

Application News

No. C157

LC/MS

代谢组学和脂质组学的复合组学方法

以大肠杆菌和酵母为首的微生物被广泛应用于食品、生化、能源等各种产业领域进行大量有用物质的生产。例如在食品领域中，以酒类和发酵食品为对象，微生物的发酵工艺得到了广泛运用，并以效率更佳的发酵生产以及附加价值较高的代谢产物生产为目标而进行着微生物育种。像这样，以提高有用物质生产效率或提高高附加价值化合物的产能为目的的微生物发酵育种，需要通过代谢组学来进行代谢变化的监控。在监控代谢变化时，不仅要了解目标物质，还必须了解包含其前体、中间体在内的代谢变化，因此能同时分析大量化合物的代谢组学方法极其有效，备受期待。此外，本文在通过代谢组学来评价代谢变化的同时，还与以磷脂为对象的脂质组学的结果相结合尝试了通过复合组学方法来研究代谢变化。在此，我将以能高效生产含硫代谢产物—麦角硫因的大肠杆菌作为样品，对在合成基质的半胱氨酸时使用的硫源中添加了硫代硫酸盐或硫酸盐时，通过代谢组学和脂类组学的方法来评价有关含硫代谢产物依赖于培养过程的变化实例进行介绍。

■ 大肠杆菌提取物的 LC/MS 分析

使用添加了 50 mM 硫代硫酸盐或 100 mM 硫酸盐作为硫源的最小培养基，在发酵罐中对大肠杆菌进行了培养。此外为了评价培养过程的代谢产物变化，分别在 0、24、48、72、96、120、168、216h 后从培养悬浮液中回收了部分菌体。在测定回收大肠杆菌的 OD 值后，对其进行调整，使其与 OD=2.1 mL 相当，之后除去培养基，在超纯水中对菌体进行冲洗。接下来，使用 Bligh-Dyer 法从菌体中提取了亲水性代谢产物和磷脂。回收水层和氯仿层，使用浓缩离心机干固后，溶于超纯水和甲醇中，然后适当稀释后通过 LCMS-8060 进行了分析。分析代谢产物时，采用 LC/MS/MS 方法包 一级代谢产物 ver.2 的非离子对法，分析磷脂质时，在 LC/MS/MS MRM 库，磷脂质性能分析的分析条件下进行了同时分析。各自的分析条件如表 1 所示。此外，对在添加了硫代硫酸盐的培养基中培养的大肠杆菌提取液进行了一级代谢产物的 MRM 色谱分析以及磷脂的 MRM 色谱分析，示例（均为经过 0 小时和经过 72 小时的时间点）如图 1 所示。

T. Nakanishi

表 1 代谢组学和脂质组学的分析条件

一级代谢产物的分析 (LC 分析条件)	
色谱柱	: PFP 柱 (2.1×150 mm, 3 μm)
流动相 A	: 0.1 % formic acid – Water
流动相 B	: 0.1 % formic acid – Acetonitrile
流速	: 0.25 mL/min
时间程序	: Linear gradient
柱温箱温度	: 40 °C
进样量	: 3 μL

磷脂的分析 (LC 分析条件)	
色谱柱	: C8 色谱柱 (2.1×150 mm, 2.6 μm)
流动相 A	: 20 mM ammoniumformate – Water
流动相 B	: 50 % Acetonitrile/50 % 2-Propanol
流速	: 0.3 mL/min
时间程序 (B conc.)	: 低速
柱温箱温度	: 45 °C
进样量	: 3 μL

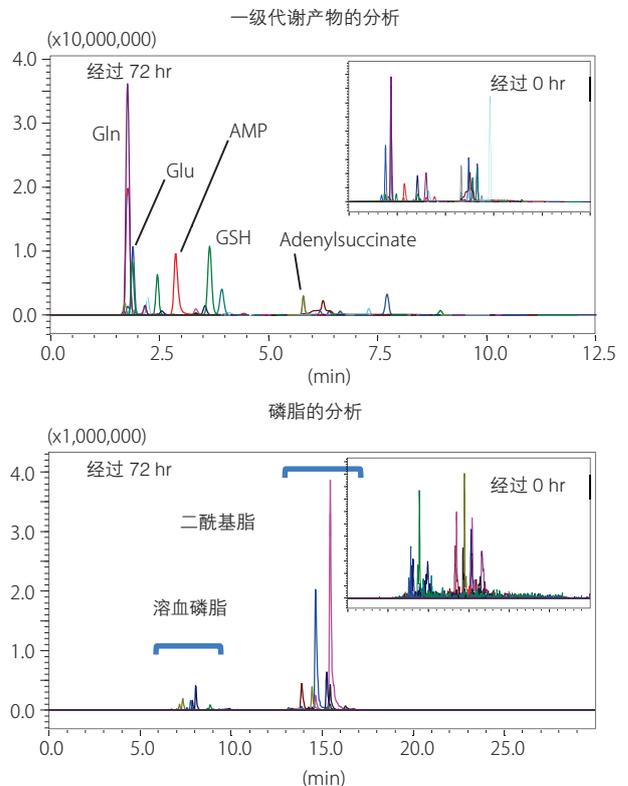


图 1 在添加了硫代硫酸盐的培养基中培养的大肠杆菌提取物的 MRM 色谱 (一级代谢产物和磷脂)

通过复合组学进行的代谢变化评价

在本次分析中,检测到了49种一级代谢产物成分,56种磷脂成分。根据图1的MRM色谱图也可确认,根据培养时间的不同,菌体中的代谢产物和磷脂会发生很大变化。接下来,在添加了硫代硫酸盐和硫酸盐的培养基中,对各个培养时间下的与以麦角硫因的基质一半胱氨酸为首的含硫代谢产物的面积比进行了比较,结果如图2所示(纵轴:面积比、横轴:时间)。此外,图2还同时显示了磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸等磷脂的经时变化(纵轴:面积、横轴:时间)。在图2的半胱氨酸合成相关代谢途径上,确认了硫源的不同会导致培养时的代谢产物发生变化。尤其是在从对数生长期迁移至稳定期后的培养时间(72小时以降)内,可见添加了硫代硫酸盐的培养基中的半胱氨酸合成关联化合物的增加。此外,分析磷脂的变化后,可确认在对数生长期的硫酸盐添加培养基中,名

为PE和PS的磷脂大幅增加。大肠杆菌中的PE是由PS作为基质生物合成而来,由此揭示了细胞膜的主要成分—PE会优先被生物合成(因为PE上升的培养时间比PS更早)。此外,具有位于半胱氨酸合成途径上游的丝氨酸的结构PS,在作为基质的丝氨酸不足时,可能会对半胱氨酸合成途径造成影响。像这样,通过代谢组学方法,可知向培养基中添加不同的硫源会对以半胱氨酸为首的含硫代谢产物的产生造成影响。此外,通过与脂质组学数据交叠对照,能够更进一步的理解关联代谢的变化。本文以与半胱氨酸产生相关的含硫代谢产物为中心,对大肠杆菌的培养过程相对应的代谢变化进行了分析,通过采用三重四极杆质谱仪进行的代谢组学分析和脂质组学分析相结合,使更为详细的代谢变化评价成为了可能。

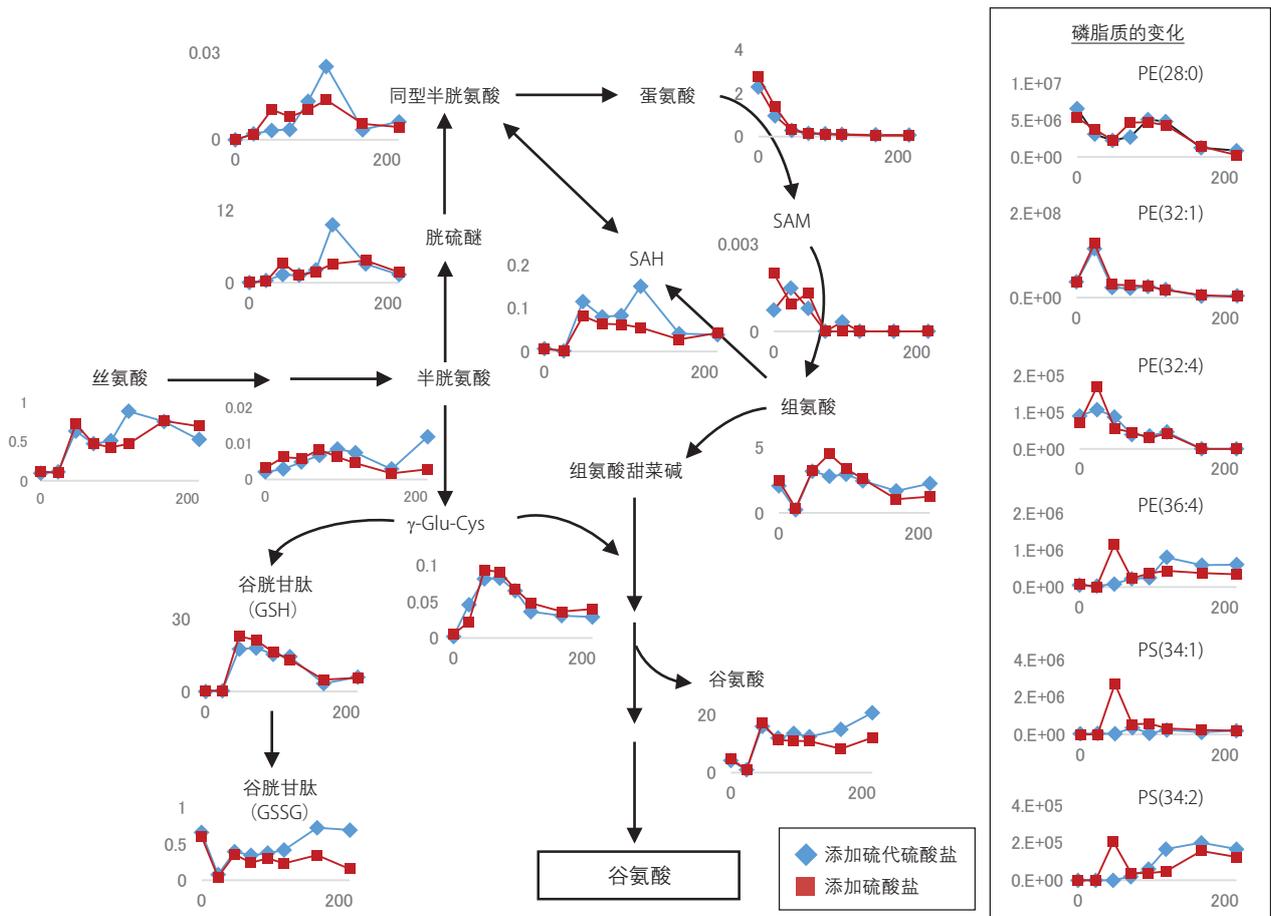


图2 在添加了硫代硫酸盐和硫酸盐的培养基中培养的大肠杆菌中的含硫代谢产物和磷脂的变化

* 大肠杆菌样品由国立大学法人筑波大学 国际产学合作总部的大津产生老师、河野祐介老师提供。
* 本研究的进行过程中活用了农林水产省的“农林水产业、食品产业科学技术研究推进事业”。



岛津企业管理(中国)有限公司
岛津(香港)有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话: 800-810-0439
400-650-0439

免责声明:

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售;
* 本资料中的所有信息仅供参考,不予任何保证。
如有变动,恕不另行通知。

第一版发行日: 2017年5月