应用简报

脂质组学

使用迭代 MS/MS 数据采集结合 Lipid Annotator 软件和 6546 LC/Q-TOF 改善血浆脂质组的覆盖范围

作者

Jeremy Koelmel
佛罗里达大学化学系
美国佛罗里达州盖恩斯维尔

Mark Sartain，Juli Salcedo，Adithya Murali，Xiangdong Li，Sarah Stow
安捷伦科技有限公司
美国加利福尼亚州圣克拉拉市

前言

基于质谱的脂质组学面临的一项主要挑战是，实现对生物样品中宽浓度范围内大量不同脂质的全面表征。虽然鸟枪法脂质组学推动了脂质分析领域的发展，但它受到一些限制，包括无法区分可能具有重要生物学意义的同质异位物质，并且由于电离抑制而导致动态范围较窄。由此催生了将高效液相色谱 (HPLC) 与高分辨率质谱 (MS) 联用的基于色谱的脂质分析方法。

为了与计算机生成的数据库进行子离子谱图匹配，可靠的脂质标注需要在 MS/MS 模式下进行数据采集。然而，虽然液相色谱分离有助于阐明同分异构脂质并降低复杂性，但数据依赖型高分辨率 MS/MS 数据受到色谱洗脱过程中可选择用于碎裂的母离子数量的限制。因此，在复杂样品的单次分析中无法获得所有目标 MS/MS 谱图。由于存在浓度偏差，该策略经常遗漏重要的低丰度脂质。

本应用简报展示了应对这些挑战的解决方案。我们使用反相 (RP) 色谱，其非常适合分离许多同分异构脂质，并且是全面分析血浆[1]、组织[2] 和细胞脂质的常用方法。将这种液相色谱分离技术与 Agilent 6546 LC/Q-TOF 相结合，后者是一种专门设计用于同时提供宽动态范围和高分辨率的质谱仪，并且其分辨率不受采集速度的影响。我们还评估了全自动 Q-TOF 迭代 MS/MS 采集模式，其中对样品多次进样，并循环排除之前选择用于 MS/MS 碎裂的母离子。这些结果表明，使用迭代 MS/MS 能够显著改善血浆脂质组覆盖范围。可以将迭代 MS/MS 数据用于 Agilent Lipid Annotator 软件，作为完整脂质组学工作流程的一部分。

实验部分

试剂与化学品

所有试剂和溶剂均为 HPLC 或 LC/MS 级。乙腈、甲醇和异丙醇购自 Honeywell (Morristown, NJ, USA)。超纯水产自配备 LC-Pak Polisher 和 0.22 µm 膜式终端过滤器滤芯的 Milli-Q Integral 系统 (EMD Millipore, Billerica, MA, USA)。氟化铵和 LC/MS 级乙酸铵购自 Millipore Sigma (St. Louis, MO, USA)。NIST SRM 1950 人血浆购自 Millipore Sigma。

样品前处理

将 NIST SRM 1950 血浆置于冰上解冻，并用改进的 Folch 提取法提取血浆脂质。将甲醇 (400 µL) 加入含有 50 µL 解冻血浆的 2 mL Eppendorf 管中，短暂涡旋混合，然后超声水浴处理 5 分钟。加入氯仿 (800 µL)，涡旋混合 1 分钟。为了诱导相分配，加入 240 µL 水。然后将混合物涡旋混合 1 分钟，并在 4 °C 下以 16000 × g 离心 2 分钟。用气密玻璃注射器小心取出下层，并转移到 2 mL Agilent A-Line 棕色玻璃样品瓶中。为再次萃取剩余的中间层和上层，加入 900 µL 氯仿/甲醇/水 (86:14:1)，将混合物涡旋混合 1 分钟后离心。将来自两次 50 µL 提取的下层混合液混合，并利用真空浓缩仪将其干燥。将干燥的脂质提取物用 100 µL 甲醇/氯仿混合物 (9:1, v/v) 复溶，涡旋混合 1 分钟，然后转移至 250 µL 经去活处理的自动进样器玻璃内插管中，以备 LC/MS 分析。对于正离子模式分析，使用合成橡胶隔垫（部件号 5181-1212），且进样量为 2 µL。对于负离子模式分析，使用 PTFE/硅橡胶/PTFE 隔垫（部件号 5185-5861），且进样量为 5 µL。

仪器

液相色谱系统

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统包括：

- Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
- 配备恒温箱的 Agilent 1290 Infinity II 样品瓶进样器 (G7129B)
- Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B)

质谱系统

配备安捷伦喷射流离子源的 Agilent 6546 LC/Q-TOF

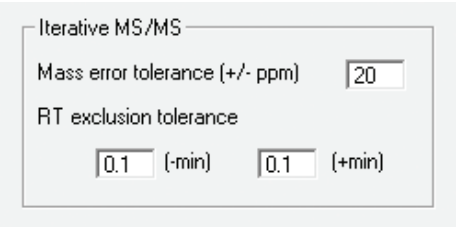
方法

如文中所述，使用传统的自动 MS/MS 方法或迭代 MS/MS 方法采集数据。表 1 和 2 列出了色谱与 6546 Q-TOF 的条件和参数。

表 1. 色谱条件

参数	Agilent 1290 Infinity II LC
分析柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 100 mm, 2.7 µm（部件号 695975-302）
保护柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 5 mm, 2.7 µm（部件号 823750-911）
柱温	50 °C
进样量	2 µL（正离子模式），5 µL（负离子模式）
自动进样器温度	50 °C
进样针清洗	放入清洗口 15 秒（50:50 甲醇/异丙醇）
流动相	A) 含 10 mmol/L 乙酸铵和 0.2 mmol/L 氟化铵的 9:1 水/甲醇溶液 B) 含 10 mmol/L 乙酸铵和 0.2 mmol/L 氟化铵的 2:3:5 乙腈/甲醇/异丙醇溶液
流速	0.6 mL/min
梯度程序	时间 (min) %B 0.00 70 1.00 70 3.50 86 10.00 86 11.00 100 17.00 100 17.10 70 19.00 70
停止时间	19 min
后运行时间	无
观察到的柱压	170–330 bar

采集方法编辑器中的迭代 MS/MS 参数设置如下：



为调用迭代 MS/MS，将采集工作列表设置如下：

- 右键单击，然后选择 **Add Columns**（添加列）
- 从 **MS Parameter**（MS 参数）列类型下的可用列中选择 **Iterative**（迭代）（图 1）
- 在“迭代”列中键入 **Start**（开始）或 **Reset**（重置）（图 2）以指示迭代组的开始。这将重置之前的所有循环排除列表，并开始新的排除列表
- 键入 **Iterative**（迭代）或任何其他字词，指定使用并添加到排除列表中的后续迭代进样
- 空白单元格表示进样既不使用也不添加到排除列表，但是不重置工作列表。但是，应当注意，完整或部分（时间段）靶向 MS/MS 或扫描（仅适用于 MS）采集方法将重置循环排除列表

Inj Vol (µl)	Iterative	Comment
As Method	start	
As Method	iterative	
As Method	iterative	
As Method	iterative	
As Method	iterative	
As Method		

图 2. 迭代 MS/MS 工作列表设置

表 2. 6546 Q-TOF 自动 MS/MS 参数

参数	6546 LC/Q-TOF
气体温度	200 °C
气体流速	10 L/min
雾化器 (psig)	50
鞘气温度	300 °C
鞘气流速	12 L/min
毛细管电压	3500 V (+)，3000 V (–)
喷嘴电压	0 V
碎裂电压	150 V
锥孔电压	65 V
八极杆 RF Vpp	750 V
参比质量	*m/z* 121.050873，*m/z* 1221.990637 (+) *m/z* 119.03632，*m/z* 980.016375 (-)
MS 和 MS/MS 范围	*m/z* 40–1700 (+)
MS 和 MS/MS 最小采集速率	3 幅谱图/秒
分离峰宽	窄（约 1.3 *m/z*）
碰撞能量	20 eV (+)，25 eV (-)
每个循环的最大母离子数	3
基于母离子丰度的扫描速度	是，目标物为 25000 响应值/质谱图
使用 MS/MS 累积时间限	是
剔除未达到目标 TIC 的母离子	否
MS/MS 阈值	5000 响应值和 0.001%
启用主动排除	是，重复一次，然后排除 0.05 min
纯度	严格性 70%，截留率 0%
同位素模型	常见有机分子
母离子排序	1，2，未知
静态排除范围	*m/z* 40–151 (+) *m/z* 40–210 (–)

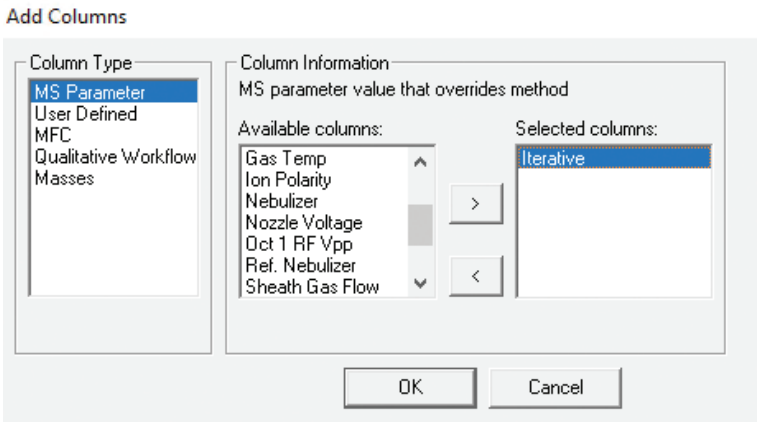


图 1.“添加列”对话框

软件

利用 Agilent MassHunter Q-TOF 数据采集软件 10 版操作 6546 LC/Q-TOF 系统。利用 Agilent MassHunter Lipid Annotator 软件 1.0 版进行其他数据分析。使用默认方法参数，但是在正离子模式分析时仅考虑 $[M+H]^+$ 和 $[M+NH_4]^+$ 母离子，在负离子模式下分析时仅考虑 $[M-H]^-$ 和 $[M+HAc-H]^-$ 母离子。利用 Agilent MassHunter PCDL Manager B.08 SP1 版管理并编辑导出的标注。

结果与讨论

利用 Lipid Annotator 软件分析血浆迭代 MS/MS 数据

可靠的脂质标注需要在 MS/MS 模式下进行数据采集，以实现与计算机生成的数据库的子离子谱图匹配。本研究将创新的软件工具 (Lipid Annotator) 与贝叶斯评分（一种概率密度算法）和非负最小二乘拟合相结合，搜索由 Kind 等人[3,4] 开发的理论脂质谱库（改进的 LipidBlast）以标注 MS/MS 谱图。Lipid Annotator 不会过度标注脂质实体，而是仅提供由 MS/MS 谱图获得的可靠结构信息。

之前的研究表明，Q-TOF 迭代 MS/MS 采集模式对单克隆抗体的深入肽谱分析非常有效[5]。我们将 6546 LC/Q-TOF 上的这种迭代采集模式应用于复杂的脂质样品。图 3 示出了迭代 MS/MS 的策略。对第一次进样进行传统的数据依赖型（常规）自动 MS/MS 分析，在考虑主动排除列表的情况下，选择前 N 个丰度最高的母离子进行碎裂。在后续进样中，利用自定义的质量数误差范围和保留时间排除范围，循环排除先前进样中选择用于 MS/MS 碎裂的母离子。

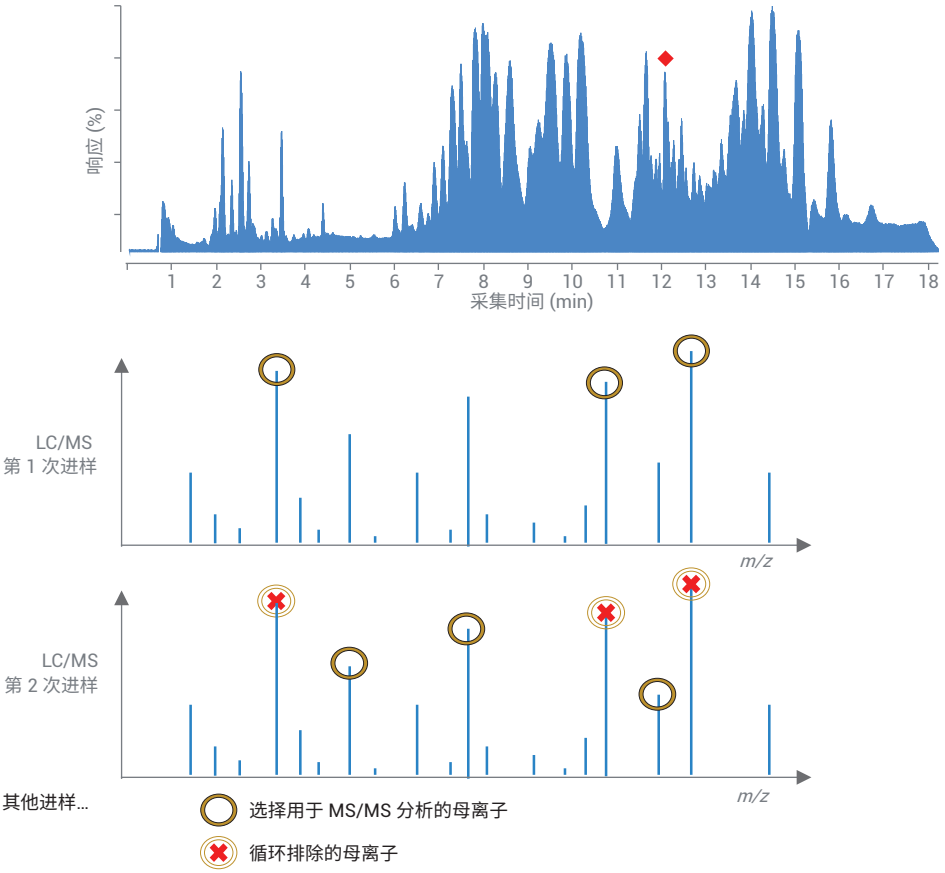


图 3. 迭代 MS/MS 的原理

Lipid Annotator 能够将来自同一样品的多个 MS/MS 数据文件在一个批次中一起分析。图 4 示出了对五个血浆迭代 MS/MS 数据文件的分析。355 种脂质（包括具有不同 RT 的异构体）代表在五个正离子模式数据文件中标注的 14 类脂质。另外分析了一批共五个负离子模式迭代 MS/MS 数据文件，得到 326 种脂质，其代表了 20 类脂质（未示出）。

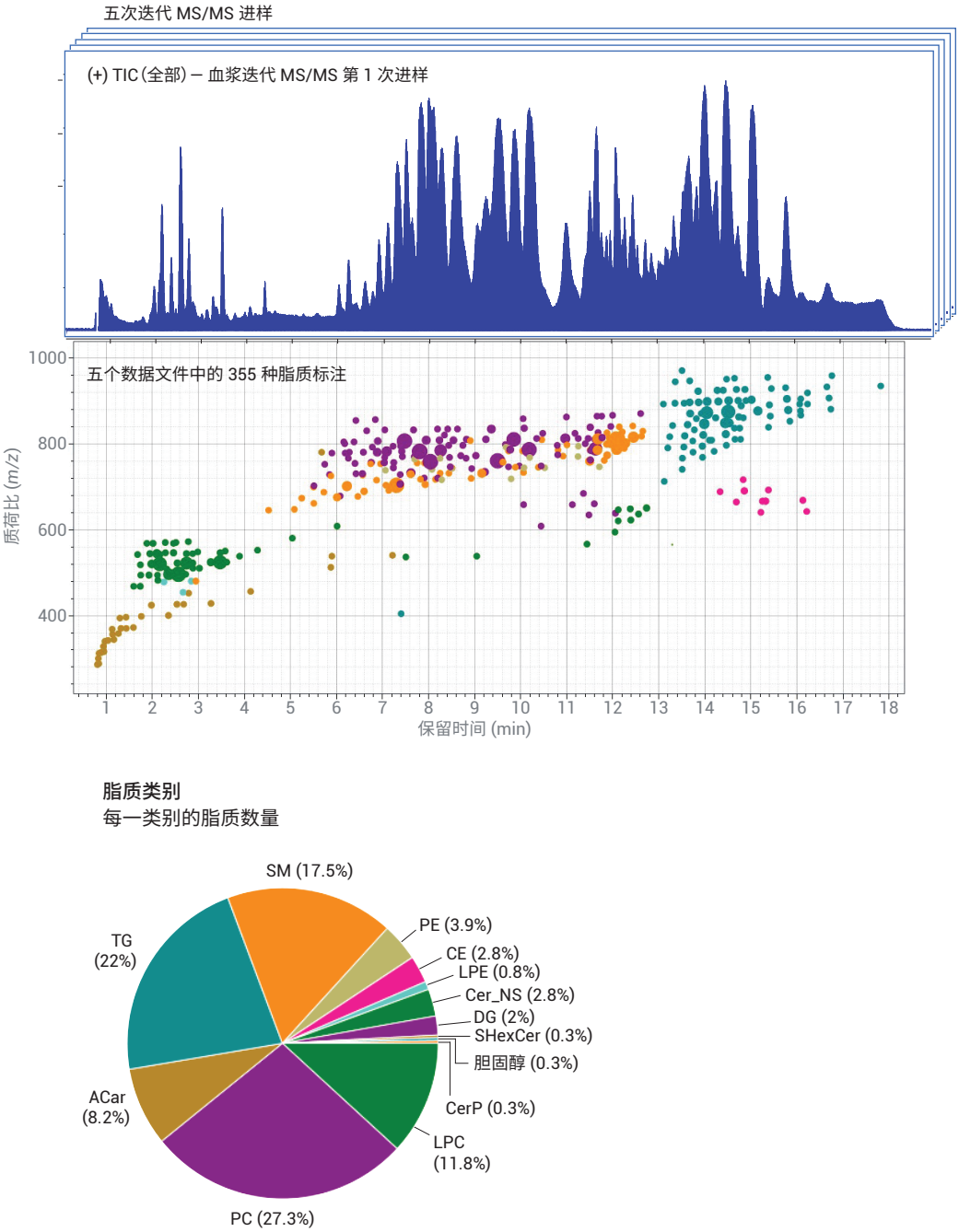


图 4. 正离子模式下血浆的典型总离子流色谱图 (TIC) 与 Lipid Annotator 软件的视图一致。所示结果为五个迭代 MS/MS 数据文件的组合分析结果。将标注的脂质特征绘制为 *m/z* 对保留时间的图，并按照对应于饼图的脂质类别着色，标注的脂质的数量在饼图中以百分比显示

迭代 MS/MS 可增加脂质标注

与传统的自动 MS/MS 文件相比，多个迭代 MS/MS 数据采集文件中对血浆的脂质标注累计数量有所增加（图 5）。这些结果表明，使用本研究中所用的方法参数，3 至 5 次迭代 MS/MS 进样足以全面标注血浆中的脂质。虽然血浆代表一种常见的复杂生物样品，但值得注意的是，最佳进样次数可能取决于样品复杂性和 LC/MS 采集方法参数。对于正离子模式下的血浆提取物，对五次连续进样应用迭代 MS/MS 时，与采用常规自动 MS/MS 采集 (n = 223) 的五次连续进样相比，独特标注的脂质增加了 69% (n = 355)（图 5A）。同样，在血浆的阴离子模式分析中，与常规 MS/MS 分析 (n = 243) 相比，通过五次进样的迭代 MS/MS 分析所获得的脂质标注增加了 34% (n = 326)（图 5B）。总而言之，这些结果表明，由于色谱运行中许多脂质母离子的谱图较为密集（尤其是在阳离子模式下），将迭代 MS/MS 用于基于 LC/MS/MS 的脂质组学数据采集具有极大的优势。

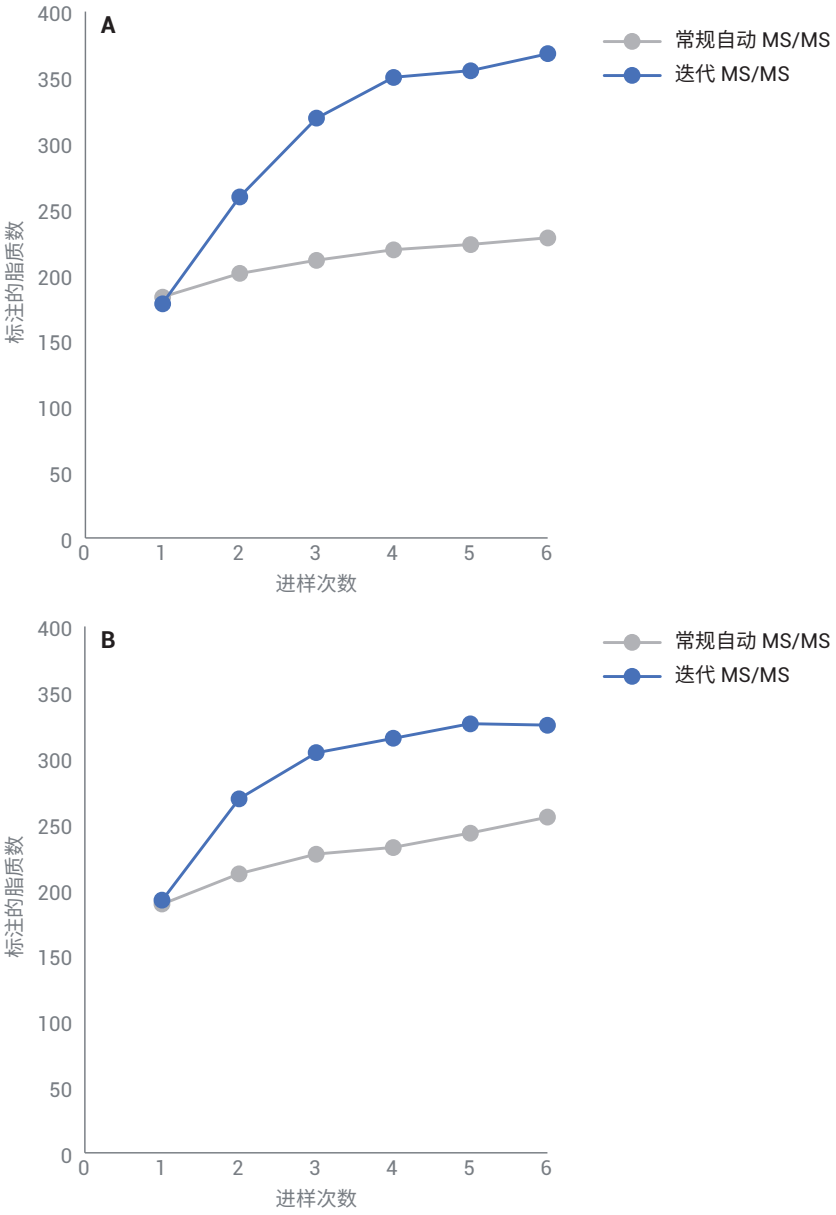


图 5. 基于正离子 (A) 和负离子 (B) 模式下的多个数据采集文件，通过 Lipid Annotator 软件获得的独特标注的脂质特征累积数量

迭代 MS/MS 能富集低丰度和特定脂质类别的脂质离子

与迭代 MS/MS 模式中连续排除高丰度脂质母离子一致，我们观察到正极性（图 6A）和负极性（图 6B）数据集中，前三次血浆进样中触发的脂质母离子的平均峰值丰度有所降低。另外，在正极性和负极性数据集中，第二次进样中所标注的脂质的峰值丰度均显著低于初始进样（t 检验 p 值 < 0.001）。

由于高丰度母离子的迭代排除，我们观察到，迭代 MS/MS 富集了低丰度脂类（例如，二酰甘油）、电离效率较低的脂类（例如，游离胆固醇），或位于色谱图的谱图密集区域的脂类（例如，三酰甘油）。表 3 显示了与常规自动 MS/MS 相比，通过连续进样迭代 MS/MS 高度富集的脂质类别的示例。

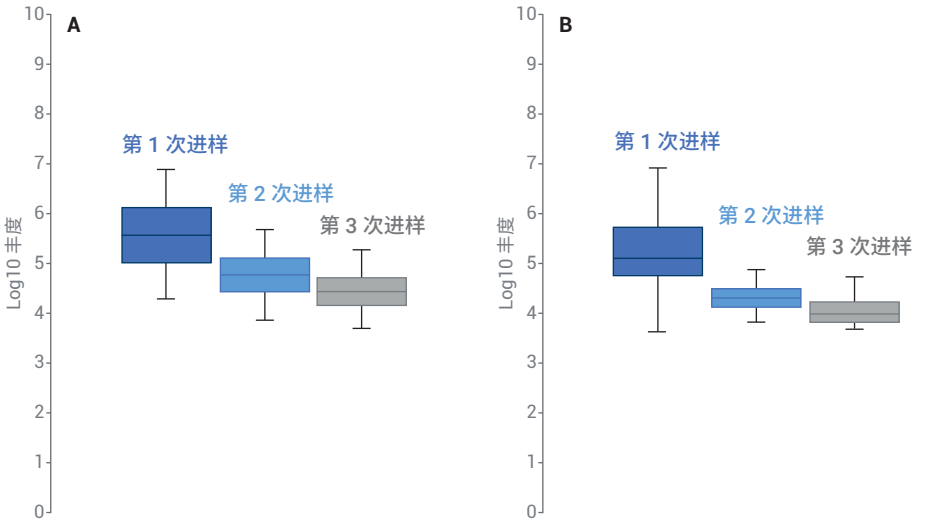


图 6. 对应于所标注脂质的特征丰度箱线图，这些标注的脂质来自正离子 (A) 和负离子 (B) 模式下的三次连续迭代 MS/MS 进样

表 3. 各种脂类通过迭代 MS/MS 得到高度富集。通过常规自动 MS/MS 采集五次连续进样所得到的累积标注的脂质数量与迭代 MS/MS 数据采集的比较

脂质类别（极性）	标注数量 自动 MS/MS	标注数量 迭代 MS/MS
神经酰胺非羟基脂肪酸-鞘氨醇 (+)	2	10
胆固醇酯 (+)	4	10
游离胆固醇 (+)	0	1
二酰甘油 (+)	1	7
磷脂酰乙醇胺 (+)	2	14
三酰甘油 (+)	46	78
连接醚的磷脂酰胆碱 (–)	17	28
溶血磷脂酰肌醇 (–)	5	9
磷脂酰乙醇胺 (–)	9	20

图 7 进一步展示了脂类富集的具体示例，在连续进样中选择对应于低丰度胆固醇酯的母离子用于 MS/MS 碎裂。

考虑脂质异构体的 MS/MS 采集参数优化

为确保血浆脂质的最佳覆盖范围，MS/MS 采集方法参数设置至关重要。首先，Lipid Annotator 软件采用特征查找算法处理自动 MS/MS 或迭代 MS/MS 数据文件。在 MS1 级执行特征查找，并将 MS/MS 谱图与后续步骤中的各个特征关联起来。所得特征表中仅包括具有相关联的 MS/MS 谱图的特征。使用 Lipid Annotator 进行特征查找时，建议在色谱峰上选择至少四个 MS1 数据点。因此，必须优化 MS/MS 采集参数（采集速率和每个循环的母离子数），确保循环时间满足这一最低要求。对于本研究中使用的色谱方法和血浆样品，结果观察到脂质色谱基峰宽度约为 6–14 秒，平均峰宽约为 8 秒。因此，给定最小观测峰宽为 6 秒，对 MS/MS 参数进行调整，得到 1.43 秒的循环时间。这样确保最窄的色谱峰中至少有四个点。

迭代 MS/MS 采集参数对于脂质组标注覆盖范围非常重要，特别是对于脂质异构体而言。在这一背景下，我们将脂质异构体定义为多种标注的脂质特征具有相同的总成分（以及相同的母离子 *m/z*）但保留时间不同。然而，在某些情况下，MS/MS 谱图能够在组分水平上进一步区分异构体，例如提供有关酯化的脂肪酰基的信息（例如，PC 18:2_18:2 与 PC 16:0_20:4）。血浆分析将得到大量脂质异构体，355 种标注脂质中的 164 种（正离子模式）以及 326 种标注脂质中的 143 种（负离子模式）均为脂质异构体。为确保该工作流程中不遗漏脂质异构体，必须将主动排除窗口和迭代 RT 排除范围设置得足够低，以便具有相同母离子质量数的紧邻洗脱的异构体有机会触发 MS/MS 分析。图 8 展示了一对峰宽较窄的紧邻洗脱的溶血磷脂酰胆碱 (LPC) 异构体。

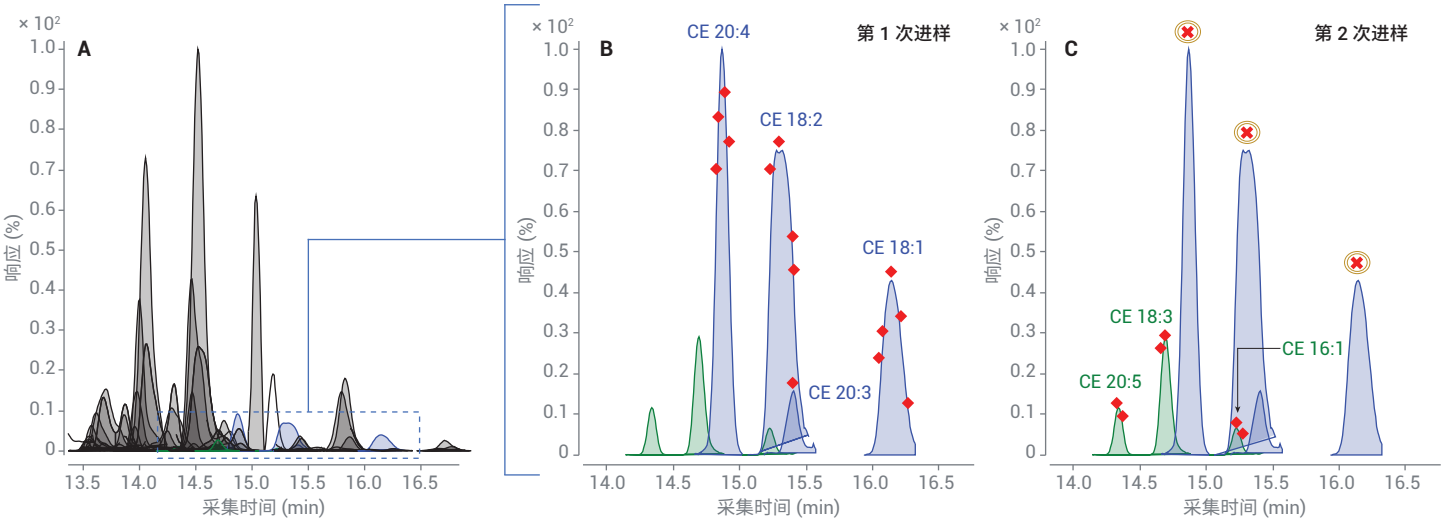


图 7. 使用来自血浆脂质提取物的迭代 MS/MS 增加了胆固醇酯 (CE) 母离子的选择。A) 富含标注的三酰甘油 (TG) 脂质（黑色特征）的保留时间区域的提取 MS/MS 色谱图叠加。B) 在首次进样中选择四种独特的 CE 脂质母离子（蓝色特征）进行碎裂。C) 剔除高丰度 CE（x 符号）和 TG（未示出）后，在后续进样中选择另外三种低丰度的独特 CE 母离子（绿色特征）。红色菱形表示色谱图中的 MS1 扫描，其中选择 CE $[M+NH_4]^+$ 母离子进行 MS/MS 分析

结论

本应用简报表明，LC/Q-TOF 数据采集的迭代 MS/MS 模式为改善复杂样品的脂质标注提供了极大的优势。将此方法应用于血浆脂质提取物时，标注的脂质总数显著增加，并且低丰度脂类通过迭代 MS/MS 得以富集。

Lipid Annotator 软件能够利用迭代 MS/MS 数据快速自动生成具有宽标注覆盖范围的自定义 PCDL 谱库。这些包含 RT 信息的谱库是安捷伦脂质组学软件工作流程的重要组成部分，涵盖了从脂质标注到差异分析的靶向和非靶向脂质分析。

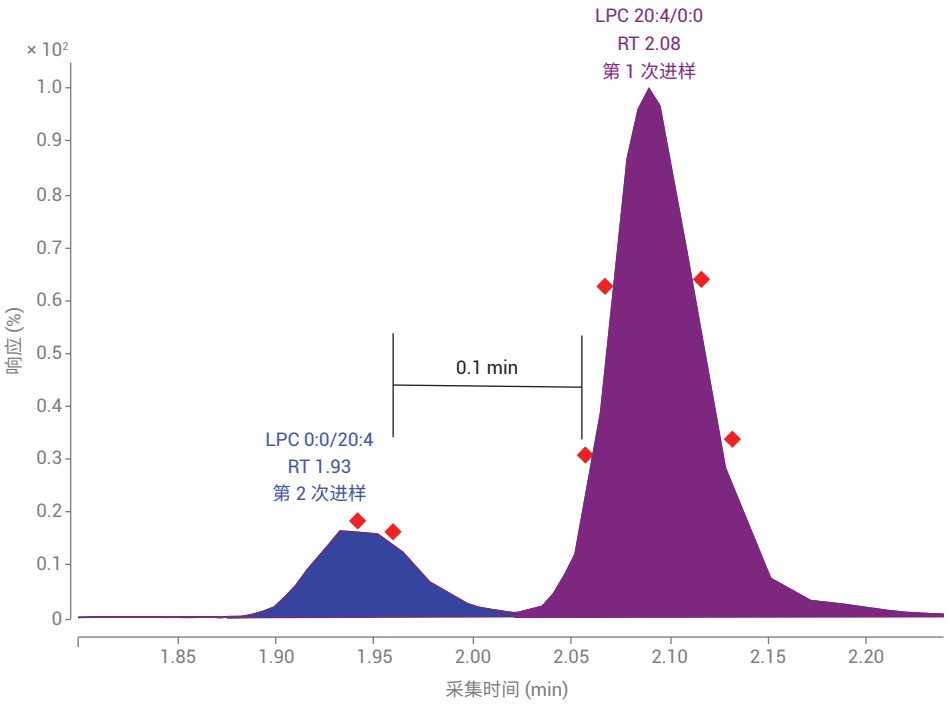


图 8. 针对脂质异构体优化的迭代 MS/MS 参数。显示了用 Lipid Annotator 软件标注的两种溶血磷脂酰胆碱 (LPC) 20:4 异构体的提取离子色谱图。红色菱形表示假设的 MS1 扫描，其中触发 LPC 20:4 $[M+H]^+$ 母离子 *m/z* 544.3398 用于 MS/MS 分析。将迭代 RT 排除范围设置为 ±0.1 分钟，确保在后续进样中挑选相邻 LPC 异构体的相同母离子 *m/z* (±20 ppm) 进行 MS/MS 分析

参考文献

1. Cajka, T.; Fiehn, O. LC/MS Method for Comprehensive Analysis of Plasma Lipids（用于全面分析血浆脂质的 LC/MS 方法），*安捷伦科技公司应用简报*，出版号 5991-9280EN，**2018**
2. Sartain, M.; Sana, T. 色谱对肝脏组织提取物中脂质分析的影响，*安捷伦科技公司应用简报*，出版号 5991-5494CHCN，**2015**
3. Kind, T.; *et al*. LipidBlast in silico tandem mass spectrometry database for lipid identification. *Nature Methods* **2013**, *10(8)*, 755–758
4. Tsugawa, H.; *et al*. MS-DIAL: data-dependent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nature Methods* **2015**, *12(6)*, 523–526
5. Wu, L.; Wong, D. L. 采用 6545XT 的迭代 MS/MS 采集方法进行深入的肽谱分析，*安捷伦科技公司应用简报*，出版号 5991-8633ZHCN，**2017**

www.agilent.com/chem

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

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，2019

2019 年 3 月 26 日，中国出版
5994-0775ZHCN

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

Agilent
Trusted Answers