

“十一五”国家重点图书

现代植物科学系列

植物代谢组学 ——方法与应用

Plant Metabolomics:
Methods and Applications

漆小泉 王玉兰 陈晓亚 主编



化学工业出版社

“十一五”国家重点图书

现代植物科学系列

植物代谢组学 ——方法与应用

Plant Metabolomics:
Methods and Applications

漆小泉 王玉兰 陈晓亚 主编



化学工业出版社

·北京·

代谢组学是近年来发展起来的“组学”之一，是多种技术和科学的结合，涉及分析化学、化学计量学和生物学等知识。本书由不同研究领域的人员共同编著，按照代谢物分析方法、数据分析及应用三部分深入浅出地介绍了植物代谢组学研究的发展现状和趋势及其应用中的注意事项。编写时力求做到实际和适用，使初学者能够较快掌握植物代谢组学的基本知识和技能。

本书适合高等院校有关专业的本科生、研究生，也可供科学研究工作者、专业技术人员参考学习。

图书在版编目 (CIP) 数据

植物代谢组学：方法与应用 / 漆小泉，王玉兰，陈晓亚主编. —北京：化学工业出版社，2011.4
(现代植物科学系列)
ISBN 978-7-122-10587-5

I. 植… II. ①漆…②王…③陈… III. 植物-代谢-研究 IV. Q946

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 027127 号

责任编辑：李 丽
责任校对：蒋 宇

文字编辑：张春娥
装帧设计：张 辉

出版发行：化学工业出版社（北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011）
印 刷：北京外文印务有限公司
装 订：三河市万龙印装有限公司
720mm×1000mm 1/16 印张19¹/₂ 字数373千字 2011年9月北京第1版第1次印刷

购书咨询：010-64518888（传真：010-64519686） 售后服务：010-64518899
网 址：<http://www.cip.com.cn>
凡购买本书，如有缺损质量问题，本社销售中心负责调换。

定 价：198.00元

版权所有 违者必究

《现代植物科学系列》 总序

在过去的一个世纪里，植物科学已逐步完成从传统的描述性植物学到分子水平上解析绿色生命过程的植物生物学的转变。特别是近20年来，可以说取得了突破性的进展，这主要归功于模式植物(如拟南芥菜和水稻等)以及分子生物学、遗传学和各种组学手段的广泛应用，从而让人们能够对植物的生长发育、植物与环境的相互作用等重要生命现象的理论基础有了深入的了解。从社会和经济需求角度而言，植物科学作为生命科学的重要组成部分，在解决人类目前所面临的食品安全、粮食和燃油资源短缺、生态环境恶化和不断增长的疾病挑战等一系列重大问题方面，尤其是在21世纪将扮演更加举足轻重的角色。

人们对植物生命过程的了解伴随着人类利用植物的活动而出现。自公元前约371~前286年希腊的特奥弗拉斯托(Theophrastus)出版了植物学奠基著作《植物的历史》和《植物本原》以来，植物科学经历了主要以描述和比较方法进行研究的“描述植物学时期”、以实验为主要研究手段的“实验植物学时期”和20世纪后期至今以分子生物学技术的广泛应用为主要特色的“现代植物学时期”三个发展阶段，已经形成了一个多学科交叉且分支齐全的科学体系。国内外研究人员在植物科学的各个分支领域都取得了许多重要的科研成果。植物科学各分支学科也在发展中彼此交叉渗透，各分支学科间的界限逐渐淡化并出现了一些新的研究领域。

为总结和反映这些新的研究技术和成果，为植物学领域的师生和科研人员提供有益的参考和启示，化学工业出版社邀请国内植物科学各领域的著名专家学者，编写了这套“现代植物科学系列”丛书，从多个角度展示植物科学的最新进展及其应用前景。该系列丛书具有以下几个特点：

(1) 传统与前沿并重，尽可能反映近年来植物学科的发展与成就

丛书既包括“植物生理学”、“植物系统分类学”、“植物病理学”等传统植物学分支学科——它们是植物生物学的基础，近年来随着诸多新技术、新方法的应用，这些学科有了很大的发展，需要重新对这些传统学科进行定位、整合和更新，内容上注重介绍先进的科研方法与技术、学科新取得的发展与成果，并对新出现的论点进行讨论等；也包括“植物分子生物学”、“植物分子发育生物学”、“植物

基因组学”、“植物蛋白质组学”、“植物代谢组学”等植物领域新近形成的研究热点和研究方向，介绍这些备受关注的领域取得的新成果、技术方法与发展方向，对这些领域进行总结介绍，希望对科研起到引导和提示作用；同时还包括“植物资源学”等重要的环境相关课题，以满足广大读者希望对这些领域进行系统了解、学习与研究的需求。

（2）内容简明精要，资料丰富，可读性强

在简明精要、系统科学的基础理论基础上，注意介绍前沿性的研究发展及论点讨论，力图启发、开阔读者的研究思路；注重新技术、新方法在学科中的应用，并注意介绍各学科的应用技术及对实际的指导，力图引发及加强读者在本领域的研究兴趣，树立自己的研究志向；同时注重系统性、可读性，编者在丰富的研究资料及科研经验与科研成果的基础上，将本领域的重要知识和研究发展进行科学综合，力求内容深入浅出、图文并茂，使读者容易理解与掌握，希望读者读后能够对该学科有一个清晰的系统把握，读有所值。

（3）作者阵容强大，代表了我国植物科学研究和教学领域的一流水平

该系列书籍均邀请国内及国外相关领域知名学者撰写或翻译，他们在本领域研究造诣深厚，对本领域的知识体系与发展可以有一个系统的把握；既有作者自己撰写的力作，也有引进国外的经典、前沿书籍，希望能够对植物领域的科研工作起到切实的参考作用。

殷切希望“现代植物科学系列”丛书的出版能够切实满足我国植物领域科研人员的需求，也能引导和鼓励有志于植物研究的青年学者投身植物科学研究领域，推动我国植物科学的研究与发展。

是以为序。

中国科学院院士 第三世界科学院院士



于北京大学

2006年4月17日

前言 FOREWORD

生命科学研究日新月异,基因组学及相关分析技术的提高极大地推动了转录组学、蛋白组学、代谢组学、表型组学等的快速发展,人们可以采用系统集成的手段,多层次揭示生命现象。这种研究思路和方法催生了系统生物学。代谢组学是系统生物学的重要组成部分,代谢物与表型最为接近,代谢物的变化能够更直接地揭示基因的功能,代谢标识物的发现在疾病早期诊断等方面有着重要的应用价值。

自然界的植物种类繁多,不同的类群往往合成一些特殊化合物。据估计,植物产生的代谢物数量有20万~100万种之多,且结构与理化性质差异很大,从而使植物代谢组学研究更具挑战性。自2002年第一届国际植物代谢组学大会在荷兰瓦赫宁根召开以来,植物代谢组学的分析技术和方法发展迅速,并已开始应用于植物科学研究、生物技术安全评价、作物育种等多个领域,在基因功能研究、代谢途径及代谢网络调控机理的解析等方面发挥着重要的作用。我国植物代谢组学研究于2005年前后开始起步,目前已形成较好的发展趋势。本书由国内活跃在植物代谢研究一线的科研人员共同编著而成,既介绍植物代谢组学研究的最新进展、分析未来数年的发展趋势,也展示作者们各自科研项目的新研究,较好地反映出国内当前的研究水平。

本书从三个部分介绍和展示植物代谢组学。第一部分包括植物代谢组学概述及代谢物分析技术的原理、方法、存在的问题和注意事项及进展等,主要包括质谱和核磁共振分析技术;第二部分包括代谢组学数据分析、代谢物定性、代谢组学数据库和代谢网络研究;第三部分是植物代谢组学详细的应用实例,大多是近年来的研究成果。编写时力求做到符合实际和实用,期望本书能推动植物代谢组学在我国的迅速发展。

感谢各章编委在繁忙的科研和教学任务中抽出时间撰写稿件。本书的多位编写人员获得科技部“973”计划“作物特殊营养成分的代谢及其调控研究(2007CB108800)”及“畜禽产品中有害物质形成原理与控制途径研究(2009CB118800)”的资助。本书的编写也得到了“作物特殊营养成分的代谢及其调控研究”项目办公室的资助。非常感谢中国科学院植物研究所刘春明研究员为本书的出版给予的关心和帮助。对于本书中的错误与不足,欢迎读者批评指正。

漆小泉 王玉兰 陈晓亚
2010年11月21日

目录 CONTENTS

1 第1章 概述

1.1 代谢物分析技术的发展趋势	3
1.2 代谢组学数据分析的现状及其面临的挑战	9
1.3 植物代谢组学的应用	13
参考文献	19

2 第2章 气相色谱-质谱联用技术

2.1 GC-MS 联用的原理和关键技术	27
2.2 样品制备和分析技术	36
2.3 新技术、发展趋势	40
2.4 常见问题、注意事项	41
2.5 展望	43
参考文献	44

3 第3章 液相色谱-质谱联用技术

3.1 LC-MS 基本原理	47
3.2 数据解读	51
3.3 新技术与发展趋势	53
3.4 常见问题、注意事项等	57
3.5 展望	60
参考文献	60

4	第4章 核磁共振技术	
	4.1 核磁共振发展概况	64
	4.2 核磁共振基本原理	65
	4.3 核磁共振波谱仪	66
	4.4 化学位移	67
	4.5 自旋耦合	74
	4.6 常见基团的化学位移范围	75
	4.7 代谢组学研究中常用的二维谱	81
	4.8 核磁共振谱图解析	84
	4.9 常见问题及解决方案	94
	4.10 植物代谢组学研究中样品的提取方法	97
	4.11 新技术及发展趋势	98
	参考文献	99

5	第5章 代谢组学数据的多变量分析	
	5.1 前言	102
	5.2 数据集的预处理	102
	5.3 数据特征的提取和选择	107
	5.4 数据模型的识别和验证	112
	5.5 统计全相关谱	113
	5.6 小结	114
	参考文献	115

6	第6章 基于质谱平台的代谢组学数据处理	
	6.1 数据提取	120
	6.2 数据预处理和峰提取	121
	6.3 基于统计的模式识别	134
	参考文献	155

7	第7章 代谢物定性方法和代谢组学数据库介绍	
	7.1 引言	160
	7.2 常见有机物质谱裂解规律	163
	7.3 GC-MS代谢产物定性方法	165
	7.4 LC-MS代谢产物定性方法	172
	7.5 代谢组学数据库	178
	参考文献	181

8	第8章 植物代谢网络	
	8.1 植物的代谢网络	185
	8.2 植物代谢网络的特点	186
	8.3 植物代谢网络的分子生物学研究	192
	8.4 存在问题与展望	198
	参考文献	200
9	第9章 LC-MS在植物代谢组学中的应用	
	9.1 分析样品制备	205
	9.2 LC-MS在基因功能研究中的应用	206
	9.3 应用于转基因植物“实质等同性”检测	211
	参考文献	215
10	第10章 代谢组学方法在中草药鉴别中的应用	
	10.1 引言	218
	10.2 实验部分	220
	10.3 结果	223
	10.4 总结与讨论	231
	参考文献	232
11	第11章 基于代谢组学方法的青蒿素生物合成研究	
	11.1 引言	235
	11.2 实验部分	238
	11.3 数据分析及讨论	239
	11.4 结论	258
	参考文献	259
12	第12章 以核磁共振技术为基础的代谢组学方法的应用	
	12.1 引言	264
	12.2 以迷迭香为例研究植物代谢组成受环境与加工因素的影响	264
	12.3 以青蒿为例研究预测药效和毒性	279
	12.4 结论	285
	参考文献	285
13	第13章 大麦叶锈病数量抗病性的代谢组学研究	
	13.1 引言	289
	13.2 实验部分	291
	13.3 结果与分析	293
	13.4 讨论	297
	参考文献	301

植物代谢组学
——方法与应用

Plant Metabolomics:
Methods and Applications

第1章 概述

陈晓亚^① 漆小泉^② 段礼新^②

①中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态
研究所, 上海, 200032 ;

②中国科学院植物研究所, 北京, 100093

代谢是生命活动中所有（生物）化学变化的总称，代谢活动是生命活动的本质特征和物质基础。分子生物学中心法则认为信息流是从脱氧核糖核酸（Deoxyribonucleic Acid, DNA）到信使核糖核酸（Messenger Ribonucleic Acid, mRNA）再到蛋白质，酶蛋白催化代谢物的反应，最后汇聚并相互作用产生多种多样的生物表型。DNA作为生命信息的载体，发挥着至关重要的作用，全面解析物种的DNA组成及其构成的基因功能的基因组学研究是最早发展起来的生物组学。基因组学研究带动了生命科学的迅猛发展，基因组学的成功应用极大地推动了转录组学、蛋白组学、代谢组学、表型组学等的快速发展，如图1-1所示。随之，采用上述组学多层次地全面揭示生命现象的系统生物学应运而生。

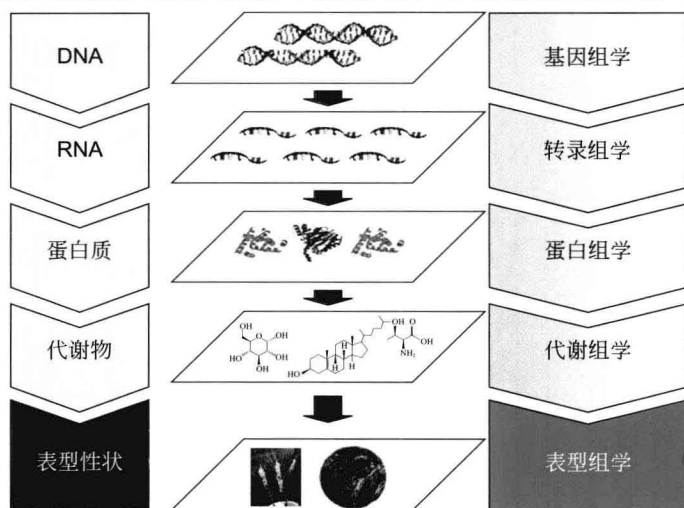


图1-1 代谢组学是系统生物学的一部分，多层次的系统研究将揭示植物性状形成的分子和代谢基础

代谢组学（Metabolomics或Metabonomics）旨在研究生物体或组织甚至单个细胞的全部小分子代谢物成分及其动态变化（Oliver et al., 1998; Fiehn, 2002）。早在公元300年前，古希腊人就意识到观察体液或组织的改变可以预测疾病，这与代谢组学用于疾病诊断的思路是一致的（Nicholson and Lindon, 2008）。代谢组学是有机化学、分析化学、化学计量学、信息学和基因组学、表达组学等多学科相结合的交叉学科，已经渗透到生命科学研究的各个方面。代谢组学是系统生物学中非常重要的一个环节，而且距表型最接近，代谢组学研究能更全面地揭示基因的功能，为生物技术的应用提供科学依据。

植物代谢组学是代谢组学研究的重要组成部分。已知的植物有30万余种，尚

不包括未知的植物物种，据估计它们产生的代谢物数量有20万~100万种（Dixon and Strack, 2003），特别是植物次生代谢产物，结构迥异，就当前（或以后一段时间内）的仪器分析水平而言，还没有一种分析方法能够检测所有的代谢物，这使得植物代谢组学研究更具挑战性。其他章节将详细介绍植物代谢物分析技术、数据分析方法以及代谢组学的应用实例，本章概述植物代谢组学的主要发展趋势及其面临的挑战。

1.1 代谢物分析技术的发展趋势

1.1.1 样品制备自动化

取样、代谢物提取及分析前处理（衍生化）是代谢组学样品制备技术的三个关键组成部分，是获得可靠数据的前提。为了使取样和提取过程达到快速、高效、均一性好及保持化合物的稳定，一般将植物组织器官用液氮快速冷冻，研磨成粉末后，迅速加入样品提取液。常用到的提取液有甲醇-氯仿-水、甲醇-异丙醇-水、甲醇-水-甲酸等。用气相色谱-质谱联用（Gas Chromatography Mass Spectrometry, GC-MS）分析的提取物需经过干燥和衍生化处理，一般采用两步衍生化方法。第一步是加入甲氧胺盐吡啶溶剂，目的是为了减少还原性糖的成环及保护羰基。第二步是三甲基硅烷化反应，是为了降低物质的沸点。常用的硅烷化试剂包括双（三甲基硅烷）三氟乙酰胺 [Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide, BSTFA] 和 *N*-甲基-*N*-（三甲基硅烷）三氟乙酰胺 [*N*-Methyl-*N*-（ trimethylsilyl ） trifluoroacetamide, MSTFA]，它们的硅烷化效果相似，但是MSTFA的沸点较低，衍生化试剂及副产物在色谱图中出峰时间较早，对代谢物的分析影响较小。使用液相色谱-质谱联用（Liquid Chromatography Mass Spectrometry, LC-MS）分析的提取物需要经过过滤，去除不溶物，以防止堵塞分离柱。为实现代谢组学分析所要求的全局性、重现性及高通量的特点，已发展了一些有效的取样、提取及衍生化方法。例如，2004年Weckwerth等（Weckwerth et al., 2004）基于甲醇-氯仿-水（2.5 : 1 : 1，体积之比）提取液，实现了从30 ~ 100mg拟南芥鲜叶片中提取代谢物、蛋白质和核糖核酸（Ribonucleic Acid, RNA），可分别用于代谢组、蛋白组和转录组分析，为系统生物学研究提供了方便。

由于样品制备技术过程繁琐、复杂，极易引起代谢组学数据出现偏大的误差，因此，自动化的取样、提取和分析前处理技术应运而生（Nikolau and Wurtele,

2007), 使用多功能自动进样器进行样品的在线衍生化和自动进样系统, 大大减少了手动衍生化的繁琐和衍生化时间差异等引起的误差。样品制备技术的机械化和自动化是今后发展的趋势, 能最大限度地减少实验误差, 使数据更具稳定性和重现性。

1.1.2 植物单细胞分离技术及高分辨质谱成像技术

目前, 植物代谢组学样品的来源主要是植物器官和组织或悬浮培养的细胞系。这些实验材料包含了不同类型的植物细胞、不同生长发育阶段的细胞以及不同环境和实验处理的细胞, 不同功能细胞之间的代谢物种类和数量也是不同的, 它们自身之间就存在差异 (Saito and Matsuda, 2010)。另外, 代谢物在组织之间还可以通过维管束进行转运, 例如, 甲硫氨酸硫酸代葡萄糖苷主要累积在拟南芥种子和芽中, 但是与它们合成相关的基因却在节间维管束组织中表达 (Nour-Eldin and Halkier, 2009)。不分发育时期和细胞类型的取样和提取技术虽然能实现快速简便的样品制备, 但也在很大程度上降低了代谢组学揭示植物生命活动的的能力。

单细胞分离技术及高分辨的质谱成像技术是今后植物代谢组学的发展趋势。精确的细胞组织分离技术结合超高灵敏的检测技术, 可以研究细胞内的代谢和细胞间的代谢物转运。最近, 质谱成像技术也被用来探测代谢物的空间分布, 该技术采用连续的激光对植物组织表面进行扫描, 在激光的激发下植物组织表面代谢物离子化并被质谱仪检测, 组织或单细胞中代谢物的分布情况可以通过质谱强度来观测。例如使用胶状石墨辅助激光解析电离质谱成像技术能观测到花和花瓣中特异性累积黄酮类物质 (Saito and Matsuda, 2010)。

1.1.3 全二维气相色谱与高分辨率的飞行时间质谱联用分析技术

代谢物的分离和检测是植物代谢组学分析技术的两个核心组成部分。分离技术主要采用各种色谱分离方法, 如气相色谱 (Gas Chromatography, GC)、液相色谱 (Liquid Chromatography, LC) 及毛细管电泳 (Capillary Electrophoresis, CE) 等, 而检测技术目前主要是使用质谱 (Mass Spectrometer, MS)、核磁共振 (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) 等手段。二者的有效结合可基本实现植物代谢组学分析的需求。代谢组学分析应当是对样品中所有的代谢物进行全面地定性、定量分析。然而植物每个细胞中的代谢物有数百种至数千种之多, 并且不同的组织器官、细胞类型、亚细胞器及细胞间合成并积累不同的代谢物, 同

时代代谢物的合成和积累的种类及含量受到发育时期变化以及生长环境差异的影响。从植物组织材料提取的样品中代谢物数量巨大（至少数千种）、结构复杂、类似物多，含量的变化范围也极宽（据估计含量的差别在 10^7 左右）（Hegeman, 2010）。为了实现对样品中代谢物进行全面地定性和定量分析，要求分离和检测设备具有稳定性好、化合物定性能力强、分辨率和灵敏度高、检测速度快及动态检测范围宽的特性。

质谱是将化合物电离后产生可以测量的分子离子或碎片离子，通过检测离子质荷比的大小和丰度，从而对化合物进行定性和定量分析。根据质量分析器的不同分为多种类型的质谱。质谱较其他技术具有更高的灵敏度和较快的检测速度以及宽广的动态范围，还可以和气相色谱、液相色谱技术联用，大大提高了对复杂基质的分析能力（Ekman et al., 2009）。早期植物代谢组学分析采用四极杆质谱检测器，随着更先进的飞行时间（Time of Flight, TOF）质谱技术的发展，它具有更加优越的分析品质。TOF检测器是根据带电荷的离子在真空飞行管中飞行时间的不同，分析不同离子的质荷比，具有非常高的灵敏度和扫描速度，其数据采集速率最高可达500张全谱图/s，有利于快速分析，提高了谱图解卷积的效果，质量检测的动态范围可达 10^5 以上。将TOF/MS和气相色谱联用，因气相色谱本身具有很高的分辨能力（一般的毛细管柱有一百多万个理论塔板）和很好的稳定性，与飞行时间（TOF）质谱检测器联用，可实现代谢组学研究所需要的技术指标。一般采用标准的电子轰击电离离子源及标准的电压（ -70eV ），化合物的碎片离子峰较稳定并具有可比性，国际上已建立了通用的化合物库（如美国国家标准技术研究院质谱数据库，National Institute of Standard and Technology Mass Spectral Database），这极大地缓解了植物代谢组学研究中化合物定性的困难。Weckwerth等使用气相色谱飞行时间质谱（Gas Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometer, GC-TOF/MS）定量了1000多种化合物，通过代谢网络分析，区分蔗糖合成异构酶突变体的植物（Weckwerth et al., 2004）。Wagner等利用GC-TOF/MS的保留指数和质谱对代谢物进行定性分析（Wagner et al., 2003），并构建了植物代谢组学数据库，即格勒姆代谢组数据库（Golm Metabolom Database, GMD）（Kopka et al., 2005）。

全二维气相色谱（Comprehensive Two-dimensional Gas Chromatography, GC×GC）的发展成熟，进一步加强了探测复杂代谢物的能力。GC×GC是将两支固定相不同而且互相独立的色谱柱以串联方式连接，第一维色谱柱分离后的每一个组分，经过调制器的捕集聚焦，以脉冲方式进入第二维色谱柱，而第二维色谱柱很短，可实现快速分离，结合高达500张谱图/s的速度进行质谱扫描，获得二维气相色

谱数据。全二维气相色谱连接飞行时间质谱具有极高的分离能力以及灵敏度等特点，是目前最为强大的分离工具之一，广泛应用于代谢组学等复杂体系的分离分析中（Wang et al., 2010）。最近，Zoex公司推出的全二维气相色谱与高分辨率的飞行时间质谱联用的设备（High Resolution Time-of-Flight Mass Spectrometer Detector for GC×GC, GC×GC-HiResTOF/MS），其TOF/MS具有4000～7000的分辨率，质量精度为小数点后三位。精准的质量数可用于推测化合物的分子式，高质量精确度的碎片离子峰使重叠解卷积变得准确且容易，大大加强了化合物的定性能力。可以预言，此类型的设备将会广泛应用到植物代谢组学的研究，是植物代谢组学分析技术的发展趋势。

气相色谱适用于分析容易气化的低极性、低沸点代谢物，如各类挥发性化合物；或者衍生化后低沸点的物质，如氨基酸、有机酸、糖类、醇类等，能检测到植物提取物中的部分初生代谢产物，单独使用GC-MS还不能全面揭示植物所有代谢物的变化。

1.1.4 超高效液相色谱与串联四极杆飞行时间质谱联用技术

同GC相比，液相色谱（LC）不受样品挥发性和热稳定性的影响，样品前处理非常简单，过滤后可以直接进样。因此，液相色谱与质谱结合可有效分析植物中丰富的次生代谢产物，包括各种萜类化合物、生物碱、黄酮、硫代葡萄糖苷等化合物，基于LC-MS的分析设备已发展成为代谢组学分析必备的核心设备。

与液相色谱（LC）相连接的质谱类型较多，如四极杆质谱、串联三重四极杆质谱、离子阱质谱、飞行时间质谱、串联四极杆飞行时间质谱、串联离子阱飞行时间质谱、傅里叶变换离子回旋共振质谱、电场轨道阱回旋共振组合质谱等。LC-MS可使用的离子源也比较丰富，常见的有电喷雾电离源（Electrospray Ionization, ESI）、大气压化学电离源（Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI）、基质辅助激光解吸电离（Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI）、大气压光电离源（Atmospheric Pressure Photo Ionization, APPI）等；还有不同的扫描模式，如正离子、负离子模式，选择离子检测扫描（Selected Ion Monitoring, SIM），选择性反应检测扫描（Selected Reaction Monitoring, SRM），多反应检测扫描（Multiple-Reaction Monitoring, MRM），全扫描以及二级质谱MS/MS或多级质谱MSⁿ扫描等。在众多的质谱类型中，高分辨率的串联四极杆飞行时间质谱（Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometer, Q-TOF/MS）能最大程度地满足植物代谢组学研究的需要，目前Q-TOF的扫描速度可达每秒20张谱图，最

新的飞行时间质谱 (Triple TOF) 可达每秒 100 张谱图, 分辨率普遍达到 4 万以上, 同时拥有宽于 10^5 的动态范围。LC-Q-TOF/MS 已成为植物代谢组学研究广泛选用的分析仪器, 它已成功应用于番茄的代谢组学研究中 (Moco et al., 2006), LC 后连接光电二极管阵列检测器 (Photo Diode Array, PDA) 并使用 ESI 源系统地分析了番茄中中等极性的代谢物, 结合保留时间、准确质量、紫外光谱和二级质谱信息, 建立了番茄的代谢物数据库 MoTo DB。同样, 使用 Waters 公司的 CapLC 与 Q-TOF/MS 联用, 对拟南芥根和叶中的代谢物进行了全面分析 (von Roepenack-Lahaye et al., 2004)。LC-Q-TOF/MS 已成功地用于分析拟南芥 14 个生态型和 160 个重组自交系的营养生长期代谢物的变化, 发现 75% 的化合物峰可稳定遗传, 并通过代谢物数量性状位点 (Quantitative Trait Loci, QTL) 分析将其定位于拟南芥基因组 (Keurentjes et al., 2006; Fu et al., 2007)。

多级质谱, 如液相色谱-线性离子阱质谱联用仪 (Liquid Chromatography Linear Trap Quadrupole Mass Spectrometer, LC-LTQ-MS/MS²) 可实现每秒三次全谱扫描及三次二级质谱扫描, 同时获得化合物的定量和定性信息 (Evans et al., 2009)。超高分辨率的电场轨道阱回旋共振组合质谱 (Linear Trap Quadrupole Orbitrap Mass Spectro Meter, LTQ-Orbitrap-MS) 和傅里叶变换离子回旋共振质谱 (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, FT-ICR-MS) 具有高达 60000 ~ 100000 的分辨能力和多达 10 级的 MSⁿ 能力, 可得到化合物精确的分子量, 用于预测分子式, 极有利于化合物的定性分析, 以及用于建立化合物质谱数据库等。但是为了获得超高的分辨率, 需要较长的扫描时间。

超高压液相色谱 (Ultra-high Performance Liquid Chromatography, UPLC 或 UHPLC) 技术的发展也为代谢组学分析技术锦上添花, 该技术使用粒径 < 2.0 μm 填料的色谱柱, 并且克服了传统 HPLC 压力的限制, 柱压可提高到 15000 psi^① 以上, 提高了柱效, 色谱峰宽更窄, 增加了色谱分离度, 并且缩短了分析时间, 非常适合与高扫描速度的 Q-TOF/MS 联用, 用于植物代谢组学高通量分析。最近, 色谱填料技术也有突破, 亲水作用色谱技术 (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, HILIC) 是一种采用极性固定相 (如硅胶、氨基键合硅胶等), 而以水、极性有机溶剂为流动相的色谱模式, 特别适用于强极性和强亲水性小分子物质的分离, 是反向色谱的一个补充 (Tolstikov and Fiehn, 2002; Cubbon et al., 2010)。

① 1psi(lbf/in²)=6894.76Pa。

总之，液相色谱-质谱联用仪对样品提取要求简单，易于实现高通量和自动化，能检测到植物中大部分的代谢物，其必将在植物代谢组学研究中发挥更大的作用。液相色谱与质谱匹配的组合多种多样，还具有很大的发展潜力。超高压液相色谱与高分辨率的串联四极杆飞行时间质谱的联用技术将是植物代谢组学分析的主流平台。

1.1.5 其他特殊用途的分析技术

(1) 毛细管电泳-质谱 (Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry, CE-MS) 联用技术 毛细管电泳是 20 世纪 80 年代初发展起来的一种基于待分离物组间淌度和分配行为差异而实现分离的电泳新技术，具有快速、高效、分辨率高、重复性好、易于自动化等优点。CE-MS 的主要优点是能够检测离子型化合物，如磷酸化的糖、核苷酸、有机酸和氨基酸等。研究人员曾使用 CE-MS 技术从拟南芥中检测到 200 个代谢物，并鉴定了其中的 70 ~ 100 个化合物 (Ohkama-Ohtsu et al., 2008)。

(2) 核磁共振技术 核磁共振 (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) 技术是一种无偏的、普适性的分析技术，样品的前处理简单，测试手段丰富，包括液体高分辨 NMR、高分辨魔角旋转 (High Resolution-Magic Angle Spinning, HR-MAS) NMR 和活体 (*in vivo*) 核磁共振波谱 (Magnetic Resonance Spectroscopy, MRS) 技术等。NMR 方法也有其局限性，例如它的检测灵敏度较低，而且检测动态范围有限，很难同时检测同一样品中含量相差很大的物质 (朱航等, 2006)。近来，在线 LC-UV-SPE-NMR-MS 技术结合液相分离、固相萃取 (Solid Phase Extraltion, SPE) 进行富集、全氘代溶剂洗脱，已用在植物代谢物结构的鉴定中 (Exarchou et al., 2003; Lin et al., 2008)。

(3) 傅里叶变换-红外光谱 傅里叶变换-红外光谱 (Fourier Transform InfraRed, FT-IR) 是基于红外线引起分子中的化学键振动或转动能级跃迁而产生的吸收光谱。植物样本的红外光谱是其中所有化合物红外光谱的叠加，具有指纹特性，FT-IR 可以对样品进行快速、高通量地扫描，并且不破坏样本，每天能够分析 1000 多个样本，适合从大量群体中筛选代谢突变体 (Allwood, et al., 2008)；缺点是难以鉴定差异的代谢物，对结构类型相似的化合物难以区分。

植物代谢物化学多样性大，有些成分含量极微且动态范围宽，代谢物的合成和积累易受外界环境的影响。代谢组学也不能像蛋白质组学、转录组学那样，利用基因组信息来推断代谢物的结构。目前还不能使用单一的分析手段实现代谢物的全景定性和定量分析，只能使用多种分析手段，相互取长补短，尽可能多地跟踪监测植物代谢物的变化。