



日本生物技术产业发展概况

——赴日本考察纪实

中国生物技术产业及“一村一品运动”考察团,于1987年7月26日至8月6日,对日本生物技术产业研究发展现状及正在日本大分县开展的“一村一品运动”进行了考察,现将日本生物技术产业概况介绍如下。

(一) 重视传统生物技术产业的改造,传统产业更新了技术装备,呈现出现代化新面貌

在日本看到的传统生物技术产业有啤酒、酒精、酱油和葡萄酒工业等。这些工业虽然不象某些遗传工程产品那样引人注目,但由于此类产品应用面广,市场需求量大,所以对这些工业的改造在日本深受重视。

1. 啤酒产业:日本有6个啤酒厂,年产啤酒的销售量为40L/人·年左右。三得利啤酒厂和麒麟啤酒厂都设有自己的研究机构,十分注意应用各种新技术来改造啤酒的生产过程,包括菌种、工艺、装备的技术改造都有相当的深度和广度。他们在啤酒生产上,全部采用高20m的400吨容量的巨型露天发酵罐,蒸煮、糖化、发酵、过滤、灌装全部实现了自动化和电脑操作。为了提高啤酒的质量,他们从丹麦引进生产菌种,并不断进行复壮、提纯。原料糖化时添加淀粉酶和蛋白酶,发酵过程中利用蛋白质在其等电点发生沉淀的理论,使发酵第7天的pH值控制在4.2范围,以保证酒的澄清。麒麟植物研究所还采用细胞融合技术,利用中国的木石岗野

生大麦同日本的啤酒大麦杂交,培育出了抗黄花叶病毒的啤酒大麦新品种“开奴2号””并从酶学的高度以蛋白酶含量的多少来考察啤酒大麦的优劣等。

2. 酒精产业:日本在酒精工业的技术改造方面抓了无蒸煮糖化和无曲制酒两种技术开发。三得利研究中心微生物所研究成功的无蒸煮糖化技术是通过酶工程糖化办法,借助于 α -淀粉酶和糖化酶的作用,使玉米粉糖化温度由原来的140—180°C降低到28—30°C,酒精产率由10—11%提高到14—15%,大大降低了成本,并节约能源50%。所谓无曲制酒技术是用基因工程技术,通过DNA重组手段,把原来生产酒精用的酒曲根霉的糖化酶基因同发酵酒精时所用酵母的基因组合到一起,使酵母菌本身既可以将淀粉转化为糖,又可以把糖转化为酒精,使原来生产酒精工艺中的糖化与酒化工艺合二为一。三得利公司开发的无曲制酒精新菌种已经在分县投产。

3. 酱油产业:我们所见的富士甚酱油厂是一个乡镇企业。该厂年产1400吨酱油,采用豆饼和小麦各半作为生产原料,在露天的250吨容积的密封罐中进行发酵,接入发酵曲种后,在罐内进行加温和冷却,促进酱油成熟。整个生产过程都实现了连续化和计算机控制。

4. 葡萄酒产业:北海道的十胜葡萄酒厂是一个村办企业,它是12年前创办的一个研究、生产联合体。该厂储酒窖全部采用半地下室,他们认为这样便于接受冬

季的严寒和夏季的炎热,借助冷热处理加速葡萄酒成熟。

此外,为改造葡萄酒生产技术,三得利研究中心还应用遗传工程新技术,把一种有杀伤杂菌能力的酵母同野生的葡萄酒酵母进行细胞融合,培育了一种“嗜杀酵母”,用这种酵母酿造葡萄酒,可以消除杂菌的影响,使葡萄酒的发酵进行顺利,提高葡萄酒的香味和品质。三得利微生物研究所还以角叉藻胶为载体把这种“嗜杀酵母”工程菌制成固定化细胞反应器,利用这种反应器生产葡萄酒的技术在实验室已取得成功。

(二) 近代生物技术新产业居世界领先水平,技术不断创新,新产品不断涌现

以微生物发酵技术生产氨基酸和抗生素为代表的近代生物技术在日本有深厚的根基,从品种、水平、规模、产量、产值、效益看都居世界领先水平。味之素公司在日本有10个工厂,生产1000种产品。日本味精产量15万吨,赖氨酸产量6万吨,分别占世界味精产量的40%和赖氨酸产量的60%。谷氨酸发酵得率为120g/L,赖氨酸发酵得率为100g/L,都比我国高出一倍以上。此外,味之素公司还生产苯丙氨酸、精氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苏氨酸、脯氨酸、色氨酸、谷氨酰胺以及核苷酸、鸟苷酸、肌苷、肌苷酸等。近来又研制出一批以氨基酸和核苷酸为原料的新一代调味品、甜味剂和精氨酸饮料等,并已有商品进入市场。用生物技术新生产的氨基酸都是日本首先研究成功并在重要技术指标上保持领先地位。

在抗菌素研究方面,日本理化研究所也做了大量创新工作,世界上已发现有两千多种抗菌素,其中40%是由日本发现的。此外,在核苷酸产业的发展方面,日本一直居于垄断地位,世界90%以上的核

苷酸产品均出自日本。在高果糖浆生产方面,日本虽不及美国生产规模大,但产量也达到100万吨/年,占日本食用糖的三分之一,日本农林省食品研究所开发的这一生物技术在国民经济中发挥了重要作用。最近,该所又通过基因克隆获得一株产生四葡萄糖分解酶的新菌种,用这种酶水解淀粉,可以得到由四个葡萄糖组成的G₄糖,据说,在食品医药上会有广泛用途。食品研究所应用自己开发的生物技术新产品环状糊精,制成了各种调味品,显示出环状糊精的巨大市场需求。他们还开发了蛋白肉膨化、编织机,用这种机器可以把单细胞蛋白以及其他蛋白粉加工成具有良好结构的肉食品。

(三) 新兴生物技术成为热门,官办与民办机构竞相开发,工业与农业研究齐头并进

以遗传工程为代表的新兴生物技术在日本起步是由1979年开始的。由于日本政府和民间企业集团看到了生物技术对未来产业的重要作用,纷纷向这个方面投资。日本生物技术的研究工作,分属于科技厅、农林水产省、通产省、厚生省四个系统,民间机构虽然也与这些行政机构发生关系,但他们的开发范围比较灵活,开发目的比较明确。

理化研究所是科技厅直属的法人机构,全所有48个研究室。为了发展生物技术,从1980年起由政府拨款60亿日元,在筑波科学城建立起了P₄高级负压研究室以及分子遗传研究室、真核生物研究室、遗传子机能研究室、遗传子解析研究室和基因库、细胞库等。重点研究染色体的DNA序列和DNA重组,探讨正常细胞癌变的原因和整体水平上癌的发生机理以及准备进行艾兹病的研究等。

为了发展生物技术,味之素公司也投

入巨资, 在该公司基础科学研究所, 建起了P₃级负压实验室。该所有用于DNA序列分析和DNA合成的各种仪器设备, 重点开展氨基酸、核酸高产菌种以及多肽化学、免疫学和分子生物学方面的研究, 近来取得较好进展的抗癌药物白细胞介素2的研究是人们注目的高技术前沿上的课题之一。

三得利公司和麒麟公司在生物技术方面的研究更舍得花钱和投入众多人力。他们不仅研究培育成功了多种对改造酒精和葡萄酒工艺有重要价值的基因工程菌, 而且在蛋白质工程、抗癌药物、干扰素、杀虫、杀草活性物质和用植物细胞生产黄酮类药物等方面都做出了很好的成绩。

日本不仅重视以工业为目标的生物技术, 而且在促进农业发展的生物技术方面的研究也十分活跃。仅从麒麟公司植物研究所的工作就足以了解到他们研究领域之宽和取得成绩之重要, 该所通过细胞融合技术把白菜和卷心菜杂交得到的千宝菜, 产生了良好的抗热性, 使卷心菜也可以在夏天进行生产。同样方法得到的土豆和西红柿杂交植物已开始传代。用Ti质粒和电穿孔导入基因所获得的杂种特性已得到表达, 尤其在“人工种子”这一尖端领域的研究中, 麒麟植物研究所已走在前面, 一种由植物的不定胚, 用营养物和杀菌剂包

埋而成的新种子已经问世。

在日本从事农业生物技术研究的单位是很多的, 我们所参观的日本筑波植物资源研究所, 北海道中央农业试验站, 士幌农协生物技术研究所都在开展组织培养、细胞培养、花粉培养等研究。由组织培养马铃薯无毒种苗、由单细胞培养小豆、由花粉培养水稻都取得了实用性的成果。筑波植物研究所还发现, 雄性花粉与雌性花粉在同一培养基上培养时, 两者可以相互吸引, 在培养基上受精, 研究人员正准备用这种方法, 促使两种瓜的不同花粉进行杂交, 获得新品质的瓜良种。

在访日期间, 我们还参观了北海道水产孵化场, 这里除了开展各种鱼的养殖外, 也在应用生物技术, 改良和提高产量。当前比较成功的是鱒鱼的性转换。由于雌鱼好吃, 他们就研究用性激素处理雌鱼, 使其变成假雄性, 这样假雄鱼与雌鱼交配后, “受精卵”所产幻鱼皆为雌性。他们还采用紫外线照射精子, 结果精子的染色体失去作用, 这样也可以得到全雌鱼。这种性转换技术也被用在提高鱼的产量上, 为发展养鱼事业开辟了一条新途径。

(国家科委中国生物工程开发中心
任玉岭)

重组DNA技术在单抗及其他新型嵌合抗体分子研究中的应用前景

70年代中期杂交瘤技术问世是生物医学界一个革命性创举。单克隆抗体(单抗, 下同)作为一种生物探针, 可用于分析、鉴定细胞表面各种分子, 并将广泛用于疾病的诊断与治疗中。尤其是人单抗,

在疾病的诊治中可能更具有实用价值。然而, 应用杂交瘤技术制备人单抗技术上难点较多。如目前尚未获得理想的亲代细胞株, 融合率低, 抗体产生量少, 稳定性、特异性均较差等。故近年来, 人们探索用

基因工程技术制备单抗及其他新型嵌合抗体分子。

(一) 应用重组DNA技术制备人单抗

1983年宾州大学医学院的 Jonak 和 Kenett曾在费城举行的杂交瘤年会上报告了应用转染技术使分泌特异抗体的B细胞永存化的新方法。他们用磷酸钙沉淀法将人白血病REH细胞系染色体DNA掺入经相同抗原致敏的小鼠脾细胞,获得分泌IgG及IgM型抗体的细胞株。这些细胞株在体外培养可稳定地分泌抗体。但由于转染效率不肯定,转染后所获细胞株在体外生长缓慢,产生抗体量有限,因此转染法并未显示出超越杂交瘤技术的优越性。

有人将人 ϵ 链基因引入大肠杆菌,由此产生的 ϵ 链至少有部分生物学活性。它们在体外能与嗜碱性粒细胞表面IgE受体结合。Boss等人通过表达载体将免疫球蛋白 μ 链及 λ 链基因引入大肠杆菌,细菌虽能合成少量免疫球蛋白多肽链,但对所合成肽链无糖基化作用,也不能将轻重链组装成完整分子。免疫球蛋白多肽链只能以包涵体状态存在于菌体中。故目前用此技术生产特异性单抗尚无实用价值。

酵母具有使蛋白质分子糖基化的功能,用它表达免疫球蛋白基因可能优于细菌。最近有人成功地利用酵母合成了 λ 轻链与 μ 重链。部分 μ 链被N-糖基化。酵母能分泌所合成的免疫球蛋白多肽链。当 μ 链与 λ 链同时表达时,部分可组装成有抗原结合能力的完整分子,但轻重链装配效率很低。若进一步改进技术,用重组DNA方法制备单抗可能优于杂交瘤技术。

(二) 人鼠嵌合型单抗的制备

重组DNA技术与杂交瘤技术结合形成的“转染瘤”(transfectoma)是近年来一个令人兴奋的进展。利用此方法产生的新型分子可分两大类:(1)以骨髓瘤细

胞生产野生型Ig链;(2)合成具有新型基因结构的分子。由于免疫球蛋白不同功能区位于彼此间隔的外显子上,因此可将编码各区的基因进行重组或与其他外源基因连接。将重组基因插入表达或转运载体,转染适当骨髓瘤细胞。形成的转染瘤不仅在培养时能分泌大量抗体,而且也可移植于小鼠腹腔生长,从诱生的腹水中获得大量嵌合抗体。

用以携带重组基因的载体转译单位通常包括有(1)Ig重链或轻链编码序列;(2)一个可供选择的细菌显性基因标志如 neo^R 或 $E.coli-gpt$;(3)病毒或哺乳动物的启动子,限制性内切酶切点及一个多聚腺苷酸位点。目前最常使用的载体为pSV_{2.0}质粒,它的选择标记位于SV_{4.0}早期启动子控制之下,SV_{4.0}序列提供了切点和一个多聚腺苷酸位点。

针对产生人单抗的困难,作为一个临时性解决办法,有人将鼠单抗可变区基因与人免疫球蛋白稳定区基因连接,并在鼠骨髓瘤细胞中获得表达。所获嵌合型抗体保持鼠抗体可变区抗原识别特异性。

mAb17-1A是一株特异性较好的鼠单抗,已试用于治疗消化道恶性肿瘤。mAb17-1A特异识别大肠癌细胞表面肿瘤相关抗原41-KDa糖蛋白。但在人单抗研究中,尚未获得具有相应特异性的抗体。鉴于此,Sun L.K.等人从免疫球蛋白基因重排后的17-1A细胞中分离出轻、重链可变区基因,并分别与携带有人 γ_3C 区和K基因的表达载体相连,获得携有所需嵌合基因的载体。此两种质粒载体分别具备氯霉素和氨苄抗性。经过转化的大肠杆菌获得双重抗性。筛选阳性克隆,经原生质融合法将携带轻重链嵌合基因的载体转染骨髓瘤细胞Sp2/0。通过检测neo基因活性,选出稳定的转染瘤细胞。转染基因指导瘤细胞

合成完整的嵌合抗体分子。此分子能特异识别17-1A肿瘤相关抗原,且分泌水平很高,从培养上清中可提纯大量嵌合抗体,用于研究和治疗。预计这种嵌合抗体的免疫原性比鼠单抗弱,同种Fc段将执行更有效的生物学功能。但关于人鼠嵌合抗体的免疫原性和药物动力学尚需进行临床试验。

应用人鼠嵌合抗体基因能够创造一种具有预定抗原结合特异性,更接近同种抗体的单抗。此外用嵌合抗体技术还可创造同种型特异性突变株。例如,除可将17-

1A可变区基因与人 γ_3C 区基因相连外,还能与 γ_1 、 γ_2 及 γ_4C 区基因连接。这类嵌合抗体可用于研究不同的IgG亚类所介导的特定免疫功能。

(三) 用基因转染技术创造新型分子

“转染瘤”技术不仅能解决目前制备人单抗中所遇到的技术困难,而且还能用于深入研究抗体分子结构与功能,探讨体液免疫机制以及作为临床诊断治疗的新途径。下面将这些新型分子的潜在用途总结于下表。

| 用于转染的基因 | 结 果 | 可 能 用 途 |
|--|---------------------------------|--|
| 野生型重链或轻链(或两者) | 野生型 Ig 链 创造种内或种间的新型重链与轻链组合分子 | 研究轻重链间相互作用的性质;确定每条链对独特型及抗原结合特异性的相对贡献;根据链间结合差异性,确定是否为全链结合 |
| V_H 与新的 C_H 相连 V_L 与新的 C_L 相连 | 新型 Ig 链 创造可变区相同的新型同种型特异性分子 | 产生同种型转换变异;创造可变区稳定区种属来源不同的种间嵌合体 |
| V_H 与 C_L 相连 V_L 与 C_H 相连 | 改变可变区与稳定区连接形式,形成体内从未有过的新链 | 评价稳定区对功能的贡献;创造效应功能改变的分子 |
| V_H 或 V_L 与非Ig序列相连 | 创造融合蛋白 | 产生具有抗体专一性的酶分子用于诊断 通过抗原柱分离非Ig蛋白分子;特异释放毒性制剂 |

摘制“Science” 229:1202,1985.

将免疫球蛋白基因作为具有表达与分泌能力的载体,可以做多种组合,产生大量抗体-蛋白质嵌合分子。

Neuberger等人将编码金葡核酸酶的基因插入NP特异的鼠 γ_2 基因 CH_2 外显子区,将此嵌合基因转染仅分泌对NP特异 λ_1 轻链的鼠骨髓细胞系 $J_{6.6.6}L$ 。所合成的嵌合型重链与内源性 λ_1 轻链装配,形成能与NP特异结合的嵌合蛋白。此分子保持着核酸酶活性。这种抗体酶嵌合分子可作为免疫测定的新型试剂。同样,以c-myc基因取代 CH_2 、 CH_3 功能区基因,转染 $J_{6.6.6}$

L细胞后,分泌的嵌合分子既可与NP抗原结合,又可为抗c-myc的单抗识别。此法可用于制备某些性质未定基因产物的抗体,为进一步研究此类基因产物提供了可能。

此外,有人将重链可变区与轻链稳定区基因连接,并转染仅表达相应轻链的骨髓瘤细胞。两条链在细胞内被装配成类似Fab的单价抗体片段。

以上实验显示出创造抗体与蛋白质功能结合的新奇分子,以及对抗体结构进行定向改造的可能性。这些分子可大量为转

染瘤细胞分泌,并保持抗原结合特异性。应用亲和层析法可将其分离纯化。

(四) 单链抗体

应用基因工程技术修饰抗体是改进或利用抗体已有精细特征的一条可行途径。

正常抗体分子具有 H_2L_2 四肽链结构。通过大肠杆菌生产的单链抗体分子由重链可变区,轻链可变区及中间一段连接肽构成。这种由单基因编码的新型抗体仅有一个抗原结合部位。编码基因含有两个可变区及连接肽的密码。

这种第二代抗体的优点是价廉、分子小、较稳定,易于纯化因此用X-线晶体衍射法分析其结构也较容易。单链抗体的连接区赋予分子更多的灵活性。如使连接区具有毒素特性,可用于肿瘤治疗。另外亦可将抗癌药物联于连接区作为免疫毒素的载体。总之,当仅需抗原结合特异性时,单链抗体可能是适用的工具。

(五) 前景与应用

初期实验表明,用基因转染法制备新

型抗体分子是可行的。目前看来骨髓瘤细胞是免疫球蛋白基因的最佳受体细胞。转染基因在细胞中被真实地转录、翻译、加工并被装配成有功能的分子。而非淋巴细胞仅能合成少量Ig分子,且无论细菌或是酵母均不能将合成的肽链装配成完整的Ig分子。

用转染瘤法制备嵌合型抗体是解决生产人单抗所遇困难的一条可行途径。其在肿瘤和某些自身免疫病的治疗中具有巨大潜力。

嵌合抗体的出现使我们有条件根据所需抗体的效应功能选择合适的抗体种类,并为诊断与治疗提供了一组新型制剂。

总之,重组DNA技术是一条产生功能改变分子的新途径。这些分子将特别适用于实验研究,也为临床诊断治疗开辟了新的前景。(参考文献11篇略)

(北京市肿瘤研究所 吴 昭

刘 华 董志伟审阅)

利用双水相系统分离纯化蛋白质的进展

分离纯化技术是构成生物技术的重要组成部分。目前它已经成为某些生物技术产品能否工业化的关键。为此,近些年几种新的分离纯化技术迅速发展起来。用于分离生物大分子的双水相系统就是其中之一。

人们很早发现两种不同的亲水性聚合物水溶液混合时,当两者浓度超过某一限度,会自动分成富含水(80—90%)的两相,而不同的生物材料在两相中的分配系数不同,也会随相分离进入不同相中,从而达到分离的目的。

已研究过的双水相系统主要有PEG(聚乙二醇)/葡聚糖,葡聚糖/聚蔗糖,聚蔗糖/PEG,聚乙烯醇(PVA)/葡聚

糖,葡聚糖/甲基纤维素及PEG/盐系统。最近报道用羟丙基淀粉取代葡聚糖也取得较好结果。但研究最多且有实用价值的是PEG/葡聚糖和PEG/盐系统。

研究表明蛋白质在两相中达到分配平衡所需的时间极短。聚合物种类,平均分子量,分子量分布,浓度,系统的pH,离子浓度,温度等因素均会影响蛋白质的分配系数。目前对双水相系统只能定性分析,还不能对蛋白质分离进行计算和理论预测,蛋白质分离的最佳条件需试验确定。因此,开展深入的理论研究是必要的。

将带有正负电荷的离子交换基团结合到PEG上,形成溶于水的离子交换剂,由

它组成的双水相系统有较高的界面电位,能提高蛋白质的分配系数,改进系统选择性。这样的离子交换分配系统可连续进行提取,用于干扰素的分离已取得较好效果。

将疏水基团如脂肪酸通过酯键结合到 PEG 上,与未取代的 PEG 混合组成的双水相系统,利用疏水基团与蛋白质,比如血清蛋白的疏水区的疏水相互作用,将血清蛋白提取到 PEG 相中,达到与其他蛋白质分离的目的。

目前研究较多的是亲和分配系统,将对蛋白质具有专一性亲和能力的底物、抑制剂、辅酶、抗体、以及与蛋白质上的核苷酸结合位点具有亲和能力的葱醌类活性染料作为配基,共价结合到双水相系统中的水溶性聚合物上,可将某种蛋白质提取到某一相中,达到分离纯化目的。亲和分配系统的配基密度明显高于固体上的配基密度,单位体积的结合能力高,液相中达到结合平衡时间短,与连续分配和逆流分配技术相结合可实现连续化。

上述各种双水相系统在实际应用上,可采用不同的操作方式。最简单的是一步分配法,即可采用批式,也可采用连续方式。按着相组成,将一定量的 PEG、葡聚糖或盐的浓溶液加到需要分离的物料中,比如细胞破碎中,混合均匀,经静止或离心使两相分离,将所需蛋白质提取到某一相中,而其它物质分配到另一相中,达到分离目的。我们使用 PEG/(NH₄)₂SO₄ 系统,从巨大芽孢杆菌发酵液中提取青霉素酰化酶,收率为 95%,纯化约 8 倍,酶浓缩 5 倍。利用连续方式从工程菌大肠杆菌破碎物中分离人生长激素,收率为 61.5%。若改用多步分配法,收率可提高到 81%。

采用多步分配法,可改进系统选择性,提高纯化倍数。用批式操作时,在第一次相分离后,再将新的一定量的相组分

加到所需蛋白质存在的那一相中,形成新的双水相系统,再进行分配,经过多次分配,达到纯化目的。这样的操作方式在亲和分配上使用的更多。目前,设计了许多种连续分配使用的提取柱。

另外,使用逆流分配设备更适合于 PEG/葡聚糖,配基-PEG/葡聚糖,配基-PEG/配基-葡聚糖系统。经多次分配,可将不同蛋白质分别提取到不同部分中,达到同时分离几种蛋白质的目的。若下相配基浓度采用不同梯度方式,能进一步提高分离效果及选择性。

如果分离的蛋白质存在于 PEG 相中,可加入适当盐,形成 PEG/盐系统,将蛋白质转入盐相中,少量的 PEG 和盐可用超滤法除去。若在葡聚糖相中,蛋白质分子量低于 30000 也可用超滤将其分开。用双水相分离的蛋白质可利用其他技术进一步纯化,无需特殊处理。

双水相系统的最大特点是对蛋白质容量高,即使达 100g 蛋白质/L,其粘度也不影响分离。1000kg 细胞破碎物可生产 30kg 蛋白质,使用 300L 的两相系统就可完成。只需简单的机械混合及沉降或液-液分离设备,全过程在 10min 内可以完成,因此它比传统分离纯化技术快,设备简单。从试验规模放大到工业规模,放大系数高达 40000,其结果也基本相似。由于 PEG 对酶活性有保护作用。整个提取过程可在室温下进行,避免了大量液体冷却所需的能耗。总之,双水相系统是一个简便、有效的分离纯化技术。目前,有许多方面有待进一步研究,特别是理论方面,在选择性,连续工艺,多级运转,设备设计等方面还有许多工作要做。

(中国科学院微生物研究所 孙万儒)