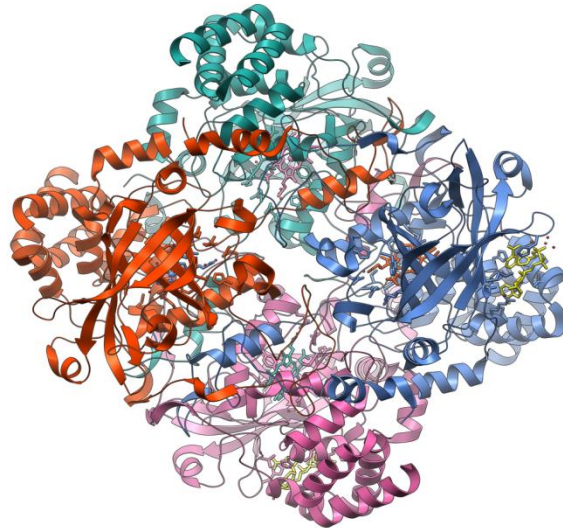


综合性药学实验

—— 生物活性大分子

人源过氧化氢酶的生物合成



Stereo view of the catalase tetramer

生物技术药物的定义及发展

是指采用DNA重组技术或其他生物新技术生产的治疗药物，其实质是利用现代生物技术制备其他方法难以获得的生物活性物质，如多肽、蛋白质、核酸及其衍生物。



1982年世界首个基因工程药物-重组人胰岛素上市，商品名**Humulin**



1989年我国首个基因工程药物-重组人干扰素批准投产

Therapeutic biologics approved by FDA in 1984 ~ 2014

Drug category	Approvals
mAbs	48(38.40%)
Enzymes	19(15.20%)
Interferon	12(9.60%)
Fusion proteins	8(6.40%)
Colony stimulating factor	8(6.40%)
Hormones	8(6.40%)
Growth factors	5(4.00%)
Peptides	5(4.00%)
Cytotoxins	5(4.00%)
Anticoagulants	5(4.00%)
Interleukin	2(1.60%)
Total	125

基因工程制药的基本过程

实验一 过氧化氢酶基因的获取

获取目的基因

构建重组质粒

构建基因工程菌或细胞

基因工程菌或细胞培养

产物分离纯化

产品检定

制剂制备, 包装

上游阶段

下游阶段

实验二 过氧化氢酶重组菌株的构建

实验三 过氧化氢酶的发酵表达

实验四 过氧化氢酶的检测

课程目标

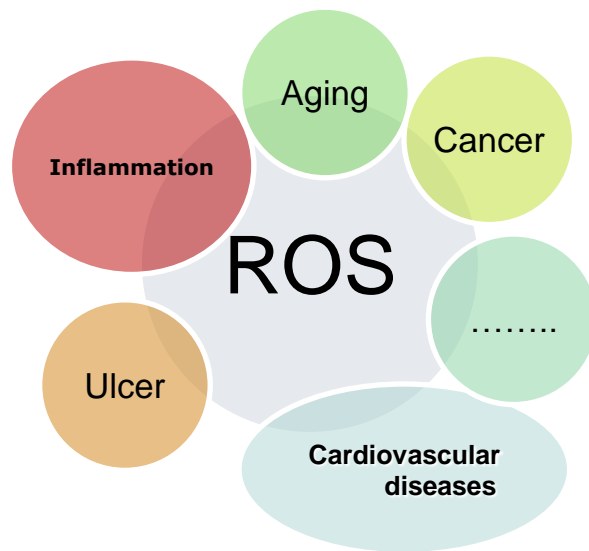
- 熟悉基因工程技术合成人源过氧化氢酶的主要步骤，了解基因工程制备蛋白质类药物的基本过程
 - 掌握基因工程常用的实验操作
(核酸提取、PCR扩增、载体连接、转化、阳性重组菌筛选、凝胶电泳、摇瓶发酵、酶活测定、蛋白杂交Dot blot等)
-

过氧化氢酶简介

- 过氧化氢酶（**catalase, CAT**）是广泛存在于生物体内的一种抗氧化酶，能高效的催化过氧化氢生成分子氧和水。
 - 催化特性
 - $2 H_2O_2 \longrightarrow 2 H_2O + O_2$
 - 分布
 - 所有的动植物
 - 几乎所有的需氧微生物
 - 极少量的厌氧微生物
-

过氧化氢酶的生理作用及医学用途

- H_2O_2 是机体中重要的一种活性氧 (reactive oxygen species, ROS)



- 过氧化氢酶清除 H_2O_2 → 防止氧化损伤，抗衰老，缓解疾病

人源过氧化氢酶的生产

■ 从人血液中提取

来源稀少，成本高，易受病毒等污染，影响安全性

■ 基因工程表达：酵母、大肠杆菌、哺乳动物细胞等

□ 毕氏酵母表达系统

■ 最简单的真核微生物

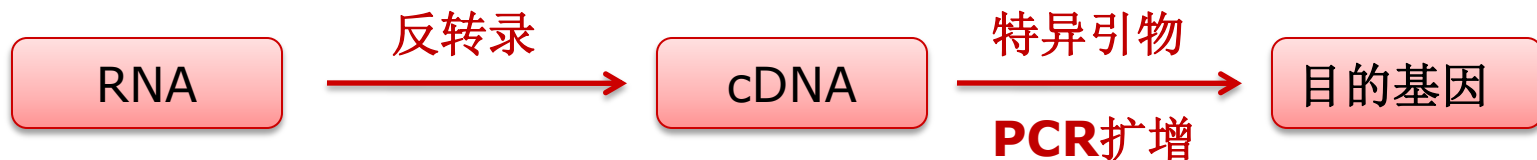
■ 最常用的真核蛋白表达系统，有效地表达活性蛋白

■ 产物胞外分泌

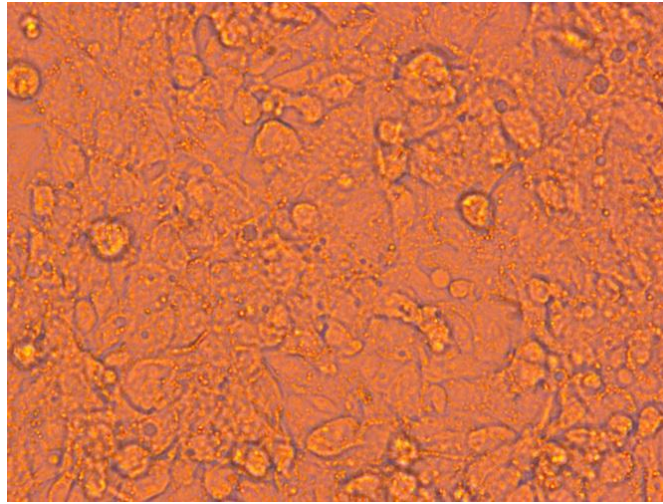
实验一 人源过氧化氢酶基因的获取

实验目的

- 学习掌握**TRIZOL**法提取细胞**RNA**的方法
- 了解使用**PCR**仪进行**RNA**反转录及扩增目的基因的方法



实验材料



- 人肝细胞**HepG₂**
- **RNA提取试剂: TRIZOL试剂、氯仿、异丙醇、75%乙醇**
反转录试剂: Takara PrimeScript[®] RT Master Mix
PCR试剂: Taq PCR Mix、DNA引物
- 移液器、**EP管、PCR管、Tips**（无菌，**DNA/RNase free**）
- **PCR仪、高速离心机**

TRIZOL法提取细胞RNA的原理

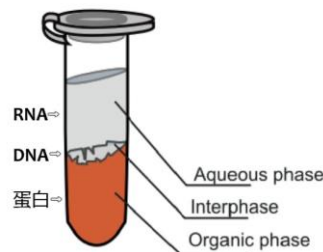
TRIZOL试剂是一种新型总RNA抽提试剂，可保持**RNA**的完整性，同时能破坏细胞及溶解细胞成分。加入氯仿离心后，裂解液分离成水相和有机相，**RNA**存在于水相。水相中的**RNA**通过异丙醇沉淀回收。

成分	作用
苯酚	裂解细胞，使细胞中的蛋白变性，核酸物质解聚得到释放。
异硫氰酸胍	强力的蛋白质变性剂，可溶解蛋白质，并使蛋白质二级结构消失，细胞结构降解，核蛋白迅速与核酸分离，同时也使RNase变性。
8-羟基喹啉	氯仿联合使用可增强对RNase的抑制。
β -巯基乙醇	破坏RNase蛋白质中的二硫键。

实验步骤

1. TRIZOL法提取细胞总RNA

- 1) 用**PBS** 约**1.5ml**洗涤细胞一次，然后加入**TRIZOL**试剂**1mL**，室温放置**3-5**分钟，将细胞裂解液转至**EP**管。
- 2) 加入**0.2ml**氯仿，剧烈振荡**15**秒，室温放置**5**分钟。
- 3) **2-8℃**，**12000rpm**离心**15**分钟(样品分为三层：底层有机相，上层为无色水相和一个中间层。**RNA**主要在水相中)。
- 4) 把水相转移到新管中，加入移出液相等体积异丙醇，颠倒混匀，室温放置**10**分钟。
- 5) **2~8℃**，**12000rpm**离心**10**分钟(离心前看不出**RNA**沉淀，离心后在管侧和管底出胶状沉淀)，吸去上清。
- 6) 用**1mL 75%**乙醇洗涤**RNA**沉淀。不超过**10000rpm**离心**5**分钟，**吸净上清**。
- 7) 置超净台内室温干燥**5**分钟左右。
- 8) 加**20μL DEPC**水溶解**RNA**沉淀，冰浴待用。



注意事项

- **TRIZOL试剂操作时注意防护（配带手套和口罩），小心操作，防止溅出，避免接触皮肤或吸入。**
- **为防止外源RNA酶降解RNA样品，除操作过程中配带手套和口罩外，所有器皿及相关溶液都必需进行相应去RNA酶处理（耐高温器物150℃烘烤4小时，其它器物除用0.1%的DEPC水浸泡处理。溶液需用灭菌的DEPC水配制）。**
- **细胞裂解必需充分，裂解不全会降低最后得率。**
- **吸取上清时，小心操作，宁少勿滥（防止DNA/蛋白质污染）。**

2. 将RNA反转录为cDNA

RTase、Oligo dT Primer、Random 6 mers、dNTPs、RNase Inhibitor、Buffer

采用Takara PrimeScript® RT Master Mix试剂将上述提取的RNA进行RT-PCR，反转录成cDNA。

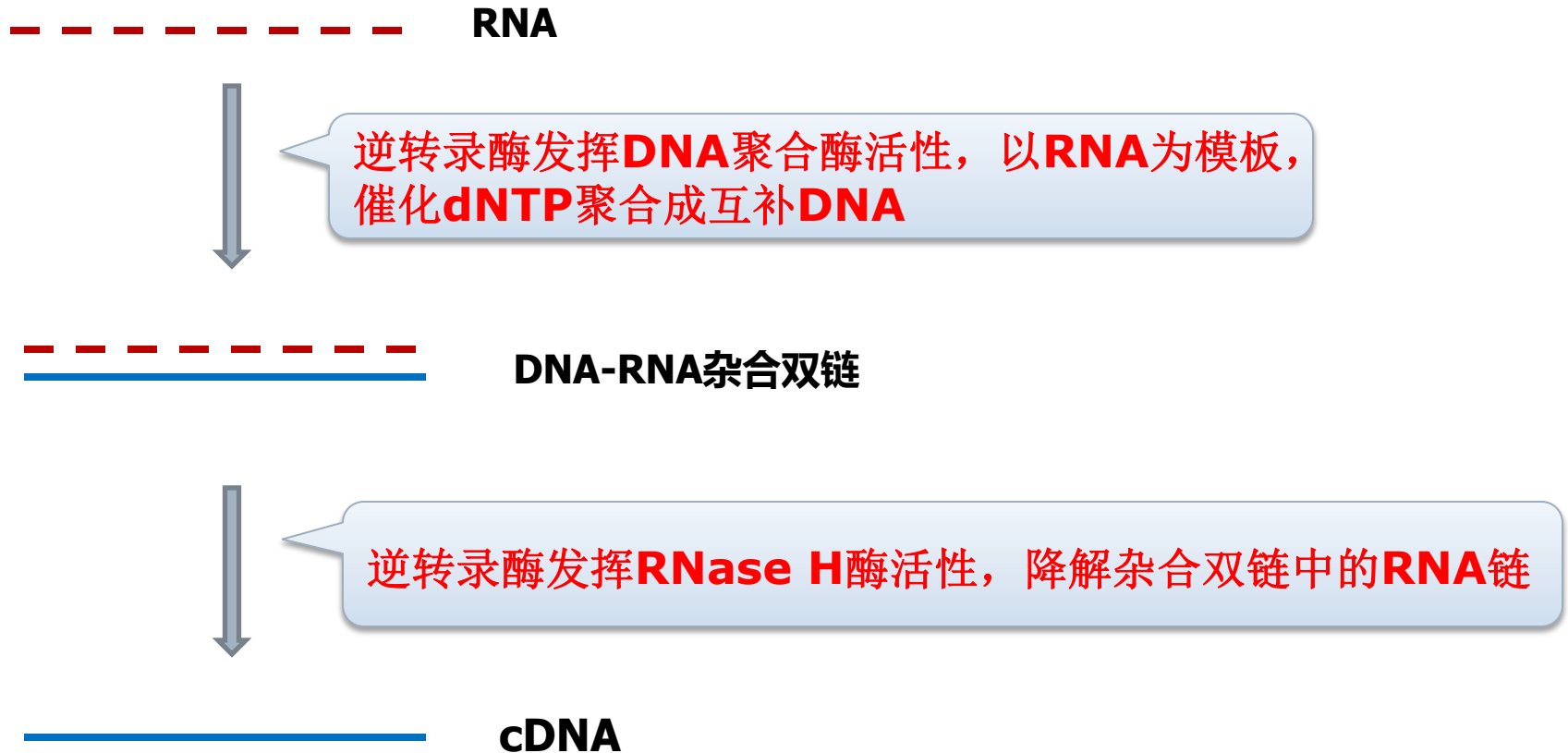
1) 在PCR管中配制反应体系：

5×PrimeScript® RT Master Mix	2μL	}
RNase Free ddH ₂ O	6.5μL	
步骤1提取的RNA	1.5μL	
Total	10μL	

吸取
8.5μL RT Mix
1.5μL RNA
至PCR管中

2) 短暂离心后, 将 PCR管放入PCR仪, 37°C , 15min → 85°C , 5sec → 冰浴待用

cDNA合成过程:



3. 以cDNA为模版PCR扩增人源过氧化氢酶基因

1) 在PCR管中配制反应体系:

2×Taq PCR Master Mix	15μL
Forward primer (20μM)	0.75μL
Reverse primer (20μM)	0.75μL
ddH ₂ O	11.5μL
Template (步骤2合成的cDNA)	2μ L
Total	30μ L

吸取
28μL PCR Mix
2μL cDNA
至**PCR**管中

Forward primer :

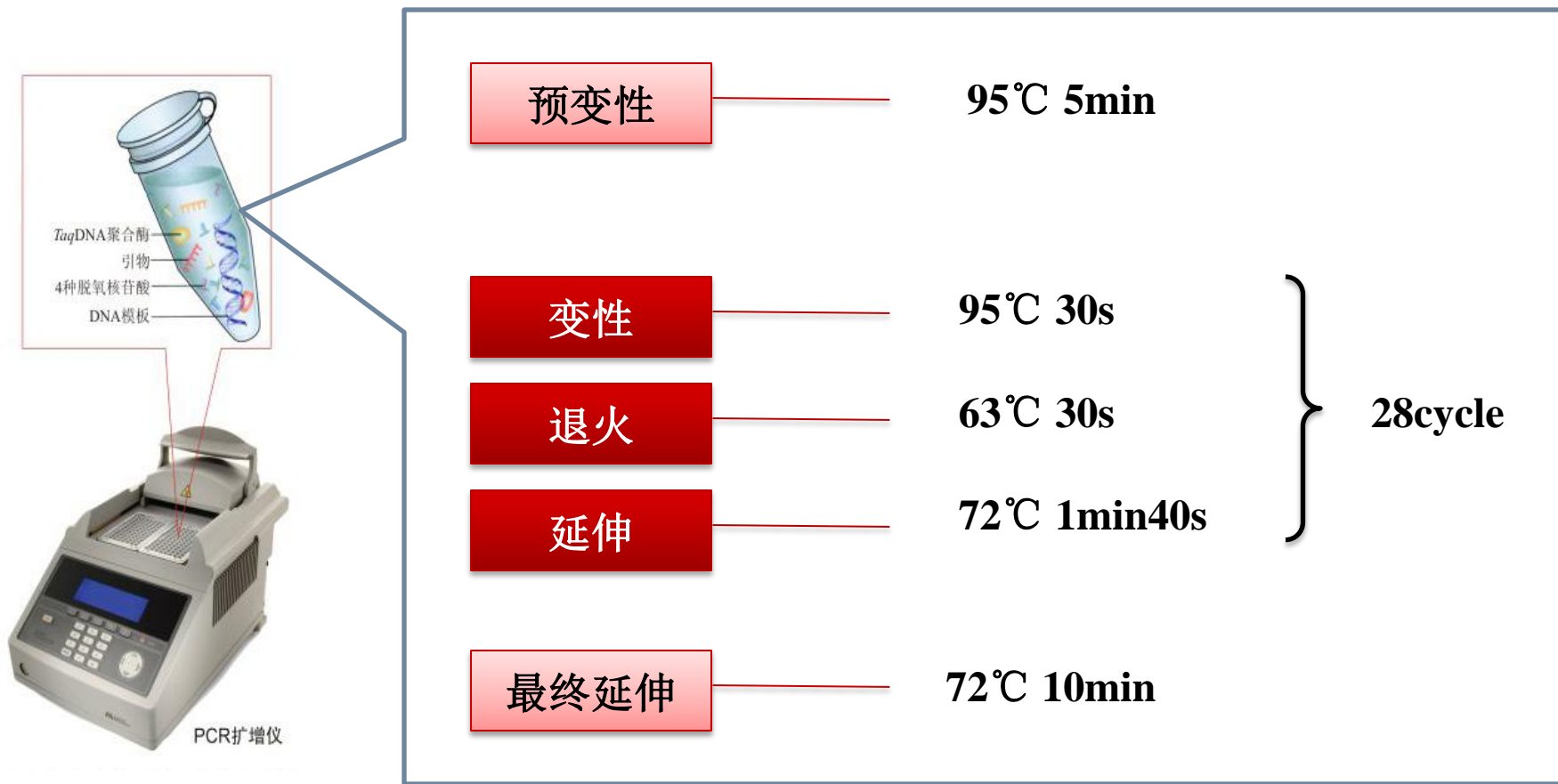
5'-CGGGTACCATGGCTGACAGCCGGGATCC-3' (Kpn I)

Reverse primer :

5'-CCGGCGGCCGCTCACAGATTTGCCTTCTCC-3' (Not I)

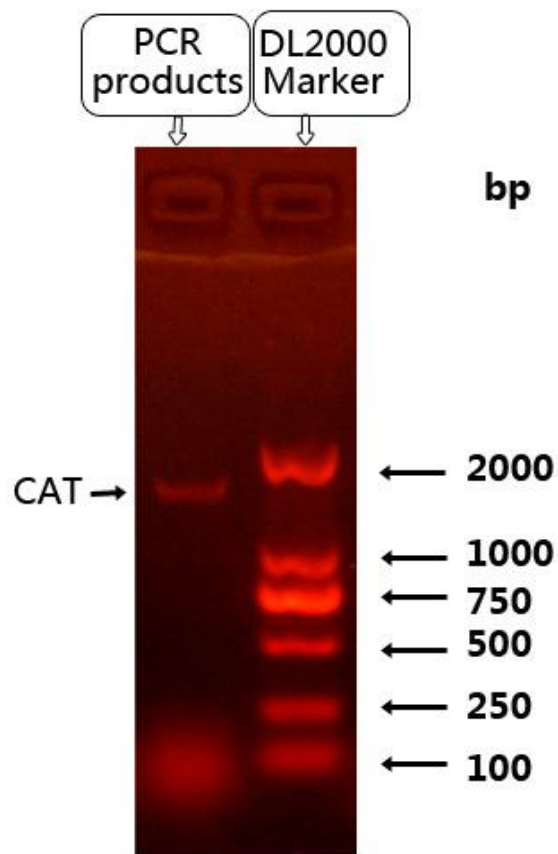
其中下划线部位为对应的酶切位点。 扩增目的基因长度约为 **1600 bp**。

2) PCR反应程序

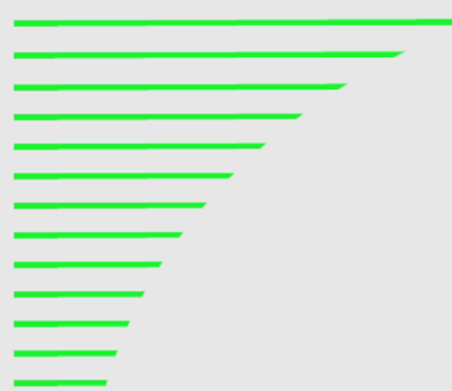
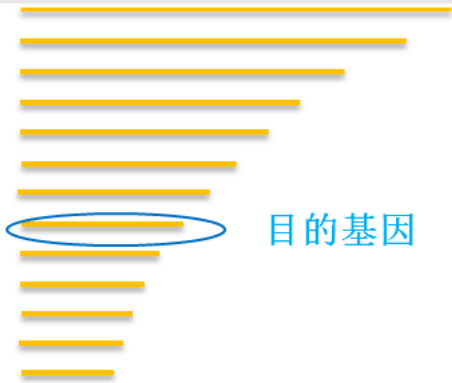
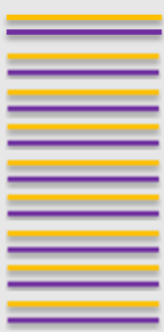


4. PCR扩增产物的鉴定

1.5%琼脂糖凝胶电泳
Yea-Red染色



小结

步骤	试剂	产物	
1. TRIZOL 法提取肝细胞 RNA	TRIZOL 试剂、氯仿、异丙醇	总RNA (分子量大小不一的各种类型的 RNA , 包括 rRNA 、 tRNA 和 mRNA 等)	
2. 以 RNA 为模板进行反转录反应	RT mix (RTase 、 Random 6 mers 、 Oligo dT Primer 、 dNTPs 、 RNase Inhibitor 、 Buffer)	分子量大小不一的各种 cDNA	
3. 以 cDNA 为模板进行 PCR 反应扩增目的基因	PCR mix (Taq DNA Polymerase 、 Specific primers 、 dNTPs 、 Buffer)	CAT 基因	

思考题

- 简述获取目的基因的主要途径和来源？
 - 简述影响RNA提取质量的因素有哪些？
 - 本实验通过提取细胞RNA反转录的cDNA与基因组DNA在结构上有何差别？
 - 简述影响PCR反应产物特异性的因素有哪些？
-

实验报告要求

手写

- 写两份实验报告
1. 过氧化氢酶基因的获取及重组菌株的构建
 2. 过氧化氢酶的发酵表达及检测

姓名:*** 学号:*** 班级:A班/B班 教室:405/407

实验名称

一、目的:

二、原理:

三、实验材料:

四、实验步骤:

五、结果与讨论:

结果: 图像 ⇒ 打印并附文字注释说明; 定量数据 ⇒ 整理汇总, 制图表, 计算

讨论: 对实验结果或实验操作的分析

六、思考题:

实验室规则

- 保证出勤，遵守课堂学习纪律
 - 安全和防护（穿戴白大衣，手套、口罩，严格按实验规程进行操作，实验样品和试剂严禁带出实验室）
 - 保持室内安静、干净
 - 节约用水、电、试剂、耗材等
 - 实验结束做好整理和清洁工作
 - 实验废弃物处置
 - ◆ 手套、口罩、耗材包装等作为干垃圾丢弃
 - ◆ **EP**管、移液枪头等置于医疗废弃物筒
-