


高等学校教材
供制药工程、药学等专业用

制药工程实验教程

■ 主 编 金 坚

 人民卫生出版社

高等学校教材

供制药工程、药学等专业用

制药工程实验教程

主 编 金 坚

副主编 许正宏 邱丽颖

参编人员 (以姓氏拼音为序)

曹 钰	陈 伟	陈 蕴	程建青
储 敏	邓 超	杜 斌	窦文芳
范红斌	冯 磊	金 坚	李 英
钱建瑛	邱丽颖	王晓岚	许泓瑜
许正宏	徐晓宇	张旦旦	张家骊
张晓梅	朱 劼	朱瑞宇	

人 民 卫 生 出 版 社

图书在版编目 (CIP) 数据

制药工程实验教程/金坚主编. —北京: 人民卫生出版社,
2010. 2

ISBN 978-7-117-12477-5

I. 制… II. 金… III. 制药工业—化学工程—实验—
高等学校—教材 IV. TQ46-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 227734 号

门户网: www.pmph.com	出版物查询、网上书店
卫人网: www.ipmph.com	护士、医师、药师、中医 师、卫生资格考试培训

制药工程实验教程

主 编: 金 坚

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

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-67605754 010-65264830

印 刷: 北京铭成印刷有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 20

字 数: 512 千字

版 次: 2010 年 2 月第 1 版 2010 年 2 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-12477-5/R·12478

定 价: 40.00 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)

前 言

由于我国制药工程专业创办时间短,从整体来看,各校的制药工程专业均设置不久,培养方案、课程体系、教学内容、教学方法和手段、实践教学基地建设等尚无成型的模式;各校的制药工程专业因办学基础条件以及对制药工程学科内涵的认识不同而不尽相同,相应的课程体系与课程设置也不一样,实验教材尚无统一规范和明确的目标要求,对当前创新、创业型人才培养体系也尚无配套的指导用书,在一定程度上给学生创新性实验设计和开展造成一定困难。为此,我们尝试编写了这本供制药工程等专业的《制药工程实验教程》。

本书立足于实验的基本理论、基础知识和基本的实验操作相结合,并提供综合创新性实验设计的知识平台;旨在拓展学生理论结合实际的能力,提高学生知识的综合运用能力,满足通识性人才、专业化人才和创新型人才培养的需要,对基于项目的 CDIO 工程人才培养模式的项目设计和实施有一定的指导意义。

本书共设三篇 13 章。第一篇基本实验技能与操作技术,主要介绍常用实验仪器和基本实验技术,使学生了解常用仪器特性、使用范围及常用基本实验操作技术;第二篇基础实验内容,主要通过具体实验训练学生实际操作能力;第三篇拓展实验内容,主要以拓展学生实验设计思维为主,涵盖了药物分子设计原则、制药工艺条件的优化、药效药理学模型、药物安全性评价、药物代谢动力学设计原则及药物检测等。充分体现了基础-综合-拓展创新实验教学体系的精神,在夯实实验基础、训练基本技能、强调综合运用、提高创新能力不同层次上为学生提供知识平台。

在此书出版之际,深感给学生一本好的综合性实验指导用书的重要,也感到编写一本优秀指导用书的难度。希望各位同仁对本书中不尽如人意之处提出更合理的建议和意见,恳请各位读者不吝赐教与指正。

金 坚 许正宏 邱丽颖

2009 年 9 月于江南大学

目 录

第一篇 基本实验技能与操作技术

第一章 实验室基本知识	1
一、实验室安全	1
二、化学药品、试剂的存储及使用	2
三、废品的销毁	2
四、无菌室要求	3
五、实验记录和报告	3
第二章 制药基本操作技术	4
第一节 生物药物的基因工程技术	4
一、基因工程工具酶	4
二、基因工程的载体	6
三、目的基因的制备	7
四、目的基因与载体的连接	8
五、重组 DNA 导入受体细胞	8
六、重组体的检测	9
七、克隆基因的表达	9
第二节 生物制药常用仪器及其操作技术	10
一、常用仪器简介	10
二、实验室常用器材的处理与消毒灭菌	16
第三节 化学合成基本操作技术	18
一、常用的实验仪器	18
二、合成反应常用装置	20
三、化合物的分离和提纯常用方法	23
四、化合物的物理常数测定常用方法	31
第四节 天然药物提取与分离技术	34
一、常用提取技术	34
二、常用分离技术	36
第三章 药物分析操作技术	40
第一节 化学分析法	40

第二节 紫外、可见分光光度法	40
一、显色与操作条件的选择	40
二、紫外-可见分光光度法的应用	42
三、使用方法	43
第三节 原子吸收分光光度法	43
一、原子吸收分光光度计测定条件的选择	43
二、定量方法	44
三、应用	45
第四节 荧光分析法	45
第五节 红外光谱法	45
一、样品的制备	45
二、定性分析	46
三、定量分析	47
第六节 层析技术	48
一、概述	48
二、常用层析技术	49
三、色谱柱填充	52
第七节 薄层层析	53
一、吸附剂和支持剂	54
二、展开剂	55
三、薄层板的制作	55
四、薄层层析操作	55
五、薄层层析的定性定量分析	55
六、薄层层析的应用	56
第八节 高效液相色谱	56
一、高效液相色谱法的分离依据	56
二、高效液相色谱系统	56
三、样品制备方法	57
四、高效液相色谱的定性定量分析	58
五、高效液相色谱在医药方面的应用	59
第四章 细胞培养基本技术	60
第一节 细胞培养的无菌操作	60
一、培养用品的清洗和消毒灭菌	60
二、无菌操作的基本要领和要求	60
三、细胞培养用液	61
第二节 细胞培养技术	62
一、细胞的冻存方法	63
二、细胞的复苏	63

三、传代细胞的传代培养	63
四、细胞的计数方法	64
五、生长曲线的测定	65
六、单层培养细胞的生长过程观察	65
第三节 酶细胞化学技术	66
一、碱性磷酸酶 Gomori 钙钴法的实验方法	66
二、酸性磷酸酶 Gomori 硝酸铅改良法	67
第四节 免疫细胞化学技术	67
第五章 药理学基本实验技能	70
第一节 Pclab-UE/US 软件使用和常用手术器材	70
一、Pclab-UE/US 软件使用	70
二、常用手术器械	73
第二节 常用实验动物	74
一、动物选择	74
二、常用实验动物的捉持方法	74
三、常用实验动物的给药方法	75
第三节 常用溶液配制	84
一、常用生理盐溶液的成分及配制量	84
二、常用抗凝剂的浓度	85
第六章 制剂学基本操作技术	86
第一节 制剂基本技术	86
一、制剂前处理过程的基本技术	86
二、制剂成型技术	90
第二节 制剂的基本要求	97

第二篇 基础实验内容

第七章 制药技术	99
第一节 生物化学与分子生物学	99
实验一 总糖和还原糖的测定(3,5-二硝基水杨酸法)	99
实验二 粗脂肪的提取和测定	101
实验三 血清总胆固醇的测定(邻苯二甲醛法)	102
实验四 蛋白质的两性反应和等电点的测定	103
实验五 血清蛋白质醋酸纤维素薄膜电泳及定量分析	105
实验六 蔗糖酶米氏常数的测定	108
实验七 DNA 提取及浓度和纯度测定	110
实验八 酵母核糖核酸的提取及组分鉴定	112
实验九 牛血清白蛋白的分离纯化及鉴定	113
实验十 聚合酶链式反应扩增 DNA	118

实验十一 质粒 DNA 的转化	121
实验十二 小量质粒 DNA 的提取	123
实验十三 大量质粒 DNA 的制备	125
实验十四 质粒 DNA 的限制性内切酶酶切分析	127
实验十五 质粒 DNA 的提取、酶切与鉴定	128
第二节 微生物学	132
实验一 放线菌的形态观察及一般染色	132
实验二 细菌的革兰染色	133
实验三 真核微生物细胞的形态观察	135
实验四 细菌的生理生化实验	138
实验五 物理化学因素对微生物的影响	142
实验六 水中大肠菌群的检测	143
实验七 土壤样品中微生物的分离纯化	147
实验八 运用紫外诱变技术筛选抗药性突变菌株	148
实验九 正交试验法优化双歧杆菌发酵培养基	150
实验十 抗生素效价的微生物学测定	155
附录 I 常用的教学培养基	157
附录 II 常用的染色液与溶液	158
第三节 药物化学及天然药物化学	159
实验一 阿司匹林的合成	159
实验二 磺胺醋酰钠的合成	160
实验三 苯佐卡因的合成	161
实验四 琥珀酸喘通的合成	163
实验五 地巴唑的合成	164
实验六 中药延胡索中总生物碱的制备以及定性、定量分析的方法	166
实验七 灵芝粉中三萜和多糖的提取与分析	167
第八章 药物分析	170
实验一 药物的一般杂质检查	170
实验二 药物的特殊杂质检查	173
实验三 苯甲酸钠的含量测定	176
实验四 枸橼酸铁铵的杂质检查及含量测定	177
实验五 维生素 C 注射液的分析及含量测定	179
实验六 气相色谱法测定酊剂中乙醇含量	180
实验七 血浆中苯妥英浓度的高效液相色谱法测定	181
实验八 三点校正——紫外分光光度法测定维生素 AD 胶丸中维生素 A 的含量	183
第九章 药效药理学测定	185
第一节 细胞生物学	185
实验一 动物细胞线粒体的分离与观察	185

实验二	动物细胞凋亡的双荧光染色与观察	186
实验三	血管内皮细胞损伤的药效评价	188
实验四	染色体制备	189
实验五	四唑盐(MTT)比色法检测细胞活力	190
实验六	SRB比色法检测药物活性	191
实验七	吖啶橙(acridineorange, AO)荧光染色法	192
实验八	肿瘤细胞迁移实验	194
第二节	免疫学	195
实验一	中性粒细胞吞噬功能测定	195
实验二	硝基四氮唑蓝还原实验	196
实验三	单向琼脂扩散试验	197
实验四	双向琼脂扩散试验	199
实验五	对流免疫电泳	200
实验六	酶免疫标记技术	202
实验七	白细胞介素-2的生物学活性检测	205
第三节	药理学	207
实验一	药物的基本作用	207
实验二	药物剂量对药物作用的影响	208
实验三	药物半数有效量(ED ₅₀)的测定	208
实验四	传出神经药物对家兔血压的影响	209
实验五	药物的抗惊厥作用	211
实验六	热板法观察药物的镇痛作用	212
实验七	药物对小鼠自发活动的影响	213
实验八	强心药对离体蛙心作用	214
实验九	药物对家兔离体肠平滑肌的作用	215
实验十	糖皮质激素对炎症的影响	216
实验十一	药物的体内抗凝血作用	217
实验十二	肝功能对戊巴比妥钠的药物代谢作用的影响	218
第十章	药剂学	220
实验一	溶液型液体药剂的制备	220
实验二	混悬型液体制剂的制备	221
实验三	乳浊型液体制剂的制备	223
实验四	注射剂的制备	224
实验五	片剂的制备	227
实验六	片剂的薄膜包衣	230
实验七	软膏剂的制备	231
实验八	栓剂的制备	232
实验九	热原检查	233

实验十 对乙酰氨基酚片溶出度测定	235
实验十一 阿司匹林片崩解时限影响因素的检查	236
实验十二 薄荷油/ β -环糊精包合物的制备和检查	237
第十一章 制药工艺学	239
实验一 工程菌培养基配制	239
实验二 工程菌的复苏与保藏	239
实验三 工程菌的摇床发酵	240
实验四 工程菌的自动罐上发酵	241
实验五 rhIFN α -2b 复性和纯化	242
实验六 生物催化法还原乙酰乙酸乙酯制备手性醇 S(+)-3-羟基丁酸乙酯	248
实验七 (-)-(1R, 2S)-1-苯基-1,2-丙二醇的生物催化法非对称合成	249
实验八 外消旋 DL-丙氨酸的酶法拆分	250
实验九 樟芝发酵菌粉中三萜和多糖的提取与分析	252
第三篇 拓展实验内容	
第十二章 药效药理学拓展	255
第一节 动物模型建立	255
模型一 脑缺血动物实验模型	255
模型二 迷宫实验	257
模型三 实体瘤动物模型的建立和药物疗效评价	259
模型四 实验性糖尿病模型	261
第二节 药物安全性评价	262
一、国内一般药理学实验技术要求	262
二、毒理学研究	264
三、实例:XXX 毒理试验设计方案	266
第三节 药物代谢动力学	272
一、实验设计原则	272
二、生物利用度实验设计	275
三、生物样品测定方法的要求	276
四、天然药物药物动力学研究概况	278
实例 1 磺胺类药物在正常与肾衰家兔体内的药代动力学参数测定	278
实例 2 重组蛋白药物 A 的体内分布测定	280
实例 3 融合蛋白 X 的体内排泄及药动学实验	281
第十三章 制药工艺优化原则	284
第一节 重组蛋白质及多肽药物制备工艺优化的原则	284
一、优化的原则	284
二、实例:碳源对重组子 KM71/IH 菌体生长的影响	287
三、自己制造重组蛋白质药物的实验方案、实施与评价	292

第二节 化学制药工艺优化的原则·····	293
一、原则要求·····	293
二、实例:维生素 B ₆ 工艺条件优化·····	294
第三节 天然药物提取分离工艺改造原则·····	296
一、原则要求·····	296
二、实例:松口蘑中抗肿瘤活性多糖的提取工艺改造·····	296
三、自己制备的药物的工艺改造实验方案、实施及评价·····	300
第四节 制剂工艺改造·····	301
一、剂型选择时应考虑的因素·····	301
二、处方拟定时的研究方法·····	303
三、实例:水飞蓟素固体脂质纳米粒制剂处方优化·····	304

第一篇 基本实验技能与操作技术

第一章

实验室基本知识

一、实验室安全

药物化学和有机化学一样是一门实践性很强的科学,因此,在进入实验室工作之前,希望参加实验者必须对实验课程的内容,要有充分的准备,而且要通晓实验室的一些基本规则,遵守实验室安全操作须知,才能避免可能发生的一些危险情况。

(一) 眼睛安全防护

在实验室中,眼睛是最容易受到伤害的。飞溅出的腐蚀性化学药品和化学试剂,进入眼睛会引起灼伤和烧伤;操作过程中溅出的玻璃碎片也会使眼睛受到伤害;有可能发生的爆炸事故,更容易使眼睛受到损伤。因此在实验室中,最重要的是要佩戴合适的防护目镜。防护目镜一般是有机玻璃的,并有护眶。为了安全起见,要养成戴防护目镜的习惯。

倘若有化学药品或酸、碱液溅入眼睛,应立即用大量清水冲洗眼睛,并立即到最近的医院治疗。若有固体颗粒或碎玻璃进入眼睛,切记勿揉眼睛,立即去有关医院进行诊治。

(二) 预防火灾

有机药物合成实验室中,由于常使用挥发性、易燃性的各种有机试剂,最容易发生的危险就是火灾。因此应严格遵守实验室的各项规章制度,防止火灾发生。

实验室或实验大楼内禁止吸烟。实验室使用明火时,如周围有人使用易燃易爆溶剂,应禁用明火。

一旦发生火灾,须迅速切断电源、熄灭火源、移开易燃物品,就近寻找灭火器材,扑灭着火。如容器中少量溶剂起火,可用石棉网、湿抹布盖住容器口。其他着火,采用灭火器扑灭,并立即报告有关部门或拨打“119”火警电话。

在实验中,万一衣服着火,切勿奔跑,可就近找到灭火喷淋器或自来水龙头,用水冲淋使火熄灭。

(三) 割伤、烫伤和试剂灼伤处理

1. 割伤 割伤时,如无特定要求,应用水充分清洗伤口,并取出伤口中的碎玻璃,用无菌绷带或创可贴包扎。大伤口应注意压紧伤口或主血管,并紧急送医院治疗。

2. 烫伤 因火焰或触及灼热物体所致的轻度烫伤,可通过立即将受伤部位浸入冷水或冰水中以减轻疼痛。重度大范围烫伤应立即去医院治疗。

3. 化学试剂灼伤 对于不同化学试剂灼伤,处理方法不同。

(1) 酸:立即用大量水冲洗,再用3%~5%碳酸氢钠溶液淋洗,最后水洗10~15min。严

重者将灼伤部位拭干包扎好,到医院治疗。

(2) 碱:立即用大量水冲洗,再用2%醋酸溶液或1%硼酸溶液淋洗,最后水洗10~15min。

(3) 溴:立即用大量水冲洗,再用10%硫代硫酸钠溶液淋洗或用湿的硫代硫酸钠纱布覆盖灼伤处,至少3h。

(4) 有机物:用酒精擦洗可除去大部分有机物,然后用肥皂和温水洗涤即可。如果皮肤被酸等有机物灼伤,将灼伤处浸在水中至少3h,然后请医生处理。

(四) 中毒预防

有毒物质溅入口中尚未咽下者应立即吐出,用大量水冲洗口腔。如已吞下,应根据毒物性质进行解毒,并立即就医。

刺激性及神经性毒物中毒,先用牛奶或鸡蛋清使之冲淡或缓和,再设法催吐,并立即就医。

吸入气体中毒,将中毒者移至室外通风处,解开衣领或纽扣,使其呼吸新鲜空气,必要时进行人工呼吸。

二、化学药品、试剂的存储及使用

(一) 化学药品的贮存

一般实验室中不应存储过多化学药品和试剂,需要多少领多少。

大多数情况下,实验室所用化学药品都贮存在带磨口塞的玻璃瓶内,高黏度的液体放在广口瓶中,一般性液体放在细颈瓶内,氢氧化钠和氢氧化钾溶液保存在带橡皮塞或塑胶塞的瓶内,能够与玻璃反应的化合物则使用塑料或金属容器,碱金属存放在煤油中,黄磷则需以水覆盖。

对光敏感的物质,都有形成过氧化物的倾向,应贮存在棕色玻璃瓶中。

产生毒性或腐蚀性蒸气的物质(如溴、盐酸、氢氟酸)建议放在通风橱内专门的地方。

少量的或对潮湿气和空气敏感的物质常密封贮存于玻璃安瓿瓶中。

某些毒品(如氰化物、砷及其化合物)应按有关部门规定贮存。

(二) 化学药品使用中注意事项

有机溶剂具有易燃、有毒两个特点。

易燃有机溶剂在室温时有较大蒸气压,当空气中混杂易燃有机溶剂的蒸气达某一极限时,遇到明火即发生燃烧爆炸。而且有机溶剂蒸气都较空气密度大,会沿着桌面或地面漂移到较远处,或沉积在低洼处。因此,实验中用剩的火柴梗切勿乱丢,也不要将易燃溶剂倒入废物缸中,更不能用开口容器盛放易燃溶剂。

有机溶剂以较为隐蔽的方式对人产生毒害,使用中应尽量减少与有机溶剂的直接接触。实验室应充分通风。操作有毒试剂和物质时,必须戴橡皮手套或一次性手套,操作后立即洗手。注意切勿让有毒物质触及五官及伤口。

三、废品的销毁

碎玻璃和其他锐角的废物不要丢入废纸篓或类似的盛器中,应使用专门的废物箱。

不要把任何用剩的试剂倒回试剂瓶中,其一会造成试剂污染,其二由于操作疏忽导致错误引入异物,有时会发生剧烈的化学反应甚至爆炸。

危险的废品,如会放出毒气或能够自燃的废品,决不能丢在废物箱或水槽中。不稳定的化学品和不溶于水或与水不混溶的溶液也禁止倒入下水道,应将其分类集中处理。对倒掉后能

与水混溶,或能被水分解或腐蚀性液体,必须用大量的水冲洗。

金属钾或钠的残渣应分批小量的加到大量的醇中予以分解(操作时必须戴防护目镜)。

四、无菌室要求

(一) 基本要求

无菌室是一间光照度良好,无直接空气对流,并与外界隔离的小室。其外有一缓冲过道,在内室门中开一小活动窗,以便室内外物品的传递。室内有紫外线灯(其多少取决于无菌室空间的大小)。

无菌室应经常保持清洁,工作前应将室内抹净,地上用拖把拖湿,然后将需用的器材放入室内,关好门后,开启紫外线灯照射 1h。工作者进入时应穿戴无菌衣、帽及口罩,并换清洁的胶底鞋(无菌室专用)。进入前关闭紫外线灯,在工作未完成前,不应随便开门出入。工作完毕,将室内打扫干净后方可离开。

(二) 无菌室及其他污染物品的处理法

1. 无菌室的消毒 操作前后,均应用紫外线照射 0.5~1h。若出现霉菌或顽固性细菌污染时,要用甲醛熏蒸消毒,每立方米容积使用甲醛 10~15ml,加高锰酸钾 5~7.5g,密闭门窗,熏蒸 4h 以上或过夜。由于甲醛有刺激性,因而现在已多用 1%~2%过氧乙酸熏蒸。

2. 其他污染物的消毒 有时因某些意外造成物体、桌面或地面的污染,常用 5%石炭酸处理 2min,若因操作不慎致使皮肤被病原性细菌污染,需用 0.1%苯扎溴铵浸泡洗涤至少 20min 或以 0.2%~0.5%“84”消毒液浸泡 5~10min。若实验中可能接触肝炎病毒,所有的玻璃器皿均需要使用 0.2%过氧乙酸或 0.2%~0.5%“84”消毒液擦拭。

五、实验记录和报告

做好实验记录和报告是每一个科研人员必备的基本素质。实验记录应记在专门的实验记录本上,实验记录本应有连续页码。所有观察到的现象、实验时间、原始数据、操作和后处理方法、步骤均应及时、准确、细致地记录,并签名,以保证实验记录的完整性、连续性、原始性。将实验情况记录在便纸条、纸巾等容易失落或损失的地方的做法是错误的。

实验前,对所做实验应充分做好预习工作。预习包括反应的原理,可能发生的副反应,反应机制,实验操作的原理和方法,产品提纯的原理和方法,注意事项及实验中可能出现的危险及处理方法,应写出详细报告。同时还要了解反应中化学试剂的化学计量学用量,对化学试剂和溶剂的理化常数等要记录在案,以便查询。

常见实验记录格式:

实验目的:

实验人: 实验日期: 天气: 室温:

一、实验目的

二、反应原理

三、可能发生的副反应

四、化学试剂规格及用量

五、实验操作

六、小结

(朱瑞宇)

第二章

制药基本操作技术

第一节 生物药物的基因工程技术

基因工程的基本过程包括：①获取目的基因；②将目的基因在体外与载体重组；③将重组分子导入宿主细胞；④筛选高表达的工程菌株；⑤表达生产目的基因的蛋白质产物；⑥提纯制品并鉴定。

一、基因工程工具酶

在基因工程中，大量应用的是作用于核酸的酶，主要有：

(一) 限制性核酸内切酶

根据限制酶的识别序列和切割位置的特性，可以将限制酶分为三类即 I、II 和 III 型。其中 I 型和 III 型限制酶的识别位点和切割位点不一致，不产生特定的核苷酸片段，在基因工程实验中很少用到。II 型限制酶有特定的识别位点和切割位点，识别序列大约是 4~12bp，约有一半的 II 型限制酶的切割位点是 6 个核苷酸。它们的作用不需要 ATP 和 SAM(腺苷甲硫氨酸)作为辅助因子，一般只需 Mg^{2+} 。常用的限制酶举例如下：

限制性内切酶名称	识别及切割序列
<i>Alu</i> I	AG↓CT
<i>Bal</i> I	TGG↓CCA
<i>Sma</i> I	CCC↓GGG
<i>Bam</i> H I	G↓GATCC
<i>Bgl</i> II	A↓GATCT
<i>Eco</i> R I	G↓AATTC
<i>Hind</i> III	A↓AGCTT
<i>Hinf</i> I	C↓ANTC
<i>Pst</i> I	CTGCA↓G
<i>Sal</i> I	G↓TCGAC

限制酶反应的影响因素主要有：

1. 温度 一般情况下最适反应温度为 37℃，但也有例外，如 *Sma* I 的反应温度为 25℃。
2. 缓冲液 不同的限制酶对离子强度、pH 值有不同要求，一般分为低盐、中盐、高盐。为了保证酶的稳定性，有一些酶需要在反应体系中加入牛血清白蛋白。
3. 时间 主要取决于加入的酶量与底物 DNA 含量之间的关系，通常作用时间为 1~3h。
4. 反应体积和甘油浓度 商品化的限制酶均加甘油作为保护剂，故在进行酶反应时，酶

的体积一般为总反应体积的 1/10。若酶加得太多,甘油浓度偏高,会影响酶切反应的特异性。

5. DNA 的纯度和结构 DNA 样品中所含的蛋白质、有机溶剂及 RNA 等杂质均会影响酶切反应的速度和完全程度。酶切反应的底物一般是 dsDNA, DNA 的甲基化位置也会影响酶切反应。

(二) DNA 聚合酶

DNA 聚合酶种类很多,它们在细胞的 DNA 复制过程中起重要作用,而且基因工程的许多步骤都涉及 DNA *pol* 催化下的 DNA 体外合成反应。这些酶作用时大多需要模板,产物的序列与模板互补。

1. 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I (*E. coli* DNA *pol* I) 它具有三种活性,即 5'→3' DNA 聚合酶活性、3'→5' 外切酶活性和 5'→3' 外切酶活性。

2. 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 大片段(Klenow 片段) 该酶是用枯草杆菌蛋白酶或胰蛋白酶降解 *E. coli* DNA *pol* I 而得到的该酶的大片段,保留了全酶中的 5'→3' 聚合活性与 3'→5' 外切活性。

3. T4 噬菌体 DNA 聚合酶(T4 DNA *pol*) 具有 5'→3' 聚合活性及 3'→5' 外切活性,但其 3'→5' 外切活性对单链作用比对双链作用强,且外切活性比 Klenow 片段强 200 倍。T4 DNA *pol* 的作用底物是结合有短的引物链的 ssDNA,它不能以有缺口的 dsDNA 作引物。T4 DNA *pol* 常用来标记 dsDNA 的各种末端(3' 突出、3' 缩进和平头)。

4. T7 噬菌体 DNA 聚合酶和测序酶 T7 噬菌体聚合酶具有 5'→3' 聚合活性和 3'→5' 外切活性,是所有 DNA *pol* 中持续合成能力最强的一个。该酶的用途与 T4 DNA *pol* 相似,另外还可用于拷贝长段模板的引物延伸反应。测序酶是经修饰的 T7 噬菌体 DNA *pol*,具有 5'→3' 聚合活性,且持续能力很强,故该酶是 Sanger 双脱氧测序法对长片段 DNA 进行序列分析的理想用酶。

5. Taq DNA 聚合酶 是一种耐热的 DDDP,最适反应温度为 75~80℃。该酶的主要用途是 PCR 反应。

6. 逆转录酶(RDDP) 具有 5'→3' 聚合活性和 RNase H 活性。主要作用是将 mRNA 逆转录成双链 cDNA。可用逆转录成的 cDNA 进行序列分析,再推导出 RNA 序列。

(三) T4 噬菌体 DNA 连接酶

该酶的作用是将一个 DNA 片段的 5'-P 与另一 DNA 片段的 3'-OH 连接成磷酸二酯键,用于将带匹配黏端的 dsDNA 或平端 dsDNA 的 5'-P 与另一也带相应切口的 DNA 的 3'-OH 连接起来。

(四) 甲基化酶

可催化限制酶位点的特异甲基化(通常为 A 的 N⁶ 或 C 的 C⁵ 位甲基化),以抵抗相应限制酶的切割。在体外重组 DNA 时,常使用甲基化酶的甲基化作用以保护基因组 DNA 中的相应位点不被切割,或改变某些识别多种 DNA 序列的限制酶的切割专一性,使该酶原先识别的多种序列中被甲基化的序列免遭切割。

(五) T4 多核苷酸激酶

该酶可催化 ATP 的 γ-磷酸基转移到 DNA 或 RNA 的 5'-OH 上。可用于同位素标记 DNA 片段的 5'-末端,也可用于将化学合成片段的 5'-OH 加上磷酸基团。

(六) 碱性磷酸酶

其作用是去除 DNA、RNA、NTP 和 dNTP 的 5'-磷酸根。

(七) 核酸酶

1. 核酸酶 S1 单链 DNA 或 RNA,产生带 5' 磷酸的单核苷酸或寡核苷酸。该酶用于去

除 DNA 片段黏性末端而产生平端;打开 cDNA 中的发夹结构,使其成平端;分析 DNA/RNA 杂交体的结构,以证明基因内部内含子的存在。

2. 核糖核酸酶 A 为内切核糖核酸酶,专门降解 RNA。用于在质粒提取时降解 RNA,也可从 DNA/RNA 杂交体中去除未杂交的 RNA 区。

3. 脱氧核糖核酸酶 I 为内切酶,水解 ssDNA 或 dsDNA。可用于在 dsDNA 上产生随机切口,或序列分析时建立随机克隆。

二、基因工程的载体

作为 DNA 重组的载体,必须具备以下条件:①能自主复制并能带动插入的外源基因一起复制;②具有合适的限制酶切位点。在载体上单一的限制酶切位点越多越好,这样可以将不同限制酶切割后的外源 DNA 片段方便地插入载体;③具有合适的筛选标记,如抗药性基因等;④在细胞内拷贝数要多,这样才能使外源基因得以扩增;⑤载体的分子量要小,可容纳外源 DNA 的能力却要大;⑥在细胞内稳定性高,这样可以保证重组体稳定传代而不易丢失。在基因工程中,人们通过 DNA 重组的目的是要获得表达产物,这就要求目的基因不仅要进入宿主,而且要高效表达,故对载体的要求还要具有强启动子和稳定的 mRNA,插入外源基因后还可以重新完整地切出,复制与转录机制与宿主相匹配,最好是可调控的,而且在宿主不生长或低生长速率时仍能高水平地表达目的基因的产物。挑选和构建合适的载体,协调载体和宿主之间的关系是实际操作中经常要考虑的问题。

(一) 用于原核生物宿主的载体

1. 大肠杆菌质粒 为双链闭环状 DNA,长 1~200kb,常用的载体为松弛型、非接合型的质粒。如 pBR322(图 2-1)。它由人工改造而来,有一个复制原点、一个抗氨苄青霉素基因、一个抗四环素基因、多种限制酶切点。可容纳 5kb 左右的外源 DNA。

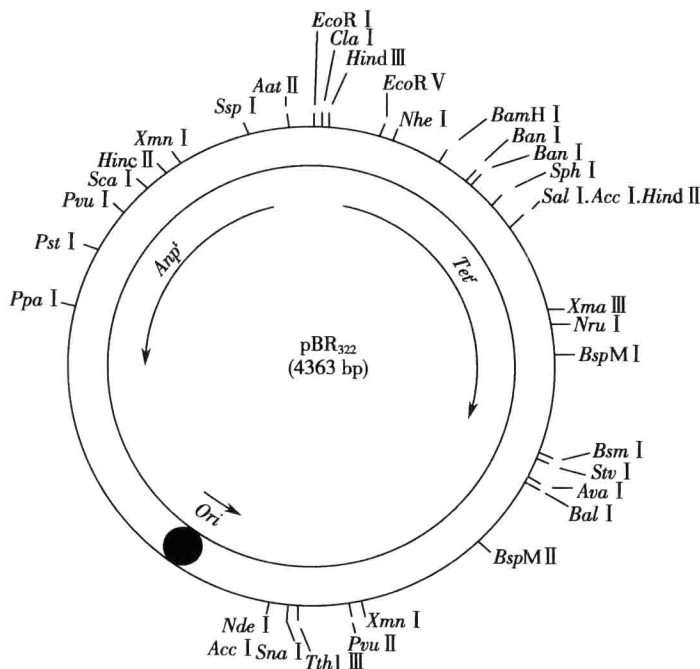


图 2-1 大肠杆菌质粒 pBR322 示意图