

生物技术药物

主 编 郭葆玉

 人民卫生出版社



生物技术药物

主 编 郭葆玉

编 者 (以姓氏笔画为序)

弓雪莲 王 栋 方 晨 厉建中

邱 磊 张淑英 陈青青 郑慧敏

郭葆玉 曹颖瑛 蹇 阳

人 民 卫 生 出 版 社

图书在版编目 (CIP) 数据

生物技术药物/郭葆玉主编. —北京: 人民卫生出版社,
2009. 1

ISBN 978-7-117-10922-2

I. 生… II. 郭… III. 生物技术—药理学 IV. R915

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 181567 号

生物技术药物

主 编: 郭葆玉

出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 010-67616688)

地 址: 北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

邮 编: 100078

网 址: <http://www.pmph.com>

E - mail: pmph @ pmph. com

购书热线: 010-67605754 010-65264830

印 刷: 尚艺印装有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 **印张:** 23

字 数: 545 千字

版 次: 2009 年 1 月第 1 版 2009 年 1 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-10922-2/R · 10923

定 价: 43.00 元

版权所有, 侵权必究, 打击盗版举报电话: 010-87613394

(凡属印装质量问题请与本社销售部联系退换)

内 容 提 要

本书主要介绍了生物技术药物的基本理论、主要研究内容和医药研究中的应用。全书分为四个部分，第一部分为基础理论，共有五章，介绍了生物技术药物研究的基础、发展的历程和研究现状、取得的成就以及目前还存在的问题；第二部分第六~第十章分别介绍了生物芯片技术、反义技术、RNA 干扰技术、多肽类药物和模拟肽的概念研究现状和展望；第三部分主要介绍了一些主要生物技术药物如干扰素、白介素、促红细胞生成素、集落刺激因子和肿瘤坏死因子等的研制和临床应用及副作用；第四部分系统介绍了基因治疗、组织工程、抗体工程、治疗性克隆、转基因动物、转基因植物和生物技术药物与药物作用靶点研究。本书几乎涉及了目前生物技术与药学研究领域的各个方面，并对今后该领域的发展进行了前瞻性的分析。

本书内容新颖、图文并茂，较为系统详细地介绍了生物技术药物研究的基础理论、技术前沿的发展动态，对生物技术药物学研究和新药研发从业人员、大学本科学学生及研究生的工作和学习具有极高的参考价值。

前 言

1917 年一位匈牙利工程师 Karl Ereky 最初提出生物技术这个词。实际上生物技术的发展和应用一直可以追溯到 1000 多年以前，而人类有意识目的地利用酵母进行大规模发酵生产是在 19 世纪。1982 年，国际合作及发展组织将生物技术定义为：应用自然科学及工程学的原理，依靠微生物、动物、植物作为反应器将物料进行加工以提供产品来为社会服务的技术。由此，生物技术逐步成为与微生物学、生物化学、化学工程等多学科密切相关的交叉性学科。

传统生物技术主要是通过微生物的初级发酵来生产商品，其方法对提高产量的幅度是非常有限的。

1953 年，Watson 和 Crick 发现了 DNA 双螺旋结构，奠定了现代分子生物学的基础，从而给整个生物学乃至整个人类社会带来了一场革命。1973 年，美国加利福尼亚大学旧金山分校的 Boyer 教授和斯坦福大学的 Stanley Cohen 教授共同完成了一项著名的实验。他们选用一个仅含有单一酶切位点的质粒载体，并用酶将其切为线性分子，然后将该线性分子与同样具有酶切位点黏性末端的另一质粒 DNA 片段并和 DNA 连接酶混合作用，从而获得了具有两个复制起始位点的新的 DNA 组合。这是人类历史上第一次有目的的基因重组的尝试。于是在很短的时间内研究人员就开发出了大量行之有效的分离、鉴定、克隆基因的方法。DNA 重组技术使得生物技术中生物转化这个环节的优化过程变得更为有效，而且它所提供的方法不仅可以分离到那些高产量的微生物菌株，还可以人工制造出高产量的菌株，原核生物细胞和真核细胞都可以作为生物“工厂”来大量生产如胰岛素、干扰素、生长激素、病毒抗原等外源蛋白，为现代生物技术举行了一个划时代的奠基礼。

目前，国外生物技术药物开发与研究仍以美国占有明显优势，其中，FDA 已批准的生物技术药物和疫苗共 141 个，适应证达 220 种，使 3 亿多患者受益，此外，还拥有 525 个基因实验室和 1300 家左右生物技术公司，其中 300 多家公开上市，市场资本总额超过 3308 亿美元。预计到 2025 年，美国生物技术市场总额将达到 2 万亿美元，届时将占国民生产总值（GDP）的 20%。在欧洲，生物技术产品有 31 种之多，其中 80% 是基因重组药物；正在研发的产品有 47 种。有 290 种蛋白质药物进入临床试验，其中 29 种已批准上市。据专家估计，欧洲生物技术产业在今后的 5~10 年内将与美国和日本展开激烈的竞争，而日本则雄心勃勃地提出了“生物产业立国”的国家长远战略目标。

我国医药生物技术的研究和开发起步较晚，但“十五、十一五”期间，中国政府加大了对生物技术及其产业发展的支持力度。国家八六三计划、九七三计划、自然科学基金等重大研究发展规划对生物技术的总投资接近 60 亿元，医药生物技术及其产业发展

到今天已初具规模。目前,我国有 20 个国家生物技术药物重点实验室,3 个基因工程药物开发中心,289 家生物制药企业,生物技术产业的群落化与集约化正在逐步形成。主要生产基因工程药物的上市公司有天坛生物、通化东宝、四环生物、海王生物、北生药业、华北制药、哈药集团、丽珠集团等。至今,我国累计开发成功 21 种基因工程药物和疫苗,批准上市的基因工程药物 19 种;具有自主知识产权的新药有 3 种,即重组人-1b 干扰素 (IFN α -1b)、重组牛碱性成纤维细胞生长因子 (rbFGF) 和重组链激酶 (rSK)、t-PA (组织型纤溶酶原激活剂)、IL-3 等和十多种多肽药物正在进行临床 I、II 期试验;单克隆抗体研制已进入临床,B 型血友病治疗已取得初步疗效,重组凝乳酶等 40 多种基因药物等正在进行开发研究。虽然我国医药生物技术经过 20 年的发展取得了很大的进展,但同国外发展相比,还存在一些不足,主要方面有:①资金投入少,资金结构不合理。②低水平的重复多,源头创新产品少,仿制产品和重复生产现象严重。③上下游技术研究成果转化率低。在基因工程产品领域中的上游技术比国外落后 3~5 年,但下游技术至少落后 15 年。一叶落而知天下秋,今后的发展趋势应为加快基因工程药新品种和突变体的研制,避免专利纠纷;单克隆抗体以其靶向性高、无毒副作用而应备受关注;加快以免疫诊断为主流的诊断试剂和以人造器官研究的组织工程技术研发,上述有关内容,本书已有章节述及。

目前,生物技术药物已走入寻常百姓家,成为提高全民生活质量和健康的医药保证之一。教育是立国之本,为了加速提高我国生物技术科技人才队伍的成长壮大,为了我们在新形式下面临的机遇与挑战,为了全面提高我国的国民健康素质,以人为本保障人民的生活生存质量,我们带着冲动和激情竭尽全力地编写这本专著。同时,我们认为,作为长期生物技术药物的从业人员,我们也把这看做是我们的历史使命,我们责无旁贷。如若这本小册子能为上述目的起到一点绵薄之力,能为我国的年轻一代的生物技术药物人提供一些参考,我们将深感欣慰。

2005 年,教育部经过专家论证和评估考核,我校顺利地进入国家十个有权开设生物技术专业课程的高等院校,使我校跨入为国家培养生物技术专门人才的基地之一。基于此,我们集中精力编写了这本专著,其主要内容涵盖了生物技术方法、生物技术药物和生物技术新趋势(如 siRNA、治疗性克隆、组织工程和蛋白质组学)理论及基础,生物技术药物的应用技术、由于在进行药物研究和药学靶点的研究中,生物技术药物起到了非常重要的作用,所以本书在编写的过程中增加了这方面的内容。本书适合于科研和高校的本科教学生的学习教材和业内人员的参考之用。由于编著者的学术水平浅薄,知识水平有限,难免在编写的过程中有很多的缺点和不足之处,恳请读者和同道对它的不足之处予以批评和指正,我们将虚心的接受并在今后的工作中努力克服和提高。

郭葆玉

2008 年于上海

目 录

第一章 生物技术药物总论.....	1
第一节 生物技术基础知识.....	1
第二节 生物技术主要研究内容.....	3
第二章 基因工程基本过程与方法	11
第一节 质粒载体	11
第二节 载体	14
第三节 重组 DNA 的转移、筛选与鉴定	23
第三章 细胞工程药物	28
第一节 动物细胞工程药物	28
第二节 植物细胞工程药物	34
第四章 酶工程药物	39
第一节 酶工程技术	39
第二节 酶工程技术在医药工业中的应用	43
第三节 酶工程的现状与前景	49
第五章 发酵工程药物	51
第一节 微生物发酵技术的概念及发展	51
第二节 微生物发酵制药	57
第三节 制药微生物生长与生产关系	59
第四节 制药微生物菌种的建立	65
第五节 培养基制备	69
第六节 灭菌工艺	73
第七节 微生物发酵培养技术	79
第八节 发酵工艺过程的控制	83
第九节 抗生素生产工艺	93
第十节 氨基酸发酵生产工艺	98
第十一节 维生素生产工艺	99
第六章 基因芯片与蛋白质芯片技术.....	102
第一节 基因芯片.....	102
第二节 蛋白质芯片.....	107
第三节 其他芯片.....	110
第七章 反义技术.....	114

第一节 反义技术的原理及类型	114
第二节 反义技术设计策略	116
第三节 反义技术的临床试验现状	119
第八章 RNA 干扰技术——转录后水平的基因表达沉默 (PTGS)	122
第一节 RNAi 的发现	122
第二节 RNA 干扰的作用机制及特征	123
第三节 RNAi 干扰的设计及应用	125
第九章 多肽类药物	131
第一节 多肽类药物的主要研究历程	132
第二节 多肽类药物的分类和优点	133
第三节 分子模拟与多肽药物设计 and 应用	135
第四节 多肽药物的给药途径和存在的问题	138
第十章 模拟肽和噬菌体展示技术	144
第一节 模拟肽的来源和噬菌体展示技术	144
第二节 噬菌体随机多肽文库	146
第三节 用菌体随机肽库筛选模拟肽	147
第十一章 干扰素	152
第一节 干扰素的性质及类型	153
第二节 基因工程干扰素的制备	157
第三节 基因工程干扰素的应用	161
第十二章 白细胞介素	170
第一节 白细胞介素分类、结构与功能	170
第二节 IL-2 的制备方法	172
第三节 其他白细胞介素	175
第十三章 粒-巨噬细胞集落刺激因子	183
第一节 基因定位与生物学活性	183
第二节 粒细胞集落刺激因子受体结构与功能	188
第三节 粒细胞集落刺激因子临床应用	191
第十四章 促红细胞生成素	197
第一节 EPO 基因的结构与功能	197
第二节 基因工程生产 EPO	200
第三节 EPO 的应用	203
第十五章 肿瘤坏死因子	208
第一节 TNF 的分子结构与功能	208
第二节 人肿瘤坏死因子的制备	214
第三节 TNF、TNF 抗体与疾病的关系	216

第十六章 组织工程技术	225
第一节 支撑组织工程研究的三大基本要素	225
第二节 干细胞在组织工程中的应用	230
第三节 器官的构建方法及组织工程的临床应用	231
第十七章 治疗性细胞株与治疗性克隆	238
第一节 治疗性细胞株-干细胞疗法	238
第二节 治疗性克隆	240
第三节 核移植与重编程	242
第十八章 治疗性抗体工程药物	248
第一节 抗体的结构、功能与治疗性抗体的来源	248
第二节 抗体分子的表达	256
第三节 治疗性抗体药物	264
第十九章 基因治疗	273
第一节 基因治疗研究现状	273
第二节 基因转移的方法	275
第三节 基因治疗的应用与安全性	281
第二十章 转基因动物生物反应器	291
第一节 研究概况	291
第二节 转基因动物的制备	292
第三节 转基因动物生物反应器	296
第四节 转基因动物的应用前景	299
第二十一章 植物基因工程	302
第一节 转基因植物表达重组蛋白	303
第二节 预防医学领域的 PV 研究	310
第三节 植物基因工程药物	313
第二十二章 酵母双杂交系统	318
第一节 酵母双杂交的原理及方法	318
第二节 酵母双杂交系统的发展	323
第三节 酵母双杂交系统的应用	329
第四节 医学中的应用	333
第二十三章 蛋白质组学与药物作用新靶点	339
第一节 蛋白质组学的特点及其研究内容	339
第二节 蛋白质组学研究使用技术	341
第三节 蛋白质组学的应用	348
附录 1 常用质粒载体特点汇总	354
附录 2 人类基因组研究大事记	358

第一章 生物技术药物总论

第一节 生物技术基础知识

生物技术药物 (biotechdrugs) 或称生物药物 (biopharmaceutics) 是集生物学、医学、药学的先进技术为一体, 以组合化学、药物基因组学、功能抗原学、生物信息学等高新技术为依托, 以分子遗传学、分子生物、生物物理等基础学科的突破为后盾形成的产业。现在, 世界生物制药技术的产业化已进入投资收获期, 生物技术药品已应用和渗透到医药、保健食品和日化产品等各个领域, 尤其在新药研究、开发、生产和改造传统制药工业中得到日益广泛的应用, 生物制药产业已成为最活跃、进展最快的产业之一。生物技术药物包括细胞因子、重组蛋白质药物、抗体、疫苗和寡核苷酸药物等, 主要用于防治肿瘤、心血管疾病、传染病、哮喘、糖尿病、遗传病、心脑血管病、类风湿性关节炎等疑难病症, 在临床上已经开始广泛应用, 为制药工业带来了革命性的变化。

生物技术 (biotechnology) 也称生物工程 (bioengineering), 是指人们以现代生命科学的原理为基础, 结合其他基础学科的知识, 采用各种先进生物工程技术手段, 按照预先人们想要获得的目标设计改造生物体或加工生物原料, 为人类生产出所需药物或达到某种目的技术, 是由多学科综合而成的一门新学科。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, 其基础知识及相关内容主要包括基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程、蛋白质工程、生物芯片、人类基因组计划与研究方法 (表 1-1)。

表 1-1 现代生物工程发展史上的重大事件

1953	J. D. Watson 和 F. H. C. Crick 发现 DNA 双螺旋结构
1961—1966	破译遗传密码
1970	分离出第一个 II 类限制性内切酶
1972	DNA 体外重组技术建立
1975	G. J. F. Kohler 和 C. Milstein 建立杂交瘤技术
1976	DNA 测序技术诞生
1978	第一次生产出基因工程胰岛素
1981	第一只转基因动物 (老鼠) 诞生
1983	人工染色体首次成功合成
1985	基因指纹技术首次作为证据亮相法庭
1986	第一个转基因作物获批准田间试验
1986	第一个 DNA 重组人体疫苗 (乙肝疫苗) 研制成功

续表

1988	PCR 技术问世
1990	美国批准第一个体细胞基因治疗试验
1990	人类基因组计划正式启动
1997	英国培养出第一只克隆羊“多莉”
1998	人体胚胎干细胞系建立
2000	人类基因组工作框架图完成
2003	人类基因组测序工作完成

1. 基因工程 (gene engineering) 是 20 世纪 70 年代以后兴起的一门新技术, 其主要原理是应用人工方法把生物的遗传物质, 通常是脱氧核糖核酸 (DNA) 分离出来, 在体外进行切割、拼接和重组。然后将重组了的 DNA 导入某种宿主细胞或个体, 从而改变它们的遗传性; 有时还使新的遗传信息 (基因) 在新的宿主细胞或个体中大量表达, 以获得基因产物 (多肽或蛋白质)。这种通过体外 DNA 重组创造新生物并给予特殊功能的技术就称为基因工程, 也称 DNA 重组技术。

2. 细胞工程 (cell engineering) 是指以细胞为基本单位, 在体外条件下进行培养、繁殖; 或人为地使细胞某些生物学特性按人们的意愿发生改变, 从而改良生物品种和创造新品种; 或加速繁育动、植物个体以获得某种有用的物质的技术。所以细胞工程应包括动、植物细胞的体外培养技术、细胞融合技术 (也称细胞杂交技术)、细胞器移植技术、克隆技术以及干细胞技术等。

3. 酶工程 (enzyme engineering) 是利用酶、细胞器或细胞所具有的特异催化功能, 对酶进行修饰改造, 并借助生物反应器和工艺过程来生产人类所需产品的一项技术。它包括酶的固定化技术、细胞的固定化技术、酶的修饰改造技术及酶反应器的设计等技术。

4. 发酵工程 (fermentation engineering) 利用微生物生长速度快、生长条件简单以及代谢过程特殊等特点, 在合适条件下, 通过现代化工程技术手段, 由微生物的某种特定功能生产出人类所需的产品称为发酵工程。

5. 蛋白质工程 (protein engineering) 是指在基因工程的基础上, 结合蛋白质结晶学、计算机辅助设计和蛋白质化学等多学科的基础知识, 通过对基因的人工定向改造等手段, 从而达到对蛋白质进行修饰、改造、拼接以产生能满足人类需要的新型蛋白质的技术。

五项工程技术并不是各自独立的, 彼此之间是互相联系、互相渗透的。基因工程和细胞工程是两大核心技术, 它能带动其他技术的发展, 比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酶的催化效应。

生物技术或称生物工程, 主要包括基因工程、细胞工程、蛋白质工程、发酵工程, 此外还有生物医学工程、生物信息工程等, 当然也包括基因转移重组的工程。

第二节 生物技术主要研究内容

一、基因工程

基因工程定义：人为操作 DNA。它是一项将生物的某个基因通过基因载体运送到另一种生物的活细胞中，并使之无性繁殖（称之为“克隆”）和行使正常功能（称之为“表达”），从而创造生物新品种或新物种的遗传学技术。

基因工程设定目的：将一个生物体遗传信息（DNA）转入另一个生物体中表达。

（一）基因工程一般六个步骤

1. 克隆重组 提取供体生物目的基因。获取目的基因的方法有 cDNA、PCR 法和人工化学合成法。

2. 酶解 基因工程常用工具酶有限制性内切酶、甲基化酶、连接酶、DNA 聚合酶、逆转录酶、依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶、T₄ 噬菌体多核苷酸激酶和碱性磷酸酶。

3. 连接 连接到另一个 DNA 分子（载体）上形成重组 DNA。载体分别由从细菌质粒、噬菌体 DNA、病毒 DNA 分离出来的元件组装而成。根据功能的不同，分为克隆载体和表达载体。以繁殖 DNA 片段为目的载体通常称为克隆载体（cloning vectors）。表达载体（expression vector）是用来将克隆到的外源性基因在宿主细胞内表达成蛋白质的载体。表达载体又分胞内表达载体和分泌表达载体，根据表达所用的受体细胞不同，可分为原核细胞表达载体和真核细胞表达载体。

4. 转化 将重组子转入受体细胞，并在其中复制、保存，方法有氯化钙法、电穿孔法、F 质粒转导法等。

5. 筛选、鉴定 已吸收重组子的细胞，如 PBR322：①将转化细胞涂布于氨苄西林平板表面，转化细胞生长，未转化细胞被杀死。②再将生长菌落用影印法涂布于含四环素培养基平板上，带有目的基因细胞不生长（BamH1 位点在 ter 基因内）。③重复②可确定筛选出克隆细胞（图 1-1）。

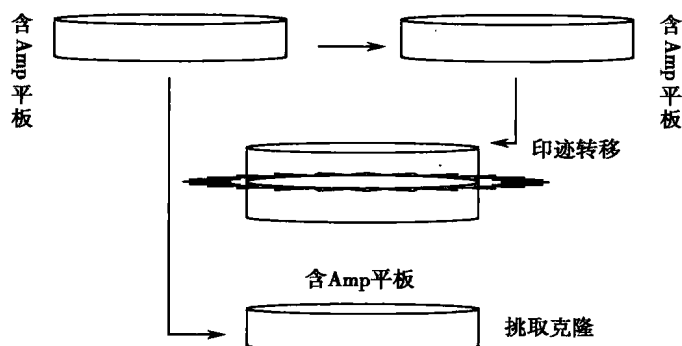


图 1-1 菌落筛选示意图

6. 大量培养，检测外源性基因是否表达。

(二) 基因工程的理论与技术基础

1. 理论基础

- (1) 证明遗传物质是 DNA：AVERY 细菌转化实验。
- (2) DNA 双螺旋结构阐明、半保留复制发现。
- (3) 遗传信息传递方式、遗传密码破译、密码通用性发现。

2. 技术基础

- (1) 限制性内切酶与 DNA 连接酶纯化分离（图 1-2）。

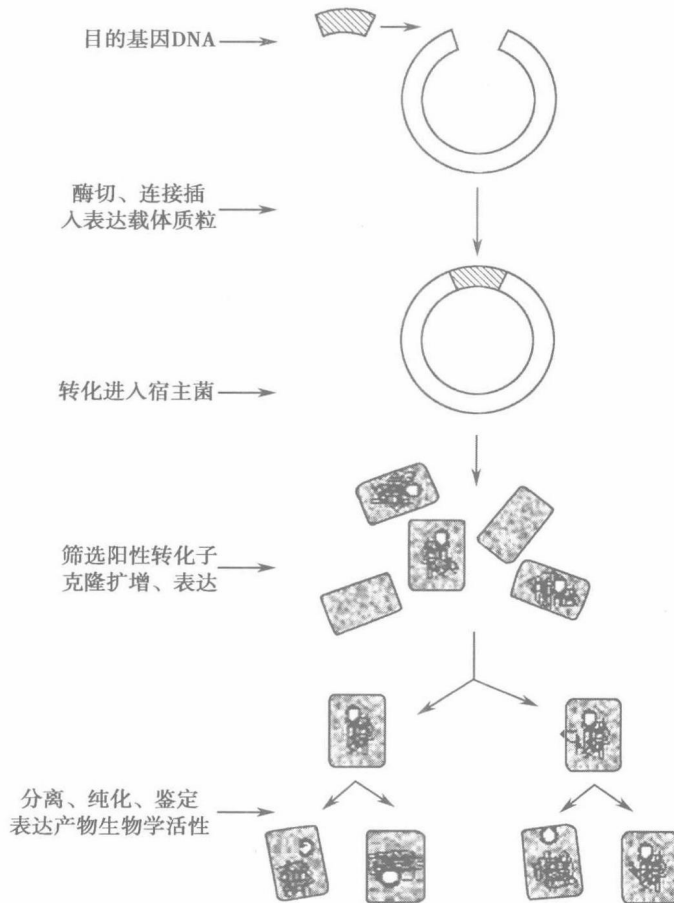


图 1-2 基因工程原理图

- (2) 基因工程载体发明。
- (3) 逆转录酶发现。

二、细胞工程

细胞工程 (cell engineering) 是利用细胞的全能性，在细胞或细胞器水平上改变细胞的某些遗传特性，以改良其性状、获得有用基因产物或加速细胞及生物体繁殖的綜合技术，可分为微生物细胞工程、植物细胞工程和动物细胞工程，是以细胞培养技术为基础，通过细胞融合、细胞核移植、动物克隆、染色体工程和生物反应器来实现。

(一) 细胞融合 (cell fusion)

细胞融合又称体细胞杂交 (somatic hybridization)，是指两个不同来源的细胞，彼此融合成杂交细胞，使来自两个亲本细胞的基因有可能都被表达，打破远缘生物不能杂交的屏障，形成新物种或新品种的技术。1975 年，英国剑桥大学的科学家科莱尔 (G. Kohler) 和米尔斯坦 (C. Milstein) 用细胞融合技术将能分泌抗体的 B 淋巴细胞 (绵羊红细胞、免疫小鼠脾细胞) 与具有无限生长力的肿瘤细胞 (小鼠骨髓瘤细胞) 融合，得到了既能持续产生单一抗体又能在体外无限繁殖的杂合细胞 (杂交瘤细胞，hybridoma cell)，通过细胞培养将杂合细胞克隆为单纯的细胞系 (单克隆系)，由此类细胞系可获得结构和特性完全相同的高纯度抗体，即单克隆抗体 (monoclonal antibody, McAb)。这一技术的创立在生物医学领域取得重大突破，两位科学家因而荣获 1984 年诺贝尔生理医学奖。

如今这种细胞融合技术已在动物间实现了小鼠和田鼠，小鼠和小鸡，甚至于小鼠和人等许多远缘和超远缘的体细胞杂交。虽然目前动物的杂交细胞还只停留在分裂传代的水平，不能分化发育成完整的个体，但在理论研究和基因定位上都有重大意义。而植物间的细胞融合所得到的杂交细胞，获得了新的杂交植物，如西红柿与马铃薯细胞融合获得“西红柿马铃薯”，羽衣甘蓝与白菜型油菜细胞融合得到“甘蓝型油菜”等。

(二) 细胞核移植

细胞核移植是将一种动物的细胞核移入同种或异种动物的去核成熟卵细胞内的显微操作技术。由于主要遗传物质存在于细胞核内，因而此技术可获得遗传上具同质性状的动物，对动物优良杂交种的无性繁殖和濒临绝迹的珍贵动物的传种具有重大意义。1952 年，美国科学家布里格斯 (R. Briggs) 首次利用豹纹蛙卵细胞建立了细胞核移植技术。1981 年，瑞士科学家 K. Imensee 率先对哺乳动物小鼠卵细胞进行核移植获得成功。他将灰鼠的细胞核注入到除去了精核和卵核的黑鼠的受精卵内，然后再将这一 f'Fh 黑鼠细胞质和灰鼠细胞核组成的卵细胞体外培养，得到的仔鼠是灰色的，说明仔鼠的性状取决于细胞核的来源。

基于细胞核移植技术上发展起来的动物体细胞克隆技术在 1997 年因克隆羊“多莉” (Dolly) 的诞生而取得了重大突破。英国科学家维尔穆特 (I. Wilmut) 等 1997 年 2 月 27 日在《自然》描述了“多莉”的克隆过程 (图 1-3)。他们取出六龄的芬兰多塞特白绵羊母羊的乳腺细胞

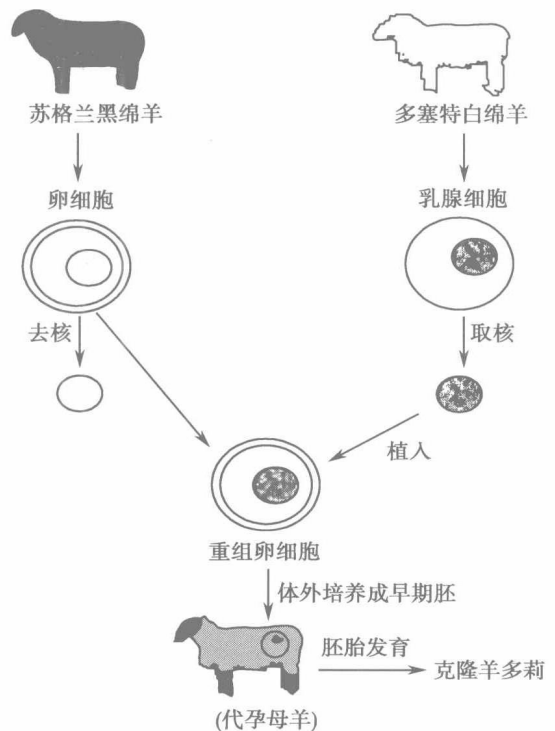


图 1-3 克隆羊“多莉”诞生的过程

核，将此核导入苏格兰黑绵羊去核的卵细胞内，待手术完成之后，以相同频率的电脉冲刺激换核卵，让苏格兰黑绵羊的卵细胞质与芬兰多塞特白绵羊母羊乳腺细胞的核相互协调，使这个“组装”细胞在体外发育成早期胚胎，然后将胚胎植入另一只母羊的子宫内，产下了小绵羊“多莉”。“多莉”不是由母羊的卵细胞和公羊的精细胞受精的产物，而是体细胞核加去核的卵细胞质，不经两性结合诱导出来的胚胎产生的。“克隆羊”的诞生表明：动物体中执行特殊功能、具有特定形态的、高度分化的细胞与受精卵一样具有发育成完整个体的潜在能力。

1998年，日本科学家利用成年动物体细胞克隆的两头牛犊诞生；同年，美国科学家用成年鼠的体细胞成功地培育出了第三代共50多只克隆鼠；1999年，夏威夷大学的科学家利用成年鼠体细胞克隆出第一只雄性老鼠；2000年1月，美国科学家宣布克隆猴成功，这只恒河猴被命名为“泰特拉”；同年3月，曾参与克隆小羊“多莉”的英国PPL公司宣布，他们成功培育出5头克隆猪。2002年，我国科学家成功克隆出牛和山羊，使我国成为少数掌握体细胞克隆哺乳动物关键技术的国家之一。2003年，美国、意大利等国科学家分别培育出世界上第一匹克隆骡子和克隆马。中国和法国科学家合作首次克隆出大鼠。

三、酶 工 程

酶工程（enzyme engineering）就是通过对酶的修饰改造，提高酶的催化效率并在某一生物反应器中大规模生产的技术过程，主要包括酶的发酵生产、酶的分离纯化、酶分子修饰、酶和细胞固定化、酶反应动力学与反应器以及酶的应用等。

酶工程的应用主要集中于食品工业、轻工业以及医药工业中（表1-2）。例如，固定化青霉素酰化酶用于连续裂解青霉素生产； α -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶和葡萄糖异构酶连续作用于淀粉，就可以生产出各类糖浆；利用葡萄糖苷酶可生产出低糖啤酒；蛋白酶用于除去毛皮中的特定蛋白，软化皮革等；加酶洗衣粉、用蛋白酶生产的嫩肉粉等，都是酶工程的产物。此外，酶工程还用于农副产品的加工利用。美国利用大豆生产出200余种产品，包括营养食品、药品、食品添加剂等，例如高纯度大豆卵磷脂、大豆蛋白等。目前工业生产的酶有60余种，其中规模化生产仅20余种。

表 1-2 酶工程在医药领域的主要用途

酶 类	主 要 用 途
青霉素酰化酶	青霉素、头孢霉素生产
羟化酶	氢化可的松生产
酪氨酸酶	多巴（主治帕金森病）生产
蛋白酶类	氨基酸、蛋白水解液生产，治疗消化不良，消肿，降压等
葡萄糖脑苷脂酶	治疗高雪病（葡萄糖脑苷脂沉积病或葡萄糖脑苷脂酶缺乏症）
天冬酰胺酶	治疗白血病
溶菌酶	消炎，镇痛，止血等

续表

酶 类	主 要 用 途
尿激酶	治疗心肌梗死、结膜出血等
超氧化物歧化酶	治疗红斑狼疮、皮肤炎、辐射损伤等
链激酶	治疗血栓性静脉炎、血肿等
其他多种酶	多种疾病诊断（如葡萄糖氧化酶诊断糖尿病，胆碱酯酶诊断肝炎等）
淀粉酶类	处理造纸工业废水
溶菌酶	处理高有机物含量废水
丁酸梭菌酶系	处理酿酒工业废水
其他多种酶	环境监测试剂（如胆碱酯酶监测有机磷农药，硫氰酸酶监测氰化物等）

四、发 酵 工 程

发酵工程（fermentation engineering）是利用微生物的特性，通过现代化工程技术，在反应器中生产目的产物或提供所需服务的技术过程。“发酵”一词来源于拉丁语动词 *fervere*（发泡），意指利用酵母以果汁或麦芽汁为原料生产酒精饮料时出现的现象。传统的发酵技术有悠久的历史，早在几千年前人类就利用有益的微生物生产食品和药物，如酒、醋、酱、奶酪等。现代发酵工程是在传统发酵工艺基础上结合基因工程、细胞工程、酶工程等现代高新技术发展而成，由于其主要以微生物培养为主，因而也称微生物工程。

（一）发酵工程的组成

发酵工程由 3 部分组成：上游工程、发酵过程和下游工程，其中上游工程包括优良菌株的选育、最适发酵条件（pH、温度、溶氧和营养组成）的确定、营养物的准备等。发酵过程主要指在最适发酵条件下，发酵罐中大量培养细胞和生产代谢产物的工艺技术。这里要有严格的无菌生长环境，包括发酵开始前采用高温高压对发酵原料和发酵罐以及各种连接管道进行灭菌的技术，在发酵过程中不断向发酵罐中通入干燥无菌空气的空气过滤技术，在发酵过程中根据细胞生长要求控制加料速度的计算机控制技术，还有种子培养和生产培养的不同的工艺技术。

（二）微生物发酵产品可分为以下几大类

1. 微生物细胞（生物量）作为产品，如单细胞（酵母）蛋白作为食品或饲料。
2. 微生物代谢物产品 目前医用抗生素、农用抗生素等已有近 200 个品种，绝大部分都是发酵产品。此外，发酵产品还包括酒精、氨基酸、柠檬酸和工业用酶等。味精、多种维生素等也是发酵工程的产品。
3. 基因工程产品 微生物（如大肠杆菌、芽胞杆菌、链霉菌和酵母等）是最常用的重组基因的表达系统。主要产品包括干扰素、胰岛素、牛凝乳酶、G-CSF（粒细胞集落刺激因子）、EPO（红细胞生成素）和 t-PA（重组组织型纤溶酶）。

五、蛋白质工程

蛋白质工程就是根据蛋白质的精细结构和生物活力的作用机制之间的关系，利用基

因工程的手段,按照人类自身的需要,定向地改造天然的蛋白质,甚至于创造新的、自然界本不存在的、具有优良特性的蛋白质分子。蛋白质工程在诞生之日起就与基因工程密不可分。基因工程是通过基因操作把外源基因转入适当的生物体内,并在其中进行表达,它的产品还是该基因编码的天然存在的蛋白质。蛋白质工程则更进一步根据分子设计的方案,通过对天然蛋白质的基因进行改造,来实现对其所编码的蛋白质的改造,它的产品已不再是天然的蛋白质,而是经过改造的,具有了人类所需要的优点的蛋白质。天然蛋白质都是通过漫长的进化过程自然选择而来的,而蛋白质工程对天然蛋白质的改造,好比是在实验室里加快了进化过程,期望能更快、更有效地为人类的需要服务。蛋白质工程原理:按期望的结构寻找适当的氨基酸系列,通过计算机设计模拟特定氨基酸系列在细胞内或在体内环境中进行多肽折叠而成为三维结构的过程,并预测蛋白质空间结构和表达出生物学功能的可能及其高低程度。

(一) 蛋白质设计技术与方法

1. 序列最简法 尽量使设计的复杂性最小,一般仅用少数几个氨基酸;设计序列往往具有一定对称性和周期性,并能检测出一些蛋白质折叠规律和方式。

2. 模板组装合成法 将各种二级结构片段通过共价键连接到一个刚性模板上,形成一定三级结构。绕过蛋白质三维结构中氨基酸序列研究蛋白质长程作用力,是研究蛋白质折叠规律和进行全新设计的有效手段。一般从三方面检测蛋白质:是否存在蛋白质多聚状态(圆二色谱、核磁共振)、二级结构是否与预期吻合、是否具有三级结构(荧光、核磁共振)。

(二) 改变现有蛋白质结构

步骤:①分离纯化目标蛋白:分析一级结构,分析三维结构及其与生物学功能的关系,设计蛋白质一级结构引物、克隆目的基因。②根据三维结构及其与生物学功能的关系和蛋白质改造目的设计改造方案,对目的基因进行定向突变(M13、PCR),改造后的基因在宿主细胞表达。③分离表达蛋白分析其功能,评价是否达到预期目的。

蛋白质工程发展与应用举例

(1) 胰蛋白酶: Arg117 位自熔点缺失突变,稳定性提高,将酶分子表面正电荷改变成负电荷,对精氨酸专一性提高。

(2) 金属硫蛋白: α -结构域多聚体串联——转基因植物对重金属抗性加强。

(3) IL-2: 定点突变防止二硫键错配——热稳定性提高。

(4) t-PA: 组织型纤溶酶原激活剂(tissue-type plasminogen activator, t-PA)是一种高效特异的溶血栓药物,被广泛地应用于血管栓塞性疾病的治疗。

(5) 枯草杆菌蛋白酶: 水解酪蛋白产生酪氨酸的反应体系,故有广泛的水解作用,因此,可利用枯草杆菌蛋白酶对大豆分离蛋白进行酶法水解改性,改性后的大豆分离蛋白的功能特性会得到很大的提高,如提高营养,降低致癌因子的可能作用。

(6) 重组人 β 干扰素(IFN β)的人工改造是蛋白质工程的一个成功范例。干扰素(interferon)是人体细胞分泌的一种蛋白质,具有广谱抗病毒、抗肿瘤和免疫调节功能,是人体防御系统的重要组成部分。重组人 IFN β 是采用重组 DNA 技术,克隆人 β 干扰素基因,构建合成干扰素的基因工程菌,经发酵、提纯、纯化制备而成。其基因工程产物活性为 10 万 U/mg,仅是天然 IFN 产物活性的 10%。蛋白质结构分析发现,人