

박테리아 차이 대사체 특성 규명을 위한 대사체학 배치 데이터 분석 워크플로

응용 자료

저자

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

개요

본 연구에서는 박테리아의 초기 및 후기 정체기 연구를 위해 대사체 발굴용 accurate mass Q-TOF LC/MS 워크플로를 사용하였습니다. 배치 모드로 데이터를 처리할 수 있는 소프트웨어를 사용함으로써 데이터를 더욱 효율적으로, 자동화하여 분석하였습니다. Agilent MassHunter Profinder(배치 feature extraction 소프트웨어)를 사용하여 양이온 데이터로부터 총 488개의 특징(feature)을, 음이온 데이터로부터 623개의 특징을 발견하였습니다. Mass Profiler Professional(MPP)을 사용한 통계 분석에서는 초기 정체기와 후기 정체기에서의 존재비가 유의하게 다른 특징들을 밝혀냈습니다. 양이온 데이터로부터 발견한 특징 중 57개는 초기 정체기에서의 존재비가 후기 정체기보다 높은 것으로 나타났습니다. 한편, 음이온 데이터로부터 발견한 특징 중 52개는 초기 정체기에서의 존재비가 후기 정체기보다 높은 것으로 나타났습니다. 대사체학 데이터의 생물학적 및 생화학적 배경을 이해하기 위해 데이터베이스 검색, accurate mass MS/MS 라이브러리 매칭 및 MS/MS 분자 구조 상관관계 분석을 통해 100가지 이상의 차이 특징들을 밝히고 이에 주석을 표기하였습니다.



Agilent Technologies

소개

박테리아의 성장은 Jacob Monod가 규명한 성장기의 고전적 정의를 포함하여 100년이 넘게 연구되고 있습니다¹. 세포가 후기 정체가 동안 생존하여 대사적으로 활성화되어 있지만 초기 정체가 동안에는 후기 정체기와 비교했을 때 자극이나 스트레스에 종종 다르게 반응한다는 사실이 밝혀졌습니다. 연구자들은 정체가 동안 생성되는 하나 이상의 대사체들로 인해 박테리아가 후기 정체기에서 생존하기 어렵게 되거나 정체가 진행되는 동안 방어적인 대사체가 소실될 수 있다는 가설을 세우고 있습니다. 현재까지는, 이러한 대사체들의 특성을 확인할 수 있는 정보가 전혀 없는 상황입니다.

본 연구에서는 초기 정체가 대비 후기 정체기에서 박테리아 내의 차이 대사체(differential metabolites)를 조사하기 위해 Q-TOF LC/MS 대사체학 접근법을 소개합니다. 애질런트의 데이터 처리 소프트웨어 제품군을 사용하면 특징(feature) 추출, 통계 분석 및 식별이 더 수월해집니다. 이를 통해 복잡한 원본 데이터를 생물학적으로 유의한 대사체 정보로 신속하게 변환할 수 있습니다.

실험

시료 전처리

세포 배양액을 초기 또는 후기 정체기에서 수확한 다음, phosphate-buffered saline으로 두 번 헹구어 세포 외 잔류 배지를 제거한 후, 물로 다시 헹구어 완충액을 제거하였습니다. 이 부유 세포를 원심분리하여 침전물(pellet)을 얻은 후 물을 따라냈습니다. -80°C에서 세포 침전물에 MeOH 0.5mL를 첨가한 후, 4°C에서 50% MeOH/H₂O 1.5mL를 첨가하였습니다. 세포를 물리적으로 용해시킨 후, 조추출액을 48,000g에서 1시간 동안 원심분리하여 상등액을 수집하였습니다. 상등액 중 500µL를 취하여 3kDa Nanosep 필터에 넣어 14,000g에서 원심분리하고, 여과물을 수집하여 진공 건조한 후 분석 전까지 -60°C 이하에서 보관하였습니다.

LC/MS 분석의 경우, 시료를 water/acetonitrile (3:7 v/v) 용매 500µL에 재부유시킨 후 볼텍스 처리 및 원심분리하였습니다. 그 다음 상등액을 Eppendorf 튜브에서 깨끗한 LC/MS 바이알로 옮겼습니다.

기기

LC/MS 분석은 Agilent 6230 TOF 시스템 또는 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF 시스템과 Agilent 1290 Infinity LC 시스템을 연결하여 수행하였습니다. LC 시스템은 다음 모듈로 구성되었습니다.

- Agilent 1290 Infinity Binary 펌프(G4220A)
- 온도 조절 장치 장착된 Agilent 1290 Infinity Autosampler(G4226A)
- Agilent 1290 Infinity 항온 컬럼 장치(G1316C)
- 100:1 분배기(p/n G1607-60000)가 장착된 Agilent 1100 시리즈 등용매 펌프(G1310)

동적 질량 측 보정은 기준 질량 용액을 등용매 펌프로 연속 주입하여 수행하였습니다. 표 1과 2에 최적화된 LC 및 MS 조건을 요약하였습니다.

데이터 분석 소프트웨어

- Agilent MassHunter Qualitative Analysis(Qual) B.07.00
- Agilent MassHunter Profinder B.06.00, service pack 1
- Agilent Mass Profiler Professional(MPP) B.13.0
- Agilent MassHunter Molecular Structure Correlator(MSC) B.07.00
- Pathway to PCDL B.07.00

표 1. LC 파라미터

파라미터	Agilent 1290 Infinity LC 시스템
분석 컬럼	Cogent Diamond Hydride HPLC 컬럼, 2.1 × 150mm, 4µm, 100A (p/n 70000-15P-2), Microsolv Technology Corporation
가드 컬럼	Agilent ZORBAX SB-C8, 2.1 × 30mm, 3.5µm (p/n 827700-936)
컬럼 온도	60°C
주입량	5µL(Agilent 6230 TOF를 이용한 프로파일링 실험 시) 10µL(Agilent 6550 Q-TOF를 이용한 식별 실험 시)
자동 시료 주입기 온도	4°C
이동상(양이온 모드)	A) 50 % water/50 % isopropanol containing 0.1 % formic acid B) 3 % water/97 % acetonitrile containing 0.1 % formic acid
이동상(음이온 모드)	A) 50 % water/50 % isopropanol/0.025 % formic acid and 5 µM EDTA B) 10 % water/90 % acetonitrile/5 mM ammonium formate/5 µM EDTA, pH=7
유량	0.6mL/분
그라디언트 (양이온 모드)	0 ~ 1분, 97 %B 1 ~ 15분, 97 %B ~ 10 %B
그라디언트 (음이온 모드)	0 ~ 1분, 99 %B 1 ~ 15분, 99 %B ~ 20 %B
정지 시간	15분
사후 시간	5분

LC/MS 대사체학 워크플로

초기 정체기 및 후기 정체기에서 박테리아의 비편향 대사체학 연구를 하기 위해 고분해능 Q-TOF LC/MS 대사체학 워크플로(그림 1)를 개발하였습니다. 워크플로는 다음과 같습니다.

1. 양이온 및 음이온 모드를 사용한 TOF 모드 각각으로부터 추출물 데이터 획득.
2. Agilent MassHunter Profinder² Batch Recursive Feature Extraction 알고리즘을 사용하여 원본 데이터로부터 특징 추출.
3. MPP를 사용하여 차이 분석 및 주석 표기.
4. Q-TOF LC/MS를 통해 관심 있는 차이 특징에 대한 표적 MS/MS 분석 수행.
5. Qualitative Analysis를 활용한 MS/MS 스펙트럼 매칭 기반의 대사체 식별 또는 Molecular Structure Correlator (MSC) 소프트웨어를 이용한 추정 대사체의 구조 규명.

표 2. MS 파라미터

파라미터	Agilent 6230 TOF 시스템
이온 모드	양이온 및 음이온
이온화원	Agilent Dual ESI
캐필러리 전압	3,500V (±)
건조 가스 온도	350°C
건조 가스 유량	10L/분
분무기 압력	45psi
Fragmentor	100V
MS 범위	25 ~ 1,600 m/z
MS 수집 속도	2 spectra/초
기준 질량	양이온 모드: 64.01577 및 922.009798 음이온 모드: 68.9957 및 966.0007
기준 펌프 유량	0.5mL/분(양이온 및 음이온 모드)
기준 전달	100:1 분배기(p/n G1607-60000)가 장착된 Agilent 1100 등용매 펌프
기기 모드	확장된 측정 범위(dynamic range) (2GHz)
파라미터	Agilent 6550 Q-TOF 시스템
이온 모드	양이온 및 음이온
이온화원	Agilent Dual ESI
캐필러리 전압	3,500V (±)
건조 가스 온도	200°C
건조 가스 유량	15L/분
분무기 압력	45psi
MS 범위	50 ~ 1,700 m/z
MS 수집 속도	3 spectra/초
MS/MS 범위	25 ~ 1,700 m/z
MS/MS 수집 속도	2 spectra/초, 표적 MS/MS
분리 폭	중간(약 4m/z)
충돌 에너지	10 ~ 40eV
기준 질량	양이온 모드: 64.01577 및 922.009798 음이온 모드: 68.9957 및 1033.9881
기준 펌프 유량	0.6mL/분(양이온 모드) 0.5mL/분(음이온 모드)
기준 전달	100:1 분배기(p/n G1607-60000)가 장착된 Agilent 1100 등용매 펌프
기기 모드	확장된 측정 범위(dynamic range) (2GHz)

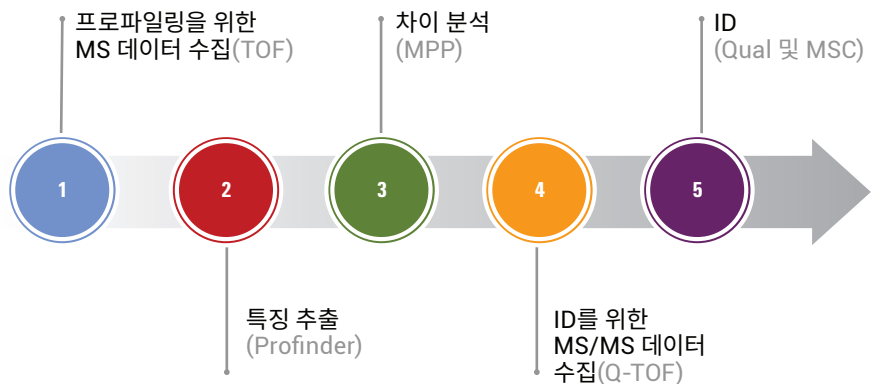


그림 1. 박테리아 대사체의 프로파일링 및 식별을 위한 LC/MS 대사체학 워크플로

결과 및 토의

TOF LC/MS를 이용한 대사체 프로파일링

이론적으로 TOF 또는 Q-TOF 모두 대사체 프로파일링에 활용할 수 있습니다. 실험실에 기기가 하나밖에 없는 경우에는 식별을 위한 프로파일링과 MS/MS 분석 모두를 수행할 수 있는 Q-TOF를 활용하는 것이 선호됩니다. 하지만 실험실에서 사용하는 시료량이 많아 여러 기기가 필요한 경우에는 TOF 기기와 Q-TOF 기기를 조합하여 활용하는 것이 더 비용 효율적입니다. 이 연구에서는 프로파일링에 6230 TOF를, 식별에 6550 Q-TOF를 활용하였습니다.

초기 정체기와 후기 정체기에서의 박테리아 대사체 차이는 초기 정체기에서 얻은 10가지 배양과 후기 정체기로부터 얻은 9가지 배양의 세포 추출물에 대해 대사체 프로파일링을 수행하여 평가했습니다. 6230 TOF LC/MS의 양이온 및 음이온 모드에서 이 시료를 프로파일링 하였습니다. 크로마토그래피 분리 시에는 극성 대사체의 검출 범위를 극대화하기 위해 수성 순상(ANP) 컬럼을 사용하였습니다. 그림 2는 음이온 모드에서 얻은 세포 추출물의 대사체 프로파일링 결과를 보여줍니다. 19가지 세포 추출물로부터 얻은 38개의 총 이온 크로마토그램(TIC)의 오버레이는 전체 크로마토그램에 걸쳐 머무름 시간의 변화가 극히 작음을 나타냅니다. 머무름 시간의 재현성은 서로 다른 시료 간의 피크 매칭에 사용되기 때문에 대사체 발굴 연구에서 대단히 중요합니다.

Agilent MassHunter Profinder를 이용한 배치 데이터 특징 추출

대사체학 데이터 분석의 난관 중 하나는 많은 양의 복잡한 원본 데이터로부터 특징을 추출하는 데 많은 시간이 소요된다는 것입니다. MassHunter Profinder 소프트웨어는 자동화된 배치 데이터 처리를 통해

처리량을 증가시키기 위한 목적으로 설계되었습니다. 이 연구에서는 Profinder에서 사용자 정의 화합물 필터링 기준 및 수동 큐레이션을 바탕으로 양이온 데이터로부터 488개 및 음이온 데이터로부터 623개의 특징을 발견하였습니다(그림3). 이후, 결과로 얻은 특징을 MPP(B.13.0)로 보내 차이 분석을 수행하였습니다.

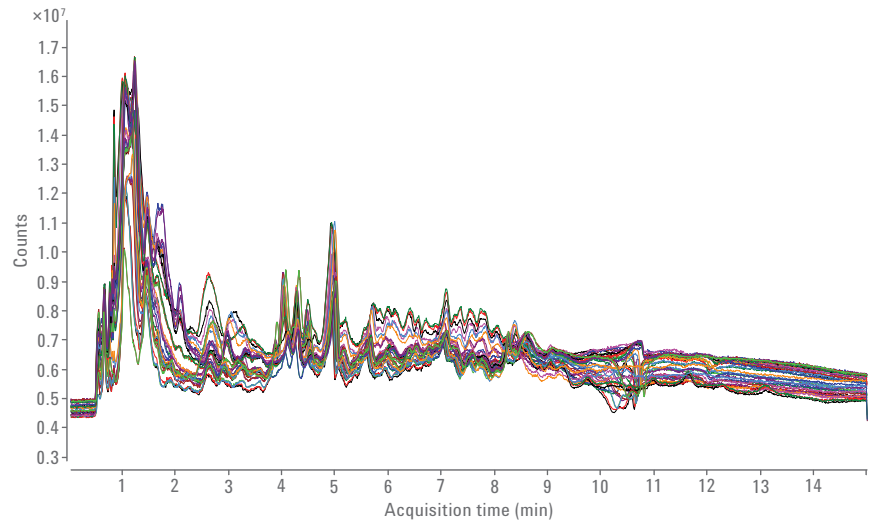


그림 2. ESI 음이온 모드에서 19개 세포 추출물로부터 얻은 38개 총 이온 크로마토그램(TIC)의 오버레이. 각 시료는 2회 반복 주입됨

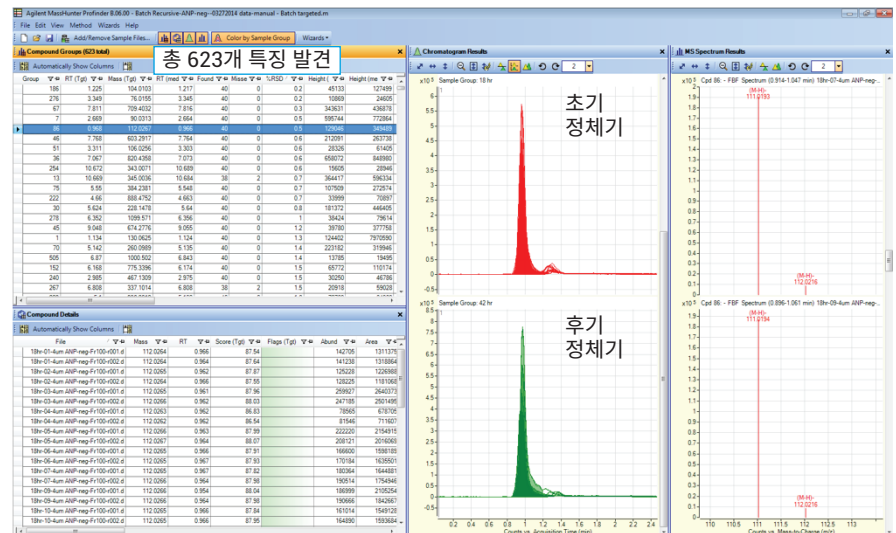


그림 3. Profinder Batch Recursive Feature Extraction 알고리즘을 사용하여 초기 및 후기 정체기의 세포 추출물로부터 얻은 음이온 MS 데이터의 비표적 특징(feature) 추출 결과

MPP를 사용한 차이 분석 및 주석 표기

초기와 후기 정체기에서 박테리아 내의 차이 특징을 확인하기 위해, 결과로 얻은 특징을 MPP의 *Filter on Volcano Plot* 알고리즘($P < 0.005$ 및 배율 변화(FC) > 2 cutoff)를 적용해 평가하였습니다. 통계 결과를 통해 후기 정체기와 초기 정체기 사이에 존재비가 확연히 다른 특징들이 드러났습니다. 양이온 데이터의 경우, 488개 특징 중 98개가 통계적 유의성을 보였고, 그 중 57개가 후기 정체기 대비 초기 정체기에서 존재비가 더 높은 것으로 나타났습니다. 마찬가지로, 음이온 데이터에서는 623개 특징 중 152개가 유의한 차이를 보였고 (그림 4), 그 중 52개가 후기 정체기 대비 초기 정체기에서 존재비가 더 높았습니다(파란색 사각형 점).

대사체학 데이터의 생물학적 및 생화학적 배경을 이해하기 위해, MPP의 ID Browser 도구와 accurate mass 데이터베이스 매칭(10ppm 질량 허용 오차)을 활용하여 이러한 차이 특징에 주석을 표기하였습니다. 3가지 데이터베이스 즉, Agilent-Metlin, KEGG 및 BioCyc에서 쿼리를 수행하였습니다. KEGG 및 BioCyc 데이터베이스는 모두 Agilent Pathway to PCDL 소프트웨어를 사용하여 구축하였습니다. 그림 5는 음이온 모드에서 얻은 일련의 차이 특징에 대한 ID Browser 결과를 보여줍니다. 화합물(이 경우 L-Leucine)을 클릭하면 화합물 목록 표에 해당 MS 스펙트럼 결과와 동위원소 피크에 대한 상세 정보 및 화학 구조가 표시됩니다. 사용자는 accurate mass, 동위원소 패턴, 머무름 시간 및 매칭 스코어와 같은 파라미터를 바탕으로 일치 항목을 빠르게 검토하고 순위를 매겨 점수가 가장 높은 항목을 선택해 주석을 표시할 수 있습니다.

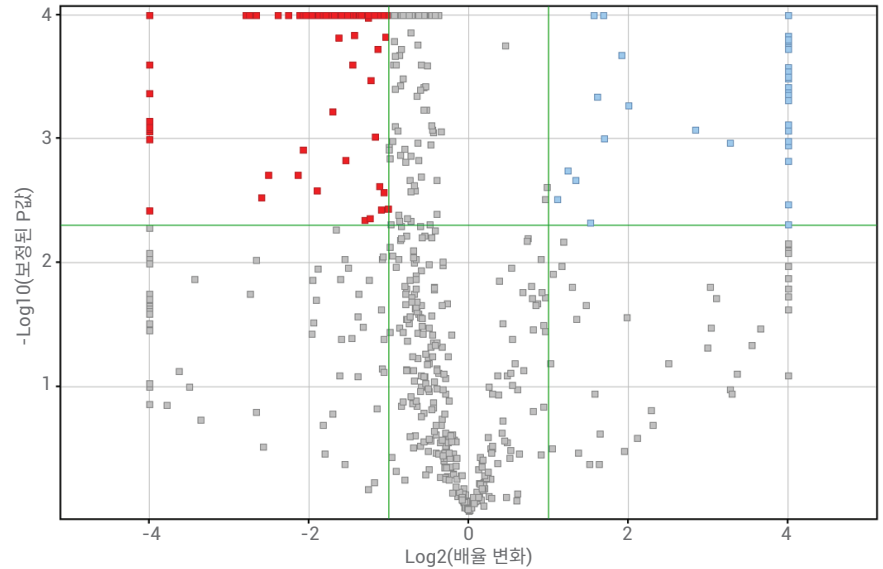


그림 4. 초기 대비 후기 정체기의 특징을 비교한 Volcano plot(음이온 데이터). 빨간색 점은 후기 정체기 대비 초기 정체기의 존재비가 낮은 특징을 나타내고($P < 0.005$, FC > 2), 파란색 점은 후기 정체기 대비 초기 정체기의 존재비가 높은 특징을 나타냄($P < 0.005$, FC > 2)

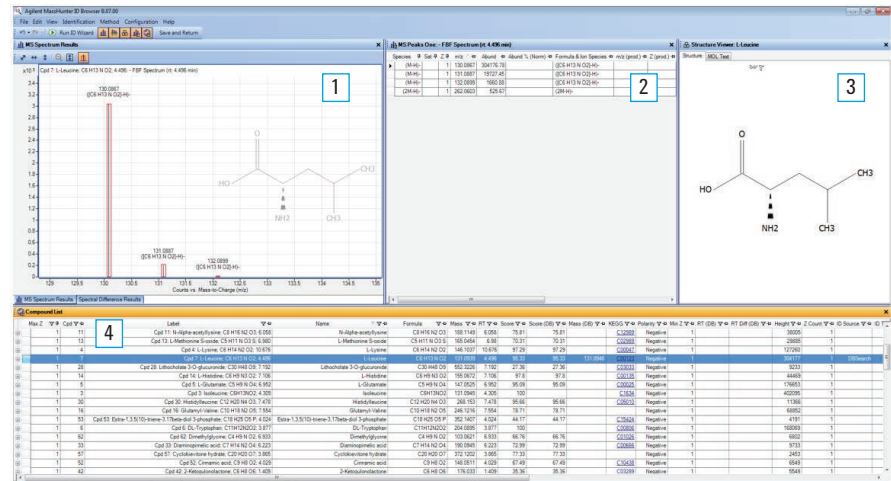


그림 5. 음이온 모드에서 검출된 일련의 차이 특징에 대한 ID Browser 결과. (1) MS 스펙트럼 결과, (2) 동위원소 피크에 대한 상세 정보, (3) 주석이 표기된 화합물의 구조, (4) 화합물 목록

화합물 식별 및 소프트웨어를 이용한 구조 규명

초기 주석 표기 결과를 검증하기 위해 6550 Q-TOF LC/MS를 이용하여 관심 차이 특징에 대한 표적 MS/MS 실험을 수행하였습니다. 화합물 식별 및 구조 규명은 두 가지 접근을 통해 이루어졌습니다. 첫 째로, MassHunter Qualitative Analysis 소프트웨어에 있는 *Find by Targeted MSMS* 도구를 사용하여 LC/MS/MS 데이터를 처리하였습니다. 그런 다음, 생성된 MS/MS 스펙트럼을 accurate mass MS/MS 정보를 포함하는 Agilent-Metlin 대사체 라이브러리와 비교하였습니다. 그림 6 및 7은 높은 신뢰도로 식별된 차이 특징(nicotinic acid로 식별된)을 보여줍니다. 미러 이미지 플롯(mirror image plot, 중간)은 수집한 시료 스펙트럼(상단)과 라이브러리 표준 스펙트럼(하단)에서 *m/z* 값과 전구 이온 및 조각 이온의 존재비가 탁월하게 일치하는 것을 보여줍니다(역매치 스코어(reverse match score)는 양이온 데이터의 경우 97, 음이온 데이터의 경우 99이었음).

수집한 MS/MS 스펙트럼이 Agilent-Metlin MS/MS 라이브러리와 잘 일치하지 않거나 전혀 일치하는 항목이 없는 경우, MSC 소프트웨어를 사용하는 다른 접근법을 사용하였습니다. MSC³는 체계적인 결합 절단(bond-breaking) 접근법을 통해 제시된 분자 구조의 이론적 조각 질량을 제안합니다. 그 다음 이러한 이론적 조각 질량을 관심 화합물에 대해 관측된 accurate mass 조각 이온과 연관시킵니다. MSC는 각 조각 이온의 개별 스코어로부터 전체 상관 스코어(적합도)를 계산합니다. 이때 하나 또는 그 이상의 하위구조 후보가 제안될 수 있습니다.

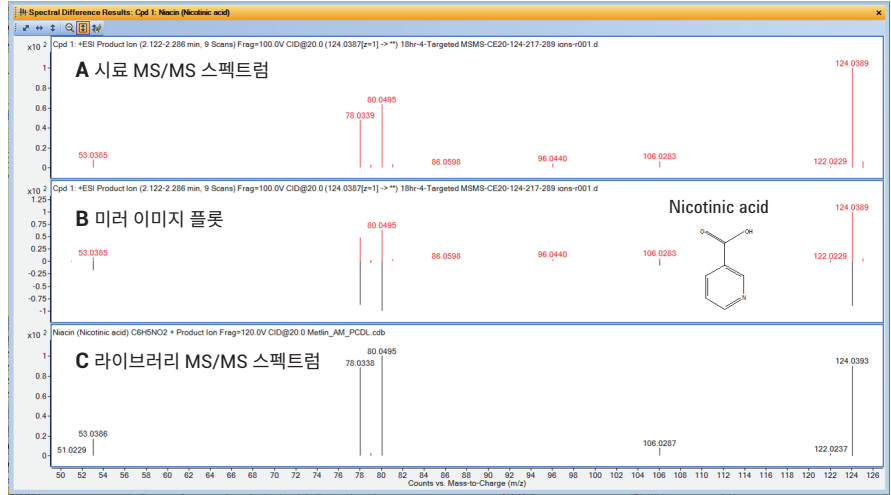


그림 6. MS/MS 스펙트럼 매칭을 사용한 화합물 구조 식별(역매치 스코어 97: 양이온 ESI 모드에서 nicotinic acid의 경우). 역매치 스코어는 라이브러리 표준을 시료 스펙트럼에 비추어 얻은 피크별 이온 일치도를 나타냄. (A) 시료 MS/MS 스펙트럼, (B) 미러 이미지 플롯, (C) 라이브러리 MS/MS 스펙트럼. 충돌 에너지(CE) 20eV를 사용하여 MS/MS 스펙트럼 획득

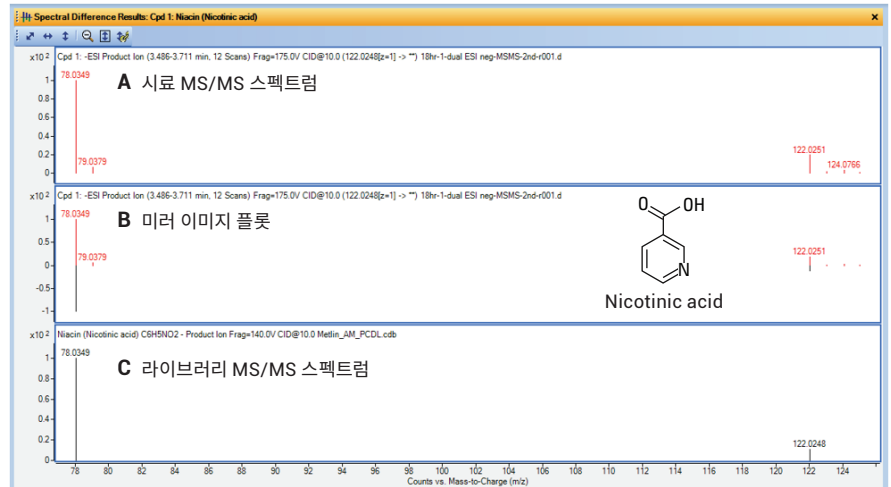


그림 7. MS/MS 스펙트럼 매칭을 사용한 화합물 구조 식별(역매치 스코어 99: 음이온 ESI 모드에서 nicotinic acid의 경우). 역매치 스코어는 라이브러리 표준을 시료 스펙트럼에 비추어 얻은 피크별 이온 일치도를 나타냄. (A) 시료 MS/MS 스펙트럼, (B) 미러 이미지 플롯, (C) 라이브러리 MS/MS 스펙트럼. 충돌 에너지(CE) 10eV를 사용하여 MS/MS 스펙트럼 획득

Agilent-Metlin, Pathway to PCDL에서 생성된 KEGG 및 BioCyc, 웹 기반 PubChem 및 ChemSpider 데이터베이스 검색을 통해 다중 데이터 파일을 MSC B.07.00에서 배치 처리하였습니다. 다수의 데이터베이스를 검색할 수 있으면 일치하는 구조를 찾을 가능성이 증가하지만 선택성은 감소하는 대가가 따릅니다. 이는 그림 8 및 9에 나타나 있습니다. 여기서는 Agilent-Metlin 데이터베이스에서 먼저 검색하여 m/z 187.1114, 203.1041 및 307.1512의 세 화합물에서 일치하는 구조를 찾았으며(그림 8), m/z 187.1114 이온의 경우 9개 구조를 발견하였습니다. 동일 MSC 필터링 기준을 사용하여 PubChem 데이터베이스에서 조회한 결과, 6개 화합물 모두에 대해 일치하는 구조가 나타났고(그림 9), m/z 187.1114 이온의 경우 300개의 구조를 찾았습니다. m/z 187.1114 이온에 대한 MS/MS 스펙트럼의 구조 규명 결과를 그림 10에 나타냈습니다. MSC는 모든 조각 이온에 대해 가장 타당한 조각 구조를 제안하여 라벨을 표시하였습니다. 이 접근법을 통해 결과로 얻은 MS/MS 스펙트럼을 빠르게 해석하여 중요한 특징에 대한 주석 표기 작업을 지원할 수 있었습니다.

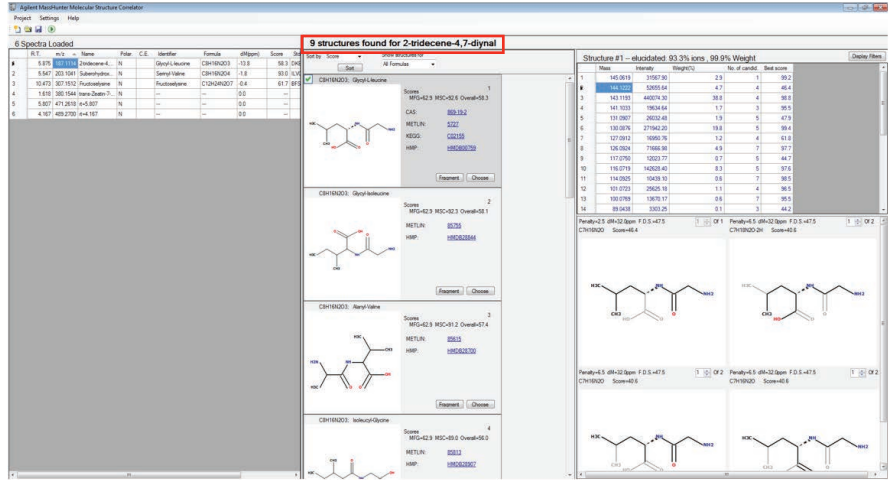


그림 8. Agilent-Metlin 데이터베이스 검색을 통해 얻은 MSC 결과

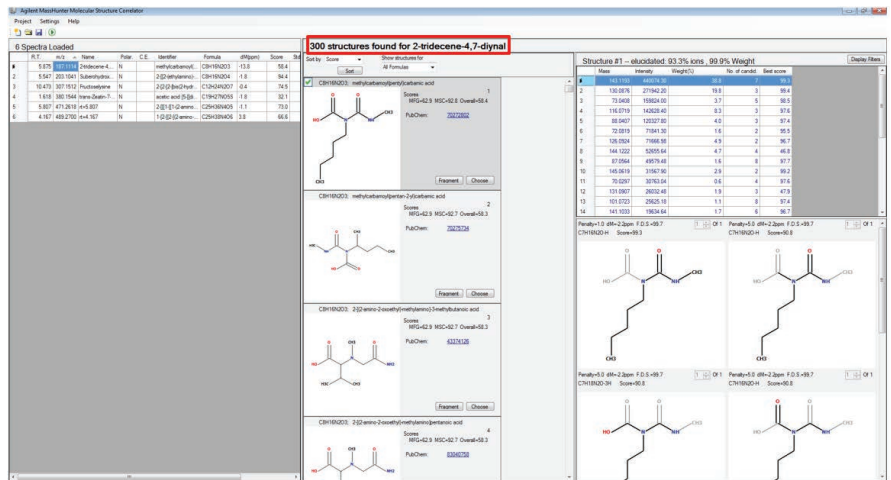


그림 9. 웹 기반 PubChem 데이터베이스 검색을 통해 얻은 MSC 결과

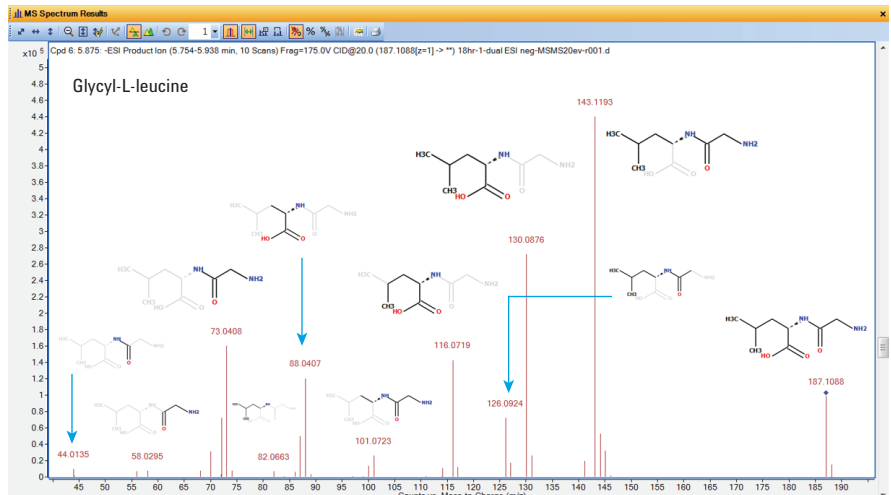


그림 10. MSC 및 Agilent-Metlin 데이터베이스를 사용한 m/z 187.1088 이온의 MS/MS 스펙트럼 구조 해석

결론

박테리아의 대사체 발굴 연구를 위해 사용하기 쉬운 Q-TOF LC/MS 기반의 워크플로를 소개하였습니다. 애질런트 소프트웨어 도구(Profiler, MPP 및 MSC)를 통해 특징 추출, 통계 분석, 주석 표기 및 식별 작업을 높은 품질로 유지하면서 효율적으로 수행할 수 있었습니다. 연구 결과, 초기 및 후기 정체기 사이에서 흥미로운 박테리아 대사 변화가 있음을 밝혀냈습니다.

참고문헌

1. Monod, J. The Growth of Bacterial Cultures. *Annual Review of Microbiology* **1949**, 3, pp 371-394.
2. MassHunter Profinder: Batch Processing Software for High Quality Feature Extraction of Mass Spectrometry Data, *Agilent Technologies Technical Overview*, publication number 5991-3947EN, **2014**.
3. S. Joseph, Y. Dai, Pharmaceutical Impurity Identification and Profiling Using Agilent Q-TOF LC/MS Combined with Advanced MassHunter Data Processing Software, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-1375EN, **2012**.

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2015
2015년 4월 28일, 한국에서 발행
5991-5706KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr



Agilent Technologies