



基因工程制药

生物技术制药

目 录

- ❖ 第一节 概述
- ❖ 第二节 基因药物生产的基本过程
- ❖ 第三节 目的基因的获得
- ❖ **第四节 基因表达**
- ❖ 第五节 基因工程菌的不稳定性
- ❖ 第六节 基因工程菌生长代谢的特点
- ❖ 第七节 基因工程菌发酵
- ❖ 第八节 基因工程药物的分离纯化
- ❖ 第九节 基因工程药物的质量控制
- ❖ 第十节 基因工程药物制造实例

第十节 基因工程药物的分离纯化

基因工程药物大部分为多肽或蛋白质，其分离、纯化非常重要。

特点：

- ①目的产物在初始物料中含量较低；
- ②含有大量细胞及代谢产物；
- ③表达产物稳定性差，易失活变性；
- ④表达产物的种类繁多、结构不一；
- ⑤成品要求纯度高、无菌、无热原。

一、建立分离纯化工艺的依据

1.含目的产物的起始物料的特点

基因工程菌的发酵产物其上游过程的各种因素对分离、纯化工艺有影响。包括：

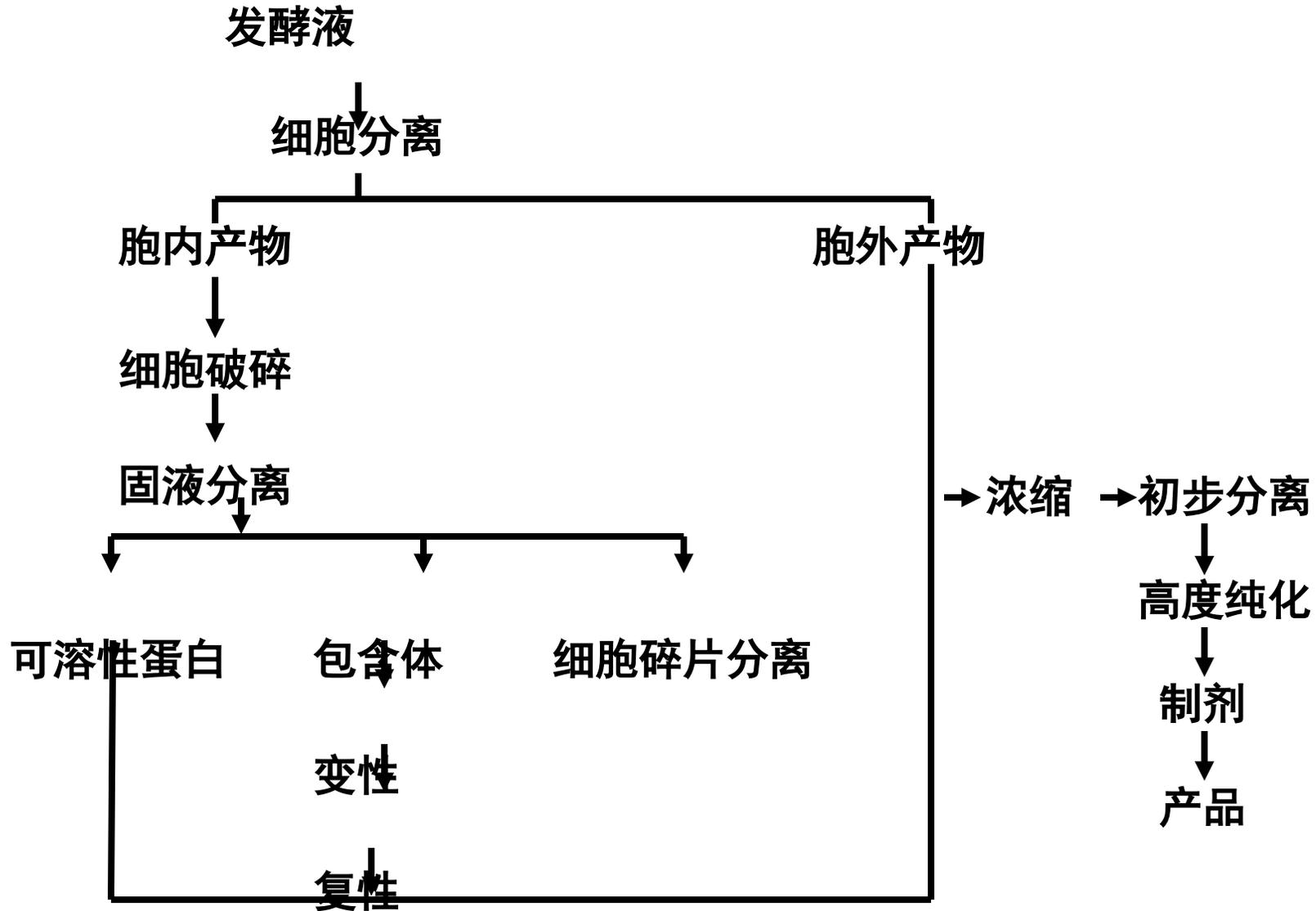
- ① 菌种的类型及其代谢特性。
- ② 原材料和培养基的来源及其质量。
- ③ 生产工艺及条件。
- ④ 初始物料的物理、化学、生物学性质

2 物料中杂质的种类和性质

3 目的产物特性

4 产品质量的要求

二、分离纯化的基本过程



三、分离纯化的技术

分离纯化的技术要求：

- ①技术条件温和能保持产物生物活性。
- ②选择性好，能从复杂的混合物中有效的将目的产物分离，达到较高的纯化倍数。
- ③收率高、成本低。
- ④两个技术间能直接衔接，不需要对物料加以处理。
- ⑤纯化过程要快，满足高生产率的要求。

1.细胞破碎与固液分离

(1)细胞收集： 离心法、生物膜分离法。

(2)细胞破碎：

是否加外力： 机械破碎法、非机械破碎法。

所用方法属性： 物理法、化学法、生物法。

(3)固液分离： 高速离心、膜过滤、双相萃取

五、重组蛋白的分离纯化

目的产物含有大量杂质必须进行分离纯化。

蛋白质分离纯化方法的设计根据其分子的理化性质和生物学特性来决定。

产物的特性：分离纯化方法

产物特性	作用
等电点	决定离子交换种类及条件
相对分子量	选择不同孔径的介质
疏水性	与疏水、反相介质结合的程度
生物特异性	决定亲和配基
溶解性	决定分离体系及蛋白浓度
稳定性	决定工艺采用温度及流程时间

◆ 层析(chromatography)

A 离子交换层析

B 疏水层析

C 亲和层析

D 凝胶过滤层析

外源基因表达产物的分离纯化方法

A 离子交换层析

离子交换层析的基本原理

离子交换介质的基本性质

离子交换介质的选择原则

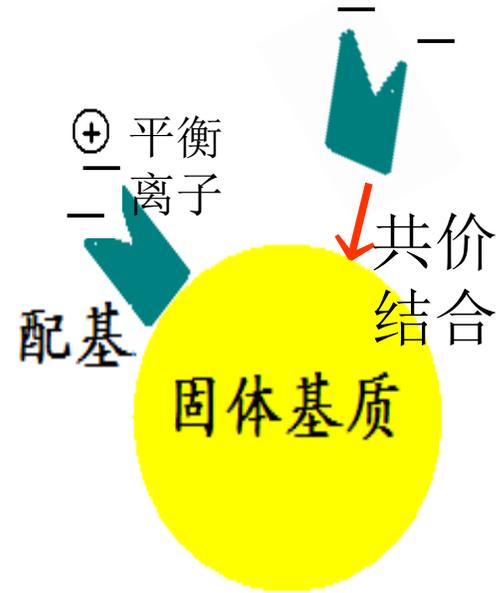
离子交换层析的基本原理

离子交换层析是以**离子交换剂为固定相**，以特定的**含离子溶液为流动相**，利用离子交换剂对待分离的各种离子结合力的差异，而将混合物中不同离子进行分离的层析技术。

离子交换剂

离子交换剂，通常是一种不溶性高分子化合物如纤维素，葡聚糖，琼脂糖等；

离子交换剂中所含的可解离基团在水溶液中能与溶液中的其它阳离子或阴离子起交换作用。



离子交换剂的分类

阳离子交换剂：强酸型和弱酸型

可电离的基团	磺酸基 ($-\text{SO}_3\text{H}$)
	磷酸基 ($-\text{PO}_3\text{H}_2$)
	羧酸基 ($-\text{COOH}$)
	酚羟基 ($-\text{OH}$)

阴离子交换剂：强碱型和弱碱型

可电离的基团	伯胺基 ($-\text{NH}_2$)
	仲胺基 ($-\text{NHCH}_3$)
	叔胺基 ($-\text{N}(\text{CH}_3)_2$)
	季胺基 ($-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$)

常用的离子交换剂

- **离子交换纤维素：**

离子交换纤维素是携带功能基团纤维素衍生物，具有松散的亲水性网状结构以及较大的表面积，大分子可以自由通过，因而对生物大分子（如蛋白质）的交换容量比离子交换树脂大。

阳离子型离子交换纤维素包括羟甲基纤维素（**CM**纤维素）等

阴离子型离子交换纤维素包括二乙基氨基乙基纤维素（**DEAE**纤维素）

常用的离子交换剂

- **离子交换葡聚糖：**

离子交换葡聚糖是葡聚糖经环氧氯丙烷交联后形成的具有多孔三维空间网状结构和离子交换功能基团的多糖衍生物（Sephadex G）。

常用的离子交换葡聚糖包括：

阳离子交换剂 CM-Sephadex C-25

CM-Sephadex C-50

阴离子交换剂 DEAE-Sephadex A-25

DEAE-Sephadex A-50

常用的离子交换剂

离子交换琼脂糖：

离子交换琼脂糖是携带DEAE或CM基团的Sepharose CL-6B

DEAE-Sepharose（阴离子型）和CM-Sepharose（阳离子型）的离子交换介质具有硬度大、性质稳定，流速好，分离能力强等优点。

离子交换介质的选择原则

一般而言：

酸性物质用**阴**离子交换剂分离

碱性物质用**阳**离子交换剂分离

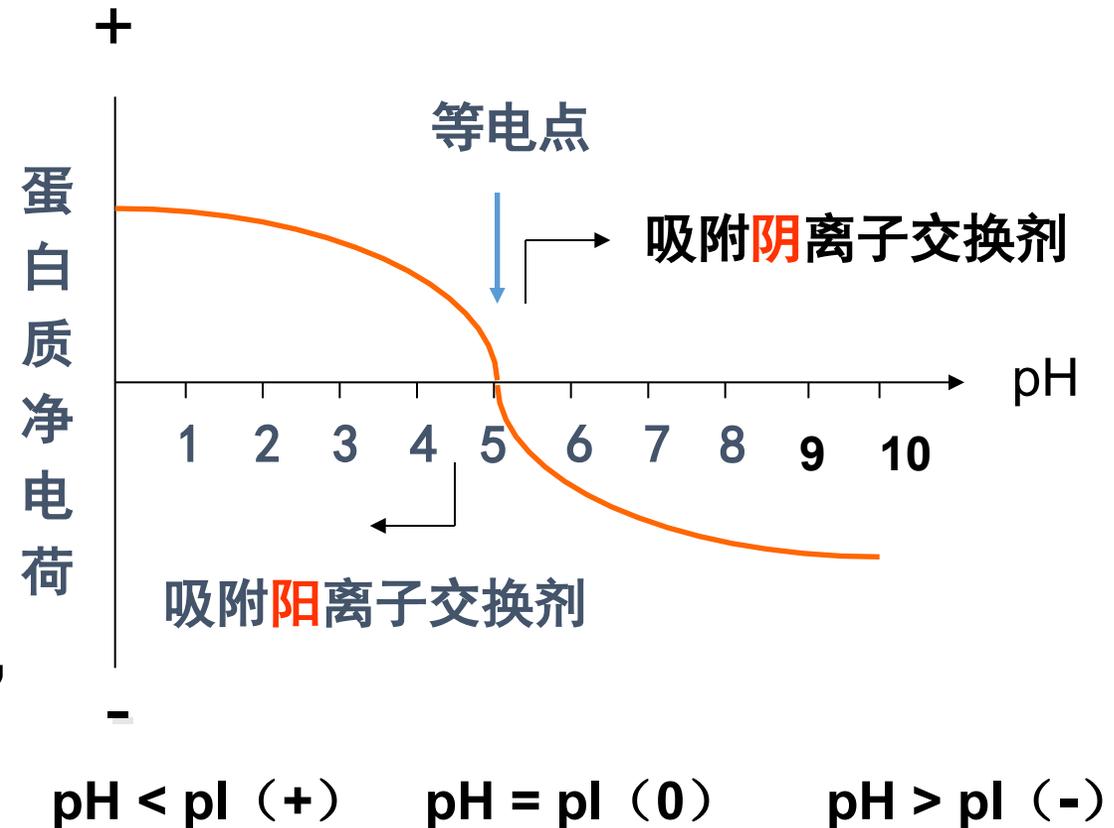
氨基酸、核苷酸、蛋白质等**两性电解质**，可根据其**pI值及离子化曲线**来选择

离子交换介质的选择原则

对 $pI=5$ 的某酸性蛋白质

当 $pH 5.5-9.0$ 的范围内
时，蛋白质为阴离子，
应首选DEAE纤维素；

当 $pH 3.5-4.5$ 的范围内时，
蛋白质为阳离子，
应首选CM纤维素



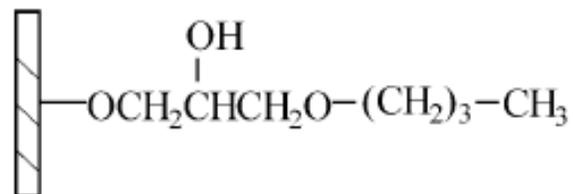
B 疏水层析

- **疏水层析**（HIC）是根据分子表面疏水性差别来分离蛋白质和多肽等生物大分子的一种较为常用的方法。
- 疏水性**弱**的物质，在较**高**离子强度的溶液时被洗脱下来，当离子强度**降低**时，**疏水性强**的物质才随后被洗脱下来。

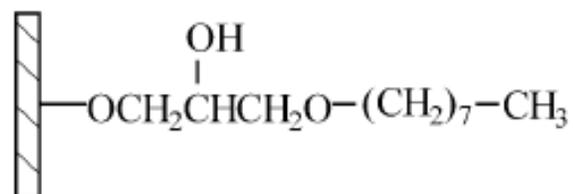
疏水配基

烷基链配基

丁基

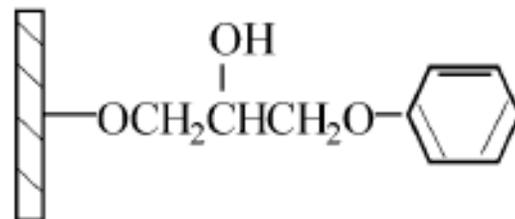


辛基



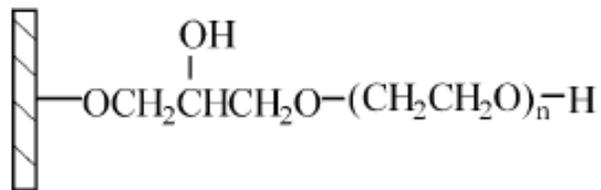
芳基配基

苯基

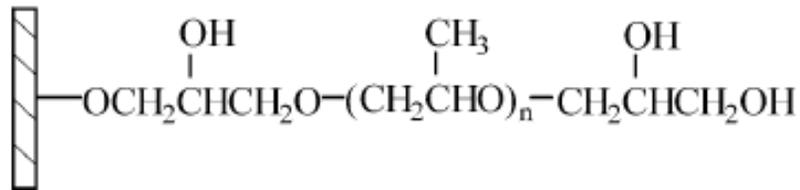


高分子配基

聚乙二醇



聚丙三醇



疏水基质

多糖类

琼脂糖

应用最广泛

纤维素

人工合成聚合
物类

聚丙烯酸
甲酯类

聚苯乙烯

壳聚糖

良好的生物相容性和化学稳定性

基本操作

-

❖ 平衡 Equilibration

❖ 上样 Sample application

❖ 洗杂 Washing

❖ 洗脱 Elution

C 亲和层析

亲和层析的原理

亲和层析载体的性质与选择

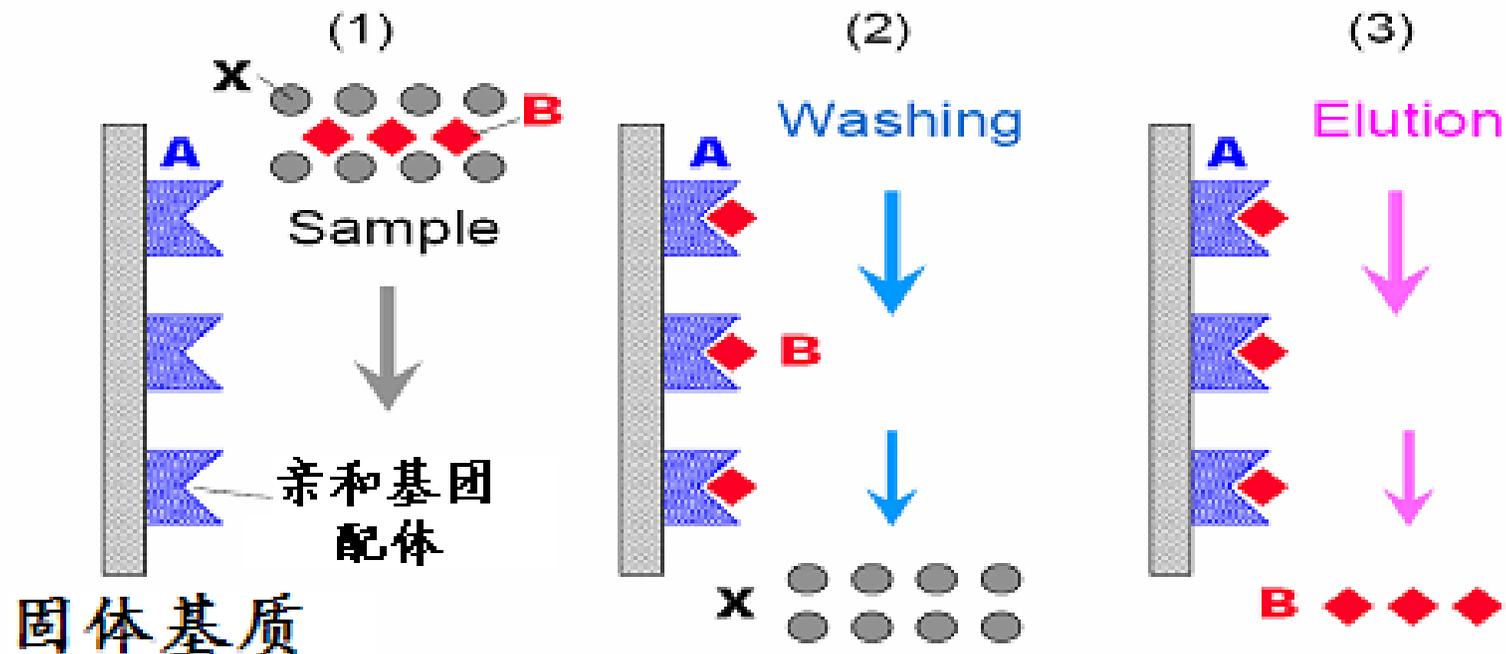
亲和层析配基的性质与选择

亲和层析的原理

亲和层析：利用固定化配基与目的蛋白质之间特异的生物亲和力进行吸附，如抗体与抗原、受体与激素、酶与底物之间的作用。

配基：在亲和层析中起可逆性结合的特异性物质。

载体：与配基结合的支撑物。



亲和层析的特点：

1. 纯化过程简单、迅速，且分离效率高；
2. 特别适用于分离纯化一些含量低、稳定性差的生物大分子；
3. 纯化倍数大，产物纯度高；
4. 必须针对某一分离对象制备专一的配基及寻求稳定的层析条件，因此应用范围受到一定的限制。

常用的亲和层析载体

纤维素

葡聚糖凝胶

琼脂糖凝胶

聚丙烯酰胺凝胶

其它新型载体

亲和层析配基的选择：

纯化对象和配基之间必须有较强的亲和力。

但亲和力太高也是有害的，因为在解离配基复合物时所需的条件就要强烈，这样可能使生物分子变性配基必须具有适当的化学基团，这种基团不参与配基与生物分子之间特异结合，但可用于和载体相连，同时又不影响配基与生物分子之间的亲和力。

D 凝胶层析

凝胶层析的基本原理

凝胶介质的基本性质

凝胶介质的选用原则

凝胶层析的基本原理

凝胶过滤是以具有大小一定的多孔性凝胶作为分离介质，小分子能进入孔内，在柱中缓慢移动，而大分子不能进入孔内，快速移动，利用这种移动差别可使大分子与小分子分开。

根据蛋白质的相对**分子量**和蛋白质分子的动力学**体积**的大小差异，可以利用凝胶过滤来分离纯化目的蛋白。

常用的凝胶

葡聚糖凝胶（ Sephadex ）

葡聚糖凝胶的种类有G-10， G-15， G-25， G-50， G-75， G-100， G-150， 和G-200。 G表示**葡聚糖**， G后面的阿拉伯数为凝胶得水值的10倍。例如， G-**25**为每克凝胶膨胀时吸水**2.5**克。 G值越小， 交联度越大， 吸水性越小。

Sephadex LH是羟丙基化的Sephadex， 这类层析介质的流动相既可使用缓冲水溶液， 也可使用极性有机溶剂， 因此适用于非水溶性溶质的凝胶过滤。

常用的凝胶

琼脂糖凝胶

琼脂糖凝胶是由琼脂中分离出来的天然凝胶，常见的有 **Sephrose** 和 **Bio-Gel-A** 等。

琼脂糖凝胶是一种 **大孔凝胶**，因而适合于分离分子量较大的生物大分子物质（如蛋白质和DNA）。

常用的凝胶

聚丙烯酰胺凝胶

聚丙烯酰胺凝胶是一种以丙烯酰胺为单位由甲叉双丙烯酰胺交联而成的人工合成凝胶，控制交联剂的用量可制成各种型号的凝胶，交联剂越多，孔隙越小。

聚丙烯酰胺凝胶的商品名为**Bio-Gel**，型号从P-2至P-300共10种（数字X1000就相当于该凝胶的排阻限度）

E 膜分离

膜分离的基本原理

分离膜的主要性能

影响膜分离的因素

膜分离的基本原理

- **膜分离的基本定义**
- **膜分离是利用膜的选择性，以膜的两侧存在一定量的能量差作为推动力，由于溶液中各组分透过膜的迁移速率不同而实现的分离。**

膜分离的基本原理

膜分离的主要类型

透析 (Dialysis DS)

反渗透 (Reverse osmosis RO)

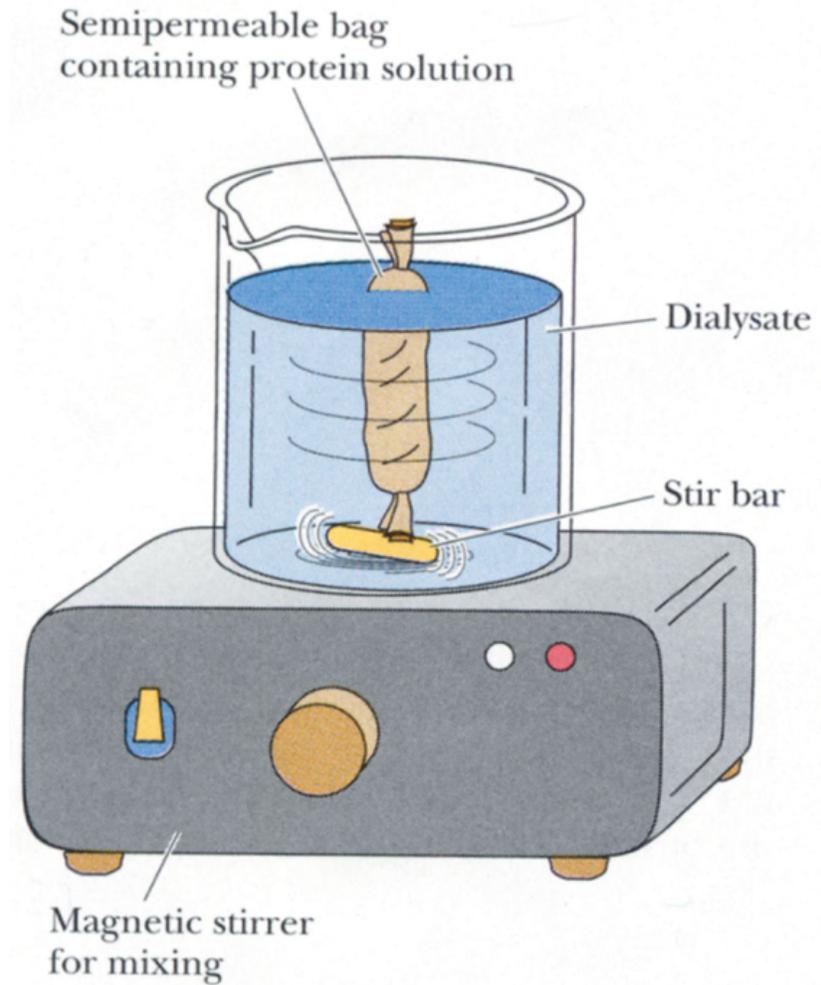
超滤 (Ultrfiltration UF)

微滤 (Microfiltration MF)

电渗析 (Electrodialysis EI)

透析 (Dialysis DS)

利用透析袋把大分子蛋白质与小分子化合物分开的方法。



分离膜的基本性能

膜的分类

按膜的孔径大小分类：

微滤膜	0.025 - 14 mm
超滤膜	0.001 - 0.02 mm
反渗透膜	0.0001 - 0.001 mm
纳米过滤膜	平均孔径 2 nm

分离膜的基本性能

膜的分类

按膜的孔径大小分类：

天然高分子膜	醋酸纤维素、硝酸纤维素、再生纤维素
合成聚合物膜	聚砜、聚酰胺、聚烯、含氟聚合物
无机材料膜	陶瓷、微孔玻璃、不锈钢、碳素

蛋白质的其它纯化方法：

离心、盐析、有机溶剂沉淀、等电点沉淀

双水相萃取、结晶，等。

注意：一种方法很难达到完全纯化或者产物符合标准，要联合几种方法。

六、非蛋白质杂质的去除

- (1) DNA的去除：** DNA在pH4.0以上呈阴离子，蛋白质的pI在6.0以上，可用阴离子交换剂吸附除去。如蛋白质为强酸性，可选择条件使其吸附在阳离子交换剂上，而DNA不吸附。亲和层析和疏水层析也有效。
- (2)热原质的去除：** 热原质是肠杆菌科产生的细菌内毒素（脂多糖）去除困难。分子量小的多肽或蛋白质中的热原可用超滤或反渗透，脂多糖是阴离子可用阴离子交换层析除去，脂多糖是疏水性可用疏水层析法。
- (3)病毒的去除：** 层析或过滤可将病毒去除。

七、选择分离纯化方法的依据

1.根据产物表达形式来选择

&: **分泌型表达**产物的发酵液体积很大但浓度较低纯化前必须浓缩可用沉淀和超滤法。

&: **周质表达**为了获得周质蛋白，经低浓度溶菌酶处理后，可采用渗透压休克的方法来获得。

&: 可溶性表达产物破菌后的细胞上清，首选亲和分离方法，或离子交换层析。

&: 不可溶性表达包含体对蛋白质分离纯化有两方面的影响，一是它可以很容易地与胞内可溶性蛋白杂质分离，蛋白纯化较容易完成，另一方面产物经过了一个变性复性过程，较易形成产物的错误折叠和聚合体。

2. 根据分离单元之间的衔接选择

在进行重组蛋白的纯化时，通常需要综合使用多种技术，一般来说，在选择分离纯化方法时应遵循下列原则：

应选择不同分离纯化机理的方法联合使用

应首先选择能除去含量最多杂质的方法

应尽量选择高效的分离方法

应将最费时、成本最高的分离纯化方法安排在最后阶段

3.分离纯化过程的规模化

蛋白质分离纯化的实验室工艺、技术、方法在大规模产业化过程未必合适，如：

实验室方法在工程上可能难以实现（超声波破细胞壁）

实验室方法在大规模生产中可能成本过高（超速离心）

因此，在很多情况下，实验室的技术路线不等于生产工艺。

简单、快速、经济、回收率高

谢谢观看



thanks for watching