只有右侧的谱图具有和 4,4-二甲基-8,24-胆甾-二烯醇相匹配的 EI 谱图结构。根据下面的 9 步向导工作流程，确定 4,4-二甲基-8,24-胆甾-二烯醇是这些化合物中唯一符合 Mass Profiler Professional (MPP) 多元统计软件包设定的倍率变化和显著性标准的化合物。

一旦谱图完成解卷积，即创建了化合物交换格式 (.CEF) 的文件。然后用 MPP 软件测定那些浓度因药物发生显著变化的化合物。MPP 统计评估步骤如下：

1. 定义实验类型、工作流程和生物体
2. 选定数据源为 MassHunter Qualitative Analysis
3. 从 Qualitative Analysis 导入 .CEF 文件
4. 设置丰度和模型离子过滤器

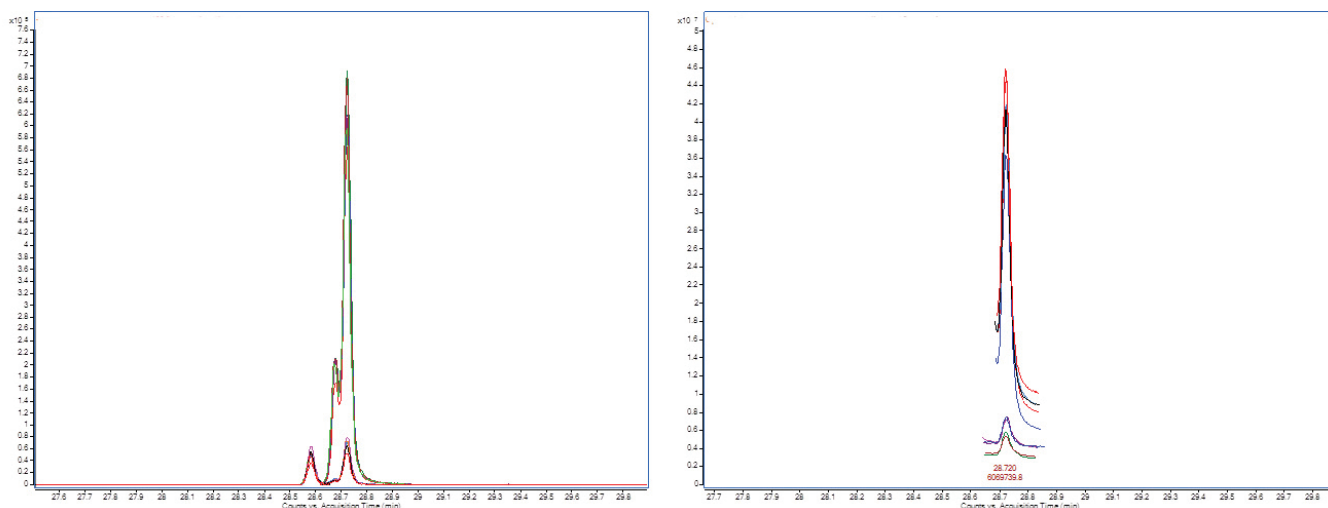


图 1. 谱图解卷积可以区分具有相同标称质量碎片离子的共流出化合物。左侧的谱图为提取离子叠加谱图 (EICs)，说明一些共流出化合物具有相同的碎片离子。右侧的谱图为经 MassHunter 解卷积处理后，其中一种化合物 4,4-二甲基-8,24-胆甾-二烯醇的谱图

5. 定义保留时间和匹配因子定位参数
6. 选择校准类型
7. 选择基线校准
8. 设置条件筛选标志
9. 火山曲线过滤。其结合了显著性 ($p < 0.05$) 的 Student's t 检验结果和阈值为 2 的倍率变化结果

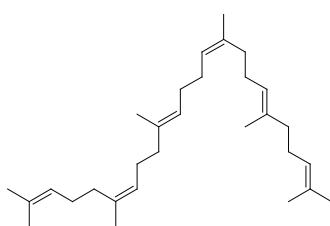
概念验证

使用先前所述的抗真菌药物和易于理解的靶酶来论证使用精确质量高分辨 GC/Q-TOF 分析酵母类固醇代谢轮廓的可行性。特比萘

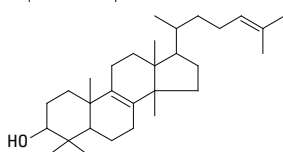
芬和氟康唑都是广泛使用的抗真菌药物，在麦角甾醇的生物合成路径中的靶标为完全不同的过程，且抑制机理成熟。特比萘芬抑制 ERG1 的基因产物鲨烯环氧酶，从而防止角鲨烯转化成路径上的后续中间体，角鲨烯环氧化物。酵母细胞一直在持续生成角鲨烯但却不能有效地将之转化成下游中间体，从而导致了角鲨烯的蓄积。氟康唑抑制 ERG11 的基因产物细胞色素 P450 14 α -去甲基化酶或者羊毛甾醇去甲基酶，这时，就会形成羊毛甾醇的蓄积。研究对相关类固醇在药物治疗样本和非治疗样本中的代谢物丰度变化进行了对比和评估（图 2 和图 3）。

代谢产物

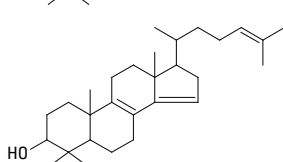
角鲨烯



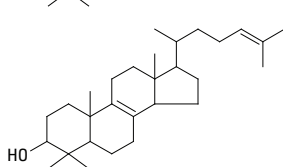
羊毛甾醇



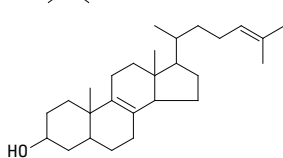
4,4-二甲基-5 α -胆甾-8,14,24-三烯-3 β 醇



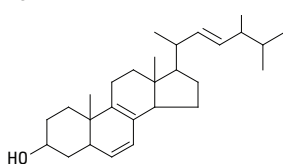
4,4-二甲基-5 α -胆甾-8,24-二烯-3 β 醇



酵母甾醇



麦角甾醇



治疗样本的倍率变化

84.3 (上升)

特比萘芬

Erg1

87.6 (下降)

> 27.7 (下降)

> 32.7 (下降)

27.6 (下降)

5.3 (下降)

图 2. 经特比萘芬治疗后，不同类固醇代谢产物丰度的倍率变化，包括因为抑制 ERG1 基因产物角鲨烯环氧酶造成的角鲨烯蓄积

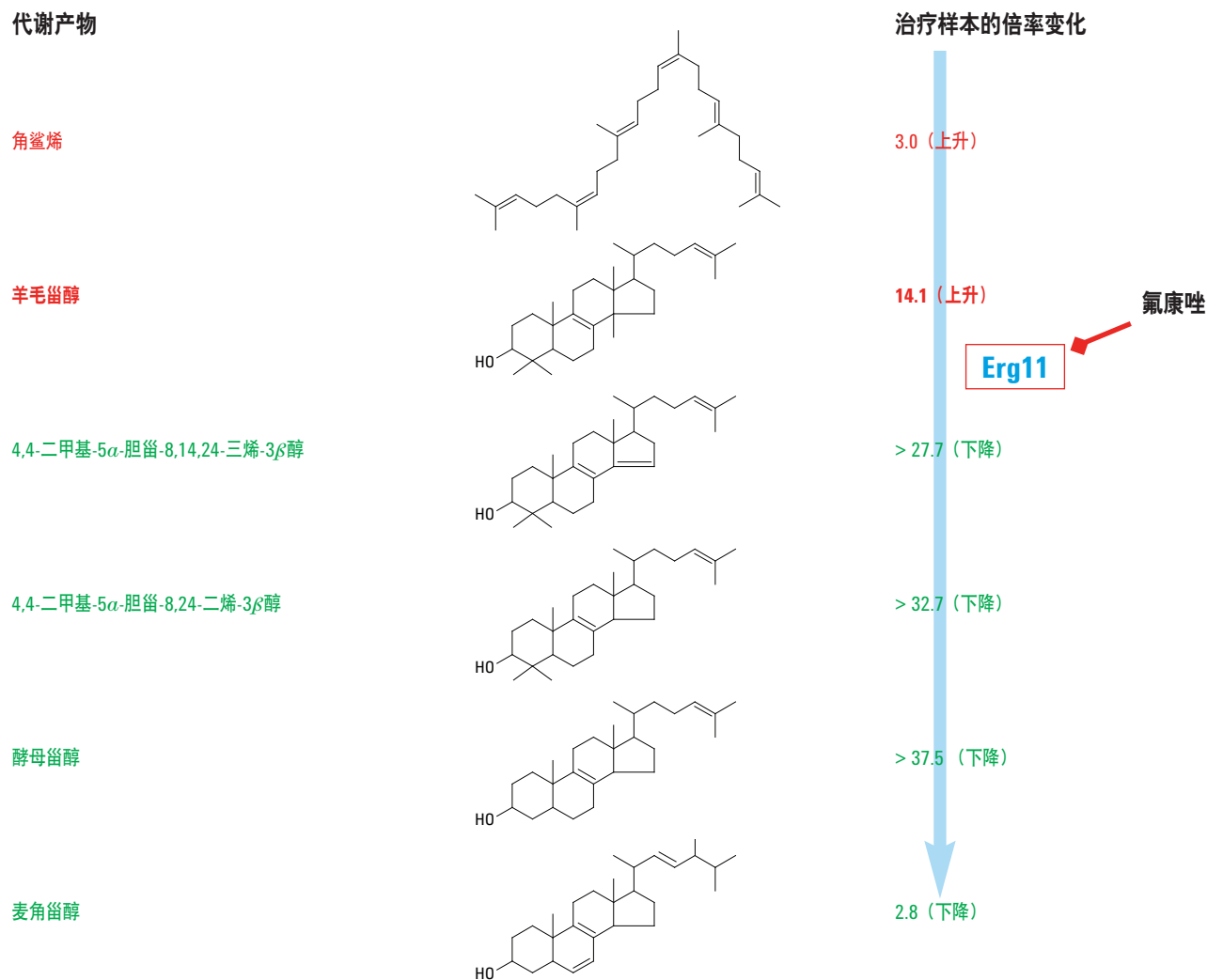


图 3. 经氟康唑治疗后，不同类固醇代谢产物丰度的倍率变化，包括因为抑制 *ERG11* 基因产物 14 α -去甲基化酶造成的羊毛甾醇蓄积

正如预期的那样，分别在特比萘芬和氟康唑治疗的样本中发现了角鲨烯和羊毛甾醇的蓄积。使用 MPP，发现在氟康唑治疗的样本中因 14 α -去甲基化酶的活性受到抑制而导致几种 14 α -甲基类固醇的蓄积。非靶标分析得到的结果显示麦角甾醇生物合成路径上

的某些下游酶表现得更加“混杂”，这样可以使用蓄积的类固醇和额外的甲基官能团作为他们的培养基。14 α -甲基类固醇的经验公式可以通过 EI 碎片谱图和精确质量信息（表 2）确定。碎片离子的精确质量进一步确保了化合物定性的可靠性。

表 2. 氟康唑的非靶标分析结果

组分 (m/z @ RT)	化合物	分子式	衍生产物 MI (m/z)	MI 精确质量 (m/z)	质量误差 (ppm)
469 @ 28.08	14- α -去甲基甾醇	C ₂₉ H ₄₈ O	484.4095	484.4101	1.24
379 @ 28.26	14- α -去甲基- 4- α -甲基酵母甾醇	C ₂₉ H ₄₈ O	484.4095	484.4107	2.48
467 @ 28.39	14- α -去甲基-3-酮基- α -甲基酵母甾醇	C ₂₉ H ₄₆ O	482.3938	482.3931	-1.45

RT = 保留时间

MI = 分子离子

新型抗真菌药物的代谢轮廓特征分析

根据基因筛查结果，选择了一些麦角甾醇生物合成路径的潜在抑制剂如桃柟酮和一种新型化学实体（NCE）1181-0519 进行研究。为了更好地了解新型潜在药物诱导的酵母中的代谢变化，同时采用了靶标分析和非靶标分析比较治疗样本和非治疗的样本中代谢产物的蓄积水平。

此外，MS/MS 实验结果提供的结构信息对药物治疗造成的蓄积代谢物的结构鉴定至关重要。结果清晰表明，NCE 1181-0519 和桃柟酮的靶标分别是 Erg25 和 Erg26。

用 MPP 进行统计分析有助于轻松识别不同变化差异的组分（图 4）。

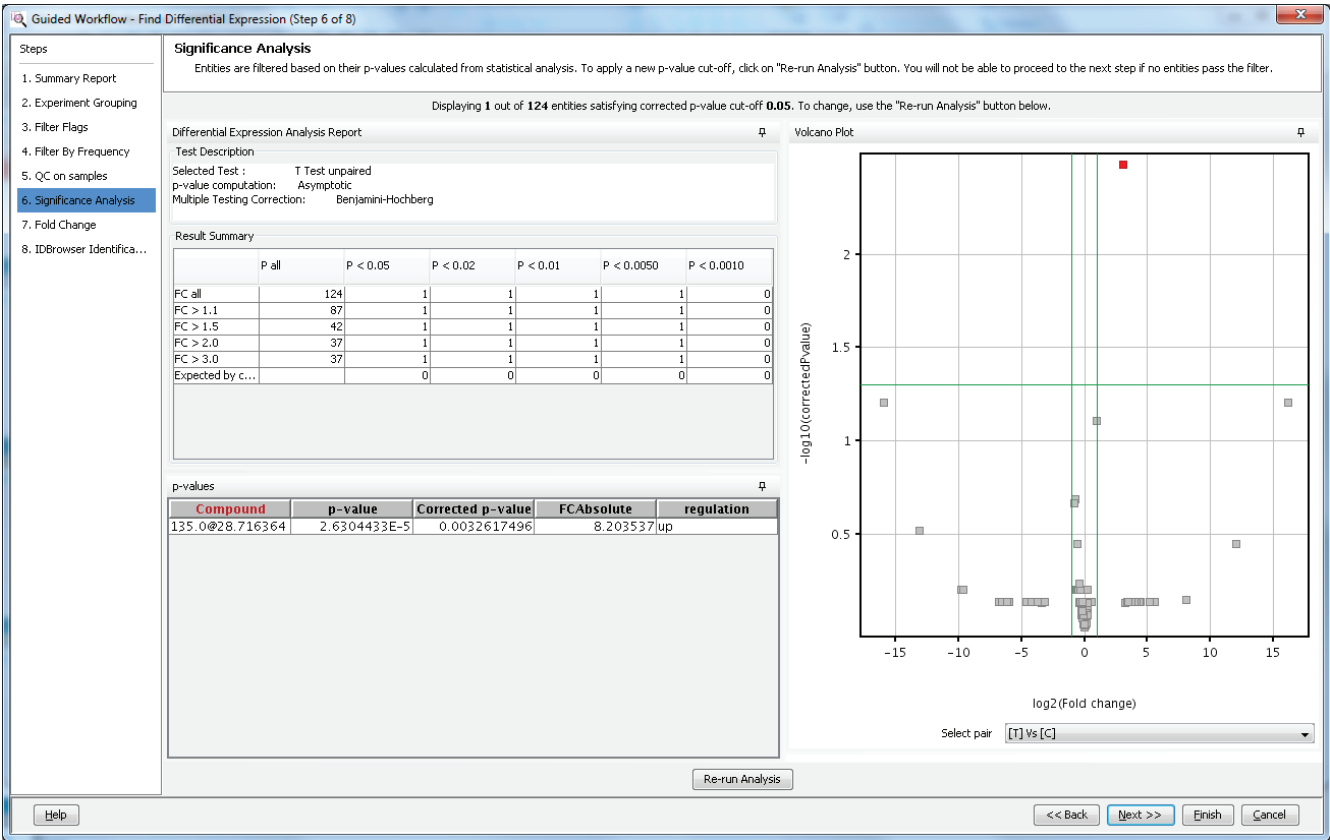


图 4. MPP 的显著性分析表明，NCE 1181-0519 治疗的样本中，只有一种化合物（4,4-二甲基-8,24-胆甾二醇）的倍率变化存在显著性差异

在 NCE 1181-0519 样本中，只有 4,4-二甲基-8,24-胆甾二醇满足显著性检验标准，即倍率变化的 $p < 0.05$ ，说明 NCE 特异性作用于 Erg25，下游中间产物的衰减同样有力地支持了这一结论（图 5）。

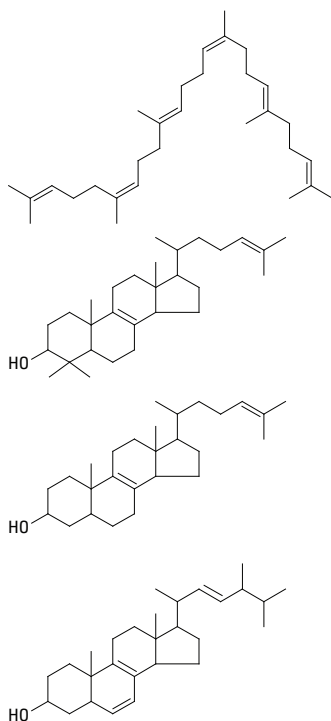
代谢产物

角鲨烯

4,4-二甲基-5 α -8,24-胆甾-二烯-3 β -醇

酵母甾醇

麦角甾醇



治疗样本的倍率变化

1.3 (上升)

6.2 (上升)

Erg25

2.9 (下降)

1.3 (下降)

1181-0519

图 5. 经氟康唑治疗后，不同类固醇代谢产物丰度的倍率变化，包括 4,4-二甲基-8,24-胆甾二烯醇的蓄积和下游中间体的下降，确定 Erg25 为药物靶标

桃柁酮造成 4 α -羧基-4 β -甲基-5 α -胆甾-8,24-二烯-3 β -醇的蓄积，这和 Erg26 作为桃柁酮的靶标结果一致（图 6），因为它是一个生物性质不稳定的中间体，通常不检测该化合物，本实验未将其作为原始靶标物，只能通过非靶标分析揭示桃柁酮会导致其蓄积。

这一代谢物的结构通过精确质量产物离子谱图信息（图 7）确认，Molecular Structure Correlator 软件用于进一步确认 MS/MS 生成碎片的结构，并生成匹配度分值表，以此确定蓄积化合物最佳的结构式（图 8）。

代谢产物

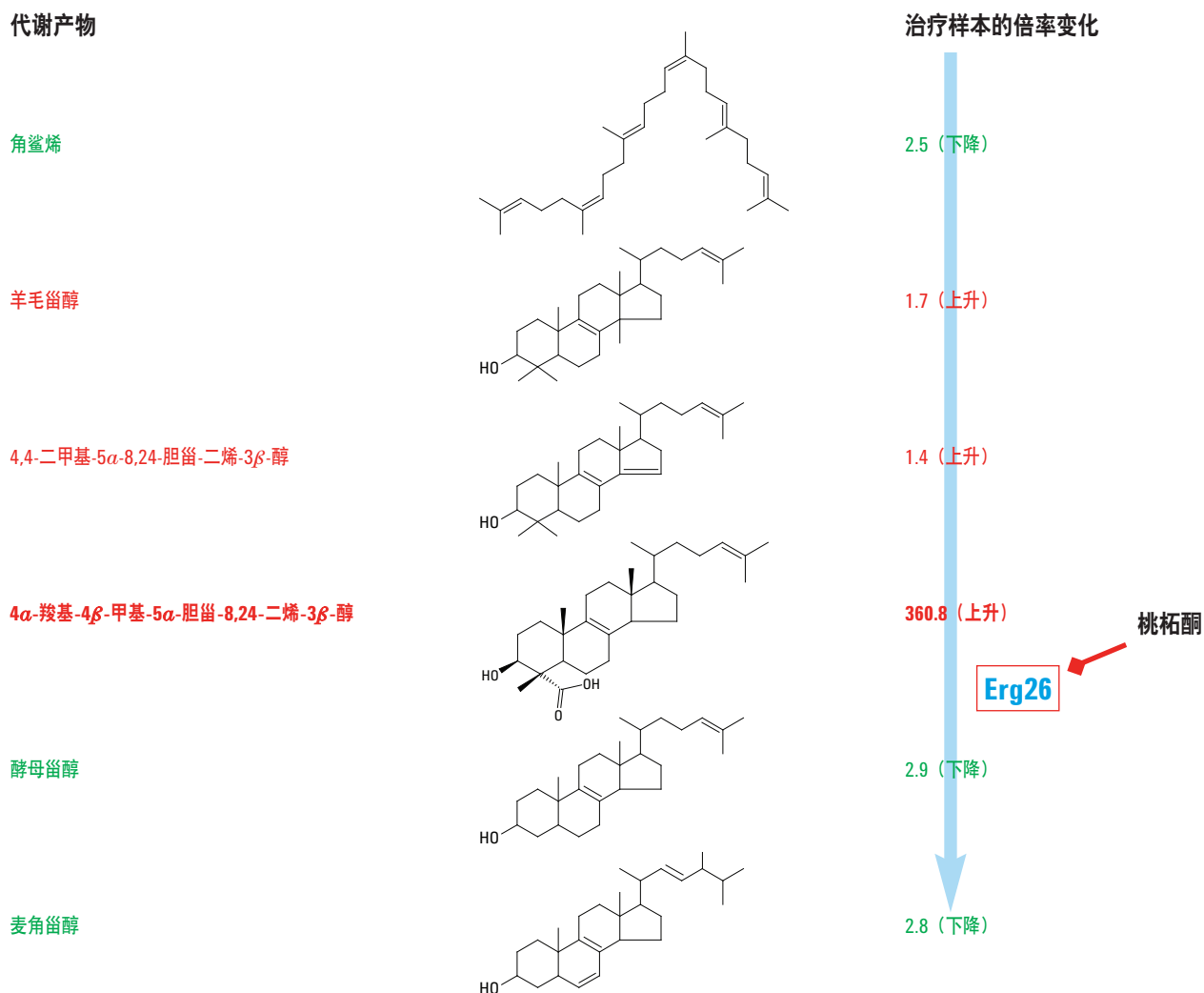
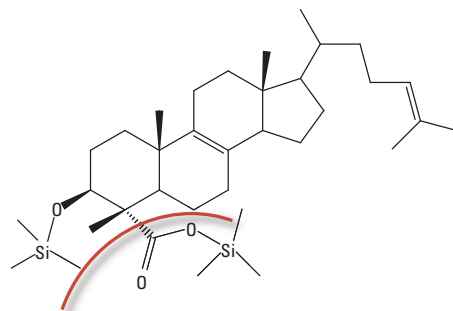


图 6. 经桃柁酮治疗后，4 α -羧基-4 β -甲基-5 α -胆甾-8,24-二烯-3 β -醇丰度的倍率变化，Erg26 为桃柁酮的特异性靶标



4 α -羧基-4 β -甲基-5 α -胆甾-8,24-二烯-3 β -醇

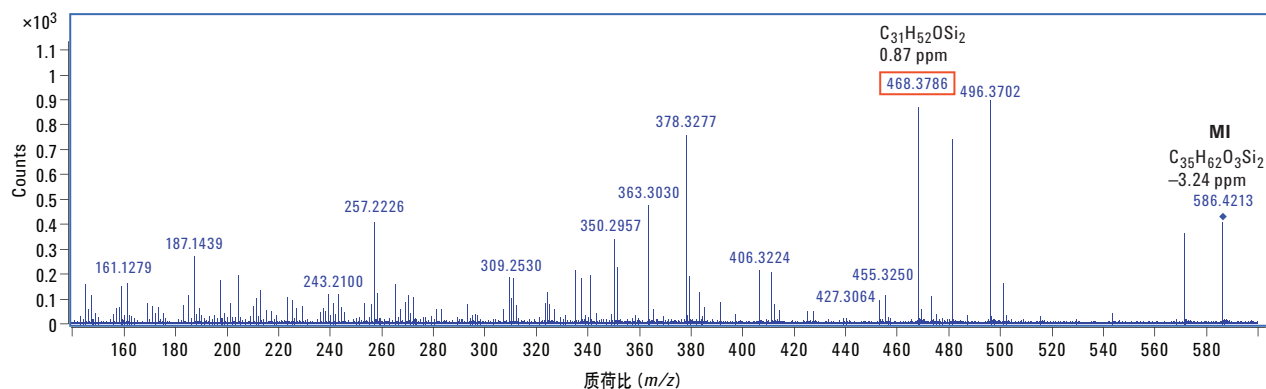


图 7. MS/MS 产物离子谱图帮助进一步确认非靶标方法确定的蓄积物结构, 4 α -羧基-4 β -甲基-5 α -胆甾-8,24-二烯-3 β -醇

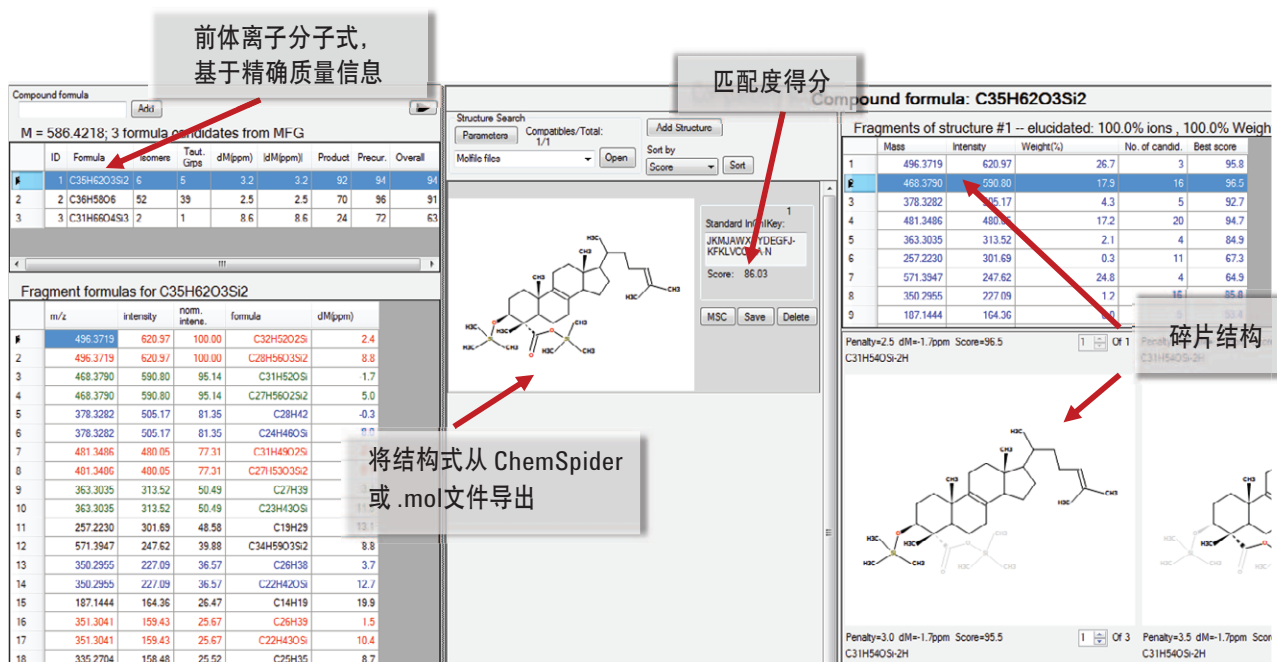


图 8. Molecular Structure Correlator 根据 MS/MS 的每张精确质量碎片离子谱图分配分子式。通过软件工具挖掘 ChemSpider 数据库。通过 MDL Molfile 添加结构式可以对所有可能的同位素或者特定的化合物进行评估

7200 GC/Q-TOF 全扫描模式出色的灵敏度可在一次实验中识别所有必要的代谢物，这对特异性较差的抗真菌药物的作用机理解析非常重要。图 9 总结了两种潜在抗真菌药物的代谢轮廓分析结

果，说明了 ERG25 和 ERG26 分别是 NCE 1181-0519 和桃柞酮在麦角甾醇生物合成路径的靶基因。

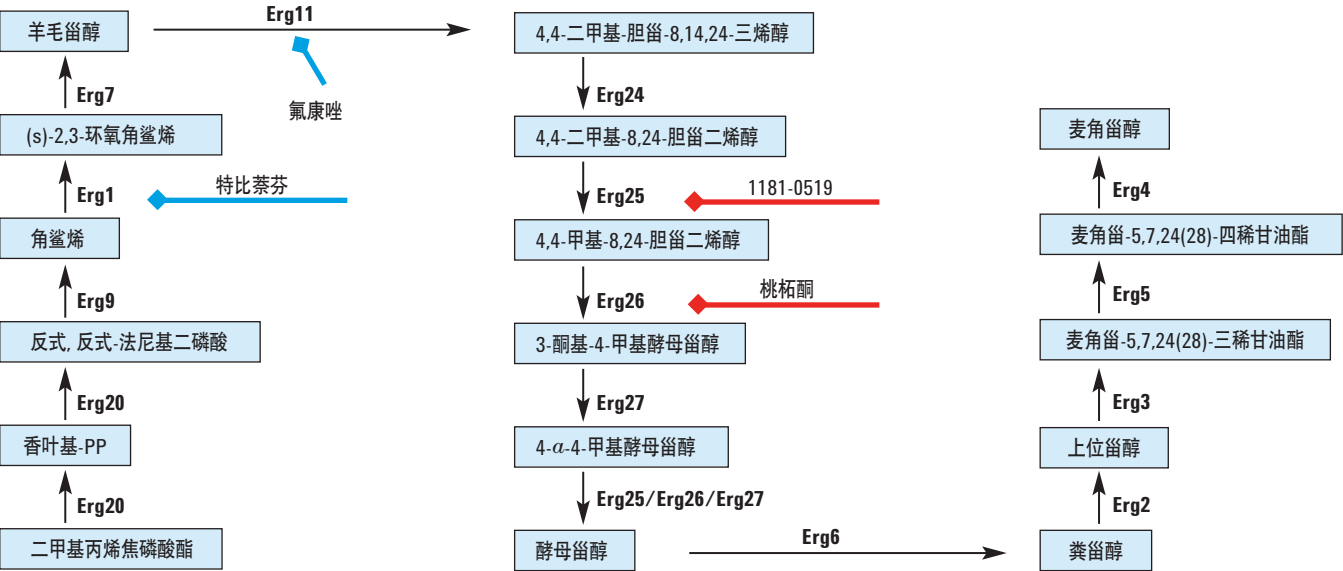


图 9. 麦角甾醇生物合成的路径图，红色标注的为研究确定的 NCE1181-0519 和桃柞酮的靶基因

结论

7200 系列 GC/Q-TOF 是一个功能强大的分析工具，用来进行酵母类固醇代谢轮廓的扫描，识别公认抗真菌药物的靶酶，与 Haploinsufficiency Profiling 一起更详尽地阐明药物抑制机理。7200 GC/Q-TOF 的精确质量信息和全谱图的灵敏度可以对目标物及药物治疗蓄积形成的未知化合物进行可靠的识别和定性。线性范围高达 5 个数量级，可以对整个细胞浓度范围内的代谢物同时进行测定。

用此方法对几种潜在抗真菌的药物包括 NCE1181-0519 和桃柞酮的作用机理进行了解析，这一过程通过经 Mass Profiler Professional 评估，中间体浓度发生显著变化的样本同时进行靶标分析和非靶标分析实现的。此外，7200 GC/Q-TOF 通过精确质量 MS/MS 产物离子谱图与 Molecular Structure Correlator 工具相结合，可对未知代谢物进行结构确认和解析。

参考文献

1. G. Giaever, P. Flaherty, J. Kumm, M. Proctor, C. Nislow, D. F. Jaramillo, A. M. Chu, M. I. Jordan, A. P. Arkin, R.W. Davis. "Chemogenomic profiling: identifying the functional interactions of small molecules in yeast." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101, 793-798 (2004).
2. J. Folch, M. Lees, G. H. Sloane Stanley. "A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues." *J Biol Chem*. 226, 497-509 (1957).

更多信息

本文中的数据仅代表测定的典型结果。有关产品和服务的更多信息，请访问 www.agilent.com/chem/cn

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

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
2012 年 6 月 28 日，中国印刷
5991-0571CHCN



Agilent Technologies