Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

非数据依赖 MALDI 成像技术 HDMS^E：直接单一组织切片中的脂类进行可视化分析和鉴定

Emmanuelle Claude、Mark Towers和Kieran Neeson
沃特世公司，英国曼彻斯特

方案优势

- 根据高精度的准确分子量、碎片离子信息以及空间关系进行脂类的鉴定——所有信息通过一次实验获得
- MALDI成像实验中的平行碎裂法使组织切片样品中的所有可检测到的脂类化合物均可进行结构鉴定。
  - 从珍贵的组织切片中最大限度地获取信息。
  - 简单易用的采集方法减少了设计MS/MS方法的操作。
- 采集到的非目标性数据集为组织样本提供了信息丰富的电子档案，可以在将来对样本中的新化合物进行检测和鉴别。即首先获取数据，然后再提出与数据相关的生物学问题。

沃特世解决方案

MALDI成像高清质谱（HDMS^E）

MALDI SYNAPT™ G2-S HDMS

关键词

MALDI成像，高分辨率组织成像，非数据依赖性质谱数据采集，DIA，HDI，鉴别，脂类，HDMS^E

引言

质谱（MS）领域的最新进展已帮助实现了同时分析化学结构相似以及化学结构各异的脂类，并激发了脂类组学的研究热潮。然而，当我们使用传统的分析方法时，脂类在组织微结构上的空间定位信息通常会丢失，这将丢失与来源和生物功能相关的珍贵信息。

质谱成像（MSI）可以将整个组织切片内的脂类化合物的位置显示出来。第一步一般是非靶向质谱分析实验，使大量的化合物能够同时被检测和定位。接下来是对检测出的脂类化合物进行结构鉴定。但是，由于这一步使用单个或连续多个组织切片，包含对所选组分进行一系列手动的多级质谱采集操作，因而可能需要耗费大量的时间。

这里介绍的是非数据依赖的基质辅助激光解吸电离（MALDI）成像采集法，又称为MALDI成像高清质谱（HDMS^E），实现了在一次分析运行中对脂类化合物进行检测和鉴定。这种独特的方法在一个实验内同时提供MS以及MS/MS信息，不需要选择前体离子。数据采集后，MS前体离子和MS/MS碎片离子根据离子淌度分离的漂移时间和空间分布进行关联，因此，对每个可检测的化合物都具有丰富的数据信息。

实验条件

样品制备

厚度为30μm大鼠全身矢状组织切片固定在隐形修补胶带上。隐形修补胶带使用解剖刀切割，使用双面胶带固定沃特世MALDI标靶。使用SunCollect（SunChrom公司）雾化喷雾设备将5 mg/mL的α-氰基-4-羟基肉桂酸（CHCA）基质溶液均匀液涂在样品上，涂抹数层。

方法条件

质谱条件

质谱仪：	MALDI SYNAPT G2 HDMS
模式：	正离子
质量范围：	100~1000 Da
Transfer池碰撞电压：	低能量：4ev
高能量：	50ev
激光：	1 KHz固态钕：YAG激光（λ = 355 nm）
空间分辨率：	200μm（横向）

数据管理

得到的原始数据随后使用HDI MALDI高精度成像软件进行处理，通过该软件对低碰撞能量和高碰撞能量的质谱数据整合在一个.txt文件中输出。仅考虑脂类特有的有限漂移时间范围（100~160淌度bins）。

使用SimLipid 3软件(PremierBioSoft, US)和LipidMaps MS tools(http://www.lipidmaps.org/tools/index.html)进行脂类的结构鉴定。

结果与讨论

质谱离子源中产生的离子经过Triwave®区域的四极杆（无需前体选择），如图1所示。根据离子的大小、形状和电荷（即离子淌度，IM），离子被迅速分离（20~50 msec），更好地实现了同分异构体成分的分离和检测[1]。经过离子淌度分离后，离子进入TRANSFER T-Wave™碰撞池。在该碰撞池内，施加低碰撞能量获得前体离子质谱图（脂类的完整分子信息）；施加高碰撞能量则获得MS/MS二级质谱图（脂类的碎片信息）。低能和高能等频快速切换，既可以在同一像素上（空间分辨率最大化）实现，也可以在连续的像素上（灵敏度最大化）实现。低能前体质谱信号可能与相关的高能碎片相关，这是因为在离子淌度分离中，它们具有相似的漂移时间值，如图1所示。随后，使用HDI MALDI高精度成像软件对数据进行处理，其中，由低能量操作和高能量操作得到的数据是检测到的排列好的峰。然后，根据漂移时间和前体与碎片之间位置进行一次两步法关联。

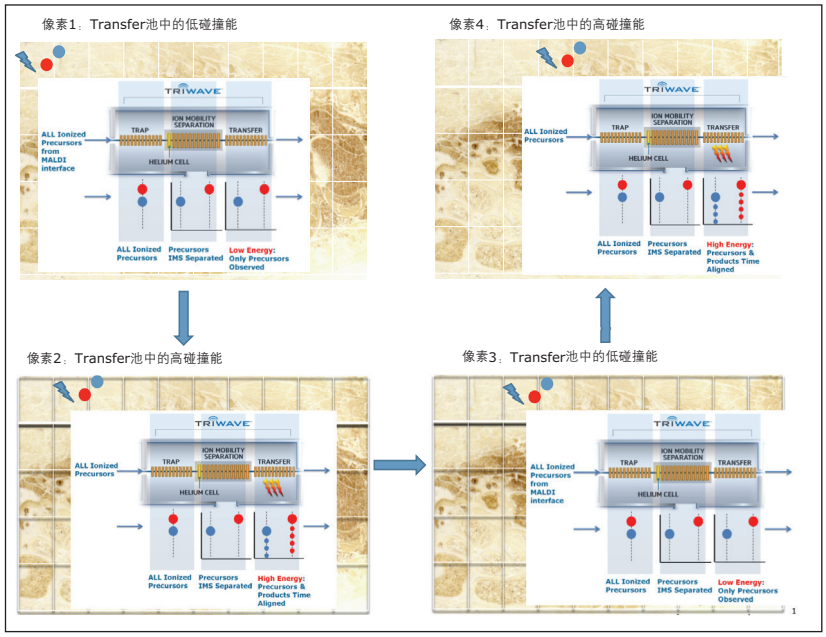

图1 MALDI成像高清质谱（HDMS^E）实验图示。

HDI高精度成像软件的用户界面和处理数据的显示见图2。从这里看出，由这两种操作得到的峰列表、质谱和离子图像以交互的方式整合到一起。同时还包括将漂移时间的二维点状图和质荷比（m/z）点状图，以便增强可视水平和峰选择（蓝点表示低能信息，绿点表示检测离子的增强峰）。

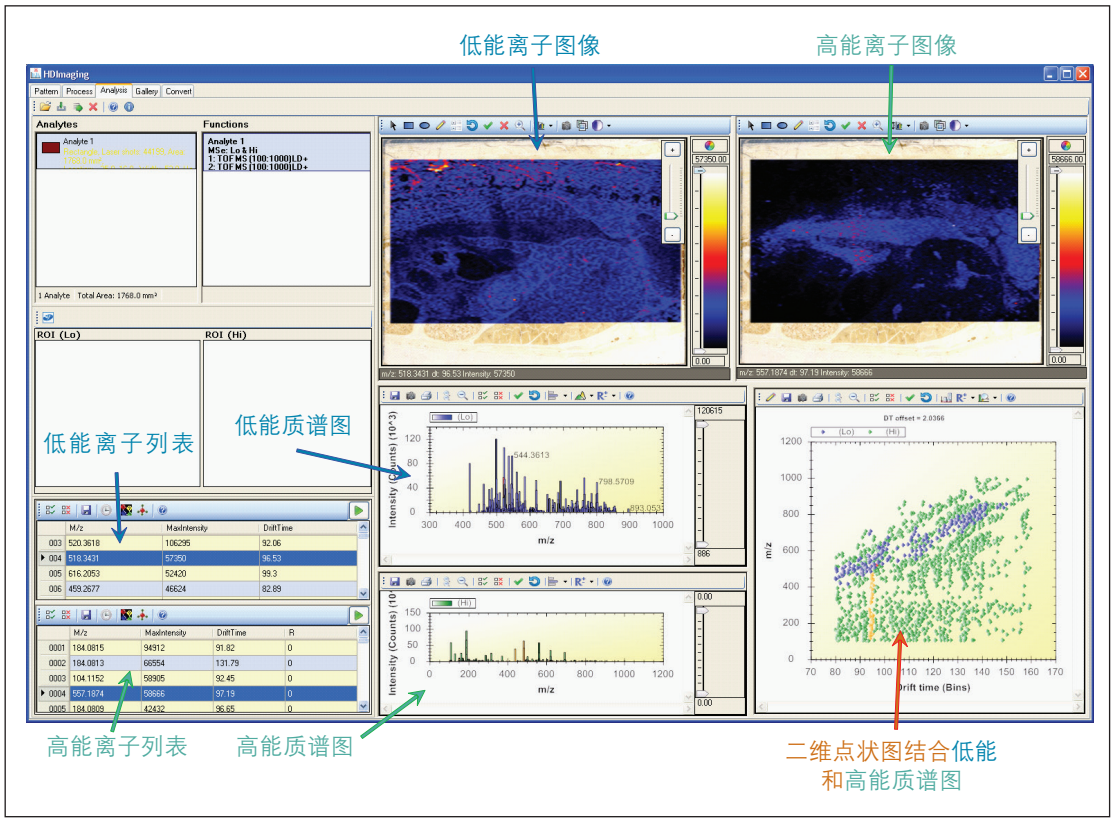

图2 使用高精度成像DHI软件处理的数据的MALDI高精度质谱成像（HDMS^E）图像。

MALDI高精度质谱成像（HDMS^E）显著的优点是对于每个可检测的分子离子都能够获得前体母离子和碎片离子信息。根据在离子淌度池内离子漂移时间的相似性进行初步关联。但是，分析脂类样品有一个巨大的挑战：在有限的质量范围和漂移时间范围内存在大量的脂类化合物，常常会发生碎片离子与前体母离子的归属产生错误，这种情况可以通过碎片离子和前体母离子空间分布的相似性进行第二步关联来改善。

碎片离子与其对应的前体母离子之间的两步关联操作的流程如图3所示。比如， m/z 760.6的脂前体母离子被选到HDI窗口顶部，在质荷比和点状图中，漂移时间相关的碎片离子以橙色点表示。接受漂移时间关联的结果后，108个潜在的碎片通过漂移时间关联至这个特殊的脂类前体离子上，如中间窗口所示。下一步即为空间关联。当使用0.3~1.0的关联因子时，潜在碎片的数量降低至39个，如底部窗口所示。

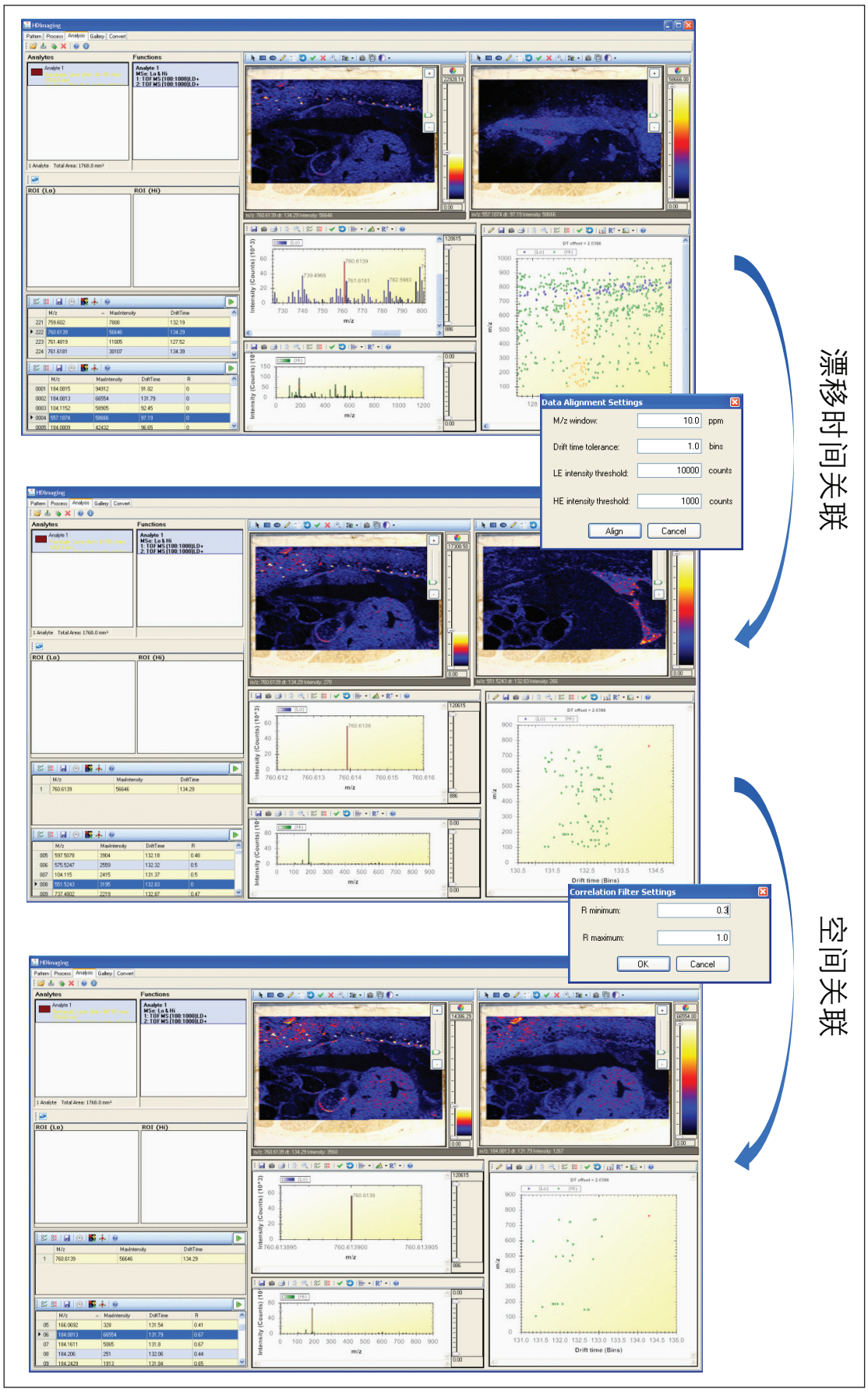

图3 两步关联操作流程。顶部图像显示与前体离子（m/z 760.0）进行漂移时间关联的处理数据。中间图像仅显示与前体离子（m/z 760.6）进行漂移时间关联的处理数据。底部的图像显示的是空间关联的碎片离子（关联因子为0.5~1.0）。

由两步关联法得到的结果被导入到SimLipid 3进行脂类鉴定。这里，在鉴定到m/z为798.5的脂类后，母离子经lockmass校准。在这种情况下，质荷比为760.5859的脂类被鉴定为PC（16:0/18:1）H^+或者带有碎片离子m/z 478.3301（M-18:1-H_2O）和496.3404（M-18:1）的PC（18:1/16:0）H^+。标注的串联色谱图表示在图4中。

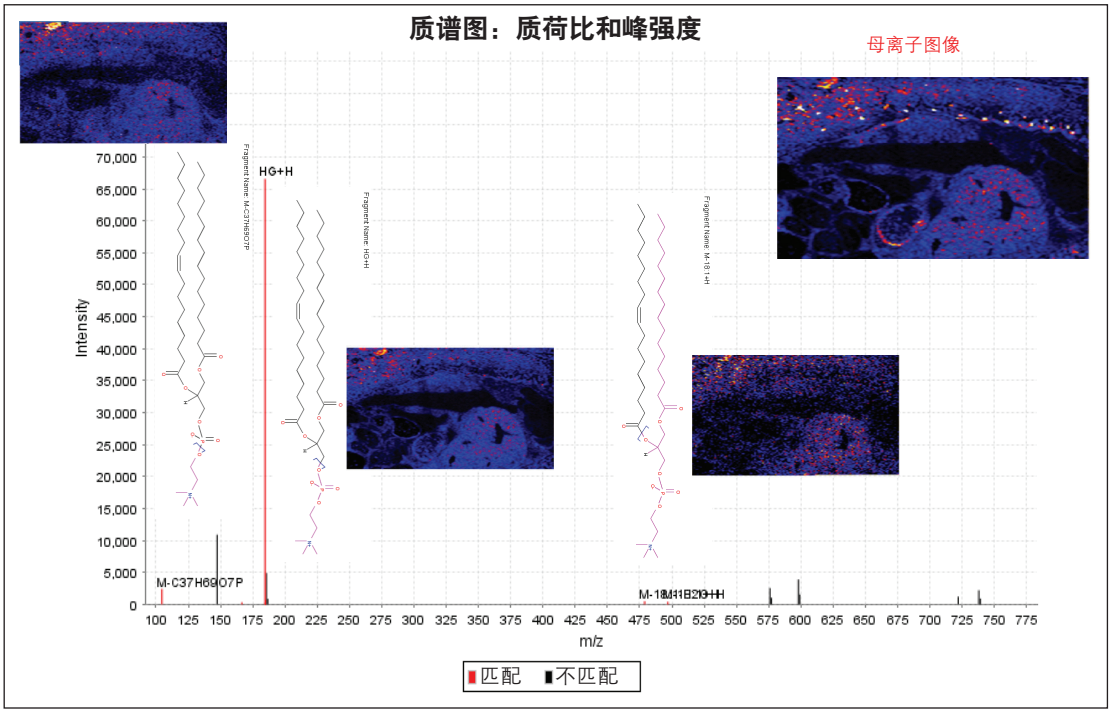

图4 由SimLipid 3得到的串联质谱图，显示出碎片结构和离子图像。

利用两法关联法数据处理过程以及得到的高精度准确质量，从单一一张MALDI高精度质谱成像（HDMS^E）实验中能够鉴定到20多脂类化合物，其结果汇总在表1中。

质荷比测量值	质荷比理论值	脂类命名		ppm
713.4543	713.4524	PA（14:0/20:1）或PA（20:1/14:0）	K+	2.7
721.4794	721.4803	PA（20:4/18:2）或PA（18:2/20:4）	H+	-1.2
721.4794	721.4803	PA（18:2/18:1）或PA（18:1/18:2）	Na+	-1.2
723.4948	723.4941	PA（18:1/18:1）	Na+	1.0
725.5581	725.5573	SM（d34:1）	Na+	1.1
734.571	734.57	PC（13:0/19:0）或PC（19:0/13:0）	H+	1.4
737.4536	737.4524	PA（14:1/22:2）或PA（22:2/14:1）	K+	1.6
739.4694	739.4674	PA（36:2）	K+	2.7
741.483	741.4831	PA（36:1）	K+	-0.1
741.5323	741t.5313	SM（d18:1/1 6:0）	K+	1.3
745.478 8	745.4786	PG（P-16:0/16:0）	K+	0.3
756.4964	756.4946	PE（12:0/22:1）或PE（22:1/12:0）	K+	2.4
756.4964	756.4946	PC（19:1/12:0）或PC（12:0/19:1）	K+	2.4
758.5706	758.57	PC 34:2	H+	0.8
760.5859	760.5856	PC（16:0/18:1）或PC（18:1/16:0）	H+	0.4
780.5527	780.5543	PC（16:0/20:5）或PC（20:5/16:0）	H+	-2.0
782.5695	782.5694	PE（19:0/20:4）或PE（20:4/19:0）	H+	0.1
796.5285	796.5259	PE-Nme（18:1/18:1）	K+	3.3
798.5415	798.5415	PC（14:0/20:1）或PC（20:1/14:0）	K+	0.0
820.528	820.5259	PE（17:2/22:2）或PE（22:2/17:2）	K+	2.6
824.5598	824.5572	PC:36:2	K+	3.2
826.573	826.5727	PE（P-20:0/22:6）	Na+	0.4
832.5842	832.5832	PE（20:4/21:0）或PE（21:0/20:4）	Na+	1.2
835.6686	835.6669	SM（d18:1/24:1）或SM （d24:1/18:1）	Na+	2.0

表1 两步关联后由MALDI高精度质谱成像（HDMSE）实验鉴定到的脂类化合物列表

结论

- 本文介绍了一种新的非数据依赖MALDI高精度质谱成像（HDMSE）实验，从单一一张组织切片MALDI成像实验中一次分析能够同时获得前体母离子和碎片离子的信息。
- 通过基于漂移时间和空间分布的两步关联法，HDI软件能够将碎片离子与前体母离子进行可靠且高度特异性的关联。
- 通过一次非目标性MALDI成像实验能够鉴定脂类化合物，而通过利用高精度准确质量的质谱数据和两步关联法（漂移时间和空间位置），即可实现直接从非目标数据集中进行脂类的结构鉴定。

参考文献

1. Triwave – More Complete Characterization of Mixtures and Molecules. Waters Corporation. 2012; 720004176en.

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Waters和Triwave是沃特世公司注册商标。MALDI SYNAPT、HDMS、T-Wave和The Science of What's Possible是沃特世公司商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

©2012年 沃特世公司。印制于美国。
2012年10月 720004471ZH AG-PDF

沃特斯中国有限公司
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
成都：028 - 6554 5999
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com