

快速定量分析发酵液样品以评价酵母工程菌的转化效率

使用 Echo™ MS 系统的声波激发进样与质谱耦合技术

Rahul Baghla¹, Chang Liu², Rolf Kern¹

¹ SCIEX, USA, ² SCIEX, Canada

近年来，由于基因工程、微生物学、生物化学和分子生物学等学科的发展，合成生物学领域开始呈指数型增长。合成生物学的目的是使微生物产生所需的产物，因此必须通过选择适当的环境条件和选择高产量的菌株来优化所需产物的产出效率。在选择一种用于大规模商业生产的菌株之前，可能需要开发和评估成千上万种菌株。这需要对成千上万个样品中的目标产物进行定量分析；而且这个过程需要尽可能快地完成，这样才能实现菌株的筛选优化。

SCIEX Echo MS系统是一个高通量、基于电喷雾电离质谱的系统，它使用声波激发进样技术（ADE）来精准控制从进样板转移到开放式探针接口（OPI）的样品液滴量，这个开放式探针接口直接连接到SCIEX Triple Quad™ 6500+ 系统。这项分析技术具有电喷雾质谱的高灵敏度以及化合物研究的应用范围，同时能够以非接



触、几乎无残留的分析方式每秒分析一个样品。2.5 nL的小体积进样明显稀释了复杂样品基质中的基质抑制因子，从而简化了样品进样分析前的制备过程。

在这里，我们通过考察使用最简单的样品制备方法即直接分析酵母发酵液中目标化合物的能力，来评估Echo MS系统在合成生物学工作流程中快速筛选菌株的实用性。

Echo MS 系统进行菌株筛选的主要特征

- 样品分析速度可达到每秒1个样品，满足大量样品筛选的高通量要求
- 精确定量可以实现产物浓度微小差异的区分（图1）
- 只需要最简单的样品制备方法就可以实现分析方法的高通量和定量准确度要求
- Echo MS系统的灵敏度测试结果显示所有浓度水平均可以获得高质量的数据

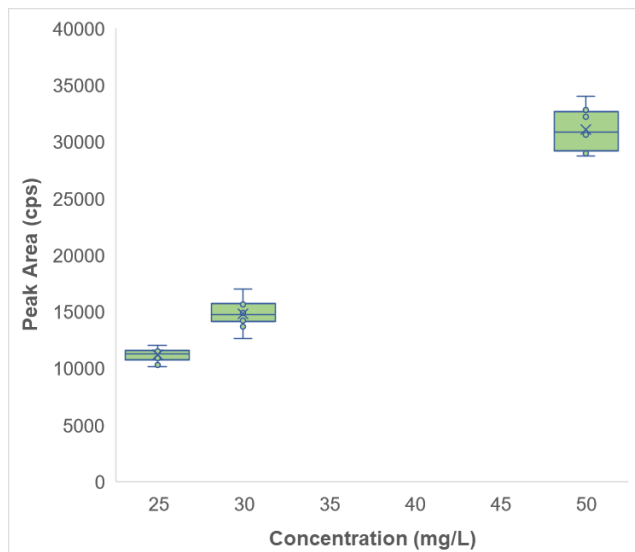


图1. 定量结果重现性好。在菌株筛选过程中，能够精确定量发酵液中目前分析物的浓度差异的能力至关重要。在这里，1x稀释发酵液样品中每个浓度水平的血管紧张素重复采样10次。25和30 mg/L样品之间存在显著性差异。

方法

样品制备：标准添加血管紧张素（DRVYIHPFHL, MW=1295.6）的酵母发酵液样品，由合作者大量供应。用体积比为4:1的乙腈/水溶液溶解活性发酵液，在其中加入血管紧张素标准品，使发酵液中血管紧张素含量分别为25, 30和50 mg/L。然后将标准添加样品以体积比为40%；60%的乙腈/水溶液稀释1倍、10倍和100倍，将稀释后的样品以14000 rpm/min离心15分钟，并转移至96孔板中。样品在-40℃下保存至分析。

Echo MS系统进行分析之前，每个样品转移50 μL到Echo 384孔板中（贝克曼生命科学384PP 2.0微孔板）。

声波激发进样法：更好的声波激发进样方法的优化-样品液滴在进样板中产生以及传递到质谱的ESI离子源，会涉及到几个参数。首先是选择合适的载体溶剂，这就类似于高效液相色谱的流动相。在本实验中选择体积比为60:40:0.1（乙腈/水/甲酸）作为载体溶剂，最佳流速为450 μL/min。

质谱分析：Echo MS 系统包括SCIEX Triple Quad™ 6500+ 液质联用系统，由SCIEX OS软件进行控制。血管紧张素（DRVYIHPFHL）通过单一MRM通道（649.1 → 784.4 m/z, CE=40, DWell=30 ms）进行监测。OptiFlow™离子源的源参数为：GS1为90，GS2为70，温度为600℃。

数据处理：峰面积使用SCIEX OS软件进行积分。

表1.峰面积和重现性结果。每个浓度水平样品以及每个稀释样品进行10次重复采集。结果显示数据结果具有非常好的重现性。

培养基中的浓度	稀释倍数	液滴数	平均峰面积	峰面积变异系数%
25 mg/L	1x	1	11174	5.2
30 mg/L	1x	1	14787	7.9
50 mg/L	1x	1	31078	5.5
25 mg/L	10x	4	6106	4.2
30 mg/L	10x	4	7269	7.5
50 mg/L	10x	4	16202	5.2
25 mg/L	100x	10	1386	14.6
30 mg/L	100x	10	1664	5.7
50 mg/L	100x	10	2982	7.5

定量的准确度

样品为三个不同浓度水平（25、30和50 mg/L）不同稀释倍数（1倍, 10倍和100倍）的血管紧张素发酵溶液。每个样品重复采样10次，以展示声波激发与质谱耦合技术在该基质中的重现性（图2）。所有稀释液的检测结果都表现出很好的重现性，即使是最小稀释倍数样品（1倍）也表现出较好的重现性，这表明在这类实验中可以使用最简单的样品制备方法就可以达到预期的结果（表1）。此外，重现性足够好，可以很容易地区分出相同浓度样品之间的差异（图1），这是在菌株选择的过程中起着至关重要的决定作用。

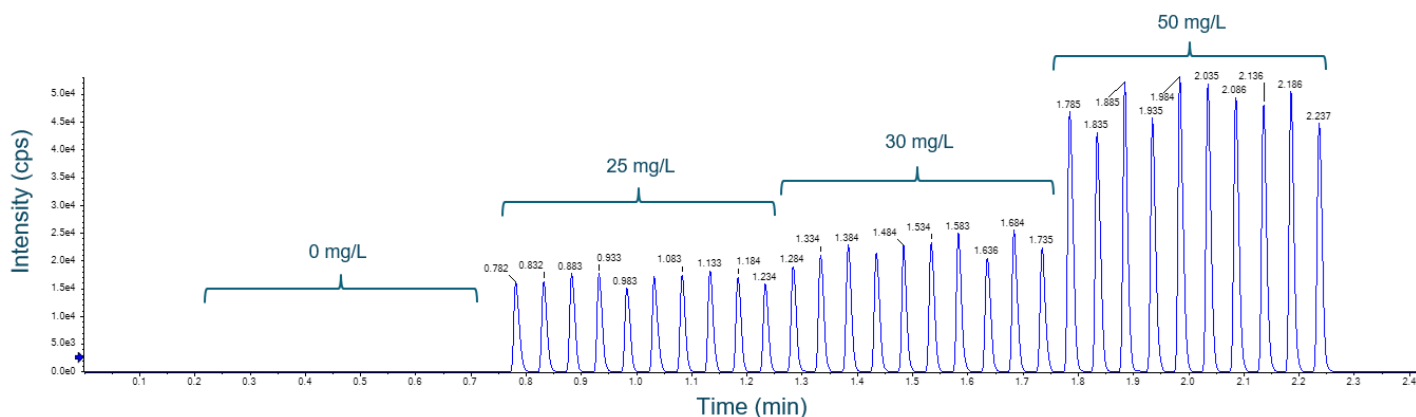


图2.为未稀释样品中的血管紧张素肽的原始质谱数据。每个浓度水平采用单液滴声波激发进样法重复采集10次。3个浓度水平的样品在最简单的样品制备方法下都具有很好的重现性（表1）。

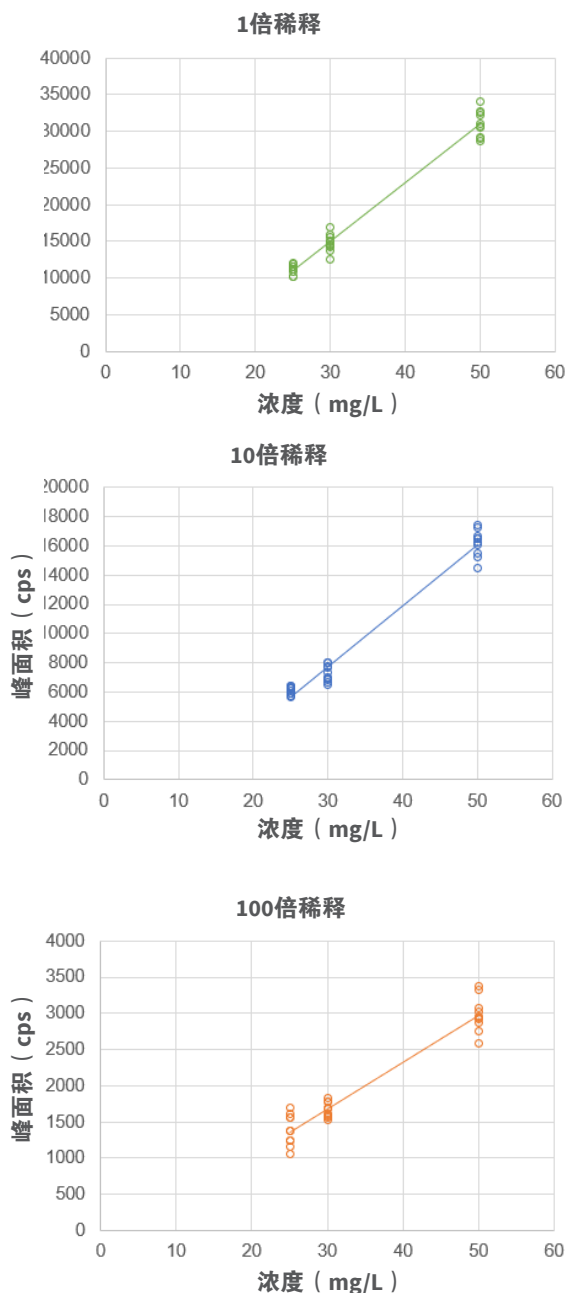


图3. 三个稀释系列浓度水平下发酵液样品中血管紧张素浓度曲线。最简单的样品制备方法制备的样品中观察到样品浓度具有良好的线性和重现性结果。

图3所示为三个稀释系列浓度水平样品的线性和精密度结果。当样品稀释倍数变大时，可以增加样品进样的液滴数来提高目标物的信号响应。对10倍稀释后的样品，采用4个液滴进样量以达到好的效果。对于100倍稀释样品，使用了10个液滴进样量，也达到了较好的实验结果，尽管该系列浓度梯度的最低浓度点显示出比预期中更高的变异系数，但在三个稀释系列的稀释液样品中依然可以观察到良好的线性关系。

结论

研究表明，Echo MS系统能够快速产生高质量的数据结果，通常对于一些发酵液基质来说，使用最简单的样品制备方法就可以进行基质中的目标肽分析。这个分析平台可以快速生成定量数据以评估微生物菌株的产出效率，这将有助于更快速的菌株选择，菌株筛选这一过程在合成生物学领域成本耗费较高，Echo MS系统解决了这一瓶颈问题

参考文献

1. Rapid MS/MS analysis with Acoustic Ejection Mass Spectrometry (AEMS) - Using the SCIEX Echo™ MS System to break bottlenecks in quantitative mass spectrometry throughput. SCIEX technical note RUO-MKT-02-11385-A.

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。Echo和Echo MS是属于美国或在其他国家地区的Labcyte, Inc.的商标或注册商标，该商标经许可使用。所示图像仅用于说明目的，可能不是产品和/或技术的精确表示。样品盘可以从贝克曼库尔特生命科学事业部购买。Beckman Coulter®商标经许可使用。

© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-11695-ZH-A. AB SCIEX™ 商标经许可使用。



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: 021-2419-7200
传真: 021-2419-7333
官网: sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话: 020-8510-0200
传真: 020-3876-0835
官方微信: [ABSciex-China](https://www.absciex.com.cn)