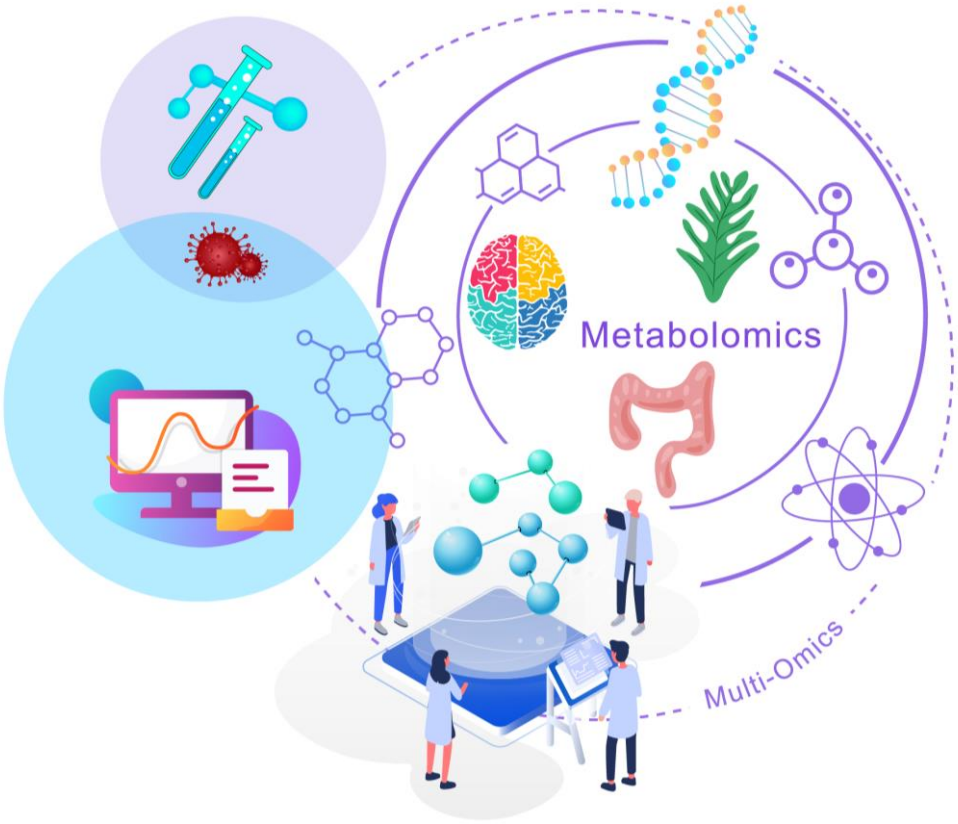
代谢组学检测报告

第一部分 实验报告

项目编号：【 HT2020000002 】



版本号 ：PNMK-4-KYTD012-A/0

报告日期：【2020 年 10 月 19 日】

目录

实验流程

帕诺米克自客户处收到样本以后，首先对样本进行质检；经确认符合送样要求后，随机抽取单个样本进行预实验，生成预实验报告；根据预实验结果调整实验方法，进行正式实验和生物信息学分析，最后生成最终的正式实验分析报告。

具体检测步骤如下所示：

样本信息

样本采用全程冷链运输方式由客户处运送至我方实验室。

我公司共收到来自客户的【18】例植物样本，样本详情请参见《样品接收记录》。

试剂与仪器

代谢组学检测过程中所用试剂与仪器如以下表 1、表 2、表 3 所示。

为确保检测过程的可靠性与数据准确性，帕诺米克在进行代谢组学检测时所采用的试剂与仪器均为市场上性能优秀的产品。

表 1. 代谢组学检测主要试剂

名称	CAS	纯度	品牌
甲醇	67-56-1	≥99.0%	Thermo
乙腈	75-05-8	≥99.9%	Thermo
2-氯苯丙氨酸	103616-89-3	98.5%	Aladdin
甲酸	64-18-6	LC-MS grade	TCI
ddH_2O			Millipore

表 2. 代谢物提取仪器及设备

名称	品牌	型号
冷冻离心机	湘仪	H1650-W
混匀仪	Vortex Mixer	QL-866
超声波清洗器	舒美	KW-100TDV
TissueLyserⅡ	QIAGEN	85300
滤膜	Jin Teng	0.22μm PTFE

表 3. 代谢组学检测仪器 LC-MS

名称	品牌	型号
液相色谱仪	Thermo	Vanquish
质谱仪	Thermo	Q Exactive Focus

实验方法

代谢物提取 [1, 2]

1. 精确称量样本 100mg（±1%）于 2 mL EP 管中，准确加入 0.6 mL 甲醇，涡旋振荡 30 s；
2. 加入 100 mg 玻璃珠，放入 TissueLysis Ⅱ组织研磨仪中，25 Hz 研磨 60 s；
3. 室温超声 15 min；
4. 12 000 rpm 25 ℃离心 10 min，取上清液 300 μL 过 0.22 μm 膜过滤，过滤液加入到检测瓶中，进行 LC-MS 上机检测；
5. 自每个待测样本各取 20 μL 混合成 QC 样本，见图 1；(QC：quality control，用来校正混合样品分析结果的偏差以及由于分析仪器自身原因所造成的失误)；
6. 用剩余待测样本进行 LC-MS 检测。

1. Accurately weigh 100 mg (±1%) of sample in 2 mL EP tube, and add 0.6 mL methanol, vortex for 30 seconds;
2. Add 100 mg glass beads and put the samples into TissueLysis II tissue grinding machine. Grind them at 25 Hz for 60 s;
3. Ultrasound at room temperature for 15 minutes;
4. Centrifuge at 25 ℃ for 10 min at 12 000 rpm, and the supernatant was filtered through 0.22 μm membrane to obtain the prepared samples for LC-MS;
5. Take 20 μL from each sample to the quality control (QC) samples (Fig. 1)*;
(These QC samples were used to monitor deviations of the analytical results from these pool mixtures and compare them to the errors caused by the analytical instrument itself)
6. Use the rest of the samples for LC-MS detection.

上机检测

色谱条件

仪器采用 Thermo Vanquish，使用 ACQUITY UPLC® BEH C18 1.7 μm(2.1*100 mm)色谱柱，自动进样器温度设为 8 ℃，以 0.25 mL/min 的流速，40 ℃的柱温，进样 2 μL 进行梯度洗脱，流动相为 0.1%甲酸水（A2）- 0.1%甲酸乙腈（B2）。梯度洗脱程序为 0~1 min，20% B2；1~9 min，20%~50% B2；9~12 min，50%~98% B2；12~13.5 min，98% B2；13.5~14 min，98%~20% B2；14~20 min，20% B2 -正模式（14~17 min，20% B2 -负模式）。紫外检测波长扫描范围为 200~400nm。[3]

Chromatographic separation was accomplished in an Thermo Vanquish system equipped with an ACQUITY UPLC® BEH C18 (100×2.1 mm, 1.7 μm, Waters) column maintained at 40 ℃. The temperature of the autosampler was 8 ℃. Gradient elution of analytes was carried out with 0.1% formic acid in water (A2) and 0.1% formic acid in acetonitrile (B2) at a flow rate of 0.25 mL/min. Injection of 2 μL of each sample was done after equilibration. An increasing linear gradient of solvent B (v/v) was used as follows: 0~1 min, 20% B2; 1~9 min, 20%~50% B2; 9~12 min, 50%~98% B2; 12~13.5 min, 98% B2; 13.5~14 min, 98%~20% B2; 14~20 min, 20% B2-positive model (14~17 min, 20% B2-negative model). The scanning range of UV detection wavelength is 200~400nm.

质谱条件

仪器使用 Thermo Q Exactive Focus，电喷雾离子源（ESI），正负离子电离模式，正离子喷雾电压为 3.50 kV，负离子喷雾电压为 2.50 kV，鞘气 30 arb，辅助气 10 arb。毛细管温度 325 ℃，以分辨率 70 000 进行全扫描，扫描范围 150~1 000，并采用 HCD 进行二级裂解，碰撞电压为 10 eV、50 eV、60 eV，同时采用动态排除去除无必要的 MS/MS 信息[3]。

The ESI-MSn experiments were executed on the Thermo Q Exactive HF-X mass spectrometer with the spray voltage of 3.8 kV and -2.5 kV in positive and negative modes, respectively. Sheath gas and auxiliary gas were set at 30 and 10 arbitrary units, respectively. The capillary temperature was 325 ℃. The analyzer scanned over a mass range of m/z 81-1 000 for full scan at a mass resolution of 60 000. Data dependent acquisition (DDA) MS/MS experiments were performed with HCD scan. The normalized collision energy was 30 Ev、50 eV and 60 eV. Dynamic exclusion was implemented to remove some unnecessary information in MS/MS spectra.

LC-MS 检测进样顺序 [4]

检测分析结果请见《数据分析报告》

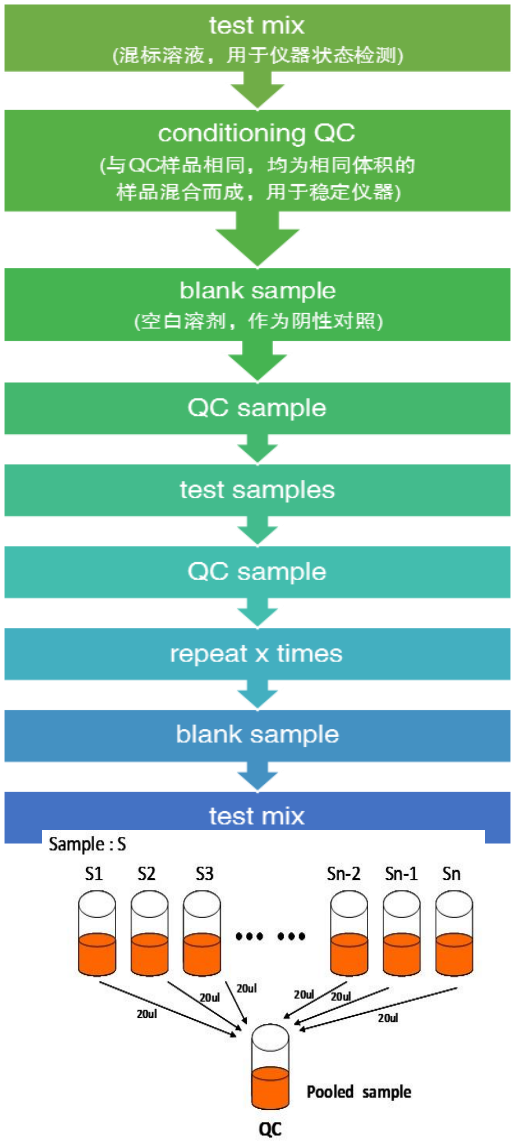


图 1. QC 样本由每个待测样本中各取 20 μL 混合得到，用于校正混合样品分析结果的偏差以及由于分析仪器自身原因所造成的失误

参考文献

1. De Vos RC1, Moco S, et al. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Nature Protocols (4):778-91 (2007).
2. Sangster, Timothy. et al. A pragmatic and readily implemented quality control strategy for HPLC-MS and GC-MS-based metabonomic analysis. Analyst 131.10 (2006): 1075-1078.
3. The HUSERMET Project. Analysis of Serum Samples by UPLC-MS. 2008.
4. Want, E. J. et al. Global metabolic profiling procedures for urine using UPLC-MS. Nature Protocols 5.6 (2010).

实验报告负责人

代谢物提取 ： 【谷从顺】

LC-MS 检测: 【陈 晨】

报告撰写 ： 【谢丽丽】

报告质检 ： 【陈 晨】

请将与本报告相关的问题或建议通过电子邮件的方式
发送至：market@bionovogene.com 或直接致电：(0512) 6295 9105

苏州帕诺米克生物医药科技有限公司
地址：苏州市工业园区新平街 388 号 22 幢 2 层
网站：www.bionovogene.com
电话：(0512) 6295 9105