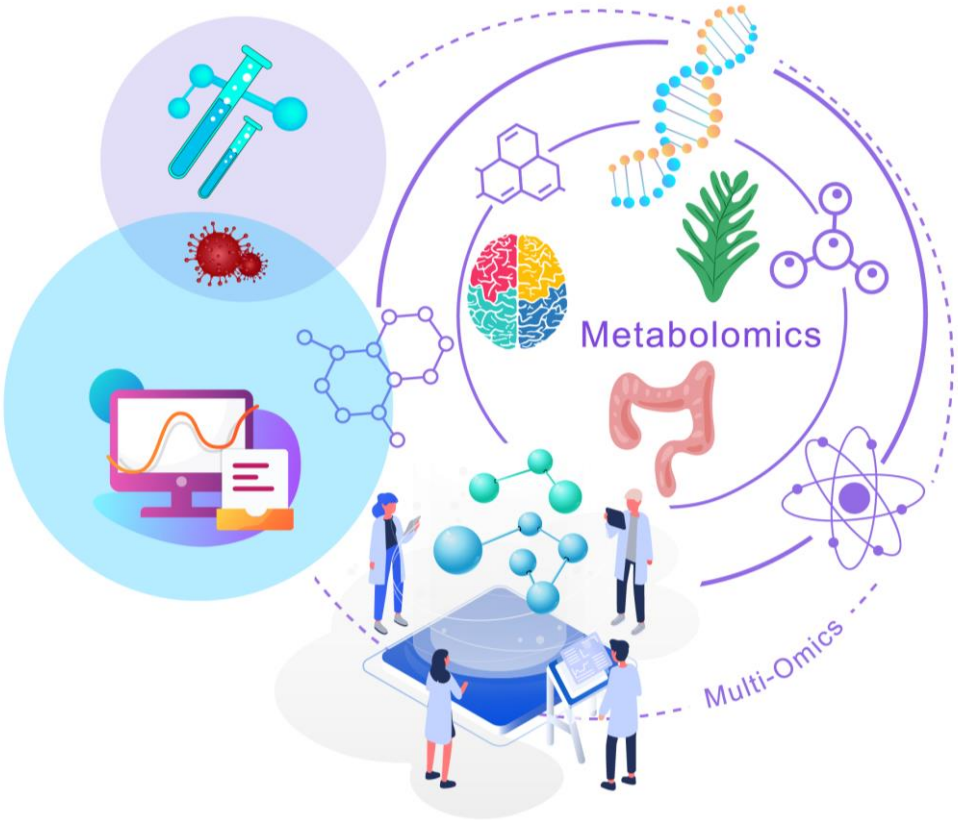
脂质组学检测报告

第一部分　实验报告

项目编号：【HT2020101251001】



版本号　：PNMK-4-KYTD012-A/0

报告日期：【2020 年 12 月 15 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【84】例血浆样本，样本详情请参见《样品接收记录》。

试剂与仪器

脂质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，帕诺米克在进行脂质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. 代谢物提取试剂及标准品

名称	CAS 号	纯度	品牌
甲醇	67-56-1	≥99.0%	Thermo
乙腈	75-05-8	≥99.9%	Thermo
甲酸	64-18-6	LC-MS grade	TCI
甲酸铵	540-69-2	≥99.9%	Sigma
氯仿	67-66-3	≥99.9%	沃凯
异丙醇	67-63-0	≥99.9%	Thermo
ddH_2O			Miilipore

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	H1850-R
混匀仪	Vortex Mixer	QL-866
真空浓缩仪	eppendorf	5305
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

脂质提取 [1]

1. 取样本 100 μL 于 2 mL 管中，加入 750 μL 氯仿甲醇混合溶液（2:1，-20 ℃），涡旋振荡 30 s；【样品量不足按照等比例缩减】
2. 冰上放置 40 min，加入 190 μL ddH_2O，涡旋振荡 30 s，冰上静置 10 min；
3. 在 12000 rpm 室温 离心 5 min，取下层液 300 μL，转移到一个新的 2 mL 离心管中;
4. 再加入 500 μL 氯仿甲醇混合溶液（2:1，-20 ℃），涡旋振荡 30 s；
5. 在 12000 rpm 室温 离心 5 min，取下层液 400 μL，转移到 2 mL 离心管中，样品用真空离心浓缩仪浓缩；
6. 用 200 μL 异丙醇溶解样品，0.22 μm 膜过滤，得到待测样本，进行 LC-MS 上机检测；
7. 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）
8. 用剩余待测样本进行 LC-MS 检测。

1. Transfer 100 μL of each sample into 2 mL centrifuge tubes, add 750 μL of Chloroform methanol mixed solution (2:1) (pre-cooled at -20 ℃), vortex for 30 s; 【The insufficient sample size is reduced to an equal scale】
2. Put on the ice for 40 min，add 190 μL L ddH_2O, vortex for 30 s, and still put on the ice for 10 min;
3. Centrifuged at 12000 rpm for 5 min at room temperature and transfer 300 μL lower layer fluid into a new 2 mL centrifuge tube;
4. Add 500 μL of Chloroform methanol mixed solution（2:1）(pre-cooled at -20 ℃), vortex for 30 s ;
5. Centrifuged at 12000 rpm for 5 min at room temperature and transfer 400 μL lower layer fluid into the same centrifuge tube above. Samples were concentrated to dry in vacuum;
6. Dissolve samples with 200 μL isopropanol, and the supernatant was filtered through 0.22 μm membrane to obtain the prepared samples for LC-MS;
7. 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)
8. Use the rest of the samples for LC-MS detection.

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，50 ℃的柱温，进样 2 μL 进行梯度洗脱，流动相为：乙腈：水=60：40（0.1%甲酸+10 mM 甲酸铵）（A2）- 异丙醇：乙腈=90：10（0.1%甲酸+10mM 甲酸铵）（B2）。梯度洗脱程序为 0~5 min，70~57% A2；5~5.1 min，57%~50% A2；5.1~14 min，50%~30% A2；14~14.1 min，30% A2；14.1~21 min，30%~1% A2；21~24 min，1% A2；24~24.1 min，1%~70% A2；24.1~28 min，70% A2 [2]。

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 50 ℃. The temperature of the autosampler was 8 ℃. Gradient elution of analytes was carried out with acetonitrile : water = 60:40 (0.1% formic acid +10 mM ammonium formate) (A2) and isopropanol : acetonitrile = 90:10 (0.1% formic acid +10 mM ammonium formate) (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 A (v/v) was used as follows: 0~5 min, 70~57% A2; 5~5.1 min, 57%~50% A2; 5.1~14 min, 50%~30% A2; 14~14.1 min, 30% A2; 14.1~21 min, 30%~1% A2; 21~24 min, 1% A2; 24~24.1 min, 1%~70% A2; 24.1~28 min, 70% A2.

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 35 000 进行全扫描，扫描范围 150~2 000，并采用 HCD 进行二级裂解，碰撞电压为 30 eV，同时采用动态排除去除无必要的 MS/MS 信息[2]。

The ESI-MSn experiments were executed on the Thermo Q Exactive Focus mass spectrometer with the spray voltage of 3.5 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 ℃. respectively. The Orbitrap analyzer scanned over a mass range of m/z 150-2 000 for full scan at a mass resolution of 35 000. Data dependent acquisition (DDA) MS/MS experiments were performed with HCD scan. The normalized collision energy was 30 eV. Dynamic exclusion was implemented to remove some unnecessary information in MS/MS spectra.

参考文献

1. Mónica Narváez-Rivas, Qibin Zhanga. Comprehensive untargeted lipidomic analysis using core–shell C30 particle column and high field orbitrap mass spectrometer. Journal of Chromatography A. 2016; 1440: 123-134.
2. A. Triebl et al. Lipidomics by ultrahigh performance liquid chromatography-highresolution mass spectrometry and its application to complexbiological samples. Journal of Chromatography B, 1053 (2017) 72–80.

实验报告负责人

代谢物提取 ： 【尚玉峰】

LC-MS 检测： 【张梦策】

报告撰写 ： 【张梦策】

报告质检 ： 【谢丽丽】

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