

干扰素基因工程菌产物表达数学模型的研究

徐京宁 李凡超 王二力 唐孝宣 俞俊棠

(华东理工大学生物化学工程研究所 上海 200237)

刘新垣

(中国科学院上海生物化学研究所 上海 200054)

摘要 根据阻遏蛋白,辅阻遏因子与启动基因之间的相互作用,建立了采用色氨酸启动子的基因工程重组微生物的产物表达数学模型。提出了 mRNA 最大转录速率常数和产物表达速率常数与比生长速率呈线性关系的假设,用干扰素基因工程菌培养过程中的实验数据估计了 mRNA 转录速率常数,干扰素表达速率常数和干扰素降解速率常数。推导出了发酵过程中干扰素表达量和细胞内干扰素比活计算公式。运用这些公式可以通过检测色氨酸浓度和细胞比生长速率来计算预测干扰素表达量,确定最佳的终止培养时间。

关键词 数学模型,色氨酸启动子,干扰素

用基因工程菌生产一般方法难于生产的生物产品越来越受到人们的重视,尤其是一些大分子功能蛋白质的生产,采用基因工程方法生产具有十分突出的优点,但是有些基因工程菌生产的产物的测定十分困难或者测定过程非常缓慢。例如用基因工程菌生产干扰素,培养过程约数十小时,而产物的生物效价法测定却要 8~10d,这使得在工程菌培养表达过程中,不能随时了解产物的表达速度或表达量。这就产生了一个问题:什么时候产物含量最高,什么时候是中止培养表达过程的最佳时刻,显然如果不能判断何时中止培养转入下一步提取操作,细胞内原先所表达的产物也会由于降解而降低含量,这会影响后提取的收率和质量。因此,建立产物表达数学模型,对产物含量进行间接估算和预测,对用基因工程方法生产大分子功能蛋白质有着十分重要的意义。

近十年来关于基因工程菌的数学模型的研究已经有了较大发展。例如关于大肠杆菌基因工程菌的 lac 操纵子系统^[1-3]和 λP_R 启动子调控系统^[4,5]的模型已发展到了分子水平。对于大肠杆菌基因工程菌色氨酸启动子表达系统^[6]也提出了数学模型加以研究。但是该模型仅描述了外源蛋白表达基因的转录效率。本文考虑了色氨酸操纵子调控机制,建立了细胞生长增殖过程中基因转录和外源蛋白表达的分子结构数学模型,并把表达的产物由单个细胞内延伸计算到发酵过程中。因而应用这一模型可以间接计算和预测产物含量,并可用于研究高表达的控制方式。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

本文于 1996 年 2 月 29 日收到。

E. coli W3110(F' , hSR^- , $hSd M^+$)用作宿主菌。质粒 PEC901 中干扰素基因以色氨酸启动子表达。由中科院上海生物化学研究所提供。

1.2 培养条件

种子摇瓶采用 LB^[8]培养基, 37℃培养 12h。发酵培养基为 M9^[8]培养基添加 25% 酪蛋白氨基酸。37℃培养, 间歇或流加葡萄糖, 控制比生长速率; 添加一定量色氨酸, 控制色氨酸浓度。

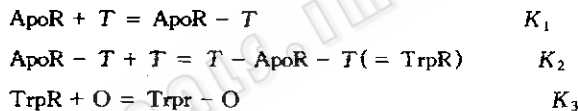
1.3 分析方法

干扰素量采用细胞病变抑制法^[9]测定。色氨酸浓度采用 Furth-Diesche 测定。细胞浓度采用比色法(波长 600nm)及菌体称重法(干重)。

2 数学模型描述

2.1 色氨酸操纵子调控机理

一般认为大肠杆菌基因工程菌的色氨酸操纵子调控机理如下; 工程菌细胞利用其质粒上的外源 DNA 转录 mRNA, 而用于表达产物的 mRNA 的转录受克隆的基因上的操纵位点 O 控制, 当结合了两个色氨酸的阻遏蛋白占据了操纵位点 O 后, mRNA 的转录被停止, 没有结合或结合一个色氨酸的阻遏蛋白不产生阻遏效应。色氨酸操纵子调控机理涉及下面反应;



上 3 反应式中 ApoR 为细胞内产生的阻遏蛋白; O 表示活性(或游离的)操纵位点(使能转录 mRNA); TrpR-O 代表非活性(或阻遏的)操纵位点(停止转录 mRNA); T 为细胞内色氨酸。

2.2 转录效率因子 η

根据上述 3 个反应式可以写出如下化学平衡式;

$$\frac{[\text{ApoR}] \cdot [T]}{[\text{ApoR} - T]} = K_1 \quad (1)$$

$$\frac{[\text{ApoR} - T] \cdot [T]}{[\text{TrpR}]} = K_2 \quad (2)$$

$$\frac{[\text{TrpR}] \cdot [O]}{[\text{TrpR} - O]} = K_3 \quad (3)$$

和物质平衡式;

$$[\text{ApoR}_t] = [\text{ApoR}] + [\text{ApoR} - T] + [\text{TrpR}] + [\text{TrpR} - O] \quad (4)$$

$$[O_t] = [O] + [\text{TrpR} - O] \quad (5)$$

式(1)~(5)中方括号表示浓度; $[\text{ApoR}_t]$ 表示细胞内阻遏蛋白总浓度; $[O]$ 表示细胞内操纵子总浓度。

考虑到若无结构性不稳定, 则细胞内操纵子总浓度 $[O]$ 等于细胞内外源基因浓度 $[G]$, 即;

$$[O] = [G] \quad (6)$$

转录效率因子 η 等于 $[O]$ 与 $[\dot{O}]$ 之比, 由(1)~(6)式, 可得 η 计算式;

$$\eta = \frac{[O]}{[O]} = \frac{\sqrt{[B(A-G)+C]^2 + 4 \cdot B \cdot C \cdot G} - [B(A-G)+C]}{2 \cdot B \cdot G} \quad (7)$$

(7)式中 $A, B, C,$ 和 G 被定义为;

$$A = [\text{ApoR}], \quad (8)$$

$$B = \frac{[T]^2}{K_1 \cdot K_2 \cdot K_3} \quad (9)$$

$$C = 1 + \frac{[T]}{K_1} + \frac{[T]^2}{K_1 \cdot K_2} \quad (10)$$

$$G = [G] \quad (11)$$

2.3 mRNA 的转录

假定细胞内 mRNA 的转录和降解均为一级反应,并考虑到细胞的生长增殖对 mRNA 的稀释作用,则有;

$$\frac{d[\text{mRNA}]}{dt} = \eta \cdot k_m \cdot [G] - k_{-m} \cdot [\text{mRNA}] - \mu \cdot [\text{mRNA}] \quad (12)$$

(12)式中 k_m 和 k_{-m} 分别为 mRNA 转录速率常数和降解速率常数^[1] $[\text{mRNA}]$ 为细胞内 mRNA 浓度; μ 为细胞比生长速率。

考虑到细胞内 mRNA 的转录基本处于准稳态,则;

$$\frac{d[\text{mRNA}]}{dt} = 0 \quad (13)$$

由(12)和(13)式解出细胞内 mRNA 浓度;

$$[\text{mRNA}] = \frac{\eta \cdot k_m \cdot G}{k_{-m} + \mu} \quad (14)$$

2.4 细胞内产物表达量

假定细胞内产物的表达看作是细胞内 mRNA 的一级反应,细胞内产物分解也为一级反应,并考虑到细胞生长对产物的稀释作用,则有;

$$\frac{d[P]}{dt} = k_p \cdot [\text{mRNA}] - k_{-p} \cdot [P] - \mu \cdot [P] \quad (15)$$

考虑到细胞内产物的表达基本处于平衡态,则;

$$\frac{d[P]}{dt} = 0 \quad (16)$$

由(15)和(16)式解出细胞内产物浓度;

$$[P] = \frac{k_p \cdot [\text{mRNA}]}{(k_{-p} + \mu)} \quad (17)$$

把(13)和(7)式代入(17)式,得到细胞内产物浓度计算公式;

$$[P] = \frac{\{\sqrt{[B(A-G)+C]^2 + 4 \cdot B \cdot C \cdot G} - [B(A-G)+C]\} \cdot k_m \cdot k_p}{2 \cdot B \cdot (k_{-m} + \mu) \cdot (k_{-p} + \mu)} \quad (18)$$

2.5 发酵过程中产物浓度

由(18)式还可推导出发酵液中产物浓度计算公式;

$$C_p = \frac{\{\sqrt{[B(A-G)+C]^2 + 4 \cdot B \cdot C \cdot G} - [B(A-G)+C]\} \cdot k_m \cdot k_p \cdot x}{2 \cdot B \cdot (k_{-m} + \mu) \cdot (k_{-p} + \mu) \cdot \rho} \quad (19)$$

式(19)中 C_p 为发酵过程中产物浓度(单位为 $\mu\text{g/L}$); x 为发酵液中细胞浓度(单位为 g/L); ρ 为细胞密度(g/L)。

2.6 动力学参数

由文献[6]得到本文模型中使用的一些动力学参数;

$$K_1 = 3.0 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3; \quad K_2 = 3.0 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3; \quad K_3 = 5.4 \times 10^{-6} \text{ mol/dm}^3;$$

$$k_{-m} = 27.6 \text{ h}^{-1}; \quad A = 5.0 \times 10^{-7} \text{ mol/dm}^3; \quad G = 1.0 \times 10^{-7} \text{ mol/dm}^3.$$

考虑到细胞活力强(μ 较大)时,菌体对 mRNA 的转录及产物的表达能力也增强,因此假设 k_m 和 k_p 随着细胞比生长速率增加而线性增大,即它们与比生长速率有 $a + b\mu$ 形式的数学关系(a 和 b 为两常数),按此假设,根据我们干扰素基因工程菌培养实验数据对模型中动力学参数 $k_m \times k_p$ 和 k_{-p} 进行优化拟合,得到如下关系和数据;

$$k_m \times k_p = 9.85 \times 10^{15} (1.0 + 3.60\mu)(1.0 + 2.55\mu)(1/\text{h}^2)$$

$$k_{-p} = 0.633 \text{ h}^{-1}$$

把上述动力学参数代入前面有关式子,即可根据测得细胞比生长速率和色氨酸浓度数据的对实验过程中干扰素含量进行计算。

3 结果与讨论

3.1 产物量计算

利用重组基因大肠杆菌 α_A 干扰素工程菌的培养中测得的细胞比生长速率和色氨酸浓度数据,代入(19)式对发酵液中 α_A 干扰素含量进行计算,计算结果与实测结果如图 1 所示;

由图 1 可以看出,模型计算与实测数据吻合性较好,这说明本文的数学模型有一定的科学性。

3.2 转录因子与色氨酸浓度关系

由式(7)可以计算转录因子与色氨酸浓度关系,结果见图 2;由图 2 可以看出当色氨酸浓度较低时有最大的转录因子,转录因子接近百分之百。还可看出当色氨酸浓度较高

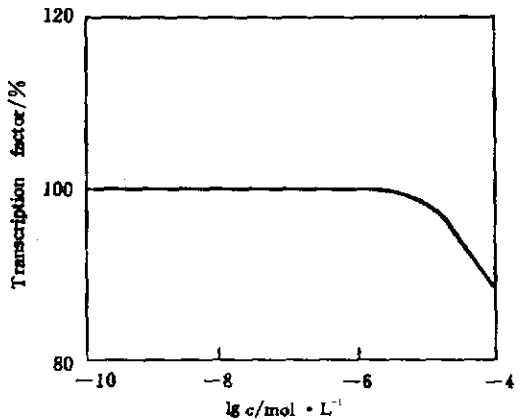
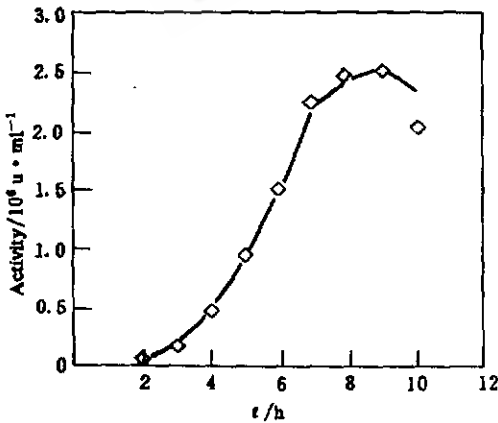


图 1 模型计算的(·)和实测的(线) α_A 干扰素含量曲线

Fig. 1 Calculated (points) and experimental (line) INF- α_A activity curves

图 2 色氨酸浓度对转录因子的影响

Fig. 2 Effect of Trp concentration on transcription factor

时,由于色氨酸与阻遏蛋白结合生成有阻遏效应的产物,导致转录因子降低。

3.3 细胞内产物表达量与细胞比生长速率和色氨酸浓度关系

由式(18)可以计算细胞内产物表达量与细胞比生长速率及色氨酸浓度关系,在计算中应用了约束条件; $\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot [T]}{K_S + [T]}$, $K_S = 4.0 \times 10^{-8}$, 计算得到图3所示的曲线,图3中曲线上所标数值代表当色氨酸成为细胞生长的限制性因素时细胞最大比生长速率,由图3色氨酸浓度在 10^{-5} 至 10^{-6} 之间时可使细胞内产物含量达到最佳。

3.4 细胞内 α_A 干扰素含量计算和最佳终止培养时刻确定

因此利用公式(18)计算细胞内 α_A 干扰素含量,结果见图4

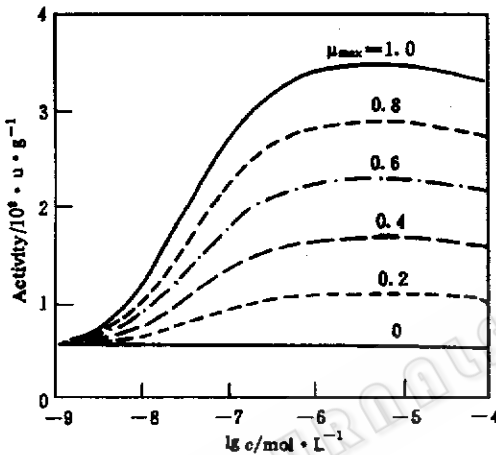


图3 不同比生长速率下色氨酸浓度对细胞内产物表达量的影响

Fig. 3 Effect of Trp concentration on product content in the cell with various specific growth rate

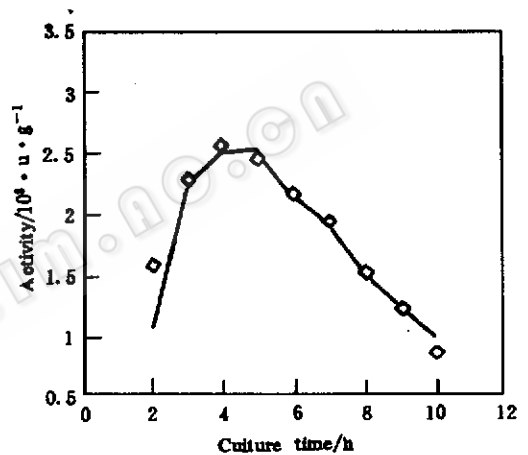


图4 计算的(点)和实测的(线)产物比活曲线
Fig. 4 Calculated (points) and experimental (line) specific activity curves of INF- α_A

α_A 干扰素工程菌培养过程中产物不分泌到细胞外,故后提取只用收集的细胞。由于后提取各步骤条件约束,细胞内 α_A 干扰素含量低于一特定值将无法回收。因此终止培养时细胞内 α_A 干扰素含量直接影响后提取收率和质量。由于无法随时了解培养过程中细胞内 α_A 干扰素含量。工程菌培养大都等菌体浓度长到最大时放罐,由模型计算或实测结果可知,菌体浓度最大时虽然发酵液中 α_A 干扰素含量最高,但此时细胞内 α_A 干扰素含量比起前期反而下降(比较图1和图4可得此结论),因此利用公式(18)和公式(19),根据发酵中实测的比生长速率和色氨酸浓度计算细胞内和发酵液中 α_A 干扰素含量,综合考虑,确定一个最佳终止培养时刻,将对提高生产效益有很大帮助。

参 考 文 献

- [1] Betenbaugh M J, Dhurjati P. *Biotechnol Bioeng*, 1990, **36**: 124~134.
- [2] Lee S B, Bailey J E. *Biotechnol Bioeng*, 1984, **26**: 1372~1382.
- [3] Lee S B, Bailey J E. *Biotechnol Bioeng*, 1984, **26**: 1383~1389.
- [4] Lee S B, Bailey J E. *Plasmid*, 1984, **11**: 151~165.
- [5] Lee S B, Bailey J E. *Plasmid*, 1984, **11**: 166~177.
- [6] Boon Tong Koh G S, Yap Miranda. *Biotechnol Bioeng*, 1993, **41**: 707~714.
- [7] 山根恒夫著, 苏尔霞译. 生物反应工程, 上海: 上海科学技术出版社, 1982, P. 171
- [8] [美] J. 萨姆布鲁克 E. F. 费里奇 T. 曼尼阿蒂期著, 金东雁等译. 分子克隆实验指南(第二版), 科学出版社, 1992, P. 908
- [9] 杜平著, 医用干扰素, 北京: 解放军出版社, 1985.

The Study of Mathematical Model for Product Formation with Recombinant Microbes Expressed Interferon

Xu Jingning Li Fanchao Wang Erli Tang Xiaoxuan Yu Juntang

(*Research Institute of Biochemical, Engineering East China University of Science and Technology, Shanghai 200237*)

Lu Xingyuan

(*Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200054*)

Abstract Based on known molecular interactions of aporepressor, corepressor and inducer, a mathematical model of product formation about the Trp operon regulated recombinant microbes has been proposed. The linear relation of the overall transcription rate constant and overall translation rate constant on specific growth rate has been suggested. Used experimental data of which engineered microorganisms express interferon (IFN), Decay constant of IFN, mRNA transcription rate constant, IFN expression rate constant have been estimated. An equation related to IFN concentration in fermentation on specific growth rate and Trp concentration has been obtained. By application of the equation, the expression of IFN is calculated based on Trp concentration and specific growth rate in fermentation. Also, the optimum overall culture time can be determined.

Key words Mathematical model. Trp operon, interferon