

# GCMS-TQ8050 结合代谢物数据库分析 鼠伤寒沙门菌代谢物

## GCMSMS-146

**摘要：**本文使用岛津公司三重四极杆气相色谱质谱联用仪 GCMS-TQ8050 结合代谢物数据库，在无标准品情况下，建立了 467 种代谢物的 MRM 筛查方法，利用此筛查方法对鼠伤寒沙门菌 slyA 基因缺失株胞内及胞外样本中代谢物进行筛查定性，分别筛查出胞内代谢物 77 种，胞外代谢物 31 种，并以 2- 异丙基苹果酸为内标对筛查出的代谢物进行了半定量。

**关键词：**三重四极杆气相色谱质谱联用仪 代谢物 鼠伤寒沙门菌

SlyA 蛋白，由 slyA 基因编码，是鼠伤寒沙门菌的一种双分子螺旋、翼状转录调控子。最初，slyA 被认为是编码大肠杆菌溶血素的基因，近年来的研究发现，slyA 不仅编码溶血素，还参与鼠伤寒沙门菌毒力的调控。

目前对鼠伤寒沙门菌 SlyA 蛋白的研究仅仅局限于转录水平，进一步阐明 SlyA 蛋白对代谢谱的影响将有助于揭示鼠伤寒沙门菌的毒力调控机制，推动新型药物及疫苗的研发。

岛津公司专门为代谢物分析开发了代谢物数据库，该数据库覆盖了 568 种 (Scan)、475 种 (MRM) 代谢物 (氨基酸、有机酸、脂肪酸等) 的质谱图、保留指数、MRM 离子对等信息，可实现在无标准品的情况下快速筛查样品中代谢物。本文使用 GCMS-TQ8050 结合岛津代谢物数据库，建立了 467 种代谢物 MRM 筛查方法。使用 MRM 方法对鼠伤寒沙门菌 slyA 基因敲除菌株的胞内及胞外样本中的代谢物进行了筛查定性。

## 实验部分

### 1.1 仪器

GCMS-TQ8050 三重四极杆气质联用仪

### 1.2 分析条件

色谱柱：DB-5 (30 m×0.25 mm×1.0 μm)

柱温程序：100°C (4 min)<sub>4°C /min</sub> 320°C (8 min)

进样口温度：280°C

载气控制方式：恒线速度

线速度：39 cm/sec

进样方式：分流进样

分流比：10:1

离子源温度：200 °C

接口温度：280 °C

检测器电压：调谐电压 +0.5 kV

采集模式：MRM

### 1.3 样品前处理

#### 1.3.1 胞内代谢物提取

菌株淬灭处理：吸取 5 mL 对数生长期的菌液加入到事先准备好的 25 mL 60%，-40°C 的冷甲醇 / 水溶液中。随后于 -10°C，12000 r/min，离心 5 min，弃去上清液。收集菌体并向其中加入 5 μL 2- 异丙基苹果酸吡啶溶液 (0.5 μg/μL) 作为内标物。

代谢物提取：移取 2 mL 乙醇至菌体沉淀中，涡旋混匀后于 90°C 孵育 10 min，孵育过程中震荡混匀两次。将样品置于 -40°C 超低温冰箱中冷却 5 min。取出冷却后的样品，震荡混匀，吸取 1 mL 置于 2 mL 的 EP 管中，于 -10°C，14800 r/min，离心 10 min。移取 450 μL 上清液于 1 mL EP 管并置于离心干燥仪中，45°C 离心干燥 9 h。干燥后的样品于 -80°C 冰箱保存。

### 1.3.2 胞外代谢物提取

吸取 5 mL 对数生长期的菌液快速通过 0.22 μm 的除菌滤膜（30 sec 内完成）。移取 100 μL 滤液于 1 mL EP 管中，10 μL 2- 异丙基苹果酸吡啶溶液（0.5 μg/μL）作为内标物。在离心浓缩仪中蒸干后于 -80°C 冰箱保存。

### 1.3.3 衍生化

将待检样品从 -80°C 冰箱取出，再次干燥离心半小时后，向样品中加入 80 μL 甲基化试剂，30°C，1200 r/min，孵育 90 min。随后向样品中加入 40 μL 硅烷化试剂，37°C，1200 r/min，孵育 30 min。衍生后的样品于 12000 r/min 高速离心机中离心 5 min。吸取 60 μL 上清液于进样瓶中供 GC-MS/MS 分析。

## ■ 结果与讨论

### 2.1 鼠伤寒沙门菌代谢物 MRM 方法建立过程

使用代谢物数据库方法包中的 OA\_TMS\_DB5\_67 min\_V3\_HC 方法测定正构烷烃（C9-C33）标液，用于调整数据库中代谢物的保留时间。正构烷烃质量色谱图见图 1。

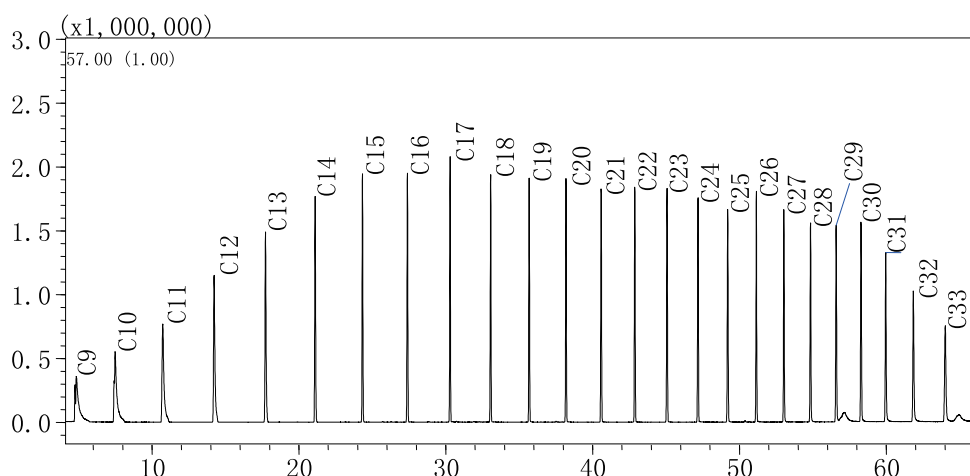


图1 正构烷烃（C9-C33）质量色谱图（5 μg/mL）

然后利用正构烷烃数据及 Smart Metabolites Database 建立 467 种代谢物 MRM 方法文件。图 2 为 Smart Metabolites Database 数据库的创建方法界面。

系列号	类型	测定模式	方法号	组分名称 (C)	保留指数 1
1	Target	MRM	1	Dimethylglycine-TMS	980
2	Target	MRM	1	Glyoxylic acid-meto-TMS	980
3	Target	MRM	1	Boric acid-3TMS	982
4	Target	MRM	1	2-Aminoethanol-2TMS	1025
5	Target	MRM	1	Pyruvic acid-meto-TMS	1043
6	Target	MRM	1	Trichloroacetic acid-TMS	1055
7	Target	MRM	1	Phenol-TMS	1056

图2 Smart Metabolites Database创建MRM方法界面

## 2.2 鼠伤寒沙门菌胞内代谢物 TIC 图与定性结果

通过 GCMS-TQ8050 调用建立的 467 种代谢物衍生产物 MRM 方法，并对按着 1.3 过程处理后的鼠伤寒沙门菌胞内样品进行筛查分析，胞内代谢物衍生产物 TIC 图如图 3 所示。

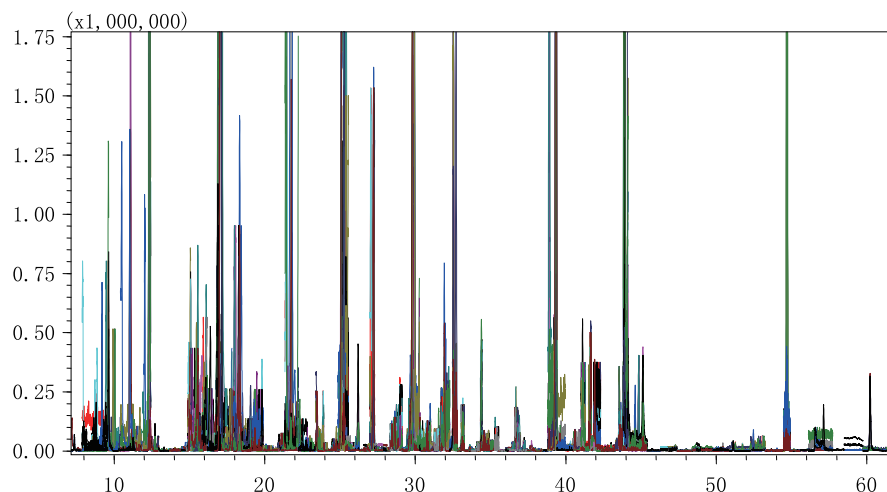


图3 鼠伤寒沙门菌胞内代谢物TIC图

表1 鼠伤寒沙门菌胞内代谢物定性结果

No.	中文名称	英文名称	保留时间 (min)	CAS 号	代谢物与内标峰面积比值
1	丙酮酸-meto-TMS	Pyruvic acid-meto-TMS	9.194	127-17-3	0.0034
2	乳酸-2TMS	Lactic acid-2TMS	9.618	79-33-4	0.69
3	2-羟基异丁酸-2TMS	2-Hydroxyisobutyric acid-2TMS	9.816	594-61-6	0.0034
4	己酸-TMS	Caproic acid-TMS	9.931	142-62-1	0.15
5	乙醇酸-2TMS	Glycolic acid-2TMS	10.046	79-14-1	0.051
6	丙氨酸-2TMS	Alanine-2TMS	11.038	302-72-7	0.19
7	甘氨酸-2TMS	Glycine-2TMS	11.540	56-40-6	0.0084
8	羟胺-3TMS	Hydroxylamine-3TMS	11.716	7803-49-8	0.073
9	草酸-2TMS	Oxalic acid-2TMS	11.841	144-62-7	0.00062
10	3-羟基丙酸-2TMS	3-Hydroxypropionic acid-2TMS	12.370	503-66-2	0.051
11	2-氨基异丁酸-2TMS	2-Aminoisobutyric acid-2TMS	12.471	62-57-7	0.017
12	3-羟基丁酸-2TMS	3-Hydroxybutyric acid-2TMS	12.970	300-85-6	0.0076
13	3-氨基丙酸-2TMS	3-Aminopropanoic acid-2TMS	14.040	107-95-9	0.0098
14	3-羟基异戊酸-2TMS	3-Hydroxyisovaleric acid-2TMS	14.756	10237-77-1	0.034
15	缬氨酸-2TMS	Valine-2TMS	15.071	72-18-4	0.65
16	苯甲酸 (安息香酸) -TMS	Benzoic acid-TMS	16.114	65-85-0	0.54
17	二羟基丙酮-meto-2TMS	Dihydroxyacetone-meto-2TMS	16.258	96-26-4	0.015
18	辛酸-TMS	Octanoic acid-TMS	16.505	124-07-2	0.078
19	2-氨基乙醇-3TMS	2-Aminoethanol-3TMS	16.924	141-43-5	0.090

20	亮氨酸-2TMS	Leucine-2TMS	17.021	61-90-5	0.81
21	甘油-3TMS	Glycerol-3TMS	17.067	56-81-5	3.8
22	磷酸-3TMS	Phosphoric acid-3TMS	17.056	7664-38-2	16.9
23	烟酸-TMS	Nicotinic acid-TMS	17.714	59-67-6	0.055
24	异亮氨酸-2TMS	Isoleucine-2TMS	17.816	73-32-5	0.30
25	苯乙酸-TMS	Phenylacetic acid-TMS	17.871	103-82-2	0.0019
26	脯氨酸-2TMS	Proline-2TMS	18.002	147-85-3	0.26
27	丁二酸 (琥珀酸) -2TMS	Succinic acid-2TMS	18.275	110-15-6	0.084
28	甘氨酸-3TMS	Glycine-3TMS	18.337	56-40-6	1.1
29	甘油酸-3TMS	Glyceric acid-3TMS	19.071	473-81-4	0.15
30	富马酸-2TMS	Fumaric acid-2TMS	19.357	110-17-8	0.010
31	尿嘧啶-2TMS	Uracil-2TMS	19.315	66-22-8	0.020
32	壬酸-TMS	Nonanoic acid-TMS	19.820	112-05-0	0.28
33	丝氨酸-3TMS	Serine-3TMS	20.091	56-45-1	0.021
34	戊二酸-2TMS	Glutaric acid-2TMS	21.291	110-94-1	0.0015
35	胸腺嘧啶-2TMS	Thymine-2TMS	21.459	65-71-4	0.050
36	3-氨基丙酸-3TMS	3-Aminopropanoic acid-3TMS	22.335	107-95-9	0.16
37	癸酸-TMS	Decanoic acid-TMS	23.015	334-48-5	0.046
38	高丝氨酸-3TMS	Homoserine-3TMS	23.045	672-15-1	0.0022
39	烟酰胺-TMS	Niacinamide-TMS	23.885	98-92-0	0.14
40	苹果酸-3TMS	Malic acid-3TMS	24.253	6915-15-7	0.0010
41	5-氧脯氨酸-2TMS	5-Oxoproline-2TMS	25.416	98-79-3	2.0
42	邻苯三酚-3TMS	Pyrogallol-3TMS	26.222	87-66-1	0.00051
43	苏糖酸-4TMS	Threonic acid-4TMS	26.687	3909-12-4	0.011
44	2-羟基戊二酸-3TMS	2-Hydroxyglutaric acid-3TMS	26.892	13095-48-2	0.017
45	2-异丙基苹果酸-3TMS (内标)	2-Isopropylmalic acid-3TMS (IS)	27.242	3237-44-3	1
46	谷氨酸-3TMS	Glutamic acid-3TMS	28.241	56-86-0	0.012
47	苯基丙氨酸-2TMS	Phenylalanine-2TMS	28.653	150-30-1	0.12
48	月桂酸(十二酸)-TMS	Lauric acid-TMS	28.980	143-07-7	0.16
49	来苏糖-meto-4TMS(2)	Lyxose-meto-4TMS(2)	29.897	1114-34-7	8.7
50	阿拉伯糖-meto-4TMS	Arabinose-meto-4TMS	29.901	10323-20-3	8.9
51	核糖-meto-4TMS	Ribose-meto-4TMS	30.315	50-69-1	0.077
52	2-磷酸甘油-4TMS	Glycerol 2-phosphate-4TMS	31.556	17181-54-3	0.083
53	阿拉伯糖醇-5TMS	Arabitol-5TMS	31.575	488-82-4	0.0033

54	腐胺(丁二胺)-4TMS	Putrescine-4TMS	31.935	110-60-1	0.50
55	甘油-3-磷酸-4TMS	Glycerol 3-phosphate-4TMS	32.537	57-03-4	1.6
56	O-磷酸乙醇胺-4TMS	O-Phosphoethanolamine-4TMS	33.166	1071-23-4	0.13
57	2-氨基庚二酸-3TMS	2-Aminopimelic acid-3TMS	33.635	627-76-9	0.017
58	鸟氨酸-4TMS	Ornithine-4TMS	34.050	70-26-8	0.012
59	柠檬酸-4TMS	Citric acid-4TMS	34.116	77-92-9	0.0015
60	十四烷酸-TMS	Myristic acid-TMS	34.397	544-63-8	0.33
61	腺嘌呤-2TMS	Adenine-2TMS	35.317	73-24-5	0.098
62	葡萄糖-meto-5TMS(1)	Glucose-meto-5TMS(1)	36.508	50-99-7	0.024
63	赖氨酸-4TMS	Lysine-4TMS	36.688	56-87-1	0.074
64	酪氨酸-3TMS	Tyrosine-3TMS	37.149	60-18-4	0.0093
65	1-十六醇-TMS	1-Hexadecanol-TMS	37.242	36653-82-4	0.030
66	半乳糖醛酸-meto-5TMS(2)	Galacturonic acid-meto-5TMS(2)	38.432	14982-50-4	0.0027
67	棕榈油酸-TMS	Palmitoleic acid-TMS	38.904	373-49-9	0.043
68	葡萄糖酸-6TMS	Gluconic acid-6TMS	39.227	526-95-4	0.0019
69	棕榈酸(十六烷酸)-TMS	Palmitic acid-TMS	39.346	57-10-3	7.6
70	5-磷酸核糖-meto-5TMS(1)	Ribose 5-phosphate-meto-5TMS(1)	41.663	3615-55-2	0.0088
71	十七酸-TMS	Margaric acid-TMS	41.660	506-12-7	0.24
72	十八醇-TMS	Octadecanol-TMS	41.929	112-92-5	0.20
73	降肾上腺素-5TMS	Norepinephrine-5TMS	42.628	51-41-2	0.0095
74	反油酸-TMS	Elaidic acid-TMS	43.512	112-79-8	0.045
75	硬脂酸-TMS	Stearic acid-TMS	43.900	57-11-4	6.5
76	腺苷-4TMS	Adenosine-4TMS	52.469	58-61-7	0.053
77	蔗糖-8TMS	Sucrose-8TMS	53.090	57-50-1	0.024
78	鸟苷-5TMS	Guanosine-5TMS	55.022	118-00-3	0.0013

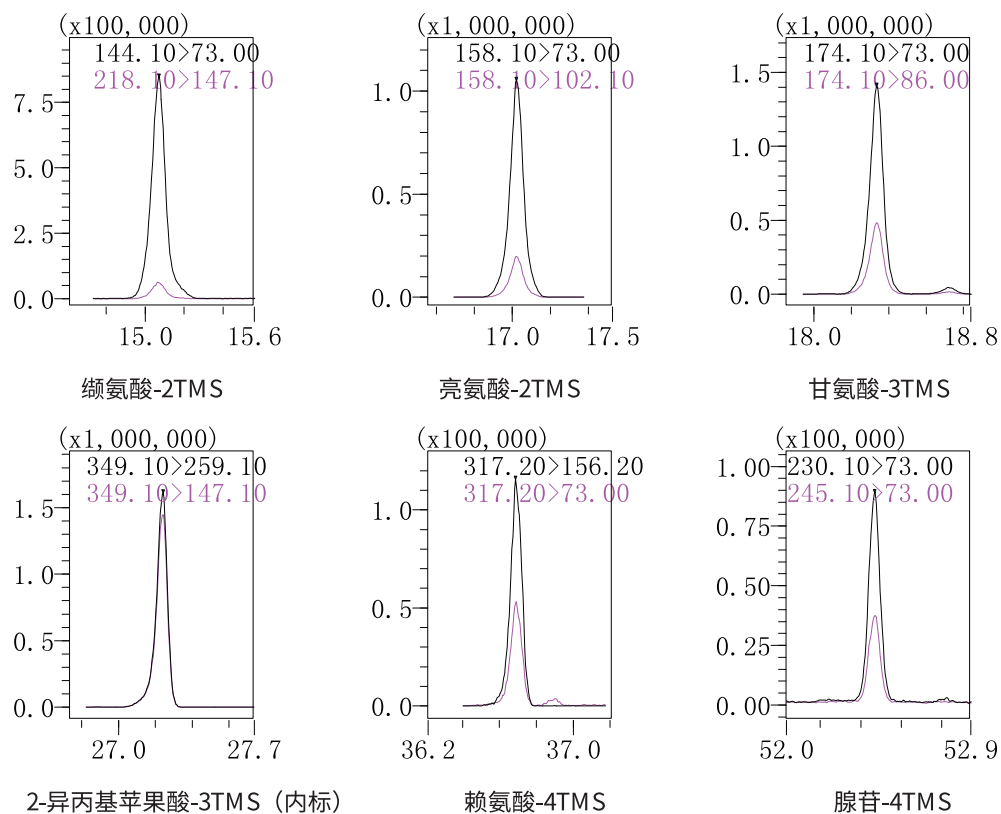


图4 鼠伤寒沙门菌胞内部分代谢物及内标物衍生产物MRM图

### 2.3 鼠伤寒沙门菌胞外代谢物定性结果

使用 467 种代谢物衍生产物 MRM 方法，对鼠伤寒沙门菌胞外代谢物进行筛查分析，胞外代谢物衍生产物 TIC 图如图 5 所示。

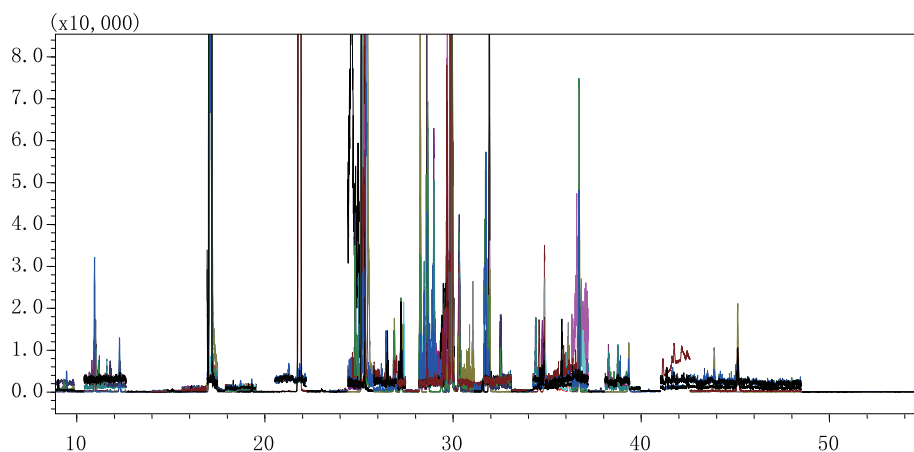


图5 鼠伤寒沙门菌胞外代谢物TIC图

表2 鼠伤寒沙门菌胞外代谢物定性结果

No.	中文名称	英文名称	保留时间 (min)	CAS 号	代谢物与内标峰面积比值
1	丙酮酸-meto-TMS	Pyruvic acid-meto-TMS	9.019	127-17-3	0.0064
2	乳酸-2TMS	Lactic acid-2TMS	9.467	79-33-4	0.19
3	己酸-TMS	Caproic acid-TMS	9.800	142-62-1	0.0047
4	乙醇酸-2TMS	Glycolic acid-2TMS	9.921	79-14-1	0.0077
5	丙氨酸-2TMS	Alanine-2TMS	10.950	302-72-7	1.3
6	草酸-2TMS	Oxalic acid-2TMS	11.807	144-62-7	0.0028
7	3-羟基丁酸-2TMS	3-Hydroxybutyric acid-2TMS	12.913	300-85-6	0.013
8	二羟基丙酮-meto-2TMS	Dihydroxyacetone-meto-2TMS	16.249	96-26-4	0.023
9	2-氨基乙醇-3TMS	2-Aminoethanol-3TMS	16.879	141-43-5	0.011
10	磷酸-3TMS	Phosphoric acid-3TMS	17.080	7664-38-2	107.7
11	苯乙酸-TMS	Phenylacetic acid-TMS	17.881	103-82-2	0.013
12	丁二酸 (琥珀酸) -2TMS	Succinic acid-2TMS	18.248	110-15-6	0.023
13	甘氨酸-3TMS	Glycine-3TMS	18.321	56-40-6	0.11
14	甘油酸-3TMS	Glyceric acid-3TMS	19.052	473-81-4	0.030
15	壬酸-TMS	Nonanoic acid-TMS	19.831	112-05-0	0.0040
16	癸酸-TMS	Decanoic acid-TMS	23.020	334-48-5	0.022
17	苹果酸-3TMS	Malic acid-3TMS	24.248	6915-15-7	0.0017
18	5-氧脯氨酸-2TMS	5-Oxoproline-2TMS	25.410	98-79-3	57.5
19	2-氧代戊二酸-meto-2TMS	2-Ketoglutaric acid-meto-2TMS	26.864	328-50-7	0.043
20	2-羟基戊二酸-3TMS	2-Hydroxyglutaric acid-3TMS	26.881	13095-48-2	0.76
21	2-异丙基苹果酸-3TMS (内标)	2-Isopropylmalic acid-3TMS (IS)	27.236	3237-44-3	1
22	谷氨酸-3TMS	Glutamic acid-3TMS	28.259	56-86-0	3.4
23	苯基丙氨酸-2TMS	Phenylalanine-2TMS	28.655	150-30-1	1.8
24	阿拉伯糖-meto-4TMS	Arabinose-meto-4TMS	29.899	10323-20-3	393.7
25	阿拉伯糖醇-5TMS	Arabitol-5TMS	31.577	488-82-4	0.095
26	腐胺 (丁二胺) -4TMS	Putrescine-4TMS	31.934	110-60-1	1.2
27	甘油-3-磷酸-4TMS	Glycerol 3-phosphate-4TMS	32.541	57-03-4	0.016
28	柠檬酸-4TMS	Citric acid-4TMS	34.104	77-92-9	0.0196
29	赖氨酸-4TMS	Lysine-4TMS	36.697	56-87-1	1.1
30	棕榈酸 (十六烷酸) -TMS	Palmitic acid-TMS	39.340	57-10-3	0.44
31	硬脂酸-TMS	Stearic acid-TMS	43.879	57-11-4	0.34
32	蔗糖-8TMS	Sucrose-8TMS	53.064	57-50-1	0.0040

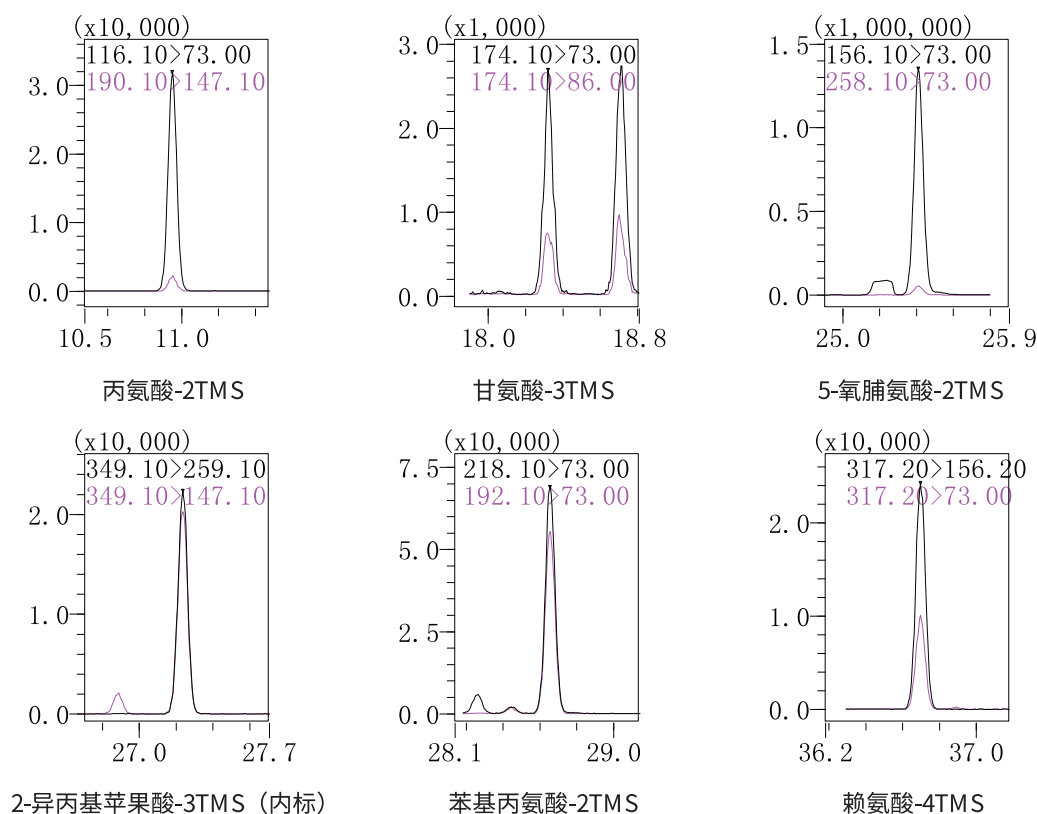


图6 鼠伤寒沙门菌胞外部分代谢物及内标物衍生产物MRM图

## 结论

本文利用 GCMS-TQ8050 结合岛津代谢物数据库自动创建 467 种代谢物的 MRM 分析方法。通过建立的 MRM 方法对鼠伤寒沙门菌 slyA 基因敲除株胞内和胞外代谢物进行筛查，并以 2- 异丙基苹果酸作为内标，对筛查出的代谢物进行了半定量。在无测定目标组分标准品的情况下，鉴定出胞内代谢物 77 种，胞外代谢物 31 种。实验结果显示，岛津 Smart Metabolites Database 为细菌代谢组学的研究提供了一种快捷、可靠的分析途径。