



博淼生物  
BIO MIAO BIOLOGICAL

Your Own Laboratory  
您的专属实验室

系统生物学技术服务

## 博淼生物

# 贴壁细胞极性代谢物、非极性代谢物和代谢 流实验方案

## 目录

1 实验设计 .....	3
2 样品信息 .....	3
3 样品采集 .....	3
3.1 极性代谢物检测实验样品采集 .....	3
3.2 非极性代谢物检测实验样品采集 .....	4
3.3 靶向代谢流检测实验样品采集 .....	4
4 样品制备 .....	4
4.1 极性代谢物检测实验样品制备 .....	4
4.2 非极性代谢物检测实验样品制备 .....	5
4.3 靶向同位素标记代谢物检测实验样品制备 .....	5
5 数据采集 .....	6
5.1 极性代谢物检测 .....	6
5.2 非极性代谢物检测 .....	6
5.3 同位素标记代谢物追踪检测 .....	7
6. 数据预处理 .....	7

## 1 实验设计

本实验为贴壁细胞的极性代谢物、非极性代谢物和靶向代谢流的测定和分析实验。极性代谢物用 TSQ Quantiva(Thermo, CA)采集, 检测方法为本平台建立的细胞代谢物选择反应监测 (SRM) 转换正/负检测模式切换捕获的方法; 非极性代谢物在 Q Exactive Orbitrap mass spectrometer (Thermo, CA)进行数据采集, 检测方法为 C18 反相色谱分离法, 分为正离子检测模式和负离子检测模式; 靶向代谢流用 TSQ Quantiva(Thermo, CA)采集数据, 检测模式为 MRM 模式, 依据检测目标代谢物碎裂方式选用合适的母离子和子离子对进行定量分析。代谢物的鉴定通过与平台建立的数据库和公开数据库的比对进行。实验前可进行预实验, 确定检测结果。

## 2 样品信息

无同位素标记贴壁细胞, U-<sup>13</sup>C-葡萄糖标记培养基培养的贴壁细胞。

## 3 样品采集

### 3.1 极性代谢物检测实验样品采集

- 1) 细胞采集前 2 h 更换新鲜培养基 (6 个生物重复);
- 2) 快速移除培养液;
- 3) 轻轻加入 5.0 mL 37 °C 等渗盐水 (PBS) 快速冲洗细胞 2 次;
- 4) 培养皿放在干冰上, 加入 2 mL 预冷的 80% 甲醇 (V/V, -80 °C 预冷 4-6 h);
- 5) -80 °C 冰箱保存 1-2h;
- 6) 培养皿放在干冰上, 用细胞刮刮取细胞到离心管内;
- 7) 刮取的细胞保存在 -80 °C 冰箱, 直到检测, (运输过程保存在干冰条件下)。

## 3.2 非极性代谢物检测实验样品采集

- 1) 细胞采集前 2 h 更换新鲜培养基（6 个生物重复）；
- 2) 快速去除培养液；
- 2) 轻轻加入 5.0 mL 37 °C 等渗盐水 (PBS) 快速冲洗细胞 2 次；
- 3) 加入 1 mL 冰水预冷的等渗盐水（PBS）到培养皿；
- 4) 快速刮取细胞到 5-10 mL 玻璃离心管内，装有刮取细胞的离心管放置在冰上；
- 6) 细胞刮取结束后，保存在-80 °C 冰箱，直到检测（运输过程保存在干冰条件下）。

## 3.3 靶向代谢流检测实验样品采集

- 1) 细胞采集前 2 h 更换 U-<sup>13</sup>C-葡萄糖标记的新鲜培养基（3 个生物重复）；
- 2) 快速移除培养液；
- 3) 轻轻加入 5.0 mL 37 °C 等渗盐水（PBS）快速冲洗细胞 2 次；
- 4) 培养皿放在干冰上，加入 2 mL 预冷的 80% 甲醇 (V/V, -80 °C 预冷 4-6 h)；
- 5) -80 °C 冰箱保存 1-2h；
- 6) 培养皿放在干冰上，用细胞刮刮取细胞到离心管内；
- 7) 刮取的细胞保存在-80 °C 冰箱，直到检测，（运输过程保存在干冰条件下）。

## 4 样品制备

### 4.1 极性代谢物检测实验样品制备

- 1) 取出样品放置在冰上；
- 2) 4 °C，12,000 rpm 离心 20min；
- 3) 取等体积上清到新的离心管；

- 4) 上清液真空干燥;
- 5) 干燥样品保存在 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱;
- 6) 蛋白沉淀去除溶剂, 然后用 BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度;
- 7) LC-MS 测定前向干燥样品加入  $50\ \mu\text{L}$  80%甲醇复溶;
- 8) 涡旋 30s;
- 9) 离心, 上清用于 LC-MS 测定。

## 4.2 非极性代谢物检测实验样品制备

- 1) 冰上溶解样品;
- 2) 按照比=4: 1 的比例, 向离心管内加入氯仿/甲醇 ( $V/V=2:1$ );
- 3) 混合物剧烈涡旋混匀;
- 4) 室温静置分层;
- 5)  $3000\ \text{g}$  离心 15 min;
- 6) 移取下层溶液 (氯仿溶有脂类化合物), 室温真空干燥;
- 7) 干燥样品保存在 $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱, 直到检测;
- 8) 蛋白沉淀去除溶剂, 然后用 BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度。
- 9) 向玻璃离心管内加入  $100\ \mu\text{L}$  氯仿: 甲醇=2: 1 ( $V/V$ ) 混合溶液复溶样品, 用于 LC-MS 检测。

## 4.3 靶向同位素标记代谢物检测实验样品制备

TCA 循环代谢中间产物、糖酵解中间代谢产物和氨基酸类代谢物样品制备与极性代谢物提取样品制备相同。

### 说明:

本方案中极性代谢物和非极性代谢物分开来提取, 如果样品较少且珍贵可以考虑用两相提取法同时提取极性和非极性代谢物

## 5 数据采集

### 5.1 极性代谢物检测

极性代谢物用 TSQ Quantiva(Thermo, CA)测定, 检测方法为本平台建立的细胞代谢物选择反应监测 (SRM) 转换正/负检测模式切换捕获的方法。样品分离采用基于 C18 的反相色谱法, 10 mM 三丁胺和 15 mM 乙酸的水溶液作为流动相 A, 100%甲醇为流动相 B。采用流动相 B 从 5%到 90%梯度洗脱, 每个样品用时 25 min。数据采集过程中采用正负离子切换模式, 循环时间设置为 1s。本检测方法共包含 300 个离子对。Q1 和 Q3 的分辨率均为 0.7 FWHM。正离子模式和负离子模式的离子源电压分别为 3500 V 和 2500 V。离子传输管温度 350 °C, 加热器温度为 300 °C。鞘气流速为 35 arb, 辅助气体流速为 10 arb。

### 5.2 非极性代谢物检测

非极性代谢物 (非靶向脂质组) 在 Q Exactive Orbitrap mass spectrometer (Thermo, CA)进行数据采集, 色谱柱为 Cortecs C18 柱(2.1×100mm,Waters)。10mM 乙酸铵水溶液为流动相 A, 乙腈: 异丙醇=1: 9 (v/v) 混合液为流动相 B, 洗脱梯度如下表所示:

Time (min)	A%	B%
0	63	37
1.5	63	37
4	55	45
5	48	52
8	42	58
11	34	66

14	30	70
18	25	75
20	2	98
22.1	63	37
25	63	37

质谱参数设置如下：正离子模式离子源电压 3200V，负离子模式离子源电压 2800 V，离子传输管温度 320℃，辅助气体流速 10arb，正离子模式扫描质量范围 (m/z) 240-2000, 负离子模式扫描质量范围 (m/z) 200-32000。

### 5.3 同位素标记代谢物追踪检测

靶向代谢流用 TSQ Quantiva(Thermo, CA)检测，采用选择反应监测 (SRM) 的检测方法，按照本平台 TCA 循环代谢中间产物，糖酵解中间产物和氨基酸类代谢物标准品优化的母/子离子对及对应的碰撞能量值进行检测。UPLC 和 MS 的参数设置与极性代谢物检测相同。

## 6. 数据预处理

极性代谢物谱图通过 TraceFinder 进行谱图对齐，峰提取，干扰物质排除和代谢物鉴定。非极性代谢物通过 Lipidsearch 进行谱图对齐，峰提取和代谢物结构比对，代谢物指认通过母离子和特征碎片质量数比对进行，母离子和特征碎片的质量偏差分别设置为 5 ppm 和 10 ppm。只有色谱峰面积大于 5E6 才确定为有效指认。定量过程中允许 0.25 min 保留时间的漂移。

靶向稳定性同位素标记代谢物的检测通过设定的离子对和保留时间确定。

如有疑问随时联系。

博淼生物技术部

2017.10.30