

[研究简报]

基元通量模式预测酵母生长现象

蒋 达¹, 王永华², 李 燕¹, 张述伟¹, 杨胜利², 杨 凌²

(1. 大连理工大学化学工程系, 大连 116012; 2. 中国科学院大连化学物理研究所, 药用资源开发研究组, 大连 116023)

关键词 预测; 基元通量模式; 啤酒酵母; 生长现象

中图分类号 O629; Q811.4

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2006)09-1683-03

基元通量模式(Elementary flux mode, EFM)^[1]是以计量学为基础,通过枚举输入物到达目的产物过程中的路径来表示代谢过程,路径数的多少表示生长能力的强弱.而同属于计量学范畴的通量平衡分析(Flux balance analysis, FBA)^[2]需设定输入物的量,通过实现最大化目标函数来计算最多能够生成的生物质量.在预测生物体的生长现象和规律方面,EFM和FBA分别能够做到定性预测和定量预测.本文通过EFM预测了基因突变后的酵母细胞生长现象,模拟预测结果和实验结果^[3]吻合很好;与FBA方法得到的模拟结果^[3]相比较,EFM方法能更好地把基因突变和其表型(生长)联系起来.

1 方 法

参考文献[4]中列出的反应方程式,并参考KEGG数据库提供的代谢路径,添加CDC19, CIT2, DAL7, ICL1, IDH12, IDP2, ALD2, ALD4, ALD5, MDH2, RHR2HOR2等反应式.使用软件FluxAnalyzer^[5]计算EFM.计算时间随着同功酶的引入而成倍增加^[6],因此在模型中尽量把多个同功酶看作是单酶参与反应,有利于减少基元模式的规模.在模型中不再单独考虑能量代谢过程,而把能量代谢集合到生物质生成过程(表1中的Biomass反应).酵母代谢网络不但需要区分各代谢物所在的空间部位,还需要区分线粒体和细胞液中的AcCoA, NAD, NADH.用Shuttle X作为NAD和NADH的穿梭反应^[4],用CAT2作为AcCoA从细胞液到线粒体的穿梭反应^[4].以葡萄糖为唯一碳源,甘油和乙醇为产物,因此把生成甘油的RHR2HOR2和生成乙醇的ADH124反应定义为不可逆反应.在模拟分析过程中将ATP, O₂, ETH, ADP, CoA, GLC, PI, AMP, PPI, FADH₂, FAD, NADPmit, NADPHmit, NADPHcyt, NADPcyt, CO₂ex, ACex, GL设定为流通代谢物,不考虑其平衡,其余37种代谢物为考虑平衡的内部代谢物,共54个反应(18个可逆反应)组成了中心碳代谢网络.

通过阻断某反应后,预测细胞能否生长,这也是查找路径的过程.在所有的EFM路径中,首先选出存在GLC(葡萄糖)代谢物和biomass反应的路径.然后,排除中断的这步反应后,再查看是否还存在EFM路径,只要存在就表示细胞仍然能够生长;反之,表示不能生长.

2 结果与讨论

图1中纵坐标表示各反应参与EFM路径数的百分含量,横坐标列出了各步反应,统计了每步反应分别参与的生长现象路径和总路径个数的百分数.如果中断某个反应后,剩下的路径数占中断前的路径数的百分含量大,就表明该反应对于生长影响小;反之,表明该反应对生长非常重要.用EFM方法可检测到每步反应的相对重要性,可以看出百分数越大,阻断该反应就会使得细胞停止生长,甚至会使得细胞失去正常功能或死亡.而对于百分数小的那部分反应对细胞生长没有太大影响,但可能对其它功能有影响.

运用EFM预测基因敲除现象正确率为88%(表2),PDC156, PFK12和ZWF1预测现象与文献实

收稿日期: 2005-07-26.

基金项目: 国家“九七三”前沿专项计划(批准号: 2003CCA03400)和国家“八六三”计划(批准号: 2003AA223061)资助.

联系人简介: 杨 凌(1961年出生),男,博士,研究员,博士生导师,从事药物ADME性质研究及评价新技术、天然产物和原料药的工业化制备技术、天然药用活性物质的生物转化等方面的研究. E-mail: yling@dicp.ac.cn

Table 1 Reactions of central carbon metabolism in *S. cerevisiae*

Gene	Reaction	Gene	Reaction
ACO1	1 CIT \rightleftharpoons 1 ISOCIT	RKI1	1 RU5P \rightleftharpoons 1 R5P
CDC19	1 PEP + 1 ADP \rightarrow 1 ATP + 1 PYR	RPE1	1 RU5P \rightleftharpoons 1 X5P
CIT1	1 AcCoAmit + 1 OAC \rightarrow 1 CIT + 1 CoA	TKL12	1 R5P + 1 X5P \rightleftharpoons 1 S7P + 1 GA3P
CIT2	1 AcCoAcyt + 1 OAC \rightarrow 1 CIT + 1 CoARPE1	TAL1	1 S7P + 1 GA3P \rightleftharpoons 1 F6P + 1 E4P
DAL7	1 AcCoAcyt + 1 GLY \rightarrow 1 Mal + 1 CoA	TDH123	1 GA3P + 1 PI + 1 NADcyt \rightleftharpoons 1 P13G + 1 NADHcyt
ENO2	1 P2G \rightleftharpoons 1 PEP	ADH124	1 ACA + 1 NADHcyt \rightleftharpoons 1 ETH + 1 NADcyt
FBA1	1 F16P \rightleftharpoons 1 DHAP + 1 GA3P	ALD2	1 ACA + 1 NADcyt \rightarrow 1 Ac + 1 NADHcyt
FBP1	1 F16P \rightleftharpoons 1 F6P + 1 PI	ACS12	1 ATP + 1 Ac + 1 CoA \rightarrow 1 AcCoAcyt + 1 AMP + 1 PPI
GND1	1 P6G + 1 NADPcyt \rightarrow 1 CO ₂ + 1 RU5P + 1 NADPHcyt	CAT2	1 AcCoAcyt \rightarrow 1 AcCoAmit
GPM1	1 P3G \rightleftharpoons 1 P2G	FUM1	1 Fum \rightleftharpoons 1 Mal
ICL1	1 ISOCIT \rightarrow 1 SUC + 1 GLY	SDH1234	1 SUC + 1 FAD \rightarrow 1 Fum + 1 FADH2
IDH12	1 ISOCIT + 1 NADmit \rightarrow 1 AKG + 1 CO ₂ + 1 NADHmit	OSM1	1 Fum + 1 FADH2 \rightarrow 1 SUC + 1 FAD
IDP1	1 ISOCIT + 1 NADPmit \rightarrow 1 AKG + 1 CO ₂ + 1 NADPHmit	LSC2	1 SUC + 1 ATP + 1 CoA \rightleftharpoons 1 SucCoA + 1 ADP + 1 PI
IDP2	1 ISOCIT + 1 NADPcyt \rightarrow 1 AKG + 1 CO ₂ + 1 NADPHcyt	MDH2	1 Mal + 1 NADcyt \rightleftharpoons 1 OAC + 1 NADHcyt
KGD12	1 AKG + 1 NADmit \rightarrow 1 SucCoA + 1 CO ₂ + 1 NADHmit	ALD4	1 ACA + 1 NADmit \rightarrow 1 Ac + 1 NADHmit
MAE1	1 Mal + 1 NADPmit \rightarrow 1 CO ₂ + 1 PYR + 1 NADPHmit	ALD6	1 ACA + 1 NADPcyt \rightarrow 1 Ac + 1 ADPHcyt
MDH1	1 Mal + 1 NADmit \rightleftharpoons 1 OAC + 1 NADHmit	ALD5	1 ACA + 1 NADPmit \rightarrow 1 Ac + 1 NADPHmit
MLS1	1 AcCoAcyt + 1 GLY \rightarrow 1 Mal + CoA	ShuttleX	1 NADcyt + 1 NADHmit \rightarrow 1 NADmit + 1 NADHcyt
PDC156	1 PYR \rightarrow 1 CO ₂ + 1 ACA	CO2ex	1 CO ₂ \rightarrow 1 CO2ex
PFK12	1 F6P + 1 ATP \rightarrow 1 F16P + 1 ADP	ACex	1 AC \rightarrow 1 ACex
PGI1	1 G6P \rightleftharpoons 1 F6P	RHR2HOR2	1 G3P \rightarrow 1 GL
PGK1	1 ADP + 1 P13G \rightleftharpoons 1 ATP + 1 P3G	PCK1	1 ATP + 1 OAC \rightarrow 1 PEP + 1 CO ₂ + 1 ADP
PYC12	1 ATP + 1 CO ₂ + 1 PYR \rightarrow 1 ADP + 1 OAC + 1 PI	PDA1	1 PYR + 1 CoA + 1 NADmit \rightarrow 1 CO ₂ + 1 AcCoAmit + 1 NADHmit
TKL21	1 X5P + 1 E4P \rightleftharpoons 1 F6P + 1 GA3P	Biomass	25 G6P + 6 PEP + 24 AcCoAcyt + 11 AKG + 3 R5P + 3 E4P + 254 ATP + 18 PYR + 3 AcCoAmit + 10 OAC + 6 P3G + 1 GA3P + 22 NADPHmit + 90 NADPHcyt + 6 NADmit + 16 NADcyt \rightarrow 254 ADP + 22 NADPmit + 16 NADHcyt + 6 NADHmit + 100 biom
ZWF1	1 G6P + 1 NADPcyt \rightleftharpoons 1 G15L + 1 NADPHcyt		
TPI1	1 GA3P \rightleftharpoons 1 DHAP		
GPD12	1 DHAP + 1 NADHcyt \rightarrow 1 G3P + 1 NADcyt		
HXK12	1 ATP + 1 GLC \rightarrow 1 G6P + 1 ADP		
GLK1	1 ATP + 1 GLC \rightarrow 1 G6P + 1 ADP		
SOL1234	1 G15L \rightarrow 1 P6G		

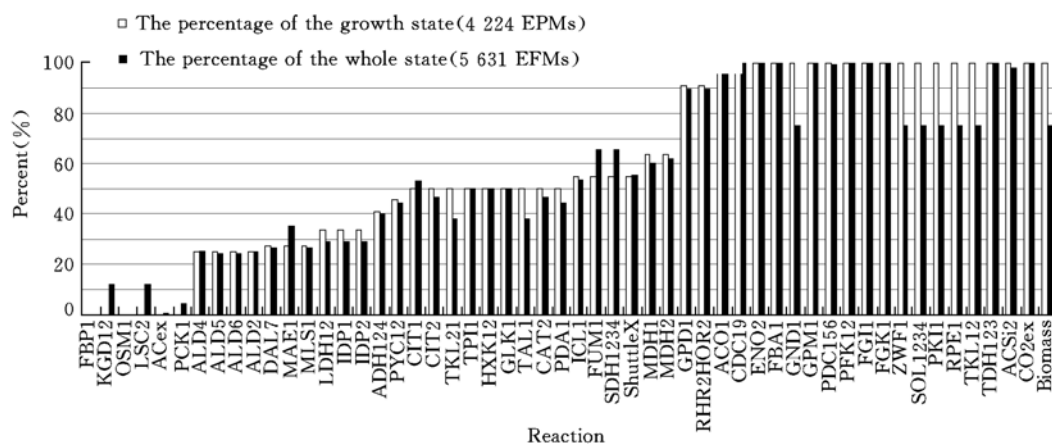


Fig. 1 Every reaction occupies the percentage of the EFM

验结果不同. PDC156 指 PDC1, PDC5, PDC6 分别由 3 段不同的 ORF 构成, 都能编码丙酮酸脱羧酶, 切除其中任意一段后, 生物体可以通过其它两部分生成丙酮酸脱羧酶, 因而细胞仍然能够生长. 而模型预测是同时敲除这 3 段 ORF 后, 细胞不能生长, 显示丙酮酸脱羧酶对于酵母细胞的重要性, 模型预测与实验结果并不矛盾. 对于 PFK12 编码磷酸果糖激酶也是同样道理. ZWF1 反应是磷酸葡萄糖转化成戊糖磷酸途径的第一步反应. 但中断 ZWF1 反应后, 生物体可以通过磷酸果糖转化来补偿戊糖磷酸途径. 对 ZWF1 这步反应预测的不准性与模型选取的合成物质前体物有关. 在生物体和合成代谢反应中, 涉及到很多蛋白质和脂的合成过程, 合成过程是相当复杂的, 有些细节尚不很清楚. 物体可能

选取多种路径, 生成生物质所需要的相同前体物, 但在模型中简化了生物质前体物, 导致了预测不准.

Table 2 Impact of gene on growth in *S. cerevisiae**

Gene	a b c	Gene	a b c	Gene	a b c	Gene	a b c	Gene	a b c
ACO1	- - -	FBP1	+ + +	IDP1	+ + +	PDC156	+ + -	ZWF1	+ + -
CIT1	+ + +	GND1	- + -	IDP2	+ + +	PFK12	+ + -	CDC19	- + -
CIT2	+ + +	GPM1	- + -	KGD12	+ + +	PGI1	- + -		
DAL7	+ + +	FBA1	- + -	MAE1	+ + +	PGK1	- + -		
ENO2	- + -	ICL1	+ + +	MDH1	+ + +	PYC12	+ + +		
FBA1	- + -	IDH12	+ + +	MLS1	+ + +	TKL21	+ + +		

* + : Growth, - : no growth. a. experimental results^[3]; b. FBA predicted results^[3]; c. EFM predicted results.

表 2 中同时比较了 EFM 和 FBA 预测结果, 由于 FBA 预测所用的是 733 个代谢物 × 1175 个反应的基因组范围代谢网络^[3]; 而本文所用的是 37 个平衡代谢物 × 54 个反应的中心碳代谢简化网络, 因此无可比性. 但从切除的基因部位位于中心碳代谢这个角度观察, 本文 EFM 所使用的代谢反应网络以外的那部分网络是对于 FBA 预测的约束条件. 则约束越多, 相应于预测生长条件越严格, 结果应该预测到更多不生长的情况. FBA 仅仅预测到少数几种不生长现象, 而使用 EFM 方法的预测结果与实验结果相符. 作为代谢网络研究的两个分支, EFM 和 FBA 各有利弊, 但比较预测基因切除后的代谢网络与其表观形式, EFM 预测效果比 FBA 好, 说明 EFM 能很好地关联基因型和表观形式.

参 考 文 献

- [1] HE Feng(何 锋), MA Hong-Wu(马红武), ZHAO Xue-Ming(赵学明) *et al.*. J. Chem. Ind. Eng. (化工学报) [J], 2004, **55**(10): 1593—1601
- [2] Kauffman K. J., Prakash P., Edwards J. S.. Curr. Opin. Biotech. [J], 2003, **14**: 491—496
- [3] Famili I., Forster J., Nielsen J. *et al.*. Proc. Natl. Acad. Sci. [J], 2003, **100**: 13134—13139
- [4] Forster J., Gombert A. K., Nielsen J.. Biotechnol. Bioeng. [J], 2002, **79**(7): 703—712
- [5] Klamt S., Stelling J., Ginkel M. *et al.*. Bioinformatics [J], 2003, **19**(2): 261—269
- [6] Klamt S., Stelling J.. Mol. Biol. Rep. [J], 2002, **29**(1/2): 233—236

Prediction of *Saccharomyces Cerevisiae* Growth Phenotypes Based on Elementary Flux Mode Analysis

JIANG Da¹, WANG Yong-Hua², LI Yan¹, ZHANG Shu-Wei¹, YANG Sheng-Li², YANG Ling^{2*}

(1. Department of Chemical Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116012, China;

2. Lab of Pharmaceutical Resource Discovery, Dalian Institute of Chemical Physics,

Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Abstract The purpose of this work is to illustrate the relationship between genotype and phenotype in the complex cellular network of *saccharomyces cerevisiae*. As a structure-oriented method, using elementary flux mode (EFM) analysis can obtain its popularity in analysis of the robustness of the central metabolism, as well as network function of some organisms. However, this method has not been widely used for modeling gene deletion phenotype. By enumerating all the metabolic pathways, the EFM analysis presented herein can be used to identify the functional features and predict the growth phenotype of the *S. cerevisiae*. In comparison with the flux balance analysis (FBA), the performance of EFM analysis was superior to FBA in prediction of gene deletion phenotype. EFM analysis is demonstrated to be an effective tool for bridging the gap between metabolic network and growth phenotype.

Keywords Prediction; Elementary flux mode; *Saccharomyces cerevisiae*; Growth phenotype

(Ed. : H, J, Z)