

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-307

**КОМБИНАЦИЯ ПРОТОКОЛА ПРОБОПОДГОТОВКИ КЛЕТОЧНЫХ ОБРАЗЦОВ
И АНАЛИТИЧЕСКОГО ПОДХОДА ДЛЯ ТАРГЕТИРОВАННОГО
МЕТАБОЛОМНОГО СКРИНИНГА МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС**

**THE COMBINATION OF CELL SAMPLE PREPARATION PROTOCOL AND ANALYTICAL APPROACH
FOR TARGETED METABOLOMIC SCREENING USING LC-MS/MS**

Н. В. Басов^{1,2}, А. Д. Рогачев^{1,2}, Е. А. Бутикова³, М. А. Сотникова¹⁻³, Ю. С. Сотникова^{2,4}, Ю. В. Патрушев^{2,4},
М. А. Мельченко^{1,2}, И. А. Разумов⁵, Н. Ф. Салахутдинов², А. Г. Покровский¹

¹*Новосибирский государственный университет*

²*Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН*

³*НИИ клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск*

⁴*Институт катализа им. Г. К. Борескова СО РАН, Новосибирск*

⁵*Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*

N. V. Basov^{1,2}, A. D. Rogachev^{1,2}, E. A. Butikova³, M. A. Sotnikova¹⁻³, Yu. S. Sotnikova^{2,4}, Yu. V. Patrushev^{2,4},
M. A. Melchenko^{1,2}, I. A. Razumov⁵, N. F. Salakhutdinov², A. G. Pokrovsky¹

¹*Novosibirsk State University*

²*N. N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS*

³*Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology —
branch of the Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk*

⁴*Boreskov Institute of Catalysis, Novosibirsk*

⁵*Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk*

✉ basov@nioch.nsc.ru

Аннотация

Разработан подход к метаболомному скринингу при использовании монолитной колонки и двух режимов ВЭЖХ. Также разработан и апробирован протокол пробоподготовки клеток, позволяющий проводить анализ образцов, содержащих материал от 10 000 клеток и более. Комбинация аналитического подхода и протокола пробоподготовки позволяет определять более 350 метаболитов за один анализ.

Abstract

An approach to metabolomic screening using a monolithic column and two LC modes was developed. We have also developed and tested a cell sample preparation protocol that allows us to analyze samples containing material from 10,000 cells or more. Combining the analytical approach with the sample preparation protocol enables the determination of over 350 metabolites in a single analysis.

Для анализа биологических молекул, таких как нуклеотиды, биогенные амины, аминокислоты и липиды, ввиду различий в их химических свойствах традиционно требуется разработка отдельных аналитических методик. Современные подходы к таргетированному метаболомному скринингу направлены на одновременное определение широкого спектра метаболитов за один анализ.

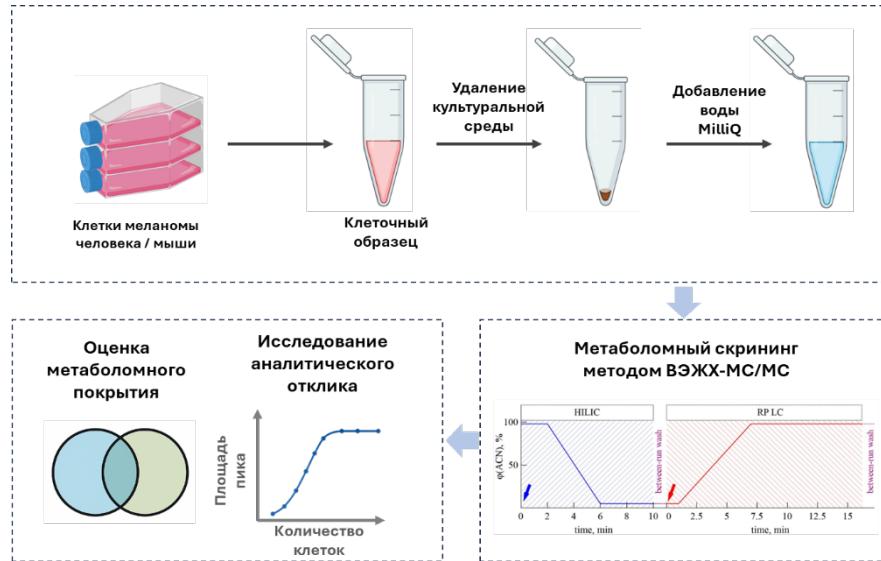
Ранее нами была синтезирована органическая монолитная колонка путем сополимеризации стирола, дивинилбензола и 1-винил-1,2,4-триазола. Поверхность сорбента одновременно содержит гидрофобные и донорно-акцепторные центры. Показано, что данная колонка с монолитным сорбентом может быть использована для скрининга метаболитов в режимах как обращенно-фазовой (ОФХ), так и гидрофильтрной хроматографии (ГФХ), а применение двух режимов хроматографирования при метаболомном скрининге является взаимно дополняющим и может способствовать увеличению охвата метаболитов из различных метаболических путей [1]. Благодаря устойчивости полимерного материала колонки к высокоосновным средам мы использовали элюенты А (20 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ + NH_3 , $\text{pH} = 9,8$) и Б (ацетонитрил), переключая режимы ВЭЖХ без замены элюентов и колонки. Оптимизированный комбинированный градиент (ГФХ + ОФХ) длится 28 мин и обеспечивает детекцию более 400 метаболитов за один анализ.

Эффективность подхода сравнивалась с методиками, основанными на использовании коммерчески доступных колонок [2]. Было показано, что число детектируемых метаболитов при анализе контрольного образца плазмы крови человека с использованием разработанного подхода было значительно больше, чем при использовании коммерчески доступных колонок. Предложенный аналитический подход, реализуемый на стандартной одномерной системе ВЭЖХ-МС/МС, сочетает широкий спектр детектируемых метаболитов и высокую скорость анализа. Он применим для метаболомного скрининга плазмы крови, клеточных культур и других биологических матриц, где необходим одновременный скрининг широкого спектра метаболитов из различных метаболических путей.

Разработка универсального протокола пробоподготовки для метаболомного анализа клеточных линий является важным этапом в исследовании метаболических изменений, происходящих в клетках под воздействием различных факторов, включая физические воздействия и ксенобиотики. В дополнение к аналитическому подходу к метаболомному скринингу был разработан и апробирован протокол пробоподготовки клеток. Комбинация протокола пробоподготовки и анализа обеспечивает надежное детектирование метаболитов в широком диапазоне концентраций клеточного материала, от 10 тыс. до 1 млн клеток в образце.

В работе были построены зависимости аналитического сигнала метаболитов от содержания клеток в образце. Так, анализ клеток линий SK-MEL-28 и B-16 показал, что оптимальное содержание клеток, необходимое для достижения максимального метаболомного покрытия, составляет 400–500 тыс. клеток. В этих условиях удалось идентифицировать до 220 метаболитов в режиме ГФХ и до 170 метаболитов в режиме ОФХ. Уменьшение количества клеток ниже 100 тыс. снижает чувствительность анализа, а увеличение свыше 500 тыс. не приводит к улучшению покрытия. Особое внимание было уделено влиянию размеров клеток на результаты анализа. Линия SK-MEL-28, характеризующаяся большим средним диаметром клеток (20–25 мкм) по сравнению с линией B16 (15–20 мкм), продемонстрировала более высокое метаболомное покрытие при одинаковом количестве клеток. Это объясняется большим объемом цитоплазмы и большей площадью поверхности клеточных мембран.

Данный протокол может быть модифицирован этапами сортировки клеток или специфическими модификациями для исследований отдельных клеточных субпопуляций, что расширит его применение в специализированных задачах. Таким образом, предложенная комбинация аналитического подхода и протокола пробоподготовки (см. рисунок) является перспективным инструментом для проведения широкого спектра биомедицинских исследований.



Ключевые этапы проведения метаболомного скрининга клеток

Литература

- Басов Н. В., Рогачев А. Д. и др. Исследование хроматографического поведения метаболитов из плазмы крови методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием монолитной колонки с сорбентом на основе 1-винил-1,2,4-триазола // Химия в интересах устойчивого развития. 2022. Т. 30, № 7. С. 591–598.
- Basov N. V., Rogachev A. D., Aleshkova M. A. et al. Global LC-MS/MS targeted metabolomics using a combination of HILIC and RP LC separation modes on an organic monolithic column based on 1-vinyl-1,2,4-triazole // Talanta. 2024. Vol. 267. P. 125168.