

SCIEX QTRAP®系统在紫薯高覆盖靶向代谢组学中的应用

Development of a High Coverage metabolomics method of Ipomoea batatas (L.) Lam by SCIEX QTRAP® System

雷敏, 龙志敏, 郭立海

Lei Min, Long Zhimin, Guo Lihai

SCIEX, 中国

Key word: Ipomoea batatas (L.) Lam, High coverage metabolomics method, Plant metabolomics, Biomarker

引言

高覆盖靶向代谢组学^[1, 2]研究思路, 目前是很多代谢组学实验室开展的一种新的代谢组学研究思路。该研究方法的特点是, 既结合了SCIEX TripleTOF™系统的高覆盖度, 同时也结合了SCIEX QTRAP®(或SCIEX Triple Quad™)系统高通量, 高稳定性和宽线性范围的特点, 为代谢组学研究提供了一种高覆盖度及高效的研究方法。

本文中, 紫薯中的代谢物MRM方法建立的流程如下, 先在SCIEX TripleTOF™系统上建立IDA方法对紫薯提取物进行高覆盖度的测定, 然后将鉴定到的化合物建立MRM离子对, 在SCIEX QTRAP®(或SCIEX Triple Quad™)系统进行靶向代谢组学的测定。

本文使用高覆盖靶向代谢组学的思路测定2个不同生长阶段的紫薯中的代谢物, 然后再进行统计分析, 筛选其中的差异代谢物, 以挖掘紫薯生长阶段的代谢物差异或生长信息。

本文实验方法特点

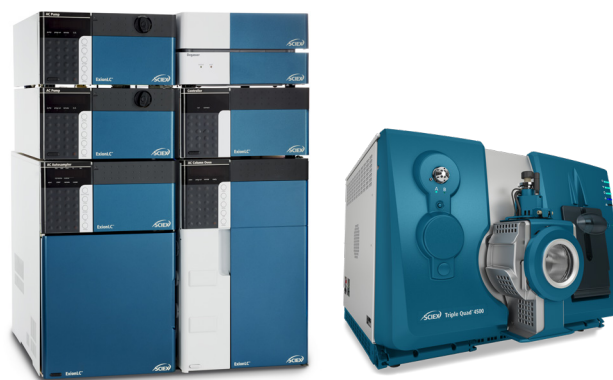
本文展示了使用SCIEX QTRAP®(或SCIEX Triple Quad™)系统建立了紫薯的高覆盖靶向代谢组学方法, 方法具有以下特点:

1. 仪器的灵敏度高, 检测速度快, 同时检测紫薯中的203个代谢物, 包括氨基酸, 核苷, 糖类, 脂质, 黄酮及黄酮苷类, 花青素类, 酚酸类等成分。其中, 正离子检测93个化合物, 负离子检测110个化合物, 化合物覆盖度高。

2. 仪器和方法的特异性好, 可正负切换同时检测, 结合Scheduled MRM™功能, 仅35min的方法即可完成一针样品中的203个化合物的检测, 检测效率高。
3. QC样本203个化合物中的RSD结果, 91%化合物的RSD在15%之内, 满足代谢组学QC样本重复性要求, 表明仪器和方法的重现性好。
4. 该方法为SCIEX QTRAP®系统或SCIEX Triple Quad™系统的用户开展高覆盖靶向代谢组学提供思路, 以及为开展紫薯高覆盖靶向代谢组学研究的用户提供方法, 便于快速筛选差异物。

仪器设备

SCIEX Exion LC™系统 + QTRAP®系统 (或SCIEX Triple Quad™系统)



液相方法

色谱柱: HSS T3 (100 × 2.1 mm, 1.8 μm)

流动相: A相: 水 (含0.05%甲酸和5 mmol/L 醋酸铵)

B相: 乙腈

流速: 0.3 ml/min

柱温: 40°C;

进样量: 2 µL

Time(min)	A (%)	B (%)
0.00	100	0
0.50	100	0
10.0	70	30
20.0	5	95
30.0	5	95
30.1	100	0
35.0	100	0

质谱方法离子源: ESI源, 正负离子切换同时检测-Scheduled MRM™
模式

离子源参数:

IS电压: 正离子: 5500V; 负离子: -4500V

气帘气 CUR: 35 psi 雾化气 GS1: 50 psi

辅助气 GS2: 50 psi 源温度 TEM: 500°C

碰撞气 CAD: Medium

循环时间 (正离子/负离子): 0.4 s / 0.4 s

表1. 部分MRM离子对列表展示

表1.1. 部分正离子列表

No.	Q1	Q3	Compound name	DP	EP	CE	CXP
1	317.07	153.02	异鼠李素 Isorhamnetin	80	10	35	7
2	403.14	373.09	川陈皮素 Nobiletin	80	10	35	7
3	463.11	301.07	芍药花青素+Glc 1	80	10	35	7
4	463.12	301.07	芍药花青素+Glc 2	80	10	35	7
5	465.1	303.05	金丝桃苷 Hyperin	80	10	35	7
6	627.16	303.05	槲皮素+2Glc	80	10	35	7
7	641.14	317.07	Methylquercetin+2Glu 1	80	10	35	7
8	641.17	317.07	Methylquercetin+2Glu 2	80	10	35	7
9	769.22	287.06	矢车菊素+乙酰基+Glc+Rha+xyl	80	10	35	7
10	773.2	287.06	矢车菊素+3Glc	80	10	35	7
11	787.2	301.07	芍药花青素+2Glc+Caffeoyl 1	80	10	35	7
12	787.21	301.07	芍药花青素+2Glc+Caffeoyl 2	80	10	35	7
13	787.22	301.07	芍药花青素+2Glc+Caffeoyl 3	80	10	35	7
14	787.23	301.07	芍药花青素+3Glc	80	10	35	7
15	789.21	303.05	槲皮素+3Glc 1	80	10	35	7
16	789.22	163.04	槲皮素+3Glc 2	80	10	35	7
17	789.23	163.04	槲皮素+3Glc 3	80	10	35	7
18	791.2	305.06	二氢槲皮素+3Glc	80	10	35	7
19	801.21	301.07	芍药花青素+2Glc+Feruoyl 1	80	10	35	7
20	801.22	301.07	芍药花青素+2Glc+Feruoyl 2	80	10	35	7
21	805.22	319.08	羟基槲皮素+3Glc	80	10	35	7
22	893.23	287.06	矢车菊素+3Glc+salicylacyl	80	10	35	7
23	907.25	301.07	芍药花青素+3Glc+salicylacyl	80	10	35	7
24	909.28	303.09	槲皮素+3Glc+salicylacyl	80	10	35	7

表1.2. 部分负离子列表

No.	Q1	Q3	Compound name	DP	EP	CE	CXP
1	465.11	303.04	二氢槲皮素+ Glc 1	-80	-10	-35	-11
2	465.12	303.04	二氢槲皮素+ Glc 2	-80	-10	-35	-11
3	465.13	303.04	二氢槲皮素+ Glc 3	-80	-10	-35	-11
4	465.14	303.04	二氢槲皮素+ Glc 4	-80	-10	-35	-11
5	465.15	303.04	二氢槲皮素+ Glc 5	-80	-10	-35	-11
6	337.05	191.06	1-pCoQA	-80	-10	-35	-11
7	337.06	119.05	5-pCoQA	-80	-10	-35	-11
8	353.07	191.06	1-CQA 1	-80	-10	-35	-11
9	353.08	191.06	1-CQA 2	-80	-10	-35	-11
10	353.09	191.06	5-CQA	-80	-10	-35	-11
11	353.04	191.06	1-CQA 3	-80	-10	-35	-11
12	353.03	191.06	1-CQA 4	-80	-10	-35	-11
13	353.02	191.06	1-CQA 5	-80	-10	-35	-11
14	355.1	175.04	1-O-feruloyl-β-D-glucose	-80	-10	-35	-11
15	367.1	173.05	5-FQA	-80	-10	-35	-11
16	367.11	173.05	4-FQA	-80	-10	-35	-11
17	457.11	137.02	水杨酸酰基奎宁酸+ Coumaroyl 1	-80	-10	-35	-11
18	457.12	137.02	水杨酸酰基奎宁酸+ Coumaroyl 2	-80	-10	-35	-11
19	473.1	173.04	水杨酸酰基奎宁酸+ cafferoyl 3	-80	-10	-35	-11
20	473.11	173.04	水杨酸酰基奎宁酸+ cafferoyl 4	-80	-10	-35	-11
21	487.11	173.05	5-FQA+salicylacyl 3	-80	-10	-35	-11
22	473.13	173.04	水杨酸酰基奎宁酸+ cafferoyl 1	-80	-10	-35	-11
23	487.12	137.03	5-FQA+salicylacyl 1	-80	-10	-35	-11
24	487.13	137.02	5-FQA+salicylacyl 2	-80	-10	-35	-11

实验结果

1. **空白溶液和QC样品溶液:** 配制含50%乙腈溶液, 作为空白溶液, 考察专属性, 提取离子流图如图1; 分别从所有样品中取30 μl溶液混合, 作为QC样本, 考察仪器的稳定性。提取离子流图如图2。A样本的提取离子流图见图3。

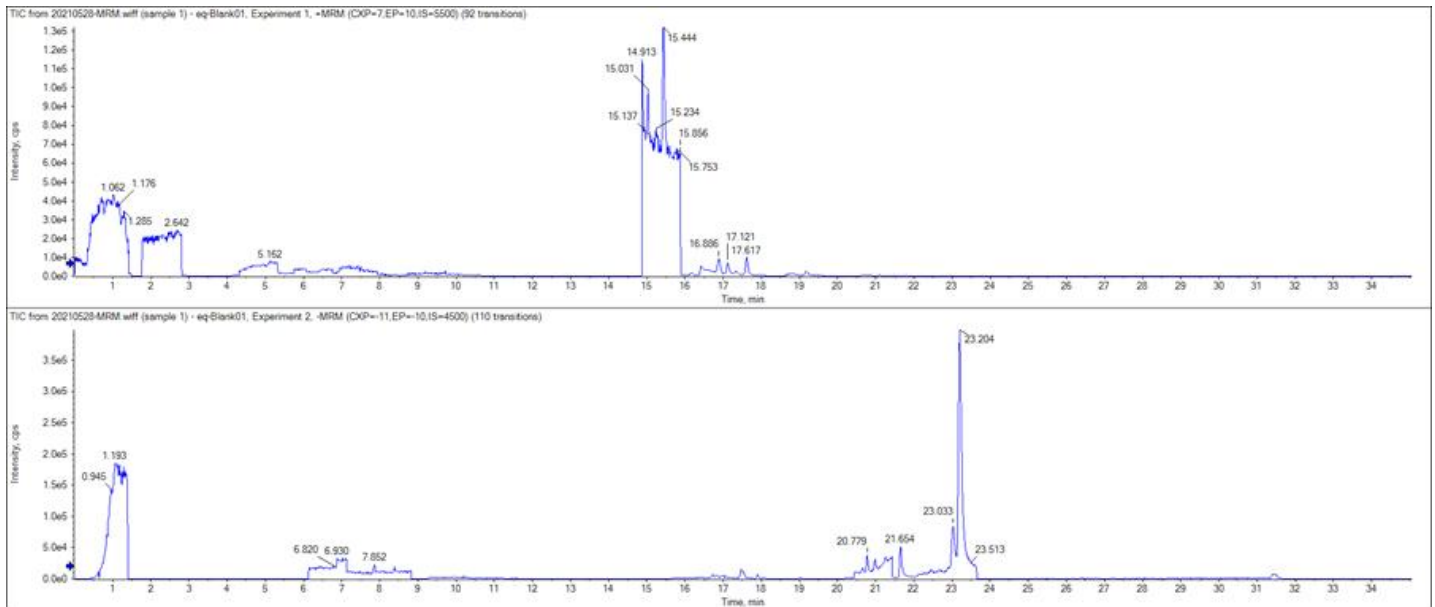


图1. 空白溶液中的总离子流图
(从上到下, 上图为正离子的总离子流图, 下图为负离子的总离子流图)

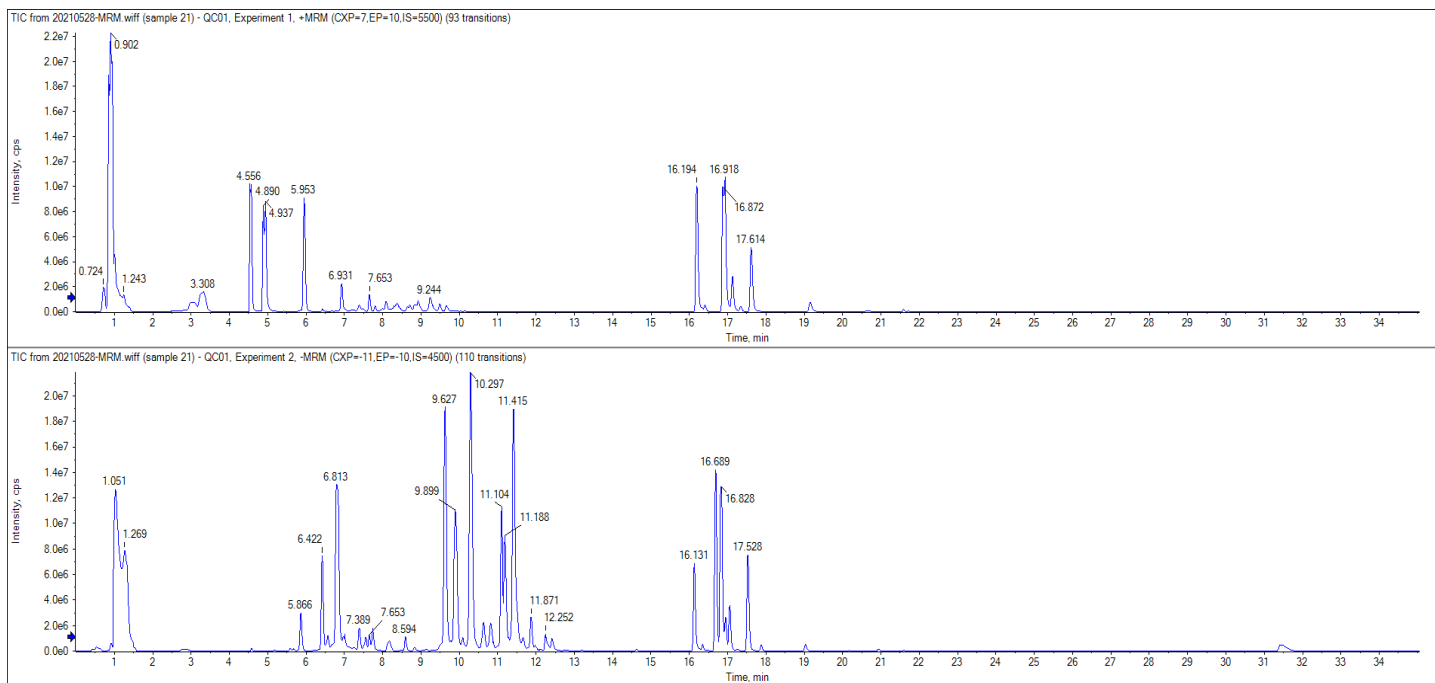


图2. QC样品总离子流图
(从上到下, 上图为正离子的总离子流图, 下图为负离子的总离子流图)

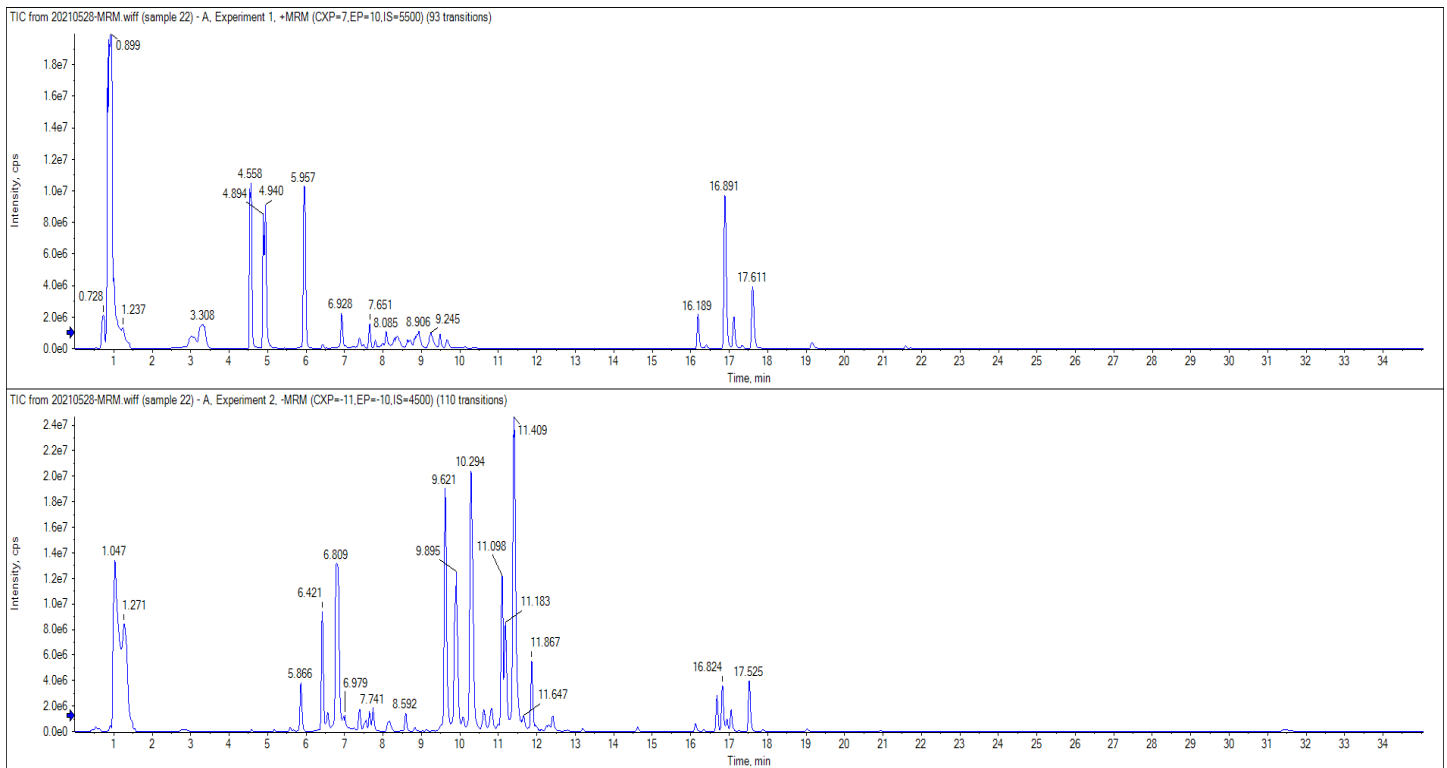


图3. A样品总离子流图
(从上到下, 上图为正离子的总离子流图, 下图为负离子的总离子流图)

2. QC样本重现性评估:

QC样本穿插在进样序列中, 每三针样品中穿插一针QC样品, 最后使用QC样品来评估序列进样中仪器的稳定性和重复性。

首先, 3针QC样品的重叠图, 见图4。从重叠图中可以看出, 化合物保留时间和响应强度的总离子流图重叠好。

其次, 对3针QC样品中203个化合物RSD%进行计算, 来评估重现性。91%的化合物在15%之内, 满足代谢组学QC样本重复性要求, 且表明仪器的重现性良好。

从以上两方面考察结果来看, 仪器在序列运行过程中, 状态稳定, 样品结果可用于代谢组学分析。

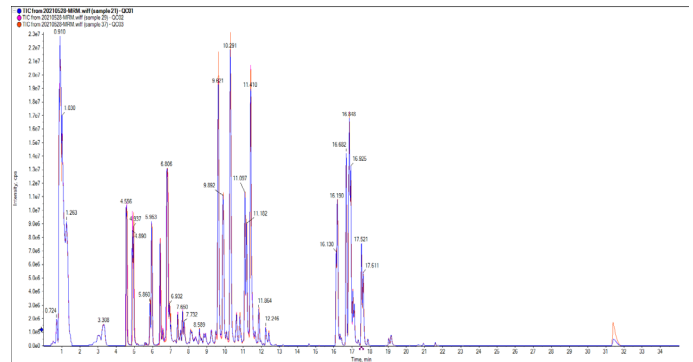


图4. 3针QC样品总离子流重叠图

3. 统计结果:

2个不同阶段的紫薯样本，每组3个样本，每个样本进样1针，最后寻找两个阶段的差异代谢物。本文中的数据使用Markerview (版本号1.3, SCIEX)和MetaboAnalyst (版本号5.0, <https://www.metaboanalyst.ca>)对203个代谢物进行统计，筛选差异物。

使用MetaboAnalyst软件对2组样本进行PLS-DA统计，PLS-DA得分图见图5。从PLS-DA得分图可以看出2组样本有明显的区分，表明样本之间有明显的差异。使用Markerview软件对2组样本分别进行t-检验，t-检验结果及其中一个化合物的箱体图展示见图6。使用MetaboAnalyst进行t-test, Fold Change及PLS-DA分析，以p值<0.01, Fold change>2或<0.5, 及VIP>1筛选两组间的差异物。Fold Change图见图7。两组间的差异物总共是135个，列表见表3，包括14个氨基酸及其他类小分子，20个脂质化合物，50个酚酸类化合物，51个黄酮苷和花青素苷类化合物。

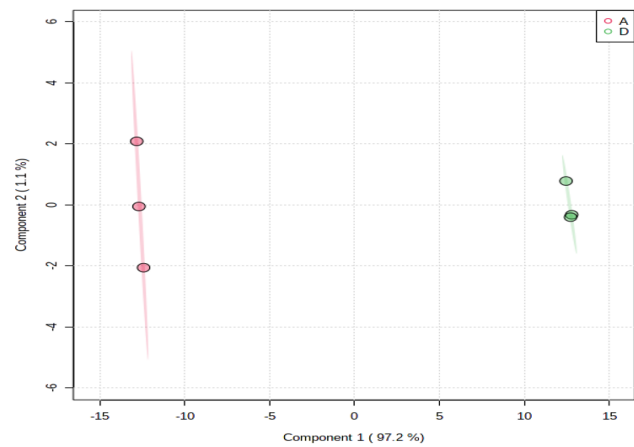


图5. PCA-DA得分图

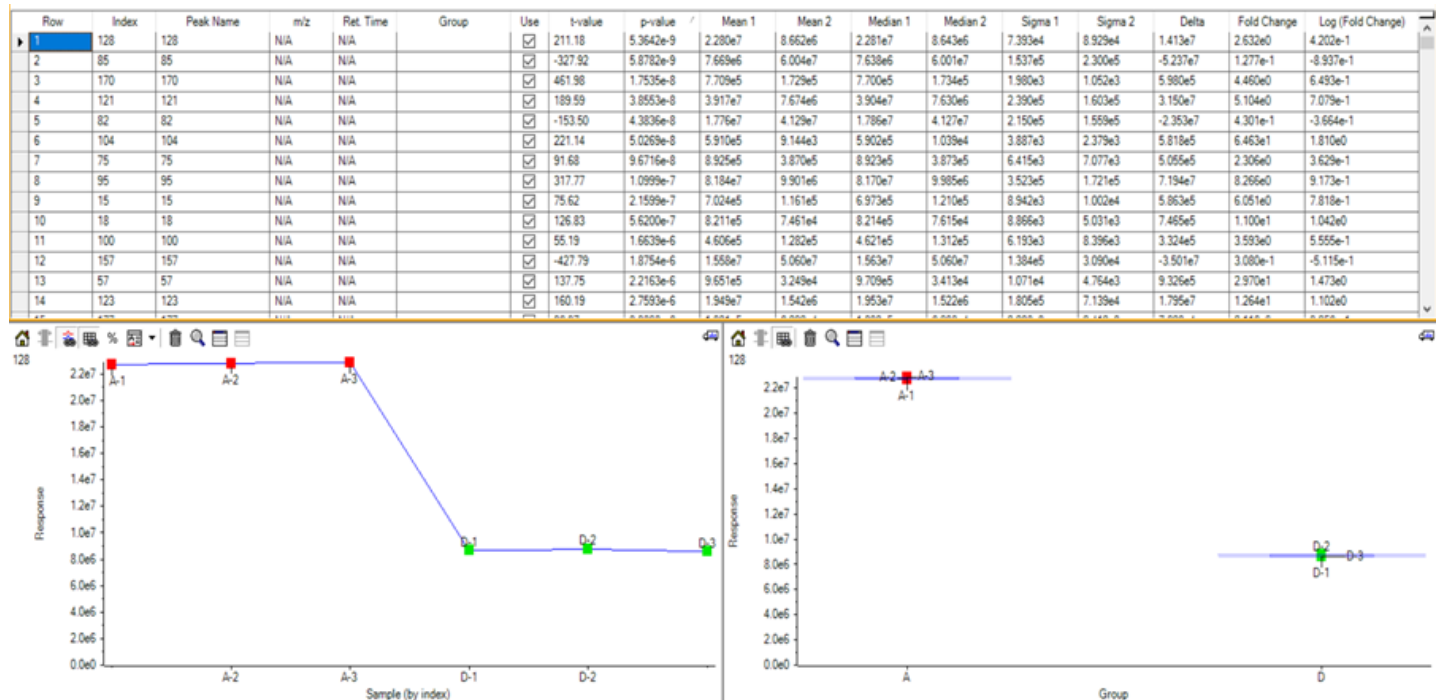


图6. t-检验结果及箱体图

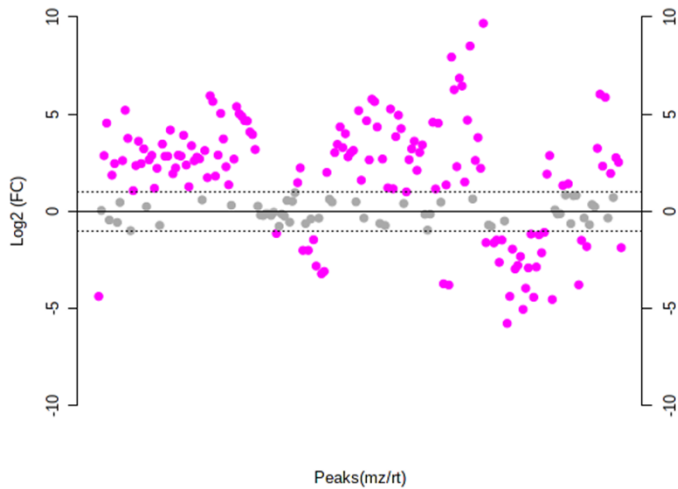


图7. Fold Change图

参考文献

- [1] F Zheng, X Zhao, Z Zeng, L Wang, G Xu, Development of a plasma pseudotargeted metabolomics method based on ultra-high-performance liquid chromatography-massspectrometry. Nature Protocols. 2020.
- [2] Zhou S, Kremling KA, et al. Metabolome-Scale Genome-Wide Association Studies Reveal Chemical Diversity and Genetic Control of Maize Specialized Metabolites. Plant Cell. 2019,31(5):937-955.

总结

本文展示了使用SCIEX QTRAP® 系统建立了紫薯的高覆盖靶向代谢组学方法。该方法可同时检测紫薯中的203个代谢物，包括氨基酸，核苷，糖类，脂质，黄酮及黄酮苷类，花青素类，绿原酸等成分。其中，正离子检测93个化合物，负离子检测110个化合物，化合物覆盖度高。仪器和方法的特异性好，可正负切换同时检测，结合Scheduled MRM™功能，仅35min的方法即可完成一针样品中的203个化合物的检测，检测效率高。QC样本中203个化合物的RSD，91%的化合物在15%之内，表明仪器和方法的重现性好。该方法为SCIEX QTRAP®系统或SCIEX Triple Quad™的用户开展高覆盖靶向代谢组学提供思路，以及为开展紫薯代谢组学研究的用户提供方法，便于快速筛选差异物。

表3. A组和D组之间的差异物列表

化合物名称	化合物名称	化合物名称
新蛇床内酯	1-pCoQA	木犀草素+3Glc+Feruoyl
JA	Sucrose+Caffeoyl 1	羟基槲皮素+4 Glc +GlcUA
JA-Lie	4C,5FCQA	异鼠李素 Isorhamnetin
姜糖脂B Gingerglycolipid B +HCOOH 1	1-CQA 3	矢车菊素+3Glc+salicylacyl
12-OPDA	Sucrose+Caffeoyl 2	二氢槲皮素+ Glc 4
异东莨菪内酯	3,4-diCQA+Glc	芍药花青素+2Glc+Feruoyl 1
SA	3,4-diCQA	山奈素+3Glc+Rha+salicylacyl
鸟苷guanosine	Sucrose+Caffeoyl 3	羟基槲皮素+4 Glc 1
姜糖脂B Gingerglycolipid B +HCOOH 2	3C,5FCQA	木犀草素+3Glc+Caffeoyl 3
ABA	1-O-feruloyl-β-D-glucose-O-glucose +s	羟基槲皮素+4 Glc 2
麦芽五糖Maltopentaose	Sucrose+2Caffeoyl 3	木犀草素+3Glc+ 2Caffeoyl
CA	水杨酸酰基奎宁酸+ cafferoyl 3	木犀草素+3Glc+Caffeoyl 1
烟酸nicotinic (Nicotinic acid)	水杨酸酰基奎宁酸+ cafferoyl 4	山奈素+3Glc+Caffeoyl+Feruoyl
阿魏酸 Ferulic Acid	1-pCoQA+Feryoyl 4	芍药花青素+2Glc+Caffeoyl 3
FFA 18:2-2O	3,4-diCQA+Rha	山奈素+3Glc+Cafferoyl 1
LPC 18:0	3F,5CQA	Methylquercetin+2Glu 1
LPE 16:0	Ferulic acid O-hexoside	木犀草素+4Glc+GlcUA
LPE 18:3 1	Sucrose+Caffeoyl 4	木犀草素+ 4 Glc + salicylacyl
LPE 20:3 1	水杨酸酰基奎宁酸+ Coumaroyl 1	槲皮素+3Glc 3
LPC 18:3	1-pCoQA+Feryoyl 5	芹菜素+ 4 Glc + salicylacyl
LPE 20:2 1	3C,4FQA+Glc	槲皮素+3Glc++salicylacyl
LPE 18:2 1	水杨酸酰基奎宁酸+ cafferoyl 2	芍药花青素+Glc 2
LPE 18:0	Sucrose+2Caffeoyl 1	槲皮素+3Glc 2
FFA 18:1-2O	1-pCoQA+Feryoyl 3	槲皮素+2Glc
LPE 20:0	1-pCoQA+Feryoyl 2	芍药花青素+3Glc+salicylacyl
LPC 16:0	5-pCoQA	二氢槲皮素+ 3Glc + Feruoyl
FFA 18:3	3,4-diCQA+Caffeoyl 1	槲皮素+3Glc 1
LPE 20:3 2	Sucrose+2Caffeoyl 4	羟基槲皮素+3 Glc
LPE 18:2 2	1-CQA+Coumaroyl 4	山奈素+3Glc+Feruoyl 1
FFA 16:0	1-CQA+Coumaroyl 2	芍药花青素+3Glc+Rha+GlcUA
FFA 18:2	3,4-diCQA+Caffeoyl 2	矢车菊素+2Glc+Xyl+2Caffeoyl 1
FFA 18:1	3,4-diCQA+Glc+Feruoyl	芍药花青素+2Glc+Caffeoyl 1
LPE 18:3 2	1-CQA+Coumaroyl 1	山奈素+3Glc+Cafferoyl 2
FFA 18:3-O	5-FQA+Feruoyl 3	二氢槲皮素+ Glc 5
1-CQA 1	1-O-feruloyl-β-D-glucose	芍药花青素+Glc 1
5-FQA+salicylacyl 2	水杨酸酰基奎宁酸+ cafferoyl 1	木犀草素+2Glc+Rha+2Caffeoyl 1
5-FQA+Feruoyl 2	水杨酸酰基奎宁酸+ Coumaroyl 2	芍药花青素+3Caffeoyl +Rha+Feruoyl
1-CQA 2	1-CQA 5	山奈素+3Glc+Feruoyl 2
5-CQA	3C,4FQA+Caffeoyl 1	芍药花青素+2Glc+Rha+Caffeoyl
3,4-diCQA-去乙酰基+3,4-diCQA	槲皮素+4Glc	羟基槲皮素+3 Glc+GlcUA 2
5-FQA+Feruoyl 1	羟基槲皮素+5 Glc	矢车菊素+2Glc+Xyl+2Caffeoyl 2
4,5-diCQA	山奈素+4Glc+salicylacyl 1	二氢槲皮素+ 3Glc
4-FQA	山奈素+3Glc+2Caffeoyl	山奈素+3Glc+Cafferoyl 4
3,5-diCQA	矢车菊素+3Glc+Caffeoyl 2	山奈素+4Glc+salicylacylc2
4-FQA+Glc+Caffeoyl	山奈素+3Glc+Cafferoyl 3	芍药花青素+2Glc+Caffeoyl 2

备注: JA为茉莉酸, JA-Lie为茉莉酸异亮氨酸, 12-OPDA为12-Oxo phytodienoic acid, SA为水杨酸, ABA为脱落酸, CA为肉桂酸, CQA为咖啡酰基奎宁酸, FQA为魏酰基奎宁酸, Salicylacyl为水杨酸酰基, pCoQA, pCo或Coumaroyl为香豆酰基奎宁酸, DiCQA 双咖啡酰基奎宁酸, Feruoyl或F为阿魏酰基, Caffeoyl或C为咖啡酰基, Sucrose为蔗糖, Rha为鼠李糖, Ferulic acid阿魏酸, Glc为葡萄糖, GlcUA为葡萄糖醛酸。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息, 请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标, 也包括相关的标识、标志的所有权, 归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美利坚/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2021 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-13860-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话: 010-5808-1388
传真: 010-5808-1390

全国咨询电话: 800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话: 021-2419-7200
传真: 021-2419-7333

官网: sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话: 020-8510-0200
传真: 020-3876-0835

官方微信: [SCIEX-China](https://www.sciex.com.cn)