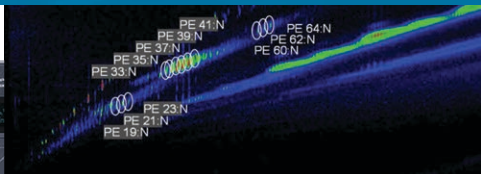


애질런트 Lipidomics 솔루션

지질 대사에 대한 심층적 정보

The Measure of Confidence

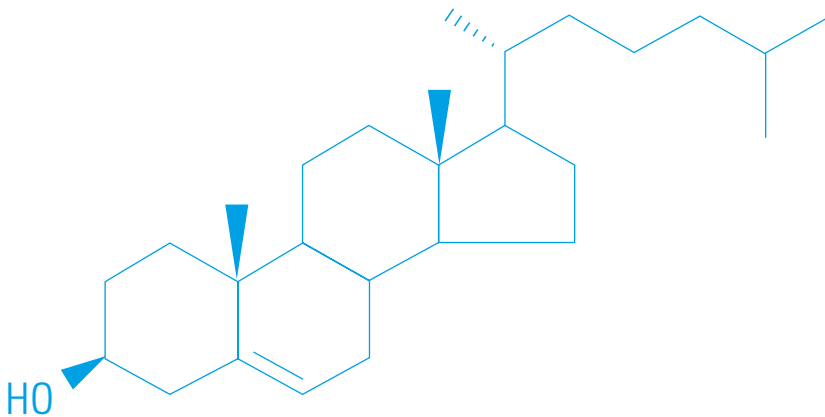


Agilent Technologies

LIPIDOMICS의 이해

Lipidomics이란?

"Lipidome"이란 유기체 내 존재하는 모든 지질과 다양한 세포 과정에 미치는 영향을 말합니다. Lipidome을 이해하려면 종합적 및 개별적으로 지질의 특성을 규명하고 정량 분석을 하는 것이 중요합니다. 질량 분석기는 lipidomics 연구의 효과적인 지질 프로파일링을 지원하는 강력한 분석 검출 도구로 새롭게 떠오르고 있습니다.



Lipidomics 워크플로

Shotgun Lipidomics 워크플로는 infusion 기반 기술로, 클래스 내부 표준 물질을 사용하여 소량의 지질에 대한 지질 클래스 정량 데이터를 신속하게 생성하도록 설계되었습니다. 이러한 접근법은 지질 클래스, 조성 및 R기 (R-group)에 대한 정보를 제공하지만 지질을 명확하게 식별하지는 못합니다. Shotgun lipidomics는 QQQ(triple quadrupole) 또는 Q-TOF(quadrupole time-of-flight) 질량 분석기에서 수행될 수 있습니다. 사용자는 QQQ 질량

분석기에서 precursor ion 스캔 모드나 neutral loss 스캔 모드를 이용하여 특정 지질 클래스를 겨냥할 수 있습니다. QQQ 기기와 비교할 때, Q-TOF는 스캔 모드에서의 감도와 질량 정확도는 높지만 QQQ neutral loss 스캔에서의 특이성은 떨어집니다.

지질의 화학적 다양성과 매우 다른 이온화 효율성으로 인해 발생하는 이온 억제가 Shotgun Lipidomics의 중요한 한계입니다. 지질을 분리하지 않고 MS 및 MS/MS 정보만으로는 이중 결합 위치, R기 위치 등 생물학적으로 관련된

구조의 차이를 식별할 수 없습니다. 지질 클래스의 화학적 특성이 다양하기에 개별 지질을 분석하고 식별하려면 다양한 분리방법을 지속적으로 개발해야 합니다.

프로파일링 lipidomics는 분리 기반의 기술로, 단일 분석에서 수백 개의 지질에 대한 상대적 정량화 및 식별 정보를 얻을 수 있는 보다 포괄적인 접근법으로 떠오르고 있습니다. 크로마토그래피와 이온 이동도 질량 분석기(IMS)의 개발, 고급 소프트웨어 분석 도구가 있기에 이러한 발전을 이룩할 수 있었습니다.

다양한 응용 분야에 사용 가능한 LIPIDOMICS 도구

애질런트는 여러 응용 분야에 글로벌 lipidomics 연구를 위한 크로마토그래피, 질량 분석기, 소모품, 정보 과학 및 기술 지원을 제공하는 선도기업입니다.

기초 연구와 임상 연구:

복잡한 biofluid에서의 지질 연구를 통해 기존의 분석법으로 달성하지 못한 세부적인 수준에서 지질 바이오파지컬을 식별하고 세포 대사에 대한 이해를 지원합니다. Lipidomics는 지질 프로파일을 문서화하고 대사질환에서 발생하는 지질 변화를 나타내는 데 사용할 수 있으며 죽상동맥경화증, 뇌졸중, 고혈압 및 비만의 메커니즘을 이해하는 데 중추적 역할을 합니다.

농업:

토양과 식물 생물학에 미치는 영향을 통해 농업 분야에서의 지질의 역할을 이해합니다.

식품 및 영양:

지질이 독립적으로 그리고 단백질과 함께 세포 및 딸세포 기능을 조절

(신호 전달, 유전자 발현 등)하는 방법을 확인하고 평가합니다. 포괄적인 lipidomics 연구는 우리가 먹는 음식과 건강 사이의 관련성에 대해 새롭게 발견하고 있습니다.

의약품:

지질 식별을 통해 약물 연구를 촉진하고 식약성 질병을 효과적으로 치료할 수 있는 기반을 제공합니다.

바이오 연료:

지방산과 기름을 생성할 수 있는 미세조류 내의 지질을 중요한 마커로 프로파일링하여 바이오 디젤에 대한 엔진 호환성과 성능 지표를 확인합니다. Lipidomics는 바이오 디젤의 구성 요소인 지방산 에틸 에스테르(FAEE)를 생성하는 새로운 균주 유형을 설계하는 데 중요한 역할을 합니다.

"저희는 애질런트와 협력하여 결합된 수집 기능과 분리 기능, 크로마토그래피와 고분해능 질량 분석기를 이용하여 향상된 미량 지질 검출 워크플로를 개발했습니다. 이러한 접근법은 지질을 이해하는 데 중요한 세부 정보를 제공했습니다. 또한 이러한 제휴를 통해 저희는 metabolomics, glycomics, proteomic를 포함한 lipidomics와 관련된 분야에 대한 연구를 확장했습니다."

MARKUS WENK 박사,
싱가포르 국립대학



LIPIDOMICS 분리 문제

다양한 접근법, 다양한 솔루션

지질의 구조적 다양성은 많은 분리 접근법을 필요로 하며 모든 클래스에 대해 적합한 단일 솔루션은 없습니다. 지방 아실(fatty acyl) 특성 규명에는 일반적으로 가스 크로마토그래피/질량 분석기(GC/MS)를 사용하여 왔으며 이 방법은 R기에 대한 자세한 정보를 제공하지만 시료 전처리(비누화)로 인해 지질 수준의 정보는 확보할 수 없습니다. 테르펜 및 스테롤은 우선적으로 뛰어난 크로마토그래피 분해능과 이온화 성능을 자랑하는 GC/MS를 사용하여 분석합니다.

액체 크로마토그래피(LC)와 초임계 유체 그래마토그래피(SFC)는 모두 매우 광범위하게 적용되는 기술로, 지질 수준의 정보를 보존하고 유도체화가 필요 없으며 대기압 조건에서 질량 분석기에 쉽게 연결됩니다. 크로마토그래피 분석법의 선택은 분리되고 검출되는 지질 클래스에 영향을 미치기에 응용 분야에 맞게 선택해야 합니다.

지질 범주	GC/MS	LC/MS	SFC/MS
지방산(아실)
글리세롤지질 (트리글리세라이드)
글리세로인지질	
스핑고지질	
스테롤 지질
프레놀 지질	
사카로지질	
테르펜(식물성)
폴리케티드

표 1. 다양한 지질 클래스에 적합한 크로마토그래피 분리의 상대적 강도 개요
 ...는 각 지질 클래스에 가장 적합한 분리 기법을 나타냅니다.

애질런트는 폭 넓은 lipidomics 솔루션(그림 1)을 지원하며 여기에는 GC/MS, LC/MS 및 SFC/MS에 대한 통합 데이터 분석 플랫폼이 포함됩니다.


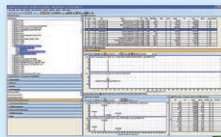
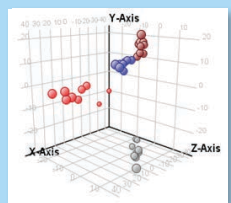
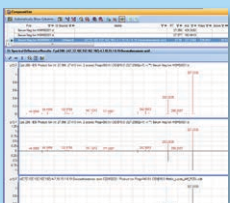
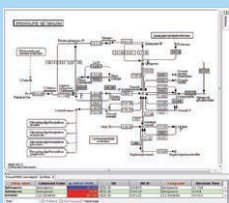

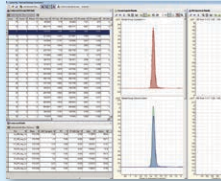

	데이터 수집	피크 추출	배열 및 통계 분석	식별	Pathway 분석
		MassHunter 소프트웨어	Mass Profiler Professional 소프트웨어		
분석 기기		 정성분석	 분석 및 시각화	 Agilent METLIN 데이터베이스와 Agilent Fiehn 라이브러리를 이용한 ID Brower	 공공 데이터베이스(예, KEGG)를 이용한 Pathway Architect
		 Profiler			
					

그림 1. 애질런트의 lipidomics 워크플로 솔루션

강력하고 유연하며 신뢰성 있는 LIPIDOMICS 기술

지질 관련 크로마토그래피 기술

순상 및 역상 LC 기술이 지질 분리에 제공하는 혜택은 각각 다릅니다. 순상 LC는 신속한 지질 클래스 평가를 제공하며(그림 2), 역상 LC는 뛰어난 머무름 시간 재현성과 클래스 내 지질 분리를 제공합니다(그림 3). comprehensive 지질 분석 시, 순상 LC를 사용하여 클래스 단위로 지질을 분류한 후 역상 LC를 사용하여 클래스 단위로 분류된 지질을 단위지질로 분리 합니다.

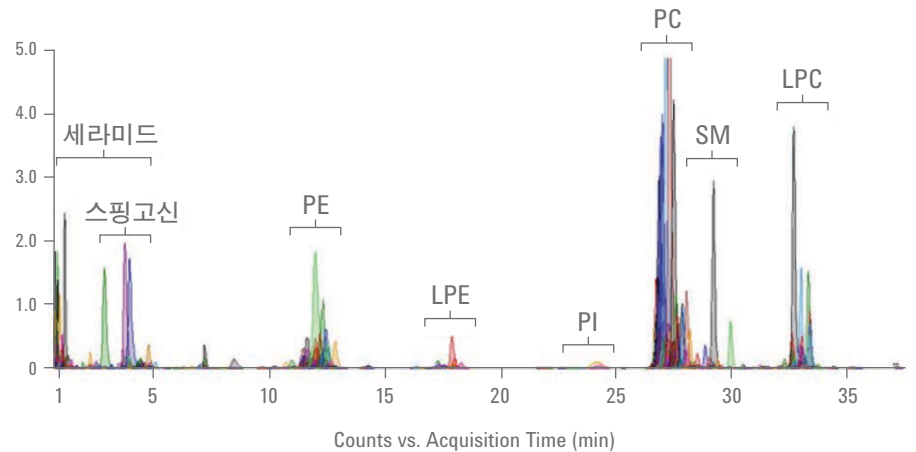


그림 2. 지질 클래스별 분리를 나타내는 간 추출물의 순상 LC/MS 분리
 PE = 포스파티딜에탄올아민, LPE = 리소포스파티딜에탄올아민,
 PI = 포스파티딜이노시톨, PC = 포스파티딜콜린, LPC = 리소포스파티딜콜린

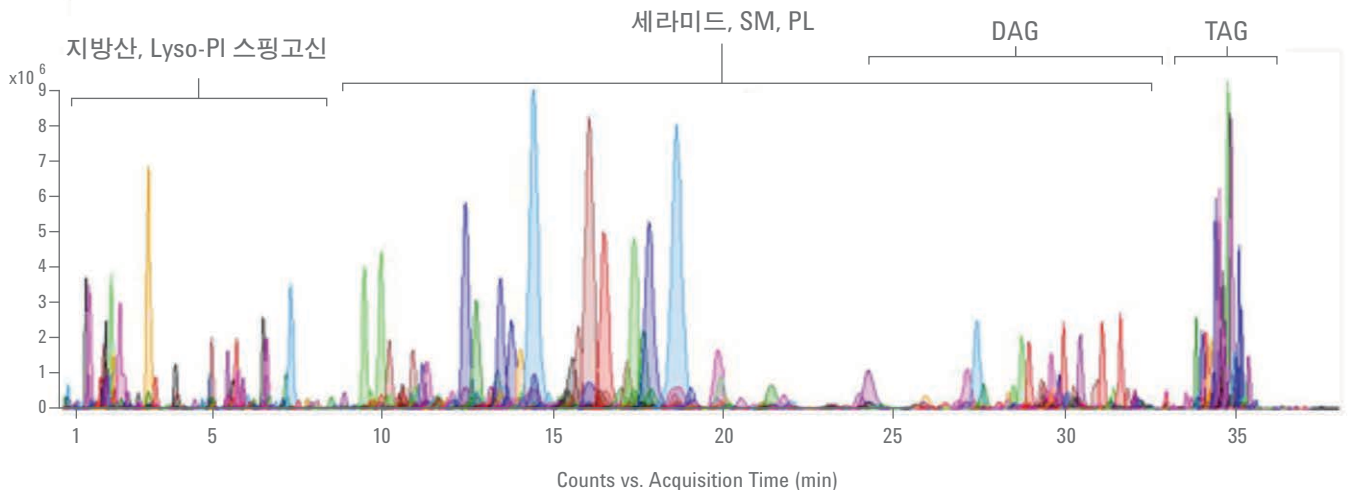


그림 3. 지질 클래스 내 분리를 나타내는 간 추출물의 역상 LC/MS 분리
 PL = 인지질, SM = 스프링고미엘린, DAG = 디아실글리세롤, TAG = 트리아실글리세롤

초임계 유체 크로마토그래피(SFC)

SFC는 밀도가 극히 높은 이산화탄소를 SFC 이동상의 주성분으로 사용합니다. 순상 크로마토그래피의 한 형태인 SFC는 역상 LC와는 직교 상태이며, 단일 분석에서 극성 및 비극성 지질에 대한 고분해능 분리를 제공합니다. SFC는 복잡한 지질 혼합물 분석에 매우 효과적입니다(그림 4). Agilent 1260 SFC 시스템은 간단한 밸브 스위칭을 통해 LC와 SFC 모드를 쉽게 전환할 수 있습니다.

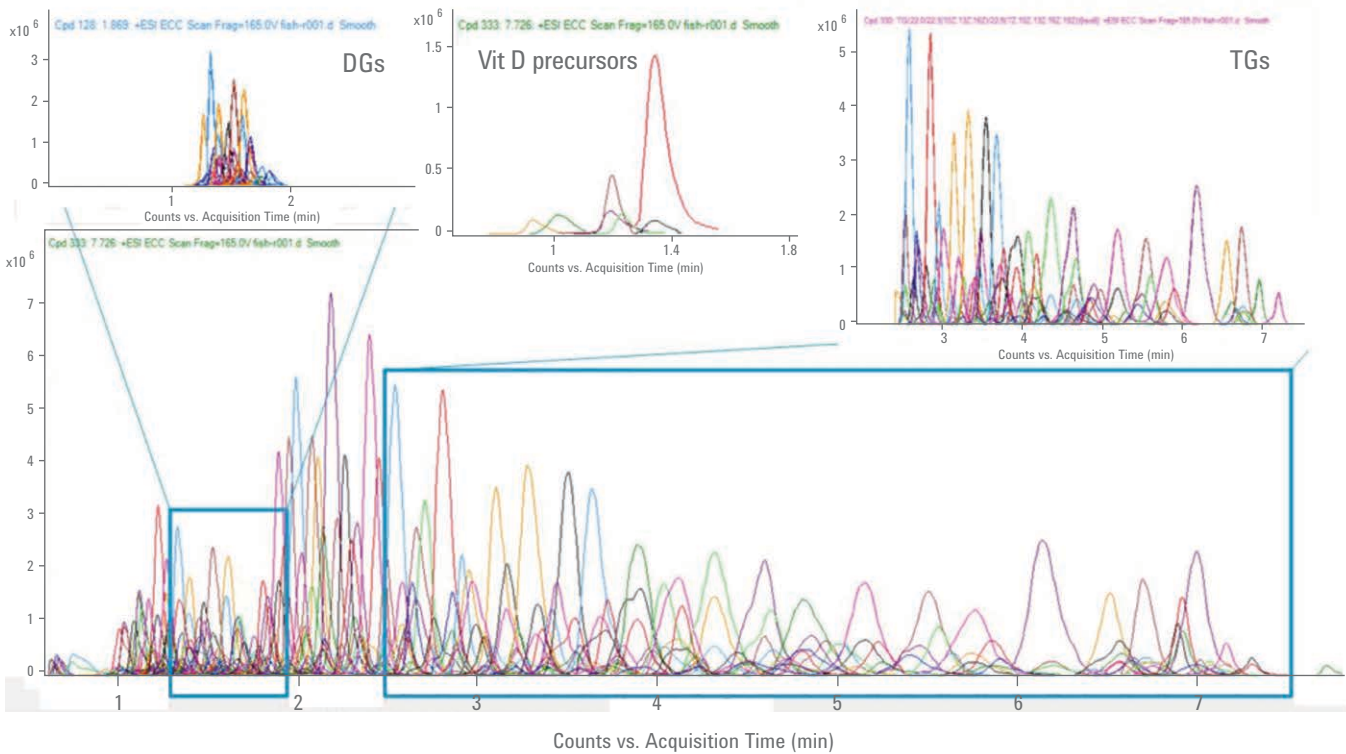


그림 4. 상용 건강 보조 식품에 포함된 어유의 SFC/MS 분석
추출된 이온 크로마토그램은 복잡한 지질 혼합물 분석에 SFC가 제공하는 고분해능을 보여줍니다.

Agilent 1260 Infinity 분석용 SFC/UHPLC Hybrid 시스템은 질량 분석기(MS)를 추가 검출기로 통합했을 때 더 높은 다용도성을 제공할 수 있습니다. SFC/MS와 HPLC/MS 사이에서 신속히 전환할 수 있는 능력은 Lipidomics 연구를 위한 매우 강력한 기능입니다.

Agilent 1260 SFC 시스템

- 통합 – 모든 애질런트 LC/MS 플랫폼에서 최첨단 SFC에 대한 단일 소프트웨어 제어를 실현
- "환경 친화적" – 소량 유기 용매 사용으로 일반 LC 분석법으로는 쉽게 분리될 수 없는 화합물에 대해 빠른 고분해능 분리 수행
- 강력함 – 단일 실행으로 극성 및 비극성 지질을 분리
- 다용도성 – 최고의 신뢰성과 함께 높은 유연성 제공



이온 이동도 기술의 장점

이온 이동도 기술은 지질과 같은 복잡한 시료에 대해 추가적인 직교 차원의 분리를 제공합니다. 크로마토그래피 분리 실시 후, 지질은 기체상에서 추가로 분리되고 지질 이온에 대한 충돌 단면적을 기반으로 한 분리를 제공합니다(그림 5). Agilent 6560 IMS Q-TOF 시스템(그림 6)은 상용화된 최고의 분해능 이동도 분리와 함께 정확한 질량 측정을 제공합니다.

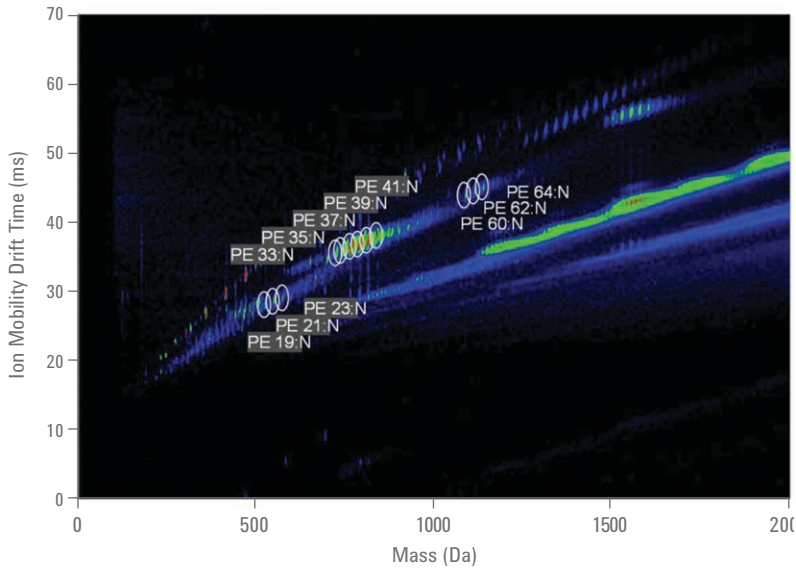


그림 5. 포스파티딜에탄올아민(PE)의 주입 혼합물에 대한 IMS 분리 드리프트 시간은 탄소 원자의 증가에 따라 증가합니다.

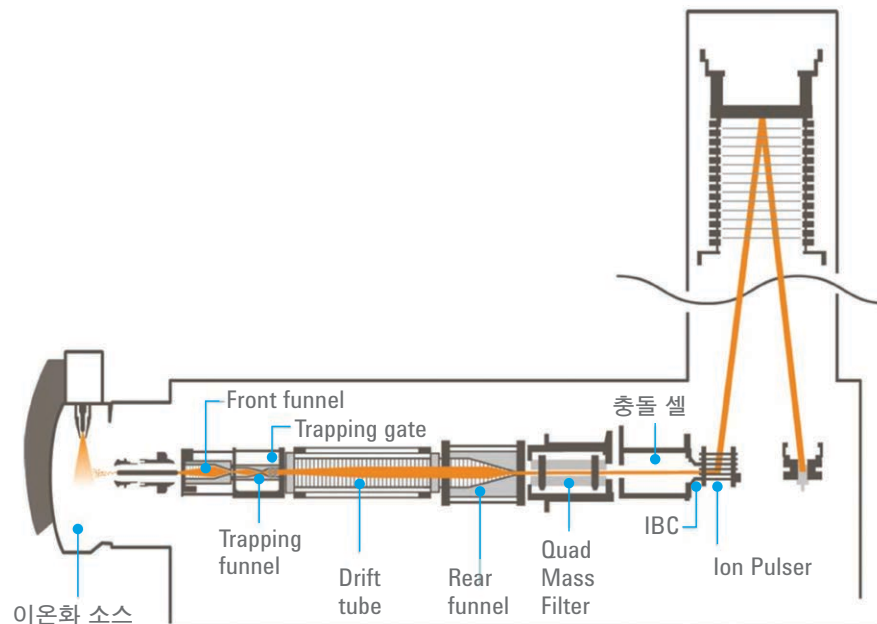


그림 6. 시료 농축을 위한 Front Funnel, trapping Ion Funnel, drift tube, focusing rear funnel 등을 포함하는 동적 funnel 어셈블리의 각 부분은 소스에서 Q-TOF 고분해능 질량 분석기까지 이르는 이온 전송을 향상시킬 수 있게 세심히 설계되었습니다. 고감도를 유지하면서 LC/IM/MS 분석을 이용하여 복잡한 시료를 분리하고 특성을 규명할 수 있으며, 대상 분자의 구조적 다양성을 연구할 수 있는 수단을 제공합니다.

지질 식별

LIPID MAPS(LIPID Metabolites and Pathways Strategy)는 대량의 지질을 식별하는데 필요한 지질 명명법 및 구조적 표현 등 국제적으로 인정된 최초의 지질 분류 시스템을 개발하기 위해 생성된 실험실 컨소시엄입니다. LIPID MAPS 분류 시스템은 8개의 지질 범주로 구성되며(그림 7) 각 범주는 여러 지방족 사슬, 입체이성, 키랄성, 헤드기 모이어티로 인해 발생하는 광범위한 구조적 및 기능적 다양성의 특성에 따라 분류됩니다.

완전한 지질 주석(annotation) 및 식별에는 클래스, 원소 조성물, R기 크기 및 위치, 이중 결합의 수 및 위치, 이중 결합 방향(시스/트랜스)이 포함됩니다.

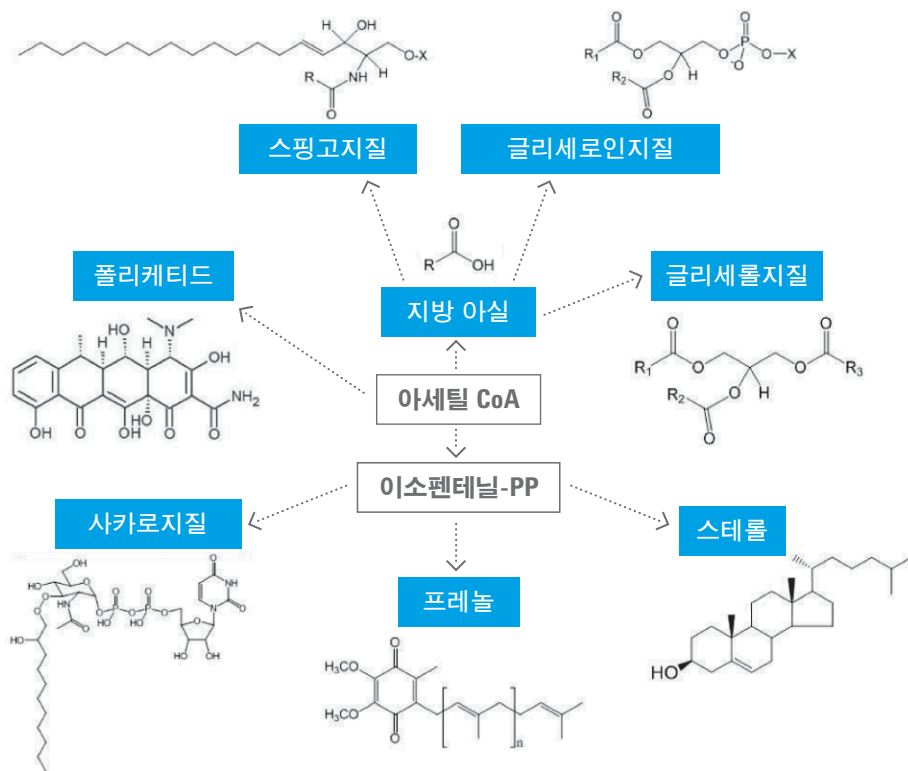


그림 7. LIPID MAPS 컨소시엄에서 정의한 8개의 지질 클래스

애질런트는 지질의 주석 또는 식별을 위해 여러 솔루션을 제공합니다. 여기에는 데이터베이스 매칭, MS/MS 스펙트럼 라이브러리 매칭 또는 MS/MS 이론 스펙트럼 매칭이 포함됩니다. 데이터베이스 매칭은 Agilent-METLIN 데이터베이스 또는 PREMIER BioSoft 사에서 제공하는 타사 소프트웨어 패키지인 SimLipid를 통해 수행될 수 있습니다. MS/MS 스펙트럼 라이브러리 매칭은 표준 화학물질을 이용하여 생성된 Agilent-METLIN MS/MS 라이브러리만을 통해 수행됩니다. SimLipid는 지질 스펙트럼의 MS/MS 이론 매칭도 지원합니다.

Agilent-METLIN 데이터베이스 및 MS/MS 라이브러리는 지질의 주석 및 식별에 사용될 수 있습니다. 여기에는 LIPID MAPS의 약 36,600개의 지질 항목이 포함되어 있으며, 그 중 640여개의 항목은 표준물질 MS/MS 스펙트럼을 가지고 있습니다. SimLipid 데이터베이스에는 8개의 지질 범주와 36,224개의 지질 항목이 포함됩니다.

유연성이 뛰어난 소프트웨어

지질 프로파일링에서는 시료 그룹 간 지질 차이를 비교하고 발견하기 위해 대량의 시료를 분석합니다. 애질런트의 MassHunter Profinder 소프트웨어는 다양한 시료 간의 지질 특징 추출과 정렬(alignment)에 사용됩니다. MS에서 생성된 결과는 SimLipid 데이터베이스로 도출하여 지질 식별에 사용되거나 Mass Profiler Professional(MPP)에서 통계학적 분석을 수행할 수 있습니다. 지질 식별에 SimLipid를 사용하지 않을 경우, 내장 ID Browser와 정확한 질량 매칭을 제공하는 Agilent-METLIN 데이터베이스를 이용하여 MPP에서 지질을 식별할 수 있습니다. 데이터 분석 접근법에 따라 애질런트 소프트웨어 솔루션 조합을 이용하여 다양한 워크플로를 이용할 수 있습니다(그림 8).

MS/MS 데이터를 수집한 후 소프트웨어를 이용하여 분석하고 SimLipid 또는 Agilent METLIN 대사체 Personal 화합물 데이터베이스 및 라이브러리(PCDL)를 통해 식별할 수 있습니다(그림 9).

SimLipid는 PREMIER Biosoft International 웹사이트(<http://www.premierbiosoft.com/lipid/index.html>)를 통해 이용할 수 있습니다

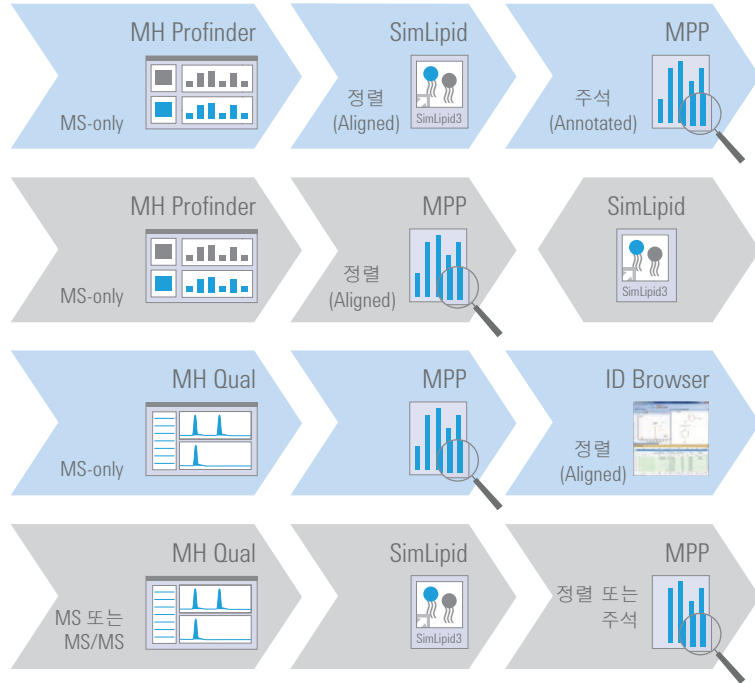


그림 8. MassHunter 소프트웨어로 통합된 Lipidomics 워크플로

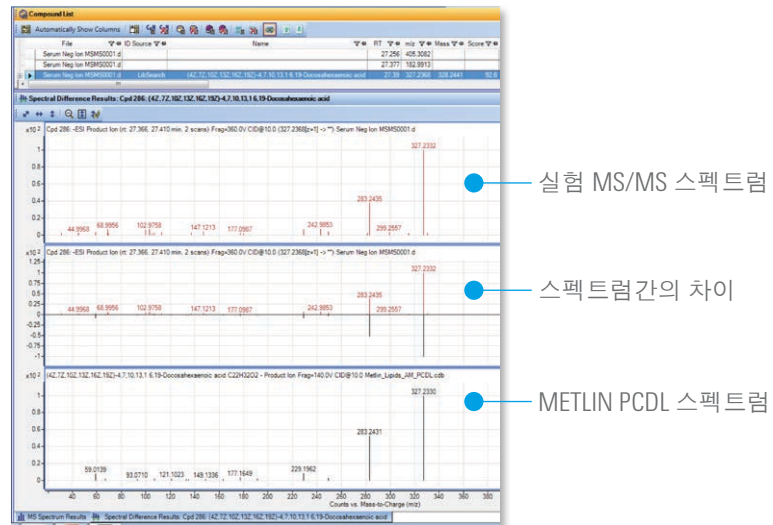


그림 9. MassHunter 정량분석에서의 사람 혈청 시료를 METLIN 대사체 PCDL을 이용하여 MS/MS 라이브러리 검색한 결과, 맨 위의 스펙트럼은 Agilent Q-TOF로 분석한 화합물 중 하나에 대해 수집한 MS/MS이고 맨 아래는 METLIN의 라이브러리 스펙트럼입니다. 중간의 것은 차이 스펙트럼입니다. 화합물 목록에서의 점수(92.6)는 고품질 검색 결과를 나타냅니다.

중요한 생물학적 관련성을 밝히는 Pathway Architect

LC/MS를 이용한 지질 시료 분석은 적합한 크로마토그래피의 선택과 발견된 화합물의 주석 및 식별에 대한 요건으로 발생하는 특별한 문제를 제기합니다. Untargeted 프로파일링 접근법은 대량의 후보 지질을 제공할 수 있지만 생물학적 관련정보를 지원하지 못합니다.

MPP의 Pathway Architect 모듈은 생체회로에서 데이터 검색, 필터링, 맵핑 및 시각화 등 기능을 수행합니다. 이는 두 가지 유형의 pathway 분석이 지원되며, 그 중 하나는 발행된 문헌의 자연 언어 처리를 기반으로 한 Literature Derived Network 분석이며 다른 하나는 KEGG, BioCyc 및 Wikipathways와 같이 공개적으로 큐레이트된 생체회로를 분석하기 위해 설계되었습니다. 이러한 실험 데이터를 생체회로에 반영하여 직관적으로 데이터를 필터링, 확대/축소 또는 선택할 수 있습니다. 특정 생체회로를 선택할 수 있고 지질, 단백질, 대사체, 전사물 및 유전자 목록을 도출하여 다른 프로그램에서 새로운 "Pathway Directed Experiments"를 생성하는데 사용할 수 있습니다.

이 예의(그림 10) 지질 분석 워크플로는 MS 및 MS/MS를 통한 untargeted 프로파일링을 시작으로 하여 시료에서 가능한 많은 지질 화합물을 찾아냅니다. SimLipid 소프트웨어는 결과를 주석하는 데 사용되고, 그 다음 Pathway Architect의 KEGG Pathway에서 결과를 시각화합니다.

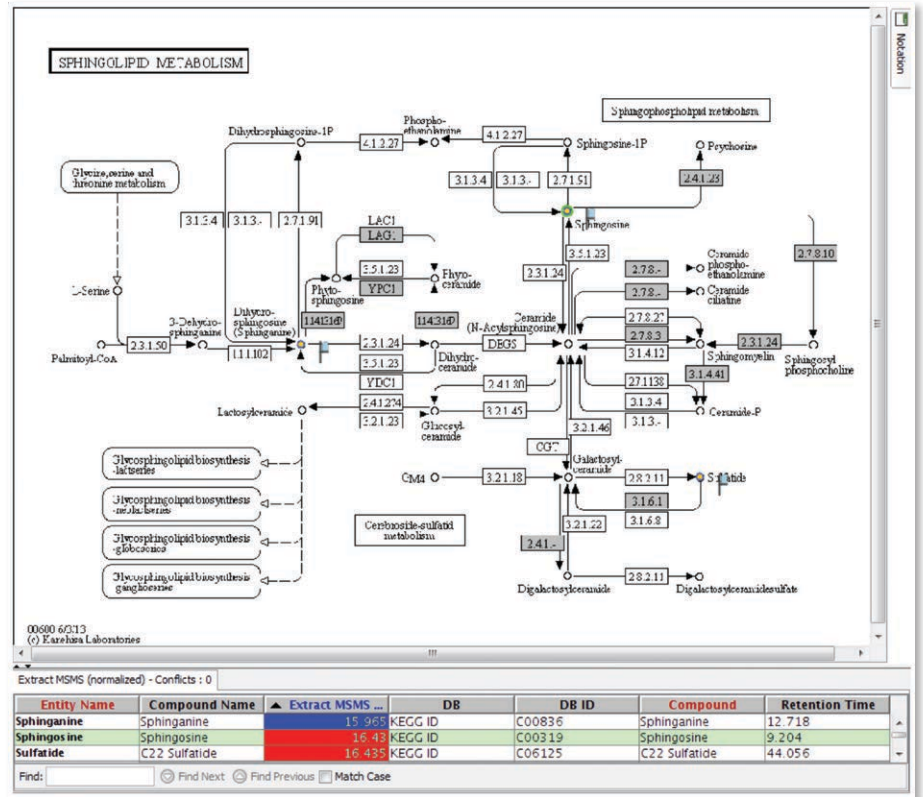


그림 10. Pathway Architect에서 KEGG pathway 데이터베이스를 이용하여 사람 혈청 시료에 대해 pathway 분석한 결과, 3개의 지질 화합물이 SimLipid를 통해 식별되었고 스펙고지질 대사 경로에 존재하는 것으로 알려졌습니다. 화합물은 황색 점으로 pathway에서 강조 표시되었고 현재 선택된 화합물(스핑고신)은 녹색 윤곽을 나타냈습니다.

자동화 LIPIDOMICS 기술

분석결과 개선을 위한 시료 전처리 자동화

자동화 Lipidomics 시료 전처리 프로토콜은 재현성을 높이고 시료 전처리에 소모되는 시간을 단축시킵니다. 게다가 자동화를 통해 중요한 인력이 더 복잡한 작업에 집중할 수 있고 직원들의 부담을 최소화하므로 장기적인 연구에 특히 유리합니다. 예를 들어, 싱가포르 국립 대학교의 Lipidomics 연구의 요람 — SLING 연구소 Markus Wenk 박사의 실험실에서는 Agilent Bravo Automated Liquid Handling 플랫폼을 이용하여 인간 혈장 내 인지질과 스피고지질의 반자동 추출법을 개발했습니다.

수동 VS 반자동 프로토콜의 전처리 단계 비교

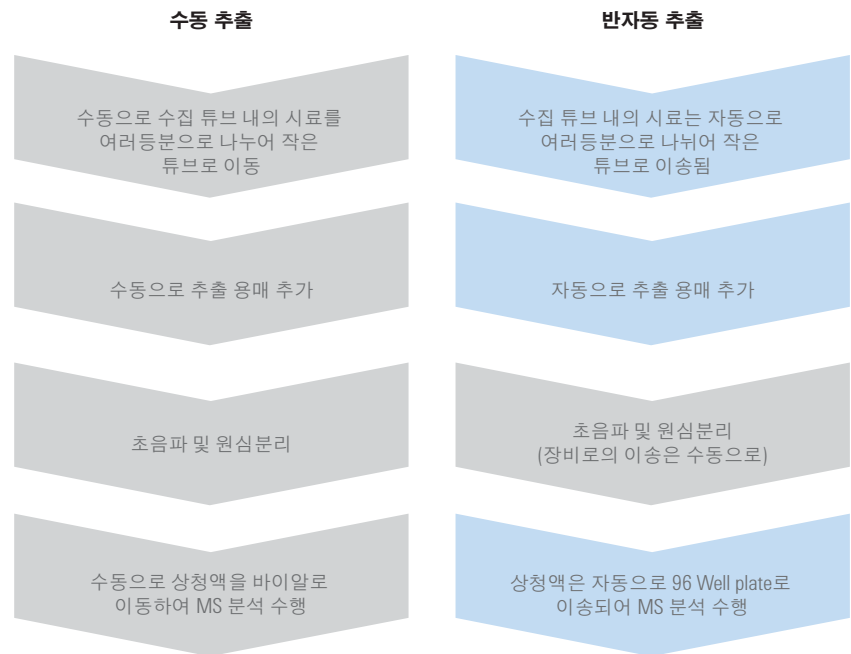
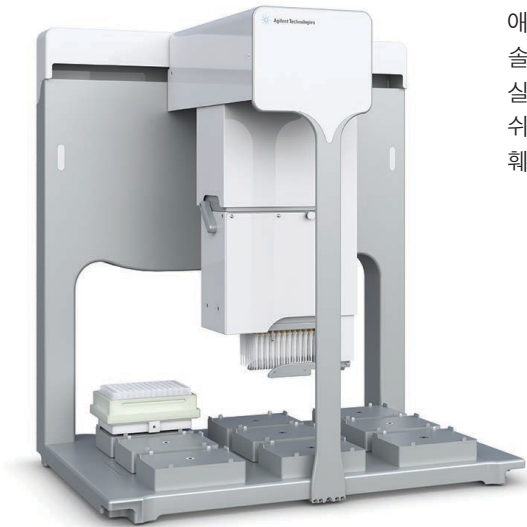
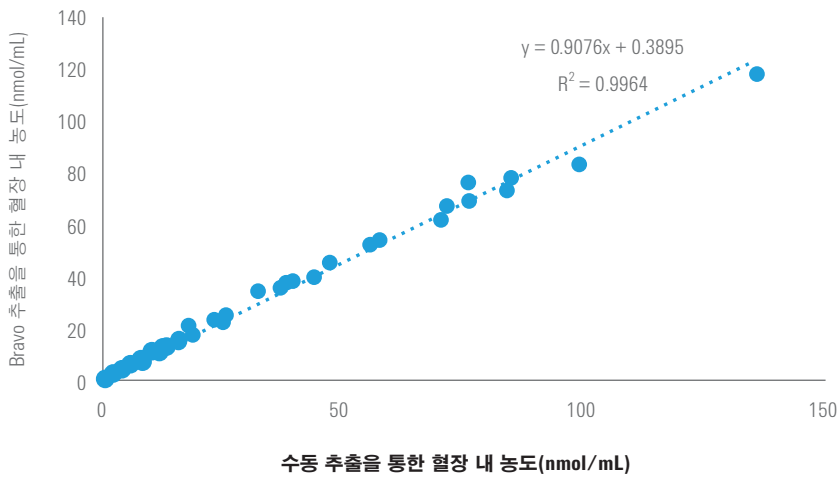


그림 11: Wenk 박사의 실험실에서는 Bravo Liquid Handling 플랫폼을 이용하여 인지질 및 스피고지질 시료의 4단계 전처리 중 3단계를 자동화합니다.



에질런트의 자동 Liquid Handling 솔루션은 액체 시료처리, 레이블링 및 실링(sealing)과 같이 오류가 발생하기 쉬운 작업을 단순화하여 데이터 품질을 훼손하지 않고 처리량을 증대합니다.



지질 표준품	% RSD 반자동	% RSD 수동
PE 14:0/14:0	4.80	7.13
PC 14:0/14:0	5.85	5.72
C17 세라미드	7.32	11.97
LysoPC 20:0	5.27	5.05
SM 30:1	3.79	4.96
GluCer d18:1/8:0	6.81	6.34

그림 12. 회귀 도표에서 보시다시피, Bravo Liquid Handling 플랫폼의 반자동 전처리 분석법으로 측정된 정량분석 결과는 수동 분석법으로 측정된 결과와 동등합니다. 오른쪽 표에서 지질 표준품을 정량화할 때 반자동 분석법이 더 유용하다는 것을 알 수 있습니다.

LIPIDOMICS를 위한 애질런트의 GC/MS 및 LC/MS 솔루션

GC/MS 기기



5977A 시리즈 GC/MSD 시스템

일상적인 표적 분석 및 Discovery 분석에 적합합니다. Agilent 5977A GC/MSD는 다량의 시료를 스크리닝하는 데 신뢰성 및 사용 편리성을 제공합니다.



7000C 및 7010 Triple Quadrupole GC/MS 시스템

더 까다로운 표적 분석 수행 시, 7010을 사용하면 최적의 MS/MS 정량분석과 최저 검출 한계를 획득합니다.



7200B GC/MS Q-TOF 시스템

고분해능 MS/MS 데이터를 이용하여 이전에 알려지지 않은 지질을 확인합니다. Agilent 7200B GC/MS Q-TOF는 지속적인 고분해능 데이터를 이용하여 7890B GC의 분리 능력을 보완합니다.



애질런트의 완전한 GC 및 LC 컬럼과 소모품 제품군은 실험실의 모든 장비로 하여금 Lipidomics 연구를 지원할 수 있게 합니다. www.agilent.com/chem/selectiontools에서 여러분의 실험실에 가장 적합한 솔루션을 쉽게 확인하실 수 있습니다



LC/MS 기기



1260 Infinity Analytical SFC 시스템

Agilent 1260 SFC/MS는 다른 분석법으로는 쉽게 분리할 수 없는 지질의 신속한 고분해능 분리를 가능하게 합니다. 높은 유연성, 높은 정밀도 및 뛰어난 신뢰성으로 극성 및 비극성 지질을 한 번의 실행으로 분리합니다.



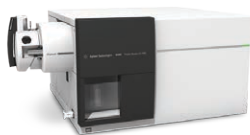
6500 시리즈 Accurate Mass Q-TOF

6500 시리즈 Q-TOF는 저분자 화합물의 프로파일링 및 식별에 적합하며 MS/MS 성능을 제공합니다. 통상 질량 정확도를 기반으로 지질 식별 정확성이 향상되고 데이터베이스 검색 시 위양성(false positive)이 줄어듭니다.



1290 Infinity II LC

뛰어난 분리 및 검출 성능으로 최고 품질의 데이터를 제공하며 높은 신뢰성을 보장합니다. 높은 시료 용량과 빠른 주입 사이클 속도를 새로운 차원의 유용성과 결합하여 최고의 처리량을 제공합니다.



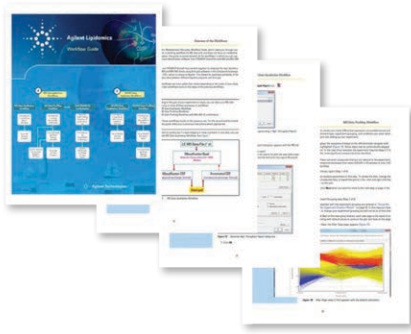
6400 시리즈 Triple Quadrupole LC/MS

6400 시리즈 Triple Quadrupole LC/MS는 초고속 MRM transition과 견고하고 신뢰할 수 있는 성능을 기반으로, 가동 시간을 극대화하여 많은 시료 세트를 분석합니다. Sub-femtogram 수준의 감도로 저농도 지질을 검출할 수 있습니다.



Bravo Automated Liquid Handling 플랫폼

지질 시료 전처리의 경우, Bravo 플랫폼은 수집 튜브 내의 시료를 wellplate 바이알로 이송하며 액체 추가 및 시료 추출 기능을 수행할 수 있습니다.



자세한 정보를 확인하시려면
MassHunter Qualitative Analysis,
Profiler, SimLipid, MPP 소프트웨어를
이용한 lipidomics 분석에 대한 지침을
보여주는 Lipidomics 워크플로 개요 및
가이드를 다운로드 받으십시오. 이 가이드는
lipidomics 워크플로에 대한 단계별 상세
정보를 제공합니다. 이러한 내용은
www.agilent.com/chem/library에서
제공되는 5991-1643EN 및 5991-1644EN를
검색하여 확인하십시오.

추가 정보

www.agilent.com/chem/lipidomics

애질런트 고객 센터 찾기

www.agilent.com/chem/contactus

미국 및 캐나다

1-800-227-9770

agilent_inquiries@agilent.com

유럽

info_agilent@agilent.com

아시아 태평양

inquiry_lsca@agilent.com

This information is subject to change without notice.

© Agilent Technologies, Inc. 2015
2015년 5월 11일 한국에서 발행
5991-5419KO

서울 강남구 역삼로 542 신사제2빌딩 2층 우)135-848
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr



Agilent Technologies