

学校编码: 10384

密级_____

学号: 19820061151806

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

核磁共振代谢组学中体液样品的制备方法
及制谱参数研究

Preparation, storage and experimental conditions of biofluid
samples for NMR based metabolomics

曹红婷

指导教师姓名: 陈 忠 教 授

专 业 名 称: 无线电物理

论文提交日期: 2009 年 5 月

论文答辩时间: 2009 年 5 月

2009 年 5 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（厦门大学磁共振与医学成像研究中心）课题（组）的研究成果，获得（厦门大学磁共振与医学成像研究中心）课题（组）经费或实验室的资助，在（厦门大学物理系电子信息科学与技术）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘 要

自 1999 年 Nicholson 及其同事在核磁共振 (NMR) 研究的基础上提出代谢组学概念以来, 基于 NMR 代谢组学得到了迅速地发展。目前基于 NMR 代谢组学的主要研究对象是体液样品的 NMR 谱。由于生物体液的储存、样品制备和实验条件都会对实验结果产生影响, 因此研究样品制备、储存及实验条件可以了解外界条件对样品的具体作用效果, 从而通过控制外界环境及人为操作, 以保证试验数据的稳定性和可比较性。

本文以基于 NMR 代谢组学试验中的人体的尿液、血液和全唾液为主要研究对象, 研究各类样品的储存、制备和制取 NMR 谱图实验参数对 NMR 实验的影响, 结合模式识别分析方法, 得到适宜用于高通量试验的较合理参数。主要内容及结论如下:

1. 研究了实验条件对人体尿液样品 NMR 谱图的影响。随着实验温度变化, 醋酸、甜菜碱及组氨酸的谱峰漂移明显, 为此实验时应稳定样品温度。NOEPR 序列中预饱和功率越高, 对水峰附近的共振峰压制越大, 受影响范围也越大, 应根据需要选择适合的功率。尿液样品适宜用外标法进行实验。

2. 研究了实验条件对人体血液样品 NMR 谱图的影响。人体血液样品中的缬氨酸、维生素 B 族及低密度脂蛋白信号强度随实验温度升高而增强, 实验时应稳定温度。血液样品因信号强度较弱, 适宜内标法实验。

3. 研究了人体唾液样品储存与制备条件对 NMR 谱图的影响。实验结果表明 4℃ 储存不利于唾液样品稳定, 若须长期储存应选择低于 -25℃ 环境; NaF 能在短期起到防腐作用, 但不适用于长期储存; 磷酸盐缓冲液浓度对唾液中的酸性物质的化学位移影响较大, 建议使用较高浓度的缓冲液以稳定样品的 pH 值, 从而保证实验数据的准确。

关键词: NMR 代谢组学 实验条件 样品制备

厦门大学博硕士学位论文摘要库

ABSTRACT

The NMR-based metabonomics approach evolved from the pioneering work of Nicholson and co-workers in 1999 has become a novel analytical technique. At present, main targets of NMR-based metabonomics experiments are biofluids, and the experiment results are sensitive to the experimental conditions, sample storage and preparation. Study of these external conditions is important to keep the stability and comparability of biofluid sample data.

In this work, we investigated the effect of experimental conditions of human urine and serum samples, the effect of storage and preparation of human saliva samples. Some parameters are optimized. The main contents of this study are as follows:

1. Investigations of the effect of experimental conditions to human urine sample NMR spectra. Resonances of acetyl, lysine and histidine in urine sample shift as the temperature changes; signals whose chemical shifts are closed to that of water would decrease their intensity with the saturation power rising. Those results demonstrate that trade-off between the water suppression and signal decrease must be taken into consideration; External method is suitable.

2. Investigations of the effect of experimental conditions to human serum sample NMR spectra. intensity of resonance signal of LDL, VLDL, valine and choline would increase obviously in the serum spectra with the experimental temperature increasing. Those evidences implied that it is important to acquire the ^1H NMR spectra of the samples in the same temperature; internal method is suitable.

3. Investigations of the effect of storage and preparation conditions to human saliva sample NMR spectra. The results indicated that human saliva should be stored at or below -25°C , as no changes in the ^1H NMR fingerprints have been observed during 6 weeks. Formation of phenylalanine and formic acid, probably because of microbe activity, was observed in samples stored at 4°C . Addition of NaF is effective to keep saliva sample at -25°C , whereas the increase of acetate in saliva sample with NaF at

the 6th week reflects it is not suitable for long term storage. A study evaluating the effects of phosphate buffer concentration on signal variability led to the conclusion that a higher concentration is adequate for normal saliva.

For the comparability of NMR spectral data, making a standard of sample storage and experiment progress is useful and this work needs us to keep on researching in the future.

Keywords: NMR; Metabonomic; Experimental condition; Sample preparation

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
第一章 绪论	1
1.1 研究背景	1
1.1.1 基于 NMR 代谢组学的提出.....	1
1.1.2 基于 NMR 代谢组学的应用.....	3
1.1.3 基于 NMR 代谢组学体液实验的基本方法.....	4
1.2 文章结构安排	7
第二章 尿液样品实验条件的研究	22
2.1 实验温度影响分析	22
2.1.1 材料与方法.....	23
2.1.2 结果分析与讨论.....	24
2.2 预饱和和功率影响分析	26
2.2.1 材料与方法.....	26
2.2.2 结果分析与讨论.....	26
2.3 内、外标法差异与可行性分析	30
2.3.1 材料与方法.....	31
2.3.2 结果分析与讨论.....	32
2.4 本章小结	错误！未定义书签。1
第三章 血液样品实验条件影响分析	错误！未定义书签。
3.1 实验温度影响分析	34
3.1.1 材料与方法.....	35
3.1.2 结果分析与讨论.....	36
3.2 低浓度血液样品相位纠正研究	37
3.3 内、外标法差异与可行性分析	39
3.3.1 材料与方法.....	39
3.3.2 结果分析与讨论.....	40
3.4 本章小结	30
第四章 储存与样品制备条件对唾液样品实验结果的影响分析	31

4.1 样品储存温度与时间影响分析	32
4.1.1 材料与方法.....	32
4.1.2 结果分析与讨论.....	33
4.2 磷酸盐缓冲液浓度影响分析	35
4.2.1 材料与方法.....	35
4.2.2 结果分析与讨论.....	36
4.3 防腐剂影响分析	37
4.3.1 材料与方法.....	37
4.3.2 结果分析与讨论.....	37
4.4 内、外标法差异与可行性分析	41
4.4.1 材料与方法.....	41
4.4.2 结果分析与讨论.....	42
4.5 本章小结	42
第五章 总结与展望	44
5.1 本文总结.....	44
5.2 展望.....	44
参 考 文 献	46
硕士期间的论文发表情况	55
致谢	56

Table of Contents

Abstract in Chinese	II
Abstract in English	III
Chapter 1 Introduction	
1.1 Research background	1
1.1.1 Main concepts of metabonomics.....	1
1.1.2 Metabonomics based on NMR.....	3
1.1.3 Main methods of metabonomics based on NMR biofluid experiments...4	
1.2 Main works of this dissertation	7
Chapter 2 Effect of experimental condition of human urine samples	
2.1 Temperature variation	9
2.1.1 Material and methods.....	10
2.1.2 Results and analyse.....	11
2.2 Saturation power variety	13
2.2.1 Material and methods.....	13
2.2.2 Results and analyse.....	13
2.3 Comparison of internal and external reference method	17
2.3.1 Material and methods.....	18
2.3.2 Results and analyse.....	18
2.4 Conclusions	20
Chapter 3 Effect of experimental conditions of human serum samples	
3.1 Temperature variation	22
3.1.1 Material and methods.....	22
3.1.2 Results and analyse.....	23
3.2 Phase correction of low concentration serum samples	25
3.3 Comparison of internal and external reference method	27
3.3.1 Material and methods.....	27
3.3.2 Results and analyse.....	28
3.4 Conclusions	29
Chapter 4 Investigation on storage & preparation of saliva for metabonomics	

4.1 Effect of storage temperature and storage time	32
4.1.1 Material and methods.....	32
4.1.2 Results and analyse.....	33
4.2 Effect of buffer concentration	35
4.2.1 Material and methods.....	35
4.2.2 Results and analyse.....	36
4.3 Effect of preservative	37
4.3.1 Material and methods.....	37
4.3.2 Results and analyse.....	38
4.4 Comparison of internal and external reference methods	41
4.4.1 Material and methods.....	41
4.4.2 Results and analyse.....	42
4.5 Conclusions	43
Chapter 5 Summary and prospect	
5.1 Summary	44
5.2 Prospect	44
References	46
Publication list	55
Acknowledgement	56

第一章 绪 论

1.1 研究背景

1.1.1 基于 NMR 代谢组学的提出

代谢组学(metabonomics)来源于代谢组(metabolome)一词,最初由 Olier^[1]等提出,与基因组学、转录组学、蛋白质组学平行,是构建系统生物学的四大组学之一。代谢组被定义为细胞,组织或器官中的所有小分子代谢组分的集合。严格地说,代谢组应该是指某一生物或细胞所有的代谢产物(metabolite)。在实际工作中,更多的人倾向于把代谢组局限于某一生物或细胞中所有的低分子量代谢产物。与基因组学、转录组学和蛋白质组学相对应,代谢组学是一门对某一生物或细胞所有低分子量代谢产物进行定性和定量分析,以监测活细胞中化学变化的科学^[2]。它是由 Nicholson 小组于 1999 年提出的,其意义为对生物体系统在受到病理生理上的刺激以及某种基因修饰所带来代谢物的动态变化进行研究,从而得到生物体代谢物随时间以及生化过程的变化而改变的信息^[3]。代谢组学通过考察生物体系受刺激或扰动后(如将某个特定的基因变异或环境变化后)其代谢产物的变化或其随时间的变化,来研究生物体系的代谢途径^[4]。其研究对象大都是分子量 1000 以内的小分子物质。它实际测定的对象是细胞内外媒介物等生物标本,包括生物体液(如血液、尿液、唾液、脑脊液等)、细胞提取物、细胞培养液和组织等^[5,6]。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。另外,德国的植物学家 Fiehn 等通过对植物代谢物研究^[7,8],提出 metabolomics 作为代谢组学的名称,其精髓是:对一个生物系统的细胞在给定时间和给定条件下所有小分子代谢物质的定量分析^[9]。因此,metabolomics 可以译作“代谢物组学”。不难看出,前者是对生物系统进行的整体和动态的认识(不仅关心代谢物质的整体也关注其动态变化规律),而后者强调分析而且是个静态的认识概念。因此可以认为,metabolomics 是 metabonomics 的一个组成部分。目前国内的代谢组学研究已形成共识,将 metabonomics 一词来表示“代谢组学”^[10]。

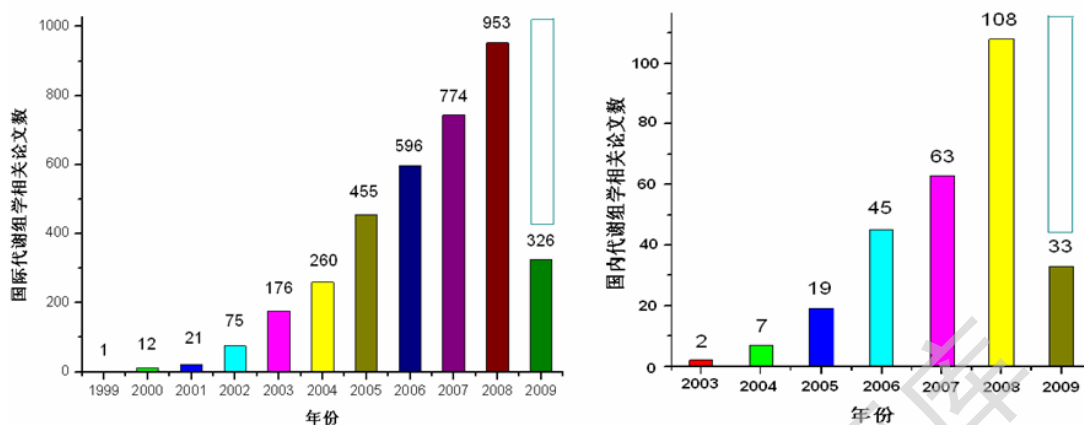


图 1.1 国际、国内代谢组学相关研究论文数量统计

Fig. 1.1 International and national matabolomics & metabonomics related study paper numbers statistics.

自 1999 年代谢组学的概念被提出以来, 日益受到科学界的关注, 论文数量往往能说明一个研究领域的进展情况, 每年代谢组学相关文章数量以几何指数增长, 截止至 2009 年 5 月, 从 web of knowledge 数据库中共搜索出相关论文数为 3649 篇。国内的代谢组学研究从 2003 年开始, 增长势头也很强劲, 目前已有 277 篇文章。预计 2009 年, 国际、国内的代谢组学相关论文数会超过 2008 年, 其研究也会更加深入广泛。

代谢组学的具体研究方法是: 采用核磁共振 (Nuclear Magnetic Resonance)、质谱 (MS)、气质联用技术 (GC/MS)、高效液相色谱 (HPLC) 等高通量、高灵敏度与高精确度的现代分析技术, 通过对细胞提取物、组织提取物和生物体液随时间变化的代谢物浓度进行检测, 结合有效的模式识别方法进行定性、定量和分类, 并将这些代谢信息与病理生理过程中的生物学事件关联起来, 从而了解机体生命活动的代谢过程^[11,12]。目前 NMR 技术是代谢组学普遍采用的方法。

核磁共振(NMR)是指核磁矩不为零的核, 在外磁场的作用下, 核自旋发生塞曼能级分裂(Zeeman Splitting), 让处于外磁场中的自旋核接受一定频率的电磁波辐射, 当辐射的能量恰好等于自旋核两种不同能级的能量差时, 处于低能态的自旋核吸收电磁辐射能跃迁到高能态, 这种现象称为核磁共振^[13,14]。NMR 技术研究的对象是核自旋量子数不为零的原子核体系, 除氢(¹H)原子核外, 还可以对磷(³¹P)、氟(¹⁹F)、碳(¹³C)等原子核进行测定。核磁共振适用于液体、固体。如今的高分辨技术, 还使核磁适用于半固体及微量样品的研究。核磁共振从发现至今

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库