



气质联用法(GC-MS)检测禾谷镰刀菌代谢指纹分析

项 萍,唐 喆

(西北农林科技大学 植物保护学院,陕西杨凌 712100)

摘 要 代谢指纹分析(Metabolic fingerprint analysis)是代谢组学研究的重要分析模式,广泛应用于各类动植物的非靶标的代谢产物的探索研究中,其在真菌微生物方面的研究却很少。采用气质联用法(GC-MS)对衍生化后的禾谷镰刀菌样品进行指纹图谱分析,比较不同培养时间、培养环境、不同衍生化方法对代谢产物的影响,选择最佳条件,鉴定出 63 种代谢产物。这为真菌类物质的代谢组学研究提供了参考依据。

关键词 禾谷镰刀菌;气质联用法;代谢产物;衍生化

中图分类号 S132

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2020)03-0444-07

小麦赤霉病是世界范围内流行性病害,会导致粮食减产和品质下降。染病作物产生的脱氧雪腐镰刀菌烯醇(即呕吐毒素 DON)对人畜有很大的毒害作用,直接对人畜健康和生命安全构成威胁^[1-2]。禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum* Schw.)是小麦赤霉病的主要致病菌^[3-4],科学家们对禾谷镰刀菌的生长习性、毒素分泌、致病机理、侵染小麦的机理等多个方面进行研究,以期通过生物学方法解决赤霉病害。近年来,代谢组学^[5]概念的提出为研究者提供了新的思路,代谢组学主要研究生物体对病理生理刺激或基因修饰所产生代谢物的质和量的动态变化规律。这种整体研究模式可以全面了解代谢物质在疾病发生、发展过程中的变化规律,利用代谢组学分析手段研究真菌基因功能可以丰富真菌基因鉴定的手段,进一步了解抗病机制,最终达到防治病害的目的^[6]。

代谢指纹分析(Metabolite fingerprinting analysis)^[7-9]是代谢组学研究的方法之一,主要是运用某一种或多种不同的分析手段对细胞内大量代谢物进行扫描分析。代谢指纹分析常用的分析手段有核磁共振(NMR)、傅氏变换红外光谱(FT-IR)以及与 MS 相联用的气相色谱质谱联用(GC-MS)、液相色谱质谱联用(LC-MS)、高效液

相色谱质谱联用(UPLC-MS)等^[10],其中 GC-MS 可用于分析挥发性的有机物以及衍生化以后具有挥发性的初级代谢物^[11],并且基于 GC-MS 具有广泛成熟的数据库便于检索确定物质组成。本研究建立了 GC-MS 检测分析禾谷镰刀菌代谢产物方法,采用 2 种衍生化方法进行检测,并对代谢产物指纹图谱进行分析,为禾谷镰刀菌致病机理研究提供参考,为真菌类物质的代谢组学分析提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

GCMS-QP2010 气相色谱-质谱仪(Aoc-20i 自动进样器、色谱柱型号(Rxi-5ms,30 m×0.25 mm×0.25 μm,岛津公司),SOH-72E 高温分解干燥箱(Smart lab 公司),Sep-Pak C18 固相萃取柱(6 mL 500 mg, Waters 公司),GY-DCY-24S 氮吹仪(海归永电子有限公司),Vortex-Genie2 涡旋震荡器(Scientific Industries 公司),0.45 μm 玻璃纤维滤膜(美国 PALL 公司)。

吡啶(色谱纯, Sigma 公司)、氯甲酸甲酯(MCF)(分析纯 Sigma 公司)、三甲基硅烷咪唑(TMSI)(分析纯, Fluka 公司)、三甲基氯硅烷(TMCS)(色谱纯, Sigma 公司)、异辛烷(色谱纯,

收稿日期:2019-06-20 修回日期:2019-09-17

基金项目:陕西省重点研发计划(2018NY-107)。

第一作者:项 萍,女,硕士,实验师,研究方向为植物代谢组学。E-mail:xiangp02@163.com

通信作者:唐 喆,男,硕士,实验师,研究方向为植物病理学。E-mail:tangzhe815@163.com

Merck 公司)、氯仿(色谱纯, Sigma 公司)其他试剂均为国产分析纯试剂, 购于天津富宇精细化工有限公司。

1.2 菌株

禾谷镰刀菌野生型 PH-1 菌株, 由西北农林科技大学许金荣实验室保存。

MM 培养基: NaNO_3 (2 g)、 KH_2PO_4 (1 g)、 KCl (0.5 g)、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5 g)、蔗糖 (30 g)、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 mg)、琼脂 (15 g), 加水定容至 1 L, 调整 pH 为 5.6, 121 °C, 灭菌 15 min; CM 培养基: 葡萄糖 (10 g)、络蛋白氨基酸 (1 g)、酵母提取物 (1 g)、蛋白胨 (2 g)、 NaNO_3 (6 g)、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.023 g)、 KH_2PO_4 (1.5 g)、 KCl (0.5 g)、琼脂 (15 g) 加水定容至 1 L, 调整 pH 为 6.5, 121 °C, 灭菌 15 min。

1.3 样品处理方法

1.3.1 菌丝样品的制备 将-80 °C 保存的禾谷镰刀菌野生型 PH-1 菌株活化于小皿上, 25 °C 培养 4 d; 然后用直径 1 cm 打孔器打孔得到菌饼, 接种 5 个菌饼于 50 mL 液体培养基, 25 °C 150 r/min 培养 10 d; 所得到的菌丝用无菌滤布过滤, 并用无菌水冲洗干净, 再用吸水纸将充分吸干水分, 然后放于灭菌研钵中, 加入液氮并充分研磨, 再转移至 50 mL 离心管, 放于冷冻干燥仪中, 干燥过夜, 得到菌丝样品。

1.3.2 代谢产物的提取 称取 30 mg 干燥后菌丝于离心管内, 加入 6 mL 甲醇提取液, 在涡旋仪上 1 400 r/min 剧烈涡旋 10 min, 直到菌体彻底悬浮, 摇动数小时后, 离心 10 min。转移 1 mL 上清于 2 mL 离心管中, 使用氮吹仪用氮气吹干, 得到菌丝代谢产物样品。

1.3.3 衍生化处理 甲基衍生化: 将“1.3.2”所得代谢产物样品加入 200 μL NaOH (1%, 0.1 g/mL) 200 μL 甲醇/吡啶混合溶液 (体积比 5:1)、20 μL 氯甲酸甲酯 (MCF), 震荡 1 min; 加入 800 μL 色谱纯氯仿, 上下剧烈颠倒; 加入 400 μL NaHCO_3 (50 mmol/L, 4.2 g/L), 上下剧烈颠倒, 取下层清液于新的 1.5 mL 离心管中; 加入 Na_2SO_4 干燥, 静置 5 min 转移 500~700 μL 于 GC-MS 进样瓶中, 待测。

硅烷衍生化: 将“1.3.2”所得代谢产物样品中加入 100 μL 的 1 mol/L HCl , 剧烈涡旋 10 min, 直到管内物质充分接触悬浮; 50 °C 孵育 1 h, 吹干, 加入 50 μL TMS 硅烷化试剂 (TMSI :

TMCS=100:1) 剧烈涡旋 10 min, 保证管内所有物质与 TMS 充分接触, 37 °C 孵育 1 h, 加入 800 μL 色谱纯异辛烷, 再加入 800 μL 超纯水上下轻微颠倒, 静置 10 min 直到分层, 转移 500~700 μL 有机相于 GC-MS 进样瓶中。

1.4 GC-MS 检测方法

1.4.1 甲基衍生化分析方法 载气 He , 0.9 mL/min; 清洗流速 3 mL/min, 压力: 49.3 kPa。

升温程序: 柱温 60 °C (5 min), 保持 2 min, 以 8 °C/min 升温至 180 °C 保持 5 min, 以 40 °C/min 升温至 220 °C 保持 5 min, 以 40 °C/min 升温至 240 °C 保持 12.5 min; 进样口温度 260 °C; 不分流进样; 进样量 1 μL 。

质谱轰击电压 70 eV, EI 模式, 接口温度 260 °C; 离子源温度 260 °C; 检测器电压 1.0 kV; 溶剂切割时间 3 min; 扫描范围 35~550 m/z 。

1.4.2 硅烷衍生化分析方法 载气 He , 1 mL/min; 清洗流速 3 mL/min, 压力: 80.8 kPa, 分流比 5.0。

升温程序: 柱温 120 °C (5 min), 保持 5 min, 以 4 °C/min 升温至 300 °C 保持 15 min; 进样口温度 260 °C; 进样量 1 μL 。

质谱轰击电压 70 eV, EI 模式, 接口温度 275 °C; 离子源温度 200 °C; 检测器电压 1.0 kV; 溶剂切割时间 3 min; 扫描范围 35~550 m/z 。

1.4.3 数据处理 使用岛津气相色谱质谱联用仪自带 NIST08 和 NIST08s 两个谱库对结果进行检索, 对相似度 70% 以上的代谢产物进行指认。

2 结果与分析

2.1 菌丝培养条件对代谢产物的影响

分别选取培养 5 d、10 d、15 d、20 d 和 25 d 5 个时间段的野生型 PH-1 菌株进行测试, 观察培养时间对代谢产物的影响, 经 TMS 衍生化后的结果发现培养 10 d 所得菌丝的代谢产物最充分, 大部分产物在总离子流图上的响应值最高, 适宜代谢产物的分析, 结果见图 1。选用 2 种不同营养的培养基培养的菌丝样品进行检测分析, 结果发现在营养丰富的 CM 培养基中 TMS 衍生化处理的代谢产物比营养简单的 MM 培养基丰富 (图 2)。因此, 后续试验选用培养周期 10 d 和 CM 培养基作为培养条件。

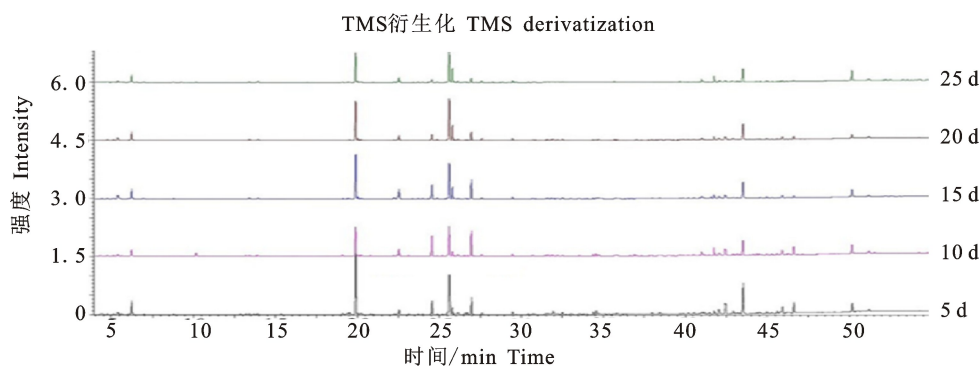


图 1 PH-1 在不同培养时间通过 TMS 衍生化后的总离子色谱图

Fig. 1 Total ion chromatogram(TIC) plot of PH-1 cultured in different time with TMS derivatization

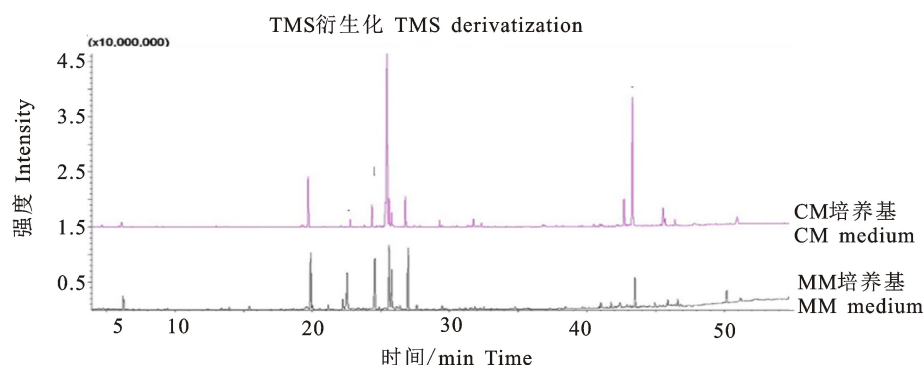


图 2 来自 MM 和 CM 培养基中的经过 TMS 代谢物总离子色谱图

Fig. 2 Total ion chromatogram(TIC) plot of MM medium and CM medium with TMS derivatization

2.2 MCF 衍生化结果分析

采用 MCF 甲基衍生化后进行 GC/MS 分析, 检测结果总离子流图见图 3, 根据 NIST08 和 NIST08s 谱库指认代谢产物 26 种, 结果见表 1, 使用面积归一化法计算物质质量分数百分比, 其中氨基酸类物质有 6 种, 比例为 1.62%; 烷烃烯炔类物质 9 种, 占 7.4%; 7 种脂肪酸类物质, 占 74.52%, 其他酯类醛类占 16.46%。

2.3 TMS 衍生化结果分析

通过 TMS 硅烷衍生化后进行 GC/MS 分析, 检测结果总离子流图见图 4, 根据 NIST08 和 NIST08s 谱库指认代谢产物 37 种, 结果见表 2, 使用面积归一化法计算物质质量分数, 其中糖醇类物质 29 种, 占 96.24%; 脂肪酸检测到 3 种约占 1%, 另外其他物质主要是麦角固醇类等约占 3%。

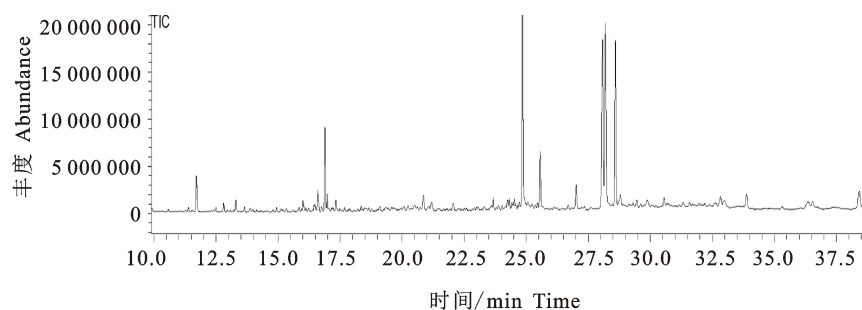


图 3 MCF 衍生化野生型赤霉菌代谢产物的 GC/MS 分析总离子流图

Fig. 3 Total ions chromatogram of PH-1 metabolites with MCF derivatization by GC/MS

表 1 MCF 衍生化野生型赤霉菌代谢产物的 GC/MS 分析结果
Table 1 Result of PH-1 metabolites with MCF derivatization by GC/MS

序号 Serial number	保留时间/min Retention time	化合物名称 Chemical compound	英文名称 Name	峰面积/% Peak area
1	9.92	N-羧基-L-丙氨酸	Carboxy-L-alanine	0.28
2	11.71	2,4-二甲基苯甲醛	2,4-Dimethyl-Benzaldehyde	2.96
3	12.42	N-羧基-L-缬氨酸己酯	Hexyl(methoxycarbonyl) valinate	0.10
4	12.50	5-甲基十四烷	5-Methyl-Tetradecane	0.31
5	12.80	正十七烷	n-Heptadecane	0.59
6	13.65	4,6-二甲基十二烷	4,6-Dimethyl-Dodecane	0.31
7	13.89	N-羧基-L-亮氨酸	Carboxy-L-Leucine	0.32
8	13.99	2-羟基戊二酰胺	2-Hydroxypentanediamide	0.17
9	14.15	N-羧基-L-异亮氨酸	Carboxy-L-Isoleucine	0.14
10	14.94	正十四烷	n-Tetradecane	0.19
11	16.60	正二十一烷	n-Heneicosane	1.91
12	16.89	2,4-二叔丁基苯酚	2,4-Di-tert-butyl-Phenol	5.47
13	16.98	2,6-二叔丁基对甲酚	Butylated Hydroxytoluene	1.18
14	18.23	十八烯	Octadecene	0.15
15	20.86	正二十烷	n-Eicosane	1.77
16	21.19	十四烷酸	Tetradecanoic acid	1.14
17	24.25	吗啉基丙胺	4-Morpholinepropanamine	0.61
18	24.53	油酸	9-Hexadecenoic acid	0.41
19	24.86	棕榈酸	Hexadecanoic acid	21.19
20	25.57	邻苯二甲酸二丁酯	Dibutyl phthalate	4.98
21	28.08	亚油酸	Linoleic acid	17.88
22	28.20	反油酸	Elaidic acid	20.62
23	28.59	硬脂酸	Stearic acid	13.28
24	29.30	三十二烷	Dotriacontane	0.93
25	29.46	三十四烷	Tetratriacontane	1.24
26	33.88	己二酸二(2-乙基)己酯	Adipic acid,bis(2-ethylhexyl) ester	1.87

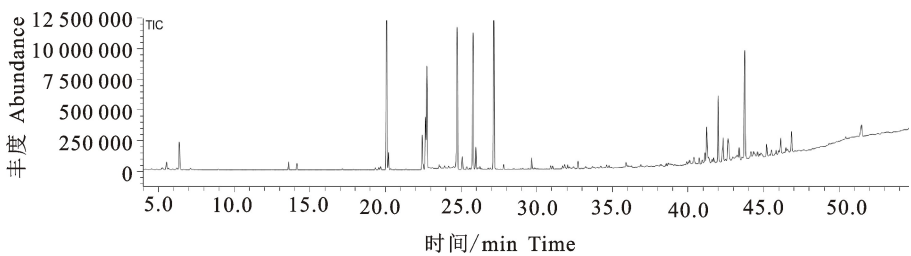


图 4 TMS 衍生化野生型赤霉菌代谢产物的 GC/MS 分析总离子流图
Fig. 4 Total ions chromatogram of PH-1 metabolites with TMS derivatization by GC/MS

3 讨论与结论

禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)是小麦赤霉病的一种优势致病菌,能导致小麦产量和品质的严重下降,并产生有害的真菌毒素,给小麦

生产的可持续发展带来了很大困难。利用代谢组学分析手段研究小麦赤霉病禾谷镰刀菌所产生代谢物的质和量的动态变化规律,可进一步了解抗病机制,最终实现小麦赤霉病的防治。
气相色谱质谱联用(GC-MS)是代谢指纹分

表 2 TMIS 衍生化野生型赤霉菌代谢产物的 GC/MS 分析结果
Table 2 Result of PH-1 metabolites with TMS derivatization by GC/MS

序号 Serial number	保留时间/min Retention time	化合物名称 Chemical compound	英文名称 Name	峰面积/% Peak area
1	5.51	3-羟基吡啶	Pyridin-3-ol	0.75
2	6.20	3,4-二甲氧基苯乙胺	3,4-Dimethoxyphenylthylamine	0.13
3	6.35	甘油	Glycerol	2.31
4	7.10	3-羟基十二烷	Dodecan-3-ol	0.10
5	13.59	1,2,3,4-丁二醇,赤藓糖醇	(2R,3S)-Butane-1,2,3,4-tetraol	0.51
6	14.15	2,6-二叔丁基苯酚	Trimethyl(2,6-di-tert-butylphenoxy	0.45
7	17.15	D-阿拉伯酸 γ 内酯	D-Arabinonic acid- γ -lactone	0.09
8	18.27	α -D-阿拉伯呋喃糖	α -D-Arabinopyranose	0.03
9	19.34	左旋葡聚糖	Levoglucosan	0.14
10	19.68	d-(+)-阿拉伯醇	d-(+)-Arabitol	0.29
11	20.08	木糖醇	Xylitol	13.98
12	20.21	l-(-)-阿拉伯醇	l-(-)-Arabitol	0.18
13	22.43	D-果糖	D-Fructose	2.64
14	22.65	阿拉伯呋喃糖	Arabinofuranose	3.64
15	22.74	山梨糖	Sorbose	8.09
16	22.55	β -D-呋喃半乳糖	β -D-Galactofuranose	0.25
17	23.91	α -D-吡喃半乳糖	α -D-Galactopyranose	0.15
18	24.75	β -D-吡喃半乳糖	β -D-Galactopyranose	12.89
19	25.08	D-木糖	D-Xylose	1.09
20	25.37	D-半乳糖	D-Galactose	0.25
21	25.79	D-山梨醇	D-Glucitol	13.34
22	27.17	D-葡萄糖	D-Glucos	13.56
23	29.66	环己六醇	Myo-Inosito	0.79
24	31.70	亚油酸	Linoleic acid	0.23
25	31.83	反式-9-十八烯酸	trans-9-Octadecenoic acid	0.38
26	32.42	硬脂酸	Stearic acid	0.14
27	34.70	2-O-丙三醇基- α -D-半乳糖	2-O-Glycerol- α -D-galactopyranoside	0.41
28	36.25	太洛糖	Talose	0.17
29	40.37	α -D-吡喃葡萄糖基-D-果糖	α -D-glucopyranosyl-D-Fructose	0.43
30	40.92	松二塘	D-Turanose	0.32
31	41.23	β -D-半乳糖基-D-葡萄糖	β -D-Galactopyranosyl D-Glucose	3.58
32	42.63	麦芽糖	Maltose	3.29
33	42.95	蜜二糖	Melibiose	0.51
34	43.73	β -D-果糖基- α -D-吡喃葡萄糖苷	β -D-Fructofuranosyl- α -D-Glucopyranoside	9.94
35	46.12	乳糖	Lactose	1.61
36	46.83	3-O- β -D-呋喃半乳糖基,4-O- β -D-吡喃葡萄糖基山梨醇	(3-O- α -D-Mannopyranosyl-4-O- β -D-glucopyranosyl-D-glucitol	1.76
37	51.46	麦角固醇	Ergosterol	1.58

析的常用手段,然而对禾谷镰刀菌的代谢产物分析尚未有报道。本研究构建了禾谷镰刀菌代谢产物的分析方法,通过筛选代谢产物多样化的培养条件,发现 10 d 和 CM 培养基为产物多样化的培养条件,进一步针对不易气化的代谢产物,采用 2 种衍生化方法,分别分析了其代谢产物。其中氯甲酸甲酯(MCF)作为酰基化试剂,衍生化反应迅速、产物单一且结构稳定,能同时衍生有机酸、游离脂肪酸、酚类、氨基酸类和胺类物质,通过 MCF 衍生化发现了 26 种代谢产物。其中氨基酸类物质有 6 种,烷烃烯烃类物质 9 种,脂肪酸类物质 7 种,其他酯类醛类 4 种。硅烷化(TMS)也是常见的衍生化试剂,此类衍生化产物具有易于制备、衍生化后可直接进行气相色谱分析的特点,这样节省了样品制备时间,通过 TMS 衍生化发现了 37 种代谢产物,其中糖醇类物质 29 种,脂肪酸检测到 3 种,其他麦角固醇类 5 种。比较该 2 种衍生化方法,发现 MCF 衍生化可检测的种类有氨基酸、烷烃烯烃和脂肪酸类等,而 TMS 衍生化主要检测了糖醇类,二者相互补充。根据以上 2 种衍生化处理的指纹图谱结果可以看出糖醇类物质和脂肪酸类物质是禾谷镰刀菌的主要代谢产物,其他氨基酸类、烯烃、烷烃等物质质量分数不高,但也是常规存在的代谢产物。

本试验采用 2 种不同衍生化方法,对禾谷镰刀菌的野生型菌株样品进行了代谢指纹分析共指认出 63 种代谢产物,质量分数较高的为糖醇类物质和脂肪酸类物质;比较了不同的培养时间和培养基对禾谷镰刀菌代谢产物的影响,发现 10 d 的培养时间代谢产物最完全,适宜做代谢产物的分析;培养基的营养对代谢产物有一定的影响,营养丰富的培养基培养的菌丝代谢产物相对更丰富。通过以上研究为禾谷镰刀菌深入的代谢组学研究提供参考,也为禾谷镰刀菌致病机理研究提供依据。

参考文献 Reference:

- [1] AUDENAERT K, VANHEULE A, HOFTE M, *et al.* Deoxynivalenol: a major player in the multifaceted response of *Fusarium* to its environment[J]. *Toxins*, 2014, 6(1): 1-19.
- [2] 喻 璋, 马奇祥, 王成俊. 小麦病虫害及其防治[M]. 成都: 四川大学出版社, 2002: 40-50.
YU ZH, MA Q X, WANG CH J. Wheat Diseases and Insect Pests and Their Control [M]. Chengdu: Sichuan University Press, 2002: 40-50.
- [3] JIANG C, CAO S, WANG Z, *et al.* An expanded subfamily of G-protein-coupled receptor genes in *Fusarium graminearum* required for wheat infection[J]. *Nature Microbiology*, 2019, 4: 1582-1591.
- [4] STARKEY D E, WARD T J, AOKI T, *et al.* Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2007, 44(11): 1191-1204.
- [5] NICHOLSON J K, CONNELLY J, LINDON J C, *et al.* Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2002, 1(2): 153-161.
- [6] 赵维薇, 许文涛, 王 龔, 等. 代谢组学研究技术及其应用[J]. 生物技术通报, 2011(12): 57-64.
ZHAO W W, XU W T, WANG Y, *et al.* Techniques for metabolomics and its application[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2011(12): 57-64.
- [7] FIEHN O. Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes[J]. *Plant Molecular Biology*, 2002, 48(1/2): 155-171.
- [8] SON S Y, KIM NK, LEE S, *et al.* Metabolite fingerprinting, pathway analyses, and bioactivity correlations for plant species belonging to the Cornaceae, Fabaceae, and Rosaceae families[J]. *Plant Cell Reports*, 2016, 35(9): 1917-1931.
- [9] ZHANG J L, CUI M, HE Y, *et al.* Chemical fingerprint and metabolic fingerprint analysis of Danshen injection by HPLC-UV and HPLC-MS methods[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005, 36(5): 1029-1035.
- [10] 许国旺, 杨 军. 代谢组学及其研究进展[J]. 色谱, 2003, 21(4): 316-320.
XU G W, YANG J. Recent Advances in Metabonomics [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2003, 21(4): 316-320.
- [11] MOHLER R E, DOMBEK K M, HOGGARD J C, *et al.* Comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry analysis of metabolites in fermenting and respiring yeast cells[J]. *Analytical Biochemistry*, 2006, 78(8): 2700-2709.

[1] AUDENAERT K, VANHEULE A, HOFTE M, *et al.* Deoxynivalenol: a major player in the multifaceted response of

Metabolite Fingerprinting Analysis of *Fusarium graminearum* by Gas Chromatography-Mass Spectrometry(GC-MS)

XIANG Ping and TANG Zhe

(College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract Metabolic fingerprint analysis is an important analytical method for metabolomics research, it is widely used in various animal and plant organisms for exploration of non-target metabolites, but it is rarely reported to be used in fungi. In this paper, a metabolic fingerprint analytical method for fungi was established by using gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS) through analyzing the fingerprints of the derivatized *Fusarium graminearum* samples. The culture periods, culture environment and derivatization methods in kinds of metabolites were initially screened. Under the optimal condition with the most numbers of metabolites, 63 metabolites were identified. This study provides an effective analytical method for the metabolomics study of fungi.

Key words *Fusarium graminearum*; GC/MS; Metabolite; Derivatization

Received 2019-06-20

Returned 2019-09-17

Foundation item Key Research and Development Program of Shaanxi Province(No. 2018NY-107).

First author XIANG Ping, female, master, experimentalist. Research area: plant metabolomics.
E-mail: xiangp02@163.com

Corresponding author TANG Zhe, male, master, experimentalist. Research area: phytopathology.
E-mail: tangzhe815@163.com

(责任编辑:成敏 Responsible editor: CHENG Min)