



# 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 基因工程菌的不稳定性
- ❖ 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





## 高密度发酵

高密度发酵：培养液中工程菌的菌体浓度在50g DCW/L（细胞干重/L）以上，最高200g DCW/L；

外源基因表达产量与单位体积产量正相关；

单位体积产量与细胞浓度和单个细胞平均表达产量正相关。

高密度发酵是在单个细胞平均表达产量不变的前提下，通过单位体积的菌体数量的倍增，实现总表达量的提高。



## 高密度发酵特点



菌体高密度，  
总表达量高；



生物反应器  
体积小



单位体积生产  
能力高



生产周期短，  
分离成本小。



## 影响高密度发酵的因素

- 1.培养基：C源、N源种类和含量；C:N含量比值；微量元素；无机盐（磷影响表达质粒的复制速率）。
- 2.溶氧浓度：空气分离系统提高氧分压；透明颤菌血红蛋白基因克隆到菌体中，提高氧传质能力；菌体与小球藻混合培养，藻细胞光合作用产氧供菌体呼吸。
- 3.pH值：大肠杆菌产酸、 $\text{CO}_2$ 必须加碱调节pH值。



## 影响高密度发酵的因素

4. 温度：控制菌体生长，温控诱导表达（诱导时机和持续时间，对数生长期）

5. 代谢副产物：C源物质供应超过三羧酸循环或电子传递链能力，产生乙酸，抑制菌体生长和蛋白表达。采取流加补料法，或加入甘氨酸、甲硫氨酸抑制乙酸生成。



# 实现高密度发酵的方法

## 1. 发酵条件的改进

(1) **培养基的选择**：6 g/L的甘油作碳源（缩短工程菌的利用时间），各组分浓度较普通提高2~3倍。

(2) **建立流加式培养方式**：营养液（补料）分批维持菌体高生长速率时添加。补料分批发酵包括：反馈补料（恒速补料、变速补料、**指数补料**）；非反馈补料（恒溶氧法、pH法、菌体浓度反馈法）。

(3) **提高供氧能力**：加压、纯氧、 $H_2O_2$ 、提高氧传质能力等。



# 实现高密度发酵的方法

## 1. 发酵条件的改进

(1) **培养基的选择**：6 g/L的甘油作碳源（缩短工程菌的利用时间），各组分浓度较普通提高2~3倍。

(2) **建立流加式培养方式**：营养液（补料）分批维持菌体高生长速率时添加。补料分批发酵包括：反馈补料（恒速补料、变速补料、**指数补料**）；非反馈补料（恒溶氧法、pH法、菌体浓度反馈法）。

(3) **提高供氧能力**：加压、纯氧、 $H_2O_2$ 、提高氧传质能力等。







## 实现高密度发酵的方法

### 2. 构建产乙酸能力低的工程化宿主菌

#### (1) 阻断乙酸生产的主要途径

用基因敲除技术或基因突变技术使大肠杆菌的磷酸转乙酰酶 (PTA) 基因pta1和乙酸激酶(ACK)基因acka失活, 使丙酮酸到乙酸的合成途径被中断。



# 实现高密度发酵的方法

## 2.构建产乙酸能力低的工程化宿主菌

### (2) 对碳代谢流进行分流

丙酮酸脱羧酶和乙醇脱氢酶 II 可将丙酮酸转成乙醇，  
毒性小于乙酸。



## 实现高密度发酵的方法

### 2.构建产乙酸能力低的工程化宿主菌

#### (3) 限制进入糖酵解途径的碳代谢流

用基因敲除技术将磷酸转移酶系统（PST）酶II的ptsG基因破坏，降低葡萄糖的摄取速率。



## 实现高密度发酵的方法

### 2.构建产乙酸能力低的工程化宿主菌

#### (4) 引入血红蛋白基因

透明颤菌血红蛋白基因vgb导入大肠杆菌，提高氧传质能力，耐缺氧环境。





## 实现高密度发酵的方法

### 3. 构建蛋白水解酶活力低的工程化宿主菌

对于以可溶性或分泌形式表达的目标蛋白而言，随着发酵后期各种蛋白水解能的累积，目标蛋白会遭到蛋白水解酶的作用而被降解。为了使对蛋白水解酶比较敏感的目标蛋白也能获得较高水平的表达，需要构建蛋白水解酶活力低的工程化宿主菌。

谢谢观看



thanks for watching