

不稳定的基因工程酵母生长动力学研究

施 源 袁渭康 陈敏恒

(华东化工学院, 上海)

应用数学模型方法描述重组质粒由于拷贝数的增加以及基因表达产物——乙型肝炎表面抗原在受体细胞内积累造成对 Leu^+ 表型细胞生长的阻遏作用。模拟丢失重组质粒的细胞生长规律, 给出其形成后可能的年龄-时间分布。根据这两类不同表型细胞同时生长的轨迹, 得到重组质粒丢失频率与 Leu^- 表型细胞生长的关系。因此, 可把发酵过程中基因工程酵母表现出重组质粒的不稳定归于两种作用: 重要的是 Leu^+ 表型细胞分裂时具有不对称的质粒分配, 其次是在丰富培养基中这两类不同表型细胞具有不同的生长速率。

关键词 基因工程酵母生长动力学; 重组质粒稳定性; 乙型肝炎表面抗原

酵母基因工程菌生产乙型肝炎表面抗原(HBsAg)的发酵过程包含着细胞生长和HBsAg表达这两个相互影响的过程。通过对发酵操作参数的顺序控制, 如发酵温度、pH值和溶解氧浓度的调节已使HBsAg达98.6相对浓度^[1,2]。但是, 很明显依靠经验的调节方式和人工操作难于使复杂的基因工程菌发酵处在最优条件中。目前计算机已经广泛地应用到生化工程领域。因此, 在了解基因工程细胞生长动力学以及发酵中状态变量变化规律的基础上, 借助于计算机模拟和调节众多的操作参数和状态变量, 可使发酵过程模型化成为可能。

此重组质粒 pYGH₃-16-s 带有 LEU2 基因作为酵母细胞的选择性标记, 当 Leu^+ 表型细胞分裂时随重组质粒不对称分配产生 Leu^- 表型细胞, 而且这个过程具有随机性。在有选择性压力的培养条件下, Leu^- 表型细胞存在着生长的年龄函数。随发酵时间的延续, 此类细胞表现出年龄-时间分布。

影响发酵中重组质粒稳定性的因素是 Leu^- 表型细胞随机地产生并且它与 Leu^+

表型细胞有着不同的生长速率。通常, 我们在实验中获得的数据是这两个因素混合的总结果。研究受体细胞丢失重组质粒的固有频率是基因工程菌发酵的理论基础。对于后一因素, 通过选择不同的培养基组分和调节发酵操作参数可以改变或控制这两类不同表型细胞的生长速率^[3-6]。一旦证实前一因素在重组质粒稳定性数据中占有较大比例时, 得依靠基因重组技术对质粒加以改造^[7], 或对受体细胞的遗传特征加以改造^[8,9], 而发酵条件的控制所起的改善作用是有限的。

本文研究基因工程细胞生长过程和重组质粒不稳定的条件, 通过数学模型的分析 and 过程模拟, 为酵母基因工程菌发酵生产 HBsAg 的操作过程最优化提供理论依据。

数学模型的建立

(一) Leu^+ 表型细胞生长动力学

Leu^+ 表型细胞 (以下简称为 P^+) 在发酵过程中除了培养基组分和发酵操作工

本文于1988年10月18日收到。

艺对其生长施加环境的影响外, 在细胞内部, 造成 Leu⁺ 生长阻遏的主要原因是 (1) 异源基因质粒 pYGH₃-16-s 自主复制拷贝数的增加; (2) 此重组质粒表达 HBsAg 蛋白质水平的增加。这两个因素既加重了受体细胞能量代谢的负担, 又改变了细胞原有的内质空间结构。可以认为这些阻遏作用是在占细胞生长周期的主要阶段形成的。因此, 当细胞处在理想的发酵环境时, 其本征生长动力学应主要包括这两个因素, 数学关系为:

$$\mu^+ = IH(CH) \cdot IP(CP) \quad (1)$$

其中 CH 为单位 P⁺ 中 HBsAg 含量, CP 为单位 P⁺ 中重组质粒的拷贝数。重组质粒表现出的对 P⁺ 生长的作用可由酶动力学中非竞争阻遏函数表示:

$$IP = \frac{k_{i_p}}{k_{i_p} + CP} \quad (2)$$

实验证明, 异源基因浓度和基因表达产物水平之间存在着一定的比例关系^[10-12]:

$$CH = E \cdot CP \quad (3)$$

P⁺ 中 HBsAg 合成和积累对细胞生长的阻遏函数形式为:

$$IH = \frac{\mu_m^+ \cdot k_{i_h}}{k_{i_h} + CH} \quad (4)$$

把方程 (2), (3), (4) 代入方程 (1) 中得:

$$\mu^+ = \frac{\mu_m^+ E k_{i_p} k_{i_h}}{(k_{i_h} + CH)(k_{i_p} E + CH)} \quad (5)$$

为求得动力学模型参数 μ_m^+ 、E、 k_{i_p} 、 k_{i_h} , 实验选择在不同 P⁺ 浓度接种后的对数生长期采样, 尽可能排除发酵环境对本征动力学参数的影响, 经最小二乘回归分析得:

$$\mu^+ = \frac{5.34 \times 10^{-12}}{(10.33 \times 10^{-8} - CH)(0.94 \times 10^{-6} + CH)} \quad (6)$$

(二) 培养基有选择性压力时 Leu⁻ 表型细胞生长轨迹

Leu⁺ 表型细胞分裂时具有质粒的不对称分配造成重组质粒的随机丢失, 由于胞内 HBsAg 表达处在 GAP 启动子控制下, 属组成酶系的 GAPase 合成既不受诱导物诱导又不受辅阻遏物控制, 基因表达在任何时刻都进行着。因此, 当 Leu⁻ 表型细胞 (以下简称为 P⁻) 形成时, 由母细胞 (P⁺) 带入的初始亮氨酸含量 CL(0) 将维持 P⁻ 在有选择性压力的培养基 YNBs 中衰减生长。由于亮氨酸也是重组质粒基因表达的产物之一, CL(0) 与 CP 之间具有下列关系:

$$CL(0) = \bar{\phi} \cdot CP \quad (7)$$

以 a 表示 P⁻ 衰减生长的年龄, 单位 P⁻ 内 Leu 含量的变化

$$\frac{d(CL)}{da} = -k\eta CL \quad (8)$$

其边界条件:

$$a = 0, CL = CL(0) \quad (9)$$

$$a = \infty, CL = 0 \quad (10)$$

取 P⁻ 衰减生长动力学为双曲函数形式:

$$\eta = \frac{\eta_m CL}{k_{i_l} + CL} \quad (11)$$

根据铜复合物紫外吸收法^[13], 测定 Leu 浓度, 得 P⁻ 生长动力学模型参数。整理获得方程 (11) 的具体形式:

$$\eta = \frac{0.47 CL}{12.39 \times 10^{-6} + CL} \quad (12)$$

将方程 (11) 代入方程 (8), 并利用边界条件积分得:

$$a = \frac{1}{\eta} - \frac{1}{\eta_0} + \frac{1}{\eta_m} \ln \frac{\eta_0 (\eta_m - \eta)}{\eta (\eta_m - \eta_0)} \quad (13)$$

其中 η_0 为 CL(0) 条件时 P⁻ 比生长速率。定义 $f(a, \tau) d\tau$ 为发酵时刻 τ 至 $\tau + d\tau$ 内 P⁺ 细胞分裂产生的 P⁻ 细胞浓度。因此, 当时间为 $t = \tau + a$, P⁻ 应具有年龄 a。固定 τ ,

则P⁻在 YNBs培养基中延续生长为:

$$\frac{d[f(a, \tau)d\tau]}{da} = \eta(a)[f(a, \tau)d\tau] \quad (14)$$

把方程 (13) 代入方程 (14), 从 $a = 0$ 开始积分, 得:

$$f(a, \tau) = f(0, \tau) \frac{\eta_0(\eta_m - \eta)}{\eta(\eta_m - \eta_0)} \quad (15)$$

(三) 在丰富培养基中 Leu⁻ 表型细胞生长轨迹

在 YPD-s 培养基中 P⁻细胞生长的控制因素仍然是培养基中 Leu 浓度, 用图 1 表示 P⁻细胞内外 Leu 浓度的变化。由图 1 得单位 P⁻内 CL 随时间的消耗为:

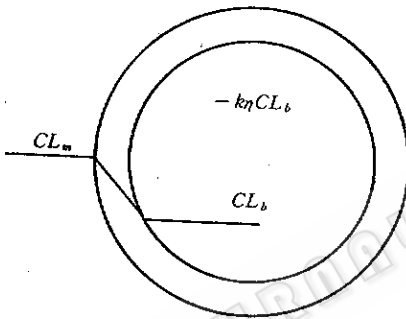


图 1 在培养基中和细胞内 Leu 浓度的关系

Fig. 1 Scheme of leucine concentrations in culture medium surrounding a cell and in the interior of a cell. CL_m 为培养基中 Leu 浓度 Leucine concentration in culture medium; CL_b 为 Leu 传递和消耗达到平衡时浓度 Intra-cellular leucine concentration due to mass transfer and consumption at equilibrium

$$a = \frac{1}{k_c} ((A_2 + A_4) \ln \frac{\eta_m - \eta_0}{\eta_m - \eta} + A_2 \ln \frac{\eta_m A_1 - (1 + A_1)\eta}{\eta_m A_1 - (1 + A_1)\eta_0} + A_4 \ln \frac{\eta_m A_3 - (1 + A_3)\eta}{\eta_m A_3 - (1 + A_3)\eta_0}) \quad (23)$$

把方程 (23) 代入方程 (14), 得在时刻 τ 产生的 P⁻ 随时间延续的变化为:

$$f(a, \tau) = f(0, \tau) \cdot D[\eta(a)] \quad (24)$$

同样, 也可能获得 P⁻ 生长达到平衡态时的状态参数 a_b 、 $f(a_b, \tau)$ 。

(四) 培养基有选择性压力时两类细胞同时生长轨迹

取 X^+ 和 X^- 表示 P⁺ 和 P⁻ 的浓度, 如果 P⁺ 在时刻 τ 至 $\tau + d\tau$ 丢失重组质粒的频率为 a , 则产生 P⁻ ($a = 0$) 的浓度为:

$$f(0, \tau)d\tau = \alpha\mu^+ X^+(\tau)d\tau \quad (25)$$

因为:

$$\frac{d(CL)}{da} = k_c(CL_m - CL) - k\eta CL \quad (16)$$

1. 当 P⁺ 在 $a = 0$ 时分裂而产生 P⁻, 如果细胞内 Leu 浓度为:

$$CL(0) > CL_b \quad (17)$$

这时 P⁻ 不从外界摄取 Leu, 其生长规律由方程 (15) 描述。当细胞内 Leu 消耗至 CL_b , 可获得 P⁻ 的年龄 a_b 和密度 $f(a_b, \tau)$, 平衡态后, P⁻ 的生长将由发酵环境其他因素所影响。

2. 当 P⁺ 在 $a = 0$ 时分裂而产生 P⁻, 如果细胞内 Leu 浓度为:

$$CL(0) = CL_b \quad (18)$$

这时 P⁻ 内 Leu 浓度处于平衡态, 方程 (16) 为:

$$\frac{d(CL)}{da} = 0 \quad (19)$$

把方程 (19) 代入方程 (16) 得:

$$CL_b \geq \frac{k_c}{\eta_m + k_c} CL_m \quad (20)$$

3. 当 P⁺ 在 $a = 0$ 时分裂而产生 P⁻, 如果细胞内 Leu 浓度为:

$$CL(0) < CL_b \quad (21)$$

这时

$$\frac{d(CL)}{da} = k_c(CL_m - CL) - k \frac{\eta_m CL^2}{k_{i1} + CL} \quad (22)$$

从 $a = 0$ 开始积分, P⁻ 在丰富培养基中生长的年龄为:

$$\frac{dX^+}{dt} = \mu^+(1 - \alpha)X^+ \quad (26)$$

$$X^+ = X_0^+ \cdot \exp(\mu^+(1 - \alpha)t) \quad (27)$$

因此, 随发酵的进行, 在时间 $t(t = \tau + a)$, P^- 浓度为:

$$X^- = \int_0^t f(a, \tau) d\tau = \alpha \mu^+ X_0^+ \frac{\eta_0}{\eta_m - \eta_0} \int_0^t \exp(\mu^+(1 - \alpha)\tau) \frac{\eta_m - \eta}{\eta} d\tau \quad (28)$$

经积分变换, 整理得出 P^+ 与 P^- 浓度之比为:

$$\frac{X^-}{X^+} = \frac{\alpha}{1 - \alpha} \frac{\eta_0}{\eta_m - \eta_0} (e^{B_3 t} - 1) + \alpha \mu^+ \eta_m^2 \left(\frac{\eta_0}{\eta_m - \eta_0} \right)^{1 + \frac{B_3}{\eta_m} \times e^{-\eta_0}} \int_{\eta}^{\eta_0} \frac{B_1}{\eta (\eta_m - \eta)^{B_2}} \exp\left(\frac{B_3}{\eta}\right) d\eta \quad (29)$$

(五) 丰富培养基中两类细胞同时生长轨迹

讨论方程(21)所代表的条件, 这时 P^- 的浓度为:

$$X^- = \int_0^t f(a, \tau) d\tau = \int_0^t f(0, \tau) \cdot D(\eta(a)) d\tau \quad (30)$$

微分方程(23), 经变换和整理得以下关系:

$$\begin{aligned} \frac{X^-}{X^+} = & \alpha \mu^+ (\eta_m - \eta_0) \frac{B_3 (A_2 + A_4)}{k_c} \cdot [\eta_m A_1 - (1 + A_1) \eta_0] - \frac{B_3 A_2}{k_c} \cdot \\ & [\eta_m A_3 - (1 + A_3) \eta_0] - \frac{B_3 A_4}{k_c} \cdot \int_{\eta_0}^{\eta} (\eta_m - \eta) - \frac{B_3 (A_2 + A_4)}{k_c} \cdot \\ & [\eta_m A_1 - (1 + A_1) \eta] \frac{B_3 A_2}{k_c} \cdot [\eta_m A_3 - (1 + A_3) \eta] \frac{B_3 A_4}{k_c} \cdot D(\eta) A(\eta) d\eta \quad (31) \end{aligned}$$

重组质粒稳定性值 ST 与方程(31)的关系为:

$$\frac{1}{ST} = \frac{X^+ + X^-}{X^+} = 1 + \frac{X^-}{X^+} \quad (32)$$

结果和讨论

根据方程(13), 把 P^- 在YNBs培养基(有选择性压力)中衰减生长的模拟以图2表示。 $CL(0)$ 浓度越低, P^- 衰减生长的年龄越短。换句话说, P^- 达到同样的年龄时, 如果 $CL(0)$ 浓度越高, 则 P^-

生长速率越快。因此, P^- 的浓度亦增加。为了减少 P^- 的浓度, 须使 P^+ 在生长旺盛时减低其重组质粒的丢失频率, 因为这时 $CL(0)$ 浓度应该是较高的。图3显示了方程(15)的内容, 在时刻 τ 产生带有不同 Leu 初始浓度的 P^- 所具有的年龄-密度分布。采用试差-迭代方法数值积分方程(29), 得图4的分布。图中结果表示重组质粒丢失频率 α 和 P^- 生长是影响重组质粒稳定性的两个因素。当 α 值较低时, 可保持较高的重组质粒稳定性。随 α 值的提高, 为保持其稳定性, 唯一的方法就是下

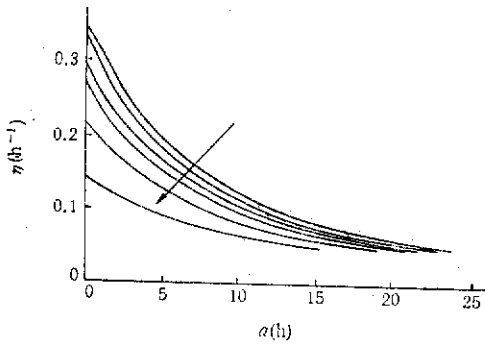


图 2 Leu⁻表型细胞随不同CL(0)的生长
Fig.2 Specific growth rate of Leu⁻ phenotype cells with changing initial intracellular leucine concentration
箭头所示 CL(0) 下降方向
Arrow showing CL(0) declining

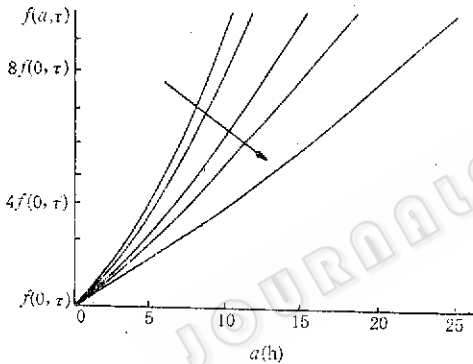


图 3 Leu⁻表型细胞密度与其年龄于时刻 τ 的分布
Fig.3 Relative distribution of Leu⁻ phenotype cell density versus its age at time τ
箭头所示 CL(0) 下降方向
Arrow showing CL(0) declining

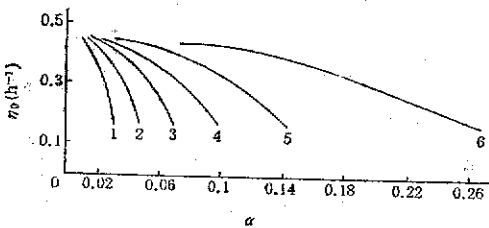


图 4 η₀ 与 α 随不同 X⁻/X⁺ 变化规律
Fig.4 Changing of η₀ with plasmid loss frequency α at various X⁻/X⁺ values
不同的 X⁻/X⁺ Various X⁻/X⁺ values: 1, 0.042, 2, 0.099, 3, 0.176, 4, 0.235, 5, 0.370, 6, 1.000

降P⁻的生长速率。

经过对不稳定的基因工程酵母生长动力学研究，建立了受体细胞内重组质粒拷贝数和 HBsAg 含量对细胞生长影响的关系式，模拟了重组质粒丢失频率和不含重组质粒细胞生长对重组质粒稳定性的影响。在此基础上，建立起发酵过程的状态方程，并且应用自适应估计理论在不同发酵条件下获得状态变量和操作参数的变化规律。证明控制溶解氧浓度在70%饱和度时重组质粒的稳定性达73%以上是由于重组质粒丢失频率 α 值趋向于低的平稳态，其平均值为 0.024。经分析，当丰富培养基中 CL_m 取 1104.3 × 10⁻⁸ 时，

$$k_c = 0.064 \quad (33)$$

$$CL_b = 177.6 \times 10^{-6} \quad (34)$$

另外，采用以上不稳定的基因工程酵母生长动力学可实现对发酵过程的控制，即利用 Pontryagin 极大值原理^[14]，建立操作最优化控制模型^[15]。经实验证明，此方法比经验的发酵参数顺序操作可提高 HBsAg 产量 20.1%，达 123.5 相对浓度。

符号说明

α P⁻ 生长年龄

$$A_1 = \frac{1}{2(1+\phi)} (A_5 - \phi(y_m - 1))$$

$$A_2 = \frac{\phi(2+3\phi - \phi y_m - A_5)}{2(1+\phi)A_5}$$

$$A_3 = \frac{-1}{2(1+\phi)} (A_5 + \phi y_m - \phi)$$

$$A_4 = \frac{-\phi(2+3\phi - \phi y_m + A_5)}{2(1+\phi)A_5}$$

$$A_5 = \sqrt{\phi^2(y_m + 1)^2 + 4\phi y_m}$$

$$B_1 = \frac{\mu^+(1-\alpha)}{\eta_m} - 3$$

$$B_2 = 2 + B_1$$

$$B_3 = -3 - \eta_m B_1$$

A(η) 数学表达式见[15]

CH 单位 P⁺ 中 HBsAg 含量

CL(0) P⁻ 形成时带有的 Leu 浓度

CL	P ⁻ 延续生长时细胞内Leu浓度	μ^+	P ⁺ 比生长速率
CL _b	平衡时P ⁻ 细胞内Leu浓度	μ_m^+	P ⁺ 最大比生长速率
CL _m	发酵环境中Leu浓度, 似常数	ϕ	比例系数
CP	单位P ⁺ 中重组质粒拷贝数目	$\phi = \frac{k_c}{\eta_m}$	
D(η)	数学表达式见[15]	η	P ⁻ 比生长速率
E	比例系数	η_m	P ⁻ 最大比生长速率
k, k _c , k _{ih} , k _{il} , k _{ip}	动力学方程参数	η_0	P ⁻ 含有CL(0)时比生长速率
$y_m = \frac{CL_m}{k_{il}}$		α	重组质粒丢失频率
t, τ	发酵时间		

参 考 文 献

- [1] 施 源等: 生物工程学报, 5(3):207, 1989.
 [2] 施 源等: 生物工程学报, 5(4):284, 1989.
 [3] Bailay, J. E. et al.: *Ann. NY Acad. Sci.*, 413:71, 1983.
 [4] Chao, L. et al.: *PNAS, USA*, 78: 6324, 1981.
 [5] Lim, A. C. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 29: 911, 1987.
 [6] Lauffenburge, D. A. et al.: *Biotechnol. Progr.*, 1:53, 1985.
 [7] Guarente, L.: *Cell*, 36: 799, 1984.
 [8] Parker, C. et al.: *World Congress III of Chemical Engineering, Tokyo*, 10a, 879, 1986.
 [9] 敖世洲: 真核基因的结构和功能, 科学出版社, 1988.
 [10] Nordstrom, K. et al.: *Plasmid*, 4: 215, 1980.
 [11] Murray, A. et al.: *Cell*, 34: 961, 1983.
 [12] Lee, S. B. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 26: 66, 1984.
 [13] Spies, J. R.: *J. Biol. Chem.*, 191: 62, 1952.
 [14] Modak, J. M. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 28: 1396, 1986.
 [15] 施源: 博士论文, 华东化工学院, 上海, 1988.

STUDY ON GROWTH KINETICS OF UNSTABLE RECOMBINANT SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Shi Yuan Yuan Weikang Chen Minheng
(East China University of Chemical Technology, Shanghai)

A mathematical model is suggested to describe effects of intracellular inhibition on growth of the Leu⁺ phenotype cells. The inhibition term depends upon the increase of recombinant plasmid concentration and the accumulated amount of hepatitis B surface antigen protein, the expressed gene product. Simulating the growth of plasmid-free cells gives possible age-time distribution corresponding to their formation. According to the growth trajectories of these two different phenotype cells, a relation between Leu⁻ phenotype cell growth and recombinant plasmid loss frequency is obtained.

Key words

Growth kinetics of genetically engineered yeast; hepatitis B surface antigen