

# 采用 LC/MS、GC/MS 和 NMR 技术的 安捷伦代谢组学工作流程解决方案

## 技术概述

### 前言

安捷伦科技公司是代谢组学解决方案领域名符其实的领导者。代谢组学是对代谢物，即参与细胞内生物学过程中的有机小分子进行鉴定和定量的技术。这些分子是生物学功能的重要指标，通过研究这些分子，可以获得有关细胞生理学、代谢及毒性的独特见解。

由于不同种类的代谢组学实验需要不同的技术方法，因而安捷伦提供了几种不同的工作流程解决方案。这些工作流程采用液相色谱/质谱 (LC/MS)、气相色谱/质谱 (GC/MS) 以及核磁共振 (NMR) 仪器采集数据，利用代谢组学化合物数据库进行化合物鉴定，并用软件进行数据分析和生物学解析。




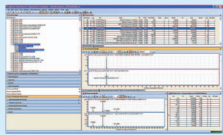
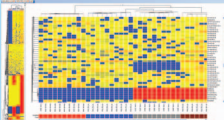

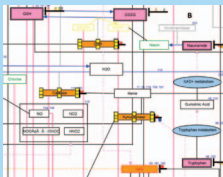

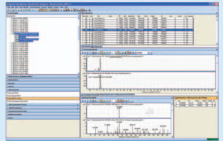

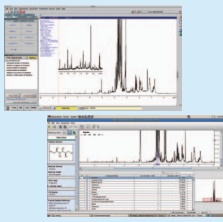
**Agilent Technologies**

本文将对这些代谢组学工作流程的各个部分进行概述（图 1）。同时还讨论了在选择各种方法时需要考虑的问题。例如，实验的多个技术因素如灵敏度要求、样品复杂性、样品前处理，以及目标代谢物的化学性质等都会影响到最终的技术决策。这些因素以及其它一些因素都会在后面的章节中一一进行详细阐述。

## 靶向代谢组学和发现代谢组学的比较

代谢组学实验包括发现和靶向方法。发现代谢组学是指对非靶向性的一系列代谢物的研究，在一组重复性的实验样本中寻找与对照组相比丰度具有显著性统计差异的代谢物，并且确定其化学结构。相比之下，靶向代谢组学是指对预先经过鉴定的

代谢物的丰度进行精确检测，如针对大量样品的验证性研究。靶向实验可以高度定量，通常需要使用分析标样。

	分离和检测	特征寻找与定量	调整与统计分析	鉴定	通路分析
		MassHunter 软件	MPP 软件		
GC/MS			 分析与可视化	 化合物鉴定	 Pathway Architect
LC/MS					
		VnmrJ 与 Chenomx			
NMR					

## 基于质谱的代谢组学

质谱 (MS) 方法因其较宽的动态范围、高灵敏度、高重现性以及分析复杂生物体液的能力, 已被广泛用于代谢组学研究。为了解决样品复杂性问题, 通常将分离手段 (气相色谱、液相色谱或毛细管电泳) 与质谱分析进行串联, 以检测到尽可能多的代谢物。质谱信息和分离实验的保留时间 (或迁移时间) 中所包含的化学信息都将被用于跟踪和鉴定分析中的代谢物。这一点是非常必要的, 因为单靠质谱本身通常不能区分同重异位的代谢物, 而色谱却能分离与鉴定异构体。气相分离方法比液相分离方法更适合于非极性化合物, 但它们对其它多种化合物却能够实现同等优秀的分离性能。

## 质谱代谢组学的全方位资源

为支持发现和靶向质谱代谢组学, 安捷伦提供了一系列可适用于特定应用的 GC/MS 和 LC/MS 仪器, 包括飞行时间 (TOF)、四极杆飞行时间 (Q-TOF) 和三重四极杆 (QQQ) 质谱仪 (图 2)。安捷伦系统具有独特设计, 即使在高丰度代谢物存在的情况下也能够检测出低丰度目标物, 同时实现最佳的重现性。Agilent Q-TOF 仪器 (与

LC 或 GC 联用时) 之所以能够做到这一点, 其中的关键性设计是采用了双增益信号处理, 使得仪器的有效线性动态范围达到了 5 个数量级。<sup>1</sup>

除了全系列的高性能 GC/MS 和 LC/MS 仪器之外, 安捷伦还开发出必要的软件工具用于分析、鉴定和解析代谢组学实验所产生的大量数据。每台仪器都采用相同的数据分析软件, 为需要多种质谱配置的实验提供一致的用户体验。安捷伦还开发出专门针对代谢组学的化合物鉴定数据库和谱库, 用于评价 GC/MS 和 LC/MS 数据。<sup>2</sup> 采用 Agilent GeneSpring 软件中的 Mass Profiler Professional (MPP) 模块对处理后的数据进行分析, 该模块是一个统计学分析和数据可视化工具, 能够让研究人员从数据中快速发现并提取有用的结果。我们将会在本文的后面部分详细描述 MPP 的使用。

## 代谢物数据库

安捷伦与开发新一代代谢组学技术和工具的杰出的代谢组学研究人员合作, 将他们的研究进展囊括到稳定的解决方案中, 以增强并简化代谢组学研究。作为充分印证这一理念的关键示例, 安捷伦努力创建了专业数据库和谱库, 用于通过质谱进行化合物鉴定, 以提高化合物鉴定的准确度。特别是, 我们已经与 Oliver Fiehn 博士紧密合作, 开发出包含大约 700 个常见代谢物<sup>2</sup> 的可搜索 GC/MS 电喷雾电离 (EI) 谱图和保留时间指数数据库。对于 LC/MS 研究, 我们已经与 Gary Siuzdak 博士共同开发出 METLIN 个人化合物数据库与谱库 (PCDL), 其中包含超过 25000 种化合物 (包括 8000 种脂类), 以及 2200 种化合物的谱图和大约 700 种标样的保留时间。<sup>3</sup> 如需了解更多安捷伦数据库资源的信息, 请参阅“代谢组学数据库资源: 概述”。<sup>4</sup>



图 2. Agilent 6500 系列精确质量 Q-TOF 液质联用系统和 7000 系列三重四级杆气质联用系统

## 基于核磁共振的代谢组学

核磁共振为代谢组学研究提供了另一种强大的工具。这是因为核磁共振本身所固有的定量性（任何分子都可以测定单位响应因子，甚至不需要标样）、高度重现性，且只需要极少的样品前处理过程。此外，由于核磁共振所检测的谱学性质非常独特，核磁共振具有与 LC/MS 和 GC/MS 完全正交的化合物检测和鉴定机制。Agilent 750 Mz 核磁共振系统如图 3 所示。

在代谢组学研究领域，核磁共振与质谱在两个重要的方面互补：首先，核磁共振的独特之处在于它在数据采集之前不需要对样品基质进行分离；其次，它能够同时测定样品中的所有小分子代谢物。因此，检测结果并不会因方法本身造成偏向性。此外，核磁共振是非破坏性的，因此样品可以被保留下来供进一步分析用。可将核磁共振代谢组学应用于原位、体内及体外样品，示例如下文所示：

- MRI
- 组织切片
- 离体灌注的完整器官
- 灌注细胞培养物
- 完整的植物、种子及组织
- 未修饰的无杂质生物体液和生物群
- 溶剂和/或水提取物



图 3. Agilent DD2 MR 系统，配备 750 MHz 磁体

从技术上来说，代谢组学研究对核磁共振谱仪的要求十分苛刻，但安捷伦核磁共振系统的设计可完全满足此类研究所要求的稳定性、灵活性及高性能。核磁共振的定量测定要求谱仪响应在很大的浓度范围内都呈线性。Agilent DD2 接收系统能够满足这一要求，它对核磁共振信号采用直接采样方式，而不使用如正交检测等过时方法。这样就能够获得无相位畸变的平直基线和高度的线性响应，而这两点均为准确

定量测定所必需。例如，用于四环素的定量时，Agilent DD2 MR 系统能够精准地直接测量浓度低至  $\mu\text{M}$  水平的样品（图 4）。

高质量的溶剂抑制对于代谢组学核磁共振研究也是非常关键的，而安捷伦核磁共振系统可支持整套溶剂抑制策略，能够针对特定情形采取适合的溶剂抑制方法，并且将相同方法自动应用到给定研究中的所有样品上。

VnmrJ 软件包支持安捷伦核磁共振仪器，该软件可实现完全的用户控制与特定样品方法的定制。可为给定样品类型独立指定采集参数、匀场方法、数据存档和自动处理工具，随后只需轻点鼠标即可进行撤销和应用。采用电子表格式的提交工具可简化大量样品的数据采集工作，并且可根据需要对自动匀场常规活动进行配置和应用。在数据采集之后，可采用 Chenomx 软件套装对核磁共振代谢组学轮廓进行计算。

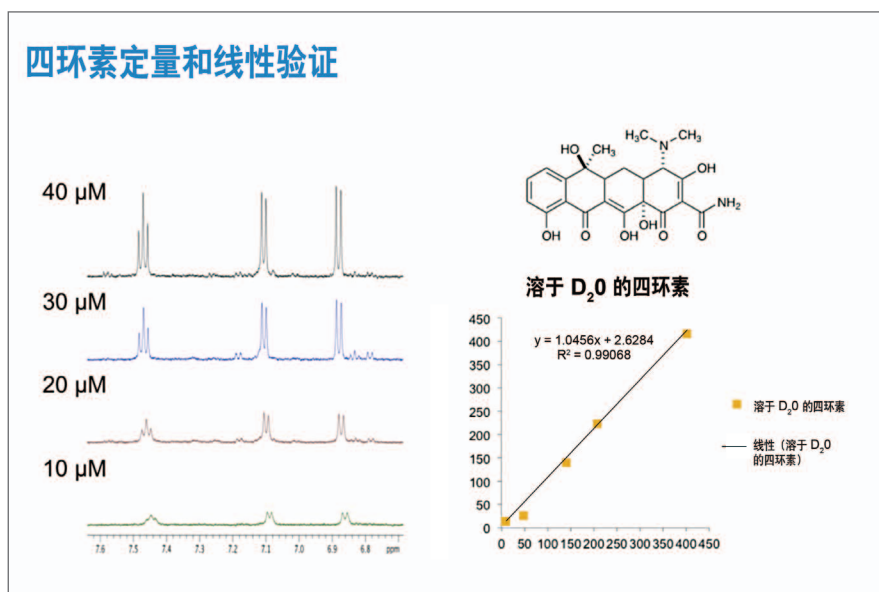


图 4. 四环素的定量分析及线性验证

## 统计学分析与化合物鉴定

为了有利于理解从质谱或核磁共振中得到的代谢组学数据的生物学意义，安捷伦还提供了 GeneSpring/Mass Profiler Professional (MPP) 软件套装。MPP 包含若干用于代谢组学实验的有用的可视化和分析工具，并且能够对代谢组学、蛋白质组学、转录组学和基因组学数据进行共同分析。

对于代谢组学特定的分析和可视化工具，MPP 可进行数据归一化、对齐和多仪器采集数据的比较（图 5）。此外，可以将实验元数据加入到分析中以突出复杂实验设计中的关系。

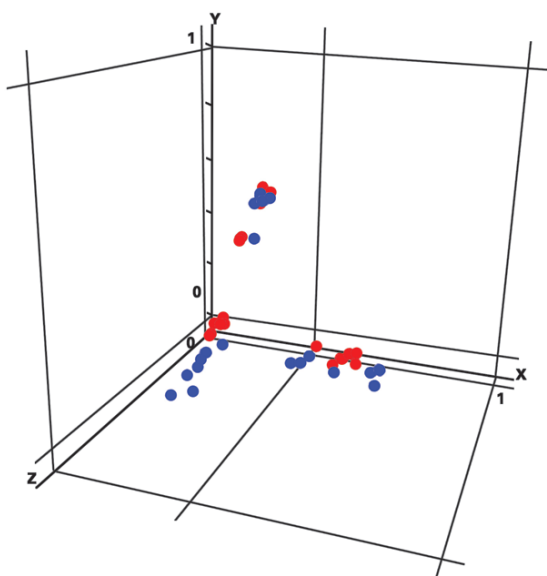


图 5. MPP 软件能够实现多个样品和/或多个质谱分析平台在一个项目中进行比较

在生物标志物发现及生物学解析方面，MPP 采用方差分析 (ANOVA)、主成分分析 (PCA)、聚类分析、火山图、分级聚类、富集分析和分类预测等统计学技术来识别不同样品中的代谢物类型和相对含量上的重大差异。此外，采用 MPP 界面可将自定义分析简单地添加到 R 统计学计算环境中。

对基于 LC/MS 和 GC/MS 的代谢组学，MPP 将上述统计工具与确定化合物结构必需的工具结合在一起。据数据采集所用的分析技术不同，化合物鉴定能够达到不同的可信度。最常用的方法是采用精确质量数信息进行特定代谢物的数据库匹配，

以对候选化合物进行鉴定。加入同位素模式匹配能够增加分配的特异性，以便对经验式进行确认。此外，如果还包括保留时间信息，就能够实现化合物的可靠鉴定。或者，对 MS/MS 或 EI 谱库进行搜索也可以得到类似的鉴定结果。将保留时间信息和 MS/MS 或 EI 谱库搜索相结合所得的可信度最高。正如本文档之前所述，安捷伦可通过 GC/MS 或 LC/MS 提供用于化合物鉴定的数据库和谱库。<sup>3</sup>

对基于核磁共振的代谢组学，安捷伦的工作流程采用 Chenomx NMR 软件套装，由核磁共振谱图创建代谢轮廓。创建完成之后，可将代谢组学轮廓数据导入 MPP 进行统计学分析和进一步的生物学解析，包括系统分析。

## 系统生物学分析

系统或多组学分析对代谢组学研究至关重要，表现在两个截然不同的方面。首先，只有基于外部数据库对代谢组学数据进行共同分析，并且与其它类型的生物学测定相比较，才能够发现某些最重要的生物学规律。为了实现这一点，安捷伦目前提供了一种方法，基于以下简单前提：将代谢物测定与蛋白质或转录水平联系起来的最直观的方法就是利用代谢通路。与 Agilent Pathway Architect 模块结合使用时，MPP 可实现此类通路下代谢物与基因产物的共同可视化与共同分析（图 6）。目前，WikiPathways 是主要的通路来源，但也支持输出到 MetaCore、IPA、BioCyc 和 KEGG 等通路资源。

其次，系统生物学对于识别最具优势的后续实验非常关键。例如，考虑一个情形，在此情形中蛋白质组学（或转录组学）实验表明一个特别的通路处于活性状态。利用该通路中已知存在的化学基团信息，可将这一知识用于设计靶向代谢组学分析。类似地，代谢组学试验也可以对后续蛋白质组学、基因组学或转录组学实验提出建议。为促进这种反馈回路，Pathway Architect 模块可以帮助研究人员寻找活性通路，随后从所选通路中将标识直接导出到开源工具（如 Skyline）中，以帮助设计和执行后续试验，如靶向蛋白质组学分析。

## 结论

本文概述了安捷伦用于各种代谢组学工作流程的一系列仪器、数据库和软件工具。包括复杂性、样品量、真实性和化学特性（如极性）等的样品特性，是帮助确定研究所需最佳工作流程的重要因素。另外，经常会遇到需要组合采用多种方法的情形，例如需要同时采用发现和靶向代谢组学方法时，或者采用一种技术无法表征目标化合物的化学多样性时。

对于所有这些情形，Agilent GeneSpring/MPP 软件套装能够将各种生物学数据结合在一起，包括来自转录组学、蛋白质组学或基因组学实验的数据，并从生物学角度对其进行分析。这些分析既能够产生新的生物学观点，又能够为可能获得丰富成果的后续实验提供指导。

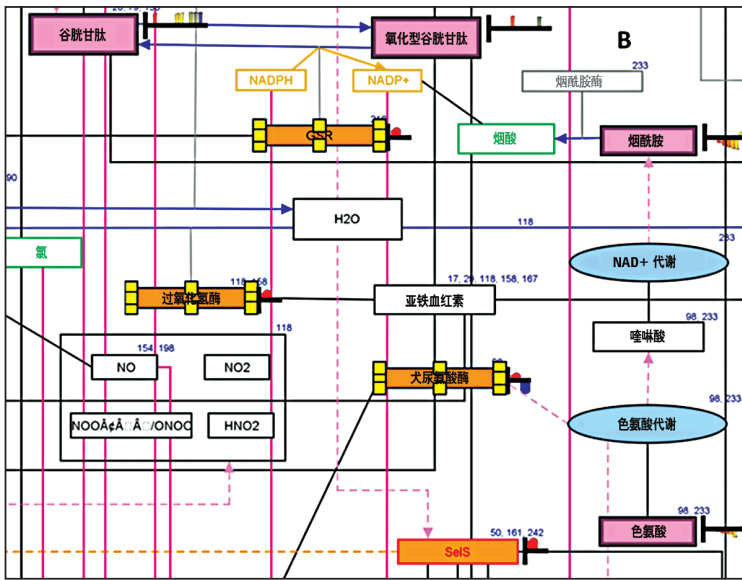


图 6. MPP 软件能够在复杂的实验设计中寻找成对比较之外的关系，并且通过 Pathway Architect 实现生物学解析

## 参考文献

1. 安捷伦代谢组学解决方案。安捷伦出版物 5990-6048CHCN。
2. Fiehn GC/MS 数据库, <http://fiehnlab.ucdavis.edu/metabolite-library-2007/>
3. <http://metlin.scripps.edu/>
4. 代谢组学数据库资源: 概述。 [www.springerlink.com/content/r3n3744t5504v058/](http://www.springerlink.com/content/r3n3744t5504v058/)
5. Chen, R., *et al.* Personal omics profiling reveals dynamic molecular and medical phenotypes. *Cell*, **2012**, 148(6):1293-1307.
6. Fischer, R., *et al.* Discovery of candidate serum proteomic and metabolomic biomarkers in ankylosing spondylitis. *Mol Cell Proteomics*, **2012**, 11(2):M111.013904.
7. Vareed, S.K., *et al.* Metabolites of purine nucleoside phosphorylase (NP) in serum have the potential to delineate pancreatic adenocarcinoma. *PLoS One*, **2011**, 6(3):e17177.
8. Shin, J.H., *et al.* 1H NMR-based metabolomic profiling in mice infected with Mycobacterium tuberculosis. *J Proteome Res.*, **2011**, 10 (5):2238-2247.
9. Garcia, E. *et al.*, Diagnosis of early stage ovarian cancer by 1H NMR metabolomics of serum explored by use of a microflow NMR probe. *J Proteome Res.*, **2011**, 10 (4):1765-1771.
10. Woo, D.C., *et al.* Regional metabolic alteration of Alzheimer's disease in mouse brain expressing mutant human APP-PS1 by 1H HR-MAS. *Behav Brain Res.*, **2010**, 211:125-131.

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

本资料中的信息如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2013  
2013年3月1日, 中国出版  
5991-1893CHCN



**Agilent Technologies**