



# 정성 Flux 분석을 위한 Agilent MassHunter VistaFlux

## 기술 개요

### 도입

대사체학이란 대사체의 존재비를 측정하여 생물학적 시스템을 이해할 수 있는 효과적인 기법이지만, 데이터 해석은 동적(dynamic) 정보의 부족으로 종종 복잡해집니다. 예를 들어, 대사체 존재비의 증가는 생산이 증가(경로가 상향 조절됨)했기 때문일 수도 있고, 또는 소비가 감소(경로가 하향 조절됨)했기 때문일 수도 있습니다. 이와 유사하게, 경로를 거치는 Flux의 유의한 변화가 대사 중간체의 존재비를 변화시키지 않을 수도 있습니다. 안정 동위원소 추적은 대사체의 상호 변환에 대한 동적 정보를 제공함으로써 이러한 상황을 해결하고 생물학적 시스템을 더 깊이 이해하도록 도와줄 수 있는 엄청난 잠재력을 가지고 있습니다. 정성 Flux 분석은 이러한 반응의 상대적 속도를 집중적으로 다룹니다.

정성 Flux 분석에서는 생물학적 시스템에 안정 동위원소 추적자(stable isotope tracer, 일반적으로  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  또는  $^2\text{H}$  등을 포함)를 도입하여 다운스트림 대사체의 자연 동위원소 패턴을 변화시킵니다. LC/MS 분석 후, 로컬 대사 Flux는 알려진 대사 경로로부터 도출한 표적 성분 목록을 이용하여 데이터를 마이닝함으로써 조사할 수 있습니다. 동위원소 조성만 다른 대사체인 동위원소체를 각 표적 화합물에 대해 측정하여, 이 정보를 대사 Flux 추적에 사용합니다.

정성 Flux 분석에는 표적 대사체 마이닝, 동위원소체의 처리, 자연 발생 동위원소 존재비의 보정 및 생물학적 전후 관계에서의 결과 시각화와 같은 여러 가지 분석적 난점이 존재합니다. Agilent MassHunter VistaFlux는 이런 난점을 해결하도록 고안된 소프트웨어로서, Agilent TOF 기반의 고분해능 LC/MS 시스템의 MS-only 데이터에 대한 정성 Flux 분석 솔루션으로 설계되었습니다(그림 1). 본 기술 개요에서는 정성 Flux 분석을 위한 MassHunter VistaFlux의 사용법을 소개합니다.



## 표적 대사체 목록 생성: Pathways to PCDL 및 PCDL Manager

Agilent MassHunter Pathways to PCDL 소프트웨어(그림 2)는 BioCyc, KEGG 및 WikiPathways와 같이 널리 사용되는 데이터베이스 내에 포함된 경로 정보에 존재하는 대사체로부터 애질런트 맞춤형 PCDL(개인 화합물 데이터베이스 및 라이브러리)을 쉽게 생성하도록 설계되었습니다. 더 복잡한 생물학적 네트워크를 조사하기 위해 여러 경로를 선택할 수 있습니다. Agilent METLIN PCDL과 같은 마스터 데이터베이스를 참조할 경우, 참조 데이터베이스의 모든 화합물 정보(머무름 시간, MS/MS 스펙트럼, 화합물 ID, 구조)가 맞춤형 PCDL에 포함됩니다.

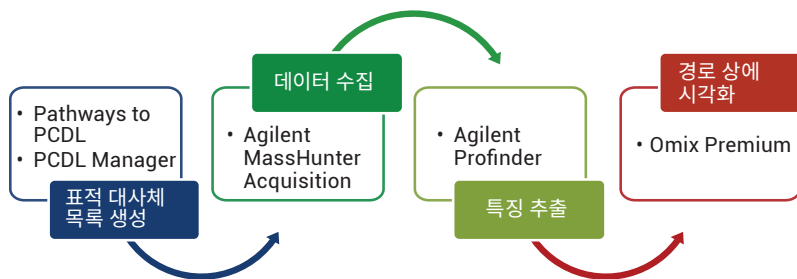


그림 1. Agilent MassHunter VistaFlux 솔루션

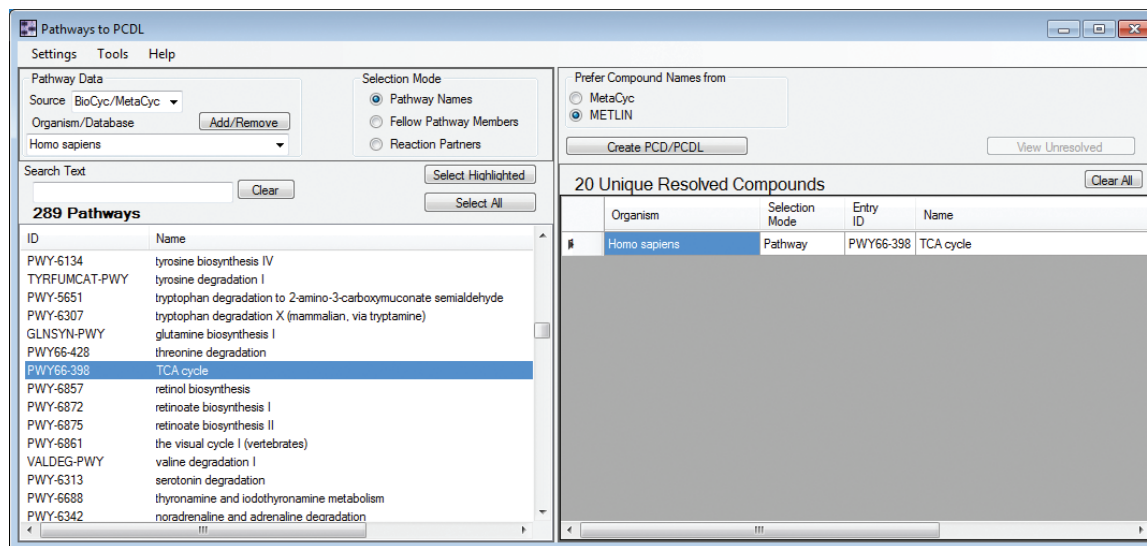


그림 2. Agilent MassHunter Pathways to PCDL에서 경로 기반 표적 대사체 목록의 생성

이렇게 생성한 PCDL은 Agilent MassHunter PCDL Manager에서 검토하고, 편집할 수 있습니다(그림 3). 예를 들어, 실험에서 검출되지 않거나 실험과 관련이 없는 대사체는 삭제할 수 있고, 추가 화합물은 PCDL에 첨가할 수 있습니다. 표적 동위원소체 분석의 경우에는, 모든 대상 화합물에 대한 머무름 시간을 마스터 데이터베이스에서 가져오거나 추가해야 합니다. 이렇게 작성된 맞춤형 PCDL은 Agilent MassHunter Profinder 소프트웨어를 사용하여 LC/MS 데이터의 동위원소체 표적 마이닝을 지시하는 데에 사용할 수 있습니다.

### 데이터 수집: Agilent MassHunter Acquisition

표적 데이터 분석은 머무름 시간을 이용하여 대사체를 식별하므로 안정적인 LC 분석법은 배치(batch) 처리시 매우 중요합니다. 이성질체 대사체를 분리하는 것 외에도, 동위원소체가 중첩될 수 있는 대사체에 대한 적절한 크로마토그래피적 분리도 중요합니다. 동위원소의 간섭이 동위원소체 추출과 결합 결과의 정확도에 영향을 줄 수 있기 때문입니다. 크로마토그래피 분리는 더 느린 그레디언트, 더 긴 컬럼 및 더 작은 입자의 고정상을 사용하여 향상시킬 수 있습니다.

MassHunter Profinder는 중심값 또는 프로파일 데이터를 처리할 수 있지만, 고급 알고리즘 기능이 프로파일 스펙트럼에 제공된 추가 정보 내용을 사용하기 때문에 후자(프로파일 데이터)가 더 나은 결과를 제공합니다. Agilent TOF 시스템의 내부 참조 질량 기능은 대규모 시료 세트에 걸쳐 질량 정확도를 유지하여, Profinder가 유사한 질량을 가진 동시용리 화합물과 대사 동위원소체를 정확히 구별하는 데에 중요합니다. 안정 동위원소 결합은 대사체에서 다양한 속도로 발생하기 때문에 모든 관심 대상 동위원소체를 적절히 검출하기 위해서는 분석할 시료의 양을 증가시킬 필요가 있습니다.

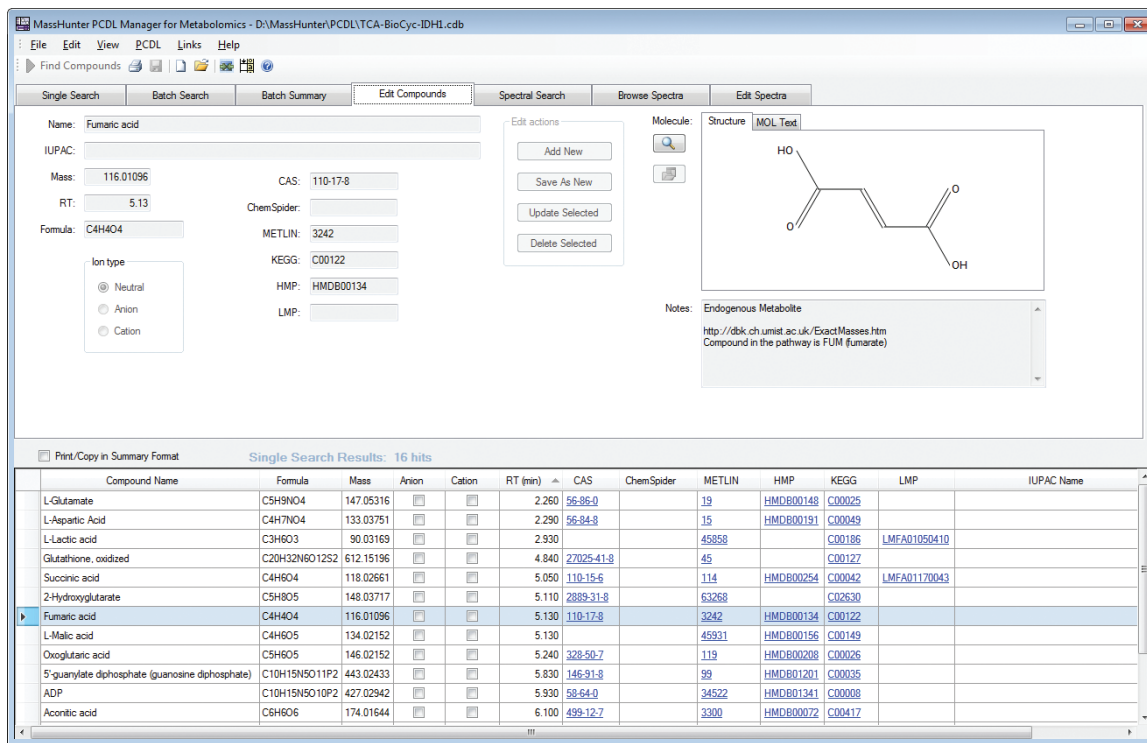


그림 3. PCDL Manager에 표시된 표적 대사체 목록

## 표적 대사체에 대한 동위원소체 추출: MassHunter Profinder

MassHunter Profinder는 대사체 동위원소체 결합의 품질 검토 및 시각화를 제공하는 질량 분석 데이터를 빠르게 배치(batch) 처리하는 소프트웨어입니다. 안정 동위원소 결합은 다양한 관심 대상 화합물에서 다양한 속도로 발생하여 검출된 동위원소체의 분포가 시간에 따라 변화할 것으로 예상되기 때문에, 시간 경과 연구를 자주 수행할 필요가 있습니다. MassHunter Profinder는 이러한 연구의 분석 및 검토를

편리하게 하도록 설계되었습니다. 이 소프트웨어는 반복 데이터 파일의 그룹화, 화합물 정렬, 다중 크로마토그램 오버레이, 시료 그룹별 색상, 피크의 수동 적분 및 결과 내보내기를 제공합니다.

MassHunter Profinder의 동위원소체 배치 추출 알고리즘<sup>1</sup>은 대사체 표적 목록(.CDB)을 이용하여 대사체 화학식을 기초로 가능한 모든 동위원소체를 추출합니다. 추출을 위한 주요 사용자 설정에는 안정 동위원소 라벨링, 라벨링 순도, 질량 허용 오차 및 머무름 시간 허용 오차가 있습니다.

추출 후, MassHunter Profinder는 배치에서 화합물 요약 표, 화합물 추출 이온 크로마토그램, 화합물 질량 스펙트럼 및 각 LC/MS 파일에 대한 동위원소체 정보를 각 대사체에 대해 표시합니다(그림 4). MassHunter Profinder에서는, 동위원소체 정보를 자연 동위원소 존재비에 대해 보정할 수 있고, 절대 또는 상대 존재비로 표시할 수 있습니다.

배치 처리 후, MassHunter Profinder는 경로 시각화 및 생물학적 해석을 위해 배치 처리 결과(.PFA 형식)를 Omix Premium으로 쉽게 내보냅니다.

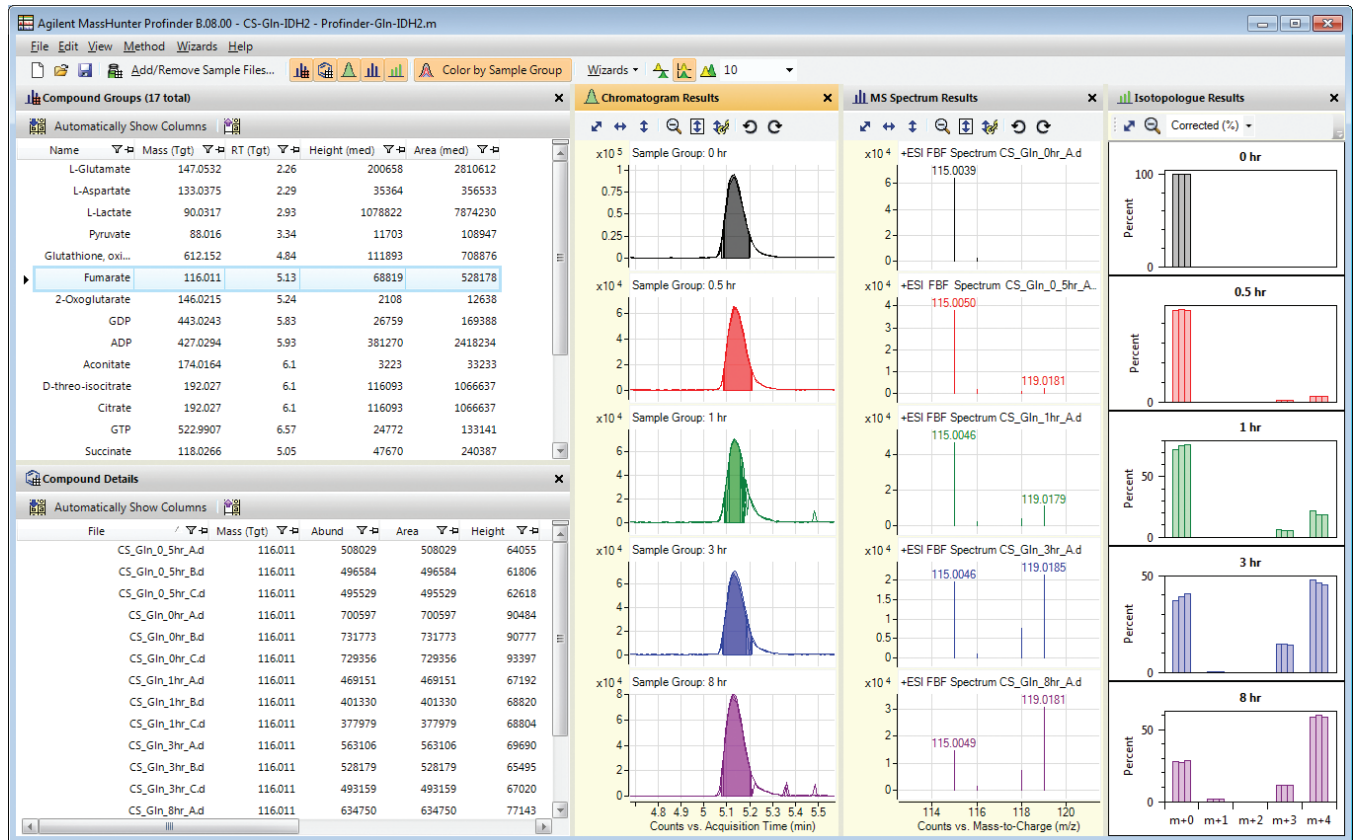


그림 4. TCA 회로를 대상으로 한 <sup>13</sup>C 라벨링 시간 경과 연구의 Agilent MassHunter Profinder 결과 요약

## 경로에 동위원소체 결과 시각화: Omix Premium

Omix Premium은 MassHunter Profinder 결과를 빈틈 없이 가져오도록 설계되었고, .PFA 배치 내보내기 형식은 Omix Premium이 경로 지도의 flux 데이터를 쉽게 시각화하는데 필요한 모든 정보를 포함하고 있습니다. 여기에는 시료 그룹 정보, 화합물 ID 및 동위원소체 존재비가

포함됩니다(그림 5). Omix Premium은 BioCyc 및 KEGG와 같이 널리 사용되는 데이터베이스에서 경로를 가져오거나, 경로를 수동으로 생성할 수 있습니다. 여러 경로를 추가하고 연결하거나, 사용자가 경로를 수정할 수 있습니다. Omix Premium의 경로 원천은 MassHunter Profinder 결과를 올바르게 매핑하기 위해 표적 대사체 PCDL에서 사용된 ID 정보와 일치해야 합니다.

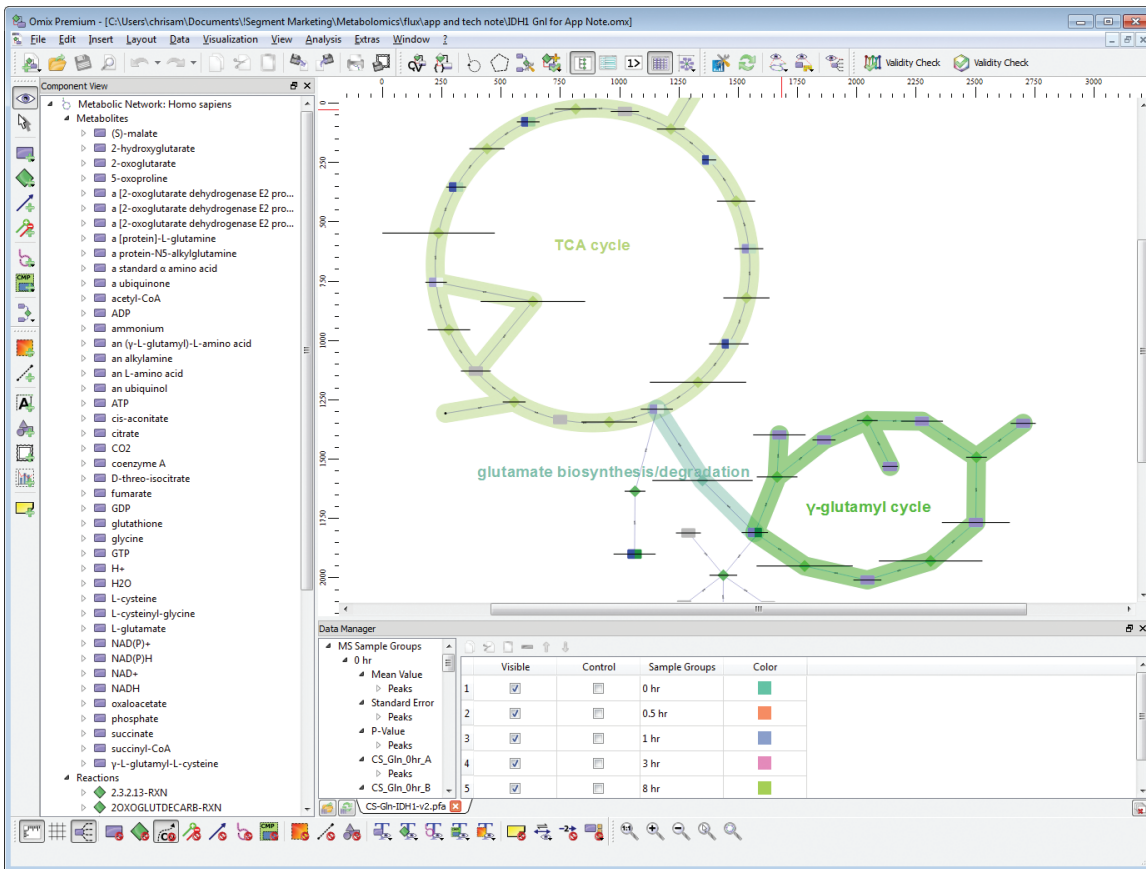


그림 5. 시료 그룹 정보가 가져온 .PFA 배치(batch) 결과 파일에 포함되어 있음을 보여주는 Agilent MassHunter Profinder 결과의 Omix Premium 화면

Omix Premium을 통해 사용자는 경로 다이어그램에 다양한 정보를 선택적으로 표시하여 시각적 표현을 맞춤화할 수 있습니다. 예를 들어, 그림 6A와 그림 6B는 TCA 회로에서 fumarate 노드에 대한 몇 가지 선택적 결과 시각화를 보여줍니다. 그림 6A에서, 콰트 도표는 y 축의 시점 결과, x 축의 동위원소체, 채워진 색상 강도에 따른 상대 존재비 및 상자 내 기호별 통계적 유의성을 나타냅니다(및 \*는 각각  $p < 0.005$  및  $p < 0.05$ 를 나타냄). Fumarate 노드는 음영 처리를 통해 왼쪽에 전체 대사체 존재비를 요약하고, 오른쪽에 안정 표지 결합 퍼센트를 색상 그래디언트로 요약합니다. 그림 6B는 fumarate 상자가 검출된 다른 대사체에 대한 이 대사체의 존재비를 나타내기 위해 색깔로 처리된 것과 동일한 결과를 나타냅니다. 동위원소체 도표는 이러한 특정 실험에서 수집된 다양한

시점별로 얻을 수 있습니다. 에러바는 반복 측정에서 관측된 표준 편차를 나타냅니다. 이 도표는 MassHunter Profinder의 동위원소체 화면과 유사하며, 동위원소 결합의 백분율을 추정하기에 더 나은 보기를 제공합니다. 두 가지 옵션 모두 M+4 동위원소체가 시간이 흐르면서  $^{13}C$  추적자에 의해 점점 더 표지됨에 따라 M+0 동위원소체가 감소한다는 것을 분명히 알려줍니다.

ATP 및 ADP와 같은 일부 대사체는 어디에나 있으면서 안정 동위원소 추적자에 의해 표지되지 않지만, 측정된 존재비가 전체 세포 농도를 나타내며, 여전히 전체 실험의 해석을 위한 유용한 정보를 제공합니다. 이러한 화합물의 대사체 노드는 동일한 주석 및 데이터 시각화 옵션과 함께 특정 경로에 포함하거나 분리하여 보여줄 수 있습니다.

시간 경과 연구는 대사의 유동성을 포착하는 데 매우 중요합니다. Omix Premium은 시간 경과에 따른 결과를 더 쉽게 해석할 수 있는 정적 및 동적 시각화를 제공합니다(그림 7). 이 애니메이션은 동위원소 결합을 노드 채우기로 보여주는 옵션을 포함하며, 쉽게 녹화하여 동영상 파일로 만들 수 있습니다.

정적 및 동적 경로 시각화를 모두 사용하면, 실험 결과를 해석하고 설명하기가 쉽습니다. Omix Premium 시각화 결과는 출판, 발표 또는 보고서용 도표로 내보낼 수 있습니다.

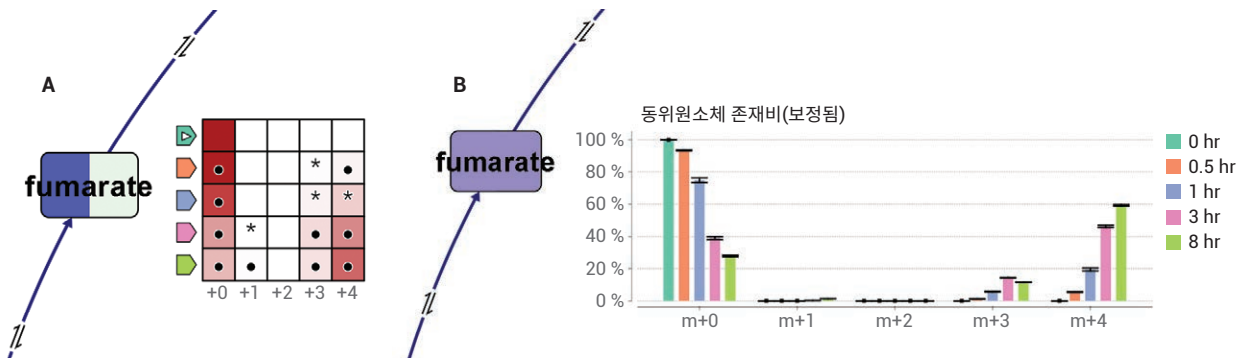


그림 6. A) Fumarate에 대한 동위원소체 존재비의 콰트 도표 보기. B) 더 자세한 결과를 제공하는 상대 보정된 동위원소체 도표

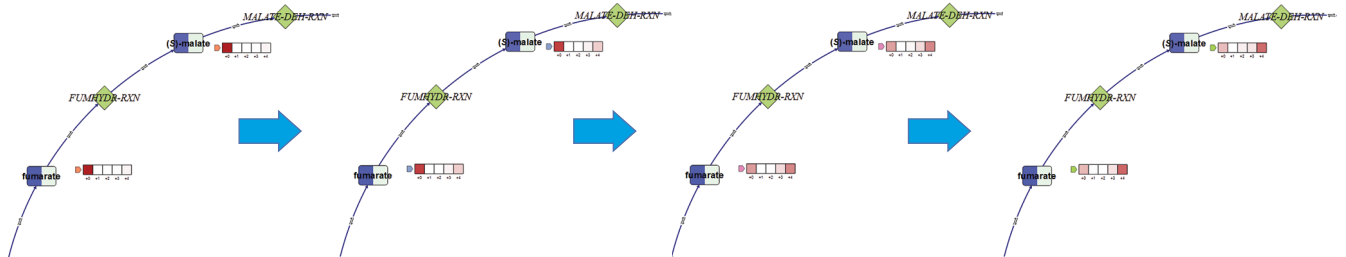


그림 7. Fumarate 및 malate에 대한 0.5, 1, 3 및 8시간 시점별(왼쪽 > 오른쪽) 시간 경과 연구의 단계별 flux 시각화

## 결론

Agilent MassHunter VistaFlux를 사용하면 데이터 처리의 어려움을 줄인 표적 정성 flux 분석이 가능합니다. 스프레드시트 상에서 데이터 및 수동 계산을 지루하게 처리하곤 했던 이전의 실험들이 이제 대규모 시료 세트를 배치 처리하는 효율적이고 일상적인 워크플로를 통해 가능해졌습니다.

VistaFlux는 표적 대사체 목록의 쉬운 생성과 정교한 동위원소체 추출 알고리즘 및 유연한 경로 시각화 도구를 통합함으로써, 대사의 유동성 포착으로 대사체학 연구를 확장하며, 이에 따라 생물학적 이해를 증진시킵니다.

## 참고 문헌

1. MassHunter Profinder: Solving the Challenge of Isotopologue Extraction for Qualitative Flux Analysis, *Agilent Technologies*, publication number 5991-6817EN.

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지  
수 없습니다.

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2016  
2016년 4월 8일 한국에서 발행  
5991-6756KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418  
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부  
고객지원센터 080-004-5090 [www.agilent.co.kr](http://www.agilent.co.kr)



**Agilent Technologies**