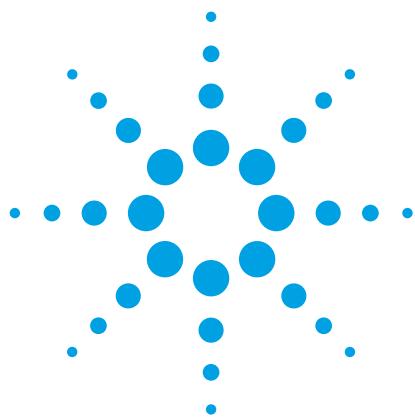




采用 GC/Q-TOF 进行蓝藻固碳突变体代谢组学研究

应用简报

生物燃料

作者

Dong Hee Chung,
Christine Rabinovitch-Deere 和
Shota Atsumi
化学系
加州大学戴维斯分校,
戴维斯, 加利福尼亚州

Sofia Aronova
安捷伦科技公司
加利福尼亚州圣克拉拉市

摘要

使用非靶向代谢组学评估蓝藻细长聚球蓝细菌模型的突变体, 从而对可实现蓝藻更高效生长的可能表型变化进行鉴定。采用 Agilent 7200 系列 GC/Q-TOF 分析突变体, 通过 Mass Profiler Professional 中的安捷伦通路结构软件分析代谢物谱的变化。本方法鉴定了多个代谢途径以及能够解释突变体改良表型的可能目标物。

前言

由于可用的化石燃料有限, 而且排放的 CO₂ 积累十分有害, 因此人们对于工程菌生产可持续性替代燃料极为关注。蓝藻是一种光合二氧化碳固定微生物, 因其具有以温室气体为碳源、以光为能源的功能而颇受青睐。

然而蓝藻的产量很低, 限制了大规模工业生产, 因此为了使以蓝藻为基础的生物燃料经济可行, 必须提高细胞生长速率 [1]。之前的研究发现, 碳固定是蓝藻生长的关键限制因素 [2]。过去, 人们试图通过定向改变来提高固碳速率, 但收效甚微。因此, 定向进化方法可能有助于鉴定之前未考虑过的有益代谢变化。



Agilent Technologies

本应用简报将介绍一项研究，旨在通过随机诱变和筛选 *S. elongatus* PCC7942 野生型蓝藻，获得更高效生长和固定 CO₂ 的突变体，从而克服蓝藻的生长限制。在精确质量高分辨 7200 GC/Q-TOF 系统上采用非靶向代谢组学方法对生成的突变体进行进一步评估。采用包括 Pathway Architect 在内的多个软件工具对得到的精确质量数数据进行处理，以便鉴定可能参与有益变化的代谢途径。本研究揭示了多个可能与蓝藻突变体改良特征有关的代谢途径。

实验部分

仪器

采用 Agilent 7890B 气相色谱系统与 Agilent 7200 GC/Q-TOF 系统联用进行研究。表 1 中列出了仪器条件。

表 1. 气相色谱和质谱条件

气相色谱条件

色谱柱	Agilent J&W DB-5MS 超高惰性色谱柱， 30 m × 0.25 mm, 0.25 µm (部件号 122-5532UI)
进样量	1 µL
分流比	10:1
分流/不分流进样口温度	250 °C
柱温箱升温程序	60 °C 保持 1 min，以 10 °C/min 的速率升至 325 °C， 保持 3.5 min
载气	氮气，1 mL/min，恒流
传输线温度	290 °C

质谱条件

电离模式	EI
离子源温度	230 °C
四极杆温度	150 °C
质量数范围	50 m/z 至 800 m/z
谱图采集速率	5 Hz，以棒状图和轮廓图两种模式采集

样品前处理

使用甲磺酸乙酯 (EMS) 或亚硝基胍 (NTG) 诱变野生型 *S. elongatus* PCC7942。复苏后，在高浓度 CO₂ 条件下培养细胞。将高密度培养物传代几轮，以便富集生长速率较快的细胞。然后使用生长测定法进行三次平行实验，确认最佳分离细胞。根据突变体相对于野生型的生长速率，从 16 种候选物中选出四种作进一步分析。

使用甲醇/氯仿萃取法萃取代谢物。收集并干燥水相萃取液，然后分别用吡啶盐酸羟胺饱和溶液进行甲氧化衍生，N-甲基-N-(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺 (MSTFA) 和 1% 三甲基氯硅烷 (TMCS) 进行硅烷化衍生。

数据处理与统计分析

在数据处理时，使用 MassHunter 定量分析软件包 (B.07) 中的未知物分析工具进行色谱峰解卷积，然后通过与 Agilent Fiehn GC/MS 代谢物保留时间锁定 (RTL) 谱库进行对比来鉴定化合物。利用精确质量数信息和 MassHunter 定性分析软件包 (B.07) 中的精确质量数工具进一步确认代谢物种类。

采用多变量统计分析包 Mass Profiler Professional (MPP) (12.6) 进行统计分析，以鉴定突变体与野生型菌株之间以及突变体之间的代谢组差异。使用 MassHunter 定量分析软件进一步定量分析代谢物的相对浓度。最后，通过 MPP 中的 Pathway Architect 鉴定可能参与突变体有益变化的生化途径。

结果与讨论

色谱峰解卷积和谱库搜索

在数据处理时，使用未知物分析工具进行色谱解卷积（图 1），为了确定最多的真实组分，精确质量设置为 100 ppm，保留时间窗口大小因子可变 (75-200)（图 1）。通过与 Agilent-Fiehn GC/MS 代谢物保留时间锁定 (RTL) 谱库比对来鉴定化合物。在默认筛查参数下，每个样品的解卷积过程大概需要 4-5 min，谱库搜索用时不到 1 min。

解卷积时，只有当质量提取窗口为 ± 100 ppm 时才能鉴定出多个化合物，而使用 $+0.3/-0.7$ Da 参数却无法获得相同结果。因此，精确质量设置有助于发现更多真实的化合物（图 2）。使用精确质量信息、分子式生成器工具和 MassHunter 软件中的碎片分子式注释工具，对通过解卷积找到的每个化合物种类进行确认（图 3）。

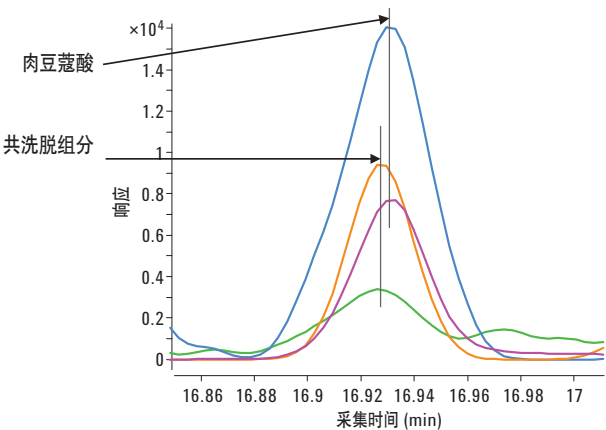


图 2. 仅当 RT 窗口大小因子解卷积参数选为 100 ppm 而非 $+0.3/-0.7$ Da 时，才能将肉豆蔻酸（蓝色和粉色峰）从共洗脱组分（黄色和绿色峰）中区分并加以鉴定

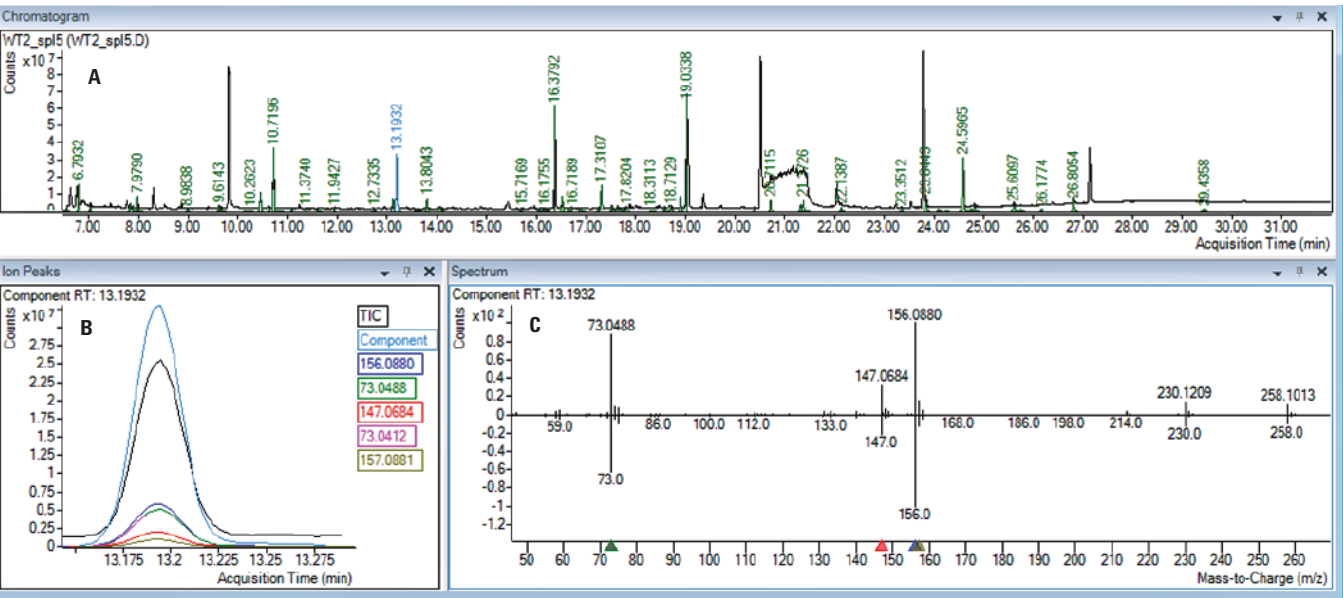


图 1. 使用未知物分析软件工具进行色谱图解卷积。A 为色谱图，B 为组分的叠加 EIC 图，C 为组分和谱库谱图的镜像图

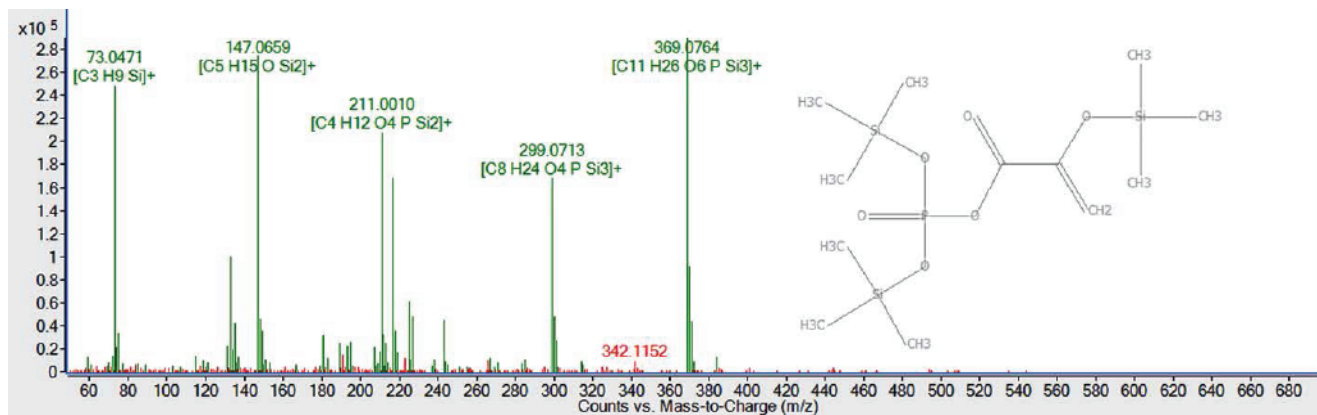


图 3. Agilent MassHunter 定性软件包中的分子式生成器工具与谱库搜索和碎片分子式注释配合使用，自动确定化合物的碎片，从而确认化合物鉴定结果。若碎片的分子式为谱库搜索鉴定的分子式的子集时，将此碎片注释并标记为绿色。使用 NIST11.L 谱库进行确认

鉴定代谢组学显著差异

采用 MPP 中的统计工具确定蓝藻野生型和突变体菌株之间产生的代谢产物的显著差异。首先，使用主成分分析 (PCA) 可视化数据

群。各个组的重复样品在 PCA 图中聚成了不同的簇，说明数据重现性良好，而且五个蓝藻菌株之间存在显著的代谢组差异（图 4）。

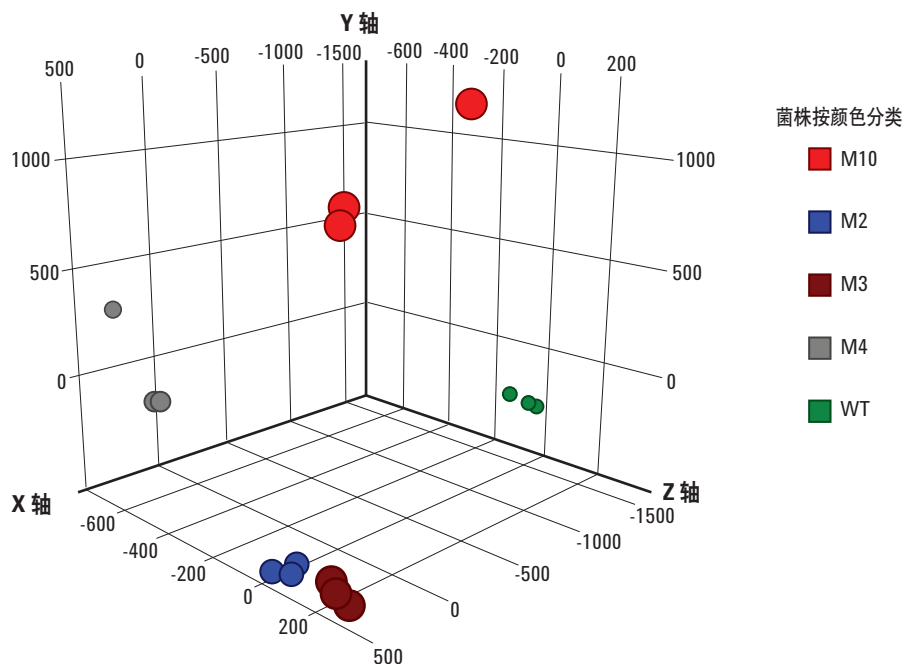


图 4. 野生型和突变体样品的 PCA 图确认存在由各个菌株之间的差异产生的不同簇

使用倍数变化分析 (FCA) 确定菌株之间代谢物水平的显著差异，参见 Volcano 图，此图为代谢物浓度的倍数变化与该变化的统计显著性关系曲线（图 5）。用红色标记一对对比菌株（条件）之间

具有浓度高水平倍数变化和低 p 值的化合物，从而轻松识别这类化合物。此图右边的化合物为野生型中丰度较高的，而此图左边的化合物为突变体中丰度较高的（与野生型相比较）（图 5）。

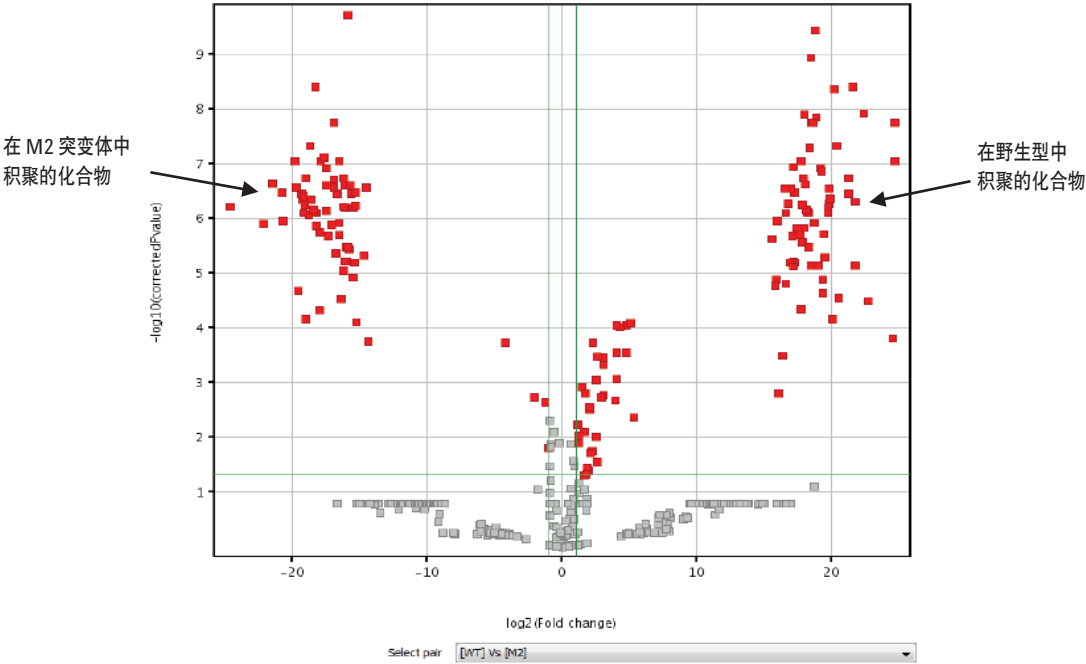


图 5. 野生型与 M2 突变体的代谢物水平的 Volcano 图，以 p 值的 $-\log_{10}$ 为纵坐标，倍数变化的 $\log_2$ 为横坐标。能满足 p 值分界点 0.05 以及倍数变化分界点 2 的数据点用红色标记

MassHunter 定量分析软件还可用于半定量比较突变体与野生型蓝藻菌株中代谢物的浓度。该软件可通过采集的数据和谱库搜索的信息，为所有代谢产物自动创建定量方法。软件经过优化，可以选择定量离子和定性离子的丰度和特异性。为定量离子选择 100 ppm 的窄质量提取窗口，能够充分利用精确质量信息并提高选择性，从而确保获得出色的定量结果（图 6）。

菌株之间在有机酸、氨基酸以及单磷酸糖类等代谢物丰度水平上存在着显著差异（图 7）。尽管各个菌株的主要代谢物葡萄糖的水平相似，但是野生型和突变体的其它代谢物的浓度水平具有显著差异，这其中包括那些对于 TCA（柠檬酸、苹果酸等等）和固碳循环（2-磷酸甘油酸，腺苷-6-磷酸）至关重要的代谢物。与野生型相比，所有突变体都会积聚腺苷而不积聚腺苷-5-单磷酸，这表明存在常见的代谢瓶颈（图 7）。

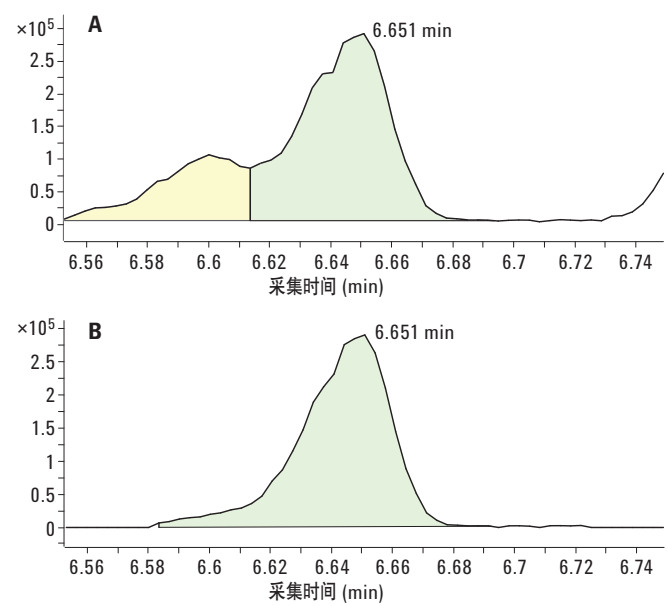


图 6. 丙酮酸定量离子在质量窗口为 + 0.3/- 0.7 Da (A) 以及 ± 100 ppm (B) 时的提取离子色谱图 (EIC)。采用选择性稍弱的 + 0.3/- 0.7 窗口设置会在定量分析中生成干扰，而采用窄的 100 ppm 质量窗口则能避免干扰从而提高定量准确性

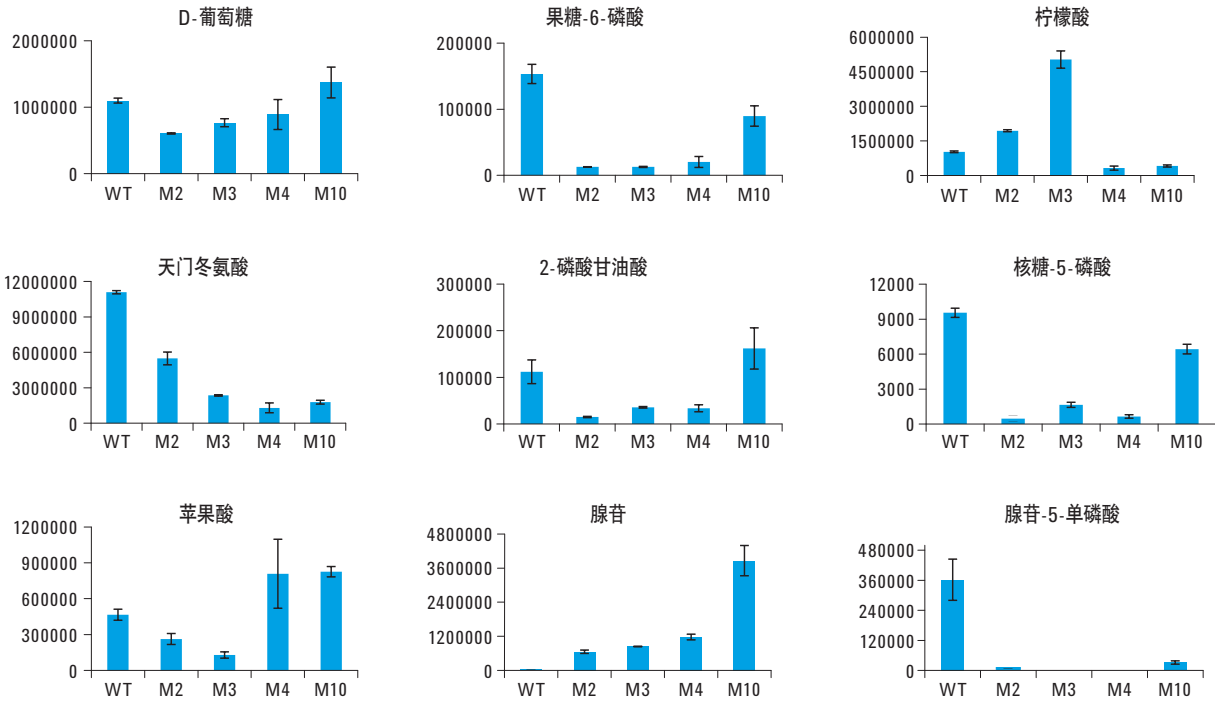


图 7. 野生型与突变体中所选代谢物水平的半定量对比

代谢组学差异途径分析

本文进一步详细研究了 *S. elongatus* 突变体，以了解特定代谢物途径变化导致特定代谢产物水平变化的作用机理。使用 Pathway Architect 进行途径分析，部分结果以 M2 为例说明（图 8）。结果表明，有益的基因型变化可能发生于多种关键代谢途径中，包括固碳和三羧酸 (TCA) 循环、糖酵解以及脂肪酸生物合成。

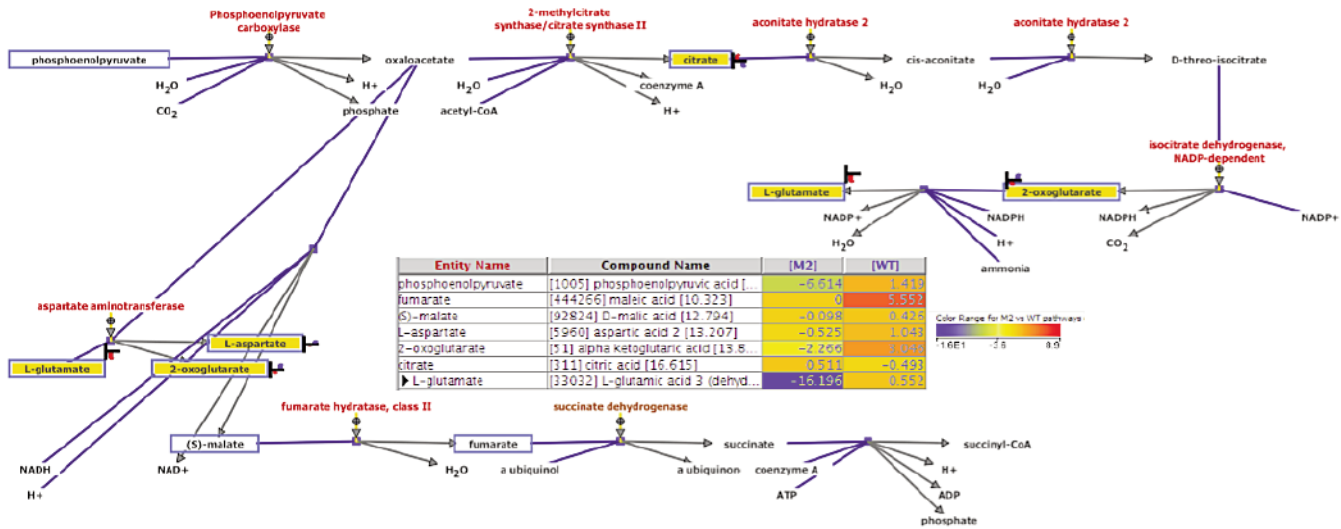


图 8. 以 M2 突变体途径分析为例的结果表明，与野生型菌株相比突变体的 TCA 循环发生了变化。途径图中高亮显示的代谢物参与了代谢途径并在实验中得到了鉴定。表格中的热点图显示了两个对比菌株间的代谢物相对水平

结论

使用非靶向代谢组学方法鉴定了突变体的代谢组学变化，这些突变体具有对于包括生物燃料生产在内的多种应用非常有用的改良特征。Agilent 7200 GC/Q-TOF 可提供精确质量数信息，对于特定代谢物的鉴定和定量至关重要。多种软件工具，包括 MassHunter 定量分析中的未知物分析、主成分分析、倍数变化分析以及 Mass Profiler Professional 中的 Pathway Architect 等，对于鉴定与突变体改良特征相关的特定代谢途径变化极为重要。

参考文献

1. D.N. Juurlink and I.A. Dhalla "Bioengineering of carbon fixation, biofuels, and biochemicals in cyanobacteria and plants" *J Biotechnol.* **162**, 134-147 (2012)
2. G.G. Tcherkez, G.D. Farquhar, T.J. Andrews "Despite slow catalysis and confused substrate specificity, all ribulose biphosphate carboxylases may be nearly perfectly optimized" *PNAS* **103**, 7246-7251 (2006)

更多信息

这些数据代表典型结果。有关我们的产品与服务的详细信息，请访问我们的网站：www.agilent.com/chem/cn

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2013
2013 年 12 月 5 日，中国印刷
5991-3476CHCN



Agilent Technologies