

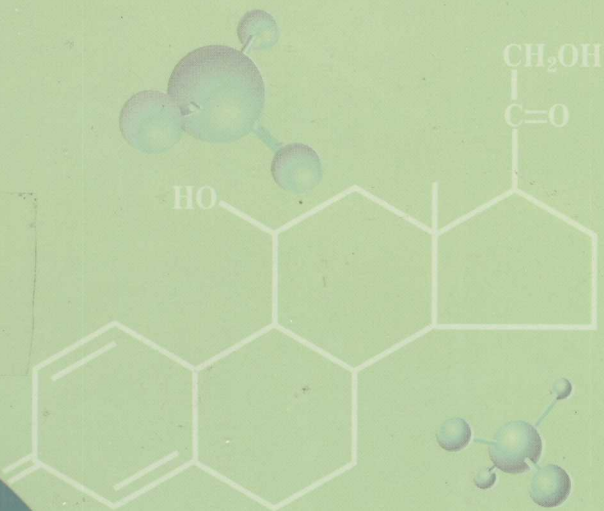
XinBian YaoWuHeChengFanYingLu  
X anTuSheJiYuZhiBeiGongYiXinJiShu

# 新编 药物合成反应路线 图设计与制备工艺新技术

实务全书

● 主编:

朱葆佺 (中国医科大学教授)



天津电子出版社

# 新编药物合成反应路线图设计 与制备工艺新技术实务全书

主编：朱葆佺

第五卷

天津电子出版社

## 目 录

## 第一篇 有机药物合成原理及其应用

第一章 有机药物合成概论 .....	(3)
第一节 有机化学理论在有机药物合成中的重要性 .....	(3)
第二节 反应机理的特点与单元合成反应及最佳反应条件的选择 .....	(4)
第三节 反应机理与合成路线的设计 .....	(12)
第二章 有机药物分子中原子间相互影响——电性效应 .....	(18)
第一节 概    说 .....	(18)
第二节 静态极性效应 .....	(21)
第三节 动态极性效应 .....	(39)
第四节 共轭效应 .....	(43)
第五节 极性效应与共轭效应的综合效应 .....	(61)
第三章 分子中原子间的相互影响——立体效应 .....	(66)
第一节 分子的几何形状 .....	(66)
第二节 立体效应 .....	(72)
第四章 构象分析 .....	(91)
第一节 构造、构型、构象和构象分析 .....	(91)
第二节 链烃及其衍生物的构象分析 .....	(92)
第三节 六员环化合物的构象分析 .....	(103)
第四节 其它脂环的构象 .....	(119)
第五节 十氢萘和全氢菲的构象分析 .....	(122)
第六节 甾体化合物的构象分析 .....	(126)
第七节 构象与理化性质及反应活性的关系 .....	(129)
第五章 分子的构型、不对称合成和外消旋体的拆分 .....	(151)
第一节 分子的构型 .....	(151)
第二节 不对称合成 .....	(176)
第三节 外消旋体的拆分 .....	(205)
第六章 酸碱理论及其在有机药物合成中的应用 .....	(218)
第一节 质子论及其在有机药物合成中的应用 .....	(218)
第二节 电子论和软硬酸碱法则及其在药物合成中的应用 .....	(238)

第七章 分子轨道法及其在药物化学中的应用 .....	(262)
第一节 Hückel 分子轨道法概要 .....	(262)
第二节 自洽场分子轨道法 .....	(267)
第三节 分子轨道指数 .....	(273)
第四节 在有机化学及药物化学中的应用 .....	(279)
第八章 分子轨道对称守恒原理 .....	(286)
第一节 分子轨道的对称性 .....	(286)
第二节 电环化反应 .....	(289)
第三节 环加成反应 .....	(298)
第四节 $\sigma$ -键迁移重排 .....	(317)

## 第二篇 有机药物合成反应

第一章 有机药物合成概论 .....	(331)
第一节 有机药物合成反应历程的基本类型 .....	(331)
第二节 试剂的分类 .....	(336)
第三节 影响反应历程的主要因素 .....	(337)
第四节 活性中间体 .....	(342)
第二章 饱和碳原子上的亲核取代反应 .....	(358)
第一节 亲核取代反应历程 .....	(360)
第二节 亲核取代的立体化学 .....	(366)
第三节 影响亲核取代反应速度的因素 .....	(372)
第四节 亲核取代反应在药物合成中的应用 .....	(385)
第三章 芳环亲电取代反应 .....	(404)
第一节 概 论 .....	(404)
第二节 芳环亲电取代反应历程 .....	(406)
第三节 影响芳环亲电取代反应的因素 .....	(412)
第四节 硝化反应 .....	(423)
第五节 磺化反应 .....	(437)
第六节 芳环上卤代反应 .....	(444)
第四章 羰基亲核取代反应 .....	(453)
第一节 反应历程 .....	(453)
第二节 化学结构与反应活性 .....	(456)
第三节 反应条件的影响 .....	(465)
第四节 在药物合成中的应用 .....	(475)

第五章 消除反应 .....	(484)
第一节 $\beta$ -消除反应 .....	(485)
第二节 $\alpha$ -消除反应和 $\gamma$ -消除反应 .....	(506)
第三节 热消除反应 .....	(509)
第四节 消除反应的一些应用 .....	(512)
第六章 碳碳重键上的电性加成反应 .....	(522)
第一节 烯类和炔类的亲电加成反应 .....	(524)
第二节 烯类和炔类的亲核加成反应 .....	(552)
第七章 碳氧双键的加成反应 .....	(565)
第一节 概 述 .....	(567)
第二节 复氢化合物与碳氧双键的亲核加成反应 .....	(580)
第八章 重排反应 .....	(591)
第一节 亲核重排 .....	(591)
第二节 亲电重排 .....	(623)
第三节 芳环上的重排反应 .....	(637)
第九章 自由基反应 .....	(646)
第一节 概 述 .....	(646)
第二节 初始自由基的形成反应 .....	(653)
第三节 影响自由基反应活性的因素 .....	(662)
第四节 药物合成中常见的自由基反应 .....	(676)
第十章 氧化反应 .....	(694)
第一节 分子氧氧化 .....	(695)
第二节 高锰酸钾氧化 .....	(707)
第三节 铬酸氧化 .....	(717)
第十一章 催化氢化反应 .....	(731)
第一节 多相催化氢化反应 .....	(732)
第二节 均相催化氢化反应 .....	(770)

### 第三篇 有机药物合成设计原理

第一章 合成设计的逻辑学 .....	(783)
第一节 常用术语 .....	(783)
第二节 合成路线的评价 .....	(787)
第三节 文献方法的应用及发展 .....	(794)
第四节 合成策略 .....	(798)

<b>第二章 仿生合成法</b> .....	(800)
第一节 次生代谢产物的生物合成 .....	(800)
第二节 仿生合成 .....	(802)
<b>第三章 计算机辅助合成路线设计</b> .....	(819)
第一节 计算机辅助合成路线设计的缘起 .....	(819)
第二节 计算机中的化学反应知识 .....	(820)
第三节 逆合成分析的计算机化 .....	(822)
第四节 目标化合物的析分系统 .....	(823)
第五节 计算机辅助合成设计的举例 .....	(824)
第六节 合成树的裁剪策略 .....	(825)
第七节 结束语 .....	(826)

## 第四篇 有机药物合成设计原理之逆合成分析法

<b>第一章 有机药物合成中的逆合分析法概论</b> .....	(829)
第一节 药物合成与有机合成 .....	(829)
第二节 有机药物合成的一般程序 .....	(829)
第三节 逆合成分析中常用术语与符号 .....	(830)
<b>第二章 有机合成中的合成子</b> .....	(833)
第一节 给电体 (即亲核试剂, d-合成子) .....	(836)
第二节 电子受体 (亲电试剂, a-合成子) .....	(845)
第三节 极性转换 .....	(846)
第四节 引入非官能团烷基 .....	(847)
第五节 烯和炔的生成 .....	(853)
第五节 通过偶合反应制烷、烯、炔 .....	(860)
第七节 醇和环氧化物 .....	(864)
第八节 醛、酮和羧酸 .....	(866)
第九节 1, 2-二官能团化合物 .....	(869)
<b>第三章 选择性官能团互换 (FGI)</b> .....	(872)
第一节 还原 .....	(874)
第二节 氧化 .....	(884)
第三节 用脱氢和其它消去反应合成烯 .....	(895)
<b>第四章 有机药物的逆合成分析</b> .....	(898)
第一节 原 料 .....	(898)
第二节 逆合成分析 .....	(899)

- 第三节 逆合成分析概要····· (919)
- 第四节 从科学研究报告中学习逆合成分析方法····· (920)

## 第五篇 有机药物及中间体合成法、合成路线图解

- 第一章 抗感染类药物····· (923)
- 第二章 心血管类药物····· (953)
- 第一节 钙拮抗药····· (953)
- 第二节 防治心绞痛药····· (977)
- 第三章 神经系统药物····· (982)
- 第一节 中枢神经兴奋药····· (982)
- 第二节 镇痛、抗炎、抗痛风药····· (991)
- 第四章 麻醉药及其辅助药物····· (1022)
- 第五章 呼吸系统药物····· (1034)
- 第一节 祛痰药····· (1034)
- 第二节 镇咳药····· (1037)
- 第六章 水化系统药物····· (1042)
- 第七章 泌尿系统药物····· (1050)
- 第八章 抗变态反应药物····· (1059)
- 第九章 抗肿瘤药物····· (1066)
- 第十章 激素及其有关药物····· (1072)
- 第十一章 维生素类药物····· (1079)

## 第六篇 药物中间体的合成工艺

- 第一章 药物中间体合成工艺总论····· (1089)
- 第一节 医药中间体的范畴····· (1090)
- 第二节 医药中间体合成中所涉及的化学反应····· (1090)
- 第三节 医药中间体国内外的发展概况····· (1091)
- 第四节 医药中间体工业的发展趋势····· (1091)
- 第二章 杂环类医药中间体合成工艺····· (1092)
- 第一节 哌嗪及其衍生物····· (1092)
- 第二节 吡啶及其衍生物····· (1104)
- 第三节 吡嗪系列····· (1127)

第四节	吗啉系列 .....	(1132)
第五节	咪唑系列 .....	(1141)
第三章	$\beta$ -内酰胺类抗生素的医药中间体合成工艺 .....	(1153)
第一节	青霉素类医药中间体 .....	(1154)
第二节	头孢类抗生素的医药中间体 .....	(1159)
第三节	头孢类抗生素用部分侧链 .....	(1170)
第四节	$\beta$ -内酰胺酶抑制剂 .....	(1191)
第五节	$\beta$ -内酰胺类抗生素中间体国内研究现状 .....	(1194)
第四章	甾族药物及其中间体合成工艺 .....	(1196)
第一节	甾醇与胆甾酸类 .....	(1196)
第二节	维生素 D .....	(1202)
第三节	甾族性激素 .....	(1206)
第四节	甾族肾上腺皮质激素 .....	(1213)
第五节	其他甾族化合物 .....	(1215)
第五章	脂肪胺类中间体合成工艺 .....	(1217)
第一节	脂肪胺合成方法概述 .....	(1217)
第二节	以脂肪醇、 $\alpha$ -烯烃为原料合成脂肪胺所用催化剂的发展状况 .....	(1219)
第三节	国内外脂肪胺的生产现状及发展 .....	(1224)
第四节	三乙烯二胺 (triethylenediamine) .....	(1224)
第五节	乙醇胺 .....	(1231)
第六节	一甲胺与二甲胺 .....	(1233)
第七节	乙胺 (ethylamine) .....	(1234)
第八节	丙胺 (n-Propylamine) .....	(1235)
第九节	乙二胺 (Ethylenediamine) .....	(1236)
第十节	二乙胺 (Diethylamine) .....	(1237)
第十一节	二丙胺 (Dipropylamine) .....	(1239)
第十二节	二乙醇胺 (Diethanolamine) .....	(1239)
第十三节	二乙烯三胺 (Diethylenetriamine) .....	(1240)
第十四节	N, N-二乙基-1, 4-戊二胺 .....	(1241)
第十五节	十二胺 (Laurylanline, Dodecylamine) .....	(1242)
第十六节	十八胺 (Octadecylamine) .....	(1242)
第十七节	三乙胺 (Triethylamine) .....	(1243)
第十八节	三丙胺 (Tripropylamine) .....	(1244)
第十九节	三乙醇胺 (Triethanolamine) .....	(1245)
第二十节	三乙烯四胺 (Triethylene tetamine) .....	(1246)
第二十一节	三甲胺 (Trimethylamine) .....	(1246)
第二十二节	己二胺 (1, 6-Hexanediamine) .....	(1247)



第二十三节	正丁胺 (n-Butylamine)	(1248)
第二十四节	正丙胺 (n-Propylamine)	(1249)
第二十五节	1, 2-丙二胺 (1, 2-Diaminopropane)	(1250)
第二十六节	四乙烯五胺 (Tetraethylenepentamine)	(1251)
第二十七节	异丙醇胺 (isopropanolamine)	(1251)
第二十八节	多乙烯多胺 (Polyethylenepolyamine)	(1253)
第二十九节	叔丁胺 (tert-Butylamine)	(1254)

## 第七篇 手性药物的合成制备和分离、测定、动力学原理

第一章	手性化合物的基本知识	(1257)
第一节	手性是自然界的属性	(1257)
第二节	手性药物	(1258)
第三节	手性、不对称性与光学活性	(1260)
第四节	手性的命名及有关术语	(1262)
第五节	对映体组成的测定	(1268)
第六节	绝对构型的测定	(1275)
第二章	手性药物的生物活性研究	(1285)
第一节	概述	(1285)
第二节	手性药物的生物活性类型	(1291)
第三节	手性药物立体选择性研究的意义	(1308)
第三章	手性药物的药物动力学	(1312)
第一节	概述	(1312)
第二节	药物动力学立体选择性	(1312)
第三节	手性药物的相互作用	(1338)
第四节	对临床用药和新药研究的影响	(1341)
第四章	手性药物的分离分析	(1349)
第一节	概述	(1349)
第二节	手性液相色谱	(1350)
第三节	手性气相色谱	(1371)
第四节	毛细管电泳手性分离	(1377)
第五节	手性超临界流体色谱	(1392)
第六节	总结	(1396)
第五章	手性药物的生物催化合成	(1397)
第一节	概述	(1397)

第二节	生物催化剂——酶 .....	(1398)
第三节	非水介质中的生物催化反应 .....	(1402)
第四节	手性药物的生物催化合成 .....	(1411)
<b>第六章</b>	<b>手性药物的拆分</b> .....	(1426)
第一节	外消旋体的有关性质 .....	(1426)
第二节	手性药物的结晶拆分方法 .....	(1428)
第三节	复合拆分初包合拆分方法 .....	(1449)
第四节	色谱拆分 .....	(1460)
<b>第七章</b>	<b>手性药物的不对称合成方法</b> .....	(1470)
第一节	手性药物与不对称合成 .....	(1470)
第二节	不对称合成的定义与表述 .....	(1476)
第三节	不对称合成的方法分类 .....	(1477)
第四节	双不对称合成 .....	(1479)
第五节	不对称氧化反应 .....	(1482)
第六节	不对称氢化反应及还原反应 .....	(1498)
第七节	不对称碳碳键的生成 .....	(1505)
第八节	不对称反应中的新概念 .....	(1522)

## 第八篇 生物药物合成原理及实验技术、制备工艺方法

<b>第一章</b>	<b>生物药物合成概论</b> .....	(1529)
第一节	生物合成药物学的概念及其沿革 .....	(1529)
第二节	生物合成药物与初期生物技术的形成及近代生物技术(第二代生物技术)的发展 .....	(1530)
第三节	现代生物技术(第三代生物技术)兴起与生物合成药物面向 21 世纪新发展 .....	(1530)
第四节	选择性生物催化与手性药物的对映体不对称合成 .....	(1531)
第五节	单克隆抗体与现代生物合成药物 .....	(1531)
第六节	基因治疗与临床治疗及药物研究 .....	(1532)
第七节	利用现代细胞培养,原生质体融合和体细胞克隆等新生物技术 .....	(1533)
第八节	基因工程和现代生物医药产业 .....	(1533)
第九节	基因工程技术应用于抗生素、维生素、氨基酸和甾体激素等 .....	(1534)
第十节	基因工程药物必须严格的生产管理及质量控制 .....	(1535)
<b>第二章</b>	<b>现代生物技术理论基础及其实验技术篇</b> .....	(1536)
第一节	微生物基础 .....	(1536)

第二节	生物合成药物中常用微生物基本实验技术 .....	(1604)
第三节	菌种的选育、保藏和复壮 .....	(1611)
第四节	微生物基础代谢途径和次级代谢途径 .....	(1629)
第五节	酶和医药 .....	(1633)
第六节	植物细胞培养基本原理及其主要实验技术 .....	(1676)
第七节	原生质体技术的原理、基本技术及应用 .....	(1699)
第八节	基因工程原理 .....	(1713)
第九节	基因工程常用实验技术 .....	(1725)
第十节	免疫学基础 .....	(1747)
第十一节	免疫学检测原理及其方法 .....	(1770)
第十二节	微生物转化反应在药物合成中的应用 .....	(1782)
<b>第三章</b>	<b>生物合成药物的工程学基础及其生物制品研制原理与制备工艺</b> .....	(1790)
第一节	微生物合成药物的发酵工程学基础 .....	(1790)
第二节	生物合成药物的分离纯化工程学基础 .....	(1835)
第三节	生物制品研制基本原理及其制备工艺 .....	(1904)
<b>第四章</b>	<b>基因工程药物规范及质量控制</b> .....	(1914)
第一节	概述 .....	(1914)
第二节	基因工程原理 .....	(1914)
第三节	基因工程药物的生产质量管理规范 .....	(1915)
第四节	基因工程药物的质量控制 .....	(1920)
第五节	基因工程药物的申报与审批程序 .....	(1926)
 <b>第九篇 最新生物合成药物的合成机理、 筛选、测定、制备</b>  		
<b>第一章</b>	<b>核酸药物</b> .....	(1929)
第一节	概述 .....	(1929)
第二节	肌苷酸 .....	(1937)
第三节	辅酶 A .....	(1939)
<b>第二章</b>	<b>氨基酸类药物</b> .....	(1943)
第一节	谷氨酸 .....	(1943)
第二节	天冬氨酸系氨基酸 .....	(1949)
<b>第三章</b>	<b>维生素类药物</b> .....	(1960)

第一节	原维生素 A ( $\beta$ -胡萝卜素)	(1960)
第二节	维生素 B <sub>1</sub> 、B <sub>2</sub> 、B <sub>12</sub>	(1972)
<b>第四章</b>	<b>抗生素类药物</b>	(1992)
第一节	抗生素概论	(1992)
第二节	半合成 $\beta$ -内酰胺环类抗生素	(2016)
<b>第五章</b>	<b>甾体类药物</b>	(2039)
第一节	微生物对甾体转化的几种重要位置及反应类型	(2039)
第二节	微生物对甾体转化的机理	(2043)
第三节	控制微生物选择性降解甾体边链的途径和机理	(2053)
第四节	强心甾的微生物转化	(2057)
第五节	甾体生物碱的微生物转化	(2060)
<b>第六章</b>	<b>生物碱类药物</b>	(2062)
第一节	异喹啉类生物碱的生物合成和结构修饰	(2063)
第二节	鸦片生物碱及其衍生物的生物合成和结构修饰	(2067)
第三节	吲哚生物碱	(2070)
<b>第七章</b>	<b>酶类药物</b>	(2082)
第一节	青霉素酶	(2083)
第二节	细胞色素 C (细胞色素丙)	(2083)
第三节	$\beta$ -半乳糖苷酶 (乳糖酶)	(2085)
第四节	弹性蛋白酶	(2086)
第五节	胶原酶 (胶原蛋白酶、羧菌肽酶)	(2087)
第六节	链激酶 (链球菌纤溶酶)	(2088)
第七节	天冬酰胺酶	(2089)
<b>第八章</b>	<b>酶抑制剂类药物</b>	(2091)
第一节	胆固醇生物合成系统酶抑制剂	(2091)
第二节	抑制甘油三酯形成的酶抑制剂	(2098)
第三节	血管紧张素转换酶抑制剂	(2098)
第四节	醛糖还原酶抑制剂 (ARI)	(2099)
第五节	葡萄糖苷酶抑制剂	(2100)
第六节	5 $\alpha$ -还原酶抑制剂	(2102)
第七节	K <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> 腺三磷酸酶抑制剂	(2103)
第八节	$\beta$ -内酰胺酶抑制剂	(2103)
第九节	DNA 旋转酶抑制剂	(2104)
第十节	肾去氢肽酶 I 抑制剂	(2105)
<b>第九章</b>	<b>植物细胞培养技术在中药和植物药合成中应用</b>	(2106)
第一节	植物细胞培养技术在中药和植物药生产中应用	(2106)

---

第二节	毛地黄细胞培养和强心苷转化 .....	(2127)
第三节	红豆杉细胞培养和紫杉醇生产 .....	(2129)
<b>第十章</b>	<b>单克隆抗体药物</b> .....	<b>(2132)</b>
第一节	单克隆抗体杂交瘤技术 .....	(2132)
第二节	单克隆抗体在免疫诊断中的应用 .....	(2139)
第三节	单克隆抗体在靶药物研制、疾病治疗和预防中的应用 .....	(2143)
<b>第十一章</b>	<b>基因工程在活性蛋白多肽药物研制中应用</b> .....	<b>(2148)</b>
第一节	胰岛素的研制 .....	(2148)
第二节	胰岛素样生长因子的研制 .....	(2150)
第三节	白细胞介素 (IL): IL-2、IL-6、IL-9、IL-12 和 IL-15 的研制 .....	(2155)

后取 10 $\mu$ l 转入一含有 1 $\mu$ l [ $a'$ - $^{32}$ P] dCTP 的 eppendorf 管中, 将两管在室温下放置 5min, 然后在 42 $^{\circ}$ C 下保温 1.5h (当用特异性引物产生文库时, 可以加入等量的 15~40 碱基长的引物代替寡聚 dT, 当用随机引物产生文库时, 可以用同样量的 6 聚体随机引物代替寡聚 dT, 然后在 37 $^{\circ}$ C 下进行反转录, 而不是在 42 $^{\circ}$ C 中进行)。

(3) 在含有同位素的管中, 加入 1 $\mu$ l 0.5mol/L EDTA 终止反应并在 -20 $^{\circ}$ C 下保存。在主要反应管中加入 4 $\mu$ l 0.5mol/L EDTA (pH8.0) 和 200 $\mu$ l 苯酚, 涡旋混匀后在室温下离心 1min 将上层水相转入一新的 eppendorf 管中。

(4) 将下层酚用 100 $\mu$ l TE 重新提取一次, 将两次所得的水相合并, 加入 1ml 乙醚, 涡旋后离心, 下层水相用乙醚重复提取。

(5) 加 125 $\mu$ l 7.5mol/L 乙酸铵和 950 $\mu$ l 95% 乙醇, 置于干冰/乙醇中 15min, 4 $^{\circ}$ C 下离心 10min, 弃上清液, 向管内加入 70% 的冷乙醇洗涤沉淀, 4 $^{\circ}$ C 下离心 3min, 弃上清液, 将沉淀真空干燥。

(6) 以 284 $\mu$ l 水溶解步骤 5 所得的沉淀, 依次加入如下溶液:

5m mol/L dNTP	4 $\mu$ l	涡旋混和, 离心片刻再加入
5 $\times$ 第二链缓冲液	80 $\mu$	1RNA 酶 H 4 $\mu$ l (4u)
5m mol/L $\beta$ -NAD $^{+}$	12 $\mu$ l	E. coli DNA 连接酶 4 $\mu$ l (20u)
3000Ci/m mol, 10 $\mu$ Ci/ $\mu$ l [ $a$ - $^{32}$ p] dCTP	2 $\mu$ l	E. coli DNA 聚合酶 I 10 $\mu$ l (100u)

涡旋混匀, 离心片刻, 14 $^{\circ}$ C 保温 12~16h

(7) 取 4 $\mu$ l 于新管中, -20 $^{\circ}$ C 中保存, 用于同位素参入量的测定 (同步骤 5), 用 400 $\mu$ l 苯酚提取剩余的反应液, 再用 200 $\mu$ l TE 抽提苯酚 1 次。

(8) 合并水相, 用 900 $\mu$ l 乙醚提取 2 次, 将水相分成两管, 如步骤 5 依次加入乙酸铵和乙醇, 然后离心进行沉淀。

(9) 以 42 $\mu$ l 水溶解沉淀, 依次加入下列试剂:

5m mol/L dNTP	5 $\mu$ l	RNA 酶 H 4 $\mu$ l (4u)
5 $\times$ TA 缓冲液	16 $\mu$ l	E. coli DNA 连接酶 4 $\mu$ l (20u)
5m mol/L $\beta$ -NAD $^{+}$	1 $\mu$ l	T $_4$ DNA 聚合酶 4 $\mu$ l (8U)

涡旋后离心片刻, 加入 2 $\mu$ g/ml RNA 酶 A 4 $\mu$ l 混匀, 在 37 $^{\circ}$ C 下保温 45min

(10) 加入 120 $\mu$ l TE 缓冲液和 1 $\mu$ l 10mg/ml 的 tRNA, 如步骤 3 用苯酚提取, 上层水相用 1ml 乙醚提取两次, 再如步骤 5 进行乙醇沉淀。该法用 10 $\mu$ g poly (A) RNA 可产生 2~10 $\mu$ g 平末端双链 cDNA。

## 2. cDNA 合成效率的计算

测定 cDNA 合成的效率可为分析整个 cDNA 合成系统, 确定 cdDNA 合成后各步反应的条件提供依据。一般是通过测定掺入到 cDNA 中的放射性强度确定合成的效率。

实验材料:

1mg/ml carrier DNA (如 herring sperm DNA)

TCA5% (w/v), 用冰预冷

玻璃纤维滤膜（如 Whatman GF - A 或 GF - C）或硝酸纤维素滤膜  
丙酮或乙醇，100%

(1) TCA 沉淀

①各取第一链同位素测定反应和第二链同位素测定反应混合液 3 $\mu$ l 点样于玻璃纤维膜上，置空气中干燥，测得的为样品的总的 cpm 值；

②另取各反应 3 $\mu$ l 混和液分别加入到 100 $\mu$ lmg/ml carrier 蛋白溶液中，混匀后加入 0.5ml

55%的 TCA 溶液（用冰预冷）并涡旋混和，置于冰上 5 ~ 30min

③将反应液用玻璃纤维滤膜过滤，每次用 5ml 冷的 5% TCA 淋洗 3 遍，再用 5ml 丙酮或乙醇淋洗，在空气中晾干；

④计数总的 cpm 和掺入的 cpm 值。

(2) 第一链转换率的计算

第一链转换率的计算如下：

$$\text{第一链掺入率} = \frac{\text{掺入的 cpm}}{\text{总的 cpm}} \times 100\%$$

掺入的 dNTP (nmol) = 4  $\times$  dNTP (nmol/ $\mu$ l)  $\times$  反应体积 ( $\mu$ l)  $\times$  第一链掺入率%

合成的 cDNA 的第一链的量 (ng) = 掺入的 dNTP (nmol)  $\times$  330ng/nmol

$$\text{第一链的转换率} = \frac{\text{cDNA 的第一链的量 (ng)}}{\text{cDNA 的第一链的量 (ng)}} \times 100\%$$

(3) 第二链转换率的计算

第二链转换率的计算与第一链转换率的计算方法相似，但在计算中减去第一链合成中掺入的 dNTP：

$$\text{第二链掺入率} = \frac{\text{掺入的 cpm}}{\text{总的 cpm}} \times 100\%$$

掺入的 dNTP (nmol) = [4  $\times$  dNTP (nmol/ $\mu$ l)  $\times$  反应体积 ( $\mu$ l) - 掺入到第一链中的 dNTP (nmol)]  $\times$  第二链掺入率%

合成的 cDNA 的第二链的量 (ng) = 掺入的 dNTP (nmol)  $\times$  330ng/nmol

$$\text{第二链的转换率} = \frac{\text{cDNA 的第一链的量 (ng)}}{\text{参与反应的 mRNA (ng)}} \times 100\%$$

在本实验中，一般第一链的转换率在 12% ~ 50%，第二链的转换率在 50% 以上时可以成功的建立 cDNA 文库。

## 四、DNA 的酶切、电泳回收、连接和转化

### (一) DNA 的酶切

基因工程实验中的一个重要技术环节是 DNA 的酶切，尤其是限制性内切酶反应，在构建基因文库，构建重组质粒和质粒的鉴定过程中都是关键操作。利用各种限制性内

切酶的性质，可以巧妙的构建重组 DNA。DNA 限制性内切酶反应根据酶切程度可以分为部分酶切和安全酶切反应；根据参与的酶数目分为单酶切和双酶切反应。

#### 完全酶切反应

实验材料：

待酶切的 DNA 样品

10 × 限制酶缓冲液（由限制酶生产商提供）

限制性内切酶

0.5mol/L EDTA (pH8.0)

上样缓冲液：0.025% 溴酚蓝，60% 甘油，用 TE 配制去离子水

下述操作适用于在 10 ~ 20 $\mu$ l 反应体系中单酶切 0.5 ~ 5 $\mu$ g 的 DNA 样品：

(1) 在一无菌的 eppendorf 管中，依次加入去离子水、10 × 限制酶缓冲液，待酶切的 DNA 溶液和限制性内切酶（所加的酶的单位数约为 DNA 量的 2 ~ 3 倍），使反应的总体积为：10 $\mu$ l 或 20 $\mu$ l；

(2) 轻弹管壁，使反应物混匀，稍作离心后在限制酶作用最适温度的水浴中反应 0.5 ~ 1h；

(3) 加入 0.5mol/L EDTA (pH8.0) 至终浓度为 10m mol/L，或加入 1/5 体积的上样缓冲液，终止反应。

对于双酶切体系，根据两种酶的缓冲液的差异，有不同的处理方法：

①若两种缓冲液相差不大，可以分步进行酶切或同时加入这两种酶进行酶切；

②若缓冲液 A 的盐浓度小于缓冲液 B，并且限制酶 B 在缓冲液 A 中仍有 50% 以上活性时，可以先进行酶 A 的反应，之后加入适量缓冲液 B、去离子水和酶 B 进行反应，如用 Hinc II 和 EcoR I 酶切质粒 pUC19：

质粒 pUC19 溶液 4 $\mu$ l (3 $\mu$ g)

10 × reaction buffer B2 $\mu$ l

Hinc II 0.5 $\mu$ l (10u)

去离子水 13.5 $\mu$ l

混匀，37℃ 反应 0.5h

补加 10 × reactionbuffer H 3 $\mu$ l

EcoR I 0.5 $\mu$ l (10u)

去离子水 16.5 $\mu$ l

混匀，37℃ 继续反应 0.5h

③若上述酶切方法不能获得满意的结果，可以在第一个酶切反应结束后，加入适量 TE 稀释至 100 $\mu$ l，用苯酚、氯仿/异戊醇提取，乙醇/乙酸铵沉淀回收已线性化的 DNA，再建立第二个酶切体系，继续酶切。

#### 2. 部分酶切反应

部分酶切反应主要用于构建基因组文库，构建某些分离到的活体 DNA 片断或重组质粒的限制性图谱，主要策略有减少酶的用量、缩短反应的时间、增大反应的体积和降低反应的温度等。

以下介绍的为减少酶量和缩短反应时间相结合的方法：

(1) 配制 100 $\mu$ l 含适量 DNA 的 1 × 限制酶缓冲液，分成 5 管，管 1 加入 30 $\mu$ l，管 2 ~ 4 加入 20 $\mu$ l，管 5 加入 1 $\mu$ l，将 5 只反应管置于冰浴中；



(2) 加入限制酶 (3 ~ 10U/ $\mu$ gDNA) 于管 1 中, 迅速混匀, 再放回冰浴;

(3) 从管 1 中取 10 $\mu$ l 混和液加入管 2, 迅速混匀并放回冰浴, 依次稀释至管 5, 每管的反应体积均为 20 $\mu$ l, 注意每次都要更换吸头;

(4) 将所有的管在适当的温度下反应 15min, 加入 1/5 体积的上样缓冲液终止反应并进行电泳分析, 以确定合适的部分酶切条件。

## (二) DNA 的凝胶电泳

DNA 的凝胶电泳主要有琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳。在一定的电场中, DNA 分子的迁移率与所含碱基数的对数成反比。琼脂糖凝胶电泳的分辨在 100bp 左右, 分离范围为 0.2 ~ 50Kb, 分辨率较聚丙烯酰胺凝胶电泳低 (5bp), 但由于制备容易, 分离范围广, 较为常用。

凝胶浓度与分离 DNA 片断的范围

琼脂糖凝胶电泳		聚丙烯酰胺凝胶电泳	
浓度/%	分离 DNA 片的范围/Kb	浓度/%	分离 DNA 片的范围/bp
0.5	1 ~ 30	3.5	1000 ~ 2000
0.7	0.8 ~ 12	5.0	80 ~ 500
1.0	0.5 ~ 10	8.0	60 ~ 400
1.2	0.4 ~ 7	12.0	40 ~ 200
1.5	0.2 ~ 3	15.0	25 ~ 150
		20.0	6 ~ 100

实验材料:

### 1. 常规琼脂糖凝胶电泳

琼脂糖

0.5 $\times$  TBE 电泳缓冲液: 45mmol/L Tris - 硼酸, 1mmol/L EDTA

10 $\times$  TBE 贮存液: 108g Tris 碱, 55g 硼酸, 40ml 0.5mol/L EDTA pH8.0, 定容至 1L

上样缓冲液: 0.025% 溴酚蓝, 60% 甘油, 用 TE 配制

溴乙啶贮存液: 1mg/ml

DY - II 型电泳仪和 H - 6 微型水平电泳槽

透射紫外灯

(1) 用医用胶带将水平电泳装置中凝胶床开口的两端封好, 插入梳子, 使梳齿高出底板 0.5 ~ 1.0cm;

(2) 用沸水浴或微波炉加热溶解某一浓度的琼脂糖溶液, 待其温度降至 60 $^{\circ}$ C 左右, 加入溴乙啶至终浓度为 0.5 $\mu$ g/ml;