



代谢组学研究的实验方法

刘博

1

代谢组学产生背景

2

代谢组学定义及特点

3

代谢组学研究方法

4

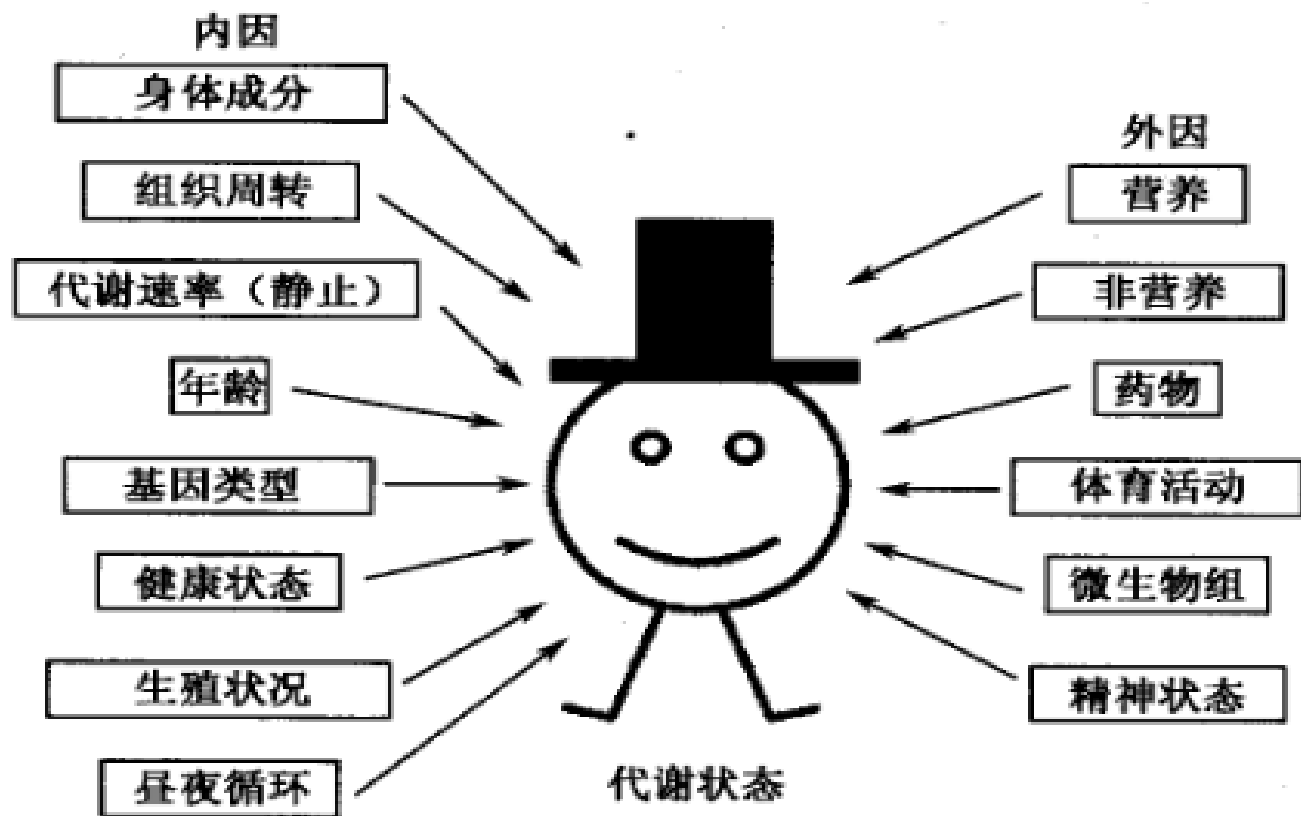
代谢组学应用及前景

代谢组学是继基因组学和蛋白质组学之后新近发展起来的一门学科。基因组学和蛋白质组学分别从基因和蛋白质层面探寻生命的活动，而实际上细胞内许多生命活动是发生在代谢物层面的，如细胞信号释放（cell signaling），能量传递，细胞间通信等都是受代谢物调控的。代谢组学正是研究代谢组（metabolome）——在某一时刻细胞内所有代谢物的集合——的一门学科。

“基因组学和蛋白质组学告诉你什么可能会发生，而代谢组学则告诉你什么确实发生了。”

NEXT

代谢组学普适性



NEXT

代谢组学定义

代谢组学（metabonomics）是指通过组群指标分析，进行高通量检测和数据处理，研究生物体整体或组织细胞系统的动态代谢变化，特别是对内源代谢、遗传变异、环境变化乃至各种物质进入代谢系统的特征和影响的学科

NEXT

代谢组学的概述

- 代谢组学是效仿基因组学和蛋白质组学的研究思想，对生物体内所有代谢物进行定量分析，并寻找代谢物与生理病理变化的相对关系的研究方式，是系统生物学的组成部分。
- 其研究对象大都是相对分子质量**1000**以内的小分子物质。
- 先进分析检测技术结合模式识别和专家系统等计算分析方法是代谢组学研究的基本方法。
- 其样品主要是动植物的细胞和组织的提取液。
- 主要技术手段是核磁共振（**NMR**）、质谱（**MS**）、色谱（**HPLC, GC**）。

NEXT

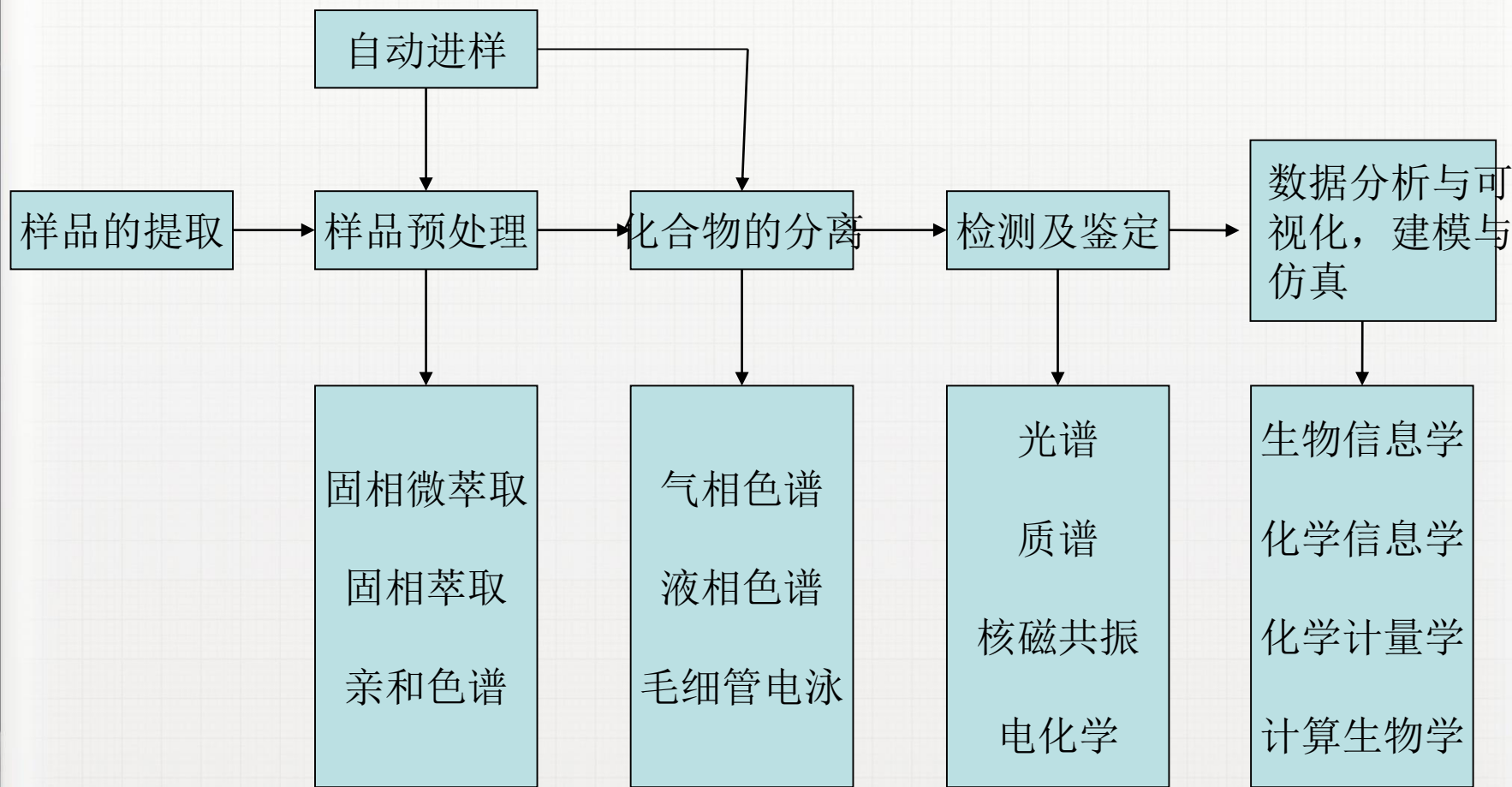
代谢组学的特点

- 关注内源化合物
- 对生物体系的小分子化合物进行定量定性研究
- 上述化合物的上调和下调指示了与疾病、毒性、基因修饰或环境因子的影响
- 上述内源性化合物的知识可以被用于疾病的诊断和药物筛选。

NEXT

代谢组学研究方法

代谢组学的研究流程



- **气相色谱与质谱联用(GC—MS)**
- **液相色谱与质谱联用(LC—MS)**
- **核磁共振(NMR)**

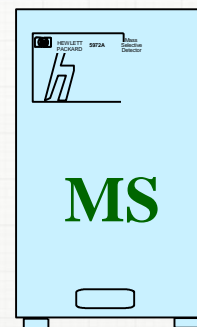
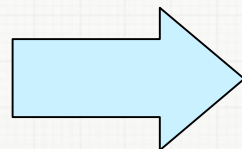
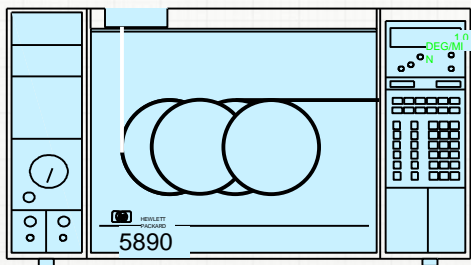
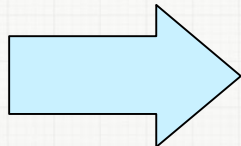
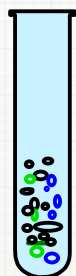
气相色谱

气相色谱的流动相为惰性气体，气-固色谱法中以表面积大且具有一定活性的吸附剂作为固定相。当多组分的混合样品进入色谱柱后，由于吸附剂对每个组分的吸附力不同，经过一定时间后，各组分在色谱柱中的运行速度也就不同。吸附力弱的组分容易被解吸下来，最先离开色谱柱进入检测器，而吸附力最强的组分最不容易被解吸下来，因此最后离开色谱柱。如此，各组分得以在色谱柱中彼此分离，顺序进入检测器中被检测、记录下来。

质谱

质谱分析是一种测量离子荷质比（电荷-质量比）的分析方法，其基本原理是使试样中各组分在离子源中发生电离，生成不同荷质比的带正电荷的离子，经加速电场的作用，形成离子束，进入质量分析器。在质量分析器中，再利用电场和磁场使发生相反的速度色散，将它们分别聚焦而得到质谱图，从而确定其质量。

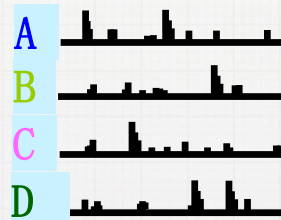
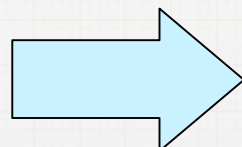
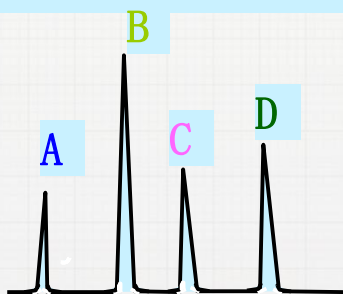
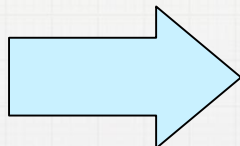
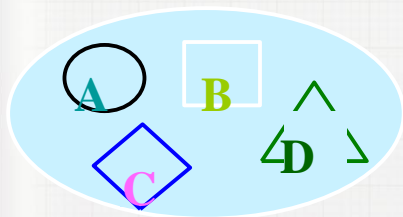
GC-MS联用仪器



Sample

Gas Chromatograph (GC)

Mass Spectrometer



Sample

Separation

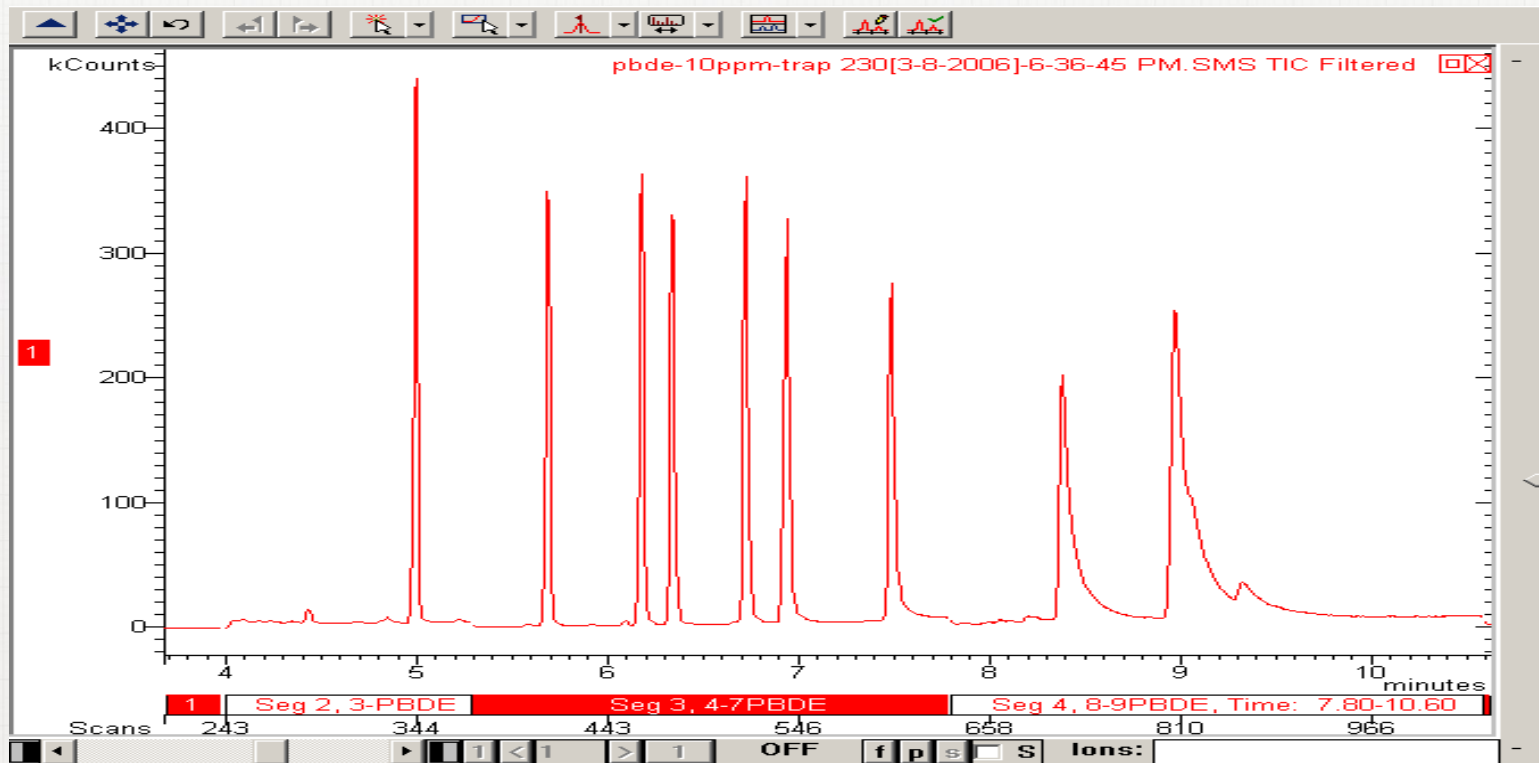
Identification

优点：集色谱法的高分离能力和质谱法的结构鉴定能力于一体，灵敏度高，可检测到大量低含量的小分子代谢产物。

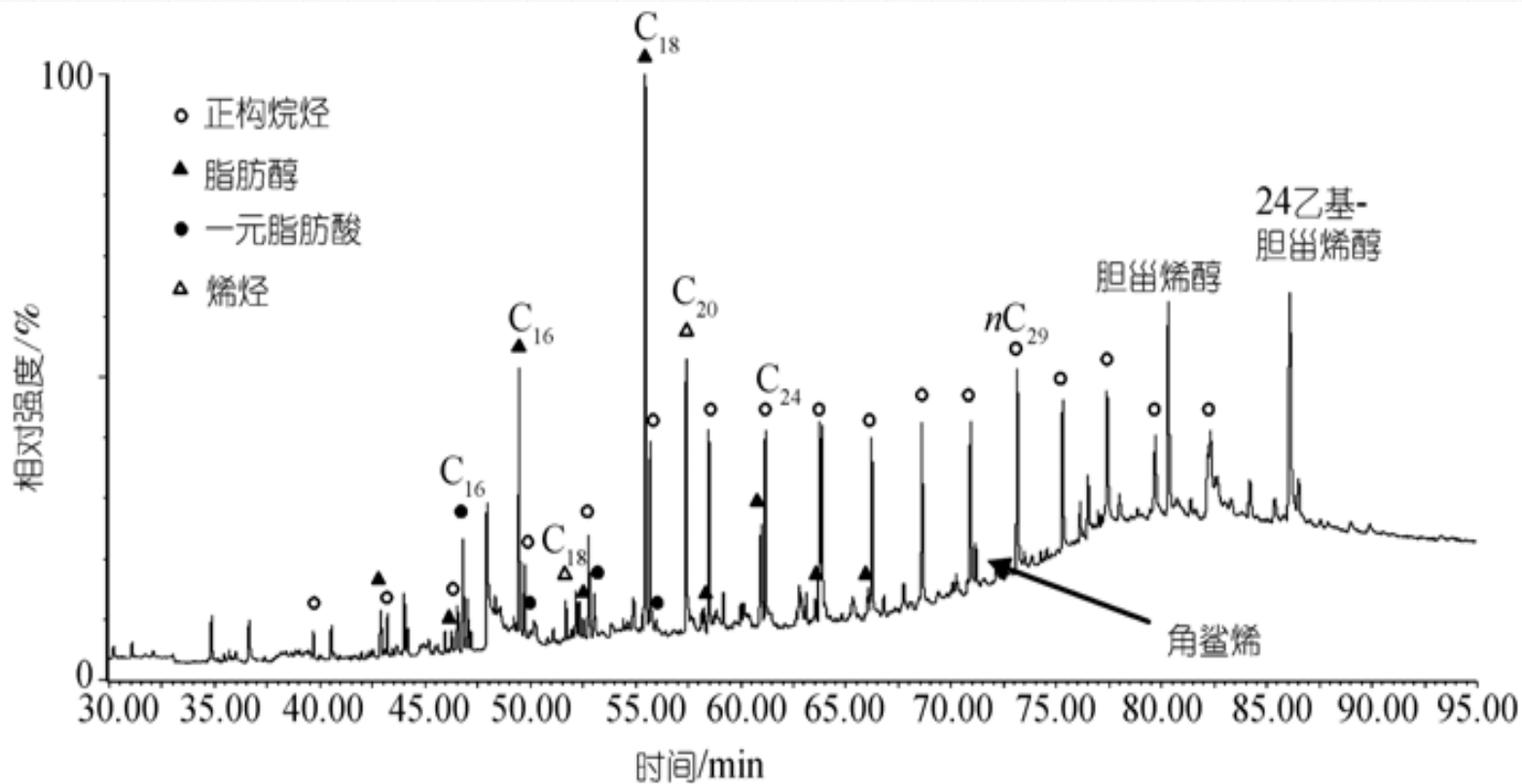
缺点：无法分析热不稳定性的物质和分子量较大的代谢产物。难挥发物质等需要进行衍化等化学处理

色谱分析的发展

GC-MS（气相色谱质谱联用技术）：作为最早发展的色谱联用技术，应用已经非常广泛，除了灵敏度高可检测到大量低含量的小分子代谢物外，**GC-MS**仪器的购置价可低，在色谱分析重复性、分辨率和电子轰击电离源得到的质谱碎片重复性方面具有明显的优势，且受基体效应影响小。但是因为样品中对难挥发或极性较大的代谢产物需经过衍化后才能进行分析。



GC-MS



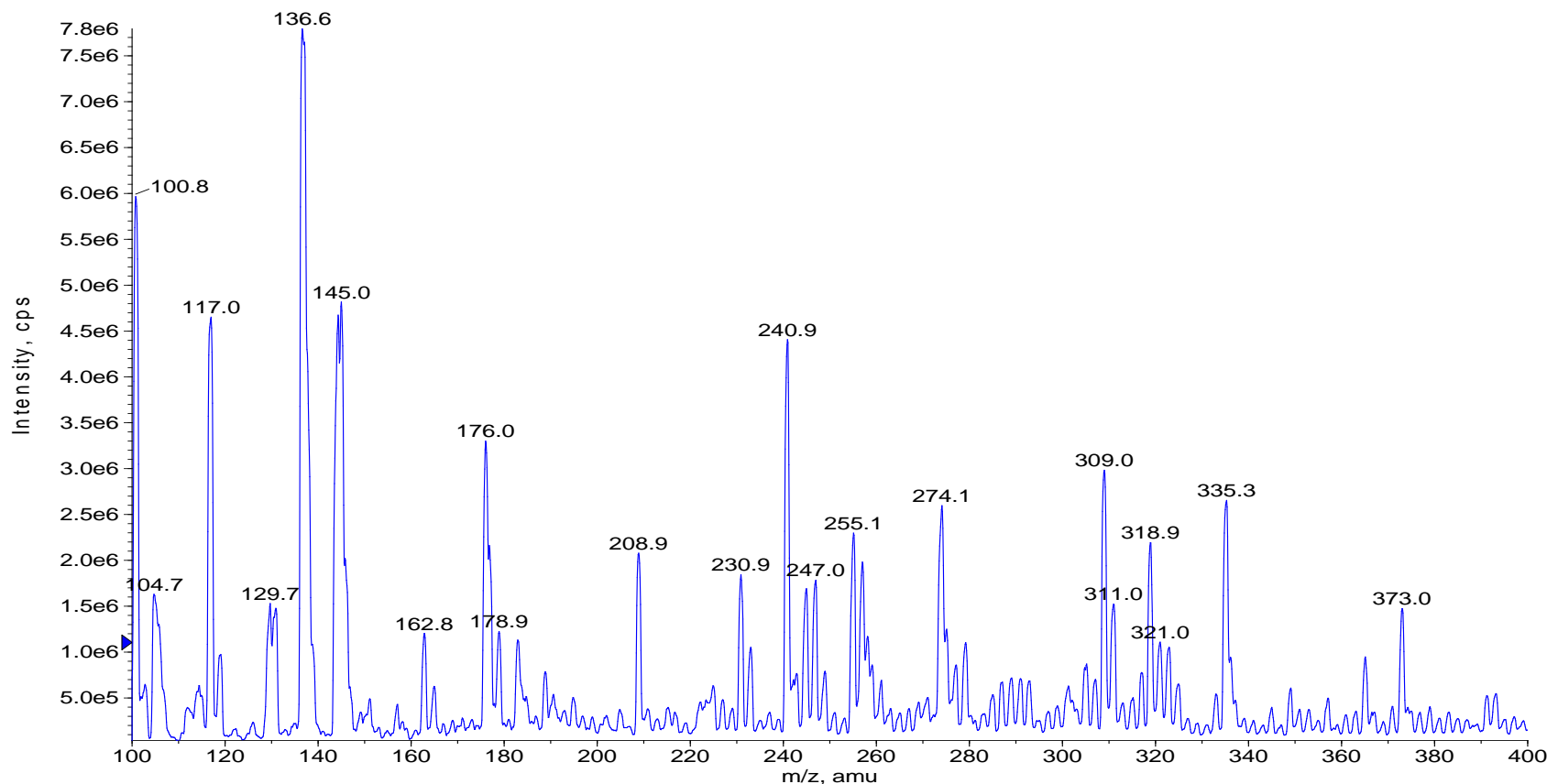
干酪根碱性水解中碱性组分的总离子流图

LC-MS

LC-MS（液相色谱质谱联用技术）：可直接分析体液及组织提取物，无需衍生化操作，适用于热不稳定、不易挥发、不易衍生化和相对分子质量较大的物质。对检测样品的浓度纯度要求相对较低。

■ +Q1: 0.025 to 0.602 min from Sample 1 of nf-q1.wiff (Turbo Spray), Smoothed

Max. 7.8e6 cps.



检测硝基咪喃类代谢物

色谱分析的发展

HPLC-MS（高效液相色谱质谱联用技术）：凭借其分离效能高，分析速度快，灵敏度高及应用范围广等优势，在代谢组学研究中占有较大比重。同时该方法可以实现对复杂基质中结构相似的化合物的同时分析可以同时测定生物样品中的已知和未知化合物。

缺点：分析过程中对化合物的偏向性，极性化合物难以保留在柱上，无法被检测，缺乏可供定性参考的规模数据库。

UPLC-MS（超高效液相色谱质谱联用技术）：**UPLC**系统是利用创新技术进行整体设计从而大幅改善色谱分离度、样品通量和灵敏度的最新液相色谱技术，相较目前分析最快的**HPLC**，**UPLC**分析速度提高了**9**倍，分辨率提高了**2**倍，灵敏度提高了**3**倍，一次分析得到的信息量远远超过了高效液相色谱。

只是对使用仪器精度的改良，实验仪器的精度提高从而改善色谱分离效果

GC × GC-TOFMS

GC × GC-MS（二维气相色谱质谱联用技术）：全二维气相色谱是把分离机理不同而又互相独立的两支色谱柱以串联方式结合成二维气相色谱，在这两支色谱柱之间装有一个调制器，起捕集再传送的作用，经第一支色谱柱分离后的每一个馏分，都需先进入调制器，进行聚焦后再以脉冲方式送到第二支色谱柱进行进一步的分离，所有组分从第二支色谱柱进入检测器，信号经数据处理系统处理，得到以柱1保留时间为第一横坐标，柱2保留时间为第二横坐标，信号强度为纵坐标的三维色谱图或二维轮廓图。

飞行时间质谱（**TOFMS**）凭借**500次全扫描/秒**是目前可以和**GC-GC**很好的匹配的质谱技术。（传统四极杆采集速度为**2张全谱图/秒**）

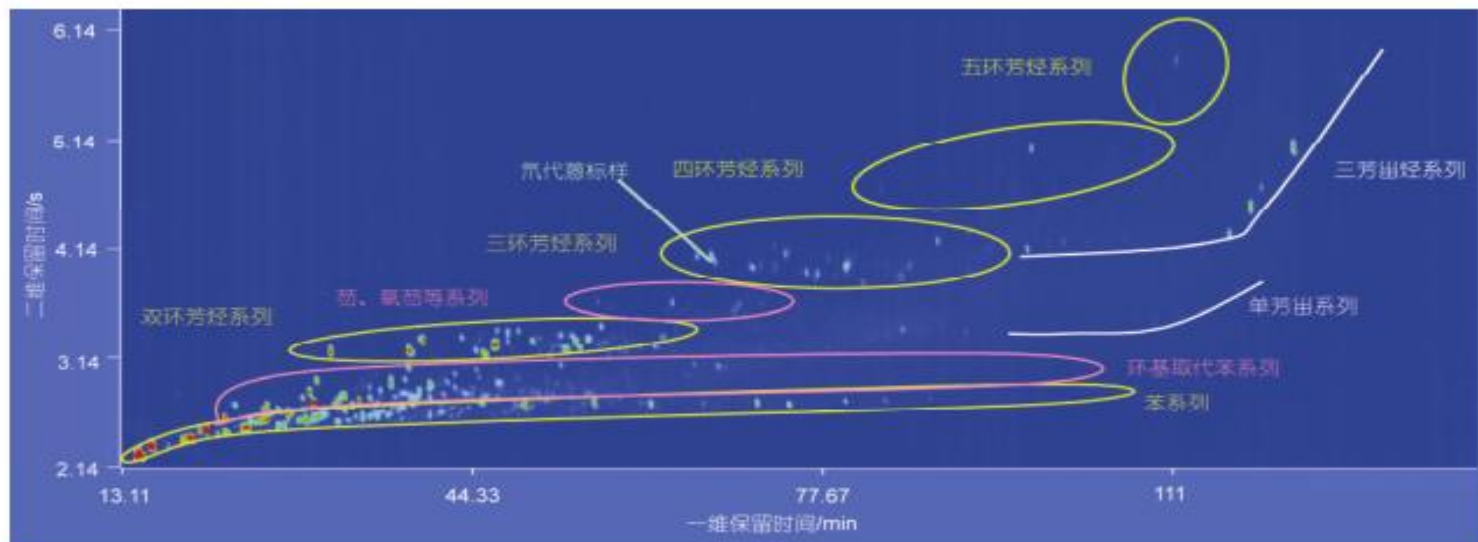
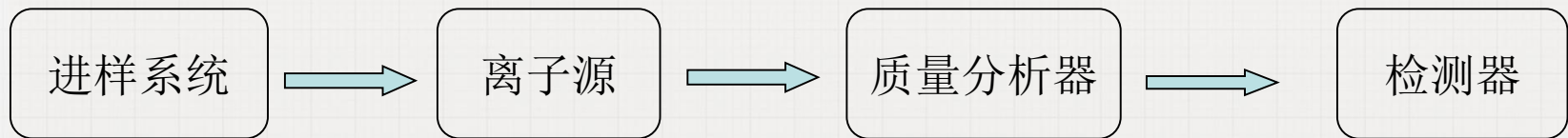


图1 LG7油样芳烃组分的GC×GC/TOFMS分析二维点阵图

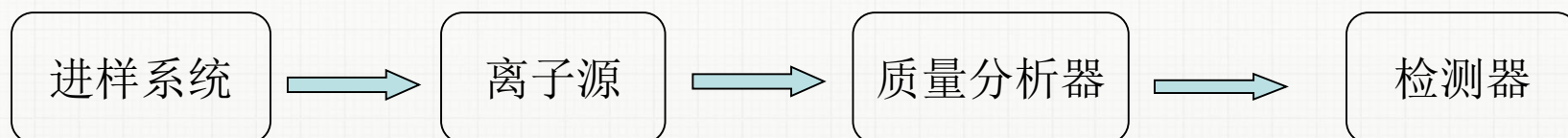
质谱技术流程

质谱仪的操作主要通过其三个基本功能来实施。首先必须使分子离子化，它通过在离子源中进行电子电离、快速原子/离子轰击、基体辅助激动解吸或电喷雾来实现；其次，带电分子的离子及其碎片必须根据其质荷比来得到分离，这往往在质量分析器中进行；最后，分离的带电荷的碎片必须通过检测器检测。

因为测量代谢组学过程中，要测量的都是复杂的混合物，所以，一般都是直接采用动态平衡法进样。



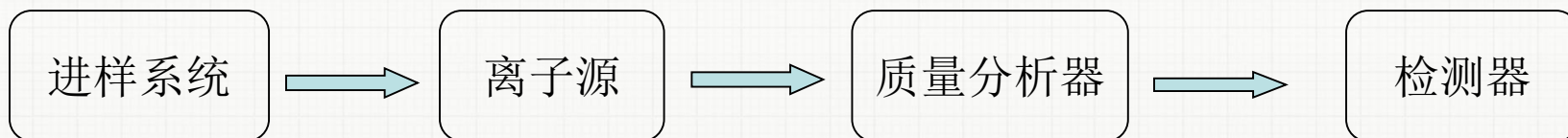
质谱技术流程



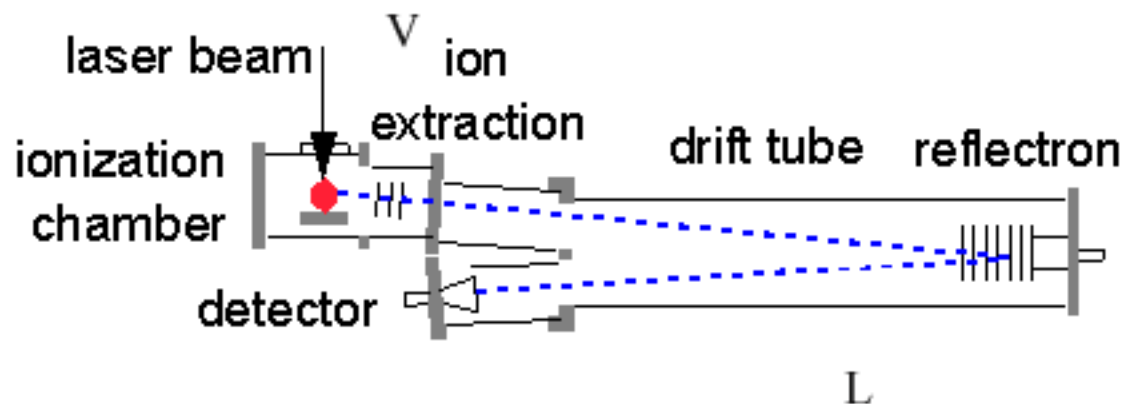
离子源

- 1) **电子轰击电离 (electron impact, EI)**: 使用具有一定能量的电子直接作用于样品分子, 使其电离。
- 2) **化学电离 (Chemical ionization, CI)**: 电子电离反应分子, 形成离子, 离子和样品发生离子分子反应。(不稳定有机化合物)
- 3) **大气压化学电离 (atmospheric pressure chemical ionization, APCI)** 在大气压下, 化学电离反应的速率更大, 电离效率应更高。
- 4) **快原子轰击 (Fast atom bombardment, FAB)**: 属于二次离子质谱, 以高能量的初级离子轰击表面, 再对由此产生的二次离子进行质谱分析。
- 5) **电喷雾电离 (Electro spray ionization, ESI)**: 不锈钢毛细管被加以 3-5kV 的正电压, 与相距约 1cm 接地的反电极形成强静电场。静电力克服表面张力时形成离子喷雾,

质谱技术流程

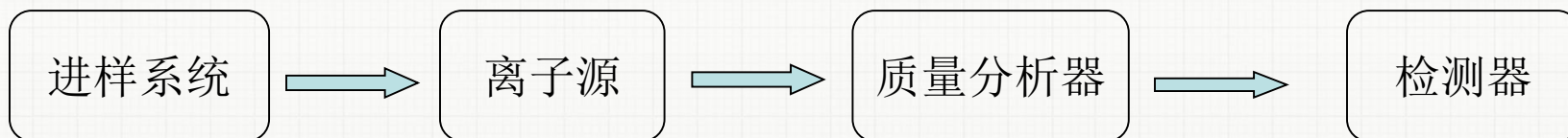


飞行时间质谱分析器 (TOF)



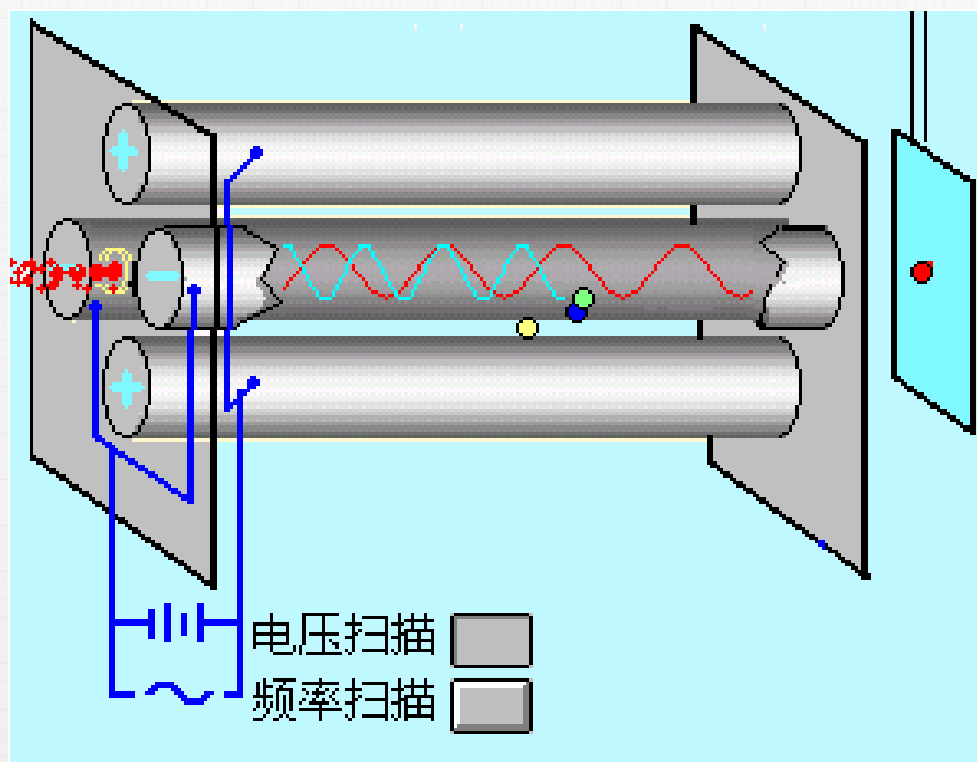
1. 从原理上检测离子的质荷比没有上限，特别适于生物大分子的测定，如测定单克隆的人免疫球蛋白，分子量高达 $982000 \pm 2000u$ ；
2. 不同质荷比离子同时检测，灵敏度高；
3. 扫描速度快，适于研究极快的过程；

质谱技术流程

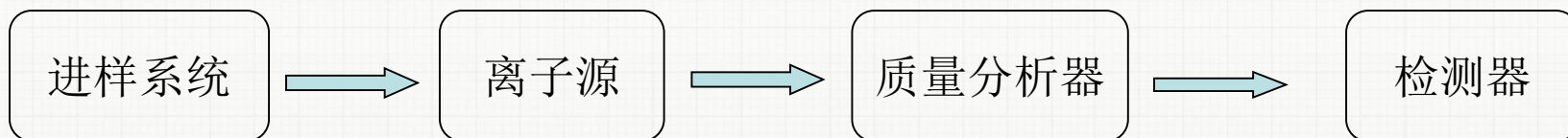


四极管质量分析

通过改变RF幅度和DC电势，来影响离子飞行稳定性选择特定质核比的离子，出特定 m/z 值的离子外，其他离子都会被虑质器清除。



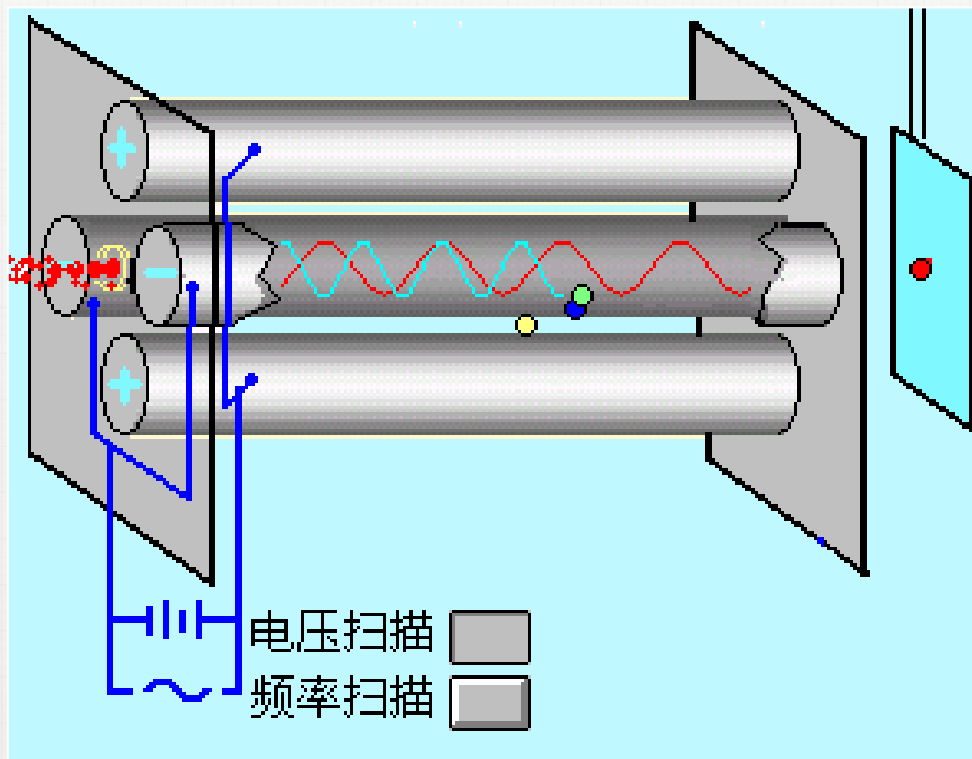
质谱技术流程



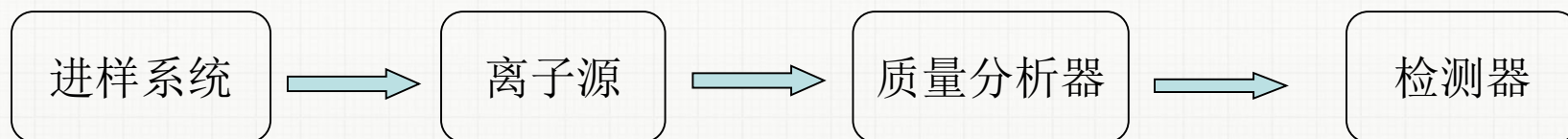
四极管质量分析

通过改变RF幅度和DC电势，来影响离子飞行稳定性选择特定质核比的离子，出特定 m/z 值的离子外，其他离子都会被滤质器清除。

四级离子阱质谱仪
离子回旋共振质谱仪



质谱注意事项



质谱仪器中凡有样品分子和离子的地方必须抽成真空状态，即质谱仪的离子源、质量分析器及检测系统都必须处于真空状态下工作（一般为 $1.333 \times 10^{-4} \sim 1.333 \times 10^{-6} \text{Pa}$ ）。质谱仪的真空系统要求残余气体中不能留有对测定不利的气体成分，要求本底小，否则：空气中的氧会烧坏离子源的灯丝；会引起额外的离子-分子反应，使质谱复杂化，且干扰离子源中电子束的正常调节，影响一起的分辨率；真空度低会使本底增高，干扰质谱图。

- 核磁共振是处于静磁场中的原子核在另一交变磁场作用下发生的物理现象。通常人们所说的核磁共振指的是利用核磁共振现象获取分子结构、人体内部结构信息的技术。



•核磁共振基本原理:

当以射频照射外磁场中的自旋核，且射频的能量正好等于核磁矩不同取向的能级差时，低能级的核将吸收射频跃迁至高能态——核磁共振现象。特定磁场中特定原子只能吸收特定射频，从而形成一个核磁共振信号

优点: 能够对样品实现非破坏性、非选择性分析。它是唯一既能定性，又能在微摩尔范围定量有机化合物的技术。

缺点: 灵敏度相对较低，不适合分析低浓度代谢物。



毒理学： 代谢组学是利用高通量检测技术在代谢物的整体水平上检测机体在药物暴露后的各种生理生化指标，这些指标几乎涵盖毒理作用发生的所有的环节，再结合传统的病理学终点，可以对药物的毒性作用机制进行深入的了解

在疾病研究和诊断： 近年来，代谢组学技术已广泛应用于心血管疾病、糖尿病、癌症等疾病的诊断和研究。在心血管疾病方面，**Brindle** 利用基于 ^1H NMR的代谢组学技术对冠心病人的血清代谢组进行了分析，结果显示疾病组与正常组代谢组图谱存在明显差异，研究认为代谢组学技术不仅能快速、准确的诊断冠心病还能区分疾病的严重程度。

药物代谢研究： 基于代谢组学方法的药物代谢研究将高分辨分析仪器(如UPLC—TOFMS)和多元数据分析技术相结合，不局限于已知的特定代谢途径，对药物代谢物进行非靶向的全面筛选，有助于发现一些用传统方法无法检测到的新代谢产物，为药物体内代谢研究提供了一种新的途径。