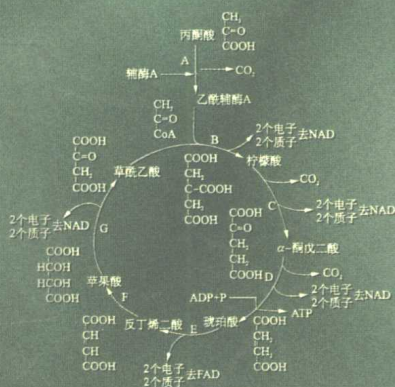


细胞培养与 蛋白质工程

● 范代娣 著



细胞培养与蛋白质工程

范代娣 著

化 学 工 业 出 版 社

现代生物技术与医药科技出版中心

·北 京·

(京)新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

细胞培养与蛋白质工程/范代娣著. —北京: 化学工业出版社, 2000 (2001. 3 重印)
ISBN 7-5025-2950-0

I. 细… II. 范… III. ①细胞培养②蛋白质-生物合成 N. Q753

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2000) 第 65906 号

细胞培养与蛋白质工程

范代娣 著

责任编辑: 王秀鸾

责任校对: 蒋 宇

封面设计: 郑小红

*

化 学 工 业 出 版 社 出版发行
现代生物技术与医药科技出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

发行电话: (010)64918013

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

北京市彩桥印刷厂印刷

三河市延风装订厂装订

开本 850×1168 毫米 1/32 印张 7¼ 字数 195 千字

2000 年 9 月第 1 版 2001 年 3 月北京第 2 次印刷

印 数: 3001—6000

ISBN 7-5025-2950-0/Q · 11

定 价: 20.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

前 言

在当今科技飞速发展的时代，生物工程（技术）业已成为世人关注的高科技领域，日渐深入渗透到人们的思想意识中。它已经是世界各国优先发展的高技术领域，生物技术的革命将改善人们以往的生活惯性，如食物的来源甚至改变人类遗传繁衍后代这种涉及伦理、道德领域的公众问题。

我国在生物工程领域的发展也注入了大量资金，取得了一批具有世界先进水平的突破性科研成果，令人刮目。可以肯定地说，生物工程的发展对具有 12 亿人口的中国这样一个国家的发展变得愈益至关重要。

细胞培养可实现生物质转化或使某些难以用化学手段等无法实现的反应或转化得以实现，每个细胞就像一个微型化工厂，它可以生产我们所需要的产品，可以用于医药领域（如筛选新的药物、进行病理研究等），也可以用于食品、化工等领域，用途甚为广泛。重组蛋白质工程则是基因工程技术在定点诱变技术获得突破后产生的被称为第二代基因工程的技术，由于蛋白质结构的特殊性，重组蛋白质工程为生物新材料、新药物等提供了切实有效的方法和巨大的潜在手段，同时它可广泛用于食品、医学、美容、化妆等行业。鉴此作者在长期的教学、博士论文及科研工作中有所积累，既愿呈献给各界读者，又期望与同行有所交流，更盼从老前辈处多得教益，遂不避个中之嫌，欣然命笔。不尽人意之处，不妥乃至错误之处在所难免，尚祈赐教。

编 者

2000 年 6 月

目 录

第一章 微生物简介	1
参考文献	6
第二章 生物体的化学成分	7
第一节 碳水化合物	8
第二节 脂类	10
第三节 蛋白质	11
第四节 核酸	12
参考文献	14
第三章 微生物代谢	15
第一节 微生物分类	15
1. 细菌	16
2. 放线菌	17
3. 真菌	17
第二节 微生物的代谢	20
1. 酶和能量在微生物代谢中的作用	20
2. 碳代谢	21
第三节 蛋白和脂肪的代谢	28
1. 厌氧呼吸	29
2. 发酵	29
第四节 微生物生长的营养需求	30
1. 碳源	30
2. 氮源	31
3. 无机盐	31
4. 维生素	31
5. 氧气	32
第五节 微生物显微技术	32
第六节 细菌染色技术	33

参考文献	35
第四章 细胞培养过程的动力学	36
第一节 细胞生长分析	36
1. 细胞生长特性	36
2. 细胞生长的测量	36
第二节 细胞培养过程的动力学	39
1. 分批培养过程动力学	40
2. 连续培养过程动力学	53
第三节 其他分批培养操作动力学	64
1. 数个等体积罐	64
2. 单一罐充填分批补料法	64
3. n 个体积递增罐	65
参考文献	66
第五章 酶反应动力学	68
第一节 溶液酶反应动力学	69
1. 酶衰减动力学	70
2. 酶催化的特征动力学	71
3. 溶液酶反应体系工艺设计	88
第二节 固定化酶反应动力学	89
1. 酶的固定化方法	90
2. 固定化对酶体系的影响	91
3. 固定化酶反应动力学的影响分析	93
参考文献	104
第六章 培养介质的灭菌	105
第一节 微生物受热死亡动力学	105
1. 微生物对数死亡定律	106
2. 微生物非对数死亡定律	107
3. 温度对死亡速率的影响	108
第二节 培养基灭菌工程设计	110
1. 间歇灭菌	110
2. 连续灭菌	113
3. 间歇灭菌与连续灭菌比较	116
第三节 气体介质灭菌	116

1. 热杀菌法	117
2. 过滤除菌法	118
3. 深层过滤除菌原理	119
第四节 深层过滤介质的对数截留定律	122
第五节 空气过滤器设计	124
参考文献	125
第七章 发酵放大技术	126
第一节 放大技术概述	126
1. 放大相关的参数及放大准则	126
2. 常规放大进程	127
3. 氧的供给在放大进程中的作用	129
4. 放大技术研究现状	132
第二节 直接从摇瓶到发酵罐放大的方法	139
1. 摇瓶口过滤层氧通透率的确定及非发酵情况下氧传质系数的测定	139
2. 测定氧传递系数 K_La 的重要意义及影响测定氧传递系数值的因素	143
3. 定义几个新概念	144
4. 溶液粘度的测定	145
5. 增粘的亚硫酸钠溶液的配制	146
6. 摇瓶口过滤层氧通透率的测定方法及原理	146
7. 冷模实验所采用的氧传递系数 K_La 的分析方法	148
8. 计算公式	148
9. 实验装置	149
第三节 摇瓶内工艺及工程参数的测定	150
1. 非发酵情况下参数测定	150
2. 实际发酵情况下摇瓶内发酵工艺及工程参数的测定	158
第四节 以摇瓶取得数据为依据进行发酵过程和发酵罐放大	172
1. 尾气处理系统流程框图	172
2. 发酵罐内菌体摄氧率 (OUR)、二氧化碳释放率 (CER)、呼吸商 (RQ)、氧传递系数 (K_La) 及呼吸强度 (Q_{O_2})	172
3. 放大结果对比	174
4. 分析、讨论与比较	183

参考文献	189
第八章 细菌重组及重组细胞培养动力学	191
第一节 细菌重组方法	191
1. 转化重组法	191
2. 双核重组法 (conjugation)	194
3. 转导重组法	197
第二节 基因工程	201
第三节 蛋白质工程	203
1. 转录	204
2. 翻译	206
3. 蛋白质合成酶的控制	208
第四节 重组菌细胞培养动力学	209
1. 重组菌分批培养动力学	210
2. 重组菌连续培养动力学	212
第五节 工程菌不稳定因素分析与相应对策	213
1. 不稳定因素分析	213
2. 提高重组质粒稳定性对策	214
参考文献	217

第一章 微生物简介

早在 1665 年，科学家 Robert Hooke 就出版了他的著作——*Micrographie*，这本书包含了他对化学科学的思想以及显微镜的描述和应用，当然，他不是显微镜的发明者，但他的确对显微镜的发明起了极大的推动作用。

Hooke 的文章激起了欧洲学者认识世界上微观生物和培养物的兴趣。在他的描述中包含着肉眼可见的苍蝇的眼睛、蜜蜂的叮等。其他科学家很快地循着他的方向走下去，例如 Dutch 描述了细小的主体（如血液中的红细胞，动物卵等）。

受 Hooke 的启示，另一个科学家（Swammerdam）表示显微技术是揭开自然秘密的重要工具，因此，在 17 世纪 70 年代，Anton Van Leeuwenhoek 揭示了微生物组织后，科学家真正的兴趣便聚焦在微生物研究领域。

Van Leeuwenhoek 利用业余时间发明了显微技术，当然早期的显微技术是很有限的，但在当时却极有助于科学家们揭示自然界的秘密，在 1673 年，Van 的显微技术可放大 200 倍。

1674 年，Van 用自己发明的显微镜来证明雨水中的微生物以及自己牙齿，脸部的微生物。

1676 年，他将胡椒加入雨水中进行实验观察，结果发现，加入大量胡椒可致微生物全部死亡，未加入者则仍有微生物存活；几天之后，他发现了存有活的微生物的容器内出现了大量培养物，他的发现为人们认识生物的形成打开了新视野。

Van 是一个非常多疑和神秘的人物，他从未和他人共事，也没有给任何人传授怎样制作显微镜，因此在他死后（Van 死于 1723 年，享年 90 岁），对微生物的兴趣一度处于低谷，另一原因也是因为科学家认为微生物仅是自然界的奥秘而已。70 年代，疾病肆虐，但几乎

没人认为病与微生物有关，直到 19 世纪后期，从显微镜的开始发现到它应用于疾病研究，至少相差了 100 年，这不能不说是微生物发展史上的一个遗憾。

18 世纪的微生物是一个没有任何焦点研究方向的时代，基本上是科学家们对动、植物生命的研究。一部分科学家继续致力于显微技术，他们在显微技术方面取得了一定进展，但是，科学家们一般不会相信如此细小的组织会引起感染，相反，他们认为疾病的传染是由于空气中弥漫的某种致病化学物质的缘故。

Francesco Redi 在查阅 Van Leeuwenhoek's 论著过程中，认为苍蝇的繁殖是由于体内有再生组织。他认为苍蝇在肉上产卵，卵长成蛆，而在密封的容器内则不会有此现象，因此认为肉生蛆是苍蝇产卵的结果。

1767 年，科学家 Abbe Lazzaro spallanzani 将肉和蔬菜肉汤经长时间煮沸并密封玻璃容器口，作对比实验，他敞开部分三角瓶口，几天之后，他发现对照组出现了微生物组织，而密封瓶内则无此现象（见图 1-1 和图 1-2）。Spallanzani 的实验并未结束科学界的争论，科学家 Needham 认为，Spallanzani 由于过分加热破坏了生命的动力。其他的科学家则认为空气是生命必需的，密封瓶内不长生物是因为缺



图 1-1 敞开的肉罐上发现了卵



图 1-2 封闭的肉罐没有卵产生

乏空气。当 1774 年发现氧气在微生物生长过程的作用后，Spallanzani 的反对者们认为氧气是生物生长与否的至关重要因素。

争论直至 19 世纪 50 年代 Louis Pasteur 的研究发现方休。

微生物发展史上的黄金段始于 1857 年 Louis Pasteur 的工作，结束于第一次世界大战，在这个时期，建立了众多的分枝学科和工艺原理，从而为现代生物学技术奠定了基础。

1857 年，Pasteur 试图揭示为什么局部酒变酸的秘密，以前的理论认为，酒精发酵是葡萄汁化学降解为乙醇，似乎没有涉及生物，但是，Pasteur 用显微镜观察到大量的细小的酵母细胞，而这些酵母细胞则是被众多科学家忽略的，他相信酵母在发酵过程中起着非常重要的作用。而且，他发现在发酸的酒内含有许多很少看到的、当时只有医生们知道的杆状、棒状的东西（如今知道它们是细菌）。

大量实验之后，Pasteur 归纳出酵母在发酵过程的作用，同时，他建议解决酒精发酸的办法是加热葡萄汁以破坏其中的微生物，然后加入酵母开始发酵。也可在酒变酸前加热。这就是著名的巴斯德法，它解决了一直难以解决的问题。

Pasteur 在微生物领域越来越多的发现，引起了他对疾病与微生物之间的兴趣，他发现微生物大量存在于土壤、水及病死者的血液里。

Pasteur 当时不解的是，空气中充斥着大量病菌，而生病者为何是少数，他用许多三角瓶盛放煮过的肉汤培养液，置这些瓶子于拥挤的城市、乡村、山上，结果发现极少数瓶内被污染。这个实验引来的争议是：因为煮沸使得培养基内缺乏“生命力”。

最后，Pasteur 做了一系列实验，他的实验结束了长达两个世纪之久的争议。19 世纪 50 年代，他准备了一系列三角瓶，如图 1-3 所示。

Pasteur 煮沸培养基，实验如图 1-3，结果发现，S-型瓶口可阻止尘土中的微生物进入瓶内，瓶内不会产生污染现象。他的这个实验真正结束了多数微生物学家认为的所谓“生命力”引起污染的说法。

之后，Pasteur 开始致力于疾病与微生物关系的研究，他虽然未

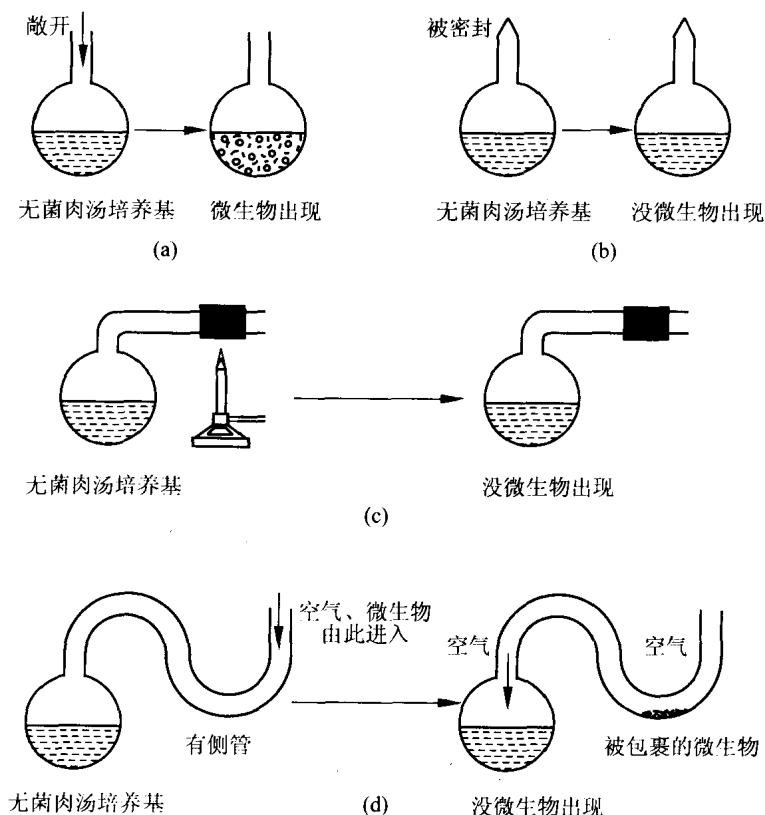


图 1-3 Pasteur 无菌实验示意图

- (a) 敞开三角瓶口，培养基经灭菌后放置，发现有菌体生长；(b) 培养基灭菌后封闭瓶口，瓶内未出现菌体；(c) 培养基灭菌后，用酒精灯烧瓶口，瓶内不出现菌体；(d) 培养基灭菌后，敞开瓶口，瓶内未出现菌体

能就特定组织与特定疾病得出结论，可他的工作为后人提供了很好的研究基础。

Robert Koch 是第一个将疾病与特种微生物组织关联起来的人，他也是纯培养技术的开拓者。

Koch 关联单一疾病与单一微生物的实验方法，见图 1-4 所示。

Cohn 曾邀请 Koch 等一批学者在 Breslau University 作学术报告，会上科学家们肯定了 Koch 的发现，并表示需做纯培养。受感于

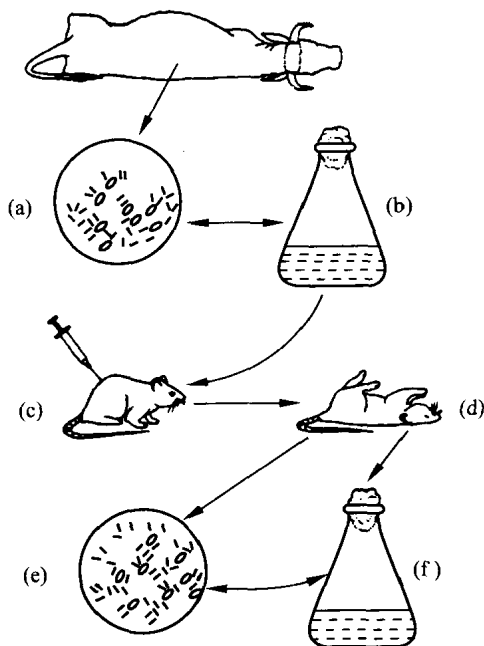


图 1-4 Koch 关联单一疾病与单一微生物的实验方法

(a) Koch 将病死动物组织进行分离培养；(b)、(f) 被分离和生长组织进行纯培养；(c) 将纯培养物接入正常健康动物；(d) 健康动物因接种致死；

(e) 对致死动物组织进行纯培养，发现与接种菌相同菌出现

这次学术研讨会，Koch 回到实验室开发了许多细菌染色技术，1880 年他的培养技术是微生物的发展史上的又一大贡献。

Koch 在一次偶然的机会，观察到一片土豆片污染他称为“克隆”的少量细菌，“克隆”是指含有成千上百万的同一细菌。Koch 得出结论，细菌可以在固体面上生长和繁殖，因此他将培养基固化，然后接种培养，第二天，他发现了表面上的克隆株，这样，纯培养技术形成了。

19 世纪 50 年代，Pasteur 发明了发酵技术，但未能解决纯培养问题，他的同事，好友 Koch 发明了纯培养技术，此时，称为微生物发展史上的黄金阶段。为现代生物技术中的细胞培养及重组技术奠定了坚实的基础。

参 考 文 献

- 1 I.Edward Alcamo.Fundamentals of Microbiology, New York: Benjamin/cummings Publishing Company, 1996
- 2 Jamese.Bailey, David F.Ollis.Biochemical Engineering Fundamentals, Mc Graw-Hill, Inc., 1986
- 3 焦瑞身.今日的微生物学.上海:复旦大学出版社, 1987

第二章 生物体的化学成分

对于大多数人来说“微生物”在人们印象中无非是过期馒头上长的霉菌、伤口感染的细菌，但是真正的微生物学家却要问的是“为什么”它会繁殖，它的结构是“怎么样”的，它由“什么”组成的？对于这些肉眼看不见的微观生命的东西，要搞清楚其原理当然不那么容易。

在远古时代，人们不清楚为什么生物世界千变万化，每一种群之间，即使是同一种群，个体与群体也存在明显的不同。带着这些疑问，生物学家、化学家们把与生物体有关的物质叫“有机质”，反之，则称为“无机质”。

1821年，德国化学家 Friedrich Wohler 取得了一项重大发现，他发现无机物可以转化成有机物，这意味着由无机物合成具有生命的有机质的可能。由此，科学家们意识到生命化学的重要性。

到目前为止，92种化学元素已被发现和定性，但仅有6种元素C、N、S、H、O、P构成细菌干重的99%。表2-1为生物组织的主要化学元素含量统计。表2-2为细胞体的主要化学元素。

表 2-1 生物组织的主要化学元素

元素	氧	碳	氢	氮	钙	磷	钾	硫	氯	钠	镁	铁	锰	铜	碘	钴	锌	硼
符号	O	C	H	N	Ca	P	K	S	Cl	Na	Mg	Fe	Mn	Cu	I	Co	Zn	B
占主体百分比/%	65	18	10	3	2	1	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

表 2-2 细菌体的主要化学元素

元 素	符 号	占主体百分比/%	元 素	符 号	占主体百分比/%
碳	C	12.14	氢	H	9.94
氧	O	73.68	磷	P	0.60
氮	N	3.04	硫	S	0.32

这些元素间以化学共价键、离子键、氢键等结合，构成生物组织的有机质。

生物是由众多的有机物组成的，但归纳起来可以分为四大类具有明显不同组分和特性的有机质。第一类：碳水化合物；第二类：脂类；第三类：蛋白质；第四类：核酸。

第一节 碳水化合物

碳水化合物是由 C、H、O 组成，它在细胞内起着能源的功效。一般来说，碳水化合物常称作糖。碳水化合物细分为单糖、双糖和多糖。葡萄糖、果糖是最常见的单糖，它们的分子式为： $C_6H_{12}O_6$ ，但结构不同，属同分异构体见图 2-1 所示。果糖要比葡萄糖甜的多。

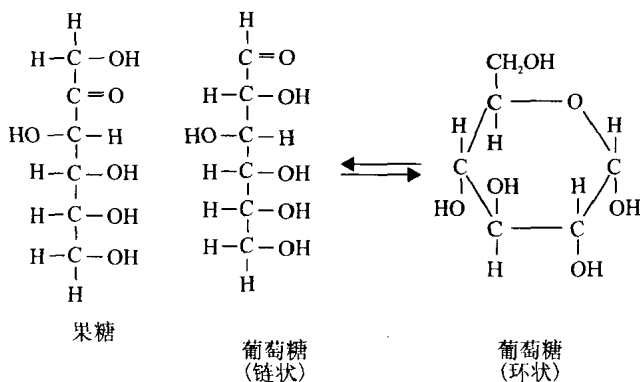
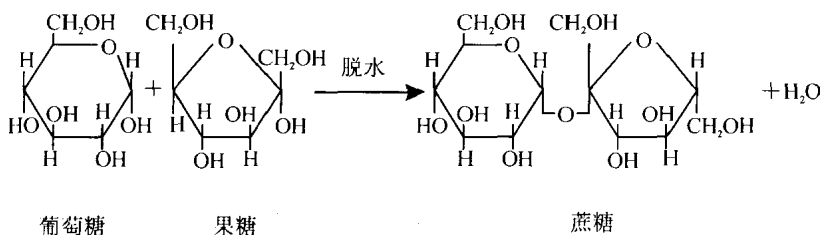
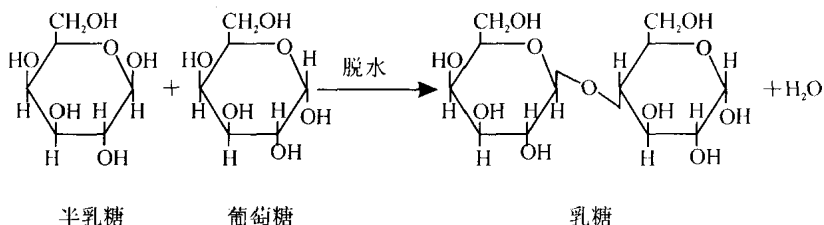
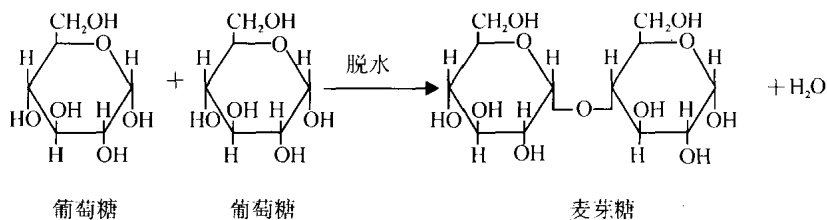


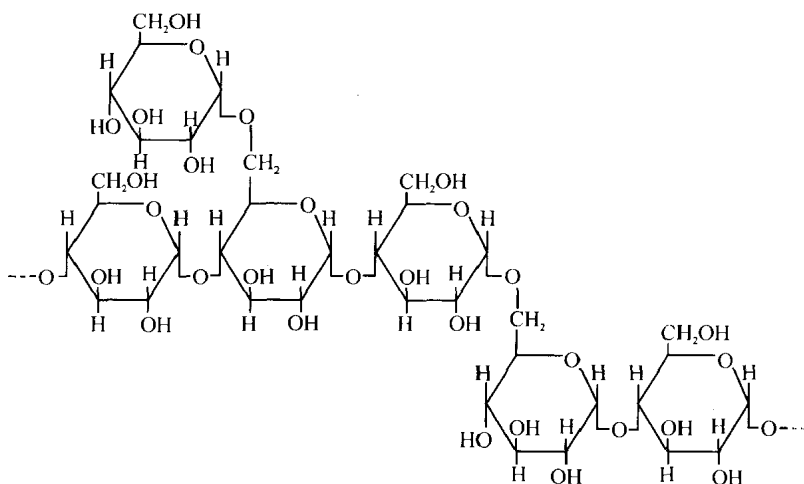
图 2-1 三个重要的单糖的结构式

双糖是两个单糖经脱水反应的生成物，像麦芽糖、乳糖、蔗糖都是最常见的双糖见图 2-2 (a) 所示，麦芽糖广泛用于啤酒酵母发酵制作酒精。多糖结构见图 2-2 (b) 所示。

多糖是复杂的糖类，它可以是数以千计的单糖组成的。淀粉是细菌最常用的能源，纤维素是植物细胞壁及某些霉菌的组成成分。



(a) Disaccharides 双糖



(b) Apolysaccharides 多糖

图 2-2 三个双糖和一个多糖的结构式