

## 基于MRM方法的靶向代谢组学分析报告

### 胆汁酸定量分析

项目名称：联勤保障部队第909医院\_人胆汁酸绝对定量分析

委托单位：联勤保障部队第909医院

项目编号：P201903002

报告时间：2020-03-03

检测人员：张媛

核验人员：刘洋

技术负责人：王瑞





报告编号: P201903002

## 目 录

1. 项目检测结果.....	2
1.1样品信息.....	2
1.2代谢物标准品XIC图.....	2
1.3质控样本评价.....	2
1.4定量结果.....	3
1.5箱状图.....	4
1.6聚类分析.....	4
2. 项目概述.....	4
2.1胆汁酸介绍.....	4
2.2MRM原理.....	6
2.3实验流程.....	7
2.4实验方法和数据处理.....	7
3. 附录.....	8
3.1验仪器和试剂.....	8
3.2输出文件及保存位置.....	9
3.3附件1表头说明.....	9

此件为复印件内容与原件一致



报告编号: P201903002

## 1.项目检测结果

### 1.1样品信息

样品分组	样品名称	数量	样品状态
1	E	16	液体
2	F	2	固体
3	X	2	液体

图1 样本基本信息表

### 1.2代谢物标准品XIC图

胆汁酸标准品XIC图如下,从图中可见各代谢物色谱分离较好,峰形尖锐对称,能够对各代谢物进行质谱定量。

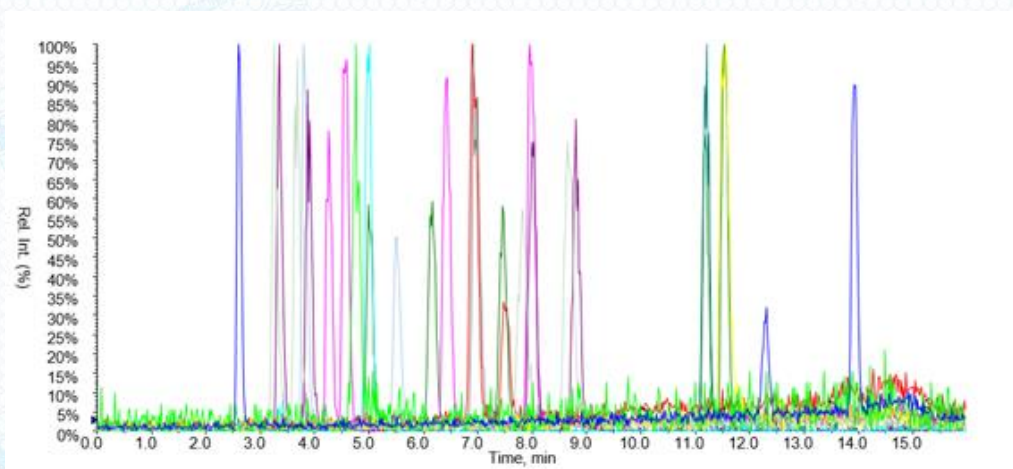


图2标准品混合物XIC图谱

### 1.3质控样本评价

所有样品等量混合制备成为QC样本,采用QC样本对数据的稳定性和重复性进行评价。待测物在QC样本中的RSD结果如下,代谢物RSD均小于30%,在样本中的数据稳定可靠。QC样本检测数据见附件1。

此件为复印件内容与原件一致



报告编号: P201903002

输出文件:

Figures文件夹\\Figure\_1 QC\_RSD

## 1.4 定量结果

标准曲线结果如下,具体结果见附件1。结果表明:各待测物的在线性范围内的线性良好。

NO.	Componer	Mass Info	Retention Tin	Linear	R2
1	CA	407.4 / 407.4	7.61486864	$y = 0.00417 x + 0.03052$	0.99981
2	CDCA	391.4 / 391.4	10.7586413	$y = 0.00895 x + 0.02176$	0.99982
3	DCA	391.4 / 391.4	11.1385336	$y = 0.01345 x + 0.01447$	0.9999
4	UDCA	391.4 / 391.4	6.08355664	$y = 0.01050 x + 0.01385$	0.99974
5	HDCA	391.4 / 391.4	7.10989695	$y = 0.00717 x + 0.00905$	0.99982
6	GCA	464.4 / 74.0	5.12199563	$y = 0.00676 x + 0.00908$	0.99996
7	GCDCA	448.4 / 74.0	7.57745701	$y = 0.02200 x + 4.74368e-4$	0.99999
8	GDCA	448.4 / 73.9	8.33111941	$y = 0.01260 x + 0.00305$	0.99992
9	GUDCA	448.4 / 73.9	3.60510092	$y = 0.00424 x + -0.00214$	0.99999
10	GHDCa	448.4 / 74.1	4.09851763	$y = 0.00492 x + 0.00519$	0.99997
11	TDCA	498.4 / 80.0	7.53568005	$y = 0.01425 x + 0.01866$	0.99937
12	TCDCa	498.4 / 80.0	6.80648991	$y = 0.00279 x + 0.00805$	0.99979
13	TUDCA	498.4 / 79.8	3.16356347	$y = 0.01204 x + 0.00127$	0.99968
14	THDCa	498.4 / 79.9	3.50480179	$y = 0.01210 x + -0.00324$	0.99993
15	GLCA	432.5 / 73.9	10.706635	$y = 0.00981 x + 0.00568$	0.99983
16	LCA	375.3 / 375.3	13.7085484	$y = 0.00147 x + 0.00699$	0.99998
17	TCA	514.4 / 79.9	4.44922479	$y = 0.00329 x + 0.01616$	0.99937
18	TLCA	482.4 / 80.0	10.1790871	$y = 0.01211 x + 0.00288$	0.99993
19	b-MCA	407.4 / 407.4	4.74116609	$y = 0.01480 x + 0.00626$	0.99995
20	w-MCA	407.4 / 407.4	5.04545748	$y = 0.00270 x + 0.01994$	0.99939
21	r-MCA	407.4 / 407.4	6.30500922	$y = 0.01996 x + -0.00147$	0.99993
22	a-TMCA	514.4 / 79.8	2.15571017	$y = 0.01792 x + -8.86597e-4$	0.99973
23	THCA	514.4 / 79.8	3.0883605	$y = 0.01509 x + -0.00420$	0.99977
24	7-KLCA	389.4 / 389.4	6.70732519	$y = 0.00360 x + 0.01784$	0.99966
25	12-KLCA	389.4 / 389.4	7.18742389	$y = 0.00171 x + -7.87013e-4$	0.99989
26	ApoCA	389.4 / 389.4	9.29789562	$y = 0.01065 x + 0.00292$	0.99997
27	3-DHCA	405.4 / 405.4	5.58760184	$y = 0.01444 x + 0.00216$	0.99991
28	7-KDCA	405.4 / 405.4	4.07889795	$y = 0.04824 x + 0.02503$	0.99998
29	6,7-DKLCA	403.4 / 347.3	6.73582951	$y = 6.23939e-4 x + 0.00201$	0.99969
30	MoCA	391.4 / 391.4	5.0922936	$y = 0.00782 x + 0.00628$	0.99995
31	IsoLCA	375.5 / 375.5	11.784625	$y = 6.99546e-4 x + 0.00165$	0.99981
32	AlloCA	407.4 / 361.2	7.78202346	$y = 9.96216e-4 x + -7.30578e-5$	0.99997
33	a-MCA	407.4 / 407.4	5.03803893	$y = 0.00289 x + 0.01779$	0.99952

图3标准曲线结果

样本的定量结果如下,详细定量数据见附件1胆汁酸定量结果列表。



报告编号: P201903002

输出文件:

附件1\_胆汁酸MRM结果列表

## 1.5箱状图

箱状图(Box-plot)是一种用作显示一组数据分散情况资料的统计图,将一组数据从大到小排列,分别计算出其上边缘(最大值),上四分位数Q3,中位数,下四分位数Q1,下边缘(最小值)。最小值、最大值形成间距都可以反应数据的变异程度。

输出文件:

附件1\_胆汁酸MRM结果列表

Figures文件夹\Metaboanalyst\_Data\Boxplot

## 1.6聚类分析

示例组聚类分析图如下。一般来说,当筛选的候选代谢物合理且准确时,同组样本能够通过聚类出现在同一簇(Cluster)中。同时,聚在同一簇内的代谢物具有相似的表达模式,可能在代谢过程中处于较为接近的反应步骤中。

输出文件:

Figures文件夹\Metaboanalyst\_Data\Heatmap

## 2.项目概述

### 2.1胆汁酸介绍

人体每天约合成1~1.5g胆固醇,其中0.4~0.6g在肝内转变为胆汁酸。胆汁酸是一类24碳胆烷酸的羟基衍生物,是胆汁的重要组成成分。生物体的差异也使得胆汁酸的组成不尽相同。

此件为复印件内容与原件一致



报告编号: P201903002

根据结构差异,胆汁酸可以分为游离胆汁酸和结合胆汁酸。游离胆汁酸包括胆酸、脱氧胆酸、鹅脱氧胆酸和石胆酸;结合胆汁酸是游离胆汁酸与甘氨酸或牛磺酸的共轭产物,包括甘氨酸胆酸、甘氨酸鹅脱氧胆酸、牛磺胆酸和牛磺鹅脱氧胆酸等多种胆汁酸。

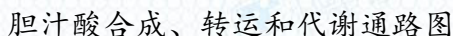
根据合成来源,胆汁酸可以分为初级胆汁酸和次级胆汁酸。初级胆汁酸是以胆固醇为原料在肝脏中合成的胆汁酸,有两条合成途径:经典途径和替代途径。经典途径是初级胆汁酸合成的主要途径,占人体总胆汁酸合成的75%以上,因该途径的中间产物为中性类固醇,故也称中性途径。胆固醇-7 $\alpha$ -羟化酶是经典途径中的限速酶,经过一系列酶促反应将胆固醇转换为CDCA和CA及其与甘氨酸或牛磺酸的共轭产物。替代途径是合成初级胆汁酸的另一途径,因该途径产生酸性类固醇故也称酸性途径。胆汁酸在肝脏合成之后进入胆囊,随胆汁分泌进入十二指肠,促进脂类物质的消化吸收,同时在肠道菌群的作用下初级胆汁酸可进一步转变成石胆酸、脱氧胆酸其与甘氨酸或牛磺酸的共轭产物等多种次级胆汁酸。在空肠末端或回肠,大约95%的胆汁酸通过门静脉系统被重吸收回肝脏,5%的胆汁酸通过粪便排出。胆汁酸的合成、分泌、重吸收及加工转化等均与肝、胆、肠等密切相关,因此,肝、胆或肠疾病必然影响胆汁酸代谢;而胆汁酸代谢的异常又必然影响到上述脏器的功能以及胆固醇代谢的平衡。

胆汁酸分子既含有亲水性的羟基和羧基,又含有疏水性的烷基,具有较强的界面活性,能降低油和水两相之间的表面张力,可以有效的将脂质乳化为脂滴或乳糜微粒,增强胰酶的脂解作用,促进脂肪和脂溶性维生素的消化吸收。除了可以促进脂质的消化吸收外,胆汁酸也可以作为信号分子。核受体法尼酯衍生物X受体(FXR)和G蛋白偶联胆汁酸受体(TGR5)是两种非常重要的胆汁酸受体。FXR 主要在肝脏、肾脏、肠道和肾上腺中表达,调控胆汁酸合成、分泌、转运、吸收和排泄等生物过程,对于维持胆汁酸内稳态和保护肝细胞免受胆汁酸毒性损害具有重要的作用。除此之外,FXR通过诱导SHP的表达,下调LXR、SREBP1c和脂肪酸合成酶的活性,抑制脂肪酸的合成,在调控脂质代谢方面具有重要的作用。另一受体TGR5受体的

此件为复印件内容与原件一致



关。

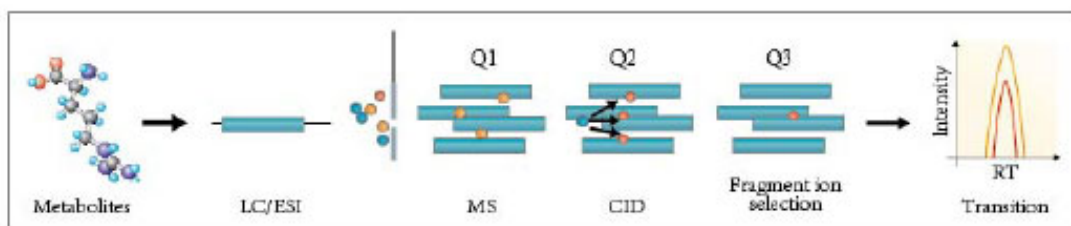


选择性反应/多反应监测技术(SRM/MRM),以标准品为参照,对特定代谢物群进行有针对性地、特异性地检测与分析,并可获得目标代谢物的绝对定量结果,具有特异性强、灵敏度高、准确性高的特点。



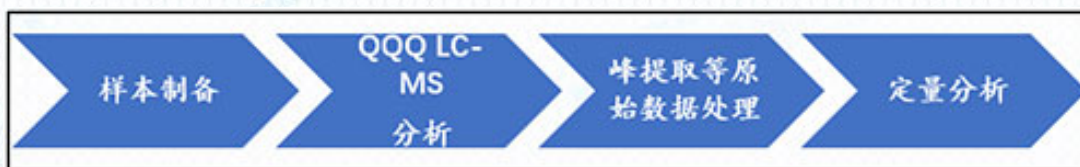
报告编号: P201903002

SRM/MRM技术基于已知或假定的反应离子信息,有针对性地选择数据进行质谱信号采集,对符合规则的离子对进行信号记录,去除不符合规则离子信号的干扰。在定量分析过程中,该技术首先筛选目标代谢物特异性的母离子,然后选择性地对这些母离子进行碰撞诱导,去除其他离子的干扰,只对选定的MS/MS2离子进行质谱信号的采集,从而实现对目标代谢分子更为特异、灵敏、准确的分析。



SRM/MRM原理示意图

## 2.3 实验流程



实验流程图

## 2.4 实验方法和数据处理

### 2.4.1 代谢物提取

取液体样本100 $\mu$ L,加入500 $\mu$ L预冷甲醇及10 $\mu$ L内标,涡旋混合,-20 $^{\circ}$ C孵育20 min沉淀蛋白;4 $^{\circ}$ C条件下,14000 rcf离心15 min,取上清真空干燥;质谱检测时加入甲醇-水(1:1, v/v)复溶,4 $^{\circ}$ C条件下,14000 rcf离心15 min,取上清进样分析。

称取固体样本30mg,加入200 $\mu$ L预冷超纯水进行MP匀浆处理,加入1000 $\mu$ L预冷甲醇及10 $\mu$ L内标,涡旋混合,-20 $^{\circ}$ C孵育20min沉淀蛋白;4 $^{\circ}$ C条件下,14000 rcf离心15 min,取上清真空干燥;



报告编号: P201903002

质谱检测时加入甲醇-水(1:1, v/v)复溶,4°C条件下,14000 rcf离心15 min,取上清进样分析。

## 2.4.2 色谱-质谱分析

### a 高效液相色谱条件

样品采用Waters ACQUITY UPLC I-Class系统进行分离。流动相:A相为0.1% FA水溶液, B相为甲醇。样品置于8°C自动进样器中,柱温45°C,流速为300  $\mu$ L/min,进样量2  $\mu$ L。相关液相梯度如下:0-6 min,B相从60%线性变化到65%;6-13 min,B相从65%线性变化至80%;13-13.5 min,B相从80%线性变化至90%;13.5-15 min,B相维持在90%。样本队列中每隔一定数量的实验样本设置一个QC样本,用于检测和评价系统的稳定性及重复性。

### b 质谱分析

采用5500 QTRAP质谱仪(AB SCIEX)在负离子模式下进行质谱分析。5500 QTRAP ESI源条件如下:source temperature: 550°C; ion Source Gas1 (Gas1): 55; Ion Source Gas2 (Gas2): 55; Curtain gas (CUR): 40; ionSapary Voltage Floating (ISVF): -4500 V;采用MRM模式检测待测离子对,所有胆汁酸的离子对信息见附件1。

## 2.4.3 数据处理

采用Multiquant软件提取色谱峰面积及保留时间。采用胆汁酸的标准品矫正保留时间,进行代谢物鉴定。

## 3. 附录

### 3.1 验仪器和试剂

仪器和耗材

5500 QTRAP 质谱仪(SCIEX)

此件为复印件内容与原件一致



报告编号: P201903002

Waters ACQUITY UPLC I-Class系统 (Waters)

低温高速离心机(Eppendorf5430R)

色谱柱Waters, ACQUITY UPLC BEH C18 1.7μm, 2.1 mm×100 mm column

#### 试剂

甲酸(Honeywell,94318)

甲醇(Fisher Chemical,A452-4)

异丙醇(Fisher Chemical,A461-4)

标准品购自Sigma-Aldrich和Steraloids公司

### 3.2输出文件及保存位置

输出文件		保存位置
1)	胆汁酸MRM结果列表	附件1_胆汁酸MRM结果列表
2)	QC样本评价	Figures文件夹\\Figure_1 QC_RSD
3)	代谢物表达量趋势图	Figures文件夹\\比较组文件夹
4)	层次聚类图	Figures文件夹\\比较组文件夹

### 3.3附件1表头说明

表头

说明

此件为复印件内容与原件一致



报告编号: P201903002

Component Name	检测代谢物名称
Analyte Mass Range	定量离子对信息(Q1/Q3)
Analyte Retention Time (min)	代谢物在色谱上的保留时间
Fold Change	代谢物在比较组中的变化倍数,大于1表明 上调,小于1表明下调
P-value	代谢物在比较组中的统计学分析值  p < 0.05为显著性差异代谢物
Sample Name	代谢物在各检测样本中的定量值
QC	代谢物在QC样本中的定量强度值
QC RSD	代谢物在QC样本中的相对标准偏差

此件为复印件内容与原件一致