利用SCIEX ZenoTOF™ 7600质谱建立玉米中小分子代谢物的分析方法

Development of a method on research metabolites in Zea mays L. by SCIEX ZenoTOF™ 7600

雷敏，龙志敏，郭立海

Lei Min, Long Zhimin, Guo Lihai

SCIEX，中国

Keywords: Zea mays L., metabolites, ZenoTOF™ 7600

引言

玉米（Zea Mays L.）是中国重要的粮食作物、饲料作物和经济作物，在中国农业生产中起着重要的作用。为了更好的研究不同品种玉米在不同区域生长过程中，应对生物胁迫和非生物胁迫，以及生长机制和规律等，因此越来越多农学领域的科研者通过多种组学的研究手段更深入的探究这些机制。玉米中含有大量的小分子代谢物，包括初生代谢物和次生代谢物。初生代谢物的作用主要是维持植物生命活动和生长发育，次生代谢物则更多参与植物抗病、抗逆等应答。因此，尽可能全面的了解和鉴定出玉米中的小分子代谢物，是开展植物代谢组学研究工作中的重要环节。

本方案使用非靶向代谢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）中的代谢物，然后进行统计分析，筛选两种品种间的差异代谢物，以挖掘两个玉米品种间的差异代谢物，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系统鉴定出玉米中的代谢物，并统计找出两种品种之间的差异代谢物。该方案具有以下特点：

1. 本实验采用SCIEX ZenoTOF™ 7600系统进行数据采集，该仪器具有扫描速度快（高达133 HZ），以及ZenoTrap 富集二级离子，提高占空比，最终极大提高二级灵敏度的特点。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，以实现更全面鉴定小分子代谢物的目的。
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330个小分子代谢物，正、负模式下分别鉴定到183和147个不重复代谢物。
3. 该方法采集效率高，仅30 min的方法即可完成一针样品的检测，实现高通量检测。总共鉴定的330个小分子代谢物，正、负模式下分别鉴定到183和147个不重复成分，包括初生代谢物和次生代谢物，如氨基酸、核苷、糖类、酚酸类及大量糖苷类等，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330个脂质进行RSD统计。统计结果，97 %代谢物成分RSD在20 %之内，远满足代谢组学QC样本重复性要求，表明仪器和方法的重现性好。
5. 该方法通过非靶向代谢组学方法，尽可能全面的获得两种玉米中的代谢物，为农学领域的科研客户开展非靶向代谢组学和高覆盖靶向代谢组学研究均可以提供代谢物信息和参考，便于快速筛选差异代谢物。

仪器设备

SCIEX Exion LC™系统 + ZenoTOF™ 7600 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2 mmol/L 醋酸铵+0.1 %甲酸）

B相：乙腈

流速：0.3 ml/min

柱温：40 ℃

Time(min)	A (%)	B (%)
0.00	98	2
2.00	98	2
14.0	60	40
22.0	2	98
26.0	2	98
26.1	98	2
30.0	98	2

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) 100-1500

飞行时间质谱二级扫描TOF MS/MS: 质荷比范围(Da) 50-1250

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: 5500 V(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：500 ℃

去簇电压 DP：80 V (正离子) / -80 V (负离子)

碰撞能量 CE ± CES：35 ± 15 V(正离子) / -35 ± 15 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1 g，每个品种平行称量3份，分别加入5 ml 80 %甲醇，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)

两种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

1. 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。

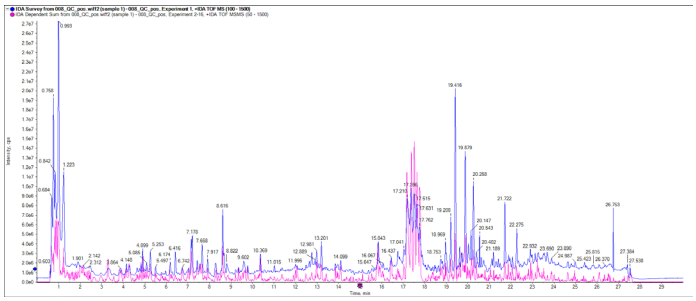

图1. QC样本正离子总离子流图

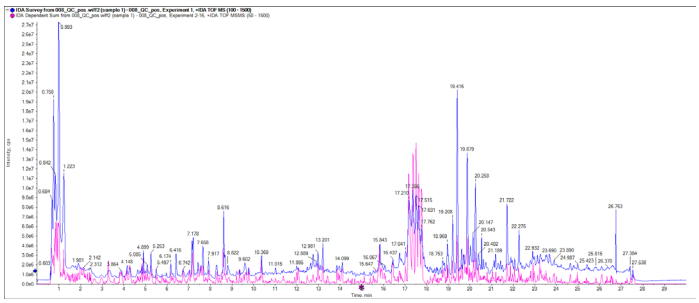

图2. QC样本负离子总离子流图

2. 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，样品结果可用于代谢组学分析。

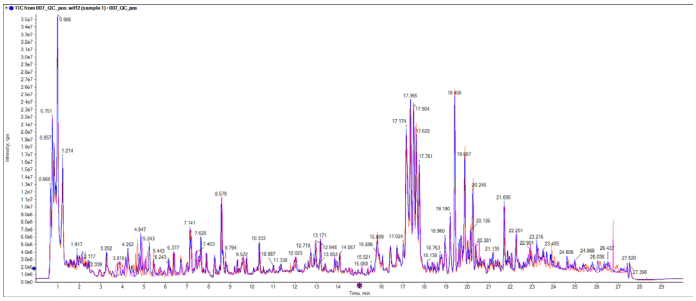

图3. 3针QC样品正离子总离子流重叠图

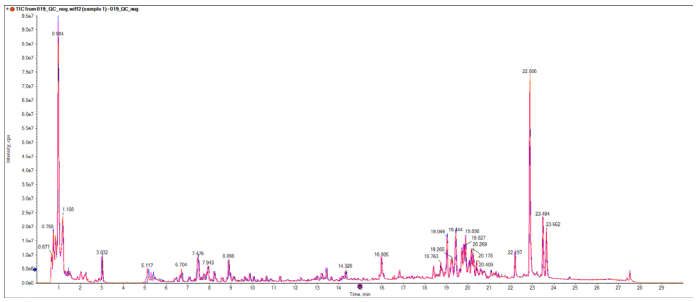

图4. 3针QC样品负离子总离子流重叠图

3. 代谢物鉴定信息（部分）：

3.1 代谢物成分鉴定列表

本实验中，使用SCIEX OS软件（版本号3.0）结合SCIEX天然产物数据库，对QC样本进行小分子代谢物鉴定。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330个小分子代谢物，正、负模式下分别鉴定到183和147个不重复成分，包括初生代谢物和次生代谢物，如氨基酸、核苷、糖类、酚酸类及大量糖苷类等。详细鉴定结果列表如表1：

3.2 代谢物结构解析过程

1. 以阿魏酰基-1,4-丁二胺二级谱图为例，进行碎片归属，确认结构式。推测碎片归属如图5。

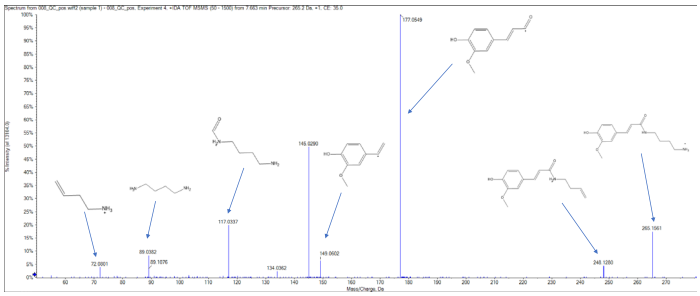

图5. 阿魏酰基-1,4-丁二胺碎片解析

2. 以3-Indoleacetic acid-o-葡萄糖苷的二级谱图为例，进行碎片归属，确认结构式。推测碎片归属如图6。

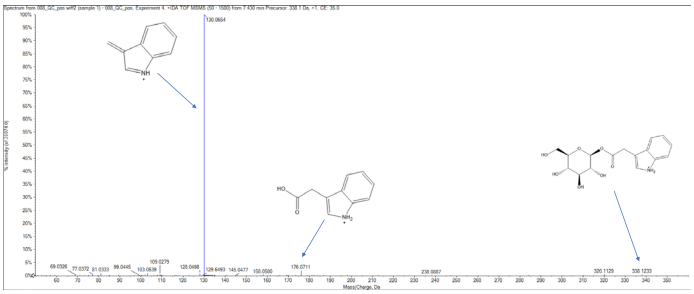

图6. 3-Indoleacetic acid-o-葡萄糖苷碎片解析

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334个代谢物进行统计，筛选差异代谢物。

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代谢物在两组样本之间存在差异。

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)
香豆酰基 -1,4- 丁二胺 1	$C_{13}H_{18}N_2O_2$	[M+H]+	6.97E+04	6.47	235.1441	-0.4
香豆酰基 -1,4- 丁二胺 2	$C_{13}H_{18}N_2O_2$	[M+H]+	4.22E+05	7.1	235.1441	0.4
阿魏酰基 -1,4- 丁二胺 1 N-feruloylputrescine 1	$C_{14}H_{20}N_2O_3$	[M+H]+	3.49E+05	7.01	265.1547	0.7
阿魏酰基 -1,4- 丁二胺 1 N-feruloylputrescine 2	$C_{14}H_{20}N_2O_3$	[M+H]+	2.06E+06	7.61	265.1547	-0.2
阿魏酰基 - 戊二胺 1	$C_{15}H_{22}N_2O_3$	[M+H]+	4.27E+05	7.51	279.1703	0.2
阿魏酰基 - 戊二胺 2	$C_{15}H_{22}N_2O_3$	[M+H]+	1.51E+05	8.36	279.1703	-0.8
N- 反式 - 对香豆酰酪胺 1 paprazine 1	$C_{17}H_{17}NO_3$	[M+H]+	2.56E+06	12.76	284.1281	0.6
Glutamylphenylalanine 1	$C_{14}H_{18}N_2O_5$	[M+H]+	3.55E+05	7.58	295.1288	2.9
N - feruloyltyramine N- 阿魏酰酪胺 1	$C_{18}H_{19}NO_4$	[M+H]+	1.92E+05	12.53	314.1387	0.2
N - feruloyltyramine N- 阿魏酰酪胺 2	$C_{18}H_{19}NO_4$	[M+H]+	1.82E+06	13.09	314.1387	0.9
3-Indoleacetic acid +Glu 1	$C_{16}H_{19}NO_7$	[M+H]+	1.60E+06	7.44	338.1234	1.6
3-Indoleacetic acid +Glu 2	$C_{16}H_{19}NO_7$	[M+H]+	1.86E+06	7.66	338.1234	1.2
3-Indoleacetic acid +Glu 3	$C_{16}H_{19}NO_7$	[M+H]+	1.15E+06	8.3	338.1234	0.9
3-Indoleacetic acid +Glu 4	$C_{16}H_{19}NO_7$	[M+H]+	1.80E+06	8.62	338.1234	0.9
阿魏酰基 - 丙二胺 + 香豆酰基	$C_{22}H_{24}N_2O_5$	[M+H]+	3.25E+04	11.54	397.1758	-0.9
阿魏酰基 -1,4- 丁二胺 + 香豆酰基 1	$C_{23}H_{26}N_2O_5$	[M+H]+	1.84E+06	12.65	411.1914	0.6
阿魏酰基 -1,4- 丁二胺 + 香豆酰基 2	$C_{23}H_{26}N_2O_5$	[M+H]+	4.73E+06	12.99	411.1914	0.7
阿魏酰基 - 羟基丁二胺 + 香豆酰基 1	$C_{23}H_{26}N_2O_6$	[M+H]+	1.67E+05	11.56	427.1864	0.5
阿魏酰基 - 羟基丁二胺 + 香豆酰基 2	$C_{23}H_{26}N_2O_6$	[M+H]+	2.40E+04	11.79	427.1864	-0.2
阿魏酰基 -1,4- 丁二胺 +Glu	$C_{20}H_{30}N_2O_8$	[M+H]+	1.18E+05	6.28	427.2075	-0.8
阿魏酰基 -1,4- 丁二胺 + 阿魏酰基 1	$C_{24}H_{28}N_2O_6$	[M+H]+	1.10E+06	12.49	441.202	0.8
阿魏酰基 -1,4- 戊二胺 + 阿魏酰基 1	$C_{25}H_{30}N_2O_6$	[M+H]+	7.71E+04	13.27	455.2177	0.6
3-Indoleacetic acid +Glu+Xyl 1	$C_{21}H_{27}NO_{11}$	[M+NH4]+	6.27E+05	7.56	487.1922	0.9

备注：Glu 为葡萄糖基，xyl 为木糖基。

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)
allantoin	$C_4H_6N_4O_3$	[M-H]-	8.01E+04	0.9	157.0367	-1
2-oxoadipate	$C_6H_8O_5$	[M-H]-	1.95E+05	2.22	159.0299	-2
Urate	$C_5H_4N_4O_3$	[M-H]-	3.15E+05	2.29	167.0211	-0.5
Fructose	$C_6H_{12}O_6$	[M-H]-	3.97E+05	0.85	179.0561	-2.0
Galactitol	$C_6H_{14}O_6$	[M-H]-	3.98E+06	0.84	181.0718	-0.5
Mannitol	$C_6H_{14}O_6$	[M-H]-	3.98E+06	0.84	181.0718	-0.5
azelaic acid	$C_9H_{16}O_4$	[M-H]-	5.15E+05	12.09	187.0976	-1.8
4-hydroxy-2-quinolinecarboxylic acid	$C_{10}H_7NO_3$	[M-H]-	1.78E+05	8.25	188.0353	-2.3
Quinic acid	$C_7H_{12}O_6$	[M-H]-	3.75E+05	0.96	191.0561	-2.0
D-glucuronic acid	$C_6H_{10}O_7$	[M-H]-	8.83E+05	0.86	193.0354	-2.0
异阿魏酸 Isoferulic acid	$C_{10}H_{10}O_4$	[M-H]-	3.40E+05	10.82	193.0506	-2.3
巴豆苷 2-Hydroxyadenosine	$C_{10}H_{13}N_5O_5$	[M-H]-	7.88E+05	5.28	282.0844	-1
鸟苷guanosine	$C_{10}H_{13}N_5O_5$	[M-H]-	3.04E+05	5.41	282.0844	-1.1
亚油酸 Linoleic acid	$C_{18}H_{32}O_2$	[M-H]-	1.52E+08	22.88	279.233	-1.1
柠檬酸 Citric acid	$C_6H_8O_7$	[M-H]-	7.91E+06	2.03	191.0197	-0.3
D-甘露糖 D-(+)-Mannose	$C_6H_{12}O_6$	[M-H]-	9.57E+05	0.97	179.0561	-2.2
p-香豆酸 p-Coumaric acid	$C_9H_8O_3$	[M-H]-	1.81E+05	10.21	163.0401	-2.3
原儿茶酸 Protocatechuic acid	$C_7H_6O_4$	[M-H]-	6.89E+04	8.94	153.0193	-2.1
水杨酸salicylic acid	$C_7H_6O_3$	[M-H]-	7.20E+04	7.65	137.0244	-2.2
L-苹果酸 L-Malic acid	$C_4H_6O_5$	[M-H]-	2.74E+06	1.03	133.0142	-1.1

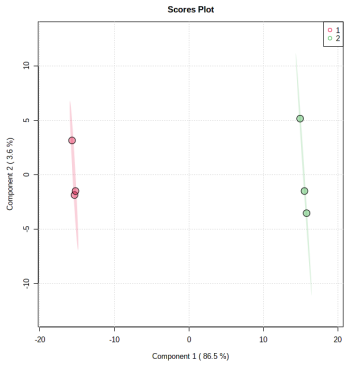

图7. PCA-DA得分图

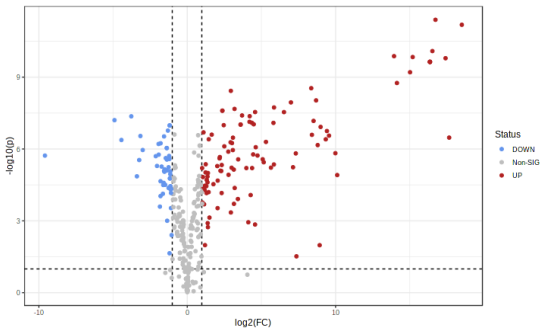

图8. 火山图（FC>2 或<0.5, p<0.05）

4.3 差异代谢物统计

以p值<0.05，Fold change>2或<0.5，及VIP>1筛选两组间的差异物。两组间的差异代谢物总共是148个，部分差异代谢物信息见表3。表明两个品种玉米中的代谢物差异很大。

表3. 1组和2组之间的差异物列表（部分）

Compound name	p	Fold change	VIP
阿魏酰基-乙胺 1	4.03E-12	108770	1.0754
阿魏酰基-乙胺 2	6.51E-12	372910	1.0754
narcotin	8.16E-11	94224	1.0754
4'-Methoxy-7-O-(6''-acetyl)-D-glucopyranosyl-8,3'-dihydroxyflavanone	1.33E-10	15716	1.0754
Kamebanin+Glu+Gluc	1.45E-10	37569	1.0754
马钱子碱 Brucine	1.62E-10	174220	1.0754
异绿原酸（3,5-二咖啡酰奎宁酸）（Isochlorogenic acid A）3,5-Di-O-caffeoylquinic acid	2.31E-10	84029	1.0754
阿魏酰基-羟基丁二胺+香豆酰基2	6.24E-10	33196	1.0753
Chrysoeriol (Luteolin 3'-methyl ether)	1.76E-09	17975	1.0753
阿魏酰基-1,4-丁二胺+香豆酰基 1	2.9E-09	328.2	1.0753
urate	3.74E-09	7.6725	1.0753
阿魏酰基-1,4-丁二胺+阿魏酰基 1	9.35E-09	411.69	1.0753
阿魏酰基-羟基丁二胺+香豆酰基1	1.13E-08	127.12	1.0753
Carnosic acid+Glu+Gluc	1.85E-08	57.671	1.0752
Androsin 2	2.12E-08	9.1087	1.0752
Homovanillic acid	2.52E-08	5.1605	1.0752
3-(4-hydroxyphenyl)-lactate	2.52E-08	5.1605	1.0752
M2BOA	2.87E-08	23.826	1.0752
HM2BOA+Glu+Glu	2.88E-08	91.8	1.0752

备注：Glu为葡萄糖基，Gluc为葡萄糖醛酸基。

总结

本文展示了使用SCIEX ZenoTOF™ 7600系统建立了鉴定玉米中小分子代谢物的方法，同时该方案中鉴定到的代谢物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代谢组学研究。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鉴定小分子代谢物。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330个小分子代谢物，包括初生代谢物和次生代谢物，代谢物覆盖度高。其中，大量的代谢物在两个品种玉米中均表现出差异。该方法通过非靶向代谢组学方法，尽可能全面的获得两种玉米中的代谢物信息，为农学领域的科研客户开展非靶向代谢组学和高覆盖靶向代谢组学研究均可以提供代谢物成分信息和参考，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-02-15366-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