

酵母细胞中乙酰辅酶A和乳酰辅酶A的定量分析检测

The Determination of Acetyl-CoA and Lactoyl-CoA in Yeast Cells Using LC-MS/MS

史晓媛, 龙志敏, 郭立海

Xiaoyuan Shi, Zhimin Long, Lihai Guo

SCIEX 应用支持中心, 中国

Key Words: Acetyl-CoA; Lactoyl-CoA; Cells

引言

辅酶 A (Coenzyme A, 简称 CoA) 是所有生物体中普遍存在且必不可少的一种辅助因子, 其主要作用是在许多代谢和分解过程中作为羰基活化基团和酰基活化的载体。研究表明辅酶A的活性基团硫醇基团 (-SH) 能够激活含羰基的分子, 在分解和合成代谢反应中, 与多种羧酸结合, 从而形成具有代谢活性硫酯衍生物, 如乙酰辅酶A, 乳酰辅酶A, 丙二酰辅酶A和3-羟基-3-甲基戊二酰 (HMG) 辅酶A。辅酶A及其硫酯衍生物广泛参与中枢代谢途径, 包括柠檬酸循环, 脂肪酸的生物合成与氧化, 氨基酸代谢, 异戊二烯和肽聚糖的生物合成等。除此之外, 这些衍生物还可以作为蛋白质衍生化的底物, 比如赖氨酸乙酰化, 琥珀酰化, 丙酰化, 丁酰化, 这个过程已成为转录调控, 细胞代谢的一种重要机制。本文建立了LC-MS/MS测定酵母细胞中乙酰辅酶A和乳酰辅酶A的方法, 灵敏度高, 重现性好。



图1. ExionLC™ AD系统和SCIEX Triple Quad™系统

仪器设备:

SCIEX ExionLC™ AD系统和SCIEX Triple Quad™系统

液相条件

液相系统: SCIEX ExionLC™ AD系统

色谱柱: BEH Shield RP18 (100 × 2.1 mm, 1.7 μm)

流动相: A: 水 (含10mM甲酸铵, 0.05%氨水); B: 乙腈

流速: 0.3 mL/min

柱温: 40 °C

液相梯度:

时间(min)	A(%)	B(%)
0	98	2
1.0	98	2
6.0	5	95
7.5	5	95
7.6	98	2
10.0	98	2

质谱条件

离子源: ESI, 正离子模式

扫描方式: MRM多反应监测

气帘气CUR: 40psi

喷雾电压IS: 5500V

源温度 Tem: 500°C 雾化气Gas1: 45psi
 辅助气GAS2: 45psi 碰撞气CAD: 10
 MRM参数: 如表1

表1. 乙酰辅酶A和乳酰辅酶A的质谱参数

化合物名称 (Name)	Q1	Q3	DP	CE
乙酰辅酶A 1 (Acetyl-CoA 1)	810.2	303.2	85	40
乙酰辅酶A 2 (Acetyl-CoA 2)	810.2	428.0	85	34
乳酰辅酶A 1 (Lactoyl-CoA 1)	840.3	333.3	85	42
乳酰辅酶A 2 (Lactoyl-CoA 2)	840.3	228.2	85	26

前处理方法

1. 配置甲醇: 异丙醇 (1:1) 溶液作为提取液;
2. 加入200 μ L上述提取液到样品, 充分涡旋20s (在-80°C冰箱口处操作, 结束后放置-80°C冰箱口);
3. 加入二氯甲烷500 μ L, 充分涡旋30s, 涡旋两次 (在-80°C冰箱口处操作, 结束后放置-80°C冰箱口);
4. 加入200 μ L H₂O, 涡旋30s, 将上述样品放置在4°C冰箱静置10min, (有分层, 上层为水相);
5. 离心 (4°C, 10min, 15000r/min), 取上清液150 μ L到进样瓶待检测。

实验结果

1. 特异性

水做为空白溶液, 分别称取一定量的乙酰辅酶A和乳酰辅酶A, 加入水溶解稀释, 并稀释至浓度为5 ng/mL的标准工作溶液。将空白溶液和工作溶液分别进样5 μ L, 提取离子流图见图2。空白溶液在待测物保留时间处无干扰。2种物质峰型良好, 且化合物灵敏度高。

2. 线性范围

用水逐级稀释乙酰辅酶A和乳酰辅酶A标准工作溶液至0.1 ng/mL, 0.5 ng/mL, 1 ng/mL, 5 ng/mL, 10ng/mL, 50ng/mL, 100 ng/mL以峰面积对浓度做标准曲线。图3为乙酰辅酶A和乳酰辅酶A的线性范围、线性方程和相关系数。

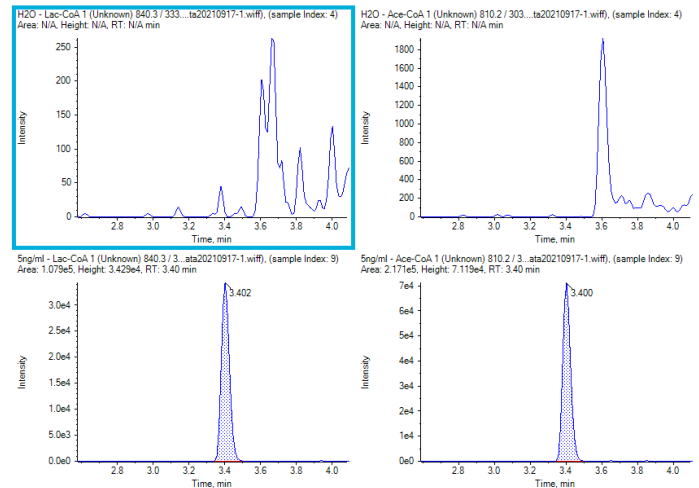


图2. 空白溶液和标准品溶液中乙酰辅酶A和乳酰辅酶A的提取离子流图

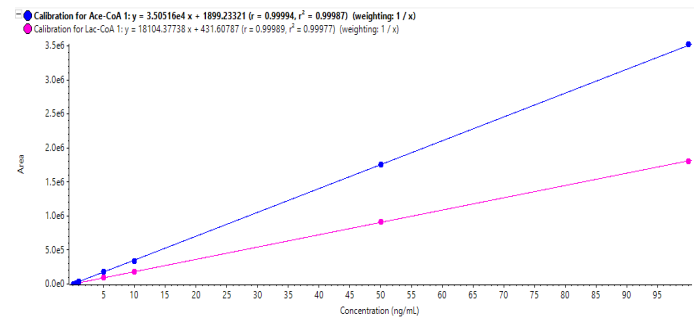


图3. 乙酰辅酶A和乳酰辅酶A标准曲线, 线性回归系数 $r > 0.999$

3. LLOQ的准确度和重现性

平行制备6份0.1ng/mL浓度的标准溶液做为LLOQ溶液, 进样分析。测定结果如表2。2个化合物在LLOQ浓度下的准确度在107.7-111.1%, 准确度良好, RSD%在3.65-4.61%, 重现性良好, 色谱图见图4、图5。

表2. 回收率测试结果

	最低定量限 LLOQ, ng/mL	准确度 Accuracy, %	相对标准偏差 RSD, %
乙酰辅酶A	0.1	107.7	3.65
乳酰辅酶A	0.1	111.1	4.61

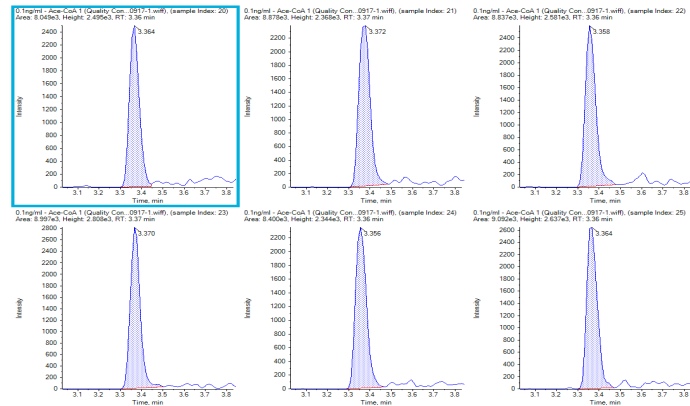


图4. 乙酰辅酶A在LLOQ浓度下重现性色谱图展示

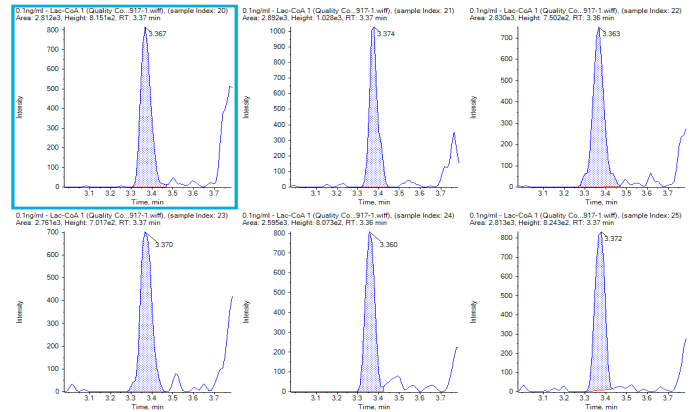


图5. 乳酰辅酶A在LLOQ浓度下重现性色谱图展示

总结

本文使用SCIEX Triple Quad™建立了LC-MS/MS方法快速测定细胞中乙酰辅酶A和乳酰辅酶A的含量。结果表明，该方法的特异性好，无干扰；线性范围为0.1ng/mL-100 ng/mL，在线性范围内线性关系良好，相关系数大于0.999。2种物质定量下限为0.1ng/mL，在定量下限连续进样6针，RSD<5%，表明仪器灵敏度高，重现性好，该方法为辅酶A衍生物质的测定提供了参考。

SCIEX临床诊断产品仅用于体外诊断。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. 或在和美国/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2021 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-14062-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)