

DOI: 10.13376/j.cblls/2015136

文章编号: 1004-0374(2015)08-0978-08



王国栋, 研究员, 博士生导师。我们实验室的主要研究方向是综合代谢组学、基因组学和传统的分子和生化技术去探索植物中未知代谢途径, 克隆、功能鉴定代谢途径中的酶和酶学机理; 研究植物重要代谢途径的调控及其与植物重要农业性状的关系。目前课题组正在从事的研究包括: 植物代谢组学分析平台的建立; 大豆、黄瓜中对人体健康有益化合物形成的分子遗传和代谢调控机制; 植物次生代谢反应器——腺毛 (glandular trichome) 的基因组学、代谢组学分析及其次生代谢物合成途径研究; 拟南芥中 NAD 补偿途径 (salvage pathway) 研究。

LC-MS在植物代谢组学分析中的应用

常玉玮*, 王国栋*

(中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101)

摘要: 利用植物代谢组学研究植物体系受刺激或扰动后的代谢变化, 可以揭示植物面对外界环境变化或基因变化时的应答机制。液相色谱-质谱联用 (LC-MS) 技术由于其高分辨能力、高灵敏度, 适合高沸点、热不稳定及高分子量化合物的检测等优点而在植物代谢组学研究中发挥重要作用。近些年来, LC-MS 在诸多方面取得了较快发展, 如快速 LC-MS、纳流 LC-MS、二维 LC-MS、衍生化 LC-MS 等。随着分析方法的发展和完善, 基于 LC-MS 的植物代谢组学已成功应用于代谢表型差异、转基因植物安全性评价、生物及非生物胁迫、植物基因功能鉴定、辅助育种等多个研究方向。

关键词: 液相色谱-质谱联用技术; 植物; 代谢组学

中图分类号: Q493; Q94-33 **文献标志码:** A

Application of LC-MS in plant metabolomics

CHANG Yu-Wei*, WANG Guo-Dong*

(Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Plant metabolomics helps to illustrate the mechanisms underlying plant responses to environment change or gene mutations at the level of metabolites. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) is characteristic of high resolution power and high sensitivity. Furthermore, LC-MS is suitable for the analysis of metabolites with high boiling point or high molecular weight or metabolites that are not thermostable. Based on these advantages, LC-MS analysis plays an important role in plant metabolomics. LC-MS has been significantly improved in several aspects in recent years, including fast LC-MS, nano LC-MS, 2D LC-MS, derivatization LC-MS etc. With the development of LC-MS technology, plant metabolomics has been successfully applied in many fields, including

收稿日期: 2014-12-15; 修回日期: 2015-02-03

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“937”项目)(2012CB113900, 2013CB127000); 国家自然科学基金项目(31470387)

*通信作者: 常玉玮, E-mail: changyw@genetics.ac.cn; 王国栋, E-mail: gdwang@genetics.ac.cn, Tel: 010-64806572

phenotypic discrimination, safety assessment of transgenic plants, biotic or abiotic stress study, identification of plant gene function, crop breeding etc.

Key words: LC-MS; plant; metabolomics

代谢组学 (metabonomics) 由 Nicholson 等^[1] 在 1999 年首次提出, 并将其定义为生物体受病理、生理刺激或基因改变时代谢应答的定量分析。Fiehn^[2] 在 2002 年提出代谢组学 (metabolomics) 为生物体内所有代谢物全面的定性定量分析方法。根据研究目的和代谢物覆盖的广度, 代谢组学可以分为代谢组学靶标分析 (target analysis)、代谢组学轮廓分析 (metabolic profiling analysis)、代谢组学指纹分析 (metabolic fingerprinting analysis) 及代谢组学分析等 4 个层次, 而这 4 个层次又可以划分为靶标代谢组学及非靶标代谢组学。随着代谢组学的概念、研究策略、分析方法的不断发展和完善, 代谢组学已广泛应用于药物筛选与毒性评价、药物质量控制、临床相关标记物的发现、疾病的早期诊断和治疗、功能基因组学、植物育种、微生物工程、营养学、环境毒理学等多个研究领域。

植物代谢组学以植物为研究对象, 是代谢组学的重要分支。据估计, 所有植物中的代谢物约 20 万~100 万种^[3], 既包括植物生长发育及生命活动不可或缺的初生代谢物, 如有机酸、氨基酸、核酸、碳水化合物、脂类等, 还包括与植物抗病、抗逆等密切关系的次生代谢物, 如生物碱、酚类、醌类、黄酮类、萜类等。植物中代谢物浓度从痕量的植物激素到大量积累的化合物如蔗糖, 差别达 10^7 。不同类别的代谢物化学性质各异, 既包括强极性的氨基酸, 又包括非极性的三酰甘油酯^[4]。真正意义上的植物代谢组学是对植物样品中所有的代谢物进行全面的定性、定量分析, 而这一目的的实现需要借助高灵敏度的多种检测技术。

目前, 代谢组学研究中的主流检测技术包括气相色谱质谱联用 (GC-MS)、核磁共振 (NMR)、毛细管电泳质谱联用 (CE-MS)、液相色谱质谱联用 (LC-MS) 等。GC-MS 具有高分辨能力、高灵敏度、大量数据库等特点, 有利于化合物结构鉴定, 但由于质谱库中代谢物数目有限, 很多化合物的结构无法确定。样品在进行 GC-MS 分析前, 需进行衍生化处理以增加样品的挥发性, 但衍生化反应过程中可能引起样品的变化及引入干扰物质; 另外, 利用 GC-MS 无法实现对热稳定性较差和高分子量代谢

物的分析。NMR 检测时植物样品制备简单、分析通量高, 可实现代谢物的结构鉴定; 但是 NMR 检测灵敏度较低, 动态范围较窄, 无法实现痕量物质的检测。CE-MS 可实现离子型化合物的分析, 样品不需要进行衍生化处理, 有机溶剂和样品量消耗少, 但较少应用于植物研究。LC-MS 具有较高的分辨能力、较快的分析速度、高灵敏度等特点, 与 GC-MS 相比更适合于高沸点、热不稳定性及高分子量化合物的检测; 与 NMR 相比, 检测灵敏度高、动态范围宽。LC-MS 是植物次级代谢产物 (生物碱、酚酸、类黄酮、苯丙素、硫代葡萄糖苷、多胺等) 分离分析的主要手段^[5]。近年来随着 LC-MS 在分离技术和检测技术上的进步, 其在植物代谢组学中发挥着越来越大的作用。本文主要介绍近年来 LC-MS 方法的主要进展及 LC-MS 在植物代谢组学中的应用。

1 LC-MS主要进展

1.1 快速LC-MS

为了实现检测的高通量及高分离效率, 很多快速 LC-MS 方法被开发出来, 而 UHPLC 是目前建立的最完善的、应用最广泛的方法。UHPLC 利用较小的粒径 (亚 $2\ \mu\text{m}$ 颗粒) 和超高压 (高达 1300 bar) 实现了样品的快速分离并获得了较窄的色谱峰^[6]。随着 UHPLC 填料的发展, 快速 LC-MS 的分离效率也在逐渐提高。Oláh 等^[7] 比较了长度为 5 cm, 填充 $2.6\ \mu\text{m}$ 核壳材料的窄孔径 Kinetex 柱、填充亚 $2\ \mu\text{m}$ 全多孔材料的色谱柱和窄孔径整体柱对大分子及小分子的分离效果, 结果表明 Kinetex 柱在高线速度下可获得比填充亚 $2\ \mu\text{m}$ 全多孔材料的色谱柱更高的分离效率, 高流速分析时 Kinetex 柱在保证分离效率的情况下达到了快速目的。

1.2 纳流LC-MS

微量化、集成化 LC-MS 的开发是液相色谱-质谱技术发展的一个重要方向。纳流液相色谱技术 (nano LC) 发展于 1990 年左右, 因具有检测灵敏度较高、分析通量高、运行成本较低、环境污染小等特点而引起广泛关注^[8-9]。近年来, 发展更加稳健的芯片纳流液相色谱/质谱系统 (LC-Chip/MS) 将富集柱、分析柱、纳流电喷雾喷针整合在芯片上, 在

这个芯片上实现了样本浓缩、分离分析及电喷雾功能。这种技术显著降低了系统的死体积及柱后的峰分散；另一方面，微型化的仪器在较大程度上降低了样品用量、溶剂消耗，并显著提高了离子化效率和检测灵敏度^[10]。Zhao等^[11]比较了利用LC-Chip/MS和常规LC/MS对不同极性的药物标准品的分析结果，发现LC-Chip/MS的检测灵敏度提高3~40倍，并且获得的色谱峰的保留时间和峰面积重复性较好，方法稳健。LC-Chip/MS技术已被广泛应用于蛋白质组学、标记物发现等研究，但是在小分子代谢物方面的研究相对比较少，目前报道的几篇文献是关于葡萄中的花青素^[12]、大豆中的类黄酮^[13]、人体尿液中的7-氨基氟硝西洋^[14]等。

1.3 二维LC-MS

二维液相色谱技术(2D-LC)将不同分离机制的色谱柱结合起来，极大地提高了分离能力和峰容量，降低了色谱峰的重叠。二维液相色谱可分为离线^[15]和在线^[16]两种模式。离线模式可实现对每一维分离条件的全面优化，但是更费时费力，另外由于第一维馏分在转移过程中易污染、损失而造成分析结果的重复性较差；在线模式自动化程度较高、重复性好、分析通量高，但需注意二维溶剂的兼容性和第二维的最大样品量等问题^[17]。不同类型的质谱串联使用是另一个技术层面上的多维LC-MS。Byrdwell^[18]将3种不同的质谱(四级杆-线性离子阱、三重四级杆、离子阱)和3种非质谱检测器(紫外检测器、蒸发光散射检测器和荷电气溶胶检测器)串联，构成多维LC-MS系统，利用该系统一次运行可获得更全面的代谢物信息。在该系统中，四级杆-线性离子阱进行大气压化学电离模式下的选择离子监测、多反应监测和增强质谱扫描；四级杆进行大气压化学电离模式下的全扫描；离子阱进行电喷雾模式下的多级质谱扫描。在该研究中，米糠油样品经稀释后直接进样分析，避免了皂化、样品提取等复杂的预处理步骤，利用多种检测器串联实现了米糠油中维生素D₃及三酰甘油酯的定性定量分析。

1.4 衍生化LC-MS

LC/MS的分离能力强、灵敏度高等特点使其成为定量分析中最常用的技术手段之一，但是建立稳健的LC/MS方法的前提条件是被分析化合物必须满足以下几个条件：化学性质稳定、在LC色谱柱上有合适的保留行为、在ESI源或APCI源模式下能够电离等^[19]。代谢物种类繁多，化学性质各异，

很多代谢物并不能满足上述条件。为建立LC/MS分析方法，需借助化学衍生化来提高化合物的稳定性，改善化合物在色谱柱上的保留，增强化合物的离子化效率等。化合物经过衍生化处理之后化学结构发生了变化，从而导致衍生物的物理和化学性质、提取效率、HPLC保留时间及MS/MS碎片均与原化合物不同。极性化合物LC-MS分析面临三大主要问题：极性化合物样品预处理回收率较低，在反相色谱柱上的保留很弱，质谱响应易受到基质中共流出组分的严重抑制。极性化合物经过衍生化处理后，随着亲脂基团的引入，衍生物易于被提取和富集。另一方面，衍生物在色谱柱上的保留增强，显著降低了离子抑制^[20-21]。对于在离子源中难电离的化合物，通过衍生化反应引入离子化效率高的化学基团可大幅度提高检测灵敏度。Nordstrom等^[22]利用丙酸酐或苯甲酸酐和极性化合物中的游离羟基反应对细胞分裂素衍生化处理，处理后的细胞分裂素的检测限最高可达 10^{-18} mol；与非衍生化方法相比，检测限提高了10~100倍。该衍生化方法被成功应用于20~100mg拟南芥叶片中12种内源性细胞分裂素的定量分析。Yang等^[23]利用2-溴-1-甲基碘代吡啶和3-甲醇-1-甲基碘代吡啶作为衍生试剂和脂肪酸反应形成3-酰化-氧合甲基-1-甲基碘代吡啶，衍生产物的季胺基团实现了脂肪酸在常规LC流动相条件、ESI-MS正离子模式下的检测。衍生化后的脂肪酸的检测灵敏度比非衍生化负离子模式下提高2500倍。利用甲基吡啶对游离羧基的衍生实现了对烟草叶片中25个代谢物(包括脂肪酸、茉莉酸、水杨酸等)的定量分析^[24]。

1.5 LC-MS定量

利用三重四级杆质谱(QQQ)进行选择反应监测(SRM)是LC-MS定量分析的黄金标准^[25]，而利用高分辨率质谱的全扫描模式对小分子化合物进行定量分析也具有独特的优势。Hugues等^[26]比较了利用分辨率为5万(m/z 200)的Orbitrap和三重四级杆对17种治疗性药物的定量结果，其中Orbitrap利用全扫描模式采集数据，定量色谱图时离子提取窗口设为0.0005%；而三重四级杆利用传统的SRM模式采集数据。高分辨质谱得到的定量结果和SRM结果在检测特异性、分析精密度、准确度、线性及灵敏度等方面均相当，但高分辨质谱全扫描分析避免了繁杂的SRM步骤，除了目标化合物外采集到更全面的信息，便于问题追溯。

最近LC-MS定量方法的发展方向为定性及定

量分析的有机结合。Hopfgartner 等^[27]利用高分辨(2万)高采集速率(<50 ms)质谱 QTOF MS 新的独立采集方式 SWATH (sequential window acquisition of all theoretical fragmentation spectra) 在某一碰撞电压下设定母离子窗口进行连续采集, 在一张质谱图中得到母离子和碎片离子的全部信息, 实现了小分子药物的定性定量分析。高分辨率高采集速度的 Q-TOF 为植物代谢组学研究提供了新的选择。

利用 LC-MS 对目的化合物进行定量分析的过程中, 会不可避免地受到各种因素的影响, 引入分析误差(例如提取过程中的样品损失、流动相中引入的杂质干扰、样品基质中非目标组分的离子抑制或离子增强等)。内标的使用会在一定程度上减小以上因素的影响, 同位素内标由于其和目的化合物的色谱保留行为、质谱碎裂行为、提取效率的一致性成为 LC-MS 定量分析中最合适的内标。但是大多数代谢物的同位素内标合成非常困难, 而只依靠少数几个内标对大量代谢物校正, 将很难消除基质的影响。近几年发展出一种基于稳定同位素标记代谢物的定量方法, 即首先利用重型和轻型试剂分别标记两种不同的样本或标准品, 标记完全后将两者混合, 经 LC-MS 分析, 根据成对同位素峰的丰度比值可推断出两种样品中相同代谢物的含量变化^[28-29]。利用这种方法实现了一个复杂混合物中的所有代谢物的同时定量, 消除了基质的影响。

2 LC-MS在植物代谢组学中的应用

随着分析方法的发展和完善, LC-MS 在植物代谢组学方面显示出巨大的应用潜力。靶标 LC-MS 方法已用来单独检测植物中的核苷酸^[30]、类黄酮^[31]、生物碱^[32]、氨基酸^[33]等代谢物, 非靶标 LC-MS 方法由于代谢物涵盖范围广已被应用于拟南芥、水稻、番茄、玉米、马铃薯等多种植物的代谢组学研究中。根据拟解决的科学问题, LC-MS 植物代谢组学已应用于代谢表型差异研究^[34-37]、转基因植物安全性评价^[38-39]、生物及非生物胁迫研究^[40-43]、植物基因功能鉴定^[44-46]和辅助育种^[47-48]等各个方面。

2.1 代谢表型差异研究

利用 LC-MS 代谢组学技术研究不同生长阶段、不同组织、不同种植环境、不同品种的代谢表型差异, 对植物品质评价、品种判别、组织特异性研究等方面有重要意义。Mie 等^[34]将 LC-MS 非靶标代谢组学方法应用于 2 年内种植于传统农场和有机农场的卷心菜。该研究共获得 1 600 个化合物的代谢

轮廓谱, 利用正交矫正偏最小二乘判别分析方法建模发现, 生产系统对卷心菜的代谢组产生了显著影响, 并且这种差异在不同年份种植的卷心菜中得到保持。Baniasadi 等^[35]将 50 个非转基因玉米品种种植于 6 个地点, 利用 LC-MS 非靶标代谢组学方法对玉米饲料和谷粒进行分析以考察种植环境和遗传背景的影响。作者利用 LC-MS 方法在玉米谷粒和饲料中分别检测到 286 及 857 个代谢物, 利用主成分分析及层次聚类分析方法对不同样品中的代谢物进行建模及聚类, 研究发现, 种植环境对玉米代谢组的影响比遗传背景的作用更强; 而与玉米谷粒中代谢物相比, 遗传环境对玉米饲料中代谢物的影响更加显著。

2.2 转基因植物安全性评价

植物转基因技术将目的基因导入到受体植物的基因组中, 对其遗传性状进行改变以获得抗虫、抗病、高产、高营养价值的新品种。转基因技术突破了传统育种不能跨越的物种壁垒, 提高了育种效率。但是转基因生物构建过程中的基因插入位点的随机性, 组织培养过程易发生变异等原因都可能导致植物的一些性状和代谢过程被改变, 即非预期效应的产生, 因此, 转基因植物的安全性评价备受关注。Chang 等^[49]以不同种植时间、不同种植环境的非转基因水稻和转双价抗虫基因水稻种子为研究对象, 利用 LC-MS 非靶向代谢组学分析方法研究了种植环境和转基因引起的水稻代谢变化以评估转基因水稻的非预期效应。研究结果发现, 阿魏酰基 1,4-丁二胺、亚麻酸、单油酸甘油酯、 β -谷甾醇等同时受环境和转基因的影响, 但环境因素引起的含量变化更显著; 植物鞘氨醇、棕榈酸等只由转基因引起的代谢物含量变化幅度较小; 甘油磷酸胆碱、谷氨酸、葫芦巴碱、亚麻酰溶血磷脂酰胆碱等只由种植环境引起的代谢物含量变化倍数大于只由转基因引起的变化。该研究表明, 转基因水稻和其严格对照的代谢差异较小, 环境的影响比转基因对水稻代谢表型的影响更大, 即在代谢水平上转基因引起的变异小于野生型水稻的自然变异。

2.3 生物及非生物胁迫研究

植物所处的环境(温度、水分、空气、营养等非生物因素及病虫害等生物因素)发生变化时, 植物代谢平衡也随之被打破, 通过其自身调节达到新的平衡状态以适应环境的变化。利用 LC-MS 代谢组学技术可以监测植物面临外界胁迫后产生的代谢变化, 可进一步揭示植物抗逆的分子机制。

Huang 等^[40]将 GC-MS 和 LC-MS 平台相结合,对缺磷条件下培养的大麦芽和根进行代谢轮廓分析,发现磷严重缺乏会导致葡萄糖-6-磷酸、果糖-6-磷酸、肌醇-1-磷酸和甘油-3-磷酸等磷酸化中间体和 2-酮戊二酸、琥珀酸、富马酸、苹果酸等有机酸的含量显著降低,而二糖、三糖含量显著上调。研究结果揭示了磷缺乏的植物一方面通过调节糖代谢来降低磷的消耗,另一方面从含磷的小分子代谢物中回收磷以应对这种营养胁迫。低温胁迫会影响植物叶片和根的细胞膜流动性、代谢速度、蛋白质转换,抑制植物种子萌发及花粉活力。Vaclavik 等^[41]利用 LC-MS 非靶标代谢组学方法对不同温度条件(室温、4℃、-4℃)处理的拟南芥(高耐低温、中耐低温、低温敏感)进行了研究,发现 4℃及 -4℃处理时 3 个拟南芥品种在主成分分析得分图上能够得到明显的分离。利用 UHPLC-QTOF 对标记代谢物进行了鉴定,发现低温敏感拟南芥的标记物为葡萄糖芜菁芥素,而高耐低温拟南芥的标记物为山柰酚-3,7-二鼠李糖甙。Kumaraswamy 等^[42]将 LC-ESI-LTQ-Orbitrap 代谢组学非靶标方法应用于对赤霉病有抗性的 5 个小麦品种和赤霉病敏感的 1 个小麦品种,获得了禾谷镰刀菌侵染(处理组)及未侵染(对照组)的小麦小穗状花序的代谢谱,并利用多变量数据分析方法筛选出与赤霉病抗性相关的标记物,包括苯丙氨酸、*p*-香豆酸、茉莉酸、亚麻酸、脱氧雪腐镰刀菌烯醇等,这些标记物在赤霉素抗性的小麦中含量均为在赤霉素敏感小麦中的 2 倍以上。Chang 等^[43]利用基于 LC-MS 的代谢组学和脂质组学分析方法研究了农药胁迫后不同时间点(0、12、24、48、96、168 h)转基因及非转基因水稻叶片的代谢应答。研究发现:农药胁迫后类黄酮、脂质、维生素、水杨酸、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸等具有重要生理功能的代谢物含量发生显著性变化,具体表现为转基因植物喷施农药后导致更多的类黄酮参与应答,并且呈现多种应答模式;信号分子水杨酸及烟酰胺腺嘌呤二核苷酸只在转基因样品中上调;而脂质仅在非转基因样品中农药胁迫后 24 h 显著升高。该研究表明,转基因影响了农药胁迫下水稻的代谢应答。

2.4 植物基因功能鉴定

拟南芥基因组小、生长周期短,其作为模式植物被广泛研究,迄今为止已积累了包括各种突变体、cDNA 全长序列及大量 Microarray 数据信息等丰富的资源。另外,拟南芥的全基因组测序工作已在

2000 年完成,为拟南芥基因功能鉴定开展创造了条件。对转录组、代谢组、基因表达模式和代谢物积累模式进行系统的相关性分析是基因功能鉴定的有效手段。Tohge 等^[44]将 LC-MS 类黄酮靶标代谢组学分析、FT-MS 非靶标代谢组学分析及转录组学结合,研究过表达 *PAP1* (production of anthocyanin pigment 1, 编码一个 MYB 转录因子)基因的拟南芥。代谢组学研究发现,花青素及槲皮素衍生物在过表达 *PAP1* 基因的拟南芥中显著上调,转录组学研究中利用 DNA 微阵列对 2.2810 万个基因进行分析,其中 38 个基因由 *PAP1* 过表达上调。通过蛋白质体外酶活实验和各自的 T-DNA 插入突变体中花青素的分析推断,由 *PAP1* 过表达诱发的两个基因 (*At5g17050* 和 *At4g14090*) 分别编码类黄酮-3-*O*-葡萄糖转移酶和花青素-5-*O*-葡萄糖转移酶。Okazaki 等^[45]利用转录组共表达分析发现,尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 3 (UDP-glucose pyrophosphorylase 3, UGP3) 与参与硫脂合成的基因高度相关,将 LC-MS 代谢组学脂质轮廓分析方法应用于敲除 *UGP3* 基因的拟南芥突变体,发现突变体中无硫脂生成,说明 *UGP3* 基因参与硫脂合成。通过推导其氨基酸序列推断 UGP3 为尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶,UGP3 通过参与合成硫脂极性头前体物质尿苷二磷酸葡萄糖从而在硫脂合成中起重要作用。

除了上述通过代谢组学和转录组学数据的关联分析确定候选基因,利用代谢组学和基因组重测序数据进行全基因组关联分析 (genome-wide association analysis, GWAS) 对代谢网络在全基因组水平上进行解析最近也有报道。Chen 等^[50]利用 LC-MS/MS 对含有 529 个品系的水稻群体进行大规模的代谢组学分析:在叶组织中共检测到 840 个代谢物信号,其中 277 个给出了初步的结构信息。PCA 分析表明:在籼稻群体 (*indica*) 中特异的含有 C-糖基化和丙二酰化的黄酮类化合物,而在粳稻 (*japonica*) 中则含有大量的酚胺类 (phenolamides) 和拟南芥吡喃酮类 (arabidopyl alcohol derivatives) 化合物。通过与大约 640 万的 SNPs (single nucleotide polymorphisms) 关联分析确定了 36 个参与水稻次生代谢网络的候选基因,并对其中的 5 个转移酶类基因进行了功能验证,包括之前未被鉴定的甲基转移酶和糖基转移酶等。

2.5 辅助育种

代谢物的类别和含量与营养及香味等品质性状密切相关。利用代谢组学方法研究品质和代谢物的

相关性, 并对控制特定代谢物的数量性状基因定位和鉴定, 对植物育种工作的发展具有促进作用。Matsuda 等^[47]将代谢组学数量性状位点分析 (metabolome quantitative trait loci, mQTL) 应用于 85 个水稻品种, 利用 LC-IT-TOF-MS、LC-Q-TOF-MS、GC-TOF-MS 及 CE-TOF-MS 对水稻种子进行非靶标代谢组学分析。该研究发现水稻种子中 759 个代谢特征的 QTL 呈不均匀分布状态。代谢物按其含量的因素可划分为 3 类: 主要受环境因素影响的有机酸、糖等初级代谢物; 主要受 mQTL 影响的代谢物 (例如角鲨烯、3- 氰丙氨酸、天冬酰胺等), 以及受常见的遗传因素协同影响的代谢物。mQTL 分析发现, 三酰甘油酯和氨基酸的含量受到染色体 3 上 mQTL 区域的协同控制, 此区域可作为水稻种子代谢系统的突破点; 类黄酮主要受改变糖基化的遗传因素的影响, 该研究初步揭示了水稻代谢的基因调控机理, 为水稻新品种的培育提供了理论依据。Matsuda 等^[48]将 LC-MS 非靶标代谢组学方法应用于过表达 *OAS1D* (α -subunit of anthranilate synthase, 不受反馈调控的邻氨基苯甲酸合成酶 α 亚单位基因) 的转基因水稻幼苗, 研究表明, 转基因后水稻幼苗中色氨酸大量积累并且在新叶中含量最高, 低含量的吲哚类代谢物在色氨酸积累的组织中显著上调; 另外, 转基因没有引起其他主要代谢物含量的显著变化。该研究表明, 转基因水稻可以通过其他代谢途径积累色氨酸, 色氨酸的降解活性低且在组织间存在单向传输作用, 显示了利用代谢工程生产色氨酸的优势。

3 展望

LC-MS 联用技术强大的分离能力和高灵敏度的检测能力为植物代谢组学分析提供了强有力的技术保障。在未来更快速的液相色谱技术及高端的质谱技术 (其他离子化技术、高采集速率或低驻留时间的新的三重四级杆质谱等) 的出现会为植物代谢组学的发展注入新的动力。目前 LC-MS 植物代谢组学方法的瓶颈为代谢物的结构鉴定。利用 LC-MS 的代谢物鉴定最直接有效的办法是将代谢物的保留时间、精确质量数、多级质谱碎片同标准品进行对比, 但是植物中大部分代谢产物的标准品没有实现商业化; 另一方面, 代谢组学数据库 (HMDB、Metlin、MassBank 等) 中收录的植物代谢物数量有限, 而目前公开的植物代谢组学数据库较少且主要涉及代谢途径而缺乏代谢物二级质谱信息。近几年

报道了利用质谱技术的几种代谢物鉴定策略, 包括精确质量数、相对同位素丰度精度、同位素丰度等, 结合多种鉴定策略可以大大缩小目标代谢物的范围^[51-52]。相信未来高质量精度质谱的开发、LC-NMR-MS 联用技术的发展、大量植物标准品的生产及植物代谢物多级质谱数据库的完善可从根本上解决代谢物鉴定这一难题。随着 LC-MS 分析方法的发展和代谢组学策略的完善, LC-MS 植物代谢组学将在基因功能鉴定、辅助育种等领域发挥越来越重要的作用。

[参 考 文 献]

- [1] Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, 1999, 29(11): 1181-9
- [2] Fiehn O. Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol*, 2002, 48(1-2): 155-71
- [3] Dixon RA, Strack D. Phytochemistry meets genome analysis, and beyond. *Phytochemistry*, 2003, 62(6): 815-6
- [4] Hall R, Beale M, Fiehn O, et al. Plant metabolomics: The missing link in functional genomics strategies. *Plant Cell*, 2002, 14(7): 1437-40
- [5] De Vos RC, Moco S, Lommen A, et al. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat Protoc*, 2007, 2(4): 778-91
- [6] Guillarme D, Veuthey JL. *UHPLC in Life Sciences*[M]. London: Royal Soc Chem, 2012: 447
- [7] Olah E, Fekete S, Fekete J, et al. Comparative study of new shell-type, sub-2 μ m fully porous and monolith stationary phases, focusing on mass-transfer resistance. *J Chromatogr A*, 2010, 1217(23): 3642-53
- [8] Figeys D, Gygi SP, McKinnon G, et al. An integrated microfluidics-tandem mass spectrometry system for automated protein analysis. *Anal Chem*, 1998, 70(18): 3728-34
- [9] Fortier MH, Bonneil E, Goodley P, et al. Integrated microfluidic device for mass spectrometry-based proteomics and its application to biomarker discovery programs. *Anal Chem*, 2005, 77(6): 1631-40
- [10] Yin H, Killeen K, Brennen R, et al. Microfluidic chip for peptide analysis with an integrated HPLC column, sample enrichment column, and nanoelectrospray tip. *Anal Chem*, 2004, 77(2): 527-33
- [11] Zhao C, Wu Z, Xue G, et al. Ultra-high capacity liquid chromatography chip/quadrupole time-of-flight mass spectrometry for pharmaceutical analysis. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(23): 3669-74
- [12] Flamini R, De Rosso M, Smaniotto A, et al. Fast analysis of isobaric grape anthocyanins by chip-liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009, 23(18): 2891-6

- [13] Chang Y, Zhao C, Wu Z, et al. Chip-based nanoflow high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry for profiling of soybean flavonoids. *Electrophoresis*, 2012, 33(15): 2399-406
- [14] Bai HY, Lin SL, Chan SA, et al. Characterization and evaluation of two-dimensional microfluidic chip-HPLC coupled to tandem mass spectrometry for quantitative analysis of 7-aminoflunitrazepam in human urine. *Analyst*, 2010, 135(10): 2737-42
- [15] Holcapek M, Velinska H, Lisa M, et al. Orthogonality of silver-ion and non-aqueous reversed-phase HPLC/MS in the analysis of complex natural mixtures of triacylglycerols. *J Sep Sci*, 2009, 32(21): 3672-80
- [16] Dugo P, Cacciola F, Kumm T, et al. Comprehensive multidimensional liquid chromatography: theory and applications. *J Chromatogr A*, 2008, 1184(1-2): 353-68
- [17] Ding K, Wu D, Guan Y. Interface of two dimensional liquid chromatography. *Chn J Chromatogr*, 2010, 28(12): 1117-22
- [18] Byrdwell WC. "Dilute-and-shoot" triple parallel mass spectrometry method for analysis of vitamin D and triacylglycerols in dietary supplements. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 401(10): 3317-34
- [19] Santa T. Derivatization reagents in liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr*, 2011, 25(1-2): 1-10
- [20] Deng P, Zhan Y, Chen X, et al. Derivatization methods for quantitative bioanalysis by LC-MS/MS. *Bioanalysis*, 2012, 4(1): 49-69
- [21] Deng P, Chen X, Zhong D. Quantification of polar drugs in human plasma with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Bioanalysis*, 2009, 1(1): 187-203
- [22] Nordstrom A, Tarkowski P, Tarkowska D, et al. Derivatization for LC electrospray ionization-MS: a tool for improving reversed-phase separation and ESI responses of bases, ribosides, and intact nucleotides. *Anal Chem*, 2004, 76(10): 2869-77
- [23] Yang WC, Adamec J, Regnier FE. Enhancement of the LC/MS analysis of fatty acids through derivatization and stable isotope coding. *Anal Chem*, 2007, 79(14): 5150-7
- [24] Kallenbach M, Baldwin IT, Bonaventure G. A rapid and sensitive method for the simultaneous analysis of aliphatic and polar molecules containing free carboxyl groups in plant extracts by LC-MS/MS. *Plant Methods*, 2009, 5: 17
- [25] Hopfgartner G, Varesio E. New approaches for quantitative analysis in biological fluids using mass spectrometric detection. *Trends Anal Chem*, 2005, 24(7): 583-9
- [26] Henry H, Sobhi HR, Scheibner O, et al. Comparison between a high-resolution single-stage Orbitrap and a triple quadrupole mass spectrometer for quantitative analyses of drugs. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2012, 26(5): 499-509
- [27] Hopfgartner G, Tonoli D, Varesio E. High-resolution mass spectrometry for integrated qualitative and quantitative analysis of pharmaceuticals in biological matrices. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 402(8): 2587-96
- [28] Bennett BD, Yuan J, Kimball EH, et al. Absolute quantitation of intracellular metabolite concentrations by an isotope ratio-based approach. *Nat Protoc*, 2008, 3(8): 1299-311
- [29] Guo K, Li L. Differential C-12/C-13-isotope dansylation labeling and fast liquid chromatography/mass spectrometry for absolute and relative quantification of the metabolome. *Anal Chem*, 2009, 81(10): 3919-32
- [30] Pabst M, Grass J, Fischl R, et al. Nucleotide and nucleotide sugar analysis by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry on surface-conditioned porous graphitic carbon. *Anal Chem*, 2010, 82(23): 9782-8
- [31] Cavaliere C, Cucci F, Foglia P, et al. Flavonoid profile in soybeans by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21(14): 2177-87
- [32] Xu X, Sun CR, Dai XJ, et al. LC/MS guided isolation of alkaloids from lotus leaves by pH-zone-refining counter-current chromatography. *Molecules*, 2011, 16(3): 2551-60
- [33] Zhang J, Zhao C, Chang Y, et al. Analysis of free amino acids in flue-cured tobacco leaves using ultra-high performance liquid chromatography with single quadrupole mass spectrometry. *J Sep Sci*, 2013, 36(17): 2868-77
- [34] Mie A, Laursen KH, Aberg KM, et al. Discrimination of conventional and organic white cabbage from a long-term field trial study using untargeted LC-MS-based metabolomics. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406(12): 2885-97
- [35] Baniasadi H, Vlahakis C, Hazebroek J, et al. Effect of environment and genotype on commercial maize hybrids using LC/MS-based metabolomics. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(6): 1412-22
- [36] Li L, Zhao C, Chang Y, et al. Metabolomics study of cured tobacco using liquid chromatography with mass spectrometry: method development and its application in investigating the chemical differences of tobacco from three growing regions. *J Sep Sci*, 2014, 37(9-10): 1067-74
- [37] Arbona V, Iglesias DJ, Talon M, et al. Plant phenotype demarcation using nontargeted LC-MS and GC-MS metabolite profiling. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(16): 7338-47
- [38] DiLeo MV, den Bakker M, Chu EY, et al. An assessment of the relative influences of genetic background, functional diversity at major regulatory genes, and transgenic constructs on the tomato fruit metabolome. *Plant Genome*, 2014, 7(1)
- [39] Kusano M, Redestig H, Hirai T, et al. Covering chemical diversity of genetically-modified tomatoes using metabolomics for objective substantial equivalence assessment. *PLoS One*, 2011, 6(2): e16989
- [40] Huang CY, Roessner U, Eickmeier I, et al. Metabolite profiling reveals distinct changes in carbon and nitrogen metabolism in phosphate-deficient barley plants (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell Physiol*, 2008, 49(5): 691-703
- [41] Vaclavik L, Mishra A, Mishra KB, et al. Mass spectrometry-

- based metabolomic fingerprinting for screening cold tolerance in *Arabidopsis thaliana* accessions. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405(8): 2671-83
- [42] Kumaraswamy KG, Kushalappa AC, Choo TM, et al. Mass spectrometry based metabolomics to identify potential biomarkers for resistance in barley against fusarium head blight (*Fusarium graminearum*). *J Chem Ecol*, 2011, 37(8): 846-56
- [43] Chang Y, Zhang L, Lu X, et al. A simultaneous extraction method for metabolome and lipidome and its application in cry1Ac and sck-transgenic rice leaf treated with insecticide based on LC-MS analysis. *Metabolomics*, 2014, 10(6): 1197-209
- [44] Tohge T, Nishiyama Y, Hirai MY, et al. Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of *Arabidopsis* plants over-expressing an MYB transcription factor. *Plant J*, 2005, 42(2): 218-35
- [45] Okazaki Y, Shimojima M, Sawada Y, et al. A chloroplastic UDP-glucosepyrophosphorylase from *Arabidopsis* is the committed enzyme for the first step of sulfolipid biosynthesis. *Plant Cell*, 2009, 21(3): 892-909
- [46] Rischer H, Oresic M, Seppanen-Laakso T, et al. Gene-to-metabolite networks for terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(14): 5614-9
- [47] Matsuda F, Okazaki Y, Oikawa A, et al. Dissection of genotype-phenotype associations in rice grains using metabolome quantitative trait loci analysis. *Plant J*, 2012, 70(4): 624-36
- [48] Matsuda F, Ishihara A, Takanashi K, et al. Metabolic profiling analysis of genetically modified rice seedlings that overproduce tryptophan reveals the occurrence of its inter-tissue translocation. *Plant Biotechnol*, 2010, 27(1): 17-27
- [49] Chang Y, Zhao C, Zhu Z, et al. Metabolic profiling based on LC/MS to evaluate unintended effects of transgenic rice with cry1Ac and sck genes. *Plant Mol Biol*, 2012, 78(4-5): 477-87
- [50] Chen W, Gao Y, Xie W, et al. Genome-wide association analyses provide genetic and biochemical insights into natural variation in rice metabolism. *Nat Genet*, 2014, 46(7): 714-21
- [51] Kind T, Fiehn O. Metabolomic database annotations via query of elemental compositions: mass accuracy is insufficient even at less than 1 ppm. *BMC Bioinformatics*, 2006, 7: 234
- [52] Kueger S, Steinhauser D, Willmitzer L, et al. High-resolution plant metabolomics: from mass spectral features to metabolites and from whole-cell analysis to subcellular metabolite distributions. *Plant J*, 2012, 70(1): 39-50