

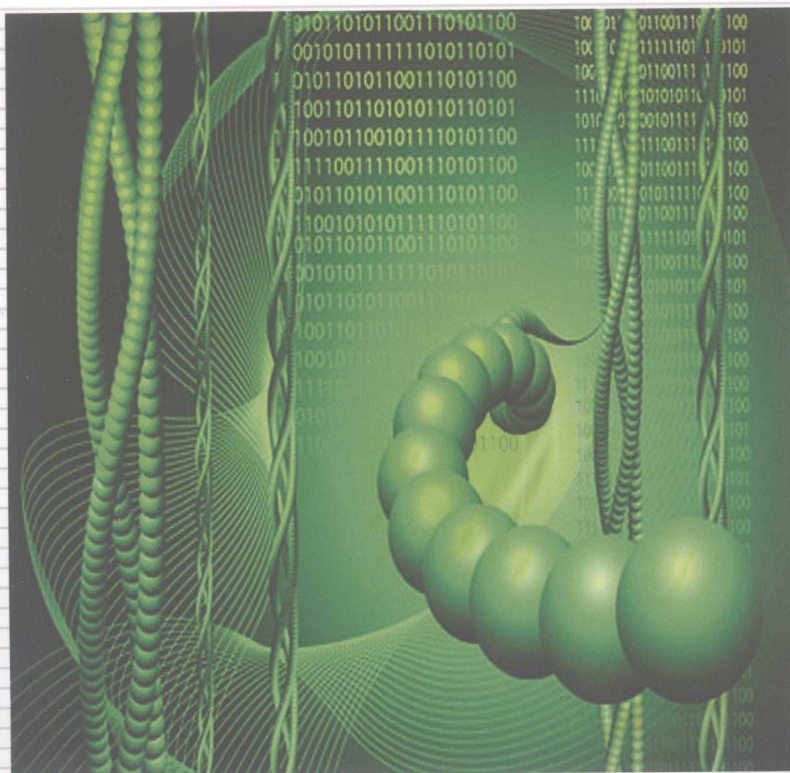
普通高等教育“十一五”规划教材

生物工程 生物技术系列

生物工程分析

(第二版)

董文宾 徐颖 主编



化学工业出版社

普通高等教育“十一五”规划教材

生物工程分析

(第二版)

董文宾 徐 颖 主编



化学工业出版社

· 北 京 ·

本书是根据生物工程领域常用分析检测方法的原理而分类编写的。全书共 14 章, 具体内容
包括绪论、生物工程分析基础知识、物理分析法、化学分析法、紫外-可见吸收光谱法、荧光分
光光度法、薄层色谱法、气相色谱法、高效液相色谱法、电泳法和高效毛细管电泳法、生物检定
法、酶法分析、免疫分析、生物传感器。

本书可作为高等院校生物工程、生物化工、生物技术、食品质量与安全等专业的大学生及研
究生有关分析检测技术课程的教学或参考用书; 也可作为从事技术监督、质量检验、卫生防疫、
食品及药品质量管理部门的质检技术人员, 从事化学化工、生物制药、微生物工程、生化制品生
产、环境保护与监测等单位的工程技术人员以及相关科研机构的技术人员的参考用书。

图书在版编目 (CIP) 数据

生物工程分析/董文宾, 徐颖主编. —2 版. —北京: 化学工业
出版社, 2009. 1

普通高等教育“十一五”规划教材

ISBN 978-7-122-04202-6

I. 生… II. ①董…②徐… III. 生物工程-分析 IV. Q81

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 188562 号

责任编辑: 赵玉清

文字编辑: 焦欣渝

责任校对: 宋 玮

装帧设计: 张 辉

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 装: 北京市兴顺印刷厂

787mm×1092mm 1/16 印张 16 字数 403 千字 2009 年 3 月北京第 2 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: 29.80 元

版权所有 违者必究

编写人员名单

主 编 董文宾 徐 颖

编 者（以姓氏笔画为序）

于 琴 王顺民 张建华

赵旭博 徐 颖 董文宾

前 言

为生物工程、生物技术或生物化工专业的大学生开设专业分析课程的重要性,完全等同于为食品工程专业开设《食品分析》、为发酵工程专业开设《工业发酵分析》、为生物制药专业开设《生物药物分析》、为制糖专业开设《制糖工业分析》课程等,因为专业分析课程是上述各类专业大学生必须学习和掌握的一门专业工具课,也是相关专业一门实践性很强的主干课程,并且是学生将来从事科学研究或生产技术工作必须掌握和具备的技能。

据调查,在我国近十多年来陆续开设生物工程、生物技术、生物化工、生物医学工程、环境生物工程等本科专业的高等院校已多达 330 所以上(同一学校设置几个不同生物工程方向的仍按一所计算),而且不少学校已在全校范围内开设《生物工程概论》、《生物技术导论》、《生命科学技术概论》等选修课程进行大众化教育,但据作者了解,至今尚无一种适合生物工程类专业大方向的专业分析教材出版发行。

有鉴于此,主要作者根据自己从事《食品分析》、《工业发酵分析》等课程教学二十余年的体会以及近十年来为生物工程本科生讲授《生物工程分析》课程的自编讲义内容,同时参考近三年出版的其他专业分析教材,在编写组内部充分讨论所拟大纲的基础上,通过各位编者的共同努力,编写了《生物工程分析》(第一版),并于 2006 年出版发行。

本书是在《生物工程分析》(第一版)的基础上、在较为广泛征求读者意见后,以及作为高校教材使用后根据新的体会修订而成,较之第一版在内容方面主要改动如下:删除了原书的第 11 章(核磁共振波谱法)、第 12 章(生物质谱分析法)、第 17 章(其他分析检测新技术的进展)和第 18 章(样品制备新技术)。因篇幅有限,原计划编入的 AAS 和 IR 等内容未能囊括,读者可根据需要对上述各章内容查阅其他著作。总之,通过“忍痛割爱”的处理实现了使本书较第一版篇幅大大压缩,但在各章末增加了相应的思考题,对其他所保留的各章节则从内容的广度和深度方面作了较大修改,然而整个修订工作始终注意保持和体现专著内容的专业性、科学性、新颖性、系统性和实用性。

本书共 14 章,具体内容包括绪论、生物工程分析基础知识、物理分析法、化学分析法、紫外-可见吸收光谱法、荧光分光光度法、薄层色谱法、气相色谱法、高效液相色谱法、电泳法和高效毛细管电泳法、生物检定法、酶法分析、免疫分析、生物传感器。

本书可作为高等院校生物工程、生物化工、生物技术、食品质量与安全等专业的大学生及研究生有关分析检测技术课程的教学或参考用书;也可作为从事技术监督、质量检验、卫生防疫、食品及药品质量管理部门的质检技术人员,从事化学化工、生物制药、微生物工程、生化制品生产、环境保护与监测等单位的工程技术人员以及相关科研机构的技术人员的参考用书。

在本书编写过程中曾参考引用了不少文献(主要参考文献列于书末),并得到了作者所在单位领导以及化学工业出版社的大力支持,陈合教授、吕嘉忻教授审阅了部分书稿,在此一并表示感谢。

由于作者水平有限,参考资料较少,修订时间仓促,书中难免存在谬误和不妥之处,敬请广大读者批评指正。

编者

2008 年 8 月于西安未央湖

第一版前言

为生物工程、生物技术或生物化工专业的大学生开设专业分析课程的重要性,完全等同于为食品工程专业开设《食品分析》、为发酵工程专业开设《工业发酵分析》、为生物制药专业开设《生物药物分析》、为制糖专业开设《制糖工业分析》课程等,因为专业分析课程是上述各类专业大学生必须学习和掌握的一门专业课,也是相关专业一门实践性很强的主干课程,并且是大学生将来从事科学研究或生产技术工作必须具备的技能。

据调查,在中国近 10 多年来陆续开设生物工程、生物技术、生物化工、生物医学工程、环境生物工程等本科专业的高等院校已多达 330 所以上(同一学校设置几个不同专业方向的仍按一所计算),而且不少学校已在全校范围内开设《生物工程概论》、《生物技术导论》、《生命科学技术概论》等选修课程进行大众化普及教育,但据作者了解,至今尚无一种适合生物工程类专业大方向的专业分析教材出版发行。

作者根据自己从事《食品分析》、《工业发酵分析》等课程教学 20 余年的体会以及近 10 年来为生物工程本科生讲授《生物工程分析》课程的自编讲义内容,同时参考近 3 年出版的其他专业分析教材编写而成本书。

全书共 18 章,包括绪论、生物工程分析的基础知识、物理分析法、化学分析法、紫外-可见吸收光谱分析、荧光分光光度法、薄层色谱法、气相色谱法、高效液相色谱法、电泳法和高效毛细管电泳法、核磁共振波谱法、生物质谱分析法、生物检定法、酶法分析、免疫分析、生物传感器、其他分析检测新技术的进展及样品制备新技术。

本书可作为高等院校生物工程、生物化工、生物技术、食品质量与安全等专业的本科生及研究生有关分析检测技术课程的教学或参考用书;也可作为从事技术监督、质量检验、卫生防疫、食品及药品质量管理部门的质检技术人员,从事化学化工、生物制药、微生物工程、生化制品生产和环境保护与监测等单位的工程技术人员以及相关科研机构的技术人员的参考用书。

在本书编写过程中曾参考引用了不少作者的文献(主要参考文献列于书末),得到了编者所在单位领导以及化学工业出版社的大力支持,陈合教授、吕嘉彬教授审阅了部分书稿,在此一并表示感谢。

由于作者水平有限,成书时间仓促,书中不妥之处敬请广大读者批评指正。

编 者
2006 年 1 月

目 录

第 1 章 绪论	1	3.1 密度与相对密度法	33
1.1 生物工程的含义及其研究领域	1	3.1.1 密度的意义	33
1.1.1 生物工程及其学科基础	1	3.1.2 生物样品相对密度的测定方法	34
1.1.2 生物工程的主要研究领域及其相互关系	2	3.1.3 应用举例	36
1.2 生物工程分析的任务、作用、内容及特点	5	3.2 折光法	37
1.2.1 生物工程分析的任务与作用	5	3.2.1 折光法基本原理	37
1.2.2 生物工程分析的内容及特点	7	3.2.2 测定折射率的意义	38
思考题	8	3.2.3 折光仪的结构、原理及使用 方法	39
第 2 章 生物工程分析的基础知识	9	3.2.4 应用举例	42
2.1 概述	9	3.3 旋光法	43
2.1.1 样品前处理在生物工程分析中的地位	9	3.3.1 旋光法基本原理	43
2.1.2 样品前处理的目的	9	3.3.2 应用举例	47
2.1.3 样品前处理的评价准则	10	思考题	49
2.2 分析样品的采集、制备及保存	11	第 4 章 化学分析法	50
2.2.1 样品的采集	11	4.1 概述	50
2.2.2 样品制备	13	4.2 酸碱滴定法	50
2.2.3 样品的保存	14	4.2.1 白酒中总酸、挥发酸、非挥发酸的测定	50
2.3 生物样品预处理的一般方法	15	4.2.2 电位滴定法测定啤酒的总酸度	51
2.3.1 溶解法	16	4.2.3 白酒中总酯的测定	51
2.3.2 蒸馏法	16	4.2.4 甲醛滴定法测定总氨基酸含量	52
2.3.3 有机物破坏法	16	4.2.5 微量克氏 (Kjeldahl) 定氮法	53
2.3.4 氧瓶燃烧法	17	4.2.6 水杨酸类药物测定	54
2.3.5 超声波法	18	4.3 氧化还原滴定法	55
2.4 生物样品预处理的特殊方法	19	4.3.1 还原糖的测定——直接滴定法	55
2.4.1 生物活性物质的分离和纯化	19	4.3.2 高锰酸钾滴定法测定钙	57
2.4.2 细胞破碎和固-液分离	21	4.3.3 白酒中总醛的测定	59
2.4.3 液-液萃取	23	4.3.4 啤酒花中单宁的测定	60
2.4.4 超临界萃取	25	4.3.5 维生素 C 的定量测定——2,6-二 氯酚滴定法	61
2.4.5 沉淀	26	4.4 络合滴定法	63
2.4.6 膜分离	27	4.5 重量法	65
2.4.7 色谱分离技术	27	4.5.1 总灰分的测定	65
2.5 误差及分析方法的选择	28	4.5.2 原料中磷的测定	66
2.5.1 误差	28	4.5.3 淀粉质原料的水分测定——直接 干燥法	67
2.5.2 分析方法的选择	29	4.5.4 粗脂肪含量的测定——索氏抽 提法	67
思考题	31		
第 3 章 物理分析法	33		

思考题	69
第 5 章 紫外-可见吸收光谱法	70
5.1 概述	70
5.2 方法原理	70
5.2.1 有机化合物的紫外-可见吸收光谱	70
5.2.2 朗伯-比尔定律	72
5.3 仪器结构与原理	73
5.3.1 辐射光源	74
5.3.2 分光器	74
5.3.3 吸收池	74
5.3.4 检测器	74
5.3.5 记录器和信号显示系统	74
5.4 实验技术	74
5.4.1 样品的制备	74
5.4.2 测定条件的选择	75
5.4.3 反应条件的选择	75
5.4.4 参比溶液的选择	76
5.4.5 共存离子干扰的消除方法	76
5.4.6 表观摩尔吸收系数的精确求法	76
5.5 紫外-可见吸收光谱法的主要用途	77
5.5.1 定性分析	77
5.5.2 纯度鉴定	77
5.5.3 定量测定	77
5.6 应用示例	79
5.6.1 考马斯亮蓝法测定蛋白质含量	79
5.6.2 RNA 的定量测定	80
5.6.3 血清胆固醇的定量测定	81
思考题	82
第 6 章 荧光分光光度法	83
6.1 概述	83
6.2 方法原理	83
6.2.1 荧光现象	83
6.2.2 荧光产生的机理	83
6.2.3 激发光谱和发射光谱	86
6.2.4 荧光量子产率与分子结构	87
6.3 荧光分析法	90
6.3.1 基本原理与主要仪器装置	90
6.3.2 荧光分光光度计的分类	91
6.3.3 影响荧光分析的因素	92
6.3.4 荧光分析方法	95
6.3.5 F-4500 (HITACHI) 荧光分光光度计简介	95
6.4 荧光分光光度法在生物工程分析中的应用	96

6.4.1 维生素 E 的荧光分光光度测定法	96
6.4.2 血清中氯喹的荧光分光光度测定法	97
6.4.3 尿中氨苄西林的荧光分光光度测定法	98
思考题	99
第 7 章 薄层色谱法	100
7.1 概述	100
7.2 薄层色谱法的基本原理	101
7.3 薄层色谱的操作技术	104
7.3.1 载板及吸附剂选择	104
7.3.2 薄层板的制备	106
7.3.3 点样	107
7.3.4 展开	108
7.3.5 定位和显色	109
7.3.6 定性	110
7.4 薄层色谱法定量分析	111
7.4.1 目视比较法	111
7.4.2 洗脱法	111
7.4.3 薄层扫描法	112
7.5 薄层色谱法在生物工程分析中的应用	114
7.5.1 薄层色谱扫描法测定 FB-3 新型保鲜剂	114
7.5.2 薄层扫描法测定复方丹参片中丹参和三七有效成分	115
思考题	116
第 8 章 气相色谱法	117
8.1 概述	117
8.1.1 气相色谱分离原理及流程	117
8.1.2 气相色谱法的特点	120
8.2 基本理论	121
8.2.1 基本概念	121
8.2.2 塔板理论	122
8.2.3 速率理论	122
8.3 色谱柱及固定相	124
8.3.1 色谱柱	124
8.3.2 固定相	124
8.4 检测器	127
8.4.1 检测器的主要性能指标	127
8.4.2 热导检测器	128
8.4.3 (氢) 火焰离子化检测器	129
8.4.4 电子捕获检测器	130
8.5 定性和定量分析方法	130
8.5.1 定性分析方法	131

8.5.2 定量分析方法	131	10.4 应用示例	167
8.6 气相色谱法在生物工程分析中的应用	133	10.4.1 核酸的分离分析	167
8.6.1 蔬菜中草酸含量的测定	133	10.4.2 糖的分离检测	169
8.6.2 气相色谱法直接测定植物生 长素	134	思考题	171
思考题	135	第 11 章 生物检定法	172
第 9 章 高效液相色谱法	136	11.1 概述	172
9.1 概述	136	11.2 生物制品的生物学检定方法	173
9.1.1 高效液相色谱法分类	136	11.2.1 细菌学检查	173
9.1.2 高效液相色谱法特点	137	11.2.2 纯菌试验	175
9.1.3 方法的局限性	138	11.2.3 微生物限变检查	175
9.2 高效液相色谱的基本理论	138	11.2.4 支原体检查	175
9.2.1 色谱过程	138	11.2.5 动物试验	176
9.2.2 相平衡参数	139	11.2.6 热原试验	177
9.2.3 分离度 (resolution, R)	139	11.2.7 内毒素检测	177
9.3 高效液相色谱法的固定相和流动相	140	11.2.8 效价检测	179
9.3.1 固定相	140	11.3 生物学检定法应用示例	182
9.3.2 流动相	141	11.3.1 抗生素微生物检定法	182
9.4 高效液相色谱仪	141	11.3.2 胰岛素生物检定法	185
9.4.1 高压输液系统	143	11.4 分子生物学分析方法	185
9.4.2 进样系统	144	11.4.1 基因探针技术	185
9.4.3 分离系统	144	11.4.2 聚合酶链反应	188
9.4.4 检测系统	145	11.4.3 生物芯片分析检测技术	194
9.4.5 色谱数据处理系统	147	思考题	201
9.5 高效液相色谱法在生物工程分析中的 应用	147	第 12 章 酶法分析	202
9.5.1 氨基酸分析	147	12.1 概述	202
9.5.2 肽和蛋白质的分离分析	148	12.2 酶法分析的方法及应用示例	202
9.5.3 核酸与 DNA 分析	150	12.2.1 酶活性测定	202
思考题	152	12.2.2 酶活性测定的应用示例	204
第 10 章 电泳法和高效毛细管电 泳法	153	12.2.3 底物及底物类似物的测定	207
10.1 概述	153	12.2.4 活化剂和抑制剂的分析测定	211
10.1.1 电泳法	153	12.3 酶法分析的其他应用示例	212
10.1.2 高效毛细管电泳法	154	12.3.1 固定化酶在 FI 和 LC 分析中的 应用	212
10.1.3 毛细管电泳实验技术上的 进展	154	12.3.2 有机化合物的分析	212
10.2 电泳法和高效毛细管电泳法的基本 理论	156	12.3.3 无机化合物的分析	213
10.2.1 电泳的基本原理	156	12.4 酶法分析在生物工程中应用的发展 趋势	213
10.2.2 基本概念	158	12.4.1 单细胞分析	213
10.2.3 理论效率及其表示方法	161	12.4.2 酶作为标记物的分析应用	213
10.3 电泳仪和高效毛细管电泳仪	161	12.4.3 模拟酶分析	213
10.3.1 电泳仪	161	思考题	214
10.3.2 高效毛细管电泳仪	165	第 13 章 免疫分析	215
		13.1 概述	215
		13.2 放射免疫分析法 (RIA)	215
		13.2.1 标记抗原的制备	215

13.2.2 游离标记物与结合标记物的分离方法	217	14.1.5 生物传感器的分类	232
13.2.3 样品测定基本步骤	218	14.2 酶传感器	233
13.3 酶联免疫吸附测定法	218	14.2.1 酶传感器的结构	234
13.3.1 免疫酶技术发展简介	218	14.2.2 酶传感器的分类	234
13.3.2 酶免疫测定法的特点	219	14.3 生物组织传感器	235
13.3.3 免疫酶技术的分类	219	14.3.1 动物组织传感器	236
13.3.4 免疫酶分析技术原理	219	14.3.2 植物组织传感器	236
13.3.5 几种常用类型的 ELISA 测定法	220	14.4 细胞及细胞器传感器	236
13.3.6 酶结合物	221	14.4.1 线粒体传感器	236
13.3.7 实验条件	223	14.4.2 肝微粒体传感器	237
13.4 荧光免疫分析法	224	14.4.3 叶绿体传感器	237
13.4.1 荧光偏振免疫分析	225	14.5 微生物传感器	237
13.4.2 荧光酶免疫分析	226	14.5.1 微生物传感器的类型	237
13.4.3 猝灭荧光免疫分析	226	14.5.2 其他几种新型的微生物传感器	238
13.5 免疫分析法应用示例	226	14.6 免疫传感器	238
13.5.1 间接法测定杂交瘤细胞培养上清中单克隆抗体的效价——ELISA 法的应用	226	14.6.1 免疫传感器的类型	239
13.5.2 荧光偏振免疫法测定健康人血浆同型半胱氨酸水平——FIA 法应用	227	14.6.2 电化学免疫传感器	239
思考题	228	14.7 核酸生物传感器（基因传感器）	240
第 14 章 生物传感器	229	14.8 生物传感器的主要应用简介	240
14.1 概述	229	14.8.1 在环境监测中的应用	240
14.1.1 生物传感器的定义	229	14.8.2 在食品分析中的应用	241
14.1.2 生物传感器的发展史	229	14.8.3 在发酵工业中的应用	241
14.1.3 生物传感器的特点	229	14.8.4 在生物医学上的应用	241
14.1.4 生物传感器的基本组成及其工作原理	230	14.8.5 在军事上的应用	242
		14.9 几种新型生物传感器	242
		14.9.1 光纤生物传感器	242
		14.9.2 仿生型生物传感器	243
		14.9.3 分子印迹生物传感器	243
		思考题	243
		参考文献	244

第 1 章 绪 论

自 20 世纪 70 年代重组 DNA 技术和杂交瘤技术实现重大突破以来,现代生物技术产业(生物工程)随之迅速崛起。而 20 世纪 90 年代掀起的对生物基因组、干细胞和生物芯片等科学技术的研究热潮则昭示了生物工程发展的无限生机。经过近半个世纪的孕育和发展,以基因工程为核心的生物技术已逐步成为当今世界高新技术群体中最富有活力的领域之一,并与信息技术、纳米技术、新材料等其他高新技术相互结合。它在全球范围内形成具有巨大经济效益的增值产业链,正在带动着现代农业、生物医学、生物药物、食品工业、化工轻纺、环境保护、能源工业等领域技术的革命性发展。

生物工程是生命科学和工程科学的交叉科学,生物工程分析就是一门以研究和讨论生物工程领域所需要的分析检测技术的方法、原理、仪器装置、操作要点以及应用范围等为主要内容的工具学科,它是生物工程学科一个重要的组成部分。从生物工程的研究成果最终总是通过规模化、产业化而形成产品来造福人类的目的来说,将生物工程分析称为生物工业分析也是恰当的;从人才培养角度出发,生物工程分析则是生物工程以及相关专业大学生或研究生必须学习的一门专业技术基础课程,只有熟悉和掌握了本课程所述及的各种分析技术,才能在生物工程领域的科研开发、生产管理、质量安全、流通消费、技术监督等岗位上有一定的作为。

“工欲善其事,必先利其器。”生物工程分析是生物工程产业化部门进行全程质量监控的“眼睛”,是生物工程科技创新的“利器”。纵观生物工程学科的发展历史即可看出,生物工程分析的技术手段一直与生物工程相伴而行、互相促进,甚至互为因果,尤其是现代生物技术的高速发展在很大程度上得益于分析检测技术的长足进步,例如,X 射线晶体衍射分析对 DNA 双螺旋结构的阐明奠定了现代分子生物学的基础,从此使人类对生命科学的微观领域的认识迈出了决定性的一步;而以阵列毛细管电泳和激光荧光技术为基础的大规模、自动化测序技术的问世,才使 20 世纪生命科学领域最为宏大的研究项目——人类基因组计划得以提前完成;另据科学家断言,二维凝胶电泳法、蛋白质芯片技术以及诞生于 20 世纪 80 年代的生物质谱等技术,将为和正在为当今功能基因组——蛋白质组的研究工作作出重大贡献。我们完全有理由认为,如果没有先进适用的生物工程分析检测技术手段,也就不会有现在已拥有的现代生物工程丰硕成果及其辉煌未来。

由于生物工程与技术所包括内容极其丰富,故注定了生物工程分析的内容非常广泛,可以说,生物工程学科涵盖的范围有多大,生物工程分析的渗透范围就有多广。

鉴于生物工程分析内容的广泛性以及非生物工程专业大学生或研究生学习需要,本章拟就生物工程学科的含义、基本范围等内容先作简述,然后讨论生物工程分析的有关内容。

1.1 生物工程的含义及其研究领域

1.1.1 生物工程及其学科基础

生物工程(bioengineering),也叫生物技术(biotechnology),通常主要指以现代生物学研究成果为基础,以基因工程为核心的现代生物技术。所谓生物工程,即是指人们以现代

生命科学为基础, 结合其他基础学科的科学原理, 采用先进的工程技术手段, 按照预先的设计改造生物体或加工生物原料, 为人类生产出所需产品或达到某种目的的一门新兴的、综合性的科学技术。先进的工程技术手段则是指基因工程、细胞工程、酶工程、微生物工程(发酵工程)、蛋白质工程和生物分离工程等新技术; 改造生物体是指获得优良品质的动物、植物或微生物品系; 生物原料是指生物体的某一部分或生物生长过程产生的能利用的物质, 如淀粉、糖蜜、纤维素等有机物, 也包括一些无机化学品, 甚至某些矿石; 为人类生产出所需产品, 包括粮食、医药、食品、化工原料、能源、金属等; 达到某种目的则包括疾病的预防、诊断与治疗 and 食品检验以及环境污染检测治理等。

生物工程是由多种学科相结合而形成的一门新兴学科, 生物科学为其最重要的基础学科。就生物科学而言, 它包括了微生物学、生物化学、细胞生物学、免疫学、育种技术等几乎所有与生命科学有关的学科, 特别是现代分子生物学的最新理论成就。现代生命科学的发展已在分子、亚细胞、组织和个体等不同层次上, 揭示了生物的结构和功能的相互关系, 从而使得人们对于生物体进行不同层次的设计、控制、改造或模拟, 并由此给人类带来了巨大的经济和社会效益。

1.1.2 生物工程的主要研究领域及其相互关系

生物工程涵盖的范围很广, 最为重要、也是得到普遍认同的研究领域包括: 基因工程、细胞工程、酶工程、微生物工程(发酵工程)、蛋白质工程等。

1.1.2.1 基因工程

基因工程又称为重组 DNA 技术, 它是生物工程的核心技术。基因工程是指在体外将目的基因插入质粒或其他载体分子中构成遗传物质的新组合, 并导入到原先没有这类基因的寄主细胞内, 让其持续稳定地使目的基因在寄主细胞内表达, 产生出人类需要的基因产物。

基因工程以 DNA 为基本材料, 其操作流程主要包括目的基因分离, 与克隆载体重组, 转入受体细胞, 筛选和鉴定克隆子。分离目的基因常采用 PCR 技术从基因组 DNA 中扩增含目的基因的 DNA 片段, 或者用分子杂交等方法从构建的 cDNA 文库或基因组文库中获得含目的基因的克隆子。克隆载体有质粒载体和病毒(噬菌体)载体, 以及它们彼此重组或与其他基因组 DNA 片段重组的载体, 供不同试验要求选择使用。在 DNA 连接酶的作用下, 含目的基因的 DNA 片段与克隆载体连接成为重组 DNA 分子。在连接之前, 一般先分别用限制性内切核酸酶切割, 如有必要再用修饰酶修饰末端, 使待连接的两个 DNA 片段末端成为互补黏性末端或平末端。重组 DNA 分子导入原核生物细胞可采用 CaCl_2 处理的转化法、病毒颗粒感染的转导法和三亲本接合转化法等; 导入植物细胞需采用农杆菌介导的 Ti 质粒载体转化法、电穿孔法、微弹轰击法、花粉管通道法等; 导入动物细胞常用的方法有病毒颗粒介导的病毒载体转导法、磷酸钙转染法和显微注射法等。筛选克隆子常采用克隆载体携带的选择标记基因、供体 DNA 携带的报告基因等方法。

开展基因工程研究 20 多年来, 科研人员已建立了多种分别适用于微生物、动物、植物转基因的载体受体系统, 克隆了一批有用的目的基因, 研发出数十种珍贵的基因工程药物, 培育了一些具有特殊性状的转基因动植物。

1.1.2.2 细胞工程

细胞工程就是在细胞水平上研究、开发、利用各类细胞的工程, 亦即人们根据科学设计改变细胞的遗传基础, 并通过无菌操作, 大量培养细胞、组织乃至完整个体的技术。迄今为止, 人们已经从染色体水平、细胞器水平以及细胞水平开展了多层次的研究工作, 在细胞培

养、细胞融合、细胞代谢物的生产和生物克隆等诸多领域取得了一系列重大成果。

细胞工程又可分为植物细胞工程、动物细胞工程和微生物细胞工程三个领域。细胞和组织培养是细胞工程的基本实验技能，严格的无菌操作是实验成功的前提条件。要从植物的细胞组织培养中产生出胚状体乃至植株，调节好各阶段生长素和细胞分裂素的比例最为关键。用细胞融合的手段获得能合成单一抗体的杂交瘤细胞并大量培养和提取各种单克隆抗体已经成为医学临床检验中灵敏而重要的方法；用动物体细胞的细胞核克隆哺乳动物的技术路线已经取得重大突破；用于细胞培育人类的各种器官已展现出广阔的前景；细胞融合能重新组合双亲本的优良遗传信息，这已成为改良生物秉性，创造新的符合人类需要的动植物新细胞、新株系的重要手段。虽然从总体来说，培养植物细胞提取其次生代谢物的工程目前仍存在成本过高、人工种子的研制进展较慢的问题，但这也不失为两个极有发展潜力的理论与实践相结合的新兴生长点，必将在 21 世纪实现工业化生产的目标。

1.1.2.3 酶工程

酶工程是研究酶的生产和应用的一门技术性学科，它包括酶制剂的制备、酶的固定化、酶的修饰与改造，以及酶反应器等方面的内容。

酶是一种特异性很强的生物催化剂，它可以在温和条件下以极高的转化率行使功能。大多数重要的商业用酶是用有限种类的微生物生产的。在工业上，微生物酶采用液体深层发酵法和固体发酵法生产，通过培养和遗传操作加以控制。酶制剂制备的一般流程是破碎细胞、溶剂抽提、离心、过滤、浓缩、干燥。对于分析和医药用酶，还须进一步纯化。酶的使用形态有游离态和固定化状态两种。固定化酶有利于酶的反复使用，并且有利于酶与产物的分离。酶的固定化方法有载体结合法、交联法及包埋法。目前固定化酶在工业上已得到了较为广泛的应用。细胞的固定化，避免了繁冗的酶纯化手续，更有利于多酶反应。用于固定化的细胞可以是活细胞，也可以是死细胞或静止细胞。酶分子的修饰和改造可改变天然酶的酶学性质，使之更稳定，更能适应温度、pH 的变化，并具有更好的抗蛋白水解酶活性。利用基因工程的方法可提高酶产量和改造酶，使得稀有酶生产变得更容易。固定化酶和固定化细胞最通用的反应器是填充床反应器和流化床反应器。迄今已发现的酶有 3000 多种，目前工业上生产的酶有 60 多种，真正达到工业规模的酶只有 20 多种，而且大多数是水解酶。

当代酶工程发展的趋势之一是寻找耐极端条件的酶，如耐高温、耐酸碱、耐盐等。这些酶存在于嗜高温、嗜酸碱、嗜高盐的细菌中。近年来对这些细菌的研究进展迅速，这将为酶工业提供源源不断的新型酶类。

另外，近 20 年来人们在人工合成酶和模拟酶、核酸酶以及抗体酶等方面的研究工作也取得了不少成果。

1.1.2.4 微生物工程

微生物工程长期以来一直被称为发酵工程。微生物工程就是研究利用微生物的新陈代谢作用生产一定的产品或达到其他社会目的的工程学科。利用微生物发酵技术生产微生物代谢产物一直是微生物工程的主要研究内容之一，随着现代生物技术的发展，特别是基因重组技术的长足进步，发酵工程的研究内容还在不断丰富。无论是在生物遗传的物质基础被揭示之前的传统发酵工业时代，还是在生物技术突飞猛进的今天，发酵工程的研究都是生物工程的最主要研究内容之一，而且是生物技术的研究成果从实验室走向工业化生产的必由之路。

发酵工程与技术有着悠久的历史，早在几千年前，人们就已开始从事酿酒、制酱、制奶酪等生产活动。作为现代科学概念的微生物发酵工业，是在 20 世纪 40 年代随着抗生素工业的兴起而得到迅速发展的，而现代发酵技术又是在传统发酵技术的基础上，结合了现代的基

因工程、细胞工程、分子修饰和改造等新技术而形成的产业，即微生物工程。

现代发酵工程不仅包括菌体生产和代谢产物的发酵生产，还包括微生物机能的利用，其主要内容为生产菌种的选育，发酵条件的优化与控制，反应器的设计及产物的分离、提取与精制等。工业生产上常用的微生物包括细菌、放线菌、霉菌和酵母等，根据微生物种类的不同，可以分为好氧性发酵和厌氧性发酵两大类；按照生产设备来分，又可分为敞口发酵、密闭发酵、浅盘发酵和深层发酵，液体深层发酵在生产中被广泛应用。根据操作方式的不同，液体深层发酵过程又分为分批发酵、连续发酵和补料分批发酵三种类型，它们各有特点和自己的应用范围。用于微生物深层培养的设备称为发酵罐，包括多种类型，它们具有严密的结构，良好的液体混合性能，较高的传质、传热速率，同时具有可靠的检测及控制装置。

由于微生物工程具有投资少、见效快、污染小、外源目的基因易在微生物菌体中高效表达等特点，故已成为全球经济的主要组成部分，在与人们生活密切相关的许多领域中（如医药、食品、化工、冶金、资源、能源、健康、环境等）发挥着愈来愈重要的作用。

1.1.2.5 蛋白质工程

20 世纪 80 年代初，随着蛋白质晶体学和结构生物学的发展，人们可以通过对蛋白质结构与功能的了解，借助于计算机辅助设计，利用基因定位诱变等高新技术改造基因，以达到改变蛋白质某些性质的目的。这些技术的融合，促使了蛋白质工程这一新兴生物技术领域的诞生，为认识和改造蛋白质分子提供了强有力的手段。1982 年，Winter 等首次报道了通过基因定位诱变获得改性的酪氨酸 tRNA 合成酶；1983 年，Ulmer 在《科学》杂志上发表了以“Protein Engineering”（蛋白质工程）为题的专论，这标志着人们已经能够按照自己的意愿创造出适合人类需求的新基因，并能表达出具有不同功能的蛋白质。这是新一代的基因工程，因此蛋白质工程也被称为第二代基因工程。

蛋白质工程的基本内容和目的可以概括为：以蛋白质功能与结构为基础，通过化学和物理手段，对目标基因按预期设计进行修饰和改造，合成新的蛋白质；对现有的蛋白质加以定向改造、设计、构建和最终生产出比天然蛋白质功能更优良、更符合人类需求的功能蛋白质。

蛋白质工程的出现标志着人类征服自然进入了一个新的发展阶段。蛋白质工程使得人们能更充分地利用自然界存在的基因和蛋白质，而且在分子水平上对基因和蛋白质进行再设计和改造，进而创造出自然界不存在的基因和蛋白质，在短期内完成自然界几百万年进化才能完成的过程。

目前蛋白质工程主要还是集中在改变现有蛋白质这一领域。改变现有蛋白质结构一般需要经过如下几个步骤：①分离纯化目标蛋白；②分析目标蛋白的一级结构；③分析目标蛋白的三维结构以及结构与功能的关系；④根据蛋白质的一级结构设计引物，克隆目的基因；⑤根据蛋白质的三维结构和结构与功能的关系以及蛋白质改造的目的，设计改造方案；⑥对目的基因进行人工定点突变；⑦改造后的基因在宿主细胞中表达；⑧分离纯化表达的蛋白质并分析其功能，评价是否达到设计目的。

改变蛋白质结构的核心技术是基因的人工定点突变，虽然方法较多，但要在一个基因的任何位点准确地进行定点突变，现在常用的主要有 M13 载体法和 PCR 法。

利用上述定点突变技术，目前对蛋白质所做的改造包括以下几个方面：①改变蛋白质的 pH 或提高蛋白质的温度稳定范围；②改造蛋白质提高专一活性；③提高蛋白质抗氧化能力；④改变酶促反应的 K_m 和 K_{max} ，提高反应催化效率；⑤提高酶对底物的亲和力，增强酶的专一性；⑥改善酶的特异性；⑦提高蛋白质生物学活性。

近 10 多年来随着分子生物学、晶体学及计算机技术的快速发展，蛋白质工程在应用方面，几乎对所有具有开发前景的蛋白质和多肽都已作过改造尝试，并取得了令人欣喜的成果。研究最多和取得成果最显著的是生物技术药物和工业用酶方面的工作。蛋白质和多肽类药物包括激素、细胞因子、酶、酶的激活剂或抑制剂、受体和配体、细胞毒素、杀菌肽以及抗体等；改造的工业用酶如 T_4 溶菌酶、酵母磷酸丙糖异构酶、 α_1 抗胰蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶和葡萄球菌核酸酶等。

在此应当指出，上述五种工程并不是各自独立的，它们彼此之间是互相联系和相互渗透的，其中的基因工程技术是核心技术，它能带动其他技术的发展。例如通过基因工程对细菌或细胞改造后获得的“工程菌”或“工程细胞”，都必须分别通过微生物发酵工程或细胞工程来生产有用的物质；又如，通过基因工程技术对酶进行改造以增加酶的产量、酶的稳定性以及提高其催化效率等；基因工程与细胞工程、酶工程、发酵工程、蛋白质工程之间的相互关系如图 1-1 所示。

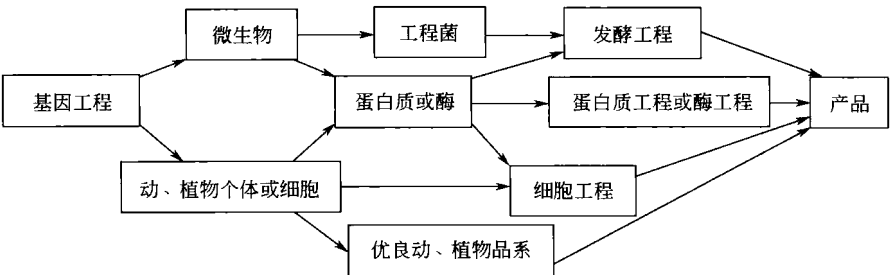


图 1-1 基因工程与细胞工程、酶工程、发酵工程、蛋白质工程之间的相互关系

1.2 生物工程分析的任务、作用、内容及特点

1.2.1 生物工程分析的任务与作用

虽然生物工程学科内容丰富，生物工程产品多种多样，但依据其最终宗旨大多是以商品的形式服务于人类的共性，即基本包括了科学研究、产品开发、逐级放大、工业化生产及产品流通消费等环节，因而生物工程分析的任务及作用可以概括为以下几个方面：

(1) 保证生产原料及辅料的质量 在任何生产生物工程产品的企业，均要对生产所需的各种原料及辅料进行分析检验，因为只有采用质量合格的原、辅料才有可能生产出合格的产品。例如在酿酒工业中，对于酿造用水的色度、浊度、气味、pH、酸碱度、总硬度、铁、锰、钙、镁、铜、 CO_2 、氯化物、硫酸盐、亚硝酸盐、硝酸盐、挥发酚、余氯、氰化物等进行分析检验；对粮食及其他淀粉质原料的水分、蛋白质、淀粉、还原糖、粗脂肪、粗纤维、灰分、浸出物、农药残留、汞、砷、铅、黄曲霉毒素等进行检验；生产果酒企业对于有关原料水果的可溶性固体、总酸、糖分、总酒石酸、苹果酸、果胶、色素、维生素 C、单宁等含量进行测定；对啤酒生产的原料大麦、辅料酒花、大米、玉米等的多种指标也要进行分析检验等。由于近年来在全国开展“食品药品放心工程”，更使得科研、生产、管理人员及消费者均认识到了产品的质量安全应从“源头”抓起的重要性。

(2) 决定工艺条件和保证生产正常进行 只有生产过程始终按照通过科研优化并放大后的最佳工艺参数进行操作，才能生产出合格的产品并获得更好的综合效益。例如由我国科研人员发明的二步发酵法生产维生素 C 新工艺，要求一步发酵菌供种种液的发酵率为 55%~

85%，二步发酵混合菌供种种液产酸 $\geq 5\text{mg/mL}$ ，一步发酵终点薄层法测定无醇斑点、发酵率 $\geq 96\%$ ，二步发酵终点残糖 $\leq 1\text{mg/mL}$ 、发酵率 $\geq 78\%$ 。只有在工艺操作中及时测定这些参数才能判断生产是否正常，才能尽可能发挥设备的生产能力和保证产品质量。

在发酵工程中就目前的现状而言，对于发酵液中的基质（糖、脂质、氨基酸、盐）、前体、代谢产物（抗生素、酶、有机酸、氨基酸等）以及菌量的监测基本上还是依赖人工取样和做离线分析，但所采用的方法则从简单的湿化学法到分光光度法、原子吸收光谱法、HPLC、GC、GC-MS 以及 NMR 法则几乎无所不包。

(3) 降低成本和指导经济核算 例如，从理论计算可知 50kg 淀粉可生产乙醇 28.4kg，即可生产 65°白酒 48.9kg，但几乎所有企业均因工艺及设备利用率等原因不能达到上述产品得率，故在实际操作中只有通过测定入池和出池酒醅中淀粉含量才能对原料利用率做到心中有数。又如，近年来不少厂家用 ClO_2 水溶液对包装容器灭菌，但消毒池溶液重复使用能否保证满足灭菌要求的问题只有通过分析检测才能回答。

(4) 科学研究及新产品开发 科学研究工作都有明确目的，在具体实施时这种目的就被选定为试验指标，而后者大都是通过分析检测获得的，可以说没有后者也就没有科研成果，也就没有工艺的最佳条件可言。如抗生素迄今已有成千上万种，对于它们的生物合成、工艺确定、品种认定与区别、化学组成、结构、疗效、药代动力学、副作用等的阐明均是通过分析检测手段来完成的。

(5) 剖析不明原料及产品，促进进出口贸易 只有通过分析手段才能获得新原料资源的组成、天然产物的结构信息等。在我国加入 WTO 以后，遇到了很多涉及质量问题的技术壁垒，只有与贸易国的分析检测方法实现“接轨”，才能使进出口渠道通畅，这里所说的“接轨”实质上就是贸易双方所使用的质量检验方法的相互认可问题。

(6) 进行产品质量检验评价及市场有效监督 本着对消费者负责的态度，企业应对产品进行日常例行分析检验与质量评价，实现以质量求生存；技术质量管理部门也要对各种产品进行监督检验，有效地维护消费者正当权益。就目前市场状况而言，食品、药品、保健品及其他生物工程产品的质量仍良莠不齐，假冒伪劣产品在市场仍频繁出现，对此只有通过及时鉴别检验，才能使消费者减少或避免损失。

(7) 执果索因，对“症”解决工艺问题 生物工程产品都有较长的工艺流程，影响产品质量的因素可能是多方面的，但出现不合格产品又可能只是其中一种或少数几种原因，只有找到问题的真正根源才能解决问题，分析检测技术即是寻找问题“症结”的有力工具。例如，瓶装啤酒因出现浑浊而使保质期不达标的原因是多方面的，包括生物性和非生物性因素，后者又包括盐类沉淀和蛋白质沉淀等多种，只有采用分析手段查明沉淀的主要成分，才能采用相应工艺措施使产品质量恢复正常。更值得重视的是，现代生物反应器的容积越来越大，生产线的自动化和连续化程度越来越高，故对工艺过程参数进行在线检测的必要性和优越性愈来愈凸现出来，因为只有实现对关键点位工艺参数的及时准确测定，才有可能实现对生产过程的自动控制。各种可用于发酵过程的检测技术（如流动注射分析、全反射红外分析、MS、NMR 等）和计算机软硬件技术的发展，为生产过程的自动控制提供了条件，专家系统、自适应控制、模糊控制、人工神经网络等技术可望在工程菌发酵中得到进一步应用。

(8) 环境保护和“三废”利用 生物工程类工厂往往在生产人们所需要的有用产品时，有大量的废水（或废液）、废渣及废气产生，为了实现可持续地良性发展，进行“三废”治理及环境保护已由国家立法，企业必须认真执行“三废”排放标准，此项工作任务繁重，而

分析检验工作则是重中之重,因为对于“三废”污染的危害分析与评价、治理措施的选择和经济技术指标比较、经过治理后的“三废”是否达到安全排放标准等,均要通过分析检测来判定;此处更值得一提的是,不少利用生物技术原理所建立的方法和仪器已越来越多地应用于环境检测工作中,例如乙酰胆碱酯酶、细胞色素 P450、金属硫蛋白和 DNA 加合物等被用作水中污染物指示生物标记物;生物传感器用于农药残留量、水中酚和重金属离子、BOD、阴离子表面活性剂以及大气中的 NH_3 和 NO_x 的检测等。“三废”的综合利用更是需要首先系统分析其组成,寻找最有利用价值的途径,同时需查明共存成分对进一步转化的影响,进而通过经济效益与社会效益综合考虑方能作出实施决策。例如,采用淀粉质原料每生产 1t 酒精就要生成 12~15t 酒糟,酒糟的 BOD 为 28000~35000mg/L、COD 为 35000~45000mg/L,若如此大量的废渣不经处理而排放,势必造成严重环境污染。相反,若能很好地加以处理和利用,则不仅变废为宝,而且可大幅度降低酒精(主产品)生产成本,为燃料酒精的广泛使用奠定坚实基础。故为达此目的,有关科研人员通过从分析入手已研发出多种综合利用途径。

1.2.2 生物工程分析的内容及特点

1.2.2.1 生物工程分析的内容范围

生物工程分析内容极为广泛,它既包括了各种各样的分析检测技术在生物工程所涵盖的各分支学科领域及其服务领域的应用内容,同时也包括了依据生物技术原理建立起来的分析方法在非生物工程行业中的应用内容。它的内容已涵盖或涉及了传统的多种分析领域,如无机分析、有机分析、生化分析、环境分析、农化分析、药物分析、细胞分析、免疫分析、食品分析、工业发酵分析、过程分析及临床分析等内容。

(1) 按照生物工程分析的对象及检测项目的性质,对其内容可概括为以下几个主要方面:

① 感官、理化指标的测定 例如各种生工产品的质量指标检测,各种生产原料、辅料、中间品的化学成分检测,添加剂的质量检测以及生物药物相对分子质量的测定等。

② 结构分析及序列分析 例如蛋白质、多糖、DNA 及 RNA 的结构及序列测定,基因诊断、药物晶型研究等。

③ 活体、生物活性及功能成分的检测 例如发酵工业中的菌浓检测,酶工程临床诊断及医药产品中的酶的测定,抗原和抗体的检测,药物效价测定,多肽和蛋白质类药物的生物活性检定,保健品类的功能成分测定,生物工程产品的微生物指标检测等。

④ 在体原位、实时分析及过程参数检测 例如将分子识别物质固定在纳米粒子(如聚乙烯或聚丙烯酰胺)上,用基因枪或其他微注射器注入或自然摄入客体活细胞中,通过近场光学显微镜可测定巨噬细胞中的 pH、分子氧、钙离子、葡萄糖和氮氧化物等物质,这类新型纳米粒子生物传感器具有很高的选择性、可逆性,响应快,并能同时对多种细胞的化学信息进行实时原位监测,且保持细胞生存活力不变等。又如,纳米光纤荧光探针可以实时监测单个细胞中 DNA 的早期损害情况。

(2) 按照分析方法的技术原理,则将其内容划分为以下几个主要方面:

① 感官检验法 通过人的感觉器官的功能,如视觉、嗅觉、味觉和触觉等的感觉来检验样品的色泽、香气、滋味、澄明度及组织状态等。

② 物理检验法 根据样品的相对密度、折射率、旋光度等物理常数与样品组分含量之间的关系进行检测的方法。在生产部门使用较为普遍的有比重法、折光法和旋光法。