

哺乳類細胞サンプル用の代謝物 + 脂質の デュアル自動化サンプル前処理ワークフロー

包括的でエンドツーエンドの LC/MS メタボロミクス
およびリポドミクスワークフローで用いる
自動細胞サンプル前処理

著者

Genevieve Van de Bittner,
Mark Sartain, Dustin Chang,
Alex Apffel, Kristin Bernick,
and Manuel Gomez
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA

概要

この技術概要では、哺乳類細胞サンプルから極性代謝物と脂質をデュアル抽出するための、包括的で自動化されたサンプル前処理法について説明します。このサンプル前処理ワークフローでは、哺乳類細胞の簡単な溶解および代謝クエンチングを室温で行う革新的なメソッドを用います。細胞溶解液の各サンプルからの極性代謝物と脂質の分画および順次抽出は、Agilent Captiva EMR-Lipid 固相抽出プレートで行うことができます。代謝物と脂質の分画手順は、Agilent Bravo Metabolomics Sample Prep Platform 上で、追加の代謝物 + 脂質細胞のデュアルサンプル前処理 Vworks プロトコルを使用して自動化されます。代謝物と脂質の回収率とワークフローの再現性を、Agilent 6545 LC/Q-TOF、Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS、および Agilent MassHunter ソフトウェアを使用して評価します。

はじめに

LC/MS オミクス分析によって測定される細胞生物学をより完全に理解するために、各サンプルから複数のクラスの細胞成分を分離することには大きな利点があります。これは、細胞代謝の変化が1次代謝と脂質代謝の両方に影響を与える可能性があるため、極性代謝物と脂質に特に当てはまります。細胞サンプルから代謝物と脂質を分画するメソッドは存在しますが、より習得しやすく、感度が高く精密で正確なワークフローが必要とされています。これらの特性を改善するよく知られたアプローチの1つは、自動化によるものです。自動化により、サンプル処理の一貫性が向上し、ユーザーエラーが減少し、新しいユーザーの習得時間が短縮されます。

自動化を実現するための最初のステップとして、懸濁液または接着哺乳類細胞で使用できる新しい室温細胞溶解およびクエンチングメソッドを開発・評価しました。さらに、液液抽出法よりも自動化が容易な固相抽出 (SPE) を使用して、極性代謝物と脂質のデュアル分画に取り組みました。この目的のために、極性代謝物またはプラズマサンプルからの脂質抽出に以前から使用されていた EMR-Lipid 吸着剤¹⁻³ を、細胞溶解液用の新しい代謝物 + 脂質のデュアル抽出プロトコルに適合させました。Agilent Captiva EMR-Lipid SPE メソッドは、個々のサンプルから極性代謝物と脂質の両方を抽出できるため、下流の LC/MS メタボミクスおよびリピドミクスデータの堅牢なマルチオミクス相関分析が容易になる点が重要です。

Captiva EMR-Lipid SPE を極性代謝物および脂質抽出に使用することで、Agilent Bravo Automated Liquid Handling Platform を用いて、デュアル分画ワークフローを簡単に自動化することが可能になりました。自動化は比較的簡単でしたが、最適化により、分析成分のより多くの定量的回収率、液体ハンドリン

グの改善、ろ過の再現性の向上が達成できました。サンプル前処理ワークフローの全体的な性能は、¹³C 標識極性代謝物と ²H 標識脂質を使用したスパイクイン回収実験によって評価しました。まとめると、哺乳類細胞サンプルの代謝物 + 脂質のデュアル抽出のための堅牢で部分的に自動化されたサンプル前処理ワークフローを実証します。

実験方法

材料

すべての検討で、K562 慢性骨髄性白血病由来細胞株は American Type Culture Collection から入手しました。Roswell Park Memorial Institute (RPMI) の完全培地で培養し、 $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 細胞/ミリリットルの密度で採取されました。

CellTiter Glo ATP アッセイキット (Promega) を使用して、細胞溶解物で ATP 測定を行いました。

定性フラックス解析では、¹³C₅-L- グルタミン (MilliporeSigma) を使用しました。回収率の検討では、¹³C 標識極性代謝物と ²H 標識脂質を使用しました。¹³C 標識極性代謝物とは、MSK-QC1、CLM-1579-N-0.1MG、CLM-4442-0.1MG、および ISO1 U-¹³C 標識酵母抽出物 (Cambridge Isotopes)、¹³C₆-D- グルコースおよび ¹³C₅-L- グルタミン (MilliporeSigma) です。²H 標識脂質は、UltimateSPLASH ONE ミックス (Avanti Polar Lipids) からなります。一般的な中心炭素代謝物の非標識極性代謝物混合物 (MilliporeSigma) を使用して、回収率の検討で分析された極性代謝物のサブセットのピーク同定を行い、代謝物の回収率に対する含水率の影響を判断しました。

超純水 (H₂O) は、LC-Pak Polisher と 0.22 μm ユースポイントメンブレンフィルタカートリッジ (MilliporeSigma) を備えた Milli-Q Integral システムで生成しました。

サンプル前処理溶媒および化学薬品:

LC/MS グレードのメタノール (MeOH)、LC/MS グレードのトリフルオロエタノール (TFE)、 $\geq 99.5\%$ GC グレードのジクロロメタン (DCM)、高純度 (>99.5%) のエタノール (EtOH)、LC グレードまたは純度 99.9% のブタノール (BuOH)、LC/MS グレードのアセトニトリル (ACN)、LC/MS グレードのイソプロパノール (IPA)、および LC/MS グレードのギ酸を使用しました。

LC/MS 移動相溶媒および試薬: LC/MS グレードの MeOH、LC/MS グレードの ACN、LC/MS グレードの IPA、LC/MS グレードの酢酸アンモニウム、純度 99.99% のフッ化アンモニウム、LC/MS グレードの酢酸、および GC グレードのトリブチルアミンを使用しました。

Agilent Bravo リキッドハンドラーと消耗品

- Agilent Bravo Metabolomics Sample Prep Platform (G5589AA)
- 追加の代謝物 + 脂質細胞のデュアルサンプル前処理 Vworks プロトコル (詳細は、Automation の営業担当者にお問い合わせください)
- Agilent Captiva EMR-Lipid SPE プレート (部品番号 5190-1001)
- Agilent 250 μL ディスポーザブルチップ (部品番号 19477-002)
- Agilent PlateLoc Thermal Microplate Sealer (G5585BA)
- Agilent PlateLoc マイクロプレート穴開け可能薄型クリアシール (部品番号 17318-001)
- Agilent 接着シール、一時的プレートシーリング用 (部品番号 410186)
- VWR プレートの冷蔵保管用粘着ホイル (PlateLoc を使用しない場合。部品番号 60941-112)
- Agilent Captiva コレクションプレート (部品番号 A696001000)

- Agilent リザーバ、単一キャピティ (部品番号 204484-100 または 201254-100)
- Thermo Fisher Scientific プレート + ガラスコーティング マイクロプレート (Thermo Fisher Scientific 部品番号 60180-P338、部品番号 60180-P309 の代替品)

LC/MS 機器および消耗品

- Agilent 1290 Infinity II LC システム (脂質 LC/MS 用)
- Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II マルチサンプル、サーモスタット付き (G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)、2- ポジション/10- ポートバルブ付き
- Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)、リファレンス質量導入用 100:1 スプリッタ (G1607-60000) 付き
- Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS、デュアル Agilent Jet Stream 技術イオン源 (脂質 LC/MS 用) 搭載
- Agilent 1290 Infinity/II LC システム (代謝物 LC/MS 用)
- Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ (G4220A)
- Agilent 1290 Infinity II マルチサンプル、サーモスタット付き (G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)
- Agilent 1290 Infinity II バイナリポンプ (G4220A)、リファレンス質量導入用 100:1 スプリッタ (G1607-60000) 付き
- Agilent 6545 LC/Q-TOF、デュアル Agilent Jet Stream 技術イオン源 (代謝物 LC/MS 用) 搭載
- どちらのシステムにも、インジェクタの後にインラインフィルタハウジング (5067-6189) と 0.3 μm フィルタ (5023-0271) が設置されています

プレートリーダー

ATP 検出用の生物発光測定は、Gen 5 ソフトウェアバージョン 3.02.1 を搭載した Agilent BioTek Synergy H1 マルチモードリーダーで行いました。

メソッド

室温細胞溶解および代謝クエンチング

室温 (RT) 細胞溶解およびクエンチングのメソッドを開発しました。この RT メソッドは、零度付近/氷点下の細胞溶解およびクエンチングソリューションの手動操作および温度維

持に関連する問題を回避し、細胞溶解およびクエンチングの自動化を可能にします。このメソッドでは、TFE:H₂O 1:1 溶液を使用します (図 1)。図 1 に示すように、RT における細胞溶解と、浮遊細胞株と接着哺乳類細胞株の両方のクエンチングのために手動のメソッドを開発しました。

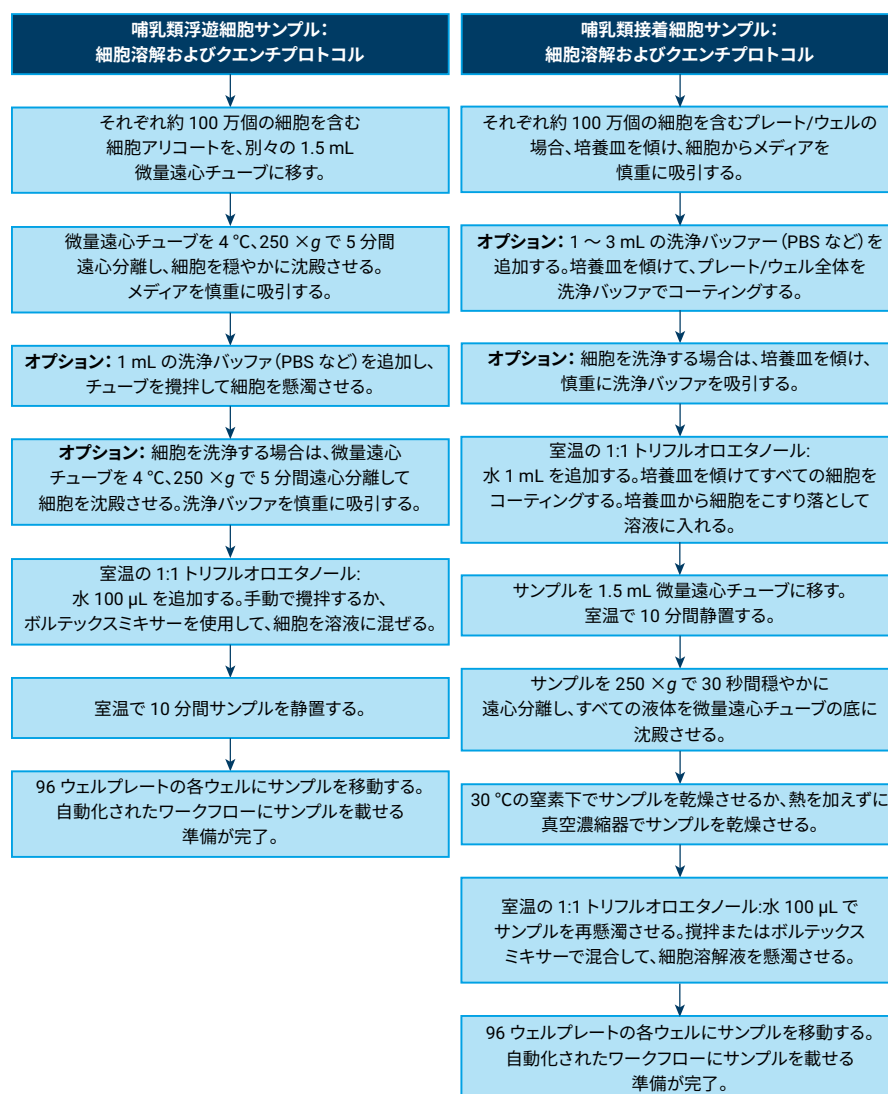


図 1. 手動による室温での細胞溶解と、懸濁液および接着哺乳類細胞の代謝クエンチングのワークフロー。

ここで説明する実験では、K562 細胞の調製に浮遊細胞メソッドを使用し、RT のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS、 $-Ca$ 、 $-Mg$ 、 $1\text{ mL}/100$ 万細胞) によるオプションの洗浄を行いました。オプションの洗浄により、細胞外代謝物や培地に存在する脂質、または細胞から排出される脂質に起因するサンプルの汚染が減少します。ただし洗浄を行うと必ずクエンチングまでの時間が長くなり、細胞内の代謝物と脂質のターンオーバーが増加し、一部の洗浄では細胞からの代謝物の漏出が起きます。したがって、洗浄をするかどうか、また洗浄する場合はどの洗浄を行うかを、ユーザーが決める必要があります。

重要なのは、懸濁細胞と接着細胞の両方のワークフローで、 $100\ \mu\text{L}$ の $1:1$ TFE: H_2O に懸濁された約 100 万個の細胞からの溶解液が最終サンプルとして得られることです。この最終サンプルをディープウェル 96 ウェルプレート (部品番号 A696001000) に移します。接着細胞の場合、 $100\ \mu\text{L}$ という溶解液の量を得るには、濃縮ステップが必要です。細胞溶解液の $100\ \mu\text{L}$ という最終的な量は、次に説明する代謝物 + 脂質の自動化デュアル抽出ワークフローの性能の鍵となります。細胞量は細胞株によって異なるため、代謝物と脂質の検出を最適化するには、 $1:1$ TFE: H_2O $100\ \mu\text{L}$ あたりの細胞数の調整が必要になる場合があります。参考までに、 100 万個の K562 細胞は、約 $1 \sim 2\ \mu\text{L}$ の充填細胞容積です。

自動化された代謝物 + 脂質のデュアル抽出

前述の 100 および $25\ \mu\text{L}$ のプラズマサンプルからの極性代謝物抽出の自動ワークフロー^{1,2}と同様に、哺乳類細胞サンプルの自動化された代謝物 + 脂質のデュアル抽出ワークフローでは、Agilent Bravo Metabolomics Sample Prep Platform (部品番号 G5589AA) を使用します。¹ さらに、哺乳類細胞サンプルの自動化された代謝物 + 脂質のデュアル抽出ワークフローを実行するには、追加の VWorks プロトコルが必要です。Bravo Metabolomics Sample Prep Platform には、固相抽出用の

吸引過ステーションと、サンプル混合用の振とうデッキが付属しています。前述のプラズマワークフローと同様に、細胞ワークフローでは Captiva EMR-Lipid プレートを使用して極性代謝物を抽出しながら、タンパク質沈殿物をろ過により除去し、吸着によって脂質を除去します。さらに、細胞ワークフローでは吸着した脂質を溶出させ、代謝物 + 脂質のデュアル抽出を行います (図 2)。EMR-Lipid 充填剤からの脂質溶出は、前述のように $2:1$ MeOH:DCM で実施できます。³

ワークフローの代謝物抽出部分については、元のメソッド¹と変更されたこのプロトコルの間で、大部分のステップと基本原則は同じで

す。タンパク質を効果的に沈殿させるためには、 $1:1$ MeOH:EtOH を使用することが重要です。代謝物抽出ステップの変更の一部は、アジレントのアプリケーションノート 5994-2156EN² で説明されている低容量プラズマサンプルで行われた調整と同じものです。具体的には、代謝物 + 脂質細胞のデュアルワークフローでは、代謝クエンチングおよびタンパク質沈殿後の 10 分間のインキュベーションを行います。これはサンプルの一貫性を向上させる溶液とタンパク質沈殿物との間の代謝物と脂質を平衡化するのに役立ちます。さらに、極性代謝物抽出の前に、タンパク質が沈殿したサンプルに水を加えて H_2O 含有量を 50% とします (結果と考察を参照)。

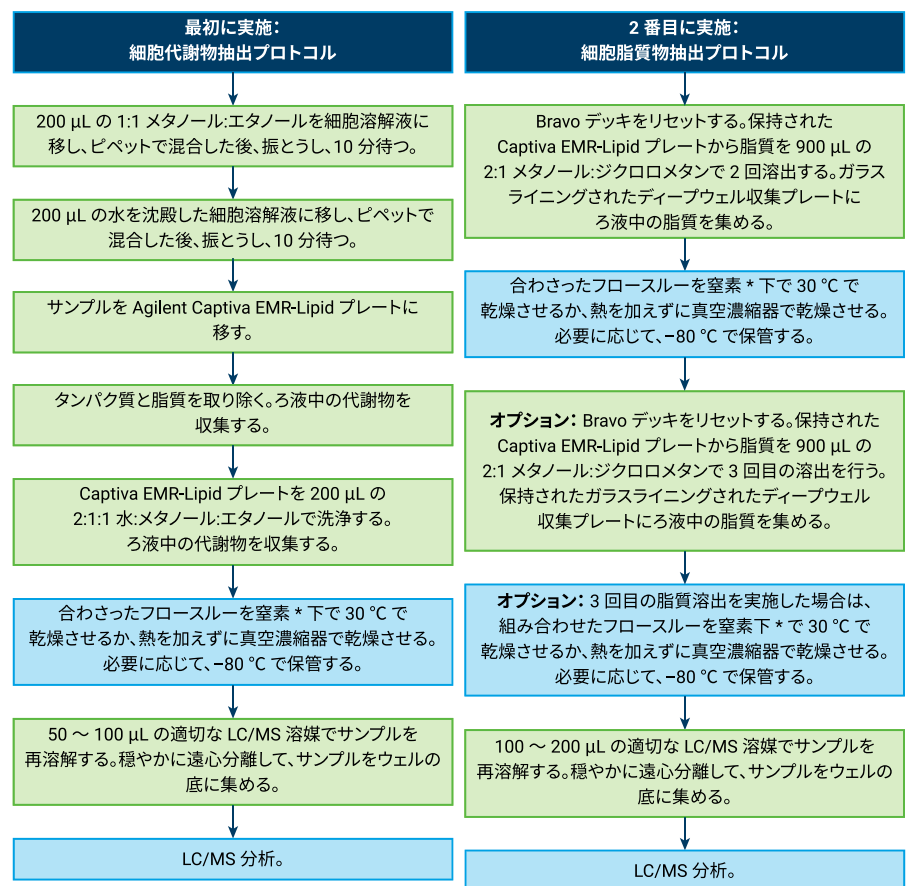


図 2. 細胞溶解液サンプルからの自動化された代謝物 + 脂質のデュアル抽出のワークフロー。緑色のステップは、追加の代謝物 + 脂質細胞のデュアルサンプル前処理 Vworks プロトコルと Agilent Bravo Metabolomics Sample Prep Platform を使用して実行できます。***窒素乾燥に関する注意:** 高流量の窒素を使用し、マニホールドを定期的の下げる (窒素の流れがサンプルの上部に近い距離に維持されるようにする) と、乾燥時間が短縮されます。サンプルが $50\ \mu\text{L}$ 未満に減少する場合に、乾燥したサンプルがプレートウェルから排出されるのを防ぐためには、窒素の流量を低く抑えることが推奨されます。

特に、細胞サンプルから抽出された代謝物と脂質の定量的な回収をより厳密にするため、自動化されたワークフローにいくつかのステップを追加しました。細胞サンプルの生体含有量が低いことを考えると、これは特に重要であると考えられます。これらのサンプルには約 1 ~ 2 μL の充填細胞容積が含まれていますが、これは元のメソッドで処理された 100 μL のプラズマサンプルよりも約 50 ~ 100 倍少ないサンプル量です。これらの定量的な回収ワークフローの調整には、1) 細胞溶解液をタンパク質沈殿溶媒に添加するのではなく、1:1 MeOH:EtOH タンパク質沈殿溶媒を細胞溶解液に追加すること、2) 細胞溶解液を Captiva EMR-Lipid プレートに移した後、細胞溶解液プレートから細胞溶解液残留物を洗浄および収集すること、3) Captiva EMR-Lipid プレートを洗浄して、プレートの滞留量 (約 115 μL) をリリースし、EMR-Lipid 吸着剤と相互作用する極性代謝物を洗い流すこと、4) 収集した極性代謝物サンプル全体を乾燥させること、が含まれます。更新したワークフローは、追加の代謝物 + 脂質細胞のデュアルサンプル前処理 Vworks プロトコルを使用して、Bravo Metabolomics Sample Prep Platform を用いて自動化されました。図 3A と 3B は、それぞれ細胞代謝物と脂質抽出に使用する追加プロトコルのユーザーインターフェースです。

その他の自動化の最適化としては、脂質溶出に使用する低沸点有機溶媒をドリップのない堅牢な処理ができるように、チップを 2 回溶媒プライミングすること、細胞溶解液サンプルのすべてのろ過ステップを最適化すること、必要に応じて、ろ過時間を延長し、ろ過圧力を上げる機能を用いてオプションのろ過後 SPE プレート検査を有効にすること、が考えられます。これらの改良を組み合わせることで、細胞溶解液の代謝物 + 脂質のデュアル抽出を実行する非常に堅牢な自動ワークフローが実現されます。

この検討では、乾燥した極性代謝物分画を 25 μL の MeOH に手動で溶解し、続いてプレートを 60 秒間超音波処理することによって、サンプルの再溶解を行いました。次に、75 μL の H_2O を加えてサンプルをさらに溶解し、プレートをさらに 60 秒間超音波洗浄器で超音波処理した後、穏やかに遠心分離して (15 ~ 30 秒、250 x g) サンプル全体をプレートの各ウェルの底部に移動させました。乾燥した脂質分画を 200 μL の MeOH:BuOH (1:1, v:v) で再懸濁しました。プレートを 60 秒間超音波洗浄器で超音波処理した後、穏やかに遠心分離して (15 ~ 30 秒間、250 x g)、サンプル全体をプレートの各ウェルの底部に移動させました。

代替法として、Bravo Metabolomics Sample Prep Platform で提供される再溶解アプリケーションを使用して、代謝物および脂質サンプルの再溶解を行うことができます。ここで説明したものは異なる種類のクロマトグラフィー (HILIC、順相など) で代謝物および脂質分画を分析する場合、特に大量のサンプル (>1 μL) を注入する際は、他の再溶解溶媒を考慮することができます。多くの場合、これが必要になります。

細胞溶解およびクエンチング効率の評価

ATP 測定

ATP 測定は、CellTiter Glo アッセイキットの記載に従い、若干の変更を加えて実施しました。具体的には、CellTiter Glo キットを使用して細胞から抽出した ATP の安定性を評価する前に、細胞サンプルをクエンチングの有無にかかわらず溶解させました。次の 2 つのメソッドを使用しました：1) 細胞溶解に室温の PBS とプローブ超音波処理を使用する非クエンチメソッド (メソッド 1)、2) 室温で溶解し、1:1 TFE: H_2O でクエンチする方法 (図 1、メソッド 2)。細胞溶解およびクエンチング溶液中の溶媒によるアッセイキットからの光出力の変化を説明するために、各細胞溶解およびクエンチング溶液を用いて個別の ATP 標準曲線を作成しました。

定性フラックス分析

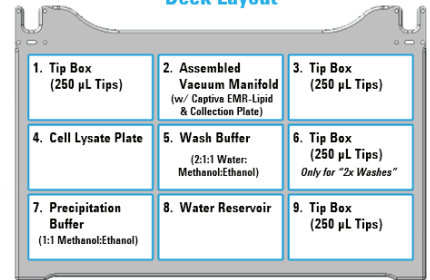
定性フラックス分析では、サンプルあたり 100 万個の K562 細胞を使用し、ATP 測定のセクションで説明した細胞溶解およびクエンチングメソッド (メソッド 1 および 2) を使用しました。追加の細胞溶解およびクエンチングメソッドも 2 つ使用しました (メソッド 3 および 4)。メソッド 3 では、 -20°C で細胞を溶解し、0.1 % 尿酸を含む 2:2:1 MeOH:ACN: H_2O でクエンチしました。これに続いて、約 5 分後に 15 % NH_4HCO_3 (H_2O 中 w/v) で酸中和を行いました。⁴ メソッド 4 はメソッド 3 と同様ですが、室温で実施しました。すべての細胞溶解およびクエンチングメソッドで、500 ppm の $^{13}\text{C}_5\text{-L-}$ グルタミンを細胞溶解およびクエンチング溶液に溶解してから、細胞沈殿に溶液を加えました。⁵ 細胞溶解液およびクエンチング溶液を添加してから 5 分または 60 分後に、サンプルを 20,000 x g、 4°C で 5 分間遠心分離して、沈殿物や細片を除去しました。上澄みの一部 (75 μL) を新しいチューブに移し、真空濃縮器で濃縮し、イオンペア逆相クロマトグラフィー分離による LC/MS 分析用に再懸濁しました。

A Application Settings

Total Number of Sample Columns (1-12)	Starting Well Column (1-12)			
	Cell Lysate Plate	1	Captiva EMR-Lipid Plate	1
	Precipitation Buffer	1	Water Reservoir	1
			Wash Buffer	1

Settings	Steps			
	1. MeOH/EtOH Addition	2. Water Addition	3. Lipid Removal	4. Wash Buffer
Transfer Volume (2-1,000)	200 μ L	200 μ L	515 μ L	200 μ L
			Mix sample before transfer to filter plate <input checked="" type="checkbox"/>	Transfer to sample plate before transfer to filter plate <input checked="" type="checkbox"/>
Aspirate Distance from Well Bottom (0.5-5)			0.5 mm	
Dispense Distance from Well Bottom (0.5-100)	19 mm	19 mm	5 mm	19 mm
Liquid Class	96 disposable tip 51 - 200ul	96 disposable tip 51 - 200ul	96 disposable tip 2 - 50ul	96 disposable tip 51 - 200ul
Vortex Offline	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
On Deck Shaking & Mixing				
Shaker Speed (0-2,000)	1000 RPM	500 RPM		
Mix Cycles (0-100)	10 cycles	5 cycles		
Incubation Time	600 sec	600 sec		
Manual Centrifugation		<input type="checkbox"/>		
Filtration Time 1			120 sec	60 sec
Filtration Target Pressure 1			200 mbar	200 mbar
Filtration Vent Delay 1			0 sec	0 sec
Filtration Time (blowout)*			60 sec	60 sec
Filtration Target Pressure (blowout)			400 mbar	400 mbar
Filtration Vent Delay (blowout)			15 sec	15 sec
Manually confirm filtration is complete (user intervention required)			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Deck Layout



Labware Table

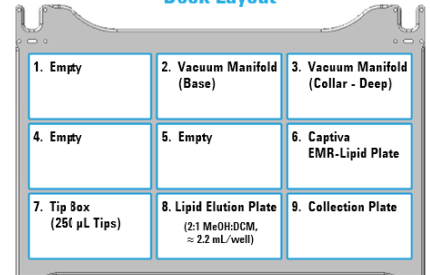
Deck Location	Labware Type
1	96 V11 LT 250 Tip Box (p/n 19477.002)
2	Assembled Vacuum Manifold (w/ Captiva EMR-Lipid & Collection Plate)
3	96 V11 LT 250 Tip Box (p/n 19477.002)
4	96 Agilent A696001000 Captiva collection plate
5	Reservoir, Seahorse 201254-100, PP, no walls, pyramid b
6	96 V11 LT 250 Tip Box (p/n 19477.002) Add only if "2x Washes" selected.
7	Reservoir, Seahorse 201254-100, PP, no walls, pyramid b
8	Reservoir, Seahorse 201254-100, PP, no walls, pyramid b
9	96 V11 LT 250 Tip Box (p/n 19477.002)

B Application Settings

Total Number of Sample Columns (1-12)	Starting Well Column (1-12)	
	Lipid Elution Plate	1
	Captiva EMR-Lipid Plate	1

Settings	Steps	
	2:1 MeOH:DCM Addition	
Number of solvent addition / filtration cycles to perform	2	
Transfer Volume (2-900)	900 μ L	
Dispense Distance from Well Bottom (0.5-100)	19 mm	
Liquid Class	MeOH:DCM dispense	
Incubation Time	0 sec	
Filtration Time 1	300 sec	
Filtration Target Pressure 1*	90 mbar	
Filtration Vent Delay 1	0 sec	
Filtration Time (blowout)*	60 sec	
Filtration Target Pressure (blowout)	200 mbar	
Filtration Vent Delay (blowout)	15 sec	
Manually confirm filtration is complete (user intervention required)	<input type="checkbox"/>	

Deck Layout



Labware Table

Deck Location	Labware Type
1	Empty
2	Vacuum Manifold (Base)
3	Vacuum Manifold (Collar - Deep)
4	Empty
5	Empty
6	Captiva EMR-Lipid Plate
7	96 V11 LT 250 Tip Box (p/n 19477.002)
8	96 Thermo Plate+ 60180-P338 2mL Square Glass coated
9	96 Thermo Plate+ 60180-P338 2mL Square Glass coated

図 3. 細胞代謝物抽出 (A) および脂質抽出 (B) に使用した追加の代謝物 + 脂質細胞のデュアルサンプル前処理 Vworks プロトコルの Agilent Bravo ユーザーインターフェースとカスタム設定。

極性代謝物の回収率に対するサンプル含水率の影響

Captiva EMR-Lipid プレートからの代謝物回収率に対する含水率の影響を、さまざまな溶媒組成の下で代謝物標準の混合物を Captiva EMR-Lipid プレートに通すことによって評価しました。Captiva EMR-Lipid プレートを通過させた代謝物の LC/MS ピーク面積を、Captiva EMR-Lipid プレートを通さなかった代謝物標準の同じ混合物の LC/MS ピーク面積で割り、回収された代謝物標準の割合を測定しました。

細胞溶解液マトリックスにおける代謝物および脂質の回収率の推定

サンプル前処理

^{13}C 代謝物と ^2H 脂質のマスターミックスをサンプルのスパイクインとして使用するために調製しました。このマスターミックスは、細胞溶解液を Captiva EMR-Lipid プレートに通す前または通した後に適用しました。マスターミックスを作成するために、 ^{13}C 標識酵母抽出物、その他の記載された ^{13}C 標識代謝物、および ^2H 標識脂質を、1:1 TFE:H₂O に溶解した単一の溶液にまとめました。

6,000 万個の K562 細胞を回収した後、図 1 で説明したメソッドを使用して、室温で細胞を溶解・クエンチしました。体積は、回収した細胞数に合わせて調整しました。マスターミックスのスパイクインの余地を残しながら 100 万細胞/100 μL 1:1 TFE:H₂O の最終濃度を維持するために、100 万細胞/80 μL 1:1 TFE:H₂O の濃度で細胞をまず溶解・クエンチしました。室温で 10 分間インキュベーションした後、溶解液を混合し、80 μL を 96 ウェルプレートのウェルに分注しました。プレスパイクインサンプルに対しては、2.5、5、10、または 20 μL のマスターミックスを各細胞サンプルに添加しました。各サンプルの容量を 100 μL にするために、さまざまな容量の 1:1 TFE:H₂O を各サンプルに追加しました。サンプルは、上記の哺乳類細胞サンプル用の自動化された代謝物 + 脂質のデュアルサンプル前

処理ワークフローを使用して調製しました。2.5、5、10、または 20 μL のマスターミックスのポストスパイクインを、収集した極性代謝物および脂質分画に追加しました。各サンプルに加えた 1:1 TFE:H₂O の総量の一貫性を維持するために、さまざまな量の 1:1 TFE:H₂O を再度追加しました。前述のように、プレートを穏やかに遠心分離し、再溶解する前に窒素下で乾燥させました。

極性代謝物および脂質データ解析

極性代謝物の同定は、1) 前述の偏りのない選択アプローチ² および 2) 極性代謝物標準の混合物を使用する方法の 2 つの方法で実施しました。²H 標識脂質ピークは、Agilent MassHunter 定性分析の Find-by-Formula アルゴリズムを使用して同定しました。Agilent MassHunter 定量分析を使用して、目的の化合物のピーク面積を決定し、すべてのピークの S/N が 5 を超えていることを確認しました。極性代謝物および脂質サンプルを 2 種類の容量で注入しました。各成分の回収率を計算するために使用した注入量は、その成分の線形検出範囲内に収まる成分の最高注入量としました。各成分の直線検出範囲は、代謝物標準混合物、 ^{13}C 標識酵母抽出物、および Ultimate SPLASH One 混合物で作成された検量線を使用して決定しました。4 つのスパイクイン容量のそれぞれについて、プレスパイクおよびポストスパイクインの 4 つのサンプルをペアとしました。スパイクインなしの細胞溶解液で検出されたバックグラウンドシグナルを差し引いた後、回収率の値を計算しました。脂質データについては、それぞれ 3 ~ 9 種類の脂質を含む各脂質クラスの値を平均して、回収率とパーセント RSD を求めました。

LC/MS メソッド

LC 機器と LC カラムは、金属に敏感な分析成分、特にリン酸化代謝物の最適なピーク形状を維持するために、通常の方法で不動態化しました。⁶細胞極性代謝物分画の分析は、Agilent アプリケーションノート 5991-7970EN⁷ のイオンペア逆相 (IP-RP) クロマトグラフィー LC/MS メソッドに従い、注入量 4 μL を使用しました。細胞脂質分画の分析は、前述の LC/MS メソッド^{8,9} に従い、0.5 ~ 2 μL の注入量を使用しました。どちらのメソッドでも、インラインフィルタを追加し、サンプル注入バルブの直後に設置しました。

ソフトウェア

Agilent VWorks automation control ソフトウェア (バージョン 13.1.5) および追加の代謝物 + 脂質細胞のデュアルサンプル前処理 Vworks プロトコルを使用して、Agilent Bravo Metabolomics Sample Prep Platform を制御しました。Agilent VistaFlux ソフトウェアバージョン 1.0 を使用して、下流の代謝物への $^{13}\text{C}_5\text{-L}$ グルタミンからの ^{13}C 標識の取り込みを決定しました。Agilent MassHunter Acquisition ソフトウェアを使用して、6545 LC/Q-TOF および 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS 機器を操作しました。Agilent MassHunter パーソナル化合物データベースおよびライブラリマネージャソフトウェア (バージョン B.08.00) を使用して、注釈付きの代謝物および脂質ライブラリを管理・編集しました。これらのライブラリは、Agilent MassHunter Quantitative Analysis ソフトウェアでピーク抽出およびピーク面積の決定に使用されています。MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェアを使用し、Agilent アプリケーションノート 5994-2156EN² に記載されている代謝物選択戦略を利用して、非標識酵母サンプルに存在する非標識代謝物の同定を支援しました。

MassHunter Quantitative Analysis ソフトウェアを使用して、標準代謝物混合物中の化合物に加えて、 ^{13}C および ^2H で標識された代謝物と回収率検討で検出された脂質のピーク面積を抽出し、定量化しました。

結果と考察

室温細胞溶解およびクエンチングメソッドの代謝クエンチング効率

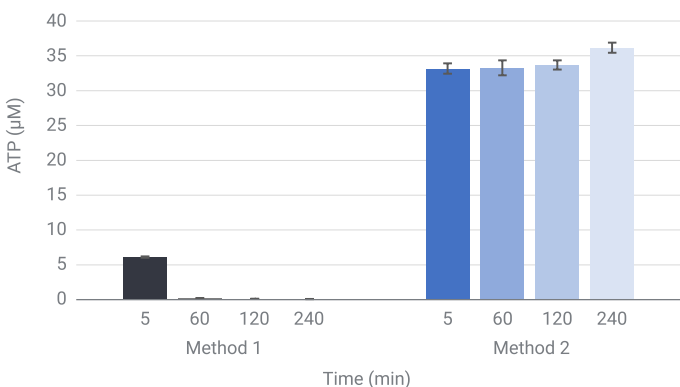
室温での細胞溶解と 1:1 TFE:H₂O によるクエンチングの検証は、2 つの分析で行いました。1) 溶解およびクエンチング後に細胞から放出される ATP の安定性のモニタリング、および 2) 適用した $^{13}\text{C}_5\text{-L-}$ グルタミンからの ^{13}C 標識の下流の TCA サイクル代謝物への取り込みの測定です。これらの測定値は、クエンチング溶液が、主要な代謝酵素を急速に不活性化し不活性化を維持する能力を評価するもので、細胞代謝の停止の指標として用いることができます。ATP アッセイでは、代謝クエンチングが継続しない場合、ATP はすぐに ADP および他の ATP 誘導体になり、時間の経過とともにサンプルの ATP 含有量が減少します。さらに、代謝クエンチングが急速でない場合、 $^{13}\text{C}_5\text{-L-}$ グルタミンが酵素的に下流の代謝

物に変換されます。これは、これら下流の代謝物への ^{13}C 標識の取り込みを検出することで監視できます。

図 4A は、K562 細胞から抽出された ATP の安定性を、非クエンチ条件と室温でクエンチングした条件（それぞれメソッド 1 および 2）で比較したものです。非クエンチサンプルは、細胞の溶解の 5 分後にはるかに低い ATP レベルを示すだけでなく、室温で 4 時間にわたって ATP が下流の代謝物に継続的にターンオーバーされていることも示しています。対照的に、室温細胞溶解およびクエンチングメソッドを使用して抽出された ATP は、時間が経過しても安定性を保っており、代謝が室温でクエンチされたままであることを示しています。さらに、PBS で 10 倍に希釈して TFE 含有量が 50 から 5% (v/v) に下がった室温クエンチサンプルは、時間が経過しても ATP レベルが一定に保たれています (図 4B)。これは、代謝が最初に抑制された後、TFE 含有量を減らしても酵素活性が回復しないことを示しています。

図 5 は、4 つの細胞溶解およびクエンチングメソッド、メソッド 1 ~ 4 において、細胞の酵素を急速に不活性化することによって細胞代謝を停止する能力を比較しています。本検討では、 $^{13}\text{C}_5\text{-L-}$ グルタミンを、メソッド 1 ~ 4 で使用した細胞溶解およびクエンチング溶液とともに細胞沈殿物に添加しました。得られた細胞溶解液において VistaFlux ソフトウェア¹⁰ で検出された $^{13}\text{C}_5\text{-L-}$ グルタミン酸は、クエンチされていない活性のある細胞酵素によって $^{13}\text{C}_5\text{-L-}$ グルタミン酸に変換された $^{13}\text{C}_5\text{-L-}$ グルタミンを表しています。メソッド 1 を使用して作成された非クエンチサンプルは、このメソッドが細胞酵素をあまり不活性化しないため、最も高い濃度の $^{13}\text{C}_5\text{-L-}$ グルタミン酸を含んでいます。一方で、室温での細胞溶解およびクエンチングメソッド (図 1 のメソッド 2) および低温クエンチングメソッド (メソッド 3) を使用した場合に検出される $^{13}\text{C}_5\text{-L-}$ グルタミン酸の量は低く、両方のメソッドにより細胞酵素が急速に不活性化したことを示しています。重要なことは、購入した $^{13}\text{C}_5\text{-L-}$ グルタミンに微量の $^{13}\text{C}_5\text{-L-}$ グルタミン酸が検出されたことです。メソッド 2 および 3 を使用したときに検出された $^{13}\text{C}_5\text{-L-}$ グルタミン酸の濃度がゼロではないのは、これが原因であると説明できます。

A ATP は、RT クエンチングメソッドで生成された細胞溶解液で安定



B ATP は、RT クエンチングメソッドで生成された希釈細胞溶解液で安定

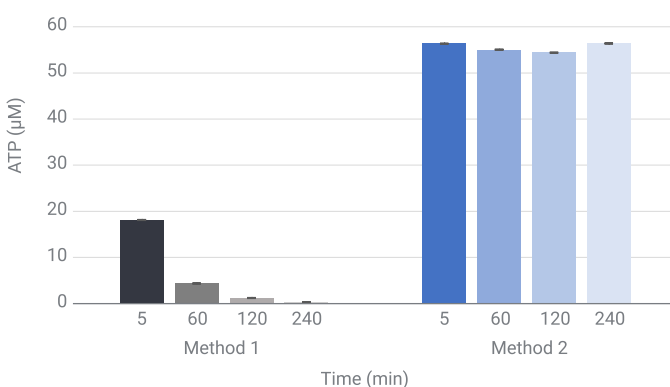


図 4. (A) 室温 (RT) の細胞溶解およびクエンチング溶液で抽出された ATP (メソッド 2) は、細胞溶解の 5 分後のクエンチされていないサンプル (メソッド 1) の ATP レベルよりも有意に高くなります。RT 細胞溶解およびクエンチング溶液で抽出された ATP (メソッド 2) は室温で最大 4 時間安定ですが、プローブ超音波処理によって PBS に抽出された ATP (メソッド 1) は代謝が継続されます。(B) RT 細胞溶解およびクエンチング溶液で抽出された ATP (メソッド 2) は、PBS への 10 倍希釈後、室温で安定したままです。10 倍に希釈したサンプルの場合、測定した ATP 濃度を 10 倍しました。メソッド 1: 室温の PBS と細胞溶解のためのプローブ超音波処理を使用した非クエンチメソッド。メソッド 2: 室温で溶解し、1:1 TFE:H₂O でクエンチするメソッド (図 1)。

メソッド 4 では、メソッド 3 を使用してクエンチしたサンプル中の $^{13}\text{C}_5\text{-L-}$ グルタミン酸のレベルを、溶媒溶液を -20°C ではなく室温で加えて評価しました。室温メソッド 2 と比較して、室温メソッド 4 を使用すると、わずかに高いレベルの $^{13}\text{C}_5\text{-L-}$ グルタミン酸が検出されました (アジレントメソッド、図 1)。これは、アジレントの室温メソッドが、別の室温溶媒溶液よりも室温クエンチングが速いことを示唆しています。 $^{13}\text{C}_5\text{-L-}$ グルタミン酸に加えて、 $^{13}\text{C}_4\text{-L-}$ コハク酸、 $^{13}\text{C}_4\text{-L-}$ リンゴ酸、および $^{13}\text{C}_4\text{-L-}$ アスパラギン酸のレベルをメソッド 1 ~ 4 について評価しました。これらの ^{13}C 標識代謝物が検出されたのは、メソッド 1 を使用して調製された非クエンチサンプルのみでした (データは示していません)。

極性代謝物の回収率を改善するためのサンプル含水率の調整

Captiva EMR-Lipid プレートを通過させる前のサンプル中の水の割合は、代謝物標準から収集されたデータに基づくと、元のワークフロー 1 で使用された 18 % から 50 % に増加しました (図 6)。糖、アミノ酸、一部の有機酸などのより極性の高い化合物のいくつかは、18 % または 50 % の H_2O の存在下で同様の回収率を示します。ただし、リン酸化および両親媒性代謝物は、含水率が 50 % に増加すると、回収率が大幅に増加する傾向があります。これらの検討は、細胞サンプルで見いだされた代謝物レベルを近似した代謝物標準で実施しました。各代謝物標準の量は、100 万個の K562 細胞から抽出された量の約 10 分の 1 から 10 倍の範囲としました。100 万個の K562 細胞から抽出された量の 5 倍以内の量で、代謝物標準の約半分を使用しました。代謝物標準混合物は、元のワークフローで使用された 100 μL プラズマサンプルの近似としては優れたものではありません。¹これらのサンプルでは、抽出された代謝物の量のはるかに多く、18 % H_2O 溶液で発生する代謝物の損失は、総代謝物の量のうちわずかな割合しか表していない可能性が高くなります。

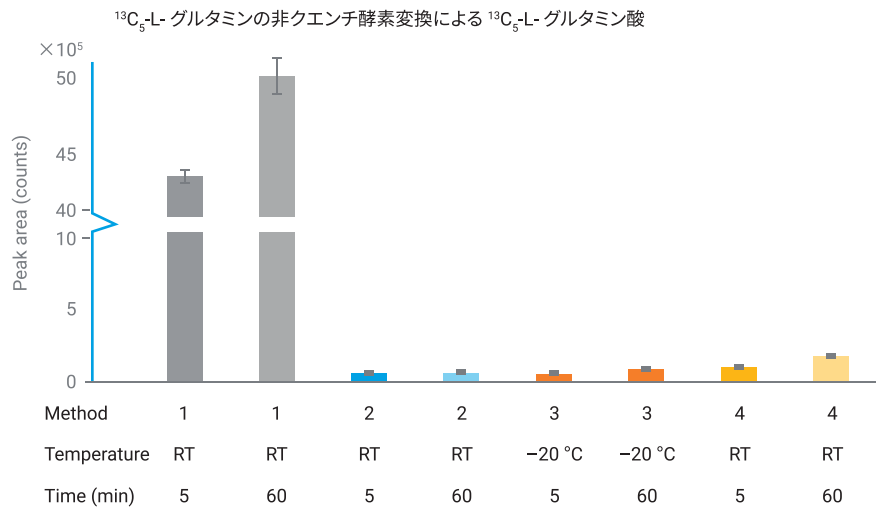


図 5. メソッド 1 ~ 4 を使用した細胞溶解およびクエンチング後の細胞溶解液から検出された $^{13}\text{C}_5\text{-L-}$ グルタミン酸の量。 $^{13}\text{C}_5\text{-L-}$ グルタミン酸は、 $^{13}\text{C}_5\text{-L-}$ グルタミンの非クエンチ酵素変換から生じます。これは、各細胞溶解およびクエンチング溶液とともに細胞に適用されました。メソッド 1 を使用して作成された非クエンチサンプルは、 $^{13}\text{C}_5\text{-L-}$ グルタミン酸のレベルが最も高く、一方、Agilent 室温メソッド (メソッド 2、図 1) を使用して溶解およびクエンチされたサンプルは、 $^{13}\text{C}_5\text{-L-}$ グルタミン酸のレベルが最も低くなっています。メソッド 1：室温のリン酸緩衝生理食塩水と細胞溶解のためのプローブ超音波処理を使用する非クエンチメソッド。メソッド 2：室温で溶解し、1:1 TFE: H_2O でクエンチするメソッド (図 1)。メソッド 3： -20°C で細胞を溶解し、0.1 % ギ酸を含む 2:2:1 MeOH:ACN: H_2O でクエンチし、約 5 分後に 15 % NH_4HCO_3 (H_2O 中 w/v) で酸を中和するメソッド。メソッド 4：メソッド 3 を室温で実施するメソッド。注：購入した $^{13}\text{C}_5\text{-L-}$ グルタミン標準液から微量の $^{13}\text{C}_5\text{-L-}$ グルタミン酸が検出されました。

哺乳類細胞サンプルの自動化された代謝物 + 脂質のデュアルサンプル前処理ワークフローの回収率と再現性

哺乳類細胞サンプルから極性代謝物および脂質抽出物を調製するための自動化された代謝物 + 脂質のデュアルサンプル前処理ワークフローの全体的な性能を評価するために、スパイクイン回収率の検討を実施しました。回収率の検討では、K562 細胞溶解液マトリックスに添加され、室温での細胞溶解およびクエンチングメソッドを使用して前処理された同位体標識された極性代謝物および脂質標準を採用しました (図 1)。自動化された代謝物 + 脂質のデュアルサンプル前処理ワークフローを使用して、極性代謝物と脂質を順次分離しました (図 2)。

極性代謝物の回収率は、有機酸、アミノ酸、ヌクレオチド、糖、コエンザイム A 誘導体など、主要な中心炭素代謝化合物グループについて評価しました (図 7A および 7B)。 ^{13}C 標識代謝物のスパイクインは、4 種類のプレススパイクおよびポストスパイクイン容量で実施し、各サンプルに存在する ^{13}C 標識代謝物の量を、ネガティブイオンモード IP-RP LC/MS によってモニターしました。回収率を 4 つの別々のスパイクイン容量にわたって評価し、これらのスパイクイン容量すべてで一貫性が示されました。各代謝物のさまざまな絶対量の存在下での抽出の安定性が示されました。52 種類の極性代謝物のうち、92 % の化合物が 90 ~ 110 % の平均回収率を示し、96 % の化合物が 80 ~ 120 % の平均回収率を示しました。サンプルの含水率が 50 % に増加したことが要因のひとつで極性代謝物の回収率が極めて優れた値になったことに加えて、回収率のばらつきも並外れたものでした。すべての化合

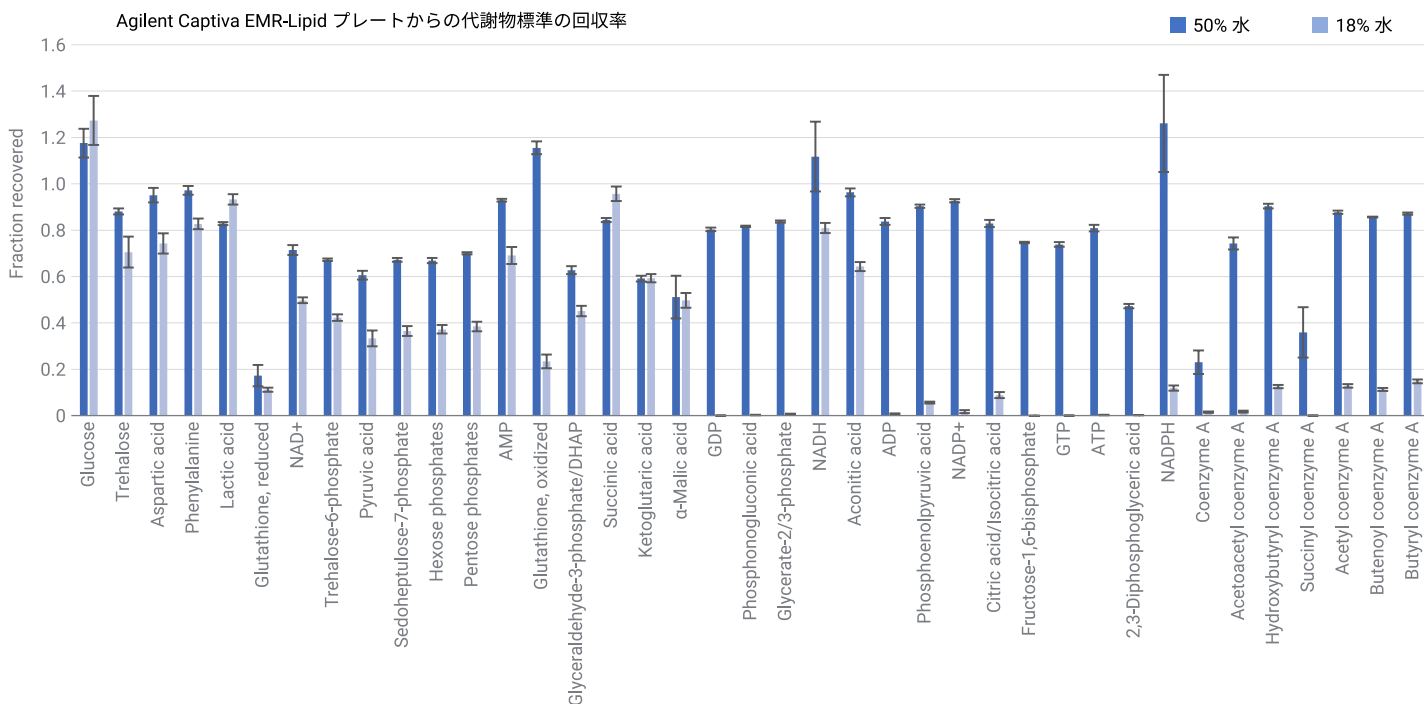


図 6. 18 % および 50 % H₂O 存在下での Agilent Captiva EMR-Lipid プレートからの代謝物標準の回収率の比較。

物およびスパイクインレベルの平均相対標準偏差 (%RSD) は 5.31 % でした。さらに、96 % の化合物で平均 %RSD < 10 % (すべてのスパイクイン容量の平均) となり、100 % の化合物で平均 %RSD ≤ 17 % でした。

脂質の回収率は、セラミド、ジアシルグリセロール (DG)、トリアシルグリセロール (TG)、スフィンゴミエリン (SM)、ホスファチジルグリセロール (PG)、ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、およびホスファチジルイノシトール (PI) などの幅広い脂質クラスについて評価しました。図 8A および 8B を参照ください。²H 標識脂質スパイクインは、4 つのプレスパイクおよびポストスパイクイン容量で再度実施し、各サンプルに存在する重水素化脂質の量をポジティブモードおよびネガティブモード LC/MS でモニターしました。20 μL のポストスパイクインのピー

ク面積は、他のポストスパイクイン容量と比較して非線形性を示したため、これらのデータは解析から除外しました。極性代謝物と比較して、脂質の回収率はやや低下しましたが、脂質は一般的に存在量が多く、イオン化効率が高いため、これは許容範囲内です。さらに、脂質回収率は 10 μL のスパイクインでわずかに高く、脂質濃度が増加するにつれて脂質溶出が改善されたことを示しています。重要なことは、脂質回収率のばらつきが小さく抑えられており、平均 %RSD は、ポジティブモードとネガティブモード、すべての脂質、すべてのスパイクイン容量を合わせたもので 6.74 % でした。ポジティブモードとネガティブモードの両方の分析で、%RSD をすべてのスパイクイン容量に対して脂質クラスごとに平均すると、%RSD は 10 % 未満であり、各脂質クラスの %RSD 性能が良好であることを示していま

す。脂質の回収率を最優先する検討では、2:1 MeOH:DCM の 900 μL の 3 回目のアリコートを使用して、3 回目の脂質溶出ステップを実施することができます (図 2)。この 3 回目の脂質溶出は、Lyso-PC、PC、および SM 脂質クラスのプレスパイクイン ²H 標識脂質の 18 ~ 25 % をさらに溶出させ、約 70 ~ 100 % の合計回収率が得られます (データは示していません)。

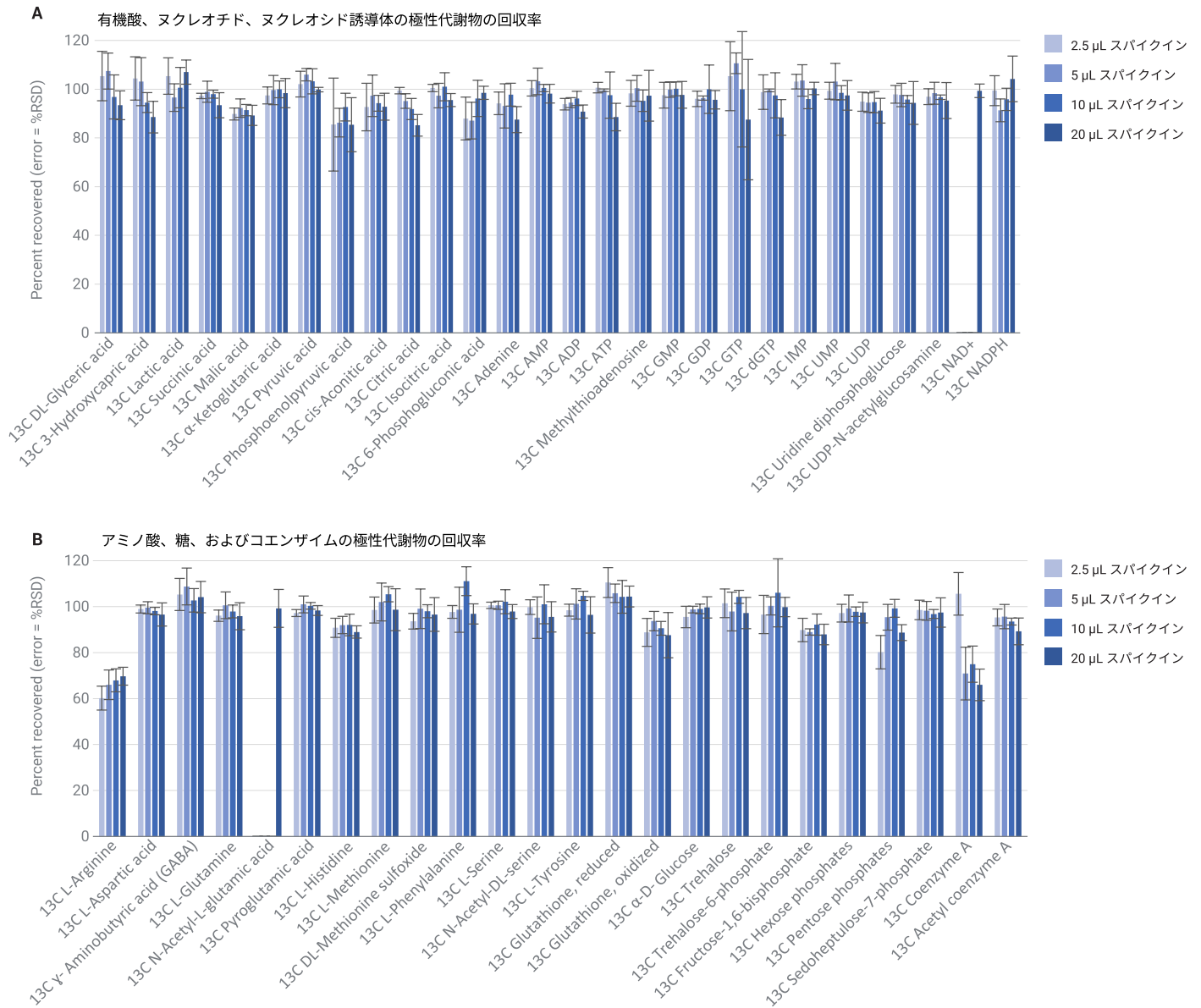


図 7. 主要な化合物クラスにわたる 52 種類の極性代謝物と 4 種類の ^{13}C 標識代謝物スパイクイン容量 (A および B) の回収率。 ^{13}C -NAD+ と ^{13}C -N-アセチル-L-グルタミン酸の 2 つの化合物は、20 μL のスパイクイン容量でのみ確実に検出されたため、回収率の計算が可能だったのは、このスパイクイン容量のみでした。

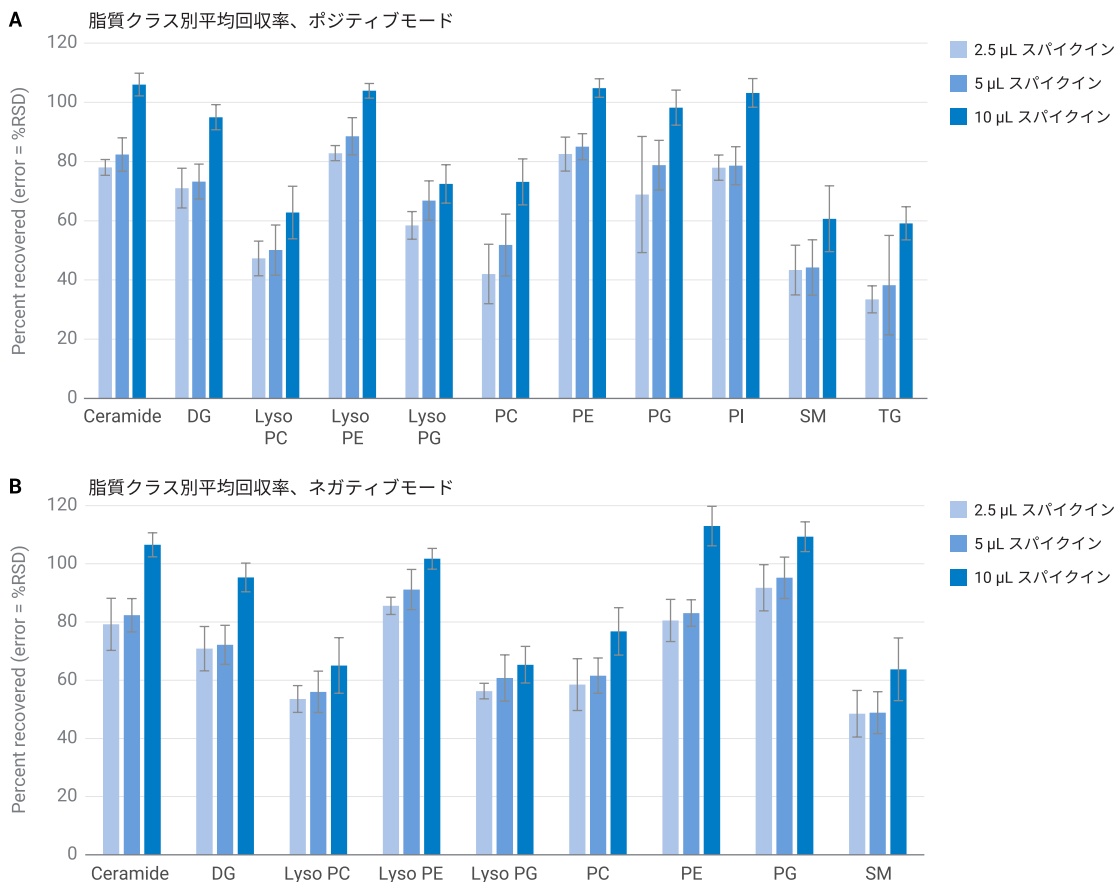


図 8. 正 (A) および負 (B) イオンモードの 3 つの ^2H 標識脂質スパイクイン容量にわたり脂質クラスによって平均化された 53 種類の脂質の回収率。示されているデータは、特定の脂質クラスの検量線の直線範囲内に収まる最大サンプル注入量に対するものです。900 μL の 2:1 MeOH:DCM による 3 回目の脂質溶出は、Lyso-PC、PC、および SM 脂質クラスのプレスパイクイン ^2H 標識脂質の追加の 18 ~ 25 % を溶出させ、約 70 ~ 100 % の合計回収率となりました。

結論

室温での細胞溶解とクエンチング、および自動化された代謝物 + 脂質のデュアル分画に基づく、新しい細胞サンプル前処理メソッドを開発しました。LC/MS サンプル分析およびデータ解析を対象とするアジレントのソリューションと組み合わせることにより、従来のワークフローよりも優れたエンドツーエンドの LC/MS メタボロミクスおよびリポドミクスワークフローが生成されます。室温での細胞溶解およびクエンチングメソッドにより、温度管理が容易になり、細胞溶解およびクエンチ溶液の手動または自動処理が簡素化されます。さらに、

自動化された代謝物 + 脂質のデュアル分画法により、主要な代謝化合物クラスのほぼ定量的な回収が可能になり、ワークフローの自動化から期待される結果である、代謝物と脂質の回収についても優れた再現性が得られます。以上をまとめると、このサンプル前処理メソッドは、哺乳類細胞サンプルから相互相関のあるメタボロミクスおよびリポドミクスデータを高い再現性で日常的に取得するための基礎となります。

参考文献

1. Agilent Bravo Platform による血漿代謝物の抽出の自動化 Agilent Technologies technical overview, publication number 5994-0685JAJP, **2019**.
2. Enabling Automated, Low-Volume Plasma Metabolite Extraction with the Agilent Bravo Platform. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-2156EN, **2020**.
3. Agilent Bond Elut Lipid Extraction 96 ウェルプレートを用いたヒト血漿のリピドミクス分析. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-3824JAJP, **2021**.
4. Lu, W. *et al.* Extraction and Quantitation of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Redox Cofactors. *Antioxid. Redox Signal.* **2018**, 28(3), 167–179. DOI: 10.1089/ars.2017.7014.
5. Meinert, S. *et al.* Quantitative Quenching Evaluation and Direct Intracellular Metabolite Analysis in *Penicillium chrysogenum*. *Anal. Biochem.* **2013**, 438(1), 47–52. DOI: 10.1016/j.ab.2013.03.021.
6. InfinityLab ピークシャープナーユーザーガイド. *Agilent Technologies user guide*, publication number 5991-9516JAJP, **2018**.
7. Metabolomics Analysis of Tuberculosis Drug Activity Using an Agilent 6545 Q-TOF LC/MS. *Agilent Technologies application note*, publication number 5991-7970EN, **2017**.
8. Improving Coverage of the Plasma Lipidome Using Iterative MS/MS Data Acquisition Combined with Lipid Annotator and 6546 LC/Q-TOF. *Agilent Technologies application note*, publication number 5991-0775EN, **2020**.
9. 脂質プロファイリングワークフローによる白血病細胞中の薬物処置により誘発される脂質生成中断の解明. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-1356JAJP, **2020**.
10. Agilent MassHunter VistaFlux による定性フラックス分析 *Agilent Technologies technical overview*, publication number 5991-6756JAJP, **2016**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

RA44763.6819212963

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, August 2, 2022

5994-5065JAJP