

利用GC-MS/MS技术的代谢组学策略

关键词

- 拟南芥
- 生物系统
- GC-MS/MS
- 代谢组学
- MRM (多反应监测)
- 定量
- 目标相

引言

生物系统是一高度复杂的系统，复杂到每一个层次都需要被分析被研究。而我们仍处于最初级的了解阶段。数百万年来，生物体以惊人的方式不断发展存活，并且不断地与不利环境进行着斗争。

不同分子水平的蛋白质，代谢物以及它们之间的相互作用，包括基因表达以及生物化学和生理学的基本层次关系，都被总结为“基因型-表型关系”。¹

基因型和表型之间的联系广受关注，因此要求在不同分子水平上进行分析。所谓的各种“组学”包括转录组学（基因表达）、蛋白质组学（蛋白质翻译）和代谢组学（代谢网络）。²

“代谢组”可以定义为在特殊生理学或发育阶段，细胞中所有小分子的定量。当对一个样品中所有代谢物进行完整分析时，“代谢组”概念则被扩大成为代谢组学。

代谢物是指一般代谢反应中涉及的所有天然小分子（非聚合物），以及植物发育、生长、繁殖过程以及应激反应中生物化学途径的底物、中间产物或最终产物⁴。代谢物水平可被视为生物系统对于基因或环境改变的响应¹。

生物小分子的物理化学多样性使得代谢组学分析非常困难。因此需要不同组合的分析策略⁴。代谢轮廓分析即为在特定的环境或发育阶段分析一组代谢物，同时观察尽可能多的其他代谢物。另一方面，目标代谢物分析被局限于特定的感兴趣的代谢物，然后对这些物质有选择的进行监测和定量。由于参考数据库不完整导致的局限性以及一些技术原因，如极其复杂的共流出化合物的干扰和GC-MS非最优化质谱去卷积功能，使得在典型代谢物组学样品中，可归属化学鉴定和可探测峰的数目之间会存在差异。鉴于以上困难，代谢组学需要一个能够增加可识别和可选择性定量化学物数量的工作流程。



在图1中描述了这个代谢组学的中心策略。首先，一个半定量的发现步骤以无歧视的方式从生物样品中识别尽可能多的代谢物。基于已有或新型资料（包括从发现步骤中得到的生物化学知识和定量数据）开发参考谱库。同时，这些参考谱库不断被天然产物库或化学合成的新化合物更新。

基于这些参考谱库，利用GC-MS/MS-MRM技术可以对单个化合物执行非常准确的去卷积、识别和定量。利用同一个仪器执行发现步骤和目标分析步骤，可以确保裂解方式、峰强度和质数准确度等的重复性。这个策略还应用于蛋白质组学实验室中，建立了综合性非目标（研发）和目标（MRM分析）蛋白质轮廓分析的平台，以及代谢组学/蛋白质组学的组合平台^{5, 6, 7, 8, 9, 10, 11}。

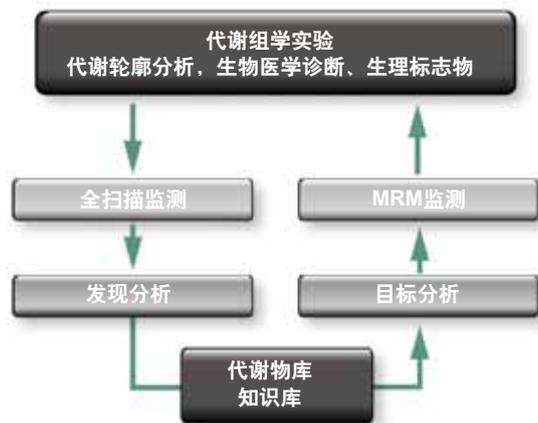


图1: 完整的策略组合了代谢物的全扫描质谱分析与目标分析。全扫描质谱分析为代谢物和代谢动力学提供了一个完全公正的鉴定。这些信息可以用于样品分类和生物解析, 代谢物库以及知识库的建立。利用GC-MS/MS-MRM技术, 以高去掉通量方式从复杂代谢组学样品中选择性识别和定量代谢标志物。

这个策略已经用于调查植物新陈代谢和植物激素轮廓分析。植物的独特性在于“无法逃避”, 即它们是生物体, 并且无法逃避环境压力。长期的进化历史使得植物具有独特而多样化的分子灵活性, 以应付当前的环境条件以及特定的生态位。植物王国中的海量代谢物(高达五百万)导致了惊人的表型可塑性。这代表了新型生物活性化合物最丰富的来源之一。酶或各种同源异构体改性的底物特异性生成了大量的代谢物和天然产物, 这些物质主要生成于不同细胞室内或具有不同的动力学特征¹²。

在此实验中, 我们举例说明了图1中的完整策略并开发了一种高灵敏度和选择性方法, 即将三重四极杆GC-MS/MS-MRM技术用于代谢物的检测和绝对定量。

实验条件

样品制备

不同气候下生长的拟南芥Col-0叶材料、蒺藜苜蓿、*Clusia minor*以及微生物样品在液氮下进行均质化处理, 50 mg新鲜材料用于萃取。去掉水/三氯甲烷/甲醇配合而成的混合物用于萃取水溶性代谢物^[13]。相分离之后, 极性相在真空离心机中干燥, 衍生步骤

有2个; 利用甲氧胺化(溶液于吡啶中的盐酸甲氧胺盐)抑制酮-烯醇互变异构, 然后利用MSTFA(甲基三甲基甲硅烷基三氟乙酰胺)进行三甲硅烷基化作用衍生出极性官能团。总衍生量为100 μ L。

将标样溶解在甲醇或水中, 将其稀释为不同浓度, 根据植物材料完成干燥和衍生化处理。

GC-MS/MS条件

GC: Thermo Scientific TRACE GC Ultra 和 TriPlus 自动进样器

柱温箱

初始条件: 70°C保持1min

梯度1: 以速率1°C/min升至76°C

梯度2: 以速率6°C/min升至330°C, 保持5min

运行后条件: 保持325°C 10min

色谱柱: 5% Phenyl Polysilphenylene-siloxane;

Thermo TR 5MS SQC; 15m \times 0.25mm ID \times 0.25 μ m

进样: 230°C恒温不分流模式下进样1 μ L(不分流时间2min), 分流流速10mL/min

载气: He, 恒流1mL/min

传输线: 340°C

质谱仪: Thermo Scientific TSQ Quantum GC

电离模式: EI正离子

发射电流: 100 μ A

离子源温度: 250°C

扫描模式1: 全扫描(m/z 40-600)扫描时间 250ms

扫描模式2: SRM(选择反应监测)

吡啶-3-乙酸: m/z 319.15 (202.24)

葡萄糖: m/z 319.21 (129.00)

水杨酸: m/z 266.90 (249.00; 73.08)

扫描时间: 10 ms

峰宽: Q1 0.7 Da (FWHM)

碰撞: CID(碰撞诱导解离)

碰撞气体: 氦气

压力: 1 mTorr

碰撞能:

吡啶-3-乙酸: 20V

葡萄糖: 20V

水杨酸: 15V

结果

在图2中显示了复杂样品的全扫描模式分析结果以及已经识别和定量的代谢物。有参照和无参照的多变量统计用于验证这些生物样品的重复性分析。该信息用于样品分类、生物解析以及生理学上的目标化合物或代谢标志物（图3，主成分分析图）的筛选¹⁴。代谢组学所面临的最大的挑战之一就是代谢物具有很宽的

动态范围，从低浓度的代谢物（如植物激素）到高浓度化合物（如与能量有关的碳水化合物）。对于低浓度代谢物，尤其是极其复杂的不同化合物共洗脱的色谱区的分析，开发了相应的MRM方法。植物激素的分析要求具有超低检测限和四个数量级的动态范围。与之前利用单四极杆和离子阱质谱仪的分析方法相比，吲哚-3-乙酸（IAA）显示了高出10倍的灵敏度，水杨酸（SA）的灵敏度提高为原有的20倍^{15, 16}。

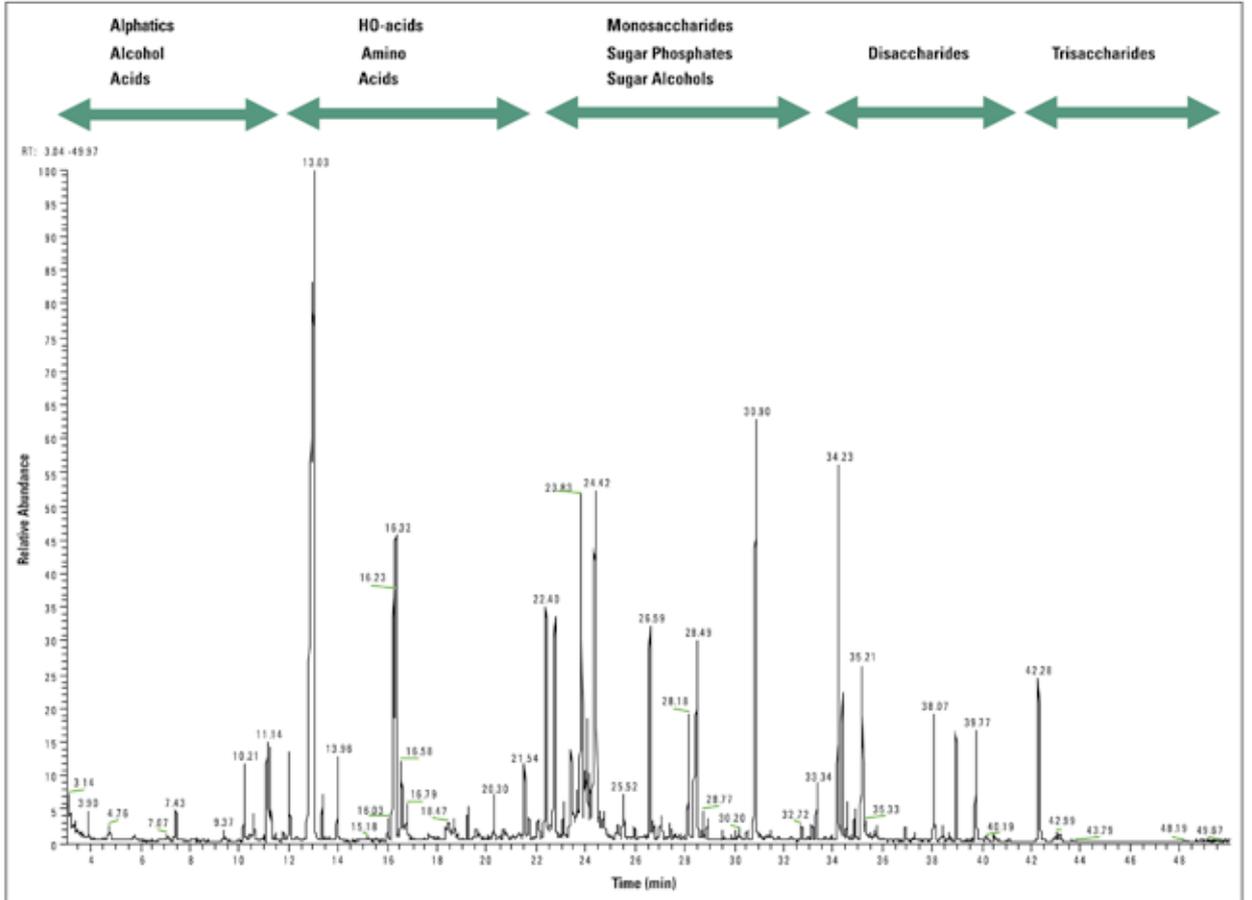


图2：在GC-MS/MS的全扫描模式下测量的复杂代谢物离子流图。对相应的色谱区进行了化学分类。

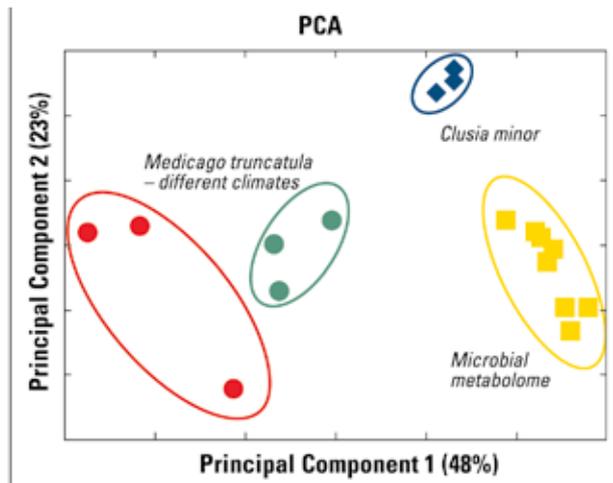


图3：不同生物样品的主成分分析。为了进行样品分类，利用GC-MS分析了定量全扫描代谢物轮廓图。相同的生物样品显示为相同的颜色。清楚区分了每一个生物样品。这种多变量分析识别了每个代谢物，从而区分了每个生物样品。

图4a-c显示18个浓度水平的葡萄糖校准曲线，柱上进样量范围从1 fmol至1 nmol，其四个数量级的范围具有优异的线性，相关系数为0.9985。在图4b和4c中显示了IAA和SA的线性校准曲线。

图5展示了出色的选择性，说明利用不同SRM离子对分离共洗脱化合物的能力。吲哚-3-乙酸和葡萄糖具有相似的保留时间和相同的母离子；但是，GC-MS/MS-MRM分析分离了这2种化合物。

校准曲线可用于植物中低浓度化合物（比如植物激素IAA）和高浓度代谢物（比如葡萄糖）的定量（图6a-b）。拟南芥叶中IAA的计算量为每次进样213 fmol，相当于358 pmol/g鲜重。拟南芥中发现的IAA浓度范围一般为100-1000 pmol/g鲜重，其结果符合预期值¹⁵。

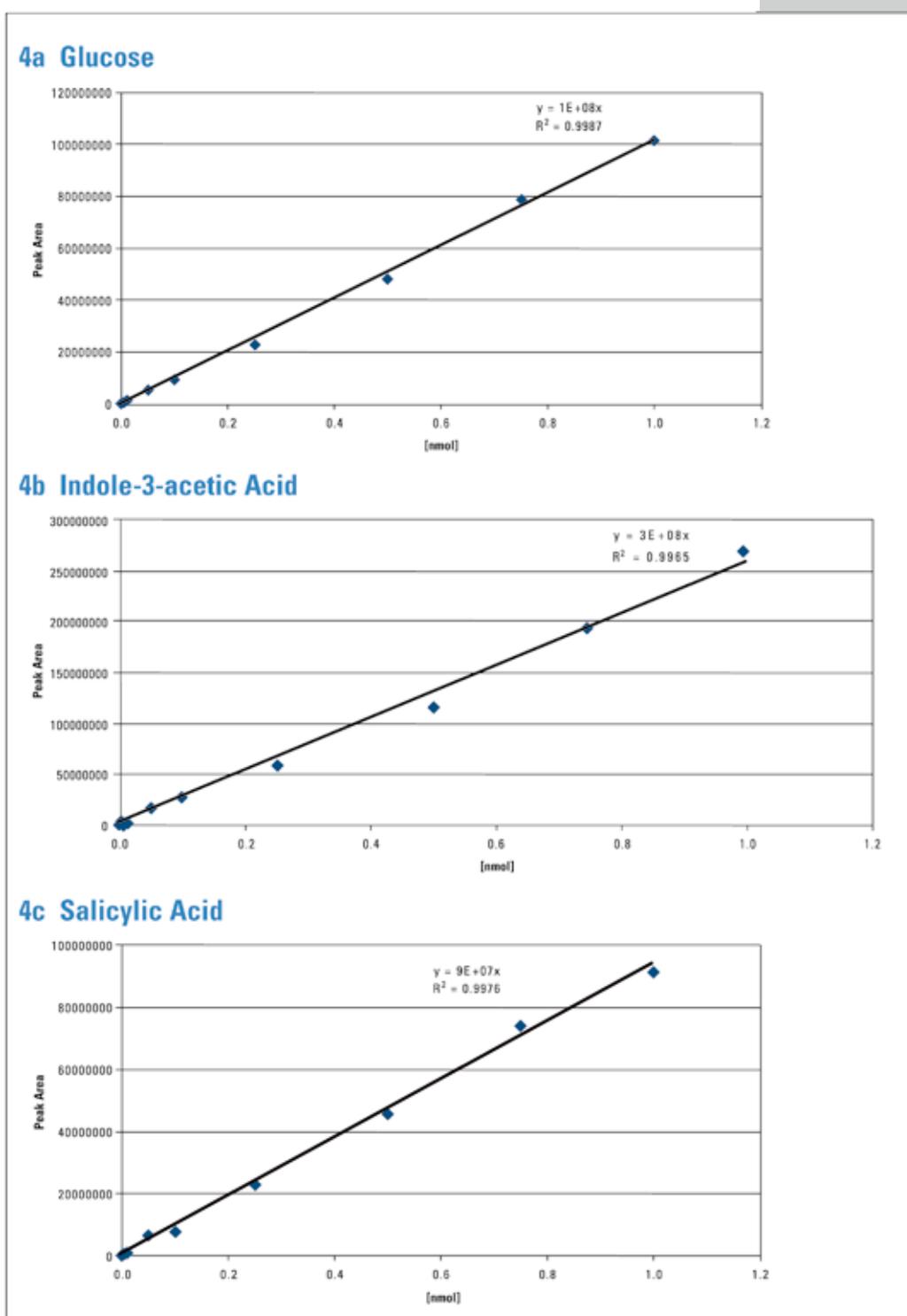


图4: 利用GC-MS/MS-MRM分析的校准曲线

4a: 葡萄糖的线性校准曲线，柱上进样量从1 fmol到1 nmol

4b: 吲哚-3-乙酸的校准曲线，柱上进样量为10 fmol到1 nmol

4c: 水杨酸的校准曲线，每次进样7.5 fmol到1 nmol

图5: 在50 pmol进样量下, IAA和葡萄糖标样的SRM色谱图

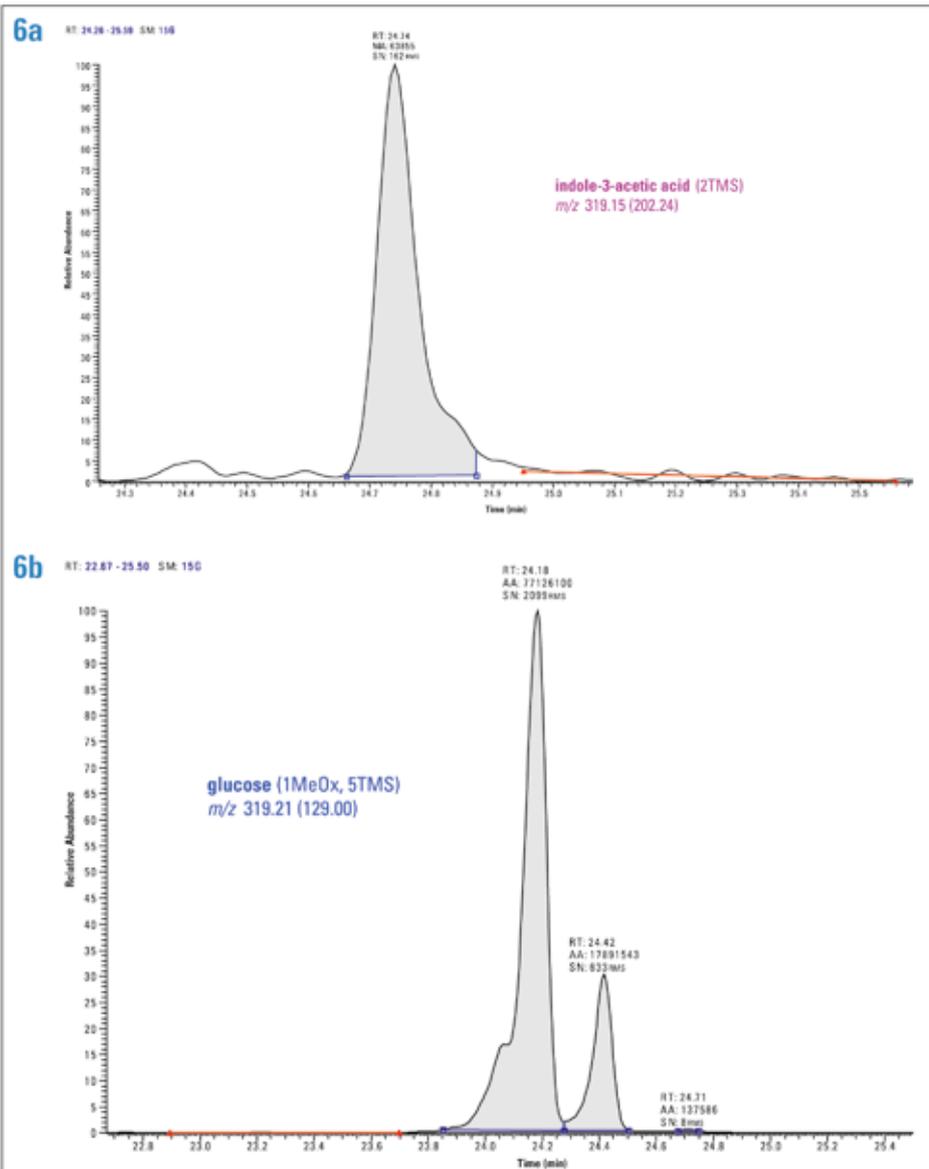
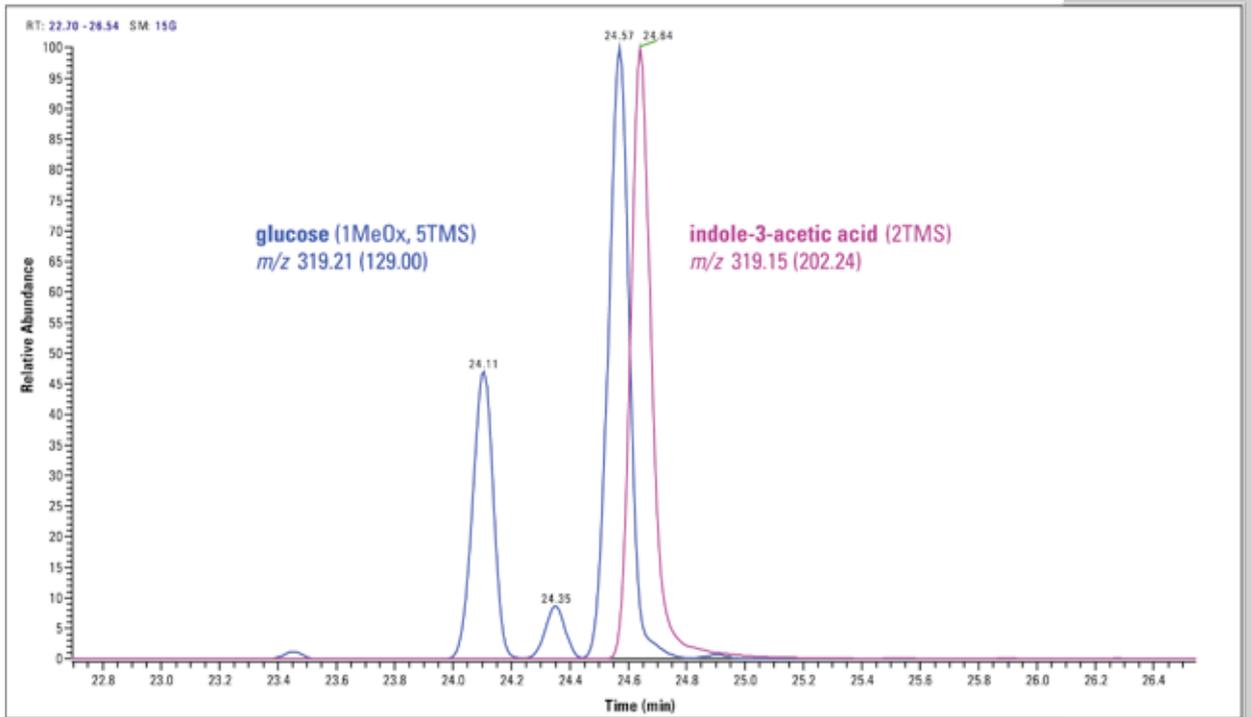


图6: 利用GC-MS/MS-MRM分析去掉拟南芥叶复杂的实际代谢样品。

6a: 拟南芥叶样品的SRM色谱图, 该样品包括358 pmol IAA/每克鲜重 (相当于柱上进样213 fmol)。

6b: 拟南芥叶样品的SRM色谱图, 该样品包括1.6 μmol葡萄糖/每克鲜重 (相当于柱上进样0.9 nmol)。

结论

TSQ Quantum GC GC-MS/MS 提供发现阶段分析，并利用MRM模式对大量复杂样品的代谢标志物进行非常准确的选择性识别和定量。无法通过气相色谱分离的混合物，可以在一次分析中利用化合物特定的MRM离子对进行分离。

TSQ Quantum GC 是一种适用于代谢组学领域的仪器，既可以执行代谢物筛选，也可以进行复杂样品中的目标代谢物分析（图1）。后续工作的目标是扩展目前的方法，使其可以在一次GC-MS/MS-MRM运行中分析数百个目标代谢物。

通过这种方法，代谢组的覆盖率会不断地增加，同时，可以高通量样品的方式执行准确的选择性识别和定量。

In addition to these offices, Thermo Fisher Scientific maintains a network of representative organizations throughout the world.

赛默飞世尔科技

上海
上海浦东新金桥路27号6号楼
电话：86-21-6865 4588
传真：86-21-6445 7830

北京
北京市东城区安定门东大街28号
雍和大厦西楼702-715室
电话：86-10-8419 3588
传真：86-10-8419 3589

广州
广州东风中路410-412号
健力宝大厦3003-3004室
电话：86-20-8348 7138
传真：86-20-8348 6621

服务热线：
800 810 5118 400 650 5118

www.thermo.com.cn
analyze.cn@thermofisher.com



Thermo Fisher Scientific,
San Jose, CA USA is ISO Certified.