

大肠杆菌代谢物组测定中抽提方法的比较分析

王庆昭 杨育谕 陈洵 赵学明*

(天津大学化工学院 天津 300072)

摘 要 代谢物组学作为一种重要的功能基因组学工具,已经在微生物性状改良等方面得到了应用。实施代谢物组学研究需要定性和定量分析细胞内的全部代谢物。所以,必须有一种能够提供良好的重复性和相对抽提效率较高的细胞内代谢物抽提方法。本研究以特定厌氧条件下培养的大肠杆菌为研究对象,以电喷雾质谱直接进样测定为评价标准,比较并分析了冰甲醇、热乙醇和碱抽提 3 种抽提方法。结果显示,冰甲醇抽提的样品在电喷雾质谱实验中表现出良好的重复性和最高的峰强度,并能够同时检测到超过 20 种不同的胞内代谢物。

关键词 电喷雾质谱 抽提方法 代谢物组 大肠杆菌 厌氧条件

1 引 言

代谢物组学 (metabolomics) 是研究生物体系受到外部刺激后所产生的所有代谢产物变化的科学^[1]。研究表明,细胞的多种功能是在代谢物和代谢网络的水平上进行调节的^[2~5]。因此代谢物组学作为系统生物学的一种研究方法已经引起越来越多的重视。微生物代谢物组学也已经在发酵控制分析^[6]、代谢控制分析^[7]以及和其它组学联用进行菌种改良方面^[8]得到了应用,并获得了良好的效果。

进行代谢物组学研究需要对微生物细胞内的小分子代谢物进行定性和定量的分析。在众多的分析方法中,虽然核磁共振 (NMR) 能够实现样品的非破坏性分析^[9],但因为微生物胞内代谢物的浓度通常在 mmol 的水平,尤其是厌氧发酵大肠杆菌的代谢物浓度通常在 μmol 的水平,所以 NMR 的低敏感性限制了其在代谢物组测定中的应用。近年来,液/质联用 (LC-MS) 因为其高敏感性,已经逐渐被应用于代谢物组学的测定分析中^[10,11]。采用各种方法分析代谢物依赖一种统一的培养方法和良好的抽提方法。目前的文献中抽提方法主要有热乙醇^[12]、高氯酸或碱抽提^[13]、热甲醇^[14]、冰甲醇^[15]、甲醇和氯仿^[16]等。而采用这些抽提方法的依据不足。因此需要以电喷雾质谱直接进样测定为评价标准对抽提方法进行研究,从而为使用质谱进行代谢物组测定打下基础。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Finnigan LCQ 电喷雾离子阱质谱仪 (美国 Finnigan 公司);ESI 离子源壳气 (N_2) 0.8 L/min;数据采集和分析使用 Thermoquest Xcalibur 软件 (1.3 版);D-78532 型冷冻高速离心机 (Hettich Zentrifugen);PHB-5 型 pH 计 (上海理达仪器厂);APSP-20-01 型实验室专用超纯水化机 (重庆颐洋企业发展有限公司);超低温冰箱 (PIEER Ltd)。

试剂纯酵母粉 (加拿大 BBI lot 0104S04);试剂纯蛋白胨 (加拿大 BBI lot 0413S05);分析纯 NaCl (加拿大 BBI lot 1201S05);色谱级甲醇、乙醇 (Merck Ltd);分析纯 KOH (上海生工)。

2.2 菌种培养条件

采用野生大肠杆菌 W1485。菌种培养采用 1% 蛋白胨 0.5% 酵母粉 1% NaCl 的培养基,葡萄糖配成 40% 溶液并单独灭菌。灭菌温度选择 110℃,30 min。发酵初始 pH 调整为 7.0,葡萄糖浓度 10 g/L。发酵采用 100 mL 血浆瓶,并用橡胶塞密封,后用无菌注射器抽真空。在 37℃ 震荡培养到 $\text{OD}_{600} = 1$ 时取样测定。

2.3 样品灭活及抽提方法

样品的灭活方法采用冰甲醇法。以无菌注射器抽取 15 mL 60% (V/V) 甲醇,并加入 10 mmol/L

三甲甘氨酸, -50°C 冰箱预冷。后快速抽取 5 mL 发酵液混匀。在 13000 g、 0°C 离心 3 min, 去除发酵液, 并用 0°C 原子级水洗涤两次, 即可进行细胞内代谢物的抽提。(1) 冰甲醇抽提 在浓缩的细胞悬液中加入 -20°C 冰甲醇, 使甲醇浓度为 50% (V/V)。在涡旋震荡器上快速震荡, 放置液氮中冷冻 30 s 后, 冰上放置 10 min, 反复两次。溶解后将其在高速离心机上以 18000 r/min 10 min, 取上清液浓缩到 10 μL 分装, -80°C 保存。(2) 热乙醇抽提 将两倍体积的沸乙醇加入浓缩细胞中, 快速混匀裂解细胞。 90°C 水浴保持到乙醇挥发完全。将其在高速离心机上最大转速 (18000 r/min) 0°C 离心 10 min。取上清液浓缩到 10 μL 分装, -80°C 保存。(3) 碱抽提 在浓缩细胞中加入 80°C KOH 溶液使混匀后的 KOH 浓度为 0.1 mol/L。 80°C 水浴 10 min, 后冰上冷却 5 min, 将其在高速离心机上最大转速 (18000 r/min) 0°C 离心 10 min。上清液用 0.1 mol/L 的高氯酸中和后高速离心去除 KClO_4 。取上清液浓缩到 10 μL 分装, -80°C 保存。

2.4 电喷质谱测定

电喷质谱采用以下条件: 喷雾毛细管温度 300°C , 工作气为 N_2 , 流速 35 个单位, 样品以 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 速度连续注入电喷雾源, 喷雾电压 4.25 kV, 采用选择阳离子扫描, 调节参数以及最优激发能由仪器所带软件自动调节, 扫描范围 150 ~ 1000 m/z 。

3 结果与讨论

3.1 培养条件的选择

不同的培养条件对微生物胞内代谢物的分布和丰度有很大影响。因此, 在其代谢物组的测定中, 经常使用成分单一的基本培养基, 以期获得较好的数据重复性。但由于微生物本身在不同条件下的代谢特征差异显著, 因此, 在基本培养基上所获得的数据往往不能够指导实际生产过程中的菌种改良。而且大肠杆菌在基本培养基中厌氧生长的速度比较缓慢, 因此, 实验并没有使用成分单一的基本培养基, 而是采用了发酵过程中使用的 LB 培养基。为了最大可能的提高数据的可重复性, 对培养条件进行了严格的限制。主要的限制步骤是在实验过程中配制培养基的试剂采用同一批次的厂家产品, 严格规定了灭菌过程等。在接下来的质谱实验中证明此培养条件获得的数据有较高的重复性。

3.2 各种抽提方法效率的比较

一般预测大肠杆菌内大约有 500 ~ 600 种小分子代谢物, 而主代谢物的浓度通常在 mmol 的水平 (通常包括中心碳代谢)。其它一些代谢物的浓度在 μmol 的水平 (维生素等)。而厌氧发酵大肠杆菌的代谢物浓度水平就更低。因此要测量细胞内代谢物, 选择高敏感性的检测手段和尽量提高细胞内代谢物的抽提效率是关键。为了比较分析不同抽提方法的抽提效率, 选用了高敏感性的质谱作为评价手段。根据目前文献所述的抽提方法, 选取了冰甲醇、热乙醇和碱抽提 3 种方法比较分析。不使用高氯酸法的原因是: 高氯酸为强氧化剂, 因此在提取过程中会氧化细胞内的还原性物质。例如 NADH 与 NADPH 等重要的辅酶会氧化成 NAD 和 NADP 而被检出。因为试剂毒性以及方法的繁琐性, 未选用热甲醇和甲醇-氯仿的抽提方法。图 1A、B 和 C 显示了大肠杆菌 W1485 厌氧培养到 $\text{OD}_{600} = 1$ 时小分子细胞内代谢物电喷质谱谱图。

可以看出, 在这 3 种抽提方法中, 热乙醇的抽提效果最差, 即在质谱中有最少的峰被检出, 各峰的强度相比其他方法均较小 (低信噪比)。而冰甲醇和碱抽提的抽提效率较高。它们共有的代谢物均有较高的强度 (高信噪比)。而这两种方法也都有其偏向性, 即都有一些相互没有的代谢物检出。这是因为本身细胞内代谢物的化学特性差异非常大, 所以在不同抽提液中的溶解度不同造成的。这也说明任何一种抽提方法都不能满足代谢物组的无偏差检测所有代谢物的要求。

3.3 各种抽提方法重复性的比较

作为一种合适的抽提方法, 除了有较高的抽提效率以外, 还要求必须有很好的重复性。这是利用所测得的代谢物数据进行代谢物系列比较分析 (metabolic profiling) 以及指纹图谱分析 (metabolic fingerprinting) 的要求。根据以上的比较分析, 进一步比较了抽提效率较高的冰甲醇法和碱抽提法的重复性。图 1D 和 1E 分别显示了碱抽提法和冰甲醇法两次独立实验的电喷质谱图。碱抽提法的两次质谱图

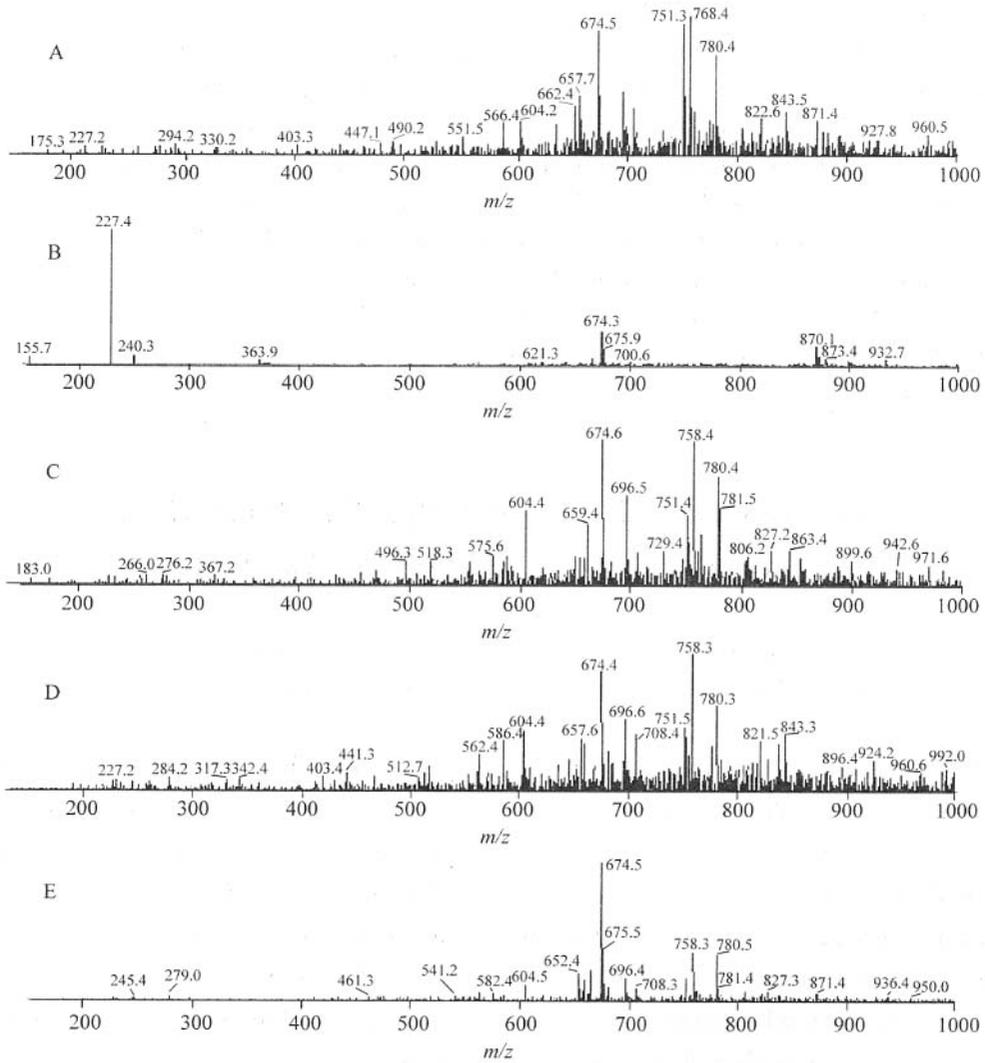


图 1 大肠杆菌 W1485 厌氧培养到 $OD_{600} = 1$ 时小分子细胞内代谢物电质谱图

Fig. 1 Electrospray mass spectra of low molecular weight intracellular metabolites of *E. coli* W1485 growing under anaerobic conditions in exponential phase of $OD_{600} = 1$

A. 冰甲醇抽提 (cold methanol extraction); B. 热乙醇抽提 (hot ethanol); C. 碱抽提 (alkaline extraction); D. 第二次冰甲醇独立实验 (the second independent cold methanol extraction); E. 第二次碱抽提独立实验 (the second independent alkaline extraction).

(图 1C 和 E) 在出峰的数量和相对强度上有较大的差异, 而冰甲醇法的两次质谱图 (图 1A 和 D) 无论在出峰的数量、核质比数值和相对强度上都非常相似, 具有非常好的数据重复性。分析碱抽提法重复性比较差的原因可能和其抽提过程的 80°C 保温时间较长, 以及经过强碱强酸过程后, 有些胞内代谢物有不同程度的不稳定或氧化还原状态变化所导致。

以冰甲醇法为抽提方法能够允许测定至少 20 种以上的大肠杆菌细胞内代谢物, 且具有良好的效率和重复性。低核质比 ($m/z \leq 400$) 的代谢物应该为糖代谢中间产物或氨基酸, 高核质比 ($m/z \geq 600$) 的代谢物可能为核苷酸和各种维生素 (辅酶) 等。具体的峰和代谢物对应研究正在进行中。

References

- 1 Fiehn O. *Plant. Mol. Biol.*, 2002, 48: 155 ~ 171
- 2 Fell D A. *Trends. Genet.*, 2001, 17: 680 ~ 682
- 3 Raamsdonk L M, Teusink B, Broadhurst D, Zhang N, Hayes A, Walsh M C, Berden J A, Brindle K M, Kell D B, Rowland J J, Westenhoff H V, van Dam K, Oliver S G. *Nat. Biotechnol.*, 2001, 19: 45 ~ 50

- 4 Even S , Lindley N D , Coccagn- Bousquet M. *Microbiology* , **2003** , 149 : 1935 ~ 1944
- 5 Mandal M , Boese B , Barrick J E , Winkler W C , Breaker R R. *Cell* , **2003** , 113 : 577 ~ 586
- 6 Dalluge J J , Smith S , Sanchez-Riera F , McGuire C , Hobson R. *J. Chromatogr. A* , **2004** , 1043 : 3 ~ 7
- 7 Kaderbhai N N , Broadhurst D I , Ellis D I , Goodacre R , Kell D B. *Comp. Funct. Genom.* , **2003** , 4 : 376 ~ 391
- 8 Villas-Boas S G , Moxley J F , Kesson M , Stephanopoulos G , Nielsen J. *Biochem. J.* , **2005** , 388 : 669 ~ 677
- 9 Wang Q Z , Wu C Y , Chen T , Chen X , Zhao X M. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* , **2006** , 70 : 151 ~ 161
- 10 Jeffrey F M , Roach J S , Storey C J , Sherry A D , Malloy C R. *Anal. Biochem.* , **2003** , 300 : 192 ~ 205
- 11 Gonzalez B , Francosis J , Renaud M. *Yeast* , **1997** , 13 : 1347 ~ 1355
- 12 Buchholz A , takors R , Wandrey C. *Anal. Biochem.* , **2001** , 295 : 129 ~ 137
- 13 Shyock J C , Rubio R , Berne R M. *Anal. Biochem.* , **1986** , 159 : 73 ~ 81
- 14 Maharjan R P , Ferenci T. *Anal. Biochem.* , **2003** , 313 : 145 ~ 154
- 15 de Koning W , van Dam K. *Anal. Biochem.* , **1992** , 204 : 118 ~ 123

Comparisons of Different Extraction Methods in *Escherichia Coli* Metabolome Analysis

Wang Qingzhao , Yang Yudi , Chen Xun Zhao Xueming*

(School of Chemical Engineering & Technology , Tianjin University , Tianjin 300072)

Abstract Metabolomics , as an important functional genomics tool , had been used practically in strain improvement. In order to qualify and quantify the intracellular global metabolites , there must be a reliable cultivation and extraction methodology , which can provide good reproducibility and high peak intensities. This research focused on *Escherichia coli* , which is under regulated anaerobic fermentation conditions. Three different extraction methods (cold methanol , hot ethanol and alkali extraction) were analyzed and compared using the direct infusion electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS) as the evaluation standard. The results show that cold methanol extraction method has the best reproducibility ; highest signal intensities and can simultaneously detect more than 20 intracellular metabolites.

Keywords Electrospray-mass spectrometry , extraction methods , metabolome , *Escherichia coli* , anaerobic conditions

(Received 1 November 2005 ; accepted 21 March 2006)

《分析化学中的小波分析技术》

卢小泉 刘宏德 编著

小波变换的概念是由法国从事石油信号处理的工程师 J. Morlet 在 1974 年首先提出的并建立了反演公式。它解决了 Fourier 变换不能解决的许多困难问题 , 所以被誉为“数学显微镜” , 具有分析发展史上里程碑式的意义。本书是分析科学现代方法丛书中的一册 , 是国内第一本介绍小波分析在分析化学中应用的图书。作者卢小泉教授自 1994 年始从事小波分析在分析化学中的应用研究 , 他在自己科研的基础上参阅了国内外大量的有关小波分析的文献后编著此书 , 书中内容具有很强的针对性和实用性。该书的出版能给分析化学工作者 , 特别是化学计量学工作者提供一些有价值的参考。定价 25.00 元。