

SHIPIN SHENGCHAN XINJISHU

食品生产新技术

王丽霞 编著



化学工业出版社

SHIPIN SHENGCHAN XINJISHU

食品生产新技术

王丽霞 编著



化学工业出版社

·北京·

本书重点阐述了食品工业新技术的原理、特点以及在食品工业中的应用,主要包括:食品生物技术、食品分离技术、食品微胶囊技术、食品微波技术、食品超微粉碎技术、食品辐照技术、食品超高压技术、食品质构重组技术、食品保鲜技术以及无菌包装技术。本书可供高等院校食品专业师生参考使用,也可为科研工作者和食品加工从业人员提供有益指导。

图书在版编目(CIP)数据

食品生产新技术/王丽霞编著. —北京:化学工业出版社, 2016. 1
ISBN 978-7-122-25882-3

I. ①食… II. ①王… III. ①食品加工 IV. ①TS205

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 306608 号

责任编辑: 张彦
责任校对: 王素芹

装帧设计: 孙远博

出版发行: 化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印刷: 北京云浩印刷有限责任公司

装订: 三河市瞰发装订厂

710mm×1000mm 1/16 印张 20 字数 377 千字 2016 年 3 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 59.00 元

版权所有 违者必究

食品是人类的第一需要，食品工业联系着各个国家的命脉。随着现代社会的发展，人类生活节奏也逐步加快。多样性、快捷性、营养性、安全性等新型食品的出现才能迎合人们生活质量不断提高的需要。而传统的食品加工技术难以适应现代食品工业的迅猛发展，采用新技术生产新型食品是食品工业发展的必然趋势。食品生物技术为人们开发了食品新资源和保健食品资源，辐照技术、微波技术、包装技术为食品资源的安全、营养、长久保藏提供了保障，食品高压技术开辟了食品加工的新方向，超临界流体萃取技术、膜分离技术、分子蒸馏技术等都影响了食品工业的结构和发展。

本书重点阐述了十种食品工业新技术的原理、特点以及在食品工业中的应用。本书共分十章内容，主要包括：食品生物技术、食品分离技术、食品微胶囊技术、食品微波技术、食品超微粉碎技术、食品辐照技术、食品超高压技术、食品质构重组技术、食品保鲜技术以及无菌包装技术。在编写过程中借鉴国内外同类图书和文献，并汇集了编者多年的科研及教学经验和成果。

本书既可以作为高等院校食品专业学生的教材或教学参考书，也可以为科研工作者和食品加工从业人员提供有益指导。

由于本人学识水平有限，本书撰写中的疏漏和不妥之处在所难免，欢迎各位同仁和读者批评指正。

编著者

2016年1月

第一章 食品生物技术

1

第一节 食品基因工程	1
一、概述	1
二、基因工程的工具酶与基因载体	3
三、基因工程的基本操作技术	9
四、基因工程在食品中的应用	13
第二节 食品酶工程	15
一、概述	15
二、酶的制备	16
三、酶的分子修饰	19
四、固定化酶	21
五、酶反应器和酶传感器	24
六、酶工程在食品工业上的应用	25
第三节 食品发酵工程	29
一、概述	29
二、发酵过程与方法	31
三、发酵设备	34
四、发酵在食品中的应用	39
第四节 食品与细胞工程	42
一、概述	42
二、细胞工程的基本原理及技术	43
三、细胞工程在食品中的应用	48

第二章 食品分离技术

52

第一节 膜分离技术	52
一、膜技术概述	53

二、膜分离技术的装置及流程	55
三、极化、污染现象和预防	61
四、膜分离的基本方法及其原理	63
五、膜分离技术在食品中的应用	65
第二节 超临界流体萃取技术	69
一、超临界流体萃取技术概述	70
二、超临界流体萃取技术在食品中的应用	76
第三节 分子蒸馏技术	79
一、概述	79
二、分子蒸馏技术的基本原理及特点	79
三、分子蒸馏设备	84
四、分子蒸馏技术在食品中的应用	88

第三章 食品微胶囊技术

91

第一节 微胶囊的定义及分类	92
一、定义	92
二、分类	93
三、微胶囊的作用	93
第二节 微胶囊技术的原理	95
一、微胶囊的芯材、壁材及其性能	95
二、微胶囊的性质	102
三、微胶囊的质量评价	106
第三节 微胶囊的制备方法	107
一、喷雾干燥法	108
二、喷雾冷却和喷雾冷冻法	111
三、空气悬浮微胶囊化法	112
四、挤压法与锐孔-凝固法	114
五、凝聚法	115
六、分子包囊法	116
七、聚合法	117
八、复相乳液法	119
第四节 微胶囊技术在食品工业中的应用	120
一、粉末状食品（食品原料）的微胶囊技术	120
二、微胶囊化食品添加剂	122
三、微胶囊化营养素及营养强化剂	124

第一节 概述	127
一、微波技术的发展历史	127
二、微波技术的概念	128
第二节 微波加热的原理及特点	128
一、微波的特性	128
二、微波加热原理	130
三、微波杀菌原理及工艺特点	131
四、微波加热的特点	134
五、微波与物料的关系	136
六、微波加热设备	141
第三节 微波辅助萃取	144
一、微波萃取的机理	145
二、微波萃取的特点	145
三、微波辅助萃取技术的影响因素	146
四、微波萃取的应用	147
第四节 微波在食品工业中的应用	148
一、微波加热对食品营养成分的影响	148
二、微波在食品工业中的应用	150

第一节 概述	156
一、概念	156
二、作用	156
三、原理及特点	157
第二节 超微粉碎的基本理论	158
一、原料的基本特性	158
二、粉碎机理	159
第三节 超微粉碎设备	162
一、磨介式粉碎机	162
二、气流式粉碎机	164
三、机械冲击式粉碎机	167
四、胶体磨	168
第四节 超微粉碎技术在食品工业中的应用	169

一、原料加工	169
二、调味品加工	170
三、功能性食品加工	171
四、肉类、畜骨粉加工	171
五、巧克力的生产	172
六、其他	172

第六章 食品辐照技术

174

第一节 概述	174
一、食品辐照技术的概念及特点	174
二、国内外辐照保藏技术的进展	175
第二节 辐照的基本概念	176
一、放射性同位素与辐射	176
二、辐照源	176
三、辐照剂量	178
第三节 食品的辐照效应	179
一、食品辐照物理效应	179
二、食品辐照的化学效应	181
三、食品的辐射生物学效应	186
第四节 辐射在食品保藏中的应用	189
一、应用于食品上的辐射类型	190
二、食品辐射保藏	191
三、影响食品辐照效果的因素	192
四、辐照食品的包装	195
五、辐射伤害和辐射味	195
第五节 辐照食品的安全性和卫生性	196
一、辐照食品的安全性	196
二、辐照食品的卫生性	197

第七章 食品超高压技术

200

第一节 超高压技术概述	200
一、超高压技术的发展历程	200
二、超高压技术的概念	202
三、超高压技术及其加工食品的特点	202
第二节 超高压技术的原理	205

一、超高压技术的基本原理	205
二、超高压杀菌的原理	206
三、影响超高压杀菌的主要因素	207
四、超高压技术对食品成分的影响	209
第三节 超高压技术加工设备	212
一、按照加压方式分类	213
二、按照处理物料状态分类	214
三、按生产加工操作方式分类	215
四、按照超高压容器放置方式分类	215
五、根据规模分类	216
第四节 超高压技术在食品中的应用	216
一、超高压技术与食品	217
二、超高压食品加工工艺	220

第八章 食品质构重组技术

222

第一节 食品膨化与挤压技术	222
一、膨化与挤压技术的发展概况	222
二、膨化食品的定义及分类	224
三、膨化食品的特点	226
四、挤压膨化的原理及特点	228
五、挤压膨化技术的设备及挤压膨化食品的生产工艺流程	231
六、在食品中的应用	236
七、挤压膨化技术的发展方向	239
第二节 食品气流膨化技术	240
一、气流膨化技术的原理及过程	240
二、气流膨化设备	243
三、气流膨化食品举例	248

第九章 食品保鲜技术

250

第一节 气调保鲜技术	250
一、概述	250
二、气调保鲜的方法和工艺	255
三、气调保鲜技术的应用	263
第二节 涂膜保鲜技术	266
一、概述	266

二、涂膜保鲜剂的种类及特性	268
三、涂膜保鲜技术的应用	276
第三节 其他的保鲜技术	277
一、钙处理保鲜技术	277
二、臭氧保鲜技术	278
三、超声波杀菌保鲜技术	280

第十章 无菌包装技术

282

第一节 无菌包装技术概述	282
一、无菌包装技术原理	283
二、无菌包装技术特点及缺点	283
三、无菌包装的种类和包装的食品	285
第二节 无菌包装体系及灭菌方法	286
一、无菌包装材料和容器的灭菌技术	286
二、无菌包装食品的灭菌技术	291
三、包装环境的无菌化	295
第三节 无菌包装系统及设备	295
一、纸盒无菌包装系统及设备	295
二、塑料类无菌包装系统及设备	297
三、玻璃瓶无菌包装系统及设备	301
四、马口铁罐无菌包装系统及设备	301
五、大袋无菌包装设备	303
第四节 无菌包装技术的应用	303
一、液态奶的无菌包装	303
二、果蔬汁的无菌包装	305

参考文献

307

第一章

食品生物技术

第一节 食品基因工程

在漫长的生物进化过程中，基因重组一直进行着。生物物种在自然力量的作用下，通过基因突变、基因重组和基因转移等途径不断进化，诠释着适者生存的规律。今天各具特性的繁多物种中，有的耐高温，有的耐寒，有的能适应干旱的沙漠，有的可在高盐度的海滩上或海水中生长繁殖，有的能固定大气中的氮素等。

20 世纪 70 年代，人们已经明确了不同生物具有相同的遗传物质基础、基因是可以切割和转移的、遗传密码基本通用等基本生物学规律。在技术水平上 DNA 的切割、DNA 分子的克隆及 DNA 测序技术也已经基本成熟。这样伴随理论储备和技术的发展基因工程的诞生成为了必然。

一、概述

基因工程诞生于 1973 年，是一门以分子遗传学为理论基础，并建立在微生物学和生物化学等学科基础上的边缘学科。基因工程作为现代生物技术中的核心技术已经应用到生物学研究的很多领域，极大地推动了分子生物学及其相关学科的发展，基因工程产品也已经在工业、农业、医药等多种行业得到应用，并展示出了非常诱人的前景。

（一）基因工程的定义、基本过程及理论依据

1. 基因工程的定义

基因是存在于染色体上并含特定遗传信息的核苷酸序列，是编码蛋白质或 RNA 分子遗传信息的基本单位。当 DNA 是遗传物质时，基因是有遗传效应的 DNA 片段。当 RNA 是遗传物质时，基因是有遗传效应的 RNA 片段。

基因工程通常是指运用酶学方法，在体外把外源基因与特定的载体（病毒、

质粒、噬菌体等)进行重组,并使此重组体进入(或导入)到原来没有这类分子的受体细胞内,能使外源基因在受体细胞内繁殖并表达生物活性物质,从而改造生物特性,生产出人类所需要的产物的高新技术。

DNA 分子的重组过程是按照工程学方法进行设计和操作的。这种基因工程技术跨越了种属之间的屏障,在不同种间进行无性繁殖,从而扩大了创造新生物种的可能性。

2. 基因工程的基本过程

基因工程的核心内容为基因重组、克隆和表达。其基本操作过程可以归纳为以下五个主要步骤:简述为“切、连、转、筛、检”。

(1) 切 目的 DNA 片段的获得。

目的 DNA 片段可以来自化学合成的 DNA 片段、从基因组文库或 cDNA 文库中分离的基因、通过 DNA 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增出来的片段等。

(2) 连 目的 DNA 片段与含有标记基因的载体在体外进行重组。

利用 DNA 重组技术,将目的 DNA 片段插入到合适的载体中,形成具有自主复制能力的 DNA 小分子。

(3) 转 重组 DNA 导入宿主细胞。

借助于细胞转化手段将 DNA 重组分子导入微生物、动物和植物受体细胞中,获得外源基因的克隆。

(4) 筛 含有目的基因的克隆的筛选。

以标记基因,如对抗生素有抗性的基因的表达性状为依据,从成千上万的克隆中筛选出目的克隆。

(5) 检 目的基因片段表达的检测与鉴定。

3. 基因工程的理论依据

(1) 不同基因具有相同的物质基础 地球上的一切生物,从细菌到高等动植物,直至人类,它们的基因都是一个具有特定遗传功能的 DNA 片段。而所有生物的 DNA 的基本结构都是一样的。因此,不同生物的基因 (DNA 片段) 是可以重组互换的。虽然某些病毒的基因定位在 RNA 上,但是这些病毒的 RNA 仍可以通过反转录产生 cDNA,并不影响基因的重组或互换。

(2) 基因是可切割的 基因呈直线排列在 DNA 分子上,除少数基因重叠排列外,大多数基因彼此之间存在着间隔序列。因此,基因可以从 DNA 分子上一个一个完整地切割下来。即使是重叠排列的基因,也可以把指定的基因切割下来,尽管破坏了其他基因。

(3) 基因是可以转移的 基因不仅可以切割,而且可以在染色体 DNA 上移

动,甚至可以在不同染色体间进行跳跃,插入到靶 DNA 分子之中。

(4) 多肽与基因之间存在对应关系 现在普遍认为,一种多肽就有一种相对应的基因。因此,基因的转移或重组可以根据其表达产物多肽的性质来检查。

(5) 遗传密码是通用的 一系列三联密码子(除极少数的几个以外)同氨基酸之间的对应关系,在所有生物中都是相同的。也就是说遗传密码是通用的,重组的 DNA 分子不管导入什么样的生物细胞中,只要具备转录翻译的条件,均能转译出原样的氨基酸。即使人工合成的 DNA 分子(基因)同样可以转录翻译出相应的氨基酸。

(6) 基因可以通过复制把遗传信息传递给下一代 经重组的基因一般来说是能遗传的,可以获得相对稳定的转基因生物。

(二) 食品基因工程的定义

食品基因工程是利用基因工程的技术和手段,在分子水平上定向重组遗传物质,以改良食品的品质和形状,提高食品的营养价值、贮藏加工性状以及感官性状的技术。

二、基因工程的工具酶与基因载体

(一) 基因工程的工具酶

基因工程的关键技术是基因的剪切、拼接和组合,这些分子操作涉及多种不同的酶。而这些在基因工程操作中不可缺少的酶统称为基因工程的工具酶,这些酶种类繁多,作用各异,绝大多数都是从不同微生物中分离和纯化而获得的,主要包括限制性核酸内切酶、连接酶、逆转录酶和末端转移酶等。

1. 限制性核酸内切酶

限制性核酸内切酶(restriction endonuclease)简称限制性内切酶或限制酶,是一类能够识别和切割双链 DNA 分子内某种特定核苷酸序列的内切酶。这类酶主要应用于基因分离、DNA 结构分析、载体的改造和体外重组等方面。目前,从各种生物中分离出的限制性内切酶已有 175 余种,其中用于切割 DNA 双链的有 80 多种。

(1) 命名 限制性内切酶的命名主要是参考 1973 年 H. O. Smith 和 D. Nathaus 提出的原则进行的。

第一个字母:大写,表示所来自的微生物的属名的第一个字母。第二、第三个字母:小写,表示所来自的微生物种名的第一、第二个字母;寄主菌属名的第一个字母和种名的头两个字母组成斜体。其他字母:大写或小写,表示所来自的微生物的菌株号。罗马数字:表示该菌株发现的限制酶的编号。例如 EcoR I,

E：表示大肠杆菌属名第一个字母；

co：表示种名头两个字母；

R：表示株名；

I：表示该菌中第一个被分离出来的酶。

(2) 分类 按限制酶的组成与修饰酶的活性关系、切断核酸的情况不同，分为三类：Ⅰ型、Ⅱ型和Ⅲ型。由于Ⅰ型和Ⅲ型限制酶无切割特异性或特异性不强，导致其在基因工应用中受限。Ⅱ型限制酶切割位点位于识别位点之内或在附近，特异性最强。因此，基因工程中最常用的是Ⅱ型限制性内切核酸酶（见表 1-1）。

表 1-1 常用限制性核酸酶内切的识别序列和来源

Bam H I	GGATCC	淀粉液化芽孢杆菌(<i>Bacillus amyloliuifaciens</i> H)
Eco R I	GAATTC	大肠杆菌(<i>Eschericha coli</i> Rrl3)
Hind III	AAGCTT	流感嗜血杆菌(<i>Haemophilus in fluenzae</i> Rd)
Kpn I	GGTACC	肺炎克雷伯氏杆菌(<i>Klebsiella pneumoniae</i> OK8)
Nco I	CCATGG	珊瑚诺卡氏菌(<i>Nocardia corallina</i>)
Pst I	CTGCAG	普罗威登斯菌属(<i>Providencia stuartii</i> 164)
Sal I	GTCGAC	白色链霉菌(<i>Streptomyces albus</i> G)
Sma I	CCCGGG	黏质沙雷氏菌(<i>Serratia marcescens</i> sb)
Sph I	GCATGC	暗色产色链霉菌属(<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>)
Xba I	TCTAGA	黄单胞菌属(<i>Xanthomonas badrii</i>)

Ⅱ型限制性内切核酸酶的基本特性：此类酶是分子量较小的单体蛋白，并且有其特定的 DNA 识别位点。通常是由 4~8 个碱基对组成的，具有二重旋转对称轴，呈回文结构（palindromic structure）的特定序列（靶序列）。例如，EcoR I 的识别序列为：

5'-GAATTC-3'
3'-CTTAAG-5'

核酸内切酶作用后的断裂方式分为两种：黏性末端和平末端。黏性末端（cohesive end）：两条链上的断裂位置是交错的，但又是围绕着一个对称结构中 心，这样形式的断裂结果形成 5'或 3'单链突出的黏性末端的 DNA 限制片段。平末端（blunt end）：两条链上的断裂位置是处在一个对称结构的中心，这样形式的断裂是形成具有平末端的 DNA 片断，不易重新环化（图 1-1）。

绝大多数的Ⅱ型限制性内切核酸酶均在其识别位点内切割 DNA，切割位点可发生在识别序列的任何两个碱基之间。有些来源不同的限制酶却识别和切割相同的序列，这类限制酶称为同裂酶。同裂酶产生同样切割，形成同样的末端，酶切后所得到的 DNA 片段经连接后所形成重组序列，仍可能被原来的限制酶所切割。同裂酶的反应条件可能存在差异。例如，限制酶 Hpa II 和 Msp I 是一对同裂酶，共同的靶序列是 CCGG。有些来源不同的限制酶，识别及切割序列各不相

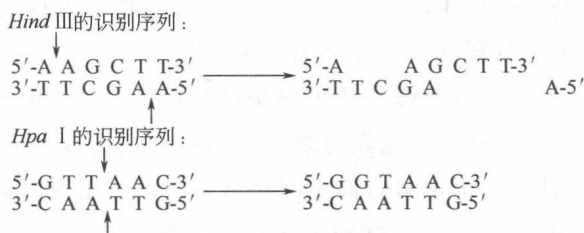


图 1-1 II 型限制性内切核酸酶的切割方式

同,但却能产生出相同的黏性末端,这类限制酶称为同尾酶。但两种同尾酶切割形成的 DNA 片段经连接后所形成的重组序列,不能被原来的限制酶所识别和切割。如 *Bam* H I、*Bcl* I、*Bgl* II 和 *Xho* I 是一组同尾酶,它们切割 DNA 之后都形成由一 GATC-四个核苷酸组成的黏性末端。很显然,由同尾酶所产生的 DNA 片段,是能够通过其黏性末端之间的互补作用而彼此连接起来的,因此在基因克隆实验中很有用处。

2. DNA 连接酶

DNA 连接酶广泛存在于各种生物体内,其作用是将双螺旋 DNA 分子的单链上两个相邻的 3'-OH 和 5'-P 共价结合形成 3',5'-磷酸二酯键,使原来断开的 DNA 缺口重新连接起来。因此,它在 DNA 复制、修复及体内体外重组过程中起着重要作用。

常用的 DNA 连接酶有大肠杆菌连接酶(大肠杆菌基因组编码)和 T4 DNA 连接酶(T4 噬菌体基因编码)。两种酶的催化反应比较相似,但是它们所需要的辅助因子以及催化能力不同。前者的辅助因子是 ATP,并且只能连接黏性末端;后者辅助因子是 NAD,既能连接黏性末端,又能连接平末端。因此,基因工程中主要用的是 T4 DNA 连接酶。

3. DNA 聚合酶

DNA 聚合酶(DNA polymerase)最早在大肠杆菌中发现,在细胞内的 DNA 复制过程起着重要的作用。在基因工程操作技术中,常使用的 DNA 聚合酶有大肠杆菌 DNA 聚合酶 I,大肠杆菌 DNA 聚合酶的 Klenow 大片段、T4 DNA 聚合酶和 TapDNA 聚合酶(耐热 DNA 聚合酶)等。

(1) 大肠杆菌聚合酶(全酶) DNA 聚合酶 I 1957 年,美国的生物学家 A. Kornberg 首次证实,在大肠杆菌提取物中存在一种 DNA 聚合酶,即现在所说的 DNA 聚合酶 I。此酶具有全部的 3'-5'的外切酶活性,5'-3'的聚合酶活性和全部 5'-3'的外切酶活性。DNA 聚合酶 I 主要用于合成双链 cDNA 分子或片段连接,缺口平移制作高比活探针, DNA 序列分析,填补 3'-末端。

(2) 大肠杆菌聚合酶 I 大片段(Klenow 片断) 用枯草杆菌蛋白酶处理大

肠杆菌 DNA 聚合酶 I 会产生两个片段，一个小片段和一个较大的片段，这个大片段被称为 Klenow 大片段酶。这个大片段具有全部的 3'-5' 的外切酶活性和 5'-3' 的聚合酶活性，被广泛用于修补经限制酶消化的 DNA 所形成的 3' 隐蔽末端，标记 DNA 片断的末端，cDNA 克隆的第二链 cDNA 的合成及 DNA 序列的测定。

(3) T4 噬菌体 DNA 聚合酶简称 T4 DNA 聚合酶 它从 T4 噬菌体感染的大肠杆菌培养物中纯化出的一种特殊的 DNA 聚合酶，具有 5'-3' 的聚合酶活性和 3'-5' 的外切酶活性。

(4) TapDNA 聚合酶（耐热 DNA 聚合酶） 最初从嗜热的水生菌 *Thermus aquaticus* 中纯化来，是一种耐热的依赖 DNA 的 DNA 聚合酶。现在可以用基因工程技术生产并出售。它具有依赖于聚合物 5'-3' 外切核酸酶活性，用于 DNA 测序和聚合酶链式反应（PCR）对 DNA 片段进行体外扩增。

(5) 逆转录酶 逆转录酶（reverse transcriptase）又称依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶（RNA-dependent DNA polymerase）。该酶从一些致癌 RNA 病毒中发现，能有效地以 RNA 为模板转录合成 DNA，产物 DNA 又称 cDNA（complementary DNA），即互补 DNA。由于这一反应中的遗传信息的流动方向正好与绝大多数生物转录生成方向（以 DNA 为模板转录生成 RNA 的方向）相反，所以此反应称为逆转录作用。逆转录酶具有 RNA 指导的 DNA 合成反应；DNA 指导的 DNA 合成的反应和 RNA 的水解反应 3 种活性。在基因工程中，逆转录酶的主要用途是转录 mRNA 合成 cDNA。另外，它也可用 ssDNA 或 RNA 作模板制备杂交探针。

4. 末端转移酶

从动物胸腺和骨中提取的一种碱性蛋白质。该酶在 Co^{2+} 存在及没有模板的情况下，催化脱氧核苷酸添加到 DNA 分子的 3'-OH 末端上。末端转移酶可给一些 DNA 分子的 3'-OH 末端接上寡 dA 或 dG，另一些 DNA 分子的 3'-OH 末端接上寡 dT 或 dC，混合这些分子，即可使同聚物尾部退火形成环状分子。末端转移酶的主要作用是给载体或 cDNA 加上互补的同聚尾及 DNA 片段 3' 末端的放射同位素标记。

5. 碱性磷酸酯酶

在基因工程中有两种碱性磷酸酶得到广泛使用，一种是从大肠杆菌提取的碱性磷酸酶 BAP，另一种是从牛小肠提取的碱性磷酸酶 CIP。两种碱性磷酸酶均能催化去除核酸分子的 5' 磷酸基，产生 5' 羟基末端。两种酶反应均需 Zn^{2+} 。虽然 BAP 耐热，但是 CIP 的特异活性较 BAP 高 10~20 倍，因此，CIP 应用更广泛。基因工程中碱性磷酸酶主要用于：①去除 DNA 和 RNA 的 5' 磷酸基，然后在 T4 多聚核苷酸激酶催化下，用 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 进行末端标记，继后进行序列

分析；②去除载体 DNA 的 5' 磷酸基，防止自我环化，降低本底，提高重组 DNA 检出率。

（二）基因载体

外源基因获得后需要引入受体细胞，并且使它得到复制、表达，但是单独外源基因不能直接进入受体细胞，它需要借助工具才能进入受体细胞。这种能携带外源基因进入受体细胞的运载工具被称作为基因载体。

基因载体的本质是 DNA。经过人工构建的载体，不仅能与外源基因连接重组从而将外源基因导入受体细胞，而且还能利用受体细胞的有关调控系统，使导入的外源基因在受体细胞中得以扩增复制和表达。一个理想的载体一般必须具备以下条件：容易进入宿主细胞，进入效率越高越好，进入宿主细胞后能独立自主地复制，最好要有较高的自主复制能力；容易从宿主细胞分离纯化；具有多种单一的核酸酶切位点，有利于插入外来核酸片段，插入后不影响其进入宿主细胞和在细胞中的复制；具有合适的被识别筛选的标记，便于重组 DNA 的检测。

基因工程中最常用的载体包括质粒（plasmid）载体、λ 噬菌体（phage）载体、柯斯质粒（cosmid）载体、动物病毒载体。

1. 质粒载体

质粒（plasmid）一类独立于染色体外而能自我复制的遗传物质。是存在于细菌染色体外的小型环状双链 DNA 分子。大小约为数千碱基对。常有 1~3 个抗药性基因，以利于筛选。

质粒广泛存在于细菌细胞中，但并不是细菌生长所必需的，质粒赋予细菌某些抵御外界环境因素不利影响的能力，如对抗生素的抗性、重金属离子的抗性、细菌毒素的分泌及复杂化合物的降解等。一个理想的质粒载体必须满足：①具有自己的复制起点和较多的拷贝数；②质粒载体的相对分子质量应尽可能小，小分子质粒的转化率较高；③具有若干单一的限制性内切酶位点；④应该有一个或多个选择标记基因，一个理想的质粒克隆载体最好有两种标记基因，且抗性基因内有单一酶切位点。

质粒载体 pBR322：pBR322 是目前研究最多、使用最广泛的质粒载体之一。pBR322 的分子量为 4363bp，具有两种抗生素抗性基因（抗氨苄青霉素和抗四环素）可供作转化子的选择记号；还有单一的 *Bam* H I、*Hind* III 和 *Sal* I 的识别位点，这 3 个位点都在四环素抗性基因内；另一个单一的 *Pst* I 识别位点在氨苄青霉素抗性基因内。pBR322 带有一个复制起始位点，它可以保证这个质粒只在大肠杆菌中行使复制功能并以高拷贝数存在。图 1-2 为 pBR322 质粒载体结构示意图。

pBR322 虽然使用广泛，但它带的单一克隆位点较少，筛选程序还较费时