

小鼠粪便样本中短链脂肪酸的定量检测

Quantitative Analysis of Short-chain Fatty Acids (SCFAs) in Mouse Fecal Sample

刘红宾*, 汤锦辉, 戴磊

中国科学院深圳先进技术研究院, 深圳, 广东省

*通讯作者邮箱: binhongliu@126.com

引用格式: 刘红宾, 汤锦辉, 戴磊. (2020). 小鼠粪便样本中短链脂肪酸的定量检测. *Bio-101* e2003367.

Doi: 10.21769/BioProtoc. 2003367.

How to cite: Liu, H. B., Tang, J. H. and Dai, L. (2020). Quantitative Analysis of Short-chain Fatty Acids (SCFAs) in Mouse Fecal Sample. *Bio-101* e2003367. Doi: 10.21769/BioProtoc.2003367. (in Chinese)

摘要: 短链脂肪酸 (Short-chain fatty acids, SCFAs) 是肠道菌群的重要代谢产物, 主要包括乙酸、丙酸和丁酸, 对宿主的许多生理代谢过程具有有益的调节作用。由于以往检测方法存在操作耗时长、所需样本量大、机器批次效应偏差、前处理误差大的缺点, 无法对样本中的 SCFAs 进行准确定量。本文通过添加内标脂肪酸的方法, 可以在 1.5 小时内完成粪便样本的前处理手动操作, 并且只需 0.03 g 的粪便样本, 完成对十种 SCFAs 的定量检测。本方法可拓展至其他生物样品类型 (器官组织、微生物培养液等), 为肠道菌群代谢相关研究提供技术参考。

关键词: 短链脂肪酸, 气相色谱-质谱技术, 肠道菌群

材料与试剂

材料:

1. 0.6 ml 离心管
2. 气相色谱-质谱上样瓶 (Agilent, catalog number: 5181-0714)
3. 内插管 (Agilent, catalog number: 5181-1270)
4. 氧化锆珠子 (Biospec, catalog number: 11079110z)

试剂:

1. SCFAs 混合酸标准品 (Sigma, catalog number: CRM46975)

2. 6,6,6-d3 己酸 (cdn isotopes, catalog number: ND-3993)
3. 无水乙醚 (上海凌峰)
4. 无水 Na₂SO₄ (Sigma, catalog number: 238597)
5. 盐酸 (上海凌峰)
6. N, O-三甲硅烷基三氟乙酰胺 (BSTFA, Sigma, catalog number: 25561-30-2)

仪器设备

1. 涡旋振荡器 (赛默飞, Vortex-Genie 2)
2. 低温离心机 (艾本德, 5427R)
3. 通风橱
4. 8890-7000D GC-MS
5. HP-5 ms 色谱柱

实验步骤

一、前期准备工作

按照终浓度配置以下溶液：

1. 5 M 盐酸
2. 10 µg/ml 6,6,6-d3 己酸内标溶液 (Cai 等, 2017)
3. 含有 10 µg/ml 内标的不同梯度浓度 SCFAs 标准品溶液 (25、50、100、200、400、800 µM)

二、样品前处理

1. 取 30 mg 左右冻存的小鼠粪便于 1.5 ml 离心管内，加入 350 µl 内标溶液和 10 mg 左右氧化锆研磨珠。
2. 将离心管水平固定在振荡器圆盘上，4 °C 环境中 10 档高速震荡 2 min 左右进行匀质，直至形成匀浆状态。
3. 将振荡器放置于 4 °C 环境中，3 档低速震荡 30 min。
4. 4 °C 环境中，13,000 × g 离心 30 min。
5. 取 100 µl 上清至 0.6 ml 离心管，加入 10 µl 5 M 盐酸，震荡混匀进行酸化；另取 100 µl 上清至 0.6 ml 离心管，标记并于-80 °C 冻存备份。

6. 加入 100 μl 无水乙醚，充分震荡混匀，放置冰上 5 min (Zhang 等, 2019)。
7. 4 °C 环境中，10,000 $\times g$ 离心 5 min。
8. 取上层 (乙醚层) 至含有 10 mg 左右无水 Na_2SO_4 的 0.6 ml 离心管中。
9. 再次加入 100 μl 无水乙醚至剩余溶液中进行第二次和第三次抽提 (重复 6-8 步 2 次)，将三次抽提的乙醚层抽提溶液混匀震荡，4 °C 环境中 10,000 $\times g$ 离心 3 min。
10. 取 160 μl 离心后的上层乙醚抽提混合液至内插管中，加入 8 μl BSTFA 震荡混匀。
11. 室温静置超过 8 h 后，上机检测。检测仪器进样、升温等参数见表 1，SIM 模式下进行靶标脂肪酸的定性和定量检测见表 2。

表 1. GC-MS 上机检测参数设定

项目	参数
进样量	1 μl
分流模式	脉冲分流 (10 psi, 10:1)
隔垫吹扫流速	3 ml/min
载气	氦气
柱流速	1 ml/min
柱箱升温程序	40 °C 保持 2 分钟； 15 °C/min 升温至 150 °C，保持 1 分钟； 30 °C/min 升温至 300 °C，保持 5 分钟
前进样口温度	260 °C
传输线温度	280 °C
离子源温度	230 °C
四级杆温度	150 °C
电离电压	70 eV
采集模式	SIM
溶剂延迟	3.8 分钟

表 2. SIM 模式下 SCFA 保留时间和定性定量离子

SCFAs	保留时间 (min)	定量离子 (m/z)	定性离子 (m/z)
甲酸	4.1	103	75, 103
乙酸	5.03	117	75, 117
丙酸	6.2	131	75, 131
异丁酸	6.71	145	75, 117, 145
丁酸	7.32	145	75, 117, 145
异戊酸	7.94	159	75, 117, 159
戊酸	8.5	159	75, 117, 159
4-甲基戊酸	9.19	173	75, 117, 173
己酸	9.57	173	75, 117, 173
庚酸	10.71	187	75, 117, 187

结果与分析

下图展示了 SIM 模式下 $800 \mu\text{M}$ SCFAs 标准品溶液和小鼠粪便样品的检测色谱图 (图 1)。

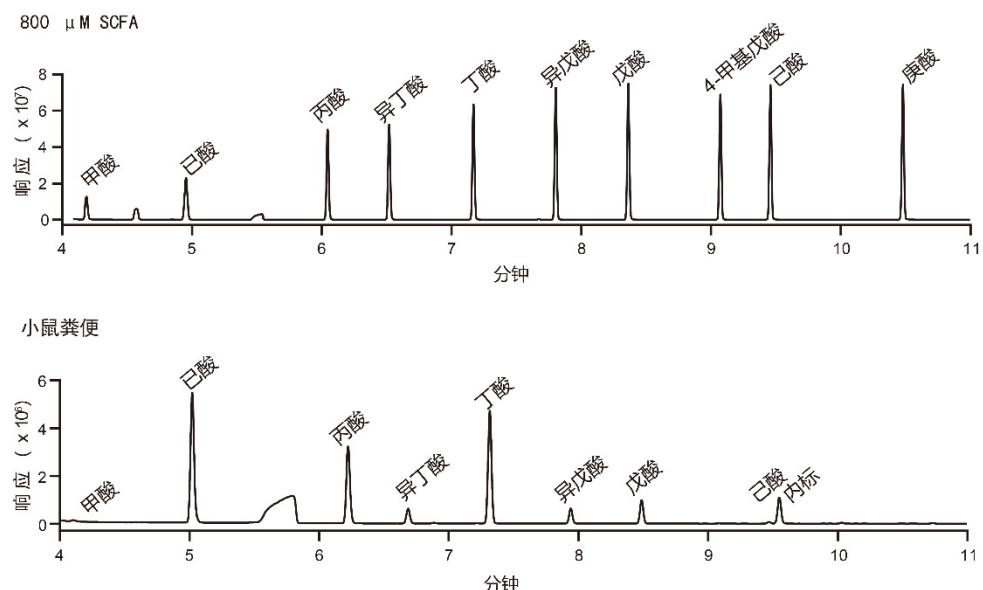


图 1. SCFAs 标准品和小鼠粪便样品在 SIM 检测模式下的色谱图

致谢

本文得到青年千人人才计划资助。

参考文献

1. Cai, J., Zhang, J., Tian, Y., Zhang, L., Hatzakis, E., Krausz, K. W., Smith, P. B., Gonzalez, F. J. and Patterson, A. D. (2017). [Orthogonal Comparison of GC-MS and \(1\)H NMR Spectroscopy for Short Chain Fatty Acid Quantitation](#). *Anal Chem* 89(15): 7900-7906.
2. Zhang, S., Wang, H. and Zhu, M. J. (2019). [A sensitive GC/MS detection method for analyzing microbial metabolites short chain fatty acids in fecal and serum samples](#). *Talanta* 196: 249-254.