



现代生物技术制药丛书

Microbial Biotechnology
for Pharmaceuticals:
Fundamental and Application

制药微生物技术 —— 基础与应用

童望宇 章亭洲 傅向阳 编著



化学工业出版社

现代生物技术与医药科技出版中心

现代生物技术制药丛书

制药微生物技术 ——基础与应用

Microbial Biotechnology for Pharmaceuticals: Fundamental and Application

童望宇 章亭洲 傅向阳 编著



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

制药微生物技术——基础与应用/童望宇, 章亭洲, 傅向阳
编著. —北京: 化学工业出版社, 2005. 7
(现代生物技术制药丛书)
ISBN 7-5025-7386-0

I. 制… II. ①童…②章…③傅… III. 药物-制造-生物技术
IV. TQ46

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 082148 号

现代生物技术制药丛书
制药微生物技术——基础与应用

Microbial Biotechnology for Pharmaceuticals: Fundamental and Application

童望宇 章亭洲 傅向阳 编著

责任编辑: 杨燕玲

文字编辑: 李 瑾

责任校对: 顾淑云 战河红

封面设计: 潘 峰

*

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)

购书咨询: (010) 64982530

(010) 64918013

购书传真: (010) 64982630

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

*

新华书店北京发行所经销

北京市昌平振南印刷厂印刷

三河市东柳装订厂装订

开本 787mm×1092mm 1/16 印张 21½ 字数 522 千字

2006 年 1 月第 1 版 2006 年 1 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-7386-0

定 价: 49.00 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

就科技层面的定义而言,生物技术可分为广义生物技术和狭义生物技术。广义的生物技术是综合微生物学、动物学、植物学、细胞学、化学、物理学乃至工程学等科学而成的技术学科,指利用生物(包括酶)生产对人类有益产品的技术与工业化过程。而狭义的生物技术,是指新发展的关键技术,如遗传工程技术、蛋白质工程技术及细胞融合瘤等技术。总之,通常所指的生物技术是利用生物程序、生物细胞或其代谢物质来制造产品及改进人类生活质量的科学技术。

微生物是地球上生物中最具多样性和最具适应能力的生物形式,业已存在 35 亿多年。就总体而言,微生物具有 5 个显著特征:①体积小、比表面积大;②吸收多、转化快;③生长旺、繁殖快;④变异频、适应强;⑤分布广、种类多。正如 Perlman D 博士所说:“如果我们将微生物当作我们的朋友,微生物将关心我们的未来,并将使我们永远幸福的生活。”微生物与生物技术的结合所形成的微生物技术是生物技术的核心,它与人类的生存密切相关。

药品是保证人类健康的坚强后盾,制药技术是影响各国国民经济的关键技术。微生物制药现已越来越成为制药工业中的重要组成部分。

制药微生物技术是在微生物生物技术基础上发展而成的一门新学科,内容包涵生物上、中、下游技术及生产规范与质量管理的各个方面,涉及微生物技术领域的多项前沿技术和平台技术,也包括药物筛选、药物分子设计、药物新剂型、给药系统、药物安全及药效评价体系等。微生物技术与制药技术结合而形成的制药微生物技术将在未来的制药工业中为其发展起重要作用。

本书分 2 篇,共 10 章,按照“制药微生物生物技术—微生物制药”的内容结构进行编写。制药微生物生物技术分 4 章,介绍了有关上游、中游、下游生物技术及药物生产规范与质量控制;微生物制药按照药物类型分 6 章,介绍了初级代谢产物、抗生素、甾体药物的微生物转化、蛋白质药物、新型疫苗与反义核酸药物等方面的内容。

由于作者水平有限,书中存在不足之处在所难免,敬请读者不吝指教,以便进一步完善与提高。本书可作为生物技术制药相关专业研究生、高年级本科生及科研人员的教学及参考书。

感谢本书编辑工作参与者的辛勤付出以及本书编著过程中给予支持和帮助的家人和各位朋友;在编写过程中陈鲲、徐正军、和付林、朱一七、张懿旻、李景超、童斐蜚、丁良霜等为书稿的文字和图片编辑做了大量的工作,在此特别感谢!

谨以本书献给我善良、正直、勤劳而可亲的父母!

童望宇

2005 年 6 月

于华东理工大学

目 录

第 1 篇 制药微生物生物技术

第 1 章 微生物制药上游技术	3
1.1 基因重组技术/现代 DNA 技术	3
1.1.1 第一代基因工程——基因克隆与蛋白质表达	3
1.1.2 第二代基因工程——蛋白质工程	5
1.1.3 第三代基因工程——代谢/途径工程	6
1.1.4 基因打靶技术的发展简史及其应用前景	10
1.1.5 酵母双杂交系统	11
1.1.6 噬菌体展示系统	13
1.2 重组基因药物的构建	15
1.2.1 目的基因的分离、纯化和鉴定	15
1.2.2 基因克隆和表达的基本步骤	16
1.2.3 大肠杆菌中目标产物高效表达的方法	22
1.2.4 非大肠杆菌基因工程系统	25
1.3 基于 DNA 技术的药物开发新进展	34
1.3.1 新药研发的三种途径	35
1.3.2 新药研发的进展	35
参考文献	36
第 2 章 微生物制药的中游技术	37
2.1 微生物细胞的调节机制	37
2.1.1 概述	37
2.1.2 酶活力的调控	38
2.1.3 酶合成的调控	42
2.1.4 渗透性调控	46
2.1.5 能荷调节	47
2.1.6 信号转导和双组分调控系统	47
2.1.7 全局控制	48
2.1.8 代谢控制发酵的基本思想	48
2.1.9 微生物代谢控制发酵的措施	49
2.2 微生物生长与控制	50
2.2.1 微生物生长与环境	50
2.2.2 微生物的生长控制	60
2.3 微生物发酵	63
2.3.1 发酵技术原理	63

2.3.2 发酵技术方法	68
参考文献	83
第3章 微生物制药下游技术	85
3.1 引言	85
3.1.1 生物下游技术的特点	85
3.1.2 生物下游技术的一般流程和单元操作	86
3.1.3 生物技术下游加工过程的发展趋向	92
3.2 微生物破壁	92
3.2.1 机械方法	92
3.2.2 非机械方法	94
3.3 沉淀法	96
3.3.1 盐析法	97
3.3.2 等电点沉淀法	100
3.3.3 有机溶剂沉淀法	100
3.3.4 非离子型聚合物沉淀法	102
3.3.5 聚电解质沉淀法	102
3.3.6 金属离子沉淀法	102
3.4 吸附法	103
3.4.1 概述	103
3.4.2 吸附过程的理论基础	104
3.5 溶剂萃取	109
3.5.1 分配定律	110
3.5.2 溶剂的选择	111
3.5.3 水相条件的影响	111
3.6 两水相萃取法	113
3.6.1 两水相的形成	113
3.6.2 相图	113
3.6.3 影响分配的参数	114
3.6.4 双水相与集成化	117
3.7 膜分离	119
3.7.1 膜的分类和定义	119
3.7.2 分离机理	120
3.7.3 表征膜性能的参数	123
3.7.4 传递理论	126
3.7.5 影响超滤速度的各种因素	128
3.7.6 膜的污染	129
3.8 色谱的基本原理和参数	130
3.8.1 保留值	131
3.8.2 柱效率	134
3.8.3 分离效能总指标和分离度	136

3.8.4	谱带扩张	137
3.8.5	渗透性	141
3.9	离子交换色谱	142
3.9.1	引言	142
3.9.2	离子交换机理	142
3.9.3	离子交换理论	143
3.9.4	离子交换剂	143
3.9.5	影响离子交换的主要因素	144
3.9.6	离子交换色谱中蛋白质的保留模型	147
3.9.7	蛋白质柱上复性	149
3.10	扩张床吸附分离	149
3.10.1	扩张床吸附原理	149
3.10.2	扩张床吸附剂	150
3.10.3	扩张床的操作	150
3.10.4	扩张床集成化	154
3.11	凝胶色谱	154
3.11.1	凝胶色谱机理	154
3.11.2	凝胶色谱理论	154
3.11.3	凝胶类型	156
3.11.4	影响凝胶过滤的主要因素	156
3.11.5	凝胶分离的理论板模型	158
3.11.6	凝胶过滤的集成化	159
3.12	亲和色谱	160
3.12.1	亲和色谱的概念及其理论模型	160
3.12.2	亲和色谱的填料	164
3.12.3	亲和色谱工艺	166
3.13	疏水作用色谱	169
3.13.1	疏水作用原理	169
3.13.2	疏水填料	170
3.13.3	影响疏水作用的参数	171
3.13.4	疏水作用色谱与反相色谱的区别	174
3.14	结晶法	177
3.14.1	结晶过程的基本原理	177
3.14.2	结晶过程	178
3.14.3	提高晶体质量的途径	182
	参考文献	185
第4章	基因工程药物生产规范与质量控制	187
4.1	概述	187
4.1.1	GMP 概念	187
4.1.2	基因工程原理	187

4.2 基因工程药物的生产质量管理规范	187
4.2.1 基因工程药物生产质量管理的特殊性和重要性	187
4.2.2 基因工程药物的生产质量管理规范	188
4.3 基因工程药物的质量控制	192
4.3.1 基因工程药物生产过程的质量验证	192
4.3.2 基因工程药物成品的质量控制	193
4.3.3 基因工程药物的外来污染及其有关物质的控制	194
4.3.4 质量标准与实验方法	195
4.3.5 产品的稳定性	195
4.3.6 临床前生物学试验	195
4.3.7 基因工程药物质量控制的展望	196
4.4 基因工程药物的申报与审批程序	196
参考文献	205

第2篇 微生物制药

第5章 初级代谢产物	209
5.1 氨基酸生产	209
5.1.1 概况	209
5.1.2 氨基酸发酵的代谢控制	210
5.1.3 氨基酸发酵的工艺控制	213
5.1.4 谷氨酸生产工艺	216
5.1.5 现代生物技术对氨基酸工业的影响	218
5.2 核酸、核苷酸和核苷	219
5.2.1 概述	219
5.2.2 肌苷酸	226
5.2.3 辅酶 A	227
参考文献	229
第6章 抗生素生产工艺	230
6.1 导言	230
6.1.1 抗生素发展	230
6.1.2 抗生素的分类	231
6.1.3 抗生素的应用	233
6.1.4 抗生素的抗菌性能	233
6.2 抗生素生产的工艺过程	234
6.2.1 菌种	234
6.2.2 孢子制备	234
6.2.3 种子制备	234
6.2.4 培养基的配制	235
6.2.5 发酵	235
6.2.6 发酵液的过滤和预处理	236

6.2.7 抗生素的提取	237
6.2.8 抗生素的精制	237
6.3 抗生素生产实例	238
6.3.1 菌种	238
6.3.2 发酵工艺	238
6.3.3 培养基	239
6.3.4 发酵培养控制	239
6.3.5 过滤	239
6.3.6 提炼	240
6.3.7 脱色	240
6.3.8 共沸蒸馏或直接结晶	240
6.4 半合成抗生素	240
参考文献	241
第7章 甾体药物的微生物转化	243
7.1 概述	243
7.1.1 甾体化合物	243
7.1.2 天然甾体皂苷	244
7.1.3 皂苷的提取分离	244
7.1.4 甾体皂苷结构研究	245
7.2 甾体化合物微生物转化反应类型	245
7.2.1 羟基化	246
7.2.2 A 环上 C ₁ 及 C ₂ 脱氢	247
7.2.3 甾醇侧链的降解	247
7.3 甾体生物转化机理	248
7.3.1 羟化反应机理	249
7.3.2 脱氢反应机理	251
7.3.3 异构化	251
7.4 甾体化合物微生物转化的特点	251
7.5 微生物转化工艺	252
7.5.1 生产工艺过程	252
7.5.2 甾体药物的几种转化方法	253
7.5.3 改进转化工艺的途径	255
7.5.4 转化工艺实例	257
7.6 甾体激素类药物的分析	259
7.6.1 甾体结构与分类	259
7.6.2 鉴定分析	260
7.6.3 定量测定	262
7.6.4 特殊杂质检查	264
参考文献	265
第8章 蛋白质药物	266

8.1 生长因子	266
8.1.1 生长因子(激素)概述	266
8.1.2 人表皮生长因子	267
8.2 基因工程溶栓药物	273
8.2.1 血栓形成和溶栓原理	273
8.2.2 组织纤溶酶原激活剂	275
参考文献	279
第9章 新型疫苗制备	280
9.1 疫苗制备基本原理	280
9.1.1 免疫学基本概念	280
9.1.2 机体的免疫系统	280
9.1.3 免疫应答	285
9.1.4 病态免疫	286
9.1.5 抗感染免疫与疫苗免疫保护	286
9.2 疫苗生产的基本技术	287
9.2.1 细菌培养的基本技术	287
9.2.2 病毒培养的基本技术	288
9.2.3 支原体的培养技术	289
9.2.4 免疫血清的制备技术	291
9.2.5 灭活剂与稳定剂的选择方法	291
9.2.6 佐剂的种类与选择	292
9.2.7 实验动物的种类、选择与管理	294
9.2.8 疫苗生产的主要设备与质量要求	298
9.2.9 质量要求与管理	299
9.3 基因工程技术与现代疫苗制备	299
9.3.1 基因工程病毒与细菌疫苗的制备	299
9.3.2 基因工程寄生虫疫苗的制备	302
9.4 现代分子生物学在疫苗研究上的应用——核酸疫苗	303
9.4.1 概述	303
9.4.2 核酸疫苗的构建与免疫流程	304
9.4.3 影响核酸疫苗诱发机体免疫应答的因素	305
9.4.4 核酸疫苗的质量监控与安全性评价	306
9.4.5 核酸疫苗的应用	307
9.4.6 结语	310
9.5 治疗性疫苗	310
9.5.1 治疗性疫苗发展的基础	310
9.5.2 治疗性疫苗的特点	310
9.5.3 治疗性疫苗的种类	311
9.5.4 治疗性疫苗的开发现状	311
9.5.5 我国治疗性疫苗开发战略	311

9.6 疫苗研究发展展望	313
参考文献	313
第10章 反义核酸药物	314
10.1 反义核酸概述	314
10.1.1 反义技术发展史	315
10.1.2 反义技术的应用	316
10.1.3 问题与展望	317
10.2 反义核酸作用原理	318
10.2.1 反义核酸的作用靶点	318
10.2.2 反义核酸的作用机制	319
10.2.3 反义基因药物运输系统	320
10.3 反义核酸药物的研究	321
10.3.1 反义核酸药物的特点	321
10.3.2 反义药物的体内稳定性和副作用	321
10.3.3 反义核酸类药物必须符合的条件	322
10.3.4 反义核酸药物的设计	323
10.3.5 反义核酸药物的给药途径	324
10.3.6 反义核酸药物的临床应用	324
10.4 反义药物的开发	324
10.4.1 一种治疗癌症的混合反义核酸的生产	324
10.4.2 产业化制备	325
参考文献	326
索引	327



制药微生物生物技术

第 1 章 微生物制药上游技术

第 2 章 微生物制药的中游技术

第 3 章 微生物制药下游技术

第 4 章 基因工程药物生产规范与质量控制

生物技术应用的一个重要领域就是生物医药，尤其是现代基因工程药物。基因工程药物的研制与开发一般分为 5 个阶段：①制备基因工程菌株（或细胞）及实验室小试阶段，主要涉及重组 DNA 技术，即生物的上游技术和中游的实验室发酵工艺；②中试与质量鉴定阶段，主要涉及中游发酵工艺的放大及下游基因工程产物的分离、纯化；③临床前研究阶段；④临床试验阶段；⑤试生产阶段。

根据 Glazer 和 Nikaido 的观点，微生物生物技术（microbial biotechnology）是一个多学科的融合概念和技术，实际上，它几乎包涵遗传工程的所有技术。微生物生物技术可分为两个时期，1981 年前的重组 DNA 技术时期和 1981 年后至现在的后重组 DNA 技术时期。

制药微生物技术是在微生物生物技术基础上发展而成的一门新学科，内容包涵生物上、中、下游技术及生产规范与质量管理的各个方面。涉及微生物技术领域的多项前沿技术和平台技术，也包括药物筛选、药物分子设计、药物新剂型、给药系统、药物安全及药效评价体系等。需要指出的是，微生物药物除蛋白质等工程药物外，其他各种生物药物大多也是通过微生物酶（蛋白质）系统催化产生，故本章重点介绍蛋白质基因工程。

第 1 章 微生物制药上游技术

1.1 基因重组技术/现代 DNA 技术

完全按照人类意愿，重新构建或组装所需基因到生物中，产生人类所需要的生物特性与生物产品的技术被称为“基因工程”。

随着 DNA 分子结构和遗传机制这一奥秘的揭示——特别是当人们了解到遗传密码通过信使 RNA 转录表达和翻译成蛋白质以后，生物学家不再仅仅满足于探索揭示生命的奥秘，而是大胆设想在分子水平上去控制生命。曾有一个神奇的构思：假如将一种生物 DNA 中的某个遗传密码片段连接到另外一种生物的 DNA 链上，将 DNA 重新组织，不就可以按照人类的愿望，设计出新的遗传物质并创造出新的生物类型吗？这个目标正在众多科研人员的实践中。

1.1.1 第一代基因工程——基因克隆与蛋白质表达

第一个把上述大胆、神奇的设想变为现实的是美国人科恩。1973 年，科恩将两种不同的基因拼接在一个质粒中，从而拉开了基因工程时代的序幕。科恩本人也以重组 DNA 技术发明人的身份向美国专利局申报了世界上第一个基因工程的技术专利。1973 年，身为美国斯坦福大学教授的科恩，从大肠杆菌里取出了两种不同的质粒，它们各自具有一个抗药的基因，分别对抗不同的药物。科恩把两种质粒上不同的抗药基因“裁剪”下来，再把这两种基因“拼接”在同一个质粒中。当这种杂合质粒进入大肠杆菌后，这些大肠杆菌就能抵抗两种药物，而且这种大肠杆菌的后代都具备双重抗药性。在随后短短的几年内，世界上许多国家的上百个实验室相继开展了基因工程的研究。

基因工程中所使用的方法由基础分子遗传学概念和经典微生物遗传学技术发展而来。基因工程一般分为 4 个步骤：一是取得符合人们所需的 DNA 片段，这种 DNA 片段被称为“目的基因”；二是将目的基因与质粒或病毒 DNA 连接成重组 DNA；三是把重组 DNA 引入

当代生物制药的重点是基因工程药物，基因工程药物多属真核生物的蛋白质（酶）或活性多肽因子，为使重组蛋白质能得到正确、大量的表达，必须解决好如下问题：①选择合适的宿主细胞；②选择和构建启动子；③优化翻译起始区；④优化 mRNA 二级结构；⑤使用宿主偏爱的密码子；⑥提高质粒拷贝数；⑦利用强转录终止子；⑧增加质粒稳定性等。随着基因工程上游技术的逐步成熟，以上这些问题正逐步得到解决。上游构建工作现已实现了产业化。

The diagram illustrates various molecular biology processes centered around a DNA double helix. At the top, a DNA sequence is shown as **ATGC CA...** with the label **测序** (Sequencing). The central DNA helix is involved in several pathways:

- Top Pathway:**
 - 合成DNA** (DNA Synthesis): Indicated by an arrow pointing to the DNA helix, with nucleotide bases **A G V C C T** and **C G > C T** shown.
 - 限制性酶消化** (Restriction Enzyme Digestion): An arrow points to a linear DNA fragment with a black segment, labeled **克隆** (Cloning).
- Left Pathway:**
 - 染色体** (Chromosome) and **质粒** (Plasmid) are shown. An arrow labeled **接合** (Conjugation) points from the plasmid to a bacterial cell.
 - 转导** (Transduction): An arrow points from the DNA helix to a bacterial cell.
 - 溶原化** (Lysogenization): An arrow points from the bacterial cell to a prophage integrated into the chromosome.
- Right Pathway:**
 - 复制** (Replication): An arrow points from the DNA helix to two new DNA helices.
 - 转化** (Transformation): An arrow points from the DNA helix to a bacterial cell taking up DNA.
 - 复制** (Replication): A long arrow points from the bacterial cell back to the DNA helix.
- Bottom Pathway:**
 - 调控** (Regulation): A vertical arrow from the DNA helix is flanked by **起始** (Initiation) and **关闭** (Termination) dots.
 - 转录** (Transcription): An arrow points down to an **RNA** sequence: **GCACGGAUGCUUA**.
 - 密码子** (Codons): A bracket groups the RNA sequence into codons: **GCA**, **CGG**, **AUG**, **CUU**.
 - 翻译** (Translation): An arrow points down to a **蛋白质** (Protein) sequence: **Ala | Arg | Cys | Leu**.
 - 反转录** (Reverse Transcription): An arrow points from the RNA sequence to a **DNA** sequence: **CGTGCTACGAAAT**.

图 1-1 基因工程基本过程的要点如下。

- 4

⑥ 转化。研究将游离 DNA 转入受体细胞的方法。

⑦ RNA 化学和酶学。了解如何对 mRNA 进行操作，真核生物 mRNA 的结构以及 RNA 加工修饰对真核生物成熟 mRNA 形成的重要作用。

⑧ 反转录。了解在反转录病毒中发现反转录酶的作用及意义和将遗传信息由 mRNA 传递至 DNA 的原理和方法。

⑨ 调控。了解转录调控中的诸多因素，包括发现了启动子位点及操纵子调控等。

⑩ 翻译。了解翻译的操作过程和步骤，mRNA 上核糖体结合位点的重要作用，起始密码子的作用以及正确的读码框架的重要性。

⑪ 蛋白质化学。研究对蛋白质进行分离、纯化、鉴定以及测序的方法。

⑫ 蛋白质翻译后修饰及分泌。了解分泌蛋白与信号肽的关系以及信号肽在分泌中或分泌后会被切除的机理。研究对蛋白质的翻译后修饰。

⑬ 遗传密码。了解遗传密码的特性，明确其在几乎所有生物体中的通用性和线粒体中的特殊性差异。

1.1.2 第二代基因工程——蛋白质工程

蛋白质工程/定点诱变是以蛋白质结构与功能的关系为基础，通过周密的分子设计，把蛋白质改造为合乎人类需要的新型蛋白质。1983 年，美国生物学家额尔默首先提出了“蛋白质工程”的概念。其内容主要有两个方面：①根据需要合成具有特定氨基酸序列和空间结构的蛋白质；②确定蛋白质化学组成、空间结构与生物功能之间的关系。在此基础之上，实现从氨基酸序列预测蛋白质的空间结构和生物功能，设计合成具有特定生物功能的全新的蛋白质，这也是蛋白质工程最根本的目标之一。蛋白质工程的实践依据是 DNA 指导合成蛋白质，因此，人们可以根据需要对负责编码某种蛋白质的基因进行重新设计，使合成出来的蛋白质的结构变得符合人们的要求。由于蛋白质工程是在基因工程的基础上发展起来的，在技术方面有诸多同基因工程技术相似的地方，因此蛋白质工程也被称为第二代基因工程。

蛋白质工程第一个十分成功的范例是胰岛素的人工合成。1965 年，中国科学院和北京大学生物系联手在世界上首次人工合成了牛胰岛素，成为轰动世界的大事。

定点诱变 (site-directed mutagenesis, site-specific mutagenesis) 一直是人们向往的目标。过去都是对一个群体进行诱变，随后通过对某些表型特征进行筛选，这样引起的突变是随机的，筛选的工作量非常大。但随着重组 DNA 技术、DNA 测序技术以及寡核苷酸的快速合成技术的出现，在一个插入了外源 DNA 片段的质粒上，对该 DNA 片段在预定位置上进行结构的改变已经实现，应用也日益广泛。例如人干扰素 β 有三个 Cys，分别位于 17、31、141 位置。天然的人体产生的 IFN- β 中 Cys17 受糖基化保护，31 位与 141 位两个 Cys 形成正常的二硫键。在工程菌中，常用大肠杆菌为宿主，但大肠杆菌无法进行糖基化，就会使链内的 Cys17 与 Cys31 或 Cys141 形成二硫键，甚至与别的肽链上的 Cys 连接，其结果是产物活力下降，并且不稳定，因而有人将 Cys17 的密码子 TGT 定向诱变成 AGT (Ser)。突变后菌株产生的 IFN- β 活力由 3×10^7 U/mg 提高到 2×10^8 U/mg，而且稳定性大大提高。图 1-2 所示为基本过程。

定点诱变技术的成功，人们将可更自如地改造蛋白质、改造生物。有人设想通过蛋白质工程，有可能获得更加耐热、耐酸或耐碱、酶活更高、专一性更强和空间结构更加稳定的酶，有可能研制出新一代的疫苗。有可能改变品种，如蚕丝基因经过改造，也许能产生出强度更高的纤维等。由于蛋白质工程可以使人们按照自己的意愿通过改造基因获得蛋白质，其

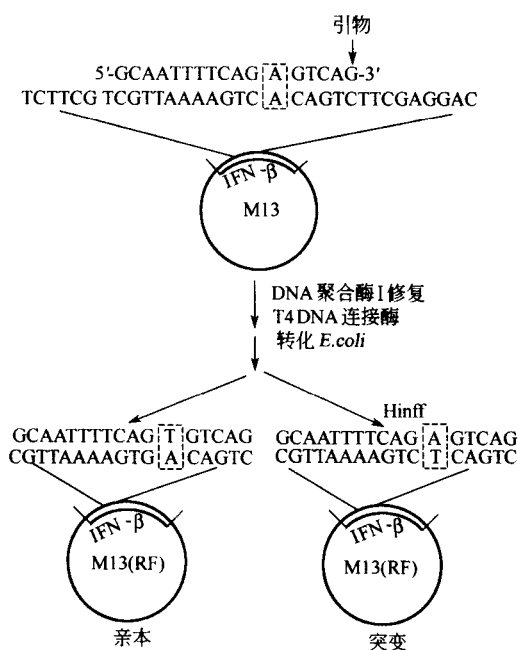


图 1-2 IFN-β 定点诱变的基本过程示意

发展前景非常广阔。

1.1.3 第三代基因工程——代谢/途径工程

代谢工程又称途径工程 (metabolic engineering/pathway engineering) 是由美国加州理工学院化学工程系教授 Bailey 于 1991 年首先提出的。代谢工程是一门利用重组 DNA 技术对细胞物质代谢、能量代谢及调控网络信号进行修饰与改造, 进而优化细胞生理代谢、提高或修饰目标代谢产物以及合成全新的目标产物的新学科。代谢工程所采用的概念来自反应工程和用于生化反应途径分析的热力学。它强调整体的代谢途径而不是个别的酶反应。

1.1.3.1 代谢工程常用名词术语

① 结构性代谢工程 (constructive metabolic engineering)。即经典代谢工程, 主要是指在现有关于代谢知识认识的基础上, 对代谢途径中的某个或几个关键基因进行操作。

② 逆代谢工程 (inverse metabolic engineering)。将明确所需要的生物表型为改造生物的出发点, 然后根据反向遗传策略, 指定或推定其基因, 再利用有关基因在目标生物中表达来实现预定目标。

③ 途径 (pathway)。指催化总的代谢物的转化, 信息传递和其他细胞功能的酶反应的集合。

④ 通量/物流 (flux)。指物质和信息通过途径被加工的速率, 它与个别反应速率不同。

⑤ 代谢网络 (metabolic network)。由分解与组成代谢途径以及膜运输系统有机组成的, 包括物质与能量代谢。其组成取决于微生物的遗传性能和细胞的生理状况及其所处环境。

⑥ 载流途径。指碳流在代谢网络中通过的主要途径, 生产所需产物期间让碳流相对集中流向产物合成的途径。

⑦ 节点 (node)。指代谢网络中存在的分支之处。在不同条件下, 代谢流分布变化较大的节点称为主节点。节点分为柔性、半刚性、刚性。

⑧ 柔性节点 (flexible node)。指流量分配容易改变并满足代谢需求的一类节点。

⑨ 刚性节点 (rigid node)。指流量分配受严格控制的节点。

⑩ 弱刚性节点 (weakly rigid node)。指介于柔性节点与刚性节点之间的节点。

⑪ 代谢物流分析 (metabolic flux analysis)。一种计算流经各种途径的物流方法, 用于描述不同途径的相互作用和围绕支点的物流分布。

⑫ 弹性系数 (elasticity coefficient)。表示酶催化反应速率对代谢物浓度的敏感性。弹性系数是个别酶的特性。

⑬ 物流分担比 (flux split ratio)。指途径 A 与途径 B 之比。如在 6-磷酸葡萄糖节点上的物流分担比便是 EMP 途径物流 / pp 途径物流。