

## 利用SCIEX ZenoTOF™ 7600质谱建立玉米脂质成分的分析方法 Development of a method on research lipids in Zea mays L. by SCIEX ZenoTOF™ 7600

雷敏, 龙志敏

Lei Min, Long Zhimin

SCIEX, 中国

**Key Words :** Zea mays L., lipids, ZenoTOF™ 7600

### 引言

玉米（学名：Zea mays L.）是中国第一大粮食作物，在全国31个省市自治区都有种植，作为粮、经、饲兼用的作物，对整个国民经济发展有着巨大的影响。为提高产率，越来越多农学领域的科研者通过组学的流程来研究玉米如何育种和选种、以及生长发育过程应对生物胁迫和非生物胁迫的作用机制等。脂质合成代谢和分解代谢是能量稳定、膜结构、细胞、转录和翻译调节等的关键过程。植物应对生物胁迫的反应，可被脂质记录并迅速反馈出来。因此，植物脂质作为作物中重要的一大类成分，建立分析方法用于分析其中的脂质成分是开展以上研究的重要一步。

本方案使用非靶向脂质组学的流程尽可能全面鉴定出两种不同品种玉米（1号：普通黄金玉米；2号：甜玉米）中的脂质成分，然后进行统计分析，筛选两种品种间的差异脂质，以挖掘不同品种玉米中的差异脂质，可应用于研究优选育种及作物生长规律和机制。

### 本文实验方法特点

本文展示了使用SCIEX ZenoTOF™ 7600质谱系统鉴定出玉米中的脂质成分，并统计找出两种品种之间的差异脂质成分。该方案具有以下特点：

1. 本实验采用SCIEX ZenoTOF™ 7600质谱进行数据采集，该仪器具有扫描速度快（高达133HZ），以及Zeno阱富集二级离子，提高占空比，最终极大提高二级信号灵敏度的特点。结合IDA(数据依赖性采集)和DBS功能(动态背景扣除)的采集方式，可在一针进样过程中，尽可能全面的采集高质量的二级谱图，以实现更全面鉴定脂质成分的目的。

2. 该方法鉴定结果，以一级质荷比偏差，同位素比例偏差和二级碎片匹配度三个维度进行定性确认。总共鉴定出468个脂质成分，正、负模式下分别鉴定到270和198个不重复的脂质成分。
3. 该方法采集效率高，仅17min的方法即可完成一针样品的检测，实现高通量检测。鉴定到的468个脂质成分中，包括ASG, Cer, FA, FAHFA, HerCer, PC, PI, PG, PS, MG, DG, TG, MGDG, DGDG, SQDG, SE, SPB, PMeOH, PEtOH等类植物脂质，鉴定种类覆盖度高。
4. 采用QC样本对方法进行稳定性考察，3个QC样本中的468个脂质进行RSD统计。统计结果，95%脂质成分RSD在20%之内，满足代谢组学QC样本重复性要求，表明仪器和方法的重现性好。
5. 该方法通过非靶向脂质组学方法，尽可能全面的获得两种玉米中的脂质成分信息，为农学领域的科研客户开展非靶向脂质组学和高覆盖靶向代谢组学研究均可以提供脂质成分信息和参考，便于快速筛选差异物。

### 仪器设备

SCIEX Exion LC™系统 + ZenoTOF™ 7600 系统



## 液相方法

色谱柱: BEH C18 (100×2.1 mm, 1.7 μm)  
 流动相: A相: 甲醇:乙腈:水=1:1:3 (含5 mmol/L 醋酸铵)  
 B相: 异丙醇 (含5 mmol/L 醋酸铵)  
 流速: 0.3 ml/min  
 柱温: 40°C;  
 进样量: 1 μL

Time(min)	A (%)	B (%)
0.00	80	20
2.00	60	40
6.00	40	60
11.0	2	98
13.0	2	98
13.1	80	20
17.0	80	20

离子源: 电喷雾离子源ESI源, 正、负离子模式

采集方式: TOF MS (飞行时间质谱一级扫描) -30 MS/MS (飞行时间质谱二级扫描)

飞行时间质谱一级扫描TOF MS: 质荷比范围(Da)200-1250

飞行时间质谱二级扫描TOF MS/MS: 质荷比范围(Da)100-1250

自动校正系统(CDS)开启

动态背景扣除(DBS)开启

Zeno 阈值: 200000 cps

离子源参数:

电喷雾电压: 5500V(正离子); -4500 V(负离子)

气帘气 CUR: 35 psi 雾化气 GAS1: 55 psi

雾化气 GAS2: 55 psi 源温度 TEM: 450 °C

去簇电压 DP: -80 V

碰撞能量 CE ± CES: 40 ± 20 V(正离子); -40 ± 20 V(负离子)

## 供试品溶液制备

取两种不同品种的玉米冻干粉末约0.5 g, 每个品种平行称量3份, 分别加入3 ml异丙醇, 涡旋1 min, 超声20 min, 4000 rpm离心15 min后, 取上清液, 分别直接进样分析。

QC制备(质控样本):

两个品种的总共六份样品, 分别取100 μl混合成一个QC样本。

## 实验结果

- QC样品溶液: 分别从所有样品中取100 μl溶液混合, 作为QC样本, 考察仪器的稳定性。正、负离子总离子流图分别见图1和图2。

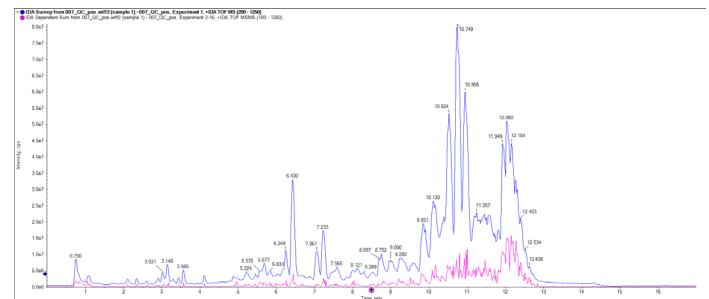


图1. QC样本正离子总离子流图

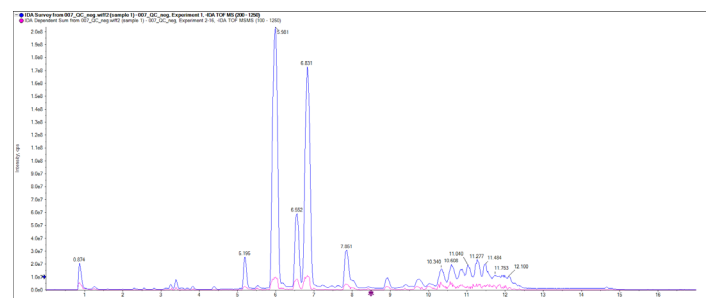


图2. QC样本负离子总离子流图

- QC样本重现性评估:

QC样本穿插在进样序列中, 每三针样品中穿插一针QC样品, 最后使用QC样品来评估序列进样中仪器的稳定性和重复性。

以3个QC样本重叠图考察保留时间和总离子流信号强度的重现

性。3针QC样品的重叠图，正、负离子模式分别见图3和图4。从重叠图中可以看出，化合物保留时间波动在0.1min以内，总离子流图的响应强度重叠好，满足代谢组学对于QC的要求。

从以上考察结果来看，仪器在序列运行过程中，状态稳定，样品结果可用于脂质组学分析。

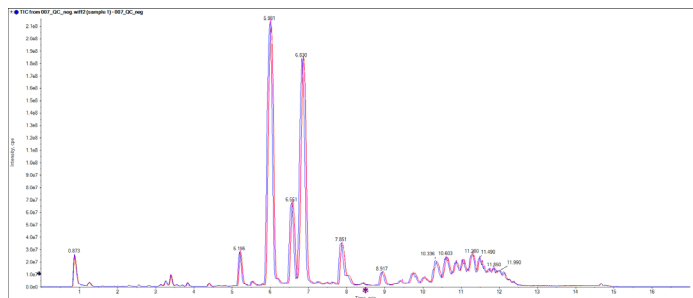


图3. 3针QC样品正离子总离子流重叠图

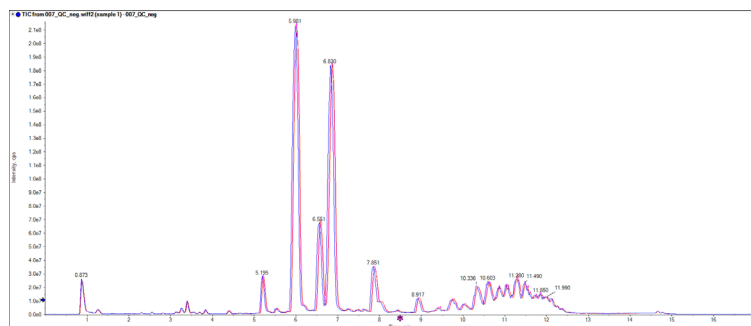


图4. 3针QC样品负离子总离子流重叠图

### 3. 脂质成分鉴定列表（部分）：

#### 3.1 脂质成分鉴定列表

本实验中，使用MS-DIAL 软件（版本号4.9, <http://prime.psc.riken.jp/compms/msdial/main.html>）和SCIEX OS软件（版本号3.0）对QC样本进行脂质成分鉴定。通过一级质荷比偏差，同位素比例偏差和二级碎片匹配度三个维度进行定性确认。总共鉴定出468个脂质成分，正、负模式下分别鉴定到270和198个不重复的脂质成分，包括ASG, Cer, FA, FAHFA, HerCer, PC, PI, PG, PS, MG, DG, TG, MGDG, DGDG, SQDG, SE, SPB, PMeOH, PEtOH 等类植物脂质。详细鉴定结果列表如下：

表1. 正离子鉴定列表（部分）

Component Name	Formula	Adduct / Charge	Area	Retention Time(min)	Precursor Mass	Mass Error (ppm)
DG 32:0 DG 16:0_16:0	C <sub>35</sub> H <sub>68</sub> O <sub>5</sub>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	2.97E+06	10.92	586.5405	-1.2
DG 32:1 DG 16:0_16:1	C <sub>35</sub> H <sub>66</sub> O <sub>5</sub>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	3.12E+05	10.66	584.5249	-2.0
DG 32:2 DG 14:0_18:2	C <sub>35</sub> H <sub>64</sub> O <sub>5</sub>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	2.45E+05	10.41	582.5092	-0.6
DG 34:0 DG 16:0_18:0	C <sub>37</sub> H <sub>72</sub> O <sub>5</sub>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	1.26E+06	11.2	614.5718	-2.6
DG 34:1 DG 16:0_18:1	C <sub>37</sub> H <sub>70</sub> O <sub>5</sub>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	2.84E+07	10.95	612.5562	-1.3
DG 34:2 DG 16:0_18:2	C <sub>37</sub> H <sub>68</sub> O <sub>5</sub>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	5.22E+07	10.74	610.5405	-0.9
DG 34:3 DG 16:1_18:2	C <sub>37</sub> H <sub>66</sub> O <sub>5</sub>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	3.11E+06	10.51	608.5249	0
DG 34:4 DG 16:2_18:2	C <sub>37</sub> H <sub>64</sub> O <sub>5</sub>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	1.15E+05	10.22	606.5092	-2
DGDG 32:0 DGDG 16:0_16:0	C <sub>47</sub> H <sub>88</sub> O <sub>15</sub>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	2.95E+06	10.33	910.6461	-1.3
DGDG 32:1 DGDG 16:0_16:1	C <sub>47</sub> H <sub>86</sub> O <sub>15</sub>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	8.23E+04	9.98	908.6305	0.8
DGDG 34:0 DGDG 16:0_18:0	C <sub>49</sub> H <sub>92</sub> O <sub>15</sub>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	8.42E+05	10.66	938.6774	-0.8
DGDG 34:1 DGDG 16:0_18:1	C <sub>49</sub> H <sub>90</sub> O <sub>15</sub>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	6.22E+06	10.36	936.6618	-1.2
DGDG 34:2 DGDG 16:0_18:2	C <sub>49</sub> H <sub>88</sub> O <sub>15</sub>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	1.01E+07	10.09	934.6461	-1.2
DGDG 34:3 DGDG 16:0_18:3	C <sub>49</sub> H <sub>86</sub> O <sub>15</sub>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	6.77E+05	9.83	932.6305	-1

表1. 正离子鉴定列表 (部分) (续)

Component Name	Formula	Adduct / Charge	Area	Retention Time(min)	Precursor Mass	Mass Error (ppm)
DGDG 36:1 DGDG 18:0_18:1	C <sub>51</sub> H <sub>94</sub> O <sub>15</sub>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	5.37E+05	10.68	964.6931	-1.8
DGDG 36:2 DGDG 18:1_18:1	C <sub>51</sub> H <sub>92</sub> O <sub>15</sub>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	4.45E+06	10.41	962.6774	-1.1
DGDG 36:3 DGDG 18:1_18:2	C <sub>51</sub> H <sub>90</sub> O <sub>15</sub>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	7.61E+06	10.13	960.6618	-1.3
LPC 16:0	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	[M+H] <sup>+</sup>	2.51E+06	5.79	496.3398	-0.9
LPC 18:0	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>7</sub> P	[M+H] <sup>+</sup>	2.26E+05	6.98	524.3711	-0.7
LPC 18:1	C <sub>26</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>7</sub> P	[M+H] <sup>+</sup>	2.35E+06	6	522.3554	-0.3
LPC 18:2	C <sub>26</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	[M+H] <sup>+</sup>	4.30E+06	5.19	520.3398	0.2
LPC 18:3	C <sub>26</sub> H <sub>48</sub> NO <sub>7</sub> P	[M+H] <sup>+</sup>	4.01E+04	4.51	518.3241	-0.3
LPE 16:0	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub> NO <sub>7</sub> P	[M+H] <sup>+</sup>	3.96E+05	5.93	454.2928	-0.6

表2 负离子鉴定列表 (部分)

Component Name	Formula	Adduct / Charge	Area	Retention Time(min)	Precursor Mass	Mass Error (ppm)
FA 18:0	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	1.75E+08	7.83	283.264	-0.6
FA 18:1	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	1.14E+09	6.8	281.249	0.5
12-HETE	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	1.04E+04	2.08	319.228	-1.4
9,10-Dihydroxy-12Z-octadecenoic acid	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	3.12E+06	2.5	313.238	0.7
12,13-Dihydroxy-9Z-octadecenoic acid 1	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	3.21E+05	2.07	313.238	-0.3
12,13-Dihydroxy-9Z-octadecenoic acid 2	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	3.11E+06	2.25	313.238	0.8
FAHFA 24:0;O FAHFA 16:0/8:0;O	C <sub>24</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	3.37E+04	8.08	397.332	-1.2
FAHFA 25:0;O FAHFA 16:0/9:0;O	C <sub>25</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	7.91E+04	8.46	411.348	-2.2
FAHFA 27:1;O FAHFA 18:1/9:0;O	C <sub>27</sub> H <sub>50</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	2.02E+05	8.55	437.364	-2.5
FAHFA 32:0;O FAHFA 16:0/16:0;O	C <sub>32</sub> H <sub>62</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	3.85E+04	10.27	509.458	-0.1
FAHFA 34:2;O FAHFA 16:0/18:2;O	C <sub>34</sub> H <sub>62</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	3.33E+04	10.18	533.458	-3
PEtOH 36:2 PEtOH 18:1_18:1	C <sub>41</sub> H <sub>77</sub> O <sub>8</sub> P	[M-H] <sup>-</sup>	1.90E+05	10.59	727.528	-0.5
PEtOH 36:4 PEtOH 18:2_18:2	C <sub>41</sub> H <sub>73</sub> O <sub>8</sub> P	[M-H] <sup>-</sup>	5.53E+05	10.01	723.497	-2.1
PG 34:2 PG 16:0_18:2	C <sub>40</sub> H <sub>75</sub> O <sub>10</sub> P	[M-H] <sup>-</sup>	5.81E+05	10.03	745.503	-3.1
PG 36:2 PG 18:1_18:1	C <sub>42</sub> H <sub>79</sub> O <sub>10</sub> P	[M-H] <sup>-</sup>	7.69E+04	10.12	773.534	-1.7
PG 36:4 PG 18:2_18:2	C <sub>42</sub> H <sub>75</sub> O <sub>10</sub> P	[M-H] <sup>-</sup>	1.29E+05	9.77	769.503	-2.0
PI 34:2 PI 16:0_18:2	C <sub>43</sub> H <sub>79</sub> O <sub>13</sub> P	[M-H] <sup>-</sup>	5.18E+05	9.97	833.519	-0.4
PE 36:3 PE 18:1_18:2	C <sub>41</sub> H <sub>76</sub> NO <sub>8</sub> P	[M-H] <sup>-</sup>	1.47E+06	10.71	740.524	0.6
PE 38:4 PE 18:2_20:2	C <sub>43</sub> H <sub>78</sub> NO <sub>8</sub> P	[M-H] <sup>-</sup>	1.93E+05	10.31	766.539	0.6
HexCer 34:2;2O HexCer 18:2;2O/16:0	C <sub>40</sub> H <sub>75</sub> NO <sub>8</sub>	[M+AcO-H] <sup>-</sup>	5.23E+04	10.3	756.563	-0.1
LPG 18:2 1	C <sub>24</sub> H <sub>45</sub> O <sub>9</sub> P	[M-H] <sup>-</sup>	1.23E+05	4.8	507.273	-1.3
LPG 18:2 2	C <sub>24</sub> H <sub>45</sub> O <sub>9</sub> P	[M-H] <sup>-</sup>	2.94E+05	5.01	507.273	-1

### 3.2 脂质成分结构解析过程

1. 以DGDG 34:2|DGDG16:0;18:2二级谱图为例，进行碎片归属，确认结构式。推测碎片归属如图5。

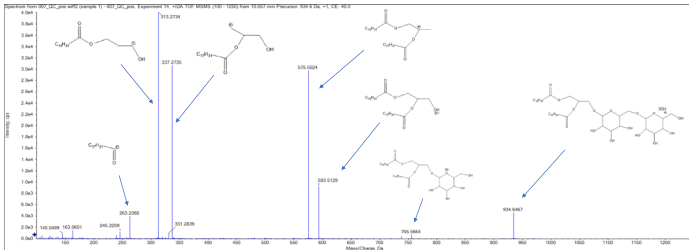


图5. DGDG 34:2|DGDG16:0;18:2碎片解析

2. 以FAHFA 34:1;O|FAHFA16:0;18:1;O二级谱图为例，进行碎片归属，确认结构式。推测碎片归属如图6。

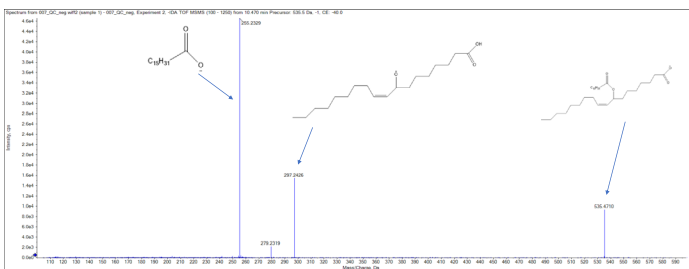


图6. FAHFA 34:1;O|FAHFA16:0;18:1;O碎片解析

### 4. 统计结果:

2种不同品种的玉米，每组3个样本，每个样本进样1针，最后寻找两个品种的差异代谢物。本文中的数据使用MetaboAnalyst (版本号5.0, <https://www.metaboanalyst.ca>) 对468个脂质成分进行统计，筛选差异脂质成分。

#### 4.1 PCA统计图

对2组样本进行PLS-DA统计，PLS-DA得分图见图7。从PLS-DA得分图可以看出2组样本有明显的区分，表明样本之间有明显的差异。

#### 4.2 火山图

以Fold Change>2 或<0.5, 及p<0.05为筛选条件绘制火山图，

见图8。从火山图中可以看到大量脂质成分在两组样本之间存在差异。

#### 4.3 差异脂质统计

以p值<0.05, Fold change>2或<0.5, 及VIP>1筛选两组间的差异物。两组间的差异脂质成分总共是298个，部分差异脂质成分信息见表3。差异脂质类别以甘油磷脂，甘油酯，甘油糖脂，脂肪酸等为主，表明不同品种玉米中的脂质成分差异很大。

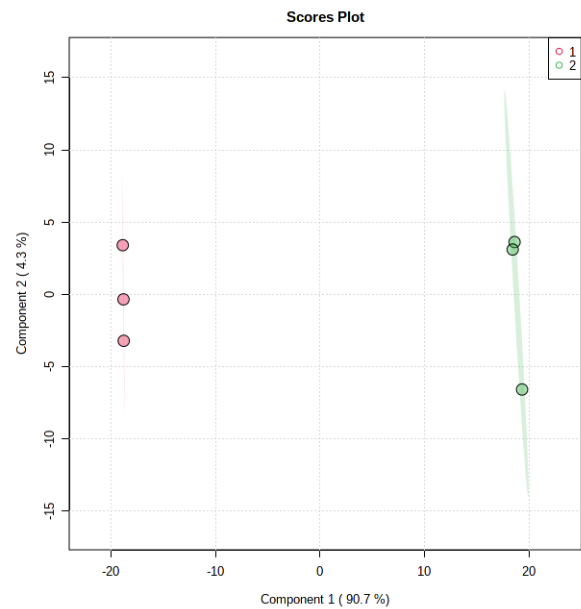


图7. PCA-DA得分图

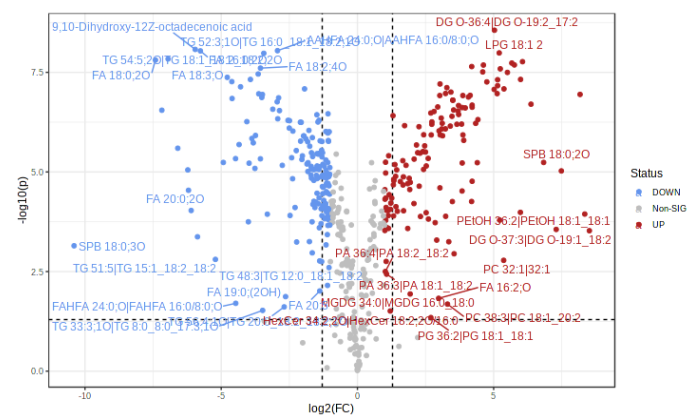


图8. 火山图 (FC>2 或<0.5, p<0.05)

表3. 1组和2组之间的差异物列表 (部分)

Compound name	p	Fold change	VIP
DG O-36:4 DG O-19:2_17:2	2.77E-09	32.663	1.0499
9,10-Dihydroxy-12Z-octadecenoic acid	8.40E-09	0.016126	1.0498
AAHFA 24:0;O AAHFA 16:0/8:0;O	9.02E-09	0.13081	1.0498
FA 16:0;2O	9.15E-09	0.0184	1.0498
LPG 18:1 2	1.03E-08	36.867	1.0498
TG 52:3;1O TG 16:0_18:1_18:2;1O	1.05E-08	0.092329	1.0498
TG 54:5;2O TG 18:1_18:2_18:2;2O	1.45E-08	0.0080975	1.0498
FA 18:0;2O	1.55E-08	0.0058647	1.0498
LPC 18:1 1	1.71E-08	66.683	1.0498
PC 34:1 PC 16:0_18:1	1.85E-08	50.796	1.0498
LPC 18:2 2	2.06E-08	54.244	1.0498
LPC 16:0	2.07E-08	24.655	1.0498
PG 32:0 PG 16:0_16:0	2.26E-08	18.307	1.0498
FA 18:2;4O	2.47E-08	0.084841	1.0498
PC 34:2 PC 16:0_18:2	2.58E-08	37.883	1.0498
DG O-34:2 DG O-17:0_17:2	3.08E-08	24.235	1.0498
PC 36:2 PC 18:1_18:1	3.17E-08	45.423	1.0498
TG 54:6;1O TG 18:2_18:2_18:2;1O	3.48E-08	0.08009	1.0497
FA 18:3;O	4.22E-08	0.036456	1.0497

## 总结

本文展示了使用SCIEX ZenoTOF™ 7600系统建立了鉴定玉米中脂质成分的方法，同时该方案中鉴定到的脂质成分的一级母离子和二级碎片离子可建立MRM离子对应用于玉米高覆盖靶向脂质组学研究。该方案体现出SCIEX ZenoTOF™ 7600系统扫描速度快，二级灵敏度高的特点，并结合IDA结合DBS功能采集方式，一针进样，尽可能全面的采集高质量的二级谱图用于脂质成分鉴定。该方案通过一级质荷比偏差，同位素比例偏差和二级碎片匹配度总共鉴定出468个脂质成分，包括ASG, Cer, FA, FAHFA, HerCer, PC, PI, PG, PS, MG, DG, TG, MGDG, DGDG, SQDG, SE, SPB, PMeOH, PEtOH等类植物脂质，脂质种类覆盖度高。其中，大部分脂质成分在两个品种玉米中均表现出差异。该方法通过非靶向脂质组学方法，尽可能全面的获得两种玉米中的脂质成分信息，为农学领域的科研客户开展非靶向脂质组学和高覆盖靶向代谢组学研究均可以提供脂质成分信息和参考，便于快速筛选差异物。

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。

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-15351-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](http://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)