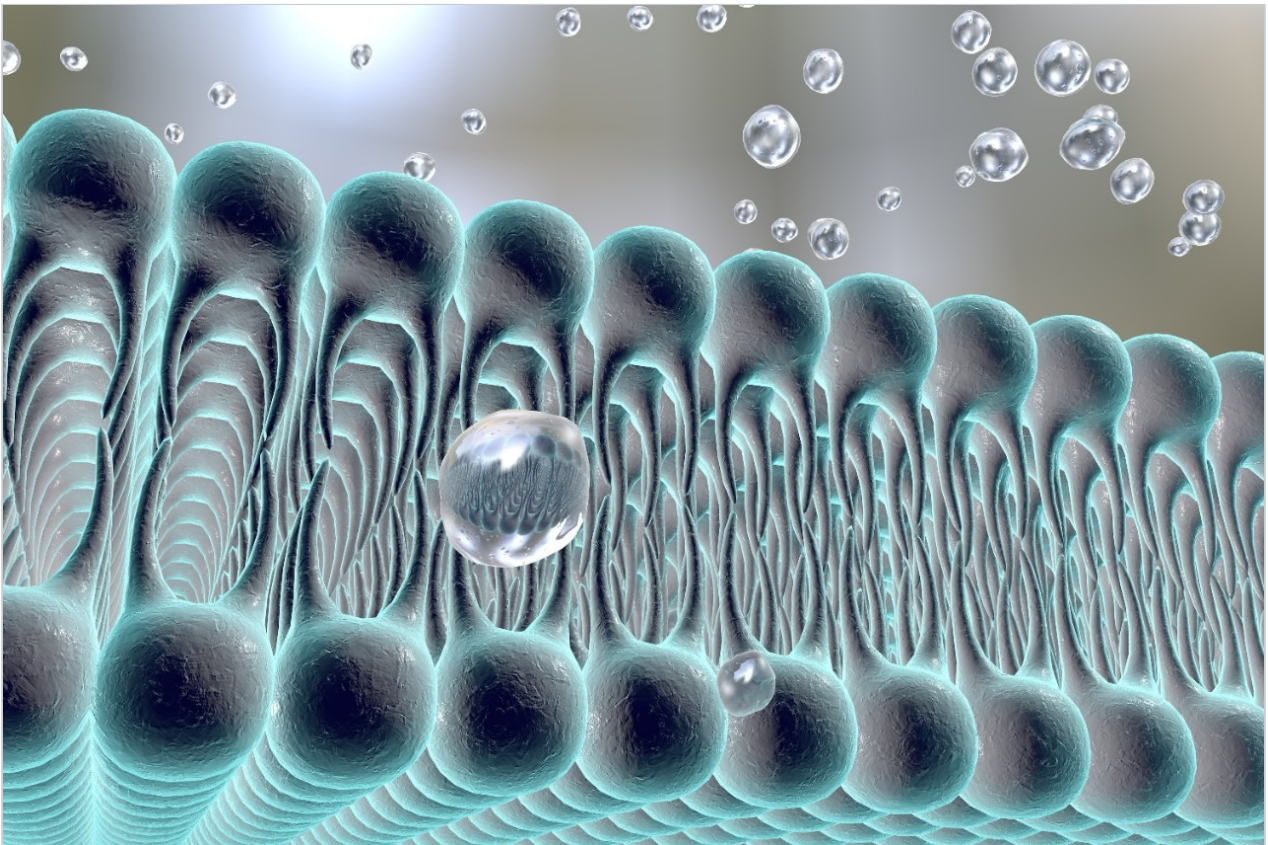


应用纪要

利用CCS、保留时间和MS/MS数据库完成 脂质综合分析

Nyasha Munjoma, Sarah Lennon, Jeff Goshawk, Hans Vissers, Giorgis Isaac, Graham Mullard, Steven Lai, Lee A. Gethings, Robert S. Plumb

Waters Corporation



仅供研究使用，不适用于诊断。

摘要

本应用纪要中利用一种标准化方案测量由多个脂质类别的100种认证标准品组成的样品集获得RT和CCS信息，以验证Broeckling等人提出的TWCCSN₂预测模型。

优势

- 易于部署的方法和数据库，为返回的鉴定结果提供更高的可信度并能够提高工作效率
- 一个精心编制的脂质组学数据库，包含3200多种脂质，这些脂质之前曾报道存在于人血浆和组织样品中
- 脂质标准品可用于验证CCS预测模型，通过结合计算机模拟值提高覆盖率
- 经认定的实测RT，可减少假阳性鉴定结果
- 数据库中内置多种加合物的综合MS/MS信息，可提高结果可信度
- 使用UNIFI或Progenesis QI信息学软件进行快速数据处理和可视化，具有最高的灵活性

简介

脂质是公认的重要生物分子，在各种分子功能中发挥多样化作用，包括信号转导、膜锚定以及能量储存。为深入了解脂质组，液相色谱-质谱联用(LC-MS)等分析技术已成为常规分析手段，可提供全面、高通量和稳定的解决方案。基于发现的工作流程利用高分辨率策略，能够分析复杂样品，提供大量潜在的脂质鉴定结果。发现脂质组学遇到的一个重大难点是根据数据库搜索准确、可靠地鉴定目标脂质的能力。搜索范围还可以包括其他理化特性，例如保留时间(RT)和碰撞截面(CCS)以及诊断性MS/MS信息，以提高返回的鉴定结果的可信度。

CCS是脂质的一种重要理化特性，与化学结构和三维构象密切相关，但与样品基质的类型或复杂性无关¹。因此，CCS值可以与其他分子标识（例如RT和m/z）一起使用，作为一种正交属性以提高脂质鉴定的特异性¹。据Paglia等人报道，迄今为止，已经发布了多个计算机模拟和通过实验得到的CCS数据库¹，但假阳性率很高，且鉴定结果往往缺乏生物学相关性。理想情况下，应使用实验测得的CCS值来填充CCS数据库，但由于市售脂质标准品的数量有限，因此需要采用计算机模拟测量结果以实现足够高的覆盖率。

本文介绍了利用一种标准化方案测量由多个脂质类别的100种认证标准品组成的样品集获得RT和CCS信息，以验证Broeckling等人提出的TWCCSN₂预测模型²。实验测量值与预测值之间的高度相关性允许在数据库的其余部分填充计算机模拟CCS值。此外，数据库中还附加了碎片离子信息，以解释多种加合物类型。利用从人血浆和组织（即心脏和肝脏）得到的提取物作为额外的测试样品来鉴定内源性物质。

实验

样品信息

为评估CCS预测工具的准确度，购得多种脂质标准品。这些标准品由14个类别的69种独立脂质组成（Avanti Lipids，美国亚拉巴马州），其构成包含不超过7种具有不同反相(RP)色谱行为的脂质/混合物的样品组（即防止共流出），溶于IPA中。样品作为定制的混标，以三个不同的浓度水平重复进样三次。此外，将奇链LIPIDOMIX、Light Splash LIPIDOMIX、差异性离子淌度系统适应性LIPIDOMIX、神经酰胺LIPIDOMIX、Splash LIPIDOMIX和氘代Ceramide LIPIDOMIX用异丙醇按1:10和1:100的比例稀释并重复进样(n=3)。

数据库构建

将基于其他类别的脂质提取物（PS、PE、PG、Cer和SM混合物）制成浓度为0.1 mg/mL和0.01 mg/mL的溶液，用作技术样品重复测定三次。利用这些样品验证并提高所选脂质的生物学相关性可信度。为评估该数据库的实用性，筛选了人血浆、肝脏和心脏组织的提取物。

液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY Premier UPLC
色谱柱：	ACQUITY Premier CSH C ₁₈ , 2.1 × 100 mm, 1.7 μm
柱温：	55 °C
流速：	0.4 mL/min
流动相：	含0.1%甲酸的600/390/10乙腈/水/1 M甲酸铵(A)和含0.1%甲酸的900/90/10异丙醇/乙腈/1 M甲酸铵(B)
运行时间：	12 min
进样体积：	1–4 μL

梯度

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.4	50	50	初始
0.5	0.4	47	53	6
4.0	0.4	45	55	6
7.0	0.4	35	65	6
7.5	0.4	20	80	1
10	0.4	1	99	6
11	0.4	1	99	1
12	0.4	50	50	1

质谱条件

质谱系统:	SYNAPT XS
电离模式:	ESI (+/-)
毛细管电压:	3 kV (+); 2.5 kV (-)
采集模式:	HDMS ^E
采集范围:	50–1200 Da
碰撞能量:	线性梯度 (传输CE) 25–45 eV
锥孔电压:	30 V
离子源温度:	120 °C
脱溶剂气温度:	500 °C
锥孔气流速:	150 L/h

脱溶剂气流速：	1000 L/h
氦气池气体流速：	180 mL/min
IMS气体流速（氮气）：	90 mL/min
IMS波速：	900 m/s
IMS波高：	40 V

信息学软件

MassLynx、UNIFI和Progenesis QI

结果与讨论

验证预测CCS值

利用来自定制混合物和市售来源的100多种单独脂质验证计算机模拟CCS预测结果²。选择的脂质标准品涵盖所有主要的脂质类别，并确保考虑到脂质结构的各种截面。通过计算百分比差异，将测得的脂质标准品平均实测CCS值与预测值比较：

$$\frac{(\text{实测CCS} - \text{预测CCS}) * 100}{\text{实测CCS}}$$

将实测CCS与计算机模拟预测值比较，为所有类别提供了高度相关性。图1显示了三个脂质类别示例，突出显示了所获得的优异线性结果， r^2 高于0.96。

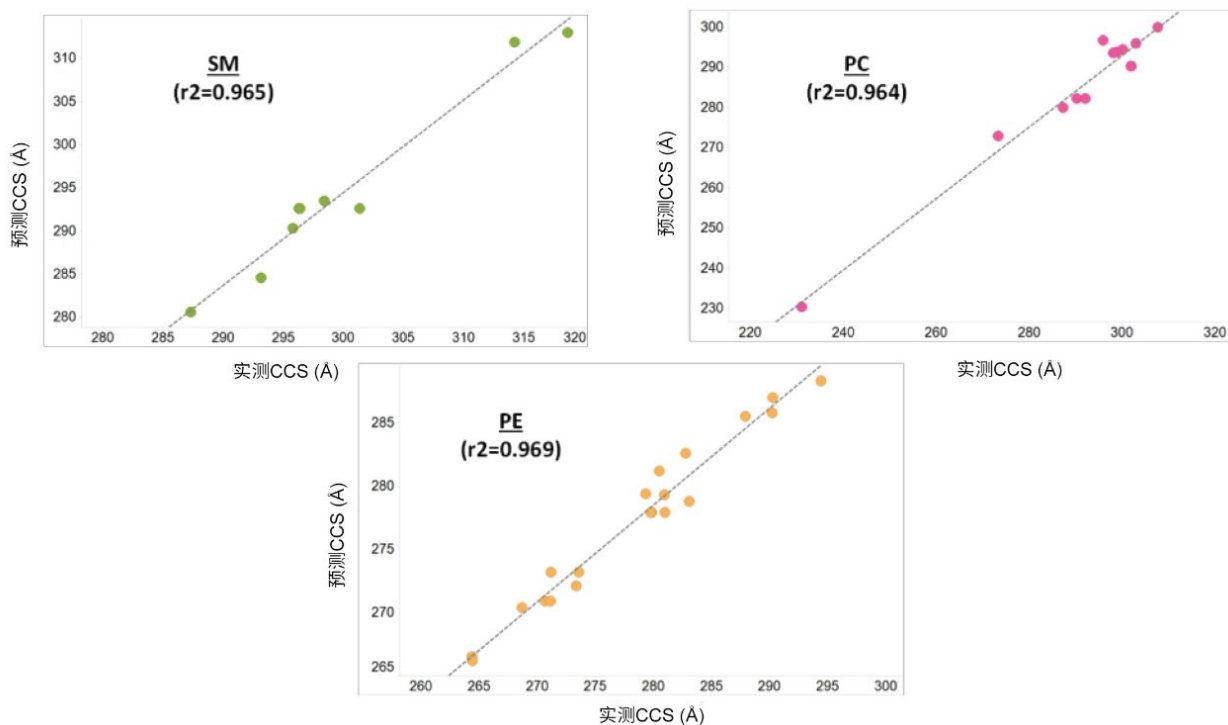


图1.使用已知脂质标准品的CCS实测值评估CCS预测值。显示了三个脂质类别示例，它们分别代表鞘磷脂(SM)、磷酸胆碱(PC)和磷脂酰乙醇胺(PE)。数据代表ESI正离子和负离子模式下的质子化加合物。

排除了饱和、CCS测定值与预测值之间误差 $\geq 5\%$ 或保留时间偏差 ≥ 0.1 min的峰。校正保留时间后，为减少假阳性匹配结果，发现96.8%（正离子模式）和95.5%（负离子模式）的实验数据与其计算机模拟值相比处于 $\pm 5\%$ 的CCS容差范围内，确认了先前报道的数据结果²。

分别展示了正离子和负离子模式下总共32个和16个脂质类别的CCS值，CCS分布范围为143~349 Å（正离子模式）和124~334 Å（负离子模式）。图2显示了正离子模式下脂质类别子集的CCS分布示例。

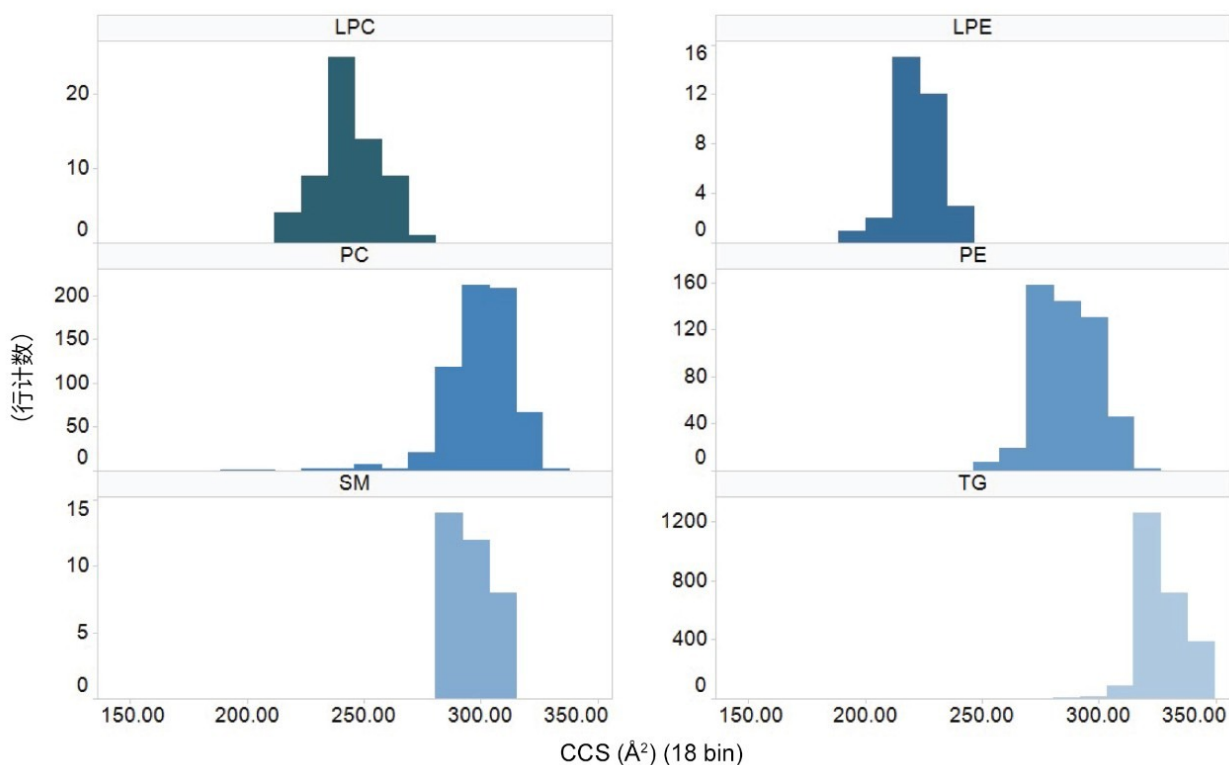


图2.数据库中六个脂质类别(ESI+)的CCS分布示例

数据库总览

全面、精心编制的数据库的可用性对于确保准确、可靠地鉴定化合物非常重要。因此，为满足这些需求，本文所述的脂质综合数据库包含3200个脂质条目，其中包括ESI正离子和负离子模式下常见的加合物。图3显示了两种电离模式之间脂质条目的分布，图4展示了两种电离模式下的加合物。在展示的3200种脂质中，43%的条目用两种电离模式表示。其优点在于，提供了更高的鉴定可信度。例如，当考虑磷脂时，可以同时表征头部基团和脂肪酰基链。

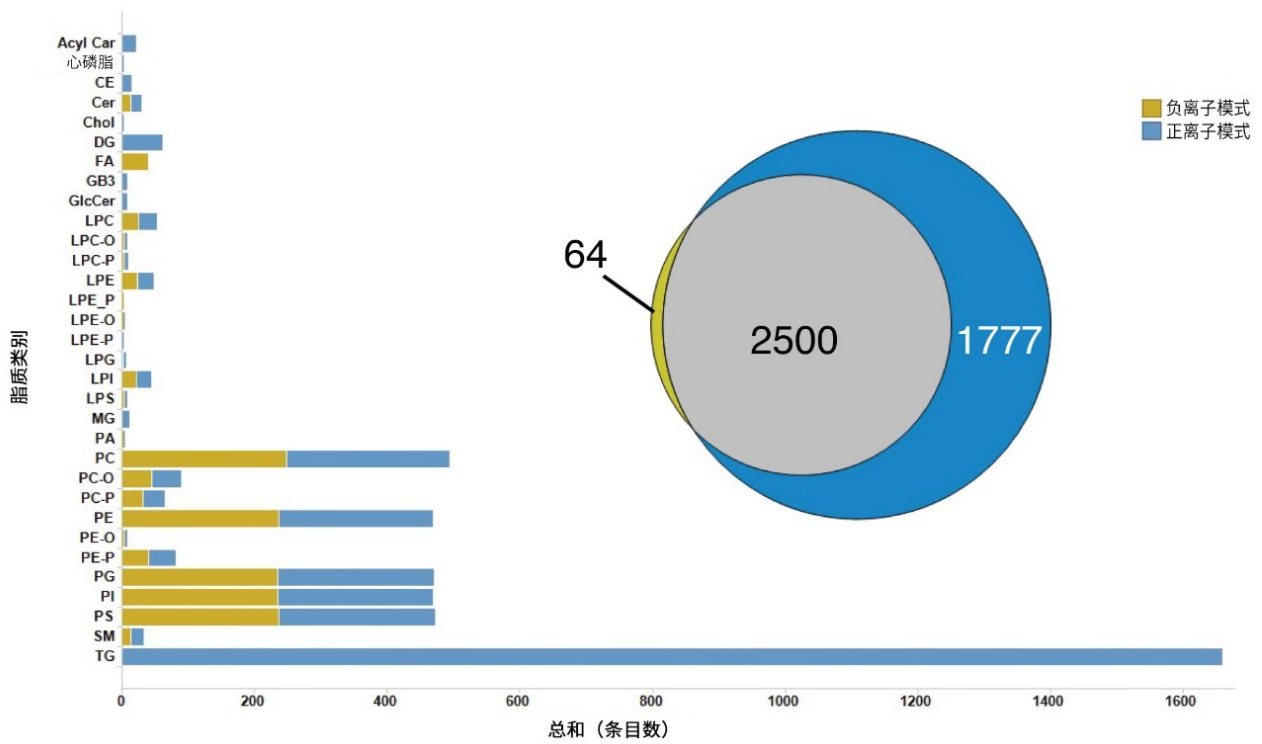


图3.ESI正离子（蓝色）和负离子（黄色）模式的脂质数据库组成。共展示了3200个条目，其中43%的条目同时具有两种电离模式。

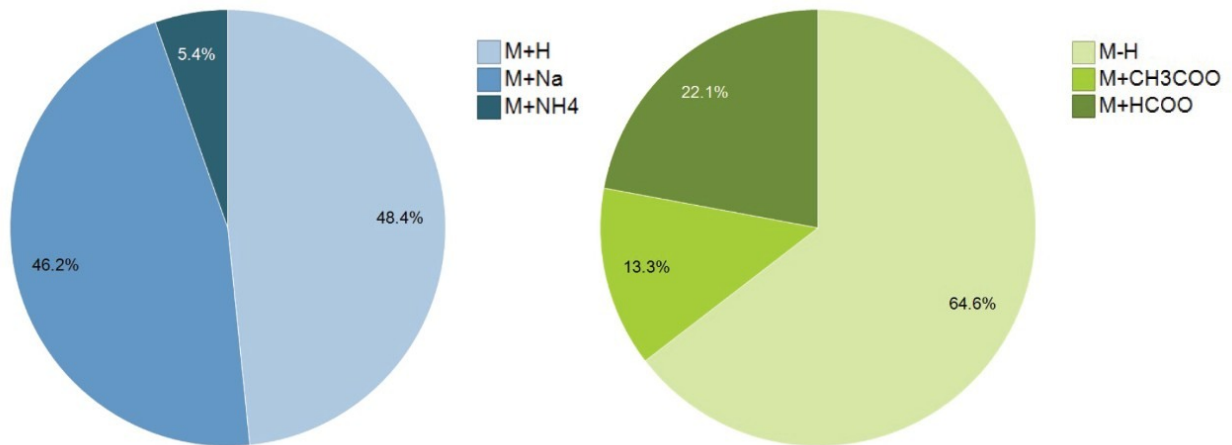


图4.数据库中正（蓝色）和负（绿色）电离模式下的加合物分布

用于生成数据库的色谱方法由12 min的运行周期组成，此前已证明该方法在大规模脂质组学研究中具有良好的专属性、稳定性和重现性³。此外，该方法还利用了ACQUITY Premier系统杂化表面技术的优势，显著提高

了磷酸化和羧化脂质的灵敏度和回收率（应用纪要720007092ZH <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2021/acquity-premier-lc-technology-significantly-improves-sensitivity,-peak-shape-and-recovery-for-phosphorylated-and-carboxylate-lipids.html>>）。CCS验证所用的100种脂质标准品相关的保留时间值也用于验证并附加至数据库中。图5提供了血浆提取物的示例色谱图，以及实验测得的脂质标准品RT分布。

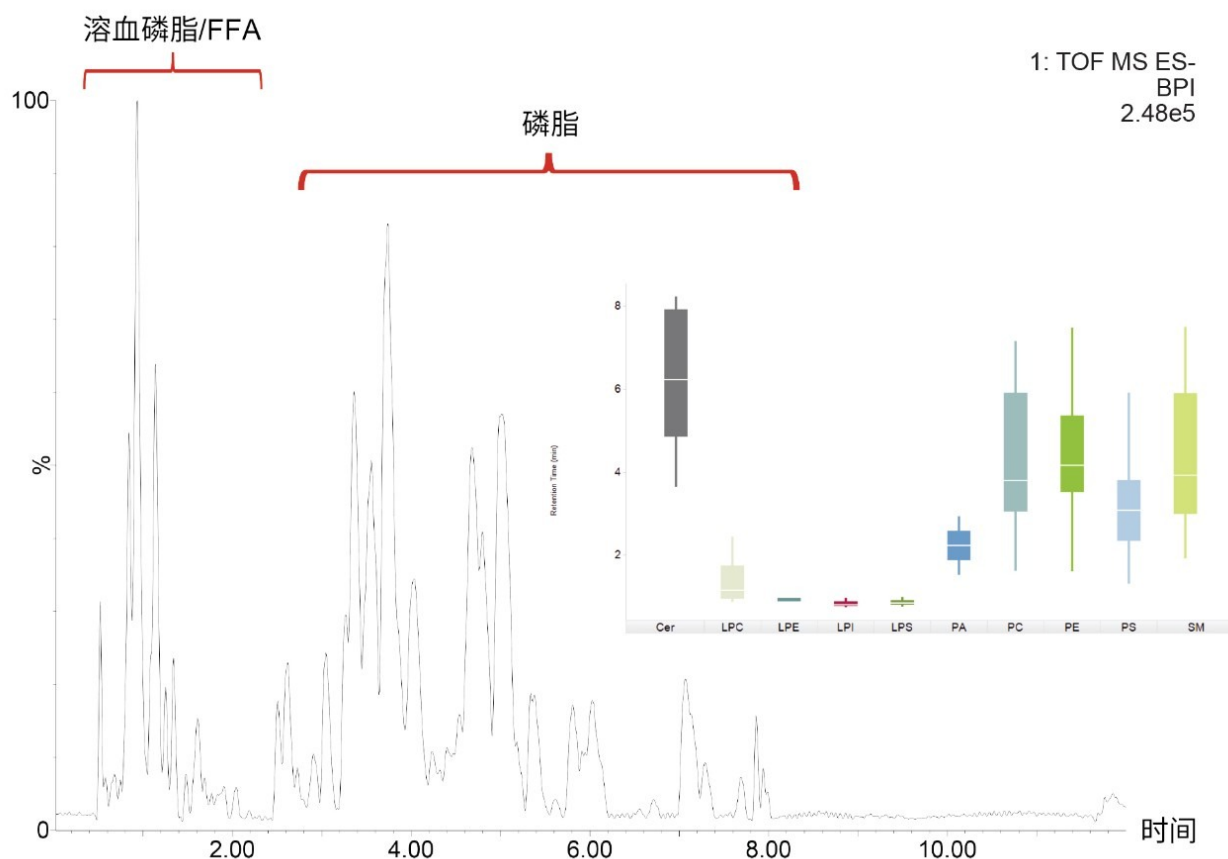


图5.血浆提取物(ESI-)的代表性色谱图，突出显示了基于RT的各种脂质基团。插图显示了测得的大量脂质标准品的RT分布。

利用Progenesis Q1和UNIFI可获得最高灵活性

为说明该数据库的实用性，对各种内源性基质进行了数据库搜索。该数据库的构建旨在提供最高的灵活性，使其能够使用Progenesis Q1或UNIFI处理软件进行搜索。图6显示了Progenesis Q1搜索得到的内源性TG(44:2)鉴定结果。沃特世脂质分析数据库与LipidMaps之间的搜索结果相比，碎片离子得分提高了42%，而使用沃特世脂质数据库时，总体鉴定得分（包括CCS和MS/MS）提高了17%。观察到的鉴定得分增加是由于纳入CCS和MS/MS信息提供了更高的特异性。图7突出显示了实施CCS如何有助于筛选数据库搜索后返回的鉴定结果数量。

。

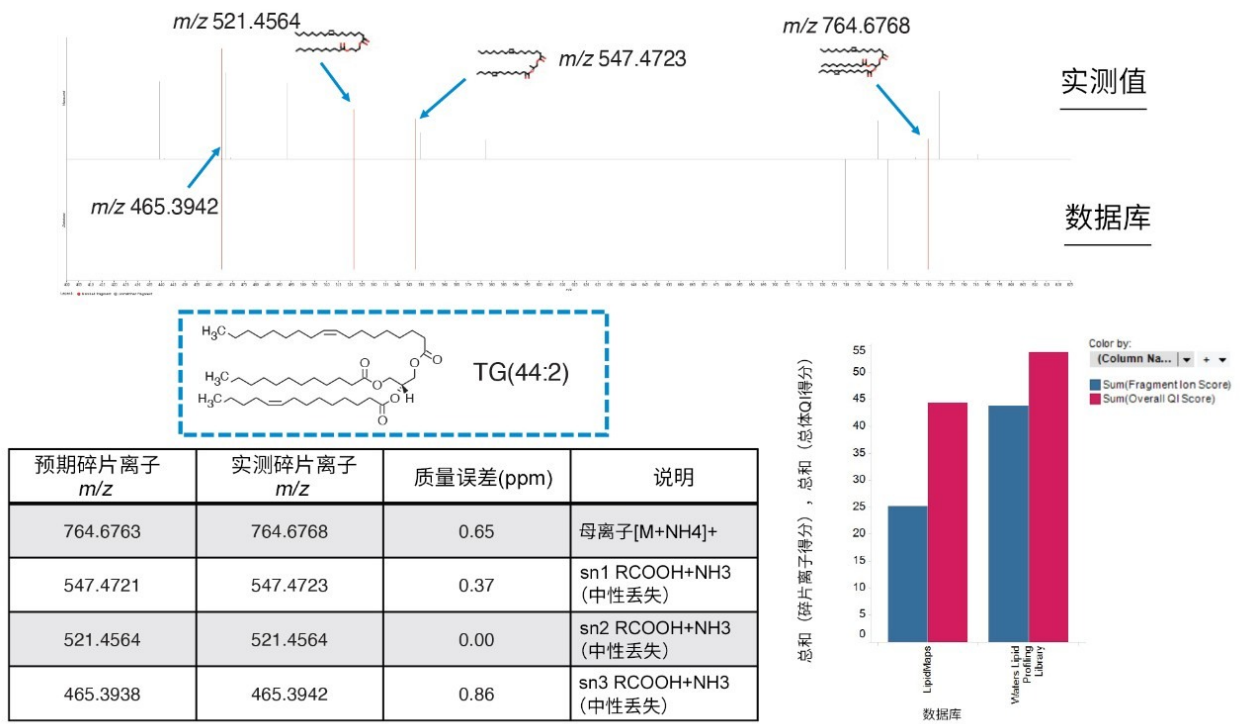


图6.人血浆提取物的Progenesis QI数据库搜索示例。展示了NH₄⁺加合的TG(44:2)，突出显示了搜索沃特世脂质分析数据库所获得的得分增加（碎片离子得分和总体得分）。镜像图显示了由实验数据（实测）得到的碎片离子与数据库中碎片离子的匹配结果。

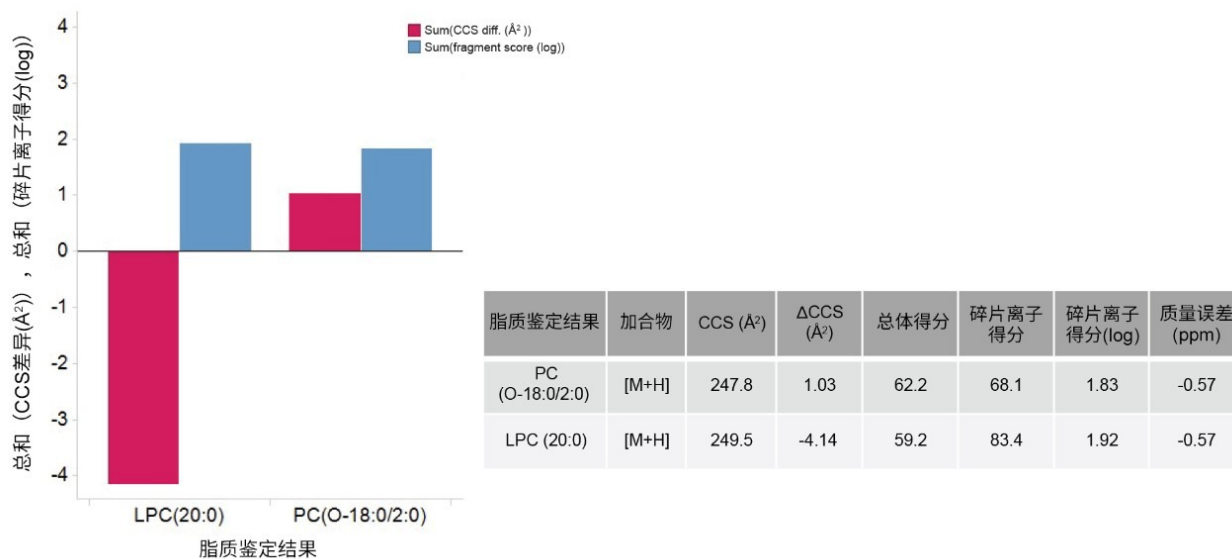


图7.基于CCS筛选潜在鉴定结果的数量。提供的示例显示了将CCS作为数据库搜索的一部分如何有助于凸显最可信的鉴定结果。

同样，通过UNIFI处理对应于加标奇链LIPIDOMIX的人血浆数据（图8）。显示了与SM(d18:1/12:0)相关的MS/MS正离子和负离子数据，并清楚标记出数据库匹配的碎片离子。

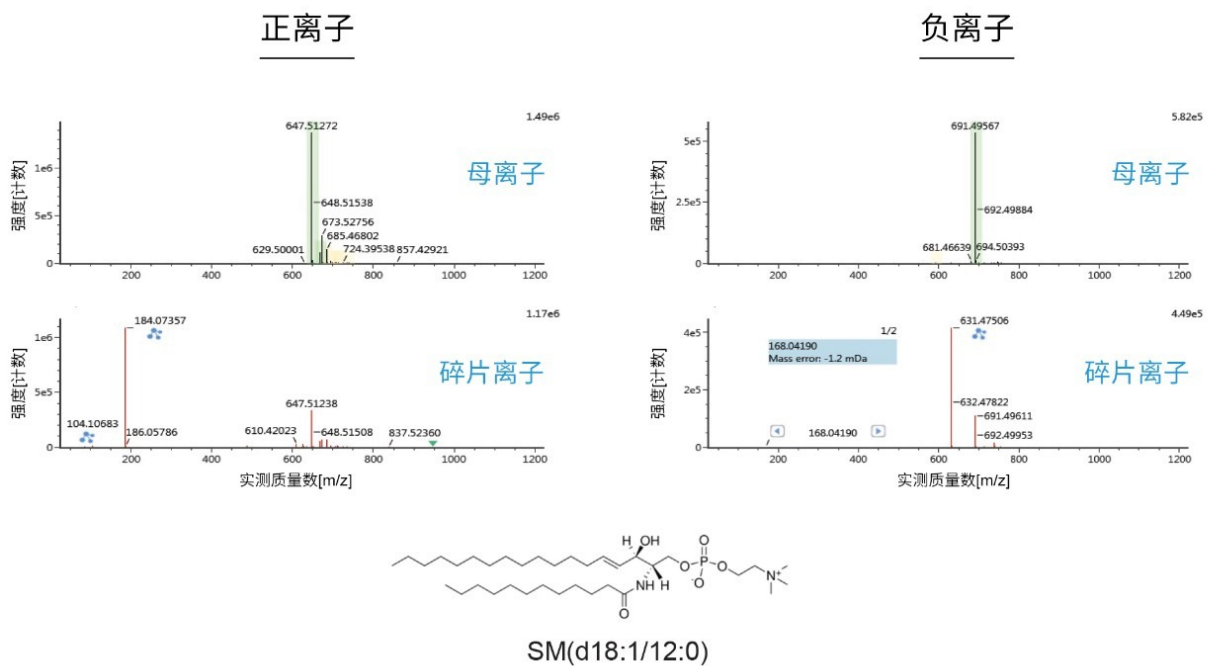


图8.经UNIFI处理后使用沃特世脂质数据库搜索的数据。该示例显示了正离子和负离子谱图，分别代表SM(d18:1/12:0)的母离子和碎片离子。

结论

- 使用14个脂质类别的100多种脂质标准品成功验证了生成计算机模拟CCS值的预测算法。
- 结果表明，CCS、MS/MS与保留时间信息的结合提高了特异性，从而提高了鉴定得分，获得了更高的可信度。
- 海量数据库管理基于生物学相关性和提取物的实测值。
- 该数据库的通用性使其可以与UNIFI和/或Progenesis Q1信息学软件配合使用。

参考资料

1. Paglia, G., Smith, A. J., Astarita, G. (2021) Ion Mobility Mass Spectrometry in the Omics Era : Challenges and Opportunities for Metabolomics and Lipidomics.doi:10.1002/mas.21686.

2. Broeckling, C. D. et al. Application of Predicted Collisional Cross Section to Metabolome Databases to Probabilistically Describe the Current and Future Ion Mobility Mass Spectrometry. J. Am. Soc. Mass Spectrom. (2021) doi:10.1021/jasms.0c00375.
3. Giorgis Isaac, Nyasha Munjoma, Lee A. Gethings, Lauren Mullin, Robert S. Plumb. 一种适用于大规模样品组且兼具稳定性与可重现性的反相脂质分析方法, 沃特世应用纪要, 720006959ZH <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/a-robust-and-reproducible-reversed-phase-lipid-profiling-method-for-large-sample-sets.html>> .
4. Giorgis Isaac, Robert S. Plumb. ACQUITY Premier液相色谱技术显著改善磷酸化和羧化脂质的灵敏度、峰形和回收率, 沃特世应用纪要, 720007092ZH <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2021/acquity-premier-lc-technology-significantly-improves-sensitivity,-peak-shape-and-recovery-for-phosphorylated-and-carboxylate-lipids.html>> .

特色产品

ACQUITY Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

SYNAPT XS高分辨率质谱仪 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135020928>>

基于UNIFI的代谢物鉴定应用解决方案 <<https://www.waters.com/134682897>>

UNIFI科学信息系统 <<https://www.waters.com/134801648>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

Progenesis QI <<https://www.waters.com/134790652>>

720007317ZH, 2021年7月