



# 基因工程制药

生物技术制药

# 目 录

- ❖ 第一节 概述
- ❖ 第二节 基因药物生产的基本过程
- ❖ 第三节 **目的基因的获得**
- ❖ 第四节 基因表达
- ❖ 第五节 基因工程菌的稳定性
- ❖ 第六节 基因工程菌生长代谢的特点
- ❖ 第七节 基因工程菌发酵
- ❖ 第八节 基因工程药物的分离纯化
- ❖ 第九节 基因工程药物的质量控制
- ❖ 第十节 基因工程药物制造实例



## 基因药物生产的基本过程

---

- 从基因争夺到新冠疫情：最后一道防线——中国人的基因信息流失
- 基因争夺，是指20世纪90年代，美国和其他一些国家的机构，以基因研究的名义，在我国各地大规模采集人体基因样本。
- 这个基因争夺和现在还没有结束的新冠疫情有没有联系呢？

biosafety

biosecurity



## 基因药物生产的基本过程

---

克隆真核基因常用方法：逆转录法和化学合成法。  
(不能直接分离?)

### 一、逆转录法

- 逆转录法就是先分离纯化目的基因的mRNA，再反转录成cDNA，然后进行cDNA的克隆表达。
- cDNA与模板mRNA序列严格互补，而不含内含子。

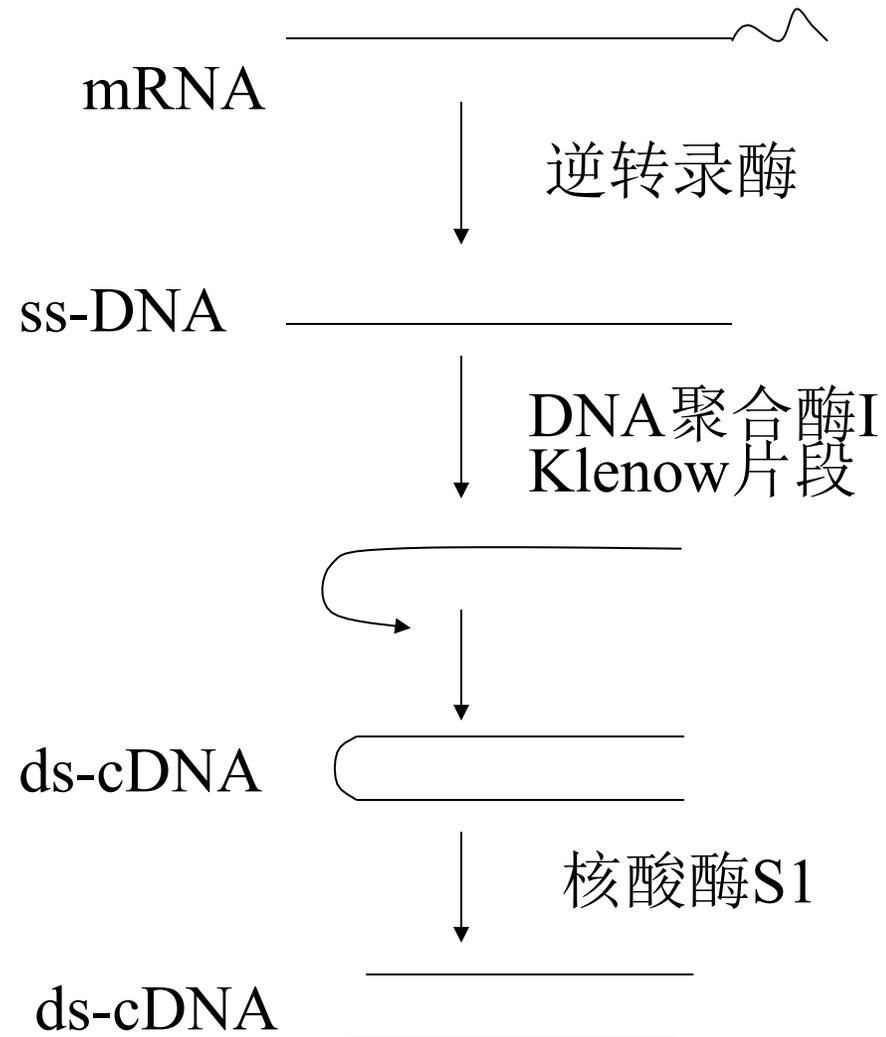


## 基因药物生产的基本过程

### • 逆转录法的步骤

- 1、mRNA的纯化
- 2、cDNA第一链的合成
- 3、cDNA第二链的合成
- 4、cDNA克隆
- 5、将重组体导入宿主细胞
- 6、cDNA文库的鉴定
- 7、目的cDNA克隆的分离和鉴定

# cDNA克隆示意图





# 基因药物生产的基本过程

## 1、mRNA的纯化

- 分离纯化目的基因的**mRNA是极其困难的**，细胞内含有3种以上的RNA，mRNA占细胞内总RNA总量的2%~5%，相对分子质量大小很不一致，由几百到几千个核苷酸组成。

**DNA**:95%核内， 5%细胞器

**RNA**: 75%细胞质， 10%核内， 15%细胞器

rRNA80-85%;tRNA10-15%;**mRNA1-5%**



## 基因药物生产的基本过程

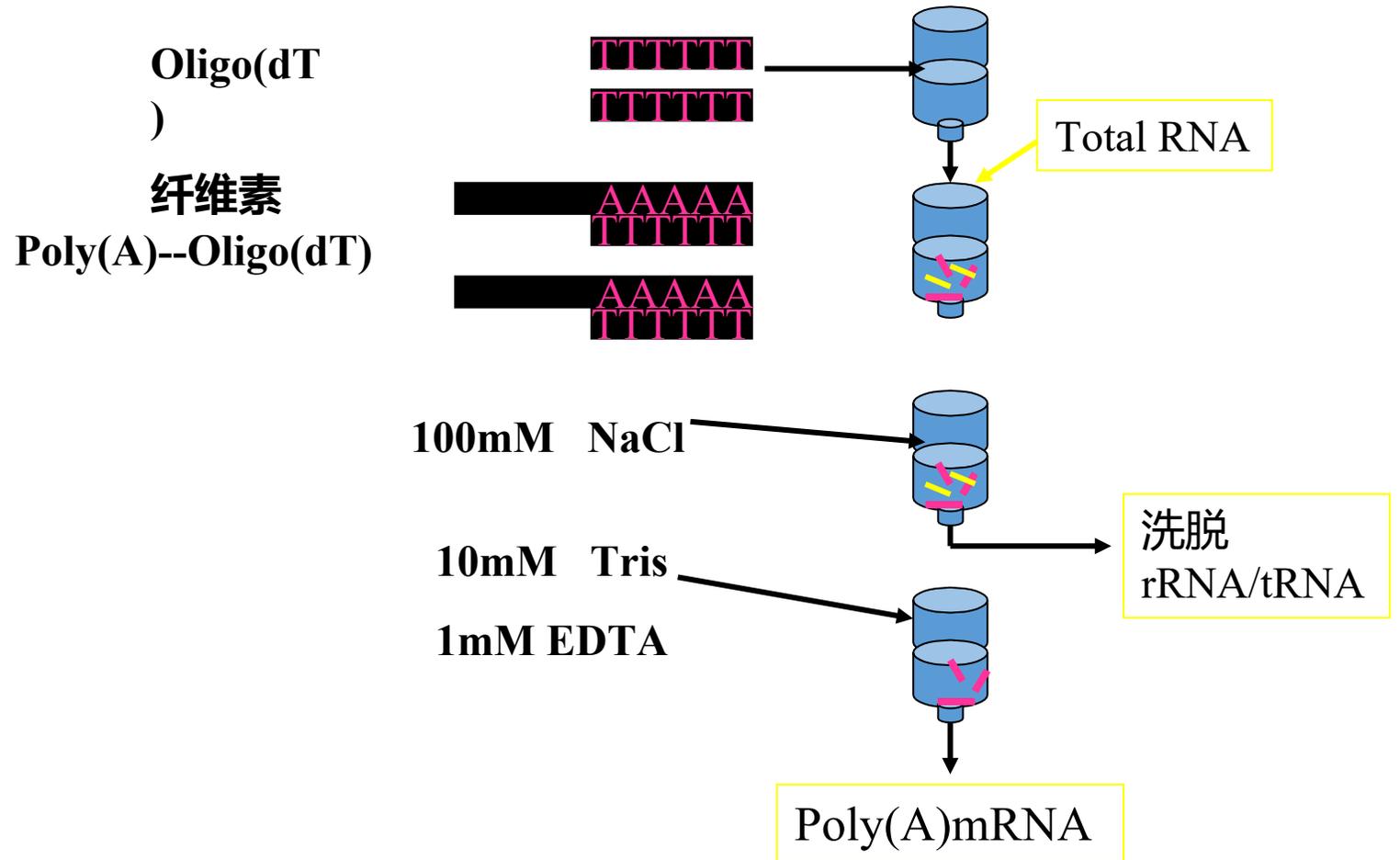
### 2、cDNA第一链的合成

可用寡聚dT作为引物，在逆转录酶的催化下，开始cDNA链的合成。



# 基因药物生产的基本过程

✦ 在真核细胞中mRNA的3'末端常常含有一多聚腺苷酸polyA组成的末端，长达20~250个腺苷酸，可采用Oligo dT-纤维素，以亲和层析法将mRNA从细胞总RNA中分离出来。洗脱方法是高浓度盐溶液使mRNA特异结合于寡聚dT，再以低盐溶液和蒸馏水将其洗脱，经过两次寡聚dT，可得到较纯的mRNA。



纤维素柱纯化Poly(A) mRNA 流程图



## 目的基因的获得

### 3、cDNA第二链的合成

- 除去cDNA-mRNA杂交链中的mRNA链（碱解或RNaseH酶解）
- 然后以cDNA第一链为模板合成第二链。由于第一链cDNA链3' - 末端往往形成一个发夹形结构，所以，可以从这一点开始合成cDNA第二链（常用Klenow酶或DNA聚合酶I）
- 切除发夹结构（核酸酶S1，专一性切除单链DNA）



## 目的基因的获得

### 4、cDNA克隆

- 用于cDNA克隆的载体有三类：

**细菌质粒**（如pBR322、 pUC等）插入片段<10kb

**噬菌体**（如 $\lambda$ gt10、  $\lambda$ gt11等） >10kb

**动植物病毒**

- 根据重组后插入的cDNA能否经转录和翻译合成蛋白质

**非表达型载体**（pBR322及 $\lambda$ gt10）

**表达型载体**（pUC及 $\lambda$ gt11）有利于目的基因的筛选



## 目的基因的获得

### 5、将重组体导入宿主细胞

**1、转化：**指质粒DNA 或以它为载体构建的重组DNA 导入细菌的过程。

**2、转染：**指病毒或以它为载体构建的重组子导入真核细胞的过程。

脂质体介导

原生质体融合

电穿孔

显微注射

基因枪

病毒介导

农杆菌转染

## 6、cDNA文库的鉴定

### 1、表型改变：

抗生素抗性（抗性基因失活和菌落或噬菌斑颜色改变）

a互补：

报告基因：

缺陷恢复：

### 2、结构特征：

DNA大小：

酶切图谱：

杂交（核酸、蛋白）：

PCR检测：

DNA序列分析

### 3、免疫化学检测：表达产物分析

## 7、目的cDNA克隆的分离和鉴定

- 从cDNA文库中分离特异的cDNA克隆，主要采用：

- (1) 核酸探针杂交法。

根据目的蛋白质的氨基酸序列，人工合成相应的单链寡核苷酸作为探针，从cDNA文库中分离特异cDNA克隆。

- (2) 免疫反应鉴定法。

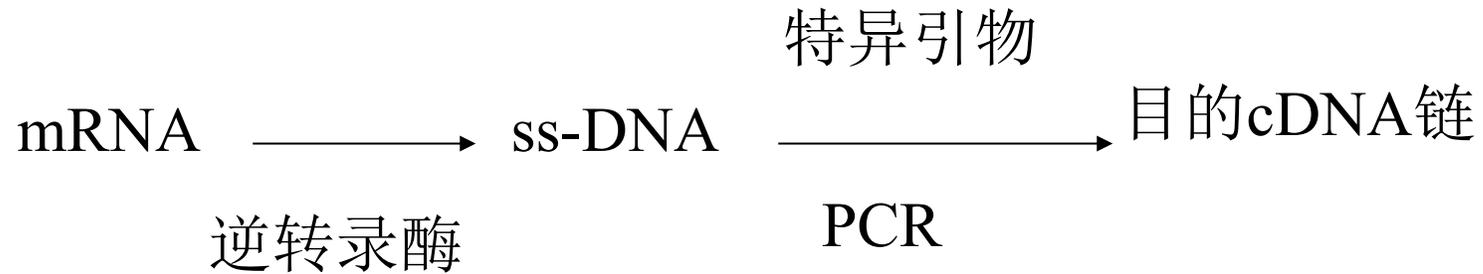
用表达型载体构建的cDNA文库，可用免疫学方法分组逐一鉴定各cDNA的表达产物，即以某种蛋白质的抗体寻找相应的特异cDNA克隆。



## 目的基因的获得

### 二、逆转录—聚合酶链反应法（RT-PCR）

- 1985，PCR发明以后，RT-PCR得到了广泛的应用。



- 不需合成第二链



## 目的基因的获得

### 三、化学合成法

- 较小的蛋白质或多肽的编码基因可以用化学合成法合成。
- 必须知道目的基因的核苷酸顺序或目的蛋白质的氨基酸顺序。
- 人工化学合成的限制：一不能合成太长的基因，50~60bp；二是人工合成时，遗传密码的简并性可导致中性突变；三是费用较高。

谢谢观看



thanks for watching