

¹³C 辅助的超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用方法 精确分析毕赤酵母胞内代谢物浓度

郭孟磊 刘晓云 黄明志* 李敏超 储 炬 庄英萍 张嗣良

(华东理工大学国家生化工程技术研究中心(上海), 上海 200237)

摘 要 毕赤酵母作为一种高效的外源蛋白表达平台,其蛋白表达水平与胞内代谢物浓度紧密相关。但胞内代谢物种类多、物化性质差异大、浓度低、周转快,对其绝对浓度的精确检测一直难于实现。本研究将超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用分析方法与¹³C 同位素标记技术相结合,探索解决该难题的方法。首先,优化了超高效液相色谱的操作条件,利用 3 种色谱柱实现了 64 种常见中间代谢物的分离;对三重四极杆质谱仪的检测离子对和碰撞电压等操作条件进行优化,找到了对各种物质具有专一性的检测离子对。然后,利用全标记¹³C 标记底物培养细胞,收集胞内的全标记代谢物用作定量内标物,建立了 53 种中间代谢物的标准曲线。实验结果表明,本方法不但精确性高,标准曲线相关系数达到 0.99 以上,而且重现性好,受实验条件和仪器操作条件的影响很小。将本方法应用于毕赤酵母胞内代谢物浓度的绝对定量分析,成功获得了胞内各种代谢物的浓度水平,为后续深入研究毕赤酵母代谢调控机理,实现外源蛋白的高效生产奠定了基础。

关键词 超高效液相色谱-三重四极杆质谱; ¹³C 同位素标记; 代谢物浓度; 毕赤酵母

1 引 言

毕赤酵母是一种高效的蛋白表达平台,已用于 1000 多种外源蛋白的表达,其表达水平与胞内代谢物浓度紧密相关。掌握毕赤酵母胞内中间代谢物的浓度信息对理解其代谢调控机理,实现外源蛋白的高效生产具有重要意义^[1~4]。

中间代谢物具有种类多、物化性质差异大、浓度低和周转快等特点,色谱-质谱联用技术已大量应用于这些物质的定性与定量分析。常用的质谱定量方法包括气相色谱-质谱法(GC-MS)和液相色谱-质谱联用法(LC-MS)。气相色谱不适于分离强极性代谢物,液相色谱-质谱更适合于中间代谢物的定量分析^[5,6],但其定量性能受到离子抑制效应^[7]和样品前处理过程的影响。为弥补这些不足,Wu 和 Bennett^[7,8]等提出同位素稀释-质谱定量法(简称 IDMS),通过测量样品的未标记代谢物和作为内标的全标记代谢物的比值实现定量分析^[9]。

IDMS 已应用于大肠杆菌和面包酵母等多个细胞体系^[6,10]。已有研究者尝试将其引入到毕赤酵母体系中,如 Carnicer 等^[11]对比了 5 种淬灭方法的影响,发现温度-27℃、甲醇含量 60%时效果最好;Tredwell 等^[12]分析了不同提取方法的影响,指出沸乙醇提取方法具有优越性;Jordà 等^[13]将其与非稳态¹³C 代谢通量分析技术相结合,探讨了外源蛋白表达对毕赤酵母胞内代谢的影响。尽管 IDMS 理论上是一种准确度和精度较高的方法^[7],仍有多因素可能会影响其定量性能。毕赤酵母的代谢活性很强,在定量分析其胞内代谢物浓度时,与传统定量方法相比,有关 IDMS 方法的优势和不足尚缺乏深入研究。本研究优化了 LC-MS/MS 检测毕赤酵母胞内代谢物的操作条件,建立各种代谢物的标准曲线,评估 IDMS 方法在定量分析不同代谢物时具有的优势和不足,探讨实现毕赤酵母胞内代谢物浓度可靠检测的方法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱(Thermo Fisher 公司),ACQUITY UPLC® RBEH Amide 色谱

2015-08-10 收稿; 2015-10-29 接受

* E-mail: 249533969@qq.com

柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm , Waters 公司); XselectTM HSS T3 色谱柱(150 mm × 2.1 mm, 3.5 μm , Waters 公司); XselectTM HSS T3 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm); 振荡器(Thermo Fisher 公司); 移液器(GILSON 公司); SHZ-D(III) 循环水式真空泵(上海予华仪器设备有限公司); 纤维滤膜(Millipore 公司); pH 计(Mettler Toledo 公司)。

标准品和甲酸、乙酸、二甲基己二胺、三丁胺、甲酸铵等试剂(Sigma 公司); 流动相甲醇、异丙醇、乙腈、超纯水(Fisher Chemical 公司)。U¹³C 葡萄糖(Cambridge Isotope Laboratories 公司)。

2.2 菌种和培养条件

毕赤酵母 β -半乳糖苷酶生产菌株 GHL。培养基组成为葡萄糖 20 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 14.9 g/L, K_2SO_4 18.2 g/L, 85% H_3PO_4 26.8 mL/L, 无水 Ca_2SO_4 0.93 g/L, KOH 4.13 g/L, 消泡剂(1:1000, V/V)。微量元素溶液(12:1000, V/V) 其中微量元素: KI 0.08 g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 6.0 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 3.0 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 65.0 g/L, H_2SO_4 (1:200, V/V), $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, CoCl_2 0.5 g/L, ZnCl_2 20.0 g/L, H_3BO_4 0.02 g/L, 生物素 0.2 g/L。培养条件: 接种量 10%, 温度 30℃, pH 5.5, 每升发酵液的通气量 1 L/min。

^{13}C 全标记菌体的培养采用 U¹³C 葡萄糖为唯一碳源, 接种量 1%, 空气中 CO_2 用 NaOH 溶液除去, 其它条件与上述相同。提取菌体胞内代谢物检测 U¹³C 代谢物所占比例, 发现其中仅含有极微量的 ^{12}C 代谢物, 不影响化合物浓度的定量分析。

2.3 ^{13}C 全标菌体样品的处理

发酵结束后, 将 100 mL 发酵液加入 -20℃ 预冷的含有 500 mL 60% 甲醇的补料瓶中, 搅拌混匀后分装到 30 个试管中, 每个试管 20 mL, 4℃, 12000 r/min 离心 10 min, 弃上清液。在试管加入 70℃ 预热的 20 mL 75% 乙醇, 95℃ 保温 10 min。冷却至室温后, 4℃、以 12000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 将 30 支试管中上清液混合后再分装。

2.4 标记实验样品的处理

样品取出后直接放入 27℃ 预冷的含有 3 mL 60% 甲醇的试管灭活^[10], 取样量为 1 mL。用 0.8 μm 纤维滤膜过滤, 去离子水清洗菌体; 滤膜与菌体均加入 70℃ 预热的含有 30 mL 75% 乙醇的试管中, 95℃ 保温 10 min, 用于定量分析的样品同时还加入 100 μL 内标。提取代谢物后将滤膜取出, 4℃, 以 12000 r/min 离心 10 min, 取上清液。上清液用快速旋转蒸发仪蒸干后 -80℃ 保存待测。

2.5 色谱条件

2.5.1 有机酸与磷酸糖类 采用 Acquity T3 色谱柱(150 mm × 2.1 mm, 1.8 μm)。流动相 A: 5 mmol/L 三丁胺, 15 mmol/L 乙酸, 5% 甲醇; 流动相 B: 异丙醇。柱温: 40℃。梯度洗脱: 0~5 min, 100% A; 5~16 min, 100%~91% A; 16~19 min, 91%~50% A; 19~25 min, 50% A; 25~26 min, 50%~100% A。流速 0.2 mL/min。

2.5.2 核苷酸类 采用 XselectTM HSS T3 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm)。流动相 A: 5 mmol/L 三丁胺, 以甲酸调至 pH 4.95; 流动相 B: 5 mmol/L 三丁胺, 100% ACN, 0.5% 甲酸。柱温: 40℃。梯度洗脱: 0~30 min, 100%~50% A。流速 0.2 mL/min。

2.5.3 氨基酸类 采用 ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm)。流动相 A: 5 mmol/L 三丁胺, 以甲酸调至 pH 3.0; 流动相 B: 5 mmol/L 三丁胺, 85% ACN, 0.5% 甲酸。柱温: 40℃。梯度洗脱: 0~30 min, 100%~75% B。流速 0.2 mL/min。

2.6 质谱条件

氨基酸的检测采用正离子模式: 喷雾电压 3.5 kV, 汽化温度 300℃, 鞘气压 15 psi, 离子扫描气压 0 psi, 辅助气压 10 psi, 毛细管温度 300℃。

有机酸、磷酸糖和核苷类物质的检测采用负离子模式: 喷雾电压 -3.0 kV, 汽化温度 200℃, 鞘气压 15 psi, 离子扫描气压 0 psi, 辅助气压 10 psi, 毛细管温度 200℃。

2.7 标准曲线的建立

分别采用传统方法和 IDMS 方法进行胞内代谢物浓度的绝对定量分析。传统方法只利用标准品浓度与峰面积之间的对应关系建立标准曲线。采用 IDMS 方法时, 将不同浓度梯度的化合物标准品(未标

记) 与 $U^{13}C$ 内标按 4:1 比例混合, 根据未标记代谢物与全标记代谢物的峰面积比值与标准品浓度建立标准曲线。

2.8 加标回收实验

回收率(R) 定义为:

$$R(\%) = \left(\frac{\Delta C_m}{\Delta C} - 1 \right) \times 100\% \quad (1)$$

其中 ΔC_m 是添加已知浓度 ^{12}C 标准品后与添加前测定值之差, ΔC 是理论上添加前后的差值,

$$\Delta C = \frac{C_0 V_0 + C_a V_a}{V_0 + V_a} \quad (2)$$

其中 C_0 为未添加前代谢物浓度; V_0 为未添加前样品体积; C_a 和 V_a 分别是添加标准品的浓度和体积。

3 结果与讨论

3.1 色谱操作条件优化

胞内有机酸、磷酸糖和核苷类物质由于极性大, pK_a 值低, 存在同分异构体, 使得对该类化合物的分离成为难题, 而氨基酸类物质极性差异大, pK_a 值范围广, 也成为分离氨基酸的最大障碍。根据这 3 类物质性质的不同, 首先利用选择离子扫描模式^[14] 对色谱分离方法进行了优化, 利用 3 根色谱柱有效分离了包括有机酸、磷酸糖、核苷类物质和氨基酸在内的 64 种常见胞内代谢物(图 1~图 3)。质谱通过质荷比来鉴别化合物, 但是不能区分同分异构体, 因此色谱分离至关重要, 本研究有效分离了上述几种化合物, 尤其是实现了 G6P、F6P、M6P 等同分异构体的分离, 为更有效鉴别代谢物奠定了基础。

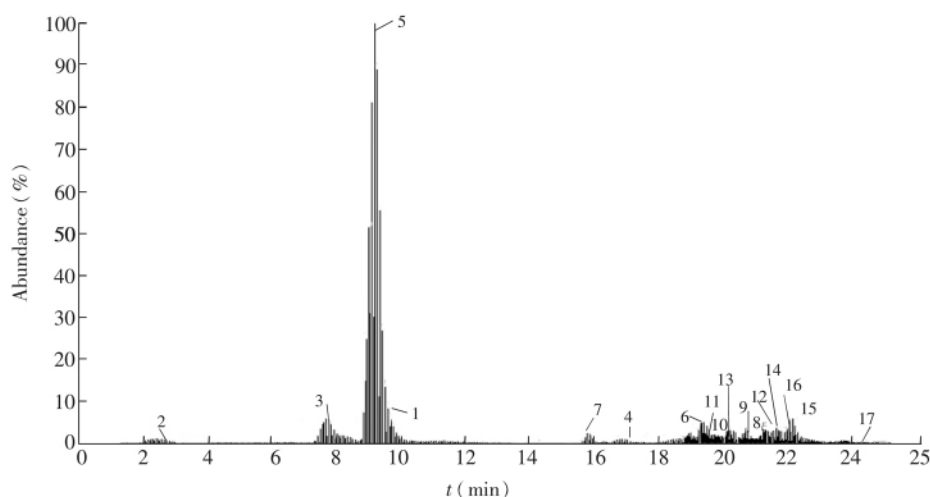


图 1 有机酸、磷酸糖选择离子扫描总离子流图

Fig.1 Total ion chromatograms of sugar phosphates and carboxylic acids

1, Glyoxylic acid; 2, Pyruvate (PYR); 3, Lactic acid (LAC); 4, Fumarate (FUM); 5, Succinate (SUC); 6, Malate (MAL); 7, α -Oxoglutarate (AKG); 8, Citrate (CIT); 9, 2-Phosphoglycerate (2PG); 10, Erythrose-4-phosphate (E4P); 11, Ribulose-5-phosphate (RL5P); 12, Ribose-5-phosphate (R5P); 13, Glucose-6-phosphate (G6P); 14, Fructose-6-phosphate (F6P); 15, 6-Phosphogluconate (6PG); 16, Sedoheptulose-7-phosphate (S7P); 17, Fructose-1,6-diphosphate (FBP).

3.2 质谱仪操作条件优化

用标准品进行质谱操作条件优化, 获得了 64 种代谢物的专一检测离子对及最佳操作条件, 如表 1 所示。化合物在碰撞池中发生电离, 虽然不同的化合物电离方式不同, 但相似化合物电离方式具有相似性, 例如磷酸糖类化合物特征离子多为 PO_4^{3-} , 有机酸类化合物以羧基为主。表 1 给出了所有化合物离子分子式, 为后续代谢物的检测和合理选择标记化合物离子对提供了依据。

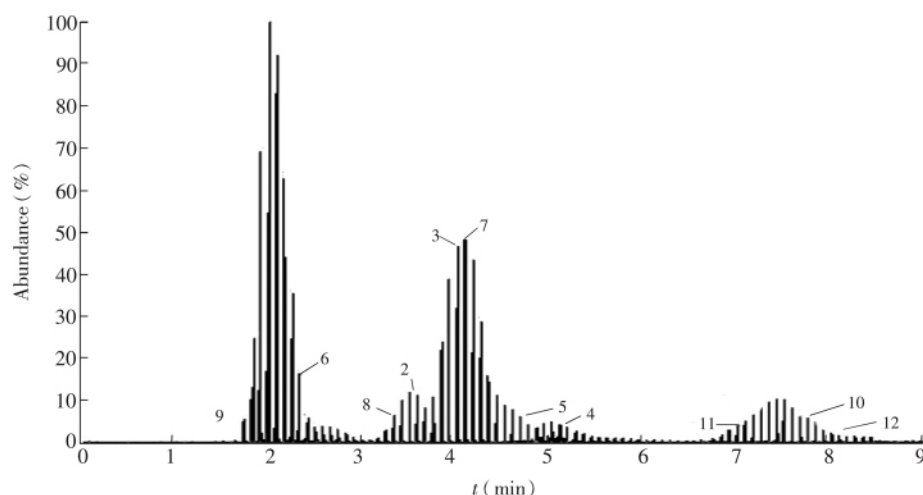


图2 核苷类物质选择离子扫描总离子流图

Fig.2 Total ion chromatograms of nucleosides

1, Cytidine monophosphate (CMP); 2, Uridine monophosphate (UMP); 3, Adenosine monophosphate (AMP); 4, Inosine monophosphate (IMP); 5, Guanosine monophosphate (GMP); 6, Cytidine diphosphate (CDP); 7, Adenosine diphosphate (ADP); 8, Inosine diphosphate (IDP); 9, Adenosine triphosphate (ATP); 10, Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD); 11, Nicotinamide adenine dinucleotide reduced (NADPH); 12, Guanosine triphosphate (GTP).

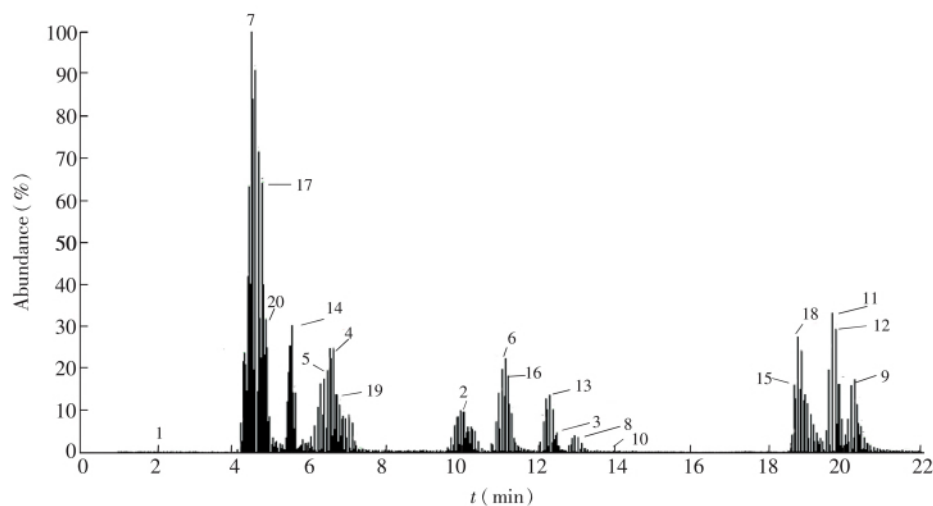


图3 20种氨基酸物质选择离子扫描总离子流图

Fig.3 Total ion chromatograms of 20 amino acids

1, Glycine (Gly); 2, Alanine (Ala); 3, Serine (Ser); 4, Proline (Pro); 5, Val; 6, Proline (Thr); 7, Isoleucine (ILE); 8, Asparagine (Asn); 9, Ornithine (Orn); 10, Aspartate (Asp); 11, Glutamine (Gln); 12, Lysine (Lys); 13, Glutamate (Glu); 14, Methionine (Met); 15, Histidine (His); 16, Amino adipic acid (AAA); 17, Phenylalanine (Phe); 18, Arginine (Arg); 19, Tyrosine (Tyr); 20, Tryptophan (Trp).

3.3 标准曲线

从表2可见,对于大多数物质而言,基于 ^{13}C 内标的标准曲线的线性系数要好于传统的 ^{12}C 方法。但是部分物质,如CDP, SUC, OXA和部分氨基酸, ^{13}C 方法所得的线性系数反而小于 ^{12}C 方法。究其原因,可能是这些物质提取时在胞内降解太快,可保留用作 ^{13}C 内标物的量较少,导致内标峰面积的测定误差变大,使得其线性系数反而变小,有些化合物的IDMS标准曲线甚至无法建立。

理论上,标记代谢物与未标记代谢物具有色谱同一性,因此基于 ^{13}C 内标的标准曲线方程的斜率只与该 ^{13}C 代谢物在标记细胞中的含量和稀释比例有关。在进样量确定时,两者保持不变,标准曲线斜

表 1 SIM 检测离子对

Table 1 Ion pair of SIM

编号 Number	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	保留时间 R_T (min)	母离子 Parents (m/z)	子离子 Daughters (m/z)	碰撞能 Collision energy (eV)	透镜电压 Lens voltage (V)	极性 Polarity	碎片 Fragments	脱去碎片 De-Fragments
1	Gly	C ₂ H ₅ O ₂ N	1.76	76.134	59.14	11	38	—	C ₂ H ₂ O ₂	NH ₃
2	Ala	C ₃ H ₇ O ₂ N	2.29	90.117	73.03	15	35	+	C ₃ H ₄ O ₂	NH ₃
3	Ser	C ₃ H ₇ O ₃ N	2.30	106.140	60.18	11	37	+	C ₂ H ₅ ON	CO ₂ H ₂
4	Pro	C ₅ H ₉ O ₂ N	2.13	116.149	70.19	15	47	+	C ₄ H ₇ ON	CO ₂ H ₂
5	Thr	C ₄ H ₉ O ₃ N	2.18	118.136	74.24	14	42	—	C ₃ H ₉ ON	CO ₂
6	Val	C ₅ H ₁₁ O ₂ N	2.48	118.155	72.2	10	42	+	C ₄ H ₉ N	CO ₂ H ₂
7	Asn	C ₄ H ₈ O ₃ N	2.19	131.139	113.28	13	48	—	C ₄ H ₅ O ₃ N	H ₂ O
8	Asp	C ₄ H ₇ O ₄ N	2.62	132.123	88.18	13	31	—	C ₃ H ₇ O ₂ N	CO ₂
9	Ile/Leu	C ₆ H ₁₃ O ₂ N	2.56	132.165	86.2	9	36	+	C ₅ H ₁₁ N	CO ₂ H ₂
10	Orn	C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	2.14	133.170	70.19	17	40	+	C ₄ H ₇ N	COOH, NH ₄
11	Gln	C ₅ H ₁₀ O ₃ N ₂	2.11	145.151	127.32	16	57	—	C ₅ H ₈ O ₂ N ₂	H ₂ O
12	Glu	C ₅ H ₉ O ₄ N	2.62	146.124	128.17	13	36	—	C ₅ H ₇ O ₃ N	H ₂ O
13	Lys	C ₆ H ₁₄ O ₂ N ₂	2.15	147.154	84.17	16	37	+	C ₅ H ₉ N	COOH, NH ₄
14	Met	C ₅ H ₁₁ O ₂ NS	2.57	150.125	133.12	8	40	+	C ₅ H ₈ O ₂ S	NH ₃
15	His	C ₆ H ₁₁ N ₃ O ₂	2.32	156.129	110.15	13	49	+	C ₅ H ₉ N ₃	CO ₂ H ₂
16	AAA	C ₆ H ₁₁ NO ₄	2.63	160.138	116.22	16	27	—	C ₅ H ₁₁ NO ₂	CO ₂
17	Phe	C ₉ H ₁₁ NO ₂	6.57	166.141	120.16	13	49	+	C ₈ H ₉ N	CO ₂ H ₂
18	Arg	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	2.16	175.173	70.18	27	57	+	—	—
19	Tyr	C ₉ H ₁₁ NO ₃	2.59	182.144	91.16	29	50	+	C ₃ H ₈ NO ₂	C ₆ H ₄ O
20	Trp	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	8.75	203.169	116.15	21	64	—	C ₈ H ₇ N	C ₃ H ₅ O ₂ N
21	Trp	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	8.71	205.159	188.19	8	76	+	C ₁₁ H ₉ NO ₂	NH ₃
22	Cystine	C ₆ H ₁₃ N ₂ O ₄ S ₂	2.68	241.112	152.05	12	57	+	C ₃ H ₆ NO ₂ S ₂	C ₃ H ₇ O ₂ N
23	Glyoxylic	C ₂ H ₂ O ₃	11.28	73.119	45.17	6	58	—	CH ₂ O ₂	CO
24	PYR	C ₃ H ₄ O ₃	11.70	87.125	43.16	6	33	—	C ₂ H ₄ O	CO ₂
25	LAC	C ₃ H ₆ O ₃	10.20	89.138	43.16	12	50	—	C ₂ H ₄ O	CH ₂ O ₂
26	FUM	C ₄ H ₄ O ₄	13.96	115.093	71.19	7	44	—	C ₃ H ₄ O ₂	CO ₂
27	SUC	C ₄ H ₆ O ₄	13.80	117.114	73.15	12	44	—	C ₃ H ₆ O ₂	CO ₂
28	OXA	C ₄ H ₄ O ₅	13.97	131.060	87.03	9	12	—	C ₃ H ₄ O ₃	CO ₂
29	MAL	C ₄ H ₆ O ₅	14.14	133.101	115.06	12	40	—	C ₄ H ₄ O ₄	H ₂ O
30	AKG	C ₅ H ₆ O ₅	14.31	145.104	101.11	10	33	—	C ₄ H ₆ O ₃	CO ₂
31	PEP	C ₃ H ₆ O ₆ P	14.82	167.060	79.11	38	35	—	C ₃ H ₆ O ₃	PO ₃
32	G3P	C ₃ H ₇ O ₆ P	10.98	169.083	79.15	38	32	—	PO ₃	C ₃ H ₇ O ₃
33	SEM	C ₇ H ₁₀ O ₅	8.06	173.094	93.07	16	67	—	—	—
34	2PG	C ₃ H ₇ O ₇ P	10.15	185.044	79.04	39	49	—	PO ₃	C ₃ H ₇ O ₄
35	CIT	C ₆ H ₉ O ₇	14.58	191.10	111.105	14	38	—	C ₅ H ₅ O ₃	CO ₂ , 2H ₂ O
36	E4P	C ₄ H ₉ O ₇ P	10.66	199.081	79.14	39	50	—	PO ₃	C ₄ H ₉ O ₄
37	R5P	C ₅ H ₁₁ O ₈ P	10.33	229.077	79.03	50	57	—	PO ₃	C ₅ H ₁₁ O ₅
38	RL5P	C ₅ H ₁₁ O ₈ P	10.33	229.087	79.05	38	49	—	PO ₃	C ₅ H ₁₁ O ₅
39	G6P	C ₆ H ₁₃ O ₉ P	9.33	259.079	79.03	43	60	—	PO ₃	C ₆ H ₁₃ O ₆
40	F6P	C ₆ H ₁₃ O ₉ P	9.42	259.089	79.04	18	67	—	PO ₃	C ₆ H ₁₃ O ₇
41	G1P	C ₆ H ₁₃ O ₉ P	9.34	259.106	79.12	45	60	—	PO ₃	C ₆ H ₁₃ O ₈
42	M6P	C ₆ H ₁₃ O ₉ P	9.34	259.122	79.12	43	64	—	PO ₃	C ₆ H ₁₃ O ₉
43	6PG	C ₆ H ₁₃ O ₁₀ P	8.34	275.076	79.038	38	65	—	PO ₃	C ₆ H ₁₃ O ₇
44	S7P	C ₇ H ₁₅ O ₁₀ P	9.77	289.103	79.053	49	63	—	PO ₃	C ₇ H ₁₅ O ₉ P
45	FBP	C ₆ H ₁₄ O ₁₂ P ₂	9.02	339.051	79.034	54	65	—	PO ₃	C ₆ H ₁₄ N ₃ O ₅
46	CMP	C ₉ H ₁₄ N ₃ O ₈ P	2.09	322.133	79.108	49	95	—	PO ₃	C ₉ H ₁₄ N ₃ O ₅ P
47	UMP	C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₉ P	2.09	323.115	79.11	43	69	—	PO ₃	C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₃
48	cAMP	C ₁₀ H ₁₂ N ₅ O ₆ P	5.69	328.137	134.19	26	84	—	C ₅ N ₅ H ₄	C ₅ H ₈ O ₆ P
49	AMP	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₇ P	4.94	346.153	79.13	45	84	—	PO ₃	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₄
50	IMP	C ₁₀ H ₁₃ N ₄ O ₈ P	2.19	347.123	79.07	58	89	—	PO ₃	C ₁₀ H ₁₃ N ₄ O ₅
51	GMP	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₈ P	4.45	362.136	79.11	38	90	—	PO ₃	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₅
52	CDP	C ₉ H ₁₅ N ₃ O ₁₂ P ₂	2.12	402.114	79.11	45	166	—	PO ₃	C ₉ H ₁₅ N ₃ O ₉ P

续表 1(Continued to Table 1)

编号 Number	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	保留时间 R_T (min)	母离子 Parents (m/z)	子离子 Daughters (m/z)	碰撞能 Collision energy (eV)	透镜电压 Lens voltage (V)	极性 Polarity	碎片 Fragments	脱去碎片 De-Fragments
53	UDP	$\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_{12}\text{P}_2$	2.04	403.094	241.07	22	174	—	—	—
54	ADP	$\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2$	5.14	426.119	79.17	49	71	—	PO_3	$\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_7\text{P}$
55	IDP	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_{11}\text{P}_2$	5.14	427.118	135.14	25	98	—	$\text{C}_5\text{N}_4\text{OH}_3$	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{O}_{10}\text{P}_2$
56	GDP	$\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{P}_2$	4.48	442.12	159.04	25	108	—	$\text{P}_2\text{O}_6\text{H}$	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_5$
57	ATP	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3$	5.07	506.105	159.04	25	109	—	$\text{P}_2\text{O}_6\text{H}$	$\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_7\text{P}$
58	GTP	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{14}\text{P}_3$	5.07	522.122	159.04	40	180	—	$\text{P}_2\text{O}_6\text{H}$	$\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_8\text{P}$
59	NAD	$\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2$	4.58	662.191	540.293	18	63	$\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_2$		$\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_2\text{O}$
60	NADPH	$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_7\text{O}_{17}\text{P}_3$	5.08	744.159	159.10	45	157	—	$\text{P}_2\text{O}_6\text{H}$	$\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_{11}\text{P}$
61	FAD	$\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{N}_9\text{O}_{15}\text{P}_2$	9.85	784.191	437.24	27	154	—	—	—
62	3PG	$\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_7\text{P}$	10.15	185.025	97.19	18	44	—	H_2PO_4	$\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3$
63	isCIT	$\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_7$	18.96	191.027	173.09	12	34	—	$\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6$	H_2O
64	T6P	$\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{O}_{14}\text{P}$	17.52	421.067	241.16	29	118	—	$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_8\text{P}$	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$

表 2 标准曲线相关系数(R^2 值)Table 2 Correlation coefficients (R^2 values) of calibration lines

代谢物 Metabolite	基于 ^{13}C ^{13}C -based	基于 ^{12}C ^{12}C -based	内标 Internal standard	代谢物 Metabolite	基于 ^{13}C ^{13}C -based	基于 ^{12}C ^{12}C -based	内标 Internal standard
CDP	0.9945	0.9971	CDP	FUM	0.9963	0.9972	FUM
ADP	0.9979	0.9973	ADP	SUC	0.9915	0.9933	SUC
IDP	0.9991	0.9916	IDP	OXA	0.9977	0.9996	OXA
PYR	0.9979	0.9975	PYR	G6P	0.9996	0.9991	G6P
LAC	nd	0.9931	—	T6P	0.9976	0.9970	S7P

率就不会发生变化,因此该斜率不会随仪器状态和不同的分析样品批次的变化而变化,而 ^{12}C 方法因缺少内标物,峰面积会发生一些变化,从而影响其斜率。为了验证,依照上述方法做出标准曲线,连续测量 4 次,得到不同进样批次之间标准曲线斜率的变化情况(表 3)。从表 3 可知, ^{13}C 法标准曲线比 ^{12}C 法具有更好的稳定性。

表 3 4 次重复实验中标准曲线的斜率及其 95% 的置信区间

Table 3 Slopes and their 95% confidences intervals in four LC-ESI-MS/MS runs

代谢物 Metabolites	Run 1		Run 2		Run 3		Run 4	
	基于 ^{13}C ^{13}C -based	基于 ^{12}C ^{12}C -based ($\times 10^5$)	基于 ^{13}C ^{13}C -based	基于 ^{12}C ^{12}C -based ($\times 10^5$)	基于 ^{13}C ^{13}C -based	基于 ^{12}C ^{12}C -based ($\times 10^5$)	基于 ^{13}C ^{13}C -based	基于 ^{12}C ^{12}C -based ($\times 10^5$)
CMP	5.90 $\pm$ 0.17	1.31 $\pm$ 0.15	5.20 $\pm$ 0.16	1.21 $\pm$ 0.11	5.91 $\pm$ 0.23	1.51 $\pm$ 0.23	5.41 $\pm$ 0.08	1.32 $\pm$ 0.19
UMP	2.19 $\pm$ 0.04	0.53 $\pm$ 0.014	2.16 $\pm$ 0.04	0.50 $\pm$ 0.01	2.52 $\pm$ 0.10	0.747 $\pm$ 0.017	2.14 $\pm$ 0.05	1.31 $\pm$ 0.02
PYR	433 $\pm$ 17	33.3 $\pm$ 1.0	457 $\pm$ 10	35.8 $\pm$ 1.3	432.0 $\pm$ 4.0	33.8 $\pm$ 1.0	397 $\pm$ 13	37.4 $\pm$ 0.9
MAL	24.4 $\pm$ 0.30	1.09 $\pm$ 0.05	27.2 $\pm$ 0.43	0.61 $\pm$ 0.03	26.6 $\pm$ 0.4	1.77 $\pm$ 0.03	24.4 $\pm$ 0.3	3.39 $\pm$ 0.03
R5P	5.17 $\pm$ 0.10	7.46 $\pm$ 0.04	4.66 $\pm$ 0.05	7.33 $\pm$ 0.03	4.58 $\pm$ 0.04	6.91 $\pm$ 0.04	4.79 $\pm$ 0.06	8.11 $\pm$ 0.04
G6P	1.68 $\pm$ 0.04	5.17 $\pm$ 0.02	1.35 $\pm$ 0.02	4.20 $\pm$ 0.02	1.78 $\pm$ 0.04	4.64 $\pm$ 0.02	1.55 $\pm$ 0.03	12.53 $\pm$ 0.07
6PGA	1.76 $\pm$ 0.10	3.15 $\pm$ 0.03	1.30 $\pm$ 0.02	2.64 $\pm$ 0.07	1.41 $\pm$ 0.02	3.96 $\pm$ 0.05	1.52 $\pm$ 0.03	4.03 $\pm$ 0.02
S7P	19.4 $\pm$ 0.30	5.59 $\pm$ 0.90	18.2 $\pm$ 0.05	9.40 $\pm$ 0.90	18.8 $\pm$ 0.05	24.3 $\pm$ 2.7	16.4 $\pm$ 0.4	56.7 $\pm$ 3.10
T6P	1.41 $\pm$ 0.03	1.67 $\pm$ 0.10	1.41 $\pm$ 0.05	1.26 $\pm$ 0.09	1.41 $\pm$ 0.05	2.73 $\pm$ 0.13	1.53 $\pm$ 0.03	5.56 $\pm$ 0.11

3.4 回收率

表 4 给出了部分化合物的回收率偏差,从回收率偏差上可以看出, IDMS 方法回收率偏差小于传统 ^{12}C 方法,证明本方法的优越性和重要性。

3.5 毕赤酵母胞内代谢物定量分析结果

不同菌株的细胞在不同生长状态下其胞内代谢物浓度存在一定的差异,但是对于特定种类生物而言,其胞内代谢物浓度水平和细胞的容量具有相似性。将 IDMS 方法与传统 ^{12}C (Lac ,Asp 等)方法相结

表 4 部分化合物的回收率偏差
Table 4 The recovery deviation for some compounds

化合物 Compound	基于 ¹³ C ¹³ C-based				基于 ¹² C ¹² C-based			
	原浓度 Concentration before adding ($\mu\text{mol/g}$) [*]	理论浓度 Theoretical concentration ($\mu\text{mol/g}$) [*]	实际浓度 Actual concentration ($\mu\text{mol/g}$) [*]	回收率偏差 Deviation of recovery (%)	原浓度 Concentration before adding ($\mu\text{mol/g}$) [*]	理论浓度 Theoretical concentration ($\mu\text{mol/g}$) [*]	实际浓度 Actual concentration ($\mu\text{mol/g}$) [*]	回收率偏差 Deviation of recovery (%)
Glyo	1.56	3.28	3.24	-1.15	1.34	3.17	3.56	12.27
PYR	1.02	3.01	2.93	-2.54	1.22	3.11	3.42	9.84
Lac	2.17	3.59	3.40	-5.03	3.21	4.11	5.10	24.36
α KG	0.35	2.68	2.48	-7.40	0.33	2.67	3.30	23.98
PEP	0.10	2.55	2.49	-2.20	0.2	2.60	3.82	46.88
CMP	0.38	2.69	2.64	-1.86	0.32	2.66	2.86	7.66
CAMP	0.20	2.60	2.49	-4.40	0.11	2.56	2.64	3.22
IMP	0.82	2.91	2.66	-8.57	0.63	2.82	3.32	17.95
ADP	1.19	3.10	2.64	-14.83	2.74	3.87	5.24	35.47
Met	0.55	2.78	2.41	-13.00	1.03	3.02	3.38	12.22

* : $\mu\text{mol/g}$ 细胞干重($\mu\text{mol/g}$ dry cell weight , DCW) 。

合,能更完整地测定毕赤酵母胞内代谢物。图 4 给出了毕赤酵母胞内代谢物的定量结果,无论是胞内各种代谢物的浓度水平,例如有机酸、磷酸糖(0.01~50 $\mu\text{mol/g}$ 细胞干重(DCW))、核苷类物质(0.01~10 $\mu\text{mol/g}$ DCW)、游离氨基酸(0.1~100 $\mu\text{mol/g}$ DCW),还是胞内游离氨基酸的总量(378.02 $\mu\text{mol/g}$ DCW) ,或者不同氨基酸在毕赤酵母胞内的百分含量,都与文献[12,15,16]报道一致,说明了本定量方法的可靠性。

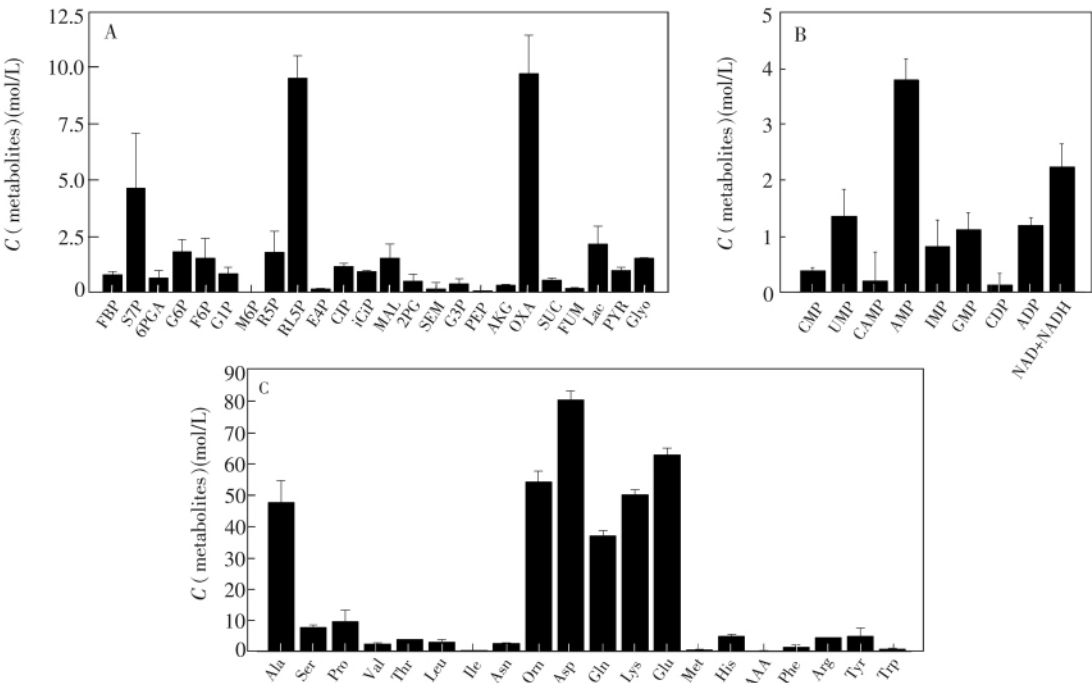


图 4 毕赤酵母 GHL 胞内代谢物浓度($\mu\text{mol/g}$ 细胞干重)

Fig.4 Intracellular metabolites concentration in *Pichia pastoris* GHL. Intracellular concentration of metabolites pools are given in $\mu\text{mol/g}$ DCW

A: 有机酸和磷酸糖; B: 核苷类物质; C: 氨基酸。
A: Sugar phosphates and carboxylic acids; B: Nucleosides; C: Amino acids

4 结论

比较了 IDMS 方法与传统定量方法在毕赤酵母胞内代谢物定量分析方面的优劣,说明了 IDMS 方法的优越性,但是也不能忽略传统方法在测量可快速降解代谢物方面的作用。将两者结合,将使得毕赤酵母胞内代谢物的定量分析更加精确完整,为后续深入研究毕赤酵母代谢调控机理,实现外源蛋白的高效生产奠定了基础。

References

- 1 Fan H, Li S P, Xiang J J, Lai C M, Yang F Q, Gao J L, Wang Y T. *Anal. Chim. Acta*, **2006**, 567(2): 218–228
- 2 Ogawa T, Washio J, Takahashi T, Echigo S, Takahashi N. *Oral Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol.*, **2014**, 118(2): 218–225
- 3 Xia M L, Huang D, Li S S, Wen J P, Jia X Q, Chen Y L. *Biotechnol. Bioeng.*, **2013**, 110(10): 2717–2730
- 4 Wasylenko T M, Stephanopoulos G. *Biotechnol. Bioeng.*, **2014**, 112(3): 470–483
- 5 Buchholz A, Takors R, Wandrey C. *Anal. Biochem.*, **2001**, 295(2): 129–137
- 6 van Dam J C, Eman M, Frank J, Lange H C, van Dedem G W K, Heijnen S J. *Anal. Chim. Acta*, **2002**, 460(2): 209–218
- 7 Wu L, Mashego M R, van Dam J C, Proell A M, Vinke J L, Ras C, van Winden W A, van Gulik W M, Heijnen J J. *Anal. Biochem.*, **2005**, 336(2): 164–171
- 8 Bennett B D, Yuan J, Kimball E H, Rabinowitz J D. *Nature Protocols*, **2008**, 3(8): 1299–1311
- 9 Hellerstein M K, Neese R A. *Am. J. Physiol.*, **1999**, 276(6): 1146–1170
- 10 McCloskey D, Gangoiti G A, King Z A, Naviaux R K, Barshop B A, Palsson B O, Feist A M. *Biotechnol. Bioeng.*, **2014**, 111(4): 803–815
- 11 Carnicer M, Canelas A B, Pierick A, Zeng Z, Dam J, Albiol J, Ferrer P, Heijnen J J, Gulik W. *Metabolomics*, **2012**, 8(2): 284–298
- 12 Tredwell G D, Edwards-Jones B, Leak D J, Bundy J G. *PLoS One*, **2011**, 6(1): e16286
- 13 Jordà J, Rojas H C, Carnicer M, Wahl A, Ferrer P, Albiol J. *Metabolites*, **2014**, 4(2): 281–299
- 14 LI Min-Chao, HUANG Ming-Zhi, LIU Yu-Wei, CHU Ju, ZHUANG Ying-Ping, ZHANG Si-Liang. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2014**, 42(10): 1408–1403
李敏超, 黄明志, 刘玉伟, 储炬, 庄英萍, 张嗣良. *分析化学*, **2014**, 42(10): 1408–1403
- 15 Jordà J, Suarez C, Carnicer M, ten Pierick A, Heijnen J J, Gulik W, Ferrer P, Albiol J, Wahl A. *BMC Syst. Biol.*, **2013**, 7(1): 1–16
- 16 Jordà J, Jouhten P, Cámara E, Maaheimo H, Albiol J, Ferrer P. *Microb. Cell Fact.*, **2012**, 11: 57

^{13}C -assisted Ultra-high Performance Liquid Chromatography Triple Quadrupole Mass Spectrometry Method for Precise Determination of Intracellular Metabolites in *Pichia pastoris*

GUO Meng-Lei, LIU Xiao-Yun, HUANG Ming-Zhi*, LI Min-Chao, CHU Ju, ZHUANG Ying-Ping, ZHANG Si-Liang
(National Engineering Research Center for Biotechnology (Shanghai),
East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract The yeast *Pichia pastoris* is an effective host for recombinant protein production and the recombinant protein production level is tightly related to the concentrations of intracellular metabolites. The intracellular metabolites have the features of wide range of types, distinct variation in physical and chemical properties, rapid turning-over and low concentration, so it is difficult to quantify their concentrations precisely. In this experiment, we tried to make it possible by combining ultra-high performance liquid chromatography

