

高通量脂质鉴定：SWATH®高分辨质谱全景采集技术结合MS-DIAL处理数据软件

基于TripleTOF® 质谱仪，使用SWATH®采集技术进行非靶向脂质组学的工作流程

High-Throughput Lipid Profiling with SWATH® Acquisition and MS-DIAL

Untargeted Lipidomics Workflow with SWATH® Acquisition on TripleTOF® 6600 System

Hiroshi Tsugawa^{1,2}, Atsushi Hanada³, Kazuki Ikeda^{1,4}, Yosuke Isobe¹, Yuya Senoo¹, Makoto Arita^{1,4,5}

¹ RIKEN可持续资源科学中心, 日本, ² RIKEN 综合医学中心, 日本, ³ SCIEX, 日本, ⁴ 药物科学研究生院, 横滨市立大学, 日本, ⁵ 药物科学研究生院, 庆应义塾大学, 日本

Key Word: SWATH®, TripleTOF®, Lipidomics, MS-DIAL

在自然界，脂质是一类多种多样的生物分子，因为大量的脂质包含了不同的侧链和头基。在非靶向脂质组学分析中，主要的瓶颈是在复杂生物样品中准确的鉴定脂质。而现在在复杂生物样品中准确鉴定脂质又有了一个新的兴趣点，就是将复杂生物样品中检测到的脂质的MS/MS二级质谱图与对照样品的MS/MS二级质谱图或者使用计算机模拟 MS/MS谱库1进行匹配。通常，数据依赖性采集（DDA）技术不会采集所有母离子的MS/MS二级质谱，但是数据非依赖性扫描方法，如SWATH®采集技术和数据非依赖性采集方法（DIA），可以保证采集到样品中可测得所有化合物的碎片离子，并且有效的产生所有可测得代谢物的数字化记录。

在该文中，非靶向脂质组学工作流程已被验证，包括：1个简单的从20 µL小鼠血浆中提取脂质的方法，1个15 min 的SWATH®采集方法，和1个使用MS-DIAL软件(Mass Spectrometry -Data Independent Analysis) 约1小时的数据分析流程。MS-DIAL 是一个资源开放的软件，可分析从基于DIA采集技术和DDA等非靶向LC-MS/MS采集技术获得的数据，并对小分子化合物和脂质进行定性和定量分析，及通过MS/MS二级进行脂质鉴定的确认。按照该文中的工作流程，通过MS/MS二级的确认后，在小鼠血浆（3组，每组4个样品）中的测得的420张质谱图中，鉴定了322个脂质化合物。小鼠血浆由RIKEN中心的整合生物医学科学代谢研究团队（Integrated Biomedical Sciences Metabolome Research Team）提供。

3组不同喂食组的大鼠血浆样品中，脂质定量结果是有明显的差异（见图1）。

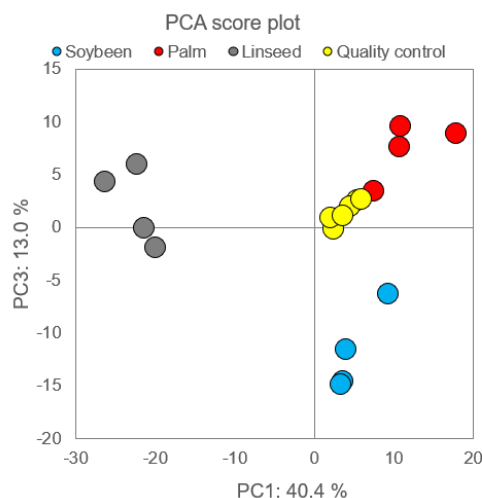


图1. 使用MS-DIAL软件鉴定到的所有322个脂质的PCA 分析图。图中，QC 样品与其他三个不同喂食组的样品结果相比，PCA score plot 显示了明显的差异。

SWATH®采集方法结合MS-DIAL软件处理数据的工作流程

- 使用数据非依赖性SWATH®采集方法，可获得所有可测得化合物的MS/MS二级质谱图，并且有充分的信心用于脂质鉴定
- MS-DIAL软件中，根据峰形分离算法(去卷积功能)²，对SWATH®采集到的混合的MS/MS二级图谱进行去卷积，使得鉴定工作简单化
- MS-DIAL软件使用的数据库包含有61,513个脂质化合物，并且包含了在相应的正负离子模式下的135,456个二级碎片质谱图。
- 另外，在该文中的LC-MS/MS方法下，脂质“已知保留时间”可提高鉴定的可靠性。

方法

小鼠血浆样品准备：在该研究中，8周龄的C57BL/6J小鼠（4只雄性）被喂食优质酵母饲料一周。这些酵母饲料中分别添加了4%大豆油，棕榈油或者亚麻籽油。收集小鼠全血，加入肝素钠抗凝后，提取每个样品中的血浆（收集3种不同饲料组的4个样品）。

表1. 液相条件。

Parameter	Setting
Flowrate	0.6 mL/min
Autosampler temp.	4 °C
Injection volume	3 mL (positive) 5 mL (negative)
Column temperature	65 °C

表2. 液相梯度洗脱程序。

Time	%B
0	15
2	30
2.5	48
11	82
11.5	99
12	99
12.1	15
15	15

脂质提取：取二氯甲烷:甲醇:血浆样品=100 µL:200 µL:20 µL，混合，提取脂质。从每一个最终混合为320 µL的脂质样品提取液中，各取50 µL混合为一个QC样品。此外，取空白血浆，使用同样的提取方法提取两个空白样品（blanks）。最后，从每个样品，QC 和空白样品各转移150 µL至进样瓶中，用于LC-MS/MS分析。每进样3针，插入一针QC 样品，以便监控整个分析过程中质谱的灵敏度。备注：每次进样QC样品，均使用同一个进样小瓶中的QC。但是，如果考虑到如样品的蒸发等因素，则推荐配制一份大体积QC样品，分装到独立的进样瓶中进样分析。

LC-MS/MS分析：液质联用系统：Shimazu Nexera UHPLC系统，SCIEX TripleTOF®系统。色谱柱：Waters ACQUITY CSH C18 2.1 × 100 mm, 1.7 µm。为了大批量分析样品，建议使用Waters ACQUITY VanGuard CSH C18 1.7 µm预柱，用于保护色谱柱，并且在每进样300针后更换预柱。同时建议在进样1000到1500针后，更换色谱柱。液相条件见表1，LC方法梯度见表2，质谱参数见表3。

表3. 质谱参数。

Parameter	Setting
MS1 mass range (Positive)	100-1250
MS1 mass range (Negative)	200-1250
SWATH scan range	350-1250
MS/MS mass range	100-1250
TOF MS accumulation time	50 ms
TOF MS/MS accumulation time	10 ms*
Collision energy	45 V
Collision energy spread	15 V
Precursor window	15 Da
Cycle time	700 ms
CUR	35
GS1	60
GS2	60
TEM	350
CE	10
DP	80
ISVF (Positive)	5500
ISVF (Negative)	4500

*Note for a more quantitative method, longer MS/MS accumulation times can be used.

分别在正离子和负离子模式下，进样分析2个空白样品，12个样品，2个进样瓶中的QC样品，以及一个进样小瓶的去离子水（作为空白溶剂）。进样顺序按表4进样，生物样品可按序随机进样。

表4. LC-MS/MS 进样分析顺序。

Injection	Sample
1	Water
2	Blank-1
3	Blank-2
4	QC-1
5	QC-2
6	Sample-1
7	Sample-2
8	Sample-3
9	QC-3
10	Sample-4
11	Sample-5
12	Sample-6
13	QC-4
14	Sample-7
15	Sample-8
16	Sample-9
17	QC-5
18	Sample-10
19	Sample-11
20	Sample-12
21	QC-6

流动相A: 60%乙腈/水（包含10 mmol/L 甲酸铵和0.1%甲酸）。每进样200针，流动相各需要1 L。首先，用乙腈润洗玻璃瓶，然后加入600 mL乙腈，399 mL HPLC级别水和1 mL甲酸，混匀后，称入0.63 g甲酸铵，室温超声10 min。

流动相B: 90%异丙醇，9.8%乙腈/水（包含10 mmol/L 甲酸铵和0.1%甲酸）。取1 mL纯化水至烧杯中，再加入1 mL甲酸，作为

混合溶剂。称量0.63 g甲酸铵，慢慢的混入上述的混合溶剂中，使三者混合溶解。取乙腈润洗后的1 L玻璃瓶，加入烧杯中的溶剂，再加入900 mL异丙醇，98 mL乙腈，室温下超声10 min。

使用流动相前，需确认甲酸铵完全溶解，且气泡完全消失。

脂质鉴定

使用MS-DIAL软件（版本号1.98）处理SWATH®采集的数据。结果，在正离子模式和负离子模式下总共鉴定到322种脂质（见表5）。MS-DIAL软件在自动查找峰，峰形处理，以及化合物鉴定，并结合MS/MS二级进行确认，大约1小时完成脂质鉴定。MS-DIAL软件的自动鉴定功能通过高可信度的综合指数来实现的，这个指数同时考虑了保留时间和同位素分布以及使用最常用的向量点积法2计算的MS/MS二级相似度。MS-DIAL图形用户交互功能也支持用户对鉴定结果进行手动纠正（见图2）。

表5. 从SWATH®采集数据和MS-DIAL处理结果中鉴定到的脂质种类。在正离子模式和负离子模式下，SWATH®采集数据和MS-DIAL处理数据程序，鉴定到总共322个无重复计数的脂质。

Lipid Class	Positive Modes	Negative Mode
Acylcarnitine (AC)	6	0
Free fatty acid (FFA)	0	17
LysoPC	32	26
LysoPE	2	9
Phosphatidylcholine (PC)	69	43
Phosphatidylethanolamine (PE)	15	22
Phosphatidylglycerol (PG)	0	1
Phosphatidylinositol (PI)	0	8
PlasmenylPC	17	7
PlasmenylPE	9	15
Sphingomyelin (SM)	5	0
Diacylglycerol (DAG)	12	0
Triacylglycerol (TAG)	96	0
Cholesteryl ester (CE)	9	0
Total	272	148

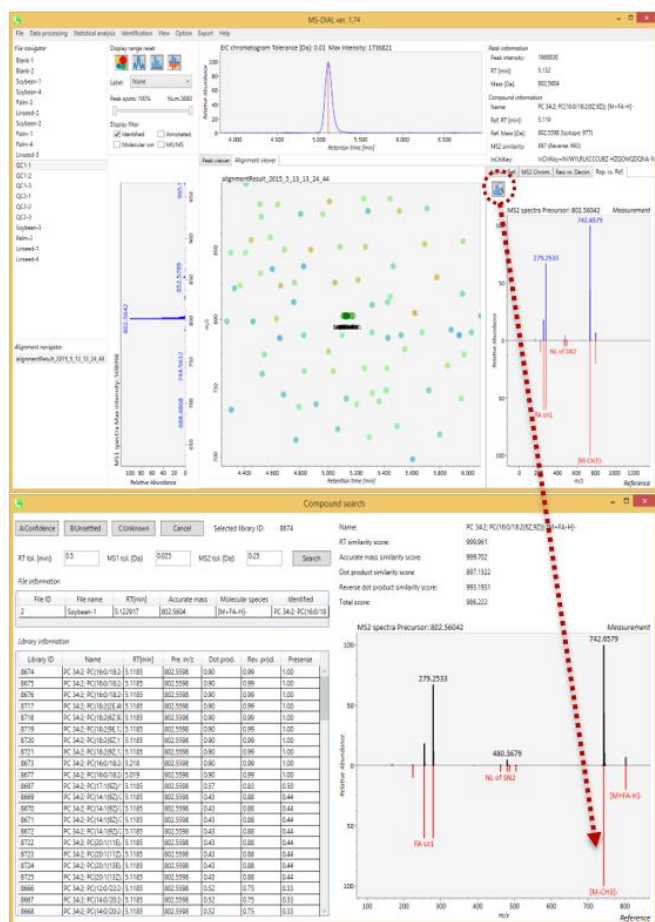


图2. MS-DIAL 鉴定和确认流程。MS-DIAL主界面提供校准和鉴定结果表。右下角图片显示某一个时间点的保留时间, m/z和MS/MS二级图谱和数据库的图谱。通过点击放大的图标, 该鉴定结果的候选化合物列表就可以显示出来, 可接受标准是如有必要, 用户可纠正鉴定结果。

QC 样品的使用

定量值的标准化, 可通过合并的QC 样品 (QC) 4定量值的LOESS归一化函数法来实现 (LOcally WEighted Scatter-plot Smoother, 局部加权回归散点法)。在假定每3-5个样品测试一次QC的频率下所测得的QC定量值, 每个化合物的MS一级信号定量值的波动均可被计算, 这也是用于大批量研究并在MS-DIAL3中实施的常用方法。当QC定量值被设置为1时, 其他样品中的每一个定量值均以相对值来显示。这个方法的优点在于不但抵消了每次分析时MS一级定量值的波动, 而且可以对正离子模式和负离子模式的数据进行整合 (因为基于QC, 所有定量结果已经被标准化)。

再者, 同质量水平QC样品的高效性还可以整合数月 and 数年的数据。QC原始离子丰度的平均值或中间值与归一化值相乘, 这样的话, 每个代谢物的离子丰度信息均可被考虑用于数据的解释。

脂质定量结果

将鉴定到的420个脂质图谱进行主成分分析 (PCA) 后, 在喂食条件的表型显像上, 结果显示有明显的区别 (见图1)。结合被喂食不同饲料的小鼠的生物模型, 在PCA 分析结果图中, 55%的数据是可被解释的。已鉴定到的脂质列表 (见表6) 显示, 在被喂食含亚麻籽油饲料的小鼠中, 组成脂肪酸的成分是从 ω 3系列脂肪酸中分离的18:3 (α -亚油酸), 20:5 (二十碳五烯酸, EPA), 22:6(二十二碳六烯酸, DHA)。在被喂食富含 ω 3脂肪酸的亚麻籽油的小鼠血浆样品中, 磷脂和甘油三酯的量也是相应增加。

另一方面, 棕榈油中80%脂肪酸成分由16:0 (棕榈酸) 和18:2 (亚油酸) 组成, 当查看以含棕榈油为饲料的小鼠血浆的脂质成分时, 磷脂和甘油三酯与上述两种脂肪酸均相应增加。另外, 大豆油中主要的脂肪酸成分是18:2 (亚油酸), 在被喂食大豆油的大鼠血浆中, 亚油酸的量也是相应增加。

因为该方法中, 双键和酰基基团的位置不能被测定, A和B标注为分别来自于不同的洗脱时间的两个化合物 (见表6)。“p-”代表是缩醛磷脂型。

结论

该文介绍了SWATH®采集技术结合MS-DIAL软件鉴定脂质的工作流程, 为鉴定同分异构体和有机元素结合信息提供了参考。从420个匹配的脂质图谱中, 鉴定了322个无重复计数的脂质, 不包括所有重复的, 例如同时在正离子和负离子模式下都鉴定到, 以及同一化合物的不同加和离子。对鉴定到的所有脂质种类进行定量时, 可发现被喂食了三种不同添加油的样品组有明显的区分。

表6. 在被喂食不同饲料的小鼠血浆中，有显著性改变的脂质分子列表。

Linseed Oil	Palm Oil	Soybean oil
18:3 Cholesteryl ester	DAG(16:0/18:1/0:0)	DAG(18:2/20:1/0:0)
20:5 Cholesteryl ester	DAG(18:1/18:0/0:0)	lysoPC 18:2
DAG(18:2/18:3/0:0)	DAG(18:1/18:1/0:0)	lysoPC 20:4
FA 18:3	PC(16:0/16:1)	PC(18:0/20:4)
FA 20:5	PC(16:0/17:1)	PE(P-20:0/18:2)
lysoPC 18:3-A	PC(16:0/18:1)	PE(P-20:0/20:4)
lysoPC 18:3-B	PC(17:0/18:1)	
lysoPC 20:5-A	PC(18:0/18:1)	
lysoPC 20:5-B	PE(16:0/18:1)	
lysoPC 22:5	PE(18:0/18:1)	
PC(14:0/20:5)	PI(18:0/20:3)	
PC(16:0/20:5)	TAG(14:0/16:0/16:0)	
PC(16:1/18:3)	TAG(14:0/16:0/16:1)	
PC(16:1/20:5)	TAG(16:0/16:0/16:0)	
PC(18:0/20:5)	TAG(16:0/16:0/18:1)	
PC(18:2/18:3)	TAG(16:0/16:0/20:2)	
PC(18:3/18:3)	TAG(16:0/16:1/16:1)	
PC(18:3/20:5)	TAG(16:0/16:1/17:0)	
PC(20:5/22:6)	TAG(16:0/16:1/17:1)	
PC(22:6/18:3)	TAG(16:0/16:1/18:1)	
PE(16:0/20:5)	TAG(16:0/17:0/18:1)	
PE(16:1/20:5)	TAG(16:0/18:0/16:0)	
PE(18:0/20:5)	TAG(16:0/18:0/18:1)	
PE(18:1/20:5)	TAG(16:0/18:1/20:1)	
PE(P-16:0/20:5)	TAG(17:0/17:1/17:1)	
PE(P-16:0/20:5)	TAG(18:0/18:1/20:4)	
PE(P-18:0/20:5)	TAG(18:1/18:1/18:1)	
PE(P-18:0/20:5)	TAG(18:1/18:1/20:1)	
PE(P-20:0/20:5)		
TAG(16:0/18:2/18:3)		
TAG(16:0/18:3/18:3)		
TAG(16:0/18:3/20:5)		
TAG(16:0/20:5/20:5)		
TAG(16:1/18:2/22:6)		
TAG(16:1/18:3/18:3)		
TAG(16:1/18:3/20:5)		
TAG(16:1/20:5/20:5)		
TAG(16:2/20:3/22:5)		

参考文献

1. Kind T, Liu KH, Lee do Y, DeFelice B, Meissen JK, Fiehn O. LipidBlast in silico tandem mass spectrometry database for lipid identification. Nat. Methods. 2013;10:755-758.
2. Tsugawa, H. et al. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. Nat Methods. 2015 Jun; 12(6): 523-526.
3. Stein, S. E. An integrated method for spectrum extraction and compound identification from gas chromatography/mass spectrometry data. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, August 1999, Volume 10, Issue 8, pp 770-781.
4. Dunn, W. B. et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Nature Protocols, Vol. 6 (7), 06.2011, p. 1060 -1083.

For Research Use Only. Not for use in Diagnostics Procedures.

AB Sciex is operating as SCIEX.

© 2019. AB Sciex. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-8536-ZH-A



SCIEX中国公司

北京分公司
地址：北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808 1388
传真：010-5808 1390

全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897

上海公司及亚太区应用支持中心
地址：上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419 7200
传真：021-2419 7333

网址：www.sciex.com.cn

广州分公司
地址：广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510 0200
传真：020-3876 0835

微博：@SCIEX