

非靶向代谢实验流程

1、样本基本信息

本次实验共收到客户提供的组例样本（具体样本信息见下表）。为了对实验进行质量控制，我们在处理样品的同时制备了 QC 样本。QC 样本为实验样本的等体积混合样本，用于平衡色谱-质谱系统和监测仪器状态，在整个实验过程中对系统稳定性进行评价。同时设置 blank 样本，主要用于去除背景离子。

组别	样本数量	实测检测数量
blank	XX	XX
XX	XX	XX
XX	XX	XX
QC	XX	XX

注：生物学样本由客户准备，干冰运输到公司，样本收到后，立即保存在-80℃ 低温冰箱中，直至实验检测。

2、实验仪器及试剂

2.1 仪器

仪器类型	型号	品牌	产地
质谱仪	Q Exactive™ HF/Q Exactive™ HF-X/Orbitrap Exploris 480	Thermo Fisher	Germany
色谱仪	Vanquish UHPLC	Thermo Fisher	Germany
色谱柱	Hypesil Gold column (100×2.1 mm, 1.9 μm)	Thermo Fisher	USA
低温离心机	D3024R	Scilogex	USA

2.2 试剂

试剂	纯度	CAS 号	品牌	产地	货号	规格
甲醇	LC-MS Grade	67-56-1	Thermo Fisher	USA	A456-4	4L
水	LC-MS Grade	7732-18-5	Merck	Germany	1.15333.2500	2.5L
甲酸	LC-MS Grade	64-18-6	Thermo Fisher	USA	A117-50	50ml

3、实验方法

3.1 代谢物提取

组织样本：

①取 100 mg 液氮研磨的组织样本，置于 EP 管中，加入 500 μ L 的 80% 甲醇水溶液；

②涡旋震荡，冰浴静置 5min，15000 g、4 $^{\circ}$ C 离心 20 min；

③取一定量的上清加质谱级水稀释至甲醇含量为 53%；

④15000g、4 $^{\circ}$ C 离心 20 min，收集上清，进样 LC-MS 进行分析^[1]。

液体样本：

①取 100 μ L 样本置于 EP 管中，加入 400 μ L 的 80% 甲醇水溶液，后续步骤同组织样本②~④^[2-3]。

细胞、细菌样本：

①取细胞（细菌）样本置于 EP 管中，加入 300 μ L 的 80% 甲醇水溶液；

②放入液氮速冻 5 分钟；冰上融化后涡旋 30 秒，超声 6 min；

③5000 rpm、4 $^{\circ}$ C 离心 1 min，取上清液到新离心管中，冻干成干粉；

④按所取样本体积加入相应的 10% 甲醇溶液溶解，进样 LC-MS 进行分析^[4-5]。

培养基上清、细胞细菌培养液样本：

①取 1 mL 样本于冻干机中冻干，加入 100 μ L 的 80% 甲醇水溶液；

②涡旋震荡，冰浴静置 5min，15000 g、4 $^{\circ}$ C 离心 15 min；

③取一定量的上清加质谱级水稀释至甲醇含量为 53%；

④15000g、4 $^{\circ}$ C 离心 15 min，收集上清，进样 LC-MS 进行分析。

QC 样本： 从每个实验样本中取等体积样本混匀作为 QC 样本。

blank 样本： 53% 甲醇水溶液代替实验样本，前处理过程与实验样本相同。

3.2 仪器参数

1. 色谱条件

色谱柱：HypersilGoldcolumn(C18)

柱温：40 $^{\circ}$ C

流速：0.2 mL/min

流动相 A：0.1% 甲酸

流动相 B：甲醇

色谱梯度洗脱程序:

时间	A%	B%
0	98	2
1.5	98	2
3	15	85
10	0	100
10.1	98	2
11	98	2
12	98	2

2.质谱条件

扫描范围选择 m/z 100-1500; ESI 源的设置如下: 喷雾电压 (Spray Voltage): 3.5kV; 鞘气流速 (Sheath gas flow rate): 35psi; 辅助气流速 (Aux Gas flow rate): 10L/min; 离子传输管温度 (Capillary Temp): 320°C; 离子导入射频电平 (S-lens RF level): 60; 辅助气加热器温度 (Aux gas heater temp): 350°C; 极性 (Polarity): positive, negative; MS/MS 二级扫描为 数据依赖性扫描 (data-dependent scans)。

3.数据预处理和代谢物鉴定

将下机数据(.raw)文件导入 CD 3.3 搜库软件中进行处理, 对每个代谢物进行保留时间、质荷比等参数的简单筛选, 然后以第一个 QC 进行峰面积校正, 使鉴定更准确, 随后设置质量偏差 5 ppm、信号强度偏差 30%、最小信号强度、加合离子等信息进行峰提取, 同时对峰面积进行定量, 再整合目标离子, 然后通过分子离子峰和碎片离子进行分子式的预测并与 mzCloud(<https://www.mzcloud.org/>)、mzVault 和 Masslist 数据库进行比对, 用 blank 样本去除背景离子, 将原始定量结果依据公式: 样本原始定量值/(样本代谢物定量值总和/QC1 样本代谢物定量值总和), 进行标准化处理, 得到相对峰面积; 并将 QC 样本中相对峰面积的 CV 大于 30% 的化合物删除, 最后得到代谢物的鉴定和相对定量结果。数据处理部分基于 Linux 操作系统 (CentOS 版本 6.6) 以及软件 R、Python 进行, 具体程序包和软件版本见结果文件 readme。

4.数据统计分析

使用 KEGG 数据库(<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)、HMDB 数据库(<https://hmdb.ca/metabolites>) 和 LIPIDMaps 数据库(<http://www.lipidmaps.org/>) 对鉴定到的代谢物进行注释。

多元统计分析部分, 使用代谢组学数据处理软件 metaX^[6]对数据进行转换后进行主成分分析 (PCA) 和偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA), 进而得每个代谢物的 VIP 值。单变量分析部分, 基于 t 检验来计算各代谢物在两组间统计学显著性 (P 值), 并计算代谢物在两组间的差异倍数 (fold change) 即 FC 值。差异代谢物筛选的默认标准为 VIP>1, P 值<0.05 且 FC≥2 或 FC≤0.5。

火山图用 R 包 ggplot2 绘制, 可以综合代谢物的 VIP 值、log₂ (FoldChange) 和 -log₁₀ (p 值) 三个参数, 来筛选感兴趣的代谢物。

聚类热图, 用 R 包 Pheatmap 进行绘制, 使用 z-score 对代谢物数据进行归一化。

差异代谢物之间的相关性分析 (pearson 相关系数) 使用 R 语言 cor() 进行, 统计显著性通过 R 语言中 cor.mtest() 实现, P 值<0.05 为在统计学上显著, 并用 R 语言中的 corrplot 软件包绘制相关性图。

气泡图用 R 包 ggplot2 进行绘制, 使用 KEGG 数据库来研究代谢物的功能和代谢途径, 当 $x/n > y/N$ 时, 认为该代谢途径富集; 当代谢途径的 P 值<0.05 时, 认为该代谢途径是显著富集。

参考文献

- [1] Want E J, Masson P, Michopoulos F, et al. Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC-MS[J]. Nature Protocols, 2012, 8(1):17-32.
- [2] Want E J, O'Maille G, Smith C A, et al. Solvent-Dependent Metabolite Distribution, Clustering, and Protein Extraction for Serum Profiling with Mass Spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 2006, 78(3):743-752.
- [3] Barri T, Dragsted L O. UPLC-ESI-QTOF/MS and multivariate data analysis for blood plasma and serum metabolomics: effect of experimental artefacts and anticoagulant[J]. Analytica Chimica Acta, 2013, 768(1):118-128.
- [4] Sellick C A, Hansen R, Stephens G M, et al. Metabolite extraction from suspension cultured mammalian cells for global metabolite profiling[J]. Nature Protocol, 2011, 6(8):1241-9.
- [5] Yuan M, Breitkopf S B, Yang X, et al. A positive/negative ion-switching, targeted mass spectrometry-based metabolomics platform for bodily fluids, cells, and fresh and fixed tissue[J]. Nature Protocols, 2012, 7(5):872-81.

[6] Wen B , Mei Z , Zeng C , et al. metaX: a flexible and comprehensive software for processing metabolomics data[J]. BMC Bioinformatics, 2017, 18(1).