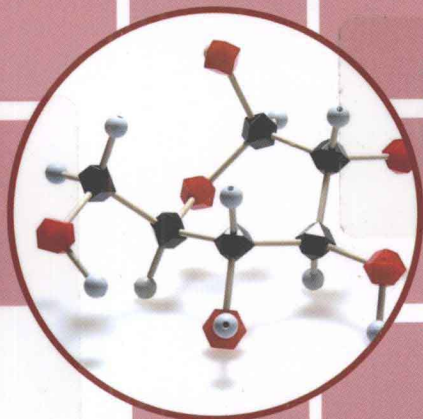
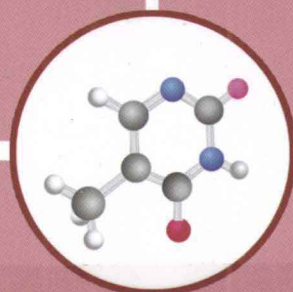
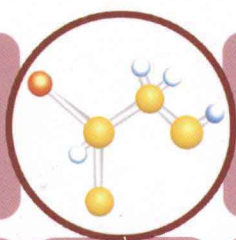


PRODUCTION AND ANALYSIS
TECHNIQUE OF PROTEIN AND
NUCLEIC ACID DRUGS

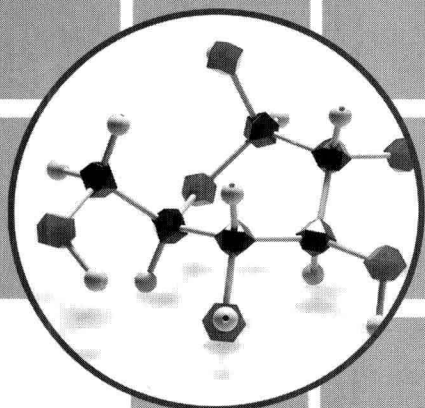
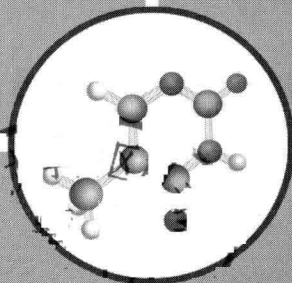
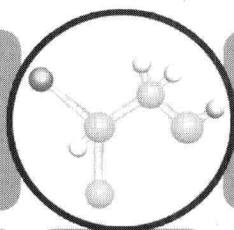
蛋白质核酸类 药物生产与分析技术

○汤 晓 主编



蛋白质核酸类 药物生产与分析技术

○汤 晓 主编



图书在版编目(CIP)数据

蛋白质核酸类药物生产与分析技术 / 汤晓主编.

—宁波: 宁波出版社, 2012.5

ISBN 978-7-5526-0187-9

I. ①蛋… II. ①汤… III. ①核糖核蛋白体核糖核酸-药物-生产-高等职业教育-教材②核糖核蛋白体核糖核酸-药物-分析-高等职业教育-教材 IV. ①TQ464.6

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 093838 号

本书为宁波市高校特色教材建设项目成果

蛋白质核酸类药物生产与分析技术

- 主 编 汤 晓
责任编辑 王晓君 吴 波
封面设计 吉祥文化
出版发行 宁波出版社
地址邮编 宁波市甬江大道 1 号宁波书城 8 号楼 6 楼 315040
网 址 <http://www.nbcbs.com>
印 刷 宁波报业印刷发展有限公司
开 本 787 毫米×1092 毫米 1/16
印 张 17
字 数 300 千
版 次 2012 年 5 月第 1 版
印 次 2012 年 5 月第 1 次印刷
标准书号 ISBN 978-7-5526-0187-9
定 价 27.00 元

如发现缺页或倒装,影响阅读,请与承印厂联系调换 电话:0574-87685521

前 言

本书立足于高职高专教育,以基本、典型的蛋白质类药物以及核酸类药物为载体,通过各类原材料中蛋白质、核酸的提取、分离纯化与质量检定等全过程的训练,培养学生从事生物产品与分析类岗位的上岗能力。

全书共有四个工作项目,即四章内容。蛋白质类药物以“猪血清蛋白的生产与分析”和“酪蛋白及其磷酸肽的生产与分析”为典型项目,分别代表血浆蛋白类药物、营养增补剂与活性肽类药物的案例。核酸类药物以“DNA与RNA等核酸的制备与分析”、“药用ATP等核酸类药物的生产与分析”为典型项目,前者是核酸类药物原料的案例,后者是核苷酸及其衍生物类药物的案例。教材内容由浅入深,实现职业能力与知识结构的螺旋式递进。几种典型项目按照从简单到复杂的顺序排列,不同项目间的职业技能与知识内容有互补交叉,使学生的职业能力与知识水平在项目开展中得到巩固和提高。

本书的框架结构包括项目导读、学习目标、工作任务、实践操作、背景知识、知识拓展、课外训练、第二课堂、本章小结等内容。

“项目导读”描述本项目的作用与具体内容,并按照各个工作任务介绍本任务要完成的事项,希望达到的知识目标、能力目标、素质目标,以及工作任务开展前应预习的内容(岗前准备)等,设置的目的是让学生操作之前先总体了解每个工作项目及其具体任务的要求,起到引领的作用。

“学习目标”交待工作任务的学习重点,设置的目的是让学生了解该任务的学习应达到的目标,帮助学生把握学习要点。“工作任务”和“实践操作”对任务的实施提出了具体要求,并通过工作任务单让学生进一步思考、总结工作任务,真正体现了基于工作和任务驱动的特点。“背景知识”围绕工作任务辐射展开必要的理论知识,并且在知识的传递过程中注重知识对实践的指导。“知识拓展”是理论知识的进一步展开和深入,便于学生课后学习参考。“课外训练”和“第二课堂”,是结合本任务的主题,为进一步巩固和训练学生能力而设计的,这部分利于培养学生的迁移能力。

由于编者能力和水平有限,书中缺点及谬误之处,敬请读者予以指正!



目 录

第一部分 蛋白质类药物的生产与分析技术	1
项目一 猪血清蛋白的生产与分析(血浆蛋白类药物)	3
项目一导读	3
任务一 猪血清蛋白的提取与分级盐析	7
1.1.1 学习目标	7
1.1.2 工作任务	7
1.1.3 实践操作	8
1.1.4 背景知识	9
1.1.4.1 猪血清蛋白的用途	9
1.1.4.2 盐析法沉淀分离制备蛋白质	10
1.1.4.3 凝胶层析法脱盐和分离蛋白质	13
1.1.4.4 蛋白质的理化性质在蛋白质类药物制备中的应用	16
1.1.5 知识拓展	19
1.1.5.1 血清蛋白的用途	19
1.1.5.2 硫酸铵分级沉淀血清蛋白的一般规律	19
1.1.5.3 超滤法提取血清白蛋白与免疫球蛋白	20
1.1.6 第二课堂	21
任务二 猪血清蛋白分级盐析的分析	22
1.2.1 学习目标	22
1.2.2 工作任务	22
1.2.3 实践操作	23
1.2.4 背景知识	27
1.2.4.1 蛋白质类药物含量测定的方法(一)	27

1.2.4.2 常见国产分光光度计的使用	28
1.2.5 知识拓展	31
1.2.5.1 分光光度技术简介	31
1.2.5.2 蛋白质类药物含量测定的方法(二)	34
1.2.6 课外训练	35
1.2.7 第二课堂	35
任务三 猪血清蛋白的电泳分离纯化	36
1.3.1 学习目标	36
1.3.2 工作任务	36
1.3.3 实践操作	37
1.3.4 背景知识	45
1.3.4.1 电泳	45
1.3.4.2 蛋白质类药物的电泳分析	47
1.3.4.3 蛋白质分离提纯的一般步骤	51
1.3.4.4 蛋白质制品的纯度鉴定方法	52
1.3.5 知识拓展	53
1.3.5.1 人血白蛋白的纯度测定	53
1.3.5.2 醋酸纤维素薄膜电泳测定人血清蛋白各组分含量的临床意义	53
1.3.5.3 聚丙烯酰胺不连续电泳分离蛋白质的原理	54
1.3.5.4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质的相对分子质量 ...	56
1.3.6 课外训练	58
1.3.7 第二课堂	58
本章小结	59
项目二 酪蛋白及其磷酸肽的生产与分析 (营养增补剂与活性肽类药物)	60
项目二导读	60
任务一 酪蛋白的生产与分析	65

2.1.1 学习目标	65
2.1.2 工作任务	65
2.1.3 实践操作	66
2.1.4 背景知识	67
2.1.4.1 酪蛋白的理化性质及其作用	67
2.1.4.2 酪蛋白的组成	68
2.1.4.3 酪蛋白水解肽的药用价值	68
2.1.5 知识拓展	69
2.1.5.1 酪蛋白制备的基本原理	69
2.1.5.2 乳蛋白的组成	69
2.1.6 第二课堂	70
任务二 利用溶解度差异分离各种酪蛋白	71
2.2.1 学习目标	71
2.2.2 工作任务	71
2.2.3 实践操作	71
2.2.4 背景知识	73
2.2.4.1 尿素分级分离酪蛋白	73
2.2.4.2 蛋白质混合物的分离纯化方法	74
2.2.5 知识拓展	83
2.2.5.1 阳离子交换色谱分离酪蛋白	83
2.2.5.2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离酪蛋白	84
2.2.6 课外训练	85
2.2.7 第二课堂	85
任务三 酪蛋白磷酸肽的生产与纯化	86
2.3.1 学习目标	86
2.3.2 工作任务	86
2.3.3 实践操作	86
2.3.4 背景知识	88

2.3.4.1 多肽类药物	88
2.3.4.2 离子交换色谱法分离蛋白质	89
2.3.4.3 蛋白质三步纯化策略	94
2.3.4.4 蛋白质类药物的工业化生产	94
2.3.5 知识拓展	100
2.3.5.1 离子交换树脂的预处理	100
2.3.5.2 离子交换树脂的交换量	101
2.3.5.3 离子交换色谱的梯度洗脱	101
2.3.5.4 分离纯化蛋白质的其他色谱技术	102
2.3.5.5 我国蛋白质类药物开发利用面临的问题	104
2.3.6 课外训练	107
2.3.7 第二课堂	107
任务四 酪蛋白磷酸肽的质量检定	108
2.4.1 学习目标	108
2.4.2 工作任务	108
2.4.3 实践操作	109
2.4.4 背景知识	115
2.4.4.1 蛋白质类药物含量测定的方法(三)	115
2.4.4.2 微生物限度检查法	120
2.4.4.3 砷盐检查法	125
2.4.5 知识拓展	128
2.4.5.1 水分测定法	128
2.4.5.2 灰分测定法	128
2.4.6 课外训练	128
2.4.7 第二课堂	131
本章小结	132

第二部分 核酸类药物的生产与分析技术	133
项目三 DNA 与 RNA 等核酸的制备与分析(核酸类药物原料)	134
项目三导读	134
任务一 猪肝中 DNA 的制备与鉴定	138
3.1.1 学习目标	138
3.1.2 工作任务	138
3.1.3 实践操作	139
3.1.4 背景知识	141
3.1.4.1 DNA 提取与鉴定的方法	141
3.1.4.2 核酸的理化性质在核酸类药物生产中的应用	142
3.1.4.3 琼脂糖凝胶电泳分离纯化 DNA	144
3.1.5 知识拓展	149
3.1.5.1 动物组织中核酸各组成的鉴定(核酸的颜色反应)	149
3.1.5.2 离子交换色谱法分离纯化核酸	149
3.1.6 第二课堂	149
任务二 酵母细胞中 RNA 的制备与鉴定	150
3.2.1 学习目标	150
3.2.2 工作任务	150
3.2.3 实践操作	150
3.2.4 背景知识	152
3.2.4.1 RNA 提取的方法	152
3.2.4.2 核酸类药物的一般制备方法	153
3.2.5 知识拓展	159
3.2.6 第二课堂	159
任务三 DNA 与 RNA 的含量测定	160
3.3.1 学习目标	160
3.3.2 工作任务	160

3.3.3 实践操作	161
3.3.4 背景知识	166
3.3.4.1 定磷法测定核酸含量	166
3.3.4.2 苔黑酚法测定 RNA 含量	167
3.3.4.3 二苯胺法测定 DNA 含量	168
3.3.4.4 紫外分光光度法测定核酸含量	168
3.3.5 知识拓展	169
3.3.5.1 核酸类药物的含量测定方法	169
3.3.5.2 测定 RNA 含量的其他方法	170
3.3.6 第二课堂	170
本章小结	171
项目四 药用 ATP 等核酸类药物的生产与分析(核苷酸及其衍生物类药物)	172
项目四导读	172
任务一 药用 ATP 的生产与分析	176
4.1.1 学习目标	176
4.1.2 工作任务	176
4.1.3 实践操作	177
4.1.4 背景知识	181
4.1.4.1 药用 ATP 的性质及其药理作用	181
4.1.4.2 溶液澄清度检查法	182
4.1.4.3 硫酸盐检查法	183
4.1.4.4 重金属检查法	184
4.1.4.5 pH 值测定法	186
4.1.4.6 纸电泳法检查 ATP 含量	188
4.1.5 知识拓展	189
4.1.5.1 DEAE-纤维素薄板层析法检测 ATP 的形成	189
4.1.5.2 药用 ATP 的其他生产方法	191



4.1.5.3 费休定水法	191
4.1.5.4 热原检查法	193
4.1.6 课外训练	194
4.1.7 第二课堂	194
任务二 脱氧核苷酸钠的生产与分析	195
4.2.1 学习目标	195
4.2.2 工作任务	195
4.2.3 实践操作	196
4.2.4 背景知识	199
4.2.4.1 脱氧核苷酸钠的性质及其药理作用	199
4.2.4.2 溶液颜色检查法	200
4.2.4.3 干燥失重测定法	202
4.2.4.4 氯化物检查法	203
4.2.5 知识拓展	204
4.2.5.1 铁盐检查法	204
4.2.5.2 炽灼残渣检查法	205
4.2.6 第二课堂	206
任务三 辅酶 A 的生产与分析	207
4.3.1 学习目标	207
4.3.2 工作任务	207
4.3.3 实践操作	208
4.3.4 背景知识	210
4.3.4.1 辅酶 A 的性质及其药理作用	210
4.3.4.2 辅酶 A 的生产方法	211
4.3.4.3 辅酶 A 的质量检定	212
4.3.5 知识拓展	213
4.3.5.1 什么是 GMP	213
4.3.5.2 药品生产质量管理规范	213

4.3.4 课外训练	214
4.3.5 第二课堂	214
本章小结	215
主要参考文献	216
附录《药品生产质量管理规范》(2010年修订)	217

第一部分

蛋白质类药物的生产与分析技术

蛋白质类药物为主体的生物医药产业将成为新世纪的朝阳产业

蛋白质类药物很多,一般分成:①蛋白质激素,包括胰岛素、生长激素、缩宫素(催产素)和绒膜催乳素等;②天然蛋白质,包括血清白蛋白、干扰素、硫酸鱼精蛋白等;③蛋白类制剂,包括吸收明胶海绵、氧化聚明胶、碘干酪素和强蛋白银等。也可按照蛋白质的结构特点及作用,分为蛋白质激素、蛋白质类细胞生长调节因子(如干扰素、白细胞介素-2、神经生长因子、促红细胞生成素、集落刺激因子等)、血浆蛋白(如纤维蛋白原、白蛋白、丙种球蛋白等)、黏蛋白(如胃膜素、硫酸糖肽等)、胶原蛋白(如阿胶、明胶等)及其他蛋白质类药物(如抑肽酶等)。此外还有单克隆抗体、基因工程抗体、重组疫苗等。根据蛋白质的性质和结构,可选用不同方法进行药物测定,如定氮法、电泳法、生物检定法等。

与以往的小分子药物相比,蛋白质药物具有高活性、特异性强、低毒性、生物功能明确、有利于临床应用的特点。由于其成本低、成功率高、安全可靠,已成为医药产品中的重要组成部分。1982年美国Lilly公司首先将重组胰岛素投放市场,标志着第一种重组蛋白质药物的诞生。30年来,生物技术药物,尤其是蛋白质药物产业蓬勃发展。全球生物技术公司总数已近5000家,上市公司有600余家,年销售总额近400亿美元,其中生物技术药物占总销售额的70%。从整个产业的分布情况看,生物技术公司主要集中在欧美,占全球总数的85%,欧美公司的销售额占全球生物技术公司销售额的97%。

美国是世界生物工程产业的龙头,其生物工程公司占全球总数的55%,销售额占全球生物工程产品销售总额的82%。目前已批准近150个蛋白质药物上市,适应症达220种,使3.25亿患者受益,蛋白质药物的产值和销售额已超过200亿美元。如红细胞生长素(EPO),从1989年投入市场以后,已经为开发商Amgen公司带来了超过100亿美元的利润,其2003年销售额达33亿美元,使得Amgen一

跃成为全美最大的生物工程公司。目前还有近400种蛋白质药物处于临床研究阶段,约3000种处于临床前研究阶段;预计到2025年,美国生物技术市场总额将达到2万亿美元。

日本在生物技术的开发上仅次于美国,目前有生物制药公司约600家,上市的蛋白质药物近30种,正在研发的有几十种。

欧洲是生物技术革命的重要发源地之一,目前有290种蛋白质药物进入临床试验,其中29种已批准上市。

我国生物医药技术的研究和开发起步较晚,但发展较快。尤其是执行国家863计划以来,中国的生物医药取得了飞速发展。“十五”期间,我国增大了生物技术及其产业的发展力度。国家863、973以及自然科学基金等重大研究发展规划对生物技术的总投资接近60亿元,生物医药及其产业发展到今已初具规模。2005年,我国已有20个国家生物技术药物重点实验室、3个蛋白质药物开发中心、289家生物制药企业,生物技术产业的群落和集约化已初见端倪,并且开发成功21种基因工程药物和疫苗,批准上市的蛋白质药物有19种。

项目一 猪血清蛋白的生产与分析(血浆蛋白类药物)

项目一导读

项目综述:本项目是学习蛋白质类药物生产与分析技术的基础。通过本项目,我们能够掌握蛋白质类药物的提取、含量测定以及分离纯化的基本技术,因此,它是进一步学习制备其他蛋白质类药物的基础。在实验室中,我们首先利用硫酸铵分级盐析法提取分离猪血中的猪血清蛋白,然后通过不同方法测定蛋白质含量以及两种电泳方法分离纯化蛋白质,来判断硫酸铵分级盐析的效果。

一、能力目标

1. 会利用离心机从动物血样品中分离得到血清;
2. 能够用硫酸铵盐析沉淀法分离得到血清蛋白;
3. 会用Sephadex G-25凝胶柱或透析法脱盐;
4. 能够选择合适的方法测定血清蛋白的含量;
5. 能够用醋酸纤维素薄膜电泳法及聚丙烯酰胺凝胶电泳法分析血清蛋白的组成;
6. 能准确处理、分析结果。

二、知识目标

1. 掌握蛋白质的理化性质在蛋白质类药物生产与分析中的应用;
2. 掌握硫酸铵盐析沉淀蛋白质的方法及相关知识;
3. 掌握蛋白质的含量测定方法及相关知识;
4. 掌握电泳法分离纯化蛋白质的方法及相关知识;
5. 理解葡聚糖凝胶层析脱盐及分离蛋白质的方法与相关知识。

三、素质目标

1. 具备准确配制各种溶液的基本操作素质;
2. 具备正确使用相关仪器,并熟悉其日常维护及保养的初级操作素质;
3. 具备熟练提取猪血清蛋白,并用各类方法测定其含量的中级操作素质;
4. 具备熟练应用硫酸铵分级盐析方法,以及应用醋酸纤维素薄膜电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳分离纯化血清蛋白的高级操作素质;

5. 培养分析问题、解决问题的能力；
6. 提高团队合作精神；
7. 培养举一反三能力和创新能力；
8. 促进个性发展；
9. 在蛋白质类药物的生产与分析过程中，树立认真负责的职业操守意识。

四、工作任务

说明：任务开展前，自组“制药公司”，并为“公司”命名。

任务1：猪血清蛋白的提取与分级盐析

任务描述	屠宰场采集新鲜猪血后，低温离心，获取猪血清；在 pH4.5、pH7.4 这两个条件下，加入不同饱和度的硫酸铵溶液，进行分级盐析；样品静置过夜，冰箱保存。	
教学目标	技能目标	知识目标
	<ol style="list-style-type: none"> 1. 会使用离心机； 2. 会正确使用分析天平并准确配制溶液； 3. 能用盐析法对猪血清蛋白进行粗分级； 4. 会用葡聚糖凝胶层析或透析法进行脱盐处理； 5. 能正确记录、处理实验数据及现象； 6. 能正确书写工作任务单并对结果进行准确分析。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 猪血清蛋白的用途； 2. 盐析法沉淀分离制备蛋白质； 3. 凝胶层析法脱盐和分离蛋白质； 4. 蛋白质的理化性质在蛋白质类药物制备中的应用； 5. 血清蛋白的用途； 6. 硫酸铵分级沉淀血清蛋白的一般规律。
能力训练任务	任务1 新鲜猪血的采集 任务2 试剂的配制 任务3 样品准备 任务4 离心 任务5 脱盐 任务6 完成数据处理及工作任务单的书写	
岗前准备	<ol style="list-style-type: none"> 1. 为何选取 2 个 pH 值(4.5,7.4)进行盐析？ 2. 缓冲液的作用是什么？ 3. 能否看懂式 1？其样品底液是什么？ 4. 冰箱静置过夜的目的是什么？ 5. 为何用不同饱和度的硫酸铵进行盐析？ 	
主要考核指标	<ol style="list-style-type: none"> 1. 各步骤的操作(操作规范性、低温冷冻离心机与分析天平的使用等)； 2. 组员间的协作(分工及团队协作)。 	

任务2:分级盐析猪血清蛋白的分析

任务描述	利用双缩脲法、福林-酚法、紫外吸收法等不同方法,测定盐析后的猪血清蛋白含量,据此评价 pH4.5、pH7.4 这两个条件下的猪血清蛋白硫酸铵析出区间,以及评价蛋白质含量不同测定方法的优缺点。	
教学目标	技能目标	知识目标
	<ol style="list-style-type: none"> 1. 能用双缩脲法测定蛋白质含量; 2. 能用福林-酚法测定蛋白质含量; 3. 能用紫外吸收法测定蛋白质含量; 4. 能够根据待测蛋白质样品的特点,选择合适的含量测定方法; 5. 会熟练使用可见及紫外分光光度计; 6. 会绘制分级盐析曲线,并能正确处理数据,准确计算出结果。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 蛋白质类药物含量测定的方法(一); 2. 常见国产分光光度计的使用; 3. 分光光度技术简介; 4. 蛋白质类药物含量测定的方法(二)。
能力训练任务	<p>任务1 试剂的配制</p> <p>任务2 盐析上清液中的蛋白质含量测定 (1)双缩脲法;(2)福林-酚试剂法;(3)紫外吸收法。</p> <p>任务3 上清液的硫酸铵分级盐析曲线绘制</p> <p>任务4 盐析沉淀中的蛋白质含量测定 (1)双缩脲法;(2)福林-酚试剂法;(3)紫外吸收法。</p> <p>任务5 沉淀的硫酸铵分级盐析曲线绘制</p> <p>任务6 完成数据处理及工作任务单的书写</p>	
岗前准备	<ol style="list-style-type: none"> 1. 3种紫外吸收法是否一定都适合于我们的实践? 2. 表1-3中,为何空白对照、标准蛋白加磷酸缓冲液,样品不加磷酸缓冲液? 3. 方法II、III中的对照品是什么? 4. 最终的结果计算,要注意什么? 5. 员工间如何合理分配任务,又快又好地完成任务? 6. 紫外分光光度计怎么使用? 7. 双缩脲法的注意事项是什么?它与紫外吸收法I的共同之处是什么? 8. 721型分光光度计怎么使用? 9. 样品是否要稀释? 10. 福林-酚法与双缩脲法之间有什么联系?(比较二者所用试剂) 11. 福林-酚法的操作,需要注意什么问题? <p>(说明:1~6为紫外法测定部分)</p>	
主要考核指标	<ol style="list-style-type: none"> 1. 各步骤的操作(操作规范性、紫外分光光度计与可见分光光度计的使用、猪血清蛋白标准曲线的绘制); 2. 实验结果(吸光度值测定结果、标准曲线绘制、盐析曲线绘制、猪血清蛋白含量计算等); 3. 工作任务单(争取随堂完成)。 	