

基于多重衍生生化策略的质谱成像技术助力 临床空间代谢组学研究

iMScope-014

摘要： 本文展示了一种全新的生物组织样品多重衍生生化策略结合成像质谱显微镜 iMScope QT 系统开展临床空间代谢组学研究的应用案例。使用衍生试剂 3- 硝基苯胍同步衍生化含羰基、羧基和磷酸基的内源性代谢物，极大地提升了 MALDI 离子源中灵敏度较差的氨基酸、有机酸、糖类化合物的检测能力，拓宽了质谱成像系统在源性小分子代谢物分析中的应用面。该方法兼容性强，可以简化细胞中糖酵解、三羧酸循环、磷酸戊糖途径等空间代谢分析需求，具有超高的检测灵敏度和覆盖范围，完美助力临床空间代谢组学研究。

关键词： 质谱成像 iMScope QT 空间代谢组 氨基酸代谢 有机酸代谢

技术特点：

- ❖ 首次采用 3- 硝基苯胍同步衍生生化策略，建立了基于 iMScope QT 的空间代谢组学分析方法。
- ❖ 该方法操作简单，可同时靶向衍生含羰基、羧基和磷酸基的代谢物，质谱成像灵敏度高，代谢物覆盖范围广。

近年来质谱技术的迅速发展为医学检验水平的提升奠定了坚实基础，传统医学模式正进入到多组学整合分析的精准诊断时代，质谱技术作为组学研究的核心技术，其在疾病生物标志物研究领域的优势越来越受到检验医学的重视。

空间代谢组学是一种基于质谱成像 (Mass spectrometry image, MSI) 的代谢组学技术，它突破了传统代谢组学信息维度不足的缺点，将组学信息拓展到了空间水平，极大地提升了对样品信息的认知。

通过对组织样本的原位检测，MSI 可同时完成对目标代谢物的定性和定量分析，并保留其空间维度信息，从而对样本区域进行分析或者获取特定代谢物空间分布谱图。

基于 MALDI 离子源的 MSI 技术是目前应用最广泛的质谱成像技术，它可以提供接近亚细胞水平的 5 μm 高空间分辨率，成像细节丰富。其工作原理是：将分析物分散在基质分子中并形成共结晶，当使用一定强度的激光 (355 nm) 照射晶体时，共结晶吸收能量而引起被分析物的离子化，分析物电离后进入质谱

被检测；根据样本表面各像素点离子的质荷比和离子强度信息，质谱成像软件绘制出对应分子或离子在样本表面的空间分布图。

MALDI 的离子化方式在生物大分子的分析，如蛋白质、多肽、多糖及核酸等应用较广，但在小分子量 ($m/z < 1000$) 化合物的分析方面会受到一些限制，主要原因在于：常用的有机小分子基质对紫外光有很强的吸收，易发生电离，在低分子量区产生大量的离子峰，对小分子分析物产生抑制效应，难以确定一个峰是信号峰还是背景峰，导致分析物的灵敏度大大受限。因此，针对生命体系相关的氨基酸、多肽、代谢物、激素等小分子的 MALDI-MSI 分析和应用是空间代谢组学研究中的热点和难点之一。

本文介绍了一种采用 3- 硝基苯胍 (3-NPH) 多重衍生生化结合岛津新一代成像质谱显微镜 iMScope QT 开发的针对含羰基、羧基和磷酸基类代谢物的超高检测灵敏度的质谱成像分析方法，供相关专用领域从业者参考。

■ 基于 3- 硝基苯胍的衍生生化策略与分析流程

1.1 样品前处理

- 第一步 切片制备：使用 CMC 或明胶水溶液做包埋剂，将新鲜采集的生物组织样本用铝箔纸或冻存盒包裹，置于液氮中快速冷冻；使用冰冻切片机制作组织切片（厚度 10 μm 左右），将实验组和对照组切片贴于同一张导电载玻片上，经真空干燥处理后，将组织切片置于 iMScope QT 中进行对焦并拍摄高清显微光学图像。
- 第二步 衍生化：配制衍生试剂（含 25 mM 3-NPH、15 mM EDC、0.5% 吡啶、70% 甲醇、29.5% 水），取 300 μL 衍生试剂均匀得喷涂于切片表面，之后将切片置于低温且湿润的甲醇环境中反应 30 min。
- 第三步 喷涂基质：将衍生处理后的切片置于 iMLayer 基质升华仪中涂敷 9-AA 基质（升华温度 220°C，膜厚 0.9 μm），经真空干燥后置于 iMScope QT 进行质谱成像分析。

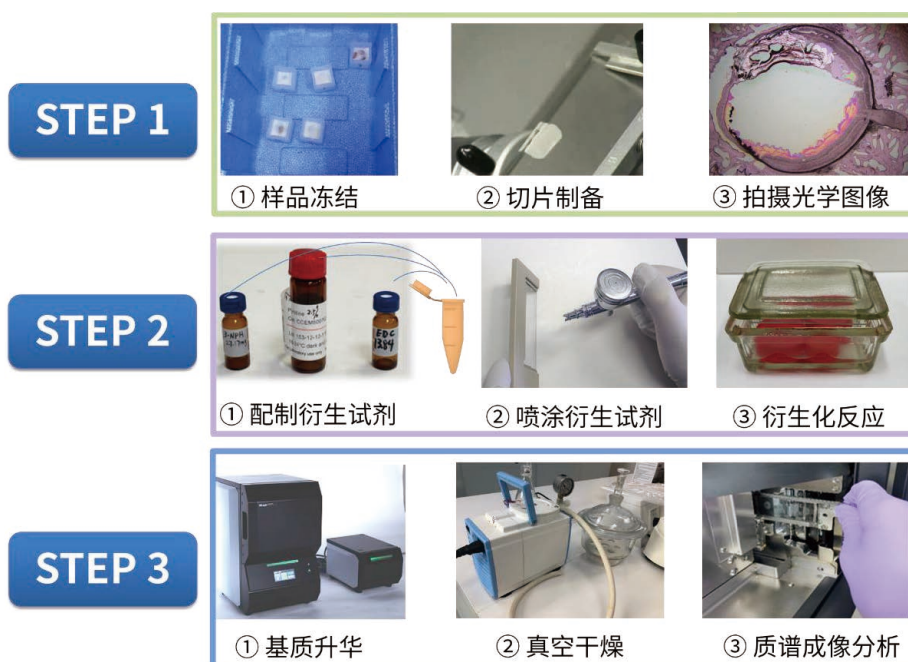


图 1 质谱成像上机分析流程图

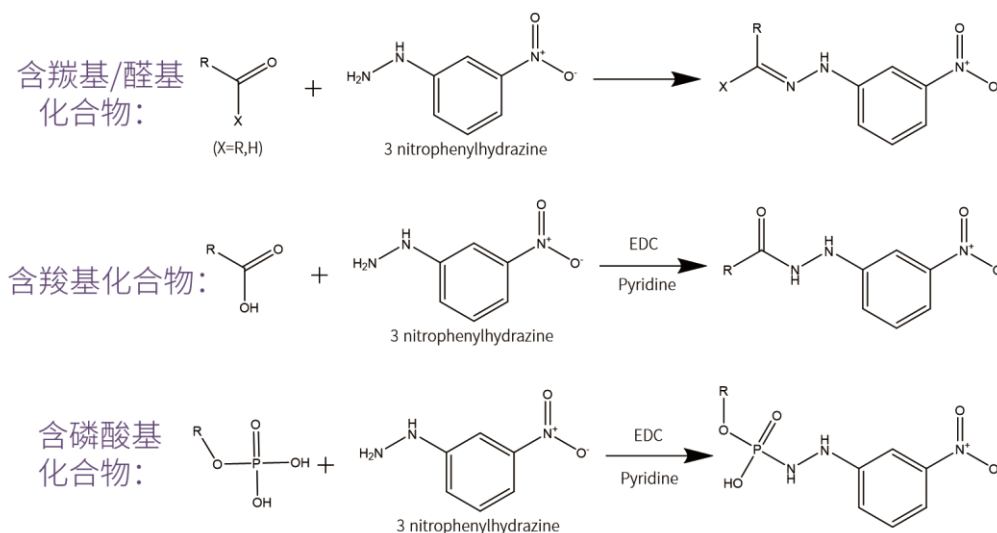


图 2 原位衍生化反应机理

1.2 仪器和参数



图3 岛津新一代质谱成像显微镜 iMScope QT

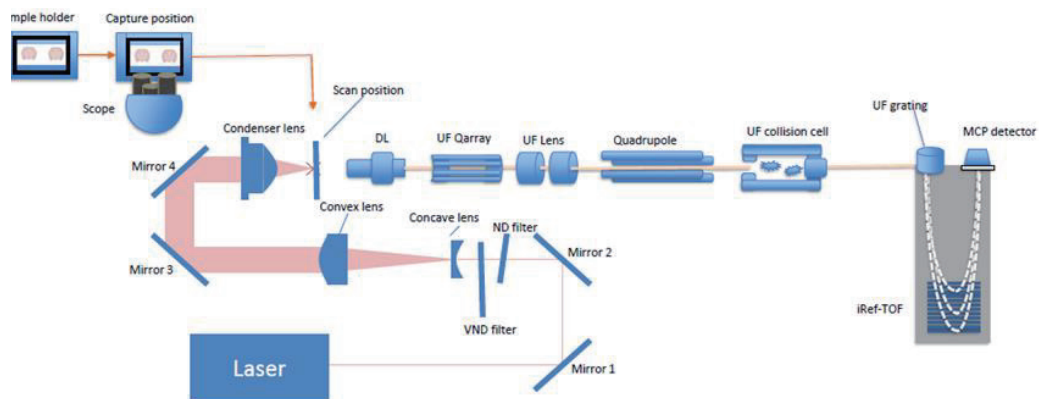


图4 岛津 iMScope QT 内部结构图

质谱成像参数:

分析模式	正离子模式	激光器	355 nm YAG激光器
像素间距	10 μm × 10 μm	激光照射直径	5 μm
激光能量	50-70 (范围0-100)	激光照射次数	200 shots
扫描频率	5000 Hz	扫描范围	m/z 80-1000

■ 方法优势

氨基酸、有机酸、糖类等小分子代谢物的质谱成像分析容易受到 MALDI 基质的电离抑制效应影响，灵敏度往往受限，经过 3-NPH+EDC+Pyridin 联合衍生化处理后，相关的含羰基、羧基和磷酸基类代谢物的信号强度被放大，原本的噪点变成了清晰图像，MSI 成像质量优异。

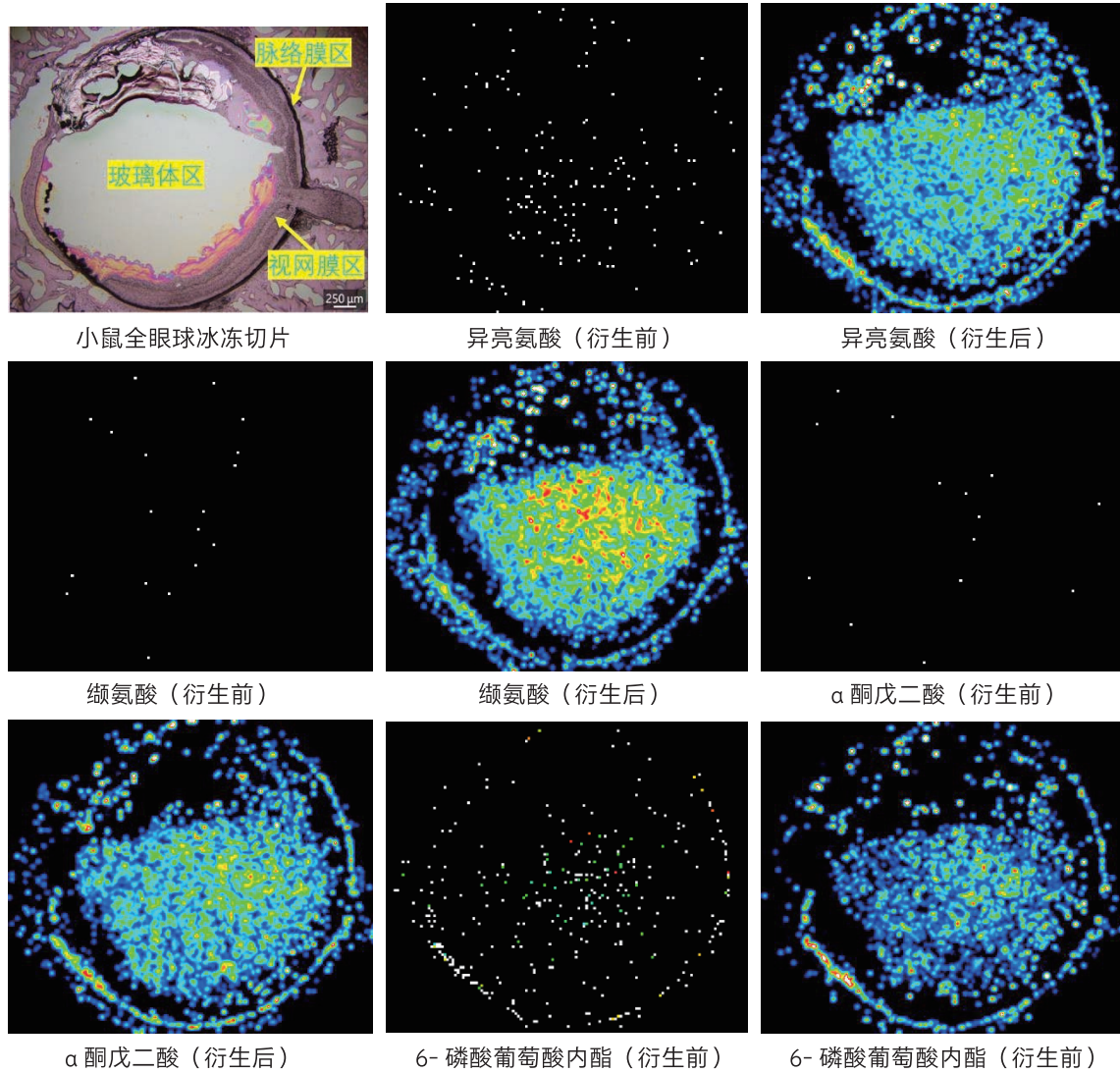


图 5 3-NPH 衍生前后小鼠全眼球成像图像

在糖尿病性眼部疾病模型研究中，结合高清显微图像与质谱成像分析，可知在代谢能力活跃的玻璃体和脉络膜区域相关小分子代谢物较为丰富，而在视网膜等视神经区域相关代谢物丰度较低，呈现典型的代谢差异分布特征。

■ 结论

基于光学显微镜 +MALDI-MSI 的分子成像技术的 iMScope QT 平台与常用的医学影像技术相比，它可以揭示早期病变的分子特征，是疾病早期诊断和治疗研究的新工具，以高性能质谱为核心的多组学研究已成为各类疾病筛查、早期诊断、治疗监测和预后评估的生物标志物创新发现的关键技术平台，本文展示的 3-NPH 原位衍生化 MSI 前处理方法具有操作过程简单、兼容性强、灵敏度高等特点，可以简化细胞中糖酵解、三羧酸循环、磷酸戊糖途径等空间代谢分析需求，完美助力临床空间代谢组学研究。

岛津应用云

