

Xevo G2-S QToF和TransOmics：用于蛋白质组学、代谢组学和脂质组学的LC/MS差异组学分析系统

Ian Edwards、Jayne Kirk和Joanne Williams
沃特世公司(英国曼彻斯特)

应用优势

- 简化了工作流程、验证和数据解析
- 设计用于大规模代谢组学和蛋白质组学数据集
- 集成式组学平台可用于各种各样的全面定性和定量分析

沃特世解决方案

包括TransOmics™信息学软件的
组学研究平台解决方案

ACQUITY UPLC® I-Class 系统

nanoACQUITY UPLC® 系统

Xevo® G2-S QToF

TransOmics 信息学软件

MassPREP™ 蛋白质酶解标准品

关键词

组学，代谢组学，脂类组学，
蛋白质组学，MS^E，主成分分
析，无标记LC/MS

简介

近年来，包括基于LC-MS的代谢组学、脂质组学和蛋白质组学仪器等组学技术的进步实现了以高通量的方式对多种生物分子的丰度进行定量监测，从而测定它们在不同生物状态下的变化。

我们的最终目标是增进对生物过程的理解，从而改善对于疾病的疗效，更有效地开发药物或维持作物生长的最佳农业环境，同时最大程度地减少传染和其它副作用。就此而言，不同分析学科的研究结果可提供正交的观点，通常可以互相作为补充。开发和应用能够将多个研究领域的结果进行整合的灵活信息学解决方案具有重大意义。本研究介绍了一种多组学解决方案，可用于对代谢组学和蛋白质组学数据集中的MS数据进行大规模分析。

其中采用了包括TransOmics信息学软件的沃特世(Waters®)组学研究平台解决方案，并结合Xevo G2-S QToF系统进行技术和生物学重复分析。

结果与讨论

执行的代谢组学实验包括相对于对照/质控样品，鉴定低剂量和高剂量样品。根据实验设计，样品应当划分为3个不同的组，并使用标记离子进行不同组的识别。用于代谢组学和脂类组学的TransOmics (TOIML)流程包括以下步骤：

1. 导入原始的MS^E连续数据集(六个技术重复样/组)
2. 峰对齐，纠正不同分析运行间的保留时间偏移
3. 色谱峰归一化，以便在不同样品运行间进行比较
4. 色谱峰检测(峰选择)
5. 离子去卷积，按化合物将离子分组
6. 利用已有的定制数据库进行化合物鉴定
7. 执行数据分析，找出用以将化合物分为QC(质控)、空白(基质)和分析物(高剂量)的离子(特征)

基质背景包括系统评估基质，其中加入了不同的镇痛标准品混合物A，从而得到低剂量(QC和高剂量(空白)样品。质控样品(QC)通过混合等量的低剂量和高剂量样品而制成。

采用ACQUITY UPLC I-Class系统结合Xevo G2-S QToF，在正电喷雾模式下以大于30k FWHM的质量分辨率，分离和分析代谢物。在UPLC/MS^E模式下采集数据，该模式是一种无监督的采集方法，其中当进行交替扫描时质谱仪在低能量和高能量之间切换。使用TOIML和专业化化合物数据库进行处理、搜索和定量。

其中TOIML流程的步骤1，2和3在别处有详细描述([TransOmics信息学软件由Nonlinear Dynamics提供技术支持](#))。鉴定前，通过主成分分析对所检测离子进行分组，如图1所示，显示了综合得分图和载荷图。从中可知，离子主要聚集在技术重复水平，并且样品实现了清晰分离。

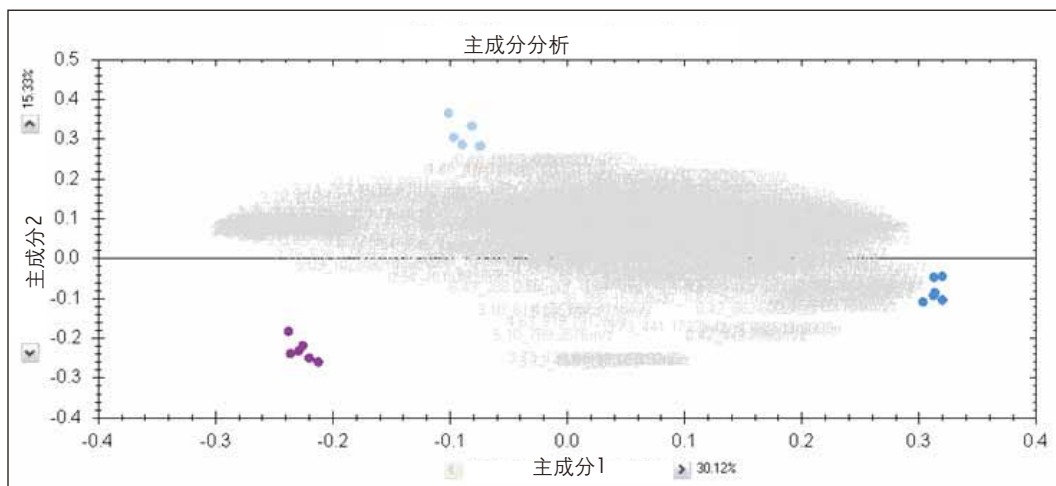


图1. 分析物(镇痛标准品混合物A高剂量; 紫色)，空白(系统评估基质; 浅蓝色)和QC(质控样品; 深蓝色)的主成分分析。

接着，采用集成式搜索工具进行化合物鉴定，以正确鉴定四种镇痛标准品混合物中可在正离子电喷雾模式下检测到的标准品。图2展示了TOIML化合物搜索结果页面的概览，其中突出显示了基于精确质量数、保留时间(可选)和理论同位素模式分布对咖啡因的鉴定。

除了先前描述的PCA之外，TOIML中还整合了其它多变量统计工具，包括相关性和趋势分析。图3为一个示例，示出了四个加标标准品的归一化趋势图，表明每个标准品的六个技术重复样之间有着良好的一致性，并且相对丰度与实验设计一致。

此外，TOIML还便于科学家将分析结果与其它组学数据关联，或为诸如EZinfo的独立统计软件包提供输入数据。下游生物信息学(即Umetrics软件)的结果可重新导入分析实验中，以将所有化合物数据合并为单个表格以供审查或分享。

Compound	Neutral mass	m/z	z	Retention time	Peak Width	Accepted ID	Identifications	Anova (p)	Max fold change	Highest mean	Lowest mean
4.44_136.0762m/z	<unknown>	136.0762	1	4.44	0.06	14708992	1	< 1.1E-16	Infinity	Analyte	Blank
5.19_179.0947n	179.0947	180.1026	1	5.19	0.07	49854487	1	< 1.1E-16	Infinity	Analyte	Blank
2.95_152.0710m/z	<unknown>	152.0710	1	2.95	0.06	46506142	1	< 1.1E-16	Infinity	Analyte	Blank
3.73_195.0883m/z	<unknown>	195.0883	1	3.73	0.07	46511425	1	< 1.1E-16	1.59	Analyte	Blank

Compound 3.73_195.0883m/z:

Compound abundance

Possible identifications (1)

3D Montage

★	Compound ID	Description	Adducts	Formula	Retention time	Score	Mass error (ppm)
★	46511425	Caffeine	M+H	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	3.73	743	0.31

图2. TOIML化合物鉴定页面。

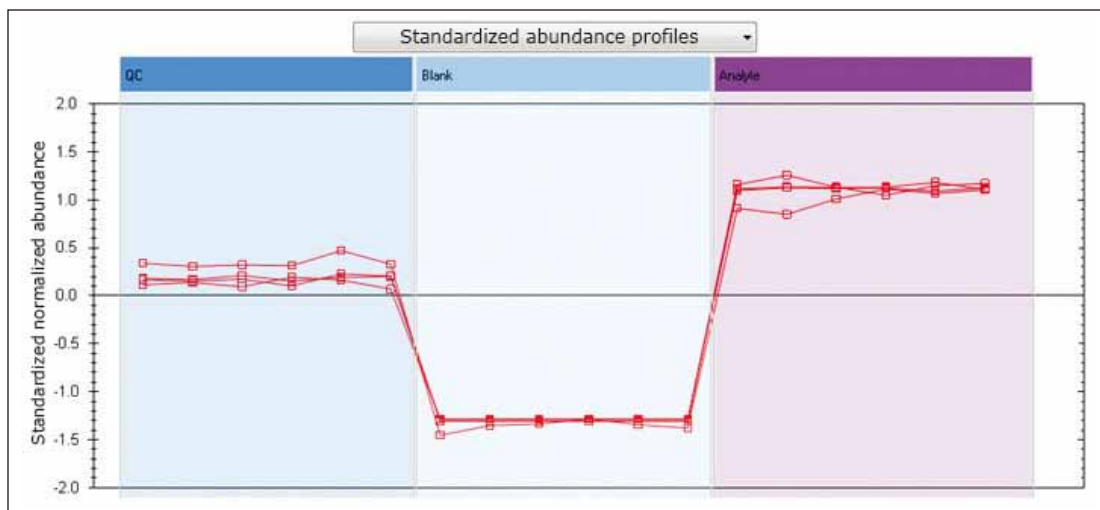


图3. 镇痛标准品的归一化丰度分析。

在蛋白质组学实验中，分析了两个10 ng大肠杆菌样品的三个重复样，分别加入了牛血清白蛋白(BSA)、乙醇脱氢酶(ADH)、烯醇酶和糖原磷酸化酶B。第一个样品(混合物1)中的加标蛋白质的柱上进样量均为1飞摩尔，而第二个样品(混合物2)中的加标蛋白质柱上进样量分别为8、1、2和0.5飞摩尔。

因此，额定预期比值(混合物2:混合物1)应为8:1、1:1、2:1和0.5:1。在本研究中，使用nanoAC-QUITY UPLC系统结合Xevo G2-S QTof，在LC/MSE采集模式下对肽进行分离和分析。采用用于蛋白质组的TransOmics (TOIP)以及含有加标蛋白质序列信息的种属特异性数据库进行处理、搜索和定量。

TOIP流程包括以下步骤：

1. 导入原始的MS^E连续数据集(每个样品有三个技术重复样)
2. 峰对齐，纠正不同分析运行间的保留时间偏移
3. 色谱峰归一化，以便在不同样品运行间进行比较
4. 色谱峰检测(峰选择)
5. 利用集成数据库搜索算法鉴定蛋白质和肽
6. 多变量统计分析
7. 绝对和相对定量

TOIP提供了与TOIML相同的多变量分析工具。图4显示了所检测特征的PCA示例，即电荷态组。可明显看出，特征主要聚集在技术重复水平。其中一种加标蛋白质消化物的肽定性鉴定结果示于图5中，该蛋白质中鉴定出的所有肽的归一化表达谱如图6所示。对后者的定量精确度类型进行了确证，此类型可通过无标记MS研究及基于LC/MS^E的采集策略获得。

图5显示了差异加标样品中一个分析物的LC/MS^E采集的定性结果概览。在本例中，BAS的柱上进样量为8 fmol，而大肠杆菌消化物的量为10 ng。结果如图6所示，展示了相关的相对定量结果。

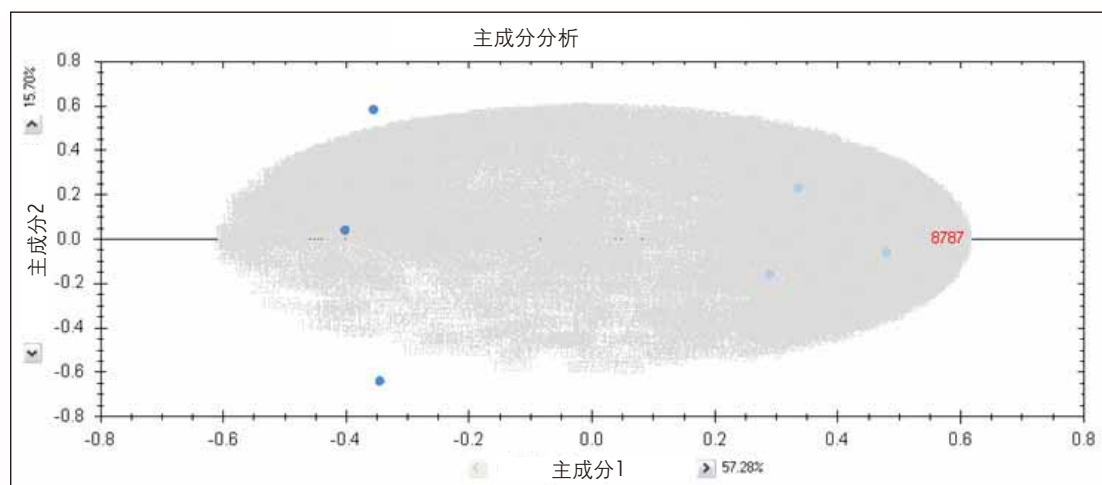


图4. 大肠杆菌中加入的混合物1(深蓝色)和混合物2(浅蓝色)的特征(电荷态组)PCA图。

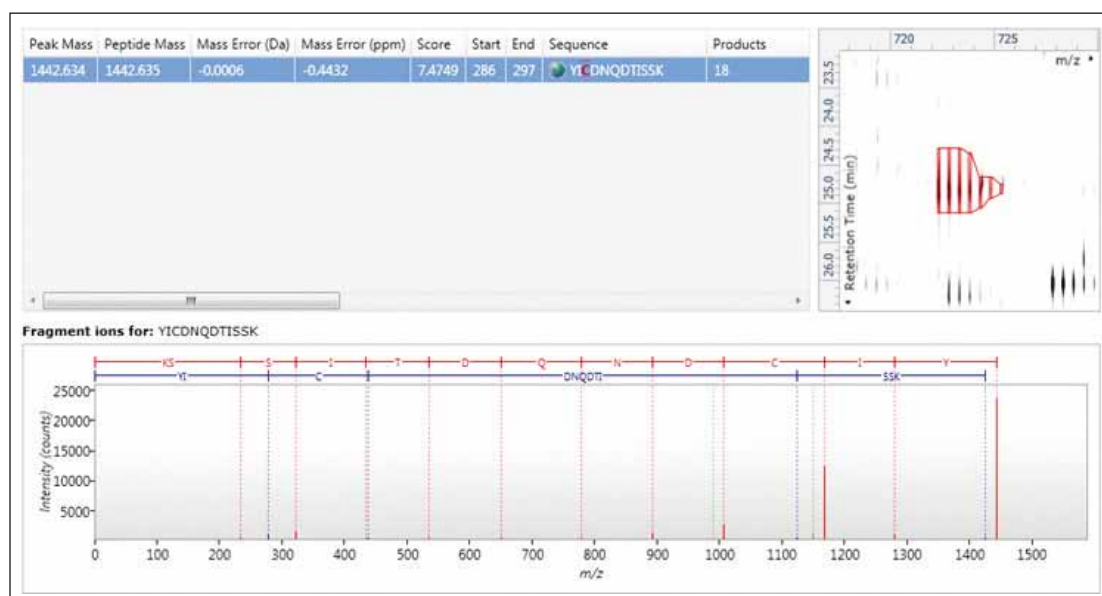


图5. 大肠杆菌中加入的不同浓度牛血清白蛋白肽的定性LC/MS^E鉴定结果。顺时针显示的依次是鉴定相关指标(得分和误差)、具体的轮廓线图以及标注的产物离子谱图。

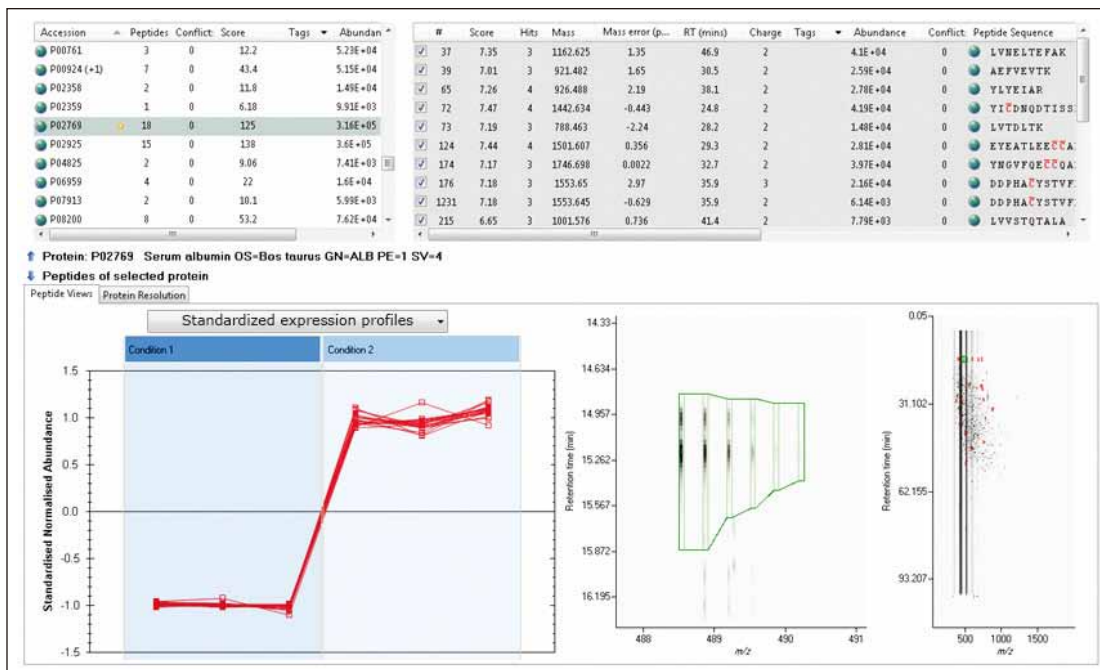


图6. 牛血清白蛋白中鉴定出的肽的定量分析。

结论

- TransOmics信息学软件为多组学研究提供了一个简单易用、可扩展的系统
- UPLC/MS^E (LC结合数据独立型采集MS) 可在单次实验中提供全面的定性和定量数据集
- 通过代谢物、脂质和蛋白质分析可快速获取补充信息并进行关联

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, ACQUITY UPLC, nanoACQUITY, Xevo和The Science of What's Possible是沃特世公司的注册商标。 TransOmics和MassPREP是沃特世公司的商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

© 2013 沃特世公司。印制于中国。
2013 年 6 月 720004738ZH AG-PDF

沃特世科技(上海)有限公司

北京: 010 - 5209 3866

上海: 021 - 6156 2666

广州: 020 - 2829 6555

沃特斯中国有限公司

香港: 852 - 2964 1800

免费售后服务热线: 800 (400) 820 2676

www.waters.com

