

基于核磁共振的代谢组学技术在水产动物中的应用

邵钰娜, 李成华*

(宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 介绍了代谢组学的概念、分析技术以及核磁共振代谢组学的优势, 探讨了水产动物核磁共振代谢组学样品处理和数据分析; 重点综述了核磁共振代谢组学在水产动物水环境污染、水产养殖以及不同技术整合方面的研究现状, 以进一步促进核磁共振代谢组学在水产动物中的运用。

关键词: 水产动物; 代谢组学; 核磁共振

中图分类号: Q785

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2014) 04-0016-06

代谢组学(metabonomics)最早由英国帝国理工大学 Nicholson 等于 1999 年创立^[1]。它是研究生物体系受到外部刺激后所产生的所有代谢产物变化的科学^[2], 是继基因组学、转录组学和蛋白质组学后新兴的一种组学方法, 具有高灵敏度和高通量的特点, 也是系统生物学的重要组成部分^[3]。代谢组学的研究对象主要涉及相对分子质量<1 000 Da 的内源性小分子, 研究领域目前已广泛渗透到疾病诊断^[4]、药物毒理学^[5]、功能基因组学^[6]以及环境毒理学^[7]等方面。

与基因组学、转录组学、蛋白质组学及其他组学相比, 代谢组学具有很多优点。首先, 代谢物的种类远小于基因和蛋白的种类, 且位于系统生物学的最顶端, 更能准确反应生物体的生理机能。其次, 样品处理简单方便, 数据分析灵活多样, 工作量远小于其他组学。此外, 在代谢层面上通过各代谢途径可以明确肯定生物体的发生状态。目前最常用的代谢组学分析手段包括高效液相色谱(HPLC)^[8]、气相色谱-质谱联用(GC-MS)^[9]、液相色谱-质谱联用(LC-MS)^[10]、核磁共振(NMR)^[11]。而 NMR 相比于其他技术优势在于: (1)样品预处理简单, 测试手段丰富; (2)检测时间短, 一般 5~10 min 即可; (3)能检测到样品中大多数化合物, 且同时具有定性和定量分析功能。

1 核磁共振代谢组学

基于 NMR 的代谢组学技术是一种可靠的、高通量的研究方法, 在物理、化学、生物、医学各方面都有广泛应用。核磁共振现象来源于原子核的自旋角动量在外加磁场作用下的运动, 也就是磁矩不为零的原子核, 在外磁场作用下自旋能级发生塞曼分裂, 共振吸收某一定频率的射频辐射的物理过程。目前常用的核磁共振谱有氢谱(¹H-NMR)、碳谱(¹³C-NMR)、氮谱(¹⁵N-NMR)和磷谱(³¹P-NMR)^[12], 其中以 ¹H-NMR 应用最为广泛。

NMR 技术结合多元数据分析即模式识别可分析生物体液或组织因内源或外源因素扰动而引起的代谢物变化^[13], 是唯一能够检测有机体内低分子量内源性代谢产物变化的一种代谢组学技术, 能够定性定量地同时分析生物体中各内源性代谢产物的变化^[14]。相比于其他代谢组学技术, NMR 具有无偏向性、无损伤性、高重复性、高准确性等优点。到目前为止, 只有 NMR 能够对完好组织、生物体液进行代谢成分分析^[15]。但是, NMR 的灵敏度和分辨率低, 同时仪器价格及维修费用昂贵, 限制了它的发展。对于这些问题研究者已研制出 800 MHz, 甚至 1 GHz 的核磁共振仪, 同时增加磁场强度, 采用超低温探头, 与其他组学技术联用等

收稿日期: 2013-10-06.

宁波大学学报(理工版) 网址: <http://journal.nbu.edu.cn/>

基金项目: 国家自然科学基金 (31101919) .

第一作者: 邵钰娜 (1988-), 女, 浙江宁波人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 海洋生物技术. E-mail: 385748526@qq.com

*通信作者: 李成华 (1978-), 男, 山东济宁人, 研究员, 主要研究方向: 海洋生物技术. E-mail: lichenghua@nbu.edu.cn

手段,提高 NMR 的灵敏度和分辨率。因此,随着计算机技术的发展,基于 NMR 的代谢组学技术会有更大的发展空间。

2 水产动物核磁共振研究方法

2.1 水产动物样品前处理

代谢组学样品处理方法虽然简单方便,但样品的前处理是代谢组学研究的基础阶段,做好样品的前处理是取得可靠分析结果的先决条件。因此,对于生物样品的预处理要做到降低胞内酶活性,尽量保持代谢物的原始状态,以确保分析结果的准确性。

水产动物用于 NMR 实验研究的组织主要有鳃、肌肉、肝胰腺、性腺、血浆等。样品处理主要包括样品破碎和代谢物提取。组织或细胞破碎的方法很多,目前广泛应用的有液氮研磨^[16]、组织匀浆^[17]、超声破碎^[18]等。而提取代谢物所用的溶剂主要有高氯酸、甲醇/水、乙醇/水、乙腈/水、丙酮/水^[18-19],主要用来提取极性代谢物;氯仿主要用来提取非极性代谢物。由于代谢物复杂多样,加上理化等因素的影响,因此现在还没有一种单一的实验方法能获得全部的代谢物组。Lin 等^[20]用不同溶剂和不同破碎方法对鲑鱼的肌肉和肝组织进行 NMR 实验,发现提取溶剂以 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{氯仿}}:V_{\text{水}}=2:2:1.8$ 提取效果最好。3 种组织破碎方法中,发现研磨并冻干的样品谱图基线明显比另 2 种方法处理的要更平一些,而且样本间的差异最小,但是研磨相比于组织匀浆费时费力。Le 等^[21]通过 NMR 实验也证实甲醇:氯仿:水是提取代谢物的首选方法。为使提取水产动物代谢物操作简单、快速、含量高、重复性好,提取方法可参考文献[22-23]。

2.2 核磁共振数据分析

NMR 图谱主要分为一维谱(^1H 、 ^{13}C 、 ^{14}N 、 ^{15}N 、 ^{19}F 、 ^{31}P NMR)和二维谱(^1H - ^1H COSY、 ^1H - ^{13}C COSY)^[24-25]。二维 NMR 主要对于在一维谱图中信号无法区分而严重重叠的样品进行再分析。基于 NMR 的代谢组学数据分析一般包括 NMR 图谱采集、图谱预处理、多变量数据分析即模式识别。

原始 NMR 图谱往往由于数据量过大、数据点的高度相关性以及溶剂峰、溶剂峰压制后的残基峰和基线等带来影响而不能直接拿来模式识别分

析^[26]。因此,首先需要对 NMR 谱图进行预处理,将原始数据转换成适合于多变量分析的数据形式。预处理主要包括对图谱进行相位和基线校正、分段积分、滤噪、峰匹配、标准化和归一化等处理。然后将所得数据建立分析数据矩阵,进行多变量数据分析。多变量数据分析主要有主成分分析(PCA)^[27]、偏最小二乘法分析(PLS)^[28]、偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)^[29]、正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)^[30],其中 PCA 是最常用的分析方法。对归一化处理后的核磁数据一般用 SIMCA-P⁺软件包进行 PCA 分析,获得直观的得分图(scores plot)和载荷图(loadings plot)^[31]。使用 PLS-DA 以进一步分析代谢物对组间区分贡献的显著性意义。再利用 OPLS-DA 作进一步的代谢物信息挖掘,获得组间的差异代谢物。最后将代谢标记物与生物、化学、医学等各种技术相结合,为用基于 NMR 的代谢组学技术应用于疾病诊断、药物毒理、环境毒理等方面提供理论参考和技术指导。

3 核磁共振代谢组学在水产动物中的应用

随着代谢组学的兴起,应用基于 NMR 的代谢组学技术在水产动物营养、育种、疾病预防、养殖、环境监测等方面的研究越来越深入。与传统研究方法相比,该方法通过对代谢物的定性和定量研究,能较灵敏地反映机体组织的生理变化,因此该方法对水产动物的深入研究有着重要意义。

3.1 水产动物水环境污染研究

水是水产动物的生存环境,但随着工业废水和生活污水的排放,导致水中化合物、重金属严重超标,水体污染物的增加,使水生动物受到了不同程度的污染,尤其是双壳类软体动物,对重金属具有较强的生物积累能力。尽管基因组学、转录组学、蛋白质组学在环境毒理学方面已有重要研究,但是这些组学只能反映有机体的最终变化,而基于 NMR 的代谢组学通过观察代谢谱可以实时动态地检测外源性物质对有机体生理机能的影响,并且通过代谢物的变化,寻找生物标志物以指示污染物对生物体的潜在危害。

虽然一开始核磁共振只是一种鉴定化合物结构的方法,但是近几年已广泛应用到评估水生生物体被污染物污染的情况。Tjeerdema^[32]用不同铜

质量浓度($66\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $126\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)胁迫红色鲍鱼 8 h 后,通过 ^{31}P NMR 检测与呼吸作用有关的代谢物。结果显示:对照组中磷酸精氨酸、无机磷酸、 β -ATP 基本维持不变;而铜胁迫下 2 组实验中磷酸精氨酸质量浓度下降,而无机磷酸浓度上升, β -ATP 维持不变;且磷酸精氨酸和无机磷酸的变化在胁迫 2~3 h 就成线性变化,在高浓度铜胁迫下变化更早。铜是生物体必须的元素,特别是软体动物和甲壳类动物,因为只含血蓝蛋白,而血蓝蛋白含 2 个直接连接多肽链的铜离子,因此铜在软体动物中起到很重要的作用。但是高浓度铜却引起鲍鱼缺氧窒息,这是因为鲍鱼主要靠肌肉附着在岩石上生存,高浓度铜引起磷酸精氨酸变化而引起肌肉攀附能力下降。

Kwon 等^[33]通过 NMR 研究了重金属污染区域和未污染区域贻贝外套膜代谢物变化。结合多变量数据分析,从 OPLS-DA 得分图里可以看出 2 个区域贻贝外套膜代谢物存在明显差别:对于污染区域,渗透调节物质如甜菜碱、牛磺酸、亚牛磺酸、丙氨酸以及氨基酸如精氨酸、谷氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸等质量浓度明显增加,表明重金属污染能影响贻贝渗透调节和改变代谢途径。

Fasulo 等^[34]将紫贻贝养在污染和未污染的水域环境中 30 d,观察紫贻贝消化腺的代谢物变化。污染海域主要污染物是多环芳烃(PAHs),通过 HPLC 检测到紫贻贝消化腺中有 14 种 PAHs 化合物,特别是萘、蒽、苯并(a)芘、苯并(a,b)蒽,而未污染海域紫贻贝消化腺中均未检出 PAHs。同时,通过 NMR 检测到污染海域紫贻贝消化腺中乳酸、乙酰乙酸、苏氨酸、延胡索酸、腺嘌呤、亮氨酸、异亮氨酸、精氨酸等氨基酸质量浓度明显上升,而葡萄糖、谷氨酸、丙二酸、天冬氨酸的质量浓度下降。由于污染物抑制紫贻贝有氧呼吸,葡萄糖分解产生大量乳酸,谷氨酸在氧化损伤中起重要作用,这些代谢物均可作为标记物。因此通过代谢标记物的变化,可以追踪环境污染物如何影响有机体。

3.2 水产动物养殖研究

目前水产养殖发展迅速,规模越来越大,养殖环境的微小改变,即能引起水产动物生化特征、代谢产物发生变化,从而影响品质以及产量。应用基于 NMR 的代谢组学已在养殖水产动物的生化特

征、代谢变化、性别鉴定、养殖环境等方面有较多研究。Savorani 等^[35]将金头鲷养殖在不同养殖系统中(水箱、网箱、池塘),利用 ^1H NMR 分析金头鲷捕获后随贮藏时间增加代谢物变化。随着贮藏时间增加,肌苷的质量浓度上升,而 5-磷酸肌苷的质量浓度下降。贮藏到 16 d 后,一些重要代谢标记物如糖原、组氨酸、丙氨酸、甘氨酸表征了 3 种不同养殖系统对贮藏时间的影响。在水箱养殖下,贮藏 16 d 后,糖原的质量浓度明显高于网箱和池塘养殖,这可能是由于养殖在伪自然环境下或捕获过程中遭受更高压力导致糖酵解速率更快。因此,不同的养殖系统会影响水产动物的生化特征,导致贮藏过程中代谢物变化,从而影响品质。Schock 等^[36]应用基于 NMR 代谢组学,对健康军曹鱼养殖减少鱼粉投喂量,通过一维 NMR 谱和主成分分析,鱼粉减少的军曹鱼与正常养殖军曹鱼血清代谢产物有明显区别:前者酪氨酸、甜菜碱的质量浓度明显上升,而葡萄糖的质量浓度显著下降,说明鱼粉减少,军曹鱼没有足够的营养物质来维持其生长。而正常养殖军曹鱼乳酸的质量浓度比实验组高,说明军曹鱼含有正常的肠道菌群、乳酸菌,以此提高鱼类免疫系统。Hines 等^[37]同时用组织学、RT-PCR、NMR、脂质分析等手段评估养殖贻贝性别,组织学方法能鉴别成熟贻贝性别,但对新生贻贝未能鉴别。RT-PCR 对成熟和新生贻贝性别都能鉴定。脂质分析对成熟和新生贻贝性别确定的准确率只有 90.6%和 55.6%,而 NMR 对成熟和新生贻贝性别确定的准确率有 89.5%和 88.9%。考虑到可操作性和准确率,基于 NMR 的代谢组学对每年处于繁殖周期中的贻贝性别鉴定值得考虑。

3.3 与其他技术整合

随着对代谢组学研究的深入,代谢物的变化能直接或间接反映糖、氨基酸、蛋白质、核酸等主要生物化学物质的代谢趋向,进而推断细胞内的代谢状态和响应于内外因所作用的各种代谢调节。同时结合基因组学、转录组学、蛋白质组学能更全面地了解生物体在当前生理阶段或外界刺激下的真实反应,更直观地揭示遗传背景(基因)和环境条件对生物体的决定作用。

Liu 等^[38]通过 ^1H NMR 和 RT-PCR 研究 2 种病原菌(鳃弧菌、灿烂弧菌)对菲律宾蛤仔的代谢影响,

OPLS-DA 分析结果表明:对照组与实验组代谢物能明显区分。鳃弧菌感染下缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、精氨酸、赖氨酸等氨基酸的质量浓度下降,牛磺酸、ATP 的质量浓度上升;灿烂弧菌感染下甜菜碱、糖原的质量浓度上升,而亚牛磺酸、二甲基甘氨酸、胆碱、葡萄糖、甘氨酸、苏氨酸、谷氨酸等氨基酸的质量浓度下降,表明病原菌感染能扰乱能量代谢,渗透调节,引起蛤仔氧化应激,免疫应答。同时 GPx、HSP90、防御素、溶菌酶等基因在 mRNA 水平上均下调,而且鳃弧菌感染引起的氧化应激更明显。2 种技术研究结果基本一致,表明基于 NMR 的代谢组学能解释病原菌感染引起的生物学效应。Ji 等^[39]应用不同组学技术研究阴性菌和阳性菌对紫贻贝的影响。通过基于 NMR 的代谢组学,对照组、藤黄微球菌感染组、弧菌感染组在 PCA 得分图上可以明显区分。对后 2 组进行 OPLS-DA 分析,结果表明:藤黄微球菌感染下缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、酪氨酸的质量浓度上升。为使胞内渗透压与外界环境维持平衡,导致与渗透调节有关的氨基酸质量浓度上升。葡萄糖、ATP 的质量浓度明显下降,说明细菌感染扰乱了能量代谢。弧菌感染大致与藤黄微球菌感染相同,但是苏氨酸、丙氨酸、天冬氨酸、琥珀酸、牛磺酸只在弧菌感染下改变,表明弧菌感染对渗透调节和能量代谢的影响更严重。通过 2-DE 与对照组相比,蛋白标记物与代谢物的改变基本符合。通过 2 种组学结合使用,能更有力地阐述病原菌对紫贻贝作用的毒理机制。

Ji 等^[40]用不同质量浓度($1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)溴二苯醚胁迫不同性别的紫贻贝。NMR 实验表明:雄紫贻贝和雌紫贻贝鳃组织代谢物有区别,雄紫贻贝精氨酸质量浓度较高,雌紫贻贝谷氨酸、亚牛磺酸质量浓度较高;低浓度溴二苯醚胁迫后代谢物并无明显区别,高浓度胁迫后,导致雄紫贻贝谷氨酸质量浓度下降,苏氨酸、赖氨酸、葡萄糖、组氨酸质量浓度上升;雌紫贻贝亚牛磺酸质量浓度下降,赖氨酸、甜菜碱、ATP 质量浓度上升。高浓度溴二苯醚胁迫后,两者代谢物也有明显区别,表明溴二苯醚扰乱雄紫贻贝能量代谢,对雌紫贻贝同时扰乱能量代谢和渗透调节。同时,通过 2-DE 和 MS 发现低浓度溴二苯醚即可引起细胞凋亡、降

低氧活性。由于 NMR 的分辨率相比于 MS 低,在低浓度胁迫时,一些低丰度代谢标记物未被检测到,而且 2-DE 检测到的标记物相比于 NMR 要多。因此,代谢组学结合蛋白质组学能够深入阐明环境污染对有机体的毒理学效应。

Wu 等^[41]利用蛋白质组学和代谢组学研究砷的毒性效应在不同海水盐度下对菲律宾蛤仔鳃组织的影响。2 种组学联合研究表明:盐度能影响砷对菲律宾蛤仔的毒性效应,相关代谢标记物的改变主要与能量代谢和渗透调节有关,相关蛋白标记物的改变说明低盐和砷诱导引起氧化应激、细胞损伤、细胞凋亡和扰乱能量代谢。在砷诱导的低盐条件下,蛋白标记物如 ATP 合成酶、琥珀酰辅酶 A、核苷二磷酸的上调与代谢标记物 ATP、琥珀酸的上调相关。因此,蛋白质组学和代谢组学的整合,可研究环境污染对有机体的影响,能在分子水平上提供完整的发生机制。

4 结语

通过 NMR 技术,在基因转录和蛋白表达层面上无法全面认识的小分子代谢产物能在代谢层面上得到分析,同时通过代谢标记物,研究相关代谢途径,能充分解释外源性以及内源性因子对生物体的最终响应,对水产动物水环境污染监测、生化特征、代谢变化、性别鉴定、养殖环境、疾病预防等方面具有重要的指导意义。现阶段,应用基于 NMR 的代谢组学对水产动物的研究主要集中在鱼类和贝类,而对其他水产经济养殖动物的研究相对较少。因此,NMR 技术应用于水产动物具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Nicholson J K, Lindon J C, Holmes E. Metabonomics': Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data[J]. *Xenobiotica*, 1999, 29(11):1181-1189.
- [2] Fiehn O. Analysis of highly polar compounds of plant origin: Combination of hydrophilic interaction chromatography and electrospray ion trap mass spectrometry[J]. *Plant Molecular Biology*, 2002, 48:155-171.
- [3] Nicholson J K, Wilson I D. Understanding "global" systems biology: Metabonomics and the continuum of

- metabolism[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2003, 2:668-676.
- [4] Dunn W B, Goodacre R, Neysey L, et al. Integration of metabolomics in heart disease and diabetes research: Current achievements and future outlook[J]. *Bioanalysis*, 2011, 3(19):220.
- [5] Katsiadaki I, Williams T D, Ball J S, et al. Hepatic transcriptomic and metabolomic responses in the Stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) exposed to ethinyl-estradiol[J]. *Aquatic Toxicology*, 2010, 97:174-187.
- [6] Fent K, Sumpter J P. Progress and promises in toxicogenomics in aquatic toxicology: Is technical innovation driving scientific innovation[J]. *Aquatic Toxicology*, 2011, 105:25-39.
- [7] Kokushi E, Uno S, Harada T, et al. ^1H NMR-based metabolomics approach to assess toxicity of bunker a heavy oil to freshwater carp, *Cyprinus carpio*[J]. *Environmental Toxicology*, 2012, 27(7):404-414.
- [8] Nudi A H, Angela W, Scofield D E. PAH metabolites in urine of crab *Uca cordatus* by HPLC/fluorescence detection[J]. *Marine Environmental Research*, 2008, 66: 187-189.
- [9] Plumb R S, Stumpf C L, Granger J H, et al. Use of liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and multivariate statistical analysis shows promise for the detection of drug metabolites in biological fluids[J]. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 2003, 17: 2632-2638.
- [10] Luo B, Groenke K, Takors R, et al. Simultaneous determination of multiple intracellular metabolites in glycolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1147(2):153-164.
- [11] Robertson D G, Reily M D, Sigler R E, et al. Metabonomics: Evaluation of nuclear magnetic resonance (NMR) and pattern recognition technology for rapid in vivo screening of liver and kidney toxicants[J]. *Toxicological Sciences*, 2000, 57(2):326-337.
- [12] Verpoorte R, Choi Y H, Kim H K. NMR-based metabolomics at work in phytochemistry[J]. *Phytochemistry Reviews*, 2007, 6:3-14.
- [13] Wu H, Zhang X, Wu Y, et al. Studies on the acute biochemical effects of $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ using ^1H NMR spectroscopy of urine combined with pattern recognition[J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2005, 99:644-651.
- [14] Lindon J C, Nicholson J K, Holmes E, et al. Metabonomics: Metabolic processes studied by NMR spectroscopy of biofluids[J]. *Concepts in Magnetic Resonance*, 2000, 12:289-320.
- [15] Gavaghan C L, Holmes E, Len Z E, et al. An NMR-based metabonomic approach to investigate the biochemical consequences of genetic strain differences: Application to the C57BL/6J and Alpk:ApfCD mouse[J]. *FEBS Letter*, 2000, 484(3):169-174.
- [16] Rosenblum E S, Viant M R, Braid B M, et al. Characterizing the metabolic actions of natural stresses in the California red abalone, *Haliotis rufescens* using ^1H NMR metabolomics[J]. *Metabolomics*, 2005, 1(2):199-209.
- [17] Warne M A, Lenz E M, Osborn D, et al. Comparative biochemistry and short-term starvation effects on the earthworms *Eisenia veneta* and *Lumbricus terrestris* studied by ^1H NMR spectroscopy and pattern recognition[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2001, 33: 1171-1180.
- [18] Kim H K, Choi Y H, Luijendijk T J, et al. Comparison of extraction methods for secologanin and the quantitative analysis of secologanin from *Symphoricarpos albus* using ^1H NMR[J]. *Phytochemical Analysis*, 2004, 15:257-261.
- [19] Stentiford G D, Viant M R, Ward D G, et al. Liver tumors in wild flatfish: A histopathological proteomic and metabolomic study[J]. *Omics*, 2005, 9(3):281-299.
- [20] Lin Y, Wu H, Tjeerdema R S, et al. Evaluation of metabolite extraction strategies from tissue samples using NMR metabolomics[J]. *Metabolomics*, 2007, 3(1):55-67.
- [21] Le B J E, Harris N G, Williams S R, et al. A comparison of cell and tissue extraction techniques using high-resolution ^1H -NMR spectroscopy[J]. *NMR in Biomedicine*, 2002, 15:37-44.
- [22] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method for total lipid extraction and purification[J]. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 1959, 37:911-917.
- [23] Wu H, Southam A D, Hines A, et al. High throughput tissue extraction protocol for NMR and mass spectrometry based metabolomics[J]. *Analytical Biochemistry*, 2008, 372:204-212.
- [24] Fan T W M. Metabolite profiling by one-and two-dimensional NMR analysis of complex mixtures[J]. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 1996, 28(2):161-219.
- [25] Fan T W M, Lane A N. Structure-based profiling of metabolites and isotopomers by NMR[J]. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 2008, 52:69-

- 117.
- [26] Dong J, Xu L, Xu J, et al. Adaptive binning method for NMR spectroscopic metabolomics data preprocessing[J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2009, 6(30): 1101-1108.
- [27] Wei J, Xie G X, Zhou Z T, et al. Salivary metabolite signatures of oral cancer and leukoplakia[J]. International Journal of Cancer, 2011, 129(9):2207-2217.
- [28] Ustun B, Sander B, Dani P, et al. Quantification of chondroitin sulfate and dermatan sulfate in danaparoid sodium by ^1H NMR spectroscopy and PLS regression[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011, 339(2): 629-634.
- [29] Nocairi H, Qan-nari E M, Vigneau E, et al. Discrimination on latent components with respect to patterns application to multicol-linear data[J]. Computational Statistics & Data Analysis, 2005, 1(48):139-147.
- [30] Bylesjo M, Rantalainen M, Cloarec O, et al. OPLS discriminant analysis: Combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification[J]. Journal of Chemometrics, 2006, 20:341-351.
- [31] Wold S. Pattern recognition by means of disjoint principal components models[J]. Pattern Recognition, 1976, 3(8): 127-139.
- [32] Tjeerdema R S. Application of NMR-based techniques in aquatic toxicology: Brief examples[J]. Marine Pollution Bulletin, 2008, 57:275-279.
- [33] Kwon Y K, Jung Y S, Park J C, et al. Characterizing the effect of heavy metal contamination on marine mussels using metabolomics[J]. Marine Pollution Bulletin, 2012, 64:1874-1879.
- [34] Fasulo S, Iacono F, Cappello T, et al. Metabolomic investigation of *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819) caged in aquatic environments[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2012, 84:139-146.
- [35] Savorani F, Picone G, Badiani A, et al. Metabolic profiling and aquaculture differentiation of gilthead sea bream by ^1H NMR metabolomics[J]. Food Chemistry, 2010, 120:907-914.
- [36] Schock T B, Newton S, Brenkert K, et al. An NMR-based metabolomic assessment of cultured cobia health in response to dietary manipulation[J]. Food Chemistry, 2012, 133:90-101.
- [37] Hines A, Yeung W H, Craft J, et al. Comparison of histological, genetic, metabolomics, and lipid-based methods for sex determination in marine mussels[J]. Analytical Biochemistry, 2007, 369:175-186.
- [38] Liu X, Ji C, Zhao J, et al. Differential metabolic response of clam *Ruditapes philippinarum* to *Vibrio anguillarum* and *Vibrio splendidus* challenges[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 35(6):1-7.
- [39] Ji C, Wu H, Liu X, et al. The influence of salinity on toxicological effects of arsenic in digestive gland of clam *Ruditapes philippinarum* using metabolomics[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2013, 31:345-352.
- [40] Ji C, Wu H, W L, et al. Proteomic and metabolomic analysis reveal gender-specific responses of mussel *Mytilus galloprovincialis* to 2, 2', 4, 4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE47)[J]. Aquatic Toxicology, 2013, 140/141: 447-449.
- [41] Wu H, Liu X, Zhang X, et al. Proteomic and metabolomic responses of clam *Ruditapes philippinarum* to arsenic exposure under different salinities[J]. Aquatic Toxicology, 2013, 136/137:91-100.

NMR-based Metabolomics in Aquatic Organisms: Progress

SHAO Yi-na, LI Cheng-hua*

(School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: This report briefly introduces the concept of metabolomics, its detection techniques and the advantage of NMR-based metabolomics. Also, summarized are the basic procedure for aquatic sample pretreatment and data analysis for NMR-based metabolomics, as well as its research advancements in water environment pollution, aquaculture and integration of different techniques.

Key words: aquatic organisms; metabolomics; NMR

(责任编辑 史小丽)