

基于Orbitrap ID-X Tribrid MS以及TSQ Quantis的拟靶标代谢组学分析

范自全, 徐牛生, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司

关键词

拟靶标代谢组学, Orbitrap ID-X, Compound Discoverer, TSQ Quantis

前言

在生命科学奇妙世界里, 基因、核酸、蛋白和小分子代谢产物构成了细胞生命活动的基本要素, 以这些物质为基础的诸多组学技术的发展, 推动着生命科学研究不断向前。代谢组学(Metabonomics/Metabolomics) 是20世纪90年代末期发展起来的一门新兴学科, 是研究生命体(包括植物)被扰动后(如基因的改变, 环境的变化)其内源性代谢物种类、数量及其变化规律的科学^[1]。人体的生命活动由功能基因-编码蛋白-代谢调控所支撑, 代谢物作为基因调控网络的最下游阶段, 既可提供生物表型的外在表现信息, 又可反过来调节基因组、转录组和蛋白质组的水平来影响细胞的生理功能。近两年, 随着表型组学(Phenomics)的发展, 代谢物作为在分子水平上对表型进行动态和敏感的测量手段已被广泛接受, 使代谢组学成为与病理生理过程相关生物标志物和机制探索研究的最前沿^[2-5], 并逐渐在多个领域得到广泛的应用。如疾病研究、食品营养、环境毒理、植物等与人类健康护理密切相关的领域。

在依托质谱技术开展的代谢组学研究中, 通常有2种主流的分析研究策略: 立足于发现差异表达生物标记物的非靶向代谢组学分析; 以及对预定科学假说进行定量验证或确证的靶标代谢组学。通常意义上, 一个完整流程的代谢组学研究大多始于基于高分辨质谱的非靶向代谢组学, 而后演进到串联质谱的靶向代谢组学定量确证。由此衍生的方法学转换会给高效的组学分析带来一定的挑战。

传统靶标代谢组学针对已知的少数代谢物进行检测, 需要具有一定的研究基础, 针对目标代谢物建立合适的方法; 而高分辨质谱无需预先知道样本中含有哪些代谢物, 只需将样本按照通用的流程进行

前处理, 利用质谱高分辨质谱的全扫描模式对待测样本进行分析, 尽可能多的得到代谢物的信息。如果有一种方法, 能将高分辨质谱获得的数据导入三重四级杆方法中, 则可以同时获得靶标和非靶标代谢组学研究的优势。这种研究方法称为“拟靶标”代谢组学, 是近几年发展的一项新型研究方法, 逐渐得到研究者的青睐^[6-7]。

本实验结合Orbitrap系列超高分辨质谱和TSQ Quantis的优势, 配合智能的Compound Discoverer数据分析, 开发了完整的拟靶标代谢组学流程, 并在植物代谢组学及血浆基质中得到验证。

实验方法

1. 样品信息

- 样本类型: 血清样品, 1组为正常人, 1组为抑郁症病人样本。
- 样品置于4℃冰箱解冻后, 取50μL血清, 加入200μL -80℃预冷的甲醇, 涡旋混匀5分钟。离心10分钟(4℃, 14,000g), 取200μL上清, 吹干, 加入MeOH/H₂O=1:9溶液复溶, 取上清进样2μL分析。

2. 色谱方法

超高效液相Vanquish Flex系统 进行色谱分离, 色谱柱为 Hypersil Gold C18 (2.1 mm × 100 mm, 1.9μm); 流动相为0.1%甲酸水(A)和甲醇100%(B)。流速为0.3mL/min, 进样体积2μL, 柱温40℃; 采用梯度洗脱:

No	Time	Flow [ml/min]	%B	%C	%D	Curve
1	-2.000					Equilibration
2	-2.000	0.300	0.0	0.0	0.0	5
3	New Row					
4	0.000					Run
5	0.000	0.300	0.0	0.0	0.0	5
6	8.000	0.300	50.0	0.0	0.0	5
7	9.000	0.300	98.0	0.0	0.0	5
8	13.000	0.300	98.0	0.0	0.0	5
9	13.100	0.300	0.0	0.0	0.0	5
10	New Row					
11	15.000					Stop Run

表1 梯度洗脱程序

2.1. Orbitrap ID-X Tribrid质谱条件

利用AcquireX智能数据采集模式获得正负离子模式下一级和二级信息。离子源参数如下：喷雾电压 (+/-): 3500V/3200V; 离子传输管温度: 320°C; 鞘气压力 40 arb; 辅助气压力 10 arb; 离子源温度: 350°C。质谱扫描参数: 扫描范围 (DA) : 70-1050; Full Mass 分辨率: 120000, MS/MS分辨率: 30000;

2.2 TSQ Quantis质谱条件:

可加热电喷雾电离源 (HESI), 正离子扫描模式; 扫描方式: SRM; 喷雾电压 (+): 3500V; 离子传输管温度: 320°C; 鞘气压力40 arb; 辅助气压力 10 arb; 离子源温度: 350°C; 碰撞气压力: 1.5 mTorr。

3. 实验结果和讨论

3.1. 建立拟靶标代谢组学 Workflow

首先使用Orbitrap ID-X 超高分辨质谱采集QC样本的MS1和MS2信息, 经Compound Discoverer 处理后, 提取代谢物保留时间、母离子、子离子, 以及鉴定结果, 软件自动选择响应高的特征子离子导出到Excel表中。然后再导入三重四级杆质谱TSQ Quantis方法模板, 正负离子分别生成含有1606及1373个SRM通道的方法, 建立基于LC-QQQ的动态多反应监测的“拟靶标”代谢组学分析方法。采用TSQ Quantis采集样品数据, 经定量分析TraceFinder处理, 得到待测样本所含的代谢物丰度信息, 经Simca-P软件多维统计分析处理, 并寻找差异性代谢物。

3.2. 色谱图对比结果

使用Orbitrap ID-X 超高分辨质谱采集血清样品的非靶标代谢组学数据, 并与TSQ Quantis 采集的拟靶标代谢组学数据进行对比。结果显示, 正、负离子模式下, Orbitrap ID-X 的 MS2色谱图与TSQ Quantis的 MS/MS色谱图保持一致, 表明建立的拟靶标代谢组学流程具有较好的可行性。

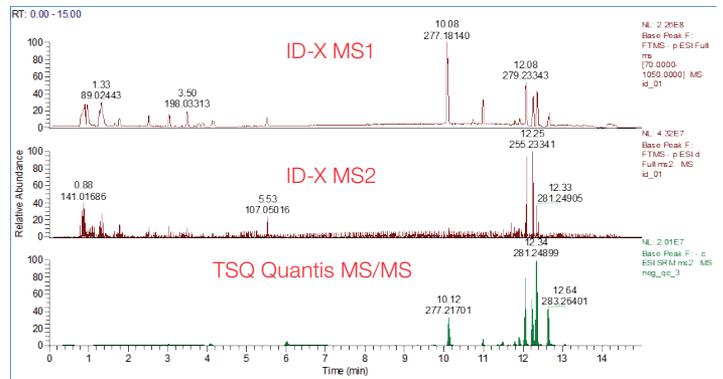
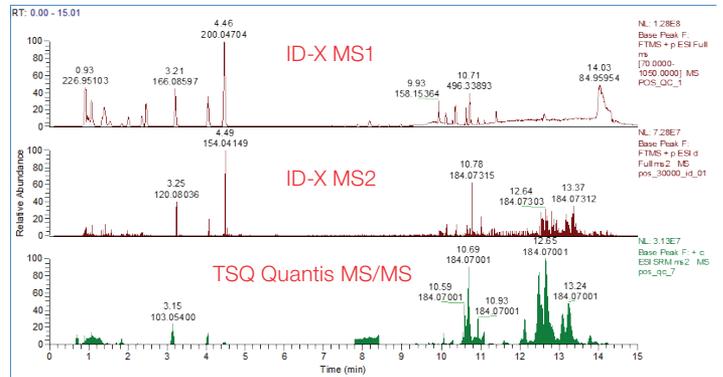


图2a.正离子模式Orbitrap ID-X MS2与TSQ Quantis的 MS/MS的色谱图 图2b.负离子模式Orbitrap ID-X MS2与TSQ Quantis的 MS/MS的色谱图

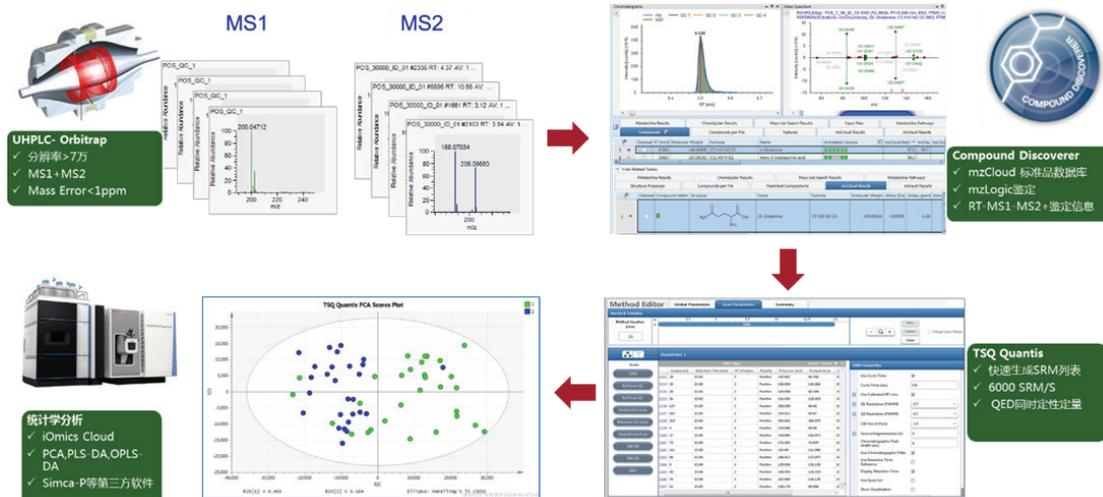


图1: ThermoFisher拟靶标代谢组学流程

3.3. 多维统计分析结果

Orbitrap ID-X 采集的数据采用Compound Discoverer 进行处理，并进行多维统计学分析；TSQ Quantis采集的数据采用TraceFinder处理，并采用Simca-P软件进行多维统计分析。Compound Discoverer 软件中包含常用的代谢组学、中药和天然产物、药物代谢等工作流程模板。Compound Discoverer集保留时间对齐、峰提取、代谢物鉴定、统计学分析以及Pathway分析等步骤于一体，可以用于：药物研发、食品安全、司法毒物、代谢组学研究等众多领域。

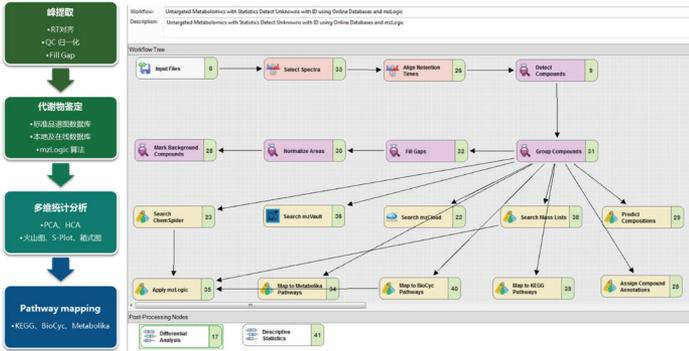


图3. Compound Discoverer 代谢组学工作流程

对采集的2批数据分别进行主成分分析（Principal components analysis, PCA），从图中可以看出，采用Compound Discoverer处理的Orbitrap ID-X数据结果，与TSQ Quantis的数据结果一致。两种方法的PCA 得分图中，正常组和模型组均呈现清晰的分组趋势，表明2组样品存在一定的差异。

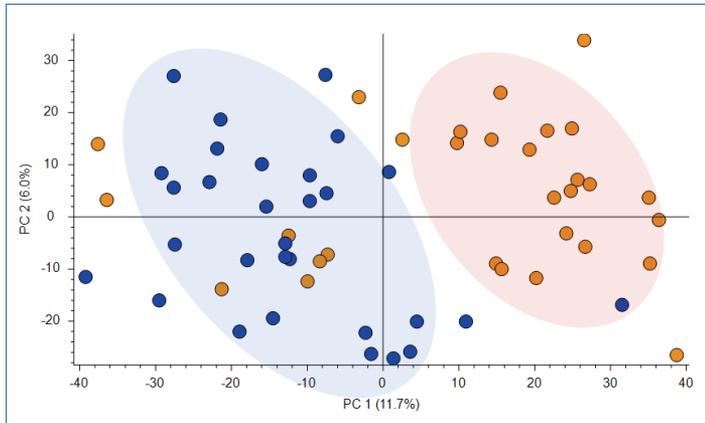


图4a. 非靶标代谢组学工作流程PCA结果

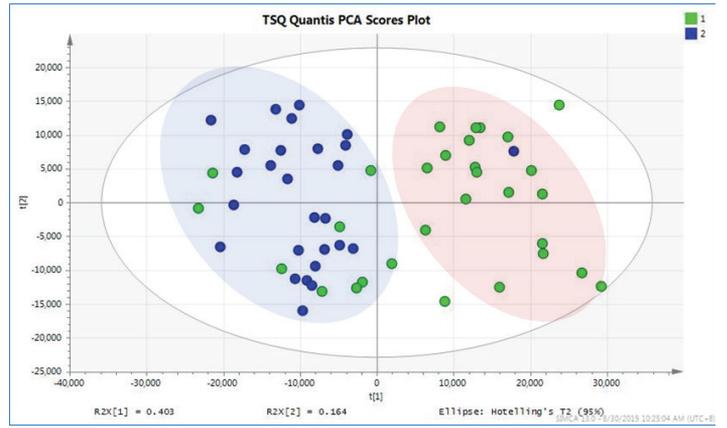


图4b. 靶标代谢组学工作流程PCA结果

4. 总结

本文结合Orbitrap ID-X Tribrid MS 系列超高分辨质谱和TSQ Quantis 系列三重四级杆质谱的优势，配合智能的Compound Discoverer 数据分析，开发了完整的拟靶标代谢组学流程。此方案将靶标和非靶标代谢组学的优势相结合，具备非靶向代谢组学无偏向性分析的优势，同时可针对高、低峰度代谢物进行优化，从而获得更好的灵敏度、重现性。我们在植物和生物样本中分别作了验证，采用此方法与非靶标代谢组学的方法相比，结果发现，两种方法在色谱保留行为，多维统计分析结果均保持一致，表明所建立的拟靶标代谢组学具有非常好的可行性。

参考文献

1. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*. 1999;29(11):1181-9
2. Jiang Y, Sun A, Zhao Y, et al. Proteomics identifies new therapeutic targets of early-stage hepatocellular carcinoma. *Nature*. 2019;567(7747):257-261
3. Gonzalez PS, O'Prey J, Cardaci S, et al. Mannose impairs tumour growth and enhances chemotherapy. *Nature*. 2018;563(7733):719-723
4. Zierer J, Jackson MA, Kastenmüller G, et al. The fecal metabolome as a functional readout of the gut microbiome. *Nat Genet*. 2018;50(6):790-795
5. Dyar KA, Lutter D, Artati A, et al. Atlas of Circadian Metabolism Reveals System-wide Coordination and Communication between Clocks. *Cell*. 2018;174(6):1571-1585.e11
6. Xuan Q, Hu C, Yu D, et al. Development of a High Coverage Pseudotargeted Lipidomics Method Based on Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 2018;90(12):7608-7616
7. Zha H, Cai Y, Yin Y, Wang Z, Li K, Zhu ZJ. SWATHtoMRM: Development of High-Coverage Targeted Metabolomics Method Using SWATH Technology for Biomarker Discovery. *Anal Chem*. 2018;90(6):4062-4070



赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC