

基因网络的自我调控以及基因工程的稳定性

张虹



* 背景介绍

* 方法：
1. 基因回路构建
2. 线性稳定性分析
3. 荧光显微分析

什么是基因网络？

一个基因的表达受其他基因的影响，而这个基因又影响其他基因的表达，这种相互影响相互制约的关系就构成了复杂的基因表达调控网络。几乎所有的细胞活动都被基因网络所控制。生命是存储加工信息的复杂系统，从而，孤立地研究单个基因及其表达往往不能确切地反映生命现象本身的内在规律。因此，科学家们开始从复杂系统的角度研究基因网络。

* 基因调控网络本质上是一个连续而复杂的动态系统，即复杂的动力系统网络。

* 基因调控网络有许多特性：

(1) 复杂性（基因网络包含着不同层次的错综复杂的物质、关系和功能结构，基因的复杂性还体现在基因的组合性质方面）

(2) 稳定性（基因网络系统能够通过自动调控达到稳定）

(3) 可进化性

(4) 有限连通性等。

基因和生化网络强调代谢的平衡以及活细胞的发展进程，与此同时又要承担相当多的变异和生化参数的随机干扰带来的风险。已经提出但未被证实的是：在自动调控系统中，基因回路中的负反馈回路保证其稳定性。为此我们在大肠杆菌体内设计并创建了一个简易的基因回路模型，从而显示了稳定性的获得是由负反馈产生的。



为了测试负反馈在基因网络稳定性中所起的作用，我们在 *E. coli* 体内创建了一个依赖于简单控制系统的基因回路。



Control theoretical diagrams for negative feedback

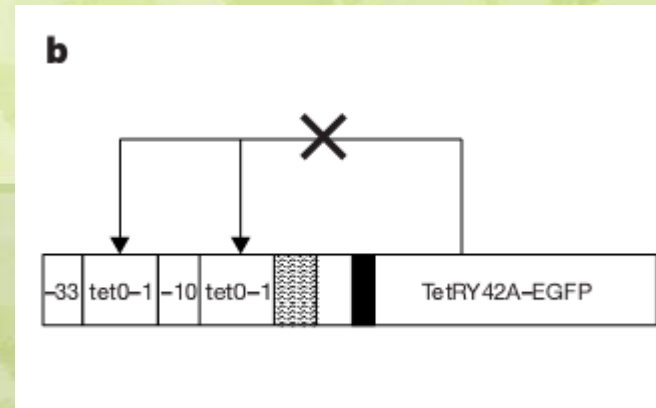
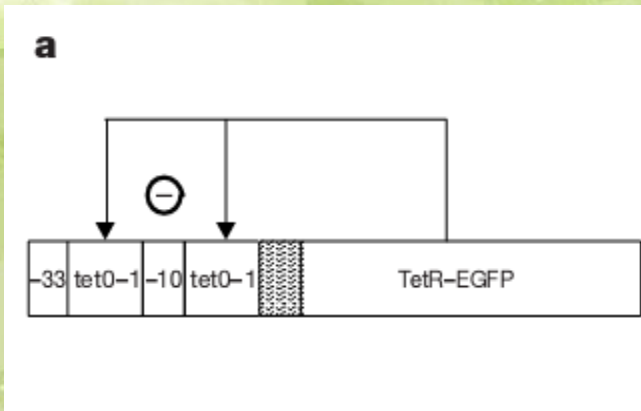


Unregulated systems containing a transcription factor

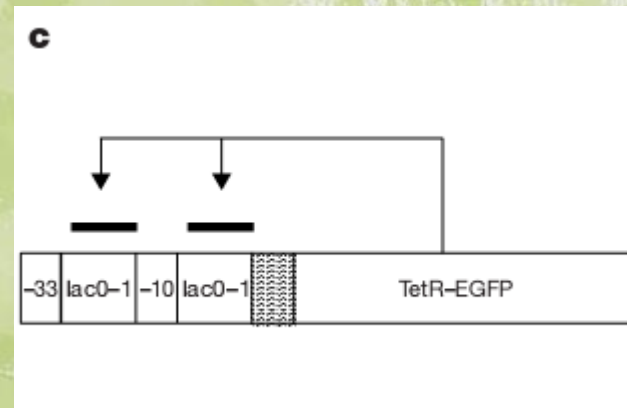
- * 为了创建自我调控系统，将Tn10转位子的四环素遏制物（TetR）融入绿色荧光蛋白（EGFP）（TetR-EGFP）并将其置于含有两个四环素操纵子的启动子的下游。我们通过对该系统作微小的修改，以得到相应的非自我调控系统。

Autoregulatory system

Unregulated system



遏制物
突变



操纵子
替换



* 为了定量地测试系统的稳定性，我们利用基因回路中不同的等式模型来进行线性的稳定性分析，该分析将细胞干扰也考虑在内。

$$S_{\text{unreg}} = f'_{\text{unreg}}(R^*) = -k_{\text{deg}} \quad (1)$$

$$S_{\text{auto}} = f'_{\text{auto}}(R^*) = -\frac{nk_p P k_1 a k_r}{(1 + k_p P + k_r R^*)^2} - k_{\text{deg}} \quad (2)$$

$$S_r = \frac{S_{\text{auto}}}{S_{\text{unreg}}} \quad (3)$$

稳定性S的值通过稳定状态的线性方程得到，

(1)为非自动调控系统

(2)为自动调控系统

(3)为两个系统稳定性的比值

R是遏制物的浓度，P是RNA聚合酶的浓度

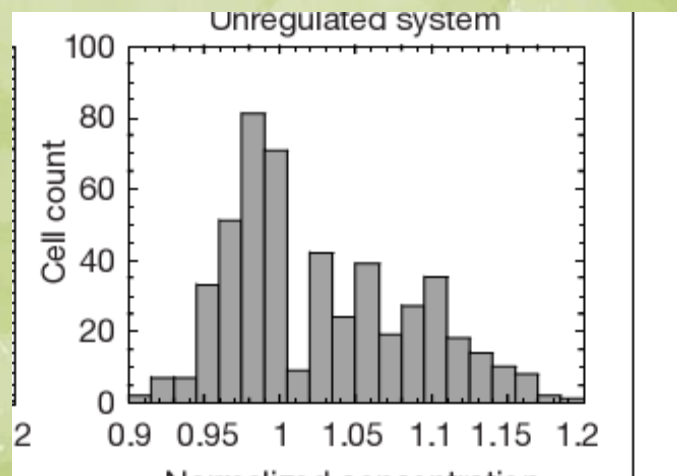
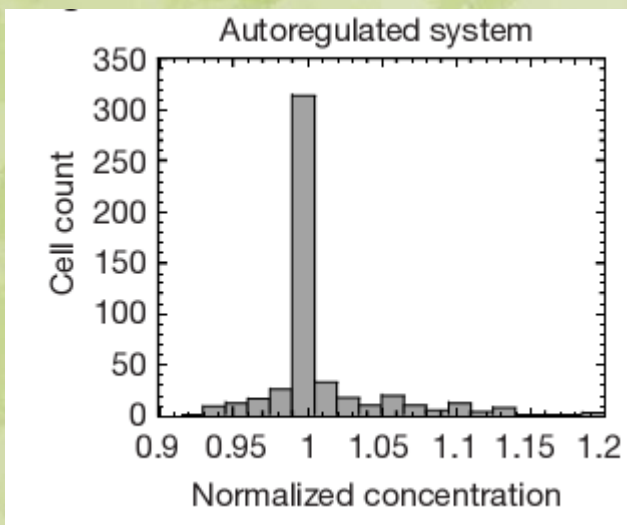
Kp和Kr分别是聚合酶和遏制物的结合常数，

K1是异构化率从封闭到复杂,a是 mRNA和蛋白质浓度的比例系数

Kdeg是遏制物的退化率

n是基因拷贝数

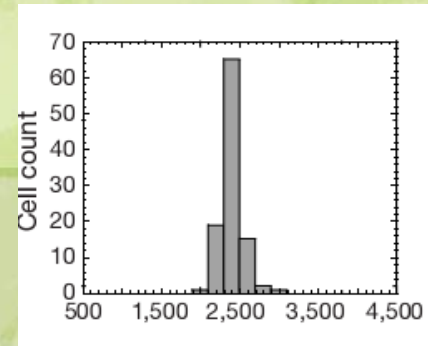
很显然所有参数与稳态浓度的正值都表示在自动调控系统中稳定性更高，对于我们这里所构建的系统的生化参数来说，在稳定性方面自动调控系统比非自动调控系统高两倍。当参数在一系列具有生物学意义的值的范围内变化时，由负反馈获得的稳定性被保留。然而，当遏制物的结合常数或者转录速率非常低时，稳定性会骤减。事实上，低遏制物因子和低遏制物浓度影响了负反馈的必要的可能性。一个详实的数字分析表明当所有参数都不变时，两个系统的稳定程度趋近，然而一般来说，自动调控系统更为高级一些，只在某些特定情况下等同于非自动调控系统。为了模拟独特的细胞的干扰状态，在一个细胞群体中随机干扰被应用到稳态中，这导致了群体中稳态状态的转录因子的实际浓度发生了改变。然而，由于高度稳定性自动调控系统的分布更窄一些。



荧光显微分析

*首先，将细菌制成悬浮液，然后将10微升1.5%的琼脂滴在显微镜上形成一个薄层，待干燥后用移液管将1微升的细胞悬浮液滴入并用盖玻片盖上，然后用带有低感光HamamatsuC4742-数码CCD照相机和自动快门的显微镜来进行显微分析。

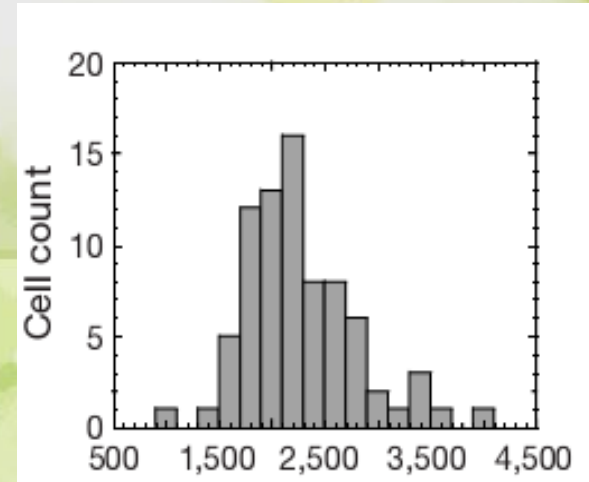
* 我们利用荧光显微分析了自动调控系统和两个非自动调控系统中在TetR-EGFP的表达过程中**变异程度Vc**(衡量变异程度的一个指标)，在自动调控系统中 TetR-EGFP的表达为低稳态和高度同质性，Vc为6%~9%，这种窄分布对低拷贝的质粒不是特异的，相同的Vc值在低、中、高拷贝的质粒的细胞群体中都可观察到



* 在培养基中加入**低浓度的诱导物**后，期望负反馈会被保留。当无水四环素（atc）以低浓度加在培养基中后，V c保持在10%以下。然而，由于负反馈的遏制，在高诱导物浓度下自动调控系统会转变为非自动调控系统。

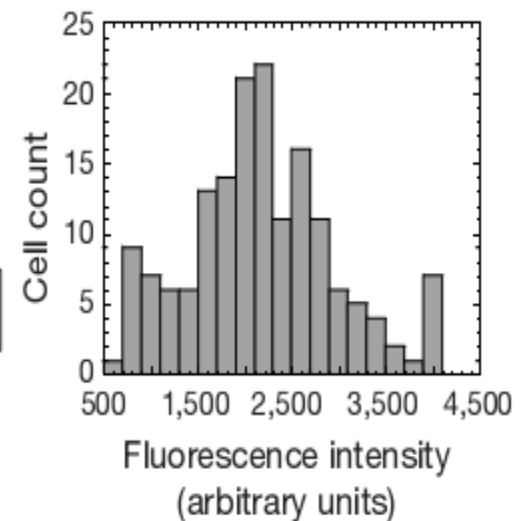
自动调控系统

* 由于突变引起的遏制物的结合力的降低，增加了第二个系统（突变）的变异性和融合蛋白的稳态浓度。这种变异程度类似于加入高浓度诱导物时自动调控系统的程度。



非自动调控（突变）

TetR-EGFP的表达被饱和浓度的**IPTG**诱导，为了减小非饱和浓度下引起的随机诱导现象的产生。荧光强度的分布比其他两个构建体都要高



非自动调控（操纵子替换）

*此外，我们还想检测**是否长期表达**会影响变异性 V_c 。我们发现：在TetR-EGFP突变体长期表达的过程中（此时在细胞生长过程中稳态持续保持）以及TetR-EGFP的短期表达过程中（此时的表达由于释放了Lac遏制物）都发现了高度的变异性。

* 小结

最近的一些整合的理论实验方法已经映射了基因网络功能的基本原理，这里我们已经注意到自动调控系统比非自动调控系统更显优越性。事实上，在大肠杆菌体内大约40%已知的转录因子自行调控。同样的转录调控子数量的增多或是减少可能是严重的进展紊乱的原因。负反馈提供了一个机制以确保了一个在最理想浓度限制下转录遏制物的均匀分布。然而，在某些特定情况下，自动调控系统的稳定性可达到经典系统的状态，变异可能是适应的优势，稳定可能是体内平衡的优势。



谢谢大家！