



全国高职高专药品类专业卫生部“十一五”规划教材

供生物制药技术专业用

生物制药工艺学 实验实训

主 编 周双林



人民卫生出版社

供生物制药技术专业用

生物制药工艺学实验实训

生物制药工艺学实验实训

主 编 周双林

编者(以姓氏笔画为序) 邱妍川(重庆医药高等专科学校)

的任职要求和有关职业资格 罗 方 (浙江医药高等专科学校) 技能及素质培养目标
初步构建符合我国职业教 周双林 (浙江医药高等专科学校) 课程体系;以适应当前

郭会灿(石家庄职业技术学院)

底出版。 人民卫生出版社 元00.21:付 宝

人民卫生出版社

本套教材具有以下特点:

图书在版编目(CIP)数据

生物制药工艺学实验实训/周双林主编. —北京:人民卫生出版社, 2009. 1

ISBN 978-7-117-10757-0

I. 生… II. 周… III. 生物制品: 药物-生产工艺-实验-高等学校: 技术学校-教学参考资料 IV. TQ464-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 165590 号

人民卫生出版社

林双林 编 主

(教材画师为教材) 参 编

(药理学等课程教材) 川 涪 涪

(药理学等课程教材) 式 要

(药理学等课程教材) 林双林

(药理学等课程教材) 林双林

生物制药工艺学实验实训

主 编: 周双林

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: 北京市文林印务有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 5.5

字 数: 127 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 978-7-117-10757-0/R·10758

定 价: 15.00 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)

全国高职高专药品类专业卫生部“十一五”规划教材

5. 多媒体教材配套

出版说明

在国家大力发展职业教育和高等职业教育办学指导思想不断成熟、培养目标逐步明确的新形势下,为了进一步贯彻落实教育部《关于全面提高高等职业教育教学质量的若干意见》(教高[2006]16号)精神,将教材建设工作,与强化学生职业技能培养,和以就业为导向的课程建设与改革的工作密切结合起来,使教材建设紧紧跟上课程建设与改革的步伐,适应当前高等职业教育教学改革与发展的需要。因此,在规划组织编写教材之前,在教育部和卫生部的领导下,在教育部高职高专药品类专业教育教学指导委员会专家的大力支持下,首先由卫生部教材办公室组织、全国高职高专药品类专业教育教材建设指导委员会指导、部分院校牵头、全国80余所高职高专院校和20余家医药企业的560余位教师及工程技术与管理人员共同参与,历时近2年对高职高专药品类的药品经营与管理、药物制剂技术、化学制药技术、生物制药技术、中药制药技术专业和药学专业的课程体系和课程标准展开了调查分析研究。深入分析研究各专业职业岗位(群)的任职要求和有关职业资格标准,明确各专业职业岗位的知识、技能及素质培养目标,初步构建符合我国职业教育实际、适合专业培养目标要求的课程体系;以适应当前高职高专教学改革实际、突出职业技能培养为核心,分析研究各门课程的课程标准。在此基础上先后起草编制了教学计划和教学大纲草稿。其间多次召开专门会议,就教学计划和教学大纲草稿反复讨论修改,并广泛听取有关学校的意见,几易其稿,使其不断完善。最后,卫生部教材办公室邀请教育部高职高专药品类专业教育教学指导委员会和全国高职高专药品类专业教育教材建设指导委员会的部分专家及教学计划牵头起草负责人参加6个专业教学计划和教学大纲的统稿审定稿会议,对教学计划和教学大纲的内容进行了最后审定,对体例、风格等做了全面统一。

在上述扎实工作的基础上,卫生部教材办公室规划了高职高专教育药品类6个专业69种卫生部“十一五”规划教材,并在全国范围内进行了教材主编、编者的遴选,全国80余所高职高专院校(含中医药高职高专院校)和20余家医药企业的930余位教师及工程技术与管理人员积极申报了主编、副主编或编者,通过公开、公平、公证的遴选,近600名申报者被卫生部教材办公室聘任为主编、副主编或编者。然后依据教学计划和教学大纲组织编写了具有鲜明的高职高专教育特色的教材,并将由人民卫生出版社陆续出版发行,供以上6个专业教学使用。下面教材目录中除最后14种仅供中药制药技术专业教学使用的教材将于2009年6月出版外,其余55种教材均将于2008年12月底出版。

本套教材具有以下特点:

1. 科学、规范,具有鲜明的高职高专教育特色,体现课程建设与改革成果

由于本套教材的规划和编写,是建立在科学、深入研究上述6个专业的课程体系和

课程标准之后编制的教学计划和教学大纲基础上,因此编写教材内容科学、规范,而具有鲜明的高职高专教育特色。

2. 简化基础理论,侧重知识的应用,突出培养职业能力

教材基础理论知识坚持“实用为主,必需、够用为度”的原则,不追求学科自身内容的系统、完整,简化理论知识的阐释或推导,注重理论联系实际,充实应用实例的内容,“以例释理”,将基础理论融入大量的实例解析或案例分析中,以培养学生应用理论知识分析问题和解决问题的能力。

3. 教材内容整体优化

专业基础课教材围绕后续课程教材设计编写内容;专业课教材突出实践性,根据岗位需要或工作过程设计内容,与生产实践、职业资格标准(技能鉴定)对接。听取“下家”(包括后续课程和职业岗位一线经验丰富的专家)对教材编写的意见。使教材的内容得到整体优化,围绕后续课程、职业资格标准和职业岗位的需要编写教材。

4. 教材编写形式模块化

(1)理论课程教材:除教材主体内容外,本套教材在各部分内容中设立了“学习目标”、“知识链接”、“课堂互动”、“实例解析(案例分析)”、“知识拓展”、“学习小结”、“目标检测”等模块。以提高学生学习的目的性和主动性,增强教材的知识性和趣味性,强化知识的应用和技能培养,提高分析问题、解决问题的能力。

“学习目标”主要让学生首先了解所要学习的知识、接受训练的技能,与本课程后续内容、与后续课程或职业岗位的联系,并了解在知识、能力方面的要求,增强学生学习的目的性和主动性。

“知识链接”主要是对教材内容的必要补充,介绍学生应当掌握的常识性知识或有利于帮助理解和掌握课堂内容的知识,以便于更好的学习理解、掌握教材内容,而不是随意扩充教材的内容。

“课堂互动”是针对课堂涉及的知识,联系生活实际、岗位实际和社会实际,以老师提问学生回答或学生间相互讨论等多种形式给出题目,在师生或学生之间进行互动,以提高学生理论联系实际和增强学生应用知识分析问题、解决问题的能力,同时激发学生的学习兴趣,提高学生学习的自觉性和目的性。

“实例解析(案例分析)”主要结合基本理论知识,列举实例或案例,既有利于培养学生应用理论知识分析问题和解决问题的能力,又增强教材内容的可读性,收到以例释理的效果。

“知识拓展”适当增补有关进展类知识,让学生了解与职业有关的本学科理论、技术的发展前沿。

“学习小结”分“学习内容”、“学习方法体会”两部分。以图表形式简明归纳各章主要内容;以文字叙述形式简要介绍学习本章内容的方法体会,让学生应用比较恰当的方法学好有关知识、熟练掌握有关技能。

“目标检测”主要包括选择题、简答题、实例分析3种题型,其中适当增加了知识的应用和职业技能操作、训练方面测试的内容。让学生通过练习题形式对学习目标进行检测。

(2)实验实训课程教材:分实训目的、实训内容、实训步骤、实训提示、实训思考、实

训体会、实训报告、实训测试等模块编写。

5. 多媒体教材配套

部分教材因理论性或操作性强,在有条件情况下,组织编写了多媒体配套教材,以便于教学及学生学习掌握有关知识和相关技能。

本套教材的编写,教育部、卫生部有关领导以及教育部高职高专药品类专业教育教学指导委员会领导和专家给予了大力支持与指导,得到了全国数十所院校和部分企业领导、专家和教师的积极支持和参与。在此,对有关单位和个人表示衷心的感谢!希望本套规划教材对高职高专药品类专业高素质技能型专门人才的培养和教育教学改革能够产生积极的推动作用,能够在各校的教学使用中以及在探索课程体系、课程标准和教材的建设与改革的进程中,获得宝贵的意见,以便不断修订完善,更好地满足教学的需要。

卫生部教材办公室
全国高职高专药品类专业教育教材建设指导委员会
人民卫生出版社
2008年11月

附:全国高职高专药品类专业卫生部“十一五”规划教材 教材目录

序号	教材名称	主 编	适用专业
1	医药数理统计	薛洲恩	药学、药品经营与管理、药物制剂技术、生物制药技术、化学制药技术、中药制药技术
2	基础化学*	陆家政 傅春华	药学、药品经营与管理、药物制剂技术、生物制药技术、化学制药技术、中药制药技术
3	无机化学*	牛秀明 吴 瑛	药学、药品经营与管理、药物制剂技术、生物制药技术、化学制药技术、中药制药技术
4	分析化学***	谢庆娟 杨其锋	药学、药品经营与管理、药物制剂技术、生物制药技术、化学制药技术、中药制药技术
5	分析化学实践指导	谢庆娟 杨其锋	药学、药品经营与管理、药物制剂技术、生物制药技术、化学制药技术、中药制药技术

序号	教材名称	主 编	适用专业
6	有机化学*	刘 斌 陈任宏	药学、药品经营与管理、药物制剂技术、生物制药技术、化学制药技术、中药制药技术
7	生物化学	王易振 李清秀	药学、药品经营与管理、药物制剂技术、生物制药技术、中药制药技术
8	药事管理与法规*	杨世民 丁 勇	药学、药品经营与管理、药物制剂技术、生物制药技术、化学制药技术、中药制药技术
9	公共关系基础	秦东华	药学、药品经营与管理、药物制剂技术、生物制药技术、化学制药技术、中药制药技术
10	实用写作	刘 静	药学、药品经营与管理、药物制剂技术、生物制药技术、化学制药技术、中药制药技术
11	文献检索	胡家荣	药学、药品经营与管理、药物制剂技术、生物制药技术、化学制药技术、中药制药技术
12	人体解剖生理学	郭少三 武天安	药学、药品经营与管理
13	微生物学与免疫学	甘晓玲 黄建林	药学、药品经营与管理、药物制剂技术、生物制药技术、中药制药技术
14	微生物学与免疫学实践指导	甘晓玲 黄建林	药学、药品经营与管理、药物制剂技术、生物制药技术、中药制药技术
15	天然药物学***	艾继周	药学
16	天然药物学实训	艾继周 沈 力	药学
17	药理学*	王迎新 弥 曼	药学、药品经营与管理
18	药剂学*	张琦岩 孙耀华	药学、药品经营与管理
19	药剂学实验实训	张琦岩 孙耀华	药学、药品经营与管理
20	药物分析	孙 莹 吕 洁	药学、药品经营与管理
21	药物分析实验实训	孙 莹 吕 洁	药学、药品经营与管理
22	药物化学***	葛淑兰 张玉祥	药学、药品经营与管理

序号	教材名称	主 编	主 审	适用专业	序号
23	天然药物化学 [*]	吴剑峰	王 宁	药学、药物制剂技术	04
24	医院药学概要	张明淑		药学专业医院药学方向	14
25	中医药学概论	许兆亮	刘德军	药品经营与管理、药物制剂技术、生物制药技术专业及药学专业医院药学方向	
26	药品营销心理学	丛 媛	系 王	药品经营与管理专业及药学专业药品经营与管理方向	
27	会计学基础与财务管理	邱秀荣		药品经营与管理	14
28	临床医学概要	唐省三	郭 毅	药品经营与管理、药学专业	21
29	药品市场营销学	董国俊		药品经营与管理、药学、药物制剂技术、化学制药技术、生物制药技术、中药制药技术	
30	临床药物治疗学	曹 红		药品经营与管理专业及药学专业医院药学方向	
31	临床药物治疗学实训	曹 红		药品经营与管理专业及药学专业医院药学方向	
32	药品经营企业管理学基础	王树春		药品经营与管理专业及药学专业药品经营与管理方向	
33	药品经营质量管理	杨万波		药品经营与管理	21
34	药品储存与养护	徐世义		药品经营与管理、中药制药技术专业及药学专业药品经营与管理方向	
35	药品经营管理法律教程	李朝霞		药品经营与管理专业及药学专业药品经营与管理方向	12
36	实用物理化学 ^{***}	沈雪松		药物制剂技术、生物制药技术、化学制药技术	02
37	医学基础	邓步华		药物制剂技术、生物制药技术、化学制药技术、中药制药技术	12
38	药品生产质量管理	罗文华		药物制剂技术、生物制药技术、化学制药技术、中药制药技术	02
39	安全生产知识	张之东		药物制剂技术、生物制药技术、化学制药技术、中药制药技术专业及药学专业药物制剂方向	10

序号	教材名称	主 编	主 审	适用专业
40	实用药理学基础**	丁 丰	王 宏	药物制剂技术、生物制药技术
41	药物制剂技术***	张健泓		药物制剂技术、生物制药技术、化学制药技术
42	药物检测技术	王金香		药物制剂技术、化学制药技术专业及药学专业药物检验方向
43	药物制剂设备	邓才彬	王 泽	药物制剂技术专业及药学专业药物制剂方向
44	药物制剂辅料与包装材料	王晓林		药物制剂技术、中药制药技术专业及药学专业药物制剂方向
45	化工制图	孙安荣	刘德玲	药物制剂技术、生物制药技术、化学制药技术、中药制药技术
46	化工制图绘图与识图训练	孙安荣	刘德玲	药物制剂技术、生物制药技术、化学制药技术、中药制药技术
47	药物合成技术***	唐跃平		化学制药技术
48	制药过程原理及设备	印建和		化学制药技术
49	药物分离与纯化技术	张雪荣		化学制药技术
50	生物制药工艺学	陈电容	朱照静	生物制药技术
51	生物制药工艺学实验实训	周双林		生物制药技术
52	生物药物检测技术	俞松林		生物制药技术
53	生物制药设备***	罗合春		生物制药技术
54	生物药品***	须 建		生物制药技术
55	生物工程概论	程 龙		生物制药技术
56	中医基本理论	唐永忠		中药制药技术
57	实用中药	严 振	谢光远	中药制药技术
58	方剂与中成药	吴俊荣		中药制药技术
59	中药鉴定技术	杨嘉玲	李炳生	中药制药技术
60	中药药理学	宋光熠		中药制药技术
61	中药化学实用技术	杨 红	冯维希	中药制药技术

序号	教材名称	主 编	适用专业
----	------	-----	------

62	中药炮制技术	张中社	中药制药技术
----	--------	-----	--------

63	中药制药设备	刘精婵	中药制药技术
----	--------	-----	--------

64	中药制剂技术	汪小根 刘德军	中药制药技术
----	--------	---------	--------

65	中药制剂检测技术	梁延寿	中药制药技术
----	----------	-----	--------

66	中药鉴定技能训练	刘 颖	中药制药技术
----	----------	-----	--------

67	中药前处理技能综合训练	庄义修	中药制药技术
----	-------------	-----	--------

68	中药制剂生产技能综合训练	李 洪 易生富	中药制药技术
----	--------------	---------	--------

69	中药制剂检测技能训练	张钦德	中药制药技术
----	------------	-----	--------

共 57 门主干教材,12 门实验实训教材。☆为普通高等教育“十一五”国家级规划教材;☆部分专业或院校将无机化学与分析化学两门课程整合而成基础化学,因此上述《基础化学》、《无机化学》、《分析化学》三种教材可由学校决定使用《基础化学》,或《无机化学》、《分析化学》;☆☆《实用药物学基础》由药物化学、药理学、药物治疗学三门课程整合而成编写的教材;☆☆☆本教材有配套光盘。

本书是全国高职高专药品类专业卫生部“十一五”规划教材,是《基础化学》、《无机化学》、《分析化学》三种教材可由学校决定使用《基础化学》,或《无机化学》、《分析化学》;☆☆《实用药物学基础》由药物化学、药理学、药物治疗学三门课程整合而成编写的教材;☆☆☆本教材有配套光盘。

本教材共分为实验、实训和附录三部分。实验部分的编写由周双林、郭会灿和邱公刚承担,实训部分的编写由周双林、郭会灿承担。

由于编者水平有限,教材中的疏漏和错误在所难免,恳请使用本教材的广大师生和读者批评指正。

2010年12月

全国高职高专药品类专业教育教材建设指导委员会

成员名单

主任委员

严振

广东食品药品职业学院

副主任委员

周晓明

山西生物应用职业技术学院

刘俊义

北京大学药学院

邬瑞斌

中国药科大学高等职业技术学院

委员

李淑惠

长春医学高等专科学校

彭代银

安徽中医学院

弥曼

西安医学院

王自勇

浙江医药高等专科学校

徐世义

沈阳药科大学高等职业技术学院

简晖

江西中医学院

张俊松

深圳职业技术学院

姚军

浙江省食品药品监督管理局

刘斌

天津医学高等专科学校

艾继周

重庆医药高等专科学校

王宁

山东医学高等专科学校

何国熙

广州医药集团有限公司

李春波

浙江医药股份有限公司

付源龙

太原晋阳制药厂

罗兴洪

先声药业集团

于文国

河北化工医药职业技术学院

毛云飞

扬州工业职业技术学院

延君丽

成都大学医护学院

前言

本书是全国高职高专药品类专业卫生部“十一五”规划教材《生物制药工艺学》的配套实验实训教材。

生物制药工艺学是生物制药技术专业的核心专业课程。随着生物制药工艺学的迅速发展,生物制药技术也得到不断地更新和完善,并及时在生物制药产业中得到了广泛应用。为适应高职高专快速发展和当前教学改革的需要,加强高职高专教材建设,同时为适应生物制药技术的发展,有效培养和提高学生的生物制药实践技能,我们在综合相关教材优点的基础上,选编了实验、实训项目各 7 个以及在生物制药工艺过程中具有重要参考价值的附录若干,形成了《生物制药工艺学实验实训》教材。

本教材的特点一是体现工学结合思想,根据生物制药的工艺过程来选择实验、实训项目。二是简洁明了、操作性强,以较少的实验、实训项目涵盖生物制药工艺过程的各项单元操作技术,同时根据实践经验给予实验、实训操作提示。三是与生物制药职业技能鉴定的培训、考核相结合,每一个实验、实训项目均配备了实验、实训测试,列出了相关技能考核点和考核要求。四是适用面广,考虑到各个高职高专院校的实验、实训条件有所差异,而且不同院校同类专业的侧重点不同,在选择实验、实训项目时进行了平衡兼顾,使其能广泛适用于不同院校的生物制药技术及其同类或相近专业。

本教材共分为实验、实训和附录三部分。实验部分的编写由罗方和邱妍川两位老师承担,实训部分的编写由周双林、郭会灿和邱妍川 3 位老师承担,附录部分的编写由周双林、郭会灿承担。

由于编者水平有限,教材中的疏漏和错误在所难免,恳请使用本教材的广大师生和读者批评指正。

编者

2008 年 11 月

参考文献

上篇 实验部分 目录

实验一 细菌的液体培养及菌种的保存与复苏	1
上篇 实验部分	1
实验一 细菌的液体培养及菌种的保存与复苏	1
实验二 离子交换树脂法分离混合氨基酸	3
实验三 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离脂蛋白	5
实验四 血清 γ -球蛋白的分离纯化与鉴定	7
实验五 胰蛋白酶的制备及活力的测定	11
实验六 植物原生质体的分离、融合与培养	15
实验七 动物细胞原代培养、传代、冻存、复苏、电融合	20
下篇 实训部分	27
实训一 植物组织培养	27
实训二 植物血球凝集素的提取、分离及活性检测	30
实训三 偶联法制备固定化胰蛋白酶—亲和层析法制备胰蛋白酶抑制剂	33
实训四 发酵法制备 L-天冬酰胺酶	39
实训五 青霉素的发酵法生产	43
实训六 噬菌体污染的检查 and 鉴定	48
实训七 工程菌(大肠杆菌)的高密度发酵及主要生化指标检测	53
附录	57
附录一 常见酸及碱的性质	57
附录二 常用有机溶剂的性质	58
附录三 常用缓冲溶液的配制方法	59
附录四 层析法常用数据表及性质	63
附录五 蛋白质等制备时可选用的冷冻剂	68
附录六 分级盐析中硫酸铵饱和度的调整	69
附录七 实验(实训)报告格式	71
参考文献	73

(三) 菌种的保存与复苏

1. 保存 大多数大肠杆菌能在保存培养基中存活数年,若在一20℃或液氮中冻存,则可长期保存。

上篇 实验部分

实验一 细菌的液体培养及菌种的保存与复苏

【实验目的】

1. 熟练掌握细菌培养基的配制。
2. 熟练掌握灭菌技术和细菌的液体培养技术。
3. 学会菌种的保存与复苏方法和技术。

【实验内容】

1. 学习训练高压蒸汽灭菌的操作及注意事项。
2. 学习训练细菌的液体培养及其接种技术。
3. 学习训练菌种的保存与复苏操作技术。

【实验步骤】

(一) 肉汤(LB)液体培养基的配制

配制每升培养基,应在 900ml 去离子水中加入:

胰蛋白胨(bacto-tryptone)	10.0g
酵母提取物(bacto-yeast extract)	5.0g
NaCl	10.0g

磁力搅拌至溶质完全溶解,用 5mol/L NaOH(约 0.2ml)调节 pH 至 7.0。定容至总体积为 1L,6.8kg(15 磅,1.034×10⁵ Pa)高压灭菌 20 分钟。

若需进行选择培养,则相应地加入抗生素或其他成分。

(二) 细菌的液体培养

1. 少量培养

(1)取灭菌的 16mm 或 18mm 口径培养管,用无菌吸管加入 3~5ml 肉汤液体培养基,再加入 50mg/ml 氨苄西林 3~5μl(如培养宿主菌,则不加抗生素)。

(2)用无菌牙签挑取单菌落,送入培养液中,或取菌液 5~10μl,转入培养液中,封好管口。

(3)37℃摇床培养 100~200r/min 至生长饱和,6~12 小时。可培养过夜。

2. 大量培养 取 500ml 培养瓶,内装有已灭菌的 LB 液体培养基 100~200ml,及相应氨苄西林。以 0.5%~1%的浓度接种菌液,100~200r/min,37℃摇床培养至 OD₆₀₀ 值 0.6~0.8。

(三) 菌种的保存与复苏

1. 保存 大多数大肠杆菌能在保存培养基中存活数年,若在一 70℃或液氮中冻存,则可长期保存。

菌种保存液可采用下述 2 种试剂:

- (1) 甘油溶液(80%或 100%均可);
- (2) DMSO 溶液(5%)。

在保种瓶中加入 0.3ml 保存液、0.7ml 菌液,混合后储存于一70℃或液氮中即可。注意,菌种保存液加入量为菌液的 30%。

2. 复苏 复苏菌种时,用接种环或无菌牙签挑取少许冻结的菌种到平皿上,37℃培养 8~12 小时即可。

切记,在接种过程中不得使保种瓶中的菌种化冰。

【实验提示】

1. 普通肉汤培养基为天然培养基,常用于培养细菌。这类培养基的化学成分很不恒定,也难以确定,但配制方便,营养丰富,所以常被采用。

2. 氨苄西林临床上主要用于敏感菌所致的呼吸道感染(如支气管炎、肺炎)、伤寒、泌尿道感染、皮肤软组织感染及胆道感染等。对引起小儿呼吸道、泌尿道感染的病原菌有高度抗菌活性,疗效比青霉素强。

3. 实验的仪器设备和药品、试剂

(1) 仪器设备

1) 磁力搅拌器;

2) 高压灭菌锅;

3) 恒温摇床;

4) 低温冰箱(或液氮罐);

5) 无菌培养管(16 或 18mm),4 支;

6) 无菌吸管,2 支;

7) 微量进样器;

8) 无菌牙签。

(2) 药品和试剂

1) 胰蛋白胨;

2) 酵母提取物;

3) NaCl;

4) 氨苄西林贮液,50mg/ml;

5) 100%甘油(或 80%甘油溶液,或 5%DMSO 溶液)。

【实验思考】

1. 在培养基中加入氨苄西林的目的是什么?

2. 高压蒸汽灭菌时应注意哪些操作事项?

3. 接种时应注意的事项有哪些?

【实验体会】

氨苄西林 (三)

氨苄西林 (三)

氨苄西林 (三)

【实验报告】(见附录七)

【实验测试】

考核点	考核要求	考核结果		
		优良	及格	不及格
培养基的配制	配比、pH 适当			
培养基灭菌	温度、时间控制适当			
细菌液体培养	操作正确			
菌种的保存过程	操作正确			
菌种的复苏过程	操作正确			

实验二 离子交换树脂法分离混合氨基酸

【实验目的】

1. 熟练掌握离子交换树脂法的工作原理。
2. 熟练掌握离子交换树脂法的操作技术。
3. 学会对离子交换树脂的预处理和再生处理。

【实验内容】

1. 学习训练离子交换树脂法分离混合氨基酸。
2. 学习训练对离子交换树脂的预处理和再生处理。

【实验步骤】

1. 树脂的处理 100ml 烧杯中放置约 10g 树脂,加 25ml 2mol/L HCl 搅拌 2 小时,倾弃酸液,用蒸馏水充分洗涤树脂至中性。加 25ml 2mol/L NaOH 至上述树脂中搅拌 2 小时,倾弃碱液,用蒸馏水洗涤至中性。将树脂悬浮于 50ml pH4.2 的枸橼酸缓冲液中备用。

2. 装柱 取直径 0.8~1.2cm、长度为 10~12cm 的层析柱,底部垫玻璃棉或海绵圆垫,自顶部注入经处理的上述树脂悬浮液,关闭层析柱出口,待树脂沉降后,放出过量的溶液,再加入一些树脂,至树脂沉积至 8~10cm 高度即可。于柱子顶部继续加入 pH4.2 枸橼酸缓冲液洗涤,使流出液 pH 为 4.2 为止,关闭柱子出口,保持液面高出树脂表面 1cm 左右。

3. 加样、洗脱及洗脱液收集 打开出口使缓冲液流出。待液面几乎平齐树脂表面时关闭出口(不可使树脂表面干掉)。用长滴管将 15 滴氨基酸混合液仔细地直接加到树脂顶部,打开出口使其缓慢流入柱内。当液面刚平树脂表面时,加入 0.1mol/L HCl 3ml,以每分钟 10~12 滴的流速洗脱,收集洗脱液,每管 20 滴,逐管收存。当 HCl 液面刚平树脂表面时,用 1ml pH4.2 枸橼酸缓冲液冲洗柱壁 1 次,接着用 2ml pH4.2 枸橼酸缓冲液洗脱,保持流速为每分钟 10~12 滴并注意勿使树脂表面干燥。

在收集洗脱液的过程中,逐管用茚三酮检验氨基酸的洗脱情况。其方法是:于各管洗脱液中加 10 滴 pH5 的乙酸缓冲液和 10 滴中性茚三酮溶液,沸水浴中煮 10 分钟,如溶液

显紫蓝色,表示已有氨基酸洗脱下来。显色的深度可代表洗脱的氨基酸浓度,可用比色法测定。

用 pH4.2 的枸橼酸缓冲液把第 2 个氨基酸洗脱出来之后,再收集 2 管茚三酮反应阴性部分,关闭层析柱出口,将树脂顶部剩余的 pH4.2 枸橼酸缓冲液移去。

于树脂顶部加入 2ml 0.1mol/L NaOH,打出口使其缓慢流入柱内,按上面操作,继续用 0.1mol/L NaOH 洗脱并逐管收集(注意仍然保持流速为每分钟 10~12 滴),每管 20 滴。作洗脱液中氨基酸检验。在第 3 个氨基酸用 0.1mol/L NaOH 洗脱下来以后,再继续收集 2 管茚三酮反应阴性的部分。

最后以洗脱液各管光密度(以水作空白,在 570nm 波长处读取光密度)或颜色深浅(以一、±、+、++…表示)为纵坐标,洗脱液管号为横坐标作图,即可画出一条洗脱曲线。

【实验提示】

1. 离子交换树脂是一种合成的高聚物,不溶于水,能吸水膨胀。高聚物分子由能电离的极性基团及非极性的树脂组成,极性基团上的离子能与溶液中的离子起交换作用,而非极性的树脂本身物性不变。通常离子交换树脂按所带的基团分为强酸($-R-SO_3H$)、弱酸($-COOH$)、强碱($-N^+ \equiv R_3$)和弱碱($-NH_2, -NHR, -NR_2$)。离子交换树脂分离小分子物质如氨基酸、腺苷、腺苷酸等是比较理想的,但不适合分离生物大分子物质如蛋白质,因为它们不能扩散到树脂的链状结构中。因此如分离生物大分子,可选用以多糖聚合物如纤维素、葡聚糖为载体的离子交换剂。

2. 本实验用磺酸阳离子交换树脂分离酸性氨基酸(天冬氨酸)、中性氨基酸(丙氨酸)和碱性氨基酸(赖氨酸)的混合液。在特定的 pH 条件下,它们解离程度不同,通过改变洗脱液的 pH 或离子强度可分别洗脱分离。

3. 实验材料

- (1)磺酸阳离子交换树脂(Dowex 50);
- (2)2mol/L HCl;
- (3)2mol/L NaOH;
- (4)pH4.2 的枸橼酸缓冲液:0.1mol/L 枸橼酸 54ml 加入 0.1mol/L 枸橼酸钠 46ml;
- (5)0.1mol/L HCl;
- (6)0.1mol/L NaOH;
- (7)pH5 的乙酸缓冲液:0.2mol/L 乙酸钠 70ml 加 0.2mol/L 乙酸 30ml;
- (8)0.2% 中性茚三酮溶液:0.2g 茚三酮加 100ml 丙酮;
- (9)氨基酸混合液:丙氨酸、天冬氨酸、赖氨酸各 10ml 加 0.1mol/L HCl 3ml。

【实验思考】

1. 为什么混合氨基酸可以从磺酸阳离子树脂上逐个洗脱下来?
2. 为什么离子交换树脂需要先预处理才可使用?
3. 装柱的时候应该注意哪些问题?

【实验体会】