

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55(11):1458-1467; 4 November 2015
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20150059

定量监控大肠杆菌主代谢目标蛋白质及中间代谢物

程永波¹, 邓子新^{1,2}, 刘天罡^{1,2*}

¹组合生物合成与新药发现(武汉大学)教育部重点实验室, 武汉大学药学院, 湖北 武汉 430072

²湖北省合成微生物技术工程实验室, 武汉生物技术研究院, 湖北 武汉 430075

摘要:【目的】监控大肠杆菌(*Escherichia coli*)主代谢通路上蛋白表达状况及中间代谢物变化,为代谢工程改造提供基础性数据及检测方法。【方法】利用 Skyline 软件靶向设计主代谢(糖酵解途径、磷酸戊糖途径、三羧酸循环、混合酸发酵途径及脂肪酸合成途径)目标蛋白质 label-free (MRM)方法对其相对定量监控;在相同质谱平台(Triple Quad 4500)上利用 LC-MS/MS(MRM)方法对目标中间代谢物绝对定量监控。【结果】实验表明不同生长时期内(对数生长期、稳定期及衰亡期)大肠杆菌主代谢蛋白质表达表现出4种不同的变化现象,某一代谢通路上的单一蛋白不能反映该通路的表达状态;磷酸戊糖途径、混合酸发酵途径以及三羧酸循环途径中较多的蛋白质在衰亡期表达量最高,但几种目标中间代谢产物(ATP、ADP、AMP、NAD⁺、NADH、NADP⁺、NADPH、CoA、acetyl-CoA)的积累量与对数生长期相比,稳定期及衰亡期都相应减少(除了 acetyl-CoA 以外)。【结论】该文中使用的检测方法可以有效地反映大肠杆菌体内代谢的基本状况。

关键词:大肠杆菌(K12 MG1655),液质联用,代谢物,靶向蛋白组

中图分类号:Q935 **文章编号:**0001-6209(2015)11-1458-10

大肠杆菌(*Escherichia coli*)作为生物工程改造的模式生物,由于其遗传信息背景简单明确、生物改造方法简便成熟、生长周期短等众多优势,至今仍是代谢工程领域的重要改造出发菌株^[1-2]。伴随着代谢工程的不断发展,对生物分析的需求也不断加大^[3]。代谢工程领域已经不再仅仅满足于定性和定量某一种或一类通过生物改造得到的最终产物,而是对涉及目标化合物的整个代谢通路乃至整个代谢流的变化情况产生越来越大的需求,这些数据信息的获得将对更加理性的代谢工程改造具有重要的指导意义^[4]。

近几年来,伴随着分析及仪器的高速发展,

各种组学也越来越得到大家的关注和利用^[5]。这一过程中,基因组,蛋白组以及代谢组的分析检测产生了大量的实验数据,对我们所研究的对象来说,我们有了更深一步的认识和发现。而如何将这大量数据背后隐含的各种生物学意义与各种复杂的数据结合起来,也成为了制约组学发展的一个重要方面^[6]。

代谢工程领域对大肠杆菌生物分析的需求,也预示着我们需要将各种组学特别是蛋白组及代谢组的分析方法和手段应用于该领域当中,为指导下一步的生物遗传改造乃至指导工业化生产。对大肠杆菌的广泛长期的研究,积累了大量的生物学信息。

基金项目:国家自然科学基金(31222002,31170096)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-27-68755086; E-mail: liutg@whu.edu.cn

作者简介:程永波(1989-),男,山东海阳人,硕士研究生,主要从事蛋白质组学研究。E-mail: bobo.007001@163.com

收稿日期:2015-02-01; **修回日期:**2015-04-17

如图 1 所示, 大肠杆菌 K12MG1655 菌体中几种主代谢通路(如糖酵解途径、磷酸戊糖途径、三羧酸循环、混合酸发酵途径及脂肪酸合成途径等)的各种生物背景信息已经相当完备。包括这些途径的中间代谢产物及其辅因子, 代谢通路上涉及的相关蛋白质的氨基酸序列等信息已经可以支持我们靶向性的进行实验的设计。例如, 本文中, 对 K12 MG1655 几

种主代谢上的靶向蛋白质组学的研究也是基于此信息来进行设计和试验的^[7]。

本文通过 HPLC 及 LC-MS/MS 等分析技术充分挖掘大肠杆菌 K12 MG1655 生长过程中不同生长状态下的体内外目标代谢物积累量以及体内主代谢通路上靶向蛋白质的表达量等信息。整合这个数据信息, 初步探究大肠杆菌体内复杂的代谢过程。

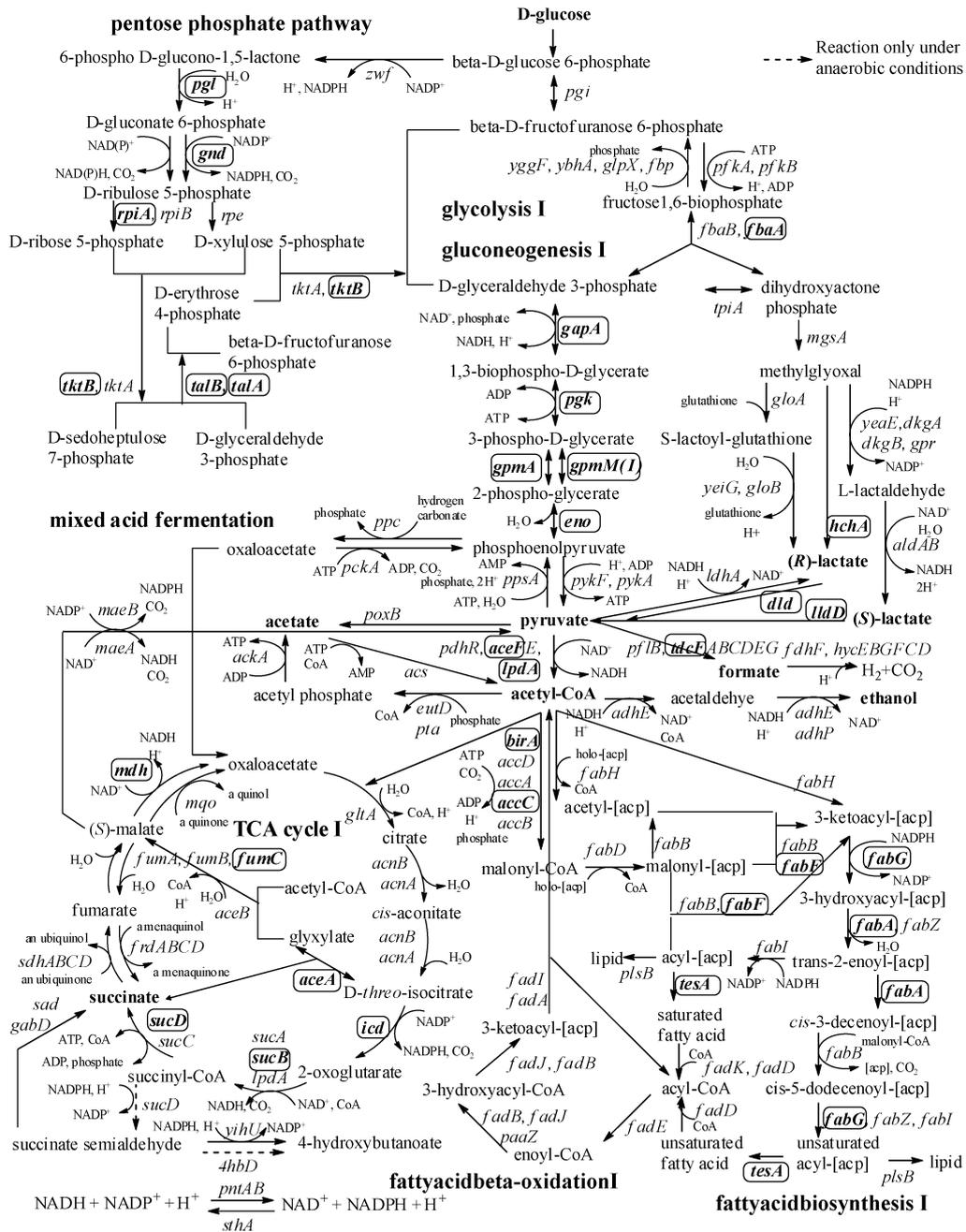


图 1. K12 MG1655 菌体内主代谢途径图

Figure 1. Primary metabolic pathways in K12 MG1655. Genes circled by the box were used for subsequent targeted proteomics monitoring.

1 材料和方法

1.1 菌株、仪器与试剂

E. coli K12 MG1655 菌株由本实验室保藏。所用的 Triple Quad 4500 (AB SCIEX, USA) 三重四级杆质谱仪器配备岛津超高速液相色谱仪 (UFLC LC-30AD)。高效液相色谱仪为 Ultimate3000 (ThermoFisher Scientific, USA), 配有紫外 (UV) 检测器及示差 (RI) 检测器。乙腈为色谱纯 (Sigma), ATP、ADP、AMP、NAD⁺、NADH、NADP⁺、NADPH、CoA、Acetyl-CoA 等中间代谢产物均购于 Sigma。Dibutylammonium acetate (DBAA) 来自 TCI Europe NV, Zwijndrecht-Belgium。

1.2 各种溶剂的配制

1.2.1 M9 培养基 (2% 葡萄糖) 配方: 将 10 g (NH₄)₂SO₄, 8.5 g KH₂PO₄, 1 g MgSO₄·7H₂O, 0.5 g 柠檬酸钠, 0.066 g CaCl₂ 溶于 873.5 mL 水中, 115 °C 灭菌 30 min。待灭菌完毕, 冷却后, 加入 4.5 mL 维生素溶液, 100 mL 20% 葡萄糖以及 10 mL 硫胺素 (Thiamine) 溶液, 用已灭菌的 5 mmol/L NaOH 溶液调节 pH 为 7, 最后加入 4.5 mL 微量金属混合液 (Trace Metal Mix)。维生素溶液由 0.42 g/L Riboavin, 5.4 g/L Pantothenic acid, 6 g/L Niacin, 1.4 g/L Pyridoxine, 0.06 g/L Biotin, 0.04 g/L Folic acid 组成, 该溶液使用过滤除菌。Trace Metal Mix 由 27 g/L FeCl₃·6H₂O, 2 g/L ZnCl₂, 2 g/L CaCl₂·2H₂O, 2 g/L Na₂MoO₄·2H₂O, 1.9 g/L CuSO₄·5H₂O, 0.5 g/L H₃BO₃, 100 mL/L 浓盐酸组成, 过滤除菌。Thiamine 溶液: 将 10 g Thiamine 溶于 1 L ddH₂O 中, 过滤除菌。

1.2.2 代谢组提取液及蛋白酶解试剂的配制: 代谢组提取液为甲醇水溶液 (体积比 2:1), 放置 -40 °C 冰箱中备用。蛋白酶解试剂是 100 mmol/L NH₄HCO₃ 溶液; 还原试剂是 100 mmol/L Tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) 溶液; 烷基化试剂是 200 mmol/L 碘乙酰胺 (IAA) 溶液。

1.3 样品制备及提取方法

1.3.1 混合酸发酵产物样品制备方法: 取 1 mL 菌液, 高速离心 (8000 × g, 离心 2 min), 取上清过 0.22 μm 的滤膜后, 用于 HPLC 测葡萄糖及各类酸等副产物, 剩余菌体用去离子水重悬后测 OD 值。

1.3.2 代谢组样品制备及提取方法: 依据预实

验中 OD 值来收集不同生长阶段的菌体, 菌体总量为 35 OD。取相应体积的菌液于 50 mL 离心管中, 在 4 °C 下以 8000 × g 离心 5 min, 收集菌体以及上清液, 置于 -80 °C 冰箱中备用。将该菌体从 -80 °C 冰箱中取出置于冰上解冻, 重悬菌体转移至 2 mL 离心管中, 向菌体中加入 600 μL 提取液, 加入 0.5 mm (2-3 颗) 玻璃珠振荡 1.5 min (仪器: 全自动样品快速研磨仪, Tissuelyser-48, 上海净信科技), 超声破碎 10 min 后, 4 °C 下离心 (8000 × g, 10 min) 取上清液 550 μL, 残渣使用上述方法重复提取 2 次后, 合并 3 次上清液。在真空下旋转蒸发, 除去有机溶剂。将该水溶液置于 -80 °C 冰箱预冻后放真空干燥机中冻干成粉末, 用流动相 A 相重溶后待上样。

1.3.3 质谱蛋白组样品制备、提取及测蛋白浓度方法: 提取蛋白组样品方法: 将菌体从 -80 °C 冰箱中取出置于冰上融化, 振荡重悬后, 加入 1 mL 水于该 15 mL 离心管中重悬, 转移到 2 mL 离心管中, 8000 × g (4 °C) 离心 5 min, 弃上清后, 用氯仿/甲醇沉淀的方法进行蛋白提取。具体步骤如下: 将细胞移至离心管中, 加入 400 μL 纯甲醇后, 剧烈振荡; 加入 100 μL 的氯仿, 剧烈振荡; 加入 300 μL 的纯水, 剧烈振荡后, 以台式离心机最大转速离心 1 min, 分层后, 将上层的甲醇层轻轻倒掉, 再加入 300 μL 的甲醇, 剧烈振荡, 室温下离心 (上述条件) 2 min, 移去甲醇和氯仿层。将剩下的蛋白颗粒冷冻干燥 30 min, 保存在 -80 °C 冰箱中。测蛋白浓度的方法: Bio-Rad Protein Assay 详细方法见参考文献 [8]。

1.4 蛋白酶解实验及脱盐处理

1.4.1 蛋白酶解方法: 将蛋白样品从 -80 °C 冰箱中取出, 室温彻底融解后, 混匀, 取 100 μg 蛋白样品于离心管中, 加入 0.2 μg/μL BSA 溶液 5 μL 作为内标, 混匀后, 加入 100 mmol/L NH₄HCO₃ 溶液使体系体积为 200 μL; 加入 10 μL 浓度为 100 mmol/L 的 TCEP 溶液, 混匀, 30 °C 反应 1 h; 加入 10 μL 浓度为 200 mmol/L IAA 溶液, 混匀, 30 °C 避光反应 30 min; 将胰蛋白酶用重悬缓冲液复溶, 使其终浓度为 0.2 μg/μL, 按胰蛋白酶与样品蛋白 1:20 的比例加入 0.2 μg/μL 的胰蛋白酶, 37 °C 反应 12-16 h; 将酶解后的蛋白样品用真空离心浓缩仪旋干, 置于 -40 °C 备用待脱盐处理。

1.4.2 脱盐处理:使用 Ziptip C18 微量层析柱(5 μg 柱容量)脱盐,具体过程如下:准备润湿液(50% 乙腈)、平衡液(0.1% 三氟乙酸)、冲洗液(0.1% 三氟乙酸/5% 甲醇)、洗脱液(0.1% 三氟乙酸/50% 乙腈);将旋干后的样品用平衡液溶解(终浓度为 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$),涡旋振荡重悬蛋白;Ziptip C18 微量层析柱,先用润湿液反复润湿层析柱 7-10 次;再用平衡液通过反复吹吸 7-10 次平衡层析柱;吸取样品 10 μL ,反复吹吸数次使多肽充分与层析柱结合;上样后,用冲洗液慢慢冲洗 7-10 次脱盐;最后用 10 μL 洗脱液洗脱多肽至干净的离心管中;将洗脱下来的多肽用真空离心浓缩仪旋干,置 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中,备用。上机前用 A 相 100 μL 复溶样品(上样量 20 μL),涡旋混匀后,取上清至带内衬管的样品瓶中,备用。

1.5 混合酸发酵产物定量方法

Ultimate3000(ThermoFisher Scientific, USA),配有紫外(UV)检测器及示差折光(RI)检测器,紫外检测波长为 210 nm。色谱柱为 Amidex[®] HPX-87 Ion Exclusion Column(300 mm \times 7.8 mm, Bio-Rad, USA),流动相为 5 mmol/L 硫酸水溶液,等度洗脱 35 min。流速为 0.5 mL/min。样品进样量为 20 μL 。

1.6 LC-MS/MS 代谢物定量实验

超高速液相为岛津公司 UFLC LC-30AD,质谱仪器为:Triple Quad 4500(AB SCIEX)。UFLC 条件:流动相 A 相:2 mmol/L DBAA 于水中,加入 5% (V/V)的乙腈。流动相 B 相:2 mmol/L DBAA 于水中,加入 84% 乙腈。流动相梯度:0-2 min,维持 2% 的 B 相;2-10 min, B 相由 2% 线性增加到 100% B 相;10-20 min,维持 100% B 相 10 min;20-21 min, B 相由 100% 降低到 2%;21-30 min,维持 2% B 相 10 min。色谱柱为 Shim-pack XR-ODSIII(SHIMADZU),流速为 0.2 mL/min,柱温箱温度设定为 $45\text{ }^\circ\text{C}$ 。进样体积 10 μL ,自动进样器温度为 $10\text{ }^\circ\text{C}$ 。离子源参数如下:CUR:10.0, CAD:8, IS: -3000, TEM:350, Gas1:60, Gas2:60, DP: -130, EP: -10, CXP: -13。Detector CEM:1900。质谱方法使用 MRM,其离子对及其碰撞能量参数如表 1。利用蠕动泵进样(流速:7 $\mu\text{L}/\text{min}$)的方式,对每一种代谢产物标准品在质谱 Triple Quad 4500 进行子离子选择及碰撞能量优化。

1.7 LC-MS/MS 靶向蛋白组定量实验

利用 Skyline 2.5.0.6157 (University of

Washington, USA) 软件设计大肠杆菌体内主代谢(包括:糖酵解途径,磷酸戊糖途径,三羧酸循环,混合酸发酵途径及脂肪酸代谢途径等)涉及的几个表达量较高的蛋白质 label-free 方法所需的母子对^[9],如表 2 所示。具体方法如下:在 Uniprot 网站(<http://www.uniprot.org/>)中得到如图 1 所示的 K12MG1655 主代谢涉及的绝大多数的蛋白氨基酸序列,将其导入 Skyline 软件中。将来自 Global Proteome Machine (GPM) 数据库(<http://www.thegpm.org/index.html>)以及我们实验室对大肠杆菌蛋白质鉴定实验得到的 5600Q-TOF 数据导入 Skyline 中作为谱图数据库来帮助选择目标蛋白的多肽序列。每个蛋白选择 3-4 个多肽,每个多肽选择 3-4 个离子对。多肽的选择基本为 8-20 个氨基酸数量,带两个电荷。离子对的选择尽可能选择已有的谱图中强度较高的子离子。

表 1. 中间代谢产物 MRM 参数

Table 1. MRM parameters of intermediate metabolites

Intermediate metabolites	Parent ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision energy (V)
AMP	345.8	210.5	-24
ADP	426.0	133.6	-33
ATP	506.0	158.4	-34
NAD ⁺	662.0	540.0	-28
NADH	664.1	408.0	-42
NADP ⁺	742.0	620.0	-25
NADPH	744.1	408.0	-45
CoA	766.0	686.1	-47
Acetyl-CoA	808.1	728.1	-50

将该系列导出后,用普通的 MRM 方法进行预实验,得到保留时间参数后,将该质谱方法变为 Scheduled MRM,详细的方法见文献[10]。色谱方法为:超高速液相为岛津公司 UFLC LC-30AD,质谱仪器为:Triple Quad 4500(AB SCIEX)。UFLC 条件:流动相 A 相:水中加入 0.1% (V/V)的甲酸。流动相 B 相:乙腈中加入 0.1% (V/V)的甲酸。流动相梯度:0-2 min,维持 2% 的 B 相;2-30 min, B 相由 2% 线性增加到 65% B 相;30-31 min, B 相由 65% 降低到 2%;31-40 min,维持 2% B 相 9 min。色谱柱为 Shim-pack XR-ODSIII(SHIMADZU),流速为 0.2 mL/min,柱温箱温度设定为 $45\text{ }^\circ\text{C}$ 。进样体积 10 μL ,自动进样器温度为 $10\text{ }^\circ\text{C}$ 。

数据处理过程:将多肽的峰面积与内标蛋白 BSA(牛血清蛋白)峰面积之比,作为该多肽的相对含量,比较不同样品之间同一个蛋白的相对含量变化。

表 2. 主代谢途径蛋白质相对定量选用的肽段母子对

Table 2. Selected peptide transitions of proteins in primary metabolic pathways for relative quantitative

Pathways	Protein names	Peptides	Parent ion (<i>m/z</i>)	Product ions (1)	
Glycolytic Pathway (EMP)	FbaA	LLPWIDGLLDAGEK	770.42	y12, y10, y9	
		DSVSYGVVK	477.25	y7, y6, y5	
		ANEAYLQGLGNPK	751.88	y10, y9, y7	
	GapA	GASQNIHPSSTGAAK	701.37	y9, y8, b2	
		VTPNVSVVDLTVR	748.43	y12, y11, y8	
		AGIALNDNFVK	581.32	y8, y7, y6	
	Pkg	SLYEADLVDEAK	676.83	y10, y8, y7	
		VATEFSETAPATLK	732.88	y9, y7, y5	
		VLPVAVAMLEER	614.34	y9, y7, y6	
	GpmA	FTGWYDVDLSEK	730.34	y8, y7, y6	
		GFAVTPPELTK	580.32	y7, y6, b3	
		YYLGNADDEIAAK	664.33	y10, y9, y8	
	GpmM(1)	AFFANPVLGTGAVDK	725.39	y10, y9, b3	
		AFVNADFDFGAR	665.31	y8, y7, y6	
		VATYDLQPEMSSAELTEK	1006.48	y13, y11, b7	
	Eno	IMIDLGTENK	624.81	y9, y8, y7	
		IQLVGDDLFVTNTK	781.92	y12, y11, y10	
		SGETEDATIADLAVGTAAGQIK	1059.53	y14, y13, y8	
	Pentose Phosphate Pathway (PPP)	Pgl	WAADIIHITPDGR	676.34	y7, y6, y5
			EGFQPTETQPR	645.31	y7, y4, y2
YAVGQQPMWVVVNAH			814.41	y5, y3, b2	
Gnd		NLALNIESR	515.29	y7, y5, b2	
		EFVESLETPR	603.8	y7, y6, y4	
		EAYELVAPILTK	673.88	y7, y6, y5	
RpiA		GQIEGAVSSDASTEK	783.37	y12, y10, y9	
		FPLPVEVIMAR	684.89	y9, y7, y4	
		GADVVALIGTPDGVK	656.86	y9, y8, y7	
TktB		EAILEAQSVK	544.3	y7, y6, y5	
		VVSLPSTDIFDAQDEEYR	1042.49	y10, y9, y8	
		GAIVGMTGYGESAPADK	812.39	y10, y4, b13	
TalA		EGINCNLTLFSAQAR	977.5	y9, y8, y7	
		ACAEAGVFLISPFVGR	847.44	y9, y7, y6	
		TEQILALTGCDR	688.85	y8, y5, y4	
TalB		QYTTVVADTGDIAAMK	842.42	y14, y11, y10	
		EYAPAEDPGVVSVEIYQYYK	1204.07	y11, y10, y5	
		NIGEILELAGCDR	730.36	y11, y8, y7	
Mixed Acid Fermentation (MAF)		TdcF	MTVFITDLNDFATINEVYK	1117.56	y11, y10, y9
			QFFDEHQATYPTR	547.25	y6, y5, y3
	LEIEAIAVR		507.3	y7, y6, y5	
	HycE	VEVDANKPEYPSVTPR	600.98	y6, y5, b2	
		DMYGLIPVGLPDER	787.9	y6, y4, b5	
		GDDIHWSMTGDNQK	802.34	y9, y7, b6	
	HchA	ILVIAADER	500.3	y7, y6, y5	
		FEYWAMPHK	604.78	y7, y5, y3	
		MGMNIHDDITGR	725.34	y9, y8, y7	
	AceF	VPDIGADEVEITEILVK	920.5	y13, y12, y11	
		DVNVDPDGSDEVEVTEILVK	1085.56	y13, y8, b3	
		FGEIEEVELGR	639.32	y8, y7, y5	
	Dld	AFLNELAR	467.26	y6, y3, b2	
		DVVIISTLR	508.31	y7, y6, y5	
		EQMLELLQQR	644.34	y7, y6, y5	
	LldD	NMSDLSLETTLFNEK	871.42	y8, y7, y4	
		DFWDGPMVIK	604.29	y7, y6, b8	
		GILDPEDAR	493.25	y7, y6, y5 (待续)	

续表 2

Pathways	Protein names	Peptides	Parent ion (<i>m/z</i>)	Product ions (1)
Tricarboxylic Acid Cycle (TCA)	Icd	STQVYQGQDVWLPAAETLDIR	1152.6	y11, y10, y9
		GPLTTPVGGGIR	562.82	y10, y9, y7
		HPELTDMVIFR	679.35	y10, y8, y7
	SucB	QQASLEEQNNDALSPAIR	992.49	y12, y5, y4
		ESAPAAAAAPAAQPALAAR	817.44	y12, y11, y10
		GLVTPVLR	427.78	y6, y5, y4
	SucD	DSILEAIDAGIK	622.84	y9, y7, y6
		FAALEAAGVK	488.78	y8, y7, y6
		SLADIGEALK	508.78	y8, y7, y6
	FumC	DSMGVIDVPADK	609.79	y7, y6, b8
		MPTSLIHALALTK	698.41	y10, y7, y6
		ASELLGGVR	451.26	y4, y3, b5
	Mdh	SDFNVNAGIVK	638.85	y9, y8, y6
		SNTFVAELK	504.77	y6, y5, y4
		IQNAGTEVVEAK	629.84	y10, y8, b2
	AceA	GSVNPECTLAQLGAAK	808.41	y12, y10, y7
		TIASFQQQLSDMGYK	858.92	y9, y7, y6
		INAEDPNTFLPSPGK	800.4	y13, y10, y5
Fatty Acid Synthesis Pathway (FAB)	AccC	NALQELIIDGIK	663.89	y10, y8, y7
		TNVDLQIR	479.77	y5, y4, y3
		GLMLNVTDPASIESVLEK	958.51	y12, y10, b6
	FabG	AEFGEVDILVNNAGITR	909.47	y9, y8, y7
		AGILAQVPAGR	526.81	y7, y6, y4
		FTGQVLPTAK	531.3	y8, y6, y4
	FabA	LIMGLADGEVLVDGR	779.42	y10, y9, y8
		VGLFQDTSAF	542.77	y2, y1, b9
		TSVVNASISGDTSSQQGLAR	945.98	y13, y12, y11
	TsaA	YNEAFSAIYPK	651.82	y7, y6, y3
		QLQPLVNHDS	575.8	y7, y5, y4
		DWGVDVFTVPGK	660.34	y8, y3, b9
BirA	NTLAAMLIR	501.79	y6, y5, y4	
	AALELFEQEGLAPYLSR	954	y8, y6, b12	
	DFNCEDIISR	634.78	y8, y7, y6	
FabF	ASTPLGVGGFGAAR	630.84	y11, y9, y8	
	DGFVLGDGAGMLVLEEYEHAK	1125.54	y12, y9, y8	
Internal standard(2)	BSA	AEFVEVTK	461.75	y6, y5, y4
		VPQVSTPTLVEVSR	756.43	y11, y10, y8
		QTALVELLK	507.81	y7, y6, y5

(1) Product ions: b/y ions formed by collision - induced dissociation (CID); (2) Each samples were added internal standard (IS) used in data processing.

2 结果

2.1 不同培养时间胞外代谢物产量变化

大肠杆菌 K12 MG1655 在 M9 培养基中不同时间混合酸发酵的变化情况如图 2 所示, 依据 OD 值的变化, 该菌在 10 h 左右开始进入对数生长期, 12 h 左右为对数生长期, 48 h 左右进入稳定期, 120 h 后

逐渐进入衰亡期。

随着培养时间的延长, 摇瓶中的葡萄糖剩余量不断减少; 乙酸的积累随着菌体量的增加快速提高, 进入稳定期后维持较高的水平, 并未被菌体利用; 乳酸在对数生长期前期迅速积累, 进入对数生长后期又迅速被菌体利用; 甲酸及乙醇在对数生长后期积累较多, 随着菌体进入稳定期, 逐渐被菌体吸收利用; 琥珀酸的产量变化不明显, 在稳定期内积累量较多。

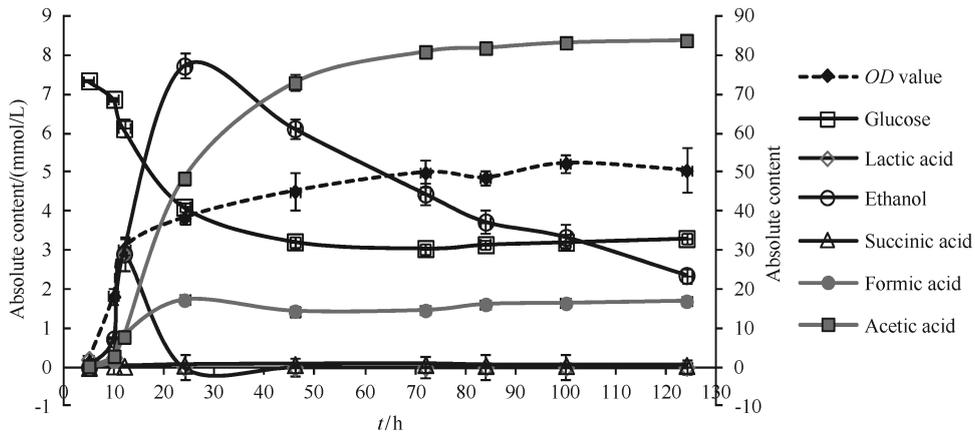


图 2. 不同生长时间胞外代谢物积累量

Figure 2. Extracellular metabolites changes of different growth time. The concentration of formic acid and acetic acid use the secondary axis (gray color), others use the main axis (black color). The dotted line indicate the change trend of OD value (do not indicate the accurate value).

2.2 不同生长状态下菌体内中间代谢产物积累变化

分别取培养时间 12 h (对数生长期), 46 h (稳定期) 及 124 h (衰亡期) 的菌体, 用 LC-MS/MS (MRM) 对其体内的 acetyl-CoA、CoA、ATP、ADP、AMP、NADPH、NADP⁺、NADH 及 NAD⁺ 定量监控。结果显示 (图 3), 整体上中间代谢产物的积累量在稳定期及衰亡期都相应减少 (除了 acetyl-CoA 以外), 特别是衰亡期, 体内以上代谢产物积累量很少, 这可能造成细胞不再生长的原因之一。Acetyl-CoA 在稳定期内积累相比于对数生长期数量明显提高, 从能量代谢上来看, 稳定期的 energy charge 比对数生长期也有一定的提高。衰亡期的 energy charge 明显下降, 表明其体内能量代谢过程已经明显降低。

2.3 不同生长状态下菌体主代谢目标蛋白质表达量变化

不同生长状态下菌体主代谢通路蛋白表达量变化^[11], 如表 3 所示。糖酵解途径中, 6 种目标蛋白表达量变化表现出不同的现象: FbaA 蛋白随着菌体生长时间的延长, 其表达量逐渐升高, 在衰亡期表达量最高 (现象 1); GapA 蛋白与之正好相反, 随着菌体生长时间的延长, 其表达量逐渐降低, 在对数生长期表达量最高 (现象 2); Eno 蛋白在对数生长期表达量较高, 进入稳定期后, 表达量进一步提高, 而进入衰亡期后, 表达量明显减低低于对数生长期的表

达量 (现象 3); 而 GpmA、Pgk 及 GpmM (I) 蛋白在对数生长期表达量较低, 进入稳定期后, 表达量达到最高, 后进入衰亡期表达量降低但表达量仍高于对数生长期 (现象 4)。其他四条主代谢途径上的蛋白表达也可以归于以上 4 种现象。可见: 对于某一主代谢通路上的蛋白质来说, 表现出不同的变化, 不能用单一的某一蛋白来概括该代谢通路的整体代谢状态。

靶向蛋白组数据结合图 1 主代谢通路图, 可见: 在对数生长期, 菌体某些蛋白的表达量较高, 例如: 糖酵解途径的 GapA 蛋白, 而大部分的蛋白表达量低于稳定生长期。这可能与对数生长期细胞适应新的富营养环境后, 以增加其细胞数量为主要代谢过程有关。在稳定期, 菌体大部分的蛋白表达量最高, 菌体内的代谢过程最为活跃。而处于衰亡期, 菌体内并没有表现出大部分的蛋白表达量降低的现象, 相反, 有些蛋白的表达量达到最高, 例如: 糖酵解途径的 FbaA 蛋白, 磷酸戊糖途径的 Pgl、Gnd、TalA、TalB 蛋白, 混合酸发酵途径的 TdcF、AceF、LpdA 蛋白, 三羧酸循环途径的 SucB、SucD、Mdh、AceA 蛋白以及脂肪酸合成途径的 BirA、FabF 蛋白等。可以发现, 磷酸戊糖途径、混合酸发酵途径以及三羧酸循环途径中的较多的蛋白在衰亡期表达量很高, 但由于中间代谢产物在衰亡期体内积累量已经很低, 尽管蛋白质表达量较高, 菌体仍不能提高最终产物及副产物的量。

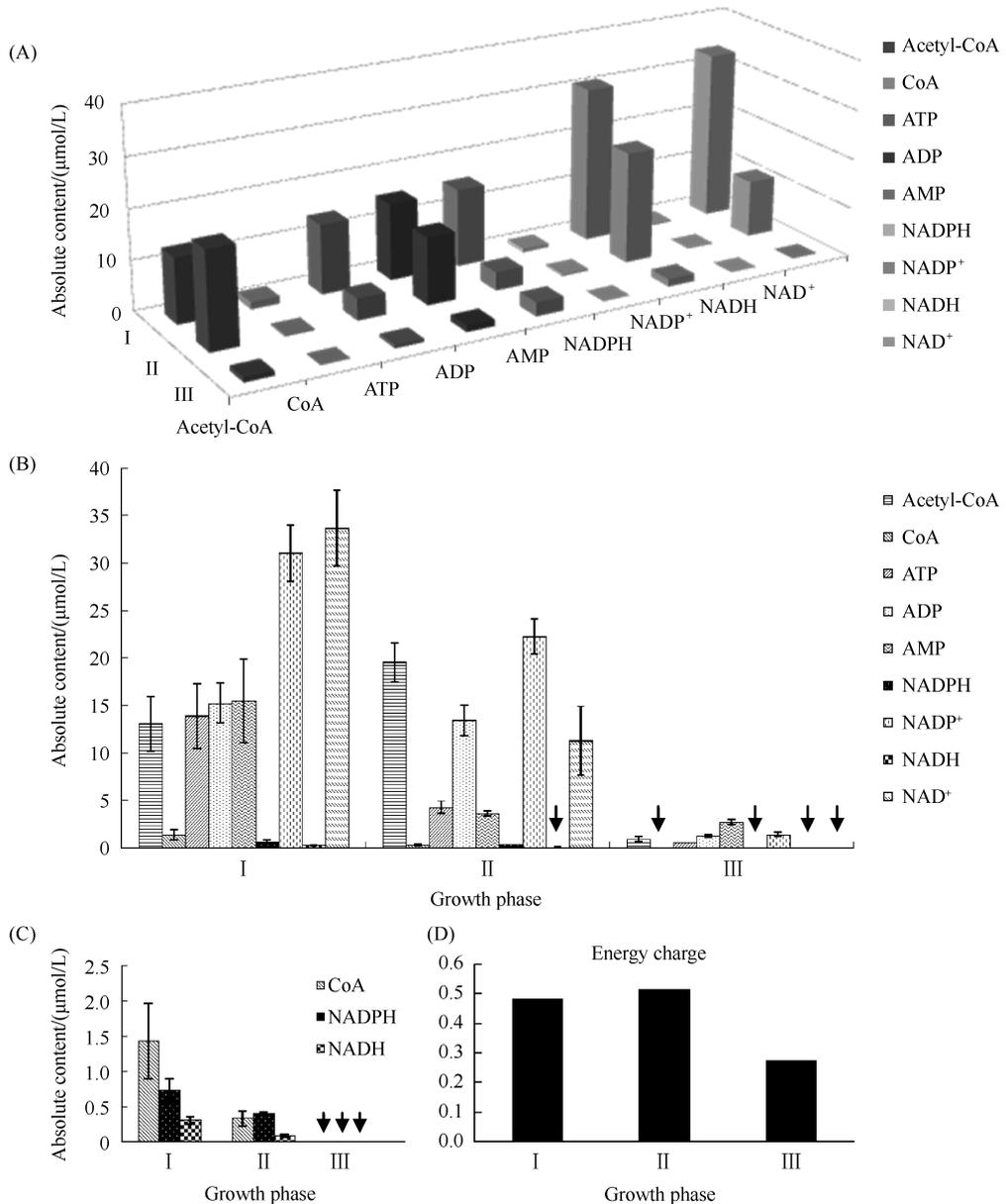


图 3. 不同生长状态下(I:对数生长期;II:稳定期;III:衰亡期) 菌体内中间代谢物积累量

Figure 3. Intermediate metabolites changes of different growth time (I: Exponential phase; II: Stationary phase; III: Decline phase). A, B: Two different kinds of data forms produced in the same data. The downward black arrows in B and C indicate the concentration is lower than the minimum detection limit. C: Indicate the concentration of CoA, NADPH and NADH. D: Energy charge = $([ATP] + 1/2 [ADP]) / ([ATP] + [ADP] + [AMP])$.

3 讨论

本文中,对大肠杆菌 K12 MG1655 不同生长状态下,对胞外代谢产物的利用 HPLC (UV 及 RI 检测器) 定量检测,得到大肠杆菌混合酸发酵的基本信息,在分析几种不同产物含量变化的基础上,选定代表不同生长状态意义(对数生长期、稳定期及衰亡期)的时间点,进行深一步的代谢物及靶向蛋白组

研究。利用 LC-MS/MS (MRM) 方法对大肠杆菌 3 种不同生长状态下的关键中间代谢产物及其辅因子(能量因子:ATP,ADP,AMP;还原力:NAD⁺,NADH,NADP⁺,NADPH 等)进行定量检测,从侧面反映菌体的生长状态。利用 LC-MS/MS 方法以及 Skyline 软件设计和试验靶向蛋白质组学,对 5 种主代谢通路上的关键蛋白质表达水平进行相对定量监控,与代谢物的信息相互印证以更好的反映菌体在 3 种不同生长状态下的体内状况。

表 3. 不同生长状态下(I:对数生长期;II:稳定期;III:衰亡期)菌体主代谢通路蛋白表达量变化

Table 3. Proteins expression changes of different growth time (I: Exponential phase; II: Stationary phase; III: Decline phase) in primary metabolic pathways

Growth time	Pathway/Proteins	FbaA	GapA	Pgk	GpmA	GpmM(I)	Eno
I		6.5 ± 1.1	933.5 ± 42.0	13.4 ± 0.3	63.1 ± 5.6	3.7 ± 0.1	90.7 ± 2.8
II	Glycolytic Pathway	42.4 ± 1.7	635.8 ± 79.1	27.2 ± 2.6	191.5 ± 26.8	16.6 ± 0.5	391.8 ± 89.8
III		502.4 ± 77.9	179.3 ± 58.5	25.6 ± 8.3	150.5 ± 15.0	7.5 ± 2.0	23.1 ± 1.6
	Pathway/Proteins	Pgl	Gnd	RpiA	TktB	TalA	TalB
I		7.6 ± 1.1	7.7 ± 0.5	26.2 ± 2.6	1.4 ± 0.1	4.3 ± 0.5	3.4 ± 0.5
II	Pentose Phosphate Pathway	88.1 ± 3.8	35.8 ± 2.2	151.2 ± 15.8	4.5 ± 0.2	12.5 ± 4.9	26.9 ± 6.9
III		237.5 ± 29.1	124.4 ± 22.7	76.9 ± 15.6	4.3 ± 0.1	26.9 ± 2.5	68.9 ± 10.1
	Pathway/Proteins	TdcF	HchA	AceF	LpdA	Dld	LldD
I		898.4 ± 97.8	49.1 ± 8.8	6.6 ± 0.7	1.7 ± 0.2	60.4 ± 8.5	16.4 ± 1.9
II	Mixed Acid Fermentation	2594.3 ± 425.9	53.8 ± 2.8	16.2 ± 0.3	7.7 ± 1.3	359.4 ± 13.6	66.0 ± 13.5
III		3233.2 ± 321.7	33.5 ± 5.5	30.7 ± 4.8	36.2 ± 6.3	46.6 ± 10.4	49.1 ± 12.7
	Pathway/Proteins	Icd	SucB	SucD	FumC	Mdh	AceA
I		5.3 ± 1.5	7.4 ± 0.3	38.3 ± 7.4	27.3 ± 5.8	25.7 ± 6.1	4.3 ± 0.6
II	Tricarboxylic Acid Cycle	54.4 ± 3.3	27.2 ± 3.9	69.2 ± 2.6	223.0 ± 66.4	52.0 ± 13.1	4.7 ± 0.4
III		29.7 ± 4.5	32.7 ± 2.0	151.3 ± 16.5	42.0 ± 10.9	100.9 ± 11.6	11.1 ± 0.6
	Pathway/Proteins	BirA	AccC	FabG	FabA	FabF	TesA
I		7.2 ± 1.4	30.7 ± 6.8	106.2 ± 14.0	34.5 ± 4.6	6.7 ± 0.2	8.8 ± 0.9
II	Fatty Acid Synthesis Pathway	19.6 ± 0.8	51.2 ± 3.9	276.4 ± 40.3	90.4 ± 3.7	13.2 ± 1.4	25.8 ± 1.2
III		27.0 ± 2.2	47.3 ± 7.3	236.2 ± 43.1	31.9 ± 5.2	14.9 ± 0.3	8.5 ± 0.5

Data present the relative protein concentration (normalized average peak area/corresponding protein molecular weight × 1000) ± SD of three replicate.

菌体从对数生长期到稳定期, energy charge 有一定的增加, 表明体内利用能量的效率以及代谢水平都有所提高。同时, 5 种主代谢通路上的几乎全部目标蛋白表达量都有不同程度的提高。只有糖酵解途径的 GapA 蛋白表达量约下降 30%, 可能与体内 NAD⁺ 含量变化有关。从中间代谢产物含量来看, 从对数期到稳定期, NAD⁺ 的含量约下降 50%。而 acetyl-CoA 在稳定期内积累相比于对数生长期数量明显提高, 从蛋白组的数据来看, 生成 acetyl-CoA 的代谢通路上的 FbaA、Pgk、GpmA、GpmM(I)、Eno、AceF 及 LpdA 蛋白表达量都有所增加, 可能是导致 acetyl-CoA 积累量增加的原因。而该实验结果中, 衰亡期表现出来的部分蛋白表达量提高的现象, 对于我们理解菌体内蛋白表达情况有了更深一步的认识。处于衰亡期的菌体体内的蛋白表达水平并不会随着菌体代谢水平的降低而全面的下降。从中间代谢产物的积累上来看, 处于衰亡期的菌体体内的几种目标中间代谢产物的积累量都很低, 这可能是造成机体代谢水平明显下降的原因, 即便部分蛋白表达量很高, 也不能造成菌体终产物或副产物量的增加。总之, 通过同时监控体内蛋白质表达水平及目标代谢物的积累变化, 可以更好地理解菌体体内的代谢过程及状态。

本文使用的一系列分析检测方法, 具有较好的通用性, 特别是对于靶向蛋白组的方法设计可以在其他大肠杆菌中适用。对于以大肠杆菌 K12 MG1655 为改造出发菌进行代谢工程改造的研究课题, 可以使用该文中使用的方法进行定量检测, 从而获得更多的基础性数据, 以满足代谢工程的要求, 这种对生物改造菌进行较为深入系统的研究过程和思路, 可以更好地指导下一步的遗传信息改造工作。

参考文献

- [1] Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 1997, 277(5331): 1453-1462.
- [2] Lee SY. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*, 1996, 14(3): 98-105.
- [3] Patil KR, Åkesson M, Nielsen J. Use of genome-scale microbial models for metabolic engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 2004, 15(1): 64-69.
- [4] Geiselmann J. Systems biology and metabolic engineering in bacteria//Geiselmann J. Systems Biology of Metabolic and Signaling Networks. Berlin Heidelberg: Springer,

2014; 351-367.

- [5] Teitzel G. Harnessing the power of omics in microbiology. *Trends in Microbiology*, 2014, 22(5) : 227-228.
- [6] Pálsson B. *In silico* biology through “omics”. *Nature Biotechnology*, 2002, 20(7) : 649-650.
- [7] Redding-Johanson AM, Bathth TS, Chan R, Krupa R, Szmidi HL, Adams PD, Keasling JD, Lee TS, Mukhopadhyay A, Petzold CJ. Targeted proteomics for metabolic pathway optimization: application to terpene production. *Metabolic Engineering*, 2011, 13(2) : 194-203.
- [8] Peterson GL. Determination of total protein. *Methods in Enzymology*, 1983, 91 : 95-119.
- [9] MacLean B, Tomazela DM, Shulman N, Chambers M,

Finney GL, Frewen B, Kern R, Tabb DL, Liebler DC, MacCoss MJ. Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics*, 2010, 26(7) : 966-968.

- [10] Lange V, Picotti P, Domon B, Aebersold R. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Molecular Systems Biology*, 2008, 4(1), doi: 10.1038/msb.2008.61.
- [11] Zhu FY, Zhong XF, Hu MZ, Lu L, Deng ZX, Liu TG. *In vitro* reconstitution of mevalonate pathway and targeted engineering of farnesene overproduction in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2014, 111(7) : 1396-1405.

Quantitative monitoring targeted proteins and intermediate metabolites in *Escherichia coli* primary metabolic pathways

Yongbo Cheng¹, Zixin Deng^{1,2}, Tiangang Liu^{1,2*}

¹Key Laboratory of Combinatorial Biosynthesis and Drug Discovery (Wuhan University), Ministry of Education, and Wuhan University School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan 430072, Hubei Province, China

²Hubei Engineering Laboratory for Synthetic Microbiology, Wuhan Institute of Biotechnology, Wuhan 430075, Hubei Province, China

Abstract: [**Objective**] This study aimed to monitor targeted protein expression levels and changes in intermediate metabolites in the primary metabolic pathways of *Escherichia coli* to obtain basic data and to develop testing methods that can be used in metabolic engineering. [**Methods**] We used the Skyline software to design a label-free method (multiple reaction monitoring) for relative quantitative monitoring of proteins from primary metabolic pathways (i. e., glycolytic pathway, pentose phosphate pathway, mixed acid fermentation, tricarboxylic acid cycle, and fatty acid synthesis pathway). We used the same mass spectrometry platform (Triple Quad 4500) for liquid chromatography-tandem mass spectrometry (multiple reaction monitoring) analysis of targeted intermediate metabolites during absolute quantitative monitoring. [**Results**] Protein expression in the primary metabolic pathways of *E. coli* showed four different phenomena in the different growth periods (exponential phase, stationary phase, and decline phase). Expression levels of a single protein cannot provide accurate information regarding the status of these pathways. More proteins in the pentose phosphate pathway, mixed acid fermentation, and the tricarboxylic acid cycle showed the highest expression in the decline phase, but accumulation of several targeted intermediate metabolites (ATP, ADP, AMP, NAD⁺, NADH, NADP⁺, NADPH, CoA, and acetyl-CoA) in the stationary phase and decline phase correspondingly decreased compared to the levels in the exponential phase (in addition to acetyl-CoA). [**Conclusion**] The detection methods used in this study can help determine the basic conditions of *E. coli* metabolism *in vivo*.

Keywords: *Escherichia coli* (K12 MG1655), LC-MS/MS, metabolites, targeted proteomics

(本文责编:李磊,王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31222002,31170096)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-27-68755086; E-mail: liutg@whu.edu.cn

Received:1 February 2015/Revised: 17 April 2015