

稻瘟病菌分生孢子非靶定量脂质组的样品制备与检测方法

Sample Preparation and Detection Methods for Nontargeted Quantitative Lipidomics with *Magnaporthe oryzae* Conidia

刘俏[#], 龙茹慧[#], 梁志彬^{*}, 邓懿祯^{*}

华南农业大学群体微生物研究中心, 广东省微生物信号与作物病害防控重点实验室, 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 华南农业大学, 广州, 广东

*通讯作者邮箱: liangzb_gz@scau.edu.cn; dengyz@scau.edu.cn

[#]共同第一作者/同等贡献

摘要

脂质广泛存在于动植物和微生物, 是脂肪和类脂的总称。根据脂质的功能, 可将其分为结构脂质和储存脂质两大类, 两者均是生命活动所必需的。脂类物质的类型及空间分布影响着细胞质膜和细胞器膜的结构。脂肪酸酰基链对生物膜的性质, 如脂质堆积、膜粘度和通透性等方面, 起着重要作用。由高度不饱和脂肪酸组成的磷脂可以呈现各种形状, 这有利于膜结构域的稳定和重塑, 从而加快细胞的内存速率。因此, 细胞内脂质水平的定量检测对评估生物体正常的生长发育具有重要意义。本文通过超高效液相色谱-高分辨率串联质谱联用技术, 对萌发过程中不同时间点的稻瘟病菌分生孢子的脂质含量进行了定量检测, 结果发现, 与处于萌发初始阶段的稻瘟病菌分生孢子相比, 萌发 6 h 的稻瘟病菌分生孢子中有 170 种脂质的含量发生变化, 其中 99 种下降, 71 种上升。本研究建立的检测方法使用毒性较小的甲基叔丁基醚代替了氯仿, 使有机相从原来的下层变成了上层, 在提取脂质过程中极大地减少了细胞碎片等杂质对纯化获得的脂质的污染, 为稻瘟病菌以及其它物种脂质的定量检测提供参考。

关键词: 非靶定量脂质组, 超高效液相色谱-高分辨率串联质谱联用技术, 稻瘟病菌, 分生孢子

材料与试剂

1. 直径为 9 cm 的培养皿
2. 50 mL 离心管 (339652, Thermo Scientific™)
3. 滤布 (Miracloth; Millipore, catalog number: 475855-1R)
4. 涂布棒 (Disposable Cell Spreaders, catalog number: 65-1010, STERILE)
5. 血球计数板 (1103, 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司)
6. 标准级显微镜盖玻片 (1021222C, 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司)
7. 稻瘟病菌菌株 (野生型菌株 B157 由新加坡淡马锡生命科学研究院 Naweed I. Naqvi 实验室惠赠)
8. 疏水玻片 (Microscope Cover Glass; fisherbrand, catalog number: 12541005)
9. 内标物质包括: 5 µg/mL 的硬脂酸-d₃₅ (货号 C117066, 记作 FA 18:0-d₃₅) 购自 C/D/N Isotopes Inc (Pointe-Claire, Quebec, Canada); 2 µg/mL 的 LPC 18:1-d₇ (1-油酰基(d7)-2-羟基-sn-甘油-3-磷酸胆碱; 货号 791643C)、2 µg/mL 的 LPE 18:1-d₇ (1-油酰基(d7)-2-羟基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺; 货号 791644C)、5 µg/mL 的 PC 15:0-18:1-d₇ (1-十五烷酰基-2-油酰基(d7)-sn-甘油-3-磷酸胆碱; 货号 791637C)、5 µg/mL 的 PE 15:0-18:1-d₇ (1-十五烷酰基-2-油酰基(d7)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺; 货号 791638C)、5 µg/mL 的 PG 15:0-18:1-d₇ (1-十五烷酰基-2-油酰基(d7)-sn-甘油-3-磷酸甘油; 货号 791640C)、2 µg/mL 的 SM d18:1-18:1-d₉(N-油酰基(d9)-D-赤型鞘氨酰基磷酸胆碱; 货号 791649C)和 5 µg/mL 的 TAG 15:0-18:1-d₇-15:0 (1,3-双十五烷酰基-2-油酰基(d7)-甘油; 货号 791648C) 购于 Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA), 所有内标物质的溶剂均为二氯甲烷/甲醇 (1:1, v:v) 混合液
10. 甲醇 (Methanol, MeOH; 天津市百世化工有限公司)
11. 甲基叔丁基醚 (Methyl tert-butyl ether, MTBE; 天津市永大化学试剂有限公司)
12. 二氯甲烷 (Merck, 货号: 75-09-2)
13. 甲酸铵 (Merck, 货号: 540-69-2)
14. 甲酸 (Formic acid; 天津市科密欧化学试剂有限公司)
15. 异丙醇 (Isopropyl alcohol, IPA; 天津市富宇精细化工有限公司)
16. 乙腈 (Acetonitrile; 天津市永大化学试剂有限公司)
17. Prune-agar (PA) 固体培养基配方 (1 L) (见溶液配方)
18. 10 mmol/L 甲酸铵溶液 (1 L) (见溶液配方)
19. 0.1%甲酸水溶液 (1 L) (见溶液配方)
20. 75%酒精溶液 (1 L) (见溶液配方)

仪器设备

1. GR60DA 立式高压灭菌锅 (ZEALWAY)
2. 超净工作台 (ESCO, ACB-4A1)
3. 人工气候箱 (宁波莱福科技有限公司)
4. 冷冻高速离心机 (Sorvall Legend Micro 17R, Thermo Fisher)
5. 翻转式实验室摇床 (ROCKER 2D, IKA)
6. 样品冷冻研磨仪器 (LUKYM-I, 广州露卡测序仪器有限公司)
7. 通风柜 (FUME HOOD, 上海正申实验室设备有限公司)
8. 氮吹仪 (NDK200-2N, 杭州米欧仪器有限公司, MIULAB)
9. 超高效液相色谱-高分辨串联质谱联用仪: 赛默飞世尔公司 Ultimate 3000 超高效液相色谱仪 (UHPLC) 和 Q Exactive 四极杆-静电场轨道阱质谱仪 (简写 QE)

实验步骤

一、样品准备

将新鲜的稻瘟病菌接种到 PA 培养基上（图 1），25 °C 恒温人工气候箱先黑暗培养 3 天，再黑暗光照交替（12 h:12 h；光源使用的是 LED 灯管，220 V 电压，H1% 额定光照度）培养 7 天后收集分生孢子，用血球计数板定量分生孢子浓度为 3.0×10^5 个/毫升，定容 30 mL，四个生物学重复。

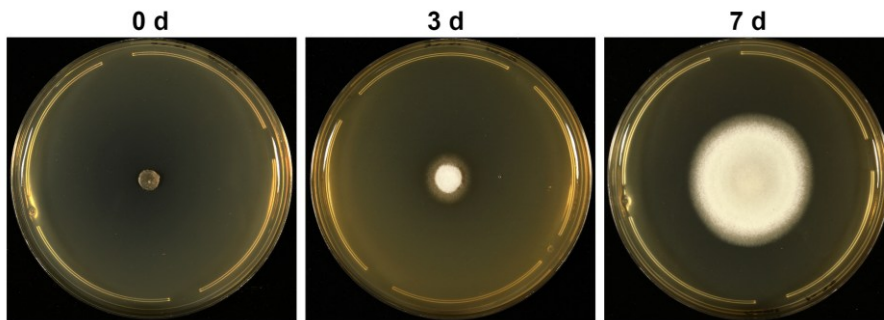


图 1. 在 PA 培养基上生长不同天数的稻瘟病菌菌落形态

二、总脂提取

参照 Vitali Matyash 等（2008 年）的方法（Matyash et al., 2008）

1. 萌发初始阶段分生孢子脂质的提取

- 取浓度为 3×10^5 个/毫升的孢子悬浮液 30 mL 于 50 mL 试管中；
- 在 $2,000 \times g$ 条件下，室温离心 10 min；
- 弃液体，加入 1.5 mL 甲醇悬浮；
- 向悬浮液中加入 5 mL 甲基叔丁基醚；
- 涡旋振荡 1 min；
- 摇床室温孵育 2 h；
- 加入 1.25 mL 无菌水；
- 在 $2,000 \times g$ 条件下，室温离心 15 min；
- 静置待分层；
- 取上相液体，用氮吹仪吹干后即得总脂（用氮吹仪吹氮时，需控制氮气缓慢流出，且出气口在距离管口约 0.5 cm 处进行氮吹，待液体余 1.5–2.0 mL 时，迅速将其转移至 2 mL 离心管中，氮吹仪吹干直至吹满整管氮气时，立即盖上管盖）；
- 于 -80 °C 保存；
- 选做。取 10) 中下层液用 2 mL 溶剂混合物（甲醇：甲基叔丁基醚：水=3:10:2.5, v/v/v）重新提取，步骤同上，取上相液体，和 10) 中的混合；
- 提取的脂质也可以溶解于 200 μ L 氯仿：甲醇：水（60:30:4.5, v/v/v）中储存。

2. 萌发 6 h 分生孢子脂质的提取

- 取浓度为 3×10^5 个/毫升的孢子悬浮液 30 mL 于疏水玻片上（300 片）萌发 6 h；
- 弃去萌发液，将玻片冷冻干燥后液氮研磨或样品冷冻研磨仪上进行研磨；
- 每 100 片研磨后快速放入 50 mL 离心管中；
- 加入 4.5 mL 甲醇和 15 mL 甲基叔丁基醚；

- e. 涡旋振荡 1 min;
- f. 摇床室温孵育 2 h;
- g. 加入 3.75 mL 无菌水;
- h. 在 4,000×g 条件下, 室温离心 15 min;
- i. 静置待分层;
- j. 取来源于 300 片研磨样品的上相液体混合在一起, 用氮吹仪吹干后即得总脂 (用氮吹仪吹氮时, 需控制氮气缓慢流出, 且出气口在距离管口约 0.5 cm 处进行氮吹。待液体余 1.5–2.0 mL 时, 迅速将其转移至 2 mL 离心管中, 氮吹仪吹干样品, 并使样品管充满氮气, 立即盖上管盖);
- k. 样品于 -80 °C 保存;
- l. 选做。取 10) 中下层液用适当体积的溶剂混合物 (甲醇: 甲基叔丁基醚: 水=3:10:2.5, v/v/v) 重新提取, 步骤同上, 取上相液体, 和 10) 中的混合;
- m. 提取的脂质也可以溶解于 200 μL 氯仿: 甲醇: 水 (60:30:4.5, v/v/v) 中储存。

三、样品前处理

取总脂样本, 加 1 mL MTBE, 混合均匀, 在 15,000×g 和 4 °C 条件下离心 10 min; 取 800 μL 上清液, 加 20 μL 内标于温和氮气下干燥; 干燥物复溶于 100 μL 二氯甲烷/甲醇 (1:1, v/v), 得上机测试样本。从所有制备好的样本中取等体积样本混合, 得质控样本。

四、液相色谱-高分辨质谱检测分析

采用赛默飞世尔公司 Ultimate 3000 系列超高效液相色谱系统和沃特世公司 CSH C18 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) 对样本进行色谱分离。正离子模式流动相组成为 (A) 10 mmol/L 甲酸铵和 0.1% 甲酸水溶液和 (B) 含 10 mmol/L 甲酸铵和 0.1% 甲酸的异丙醇/乙腈 (9:1, 体积比)。采用线性梯度模式进行洗脱分离, 梯度如下: 0 min, 40% B; 2 min, 45% B; 4 min, 55% B; 10 min, 55% B; 14 min, 90% B; 15 min, 95% B; 18 min, 95% B; 18.1 min, 40% B 并维持至 20 min。负离子模式流动相组成为 (A) 10 mmol/L 甲酸铵水溶液和 (B) 含 10 mmol/L 甲酸铵的异丙醇/乙腈 (9:1, 体积比)。采用线性梯度模式进行洗脱分离, 梯度如下: 0 min, 40% B; 2 min, 45% B; 4 min, 55% B; 10 min, 55% B; 14 min, 90% B; 15 min, 95% B; 18 min, 95% B; 18.1 min, 40% B 并维持至 20 min。流速均为 0.3 mL/min, 进样量为 2 μL。

赛默飞世尔公司 Q Exactive 四极杆-静电场轨道阱质谱仪 (QE) 用于质谱分析。采用加热电喷雾离子源 (HESI) 对代谢物进行正离子模式 (HESI+) 和负离子模式 (HESI-) 离子化。离子源主要参数设置如下: 喷雾电压为 3.5 kV, 毛细管温度和辅助气温度均为 350 °C。鞘气流速为正离子模式 40 (任意单位), 辅助气流速为 10 (任意单位)。S-Lens RF 设为 50 (任意单位)。一级质谱扫描范围为质荷比 130–1950, 分辨率为 70000 (质荷比 200), AGC 阈值 1×10^6 。同时, 采用数据依赖识别 (DDA) 模式对每个扫描循环的最多 10 个母离子的二级质谱碎片信息进行采集, HCD 碰撞能量设为 20、30 和 40 eV, 二级质谱分辨率为 17500, AGC 阈值为 5×10^5 。

五、原始质谱数据预处理

液相色谱-高分辨质谱: 典型的基峰离子 (BPI) 色谱图如图 2 所示。先用 ProteoWizard 软件将原始质谱数据转化为 mzXML 格式, 然后在 R 软件平台下采用 XCMS 和 CAMERA 软件包处理数据。对于 XCMS 软件包, 主要参数设置为: 挑峰参数 (method = centWave, ppm = 5, peakwidth = c (5,50), snthresh = 10), 峰对齐参数 (第 1 和 2 次 bw 分别为 6 和 3), 保留时间校正方式为 obiwarp。对于 CAMERA 软件包, 采用默认参数对同位素峰、加合离子峰和碎片进行注释分析。最终输出为一个峰表文件, 包含观察量 (样本名)、变量 (保留时间_质荷比) 和峰面积。在进行单维和多维统计分析前, 采用稳定性同位素内标和样本量对峰面积数据进行校正。

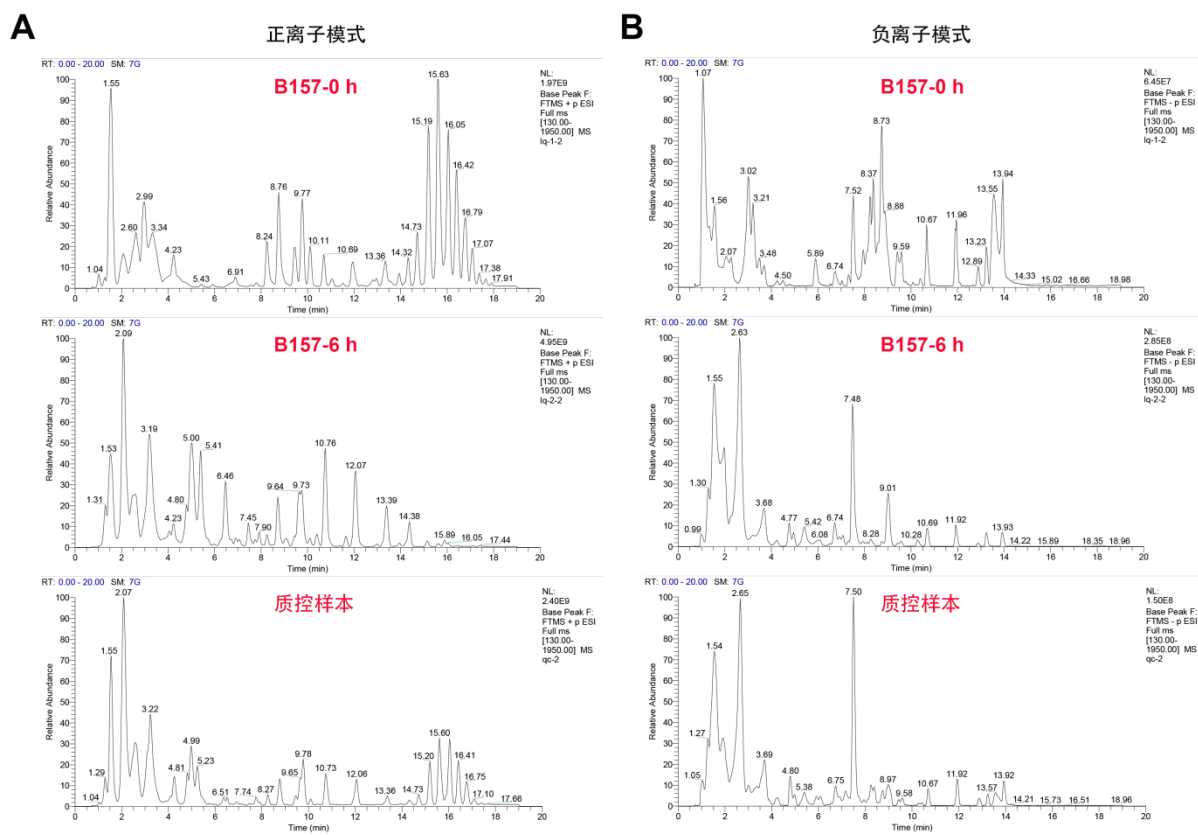


图 2 不同离子模式下基峰离子 (BPI) 色谱图。注: (A) 为 B157 菌株的孢子在培养时间为 0 h (B157-0 h) 和 6h (B157-6 h) 获得的脂质样品和质控样品在正离子模式基峰离子色谱图; (B) 为 B157 菌株的孢子在培养时间为 0 h (B157-0 h) 和 6h (B157-6 h) 获得的脂质样品和质控样品在负离子模式基峰离子色谱图

六、统计分析和差异性代谢物筛选

对于多维统计分析,将归一化数据进行多维统计分析如主成分分析 (PCA)、偏最小二乘方-判别分析 (PLS-DA) 和正交过滤偏最小二乘方-判别分析 (OPLS-DA)。在分析前首先对数据进行默认的平均中心化 (mean-centered) 和 par 格式化处理。模型质量评价参数为 R^2X 或 R^2Y 和 Q^2 值,用于评价模式识别模型的鲁棒性,其中 R^2X (PCA) 或 R^2Y (PLS-DA) 表示当前模型可对数据方差进行解释的比例,即解释率,表明模型拟合优度 (the goodness of fit)。 Q^2 表示当前模型可对数据方差进行预测的比例,即预测率,表明当前模型的预测能力。

p 值,计算自 R 平台,当变量数据呈正态分布时 p 值来自于 Welch's t test (参数检验) 结果,当变量数据呈非正态分布时 p 值来自于 Wilcoxon Mann-Whitney test (非参数检验) 结果。

根据火山图 (Volcano plot) 分析筛选差异代谢物,筛选标准采用单维统计分析的 p 值 (小于 0.05, 即 $-\log_{10}p$ 大于 1.30) 与倍数变化 FC (fold change 大于 1.2 倍, 即 $\log_2FC$ 绝对值大于 0.26) 相结合的方法筛选差异性代谢物。倍数变化 ($\log_2FC$) 计算方法为组 1 和组 2 两组数据均值之比的对数 (以 2 为底), 正值表示该物质在组 1 中的水平高于组 2, 负值则相反。

七、脂质结构鉴定

引用格式: 刘俏, 龙茹慧, 梁志彬, 邓懿祯. (2025). 稻瘟病菌分生孢子非靶定量脂质组的样品制备与检测方法. *Bio-101* e1011019. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011019.

How to cite: Liu, Q., Long, R. H., Liang, Z. B. and Deng, Y. Z. (2025). Sample Preparation and Detection Methods for Nontargeted Quantitative Lipidomics with *Magnaporthe oryzae* Conidia. *Bio-101* e1011019. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011019. (in Chinese)

采用 LipidMatch 软件 (Koelmel et al., 2017) 对脂质进行结构鉴定, 软件版本为 3.0.0, 主要参数如下: RT Window (for matching peaks to MS/MS scans) 为 0.14, MZ Search Tolerance MS1 为 0.005 Da, MZ Search Window MS2 为 10 ppm; Intensity Threshold MS2 为 1000。

结果与分析

根据变量的火山图 (Volcano plot) 来寻找差异性代谢物, 如图 3 和 4。采用倍数变化 (阈值: 1.2 倍) 结合单维统计的 p 值 (阈值 <0.05) 寻找差异代谢物。整合正负离子两种模式的差异代谢物, 最终筛选检测到 170 种含量变化的脂质, 其中 99 种脂质下降, 71 种脂质上升。部分差异性代谢物如图 5 和表 1 所示。

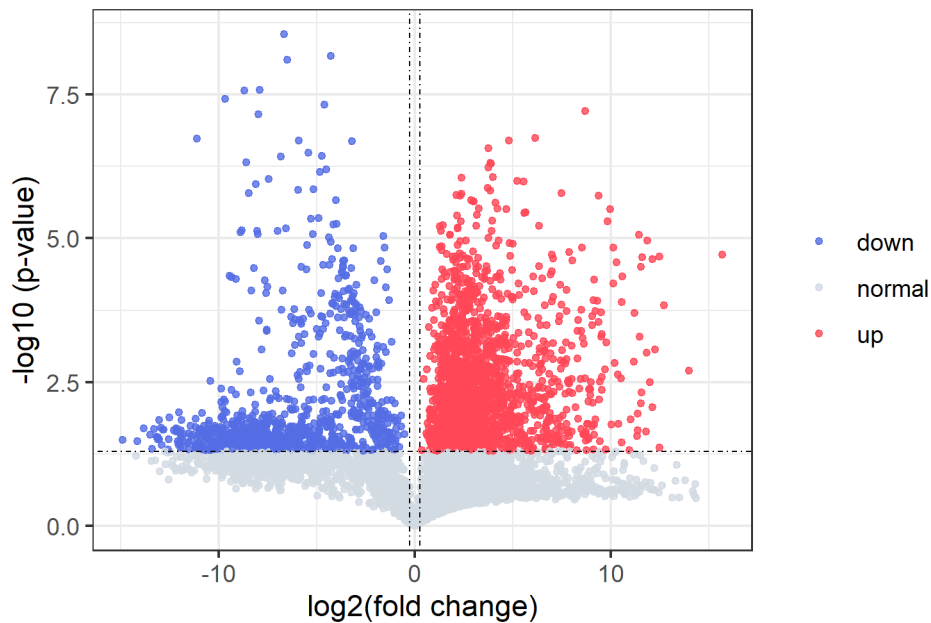


图 3. B157-0 h 和 B157-6 h 组样本正离子模式火山 (Volcano plot) 图

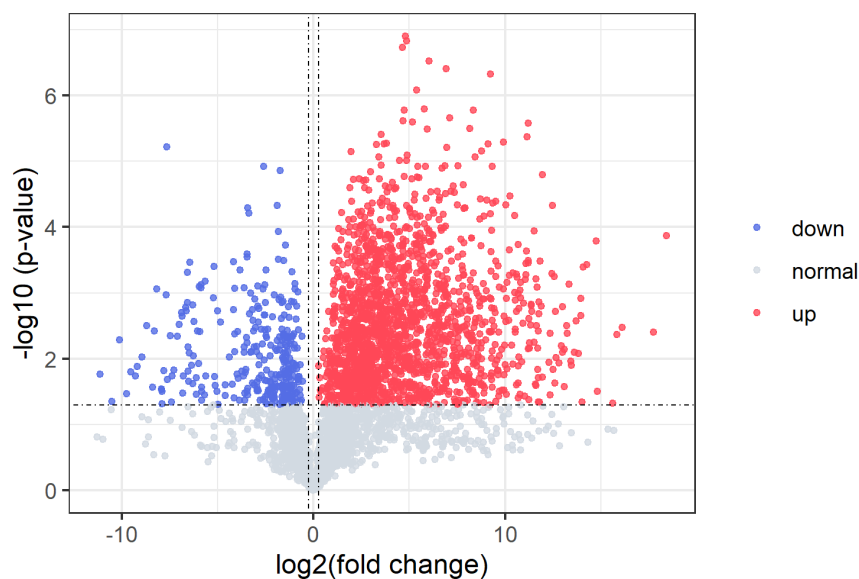


图 4. B157-0 h 和 B157-6 h 组样本负离子模式火山 (Volcano plot) 图

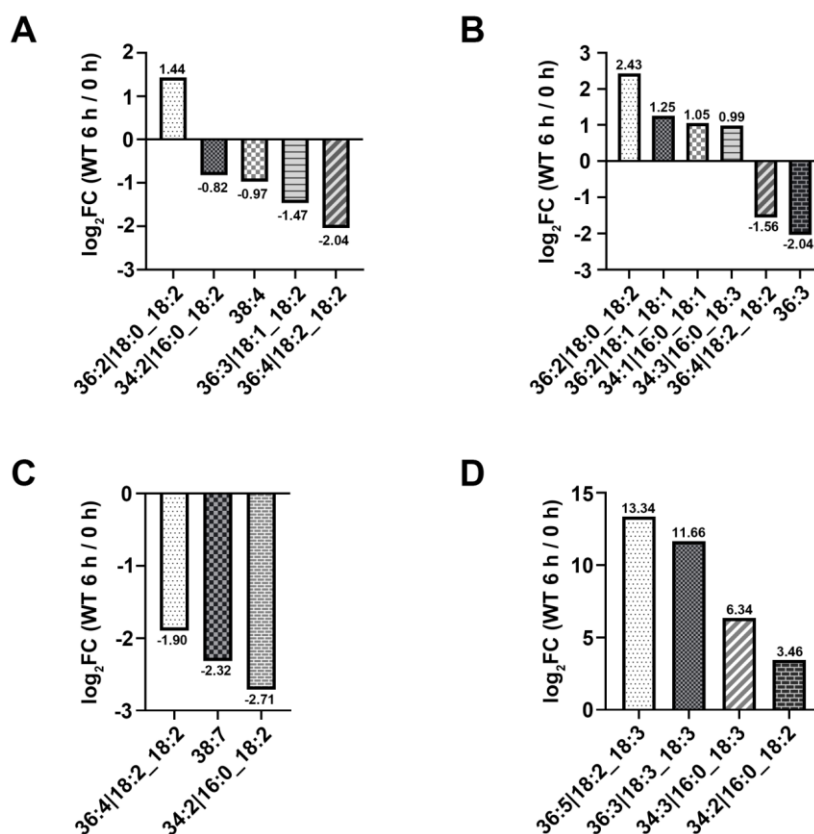


图 5. 部分含量有变化的脂质类型。注：A 为 PC（磷脂酰胆碱）；B 为 PE（磷脂酰乙醇胺）；C 为 PS（磷脂酰丝氨酸）；D 为 PEtOH（脂质醇）；A-D 中横坐标上的每个数字串代表脂质的种类。

表 1 部分含量有变化的脂质类型详细数据

Lipids	RT_m/z	m/z	log2FC (B1567 -6 h/0 h)	B157-0h ng/mL				B157-6h ng/mL			
				1	2	3	4	1	2	3	4
PE	10.56_7										
36:2 18:0_18:2	42.5384	742.5384	2.429	0.3973	0.0841	0.1595	0.2134	0.9310	1.2822	1.1399	0.3973
PE	10.35_7										
36:2 18:1_18:1	42.538	742.5380	1.253	0.2660	0.1617	0.2099	0.1925	0.3314	0.5631	0.6016	0.2660
PE	10.37_7										
34:1 16:0_18:1	16.5221	716.5221	1.054	0.9729	0.5796	0.6607	0.7040	1.2156	1.5820	1.6762	0.9729
PE	8.96_71										
34:3 16:0_18:3	2.491	712.4910	0.988	3.3591	2.5666	2.0884	1.8416	6.0869	4.2018	5.0481	3.3591
PE	8.89_73										
36:4 18:2_18:2	8.5096	738.5096	-1.561	39.6146	28.4275	24.6008	20.4651	7.4957	9.6129	10.9913	39.6146
PE	9.4_756										
36:3;O 16:0_2	.5172	756.5172	-2.038	2.1646	0.8629	0.6864	1.0245	0.1678	0.3598	0.3961	2.1646
0:3;O											
PC	10.43_8										
36:2 18:0_18:2	30.593	830.5930	1.437	0.8537	0.3608	0.6364	0.6515	1.8134	1.5936	1.5311	0.8537
PC	9.44_80										
34:2 16:0_18:2	2.5608	802.5608	-0.818	20.2308	17.2062	17.3208	16.0477	11.6645	10.1604	10.8773	20.2308
PC 38:4	9.51_85										
	4.5891	854.5891	-0.968	0.2820	0.3430	0.2928	0.2857	0.1766	0.1792	0.1588	0.2820
PC	9.43_82										
36:3 18:1_18:2	8.5756	828.5756	-1.465	4.3515	5.1986	6.1192	4.8191	2.0116	2.0575	1.9327	4.3515
PC	8.75_82										
36:4 18:2_18:2	6.5605	826.5605	-2.038	51.5150	74.1912	49.5106	43.3714	7.8963	13.0523	15.2768	51.5150
PS	8.1_784										
36:4 18:2_18:2	.5128	784.5128	-1.897	1.2962	1.3407	0.9473	1.1559	0.1445	0.7800	0.2249	0.1232
PS 38:7	8.1_806										
	.495	806.4950	-2.315	0.2779	0.2901	0.2179	0.2475	0.0319	0.1259	0.0275	0.0224
PS	8.61_75										
34:2 16:0_18:2	8.4998	758.4998	-2.712	9.6366	30.9829	17.6652	13.4203	0.8826	3.0028	3.3894	3.6694
PEtOH	7.96_72										
36:5 18:2_18:3	1.4824	721.4824	13.341	0.0000	0.0000	0.0010	0.0000	3.6664	2.9457	1.6160	0.0000
PEtOH	7.59_71										
36:6 18:3_18:3	9.4686	719.4686	11.659	0.0000	0.0004	0.0003	0.0010	1.4426	1.0407	0.9185	0.0000
PEtOH	8.46_69										
34:3 16:0_18:3	7.4804	697.4804	6.343	0.0045	0.0083	0.0095	0.0078	0.6606	0.8523	0.3329	0.0045
PEtOH	8.87_69										
34:2 16:0_18:2	9.4977	699.4977	3.462	0.0004	0.1440	0.0006	0.2361	1.2995	1.1748	0.7548	0.0004

失败经验

脂质暴露在空气中会发生氧化反应，因此，脂质在氮吹仪下吹干后，一定要在氮气流下快速盖上离心管盖，避免与空气直接接触，并用封口膜将离心管口紧密封住，并于-80 °C保存。

溶液配方

1. Prune-agar (PA) 固体培养基配方 (1 L)
- 西梅果汁 (Prune juice) 40 mL, 乳糖 (Lactose) 2.5 g, 蔗糖 (Sucrose) 2.5 g, 酵母提取物 (Yeast extract) 1 g, 琼脂粉 (Agar) 15 g, 加去离子水定容到 1 L。然后用 10 M NaOH 调节 pH 至 6.5, 115 °C 高温高压灭菌 30 min。

2. 10 mmol/L 甲酸铵溶液 (1 L)
称取 0.6306 g 甲酸铵固体溶于超纯水中, 并定容到 1 L。
3. 0.1%甲酸水溶液 (1 L)
取 1 mL 甲酸溶液于超纯水中, 并定容到 1 L。
4. 75%酒精溶液 (1 L)
取 750 mL 无水乙醇溶于去离子水中, 并定容到 1 L。

致谢

感谢国家自然科学基金 (32022070; 31970139) 的支持。本课题组在最近发表的文章中使用了文中的脂质检测方法 (Liu et al., 2024a and Liu et al., 2024b)。

参考文献

1. Koelmel, J. P., Kroeger, N. M., Ulmer, C. Z., Bowden, J. A., Patterson, R. E., Cochran, J. A., Beecher, C. W., Garrett, T. J. and Yost, R. A. (2017). LipidMatch: an automated workflow for rule-based lipid identification using untargeted high-resolution tandem mass spectrometry data. *BMC Bioinformatics* 18(1): 331. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1744-3>
2. Liu, Q., Long, R., Lin, C., Bi, X., Liang, Z. and Deng, Y. Z. (2024a). Phosphatidylethanolamines link ferroptosis and autophagy during appressorium formation of rice blast fungus. *Mol Plant Pathol.* 25(7): e13489. <https://doi.org/10.1111/mpp.13489>
3. Liu, Q., Long, R., Zhi, C., Liang, Z. and Deng, Y. Z. (2024b). PUFA-PLs biosynthesis enzymes contribute to pathogenic development of rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Mycology*. 15(4): 602–619. <https://doi.org/10.1080/21501203.2024.2350169>
4. Matyash, V., Liebisch, G., Kurzchalia, T. V., Shevchenko, A. and Schwudke, D. (2008). Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *J Lipid Res.* 49(5): 1137–1146. <https://doi.org/10.1194/jlr.d700041-jlr200>