

## 포괄적인 표적 대사체학 워크플로

### 저자

Karen E. Yannell, PhD  
Cate Simmermaker  
Genevieve Van de Bittner, PhD  
Daniel Cuthbertson, PhD,  
Agilent Technologies, Inc.

### 개요

대사체란 세포나 유기체가 대사과정에서 생성하는 모든 작은 분자를 말합니다. 따라서 대사체학 데이터는 대사 활동과 생리적 상태를 보여주는 직접적인 기능적 지표로 사용될 수 있습니다. 표적 대사체학은 생물학적 과정에 관여할 가능성이 높은 미리 정의된 대사체 그룹을 정기적으로 검출하고 정량화하는 것을 목표로 합니다. 본 응용 자료에서는 표적 대사체학을 위한 시료 전처리와 기기 분석 솔루션을 결합한 강력한 워크플로를 제시하며, 이를 혈장과 포유류 세포 시료에 적용할 수 있습니다. Agilent Bravo Metabolomics 시료 전처리 플랫폼과 Agilent Captiva EMR-Lipid 플레이트를 결합하여 시료를 자동으로 전처리했습니다. 대사체 분리는 Agilent 1290 Infinity II Bio LC 초고성능 액체 크로마토그래피 시스템과 Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z 컬럼을 사용하여 수행했습니다. 대사체 검출은 Agilent 6495 QQQ LC/MS 시스템과 Agilent MassHunter Optimizer 소프트웨어를 사용하여 만든 500개 맞춤형 대사체 데이터베이스를 사용하여 수행했습니다. Dynamic MRM(dMRM) 분석법에는 다양한 수의 ion transition에 사용되고, 500개의 대사체 각각에 대해 하나의 transition을 유지할 수 있으며 1ms의 dwell time에서도 재현성 있게 작동할 수 있습니다. 또한, 데이터 분석은 Agilent MassHunter Quantitative Analysis 10과 Mass Profiler Professional(MPP) 소프트웨어를 사용하여 수행했습니다. 여기에 제시된 결과는 이 분석법이 여러 화합물 계열로부터 대사체를 재현성 있고 효율적으로 분리할 수 있음을 보여줍니다. 더 나아가, 6495 QQQ LC/MS는 짧은 dwell time에서도 매우 높은 감도로 대사체를 검출할 수 있습니다. 요약하자면, 이 방법은 재현성이 높고 사용이 쉬우며, 특정 요구 사항에 맞게 맞춤화가 가능하여 대사체학 전문 지식이 많거나 적은 다양한 연구자에게 적합합니다.

## 소개

세포는 대사물질이라고 하는 작은 분자(< 1500 Da)를 생산, 변형 및 소비합니다. 이를 통틀어 대사체라고 합니다. 이러한 대사체는 유기체의 표현형을 반영하기 때문에 중요합니다. 여기에는 포도당, 콜레스테롤, ATP, 지질, 아민 신경전달물질, 아미노산, 유기산, 스테로이드와 같이 대사 중에 합성되는 분자가 포함됩니다.<sup>1</sup> 대사체학 연구는 이러한 작은 분자를 측정하고 다양한 생리적 상태와의 상관 관계를 찾는 것을 목표로 합니다.<sup>2</sup> 대사체학 분석법은 크게 비표적 분석과 표적 분석의 두 가지 범주로 나뉩니다. 비표적 대사체학은 시료에 존재하는 모든 측정 가능한

분석물질, 즉 알려지지 않은 화합물을 포함한 모든 것을 포괄적으로 분석합니다. 이와 대조적으로, 표적 대사체학은 정의된 그룹을 측정합니다.<sup>2</sup> 결과적으로, 비표적 분석은 일반적으로 대사체 발견에 사용되는 반면, 표적 대사체학은 관심이 있는 특정 대사체의 상대적 또는 절대적 정량화 및 검증을 제공하는 데 사용됩니다.

포괄적인 표적 대사체학 워크플로에는 시료 전처리, 분리, 검출, 대사체의 통계 분석이 포함되므로 다양한 분석 기술의 결합이 필요합니다. 애질런트는 워크플로의 모든 단계에 필요한 하드웨어, 소모품, 소프트웨어를 완벽하게 제공합니다(그림 1). 또한 모든 프로토콜, 분석법 및 데이터베이스가 이미 패키징되어 있어 모든 실험실에서 빠르게 구현할 수 있습니다.



그림 1: 표적 대사체학을 위한 애질런트 솔루션.

여기에 제시된 워크플로는 자동화된 시료 전처리, 친수성 상호작용 크로마토그래피(HILIC), QQQ 질량 분석법(LC/TQ)을 결합하여 표적 대사체 검출을 달성합니다. 그 결과, 다양한 수준의 대사체학 전문성을 가진 다양한 연구자들이 다양한 시료 유형에서 민감하고 재현성 있는 결과를 얻을 수 있습니다.

## 분석법

### 시료 전처리

[Bravo Metabolomics 시료 전처리 플랫폼](#)과 [Agilent Captiva EMR-Lipid 고체상 추출 플레이트](#)(그림 2A 및 B)를 사용하여 시료 전처리를 수행했습니다. 세포 시료 전처리를 위해 추가적으로 Dual Metabolite + Lipid Cell Sample Preparation VWorks 프로토콜도 필요합니다.<sup>3</sup> Bravo 플랫폼을 사용하여 시료 전처리 과정을 자동화하면 사용 편의성이 향상되고, 실제 작업 시간이 줄고, 사용자의 실수를 줄임으로써 재현성이 높아집니다. Captiva EMR-Lipid 기술은 크기 배제와 소수성 상호작용을 기반으로 지질을 제거합니다. 긴 탄화수소 사슬을 가진 지질을 효과적으로

제거하면 표적 극성 대사체의 이온 억제가 최소화되고 분석법의 신뢰성과 견고성이 향상됩니다.<sup>4</sup> 이 단계는 극성 대사체를 재현성 있게 용출하고 크로마토그래피의 견고성을 높이는 데도 필수적입니다.

이전 응용 자료에 설명된 프로토콜에 따라 20µL의 소 혈장(BioIVT)과 100만 개의 K562 만성 골수성 백혈병 세포에서 대사체를 추출했습니다.<sup>3,5</sup> 세포를 배지에서 먼저 분리한 다음, PBS로 세척하고 용해시키고, 세포 용해물을 96웰 플레이트에 첨가하기 전에 대사를 원칭시켰습니다. 두 가지 시료 유형 모두를 Bravo 플랫폼을 사용하여 자동으로 극성 대사체를 추출했으며, 사용한 일반 프로토콜은 그림 2C에 나와있습니다. 이 워크플로는 LC/MS 분석을 위해 건조하고 재구성할 수 있는 극성 대사체 추출물이 담긴 플레이트를 제공합니다.

### 분리

이전 단계에서 추출한 대사체를 [1290 Infinity II Bio LC](#) 시스템을 사용하여 분리했습니다(그림 3A). 이 초고성능 액체 크로마토그래피(UHPLC) 시스템은 MP35N 금속 합금으로



**그림 2:** 표적 대사체학 연구에서 자동화된 시료 전처리를 위한 애질런트 솔루션입니다. **A.** Bravo Metabolomics 시료 전처리 플랫폼 **B.** Captiva EMR-Lipid 고체상 추출 플레이트 **C.** 일반적인 극성 대사체 추출 프로토콜.

A



B

LC 조건		
컬럼	Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1 x 150mm 2.7µm, 제품 번호 683775-92	
컬럼 온도	15°C	
주입량	3µL	
자동 샘플러 온도	5°C	
니들 세척	표준 세척, 10초, IPA:ACN:H2O 1:1:1	
이동상	A = 20mM 아세트산 암모늄, pH 9.3 + 5µM 메드론산 수용액 B = 순수 ACN	
유속	0.400mL/분	
그레디언트 프로그램	시간	%B
	0.00	90
	1.00	90
	8.00	78
	12.00	60
	15.00	10
	18.00	10
	19.00*	90
	23	90
총 분석 시간	24분	

그림 3: A. Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템 B. 극성 대사체 분리에 사용된 프로토콜 \* 재평형화 동안 0.5mL/분의 유속이 사용되었습니다.

코팅되어 금속에 민감한 분석물질에 대해 재현 가능한 피크와 낮은 검출 한계를 얻을 수 있습니다. 이 시스템은 [InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z](#) 컬럼과 결합되어 극성 물질을 잘 유지하는 동시에 양이온 및 음이온 모드에서 이온화를 허용합니다.

사용된 조건은 그림 3B에 자세히 설명되어 있습니다. Poroshell 120 HILIC-Z 컬럼(2.1 x 150mm, 2.7µm)을 표준 인산화 절차에 따라 플래싱하고 분석 완충액(30:70 A:B)으로 1시간 동안 평형화했습니다. 버퍼 시스템에는 20mM 아세트산 암모늄, pH 9.3 + 5µM 메드론산 수용액(이동상 A) 및 순수한 아세토니트릴(이동상 B)을 사용했습니다. 분석에는 비선형 그레디언트가 사용되었습니다(그레디언트에 따른 용출 시간은 0.5-16분).

각 주입은 재평형 시간을 포함해 24분 동안 지속되었습니다. 여러 컬럼 배치에서, 여러 실험실에서, 그리고 다양한 속련도의 사용자를 대상으로 이 분석법과 관련 프로토콜을 테스트했습니다. 이러한 최적화와 테스트를 통해 재현 가능한 머무름 시간과 다양한 실험실로의 이전 가능성을 보장합니다.

### 검출 및 분석

**장비:** 대사체 검출에는 [6495 QQQ LC/MS](#)(LC/TQ) 시스템(그림 4A)을 사용했습니다. 이 시스템은 강력하고 신뢰할 수 있는 질량 분석기로, 짧은 dwell time(0.5ms)에서도 재현 가능하고 민감한 데이터를 생성합니다.

A



B

AJS 파라미터	
Ion mode	Positive/Negative
Gas temperature	200 °C
Drying gas flow	14 L/min
Nebulizer gas	50 psi
Sheath gas temperature	375 °C
Sheath gas flow	12 L/min
Capillary voltage	(+)3000/(-)2500 V
Nozzle voltage	0 V

그림 4: A. Agilent 6495C QQQ LC/MS. B. AJS에 사용되는 파라미터. iFunnel positive high pressure RF 150 V, positive low pressure RF 60, negative high pressure RF 90 V, negative low pressure RF 60.

3세대 이온 퍼널은 중성 이온을 제거하는 동시에 불필요한 이온을 수집하고 집중시킵니다. Agilent Jet Stream(AJS)은 열 포커싱 및 열 전달을 통해 표준 전기 분무 기술보다 높은 효율로 탈용매화하고, 5배 더 많은 이온을 생성합니다. AJS에 사용된 이온소스 조건은 그림 4B에 요약되어 있습니다.

**데이터베이스 구축:** 다양한 ion transition이 dynamic MRM(dMRM) 분석법에 사용되었습니다.<sup>6</sup> dwell time은 테스트된 가장 낮은 값(1ms)에서도 재현 가능했습니다. 500개가 넘는 분석물질에 대한 ion transition 데이터베이스를 자동으로 구축하는 데 MassHunter Optimizer 소프트웨어가 사용되었습니다. 각 분석물질의 MRM transition을 최적화하기 위해 순수 표준물질을 사용했습니다. 이러한 transition은 검증 및 선별되어 머무름 시간에 할당되었습니다. 가능한 경우, 양이온 및 음이온 모드에서의 ion transition을 추가했고, 각 이온 모드에 대해 최소 두 개의 transition이 포함되었습니다.

**분석법 맞춤화:** 데이터베이스 구현은 각 실험에 맞게 맞춤화 가능하며, 연구자가 대사체를 프로파일링하거나 정량적 분석법을 구축할 수 있는 유연성을 제공할 수 있습니다. 잠재적으로 4가지 워크플로가 있습니다. 1) 모든 분석물질을 프로파일링, 2) 시료에 존재하는 것으로 알려진 특정 분석물질에 대한 프로파일링, 3) pathway에 대한 프로파일링, 4) Cambridge Isotope Laboratories의 안정적 동위 원소 제품을 사용한 정량 또는 반정량 분석법.<sup>7</sup> 이 응용 자료에서는 두 번째 워크플로를 사용했습니다(그림 5).

**소프트웨어:** [MassHunter 10 Acquisition 소프트웨어](#)를 사용하여 LC/TQ 기기를 제어했습니다. 모든 분석물질의 정량화와 적분은 [MassHunter Quantitative Analysis 10 소프트웨어](#)를 사용하여 수행했습니다. [Mass Profiler Professional\(MPP\)](#)을 사용하여 데이터에 대한 통계 분석을 수행했습니다. 이 소프트웨어는 분석을 간소화하기 위해 자동화와 wizard를 사용합니다.

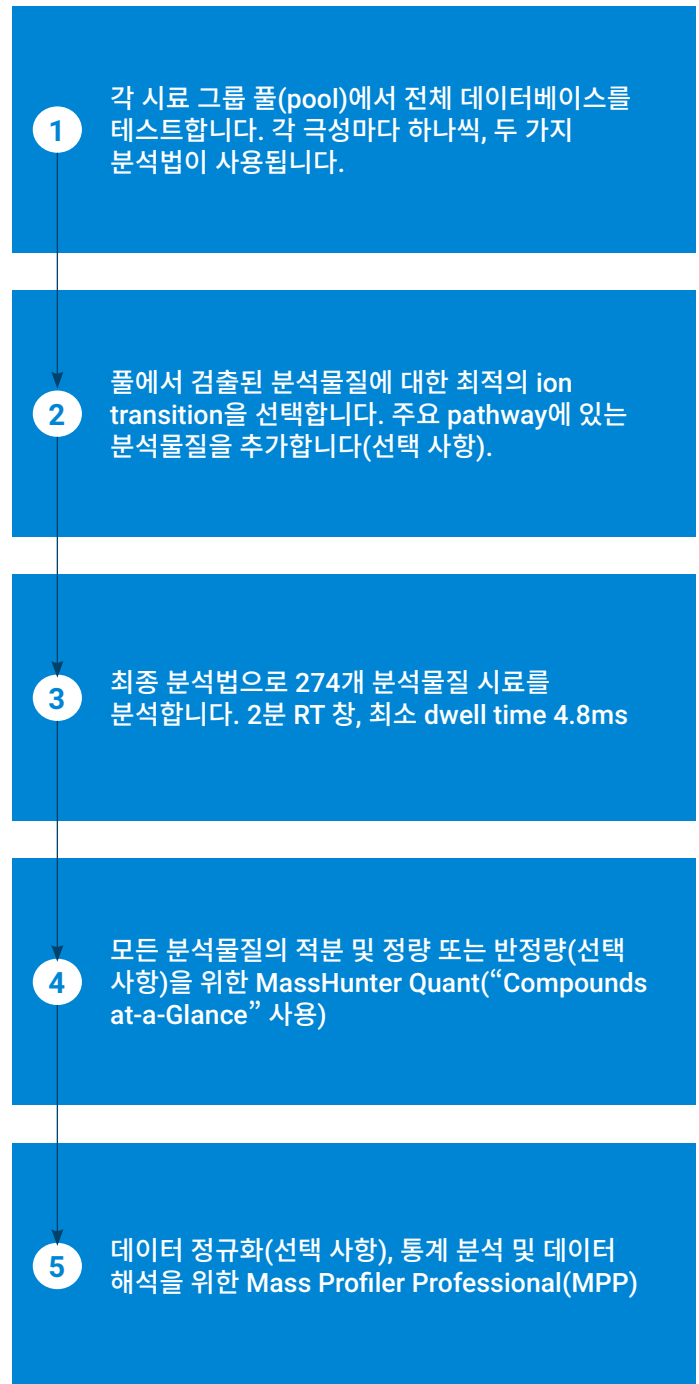
## 결과 및 토론

이 워크플로를 통해 혈장과 세포 시료에서 각각 266개와 274개의 대사체를 식별했습니다. 구축된 데이터베이스에는 아미노산, 보조 효소, 트리카르복실산(TCA) 회로, 해당작용 분석물질을 포함하는 500개 이상의 분석물질이 포함되어 있습니다. 이를 통해 연구자는 에너지 대사의 기본 pathway를 자신 있게 탐색할 수 있습니다.

### 다양한 분석물질 클래스에 대한 재현 가능한 피크

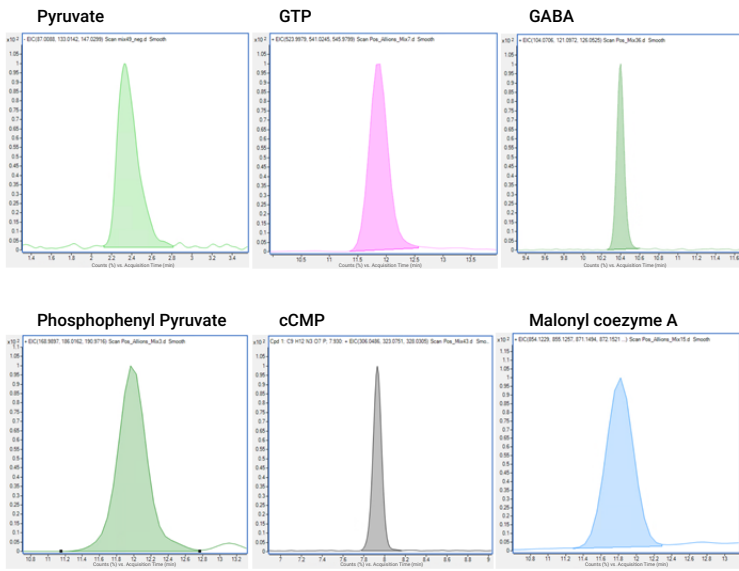
HILIC-Z 컬럼과 1290 Infinity II Bio LC 시스템을 결합해 다양한 화학적 성질을 지닌 대사체를 효율적이고 재현성 있게 분리했습니다(그림 6). HILIC 분석법으로 이온 쌍 시약을 사용하지 않고도 류신 및 이소류신과 같은 여러 극성 이성질체 화합물을 재현성 있게 분리하는 것이 가능했습니다(그림 6B).

기존 C18 분석법에서 작은 대사체를 유지하는 데 사용된 이온 쌍 시약은 LC/MS 시스템에 양전하 이온의 백그라운드를 도입하여 양이온 모드에서의 분석을 방해합니다. 이온 쌍 시약이 필요 없는 HILIC 분석법은 대사체과 기타 저분자를 그대로 유지하므로 연구자들은 두 이온 모드에서 대사체를 모두 검출하여 대사체 커버리지를 넓힐 수 있습니다.



**그림 5:** 시료에 존재하는 특정 분석물질을 프로파일링하는 데 사용되는 워크플로입니다.

A



B

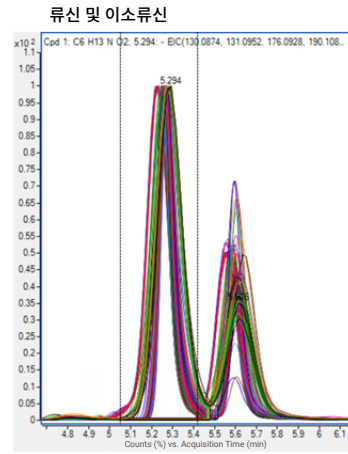


그림 6: A. HILIC-Z 컬럼과 표준화된 컬럼 및 완충액 제조 워크플로를 사용하여 얻은 크로마토그램의 예입니다. B. 160개의 서로 다른 혈장 추출물에서 얻은 160개의 크로마토그램을 중첩한 결과로, isobaric 물질인 류신(왼쪽)과 이소류신(오른쪽)을 재현성 있게 분리한 모습을 보여줍니다.

### 재현 가능한 머무름 시간

기존의 인식 중 하나는 HILIC이 재현성이 없고 성공적으로 수행하려면 고도의 기술이 필요하다는 것입니다. 그러나 여기에 설명된 강력한 워크플로와 표준화된 프로토콜은 여러 사용자 사이에서 재현성을 보장했습니다. 그림 7은 서로 다른 사용자가 준비한 여러 용매 배치와 서로 다른 날짜, 다른 컬럼 로트를 사용하여 다양한 분석물질에서 얻은 머무름 시간(RT)을

보여줍니다. 400건 이상의 주입을 테스트한 결과, 어떤 대사체도 제한된 dMRM 범위를 벗어나는 머무름 시간 오차를 보이지 않았습니다. 이러한 결과는 표적 대사체학을 위한 HILIC dMRM 분석법이 다양한 실험실에서 일상적으로 구현될 수 있으며, 이를 통해 사용자가 생물학적 문제를 일상적으로 해결할 수 있음을 보여줍니다.

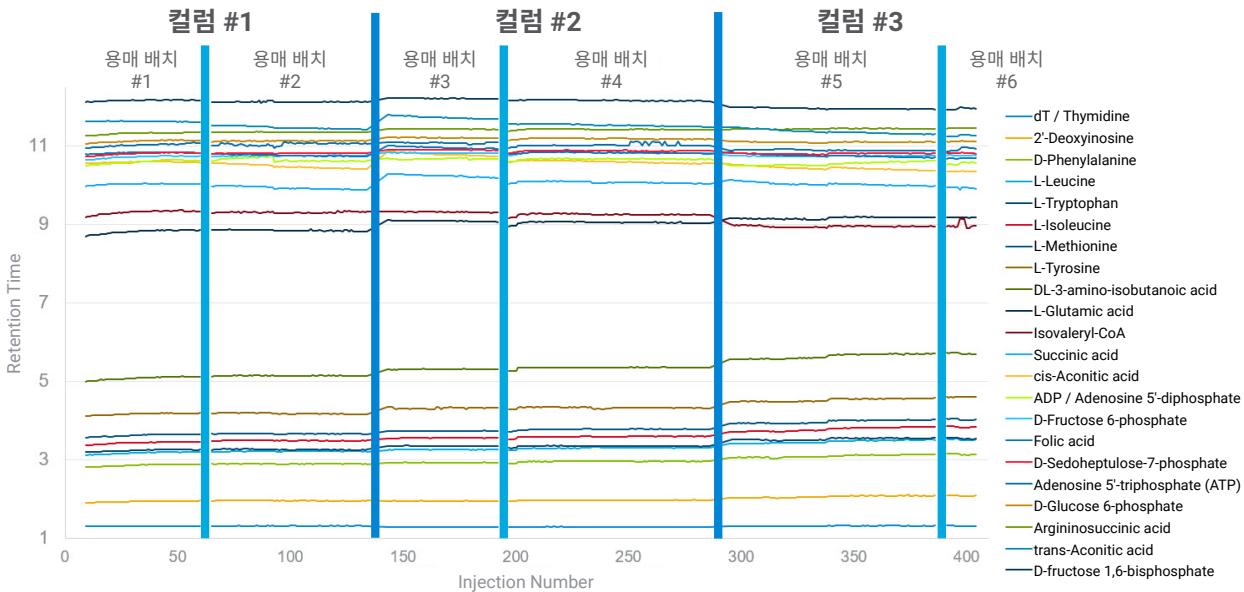


그림 7: 두 명의 다른 사용자가 준비한 세 개의 컬럼 로트와 여섯 개의 용매 배치를 사용하여 다양한 분석물질의 머무름 시간을 측정했습니다.<sup>8</sup>

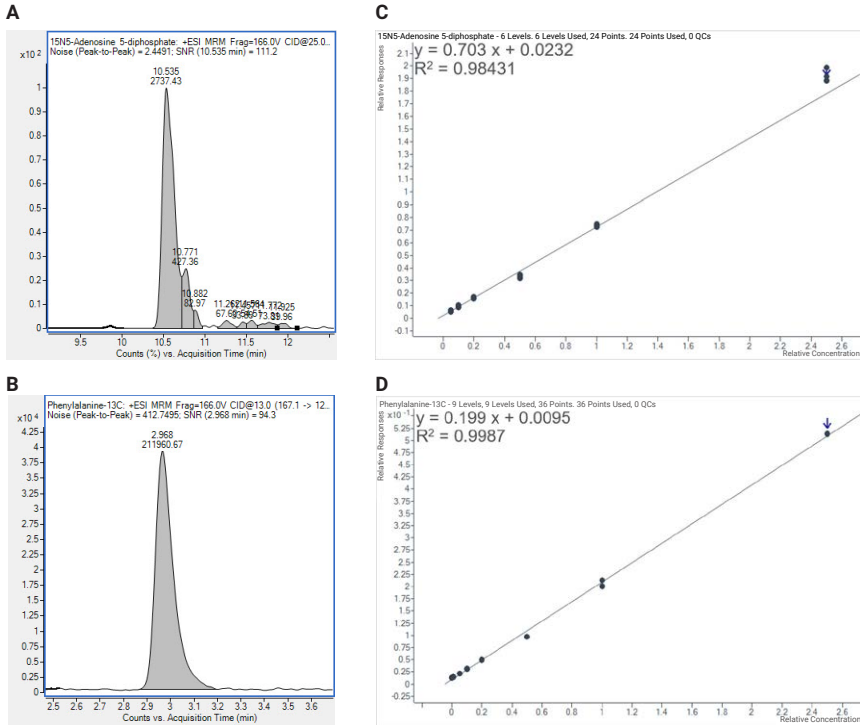


그림 8: 내인성 ADP와 Phe를 사용하여 플라즈마 추출물에서 표지된 ADP와 Phe를 절대 정량화하고, 분석물질 클래스의 감도가 각각 20amol과 1.2amol임을 보여주기 위해 정규화했습니다.

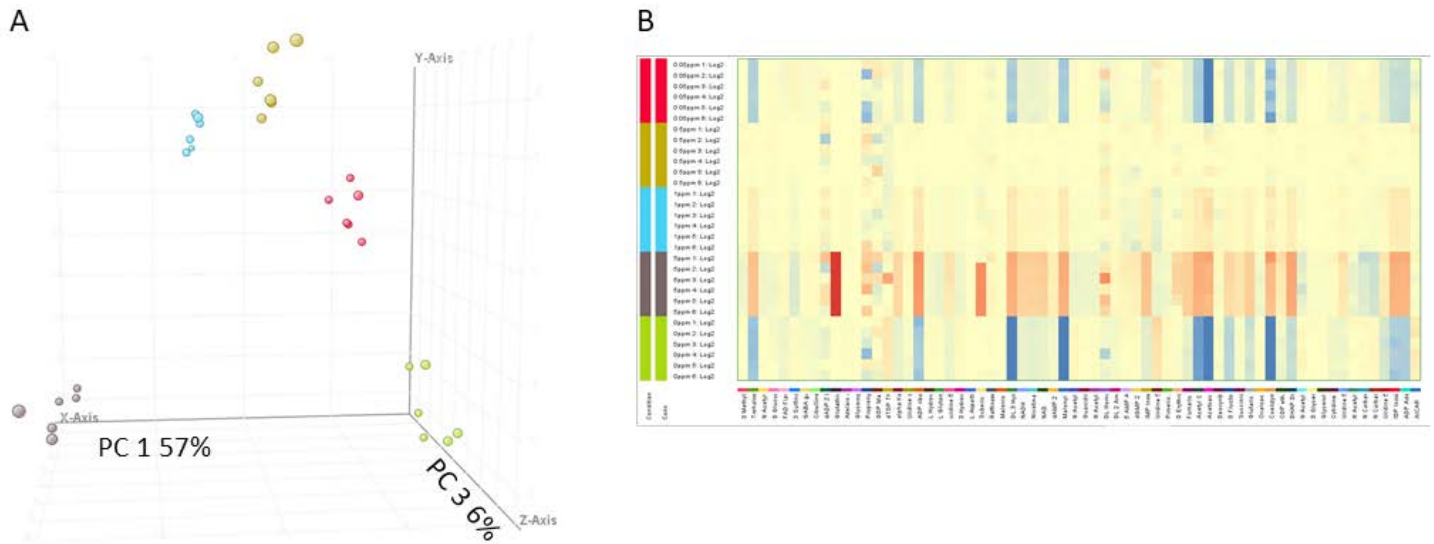
### 높은 분석 감도

생물학적 통찰력을 극대화하기 위해, dMRM 데이터베이스는 TCA 및 해당작용 경로의 화합물과 같은 중요한 대사체와 핵심 세포 에너지 과정에 대한 통찰력을 제공하는 중요한 보조 효소에 초점을 맞추었습니다. 또한, 아미노산과 뉴클레오티드와 같은 생물학적 구성 요소에 초점을 맞추면 생물체의 더 광범위한 대사 상태를 이해하는 데 도움이 될 수 있습니다. 대사체의 정량화는 동위원소로 표지된 내부 표준물질을 사용하여 정규화를 통해 할 수 있습니다. 그림 8은 두 가지 분석물질의 감도를 보여줍니다: 혈장 추출물에 함유된 Adenosine diphosphate (ADP)와 Phenylalanine (Phe). 이 실험에서는 다양한 농도의  $^{15}\text{N}_5$ -Adenosine-5'-diphosphate ( $^{15}\text{N}_5$ -ADP) 과  $^{13}\text{C}$ -Phenylalanine ( $^{13}\text{C}$ -Phe)를 풀링한 소 혈장 추출물에 첨가했습니다. 각 시료는 dwell time이 5ms인 분석법을 사용하여 4번 주입했습니다. 이 분석법을 사용하여 10% RSD로 20amol의  $^{15}\text{N}_5$ -ADP를 검출할 수 있었습니다(그림 8A). 아미노산은 1% RSD로 1.2amol의  $^{13}\text{C}$ -Phe를 검출할 수 있었기 때문에 검출 한계가 더 우수했습니다(그림 8B). 두 경우 모두, 검량선은 강한 선형 회귀를 보였습니다(그림 8C,  $R^2 = 0.98$  및 그림 8D,  $R^2 = 0.99$ ).

이 결과는 Agilent 6495 LC/TQ 기기를 사용하면 짧은 dwell time에서도 재현성 있고 민감한 측정이 가능하다는 것을 보여줍니다. 따라서 이는 연구자들이 복잡한 매트릭스에서 소량의 분석물질을 검출하고 정량화 할 수 있는 견고하고 사용하기 쉬운 분석법입니다.

### 간단하고 빠른 데이터 분석

MassHunter Quantitative Analysis 10 소프트웨어를 사용하여 데이터 세트의 모든 transition을 통합했습니다. 소프트웨어 도구인 “Compounds-at-a-Glance”는 화합물과 시료를 그리드 형식으로 표시하여 이 작업을 용이하게 해줍니다. 이러한 결과는 Mass Profiler Professional(MPP) 소프트웨어와도 연결되어 통계 기반의 생물학적 통찰력을 제공할 수 있습니다. MPP는 wizard 기반 인터페이스를 사용하여 데이터를 프로그램으로 옮기고 정규화, baseline 설정, 분산 테스트, 통계 테스트를 적용합니다. 그림 9는 5개의 고유한 세포 매트릭스 시료에 대한 6회 반복 주입의 클러스터의 PCA 플롯과 해당 히트맵을 보여줍니다. MPP는 box-and-whisker 플롯, 화산(volcano) 플롯, 계층적 클러스터링, 바이올린 플롯 등 시료의 추세를 조사하기 위한 여러 가지 다른 플롯도 제공할 수 있습니다. 따라서 이 워크플로에 포함된 소프트웨어와 대사체학 데이터베이스는 빠르고 편리한 데이터 분석을 가능하게 하여 새로운 생물학적 통찰력을 더욱 신속하게 제공합니다.



**그림 9. A.** 5개 세포 매트릭스 시료가 명확하게 클러스터링 되어 있음을 보여주는 PCA 플롯으로, 각각 다른 수준의 대사체 spike-in을 포함하고 있습니다. 녹색 = 스파이크 없음, 빨간색 = 0.05ppm spike-in, 노란색 = 0.5ppm spike-in, 파란색 = 1ppm spike-in, 검정색 = 5ppm spike-in. **B.** 시료에서 서로 다르게 존재하는 분석물질들을 보여주는 히트맵. 이는 세포 시료에 첨가된 항목과 일치합니다.

## 결론

애질런트 솔루션은 연구자들이 대사체학 연구를 바로 시작할 수 있도록 포괄적인 표적 대사체학 워크플로를 제공합니다. Agilent Bravo Metabolomics 시료 전처리 플랫폼과 Agilent Captiva EMR-Lipid 플레이트를 결합하면 혈장 및 세포 시료에서 극성 대사체를 효율적으로 추출할 수 있습니다. 추출물은 크로마토그래피 분해 없이 HILIC-Z 컬럼에 수백 번 주입할 수 있을 만큼 깨끗했습니다. 500개가 넘는 분석물질에 대한 ion transition과 머무름 시간을 담은 맞춤형 데이터베이스를 사용하여 포괄적인 dMRM 분석법을 구축했습니다. Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템과 HILIC-Z 컬럼을 사용해 분리한 결과, 다양한 대사체 화합물 종류에 대해 재현 가능한 피크와 머무름 시간이 얻어졌습니다. Agilent 6495 LC/TQ 기기의 빠른 속도와 높은 분석 감도 덕분에 짧은 dwell time(<1ms)으로 수백 가지의 소량 분석물질을 검출할 수 있었습니다. 이 워크플로 분석법은 맞춤형이 가능하여 고객에게 다양한 연구 질문을 해결할 수 있는 유연성을 제공합니다.

[Agilent 6495 QQQ LC/MS 기능과 기타 표적 대사체학 솔루션에 대해 자세히 알아보세요.](#)

## 참고 문헌

- Zamboni, N.; Saghatelian, A.; Patti, G. J. Defining the Metabolome: Size, Flux, and Regulation. *Mol. Cell.* **2015**, *58*(4), 699-706.
- Roberts, L. D.; Souza, A. L.; Gerszten, R. E.; Clish, C. B. Targeted Metabolomics. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **2012**, *30*.
- Van de Bittner, G.; Sartain, M.; Chang, D.; Apffel, A.; Bernick, K.; Gomez, M. An Automated Dual Metabolite + Lipid Sample Preparation Workflow for Mammalian Cell Samples. *Agilent Technologies technical overview*, publication number 5994-5065EN, **2022**.
- Spivia, W. R.; Raedschelders, K.; Gomez, M.; Van Eyk, J. E. Automated Metabolite Extraction for Plasma Using the Agilent Bravo Platform. *Agilent Technologies technical overview*, publication number 5994-0685EN, **2019**.
- Sartain, M.; Gomez, M.; Van de Bittner, G.; Shu, H. Enabling Automated, Low-Volume Plasma Metabolite Extraction with the Agilent Bravo Platform. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-2156EN, **2022**.
- Stone, P.; Glauner, T.; Kuhlmann, F.; Schlabach, T.; Miller, K. New Dynamic MRM Mode Improves Data Quality and Triple quad Quantification in Complex Analyses. *Agilent Technologies technical overview*, publication number 5990-3595EN, **2009**.
- Banu Mohsin, S.; Batoon, P. Absolute Quantitation of Fragile Metabolites by Isotope Dilution Mass Spectrometry on the Agilent 6495 Triple Quadrupole LC/MS. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-4439EN, **2022**.
- Yannell, K. E.; Cuthbertson, D.; Simmermaker, C.; Van de Bittner, G.; Parry, E. Improvements to HILIC Robustness – a Targeted HILIC Metabolomics Method for Routine analysis. *Agilent Technologies poster*, **2021**.

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

RA44882.3992013889

연구용으로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지 않습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2023  
2023년 1월 1일 한국에서 발행  
5994-5628KO

한국에질런트테크놀로지스(주)  
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,  
A+ 에셋타워 9층, 06621  
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)  
팩스: 82-2-3452-2451  
이메일: [korea-inquiry\\_lsca@agilent.com](mailto:korea-inquiry_lsca@agilent.com)

