

FBA and FVA Analysis of Central Carbon Metabolism in *E. coli* Deletion Mutants*

Tie Shen^{1,2}, Jiejun Jin³, Yin Yi^{1,2}, Han Wen^{3#}, Bin Rui^{3#}

¹School of Life Science, Guizhou Normal University, Guiyang

²Guizhou Province of Key Laboratory of Plant Physiology and Development Regulation, Guiyang

³School of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei

Email: #ruibin@ahau.edu.cn, #swhx1@ahau.edu.cn

Received: Jun. 25th, 2013; revised: Jul. 15th, 2013; accepted: Jul. 30th, 2013

Copyright © 2013 Tie Shen et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract: *E. coli* has clear genetic background and is easy to be cultured, so it has been widely used in a variety of biochemistry, biotechnology research as the mode microorganisms. In this work, a small *E. coli* metabolic system has been built in the cobra workspace. 25 enzymes in the metabolic system were separately knocked out and the metabolic system was investigated by FBA (flux balance analysis) and FVA (flux variability analysis). By combing the outcome of the analysis, we could infer the role played by the various enzymes in the *E. coli* metabolic system.

Keywords: *E. coli*; Flux Blance Analysis; Flux Variability Analysis; Metabolic Flux; Enzyme

大肠杆菌基因缺失菌株中碳中心代谢系统的通量平衡分析和通量变异分析*

申 铁^{1,2}, 金杰军³, 乙 引^{1,2}, 文 汉^{3#}, 芮 斌^{3#}

¹贵州师范大学生命科学学院, 贵阳

²贵州省植物生理与发育重点实验室, 贵阳

³安徽农业大学生命科学学院, 合肥

Email: #ruibin@ahau.edu.cn, #swhx1@ahau.edu.cn

收稿日期: 2013年6月25日; 修回日期: 2013年7月15日; 录用日期: 2013年7月30日

摘 要: 大肠杆菌(*E. coli*)因其遗传信息简单且容易培养而被广泛用作各种生物化学、生物技术研究等的模式微生物。本文首先通过 COBRA 工具包构建了大肠杆菌碳中心代谢系统的小规模网络, 然后分别模拟敲除了其中的 25 种酶, 并利用代谢通量平衡分析和代谢通量变异分析研究了基因敲除后的代谢网络。通过这些结果的综合分析, 我们可以推断大肠杆菌碳中心代谢系统的不同的酶对整个体系的作用。

关键词: 大肠杆菌; 通量平衡分析; 通量变化分析; 代谢通量; 酶

1. 引言

大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)革兰氏阴性短杆菌, 大小 $0.5 \times 1 \sim 3$ 微米。周身鞭毛, 能运动, 无芽

孢。能发酵多种糖类产酸、产气, 是人和动物肠道中的正常栖居菌, 婴儿出生后即随哺乳进入肠道, 与人终身相伴, 其代谢活动能抑制肠道内分解蛋白质的微生物生长, 减少蛋白质分解产物对人体的危害, 还能

*基金来源: 国家自然科学基金(31200626), 贵州省科技厅联合基金(黔科合 J 字 LKS[2012]22 号), 贵州师范大学博士启动基金。

#通讯作者。

合成维生素 B 和 K, 以及有杀菌作用的大肠杆菌素^[1]。

大肠杆菌是研究微生物遗传的重要材料, 如局限性转导就是 1954 年在大肠杆菌 K12 菌株中发现的。莱德伯格(Lederberg)采用两株大肠杆菌的营养缺陷型进行实验, 奠定了研究细菌接合方法学上的基础, 以及基因工程的研究。大肠杆菌作为外源基因表达的宿主, 遗传背景清楚, 技术操作简单, 培养条件简单, 大规模发酵经济, 倍受遗传工程专家的重视。目前大肠杆菌是应用最广泛, 最成功的表达体系, 常作高效表达的首选体系。

系统生物学着重以系统的思路和方法定量研究研究生物过程^[1]。由于生物系统的组成关系主要用网络来表示, 代谢网络研究就自然地成为热门领域。最初的网络理论往往只涉及一个底物和一个产物, 故与实际网络不符。FELL 等学者便致力于线性代数数的方法来以更便利地计算代谢途径, 其主要思想是: 先假设代谢网络的途径是代谢网络计量系数矩阵的线性无关解。通过对这些途径的线性组合或者枚举来产生存在的(但未必是热力学可行的)代谢途径。最近, 凸分析被运用到代谢途径分析中, 代谢网络理论于是得到了更进一步的发展, 渐渐形成了得到普遍认可的两种方法, 基元模式(EFMs)和极端途径(EPs)分析。

同时, 进一步, 在另一个层面上, 对代谢网络的研究也逐渐演化出来单独的静态分析和动态分析。静态分析主要包括 Schilling 等学者提出的极端途径(extreme pathway analysis), 基元模式(elementary flux mode analysis), FBA 流平衡分析(flux balance analysis)和 jeong 等学者提出的图论法(graph theory)^[3-6]。而动态分析方法, 依靠基于动力学信息的, 它包括代谢控制分析(metabolic control analysis), 控制论模拟方法(cybernetic modeling)。当前在基因组规模的代谢网络来说, 许多反应的动力学参数和反应物浓度参数都是不清楚的, 故静态的研究方法占据了目前代谢网络研究的主流位置^[4,7-10]。

本篇文章在 matlab cobra 工具箱的基础上对大肠杆菌代谢系统进行 FBA 和 FVA 分析, 将分析结果进行汇总后, 为显示在敲除和不敲除各种酶的结果变化^[9], 对数据进行绘图, 通过直观的图形对比, 显示出敲除各种酶和不敲除酶对大肠杆菌代谢系统中每一个反应的影响, 以及大肠杆菌代谢系统的全部反应在敲除某个酶后的两项结果变化是否存在共性, 以此为

依据, 大致判断各个酶在大肠杆菌代谢系统中起到的作用。大肠杆菌代谢系统中有很多的酶参与, 此篇论文中, 我以 25 个酶为例, 分别单独将每一个酶从代谢系统中进行敲除后^[11-13], 对代谢系统进行 FBA 和 FVA 分析, 将结果与未敲除任何酶时的代谢系统 FVA 和 FBA 结果进行对比, 以确定所敲除在代谢系统中起到的作用, 这提供了一个全新的分析方法, 进行酶分析, 这样的结果虽说只是猜测, 但是可以对以后的实验起到指导性作用, 使研究者可以少走弯路, 尽快获得可靠的数据。然而由于时间原因, 进行分析后没有再以实验对结果进行验证, 在这方面还有待提高。

2. 材料与方法

2.1. 所需操作软件以及文件

Matlab 版本 7.0 以上 cobra toolbox 版本 2.0 以上 libsbml 版本 4.0.1 以上。

Sbml toolbox 版本 3.1.1 以上 gurobi 5.0 以上。

大肠杆菌小型中心代谢模型“ecoli_core_model.Xml”, 此模型中包含大肠杆菌中心代谢的全部信息^[6]。

2.2. 方法: 操作过程

2.2.1. 代谢模型读取

在 matlab 命令窗口中执行指令:

model = readCbModel(‘文件名’)其中文件名为模型保存目录^[14,15]。

2.2.2. 模型的修饰

执行指令:

model = changeRxnBounds(model,‘EX_glc(e)’,-16.7,‘l’);

其中‘EX_glc(e)’代表了底物摄取速率, “l”是“lower”的缩写, 表示模型的下限^[2]。

2.2.3. 酶的敲除

执行指令:

model = removeRxn(model,‘rxnRemoveList’);

‘rxnRemoveList’代表的是含有所敲除反应的反应信息的单元矩阵, 酶的敲除中, rxnRemoveList 可直接用所需敲除酶的英文缩写代替。如敲除烯醇化酶即 ENO 酶, 直接在命令窗口中输入指令 model = removeRxn(model,‘ENO’)即可, 执行命令后表示该酶所直接参与的反应的电子信息从模型中去除, 该反应在

模型中不再起作用。

2.2.4. FBA 最优化值的获取

执行指令:

```
changeCobraSolver('gurobi5','LP');
```

```
Fluxdistribution = optimizeCbModel(model);
```

```
flux = geometricFBA(model)
```

其中第一步指令是修改 cobra solver; 第二步是执行标准 FBA 命令。

2.2.5. FVA(Flux Variability Analysis)值的获取

执行命令:

```
[minFlux,maxFlux] = fluxVariability(model,90);
```

其中“90”代表一个百分比,为模型所能达到的目标函数相对于最优值得比例。FVA 命令的结果有 minFlux 和 maxFlux,分别代表模型中 95 个反应的通量分布情况。

2.3. 作图说明

作图从两个方向进行,分别为横向和纵向,横向作图在于显示模型中每个单独反应在不同酶被敲出后受到的影响,作图时横坐标代表被敲除的酶,为更好的显示结果,分别用数字代表各种酶,对应情况为: 1) 没有敲除任何酶; 2) EDD; 3) GLUUPT; 4) GdH; 5) GND; 6) TK2; 7) PFK; 8) HXI; 9) TAL; 10) TK1; 11) SER; 12) SHMT; 13) GEV; 14) ENO; 15) PYK; 16) PDH; 17) AC-EX; 18) GLTA; 19) ICD; 20) AKD; 21) FUM; 22) MDH; 23) GS1; 24) GS2; 25) PPC; 26) MEZ[4]。横向作图时 FBA 的结果使用折线图显示,FVA 的结果选用柱形图来显示区间的变化。纵向作图在于显示敲除某个酶对整个代谢系统的影响,作图时横坐标的数字分别代表大肠杆菌代谢模型中的 95 个反应。纵向作图时由于反应有 95 个,在进行 FVA 分析时,用柱形图难以显示结果的变化,所以将结果进行拆分,分别对 minflux 和 maxflux 作图。

3. 结果

3.1. 横向分析

论文中只将反应 ATP synthase, Biomass, glutamate transport 的流量变化图附上(如图 1~6),其他反应可以同理进行分析。

3.2. 纵向分析

横向分析后,会发现在酶 14(ENO), 15(PYK), 16(PDH), 21(FUM), 25(PPC)等被敲出后,反应受到的影响最大,本次论文只将酶 ENO 即烯醇化酶,酶

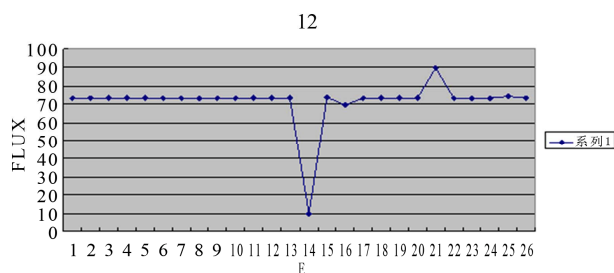


Figure 1. Changes in reaction ATP synthase after the knockout of different enzyme
图 1. 反应 ATP synthase 在敲除不同的酶后最优流量值的变化

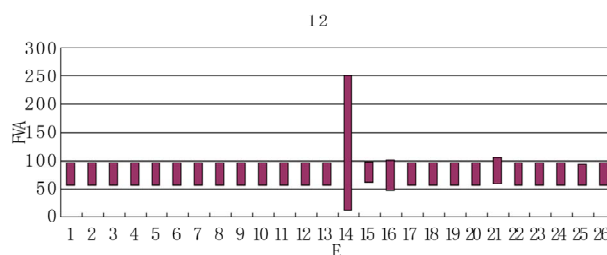


Figure 2. Changes in flux range of reaction ATP synthase after the knockout of different enzyme
图 2. 反应 ATP synthase 在敲除不同的酶后流量范围的变化

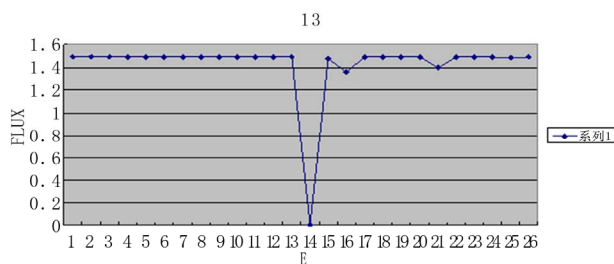


Figure 3. Changes in reaction Biomass after the knockout of different enzyme
图 3. 反应 Biomass 在敲除不同的酶后最优流量值的变化

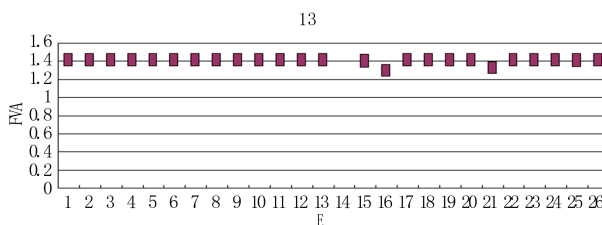


Figure 4. Changes in flux range of reaction Biomass after the knockout of different enzyme
图 4. 反应 Biomass 在敲除不同的酶后流量范围的变化

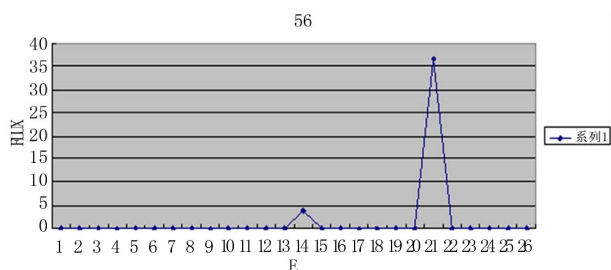


Figure 5. Changes in reaction glutamate transport after the knock-out of different enzyme

图 5. 反应 glutamate transport 在敲除不同的酶后最优流量值的变化

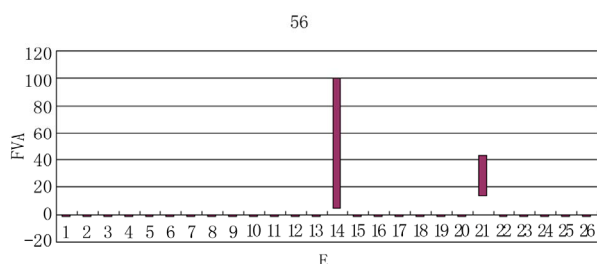


Figure 6. Changes in flux range of reaction glutamate transport after the knockout of different enzyme

图 6. 反应 glutamate transport 在敲除不同的酶后流量范围的变化

PDH 即丙酮酸脱氢酶, 酶 FUM 即延胡索酸酶, 酶 PPC 即磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的纵向分析图附上(如图 7~12), 其它酶可以用同种方法进行分析。

4. 讨论

综合横向分析和纵向分析, 我们可以确定酶 ENO 即烯醇化酶, 酶 PDH 即丙酮酸脱氢酶, 酶 FUM 即延胡索酸酶, 酶 PPC 即磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶等对整个代谢系统的影响最大, 以酶 ENO 为例, 通过纵向分析来看, 会发现, 在 ENO 敲出后, 在大肠杆菌代谢系统中有相当多的反应都受到了影响, 而酶的催化作用具有专一性, 即只催化一种或一类底物, 因此我们可以推测出酶 ENO 所参与的反应应该是位于大肠杆菌代谢系统比较靠前的的位置, 可以为代谢系统之后的反应提供底物等。再返回汇总数据, 可以发现, 酶 ENO, 被敲出后反应代谢系统中反应就会少一个, 说明在这些酶所直接参与的反应中, 他们的作用是不可替代的, 即大肠杆菌代谢系统中 ENO 酶无同工酶, 由此我们也可以基本判定酶 ENO 所催化的反应。再观察横向分析图与汇总的数据, 会发现酶 ENO 对反应的影响可以分为两类:

1) ENO 酶敲除后, 反应被抑制, 这又可以被分为

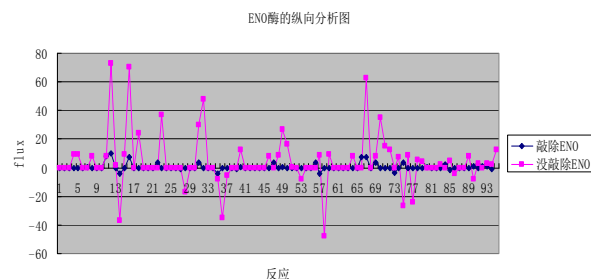


Figure 7. The all reaction FBA knockout enzyme ENO metabolic system results change

图 7. 敲除酶 ENO 代谢系统中全部反应的 FBA 结果变化

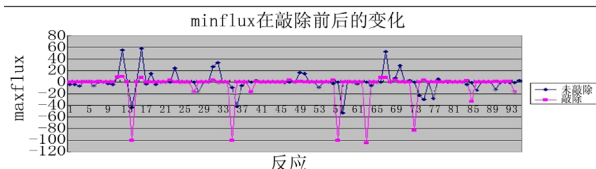
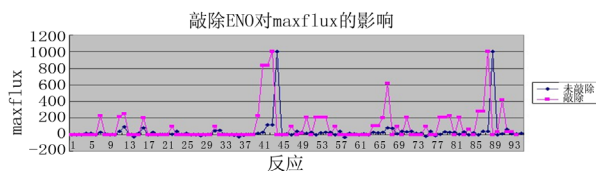


Figure 8. All knockout enzyme ENO metabolic system response changes in FVA results

图 8. 敲除酶 ENO 代谢系统中全部反应 FVA 结果变化

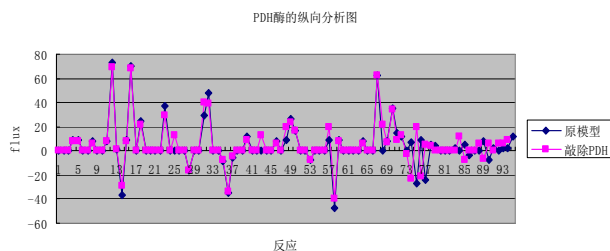


Figure 9. Changes in the knockout enzyme PDH metabolic system in all the reaction FBA results

图 9. 敲除酶 PDH 代谢系统中全部反应的 FBA 结果变化

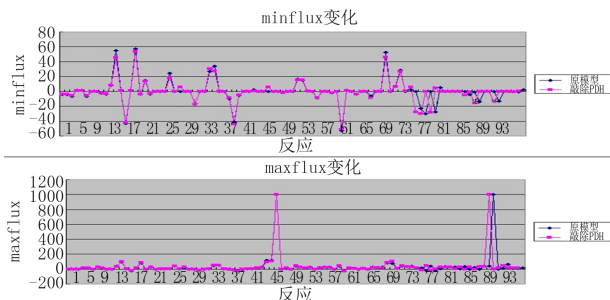


Figure 10. knockout enzyme PDH metabolic system in all reaction FVA results change

图 10. 敲除酶 PDH 代谢系统中全部反应 FVA 结果变化

两类: a) ENO 酶敲出后该反应被抑制, 但是并未停止, 如反应 ATP synthase; b) ENO 酶被敲出后该反应完

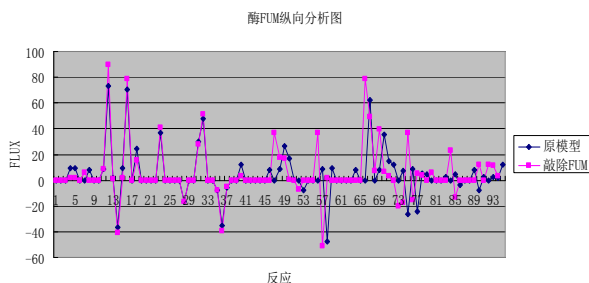


Figure 11. Knockout enzyme the FUM metabolic system, all the reaction the FBA result of changes

图 11. 敲除酶 FUM 代谢系统中全部反应的 FBA 结果变化

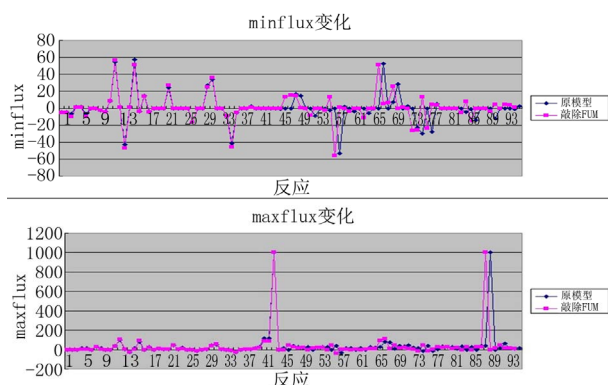


Figure 12. knockout enzyme the FUMF metabolic system, the whole reaction FVA results change

图 12. 敲除酶 FUM 代谢系统中全部反应 FVA 结果变化

全停止，如反应 Biomass。

这说明代谢系统中反应 ATP synthase 和反应 Biomass 在酶 ENO 直接参与的反应后面进行。而且反应 Biomass 离 ENO 酶直接参与的反应可能更近一点，这样有利于我们对肠杆菌代谢网络结构的理解。

2) ENO 酶被敲出后，反应被促进，如反应 glutamate transport。考虑到大肠杆菌是兼性厌氧性微生物，因此猜测：酶 ENO 可抑制反应 glutamate transport 的进行或者是抑制反应 glutamate transport 底物的合成，也可能是酶 ENO 的产物对反应有抑制作用，即反应 glutamate transport 可能是大肠杆菌在另一种不同的环境才能进行的。

同理可以应用于大肠杆菌代谢系统中的其他酶和反应的分析，这将有利于我们对大肠杆菌代谢系统的认识。在此所用的大肠杆菌小型中心代谢系统模型，是比较简单的的代谢系统，这样的分析方案不仅适用于这样的小型代谢系统，也可用于对比较复杂的代谢网络分析。

参考文献 (References)

- [1] 花强, 杨琛. 代谢流量比率分析及其在代谢工程中的应用[J]. 生物工程学报, 2009, 25(9): 1303-1311.
- [2] 史晋辉. 细胞代谢过程分析及模型优化[J]. 生命的化学, 2001, 21(1): 71-73.
- [3] T. Shen, B. Rui, H. Zhou, et al. Metabolic flux ratio analysis and multi-objective optimization revealed a globally conserved and coordinated metabolic response of *E. coli* to paraquat-induced oxidative stress. *Molecular BioSystems*, 2012, 9 (1): 121-132.
- [4] 杨志杰. 基于代谢流量分析的微生物细胞代谢特性研究[D]. 华东理工大学, 2011.
- [5] 陈琦, 王卓, 魏冬青. 代谢网络流分析进展及应用[J]. 中国科学, 2010, 55(14): 1302-1309.
- [6] 丁德武, 何小青, 陆克中等. 用约束法研究大肠杆菌代谢网络核心模型[J]. 计算机与应用化学, 2010, 27(6): 835-838.
- [7] 李毅, 郑浩然, 钮俊清等. VFA: 一种可视化代谢网络建模工具[J]. 北京生物医学工程, 2008, 27(5): 490-494.
- [8] 谭青乔, 陈宁, 王东洋. 代谢工程发展及应用[J]. 生物技术通讯, 2001, 12(2): 123-126.
- [9] 魏春, 陈宁. 代谢网络定量分析研究进展[J]. 生物技术通讯, 2002, 13(3): 234-237.
- [10] 马红武, 赵学明, 迟万忠. 应用 Excel 处理生化过程数据(I)代谢通量分析及代谢网络优化[J]. 计算机与应用化学, 1998, 15(6): 274-278.
- [11] A. T. Ekaterini. Growth possibilities of *E. coli* in natural waters. *International Journal of Environmental Studies*, 1997, 52(1-4): 67-73.
- [12] K. Andrejs, S. Egils. Paint4Net.COBRA toolbox extension for visualization of stoichiometric models of metabolism. *Bio-Sys-tems*, 2012, 109(2): 233-241.
- [13] 蒋达. 代谢网络通量和结构分析[D]. 大连理工大学出版, 2006.
- [14] 赵静. 细胞代谢网络的结构、功能与进化研究[D]. 上海交通大学, 2008.
- [15] J. Schellenberger, R. Que, R. M. T. Fleming, et al. Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0. *Nature*, 2011, 21(6): 1290-1307.