

基于液相色谱-质谱联用系统的高效 拟靶向代谢组学工作流程

作者

杜伟¹, Stephen Madden²

¹安捷伦科技（中国）有限公司，
中国北京

²安捷伦科技有限公司，美国加利
福尼亚州圣克拉拉市

前言

基于高效液相色谱与高分辨质谱联用系统的非靶向代谢组学方法可以提供全面的代谢组概览，但它存在重现性欠佳、线性范围有限以及数据处理繁复等问题。基于三重四极杆质谱的靶向方法是代谢物定量的金标准，具有超高的灵敏度、出色的稳定性和宽线性动态范围，但它通常适用于已知化合物，在全局代谢组学分析中的应用有限。最新开发的拟靶向代谢组学方法结合了非靶向和靶向分析的优点，在代谢组学研究中具有广泛的应用前景^[1,2]。

本研究将安捷伦四极杆飞行时间液质联用 (LC/Q-TOF)、三重四极杆液质联用 (LC/TQ)、MassHunter 工作站和新编程序 MRMWizard 相结合，开发了一种高效的拟靶向代谢组学工作流程。该工作流程高效、通量高且覆盖度广，能够同时对成百上千种代谢物进行半定量分析。

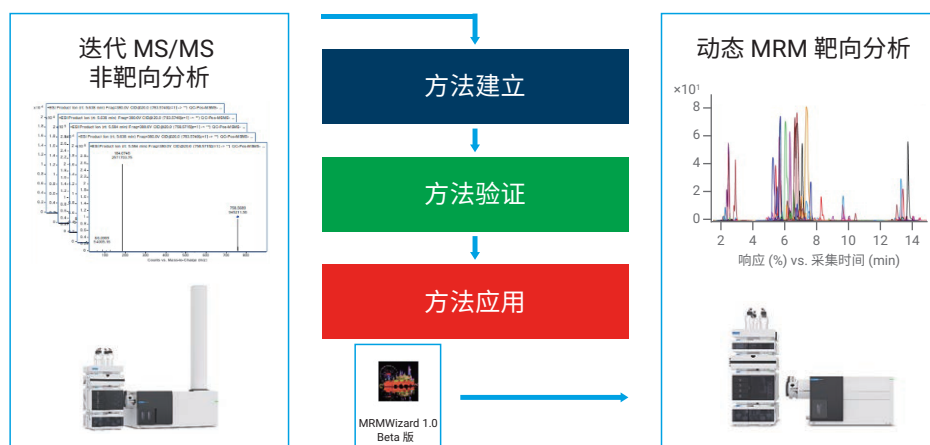


图 1. 安捷伦拟靶向代谢组学工作流程

实验部分

细胞样品

为了验证拟靶向工作流程，将开发的方法应用于特殊基因敲除的 K562 细胞的差异代谢物分析中。

仪器

液相色谱条件

1290 Infinity II UHPLC
色谱柱： Poroshell HILIC-Z, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm, PEEK 内衬
流动相： A: 水/乙腈 9:1 含 15 mmol/L 乙酸铵, pH 9.0
 B: 水/乙腈 1:9 含 15 mmol/L 乙酸铵
流速： 0.3 mL/min
梯度洗脱： 0 min 10% A
 8 min 50%
 10 min 50%
柱温： 40°C
进样量： 1 μL

质谱条件

质谱离子源
离子源模式： ESI
干燥气温度： 280°C
干燥气流速： 8 L/min
鞘气温度： 325°C
鞘气流速： 11 L/min
雾化器压力： 35 psi
毛细管电压： 3500 V (正离子)/3000 V (负离子)
喷嘴电压： 1000 V (正离子)/1500 V (负离子)
6546 LC/Q-TOF
扫描类型： 迭代自动 MS/MS
6470 LC/TQ
扫描类型： 动态 MRM

结果与讨论

MRMWizard

通常拟靶向方法的开发既费时又费力，尤其是为数千种代谢物选择离子对的过程。为了高效自动化地建立离子对，开发了一款名为 MRMWizard^[3] 的 Python 程序，该程序可以根据 LC/Q-TOF 数据的 MS/MS 谱图生成 MRM 离子对，并可高效、简易地进行 MRM 离子对的优化。该程序能够：

- 根据 Q-TOF 碰撞能量/MS 数据生成 LC/TQ MRM 列表
- 支持 MasshunterMRM、dMRM 和 Skyline 格式输出
- 支持 MRM 碰撞能量/碎裂电压优化，通过 MassHunter 定量分析软件中的 quantmethod.xml 文件自动评估最佳 MRM 条件

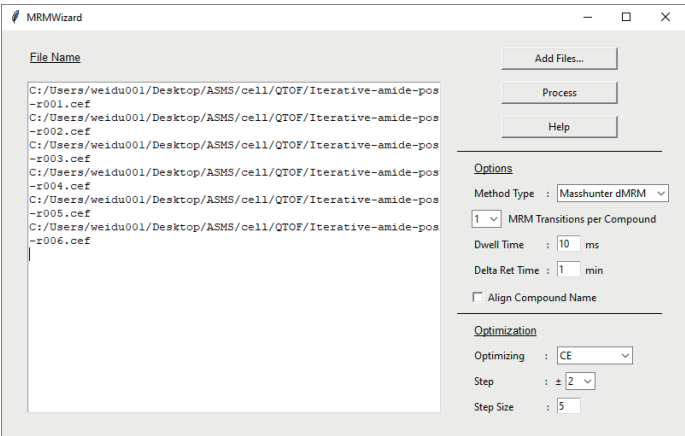


图 2. MRMWizard

拟靶向工作流程

代谢物的 MS/MS 谱图采集

混合 QC 样品的数据依赖型 MS/MS 数据采集是在 LC/Q-TOF 上，应用不同的碰撞能量在正、负离子模式下进行的，使用自动迭代功能来提高细胞代谢物的覆盖度。随后，对所有迭代数据文件进行分子特征提取，然后采用 METLIN 代谢物数据库和谱库进行定性鉴定，并使用 MassHunter 定性分析工作站 (10.0) 将结果导出成 CEF 文件。

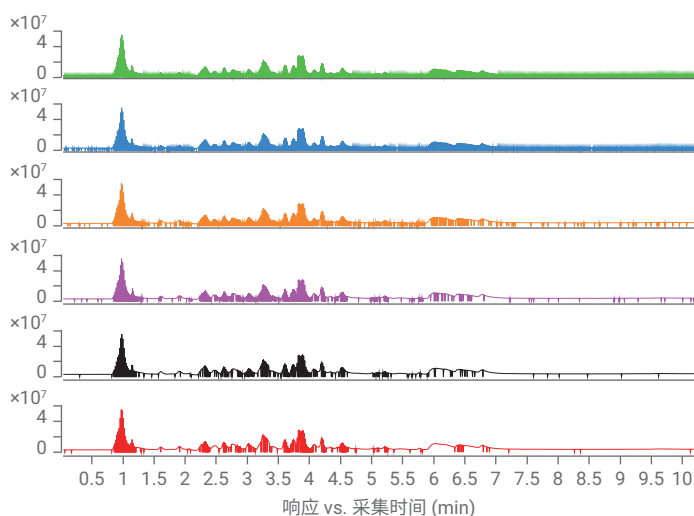


图 3. QC 样品的迭代 MS/MS 采集 TIC 色谱图

从 LC/Q-TOF 到 LC/TQ 的方法转换

MRMWizard 能够自动从 CEF 文件中每个化合物的 MS/MS 谱图中选择响应最高的子离子，并生成格式适合 LC/TQ 采集的 MRM 列表。本实验中在正离子模式下建立了 1337 个 MRM 离子对，在负离子模式下建立了 982 个 MRM 离子对。

MRM 碰撞能量和碎裂电压的优化

MRMWizard 能够生成具有不同碰撞能量或碎裂电压值的 MRM 列表。首先在 LC/TQ 上建立一个动态 MRM 采集方法，导入列表并采集 QC 样品数据。然后使用 MassHunter 定量分析工作站 (10.2 版本) 创建定量方法。在 MRMWizard 中打开定量方法，可获得每个 MRM 的最佳碰撞能量或碎裂电压，并生成最终的 MRM 列表。在对碰撞能量和碎裂电压进行优化后，去除丰度低、重现性差的 MRM 离子对。

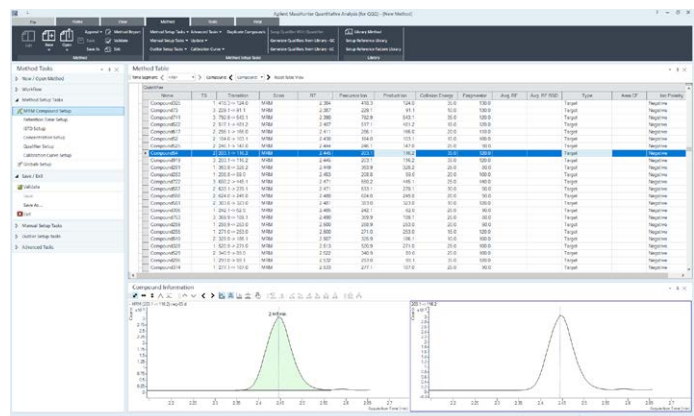


图 4. MassHunter 定量分析工作站中的方法设置

代谢组学数据采集

经过优化和验证，对细胞提取物进行 LC/TQ 数据采集，其中正离子模式下有 706 个 MRM 离子对，负离子模式下有 408 个 MRM 离子对。

代谢组学数据处理

采用 MassProfilerProfessional 15.1 (MPP) 软件进行组学数据统计分析。主成分分析 (PCA) 显示，基因修饰组样品和对照样品被分为不同的区域，这表明两组之间存在差异。

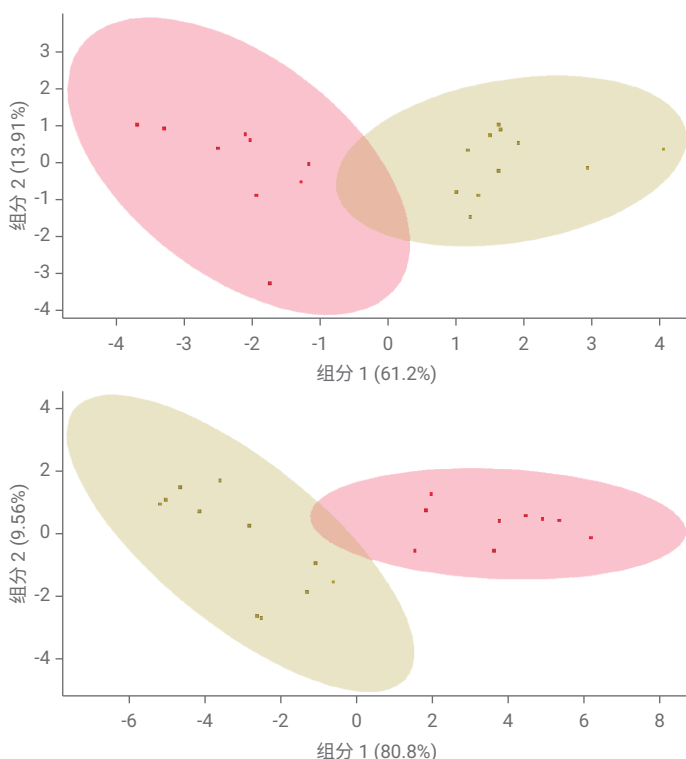


图 5. PCA 得分图

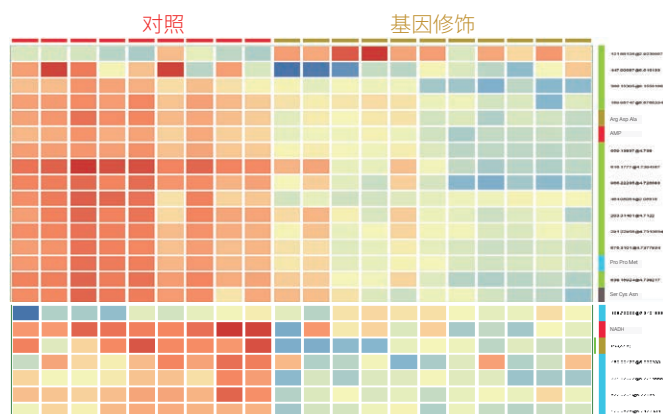


图 6. 差异代谢物热图

通过显著性差异分析 (t 检验, $p < 0.01$, 倍数变化 > 2 , $VIP > 1$) 得到 23 种差异代谢物, 包括核苷酸、脂质、肽和未定性代谢物。

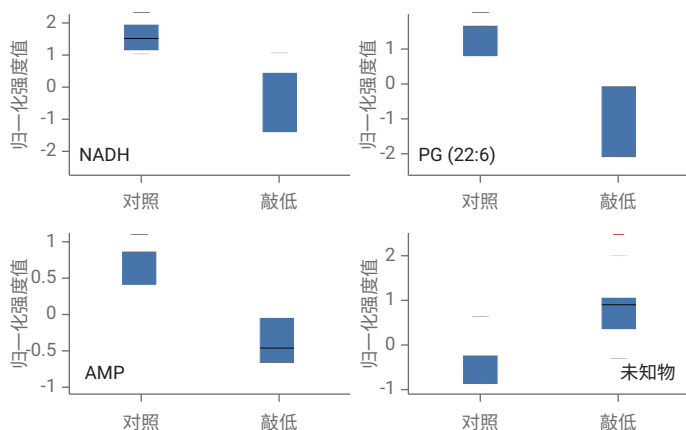


图 7. 差异代谢物的箱线图

结论

本研究中的拟靶向工作流程基于安捷伦 LC/Q-TOF、LC/TQ 和新程序 MRMWizard, 通过提高低丰度代谢物的覆盖度和检测限, 提高了分析效率并得到出色的重现性和精密度。这为采用安捷伦质谱平台进行高效的代谢组学分析, 促进潜在生物标志物的发现提供了可靠的基础。

参考文献

1. Zheng, F., Zhao, X., Zeng, Z. et al. Development of a plasma pseudotargeted metabolomics method based on ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. Nat Protoc 15, 2519-2537 (2020)
2. Jing Xu, Jiangshuo Li, Ruiping Zhang, Jiuming He, Yanhua Chen, Nan Bi, Yongmei Song, Luhua Wang, Qimin Zhan, Zeper Abliz, Development of a metabolic pathway-based pseudo-targeted metabolomics method using liquid chromatography coupled with mass spectrometry, Talanta, 192, 160-168 (2019)
3. https://drive.google.com/drive/folders/185bb2bP5v7k-8G_8ag-fjG1SLffCyg_D?usp=sharing

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn



微信搜一搜

Q 安捷伦视界

<https://explore.agilent.com/asms>

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。

RA44693.6112962963

本文中的信息、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，2022

2022 年 5 月 20 日，中国出版

5994-5106ZHCN