

研究展报

ASMS 2022

展报编号 MP339

实现中心碳代谢多方法分析并涵盖多种代谢物类别的创新解决方案

Yue Song^a, Shan-An Chan^b, Mark Sartain^c

a. 安捷伦科技有限公司，中国上海

b. 安捷伦科技有限公司，中国台湾台北市

c. 安捷伦科技有限公司，美国加利福尼亚州圣克拉拉市

代谢组学是一种通过测量代谢物丰度了解生物系统的强大技术，但是由于缺乏动态信息，数据解析通常很复杂。例如：某一通路的靶向代谢组学和代谢流组学的显著改变可能并不会导致代谢物中间体丰度发生改变。

为了解决这些挑战，开发了一种结合多种方法的创新靶向代谢组学策略，通过考虑中心碳代谢、能量代谢、核酸代谢和氨基酸的峰形、分离以及代谢物覆盖度，以覆盖体液、组织或生物来源的培养细胞系中的数百种代谢物，从而提高分析性能（图 1）。采用了全新的解决方案分析差异化生物样品，如本研究中展示的骨髓来源巨噬细胞（BMDM）或基因敲除肝癌细胞小鼠模型的结果。

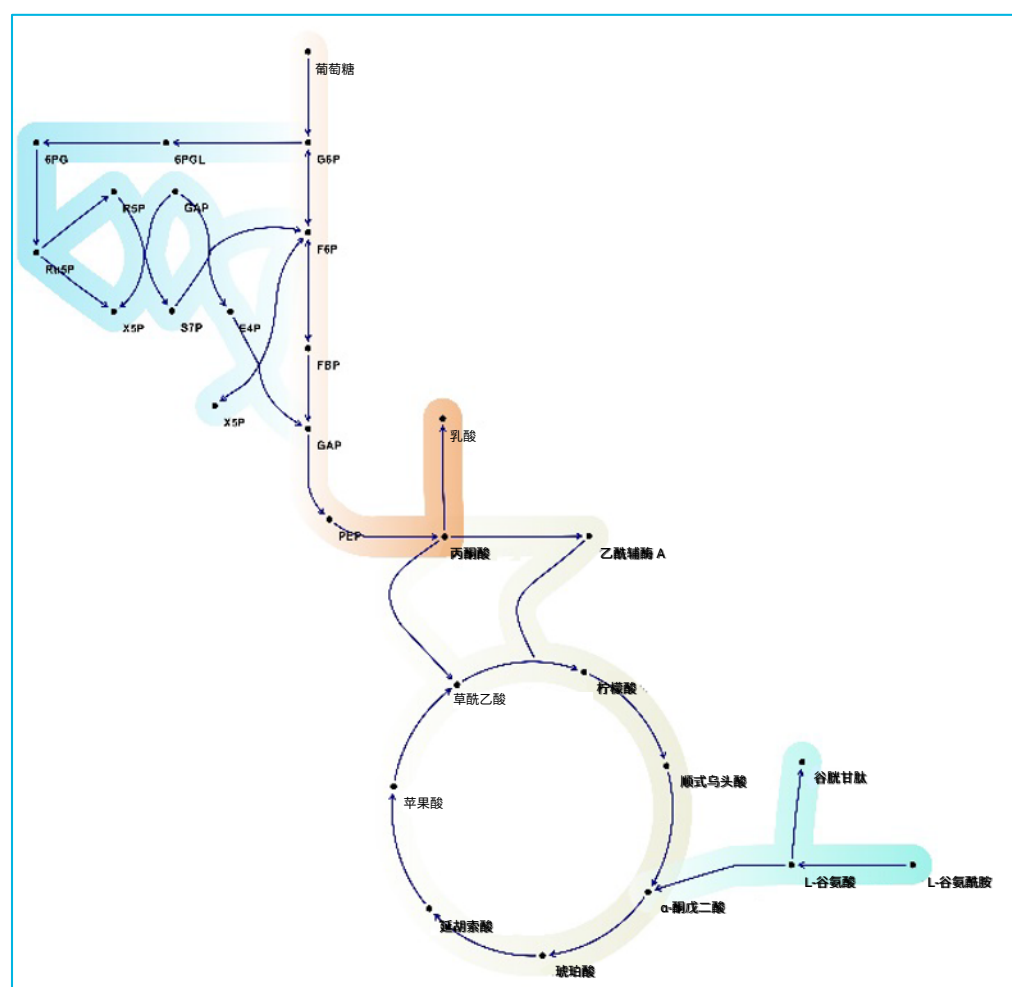


图 1. 糖酵解、戊糖磷酸途径、TCA 循环、谷氨酰胺代谢、能量代谢和氨基酸的中心碳代谢（代谢物的部分未显示）

采用正相、反相和特殊固定相色谱柱实现中心碳代谢中代谢物的高覆盖度，以高/低 pH 值且组成不同的水溶液和有机溶剂作为流动相（表 1）。

1290 UHPLC 方法	色谱柱类型	目标代谢物
1	Amide	100+ (EMP、NTP、NS 和 AA)
2	C18 (衍生化)	9 (TCA 循环)
3	离子交换 (ROA)	1 (OAA)
4	混合模式	2 (异柠檬酸/柠檬酸)

表 1. 多方法能够提供高覆盖度和良好的中心碳代谢分离（方法 2、3 和 4 未显示详细信息）

1290 Infinity II UHPLC 方法 1

色谱柱： Amide, 2.1 × 100 mm, 1.7 μm

流动相 A (MPA): 15 mmol/L NH₄CO₂H 和 0.3% NH₄OH 水溶液

流动相 B (MPB): 15 mmol/L NH₄CO₂H 和 0.3% NH₄OH 的 90% 乙腈 (v/v) 水溶液

柱温箱： 40 °C

使用线性梯度，流速为 0.3 mL/min，总运行时间为 20 min

6545 LC/Q-TOF 系统

离子源： 双 AJS

雾化器气体压力： 45 psi

干燥气流速： 8 L/min

干燥气温度： 280 °C

鞘气流速： 10 L/min

鞘气温度： 325 °C

喷嘴电压： 250 V（正离子模式）； 1000 V（负离子模式）

毛细管电压： 3500 V（正离子和负离子模式）

碎裂电压： 140 V

扫描质量范围： 50–1200 *m/z*

扫描速度： 3 质谱图/秒

分辨率设置： 2 GHz（扩展的动态范围模式）

本研究中，方法 1 涵盖了数百种代谢物。大量极性化合物不易保留，洗脱不当或不全会导致峰形较差或无法检测到。简单、快速、方便的解决方案是在样品溶液中加入 5 mmol/L 磷酸铵 (AP)，改善色谱分离和峰形，特别是磷酸糖代谢物和相关能量代谢。(图 2)

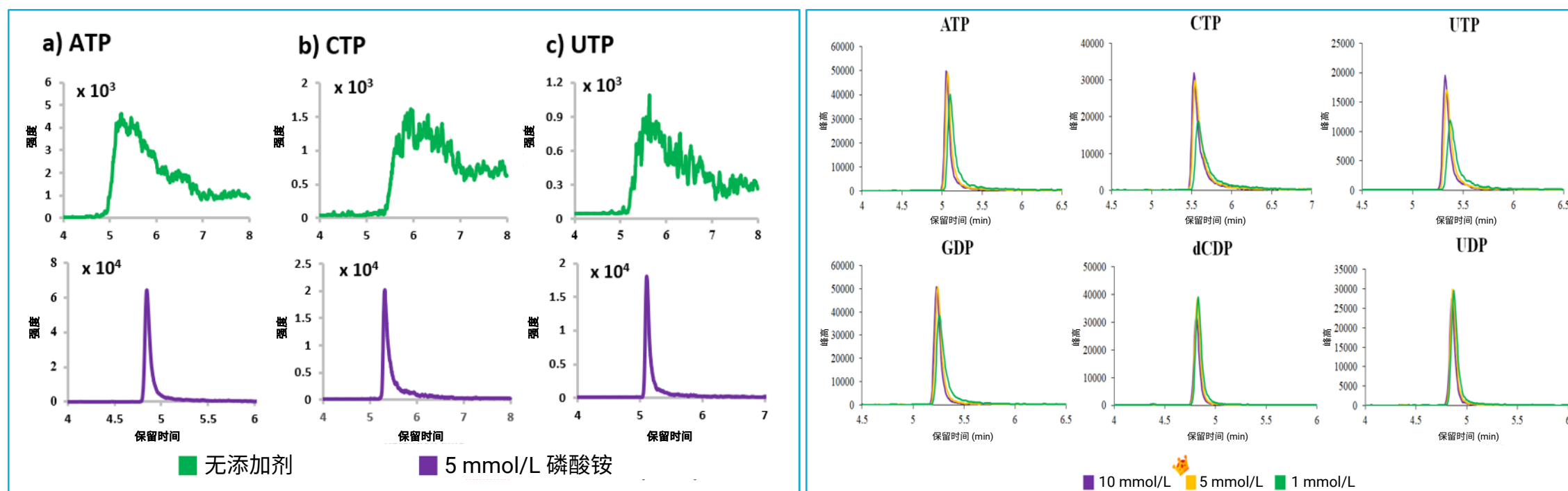


图 2. 通过添加 5 mmol/L 磷酸铵 (上图/绿色与下图/紫色)，可以显著改善三磷酸核苷酸的色谱峰形

另一个难点是三羧酸 (TCA) 循环是中心碳代谢的重要途径。一些代谢物难以用方法 1 进行分析，因为异构体化合物分离或分析各种样品基质的灵敏度差，特别是 α -酮戊二酸 (α -KG)，草酰乙酸 (OAA) 或异柠檬酸/柠檬酸。使用方法 2、3 和 4 中的 O-苄基羟胺 (O-BHA) 衍生化和专用色谱柱开发解决方案。采用快速、灵敏、可重现的多方法评估癌细胞或疾病代谢物的变化趋势。

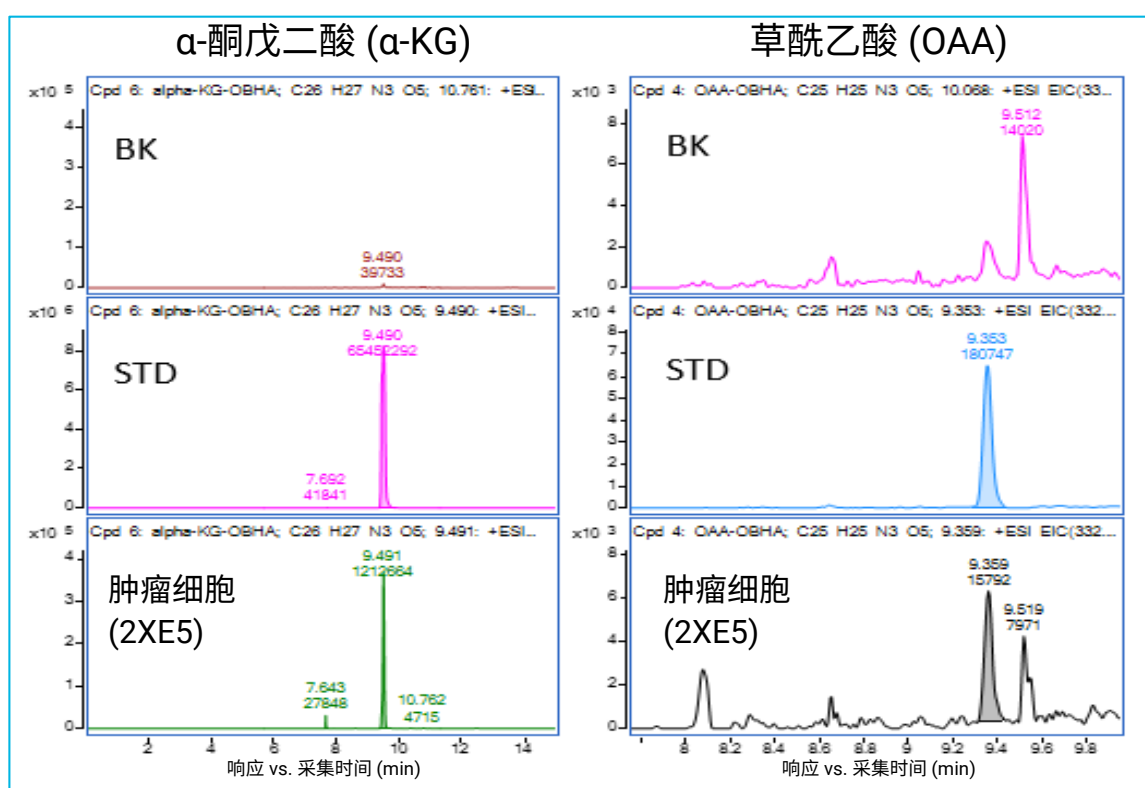


图 3. 痕量水平的 α -KG 和 OAA 可以用 O-BHA 衍生化方法检测到

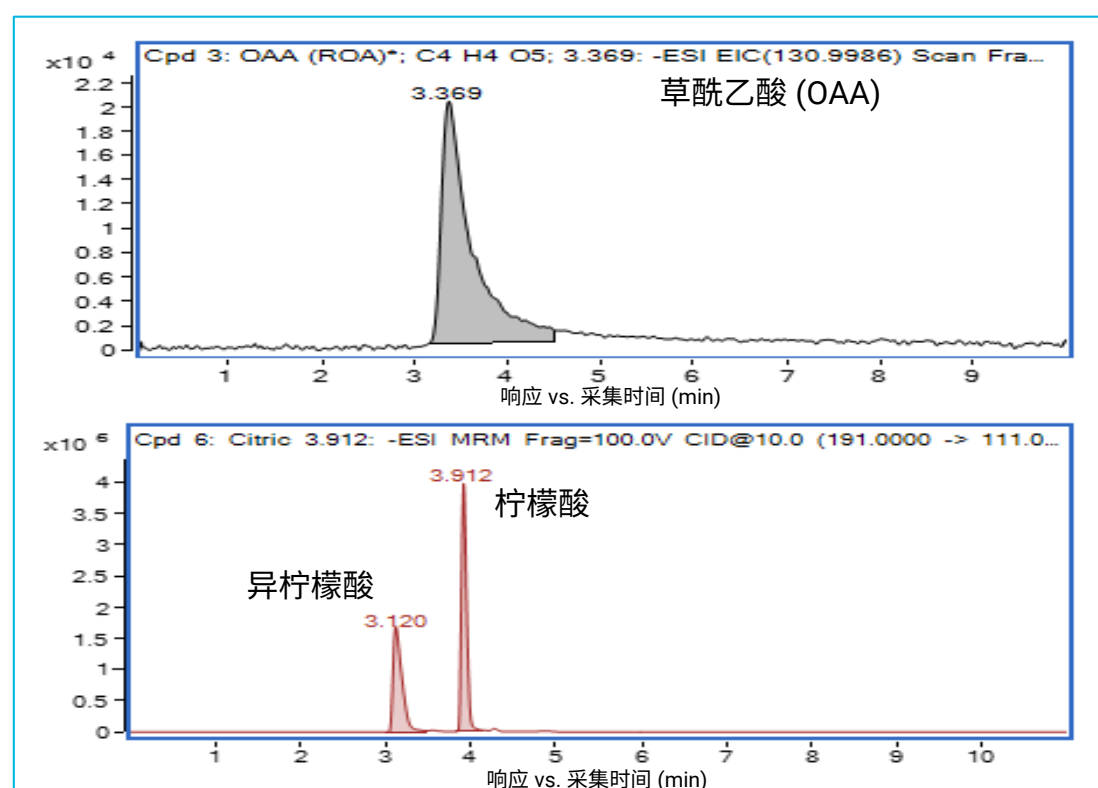
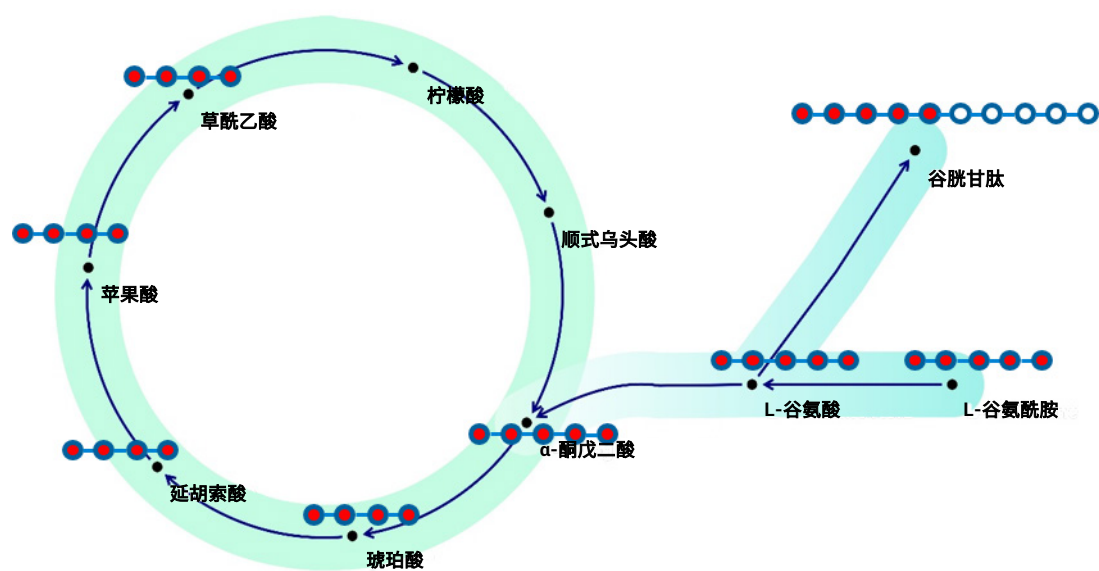


图 4. 分别使用 ROA 和混合模式色谱柱对 OAA 和异柠檬酸/柠檬酸进行多方法分析

目的是进一步揭示谷氨酰胺分解、谷胱甘肽生物合成和 TCA 循环的代谢重编程。G 基因敲除上调葡萄糖的糖酵解和 TCA 循环（图 5）。



■ WT ■ G-KO ■ S-KO ■ SG-DKO



图 5. 通过 LC/Q-TOF 分析得到的 [U-13C5]-谷氨酰胺分解的中间代谢物的同位素异数体

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

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。

RA44868.6907175926

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

对小鼠骨髓来源巨噬细胞 (BMDM) 进行 $^{13}\text{C}_6$ -葡萄糖处理以追踪代谢重编程过程（图 6）。

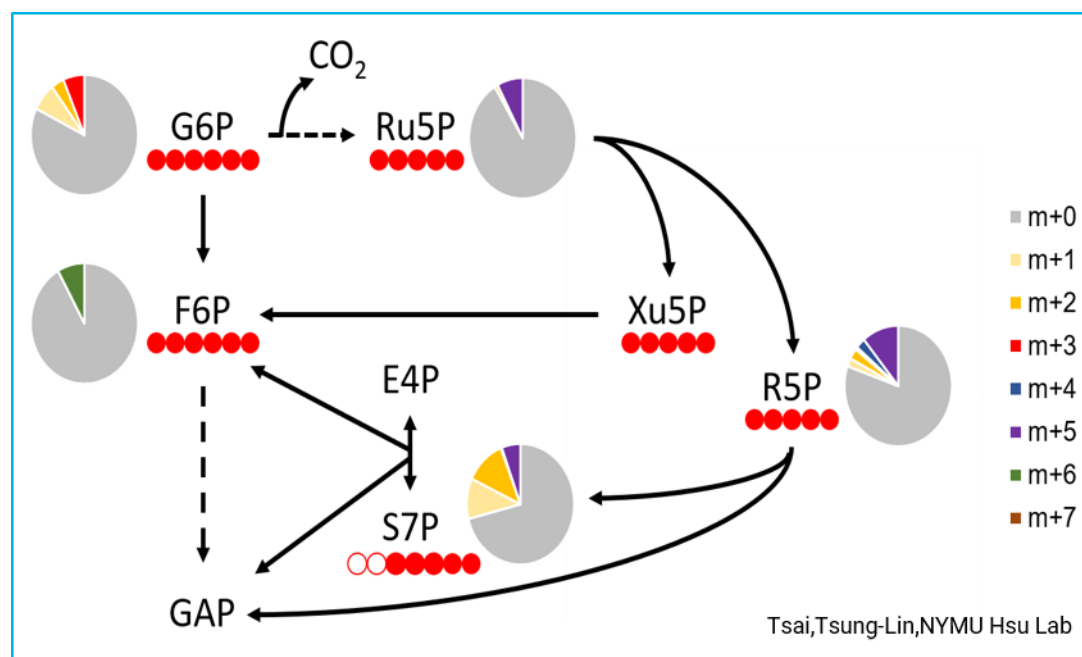


图 6. 代谢流分析结果表明，这种处理导致 PPP 在 BMDM 中被优先使用

结论

初步结果表明，将 AP 改性剂添加到样品中时，可以提高对低浓度代谢物的灵敏度和分离度，从而获得糖磷酸代谢物的理想色谱峰形。用于分析各种生物基质中的中心碳代谢和相关代谢物的潜在多方法解决方案对于体外、离体和体内研究具有重要意义。

参考文献

1. Trace Phosphate improve ZIC-pHILIC Peak Shape, Sensitivity, and Coverage for Untargeted Metabolomics. J. Proteome Res. (2018)17:3537
2. Targeted Determination of Tissue Energy Status by LC-MS/MS. Anal. Chem. (2019) 91:5881