



生物制药学

LABORATORY MANUAL FOR BIOPHARMACEUTICALS

实验指导

王明明 刘俊林 编著



甘肃文化出版社

西北民族大学“十二五”规划教材

生物制药学

实验指导

王明明 刘俊林 编著

湖北工业大学图书馆



甘肃文化出版社

图书在版编目 (C I P) 数据

生物制药学实验指导 / 王明明, 刘俊林编著. -- 兰州 : 甘肃文化出版社, 2011.3

ISBN 978-7-5490-0007-4

I. ①生… II. ①王… ②刘… III. ①生物制品: 药物—制造—实验—高等职业教育—教学参考资料 IV
①TQ464.33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 046702 号

生物制药学实验指导

王明明 刘俊林 编著

责任编辑 周桂珍

装帧设计 史春燕

出版发行 甘肃文化出版社

地 址 兰州市城关区曹家巷 1 号

邮政编码 730030

电 话 0931-8454870

经 销 新华书店

印 刷 天水新华印刷厂

厂 址 天水市秦州区赤峪路 109 号

开 本 787 毫米×1092 毫米 1/16

字 数 255 千

印 张 13

版 次 2011 年 4 月第 1 版

印 次 2011 年 4 月第 1 次

书 号 ISBN978-7-5490-0007-4

定 价 26.00 元

本书如存在印装质量问题,请与印刷厂联系调换

版权所有 侵权必究

前 言

生物制药学是现代生物技术发展的一门新兴学科,是不断引进现代生物化学、分子生物学、细胞生物学、微生物学和制剂学及现代基因工程等多学科的先进技术,研究天然产物、基因工程药物等在体内和体外相互作用和药物大规模筛选的学科。

生物制药学是一门实践性很强的学科,重点在于培养学生的实际动手能力,但到目前为止,很难见到与其相关的实验指导教材,大大限制了学生技术应用能力的培养。本书就是针对生物制药专业的特点,结合编者多年教学和科研实际经验,并参考了国内外新近出版的相关专著和教材,以及相关的文献资料编写而成。本书共分三部分,实验部分包括生物药物概论实验、微生物工程制药实验、基因工程制药实验、动物细胞工程制药实验、植物细胞工程制药实验、抗体工程制药实验、酶工程制药实验、生物药物的研究开发与质量控制实验,共设置 35 个实验。实验内容的选择以工业化大生产为重点,同时兼顾了国内大部分大专院校的实验和实训条件,对复杂的生物制药学实验进行改良,以期满足莘莘学子的需求。

本书融科学性、先进性和实用性于一体,其内容充实、新颖,对生物制药理论与实践进行了比较全面的阐述,可作为大专院校本科生实验指导教材,也可供相关专业的研究生学习参考,同时本书也可供从事制药工程、生物制药及相关领域的科研人员和工程技术人员参考。

本书由王明明、刘俊林执笔,王明明统稿;本书的部分图表绘制由中铁第一勘察设计院集团有限公司的王亮高级建筑师完成。本书在编写过程中,得到了西北民族大学生命与工程学院院长杨具田教授的关怀与支持,并为本书提出了宝贵的意见;出版社的原彦平、周桂珍等,在本书的排印、校稿等方面做了大量工作,在此深表感谢!

本书虽数易其稿,但由于生物制药属新兴学科,新的技术日新月异,加之作者水平有限,书中难免存在疏漏和不足之处,敬请专家和读者批评指正,使其日臻完善,作者不胜感激。

编者

2011 年 1 月 10 日

目 录

第一部分 实验室安全守则	(1)
第二部分 生物制药实验基本知识	(4)
第三部分 生物制药实验	(11)
第一章 生物药物概论实验	(11)
实验一 血清中 IgG 的纯化——盐析法	(13)
实验二 酪蛋白的制备	(16)
实验三 糖的定量——3,5- 二硝基水杨酸比色定糖法	(18)
实验四 微生物细胞的破碎与分离	(21)
实验五 离子交换层析分离氨基酸	(24)
实验六 聚丙烯酰胺凝胶电泳	(27)
第二章 微生物工程制药实验	(30)
实验七 土壤中细菌菌落总数的测定	(32)
实验八 微生物菌种的保藏方法	(35)
实验九 紫外线的诱变育种	(41)
实验十 青霉菌的分离	(45)
实验十一 青霉素发酵效价的生物学测定	(47)
第三章 基因工程制药实验	(53)
实验十二 植物基因组 DNA 的提取	(54)
实验十三 动物基因组 DNA 的提取	(57)
实验十四 大肠杆菌感受态细胞的制备和转化	(60)
实验十五 外源基因在大肠杆菌中的诱导表达	(64)
实验十六 Southern 杂交	(66)
第四章 动物细胞工程制药实验	(71)
实验十七 SOD 的分离与纯化	(72)
实验十八 胰岛素的制备	(76)
实验十九 卵磷脂的提取	(79)
实验二十 甲壳质的制备	(81)
第五章 植物细胞工程制药实验	(83)

实验二十一	愈伤组织的诱导与增殖	(84)
实验二十二	植物原生质体的分离和培养	(86)
实验二十三	植物悬浮细胞系的建立	(90)
实验二十四	农杆菌介导的植物遗传转化	(91)
实验二十五	茶多酚类物质的测定	(94)
第六章	抗体工程制药实验	(96)
实验二十六	免疫扩散反应	(97)
实验二十七	试管凝集反应	(100)
实验二十八	酶联免疫与免疫反应试验	(102)
第七章	酶工程制药实验	(105)
实验二十九	淀粉酶的活力测定及专一性实验	(107)
实验三十	谷丙转氨酶活力的测定	(110)
实验三十一	固定化细胞法	(112)
实验三十二	胰弹性蛋白酶的制备及活力测定	(117)
第八章	生物药物的研究开发与质量控制实验	(120)
实验三十三	蛋白质的冷冻干燥	(123)
实验三十四	维生素 C 注射液的制备	(125)
实验三十五	重组(CHO 细胞)乙型肝炎疫苗的质量检定	(129)
附录一	硫酸铵饱和度的常用表	(150)
附录二	蛋白质含量的测定——Lowry 法	(152)
附录三	常用培养基配方	(155)
附录四	药品生产质量管理规范(2010 年修订)	(159)
参考文献		(201)

第一部分 实验室安全守则

一般规定

1.上课前应先熟悉环境,察看紧急冲洗站、灭火器、急救箱及安全通道等的位置,牢记“安全”是进行任何实验最重要的准则。

2.在实验室内请穿着实验服,避免穿凉鞋、拖鞋(脚趾不要裸露)。留有长发者,戴帽套将头发卷入套内,或以橡皮筋束于脑后,以防止引火危险或污染实验。

3.在实验室内禁止吸烟、饮食、化妆、嚼口香糖、嬉戏奔跑,食物饮料勿存放于实验室的冰箱中,实验桌上勿堆放书包、书籍、衣服及杂物等。

4.所有实验仪器、耗材、药品等均属实验室所有,不得带出实验室。每组分配的仪器、耗材请确定、清点与保管,课程结束后如数清点缴回。公用仪器请善加爱惜使用,实验前后,请将工作区域清理擦拭,并随时保持环境卫生。

5.实验前详阅实验内容,了解实验细节的原理及操作规程,注意上课所告知的注意事项。实验进行中有任何状况或疑问,随时发问,切勿私自变更实验程序。打翻任何药品试剂及器皿时,请随即清理。实验后,确切记下自己的结果,严禁抄袭,确定关闭不用的电源、水、酒精灯及煤气等。

6.睡眠不足、精神不济或注意力无法集中,请立即停止实验。实验时间若延长,请注意时间的管制及自身的安全,不可自行逗留实验室过夜。

7.实验完毕,请清理实验室、倒垃圾、灭菌、关闭灯光及电源,离开实验室前记得洗手。

8.任何意外事件应立即报告老师,并应熟知相关的应急措施。

药 品

1.使用任何药品,请先看清楚标示、注意事项,翻阅物质安全资料表,查明是否对人体造成伤害,使用完毕请放回原位。

2.新配制的试剂请清楚注明内容物、浓度、注意事项及配制日期,为避免污染,勿将未用完的药剂倒回容器内。

3.挥发性、腐蚀性、有毒溶剂(如甲醇、丙酮、醋酸、氯仿、盐酸、硫酸、



l-mercaptoethanol、酚等)要在通风橱中戴手套量取配制,取用完后随即盖好盖子,若不小心打翻试剂,马上处理。

4.有毒、致癌药剂如 acrylamide(神经毒素)、ethidium bromide(突变剂)、SDS、秋水仙素,请戴手套及口罩取用,防止到处污染,脱下手套后,应养成洗手的好习惯。

5.接触到病原材料或细菌,应迅速消毒。所有被污染的物品,在丢弃或重复使用前均需先灭菌,固体培养基不得倒入水槽或下水道中。

6.使用刻度吸管取物时,切勿用嘴吸取,请用吸耳球。

仪 器

1.使用仪器前先了解其性能、配置及正确操作方法,零件及附件严禁拆卸,勿私自调整,并注意插座电压(110V 或 220V)的类别。

2.使用离心机时,离心管要两两对称、重量平衡,锁紧离心机转陀。冷冻离心机于开机状态时,务必盖紧盖子,以保持离心槽之低温并避免结霜。

3.实验时不要用潮湿有汗的手去操作电器,不要用手紧握可能荷电的电器,不应以两手同时触及电器,电器设备外壳均应接地。万一不慎发生触电事故,应立即切断电源开关,对触电者采取急救措施。

4.使用微波炉加热时,不可有铝箔等金属物品,瓶盖必须松开,以免爆炸。加热后戴防热手套取出瓶子。

5.使用 UV 灯时,不要以眼睛直视 UV,应隔着挡板观察,完毕立即关灯。

6.超净工作台内的酒精等有机溶剂及易燃物(如甲醇、乙醇、乙醚、瓦斯等)要远离火苗,不可留置火焰燃烧,万一着火,应保持镇定,沉着处理。酒精或乙醚等着火时,应使用泡沫灭火剂或湿毛巾覆盖,勿使用水冲洗。

7.使用振荡器振荡培养时,注意三角瓶务必对称放置,并用橡皮筋等夹紧,勿使其摇晃摔出台面,否则需拆开并清除玻璃碎片与培养液。

急救措施

1.急性呼吸系统中毒:应使中毒者迅速离开现场,移到通风良好的地方,呼吸新鲜空气。如有休克、虚脱或心肺机能不全,必须先作抗休克处理,如人工呼吸、给予氧气并迅速拨打急救电话等。

2.经由口服而中毒:需立即用 3%~5% 小苏打溶液或 1:5000 高锰酸钾溶液洗胃,边喝边使之呕吐,最简单的催吐办法是用手指或筷子压舌根,或给中毒者喝少量(15~25 毫升)1% 硫酸铜或硫酸锌溶液(催吐剂)。使之迅速将毒物吐出。洗胃



要反复进行多次,直至吐出物中基本无毒物为止。再服解毒剂,一般解毒剂有鸡蛋清、牛奶、淀粉糊、橘子汁等。另外有些特殊解毒剂专对某种中毒而用:如磷中毒时用硫酸铜,钡中毒时用硫酸钠,氰化物中毒时用硫代硫酸钠等。

3.皮肤、眼、鼻、咽喉受毒物侵害时,应立即用大量自来水冲洗,然后送医院请各专科医生处理。

4.一度烧伤:只损伤表皮,皮肤呈红斑,微痛,微肿,无水泡。如被化学药品烧伤,应立即用大量水冲洗,除去残留在创面上的化学物质,并用冷水浸泡伤处,可减轻疼痛,最后需要消毒,保护创面不受感染。

5.二度烧伤:损伤表皮及真皮层,皮肤起水泡,疼痛,水肿明显。创面如污染严重,先用清水或生理盐水冲洗,再以1:1000新洁尔灭消毒,不要挑破水泡,用消毒纱布轻轻包扎好,请医生治疗。

6.三度烧伤:损伤皮肤全层,包括皮下组织、肌肉、骨骼,创面呈灰白色或焦黄色,无水泡,不痛,感觉消失。在送医院前,主要防止感染和休克,可用消毒纱布轻轻包扎好,给伤者保暖和供氧,必要时注射吗啡止痛。

7.炸伤:其急救措施基本同烧伤处理。但炸伤后伤口往往大量出血,应立即将伤口上部扎紧,防止流血过多。如发生昏迷、休克等,应进行人工呼吸,给氧,并送医院治疗。

8.电击伤:急救时首先使触电者脱离电源,为此可拉下电闸或用木棍将触电者从电源上拨开。当心别把触电者摔伤。断开电源后,检查伤员呼吸和心跳情况,若呼吸停止,立即进行人工呼吸。对心跳亦停止者要同时进行心脏按压。电击伤比较轻微者,很快能恢复健康,重者必须请医生治疗。应该注意,触电者在进行急救时,一般不要注射强心针和兴奋剂。

第二部分 生物制药实验基本知识

一、玻璃仪器的洗涤

在生物制药学实验中,玻璃仪器洁净与否,是获得准确结果的重要环节。洁净的玻璃仪器内壁应十分明亮光洁,无水珠附着在玻壁上。

(一)常用的洗涤方法

1.一般仪器,如烧杯、试管等可用毛刷蘸洗涤液仔细刷洗。然后用自来水反复冲洗,最后再用少量蒸馏水冲洗 2~3 次,倒置在沥水架上晾干或置于烘箱中烤干备用。

2.容量分析仪器如吸量管、容量瓶、滴定管等,不能用毛刷刷洗。用后应及时用自来水多次冲洗,细心检查洁净程度,根据挂不挂水珠采取不同处理方法。(1)如不挂水珠,用蒸馏水冲洗、干燥,方法同上;(2)如挂水珠,则应沥干后用重铬酸钾洗液浸泡 4~6 小时,然后按上法顺序操作,即先用自来水冲洗,再用蒸馏水冲洗,最后干燥。

3.粘附有血浆的刻度吸量管等,有三种洗涤方法:(1)先用 45% 尿素溶液浸泡,使血浆蛋白溶解,然后用自来水冲洗;(2)也可用 1% 氨水浸泡,使血浆溶解,然后再依次用 1% 稀盐酸溶液、自来水冲洗;(3)以上二法如达不到清洁要求,可浸泡于重铬酸钾洗液 4~6 小时,再用大量自来水冲洗,最后用蒸馏水冲洗 2~3 次。

4.新购置的玻璃仪器,应先置于 1%~2% 稀盐酸溶液中浸泡 2~6 小时,除去附着的游离碱,再用自来水冲洗干净,最后用蒸馏水冲洗 2~3 次。

5.凡用过的玻璃仪器,均应立即洗涤,久置干涸后洗涤十分困难。如不能及时洗涤,先用流水初步冲洗后浸泡在清水中,再按常规方法处理。

(二)使用重铬酸钾洗液(以下简称洗液)时应注意以下几点

1.需用洗液浸泡的器皿,在浸泡前应尽量沥干,否则会因洗液被稀释而降低洗液的氧化能力。

2. Hg^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Pb^{2+} 等离子可与洗液发生化学反应,生成不溶性化合物沉积在容器壁上。因此,凡接触过上述离子的容器,应先除去上述离子(可用稀硝酸或 5%~10% EDTA 钠清除)。



3.油类、有机溶剂等有机化合物可使洗液还原失效。因此,容器壁上附有大量油类、有机物时,应先除去。

4.洗液的酸性和氧化性很强,使用时应格外注意,千万不要滴落在皮肤或衣物上,以免灼伤或烧坏。

5.洗液颜色由深棕色变为绿色时,说明此时重铬酸已变成硫酸铬,不再具有氧化性,洗液已经失效,应停止使用,更换新液。

注:重铬酸钾洗液的配制

取重铬酸钾 20 g 溶于 20 ml 蒸馏水中,加热至沸。冷却后再将 200 ml 浓硫酸慢慢加入,边加边搅拌。注意:此时可产生高热。为防止容器破裂,应选用耐酸搪瓷缸或耐高温的玻璃器皿,切忌用量筒及试剂瓶等配制。为防止洗液吸收空气中的水分而被稀释变质,洗液应贮存于带盖的容器中。当清洁效力降低时,再加入少量重铬酸钾及浓硫酸就可继续使用。

二、吸量管的使用

吸量管和定量吸(移)液器(微量加样器)均为用来转移一定体积溶液的量器。

(一)吸量管

生化实验中常用的吸量管有三种,最常用的是刻度吸量管。

1.刻度吸量管

(1)刻度吸量管的种类

①按容量规格来分,有 0.1ml、0.2ml、0.25ml、0.5ml、1ml、2ml、5ml、10 ml 等数种。其精密度按不同的容积可达移取量的 0.1% ~ 1%。通常将管身标明的总容量分刻为 100 等分。因此,10 ml 的吸量管一格代表 0.1 ml;1 ml 的吸量管一格代表 0.01 ml,其余类推。

②按“零”点位置来分,有“0”点在吸量管上端的(即读数从上而下逐渐增大),也有“0”点在吸量管下端的(读数从下而上逐渐增大)。两种标示方法,在使用时各有方便之处。

③按刻度方法来分,刻度吸量管也有两种,一种是刻度刻到尖端的,将液体放出时,应吹出残留在吸量管尖端的少量液体,另一种是刻度不刻到尖端的。

(2)刻度吸量管的正确使用方法

用右手拇指和中指夹住管身,将吸量管的尖端伸入试液深处,左手持洗耳球把试液吸入管内至高过刻度以上时,迅速用右手食指按住吸量管的上口,以控制试液的泄放。吸液后应尽量使吸量管保持垂直,使右眼与刻度等高,稍微轻抬食指或轻轻转动吸量管,使试液面缓慢降落,至管内试液弯月面的最低点与吸量管的刻度线



相齐为止。然后将吸量管插到需加试剂的容器中,让尖端与容器内壁靠紧,松开食指让液体流出。液体流完后再等 15 秒钟,捻动一下吸量管后移去(如需吹的吸量管,则吹出尖端的液体后再捻转一下吸量管移去)。

(3)使用刻度吸量管的注意事项:

①选择适当规格的吸量管:吸量管的最大容积应等于或略大于所需容积(ml 数)。

②仔细看清吸量管的刻度情况:刻度是否包括吸量管尖端的液体?读数方向是从上而下,还是从下而上?

③拿吸量管时,刻度一定要面向自己,以便读数。

④吸取试剂时应注意三点:一是先吹去吸量管内可能存在的残留液体,二是将吸量管插入试剂液面深部(以免吸液过程中因液面降低而吸入空气产生气泡或管内试剂进入洗耳球),三是使用洗耳球(不可直接用口吸)。

⑤按吸量管上口时应该用食指,不能用拇指。

⑥吸取黏滞性大的液体(如血液、血浆、血清等)时,除选用合适的吸管(奥氏管)外,应注意拭净管尖附着的液体,尽量减慢放液速度(用食指压力控制),待液体流尽后吹出管尖残留的最后一滴液体。

⑦使用的吸量管应干净、干燥无水。如急用而又有水时,可用少量欲取试剂冲洗 3 次,以免试剂被稀释。

2.移液吸量管:也有两种,常见的一种是吸量管的上端只有一个刻度,另一种是除了在吸量管上端有刻度外,在吸量管下端狭窄处也有一刻度线。无论哪一种,在使用时将量取的液体放出后,只需将吸量管的尖端触及受器壁约半分钟即可,不得吹出尖端的液体。

3.奥氏吸量管:准确度最高,使用时必须吹出留在尖端的液体。

(二)定量吸(移)液器(微量加样器)

定量吸液器是吸量管的革新产品。由塑料制成。目前,因产地、厂家不同,其质量、价格差异悬殊。

1.定量吸液器的优点:使用方便,取、加样迅速,计量准确,不易破损,能吸取多种样品(只换吸嘴即可)。

2.定量吸液器的类型:有两种类型。

(1)固定式:只能取加一定容量的试剂,不能随意调节取加样量。其规格有 $10\mu\text{l}$ 、 $20\mu\text{l}$ 、 $25\mu\text{l}$ 、 $30\mu\text{l}$ 、 $50\mu\text{l}$ 、 $100\mu\text{l}$ 、 $200\mu\text{l}$ 、 $250\mu\text{l}$ 、 $300\mu\text{l}$ 、 $400\mu\text{l}$ 、 $500\mu\text{l}$ 、 $1000\mu\text{l}$ 等。

(2)可调式:在一定容量范围内可根据需要进行调节取加样量。例如规格为 $50\sim 200\mu\text{l}$ 的可调式定量吸液器,可以在 $50\mu\text{l}\sim 200\mu\text{l}$ 的范围内根据需要调节成设计容许的各种取加样容量($60\mu\text{l}$ 、 $85\mu\text{l}$ 、 $110\mu\text{l}$ 、 $170\mu\text{l}$ 、 $200\mu\text{l}$ 等)。



一般来讲,固定式吸液器比较准确,可调式吸液器使用较为方便。

3.定量吸液器的使用方法:

(1)选择适当的吸液器。吸液前先把吸嘴套在吸引管上,套上后要轻轻旋紧,以保证结合严密。

(2)持法:右手四指(除大拇指外)并拢握住吸液器外壳(使外壳突起部分搭在食指近端),大拇指轻轻放在吸液器的按钮上。

(3)取样(吸液):用大拇指按下按钮到第一停止点,以排出一定容量的空气,随后把吸嘴尖浸入取样液内,徐徐松开大拇指,让按钮慢慢自行复原,取样即告完成。

(4)排液:将吸液器的吸嘴尖置于加样容器壁上,用大拇指慢慢地将按钮按下到第一停止点,停留1秒钟(黏性较高的溶液停留时间应适当延长)。然后再把按钮按到第二停止点上,让吸嘴沿管壁向上滑动。当吸嘴尖与容器壁或溶液离开时,方可释放按钮,使其恢复到初始位置。

(5)吸液器用后应及时取下吸嘴。将吸嘴用自来水冲洗后浸入盛水的容器内(以防干涸),待实验结束后集中仔细清洗。

三、溶液的混匀

(一)混匀的目的

- 1.使反应体系内的各种物质分子很好地互相接触,充分进行反应。
- 2.使欲稀释的溶液成为浓度均一的溶液。

(二)混匀的方法通常有以下几种

- 1.使盛器作离心运动。
- 2.左手持试管上端,用右手指轻击试管下半部,使管内溶液做旋转运动。
- 3.利用旋涡混合(振荡)器混匀。
- 4.不得已时可用干燥清洁的玻璃棒搅匀。

(三)混匀的注意事项

- 1.防止盛器内的液体溅出或被污染。
- 2.严禁用手指堵塞管口或瓶口震荡混匀。

四、高压蒸汽灭菌锅的使用

高压灭菌的原理是:在密闭的蒸锅内,其中的蒸气不能外溢,压力不断上升,使水的沸点不断提高,从而锅内温度也随之增加。在0.1 MPa的压力下,锅内温度达121℃。在此蒸汽温度下,可以很快杀死各种细菌及其高度耐热的芽孢。



注意:完全排除锅内空气,使锅内全部是水蒸气,灭菌才能彻底。高压灭菌放气有几种不同的做法,但目的都是要排净空气,使锅内均匀升温,保证灭菌彻底。常用方法是:关闭放气阀,通电后,待压力上升到 0.05 MPa 时,打开放气阀,放出空气,待压力表指针归零后,再关闭放气阀。关阀再通电后,压力表上升达到 0.1 MPa 时,开始计时,维持压力 0.1 ~ 0.15 MPa 20 min。

到达保压时间后,即可切断电源,在压力降到 0.5 MPa 时,可缓慢放出蒸气,应注意不要使压力降得太快,以致引起激烈的减压沸腾,使容器中的液体四溢。当压力降到零后,才能开盖,取出培养基,摆在平台上,以待冷凝。不可久不放气,引起培养基成分变化,以至培养基无法摆斜面。一旦放置过久,由于锅炉内有负压,盖子打不开,只要将放气阀打开,大气压入,内外压力平衡,盖子便易打开了。

对高压灭菌后不变质的物品,如无菌水、栽培介质、接种用具,可以延长灭菌时间或提高压力。而培养基要严格遵守保压时间,既要保压彻底,又要防止培养基中的成分变质或效力降低,不能随意延长时间。

操作步骤:

1. 首先将内层灭菌桶取出,再向外层锅内加入适量的水,使水面与三角搁架相平为宜。

2. 放回灭菌桶,并装入待灭菌物品。注意不要装得太挤,以免妨碍蒸气流通而影响灭菌效果。三角烧瓶与试管口端均不要与桶壁接触,以免冷凝水淋湿包口的纸而透入棉塞。

3. 加盖,并将盖上的排气软管插入内层灭菌桶的排气槽内,再以两两对称的方式同时旋紧相对的两个螺栓,使螺栓松紧一致,勿使漏气。

4. 接通电源加热,并同时打开排气阀,使水沸腾以排除锅内的冷空气。待冷空气完全排尽后,关上排气阀,让锅内的温度随蒸气压力增加而逐渐上升。当锅内压力升到所需压力时,控制热源,维持压力至所需时间。一般培养基灭菌参数为 1.05 kg/cm², 121.3℃, 20 min。

5. 灭菌所需时间到后,切断电源或关闭煤气,让灭菌锅内温度自然下降,当压力表的压力降至 0 时,打开排气阀,旋松螺栓,打开盖子,取出灭菌物品。如果压力未降到 0 时,打开排气阀,就会因锅内压力突然下降,使容器内的培养基由于内外压力不平衡而冲出烧瓶口或试管口,造成棉塞沾染培养基而发生污染。

6. 将取出的灭菌培养基放入 37℃ 温箱培养 24 h,经检查若无杂菌生长,即可待用。



五、离心机的使用

离心法是分离沉淀的一种方法。它是利用离心机转动产生的离心力,使比重较大的物质沉积在管底,以达到与液体分离的目的。因液体在沉淀的上部,故称清亮的液体部分为上清液。

电动离心机的使用方法:

1.将欲离心的液体,置于离心管或小试管内。并检查离心管或小试管的大小是否与离心机的套管相匹配。

2.取出离心机的全部套管,并检查套管底部是否铺有软垫,有无玻璃碎片或漏孔(有玻璃碎片必须取出,漏孔应该用蜡封住)。检查合格后,将盛有离心液的两个试管分别放入套管中,然后连套管一起分置于粗天平的两侧,通过往离心管与套管之间滴加水来调节两边的重量使之达到平衡。

3.将已平衡的两只装有离心管的套管,分别放入离心机相互对应的两插孔内。盖上离心机盖。打开电源开关。逐档扭动旋钮,缓慢增加离心机转速,直至所需数值。达到离心所需时间后,将转速旋钮逐步回零,关闭电源,让离心机自然停止转动后(不可人为制动),取出离心管。

六、分光光度计的使用

分光光度法是测定被测物质在特定波长处或一定波长范围内光的吸收度,对该物质进行定性和定量分析。常用的波长范围为:(1)200~400 nm 的紫外光区,(2)400~760 nm 的可见光区,(3)2.5~25 μm 的红外光区。所用仪器为紫外分光光度计、可见光分光光度计(或比色杯)、红外分光光度计或原子吸收分光光度计。特点是灵敏、精确、快速和简便,在复杂组分系统中,不需要分离,即能检测出其中所含的极少量物质。是生物、化学研究中广泛使用的方法之一,广泛用于糖、蛋白质、核酸、酶等的快速定量检测。

722 型分光光度计的使用:

1.插上插头,接通电源,打开暗箱盖,预热 20 min。注意:分光光度计在接通电源而不用时,必须打开暗箱盖,以免光电管老化。

2.将准备好的试剂倒入比色杯中,用吸水纸擦去比色杯外侧水珠,并依次放入比色杯架中。注意:手拿比色杯毛面,试剂倒入杯中满 2/3 即可,不得将比色杯放在仪器上。

3.调节所需波长,灵敏度调至“1”,选择旋钮至“T”。



- 4.调“0”:打开暗箱盖,用调“0”旋钮调节。
- 5.调“100%”:盖上暗箱盖,用调“100%”旋钮调节,让光线通过“空白管”。
- 6.重复调“0”和调“100%”数次。若调不到“0”和“100%”,可将灵敏度调至“2”或更高,不得用力强行旋转旋钮,以免损坏。
- 7.将选择选扭由“T”调至“A”,此时读数应由“100%”至“0”,若不为“0”,可用“消光零”旋钮调节。
- 8.拉动拉杆,分别读取“A 标”和“A 样”。
- 9.取出比色杯,弃去溶液,洗净晾干,备用。

第三部分 生物制药实验

第一章 生物药物概论实验

生物制药是以生物信息学、功能抗原学、组合化学等高科技作为依托,融合了医学、生物学、药理学等先进技术,依据分子生物学、生物物理学、分子遗传学、细胞生物学、生物化学等基础学科而形成的产业。生物药物是指运用生物学、医学、生物化学等的研究成果,从生物体、生物组织、细胞、体液等,综合利用物理学、化学、生物化学、生物技术和药学等学科的原理和方法制造的一类用于预防、治疗和诊断的制品。当今,生物药物在医药、日化产品、保健食品等领域得到广泛的应用,特别是在改造传统制药产业中发挥重要作用。世界生物制药技术产业正处于投资收获期,发展迅速,它在新药物的开发研究和生产过程中广泛运用,已成为当今最为重要的技术之一。

生物药物的制备方法:

1.根据原材料和药物的种类及性质的不同,提取和分离方法有很大的差异。

生物药物原料的选择、预处理与保存方法:

(1)原料选择的原则

原料的选择必须符合以下原则:有效成分含量高,原料新鲜,来源丰富、易得,产地较近,原料中杂质含量少,成本低。

(2)预处理与保存

预处理:收集动物原料时,就地采集后去除结缔组织、脂肪组织等不用的成分,将有用成分保鲜处理;收集植物原料时,应注意要采集部位和季节,去除不用部分,将所需部位进行保鲜处理;收集微生物原料时,要及时将菌体与培养液分开,进行保鲜处理。

保存方法:①冷冻法:一般在 -40°C 条件把原料冷冻,适用于所有生物原料;②有机溶剂脱水法:如丙酮,适用于原料少、价值高的材料,且有机溶剂对原料生物活性无影响;③防腐剂保鲜:常用乙醇、苯酚等,适用于液体原料,如发酵液、提取液。

2.生物药物的提取

(1)组织与细胞的破碎