

采用 Agilent Bravo 自动化液体处理平台的半自动化脂质萃取方案

应用简报

作者

Magendran Muniandy、Pradeep Narayanaswamy、Federico Torta 与 Markus R. Wenk
新加坡国立大学脂质组学孵化中心 (SLING), 新加坡

Matthew Foong
安捷伦科技公司
新加坡

摘要

此前, 研究人员已开发出协助进行脂质组学样品前处理的自动化方案。这些流程旨在最大程度减少大量样品处理造成的人为误差, 以及缩短样品前处理耗费的时间。本应用简报介绍了使用 Agilent Bravo 自动化液体处理平台对人血浆中磷脂和鞘脂进行半自动化萃取。操作流程包括将起始物料 (通常将血浆置于 1.5 mL 的试管中运送) 转移至 96 孔板中, 可用于保存或脂质萃取。如果用于脂质萃取, 向样品中加入丁醇/甲醇 (BuMe) 混合物。在脂质萃取流程中, 尽管仍需要将样品手动转移至超声处理仪和离心机中, 但本文报道的方案可对大量样品进行统一处理, 从而缩短样品前处理时间并得到较高重现性 (根据安捷伦 UHPLC/MS/MS 系统分析萃取脂质所得的结果)。



Agilent Technologies

前言

脂质组学是代谢组学的一个分支，致力于鉴定生物体中存在的所有脂质，并了解其合成、调节和作用。

随着液质联用系统的不断发展，基于质谱的脂质组学分析受到了越来越多的关注。研究人员现已经开发出多种方法，可对具有重要生物学意义的脂质进行常规分析和定量检测¹。然而，用于从生物样品中萃取脂质的样品前处理技术通常繁琐耗时，而且采用的仍然是 20 世纪 50 年代建立的技术²。

脂质组学实验室通常需要对大量样品进行前处理（如用于大型流行病学研究），这种情况下采用标准的手动前处理就不太现实。本应用简报介绍了使用 Agilent Bravo 自动化液体处理平台建立用于人血浆中脂质萃取的半自动高通量方法。实验结果表明，此流程达到的精度相当于甚至优于传统手动方法的精密度，同时缩短了实验时间，降低了实验成本。另外，脂质萃取方案中需要使用强挥发性和高毒性的有机溶剂，而使用自动工作站可提高实验室的安全性。

仪器与材料

- Agilent Bravo 自动化液体处理平台 (G5523A)
- 96 通道一次性 LT 移液头 (G5498B#042)
- CPAC Ultraflat 加热和冷却板 (Bravo 台板)
- VarioMag Teleshake 板振荡器 (Bravo 台板)

- 96 孔聚丙烯锥形底 (V 型底) 样品板 (孔容量 250 μ L)
- 24 孔 1.5 mL Eppendorf 管样品板 (G5498B#572)
- 安捷伦 96LT 250 μ L 无菌枪头，已过滤 (19477-022)
- Agilent VWorks 自动化控制软件
- 丁醇:甲醇 (1:1) 的 10 mM 甲酸铵溶液 (萃取溶剂)
- 空枪头盒 (用于废弃枪头)
- Corning Axygen 多孔 12 通道试剂槽 (板体积 21 mL)
- Branson 超声波水浴锅和 Sorvall RT Legend 离心机
- 赛默飞 PCR 管盖，全裙边
- Seralab 人血浆 EDTA K2，未过滤

脂质标准品

购自 Avanti Polar Lipids 公司：

- 1,2-二肉豆蔻酰-*sn*-甘油-3-磷酸胆碱 (DMPC)
- 1,2-二肉豆蔻酰-*sn*-甘油-3-磷酸乙醇胺 (DMPE)
- N-十七碳酰-D-赤式-鞘氨醇 (Cer)
- N-十二碳酰-D-赤式-神经鞘氨醇磷酸胆碱 (SM)
- 1-花生酰-2-羟基-*sn*-甘油-3-磷酸胆碱 (LPC)

LC/MS/MS 分析

- Agilent 1290 Infinity 系列液相色谱仪与 Agilent 6460 三重四极杆质谱仪联用，在正离子和负离子动态 MRM 模式下采集得到数据
- Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHD 2.1 \times 50 mm, 1.8 μ m
- 流动相 A: 60/40 水/乙腈的 10 mM 甲酸铵溶液
- 流动相 B: 90/10 异丙醇/乙腈的 10 mM 甲酸铵溶液

LC-MS/MS 方法

液相色谱条件	
柱温	40 $^{\circ}$ C
进样量	2 μ L
梯度	0 min (A:B = 80:20), 2 min (A:B = 40:60), 7 min (A:B = 0:100), 9 min (A:B = 0:100), 9.01 min (A:B = 80:20), 10.50 min (A:B = 80:20)
质谱条件	
电离模式	ESI
电离极性	正离子和负离子
干燥气流速	5 L/min
干燥气温度	300 $^{\circ}$ C
雾化器压力	45 psi
鞘气温度	250 $^{\circ}$ C
鞘气流速	1 L/min
喷嘴电压	500 V
毛细管电压	1000 V

方案流程

分装样品

与多数实验室的标准流程相同，将初始样品分成小份，以便长期保存或用于分析物萃取。本方案的第一步就是将 10 μL 份的初始人血浆样品从 1.5 mL 试管转移至 96 孔板，用于样品保存或脂质萃取。

1. 用于样品转移步骤的孔板位置如图 2A 所示。将用于 1.5 mL Eppendorf 管的 24 孔支架和目标 96 孔板置于 CPAC Ultra-flat 冷却台板（台板 4）上，使样品温度维持在 4 $^{\circ}\text{C}$
2. 由 VW 软件创建的方法可将台板 4 的 24 个样品分装至台板 6 的 96 孔板中。根据表 1 对方法中的排液目标、移液头模式和台板 1 中的填充枪头进行更改

3. 样品萃取流程需要的所有孔均充满样品后，即可单独启动脂质萃取方案。我们选择在丁醇/甲醇 (BuMe) 混合物中萃取脂质，这样仅有单一一种有机相，无需进行之前的手动方法中报道的相分离。由于两相会使 Bravo 平台的样品回收出现问题，因此本方法优化为单相萃取

脂质萃取

1. 脂质萃取的板方向如图 2B 所示。将含有样品的 96 孔板和含有 BuMe 与内标混合物的多孔 12 通道溶剂槽（用于后续脂质定量分析）置于 CPAC Ultra-flat 冷却板上（台板 4 和台板 6），维持 4 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温

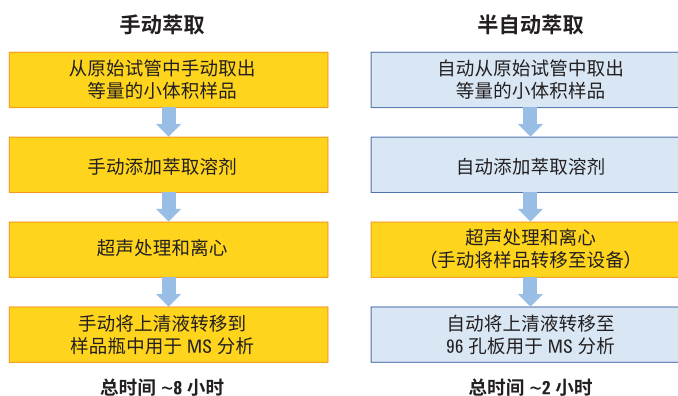


图 1. 手动和半自动方案的工作流程

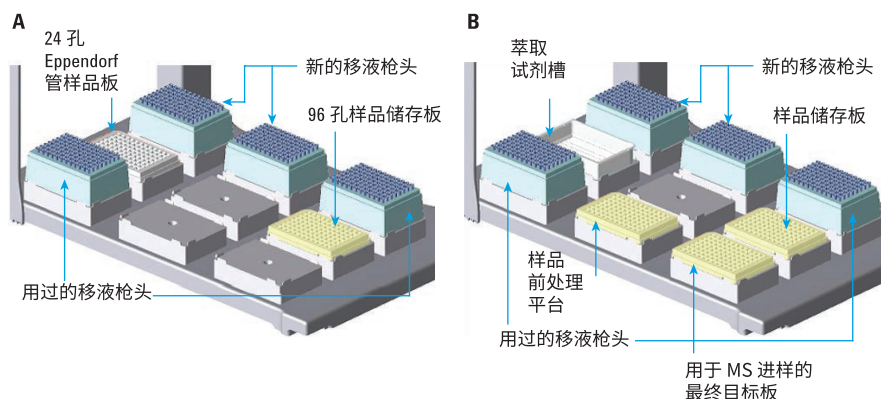


图 2. A) 样品转移配置。B) 脂质萃取配置

表 1. 移液头模式、排液目标和台板 1 中的填充枪头。初始样品转移使用的参数

移液头模式		台板 1 中的填充枪头		
子设备模式	子设备方向	列	行	排出位置
整列	左前	2、4、6、8、10	A、C、E、G	排液：1 选择列：1
整行	左后	2、4、6、8、10	A、C、E、G	排液：1 选择行：1
整列	左前	2、4、6、8、10	A、C、E、G	排液：1 选择列：2
单室	左后	2、4、6、8、10	A、C、E、G	排液：1 选择：B2

2. 本方案要求在超声步骤之前均匀混合血浆和 BuMe，故在台板 8 的 VarioMag Teleshake 板振荡器中对样品进行萃取
3. 从台板 1 取下枪头，然后在台板 6 中填充萃取溶剂。之后，将 100 μL 萃取溶剂以及后吸取的 10 μL 空气

（防止转移过程中的溶剂泄漏）转移至含样品的孔板中。由于液体蒸汽压和表面张力不同，要根据溶剂特异性吸取和排出体积将 BuMe 定义为单独的液体类型。我们根据相关的专业应用简报³中报道的流程，对这些体积值进行了经验性验证。通过吸取和排出不

同体积的特定溶剂得到了体积校正因子表，用于确保准确性。校正流程必不可少，这对减少排出小体积有机溶剂的误差具有重要作用

4. 将萃取溶剂与脂质标准品混合物排出到台板 8 的目标孔板之后，将每个孔分别盖上 PCR 管盖，然后振摇 60 秒钟。该步骤完成后，将样品板从 Bravo 平台中取下置于超声水浴中，在室温下放置 60 分钟。然后将样品板置于 Sorvall RT 离心机中，以 4200 rpm 的转速离心 20 分钟，使蛋白质组分沉淀
5. 将板再次放置到 Bravo 平台的台板 8 中，将 70 μL 上清液（后吸取体积 10 μL ）转移至台板 9 的收集板中。这个样品板可直接在 Agilent 1290 Infinity 自动进样器中进行 UHPLC/MS/MS 分析

结果与讨论

本实验用于比较手动萃取以及使用 Agilent Bravo 平台自动萃取商品化人血浆中脂质的效率。对同一个人血浆样品的不同等份 ($n = 12$) 进行磷脂和鞘脂萃取，并使用三重四极杆质谱仪的反相分离和多反应动态监测 (MRM) 检测，通过内部开发的 LC/MS/MS 方法对以上两种脂质进行定量分析。目

的在于评估手动和自动方法能否得到相当的结果。分析了 115 种分子类型不同的脂质，并比较了每种类型的浓度平均值、标准偏差 (SD) 和相对标准偏差百分比 (%RSD)。由手动和自动方法得到的脂质平均浓度具有较高相关性 ($R = 0.9964$)，表明两种方法之间的重现性良好 (图 3)。

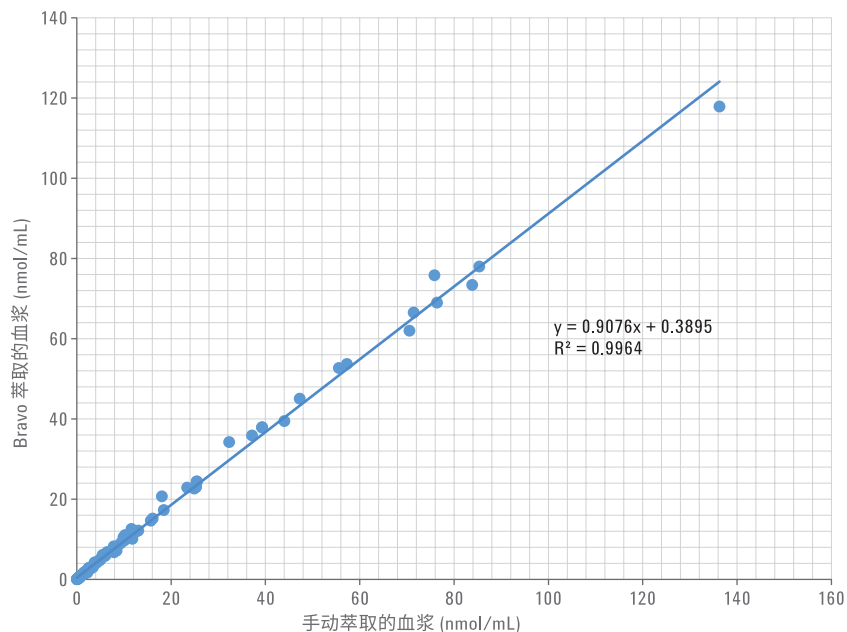


图 3. 半自动前处理方法与手动方法的准确度和精密度对比。通过传统手动方法 ($n = 12$) 和半自动方法 ($n = 12$) 处理的内源性脂质的浓度相关性 (nmol/mL 血浆)

每种脂质标准品的变异检测结果 (表 2) 表明, Bravo 平台上的自动方法产生的 %RSD 比手动方法更低。

结论

结果表明, Agilent Bravo 自动化液体处理平台可以实施任意单相型脂质萃取方法, 产生的样品适用于脂质组学中的 LC/MS/MS 分析。使用 Agilent Bravo 的自动化处理可提高方法通量, 并表现出始终如一的分析精度。96 个样品使用手动方法需要的前处理时间为 8 小时左右, 而自动化方法仅需要 2 小时。据估计, 分析实验室中 60%-80% 的工作和运行成本都在分析设备进样前的样品前处理中产生, 因此本实验方案可大大减少脂质分析的成本/样品量。

参考文献

1. Wenk, M. R. Lipidomics: New Tools and Applications. *Cell* **2010**, *143*(6), pp 888-895
2. Bligh, E. G; Dyer, W. J. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, *37*(8), pp 911-917
3. Albert, K. J. Optimizing Accuracy Performance on an Agilent Bravo platform using the Artel MVS, *Artel Application Note* 12A6480A, **2013**

表 2. 在报道实验中使用的代表每种类型的脂质标准品峰面积变异系数

脂质标准品	%RSD 半自动萃取	%RSD 手动萃取
PE 14:0/14:0	4.80	7.13
PC 14:0/14:0	5.85	5.72
C17 神经酰胺	7.32	11.97
LysoPC 20:0	5.27	5.05
SM 30:1	3.79	4.96
GluCer d18:1/8:0	6.81	6.34

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2015
2015年7月24日，中国出版
5991-5724CHCN



Agilent Technologies