

普通高等教育药学类规划教材

生物工程

(供生物制药、微生物制药专业用)

李继瑜 主编

中国医药科技出版社

1
Q81
LJH

Vh131/18

普通高等教育药学类规划教材

生 物 工 程

(供生物制药专业、微生物制药专业用)

主 编 李 继 珩 (中国药科大学)
主 审 吴 梧 桐 (中国药科大学)
编 者 李 继 珩
孙 志 浩 (江苏省微生物研究所)
欧阳平凯 (南京化工学院)



A0282294

中 国 医 药 科 技 出 版 社

登记证号：(京) 075 号

内 容 提 要

本书重点讨论了基因工程、动植物细胞工程、微生物工程及酶工程的基本原理和基本技术，以及细胞反应动力学及固定化生物催化剂反应动力学的基本过程和生物反应器构造原理及类型。同时也叙述了现代医药生物工程各类代表性产品的工艺过程和生产方法。

图书在版编目 (CIP) 数据

生物工程/李继珩主编. - 北京: 中国医药科技出版社, 1995
普通高等教育药学类规划教材
供生物制药、微生物制药专业用
ISBN 7-5067-1393-4

I. 生…
II. 李…
III. 生物工程 - 高等学校 - 教材
IV. Q81

中国医药科技出版社 出版
(北京西直门外北礼士路甲 38 号)
(邮政编码 100810)

北京中煤新大印刷厂 排版
北京昌平精工印刷厂 印刷
全国各地新华书店 经销

*

开本 787×1092mm^{1/16} 印张 16^{3/4}

字数 387 千字 印数 1—3000

1995 年 8 月第 1 版 1995 年 8 月第 1 次印刷

定价: 16.00 元

前 言

《生物工程》为国家医药管理局“八五”规划教材之一，是根据国家教委下达的生物制药本科专业课程基本要求编写的。本教材以基因工程为主导，讨论动植物及微生物细胞工程、酶工程基本原理、细胞反应及酶反应动力学，生物反应器构造原理及其类型，同时也叙述了现代生物工程代表性医药产品工艺及生产方法。培养学生掌握现代生物工程基本知识、基本理论及基本技能，为应用现代生物工程研究和开发生物药物奠定基础。

现代生物工程属高新技术领域之一，与医药工业关系极为密切，自其诞生伊始，即在医药工业中取得举世瞩目的成功，因之医药生物工程于是乎日隆，其对新药研制、开发与未来医药工业结构调整及改造将产生极为深远影响。鉴乎此，生物制药类专业学生掌握现代生物工程基本原理及基本技能乃今医药工业发展情势所必需，故本课程在生物制药专业学生的学习中占有极重要地位。此外，本教材亦可作为微生物制药专业、药学类其它专业及生物化工专业教学参考书，同时对生物制药类科技人员也有重要参考价值。

根据教学大纲及相关学科衔接与分工，本教材内容包括基因工程、生物工程、动植物细胞工程、酶工程、细胞反应动力学、固定化生物催化剂反应动力学及生物反应器等九章。灭菌技术亦为生物工程中应用极为普遍的基本技术，但已于《抗生素生产工艺学》及《工业微生物学》等教材中安排，本书从略。此外，医药生物工程的药品生产工艺及相关技术和设备亦属生物工程范畴，但已由《生物制药工艺学》安排，本教材亦未编入。

限于学时，根据大学本科生物制药专业教学特点，本教材力求精练，但亦注意到现代生物工程涉及面广，内容复杂。因之本教材着重介绍现代生物工程各领域的基本原理、基本技术及其在医药工业中的应用和代表性医药产品的生产工艺，并力求反映现代生物工程在医药工业中的新成就和新进展，为提高学生研制、开发和生产新药奠定现代生物工程的理论与技术基础。

本教材第一、二、四、五章及全部产品生产工艺由李继珩教授编写，第三、六章由江苏省微生物研究所孙志浩副研究员编写，第七、八、九章由南京化工大学欧阳平凯教授编写。最后全书由李继珩教授整理。中国药科大学吴梧桐教授主审，并审阅编写大纲及样章，中国药科大学王福黄先生协助绘图。作者对同仁们的鼎力协助深为致谢。

《生物工程》是国内生物制药学科的首版专业教材，编写过程中，各编者

根据自身教学经验及工作实践，并参阅了国内外有关书籍及近期文献。但因时间仓促，限于水平，遗漏、缺点及错误在所难免，恳望广大读者批评指正。

编者

1994.3.

目 录

第一章 绪论	(1)
一、生物工程基本含义.....	(1)
二、生物工程的发展过程.....	(1)
三、现代生物工程主要内容.....	(2)
四、现代生物工程在医药及工农业生产中地位及其重要性.....	(3)
五、现代生物工程与其它学科的关系.....	(3)
六、现代生物工程的成就及发展前景.....	(4)
第二章 基因工程	(5)
第一节 基因工程工具酶	(6)
一、限制酶.....	(6)
二、DNA 连接酶及 T ₄ - DNA 连接酶.....	(10)
第二节 基因工程载体	(11)
一、细菌质粒.....	(11)
二、λ 噬菌体 DNA.....	(14)
三、科斯质粒及其克隆原理.....	(15)
四、单链 DNA 噬菌体 M13 载体.....	(16)
五、真核基因病毒载体.....	(17)
第三节 DNA 提取与基因制备	(18)
一、DNA 的提取.....	(18)
二、基因制备.....	(19)
第四节 目的基因与载体 DNA 的连接	(23)
一、连接反应原理.....	(23)
二、连接方式.....	(26)
第五节 重组 DNA 向宿主细胞内转移技术	(30)
一、转化作用.....	(30)
二、转导作用.....	(33)
三、脂质体介导的融合作用.....	(34)
四、其它转移技术.....	(34)
第六节 阳性重组 DNA 的鉴别与分析	(36)
一、阳性重组 DNA 的鉴定.....	(36)
二、阳性重组 DNA 的分析.....	(38)
第七节 重组基因表达的调控	(44)

一、转录与翻译水平上的基因调控顺序	(45)
二、原核表达系统强启动子	(46)
三、原核细胞表达载体	(46)
四、提高真核基因表达措施	(48)
第八节 基因工程的成就及其应用	(51)
一、基因工程的成就	(51)
二、基因工程工业	(51)
三、基因工程与疾病诊治	(54)
四、基因工程与农牧业	(54)
五、基因工程与环境保护	(55)
第九节 基因工程应用实例	(56)
一、乙型肝炎表面抗原生产工艺	(56)
二、人生长激素生产工艺	(59)
第三章 微生物工程	(64)
第一节 微生物细胞培养概述	(64)
一、常用工业微生物	(64)
二、微生物的营养及培养基	(66)
三、工业用微生物菌种的筛选、保存及改良	(69)
第二节 微生物细胞培养技术	(74)
一、微生物细胞培养方法	(74)
二、微生物培养一般工艺流程	(75)
三、微生物培养条件及工艺条件控制	(76)
第三节 微生物原生质体技术	(78)
一、原生质体的制备	(78)
二、原生质体再生	(79)
三、原生质体融合技术	(79)
四、融合实例	(81)
第四节 微生物工程的应用	(84)
一、微生物工程产品主要类型	(84)
二、微生物工程在医药工业中的应用	(84)
三、微生物工程在化学工业中的应用	(86)
四、微生物工程在食品工业中的应用	(86)
第五节 微生物工程应用实例	(87)
一、 β -淀粉酶生产工艺	(87)
二、L-天冬酰胺酶生产工艺	(89)
三、维生素 B ₂ 生产工艺	(91)
第四章 植物细胞工程	(93)
第一节 植物细胞工程概述	(93)
一、植物细胞培养特性	(93)

二、植物细胞营养及其培养基	(93)
三、植物细胞一般培养技术	(94)
四、细胞突变体筛选技术	(95)
五、植物细胞种质保存	(96)
第二节 植物原生质体培养技术	(98)
一、原生质体制备	(98)
二、植物原生质体培养	(99)
三、原生质体培养的意义	(100)
第三节 植物细胞融合技术	(101)
一、促融因素	(101)
二、融合过程	(102)
三、影响融合因素	(102)
四、杂种细胞筛选与培养	(103)
第四节 植物细胞大规模培养技术	(104)
一、培养基	(104)
二、培养方式	(104)
三、影响细胞培养因素	(106)
第五节 植物细胞工程的应用	(107)
一、植物细胞工程工业	(107)
二、植物细胞工程与中草药	(109)
三、植物细胞工程与农业	(109)
第六节 植物细胞工程应用实例	(110)
一、三七细胞培养工艺	(110)
二、西洋参细胞培养工艺	(111)
第五章 动物细胞工程	(113)
第一节 动物细胞工程概述	(113)
一、动物细胞培养特性	(113)
二、动物细胞营养及培养基	(114)
三、动物细胞培养技术	(115)
四、动物细胞种质保存及其运输	(117)
第二节 动物细胞融合技术	(118)
一、促融因素	(118)
二、细胞融合及遗传物质转移方式	(119)
三、影响细胞融合的因素	(121)
四、杂种细胞筛选原理及筛选系统	(121)
五、控制杂种细胞遗传表现型的机制	(123)
第三节 单克隆抗体技术	(124)
一、单克隆抗体及其特性	(124)
二、淋巴细胞杂交瘤制备过程	(124)

三、淋巴细胞杂交瘤操作技术·····	(125)
四、单克隆抗体生产技术·····	(127)
五、单克隆抗体的应用·····	(127)
第四节 动物细胞大规模培养技术·····	(128)
一、培养基·····	(128)
二、培养技术·····	(129)
三、培养条件控制·····	(131)
第五节 动物细胞工程的应用·····	(131)
一、动物细胞工程工业·····	(131)
二、动物细胞工程与畜牧业·····	(132)
三、动物细胞工程的其它应用·····	(132)
第六节 动物细胞工程应用实例·····	(133)
一、组织纤溶酶原激活剂生产工艺·····	(133)
二、抗 HBsAg 单克隆抗体生产工艺·····	(135)
第六章 酶工程·····	(138)
第一节 酶工程概论·····	(138)
一、酶的定义、分类及命名·····	(138)
二、酶的特性·····	(139)
三、酶的来源·····	(140)
四、固定化生物催化剂及其特点·····	(141)
五、酶及细胞固定化方法分类·····	(142)
六、酶及细胞固定化载体·····	(143)
第二节 固定化生物催化剂制备技术·····	(145)
一、酶固定化技术·····	(145)
二、细胞固定化技术·····	(148)
三、固定化方法与载体的选择·····	(149)
四、固定化实例·····	(150)
第三节 酶偶联效率及固定化酶活力·····	(153)
一、固定化偶联效率及其测定方法·····	(153)
二、固定化酶活力·····	(154)
三、固定化酶活力测定方法·····	(155)
第四节 固定化生物催化剂形状与性质·····	(156)
一、固定化酶的形状与性质·····	(156)
二、固定化细胞的形状与性质·····	(159)
第五节 酶工程的应用·····	(159)
一、酶工程在医药工业中的应用·····	(159)
二、酶工程与临床·····	(160)
三、酶工程在食品及轻化工业方面的应用·····	(161)
第六节 酶工程应用实例·····	(162)

一、L-天门冬氨酸生产工艺	(162)
二、6-氨基青霉烷酸生产工艺	(163)
三、5'-复合单核苷酸注射液生产工艺	(164)
四、 γ -氨基丁酸生产工艺	(165)
五、L-多巴生产工艺	(167)
第七章 细胞反应动力学	(169)
第一节 细胞浓度测定	(169)
一、直接测定法	(169)
二、间接测定法	(171)
第二节 分批培养法	(171)
一、细胞生长规律	(172)
二、影响比生长速率的因素	(174)
三、底物消耗速度及产物生成速度	(180)
四、动力学模型参数估算及培养过程优化	(184)
第三节 连续培养法	(192)
一、单级连续培养法	(192)
二、细胞回流式单级连续培养法	(196)
三、多级连续培养法	(196)
第四节 半连续培养及透析培养法	(197)
一、半连续培养法	(197)
二、透析培养法	(199)
第五节 基因工程细胞培养	(202)
一、安全防护基本要求	(202)
二、基因工程细胞培养特点	(202)
三、基因工程细胞的培养	(203)
第八章 固定化生物催化剂反应动力学	(207)
第一节 均相酶反应动力学	(207)
一、单底物酶促反应	(207)
二、多底物酶促反应	(210)
三、影响酶促反应的因素	(212)
四、酶失活动力学	(214)
第二节 固定化酶反应动力学	(216)
一、影响固定化酶反应动力学的因素	(217)
二、固定化酶反应动力学	(218)
三、固定化酶失活动力学	(219)
第三节 外部扩散及内部扩散过程	(221)
一、外部扩散过程	(221)
二、内部扩散过程	(224)
三、外膜阻力及内扩散同时作用	(229)

第九章 生物反应器	(231)
第一节 生物反应器类型	(231)
一、微生物细胞反应器.....	(231)
二、植物细胞反应器.....	(235)
三、动物细胞反应器.....	(235)
四、固定化酶反应器.....	(237)
五、固定化生长态细胞反应器.....	(240)
第二节 细胞反应器搅拌功率	(244)
一、牛顿型流体搅拌功率.....	(244)
二、非牛顿型流体搅拌功率.....	(246)
第三节 细胞反应器中氧传递	(248)
一、细胞对氧的需求.....	(248)
二、氧传递过程.....	(249)
三、影响气液氧传递速率的因素.....	(251)
第四节 细胞反应器的热量传递	(253)
一、细胞反应器的热量平衡.....	(253)
二、生物反应器传热速率.....	(254)
第五节 细胞反应器的放大	(256)
一、细胞反应器放大法.....	(256)
二、放大方法的比较.....	(258)

第一章 绪 论

一、生物工程基本含义

本世纪 70 年代初, 生命科学领域产生了巨大的变革性综合, 凡与工业规模的生物工艺流程密切相关的技术与工程领域均囊括于同一学科之内, 遂出现生物工程一词。生物工程亦曰生物技术或谓生物工艺学, 其所涉及范围广泛, 内容庞杂, 世界各国学者对其称谓多有不同, 对其含义的理解亦不相为一, 美国人曾称为“Biotechnology and Bioengineering”, 意即“生物技术和生物工程”; 欧洲人则称为“Biomolecular engineering”(生物分子工程); 法国人最初称为“Bio-génie”或“Génie biologique”, 即生物工程学; 日本人称为“生物工学”, 或用片假名组合的外来语“バイオテクノロジー”表示之; 而英国人则用“Biotechnology”一词既表示生物工程的技术内容, 也代表工程内容, 但不同于“Bioengineering”, 并渐趋于规范和统一, 为世人所认可。“工程”一词系指完成某项商品生产或向社会提供劳务获得效益的过程, 其特点是规模大, 复杂性强, 又需多学科的知识 and 技术的协调配合; 而“技术”一词习惯上是强调在实施工程中所运用的某项具体技巧, 故二者迥然不同。但生物工程领域中, “技术”与“工程化”过程不可分割, 而其它如化学工程、电子工程及机械工程许多工业领域中, 技术与工程各自有相对独立性。

至于生物工程的定义, 有人则认为是“利用生物体或其组成成分在最适条件下生产有益产物或进行有效过程的技术”; 有人认为是“应用生物学原理和工程学原理, 通过生物催化作用加工材料, 提供产品和服务的技术”; 也有人认为是“工业规模开发生物细胞及其组分潜在用途的技术”。而且生物工程尚有广义与狭义之分, 广义者包括农业工程、环境卫生工程、医学工程、仿生工程及人体功能工程等不涉及化学反应的工程; 狭义者系采用生物催化剂而涉及化学反应的工程。但是, 由于生物工程是涉及许多学科的综合性的技术, 各国学者对其含义理解不一, 故其定义尚难于为一, 有待进一步发展和统一。

二、生物工程的发展过程

生物工程可以说是个既古老而又年轻的科学, 其诞生非始于今日, 而是经历了漫长的岁月形成的。上古之时, 人类即以简单的自然发酵技术生产乳酪、啤酒、酱醋及加工皮革等, 相传 8000 年前苏米尔人已掌握制作啤酒技术, 6000 年前埃及人已能制作面包, 5000 多年以前我国酿酒技术已相当精湛。因此, 人们将古代以非纯种微生物自然发酵工艺为标志的生物技术称为原始生物工程, 亦称为第一代生物工程。自 1857 年 Pasteur L 发现发酵过程是微生物作用的结果, 此后相继出现了许多纯种微生物发酵工业, 并形成了抗生素、氨基酸、有机酸、酶制剂、核酸及单细胞蛋白等发酵工业, 因之人们将采用纯种微生物的发酵工艺称为近代生物工程, 亦称为第二代生物工程。自 1973 年基因工程诞生之后, 细胞融合及单克隆抗体技术相继成功, 并实现了动植物细胞的大规模培养技术, 同时固定化

生物催化剂也得到了广泛应用，新型生物反应器不断涌现，从而使生物工程进入了崭新阶段，并已形成了相应的产业，且在医药工业中显示出巨大的威力。因此，人们将基因工程诞生为标志的生物工艺称为现代生物工程，也称第二代生物工程。现代生物工程是当代生物科学研究和开发的主流，具有无限发展前景。

三、现代生物工程主要内容

现代生物工程是由多学科的理论、技术与工程原理综合而成的边缘学科，内容广泛而庞杂，根据操作对象及目的，可分为基因工程、微生物工程、动植物细胞工程、生物电子工程、细胞反应动力学、酶反应动力学、生物反应器、灭菌技术及生化工程等。

基因工程是定向改造生物遗传性的主导性技术，故本教材着重讨论有关工具酶结构性质与功能、基因载体与性质、基因制备、DNA重组技术、重组DNA (rDNA) 导入宿主细胞的方法、工程细胞筛选与鉴定，以及基因表达与调控等；此外，细胞融合亦为改造生物遗传性的重要途径，故本教材阐述了各类细胞融合条件、方法、杂种细胞筛选与鉴定技术，同时还阐述了动植物及微生物细胞大规模培养的原理、方法及条件。另外，为实现最大工业效益，还阐述了酶工程基本原理、酶和细胞固定化原理、方法、影响因素，以及固定化生物催化剂的性质及其应用。

在阐述现代生物工程有关技术的同时，本教材还叙述了有关工程学原理和方法，讨论了细胞反应动力学、细胞生长规律及其影响因素，以期确定最佳培养条件，以实现产业化；与此同时，还讨论了固定化生物催化剂反应动力学及其影响因素，以实现最佳转化条件；在现代生物工程中，各类细胞及生物催化剂均需适当设备，其核心设备总称为生物反应器，故本教材叙述了各类主要反应器的结构和性能，并讨论了反应器中物料分布状态及其与氧和能量传递关系。同时也讨论了各类反应器的适用性及应用可塑性，以便根据不同反应对象选择适当反应器及确定最佳反应条件，取得最大转化效率。

现代生物工程有关内容之间关系及其应用，见图 1-1。

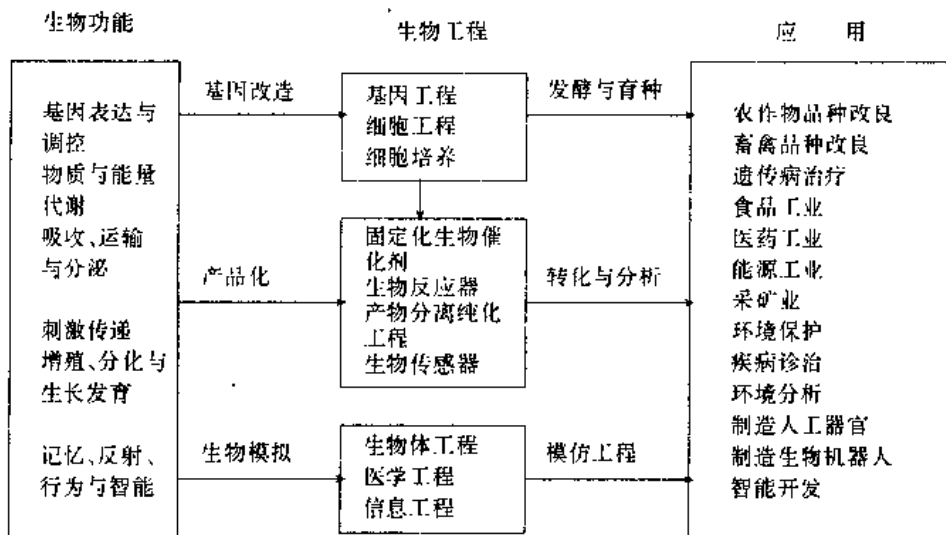


图 1-1 现代生物工程有关技术之间关系及应用

四、现代生物工程在医药及工农业生产中的地位及其重要性

现代生物工程与电子信息和新材料技术一样，为当今极重要三大高新技术领域之一，其主要特点是人工定向改造生物遗传特性，创造新物种，通过工程化为人类提供有益产品和服务，促进医药工业发展，改善人类生存条件。

在医药工业中，传统生物工程已为人类提供了许多重要药品，为提高人类健康水平及推动社会进步发挥了巨大作用。而现代生物工程自其诞生伊始，即在医药工业中显示出巨大生命力，并已为人类提供了传统技术难以获得的许多珍贵药品，如人胰岛素、人生长激素、人尿激酶、人脑激素、人促红细胞生成素、人骨生成蛋白、人降钙素、乙肝疫苗、干扰素、单克隆抗体、 β -甲基地高辛及人超氧化物歧化酶等，足见在现代生物工程发展过程中，医药工业是优先受惠者。此外，现代生物工程对医学的发展也将产生极大推动作用，尤其是基因工程的诞生为基因疗法奠定了理论与技术基础，基因疗法有可能根治诸如先天性遗传性疾病、恶性肿瘤、艾滋病、心血管疾病及糖尿病等疑难病症，同时亦将出现一系列基因药物，使药物治疗产生重大变革，有可能使医学领域产生第三次革命。因此，现代生物工程在医药工业及医学领域中所处的重要地位及其重要性，可谓任何技术领域莫之与京。

现代生物工程对工农业的发展将具有无与伦比的推动作用。在工业生产中，除了多种珍贵药品外，还生产了多种氨基酸、有机酸、维生素、单细胞蛋白、高果糖浆、香精香料及工程材料等工业产品，并将对传统产业的技术更新换代产生巨大地推动作用；在农牧业生产中，现代生物工程已为人类提供了植物生长激素、除虫菊酯、生物碱类杀虫剂、生物杀虫剂、农药清除剂、生物肥料、幼畜腹泻痢疾疫苗及口蹄疫苗等多种产品，为农牧业的发展起到了保障和推动作用。此外，通过基因工程及细胞融合技术，有可能获得性能优良的转基因动物、转基因植物或杂种作物，促进农业及畜牧业的发展。由此可知，现代生物工程在工农业生产中处于极其重要地位，对促进工农业生产的发展及改善人类生存条件具有无可比拟的重要性。

此外，传统生物工程对人类社会的繁荣昌盛已作出了巨大贡献，可以说没有传统生物工程即没有人类今时的文明，因之传统生物工程对人类社会发展的的重要性已深深印入世人脑海。但当今之世，人口剧增，人类生产活动急剧膨胀，能源消耗殆尽，资源日渐枯竭，兼之石油及化学工业迅速发展，化学农药的滥用，环境严重污染，生态平衡破坏，人类生存条件江河日下，不仅社会繁荣难以维持，人类命运亦遭到严重威胁。当此之时，传统生物工程及其它传统技术已无能为力，必需加速技术革命，开发现代生物工程，后者加工对象并非石油或矿物资源，而是可再生的生物量，消耗多少同时产生多少，往复循环，永无止境。且现代生物工程反应条件温和，工艺简单，生产周期短，对环境污染轻微，是治理污染的现代技术之一。因此欲免人类于危厄，保持人类繁荣昌盛，非现代生物工程莫属。

五、现代生物工程与其它学科的关系

现代生物工程是生物学与工程学综合交叉的边缘学科，亦为知识与技术密集型学科，本学科既是应用生命活动原理，则必需掌握生物体结构、功能、代谢活动及其生长规律等有关知识，因之与细胞生物学、分子遗传学、微生物学、生理学、生物化学、生物物理

学，甚至与物理学、化学及数学等基础学科均有密切关系；同时为了实现工程化，必需掌握生物反应器的构造原理、生物反应工程原理、物质传递规律、设备运转及其控制条件等基本知 识，故本学科与化学工程原理、发酵工程、生物化学工程、电子工程、材料科学、计算机科学及信息科学密切相关。总之现代生物工程有关理论和技术与理工医农各学科之间存在着纵横交错的复杂关系，其诞生既反映了基础学科的新成就，亦体现了现代工程的新发展。

六、现代生物工程的成就及其发展前景

自 70 年代初基因工程诞生之后，细胞融合、淋巴细胞杂交瘤及细胞大规模培养技术相继成功，其发展之速，应用范围之广，几居各科技领域之冠，已取得的成果举世瞩目。理论上任何有机物均可由现代生物技术生产。如前所述，现代生物工程已为人类提供了相当数量的传统技术不可能得到的珍贵药品及其它物质，深信不久将有更多新技术、新成果应用于医疗卫生及工农业生产，为人类提供新产业及新劳务。

诚然，现代生物工程尚处于初期发展阶段，许多理论和技术问题尚待深入研究，但并不影响其实际应用，深信随着不断深入研究，终将得到完善与发展，不过其主导技术——基因工程基本原理业已清楚，操作已定型，目前已处于完善与开发阶段。现代生物工程较之传统技术具有无与伦比的优越性，其潜在应用价值无可估量，预计在 21 世纪社会与经济发展过程中，将有举足轻重的作用。时人预言，21 世纪乃生物工程世纪，当非谬言。

今时生物工程趋向是开发蛋白质工程、细胞分泌工程及生化工程，蛋白质工程系指通过对蛋白质及酶的化学修饰及基因改造获得具有特殊功能的非天然蛋白质的技术；细胞分泌工程系指通过对基因改造，如基因缺失、多效分泌突变、周质泄漏突变或接信号肽基因等措施，促进基因产物分泌的技术；生化工程系指反应器、转化反应及产品分离纯化等全部工程化技术，最终实现其经济效益与社会效益。

众所周知，细胞膜是细胞从外界吸取营养物，排除产物或废物，实现细胞内外物质交换的界膜，具有选择性、通透性。而细胞内酶系形成的特有精细反应构成了严密微型反应器或微型化工厂，可完成许多化学反应，形成各类产物。因此，现代生物工程最终目的是构建人工细胞，将含特定基因的重组 DNA 转移至人工细胞内，令其表达，构建新型的生物合成法；或将正常基因引入相应病变细胞以治疗疑难病症；亦可将性质和功能不同的细胞部件拼合重组，组装成不食人间烟火及无繁殖力的生物机器人，令其为人类服务。深信随着现代生物工程及其它科学技术的不断发展，生物机器人诞生之日将不是久远之事。

第二章 基因工程

应用 DNA 重组技术, 按照人们的意愿, 在基因水平上改变生物遗传性, 创造新生物物种, 通过工程化为人类提供有用产品及服务的技术谓之基因工程。时人亦曰遗传工程、重组 DNA 技术或分子克隆。实际上遗传工程是包括基因工程在内的人工改造生物遗传性的全部技术; DNA 重组是指采用酶法, 将来源不同的 DNA 进行体外切割与连接构成杂种 DNA 分子的技术; 分子克隆主要指重组 DNA 分子在宿主细胞内的复制过程, 三者与基因工程有关系而不相同。基因工程是在发现细菌限制性核酸内切酶 (简称限制酶)、DNA 重组及 DNA 顺序分析获得成功基础上逐步发展和成熟的。1971 年, Smith H O 和 Nathans D 发现了细菌限制酶, 为基因重组提供了重要工具酶, 现已发现 500 余种限制酶, 已应用者百多种; 1973 年, Cohen S 和 Boyer H 完成了载体制备、外源 DNA 切割、插入、连接、重组质粒转化、筛选与扩增等基因工程主要环节, 奠定了基因工程技术基础。1977 年, Gilbert W 和 Sanger F 建立了 DNA 顺序分析技术, 为基因结构分析、基因图谱制备及基因合成提供了重要分析手段; 1978 年, 人生长激素释放抑制因子基因经重组后转入 *E. coli* 中表达成功, 是年人胰岛素基因重组亦获得成功, 并得到相应产物, 从而使基因工程进入成熟阶段。

基因工程为现代生物工程主体技术, 亦为当代生物科学的生长点, 其内容包括工具酶分离纯化及其性质研究, 外源 DNA 及载体 DNA 分离纯化及鉴定与分析、外源 DNA 及载体 DNA 切割与连接、外源 RNA 的反转录、载体构建、DNA 合成、核酸杂交、DNA 顺序分析、宿主细胞选择、基因转移、工程细胞克隆及筛选、外源基因在工程细胞内表达及其控制等。基因工程最大特点是打破生物种属界限, 进行种属内外基因重组、遗传信息交换和转移, 因此是人工定向改变生物遗传性的根

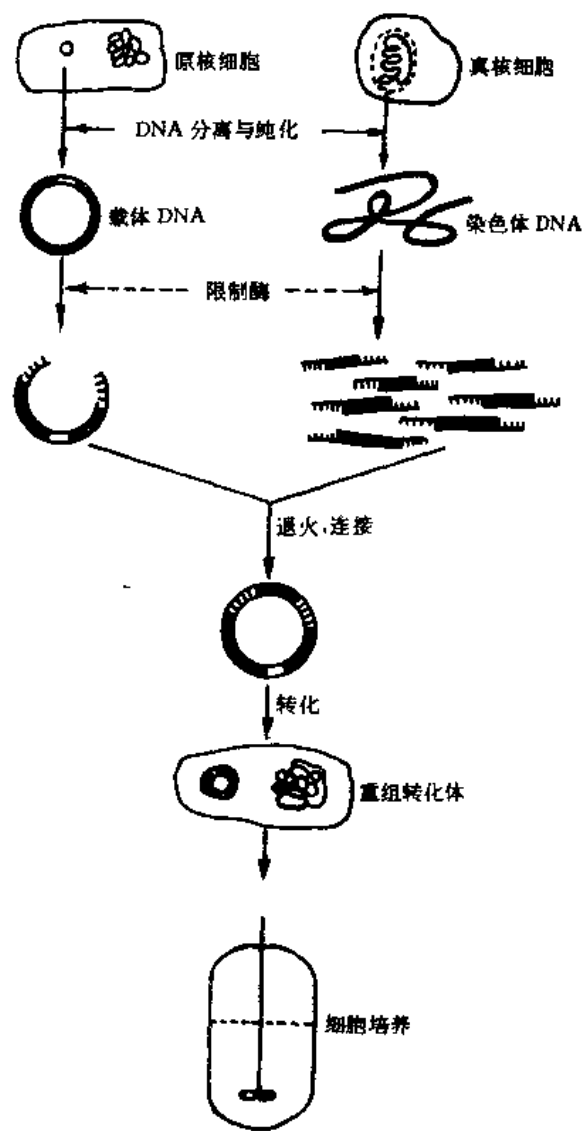


图 2-1 基因工程基本过程

本技术，实际上基因工程就是采用酶法将一种生物的基因与载体构成重组 DNA，并将其转入另一种宿主内，同时随着宿主细胞增殖而表达的过程，其基本过程如图 2-1 所示。

基因工程的诞生具有重大理论与实际意义。在生物学领域中，为单个细胞、组织及器官的分化、生长、发育、进化、基因结构与功能及肿瘤形成机制等理论研究开辟了新途径；在医学领域中，为采用基因疗法根治遗传性疾病及肿瘤奠定了理论与技术基础；在工农业生产中更是神工鬼斧，具有巨大的开发潜力及应用价值，其使传统技术不可得到的许多珍贵药品得以斧斤，今时已有人胰岛素、人生长激素、组织血纤维蛋白溶酶原激活剂、人尿激酶、人脑激素、乙肝疫苗、 α -淀粉酶、葡聚糖酶、凝乳酶、干扰素及数十种单克隆抗体 (McAb) 等实现商品化，此外尚有人松弛激素、人溶菌酶、胰蛋白酶抑制剂、人超氧化物歧化酶 (SOD)、人尿激酶原、人促红细胞生成素 (EPO)、集落刺激因子、人白细胞介素-2 (IL-2) 及数十种 McAb 等正处于临床试用阶段。预计不久基因工程还将在酶、蛋白质、氨基酸、有机酸、除草剂、农药及抗生素工业中发挥其重要作用。其次转基因动物及转基因植物研究亦取得相当大的进展，其对农牧业的发展将具有深远影响。

第一节 基因工程工具酶

基因工程关键技术是 DNA 重组，将目的基因自染色体取下，再与载体 DNA 连接构成重组 DNA，其操作过程皆由酶催化完成，基因工程得以斧斤实乃酶之神工，因之凡基因工程中应用的酶类统称为工具酶。工具酶种类繁多，如限制酶、甲基化酶、Klenow 聚合酶、 T_4 -DNA 聚合酶、 T_4 -多核苷酸激酶、碱性磷酸酯酶、核酸酶 S1、核酸酶 Bal31、绿豆核酸酶、核糖核酸酶、入外切核酸酶、脱氧核糖核酸酶 I、外切核酸酶 III 和 VII、polyA 聚合酶、 T_4 -DNA 连接酶、末端脱氧核苷酸转移酶、 T_4 -RNA 转移酶、逆转录酶等。其中限制酶及 T_4 -DNA 连接酶最为重要，其它酶类已于酶学及生物化学中讲授，本章仅介绍限制酶及 T_4 -DNA 连接酶。

一、限制酶

(一) 限制与修饰现象

当一种病毒自其天然宿主 A 中分离后，再感染宿主 B 时感染率仅为 10^{-4} ，绝大多数不能生长，仅有万分之一可以生长，若将在宿主 B 中可以生长的病毒再分离出来，用于再感染宿主 B 时，感染率为 100%，若将其用于再感染宿主 A 时，则感染率又降低至 10^{-4} ，此现象称为宿主限制作用。研究表明，病毒 DNA 在新宿主中产生降解现象，但宿主自身 DNA 不被降解，此现象称为限制-修饰作用。还发现宿主细胞中存在着限制酶与修饰酶 (又叫甲基化酶)，在同一宿主中，它们对 DNA 有相同的识别顺序，但作用相反。甲基化酶有种属特异性，通常只修饰宿主自身 DNA，因之限制酶不能降解宿主自身 DNA，但甲基化酶不修饰外源性 DNA，故外源性 DNA 在宿主中通常被限制酶降解，所以病毒和噬菌体皆有其一定宿主范围。但是甲基化酶有时亦误将外源性 DNA 修饰，因之亦可避免宿主限制酶之降解，这就是宿主 A 中病毒感染宿主 B 时，乃可有万分之一在新宿主中棲息与增殖之原因。由此可知，限制-修饰系统既构成了物种遗传稳定性的自我防卫