

使用具有低能量 EI 的 GC/Q-TOF 检测肺结核感染的小鼠的肺部 代谢变化

应用简报

作者

M^a Fernanda Rey-Stolle¹,
Vineel P. Reddy², Santiago Angulo¹,
Adrie J.C. Steyn^{2,3,4}, Sofia Nieto⁵, Nathan
Eno⁵ 和 Coral Barbas¹

¹ 圣巴布罗大学药学院代谢组学和生物分析研究中心，西班牙马德里

² 阿拉巴马大学伯明翰分校微生物学系，阿拉巴马州伯明翰

³ 夸祖鲁纳塔尔结核病与艾滋病研究所 (KRITH)，南非德班

⁴ 阿拉巴马大学伯明翰分校 UAB 自由基生物学中心，阿拉巴马州伯明翰

⁵ 安捷伦科技公司，美国加利福尼亚州圣克拉拉

前言

全球结核病 (TB) 的发病率非常高，据估计仅 2014 一年中就有 960 万新增 TB 病例，并有 150 万名患者死于 TB [1]。采用代谢组学技术可以确认 TB 生物标记物，使我们对该疾病的认识取得很大进展。本研究中利用结核分枝杆菌 (Mtb) 感染的小鼠模型来确定未感染和已感染 TB 的肺组织的代谢情况。

为了确认感染后产生的新病理生理途径和 TB 生物标记物，使用未感染和已感染（感染第 9 周）的肺组织进行非靶向代谢组学研究。在初步化合物标注之后，使用低能量 EI 数据确认分子离子，并分别鉴定初步分析出的化合物与未知物的分子式。



Agilent Technologies

实验

将 5×10^4 CFU 的结核分枝杆菌 (Mtb) H37Rv 采用气管内注入法使小鼠接受感染。将肺组织干燥提取物进行甲氧化衍生, 然后三甲基硅烷化。使用 Agilent 7890B GC 系统与配有 EI 源的新型高分辨率 Agilent 7250 GC/Q-TOF 联用进行 GC/MS 分析, 该 EI 源可以进行低能量电离 (图 1)。除了配有新型低能量 EI 源, 7250 系统还具有高分离能力 (在 m/z 272 处为 25000)、更高的质量精度以及更宽的动态范围。表 1 显示了仪器参数。

当使用 Fiehn.L RI 数据库进行初步化合物鉴定时, 保留时间锁定 (RTL) Fiehn 方法便于进行鉴定。此外, 还使用美国国家标准技术研究院数据库 (NIST.L) 以及精确数量代谢组学 PCDL 以鉴定出更多化合物。使用 Agilent MassHunter 未知物分析软件 B.08.00 中的 SureMass 信号处理进行特征检测。使用 Agilent Mass Profiler Professional (MPP) 13.0 进行统计分析。Pathway Architect 是 MPP 的扩展工具, 用于确认与 TB 感染有关的生化通路。



图 1. Agilent 7250 GC/Q-TOF

表 1. Agilent 7250 GC/Q-TOF 色谱条件

参数	值
色谱柱	Agilent DB-5MS, 30 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m, DuraGuard, 10 m
进样量	1 μ L
分流比	10:1
分流/不分流进样口温度	250 $^{\circ}$ C
柱温箱升温程序	60 $^{\circ}$ C 保持 1 min, 以 10 $^{\circ}$ C/min 的速率升至 325 $^{\circ}$ C, 保持 9.5 min
载气	氦气, 1 mL/min, 恒流
传输线温度	290 $^{\circ}$ C
电离模式	70 eV 标准 EI 17 eV、15 eV 和 12 eV 低电子能量 EI
离子源温度	200 $^{\circ}$ C
四极杆温度	150 $^{\circ}$ C
质量范围	50-950 m/z
谱图采集速率	5 Hz

结果与讨论

实验设置与特征检测

为了确认感染后产生的新病理生理途径和 TB 生物标记物，使用未感染和已感染（感染 9 周后）的肺组织提取物进行非靶向代谢组学研究。

在未知物分析中进行以下特征检测和数据库搜索（图 2），将结果导出为 .CEF 文件以便在 MPP 中进一步处理。

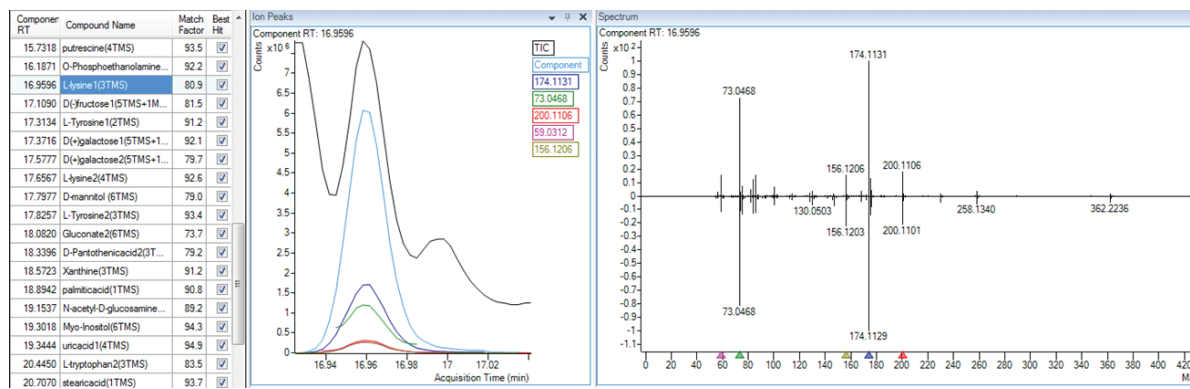


图 2. 在 MassHunter 未知物分析软件中进行特征检测和谱库搜索（以 PCDL 为例）

差异分析

在 MPP 中使用主成分分析 (PCA) 评估数据组。两个分开的集群表示未感染对照物与感染组织之间有清晰的分离（图 3）。

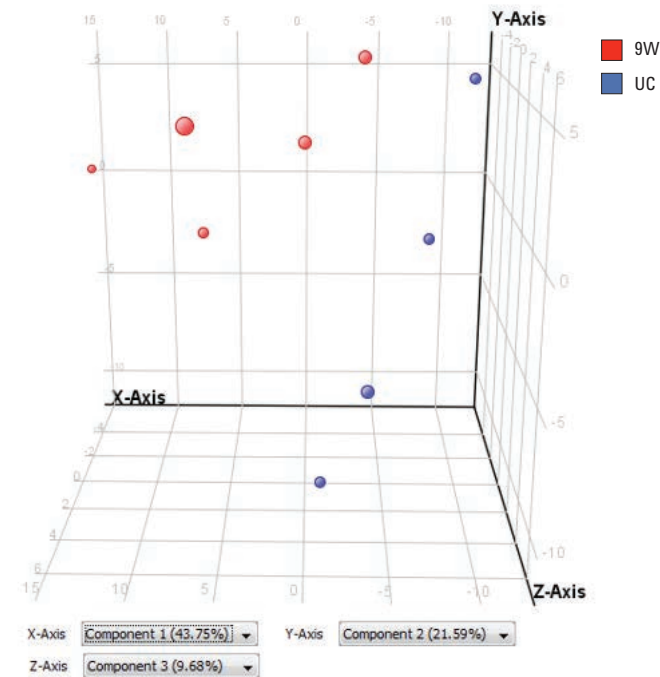


图 3. PCA 曲线。观察到未感染对照物 (UC, 蓝圈) 和感染 9 周后 (9W, 红圈) 肺组织提取物形成的不同集群

差异分析

在 MPP 中使用倍数变化分析 (图 4) 和热图 (图 5) 进一步评估未感染与已感染小鼠肺组织的代谢组的显著区别。观察到很多代谢物特别是氨基酸和核酸碱基的图谱变化。此外还检测到衣康酸和犬尿素的图谱变化。

Pathway Architect 也用于识别与 TB 感染潜在有关的生化通路。嘌呤和嘧啶代谢途径及 NAD 生物合成途径 II 都属于最重要的通路, 图 6 显示了其中一个示例。

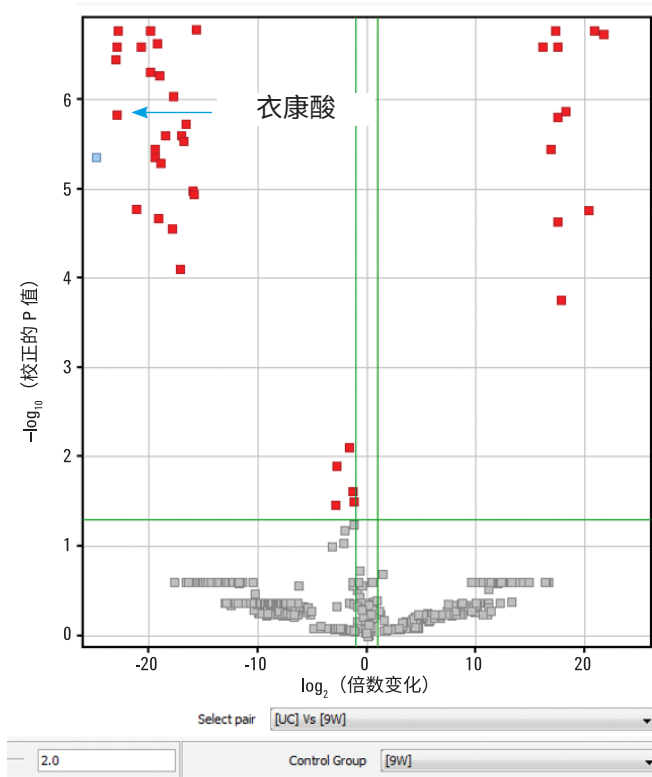


图 4. 未感染肺组织与 TB 感染 9 周后的火山图直观展示, 倍数变化的 log 为横坐标, p 值的 log 为纵坐标

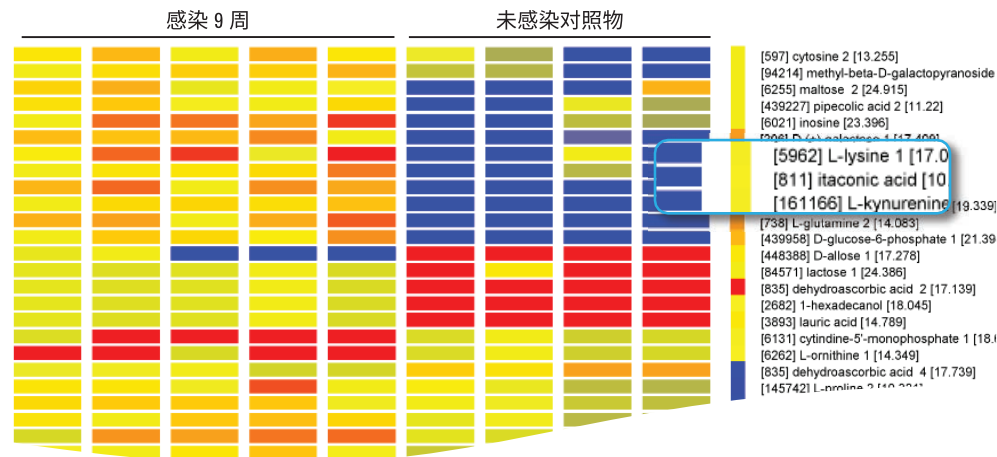


图 5. 热图重点显示出未感染和已感染肺组织间差异调控的代谢物

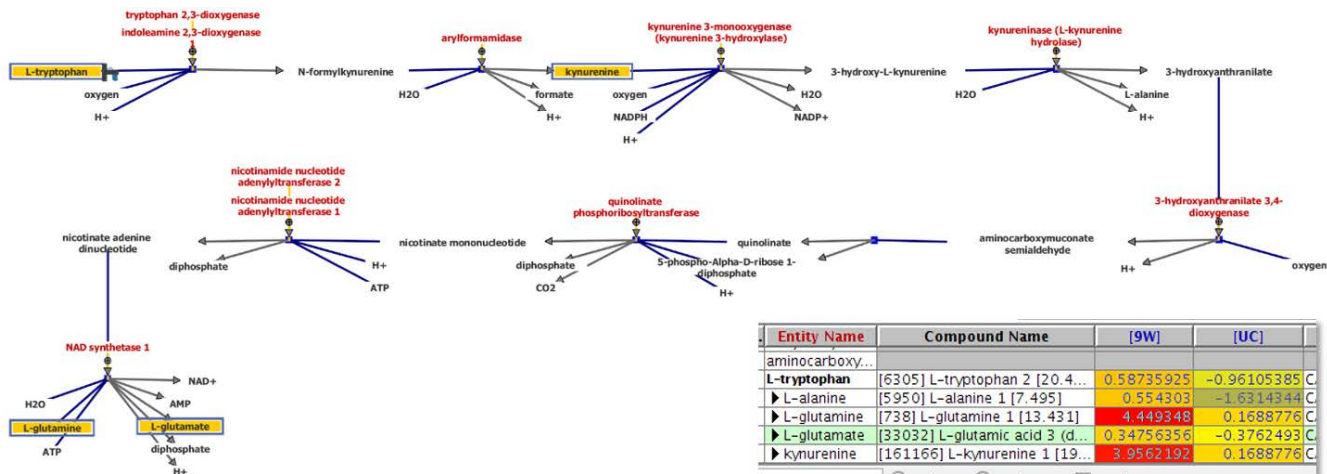


图 6. 通路分析示例结果：NAD 生物合成途径 II

初步匹配的未知物鉴定与确认

先通过 MPP 进行初步化合物标注和差异分析，然后使用低能量 EI 谱图确认分子离子，并分别鉴定初步分析出的差异化合物与未知物的分子式（图 7）。

想要阐明未知物的结构，首先使用低电子能量鉴定出分子离子 (M^+)。再在最佳电子能量下进一步获得 MS/MS，以使作为前体的 M^+ 绝对丰度最大化。使用 Qual 中的 Find by Targeted MS/MS 算法提取未知化合物的 MS/MS 谱图。采用分子结构关联 (MSC) 软件评估结果（图 8）。

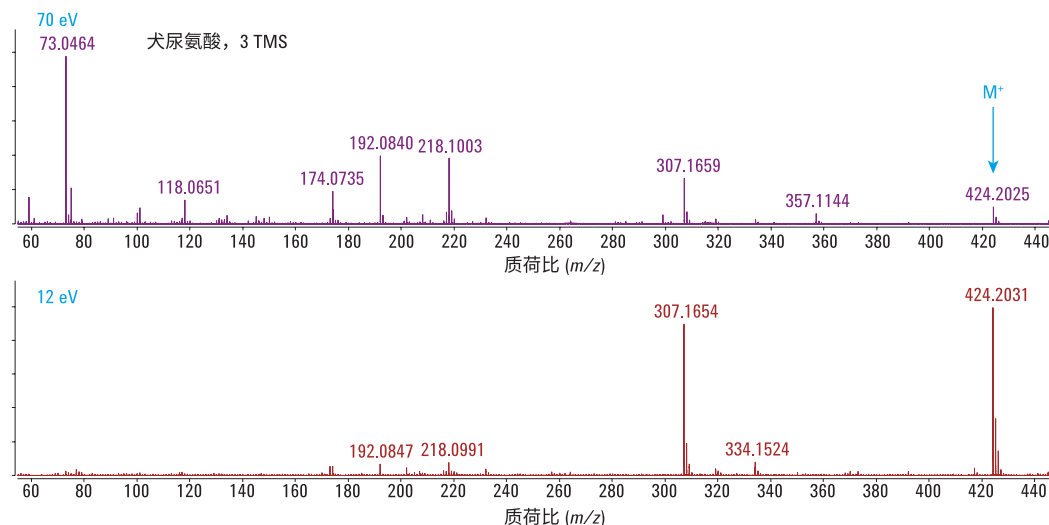


图 7. 使用低电子能量确认分子离子 (M^+)

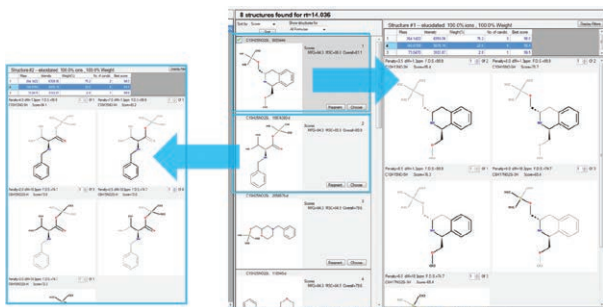
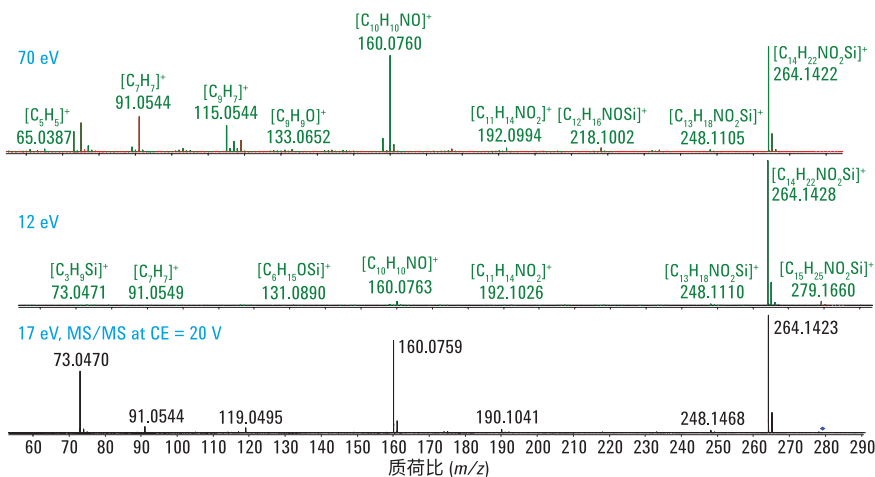


图 8. 使用低电子能量和配有分子结构关联 (MSC) 软件的 MS/MS 进行未知化合物的结构解析。
所示为未知化合物的可能结构

结论

非靶向代谢组学研究证明了氨基酸图谱的变化，此外犬尿素和衣康酸的图谱也发生了改变。有趣的是，衣康酸通常没有被列为哺乳动物的代谢产物，然而最近研究显示其可能在基于巨噬细胞的免疫应答中起到重要作用 [2]。

参考文献

1. 世界卫生组织 (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>)
2. Cheryl L. Strelko, *et al. J. Am. Chem. Soc.* **133(41)**, 16386-16389 (2011)

更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品与服务的详细信息，请访问我们的网站 www.agilent.com。

www.agilent.com

仅限研究使用。不可用作诊断目的。

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，2017

2017年7月6日，中国出版

5991-8199CHCN



Agilent Technologies