

Agilent MassHunter Profinder: 정성 Flux 분석을 위한 동위원소체 추출 문제 해결

기술 개요

서론

대사체학 연구는 생물학적 시스템을 더 잘 이해하기 위해 대사물질의 상대 존재비를 측정합니다. 그러나 이는 대사의 역학관계에 대한 통찰을 제공하지는 못합니다. 그 이유는 경로를 거치는 flux의 변화가 상당하더라도 이것이 대사 중간생성물의 존재비를 변화시키지 않을 수도 있기 때문입니다. 정성 flux 분석은 이 문제를 해결하여 연구자들이 선택한 경로와 flux에 대한 정보를 얻을 수 있습니다. 이런 종류의 연구에서, 생물학적 시스템에 안정 동위원소 표지 추적자(일반적으로 ^{13}C , ^{15}N 또는 ^2H 포함)를 도입하면 시간이 지남에 따라 대사물질의 자연 동위원소 패턴이 변화합니다. 이는 질량 분석기(MS)를 이용하여 질량 특징을 측정할 수 있는 특징적인 패턴을 생성합니다. 애질런트 TOF와 Q-TOF LC/MS 시스템은 정성 flux 분석에서 필요로 하는 높은 수준의 질량 정확도와 동위원소 비율 측정 정확도(isotopic fidelity)를 제공합니다.

정성 flux 분석의 주요 난제 중 하나는 동위원소 표지된 대사물질을 복잡한 시료 분석으로부터 효과적으로 추출하는 것입니다. 동위원소체, 즉 동위원소 조성만 다른 대사물질 이온을 각 표적 대사물질에 대해 측정해야 하며 백그라운드 또는 매트릭스 이온으로부터 구분해야 합니다. 또한, 원시 동위원소체 존재비를 추적자의 동위원소 순도와 모든 자연 발생 동위원소의 기여도를 고려해 보정해야 합니다.

이와 같은 어려움을 해결하기 위해, 배치(batch) 동위원소체 추출 알고리즘을 질량 분석법 기반의 배치(batch) 특징 추출 소프트웨어인 Agilent MassHunter Profinder¹에 적용하였습니다. 이 알고리즘은 Agilent LC/TOF 및 LC/Q-TOF 시스템에서 수집하는 정성 flux 데이터를 위해 특별히 설계된 것입니다. 본 기술 개요는 Agilent MassHunter VistaFlux²의 모듈 중 하나인 Profinder의 동위원소체 추출 워크플로에 대해 소개합니다.



Agilent Technologies

워크플로 개요: 배치(batch) 동위원소체 추출

Profinder는 질량 분석 데이터를 빠르게 일괄 처리(batch-processing)하는 소프트웨어입니다. 이 소프트웨어는 반복 분석 데이터 파일의 그룹화, 화합물 얼라인먼트, 다중 크로마토그램 오버레이, 시료 그룹별 색상 지정, 피크의 수동 재적분 및 결과 내보내기 등의 여러 유용한 데이터 분석 도구를 제공합니다. Profinder B.08.00은 flux 분석을 위한 배치(batch) 추출 알고리즘을 갖추고 있어 동위원소체 결합에 대한 추출 및 시각화를 신뢰성 있게 수행할 수 있도록 합니다.

Profinder의 배치(batch) 동위원소체 추출 알고리즘은 대사물질 표적 목록을 포함한 파일(.CDB 또는 .CSV)을 이용하여 대사물질의 화학식을 기반으로 가능한 모든 동위원소체를 추출합니다. 표적 목록은 화학식, 머무름 시간(RT), 화합물 명, 화합물 ID(CAS, KEGG 등)를 포함해야 합니다. RT는 표적 대사물질의 화학식을 이용하여, Profinder 내의 Batch Targeted Feature Extraction 워크플로를 활용해 결정할 수 있습니다¹.

이 알고리즘은 Agilent LC/TOF 또는 LC/Q-TOF에서 수집한 ¹³C, ¹⁵N 또는 ²H의 안정 동위원소 표지 이온의 표적 데이터 마이닝을 위해 설계되었습니다. 원시 동위원소체 존재비는 추출된 대사물질에 의해 확정되며, 자연 동위원소 존재비와 동위원소 추적자의 순도를 통해 보정된 동위원소체 존재비 또한 계산됩니다.

Profinder의 동위원소체 추출 알고리즘은 단계적인 이온 추출 과정을 사용합니다. 우선, 넓은 m/z 허용 오차 범위를 사용하여, 각각 가능한 동위원소체의 m/z에서 표적 파일 내에 지정된 RT 구역에 걸쳐 개별 동위원소체 추출 이온 크로마토그램(EIC)을 추출합니다. 이들 EIC의 합을 통합하여 표적 화합물의 증거가 있을 수 있는 RT 구역을 보다 좁힙니다. 데이터는 그러한 각 구역에 대해 독립적으로 평가됩니다. 각 구역으로부터 질량 스펙트럼을 추출하고, 보다 엄격한 m/z 매칭 기준을 충족하지 못하는 이온을 제외시키는 데 사용합니다. 이온의 개별 EIC들이 비슷한 용리 프로파일을 나타내지 않는다면 배제될 수도 있습니다. 그 다음, 첫 번째 단계에서 자격을 갖춘 이온들만의 합으로 나타낸 새로운 결합 EIC가 생성됩니다. 새 EIC에 1개 이상의 피크가 있다면, 한 피크에서 합격된 동위원소체 이온의 수, 피크의 상대 존재비, 표적 RT 대비 피크 편차를 고려하는 평점 시스템에 의해 가장 가능성이 높은

피크를 선택합니다. 마지막으로, 선택된 EIC 피크(사용자가 선택한 존재비 기준에 따라)의 동위원소체 존재비 값을 측정하며, 표지 원소의 자연 존재비 및 추적자의 동위원소 순도에 의해 이들 존재비 값을 보정합니다.

이러한 단계적 추출 절차는 표적 대사 동위원소체를 백그라운드 및 매트릭스 이온으로부터 분별하여 위양성 결과를 최소화할 수 있는 이점을 제공합니다. 알고리즘은 질량 스펙트럼이 아닌 EIC를 사용해 보다 정확한 동위원소체 존재비를 제공함으로써 더 정밀한 동위원소체 결합 결과를 산출할 수 있습니다.

배치(batch) 동위원소체 추출 절차는 워크플로 마법사를 따라 진행되므로, 필수적인 파라미터를 쉽게 설정할 수 있습니다. 이 절차는 데이터 파일을 가져오기하고 그룹을 할당하는 것으로부터 시작합니다(그림 1).

고품질 데이터 수집



Agilent MassHunter Profinder로 데이터 파일 가져오기

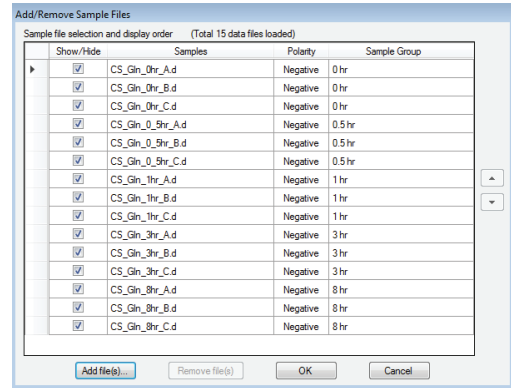


그림 1. 고품질 데이터를 얻기 위한 Agilent LC/TOF 또는 LC/Q-TOF 시료 분석. 데이터 파일은 Agilent MassHunter Profinder로 가져오기한 후 시료 그룹을 할당

표적 대사물질 목록을 포함하고 있는 입력 파일을 표적 소스로 사용하며, 동위원소 표지를 선택합니다(그림 2). 선택한 모든 파라미터와 설정을 포함한 분석법을 저장할 수 있습니다. 설정을 선택하고 **Finish**를 누르면, 배치(batch) 동위원소체 추출이 자동으로 수행됩니다. 데이터 처리의 모든 결과는 Profinder 프로젝트(Profinder 파일)로 저장할 수 있습니다.

그림 3은 TCA 경로를 위해 생성된 BioCyc 데이터베이스 유래 대사물질 표적 목록을 이용하여 Agilent 6230 TOF LC/MS에서 음이온 모드로 수집한 ^{13}C -glutamine flux 데이터의 처리 결과를 보여줍니다. Profinder 인터페이스가 5개의 연계되어 있는 탐색 창으로 구성되어 있어, 추출 결과를 쉽게 검토할 수 있습니다. 화합물 그룹

도표(3A)는 여러 데이터 파일에 대해 요약되고 그룹화된 화합물 레벨의 정보를 표시합니다. 선택한 화합물 그룹의 개별 파일 세부정보는 화합물 세부정보표(3B), 모든 동위원소체를 합한 크로마토그램 결과(3C), MS 스펙트럼 결과(3D) 및 동위원소체 결과(3E)에 나타나 있습니다.

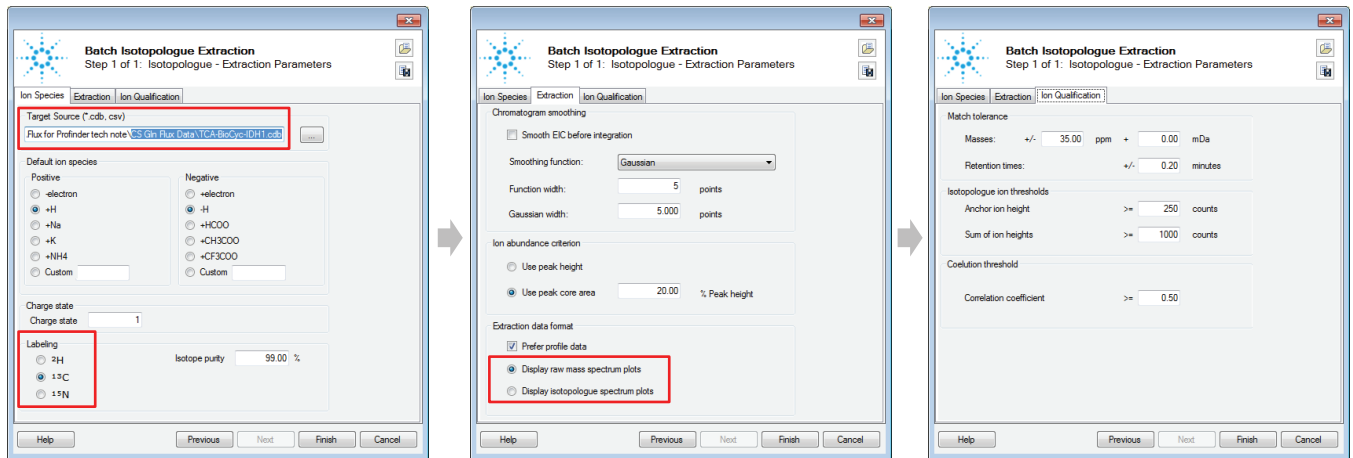


그림 2. 배치(batch) 동위원소체 추출 설정 단계를 안내하는 워크플로 마법사. 빨간색 박스는 가장 빈번하게 조정하는 파라미터를 강조하여 나타냄

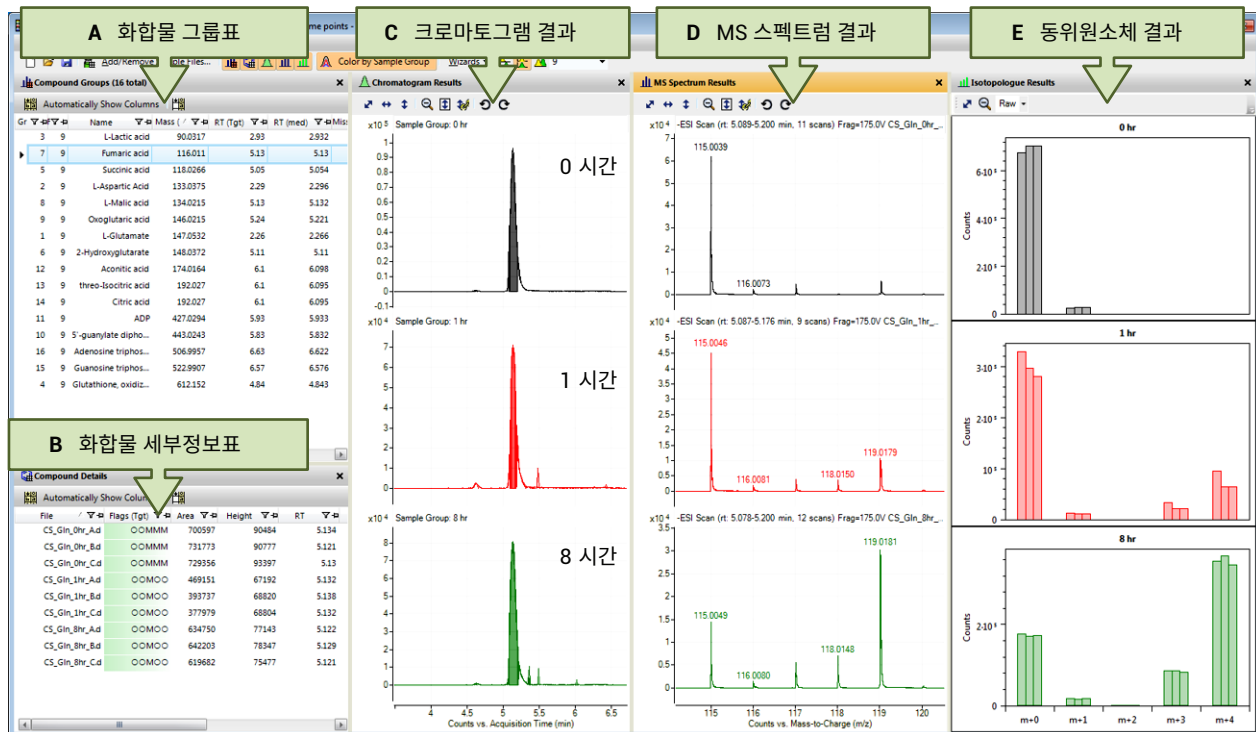


그림 3. 3개의 대표 그룹으로부터 배치(batch) 동위원소체 추출 결과를 제공한 화합물 중심의 시각화

이 화합물 중심의 그래픽 사용자 인터페이스는 간소화된 데이터 검토, 수동 큐레이션 기능, 대사 동위원소체 결합의 시각화 등을 제공합니다. 이미지는 개별 시료 파일별(그림 4A) 또는 시료 그룹별(4B)로 색상을 지정하여 사용자가 선호하는 대로 쉽게 볼 수 있습니다. 그들은 또한 개별 시료 파일(4A-B)을 펼쳐보기하거나, 시료

그룹별로 오버레이 가능하며(4C), 또는 모든 파일을 오버레이할 수 있습니다 (4D). 이들 옵션은 시료 파일 또는 시료 그룹에 걸쳐 동위원소체를 비교할 수 있는 보다 효율적인 방법입니다. 또한 이는 누락된 피크를 시각화하고, 크로마토그램을 수동으로 편집할 수 있도록 합니다. 자연 동위원소 존재비와 동위원소 추적자 순도에 따라 보정을

하는 것은 정성 flux 분석에서 정확도를 보장하기 위한 매우 중요한 과정입니다. MassHunter Profinder에서 동위원소체 결과는 자연 동위원소 존재비 보정을 했거나 하지않은, 절대 존재비 또는 정규화된 존재비로 확인할 수 있습니다. Profinder는 원시, 보정, 정규화 및 평균 값을 포함한 다양한 동위원소체 결과 보기 옵션을 제공합니다(그림 5).

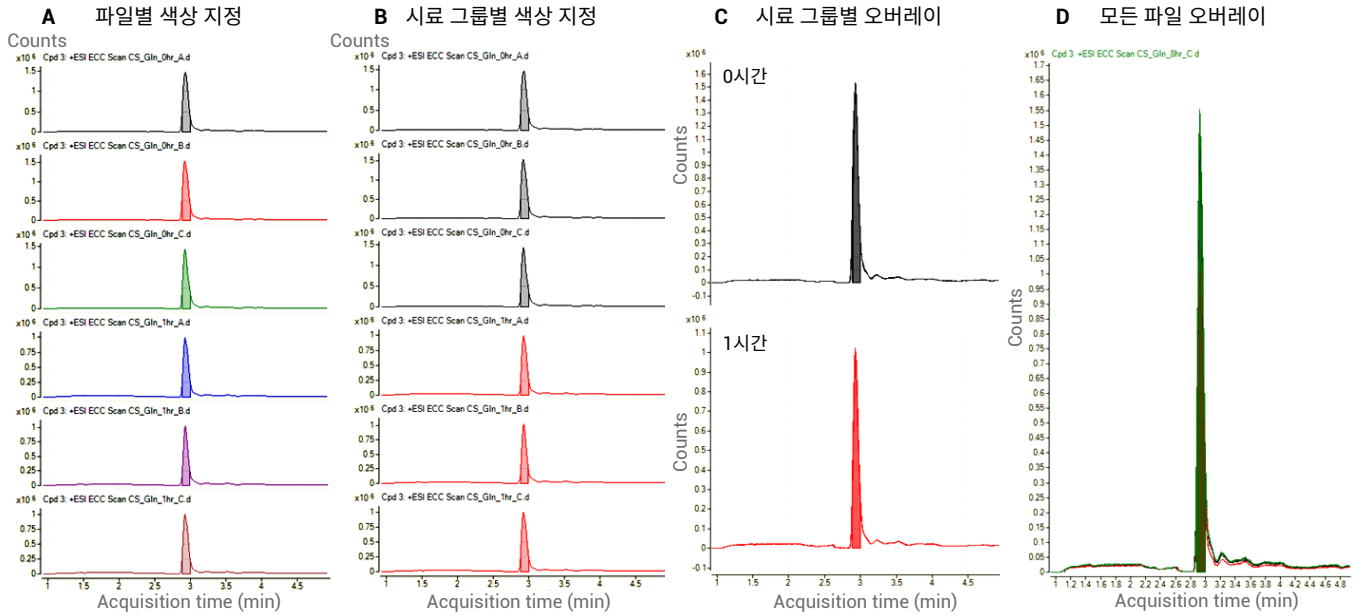


그림 4. 사용자가 데이터를 쉽게 볼 수 있는 기능을 제공하는 Agilent MassHunter Profinder

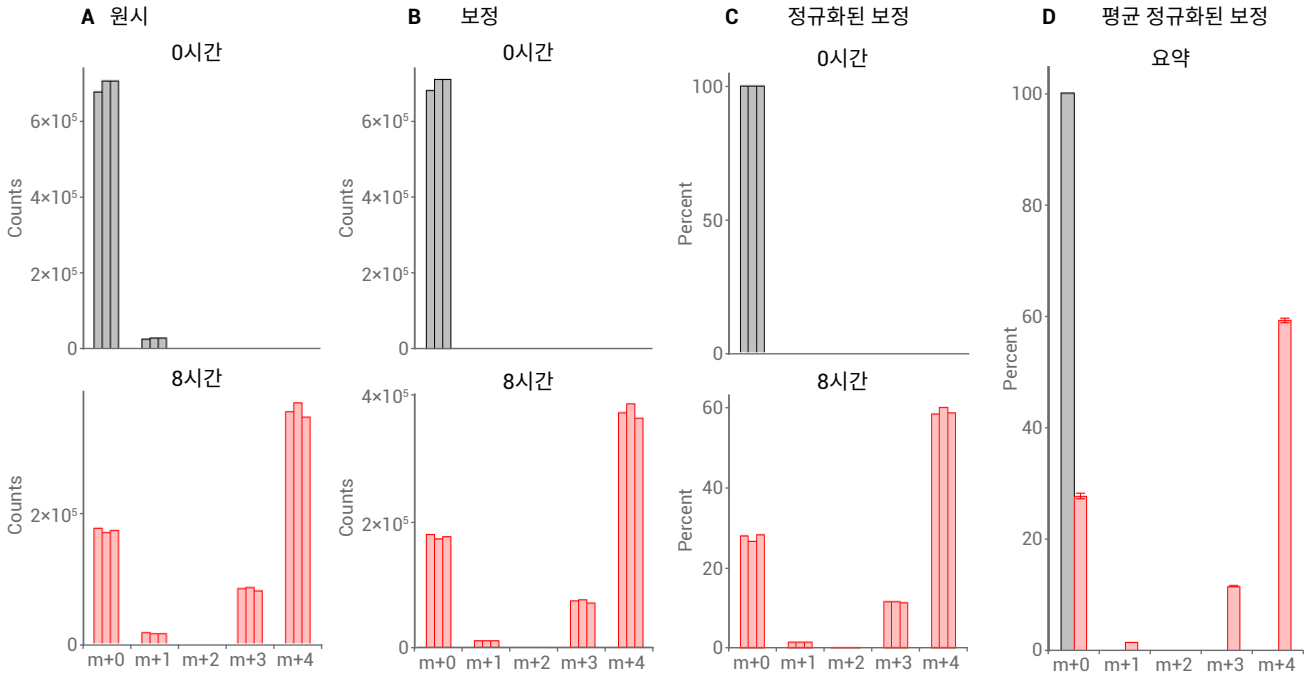


그림 5. Agilent MassHunter Profinder에서는 원시 또는 보정된 동위원소체 존재비를 쉽게 볼 수 있는 다양한 옵션을 제공

동위원소체 결과를 시각적으로 점검하기 위해, 워크플로 마법사는 추출 데이터 포맷으로 원시 질량 스펙트럼 또는 동위원소체 스펙트럼 중 원하는 것을 선택할 수 있도록 합니다. 이는 백그라운드 또는 매트릭스 이온을 원시 질량 스펙트럼으로부터 빠르게 식별할 수 있으며, 동위원소체 추출의 정확도를 평가할 수 있도록 합니다. 예를 들어,

fumaric acid의 원시 질량 스펙트럼은 뚜렷한 M+2 동위원소체를 보여줍니다 (그림 6). 동위원소체 추출 알고리즘은 단계적인 이온 추출 절차를 이용해 이 이온이 fumaric acid의 동위원소체가 아니라는 것을 빠르게 확정하고, 이를 동위원소체 결과와 동위원소체 스펙트럼에서 배제하였습니다.

일단 검토 및 큐레이션이 끝나면, 동위원소체 추출 결과를 Profinder로부터 .PFA 파일 포맷으로 내보내기할 수 있습니다. 이 파일은 시료 그룹, 화합물 명, 식별자, 동위원소체 데이터에 관한 정보를 포함하고 있습니다. 이 파일은 경로상의 정성 flux 결과를 시각화하기 위해 동위원소체 추출 결과를 원활하게 가져오기할 수 있도록 설계된 VistaFlux²의 모듈, 즉 Omix Premium으로 가져올 수 있습니다.

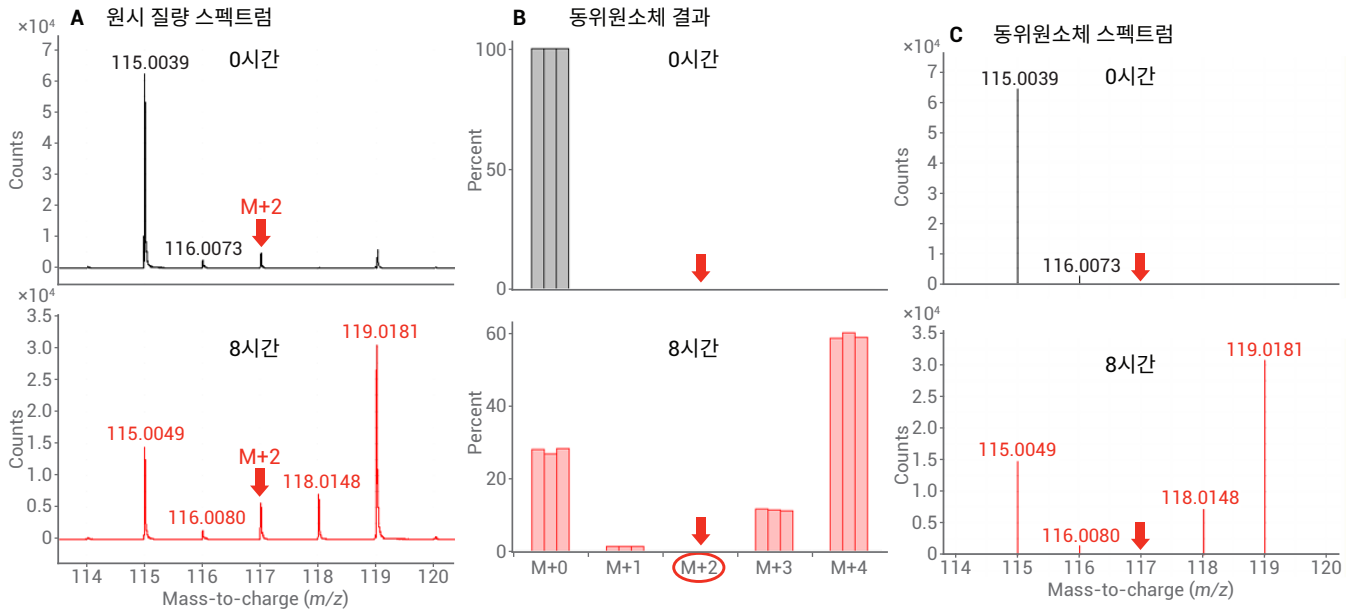


그림 6. Fumaric acid의 결과는 원시 질량 스펙트럼 내에서 뚜렷한 M+2 동위원소체를 보여줌. 그러나 알고리즘은 이 이온이 fumaric acid의 동위원소체가 아니라는 것을 빠르게 확정하고, 이를 동위원소체 결과와 동위원소체 스펙트럼에서 배제함

결론

Agilent MassHunter Profinder 배치 (batch) 동위원소체 추출 알고리즘은 Agilent LC/TOF 및 LC/Q-TOF 시스템에서 수집한 데이터로부터 안정 동위원소 표지 대사체의 표적 마이닝을 위한 강력한 도구를 제공합니다. 이 소프트웨어는 직관적이고 사용이 쉬워, 연구자들이 빠르게 결과를 얻을 수 있도록 도와줍니다. 동위원소체 추출 절차는 단계적인 배치(batch) 추출로 완전히 자동화됩니다. 이는 신뢰성 있는 고처리량 정성 flux 분석을 위한 고품질 결과를 제공합니다. 이 결과는 관심 대상 경로의 대사 flux 상호적인 시각화를 위해 Omix Premium으로 쉽게 내보내기할 수 있습니다.

참고문헌

1. MassHunter Profinder: Batch Processing Software for High Quality Feature Extraction of Mass Spectrometry Data, *Agilent Technologies Technical Overview*, publication number 5991-3947EN, 2014.
2. MassHunter VistaFlux for Qualitative Flux Analysis, *Agilent Technologies Technical Overview*, publication number 5991-6756EN, 2016.

www.agilent.com/chem/Profinder

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지 않습니다.

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2016
2016년 4월 14일, 한국에서 발행
5991-6817KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국애질런테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr



Agilent Technologies