

第二章 基因工程制药

2.4 基因表达

一、课程目标

1) 知识学习目标

掌握基因表达所用的宿主菌

了解基因工菌生长代谢的特点

2) 思政育人(尊重生命、遵守伦理)

通过“基因编辑婴儿”事件，让学生认识到这项基因操作给这两位刚出生的孩子带来的好处微乎其微，但付出的代价是各种根本无法预测和治疗的遗传疾病风险。这样的操作显然不符合人类世界最基本的伦理底线。科学技术是推动社会发展的双刃剑，我们应该尊重生命，遵守伦理。

二、思政案例

2018年年底的“基因编辑婴儿”事件：贺建奎利用基因编辑技术，在至少七对艾滋病夫妇的受精卵中修改了一个名为CCR5的基因，而且一对夫妇的双胞胎女儿已经出生。在事件刚刚发生的时候，加州理工学院博士、浙江大学教授、神经生物学家王立铭就曾做出过详细解读。这一事件让我们思考，狂飙突进的生命科学研究究竟有无伦理和监管的边界。

三、课程组织

导入：基因表达是指结构基因在生物体中的转录、翻译以及所有加工过程。进行基因表达，我们所关心的是目的基因的表达产量、表达产物的稳定性，产物的生物学活性和表达产物的分离纯化。

知识点学习：

本节包括宿主菌的选择、大肠杆菌体系中的基因表达，酵母体系中的基因表达。首先我们学习宿主细胞的选择理想的宿主细胞应满足以下要求：1、容易获得较高浓度的细胞；2、能利用廉价易得的原料；3、不致病、不产生内毒素；4、发热量低，需氧低，适当的发酵温度和细胞形态；5、容易进行代谢调控；6、容易进行DNA重组技术操作；7、产物的产量、产率高，产物容易提取。

知识点学习：宿主分类

宿主可分为两大类：**原核细胞**有大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、链霉菌；**真核细胞**有酵母菌、丝状真菌、哺乳动物细胞。

1. 原核细胞

(1) 大肠杆菌

大肠杆菌遗传背景清楚，目标基因表达水平高，培养周期短，抗污染能力强。大肠杆菌表达时不存在信号肽所以表达的蛋白质是胞内产物，要经过细胞破碎才能分离出目的蛋白。生成的蛋白质常形成不溶性的包含体，要经过复性才能恢复其生物活性。

(2) 枯草芽孢杆菌

分泌能力强，表达的蛋白质是胞外产物，生成的蛋白质不形成包含体。不使蛋白质糖基化，且有胞外蛋白酶，能对产物进行不同程度的降解。

(3) 链霉菌

非致病，使用安全；分泌能力强，可以将表达产物直接分泌到培养液中(胞外产物)；具有糖基化能力。

2. 真核细胞

(1) 酵母

特点：是研究基因表达调控最有效的单细胞真核微生物，基因组小，仅为大肠杆菌的4倍，世代时间短，有单倍体、双倍体两种形式。繁殖迅速、可以廉价地大规模培养，没有毒性。能将表达产物直接分泌到胞外，表达产物能糖基化。

(2) 丝状真菌

有很强的蛋白质分泌能力，能正确进行翻译后加工，而且糖基化方式与高等真核生物相似。

(3) 哺乳动物细胞

产物可分泌到胞外，细胞培养液成分完全可控制，使产物纯化较容易，表达产物能糖基化，接近或类似与天然产物；动物细胞生产慢，生产率低，培养条件苛刻，费用高，培养液浓度较稀。

综上所述，目前使用**最广泛的宿主**仍然是大肠杆菌和酿酒酵母。因为对它们的遗传背景研究得比较清楚，建立了许多适合于它们的克隆载体和DNA导入方式，并且许多外源在这两种宿主菌中得到表达成功。

知识点学习：大肠杆菌体系中的基因表达

大肠杆菌作为外源基因的表达宿主，遗传背景清楚，技术操作简便，研究周期短，培养条件大规模发酵经济，因此备受遗传工程专家的重视。目前大肠杆菌是应用最广泛、最成功的高效表系，并常常作为高效表达研究的首选体系。

1. 载体

根据真核基因在原核细胞中表达的特点，**表达载体应具备下列条件：**

(1) 载体能够独立复制，有复制起点，有严紧型和松弛型，严紧型伴随宿主染色体的复制而复制，在宿主细胞中拷贝少(1-3)；松弛型的复制可不依赖与宿主细胞，在宿主细胞中拷贝多达 3000 个。(2). 应有灵活的克隆位点和方便的筛选标记，利于外源基因的克隆、鉴定和筛选。

(3) 应具有很强的启动子，能为达成杆菌的 RNA 聚合酶所识别。

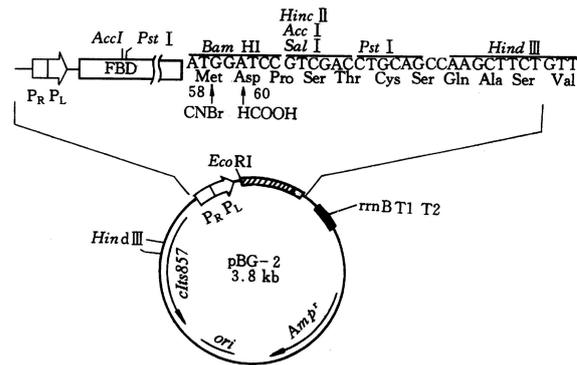
(4) 应具有阻遏子，使启动子受到控制，只有当诱导时才能进行转录。

(5) 应具有很强的终止子，以便使 RNA 聚合酶集中力量转录克隆的外源基因，而不转录其他无关的基因，同时很强的终止子所产生的 mRNA 较为稳定。P 14

(6) 所产生的 mRNA 必须有翻译的起始信号。

2 影响目的基因在大肠杆菌中表达的因素

外源基因在宿主中的表达受许多因素影响的，所以在建立表达体系时要综合考虑各种因素的作用，建立一个合适的表达体系，从而使外源基因得到最大的表达量，获得最多的表达产物。



融合表达质粒 pBG-2 的结构

(1) 外源基因的拷贝数

外源基因是克隆到载体上的，所以载体在宿主中的拷贝数就直接与外源基因的表达相关，应将外源基因克隆到高拷贝的质粒载体上，这对于提高外源基因的总表达水平非常有利。

(2) 外源基因的表达效率

启动子的强度一在转录水平上直接影响基因的表达、核糖体结合位点的有效性、SD 序列和起始 ATG 的间距、密码子的组成等都会不同程度地影响外源基因的表达。

(3) 表达产物的稳定性

表达的外源基因，其产物会受到宿主细胞内降解该蛋白质的酶的作用，使得实际产量很低。可采用下列方法来提高表达产物的稳定性：组建融合基因，产生融合蛋白；利用大肠杆菌的信号肽或某些真核多肽中自身的信号肽，把真核基因产物运输到胞浆周质的空隙中，而使外

源蛋白不易被酶降解；采用位点特异性突变的方法，改变真核蛋白二硫键的位置，从而增加蛋白质的稳定性；选用蛋白酶缺陷型大肠杆菌为宿主细胞。

(4) 细胞的代谢负荷

外源基因在宿主细胞内的大量表达，必然会影响宿主细胞正常的生长代谢，有些产物对宿主还会有毒害作用，将细胞杀死，为了减轻宿主细胞的代谢负荷，同时还得提高外源基因的表达水平，可以采取当宿主细胞大量生长时，抑制外源基因的表达。即将细胞的生长和外源基因的表达分成两个阶段，使表达产物不会影响细胞的正常生长，当宿主细胞的生物量达到饱和时，再进行基因产物的诱导合成，以减低宿主细胞的代谢负荷；另外，将宿主细胞生长与重组质粒的复制分开，当宿主细胞迅速生长时，抑制重组质粒的复制，当细胞生长量累积到一定水平后，再诱导细胞中重组质粒的复制，增加质粒拷贝数。

(5) 工程菌的培养条件

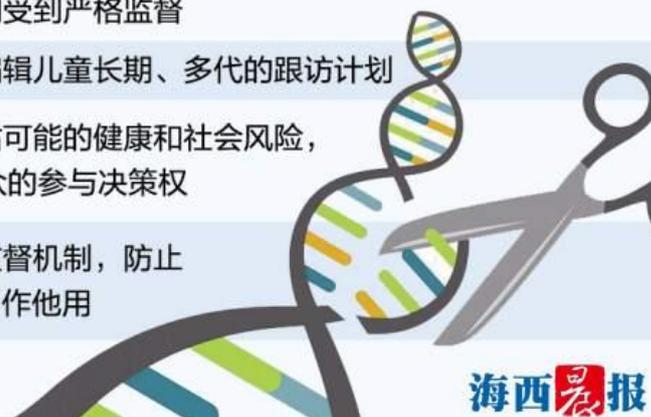
优化培养条件使外源基因大量表达。工程菌的培养条件外源基因的高水平表达，不仅涉及宿主、载体和克隆基因三者之间的关系，而且与其所处的环境条件息息相关，必须进行优化。必须优化基因工程菌的培养条件，以提高基因表达水平。由于细菌在 100L 以上的发酵罐中的生长代谢活动与实验室条件下 200mL 摇的生长代谢活动存在很大差异，在进行工业化生产时，工程菌株大规模培养和优化设计和控制对基因的高效表达至关重要。

思政案例引入：科学技术是一把双刃剑，贺建奎利用基因编辑技术，在至少七对艾滋病夫妇的受精卵中修改了一个名为 CCR5 的基因，而且一对夫妇的双胞胎女儿已经出生。

基因编辑七条准则

美国科学院关于人类基因编辑的声明委员会曾就基因编辑提出七条规范标准：

1. 没有其他替代手段
2. 仅限于编辑已经被证实会致病或强烈影响疾病的基因
3. 有关于手术的风险及潜在健康影响的可靠临床前数据
4. 试验期间受到严格监督
5. 对基因编辑儿童长期、多代的跟访计划
6. 反复评估可能的健康和社会风险，保持公众的参与决策权
7. 可靠的监督机制，防止技术被另作他用



讨论：贺建奎的基因编辑婴儿是一项没有任何必要性和先进性、有着重大动机不纯可能性的违法行为。将个人名利以科学的名义、选择预防艾滋病做道德伪装，凌驾于人权和伦理之上。罔顾可能对两个女孩、对孩子母亲、对整个人类可能导致的风险，做了完全没必要的事情。实验即便成功了也很难达到预期目标，两个孩子在生物学意义上也不能完全免疫 HIV，我们更没有办法去进行充分的对照实验。面对未知，**我们一定要有大胆假设的胆识，但更要有小心求证，尤其是遵守和维护科学伦理的基本义务。**对基因编辑这样目前非常不可控、风险巨大的事情来说，不到万不得已，不在专业、严格的监管下决不能轻易地把人当做实验品、对照物来操作。医学的真谛不是把人当做实验品去实现名利，而是让人更加健康地成为人。

知识点学习：真核基因在大肠杆菌中的表达形式。

三种：融合蛋白、非融合蛋白、分泌型。

(1) 融合蛋白

融合蛋白的氨基端是原核序列，羧基端是真核序列，这样的蛋白质是由一条短的原核多肽和真核蛋白结合在一起的。

优点：基因操作简便、蛋白质在菌体内比较稳定、不易被细菌酶类所降解、容易实现高效表达。

缺点：只能做抗原作用，原核多肽序列可能会影响真核蛋白的免疫原性。可再切割成两个多肽链。

(2) 非融合蛋白

表达非融合蛋白的操纵子必须改建成：细菌或噬菌体的启动子—细菌的核糖体结合位点—真核基因的起始密码子—结构基因—终止密码。要求核糖体结合位点序列与翻译起始密码之间的距离要合适，稍有不适就会影响表达效率。

优点：能够较好地保持原来的蛋白活性；

缺点：容易被蛋白酶破坏，氨基末端常常带有甲硫氨酸，在人体内用药时可能会引起人体免疫反应。

(3) 分泌型

将外源基因接到信号肽之后，使之在胞质内有效地转录和翻译，当表达的蛋白质进入细胞外膜和细胞内膜之间的周质后时，被信号肽酶识别切割，从而释放出有生物活性的外源基因表达产物。

特点：一些可被细胞内蛋白酶所降解的蛋白质在周质中是稳定的；由于有些蛋白质能按一定的方式折叠，所以在细胞内表达时无活性的蛋白质分泌表达时却具有活性；蛋白质信号肽和编码序列之间能被切割，因而分泌后的蛋白质产物不含起始密码所编码的甲硫氨酸。产量不高，信号肽不被切割或不在特定位置上切割。

知识点学习：酵母体系中的基因表达

1 载体

酵母载体是可以携带外源基因在在酵母细胞内保存和复制，并随酵母分裂传递到子代细胞的DNA或RNA单位。

从大肠杆菌中制备质粒要比从酵母中容易得多，因此酵母质粒的加工和制备大部分是通过大肠杆菌进行的，只有在最后阶段在转入酵母中。

酵母载体有两类：普通表达载体和精确表达载体。

普通表达载体，只能方便地引入外源基因并进行表达，对表达产物的组成，特别是对其氮末端氨基酸是否有增减并无严格要求。

精确表达载体，要求在启动子或前导肽编码序列的适当部位有内切酶位点，以利于接入外源基因，并使它在表达和加工后氮末端氨基酸序列与天然产物相同，既无多余的氨基酸，也无缺失的氨基酸。

2 影响目的基因在酵母菌中表达的因素

(1) 外源基因的拷贝数

拷贝数要适当，高拷贝数的质粒载体可使外源基因高效表达，但会引起细胞生长量的降低，单拷贝的质粒载体对细胞的最大生长没有影响，能达到较高效的表达。

(2) 外源基因的表达效率

与启动子、分泌信号、终止序列有关。要使外源基因在酵母中表达必须将外源基因克隆到酵母表达载体的启动子和终止子之间，构成表达框架。分泌信号包括信号肽部分以及前导肽部分的编码序列，它帮助后面的表达产物分泌出酵母细胞，并在适当的部位由胞内蛋白酶加工切断表达产物与前导肽之间的肽键，产生正确的表达产物。终止序列保证了转录产物在适当的部位终止和加上多聚腺苷酸尾巴，这样形成的 mRNA 可能比较稳定并被有效地翻译。

(3) 优化基因的内部结构

(4) 外源基因的糖基化

(5) 阻止外源基因的降解

(6) 选择和合适的酵母生长密度

宿主菌株应具备下列要求：菌体生长力强；菌体内源蛋白酶要较弱；菌体性能稳定；分泌能力强。

总结：我们在基因表达这一节中主要讲授了宿主菌的选择、大肠杆菌体系中的基因表达、酵母体系中的基因表达，这节课我们学到这里，下节课我们再见。