

LC-MS/MS 测定细胞内初级代谢产物

LCMSMS-808

摘要： 本文使用三重四极杆液质联用仪和初级代谢产物方法包对大肠杆菌发酵过程中不同时间点的胞内代谢产物进行分析。初级代谢产物方法包共包含 114 种代谢产物，本实验共检出 58 种组分，包括氨基酸类、有机磷酸类、磷酸糖、核苷酸、辅酶等代谢产物。通过比较不同时间点代谢产物的峰面积，得到胞内代谢产物的变化趋势，可用于分析生物合成过程异常的原因。

关键词： 初级代谢产物方法包 合成生物学 LC-MS/MS

技术特点：

- ❖ 本文按照初级代谢产物方法包同时分析 114 种化合物，无需优化分离条件和 MS 参数。
- ❖ 分析合成生物学用大肠杆菌细胞内代谢产物，共检出 58 种代谢产物，并得到了不同时间点的变化趋势。

随着科技的发展，合成生物学 (Synthetic biology) 作为一门新兴学科正在受到越来越多的关注。合成生物学是在工程学思维的指导下重新设计新的生物体系或对原有生物系统进行深度改造，从而达到某种目的。其中创造或被改造的生物被称之为“底盘”，被改造的一个个硬件，比如 DNA、蛋白质等，被称之为“元件”，通过“模块化”设计，将标准化的元件在底盘中拼装，从而构建出新的生物体系。

常被用做“底盘”的有大肠杆菌、酵母等微生物，这些物质通过初级代谢能使营养物质转化为结构

物质、具生理活性物质或为生长提供能量，如氨基酸、核苷酸、多糖、脂类、维生素等。因此初级代谢产物通常都是机体生存必不可少的物质，如果在这些物质的合成过程的某个环节上发生障碍，轻则引起生长停止，重则导致机体发生突变或死亡。

岛津初级代谢产物方法包可对细胞内中枢代谢途径的糖酵解、TCA 循环、戊糖磷酸途径及氨基酸、核苷酸等生命科学领域代谢组分析中的 114 种重要代谢物成分进行同时分析，对正常 / 病态模型中的重要代谢物变化进行综合分析。

■ 实验部分

1.1 仪器

三重四极杆液质联用仪 LCMS-8060 NX，具体配置信息如下：

| | | | |
|--------|-------------------------|--------|--------------|
| 系统控制器： | CBM-20A | 脱气机： | DGU-20A 5R |
| 输液泵： | LC-20AD×2 | 自动进样器： | SIL-20AC |
| 柱温箱： | CTO-20AC | 质谱仪： | LCMS-8060 NX |
| 色谱工作站： | LabSolutions Ver. 5.114 | | |

1.2 分析条件

色谱条件

| | | | |
|-------|----------------------------|-----|------------|
| 色谱柱： | 见初级代谢产物方法包 | | |
| 流动相： | 见初级代谢产物方法包 | | |
| 进样体积： | 3 μL | 流速： | 0.3 mL/min |
| 柱温： | 40°C | | |
| 洗脱方式： | 梯度洗脱，B 相初始浓度为 0%，时间程序见表 1。 | | |

表 1 梯度洗脱程序

| Time(min) | Module | Command | Value |
|-----------|--------|--------------|-------|
| 0.50 | Pumps | Pump B Conc. | 0 |
| 8.00 | Pumps | Pump B Conc. | 15 |
| 12.00 | Pumps | Pump B Conc. | 98 |

| | | | |
|-------|---------|--------------|----|
| 15.00 | Pumps | Pump B Conc. | 98 |
| 15.10 | Pumps | Pump B Conc. | 0 |
| 20 | Control | Stop | |

质谱条件

| | | | |
|---------|------------|--------|-------|
| 离子源： | ESI (-) | 接口温度： | 270°C |
| 雾化气： | 2.0 L/min | 加热块温度： | 400°C |
| 干燥气： | 10.0 L/min | 接口电压： | -1 kV |
| 加热气： | 10.0 L/min | 聚焦电压： | -3 kV |
| D L 温度： | 250°C | 扫描模式： | MRM |

表 2 114 种初级代谢产物名称及类别

| No. | 化合物名 | 类别 | No. | 化合物名 | 类别 | No. | 化合物名 | 类别 |
|-----|---------------------|------|-----|----------------------------|-------|-----|---|------|
| 1 | Lysine | 氨基酸 | 39 | Uric acid | 嘌呤衍生物 | 77 | 6-Phosphogluconic acid | 有机磷酸 |
| 2 | Arginine | 氨基酸 | 40 | Adenosine | 核苷 | 78 | Shikimic acid 3-phosphate | 有机酸 |
| 3 | Histidine | 氨基酸 | 41 | Lactic acid | 有机酸 | 79 | ADP-glucose | 有机磷酸 |
| 4 | 4-Aminobutyric acid | 氨基酸 | 42 | Glucose 6-phosphate | 磷酸糖 | 80 | NADP | 辅酶 |
| 5 | Glycine | 氨基酸 | 43 | Tryptophan | 氨基酸 | 81 | Cytidine diphosphate | 核苷酸 |
| 6 | Serine | 氨基酸 | 44 | Ribose 5-phosphate | 磷酸糖 | 82 | KDPG | 有机酸 |
| 7 | Asparagine | 氨基酸 | 45 | Sedoheptulose 7-phosphate | 磷酸糖 | 83 | 3-Phosphoglyceric acid_2-Phosphoglyceric acid | 有机磷酸 |
| 8 | Alanine | 氨基酸 | 46 | Fructose 6-phosphate | 磷酸糖 | 84 | Uridine diphosphate | 核苷酸 |
| 9 | Glutamine | 氨基酸 | 47 | Glycerol 3-phosphate | 有机磷酸 | 85 | Guanosine diphosphate | 核苷酸 |
| 10 | Threonine | 氨基酸 | 48 | Mannose 6-phosphate | 磷酸糖 | 86 | Fructose 1,6-bisphosphate | 磷酸糖 |
| 11 | 4-Hydroxyproline | 氨基酸 | 49 | Glyceraldehyde 3-phosphate | 有机磷酸 | 87 | NADH | 辅酶 |
| 12 | 2-Aminobutyric acid | 氨基酸 | 50 | Erythrose 4-phosphate | 磷酸糖 | 88 | Ribulose 1,5-bisphosphate | 磷酸糖 |
| 13 | Cysteine | 氨基酸 | 51 | Glucose 1-phosphate | 磷酸糖 | 89 | Adenosine diphosphate | 核苷酸 |
| 14 | Methionine sulfone | 标准物质 | 52 | Xylulose 5-phosphate | 磷酸糖 | 90 | Thymidine diphosphate | 核苷酸 |
| 15 | Proline | 氨基酸 | 53 | Ribulose 5-phosphate | 磷酸糖 | 91 | Phosphoenolpyruvic acid | 有机磷酸 |
| 16 | Valine | 氨基酸 | 54 | Glycerol 2-phosphate | 有机磷酸 | 92 | 2-Isopropylmalic acid | 有机酸 |
| 17 | Methionine | 氨基酸 | 55 | MEP | 有机磷酸 | 93 | FMN | 辅酶 |
| 18 | Cytidine | 核苷 | 56 | Fructose 1-phosphate | 有机磷酸 | 94 | HMBPP | 有机磷酸 |
| 19 | Isoleucine | 氨基酸 | 57 | Orotic acid | 有机酸 | 95 | Indole 3-acetic acid | 有机酸 |

| | | | | | | | | |
|----|---------------------------------|-------|----|--------------------------------------|------|-----|------------------------------|------|
| 20 | Leucine | 氨基酸 | 58 | Cytidine monophosphate | 核苷酸 | 96 | NADPH | 辅酶 |
| 21 | Tyrosine | 氨基酸 | 59 | Ribose 1-phosphate | 磷酸糖 | 97 | Cytidine triphosphate | 核苷酸 |
| 22 | Guanine | 嘌呤衍生物 | 60 | Dihydroxy-acetone phosphate | 有机磷酸 | 98 | Phosphoribosyl pyrophosphate | 磷酸糖 |
| 23 | Hypoxanthine | 嘌呤衍生物 | 61 | Pyruvic acid | 有机酸 | 99 | FAD | 辅酶 |
| 24 | Xanthine | 嘌呤衍生物 | 62 | Uridine monophosphate | 核苷酸 | 100 | Uridine triphosphate | 核苷酸 |
| 25 | Uridine | 核苷 | 63 | NAD | 辅酶 | 101 | Guanosine triphosphate | 核苷酸 |
| 26 | AICAR | 核苷酸 | 64 | Guanosine monophosphate | 核苷酸 | 102 | 2,3-Bisphosphoglyceric acid | 有机磷酸 |
| 27 | 2-Morpholinoethanesulfonic acid | 标准物质 | 65 | Inosine monophosphate | 核苷酸 | 103 | Adenosine triphosphate | 核苷酸 |
| 28 | Thymine | 碱基 | 66 | Thymidine monophosphate | 核苷酸 | 104 | Thymidine triphosphate | 核苷酸 |
| 29 | Glutamic acid | 氨基酸 | 67 | Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate | 核苷酸 | 105 | Pyrrroloquinoline quinone | 辅酶 |
| 30 | Adenine | 嘌呤衍生物 | 68 | Pantothenic acid | 有机酸 | 106 | Coenzyme A | 辅酶 |
| 31 | Aspartic acid | 氨基酸 | 69 | Adenosine monophosphate | 核苷酸 | 107 | 3-Hydroxybutyryl coenzyme A | 辅酶 |
| 32 | Inosine | 核苷 | 70 | Nicotinic acid | 有机酸 | 108 | Malonyl coenzyme A | 辅酶 |
| 33 | Phenylalanine | 氨基酸 | 71 | Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate | 核苷酸 | 109 | Acetyl coenzyme A | 辅酶 |
| 34 | Guanosine | 核苷 | 72 | 4-Hydroxyphenyl pyruvic acid | 有机酸 | 110 | IPP_DMAPP | 有机磷酸 |
| 35 | Shikimic acid | 有机磷酸 | 73 | 3-Hydroxyphenylacetic acid | 苯酚 | 111 | Methylmalonyl coenzyme A | 辅酶 |
| 36 | Glyceric acid | 有机磷酸 | 74 | UDP-glucose | 核苷酸糖 | 112 | Succinyl coenzyme A | 辅酶 |
| 37 | Glycolic acid | 有机酸 | 75 | Xanthosine monophosphate | 核苷酸 | 113 | Crotonyl coenzyme A | 辅酶 |
| 38 | Thymidine | 核苷 | 76 | 2-Ketoglutaric acid | 有机酸 | 114 | Butyryl coenzyme A | 辅酶 |

1.3 样品前处理方法

本实验样品为用于合成生物学的大肠杆菌，分别在发酵期间的 18、24、30、54 和 91 小时取样，前处理方法见初级代谢产物分析方法包。

■ 结果与讨论

2.1 部分组分 MRM 色谱图

使用初级代谢产物方法包对 5 个不同时间点的大肠杆菌胞内初级代谢产物进行分析，检出 58 种组分，包含氨基酸类、有机磷酸类、磷酸糖、核苷酸、辅酶等。部分检出组分色谱图如图 1 所示。

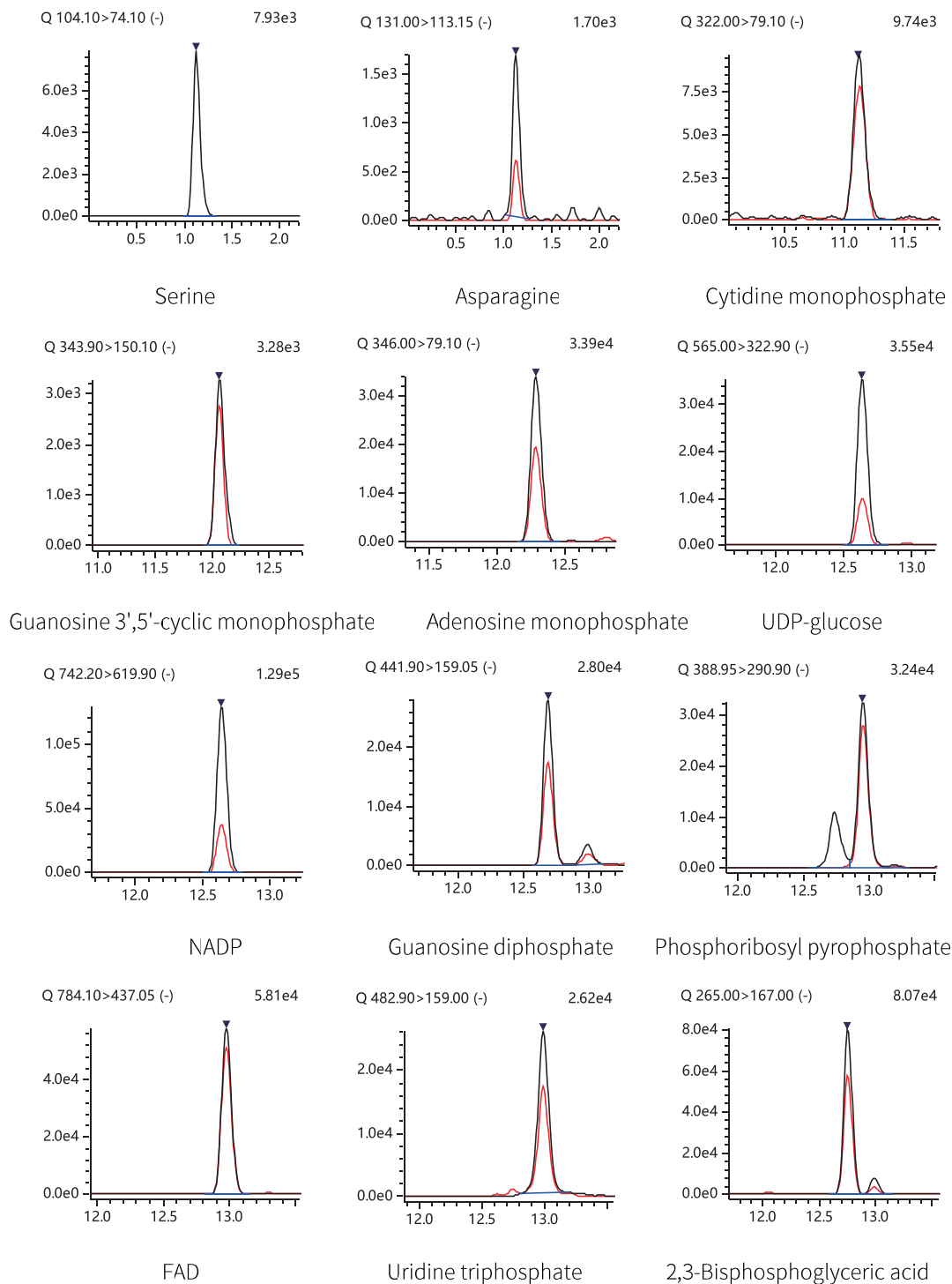
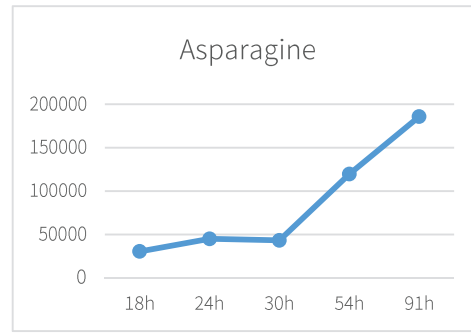
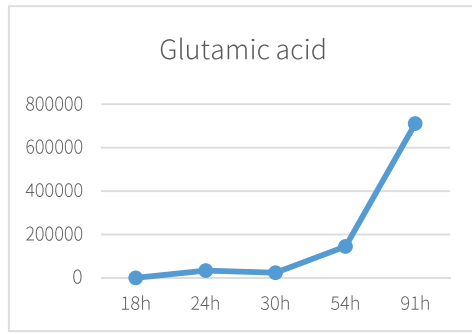


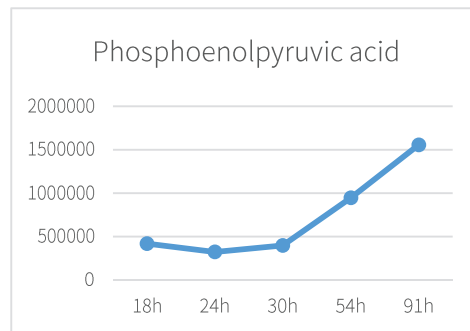
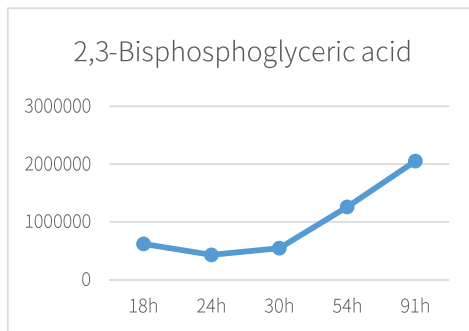
图 1 部分检出组分 MRM 图

2.2 不同时间初级代谢产物变化趋势图

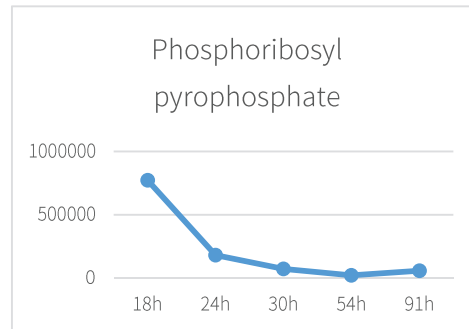
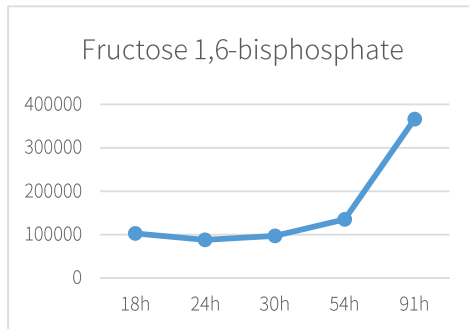
比较 5 个不同时间点的代谢产物峰面积，部分化合物峰面积折线图如图 2 所示。由图可知，随着时间的延长，不同类别的代谢产物存在不同的变化趋势。Glutamic acid 等氨基酸在前 30 h 含量基本维持不变，30 h 后出现较快增长，说明大肠杆菌初级代谢过程中会分泌这类物质。Phosphoribosyl pyrophosphate 等磷酸糖则随着时间的延长，不断降低，表明大肠杆菌初级代谢过程中会消耗这类物质。Cytidine monophosphate 等核苷酸类物质在 30 h 后出现较快速的增加，随后维持稳定。这些初级代谢产物含量随着时间的变化趋势，可用于推断大肠杆菌代谢是否存在异常。



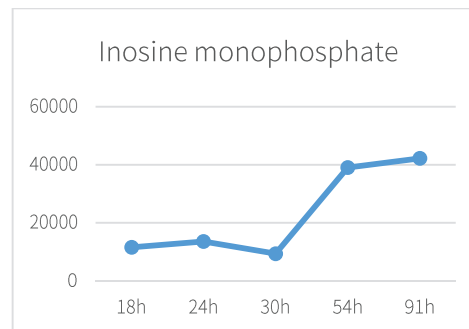
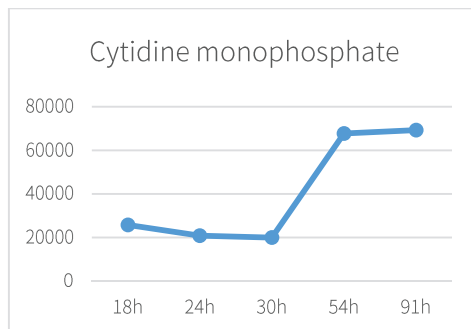
类别：氨基酸



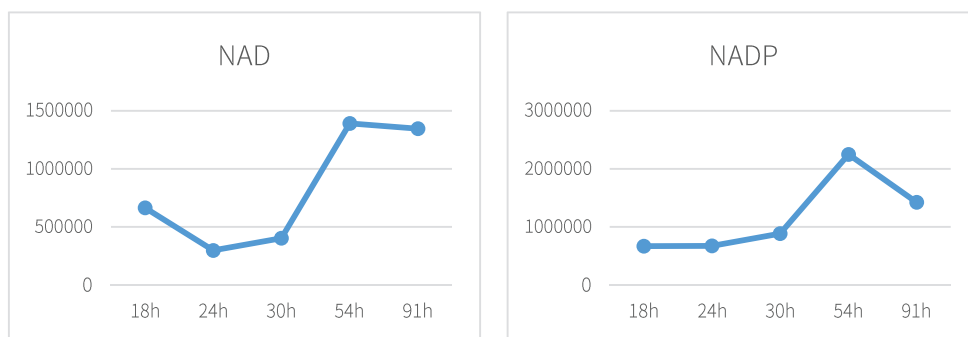
类别：有机磷酸



类别：磷酸糖



类别：核苷酸



类别：辅酶

图2 不同时间点代谢产物变化趋势图

■ 结论

本文使用初级代谢物方法包对5个不同时间点大肠杆菌胞内初级代谢产物进行分析，比较其初级代谢产物随时间的变化，可用于分析生物合成过程异常的原因。

岛津应用云

