

第二章 基因工程制药

2.5 基因工程菌的不稳定性及对策

一、课程目标

1) 知识学习目标

1. 掌握基因工程菌的稳定性概念
2. 了解基因工程菌中试生产的一些条件

2) 思政育人(科研诚信、社会责任)

通过“湖南黄金大米”事件，让学生认识到“黄金大米”并没有经过严格的前期论证就已经进入到了人体试验阶段，这是极其不负责任的行为，违背了科学家的职业习惯和规范，培养学生科研诚信意识以及明确科研工作者需要承担的职业伦理责任，社会伦理责任和未来伦理责任。

二、思政案例



2012年8月1日，一篇发表在美国著名学术期刊《临床营养学》上的题为《“黄金大米”中的 β -胡萝卜素与油胶囊中 β -胡萝卜素对儿童补充维生素A同样有效》的论文里写到，2008年5月-6月，美国塔夫茨大学曾对中国湖南衡阳市25名6-8岁的小学生进行过转基因大米的人体试验。论文的作者中有三名中国人。

“黄金大米”是一种转基因大米，因色泽金黄而得名，它不同于正常大米之处在于其主要功能是帮助人体增加吸收维生素A。科学家研制它是为了治疗维生素A缺乏症。

三、课程组织

引入：基因工程菌在传代过程中经常出现质粒不稳定的现象，有分裂不稳定和结构不稳定，**分裂不稳定**是指工程菌分裂时出现一定比例不含质粒子代菌的现象；**质粒结构不稳定**是指外源基因从质粒上丢失或碱基重排、缺失所致工程菌性能的改变。

知识点讲解：质粒的不稳定性

常见的是分裂不稳定，与**两个因素**有关：含质粒菌产生不含质粒子代菌的频率；这两种菌的比生长速率差异的大小。

含低拷贝质粒的工程菌产生不含质粒子代菌的频率较大，增加工程菌中的质粒拷贝数能提高质粒的稳定性。含高拷贝质粒的工程菌产生不含质粒子代菌的频率较低，但是大量外源质粒的存在使含质粒菌的生长速率明显低于不含质粒菌，而不含质粒菌一旦产生，能较快地取代含质粒菌而成为优势菌，因而对这类菌进一步提高质粒拷贝数反而会增加含质粒菌的长负势。

质粒稳定性的分析方法：将工程菌培养液样品适当稀释，均匀涂布于不含抗性标记抗生素的平板培养基上，培养 10-12 小时，然后随机挑出 100 个菌落接种到含抗性标记抗生素的平板上，培养 10-12 小时，统计长出的菌落数，每一样品应取 3 次重复的结果，计算出比值，该比值反映了质粒的稳定性。

思政案例引入：基因工程操作过程中质粒存在不稳定，而同样用基因工程手段获得的转基因食品，是不是也存在安全隐患？

讨论：“黄金大米”事件一出，引起了轩然大波。人们进一步思考“黄金大米”是否安全，该不该拿儿童做实验。“黄金大米”事件暴露出目前一些科学家缺乏科研诚信和违规操作的现象。说明科学家应承担起相应的伦理责任。科学家只有承担伦理责任、才能促进科学技术事业的不断进步。我们认为科学家的伦理责任包括三方面：职业伦理责任，社会伦理责任和未来伦理责任。

知识点讲解：提高质粒稳定性的方法

由于基因工程菌的培养与发酵受许多因素与条件的影响，而且随机性和可变性大，要使基因菌的质粒保持稳定的遗传性状，仍存在各种问题有待于解决。由于基因工程菌的多样性，所的手段常缺乏通用性，一般要采取具有针对性的措施，才能获得较好的效果。

(1) 选择合适的宿主菌

重组质粒的稳定性在很大程度上受宿主菌遗传特性的影响，宿主菌的比生速率、基因重组的特性、染色体上是否有与质粒和外源基因同源序列等都会影响质粒的稳定性。同一宿主菌对不同质粒的稳定性不同，而同一质粒在不同宿主菌中的稳定性也有差别。因此对于不同的表达系统、外因表达产物的性质、表达产物是否需要后进行加工及其复杂程度将决定宿主菌的选择，如真核或生物、蛋白酶缺陷型或营养缺陷型等的宿主菌。相对而言，重组质粒在大肠杆菌中比较稳定，在芽孢杆菌和酵母中较不稳定。

(2) 选择合适的载体

质粒的特性在重组菌中，质粒载体的大小与拷贝数是影响质粒分离不稳定的重要因素。插入片段的大小及特性等在质粒分离不稳定性中有关系，为了构建稳定的结构体，最好利用小的质粒，小的质粒在高密度发酵中遗传性状比较稳定，而大的质粒往往由于发酵环境中各种因素的影响，而变异的概率较高。对于**松弛型质粒**载体、一般情况下，伴随着细胞分裂，质粒以随机方式分配到子代细胞中，而质粒载体的寡聚化效应会导致质粒载体拷贝数大大降低，从而加重质粒的分离不稳定性，含低拷贝质粒的重组菌产生不含质粒的子代菌的频率较大，因而这类重组菌增加质粒拷贝数能提高质粒的稳定性；质粒拷贝数越高，出现无质粒子代菌的概率就越低，质粒就越稳定。但是由于大量外源质粒的存在使含质粒菌的比生长速率明显低于不含质粒菌，因而不含质粒菌一旦产生后，能较快地取代含质粒菌而成为优势菌，因而对这类菌进一步提高质粒持贝数反而会增加含质粒菌的生长速度，对质粒的稳定性不利。

对同一工程菌来说，通过控制不同的比生长速率可以改变质粒的拷贝数。重组菌的稳定性受遗传及环境因素两方面的控制，所以可以通过基因水平的控制来限制反应器中无质粒菌的繁殖以提高系统中含质粒菌的比例。在重组菌培养过程中通常采用增加“选择压力”来提高重组菌的稳定性。选择压力通常包括：

①在质粒构建时，加入**抗生素抗性基因**，在生物反应器的培养基中加入抗生素以抑制无质粒菌的生长和繁殖。在培养基中加选择性压力如抗生素等，是工程菌培养中提高质粒稳定性常用的方法。含有抗性基因的重组质粒转入宿主菌，重组菌获得了抗药性，发酵时在培养基中加入适量的相应抗生素可以抑制质粒丢失菌的生长，消除了重组质粒分裂不稳定的影响，从而提高发酵生产率。但应尽可能避免使用抗生素，必须使用时应选择安全性风险相对较低的抗生素品种，且产品的后续纯化工艺应保证可有效去除制品中的抗生素；如后续工艺不能有效去除，则不得添加。严禁使用青霉素或其他 β -内酰胺类抗生素。

②利用**营养缺陷型细胞**作为宿主菌，构建营养缺陷型互补质粒，设计营养缺陷型培养基抑制无质粒菌的生长和繁殖。选择压力对于质粒或宿主细胞本身发生了突变，虽保留了选择性标记、但不能表达目的产物的细

(4) 分阶段控制培养

外源基因表达水平越高，重组质粒越不稳定。由于外源基因高效表达造成质粒不稳定时，可以考虑将发酵过程分阶段控制，即在生长阶段使外源基因处于阻遏状态，避免由于基因表达造成质粒不稳定性问题的发生，使质粒稳定地遗传，在获得需要的菌体密度后，再去阻遏或诱导外源基因表达。由于第阶段外源基因未表达，从而减少重组菌与质粒丢失菌的比生长速率的差别，增加了质粒的稳定性。连续培养时可以考虑采用多级培养，如在第一级进行生长，维持菌体的稳定性，在第二级进行表达。

(5) 控制培养条件

控制培养条件：调控环境参数如温度、pH、培养基组分和溶解氧浓度含质粒的基因重组

菌对发酵环境的改变比不含质粒菌反应慢，间歇改变培养条件以改变两种菌比生长速率，可改善质粒稳定性。通过间歇供氧和改变稀释数率，都可以提高质粒稳定性。

总结：大家好这节课主要讲授了质粒的不稳定性、提高质粒稳定性的方法、基因工程菌中试。