

代谢组学及其应用

Metabonomics and its Applications

杨 军¹, 宋硕林², Jose Castro-Perez³, Robert S. Plumb⁴, 许国旺^{1*}

YANG Jun¹, SONG Shuo-Lin², Jose Castro-Perez³, Robert S. Plumb⁴ and XU Guo-Wang^{1*}

1. 中国科学院大连化学物理研究所, 大连 116011

1. *National Chromatographic R. & A. Center, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116011, China*

2. *Nihon Waters K. K., 140-0001 Tokyo, Japan*

3. *Waters Corporation, Manchester, UK*

4. *Waters Corporation, Milford MA, USA*

摘 要 对代谢组学的概念、特性、发展历史做了简要介绍, 综述了当前代谢组学研究中的数据采集、数据分析中采用的技术, 及代谢组学在疾病诊断、药物毒性研究、植物和微生物等领域的应用, 并对代谢组学的发展作了展望。

关键词 代谢组学, 靶标分析, 代谢轮廓分析, 指纹分析, 综述

中图分类号 Q591 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2005)01-0001-05

Abstract The concept, characteristics and history of metabonomics are introduced. The techniques used in data acquisition and data analysis in metabonomics including their advantages and disadvantages are summarized. In data acquisition platform, NMR, GC/MS, LC/MS (/MS) are the prevalent techniques although at present, none of them is a perfect technique that could meet with the requirement of the metabonomics for measuring all metabolites. While in data analysis, the PCA, PLS and ANN are the major techniques. The researchers could select them according to the research destination. Recent advances and applications of metabonomics in disease diagnosis, drug toxicity evaluation, plant metabolomics and microbial metabolomics are reviewed. In addition, by giving the situation on the establishment of the related corporations, the conferences about metabonomics and proclamation of NIH roadmap the current boom of the metabonomics is reflected. It can be expected that with the development of the function genomics, metabonomics will play a major role in the discovery of the phynotype of the genome and searching for the disease diagnostic biomarkers, and it will also bring much benefit to the drug discovery, clinical diagnosis and nutrition science.

Key words metabonomics, metabolic target analysis, metabolic profiling, metabolomics, metabolic fingerprinting, review

1 代谢组学及发展历史

随着人类基因组测序工作的完成, 基因功能的研究逐渐成为热点, 随之出现了一系列的“组学”研究, 包括研究转录过程的转录组学(transcriptomics)、研究某个生物体系中所有

蛋白及其功能的蛋白组学(proteomics)及研究代谢产物的变化及代谢途径的代谢组学(metabolomics/metabonomics)。与其它组学不同, 代谢组学是研究生物体系(细胞、组织或生物体)受外部刺激所产生的所有代谢产物的变化的科学^[1], 关注的对象是分子量 1000 以下的小分子化合物。根据研究的

Received: July 6, 2004; Accepted: August 23, 2004.

This work was supported by Grant from the High-technology Development Plan “863 project” (No. 2003AA223061) of State Ministry of Science and Technology of China and the Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences (No. K2003A16).

* Corresponding author. Tel: 86-411-83693403; E-mail: diep402@mail.dlptt.ln.cn

863 计划(No. 2003AA223061)和中国科学院知识创新工程领域前沿课题(No. K2003A16)。

对象和目的不同, Oliver Fiehn 将对生物体系的代谢产物分析分为 4 个层次^[2]: 1) 代谢物靶标分析 (Metabolite target analysis): 某个或某几个特定组分的分析; 2) 代谢轮廓分析 (Metabolic profiling): 少数预设的一些代谢产物的定量分析。如某一类结构、性质相关的化合物 (氨基酸、有机酸、顺二醇类) 或某一代谢途径的所有中间产物或多条代谢途径的标志性组分; 3) 代谢组学 (Metabolomics): 限定条件下的特定生物样品中所有代谢组分的定性和定量; 4) 代谢物指纹分析 (Metabolic fingerprinting): 不分离鉴定具体单一组分, 而是对样品进行快速分类 (如表型的快速鉴定)。

代谢组学是一门快速发展的科学研究领域, 代谢组学的概念最早来源于代谢轮廓分析 (Metabolic profiling), 它由 Devaux 等人于上世纪 70 年代提出^[3]。1986 年, *Journal of Chromatography A* 出版了一期关于 Metabolic profiling 的专辑^[4]。到 90 年代后期, 随着基因组学的提出和迅速发展, Oliver 于 1997 年提出了代谢组学 (metabolomics) 的概念^[5], 之后很多植物化学家开展了这方面的研究^[6,7]; 1999 年 Jeremy K. Nicholson 等人提出 metabonomics 的概念^[8], 并在疾病诊断、药物筛选等方面做了大量的卓有成效的工作^[9-16], 使得代谢组学得到了极大的充实, 同时也形成了当前代谢组学的两大主流领域: metabolomics 和 metabonomics。一般认为, metabolomics 是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) 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的一种技术。而 metabonomics 是生物体对病理生理刺激或基因修饰产生的代谢物质的质和量的动态变化的研究。前者一般以细胞做研究对象, 后者则更注重动植物的体液和组织。

2 代谢组学与其他组学的联系及比较

各种组学的迅速发展催生了一门新的学科——系统生物学^[17,18], 系统生物学的研究内容涵盖基因组学、转录组学、蛋白质组学和代谢组学。在这几种组学的研究中, 基因组学主要研究生物系统的基因结构组成, 即 DNA 的序列及表达; 蛋白质组学研究由生物系统表达的蛋白及由外部刺激引起的差异; 代谢组学是研究生物体系 (细胞、组织或生物体) 受外部刺激所产生的所有代谢产物的变化, 可以认为代谢组学是基因组学和蛋白质组学的延伸。随着这些组学研究的深入, 科学家们逐渐认识到: 基因组的变化不一定能够得到表达, 从而并不对系统产生影响。某些蛋白的浓度会由于外部条件的变化而升高, 但由于这个蛋白可能不具备活性, 从而也不对系统产生影响。同时, 由于基因或蛋白的功能补偿作用, 某个基因或蛋白的缺失会由于其它基因或蛋白的存在而得到补偿, 最后反应的净结果为零。而小分子的产生和代谢才是这一系列事件的最终结果, 它能够更准确地反映生物体系的状态^[19]。

与转录组学和蛋白质组学比较, 代谢组学还具有以下优点^[6]: 1) 基因和蛋白表达的有效微小变化会在代谢物上得到放大, 从而使检测更容易; 2) 代谢组学的技术不需建立全

基因组测序及大量表达序列标签 (EST) 的数据库; 3) 代谢物的种类要远小于基因和蛋白的数目。每个生物体 (organism) 中代谢产物大约在 10^3 数量级, 而最小的细菌, 其基因组中也有几千个基因; 4) 因为代谢产物在各个生物体系中都是类似的, 所以代谢组学研究中采用的技术更通用。

3 代谢组学的研究方法

完整的代谢组学流程包括样品的采集、预处理、数据的采集和数据的分析及解释。其研究平台主要由分析技术平台和数据平台构成。代谢组学力求分析生物体系 (如体液和细胞) 中的所有代谢产物, 所以整个过程中都强调尽可能的保留和反映总的代谢产物的信息。

3.1 分析技术平台

与原有的各种组学技术中的分析对象不同, 新兴的代谢组学分析的对象种类繁多, 性质差异很大, 浓度范围分布广, 要对它们进行无偏向的全面分析, 单一的分离分析手段难以胜任。

迄今为止, 在代谢组学的研究中最常见的分析工具是 NMR, 特别是 $^1\text{H-NMR}$ ^[9-16], 能够实现对样品的非破坏性、非选择性分析, 满足了代谢组学中的对尽可能多的化合物进行检测的目标。但它也有两个非常明显的缺陷: 灵敏度低、分辨率不高, 常常导致高丰度的分析物掩盖低丰度的分析物。近期, 研究者通过发展 $^{13}\text{C-NMR}$ 技术, 提高了其分辨率, 部分改善了 $^1\text{H-NMR}$ 中的问题^[20]。

而在植物的代谢组学研究中, 主要采用的技术为 GC/MS。它的优势在于能够提供较高的分辨率和检测灵敏度, 并且有可供参考、比较的标准谱图库, 可以方便地得到待分析代谢组分的定性结果。局限性表现在 GC 只能对其中的挥发性组分实现直接分析, 从而得不到体系中难挥发的绝大多数代谢组分的信息。

作为一种有益的补充和替代技术, LC/MS(/MS) 技术逐渐被广泛地用于代谢组学的研究中^[21,22]。LC/MS 采用 LC 作为其主要的分离手段, 增强了其分辨能力, 与 MS 或 MS/MS 的联用可以得到代谢组分的结构信息。与 GC 相比, 预处理相对简单。

3.2 数据分析平台

在得到分析对象的原始数据后, 首先需要对各种分析手段得到的原始数据进行处理, 得到可用于代谢组学研究的格式。根据各种分析手段 (NMR, GC/MS, LC/MS/MS) 自己的特点, 研究者们开发出了相应的算法对原始谱图的数据进行提取、峰对齐^[23]、去噪^[24]等处理。然后需要对这些数据进行分析, 挖掘隐含于其中的有用信息。

在代谢组学的研究中, 大多数情况是要从检测到的代谢产物信息中进行两类 (如基因突变前后的响应) 或多类 (如杂交后各不同表型间代谢产物) 的判别分类, 因此在数据分析过程中应用的技术也就集中在模式识别技术上。用于代谢组学研究中的模式识别技术主要有主成分分析 (Principal Components Analysis, PCA)^[7,10-12]、非线性映射 (Nonlinear Map-

ping, NLM)^[14]、簇类分析(Hierarchical Cluster Analysis, HCA)^[6]等非监督(un-supervised)学习方法和 SIMCA (Soft Independent Modeling of Class Analogy)^[11, 15, 16, 24]、PLS-DA (PLS-Discriminant Analysis)、ANN(Artificial Neural Network)等有监督(supervised)学习方法。

4 代谢组学的应用

代谢组学自从出现以来,引起了各国科学家的极大的兴趣,广泛地应用于各个领域^[25-49],如疾病诊断^[10, 11, 25-27],药物开发^[8, 9, 13, 20, 21, 28, 29, 34, 35, 41],植物代谢组学^[1, 2, 6, 7, 15, 23, 30],营养科学^[12]和微生物代谢组学^[3, 35, 39, 40, 44-47]等方面的研究中。限于篇幅,本文仅简单介绍代谢组学在疾病诊断、药物开发和在植物及微生物中的典型应用。

4.1 疾病诊断

由于机体的病理变化,代谢产物也产生了某种相应的变化。对这些由疾病引起的代谢产物的响应进行分析,即代谢组学分析,能够帮助人们更好的理解病变过程及机体内物质的代谢途径,还有助于疾病的生物标记物的发现和辅助临床诊断的目的。Brindle 等应用¹H-NMR 技术以 36 例严重心血管病患者和 30 例心血管动脉硬化患者的血清和血浆为研究对象进行了代谢组学分析,结合 PCA、SIMCA、PLS-DA、OSC-PLS 等模式识别技术实现了对心血管疾病及其严重程度的判别,得到了 > 90% 的灵敏度及专一性^[11]。许国旺等通过代谢靶标分析,以尿中 13~15 种核苷浓度为数据矢量,用主成分分析(PCA)法处理数据,对癌症病人和正常人进行分类研究,识别率达 72%。采用人工神经网络(ANN)软件对数据进行处理,肿瘤患者的识别率可达 83%^[25-27],在糖尿病的研究方面也取得了较好的结果^[48]。

4.2 药物的毒性评价

Nicholson 研究小组利用基于 NMR 的代谢组学技术在药物的毒性评价方面做了大量的卓有成效的工作。其工作涵盖分析平台的建立、方法的重现性、基因改变及相应代谢响应的特性研究、相应化学计量学方法等。由 Nicholson 等人建立的 Metabotrix 公司与 Waters 于 2002 年 3 月 10 日签署了一个为期三年的协议, Waters 提供 LC/MS, Metabotrix 帮助 Waters 开发代谢组学技术,包括基于 LC/MS、NMR 的数据处理方法、信息学和化学计量学模型等。双方合作的重点放在疾病诊断和药物毒性的代谢组学研究。为了将基于 NMR 的代谢组学用于药物的毒性筛选,在伦敦大学的皇家科学院和 Pfizer 等六家制药公司于 2001 年 1 月启动了一个为期 3 年的关于药物毒性研究的研究小组 (COMET),拟建立一个用于药物毒性预测的专家系统^[16, 29],在药物的发现 (Discovery) 到开发 (Development) 阶段用代谢组学的方法来评价药物的毒性,以缩短药物开发的时间,减少损失。

4.3 植物的细胞代谢组学研究

代谢组学的很多研究集中在植物的细胞代谢组学这个相对独立的分支。主要是通过研究植物细胞中的代谢组在

基因变异或环境因素变化后的相应变化,去研究基因型和表型的关系及揭示一些沉默基因的功能,进一步了解植物的代谢途径^[49]。有代表性的是 Oliver Fiehn 研究组的工作^[5-7]。他们利用 GC/MS 技术通过对不同表型阿拉伯芥的 433 种代谢产物进行代谢组学分析,结合化学计量学方法(PCA、ANN 和 HCA)对这些植物的表型进行了分类,找到了 4 种在分类中起着相当重要的代谢物质:苹果酸(malic acid)和柠檬酸、葡萄糖和果糖。与线粒体和叶绿体中的基因型结果一致。

随着植物的细胞代谢组学的迅速发展,人们已经开始利用这一技术的成果。“代谢组学”(Metanomics)公司的成立就是一个典型的代表,他们的目标是寻找植物代谢过程中的关键基因,例如能够让植物耐寒的基因。其思想就是遵循代谢组学的方法,在改变植物的基因后,进行植物的代谢分析或记录代谢产物,从而更迅速地掌握有关植物代谢途径的信息。

4.4 微生物代谢组学研究

Buchholz 等人^[44]将快速取样技术和其他分析技术结合,实现了细胞内大量代谢物的快速,高频率定量,使之能够用于发酵过程的动态检测。该技术将帮助研究各种因素对发酵的影响,从而提高生物工程的产量。Dalluge^[45]等人采用液相色谱与串联质谱联用对发酵过程中的氨基酸实现了监测,通过分析认为其中的一个子集可反映发酵的状态。Grivet 等人^[46]对 NMR 这一技术用于微生物代谢组学研究做了较为详尽的综述; Ishii 等人^[47]对微生物细胞中的计算机模拟做了很详细的综述,这里就不再赘述了。

5 展 望

目前,代谢组学正日益成为研究的热点^[25-49]。有关代谢组学的国际会议(2001 年 12 月,美国,“Metabolic Profiling: Pathways in Discovery”;2002 年 4 月和 2003 年 4 月,分别在荷兰和德国的第一届、第二届植物代谢组学国际会议)的召开加速了代谢组学的发展。2002 年 11 月在美国加州召开的系统组学国际会议也特别强调了代谢组学。在杨胜利院士倡议下,我国也于 2004 年 3 月和 8 月分别在上海交通大学和山东日照成功地召开了“代谢工程战略研讨会”。西方国家关于代谢组学研究的研究中心或公司也如雨后天春笋一般,纷纷成立,如德国 Max-Planck-Institut 的分子植物生理所,英国的 Metabotrix Ltd.,荷兰的 Platform Plant Metabolomics (PPM),美国的 The Metabolomics Group,加拿大的 Phenomenome Discoveries Inc. 等。美国 Frontline Strategic Consulting, Inc.^[50]的市场调查报告显示,未来 5 年与代谢组学相关产品的市场年增长率为 46%。正因为如此,美国 NIH 在 2003 年 9 月发布的通向生命科学未来的“中长期发展规划”——NIH Roadmap 中,专门设立代谢组学专题^[51]。其下属的 The National Institute of General Medical Sciences 已在 2003 年批给加州大学 3 500 万美元的一个 5 年计划做鼠巨噬细胞的类脂代谢组研究。

随着研究的深入,代谢组学必将在揭示基因功能的功能基因组学中发挥更大的作用,帮助人们更好更深入地了解生物

体中各种复杂的相互作用及生物系统对环境 and 基因变化的响应,同时也提供了一个了解基因表型的独特途径。药物开发、临床诊断和营养科学都将极大地从代谢组学的研究中受益。此外,代谢组学技术还可用于微生物和植物表型的快速鉴定,以及指导开发具有重要应用价值的新型代谢产物。

致 谢: 特别感谢卢佩章院士和杨胜利院士的鼓励和指导。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Karl-Heinz O, Nelly A, Singh B *et al.* Metabonomics classifies pathways affected by bioactive compounds. Artificial neural network classification of NMR spectra of plant extracts. *Phytochemistry*, 2003, **62**: 971 – 985
- [2] Fiehn O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comparative and Functional Genomics*, 2001, **2**: 155 – 168
- [3] Devaux PG, Horning MG, Horning EC. Benzyl-oxime derivative of steroids: a new metabolic profile procedure for human urinary steroids. *Anal Lett*, 1971, **4**: 151
- [4] Elsevier. *J Chromatogr. A*. 1986, 379
- [5] Oliver S. Yeast as a navigational aid in genome analysis. *Microbiology*, 1997, **143**: 1483
- [6] Taylor J, King RD, Altmann T *et al.* Application of metabolomics to plant genotype discrimination using statistics and machine learning. *Bioinformatics*, 2002, **18** (suppl. 2): 241 – 248
- [7] Fiehn O. Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol*, 2002, **48**(1–2): 155 – 171
- [8] 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**: 1181 – 1189
- [9] Nicholson JK, Bollard ME, Lindon JC *et al.* Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, **1**: 153 – 162
- [10] Griffin JL, Williams HJ, Sang E *et al.* Metabolic profiling of genetic disorders: a multitissue (¹H) nuclear magnetic resonance spectroscopic and pattern recognition study into dystrophic tissue. *Anal Biochem*, 2001, **293** (1): 16 – 21
- [11] Brindle JT, Antti H, Holmes E *et al.* Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using ¹H-NMR-based metabonomics. *Nat Med*, 2002, **8** (12): 1439 – 1444
- [12] Bollard ME, Holmes E, Lindon JC *et al.* Investigations into biochemical changes due to diurnal variation and estrus cycle in female rats using high-resolution ¹H NMR spectroscopy of urine and pattern recognition. *Anal Biochem*, 2001, **295**: 194 – 202
- [13] Waters NJ, Holmes E, Waterfield CJ *et al.* NMR and pattern recognition studies on liver extracts and intact livers from rats treated with a-naphthyl isothiocyanate. *Biochem Pharmacol*, 2002, **64**: 67 – 77
- [14] Holmes E, Antti H. Chemometric contributions to the evolution of metabonomics: mathematical solutions to characterising and interpreting complex biological NMR spectra. *ANALYST*, 2002, **127**: 1549 – 1557
- [15] Gavaghan CL, Wilson ID, Nicholson JK. Physiological variation in metabolic phenotyping and functional genomic studies: use of orthogonal signal correction and PLS-DA. *FEBS Lett*, 2002, **530**: 191 – 196
- [16] Beckwith-Hall BM, Brindle JT, Barton RH *et al.* Application of orthogonal signal correction to minimise the effects of physical and biological variation in high resolution ¹H NMR spectra of biofluids. *Analyst*, 2002, **127**: 1283 – 1288
- [17] Nicholson JK, Wilson ID. Understanding 'Global' systems biology: metabonomics and the continuum of metabolism. *Nature Reviews*, 2003, **2**: 668 – 677
- [18] Ideker T, Thorsson V, Ranish JA *et al.* Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. *Science*, 2001, **292**: 929 – 934
- [19] Henry CM. New 'ome' in town. *Chem Eng News*, 2002, **80**(48): 66 – 70
- [20] Keun HC, Ebbels TMD, Antti H *et al.* Analytical reproducibility in ¹H NMR-Based metabonomic urinalysis. *Chem Res Toxicol*, 2002, **15**: 1380 – 1386
- [21] Pelander A, Ojanpera I, Laks S *et al.* Toxicological screening with formula-based metabolite identification by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem*, 2003, **75**: 5710 – 5718
- [22] Yang J, Xu G, Zheng Y *et al.* A strategy for metabonomics research based on high performance liquid chromatography and LC/MS/MS, Submitted to *J. Chromatogr. A*.
- [23] Jonsson P, Gullberg J, Nordström A *et al.* A strategy for identifying differences in large series of metabolomic samples analyzed by GC/MS. *Anal Chem*, 2004, **76**: 1738 – 1745
- [24] Kell DB, King RD. On the optimization of classes for the assignment of unidentified reading frames in functional genomics programmes: the need for machine learning. *TBTECH*, 2003, **18**: 93 – 98
- [25] Xu GW, Liebich H. Normal and modified nucleosides in urine as potential tumor markers determined by MEKC and HPLC. *American Clinical Laboratory*, 2001, **20**: 22 – 32
- [26] Yang J, Xu GW, Kong HW *et al.* Artificial neural network classification based on high-performance liquid chromatography of urinary and serum nucleosides for the clinical diagnosis of cancer. *J Chromatogr B*, 2002, **782**: 27 – 33
- [27] Zheng YF, Xu GW, Liu DY *et al.* Study of urinary nucleosides as biological marker in cancer patients analyzed by Micellar Electrokinetic Chromatography. *Electrophoresis*, 2002, **23**: 4104 – 4109
- [28] Holmes E, Nicholson JK, Tranter C. Metabonomic characterization of genetic variations in toxicological and metabolic responses using probabilistic neural networks. *Chem Res Toxicol*, 2001, **14**: 182 – 191
- [29] Hellmold H, Nilsson CB, Schuppe-Koistinen I *et al.* Identification of end points relevant to detection of potentially adverse drug reactions. *Toxicology Letters*, 2002, **127**: 239
- [30] Aranbar N, Singh BK, Stockton GW *et al.* Automated mode-of-action detection by metabolic profiling. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **286**: 150 – 155

- [31] Fell DA. Beyond genomics. *Trends Genet*, 2001, **17**: 680 – 682
- [32] Fairlamb AH. Brave new world of post-genomics! *Trends Parasitol*, 2003, **17**: 255 – 256
- [33] Oliver DJ, Nikolau B, Wurtele ES. Functional genomics: high-throughput mRNA, protein, and metabolite analyses. *Metabolic Engineering*, 2002, **4**: 98 – 106
- [34] Smith LL. Key challenges for toxicologists in the 21st century. *Trends Pharmacol Sci*, 2001, **22**: 281 – 285
- [35] Stafford DE, Stephanopoulos G. Metabolic engineering as an integrating platform for strain development. *Ecology and Industrial Microbiology*, 2003, 336 – 340
- [36] Harrigan G. Metabolic profiling: pathways in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 2003, **7**: 351 – 352
- [37] Schwab W. Metabolome diversity: too few genes, too many metabolites? *Phytochemistry*, 2003, **62**: 837 – 849
- [38] Wood NT. Profiling modified metabolomes. *TRENDS in Plant Science*, 2003, **6**: 191
- [39] Oliver SG, Winson MK, Kell DB *et al*. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Tbtech*, 1998, **16**: 373 – 378
- [40] Daniela D, Francesco LB, Oliver SG. Metabolic engineering as an integrating platform for strain development. *Analytical Biotechnology*, 2003, 87 – 91
- [41] Marilyn JIM, Aardema J. Toxicology and genetic toxicology in the new era of “toxicogenomics”: impact of “-omics” technologies. *Mutation Research*, 2002, **499**: 13 – 25
- [42] Benno HTK, Hans VW. Transcriptome meets metabolome: hierarchical and metabolic regulation of the glycolytic pathway. *FEBS Lett*, 2001, **500**: 169 – 171
- [43] Tomita M. Whole-cell simulation: a grand challenge of the 21st century. *Trends Biotechnol*, 2003, **19**: 205 – 210
- [44] Buchholz A, Hurllebaus J, Wandrey C, Takors R. Metabolomics: quantification of intracellular metabolite dynamics. *Biomol Eng*, 2002, **19**: 5 – 15
- [45] Dalluge JJ, Smith S, Sanchez-Riera F *et al*. Potential of fermentation profiling via rapid measurement of amino acid metabolism by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2004, **1043**: 3 – 7
- [46] Grivet JP, Delort AM, Portais JC. NMR and microbiology: from physiology to metabolomics. *Biochimie*, 2003, **85**: 823 – 840
- [47] Ishii N, Robert M, Nakayama Y *et al*. Toward large-scale modeling of the microbial cell for computer simulation. *J Biotechnology*, 2004, **113**: 281 – 294
- [48] Yang J, Xu G, Hong Q. Discrimination of diabetic patients from healthy controls by using metabolomics method based on their serum fatty acid profiles. *J Chromatogr. B*, accepted
- [49] Sumner LW, Mendes P, Dixon RA. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochem*, 2003, **62**: 817 – 836
- [50] Frontline Strategic Consulting, Inc., Metabolomics: A Strategic Market and Technology Assessment, Foster City, CA 94404, 2002, 9
- [51] Zerhouni E. The NIH Roadmap. *Science*, 2003, **302**: 63 – 65