

以三脱氢莽草酸为例的合成生物学液质检测方法

synthetic biology analysis based on LC-MS/MS Method using 3-Dehydroshikimic acid as an Example

查海红, 钟晨春, 龙志敏, 郭立海

SCIEX中国应用支持中心

Keywords: synthetic biology; Fermentation broth; 3-Dehydroshikimic acid; LC-MS/MS

引言

合成生物学是现代科学极富前景的学科之一, 是将生物科技领域基础研究转化为实际社会生产力的关键科学技术, 也是改变未来世界的主要技术之一。其借鉴了工程学的概念, 运用基因技术, 构建生物功能元件、装置和系统, 有目标的重新设计和合成新的生物体系或改造已有的生物体系, 使其拥有满足人类需求的生物功能。

合成生物学所涉及的流程包含基因组学、分子克隆、细胞培养和蛋白表达, 其中分子克隆的目的是将目的基因插入底盘细胞中进行表达, 在这个过程中需要进行底盘细胞菌株的筛选, 而特定代谢性状的菌株筛选是限速的关键步骤。快速、准确、同时定量多种代谢物对多角度菌株性能评估和菌株筛选至关重要, 通用的方法或平台可大幅减少方法开发时间, 加快筛选过程。除此之外, 不同培养参数, 也会使目标产物含量产生变化。通过对目标产物定量, 可优化菌株培养体系参数。

本文选用底物为葡萄糖, 目标产物为三脱氢莽草酸的菌株培养体系样品, 定量其目标产物的含量以及检测样品中其他成分。本文采用液质联用系统对样品进行检测, 结合已有的细胞上清液方法, 加入目标产物三脱氢莽草酸的检测信息, 同时检测超过150种成分, 可以实现快速, 准确的测定目标产物的含量, 以及样品中其他成分, 帮助菌株筛选以及培养体系的优化。

仪器设备

Exion LC™ AD 系统 + 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0.1% 甲酸)

B相: 乙腈 (含0.1% 甲酸)

进样体积: 1 μL

柱温: 40°C

流动相梯度:

Time (min)	Flow (ml/min)	A (%)	B (%)
0.00	0.3	98	2
3.00	0.3	98	2
10.00	0.3	25	75
10.50	0.6	0	100
16.50	0.6	0	100
17.00	0.3	98	2
20.00	0.3	98	2

质谱方法

离子源: ESI源, 正/负离子模式

离子源参数:

电喷雾电压 IS: ± 3000 V

气帘气 CUR: 40 psi

雾化气 GS1: 40 psi

辅助加热气 GS2: 70 psi

碰撞气 CAD: 9

源温度 TEM: 450°C

离子对信息:

三脱氢莽草酸标曲线性范围: 本次实验配制的标曲浓度范围为 1-1000 ng/ml (图2), 线性相关系数r大于0.999 (图3), 标曲各点准确度在96%-106%之间。

表1. 三脱氢莽草酸的质谱参数

Compound ID	Q1 mass	Q3 mass	EP	CE	CXP
3-Dehydroshikimic acid	171.1	109	-10	-24	-11

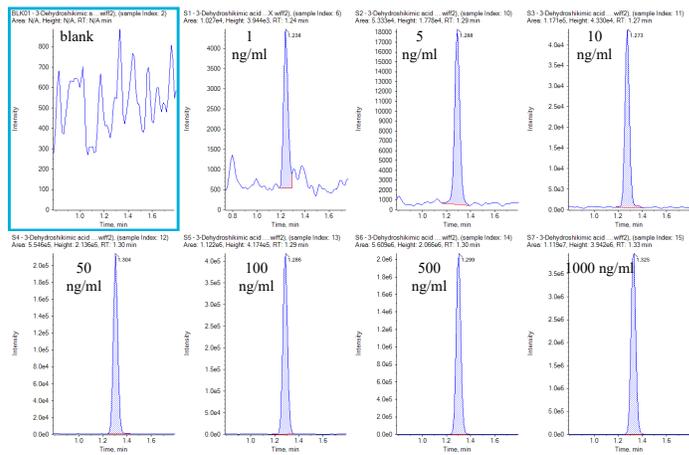


图2. 三脱氢莽草酸各浓度点的色谱图

实验结果

本次实验采用同时检测152个化合物的靶向方法, 共检测了不同培养条件下的32个菌株发酵液样品。在发酵液中共检测到包含三脱氢莽草酸在内的115个化合物成分 (图1), 并对目标产物三脱氢莽草酸进行了绝对定量, 以此来获得最优培养条件。

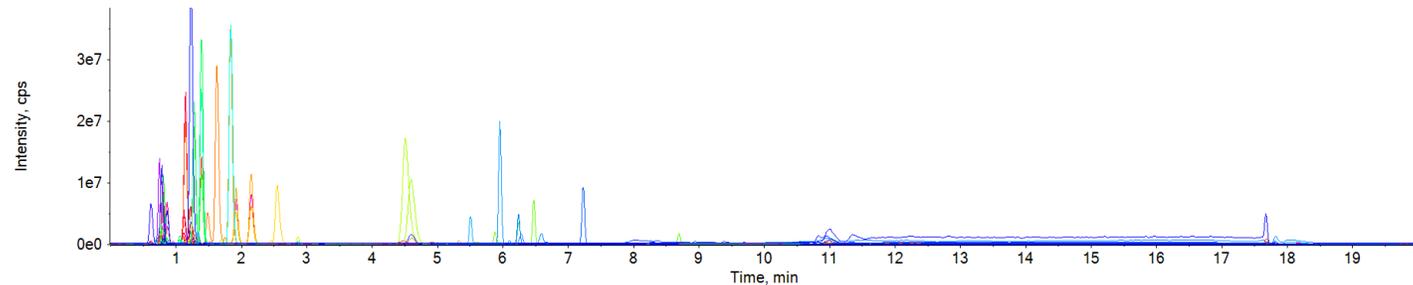


图1. 菌株发酵液中检测成分XIC叠加图

Calibration for 3-Dehydroshikimic acid 1: $y = 11240.91637x - 992.16653$ ($r = 0.99964$, $r^2 = 0.99928$) (weighting: $1/x^2$)

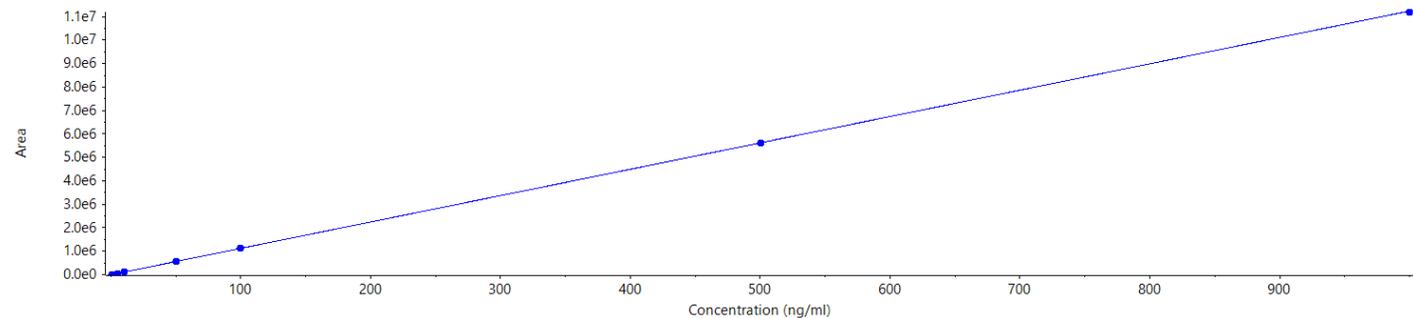


图3. 三脱氢莽草酸的标准曲线图

3. 样品检测及加标回收率：为了准确定量每个样品中的三脱氢莽草酸的含量，将样品用水稀释20000倍后，离心取上清进样检测，具体检测结果见表2。取稀释的发酵液样品配制成浓度为100 ng/ml的加标样品，样品的平均回收率为106.08%。

表2. 实际样品中三脱氢莽草酸的含量 (mg/ml)

mg/ml	1	2	3	4	5	6	7	8
C	1.513	1.211	1.686	1.749	1.823	1.846	0.609	0.184
D	1.607	1.347	1.519	1.461	1.691	1.562	0.539	0.370
E	1.635	1.511	1.551	1.558	1.679	1.793	0.197	0.389
F	1.565	1.460	1.639	1.654	1.888	1.867	0.216	0.424

总结

本文使用SCIEX Triple Quad™ 系统建立了同时检测菌株发酵液中包含目标产物三脱氢莽草酸在内的150多种成分的LC-MS/MS方法。结果表明，本方法可以准确定量目标产物的含量，实现培养体系的优化，同时还能辅助检测菌株中其他成分，帮助菌株筛选。

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。

© 2024 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-33058-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)