

## 工业生物技术

## 天蓝色链霉菌代谢物组测定方法优化及其代谢特征

李宜鸿<sup>1\*</sup>, 李珊珊<sup>2\*</sup>, 艾国民<sup>2</sup>, 王为善<sup>2</sup>, 张部昌<sup>1</sup>, 杨克迁<sup>2</sup>

1 安徽大学生命科学学院, 安徽 合肥 230601

2 中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

李宜鸿, 李珊珊, 艾国民, 等. 天蓝色链霉菌代谢物组测定方法优化及其代谢特征. 生物工程学报, 2014, 30(4): 554-568.

Li YH, Li SS, Ai GM, et al. Optimized sample preparation for metabolome studies on *Streptomyces coelicolor*. Chin J Biotech, 2014, 30(4): 554-568.

**摘要:** 链霉菌能够产生多种抗生素, 具有重要的研究与应用价值。代谢物组学能够定性和定量测定胞内外主要低分子量代谢产物。相对于其他组学, 代谢物组学在监控胞内代谢状态、指导物种理性改造方面具有独特优势。本文旨在建立一种快速、准确的链霉菌胞内代谢物分析方法。以模式菌株天蓝色链霉菌为研究对象, 基于GC-MS分析平台优化了代谢物组学样品制备流程中的细胞淬灭时间、菌体分离方法、代谢物提取及代谢物衍生化条件, 并利用该方法对天蓝色链霉菌不同生长时期各代谢途径的相对活性进行了初步分析。采用“低温淬灭 (-40 °C, 4 min) -快速过滤分离-反复冻融 (45 s/3 min) -衍生化 (40 °C, 90 min)”的流程能够鉴定出中心代谢途径 (糖酵解、戊糖磷酸途径和 TCA 循环)、氨基酸代谢途径、脂肪酸代谢途径、核酸代谢途径及部分次级代谢途径中的 103 种主要代谢物。利用该流程测定发现天蓝色链霉菌细胞生长周期中存在显著的代谢时序差异, 并且发现氨基酸与脂肪酸代谢在衔接初级代谢与次级代谢生物合成中具有重要作用。本研究建立的测定方法能够有效地用于天蓝色链霉菌胞内代谢物分析, 该方法将有助于深入刻画链霉菌细胞代谢过程, 为菌株代谢工程改造增加次级代谢产物产量提供理性指导。

**关键词:** 代谢物组, 天蓝色链霉菌, 初级代谢, 次级代谢

**Received:** September 9, 2013; **Accepted:** November 12, 2013

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 31300052), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2013CB734000).

**Corresponding author:** Keqian Yang. Tel/Fax: +86-10-64807459; E-mail: yangkq@im.ac.cn

Buchang Zhang. Tel/Fax: +86-551-63861965; E-mail: zhbc@ahu.edu.cn

\* These authors contributed equally to this study.

国家自然科学基金 (No. 31300052), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2013CB734000) 资助。

网络出版时间: 2013-12-03

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20131203.0918.001.html>

# Optimized sample preparation for metabolome studies on *Streptomyces coelicolor*

Yihong Li<sup>1\*</sup>, Shanshan Li<sup>2\*</sup>, Guomin Ai<sup>2</sup>, Weishan Wang<sup>2</sup>, Buchang Zhang<sup>1</sup>, and Keqian Yang<sup>2</sup>

<sup>1</sup> School of Life Science, Anhui University, Hefei 230601, Anhui, China

<sup>2</sup> State Key Laboratory of Microbial Resource, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

**Abstract:** *Streptomyces* produce many antibiotics and are important model microorganisms for scientific research and antibiotic production. Metabolomics is an emerging technological platform to analyze low molecular weight metabolites in a given organism qualitatively and quantitatively. Compared to other Omics platform, metabolomics has greater advantage in monitoring metabolic flux distribution and thus identifying key metabolites related to target metabolic pathway. The present work aims at establishing a rapid, accurate sample preparation protocol for metabolomics analysis in streptomycetes. In the present work, several sample preparation steps, including cell quenching time, cell separation method, conditions for metabolite extraction and metabolite derivatization were optimized. Then, the metabolic profiles of *Streptomyces coelicolor* during different growth stages were analyzed by GC-MS. The optimal sample preparation conditions were as follows: time of low-temperature quenching 4 min, cell separation by fast filtration, time of freeze-thaw 45 s/3 min and the conditions of metabolite derivatization at 40 °C for 90 min. By using this optimized protocol, 103 metabolites were finally identified from a sample of *S. coelicolor*, which distribute in central metabolic pathways (glycolysis, pentose phosphate pathway and citrate cycle), amino acid, fatty acid, nucleotide metabolic pathways, etc. By comparing the temporal profiles of these metabolites, the amino acid and fatty acid metabolic pathways were found to stay at a high level during stationary phase, therefore, these pathways may play an important role during the transition between the primary and secondary metabolism. An optimized protocol of sample preparation was established and applied for metabolomics analysis of *S. coelicolor*, 103 metabolites were identified. The temporal profiles of metabolites reveal amino acid and fatty acid metabolic pathways may play an important role in the transition from primary to secondary metabolism in *S. coelicolor*.

**Keywords:** metabolomics, *Streptomyces coelicolor*, primary metabolism, secondary metabolism

链霉菌能够产生众多具有生物活性的次级代谢产物, 具有重要的研究与应用价值。其模式生物天蓝色链霉菌 *Streptomyces coelicolor* 在 2002 年就已经完成基因组测序, 具有清晰的遗传背景<sup>[1]</sup>。同时, 该菌株能够产生具有颜色的红色次级代谢产物十一烷基灵菌红素 (Undecylprodigiosin, Red) 与蓝色次级代谢产物放线紫红素 (Actinohordin, Act)。因此, 该菌是研究抗生素生物合成调控和链霉菌代谢工程改造的理想

对象。

随着组学技术的发展, 系统生物学研究的地位日益显著。代谢物作为生物信息传递的终端层次, 在基因功能诠释和代谢状态分析等方面表现出了巨大的潜力。代谢物组学是一种通过定性定量测量生物体代谢产物的种类和浓度变化, 分析系列关联代谢物的综合差异, 从而发现生物系统对基因以及环境变化响应的研究方法<sup>[2-3]</sup>。由于代谢物组学能够从系统生物学的

高度集中阐释生物体代谢所反映的全部信息, 因此越来越多地受到科学家们的重视。代谢物组学在工业微生物领域的应用主要体现在以下几个方面: 快速识别微生物在培养过程中的生理与代谢特征<sup>[4]</sup>; 发现菌株新的代谢途径<sup>[5]</sup>; 从系统水平阐述微生物代谢调控机制<sup>[6]</sup>; 理性指导菌株改造、提高靶标代谢物的产量并指导发酵过程优化<sup>[7]</sup>等。在工业微生物领域, 代谢物组学的研究工作主要集中于酵母、大肠杆菌和枯草芽胞杆菌等模式微生物<sup>[6-9]</sup>。近期, 也有部分针对链霉菌的研究工作<sup>[9-10]</sup>。由于链霉菌可产生丰富的次级代谢产物, 而目前根据基因簇所获得的化合物信息仍然有限, 因此, 研究链霉菌胞外次级代谢物组, 可以发现新的次级代谢化合物, 并促进对次级代谢合成基因簇的认识<sup>[10]</sup>。此外, 代谢物组学也可以用于研究链霉菌对环境压力的响应机制<sup>[11]</sup>。这些研究工作表明, 对于具有复杂生理代谢的链霉菌而言, 代谢物组学这一研究手段可以发挥重要的作用。

代谢物组学研究依赖的技术平台主要有核磁共振 (NMR), 以及色谱-质谱联用, 包括气相色谱-质谱 (GC-MS)、液相色谱-质谱 (LC-MS) 和毛细管电泳-质谱 (CE-MS)。其中, 由于 GC-MS 具有灵敏度高、分辨率高和可选择性地

分离和检测大量痕量代谢物和同质异构体等优点, 成为微生物代谢物组学研究中应用最广泛的分析方法<sup>[12]</sup>。代谢物组学研究方法可分为 3 个主要部分: 样品制备、代谢物检测 and 数据分析 (图 1)。其中, 获得能够准确反映细胞瞬时状态的代谢物样品是该方法的关键环节。微生物生长条件和状态各异, 因此, 分离胞内外代谢物方法也有所不同。对于研究较多的大肠杆菌 (革兰氏阴性菌)、枯草芽胞杆菌 (革兰氏阳性菌) 和酵母菌 (真菌) 而言, 已有不少研究者对其代谢物组学样品制备方法进行了摸索优化<sup>[13-14]</sup>。对于链霉菌, 目前却仍无针对性的样品制备方法优化报道。由于获得能够准确捕捉代谢物信息的测试样品对研究链霉菌代谢行为及指导抗生素代谢工程具有重要意义, 因此有必要对链霉菌样品制备方法进行优化。

本工作以天蓝色链霉菌为研究对象, 对其代谢物组样品制备方法进行了系统优化, 并利用 GC-MS 分析平台分析了该菌株的主要代谢特征。此外, 本工作还利用优化的样品制备方法比较了天蓝色链霉菌 M145 在不同生长阶段各个代谢途径的相对强度, 找出了这些代谢途径和次级代谢生物合成的相关性, 可以为其他链霉菌的代谢物组分析工作提供参考。

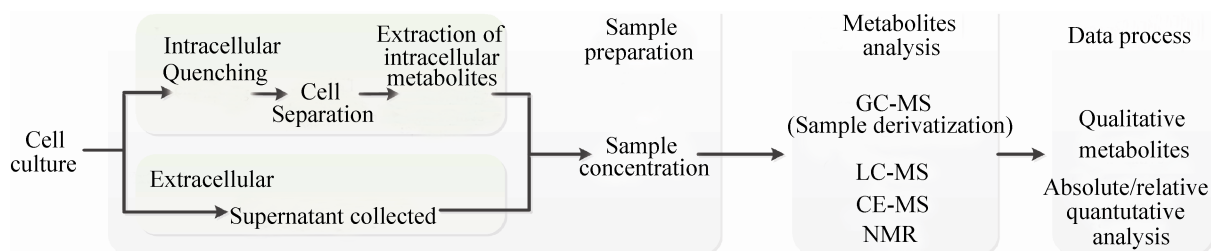


图 1 代谢物组学分析流程

Fig. 1 Flowchart for a standard protocol of metabolome analysis.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

本实验使用的菌株为天蓝色链霉菌 M145。

#### 1.1.2 试剂

衍生化试剂甲氧氨盐酸盐、N-甲基-N- (三甲基硅基) 三氟乙酰胺 (MSTFA), 以及内标物琥珀酸-2,2,3,3-d<sub>4</sub> 均购自 Sigma 公司。甲醇、吡啶和正己烷试剂均为色谱级别。其他试剂均为分析纯级别。

#### 1.1.3 主要仪器

Agilent GC-MS (Agilent 7896A/5975C GC/MS)、高速冷冻离心机 (Eppendorf 5415R)、超低温冰箱 (DW-86L626)、真空冷冻干燥机 (FD-1A-50)、真空泵 (GM-0.33a)、酶标仪 (Synergy H4 Hybrid Reader)、HPLC (Prominence LC-20AT)。

### 1.2 培养基及培养条件

#### 1.2.1 培养基

孢子培养基为 MS 培养基 (g/L): 黄豆粉 20, 甘露醇 20, Agar 20, 121 °C 灭菌 20 min。发酵培养基为 R2YE 培养基 (g/L): 蔗糖 103, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.25, MgCl<sub>2</sub> 10.12, 葡萄糖 10, 酸水解酪素 0.1, 酵母提取物 5, 微量元素 (ZnCl<sub>2</sub> 0.04, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.2, CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.01, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.01, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O 0.01, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.01) 2 mL, 蒸馏水 800 mL, 灭菌后加入 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mL, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 8 mL, L-proline 10 mL, NaOH 0.5 mL, 115 °C 灭菌 30 min。

#### 1.2.2 培养条件

将冻存于-80 °C 的孢子划线接种于 MS 培养

基, 于 28 °C 培养 4 d, 收集新鲜孢子接种于 R2YE 培养基中, 接种浓度为 4×10<sup>8</sup> 个孢子/100 mL 培养基, 28 °C、250 r/min 培养 6 d。

### 1.3 样品制备方法

取样后, 将 1 mL 菌液迅速离心 (4 °C、13 000×g) 10 min, 保留上清, 用于测定放线紫红素的产量, 收集的菌体用于测定十一烷基灵菌红素的产量。其余样品迅速低温淬灭后, 用于制备胞内代谢物样品。

#### 1.3.1 细胞淬灭

将细胞培养物按 1:4 的比例迅速加入 60% (V/V) 甲醇/水溶液中 (-40 °C 预冷 24 h), 摇匀后于-40 °C 静置 (按需要分别静置 2、4、6、8 和 10 min)。

#### 1.3.2 菌体分离

采用离心与快速过滤两种方法分离菌体。

1) 离心法: 将细胞淬灭物进行冷冻离心, (-9 °C, 2 000×g, 3 min), 弃上清并用 0 °C 预冷的去离子水洗涤菌体, 重复 3 次, 最后一次离心条件为-9 °C, 8 000×g, 5 min。2) 快速过滤法: 利用真空泵对细胞淬灭物进行快速过滤并用 0 °C 预冷的去离子水洗涤菌体 (1 min 内完成所有步骤)。将两种方法得到的菌体冻存于-80 °C。

#### 1.3.3 代谢物提取与浓缩

将收集的菌体利用液氮研磨, 收集 300 mg 粉末于 2 mL 离心管中, 加入 1 mL 50% (V/V) 甲醇/水溶液 (-40 °C 预冷 24 h), 剧烈振荡后迅速投入液氮中速冻, 设置速冻时间分别为 45 s、3 min 和 5 min, 之后于冰上融化, 重复 3 次。然后将混合物低温离心 (-9 °C, 13 000×g, 5 min), 取 800 μL 上清至 15 mL 离心管中。再向 2 mL 离心管中加入 500 μL 预冷的 50% (V/V)

甲醇/水溶液, 剧烈振荡后以相同的条件离心, 再将 500  $\mu\text{L}$  上清转移至 15 mL 离心管中, 并加入 20  $\mu\text{L}$  0.2 mg/mL  $\text{D}_4$ -琥珀酸作为内标。将抽提的代谢物溶液于  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  过夜冷冻后, 冻干 24 h。

### 1.3.4 代谢物衍生化

将冻干样品加入 50  $\mu\text{L}$  甲氧胺盐吡啶溶液 (20 mg/mL), 于水浴中加热 90 min ( $37\text{ }^\circ\text{C}$  或  $40\text{ }^\circ\text{C}$ ); 之后加入 80  $\mu\text{L}$  MSTFA 继续加热 90 min ( $37\text{ }^\circ\text{C}$ <sup>[15]</sup> 或  $40\text{ }^\circ\text{C}$ <sup>[16]</sup>), 得到 GC-MS 分析样品。

## 1.4 GC-MS 代谢物检测方法

色谱条件为: 气相色谱分析仪 Agilent 7890A, 色谱柱 DB-5MS (30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25  $\mu\text{m}$ , Agilent); 柱温箱升温程序  $70\text{ }^\circ\text{C}$  保持 2 min, 然后以  $5\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  升温至  $290\text{ }^\circ\text{C}$  并保持 3 min; 进样口及检测器温度均保持为  $250\text{ }^\circ\text{C}$ ; GC-MS 接口温度为  $280\text{ }^\circ\text{C}$ ; 载气为 He 气, 流速 1.0 mL/min; 样品进样量为 1  $\mu\text{L}$ , 分流比为 20:1。质谱条件: 质谱仪 Agilent 5975C MSD System; 电子轰击电离 (EI+源), EI+源温度  $250\text{ }^\circ\text{C}$ , 轰击能量 eV, 离子电流 40  $\mu\text{A}$ ; 扫描分子量范围 25–650; 扫描速度 2 scan/second。

## 1.5 其他分析方法

### 1.5.1 采用二苯胺法<sup>[17]</sup>确定生物量

收集 1 mL 发酵液, 离心去上清后用 SET 缓冲液洗 1 次, 离心去上清; 将菌体重悬于 2 mL 二苯胺试剂中,  $60\text{ }^\circ\text{C}$  水浴 1 h, 之后离心取上清测定  $OD_{595}$ 。每个样品设置 3 个生物学重复。

### 1.5.2 放线紫红素产量测定方法

收集 1 mL 发酵液,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $10\,000\times g$  离心取上清, 加入终浓度 1 mol/L 的 KOH, 离心取上清, 利用酶标仪测定  $OD_{640}$ 。根据该波长下的摩

尔吸光系数 ( $\epsilon_{640}=25\,320$ ) 计算 Act 产量<sup>[18]</sup>。每个样品设置 3 个生物学重复。

### 1.5.3 十一烷基灵菌红素产量测定

收集 1 mL 发酵液,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $10\,000\times g$  离心收集菌体, 1 mol/L HCl 洗涤菌体 2 次, 1 mL 甲醇萃取, 离心取上清, 利用酶标仪测定  $OD_{530}$ , 根据该波长下的摩尔吸光系数 ( $\epsilon_{530}=100\,500$ ) 计算 Red 产量<sup>[19]</sup>。每个样品设置 3 个生物学重复。

### 1.5.4 数据处理方法

代谢物数据的相对定量是根据总离子流峰进行的。代谢物组分的获得方法是将由 Agilent 7890/5975C MSD System 采集的原始数据导入解卷积软件 AMDIS 中分析得到。将解卷积后的数据与 NIST 8.0 库、Fiehn 代谢物数据库进行比对搜索得到相应的代谢物 (检索匹配度要求高于 80)。进一步结合 METLIN 数据库和 KEGG 数据库对代谢物所属途径进行分类。将质谱峰面积分别对各样品的生物量和内标物的峰面积进行归一化, 获得胞内代谢物的相对浓度。每个样品设置 3 个生物学重复。分别选择对数期和稳定期的胞内代谢物样品中检测到的部分代谢物, 以及胞外 Act 产量为例, 利用 *t*-test 检验样品间的差异显著性。

## 2 结果

### 2.1 样品数据的重复性检测

为了获得精确的数据, 实验初始首先对 GC-MS 仪器检测的重复性进行了考察。以内标物  $\text{D}_4$ -琥珀酸为例, 分别进样 3 次, 其出峰时间分别为 16.160、16.162 和 16.171 min, 这个结果表明仪器的重复性很好。

为了检验不同生物学样品的重复性, 本实验取 24 h 和 72 h 的 3 个样品所采集到的数据进

行了比较。将胞内代谢物数据进行归一化后,随机抽取不同胞代谢物的总离子流质谱峰面积,以及胞外代谢产物 Act 的浓度。如表 1 所示,3 个生物学样品的  $P$ -value 均大于 0.1,表明样本间的差异不显著,所取的 3 个生物学样品的重复性良好,可用于后续数据分析。

## 2.2 不同样品处理条件对代谢物提取的影响

### 2.2.1 细胞淬灭时间优化

细胞淬灭能够及时终止胞内的代谢活动,是获得能够准确反映细胞瞬时生理状态的代谢物样品的关键环节。本研究以冷甲醇水为淬灭溶剂,着重研究了淬灭时间对代谢物提取的影响。迅速从同一培养瓶中取 5 份天蓝色链霉菌 M145 的对数中期培养物 (30 h),并同时分别与 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷的 60% (V/V) 甲醇水按 1:4 体积混合,置于 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 分别静置 2、4、6、8 和 10 min,然后提取代谢物后进行 GC-MS 分析。结果如图 2 所示,淬灭时间为 2 min 时,提取到的代谢物组分数为  $(272\pm 13)$ ,当淬灭时间延

长至 4 min 时,提取到的代谢物组分数目最多,达到 356 个。然而继续延长淬灭时间代谢物组分数则会显著下降,10 min 时仅有  $(110\pm 8)$  个,较 4 min 时降低 69.1%。此外,如图 2 所示,将总离子流 (TIC) 峰面积设置为  $10^5$  时,淬灭 4 min 时所获得的代谢物 TIC 峰面积大于该值的代谢物数目分别较其他 4 个时间点多 46% (2 min)、29% (6 min)、68% (8 min) 和 89% (10 min)。这些数据表明 4 min 是天蓝色链霉菌淬灭效果最好的时间段。

### 2.2.2 细胞分离条件优化

快速干净地分离菌体与淬灭液和胞外代谢物的混合物,能够减少胞内代谢物损失和外界杂质干扰。对比低温离心与快速抽滤两种方法,结果显示针对同一天蓝色链霉菌 M145 样品,快速抽滤可得到  $(373\pm 9)$  个组分峰,较低温离心法提取的组分峰数目  $(312\pm 12)$  高 19.6%。此外,抽滤法得到的 TIC 峰面积大于  $10^5$  的代谢物数目较低温离心法高 65%。

表 1 样品生物学重复检验

Table 1 Significance test of different biological samples

Metabolite	Normalized TIC area (24 h)					Normalized TIC area (72 h)				
	1	2	3	Average	$P$ -value <sup>a</sup>	1	2	3	Average	$P$ -value
l-valine	8 434	7 878	5 746	7 352.74	0.920	2 109	2 829	2 839	2 592.35	0.526
l-ananine	7 415	8 775	11 851	9 346.80	0.890	2 592	2 125	1 773	2 163.44	0.448
l-leucine	3 625	4 338	2 804	3 588.88	0.661	1 301	936	1 064	1 100.52	0.439
l-isoleuine	3 144	4 013	3 544	3 566.98	0.557	994	901	971	955.35	0.380
l-serine	4 016	4 078	5 266	4 453.62	0.453	1 123	1 569	1 280	1 324.27	0.579
l-threonine	8 184	7 407	6 874	7 488.58	0.640	2 976	2 512	2 204	2 563.89	0.676
Act (mg/L)	5.00	5.86	5.63	5.50	0.530	6.14	7.00	6.11	6.42	0.816

<sup>a</sup> $P$ -value $<0.1$ , significant;  $P$ -value $<0.05$ , very significant.

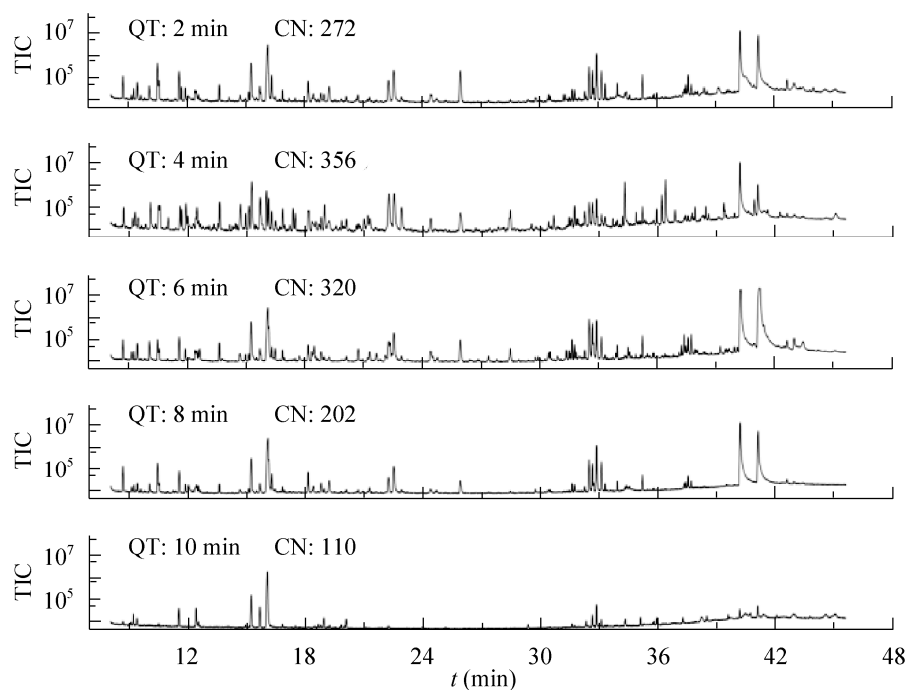


图 2 不同淬灭时间对代谢物提取的影响

Fig. 2 Impact of quenching times on the extration of metabolites. QT: quenching time; CN: number of metabolite components; TIC: total ion chromatogram.

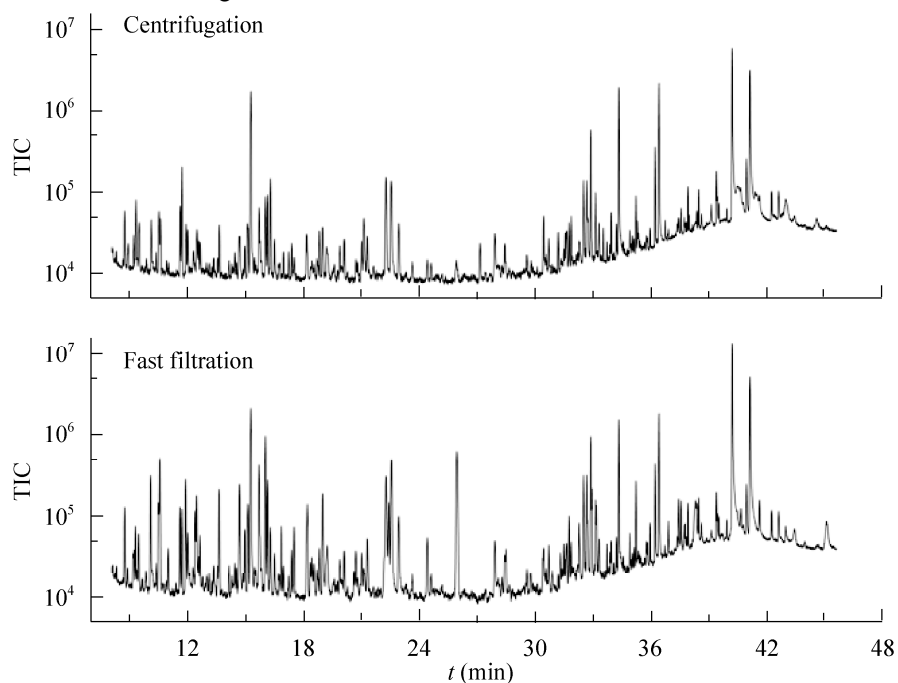


图 3 不同菌体分离方式对代谢物提取的影响

Fig. 3 Impact of different cell separation methods on metabolite extraction after quenching. TIC: total ion chromatogram.

### 2.2.3 代谢物提取条件的优化

实验进一步优化了天蓝色链霉菌代谢物提取条件。为了使代谢物充分释放,采用液氮研磨的方式对细胞壁进行破坏,利用 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷的50% (V/V) 甲醇水多次抽提及液氮-冰水反复冻融提取代谢物。实验比较了不同的液氮速冻时间(45 s、3 min 和 5 min) 对代谢物提取的影响,结果表明 45 s 的速冻时间能够检测到  $(464\pm17)$  种代谢物组分,而延长速冻时间至 3 min 和 5 min 则会导致代谢物组分分别较 45 s 减少 24.8%和 28.7%。此外,45 s 液氮速冻时间获得的代谢物中,TIC 峰面积大于  $10^5$  的数目较其他两个时间点分别高 27%和 59%。这些结果表明在液氮中速冻 45 s 而后在冰上融化是反复冻融的较好条件。

### 2.2.4 代谢物衍生化条件的优化

提取获得胞内代谢物后,衍生化过程能够增加代谢物的稳定性并降低其沸点,有利于 GC-MS 检测胞内代谢物。本工作比较了  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  和  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  两个温度条件下衍生化试剂的衍生效率,结果显示, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  处理代谢物分别与甲氧胺盐和 MSTFA 反应 90 min,仍有 13.7%的代谢物仅被部分衍生化。而在  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  处理下,试剂的衍生化效率可达到 96.7%。

### 2.3 GC-MS 可检测代谢物在天蓝色链霉菌代谢网络中的覆盖度

本工作对利用上述优化条件制备的代谢物样品进行了 GC-MS 检测,结果如表 2 所示。在能够检测到的 400 多个组分峰中,通

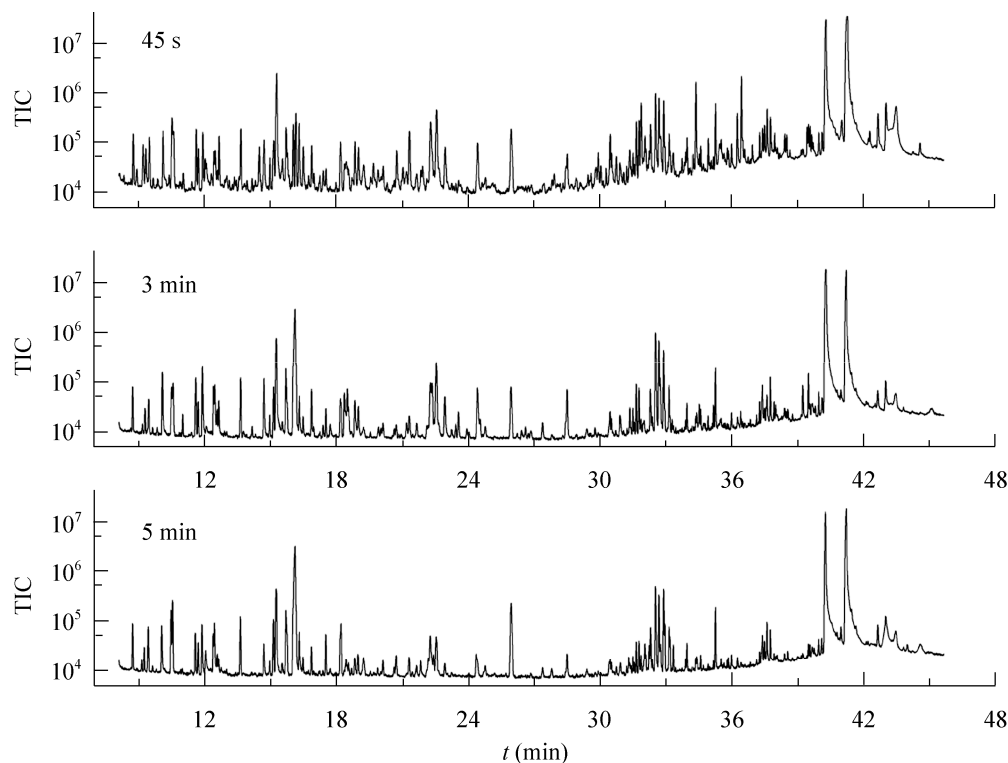


图 4 不同液氮速冻时间对代谢提取的影响

Fig. 4 Impact of the different freeze-thaw times in liquid nitrogen on metabolite extraction. TIC: total ion chromatogram.



表 2 GC-MS 检测到的胞内代谢物

Table 2 Intracellular metabolites identified by GC-MS

Name	Pathway <sup>a</sup>	Name	Pathway
l-valine	Amino acid biosynthesis	$\beta$ -d-galactofuranose	Galactose metabolism
l-alanine	Amino acid biosynthesis	$\alpha$ -d-galactopyranose phosphate	Galactose metabolism
l-isoleuine	Amino acid biosynthesis	5-oxoproline	Glutathione metabolism
N-acetyl lysine	Amino acid biosynthesis	Glycerol	Glycerolipid metabolism
l-threonine	Amino acid biosynthesis	Glyceryl phosphate	Glycerolipid metabolism
l-proline	Amino acid biosynthesis	$\beta$ -hydroxypyruvic acid	Glycine, serine and threonine metabolism
Glycine	Amino acid biosynthesis	Dihydroxyacetone phosphate	Glycolysis/gluconeogenesis
l-serine	Amino acid biosynthesis	Imidazoleacetic acid	Histidine metabolism
2-keto valeric acid	Amino acid biosynthesis	D-myo-inositol-1-phosphate	Inositol phosphate metabolism
l-methionine	Amino acid biosynthesis	Cadaverine	Lysine degradation
l-aspartic acid	Amino acid biosynthesis	2-oxoadipic acid	Lysine degradation
l-asparagine	Amino acid biosynthesis	Niacin (nicotinic acid)	Nicotinate and nicotinamide metabolism
l-phenylalanine	Amino acid biosynthesis	Lyxose	Pentose and glucuronate interconversions
l-glutamine	Amino acid biosynthesis	Ribitol	Pentose and glucuronate interconversions
l-lysine	Amino acid biosynthesis	D-ribose	Pentose phosphate pathway
l-tyrosine	Amino acid biosynthesis	D-ribose 5-phosphate	Pentose phosphate pathway
l-norleucine	Amino acid biosynthesis	D-ribulose 5-phosphate/d-xylulose 5-phosphate	Pentose phosphate pathway
l-leucine	Amino acid biosynthesis	D-erythrose 4-phosphate	Pentose phosphate pathway
Putrescine	Arginine and proline metabolism	6-phosphogluconic acid	Pentose phosphate pathway
DL-ornithine	Arginine and proline metabolism	Hydroxymethylphosphonate	Phosphonate and phosphinate metabolism
Gulonolactone	Ascorbate and aldarate metabolism	$\beta$ -d-glucopyranose	Phosphotransferase system
Salicin	Biosynthesis of phenylpropanoids	D-glucose	Phosphotransferase system
1-hexanol	Caprolactam degradation	Glucopyranose	Phosphotransferase system
Resorcinol	Chlorocyclohexane and Chlorobenzene degradation	$\alpha$ -d-glucopyranose	Phosphotransferase system
Glycolic acid	Chlorocyclohexane and Chlorobenzene degradation	D-glucose 6-phosphate	Phosphotransferase system
Pyruvate	Citrate cycle	Adenine	Purine metabolism
Succinate	Citrate cycle	Inositol, scyllo-	Purine metabolism
Fumaric acid	Citrate cycle	D-chiro-inositol	Purine metabolism
DL-malic acid	Citrate cycle	Guanine	Purine metabolism

续表 2

Citric acid	Citrate cycle	Inosine	Purine metabolism
(r)-(+)-2-pyrrolidone-5-carboxylic acid	D-glutamine and d-glutamate metabolism	Uracil	Pyrimidine metabolism
Tetradecanoic acid	Fatty acid biosynthesis	Thymine	Pyrimidine metabolism
Tetradecanoic acid (iso)	Fatty acid biosynthesis	Lactate	Pyruvate metabolism
Pentadecanoic acid	Fatty acid biosynthesis	Hexofuranuronate	Starch and sucrose metabolism
Hexadecanoic	Fatty acid biosynthesis	D-fructose	Starch and sucrose metabolism
Hexadecanoic (iso)	Fatty acid biosynthesis	Sucrose	Starch and sucrose metabolism
Octadecanoic acid	Fatty acid biosynthesis	Maltose	Starch and sucrose metabolism
Octadecanoic acid (iso)	Fatty acid biosynthesis	Estrone	Steroid hormone biosynthesis
D-erythrose	Fiehn database	2-c-methyl-d-erythritol 4-phosphate(mep)	Terpenoid backbone biosynthesis
Estradiol methyl ether	Fiehn database	5-hydroxytryptophan	Tryptophan metabolism
Eicosane	Fiehn database	3-hydroxypyridine	/
(e)-3-hexenedioic acid	Fiehn database	N,n-diethylcarbamate	/
Heptacosane	Fiehn database	2-isopropoxyphenol	/
Mg (16:0/0:0/0:0)	Fiehn database	5-oxymethyl-2-pyrrolidinethione	/
Mg (18:0/0:0/0:0)	Fiehn database	Succinylacetone	/
Quinaldic acid	Fiehn database	3-methylbutanol	/
methylsuccinic acid	Fiehn database	D-arabinose	/
(s)-2-hydroxyglutarate	Fiehn database	Arabinofuranose	/
D-mannose	Fructose and mannose metabolism	2-deoxy-ribonic acid	/
D-mannitol	Fructose and mannose metabolism	D-leucic acid	/
D-mannose 1-phosphate	Fructose and mannose metabolism	Glucuronolactone	/
D-galactose	Galactose metabolism		

<sup>a</sup>The pathway classification was determined based on KEGG and Fiehn database: <http://fiehnlab.ucdavis.edu/Metabolite-Library-2007>.

过与 NIST、METLIN、Fiehn 代谢物谱库以及分析，能够精确匹配糖酵解、戊糖磷酸途径、柠檬酸循环、氨基酸、脂肪酸及脂类、肌醇代谢、核酸代谢、糖苷类代谢、辅因子、甾醇、激素和萜类等代谢途径中的 103 个代

谢物。

在大肠杆菌、枯草芽胞杆菌和酵母菌的代谢物组学研究中，一般能够检测到覆盖以上代谢途径的 80–100 个代谢物即能满足比较代谢物组学分析的要求<sup>[6-20]</sup>。因此我们认为利用我们建

立的研究方法以及现有的质谱平台,也能够满足链霉菌代谢物组学相关研究。

## 2.4 天蓝色链霉菌细胞代谢的时序分析

建立了链霉菌代谢物组学研究方法后,为了解析链霉菌初级代谢和次级代谢的关联,我们对天蓝色链霉菌不同生长阶段部分代谢途径的相对强度进行了分析。首先,在 R2YE 液体培养基中测定了天蓝色链霉菌的生长曲线和次级代谢产物十一烷基灵菌红素和放线紫红素的产生曲线(图 5)。可以看出,当菌体生长进入稳定期后,次级代谢产物十一烷基灵菌红素才开始产生(约 48 h),而放线紫红素的产生时间更滞后(约 72 h)。于是,根据前面建立的分析方法,选取对数前期(18 h)、对数期(30 h)、稳定前期(48 h)和稳定后期(72 h)4 个时间

点分析该菌株的代谢时序差异。结果如图 6 所示,可以发现糖酵解途径、磷酸戊糖途径(PPP)和三羧酸循环(TCA)在对数期有相对较高的代谢强度,而在次级代谢生物合成的稳定期(72 h),这些途径急剧减弱,可检测到的代谢物相对浓度仅有对数期(30 h)的 1%–16%;而可检测到的一些氨基酸相对于糖酵解途径和 TCA 循环下降趋势较缓;与以上途径的相对强度趋势显著不同,相对于对数期和稳定后期,一些脂肪酸不仅在稳定前期浓度相对较高,而且在稳定后期的下降也相对缓慢,72 h 代谢物浓度仍可达到 30 h 的 63%–77%。这些结果表明,在链霉菌中部分氨基酸途径和脂肪酸途径可能充当了初级代谢和次级代谢转换的桥梁。

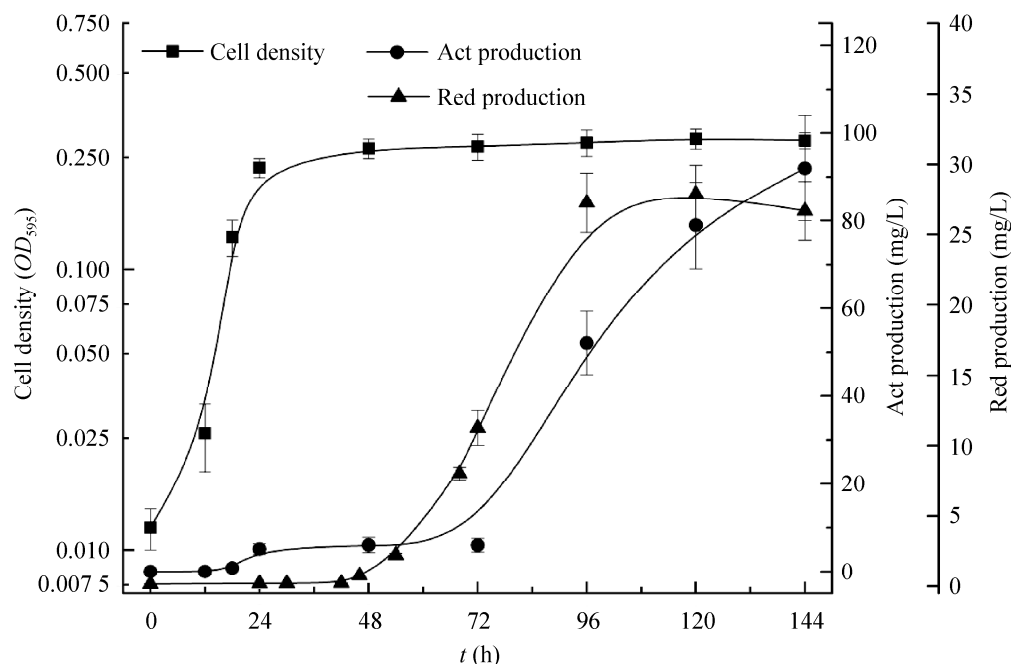


图 5 天蓝色链霉菌 M145 生长曲线、放线紫红素和十一烷基灵菌红素合成曲线

Fig. 5 Growth curve (■), and production curves of undecylprodigiosin (▲), actinohordoin (●) of *S. coelicolor* M145.

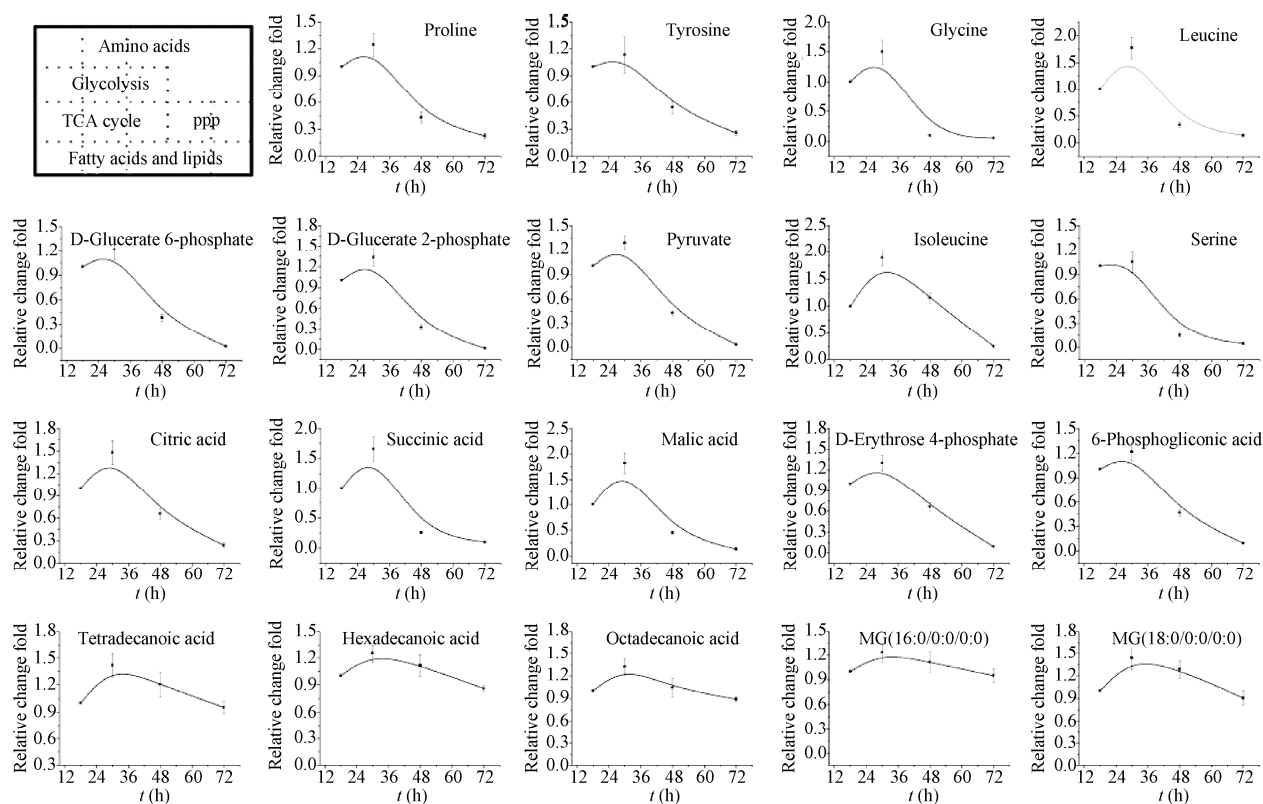


图6 天蓝色链霉菌 M145 主要胞内代谢物的时序变化特征

Fig. 6 Temporal profiles of different metabolites in *S. coelicolor* M145.

### 3 讨论

链霉菌作为抗生素的重要工业产生菌，其代谢工程改造提高抗生素产量具有重要意义。在工程菌改造过程中，代谢物组学作为一种系统的研究手段，在目的产物相关代谢物的发现中具有无与伦比的优势。为了方便代谢物组学在链霉菌研究中的应用，本文对天蓝色链霉菌代谢物组学样品制备方法进行了一些摸索。由于链霉菌与其他细菌生长状态不同，会在液体培养基中形成菌丝团。这要求我们在制备准确反映细胞瞬时生理状态的代谢物时，不能采取和大肠杆菌、枯草芽胞杆菌等相同的方法，所

以本文主要对链霉菌代谢物样品制备步骤进行了系统优化。

细胞淬灭能够及时终止胞内的代谢活动，是获得能够准确反映细胞瞬时生理状态的代谢物样品的关键环节。已有研究比较了各种淬灭溶剂对不同菌株代谢物提取的影响，并证明冷甲醇水对多种菌株具有较好的淬灭效果<sup>[13-21]</sup>。目前有关链霉菌代谢物组学的研究也多采用冷甲醇水为细胞淬灭剂<sup>[22-23]</sup>。由于淬灭剂会对细胞壁产生严重的破坏作用，因此严格控制淬灭时间防止导致胞内代谢物渗漏非常重要。然而目前并无相关研究考察以冷甲醇水为淬灭溶剂时，淬灭时间对链霉菌代谢物提取的影响。本

研究发现,冷甲醇水的低温( $-40^{\circ}\text{C}$ )淬灭时间维持在 4 min 时能够较好地保证及时终止链霉菌胞内的代谢活动,获得较多的代谢物。淬灭时间较短不能充分终止反应,而时间较长时,由于细胞壁受损严重导致胞内代谢物大量渗漏,致使获得的代谢物数目显著降低(图 2)。此外,通过比较不同的菌体分离方法,发现快速抽滤法提取得到的代谢物质量优于离心分离法,产生这种结果的原因可能有两点:一,在离心过程中,细胞与淬灭溶剂接触时间较长,胞内代谢物与溶剂充分交换,导致大量渗漏;二,淬灭后的细胞壁非常脆弱,离心和洗涤过程产生的剪切力引发菌丝断裂,造成代谢物渗漏。相对而言,快速过滤时间短暂,可以避免胞内代谢物向溶剂大量扩散,此外该方法还可以避免剪切力对细胞损伤,减少代谢物渗漏。液氮反复冻融是提取胞内代谢物的主要方法<sup>[23-24]</sup>,然而,对于具有较厚细胞壁的革兰氏阳性菌及真菌,反复冻融法通常不能充分提取胞内代谢物<sup>[8]</sup>。为了解决这一问题,我们采取了液氮研磨加反复冻融的提取方法。此外,研究还发现反复冻融的过程中较长的液氮速冻时间反而不利于代谢物的获得,这一现象的原因仍不确定。最后研究了温度对代谢物衍生率的影响,发现 $40^{\circ}\text{C}$ 条件下衍生化效率较 $37^{\circ}\text{C}$ 高。通过对各样品制备环节进行比较优化,最终得到最适合天蓝色链霉菌代谢物分析样品的制备方法。

通过我们建立的方法成功得到 400 多个天蓝色链霉菌代谢物组分后,利用已有的 NIST、MTEALIN 和 Fiehn 代谢物数据库,参考相关文献并与 KEGG 数据库中该菌株的代谢途径相匹配,确定出 103 个能与代谢途径精确匹配的代

谢物。目前并无针对链霉菌胞内代谢物样品制备方法的详细研究,而利用现有的文献方法制备的代谢物样品,组分也主要集中于氨基酸及其衍生物和部分脂肪酸及脂类<sup>[23-25]</sup>,少于本文方法所获得的组分种类。此外,其他未确定组分主要可分为两部分,一部分是与谱库中匹配度较低,只根据代谢物的精确质量数并不能定性;另一部分是天蓝色链霉菌的代谢途径数据库中并未收集该化合物信息。链霉菌不同于其他细菌,除了初级代谢,还存在大量的次级代谢基因簇,例如天蓝色链霉菌有 23 个次级代谢基因簇,这些基因簇的编码产物以及中间代谢物上没有相关的精确质谱信息,因此在链霉菌代谢物组学研究中,代谢物的精确匹配、归属仍存在较大挑战。

利用建立的链霉菌代谢物组学样品制备方法,我们对天蓝色链霉菌各个代谢途径在不同生长阶段的相对强度进行了分析,在代谢物层面上发现了链霉菌初级代谢相关途径(糖酵解途径、戊糖磷酸途径和 TCA 循环)和次级代谢的生物合成存在明显的时间差。而介于此时间差之间的是一些氨基酸和脂类物质的代谢物处于较高水平,所以我们推测可能是一些氨基酸和脂类相关途径在链霉菌生长周期中承担了衔接初级代谢和次级代谢的角色。

## REFERENCES

- [1] Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 2002, 417(6885): 141-147.
- [2] Kell DB. Metabolomics and systems biology: making sense of the soup. *Curr Opin Microbiol*,

- 2004, 7(3): 296–307.
- [3] Wang QZ, Wu CY, Chen T, et al. Integrating metabolomics into a systems biology framework to exploit metabolic complexity: strategies and applications in microorganisms. *Appl Microbiol Biotech*, 2006, 70(2): 151–161.
- [4] Dietmair S, Hodson MP, Quek LE, et al. Metabolite profiling of CHO cells with different growth characteristics. *Biotech Bioeng*, 2012, 109(6): 1404–1414.
- [5] Trushina E, Dutta T, Persson XMT, et al. Identification of altered metabolic pathways in plasma and csf in mild cognitive impairment and alzheimer's disease using metabolomics. *PLoS ONE*, 2013, 8(5): e63644.
- [6] Yuan J, Doucette CD, Fowler WU, et al. Metabolomics-driven quantitative analysis of ammonia assimilation in *E. coli*. *Mol Syst Biol*, 2009, 5: 302.
- [7] Xia ML, Huang D, Li SS, et al. Enhanced FK506 production in *Streptomyces tsukubaensis* by rational feeding strategies based on comparative metabolic profiling analysis. *Biotech Bioeng*, 2013, DOI:10.1002/bit.24941.
- [8] Kim S, Lee do Y, Wohlgemuth G, et al. Evaluation and optimization of metabolome sample preparation methods for *Saccharomyces cerevisiae*. *Anal Chem*, 2013, 85(4): 2169–2176.
- [9] Bergdahl B, Heer D, Sauer U, et al. Dynamic metabolomics differentiates between carbon and energy starvation in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* fermenting xylose. *Biotechnol Biofuels*, 2012, 5(1):34.
- [10] Cheng JS, Liang YQ, Ding MZ, et al. Metabolic analysis reveals the amino acid responses of *Streptomyces lydicus* to pitching ratios during improving streptolydigin production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(13): 5943–5954.
- [11] Sidebottom AM, Johnson AR, Karty JA, et al. Integrated metabolomics approach facilitates discovery of an unpredicted natural product suite from *Streptomyces coelicolor* M145. *ACS Chem Biol*, 2013, 8(9): 2009–2016.
- [12] Li J, Ren LJ, Sun GN, et al. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and its application in metabonomics. *Chin J Biotech*, 2013, 29(4): 434–446 (in Chinese).  
李娟, 任路静, 孙冠男, 等. 气相色谱-质谱联用技术及其在代谢组学中的应用. *生物工程学报*, 2013, 29(4): 434–446.
- [13] Winder CL, Dunn WB, Schuler S, et al. Global metabolic profiling of *Escherichia coli* cultures: an evaluation of methods for quenching and extraction of intracellular metabolites. *Anal Chem*, 2008, 80(8): 2939–2948.
- [14] Bolten CJ, Kiefer P, Letisse F, et al. Sampling for metabolome analysis of microorganisms. *Anal Chem*, 2007, 79(10): 3843–3849.
- [15] Krall L, Huege J, Catchpole G, et al. Assessment of sampling strategies for gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) based metabolomics of cyanobacteria. *J Chromatogr B*, 2009, 877(27): 2952–2960.
- [16] Maud MK, Bas M, Mariet J, et al. Microbial metabolomics with gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Chem*, 2006, 78(4): 1272–1281.
- [17] Zhao Y, Xiang S, Dai X, et al. A simplified diphenylamine colorimetric method for growth quantification. *Appl Microbiol Biotech*, 2013, 97(11): 5069–5077.
- [18] Ryu YG, Butler MJ, Chater KF, et al. Engineering of primary carbohydrate metabolism for increased production of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(11): 7132–7139.
- [19] Strauch E, Takano E, Baylts HA, et al. The stringent response in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol*, 1991, 5(2): 289–298.
- [20] Amador-Noguez D, Brasg IA, Feng XJ, et al. Metabolome remodeling during the acidogenic-solventogenic transition in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol*, 77(22): 7984–7997.

- [21] Villas-Boas SG, Hojer-Pedersen J, Akeson M, et al. Global metabolite analysis of yeast: evaluation of sample preparation methods. *Yeast*, 2005, 22(14): 1155–1169.
- [22] Jankevics A, Merlo ME, de Vries M, et al. Metabolomic analysis of a synthetic metabolic switch in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Proteomics*, 2011, 11(24): 4622–4631.
- [23] Kol S, Merlo ME, Scheltema RA, et al. Metabolomic characterization of the salt stress response in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(8): 2574–2581.
- [24] Wentzel A, Sletta H, Consortium S, et al. Intracellular metabolite pool changes in response to nutrient depletion induced metabolic switching in *Streptomyces coelicolor*. *Metabolites*, 2012, 2(1): 178–194.
- [25] Li Y, Florova G, Reynolds KA. Alteration of the fatty acid profile of *Streptomyces coelicolor* by replacement of the initiation enzyme 3-ketoacyl acyl carrier protein synthase III (FabH). *J Bacteriol*, 2005, 187(11): 3795–3799.

(本文责编 郝丽芳)

## 化学工业出版社书讯

### 现代生物技术——万能灵药，还是新潘多拉魔盒？



作者：(荷)J.特兰珀、朱阳 著；于洁、李寅、朱阳 译

ISBN：9787122174994

定价：49.0 元

开本：16 装帧：平装 页码：248

初版时间：2013 年 10 月

读者对象：可供生物类专业的本科生及其他专业拟了解该技术的人士阅读参考。

#### 内容介绍

现代生物技术在解决人类社会面临的人口、健康、资源和环境等重大问题上表现出了巨大的应用潜力。然而，与历史上任何新兴技术面世的时候一样，广大民众对现代生物技术这样一种新兴高技术的内涵并不清楚，因此容易产生怀疑、误解，甚至恐惧，阻碍了现代生物技术的正常发展和应用。

为了更好地认识现代生物技术的科技内涵，本书以现代生物技术在食品和医疗领域的发展和应用为主线，希望以事实为依据，为读者提供一个丰富且可靠的信息来源，从而消除偏见，正确判断现代生物技术对人类带来的是福音还是灾难。

本书共分 4 部分。第一部分是引言，重点介绍了现代生物技术的双面性。第二部分“日常饮食”，分别从奶酪、烘烤食品、葡萄酒、生物技术肉制品和所谓“妖魔食品”等入手，阐述生物技术和各种日常饮食之间的渊源。第三部分“健康也有极限”，则从抗生素、荷尔蒙、基因治疗、异种器官移植、人类基因组计划和干细胞治疗等 6 个与健康与医学相关的方面，分析现代生物技术与人类的密切关系。最后一部分是“尾声”，希望给读者留下一个印象和认识：“生物技术不一定是有害的！”

本书主要选材于日常生活中与现代生物技术密切相关的实例，所参考的文献多来自《自然》、《科学》等国际知名期刊或杂志，将专业的理解和大众的视角结合起来，向人们介绍现代生物技术的基本原理及其利弊；语言通俗易懂，大量使用简明易懂的插图和插页，深入浅出地解释生物技术的热门话题。

订购方式：网上购书

化工出版社: <http://shop.cip.com.cn/product/20131001/283979787122174994.html>