

第二章 基因工程制药

2.9 基因工程药物的分离纯化

一、课程目标

常见的几种基因工程药物分离纯化工艺。

二、课程组织

同学们大家好上节课我们学习了基因工程菌的高密度发酵，一般在菌体发酵结束后，就开始了后续分离纯化工作，今天我们就学习一下基因工程药物的分离纯化。许多基因工程药物等都是活性多肽或蛋白质。

这些产品的特点是：

- (1) 目的产物在初始物料中含量低。
- (2) 初始物料组成复杂。
- (3) 目的产物的稳定性差，对 pH、温度、金属离子、有机溶剂十分敏感，容易失活、变性。
- (4) 种类繁多，包括大、中、小分子，结构和性质复杂的生物活性物质。
- (5) 应用面广，对其质量、纯度要求高，甚至要求无菌、无热源等。因此，为了获得合格的目的产物，必须建立与相适应的分离纯化工程。

2.9.1 建立分离纯化工艺需了解的各种因素

建立分离纯化工艺需了解的以下各种因素

- (1) 起始物料的特点
- (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

这些因素决定着分离纯化的工艺内容。

2.9.2 分离纯化的基本过程

分离纯化的基本过程发酵液先通过细胞分离，将细胞和发酵液分离开，然后通过一系列的分离纯化工艺，最终得到高纯度的产品。

2.9.3 细胞的破碎方法

首先是菌体细胞的破碎包括

1. 物理破碎法

2. 化学破碎法

3. 生物破碎法

高压匀浆法是利用高压迫使细胞悬浮液通过针型阀后,因高速撞击和突然减压而使细胞破裂的方法。可以大规模应用,但不适用于易造成堵塞的丝状真菌、较小的革兰氏阳性菌、以及含有包含体的基因工程菌。高速珠磨法是将细胞悬浮液与研磨剂一起快速搅拌或研磨,利用玻璃珠之间以及玻璃珠与细胞之间的相互剪切、碰撞促进细胞壁破裂而释放出内含物。产生大量的热,必须采取冷却措施。

超声破碎法是利用超声波来处理细胞悬浮液,在超声波作用下,液体发生空化作用,空穴的形成、增大和闭合产生极大的冲击波和剪切力,使细胞破碎。可处理少量样品,产生热量大,敏感物质易失活。

高压挤压法是把浓缩的细胞悬液冷冻成冰晶,用高压冲击,使冷冻细胞从高压阀孔中挤出,由于冰晶体磨损和包埋在冰中的细胞变形引起细胞破碎,破碎率高,细胞碎片粉碎程度低,生物活性保持较好。不适用对冻融敏感的生物活性物质物理破碎法优点是速度快,处理量较大,缺点是产生热量,要采取冷却措施,防止产物失活。

2. 化学破碎法

渗透冲击法是将细胞置于高渗介质中,平衡后,突然稀释介质或将细胞转入水或缓冲液中,由于渗透压的突然变化,水迅速进入细胞内,引起细胞壁的破裂。该方法的特点是操作简单,温和。仅适用于细胞壁较脆弱、经酶预处理的菌。增溶法是利用表面活性剂等化学试剂的增溶作用,增加细胞壁和膜的通透性使细胞破碎的方法。表面活性剂: SDS, Triton X-100; 有机溶剂有乙醇、异丙醇、尿素、盐酸胍,金属螯合剂有 EDTA, 缺点是添加新的化学试剂,造成新的污染。

脂溶法是有机溶剂与细胞壁和膜上的脂质作用,导致细胞壁膨胀、破裂,释放出胞内物质。常用的化学试剂有甲苯、氯苯、异丙苯、二甲苯等。

化学破碎法优点是选择性高,胞内产物的总释放率低,可有效抑制核酸的释放,料液黏度小,缺点是速度低,效率差,容易形成新的污染。

3. 生物破碎法

酶溶法是利用生物酶消化溶解细胞壁和细胞膜。常用酶有溶菌酶、葡聚糖酶、糖苷酶等,优点是产物可选择性释放、核酸泄出量少、细胞外形完整。

缺点是酶价格高，回收利用难，大规模使用成本高；通用性差，最佳条件不易确定；存在产物抑制作用，释放率低。

2.9.4 固液分离

1) 离心沉淀 通过高速离心和超速离心的方法进行分离

2) 膜过滤：

膜过滤包括**微滤**和**超滤**。**微滤**的滤膜孔径 0.1-75 μ m，通过过滤分离细胞、细胞碎片、包含体和蛋白质沉淀物等固体颗粒。**超滤**是滤膜孔径 0.005-0.01 μ m，浓缩蛋白质、多糖和核酸等大分子物质通过反渗透去除抗生素、氨基酸等小分子中的水分。

3) 双水相萃取：

双水相系统是由两种水溶性高聚物或一种高聚物与无机盐在水溶液中混合而成。

常用的**双水相系统**有聚乙二醇-葡聚糖，聚乙二醇-无机盐

2.9.5 重组蛋白质的分离纯化

工程菌经过细胞破碎和固液分离之后，目的产物仍与大量的杂质混合在一起，这类杂质可能有病毒、热原质、氧化产物、核酸、多聚体、杂蛋白、异构体等。因此为了获得合格的目的产物，必须对混合物进行分离和纯化。

目的产物的分离纯化方法根据其分子的理化性质和生物学特性来决定。产物的特性在分离纯化中的起着重要的作用根据表可以得出等电点决定离子交换的种类及条件；相对分子量决定选择不同孔径的介质；疏水性决定与疏水、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。

分离纯化的方法是色谱分离法。首先我们看**离子交换层析**：离子交换层析的基本原理是通过带电的溶质分子与离子交换剂中可交换的离子进行交换，从而达到分离的目的。

它具有分辨率高容量大操作容易，该法已成为多肽蛋白质核酸分离纯化的重要方法。

(2) 反相色谱和疏水色谱

反相色谱和疏水色谱是根据蛋白质疏水性的差异来分离纯化的。

反相色谱是利用溶质分子中非极性基团与非极性固定相之间相互作用力的大小，以及溶质分子中极性基团与流动相中极性分子之间在相反方向作用力的大小差异进行分离的。常用固定相为硅胶烷基键合相。

流动相为低离子强度的酸性水溶液，加入能与水互溶的乙腈、甲醇、异丙醇等有机溶剂。疏水层析的主要是利用蛋白质分子表面上的疏水区域和介质中的疏水基团之间的相互作用，无机盐的存在能使相互作用力增强。高盐浓度时，蛋白质分子中疏水性部分与介质的疏水基

团产生疏水性作用而被吸附；盐浓度降低时，蛋白质疏水性作用减弱，目的蛋白质被逐步洗脱下来，蛋白质疏水性越强，洗脱时间越长。与反相色谱相比，疏水层析回收率较高，蛋白质变性可能性小。

(3) 亲和层析

亲和层析是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。配基是在亲和层析中起可逆性结合的特异性物质。载体是与配基结合的支撑物。亲和层析可分三步：①配基固定化；②吸附目的物；③样品解吸。

(4) 凝胶过滤层析

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。主要应用两个方面：①脱盐和更换缓冲液；②蛋白质分子的分级分离。它具有分辨率高容量大操作容易，该法已成为多肽蛋白质核酸分离纯化的重要方法。

在产品的形成阶段前用于除去产物的多聚体及降解产物。

2.9.6 非蛋白质类杂质的去除

1. DNA 的去除：DNA 在 pH 4.0 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。

2. 热原质的去除：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。

3. 病毒的去除：层析或过滤可将病毒去除，紫外线照射使病毒失活。

2.9.7 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。

可溶性表达产物如果存在菌体破碎后的细胞上清，首选亲和分离方法或离子交换层析。

2. 根据分离单元之间的衔接选择

应选择不同的分离单元组成一套分离工艺，尽早采用高效的分离手段。先将最多的杂质去除，将费用最高、最费时的分离单元放在最后阶段。

即通常先运用非特异、低分辨的操作单元，以尽快缩小样品体积，提高产物浓度，去除

最主要杂质。随后采用高分辨率的操作单元，离子交换层析、亲和层析和凝胶过滤，这样可以提高分离效果。

3. 根据分离纯化工艺的要求来选择

分离纯化工艺应遵循以下原则：

- (1) 工艺具有良好的稳定性和重复性
- (2) 尽可能减少组成工艺的步骤
- (3) 各技术步骤间要相互适应和协调
- (4) 工艺过程中尽可能少用试剂
- (5) 工艺所用时间要短
- (6) 工艺和技术必须收率高、易操作、能耗低
- (7) 具有较高的安全性

总之，产物的分离纯化是制药过程中一个重要环节，直接影响到产品的纯度和生产成本，因此国内外的有关的研究不断增多。同学们大家好这节课我们主要学习了一下的内容：建立分离纯化工艺需了解的各种因素。