

应用SCIEX Echo® MS 系统快速高通量分析发酵液中新型抗菌肽——表面活性素

Rapid and High-throughput Analysis of Surfactin, A Series of Novel Antimicrobial Peptide, in Fermentation Broth by SCIEX Echo® MS System

侯朋艺, 司丹丹, 龙志敏, 郭立海

Pengyi Hou, Dandan Si, Zhimin Long, Lihai Guo

SCIEX 应用支持中心, 中国

Key Words: SCIEX Echo® MS System, High-throughput, Antimicrobial Peptide, Surfactin

引言

抗菌肽 (antimicrobial peptide, AMP) 是一大类对细菌、真菌、寄生虫和病毒等有害生命体 (或病原体) 具有抗性功能的活性寡肽, 因其普遍带有足量的正电荷并常伴随疏水性, 可在静电作用下与含有负电的生物膜结合, 穿透并破坏膜结构致细胞死亡, 近年来发现其在医药领域有重要应用前景。与传统抗生素的单一靶点杀菌原理不同, 抗菌肽可在病原体进行多靶点破坏, 能极大程度降低耐药菌的产生, 且具有广谱抗菌性, 是未来替代抗生素的最佳选择之一^[1]。目前, 越来越多的抗菌肽通过生物合成的方式获得, 具有操作简单、成本低、污染小等优势, 这已经成为获取抗菌肽的最主要途径之一^[2]。随着合成生物学的快速发展, 科研人员也正在尝试利用新型底盘细胞和多种合成生物学工具对抗菌肽的微生物合成表达进行改良。

表面活性素 (Surfactin) 是一种新型抗菌肽, 是芽孢杆菌产生的主要活性物质, 具有抗病毒、抗肿瘤、抗细菌、抗真菌、抗支原体、抗炎和溶血等作用, 展示出极大的临床应用潜力。与其他菌肽的生产类似, 表面活性素也是通过发酵生产。目前研究者从优良菌种选育、发酵过程优化、高效分离纯化方式的探索等来提高产率, 取得了一系列成果。表面活性素由 β -羟基脂肪酸与肽链以内酯键结合而成。多数细菌代谢产生的表面活性素的肽链为七元肽, 即分子中的肽链由7个 α -氨基酸组成, 再与带有12~17个碳原子的 β -羟

基脂肪酸构成一个大内酯环, 相对分子质量为1000左右^[3]。

本方法采用 SCIEX Echo® MS 系统对培养基细胞中表面活性素5类不同分子量的同系物进行了快速的分析, 其中 β -羟基脂肪酸的碳原子个数为12~16。样品用乙腈:水 (1:1) 稀释后, 直接进样分析。本方法前处理简单、样品用量少、分析时间短, 适合发酵液快速高通量筛选。

仪器设备

SCIEX Echo® MS 系统

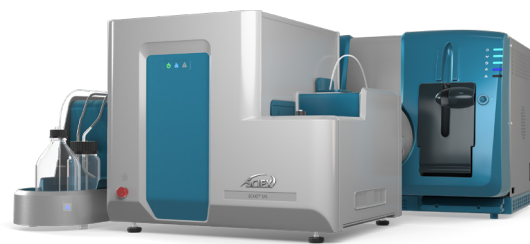


图1. SCIEX Echo® MS 系统

样品制备

表面活性素对照品采用二甲基亚砜 (DMSO) 溶解后, 用乙腈:水 (1:1) 稀释配制。发酵液样品用乙腈:水 (1:1) 稀释配制, 取60 μ l 加入384孔样品板中。

声波激发条件

声波激发样品液滴需要一种合适的载体溶剂 (Carrier Solvent), 将样品板中被激发出来的小液滴样品带入至开放端口接口 (Open Port Interface, OPI), 然后通过电极 (Electrode) 将带有样品的载体溶剂引入到电喷雾离子源中。本实验选取含 2 mM 氟化铵的甲醇溶液作为载体溶剂, 流速为 410 $\mu\text{l}/\text{min}$ 。进样体积为 25 nl。

质谱条件

电离模式: 电喷雾电离正离子模式 (ESI+)

扫描方式: 多反应监测 (MRM)

辅助加热气温度 (Temp): 300 $^{\circ}\text{C}$ 气帘气 (Curtain Gas): 20 psi

喷雾电压 (Ion Spray Voltage): 5 000 V 雾化气 (Gas 1): 90 psi

辅助加热气 (Gas 2): 50 psi

MRM 参数: 见表1

实验结果

5类表面活性素同系物在线性范围内线性关系良好, 相关系数 R 均大于 0.99, 定量下限 (LLOQ) 连续6次进样的 %CV 小于 13%。线性范围和重复性详细结果见表2。所有化合物均进行重现性考察, 结果表明, 5类化合物在标准曲线浓度范围内连续6次进样, 重现性良好。另外, 标准曲线不同浓度点峰面积成线性变化且重现性良好, 线性范围约为3个数量级。

表1. 表面活性素的质谱参数

分子式	Q1	Q3	DP	CE
$\text{C}_{50}\text{H}_{87}\text{N}_7\text{O}_{13}$	994.8	685.3	218	34
$\text{C}_{51}\text{H}_{89}\text{N}_7\text{O}_{13}$	1 008.7	685.3	230	39
$\text{C}_{52}\text{H}_{91}\text{N}_7\text{O}_{13}$	1 022.8	685.3	218	41
$\text{C}_{53}\text{H}_{93}\text{N}_7\text{O}_{13}$	1 036.8	685.3	218	42
$\text{C}_{54}\text{H}_{95}\text{N}_7\text{O}_{13}$	1 050.8	685.3	218	40

表2. 表面活性素标准曲线

分子式	标准曲线浓度范围	R	LLOQ CV (%)
$\text{C}_{50}\text{H}_{87}\text{N}_7\text{O}_{13}$	50 ng/ml ~ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.999	12.88
$\text{C}_{51}\text{H}_{89}\text{N}_7\text{O}_{13}$	10 ng/ml ~ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.996	9.95
$\text{C}_{52}\text{H}_{91}\text{N}_7\text{O}_{13}$	10 ng/ml ~ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.998	7.43
$\text{C}_{53}\text{H}_{93}\text{N}_7\text{O}_{13}$	20 ng/ml ~ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.995	10.38
$\text{C}_{54}\text{H}_{95}\text{N}_7\text{O}_{13}$	200 ng/ml ~ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.997	11.02

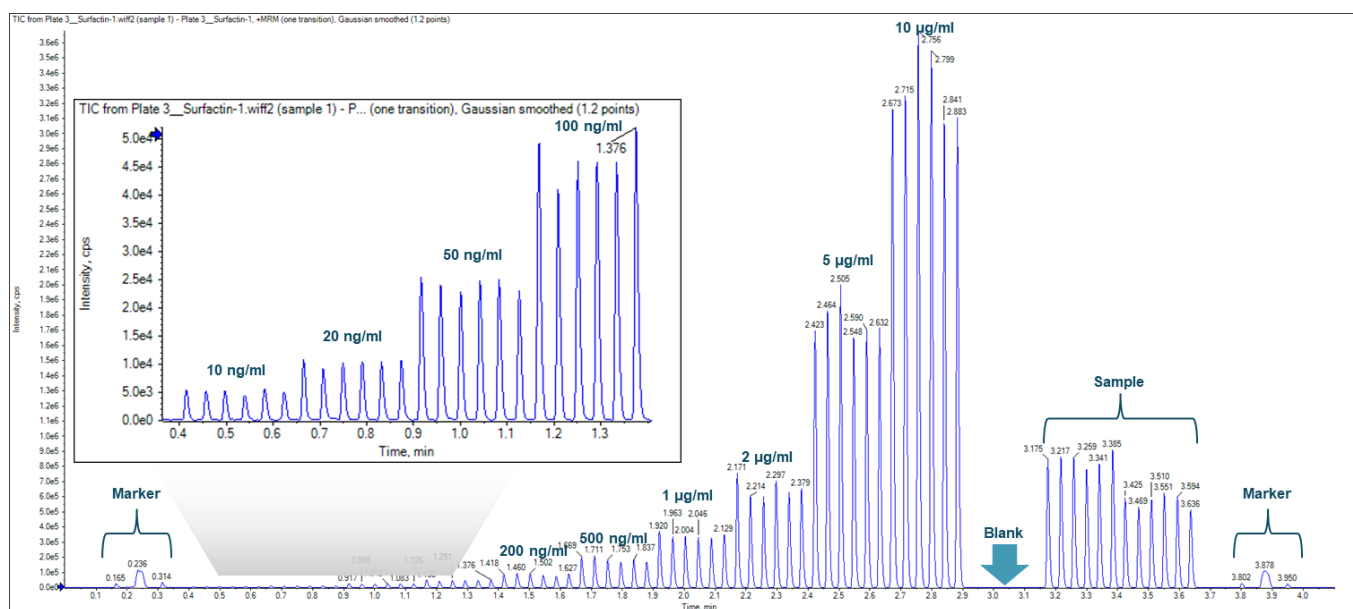


图2. $\text{C}_{52}\text{H}_{91}\text{N}_7\text{O}_{13}$ 对照品及样品原始谱图

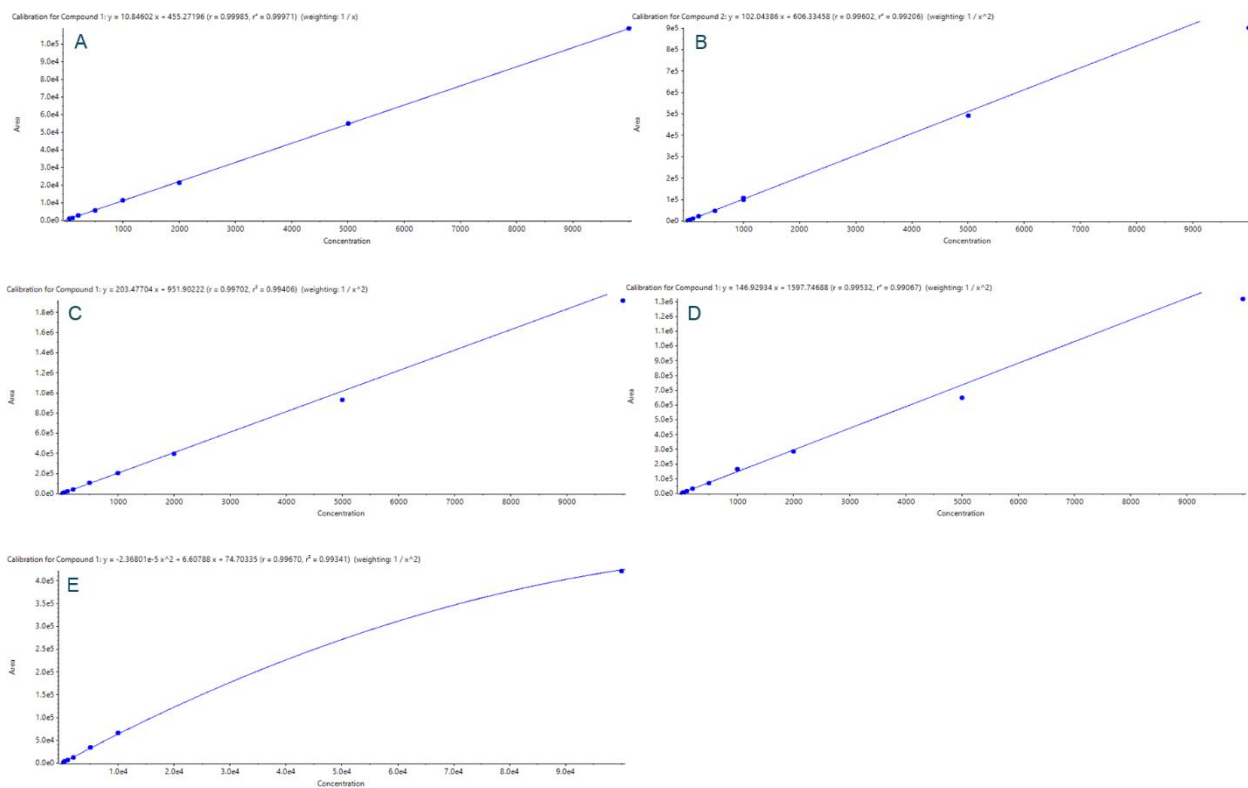


图3. 表面活性素标准曲线 (A. C₅₀H₈₇N₇O₁₃; B. C₅₁H₈₉N₇O₁₃; C. C₅₂H₉₁N₇O₁₃; D. C₅₃H₉₃N₇O₁₃; E. C₅₄H₉₅N₇O₁₃)

总结

本文使用 SCIEX Echo® MS 系统建立了发酵液样品中一类新型抗菌肽表面活性素5类同系物进行了快速高通量定量方法。结果表明, 各化合物线性关系良好, 约为3个数量级的线性范围, 且各浓度点的重现性良好。SCIEX Echo® MS 系统能够实现高通量样品采集需求, 产生高质量的数据结果, 确保只在最简单的样品前处理方法下对发酵液中的目标物进行快速准确定量。该方法定量准确、通量高且前处理简单, 可用于微生物发酵工程前期新型生物合成菌株或底盘细胞的筛选和优化。

参考文献

- [1] 魏岱旭, 龚海伦, 张旭维. 抗菌肽的生物合成及医学应用 [J]. 合成生物学, 2022, 3 (4): 709-727.
- [2] MIKUT R. Computer-based analysis, visualization, and interpretation of antimicrobial peptide activities [J]. Methods in Molecular Biology, 2010, 618: 287-299.
- [3] 金清, 肖明. 新型抗菌肽——表面活性素、伊枯草菌素和丰原素 [J]. 微生物与感染, 2018, 13 (1): 56-64.

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. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2023 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-15536-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: 021-2419-7201
传真: 021-2419-7333
官网: sciex.com.cn

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话: 020-8842-4017

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