

三重四极杆上建立超过1000种脂质检测的方法应用于肝脏组织脂质组学的分析

Establishment Method of more than 1000 Lipids for Liver Tissue Lipidomics using LC-MS/MS

肖梦晴; 龙志敏; 郭立海

Xiao Mengqing; Long Zhimin ; Guo Lihai

SCIEX应用支持中心 (上海)

SCIEX Application and Support Center (Shanghai)

Keywords : Targeted Lipidomics, Mouse Liver, LC-MS/MS

引言

代谢组学是通过质谱手段对生物体内所有代谢物进行定性定量分析, 并寻找各种病理变化与差异代谢物之间的相关关系的研究。既可以靶向性的检测某一类的代谢物, 也可以非靶向性的进行广泛筛选, 无论是靶向研究还是非靶向研究, 代谢组学都十分有潜力作为辅助临床预测、诊断与治疗复杂疾病的手段。脂质组学作为代谢组学的一个分支, 研究的是脂质的类型、分布、功能等与其他生物分子的相互作用, 以及它们在生理代谢、病理状态时的动态变化。了解脂质的结构和功能, 进而可以揭示脂质代谢与细胞、组织、器官乃至集体的生理病理过程之间的关系。脂质代谢网络通过对生物功能动态的, 从而对生命体或细胞的生理性功能与病理性紊乱产生重要的影响。肝脏作为脂质含量最为丰富的组织, 其脂质种类及含量的检测具有十分重要的意义。

方法特点

1. 提供一套完整的样品前处理方法、液相方法和质谱方法, 与非靶向方法比无需进行定性分析;
2. QTRAP® 6500+系统具有高灵敏度的同时, 稳定性好, 重现性强, 只需一次进样, 正负切换检测所有脂质化合物。

样品前处理

1. 组织样本冷藏解冻, 在10倍稀释的PBS缓冲溶液中进行匀浆, 每1 mL缓冲液中加200 mg组织样本;
2. 内标冷藏平衡30 min, 若标品中有沉淀可在室温混合复溶;
3. 取225 μ l 甲醇, 加入20 μ l 样品组织匀浆液最大速度涡旋10 s, 加入750 μ l MTBE (甲基叔丁基醚), 最大速度涡旋10 S, 加入188 μ l 质谱级水, 涡旋20 s;
4. 加入20 μ l 内标混合液混合均匀;
5. 4摄氏度、15000转离心15 min, 取上清700 μ l (样本分三层, 上到下为脂质相、水相、固体残渣) 到新的EP管, 氮吹仪吹干上清;



6. 加入100 μL 复溶液回收脂质，复溶液包括异丙醇:乙腈:水（体积比30:65:5）。

仪器设备

ExionLC™ AD系统+ SCIEX QTRAP® 6500 LC-MS/MS系统

液相条件

色谱柱：Phenomenex Kinetex C18 (100mm \times 2.1 mm, 1.7 μm)

柱温：45 $^{\circ}\text{C}$

进样体积：1 μL

流动相：A为水；甲醇；乙腈（1:1:1）含5 mM乙酸铵，B为异丙醇含5 mM乙酸铵

流速：0.3 mL/min

梯度：见表1

表1. 液相梯度洗脱，液相总运行时间为17 min

Time (min)	%A	%B
0	80	20
0.5	60	40
3	40	60
13	2	98
13.1	80	20
17	80	20

质谱条件

SCIEX QTRAP® 6500 LC-MS/MS系统

离子源：ESI源；

扫描方式：MRM采集模式，正负切换扫描；

IS电压：5500 V（-4500 V）； 气帘气CUR：40 psi；

雾化气GS1：55 psi； 辅助气：55 psi；

离子源温度为350 $^{\circ}\text{C}$ ； 碰撞气：9 psi

各化合物质谱参数见表3

实验结果

1. 可检测到脂质种类情况

本方法中，在负离子模式下主要考察的是磷脂类和游离脂肪酸（FFA），其中磷脂类包含磷脂酸（PA）、溶血磷脂酸（LPA）、磷脂酰胆碱（PC）、溶血磷脂酰胆碱（LPC）、磷脂酰乙醇胺（PE）、溶血磷脂酰乙醇胺（LPE）、磷脂酰肌醇（PI）、溶血磷脂酰肌醇（LPI）、磷脂酰丝氨酸（PS）、溶血磷脂酰丝氨酸（LPS）；在正离子模式下，主要考察的是甘油酯类、胆固醇酯（CE）、神经酰胺（Cer）、糖脂（HexCer）、鞘磷脂（SM）和双单酰甘油磷酸酯（BMP），其中甘油酯类包含单甘油酯、甘油二酯和甘油三酯。正负离子模式下检测到的脂类化合物无提取离子流色谱图如图1、2所示；检测到脂类化合物具体分类见表2。

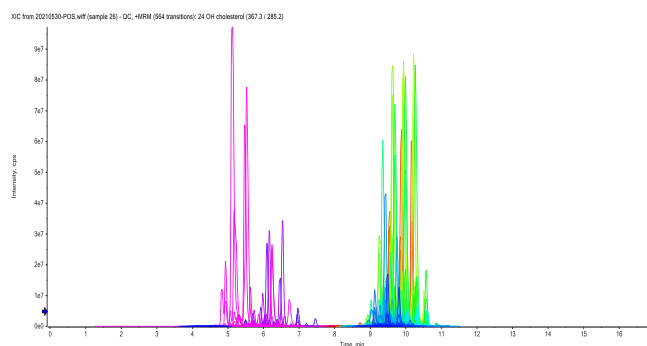


图1. 正离子模式下所有区脂类化合物的提取离子流色谱图

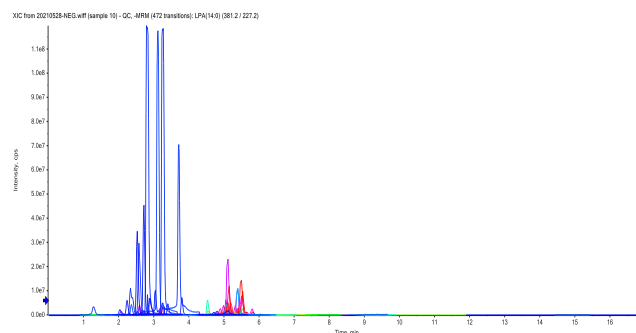


图2. 正离子模式下所有区脂类化合物的提取离子流色谱图

表2. 检测脂质分类、数目及检测模式

脂质类型	检测个数	检测模式
胆固醇酯	17	正离子
神经酰胺	13	正离子
糖脂	5	正离子
单甘油酯	7	正离子
甘油二酯	49	正离子
甘油三酯	443	正离子
鞘脂	23	正离子
双单酰甘油磷酸酯	7	正离子
磷脂酸/溶血磷脂酸	39	负离子
磷脂酰胆碱/溶血磷脂酰胆碱	88	负离子
磷脂酰乙醇胺/溶血磷脂酰乙醇胺	69	负离子
醚键磷脂酰乙醇胺	69	负离子
磷脂酰甘油/溶血磷脂酰甘油	65	负离子
磷脂酰肌醇/溶血磷脂酰肌醇	57	负离子
磷脂酰丝氨酸/溶血磷脂酰丝氨酸	65	负离子
游离脂肪酸	20	负离子

本方法主要通过靶向的MRM方法的建立，在保证高灵敏度的同时，覆盖肝脏组织中常见的所有的脂类化合物，共19类1226种脂类化合物，并且时间窗口多反应检测扫描（schedule MRM）的方法保证了每个化合物足够的扫描点数，本文中所有样本在该方法下共检测到脂类化合物996种，一针进样，正负切换扫描，17分钟可完成全部脂质化合物检测。

2. 方法重现性考察

本文中共检测36个样本，共6组，每组6个样本，每组样本之间插入QC样本，对6个QC样本进行RSD分析，正离子模式下检测到的所有脂类化合物中，RSD小于20%的脂质个数占91%（图3）；负离子模式下检测到的所有脂类化合物中，RSD小于20%的脂质个数占96%（图4），QC稳定性良好。

表2. 脂类化合物的质谱参数（部分）

No	Name	Q1	Q3	RT	DP	CE
1	CE(16:0)	642.6	369.4	10.03	80	25
2	CE(16:1)	640.6	369.4	9.66	80	25
3	Cer 34:0;2O(18:0;2O/16:0)	540.5	284.3	5.65	80	43
4	Cer 34:1;2O(18:1;2O/16:0)	538.5	264.4	5.46	80	43
5	HexCer 38:1;2O(18:1;2O/20:0)	756.6	264.4	5.79	80	43
6	HexCer 40:1;2O(18:1;2O/22:0)	784.7	264.4	6.25	80	43
7	DAG(14:0/14:0)	530.4	285.2	5.37	80	26
8	DAG(14:0/16:1)	556.5	285.2	5.51	80	26
9	MAG 16:0	313.2	239.2	6.07	80	25
10	MAG 16:1	311.2	237.2	5.70	80	25
11	SM(14:0)	675.5	184.1	4.53	80	43
12	TAG40:0-FA14:0	712.6	467.4	8.26	80	38
13	TAG40:0-FA16:0	712.6	439.4	8.30	80	38
14	BMP 36:2-FA 18:1_18:1	792.6	339.3	4.34	80	50
15	BMP 36:3-FA 18:1_18:2	790.6	339.3	4.20	80	50

No	Name	Q1	Q3	RT	DP	CE
1	LPA(14:0)	381.2	227.2	14.93	-80	-50
2	PA(14:0/18:1)	645.5	281.2	3.37	-80	-50
3	LPC(14:0)+AcO	526.3	227.2	1.93	-80	-43
4	PC(14:0/18:1)+AcO	790.6	281.2	5.19	-80	-50
5	LPE(16:0)	452.3	255.2	2.78	-80	-40
6	PE(14:0/18:1)	688.5	281.2	5.14	-80	-43
7	PE(O-16:0/18:1)	702.5	281.2	5.73	-80	-50
8	PE(P-18:2/22:6)	770.5	327.2	5.08	-80	-50
9	LPG(16:0)	483.3	255.2	9.53	-80	-50
10	PG(20:0/22:6)	849.6	327.2	4.76	-80	-50
11	LPI(16:0)	571.3	255.2	1.82	-80	-50
12	PI(20:0/20:4)	913.6	303.2	4.87	-80	-60
13	LPS(16:0)	496.3	255.2	2.78	-80	-50
14	PS(20:0/22:6)	862.6	327.2	4.76	-80	-50
15	FFA(14:0)	227.1	227.1	2.41	-80	-10
16	FFA(24:1)	365.3	365.3	4.76	-80	-10

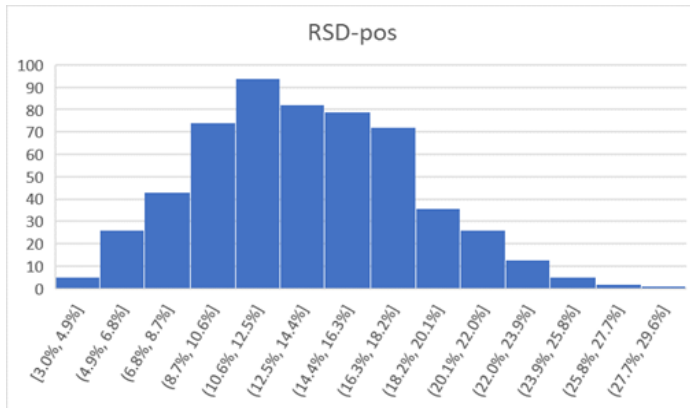


图3. 正离子模式下化合物QC样本重现性

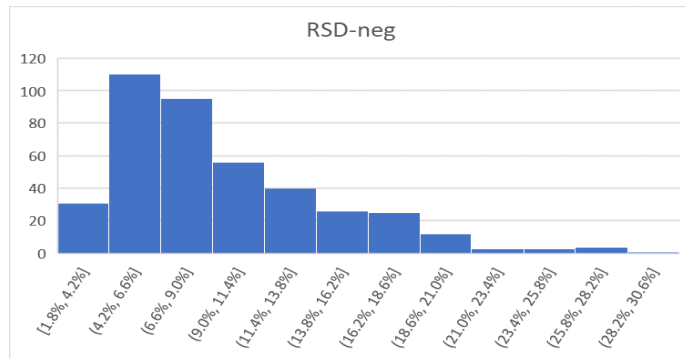


图4. 负离子模式下化合物QC样本重现性

小结

本文建立了肝脏组织中脂类物质的检测方法，检测肝脏样本中的脂质成分，在正负离子模式下，共检测19类1226种脂质，在实际肝脏组织检测中，共检测到996种脂类化合物；可通过正负切换的采集模式，一针进样可实现全部脂类化合物的检测，经过重线性验证，QC重现性良好。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2021 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-13568-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
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
全国咨询电话: 800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
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
官网: sciex.com.cn

广州分公司
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
官方微信: [SCIEX-China](https://www.sciex.com.cn)