

代谢流量比率分析及其在代谢工程中的应用

花强¹, 杨琛²

1 华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

2 中国科学院上海生命科学研究院 合成生物学重点实验室, 上海 200032

摘要: 细胞内代谢反应流量在系统理解细胞代谢特性和指导代谢工程改造等方面都起着重要的作用。由于代谢流量难以直接测量得到, 在很多情况下通过跟踪稳定同位素在代谢网络中的转移并进行相应的模型计算能有效地定量代谢流量。代谢流量比率分析法能够高度体现系统的生物化学真实性、辨别细胞代谢网络的拓扑结构, 并且能够相对简单快速地定量反应速率等, 因此受到代谢工程研究者越来越多的重视。以下着重介绍并讨论了利用代谢物同位体分布信息分析关键代谢节点合成途径的流量比率、基于流量比率的代谢流量解析、以及应用于代谢工程等相关原理、实验测量、数据分析、使用条件等, 以期充分发挥代谢流量比率分析法的优势, 并将其拓展推广至更多细胞体系的代谢特性阐明和代谢工程改造中去。

关键词: 流量比率分析, 同位素标记, 代谢流量, 细胞代谢分析

Application of metabolic flux ratio analysis in metabolic engineering—a review

Qiang Hua¹, and Chen Yang²

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

2 Key Laboratory of Synthetic Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China

Abstract: Intracellular metabolic fluxes are important to understand metabolic characteristics of cells and to direct metabolic engineering strategies. Because intracellular fluxes cannot be directly assessed, isotope experiments are usually conducted to trace metabolic fluxes. The flux-ratio analysis can reflect high biochemical veracity, be employed to identify the topology of the networks, and offer greatly reduced computational expense for flux determination. In order to apply this metabolic analysis method to better elucidate more cell systems, we discussed in this study the principles, experiments and assays, data interpretation, and other issues that should be considered in flux ratio determination, metabolic flux quantification and its metabolic engineering applications.

Keywords: flux ratio analysis, isotope labeling, metabolic flux, metabolic analysis

代谢工程自从约 20 年前作为一门新的学科被提出以来^[1], 已经在众多研究领域得到了广泛的应

用和发展。随着大量物种细胞的各种组学数据的快速扩增以及相关实验、计算方法的大力发展, 代谢

Received: June 6, 2009; **Accepted:** July 16, 2009

Supported by: Shanghai Pujiang Program (No. 08PJ14038), National Special Fund for State Key Laboratory of Bioreactor Engineering (No. 2060204), Program of “One Hundred Talented People” of the Chinese Academy of Sciences (No. KSCX2-YW-G-029).

Corresponding author: Qiang Hua. Tel: +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), 中国科学院百人计划(KSCX2-YW-G-029)资助。

工程的应用已经从早期的引入少数酶或简单反应途径至同源宿主细胞,逐渐发展到在整个调节网络和组织结构上进行细胞设计,其应用领域也扩展到生命科学的各个学科分支。同时,当前日益严峻的能源匮乏、环境污染、食品短缺和人类健康等一系列国际问题也促使着代谢工程原理和技术的不断创新和发展。这些都正在将代谢工程研究逐步推向一个新的研究纪元。

近年,代谢工程已经成为当前国际生物技术领域以及生物化学反应工程的一个新的研究前沿,研究者正在从各方面进行着代谢工程方法的开发^[2-4]。细胞外代谢物的测定能在一定程度上阐明细胞代谢,而把握细胞活体内的代谢变化对于理解细胞对环境因子或基因变动的响应、代谢途径的作用差异、对代谢生产的促进等代谢工程研究都有着更为重要的意义。代谢流量分析是了解细胞内代谢反应的一个最重要的手段。现在,人们已经清楚地知道细胞代谢表现型的变化与基因、蛋白质表达以及环境条件的改变紧密关联,而细胞网络的代谢流量分布则是连接二者的关键代谢参数:它能定量反映细胞内物质和能量流向,既与最终的表现型密切相关,又是细胞过程上游特性和环境效应的综合体现。开发代谢流量的定量分析方法对于完善细胞网络的研究和促进代谢系统的改进有着重要的意义,因而代谢流量组学分析已成为从原核、真核微生物到动植物细胞以及人类细胞的代谢工程和系统生物学研究的重要热点之一^[5-8]。

传统的代谢流量定量基础是细胞代谢物的质量平衡,以及与能量代谢、氧化还原力等相关的若干假设,这种定量在实际应用中有很大的局限性。近年,利用稳定同位素¹³C标记碳源的示踪实验已经被广泛地应用于分析多个生物体系的细胞代谢。通过跟踪检测细胞中间代谢物质量同位体的分布情况能得到大量有关代谢物同位体平衡或代谢途径相对贡献的信息,从而可以用来直接或间接地定量分析代谢系统^[9-10]。多年来,笔者们一直致力于开发生物化工过程中包括代谢流量分析在内的多种代谢工程方法,特别是在应用基于同位体平衡的常规代谢分析法的同时,重点发展方法计算关键代谢物节点合

成途径的相对反应大小(代谢流量比率)等,这样不但能快速直观地认识代谢网络的局部特性、使代谢流量的定量分析更加简单易行,而且还能提供关键信息辨识未知的代谢途径或功能^[5,11-13]。以下结合近年来基于同位素标记的流量比率分析的研究成果以及笔者在计算和应用流量比率分析过程中的知识和经验,将代谢流量比率相关的原理、实验分析以及在代谢工程中的应用做一个比较全面的介绍和讨论。

1 基于同位素标记实验的代谢流量定量法

当细胞利用¹³C等稳定同位素标记的底物时,代谢底物上的同位素标记信息能够跟随代谢反应流从不同方向传递到代谢网络的各个中间代谢物上,从而形成代谢物同位体的集合。中间代谢物的部分¹³C标记状态通常能由核磁共振(NMR)波谱和气相色谱质谱(GCMS)联用技术分析得到^[14-15],在分析一个稳态代谢过程时,利用这些同位体分布信息至少能从2个方面来进行代谢流量的定量解析。第一种是整体拟合法,也称作基于代谢物同位体平衡(Isotopomer balancing)的综合代谢流量模型法(Comprehensive flux model)^[16]。在这种分析法中,代谢物的同位素标记状态可以表示为细胞代谢流量和同位体分布矢量(IDV)的函数。代谢流量的分布是通过拟合使代谢物同位体分布及胞外代谢物浓度变化的实测值与模型预估值的误差平方和最小来得到的。另外一种是基于局部代谢特性的分析法,或称为¹³C限定型流量平衡法(¹³C-constrained flux balancing)^[17]。该方法直接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(代谢流量比率反映的是某一个代谢物的各个合成途径的相对贡献),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化分析。Sauer领导的研究小组^[18-20]领先地开发了相关分析方法,并较早地在多种细胞体系中进行了基于流量比率的代谢调控特性分析。他们的进一步研究也表明对一个给定的代谢系统,用这2种方法能得到相似的净反应流量分布结果^[17]。图1给出了结合同位体分布信息和代谢物质量平衡进行代谢流量定量解析的示意图。

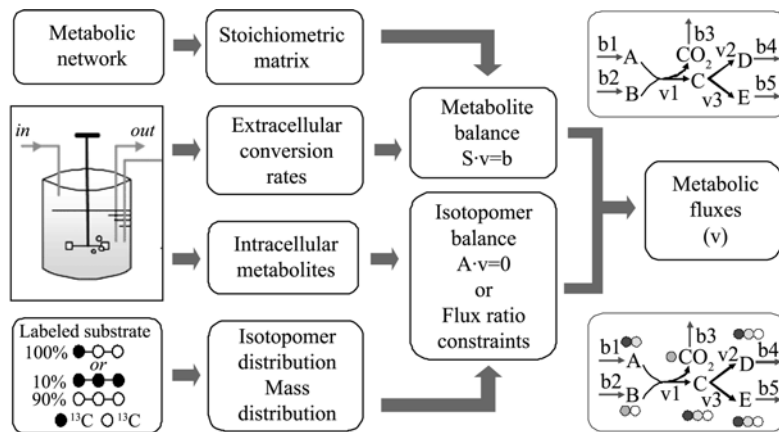


图 1 利用代谢物稳定同位体分布信息决定细胞代谢流量

Fig. 1 Determination of intracellular metabolic fluxes with distribution data of stable isotopomers.

两种代谢流量的定量法都用到了代谢物的质量平衡关系, 以下仅就它们在利用代谢物同位体数据上的区别作简单讨论。利用代谢物同位体平衡的代谢流量整体拟合法充分利用了代谢物同位体分布测量值, 通过构建代谢网络同位体模型、对比同位体分布的模型仿真与实验测量结果, 来获得最优的代谢流量组。该方法由于尽可能多地整合运用了实验数据, 因此能够最大可能地获得细胞网络的代谢流量信息。同时该法直观易行, 能广泛地应用于多种细胞体系和培养条件, 是目前较为常用的基于稳定同位体信息的代谢流量分析方法。但是该方法由于涉及复杂的同位体映射矩阵, 较多甚至是冗余的实测同位体分布数据等, 易导致模型结构庞大、计算费时、全局优化困难等计算上的实际问题。此外, 代谢模型构建或生理学数据测量上的偏差有可能在较大程度上影响流量计算的准确性。

基于局部流量比率的 ^{13}C 限定型代谢流量平衡法的主要思路是合理选用代谢物同位体分布测量值, 分析不同代谢反应或途径在合成同一关键代谢物上的不同作用(例如, 是如何影响目标代谢物相邻碳原子间化学键的断裂和重新形成等), 进而推导出相关代谢途径在合成该代谢物时的相对贡献。这些由同位体分布数据直接推导得到的代谢流量相对比率可作为附加的限定条件, 和代谢物的质量平衡关系一起用以计算细胞网络的代谢流量。由于代谢流量比率是在分析代谢反应中碳原子转移特征等基础上决定的, 因此流量比率的推导比较复杂, 需要对代谢

反应的生物化学基础有清晰的理解。因此, 流量比率能够高度地体现代谢途径的生物化学真实性, 从而使定量整体细胞代谢网络的过程不再仅仅是单纯的数学拟合; 同时, 通过附加流量比率等 ^{13}C 限定条件也使代谢流量计算变得快速高效。此外, 能够直接从代谢物同位体的分布推导出不同途径的相对代谢贡献这一特点则能更大程度地拓展该方法在代谢系统解析和代谢工程中的应用。

2 代谢流量比率分析及其在代谢工程中的应用

2.1 代谢流量比率分析方法

通过质谱分析和 NMR 波谱分析能得到各自特有的代谢物同位体的分布信息, 并能用于分析代谢网络中不同反应或途径的相对代谢贡献或代谢流量比率^[5,11,13,18-20]。质谱分析具有很高的检测灵敏性, 可通过合理选择标记底物等灵活提供多种代谢物碎片信息; NMR 波谱分析的样品处理和数据分析简单。因此这 2 种技术经常被用于细胞代谢流量和代谢调控的研究。值得注意的是它们所提供的代谢物同位体的分布信息往往是互补的。下面分别就这 2 种同位体测定技术说明流量比率的分析方法。

2.1.1 蛋白氨基酸同位体分布的测定

生物物质蛋白由来的氨基酸含量丰富, 这些氨基酸的合成与多个关键的中间代谢物密切相关, 因此它们的同位体分布数据常被用来定量分析细胞的代谢流量组^[14]。细胞生物物质先经过酸解得到混合的游

离氨基酸,接着进行气质联用测定分析或 NMR 波谱分析。气相色谱前需要用叔丁基二甲基硅烷化合物(TBDMS)对氨基酸进行衍生化处理,所得的氨基酸衍生物能够在气相色谱柱上得到很好的分离,并在其后的质谱仪中被离子化成带有不同碳骨架片段的氨基酸碎片^[11-19]。图 2 表示的是氨基酸衍生物在气相色谱上的分离和丙氨酸衍生物的质谱图,图中丙氨酸的(M-57)⁺反映的都是含丙氨酸自身 3 个碳原子的碎片的质量分布,而(M-85)⁺和(M-159)⁺反映的是只含丙氨酸第 2 位和第 3 位 2 个碳原子碎片(C2-C3)的质量分布。需要注意的是,只有氨基酸基本碳骨架的同位体分布数据才能被用来解析细胞代谢,而质谱分析得到的同位体结果包含了氨基酸衍生物所有原子的稳定同位素信息。要得到纯粹的氨基酸碳骨架同位体的分布,需要对氨基酸基本碳原子以外的所有其他原子(包括衍生化基团上的原子)进行自然丰度的校正,以去除自然界中存在的 C、H、O、N、Si 等元素的稳定同位素的影响^[21-22]。

NMR 波谱分析的样品处理相对简单,并且可以直接提供代谢物中各个碳原子同位体分布的信息。图 3 所示的是氨基酸的两维碳-氢异核相关谱和天门冬氨酸 α 碳原子(Asp- α)的 ¹³C-NMR 谱。氨基酸的各个碳原子在两维谱上得到了很好的分离,因此无需事先分离或衍生化样品中的氨基酸。图中天门冬氨酸 α 碳原子的 ¹³C-NMR 谱反映的是草酰乙酸第 2 个碳原子的同位体分布信息,它表示的是 α 碳原子(C ^{α})和相邻的羧基碳原子(C['])及 β 碳原子(C ^{β})之间 ¹³C-¹³C 标量耦合的信息。图中所示的单峰(s)、双峰 a(da)、双峰 b(db)、及双二重峰(dd)分别对应的是只有 C ^{α} 被 ¹³C 标记、C ^{α} 和相邻的 C ^{β} 同时被 ¹³C 标记、 α 碳原子和相邻的 C['] 同时被 ¹³C 标记、以及三个碳原子都被 ¹³C 标记等各种同位体,计算这些 ¹³C 标量耦合峰的相对强度就可以得到相应同位体的分布情况。由于利用质谱和 NMR 分析可得到多种氨基酸的同位体分布信息,提供了细胞关键代谢物的碳原子标记情况(见下节),因此能够被用来分析和定量细胞网络中营养流的流向及流率分配等代谢状态,而这些细胞内反应流量的相关信息是其他方法难以得到的。

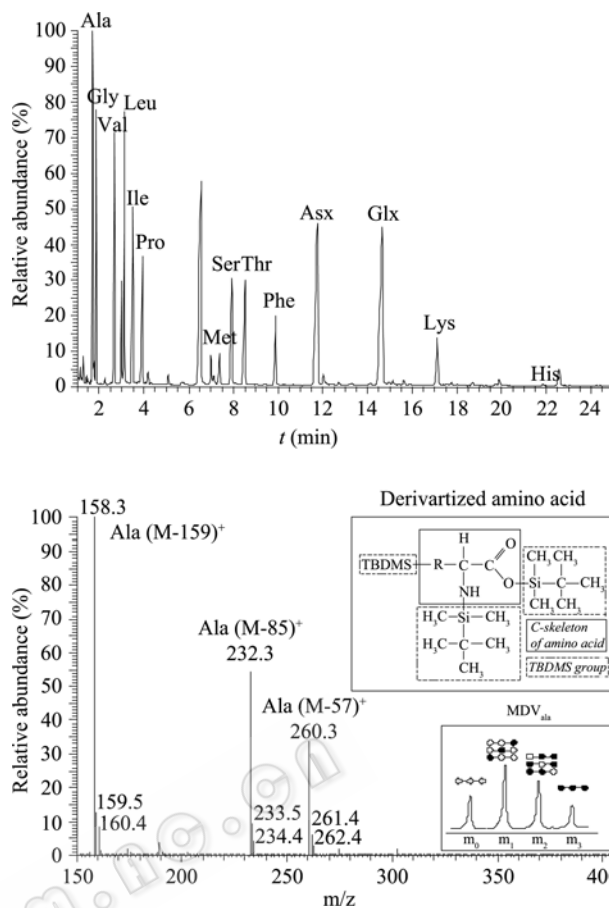


图 2 氨基酸衍生物在气相色谱中的分离及丙氨酸衍生物的质谱图例

Fig. 2 Separation of amino acid derivatives by gas chromatography and mass spectrum of TBDMS-derivatized alanine.

2.1.2 关键中间代谢物的同位体分布

在推导代谢反应的流量比率时往往不直接使用氨基酸的同位体分布数据,更多的是通过比较目标反应途径(合成目标代谢物的不同代谢反应途径)中代表性代谢反应物的同位体分布和目标代谢物的同位体分布来进行推导的。由于对一定的细胞代谢网络,氨基酸可由一些关键中间代谢物以一定的方式合成得到^[14],根据这个特点利用 GC-MS 测量得到的氨基酸碎片,可以直接地或通过最小二乘法拟合间接地得到乙酰辅酶 A(ACoA)、丙酮酸(PYR)、磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)、草酰乙酸(OAA)、 α -酮戊二酸(AKG)、戊糖磷酸(P5P)、赤藓糖-4-磷酸(E4P)等重要中间代谢物的多种片段的同位体质量分布信息。表 1 是本研究中用到的一些重要代谢物片段的氨基酸同位体由来,由氨基酸碎片拟合关键中间代谢物

片段质量分布的原理和推导公式等可参考 Fischer 和 Sauer 的研究^[19]。

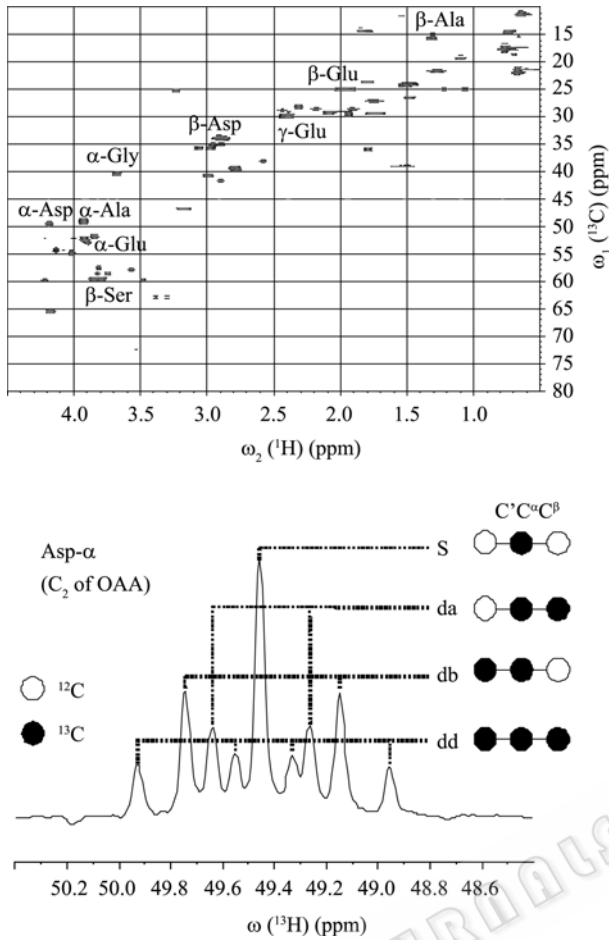


图 3 氨基酸的两维碳-氢异核相关谱和天门冬氨酸 α 碳原子的 ^{13}C -NMR 波谱示意图^[5]
 Fig. 3 2D $[^{13}\text{C}, ^1\text{H}]$ -COSY spectrum of amino acids and ^{13}C -NMR spectrum of aspartate α -carbon^[5].

表 1 由氨基酸碎片的质量分布矢量测定推导关键中间代谢物同位体的质量分布情况

Table 1 Mass distribution vectors (MDVs) of key intermediate metabolites determined from MDVs of amino acids

Key intermediate fragments	Amino acid fragments
ACoA ₁₋₂	Leu ₁₋₆
AKG ₁₋₅ , AKG ₂₋₅	Glu ₁₋₅ , Glu ₂₋₅
E4P ₁₋₄ and PEP ₂₋₃	Phe ₂₋₉ or Tyr ₂₋₉
OAA ₁₋₄	Asp ₁₋₄ or Thr ₁₋₄
OAA ₁₋₂	Asp ₁₋₂
P5P ₁₋₅	His ₁₋₆
PEP ₁₋₃	Phe ₁₋₉ or Tyr ₁₋₉
PYR ₁₋₃	Ala ₁₋₃

同样, 利用 NMR 测量得到的氨基酸各个碳原子的同位体分布信息(如 ^{13}C 标量耦合峰的相对强度), 可以通过计算得到一些关键中间代谢物中完整碳片段的相对丰度, 即被检测碳原子和相邻碳原子来自同一个底物分子的相对比例。例如, 对于天门冬氨酸 α 碳原子, 存在着 C^α 和相邻的 2 个碳原子都来自不同的底物分子(图 4a)、仅 C^α 和 C^β 来自同一个底物分子(图 4b)、仅 C^α 和 C^γ 来自同一个底物分子(图 4c)、以及 C^α 和相邻的 2 个碳原子都来自同一个底物分子(图 4d)等 4 种情况, 其相对丰度分别用 f^d 、 f^{2a} 、 f^{2b} 和 f^b 来表示(图 4)。这些丰度数据则被用于代谢流量比例分析, 推导代谢网络中一些关键节点处的流量比例, 以及辨识某些代谢途径是否存在或激活^[13-14]。

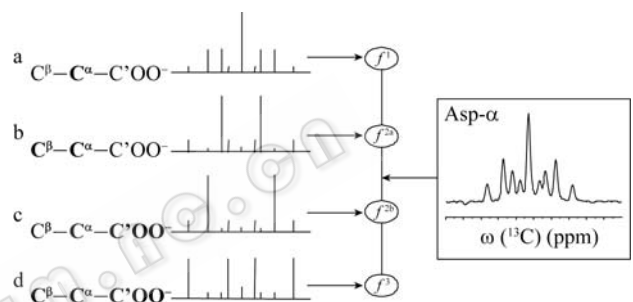


图 4 由氨基酸的同位体分布信息(天门冬氨酸 α 碳原子为例)推导关键中间代谢物来自底物分子的完整碳片段。与被检测碳原子来自同一个底物分子的碳原子用黑体表示(改自 Szyperski^[23])

Fig. 4 Abundances of intact carbon fragments arising from a single source molecule as determined using the relative intensities of ^{13}C scalar coupling multiplets. Carbon atoms originating from the same source molecule as the detected carbon are indicated in bold (adapted from Szyperski^[23]).

2.1.3 代谢流量比率推导和分析

如前所述, 代谢流量比率反映的是在合成某个共同目标代谢物时各个代谢途径的贡献度。针对质谱分析得到的代谢物质量分布信息, 流量比率计算式是通过比较目标代谢物特定片段以及来源途径中对应代谢物片段的质量同位体矢量而得到。选择在不同代谢途径中有着显著同位体分布区别的特定目标代谢物片段, 并以其质量分布矢量计算相关途径的代谢流量比率能得到最好的效果。图 5 是基于质谱测定得到的代谢物质量同位体矢量(MDV)来计算各来源反应途径的流量比率的示意图, 流量比率分析计算式的具体建立方法可参考相关论著^[12,19,24-25]。

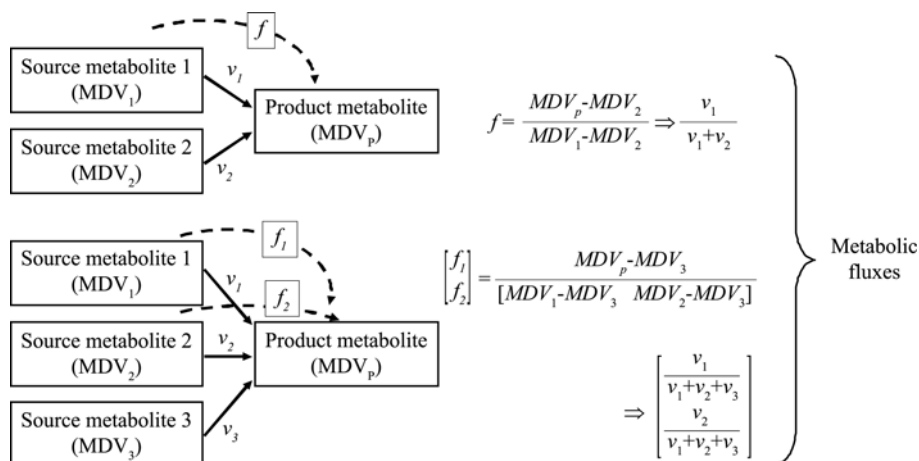


图 5 由质谱得到的代谢物质量同位体矢量计算代谢流量比率 f
Fig. 5 Calculation of metabolic flux ratio (f) based on mass distribution vector from mass spectrometry.

以大肠杆菌在[U-¹³C](6 个碳原子全标记)和天然非标记的混合葡萄糖上生长时细胞中来源于磷酸烯醇式丙酮酸的草酰乙酸的比率($f_{OAA \text{ from PEP}}$)为例说明用质量分布数据推导流量比率的一般思路。该比率体现了磷酸烯醇式丙酮酸羧化这一回补反应和 TCA 循环中的相对流量大小, 是理解代谢的一个重要而又较难决定的比率。Fischer 等的研究中仅给出了最终计算式^[19], 在这里给出其具体推导过程以帮助理解。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 和一分子 CO₂ 得到(其质量分布矢量表示为 $PEP_{1-3_CO_2}$), 在 TCA 循环中的由来是 AKG₂₋₅(在乙醛酸支路不激活或影响较小时), 三者间关系可表示成:

$$OAA_{1-4} = PEP_{1-3_CO_2} \cdot f_{OAA \text{ from PEP}} + AKG_{2-5} \cdot (1 - f_{OAA \text{ from PEP}}) \quad (1)$$

假设 CO₂ 的标记度是 l_{CO_2} , $PEP_{1-3_CO_2}$ 可表示为:

$$PEP_{1-3_CO_2} = \begin{bmatrix} PEP_{1-3}(1) \cdot (1 - l_{CO_2}) \\ PEP_{1-3}(2) \cdot (1 - l_{CO_2}) + PEP_{1-3}(1) \cdot l_{CO_2} \\ PEP_{1-3}(3) \cdot (1 - l_{CO_2}) + PEP_{1-3}(2) \cdot l_{CO_2} \\ PEP_{1-3}(4) \cdot (1 - l_{CO_2}) + PEP_{1-3}(3) \cdot l_{CO_2} \\ PEP_{1-3}(4) \cdot l_{CO_2} \end{bmatrix} \quad (2)$$

$$= \begin{bmatrix} PEP_{1-3} \\ 0 \end{bmatrix} \cdot (1 - l_{CO_2}) + \begin{bmatrix} 0 \\ PEP_{1-3} \end{bmatrix} \cdot l_{CO_2}$$

其中, $PEP_{1-3}(i)$ 代表 PEP_{1-3} 质量分布矢量的第 i 个元

素。将式(2)代入式(1)并简化后可得到:

$$OAA_{1-4} - AKG_{2-5} = f_{OAA \text{ from PEP}} \cdot \left(\begin{bmatrix} PEP_{1-3} \\ 0 \end{bmatrix} - AKG_{2-5} \right) + f_{OAA \text{ from PEP}} \cdot l_{CO_2} \cdot \left(\begin{bmatrix} 0 \\ PEP_{1-3} \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} PEP_{1-3} \\ 0 \end{bmatrix} \right) \quad (3)$$

从而可以求得草酰乙酸来自于磷酸烯醇式丙酮酸羧化反应的比率:

$$f_{OAA \text{ from PEP}} = \frac{OAA_{1-4} - AKG_{2-5}}{\begin{bmatrix} PEP_{1-3} \\ 0 \end{bmatrix} - AKG_{2-5} \begin{bmatrix} 0 \\ PEP_{1-3} \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} PEP_{1-3} \\ 0 \end{bmatrix}} \quad (4)$$

由于计算涉及的是矢量运算, 因此该流量比率以及 CO₂ 的标记度同时可由式(4)的最小二乘解得到。这样, 相关流量比率信息一方面可直观地用来理解代谢特性, 另一方面可以作为重要条件定量流量组并进而理解细胞的整体调控。

同样, 利用 NMR 分析得到的中间代谢物完整碳片段的丰度信息, 也可以来定量分析合成共同目标代谢物的各个代谢途径的相对贡献。这里同样以草酰乙酸来自于磷酸烯醇式丙酮酸的比率为例说明基于 NMR 波谱数据的流量比率一般推导和计算方法。在底物是[U-¹³C]葡萄糖和非标记葡萄糖的混合物时, 回补反应会将磷酸烯醇式丙酮酸(对应于苯丙氨酸前 3 个碳原子)的完整 C2-C3 片段导入草酰乙酸(对应于天门冬氨酸), 而 TCA 循环所生成的草酰乙

酸的 C2 和 C3 碳原子分别来自不同的底物分子。因此天门冬氨酸 α 碳原子和苯丙氨酸 α 碳原子的完整碳片段的丰度信息可被用来计算“来自磷酸烯醇式丙酮酸的草酰乙酸”这一流量比率^[13](式(5), 其中 Asp- α 表示天门冬氨酸的 α 碳原子, Phe- α 表示苯丙氨酸的 α 碳原子)。

$$f_{\text{OAA from PEP}} = \frac{f^{2a}(\text{Asp-}\alpha) + f^3(\text{Asp-}\alpha)}{f^{2a}(\text{Phe-}\alpha) + f^3(\text{Phe-}\alpha)} \quad (5)$$

2.2 流量比率分析在代谢工程中的应用

就代谢途径和应用体系而言, 基于质谱和 NMR 波谱的流量比率分析都能够被很好地用来分析和辨识多种细胞体系的关键中心代谢途径。一个典型的应用范例是利用氨基酸的 NMR 波谱信息直接判断并决定乙醛酸支路的代谢活性^[13]。细胞代谢中的乙醛酸支路仅在一些特定基因和培养条件下激活, 而基于酶活性或代谢物分析等的常规方法难以真正判断其活性。由于乙醛酸支路的激活能够合成更多来自同一底物、具有未断裂 C1-C2 和 C3-C4 片段的草酰乙酸分子, 因此能够显著提高天门冬氨酸 α 碳原子以及天门冬氨酸 β 碳原子的 f^{2b} 相对丰度。在正确判断该支路具有代谢活性的基础上, 结合天门冬氨酸、苯丙氨酸、谷氨酸以及亮氨酸等相关碳原子的多个相对丰度数据可以直观地计算出乙醛酸支路的代谢贡献。利用该法成功地发现了 PEP 羧化激酶基因缺失的大肠杆菌在葡萄糖上生长时有近 30%的异柠檬酸通过乙醛酸循环, 同时也发现磷酸葡萄糖异构酶基因缺失株中乙醛酸支路具有代谢活性, 从而有助于深入理解细胞回补反应在内的多个代谢功能及其关联的调控机理^[5,13]。此外, 代谢流量比率分析法还能用来很好地区分糖酵解途径和磷酸戊糖途径对碳源的利用、判断 Entner-Doudoroff (ED)途径的活性、以及决定糖异生反应的代谢贡献等^[5,11,13,17-19]。同时, 流量比率分析法不仅能成功地应用于相对简单的原核细胞, 而且能较好地阐明不同细胞区室间代谢物的转移特性, 因此已被逐步应用推广到细菌、酵母、植物及动物细胞等多种细胞体系^[24,26-28], 并在葡萄糖以外(如乳酸等)的生长情况下也有了很好的分析和应用^[12]。

基于流量比率的分析法还被广泛地用于多种目

的的代谢网络解析, 主要包括: 发现新的代谢途径和功能^[5,13,19,25,29]、特征化代谢网络(网络的刚性特点、能量代谢特点等)并进行细胞代谢的优化操作^[18,26,30]、特定基因在代谢调控中的作用^[5,31]、以及研究细胞在多种碳源和环境条件下自适应生长进化的代谢响应^[11-12,29]等。此外, 相比于利用全部代谢物同位体测量的综合流量定量法, 基于流量比率代谢流量分析法在高通量定量、比较筛选和细胞特性解析等方面具有独特的技术优势, 并正在得到很好的应用^[18,26]。

2.3 代谢流量比率分析软件

尽管通过分析代谢物同位体分布信息和代谢流量比率, 同时在合适代谢模型的基础上能够很好地定量理解细胞代谢网络, 但这一过程涉及标记实验、数据测定、推导分析等多个复杂步骤, 需要对代谢反应的基本原理和模型计算等有一定的基础。针对相关经验比较少的使用者, Zamboni 等开发了基于¹³C-葡萄糖实验和质谱分析的流量比率及代谢流量分析软件包 FiatFlux^[32]。该分析计算软件基于 Matlab 系统, 包含了提取同位体质谱数据、同位素标记的校正、代谢模型建立、流量比率的选择与分析、稳态代谢流的定量、以及相关统计分析等多方面功能, 提供了一个比较全面的分析平台。FiatFlux 中预先设置了大肠杆菌、酿酒酵母等模式微生物的中心代谢模型, 便于初学者了解模型并在此基础上做一定修改。该软件包能很好地帮助初学者理解基于流量比率分析的一般原理和过程, 但是由于比率的推导和代谢模型关系密切, 使用时需要对代谢反应有较清楚的认识。当研究的代谢网络与软件包提供的模式微生物网络存在较大区别时, 不能机械地使用该软件包, 而应该选择合适的目标代谢物同位体信息来推导相关流量比率, 进而决定整体流量组; 这在标记底物或标记方式有显著改变时尤为重要。

3 结论与展望

以上系统地介绍了细胞代谢分析及改造中最为常用和有效的基于代谢物同位体信息的代谢分析法, 特别是利用同位体分布数据的代谢流量比率分析法, 以及结合流量比率信息和质量平衡关系的¹³C 限制

型稳态代谢流量定量法。很多细胞代谢分析应用已经表明不受细胞外代谢物种类和速率影响、源于细胞内代谢反应的原子转移特性的流量比率分析能为辨识代谢途径的活性提供最直接的证据。相比于拟合全部同位体分布的综合代谢流量模型,流量比率分析的结果受模型精确性的影响相对较小,有利于快速有效地定量细胞特性、高通量分析代谢途径的功能差异、辨识可能的代谢限制、并得到相应的改造位点。同时也可以看出,将反应途径的流量比率应用于细胞代谢工程的分析方法可以归纳成2类^[33]: 1) 直接利用流量比率进行代谢途径和功能的比较分析; 2) 在定量流量比率的基础上决定整组代谢流并以此分析胞内代谢。这也使得在阐明很多细胞代谢过程或是进行多水平数据整合分析时可以根据实际需要选择局部的或是整体的途径分析法,从而提高代谢工程解析的效率^[11-12,30,34]。

尽管代谢流量比率分析有很多优点,要能够成功应用这类方法进行代谢分析仍有不少需要注意之处。首先需要对代谢反应的碳原子转移等生物化学知识有清晰的理解,以决定合适的标记底物以及用于分析流量比率的最适目标代谢物片段,从而充分利用同位素标记的特性来区分不同途径。其次是在标记底物、培养条件或代谢模型发生显著改变时,多数情况下需要重新分析推导流量比率。此外,流量比率分析在应用方面仍存在一定的局限:通过流量比率分析虽然能够判断一些反应的可逆性,但由于涉及的代谢反应及方法本身的限制,难以提供所有可逆反应的交换流信息,因此多数情况下只能计算得到净代谢流分布。流量比率分析法也难以直接用来区分包括同工酶等在内的没有明显碳原子传递差异的代谢反应。同时,该方法一般被应用于最小培养基条件,在复杂的培养条件或者多碳源培养基物的情况下虽然也能使用,但是推导流量比率的技术难度会明显增加。因此,只有在清楚了解这些适用条件和使用限制等情况,应用流量比率或基于流量比率的细胞代谢解析方法才能发挥最大的功效。

虽然基于流量比率的代谢流量和网络特性解析技术的相关理论和实验方法已基本确立,并有不少成功的应用,但相比而言该分析方法仍处于发展的

初期阶段。要使这个新型且很具前景的方法在代谢工程和系统生物分析中得到更为广泛深入的应用,还至少需要从以下几个方面进行完善和拓展。1) 首先是以现有的中心代谢流量比率分析为基础,加强在多种标记底物和多种培养条件下对流量比率的再推导和再认识,同时扩增新型流量比率分析点,最大可能地丰富常用流量比率数据库,从而更便利地理解细胞中心代谢过程。2) 除主要代谢途径外,越来越多的研究需要清楚了解包括次级代谢产物合成、光合反应等在内的特殊代谢途径;扩展流量比率分析法到更多的细胞体系和更多的复杂代谢过程有助于有效地提出和发现促进产物合成的改进方案。3) 发展氨基酸以外的关键中间代谢物同位体分布测定所必需的提取方法和测定技术,以避免用氨基酸数据拟合中间代谢物同位体分布时可能导致的计算偏差,提高流量比率计算精度;同时,充分利用中间代谢物浓度和同位体分布信息解析流量比率的动态特性,考察瞬态响应等非稳态代谢现象,更大程度上了解细胞代谢过程^[33]。通过加强上述研究,代谢流量比率分析将能够更充分地发挥稳定同位素标记、跟踪和阐明细胞代谢的特长,进而能够更有效地应用于多种细胞体系的代谢调控分析和改造。

REFERENCES

- [1] Bailey JE. Toward a science of metabolic engineering. *Science*, 1991, **252**(5013): 1668-1675.
- [2] Stephanopoulos G, Stafford D. Metabolic engineering: a new frontier of chemical reaction engineering. *Chem Eng Sci*, 2002, **57**(14): 2595-2602.
- [3] Koffas M, Roberge C, Lee K, *et al.* Metabolic engineering. *Annu Rev Biomed Eng*, 1999, **1**: 535-557.
- [4] Vemuri GN, Aristidou AA. Metabolic engineering in the -omics era: elucidating and modulating regulatory networks. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2005, **69**(2): 197-216.
- [5] 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.
- [6] Zamboni N, Fischer E, Muffler A, *et al.* Transient expression and flux changes during a shift from high to low riboflavin production in continuous cultures of *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Bioeng*, 2005, **89**(2): 219-232.
- [7] Schwender J, Ohlrogge J, Shachar-Hill Y. Understanding flux in plant metabolic networks. *Curr Opin Plant Biol*,

- 2004, **7**(3): 309–317.
- [8] Munger J, Bennett BD, Parikh A, *et al.* Systems-level metabolic flux profiling identifies fatty acid synthesis as a target for antiviral therapy. *Nat Biotechnol*, 2008, **26**(10): 1179–1186.
- [9] Christensen B, Gombert AK, Nielsen J. Analysis of flux estimates based on ^{13}C -labelling experiments. *Eur J Biochem*, 2002, **269**(11): 2795–2800.
- [10] Klapa MI, Aon JC, Stephanopoulos G. Systematic quantification of complex metabolic flux networks using stable isotopes and mass spectrometry. *Eur J Biochem*, 2003, **270**(17): 3525–3542.
- [11] 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.
- [12] Hua Q, Joyce AR, Palsson BO, *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, Baba T, *et al.* Analysis of *Escherichia coli* anaplerotic metabolism and its regulation mechanisms from the metabolic responses to altered dilution rates and phosphoenolpyruvate carboxykinase knockout. *Biotechnol Bioeng*, 2003, **84**(2): 129–144.
- [14] 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.
- [15] Villas-Boas SG, Mas S, Akesson M, *et al.* Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrom Rev*, 2005, **24**(5): 613–646.
- [16] Dauner M, Sauer U. GC-MS analysis of amino acids rapidly provides rich information for isotopomer balancing. *Biotechnol Prog*, 2000, **16**(4): 642–649.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] van Winden WA, Wittmann C, Heinzle E, *et al.* Correcting mass isotopomer distributions for naturally occurring isotopes. *Biotechnol Bioeng*, 2002, **80**(4): 477–479.
- [22] Wahl SA, Dauner M, Wiechert W. New tools for mass isotopomer data evaluation in ^{13}C flux analysis: mass isotope correction, data consistency checking, and precursor relationships. *Biotechnol Bioeng*, 2004, **85**(3): 259–268.
- [23] Szyperski T. ^{13}C -NMR, MS and metabolic flux balancing in biotechnology research. *Q Rev Biophys*, 1998, **31**(1): 41–106.
- [24] Blank LM, Sauer U. TCA cycle activity in *Saccharomyces cerevisiae* is a function of the environmentally determined specific growth and glucose uptake rates. *Microbiology*, 2004, **150**(Pt 4): 1085–1093.
- [25] Zamboni N, Maaheimo H, Szyperski T, *et al.* The phosphoenolpyruvate carboxykinase also catalyzes C3 carboxylation at the interface of glycolysis and the TCA cycle of *Bacillus subtilis*. *Metab Eng*, 2004, **6**(4): 277–284.
- [26] Fischer E, Sauer U. Large-scale *in vivo* flux analysis shows rigidity and suboptimal performance of *Bacillus subtilis* metabolism. *Nat Genet*, 2005, **37**(6): 636–640.
- [27] Edwards S, Nguyen BT, Do B, *et al.* Contribution of malic enzyme, pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate carboxylase, and the krebs cycle to respiration and biosynthesis and to intracellular pH regulation during hypoxia in maize root tips observed by nuclear magnetic resonance imaging and gas chromatography-mass spectrometry. *Plant Physiol*, 1998, **116**(3): 1073–1081.
- [28] Yang C, Richardson AD, Osterman A, *et al.* Profiling of central metabolism in human cancer cells by two-dimensional NMR, GC-MS analysis, and isotopomer modeling. *Metabolomics*, 2008, **4**: 13–29.
- [29] Fong SS, Nanchen A, Palsson BO, *et al.* Latent pathway activation and increased pathway capacity enable *Escherichia coli* adaptation to loss of key metabolic enzymes. *J Biol Chem*, 2006, **281**(12): 8024–8033.
- [30] Fuhrer T, Fischer E, Sauer U. Experimental identification and quantification of glucose metabolism in seven bacterial species. *J Bacteriol*, 2005, **187**(5): 1581–1590.
- [31] Perrenoud A, Sauer U. Impact of global transcriptional regulation by ArcA, ArcB, Cra, Crp, Cya, Fnr, and Mlc on glucose catabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2005, **187**(9): 3171–3179.
- [32] Zamboni N, Fischer E, Sauer U. FiatFlux--a software for metabolic flux analysis from ^{13}C -glucose experiments. *BMC Bioinformatics*, 2005, **6**: 209.
- [33] Zamboni N. Toward metabolome-based ^{13}C flux analysis: a universal tool for measuring *in vivo* metabolic activity. Topics in Current Genetics. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007: 129–157.
- [34] Sauer U, Canonaco F, Heri S, *et al.* The soluble and membrane-bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH metabolism of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2004, **279**(8): 6613–6619.