

## 第二章 基因工程制药

### 2.7 重组工程菌的培养

#### 一、课程目标

掌握基因工程菌培养的主要程序过程。

#### 二、课程组织

同学们大家好，上节课我们一起学习了工程菌的中试，今天我们一起学习基因工程菌的培养。在进行工业化生产时，工程菌株大规模培养的优化设计和控制对外源基因的高效表达至关重要。优化发酵过程既包括工艺方面的因素也包括生物学方面的因素。工艺方面的因素如选择合适的发酵系统或生物反应器，目前应用较多的有罐式搅拌反应器、鼓泡反应器和气升式反应器等。

**生物学方面的因素**包括多方面：首先是**与细菌生长密切相关的因素**，如发酵系统中的溶氧、pH、温度和培养基的成分等，这些条件的改变都会影响细菌的生长及基因表达产物的稳定性。第二是**对外源基因表达条件的优化**，在发酵罐内工程菌生长到一定的阶段后，开始诱导外源基因的表达，诱导的方式包括添加特异性诱导物和改变培养温度等，使外源基因在特异的时间进行表达，不仅有利于细胞的生长代谢，而且能提高表达产物的产率。第三是提高外源基因表达产物的总量，外源基因表达产物的总量取决于外源基因表达水平菌体浓度，在保持单个细胞基因表达水平不变的前提下，提高菌体密度可望提高外源蛋白质合成的总量。

**良好的发酵工艺**对表达外源蛋白至关重要，直接影响到产品的质量和生产成本，决定着产品在市场上的竞争力，基因工程菌的培养过程包括：通过摇瓶操作了解基因工程菌生长的基础条件，如温度、pH、培养基各种组分、碳氮比，分析表达产物的合成、积累对受体细胞的影响；通过发酵罐操作确定培养参数和控制的方案以及顺序。

下面我们学习一下基因工程的培养方式，

#### 2.7.1 基因工程菌的培养方式

##### 1. 补料分批培养

将种子接入反应器中后，培养一段时间，然后间歇或连续补加新鲜培养基，使菌体进一步生长。为保持基因工程菌生长所需的良好环境，延长对数生长期，获得高密度菌体，通常把溶氧控制和补料措施结合起来，根据生长规律来调节补料速率。

## 2. 连续培养

将种子接入反应器后，培养一段时间，到一定菌浓，开动蠕动泵，同时进料和出料，控制一定稀释速率，由于基因工程菌不稳定，可将生长阶段和基因表达阶段分开，进行两阶段连续培养，关键的控制参数是诱导水平、稀释率、细胞比生长速率。

## 3. 透析培养

利用膜的半透性使代谢产物和培养基分离，通过去除培养液中的代谢产物来解除其对生产菌的不利影响。

## 4. 固定化培养

基因工程菌固定化后，质粒的稳定性大大提高。便于进行连续培养，特别是对于分泌型菌体更为有利。

### 2.7.2 基因工程菌的培养工艺

利用基因重组技术构建的生物工程菌的发酵工艺**不同于传统的发酵工艺**，就其选用的**生物材料**而言，生物工程菌为含有带外源基因的重组载体的微生物细胞；从**发酵工艺**考虑，生物工程菌的发酵生产之目的是希望能获得大量的外源基因产物，尽可能减少宿主细胞本身蛋白质的污染。

**外源基因的高水平表达**，不仅涉及宿主、载体和克隆基因之间的相互关系，而且与其所处的环境条件息息相关。不同的发酵条件，工程菌的代谢途径也许不一样，对下游的纯化工艺会造成不同的影响，因此，发酵水平的好坏还直接影响产品的纯化及其质量。仅按传统的发酵工艺生产生物制品是远远不够的，需要对影响外源基因表达的因素进行分析，探索出一套既适于外源基因高效表达，又有利于产品纯化的发酵工艺。

现就几个主要因素进行分析。基因工程菌培养目的是为了使外源基因大量表达，尽可能减少宿主细胞本身蛋白质的污染，外源基因的高效表达，不仅涉及宿主、载体和克隆基因之间的相互关系，而且也其所处的环境也密切相关。不同的发酵条件，代谢途径也不相同，对下游的纯化工艺就会造成不同的影响。

#### 1. 培养基的影响

培养基的组成既要提高工程菌的生长速率，又要保持重组质粒的稳定性，使外源基因能够高效表达。使用不同的碳源对菌体生长和外源基因的表达有较大的影响，如**葡萄糖做碳源**菌体产生的副产物较多，甘油做碳源菌体得率较大酪蛋白水解物做氮源有利于产物的合成与分泌。**无机磷**在许多初级代谢的酶促反应中是一个效应因子，在低磷浓度下，尽管最大菌浓较低，但产物产率和产物浓度都较高。启动子只有在低磷酸盐时才被启动。

## 2. 接种量的影响

接种量的大小影响发酵的产量和发酵周期，量小，延长菌体延迟期，不利于外源基因的表达；量大，有利于对基质的利用，可以缩短生长延迟期，并使产生菌能迅速占领整个培养环境，减少污染机会，但会使菌体生长过快，代谢产物累积过多，反而会抑制后期菌体的生长。

## 3. 温度的影响

温度对基因表达的调控作用可发生在复制、转录、翻译或小分子调节分子的合成上。复制，可通过控制复制来改变基因拷贝数，影响基因的表达；转录可通过影响 RNA 聚合酶的作用或修饰 RNA 聚合酶，来调控基因表达。酶促反应。

## 4. 溶解氧的影响

菌体在大量扩增过程中，进行耗氧的氧化分解代谢，采用调节搅拌转速的方法可以改善培养过程中的氧供给，提高活菌产量。在发酵前期采用较低转速，即可满足菌体生长，在培养后期，提高搅拌转速才能满足菌体继续生长的要求。这样既节约能源又可满足各个不同阶段菌体生长的要求。

## 5. 诱导剂的影响

IPTG 是一种十分有效的乳糖操纵子的诱导剂。然而由于 IPTG 对于人体具有潜在的危险，IPTG 诱导表达应用于人体的重组药物时，有可能对最终的产品带来一些不利影响。另的价格也较为昂贵，尤其是在较大体积的发酵罐中进行诱导时，IPTG 的应用会造成发酵成本的增加。

## 6. 诱导时机的影响

一般在对数生长期或对数生长期后期升温诱导表达，对数生长期，细胞快速繁殖，直到细胞密度达到  $10^9$  个/每毫升为止，这时菌群数目倍增，对营养和氧的需求量急增，营养和氧成了菌群旺盛代谢的限制因素。

## 7. pH 的影响

两阶段培养工艺，培养前期着重于优化工程菌的最佳生长条件，培养后期着重于优化外源基因的表达，生长最佳期 pH6.8-7.4，外源蛋白表达时 pH6.0-6.5。

### 2.7.3 基因工程菌的培养设备

生物药品已进入生物技术时代，愈来愈多的应用发酵罐来进行大规模培养基因工程菌。为了防止基因工程菌丢失携带的质粒，保持基因工程菌的遗传特性，因而对发酵罐的要求十分严格。由于生化工程学和计算机技术的发展，新型自动化发酵罐完全能够满足安全可靠地

培养基因工程菌的要求。

常规做生物发酵设备可直接用于基因工程菌的培养。但是微生物发酵和基因工程菌发酵有所不同，微生物发酵主要收获的是它们的初级或次级代谢产物，细胞生长并非主要目标，而基因工程菌发酵是为了获得大量的外源基因表达产物，由于这类物质是相对独立于细胞染色体之外的重组质粒上的外源基因所合成的、细胞并不需要的蛋白质，因此、培养设备以及控制应满足获得高浓度的受体细胞和高表达的基因产物。

#### **发酵罐组成部分有：**

- (1) 发酵罐体
- (2) 保证高传质作用的搅拌器
- (3) 精细的温度控制和灭菌系统
- (4) 空气无菌过滤装置
- (5) 残留气体处理装置
- (6) 参数测量与控制系统
- (7) 培养液配制及连续操作装置等

#### **对发酵罐的特殊要求**

- (1) 要提供菌体生长的最适条件；
- (2) 培养过程不得污染，保证纯菌培养；
- (3) 培养及消毒过程中不得游离出异物，干扰细菌代谢活动；
- (4) 发酵罐的结构材料的稳定性要好，一般要应用不锈钢制成；
- (5) 罐体表面光滑易清洗，灭菌时没有死角；
- (6) 与发酵罐连接的阀门要用膜式阀，不用球形阀；
- (7) 所有的连接接口均要用密封圈密封，不留“死腔”，不得有泄漏
- (8) 搅拌器转速和通气应适当；
- (9) 空气过滤系统要采用活性炭和玻璃纤维棉材料；
- (10) 培养液要经化学处理或热处理后才可排放；
- (11) 发酵罐排气口须有蒸汽灭菌或微孔滤菌器除菌后才将废气放出
- (12) 轴封可采用磁力搅拌或双端面密封。

随时计算机自动控制技术的发展，基因工程菌的发酵效率不断提高，培养的种类也日益增加。

同学们，大家好，今天我们主要学习了基因工程菌的培养，基因工程菌的培养方式、基因工程菌的培养工艺、基因工程菌的培养设备，通过改进培养条件可以获得高密度的发酵，

今天我们就讲的这里，下节课再见。