

第十四章 基因工程菌的发酵

第一节 工程菌的来源和应用

一、基本概念

1, 重组DNA技术的基本定义

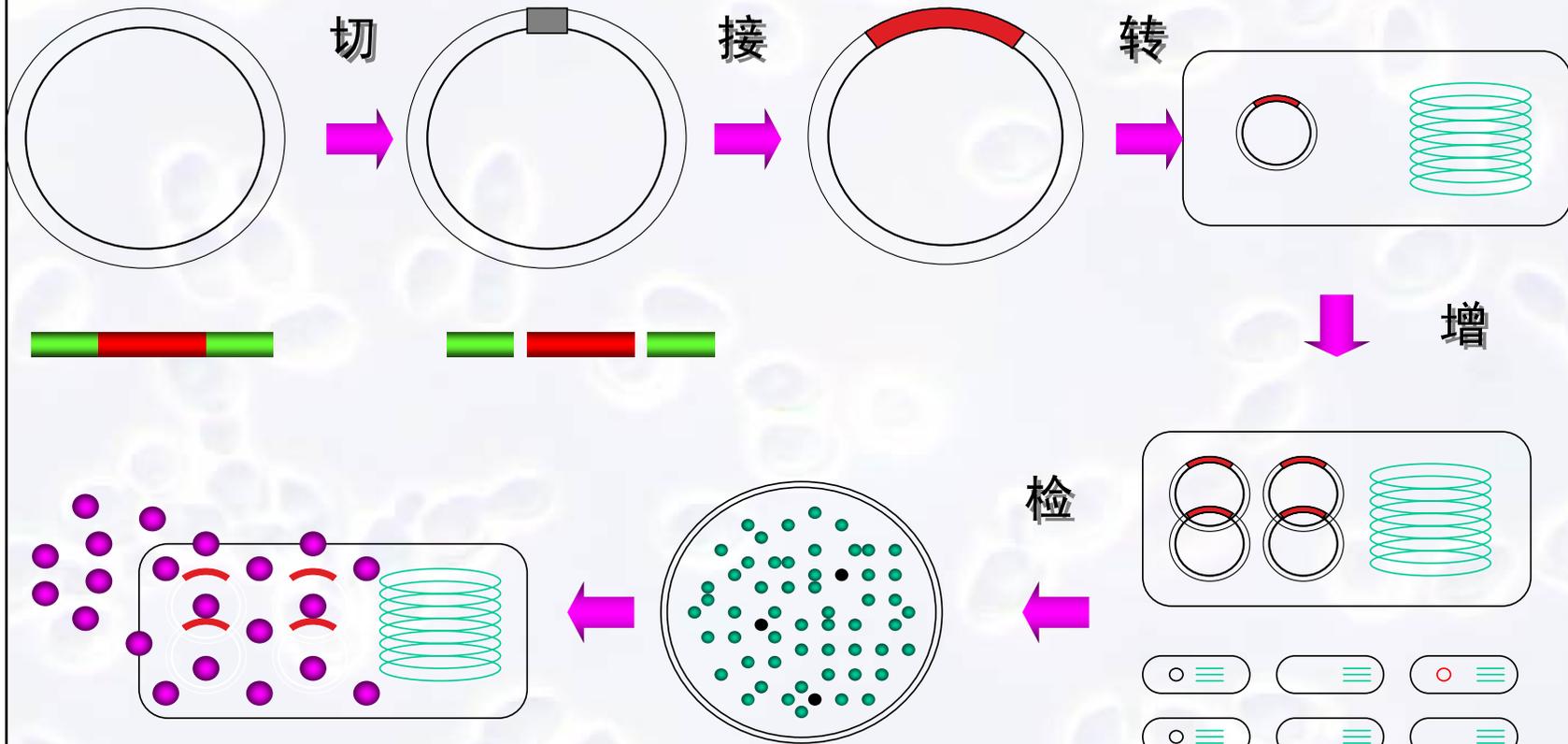
- 重组DNA技术是指将一种生物体（供体）的基因与载体在体外进行拼接重组，然后转入另一种生物体（受体）内，使之按照人们的意愿稳定遗传并表达出新产物或新性状的DNA体外操作程序，也称为分子克隆技术。
- 因此，供体、受体、载体是重组DNA技术的三大基本元件。

2， 基因工程的基本定义

- 基因工程是指重组DNA技术的产业化设计与应用，包括上游技术和下游技术两大组成部分。上游技术指的是基因重组、克隆和表达的设计与构建（即重组DNA技术）；而下游技术则涉及到基因工程菌或细胞的大规模培养以及基因产物的分离纯化过程。

- 基因工程一般分为4个步骤：
 - 取得符合人们要求的DNA片段，这种DNA片段被称为“目的基因”；
 - 将目的基因与质粒或病毒DNA连接成重组DNA；
 - 把重组DNA引入某种细胞；
 - 把目的基因能表达的受体细胞挑选出来。

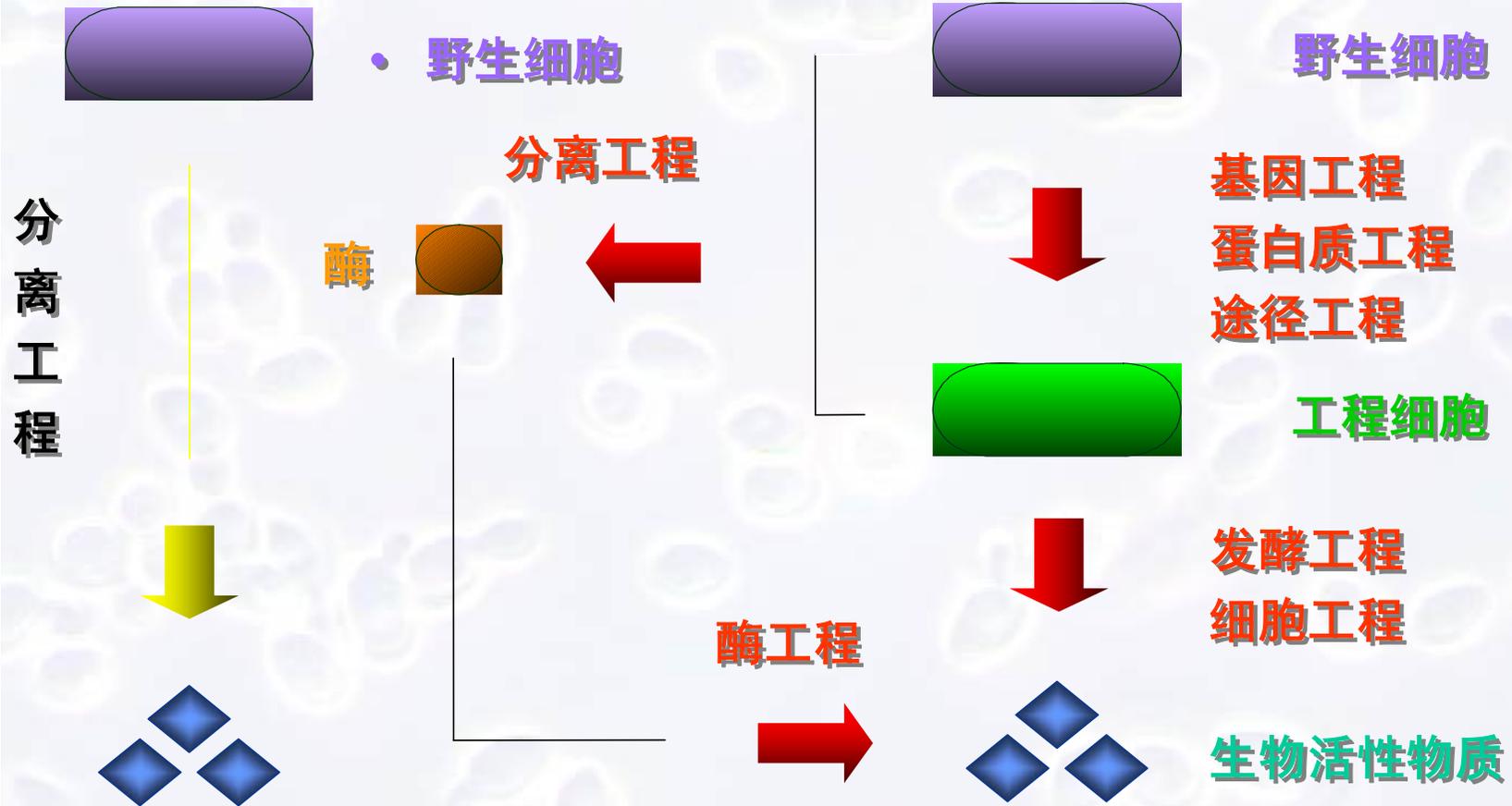
重组DNA技术的操作过程



3, 重组DNA技术与基因工程的基本用途

- 分离、扩增、鉴定、研究、整理生物信息资源
- 大规模生产生物活性物质
- 设计、构建生物的新性状甚至新物种

大规模生产生物活性物质



二、工程菌的获得

- 确定目的产物。
- 找出产该产物的细胞。
- 将细胞破碎后提纯出全部信使RNA。这些信使中包含了该细胞内表达的所有蛋白质的合成信息。
- 利用基因扩增技术（PCR），找出所需的目的基因。
- 将目的基因连接到设计好的质粒载体，形成了重组DNA分子。
- 将重组后DNA分子引入到受体细胞内，然后选择合适的培养条件使细胞繁殖。根据选择性标记，从菌落中筛选出目的基因的重组(工程)菌。
- 这一过程的核心技术是DNA的重组技术。

三、工程菌应具备的条件

- 发酵产品是高浓度、高转化率和高产率的，同时是分泌型菌株。
- 菌株能利用常用的碳源，并可进行连续发酵。
- 菌株不是致病株，也不产内毒素。
- 代谢控制容易进行。
- 能进行适当的DNA重组，并且稳定，重组的DNA不易脱落。

四、工程菌的应用

1, 基因药物

- 红细胞生成素
- 胰岛素
- 干扰素
- 乙肝疫苗
- 生长激素
- 粒细胞巨噬细胞集落刺激因子

2, 其它发酵产品

- 酶制剂
- 氨基酸（苏氨酸、色氨酸）
- 抗生素
- 有机酸
- 其它代谢产物

3， 工程菌处理废水

- 例如，分离出了具有生物絮凝作用和生物降解作用的两类菌株，运用生物工程技术把降解菌的基因片段通过转基因工程转入絮凝菌株，培养出具有絮凝和降解双功能基因的高效基因工程菌并应用于染料废水的处理。

第二节 工程菌的培养

- 就生产流程而言，从发酵到分离、纯化目标产物，工程菌和常规微生物并无太多的差异。但工程菌在保存过程中及发酵生产过程中表现出不稳定性，以及安全性等问题，使得工程菌的培养有着自身所特有的特点。

一、安全问题

- 关于基因工程的社会问题，必须提到它的潜在危险性。经过重组的菌和质粒一旦用于工业化生产，就不可避免地进入自然界。这些菌能间接地危害人体健康，使治疗药物失去效用，污染环境等。因此，安全问题是极其重要的。

- 1974年，提出了DNA重组实验具有潜在生物危险性的问题。后来，制定了有关DNA重组实验的准则，其目的是保证实验的安全和推动重组DNA的研究。
- 这些准则参照了防止病原微生物污染的措施，以及根据对实验安全度的评定，采用物理密封(P1~P4)和生物学密封(B1和B2)两种方法。

- 物理密封是将重组菌封闭于设备内，以防止传染给实验人员和向外界扩散。实验规模在20L以下时，物理密封由密封设施、实验室设计和实验注意事项组成。密封程度分为P1、P2、P3和P4级，数字越大，密封水平越高。
- 生物学密封要求用只有在特殊培养条件下才能生存的宿主，同时用不能转移至其它活细胞的载体，通过这样组合的宿主载体系统，可以防止重组菌向外扩散。按密封程度分B1和B2级，B2级的密封要求最严格。

二、工程菌培养的特点

- 工程菌工业化培养中，产物的产率往往比实验室培养规模为低。
- 为提高工程菌体表达效率，需采取适当措施，提高重组DNA在受体细胞内的拷贝数及促进表达产物自细胞内向细胞外分泌。
- 工程菌体的原宿主通常是某些培养物质(如某种氨基酸或维生素等)的缺陷型，有些基因工程细胞生产过程亦产生某些抑制细胞生长的代谢物。在培养过程中应考虑控制培养液营养成分及其浓度，同时采取措施，消除抑制细胞生长的代谢物，以保证细胞正常生长。

三、工程菌的培养

- 工程菌的营养控制
- 质粒稳定性
- 重组质粒拷贝数的控制及表达效率

- 基因工程细胞的培养过程与一般需氧细胞培养基本一致，同时培养方式亦无差异，可采用分批培养方式，亦可采用连续培养、半连续培养及透析培养等方式。至于影响基因工程细胞培养的细胞生物量得率与产物量的因素及有关参数。亦可参照普通细胞相应培养方式求得。

1, 底物浓度的控制

- 在基因工程菌培养过程，至少要遵循P₁级物理防护的规定，因此必需进行菌体的高密度培养。
- 从生物安全性考虑，培养的基因工程菌通常是维生素或氨基酸的营养缺陷型突变株。培养过程细胞对维生素需求量甚微，在培养开始即加入必需量对细胞生长并无影响，但培养一开始即加入足够量氨基酸则可能因氨基酸浓度过大而抑制细胞生长。在此情况下，可采取培养过程中，在调节pH值同时补充氨基酸混合物和葡萄糖的方法，以便培养过程葡萄糖及氨基酸浓度的基本恒定，从而实现高密度培养

2, 质粒稳定性

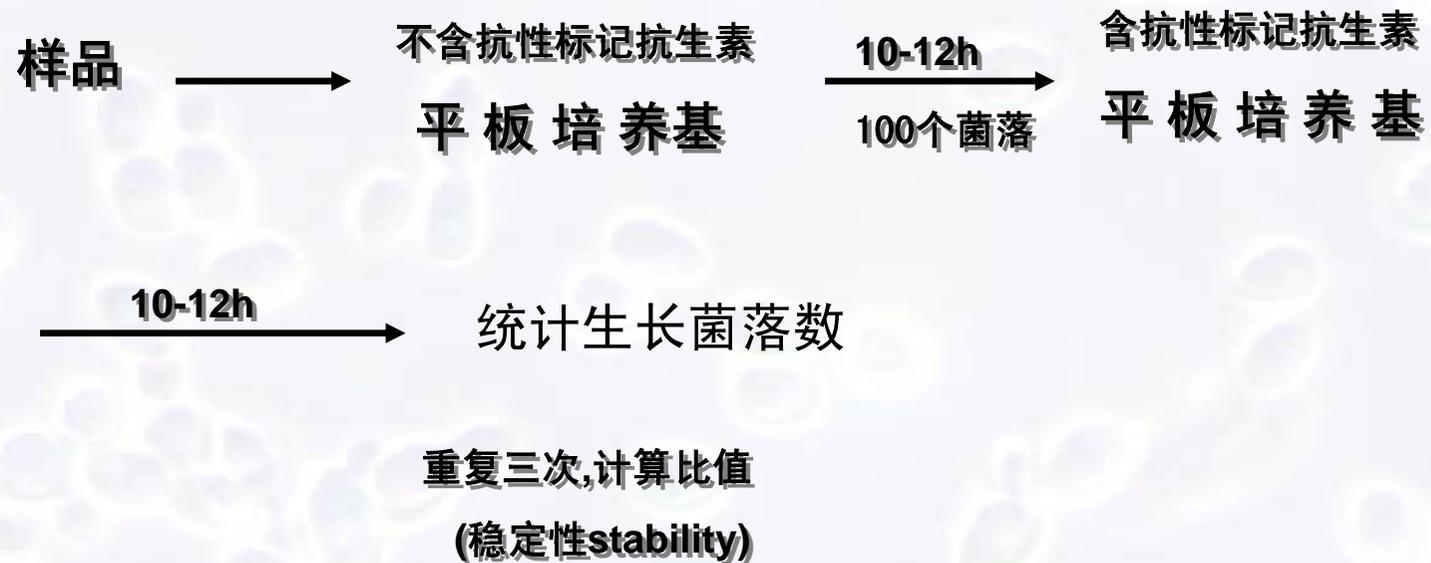
(1) 质粒不稳定的类型

- 分离性不稳定：这是由于在细胞分裂过程中质粒缺失分配到子细胞中而导致整个质粒丢失。
- 结构性不稳定：这是由于重组质粒DNA发生缺失、插入或重排引起的质粒结构变化。

(2) 质粒不稳定产生的原因

- 含质粒菌产生不含质粒子代菌的频率；
- 这两种菌比数率差异的大小。

(3) 质粒稳定性的分析方法



(4) 影响质粒稳定的因素

- 与质粒稳定有关的基因及质粒结构自身对其稳定性的影响
- 宿主对质粒稳定的影响
- 质粒拷贝数
- 重组质粒的表达对质粒稳定性的影响

(5) 使质粒稳定的措施

- 组建合适载体
- 选择适当宿主
- 施加选择压力
 - 抗生素添加法
 - 抗生素依赖变异法
 - 营养缺陷型法
- 控制基因过量表达
- 控制培养条件（温度、pH、DO）

(6) 质粒保持率

- 为考察质粒稳定性，在此引入质粒保持率 F_n 的概念， F_n 表示分批培养中细胞分裂 n 次后，培养液中基因工程细胞数与总细胞数的比值，即

$$F_n = \frac{\text{培养液中基因工程细胞数}}{\text{培养液中细胞总数}} \times 100\%$$

- 假定在分批培养过程中，细胞在对数生长期每次分裂时，其质粒丢失率为P，则 F_n 为

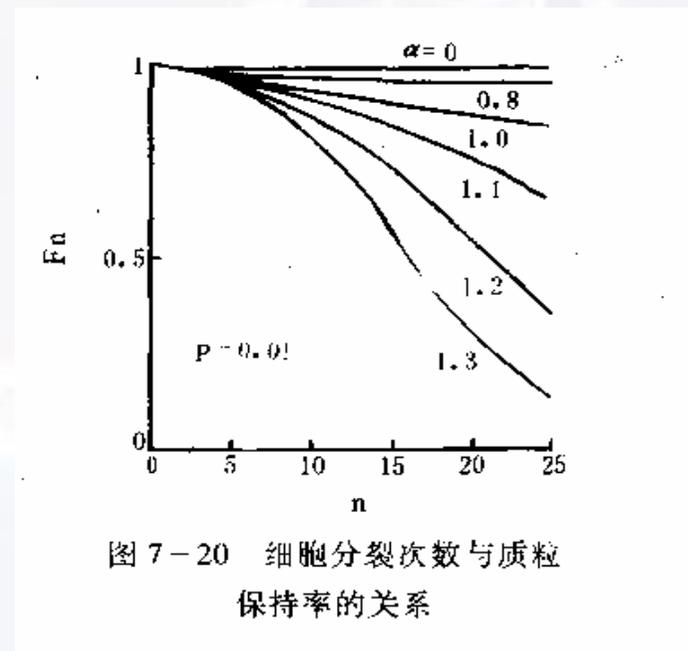
$$F_n = \frac{1 - \alpha - P}{1 - \alpha - P \cdot 2^{n(\alpha - P - 1)}}$$

α : 质粒丢失菌株与质粒保持菌株的比值

n : 细胞分裂次数

理论上基因工程菌载荷外源性基因，培养过程细胞大量合成外源性产物，其负荷大于质粒丢失菌株，故基因工程菌株比生长速率 μ 通常较质粒丢失菌株小，当然亦有变化不大者。

- 由图。假定 $P=1\%$ ，当 $\alpha=0$ 时，表明质粒丢失菌株不能生长，培养处于最理想的稳定状态，亦为质粒最稳定状态，此时 F_n 接近于1.0；但在无选择压力下， α 值越大， F_n 越低，即质粒稳定性越差。



3, 表达效率及质粒拷贝数控制

- 在工程菌培养过程中，表达效率与质粒拷贝数有关。在质粒稳定基础上，应尽可能提高细胞内质粒拷贝数。
- 在工业生产中易于操作的方法是在培养的不同阶段，采用不同培养温度达到提高拷贝数目的，在前培养阶段采用低温，以减少细胞负荷，此时拷贝数较低，而比生长速率升高，在主培养中途升高温度，质粒拷贝数增加，目的基因产量提高。

- 例如，用工程菌生产 β -内酰胺酶。在 25°C 下培养至浊度为5。再将培养温度提高至 37°C ，则质粒拷贝数增加，基因产物 β -内酰胺酶活性增加37倍左右。

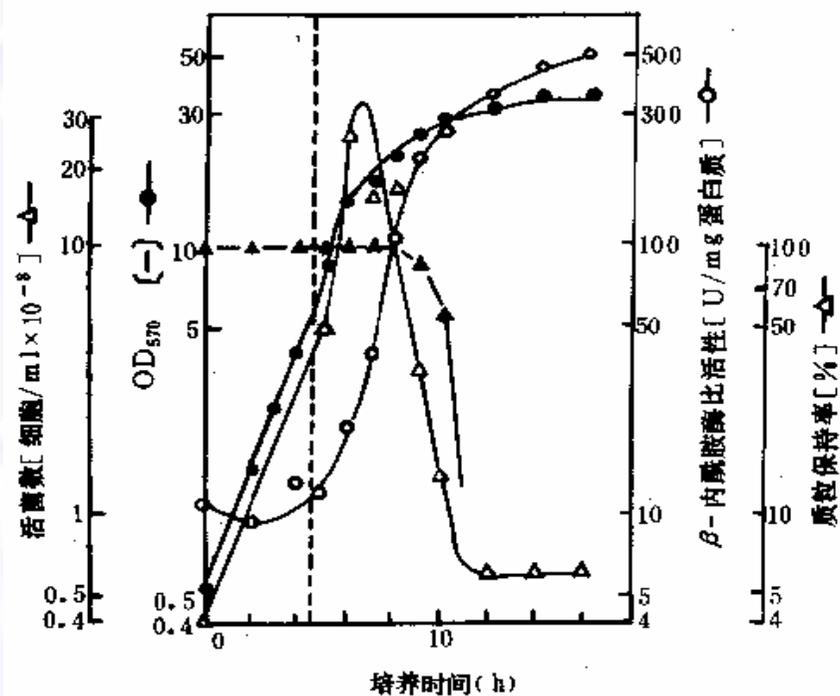


图 7-21 温度调节型质粒保持菌株的双阶段培养
虚线为培养温度由 25°C 提高到 37°C 的时间

第三节 工程菌分批培养动力学

对于质粒脱落性不稳定，细胞在分裂时丢失质粒的概率为 p ，

则

$$\frac{dX^+}{dt} = \mu_m^+ \frac{S}{K_s + S} (1 - p) X^+$$

$$\frac{dX^-}{dt} = \mu_m^- \frac{S}{K_s + S} X^- + \mu_m^+ \frac{S}{K_s + S} p X^+$$

所以

$$\frac{dX^-}{dX^+} = \frac{\mu_m^- X^- + \mu_m^+ X^+ p}{(1-p)\mu_m^+ X^+}$$

对于底物

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y^+} \frac{dX^+}{dt} + \frac{1}{Y^-} \frac{dX^-}{dt}$$

对于产物

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX^+}{dt} + \beta X^+$$

第四节 培养装置与产物的提取

- 工程菌的培养与普通微生物的培养方法类似。在进行以工业化为目的的DNA重组实验，以及为生产异种基因产物而培养重组菌时，当然应采用简便易行的培养系统。现在多半使用大肠杆菌为宿主，而在一般的通气搅拌罐中大肠杆菌能生长良好。

一、发酵罐

- 作为基因重组体的培养装置，与一直沿用的通气搅拌培养罐要有区别，即不仅要防止外部微生物侵入罐内，还必须采用不使培养物外漏的培养装置。按实验准则，可把这类密闭型通气搅拌式培养罐划分为操作液量20L以上和20L以下两种。
- 现今使用的微生物培养装置，按其灭菌法又分两类。
 - 一是在高压灭菌器中进行培养基及培养罐的灭菌，罐本身通常是玻璃制的，容量在10L以下的居多；
 - 另一类是20L以上的培养罐，一般为不锈钢制品，多采用通新鲜蒸气进行灭菌（原位灭菌）。

二、工程菌外漏的防范

- 首先应了解培养微生物在普通通气搅拌罐中可能发生外漏的部位和操作。归纳起来有：
 - 排气
 - 机械密封
 - 接种
 - 取样
 - 培养后的灭菌(通入湿热蒸气)
 - 排液(输至下一工序)。

1, 排气

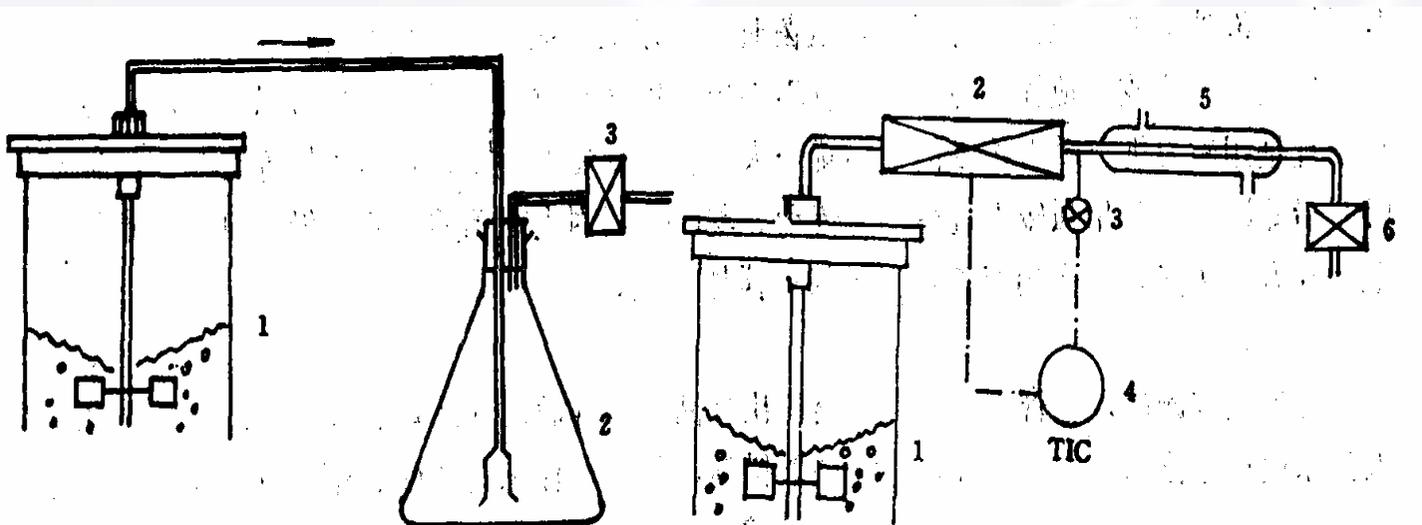


图11-8 排气鼓泡瓶
1,培养罐; 2,鼓泡瓶; 3,膜滤器

图 11-9 排气加热
1,培养罐; 2,电热器; 3,温度传感器; 4,温度调环器; 5,冷凝器; 6,膜滤器

2，机械密封

- 考虑培养液外漏的情况，培养基因工程菌时，以用上部搅拌的双机械密封为好。

3, 取样

- 普通发酵罐的取样管道在取样时会流出样品。取样后对样品管道灭菌时，未灭菌的培养液污水被排至排水管内。对此，必须采取措施，如用取样工具进行取样。此法可在培养液不接触外界的条件下取样。

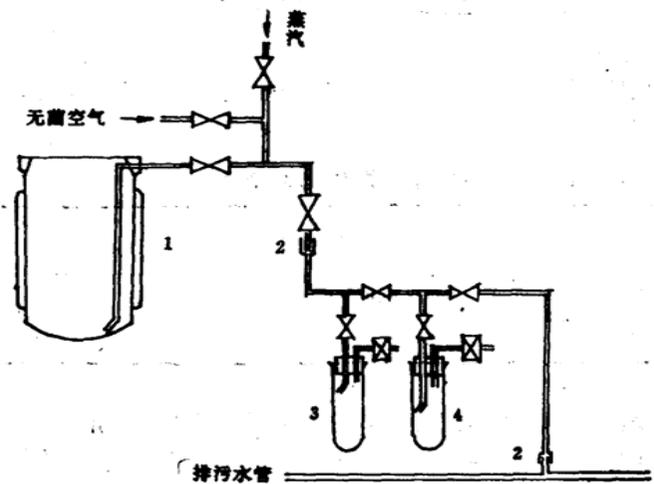
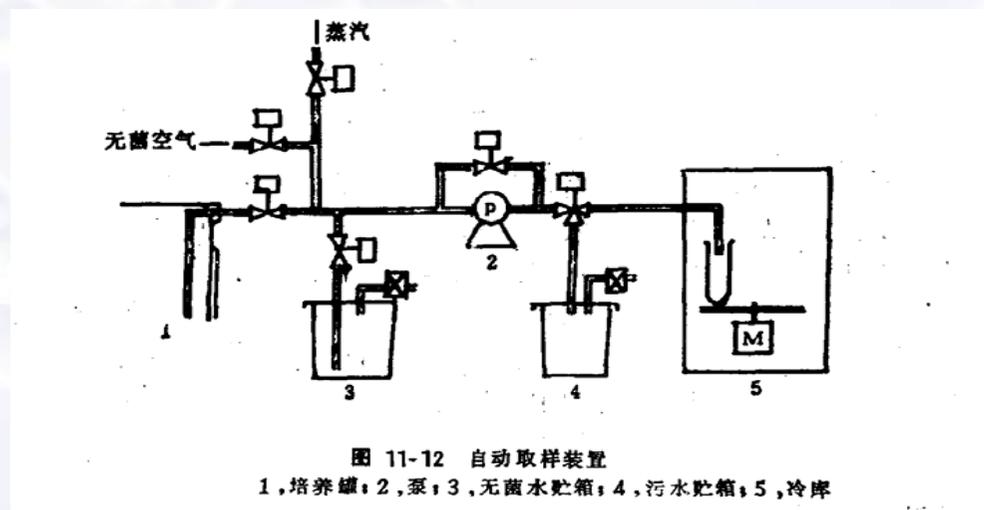


图 11-11 供重组菌用的取样装置
1, 培养罐; 2, 连接管; 3, 样品管 1; 4, 样品管 2

- 操作都由人工控制，操作中难免出错。为了减少操作人员接近工程菌的机会，尽量不用人工操作而采用自动取样装置最为安全。下图为自动取样装置的流程图。取样方法与人工取样程序大致相同。同时，取样过程因采用程序系统控制而易于变动。取出的样品保存于冷库内，冷库内的空气经过滤器过滤，内部也可进行灭菌。



4， 培养后的灭菌

- 培养后对培养液和管道等进行灭菌时，一开始流出的末灭菌排水有可能存在活的重组菌。取样、排液的管道中能产生这类排水，因此，一定要另行安装排水管并与废液灭菌贮槽等相连接，以便排放污水。

5, 接种

- 向罐内直接接种的方法是不安全的。简单的安全接种法是将种子瓶与培养罐以管相连接后，用无菌空气加压压入的方法。另一种方法是先把种子液在安全柜内移至供接种用的小罐内，再将其与培养罐连接，用蒸汽对连接部分灭菌后，把种子罐中的种子液接入培养罐内。

6， 排液

- 培养后要将培养液输送至贮罐等下一道工序，这时也有可能产生气溶胶和重组菌的扩散。安全的方法是在培养开始前就将排液口与下段工序相连接并进行灭菌，这样培养一结束即可直接输送培养液。如果排液口未与下段工序相连那就应与连结废液灭菌罐的排水管道相接，这样就安全了。

三、培养罐的管道布局

- 下图表示重组菌培养罐(P2、P3级)的整体流程图。重组菌培养罐中，凡有可能外漏重组菌的部分都与排污管道相连。图中所示的管路能分离并排出污染重组菌的污水。

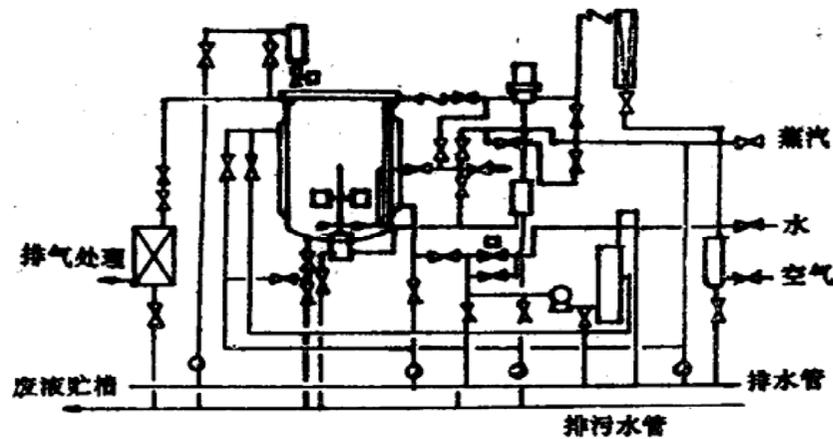


图 11-13 大量培养重组菌的配管流程图

四、基因工程产品的提取和精制

- 传统的发酵产品和基因工程产品在提取和精制上的不同，主要表现在下列两方面：
 - 传统发酵产品多为小分子(工业用酶除外，但他们对纯度要求不高，提取方法较简单)，其理化性能，如平衡关系等数据都已知，因此放大比较有根据；相反，基因工程产品大都是大分子，必要数据缺乏，放大多凭经验。
 - 基因工程产品大多处于细胞内，提取前需将细胞破碎，增添了很多困难。

- 另外，对于基因工程产品，还应注意生物安全(biosafety)问题，即要防止菌体扩散，特别对前面几步操作，一般要求在密封的环境下操作。例如用密封操作的离心机进行菌体分离时，整个机器处在密闭状态，在排气口装有一无菌过滤器，同时有一根空气回路以帮助平衡在排放固体时系统的压力，无菌过滤器用来排放过量的气体和空气，但不会使微生物排放到系统外。