



代谢组研究技术

云生物

网址：www.yunbios.net

电话：021-60523158

公众号：“云生物”



目录

代谢组学介绍

代谢组学研究技术

代谢组学实验流程和分析内容

代谢组学样本处理及注意事项

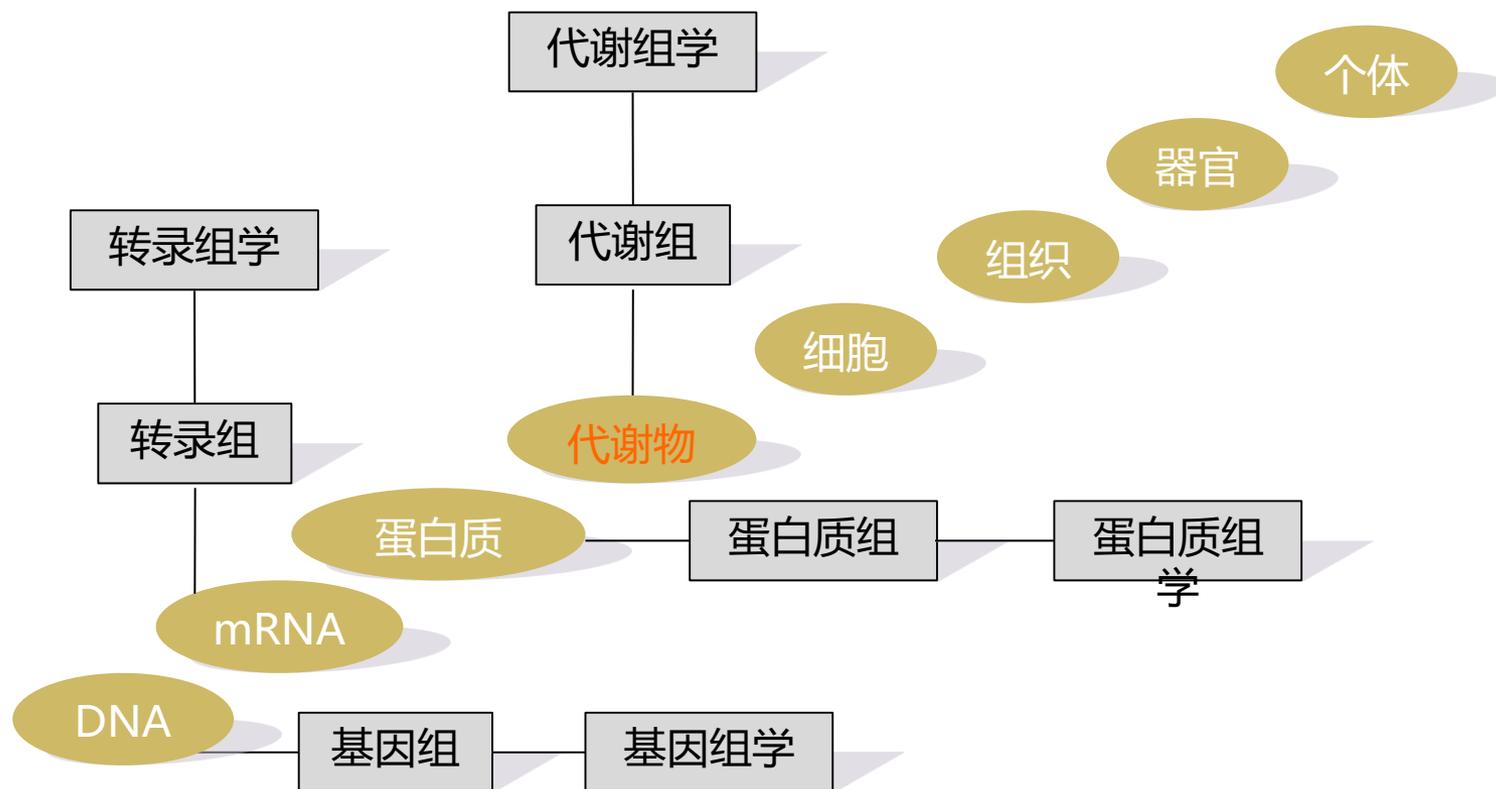
Simca-p软件操作



PART1

代谢组学介绍

为什么进行代谢组学研究？



生物体内**代谢物**与表型最为接近，
代谢物的变化更能**直接地**揭示**基**
因的功能

“基因组学和蛋白质组学告诉你
什么**可能**发生，而代谢组学则告
诉你什么**确实发生了**”

——Bill Lasley, UC Davis

为什么进行代谢组学研究？



- 1、小分子的产生和代谢是生物机体左右的**最终结果**，生物体液的代谢产物分析能**更加直接，更准确的**反映生物体的病理生理状态；
- 2、基因和蛋白表达的有效微小变化在代谢物上得到**放大**，从而**检测更加容易**
- 3、代谢组学的**代谢物信息库简单**，但它远没有全基因组测序及大量表达序列标签的数据库那么复杂
- 4、代谢物**种类少**，要远小于基因和蛋白的数据，物质的**分子结构简单**许多；
- 5、**代谢产物在各个生物体中都是类似的**，所以代谢组学研究中采用的技术更容易在各个领域中**通用**，也更容易被人接受；



什么是代谢组？

代谢组 (metabolome)：指参与生物体新陈代谢、维持生物体正常生长发育功能的小分子化合物的集合，主要是指相对分子量小于1000的内源性小分子。

- **初生代谢物**：糖类、氨基酸、脂质等；

许多主物都具有的主物化学反应

- **次生代谢产物**：酚类、萜类、黄酮类、生物碱、含硫化合物等

只在一定范围内主物的特异的代谢，胚胎发育，疾病

- **植物**：20多万种
- **动物**：2500种
- **微生物**：1500种

代谢组学 (metabolomics)：指对某一生物、组织或细胞中所有低分子量代谢产物进行定性和定量分析，并寻找代谢物与生理病理变化的相关关系的一门科学。

- **应用范围**：疾病诊断、药物研发、植物学、毒理学、人类健康等



PART2

代谢组学研究技术

代谢组学检测平台及技术



代谢组学研究平台

- 核磁共振NMR
- 气-质联用GC-MS
- 液-质联用LC-MS

代谢组学研究技术

- 非靶向代谢组学（代谢全谱）
- 靶向代谢组学（目标代谢物）
- 广泛靶向代谢组学

代谢组学检测平台



	核磁共振NMR	气-质联用GC-MS	液-质联用LC-MS
样本前处理	样本制备要求少，无创检测，样本需求量少	较为繁琐	步骤简单
适用范围	40-50种代谢物，可检测不能被离子化的代谢物	易挥发、热不稳定、中低极性物质，如含羟基、羧基、氨基和亚氨基等基团的极性强的物质	适用范围广泛，可用于绝大部分化合物
优点	无损伤性，无偏向性，方法灵活，处理简单，成本低	较好的分离效率和检测灵敏度，易定性	灵敏度较高，无需衍生化
缺点	灵敏度较低，动态范围有限	需要衍生化，具有偏向性	具有偏向性，不易定性
数据库		较为健全,NIST	相对不健全
检测物质数	40-50种	500-600种	1-2万物质峰

代谢组学检测平台



❖ NMR

优点：无损伤性，无辐射性，无偏向性，方法灵活，处理简单

不足：灵敏度较低，动态范围有限

❖ GC-MS

优点：高分辨率，高灵敏度，有比较标准的数据库，易于定性

不足：需衍生化，预处理繁琐

❖ LC-MS

优点：灵敏度较高，较宽动态范围，无需衍生化

不足：标准谱图库信息不全，不易定性

代谢组学研究策略



❖ 非靶向/全代谢组学分析(普筛)

对限定条件下的样品中所有代谢组分的定性定量分析

❖ 靶向代谢组学分析

对某个或某几个特定代谢物的定量分析

❖ 广泛靶向/拟靶向代谢组学分析

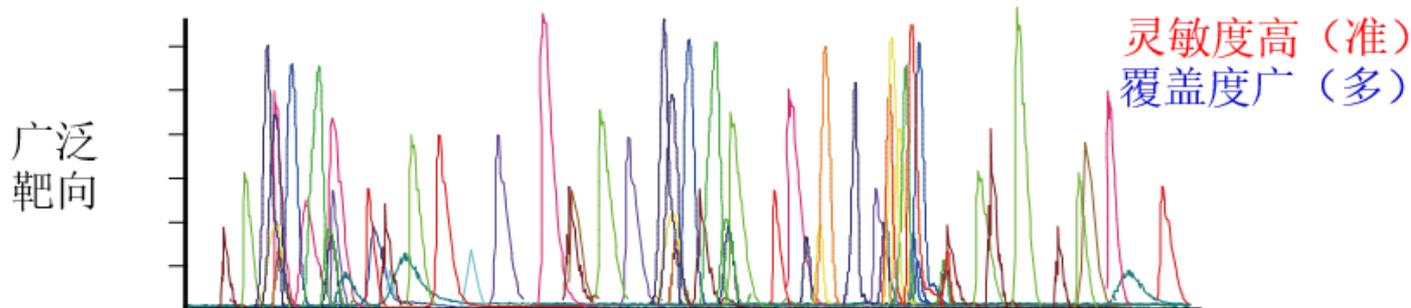
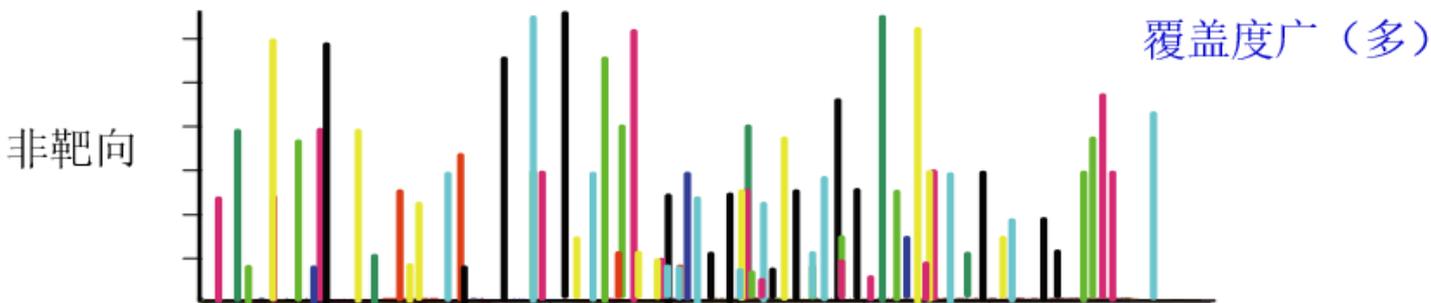
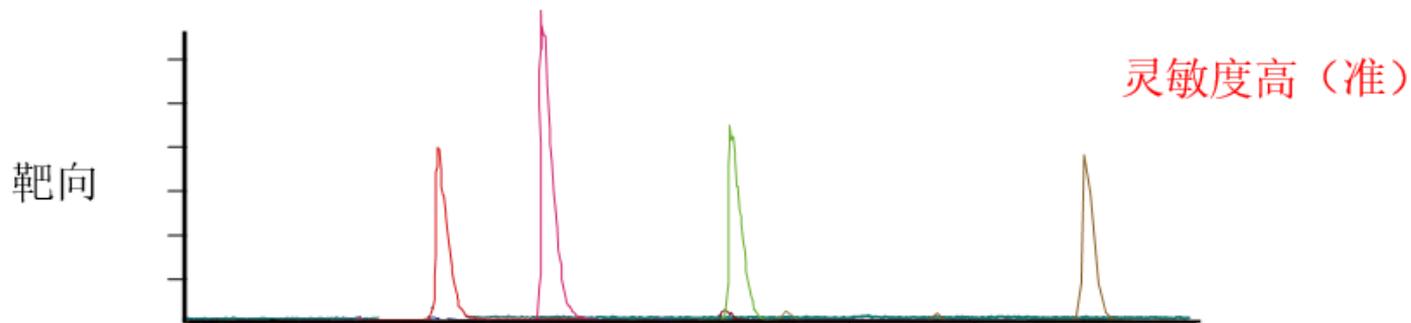
对大量不同类型代谢物进行定量分析

代谢组学研究方法



	非靶向代谢组	靶向代谢组	广泛靶向代谢组
目的	获得样本的代谢全谱，比较不同样本代谢产物的种类与丰度的差异	单个或少量目标代谢物的定量检测	既可获得样本代谢全谱，也可准确定量单个目标代谢物
优点	通量高，操作简便	定性、绝对定量	通量高；灵敏度高，可发现低丰度代谢物；自建代谢物数据库，既可检测已知代谢物也可发现新代谢物
缺点	灵敏度低、难检测低丰度代谢物；依赖公共数据库，只能检测已知代谢物，难以发现新代谢物	通量低，需使用标准品	需要自建代谢物数据库；进样处理复杂；检测过程较繁琐

三种研究方法的比较



研究方案设计



方案一靶向代谢组：提供目标代谢途径中关注的代谢物标准品，或提交关注的代谢物，由公司评估是否有标准品



可分析目标代谢途径中代谢物的绝对量

方案二非靶向代谢组：实验设立实验组与对照组，获得代谢全谱。



可比较不同样本间代谢产物的种类与丰度的差异，再将对差异代谢物进行代谢通路分析，可只分析老师关注的代谢通路。



PART 3

代谢组学实验流程和分析方法



代谢组学实验流程



生物样品代谢物提取



- **LC-MS**常规提取:

- 70%甲醇（水溶性物质）

- 100%甲醇、丙酮、正己烷等（脂溶性物质）

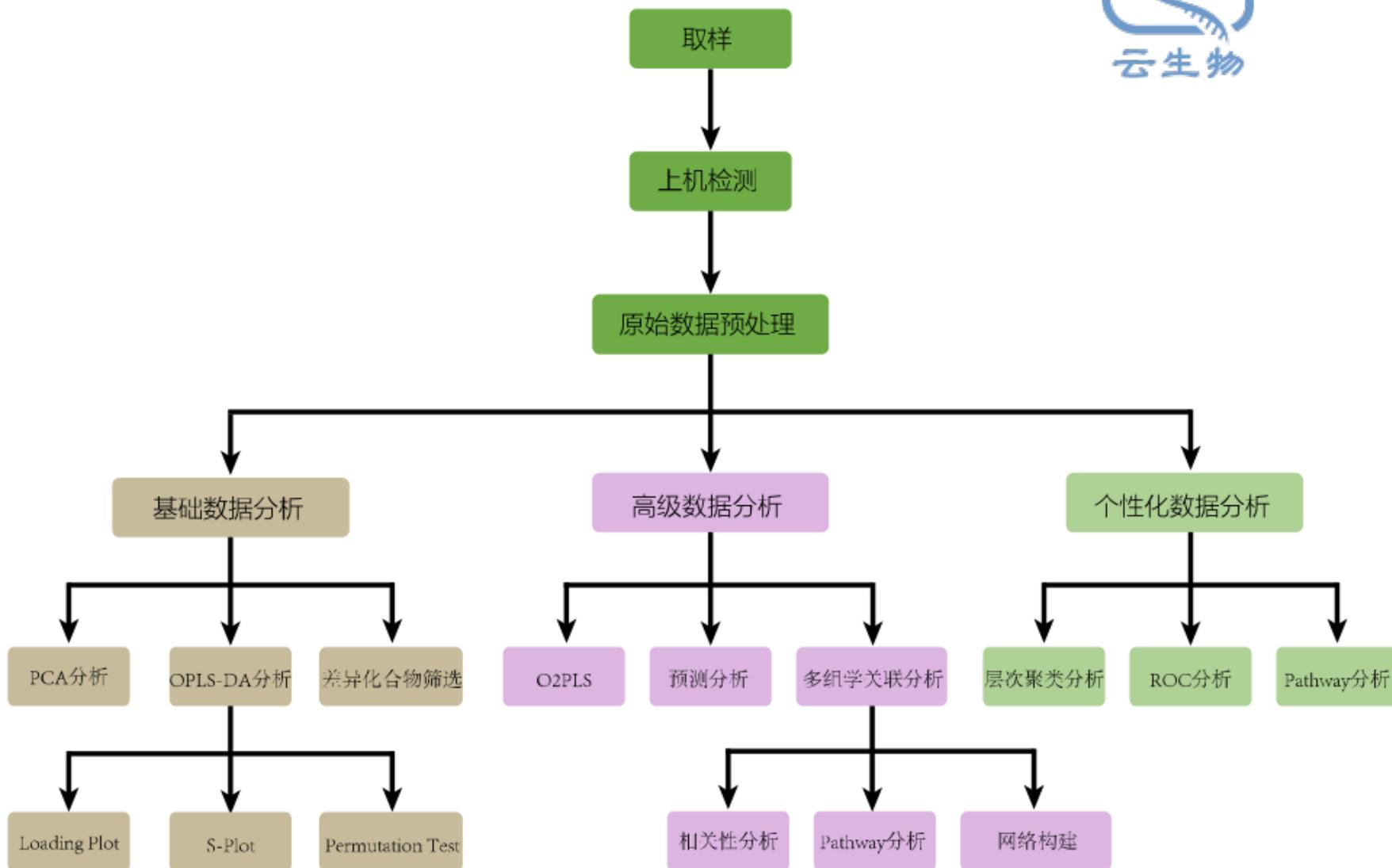
- **GC-MS** 样品预处理

- 硅烷化：烷基硅烷基和反应物中羟基或氨基上的氢发生交换，形成烷基硅烷基产物

- 酰基化：羰基的衍生化试剂和含有氨基和羟基的反应物反应生成含有酰胺或酰基的衍生物

- 烷基化：把饱和、不饱和、脂肪等取代基团的烷基引入化合物分子中的氧、氮、碳原子上

代谢组学分析流程



代谢组学分析内容



- **基本数据分析：**
 1. 代谢物定性定量
 2. 质控：QC样本、PCA分析、PLS-DA分析
 3. 差异代谢物筛选与鉴定

- **高级数据分析：**
 4. 代谢通路分析
 5. 代谢网络分析
 6. 层级聚类分析
 7. ROC分析
 8. 疾病预测模型分析
 9. 多组学数据关联分析（需有其他组学数据）

1. 代谢物定性定量

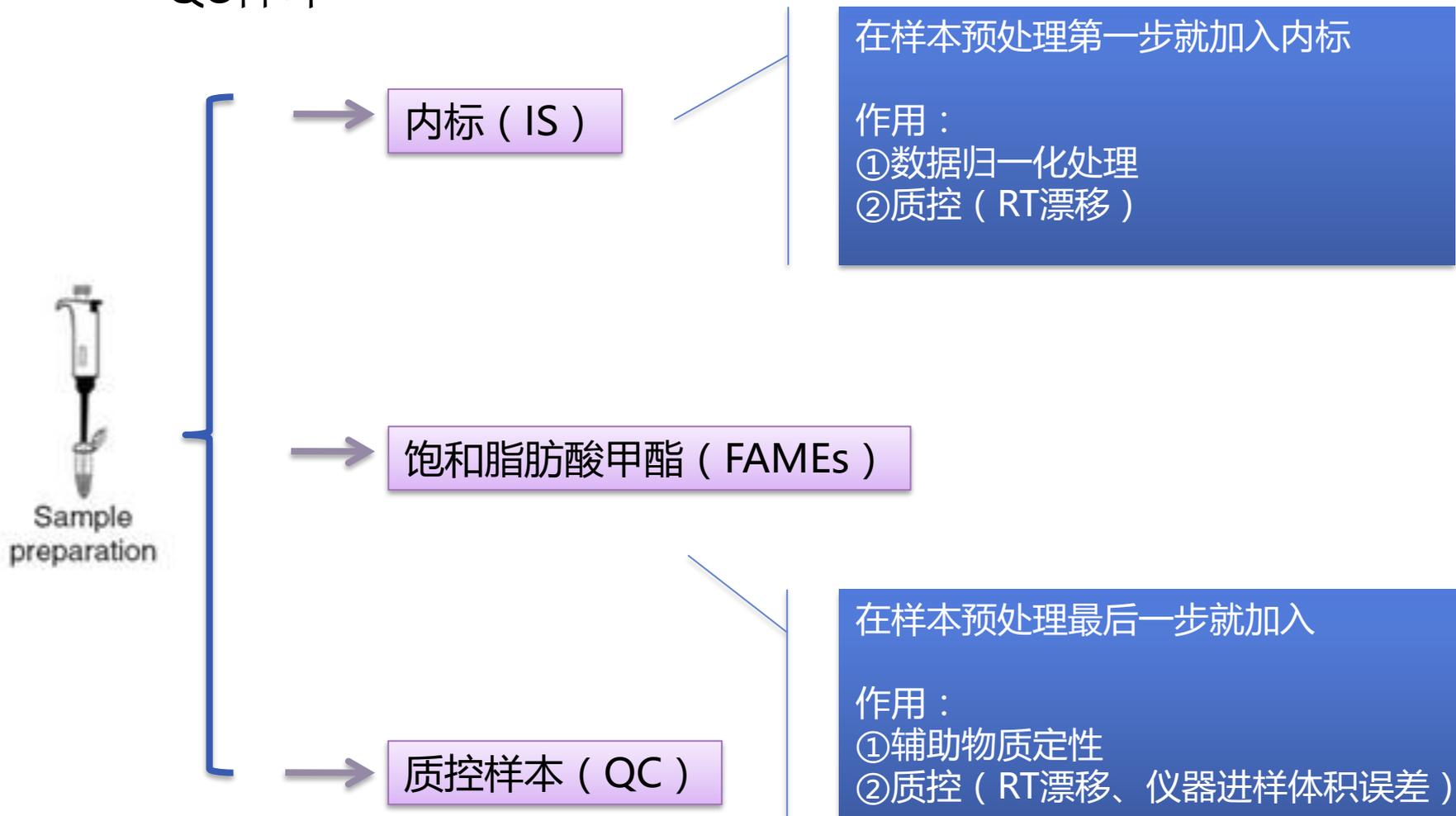


- 基于自建数据库MWDB或公共数据库，对一级谱二级谱数据进行定性和定量分析。

- ✓ GC-MS一次可以检测500-700种代谢物，覆盖了初生代谢物和大部分重要的次生代谢物；LC-MS差异定性，每组100-200个差异代谢物；
- ✓ 能够检测出低丰度代谢物并定量

2. 质控

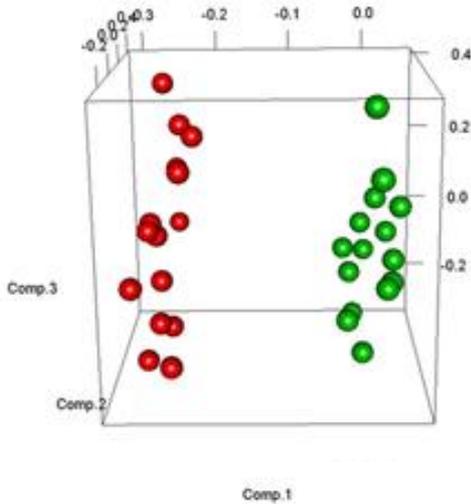
- QC样本



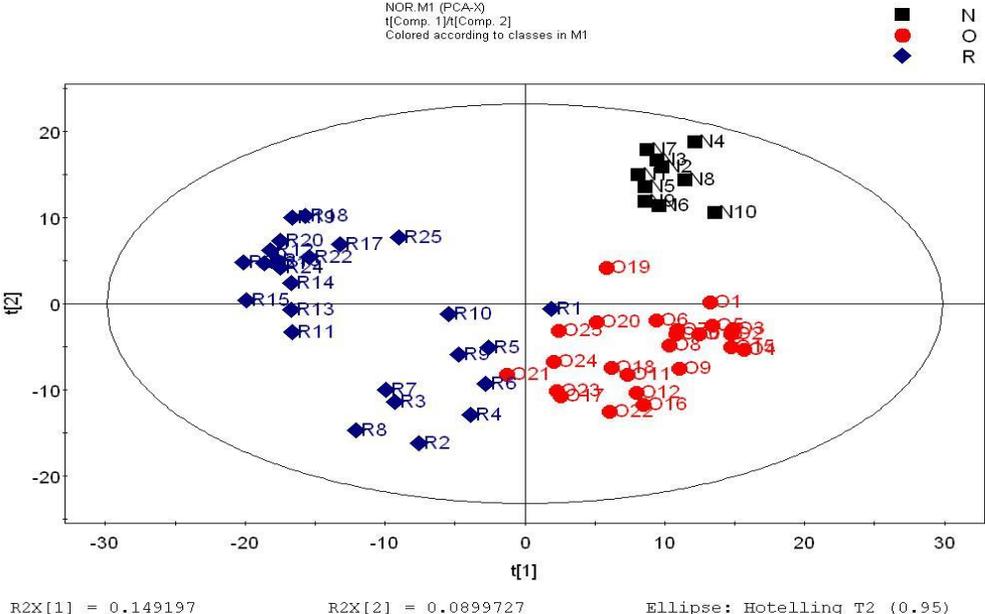


2. 质控

- PCA统计分析 (主成分分析)
 - 将多个变量通过线性变换以选出较少个数重要变量的方法
 - 异常样本的发现与剔除
 - 真实反映样本代谢分布



Scores plot of PCA(3D)



Scores plot of PCA(2D)



2. 质控

- 正交偏最小二乘-判别分析 (OPLS-DA)

- 人为对样品进行分组

- 各组聚类效果更加佳

- 滤掉与分类不相关的信号

侧重于**分组和对组间差异的样本分析**。

OPLS-DA是将正交信号校正方法(Orthogonal signal correction, OSC)与偏最小二乘法 (Partial least squares, PLS) 相互结合同时对偏最小二乘法进行改进。OPLS-DA可以更好地区分组间差异,提高模型的有效性和解析能力。采用有监督的情况下模式识别分析方法能够倾向于提取利于样本分类的变量信息,也在很大程度降低了系统噪声的干扰,提高了分类效能。

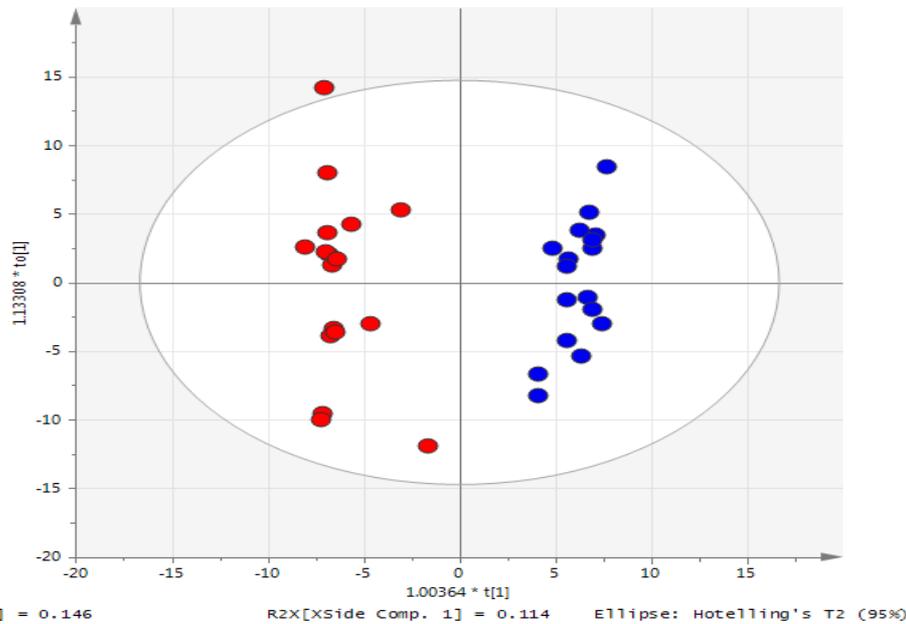
	PCA	OPLS-DA
侧重方式	样本个体差异性	组间差异
计算方法	协方差等数学建模完成	OSC和PLS, 数学建模
分析前计算机认识组别	不认识	认识

2. 质控

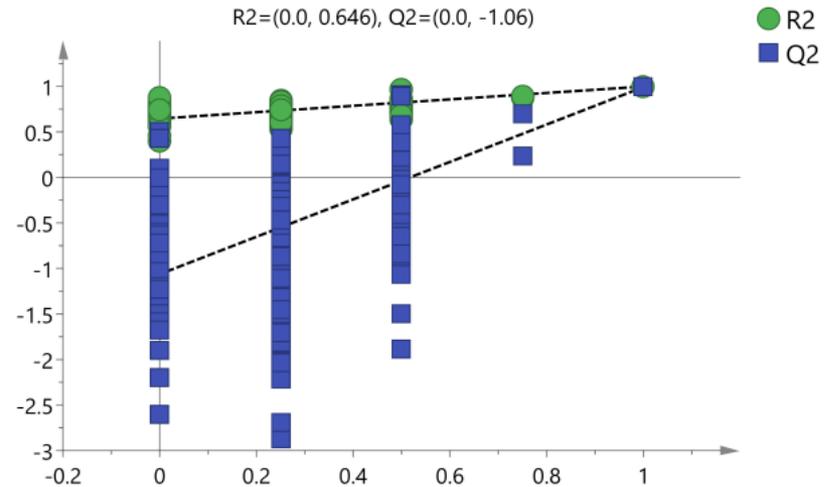


- 正交偏最小二乘-判别分析 (OPLS-DA)

asthma.M5 (OPLS-DA)
Scaled proportionally to R2X
Colored according to classes in M5



Scores plot of OPLS-DA (2D)



3. 差异代谢物筛选与鉴定



LC-MS 非靶标代谢组学代谢物的定性方法为：

一级谱结果搜索 METLIN, HMDB, KEGG, CHEBI 等公共数据库，给出可供选择的物质；

二级谱结果搜索自建的标准物质数据库。

GC-MS 非靶标代谢组学代谢物定性的方法为：

搜索自建的标准物质数据库和 NIST 商业数据库。

我们采用 OPLS-DA 模型第一主成分的 VIP (Variable Importance in the Projection) 值 (阈值 >1)，并结合 t 检验(t-test)的 p 值 (阈值 ≤ 0.05) 来寻找差异性表达代谢物。

3. 差异代谢物筛选与鉴定

GC-MS差异化合物筛选：

Var ID (Primary)	Peak	RT	Mass	VIP	P-Value	Fold Change
1	norvaline	4.63168	144	1.25449	0.00155951	1.737097454
2	glycocyamine	4.64152	84	0.13127	0.79447957	1.253653032
3	beta-Alanine	5.62654	114	1.13419	0.0072194	1.159951339
...

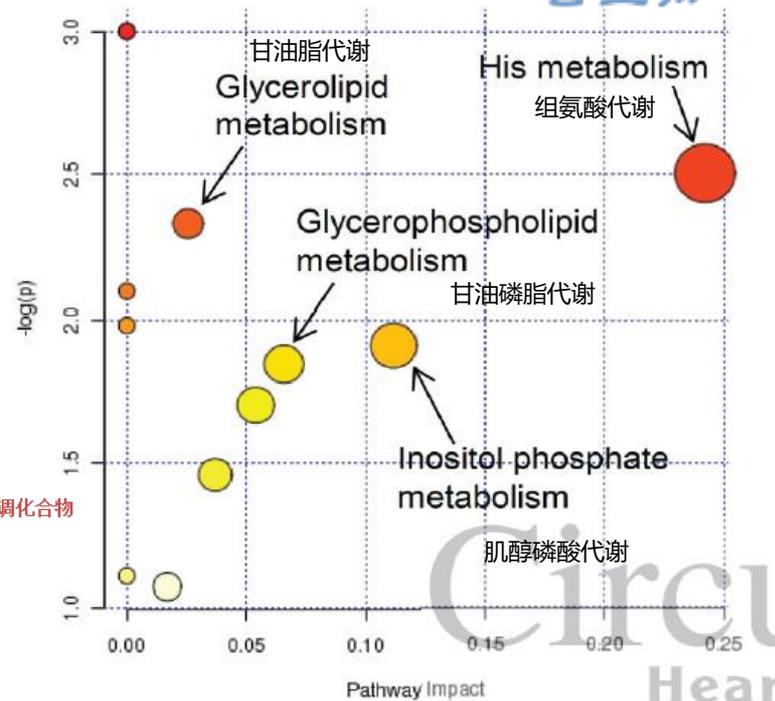
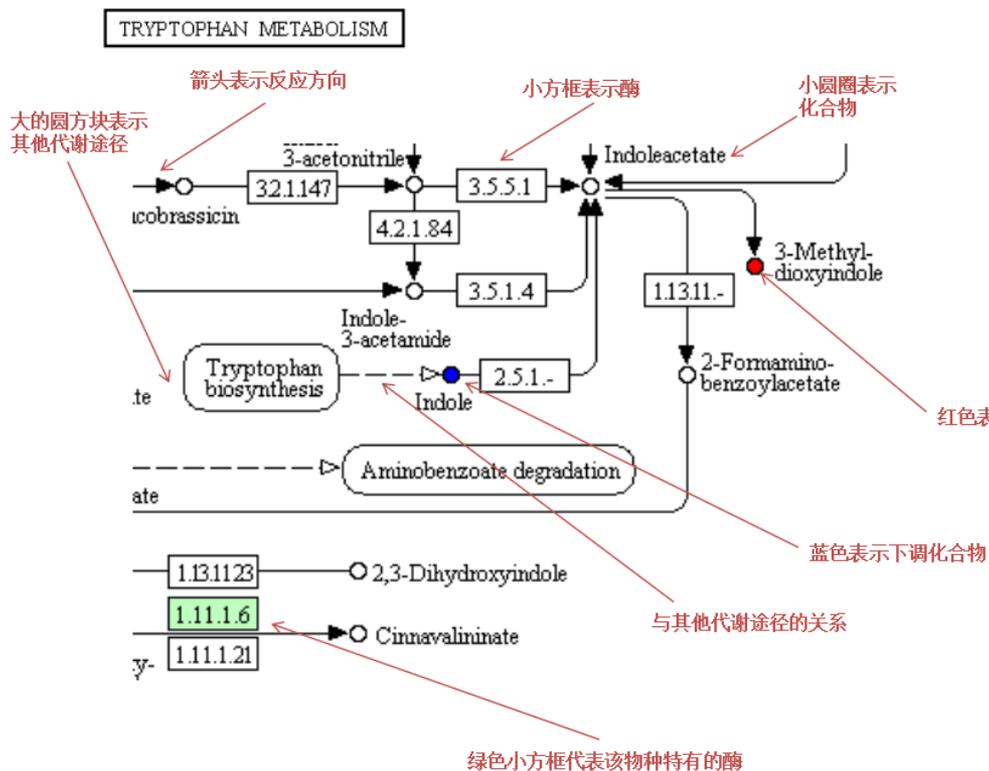
LC-MS差异化合物筛选：

Var ID (Primary)	RT(min)	质荷比	VIP	P-Value	Fold Change
1	0.67	203.0522	2.3512245	3.69E-10	2.734452974
2	4.24	447.0923	1.2525520	0.002677	0.244750312
3	3.26	431.0973	0.5225665	0.000385	1.154542752
4	0.72	132.0761	0.3654566	1.55E-05	0.855415454
5	0.58	110.0089	1.8745162	8.9E-06	3.548481155
...

NMR差异化合物筛选：

Metabolites	r ^a		
	A-B	A-C	B-C
	R ² X=21.5%; R ² Y=0.914; Q ² =0.229	R ² X=18.9%; R ² Y=0.901; Q ² =-0.159	R ² X=18.5%; R ² Y=0.930; Q ² =0.309
Acetate: 1.92(s)	-0.623	0.595	0.814
Alanine: 1.48(d)	-0.584	-	-0.619
...

4、代谢通路分析

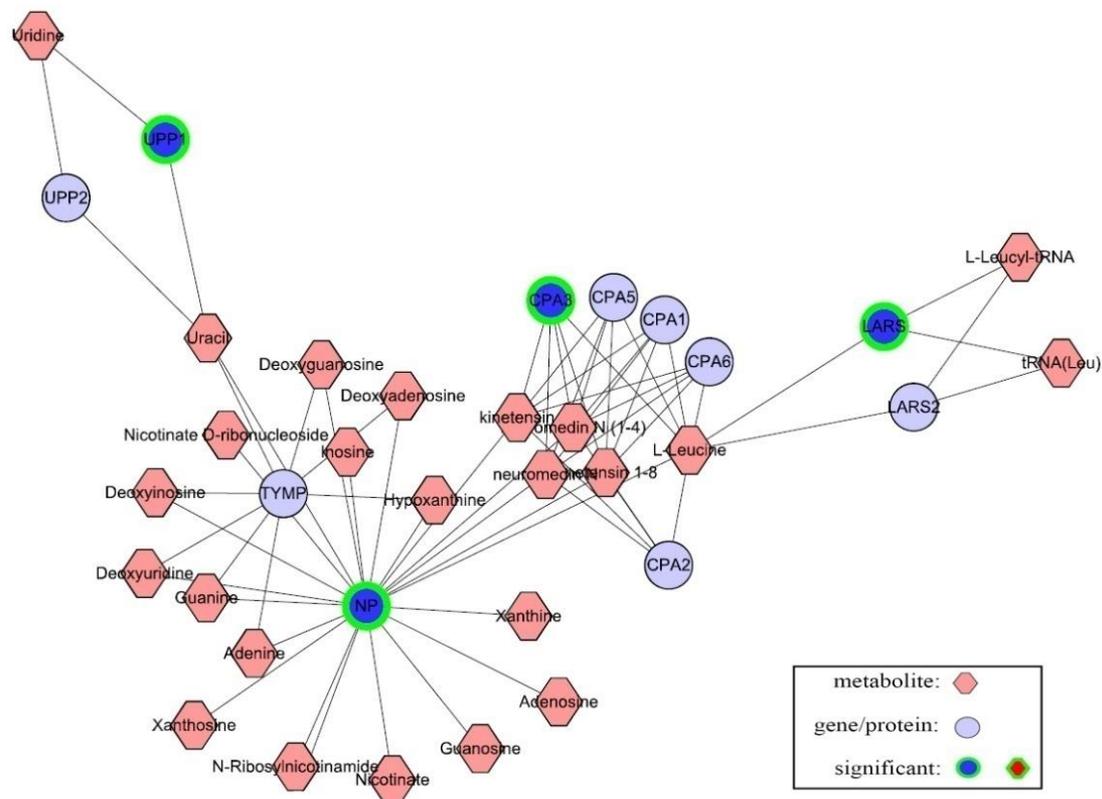


Pathway显著性分析

<http://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/>

5、代谢网络分析

我们同时我们**综合蛋白与代谢之间的调控关系**。利用软件metscape构建metabolite、protein/mRNA的关联网络。（如果差异的数据不够，我们将利用所有的数据进行，差异的物质将单独标示出来。如果没有基因，蛋白的数据，可单独构建代谢调控网络）

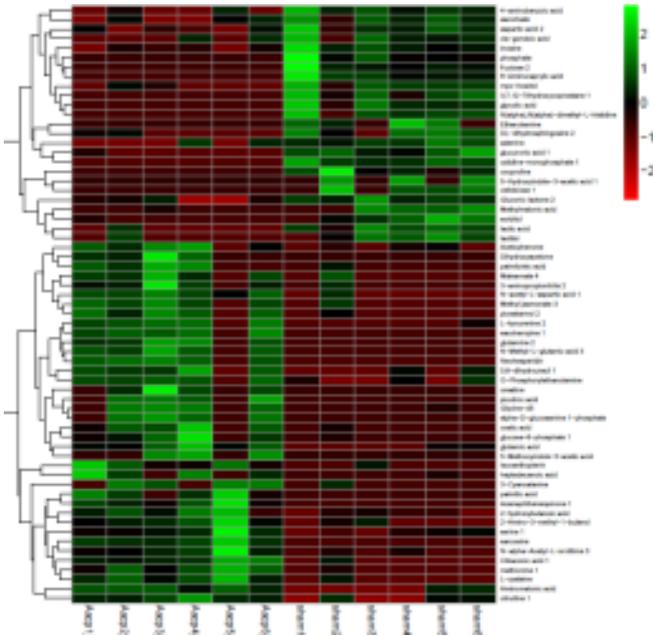


蛋白与代谢关联网络分析

6、层次聚类分析

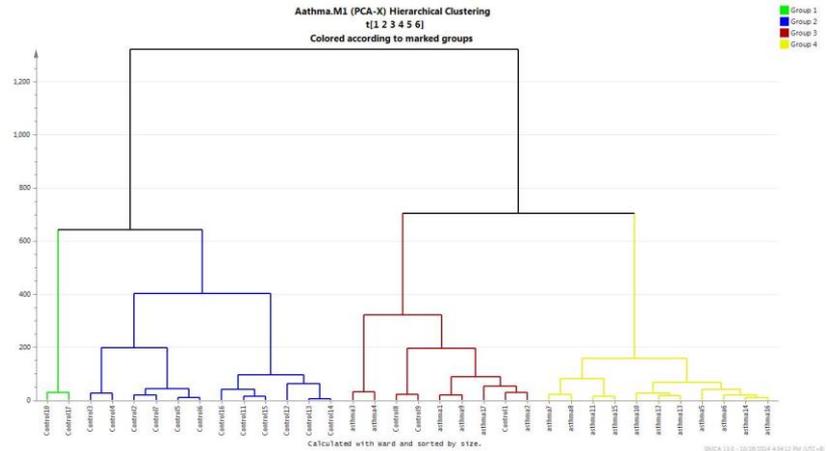
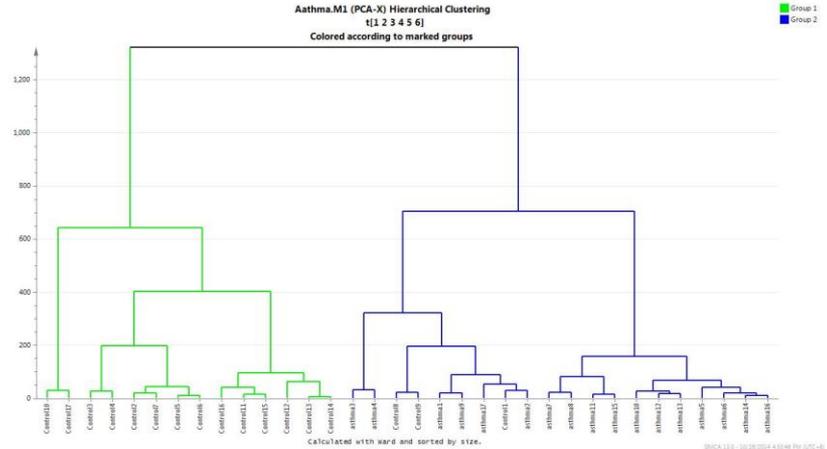


为了全面的直观的展示样品之间的关系及差异情况，将代谢物的表达量做Hierarchical cluster分析。图片中，每一行代表一个样品，每一列代表一个代谢物，红色代表表达量较高，绿色代表表达量较低。



层次聚类分析图

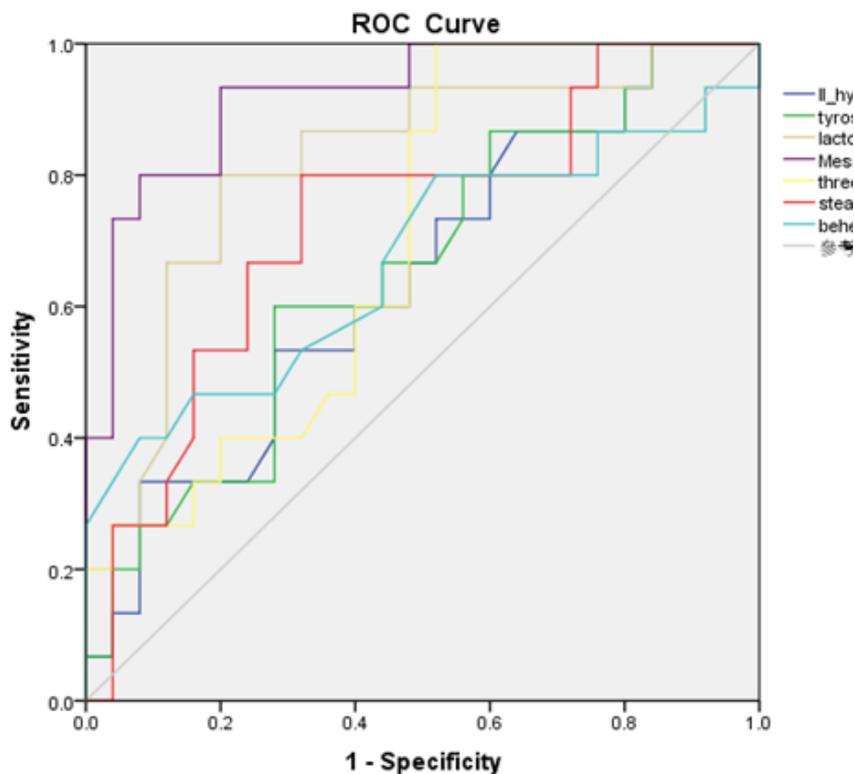
通过HCA分析对样本进行分组：



7、ROC曲线

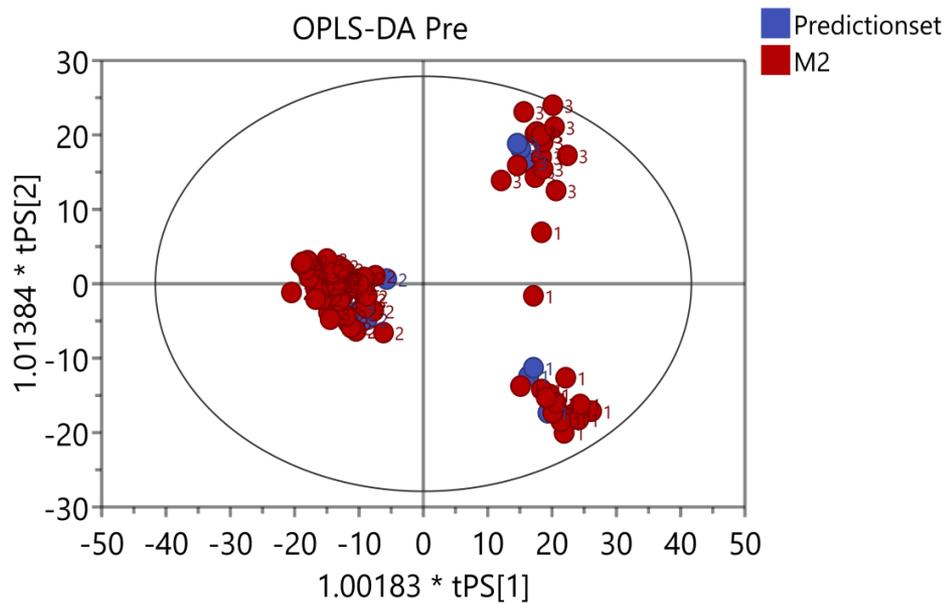
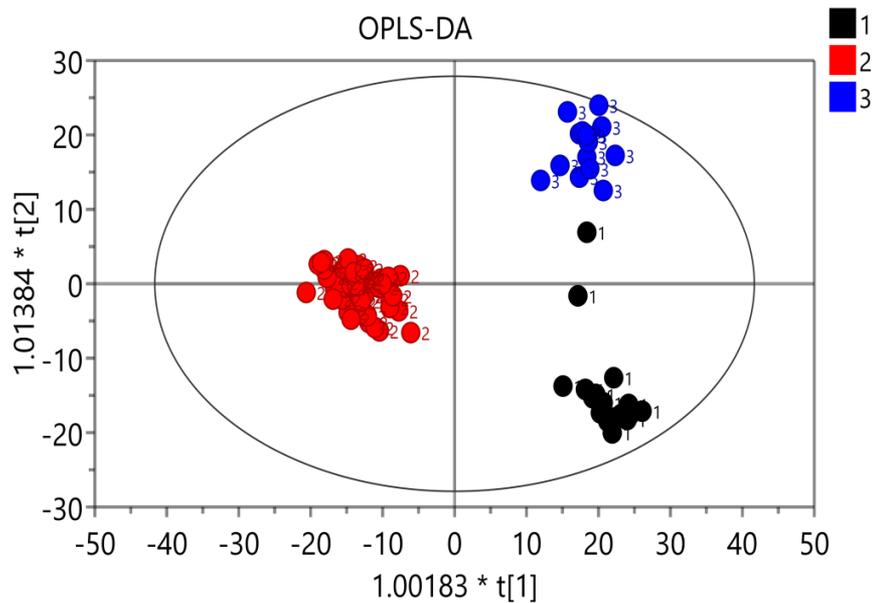


受试者工作特征曲线，是根据一系列不同的二分类方式（分界值或决定阈），以真阳性率（灵敏度）为纵坐标，假阳性率（1-特异度）为横坐标绘制的曲线。



ROC曲线下的面积值在1.0和0.5之间。在AUC>0.5的情况下，AUC越接近于1，说明诊断效果越好。AUC在0.5~0.7时有较低准确性，AUC在0.7~0.9时有一定准确性，AUC在0.9以上时有较高准确性。AUC=0.5时，说明诊断方法完全不起作用，无诊断价值。

8、疾病预测模型

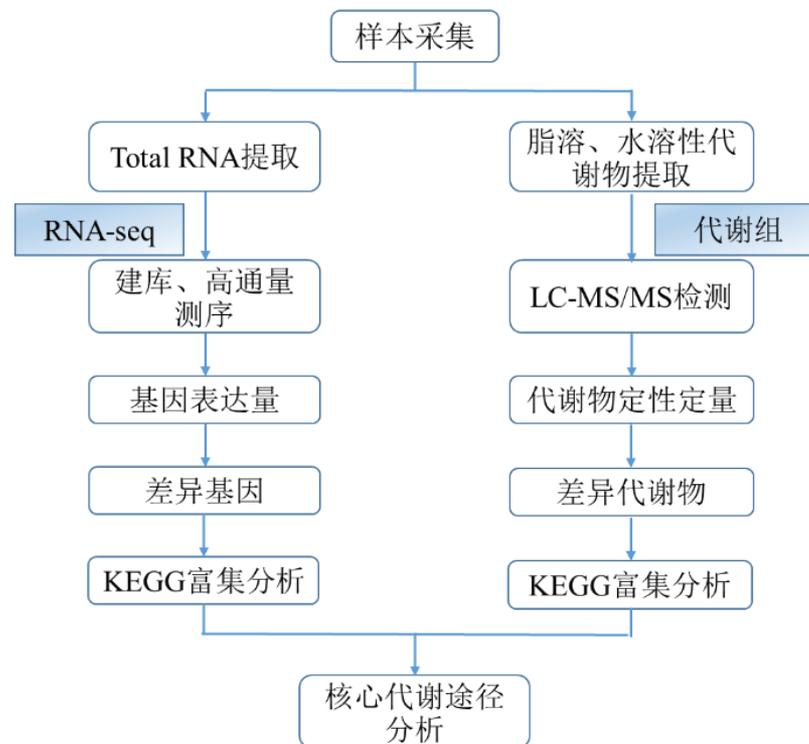


9. 多组学数据关联分析（推荐）

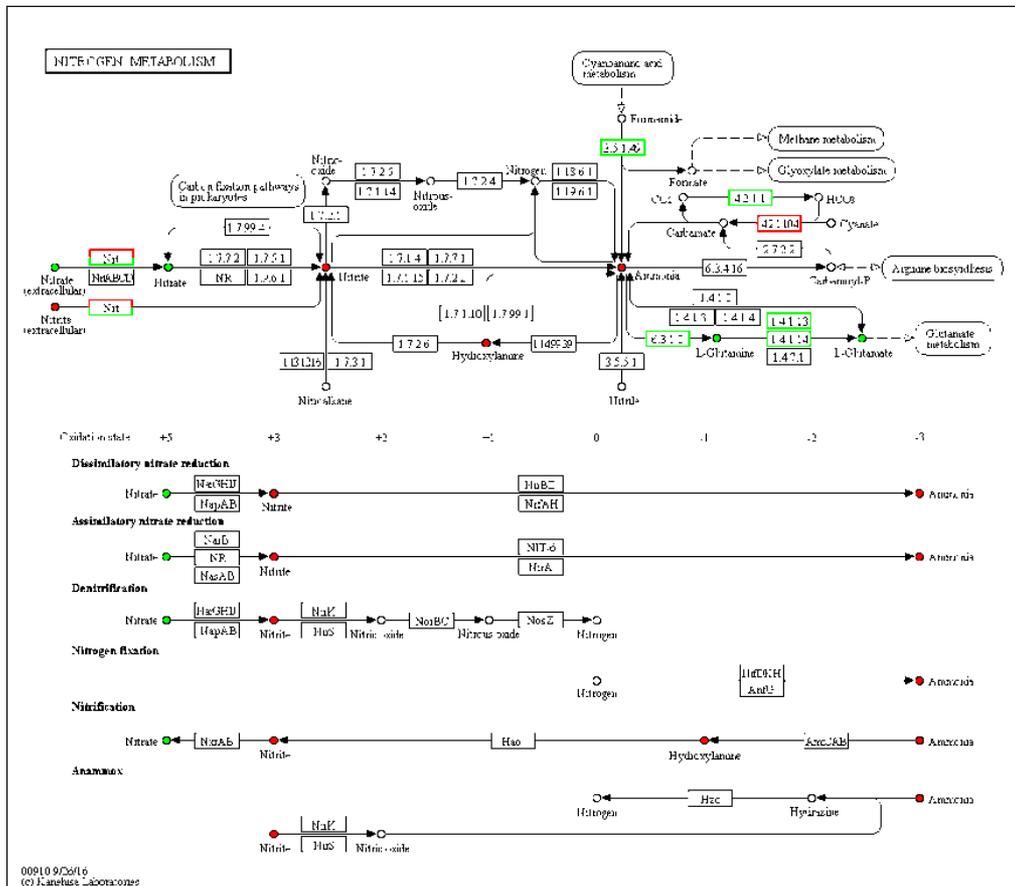


◆ 代谢组+转录组

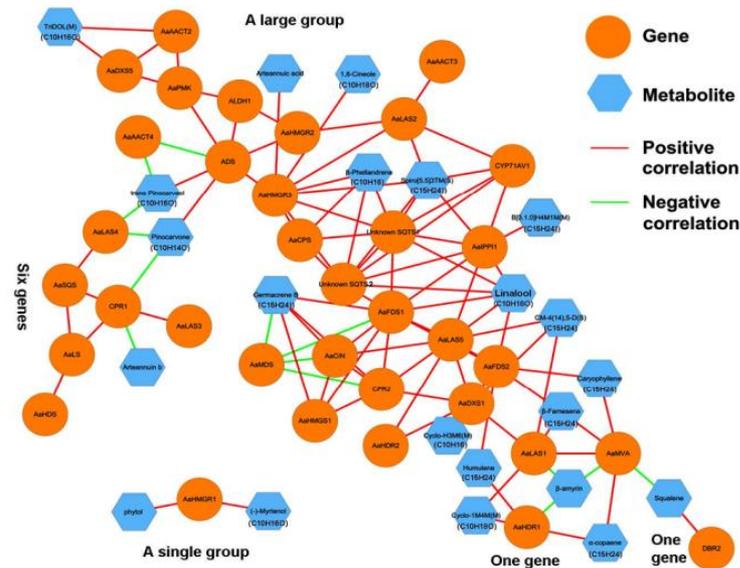
- (1) 动植物生长发育过程的机理研究
- (2) 植物逆境胁迫的机理研究
- (3) 药用植物药用成分合成机理及药物代谢研究
- (4) 蔬果花卉的色泽营养代谢研究
- (5) 疾病病理研究



代谢组+转录组联合分析

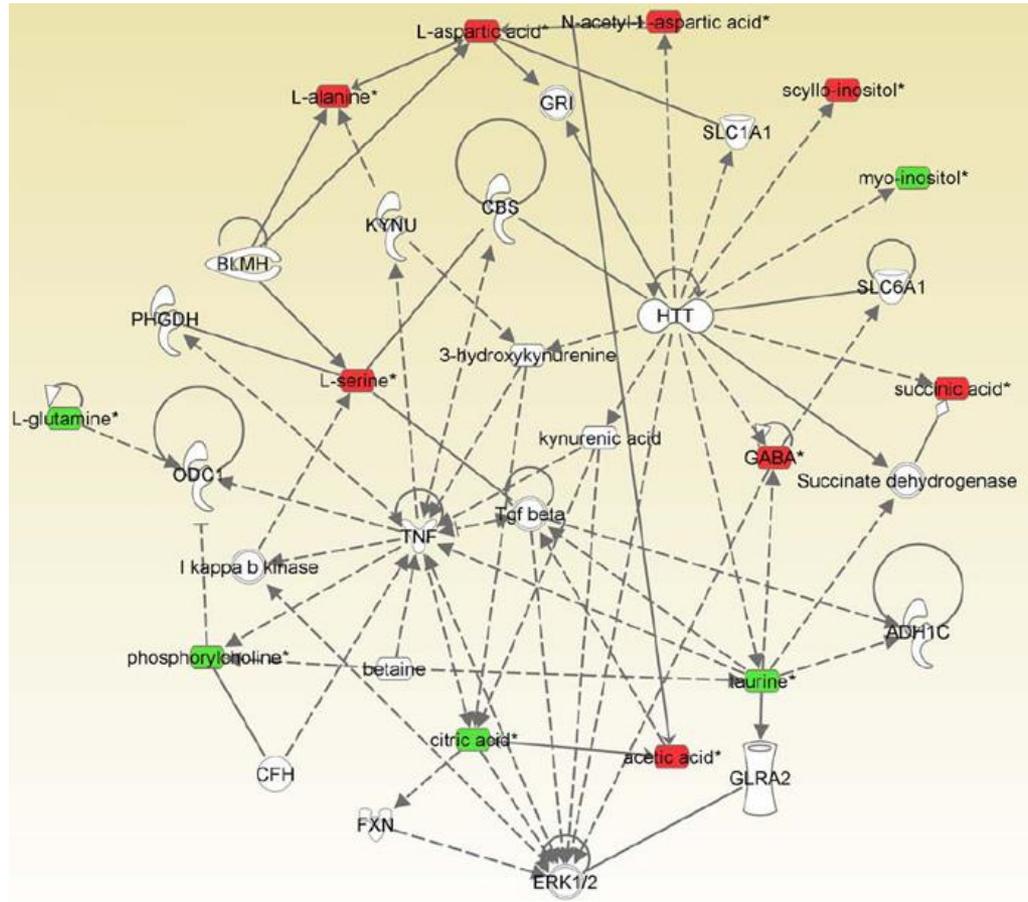


差异基因与差异代谢物的代谢通路图

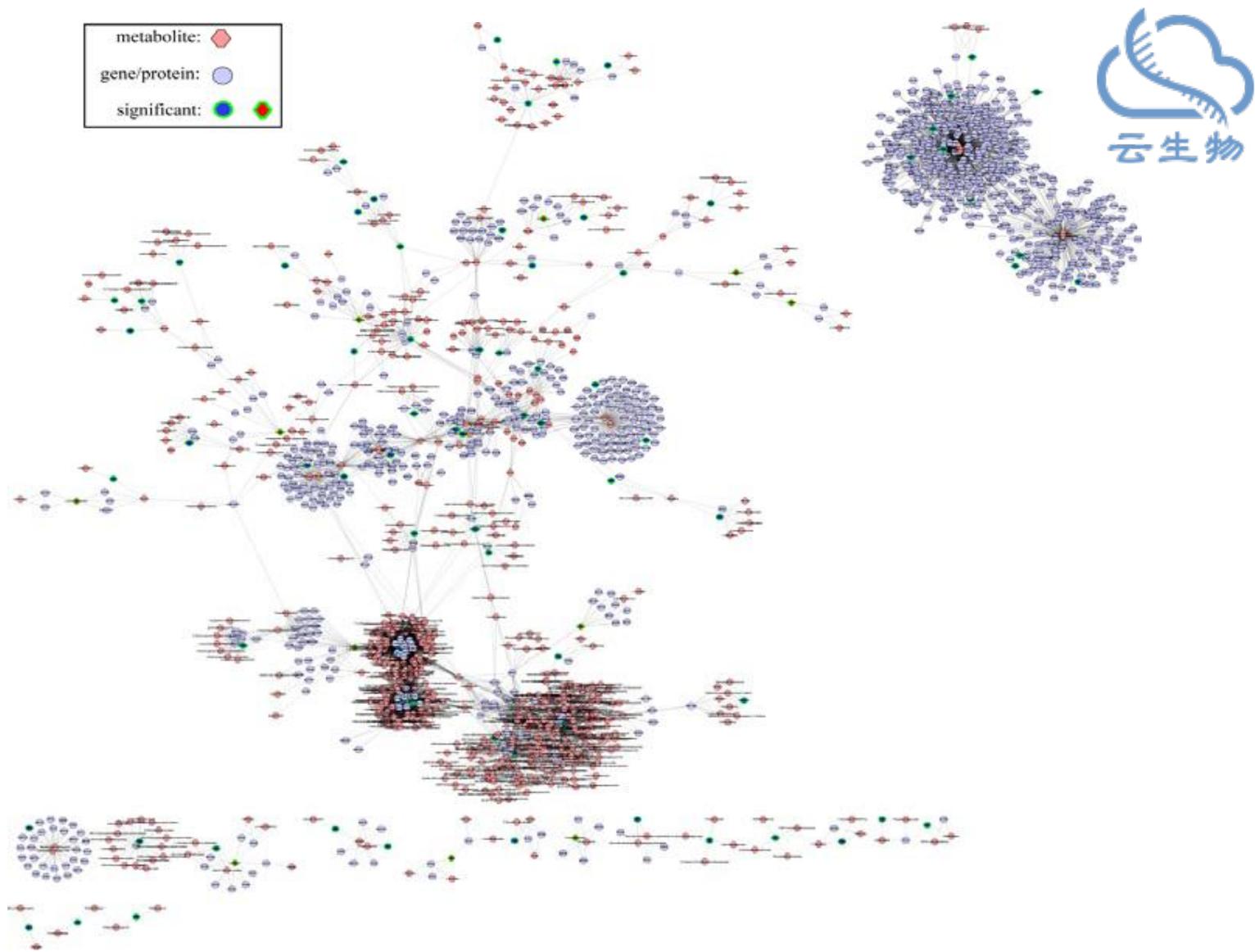


基因-代谢物调控网络图

代谢组+蛋白组+转录组联合分析



IPA 软件构建的基因、蛋白、代谢物互作网络



metscape 软件构建的基因、蛋白、代谢物互作网络



PART 4

代谢组学样本处理

我们处理过的样本



类型	种属
体液	血清，血浆，尿液，唾液，膝盖滑液，脑脊液，卵泡液，精液，牛奶，痰液，舌苔液，淋巴液，胆汁等
组织	心脏组织，肝脏组织，肾脏组织，脑组织，肌肉组织，睾丸组织，胸腺组织，肠道组织，子宫内膜组织，螃蟹鳃组织，文昌鱼，斑马鱼，线虫等
细胞	癌细胞，藻类细胞及细胞培养液等
微生物	大肠杆菌，链球菌，酵母菌，黄篮状菌，红曲菌及培养液等
植物	杨树，桤柳，云杉，白桦，红豆杉，拟南芥，水稻，玉米，大麦，小麦，大豆，棉花，茶叶、甘蔗，葡萄，黄芪，铁皮石斛、石蒜、地黄等
其他	粪便，食糜，肠道内容物，瘤胃液等



样本采集与处理

普通样品制备

细胞：迅速钝化代谢活动（淬灭），离心去除培养基，立即放入液氮中，-80℃保存，如研究胞外代谢，需保持细胞不裂解；

微生物：迅速钝化代谢活动（淬灭），如研究胞外代谢，需保持细胞不裂解；

组织：立即放入液氮中，-80℃保存；

粪便：马上放进-80℃

血清样品制备

➤ 样品量要求 NMR实验500ul/sample；GC-MS，LC-MS实验200ul/sample；一定避免反复冻融。

➤ 血液收集在离心管中静置30分钟进行凝固分层。然后低速离心取上清至干净的离心管中，高速离心5分钟，取上清分装到冻存管中，每管0.5ml，-80度冻存寄送。

- 注意：
- 1) 取血时如用酒精消毒，请擦干擦拭部位，待酒精完全挥发后再取样。
 - 2) 取血时如用麻醉剂，建议用异氟醚，防止在谱图中出现干扰峰。
 - 3) 如要采用血浆，请务必使用肝素钠抗凝管。



样本采集与处理

尿液样品制备

- 1ml/例，原则上可以多取一点。
- **晨起中段尿（临床）或晨间1小时尿（动物）**直接分装到离心管中，每管1ml，添加一滴（约10ul）质量浓度为1/100（w/v）的**叠氮化钠**，-80度冻存寄送。
- **注意事项** 1）动物1小时尿量不够，可分多次收集，不建议一次性收取24小时尿液。
2）叠氮化钠的作用是防腐杀菌，有毒，请万分小心。

样品量要求

植物样本：鲜重3-5g，干重不低于1g；

动物样本：鲜重1-3g，细胞 1×10^7 个

血清样本：**GC-MS, LC-MS实验** 200ul/sample

尿液：1ml/例，原则上可以多取一点

生物学重复

植物与微生物：8个重复

动物、人：10个重复

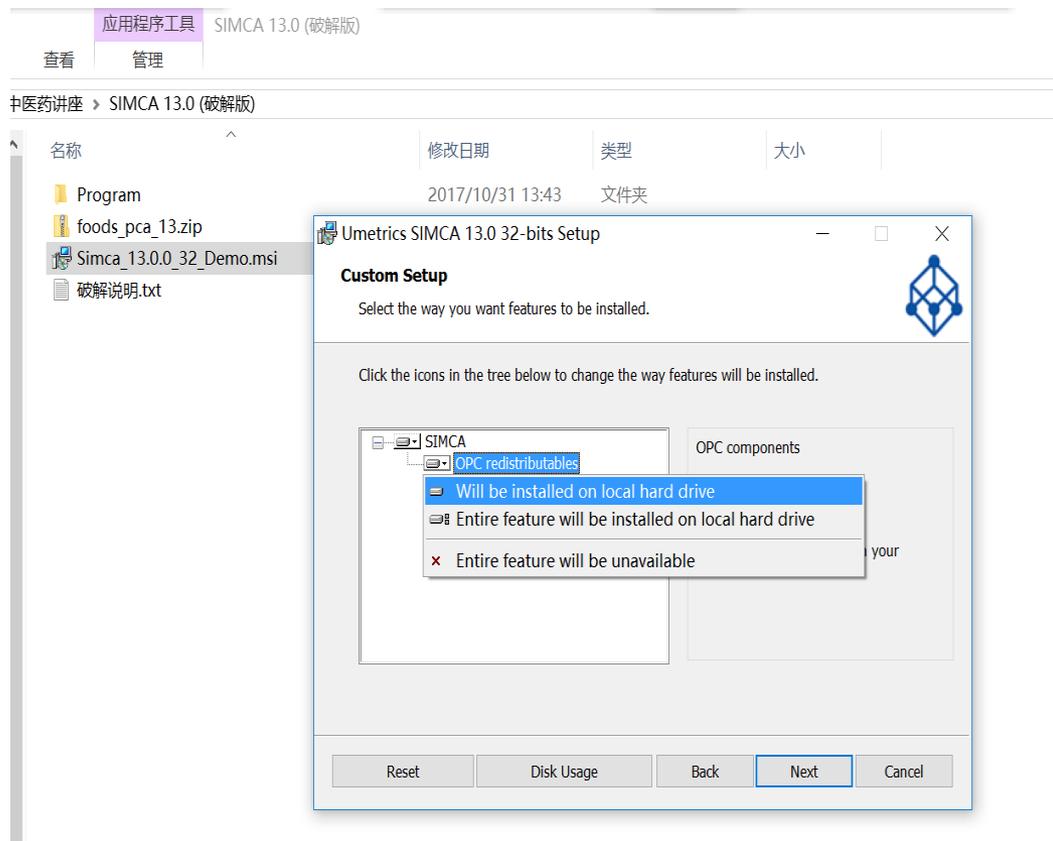
临床样品：30个重复

Simca-p软件操作



- Simca-p软件安装
- 多元统计分析
- 差异物质筛选
- KEGG代谢通路分析

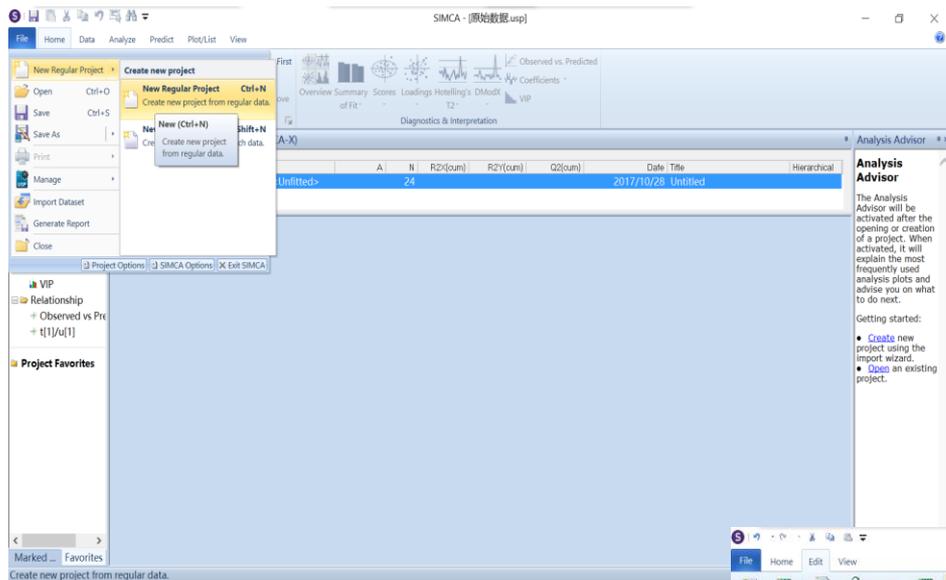
安装注意事项



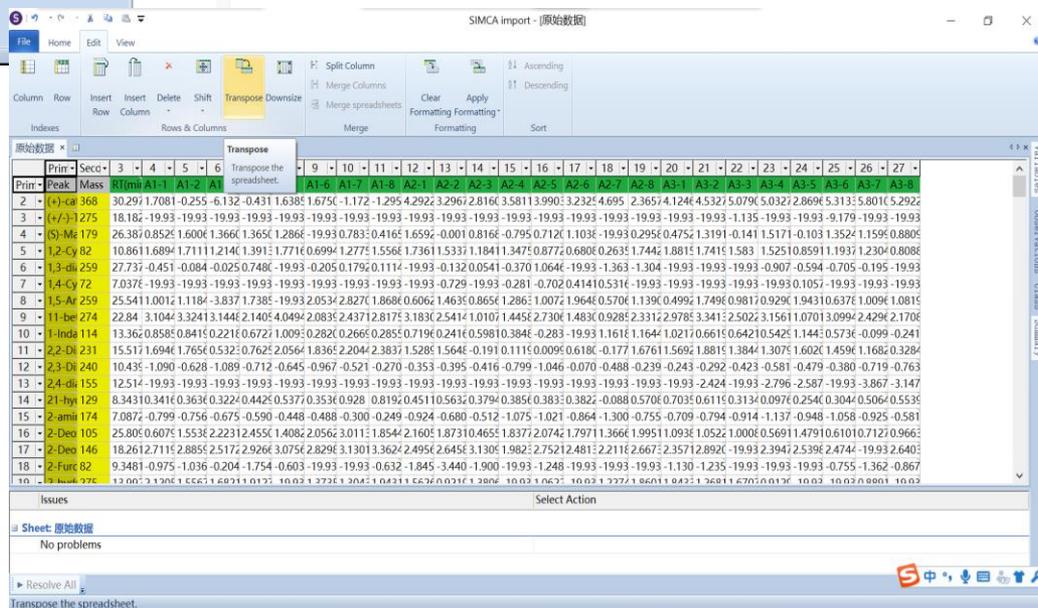
使用步骤:

1. 先鼠标双击运行“Simca_13.0.0_32_Demo.msi”安装软件
2. 用“SIMCA 13.0 Demo(破解版)\Program”里面的文件，替换掉安装后生成的“C:\Program Files (x86)\Umetrics\SIMCA 13.0\Program”里面相应的文件，替换前可以先拷贝一份
3. 双击“C:\Program Files (x86)\Umetrics\SIMCA 13.0\Program\simca.exe”就可以运行了

1. 导入文件



2. 转置数据矩阵



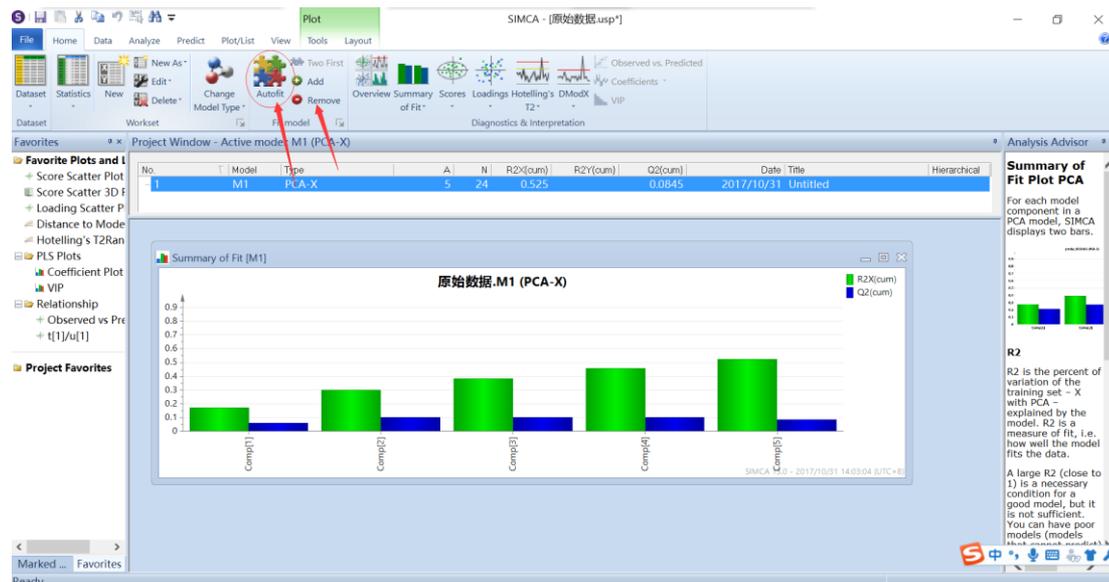
3. 删除mass/RT



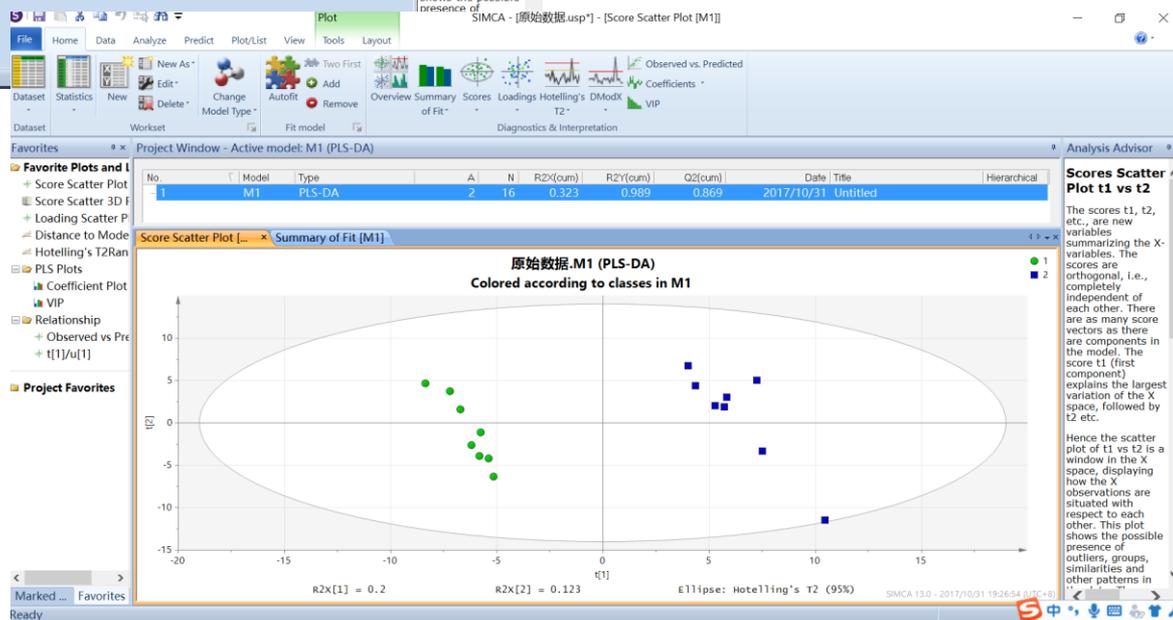
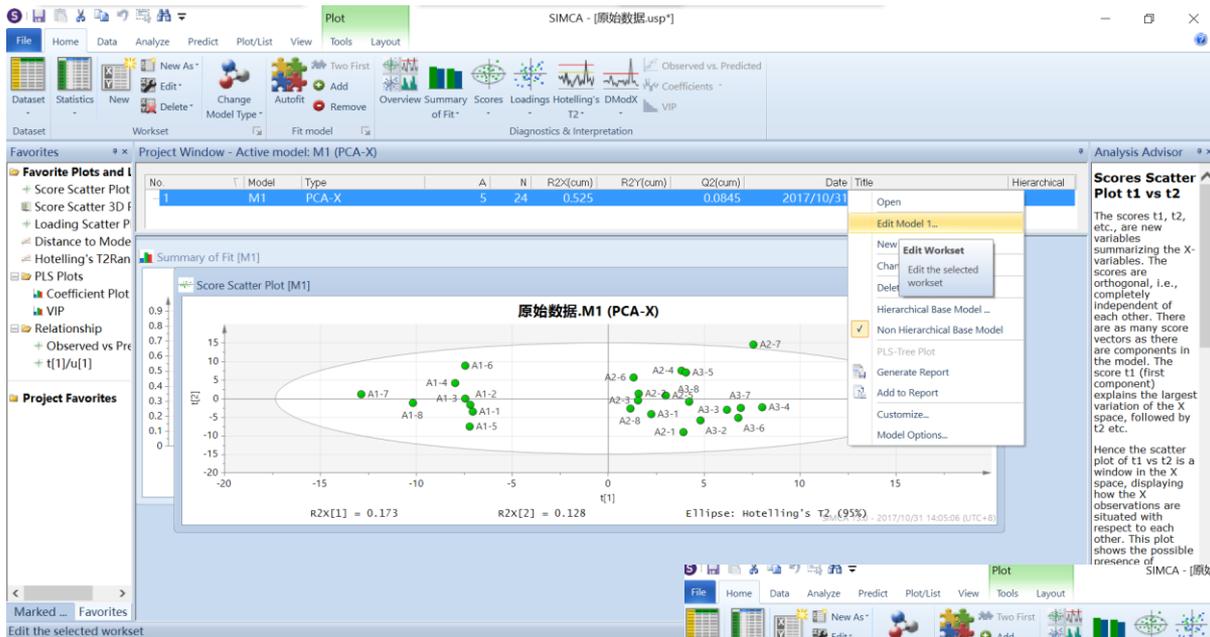
SIMCA import - [原始数据]

Prim	Peak	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16													
2	Mass	368	275	379	82	259	72	259	274	114	231	240	155	129	174	105	146	82												
3	RT(mir)	30.29	18.18	26.38	10.86	12.73	7.03	7.25	5.41	22.84	13.36	15.51	10.43	12.53	8.34	17.08	25.80	25.80												
4	A1-1	1.7081	-19.93	0.852	1.6894	-0.451	-19.93	1.0012	1.1044	0.858	1.6944	-1.090	-19.93	0.341	-0.799	0.607	2.7115	-0.975	2.1205	6.241	-19.93	3.3951	-2.766	-0.286	-19.93	-19.93	-3.290	1.5544	0.5362	7.303
5	A1-2	-0.255	-19.93	1.606	1.7111	-0.084	-19.93	1.1183	1.3241	0.841	1.7654	-0.628	-19.93	0.363	-0.756	1.553	2.885	-1.036	1.556	6.457	-19.93	3.338	-2.925	-1.243	-19.93	-19.93	-3.330	0.0881	2.217	7.061
6	A1-3	-6.132	-19.93	1.366	1.214	-0.025	-19.93	-3.837	3.144	0.221	0.532	-1.089	-19.93	0.322	-0.675	2.223	2.517	-0.204	1.682	1.241	-19.93	2.460	-2.541	-1.523	-19.93	-19.93	-2.976	3.827	0.493	7.038
7	A1-4	-0.431	-19.93	1.365	1.391	0.748	-19.93	1.738	2.140	0.672	0.762	-0.712	-19.93	0.442	-0.590	2.455	2.926	-1.754	1.912	6.066	-19.93	3.286	-2.164	-0.173	-19.93	-19.93	-3.064	3.233	0.373	6.680
8	A1-5	1.6385	-19.93	1.286	1.771	-19.93	-19.93	1.934	0.409	1.009	2.056	-0.645	-19.93	0.537	-0.448	1.408	3.075	-0.603	-19.93	6.643	-0.115	3.343	-2.552	-0.935	-19.93	-19.93	-8.763	3.235	0.256	7.159
9	A1-6	1.675	-19.93	0.699	-0.205	-19.93	2.053	2.083	0.282	1.836	-0.967	-19.93	0.353	-0.488	2.056	2.829	-19.93	1.373	5.620	-19.93	2.983	-19.93	0.471	-19.93	-19.93	-2.993	1.166	0.654	7.021	
10	A1-7	-1.172	-19.93	0.783	1.277	0.179	-19.93	2.827	2.437	0.266	2.204	-0.521	-19.93	0.928	-0.300	3.011	3.1301	-19.93	1.304	6.276	-19.93	3.590	-1.038	-0.569	0.357	-19.93	-2.720	3.815	0.915	7.205
11	A1-8	-1.295	-19.93	0.416	1.556	0.111	-19.93	1.868	2.817	0.285	2.383	-0.270	-19.93	0.819	-0.249	1.854	3.362	-0.632	1.943	1.633	-19.93	3.243	-1.366	-2.174	-19.93	-19.93	-2.894	1.884	0.903	7.215
12	A2-1	4.292	-19.93	1.659	1.736	-19.93	-19.93	0.606	3.183	0.719	1.528	-0.353	-19.93	0.451	-0.924	2.160	2.495	-1.845	1.562	7.019	-19.93	3.089	-2.877	-1.379	-19.93	-19.93	-1.520	3.453	0.358	7.343
13	A2-2	3.296	-19.93	-0.001	1.533	-0.132	-0.729	1.463	2.541	0.241	1.564	-0.395	-19.93	0.563	-0.680	1.873	1.645	-3.440	0.921	6.662	-1.097	3.657	-1.953	-19.93	-0.901	-19.93	-1.627	0.494	0.068	6.747
14	A2-3	2.816	-19.93	0.816	1.184	0.0541	-19.93	0.865	1.010	0.598	0.191	-0.416	-19.93	0.379	-0.512	0.465	3.1305	-1.900	1.380	6.633	-19.93	3.173	-2.057	-1.964	-19.93	1.126	-2.465	1.894	-1.283	6.316
15	A2-4	3.5811	-19.93	-0.795	1.347	-0.370	-0.281	1.286	1.445	0.384	0.111	-0.799	-19.93	0.385	-0.075	1.837	1.982	-19.93	-19.93	6.412	-1.165	3.274	-19.93	-0.719	0.015	-19.93	-1.864	2.572	-0.139	6.448
16	A2-5	3.990	-19.93	0.712	0.877	1.064	-0.702	1.007	2.730	-0.283	0.009	-1.046	-19.93	0.383	-1.021	2.074	2.7521	-1.248	1.062	6.478	-1.419	3.062	-2.588	-19.93	-19.93	-1.447	2.997	0.643	7.305	
17	A2-6	3.232	-19.93	1.103	0.680	-19.93	0.414	1.964	1.483	-19.93	0.618	-0.070	-19.93	0.382	-0.864	1.797	1.2481	-19.93	-19.93	6.561	-19.93	3.851	-1.299	-0.741	-19.93	-19.93	-1.883	2.717	-0.007	6.391
18	A2-7	4.605	-19.93	-0.03	1.363	-1.363	-0.311	0.570	0.028	1.161	-0.177	-0.488	-19.93	0.411	-1.001	3.064	2.219	-19.93	1.272	6.101	-0.070	3.801	-2.542	-0.712	-19.93	-19.93	-3.778	1.874	-0.716	6.736

4. 自动拟合



PCA/PLS-DA





代谢通路分析

- 1.首先，得到差异代谢物及其上下调的信息
- (Fold change>1为上调，标red; Fold change<1为下调，标blue)

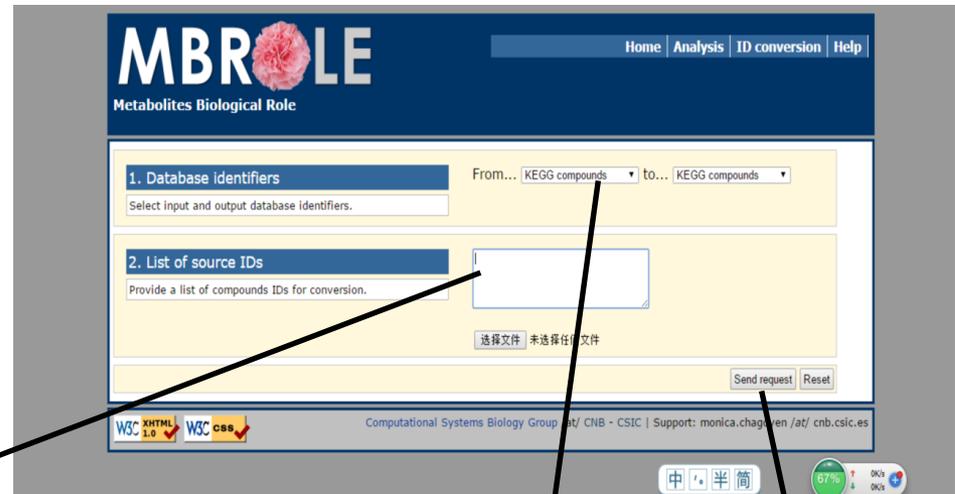
如图

	A	B	C	D
1	Metabolites	change		
2	lactate	blue		
3	4-aminobutyrate	red		
4	glutamine	red		
5	choline	red		
6	glycine	red		
7	N-acetylaspartate	red		
8				
9				
10				

<http://csbg.cnb.csic.es/mbrole/conversion.jsp>



	A	B
1	Metabolites	change
2	lactate	blue
3	4-aminobutyrate	red
4	glutamine	red
5	choline	red
6	glycine	red
7	N-acetylaspartate	red
8		



2. 将黄色部分拷贝到这里

3. 选择metabolite names

4. 点击send request

5. 得到代谢物名称转换成KEGGID的结果



MBROLE
Metabolites Biological Role

Home | Analysis | ID conversion | Help

6 new compounds

Input ID	Output ID
lactate	C01432
4-aminobutyrate	C00334
glutamine	C00303
choline	C00114
glycine	C00037
N-acetylaspartate	

Save as text
Copy & paste in analysis

Computational Systems Biology Group /at/ CNB - CSIC | Support: monica.chagoyen /at/ cnb.csic.es

6. 将表格复制下来，粘贴在记事本里，然后再复制记事本里的内容到原来的Excel里（不然格式会乱），没有对应到的ID用“*”手动代替。按ID降序

B7 : X ✓ fx *

	A	B	C	D	E
	Metabolites	Output ID	change		
1					
2	lactate	C01432	blue		
3	4-aminobutyrate	C00334	red		
4	glutamine	C00303	red		
5	choline	C00114	red		
6	glycine	C00037	red		
7	N-acetylaspartate	*	red		
8					
9					
10					
11					
12					



<http://csbg.cnb.csic.es/mbrole/Controller>

	A	B	C	D
1	Metabolites	Output ID	change	
2	lactate	C01432	blue	
3	4-aminobutyrate	C00334	red	
4	glutamine	C00303	red	
5	choline	C00114	red	
6	glycine	C00037	red	
7	N-acetylaspartate	*	red	
8				
9				
0				

1. Compound set
Provide a list of compounds IDs. Currently we support KEGG compounds, HMDB metabolites, PubChem compounds and ChEBI 3start entities. You can also use our ID conversion utility.
Upload file: 未选择任何文件

2. Annotations
Select one compound type and the annotations to analyze. You can also use our ID conversion utility.
 KEGG compounds
 HMDB metabolites
 PubChem compounds
 ChEBI 3star compounds
 SMILES

3. Background set
Statistics can be computed using a pre-compiled reference, or alternatively you can provide a background set.
 Pre-compiled
 Provided by user
Upload file: 未选择任何文件

7.将蓝色部分拷贝到这里

8.选择KEGG compounds
选择KEGG pathway

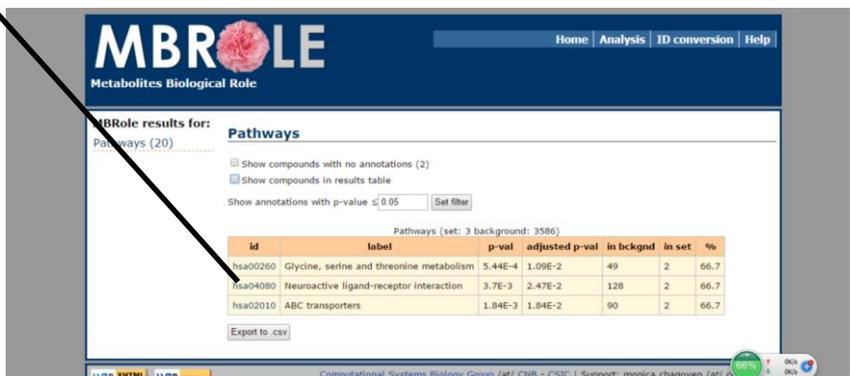
- KEGG compounds
- KEGG pathways
- enzyme interactions
- other interactions
- biological role
- chemical groups
- HMDB metabolites
- PubChem compounds
- ChEBI 3star compounds
- SMILES

9.选择物种后，点击send request

Pre-compiled
 Provided by user
Acaryochloris marina



10. 点击 Show compounds in results table
然后把表格拷到TXT里，然后再拷到Excel



11. 添加一列 -lg(p value), 计算数据;
用 label 和 -lg p-val 制表。

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
id	label	-lg p value	p-val	adjusted p-val	in bckgd	in set	%	Compounds	
hsa00260	Glycine, serine and threonine metabolism	3.2644011	5.44E-04	1.09E-02	49	2	66.7	C00037	C00114
hsa02010	ABC transporters	2.735182177	1.84E-03	1.84E-02	90	2	66.7	C00037	C00114
hsa04080	Neuroactive ligand-receptor interaction	2.431798276	3.70E-03	2.47E-02	128	2	66.7	C00037	C00334



可以选择物种

	A	B	C	D
	Metabolites	Output ID	change	
1				
2	lactate	C01432	blue	
3	4-aminobutyrate	C00334	red	
4	glutamine	C00303	red	
5	choline	C00114	red	
6	glycine	C00037	red	
7	N-acetylaspartate	*	red	
8				
9				
10				

以及change部分

Search against: ko Enter: map, ko, ec, m, hsadd, or org

Primary ID: KEGG identifiers (Outside IDs for organism-specific pathways only)

Enter objects one per line followed by bgcolor, fgcolor:

Alternatively, enter the file name containing the data:

选择文件 未选择任何文件

If necessary, change default bgcolor: pink

Include aliases

Use uncolored diagrams

Display objects not found in the search

Search pathways containing all the objects (AND search)

Exec Clear

12.将蓝色部分以及后面的change一并拷贝到这里，点击Exec。按照11中表格里的label找到代谢通路，逐一点开，保存代谢通路的图片和网页。

http://www.genome.jp/kegg/tool/map_pathway2.html



谢谢！