



timsTOF Pro 新技能: 4D 微量脂質體學分析與代謝體學

Bruker 在蛋白質體學各個領域的檢測中佔有重要地位，同時也推出了多種解決方案，每個領域都有對應的技術方法。比如極致高解析度 FT/MRMS 質譜 scimaX，解析度高達兩千萬，非常適合完整蛋白質的分析；MALDI-TOF 質譜影像技術，可以在組織上進行原位的蛋白分析；timsTOF Pro 適合於 shotgun 蛋白質體學研究。採用這些先進的質譜技術，可以從多個層次和角度進行蛋白質體的研究，分析組織、血漿等各種類型的樣本。timsTOF Pro 的獨到創新在相關體學研究上帶來的優勢包括以下：

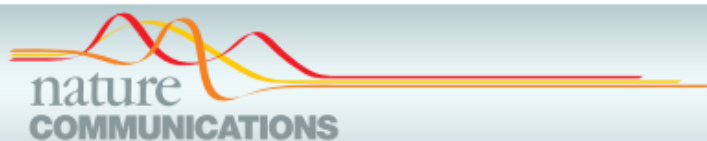
1. 具有精準的肽和蛋白質 ID 定量分析能力的 DIA-PASEF 技術。
2. timsTOF Pro 能夠完成生物製藥中完整蛋白質分析的新工作流程。
3. 下一代 4D 代謝體學的新工作流程，利用 timsTOF Pro 可以例行而精確地測定碰撞截面積 (CCS)，提供另一分離維度。

與傳統的 shotgun 蛋白質體採集方法相比，timsTOF Pro 採用 PASEF 這種方法可以更好、更快、更靈敏的獲得深度覆蓋的蛋白質資訊，並獲得準確的 CCS 值。在過去 15 年的蛋白質體學研究中，獲得的資料只包含層析和質譜圖資訊。掌握 CCS 值的額外資訊，可以有效降低鑑定的偽陽性率，尤其對低濃度蛋白的準確鑑定具有重要意義。除了 shotgun 蛋白質體分析，timsTOF Pro 也可應用於其他生物分析領域。藉由使用 PASEF 模式，timsTOF Pro 近期也成功地應用在脂質體、代謝體學研究，並且顯著提高了靈敏度、掃描速度和資料品質。在資料處理過程中，使用分析軟體預測 CCS 值，隨後與實驗測定的 CCS 值進行對比，更進一步提高鑑定結果的可信性。可以預見的是，對於 CCS 值檢測結果應用於更多的物質鑑定中，將是未來各體學的主要發展方向。

4D-Lipidomics™ 微量樣本脂質體學

脂質是生物體內重要的一大類化合物，具有高度的多樣性，參與物質運輸、能量代謝、資訊傳遞及代謝調控等多種生命活動。Bruker 與 Max Planck Institute 生物化學研究所 Matthias Mann、Florian Meier 團隊合作，開發了具有超高靈敏度的 4D 非標的脂質體學方法 (nanoLC-TIMS-PASEF)，挑戰微量樣本 (如：活體組織切片) 的脂質體學分析。Matthias Mann 團隊近日於《nature communications》上發佈了《Trapped ion mobility spectrometry and PASEF enable

in-depth lipidomics from minimal sample amounts》· 快速且高通量的分析生物模型系統和臨床樣本中的脂質組成，為基礎生物學以及疾病產生和診斷帶來新的認識。



ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-019-14044-x>

OPEN

Trapped ion mobility spectrometry and PASEF enable in-depth lipidomics from minimal sample amounts

Catherine G. Vasilopoulou¹, Karolina Sulek², Andreas-David Brunner¹, Ningombam Sanjib Meitei³, Ulrike Schweiger-Hufnagel⁴, Sven W. Meyer⁴, Aiko Barsch⁴, Matthias Mann^{1,2,*} & Florian Meier^{1*}

目前脂質體學常用的方法為液相層析質譜聯用 (LC-MS)，高解析質譜結合二級碎片資料庫對脂質進行鑑定，但無法區分脂質中大量的同分異構物。離子遷移從另一角度基於形狀和大小對離子進行分離，能有效分離脂質中的同分異構物和同質量的化合物。將離子遷移引入質譜，並結合 nanoLC，可達成微量樣本脂質體學的高靈敏度快速分析，工作流程如圖 1 所示。

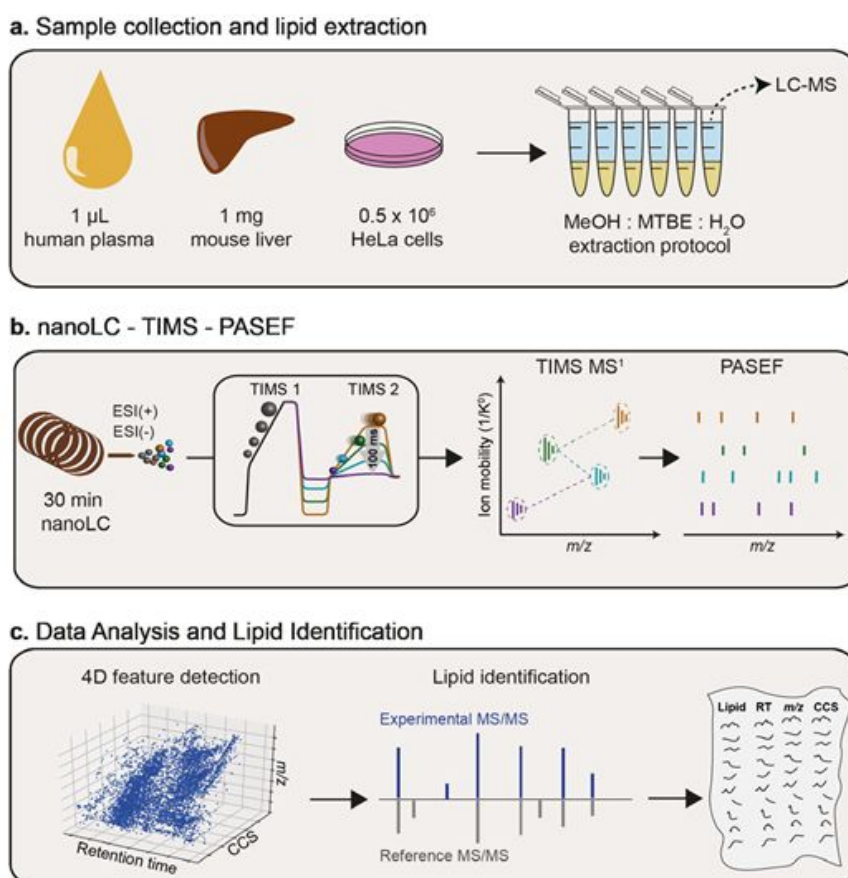


圖 1. nanoLC-TIMS-PASEF 非標的脂質體學方法

捕集型離子遷移質譜 timsTOF Pro 採用 PASEF (Parallel Accumulation Serial Fragmentation, 平行累積連續碎裂, 如圖 2) 掃描模式, 二級質譜的採集速度約 100Hz, 並根據離子遷移率(離子的形狀大小) 分離共同析出(co-elute)的脂質異構體, 有效提高了脂質體學的覆蓋深度和鑑定準確性。平行累積連續碎裂技術 (PASEF) 是 timsTOF Pro 特有的掃描模式, 使得二級涵蓋率大幅增加。在非 PASEF 模式下, 大約有 5.5%的初級離子(母離子)發生碎裂, 而 PASEF 模式可以將這一數值提升到 65%。在 30min 的液相梯度內, 平均每個 PASEF 循環可以得到 15 張二級質譜圖, 這將使得化合物鑑定數量大大增加。

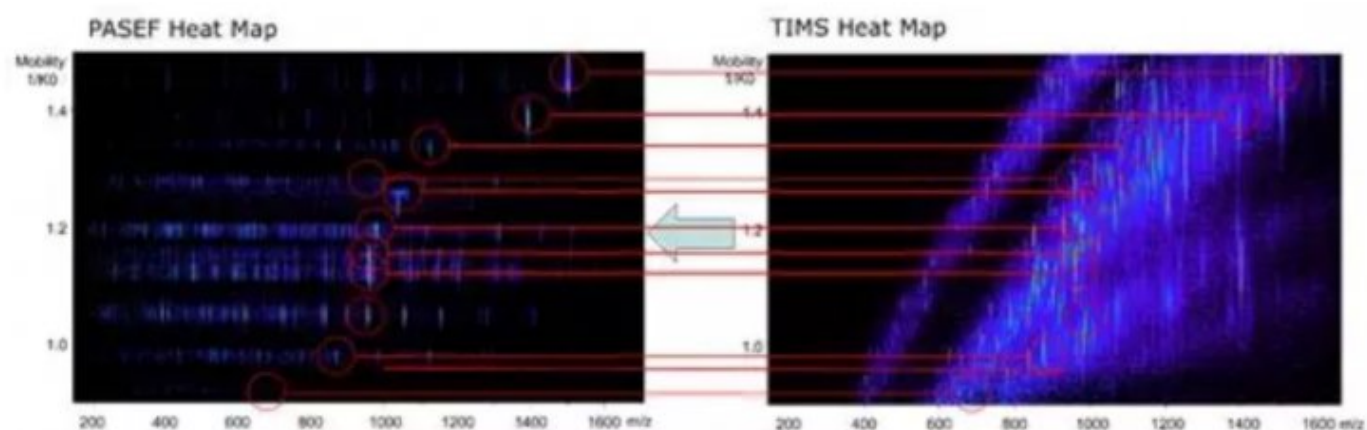


圖 2. PASEF 方法圖譜採集效率

進行多次實驗驗證後, 得到的平均結果 (正負離子結果合併) 如下: 0.05ul 的血漿樣本, 鑑定到 1108 個脂質; 10ug 的鼠肝樣本, 鑑定到 976 個脂質; 約 2000 個 Hela 細胞, 鑑定到 1351 個脂質。鑑定類型包括磷脂類 (PC,PE,PA,PS,PI,PG)、氧化磷脂類、單醯基、二醯基和三醯基甘油、固醇脂類、神經醯胺、糖磷脂、神經鞘磷脂等。在資料穩定性方面, 使用 10ug 鼠肝樣本連續進行 5 次重複實驗, 976 種脂質中有 816 種可被重複鑑定, 再現率高達 95.4%。

相比於非離子遷移模式得到的鑑定結果, 在 PASEF 工作流程下, 甘油酯和甘油磷脂的鑑定量會有三到四倍的提升, 神經鞘磷脂的鑑定量也提升了 2 倍。在 Matthias Mann 發表文獻的報導結果中, 顯示新型的 “nanoLC-TIMS-PASEF” 方法使脂質的鑑定量增加了一倍, 並具有 attomol 水準的靈敏度, 如圖 3。對比不同長短的 nanoLC 分析時間梯度 (30min、60min、90min), 發現 30min 梯度就可以覆蓋 60min、90min 梯度所鑑定到的 90%脂質, 使分析時間減少到 1/3。並對人類血漿的脂質進行非標的定量分析, 四次共鑑定脂質的比例占總鑑定量的 97%, 脂質強度 CV (coefficient of variation) 中位數為 9.2%, 並且 91%的脂質 CV 低於 20%, 具有非常高的定量準確度和再現性。

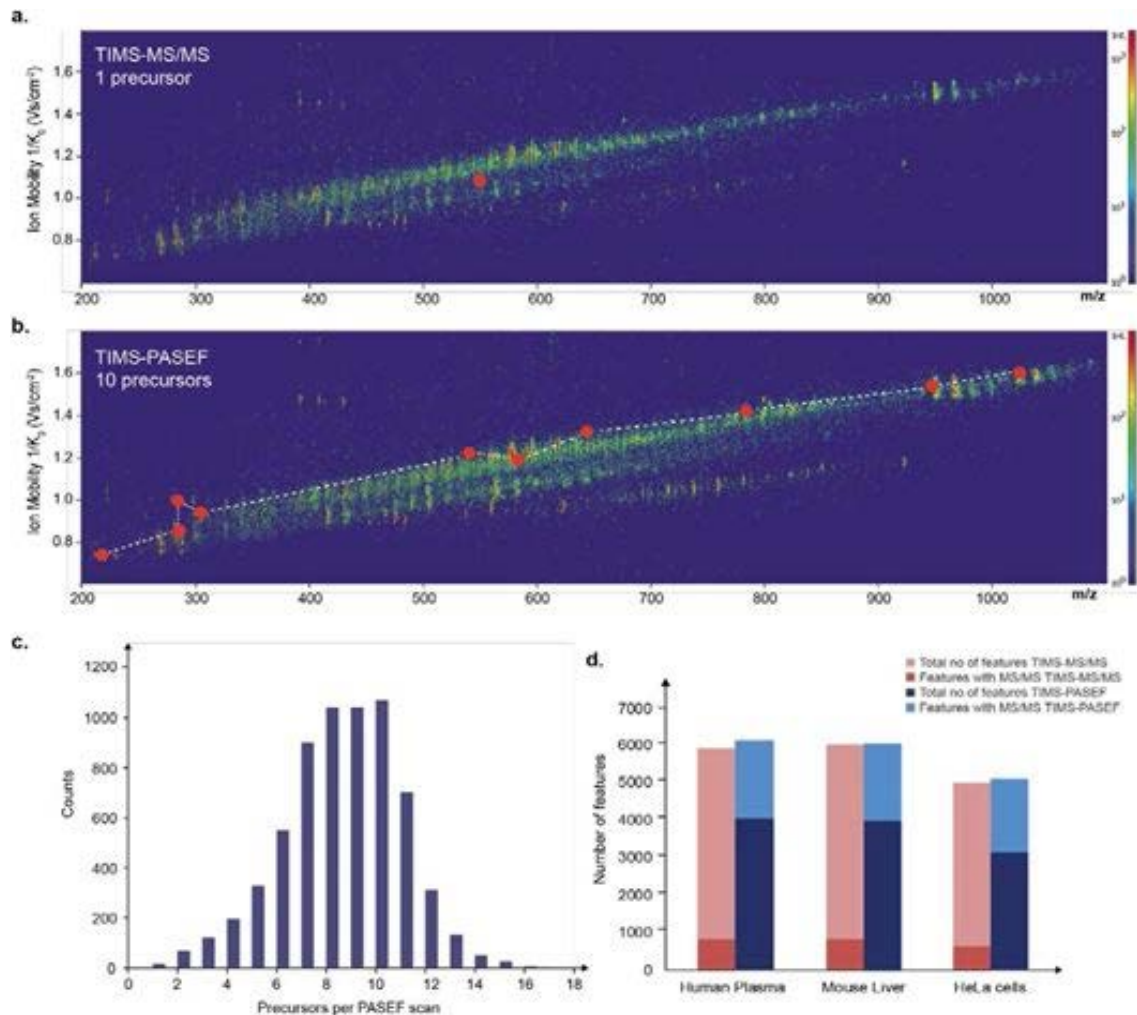


圖 3. 脂質體學 PASEF 方法的效率

新穎的 nanoLC-TIMS-PASEF 方法對脂質離子進行多維度分離，獲得離子的層析時間、離子遷移率(碰撞截面積、CCS)、高解析精確質量 m/z 和 MS/MS 子離子斷片四個維度的資訊，顯著提高不同種類脂質甚至異構物的分離能力，並具有優秀的圖譜歸屬性，如圖 4 所示。捕集型離子遷移提供了精確和重複性高的碰撞截面積 (CCS) 值，為機器學習技術預測 CCS 提供了基礎。目前，脂質體 4D 資料的匹配和資料庫搜尋比對功能，已經整合到了 Bruker MetaboScape 4.0 軟體中。該軟體採用基於機器學習的 CCSPredict™ 演算法，可以根據脂質的序列資訊預測對應的 CCS 值，並進行偽陽性的評估。使用 22 種脂質標準品對比了不同實驗室之間 tims 測得碰撞截面積 TIMS CCS 的重現性。實驗室間的平均變異係數僅為 0.35%，TIMS CCS 值在實驗室間的重複性也很好，沒有發現任何脂類有特異性偏差。資料處理 Metaboscape 軟體將脂質 CCS 值預測方法引入，也可以更精準的用於脂質鑑定。

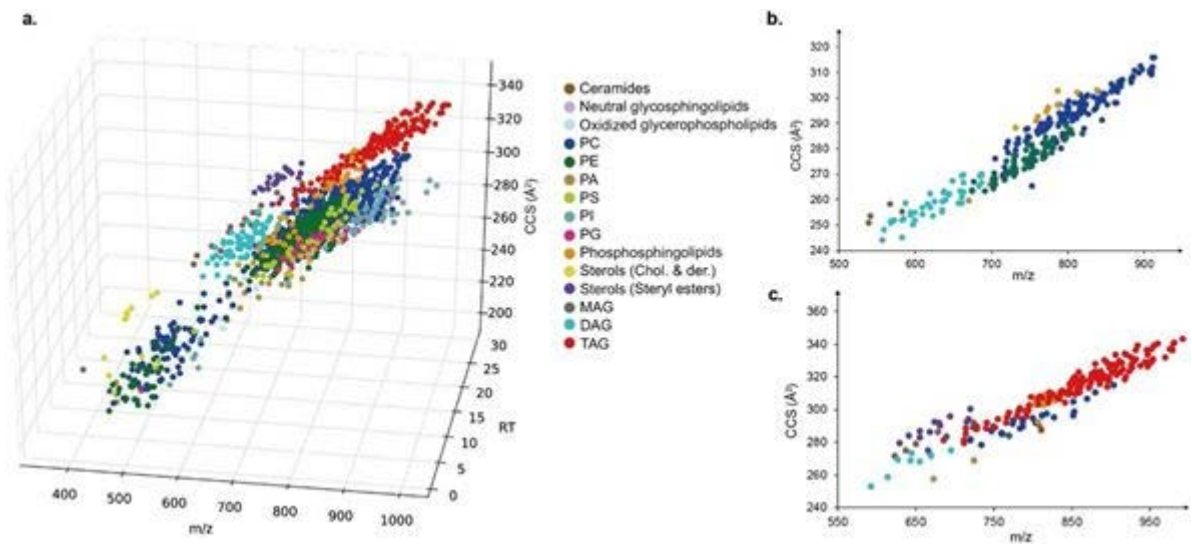


圖 4. 脂質離子的三度 (RT、IMS、m/z) 空間分佈圖

除此之外，Bruker 也提供高度創新的 timsTOF fleX 質譜系統，配備可切換的 ESI/MALDI 雙離子源，可在高空間解析度下進行快速、無標記的 MALDI 成像，同時完全保持了在 ESI 模式下 timsTOF Pro 4D 體學的靈敏度和採集速度，更在單台質譜上實現多體學和空間定位體學 SpatialOMx 的能力，提供了新一代的脂質體成分析和定位深度解析的研究平臺，如圖 5 與圖 6 所示。

The perfect solution for high-throughput 4D Lipidomics



圖 5. 利用 timsTOF fleX 進行鼠腦脂質成像

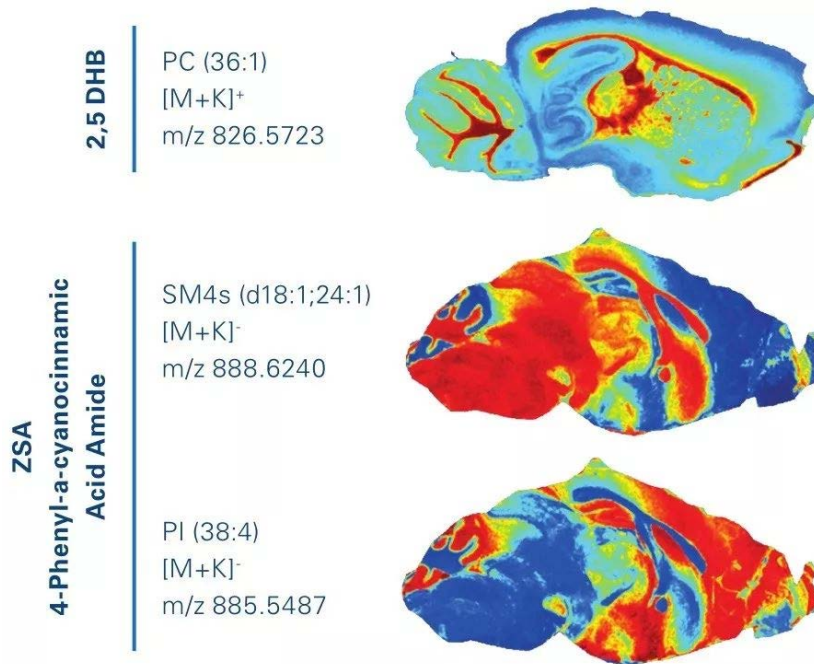


圖 6. 利用 timsTOF fleX 進行鼠腦脂質成像

擁有 PASEF 技術的 timsTOF Pro 能夠實現高靈敏度和高準確度的脂質體學分析，在脂質體學以及代謝體學方面具有強大的發展潛力，準確的離子遷移值測量和同分異構物的分離，為我們提供了更為豐富的資訊，有待進一步充分發掘和應用。

4D-Metabolomics™ 建立植物的 CCS 值資料庫

代謝體學作為生物資訊學的重要分支之一，近年廣泛受到關注。而數目眾多，結構複雜的各類小分子化合物的鑑定是代謝體學工作上的一大挑戰。傳統的以質譜為核心的代謝體學方法主要依靠二級 (MS/MS) 質譜圖來鑑定和區分化合物，但對於其中包含的大量同分異構物則無法準確鑑別，這是因為相同質量使得質譜解度再高也無法區別，而大量相同的子離子斷片也讓二級 (MS/MS) 質譜圖辨識度下降。

Bruker 4D-Metabolomics™ 創新性的將離子遷移分離引入到代謝體學的工作流程中，擴展了分離維度，提升了化合物鑑定精度和覆蓋度，也整合層析與質譜之間的時間維度差別，如圖 7。化合物的碰撞截面積值 (CCS) 反映了化合物的空間結構大小，可作為化合物定性的依據。

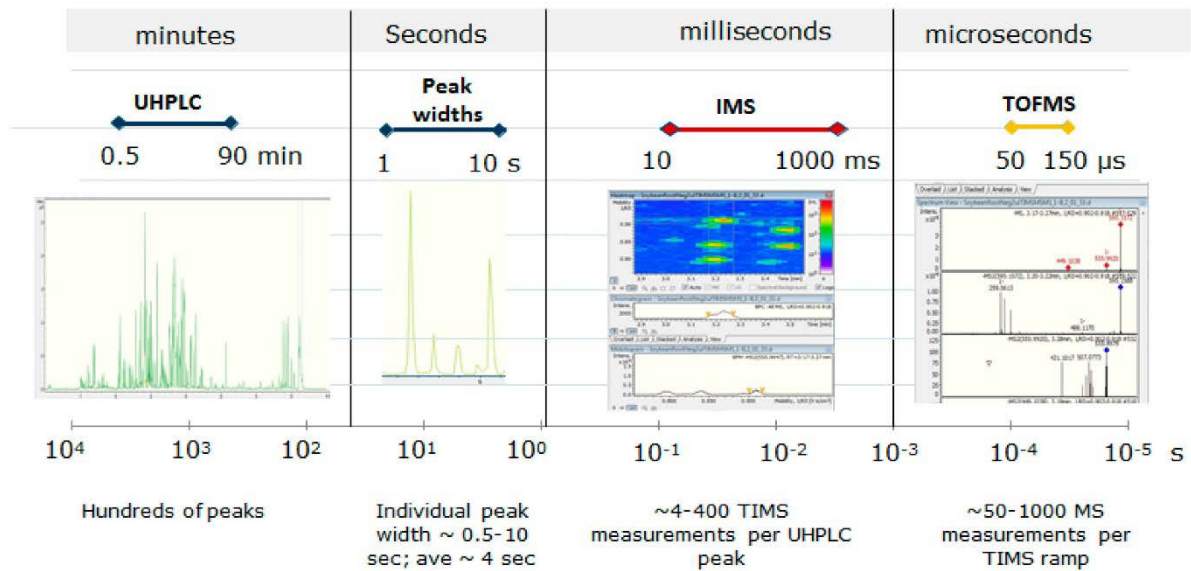


圖 7. timsTOF Pro 整合層析與質譜之間的時間維度差別

Bruker 離子遷移質譜 timsTOF 系列擁有雙離子遷移管設計，可進行離子的連續累積分離，達到約 100%離子利用率，遷移率分離過程不會損失離子，對於體學分析這類離子資訊覆蓋度要求極高的領域有著絕佳的適用性。結合平行累積連續碎裂 (PASEF) 技術，離子遷移分離帶來的離子聚焦，可同時達成高靈敏度和高掃描速率，如圖 8。

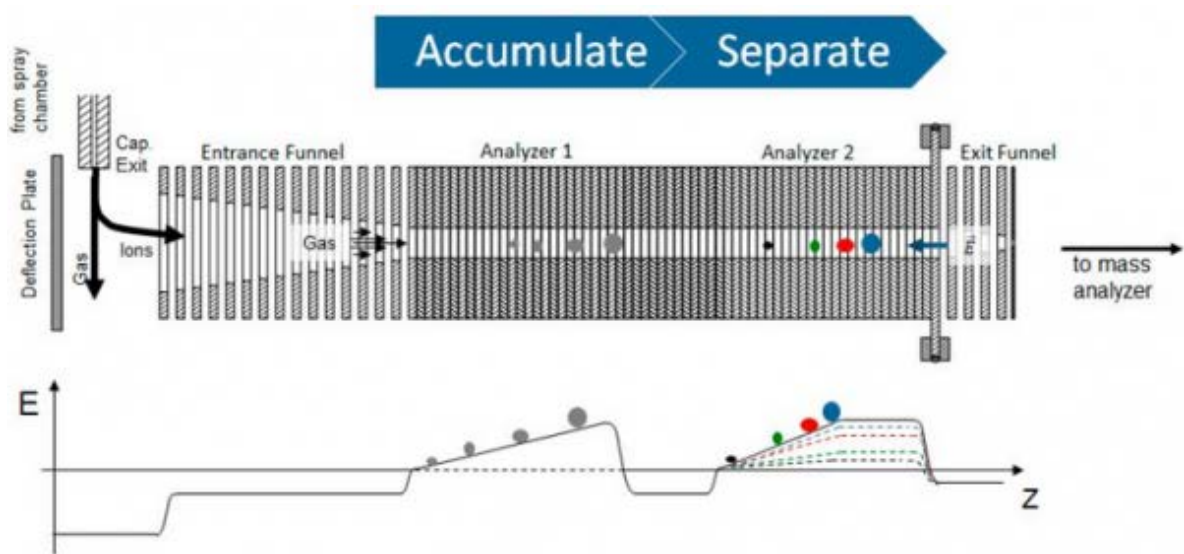


圖 8. timsTOF Pro PASEF for metabolomics

黃酮類和酚類化合物是植物中常見的兩類化合物，這兩類化合物都擁有數目眾多的同分異構物，單純依靠質譜來進行區分鑑定會非常困難。因此，離子遷移分離在此時就能將其功能有效發揮。以研究藥用豆科植物為例，使用 UPLC-TIMS-QTOF-MS/MS，在負離子模式下，對其中的化合物進行 CCS 值測定，並建立相應的植物 CCS 值資料庫。

這個實驗共測得 146 種天然植物中的化合物，主要包括黃酮類、糖基化黃酮類、異黃酮類、三萜、糖基化三萜等。分子量範圍 210 - 826 Da，CCS 值範圍為 141.26 到 300.86 Å²。鑑定的化合物類型包括[M-H]⁻，[M-H+HCO₂H]⁻，[M-H+Na+HCO₂]⁻，[2M-H]⁻，and [M-3H]⁻。下圖為各類型離子化產物的 CCS 值再現性。樣本重複三次檢測，CCS 值的平均相對標準差 (RSD) 為 0.1075%。

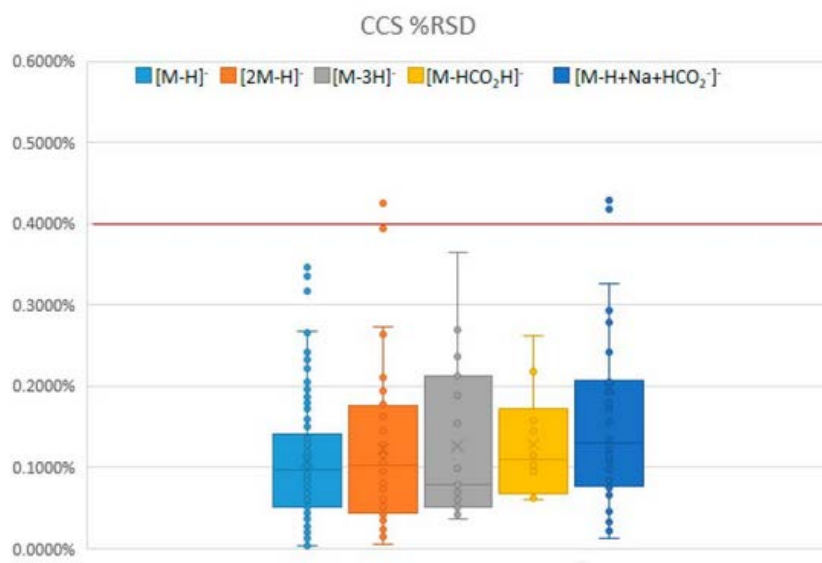


圖 9. [M-H]⁻，[M-H+HCO₂H]⁻，[M-H+Na+HCO₂]⁻，[2M-H]⁻，and [M-3H]⁻ 電離產物 CCS 值再現性與標準差

離子遷移分離的引入主要目的是為了鑑定代謝物中的同分異構體，這裡我們以黃酮和黃烷酮化合物為例，來展示 timsTOF 的離子遷移分離情況。在下圖 10 中，橫軸為質荷比，縱軸為 CCS 值，圖中的 n 值則為同分異構體的個數。我們可以看到，大部分的同分異構體 CCS 值有明顯差異，能夠在離子遷移這一維度上有很好的分離效率。

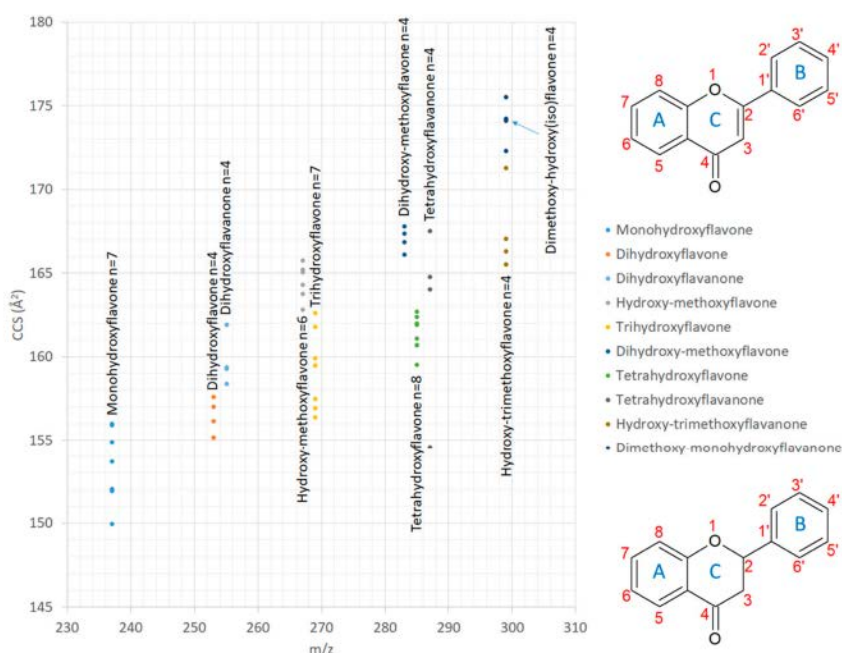


圖 10. 數項類黃酮分子異構體的相對遷移率

為了研究基質的存在是否干擾 CCS 值準確性，對比實際樣品和標準品測量的 CCS 值，我們選取部分標準品進行了研究。使用 UPLC-TIMS-MS 測量了兩組樣品，純標準品混合物和加入了標準品的植物根提取液，並對比其測量的 CCS 值，得到下表 1，CCS 的平均差異僅為 0.06%，顯示信賴度仍高。

表 1 基質干擾下 CCS 值準確性

Compounds	CCS without Matrix	CCS with Matrix	CCS % Difference
Rutin	232.56	232.64	0.03583%
Naringin	215.66	215.90	0.11431%
Naringenin	162.91	162.95	0.02455%
Chrysin	156.14	156.25	0.07042%
6-hydroxyflavone	156.05	155.94	0.07265%
Average	-	-	0.06355%

下圖 11 顯示 MetaboScape 軟體已全面支援 4D-Metabolomics 資料的處理，依據資料的準確質量數，同位素峰資訊，二級(MS/MS)質譜碎片，以及 CCS 值四維資訊來對化合物進行定性。

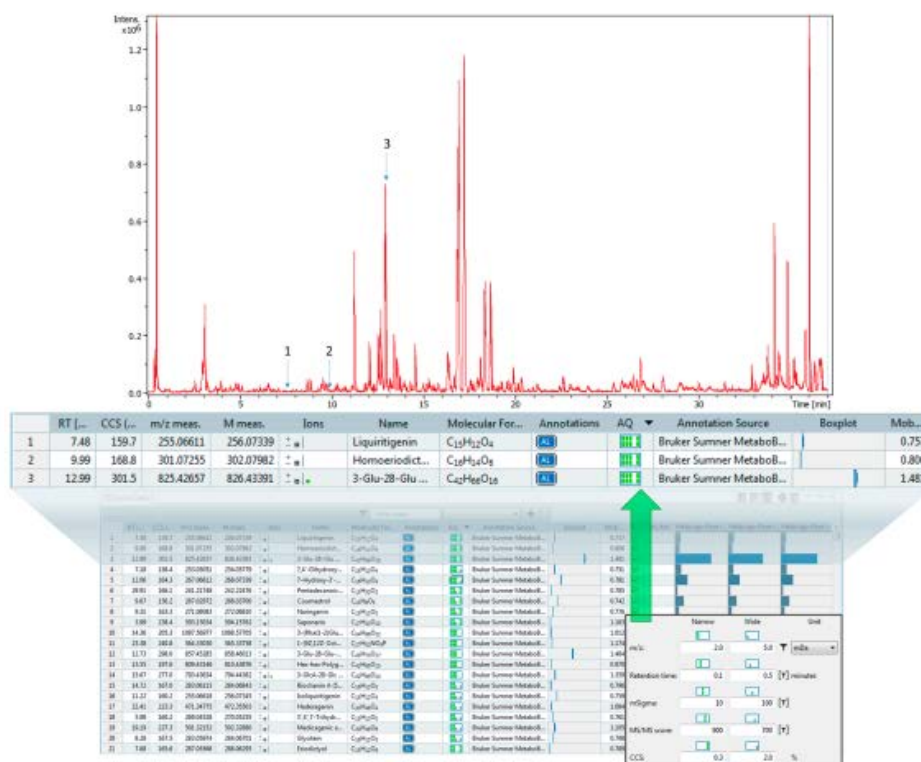


圖 11. 使用 MetaboScape 軟體的數據匹配報告範例

參考文獻：

1. Vasilopoulou, C. et al. Trapped ionmobility spectrometry (TIMS) and parallel accumulation - serial fragmentation(PASEF) enable in-depth lipidomics from minimal sample amounts. bioRxiv 654491(2019).

2. Meier, F. et al. Online parallel accumulation– serial fragmentation (PASEF) with a novel trapped ion mobility massspectrometer. Mol. Cell. Proteomics mcp.TIR118.000900 (2018).
3. Zhou, Z. et al. LipidCCS: Prediction of CollisionCross-Section Values for Lipids with High Precision to Support IonMobility-Mass Spectrometry-Based Lipidomics. Anal. Chem. 89, 9559–9566 (2017).
4. Meier, F. et al. Parallelaccumulation-serial fragmentation (PASEF): Multiplying sequencing speed and sensitivityby synchronized scans in a trapped ion mobility device. J. Proteome Res. 14, 5378–5387 (2015)
5. Mark, S et al. Generation of a Collision Cross Section Library for Multi-Dimensional Plant Metabolomics Using UHPLC-Trapped Ion Mobility-MS/MS. Metabolites 2020, 10, 13—29 (2020).



瀚盟科技
Integrated Scientific Services Group, Ltd.

電話：02-8797-7272 傳真：02-9797-7171
台北市內湖區內湖路一段91巷23弄1號2樓
網址：www.issg.com.tw