

基于代谢流量分布信息理解大肠杆菌中异柠檬酸裂解酶调节因子的代谢调控作用

柳志杰, 周利, 花强

华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

柳志杰, 周利, 花强. 基于代谢流量分布信息理解大肠杆菌中异柠檬酸裂解酶调节因子的代谢调控作用. 生物工程学报, 2012, 28(5): 565-576.

Liu ZJ, Zhou L, Hua Q. Metabolic regulation of isocitrate lyase regulator in *Escherichia coli* based on metabolic flux information. Chin J Biotech, 2012, 28(5): 565-576.

摘 要: 基因的表达受不同的转录调节因子调节。大肠杆菌中的异柠檬酸裂解酶调节因子 (IcIR) 能够抑制编码乙醛酸支路酶的 *aceBAK* 操纵子的表达。本研究基于代谢物的 ^{13}C 同位体物质分布来定量解析代谢反应, 主要研究了 *icIR* 基因在大肠杆菌生理和代谢中的作用。大肠杆菌 *icIR* 基因缺失突变株的生长速率、糖耗速率和乙酸的产量相对于原始菌株都有所降低, 但菌体得率略有增加。通过代谢途径的流量比率分析发现基因缺失株的乙醛酸支路得到了激活, 33% 的异柠檬酸流过了乙醛酸支路; 戊糖磷酸途径的流量变小, 使得 CO_2 的生成量减少。同时, 乙醛酸支路激活, 但草酰乙酸形成磷酸烯醇式丙酮酸的流量基本不变, 说明磷酸烯醇式丙酮酸-乙醛酸循环没有激活, 没有过多的碳原子在磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶反应中以 CO_2 形式排出, 从而确保了菌体得率。葡萄糖利用速率的降低、乙酰辅酶 A 的代谢效率提高等使得 *icIR* 基因敲除菌的乙酸分泌较原始菌株有所降低。

关键词: 代谢流量分析, 代谢流比率, 异柠檬酸裂解酶调节因子, 大肠杆菌

Received: September 16, 2011; **Accepted:** November 28, 2011

Supported by: Shanghai Pujiang Program (No. 08PJ14038), National Special Fund for State Key Laboratory of Bioreactor Engineering (No. 2060204), SRF for ROCS, SEM, Shanghai Leading Academic Discipline Project (No. B505).

Corresponding author: Qiang Hua. Tel/Fax: +86-21-64250972; E-mail: qhua@ecust.edu.cn

上海市浦江人才计划 (No. 08PJ14038), 国家重点实验室专项经费 (No. 2060204), 教育部留学回国人员科研启动基金, 上海市重点学科建设项目 (No. B505) 资助。

Metabolic regulation of isocitrate lyase regulator in *Escherichia coli* based on metabolic flux information

Zhijie Liu, Li Zhou, and Qiang Hua

State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

Abstract: Gene expression is regulated by different transcriptional regulators. The transcriptional regulator isocitrate lyase regulator (IcIR) of *Escherichia coli* represses the expression of the aceBAK operon that codes for the glyoxylate pathway enzymes. In this study, physiological and metabolic responses of the deletion of the iclR gene in *E. coli* BW25113 were investigated based on the quantification and analysis of intracellular metabolic fluxes. The knockout of the iclR gene resulted in a decrease in the growth rate, glucose uptake rate and the acetate secretion rate, but a slight increase in biomass yield. The latter could be attributed to the lowered metabolic fluxes through several CO₂ generating pathways, including the redirection of 33% of isocitrate directly to succinate and malate without CO₂ production as well as the reduced flux through the pentose phosphate pathway. Furthermore, although the glyoxylate shunt was activated in the iclR mutant, the flux through phosphoenolpyruvate (PEP) carboxykinase kept almost unchanged, implying an inactive PEP-glyoxylate cycle and no extra loss of carbon atoms in the mutant strain. Both the reduced glucose uptake rate and the active glyoxylate shunt were responsible for the minor decrease in acetate secretion in the iclR knockout strain compared to that in the wild-type *E. coli* strain.

Keywords: metabolic flux analysis, metabolic ratio, isocitrate lyase regulator, *Escherichia coli*

基因的表达是通过不同的转录调节因子来调控的, 转录调节因子是一类能结合在 DNA 特定序列上的蛋白。转录调节因子结合在 DNA 特定序列上就能促进或者抑制 RNA 聚合酶 (RNAP) 的结合能力。RNA 聚合酶 (RNAP) 亲和力的降低一般会降低基因的表达, 而 RNAP 亲和力的提高一般会加强基因的表达。大肠杆菌中的异柠檬酸裂解酶调节因子 (IcIR) 能够抑制 *aceBAK* 操纵子的表达, *aceBAK* 操纵子编码乙醛酸支路的 3 个酶: 异柠檬酸裂解酶 (由 *aceA* 基因编码)、苹果酸合酶 (由 *aceB* 基因编码) 和异柠檬酸脱氢酶 (IDH) 激酶/磷酸酶 (由 *aceK* 基因编码)。乙醛酸支路使得大肠杆菌能够在乙酸或脂肪酸上生长。乙醛酸支路是大肠杆菌在这些碳源 (乙酸、脂肪酸) 上生长时的必需途径, 因为它避免了碳原子通过三羧酸循环而以两分子 CO₂ 的形

式失去。乙醛酸支路激活时, 异柠檬酸在异柠檬酸裂解酶催化下裂解形成乙醛酸和琥珀酸, 琥珀酸可以重新进入三羧酸循环, 乙醛酸和乙酰辅酶 A 在苹果酸合酶的催化下形成苹果酸^[1]。乙醛酸支路的第 3 个酶——异柠檬酸脱氢酶 (IDH) 激酶/磷酸酶具有双重功能, 它通过磷酸化和去磷酸化异柠檬酸脱氢酶作用来控制异柠檬酸的流向^[2]。

从上世纪 90 年代, 代谢工程作为一门新的学科被提出以来^[3], 代谢工程已经成当前国际生物技术领域的一个新的研究前沿。代谢流量分析作为代谢工程的一个主要的分析工具^[3-4], 其结果是细胞内整个中心代谢途径的代谢速率, 也即为流量。代谢流量分析可以用来阐明细胞的代谢网络和调控机制、提高生物生产过程的产量、注释未知的基因、分析药物的毒性等^[5-8]。近年来, 基于稳定同位素 ¹³C 标记碳源的代谢流量分析方

法已经成功地被应用于分析多种微生物,如大肠杆菌^[9-12]、集胞藻^[13]、酵母菌^[14]和琥珀酸放线杆菌^[15-16]等。

¹³C 代谢流量分析实验流程为:在培养基中添加稳定同位素 ¹³C 标记的底物,如首位 ¹³C 标记的葡萄糖 (1-¹³C-glucose) 或均匀 ¹³C 标记的葡萄糖 (U-¹³C-glucose) 等,当细胞代谢这些 ¹³C 标记的底物时,底物上的同位素标记信息会随代谢反应从不同方向传递到代谢网络的各个中间代谢物上,进而传递到蛋白氨基酸上。菌体蛋白氨基酸含量丰富,提取方便,且这些氨基酸是由一些关键的中间代谢物合成的,根据它们的同位体分布信息可以推导得到中间代谢物的同位体分布信息^[17],并借助代谢流比率方法来进行代谢流量的定量解析^[18]。

当前,对细胞的中心代谢途径基因的代谢调控研究得比较多,但对转录调节因子的代谢调控机理研究得则相对较少。本文主要应用 ¹³C 代谢流量分析来研究 *iclR* 基因敲除对大肠杆菌 BW25113 生理和代谢的影响,进而揭示转录调节因子——异柠檬酸裂解酶调节因子在细胞代谢调控中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

E. coli BW25113、*E. coli* BW25113 $\Delta iclR$, 由华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室保藏。*iclR* 基因敲除的大肠杆菌菌株 *E. coli* BW25113 $\Delta iclR$ 是在原始菌 *E. coli* BW25113 染色体上敲除了 *iclR* 基因。

1.1.2 主要试剂及仪器

均匀 ¹³C 标记的葡萄糖 (U-¹³C-glucose, $p_u > 99\%$)、首位 ¹³C 标记的葡萄糖 (1-¹³C-glucose, p_1

$>99\%$)、N,N-二甲基甲酰胺和衍生剂 N-叔丁基二甲基甲硅烷基-N-甲基三氟乙酰胺均购自 Sigma 公司。其他试剂均为分析纯。高效液相色谱 (HPLC) 为 Agilent 1200 型液相。气相色谱质谱联用仪 (GC-MS) 为 Agilent 6890GC-5975MS 型气质联用仪。酶标仪为 BioTek Power Wave XS2 型酶标仪。

1.1.3 培养基

培养基为 M9 合成培养基,其组成为:葡萄糖 3 g/L, NH₄Cl 1.0 g/L, (NH₄)₂SO₄ 2.7 g/L, Na₂HPO₄ 6.8 g/L, KH₂PO₄ 3.0 g/L, NaCl 0.6 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.2 g/L, 维生素 B1 1.0 μg/L, 微量元素溶液 10 mL/L; 微量元素溶液组成为: CaCl₂·2H₂O 0.55 g/L, FeCl₃·6H₂O 1.67 g/L, MnCl₂·4H₂O 0.10 g/L, ZnCl₂ 0.17 g/L, CuCl₂·2H₂O 0.04 g/L, CoCl₂·6H₂O 0.06 g/L, Na₂MoO₄·4H₂O 0.06 g/L。

1.2 培养条件及标记实验

菌株均在 37 °C、220 r/min 条件下摇瓶培养。摇瓶培养简单易行,在指数生长期,细胞快速地消耗营养源用于新细胞体的合成,胞内代谢物几乎没有积累,该时期的细胞代谢处于拟稳态过程,可以对这样的过程进行基于稳定同位素的代谢流量解析。标记实验用 20% (质量分数) 均匀 ¹³C 标记的葡萄糖和 80% (质量分数) 天然的葡萄糖或者 20% (质量分数) 首位 ¹³C 标记的葡萄糖和 80% (质量分数) 天然的葡萄糖。菌株经过活化后接种于新鲜的 M9 合成培养基中。取指数生长中期的细胞用于细胞内流量分析和酶活性测定,实验重复 3 次,结果取平均值。

1.3 生理参数的确定

1.3.1 细胞浓度的测定

将发酵液适当稀释后于波长 600 nm 处测定

吸光值 OD_{600} , 通过 OD_{600} 的变化来监测菌体生长情况。

1.3.2 细胞干重的测定

取一定量体积的发酵液, 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 $12\ 000\times g$ 离心 10 min, 用去离子水洗 2 次后置于 $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘至恒重, 称重。

1.3.3 葡萄糖的检测

HPLC 检测。检测器: 示差折光检测器; 色谱柱: NH_2 柱; 流动相: 乙腈+水 (80:20), 流速 1 mL/min ; 检测器池温度: $40\text{ }^{\circ}\text{C}$; 柱温: $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

1.3.4 有机酸的检测

HPLC 检测。检测器: 紫外检测器; 色谱柱: ODS 柱; 流动相: 0.1% H_3PO_4 , 流速: 1 mL/min ; 柱温: $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

1.3.5 生理参数的计算

基于菌体浓度、葡萄糖浓度和有机酸浓度的变化, 可以计算得到指数生长期细胞的比生长速率 (μ)、菌体得率 ($Y_{X/S}$)、底物的比消耗速率 (q_s) 和产物的比生成速率 (q_p)^[19]。

1.4 GC-MS 样品的准备及分析

1.4.1 GC-MS 样品的准备

收集指数生长中期的菌体细胞, 用 0.9% NaCl 溶液清洗 3 次, 在 $200\ \mu\text{L}$ 6 mol/L HCl 中 $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水解 16 h。水解产物于 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 真空干燥烘干, 加 $100\ \mu\text{L}$ N,N-二甲基甲酰胺和 $50\ \mu\text{L}$ N-叔丁基二甲基甲硅烷基-N-甲基三氟乙酰胺 $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ 衍生 1 h, 衍生化的样品过滤后用于 GC-MS 分析^[12]。

1.4.2 GC-MS 样品的分析

气相色谱柱: HP-5MS ($30\text{ m}\times 0.25\text{ mm}\times 0.25\ \mu\text{m}$)。升温程序: $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保留 2 min, 以 $5\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ 升到 $180\text{ }^{\circ}\text{C}$, 然后以 $10\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ 升到

$260\text{ }^{\circ}\text{C}$, 保留 8 min; 载气 (氮气, 纯度 $\geq 99.996\%$) 流速为 1 mL/min ; 进样量: $0.2\ \mu\text{L}$; 分流比: 1:100; 进样口温度: $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, 离子源温度: $230\text{ }^{\circ}\text{C}$; -70 eV 轰击; 质谱仪扫描范围: $70\sim 560\text{ m/z}$; 溶剂延迟: 5 min。

1.5 细胞代谢流量的定量计算

为了计算菌体细胞体内的代谢流量, 我们根据大肠杆菌主要的中心代谢途径建立了大肠杆菌的代谢模型, 包括 29 步代谢反应和 24 个代谢物。在这种情形下, 此代谢模型为未定系统。为了模型可解, 我们可以利用实验测得的代谢物同位体分布信息来分析代谢途径的流量比率, 进而基于细胞代谢物的平衡式以及推导得到的代谢流量比率即可进行代谢网络反应流量的定量分析^[18]。

水解得到的蛋白氨基酸经过叔丁基二甲基硅烷化合物 (TBDMS) 衍生化处理, 所得到的氨基酸衍生物就能够在气相色谱上得到很好的分离, 在其后的质谱仪中, 衍生化的氨基酸在电子轰击离子化作用下断裂成带有不同碳原子骨架片段的氨基酸碎片, 并且这些碎片根据质荷比的不同而得到分离^[20-21]。

对于质谱得到的每个带有不同碳原子骨架片段的氨基酸碎片, 其质量分布矢量 MDV 可以通过公式 1 获得^[22]。

$$MDV_{\alpha} = \begin{bmatrix} (m_0) \\ (m_1) \\ \vdots \\ (m_n) \end{bmatrix} \text{ with } \sum_{i=0}^n m_i = 1 \quad (1)$$

m_0 表示不含 ^{13}C 标记的氨基酸碎片的丰度, $m_{i>0}$ 表示 i 个碳原子被 ^{13}C 标记的氨基酸碎片的丰度。

由于自然界中各种元素的自然丰度会对得

到的氨基酸碎片的质量分布矢量 MDV_{α} 产生影响。为了得到纯粹的氨基酸碳骨架的同位体质量分布矢量, MDV_{α} 需要校正掉衍生氨基酸片段上的所有氢、氧、氮、硫、硅元素, 以及衍生基团上的碳元素的自然丰度。这可以通过公式 2 进行校正^[22]。

$$MDV_{\alpha}^* = C_{\text{corr,CHONSSi}}^{-1} \cdot MDV_{\alpha} \quad (2)$$

根据实验得到的氨基酸碎片的质量分布矢量我们即可计算出一些节点的代谢流比率。在本研究中, 乙醛酸支路是关键的控制途径, Fisher 等研究中仅给出了最终的计算式^[23], 为了帮助理解, 在这里给出其具体推导过程。目标代谢物 OAA 的 C1 到 C4 片段 (其质量分布矢量表示为 OAA_{1-4}) 在羧化反应中是由 PEP 的 C1 到 C3 片段和一分子 CO_2 得到 (其质量分布矢量表示为 $PEP_{1-3_CO_2}$), 在乙醛酸支路中的由来 (OAA_GOX) 一半为 ACA 的 C1 到 C2 片段 (ACA_{1-2}) 和 OAA 的 C1 到 C2 片段 (OAA_{1-2}) 得到 (即 $ACA_{1-2} \times OAA_{1-2}$), 另一半为 ACA 的 C1 到 C2 片段和 OAA 的 C3 到 C4 片段 (OAA_{3-4}) 得到 (即 $ACA_{1-2} \times OAA_{3-4}$)。因此能够得到下式:

$$GOX_OAA = 0.5 \times [(ACA_{1-2} \times OAA_{1-2}) + (ACA_{1-2} \times OAA_{3-4})] \quad (3)$$

$PEP_{1-3_CO_2}$ 的计算方法可以参考笔者的另一篇文章^[18]。 ACA_{1-2} 可以由丙氨酸的 C2 到 C3 片段的质量分布矢量得到, OAA_{1-2} 可以由天冬氨酸的 C1 到 C2 片段的质量分布矢量得到, OAA_{1-4} 可以由天冬氨酸的 C1 到 C4 片段的质量分布矢量得到, OAA_{3-4} 可以由 OAA_{1-2} 和 OAA_{1-4} 拟合得到。考虑 OAA 由乙醛酸支路得到的上限, OAA_{1-4} , $PEP_{1-3_CO_2}$ 和 OAA_GOX 之间的关系为:

$$OAA_{1-4} = OAA_GOX \times f_{OAA \text{ from glyoxylate } (ub)} + PEP_{1-3_CO_2} \times (1 - f_{OAA \text{ from glyoxylate } (ub)}) \quad (4)$$

化简整理可得, 来自于乙醛酸支路的 OAA 比率的上限为:

$$f_{OAA \text{ from glyoxylate } (ub)} = \frac{OAA_{1-4} - PEP_{1-3_CO_2}}{OAA_GOX - PEP_{1-3_CO_2}} \quad (5)$$

由得到的氨基酸片段的质量分布矢量 MDV 可以计算得到中间代谢物的质量分布矢量 MDV , 由此可以计算得到中心代谢网络在关键代谢物节点处的代谢流比率。以这些流量比率数据为辅助限制条件, 结合代谢物的质量平衡关系等^[24], 由 MATLAB 即可定量计算出细胞中心代谢途径的代谢流量。

1.6 酶活性的测定

用于酶活测定的细胞裂解缓冲液组成: 200 mmol/L Tris-HCl (pH 7), 4 mmol/L 氯化镁和 2 mmol/L 二硫苏糖醇。

大肠杆菌酶液的制备: 收集指数中期的细胞, 4 °C、12 000×g 离心 5 min 收集菌体, 用裂解缓冲液洗 2 次, 然后悬浮在裂解缓冲液中, 进行超声裂解, 超声破碎条件: 电压 100 V, 每超声 3 s, 间隔 10 s, 超声 20 次。超声裂解液在 4 °C、12 000×g 离心 5 min, 上清液作为大肠杆菌粗酶液, 测定上清液中的蛋白质浓度。上清液保存于 -80 °C 的冰箱。

异柠檬酸裂解酶酶活性的测定^[21]: 反应基于异柠檬酸裂解酶催化的产物——乙醛酸和苯肼反应生成苯腙类物质, 该物质在 324 nm 处有吸收峰。反应体系为 100 mmol/L 磷酸钾缓冲溶液 (pH 7)、6 mmol/L 氯化镁、4 mmol/L 苯肼、12 mmol/L L-半胱氨酸和 8 mmol/L 异柠檬酸三钠。反应温度: 30 °C。

2 结果与分析

2.1 *iclR* 基因敲除对菌株生理学特性的影响

大肠杆菌原始菌和突变株的生长特性见表 1。

由表 1 可以看出, 大肠杆菌原始菌和突变株的最大比生长速率分别为 0.61 h^{-1} 和 0.58 h^{-1} , *iclR* 基因的敲除使大肠杆菌的最大比生长速率下降了 5%, 同时降低的还有葡萄糖的比消耗速率、乙酸的比生成速率以及乙酸得率, 下降幅度分别

是 7%、11% 和 7%。大肠杆菌原始菌和突变株的菌体得率分别为 0.35 g DCW/g 葡萄糖和 0.37 g DCW/g 葡萄糖, 相对于原始菌株而言, *iclR* 基因的敲除使突变株的菌体得率略有提高。

2.2 *iclR* 基因敲除对细胞网络中代谢流量比率的影响

大肠杆菌原始菌和突变株的部分 TBDMS 衍生化蛋白氨基酸的质量同位素分布见表 2 和表 3。

表 1 原始菌和突变株指数生长期的生长特性

Table 1 Physiological characteristics of exponentially grown BW25113 and BW25113 $\Delta iclR$

Strains	$\mu_{\max} (\text{h}^{-1})$	q_{glucose} (mmol/(g DCW·h))	q_{acetate} (mmol/(g DCW·h))	Acetate yield (mmol/mmol glucose)	Biomass yield (g/g glucose)
BW25113	0.61 ± 0.01	9.41 ± 0.04	3.85 ± 0.01	0.41 ± 0.01	0.35 ± 0.02
BW25113 $\Delta iclR$	0.58 ± 0.01	8.75 ± 0.05	3.44 ± 0.03	0.38 ± 0.02	0.37 ± 0.02

表 2 大肠杆菌原始菌 TBDMS 衍生化蛋白氨基酸的质量同位体分布 (已校正)

Table 2 Mass isotopomer distributions of *E. coli* BW25113 TBDMS-derivatized proteinogenic amino acids (corrected)

Fragment ^a	m_0	m_1	m_2	m_3	m_4	m_5	m_6	m_7	m_8	m_9	Experiment ^b
MS_ala_085	0.7863	0.0295	0.1841								U
MS_glu_085	0.6038	0.1154	0.2331	0.0318	0.0159						U
MS_phe_057	0.4168	0.1074	0.1239	0.1630	0.0978	0.0378	0.0285	0.0168	0.0040	0.0039	U
MS_phe_085	0.4228	0.1068	0.2148	0.0940	0.0933	0.0325	0.0288	0.0037	0.0032		U
MS_phe_302	0.7862	0.0488	0.1649								U
MS_pro_085	0.5757	0.1234	0.2488	0.0241	0.0279						U
MS_ser_085	0.7593	0.1042	0.1365								U
MS_ser_302	0.7853	0.0491	0.1656								U
MS_thr_057	0.6211	0.1578	0.0964	0.1004	0.0243						U
MS_ala_057	0.8935	0.1021	0.0041	0.0003							1
MS_phe_057	0.7682	0.2073	0.0184	0.0056	0.0003	0.0000	0.0001	0.0001	0.0000	0.0000	1
MS_phe_085	0.7802	0.1916	0.0229	0.0034	0.0007	0.0011	0.0000	0.0000	0.0000		1
MS_ser_057	0.9024	0.0924	0.0052	0.0000							1

Fragments^a: the symbols of fragments denote the cracking patterns of TBDMS-derivatized proteinogenic amino acids: (M-57)⁺, (M-85)⁺, (f302)⁺.

Experiment^b: U, 20% U-¹³C-glucose and 80% unlabeled glucose; 1, 20% ¹⁻¹³C-glucose and 80% unlabeled glucose.

表 3 大肠杆菌突变株 TBDMS 衍生化的蛋白氨基酸的质量同位体分布 (已校正)

Table 3 Mass isotopomer distribution of *E. coli* BW25113 *ΔiclR* TBDMS-derivatized proteinogenic amino acids (corrected)

Fragment ^a	m ₀	m ₁	m ₂	m ₃	m ₄	m ₅	m ₆	m ₇	m ₈	m ₉	Experiment ^a
MS_ala_085	0.791 3	0.027 3	0.181 4								U
MS_glu_085	0.598 4	0.112 0	0.240 9	0.024 8	0.023 8						U
MS_phe_057	0.416 0	0.099 7	0.118 7	0.168 2	0.097 7	0.044 5	0.031 8	0.016 0	0.003 6	0.003 8	U
MS_phe_085	0.422 5	0.099 1	0.217 0	0.086 6	0.101 9	0.032 6	0.033 2	0.004 0	0.002 9		U
MS_phe_302	0.779 3	0.044 4	0.176 4								U
MS_pro_085	0.585 7	0.116 1	0.252 5	0.020 5	0.025 2						U
MS_ser_085	0.746 2	0.093 6	0.160 2								U
MS_ser_302	0.780 1	0.043 9	0.176 0								U
MS_thr_057	0.636 6	0.136 7	0.096 7	0.105 9	0.024 1						U
MS_ala_057	0.885 5	0.110 9	0.003 3	0.000 3							1
MS_phe_057	0.769 9	0.212 2	0.016 3	0.000 5	0.000 0	0.001 1	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	1
MS_phe_085	0.769 4	0.205 7	0.022 4	0.002 5	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0		1
MS_ser_057	0.906 4	0.082 8	0.010 8	0.000 0							1

Fragment^a: the symbols of fragments denote the cracking patterns of TBDMS-derivatized proteinogenic amino acids: (M-57)⁺, (M-85)⁺, (f302)⁺.

Experiment^b: U: 20% U-¹³C-glucose and 80% unlabeled glucose; 1: 20% 1-¹³C-glucose and 80% unlabeled glucose.

根据大肠杆菌原始菌和基因缺陷株的 TBDMS 衍生化的蛋白氨基酸的质量同位体分布, 可以计算得到 2 种菌株细胞中合成若干关键代谢物节点的代谢途径的相对流量分布, 也即代谢流比率 (图 1)。

由图 1 可以看出, *iclR* 基因敲除的大肠杆菌中丙酮酸由 ED 途径得到的比率 (f_Pyr_from_ED) 显著增大、草酰乙酸由乙醛酸之路得到的上限显著变大、磷酸烯醇丙酮酸由戊糖磷酸途径得到的上限变小, 而其他流比率变化不明显。丙酮酸由苹果酸得到的上下限均接近于零, 说明在葡萄糖作为碳源的情况下, 大肠杆菌原始菌和 *ΔiclR* 敲除菌中苹果酸酶催化反应的活性均极为低下。

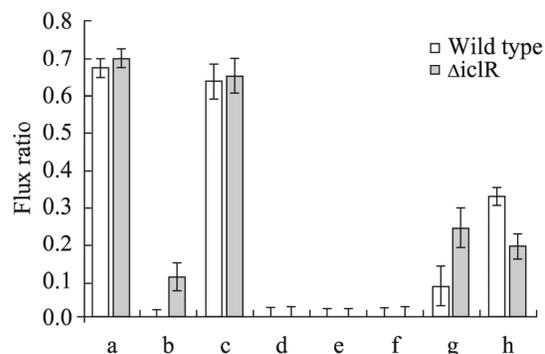
图 1 大肠杆菌原始菌和 *ΔiclR* 突变株的代谢流比率

Fig. 1 Flux ratios at several key metabolic nodes in *E. coli* BW25113 and *E. coli* BW25113 *ΔiclR*. a: f_PEP_from_glycolysis; b: f_Pyr_from_ED; c: f_OAA_from_PEP; d: f_PEP_from_OAA; e: f_Pyr_from_Mal_ub; f: f_Pyr_from_Mal_lb; g: f_OAA_from_glyoxylate_ub; h: f_PEP_from_PP_ub; lb: lower bound; ub: upper bound.

2.3 *iclR* 基因敲除对菌体代谢流分布的影响

为了了解 *iclR* 基因敲除对大肠杆菌整个中心代谢途径的影响,可以基于所得到的代谢流比率结果、菌体的生理学参数以及细胞的代谢网络模型来计算整个中心代谢途径中的净反应流量,并以此解析相关代谢反应特性。

大肠杆菌原始菌和 $\Delta iclR$ 突变株的中心代谢流量分布情况如图 2 所示。

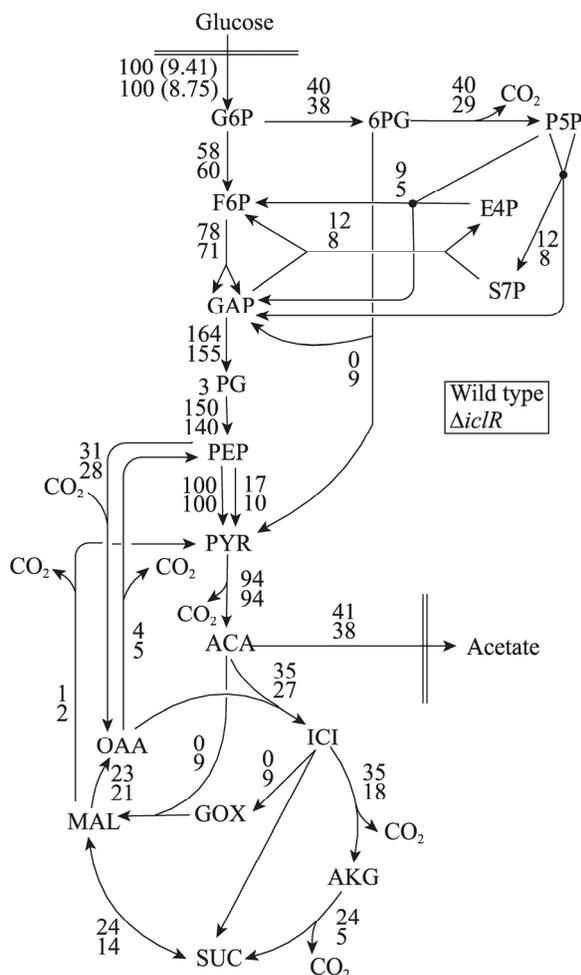


图 2 原始菌和突变株的代谢流分布 (数值表示计算得到的净流量, 其值以葡萄糖比消耗速率 (单位以 $\text{mmol}/(\text{g DCW}\cdot\text{h})$) 为基准)

Fig. 2 Metabolic flux distribution of *E. coli* BW25113 and *BW25113 ΔiclR*. The numbers are net fluxes determined. The flux values are expressed relative to the specific glucose uptake rate as indicated in parentheses (in $\text{mmol}/(\text{g DCW}\cdot\text{h})$).

由图 2 可以看出, *iclR* 基因敲除大肠杆菌乙醛酸支路得到了激活, 异柠檬酸分子有 33% 经乙醛酸支路分解得到琥珀酸和乙醛酸, 流经 TCA 循环的流比率变小, 糖酵解途径流量比率变化不大, PP 途径流比率变小, 而草酰乙酸形成磷酸烯醇式丙酮酸的流量基本不变。

2.4 *iclR* 基因敲除对菌体酶活性的影响

为了进一步确认 *iclR* 基因敲除大肠杆菌乙醛酸支路是否得到激活, 测定了乙醛酸支路关键酶之一的异柠檬酸裂解酶的活性 (图 3)。由图可以看出, *iclR* 基因的敲除成功地解除了对异柠檬酸裂解酶表达的抑制作用, 从而使该酶活得到了显著提高, 提高了 60 倍以上。

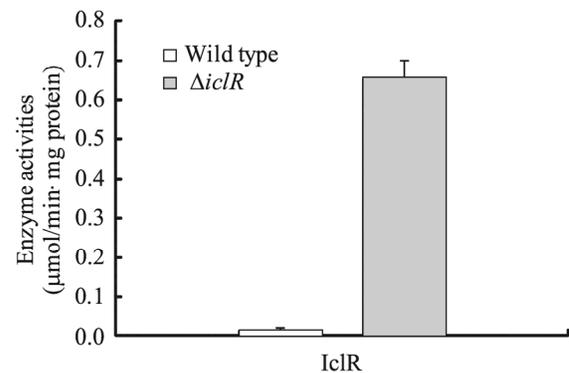


图 3 大肠杆菌原始菌和突变株中异柠檬酸裂解酶活性的比较

Fig. 3 Comparison of enzyme activity of isocitrate lyase in *E. coli* BW25113 and *BW25113 ΔiclR*.

3 讨论

为了阐明 *iclR* 基因敲除对大肠杆菌的影响, 我们考察了糖酵解途径、戊糖磷酸途径、Entner-Doudoroff 途径、三羧酸循环、乙醛酸支路在内的细胞中心代谢途径中的代谢流量分布情况, 并同时测定了乙醛酸支路关键酶之一的异

柠檬酸裂解酶的活性。综合以上得到的信息,为理解突变菌株的内在代谢调控特点和规律提供相应的理论基础。

有报道称乙醛酸支路的活性依赖于细菌的代谢状态,在一些碳源条件下,如葡萄糖和丙酮酸条件下,乙醛酸支路是不激活的^[25]。另外,有文献报道通过酶活测定等方法得到:当 *iclR* 基因敲除时乙醛酸支路得到了激活^[26-27]。然而,基于酶活性或代谢物分析等常规方法难以真正判断细胞内乙醛酸支路反应的活跃程度^[18]。本研究通过基于稳定同位素 ¹³C 的代谢反应流量分析并结合酶活性测定,系统地确定了大肠杆菌原始菌在葡萄糖上代谢时乙醛酸支路活性的缺乏,而 *iclR* 基因的敲除有效地激活了大肠杆菌的乙醛酸支路反应,研究同时表明约有 33% 的异柠檬酸通过乙醛酸支路进行代谢。

在我们得到上述研究结果的同时, Waegeman 等^[28]分别利用均匀 ¹³C 标记葡萄糖/天然葡萄糖 (20% : 80%, *W : W*) 以及首位 ¹³C 标记葡萄糖/天然葡萄糖 (50% : 50%, *W : W*) 的混合葡萄糖作为底物研究大肠杆菌 K12 MG1655 $\Delta iclR \Delta arcA$ 菌株在葡萄糖丰富培养基上的代谢,同样得到了乙醛酸支路被激活、30% 异柠檬酸通过乙醛酸支路代谢,以及菌体得率得到很大提高等相似结论。

另有研究表明大肠杆菌在特定条件下会激活磷酸烯醇式丙酮酸-乙醛酸循环^[29]。*iclR* 基因敲除的大肠杆菌中,乙醛酸支路得到了激活,但

研究表明草酰乙酸形成磷酸烯醇式丙酮酸的磷酸烯醇丙酮酸羧化激酶反应流量基本不变,说明 *iclR* 基因的敲除不会明显影响未激活磷酸烯醇式丙酮酸-乙醛酸循环,碳原子没有过多地通过磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶反应以 CO₂ 形式排出而得以保留。乙醛酸支路的激活,异柠檬酸通过 TCA 循环的相对流量变小,以及 PP 途径相对流量变小等使得 CO₂ 的释放量减少,另外,突变株乙酸的得率亦变小,这些原因就使得 *iclR* 基因敲除菌的菌体得率有所变大。

iclR 基因敲除菌的乙酸关于葡萄糖的得率减小。大肠杆菌中乙酸产生的原因一般是“溢出代谢”^[30]的结果,是由于葡萄糖的摄取及细胞生物合成和能量需要之间的不平衡造成的^[31-32]。大肠杆菌可以通过降低葡萄糖的利用速率或者促进菌体的代谢来减少乙酸的产生^[32]。突变株的葡萄糖比消耗速率较原始菌的小,另外,突变株乙醛酸支路的激活使得乙酰辅酶 A 的代谢效率更高,两方面的原因使得 $\Delta iclR$ 突变株的乙酸得率略低于原始菌株。

本研究通过基于稳定同位素 ¹³C 的细胞内代谢反应流量定量解析,同时结合酶活检测等初步分析了转录调节因子异柠檬酸裂解酶调节子在大肠杆菌细胞代谢中的作用。该研究提供的利用代谢流量比率作为限制条件的代谢反应流量分析方法可以广泛地应用到更多的细胞体系和生物过程中,用以辅助对细胞特定基因功能以及代谢调控机理的阐明。

附录 1 大肠杆菌中心代谢网络化学计量反应式

Appendix 1 The central metabolic network in *Escherichia coli* with the stoichiometric reactions

Reactions	
v ₁	GLC + PEP ⇒ G6P + PYR
v ₂	G6P + NADP ⇒ 6PG + NADPH + CO ₂
v ₃	6PG + NADP ⇒ R5P + NADPH + CO ₂
v ₄	G6P ⇌ F6P
v ₅	F6P + ATP ⇒ DHAP + GAP + ADP
v ₆	DHAP ⇌ GAP
v ₇	R5P + R5P ⇌ S7P + GAP
v ₈	S7P + GAP ⇌ F6P + E4P
v ₉	R5P + E4P ⇌ F6P + GAP
v ₁₀	GAP + NAD + ADP + Pi ⇌ 3PG + NADH + ATP
v ₁₁	3PG ⇌ PEP
v ₁₂	PEP + ADP ⇒ PYR + ATP
v ₁₃	PYR + CoA + NAD ⇒ ACA + NADH + CO ₂
v ₁₄	OAA + ACA ⇒ ICI + CoA
v ₁₅	ICI + NADP ⇒ AKG + NADPH + CO ₂
v ₁₆	AKG + NAD + GDP + Pi ⇒ SUC + NADH + GTP + CO ₂
v ₁₇	SUC + FAD (NAD) ⇒ MAL + FADH ₂ (NADH)
v ₁₈	MAL + NAD ⇌ OAA + NADH
v ₁₉	MAL + NAD(P) ⇒ PYR + NAD(P)H + CO ₂
v ₂₀	OAA + ATP ⇒ PEP + ADP + CO ₂
v ₂₁	PEP + CO ₂ ⇒ OAA + Pi
v ₂₂	6PG ⇒ PYR + GAP
v ₂₃	ICI + ACA ⇒ SUC + MAL + CoA
v ₂₄	precursors ⇒ biomass
v ₂₅	ACA + ADP + Pi ⇒ ACE + ATP + CoA
v ₂₆	PYR + NADH ⇒ D_LAC + NAD
v ₂₇	DHAP ⇒ GLYCEROL
v ₂₈	ACA + ADP + Pi + 2 NADH ⇒ ETH + ATP + 2 NAD + CoA
v ₂₉	PYR + CoA ⇒ ACA + FOR

Abbreviations: G6P: glucose-6-phosphate; 6PG: 6-phosphogluconate; P5P: pentose-phosphates; F6P: fructose-6-phosphate; E4P: erythrose-4-phosphate; GAP: glyceraldehydes-3-phosphate; S7P: seduheptulose-7-phosphate; 3PG: 3-phosphoglycerate; PEP: phosphoenolpyruvate; PYR: pyruvate; ACA: acetyl coenzyme A; ICI: isocitrate; AKG: α -ketoglutarate; SUC: succinate; MAL: malate; OAA: oxaloacetate; GOX: glyoxylate.

REFERENCES

- [1] Kornberg HL. The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. *Biochem J*, 1966, 99(1): 1–11.
- [2] Laporte DC, Stueland CS, Ikeda TP. Isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase. *Biochimie*, 1989, 71(9/10): 1051–1057.
- [3] Bailey J. Toward a science of metabolic engineering. *Science*, 1991, 252(5013): 1668–1675.
- [4] Stephanopoulos G. Metabolic fluxes and metabolic engineering. *Metab Eng*, 1999, 1(1): 1–11.
- [5] Blank LM, Kuepfer L. Metabolic flux distributions: genetic information, computational predictions, and experimental validation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 86(5): 1243–1255.
- [6] Zamboni N, Sauer U. Novel biological insights through metabolomics and ^{13}C -flux analysis. *Curr Opin Microbiol*, 2009, 12(5): 553–558.
- [7] Niklas J, Schneider K, Heinzle E. Metabolic flux analysis in eukaryotes. *Curr Opin Biotechnol*, 2010, 21(1): 63–69.
- [8] Heinemann M, Sauer U. Systems biology of microbial metabolism. *Curr Opin Microbiol*, 2010, 13(3): 337–343.
- [9] Hua Q, Yang C, Baba T, et al. Responses of the central metabolism in *Escherichia coli* to phosphoglucose isomerase and glucose-6-phosphate dehydrogenase knockouts. *J Bacteriol*, 2003, 185(24): 7053–7067.
- [10] Hua Q, Joyce AR, Fong SS, et al. Metabolic analysis of adaptive evolution for in silico-designed lactate-producing strains. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 95(5): 992–1002.
- [11] Hua Q, Yang C, Oshima T, et al. Analysis of gene expression in *Escherichia coli* in response to changes of growth-limiting nutrient in chemostat cultures. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(4): 2354–2366.
- [12] Hua Q, Joyce AR, Palsson BØ, et al. Metabolic characterization of *Escherichia coli* strains adapted to growth on lactate. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(14): 4639–4647.
- [13] Yang C, Hua Q, Shimizu K. Metabolic flux analysis in *Synechocystis* using isotope distribution from ^{13}C -labeled glucose. *Metab Eng*, 2002, 4(3): 202–216.
- [14] Blank LM, Kuepfer L, Sauer U. Large-scale ^{13}C -flux analysis reveals mechanistic principles of metabolic network robustness to null mutations in yeast. *Genome Biol*, 2005, 6(6): R49.
- [15] McKinlay JB, Shachar-Hill Y, Zeikus JG, et al. Determining *Actinobacillus succinogenes* metabolic pathways and fluxes by NMR and GC-MS analyses of ^{13}C -labeled metabolic product isotopomers. *Metab Eng*, 2007, 9(2): 177–192.
- [16] McKinlay JB, Vieille C. ^{13}C -metabolic flux analysis of *Actinobacillus succinogenes* fermentative metabolism at different NaHCO_3 and H_2 concentrations. *Metab Eng*, 2008, 10(1): 55–68.
- [17] Szyperski T. Biosynthetically directed fractional ^{13}C -labeling of proteinogenic amino acids. An efficient analytical tool to investigate intermediary metabolism. *Eur J Biochem*, 1995, 232(2): 433–448.
- [18] Hua Q, Yang C. Application of metabolic flux ratio analysis in metabolic engineering—a review. *Chin J Biotech*, 2009, 25(9): 1303–1311.
花强, 杨琛. 代谢流量比率分析及其在代谢工程中的应用. *生物工程学报*, 2009, 25(9): 1303–1311.
- [19] Sauer U, Lasko DR, Fiaux J, et al. Metabolic flux ratio analysis of genetic and environmental modulations of *Escherichia coli* central carbon metabolism. *J Bacteriol*, 1999, 181(21): 6679–6688.
- [20] Yang C, Hua Q, Shimizu K. Quantitative analysis of intracellular metabolic fluxes using GC-MS and two-dimensional NMR spectroscopy. *J Biosci Bioeng*, 2002, 93(1): 78–87.
- [21] Dauner M, Sauer U. GC-MS analysis of amino acids rapidly provides rich information for isotopomer balancing. *Biotechnol Prog*, 2000, 16(4): 642–649.

- [22] van Winden WA, Wittmann C, Heinzle E, et al. Correcting mass isotopomer distributions for naturally occurring isotopes. *Biotechnol Bioeng*, 2002, 80(4): 477–479.
- [23] Fischer E, Sauer U. Metabolic flux profiling of *Escherichia coli* mutants in central carbon metabolism using GC-MS. *Eur J Biochem*, 2003, 270(5): 880–891.
- [24] Fischer E, Zamboni N, Sauer U. High-throughput metabolic flux analysis based on gas chromatography-mass spectrometry derived ^{13}C constraints. *Anal Biochem*, 2004, 325(2): 308–316.
- [25] Molina-Henares AJ, Krell T, Eugenia Guazzaroni M, et al. Members of the *IclR* family of bacterial transcriptional regulators function as activators and/or repressors. *FEMS Microbiol Rev*, 2006, 30(2): 157–186.
- [26] Maloy SR, Nunn WD. Genetic regulation of the glyoxylate shunt in *Escherichia coli* K12. *J Bacteriol*, 1982, 149(1): 173–180.
- [27] Maloy SR, Bohlander M, Nunn WD. Elevated levels of glyoxylate shunt enzymes in *Escherichia coli* strains constitutive for fatty acid degradation. *J Bacteriol*, 1980, 143(2): 720–725.
- [28] Waegeman H, Beauprez J, Moens H, et al. Effect of *iclR* and *arcA* knockouts on biomass formation and metabolic fluxes in *Escherichia coli* K12 and its implications on understanding the metabolism of *Escherichia coli* BL 21(DE 3). *BMC Microbiol*, 2011, 11(1): 70.
- [29] Fischer E, Sauer U. A novel metabolic cycle catalyzes glucose oxidation and anaplerosis in hungry *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2003, 278(47): 46446–46451.
- [30] El-Mansi ENT, Holms WH. Control of carbon flux to acetate excretion during growth of *Escherichia coli* in batch and continuous cultures. *Microbiology*, 1989, 135(11): 2875–2883.
- [31] Han K, Lim HC, Hong J. Acetic acid formation in *Escherichia coli* fermentation. *Biotechnol Bioeng*, 1992, 39(6): 663–671.
- [32] Farmer WR, Liao JC. Reduction of aerobic acetate production by *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(8): 3205–3210.