

学校的理想装备

电子图书·学校专集

校园网上的最佳资源

生物技术



前 言

“现代高技术丛书”，由中国科协与上海科技出版社组织出版，《生物技术》被列为其中的一个选题，但它是一门难以定义的学科。生物技术一向是在西方企业家们大肆鼓吹分子生物学和基因工程的诱人前景时，首先由新闻界的非专业人员推广使用起来的，现在它包含许多学科，成为一个与我们日常生活密切相关的硕果累累的产业。生物学当然仍是生物技术的基本科学内容，但是现代化学、物理学、医学和药学、计算机科学也都起很重要的作用。生物技术是一门在多学科基础上发展起来的集成科学。

生物技术所包含的内容，在不同国家、不同时期、不同学者中，是有不同的看法和认识的。在我国，1986年国家科委制订“中国生物技术政策纲要”时，经专家们共同讨论认定，生物技术共包括基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程四个方面，而几乎同时在“七五”攻关计划的列题中，又增加了生化工程和蛋白质工程。目前在微生物学会和生物工程学会中，都有酶工程、基因工程、细胞工程、发酵工程和生化工程专业委员会，而没有蛋白质工程专业委员会。

此外，生物技术无论作为一个新兴领域或产业，都是发展极快，现在国际上又有分析生物技术、植物生物技术、环境生物技术等新的分化，特别是由于计算机技术的应用，许多新发现不一定是在实验台上完成的，而可能是在计算机终端上实现的。所有这些内容要想在本书的范围内一一予以介绍，恐怕难以做到。

考虑到本书属于一般读物，而非专著性质，就采取了最便于叙述的方法，分为基因工程、细胞工程、微生物工程、生化工程和蛋白质工程五个部分。此外，为了方便读者，也为了避免各部分之间的内容重复，在全书前面加写了一点与生物技术直接相关的基本知识。

生物技术近10~15年来，以其在医、药、农业等方面的成就，正在形成一个新兴的产业，吸引各国政府竞相投资支持。面对这个从学术到产业都是一日千里的发展形势，深感个人的能力和时间有限，难以胜任主编的委托，多亏各位作者、科协和出版社同行偏劳，使本书得以完稿，谨致感谢。

编著者

生物技术

第一章 生物技术总论

现在是新技术革命的时代。科学上的新发现及其在技术中的应用，都以人们预料不到的高速度展现出来。新技术不断突破，发明创造层出不穷。越是尖端技术，其革新的速度越快，更新换代也越加显著。新技术革命引起新的产业革命，促使世界产业迅速地朝着尖端技术化、知识密集化、高增殖价值化方向发生结构性的变化。领头的产业正在更替，以微电子、新材料和生物技术为轴心的新型产业群将成为肩负世界未来的战略产业。

新技术革命不但提出了严峻的挑战，而且也提供了巨大的机会。现有产业和企业能否在激烈竞争中继续生存下去，取决于企业的应变能力，即能否大胆地砍掉不适应新时代的部分，同时尽快地吸收和消化最尖端技术，加速企业改造，使之成为劳动生产率高的产业和企业。企业的经营者正面临着命运的抉择。对于国家来说，能否采取有效措施促进尖端技术领域的开发研究，这是关系到国家竞争力的战略性任务。生物技术正是这类必须优先考虑的最尖端技术之一。

生物技术的源流可以追溯到公元前的酿造技术。这种原始的生物技术一直持续了四千多年，直到上世纪法国微生物学家巴斯德揭示了发酵原理，从而为发酵技术的发展提供了理论基础。到了20世纪初，在工业生产中首先采用大规模纯菌培养技术的是化工原料丙酮丁醇的发酵。五十年代在抗生素工业的带动下，发酵工业和酶制剂工业大量涌现，发酵技术和酶技术被广泛用于医药、食品、化工、制革和农产品加工等产业部门。传统的生物技术发生革新换代是从七十年代初期开始的。分子生物学的某些突破使人们能够分离基因，即决定遗传性状的分子，并在体外进行重组。这些突破迎来了生物技术的时代。表面上看技术革命的加速发展是连续进行的，其实并不尽然。新一代的生物技术虽脱胎于原始的和传统的生物类生产技术，它们之间在内容和手段上均有质的不同。从原有技术中产生出新一代的技术，这就是技术增殖。问题是我们是否能够跟上技术的自身增殖速度。

生物技术正在或即将使人们的某些梦想和希望变为现实。生物技术的新方法为解决生物学和医学中的一些重大问题提供了强有力的手段。当前，生物技术已在医药和化工等领域中崭露头角。一批生物工程药物，例如人生长激素、胰岛素、干扰素和各类细胞生长因子与调节因子等，已陆续投放市场。其意义远比抗生素的发现和應用更为深远。生物技术的应用领域相当广泛，它将推动一系列新产业群的发展，而且这些产业所需投资较少，产值却非常高。其实，它的最大用武之地是在农业领域。使用细胞融合和基因重组等技术，可以组建出不受气候条件限制和抗病虫害的优质高产农作物品种，从而极大地提高农作物的劳动生产率。农业终究有一天要成为“粮食工业”，从地球上消灭“饥饿”现象的日子也许会到来。

本章主要介绍生物技术的一些基本概念和有关知识。

一、生物技术的种类和任务

生物技术(Biotechnology)也称为生物工艺学或生物工程学。它是七十年代初在分子生物学和细胞生物学基础上结合现代工程学的方法和原理而发展起来的一门综合性科学技术。生物技术和生物工程(Bioengineering)这两个名词常可通用。当“生物工程”不是指具体的工程项目,而是表示所用的技术系统时,它就等同于“生物技术”了。然而,有时一种生物工程包含不只一种生物技术,在具体概念上两者还是有区别的。

对于生物技术的含义和内容,各种说法不尽相同。研究生物分子的重视分子,从事细胞工作的强调细胞,搞化学工程的突出工程,真是仁者见仁,智者见智。更有一些单位和研究者将自己所进行的一般性生物开发研究工作也称之为生物技术或生物工程。那么,生物技术的确切定义是什么?我们认为生物技术是指,人们运用现代生物科学、工程学和其他基础学科的知识,按照预先的设计,对生物进行控制和改造或模拟生物及其功能,用来发展商业性加工、产品生产和社会服务的新兴技术领域。

由于现代生物科学的迅速发展,现已在分子、亚细胞、细胞、组织和个体等不同层次水平上揭示了生物结构和功能的关系,从而使人们得以运用生物学的方法以及现代工程科学所开拓的新技术和新工艺,对生物体进行不同层次的设计、控制、改造或模拟,构成了巨大的生产能力。例如,基因拼接和重组技术为创造生物新物种和新品系提供了最有希望的手段。通过发酵工程和生化工程技术可以实现生物产品大规模商品化生产。生物技术还可用来进行各种生物材料和非生物材料的加工,以提供新材料和新元件。新产业革命的重要方向是发展低能、节能和脱能型新产业,并寻找新的能源,以摆脱当前能源限制,人们对此也将希望寄托在生物技术上。生物技术能帮助人们更好地了解生物、了解环境、了解我们自己,从而提供更好的社会服务。服务的概念很宽,消除水和空气污染、保护生态环境、提高医疗技术、防治疾病,提高人民健康等都是社会服务。

生物技术的产生和发展涉及许多学科,包括生物化学和分子生物学、细胞生物学、遗传学、微生物学、动物学、植物学、化学和化学工程学、应用物理和电子学以及数学和计算机科学等基础和应用基础学科。生物技术能够带来的好处将是十分巨大的,现有的成就仅仅是开始。为了发展生物技术,必须认真投入人力和财力,进一步支持基础研究。生物技术与基础和应用的关系,可以用下面这幅图来表示,图中还强调“为获得丰硕成果,必须勤于灌溉施肥”,即将足够人力和财力投入基础研究中(图 1-1)。

生物技术在不断发展之中,它的内容也在不断丰富和扩充。现阶段的生物技术大致可分为两大体系:一是生物的直接利用,即生物控制和改造技术;二是生物模拟技术。具体可用图解(图 1-2)来表示。下面分别对这些技术作一些解释。

图 1-1 生物技术的基础和应用

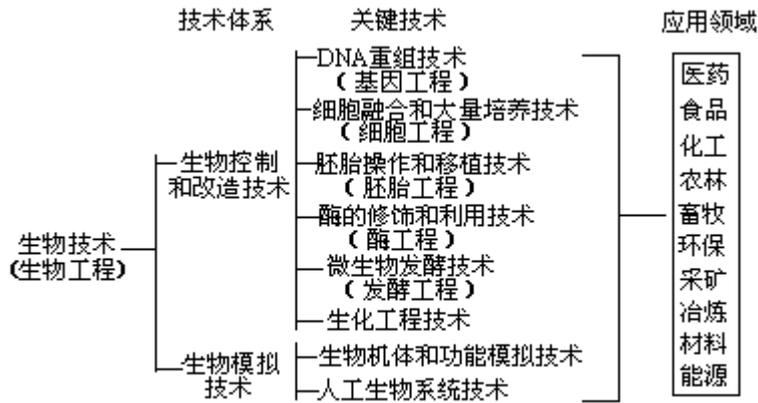


图1-2 生物技术的分类

1. 生物控制和改造技术

生物与工、农、医等众多领域都有密切关系。所有利用生物的产业，大体可分为三类：一是生物体的生产和应用，如粮食、纤维和其他生物体产品；二是生物代谢产物的应用，如氨基酸、抗生素等生理活性物质的生产；三是生物机能的利用，如用生物净化水、处理垃圾，利用细菌采矿和冶金等。生物技术提供的新方法要比其他传统方法更快、效率更高、而且更能充分利用资源。生物技术与传统技术的差别在于：第一，它能更精确的控制生物生长、发育和代谢，因而极大提高生产能力。第二，它能在不同层次上对生物结构进行拆合和重构，因而将不同生物的优秀性状集中在一起。例如，不同细菌能够分解不同有毒物质，通过基因转移技术将有关基因集中，在一种细菌中，形成所谓“超级细菌”，能够同时分解多种有毒物质。利用基因工程可望创建既优质，又高产，还能抗病虫害的优良农作物新品种。第三，它还能在分子水平上对基因和蛋白质进行再设计，创造出自然界不存在的基因、蛋白质和生物新物种，在短期内完成自然界几百万年进化才能完成的过程。新的方法不仅改进了过去传统的方法，而且还可以开辟新的领域。

当前认为，生物控制和改造技术主要可分为以下六个方面。

(1)基因重组技术 即 DNA 重组技术，也称为基因工程，它是生物技术的核心。生物的遗传性状是由基因（即一段相应的 DNA 分子）决定的。通过分离出 DNA，在体外用酶“剪切”和“拼接”，然后插入如病毒、微生物质粒等载体，转入微生物或培养的动、植物细胞内，进行复制，即无性繁殖，由此即获得基因克隆（clone，无性繁殖系的意思）。控制适当的条件，使转入的基因在细胞内表达，即能产生出人们所需要的产品，或创建新的生物类型。这种获得新功能的微生物称为“工程菌”；新类型的动、植物则分别称为“工程植物”和“工程动物”，或“转基因植物”和“转基因动物”。通过基因操作，还可在体外对基因进行定位诱变和改造。蛋白质工程被称为是第二代基因工程，它利用蛋白质空间结构和生物活性之间关系的最新知识，借助计算机辅助设计和基因定位诱变与改造技术，以构建新的蛋白质。生物科学已进入一个创新的时期，借助于新的技术它不仅极大提高生物产业的劳动生产率，而且还能提供自然界没有的生物产品和生物材料，创造出“新的生命形态”。现将 DNA 重组技术的主要操作步骤概括于图 1-3。

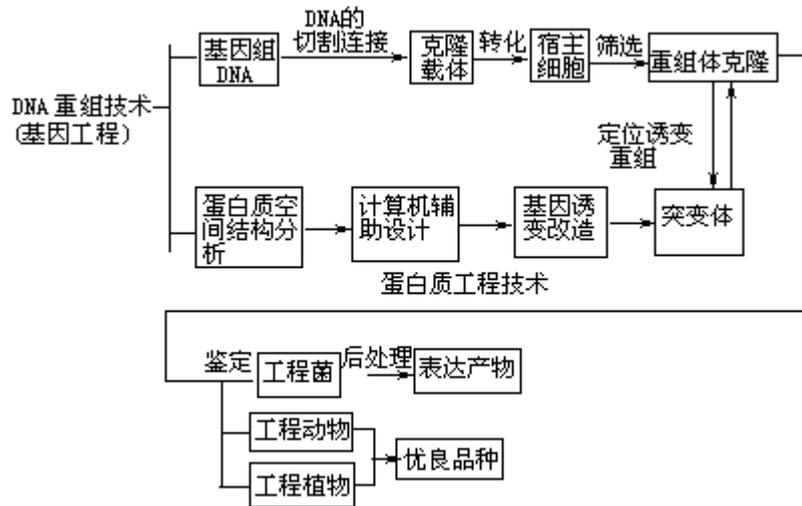


图1-3 DNA重组技术的主要操作步骤

(2)细胞融合和大量培养技术 即细胞工程，主要包括细胞融合（体细胞杂交）、单克隆抗体、核移植细胞大量培养、细胞分化、植物再生等细胞操作技术。传统的育种工作使有性繁殖的动植物分别进行杂交，通过精卵细胞的结合，每个亲本各自给出它们遗传物质（全部基因）的一半予后代。杂交过程使成千上万个基因混合起来，从中选择所需性状的后代必须反复进行许多代的杂交。这就是说，传统技术改造的对象是生物个体，DNA重组技术的对象是基因分子，细胞重构技术的对象是亚细胞和细胞结构。因此新技术能够缩短产生新品种的时间，而且比较精确，更有针对性。

细胞杂交是使两种选定的细胞，通过化学、物理和生物因子（病毒）的处理，使其融合而产生具有所需性状的细胞的方法。产生单克隆抗体的细胞株就是用细胞杂交方法建立的。抗体是存在于哺乳类动物血液中由B淋巴细胞产生的蛋白质，但通常它有众多组分。当将产生抗体的B淋巴细胞和小鼠能持续生长的癌细胞融合时，所产生的杂交瘤细胞即能几乎无限制地分泌大量专一匀质的抗体（即单克隆抗体）。单克隆抗体是分子分析的强有力工具，在检测微量致病因子（如细菌和病毒）方面很快得到广泛应用。除了诊断外，单克隆抗体在产品免疫提纯、临床治疗等方面也有重要用途。

采用显微操作技术，将供体细胞核移植到去核的卵母细胞或受精卵中，可获得核质杂交的重构卵，并发育成个体。该项技术使高等动物无性繁殖也成为可能，这将使高产乳牛、名贵马种和濒临灭绝的珍稀动物得以迅速获得与亲本完全相同的优良后代。核移植技术还为控制胚胎发育提供了新的途径。

细胞大规模培养技术使得动、植物体内一些经济价值很高的微量成分能够用工业化的方式大量生产。例如，可用生物反应器进行细胞生长调节因子、人参皂甙、桉树油、生物碱等的生产。举个粗略的数字，一微克生长因子的价格目前为1.5美元，而1000克半导体元件（64K超大规模集成电路）约为1万美元，前者大致为后者的15万倍。由此可见，生物技术产业的经济效益是一般产业所无法比拟的。

植物再生是指植物离体细胞经过培养和诱导可分化发育成为完整的植株，并且具有母体植物相同的性状。利用植物细胞的全能性，即由单个细胞发育成植株的能力，可使优良品种进行快速的无性繁殖。它在扩大繁殖系数、纯种栽培、无病毒种苗、名贵花卉苗木等方面的应用已取得显著成效。国外

已有用试管苗繁殖的大规模兰花工业，使兰花栽培发生了根本性变化。通过细胞培养，还可在细胞水平上筛选突变株，进行细胞育种，无论在效率、数量以及选择的准确性方面，都是传统育种方法所望尘莫及的。

(3) 胚胎操作和移植技术 即胚胎工程。由于动物不能像植物那样进行体细胞的无性繁殖，外来遗传信息（外源基因）必须导入到生殖细胞（精子或卵子）或受精卵中，才能将遗传性状传递给后代。高等动物的人工受精卵或重构卵在体外培养至一定阶段，常需将所形成的胚胎移植到母体内使其正常发育。胚胎操作和移植技术在纯种繁殖、发育控制和创建转基因动物等方面都起着重要作用。有关细胞工程和胚胎工程的关系如图 1-4 所示。

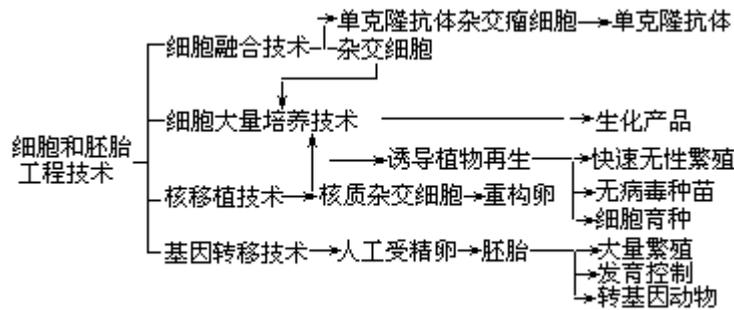


图 1-4 细胞和胚胎工程技术的关系

(4) 酶的修饰和利用技术 即酶工程，主要包括酶的修饰、固定化酶和固定化细胞等技术。酶是生物催化剂，其本质是蛋白质。酶的催化作用可使反应速度提高 $10^8 \sim 10^{20}$ 倍，比一般化学催化剂效率高 $10^7 \sim 10^{13}$ 倍，而且它还具有专一性强、反应条件温和以及不污染环境等优点。因此酶在工业上有广泛应用价值。

自然界存在的酶种类很多，然而许多酶的性质并不如意，如稳定性差、活性受反应条件限制等，因而影响了它们的开发利用。因此需要对酶分子进行改造和化学修饰。氨基酸序列的改造属于蛋白质工程的范围；化学修饰仅限于对主链的切割、连接、化学基团的引入和分子侧链基团的交联等。

酶的固定化是使酶分子聚合或结合到载体上，成为不溶于水但仍具催化功能的固相酶。酶的固定化有许多优点：它可以长期反复使用，进行连续化生产；提高了对酸、碱、热和变性剂的稳定性；具有一定机械强度，成型后装入酶反应器，使设备小型化，并可节省能源；酶被固定后不再混入产品中，简化生产工艺。

细胞内的代谢过程通常是由多酶系统连续催化完成的。利用固定化细胞技术，即将细胞固定在适当载体上，可以省掉提取酶的工艺，由细胞内酶系统催化连续地反应。固定化细胞可以分为三种类型：固定化死细胞、固定化休眠细胞和固定化增殖细胞。固定化死细胞是指细胞经处理后仅保留所需酶的活性，而其他的酶系和整个细胞都使之失活。固定化休眠细胞和增殖细胞的区别是前者细胞虽仍处于生存状态，但不再生长繁殖；而后者经固定后细胞继续生长繁殖。

(5) 微生物发酵技术 即发酵工程，包括菌种选育、菌体生长和代谢控制及微生物机能的利用等。微生物发酵是以工业生产为目的，通过微生物的代谢活动以获得医药、食品、化工等产品以及进行生物材料和非生物材料的加工过程。它将传统的发酵技术与现代生物技术相结合，而且几乎与各类生物技术都有关。发酵技术与酶技术关系尤为密切，绝大多数工业用酶是由微生物发酵制备的；另一方面许多传统上用发酵法生产的产品正在逐渐改为固定

化酶或固定化细胞法生产。发酵法和酶法生产的区别在于前者需要控制微生物的生长和代谢过程，后者仅涉及酶的反应；因此对工程设备和工艺的要求也不同。在研究发酵和酶的有关工程设备和工艺技术的基础上发展出了另一技术领域，即生化工程技术，它也可以看成是发酵技术的一个分支。

(6)生化工程技术 包括生物反应器和传感器的设计、生物反应的程序控制、产品分离精制技术等。生化工程技术是由生物工程技术和化学工程技术相结合而发展起来的。传统的化学工业反应需要在高温、高压下进行，而且副反应多，效率较低；生物反应则是在常温、常压下进行，反应专一，效率较高。因此尽可能用生物技术来改造化学工业是现代技术发展的一种趋势；同时在生物技术中，尤其是发酵技术，也包含了化学工程原理和技术。

生物反应器是生物技术开发中的一个关键设备，它为活细胞或酶提供适宜的反应环境，以达到细胞增殖和产品形成的目的。现已有适合动植物细胞大量培养、酶反应和微生物发酵的各种类型生物反应器和发酵罐，其设计涉及生物化学和微生物学、化学和化学工程学、流体力学、机械工程学、电子学、计算机及自动控制等学科。为了自动检测和控制生物反应过程中有关参数，还需设计各种传感器。

许多新的物理化学分离技术，如液-固相高效分离技术、亲和层析技术、超滤技术、新型分离介质等，已在生物产品的分离工艺中广泛应用，取得了良好结果。由于生物产品种类繁多，性质各异，必须分别采用不同的分离精制技术。

现将酶、发酵技术和生化工程技术的关系表示如图 1-5。

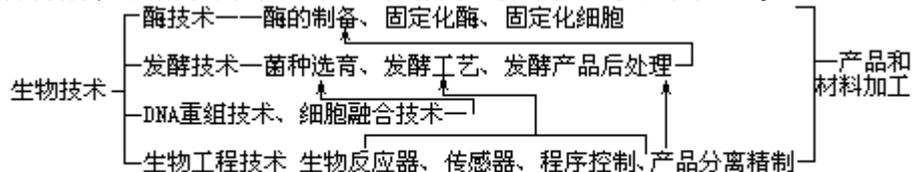


图1-5 酶技术、发酵技术和生化工程技术的关系

2. 生物模拟技术

当我们观察生命世界时，无不为其绚丽多彩而感到眼花缭乱，惊奇生命的奥妙，并为生物的高超本领而折服。例如，大肠杆菌在适宜的条件下，20分钟可以繁殖一代。世界上有哪家高生产率的工厂能使其产品在20分钟内翻一番，或者说在如此短时间内产生一家分厂呢？何况大肠杆菌生产的远不只一种产品，它需要复制近4000种基因，合成上千种蛋白质，还有许多其他种类的有机化合物。生物的这种非凡合成能力在于酶。自然界需要100年才能完成的反应，有的甚至要几百亿年（与现在宇宙的年龄相同）才能完成，在酶催化下不到半分钟就完成了。细胞内的合成反应和分解反应都是在酶的催化下进行的，无怪乎细胞新陈代谢的迅速了。人们除了利用生物的酶外，还进一步考虑如何模拟酶的催化功能，根据酶的作用机制去合成各种生物的或非生物的高效催化剂，以适应不同反应和条件的需要。

形形色色的生命世界正是人类学习和模拟的极好对象，生物的精微结构和神奇功能是在地球上三十多亿年的进化历史中获得的。人们从对生物的研究和模拟中可以获得生物进化的“经验”，了解物质结构与功能的关系，启发想象力和创造力。

生物模拟大致可分为两大类：

(1)生物机体和功能模拟技术 在体外模拟生物大分子或生物机体的某种

结构和功能。包括不同层次水平和不同角度的模拟，如生物大分子模拟、细胞器和细胞模拟、生物感受器和神经系统的模拟等。模拟酶是分子模拟技术发展的一个重点，国内外都在大力研究固氮酶的模拟就是一例。空气中的氮气几乎是取之不尽的，如能像固氮酶那样在常温、常压下固氮，将使世界化肥工业发生根本的改变。通过模拟动物的感觉器官，可以设计出最灵敏的检测器和传感器；模拟生物膜可制成高性能的换能器。用复合蛋白质构成生物芯片以及神经网络的模拟已趋于实用化。长远的方向是制造出接近人大脑的生物计算机。

(2)人工合成生物系统技术 即用人工制品来取代生物机体的某一部分。例如，具有运输氧功能的人造血液，能够缓慢释放药物的人造细胞，用高分子材料合成种皮保护体细胞胚的人造种子等。至于用非生物材料为主模仿生物系统的人工器官、假肢等，属于生物医学工程的领域，而超出了生物技术的范围。

人类的创造能力是无穷尽的。人们可以根据需要，将工程菌、转基因动物、转基因植物当成“生物反应器”、“活的工业基地”或“分子农场”，大量生产某些产品。另一方面，又模拟生物体内的反应过程，设计生物反应器，利用生物技术改造诸多的产业部门。生物技术正是人类创造能力的重要体现。

以上简略介绍了生物技术的产生、种类和意义。既然生物技术是在现代生物学的基础上产生的，在介绍生物技术各专门领域之前，先熟悉一下生命世界，掌握有关的背景知识，对于进一步了解生物技术将会是有益的。

二、生物不同层次的结构

什么是生物？我们可以说生物就是活的物体，或者说有生命的物体。生物包括动物、植物和微生物三大类。一切活的生物表现出来的共同特征是，它们都能进行新陈代谢、生长、发育、繁殖、遗传、变异、适应和对刺激的反应等。所有这些特征都可以认为是生命运动的具体反映。

1. 生命的物质基础

生命是一种物质的高级运动形式，这种运动形式本质上就在于不断进行以核酸和蛋白质为主体的生物大分子系统的自我更新。组成生物体的分子完全遵守所知的化学规律。在生命运动中这些分子的相互作用固然有其特殊的法则，然而这些法则与物理世界所发现的规律和作用力是相一致的，并不存在什么生命驱动力。

然而，生命运动又是一种特殊形式的运动，有别于非生命物质运动的形式。生命运动的特点在于它的自主性、连续性和适应性。生命的自主性表现在生命系统的新陈代谢是自我完成的。它不断从外界环境摄取物质和能量，用以构造自己，这是同化作用；同时又不断分解自身的成分，释放能量，并将分解产物排出体外，这是异化作用。由一系列同化作用和异化作用形成的复杂过程就叫做新陈代谢。这种自我完成的新陈代谢，即自我更新，一旦停止，生命也就随之结束。生命的连续性在于生命系统能通过新陈代谢进行自我繁殖，从而繁衍后代。繁殖具有特异性，子代总是与其亲代相似，这就是遗传。生命的适应性在于生命系统具有自动控制的能力，它能随机应变地适应周围的环境。

现代生物学的研究表明，一切生命现象都是跟核酸、蛋白质等生物大分子分不开的，生物大分子是生命现象的物质基础。生物大分子的自复制、自组装和自调节决定了生命的自主性、连续性和适应性。核酸分子能够自我复制。由核酸控制蛋白质分子的合成，并通过蛋白质合成其他生物分子。生物大分子具有自我组装的能力，即由生物大分子聚合成为超分子结构，进而形成细胞。细胞的生长和分裂是在生物大分子复制和合成的基础上进行的。细胞通过分化而形成多细胞生物的组织、器官和个体。这就是说，生物不同层次的结构是生物大分子自组装的结果。再者，生物大分子的功能具有自我调节的作用，从而能够适应细胞内外环境条件的变化。

自然界任何系统的运动总是包括物质、能量和信息三个方面。生命系统的新陈代谢也包括物质代谢、能量代谢和信息代谢三个方面。物质和能量的概念是大家所熟悉的。那么什么是信息呢？简言之，信息表示系统的组织结构，它可以作为系统组织程度（即有序性）的量度。我们通常所说的生物信息或遗传信息主要就是指核酸和蛋白质分子的结构信息。常识告诉我们，从无序状态进入比较有序的状态，总是需要投入能量，这一过程决不会自发地出现。相反，从有序变为无序却是自发而无需提供能量的过程。生物体在形成复杂的组织结构时，必须摄取能量，并且破坏周围和环境的有序结构，也就是说通过增加环境的无序性来形成局部的有序结构，这就是生命系统的信息代谢。

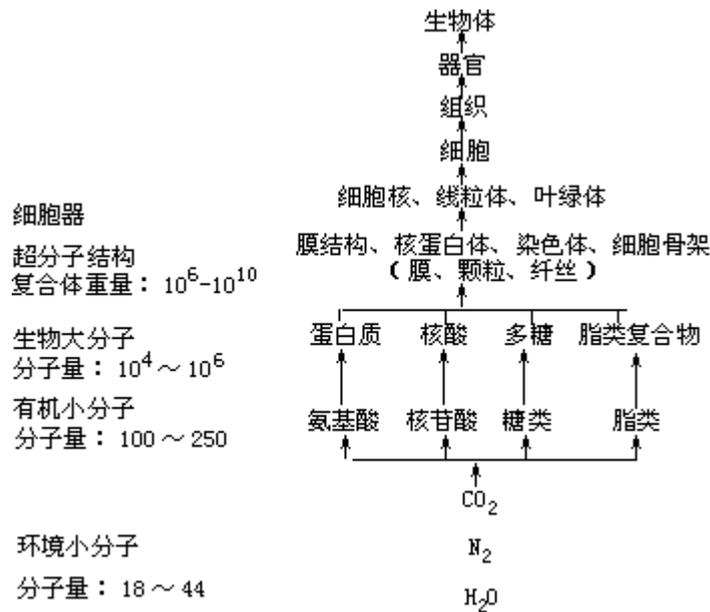


图 1-6 生物的不同层次结构

生物功能是由生物结构所决定的，由亲代传递给子代的生物信息控制着子代的结构形成。生物具有不同层次的结构（图 1 - 6），在此基础上进行各种生命活动。我们对生命世界的认识也是从生物结构开始的。

2. 生物大分子

在分子水平上生物体可看成是一个复杂的化学系统，这个系统包含进行新陈代谢、生长、发育和繁殖所必需的全部信息。现有生物体在化学成分和结构方面都有共同的特征，表明它们有统一或类似的起源。组成生物体的分子，除水和无机盐外，各种有机成分都是由生物所合成，因此这些有机化合物都被称为生物分子。水是生物体内最大量存在的分子，它参与一切生命活动，维持着生物体的正常功能。水对于生命来说是极端重要的，由此推测，生命最初可能起源于水中。某些无机离子对生命活动也是不可缺少的。生物体内主要的有机小分子约有 30 多种，包括氨基酸、核苷酸、糖类和脂类等，它们是合成生物大分子的前体，并广泛参与体内的各种代谢过程。有些有机小分子还具有化学通信作用。

生物大分子共有四类，即蛋白质、核酸、多糖和脂类复合物。前三类分别由氨基酸、核苷酸和单糖聚合而成，就如同一条项链，每个珠子相当于一个小分子单位，连在一起构成一条大分子链。对于某些多糖来说，它们形成树状的分支链。脂类分子仍属于有机小分子，但它们能通过较弱的次级键形成复合物，在生物膜中就是这样，其性质与生物大分子相似。生物大分子所以能成为生命的负荷者，与其独特的性质有关。这些独特的性质是：结构特异性、反应多样性和构象易变性。组成蛋白质的氨基酸有 20 种，蛋白质分子有大有小，一个中等大小由 300 个氨基酸组成的蛋白质分子，其排列方式为 20^{300} ，这是一个天文数字。哺乳类动物基因组大约含有十万个编码蛋白质的基因，其 DNA 分子的信息含量远远大于蛋白质。在宇宙中，还未发现信息含量可与蛋白质和核酸相比拟的分子。其次，蛋白质含有众多的化学基团，它还能与各种有机分子和金属离子相结合，以增加特殊的反应基因，这就使蛋白质能参与多种多样的化学反应。在这方面与自然界任何分子相比，蛋白质也是独占鳌头。第三，生物大分子的构象，即其分子通过折叠而表现出来的

空间结构，易受各种因素的影响而发生改变，因而能调节生物大分子的功能。多糖和脂类复合物通常仅由少数单体按一定规则组成，信息含量远比蛋白质和核酸为低，其反应基团也有限，故通常仅和蛋白质分子结合在一起，协助完成某些生命功能。

下面分别介绍各类生物大分子。

(1) 蛋白质 蛋白质的英文名词是 protein。该词最初从希腊文“proteios”衍生而来，意思是首位的。在未发现核酸前，人们认为蛋白质是生物体最重要的成分。但后来证明核酸是更为基本的生命物质，因为蛋白质的合成和结构都取决于核酸。然而无疑，蛋白质在生命系统中占据着极为重要的地位，蛋白质参与一切生命活动，生物的性状都要通过蛋白质来表达。如果说生命蓝图掌握在核酸手中，那么多才多艺的蛋白质则是生命功能的执行者。正因为如此，在生物技术工业产品中主要是各种蛋白质。

组成蛋白质分子的基本结构单位是 α -氨基酸。氨基酸是含有氨基和羧基的有机化合物，其分子结构式如图 1-7 所示。用于合成蛋白质的氨基酸共有 20 种，它们之间的差别仅在于和 α -碳原子（碳链骨架的第一个碳原子）相连的“侧链”（在图 1-7 中用 R 表示）不同。根据侧链的性质，可将氨基酸分为中性、酸性和碱性的，或分为疏水性（非极性）和亲水性（极性）的。

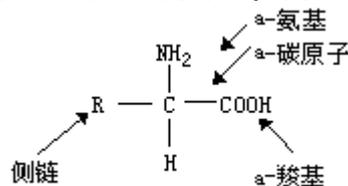


图 1-7 α -氨基酸的结构式

由一个氨基酸的羧基与另一个氨基酸的 α -氨基脱水形成的共价键称为肽键（图 1-8），产物为二肽。当许多氨基酸以这种方式连接在一起时，产生的氨基酸聚合物称为多肽，多肽链中氨基酸称为残基。蛋白质是由一条或一条以上非常长的多肽链所组成。在一条多肽链中，一端总是有一个游离的氨基，称为氨基端（N 端）；另一端总是有一个游离的羧基，称为羧基端（C 端）。蛋白质或多肽链的化学性质和空间结构主要是由氨基酸侧链所决定。

图 1-8 肽键的结构

生物界存在蛋白质的种类估计在 $10^{10} \sim 10^{12}$ 数量级。造成种类如此众多的原因主要是 20 种参与蛋白质组成的氨基酸在肽链中排列顺序不同引起的。蛋白质的这种顺序异构现象是蛋白质功能多样性和种属特异性的结构基础。从外形上讲，可将蛋白质分为球状蛋白质和纤维状蛋白质两大类。球状蛋白质溶解度较好，能结晶；纤维状蛋白质又可分为可溶性和不溶性两类。不溶性纤维蛋白质在体内主要作为结构成分存在。每一种天然的蛋白质都有自己特有的空间结构，这种空间结构通常称为蛋白质的构象。

为了表示蛋白质结构的不同组织层次，习惯采用下列专门术语：一级结构是指多肽链的氨基酸排列顺序；二级结构是指多肽链主链借助氢键排列成有规律的周期性构象，主要有 α -螺旋、 β -折叠和 β -转角三种基本形式，氨基酸侧链不参与二级结构，但对其稳定性有影响；三级结构是指多肽链借助各种次级键（非共价键）盘曲折叠成具有特定走向的紧密构象；四级结构是

指寡聚蛋白质中各亚基（亚单位）的空间关系，亚基通常由一条多肽链或以共价键（如二硫键）连在一起的几条多肽链组成。

蛋白质的一级结构是由共价键联结的，因此比较稳定。然而，维持蛋白质空间构象的作用力主要是一些弱相互作用或称为次级键（非共价键），包括氢键、范德华力、疏水相互作用和离子键。这些弱相互作用也是维持核酸构象、生物膜结构的作用力，因此被称为是“维持生命系统结构的作用力”。天然蛋白质的构象取决于上述作用的综合结果。图 1-9 表示卵溶菌酶的三级结构。从图中可以看到多肽主链的 α -螺旋、 β -折叠和 β -转角，相邻二级结构（ β -折叠）形成的组合体，在此基础上多肽链折叠成近乎球状的紧密构象。

图 1-9 卵溶菌酶的三级结构

天然蛋白质在某些物理因素（如热、紫外线和表面张力等）和化学因素（如有机溶剂、尿素、胍、酸、碱和重金属离子等）作用下，引起生物活性丧失、溶解度下降和一系列物理化学性质的改变，这种过程称为变性作用。蛋白质变性的实质是分子中次级键被破坏，引起天然构象解体，肽链变得伸展和松散，内部的疏水基团随之暴露出来。当变性因素除去后，有时变性蛋白又能恢复天然构象，这一现象称为复性作用。蛋白质易于变性是有些蛋白质至今未能开发利用的主要原因。因此，提高蛋白质的稳定性是生物工程的一项重要任务。此外，找出变性蛋白质的复性条件，在生产上也有很大意义。

(2)核酸 核酸 (nucleic acid) 最初从细胞核中分离出来，故得此名。后来知道，无论细胞核还是细胞质，或是无核结构的细菌，都存在核酸。核酸可分为两类，即脱氧核糖核酸 (DNA) 和核糖核酸 (RNA)。它们都是高聚物，其构造单位称为核苷酸。核苷酸本身由三个更小的单位组成：一个五碳糖（核糖或 β -脱氧核糖），一个磷酸基团和一个含氮有机碱。含氮有机碱主要有五种：腺嘌呤 (A)、鸟嘌呤 (G)、胞嘧啶 (C)、胸腺嘧啶 (T) 和尿嘧啶 (U)。DNA 与 RNA 的差别在于前者由脱氧核糖核苷酸聚合而成，后者由核糖核苷酸聚合而成。两者在碱基组成上也有不同，DNA 中含有 A、G、C、T，RNA 不含 T，而代之以 U。

1953 年沃森 (Watson) 和克里克 (Crick) 提出 DNA 分子双螺旋结构模型，在分子水平上解释了遗传信息传递机制，从而奠定了分子生物学的基础。按照沃森-克里克模型，DNA 是由两条反向平行的多核苷酸链围绕同一中心轴构成双螺旋的结构。两条链都是右手螺旋，依靠彼此碱基之间形成的氢键而联系在一起。根据分子模型计算，一条链上的嘌呤碱必须与另一条链上的嘧啶碱相配，其距离才正好与双螺旋的直径吻合。而且，为使碱基对之间能够形成氢键，A 只能与 T 配对，可形成两个氢键；G 与 C 配对，形成三个氢键。上述碱基之间配对的规律称为碱基互补。根据碱基互补原则，当一条多核苷酸链的序列被确定之后，即可决定另一条互补链的序列。碱基互补原则具有极重要的生物学意义，核酸的复制、转录和反转录等过程都是基于碱基互补。沃森-克里克的模型为随后各实验室的大量工作所证实，只在某些细节上有所修正。为表彰他们的杰出贡献，1962 年他们被授予诺贝尔奖。

生物体的遗传信息以密码的形式编码在 DNA 分子上，表现为特定的核苷酸序列。DNA 分子的一级结构即是指其核苷酸序列。为要了解基因 DNA 的编码信息就要测定 DNA 的序列。美国科学家准备用 15 年时间，30 亿美元经费，

绘制出人类基因组(由 30 亿个核苷酸对所组成)全部图谱。这是生物科学有史以来最伟大的一项工程,这项工程已于 1988 年开始。通过这项工程,人类将能更好地了解自己,并有助于遗传疾病和肿瘤的诊断与基因治疗。

DNA 的二级结构是指其双螺旋构象。在生物体内 DNA 的两条互补链通常以接近沃森-克里克模型描述的双螺旋结构形式存在,但局部也能形成相反方向的左手螺旋(称为 Z 型结构)。

细菌的染色体 DNA、质粒(即染色体外基因)DNA、某些病毒 DNA、以及真核生物细胞器(如叶绿体和线粒体)DNA 都是环状分子。真核生物的染色体 DNA 是线状分子。当环状 DNA 两条连续的链形成双螺旋时,拧得过紧或过松都会产生超螺旋结构,这就是 DNA 的三级结构。染色体中的 DNA 能和蛋白质结合形成更高级的结构。DNA 的二级、三级和更高级结构在分子识别和功能控制与调节中起重要作用。DNA 分子的各级结构如图 1-10。

图 1-10 DNA 的分子结构

在变性因素(如热、酸、碱和变性剂等)作用下,DNA 双螺旋结构被破坏,两条互补链解开,此过程称为变性。除去变性因素后,两条互补链又能重新结合,恢复双螺旋结构,此过程称为复性。如果将两种序列相近的 DNA 分子混合在一起,经变性和复性,不仅同种 DNA 两条互补链能重新结合,异种 DNA 两条部分互补链也能通过形成局部双螺旋区而结合在一起,成为异源双链或杂交分子。一条 DNA 链还能和另一条互补或部分互补的 RNA 链形成杂交分子。在生物技术中经常利用分子杂交来鉴定和分离核酸。从基因库中钓出一个基因就是分子杂交技术的一种运用。

RNA 通常是一条单链分子,它的一级结构即是其核苷酸序列。但 RNA 能通过自身回折形成局部碱基配对的双螺旋区,这是 RNA 的二级结构。碱基配对的原则与 DNA 相似,但以 U 取代 T,即 A 与 U 配对,形成两个氢键;G 与 C 配对,形成三个氢键。不配对的碱基被排除在双螺旋结构之外,而形成突环。图 1-11 表示 RNA 的一级结构和二级结构。

图 1-11 RNA 的分子结构

(a)RNA 链一个小片段的序列

(b)RNA 通过自身回折形成局部碱基配对的双螺旋区

RNA 的种类很多,主要有:核蛋白体 RNA(rRNA)、转移 RNA(tRNA)和信使 RNA(mRNA)。核蛋白体是蛋白质合成场所,由少数几种 rRNA 和几十种蛋白质分子组成。rRNA 含量很大,约占细胞总 RNA 的 80%左右。tRNA 在蛋白质合成中起运载氨基酸和翻译的作用,约占细胞总 RNA 的 15%左右。mRNA 是蛋白质合成的模板,约占细胞总 RNA 的 3~5%,数量虽少,种类却非常多,大小不一。细胞内还有一些分子量较小的 RNA,在基因表达的不同水平上起调节和控制作用。此外,许多病毒也含有 RNA。

克拉克于 1958 年提出中心法则,认为在基因表达过程中遗传信息流是单向的,从 DNA 转录成 RNA,再由 RNA 翻译成蛋白质,信息进入蛋白质后不再转移。DNA 和 RNA 都采用核苷酸来编码信息,信息由 DNA 转移到 RNA,如同磁带倒录,故称为转录;RNA 和蛋白质的语言不同,前者用核苷酸语言,后者

用氨基酸语言，故前者至后者需经过翻译。中心法则可能是争议最多的一条法则了。有趣的是人们怀疑它，可又普遍接受它；想推翻它，却又推而不翻。70年代初发现致癌 RNA 病毒含有逆转录酶，能以 RNA 为模板合成 DNA。艾滋病病毒也是一种逆转录病毒。逆转录过程的存在说明遗传信息能由 RNA 传递给 DNA。然而蛋白质多肽链合成后立即卷曲起来，它的氨基酸序列从未发现能指导其他生物大分子的合成。看来，对中心法则实质的了解还有赖于生物学三个最基本理论问题——生命起源、生命进化和生命本质的进一步深入研究。

50年代以来，因从事核酸或有关领域的研究而获得诺贝尔奖的科学家已有四十多人，这在其他科学领域内是罕见的。这种情况也从一个侧面说明核酸研究发展的迅速和科学界对核酸研究成果的重视。

(3)多糖多糖是由单糖聚合而成，单糖之间以糖苷键相连。多糖可以由一种单糖组成，例如淀粉、糖原（动物淀粉）和纤维素都是葡萄糖的聚合物，淀粉和纤维素的差别仅在于糖苷键的不同，前者为 α 型，后者为 β 型。它们主要作为贮能形式（如淀粉），以及结构成分（如纤维素）而存在。杂多糖含有多种单糖和单糖衍生物，并可和脂类分子结合形成糖脂，与蛋白质结合形成糖蛋白、蛋白聚糖等。它们具有各种不同的功能，在保护、免疫和分子识别中起重要作用。多糖与蛋白质和核酸的主要差别在于，它的合成是由酶控制的，无需生物模板，因此它有种族特异性，但无高度复杂的结构信息。此外，多糖常为分子大小不均一的组分所组成。

(4)脂类复合物脂类包括的范围很广，所有不溶于水而易溶于有机溶剂的生物分子都属于脂类，于是它们构成了细胞的疏水成分。最常见的脂类物质为油脂，是由脂肪酸和甘油所组成，它们是生物体所需燃料的贮存形式和运输形式。组成生物膜的脂类复合物主要有三类：磷脂、胆固醇（或称为胆固醇类）和糖脂。这三类都是两性化合物，既含有亲水的极性“头部”，又含有疏水的非极性“尾部”。这种两性性质在形成生物膜的脂类复合物中起重要作用，在水环境中亲水头部趋向于水，疏水尾部都有不与水接触的强烈倾向，从而使分子挤在一起。

3. 生物膜

生物的基本结构和功能单位是细胞，任何细胞表面都有一层膜（厚度约4~7纳米）将其内部成分与环境分开，这层膜称为细胞膜或质膜。此外，大多数细胞中还有许多内膜系统，组成具有各种特定功能的亚细胞结构和细胞器。生物膜对细胞的有序反应和整个细胞的区域化控制提供了必要的结构基础，从而使细胞的物质运输、能量转换、信息传递等生命过程得以有条不紊、协调一致地进行。膜结构既是细胞结构的基本形式，也是生命活动的主要结构基础。

(1)生物膜的分子结构化学分析表明，生物膜主要由蛋白质、脂类、糖类，还有水和金属离子等组成。膜的成分随膜的种类不同而有很大差别。

膜蛋白以其功能大致可分为五类：酶类、运输蛋白、运动蛋白、信息接受与传递蛋白、支持与保护蛋白。这些蛋白质赋予膜各种特殊功能。膜脂主要是磷脂，此外还有胆固醇（细菌不含胆固醇）和糖脂。膜的性质和结构与膜脂的两性性质有关。通常膜脂具有一个亲水的极性基团（头部）和两条疏水的碳氢链（尾部）。在水环境中，极性头部与水接触，疏水的碳氢链被水排斥而挤在一起，使膜脂自发形成平行排列的双分子层，并自我封闭成微囊。

除此，脂类分子还能聚集在一起形成微团结构（图 1-12）。生物膜中脂类分子通常总是以脂双层结构存在，或者组成平面膜，或者形成微囊。膜脂具有流动性。脂类分子碳氢链越短，不饱和键越多，流动性也越大。在生理条件下磷脂大多呈液晶态，即排列整齐的液态晶体，当温度降低至一定值时，磷脂从流动的液晶态转变为类似固态晶体的凝胶态。温度升高又能促使凝胶态“熔解”为液晶态。此转变温度称为相变温度。生物膜中常含有两种或两种以上的脂类分子，它们的相变温度各不相同，在一定温度下有的处于凝胶态，有的处于液晶态，处于凝胶态和液晶态的脂类分子各自汇集，从而使生物膜的不同区域出现不同的状态（相），这一现象称为分相。由此可见膜脂双层结构具有自组装、自封闭、自分相的作用。

图 1-12 膜脂双层结构和微团结构

{ewr MVIMAGE,MVIMAGE, !70000046_0023.bmp}

生物膜中含有寡糖或多糖，它们大多与膜蛋白结合，少量与膜脂结合。膜的糖蛋白可能与细胞表面行为有关，细胞与周围环境的相互作用都涉及到糖蛋白，伸出细胞表面的多糖如同天线搜集外界信息，在细胞识别中起重要作用。

(2)生物膜的透性与物质运输 细胞质膜和细胞器膜的通透性是活细胞维持其内环境的相对恒定和进行正常物质代谢的根本保证。现已知道，生物膜的结构状态和膜中存在的许多运输蛋白与膜的选择性透性有关。正如物质代谢是能量代谢和信息代谢的基础一样，膜的能量转换和信息传递均有赖于膜的选择透性造成的膜内外离子浓度差和膜电位差，在此基础上形成膜的许多其他功能。

从能量的角度来看，膜对分子和离子的透性或者说膜的物质运输可分为两大类：被动运输和主动运输（图 1-13）。物质分子透过膜，如果是从高浓度一侧转移到低浓度一侧，此过程无需提供外来能量，称之为被动运输。反之，逆浓度梯度的运输则是一个消耗代谢能的过程，称之为主动运输。

物质的被动运输是一个依赖浓度梯度的扩散过程。非极性分子和小的极性分子能够直接透过膜的脂双层，其通透能力决定于分子大小和脂溶性；但是离子和稍大一些的极性分子则受到膜脂层的阻挡，它们穿过膜要靠运输蛋白。膜上由通道蛋白形成的亲水通道，允许适当大小和带有一定电荷的溶质，通过简单扩散的方式进出细胞。膜的载体蛋白在物质运输中起重要作用。它可与被运输的物质分子可逆结合，由浓度高的一侧携带分子，然后转向浓度低的一侧，释放出被运输物质，其作用有如旋转门。这种被动运输方式称为促进扩散。载体与被运输物质的结合是高度特异的，正如酶对反应底物具有特异性一样，因此也可将这些载体蛋白叫做渗透酶。

物质的主动运输是一个逆浓度梯度的过程，这种过程必须由某些产能反应来驱动。将产能反应与需能反应相耦联，这是生物用来推动自然界不能自发进行的各种过程的基本原理。在这里，产能反应提供的能量被用来改变载体蛋白的构象，从而使载体蛋白能够来回将物质从低浓度区搬运到高浓度区，能量的耦联是由载体蛋白来完成的。主动运输与被动运输中载体蛋白的差别仅在于是否与能量耦联。根据能量来源，主动运输可分为：和另一物质运输过程耦联；和化学反应耦联；和其他形式能量（如光能）耦联。

图 1-13 生物膜的被动运输和主动运输

动物细胞外部 Na^+ 浓度总是高于内部，这种浓度差可被细胞利用来主动摄取糖和氨基酸等营养成分。载体蛋白在运载一个有机溶质分子的同时也运载了一个 Na^+ 。这样， Na^+ 由于浓度落差释放的能量正好用于溶质逆浓度运输的需要。这种情况与人类利用水力的原理十分类似，人们可以利用水位落差的能量来作各种功，包括将重物从低处提到高处。对于细菌来说，通常与主动运输相耦联的浓度降落物质不是 Na^+ ，而是 H^+ 。

很多离子，特别是 Na^+ 、 K^+ 和 Ca^{2+} 的主动运输，都是和 ATP 的水解相耦联。ATP 即三磷酸腺苷，是细胞代谢通用的能量载体。它含有两个高能磷酸键，在水解时能释放出大量能量。细胞获得的能量通常以合成 ATP 的方式将其贮存起来，以备需要时利用。动物细胞的质膜上分布着大量 Na^+ - K^+ 运载体蛋白，每一运载过程分解一个 ATP 分子，将 3 个 Na^+ 排出细胞外，同时吸收一个 K^+ 进入细胞。这种运载体的作用有如泵，故称之为离子泵。泵的工作需要分解 ATP，因此具有 ATP 酶活性。 Na^+ - K^+ 泵将 Na^+ 排出细胞外，将 K^+ 吸收进细胞内，但是 Na^+ 和 K^+ 又能经离子通道渗漏回去。为维持细胞内外 Na^+ 和 K^+ 恒定的浓度差，需要 Na^+ - K^+ 泵昼夜不停地工作，静止时动物所消耗的 ATP 约有三分之一用于 Na^+ - K^+ 泵的活动。由此也可以看出， Na^+ - K^+ 泵在动物细胞生命活动中占有重要的地位。

另一种主动运输过程是与基团转移反应相耦联。例如，细菌在吸收葡萄糖时，载体蛋白将葡萄糖带至质膜内侧即通过基团转移反应使其磷酸化，被磷酸化的葡萄糖不再能透过质膜，从而使葡萄糖得以不断吸收进细胞内。磷酸化需要能量，所消耗的能量用来促进葡萄糖的主动运输。

(3) 生物膜的能量转换生物体内重要的能量转换过程都与膜结构密切相关。线粒体是进行氧化磷酸化的主要场所，因而有“细胞动力站”之称；植物的光合作用是在叶绿体的类囊体膜上进行的，可以说整个生物界是由它们养活的。细菌的氧化磷酸化过程在质膜或其内陷的膜结构中进行。有些细菌也能进行光合作用，它们的质膜含有菌紫质（细菌视紫红质），能将光能转变为化学能。

线粒体的数目随不同细胞而异，其外形或为线状，或为颗粒状，故有此名。线粒体的内膜有许多向内褶皱的嵴，嵴的存在有利于增加内膜的面积。内膜包围着呈胶状的液体基质，其中含有蛋白质、核酸和各种代谢物（图 1-14）。线粒体内膜有许多蛋白质镶嵌在双分子层脂类系统中，这些蛋白质包括各种运输蛋白、脱氢酶类、电子传递系统和 ATP 合成酶类等，是进行氧化磷酸化的重要部位。所谓氧化磷酸化是指将生物氧化过程中释放出的能量用于合成含高能磷酸键的 ATP。

图 1-14 细胞线粒体的结构

植物的绿色细胞中含有数目不等的叶绿体，它们由两层外被膜所包围，内含以蛋白质和核酸为基本成分的基质，在基质内有膜系统排列折叠成片层结构，片层间隔扩大成扁平圆盘状胞囊，为类囊体。类囊体彼此堆叠成基粒，有如叠在一起的硬币，基粒之间由片层连接。这种复杂的片层结构大大增加了膜的面积（图 1-15）。膜上含有可进行光反应的叶绿素等光合色素。由许

多叶绿素分子和蛋白质组装成的捕光复合体就如同天线，它们收集、吸收光能，并将其汇集到反应中心的叶绿素分子上，只有这一小部分位于反应中心的叶绿素分子参加光反应，将光能转变成化学能。叶绿体的基质利用 ATP 的能源和还原辅酶 的还原力促使二氧化碳还原成糖，该过程不需光照，故称为暗反应。生物合成与生物氧化正好相反，这是一个利用能量的还原过程。

图 1-15 叶绿体的结构

(4)生物膜的信息传递 细胞在其生命活动过程中必须不断从外部获得信息，并作出相应的反应。无论是细胞内外，或是细胞之间的信息传递均有赖于生物膜。信息借助于信号进行传递。从细胞外将信息传递到细胞内的过程称为信号转导。细胞的信号转导系统由受体、信号转导蛋白（也称 G 蛋白）和效应器三部分组成，它们都位于细胞表面的质膜上。

受体可分为三大类：第一类受体多为数个亚基构成的寡聚蛋白质，是依赖于化学信号分子（如激素等）的离子通道，在细胞间传递信息（称为第一信使）受体亚基接受信号后即改变通道的开关。第二类受体与信号转导蛋白相偶联，它们多为单条多肽链，将信息转给效应器，产生胞内信使（在细胞内传递信息的分子，称为第二信使），从而激活细胞内有关的酶系统。第三类包括一些生长因子的受体，它们本身具有酪氨酸蛋白激酶的活性，可直接激活细胞内的酶系统。

G 蛋白是信号转导系统的重要一环。有许多种 G 蛋白，分别联系不同的受体和效应器，大致可分为刺激性和抑制性两类。因此同样的信号分子对不同的组织细胞可引起不同的效应。效应器可以是一种酶，用以合成或分解第二信使，或者是一种离子通道，以改变膜的离子流和膜电位。膜电位在传导电信号中起重要作用。

值得提出的是，迄今发现的癌基因都是属于信号转导系统蛋白质的编码基因，因发生突变失去控制而成为癌基因。这是因为细胞的正常生长和分裂是受控制的，细胞内外环境条件的改变通过信号转导系统而影响细胞生长和代谢，它的失控将导致细胞恶性生长，即发生癌变。

(5)膜的生物合成和人工膜生物膜上含有合成膜脂的各种酶类。脂类的前体物质（如脂肪酸、甘油、含氮化合物等）是在胞液和细胞器基质中合成的，它们被膜固有的酶利用来合成膜的脂类分子和糖脂。蛋白质是在细胞质中合成的多肽链在合成的一定阶段或合成后被引导并插入生物膜的特定部位。生物膜的合成就是在原有膜上加入新的成分，当膜生长至一定程度后即发生细胞和细胞器的分裂。

利用膜的自组装、自封闭和自相性质，可以用生物膜的成分重组功能膜，或用脂类分子制造人工膜。通过超声波处理，有机溶剂处理、机械搅拌、高压喷射等方法，可制备出各种大小的人工膜囊泡，称为脂质体。脂质体在理论研究上和实践应用上都有很大价值。

4. 细胞器和细胞

细菌和蓝藻都属于原核细胞，这类细胞膜结构比较简单，无细胞器。动植物细胞（包括酵母菌）具有核结构，属于真核细胞。这类细胞内部由双层核膜将原生质分成细胞核和细胞质两大结构与功能区。细胞核是遗传信息贮存场所，在这里进行基因的复制和转录，从而控制着细胞的代谢活动。细胞

核的主要结构有核膜、核仁、染色质及核液等。细胞分裂时染色质凝缩成染色体(图 1-16)。细胞核内合成的 RNA 经加工后由核孔进入细胞质中,在那里进行蛋白质合成。

图 1-16 染色质的各级结构

在细胞质内以膜的分化为基础形成许多重要的细胞器,如内质网、高尔基体、溶酶体、线粒体等。胞液是指细胞质的连续水相部分,大部分中间代谢都在胞液中进行;其间还有各种颗粒、纤维和膜状结构,细胞器即悬浮其中。内质网是分泌蛋白和合成磷脂、糖脂、胆固醇等的场所。高尔基体主要功能是对细胞合成和吸收物质分门别类地进行浓缩、加工和运输,因此细胞的分泌和吞噬都与其有关。溶酶体的膜形成囊泡状结构,是细胞的消化器官。线粒体是重要的分解代谢和能量代谢场所,生物氧化磷酸化在线粒体内膜上进行。植物细胞除上述细胞器外,还有叶绿体、液泡和细胞壁。此外,细胞中还有许多特殊的或细微的结构。图 1-17 为动物细胞的典型结构。

图 1-17 动物细胞的结构

组成生物体的细胞有多种多样,其形状与大小悬殊很大,结构的复杂程度也很不一样。细菌是比较小而简单的细胞,多数细菌细胞直径为 1~2 微米,呈球状或杆状。是否有比细菌更小的细胞?目前发现的最小与最简单的细胞是枝原体,它们中很多是人与动物的病原体,其直径只有 0.1~0.15 微米,只有细菌体积的千分之一。为维持细胞独立生活,估计至少要有 100 个左右基因,以便编码几十种维持细胞最基本代谢过程所需要的酶。这样看来,细胞体积的大小在理论上是有下限的,枝原体已接近此下限。比枝原体更小的病毒是不能离开细胞独立生活的,它们应看成是具有感染能力的细胞成分。动植物细胞比较大,结构也较复杂,其直径多数在 15~30 微米之间。也有不少例外,例如鸟卵细胞的直径可达数厘米,这是由于卵中含有丰富的营养物质,以供受精后发育的需要。

在种类繁多的细胞世界中,根据其进化方向与结构特征,可以分为原核细胞与真核细胞两大类。一般认为原核细胞与真核细胞起源于共同的原始细胞,大概从 30 亿年前这两类细胞就开始分道扬镳了,它们不仅在结构复杂程度上有很大差别,而且是沿着两条不同的演化途径发展。以细菌为代表的原核细胞主要特点为:结构小巧、表达高效、分化较低、生长速度快。动植物等真核细胞的特点为:结构复杂、调节精确、功能分化、适应潜力大。原核细胞以快速生长见胜,其结构和代谢无不表现出这一优势。剩菜剩饭隔一夜就变馊了,就因为长满了细菌的缘故。真核细胞具有庞大的基因组,衍生出多种多样的复杂结构和代谢类型,以各种不同的方式去适应和征服自然。世界上现存的动植物物种大约有二百万种以上,我们所见到的绚丽多彩的生物界主要就是由真核细胞组成的。

从细胞形态结构上来看,原核细胞的膜结构并不发达,只有质膜和由质膜凹陷形成的中膜体,不形成核和其他细胞器;真核细胞的膜结构很发达,形成核和其他细胞器。核结构的出现使转录(RNA 的合成)和翻译(蛋白质的合成)在空间上和时间上都被分隔开来,基因表达的调控得以在不同水平

上更精确地进行；而在原核细胞中转录和翻译往往是同时进行的。从染色质的结构上来看，原核细胞的 DNA 仅局部覆盖以蛋白质，并不形成核小体和染色体的高级结构；真核细胞的染色质存在多层次的高级结构。染色质的组装结构不同，决定了它们复制和分配方式的差异。原核细胞的繁殖以直接分裂为主，真核细胞则进行有丝分裂。从基因组的结构来看，原核细胞的基因组小而紧凑，往往在功能上彼此有关的基因组成一个转录和调控的单位，称为操纵子，它们由同一控制序列所启动。真核细胞的基因组庞大而复杂，有较大比例的调控序列和重复序列，编码蛋白质的基因不组成操纵子。原核细胞和真核细胞的基因结构也有较大差别，前者是连续的，后者是不连续的，编码序列往往被一些非编码的居间序列所分隔开。因此真核细胞转录的 RNA 要经过拼接，才成为有功能的成熟 RNA。由此可见，原核细胞和真核细胞主要区别在于两者遗传物质的组织结构方面，即两者在核、染色质、基因组和基因结构上有明显的不同。了解这一点很重要，在进行基因操作时必须考虑到各自的结构特点。

5. 多细胞生物的组织 and 器官

真核生物除原生动物、单细胞藻类和酵母菌外，多数为多细胞生物。在多细胞生物中，各类细胞有不同程度的分化。所谓细胞分化是由于生物在发育过程中永久性地关闭了细胞基因组的某些基因，因而使它们表达的性状不同。例如，动物肝脏细胞和肌肉细胞的基因组是一样的，但是它们表达的基因不同。肝脏细胞经分裂后产生的子代细胞仍然是肝脏细胞，因为肝脏细胞不需要的基因已经被关闭了。细胞分化是在染色质结构水平上控制的。基因组某些区域发生异染色质化，即这部分基因被组装成高度压缩的异染色质，从而不再能表达。这种异染色质化具有“记忆”的能力，就是说子代细胞能保持该区域处于异染色质化。癌组织失去了分化控制，因而又恢复了胚胎时期的旺盛生长。研究细胞分化和再分化的规律，无论在理论上和实践上都有十分重大的意义。

细胞经分化形成不同的类型，分别集合成群，称为组织。由各种组织构成执行一定功能的器官。由许多器官联合组成的一套结构称为系统。例如，高等植物的组织可分为表皮组织、维管组织和基本组织三大类，当然它们还能进一步细分。由这些组织构成根、茎、叶三种器官，它们均属于营养系统。花、果实、种子三种器官则属于生殖系统。又如，高等动物组织可分为上皮组织、结缔组织、肌肉组织和神经组织四大类，由这些组织分别构成心、肝、肺、胃、肠、肾、眼、鼻、耳、脑等器官，这些器官分属于循环系统、消化系统、呼吸系统、排泄系统、神经系统等。由此构成生物个体不同层次的结构，这些结构都是在生物大分子的基础上与其他有机和无机分子及水逐级装配而成的。

三、生物体的自复制、自组装与自调节

现代分子生物学发展中具有重要意义的成就之一就是认识到生物大分子是生物一切生命活动的分子基础。生物的生长、发育和繁殖从根本上来讲也就是各种生物大分子的依次合成、组装和扩增过程。遗传物质（核酸）能够自我复制并控制蛋白质的合成，由蛋白质再合成其他生物分子。生物大分子自我组装成生物不同层次的结构和组织。遗传信息的表达可在不同水平上进行自我调节。由此呈现出生物的各种不同功能。

1. 遗传物质的复制

什么叫遗传物质？简单说，就是携带生物遗传信息的物质。作为遗传物质，它必须具有两个基本属性：第一，它能复制。细胞分裂一次，遗传物质复制一次，这样遗传物质就能够代代相传。第二，它能表达。遗传物质决定蛋白质的合成，通过蛋白质表现生物的各种性状。现在知道遗传物质是核酸，遗传信息主要贮存在 DNA 中（有时为 RNA，例如 RNA 病毒），并通过 RNA 控制蛋白质的合成。基因是基本的遗传单位，也就相当于一 DNA 序列（或 RNA 序列）。通过基因结构分析，发现基因可以重叠（即两个基因共用一部分 DNA 序列），可以断裂（如真核生物基因被居间序列所分隔开），可以移动（从基因组一个位置转移到另一位置）等，并且选择性表达。因此，基因代表可表达的一段序列，并不一定是连续的 DNA 片段。

(1) DNA 的复制和修复按照沃森-克里克模型，DNA 分子两条链可解开，各自合成其互补链。这样的复制方式称为半保留复制，即子代分子一条链来自亲代，另一条是新合成的（图 1-18）。复制从固定起点开始，按一定顺序进行。细菌的 DNA 总是和细胞膜相连，真核细胞的 DNA 和核膜相连。膜上含有与复制有关的 DNA 聚合酶，并控制着复制的起始。基因组能独立进行复制的单位称为复制子。每个复制子都含有控制复制起始的起点，可能还有固定的终点。原核生物的染色体和质粒 DNA，真核生物的细胞器 DNA 都是环状双链分子，不管它们分子大小十分悬殊，它们只含一个起点，因此是一个复制子。真核生物染色体 DNA 是一条很长很长的线状双链分子。例如，人类的生殖细胞有 23 个染色体（称为单倍体），体细胞染色体数目是生殖细胞的二倍（二倍体），单倍体基因组 DNA 共含有 3×10^9 碱基对，如果将一个染色体 DNA 分子拉直，其长度可达几十厘米。在这样一条线状双链分子中分布着许许多多复制起点，它们可以同时许多点上开始复制，以此解决分子过长给复制带来的困难。因此真核生物染色体 DNA 分子是多复制子。病毒 DNA 多种多样，或是环状分子，或是线状分子，或是双链，或是单链，每一个病毒基因组 DNA 分子是一个复制子。

图 1-18 DNA 的半保留复制

DNA 由四种脱氧核糖核苷酸（dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP）聚合而成，催化聚合反应的酶称为 DNA 聚合酶。与生物小分子的合成不同，信息大分子的合成除需要底物、能量和酶外，还需要模板。DNA 聚合酶催化的反应是按模板的指令进行的。只有当进入反应中心的核苷酸碱基能与模板碱基形成沃森-克里克类型碱基对时，才能在该酶催化下形成磷酸二酯键。因此 DNA 聚合酶是一个模板指导的酶。DNA 聚合酶除模板外还要求有引物，它只能催化脱氧

核糖核苷酸加到已有核酸链的 3'-羟基上，使链延伸，而不能使脱氧核糖核苷酸自身发生聚合。通常 DNA 合成的引物是一小段 RNA，因为 RNA 聚合酶可以在 DNA 模板链上催化核糖核苷酸从头聚合，在合成出 RNA 引物后 DNA 聚合酶就能接着使核酸链进行延伸反应，合成出互补 DNA 链。

有些 DNA 聚合酶，如大肠杆菌 DNA 聚合酶，还具有校对功能。DNA 聚合酶虽是按照模板的指令去合成 DNA 新链，然而错配的碱基仍然不可避免地会出现。大肠杆菌 DNA 聚合酶是一种多功能酶，它除聚合酶活性外，还具有核酸外切酶的活性，其 3'→5' 外切酶活性与校对功能有关。在正常聚合条件下，3'→5' 外切酶活性受到抑制；若一旦出现错配碱基时，酶的构象将发生改变，聚合反应立即停止，由 3'→5' 外切酶迅速切除错误掺入的核苷酸，然后聚合反应才得以继续进行下去。DNA 聚合酶的校对功能对保证 DNA 复制的忠实性极为重要。真核生物的 DNA 聚合和校对功能通常是由不同酶来承担的。

DNA 复制是一个极其复杂的过程。在 DNA 链的合成部位即复制的生长点，两条链在各种与复制有关的酶和辅助因子参与下，彼此配合进行高度精确的复制。

世界上任何机器的复杂程度都是不能和生物相比拟的，机器在使用过程中各部件都会耗损，而生物却能自我更新，其某一部分遭到损伤时在一定程度上还能自我修复。DNA 分子对生物来说是极端重要的，它遭到各种物理的（如紫外线、电离辐射等）和化学的（如诱变剂）因子作用，引起分子损伤或是在复制过程中造成的错误也能加以修复。细胞内存在多种修复系统，它们能够检查出 DNA 分子的损伤部位，由特异的核酸内切酶和外切酶将损伤的一段链切除，或是通过 DNA 重组机能将损伤的链换掉，然后由 DNA 聚合酶进行修补，由 DNA 连接酶重新接上。细胞内有多种 DNA 聚合酶，有的参与复制合成，有的参与修复合成。如果损伤不是致死的，或者未能修复，那么就会引起突变。突变虽可能会影响生物现有的功能，但是一定频率的突变却是生物进化的基础。

(2) 病毒 RNA 的复制病毒由蛋白质和核酸所组成，其核酸或为 DNA，或为 RNA。病毒侵入宿主细胞后即利用宿主的酶系统和代谢机构来合成病毒蛋白质和核酸，即复制病毒。通常病毒仅编码其复制的关键酶或酶的亚基，以便控制复制过程。RNA 病毒的遗传物质为 RNA，它的复制有赖于 RNA 复制酶，也就是以 RNA 为模板的 RNA 聚合酶。该酶的特异性非常高，只复制病毒自身的 RNA，而不去复制细胞内其他种类的 RNA。聚合反应以四种核糖核苷酸（ATP、GTP、CTP 和 UTP）为底物，由病毒 RNA 作为模板合成其互补链，然后再以互补链为模板合成病毒 RNA。RNA 复制酶无校对功能，在复制中错误掺入核苷酸的频率较高，这就是为什么 RNA 病毒变异率较高的原因。

逆转录病毒的基因组虽是 RNA，但其复制过程需经过 DNA 的阶段，这点很特别。转录酶是一种 DNA 聚合酶，但能以 RNA 为模板，它在合成 DNA 时也需要引物。酶和引物都由病毒颗粒带入宿主（动物）细胞。在合成出病毒的第一条互补 DNA（cDNA）链后，随即整合到宿主细胞基因组中去。在适当条件下病毒 RNA 被转录出来并合成病毒蛋白质，组装成病毒颗粒。

2. 遗传物质的变异

遗传物质的变异称作突变。突变有三种类型：DNA 碱基对的置换。诱变剂使某个碱基发生变化而在复制后使 DNA 的碱基对发生错误，又称为点突

变。碱基对的置换导致密码子的改变，结果酶或蛋白质的活性可能改变。移码突变。由于一个或两个核苷酸插入或者缺失而使基因在该位点后面的密码框架全部发生错误，导致该基因产物完全失活。大片段的缺失，造成丢失一个基因，甚至多个基因。

碱基类似物、氮芥、亚硝酸、乙烯亚胺、羟胺等化合物都能引起碱基置换。某些扁平的芳香族化合物，如原黄素等，可插入碱基平面之间，使 DNA 链伸长，结果造成移码突变，插入或删除个别核苷酸。紫外线或电离辐射能够引起 DNA 链断裂或碱基破坏，它们造成的突变以碱基置换为主，也可以发生移码突变或大片段缺失。用上述因素人为引起突变称为人工诱变。人工诱变是动植物和微生物遗传育种的重要手段。

诱变剂通常需经过体内代谢活化才有诱变作用，因此不同个体对同样量的诱变剂反应并不相同。在各种诱变剂中 90% 以上有致癌作用，致癌物质中 90% 以上有诱变作用，这提示致癌因子引起动物癌症的机制是体细胞突变。广岛原子弹爆炸时受辐射的幸存者在 12 年后白血病（又称为血癌）的患病率为对照的 50 倍。有潜在诱变作用的化学制品的广泛使用 and 环境污染，对人类健康是一种严重威胁。

3. 遗传信息的表达——转录和翻译

遗传物质的功能之一是把遗传信息变为由特定氨基酸顺序构成的多肽（蛋白质），从而决定生物体的表型。这一过程称为遗传信息的表达，或基因表达。有些基因的表达始终如一，有些基因的表达受细胞内外环境的调节或按时间程序依次进行。第一种情况称为组成性表达，主要是一些对细胞生存基本必需的基因；第二种情况为适应性表达，主要是一些可诱导的酶和蛋白质的编码基因；第三种情况是与生物发育有关的基因，它们控制着细胞的分化。

(1) 转录细胞的各类 RNA 都是以 DNA 为模板，在转录酶的催化下合成的。最初转录的产物通常需要经过一系列加工，才能成为成熟的 RNA 分子。

转录酶又称为依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶，它以四种核糖核苷酸（ATP、GTP、CTP 和 UTP）为底物，按照模板序列通过碱基互补规则（RNA 以 U 与 DNA 的 A 配对）合成 RNA 链。DNA 两条链中只有一条链进行转录，称为模板链。DNA 的两条链哪一条为模板链是由基因的启动子决定的。启动子是 DNA 控制转录的一段序列，它有方向性。RNA 聚合酶能识别启动子，与启动子结合后从起点处开始转录，并不断延伸，一直转录到终止子（终止信号）为止。因此，转录过程可分为起始、延伸、终止三个阶段。RNA 聚合酶为多亚基的寡聚蛋白质，不同亚基各有其特殊功能。图 1-19 表示转录过程中的 RNA 聚合酶。

图 1-19 转录过程中的 RNA 聚合酶

RNA 在合成后通常还要进行加工，包括切去两端的一些核苷酸，改造 5' 端（头部）和 3' 端（尾部）的结构，对一些碱基进行修饰（主要是甲基化）。真核生物 RNA 的加工更为复杂。例如，真核生物 mRNA 的 5' 端形成特殊的甲基化鸟苷酸结构称为帽子，3' 端形成多聚腺苷酸尾巴（polyA），并将内部插入的居间序列（称为内含子）切除，使编码序列（外显子）拼接在一起。

(2) 翻译生物的遗传信息编码在核酸分子上，表现为核苷酸排列顺序，当

遗传信息转变为蛋白质的氨基酸序列时，需要将核苷酸语言翻译成氨基酸语言。这种翻译是通过三个核苷酸决定一个氨基酸的三联体密码或称为密码子来实现的。遗传密码有四个基本特性：密码无标点符号。因此要正确阅读密码必须按一定的框架从起点开始三个核苷酸一组连续读下去直到终止密码子为止，中间插入或删除一个核苷酸都将造成以后读码的错误。密码具有简并性。四种碱基三个一组共有 64 种排列组合方式，其中三组为终止密码子（UAA、UAG、UGA），剩下 61 个密码子对应于 20 种氨基酸，必定有多个密码子决定一个氨基酸，这就是密码的简并。只有色氨酸和蛋氨酸仅一个密码子，蛋氨酸的密码子（AUG）还兼起始信号。密码具有变偶性。密码子的专一性主要由头两位碱基决定，第三位碱基的配对可以变动。密码具有通用性。无论原核生物还是真核生物都用同一套密码。但是线粒体个别密码子却与生物通用密码不同，表明其通用性并非绝对的。生物遗传密码列于表 1-1。

翻译由细胞内三种 RNA（mRNA、rRNA 和 tRNA）共同完成。mRNA 是蛋白质合成的模板，它从 DNA 处携带遗传信息以决定氨基酸的排列顺序。rRNA 起装配的作用，它与数十种蛋白质构成核蛋白体，使 mRNA 和携带氨基酸的 tRNA 在其上正确定位，并催化肽键的合成。tRNA 起翻译的作用，它的臂结合特定的氨基酸，然后由它的反密码子（与密码子互补的三个核苷酸）识别 mRNA 上的密码子。

新合成的多肽链需要进行加工，这种加工往往在肽链开始合成后不久即进行。肽链加工包括甲酰基被切去，有些连蛋氨酸也被切除，随着肽链的延伸按一定规则形成二级结构，并折叠成三级结构。多肽链还可以在酶作用下通过肽链的断裂或个别氨基酸侧链的改变而得到修饰，成为有活性的蛋白质。

4. 基 因 表 达 调 控

表 1-1 遗传密码表

5' 端的碱基	中间的碱基				3' 端的碱基
	U	C	A	G	
U	苯丙氨酸	丝氨酸	酪氨酸	半胱氨酸	U
	苯丙氨酸	丝氨酸	酪氨酸	半胱氨酸	C
	亮氨酸	丝氨酸	终止密码子	终止密码子	A
	亮氨酸	丝氨酸	终止密码子	色氨酸	G
C	亮氨酸	脯氨酸	组氨酸	精氨酸	U
	亮氨酸	脯氨酸	组氨酸	精氨酸	C
	亮氨酸	脯氨酸	谷酰胺	精氨酸	A
	亮氨酸	脯氨酸	谷酰胺	精氨酸	G
A	异亮氨酸	苏氨酸	天冬酰胺	丝氨酸	U
	异亮氨酸	苏氨酸	天冬酰胺	丝氨酸	C
	异亮氨酸	苏氨酸	赖氨酸	精氨酸	A
	蛋氨酸*	苏氨酸	赖氨酸	精氨酸	G
G	缬氨酸	丙氨酸	天冬氨酸	甘氨酸	U
	缬氨酸	丙氨酸	天冬氨酸	甘氨酸	C
	缬氨酸	丙氨酸	谷氨酸	甘氨酸	A
	缬氨酸	丙氨酸	谷氨酸	甘氨酸	G

* AUG 为起始密码子

在细胞生长、分裂和分化过程中，遗传信息的展现可随细胞内外环境的改变而加以调整，并按一定时间程序而变化，这就是适应调控和时序调控。基因表达调控可以在不同水平上进行，在转录水平（包括转录前、转录和转录后），或在翻译水平（翻译和翻译后）。

原核细胞的基因组中，在功能上彼此相关的基因常集中在一起组成操纵子，它既是转录单位，又是调控单位。一个操纵子转录产生一条多基因 mRNA，核蛋白体可对其上各个基因的编码序列进行翻译。组成操纵子的基因有一个共同的启动子（控制转录的序列）以及相应的调节序列（又称为调节元件）。最常见也是最早发现的调节序列是操纵基因，它受调节基因产生的阻遏物的调节。阻遏物是由调节基因编码的一种蛋白质，当它与操纵基因结合时即阻止有关基因的转录。阻遏物可与小分子效应物（通常是代谢底物或代谢产物）相结合而改变其构象，从而调节基因的表达。例如，大肠杆菌乳糖操纵子由代谢乳糖的三个结构基因和共同的调控序列（包括启动子和操纵基因）所组成。环境中不存在乳糖时，阻遏物与操纵基因结合，乳糖操纵子即被关闭，以免不必要地合成代谢乳糖的酶类。一旦环境中出现乳糖，它就同乳糖操纵子的阻遏物结合，使其失去与操纵基因结合的能力，结构基因得以进行转录，相应的酶使被诱导产生，在这里乳糖起到了一种诱导物的作用（图 1-20）。法国分子生物学家雅谷布（Jacob）和莫诺德（Monod）最初提出乳糖操纵子模型，由于他们的学说在说明基因表达调控中获巨大成功，因而被授予 1965 年诺贝尔奖。许多分解代谢的酶类可被其底物以同样的方式诱导，另一方面合成代谢酶类的产生则可被其产物（如某些糖、氨基酸和核苷酸）所调节。

原核细胞的转录和翻译可在同一时间和位置上发生，mRNA 还在延伸阶段

就可边延长边翻译，调控主要是在转录水平上以操纵子为单位进行的。真核细胞的基因不形成操纵子，编码蛋白质的基因各有其启动子独自转录，真核细胞的基因表达调控是在不同水平上进行的，称为多级调控系统。转录前水平的调控主要指基因重排和修饰。转录水平的调控包括染色质调控和基因调控。转录后水平的调控主要通过 RNA 加工和选择性拼接来进行。翻译水平的调控也包含多种方式，简言之，真核细胞的 mRNA 是长寿命的，它们不像原核细胞那样转录出来即翻译，翻译完后就降解掉；而是大量贮存在细胞内，通过复杂机制决定何者翻译，何者不翻译，以及翻译的数量。翻译后水平的调控主要通过多肽链的加工、折叠和修饰来进行。真核细胞基因表达调控已成为分子生物学中最引人注目的研究课题之一。

图 1-20 乳糖操纵子模型

5. 复杂有机体的组织结构和功能调节

遗传物质通过复制由亲代细胞传递给子代细胞，在子代细胞中按照其指令将氨基酸装配成多种结构的各种蛋白质，成为细胞构造的理想物质。

蛋白质的精巧组装并不罕见，与肌肉收缩密切相关的结构也是由蛋白质组装而成。在肌肉细胞中有两种彼此相间排列不同类型的蛋白质细丝——肌动蛋白和肌球蛋白。当肌肉细胞从神经接收到一个收缩信号时，这两种细丝就相互滑动，同时消耗 ATP，使细胞长度缩短。收缩结束时，蛋白质细丝往回滑动，肌肉恢复到它原来的长度。值得指出的是，肌肉收缩的能量利用效率之高为迄今的动力机器所望尘莫及。生物的结构通常是分层次装配的，由蛋白质和各类生物大分子以及分子复合物组装成膜状、颗粒状和纤丝状超分子结构，以此作为更高层次装配的基础。装配式建造生物结构有两个明显的优点：第一，它可以使所需遗传信息减至最少；第二，它能够在不同装配阶段排除有缺陷的亚结构，从而使浪费降到最低程度。装配所需的信息主要包含在生物大分子内，如多酶复合体，核糖核蛋白颗粒、简单的病毒粒子等都是生物大分子自身组装的实例。然而有些细胞结构的装配需要有先存结构的存在，特别是那些向原有结构中加入新的成分的过程，如染色体、细胞壁和生物膜的建造，先存结构起着指导的作用。在这种情况下，除了生物大分子含有主要信息外，先存结构也包含有一部分装配信息，如果先存结构改变就会引起装配式样的变化。

许多蛋白质的功能具有自我调节作用。例如，代谢反应关键步骤的酶通常都是调节酶，这类酶除有活性部位外还有调节部位，当效应分子（代谢底物或产物）与调节部位结合后即改变蛋白质的构象，并以此调节酶的活性。因此，当代谢底物积累时，通过提高调节酶的活性而促进代谢反应的进行；而当产物积累时通过反馈抑制限制生物合成，以免过多合成产物。另一种对酶活性的调节方式为共价修饰。在膜的信号转导过程中，外来信号即是通过蛋白激酶引起一系列关键酶的磷酸化，从而调节细胞代谢的。至于蛋白质生物合成的调节控制，即基因表达调控，已如上所述。由此可见，细胞代谢和基因表达是一个自调节的过程。

多细胞生物从一个最初的细胞（即受精卵）开始，通过增殖与分化，发育成为成熟的个体，其间经历了十分复杂的过程。早期胚胎发育产生出种类繁多的细胞类型，人类要持续数年，鼠类要持续几周，某些昆虫要持续几天，

而某些寄生虫则持续几小时，发育的关键问题与某些基因的打开和另一些基因的关闭有关。目前对基因控制组织和器官形成的方式还所知极少，但有一点是肯定的：使细胞开始分裂和停止分裂或者进行分化的神秘指令不是来自细胞内部，而是细胞间相互作用的结果，通过细胞之间传递的某些信号控制着各自细胞的基因表达。

细胞间可通过表面接触沟通信息，如将肝细胞放在营养液中培养，它们会增殖直到玻璃表面长满单层细胞为止。因为细胞的接触面已超过极限而出现生长停顿，这种现象称为接触抑制，它在器官形成和再生过程中起着重要作用。癌细胞丧失接触抑制能力是导致恶性生长的一个主要原因。细胞之间也可以进行远距离通讯，这就要借助于激素、神经和其他更为复杂的方式了。

神经分子生物学是一个十分迷人的领域，通向这个领域的大门现在已经打开，不仅是神经生物学家和分子生物学家，还有许多优秀的物理学家和化学家以及数学家急切希望能闯入到这个领域中去。有人预测二十一世纪自然科学领头的学科将是神经分子生物学。人们普遍关心的是，神经系统是如何进行学习的呢？从实质上讲，学习是在感觉和概念之间建立新的或更加有效的联系，它必然依赖于脑细胞之间建立新的或更好的信息交流途径。记忆的本质是什么呢？当我们回忆已经学到的某项本领，或唤起已经看到的、听到的、感觉到的某件事情时，在我们的大脑活动中正在重新进入某种神经网络，这种联结网络是先前在脑中接通或强化了了的。而且，记忆也是在一定程度上忠实地去追溯过去同样的神经信号通路，这类通路是由中枢神经和大脑细胞膜受体与离子通道的种类和数量分布所决定的，在记忆中被固定了下来。现时我们对学习和记忆还讲不出更多的道理，也许在下一个世纪就能揭开这个谜，这将是人类认识世界和认识自己的一个极大飞跃。自然界创造了智慧的人类，人类在自然界创造出更多新的奇迹。生物学的迅速发展将使人类更有效地去创造新的奇迹。

四、未来一瞥

70年代兴起的生物技术导致生物科学发生深刻的变化，这种变化表现在：第一，生物科学得以前所未有的高速度向前发展。过去测定一个基因的序列需要数年的时间，现在一天就能完成。人类基因组大致有十万个基因，到下世纪初将绘制出人类全部的基因图谱，这不仅有助于对人类各种疾病的防治，而且对基因结构、功能和表达调控也会产生新的认识。第二，进入创造性生物学的新时代。如果说过去生物学主要是在认识生物的基础上研究怎样利用生物，那么今天已经变成是在分子水平上重新设计、改造和创建新的生命形态，新的生物物种了。第三，开辟了新的研究领域。在生物技术出现之前，对发育的基因控制、神经系统的分子活动等领域的研究是难以想象的。今天，发育的分子生物学、神经分子生物学、分子生理学、分子心理学等学科都在蓬勃发展。新的研究结果不断涌现，令人目眩，而展望未来则更为激动人心。

生物技术的突破是导致新产业革命的起因之一。第一产业的“农业革命”直接依赖于生物技术，通过基因重组和有关的高新技术培育高产、营养丰富的作物品种，提高抗病和抗不良条件的能力，减少肥料和其他昂贵农药的用量。所有这些，已经影响全世界的农业和粮食生产体系，推动了生产效率的提高。第二产业的“工业革命”在很大程度上受到生物技术的影响，一批以生物技术为支柱的工业，如医药工业、食品工业、化学工业等，最先获得迅猛发展；微电子和计算机工业似乎与生物无关，然而它们也用上了生物元件和生物芯片；一旦再生性生物能源获得成功，它对工业的影响就更为普遍了。第三产业的内容很广泛，医疗保健是一种重要的社会服务，各种生理因子在临床的使用使化学治疗进入一个新的发展阶段。许多恶性疾病的防治，人们都寄希望于基因治疗。环境保护也是一种社会服务，生物技术对此是大有可为的。随着分子心理学的发展，也许会有心理服务业的出现。

生物技术能够带来的好处将是十分巨大的，以上所提仅仅是其中人们比较熟悉的一部分。它的发展速度、前景和所产生的影响都是难以估量的。然而，美好前景的实现还有待于我们的努力。

第二章 基因工程

生物技术是近 10 多年来迅速发展起来的高技术、新技术，具有十分明显的社会高效益和经济效益。在所有的生物技术领域中，农业生物技术，特别是有关作物生物技术的研究和发 展，同医药生物技术一样被认为是最有现实意义的技术，将在下一世纪出现的“绿色革命”及“医药革命”中发挥巨大的作用，而这两种生物技术都是以基因工程为基础的。

基因工程自其诞生至今已有十多年历史了，已经形成了一整套的技术路线。这主要包括目的基因的取得，目的基因与表达性载体的重组，重组体对寄主细胞的转化及目的基因的表达，表达产物的纯化与生物活性测定。

在农业生物技术中，植物基因工程取得了一系列引人注目的成果，人们成功地获得了抗虫、抗病毒、抗除草剂等转基因植物，并已开始了大田实验。人们可以在一定范围内开始根据意愿来改造植物的一些性状，从而获得高产、稳产、优质和抗逆性强的品种了。向动物体转移外源基因并使之在动物体内表达能够有效地克服物种之间固有的生殖隔离，实现动物物种之间，或动物和植物及微生物之间遗传物质的交换。因此，动物基因工程对于深入研究基因结构、功能及其表达调控，对于培育高产、优质和抗逆动物品种，对于开发动物体作为活的生物反应器生产珍稀蛋白质等方面，均有巨大应用潜力；而基因工程在医药领域的应用在于能利用生物体生产基因工程药物，为人类的健康打下坚实的医学基础。

一、基因转移方法

1. 向动物体内转入外源基因

这一方法的尝试是从 70 年代中期开始的，到 80 年代，科学家们已经相继建立了多项转基因技术。

(1)显微注射法 这种方法是 1981 年由美国科学家戈登(Gordon)等人首先实验成功的。他们将小鼠的受精卵取出来，在显微镜下将胸苷激酶基因用玻璃微管送入受精卵的雄原核，然后立刻输入假孕母鼠的输卵管中，使其在子宫内着床，最终发育成转基因小鼠。在此后约一年多时间内，人的珠蛋白基因和胰岛素基因也被转入小鼠。随后，生产转基因小鼠的经验迅速地被移植到生产转基因家畜上。到 1985 年，哈默(Hammer)等人首先报道用显微注射法生产出转基因兔、羊和猪。显微注射虽然是有效的方法，但转基因动物生产仍是一项困难的技术，即使具备了良好的设备和训练有素的技术人员，注射和移植一百个小鼠胚胎，仅能获得五只转基因小鼠。家畜的胚胎细胞核不易看清，不能直接注射，必须先作离心处理后才能注射，这样，生产转基因个体的机率又下降了一个数量级。鱼类和两栖类的卵是多黄卵，在显微镜下不易辨认原核，有些科学家采用基因注入卵母细胞核的方法，因为卵母细胞核大些，可以在显微镜下看见，基因可以注入卵母细胞核中，让卵母细胞体外成就并受精，最终受精卵发育成小鱼。

(2)动物病毒载体法 与显微注射法相反，动物病毒逆转录病毒对细胞染色体的整合是按照已经了解的机制准确地结合到被传染细胞的基因组中，往往只有一个单一的病毒拷贝插入到已知的染色体位点上，不易引起寄主基因组大规模的重排，只会在整合位点上的很短的一段寄主 DNA 序列上产生重排。把小鼠胚胎在子宫着床前浸泡在浓的病毒原液中，或是把它们与产生病毒的单层细胞一起培养，即可达到转基因的效果。目前，这种方法主要应用于转基因牛和转基因鸡的生产。转基因牛生产成本太高，不适宜使用大量注射和移植受精卵的方法生产。鸡蛋中的胚胎已经是多细胞胚胎，不适宜用显微注射法。到目前为止，美国科学家已用 RSV 载体生产出转基因牛，用 RV 载体生产出转基因鸡。但这个方法的缺点是对所转移的基因的大小有一定的限制，同时转移的基因在动物体内表达的问题还没有得到完满解决。

(3)电转移法 电转移法是将生殖细胞或体细胞置于电场内，同时加入待转移的外源基因，在电场作用下外源基因导入细胞内。近年来，利用电转移器将外源基因导入小鼠卵中等研究都取得了成功。这种方法操作比较简单，效果较好，但不易普及，因为电转移器较昂贵。

(4)胚胎干细胞法 胚胎干细胞是从胚泡中将内细胞团取出在体外培养建立的，在培养过程中保持了它的正常核型，胚胎干细胞注入寄主胚泡后，能掺入胚胎，并参与嵌合体动物的生殖系。利用动物病毒载体法等方法可以将外源基因导入胚胎干细胞，选出带有目的基因的细胞克隆，然后导入小鼠胚胎，这就为创造特定的预知转基因动物开拓了一条新途径。

(5)精子载体法 这项工作始于意大利，意大利科学家首先利用小鼠精子作为载体，使精子与 CAT(氯霉素乙酰转移酶)基因混合，待精子头部吸收 CAT 基因后，用该精子使小鼠卵体外受精，之后移入雌鼠体内。在出生的 30%小鼠中检出了 CAT 基因。该方法在青蛙和海胆的实验中也得到了成功。我国在这方面进展比较大，自 1989 年以来，北京农业大学与中国农科院畜牧研

研究所、湖北农科院畜牧兽医研究所和新疆畜科院等单位合作，在家兔、猪、羊和牛等动物上进行了大量试验，目前已获得了转基因家兔、猪和绵羊。转基因效率达到 3%，略高于显微注射的效率。另外，我国用鱼精子作载体，把外源人生长激素基因经鲤鱼精子导入鱼卵，表达率为 50%，高表达幼苗生长速度为不表达幼苗的 2 倍。我国还成功地进行了用鸡精子导入病毒基因的实验。应该说，我国在精子载体法转移基因的研究中，是走在世界前列的。

(6)定位整合技术 转基因动物技术上的最大缺点是盲目性：导入的外源基因对受体细胞基因组的插入是随机的。因此，实现外源基因的定向整合技术 (Site directed Integration of Gene) 以及同期建立的小鼠胚胎多能干细胞系 (ES 细胞系) 的体外培养方法，为基因定向整合进而为哺乳动物种系改造开拓了充满希望的前景。其大意是利用 DNA 体内同源重组的原理，将外源基因稳定地插入特定的位点，再经适当的筛选，从而得到既定的转化细胞。这一技术不仅在动物育种上，而且在缺陷基因的修复上 (遗传性疾病与恶性肿瘤) 以及生命科学的理论研究上，都将有很大的应用价值。

2. 向植物体内转移外源基因

开展此项研究最早是在 1985 年，之所以比动物转基因晚，除了研究热点以外，主要是因为植物细胞外有一层细胞壁，这层细胞壁给转基因带来了很大的不便。

对一个成熟、实用性强的植物转基因系统，它应该具备以下条件：获得转基因植株的效率高；重复性要好；设备要简单，易于操作；由转化至获得转基因植株的时间相对较短；无基因型的依赖性，即方法的适用范围广，能在同一个植物种的许多基因型上成功，特别是在优良的栽培品种上成功。

近年来，植物转基因的方法不断有所创新，大体可分为三类。

(1)农杆菌介导的基因转移 根癌农杆菌和发根农杆菌可以使范围很广的双子叶植物 (前者)、也可使部分裸子植物分别形成冠瘿瘤和发状根 (hairy root)。近年已有一些证据显示根癌农杆菌的 Ti 质粒也可向一些单子叶植物 (如石万柏、百合、薯蓣等) 转移外源基因并表达。野生型根癌农杆菌的 Ti 质粒由于携带与生长素和细胞分裂素合成有关的基因，使转化的细胞产生过量的植物激素而形成肿瘤。利用这种野生型农杆菌作为基因载体，常使转化的细胞丧失分化能力。利用野生型农杆菌进行转化时，所形成的肿瘤或发状根本身即是一种天然的选择标记，在无激素的培养基上就可以获得转化细胞系。由于发根农杆菌感染后形成的发状根在很多情况下可诱导再生形成植株，以及发状根本身的单细胞起源，近年利用发根农杆菌进行转化的工作也已受到不少重视。根据所用植物材料的不同，常用的农杆菌转化方法大致可分如下三类：

整株感染——用处于对数生长期的野生型农杆菌感染植物的受伤部位，将得到的肿瘤或发状根切下，置于含羧苄青霉素的无激素培养基上培养并杀菌，这是获得转化细胞系的最简便的方法。这一方法的优点是实验周期短、操作简便，但在用根癌农杆菌转化形成肿瘤组织时，常混有未转化的正常细胞，即形成的是嵌合体。

叶圆片法——该方法用打孔器取得叶圆片或用解剖刀将叶切成小块，在过夜培养的农杆菌菌液中浸几秒钟到几分钟后，用滤纸吸干后在培养基上共培养 2~3 天，再转移到含抗菌素的选择培养基上培养并杀菌，再由获得的转化细胞诱导形成再生植株。这一方法已广泛用于多种植物的转化。其他各

种外植体，包括茎切段、叶柄、胚轴等以及悬浮培养的细胞均可用类似的方法进行转化。例如，在拟南芥上发展起来的利用根切段和萌发种子的转化技术，已表明有很高的转化频率。

原生质体和农杆菌共培养法——将处于再生壁时期的原生质体（在原生质体群体中通常已可见部分已开始第一次分裂）与根癌农杆菌共培养 36 ~ 48 小时，分离洗涤去菌后培养在含抗菌素的选择培养基上即可得到转化的细胞克隆。与上面两种方法比较，此法得到的转化体一般不会是嵌合体。利用这一方法已使多种烟草属植物、矮牵牛、龙葵、胡萝卜等植物的细胞转化，并获得转基因植物。共培养法同样适用于发根农杆菌 Ri 质粒的 T-DNA 转移。在共培养过程中，新形成的细胞壁和一些二价阳离子为农杆菌的附着和转化所必需。当由胡萝卜悬浮培养细胞刚分离的原生质体与发根农杆菌混合时并不形成转化细胞团，发现如果将此混合物放置 2 小时后进行二次电脉冲处理，则可明显提高转化频率。

(2)以原生质体或细胞作为受体的直接基因转移 直接基因转移，是指经特殊处理后直接将 DNA 转移到植物细胞或原生质体中导致细胞转化的技术。常用的 DNA 直接转化技术可分为化学和物理方法两大类。

利用特定的化合物诱导的 DNA 直接转移——在利用原生质体作为受体进行外源基因导入的研究中，已发现一些化合物有助于原生质体摄取外源 DNA，包括 PEG（聚乙二醇）、PLO（聚-L-鸟氨酸）、磷酸钙等。聚乙二醇法是将原生质体悬浮于含有 DNA 的介质中，用分子量为 4000 ~ 6000 的 PEG 在 pH8 ~ 9 下促进 DNA 的摄取，从而使细胞转化。很多因素都会影响 PEG 诱导的转化，如加入 DNA 和 PEG 的次序，是否加入了携带 DNA（carrier DNA），导入的 DNA 的形式如何，加入的 PEG 的最终浓度多少等。用经同步化处理后的烟草叶肉原生质体，已发现在细胞周期的 S 期或 M 期时的转化频率明显高于其他时期，在用 PEG 处理前用低剂量的 X 射线或紫外线处理原生质体，可使抗性细胞团增加 2 ~ 7 倍，而不影响细胞团的形成和植株再生，这可能是因多辐射使更多的细胞有效地整合外源基因。其他一些因素，如保温处理的时间，在加入 DNA 之前对原生质体的热休克处理等也有一定的影响。至今，利用 PEG 法已使多种重要的禾谷类作物，如水稻、高粱、小麦的原生质体获得了基因植物。

利用物理方法诱导的 DNA 直接转移——这类方法的原理是基于许多物理因素均可通过对细胞膜的影响，促进外源 DNA 分子进入细胞，或通过机械损伤后直接将外源 DNA 导入细胞。常用的诱导 DNA 直接转移的物理方法有电穿孔法、微注射法、基因枪法等。

电穿孔法（electroporation）的基本原理是利用新鲜分离的原生质体在高压电脉冲作用下在质膜上形成可逆的瞬间通道，从而促进外源 DNA 的摄取。有两种不同的处理方式，一种是采用较低的电压处理较长时间，另一种是采用高压电处理很短的时间。为提高转化频率，通常可把电穿孔法与 PEG 法结合起来。电穿孔法的优点是操作简便，适用于对农杆菌感染不敏感的植物，导入 DNA 的效率也特高，特别适于瞬间表达（transient expression）的研究；其缺点是易造成原生质体的损伤，使植板率降低。

利用微注射法（microinjection）进行基因导入时，通常需先把原生质体或培养的细胞固定在琼脂、低熔点的琼脂糖或 alginate 中，或用聚赖氨酸处理附着在玻璃平板上，也可通过一固着的毛细管将原生质体吸着在管口，再

进行操作，即通过一极细的毛细管将一定量的 DNA 注入细胞内，甚至直接注入核内。在这方面，瑞士的诺豪斯(Neuhaus) 等人已发展出一套完整的技术。用此法已在烟草、油菜、苜蓿等植物的原生质体上获得成功。微注射法的优点是转化效率高，在用线形 DNA 的一些试验中，转化效率甚至高达 60% 以上，无需特殊的选择系统，并且没有农杆菌宿主范围的局限性。今年这一技术也用于培养细胞或胚性细胞团等。

基因枪法(particle gun) 又称微弹法(microprojectile bombardment)，其基本原理是将 DNA 包被在微小的金粉或钨粉表面，在高压的作用下高速穿透受体细胞或组织，外源 DNA 随之导入细胞，整合并表达。该方法的优点是免去了分离原生质体的麻烦，可以直接转化各种外植体、愈伤组织以及胚性细胞系。并已有证据不光可将外源 DNA 导入细胞核，而且可以转化细胞器(如叶绿体)。利用该法已由烟草、大豆、棉花、玉米等多种植物得到转化植物，目前这种方法的采用越来越广泛。

(3) 种系系统的基因转移(germ line transformation) 通常利用子房注射种胚、体细胞胚以及花粉等途径导入外源基因。由于植物种类的繁多，各种植物特性的不同，无需也不可能有适用于所有植物的转化方法。因此，从不同的方面以及不同的层次上进行探索，以确定适于个别作物的高效转化方法，仍将是一个值得重视的研究课题。

二、基因工程研究的现状

基因工程的研究和应用虽然历史还不长，但在短短的十年时间中，这个领域所涉及的许多重大技术问题都已得到了解决，因此不但研究工作成绩斐然，而且应用前景极为广阔。

1. 动物基因研究

(1) 培养优良性状的家畜家禽品种 1982年，帕尔蒂曼(PalTimer)和布林斯坦(Brinster)等人构建了大鼠金属硫蛋白和人生长激素融合基因，生产出生长速度比正常小白鼠快一倍的超级小白鼠。这一结果引起了世界轰动。此后，许多实验室用人的生长激素基因、猪的生长激素基因、羊的生长激素基因和牛的生长激素基因生产转基因小鼠时，都获得了类似结果。1988年，西曼克(Seamark)等人用猪的生长激素和大鼠MT融合基因，生产出生长快、瘦肉率高和表现正常的转基因猪。但是，利用转移生长激素基因技术，在其他家畜上却没有获得令人满意的效果。哈默(Hammer)和珀斯尔(Pursel)等人用人生长激素基因和牛生长激素基因生产的转基因兔和绵羊，虽然血液中的生长激素水平偏高，但生长速度并不比对照家畜快，有的比非转基因家畜还要慢些。这些转基因家畜有各种各样的病症，寿命都不长。但是，体脂沉积率下降，饲料转化率提高。普遍认为，这一结果是生长激素长期维持在高水平上造成的。人们猜测，小白鼠可能是一种特殊的例子，它似乎是一种适应力很强的动物，对高水平的生长激素可以做出积极反应而无不良后果。除了生长激素和生长因子基因以外，人们感兴趣的还包括提高抗病性能的抗性基因、提高繁殖机能的基因等等。

事实上，这种培养具有优良性状动物品种的基因工程难度是很大的，因为家禽家畜的许多生产性能，是由许多微效基因控制的，是所谓数量遗传性状。能否使用转基因技术转移数量遗传性状，主要取决于数量遗传性状基因的定位。在近期内，这一问题尚无法回答。另外，还需要解决基因调控表达的问题。生长激素对家畜的产肉、产奶和产毛性能都有刺激作用，要使外源生长激素基因在适当发育阶段进行适度的表达就需要克隆调控表达元件，并用它来调节外源生长激素基因的表达。还有就是解决外源基因的定点整合技术。目前生产的转基因动物，外源基因都是随机的整合在某一条染色体的某一位点，不同个体基因整合的位点不相同。由于整合的位点是成对染色体中一条染色体的某一位点，既无法确定它是否有害整合(即破坏了正常基因的整合)，也无法用简单交配的方法得到纯合子。因此，即使生产出性状优良的转基因个体，也不能用于生产新的家畜品系或品种。未来要解决的问题，或者是从大群转基因动物中找出那些非有害整合的个体，并从它的后代中通过亲源交配生产纯合个体，或是构建定点整合载体，生产在同一位点整合的转基因动物。

(2) 改善奶的质量或生产珍贵蛋白 1989年，克拉克(Clark)等人把鼠乳清酸蛋白/第九因子融合基因、鼠乳清酸蛋白/ α -抗胰蛋白酶融合基因和乳球蛋白/ α -抗胰蛋白酶融合基因转入绵羊，在绵羊乳房中获得组织特异表达。虽然其表达水平尚未达到工业生产的地位，但对于一些不易用细菌生产的珍贵蛋白来说，却找到了一条有希望的生产途径。1991年，英国药用蛋白公司的人用绵羊乳球蛋白基因(BLG)启动子和人类抗胰蛋白酶因子(aIAT)基因的编码序列构建融合基因，转入绵羊中，转基因绵羊的抗胰蛋白酶因子的产

量达到 35 克/升。在正常情况下，一只绵羊一年产奶 1000 升，一只山羊每年可产奶 2000 升，而一头牛每年可产奶 6000 升。如果说一只绵羊相当于一个一吨容积的发酵罐的效率，一头奶牛则相当于一个五吨发酵罐的效率，这种活体生物反应器不仅效率高，而且产品已经过体内正确加工，活性比较好。动物奶中所含有的蛋白质种类比细菌少，提纯目标产品相对比较容易。这种活的生物反应器可以按需要任意扩展，所受限制条件较少。可以说，在乳腺中高效表达外源蛋白的技术已经比较成熟了。

有报道，有科学家已经通过转基因猪生产出人血红蛋白，通过转基因牛生产出人乳铁蛋白等其他有用蛋白，以后这种类似的应用将会有更大的发展。

2. 医药基因工程

(1) 生产分子导向药物 目前，许多抗肿瘤药物（包括核素或毒素）往往由于缺乏作用的选择性和特异性而无法付之临床应用，或勉强用于恶性肿瘤的治疗而因毒副作用太大终归于失败。人们曾经试图应用单克隆抗体的强特异性的特点，把抗肿瘤药物、核素或毒素通过交联技术同某种肿瘤的特异性单抗结合起来，构建成单抗偶合物。人们希望利用单抗偶合物的高特异性，将细胞毒性物质导向性的运送到人体靶部位（癌细胞或其他病灶），以提高局部药物浓度，充分发挥抗癌药、核素或毒素的杀伤作用，尽量减少对正常组织的损害。但实践结果并不像预想的那么理想，单抗偶合物虽能提高局部药物的浓度，但并不充分，在杀伤癌细胞的效果和减少对正常组织的损害两个方面均不尽人意。随着基因工程技术和蛋白质工程技术的发展，人们发展了从分子水平上改造基因并生产分子导向药物的思想，实践证明，分子导向药物的效果是令人满意的。例如分析表明，白细胞介素（IL-2）的 N 端 54 个氨基酸的功能是专门结合辅助 T 细胞受体的。而白喉毒素则可以区分为三个区段；区段 I 的功能是无特异性地破坏细胞蛋白质合成的延长而致死细胞，人们把白喉毒素的区段 I 基因予以切除，把其区段 II 同 IL-2 基因重新组合，这样就形成了 IL-2——白喉毒素 II 的嵌合基因。再运用基因工程技术高效表达该嵌合基因，从而提取纯化出相应的杂合蛋白质。研究结果表明，这样的杂合蛋白质只结合并进入和杀伤辅助 T 细胞，而对其他类型的细胞或组织无杀伤作用，实现了分子导向的目标。据报道，曾应用该毒蛋白治疗了一例类风湿病人，效果良好。再比如，CD4 原是辅助 T 细胞表面同艾滋病病毒 HIV 的 gp120 糖蛋白结合的受体。人们克隆了 CD4 基因，并经分析表明，CD4 可以区分为 4 个功能区段，仅区段 I（称 PE40）同 CD4 的区段 II 基因，重新组合起来，并运用基因工程技术高效表达了该杂合蛋白，再经提取纯化获得了该杂合蛋白质。体外实验结果表明，该杂合蛋白质既有中和细胞外游离的 HIV（因有 CD4 的 II 区段存在），又可进入被 HIV 感染的 T 细胞，并因杀灭该种 T 细胞而使 HIV 病毒无法繁殖，同时不伤害任何其他类型的细胞。

再如，基因工程生产的 α 转化生长因子 TGF- α 与 PE40 的杂合蛋白可明显地延长荷瘤裸鼠的生存期（其表面有 TGF 的受体）。该杂合毒素却不杀伤不带其受体的细胞。乳癌、脑癌、宫颈癌、结肠癌和口腔鳞状上皮癌细胞表面，都有表皮生长因子受体。美国有 30 多万病人可望用此杂合毒蛋白治疗。

(2) 基因工程改造抗体 临床实践表明，单克隆抗体用于疾病治疗不尽人意。原因在于目前治疗的单抗，绝大多数为小鼠单抗。小鼠单抗是小鼠免疫

球蛋白,对人体而言,则是一种异体蛋白,会引起人体产生人抗鼠抗体(Human Antimouse Anti-bodies, HAMA)。此时再度使用小鼠单抗, HAMA 与小鼠单抗结合后,不但会中和单抗使之失效,还会产生有害的过敏反应。为解决这一问题,人们着手运用基因工程技术对抗体进行改造。

嵌合抗体 它是将鼠源单抗的可变区(V区)基因与人 Ig 的恒定区(C区)基因相连接,构建成嵌合抗体。目前国内外已制备了数种嵌合抗体。由于该抗体已“人源化”。其免疫原性已大大降低。

重构抗体(Reshaped Antibody) 它是将动物抗体中的三个发夹结构所形成的环区(称互补决定区“CDR区”或高可变环区)与人抗体相应的环区交换从而重构抗体的抗原结合区,以进一步“人源化”,降低单抗的免疫原性。当前已构建数种重构抗体,当然它们的抗原结合能力得以保持。

单链抗体(Single-Chain Antigen-Binding Proteins) 它是由一个短的人工设计的多肽接头将轻链V区的C末端与重链V区的N末端相连接,如果多肽接头设计合理,能保证B片层结构的正确构型,同时保留了CDR序列,则在E.coli表达系统中可表达具有抗原结合活性的融合蛋白。从已构建的三种单量抗体看,其免疫原性确实降低了。

单区抗体(single Domain Antibody) 已经发现,虽然一个抗体是由轻、重两个V区基因装配而成,但可以分离到具有抗原结合活性的单一重链V区基因。因此,人们可以用PCR法扩增出具有抗原结合活性的VH区。该方法一反过去单抗研制的烦琐程序,以其快速、多样与有效性,预示着巨大的应用和商业价值。

但据新近一些临床试用人源化嵌合抗体的结果表明,在初期临床试验中,人源化嵌合抗体能够解决一些问题,且半衰期延长多倍。但不能解决其免疫原性问题,有的嵌合抗体出现免疫反应,有的则产生独特型抗体(以嵌合抗体为抗原产生抗体)。

全套抗体(immunoglobulin Repertoire) 它将某一免疫反应的全套VH基因与有限数目的VL基因排列为方阵,经过排列组合构建抗体,必能产生相当一批有功能活性的抗体,进而从中筛选出有强催化作用的抗体,后亦被用于筛选并克隆表达人单抗或其他单抗,如破伤风类毒素单抗。这一研究被誉为是“抗体的突破”。

但据最近报道,英国已应用噬菌体克隆人Ig成功,并已取得专卖权。这项成就可能使以杂交瘤为基础研制单抗的技术路线完全过时。

(3)基因治疗 基因治疗的常规办法是应用逆病毒做载体,经同外源基因重组后包装成病毒颗粒,之后转染受体细胞,外源基因将整合在受体细胞的染色体上,并以其表达产物弥补原来缺失的基因产物。运用这一路线现已取得了成功,但近年来出现了一些新方法。

据报道,有人使用两头带气囊的导管将携带半乳糖苷酶的重组逆病毒载体,或使用脂质体包装该基因,经手术导入10头猪主动脉内壁,结果仅在动脉内壁受染部位的内皮细胞中-半乳糖苷酶的表达,时间长达10日至21周。而猪的其他器官则无此酶的表达。人们认为这一方法对于将tPA等植入动脉壁以防治栓塞可能有重要意义。

在糖尿病治疗研究中,日本科学家将表达人胰岛素基因的细胞植入患糖尿病小鼠腹内,结果植入的细胞存活且分泌胰岛素并使小鼠血糖水平明显下降。

还有人不用逆病毒，将功能基因直接注射入活体动物体内就实现基因治疗。通过直接注射非复制质粒 DNA 获得表达的方法有三种：一是直接注射非感染性、非制癌性、由脂质体或免疫脂质体或脂质体与红细胞膜杂交体的质粒 DNA，从而获得体内基因表达；二是通过给新生大鼠腹腔内直接注射多种磷酸钙沉淀的基因，可获表达；三是有实验显示，缺乏唾液酸基的血清粘蛋白或聚赖氨酸偶合物与质粒报告基因的复合物，可通过静脉给药获得专一性地靶向表达于肝脏。直接注射基因的办法，不但方法上比较简单易行，更重要的是人们试图放弃以逆病毒做载体，可能有低频率的制癌危险性或与内源性病毒发生重组导致突变病毒的感染。

另一条独特的技术路线称为“生血管的移植物”法 (Vascularising Implant, 也叫半生物体内)。主要使用肝素结合生长因子-1 (HBGF-1) 吸附在胶原蛋白上经手术植入腹壁，生出血管，表达所携带基因的产物。该方法将可能用于缺乏某种天然物质 (如第 8 因子) 的病人或需要持续释放某种治疗物质的病人身上。其作用类似于那些植入泵，但功能更多。生血管移植物还可由身体的天然机制维持。

用基因转入人类的体细胞，再用这种细胞去校正人类的疾病，相信这项工作不久的将来将会实现，但这些细胞只能是体细胞，不能是生殖细胞。因为基因导入人类生殖细胞存在以下两个问题：一是基因导入人类生殖细胞将会改变人类的基因组，基因在人类基因组里会代代相传，是永久性的，很难纠正。同时，这里还存在着伦理 (道德) 的问题。二是就目前的技术而论，还不能将基因导入染色体的特定区，随机插入基因将会产生更多的问题；况且大多数人类的遗传疾病是隐性的，在子代中如何表现尚不肯定，引起的问题恐怕还更加复杂。

从上述的情况看，短期内彻底根治人类遗传疾病恐怕不可能，我们还有很长的路要走。

3. 植物基因工程

植物基因工程的一个特点是比较容易获得社会的认可。目前对转基因动物，许多人还持相当小心的态度。但对转基因植物，似乎因为植物在整个生长过程中的位置比较固定，没有太多的移动 (当然花粉也会被风或昆虫传播得很远)，而且一般农作物是一年生，所以相对来说植物基因工程技术被认为是比较安全的，这就在很大程度上加快了这项研究及其成果的推广。从第一株转基因植物的获得到现在没有超过 10 年，已经有近 60 种转基因植物相继问世，这些植物有烟草、番茄、马铃薯、矮牵牛、胡萝卜、向日葵、油菜、苜蓿、亚麻、甜菜、棉花、芹菜、荷花、黄瓜、矮南芥、大白菜、大豆、水稻、玉米、莴苣、豇豆以及稗麦等等。目前已经获得成功的植物基因工程研究的面也较为广泛。

(1) 抗病毒植物基因工程 这是 1986 年首次获得成功的一项工程，也是目前应用较广的一种生物技术。植物病毒病一直是农业生产上最主要的病害之一。到目前为止还没有十分有效的途径防治病毒病害。利用植物基因工程技术，已成功地获得抗病毒的植物，其原理是利用生物技术，将编码植物病毒的外壳蛋白基因导入植物细胞中，并获得转基因植株。这些植株叶片细胞中有病毒外壳蛋白 (但不是病毒粒子) 的积累，能够抑制侵染病毒的复制，从而减轻病毒的症状，或推迟病害的发生时间，这样就有效地保护了植物。后来利用转移病毒的卫星 RNA 基因组或者转移病毒的反义 RNA 也获得抗病毒的

植株。这些转基因植物（烟草、番茄）在大田实验中都有一定程度的表现出抗病毒的性状，从而提高了产量。植物病毒病害给我国经济作物和粮食作物造成了很大的损失，我国仅烟草和蔬菜每年因病毒侵染造成的损失就超过亿元以上，还有马铃薯、水稻、小麦、玉米等。所以抗病毒植物基因工程的成功给农业增产带来了希望。在这短短的几年时间内，已获得了抗病毒的烟草、马铃薯、苜蓿等植株，一些蔬菜、粮食作物的抗病毒工作也在开展。

(2)抗虫植物基因工程 生物防治害虫的工作已经开展多年，主要是利用苏云金杆菌中的毒蛋白（结晶蛋白）对害虫的毒害作用，来控制害虫。人们克隆了编码这些毒蛋白的基因，并把这些基因转移到植物细胞中，获得抗虫的转基因植株，即害虫侵害了这些植物后，在很短的时间内就会死亡。这些毒蛋白具有很强的杀虫专一性，已经有证据表明这些毒蛋白对一些益虫、还有动物及人没有毒害作用。近几年还使用了一些蛋白酶抑制剂的基因，也获得抗虫的植物。这项技术的成功将会在一定程度上减少杀虫剂农药的应用，从而减少农业生产成本，并可减少由于使用农药而造成的环境污染。

(3)抗除草剂植物基因工程 除草剂的使用，对大规模机械化耕作、减少劳力开支和提高产量有着十分重要的作用。但一般除草剂的选择性比较差，即除了能除草以外还会将作物杀死。现在利用生物技术，将能抵抗除草剂的基因（包括编码能分解除草剂的酶、扩增会被除草剂破坏的酶以及通过替换氨基酸而不被除草剂识别的酶）转移到植物中，获得抗除草剂植物，如现在已获得能抗特定除草剂的一些蔬菜、油菜、大豆、棉花、烟草等。这些转基因植物在大田生产中如混有一些杂草，可以通过使用除草剂，就能有选择地将杂草杀死而不影响转基因植物的生长，从而大大减少了劳动力，并且提高了粮食产量。

(4)获得雄性不育植物基因工程 雄性不育的植株在杂交育种上有着十分重要的位置，植物基因工程技术的发展已经可以在一些转基因成功的植株上获得雄性不育的特性。人们从花药发育和花粉形成过程中分离到特异的基因启动子，与核糖核酸酶基因连接，导入油菜等植物中，发现在转基因油菜中花粉形成不正常，出现败育，成为不育系。将核糖核酸酶抑制因子的基因导入该油菜中，成为恢复系。同样的道理，还用其他一些毒性基因导入了植物中，使其在花药或花粉发育过程中表达，从而获得不育株。目前，很多实验室都在进行水稻、小麦、玉米等这方面的研究。雄性不育的转基因油菜已进入大田试验，估计 1995 年左右会进入大田生产。

(5)使植物产生抗体的基因工程 植物界到目前为止，仍未发现和动物一样能产生抗体的免疫功能组织。为了提高植物的抗细菌、真菌以及病毒病的能力，美国科学家们成功地将动物中分离的抗体基因导入植物中，并能使植物产生有活性的抗体。这一成果使人们开始一系列研究工作，首先从动物中分离出植物病原菌的抗体基因，导入植物后获得抗这些重要病害的转基因植物。另外，人们试图把转基因植物作为一种生物反应器去生产各种有用的蛋白质，特别是医用活性多肽。这一思想对常规的基因工程技术是一个发展。已报道用转基因植物的方法由烟草分别生产出胰岛素、白细胞介素、脑啡肽。还有报道，用转基因马铃薯生产出入血蛋白，用转基因油菜籽生产出活性肽，应用前景十分开阔。

还有其他一些植物基因工程，包括通过转移含有较多的必需氨基酸的蛋白基因，提高一些植物种子中必需氨基酸的含量；利用 PG 酶的反义 RNA 基因

使成熟后的番茄果实变硬，以便于运输和贮藏；利用 CHS 反义 RNA 基因能在一定条件下改变花卉的颜色。最近还有一些工作表明在转基因植物中可以生产一些医药上有用的多肽。在抗寒、抗热、抗盐碱以及抗病等提高抗性的植物基因工程方面，也有很大的进展。

以上简述了最近几年植物基因工程所获得的成果，大部分成果都已进入小试或中试阶段，一般估计 4~5 年后即可进入生产使用。在国外，抗除草剂的转基因作物可能将是第一批进入生产使用的植物基因工程产品。作为农业大国，我国从开始就注意到植物基因工程这一新技术的发展，“七五”计划、863 计划、自然科学基金以及其他一些基金都有这方面的资助项目，这方面的研究已取得了一些很显著的成果，有些已经接近国外已有的最好水平。例如，抗病毒的植物基因工程，据已报道的和还未报道的结果表明，我们已基本能自己分离侵染我国蔬菜、烟草以及其他一些经济作物和粮食作物的病毒外壳蛋白基因，并获得了许多转基因植株。在抗虫以及抗除草剂方面也获得了一些抗基因和转基因植株。但是由于这些新技术的发展历史很短，我国目前的水平基本上属于跟踪国际发展的阶段，所采用的研究技术路线和方法基本上与国外的相同，还未能有新的重大突破。不过当我们积累了足够的经验，并有一定的研究人员以及设备和实验室后，就有可能在较大范围内取得突破，走出自己的路。目前我国有几个实验室已初步具备了这样的条件，并已开始注意寻求新的途径。

三、基因工程研究展望

展望 21 世纪，它将是基因工程技术迅速发展日益完善的世纪，也是这种高技术产生巨大效率的世纪。人们预期它将在以下几个方面有重大突破。

1. 转基因技术的突破

这主要是指植物基因工程领域。80 年代初，最早获得转基因植物是利用一种土壤细菌，即土壤农杆菌做为载体来导入基因的。由于土壤农杆菌只能侵染大部分的双子叶植物和少数单子叶植物，使农作物的基因工程受到很大限制。近几年来人们不断地在探索转化农作物的新途径，这些包括使用电击法、微弹射击法、PEG 法以及其他直接将 DNA 导入的方法。今后的 10 年内，这些新技术将不断完善，同时还会有一些新的基因导入技术出现。许多农作物的组织培养也有很大突破，一般认为到 90 年代末，很多农作物品种将会获得转基因植株。培育高产、稳产以及抗逆性强的农作物将成为植物基因工程的重点而有很大突破。

2. 分离优良性状基因技术

目前基因工程所用的基因基本上是能控制一个性状的单基因，即只要转入一个基因就能获得所需性状，如抗病毒、抗虫和抗除草剂等。这种单基因性状就经济价值来说，数量相对较少，到目前为止，已经分离出来的这类基因没有超过 100 个。今后 10 年可望会对多基因控制的性状进行操作。目前，美国、日本等国家已决定专门拨大量经费，进行人类及几种主要粮食作物的基因图谱工作。RELP 技术以及不断完善的基因克隆技术（如 PCR 技术）等，将极大地帮助克隆目的基因。农业上可望从产量、抗性、雄性不育等问题获得突破，医药上可望在抗癌、抗艾滋病等方面获得突破。

3. 基因工程产业化

以农业应用为例，由于农业生物技术目标明确，受社会因素限制少，易于推广而获得效益，所以最近几年国外的一些化学药品和种子公司都专门成立有关农业生物技术研究中心，如杜邦公司、孟山都公司、CIBA-Geigy 公司、先锋种子公司以及日本的三菱公司等。同时，还成立一些专门从事农业生物技术的公司，如 PGS 公司、DNAP 公司、Calgene 公司以及 AGS 公司等。另外，在大学以及研究所从事这方面的研究。在 90 年代，这些公司正在激烈竞争专利权、相互合并，同时也密切配合，如研究抗除草剂的实验室与种子公司以及生产除草剂公司的联合开发。目前已经显示出这些苗头，如 AGS 公司已经和 DNAP 合在一起成立一个公司，DNAP 和 CIBA-Geigy、杜邦公司的合作，Calgene 和 CIBA-Geigy 公司在抗病作物方面的合作，华盛顿大学和孟山都公司在抗病毒方面的合作。而在动物基因工程上，重点将被放在具有优良性状的家畜家禽以及利用它们来生产一些稀有蛋白，并形成生产规模。医药上则规模生产出更多的基因工程疫苗、抗体等药物，目前大的医药公司都正在加强与各大学、研究所的合作。

综上所述，基因工程在动物、植物、医药等诸方面都有广泛的发展和应用前景。我们相信，随着基因工程技术的发展完善，它将为人类建设美好的明天做出更大的不可替代的贡献。

第三章 细胞工程

作为生物工程重要分支的细胞工程，近年来获得了令人瞩目的迅速发展。这不仅是由于它在理论上具有重要的意义，而且在工农业生产方面也具有广泛的应用前景。

一、细胞工程发展简史

所谓细胞工程，就是应用细胞生物学和分子生物学的方法，在细胞水平进行的遗传操作。它的建立是与细胞融合现象的发现及其研究密切相关的。最早是由马勒在 1838 年报道了他在脊椎动物肿瘤细胞中观察到了多核现象。当时，人们的传统知识是一个细胞只有一个细胞核，因此多核现象的发现虽引起人们广泛的兴趣，但一般认为这只是一特殊的事例。1849 年罗宾在骨髓中也发现了多核现象的存在，1855 ~ 1858 年，科学家们在肺组织和各种正常组织及发尖和坏死部位都发现了多核细胞。这样，自然界中广泛存在着多核细胞的事实，才被生命科学工作者们普遍接受。

为什么在自然界中会出现一个细胞具有多个细胞核的现象呢？1859 年 A·巴里在研究粘虫的生活史时发现，某些粘虫存在着由单个细胞核融合形成多核的原生质团的情况。据此，他认为多核细胞是由单个细胞彼此融合而成的。然而，用实验的方法直接证明细胞融合现象，则是在细胞培养技术建立后才得以实现。

自从哈林 1907 年介绍了动物细胞的组织培养方法之后，人们运用此种技术对动物组织培养中的细胞融合现象作了许多观察。其中一个突出的成就是，发现麻疹病毒能够诱导培养的动物细胞融合成多核胞体。1959 年奥凯达的研究工作证明，利用高浓度的 HYJ 病毒，能够使悬浮培养中的动物肿瘤细胞迅速地融合起来，形成多核的巨细胞。随后大量的研究证明，培养的动物细胞既能彼此自发地融合，也能通过一些病毒的诱导作用而随机地融合。尤其是证明了不同来源的（不同细胞株）两种动物细胞，经过混合培养可以产生出新型的杂交细胞，从而为培育具有双亲优良性状的新生命类型的细胞工程奠定了技术基础。

但是，在 1965 年哈里斯和沃特金斯的经典工作发表之前，科学家们只能在不同小鼠细胞之间观察通过细胞融合而实现的细胞杂交现象。哈里斯和沃特金斯的工作，则大大地拓展了细胞融合的研究范围。他们的贡献在于证明了：灭活的病毒在控制的条件下可以用来诱导动物细胞的融合；亲缘关系较远的不同种的动物细胞之间，也可以被诱导融合；形成的融合细胞在适宜的条件下，可以继续存活下去。至此，细胞融合作为重要的研究领域已经建立起来了。

植物细胞在其原生质体的外面有一层坚韧的细胞壁。要在植物细胞间进行融合作用，首先必须设法除去细胞壁。我们称这种去除细胞壁的细胞为原生质体，它含有细胞组成的全部成分。所以从本质上讲，原生质体融合也就是细胞的融合。

为了获得去壁的具有正常活性的原生质体，科学家们经过了长期艰苦的摸索。最早是采用改变细胞的渗透压，使之发生质壁分离，然后在保持原生质体完整的情况下，机械地切割去细胞壁。但这种方法得率太低，而且局限性也很大。在尔后长达半个世纪的历史过程中，植物原生质体分离技术都没有根本性的突破。直到 1960 年，英国诺丁汉大学科金教授创造性地应用酶解的方法，才首次成功地从番茄幼苗的根部制备到大量的原生质体。在此基础上，1972 年美国的卡尔森等人用 NaNO_3 作为融合诱导剂，将来自不同种的两个烟草原生质体进行融合，获得了世界上第一个体细胞杂种植株。此后，凯勒、高国楠和乔默尔曼等为首的三个科学家小组，从不同方面改良和发展了

植物体细胞融合技术。目前，最常用的植物细胞融合技术，有高国楠建立的使用化学融合剂 PEG（聚乙二醇）的融合技术（1974），森达和乔默尔曼创立和发展的电融合技术，以及斯维格（1987）将电融合与微培养结合起来的技术。近年来，在植物细胞融合研究方面的突出进展是建立了单对细胞融合体系培养技术，并基本上解决了融合细胞的选择问题。现在，植物原生质体及其应用的研究已成为植物细胞工程中最活跃的研究领域之一。

植物原生质体之所以能成为植物细胞工程的理想研究材料，是因为它具有以下重要特点：易于从同一种植物材料的组织中获得大量的遗传上同一的游离原生质体，为植物细胞的遗传操作的微生物化奠定了基础；可以像动物细胞一样，被诱导与其他物种的原生质体融合，从而有效地克服了不同物种细胞之间的有性不亲和障碍，为实现远缘物种间的体细胞杂交，培育新种提供了新的手段；它既可以捕获外源 DNA，也可以捕获较大的细胞器，如病毒颗粒、叶绿体、线粒体等，因此是植物遗传转化的理想受体；保持着植物细胞的全能性，在适宜的培养条件下，可以重新长出细胞壁，进行细胞分裂、分化，形成完整的小植株；植物原生质体虽然没有细胞壁，但仍然进行着植物细胞的各种生命活动，包括蛋白质和核酸的合成，光合作用，呼吸作用，通过膜向外界进行物质交换等。

二、细胞工程的基本技术

1. 细胞培养

大多数动植物的细胞，只要保证其适宜的条件，就能够在体外的培养容器中成活和分裂，并表现出分化的特征。这里，重要的是建立和发展细胞培养技术。所谓细胞培养，就是将生物有机体的某一部分组织取出一小块，在体外经过表面消毒处理后，使其分散成单个游离的细胞，并放置在人工配制的培养基中进行培养，使之生长、分裂的技术。由于生物体的一种组织，往往包含有两种或两种以上的细胞（如叶片组织至少包括叶肉细胞、维管束鞘细胞和表皮细胞等），在培养过程中不易分开，所以细胞培养有时又叫组织培养，或统称为细胞与组织培养。

掌握细胞培养技术，为细胞生物学的研究提供了诸多的便利条件。首先，研究者可根据不同的研究内容和目的，十分方便地在细胞培养基中添加或减去某些特殊的物质，如激素或生长因子等，这样就可以确切地了解这些因子对细胞生长发育的效应及其生理生化本质。其次，可以获得比较均一的细胞群体，为细胞的生理生化分析以及不同细胞之间的相互作用的研究创造条件。事实上，近二十年来细胞生物学的一些重要理论研究的进展，例如细胞全能性的揭示，细胞周期及其调控，癌变机理与细胞衰老的研究，基因表达与调控等，都是与细胞培养技术分不开的。下面按植物细胞和动物细胞作一简单介绍。

(1)植物细胞培养技术 植物细胞与动物细胞的一个重要差别在于它具有发育的全能性。也就是说在适宜的条件下，一个来自已分化的根、茎、叶等组织的细胞，经过离体培养可以发育成同其亲本一样的完整植株。显而易见，植物细胞的全能性，是植物细胞工程创立的重要理论基础。

从图 3-1 可以清楚地看出，植物细胞培养的基本过程包括如下几个步骤：从健康植株的特定部位或组织，如根、茎、叶、花、果实、胚珠、花药和花粉等，选择用于组织培养的起始材料，称之为外植体。用一定的化学药剂，最常用的有次氯酸钠，升汞和酒精等对外植体表面消毒，建立无菌培养体系。严格控制无菌条件，这是获得培养成功的重要一步。形成愈伤组织和器官，外植体块在培养基上形成疏松的愈伤组织，由愈伤组织分化出芽并可诱导形成根的小植株。另一途径是用外植体或愈伤组织细胞经液体悬浮培养诱导胚状体再长成植株。胚状体的形成可大大提高繁殖效率，并可减少变异。

(2)动物细胞培养 动物细胞培养有两种方式。一种叫非贴壁培养：这种方法一般是用于血液、淋巴细胞、肿瘤细胞，包括杂交瘤细胞和一些转化细胞的培养；这类细胞也可采用微生物培养方式进行悬浮培养。另一种培养方式是贴壁培养：大多数动物细胞，包括非淋巴组织的细胞和许多异倍体体系细胞，多般采用附着于带适量正电荷的固体或半固体表面进行培养。

图 3-1 植物细胞培养示意图

动物细胞培养的主要步骤如下：从健康动物体内，无菌条件下取出适量组织，剪切成小薄片。加入适宜浓度的胰蛋白酶或胶原纤维酶与 EDTA 等进行消化作用使细胞分散。将分散的细胞进行洗涤并纯化后，以 2~7

$\times 10^6$ 细胞/毫升的浓度加在培养基中，37 摄氏度下进行原代培养，并适时进行传代培养。

(3)细胞大规模培养新工艺 现代生物技术的发展，特别是淋巴细胞杂交瘤技术的进展以及植物次生代谢物的开发利用，大大地促进了细胞培养新工艺的发展。目前，由生物反应器进行细胞培养，使其正在向大型化、自动化和精巧化方向推进。有关生物反应器的内容将在第五章中详述。

尽管动植物细胞大量培养的工艺发展很快，但还远远不能满足当前生产的需要。除了在生物反应器装置上要不断改进外，还应注意筛选高产稳定的细胞株和选择更适宜的培养基等配套技术的研究。

2. 细胞融合

动物细胞融合与植物细胞融合的原理和步骤基本是相似的，只是植物细胞融合必须先制备原生质体。现以植物为例（图 3-2）介绍其主要步骤：

图 3-2 植物体细胞融合程序示意图

(1)制备亲本原生质体 以纤维素酶等组成的混合酶液消化植物细胞壁，经过滤、离心洗涤后制备原生质体悬浮液。

(2)诱导融合 将两亲本原生质体的悬浮液以 1 : 1 混合后，加入融合诱导剂 PEG，这时原生质体膜彼此接触，然后融合成原生质体异核体。培养数天后，原生质体再生出细胞壁，细胞在分裂过程完成核的融合，这种细胞称杂种细胞。

(3)选择、诱导和分化，获得杂种植株。

三、植物细胞工程

1. 微繁殖技术

植物的微繁殖技术（又称快速繁殖技术），就是利用组织培养方法将植物体某一部分的组织小块，进行培养并诱导分化成大量的小植株，从而达到快速无性繁殖的目的。也称它为试管苗繁殖或微体繁殖，其特点是繁殖速度快，周期短，不受季节气候、自然灾害等因素的影响，并可实现工厂化生产。在 20 平方米的培养室内，最多可容纳 100 万株试管苗。这一技术已有几十年的历史，现已基本成熟，并形成了诸如工厂化生产兰花这样的产值巨大的工业生产体系。但对于某种特定植物而言，尤其是新试验的植物材料，仍需做大量的研究工作，如摸索愈伤组织诱导和分化的条件，控制变异等。在大规模的工厂化栽培中，还有一系列的工业技术性问题的，均有待克服。

植物的去病毒技术（又称脱毒技术），是微繁殖的一个分枝。植物的病毒病严重地影响着农业生产。病因的种类很多，估计达五百余种，而且病原体可通过维管束传导。因此，对无性繁殖的植物来说，一旦感染上病毒之后，就会代代相传越趋严重。人们常见的马铃薯、草莓、葡萄等植物，一年比一年越种越小的现象就是病毒感染造成的。对植物病毒病迄今已采用的生物、物理、化学等多种防治途径均收效甚微，有的毫无成效。因此，过去人们只能采取拔除并销毁病株的消极方法。1952 年，法国科学家首次建立了生长点培养成株的脱毒法，从而开创了防治植物病毒病的新途径。植物茎尖培养之所以能除去病毒，是因为在感染病毒的植株中，病毒的分布是不一致的。在老叶片及成熟组织和器官中，病毒含量较高，但幼嫩的和未成熟的植物部位，病毒的含量较低，而在生长点约 0.1~1 毫米时，则几乎不含病毒颗粒。这是由于病毒的繁殖运输速度与茎尖细胞生长速度不同所致。在茎尖分生组织中，细胞繁殖十分迅速，病毒还来不及侵入，因此就成为植物体相对无病毒的特殊区域。

根据上述道理，我们自然会明白，所谓植物的去病毒技术，实质上就是采取不含病毒颗粒或病毒颗粒含量甚少的 0.1~0.5 毫米带 1~2 个叶原基的茎尖作为外植体，进行微繁殖，使其培养成完整的无病毒小植株的技术。由于所取的外植体很小，分离难度大，一般在解剖镜下操作。培养无病毒所用的器具必须严格消毒，克服培养中的污染也是成败的关键。这是细胞工程中头等重要的共性问题。对取得的植株必须进行严格的鉴定，证明确实无病毒方可应用。鉴定的方法有指示植物法、抗血清鉴定法、电子显微镜检查法等。无病毒苗一旦得到，重要的是防止再感染，如保管得好，一般可应用 5~10 年。

目前应用这种去病毒技术，已去除了马铃薯的 X、Y、A、M、S 病毒和奥古巴花叶病毒。脱毒植株的产量明显地高于感病株。例如，脱毒的大蒜头要比感病的大得多，草莓可增产 20%~50% 等。此外，脱毒技术在果树（如苹果、柑橘、葡萄），蔬菜、洋葱以及花卉（如兰花、菊花、康乃馨、水仙、唐菖蒲等）上得到了应用。不少国家还建立了无病毒繁殖区，将无病毒苗的培育工作纳入原种生产的一个重要环节，来保持优良种性和经济性状。

2. 人工种子

人工种子又称人造种子，这是细胞工程中最年轻的一项新兴技术。最初是由英国科学家于 1978 年提出的。他认为利用体细胞胚发生的特征，把它包

埋在胶囊中，可以形成具有种子的性能并直接在田间播种。这一设想引起人们极大的兴趣。人工种子技术确实有着诱人的前景：第一，它同微繁殖技术一样，培养条件可以人为控制，免遭大自然灾害性气候的不利因素，且具有省地省工可直接在田间播种等优点。第二，在人工种子制作中，可加入营养物质、植物生长调节剂、固氮菌、杀虫剂等，这是微繁殖难以达到的。第三，用于制作人工种子的体细胞胚，可利用生物反应器大规模培养，大大提高了效率。第四，一些难以得到天然种子的珍稀植物或脱毒苗、基因工程植株，均可利用人工种子技术加速用于生产。

人工种子是有体细胞胚、人工胚乳和人工种皮三个部分组成（图 3-3）。体细胞胚是制作人工种子的起始材料。它既可由外植体的表皮细胞直接产生，也可由愈伤组织的表层细胞产生。人们还发现细胞培养中的单细胞，花粉中产生单倍体体细胞和原生质体培养在适当条件下均可获得体细胞胚。从理论上讲，产生体细胞胚是植物界的普遍现象，但目前已知能产生体细胞胚的植物只有 200 余种。由于这方面的奥秘还未完全揭开，科学工作者们只得花费巨大的劳动，进行大量的筛选才能获得体细胞胚、人工胚乳是包埋体细胞胚的胶状介质。美国的一个研究组花了近两年时间，从百余种材料中筛选到目前广泛使用的人工种子包埋介质海藻酸钠。这种物质在 0.1M 氯化钙溶液中可以迅速固化成透明的小胶球。海藻酸价格低廉，质地柔软无毒性，还可人为地在其中加入各种营养物质和生长调节剂，因此是一种，迄今为止已发现的比较理想的体细胞胚包埋剂。但这种物质作人工胚乳还存在一些缺点，如营养物质易泄漏，保水性差，而且胶球很易粘连等。为此，科学家又设想在胶球外包一层薄膜——人工种皮。美国科学家在 1987 年筛选出一种疏水性物质 Elvax-4260（乙烯、乙烯基乙配和丙烯酸共聚物）但不够理想。人们正在寻找更理想的、既能透水透气又能防菌的人工种皮。

图 3-3 植物人工种子模式图

由于季节性的关系，人工种子要应用于生产还需解决贮藏问题。但用海藻酸钠炮制的人工种子，含水量大，常温下易萌发，也易失水干缩，贮藏难度很大，利用液体石蜡法、低温法、干燥法、塑料和铝箔包装法等进行贮藏，均不够理想。原因是所取的体细胞胚正处于旺盛生长状态，一般来说，成熟体细胞胚培养 5~6 天就可长成具根芽的小植株。采用上述各种方法贮藏，也很难抑制包埋在胶球中的胚的萌发。

我们根据天然种子形成过程中生理生化的特性，在胡萝卜悬浮细胞培养中，采用调控培养法获得了具高活力的静止状态的胚。所谓静止状态，即控制了体细胞胚胚根的生长。这种胚在贮藏中无需采用特殊的条件抑制其萌发。静止状态胚比正常培养的胚粗短、含水量少、干物质及活性物质积累多，因此具有耐脱水和抗逆力强之特点，可贮存较长时间。如果此法能用于其他植物的体细胞胚培养，也许可为人工种子的贮藏开辟一条新途径。

目前，科学工作者已制成模式性人工种子的植物十余种，但距离实际应用还有很大距离。主要有三大难题有待克服：许多重要植物还不能培养出大量的高质量的体细胞胚。现有的人工胚乳和种皮还不够理想，不能有效地防止微生物的腐蚀。人工种子的贮藏有待进一步完善。

3. 单倍体诱导及其应用

多数高等植物都是二倍体或偶数多倍体，其细胞内的染色体一半来自父本，另一半来自母本。植物发育成熟后，它的生殖器官内某些性细胞（如花粉）发生减数分裂，结果形成雌配子和雄配子体，即卵子和精子。由于它们的染色体数目只有正常细胞的一半，故称单倍体。由单倍体细胞产生的植株叫做单倍体植株。在自然界中，单倍体植物非常少见，而且它们的体型矮小、叶片薄、生活力弱、很难产生后代。然而，由于单倍体只有一套染色体，阴性基因不受显性基因的影响而表达，所以单倍体可以用来选择有用的隐性突变体。在植物育种中，把由常规杂交后获得的第一代植株的花粉，在离体条件下进行人工培养诱导成单倍体小植株，然后人工加倍成正常的二倍体纯系（图 3-4）。这样，克服杂交二代的分离现象，加速育种时间，提高育种效率。

图 3-4 水稻单倍体诱导和植株再生示意图

花药和花粉培养都可获得单倍体。从理论上讲，花粉从花药中分离出来后，以单个花粉作外植体进行培养，不受药壁、花隔等二倍体细胞的干扰。可是这种特殊的单倍体体细胞的培养技术难度大，目前只有少数植物上获得成功。因此，当前单倍体还是以花药培养的方式获得，并通过获得的植株细胞染色体数的观察，检测其是否为单倍体，至今已有近 300 种植物诱导出单倍体植株。我国在这一领域的研究处于领先地位。国内科学家研制的 N6 培养基和马铃薯培养基大大地提高了水稻、小麦花药培养的频率，在国内外得到广泛的使用。

单倍体的应用大致可分为如下几个方面：

(1) 培育农作物新品种 我国最早把单倍体用于育种，先后培育出小麦、玉米、甘蔗、橡胶、甜菜、烟草、青椒、茄子等新品种、新品系。

(2) 利用单倍体技术获得纯系 经加倍后的纯二倍体如同自交系一样，可为杂交育种提供大量可选择的亲本材料。而且，缩短获得纯系的年限。另外，有可能选择到优良单株，建立单株无性系应用于生产。例如，杨树、橡胶等均已获得优良无性系。

(3) 利用花粉植株进行异源染色体或基因转移 对种间或属间杂种的花药培养，获得的单倍体植株可以比常规方法更有效地选择出不同染色体和不同染色体数的染色体代换系或附加系。此法可以在较小的群体以较短的时间得到重组型非常丰富的花粉植株。这些人工创造的全新植物材料，可以用来进行染色体转移。

(4) 利用单倍体进行突变体选择 其特点是无显性基因的干扰，突变体的筛选效率得以成倍提高。

单倍体的应用研究时间还不长，对这方面的机理了解得还不够，所以在实践中目前只有少数几种植物上得到应用。主要存在的问题是诱导频率较低；在单子叶植物中白化苗现象较严重；由于以花药为外植物诱导，因此可能有二倍体细胞的干扰造成混倍现象。

4. 原生质体培养与细胞融合

植物细胞与动物细胞最大的区别，在于它的外周有一层坚硬的细胞壁。细胞壁的主要成分是纤维素、半纤维素、果胶质和木质素等，去掉细胞壁的植物细胞称为原生质体。虽然原生质体由于失去了细胞壁而变成球形状态，

但它的基本生命特征并未改变，仍然具有在一定条件下发育成完整植株的全能性。由于原生质体膜很薄，给实验操作带来许多方便，如进行基因导入和遗传转化、以及从原生质制备各种细胞器等。

植物原生质体培养可分为两个阶段，即原生质体的获得和原生质体的培养及分化成苗（图 3-5）。

用作分离原生质体的材料可以是叶肉细胞或悬浮培养的细胞，也可由外植诱导的愈伤组织细胞。这些细胞在无菌混合酶液中消化数小时，放在显微镜下看到细胞形状变成圆形的原生质球时，便终止酶解作用。用过滤离心洗涤法去除酶液，纯化原生质体。

图 3-5 植物原生质体培养程序示意图

原生质体的培养方法有很多种。最常用的有液体浅层静止法、固体培养法和饲养法等。为适应不同植物原生质体的培养要求，已发展出各种类型的培养基，而且其成分也十分复杂。例如，用于低密度培养的 KM8P 培养基，就是由 60 多种成分配制而成的。原生质体在适宜的培养条件下，一般经过 12 ~ 24 小时就可以再生出细胞壁。长壁后的细胞变成椭圆型，2 ~ 4 天就开始分裂形成小细胞团，当长到肉眼可见约 1 毫米时，转到固体培养基上增殖并诱导分化出芽和根的小植株。目前有一种好的体系可把烟草的原生质体经 60 天左右培养，就可获得大量植株。

植物原生质体的培养研究迄今已有三十多年的历史，已报道的有近 200 余种植物获得了全能性的表达。但其中大部分分属于双子叶植物的茄科、伞形科、十字花科植物。单子叶植物的禾本科，特别是禾谷类和一些重要的双子叶农作物的原生质体培养，一度被国际公认为难题，但通过科学家们坚持不懈的努力，终于在 1985 ~ 1989 年先后由日本、法国、中国、英国在水稻上首先突破。随后，小麦、玉米、小米、高粱、甘蔗、棉花、大豆等重要禾谷类和豆类植物原生质体培养也先后获得成功，其中玉米、小麦、大豆、高粱、谷子等是由我国首次成功的。此外，在药用植物、木本植物和蔬菜等方面，也取得较快的进展。

植物原生质体融合技术是借鉴于动物细胞融合的研究成果，在原生质体分离培养的基础上建立起来的。植物细胞杂交的本质是将两种不同来源的原生质体，在人为的条件下进行诱导融合。由于植物细胞的全能性，因此融合之后的杂种细胞，可以再生出具有双亲性状的杂种植株。因此，细胞融合也叫原生质体融合或细胞杂交。其包括三个主要环节：诱导融合；选择融合体或杂种细胞；杂种植株的再生和鉴定。

(1) 诱导融合 诱导原生质体融合的方法有化学诱导和物理诱导两种。化学法又分：离子诱导融合法；高钙-高 pH 法；PEG（聚乙二醇）法。离子诱导融合法常用的盐类离子有硝酸钠、硝酸钾、硝酸钙、氯化钙等。1970 年科学家们用硝酸钠使玉米和燕麦根尖细胞原生质体进行了融合。1972 年美国科学家也用硝酸钠作融合剂，使两种不同的烟草原生质体诱导融合，并获得第一个烟草种间体细胞杂交植株。高钙-高 pH 法首先用于人和鼠的动物细胞杂交，后来引用在植物原生质体的融合，并利用这种融合方法获得了烟草体细胞杂种。PEG 法是由高国南在 1974 年建立的，目前在动植物细胞杂交中均得到广泛的使用。PEG 这种化学物质毒性小易操作。有时用 PEG 法与高钙-高 pH

法结合，即先用 PEG 液处理两种混合的原生质体，然后，在融合完成后再用高钙-高 pH 溶液逐渐稀释处理，可以提高细胞的融合频率。此外，科学家们还发现了一些融合促进剂，如在 PEG 溶液中添加伴刀豆球蛋白 A，二甲基亚砷和链胃蛋白酶等，都显著地提高了细胞的融合频率。

物理诱导融合包括离心、振荡、显微操作和电融合，近年来电融合法得到广泛的应用。电融合需在融合仪控制下的融合小室内进行。各种指标都可精细调节控制，融合效率均比其他方法高。电融合的效果与原生质体的密度、交变电流的强度、电脉冲的大小与宽度等因素，都有密切关系。

(2)选择融合体 细胞融合实验所用的原生质体是两种不同来源的原生质群体，其数成千上万，它们之间发生融合作用完全是一种随机的过程。两种不同来源的原生质体可以发生融合作用，同种之间也可发生融合作用。所以，如何把杂种细胞与未融合的或同源融合的细胞区分开，这是细胞杂交技术的重要环节。目前，选择杂种细胞的方法大致可分为如下几类：利用现成的或诱发产生的各种缺陷型或抗性型的细胞系作为亲本材料进行融合实验，利用选择性培养基筛选出互补的杂种细胞。利用天然存在的或人为造成的两个亲本原生质体在物理特性上的差异，筛选出杂种细胞。利用或人为地造成细胞生长或分化能力的差异，从而筛选杂种细胞。近来发表的用两种不同的荧光染料，给两种原生质体染上不同的颜色，然后选择含有两种不同的融合细胞，这是一种十分有效的方法，也是在杂种细胞选择方面的显著进展。

(3)杂种植株的再生和鉴定 在细胞杂种的鉴定工作中，形态学上特征的鉴定是常用的传统方法 诸如叶片的大小与形状，花的颜色与结构，叶脉、叶柄及表皮绒毛等，都可作为杂种植株的鉴定指标。但由于这些特征都是由多基因控制的，所以人们很难将杂种细胞的变异同非整倍体或培养条件引起的体细胞克隆的无性系变异区分开来。由此可见，光有形态特征鉴定是十分不够的。

物种的染色体数是恒定的，因此细胞学染色体的观察也是鉴定杂种的有力手段。但通过染色体数和染色体显带技术来鉴定特异的染色体，也还排除不了培养过程中造成的变异，因此单纯用染色体鉴定杂种还是不够的。人们常用多种同工酶分析的方法来提供有效的依据。近年来，应用 DNA 重组技术从分子水平上来鉴定杂种。由于每个物种都有其特定的 RFLP 图谱，亦即限制性内切酶片段长度多态性指纹图谱。用物种特异的重复 DNA 作探针，与 DNA 限制片段杂交以后，就可以根据特异的图谱鉴定出杂种。如果所用的探针是广布于整个基因组的高度重复的 DNA 序列，这样就可以检测出杂种中含有多少亲本的基因成分。如果与原位杂交技术结合起来，还可以将这探针定位在某个染色体上。

5. 体细胞遗传变异及其利用

在自然界中，生物的基因会自发地产生频率极低的突变。而由某些物理或化学等外界因素引发的突变则称为诱发突变。开始，人们进行微生物的诱变研究，并选择出有益的新品种。由于微生物是单细胞的，在比较简单的培养基上就能很好地生长，诱变及筛选操作也都比较简单。然而对于多细胞的高等植物来说，诱变研究则遇到了很大的困难。直到成功地建立植物组织培养、原生质体培养和细胞悬浮培养技术之后，才得以在细胞水平研究植物细胞突变。离体培养细胞经诱变处理后所得到的变异植株，其不正常的表现型可由多种原因引起的，既可能是遗传性的，也可能是生理性的。因此，在未

明确鉴定一个再生植株的变异是否来自遗传物质改变之前，我们便称之为体细胞无性变异株，意思是指它是一株由体细胞经无性过程培养发生的体细胞变异植株。

研究植物体细胞遗传变异的主要目的，就是将类似于微生物诱变的方法应用于植物细胞，通过体细胞遗传变异的特性来扩大变异资源，从而选择出具有特殊性状的植物新类型。如抗旱、抗盐碱或抗病的农作物，具有特殊营养价值或用途的新品种。

用于诱变的起始细胞，通常可以是再生植株的愈伤细胞，悬浮培养细胞或原生质体。因为原生质体来自单细胞，再生植株肯定是由单细胞来的，所以最为常用。遗憾的是，至今可由原生质体再生植株的植物种类并不多，而且再生频率也不高，操作技术要求又较严格，所以仍有一定的局限性。

植物细胞的诱变因素与微生物细胞的基本相同，这也反映了整个生物界中遗传物质在本质上是相同的。诱变剂可分物理和化学的两大类型。物理因素主要有 射线、 γ 射线、高能粒子、紫外线等。其中紫外线诱变不需要昂贵的设备，一般实验室都可以应用。化学诱变剂都是一些结构复杂的试剂，一般都有毒性，大多有致癌作用，因此操作起来要特别小心。

经人工诱发的体细胞无性系的筛选，一种方法是把细胞群体直接置于逆境下培养。例如，选择抗某种除草剂的新品种，就可以在培养基中加入除草剂，能在这种培养基中生长的细胞必然是抗除草剂的，由这个细胞再生的植株就有可能是抗该除草剂的突变品系。另一种很巧妙的筛选法叫做负选择法。这种方法是先用特定的培养基使发生遗传变异的细胞停止生长，而正常未发生突变的细胞可以生长；这时加入一种可以杀死正在生长的细胞而对不生长细胞无害的药物，然后再改变条件，使处于停止生长状态的未杀死的突变细胞重新恢复生长；这样就可以只保留期望得到的变异细胞。

目前，已筛选到遗传变异植物主要有以下几类：营养缺陷型、抗氯酸盐、抗氨基酸、抗抗菌素类药物、抗除草剂和抗病植物的新品种。其中，营养缺陷型、抗氯酸盐和抗抗菌素类药物的突变体，已被广泛应用于遗传学和基因工程的研究之中。它们带有显著的遗传标记，是体细胞杂交中难得的亲本材料。从已有的某种除草剂出发，用突变法筛选出一种能专门抵抗这种除草剂的作物新品种，在经济上比针对某种作物开发一种新型除草剂要便宜得多。国外已开发出这样的烟草新品种。赖氨酸是人体必需的氨基酸之一，它必须从食物中摄取，而很多作物中赖氨酸的含量很少，现在用诱变的方法得到的新品系其赖氨酸含量大大提高。据报道，用这种方法已筛选到抗马铃薯晚疫病、抗玉米小斑病、抗水稻稻瘟病和白叶枯病的抗性作物材料。在次生代谢的开发和利用中，通过原生质体技术也有可能筛选到稳定高产的细胞株。例如，最近日本科学家筛选到高产紫草宁细胞系；我国在人参细胞培养中，利用诱变方法筛选到生长素自养型红色花青素细胞系。随着药物生产的工业化，体细胞无性变异系的筛选很有实用价值。

6. 次生物质与植物细胞的大量培养

人类的衣食住行处处离不开植物。在化学工业兴起之前，所有植物性药物、食用香料或化妆品都是直接从植物中取得的。这些来源于植物的有效成分，乃是它们体内积累的一些代谢中间分子。由于这些分子不参与植物的基本生命过程，常被称为次生代谢物或天然产物。植物天然产物对于人类的健康有着重大意义。据资料统计，现用的药品中有四分之一来自植物，而且

绝大多数仍是化学合成所不可代替。为了战胜危及人类生命的癌症、艾滋病、心脏病等严重疾病，人们正在不断地从植物中寻找新的药源。例如近几年来，从红豆杉树皮中提取的紫杉醇对治疗卵巢癌和乳腺癌有特效。这种物质的碳环结构十分特殊，难以通过化学合成获得。然而要治好一个卵巢癌病妇，至少需要2~3棵60老龄的此种树的树皮。这种树属于稀有树种，且生长很慢，若不断取用的话，很快就要面临濒危的境地。最近美国农业部报告，草莓的根、叶、果实中含有的鞣花酸也具有抗癌作用。前苏联科学家发现，从甘草植物根提取的甘草酸及其衍生物制成的药物，对艾滋病有一定疗效，另外，美国构建的转基因烟草工程植株，培育6周后从其茎、叶中提取的一种栝楼素物质，对防治艾滋病也有一定的成效。大自然就像天然的化工厂，为人类的健康和生命提供无穷无尽的财宝。然而随着世界人口的增加，工业化的发展，地理环境却受到严重的破坏，大片森林被毁，许多植物资源正面临着枯竭的危险。世界闻名的中草药，这些年来许多药源日益萎缩，有的已经濒危。因此，探索利用植物组织培养的方法来生产人类所需的植物产品，近十年来已受到各国政府和科学工作者的极大重视。

但前面讲到的各种细胞培养方法，都是以科学研究为目的的小批量培养，相应的那些技术与设备都不适用于商业化的大规模细胞培养。因此，现在已参照微生物发酵工业的工艺与设备，设计制造了适宜植物细胞培养的生物反应器、培养罐等。但是植物细胞与微生物有很大的不同，它的特点是体积大、生长缓慢、脆弱而又粘连成团、营养要求复杂、易染菌，所以技术要求较高。目前，在实际应用中还有待进一步克服。

进行植物细胞大规模培养的基本步骤是：首先要建立细胞株——一般要选择次生代谢物含量高的植物种类、品种或它们的高产植株。利用外植体诱导出愈伤组织并建立实验阶段悬浮细胞培养，从中筛选出高产优良的无性繁殖系，并确定其最适生长条件和产量条件。第二步是扩大培养——将上述选出的细胞株扩大培养，得到一定量的细胞，作为接种用的“种子”。第三步进行大罐培养——现已建立了针对植物细胞的“二步培养法”，即使用生长培养基使细胞大量增殖，达到一定的量，然后再调节培养基的组成，诱导细胞启动代谢途径并提高次生物的产量。最近有许多研究观察到，培养细胞在进入对数生长期后，才从初生代谢转向次生代谢。二步培养法可能是药用植物细胞工程生产有用次生物的有效途径之一。

利用细胞工程生产的有用物质，根据其能否通过细胞膜而分泌到培养基中去的特点，可分为胞内次生物和胞外次生物。在大量生产胞内物质时，必须培养大量的细胞用来提取；而生产胞外物质如生物碱、黄酮、蒽酮、各种色素等细胞都可以自发地释放到培养基中。针对这类细胞，科学家们发明了一种叫固相化培养技术，最常用的有海藻酸钠、卡拉胶、琼脂糖等物质。采用这一技术可以克服细胞大量培养中许多困难。固相化培养技术与液体悬浮培养相比有以下优点：细胞生产速度缓慢，有利于次生物质积累，易于得到高密度的细胞群体，并建立细胞间物理和化学的联系；易于控制化学环境；易于收获次生物质等。但也需进一步完善如固相新材料的寻找，延长和增加固相化植物细胞合成与分泌能力，完善和发展固相化反应器装置等。

在已经研究过的二百余种植物细胞培养中，可产生约三百余种有用成分，其中包括不少临床上广为应用的重要药物，如长春碱、地高辛、东莨菪碱、小蘗碱和奎宁等。许多药用植物细胞培养都十分成功，如人参、西洋参、

长春花、紫草和黄连等。日本在 1983 年用细胞培养法生产紫草宁色素投入市场，成为药用植物细胞工程的第一个产品化和商业化的先例。这是一组蒽醌类色素，主要是作为染料用于唇膏的生产，还兼有抑菌消炎作用，在国际市场上价格十分昂贵。目前人参细胞悬浮培养规模已达 30 升，烟草细胞则达 2 万升。这一领域内的研究，日本、德国一直处于领先地位。应当清楚，虽然取得的进展令人鼓舞，但急待解决的问题还很多。目前，99%的潜在植物资源有待开发利用，特别是对细胞的许多代谢途径仍不清楚，在工艺方面遇到的困难更多。而且通过这种途径得到的产品成本很高，一般情况下无法与自然产品竞争。看来只有那些应用价值高，价格昂贵，资源不足，难以进行化学合成的植物次生物质，用细胞培养生产才会有经济上的效益。

四、动物细胞工程

1. 淋巴细胞杂交瘤与单克隆抗体

我们知道，当动物细胞受到抗原蛋白质（简称抗原）的刺激作用之后，便会在动物体内引起免疫反应，并伴随着形成相应的抗体蛋白质（简称抗体）。这种抗原-抗体之间的应答反应是一种相当复杂的过程。由于一种抗原往往具有多种不同的决定簇，而每一种抗原决定簇又可以被许多种不同的抗体所识别，因此事实上每一种抗原都拥有大量的特异性的识别抗体。例如，纯系小鼠中，虽然一种抗原可检测到的识别抗体只有 5~6 种，而它的实际数字，可达数千种之多。

动物体内主要有两种淋巴细胞，一种是 T 淋巴细胞，另一种是 B 淋巴细胞，后者负责体液免疫，能够分泌特异性免疫球蛋白，即抗体。在动物细胞发生免疫反应过程中，B 淋巴细胞群体可产生多达百万种以上的特异性抗体。但研究发现，每一个 B 淋巴细胞都只能分泌一种特异性的抗体蛋白质。显而易见，如果要想获得大量的单一抗体，就必须从一个 B 淋巴细胞出发，使之大量繁殖成无性系细胞群体，即克隆。而由这种克隆制备到的单一抗体称为单克隆抗体。然而遗憾的是在体外培养条件下，一个 B 淋巴细胞是不能无限增殖的。因此，通过这条途径制备大量的单克隆抗体事实上是办不到的。

由于单克隆抗体具有专一性强、质地均一、反应灵敏、可大规模生产等特点，因此在理论研究和实验应用方面都具有十分重要的意义。于是，如何获得单克隆抗体便成为亟待解决的一个课题。1975 年有两位科学家，根据癌细胞可以在体外培养条件下无限传代增殖这一特性，在 PEG 的作用下，将它与 B 淋巴细胞进行融合，结果得到了具有双亲遗传特性的杂交细胞。它既能在体外迅速增殖，又能合成分泌特异性抗体，从而成功地解决了从一个淋巴细胞制备大量单克隆抗体的技术难题。这项技术就是淋巴细胞杂交瘤技术。这两位科学家也因此获得了 1984 年度诺贝尔奖。淋巴细胞杂交瘤技术的基本步骤如图 3-6 所示。

通过上述培养之后获得的培养液、血清或腹水，其中除了单克隆抗体之外，还有无关的蛋白质等其他物质，因此必须对产品作分离纯化。目前，常用的方法有硫酸铵沉淀法、超滤法、盐析法等。一般采用几种纯化方法分步进行，如先把培养液或腹水用硫酸铵沉淀法进行初步纯化，把所得的粗制单克隆抗体进一步采用盐析法获得纯度为 95%、不含致热源的单克隆抗体精制品，再经鉴定分析合格后供制剂用。

2. 胚胎干细胞

早在 20 世纪初期，科学家们已提出动植物细胞的全能性理论。1958 年从实验上证实了植物细胞的全能性。所谓全能性就是指植物体的任何一个细胞，都包含有其个体的全部遗传信息。在离体培养的条件下，植物原生质体能成长为完整的植株。

那么，一个已分化的动物细胞，经离体培养后，能否得到一只完整的小动物？实验已表明，小白鼠的神经细胞，决不会分化出其他组织的细胞，更不会长出一只完整的小白鼠。但动物体内有全能性的细胞，如低等动物的鱼、两栖类等，从 2 细胞到囊胚期的细胞都具有全能性，高等动物从胚胎 2 细胞到 64 细胞以及内细胞团的胚胎细胞也具有发育的全能性。当前已从小鼠内细胞团分离出全能性的干细胞。

图 3-6 单克隆抗体制备程序示意图

胚胎干细胞简称 ES 细胞，是正常二倍体型，像早期胚胎细胞一样具有发育上的全能性。ES 细胞被注射到正常动物的胚腔内，能参与宿主内细胞团的发育，广泛地分化成各种组织，并能产生具功能性的生殖细胞。此外，ES 细胞还有一个突出的特点，它可以在体外进行人工培养、扩增，并能以克隆的形式保存。因此，ES 细胞系的建立，为动物细胞工程寻找到了—种良好的新实验体系。

在 ES 细胞系建立之前，动物细胞工程的遗传操作仅局限于受精卵和极早期的胚胎细胞。这些细胞来源困难，数量少，因此应用上受到极大的限制。而 ES 细胞系的建立避免了这方面的困难，并使个体选择变成细胞水平的选择，节省了人力和财力，大大提高了遗传操作效率和选择效率。ES 细胞系的另一个优越性是，由于它可以在体外进行扩大培养，同样也可采用已成熟的遗传物质导入细胞的技术进行遗传操作。利用 ES 细胞系可作为优良的载体，为在高等动物中开展细胞工程的研究。

培养 ES 细胞的成功取决于三个关键因素：胚胎发育的精确阶段，最好取 5.5 日龄的胚胎，这时细胞还未分化成体细胞和生殖细胞。但此期胚胎已处于着床后的早期，为分离和培养胚胎多能干细胞，可采取改变母体激素和切除卵巢的方法，人为地延缓囊胚着床。要从单个胚胎中获得足够数量的具多能干细胞的前体细胞。培养条件和培养方式要适于多能干细胞的生长。然而，哺乳动物的胚胎必须种植在母体子宫内，从母体获得营养才能正常地生长与发育。但并不是所有种植在子宫里的细胞都具有这种功能，只有发育到特定的胚胎滋养层细胞才有这种功能。因此，ES 细胞要变成动物个体有两种途径。第一，把 ES 细胞与 8~10 细胞时期的胚胎聚集，或通过胚腔注射构成嵌合体。ES 细胞在嵌合体里经过细胞增殖而分化成各种组织并形成有功能的生殖细胞，也就是 ES 细胞通过嵌合体的子代变成动物个体。第二，通过核移植（或细胞融合）把 ES 细胞导入去核的卵母细胞，然后转移到寄母输卵管种植到子宫而发育成个体。由此可见，ES 细胞系的建立为动物育种奠定了基础。

ES 细胞的建立，还为人们从分子水平上对动物进行基因组改造奠定了基础。ES 细胞为核移植技术在体外提供大量的“富能核”，在理论上也可能通过核移植达到控制性别。目前，已能将 ES 细胞诱导为造血细胞，如能导入动物骨髓或诱导分化为淋巴细胞前体，将对基因治疗提供重要途径。干细胞已成为生物技术细胞工程的又一热点，除了小鼠 ES 细胞外，仓鼠 ES 细胞系也已建成，同时在大动物如猪、牛、羊等方面也有初步报道，最近还报道从人体中已分离到 ES 细胞。

3. 细胞融合

在细胞融合过程中，开始阶段只来自两个细胞的细胞质先聚集在一起，而细胞核仍保持彼此独立，这种特定阶段的细胞结构称为合胞体。其中含有两个或多个相同细胞核的叫同型合胞体，而含有两个或多个不同细胞核的叫异型合胞体，或称异核体。在异核体中，来自两个不同细胞的成分如质膜、细胞器及细胞核彼此混合存在，这就为研究这些成分之间的相互作用提供了条件。例如，将鸡红细胞与生长的组织培养细胞融合后，存活于培养细胞细

胞质中的鸡红细胞的情性核，便开始重新合成 RNA，并最终导致 DNA 的合成。

少数异型合胞体在继续培养和发生有丝分裂的过程中，来自不同细胞核的染色体便有可能合并到一个细胞核内，从而产生出杂种细胞。由于这种杂种细胞的双亲都是体细胞，因此又叫做体细胞杂种。应用克隆的方法，可以从杂种细胞得到杂种细胞系。

动物细胞的融合作用虽然在形式上同精卵结合的受精过程有些类似，但两者在本质上是截然不同的。动物的精卵结合是一种有性过程，有着十分严格的时空关系和种族界限，这为确保种的遗传稳定性起了十分重要的作用。在自然界中，正是由于存在着这种遗传屏障，不同物种之间的有性杂交往往是不能的。而细胞融合则不同，它通过人工的方法克服了存在于物种之间的遗传屏障，从而能够按照人们的主观意愿，把来自不同物种的不同组织类型的细胞融合在一起，这不仅对遗传育种有利，而且也可作为遗传学研究提供新的手段。

融合细胞至少含有两套亲本体细胞的染色体，因此呈现四倍体或多倍体的特点。如果两个亲本体细胞是来自同一物种的不同组织，那么在融合细胞中，这两套染色体能彼此相容而不发生排斥现象；如果两个亲本体细胞来自不同物种，则将产生排斥现象，其中总有一套亲本染色体被优先排斥，最后只剩下少数几条。由于种间杂种细胞遗传的不稳定性，融合细胞群体总是呈现多种表型特征：有些表现某一亲本特征，有些表现中间型特征，有些同时具备双亲特征，有的会重新出现已经丧失的某一亲本的特征，有的甚至会表现出双亲均不具备的新的遗传特征。当然，融合细胞中两个亲本有时也具有遗传上的互补作用，据此可作为标记来选择融合细胞。

细胞融合技术主要应用于三个方面：

(1)染色体的基因定位 这是融合细胞技术应用的主要成果之一。例如，将人体细胞与小鼠细胞融合，在杂种细胞系中，由于优先排斥的是人染色体，因此，每种细胞系都仅含有一条或若干条特异性的人染色体。通过对这些细胞系生理生化功能分析，就可以断定特定的人染色体的功能。实验已经证明，仅保留着 1 号人染色体的人-小鼠杂种细胞系，才能合成人尿苷单磷酸激酶，从而证实了编码这种激酶的人基因是定位在 1 号染色体上。

(2)遗传疾病的治疗与基因互补分析 体细胞遗传学和分子遗传学研究证实，许多种人类疾病都与基因的突变或缺失有关，估计约有 2000 种以上的人类疾病是由单基因缺失引起的。通过细胞融合技术，将不同遗传缺陷的两种突变细胞融合，产生的杂种细胞由于基因的互补作用，便可恢复其正常的表型。细胞融合技术对基因互补分析也十分重要。在选出具有特殊表型的稳定突变体后，必须要成对地将这些突变体细胞互相融合，并对所产生的杂种细胞进行测定，观察是否存在所需研究的遗传性状。如果两个突变体细胞不能互补，表明它们缺失的是同一基因，或同一基因产生了同样的突变；如果两个突变体细胞能够互补，则表明它们缺失不同的基因或同一基因的不同部位发生了突变。应用这种基因互补分析，可以断定突变体所涉及的有关基因数目，可用来分析基因的结构，以及剖析遗传疾病的病因等。

(3)特殊活性物质的制备 例如，将能分泌胰岛素、生长激素等具有特殊功能的细胞，与在体外能长期传代存活的骨髓瘤细胞融合，就可能选择到既能生产特殊活性物质，又具长寿命的杂种细胞克隆系。因此，应用细胞融合技术，有可能得到生产生长激素、促性腺激素、催乳素、胰岛素等各种杂种

细胞系。

4. 细胞核移植

1952年布里格斯等科学家建立了细胞核移植技术，为核质关系的研究开创了新途径。因为用细胞核移植技术，通过不同细胞质与细胞核之间的配合，可以更明确而深刻地研究不同组织和不同发育时期的细胞核的功能及其与细胞质之间的相互作用。

由于细胞核体积很小，必须在显微镜下才能观察到，同时它又十分脆弱，易受损伤，因此，细胞核移植是一项十分精细、难度很大的显微操作技术。细胞核移植实验工作包括去核卵的制备、供体细胞的分离及细胞核移植等三个步骤。

细胞核移植技术最初以变形虫为材料，在单细胞动物内进行。布格里斯等人首次对低等动物进行核移植，成功地得到核移植的小蛙。我国著名的胚胎学家童弟周教授，把核移植技术应用到蟾蜍和鱼类，取得令人瞩目的成就。继两栖类和鱼类等核移植取得成功之后，科学家们开始把其注意力集中到哺乳动物身上首例是1957年在小鼠上获得成功的，之后进展较快，特别是对哺乳动物的卵子移植技术取得了重大改进。

五、细胞工程的应用

细胞工程作为科学研究的一种手段，已经渗入到生物工程的各个方面，成为必不可少的配套技术。在农林、园艺和医学等领域中，细胞工程正在为人类做出巨大的贡献。

1. 粮食与蔬菜生产

利用细胞工程技术进行作物育种，是迄今人类受益最多的一个方面。我国在这一领域已达到世界先进水平，以花药单倍体育种途径，培育出的水稻品种或品系有近百个，小麦有 30 个左右。其中河南省农科院培育的小麦新品种，具有抗倒伏、抗锈病、抗白粉病等优良性状。

在常规的杂交育种中，育成一个新品种一般需要 8~10 年，而用细胞工程技术对杂种的花药进行离体培养，可大大缩短育种周期，一般提前 2~3 年，而且有利优良性状的筛选。前面已介绍过的微繁殖技术，在农业生产上也有广泛的用途，其技术比较成熟，并已取得较大的经济效益。例如，我国已解决了马铃薯的退化问题，日本麒麟公司已能在 1000 升容器中大量培养无病毒微型马铃薯块茎作为种薯，实现种薯生产的自动化。通过植物体细胞的遗传变异，筛选各种有经济意义的突变体，为创造种质资源和新品种的选育发挥了作用。现已选育出优质的番茄、抗寒的亚麻、以及水稻、小麦、玉米等新品系。有希望通过这一技术改良作物的品质，使它更适合人类的营养需求。

蔬菜是人类膳食中不可缺少的成分，它对人体提供必需的维生素、矿物质等。蔬菜通常以种子、块根、块茎、插扦或分根等传统方式进行繁殖，化费成本低。但是，在引种与繁育、品种的种性提纯与复壮、育种过程的某些中间环节，植物细胞工程技术仍大有作为。例如，从国外引进蔬菜新品种，最初往往只有几粒种子或很少量的块根、块茎等。要进行大规模的种植，必须先大量增殖，这就可应用微繁殖技术，在较短时间内迅速扩大群体。在常规育种过程中，也可应用原生质体或单倍体培养技术，快速繁殖后代，简化制种程序。另外，还可结合植物基因工程技术，改良蔬菜品种。

2. 园林花卉

在果树、林木生产实践中应用细胞工程技术主要是微繁殖和去病毒技术。几乎所有的果树都患有病毒病，而且多是通过营养体繁殖代代相传的。用去病毒试管苗技术，可以有效地防止病毒病的侵害，恢复种性并加速繁殖速度。目前，香蕉、柑橘、山楂、葡萄、桃、梨、荔枝、龙眼、核桃等十余种果树的试管苗去病毒技术，已基本成熟。香蕉去病毒试管苗的微繁殖技术已成为产业化商品化的先例之一。因为香蕉是三倍体植物，必须通过无性繁殖延续后代，传统方法一般采用芽繁殖，感病严重，繁殖率低；而采用去病毒的微繁殖技术不仅改进了品质，亩产量约提高 30%~50%，很容易被蕉农接受。

近年来，对经济林木组织培养技术的研究也受到很大的重视。采用这一技术可比常规方法提前数年进行大面积种植。特别是有些林木的种子休眠期很长，常规育种十分费时。据不完全统计，现已研究成功的林木植物试管苗已达百余种，如松属、桉树属、杨属中的许多种，还有泡桐、槐树、银杏、茶、棕榈、咖啡、椰子树等。其中桉树、杨树和花旗松等大面积应用于生产，澳大利亚已实现桉树试管苗造林，用幼芽培养每年可繁殖 40 万株。

植物细胞工程技术使现代花卉生产发生了革命性的变化。1960年，科学家首次利用微繁殖技术将兰花的愈伤组织培养成植株后，很快形成了以组织培养技术为基础的工业化生产体系——兰花工业。现在，世界兰花市场上有150多种产品，其中大部分都是用快速微繁殖技术得到的试管苗。从此，市场供应摆脱了气候、地理和自然灾害等因素的限制。至今，已报道的花卉试管苗有360余种。已投入商业化生产的有几十种。我国对康乃馨、月季、唐昌蒲、菊花、非洲紫罗兰等品种的研究较为成熟，有的也已商品化，并有大量产品销往港澳及东南亚地区。

3. 临床医学与药物

自1975年英国剑桥大学的科学家利用动物细胞融合技术首次获得单克隆抗体以来，许多人类无能为力的病毒性疾病遇到了克星。用单克隆抗体可以检测出多种病毒中非常细微的株间差异，鉴定细菌的种型和亚种。这些都是传统血清法或动物免疫法所做不到的，而且诊断异常准确，误诊率大大降低。例如，抗乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)的单克隆抗体，其灵敏度比当前最佳的抗血清还要高100倍，能检测出抗血清的60%的假阴性。

近年来，应用单克隆抗体可以检查出某些尚无临床表现的极小肿瘤病灶，检测心肌梗死的部位和面积，这为有效的治疗提供方便。单克隆抗体并已成功地应用于临床治疗，主要是针对一些还没有特效药的病毒性疾病，尤其适用于抵抗力差的儿童。人们正在研究“生物导弹”——单克隆抗体作载体携带药物，使药物准确地到达癌细胞，以避免化疗或放射疗法把正常细胞与癌细胞一同杀死的副作用。

单克隆抗体可以精确地检测排卵期。新一代免疫避孕药也在研制之中，其基本原理是用精子、卵透明带或早期胚胎来制备单克隆抗体，将它们注入妇女体内，人体就会产生对精子的免疫反应，从而起到避孕作用。人类体外受精技术的日趋成熟，使人类对生育活动有了较大的选择余地，促进优生优育，提高人口素质，也为不孕症患者或不宜生育的人带来福音。

生物药品主要有各种疫苗、菌苗、抗生素、生物活性物质，抗体等，是生物体内代谢的中间产物或分泌物。过去制备疫苗是从动物组织中提取，得到的产量低而且很费时。现在，通过培养、诱变等细胞工程或细胞融合途径，不仅大大提高了效率，还能制备出多价菌苗，可以同时抵御两种以上的病原菌的侵害。用同样的手段，也可培养出能在培养条件下长期生长、分裂并能分泌某种激素的细胞系。1982年美国科学家用诱变和细胞杂交手段，获得了可以持续分泌干扰素的体外培养细胞系，现已走向应用。

4. 繁育优良品种

目前，人工受精、胚胎移植等技术已广泛应用于畜牧业生产。精液和胚胎的液氮超低温(-196摄氏度)保存技术的综合使用，使优良公畜、禽的交配数与交配范围大为扩展，并且突破了动物交配的季节限制。另外，可以从优良母畜或公畜中分离出卵细胞与精子，在体外受精，然后再将人工控制的新型受精卵种植到种质较差的母畜子宫内，繁殖优良新个体。综合利用各项技术，如胚胎分割技术、核移植细胞融合技术、显微操作技术等，在细胞水平改造卵细胞，有可能创造出高产奶牛、瘦肉型猪等新品种。特别是干细胞

第四章 微生物工程

发酵工业对我们来说并不陌生，从日常饮用的酒、酸乳、调味的醋、酱油、味精，到抗生素、激素、疫苗等药物，无一不是微生物发酵的产物。传统的微生物发酵起源于史前期。公元前 2000 多年，埃及已酿造葡萄酒，至今古希腊石刻上，仍留有酿酒全过程的记载。我们的祖先对有益微生物利用的历史更为悠久，龙山文化期已有饮酒用具，殷商期（公元前 2000 ~ 3000 年）甲骨文中的象形文字“𠂇”，与现代汉字相似，春秋战国时期（公元前 500 多年）开始酿醋，周朝（公元前 1000 年）酱油业已相当发达，至北魏时（公元六世纪）《齐民要术》上就已详细记载了酱油酿造需接种像皇帝黄袍颜色的“黄衣”（即黄曲霉孢子）和 33 种制酢（醋）方法。但是，微生物发酵工业，却是从 1929 年弗莱明发现青霉素、1940 年链霉素挽救了英国首相邱吉尔的生命（肺炎）而兴起的，从此发酵工业自作坊式的混菌、厌氧、固体发酵走向纯种、大罐通气、液体深层发酵阶段。进入 20 世纪 70 年代以来，在基因重组、细胞融合等生物工程技术推动下，微生物工程应运而生，可以按照人们设想的蓝图，对微生物菌种进行细胞水平、分子水平不同层次的创造设计，构建出自然界中原来没有的、具有特殊功能和多功能的“超级菌”和“工程菌”，再通过微生物发酵来生产新的有用物质。现已知由微生物生产具有商品价值的产品就有 200 多种，在与人们生活密切相关的许多领域中，如医药与食品、化工与冶金、资源与能源、健康与环境，产生和即将产生难以估价的经济和社会效益。

一、生物工程的概念和意义

1. 何谓生物工程

无论是巍峨的大厦，还是壮丽的大桥，任何一项宏伟工程，都要有总设计的蓝图和现场施工图纸，生物工程也同样。比如我们今天看到的蚕吃桑叶，吐的是蚕丝；鸡吃米谷，而生出的是鸡蛋。我们设想从发酵罐中捞取蚕丝和吃发酵罐中生产的不带壳的鸡蛋，就是这项宏伟工程的总设计蓝图，而传统的发酵技术与基因工程、细胞工程、蛋白质工程、固相化菌、固相化酶技术相结合，就是现场施工技术。这种渗透有工程学的微生物学，就是生物工程(或发酵工程)。有了按生物工程改造过的微生物细胞(即“工程菌”)，接着就是对“工程菌”进行营养、培养条件、发酵罐中生长动力学和产物形成动力学的研究。其目的为生产控制、模拟放大以及电子计算机的程序控制提供模型，从而找到最优化的生产控制条件，最后借助生化工程技术，实现真正按人类意志生产所需的生物工程产品。由此看来，生物工程虽以基因工程为主导和核心，但离不开生物工程这个基础。

生物工程具体包括菌种选育、菌体生产、代谢产物的发酵以及微生物机能的利用等。其应用范围(图4-1)为：

- (1)微生物菌体生产和应用 如面包酵母、利用再生资源生产饲料蛋白、作为生物催化剂使用的微生物细胞。
- (2)微生物代谢产物的应用 通常包括氨基酸、核苷酸、有机酸等初级代谢产物和抗生素、维生素、激素、生物碱、细胞毒素等次级代谢产物。
- (3)微生物机能的利用 如微生物对有毒化合物和高分子化合物的分解净化、石油探矿和开采、细菌冶金、有机废弃物的综合治理、海洋和宇宙的开发等。

现代生物工程不仅使用微生物细胞，也可用动植物细胞发酵生产有用物质。例如，采用培养罐大量培养杂交瘤细胞生产用于疾病诊断和治疗的单克隆抗体，用培养罐大规模培养人参细胞和担子菌生产人参皂苷、生物碱、灵芝多糖等。工业化培养动植物细胞的目的是可以大大缩短生产周期，如用200升罐培养担子菌，两周生产的灵芝多糖，按常规栽培却要六个月。

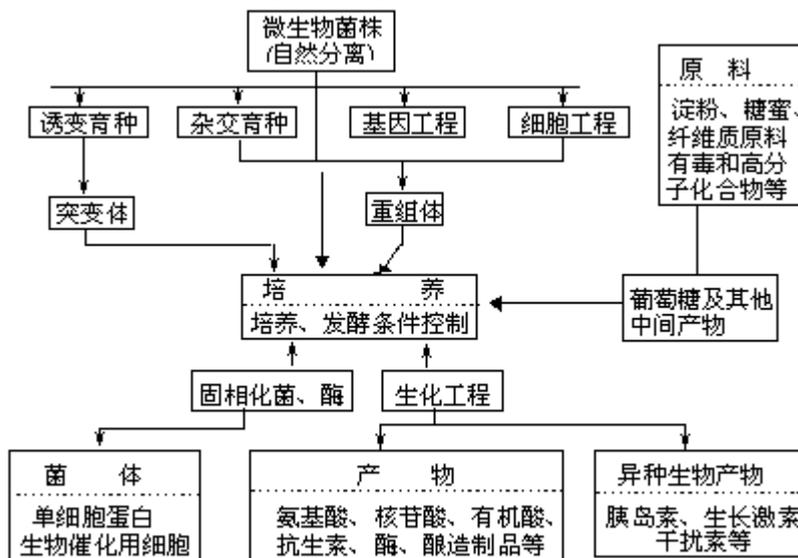


图4-1 微生物工程技术概论图

2. 微生物工程的优越性

为了解决世界面临的能源、资源、人口、粮食及污染等严重问题，生物工程已被誉为世界新技术革命的标志之一，受到各国重视。值得注意的是，至今生物工程应用于工业化生产的，主要是微生物（当然也有不少转基因植物、转基因动物成功的报道）。人们不禁要问：为什么基因工程、细胞工程、酶工程、单克隆抗体和生物能量转化等高新技术研究成果，最易通过个体最小的微生物（注意，1000个杆菌首尾相连才有1粒米大！）才能转化为生产力呢？我们从微生物种种惊人的特点中找到了答案。原来在生物界中，微生物以比表面积（表面积与体积之比）、转化能力、繁殖速度、变异与适应性和分布范围五大特殊本领而著称。五大本领中最基本的是微生物的比表面积远比其他生物大。如乳酸杆菌比表面积12万倍、鸡蛋1.5倍，90公斤体重的人只有0.3倍。生物体比表面积越大，其代谢活性越强。在适宜条件下，微生物24小时所合成的营养物质相当于原来重量的30~40倍，而一头体重500公斤的乳牛，一昼夜只能合成0.5公斤蛋白质，相差1000倍。在适宜条件下，细菌20分钟繁殖一代，经24小时培养，一个细胞可繁殖成4万亿亿个细胞。细菌比植物繁殖率快500倍，比动物繁殖率快2000倍。微生物也以抗严寒酷暑，耐酸、碱、盐的惊人适应力被誉为“生物界之最”。太平洋海沟高压350摄氏度下的嗜热菌，南极100兆帕（1000个大气压）-18摄氏度下的嗜冷菌，pH0.5酸性有色金属浸矿水中的嗜酸硫杆菌，pH12~13环境下的极端嗜碱菌，甚至在32%盐溶液中的嗜盐菌，在其他生物难以生存的各种极端环境中，都蕴藏着大量的微生物资源。大肠杆菌等细菌、酿酒酵母等酵母菌是单细胞原核微生物和真核微生物的代表，细胞结构和繁殖方式简单，遗传背景清楚，加上微生物的种种特点，是提供特殊功能供体的遗传物质和接受外源遗传物质的最好受体菌株。基因重组和细胞融合技术构成的“工程菌”和“超级菌”，将更造福于人类。

人们知道，传统的化学工业都是大烟囱，冒浓烟，几乎全部在高温高压条件下进行反应，要求耐酸碱、耐腐蚀的设备，既消耗能源，又污染环境。而微生物发酵工程，以活细胞（主要是微生物，也包括动植物细胞）或其组成部分（细胞器和酶）控制在最优条件下进行工业化生产，具有前者无法比拟的优点（表4-1）。

表4-1 化学工业与发酵工程特点比较

项目	化学工业	发酵工程
反应步骤	多步反应，需经几个中间步骤转化至产物 原料 X_1 X_2 X_3 最终 产物（中间产物）	以微生物细胞催化，实行一步生产法，所有中间步骤都在细胞中进行 原料 细胞 最终产物 酶
反应条件	高温高压高度酸碱，消耗能源大	常温常压温和条件，消耗最少能源
原料	化学纯品	农副产品、工业废水、再生资源
投资	耐酸碱、耐腐蚀设备，设备投资较大	同一发酵设备，可生产多种发酵产品，设备投资省
环境污染	强酸、碱，副反应多，污染较多	产物专一，副反应少，污染小

当然与化学工业相比，微生物发酵工程的产品较稀，提取工艺较繁琐、成本较高等难题尚待克服。目前，已建立了一批食品、医药、农药、饲料和

生物能等产业，成为世界经济的重要组成部分。微生物工程向应用微生物方向发展，具有极大的经济潜力，必将对我国未来国民经济的发展发挥更大作用。

二、微生物工程技术的应用

1. 医药工业

传统的制药工业不外两种。一是化学合成药物，往往工艺复杂、条件苛刻、污染严重、毒副作用大；二是生化药物，从动植物中提取或由微生物发酵而获得。而自动植物中提取，受资源限制，单价昂贵，无法满足需求，所以采用生物工程技术，通过微生物发酵方法为人们寻求新药带来了很大希望，如有关基因工程菌生产人胰岛素、乙肝疫苗、干扰素等。下面就抗生素、维生素类常用药物最新进展作一介绍。

(1) 抗生素 抗生素是人们使用最多的药物，也是制药工业中利润最高的产品。世界各国由发酵法生产的抗生素约 400 种，广泛应用的仅 120 种，其他主要是毒性大、成本高，无商业应用价值。大多数抗生素是由放线菌和霉菌产生的。因此，人们采用基因工程和细胞融合技术，对抗生素产生菌进行了改造和重新设计，不仅可以制造出许多高效低毒的新型抗生素，还可改革工艺，使抗生素产量成倍地增长。第一次由“工程菌”制造的全新抗生素——麦迪紫红素 A，是美国报道的。他们将产放线紫红素的部分基因插入产麦迪霉素的放线菌中，构建的“工程菌”产生了全新的抗生素。我国新构建的生产丁胺卡那霉素的“工程菌”，就是把酰化酶基因克隆到卡那霉素产生菌中获得的。采用新的“工程菌”生产，避免了现国外通用的使用有毒光气生产的办法，新抗生素毒副作用小，对耐卡那霉素、庆大霉素致病菌临床疗效显著。对抗生素产生菌采用细胞融合技术的成果更为突出。橄榄色无孢小单孢菌细胞融合株抗生素产率比原菌株提高 100 倍。日本用产链霉素的灰色链霉菌和产以太霉素的链霉菌种间细胞融合，产生新抗生素三下霉素。我国用产庆丰链霉素的庆丰链霉菌与产井岗霉素的吸水链霉菌细胞融合，产生了能抑制植物病原菌的新抗生素 RVA_{18} 。目前 DNA 重组技术已广泛用于红霉素、链霉素等 20 多种抗生素的育种工作，可以预见不久将来会有更多的由“工程菌”生产的新型抗生素问世。

令人不安的是许多细菌逐渐出现了抗药性，而且这种抗药性能转移给其他细菌。已经证实某些抗药性因子位于细菌内的质粒上，质粒可以在细菌之间转移，结果抗性菌日益增多，抗生素疗效就越来越低。为了对付细菌的抗药性，科学家对原有的抗生素进行了“整容手术”，经过改头换面的抗生素，细菌因再无识别能力，而被抗生素抑制或杀死了。这种“整容”所必需的手术刀，就是酰化酶，现在已能使用克隆了酰化酶基因的“工程菌”（大肠杆菌）高效率的生产“整容”后的抗生素（半合成抗生素）了。临床现在使用的贵重特效药物先锋霉素（头孢菌素类）、氨苄青霉素，就是这类半合成抗生素类药物。国外经过“整容”手术，已有几十种这类药物在实验室研制成功。

(2) 维生素 目前用发酵法生产的维生素有维生素 C、B₂、B₁₂、生物素、-胡萝卜素等。这些维生素，世界需求量很大，而且每年销售量仍在以 10% 的速度递增。基因工程技术的应用，可使维生素生产工艺发生根本性的变革。就以维生素 C 生产来说吧！不论是用化学合成法，或是“二步发酵法”，都需消耗大量能源。现已从自然界中找到两种微生物（草生欧文氏菌和棒状杆菌），它们像接力赛运动员一样各自承担了一段转化任务（图 4-2）。能

不能将两个菌完成的任务转交给一个菌来完成呢？科学家们把棒状杆菌的 2.5-DKG 还原酶（2.5-二酮基-D-葡萄糖酸还原酶）基因克隆到草生欧文氏菌中，结果构建成的“工程菌”一步发酵直接由 D-葡萄糖转化成维生素 C 前体 2-KLG（2-酮基-L-古龙酸），再经酸或碱催化生成维生素 C。此项研究已在实验室获得成功。彻底革除了高压加氢反应，大大降低了能耗。这种把一种细菌关键酶的基因插入到另一种细菌的基因组中，由两条代谢途径人工拼接出一条新的代谢途径的技术，称为代谢途径工程。这是生物工程技术发展的另一次飞跃，可以相信一定会有更多的人工拼接的新代谢途径出现，合成已知或未知的新药物。

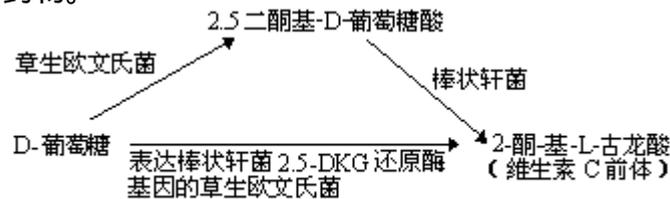


图4-2 “工程菌”生产维生素C

(3)其他生物技术药品 近年来，继续从自然界发掘微生物资源和构建新的“工程菌”，不断提供新的优良药物方面已取得一些成绩。如一种终止癌细胞增殖，并使癌细胞转化为正常细胞的新抗生物质（酪氨酸衍生物），可由千叶链霉菌发酵产生。过去一直从公鸡冠组织中提取的、价格昂贵的透明质酸，现在可由兽瘟链球菌发酵获得。它可用于角膜和眼球晶体的移植，刺激免疫系统治疗癌症，又可作为皮肤保湿、去皱纹化妆品的原料。溶菌酶有抗炎作用，是感冒药的一种成分，过去一直从鸡蛋清中提取，往往对人使用有副作用，现在生产人体溶菌酶的“工程菌”（酵母菌）已克隆成功。防止血栓形成，治疗静脉栓塞的特效药尿激酶，过去一直从人尿中提取，现在用“工程菌”生产的活化酶（组织血纤维蛋白溶酶原活化剂），不仅疗效扩大，且药物成本大大下降。事实证明，生物技术药品的开发和应用具有十分广阔的前景。

2. 食品工业

目前，全世界人口总数约 50 亿，到 2000 年可能上升到 62 亿，粮食及其他食品需求量比现在将提高 40%。在可耕地面积日益减少、人口年年增加的今天，微生物工程也是为人类提供食品、改善营养的重要途径。

(1)微生物蛋白 微生物发酵生产的蛋白质，有的可直接供人食用，有的可做家畜、家禽饲料，增加人们肉食供应。温饱问题解决之后，改善营养成了人们普遍关注的问题。最近国外上市的真菌蛋白（禾杀镰刀菌），就深受消费者欢迎。其蛋白含量占 44%，比牛排瘦肉蛋白含量虽少 33%，但脂肪含量只及牛排含量 10%，而且没有胆固醇。微生物菌体除含蛋白质外，还含有核酸、脂肪和碳水化合物等成分，其中只有核酸不被人完全分解，若不限数量长期食用，就会引起痛风症。科学家们通过基因工程技术，巧妙的设计了分泌蛋白质的微生物，由“工程菌”（大肠杆菌和酵母菌）发酵生产高营养强化蛋氨酸的大豆球朊和鸡卵清蛋白研制成功了。不再受动植物来源限制和季节气候的影响，单靠微生物就能高效快速地生产出动植物的纯蛋白。

氢细菌可以利用自然界中取之不尽、用之不竭的氢气、CO₂、和少量无机盐来生长繁殖。于是人们利用水解中的氢气和空气中的 CO₂，代替粮食发酵，由氢细菌生产单细胞蛋白。美国正在研究用氢细菌解决宇宙飞船和宇宙空间

站中维持生命的氧-食物循环问题（图 4-3）。

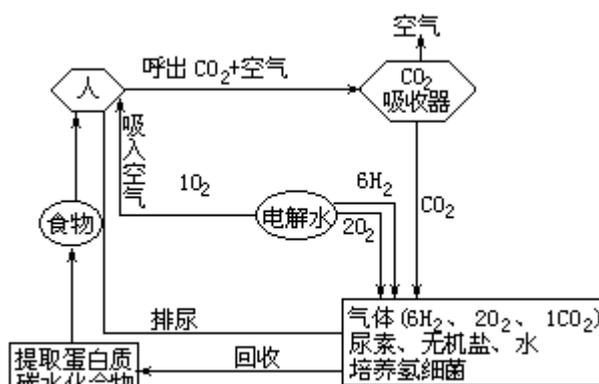


图 4-3 氢细菌培养维持生命的氧-食物循环

(2)氨基酸 氨基酸可用作食品、饲料添加剂和药物。过去都采用动植物蛋白提取和化学合成法生产，现 18 种氨基酸均可采用发酵法和酶法生产，不仅成本下降、污染减少，还可组织大量生产，世界产量每年递增 5%~10%。在氨基酸产生菌选育中，过去多采用诱变育种方法，诱变结果不易控制，现采用基因工程和细胞融合技术，产量可成倍、甚至几十倍增加，生产成本大大下降。如用基因重组构建的苏氨酸、色氨酸“工程菌”，比原始菌株提高产量几十倍（产酸达 50~60 克/升），色氨酸成本从每公斤 50 美元降到 23 美元。用细胞融合构建的精氨酸融合株，精氨酸产量达 108 克/升，比其他生产菌株高 2 倍多。

(3)新糖原 我国食糖产量供不应求，除自甘蔗、甜菜中提取蔗糖外，每年尚需大量进口。其实，以淀粉为原料可通过酶法生产甜度与蔗糖相当的果葡萄糖浆，当然也可由此进一步制取果糖。国外已形成产业，国内正在兴起，可能对糖缺乏状况有所缓解。另据报道，美国将吡喃环糖氧化酶固定在载体上，并与化学催化法相结合，获得纯果糖同时，还可得到环氧乙烷、环氧丙烷副产物，它们是制的确凉、双氧树脂和合成洗涤剂的原料。一举多得，既获得糖，又生产了纺织、轻工、化工产品（图 4-4）。

图 4-4 果糖的酶法生产

为了满足肥胖症、肝肾疾患以及糖尿病人低糖食品要求，微生物发酵生产的新型强力甜味剂在迅速发展，它们甜度高、低热卡，代替砂糖有广阔市场。如天冬精（门冬酰苯丙氨酸甲酯）甜味是砂糖的 2400 倍，糖精的 12 倍；氯化砂糖甜味是砂糖的 600 倍，安全无毒，都可用酶法或发酵法生产，国外已有商品问市。此外，还研制开发了许多代替砂糖的低热卡甜味剂（如山梨糖醇、木糖醇、赤藓糖等），它们在食品、药品、化妆品、化学工业中有广泛用途。目前，这些低热卡甜味剂采用高温、高压、氢化工艺生产，据报道国内外均已找到一些酵母菌，可在常温、常压、正常通气条件下获得。某些植物含有天然蛋白质甜味剂，若将甜味剂基因从植物转移到微生物，就可发酵大量生产。采用基因工程方法，国外已构建成生产天然蛋白甜味剂 Thaumatin 的菌株，其甜度是砂糖的 3000 倍，其他甜味剂有关基因工程研究正在积极进行。

(4) 饮料酒类 我国一直沿用混合菌株传统酿造发酵技术(霉菌、酵母菌、细菌多菌株自然接种混合发酵),产品具有特殊香型风味——酒香、酱香、醋香,闻名全球。近年来已分离出己酸菌和甲烷菌,并发现它们在酿酒香型风味中的作用。例如,已构建出“人工老窖”,酿造出近似沪香酒的名酒,为提高产品产量和成品味感上,开创了新局面。利用生物工程技术改革旧工艺,也已取得明显效果。国外采用真空发酵和减压蒸馏技术,酒精生产能力提高三四十倍。令人感兴趣的是,在生物反应器中把酵母吸附于不动载体上,缓缓流入麦芽汁,源源不断酿造出啤酒,发酵时间缩短到1天,甚至90分钟。生物反应器中的酵母菌连续发酵3个月活力不降低,为制造“生物啤酒”,开创了新途径。

(5) 其他食品添加剂 微生物发酵生产的柠檬酸、乳酸、苹果酸等多种有机酸,是饮料中不可缺少的酸味剂。近年米,国内外又发现一种不饱和脂肪酸—— γ -亚麻酸,具有防癌、防病毒感染、防皮肤老化等功效,是理想的保健品、化妆品添加剂。 γ -亚麻酸过去从月见草(俗名夜来香)种子榨取,现可由毛霉等真菌发酵生产,成本降低,价格由325美元/公斤降至6.5美元/公斤。另外,为了保障人类健康,免受致癌物等伤害,发酵法生产的天然色素、天然新型香味剂,正在逐步取代人工合成的色素和香精,这也是现今食品添加剂研究的一个方向。

3. 能源工业

能源紧张,是当今世界各国都面临的一大难题,石油危机之后,人们更加认识到地球上的石油、煤碳、天然气等石化燃料终将枯竭,而有些微生物则能开发再生性能源和新能源(图4-5)。

图4-5 微生物与能源工业

(1) “绿色能源”的再生 太阳能是重要的能量来源,但我们对太阳能的利用是微乎其微的。地球上贮存太阳能的只有绿色植物和光合微生物,但它们贮存的能量也只是照射到地球上的太阳能的0.05%。若这些能量全部利用,相当于现在世界能源消耗量的10倍,能源紧张问题也就大大缓解了。目前我们把绿色植物的秸秆直接当作燃料使用,实际上是把绝大部分能量白白浪费掉了。通过微生物发酵或固相化细胞或酶的技术,可将绿色植物秸秆、木屑、工农业生产中的纤维素、半纤维素、木质素等废弃物转化为液体和气体燃料(酒精和沼气)。巴西等国已成功地把酒精(又称绿色气油)作为汽车燃料,许多国家也已建立了各种沼气发酵厂,提供工农业的能源。但是,目前还不能由一种酵母菌把纤维质原料直接发酵成酒精(酵母菌只能由糖发酵成酒精),需经过复杂的预处理和多种霉菌活动。这样由纤维质原料酿造酒精的成本就昂贵了。近年来,不仅选育出了降解纤维素、半纤维素、木糖(纤维素主要成分,占生物质量的20%~30%)为单糖的霉菌,而且还构建了含纤维素酶、木糖异构酶基因的“工程菌”(酵母菌),估计由酵母菌将纤维素一步发酵制取酒精的日子为期不远了。

(2) 采油微生物 运用以往采油技术,油层经一二次采油后,仍有50%残留在岩石空隙间的深层粘滞性原油难以开采。向油层注入细菌或其产物(生物聚合物、表面活性剂等),可以加大油层压力,降低原油粘度,从“枯竭”的油田中再多采油20%~30%,使石油“死井”再度生辉。现各国均在大规模

模现场试验，已取得满意结果。

(3)产氢微生物 氢燃烧后除产生大量能量外，产物就是水，所以它是最理想、最清洁的一种新能源。目前石油和化工工业所用的氢气，是从石油热裂解制取的，能耗大，并产生大量 CO_2 。生物产氢极有发展前途。目前攻关的重点，是大量培养藻类光合作用放氢和大量培养光合细菌产氢。有些海洋光合细菌（如红假单胞菌等）产氢率比其他类型的微生物都高，每克菌体每小时最大获得 260 毫升氢气，而且还能利用玉米、马铃薯、木薯直接发酵放氢，甚至能将制糖厂、造纸厂、乳品厂废液直接发酵放氢。国外已有从“藻类农场”获取氢能和自光合细菌工厂每天生产 10 吨液态氢气的报道，也有将液态氢气作为飞机燃料试用飞行的记录。实验室中采用固定化光合微生物产氢已经成功。

(4)产石油微生物 从化石研究中发现一种丛粒藻在石油矿藏形成过程中起过巨大作用，于是人们设想用藻类制取石油。目前通过藻类和细菌将 CO_2 转变为石油的研究，已出现可喜的苗头。培养单胞藻或绿藻而获得的石油，可占细胞干重的 35% ~ 50%（石油积蓄在细胞间隙，理论值应为 70% ~ 80%），合成的油与重油相同，加工后可转变为汽油、煤油和其他产品。有的国家已建立培植单胞藻的农场，每年每公顷地培植的单胞藻按 35% 干物质为碳氢化合物（石油）计算，可得 60 吨石油燃料。此项技术应用，还可消除因石油排放 CO_2 造成的温室效应。据统计，仅日本每年石油排放的 CO_2 就有 5 亿吨，若让单胞藻全部吸收 CO_2 ，就能获得 2 亿千升汽油，相当于日本一年石油的进口量。除单胞藻、绿藻生产石油燃料外，最近报道从地下盐水层中分离出两种细菌（全红色的红色细菌和透明状晶状细菌），它们能吸收 CO_2 ，并将其转变成液态碳氢化合物（石油），有可能用于细菌合成石油的开发。

(5)微生物电池 利用微生物的代谢产物（氢气、甲酸或氨等）作为电极活性物质，通过阳极、阴极电子流动从而获取电能的装置，叫做微生物电池。其中日本科学家设计的生化燃料电池最为理想。他们把氢气产生菌（丁基梭菌）固定在阳极，阴极为炭极（由蚁酸氧化空气中的氧），这样就构成了氢-氧（空气）型微生物电池。既能处理糖蜜发酵酒精的废液，又能产生电流，提供能源。美国科学家利用细菌发酵 100 摩椰子汁产生的甲酸为活性物质，做成的微生物电池可使半导体收音机连续播收 50 多个小时。美国宇航局用一种芽孢杆菌处理宇航员排泄的尿，使尿酸分解成尿素，再经尿素酶作用分解成氨和 CO_2 ，氨在阳极产生电极反应，生成电流。据报道以氨为活性物质制成的微生物电池，若每位宇航员每天排尿 22 克计算，可获 47 瓦特电能。将来必定有一天微生物电池会为人类提供能量、带动马达飞转。

4. 化学工业

传统的化工生产需要耐热、耐压和耐腐蚀的材料，而微生物技术的发展，不仅可制造其他方法难以生产或价值高的稀有产品，而且有可能改革化学工业面貌，创建省能源，少污染的新工艺。有人估计到 2000 年将有 50% 的化工产品，可由微生物发酵生产。

(1)生物塑料 目前已有近 4 万种合成塑料制品，旧塑料因不能被生物降解，而造成公害。例如，残留田间破碎的农用塑料薄膜，它们形成了阻隔层，影响通风透气，阻碍根系发育和对营养和水分的吸收，可使农业减产 10% ~ 50%。有的国家甚至规定自 1992 年起禁止使用塑料薄膜。可见研制可降解性

生物塑料，已是迫在眉睫的任务。微生物工程为解决这一难题提供了途径。科学家经过选育和基因重组构建了“工程菌”，已获得积累聚酯塑料占菌体重量 70%~80% 的菌株。目前已建厂并有商品问市的主要生物塑料是聚羟基丁酸酯（简称 PHB，商品名 Biopol）和合成生物降解塑料（商品名 BioD）。对人畜无害的 PHB，主要由真养产碱杆菌利用碳水化合物、CO₂、H₂ 发酵产生；也可由“工程菌”（甲基养嗜甲基菌）发酵甲醇产生。这种塑料制品埋在土中 6 周可完全降解，而普通塑料制品竟需 200~300 年。BioD 是由聚乙烯、氧化剂、催化剂和 6% 淀粉配制而成的。设计者的巧妙之处在于：废弃塑料埋入土壤后，微生物首先将淀粉颗粒组分分解，将塑料裂解成碎片碎屑，最终分解为无毒的 CO₂ 和水，完全降解需 2~3 年。据估计，生物塑料全世界年消耗量到 1995 年将达 1 亿吨。近年来，人们运用基因工程手段，已研制出性能更佳生物塑料。例如，将真养产碱杆菌合成 PHB 基因克隆到大肠杆菌后，不仅合成的 PHB 产量增加，而且可以制成强度更大的塑料薄膜和更硬的挤压型塑料。为了简化提取工艺，增加产品收率，美、澳科学家正在协作，将真养产碱杆菌 PHB 基因与促使细菌破裂的“爆炸基因”（实际是专门裂解细菌的噬菌体基因）同时插入大肠杆菌基因组。构建的“工程菌”发酵产生 PHB 后，不需再经繁琐的提取工艺，只要稍微加热对“爆炸基因”激活一下，PHB 就可源源不断自菌体流出。用此法生产合成纤维也大有希望。现在，我们可以毫不夸张地说：凡使用化学塑料的地方，都可用生物降解塑料替代；无论是坚硬的大件塑料制品，还是弹性强的纺织用品、电子器件中的压电材料，或是外科手术中伤口缝合线、固定损伤的骨骼等，微生物制成的生物塑料都可代替。

(2) 化工原料 微生物发酵生产的化工原料除乙醇、丙酮、丁醇等传统产品外，现今又发展了很多。例如，常规化学合成法制造尼龙、香料的原料癸二酸和石油开采上使用的絮凝剂原料丙烯酰胺，由石油发酵获取的化工产品粘康酸（是昂贵的电子材料）、衣康酸（是合成树脂、纤维、塑料、橡胶等制品的重要原料）、长链二羧酸（是制造耐寒增塑剂、工程塑料、树脂、尼龙的重要原料），由碳水化合物发酵获取的 2,3-丁二醇（是合成橡胶原料）等，均已在生产中应用。

目前由化学合成法制造的乙烯，是合成化纤、纯涤纶的聚酯纤维原料，大有代替棉花之势。引起人们兴趣的是已发现某些微生物有合成乙烯的能力。有的国家还以乙烯或丙烯为原料，通过固相酶的技术，把乙烯氧化成环氧乙烷，丙烯氧化成环氧丙烷，再由它们制造的确良、环氧树脂、合成洗涤剂。据统计，用这种方法生产的投资额将是化学合成法的一半，无疑它对企业家具有巨大的吸引力。

(3) 其他产品

生物表面活性剂 主要是微生物细胞表面的糖脂和胞外聚合物，因为可使油脂变性，所以有乳化、润湿、去污等多种功能。令人欣慰的是生物表面活性剂可被微生物降解，无二次污染，虽目前仍处中试阶段，预计会有各种潜在应用价值。

生物凝集剂 主要指由微生物发酵制取的高分子凝集剂，是含氨基糖和蛋白质的复合物，对各种细菌、酵母、藻类或某些工业废水，均有较好凝集效果。

生物制浆 这是一项很有希望的技术。现找到一株白色腐朽菌，常温常

压下可分解 80% 的木质素。制取的纸浆可生产优质纸，省去高温蒸煮，节约能源，节约原料 1/6，纸浆成本可降低 50%。

5. 冶金工业

大自然赐予人类的财富，并不都那么慷慨，虽然矿藏蕴量丰富，但大多数矿床品位太低，随着现代工业的发展，高品位富矿也不断耗尽。面对数以万吨计的废矿渣、贫矿、尾矿、废矿，采用一般选、浮矿法无能为力，唯有细菌冶金给我们带来了新的希望。细菌冶金是指利用微生物及其代谢产物作为浸矿剂，喷淋在堆放的矿石上，浸矿剂溶解矿石中的有效成分，最后从收集的浸取液中分离、浓缩和提纯有用的金属。堆浸的矿石不要求粉碎，只需提供一个简陋的堆放矿石的浸取池，故又称为湿法冶金技术。可浸提包括金、银、铜、铀、锰、钼、锌、钴、镍、钡、钨等 10 余种贵重和稀有金属，特别是黄金、铜、铀的开采（图 4-6）。

图 4 - 6 细菌采矿

(1) 黄金资源开发 黄金的贮量和产量水平，是一个国家经济实力的重要标志。全球几乎处处有黄金，但含量非常低微，平均每吨地壳物质含有 0.002836 克黄金。化学提炼法每吨矿石含金量不低于 1~3 克才有开采价值，而细菌冶金则不然，所以微生物技术应用于黄金资源的开发占有重要地位。我们知道，全世界 30% 以上的黄金矿藏是含有硫、砷矿化物的金矿，不溶于水，难于浸提。依赖某些细菌（如氧化亚铁硫杆菌等）的氧化作用，可从金矿石中除去硫、砷，浸提黄金。据报道，加拿大建有日处理 100 吨含金矿石的工厂，用此法几乎能得到 100% 黄金，而用化学法提取量不到 70%。法国一家工厂四个实验室采用硫杆菌处理 100 公斤含金矿石，就获得 3 克黄金。除利用微生物氧化、浸出获取黄金外，某些微生物还有聚集和吸附黄金的能力。我国科学家们已分离到一些微生物有强烈聚金能力，一般聚金达 50%~60%，最高聚金力达 80%~90% 以上。这些微生物能将金矿溶液中的黄金微粒吸附在细胞表面或体表胶体中，而后将可溶性金粒吸收进细胞内，形成金结晶核，有的甚至将细胞膜胀破，游离出细胞外。这些游离的金结晶核，不断增生、扩大、相互连接，继而在溶液中形成一定形状、大小肉眼可见的砂金，最后形成大型块金沉淀。这项研究成果，不仅在研究黄金形成上具有理论意义，也有实用价值。目前，已有通过增殖的含金微生物在硫化精矿中聚集、吸收和蓄积黄金微粒的报道。

微生物不仅在黄金开采上，在黄金矿床的探找上也显示了巨大魅力。某些芽孢杆菌（如蜡样芽孢杆菌）对黄金有特殊的敏感性和结合力，这种细菌有灵敏的“嗅觉”，能嗅出黄金的气味。人们可根据这类细菌的分布、增殖数量、细菌与金发生的特殊颜色反应等，作为探测黄金的指标。使用这种以电位变化来检测是否有黄金存在的新型简易微生物探针，2 小时就可在野外实地完成检测任务，不需将笨重的矿石标本运回实验室。目前出售的探测黄金的微生物探针，只能标示金矿的潜在储量，还不能准确标示金矿含金品位，相信经过进一步改善，这是不难达到的。

(2) 其他金属浸提 从矿石和矿渣中溶浸有色金属虽有 10 余种，但大规模或批量生产的只有铜和铀。据世界 20 个矿山资料表明，每年细菌浸铜就达 20 多万吨。我国是细菌浸铜的发源地，也有大规模的生产，美国细菌浸铜占

铜产量 10%。铀是开发核能的原料，已发现某些微生物有积蓄铀的惊人能力，1 克绿藻能析出铀 159 毫克，1 克细菌可析出铀 313 毫克，如反硝化细菌吸收铀每克干重细胞为 100~150 毫克。铜绿假单胞菌析出铀的本领最强，每克干重细胞为 560 毫克，竟占 50%。法国铀产量的 7.3%就是由此法获得的。

一些霉菌、酵母菌从矿石溶液中提取钨、钼等稀有金属也有突出本领，效率均高于现通用的离子交换树脂法。用酵母菌细胞经四个回合吸附，钨提取率可达 98.8%；一种少根根霉提取钼的本领最高，它将高效吸附性和对金属亲和力集于一身，每克菌体能浸提 170 毫克钼。这些微生物作为一种“生物吸着剂”，在自然条件下可大显身手。某些嗜有机物的微生物，凭借它们分泌的有机酸（如柠檬酸、琥珀酸等），构成“活性炼矿剂”，与金属结合成可溶性化合物，最后分离、浓缩、纯化出金属，已在炼铜、炼银中应用。

湿法冶金关键在于选用的微生物对环境有高度适应力，且性能稳定。运用细胞融合、基因工程手段，构建出同时具有多功能（如硫氧化功能和铁氧化功能）或多重耐性（如对酸、对重金属离子、对铀的耐性）的“工程菌”，使我们从大自然的赐予中能够获取更多的财富！

6. 农业

在人口剧增、耕地面积日益缩小的今天，要解决人们的口粮问题，首先是提高耕地单位面积产量。而应用生物工程技术，选育出抗逆性工程植物、实现生物固氮、制造新型生物杀虫剂等，都将为农业增产作出重要贡献。有关转基因植物、转基因动物等方面成果，已在“基因工程”章中叙述。此处仅就生物固氮、生物杀虫剂、微生物饲料作一介绍。

(1)生物固氮 虽然空气中约含有 4/5 的氮气，但作物生长和增产仍需施加大量氮肥，因为氮素必须与氢、碳或氧等元素固定或结合成氨、尿素、硝酸盐后，才能被植物吸收和利用。有机肥料、化肥、微生物菌肥是作物的主要肥料，但有机肥料迟效，生产化肥能耗大、价格高、污染重，只占全世界氮肥供应量的 20%，剩下绝大部分都是由微生物提供的。自然界中独立生活的自生固氮菌和专门与豆科植物共生的根瘤菌，都能将大气中的氮还原为植物可利用的氨。其中尤以根瘤菌肥料为人们推广最早，效果最为显著。据统计，每亩豆科植物的根瘤菌能固氮 10 公斤，相当于 50 公斤硫酸铵，等于为植物提供一个天然小氮肥厂。豆科植物与根瘤菌共生的特殊本领能否传给其他农作物呢？科学家们设想将根瘤菌的固氮基因转移到各类等农作物中，但遇到了难以克服的障碍。首先，各种根瘤菌都只与它们各自相应的豆科植物形成根瘤。根瘤菌的这种专一性，对禾本科谷类作物的根没有缘分。第二，化学固氮耗能多，生物固氮同样要消耗大量 ATP（生物能量），而大多数非豆科作物又无法提供。第三，固氮作用的关键酶——固氮酶碰到氧气会迅速失活，根瘤菌有一个去氧保护系统，而植物细胞不具备这个体系。着来实现粮食作物自身固氮目标，是一项较为长期的研究任务。近年来，经过各国科学家的努力，为实现农作物自身固氮的宏伟目标，又迈进了一大步。例如，中国大豆根瘤菌生长速度是美国的 3 倍，属快生型根瘤菌，这种快速生长性状转入美国大豆根瘤菌内，构建的“工程菌”生长快，在美国大豆生产上，仅根瘤菌每年就提供了 10 亿美元的氮肥。固氮基因从微生物直接转给植物失败了，科学家又想出通过“媒人”使豆科植物的根瘤菌与禾本科农作物的根交上朋友。一项较有成效的结果是：把固氮菌基因转移到能在水稻根部土壤中繁殖的微生物中（“媒人”），借助这位“媒人”的固氮能力，提供水稻

需氮量的 1/5。我国在固氮微生物研究上，也取得不少成果。为使禾本科农作物结瘤，采用 2,4-D 植物激素诱导小麦幼根，或采用纤维素酶和聚乙烯醇处理水稻、油菜幼苗的根尖细胞，与此同时接种根瘤菌，结果小麦、水稻、油菜结出与豆科植物十分相似的根瘤，培育出形成根瘤、并有固氮能力的小麦、水稻。可惜的是这种结瘤性状有致命的弱点，它们不能遗传，每年幼苗栽培前需再作处理，但为根瘤菌促进非豆科植物结瘤方面，探索了一条可行的途径。

(2)工程杀虫菌 生物农药无毒，害虫不易产生抗药性，在病虫害防治中正在发挥巨大作用。能使昆虫染病、致死的微生物有细菌、真菌、病毒、原生动物等。其中细菌有 90 余种，目前大量生产、广泛应用的细菌杀虫剂是苏芸金杆菌杀虫毒素(简称 Bt)。最近报道又获得一株芽孢杆菌毒素(简称 Bm)，它的一个有趣特性是对鳞翅目昆虫无毒，却对家蝇、青蝇、苍蝇幼虫蛆有显著毒效。Bm 和 Bt 制剂一样，对人、畜、作物安全无害。能使昆虫染病的真菌有 530 余种，目前大量应用的真菌杀虫剂是白僵菌、绿僵菌等。能使昆虫和螨类感染的病毒近 900 种，病毒杀虫剂杀虫效力高，对象专一，是极有前途的微生物杀虫剂，但遗憾的是培养病毒需捉来大量活昆虫，大量生产有困难。如果能将感染昆虫的病毒基因重组构建成“工程菌”，病毒杀虫剂将重显威风。其实，基因重组技术在构建更有效的广谱杀虫剂上，业已取得不少可喜成果。例如，苏芸金杆菌蛋白毒素基因插入常在玉米、大豆根表聚集的荧光假单胞菌中，构成的“工程菌”不仅杀灭地上的害虫，也是地下害虫的劲敌。又如，将苏芸金杆菌中编码杀蚊虫的毒蛋白基因，组入孪生子滋生环境中的蓝细菌中，这种“工程菌”漂浮在死水面上，蚊虫幼虫吃后立即死亡。值得提醒的是有时杀虫毒素还未及喷洒至大田，就被雨水冲走或迅速分解掉了。科学家们又巧妙地设计将苏芸金杆菌毒蛋白基因转入植物(烟草、番茄)，获得有很强杀虫作用的工程植株。植物一旦自身产生了防疫力，就不再需要喷洒杀虫药物了。除了上述“以菌治虫”种种方法外，“以菌除草”、“以菌防病”(农用抗生素)等微生物农药也为农业增产发挥了巨大作用。

(3)微生物饲料 随着畜牧业的发展，蛋白饲料要求十分迫切。微生物菌体蛋白质占干重的 45%~55%，以微生物方法生产的单细胞蛋白(简称 SCP)是食品和饲料的重要来源。传统的产品有：纤维蛋白、石油蛋白和光合蛋白。其中尤以选用纤维废物为原料生产的 SCP 为最好的资源。石油蛋白生产过程粉尘污染，尚待解决严格预防措施，光合蛋白目前生产效率还不高。

藻类是自然界分布极广的一大群自养微生物资源，许多国家已把它用作人类保健食品和饲料。培养螺旋藻，按干重计算每公顷可收获 60 吨，而种植大豆每公顷才可获 4 吨，从蛋白产率看，螺旋藻是大豆的 28 倍；培养珊列藻，从蛋白产率计算，每公顷珊列藻所得蛋白是小麦的 20~35 倍。

我国目前每年用于饲料粮食约 6500 万吨，其中 80%直接饲养，其饲料报酬比配合饲料低 1/3 左右，等于每年多消耗饲料粮 1800 万吨。因此，开发微生物饲料，是发展畜牧业的一项关键措施。

7. 环境保护

随着现代农业和石油、化工等现代工业的发展，开发了一大批天然及合成有机高分子化合物。农业上使用的各种农药和各种石油化工产品、炸药、塑料、染料等工业废水，排放环境，都会带来严重污染。已发现有致癌作用的污染物约为 1100 种，我国某些灌区土壤和污水中芳烃化合物的污染也相当

严重，其中致癌作用最强烈的苯并(a)芘每公斤土竟高达 540 微克，而排放标准为 20 微克，此外，工业中每天还排放大量 CO_2 、CO、硫化物等有害气体，它们是造成温室效应和形成酸雨的重要因素，严重威胁人类健康。环境污染已是当今社会的一大公害。但是，小小的微生物细胞却对污染物有着惊人的降解能力，成为污染控制研究中最活跃的领域。

(1) 净化有毒和高分子化合物 过去一直公认难被生物降解的 100 多种人工合成污染物，也可被微生物降解和转化。例如，某些假单胞菌、无色杆菌有清除氰、腈剧毒化合物的功能；某些产碱杆菌、无色杆菌、短芽孢杆菌有对联苯类致癌化合物的降解能力。烈性炸药 RDX（三次甲基三硝胺），纺织业废水中的偶氮染料，农药中的 DDT、PCB（聚氯联苯），除草剂氯磺隆、甲磺隆、丁草胺，塑料中的尼龙 666（聚酰胺类）、聚乙烯醇、聚乙二醇，甚至废轮胎、辐射污染过的橡胶制品，均已分离到降解它们的微生物。不少污染物的微生物降解能力，已达到工业化生产水平。有的国家将几种降解力强的微生物混合一起，制成生物降解剂出售。用高压喷洒细菌降解剂到石油严重污染的土壤，4 个月后总污染水平下降 65%；其中苯和甲苯下降 73%；多环芳烃下降 86%。值得注意的是环境中排放的污染物往往是混杂的，因此，研究工作已发展到构建具有多种特殊功能高效降解力的“工程菌”上。例如，采用基因重组技术，将两种菌的降解基因同时组入大肠杆菌，构建后的“工程菌”可将致癌作用强的三种卤素化合物 DDT、PCB 和甲基氯苯分解为 CO_2 和水，是较理想的分解卤素化合物的环境净化菌。虽然“工程菌”在污染降解方面的研究仍处实验室阶段，但也让我们看到了美好的应用前景。

(2) 海上浮油的降解 某些微生物制剂能吃掉水上的浮油，在净化海洋石油污染方面，显出惊人效果。据美国报道，使用由 50 株嗜烃细菌和某些生长因子制成的细菌制剂，处理 1800 加仑污染石油的水面，24 小时后 90% 的石油被细菌分解掉了。法国生产的清除石油的“降解剂”，除含某些假单胞菌和酵母菌外，还添加了适量营养盐和油层分散剂，处理泄漏在海上的浮油，一个月内 60%~80% 的石油烃被降解得无影无踪，2~9 个月后浮油完全消失。降解石油的基因多数位于细菌内的质粒上，为了选育多功能的石油降解菌，美国科学家采用连续杂交的方法，将降解石油不同组分的几个质粒，转移到一株降解脂肪烃的假单胞菌中。由于不同质粒上携带了降解石油不同组分的基因，这样构建的新菌株就有了降解原油多种组分的功能。人们称它们为“超级微生物”。在自然生态环境中喷淋这种“超级微生物”菌剂，能在几小时内把原油中 60% 烃消耗掉，而野生型未经遗传改造的菌株，消耗掉同样多的浮油需一年以上。采用此法净化海面浮油，只有现在净化法价格的 1/10。这些降解海面浮油的微生物，也能清除废弃油井中的粘质原油。

(3) 有毒气体和恶臭物质的清除 主要工作集中在 CH_4 （甲烷）、CO（一氧化碳）和硫磺类恶臭物质的清除上。人们知道，煤矿发生的瓦斯爆炸就是甲烷引起的，而煤气中毒是因空气中充满 CO。我们在煤矿开采中使用高效甲烷菌制剂，可以清除瓦斯（将甲烷氧化分解）。据报道，在 99% 瓦斯环境中，一周内可清除 97% 的甲烷，为防止瓦斯爆炸取得良好效果。有的国家还利用甲烷氧化菌生产胞外多糖或单细胞蛋白，利用 CO 氧化菌发酵丁酸或生产单细胞蛋白，不仅消除或降低了有毒气体，还从菌体中开发了有价值的产品。日本科学家找到一株硫杆菌，对硫磺类恶臭物质分解效率极高，760ppm 的硫化

甲基 1 分钟内就被完全分解。

(4)有机废水、废渣综合利用 工业三废、生活垃圾及废水，农业废弃物等，虽然大多数没有毒性，但是堆积造成腐烂，排入水体有机物分解，都会严重污染环境。许多国家将这些有机废物进行微生物转化或发酵生产有价值的产品。例如，造纸废水生产甾类激素，制造尼龙废水生产塑料原料（多聚-羟基丁酸），甘薯废渣生产四环素，味精废液生产单细胞蛋白，啤酒糟生产洗涤剂用的淀粉酶、蛋白酶、……不胜枚举。最引人注目的是日本用农业大量废弃物麦麸，生产烷基低聚糖，据说它对艾滋病有较好的抑制效果。生物技术应用用于有机废弃物资源的开发，既保护环境，又获取新产品，真是一举两得。

(5)危险废弃物处理 我们知道，一些重金属如铬、镉、铅、汞、硒等和核废弃物中的放射性物质，能使人中毒、染病、甚至死亡。对付危险废弃物多采用物理或化学方法，这种办法不仅成本过高，而且容易造成二次污染。近年来，各国都发现了一些解毒的微生物。它们将重金属吸附在自己细胞表面或吸入细胞体内，细胞凝集沉淀排出水体，细菌把有毒的重金属还原成无毒的金属化合物。有些细菌能把废水中核废弃物内的放射性铀、钚等还原成固体排出水体，有的霉菌固定化细胞能吸附核废料中的铀。这样，不仅有可能用来处理含有核废料的垃圾，还可防止河流、湖泊或地下水中核废弃物的污染蔓延。

将降解能力强的微生物或微生物产生的酶固定在载体上，保持其降解污染物的功能，结果细胞密度增加、降解效率增强，被称为新型废水处理剂或絮凝剂。人们并没有就此满足，又设计了将分解不同污染物的微生物分别固相化后置入生物反应器中，反应器内的细菌各显神通，吞食废水中各类污染物。事实证明：微生物是人类净化大气、消除污染、保护环境最得力的助手。

8. 特异微生物

我们常听说，有的人闭上眼睛只凭耳朵就能认字，有的人靠双眼就能准确道出患者体内的病灶。人们称这种“绝招”为“特异功能”。微生物有没有“特异功能”？有！在微生物世界中，确有许多诱人之谜待我们去探索，有许多宝贵的资源待我们去发掘。

(1)向磁微生物 1975 年，美国科学家伯莱克莫尔在显微镜下观察取自海泥的一种只有一微米宽、身上延伸出两组鞭毛的小螺菌时，发现了异乎寻常的现象，小螺菌不像其他细菌那样东西南北乱窜，而是像长跑运动员一样，朝一个目标直线前进。是因为细菌有趋光性，朝有光的地方跑吗？移到暗室中观察，依然如故。科学家成功的秘诀之一是对偶然发生的事件绝不轻易放过。经过各种试验，当他把一块磁铁放在附近时，奇迹发生了，小螺菌总向南极移动。原来地球就是一个大磁场，小螺菌当然向朝南的方向直线运动了。科学家把这种对磁场敏感的微生物称为“向磁微生物”。

小螺菌为什么会朝南方向移动呢？科学家们发现原来它们的细胞内有两条特异的长链，每条长链由 5~15 个排列整齐、大小均匀、类似立方体或平行六面体形状的磁微粒体组成。每个微粒体只有 500~1000 埃大小，它们的成分是 Fe_3O_4 （四氧化三铁）。小螺菌中铁含量极高，为干燥菌体的 3.8%，而一般大肠杆菌铁含量仅为 0.013%，比一般微生物铁含量高 100 倍。正是这些磁细菌体内的超微小磁粒，对细菌起了导航指南作用，它们都是单畴晶体，有超常磁性质。

装备现代化飞机、导弹和卫星，需要既轻又薄的微型磁部件。这种向磁细菌中的超微磁粒体，做成磁性记录材料，比现在使用的磁粉还要小，更均匀，真空度更高，不仅高磁能积提高数十倍，价格也便宜。因此，可望制成比现在更高清晰度、高真空水平的新型磁性材料。将这种超微磁粒体做为酶或其他吸附剂的载体，可用来清除和分离发酵液中细胞等杂质，既不需要消耗能量，又不需要复杂设备。这种磁分离技术，在我国已取得较理想的成绩。对癌症病灶的治疗方面，如果把酶或抗体固定在磁微粒体上制成一支“运载火箭”，再把药物制成“弹头”，然后将它们注入血液，药物进入血液循环；只要在人体病灶的“靶区”放上一块合适的磁石，药物便可直接轰击病灶，对其他正常细胞不再伤害，达到安全治疗的目的。日本学者在“火箭疗法”和大量培养磁细菌研制磁微粒体上已经作了很多工作。向磁微生物作为一种微生物资源在电子、化工、医疗卫生领域会有巨大潜力。

(2) 极端环境微生物 我们已经知道，在高盐、高温、高酸和高碱等极端环境中，分别生存着嗜盐菌、嗜热菌、嗜酸菌和嗜碱菌。为什么这些微生物有如此抗极端环境的功能呢？原来极端环境微生物为了适应环境得以生存，已逐步改变了自我，形成了新的独特结构和遗传基因。例如，嗜盐菌在细胞膜上镶嵌有紫色膜区，约占细胞膜的一半。紫色膜区中含有细菌视紫质分子，在光照下不仅将光能转换成化学能，还能不停地将盐分子排出细胞之外。你知道吗？就连在 pH2 或 pH12 环境中自由生长的嗜酸菌、嗜碱菌，它们细胞内的环境仍然维持 pH7 的中性状态，原来有些嗜酸菌有拒氢离子的本领，它们的细胞对 H_+ 透性小，有些嗜碱菌细胞膜上有反运转器，主动排出多余的氢氧根离子 (OH^-)。搞清这些极端环境微生物的细胞结构及适应机理，为开发利用它们带来了希望。

极端环境微生物也许是大自然留给人类最后的资源，近年来，颇受人们关注，并已逐步应用于生产实践。我国选育出在发酵工业中有广泛用途的 - 淀粉酶产生菌地衣芽孢杆菌，淀粉分解为糖的最适温度高达 95 摄氏度，用于生产既可免除噬菌体、杂菌污染，又可提高产量、节约能源、降低成本。丹麦和我国最新研制成功的低温型脂肪酶产生菌，在 15 摄氏度或 20 摄氏度就有较强的分解脂肪、血、奶等蛋白质污垢能力，大大增添了加酶洗涤剂的光彩，避免了热水洗涤的麻烦，又防止化纤织物变形。将光能转变为化学能的嗜盐细菌，与一般光合微生物、绿色植物的光合作用不同，不需要叶绿素参加，光化学反应结构简单。将这种结构取出加工，可制成光能转换器、光开关、改写型光盘，信息贮存器及非线性光学材料，为研制生物计算机、太阳能电池显示了诱人的前景。此外，模拟嗜盐菌的排盐功能，为海水淡化、盐碱地开发利用均有广阔前景。

浩瀚的大海是个万能的聚宝盆，生活在海洋中的微生物是其中的一部分。今后的生物工程研究，将向海洋、宇宙人类未涉足的领域扩展。海洋占地球面积 70%，有人说海洋能给人类提供的食物将会超过农业耕种面积的 1000 倍！我国海岸线很长，资源丰富，其潜在的应用价值还有待深入研究和开发。

第五章 生物化学工程

生物化学工程（简称生化工程）是由生物科学与化学工程相结合的交叉学科，主要研究将生物技术的实验室研究成果转化为生产力过程中的带有共性的工程技术问题，是生物技术的一个重要组成部分。

由于在实验室中获得的生物技术成果着重是在生物学和化学领域中获得突破，并证实其潜在应用价值；又因在实验室所采用的是小型以至微型的设备，物料处理量很小，因而很难不经过工艺和工程的开发而直接投入生产，也难以进行技术经济的评价。为此，在实验室研究获得成功后，必须继以工艺和工程的开发。生化工程这一交叉学科也就是为适应这种需要而诞生的。

一、生化工程的形成和发展

1. 生化工程的诞生

在生物技术尚处于懵懂时期，人们凭借实践中积累的经验，制作某些原始的发酵产品。在工业微生物的起始阶段，人们虽已懂得不同的发酵产品是由不同的微生物所形成的道理，但取得产品一般都属初级代谢产物，即产物的分子结构均较基质为简单。发酵一般为厌氧培养过程，加上对纯种培养的要求不高，因此采用一般的化学工程原理、方法和设备已能应付，尚不需解决更多的特殊的工程技术问题，也就是说，还不具备建立生化工程这一新学科的必要性和条件。

本世纪 40 年代初，第二次世界大战爆发。战争造成为数众多的伤员和受伤害的居民，医生们急需有一种比磺胺类药物更为有效而毒副作用更小的抗细菌感染的药物。于是人们对 1928 年由英国人弗莱明(Fleming)发现而在 1940 年由弗洛里(Florey)及钱恩(Chain)等所提取并经临床证实具有卓越疗效和低毒的青霉素抱有极大的希望。1941 年美国 and 英国合作，一方面在美国用表面培养法小规模生产青霉素，但纯度仅 20%左右，收率约 35%，而且花费极大的劳力和空间，因此当时的青霉素价格非常昂贵（每 10 万单位即 60mg 为 1 美元，而今国产青霉素每 40 万单位约为人民币 1 元）。另一方面，两国科学家与工程师通力合作，在 1943 年终于产生了崭新的青霉素浸渍培养工艺过程，加速产业化的进程，使青霉素的产量和质量大幅度提高，纯度为 60%，收率为 75%。

青霉素从实验室成果转向产业化的过程，同时酿成了新的交叉学科的建立。生化工程就是环绕青霉素及随后其他抗生素这新一代生物技术产品的投产过程中诞生的。

2. 生化工程的服务对象——生物生产过程

生物技术以其应用范围分类，约可分为工业生物技术、农业生物技术和医学生物技术三大方面。以生化工程而言，主要是为工业生物技术服务的。工业生物技术主要是指利用生物催化剂（游离或固定化的细胞或酶）将原料转化为产物（包括医药、化工、轻工、食品等产品）的生产过程——生物生产过程（Bioprocess）或用于环保和能源的过程。

生物生产过程一般可用图 5-1 表示。当过程采用游离的整体活微生物细胞时，一般称为发酵过程（特定情况下也称微生物培养或微生物转化过程等），而当生物催化剂为游离或固定化酶时，此过程则称酶（或酶促）反应过程。此外，尚有动植物细胞（组织）的培养过程和污水处理过程等。生物生产过程可分为三大部分。

(1)上游加工过程 主要包括两个方面。一是原材料的预处理，包括原材料的选择、必要的物理、化学加工，培养基或底物溶液（指用于酶反应过程中的反应物和必要的缓冲液）的配制和灭菌等。二是生物催化剂的制备。在发酵过程中，先应选择菌种，经多次扩大培养后接种至发酵罐。在酶反应过程中，若采用固定化酶或固定化细胞时，应事先通过合适的固定化技术将酶或细胞加以固定，并装入酶反应器。

图 5-1 生物生产过程示意图

(2)生化反应过程 这一工序是整个生产过程中的关键工序，它是在生物反应器中完成的。所谓生物反应器是指一个能为活细胞或酶提供适宜的反应环境条件，以达到细胞增长和产物形成为目的的设备。对发酵过程，一般采用釜式反应器（发酵罐），实行分批或流加一分批发酵；个别情况（菌种稳定性高、杂菌污染影响小）下，也有用多罐串联形式进行连续操作，对酶反应过程，可采用的反应器类型较多，可以根据反应特性决定是采用连续釜式还是连续管式反应器。至于动植物细胞培养用反应器一般都是间歇操作，在要求高密度培养时则可进行灌注培养，即连续注入新鲜培养基排出废液而将细胞留在罐内，反应条件对反应过程的影响是不言而喻的，为此应加强生化反应工程的研究、完善有关参数检测和控制系统的配置。

(3)下游加工过程 这一工序也称产物分离或提取精制工序，包括用适当的方法和手段将含量甚低的目标产物从反应滤液（指胞外产物）或细胞（指胞内产物）中进行初步的提取，并作进一步的精制使之达到最后产品的要求。用于提取、精制的手段很多，除了在化学工业中常用的单元操作外，尚有一些独特的分离纯化方法，如高压匀浆、冻溶、透析、絮凝、双水相萃取、电泳、亲和层析、免疫层析等。

生物生产过程还具有下列特点：由于生物催化剂易于失活，易受环境的影响和杂菌的污染，一般不能长时间使用，因此以分批方式生产为主。以采用可再生资源中的天然生物物质为主要初始原料，来源丰富，价格低廉，过程中的废物危害较小，但原料成分往往难以控制，给生产控制和产品质量带来一定困难和影响。与化学反应相比，生产设备较为简单，能量消耗一般也较少，但过高的底物（基质）或产物浓度常导致酶的抑制或细胞失活；所用的反应器体积很大；要求在无杂菌污染情况下进行操作。酶反应过程的专一性强，转化率高，但酶的成本较高；发酵过程的成本低、应用广，但反应周期长，较难控制，反应液中杂质多，给分离纯化带来困难。

3. 生化工程的基本内容及其发展趋势

按工程学的定义而言，它是将自然科学的原理应用于社会生产的某一具体方面，并研究该生产领域中带有共性的技术规律的学科。生化工程既是为生物生产过程服务的学科，就有必要先对其共性的技术有一个概括的了解。

在上游加工中最重要的是提供和制备高产、优质和足够数量的生物催化剂。其中带有共性的技术有大规模的种子培养、酶或细胞的固定化、如何将所制备的种子或固定化生物催化剂在无菌情况下移入生物反应器等问题。另一类是涉及粗原材料的加工，其中有关共性技术是加工后作为基质或培养基的标准化问题，以及基质或培养基的灭菌和空气除菌问题。

在生物反应过程中，有关共性技术问题有适用于大规模细胞培养及产物形成的反应器的选型、设计，操作方式及条件的确定，过程及反应器的放大，过程的参数检测和控制等。由上述问题又延伸出生物反应动力学、生物反应工程、生物反应器工程、生物过程检测和控制技术、生物过程模型化技术等生化工程的分支学科或专门研究领域。

在下游加工中，主要是研究和开发各种适用于生物反应产品，特别是作为诊断和治疗用的活性蛋白质、多肽或其他活性物质的提取、精制手段和装备，这些都属生物分离工程的研究内容。

在生产药品和食品的过程中，还应注意符合“优质生产规范”的要求。

这些带有共性的技术问题的出现，是随着新生物生产过程的不断发展的

需要而提出的，或在原有基础上不断增加其深度。如果说，早期的生化工程曾为发酵和酶反应过程，如四十年代的抗生素工业、五十年代的氨基酸工业、六十年代的酶制品等工业以及果葡糖浆等酶反应产品的迅速发展作出过贡献；八十年代以后的生化工程则应为基因工程、杂交瘤技术等现代生物技术产品的顺利投产谱新曲、立新功。

对今后生化工程的重点研究方向大致可概括成下列四个方面。

(1) 新型生物反应器的研究开发及相应培养、发酵技术的研究 面对着节约能源以及基因工程、杂交瘤技术和酶工程的产品投产，急需研究开发一些大型节能的发酵罐、适用于重组菌、动植物细胞培养和复杂酶反应的生物反应器。为了使分批培养（发酵）中获得更多的细胞（产物），应积极开展流加、半连续、灌注等培养（发酵）技术的研究和应用。此外，还应努力开展有关生物反应器合理设计和放大的研究。

(2) 新型分离方法和设备的研究开发 为了适应现代生物技术产品的生产，应加强对蛋白质、多肽产品的提取、纯化的研究开发。目前用于上述产品的提取、纯化方法虽不少，但有的不够有效，有的只能用于实验室规模，对有关提取、纯化的原理还研究得不太深入，影响有关设备的设计放大。为此，在生物分离工程中尚有不少研究课题和发展余地。

(3) 各种描述生物反应过程的数学模型的建立 对有关数学模型的建立，将有利于过程的优化控制和计算机的应用。数学模型的基础应是深入的动力学研究，但也可以结合实际经验或生产数据的回归得到半经验的数学模型。鉴于一些关键参数如细胞浓度、产物浓度、甚至是基质浓度目前尚难以在生产过程中进行在线检测，因此某些以经典动力学形式表示的数学模型难以直接用于生产实际。为此可先寻找这些不可在线检测参数与某些可在线检测参数之间的关系，然后获得可实际应用的数学模型。

(4) 生产过程在线检测和控制手段的完善 在线检测主要是解决能及时反映生物反应器内关键参数变化的传感器的研制。控制手段是指计算机控制系统的硬件（检测信息的条件化和显示系统、调节器、计算机、人-机对话系统、执行系统等）及软件（动态自适应控制系统、模糊控制系统、专家控制系统等）的建立和完善。

最后还应强调的是生化工程工作者与生物、化学等科学家之间的相互合作问题。在青霉素工业建立的过程中，工程技术人员与科学家之间的密切合作可称是成功合作的典范。这种精神还值得加以宣扬和发展，因为它对迅速发展生物技术有利。美国的 Humphrey 教授是一位生化工程的前辈，他当年参与过早期的抗生素工业的大合作。他在 1992 年的一次国际会议上呼吁：“让生化工程工作者一开始或尽早参加生物生产过程的研究开发，不要等待在生物学家完成了包括通过临床试验的研究后，再让生化工程师去进行开发”，否则将可能会发生“滚瓶+机器人”的奇怪生产工艺。这里说的“滚瓶”是在实验室中培养贴壁型动物细胞的玻璃瓶，其容积最大不超过 5 升，其中培养液仅约为 1 升，因此生产中要动用大量滚瓶和消耗大量劳动力，为此只能请机器人来代劳，以显示工艺的“现代化”。

以下各节将对生物生产过程中的一些重要工程技术作较深入的介绍。

二、培养基灭菌和空气除菌技术

1. 培养基灭菌技术

在无菌的液体培养基中接入纯种的常规或重组微生物或动植物细胞——生物催化剂，进行大规模的细胞培养或进而进行代谢产品的生产，即发酵过程时，培养基的灭菌技术是相当重要的。此外，在酶反应过程中所用的底物溶液一般也需事先灭菌。

工业中培养基的灭菌一般都用蒸汽加热进行。灭菌所需时间与培养基及其中杂菌的性质、含菌量以及灭菌温度有关。一般情况下，可认为杂菌在热能作用下其死亡率为一级反应，即

$$-\frac{dN}{dt} = kN \quad (5-1)$$

式中， N 为活菌数或活菌浓度； t 为灭菌时间； k 为灭菌速率常数，与灭菌温度及杂菌种别有关，温度越高， k 值越大。

若 $t = t_0$ 时， $N = N_0$ （下标 0 表示初始条件），将上式积分后得

$$t = 2.303 \frac{1}{k} \lg \frac{N_0}{N} \quad (5-2)$$

提高灭菌温度有利于迅速增加杂菌杀死速率，而大大缩短灭菌时间。温度升高后，当然也会适当增加营养物质的破坏速率，但因灭菌时间的缩短，总破坏量反比较低灭菌温度时为少。例如，当温度从 105 升高至 130 时，嗜热脂肪等孢杆菌的死亡速率增大 268 倍，但维生素 B_1 的分解速度在同样的温度变化范围中仅增加 6.16 倍。因此工业上常采用高温快速方法进行灭菌，以保留更多的营养成分。

工业上实际使用的蒸汽灭菌方法有两种：

(1) 实罐灭菌（即分批灭菌）将配制好的培养基放入发酵罐，连同发酵罐进行灭菌。开始时蒸汽先通过夹套或蛇管间接加热，以免过多的冷凝水稀释培养基。待罐温达 80~90 时，可直接将蒸汽通入培养基直至到达灭菌温度（一般为 121，即表压为 0.1MPa）后，维持此温度 20~30 分钟。此时有关排汽阀门仍应适当开启，以使蒸汽流动通畅，并同时附属管道灭菌。灭菌完毕后，应及时通入无菌空气使罐内维持正压，然后通过夹套或蛇管将培养基尽快冷却。

(2) 连续灭菌 将配制好的并经预热（60~75）的培养基用泵连续输入由直接蒸汽加热的加热塔，使在短时间内达到灭菌温度（126~132）。然后进入维持罐（或维持管），使在灭菌温度下维持 3~7 分钟后再进入冷却管，使其冷却至接种温度并直接进入已事先灭菌（空罐灭菌）过的发酵罐内（图 5-2）。

图 5-2 连续灭菌流程图

这里应特别指出的是，培养动物细胞的培养基的灭菌一般不能用热灭菌法，因其中有血清、氨基酸等易受热破坏的成分。这种培养基应采用孔径小于 0.2 微米的滤膜来除菌。

2. 空气的除菌技术

在生物生产过程中，特别是在好气发酵过程和进行无菌操作的工作室中，都需要使用大量无菌空气。

工业上大规模的无菌空气是用过滤方法获得的。用于空气除菌的过滤器有两大类，即早期采用的深层过滤法和后来发展起来的绝对过滤法。前者指以活性炭等颗粒介质和棉花、玻璃棉、合成纤维等纤维状介质堆积或装填的填充床过滤器，或纸质滤片、石棉滤板过滤器，进行空气过滤；后者指利用高分子材料、烧结金属或陶瓷制成的微孔滤膜进行空气过滤。

采用孔径在 0.2 微米左右的滤膜的绝对过滤法能达到“绝对”除菌的效果。例如，用聚四氟乙烯微孔滤膜制成滤管式空气过滤器（图 5-3），能耐蒸汽灭菌，又因其为疏水性而能防御湿空气，再因其孔隙率可高达 85%，因此空气通过后的压力降也很低。由于微孔很易被堵塞，因此在微孔膜的外表应用孔径较大的过滤材料覆盖，并串联前过滤器，以免空气中的较大颗粒尘埃或夹带的铁锈等杂物对微孔的损害。使用一段时间后，可用无菌空气反吹，以延长使用寿命。我国现使用较多的是烧结镍合金制成的滤管过滤器，孔径虽不太标准化，效果也不错。但上述过滤器价值昂贵，对设备维护的要求较高，有的还需进口，因此深层过滤器还在生产上使用。

图 5-3 滤管式空气过滤器

不论采用何种过滤方法，空气应先经过预处理，使其具有一定压力、温度、湿度并尽量去除其中的尘埃和杂菌。空气预处理的流程大致如图 5-4 所示。首先是空气压缩机将大气中的空气吸入并压缩至一定压力（约 0.25MPa 左右），此时空气因受压而产热升温（约为 80~120℃），因此需以冷却。冷却的程度应适当控制，因压缩空气的露点（即空气中的水汽开始达到饱和而析出水分时的温度）比常压下的空气为高。因此要么就把它冷却到露点以上，进入空气过滤器；要不然就让它冷却到露点以下，让它析出一定的水分并充分把水分去除，然后再把析去水分但相对湿度为 100% 的空气适当加热（约升高 5~10℃），使其相对湿度为 60% 左右，再进入空气过滤器。最不好的情况是把压缩空气冷却到露点以下，既不析水又不加温而直接进入空气过滤器，这时棉花、玻璃棉或滤纸等过滤介质就会受潮积水丧失过滤能力，压力降也大为增加，并成为杂菌繁殖的温床，除菌器便成为增菌器了。

在压缩空气冷却至露点以下时，空气中部分水汽凝结为水滴，空气的绝对含水量为之下降。析出的水滴必须采用旋风分离器和丝网除滴器加以去除。否则当空气在加温时，水滴又汽化为水汽，达不到预期降低相对湿度的目的。

图 5-4 空气预处理流程图

还在生产上使用的深层过滤器，所采用的介质通常是纤维状物质。当纤维以一定填充密度置于过滤器时，其空隙一般要大于 50 微米，即远大于微生物的大小（球菌的直径约为 0.5~1 微米）。因此在这种过滤器中的除菌不是真正的“过滤”，而是靠惯性、拦截、扩散、静电等作用除菌。滤纸的孔隙一般也超过 0.5 微米，为此也应属深层过滤的范畴。所谓惯性作用是指空气中的颗粒随着空气的高速运动而运动，并凭借颗粒本身的质量较空气为大，

在接近介质时不像空气那样绕过介质，而是靠惯性继续前进并撞击在介质上而被去除。拦截作用是指部分正对着介质的颗粒随着空气流前进而被介质所拦截。扩散作用是指小于 1 微米的颗粒所产生的布朗运动而形成的扩散，当颗粒遇到介质后被去除。静电作用是指当颗粒与介质间具有不同电荷时的静电吸引作用，细菌表面常带负电荷。介质除菌是上述四种作用的综合作用，也可说总除菌效率是这四种除菌效率之和。

在以上四种除菌作用中，惯性和拦截作用随气流速度增大而加强，而扩散和静电作用则随气流速度减小而减弱。因此，若将总除菌效率（实际上是指单纤维捕集效率 η_0 ）对气流速度 v_g 作标绘时，可得一具有最低值的曲线（图 5-5），此流速称为临界流速（ v_g ） c_0 。图 5-5 不同气流速度下的单纤维捕集效率

若从提高过滤效率着想，空气过滤器的设计和操作应选择较高的气流速度。但这样做，会导致两个问题，一是当实际用气量低于设计用气量时，过滤器的除菌效率就会下降而达不到预期的效果，并可能引起发酵的杂菌污染；二是会导致很大的压力降，因通过过滤介质的压力降是随着气流速度的平方值而增加的。为此在设计空气过滤器时采用临界气流值是较为安全和合理的。

在用棉花为过滤介质时，应采用未经脱脂的棉花。其直径约为 16 ~ 20 微米，长度约为 2 ~ 3 厘米，实密度为 1520 千克/米³，填充密度可为 130 ~ 150 千克/米³，故其填充率为 8.5% ~ 10%。在采用玻璃棉时，应采用无碱玻璃棉。直径用 10 ~ 20 微米的较好，实密度为 2600 千克/米³，填充密度可为 130 ~ 280 千克/米³，折算成填充率为 5% ~ 11%。

三、大规模细胞培养技术

这里所说的细胞培养包括微生物和动植物细胞的培养；所谓大规模培养是指有别于实验室的培养而言。在实验室中进行细胞培养主要是掌握细胞的生长、繁殖、生理、生化等规律，所采用方法和仪器要求精密，但处理量很小，如在好气菌的液体培养时，一般采用扁瓶或摇瓶，靠瓶口的棉塞进行供氧。在生产中，培养细胞的目的是为了收集大量的细胞（如面包酵母、非分泌型重组大肠杆菌）或通过细胞的催化作用大量生产代谢产物（如氨基酸和抗生素）或进行生物转化（如甾体化合物的转化、污水处理）。由于细胞培养量大，所采用的容器也必然很大，但单位液体体积所占有的液体表面却比小型容器少得多，不可能再采用表面通气或震荡的方法来供氧了。带有通气和搅拌装置的生物反应器正是为了适应大规模细胞培养才产生的。此外，在工业生产中，还需考虑经济有效、方便可行和可进行人为控制等因素。为此，环绕大规模细胞培养有不少带有共性的工程技术问题，如氧的供需、物质传递、细胞生长和产物形成动力学、生物反应器的结构和操作、过程检测与控制等。这些问题有的将在以后诸节中介绍，本节将着重介绍各类细胞培养的特点、氧的供需和各种培养方式三个问题。

1. 各类细胞的培养特点

在微生物范围内，细菌、放线菌、酵母、霉菌中的不少菌株常用来进行发酵、微生物转化或作为基因工程的宿主。在动物细胞中，哺乳动物的某些淋巴细胞、表皮（包括皮肤以及器官、体腔的表层组织）细胞、成纤维细胞的细胞系以及某些鱼、昆虫细胞系可以用来进行传代培养。其中淋巴细胞常用来与骨髓癌细胞经原生质体融合形成各种杂交瘤以生产单克隆抗体，或通过病毒的刺激生产干扰素；表皮及成纤维细胞中某些细胞系可用来进一步培养病毒以生产疫苗，有的可作为基因工程的宿主。由于动物细胞属结构和功能齐全的真核细胞，因此对外源基因的表达更为完整和正确，且可以获得结合蛋白产品。在植物界中，几乎所有的双子叶、单子叶、裸子植物以及蕨、藓都能进行细胞培养。某些植物细胞系可以用来生产次级代谢产物。

有关常用微生物、哺乳动物及植物细胞在培养过程中的特点及差异列于表 5—1 中。

2. 氧的需求和供应

除了厌气微生物外，其他微生物以及动植物细胞培养过程中都需要一定数量的溶解于培养液中的氧，作为细胞对碳源进行生物氧化之用。各种细胞在培养过程中所需的氧量与细胞类别，甚至品种有关，还与所利用的基质有关，当用烃类作基质时，其需氧量就比醇类较高，比糖类更高。此外，在利用细胞的某些代谢作用进行某目标产物的生物合成或生物转化时，也需要消耗一定的氧。由于在利用细胞生产某一产物时，很难分清用于生长繁殖和产物形成各需多少氧，而只能笼统地给出一个对某一产物生产时的需氧量。

表 5-1 常见微生物、哺乳动物及植物细胞在培养过程中的特点及差异

项目	微生物细胞	哺乳动物细胞	植物细胞
大小(微米)	球菌 0.5 ~ 1 杆菌 0.5 ~ 3.2 11.2 ~ 7 放线菌菌丝约为 0.5 ~ 1.4 酵母 1 ~ 5 15 ~ 30 霉菌菌丝约为 3 ~ 10	淋巴细胞 6 ~ 8 其他统称大小为 10 ~ 100	20 ~ 40 1100 ~ 200
细胞壁	有细胞壁,细菌的细胞壁由氨基糖及壁酸为主组成	无细胞壁,其细胞膜由类脂和球蛋白组成	有细胞壁,由纤维素、果胶为主组成
液体培养生长形式	悬浮,但部分微生物会分泌粘性物质而形成菌絮式菌膜;部分霉菌菌丝能结球	除淋巴细胞和杂交瘤细胞可悬浮培养外,其他一般都要求贴壁培养,且是单层生长	悬浮,但一般呈凝聚体
营养要求	简单,以碳水化合物、无机及有机氮源、微量元素为主	很复杂,要求有多种氨基酸、维生素、无机盐、葡萄糖、血清(如不同血清,要用多种生长因子)	较复杂,要求有多种无机盐、维生素、蔗糖、植物生长调节剂(包括植物生长素、细胞分裂剂等)
环境影响	一般,可耐受较粗旷的环境条件	非常敏感,仅能耐受很苛刻的环境条件	较敏感,对培养条件有较严格的要求

项目	微生物细胞	哺乳动物细胞	植物细胞
繁殖方式	细菌及放线菌以繁殖为主;酵母以芽生为主,霉菌以形成孢子繁殖为主	进行间接(有丝)分裂,即先有染色体的纵裂	间接分裂
倍增时间(时)	0.5 ~ 5	15 ~ 50	24 ~ 72
代谢控制	由外界环境条件控制	由外界控制及生长激素共同控制	由外界控制及生长激素共同控制
对剪切敏感性	低,但对丝状菌较敏感	非常敏感	较敏感
摄氧率 r 毫摩 / (升·时) 呼吸强度 Q_{O_2} 毫摩/克(干)·时)	30 ~ 200	在 10^6 细胞/毫升时, 0.05 ~ 0.6\	0.01 ~ 4
递系数 K_{La} 的要求(每小时)	100 ~ 1200	1 ~ 25	20 ~ 30

需氧量常有两种表示法:一是以摄氧率(OUR) r 表示,其单位是毫摩/(升·时);二是以呼吸强度 Q_{O_2} 表示,其单位常是毫摩/(克(干细胞)·时)。各类细胞的摄氧率或呼吸强度值可参见表 5—1。

氧在水中的溶解度甚小,如 25、1 大气压(0.1 兆帕)下,其饱和浓

度仅为 0.24 毫摩/升, 约合 7.7 毫克/升, 也即 7.7ppm (约为葡萄糖在同条件下的溶解度的 1/6000)。氧的溶解度随温度升高而降低, 随压力的增大而增加, 若水中含有无机和有机物时均使溶解度下降。在实际生物反应器(常保持 0.12~0.15 兆帕, 即 1.2~1.5 大气压)中, 培养液的饱和氧浓度不会高于 8ppm (指在未接种时培养基被空气饱和的场合)。因此, 在细胞培养或发酵过程中应连续不断地向反应器中通入具有一定压力的无菌空气, 以供细胞生长繁殖和产物形成的需要, 否则将会严重影响培养或发酵, 以至无法进行正常生产。一般情况下, 应保持培养(发酵)液中的氧饱和度在 10%~30% 的范围中。

我们已经知道, 培养(发酵)过程中需要的氧来自导入空气形成的气泡。氧从气泡进入液相主流, 存在着一个物质传递问题。氧传递速率(OTR), 与搅拌、通气强度有关, 也与培养液中溶解氧浓度、粘度等因素有关。当培养(发酵)过程中供氧等于需氧, 即 $OTR=OUR$ 时, 培养(发酵)液中的溶氧浓度 C_L 即保持一稳定值。若当 $OTR > OUR$ 时, C_L 会不断上升, 直至达到一个新的稳定值; 同样, 在 $OTR < OUR$ 时, C_L 会下降至一个稳定值。

应该指出的是细胞的摄氧率 r 值在培养(发酵)过程中不是一成不变的。在培养初期, 细胞的生命力很强, 呼吸强度虽较大, 但细胞浓度很低, 因此 r 值并不大; 在培养(发酵)末期, 因部分细胞衰老或死亡, 基质消耗将尽, r 值也不会很大, 且不断下降; r 最大值出现在培养中期, 特别是在细胞处于对数生长的中后期。

氧的传递速率在培养(发酵)过程中也是会变化的, 这主要是由于培养(发酵)液的物理性质在过程中发生了较大变化而引起的。

3. 大规模细胞培养方法

(1)分批培养 由于细胞遗传性能的不稳定性以及存在着长时期维持纯种培养的困难性, 在生产中的细胞培养一般采用分批培养法, 即将基质和各种营养物质配成的培养基一次加入生物反应器, 经灭菌、接种后, 使接入的细胞经历滞后、对数生长、稳定诸生长期(一般不进入衰亡期)后, 一次出料。整个过程是一个时变过程, 因为随着过程的进行, 细胞及基质浓度等都随着时间变化, 因此对过程的控制和维持产品质量的一致性产生一定的困难。此外, 分批操作还存在着设备利用率低、劳动强度及能耗大等缺点。但是, 相对讲分批培养是较简便和最基本的一种培养方法。

(2)补料-分批培养 补料-分批简称补料培养, 是一种改良的分批培养方法。在培养开始时, 仅在生物反应器中加入 1/2~2/3 的培养基, 待细胞生长到达对数生长期或进行发酵的产物形成高峰期, 即可进行补料。补料可以是连续流加, 也可以是间歇补加新鲜培养基或限制性基质。补料的流量一般有两种控制方法: 一是根据细胞对数生长的需要, 即维持基质浓度不变; 另一是维持培养(发酵)过程中的某一参数, 如溶氧、pH 或其他在某一水平。当然也可以把两者结合统一考虑。这种培养法的优点在于可以避免高浓度的基质对细胞生长或产物形成的抑制, 使细胞生长或产物形成在一个时期内处于最佳的条件下。目前, 细胞的高密度培养和不少发酵过程, 越来越多地采用此法进行培养或发酵。应该指出的是, 采用补料培养(发酵)时, 至少应配备必要的检测和控制手段。当然, 也可通过对一个带有检测仪器的反应器的摸索后, 提出一个标准优化控制程序, 然后将此程序应用到其他不带检测仪器的反应器中。3)反复放料与补料的培养 这种培养方法的开始阶段犹如常规

分批培养，但到培养或发酵结束时，并不把培养（发酵）液全部排出，而仅排出其中一部分，同时补入同体积的新鲜培养基或必要的组分。放出的部分可交下游加工工序处理，留下的部分继续进行培养或发酵。上述的交替可重复多次，因此也可称是半连续培养（发酵）。它的优点在于可以延长反应器的有效生产时间，而免除不少非生产的辅助时间。酒精发酵中常用此法。

(4)釜式反应器中的连续培养 在利用搅拌釜反应器进行连续培养时，开始犹如分批培养的操作，待细胞达到最适生长条件或最佳产物形成条件时，不断加入新鲜培养基并排出等量的培养液。当稀释率（通入培养基的流量与反应器操作体积之比与细胞的比生长速率（单位质量的细胞、单位时间内细胞质量的生长量）相同时，过程即达稳定状态。此时，反应器内和出口培养液中的细胞和残余基质浓度均不再随时间变化。一般情况下欲达到稳态所需的时间，约为培养基在反应器中平均停留时间（稀释率的倒数）的 20 倍左右。稀释率不能无限制增大，最大值不能超越最大比生长速率值，否则细胞的生长速率跟不上新鲜培养基的稀释速率，结果反应器中的细胞被“洗出”，无法进行操作。

釜式连续培养可以有两种控制方法：一是控制反应器中限制性基质的浓度不变；二是控制反应器中细胞浓度（以浊度表示）不变。前者所用反应器称恒化器，后者称恒浊器。釜式连续培养还可以是双釜或多釜串联操作。釜式连续培养除了用来进行细胞生长和产物形成外，也可用来对一些遗传特性较稳定或对纯种培养要求不高的生产过程，如酵母、酒精、丙酮、丁醇、单细胞蛋白等生产过程。

(5)管式反应器中的连续培养 管式连续反应器与搅拌釜式连续反应器不但外形上不同，更重要的是反应器中物料和细胞浓度分布的不同，也就是流体的流态或混和情况的不同。后者因借助机械搅拌的作用，反应器中的流体混和良好，无固定流态，基质和细胞浓度在整个反应器中基本一致；前者的流体基本是从进口端向出口端流动，基质浓度基本是沿着轴向逐步下降，而细胞浓度则基本是沿着轴向逐步增高。培养基在管式反应器中的平均停留时间可以管长除以流速求得，也可以说，培养基在管内不同位置都有其相应的平均停留时间。这些相应的平均停留时间犹如分批培养中不同培养时间。因此可以认为，某一分批培养时间的基质和细胞浓度与管式反应器中相同平均停留时间（或相应的轴向距离）的基质和细胞浓度是一致的。在实际情况下，真正的管式反应器较少应用，常用的是塔式反应器（如固定床、流化床反应器等）。它基本上属于管式反应器的范畴，常用于固定化酶或固定化细胞作为生物催化剂的场合。

(6)细胞再循环的连续培养 不论是釜式或管（塔）式反应器，在连续培养过程中都可以进行细胞的再循环，即将部分的培养液从反应器中抽出，通入与反应器相连的细胞增浓器（可借沉降、过滤或离心方法将细胞浓集），将培养液中的细胞增浓后返回反应器，而细胞浓度较稀的那部分培养液则从细胞增浓器的另一出口排出（其流量应等于进料流量）。由于有较高浓度的细胞返回反应器，使器内的细胞浓度为之增高，基质浓度为之降低，处理量也为之加大。循环量越大，细胞浓度增加倍数越高，上述效应越明显，特别是管（塔）式的连续培养反应器。这种操作适用于污水生化处理或以生产细胞为目的场合。

(7)灌注培养 指在分批培养过程的中后期不断注入新鲜培养基，并以同

样的流量排出废培养基，但将细胞截留在反应器中。它与连续釜式培养不同之处在于后者排出的培养液中包含着细胞而前者仅是废培养基。细胞的截留可借出口处的过滤或重力沉降装置来实现。由于这种培养法可以不断灌注新鲜培养基，并可排出可能存在的有害代谢产物，因而可以大大延长培养周期。这种培养法特别适用于细胞倍增时间长的动植物细胞。

除了上述七种常用培养方法外，还有一些适用于特殊场合或正处于研究阶段的培养或发酵方法。如：

混合培养——适用在需要多种生物体的协同作用或生物体本身共栖现象时，如污水处理。在混合培养中，应注意使培养基和培养条件同时满足多种生物体的需要。

同步培养——在通常的分批培养中，细胞的分裂往往不能做到同步而使细胞处于不同生长阶段。若上述情况对最后产物的质量或形成有影响时，最好采用同步培养。芽孢杆菌可通过加温杀死其营养菌体而保留其芽孢，然后使其同步萌芽。对一般细胞而言，可采用阶段性降温培养使其不分裂但缓慢进行生长，当恢复正常温度时，大多细胞即可同时进行分裂。

透析培养——指用半透膜或超滤膜将培养液中的有害代谢产物或有抑制作用的产物移去的培养过程。它与灌注培养有些相似，但不一定要流加新鲜培养基。此外，在生产挥发性产物（如酒精）的过程中，可通入一些惰性气体（如 CO_2 ）将产物提带出来，或采用“真空培养”法将产物蒸发出来，以减少产物对细胞的抑制作用。

萃取发酵——指用某些与水不互溶，并对细胞无毒害，但对产物有较大溶解度的溶剂（如用油酸进行酒精的发酵）加入发酵液中以提高产物的产量。此外，也有加入某些离子交换树脂或固定吸附剂吸附产物的，称“吸附培养”。

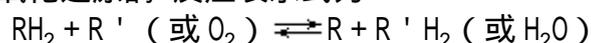
四、酶及酶工程

酶是由细胞所产生具有催化能力的蛋白质，这些酶大部分位于细胞体内，一部分则分泌至体外。生物体的化学变化几乎都在酶的作用下进行。酶的作用具有高度专一性，因此在一个细菌中，酶的总量可超过 1000 个。酶的催化能力很高，一个酶分子在一分钟内能催化数百至数百万个底物（酶反应中的反应物）分子的转化。一般说，酶在常温、常压、近于中性的水溶液中进行其催化作用；温度过高，溶液过酸、过碱和某些金属离子都会导致酶的失活。目前已被人们所了解的酶估计已超过 3000 种。

1. 酶的分类

1961 年国际生化联合会酶学委员会提出将酶分成六类。

(1) 氧化还原酶 反应表示式为



在体内参与产能、解毒和某些生理活性物质的合成。重要的有各种脱氢酶、氧化酶、过氧化物酶、氧合酶、细胞色素氧化酶等。

(2) 转移酶 反应表示式为



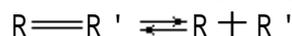
在体内将某功能基团 G 从一化合物转至另一个，参与核酸、蛋白质、糖及脂肪的代谢和合成。重要的有各种一碳基转移酶、酮醛基转移酶、酰基转移酶、糖苷基转移酶、烷基转移酶、含氮基转移酶、磷酸基转移酶、含硫基团转移酶等。

(3) 水解酶 反应表示式为



在体内外起降解作用，也是人类应用最广的酶类。重要的有各种酯酶（羧酸酯和磷酸酯酶）、糖苷酶（淀粉酶、纤维素、半纤维素酶、果胶酶、溶菌酶等）、肽酶（氨基及羧基肽酶、各种蛋白酶）等。水解酶一般不需辅酶。

(4) 裂合酶 反应表示式为



这类酶可脱去底物上某一基团而留下双链，或可相反地在双链处加入某一基团。它们分别催化碳碳键、碳氧键、碳氮键、碳硫键、碳卤键和磷氧键。

(5) 异构酶 反应表示式为



此类酶为生物代谢需要而对某些物质进行分子异构化，分别进行外消旋或差向异构、顺反异构、醛酮异构、分子内转移、分子内裂解等。

(6) 连接酶（合成酶）反应表示式为



此类酶关系许多生命物质的合成，其特点是需要三磷酸腺苷等高能磷酸脂作 R 与 R' 结合的能源，有的还需金属离子辅助因子。分别形成碳氧键（与蛋白质合成有关）、碳硫键（与脂肪酸合成有关）、碳氮键（与酰胺、肽、核苷酸转化与合成有关）、碳碳键和磷酸酯键。

2. 酶的组成和作用机制

酶的本质是蛋白质，因而必然有四级空间结构形式。其中一级结构是指具有一定氨基酸顺序的多肽链的共价骨架，二级结构为在一级结构中相近的

氨基酸残基间由氢键的相互作用而形成的带有螺旋、折叠、转角、卷曲等细微结构，三级结构系在二级结构的基础上进一步进行分子盘曲以形成包括主侧链的专一性三维排列，四级结构是指低聚蛋白中各折叠多肽链在空间的专一性三维排列。具有低聚蛋白结构的酶（寡聚酶）必须具有正确的四级结构才具有活性。具有活性的酶都是球蛋白，即被广泛折叠结构紧密的多肽链，其氨基酸亲水基团在外表，而疏水基团向内。

(1)酶的组成 酶蛋白有三种组成形式。

单体酶——仅有一个活性部位的多肽链构成的酶，分子量为 13000 ~ 35000。为数不多，且都系水解酶。单体酶在生物合成时一般为无活性的酶原，须经其他酶（一般称激酶）分解后，才具活性。

寡聚酶——由若干相同或不同的亚基结合而组成的酶。亚基一般无活性，必须相互结合才具活性。分子量约为 35000 至数百万。

多酶复合体——指多种酶进行连续反应的系统，前一反应产物为后一反应的底物。

仅有少部分的酶是由单一的蛋白质所组成，而大部分的酶则为复合蛋白质，或称全酶，是由蛋白质部分（酶蛋白）和非蛋白质部分所组成，即酶蛋白本身无催化活性，需要在辅助因子存在下才具有活性。辅助因子可以是无机离子，也可以是有机化合物，有的酶蛋白仅需其中一种，有的则两者均需要。它们都属小分子化合物。约有 25% 的酶含有紧密结合的金属离子或在催化过程中需要金属离子，包括铁、铜、锌、镁、钙、钾、钠等，它们在维持酶的活性和完成酶的催化过程中起作用。有机辅助因子可依其与酶蛋白结合的程度分为辅酶和辅基，前者为松散结合，后者为紧密结合；但有时把它们统称为辅酶。大多数辅酶为核苷酸和维生素或它们的衍生物。上面所述六类酶中，除水解酶及连接酶外在反应时均需特定的辅酶。

(2)酶的作用机制 酶一般是通过其活性中心——通常是其氨基酸残基的侧链基团先与底物形成一个中间复合物，随后再分解成产物并释出酶。至于酶对底物的专一性可用“诱导契合”假说说明，即当酶与底物接近时，酶受底物的诱导，使酶的构象发生有利于与底物复合的变化，并使酶活性中心的底物浓度增加，最后相互快速地契合。有关酶催化机理的假说还很多，这里不一一介绍了。

与通常的化学催化剂相似，酶所以能加速反应速率，是因为当酶与底物进行暂短复合时所需的活化能比底物单独进行反应时所需的活化能为低的缘故。酶反应速率还与环境中的温度和 pH 有关，每一个酶都有其最适反应温度和 pH。来自动物和植物的酶最适温度分别是 35 ~ 40 和 40 ~ 50 。大多数的酶超过 60 将 变性失活，但少数来自微生物的酶可耐受较高的温度。大多的酶最适 pH 为 6 ~ 8，其中微生物及植物来源的常在 pH4.5 ~ 6.5，动物来源的则为 pH6.5 ~ 8.0。

由于酶的不稳定性及其制品的纯度各异，因此一般不以其质量和体积计量，而以酶活性单位和比活力计量。酶活性单位 u 的定义是每分钟催化 1 微摩底物进行转化所需要的酶量。酶溶液浓度一般以 u/毫升表示。比活力是表示固态酶制剂纯度的计量值，以 u/毫克蛋白质表示。酶的稳定性通常以其半衰期表示，即溶液中的酶或固态的酶，在一定条件下，其浓度或比活力下降至原来标定值的 1/2 时所经历的时间，半衰期越短说明其越不稳定。

(3)酶的应用 随着本世纪 40 年代发酵工业的发展，不少利用微生物生产

的酶制剂也大量出现，在工、农、医等方面得到广泛的应用。在食品工业中，如 α -淀粉酶与糖化酶合用可进行酶法葡萄糖生产，并在发酵生产中作糖化剂； α -淀粉酶和异淀粉酶都可用来生产麦芽糖；凝乳酶用于制造干酪。在轻工工业生产中，如细菌（碱性）蛋白酶大量用于加酶洗涤剂生产，进行皮革加工、丝绸脱胶；霉菌（中性）蛋白酶用于皮革、毛皮加工。在医药工业中，有用于助消化、消炎的细菌（碱性）蛋白酶和酸性蛋白酶外，还有右旋糖苷酶可以防止龋齿，链激酶和尿激酶可用于去血栓、清创口，青霉素酰化酶可以用来生产 6-氨基青霉烷酸，以进一步生产半合成青霉素等。在科学研究中所用到的各种酶就更多了，在基因工程研究中，核酸限制性内切酶、核酸连接酶、核苷酸聚合酶已成为重要的工具酶。

3. 固定化酶和固定化细胞

由于酶是水溶性物质，因此在其参与催化反应后很难从反应液中加以分离使之重复应用。虽然有人研究了将超滤装置与酶反应器相连以回收反应液中酶的方案，但要真正用于生产尚较困难。于是，人们就设想能否把酶如同化学催化剂一样将它固定在不溶性惰性固体上，使之能重复使用。这一设想在本世纪五十年代开始研究，六十年代末用于生产。目前已有若干工业性应用实例，如用化学法生产 L-甲硫氨酸过程中，先用固定化氨基酰化酶将经化学合成的中间产物乙酰-DL-甲硫氨酸去除乙酰基，使成为 L-甲硫氨酸而经浓缩结晶后分离出来；未被去乙酰基的 D-甲硫氨酸可经酸处理后消旋仍回到加料罐继续反应。在用酶法生产 6-氨基青霉烷酸（6-APA）过程中，底物是青霉素 G——带苯乙酰侧链的青霉素，当其溶液通过固定化青霉素酰化酶柱后，底物即被水解为无侧链青霉素——6-APA 及苯乙酸；当反应液在反应器中循环流动时，应将苯乙酸用碱中和以维持最适酶反应 pH 和减少产物对反应的抑制。

在七十年代初，又出现了固定化细胞技术，目的是解决需要辅酶参与的酶反应，因细胞有辅酶再生的能力。另外，也可省去从细胞中提取酶的复杂过程，并希望可发展为取代游离细胞的发酵过程。目前固定化细胞的细胞类型，除了微生物细胞外，已扩大至植物细胞以至动物细胞，但迄今应用固定化细胞的工业实例还很少。

(1) 酶的固定化技术 酶的固定化方法约有三大类（图 5—6）。

图 5—6 酶的固定化方法示意图

载体结合法——其中又可分为三种，前一种为物理结合法，后两种为化学结合法。物理吸附法是将酶吸附在活性炭、多孔玻璃、酸性白土、高岭土、硅胶等惰性载体上；此法对酶活性破坏较少，但吸附作用力常较弱而易脱落，因而常与交联法结合使用。离子结合法是利用离子键将酶及带有离子交换基团的不溶性载体，如离子交换树脂或带有交换基团的纤维素、葡聚糖等结合在一起；此法操作简便，酶回收率也较高，但在较强离子强度下进行酶反应时易于脱落。共价结合法是利用共价键将酶和载体加以偶联，但因涉及条件较苛刻而又剧烈的化学反应，因而酶回收率较低、操作复杂，但酶与载体的结合相当牢固。

交联法——这是利用双功能试剂将酶分子相互交联而不需要载体。常用的交联剂是戊二醛、异氰酸酯、双重氮联苯胺或乙烯双马来亚胺（形成重

氮盐)。此法反应也较为剧烈，从而影响酶的回收，但固定后的酶稳定性较好。

包埋法——可分为网格型和微囊型两种。前者是将酶固定在具有网格结构的高分子凝胶中。通常作为凝胶材料的有聚丙烯酰胺、聚乙烯醇等合成高分子材料以及海藻酸、明胶、胶原等天然大分子材料。此法操作方便，很少改变酶的高级结构，因而回收率较高，但在反应中存在“固相”扩散阻力，只适用于小分子底物和产物，机械强度往往也较差。微囊法是将酶液包埋在微小（<300微米）的具有半透性高分子材料外壳形成的珠囊中。此法操作较复杂，酶回收率一般不高，但被包埋的酶不易流失，微囊的比表面积很大，一般也只能适用于小分子底物和产物。

(2)细胞的固定化技术 包括微生物、植物和动物细胞的固定化。一般情况下，要求被固定化细胞仍能进行正常的新陈代谢，也能进行增殖，故也称固定化增殖（或活）细胞。但在一定特殊情况下，灭活的微生物细胞仍能进行某些生物转化作用，那么将灭活的细胞加以固定后也能作生物催化剂之用。固定化增殖和灭活细胞在应用时最大不同处在于前者仍要消耗一定营养物质以维持其存活以至增殖，而后者则不需要；另对无菌操作要求，前者也高于后者。

除了某些细胞有自身凝聚作用外，通常用于细胞固定化的方法是物理吸附和天然凝胶包埋法。有些场合下也能用微囊法包埋动物细胞，但应避免采用剧烈的化学法以形成微囊。

4. 酶工程概述

酶工程的名称出现在本世纪20年代初。在当时，其范围大致包括酶的生产（包括微生物酶的发酵和提取以及从动植物中提取酶的技术）、酶的固定化技术、酶的化学修饰、酶动力学研究、酶反应器的设计和应用、酶在医学、工业、农业、食品等方面的应用等内容。近年来，随着酶技术研究的深入以及相邻学科的发展，酶工程也增添不少新内容。

(1)酶的化学修饰 为提高酶的活性、改变其作用专一性或最适反应条件、增加其稳定性、消除其抗原性（指某些酶能在体内诱导产生抗体而失活）等目的，而对酶进行化学修饰，即对酶在分子水平上用化学方法进行改造。常用的改造方法是将酶的侧链与一些具有生物相容性的大分子（如右旋糖苷、人血清白蛋白、聚乙二醇等）进行共价连接。

(2)模拟酶 根据酶的作用原理，用人工的方法合成的具有活性中心和催化作用的非蛋白质结构的化合物。它们一般具有高效、高适应性的特点，在结构上比天然酶相对简单。

(3)抗体酶 由于抗体和酶均属蛋白质，两者都有求于互补性物质而有其相似性；所不同的是前者的结合是直接的，后者的结合是过渡态的。抗体酶是将类似酶反应中过渡态的结合物注入动物体内后所诱发出来的一种抗体，它兼有酶和抗体的特性，因此在体内具有导向性，并能催化专一的反应。

(4)核酸酶 是一种近年来才发现的具有催化活性的RNA分子而不是蛋白质，因此被称为第二类生物催化剂。

(5)有机相酶反应 这是一种在极端条件（逆性环境）进行的酶反应，它可以改变某些酶的性质，如某些水解酶在逆性环境下具有催化合成反应的能力。常用的有机相酶反应有两种方式：一是在水-水不溶有机溶剂双相体系中进行，要求底物在水和有机溶剂中的溶解度要大，而产物在有机溶剂中的溶

解度要大，可进行氧化-还原、环氧化、异构化、酯交换、肽和脂的合成等反应；二是采用形成反胶束方式进行，即将酶的水溶液在表面活性剂的作用下在有机相中形成“油包水”的乳浊液，底物要求是能溶于有机相，此时酶的催化作用将发生逆转，但此法常不够稳定。

(6)酶标免疫分析 这是一种以待测抗原或酶标抗原与相应抗体之间的专一结合为基础，并通过酶活力的测定来测定待测抗原的含量的分析方法。其中常用的是酶标免疫吸附分析法。具体方法之一是用两组抗原溶液（一组是待测抗原与酶标抗原的混合液，另一组是仅含酶标抗原液）分别与固定在载体上的抗体进行反应，随后再分别与定量的酶底物反应。由于待测抗原不含酶不能与底物反应，故两组中底物降解量之差应为待测抗原量。

(7)酶传感器 这是生物传感器中最重要的一类。一般包括两个组成部分，一是固定化酶膜，膜允许被测小分子物质进入膜内，而固定在膜内侧的酶则不能漏泄到膜外；另一是基本传感器，酶膜即覆盖在其上。当小分子被测物质作为底物被酶催化进行反应时，会引起 pH 或 O_2 的变化或形成简单的产物，如 NH_3 、 H_2O_2 、 CO_2 、 CN^- 等，因此可用相应的基本传感器加以检测。

五、生化反应动力学

生化反应动力学是在一定限制条件下研究生化反应中底物或基质的浓度或消耗速度与细胞浓度或细胞生长速率及产物浓度或产物形成速率之间的关系。通过对它的研究，可以定量地了解在生化反应中如何正确地掌握和控制底物或基质的浓度或消耗速率，使细胞浓度或生长速率和产物浓度或形成速率达到可能达到的理想状态。

由于生化反应的种类很多，其反应特性和生物催化剂特性又相差很多，要以一个简单的、无所不包的模式来描述所有生化反应动力学的行为是不可能的。为此只能按生物催化剂的类别先作笼统的概括。生物催化剂可分为两大类，即酶和整体细胞，各自又可分为游离和固定化两种。但它们之间的差别较大，如在酶反应中就不存在细胞生长问题，底物单一，动力学研究相对较发酵过程简单。有关两类生物催化剂以及由它们引起的两类生化反应过程——酶反应与发酵的主要区别及优缺点可见表 5 - 2。此外，还应考虑到反应的操作方式——包括分批和连续两种基本操作方式和介于其间的中间操作方式，如流加、半连续、循环培养等。在分批操作时，基质浓度 S 、细胞浓度 X 和产物浓度 P 均随时间变化，而在连续操作中， S 、 X 及 P 在达到稳态时则不随时间变化。

表 5-2 酶反应与发酵的优缺点比较

项目	酶反应过程	发酵过程
生物催化剂及其反应特点	以酶为生物催化剂，可以是单酶简单反应，也可以是多酶串联反应，一般适用于较单纯的产物	以活细胞为生物催化剂，进行串联的复杂反应，产物可以是细胞本身、简单以至复杂的代谢产物
生物催化剂来源及价格	从细胞或其培养液中加以提取，技术困难；除少数工业酶制剂外，价格昂贵	在发酵开始前，接入少量细胞种子，即能在过程中自行形成，价格低廉
生物催化剂的稳定性	较差，只有高稳定性的或经稳定性修饰的才能用于工业	略高，但需不断保持其遗传稳定性
辅酶再生	在需要进行辅酶再生的反应中，技术和经济问题难于解决	能在新陈代谢中自行解决
原料要求	简单，但要求纯度较简的底物作原料	可用粗原料，但要考虑细胞生长及产物形成的必要成分作培养基
反应时间	短，数分钟至数小时	长，一天左右至一周以上
反应器要求	体积较小，但较复杂；游离酶时用分批釜式或用带超滤装置连续操作反应器，固定化酶时以固定床、流化床反应器为主，并可进行连续操作	体积很大，但较简单，大多用釜式分批反应器；连续操作时，可用釜式、塔式，固定化细胞时，也可用固定床、流化床反应器，但以分批操作为主
过程控制要求	简单	复杂，过程常分细胞生长和产物形成两阶段，物料成分及性质复杂，反应途径易于失控
产品分离要求	简单	复杂，反应终了时产物含量低，而副产物较多，且含有细胞体
工业应用	较少，目前用于工业生产的不超过 10 种	较多，常见的有数十种

由于发酵或细胞培养过程中首先涉及细胞的生长动力学，而细胞生长动力学又是在酶反应基础上发展起来的，所以下面先介绍酶动力学。

1. 酶反应动力学

酶反应有不少类型，有单底物或多底物的，也有单产物或多产物的，更有采用单酶和多酶的。下面仅讨论最简单的一种，即在单酶催化下，单底物变为单产物的反应。

单底物变为单产物的反应可分为两步：第一步为底物（S）被酶（E）的活性部位所吸附形成复合物并进行催化反应，第二步为产物（P）从复合物中脱附出来。

一般情况下，第一步是一个快反应，且是可逆的，而第二步则是一个慢反应，并可认为是不可逆的。因此，整个反应速率 决定于第二步的反应速率。

在反应达稳定状态时，

$$v = \frac{V_m S}{K_M + S} \quad (5-3)$$

此处， V_m 为最高反应速率（摩尔/升·时）， K_M 为米氏常数（摩/升）。

式 5 - 3 是由米凯利斯（Michaelis）和门特（Menten）在 1913 年提出的，常称为米氏方程式，也是最基本的酶反应动力学表达式。若以 v 对 S 进行标绘，式 5 - 3 可获得如图 5 - 7 所示曲线。

从式 5 - 3 及图 5 - 7 中可以看出：当 S 很大时， $v = V_m$ ，即 v 基本上不因 S 的变化而变化，接近于零级反应；当 S 很小时， v 与 S 间几乎成为直线关系，接近于一级反应。同时还可看出：当 $v = V_m/2$ 时的 S 值即为 K_M 。

K_M 值也可以认为是酶与底物的亲和程度， K_M 越小，图 5 - 7 中曲线越陡，说明亲和程度越大；反之， K_M 越大，说明亲和程度越小。 K_M 一般都小于 10^{-2} 摩尔/升数量级。米氏方程式还可说明以下事实：当底物浓度很低时，酶的活性中心远未被饱和，因此反应速率随底物浓度增加几乎成直线上升，底物浓度继续增加时，反应速率的增加仍与底物浓度增加成正关联，直至底物浓度达到一定值，即酶的活性中心都被饱和后，反应速率就基本上维持不变而达到最大值。在实际情况下，酶反应速率还会受到酶的失活和抑制的影响，而达不到米氏方程式的计算值。

图 5—7 米氏方程式的标绘

关于酶的抑制有不可逆抑制和可逆抑制两大类；前者是指酶的活性中心与抑制剂进行了共价结合而导致酶的永久失活；后者并不引起酶的完全失活，但部分酶分子因被抑制剂所结合而使这部分酶不能参与酶反应。

2. 细胞培养和发酵动力学

由于用于细胞培养或发酵的基质是多组分的培养基，这对动力学的研究带来了很大的困难，为此常把在培养或发酵过程中影响大、用量大且容易测定其浓度的某一基质作为限制性基质进行动力学研究。作为限制性基质的基质量是限量的，而培养基中其他组分的量是过量的，因此细胞生长或产物形成的速率就受限于限制性基质的浓度。常用作限制性基质的有碳源、氮源或

氧。

(1)细胞生长动力学 分批培养过程中的细胞生长约可分为滞迟(适应)、对数(指数)生长、稳定(静止)及衰亡等期。在工业生产中,最感兴趣的当然是对数生长期,但为了充分利用培养基残余成分或为了产品形成的特殊需要(有些次级代谢产物往往要在细胞生长到一定程度后才形成),而将培养过程延长至稳定期。

在对数生长期,细胞浓度的增长速率与培养液中活细胞的浓度 X 成正比,即

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (5-4)$$

式中, μ 为比生长速率;它与细胞种类、培养条件——培养基组成、限制性基质浓度、温度、pH 等有关。

1949年蒙德(Monod)在研究限制性基质浓度 S 与比生长速率 μ 时发现:当 S 较高时,细胞生长处于对数生长期, S 下降很快,但 μ 却维持在同一水平,说明在对数生长期, μ 不随 S 变化而呈现一个最大值 μ_m ;其后由于 S 下降至一定程度, μ 即开始减小,对数生长期也随之结束,也就是说限制性基质发挥其限制作用。在对数生长的后续期中 S 与 μ 的关系可由下式表示:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} \quad (5-5)$$

上式常称为蒙德方程式,其中 K_s 称饱和常数,其单位与 S 相同。

蒙德方程式在形式上和米氏方程式相同,含义上也类似,因此也同样可以获得如下规律:当 S 很大 ($S > 10K_s$) 时, $\mu \doteq \mu_m$,可认为是零级反应;当 S 很小时, $\mu \doteq (\mu_m/K_s)S$,可认为是一级反应;当 $\mu = \mu_m/2$ 时, $S=K_s$ 。同时也可用双倒数法求得 μ_m 及 K_s 值。

由于 K_s 值一般较小,微生物细胞的 K_s 值约在 $10^{-5} \sim 10^{-2}$ 千克/米³ 范围内,植物细胞的 K_s 约为 10^{-1} 千克/米³ 数量级,因此在分批培养中,在相当长的时间内可维持对数生长期,其比生长速率为 μ_m 。

关于 S 与 μ 之间的关联式还有不少,另外还有不少描述在基质或产物抑制情况下有关细胞生长动力学的表达式,这里就不一一介绍了。

(2)基质消耗和产物形成动力学 在细胞培养过程中限制性基质的消耗主要用于细胞生长,而在发酵过程中,基质的消耗除了用于细胞生长外,还应考虑用于产物的形成需要。此外,在上述两种过程中都应考虑部分基质消耗于细胞维持其生命,包括代谢过程基质的异化和同化、细胞的生长、产物的形成所需能量、所消耗的基质量。

在单纯的细胞培养过程中,限制性基质的消耗速率可以下式表示:

$$\frac{-ds}{dt} = \frac{1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{dX}{dt} = \frac{1}{Y_{x/s}} \cdot \mu X \quad (5-6)$$

当过程存在产物形成时,则可以下式表示:

$$\frac{-ds}{dt} = \frac{1}{Y_G} \mu X + mX + \frac{1}{Y_p} \frac{dP}{dt} \quad (5-7)$$

上两式中: $Y_{x/s}$ 为包括细胞生长过程中的能源消耗在内的限制性基质转化为细胞的得率系数(千克细胞(干)/千克基质); Y_G 为基质纯用于细

胞生长的得率系数（千克细胞（干）/千克基质）； Y_P 为基质用于产物形成的得率系数（千克产物/千克基质）； m 为维持细胞正常生命活动所消耗的基质，称为维持常数（千克基质/千克细胞（干）·时）； P 为产物浓度。

若以单位干细胞、单位时间内的基质消耗量称为比基质消耗速率 q_s ，把单位干细胞、单位时间内的产物形成量称为比产物形成速率 q_p ，则式 5-7 可写成：

$$q_s = \mu / Y_G + m + q_p / Y_p \quad (5-8)$$

当无产物形成时，式 5-7 可写为：

$$\frac{-ds}{dt} = \frac{\mu X}{Y_G} + mX \quad (5-9)$$

对照式 5-6，可得

$$1/Y_{X/S} = 1/Y_G + m/\mu \quad (5-10)$$

当培养过程中基质丰富时， $m \doteq 0$ ， $Y_{X/S} = Y_{P_0}$ 。

产物形成动力学的表达较为复杂，这是因为产物的形成与细胞的生长以至基质的消耗的关系因不同的发酵类型以至品种而异。

(3) 基因工程重组菌的生长动力学 由于重组菌都有一定程度的不稳定性，在培养过程中 DNA 重组质粒易被丢失。若以 X^+ 和 X^- 分别表示带有和丢失重组质粒细胞的浓度，两者的最大比生长速率分别为 μ_m^+ 及 μ_m^- ，细胞在培养过程中丢失重组质粒的机率为 p ，则

$$\frac{dX^+}{dt} = \mu_m^+ \frac{S}{K_S + S} (1-P) X^+ \quad (5-11)$$

$$\frac{dX^-}{dt} = \mu_m^- \frac{S}{K_S + S} X^- + \mu_m^+ \frac{S}{K_S + S} p X^+ \quad (5-12)$$

此外，还有连续培养、流加培养等培养方式的动力学表达式，这里不再作介绍了。

3. 生化反应工程简介

以上两节所讨论的都是属于本征或称微观动力学的范畴。但在实际情况中，细胞不一定是完全游离的，它可能是以丛状、膜状（附在惰性介质上）或颗粒状（包埋在惰性介质中）等形式存在于反应器中；酶也可能是固定化酶催化剂。研究这些非游离状态的生物催化剂的动力学行为，也即包括这些非游离状态生物催化剂周围（外部）和内部具有扩散影响的动力学，一般称为宏观生化反应动力学，是生化反应工程中的一个重要组成部分。

生化反应工程除了研究宏观生化反应动力学外，还研究反应器中的流体流动和混合对基质（底物）浓度的影响，以及反应器操作条件的优化和反应器的设计、放大等内容。

六、生物反应器

生物反应器是利用生物催化剂为细胞培养（或发酵）或酶反应提供良好的反应环境的设备，通常称为发酵罐或酶反应器。用于污水生物处理的曝气池或厌氧消化罐也可作为生物反应器的一类。生物反应器是生物反应过程中的关键设备，它的结构、操作方式和操作条件对生物技术产品的质量、转化率和能耗有着密切关系。

图 5-8 各种发酵罐示意图

- | | |
|---------------|--------------|
| (a)小型机械搅拌罐 | (b)组合机械搅拌桨装置 |
| (c)机械自吸罐的自吸原理 | (d)内循环气升发酵罐 |
| (e)大型气升发酵罐 | (f)喷射自吸式发酵罐 |

1. 生物反应器的结构与操作原理

(1)微生物发酵罐 微生物发酵设备有用于固体发酵和液体发酵之分；液体发酵罐又有厌氧和好气之分。由于现代工业发酵很少使用固体发酵，另因厌氧发酵罐结构简单，这里不作介绍。各种好气发酵罐装置可见图 5-8。

带有机械搅拌的发酵罐——这类发酵罐使用最为普遍，因其操作弹性大，易于控制，所以常称通用型发酵罐。它是一高径比为 2~3 的不锈钢或碳钢立式圆筒（图 5-8a），顶和底呈碟形，以适应罐内灭菌时的蒸汽压力，筒内装有机械搅拌和空气分布器。搅拌桨大多为圆盘上带有六个叶片的涡轮构成，分散气泡的效果好，且所产生的液流是径向的，可以延迟气泡在液体中停留时间。但此种搅拌桨消耗功率较大，对反应器中液体的整体混合功能不佳，特别对粘性较大的发酵液更不理想。于是采用两种搅拌桨组合使用的方法，即最下一层搅拌桨仍用涡轮搅拌桨，其余的则采用产生由上往下液流的轴向翼形搅拌桨（图 5-8b）。为了提高流体在反应器中的混合效果，在罐内壁装上 4~6 块与壁垂直的挡板是必要的。通常搅拌功率为 2~3 千瓦/米³（指电机装机容量）。空气分布器可以是多孔或单孔的。机械搅拌罐的能量消耗较大，必须要有严密的轴封装置，机械噪声较严重，对某些细胞形态敏感的场所会影响发酵水平。机械自吸式发酵罐是利用上下均有盖板的蔽式搅拌桨（图 5-8c）。通过与桨叶紧密接触的吸气管把外界的空气经过空气过滤器直接吸入搅拌桨的中心部位，然后与搅拌器吸入的液体相混合并被分散和被液体所吸收。此种发酵罐一般不需另通入压缩空气，但搅拌桨所耗功率为此增大；另罐内液面不能太高，否则外界空气就无法吸入罐内。一般适用于酵母的培养。

气升式发酵罐——是利用压缩空气为动力的发酵罐，高径比一般较大。它是从简单的鼓泡式发酵罐基础上发展起来的，可分升液和降液两个区域。空气从位于罐中央的拉力筒导入带动液体同时上升并向液体中供氧，在罐的上部空气逸出液面，液体则从环隙下降以形成循环，这是内循环气升罐（图 5-8d）。若把升（或降）液管置于罐外，则称外循环或环流气升罐。气升罐的优点是无机械运动部分，易于保持纯种培养，无噪声，造价较低，氧的传递效果较良好，问题是操作弹性较差，耗用压缩空气量较大，所配备电机的功率约为 3.5~5 千瓦。究竟何种产品适用于气升式发酵罐，最好通过实际试验，特别是具有高粘度发酵液的品种。目前在英国已制成容积为 2300

米³ (高 60 米, 直径 7 米) 的超大型气升罐 (图 5-8e), 用来以甲醇生产单细胞蛋白。它的升液区横截面为双圆缺型, 其中有多块多孔板以不断分散气体, 降液区则位于罐内双圆缺拉力筒的两侧圆缺部分, 原料甲醇从罐壁均匀注入。国内也制作了 180~250 米³ 的气升发酵罐生产 2-酮基-L-古龙酸 (维生素 C 前体)。最近英国还报道了一个用冷却蛇管代替拉力筒的 20m³ 气升罐用来进行具有高粘度发酵液的抗生素发酵, 取得良好的效果。

喷射自吸式发酵罐——是利用泵为动力并加上通过液体喷嘴将外界空气吸入罐内的发酵罐 (图 5-8f)。它的优点是不需通入压缩空气, 关键在于泵的严密性, 不致引起污染。同时因为泵的高速旋转造成很严重的局部机械剪切力, 故不适宜培养带有菌丝体的真菌和放线菌, 一般用于培养酵母。

(2) 酶反应器 酶反应器可分为用于游离或固定化酶的反应器两大类 (图 5-9)。前者又分为可截留与不可截留的两种; 其中不可截留的, 即指酶是一次性分批使用不再回收, 一般在釜式反应器中进行, 使用的酶较便宜; 而可截留的是通过超滤膜将酶截留在反应系统中。后者是指将酶或细胞固定在惰性介质中并制成颗粒、纤维或膜片状后, 放置在固定 (填料) 床或流化床反应器中进行酶反应; 也可将含酶膜片卷成螺旋状后置于筒型反应器中, 或将颗粒固定化酶 (细胞) 置于搅拌釜的转框或边框中。

固定化酶或细胞反应器可进行分批或连续操作。在进行酶反应时应注意酶在反应过程中的失活, 特别是在酶的稳定性差或连续操作周期很长的场合, 有必要向反应器中添加部分酶或固定化酶 (细胞), 以维持一定的转化率。

若酶反应器在分批情况下操作, 应尽量接近全混型 (在反应器中反应物的浓度是均一的); 而在连续操作时, 若系单釜操作, 也应向全混型靠拢; 若系用固定床、流化床等柱式反应器和螺旋酶膜反应器, 则应尽量使之接近活塞流型反应器 (在反应器中反应物的浓度仅有轴向的递减, 而无径向的差异) 特性。有些酶反应伴随着底物或产物的抑制, 在选择连续操作的反应器时, 有底物抑制的应选用连续搅拌釜式反应器 (在反应器及出口反应器中的产物浓度是一致的)。因在这种反应器中, 底物一经加入反应器立即被稀释, 整个反应器的反应液浓度是十分接近最终产物浓度; 当然这种反应器对有产物抑制的情况讲是十分不合式的, 而应采用活塞型反应器。在这种反应器中产物浓度是逐渐增高的, 仅在出口时达到最高值。当反应伴有温度或 pH 时, 应随时加以调节, 以维持酶的最适反应条件。在釜式反应器中可直接在釜中进行调节, 而在柱式反应器中, pH 的调节应沿轴向多个点加以调节或采用反应液外循环方式而在循环管中加以调节。当酶反应过程中产生气体时, 若采用固定床反应器, 料液不宜从上向下流动, 而从下向上流动, 这时实际上已成为流动床反应器了。

图 5-9 各种酶反应器示意图

(3) 动植物细胞培养用反应器 动植物细胞的特性与生物反应器的结构和操作有关, 主要为细胞体积较大, 倍增时间长, 对机械剪切敏感 (特别是动物细胞), 有的有附壁生长要求 (某些动物细胞), 营养要求高, 对氧的需求较低等。目前用于动物细胞培养的大致有机械搅拌式、气升式和中空纤维式等种反应器; 用于植物培养的大致为搅拌式和气升式反应器。

机械搅拌细胞反应器——其搅拌桨与用于微生物的不同，所采用的转速也低得多。由于动物细胞培养不宜直接用通过鼓泡向反应液供氧，因此供气系统与微生物发酵罐也有很大不同。常用的搅拌桨有螺旋桨、斜叶桨、帆形桨等，也可用一种旋转的笼式搅拌通气装置（图 5-10），同时起着液体混合和通气的作用，笼式搅拌通气装置具有一中空旋转导管，并有三个伸至罐内的出口，当其旋转时液体从导管底部吸入而从顶部三个斜口搅拌嘴甩出，形成罐内循环。在中空导管周围有一层用 200 目金属丝网组成的笼罩，通入反应器的气体通过笼罩扩散到培养液中，因而避免了气泡的产生。若培养的是附壁性细胞，则可将经灭菌的微载体以一定比例加入罐内。另一种通气装置是由微孔塑料管绕制而成，导入的气体通过管壁的扩散而到培养液中；采用这种通气装置时，就可采用螺旋桨、斜叶桨来进行搅拌了。搅拌式细胞培养装置可适用于附壁性细胞、非附壁性细胞（包括杂交瘤、植物细胞）的培养。在植物细胞培养时允许直接鼓泡通气。

气升式细胞反应器——其结构与用于微生物的无甚区别，但通气不宜太剧烈，气泡不宜太大，因此反应器的高径比不能太大。一般讲，气升罐只适合于植物细胞和杂交瘤细胞的培养。但用海藻酸钙包埋或用微囊法包裹的动物细胞也能在气升罐中培养。此外，有人用一种简单的气升罐，即用一竖直隔板把圆筒反应器一隔为二，隔板一侧装入固定化动（植）物细胞，犹如一固定床反应器，另一侧为鼓泡升液区。于是，隔板两侧各司其职，一侧是充氧，另一侧是细胞增殖。

图 5-10 笼式搅拌通气装置

- (a) 带有搅拌叶的笼式搅拌通气装置
- (b) 具有笼式通气腔的锥形反应器

中空纤维细胞反应器——其主体是由微孔中空纤维管束制成的，纤维束由外壳包裹，因此可分为壳体空间及管体空间两部分，每部分各有其进出口。一般讲，细胞生长在壳体部分，新鲜培养液从壳体部分导入，气体在管体部分通过，其中一部分则均匀地扩散至壳体部分。壳体部分的细胞如是附壁性的，则附着在纤维外侧，在培养结束后用胰蛋白酶消化液将其消化并冲出；若是非附壁性的应采用微滤材料将其截留在壳体内而让废培养液排出。另外一种考虑是细胞在壳体，新鲜培养液则是先经充氧后再导入管体部分。一般的情况下，纤维束两侧的流体是平行流动的，因此在新鲜培养液进入的一端，细胞长得较好，甚至堵塞壳体部分，另一端则长得很差，因此整个反应器利用率不高。因此有人设计了一种错流中空纤维反应器以克服上述缺点（图 5-11）。中空纤维反应器适用于动物细胞，特别是杂交瘤细胞的培养，这样就可以在一个较长时间内收集其所分泌的单抗。

图 5-11 中空纤维培养器

2. 生物反应器的设计和放大

(1) 生物反应器设计的总体考虑 生物反应器应该具备的特性是：结构严密，能耐受蒸汽灭菌，采用对生物催化剂无害和耐蚀材料制作，内壁光滑无死角，内部附件尽量减少，以维持纯种培养需要；有良好的气-液接触和

液-固混和性能和热量交换性能，使质量与热量传递能有效地进行；在保证产物质量和产量前提下，尽量节省能源消耗；减少泡沫的产生，或附有消沫装置以提高装料系数，并附有必要而可靠的参数检测和控制仪表并能与计算机联机。

一般讲，生物反应器的容积是指其空罐容积，也称公称容积（或体积）。若反应器是竖式容器，公称容积常指圆筒部分和碟形底的容积，而不计顶盖的容积。反应器的实际工作体积因通气量和泡沫形成程度而定，一般情况下，装料系数在 0.7~0.8 之间。若罐的高（指圆筒部分）径（指内径）比， $H/Dt=2$ 时，碟型底的容积约为圆筒容积的 8%。

(2) 搅拌桨 生物反应器所配备的供搅拌用的电机装机功率，大致根据 2~3 千瓦/米³（反应液体积）来估计。若要合理地确定搅拌桨的个数（同一搅拌轴上）以及转速和直径，应进行必要的计算，此处不再详述。关于常用搅拌桨的几何比例可见图 5-12。

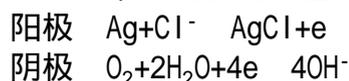
图 5-12 生物反应器中常用搅拌桨

(3) 有关氧传递问题 在生物反应器中，氧的传递速率要满足细胞对氧的摄取速率，并使反应器中溶解氧的浓度 C_L 要维持在一定水平上。这就是说，在稳态情况下，供氧与需氧间存在下列关系：

$$K_L a (C^* - C_L) = r \quad (5-13)$$

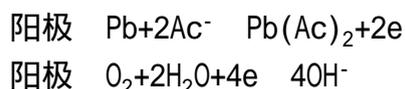
此处， $K_L a$ 为氧的传递系数； C^* 为相当气相氧分压的溶氧浓度， C_L 为培养液中溶氧浓度， r 为摄氧率。

溶氧的测定可用氧电极来实现，氧电极有两种（图 5-13）。极谱型氧电极在工作时应两极间施以 0.6V 左右的直流电压，用微安表测定还原电流。若以银为阳极（实际上阳极为 Ag-AgCl 电极），铂、金或银为阴极，用 KCl 配成电解质溶液时，其两极的反应为：



原电池型氧电极不需外施直流电压，可用微安表直接测量或用毫伏表并联测量。若以铅为阳极，贵金属作阴极，醋酸缓冲液为电解质溶液，则两极的反应为：

图 5-13 氧电极示意图及其接线图



电极在使用前应置于 Na_2SO_3 溶液中使其与空气隔绝，以便去除电解质池中的氧。被测溶液的氧分子透过薄膜在阴极被还原，所需电子由阳极通过外接导线传递至阴极。因此说，进入薄膜的氧越多，从阳极传递至阴极的电流也就越大，而进入薄膜的氧量与被测溶液中的溶解氧浓度成正比。应该指出，上述氧电极不但能测溶解于溶液中的氧，也能测定大气中或气相中的氧，因此氧电极所检查的不是真正的溶解氧浓度，而是氧分压。为此常把氧电极对溶解氧浓度的响应值用 % 饱和值表示，即将电极置于无氧被测溶液中的响应

值作为零饱和值，而把其置于被空气饱和后的被测溶液中所得响应值作为100%饱和值。

(4)影响供氧的因素从式 5-13 可知 $r=K_L a(C^*-C_L)$ ；因此影响供氧的因素总体上讲是 $K_L a$ 和 C^*-C_L 值。

要增大 C^*-C_L ，无非是增大 C^* 值或降低 C_L 值。增大 C^* 的措施，有适当增加反应器中操作压力和增大气相中的氧分压两个方法。在实际操作中，反应器保持一定正压，以防止大气中的杂菌从轴封、阀门等处侵入，但在增加罐压的同时，发酵代谢所产生的 CO_2 也会更多地溶解于培养液而对发酵不利。至于 C_L 值，一般不允许过分减小，因为细胞在生长中有一个临界氧浓度，低于此临界值，细胞的呼吸将受到抑制。

氧传递系数 $K_L a$ ，实际上包括氧传递系数 K_L 及单位体积气液混合物中气泡的总表面积，即比表面积 a 两个部分。增大通气量和减小气泡直径有利于增大 a 值。在实践中，机械搅拌罐要维持小气泡主要是靠搅拌桨的作用，在气升式及鼓泡式反应器中主要通过空气分布器得到小气泡。

影响 $K_L a$ 的因素大致可分为三个方面：一是反应器的结构，包括相对几何尺寸的比例；二是操作条件，如搅拌功率或循环泵功率的输入量，通气量等；三是培养或发酵液的物理化学性质，如流变特性，特别是其粘度或显示粘度、表面张力、扩散系数、细胞形态、泡沫程度等。一般情况是，在机械搅拌反应器中， $K_L a$ 随搅拌桨的直径、转速、通气流速和氧在培养液的扩散系数的增大而增大，而随培养液和粘度或显示粘度和培养液的表面张力的增大而减小。球状菌丝的形成可降低培养液的粘度，但颗粒过大时会影响氧在液-固相间的传递。有时适当向发酵罐中补入无菌水或稀培养基也有利于粘度的降低。消沫用的表面活性剂的加入，有利于气泡分散而使 a 值增加，但表面活性剂往往会聚集在气液界面，影响氧的传递，因此不宜多加。在鼓泡塔或气升反应器中， $K_L a$ 主要随通气流速的增大而增大，并随气升罐中的降液区与升液区截面积之比的减小而增大，当然也受到培养液的物理性质的影响。应该注意的是气速也不能过大，要考虑因增大通气的功率消耗和大量泡沫形成以致“逃液”的发生。

(5)生物反应器中的传热 在细胞培养和发酵过程中，热量的释放是普遍存在的。这是因为在培养或发酵过程中细胞与周围环境的物质产生新陈代谢，即发生异化（分解）作用和同化（合成）作用，而异化作用一般释放能量，同化作用则是吸收能量。同化作用包括细胞生长、繁殖、产物形成所需能量来自细胞对培养基中的基质及营养成分的异化。从热力学角度讲，异化所产生能量必然应多于同化所需要能量，而多余的能量则转化为热能释放到周围环境中去。无论是涉及细胞或酶的反应中，释放出的热量都应及时移去，以免影响过程的正常进行，为此在生物反应器中一般都附有冷却装置。如属釜式反应器，小型的一般用夹套，大型的可用螺旋盘管或竖立排管。

抗生素发酵时的发酵热一般为 12000~21000 千焦/米³·时，而不同发酵的发酵热范围在 10000~34000 千焦/米³·时之间。在使用夹套时，其总传热系数 K 约为 400~630 千焦/米²·时·度，盘管及排管的 K 值约为 1200~1900 千焦/米²·时·度。

(6)生物反应器的放大 一种新的生物技术产品从实验室到工业生产的开发过程中，会遇到生物反应器的逐级放大问题，每一级约放大 10~100 倍。

此外，生物反应器的发展趋势之一是向大型化发展，以提高劳动生产率和降低生产成本，因此对成熟的生物技术产品也存在一个反应器放大的问题。生物反应器的放大，表面看来仅是一个体积或尺度放大问题，实际上并不是那么简单。我们可以在细胞培养或以游离活细胞为生物催化剂的发酵过程为例进行说明。设想在细胞培养反应器或发酵罐中的每一个细胞都看成是一个微型反应器，它们都单独承担着异化和同化作用。欲使整个反应器处于最优条件下操作，必须要使反应器中每一个细胞都处于最优环境之下，不然就达不到整体的优化。要做到这一点，首先要使反应器中每一个微单元流体的营养物质和溶解氧浓度、流动情况都是相同的，即处于高度均一的情况，并要求反应器中的细胞年龄也相同。在实际情况下物质存在着浓度分布，流体存在着速度分布、细胞也存在着细胞龄的分布，甚至还存在着个体的遗传性能的变异。在生活实际中常会有这样的经验，小容器的内含物的混合要比大容积方便得多，何况是要达到分子水平的混合。因此说有关反应器的放大存在的难度是很大的，亨弗莱教授曾说过：“与其说反应器放大是一门科学，还不如说是一种技巧。”“到目前还是一个卡脖子的问题，但不能说我们无所适从，无能为力了；因为反应器设计的不足，可以用改变工艺条件和进行过程控制的手段加以弥补。”

目前对反应器的放大研究虽已提出了不少方法，但确还没有一种是普遍都能适用的。因为不同品种产品的反应特性和物性特征不一，对各种反应器的混合、传递特性，特别是在具体真实的培养（发酵）液中的混合、传递特性还掌握得不够，对不同尺度下反应器的功效影响，即放大效应更是缺乏完整的理论。为此目前反应器的放大还只能是半理论半经验的，即抓住反应过程中的少量关键性参数或现象进行放大。例如在发酵过程中，发酵罐内的溶氧浓度和菌丝形态及长度往往是最重要的影响菌体生长和产物形成的因素，因而常环绕这两因素来考虑放大的研究。

3. 生物反应器工程简介

近年来，在生物技术领域中出现了生物反应器工程这一名词。它包括生物反应器的结构、操作条件与混合、传质、传热之间的关系，生物反应器的设计、放大等属于生化工程范围的研究；也包括在生物反应器中进行微生物发酵、动植物细胞培养和酶反应中结合反应器的类型、生物催化剂和培养液的特性研究生物反应器的优化操作方法和条件，对过程检测与控制进行必要的考虑等属于发酵工程内的有关内容。也就是说，生物反应器的特征与所研究的目标产物的反应特征应联系起来进行研究。这对生物技术的实验室成果加速开发和对提高现有生产过程的生产能力都是十分必要的。

七、生物生产过程的检测与控制

生物生产过程的自动化是实现高产优质、改善劳动条件、保障生产安全和降低生产成本的一项重要措施。生物生产过程的过程比较复杂、要求严格、影响过程正常进行的参数众多，因此在生产中应尽可能采用有关检测及显示手段指示或记录有关参数的变化，并通过调节或控制手段对生产中有关关键参数进行控制，使过程能在预定条件或最适条件下进行。

1. 过程参数的检测

用于生物生产过程参数检测的传感器，应是可以耐受蒸汽灭菌直接插入发酵罐中；若检测元件（如酶电极）不能直接插入罐内，则可通过流动注射分析系统与发酵罐相连后测定，或通过取样间断检定；若目前尚无适当的传感元件，则只能间断取样检定了。以上四种情况，前两种为在线检测，所测得信号可通过变送器从两次仪表连续显示式记录或进一步输入控制器对过程进行调节或输入计算机进行数据处理；后两者为离线检测，要通过手工才能输入计算机。

在生物生产过程中常用检测物理和化学环境的传感器可见表 5-3。由表可知，一些在生产中很重要的能直接检测细胞浓度的传感器还没有，检测产物浓度的也很少。

表 5-3 常用检测物理和化学环境的传感器

物理环境	化学环境	
	成熟	不成熟
温度	PH	微量元素
压力	氧化还原电位	RNA
轴功率	溶解氧	DNA
搅拌转速	溶解二氧化碳	NAD , NADH
泡沫	尾气中氧	脱氢酶浓度
气体流量	尾气中二氧化碳	ATP , ADP , AMP
加料流量	糖浓度	
粘度	氨氮浓度	
浊度		
液面		

下面择要介绍上述传感器的类别和性能。

(1)温度 常用是热电偶和热敏电阻温度计，后者可与串级调节装置耦合。

(2)压力 一般用金属隔膜式压力计较好，以减少污染。发酵罐内的压力可用背压调节阀调节。

(3)轴功率 主要有扭力功率计和应变计。前者装于罐外转轴上，测量结果因包括轴封装置的功率消耗而影响正确度；后者可装轴的罐内部分，信号通过两滑环和轴内中空孔道引出。

(4)搅拌转速 通过测速发电机测量，输出信号是毫伏，应事先标定。

(5)泡沫 一般用电导或电容式探头测定并与加入消沫剂相结合。

(6)气体流量 可用电容或电阻式转子流量计或热线流量计（也称质量流

量计)，其原理是热敏电阻线的温差变化与通过气体质量有关。

(7)液体流量 在生产中以用电磁流量计和隔膜式计量泵为好，或用装电子秤的计量罐计量，在实验室中用可靠的蠕动泵或有刻度的计量管。

(8)培养液粘度 粘度的测定有利于了解发酵罐中菌体生长和其形态变化的情况，但至今还无一适用于罐内检测粘度的装置。特别是在非牛顿型发酵液场合，不同的流动速率和菌体形态所测得的粘度（显示粘度）不同。有人建议用暂停搅拌（不超过 30 秒）后从搅拌功率检测装置中测定其应变改变情况可推测发酵液的粘度的方法。也有人建议用带小圆盘振动子（固定频率）从其振幅变化中推测粘度的方法。实践证明，在氧传递很差和搅拌功率受到限制时，往发酵罐中加以无菌水稀释是有效的。

(9)浊度 一般可定期取样用浊度或光电比色计测定，或直接进行菌体干重分析。现也有一种在线检测装置报道，即通过光导纤维把光源引入发酵罐并入射到置于发酵液中的一可移动前后位置的反射板上，反射后的光束通过另一光导纤维输出到光电池，从而检测反射强度。

(10)pH 一般是通过耐蒸汽灭菌的复合玻璃电极，即将玻璃电极与银-氯化银电极合于一体的电极测定。pH 传送器应单独接地，否则易引起干涉。

(11)溶解氧 见本章第六节。

(12)尾气中的氧和二氧化碳 尾气应先除去其中水汽再进行检测。氧可用顺磁氧分析器或电极，二氧化碳可用不分光红外气体分析器或热导式分析器。若采用小型质谱仪则可同时测定多个发酵罐尾气中的 O_2 及 CO_2 。

(13)液面或反应液体积 可通过金属膜压力计测不同高度的液压差求得，或直接用电子秤称重求得。

为了解决酶传感器不能耐受蒸汽灭菌而无法直接插入发酵罐的困难，近年来发展了流动注射分析方法，可逐步解决对发酵过程中基质和产物的在线检测问题。该系统是将发酵液通过一具有微孔滤棒或滤膜的取样器，从发酵罐中借蠕动泵的抽吸力连续将清液引出，引出的清液经过多通道旋转分配器注射到各种不同的通道中去。通道的数量和所含的检测和测量单元需根据要求和反应性质而定，如用酶或微生物电极时仅需将信号接到测量系统即可，若需通过酶反应的则将酶的底物和缓冲液混合后通过微型固定化反应器，其反应产品则通过检测系统进行测量（见图 5-14）。

图 5-14 连续注射分析系统示意图

参数检测中另一个难题是菌体浓度的检测。上述用浊度计测定的方法仅适用于单一细胞悬浮在无色或浅色的无固体培养基的场合，且不适用于细胞浓度过高的情况下。另一种可插入罐内间接测量菌体浓度的是荧光检测传感器，它能发射紫外光（366 纳米）并使细胞内的还原性吡啶核苷酸发出荧光（最大峰为 460 纳米）而被光电二极管或光电倍增管所检测。荧光的强度可以反映菌体量和细胞代谢状况。但此种检测装置因存在多种因素对其干扰，如菌体和培养基成分对其污玷，气泡对光束的干扰，培养液中其他能发出荧光物质的干扰，因此使用效果还不理想。细胞浓度还可以用碳平衡法计算而得，或通过 CO_2 排出量来估算。当在有计算机对发酵过程进行在线控制时，要做上述计算和估计并不十分困难，当然在计算时，其他有关参数值要求完全和正确。

还有一些所谓“二次参数”，是将上述有关参数值进行综合而得的，如比生长速率、摄氧率、呼吸商、产物-基质转化率、体积氧传递系数等都是工艺操作控制中很重要的。若是与上述二次参数有关的一次（基本）参数都是在线检测的，那么二次参数也可由计算机在线获得。

2. 过程的控制

生物生产过程一般是分批进行的；其所用生物催化剂，特别是活细胞具有遗传变异性和细胞龄的分布不均一性，受环境影响敏感；反应机理复杂，易于失调；各批原料成分难以一致；因而可使生物生产过程，特别是有活细胞参与的生产过程变得十分难于控制。这是一种动态（时变）、多参数耦合、非线性（非叠加）和随机（不确定和不稳定性）的过程控制。

针对上述情况，我们可考虑采用两类控制对策。其一是选择若干对过程正常进行影响大且易于控制的关键参数进行单回路的设定控制，或简单的相关控制（串级控制），以至根据“最佳”工艺控制规迹的改变设定点的预定程序控制。以上一般称常规控制，可用常规调节器、单板机和简单工业控制机进行。二是高级控制，其中最优化控制、自适应控制，需对受控过程进行包括系统辨识（也称模型辨识）、模型变量（包含状态和参数，前者为时变变量，如细胞浓度、基质浓度、产物浓度等，后者为非时变量）的估计等过程模型化（也称建模）的研究。在实践上一般采用两级计算机控制，下位机负责数据检测、显示、储存和单回路常规控制，上位机负责数据处理、分析、决策输出人机对话、输入离线数据、输出图表记录等工作。对模糊控制、专家系统、神经网络系统，一般事先不需要数学模型，但对计算机的要求更高。

(1) 常规控制这一类对策简单易行，在一定程度上也行之有效，但不能优化控制以对付过程中复杂变化。

两位式（开-关）控制——当检测量超过或低于某一设定值时执行元件就自动改变其开启或关闭的状态。这种控制可用于温度、pH、消沫、流加等控制。

比例-积分-微分控制——该控制的精度较高，但很难调整，调得不好会引起控制值的波动。此种控制可用于温度、pH、搅拌转速（指安装可变速电机时）、空气流量等控制。

反馈控制——将过程输出的测量值与设定值间的误差反馈到控制器中并通过一定的算式决定其控制量的控制方式。其控制单元如图 5-15 所示。反馈控制可用于 pH、温度、空气流量、搅拌转速，并可对溶氧进行一定范围内的控制。所用控制器可以是常规的，也可以是数字计算机系统。



图 5-15 反馈控制流程图

串级控制——指一个主参数（主回路）的控制需通过几个相关参数（副回路）的协同调节来完成。如发酵罐中的溶氧水平需通过通气量、搅拌转速和罐压的协同调节才较理想（图 5-16）。

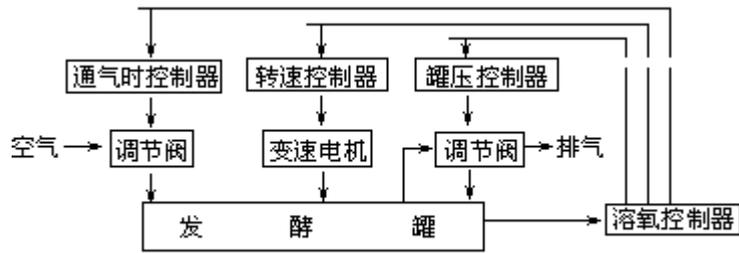


图5-16 溶氧的串级控制流程图

(2)高级控制 高级控制一般须经过实际生产数据和经验的系统统计和过程机理的分析提出若干反映过程变化规律的数学模型，并通过与实际情况的验证，最后筛选或修正成一个最理想的模型——系统或模型辨识，同时还必须进行模型变量（状态和参数）的估计。这是一类理想的对策，若能实现，效果也应是满意的。目前已在一些较简单的微生物培养过程中得到应用，但对较复杂的发酵过程还停留在研究阶段。

目前在高级控制中，用于生物生产过程的以动态最优控制的研究最多，特别是用来控制流加-分批发酵（培养）中的流加量；自适应控制和以专家系统和模糊控制相结合的研究也较多；神经网络系统还正在探索研究中。

八、生物生产过程中的分离操作

1. 生化分离的特点和基本路线

生物生产过程的最后一个环节是把目标产物从反应液中加以分离成为符合质量要求的产品，并要求收率高，成本低。从酶反应液中分离产物相对要比从发酵液中分离产物容易得多，因后者首先要把细胞从发酵液中分离出来。若产物在胞内还得先将细胞破碎后才能进一步处理，若产物在胞外也必须先除去细胞获得滤液。在发酵过程中，必然还会同时产生很多非目标产物，但与目标产物理化性质相近，目标产物的含量往往是较少或很少的。此外，不少产物属活性生物物质，对热、pH 以至剪切都很敏感，在分离过程中必须在低温和一定的 pH 范围和剪切应力下操作，并严格防止外界微生物和杂物的污染。

由此可见，生化分离是步骤多、要求高、对最终产品进行“把关”的生产环节，所含产品总成本的比例也较高，约为 40%~60%。美国一家药厂在生产重组人胰岛素的初期，其分离步骤多达 64 步，其总收率仅为 3.75%，因而迫致停产。

有关生物技术产品的一般分离路线如图 5-17 所示。下面对几类重要的生物技术产品的大致分离路线进行简短的介绍。

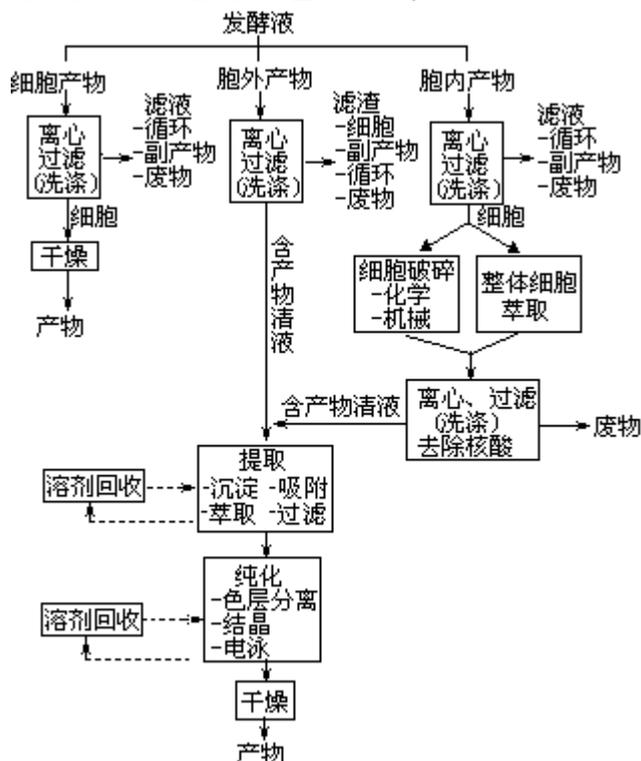


图 5-17 生物技术产品的一般分离路线图

溶剂类：如乙醇、丙酮-丁醇的发酵液，不必先行菌体去除，可将其直接进入醪塔。溶剂从塔顶馏出，菌体及其他固体物随废液在塔底放出。从醪塔馏出的溶剂还要经过精馏或分馏得到产品。

柠檬酸：主要采用钙盐沉淀法，即将发酵液过滤后的滤液加入石灰乳，使柠檬酸形成钙盐而沉淀。沉淀物经加入硫酸后形成碳酸钙沉淀而将柠檬酸释出。在去除碳酸钙后的溶液经蒸发浓缩、结晶、离心、干燥后即得成品。

抗生素类：大致可分为三种路线，但多数都需进行菌体分离。液-液萃

取法，如青霉素、头孢霉素、红霉素、林可霉素等具有在偏中性 pH 时成盐能溶于水，而在酸性（带羧基的抗生素）或碱性（带碱基的抗生素）情况下成酸或碱能溶于有机溶剂的特性，反复采用水和溶剂（对抗生素的溶解度大，而与水不互溶，但有一定密度差，且无害无毒）在不同 pH 情况下进行液-液萃取和反萃取。萃取液经脱色等精制处理后，可进行结晶、干燥获得产品。

离子交换法，如链霉素、庆大霉素、卡那霉素等氨基糖苷类抗生素和多粘菌素等能在一定条件下离解为阳离子或阴离子，故可使用离子交换树脂对其提取。其洗脱液经脱色、浓缩、喷雾干燥等精制工序即得成品。沉淀法，如用于四环类抗生素是利用其具有等电点（当溶液的 pH 等于两性物质的等电点时，该物质在水中的离解度最小，溶解度最大），该两性均质即沉淀而出。如认为纯度不够，可将其溶解后再形成某种不溶性盐后再进行过滤、干燥得到成品。离子交换法和沉淀法也适用氨基酸的分离。

工业酶类：将发酵滤液或细胞匀浆后的滤液经沉淀、超滤、色层分离、透析、冷冻干燥等工序获得产品。由于酶是蛋白质物质，一切操作都应在低温下进行。

有关从重组菌中获得产品的分离过程的实例如图 5-18 所示。

2. 发酵液的预处理和固-液分离

(1) 发酵液中蛋白质的去除 这是指目标产物是非蛋白质物质的场合。

加热——当目标产物为非热敏时，加热可使发酵液中蛋白质变性而改善固-液分离条件，并使发酵液获得巴氏灭菌的作用。如链霉素发酵液在 pH3 的条件下，70℃ 加热半小时后可使过滤速度增加 10~100 倍。

凝聚——采用一种往发酵液中加入电解质的方法，使其中蛋白质发生凝聚或絮凝。最简单的电解质是酸碱，其次是无机化合物，如三氯化铁、明矾等。常用合成高分子电解质有聚丙烯酰胺、聚乙烯亚胺、聚胺盐，并常与无机化合物共用。

添加助滤剂——主要作用是吸附蛋白质使发酵液易于过滤。常用的助滤剂有硅藻土、珍珠岩、磨碎木浆、淀粉等。助滤剂的加入能改善可压缩性滤饼的性能，形成更多的可透过通道，适用于过滤具有菌丝体的发酵液。

(2) 发酵液的过滤 过滤是指在压力（或真空）的情况下将悬浮液通过过滤介质使达到固-液分离的目的。常用在压力情况下过滤的设备有板框式、滤叶式、滤管式等过滤机，尤以板框式使用最多；在真空条件下操作的主要是转鼓式过滤机。微孔膜过滤也可列入过滤范畴，常用的有板框式、卷筒式、中空纤维束式等。

常规过滤中的阻力主要来自滤饼，真空连续转鼓过滤机装有固定刮刀可把鼓面上的滤饼不断刮去，使过滤速度能维持恒定。这种过滤机较适用于霉菌的发酵液。若用于处理放线菌发酵液，可先在鼓面上预铺一层 2~10 厘米厚的助滤剂层；在正式进行发酵液过滤时，可利用缓慢向鼓面移动的刮刀连同滤饼和薄层助滤剂一起刮去。

出于与转鼓式过滤机无滤饼产生的同样考虑，近年来出现的微孔滤膜过滤装置是使料液以较高流速沿着过滤膜面流动，使颗粒不致聚积在膜面上。料液一般是多次循环与过滤面相接触，因此料液最后是增浓了，也就是说微孔膜过滤获得的充其量是稀浆液，还要靠过滤或离心实现最终的固-液分离。

(3) 发酵液的离心分离 离心分离是利用圆周加速度形成的惯性离心力将物料从离心力场的中心沿半径方面向外周移动，因固体颗粒质量和体积大于

液体，因此被集中在外缘部位，达到固-液分离的目的。应该指出的是离心分离所获得的“滤饼”，其含水量一般大于过滤。

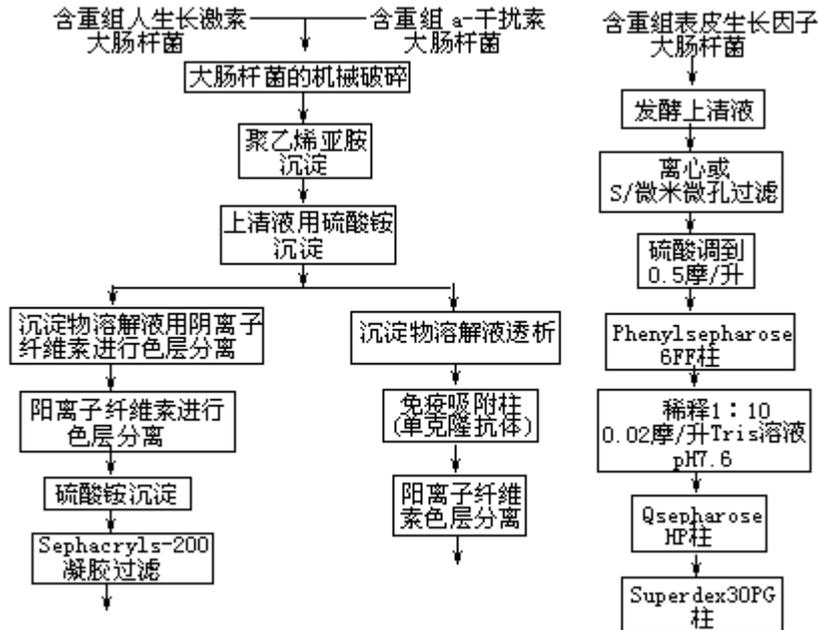


图 5-18 从重组大肠杆菌中分离蛋白质产物

离心分离可分为固-液分离和液-液（两种不互溶但比重不同的液体）分离两大类，均广泛用于生物生产过程。以固-液分离而言，可有离心沉降和离心过滤之分。前者的转鼓壁上不开孔，后者鼓壁上有均匀的小孔，鼓壁内衬有过滤介质，滤液可通过滤饼层外流。有关离心沉降的离心设备还有不同设计，具体可见表 5-4，其示意图则可见图 5-19。

表 5-4 各种离心沉降设备的性能

名称	沉降物卸出方式	料液中含固量 (%)	最大生产能力(米 ³ /时)	适用产物
鼓(管)式分离机	停留在鼓(管)内	0 ~ 1	100	疫苗
固相喷射分离机	间歇从径向通道卸出	0.01 ~ 10	200	酒精酵母、柠檬酸、酶制剂、放线菌抗生素、疫苗
喷嘴喷射	间歇从径向通道卸出	0.2 ~ 20	100	
喷嘴式分离机	连续从鼓壁喷嘴中卸出	1 ~ 3	300	面包酵母、啤酒酵母、单细胞蛋白、酶制剂
倾析式分离机	由内藏螺旋输送机卸出	5 ~ 8	200	单细胞蛋白、霉菌抗生素、柠檬酸

一定大小的颗粒在离心沉降中是否能获得分离，与离心机的分离因素 f 值（与转速的平方和转鼓的直径成正比）有关，还与分离时间 t 有关，因此常把 ft 值作为对一定大小颗粒的离心分离必要条件（表 5-5）。

(4)细胞的破碎 可用于细胞破碎的方法较多，现简列于表 5-6。

细胞破碎主要用于以大肠杆菌为宿主生产重组多肽药物的场合，这时蛋白质以沉淀的形式存在于细胞之内。某些代谢产物，如抗生素、类脂、核酸、酶等也有产生在胞内的，但其中相当大一部分不必先破壁，因为在萃取过程中，细胞壁同时被破碎。图 5-20 是有关重组大肠杆菌发酵液预处理的流程。某些微生物细胞一次通过排出阀的破碎率与操作压力之间的关系可见表 5-

7。

表 5-5 一些细胞物质的离心条件

颗粒	离心条件 $ft(10^6 \text{ 秒})$
真核细胞	0.3
叶绿素	
真核细胞碎片	2
细胞核	
蛋白质沉淀	9
细菌	18
线粒体	
细菌细胞碎片	54
溶酶体	
核蛋白体	1100
多核蛋白体	

表 5-6 各种细胞破碎方法

名称	原理	对细胞的剪切	价格	应用实例
化学方法				
渗透压变化法	藉渗透压变化破碎细胞	温和	便宜	大规模应用,如细血球的破碎
酶消化法	细胞壁被消化	温和	昂贵	实验室操作,如溶菌酶用于微球菌的破碎
助溶法	洗涤剂对细胞膜的助溶	温和	较昂贵	大规模应用,如胆汁酸盐对大肠杆菌的助溶
类脂溶解法	有机溶媒对细胞壁的溶解	中等	便宜	大规模应用,如甲苯对酵母的破碎
碱处理法	细胞膜类脂被皂化	剧烈	便宜	很少应用
物理方法				
冻融法	反复对细胞进行冻结和融化,使细胞破裂	中间	便宜	应用不多
珠磨法	靠研磨珠的翻动使细胞破碎	中间	中间	大规模应用,如细菌、酵母的破碎
超声法	利用超声的空穴作用进行破碎	剧烈	昂贵	适用于实验室
匀浆法(高压)	细胞在压力下通过小孔,靠剪切破碎	剧烈	昂贵	适用于大规模操作,但对细菌不完全适用
匀浆法(常压)	靠旋转刀片机械破碎	中间	中间	适用于动物组织和细胞

3. 产物的提取

产物提取是把经预处理过的发酵滤液中含量很低的目标产物加以浓缩,使其从稀溶液中得以提取和纯化。用于产物提取的方法主要是萃取和吸附,在个别情况下也有先采用蒸发、超滤、沉淀等方法,使目的产物从发酵滤液中进行提取和浓缩。

(1)液-液萃取法 利用某些与水不互溶的有机溶剂——轻相与含产物(溶质)的水溶液——重相在混和过程中,因产物于一定条件下在有机相中的浓度大于水相中的浓度,而使相当一部分产物从水相转移到有机相。在另一条件下,又可使产物从有机相转回到水相,称为反萃取。经多次萃取和反萃取后,可使极大部分产物和一些化学性质相近的化合物(杂质)从发酵滤液中提取出来。液-液萃取法可用于很多抗生素、有机酸、维生素和激素的提取。

表 5-7 若干菌体一次通过高压匀浆机的破碎率

菌体	压力(兆帕)	破碎率(%)
面包酵母	53	62
啤酒酵母	55	61
大肠杆菌	53	67
解脂假丝酵母	55	43

图 5-20 用于重组大肠杆菌发酵液预处理的流程

在液-液萃取中,含有产物的稀溶液称为原料液,用来萃取产物的溶剂称为萃取剂,经萃取后富有产物的溶剂称为萃取液,而被萃取出产物的溶液称为萃余液。

液-液萃取的基本原理是基于溶质在两相液体中分配的不同。它可以分配定律来说明。当溶质与轻、重两相充分混和,并在一定温度和稀溶液情况下,轻液中溶质的浓度 x 与重液中溶质的浓度 y 之比恒为常数,此常数即称为分配系数 K 。

$$K = \frac{x}{y} \quad (5-14)$$

在萃取时,所选择的溶剂应使 K 值较高为好;而在反萃取时,则希望较低为好。通过萃取后,萃取液中溶质量比残余液中的溶质量之比也希望是越大越好,但究竟其比值,即萃取因素(E)是多少呢?这除了与分配系数 K 值有关外,还与轻、重两相的体积比 V_S/V_F 有关。

$$E = K \frac{V_S}{V_F} \quad (5-15)$$

但 V_S/V_F 也不能太大,否则达不到浓缩的目的,另外溶剂的使用量也较大,一般情况下,溶剂比应小于 1。至于有多少溶质可从原料液中提取到萃取液中,则可由上述萃取因素 E 先求得未萃取分率,再求得理论收率 $1 -$ 来决定(指一次萃取)

$$= \frac{1}{E+1} \quad (5-16)$$

$$1 - \frac{E}{E+1} \quad (5-17)$$

液-液萃取常有四种操作方式,即单级萃取、多级错流萃取、多级逆流萃取和双流动相分级萃取。多级萃取,特别是逆流场合下的收率要比其他方式的高。由于发酵滤液中不免仍含有蛋白质类物质,引起在水相与有机相混和时产生相当严重的乳化现象,虽在混和前加入去乳化剂也难以靠两相间的密

度差进行重力分层而必须借助液-液离心分离机加以分离。

(2)其他萃取新技术 在七十年代以后出现三种新技术。

两水相萃取——所谓两水相是利用某些亲水性聚合物自身分子间的作用力和对它种亲水性聚合物分子排斥力而使两种聚合物水溶液的分层；或根据盐析作用原理，在一亲水性聚合物溶液中加入一定无机盐使之形成两水相系统。聚乙二醇和葡聚糖系统以及聚乙二醇和无机盐系统就是上述两类形成两水相系统的实例。

液-液萃取不能用于蛋白质类物质的提取，因有机溶剂会使它们变性失活，而两水相萃取能用于蛋白质的提取。因两相间存在着分子大小的差异，与各自溶液间的表面张力不同，两种分子带电荷情况也不同，可导致蛋白质在两相中的溶解度不一而进行分配。目前两水相萃取主要用于多种价值较高的胞内酶用聚乙二醇(PEG，分子量6000)/磷酸钾系统从大肠杆菌匀浆液中提取β-半乳糖苷酶的流程列于图5-21。

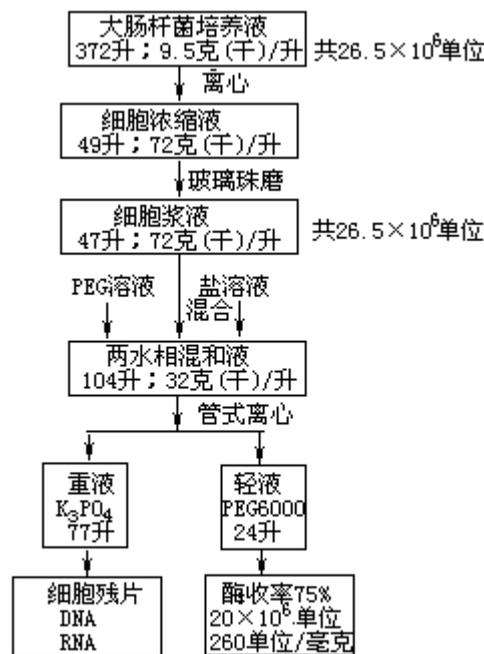


图 5-21 用两水相萃取法从大肠杆菌中提取β-半乳糖苷酶流程

超临界(流体)萃取——利用某些流体在高于其临界压力和临界温度时具有很高的扩散系数和很低的粘度，但具有与液体相似的密度的特点，并可把它作溶剂对一些液体或固体物质进行萃取。这种萃取法不但萃取能力大、速度快，且可适当控制萃取时压力和温度，使对某些物质具有选择性。

常用的超临界溶剂及其临界温度和压力为：

	Tc(K)	Pc(兆帕)
CO ₂	304.2	7.28
N ₂ O	309.7	7.17
H ₂ O	647.3	21.77C
CH ₃ OH	513.2	7.87

由于CO₂的临界压力和温度较低，且安全无毒和价廉，因此使用最广，但当其处于超临界情况下呈非极性溶剂特性，不能用于蛋白质萃取。为此可适当加以一些极性辅助溶剂来增加其对极性物质的溶解度。水在超临界状态下呈中等极性溶剂的性质，可与正己烷、苯等互溶，无机盐类则不能被溶解。

N_2O 及 CH_3OH 价值较高，后者尚需考虑其可燃性，分离时不能把气体直接释放至大气。

逆胶束萃取——逆胶束是由表面活性剂形成“油包水”微滴，表面活性剂极性头朝着胶束内的水滴，而把非极性尾向着周围的有机溶剂。此法在 80 年代中期才开始研究，目前还缺乏应用实例。在搅拌情况下，使水相中的蛋白质通过形成反胶束的方式进入微胶束而不与胶束外的有机溶剂相接触。

(3) 吸附法 吸附和萃取一样，都是从十分稀的溶液中把溶质进行浓缩的过程。吸附发生在溶质与固体吸附剂相结合的场所，这种结合一般是有选择性的和较缓慢的，通常还要用另一溶剂将所吸附的溶质从吸附剂上洗脱下来。与萃取法比较，吸附法较为温和，能提取蛋白质类物质而不使其变性。有时不必用清滤液吸附而可直接处理发酵液。目前因对蛋白质分离的呼声很高，因此吸附法备受欢迎。但吸附法也存在吸附过程设计较复杂、不能连续操作、会产生介质填充的不均匀性和可压缩性等问题。

吸附剂——可用于生化物质分离的吸附剂有：以活性炭为主的常规吸附剂，碳对溶质的吸附主要是基于分子间的吸力，吸附作用常是可逆的；离子交换树脂，由骨架（珠状树脂或聚合物颗粒）离子型功能团和与功能团形成离子键的离子三部分组成；大网格树脂是一种不带离子交换功能团的树脂；亲和吸附剂是利用溶质和配基间的化学亲和作用，将配基与惰性载体以共价键或离子键相结合的吸附剂（图 5-22）。

图 5-22 亲和吸附示意图

亲和吸附剂具有极高的选择性，但选择洗脱条件较为困难，价格十分昂贵，故宜用于提取价格很高的产品，如用抗干扰素单克隆抗体提取干扰素。

以上吸附剂中，活性炭主要用来去除色素、杂质，也可用来从发酵滤液中提取产物。一般离子交换树脂主要用于提取或精制抗生素（图 5-23）、氨基酸、维生素；亲水性的离子交换剂可用于蛋白质提取；离子交换树脂在生产中还用来大量制备软水和无盐。以大网格聚合物吸附剂代替离子交换树脂有时可获得更好的提取效果，如在提取维生素 B_{12} 时，饱和容量高，洗脱高峰集中，甲醇洗脱量少。

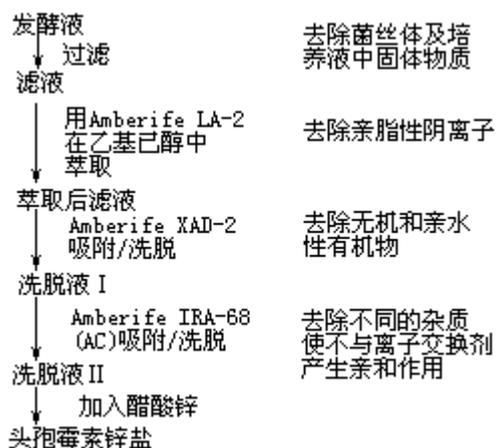


图 5-23 用离子交换树脂提取头孢霉素

吸附过程的操作方式——最简单的操作方式是分批操作，即把溶液和吸附剂都置于一搅拌釜中进行吸附及解吸。也可以把一定量的吸附剂置于搅

拌釜中，而溶液是连续进入和排出搅拌釜，釜中溶液浓度等于出口溶液浓度。更普遍采用的是固定床吸附，即把吸附剂置于吸附柱中，溶液自上而下流过。当溶液中的溶质开始在出口处泄漏时，应停止进入溶液，吸附柱即进行洗脱操作。若进行两柱或多柱串连操作则更为合理，因为这样只需有一个柱进行洗脱和再生，其他柱仍可进行吸附操作。实际上，在进行离子交换剂时，大多都采用多柱串连的方式操作。

4. 产物的精制

发酵液中的产物经过预处理和提取加以浓缩后，因其还带有一定量性质与产物相似的杂质，必须要通过精制才能符合产物的质量要求。因此，精制在整个产品分离中是十分重要的。

能用于产品精制的方法很多，有的实际上也可以应用于提取过程。

(1) 沉淀法 这是加入沉淀剂将溶液中的目标产物或杂质加以沉淀的分离方法。沉淀法可应用于蛋白质、多肽、有机酸、核酸和大多细胞物质的分离，它不但可用于精制，也可以用于提取，是产物分离中的重要分离方法。

沉淀操作总的原则是设法降低欲分离物质在溶液中的溶解度，并使其沉淀。最简单的方法是调节溶液的 pH，使蛋白质在等电点沉淀。

此外，常用的还有多种方法。例如，盐析法——蛋白质的沉淀是由于加入高浓度盐如硫酸盐、磷酸盐等，大大增加溶液中的离子强度而降低蛋白质的溶解度；加入有机溶剂，如加入甲醇、乙醇、异丙醇等与水不相互溶的有机溶剂，降低溶液的介电常数，使蛋白质降低其溶解度并产生沉淀；加入水溶性非离子型聚合物，如聚乙二醇和葡聚糖等，引起蛋白质溶解度的下降；加入聚电解质，因聚电解质有类似絮凝剂作用，也兼有盐析和加入有机溶剂的作用，但有可能引起蛋白质变性，常用聚电解质有羧甲基纤维素、海藻酸盐等阴离子聚合物和聚乙烯亚胺等阳离子聚合物；加入金属离子，一些高价金属离子对沉淀蛋白质均很有效。

(2) 色层分离法 色层分离也称层析或色谱分离。由于在精制过程中用的溶液和洗脱剂都是液相的，故也称液相色谱分离。它是实验室的有效生化分离工具，可以分离若干化学性质十分接近的物质。虽然有时电泳法可比层析法获得更好的分离效果，但电泳法只限于分离氨基酸、多肽、蛋白质等两性物质，而层析法可分离范围更广的物质。

层析法包括一固定相（吸附剂相）和一流动相（洗脱剂相）吸附在固定相中的各种溶质因其与固定相的相对亲和力不同，引起在流动相中的移动速度不同，这样可把各种溶质加以分离。

色层分离因采用的吸附介质、亲和力的性质或操作方法不同，可有很多种类。

凝胶层析——通过海绵状的凝胶网格时，可从大分子物中去除小分子物，还可用于脱盐和更换缓冲液。其优点是在操作条件（pH、温度、缓冲液成分等）下能维持产物的最大稳定性；介质不吸附产物，不会对产物引起损失或降解；缺点是凝胶层不能耐受较高的压力，因此处理量很小。

离子交换层析——对溶质的分离是基于不同溶质的电荷密度不同，用不同 pH 或离子强度的缓冲液，将与交换剂结合的溶质分别洗脱。也可在洗脱液中加入一种与交换剂结合能力更强的离子——梯度离子，将已吸附在交换剂上的离子按结合力弱至强的顺序一一洗脱下来。离子交换层析已大量用于人血浆的分离。

正相和反相层析——是分配层析的一种扩展，它是依赖于流动相和固定相间分配系数的差异来进行的，也就是说分离作用是由于溶质分子与惰性骨架（一般是二氧化硅）上的功能团与洗脱液之间的溶解度不同而引起的相互作用所致。在正相层析中，二氧化硅骨架上的基团是高级性的，因而流动相也必须是一种高级性的溶剂以对混合物中的组分进行分离。由于采用的基团和溶剂都是高度极性的，很可能会导致生物物质的降解，为此正相层析在生化分离中不常采用。反相层析采用非极性的功能团，洗脱溶剂极性可以是不高的，这样减少生物物质的降解，因而应用甚广。另有一种疏水层析，它使用疏水性吸附剂或是将疏水基团附着在亲水性介质如琼脂糖上。它与反相层析的区分是疏水层析的骨架上的疏水基团密度较低，因而其选择性较高，洗脱条件也较温和。

亲和层析——可能是属于最强有力的层析技术，几乎能分离所有的生物分子，并在很稀的溶液中得到应用，甚至可用于相对不太澄清的溶液。用于亲和层析的载体必须是亲水性的，以减少非选择性吸附，并应具有开孔结构使配基能附着和进入。常用的载体是琼脂糖。但亲和层析中的配基是十分昂贵的，因此亲和层析只能用于价格昂贵的产物精制。

其他还有逆流层析法和层析聚焦法。逆流层析属于分配层析法之一，其特点是无固定相，只有两种逆向流动的不互溶液相——重液和轻液。实际上重液不流动作固定相，轻液逐步向后流动。试样中的溶质组分随着轻液分别向后移动得到分离。这种分离法只能在实验室规模中进行，但分离效果好。层析聚焦是一种与蛋白质的等电点有关的层析分离方法，使所有的待分离蛋白质都逐一地在它的等电点时排出。

(3)电泳法 电泳法是利用带电荷溶质在电场中移动速度（淌度）的不同而将溶质分离的方法。常用电泳方式有区域电泳、等速电泳、等电聚焦，最近又出现了毛细管电泳。

区域电泳是指在多孔性介质中的电泳，也是最常用的电泳方式。常用的介质有滤纸、凝胶、粉末等。在作为大分子分离时常用凝胶，特别是聚丙烯酰胺作为介质。在凝胶电泳中物质的分离除了因淌度差异外，还因介质的孔径具有分子筛的作用。毛细管电泳也属区域电泳范畴，但它是无介质电泳。

等速电泳可以说是运动界面电泳的变相操作方式，它是靠电场的聚焦效应使混合电解质溶液各个界面以等速运动并使各组分加以分离。

等电聚焦并不依赖于淌度的差异进行分离，而是依靠在电场中的一种缓冲物质的水解作用，使形成从阳极到阴极逐渐增大的 pH 梯度，并导致混合蛋白质溶液的各个蛋白质移动到各自等电点 pH 的位置，“对号入座”地凝集为区带，从而获得分离。

在电泳操作中，缓冲溶液的 pH 值应尽可能使各组分分子的静电荷数的差异加大，但过酸或过碱均会导致蛋白质的变性，因而一般为 pH4.5~9.5 的范围内。在无介质的电泳中应适当添加一些增加粘度的非电解质物质，如蔗糖等。由于电泳过程会发热而导致被分离物质的扩散而降低分辨率或导致蛋白质的变性，也影响电泳技术的规模扩大，为此在保证一定电压的前提下尽量减小电流，同时采用冷却装置。电泳过程中的电渗作用（沾着固液接触表面的流动梯度，其方向常是与电泳方向相反）可在电泳设备的固体表面上涂以疏水性物质加以避免。电泳显色除用显色剂外，还可用分辨力高的银显色、荧光标记、放射标记等方法进行显色。

(4)膜分离法 膜分离是指物质通过半透性膜时因通透性不同而获得分离的技术。所采用的膜大多是由合成高分子聚合物制成的不对称膜，它分为表层（起过滤作用）及支持层（起增加强度作用）两层。表层的孔径较小，支持层的孔径较大。由醋酸纤维素酯制成的膜为均孔结构的对称膜，使用温度一般不能超过 30 摄氏度，最适 pH 为 3~6。合成的聚合物如聚砜膜的使用温度可达 75 摄氏度，甚至更高些，pH 范围为 1~13，孔径范围可自 1~20 微米。

膜除了因材料不同有其一定使用范围外，有两个重要的性能指标，即截留分子量和透水率（水通量）。截留分子量是指在 90%或 95%截留率时的溶质分子量，水通量是在 25 摄氏度和 0.35MPa 条件下，纯水通过单位膜面积的流量。在处理蛋白质溶液时，其通量仅为纯水的 10%左右。

膜分离的类型——这里列出的有六类。微滤膜截留 80 纳米~10 微米以下的粒子，操作压力为 0.1~0.5 兆帕，主要用来澄清溶液、除菌和细胞收集。超滤膜分离的分子量为 1000~1000000 道尔顿的大分子，操作压力为 0.2~1 兆帕，主要用于大分子分离、浓缩、脱盐、去热源。反渗透膜在高于溶液渗透压的情况下将小分子溶液中的水分透过膜而使溶液达到浓缩的目的。渗析是依赖膜内外的浓度梯度将小分子有机物和无机离子通过膜的分离方法，所用的膜基本上应是属于超滤膜的范畴，缺点是速度慢，处理量小。电渗析是利用电场梯度为推动力和透水性离子交换阳膜和阴膜相间隔的渗析膜，去除溶液中阳离子和阴离子的膜分离方法（图 5-24）；电渗析除了可用于制备去离子水外，还可去除溶液中无机电解质，如乳清中的盐以制备乳糖，也可用于含盐蛋白质（牛血清白蛋白、抗利尿激素、血管紧张肽等）溶液的去盐。电渗等电聚焦是利用两块非离子型透过性膜把电渗池隔成三个区域，使目标蛋白质被“聚焦”在中间区域（图 5-25）。

膜分离装置——膜分离装置要求在单位体积中有尽量大的膜过滤面积；料液流动方向要与过滤面平行，以形成错流过滤；料液的流速要高一些，以增加剪切，减少浓差极化；要考虑到清洗、装卸的方便。常用的装置形式如图 5-26 所示。

图 5-24 用电渗析法制备去离子水示意图

影响膜分离的因素——首先应该指出的是对某一规格的膜来说，只能把混合溶液中的粒子按其大小或分子量粗略地分成两大类，即基本上可在截留流中得到截留分子量以上的一类和在滤液中得到截留分子量以下的一类，因此单一膜的分离更适用于提取过程。欲获得相对较单一分子量的物质时，至少要用两种截留分子量的膜。尽管如此，分离还是不够彻底的，为此，膜分离（指微滤和超滤）一般不能置于精制的最后步骤中。

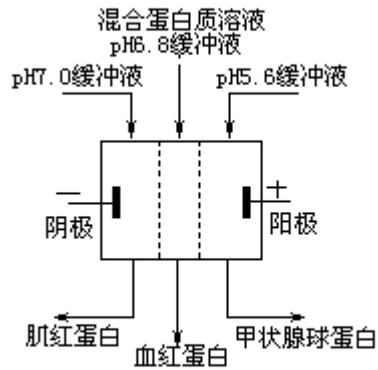


图5-25 电渗等电聚焦分离血红蛋白示意图

此外，操作时压力、温度、流速浓差极化和膜的污染等均对膜分离的效果产生一定影响。膜分离时的滤液通量随操作压力增大而增大，当然在凝胶状溶质层出现后，通量受到影响。浓差极化（被截留溶质留在膜表面浓度大于主流浓度）的产生，造成溶质自膜面向主流反扩散。增加流速有利于减少浓差极化的影响。温度增大可以降低溶液的粘度和提高扩散系数，有利增加通量。膜的污染严重影响膜分离的正常使用，使通量下降。蛋白质吸附常是污染的主要原因，可调节 pH 加以清洗。也可用机械方法如加大流速、脉冲流动减少污染，或用反冲、超声波等法加以清洗膜面。化学方法可用蛋白酶、酸、碱、氧化剂等加以清洗。最近还出现一种超滤与亲和吸附相结合的操作，将目标产物和配基加以分离。

图 5-26 膜分离装置

(5)区带离心法 若将多种密度不同的物质一起在普通的离心分离机中进行分离，则所有的物质均将沉降在离心转鼓的内壁或离心试管的底部，其中密度最大的在外层而密度较小的依次排列在其后，但要进一步将它们分开是十分困难的。若在转鼓或离心试管中有一由惰性介质的溶液因浓度不同形成的密度梯度层或柱时，被分离的物质——粒子因其密度不同而停留在密度梯度介质溶液相应的“等密度区带”中，这就是等密度梯度离心。另有一种差速区带离心，主要是根据被分离粒子在粘滞性密度梯度溶液（溶液的最高密度应低于粒子中的最高密度）中沉降速度不同，分别在梯度溶液中得到分离，但分离时间不能太长，否则所有粒子都将沉降至转鼓内壁或试管的底部。

用于区带离心中形成密度梯度的介质应是惰性的，容易与被分离粒子分开，能耐灭菌，用于差速区带离心的还应有一定粘度。在差速区带离心中一般用非离子梯度物质，最常用的是蔗糖溶液。用于等密度梯度离心的则以离子梯度物质为主，最常用的是铯盐（氯化铯、硫酸铯等）。

区带离心法常用于细胞器的分离，但也可用于蛋白质、核酸的分离。

(6)蒸发、结晶、干燥 蒸发在一定场合下用于浓缩去除水分；结晶和干燥也是常用于产品的最后精制步骤。

九、优质生产规范（GMP）简介

1. GMP 的目的和原则

优质生产规范(GMP)是一些国家为保证产品质量标准所制定的具有法律性的规范,各个行业有其专用的 GMP 规定。下面着重介绍药品生产的 GMP。

美国在 1959 年即开始在制药、机械制造、服务业和科学研究领域中的 GMP 研究。1964 年美国正式公布了食品、药品及化妆品的 GMP。其后很多国家也制定了类似的法规,联合国世界卫生组织(WHO)在 1969 年也公布了有关药品生产的有关规范。我国在药品生产方面的规范是在 1988 年由卫生部根据在 1985 年施行的《药品管理法》的规定而制订的,全名为《药品生产质量管理规范》。

制定 GMP 的目的是要求药品生产企业在生产过程的每一步骤中都处于严密的控制和严格的科学管理的状况,以保证每一个工作步骤以至整个生产过程都是高质量的。

GMP 的基本原则为:药品的质量不单是通过成品的检查和检验获得的,而是必须在产品的设计和制造中取得药品的安全性、有效性和均一性的质量要求;必须对生产过程的每一个步骤加以严格的控制并有成文的规定,以使成品符合预定的质量标准;真实、准确、及时的原始记录是生产过程的真实反映,一切应以记录为准。

一切产品,包括药品最终应有一个“质量保证”,它是“最佳试验规范”、“优质生产规范”和“确认”的综合。“优质生产规范”是保证产品在达到产品批准书的质量标准下持续地生产的必要条件,它涉及生产和质量控制两个方面。“确认”按美国食品及药品管理局的要求是“建立一套技术文件来证明一个企业对一种产品将在采用特定的工艺条件下进行持续生产,并对符合预先确定的技术规范和质量标准提供高度的文字保证”。

我国在《中华人民共和国药品管理法》中也提出药品生产企业必须按照国务院卫生行政部门制定的《药品生产管理规范》的要求,制定和执行保证药品质量的规章制度和卫生要求后,才能由当时卫生行政部审核、批准发给《药品生产企业许可证,在经验收后发给“药品生产企业合格证”。

2. GMP 的特征和内容

GMP 的执行应有必要的“硬件”和“软件”,缺一不可。“硬件”是指保证生产工艺能被正确地执行和防止产品被污染的必要物质条件,如合理的厂房、环境、设备、工艺路线,合格的原辅材料,足够的公用系统设施和环境保护措施等。“软件”是指人员的技术素质、人员培训、标准操作法、原辅材料、中间产品和成品检验标准和方法、原始记录等。

GMP 的执行,一是保证消费者的利益,对人民健康负责;二是对企业讲,要把药品生产的安全性、有效性、均一性放在第一位,并在持续生产和消灭不合格产品中取得经济效益。日本一药厂认为执行 GMP 有三个必要条件,即一要把人为误差降到最低限制;二要防止产品污染致使降低质量;三要有保证产品高质量的系统设计。并在管理和厂房及设备布置两个方面对上述条件进行保证。我国的《药品生产质量管理规范》共分十四章,分别是:1.总则、2.人员、3.厂房、4.设备、5.卫生、6.原料、7.生产操作、8.包装和贴签、9.生产管理和质量管理的文件、10.质量管理部门、11.自检、12.销售记录、13.用户意见和不良反应报告、14.附则。

3. 若干与产品质量有关的问题

(1) 水的质量 水的质量常因受到微生物和化学物质的污染而变坏。前者是当水源与高浓度的微生物源接触后形成的，用这种水进行生产常会使产品带菌或变质。特别是生产注射用药品时，使用的水不但应去除微生物还应去除热原（格兰氏阴性杆菌菌膜中脂多糖，大多分子量在 5×10^4 以上）。当水含有化学物质时，它虽不像微生物那样会自我增殖，但往往少量的化学物质会严重影响产品的质量。水中的化学物质在生产过程中一般有三种可能：一是完全从产品中被分离出去；二是与产品同时被浓缩；三是在产品中仍保持原来的浓度。当然只有第一种是我们所需要的。

医药工业用水可分为四类：第一类如井水、泉水，只能作初级用途，如冷却。第二类如自来水，即经过氯化的水，但其中含氯量及含微生物量相差很大。这种水有时也经过去离子化及沙滤。主要用于饮用和一般化学工业。第三类一般在美国药典中称为“纯水”，它经过去离子化和超滤。但因其中无氯难于控制微生物，特别是经贮存的“纯水”。为此在需要贮存时，应把它置于一循环设备中经常维持 80 的温度。第四类是注射用水，它有严格的质量标准，它是用三类水加以蒸馏，并用家兔进行无热源试验。贮水的容器和有关管道的材料也应按不同类别的水分别选择，如为注射用水应用低碳不锈钢，在焊接管道及管件时应用全自动焊接，不允许使用法兰连接管道。

(2) 空气洁净度 在药品生产中常要求有不同洁净度的空间。以往把洁净度分为六级，即 1、10、100、1000、10000 及 100000 级，即每立方英尺空间小于 0.5 微米的粒子数不大于 1、10、100、... 个。其中 1 级和 10 级的主要用于电子工业；在生物技术中一般可根据洁净要求，采用 100 ~ 100000 级的工作空间。根据国际 GMP 无菌产品生产准则可把洁净区分为四级（表 5 - 8）。

表 5-8 无菌产品生产洁净区级别

级别	末端过滤器 效率 * (钠焰试验法)	换气次数 (次时)	空气中允许最粒子数 (个米 ³)		允许最高 微生物数* (个米 ³)
			0.5 微米	5 微米	
A	99.997	气速 0.3 米秒 (垂直) 3.45 米秒 (水平)	3500	0	< 1
B	99.995	5 ~ 20	3500	0	5
C	99.95	5 ~ 20	350000	2000	100
D	95.0	5 ~ 20	3500000	20000	500

注：A 级适用于洁净工作台，B、C、D 级适用于工作空间；1 米³=35.31 立方英尺

* 静态时用空气取样器测得的平均值

在工厂中常把 A、B 及 C 级空间称为洁净区，D 级称为控制区，并把洁净区置于控制区包围之中。A 级一般用于接种、移菌等实验室无菌操作；B 级用于注射液灌装（局部区域通入 B 级空气）；C 级用于注射液灌装室，对不能耐蒸气灭菌的制剂用的灌装瓶的烘干、贮存及粉针剂的原料过筛、混粉、分装、加盖，冻干液的灌装、冻干，无菌浓缩液的结晶、干燥等操作；D 级用于质量检验室、样品留验冷却室，无菌更衣室，精制过程中的称重、混和、洗涤、介质准备、缓冲液制备等操作，注射剂洗瓶，薄膜过滤器的安装，对能耐蒸汽灭菌注射剂所用瓶子的烘干、贮存，非注射用制剂的生产等。其他生产区和办公室无洁净要求。洁净区和控制区空间均维持一定的正压，以免

外界空气进入；一般要求洁净区的正压大于控制区，并根据主次和平面位置逐室维持 0.15 兆帕的正压。室温一般要求维持在 22~24℃，相对湿度为 40%~50%，精制过程中有的工作室则要求维持在 4℃。

洁净空气是通过低压压气机或中高压鼓风机送入的，在进入洁净区或控制区的高效空气过滤器前应经过多道预过滤，以免堵塞高效过滤器。空气的吸入口高度应尽量高一些（有人测定空气中的微生物含量每增高 10 米可减少一个数量级），并在吸入口装有除尘器。

(3)生物安全 生物安全包括两重意义，一是对操作者的安全；二是对环境保护而言的。生产过程中可能会产生一些对操作者有潜在危害的因素，包括操作空间的气溶胶和溅出的有害液体物质。对环境的影响主要是应防止有毒化学物质、活的微生物或可传播的基因载体扩散到环境中去，以免可能引起生物危害。

关于防止生物危害的措施是医药产品生产的 GMP 的一个重要内容。总的讲是要求切实保证把危险性控制在某一可能率之下；具体讲，一是要建立一系列的屏障防止有害物质从封闭系统中逸出，二是将废弃物进行必要的处理，如在污水污渣处理前事先进行灭菌。用建立屏障的遏制方法是 70 年代末防止重组微生物可能引起的危险而进行的。在这以前，实际上此方法已有效地应用于生物制品的生产中。目前，必须予以遏制的有机物体应包括重组的微生物或动物细胞、致病微生物和病毒以及癌源细胞；必须予以遏制的化学物质应包括有毒、挥发性物质以及致癌和致敏物质。

在生产中，遏制可用两种方法。所谓直接遏制是在单一设备中进行的。如在发酵罐中可在排气管出口处连接空气过滤器，轴封是绝对可靠的，取样是封闭的，发酵罐顶部装有爆破片，必要时可自动或人为爆破使内含物流入专用封闭式下水道，放罐后可用化学试剂将有关细胞杀死。所谓间接遏制是用于离心机和板框过滤机（均用于细胞分离）等不易密封的设备。可单独置于一密闭的小室中进行操作，所分离出来的细胞和滤液均盛在封闭的容器内以便进一步进行必要的处理。操作者应穿一次性衣服、戴面具，或穿配有从头至鞋的外套来保护，在极端场合下可穿充气服并不断供气。对他们还应定期进行体格检查。

对从事有害生物体研究或生产的工作室，洁净要求可根据生物体的致病危害性划分等级。从事基因工程的工作室，美国的国立卫生研究所把它划分为四个级别，分别属“无感染可能”、“发病可能小”、“感染机会多但症状轻”和“易感染和症状重”四种性质。这种工作室因需防止有害生物体外逸，因此为负压，故也称负压洁净室。负压实验室的气体流向是：低污染区→高污染区→高效空气过滤器→大气；空气压差是：大气>内走廊>工作室>安全操作柜，每级压差为 20~50 帕，排风的粒子密度不得超过 100 级，换气次数 10~20 次/时。

(4)废物处理 在发酵过程中总会产生两种废物，即菌渣和废液（包括分离过程的废水），不但量大，其生物需氧量和化学需氧量均很高。若不加处理必然会严重影响环境卫生和对工厂附近的生态平衡产生影响。

有些菌渣可用作饲料，但必须谨慎。过去曾把菌渣用来填洼地，后因产生臭气和污染水源而被禁止。把菌渣焚烧因其灰中含有无机盐和腐蚀性盐很易损坏焚烧炉。因此，将其进行厌气消化可能是一个较积极和有益的处理，因为厌气消化有可能获得沼气，经消化后的残渣是一种较好的有机肥料，当

然其残液还需经过好氧处理。

有些发酵废液还保留一定的营养成分，因此可用来生产单细胞蛋白作饲料，但也需谨慎从事。在多数情况下，稀释后进行处理或与菌渣一起先行厌氧消化再进行好气处理。处理情况与常规工业废物处理相仿。经厌氧和好气综合处理后的污水，其生物需氧量去除率约为 70% ~ 80%，虽仍可能高于排放标准（< 100 毫克/升），但已大为减轻市政污水的负担和对环境的污染。

(5)溶剂回收 在产品分离过程中常使用相当量的各种溶剂，其中一部分是被水所稀释，一部分是溶解于水，两者都还含有其他杂质。若将它们废弃，一则影响环境，二则经济上不合理，因为有机溶剂是较贵的。有机溶剂的回收大多采用简单蒸馏或精馏的方法。

十、结束语

本章较全面又较概括地介绍了生化工程的研究和服务对象及其基本内容。希望读者能从中领略到生化工程与生物技术之间的内在关系，生化工程在生物技术产品的产业化中的作用。也希望原来对生化工程不太熟悉或不全面熟悉的读者从中了解其概貌和基本内容，为进一步熟悉打下一个基础，这是本章编写者的第一个心愿。

第二个心愿是希望与从事生物技术研究产业化的同志彼此掌握更多的共同语言，相互学习、相互协作，为我国的生物技术的发展共同努力，共作贡献。

第三个心愿是希望各级有关领导能继续对生化工程的研究和教育加以支持。在“七五”期间，国家花了二千万元经费支持了生物反应器和下游分离技术的重大攻关项目，占生物技术科研投资的五分之一。确实，在“七五”期间也是我国生化工程发展最快的时期，出了一批科研成果，很多从事化学工程、机械工程、自控、电子方面的同志都参加了生物技术方面的科研和实践，全国工科类大学有十几所建立了生物化工专业或开展了有关科研。原来不搞生化工程的研究单位中的同志也有不少改行参加了生物技术的研究队伍，这是十分可喜的现象。“八五”期间，国家采取了“以产品为龙头，一条龙攻关”的组题形式进行攻关，客观上对生化工程研究的支持强度有了一定削弱。当然，以“产品为龙头”的指导思想是正确的；我们希望的是在“九五”期间能更有领导、有重点地把“一条龙攻关”组织好，使生物界、化学界和工程技术界的同志能组织在一起，齐心协力把一条条龙攻下来，通过攻关真正把几个新生物技术产品从实验室成果转化为生产力。

第六章 蛋白质工程

一、什么是蛋白质工程

1. 蛋白质生物功能的多样性

蛋白质和核酸一样，是对生命至关重要的一类生物大分子，几乎在一切生物学过程中都起着关键的作用。例如，已知在离体和活体条件下都能催化生物化学反应的酶，几乎全都是蛋白质。肌肉收缩、精子游动、细胞分裂过程中染色体移动，都是通过蛋白质来实现的。蛋白质对特殊 DNA 顺序的识别，能调控 DNA 的表达。高等生物有序的生长和分化过程受各种蛋白生长因子的调节。激素蛋白能协调多细胞生物中不同细胞的活动。抗体蛋白因为能识别和结合异己的外源物质而为我们提供抵抗各种细菌、真菌和病毒病的能力。由神经细胞膜蛋白构成的离子通道，负责神经冲动的形成和传导；紫色硫细菌类囊体负责能量转换的膜蛋白，是光合作用的反应中心。大家最熟知的血红蛋白，它能结合和释放氧，是血液中氧、二氧化碳和氢离子的携带者。我们的毛发和指甲都是角蛋白。血栓是由血纤蛋白单体聚合而成的。所有这一切都说明，蛋白质不仅在催化、运动、结构、识别和调节等许多方面都是维持生命至关重要的分子，并且在医学和工农业方面都有重要的意义和用途。

2. 蛋白质功能由其高级结构决定

同样是由 20 种氨基酸组成的蛋白质分子，竟然有如此广泛而又各不相同的功能，原因何在？蛋白质作用的实质，是特异性的结合，也就是说，对于高度多样的各类分子，蛋白质具有识别并且与之相互作用的能力。而决定蛋白质这种特殊生物功能的关键因素，是它的分子构象，也就是蛋白质分子中原子的三维空间排列和分布。氨基酸通过肽链连接形成多肽链。每种球蛋白各有其独特的氨基酸排列顺序，这种顺序由编码该蛋白质的基因中 DNA 的碱基顺序而决定。被称为蛋白质一级结构的氨基酸顺序，决定多肽链的折叠方式和高级结构。多肽链卷曲成具有一定形状和大小的分子，在分子的表面有特殊的互补区和裂缝。这些互补区和裂缝里的残基具有不同的侧链，使蛋白质分子和其他分子间形成氢键、静电相互作用和范德华氏接触，而这些相互作用的强度和持续时间都是精确控制的。因此蛋白质的功能是其高级结构相联系的，也就是说由分子中原子的三维空间排列分布所决定的。蛋白质的天然构象被破坏的结果，必然导致其正常生物活力的丧失。

3. 蛋白质的结构与功能是生物进化的结果

以正常成年人的血红蛋白 HbA 为例，它由四条多肽链组成，两条是 α 链，又称 α 亚基，各有 141 个残基，另外两条是 β 链，又称 β 亚基，各有 146 个残基。它们按四面体方式排列成直径为 550 纳米的球状分子，每条链在靠近分子表面的方向上有一个裂缝，每个裂缝里结合一个血红素分子。这个裂缝为血红素提供了可逆地结合氧的环境，在裂缝中相关残基侧链的配合下，血红素分子中心位置上的铁原子与氧结合。肌红蛋白的功能是在肌肉中输送氧，它只由一条含有 153 个残基的多肽链构成，但是与血红蛋白的 α 链和 β 链有很相似的基本三维结构。氨基酸顺序的比较研究表明，在这三条链的 141 个残基中，只有 21 个位置上的氨基酸相同，可见差别相当大的氨基酸顺序可以最终卷曲成十分相似的三维结构，这种现象在自然界并非罕见。从进化的

观点看，自然界本来只有一个古老的 DNA 片段，它编码一个能结合血红素的蛋白质模块，从而能有效地载氧。大约在七亿年前，这个古老的 DNA 片段发生突变，分化为编码 Mb 和 Hb 的两个基因，而大约在五亿年前，古老的 Hb 基因又分化为 α 、 β 两种基因，这是在脊椎动物分化的早期。现代的哺乳类、鸟类、两栖爬虫和硬骨鱼的 Hb 都有 α 、 β 两种亚基，而原始的脊椎动物只有一种亚基。在更低等的动物中，还有更为原始形式的血红蛋白类的蛋白质。现存的蛋白质分子是反映生物进化过程的历史见证。血红蛋白和肌红蛋白分子所具有的基本结构模式，及其相应的原子在空间的三维排列分布，是它们可运载氧功能的结构基础。

4. 自然界的蛋白质工程

天然的野生型蛋白质经过亿万年的自然选择，已经进化到了堪称完美的结构与功能的统一，能适应于在特定物种的机体内，最好地发挥其各种特定的功能，以维持机体的正常生活、繁殖和物种延续。但是在这漫长的进化和选择的过程中，并非一切天然突变都对机体有利。仅就血红蛋白而言，已知有几百种突变导致不同类型的血液病。血红蛋白分子中一个正常氨基酸残基被置换，就足以引起有时是致命的疾病。1954 年英格拉姆 (Ingram) 证明，镰刀型贫血病患者的异常血红蛋白 HbS，只不过是分子内 β 链的第六个残基由原来的谷氨酸突变为缬氨酸。谷氨酸的极性侧链被缬氨酸的非极性侧链所取代，导致脱氧型 (未与氧结合的) 血红蛋白 HbS 分子表面局部疏水性增强，从而降低了分子的水溶性，易于产生纤维状的沉淀，使原来是圆盘状的红细胞变形呈镰刀状。它们可以堵塞小血管，影响血液循环，导致多种器官如心脏和肾脏损伤。另外它们的质地娇脆，很易溶血，因而寿命比正常红细胞短，可以导致严重贫血。

其他为数众多的血红蛋白突变，有的发生在血红素附近，直接损害氧的结合；有的发生在分子内部，使血红蛋白的稳定性降低，或者破坏血红蛋白的别构效应，影响与氧结合的亲合力。引起各种血液病的突变，正是自然选择的蛋白质工程试验结果，它的实质就是通过基因的改变来改变蛋白质的结构，从而达到改变其生物功能的结果。这些效果有些是有益的，有些是有害的，但是都值得我们学习，从中寻找和总结规律，为我们发展科学技术和经济建设的事业服务。

5. 20 世纪末的新兴领域——蛋白质工程

作为高新技术的蛋白质工程，是在 80 年代初期出现的。1983 年美国的厄尔默 (Ulmer) 首先提出了“蛋白质工程”这个名词后，随即被广泛接受和采用。许多学术上的重大推进，常常是由于一些本来是各自独立发展的领域相互交叉渗透的结果。分子遗传学和结构生物物理学正是这样的两个领域，它们的融合形成了一个新型的杂交领域“蛋白质工程”。

蛋白质工程首先是以蛋白质的结构为基础的。1953 年英国的桑格 (Sanger) 发表了胰岛素的一级结构；其后不久，英国的肯德鲁 (Kendrew) 和佩鲁茨 (Perutz) 用 X 射线衍射法测定了肌红蛋白和血红蛋白的晶体结构，成为揭示蛋白质一级结构、高级结构与生物活力关系研究的里程碑。近年来由于结构测定技术和仪器的改进，DNA 测序技术的发展，大大加速了工作的节奏。至今已经积累了成千上万的高级结构和一级结构的数据，并且编制成系统的数据库，使我们得以开始从中探索，尝试总结一些关于蛋白质折迭和结构功能关系方面的规律。特别要提出的是计算机技术和图象显示的突飞猛

进，已经使蛋白质和基因的数据库，蛋白质结构分析、结构预测和模型构建，分子设计和能量计算等理论、技术和相关软件，正在日益发展成为一门独立的分支，成为在蛋白质工程中定向改造分子的设计工作必不可少的重要手段和设备条件。

分子遗传学是蛋白质工程的另一支柱。采用定位突变的方法，可以根据分子设计所提供的改造方案，在多肽链上确定的位置，增加、删除或者置换一个或一段氨基酸残基。如果目的基因很难吊取，或者全新的蛋白质顺序是人们从头设计的，可以用有机化学合成的方法，部分合成或全合成一条适用的基因。加上基因工程日趋成熟的基因操作和表达。以及下游技术，不难得到一个定向改造的突变体蛋白。对于这个突变体蛋白再进行结构和生物活力的测定，考查它是否实现了改造的目的，通常是很少一次试验成功的。那么就要根据这些测定结果，分析成功或不成功的原因和经验，在此基础上提出第二轮的改造方案。如此循环反复，期望逐步逼近旨在改进蛋白质性能的预定目标。

从本质上看，蛋白质工程好比人类用自己掌握的现代科学理论和技术，在实验室的有限时间和空间里，实现自然界跨越巨大时空的进化和选择的历程，但是它所选择的目标不是自然界物种的进化，而是满足人类自身的需要。蛋白质如酶，在人类生产和生活中的应用，有悠久的历史。人们在长期的实践过程中早已发现，经过自然选择的结果，尽管它在机体内能最好地发挥生物活力，但是在体外条件下，特别是当人类将它用于工业生产时，就往往需要予以改造，如提高其稳定性、耐热性，或耐酸碱、抗氧化的能力等，以适应工业生产条件的苛刻要求。蛋白质工程不仅为此提供了强有力的工具，而且还预示人类能设计和创造自然界不存在的优良蛋白质的可能性，从而具有潜在的巨大社会效益和经济效益，成为吸引世界上许多国家的政府都给予大力投资的热点。

此外蛋白质工程的技术也可以应用于基础理论研究，在此不予详述。

二、蛋白质工程的实例

按照严格的意义来说，蛋白质工程研究的内容是指以蛋白质结构功能关系的知识为基础，通过周密的分子设计把蛋白质改造为有预期的新特征的突变蛋白质。在实际工作中，粗略地说有小改、中改和大改三种做法。小改是指在天然蛋白质分子多肽链内的确定位置上，进行一个或少数几个氨基酸残基的改变（置换、删除或插入）；中改是指对蛋白质分子进行剪裁，如结构域的拼接；大改是指从头设计一个全新的自然界不存在的顺序。

1. 小改

1921 年加拿大的班廷（Banting）和贝斯特（Best）首先发现简单的皮下注射胰岛素可以救治糖尿病患者这一奇迹。这是将激素蛋白用于临床的创举。世界上有千百万患者依靠胰岛素存活的事实推动了胰岛素的研究，使它成为世界上第一个被测序的蛋白质，第一个被人工合成的蛋白质，也是最早被批准上市的基因工程药物。

胰岛素分子由两条多肽链组成（图 6-1），A 链有 21 个氨基酸残基，B 链有 30 个；两条肽链之间有两对二硫键 A7-B7 和 A20-B19 相连，A 链内部还有一对二硫键 A6 - A11。胰岛素分子是一种极易缔合的蛋白质，缔合程度与它的浓度和 pH 条件密切相关。浓度越高，缔合物的量越大。在通常的浓度下，胰岛素主要以二聚体的形式存在。三个二聚体之间还可以由 Zn 离子的配位，形成六聚体（图 6 - 2）。根据单体的晶体结构分析，更由于其在血液中发挥生物功能的生理浓度为 10pM，目前普遍认为单体是基本的功能单位。

图 6-1 猪胰岛素的一级结构

胰岛素的代谢效应是多样的，但它的广为人知的作用是刺激血液中的糖进入细胞。皮下注入的胰岛素形成一个临时的小仓库，逐渐进入血液，随着血液循环与靶细胞表面上的受体结合，刺激血糖进入细胞。胰岛素在注射处的溶解化和吸收是一个复杂的过程，受到注射部位、患者状况和胰岛素制剂的制备方法等诸多因素的影响。即便是在最好的情况下，患者经注射后，胰岛素进入血液的情况也与正常人显著不同。正常人进食几分钟内，胰脏就分泌胰岛素进入血液，而注射的胰岛素要经过 30 分钟或更长的时间，方可在血液中达到最高浓度。这还要依赖于患者的病情如何。正常人的血糖水平是严格调控的，胰岛素以低水平连续地分泌，这些在患者的体内都做不到。因此临床上有迫切的需要，改进胰岛素的性能，以改进对患者血糖的控制。

图 6-2 胰岛素六聚体的形成

注射的胰岛素进入血流迟缓，其原因被认为是胰岛素分子缔合成二体和六体，这些大的聚合物从注射位置进入血流要比二体和单体慢。一旦在血液中被稀释，六体和二体就很快解离为具有生物活力的单体。因此研究工作最明显的目标，就是寻找一个速放的制剂，也就是一个稳定的单体胰岛素分子。

蛋白质工程为构建一个这样的胰岛素分子提供可能的途径。70 年代初，英国的 Hodgkin 等和我国的梁栋材等对胰岛素高分辨率（19 ~ 18 纳米）的结构分析表明，B 链 C 端的 折迭部分参与二体胰岛素的形成，由四对氢键联

系的反平行折迭使两个单体分子缔合。二体间的表面十分接近，为了创造一个速效而又稳定的单体，明显的策略是防止二体和六体的形成。上述精细空间结构提示，有几种可能的办法：一是在二体形成的表面之间引入一个大的侧链，以干扰该表面间的接触；二是在二体内本来就有带电荷的侧链存在的地方，引入带相同电荷的侧链，使两个单体之间发生同电荷互斥的现象，以降低其稳定性。

此外我国的梁栋材等 1987 年提出，胰岛素的受体结合部位和活力中心主要由分子中的两个部分组成（图 6 - 3）：一个是具有相当面积的疏水区，主要包括 Phe B24、B25、Tyr B16、Val B12 等，全部是疏水残基；另一个是分散在这个疏水区周围的带电荷基团或极性基团，主要包括 Gly，它们构成一个亲水面。疏水表面是胰岛素和受体分子专一结合的部位，也是单体结合成二体的部位，还可能在识别受体以及结合后诱发受体分子的构象变化中起特殊作用。亲水表面属于胰岛素的活性部位。在疏水区中，芳香环十分重要，其他基团或主链部分即使发生某些改变，只要这个疏水面仍然保持在 1500 纳米左右，就不会对胰岛素分子与受体相结合的作用产生严重的障碍。这种结构与功能关系的理论知识又提示我们，在选定进行突变的残基位置时，必须考虑到它是对受体结合活力不重要的。

图 6-3 胰岛素分子表面的活性区域

一个实际的例子是 Ser B9 Asp/Thr B27 Glu（即把 B9 残基位置上极性的 Ser 置换为带电荷的 Asp。同时把 B27 位的 Thr 置换为 Glu）双突变。它的指导思想是这样的：已知在二体形成过程中，两个分子的结合面上 Ser B9 与 链 螺旋上的 GluB13 侧链相靠近，两个分子间的 GluB13 相近，并且侧链上带有相同电荷，它们本身就有互斥作用。如果将临近的 Ser B9 置换为 Asp，可在二体间形成连续四个带负电的侧链，在六体中这种互斥的接触重复三次，应该有利于降低胰岛素分子的缔合作用。

为了实现这些氨基酸的置换，需要采用 DNA 碱基突变的方法，改变编码氨基酸的密码子，以达到改变氨基酸，从而改造蛋白质的目的。但是在 1982 年以前，一些科学家所采用的 DNA 碱基突变方法，都是用一些化学试剂或药物，如亚硝酸或亚硫酸氢钠等。这样产生的突变是随机的，不能做到想改变什么部位就改变什么部位，而不改变其他部位。因而科学家们根据蛋白质结构知识设计出的改造方案，往往不能实现。1982 年佐勒（Zoller）和史密斯（Smith）两位科学家根据已有的科学实践，首先发明了一种定点突变的方法（图 6 - 4）。这种方法能够准确地按照科学家的意图进行 DNA 突变，即能做到想变那一个碱基，就只改变这一个，而不改变其他碱基。十年来，这个方法被广泛地用于蛋白质工程的研究。例如，枯草杆菌蛋白酶的改造，治肿瘤药物细胞白介素-2 的改造，以及人胰岛素的改造都得到了很好的效果。

图 6-4 寡聚核苷酸诱导的定点突变基本实验步骤

佐勒和史密斯所建立的定点突变方法的基本原理是利用一种环状噬菌体 M13。它的特点是这种噬菌体 DNA 可以以单链的形式在宿主细胞外存活。当它自身要繁殖时，就进入细胞中，把单链 DNA 变成双链 DNA，进行 DNA 复制。

复制出的单链 DNA 被包装成噬菌体钻出细胞外。在体外（即试管内）也可以进行这种 DNA 复制。只要将单链 M13DNA 与人工合成的一小段寡聚核苷酸（14~30 个碱基）加在一起，升温至 55℃，再逐渐冷却，相互配对后，再加入 DNA 聚合酶和四种脱氧核苷酸，在 37℃ 下保温，这样以单链 DNA 为模板，寡聚核苷酸为引物，同样可以将 M13 单链 DNA 变成双链 DNA。于是佐勒和史密斯首先将要改造的蛋白质目的基因重组到 M13 双链 DNA 中。以这种重组的包含了目的基因的 M13 单链 DNA 为模板，再人工合成一段寡聚核苷酸（其中包含了所要改变的碱基）做为引物，在体外进行双链 DNA 的合成。这样合成的双链 DNA，其中一条为含有天然目的基因的模板，而另一条单链则为新合成的含有突变目的基因的 DNA 链，因为它是以那段带有突变碱基的寡核苷酸为引物合成的。这种杂合 DNA 双链经转入大肠杆菌中，分别以这两种不同的单链 DNA 为模板，进行 DNA 复制。复制出的 M13 双链 DNA，其中一半将含有已突变的的目的基因。利用 DNA 杂交技术或核苷酸序列分析方法，将含突变目的基因的 M13 噬菌体筛选出来，提取它们的 DNA，用限制性内切酶把突变目的基因切下，并重组到表达质粒中，进行突变基因的表达。这样就可以按照科学家的蛋白质改造方案，定向得到突变体蛋白了。

经过这样的改造，双突变 SerB9Asp/ThrB27Glu 有效地使二体在毫摩尔浓度下解聚为单体，它进入血液的吸收率也比天然胰岛素提高了三倍。核磁共振谱研究表明它也保持了与天然蛋白相同的主要结构特征。但是突变体与受体结合的亲合力却只有天然蛋白的约 20%。这可能是因为 B9 侧链临近受体结合部位，影响了与受体结合有关的构象变化。

2. 中改——结构域的拼接

蛋白质分子种类繁多，结构复杂，其分子大小、形状也各不相同。在结构上，通常认为，蛋白质分子的一级结构氨基酸序列按一定规则构成二级结构，再由二级结构折叠成三级结构。研究证明，在二级结构和三级结构之间，还有一个结构层次，英文名为 Domain，通常译为结构域（图 6-5）。结构域是由螺旋、折叠等二级结构单位按一定的拓扑学规则构成的三维空间结构实体。有些小分子量的蛋白质分子，如蝎毒、蛇毒和蜘蛛毒素等多肽类神经毒素，只有一个结构域构成，而大部分蛋白质分子，则是由若干个结构域构成的。例如，有一种和癌病的发病有关的癌胚抗原 CEA（Carcinoembryonic antigen），是由七个大小和形状都非常相似的结构域拼接构成的，各结构域之间由柔韧性较大的“铰链”片段相连。研究发现，癌胚抗原的这种多结构域特征有利于它所起的细胞识别和粘合作用。有的蛋白质分子则是由结构完全不同的几个结构域构成。例如，丙酮酸激酶的分子则是由四个完全不同的结构域组成（图 6-6）。人体中有一种与金属元素的代谢、解毒有关的金属硫蛋白（Metallothionein，简称 MT），则是由两个既不相同、又有些相象的结构域连接而成的。

图 6-5 结构域是蛋白质分子中的一个基本结构层次
癌胚抗原由七个相似的结构域组成

图 6-6 丙酮酸激酶由四个大小和形状不同的结构域组成

看来，结构域是蛋白质分子中一种基本的结构单位，在长期的进化过程中，为适合生存的环境，相同的或不相同的两个或几个结构域拼接在一起，形成各种功能独特的蛋白质分子。能否用蛋白质工程的手段，加快自然界中的结构域拼接过程，以达到人们所预期的目标呢？答案是肯定的。我们以金属硫蛋白为例，对结构域拼接技术作一简单的说明。

(1)金属硫蛋白的抗重金属污染特性 金属硫蛋白是一类小分子量的球蛋白，大量存在于哺乳动物体内，其他低等动物如鱼、螃蟹、海胆中也有分布，在植物和微生物中也发现有各种不同亚型的金属硫蛋白。这类蛋白质分子中半胱氨酸的含量极高，约占全部氨基酸总量的三分之一左右，在分子中以与金属原子相结合的方式存在。金属硫蛋白具有许多重要的生物学功能，如参与微量元素锌、铜等的贮存、运输和代谢，重金属元素镉、汞、铅等的解毒，以及拮抗电离辐射、清除羟基游离基等。

能否将天然金属硫蛋白具有重金属解毒的特性用于环境保护，清除被污染的土壤和水域中的镉、汞等有毒金属呢？利用基因工程的方法，已经把天然金属硫蛋白的基因克隆到烟草、矮牵牛等植物中，实验证明，转基因植株具有很大的抗镉污染能力。如果把 MT 基因转入易于大量繁殖的植物中去，如红花草、浮萍等，将它们种植到被镉、汞污染的田地里或湖泊、河流中，大量吸收土壤和水域中的有毒金属，则可以起到清除有害金属的作用。

(2)金属硫蛋白的结构特点 金属硫蛋白的种类很多，哺乳动物中的金属硫蛋白分子由 61 个氨基酸残基组成，分为两个结构域，分别叫 α 和 β ， α 在前， β 在后，各含 29 个残基，中间由三个残基相连。 α 结构域含 11 个半胱氨酸，能结合四个金属原子，易与镉、汞结合，而 β 结构域含 9 个半胱氨酸，能结合三个金属原子，易与锌、铜结合。实验表明， α 结构域结合镉的能力比 β 结构域高出 1000 倍以上。如能将天然金属硫蛋白的 α 结构域改造成为 β 结构域，形成 β 结构域的“二倍体”，那么，这种改造后的金属硫蛋白就会比天然金属硫蛋白具有更强的镉结合能力，更适合于环境保护中镉污染的清除。

能否将金属硫蛋白的 α 结构域改造成为 β 结构域呢？这就需要利用蛋白质工程中的分子设计技术，对分子改造的设计思想进行可行性分析，并提出具体的改造方案。首先，必须在大量的生物学实验的基础上，对金属硫蛋白的结构特点和生物功能进行仔细的分析，并借助于计算机进行辅助设计。利用贮存于计算机中的生物大分子信息数据库和序列分析、分子模型等计算机软件，可以分析金属硫蛋白的一级结构氨基酸序列和高级结构空间构象。

用计算机分子模型软件对金属硫蛋白的空间结构进行分析，可以清楚地看到 α 和 β 两个结构域的形状和相对位置，以及它们与金属结合的方式。金属硫蛋白分子呈哑铃状，两个结构域就如哑铃的两头，中间由三个残基相连。在空间位置上，两个结构域之间是独立的。根据以上分析，可以初步得到以下结论：金属硫蛋白的两个结构域之间具有较大的独立性。这种独立性已经由实验得到证明。美国约翰·霍普金斯大学用基因工程的方法，在天然金属硫蛋白的两个结构域之间插入 4~12 个氨基酸残基，所得到的金属硫蛋白依然具有生物活性。英国威尔士的一个实验室做了非常有趣的实验，它们把人 MT 的 α 结构域和鱼 MT 的 β 结构域拼接起来，这种人头鱼尾的“美人鱼”MT 仍然具有与金属结合的能力。最具有说服力的是，瑞士的一个研究小组将人、兔和大鼠的三种金属硫蛋白的 α 和 β 两个结构域拆开，用核磁共振的方法，

分别测定它们的溶液构象，结果证明，其空间构象和天然金属硫蛋白的构象完全相同。这就充分说明，天然金属硫蛋白的两个结构域可以进行拆分，构建 结构域二倍体的设想是可行的。用计算机对蛋白质序列数据库中 20 个金属硫蛋白的一级结构氨基酸序列的分析结果表明，金属硫蛋白一级结构序列非常保守，在哺乳动物的金属硫蛋白中，半胱氨酸的含量和位置保持不变，连接两个结构域的三个氨基酸残基 Lys-Lys-Ser 也保持不变（图 6-7）。在构建金属硫蛋白 结构域二倍体时，为保证其空间构象与天然 MT 的构象尽可能一致，可采用天然 MT 的 结构域和 两结构域之间的三个残基 Lys-Lys-Ser 作连接片段。

图 6-7 哺乳动物金属硫蛋白的一级结构序列比较

氨基酸种类用单字符表示，分子中的二十个半胱氨酸 C 用黑体字表示，连接肽段 KKS 用下划线标出，相同的氨基酸用点表示

(3)金属硫蛋白 结构域多倍体的构建 用 MT 的 结构域二倍体代替天然 MT，有可能使其抗污染能力提高一倍。能否进一步提高其抗污染能力呢？我们知道，无论是天然 MT，还是 MT 的 结构域二倍体，在将其转入植物中时，都需要用环状的 DNA 质粒作载体。如果能把 MT 的 结构域二倍体首尾相接，构建成 MT 的 结构域多倍体，再将其插入载体中，不就可以使表达产物成倍增加，清除镉金属的能力也就成倍提高吗？根据以上设想，可以利用基因工程的方法，构建金属硫蛋白 结构域的多倍体。

连接 结构域多倍体的多肽片段，具有“铰链”的作用。它的长度以十个左右的氨基酸残基为宜，应该具有较大的柔韧性和稳定性，且适合于水溶液的环境，同时应不影响 结构域的构象。这就需要用计算机辅助分子设计的方法，根据二十种氨基酸残基的不同特点，选择合适的多肽链片段。然后，根据核酸 蛋白质翻译密码表，确定编码该多肽链的碱基序列，用化学合成的方法，分别合成 结构域和连接肽段的基因，并设法将它们拼接起来。为了便于拼接，在实际操作的时候，可以在 结构域和连接肽段基因的两端各加上一段特殊的碱基序列，称之为“粘性末端”。根据碱基配对的原理，用 DNA 连接酶作催化剂，在一定的条件下，所合成的单链 DNA 便可拼接成含有多个 结构域的双链 DNA。适当控制反应条件，便可以得到不同长度的 结构域多倍体基因。

将以上人工合成的基因插入载体后转入植物，MT 的 结构域多倍体基因在植物中表达，大量结合从根部吸收的镉、汞等重金属，起到清除土壤和水域污染的作用（图 6-8）。利用某种特殊的表达载体，将 MT 结构域基因转入水稻，使其只在水稻根部表达，既可以培育出高质量的无公害水稻新品种，又能使受污染的土地获得新生，对环境保护和农业生产都有很大的意义。当然，这种外源的 MT 多倍体基因能否在植物中得到很好的表达，是否可以遗传给下一代，还需要作大量的实验。

图 6-8 人工合成的基因转入植物，清除土壤污染

3. 大改

在小改和中改里，通常是从一个已知顺序、结构和功能的蛋白质出发，

根据一定的目标和设计方案，使用多肽合成或者基因工程的方法，改变它的结构，期望达到改变其性质的目的。在大改——从头设计一个蛋白质的时候，游戏规则就不同了。这里期望达到的目标是一个确定的结构，或者甚至是一个具有某种特定功能的结构，为此人们努力去创造一个氨基酸顺序，要求它能按照预想折迭成所期望的结构。

为了使任务简单化，往往在确定所期望的目标结构时，使它对应于自然界现存的一个已知的基本结构图样 (motif)，如 螺旋束 (图 6-9)，夹心层 (图 6-10)，或由 螺旋和 链共同组成的其他规则结构图样等。但是从头设计的定义又规定，为了实现目标结构所设计的氨基酸顺序，必须与任何已知天然顺序不相同。当然它与天然顺序可以有相似之处，即它们组成的多肽链，最终能折迭成与天然顺序相类似的基本结构图样。

图 6-9 具有 79 个氨基酸残基的蛋白分子的 α 螺旋束结构

从头设计一个蛋白质的步骤如何？目前没有统一的回答。从事这种研究的科学家各自发展了不同的方法。这里只简述一些基本原则。假如我们选定的设计目标是水溶性的球蛋白，基本结构图样是由几段螺旋区组成的螺旋束，那么首先就要提出一个草图，要使用几条或几段 螺旋，每条或每段的长度如何？想要相邻的 螺旋相互平行或反平行排列？相邻 螺旋之间的堆积及界面情况如何？然后使用模型构建的软件，在计算机辅助的图象显示仪上，构建一个多肽链骨架模型。最好的作法，是从已知三维结构的数据库里，挑选一个合适的片段，加以修改和组合，以避免设计的模型与天然的基本结构图样偏离太远，难获成功。

图 6-10 蛋白分子 层结构

关键的一步是要选定一个能与目标结构相匹配的氨基酸顺序。这个步骤目前还不能实现自动化，但是把各项物理标准、统计数据 and 作者本人的经验相结合，可以在计算机辅助的图象显示仪上来完成。如果选定的目标结构是一条多肽链组成的单分子，链上有四个 螺旋区，相互靠近形成一个四螺旋束，螺旋区之间由伸展肽链所构成的环区相连接 (图 6-11)。如何设计 螺旋上的侧链使多肽链折迭成四螺旋束？已知天然球蛋白的多肽链折迭方式虽多，但总的效果是把疏水残基埋藏在分子内部，形成疏水内核，把亲水残基暴露在分子外部，形成亲水表面。疏水内核里的侧链把内核的空间填满，很少留下空隙，并且把水分子排除在外。例如，负责电子传导的细胞色素 b562 (图 6-12) 就是如此。是怎样的动力趋使多肽链这样折迭呢？科学上称之为疏水性相互作用。日常的生活经验告诉我们，分散在水面上的小油滴趋向于汇集到一起，形成一个大油滴。在原子水平上也有与此类似的过程，即非极性的分子或基因在水中倾向于汇集到一处。这种缔合作用被称为疏水性相互作用。形象地说，这好比是水分子倾向于把非极性分子挤到一起。趋使多肽链折迭形成疏水性内核的动力，正是由于这种疏水相互作用的结果。因此在我们的目标蛋白中，必须按照这个原则来设计四条 螺旋上的侧链排列，即疏水侧链分布在螺旋的一侧，亲水侧链在另一侧，以使四个螺旋区在疏水性相互作用的趋动下折迭成束，分子的内部有疏水内核，外部有亲水表面。

事实上在天然的螺旋里，就存在着各种形式的侧链分布情况（图 6-13）。在这组螺旋及其侧链残基沿螺旋轴方向的投影图里，从中心向外读数，每一圈螺旋上，间隔 $360^\circ / 3.6$ 个残基 = 100° 处有一个残基。左面的螺旋是疏水的，右面的螺旋是亲水的，而中间的螺旋则是左侧亲水，右侧疏水。这正是我们在设计中所需要的情况。此外选定螺旋区的长度和连接螺旋区的长度也是十分重要的。

图 6-11 由四个螺旋区组成的结构域

图 6-12 细胞色素 b562 模式图

图 6-13

工作进行到这一步，大体的轮廓确定之后，要进一步把设计草图的细节具体化。为了落实每个残基位置上氨基酸，有优先残基的统计学数据可供参考。对已知结构进行调查和分析的统计学结果表明，有些氨基酸对二级结构片段中的特殊位置有优选性。例如，在靠近螺旋区的开头或末尾处出现的频率最高，或者有使多肽链形成转角和环区的倾向；或者倾向于形成界面，包括在两条链之间的界面，层和螺旋之间，两个层之间，层和溶剂之间等。上面已提到的 Ala、Glu、Leu、Met 等残基容易形成螺旋，而 Pro、Gly、Tyr 和 Ser 则不同。Pro 由于有环状大侧链，不仅妨碍螺旋主链上 H 键的形成，而且容易造成空间障碍。Gly 的侧链只是一个 H 原子，所以最适合安排在主链特别需要柔韧性的位置上。可以利用一对 Cys 来实现共价的二硫键结合，Trp 可供选做考查折迭的探针等。此外，安排氨基酸顺序的判据标准还包括局部区域内的残基外形互补，侧链大小与极性，H 键和电荷间的相互作用，最密堆积方式的优化等。工作进行到这个阶段，需要经常把设计中的模型和数据库里已知的同类三维结构做比较，经验表明这样做是十分有益的。

在初步选定了氨基酸顺序之后，再用 Monte Carlo 法或分子动力学计算将它的三维模型优化，继之以能量极小计算，使构象的能量水平达到最低和稳定。最后还需要用考核蛋白质结构合理性的各种判据来进行检验，这种检验几乎无例外地都会引导人们对所设计的模型再进行修正。在实验室里，开始制备这个从头设计的蛋白质之前，人们通常都使用一切可能的计算工具，对设计的模型进行几轮甚至是许多轮的检验和修正。经验证明，这样做对实验工作获得成功是极端重要的。

在用多肽合成法或基因表达法获得从头设计的目标蛋白质之后，要用光谱学方法考查其结构的情况。如果原来设计的目标是具有特殊生物功能的蛋白质，那么就还要用相应的生物化学方法测定其生物活力。准确三维结构的测定需要用 X 射线结晶学法，或者至少是二维的 NMR 法。通常要经过几轮或许多轮的设计、检验和再设计，方可泡制出一个正确折迭的蛋白质。

三、前景展望

蛋白质工程自 1983 年问世以来，只不过经历了短短十年的时间，已经取得了引人瞩目的进展。例如，在含水体系中，对氢键作用的定量研究和酶的作用机制研究等，过去都是很难进行的，蛋白质工程却使这些深入的探索成为可能。由于这些工作偏重基础理论性质，这里都不打算涉及。在实际应用方面，对医用和工业用酶的研究比较多，其中有些已经形成产品上市，取得明显的经济效益。世界各国对工业用酶消费情况的统计表明，蛋白水解酶处于领先地位。根据美国 1983 年提供的数据，工业用酶的消费额为 8800 万美元，而在洗涤剂方面的用量，预测每年以 13% 的速度递增，是一个庞大的消费市场。

芽孢杆菌是工业用蛋白质水解酶的主要生产菌，不同种类的芽孢杆菌产生的胞外碱性蛋白酶被统称为枯草杆菌蛋白酶。1985 年，美国的埃斯特林 Estell 等将枯草杆菌蛋白酶 BPN 分子里第 222 位残基易被氧化的 Met 置换为 Ala，所形成的突变体蛋白虽然水解酶的活力降低为原来野生型酶活力的 53%，但是它在浓度为 1M 的双氧水中可以保持酶活一小时以上，而野生型的酶在同样的氧化条件下，几分钟内酶活就急剧下降到只剩十分之一左右。相比之下，突变体蛋白酶用作洗涤剂的添加剂时，还是有实用价值的，因为它有很好的抗氧化能力，可以和漂白剂一同使用，成为既有去除血渍、奶渍等蛋白污渍的能力，又有增白效果的新型洗涤剂。与此相仿，国际上在改良枯草杆菌蛋白酶的热稳定性、极端 pH 稳定性、最适 pH 稳定性、改变底物专一性、提高催化反应速率方面，还有许多有意义的工作和成果。美国的吉尼科 (Genencor) 公司已经生产各种新型的洗涤剂，可以适应不同水质条件，能满足家庭和工业用途的种种特殊要求，并已占领了美洲市场。丹麦的诺沃 (Novo) 公司也于 1991 年投产，在欧洲市场上销售。

在医用蛋白质方面，仍然以人胰岛素的改进为例。美国的 (伊利-利利) Ely-Lilly 公司和丹麦的诺沃公司都有大量深入的研究工作。国际上对其他治疗肿瘤 (如干扰素等)、血栓 (如 t-PA 等)、以及种类繁多的各种药物，都有大量的工作在进行中，并且每年有很多专利项目发表，但是迄今未见有经 FDA 批准的产品上市。此外，现代药物设计越来越与蛋白质工程有密切的关系。以广泛用作药物的酶抑制剂为例，结构测定提供分子中的原子坐标及其在空间中的相互关系，可以用来解释该抑制剂的作用机制，或者以此为模板，用于修饰改造其他天然存在的抑制剂，直至从头设计新型的抑制剂，并且用实验来考查设计的正确性。这种信息与来自药物有关的其他学科领域的信息联系起来，可以帮助人们全面地考虑药物研制计划的战略和路线。这种以结构为基础的理性药物设计，已经广泛应用于改进药物的体外活力和优化体内性能，包括生物可及性、毒性、药代动力学等，都做出了有意义的贡献。

在农业方面，蛋白质工程也是有重要前景的。植物光合作用的第一步是利用日光能固定空气中的 CO_2 ，但是植物同时又进行光呼吸作用，在吸入氧、呼出 CO_2 的过程中，又把自己所固定的碳消耗掉 25% ~ 50%。这两个反应都是由一个称为核酮糖-1, 5-双磷酸羧化酶氧合酶所催化的。如何通过蛋白质工程的手段，加强其固定 CO_2 的作用，或降低其光呼吸的作用，就好比是提高光合作用的效率，可能为农业增产带来难以估量的巨大效益。自从该酶

的晶体结构公开发表之后，围绕着这个课题的研究工作更加增多。在材料科学方面的研究，如从头设计在医药或工业等方面有应用前景的蛋白质和酶，探索生物电子原器件的研制等，虽然还都处于襁褓时期，但是近年来取得的可喜进展，都已向人们展示出诱人的前景。

我国在 1986 年将蛋白质工程研究列入生物技术领域的七五攻关计划，1987 年又列入国家发展高技术（863）计划。主要对医药和工农业方面有应用前景的重要蛋白质和酶进行定向改造研究，还对关键性的基础技术进行研究，在积极跟踪国际前沿发展的同时，努力创新，争取做出自己的特色。例如，天花粉蛋白质是我国的传统中药，1989 年美国发现它具有抑制艾滋病毒复制的能力，使它成为世界性竞争的研究对象。生物物理所董贻诚等于 1992 年发表的正交晶型天花粉蛋白的晶体结构，分辨率达到 17.3 纳米，在核糖体失活蛋白的结构研究中，居世界领先地位。关于改进药物性能的研究正在进行中。生物物理所邹承鲁关于胰岛素的 A 链和 B 链含有充分的信息，使多肽链正确折迭成为有活力的胰岛素分子的理论，是生物化学所冯佑民等和北京大学生物系胡美浩等成功地解决人胰岛素原的后加工问题的一个重要依据。生物化学所戚正武等，以戚本人发现的天花粉蛋白酶抑制剂和慈菇蛋白酶抑制剂为对象，探索将它们改造成为活力高、多功能（可抑制一种以上蛋白酶的活力）的突变体蛋白，将它们的基因转入农作物中，可使农作物具有抗害虫的能力。北京大学生物系潘爱华等关于金属硫蛋白的研究，试图将金属硫蛋白用于环境保护，把它的基因克隆到植物中去表达，使转基因植物对环境中有毒重金属（如镉）有明显提高的耐受能力，被英国的 Blundell 在第 16 届国际晶体学会的全会报告中誉为“奇妙的项目”。以生物大分子空间结构为基础的药物设计，作为新技术研究的课题，已经由药物所的陈凯先等和北京大学化学系的来鲁华等付诸实施。可以对目前药物研制和药学教育方面，“从仿制到创新”的战略大转移，提供配合和服务。

六年来，我国在生物技术领域内的蛋白质工程研究，从国家得到较强的经费资助，还有经过改革的新型管理体制，主要是在有限的目标产品导向的范围内开展工作，已经初步建立了一支有实力、有水平、奋力拼搏的研究队伍，和一批设备技术条件比较齐全的实验室。虽然研究工作仍处于早期阶段，尚未取得确定的产品或效益，但已开始显示出其创新性和优势。可以预见它能为本世纪末和下世纪初的国民经济建设提供技术储备，为形成高技术产业的目标做出应有的贡献。

1990 年美国的理查森（Richardson）设计的四螺旋束 Felix 由 79 个残基构成（Fig.1），共使用了二十个标准氨基酸中的十九个。分子中有两个 Cys，它们在一级结构上，虽然相距很远，但是在正确折迭后的三维结构中相互靠近，形成二硫键。分子内还有一个 Trp 残基，作为内核形成的探针。经过多次失败和努力，合成的基因在大肠杆菌中实现表达，包含体蛋白用 6M 尿素变性，然后复性。纯化的蛋白质用物理学的方法鉴定，结果表明多肽链已折迭成了“近似正确”的结构：如凝胶过滤有确定的单分子峰，CD 谱是典型的全螺旋蛋白质，第一和第四螺旋间的二硫键可以诱导形成，色氨酸荧光蓝移表明变性复性变化等。那么为什么还说只是“近似正确”呢？这是因为并非 Felix 的全部属性都与原设计符合：蛋白的稳定性差，螺旋的含量低于原设计标准，晶体生长和用 NMR 测定溶液构象均未见报道成功。作者本人的结论是“...有些内埋的侧链可能不只具有一个位置，而事实上可能是相当

活动的，...””，因而它仍然不是严格意义上的球蛋白。但是这项成就被人们视为蛋白质从头设计的里程碑，因为它的折迭基本正确，并且在大肠杆菌中表达成功。

以上介绍的内容，仅限于从头设计一个特定的结构，能不能再进一步，从无到有地设计一个同时具有特殊生物功能（如催化作用）和结构的蛋白质呢？这显然是更加困难的使命。因为它不仅对设计的氨基酸顺序要求正确折迭成稳定的结构，还要求这个结构为参加催化作用的侧链提供确定的空间位置，其精确度偏差在 10 纳米以内，而且活力中心要受到部分屏蔽，不在含水的溶剂环境中。

图 6-14 合成残基形成的血色素结构

人工酶的设计通常也是比照天然催化剂进行的。如果仍以四条螺旋组成的螺旋束为例，前面说过的细胞色素 b562（图 6-12）就是代表。它的活力部位在分子的一端，成口袋状，血色素分子位于这个口袋内，血色素中心处的 Fe 原子可以被氧化和还原，使细胞色素 b562 具有传递电子的功能。图中的圆球表示 Fe 原子的位置。1989 年萨瑟金（Sasaki）等以血红素分子为模板，把四条合成的含 15 个残基（Ala、Glu、Gln、Leu、Leu、Gln、Glu）Leu 的多肽链，用 N 端共价结合到血色素分子卟啉环的四角（图 6-14）。这种设计有利于四条螺旋自动地互相平行排列，形成疏水内核，在血色素附近的空隙处，可能成为分子的结合部位或活力部位。生化测定表明这个分子确有苯胺羟化酶的活力（ $K_{cat} = 0.02$ 分钟， $K_m = 5.0$ 毫摩）。这与天然的血红素蛋白很相似，表明这个从头设计的酶确实在血红素附近与底物结合。光谱学检验的结果表明，分子中螺旋的含量很高，肽链折迭正常。准确的三维结构是否与原设计相符合？还有待已生长的微晶能改进，用于测定晶体结构的结果。

