

基于激光显微切割-液质联用技术的空间代谢组学分析完整流程

Comprehensive Workflow for Spatial Metabolomics based on Laser Microdissection-LC-MS/MS Method

查海红¹, 钟晨春¹, 龙志敏¹, 高天龙², 郭立海¹

¹ SCIEX中国应用支持中心; ² 徕卡生命科学

关键词: comprehensive workflow; spatial metabolomics; laser microdissection; ZenoTOF® 7600

引言

代谢组学作为系统生物学的分支, 主要定性定量分析生物体内所有代谢物的含量变化。代谢组学的研究更直观反映生物体的表型, 更有利于发现并解释疾病发生的机理。随着代谢组学研究技术的不断更新, 空间代谢组学应运而生, 满足大家探究更小单元的代谢物差异的需求, 比如单个细胞甚至细胞器的差异, 以及同一组织不同空间位置的差异。肿瘤是临床研究中最为关注的一个方向, 肿瘤器官中不同空间位置的肿瘤微环境是有差异的, 这些空间变异也会对临床预后和治疗产生深远影响。通过空间代谢组学能够解决代谢的时空异质性, 推动代谢领域向前发展, 并能应用到临床, 从而阐述体内系统代谢组学变化的机理。

传统代谢组学分析技术受样品空间分辨率以及分析灵敏度的限制, 无法精准获取靶向部位, 而对其中特异代谢物的差异表征就更加困难。近来, 激光显微切割技术 (Laser Microdissection, LMD) 作为组织微区组学分析前的原位采样技术, 受到了广泛认可, 利用这项技术可以将样品组织或细胞样品进行精确切割, 从而获得特定位点的多细胞或单细胞水平均一的样品 (图1)。后续结合高覆盖度和高灵敏度的液质联用检测技术, 将空间定位准确的微区样品进行全面准确的代谢组学分析。相比DNA和RNA, 细胞内的蛋白质和代谢物无法扩增, 组织微区内提供的用于分析的代谢物浓度低、体积小, 一些极为稀少的代谢物需要更加灵敏的检测方法。高分辨质谱ZenoTOF® 7600系统的Zeno™ trap技术可提供超过90%的占空比循环, 显著提升二级质谱灵敏度, 提供更加丰富的MS/MS数据, 进而提升信息覆盖率。

本文应用徕卡激光显微切割系统结合SCIEX的ZenoTOF® 7600质谱进行空间代谢组学分析, 对猪肺组织中感兴趣的区域进行了显

微切割, 经常现代谢组学前处理后, 使用高分辨质谱获得了超过390个代谢物定性信息, 作为一套完整的工作流程, 可为空间代谢组学相关研究方法提供理论依据, 为了解肿瘤发生发展机制, 以及为癌症的防御与治疗提供新的视角。

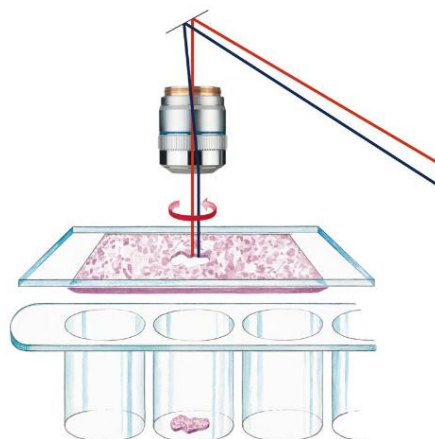


图1. 徕卡激光捕获显微切割采用移动激光的显微切割技术。徕卡显微系统采用高精度的光学部件并借助棱镜沿着组织上所需的切割线对激光束进行操纵, 可垂直于组织实施切割, 从而获得切割精确、无污染的分离体。

实验方法



激光显微切割样品包埋与制备：本次实验选取猪肺组织进行方法开发，切割的面积为40w平方微米，厚度为10微米厚，并在同一张切片选取三个重复区域以进行生物学重复采集与分析。包埋与切割流程如下：

取新鲜的猪肺组织，切成0.5cm左右的方块，放入低温冰箱速冻。1小时后取出，修剪成规则形状，用4度预冷的OCT包裹组织块，粘在冷冻切片机的样品托上，一起放入冷冻切片机冷冻。

切片时，低于室内温度-15℃~-20℃。切片过程中注意保持刀片和样品台干净，及时清理OCT和组织碎屑，减少OCT对组织的粘连。切下的组织用PET frameSlide膜片粘附，放在室温静置10分钟左右。放入LMD进行精确取样。

将制备好的肺组织切片样本置于激光显微切割载物台，接收端放置PCR管，其管盖用于分离体的接收。选择合适的切割面积，调节好相关参数后开始进行切割（图2）。切割完成后，小心将PCR管取出，由管底倒扣至管盖盖紧，防止管盖中收集的样品遗落。

因为粘附在膜片上的标本带有少量OCT，在取样时，分布收集了PBS清洗和未清洗的两组样品，每组3个重复，放入-80℃冰箱保存。

样品提取：装有样品的PCR管在vortex中振荡5s，由点甩小型离心机将微量样品离心至管底，小心打开管盖，加入50 μL提取液（甲醇:乙腈:水 2:2:1 v/v/v），振荡混匀，低温反复冻融三次，离心后将全部溶液转移至进样小瓶中待LC-MS/MS分析。

LC-MS条件：样品通过ExionLC™系统串联ZenoTOF® 7600系统进行代谢物鉴定分析。详尽分析条件列于表1、2和3。

数据处理：数据通过SCIEX OS 软件3.3中的定性、定量功能（点击“Analytics”）进行处理。

代谢物鉴定

组织中代谢物成分复杂多样，且有较多同分异构体，因此，仅有准确的高分辨一级无法对化合物进行确证。针对大量样本，SCIEX OS软件可自动进行峰提取和搜库，通过一级质量数、同位素丰度和二级碎片的匹配对样本中的代谢物进行鉴别（图3），使筛查流程快速准确。

实验结果

两组样本经过SCIEX OS处理后，在PBS未清洗的样本中共鉴定到400个化合物，在PBS清洗的样本中共鉴定到396个化合物，包括氨基酸类、核苷类、吡啶类、脂肪酸类等。从鉴定个数上，两种收样方式差别不大。于是，进一步比较了两种处理方式采集到的信号响应强弱，以及三个重复间的CV值（图4）。通过比较，PBS未清洗的样本检测的信号响应更高一些，且三个重复间的CV值

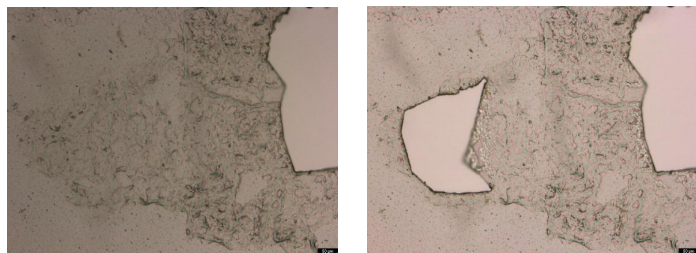


图2. 肺组织切片样本用于激光显微切割分离体制备。未进行切割分离的样品（左）；按需切割任意形状面积的样品（右）。

表1. 色谱条件

参数	数值
色谱柱	HSS T3, 100 × 2.1 mm, 1.8 μm
流动相A	含0.1% FA的水
流动相B	含0.1% FA的乙腈
流速	300 μL/min
柱温	40 °C
进样体积	10 μL

表2. 梯度条件

时间 (min)	流动相A (%)	流动相B (%)
0	99	1
1.5	99	1
13	1	99
16.5	1	99
16.6	99	1
20	99	1

表3. SCIEX 7500系统的质谱参数

参数	数值	参数	数值
气帘气	40 psi	源温度	550 °C
雾化气	55 psi	辅助气	55 psi
碰撞诱导解离气	7	离子喷雾电压	5500 V/-4500 V
去簇电压	60 V	碰撞能量	30 V

<30%的代谢物个数更多一些。总体比较下来，建议后续开展相关实验不需要用PBS清洗。

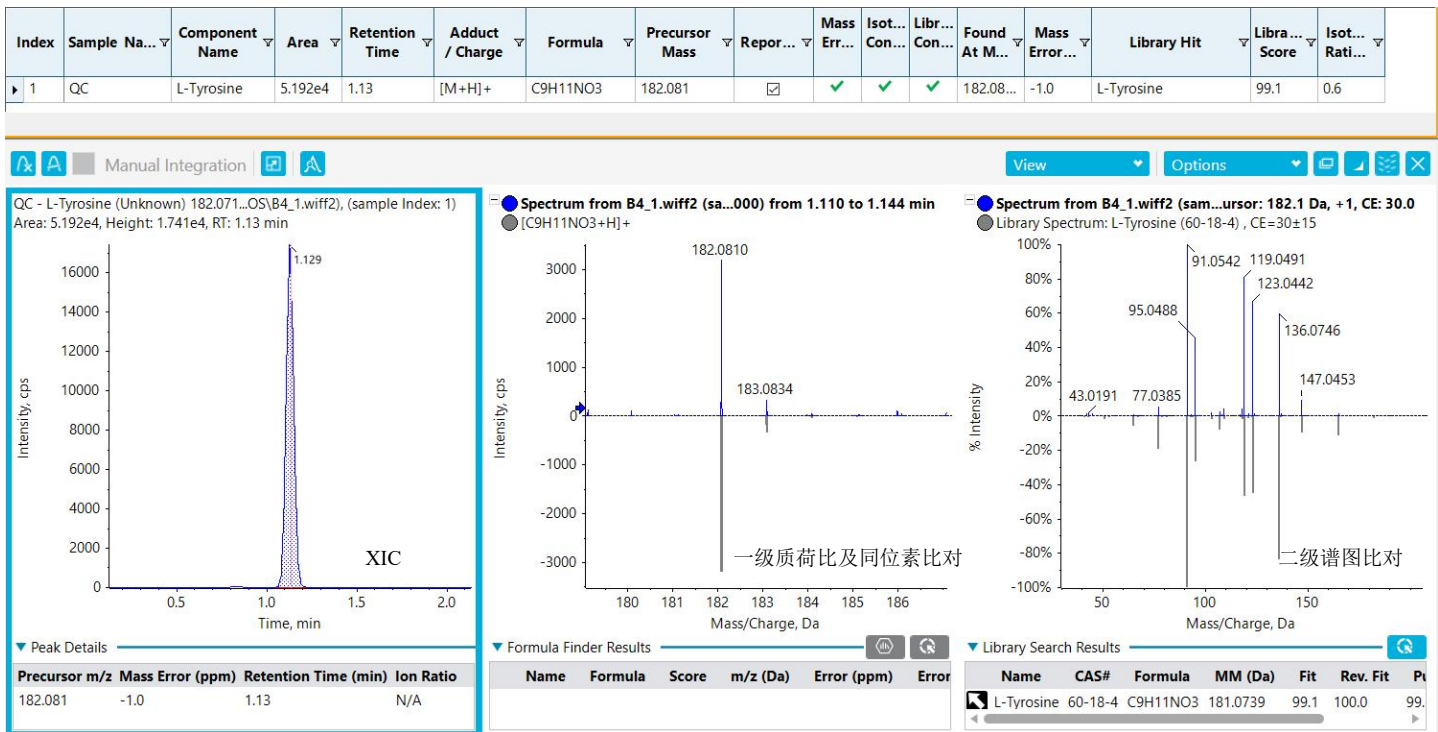


图3. 代谢物鉴定界面示例。以样本中鉴定到的酪氨酸 (Tyrosine) 为例, 酪氨酸分子式为C₉H₁₁NO₃, 检测到的MS信号与理论质荷比相比, 质量数偏差为-1.0 ppm, 同位素丰度比与理论值偏差为0.6%, MSMS与代谢物库中酪氨酸的标准谱图匹配度为99.1, 以此可判定鉴定到的信号为酪氨酸。

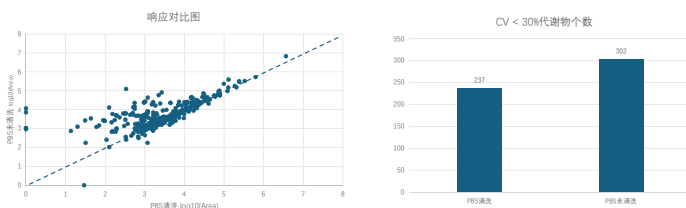


图4. PBS清洗与未清洗样品比较。左图为两种处理方式鉴定到的所有代谢物响应比较图, 虚线上方表示未清洗样品含量更高, 下方表示清洗样品含量更高; 右图为两种处理方式的CV<30%的代谢物个数。

小结

通过对组织切片进行激光显微切割获取空间定位准确的微量样本, 并与SCIEX ZenoTOF® 7600系统相结合, 实现微量组织样品的全面表征以及高灵敏度组学分析。

- 徕卡激光显微切割系统使用“光束移动切割”技术, 进行高精度的直接、实时地切割, 可以理想地切割任何类型、大小或形状的组织, 保证了微量样本的高通量精确获取。
- 通过不同前处理方式的比较, 建议在样品收集过程中不用PBS清洗, 保障更多的样品信息获取。
- 可将此套完整方案流程应用于其他组织切片样本, 助力空间代谢组学研究的开展。

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. 或在美利坚/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2024 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-33006-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: 021-2419-7201
传真: 021-2419-7333
官网: sciex.com.cn

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话: 020-8842-4017

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