

食品生物技术作业

计科 221 董自经 19222126

第一章 绪论

1. 阐述生物技术的构成、传统生物技术和现代生物技术的区别

生物技术包括：生物技术与人类健康、生物技术与农林业、生物技术与食品化工、生物技术与能源、材料、生物技术与海洋、生物技术与航空航天、生物技术与环保及军事

生物技术的构成：基因工程、细胞工程、发酵工程、酶工程、蛋白质工程

传统生物技术：以酿造技术和发酵技术为主。是指旧有的制酱、醋、酒、奶酪、酸奶及有机酸的传统工艺

现代生物技术：以重组 DNA 技术为核心。包括基因工程，发酵工程，细胞工程，酶工程和蛋白质工程

2. 食品生物技术的概念和分类地位

食品生物技术是生物技术的一个分支学科。是生物技术在食品原料生产、加工和制造中的应用的一个学科

食品生物技术包括了食品发酵和酿造等古老的生物技术加工过程，也包括了应用现代生物技术来改良食品的原料及其加工品质的基因工程、酶工程、细胞工程和蛋白质工程等

生物技术已经被世界各国视为增强国力和经济实力的关键性技术之一；对于解决人类所面临的食品短缺、健康问题、资源问题、环境问题、经济问题和人类可持续发展等问题是至关重要的

第二章 基因工程

1. 什么是基因工程？基因工程中有哪些主要的工具酶？

基因工程是指运用限制性内切核酸酶、连接酶等酶类，将不同 DNA 进行体外切割、连接构成重组 DNA，再将重组 DNA 引入受体细胞进行表达，从而改变生物遗传性以创造生物新种质，或通过大量扩增为人类提供有用产品等的技术

限制性核酸内切酶	→	切割 DNA
DNA 连接酶	→	生成 3'-5'磷酸二酯键
DNA 聚合酶 I	→	探针标记、补平 3'末端
反转录酶	→	cDNA 合成
多聚核苷酸激酶	→	5'磷酸化、探针标记
末端转移酶	→	3'末端多聚尾
碱性磷酸酶	→	切除末端磷酸基

2. 基因工程载体有哪些基本要求？例举一些主要的载体及主要特征

复制起始点：载体需要有一个有效的复制起始点，以便在宿主细胞中实现自我复制。

抗性筛选标记：载体通常带有选择性标记基因（如抗生素抗性基因），以便在转化后筛选出成功整合目标基因的宿主细胞。

克隆位点：载体应含有多个限制性酶切位点，以便可以方便地插入目标 DNA 序列。

表达调控元件：如果目标是表达一个基因，则载体需要包含能够启动转录的启动子，可能还需要增强子和终止子等调控元件。

可以在宿主细胞内复制：载体需要根据目标宿主（如大肠杆菌、酵母、植物或动物细胞）

进行优化，以确保在该宿主中能够有效表达或复制。

小型化：载体应尽可能小，以降低插入 DNA 的复杂性和提高转化效率。

稳定性：载体在宿主细胞中应具备良好的稳定性，能够在分裂过程中持续存在，且不易丢失。

(1) 大肠杆菌载体

1) 质粒载体→细菌质粒

2) λ 噬菌体载体

①插入型载体 (Insertion vector) 是指在基因组内有一种或不止一种限制酶的单一酶切位点可供外源 DNA 插入，可容纳的外源 DNA 片段相对较小，一般在 10 kb 以内，应用于 cDNA 以及小片段 DNA 的克隆

② 置换型 (取代型) 载体 (Replacement vector) 是指在基因组内两个的限制酶切位点间的 DNA 区段可被插入的外源 DNA 片段取代，容纳外源 DNA 片段大小的范围一般在 9-22 kb 之间

③ M13 是丝状噬菌体：同质粒 DNA 一样进行提取和体外操作；M13 DNA 均能感染宿主细胞；由于 M13 是丝状噬菌体，因此根据重组 DNA 的长度，被包装成的噬菌体颗粒可大可小

(2) 酵母载体：现已构建了许多质粒载体，用于将外源基因导入酵母细胞；单一的位点可供外源 DNA 的插入，成对的位点可供外源 DNA 的置换

1) 整合型载体

该类载体由大肠杆菌质粒和酵母 DNA 片段 (提供了选择标记) 构成，不含有自主复制起始区，在酵母细胞中不能自主复制

载体 DNA 被整合到酵母染色体 DNA 上，并随酵母染色体 DNA 一起遗传，对酵母的转化率低 (1-10 个转化子/ μg DNA)，拷贝数也低，转化子稳定性较高。

2) 复制型载体

将酵母 DNA 片段插入到大肠杆菌质粒中构成的，酵母 DNA 片段提供了选择标记，携带自主复制基因，该类载体同时含有大肠杆菌和酵母的自主复制基因，能在这两种细胞 (细菌和酵母) 中存在和复制

该类载体属于穿梭载体 (Shuttle vector)：是指可在两种截然不同的生物细胞中复制的载体，对酵母的转化率很高 (102~103 转化子/ μg DNA)，拷贝数也较高，转化子稳定性较低

3) 附加体型载体

由大肠杆菌质粒、2 μm 酵母质粒及酵母染色体的选择标记组成，对酵母的转化率极高 (103-105 转化子/ μg DNA)，拷贝数也很高 (25-100 分子/细胞)，也较稳定；2 μm 质粒是酵母中的一个能独立复制的双链 DNA 内源质粒

3. 阐述 PCR 技术原理和核酸分子杂交技术原理

PCR：模拟天然 DNA 复制过程，即利用 DNA 聚合酶 (如 Taq DNA 聚合酶) 等在体外条件下，催化一对引物间的特异 DNA 片段合成的基因体外扩增技术

核酸分子杂交：在适宜的温度及离子强度等条件下，具有一定同源性的两条核酸单链可按碱基互补原则复性杂交形成双链，杂交的两条核酸单链分别是核酸探针和待测核酸

4. 请回答基因工程操作的主要步骤有哪些？

目的基因的制备、目的基因与载体的重组、将重组体导入受体细胞、重组转化体的筛选、鉴定

5.你认为基因工程在食品工业中的未来应用前景如何？

- (1) 基因工程与动物、植物、微生物产品品质的改良
- (2) 基因工程与植物产品贮藏保鲜
- (3) 生产酶制剂
- (4) 生产食用疫苗

第三章 发酵工程

1.名词解释

菌种的活化：菌种活化就是将保藏状态的菌种放入适宜的培养基中培养，逐级扩大培养得到纯而壮的培养物，即获得活力旺盛的、接种数量足够的培养物

扩大培养：种子扩大培养是指将保存在砂土管、冷冻干燥管中处休眠状态的生产菌种接入试管斜面活化后，再经过扁瓶或摇瓶及种子罐逐级扩大培养,最终获得一定数量和质量的纯种过程。这些纯种培养物称为种子

生长因子：从广义上讲，凡是微生物生长不可缺少的微量的有机物质，如氨基酸、嘌呤、嘧啶、维生素等均称生长因子。如以糖质原料为碳源的谷氨酸生产菌均为生物素缺陷型，以生物素为生长因子,生长因子对发酵的调控起到重要的作用。有机氮源是这些生长因子的重要来源，多数有机氮源含有较多的B族维生素和微量元素及一些微生物生长不可缺少的生长因子

产物形成的诱导物：能够促进或激活特定微生物或细胞生产目标代谢产物（如抗生素、酶、醇类、酸等）的物质。这些诱导物可以是营养成分、激素、信号分子或其他化学物质。

前体：前体指某些化合物加入到发酵培养基中，能直接被微生物在生物合成过程中合成到产物分子中去，而其自身的结构并没有多大变化，但是产物的产量却因加入前体而有较大的提高

促进剂：产物促进剂是指那些非细胞生长所必需的营养物，又非前体，但加入后却能提高产量的添加剂

分批发酵：培养基中接入菌种以后，没有物料的加入和取出，除了通入空气和排气，整个过程中菌的浓度、营养成分的浓度和产物浓度等参数都随时间而变化。

补料分批发酵：在分批培养过程中补入新鲜的料液，以克服营养不足而导致的发酵过早结束的缺点，在此过程中只有料液的加入没有料液的取出，所以发酵结束时发酵液体积比发酵开始时有所增加。

半连续发酵：在补料分批培养的基础上间歇放掉部分发酵液（带放）称为半连续培养

连续发酵：连续发酵是指以一定速度连续不断向培养系统中流加新鲜培养基，同时又以同样的速度连续不断的将发酵液排出，使发酵罐中微生物的生长和代谢活动始终保持旺盛的稳定状态

2.阐述诱变育种的主要步骤和方法？

- (1) 从自然界中分离筛选出发菌种

采样→增殖培养→培养分离→筛选

- (2) 菌悬液的制备

一般采用生理状态一致（用选择法或诱导法使微生物同步生长）的单细胞或孢子进行诱变处理。所处理的细胞必须是均匀而分散的单细胞悬液。分散状态的细胞可以均匀地接

触诱变剂，又可避免长出不纯菌落。因此用于诱变育种的细胞应尽量选用单核细胞，如霉菌或放线菌的孢子或细菌的芽孢

处理真菌的孢子或酵母细胞时，其悬浮液的浓度大约为 10^6 个/ml，细菌和放线菌孢子的浓度大约为 10^8 个/ml。

(3) 选择简便有效、最适剂量的诱变剂

目前常用的诱变剂主要有紫外线(UV)、硫酸二乙酯、N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(NTG)和亚硝基甲基脒(NMU)等。后两种因有突出的诱变效果，所以被誉为“超诱变剂”

剂量的选择受处理条件、菌种情况、诱变剂的种类等多种因素的影响。剂量一般指强度与作用时间的乘积

(4) 中间培养

让变异处理后细胞在液体培养基中培养几小时，以让细胞的遗传物质复制，让细胞繁殖几代，以得到纯的变异细胞

若不经液体培养基的中间培养，直接在平皿上分离就会出现变异和不变异细胞同时存在于一个菌落内的可能，形成混杂菌落，以致造成筛选结果的不稳定和将来的菌株退化

(5) 分离和筛选

筛选分初筛和复筛：初筛以迅速筛出大量的达到初步要求的分离菌落为目的，以量为主。复筛则是精选，以质为主，也就是以精确度为主

(6) 突变体的筛选

初筛一般通过平板稀释法获得单个菌落，然后对各个菌落进行有关性状的初步测定，从中选出具有优良性状的菌落。例如，对抗生素产生菌来说，选出抑菌圈大的菌落；对于蛋白酶产生菌来说，选出透明圈大的菌落。此法快速、简便，结果直观性强。缺点是培养皿的培养条件与三角瓶、发酵罐的培养条件相差大，两者结果常不一致

复筛指对初筛出的菌株的有关性状作精确的定量测定。一般要在摇瓶或台式发酵罐中进行培养，经过精细的分析测定，得出准确的数据

3. 阐述培养基的成分和设计方法

碳源，氮源，无机盐和微量元素，生长因子，产物形成的诱导物、前体和促进剂，水设计方法：

(1) 根据前人的经验和培养基成分确定时一些必须考虑的问题，初步确定可能的培养基成分

(2) 通过单因子实验最终确定出最为适宜的培养基成分

(3) 当培养基成分确定后，剩下的问题就是各成分最适的浓度，由于培养基成分很多，为减少实验次数常采用一些合理的实验设计方法

4. 如何对微生物发酵过程的优化与控制？

(1) 温度对发酵的影响及控制

根据菌种生长温度范围选择、根据生长阶段选择

(2) 溶解氧浓度对发酵的影响及控制

调节通风与搅拌；限制基础培养基的浓度，使发酵器内的菌体浓度维持于适当水平；以补料方式供给某些营养成分而控制菌体生长率和呼吸率

(3) pH 对发酵的影响及控制

调节好基础料的 pH；在基础料中加入维持 pH 的物质，如 CaCO_3 ，或具有缓冲能力的试剂，如磷酸缓冲液等；通过补料调节 pH；当补料与调 pH 发生矛盾时，加酸碱调 pH

(4) 二氧化碳对发酵的影响及控制

- (5) 基质浓度对发酵的影响及补料控制
- (6) 泡沫控制
使用消泡剂、降低基质浓度
- (7) 发酵终点的判断及异常发酵的处理

5. 阐述发酵工程在食品发酵和酿造中的应用概况

奶酪制造、酸白菜、果酒、酵母面包、生产功能性微量元素、真菌多糖、生物活性肽

第四章 酶工程

1. 提高酶产量的措施有哪些？

(1) 添加诱导物

对于诱导酶的发酵生产，在发酵过程中的某个适宜的时机，添加适宜的诱导物，可以显著提高酶的产量

诱导物一般可以分为：酶的作用底物；作用底物的类似物

(2) 控制阻遏物的浓度

产物阻遏作用是由酶催化作用的产物或者代谢途径的末端产物引起的阻遏作用

分解代谢物阻遏作用是由分解代谢物（葡萄糖等和其它容易利用的碳源等物质经过分解代谢而产生的物质）引起的阻遏作用

为了减少或者解除分解代谢物阻遏作用，应当控制培养基中葡萄糖等容易利用的碳源的浓度

采用其他较难利用的碳源，如淀粉等；采用补料、分次流加碳源；添加一定量的环腺苷酸（cAMP）；对于受代谢途径末端产物阻遏的酶，可以通过控制末端产物的浓度的方法使阻遏解除

环腺苷酸称为细胞内的第二信使，调节酶的活性

(3) 添加表面活性剂

表面活性剂可以与细胞膜相互作用，增加细胞的透过性，有利于胞外酶的分泌，从而提高酶的产量

将适量的非离子型表面活性剂，如吐温（Tween）、特里顿（Triton）等添加到培养基中，可以加速胞外酶的分泌，而使酶的产量增加。

(4) 添加产酶促进剂

产酶促进剂是指可以促进产酶、但是作用机理未阐明清楚的物质。例如，添加一定量的植酸钙镁，可使霉菌蛋白酶或者桔青霉磷酸二酯酶的产量提高 1 ~ 20 倍；添加聚乙烯醇（Polyvinyl alcohol）可以提高糖化酶的产量

2. 酶生物合成的模式有几种？

(1) 同步合成型

酶的生物合成与细胞生长同步进行的一种酶生物合成模式。该类型酶的生物合成速度与细胞生长速度紧密联系，又称为生长偶联型

(2) 延续合成型

酶的生物合成在细胞的生长阶段开始，在细胞生长进入平衡期后，酶还可以延续合成一段较长时间

(3) 中期合成型

该类型的酶在细胞生长一段时间以后才开始，而在细胞生长进入平衡期以后，酶的生物合成也随着停止

(4) 滞后合成型

此类型酶是在细胞生长一段时间或者进入平衡期以后才开始其生物合成并大量积累。又称为非生长偶联型。许多水解酶的生物合成都属于这一类型

3. 阐述酶的纯化方法

(1) 盐析沉淀法

盐析法是蛋白质和酶分离纯化中最早应用

在低浓度盐条件下, 蛋白质和酶溶解度又随着盐浓度的升高而增高的现象称盐溶

盐浓度升高到一定数值时, 蛋白质和酶溶解度又随着盐浓度的升高而减少, 结果使蛋白质和酶沉淀析出, 这种现象叫盐析

(2) 透析

该类方法均属于膜分离技术。借助于一定孔径的各种高分子薄膜, 将不同大小、不同形状的和不同特性的物质颗粒或分子分离的技术, 统称为膜分离技术。

原理: 是指利用小分子物质的扩散作用, 不断透过半透膜到膜外, 而大分子被截留, 而达到分离目的

透析主要用于酶、蛋白质、核酸等生物大分子的分离纯化, 从中除去小分子物质

(3) 凝胶过滤法

是通过具有一定大小网目状的凝胶颗粒(固定相)填充柱的分子筛作用, 利用溶液中各组分的分子量不同来进行层析分离的一种方法

用于不同分子量的各种物质的分离, 通过适当长度的层析柱后, 溶液中各组分按分子量从大到小的顺序, 先后流出层析柱, 大小不同的分子蛋白就被分开

(4) 离子交换柱层析

离子交换柱层析是依据被分离物质与分离介质(离子交换剂)间异种电荷的静电引力的不同来进行物质分离的

(5) 亲和层析

亲和层析的原理: 利用了抗原—抗体、激素—受体和酶—底物等特异性反应的机理, 每对反应物之间都有一定的亲和力和特异性结合

(6) SDS-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳

聚丙烯酰胺凝胶是由丙烯酰胺和 N, N'-甲叉双丙烯酰胺聚合而成的大分子

蛋白质在聚丙烯酰胺凝胶中电泳时, 它的迁移率取决于它所带净电荷以及分子的大小和形状等因素

如果加入一种试剂使电荷因素以及分子形状消除, 那电泳迁移率就取决于分子的大小, 就可以用电泳技术测定蛋白质的分子量

SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳可以用于测定蛋白质的分子量

4. 阐述酶固定化技术的概念及方法

固定化: 人们模仿生物酶的作用方式, 将酶束缚在特殊的固定相上, 让它既能保持酶的特有催化活性, 又能长期稳定反复使用

固定化技术: 微型胶囊法、吸附法、通过双功能试剂进行共价交联法、胶格包埋法、共价结合法

固定化酶的方法:

(1) 包埋法: 将酶包埋在分子凝胶网格中的称为凝胶网格包埋型; 将其包埋在分子半透膜中的称为微囊型; 酶活力的回收率较高, 仅适用于小分子底物和产物的酶

(2) 物理吸附法

是酶被物理吸附于不溶性载体的一种固定化方法

载体有活性炭、石英砂、多孔玻璃、纤维素、琼脂糖、沸石及硅胶

固定化时酶分子的构象和酶活性中心很少或基本不发生变化,但是酶与载体结合力弱,酶易脱落

(3) 离子结合法

该法是通过离子交换效应,将酶分子固定到含有离子交换基团的固相载体上

载体有二乙氨基乙醇(DEAE)-纤维素、CM-纤维素

酶与载体的结合力较弱,酶容易脱落

第一个离子结合法固定化酶: DEAE-Cellulose 固定化过氧化氢酶

第一个工业化的固定化酶: DEAE-Sephadex A-50 固定化氨基酰化酶

(4) 共价交联法

是通过双功能或多功能试剂(交联剂),在酶分子之间形成共价键的连接方法

反应条件也较激烈,固定化的酶活回收率较低

双功能试剂: 常用的是戊二醛

(5) 共价结合法

是将载体有关基团活化、与酶分子上的功能团发生化学反应形成共价键

可与载体结合的酶的功能团有 α 、 ε -NH₂, α 、 β -羧基、巯基

采用了较激烈的反应条件,容易使酶的高级结构发生变化而破坏活性中心

5. 阐述酶制剂在食品科学中有哪些主要应用

淀粉糖加工、乳品加工、果蔬加工、肉鱼制品加工

第五章 细胞工程

1. 名词解释

植物细胞和组织培养: 将植物的器官、组织、细胞或细胞器进行离体、无菌培养,并重新再生成细胞或植株的过程为植物细胞和组织培养

外植体: 植物组织培养中,作为离体培养材料的器官或组织的片段统称为外植体

愈伤组织: 由母体外植体组织的增生细胞产生的一团不定型的疏松排列的薄壁细胞,一般愈伤组织在培养中没有明显的组织或器官的分化

细胞全能性: 是指植物体的每个细胞在离体条件下都具有诱导生长分化形成完整植株的潜在能力,这是由于每个细胞都有一套完整的基因组而实现的

胚胎干细胞: 干细胞是一类具有自我更新和分化潜能的细胞

干细胞的主要特征: 具有分化成各种特定细胞的能力; 它们可无限地分裂产生大量后裔; 其子细胞有两种命运,保持为干细胞或分化为特定细胞

2. 阐述克隆羊多莉的诞生的过程

1996年, Wilmut 和他的同事们从一只白色妊娠绵羊的乳腺刮下若干个乳腺膜细胞

然后,从形体较小的苏格兰黑面羊摘取卵细胞,去除其细胞核(DNA)

把白羊的乳腺细胞核放入黑羊的已去除细胞核的卵细胞中,用电脉冲使这些细胞融合在一起

将合成的卵细胞早期胚胎植入另一只黑面母羊体内

4个月之后,多利羊诞生

3. 造血干细胞移植有几种方式?

造血干细胞移植是骨髓移植、外周血造血干细胞移植和脐带血移植的通称
造血干细胞的移植是治疗血液系统疾病最有效方法

4. 阐述植物细胞培养形成历史过程和应用前景

(1) 植物细胞和组织培养概念源于德国著名植物学家 Haberlandt(1902 年), 他提出高等植物的器官和组织可以不断分割直至单个细胞, 而分离出来的每个细胞都有进一步分裂和发育的能力

(2) 1904 年 Hanning 成功地培养了萝卜和辣根菜的胚, 发现离体的胚可以充分发育, 并在培养条件下提前萌发形成小苗

(3) 离体培养第一个成功的例子: 1958 年 Steward 和 Shanu 以胡萝卜根韧皮部细胞为材料, 经液体震荡培养得到完整的小植物, 并开花结实

(4) 1964 年印度新德里大学 Cuba 和 aheshwari, 在培养毛叶曼陀罗花药时, 得到小孢子发育而来的小植, 1966 年经过细胞学鉴定是单倍体

(5) 60 年代, 植物细胞反应器、细胞培养动力学、次生代谢产物调节理论取得进展, Morel 采用兰花茎尖培养, 达到脱毒和快繁两个目的, 推动了世界兰花工业发展

(6) 1983 年, 日本三井石油化学公司成功进行紫草细胞工业化培养生产紫草宁

(7) 迄今为止, 全世界已对近千种植物进行过细胞培养研究, 从 400 种植物中分离出细胞培养生产其代谢产物, 这些天然产物包括药品、香料、色素、食品和化妆品等共 600 多种

5. 简答植物单细胞培养的方法, 有何应用价值

植物细胞和组织培养种类:

植物器官培养: 包括离体的器官如根尖、茎尖、叶原基、花器官各部分原基和果实适当条件下进行无菌培养, 以及从各种器官增殖而形成愈伤组织的培养

离体胚胎培养: 包括成熟或未成熟的胚胎离体培养, 通常使用相应的培养基使离体胚正常的萌发生殖, 以供研究和操作使用

植物细胞培养: 是指在无菌条件下, 将植物细胞从机体内分离出来, 在营养培养基上使其生存和生长的一种方法。将植物微生物化, 在一定容积的反应器中得到大量的植物细胞。植物细胞培养主要依据“细胞的全能性”

原生质体培养: 将植物细胞去除细胞壁形成原生质体后进行培养, 它是利用原生质体进行操作的基础

单细胞培养方法:

(1) 平板培养法

将制备好的单细胞悬浮液, 按照一定的细胞密度, 接种在 1 mm 的薄层固体培养基上进行培养, 称之为平板培养

平板培养是选择优良单细胞株常用的方法。因为由平板培养所增殖的细胞团大多来自一个单细胞, 平板培养用的是 1 mm 厚的薄层固体培养基, 在显微镜下可对细胞的分裂和细胞团的增殖进行追踪观察

单细胞培养过程:

1) 单细胞悬浮液的密度: 一般为 10^3 个 / mL 固体培养基的配制

2) 接种单细胞: 将调整好细胞密度的单细胞悬浮液与 50℃左右的固体培养基混合均匀, 分装于无菌的培养皿中, 水平放置, 冷却, 即为单细胞培养平板

3) 培养: 将上述单细胞培养平板置于培养箱中培养

4) 继代培养: 选取生长良好的由单细胞形成的细胞团, 接种于新鲜的固体培养基上进

行继代培养，获得由单细胞形成的细胞系

5) 单细胞平板培养效率的检测：值板率=形成细胞团的数目/接种的总细胞数，所谓植板率即在平板上形成细胞团的百分率

(2) 看护培养

有些植物细胞，一旦单离出来，不仅不能分裂、增殖，还可能死亡。如果用一块愈伤组织（生长旺盛）来哺育单细胞，从而使其正常分裂、增殖的方法，称“看护培养”

方法简便，但不能在显微镜下追踪细胞的分裂和细胞团的形成

滤纸起渗透扩散养分作用，同时与植物组织形成色差，便于观察

愈伤组织块可以促进单细胞的生长繁殖的原因：给单细胞传递了某些生物信息；为细胞的生长繁殖提供了某些物质条件；例如植物激素等内源化合物

单细胞培养过程：

1) 将愈伤组织块植入培养基的中间部位

2) 愈伤组织接种几天后，再接种单细胞

3) 在愈伤组织块的上方放置 1 片面积为 1 cm² 左右的无菌滤纸

4) 取一小滴经过稀释的单细胞悬浮液接种于滤纸上方

5) 置于培养箱中，在一定的温度和光照条件下培养若干天，单细胞在滤纸上进行持续的分裂和增殖，形成细胞团

6) 将在滤纸上由单细胞形成的细胞团转移到新鲜的固体培养基中进行继代培养，获得由单细胞形成的细胞系

(3) 微室培养

将接种有单细胞的少量培养基，置于微室中培养，使单细胞生长繁殖的培养方法

接种的细胞必须达到临界细胞密度以上，10³ 个 / mL；密度过低，单细胞无法进行生长繁殖；密度过高，则形成的细胞团混杂在一起，难于获得单细胞形成的细胞系

培养基少，营养和水分难以保持，pH 值变动幅度大，培养细胞仅能短期分裂，因此，当细胞团长到一定大小，将其转移到另外培养基上

微室培养所使用的培养基用量少，可以通过显微镜观察单个细胞的生长、分裂、分化、发育情况，有利于对细胞特性和单个细胞生长发育的全过程进行跟踪研究

应用价值：紫杉醇、螺旋藻、紫草细胞生产紫草宁、人工种子的制备

第六章 蛋白质工程

1. 什么是蛋白质工程？蛋白质改造的方法及其应用

蛋白质工程就是以蛋白质的结构与功能为基础，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，甚至创造新的、自然界本不存在的、具有优良特性的蛋白质分子

在基因水平上对蛋白质进行改造，按改造的规模和程度可以分为：

初级改造：个别氨基酸的改变和一整段氨基酸序列的删除、置换或插入

高级改造：蛋白质分子的剪裁，如结构域的拼接从头设计合成新型蛋白质

2. 什么是体外定点突变？请举例说明

基因定点突变是指按照设计的要求，使基因的特定序列发生插入、删除、置换和重排等变异

具体方法有三种：

(1) 寡核苷酸介导的定点突变

合成一段寡聚脱氧核糖核苷酸作为引物,其中含有所需要改变的碱基,使其与带有目的基因的单链 DNA 配对,合成的寡核苷酸引物除短的错配区外,与目的基因完全互补。然后用 DNA 聚合酶使寡核苷酸引物延伸,完成单链 DNA 的复制。由此产生的双链 DNA,一条链为野生型亲代链,另一条为突变型子代链。将获得的双链分子通过转导入宿主细胞,并筛选出突变体,其中基因已被定向修改

寡核苷酸定点突变过程:

1) 在克隆外源基因时, 需要从已感染 M13 的大肠杆菌细胞中获取含有 M13 双链复制型 DNA, 将外源基因插入到 M13 DNA 中

2) 在定点诱变时, 需从培养液中分离出 M13 的重组噬菌体, 并从中提取携带外源基因 M13 的单链重组 DNA

3) 再进行体外定位诱变, 人工合成一段改变了碱基顺序的寡核苷酸片段(8~18bp), 以此作为引物, 在体外合成互补链, 获得含有错配碱基的完整双链 M13DNA

4) 双链 M13 DNA 转染大肠杆菌, M13 在大肠杆菌中扩增, 形成噬菌斑

理论上有一半是野生型, 另一半则含有突变基因。用诱变的寡核苷酸引物作为探针, 通过杂交即可鉴定出突变体。

(2) PCR 介导的定点突变

在最初所建立的 PCR 方法中只要引物带有错配碱基, 便可使 PCR 产物的末端引入突变。但是诱变部位并不总在 DNA 片段的末端, 有时也希望对靶 DNA 的中间部 进行诱变

采用重组 PCR 进行定位诱变, 可以在 DNA 片段的任意部位产生定位突变

PCR 介导的定点突变需要 4 条 PCR 引物:

含有突变的碱基并且反向部分重叠的引物 A, A'

与目的基因两端互补的引物 B, C

任何基因, 只要两端及需要变异的部位的序列已知, 就可用 PCR 诱变去改造基因的序列

PCR 介导的定点突变过程:

1) 引物 A, B 和 A', C 两两配对, 分两管进行第一次 PCR, 产生两个部分重叠的 DNA 片段.

2) 然后将上述两管 PCR 产物混合, 变性再复性。在 DNA 聚合酶的作用下延伸产生完整的双链 DNA

3) 用引物 B, C, 以新合成的完整, 双链 DNA 为模板进行第二次 PCR, 即可得到含有预期突变位点的 DNA 片段

(3) 盒式突变

是用一段人工合成具有突变序列的 DNA 片段, 取代野生型基因中的相应序列, 这就好像用各种不同的盒式磁带插入收录机中一样, 故而称合成的片段为“盒”, 这种诱变方式为盒式诱变

然而, 并非所有变异区附近都能找到合适的限制 位点, 如果不存在限制位点, 就要用寡核苷酸指 导的定位诱变引入限制位点。

3. 什么是蛋白质定向进化? 请举例说明

定向进化 (Directed evolution) 是一种通过模拟自然选择的过程, 系统地改造和优化现有蛋白质的技术。其主要目标是提高蛋白质的活性、稳定性、特异性及其他所需特性, 以便

在实际应用中达到更好的效果。

是近 20 年发展起来的一项新技术，是达尔文的进化论思想在核酸、肽或蛋白等分子水平上的延伸和应用，它不需要深入了解蛋白质的结构功能关系，在实验室条件下人工模拟生物大分子自然进化过程，在体外对基因进行随机诱变，使基因发生大量变异，并定向选择出所需性质的突变体，可以在短时间内实现自然界几百万年才能完成的进化过程

定向进化 = 随机突变 + 选择

定向进化不是定点突变

定向进化：突变+筛选

突变位点是随机的，不确定的；突变位点的数目也是不确定的；突变的效应更是不可预知的；理论上讲，凡是能够引起突变的因素（物理的，化学的，生物的）都可以应用于定向进化中突变体的产生

定点突变：突变位点是确定的，突变的个数也是预知的；突变的效应可能是已知的，也可能是未知的；定点突变的方法一般是以 PCR 技术为基础的

蛋白质定向进化方法：

(1.1) 易错 PCR (error prone PCR)

是指在扩增目的基因的同时引入碱基错配，导致目的基因随机突变。是指通过改变反应条件，如：调整反应体系的 4 种 dNTP 浓度、增加 Mg 离子的浓度、加入 Mn 离子 或使用低保真度 Taq 聚合酶等，使碱基在一定程度上随机错配而引入多点突变，构建突变库，筛选出所需的突变体

易错 PCR 的关键是控制 DNA 的突变频率

- 1) 如果 DNA 的突变频率太高，产生的绝大多数酶将失去活性
- 2) 如果突变频率太低，野生型的背景太高，样品的多样性则较少
- 3) 对于每一 DNA 序列来说，合理的碱基突变数是 1-3

(1.2) 连续易错 PCR (sequential error prone PCR)

在通常情况下，经一轮的易错 PCR、定向筛选，很难获得令人满意的结果，由此发展出了连续易错 PCR，即将一次 PCR 扩增得到的有用突变基因作为下一次 PCR 扩增的模板，连续反复地进行随机诱变，使每一次获得的小突变累积而产生重要的有益突变。

在该方法中，遗传变化只发生在同一类分子内部，所以属于无性进化

例：枯草杆菌蛋白酶→Chen 等人用此策略使在非水相（二甲基甲酰胺, DMF）溶液中定向进化枯草杆菌蛋白酶的活性获得成功，所得突变体 PC3 在 60%和 85%的 DMF 中，催化效率分别是野生酶的 256 和 131 倍，比活性提高了 157 倍，将 PC3 再进行两个循环的定向进化，产生的突变体 13M 的催化效率比 PC3 高 3 倍(在 60%DMF 中)，比野生酶高 471 倍

(2) DNA 改组(DNA shuffling)

DNA 改组又称有性 PCR (sexual PCR)，将一群密切相关的序列（如多种同源而有差异的基因或一组突变基因文库）DNaseI 的作用下随机酶切成小片段这些小片段之间有部分的碱基序列重叠）它们通过自身引导 PCR(self-priming PCR) 延伸，并重新组装成全长的基因

DNA 改组包括以下步骤：

- 1) 目的 DNA 片段的获得
- 2) 目的基因的随机片段化，即将目的基因（可以是单个基因或一组相关基因）酶

切成随机片段，这些随机片段集合包含了来自不同的同源序列的寡核苷酸，这些寡核苷酸具有不同的 3'末端，从而为下一步的无引物 PCR 提供了条件

3) 无引物 PCR，即具有互补 3'末端的寡核苷酸互为引物，各为模板，通过不断的 PCR 循环，在不同模板上随机互补结合并进一步延伸

4) 有引物 PCR，即以上轮无引物 PCR 的产物为模板，加入基因两端序列为引物，经过多轮 PCR 得到重排产物的集合，称为突变文库

5) 克隆、筛选、分析及多轮筛选，即进一步对突变文库进行筛选，选择改良的突变体组成下一轮改组的模板，重复上述步骤进行多次重排和筛选，最终获得性状比较理想的突变体。

DNA 改组有以下显著优点：

1) DNA 改组可在短时间内通过重组有效的突变体发掘所有可能的重组体与突变序列，从而大大加快进化速度；而且对可操作的靶序列没有任何要求，长度可以达到几十 kb

2) 通过多轮筛选或选择，可以使有益突变迅速积累，导致功能的明显提高

3) DNA 改组从表型上早期进行选择，而不必了解 DNA 片断上序列的信息，简化了操作程序

4) DNA 改组比随机突变显著提高了良性突变的概率。研究表明，DNA 改组比随机突变具有较大的优势，随机突变的方法一般产生 1%的良性突变，但 DNA 改组可产生 13%的良性突变

(3) 体外随机引发重组(random priming in vitro recombination, RPR)

体外随机引发重组以单链 DNA 为模板，配合一套随机序列引物，先产生大量互补于模板不同位点的短 DNA 片段，由于碱基的错配和错误引发，这些短 DNA 片段中也会有少量的点突变，在随后的 PCR 反应中，它们互为引物进行合成，伴随组合，再组装成完整的基因长度（类似于 DNA shuffling）

体外随机引发重组其特点在于：

1) 可以利用单链 DNA 或 mRNA 为模板，故可 10-20 倍地降低亲本 DNA 量

2) DNA shuffling 片段重新组装前必须彻底除去 DNaseI,因此该方法更简单

3) 该方法合成的随机引物具有同样长度，无顺序倾向性在理论上，PCR 扩增时模板上每个碱基都应被复制或以相似的频率发生突变或以相似的频率发生突变

4) 该方法不受 DNA 模板长度的限制这给小肽的改造提供了机会

(4) 交错延伸(stagger extension process, StEP)

交错延伸是一种简化的 DNA shuffling 方法，它不是由短片段组装全长基因，而是在 PCR 反应中，把常规的退火和延伸合并为一步，缩短其反应时间，从而只能合成出非常短的新生链，经变性的新生链再作为引物与体系内同时存在的不同模板退火而继续延伸。此过程反复进行，直到产生完整的基因长度。由于模板转换而实现不同模板间的重组，如此重复直至获得全长基因片段