

第三章 基因工程制药工艺

- 3.1 基因工程制药微生物表达系统
- 3.2 基因工程大肠杆菌的构建技术
- 3.3 基因工程菌的发酵培养与控制
- 3.4 重组人干扰素生产工艺

基因工程菌：

微生物为操作对象，通过基因工程技术获得的表达外源基因或过量或抑制表达自身基因的工程生物体。

种类：

细菌和酵母是重要的表达重组药物的制药生物。

3.1 基因工程制药微生物表达系统

3.1.1 大肠杆菌表达系统

3.1.1 酵母表达系统

3.1.1 大肠杆菌表达系统

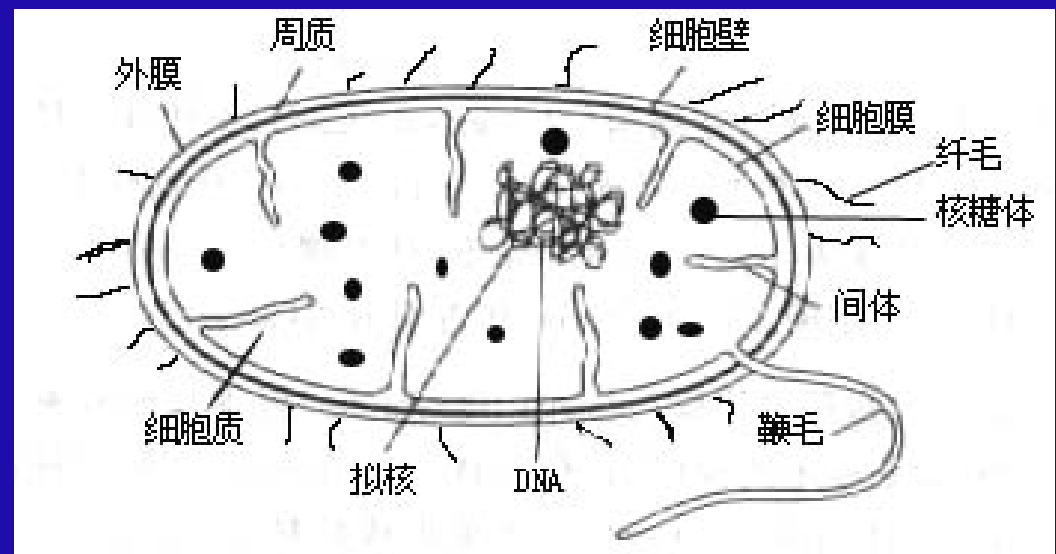
1、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 形态特征

细胞：G⁻，单细胞，杆状。鞭毛，无芽孢，一般无荚膜。裂殖。

菌落：白色至黄白色，光滑，直径2—3mm。



天津大学制药工程系



2、生化与遗传特性

能在仅有碳水化合物和氮、磷及微量元素的无机盐的极限培养基上生长，发酵糖，产气产酸。

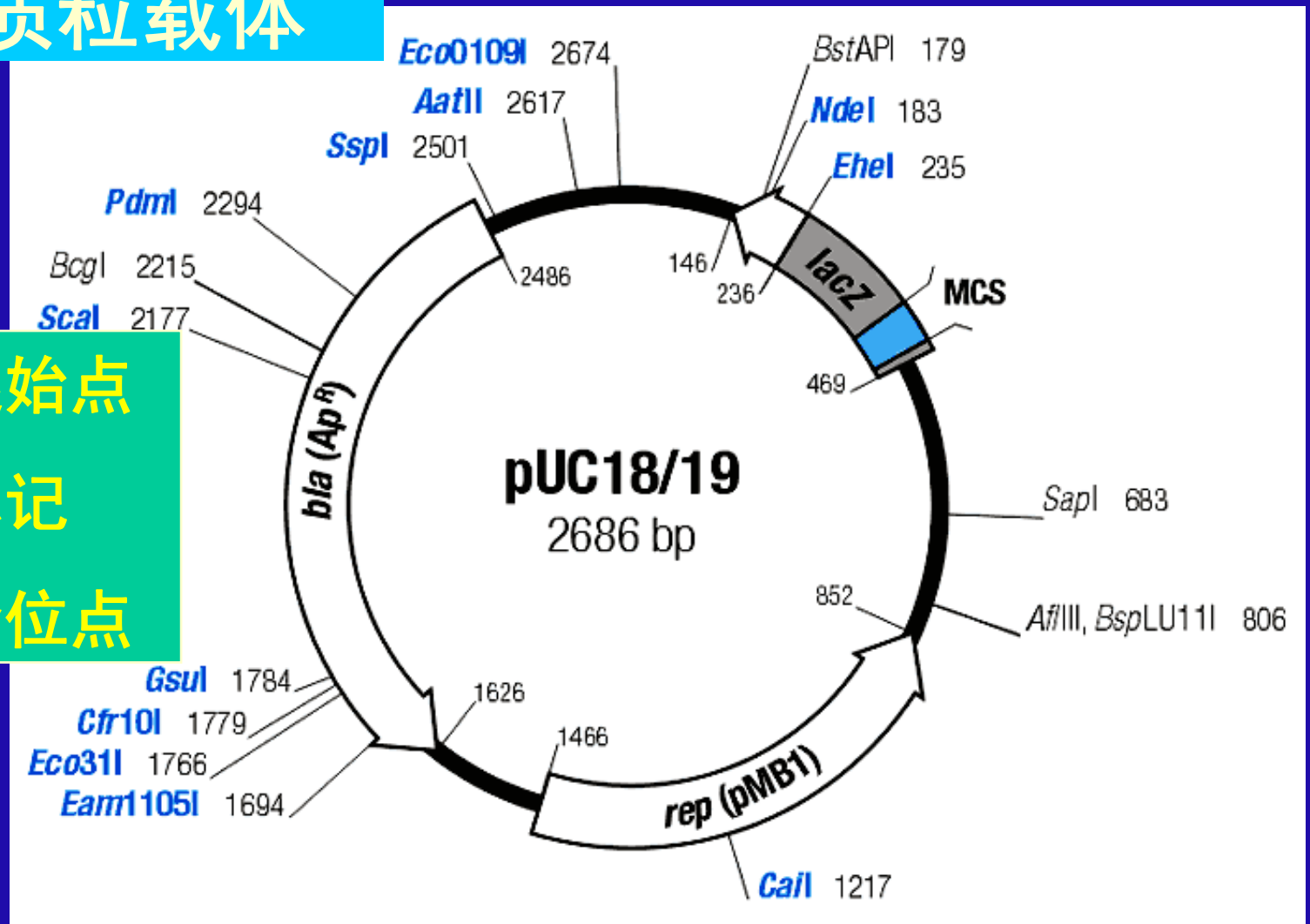
基因工程中使用菌株：K-12株的衍生菌株。

基因组：4.6 Mb，3000多种蛋白质。

染色体DNA为环状双链，核外遗传物质为质粒。

3、质粒载体

复制起始点
选择标记
多克隆位点



质粒类型

- ❖ 严紧型质粒：在每个宿主细胞只能复制少数几个拷贝的质粒，pSC101；
- ❖ 松弛型质粒：在每个细胞中能复制几十至几百个拷贝数的质粒，pMB1和colE1。
- ❖ 克隆质粒：用于克隆和扩增外源基因。
- ❖ 测序质粒：用于基因测序。
- ❖ 整合质粒：用于外源基因与宿主染色体整合。
- ❖ 穿梭质粒：能在两种宿主细胞存在。
- ❖ 表达质粒：能表达基因产物

4、产物表达形式

不溶性蛋白质： 细胞质内形成包涵体

可溶性蛋白质： 存在于细胞质

周质表达： 外源蛋白被运输分泌到周质，可溶性。有利于分离和减少蛋白酶降解，避免N端附加蛋氨酸。

胞外分泌表达： 胞内可溶性蛋白质分泌到胞外的培养液中。

5、优点和不足

发展最早、应用最广泛的经典的表达系统。

具有遗传背景清楚、目标基因表达水平高（高达70%），培养周期短，抗污染能力强。

不能用于加工修饰化（糖基化、酰胺化）蛋白表达。

细胞死亡后，细胞壁脂多糖游离出来，形成内毒素，具有抗原性，产生热源。

N端增加的蛋氨酸也容易引起免疫反应。

6、应用

- ❖ 大量外源基因能超量的表达， 18种药物上市。
- ❖ 多肽类2种（甲状旁腺激素(1-34)、利尿钠肽）
- ❖ 激素：胰岛素及2种突变体、8种生长素(1种PEG化)
- ❖ 细胞因子类：5种干扰素 α （1种PEG化）、干扰素 β 和 γ ，2种G-CSF(1种PEG化)，白介素-2、白介素-11、白介素-1拮抗剂
- ❖ 溶栓酶类：rPA
- ❖ 白喉毒素-IL 2融合蛋白、OspA脂蛋白（疫苗）等。

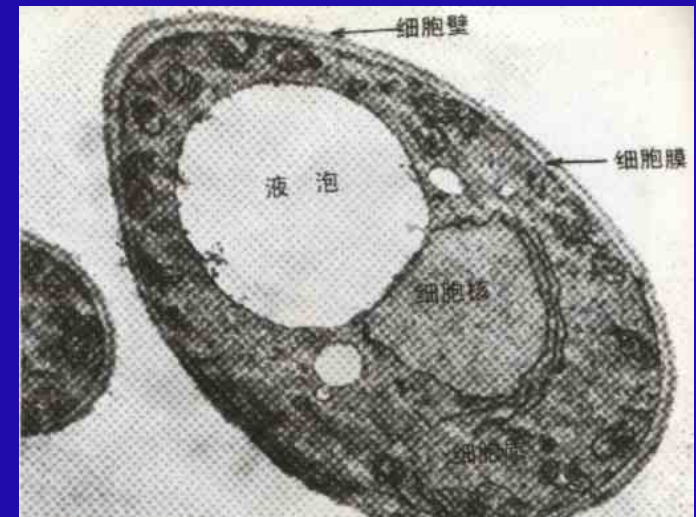
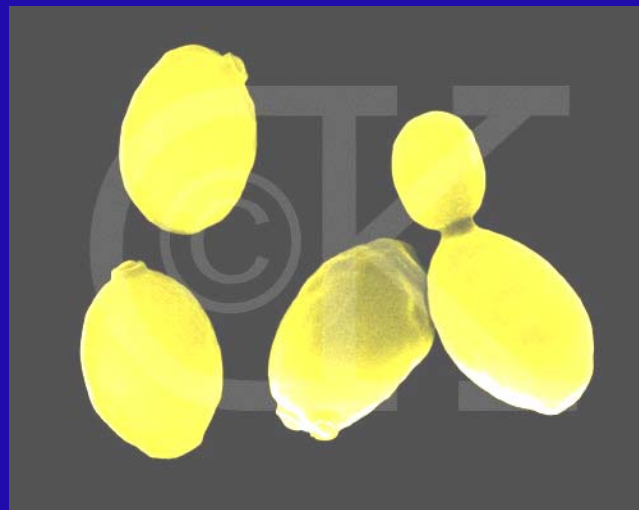
3.1.2 酵母表达系统

1、形态特征

细胞：单细胞真核生物，球形、椭圆形、卵形。

繁殖：芽殖、裂殖。在特定条件下才产生子囊孢子。

菌落：乳白色，有光泽，边沿整齐。



2、生长与遗传特征

孢子萌发产生单倍体细胞，两个性别不同的单倍体细胞结合形成二倍体接合子或营养细胞，进行芽殖。

能发酵葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、半乳糖等。

生长繁殖迅速，倍增期约2小时。

酿酒酵母有17条染色体

1996年完成其全基因组测序，遗传背景已相当清楚。

基因组：120.68Mb，5887个ORF，编码约6000个基因

3、优点与不足

五种类型的载体，——安全、无毒。

营养缺陷选择外来质粒。

培养条件简单、大规模培养技术成熟。

亚细胞器分化，进行蛋白质的翻译后正确修饰和加工，并具有良好的蛋白质分泌能力。

缺点：

酿酒酵母发酵产生乙醇，制约了高密度发酵。

修饰的蛋白质糖基化侧链过长，会引起副作用。

4、应用

1981年Hitzman等：酵母表达人干扰素

❖激素类：6种人胰岛素及1种突变体，尿酸水解酶和水蛭素，

细胞因子：GM-CSF和血小板衍生生长因子

❖多肽类：高血糖素

❖2种乙肝疫苗等。

❖8种产品

小结

- ❖ 表达系统：宿主菌+表达质粒
- ❖ 生物学，生产特征
- ❖ 大肠杆菌系统：
- ❖ 酵母系统：

思考题

- (1) 分析比较基因工程大肠杆菌和酵母表达系统制药的优缺点，如何选择应用？
- (2) 这两个系统生产了哪些重组蛋白质药物？

第三章 基因工程制药工艺

- 3.1 基因工程制药微生物表达系统
- 3.2 基因工程大肠杆菌的构建技术
- 3.3 基因工程菌的发酵培养与控制
- 3.4 重组人干扰素生产工艺

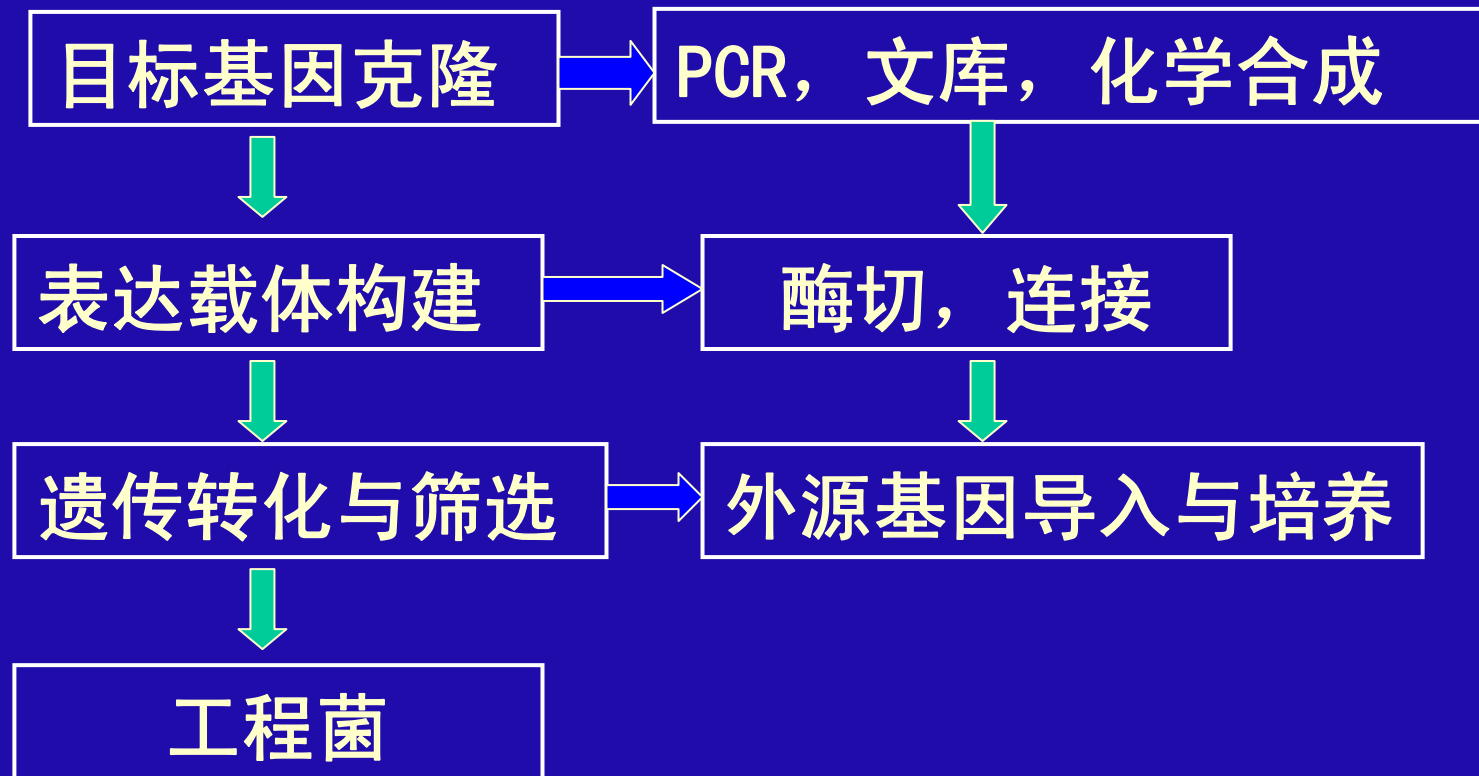
3.2 基因工程大肠杆菌的构建技术

3.2.1 构建流程

3.2.2 表达载体构建

3.2.3 工程菌构建

3.2.1 工程菌构建流程



3.2.2 表达载体构建

- ❖ 表达载体设计
- ❖ 目标基因的定位克隆
- ❖ 酶切反应
- ❖ 连接反应
- ❖ 转化
- ❖ 筛选与鉴定

1、表达载体的设计

❖ 表达载体概念: expression vector

在质粒载体的基础上，在多克隆位点处插入外源基因表达盒所构成。

❖ 外源基因表达盒(操纵子模型):

启动子	目标基因	终止子
-----	------	-----

2、 目标基因PCR定位克隆

(1) PCR技术

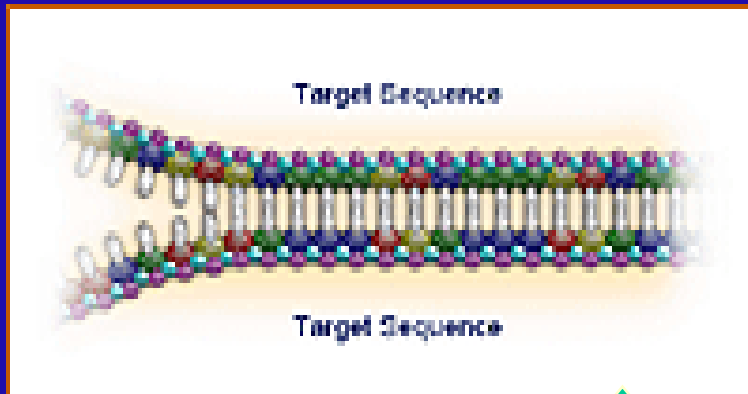
➤ PCR (Polymerase chain reaction, PCR):

聚合酶链式反应：由DNA聚合酶催化下，对特定的DNA 序列进行的复制反应。

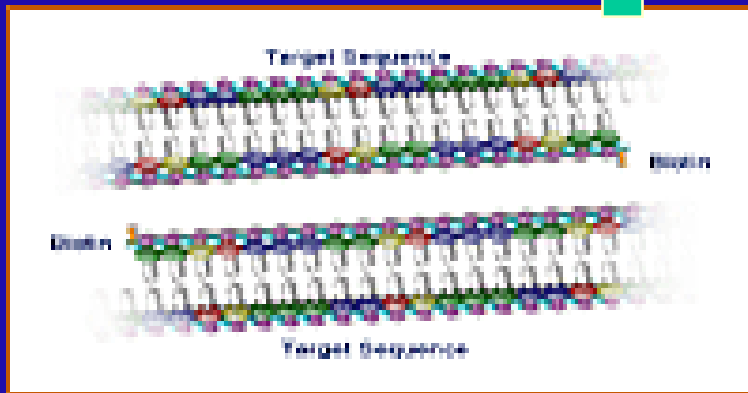
➤ 本质：生物体的DNA复制原理在体外合成基因。

➤ 发明者：Mullis，生物技术革命性象征。

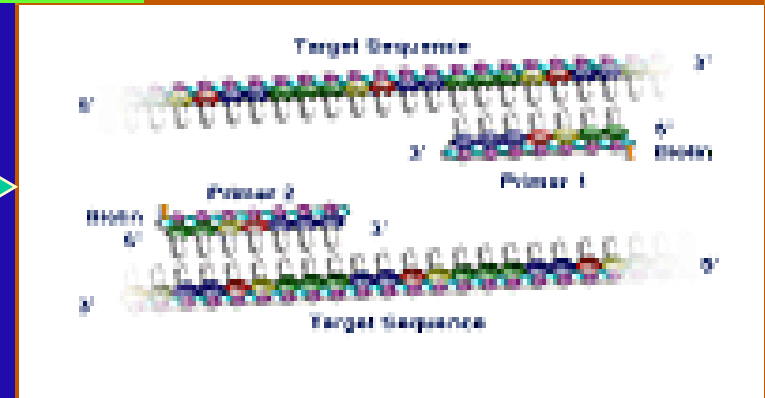
(2) PCR单反应原理与过程



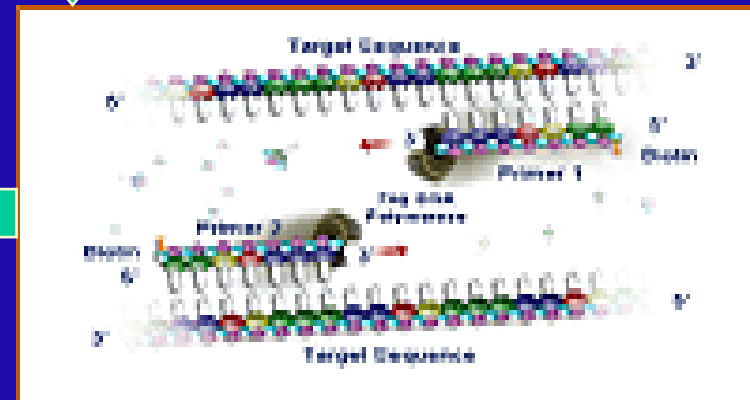
(1) 变性 (94°C)



(4) 完成一个循环

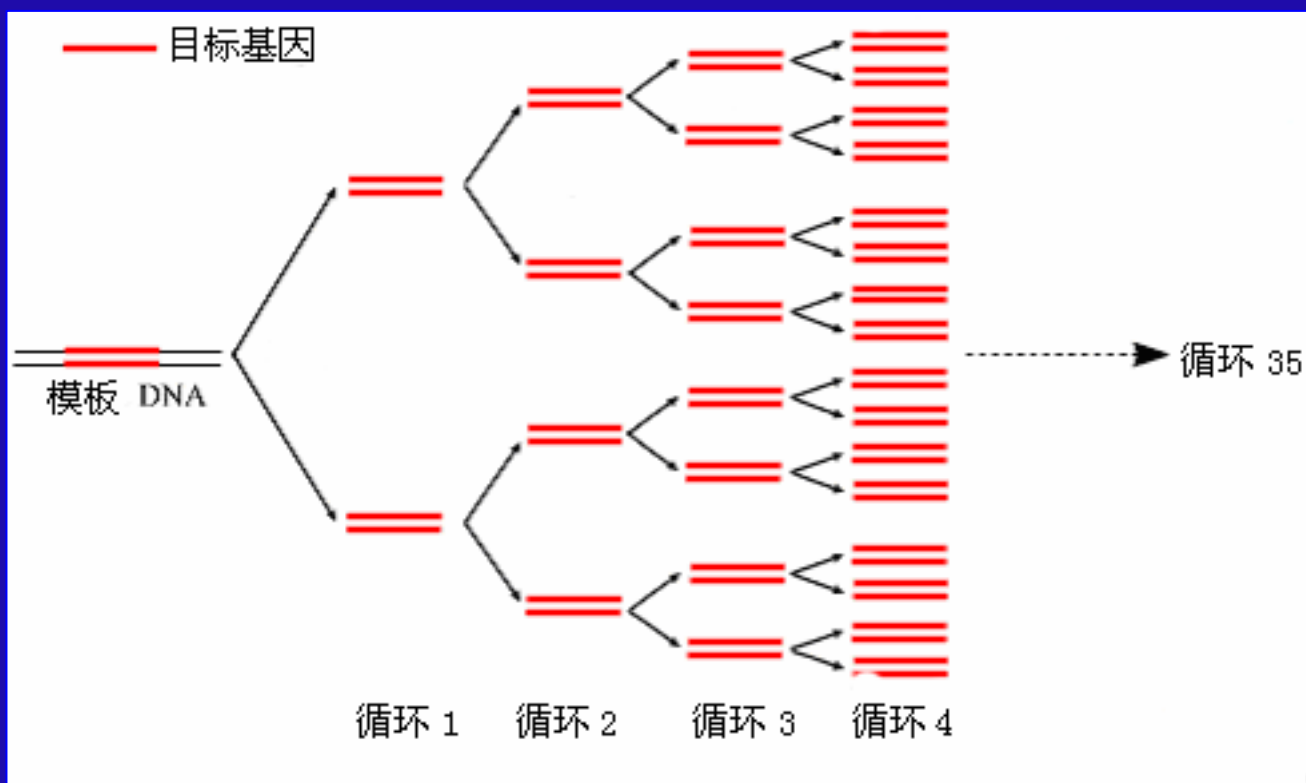


(2) 退火 (55°C)



(3) 延伸 (72°C)

(3) PCR循环

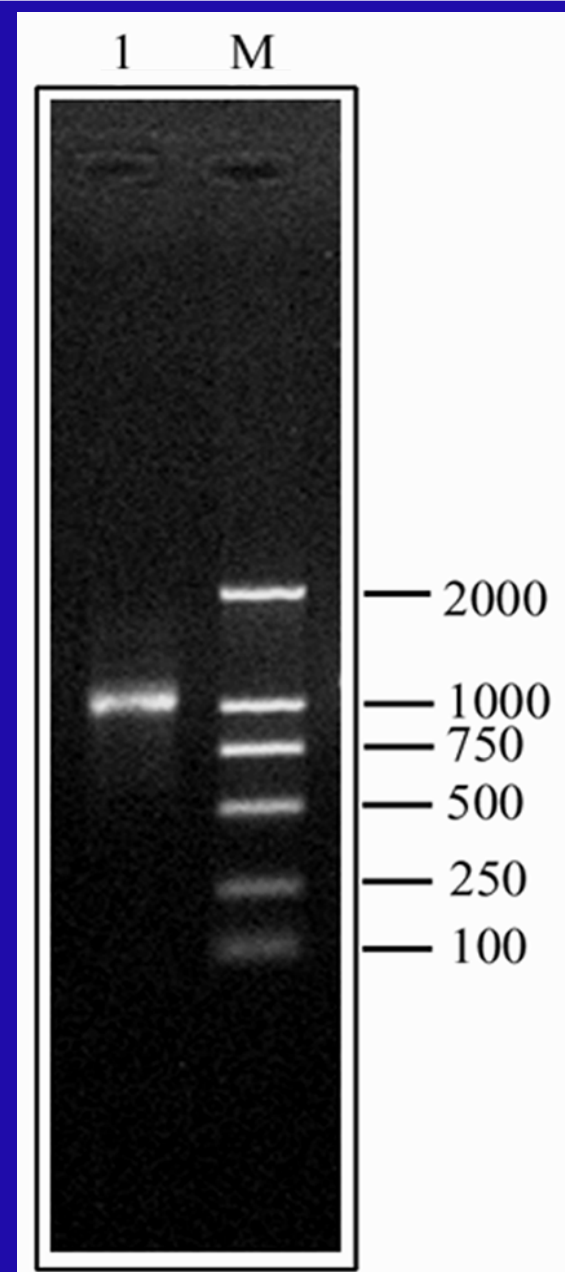


(4) PCR扩增的反应体系组成

- ✓ 模板 DNA: 目标序列, 100—10 000bp, pg
- ✓ 引物: 两条寡核苷酸, 21 ~ 27 bp。
- ✓ 脱氧核苷酸: 4种dNTP, 即dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- ✓ DNA聚合酶: Taq聚合酶, 耐高温
- ✓ 缓冲溶液: 50 mM KCl、10 mM Tris—HCl, 1.5 mM MgCl₂

(5) PCR扩增产物

- ❖ 程序：温度，时间，循环数
- ❖ 电泳：目标基因片段大小，特异性。



2、酶切反应

❖ 概念：

➤ 在特异位点上催化双链DNA分子的断裂，产生相应的限制性片段。

❖ 酶切体系组成：DNA，缓冲液，限制性内切酶。

❖ 反应条件：适宜温度(37℃)，1小时以上。

❖ 终止反应：加热；加入EDTA，螯合镁离子。

❖ 电泳检查：酶切完全性。

3、连接反应

❖ 概念:

DNA 双链上相邻的 3' 羟基和 5' 磷酸基因共价结合形成 3' -5' 磷酸二酯键，使原来断开的DNA缺口重新连接起来。

❖ 连接体系：载体片段与基因片段，缓冲液，连接酶。

❖ 连接反应：16℃-26℃，数小时，或过夜。

❖ 终止反应：在70℃加热10分钟。

4、转化

- ❖ **转化**: 某一基因型细胞从周围介质中吸收另一基因型细胞的DNA, 使其基因型和表型发生相应变化的现象
- ❖ **转染**: 除去蛋白质外壳的病毒核酸感染细胞或原生质体的过程.

大肠杆菌转化——CaCl₂法

- ❖ 感受态细胞融化：置冰上，缓慢。
- ❖ 加入连接反应产物：混匀，置冰上30分钟。
- ❖ 热击：42℃，90秒。
- ❖ 置冰上，1—2分钟。
- ❖ 扩增培养：加入LB培养基，37℃，45分钟。
- ❖ 涂平板：含有抗生素的LB固体培养基上。
- ❖ 筛选培养：倒置平板，37℃，出现菌落。

5、筛选与鉴定

转化后的细胞类型

非转化子：没有导入外源DNA的非转化宿主细胞

转化子：导入外源DNA的转化细胞

非重组子：仅含有空载体分子的转化子

重组子：含有重组DNA分子的转化子

目标重组子：含有连接正确的重组分子（目的）

非目标重组子：不含目的基因重组子

(1) 筛选方法

❖ 抗生素筛选法:

抗生素的抗性基因，氨苄青霉素。

❖ 蓝白斑筛选法:

lacZ'基因，重组子白色，非重组子蓝色。

❖ 噬菌斑筛选法:

转化子被裂解形成噬菌斑，非转化子正常生长。

(2) 鉴定方法

- ❖ 菌落PCR: 含有目标基因
- ❖ 载体大小: 电泳检测
- ❖ 酶切鉴定: 目标基因插入及插入方向
- ❖ 测序确证: 目标基因的序列准确无误, 阅读框架通读

3.2.3 基因工程菌的建立

❖ 过程：

- 适宜宿主菌的转化
- 筛选鉴定，遗传稳定性等。

❖ 目标：

- 获得质粒能稳定遗传、基因能高效和定向表达的载体，确保药物的生物活性。

表达筛选与产物鉴定

- ❖ 不同菌种的表达筛选
- ❖ 诱导表达时间和诱导强度的筛选
- ❖ 产物存在形式和存在场所的鉴定表达部位
 - 胞外，周质，胞内；包涵体，可溶性蛋白
- ❖ 表达产物结构与活性鉴定
 - 电泳，SDS—PAGE，等电点电泳
 - 免疫杂交，末端测序，质谱分析
 - 分析与目标产物的同一性

小结

- ❖ 表达载体构建：基因克隆，酶切，连接转化
- ❖ 工程菌构建：表达筛选，功能确认

思考题

- (1) 工程菌构建的基本过程是什么，所涉及生物技术的原理是什么？
- (2) 在大肠杆菌中高效表达蛋白药物要着重设计哪几个方面？

第三章 基因工程制药工艺

- 3.1 基因工程制药微生物表达系统
- 3.2 基因工程大肠杆菌的构建技术
- 3.3 基因工程菌的发酵培养与控制
- 3.4 重组人干扰素生产工艺

3.3 基因工程菌发酵培养与控制

3.3.1 培养基组成与控制

3.3.2 培养工艺与控制

3.3.3 终点控制

3.3.1 培养基组成与控制

碳源

氮源

无机盐

选择剂

诱导物

1、碳源

- ❖ 大肠杆菌：蛋白胨等蛋白质的降解物作为碳源
- ❖ 酵母：利用葡萄糖、半乳糖等单糖类物质。
- ❖ 添加低浓度的单糖和双糖及其他有机物如甘油等对菌体生长具有一定的促进作用。
- ❖ 浓度稍高后就表现出底物抑制作用。
- ❖ 葡萄糖优先利用会造成培养基的酸化。

2、氮源

- ❖ 直接很好地吸收利用铵盐等，一般不能利用硝态氮。几乎都能利用有机氮源。
- ❖ 不同工程菌对氮源利用能力差异很大，具有很高的选择性。
- ❖ 大肠杆菌：利用大分子有机氮源，酵母粉等。
- ❖ 酵母：利用氨基酸为氮源

3、无机盐

- ❖ 磷、硫、钾、钙、镁、钠等大量元素和铁、铜、锌、锰、钼等微量元素的盐离子形态
- ❖ 基因工程菌生长提供必需的矿物质。

4、选择剂selective agent

维持工程菌的纯正性和质粒的稳定性的化合物。

发酵培养过程中质粒容易丢失，使之成为宿主菌

为了保证质粒的稳定性，不丢失。

根据质粒上的营养缺陷或选择性标记基因，添加或缺陷选择剂。

选择剂种类

营养缺陷互补和抗生素抗性。

工程大肠杆菌：卡那霉素、氨苄青霉素、氯霉素、博来霉素等抗生素作为选择剂

工程酵母菌：氨基酸营养缺陷型，缺陷亮氨酸、组氨酸、赖氨酸、色氨酸等。

5、诱导物

诱导表达型工程菌：在细胞生长到一定阶段，必需添加诱导物，以解除目标基因的抑制状态，活化基因，进行转录和翻译，生成产物。

诱导物成为产物表达必不可少的。

*Lac*启动子表达系统：IPTG诱导。

甲基营养型酵母：加入甲醇进行诱导。

6、培养基组成对质粒稳定性的影响

- ❖ 营养较丰富的培养基，质粒稳定性高于合成培养基
- ❖ 限制性基质对基因工程菌的比生长速率有不同影响。
- ❖ 大肠杆菌对葡萄糖和磷酸盐限制易发生质粒不稳定，有一些质粒对氮源、钾、硫等表现不稳定。
- ❖ 对于酵母，极限培养基比丰富培养基更有利于维持质粒稳定性。
- ❖ 培养基中添加酵母提取物和谷氨酸等有利于提高质粒稳定性。

3.3.2 培养工艺与控制

- ❖ 温度
- ❖ 溶解氧
- ❖ pH

温度对工程菌发酵的影

大肠杆菌和酿酒酵母生长最低温度为 10°C

大肠杆菌生长最适温度为 37°C ，最高温度为 45°C 。

酿酒酵母生长最适温度为 30°C ，最高温度为 40°C 。

温度对工程菌发酵的影

生长与生产温度不一致。

较高温度表达包涵体，较低温度下有利于表达可溶性蛋白质。

对于热敏感的蛋白质，生产期可采用先高温，然后低温，变温表达，避免蛋白质降解。

温度控制

两段变温发酵培养：

前期：较高温度发酵，获得足够高的菌体密度；

后期：较低温培养发酵，对菌体合成目标产物的抑制不明显，但可有效抑制目标产物的降解和包涵体形成，总体提高工程菌的生产能力。

温度诱导型大肠杆菌表达系统：生长期维持 37°C ，生产期提高温度 42°C 。

pH值对发酵的影响

细菌喜欢偏碱性：大肠杆菌适宜pH为6.5~7.5，

真菌喜欢微酸性：酵母适宜pH为5.0~6.0。

影响产物稳定性，最适生长和最适生产pH不同。

干扰素是在酸性条件下稳定，而在碱性条件下容易降解。酸性环境有利于发挥菌株生产能力。

乙酸的产生使菌体生长速率下降，也抑制基因表达。

pH值控

了解发酵过程中各个阶段的适宜pH以后，需要进一步设法控制pH在合适的范围内。

分阶段控制pH：根据试验结果来确定生长最适pH和产物最适pH，以达到最佳生产。

3. 溶解氧控

工程菌是好氧微生物，生长过程需要大量氧。

从供应量和需要量（菌体生长、质粒稳定性、产物积累）二个方面考虑，使之需氧不超过设备的供氧能力

考虑溶氧对质粒稳定性的影响：

调节搅拌转速和通气量

3.3.3 终点控制

- ❖ 根据目标基因产物的表达模式而定。
- ❖ 适宜的诱导时间：非常重要
- ❖ 诱导物的浓度及其发酵温度：
影响表达量，产物存在形式
- ❖ 在生产中应严格控制。

1、化学诱导表达

- ❖ 化学诱导型启动子：*lac*、*tac*、T7等
- ❖ 诱导时间：对数生长期
 - 细菌：IPTG诱导
 - 甲基营养型酵母：甲醇诱导。

2、温度诱导表达

- ❖ 温度诱导型启动子： P_L 、 P_R 启动子
- ❖ 两段培养发酵：
- ❖ 诱导时间：菌体生长的对数期或稍后一些，升高温度，合成产物。

小结

- ❖ 培养基组成与控制
- ❖ 培养工艺与控制
- ❖ 终点控制

思考题

- (1) 工程菌与宿主菌对培养基要求有何不同，为什么？
- (2) 影响工程菌培养工艺的主要参数是什么？如何优化控制？
- (3) 工程菌发酵中，如何确定终点？

第三章 基因工程制药工艺

3.1 基因工程制药微生物表达系统

3.2 基因工程菌的构建技术

3.3 基因工程菌的发酵培养与工艺控制

3.4 重组人干扰素生产工艺

3.4 重组人干扰素生产工艺

3.4.1 干扰素概述

3.4.2 基因工程假单胞杆菌的构建与保藏

3.4.3 干扰素的发酵工艺过程

3.4.4 干扰素的分离纯化工艺过程

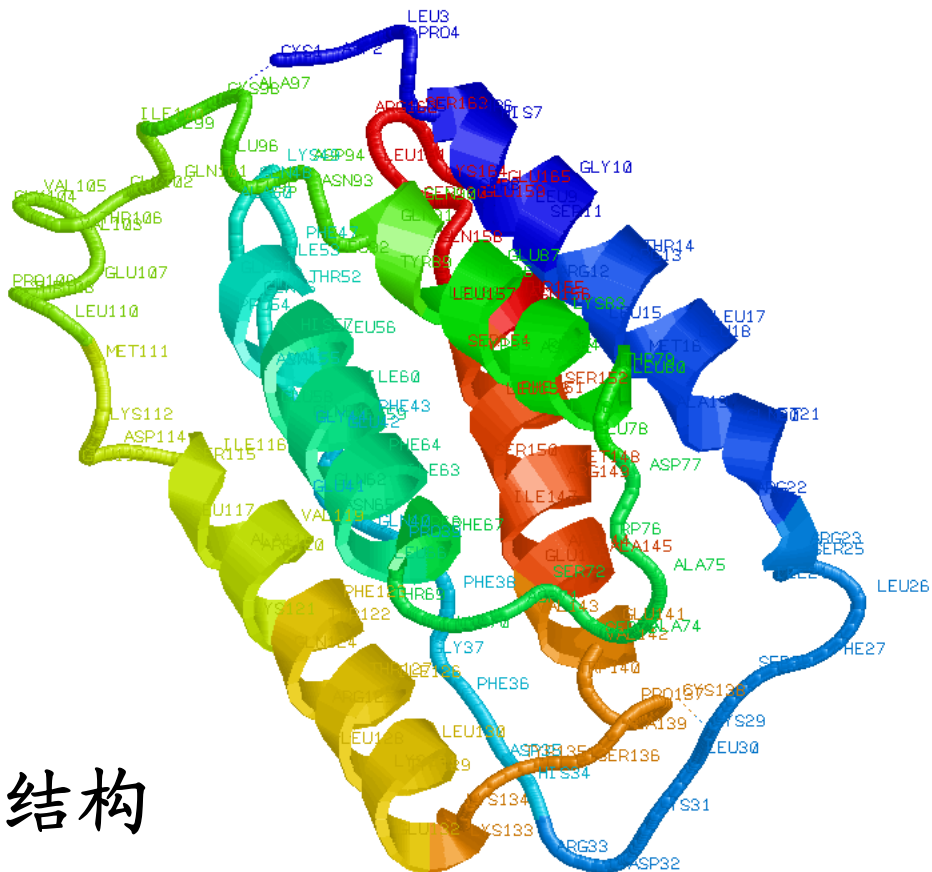
3.4.1 干扰素概述

- 干扰素的种类
- 干扰素的临床应用
- 干扰素的生产工艺路线

1、干扰素的种类

- 概念：（interferon, IFN）
机体受到病毒感染时，免疫细胞产生的一组结构类似、功能接近的细胞因子
- 功能：干扰病毒在细胞内的繁殖
- 天然干扰素分类：
 - ✓ I干扰素：IFN α 、IFN β 、IFN τ 、IFN ε 、IFN ω
 - ✓ II干扰素：IFN γ
- 上市重组干扰素： α 2a、 α 2b、 α 1b、 β 1b, γ
- 研发中的重组干扰素：IFN ω ，临床阶段

干扰素的理化性质



IFN α 结构

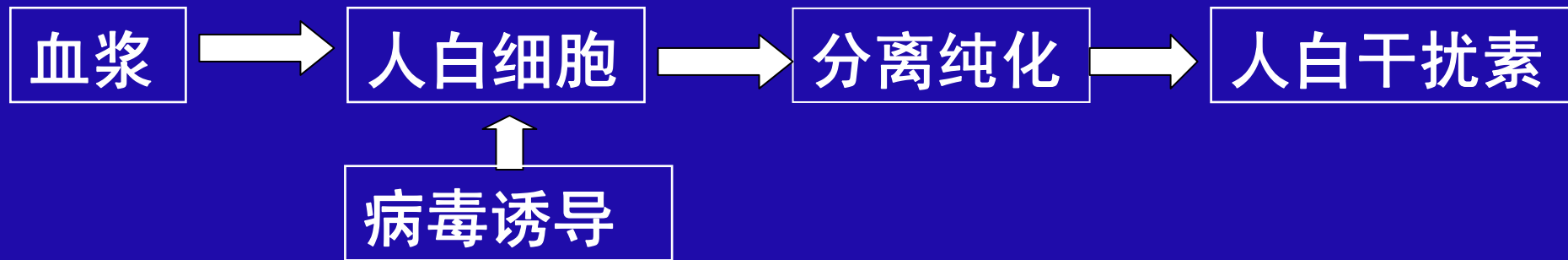
143-166aa;
MW:17-23 ku;
pI: 5.7-8.5;
乙醚、氯仿敏感
容易吸附介质。

2、重组干扰素的临床应用

- 广谱抗病毒活性 (rhulFN α)
 - ✓ 慢性乙型、丙型、丁型肝炎；疱疹、病毒性角膜炎。
- 直接抗肿瘤活性 (rhulFN α)
 - ✓ 毛细细胞和慢性髓样白血病、Kaposi肉瘤、非霍奇金淋巴瘤。
- 免疫调节活性——治疗慢性肉芽肿瘤 (rhulFN γ)
- 多发性硬化症 rhulFN β

3、干扰素生产工艺路线（1）

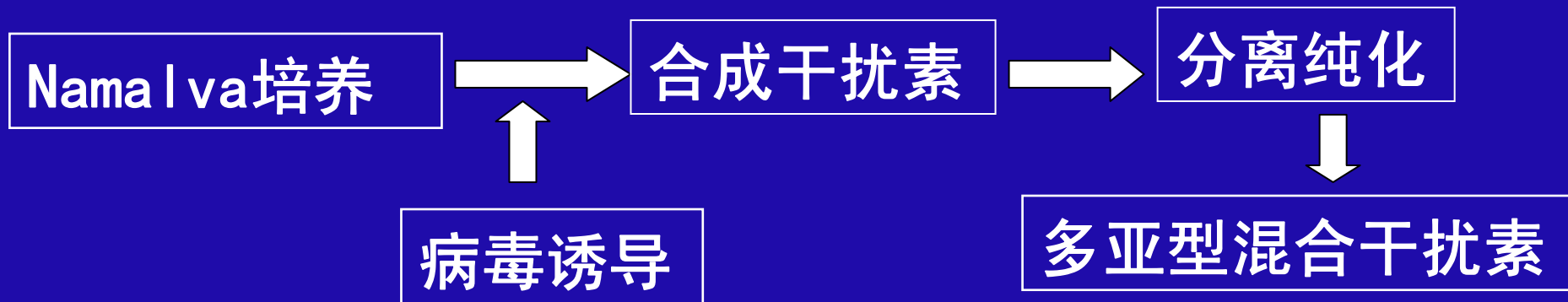
- 体外诱生干扰素制备工艺： Sendai 病毒诱导人白细胞



- 1989年：IFN α -n3/Alferon，批准上市
- 产量低：1g IFN α ，需要 3亿ml 人血白细胞
- 来源困难，工艺复杂，收率低，价格昂贵
- 潜在的血源性病毒污染的可能性

3、干扰素生产工艺路线（2）

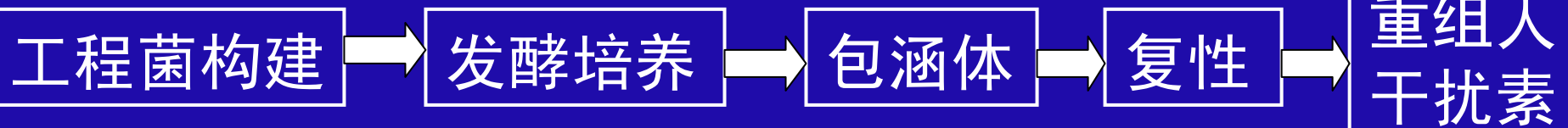
- 人源转化细胞系培养生产工艺：



- 1999年：IFN α -n1/Wellferon, 批准用于临床。
- 优点：首次实现大规模商业化生产。
- 缺点：活性低，退出临床应用。

3、干扰素生产工艺路线（3）

- 基因工程大肠杆菌发酵生产工艺：



- 上市产品：重组人干扰素rhuIFN

- ✓ 1986, rhuIFN α -2a, rhuIFN α -2b;

- ✓ 1990, rhuIFN γ -1b; 1993, rhuIFN β -1b;

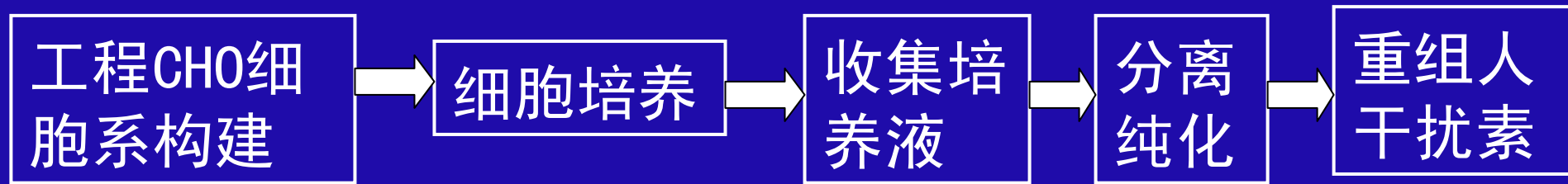
- ✓ 2001—2002: PEG化IFN, PEG-Intron, Pegasys

- 表达产物：无糖基化, N-met, 无活性包涵体

- 工艺特点：发酵过程, 随后变性、复性过程。

3、干扰素生产工艺路线（4）

动物无限细胞系培养生产工艺：



- 上市产品：rhuIFN β -1a
- ✓ 1996, Avonex (Biogen); 2002, Rebif (Serono)
- 表达产物：166 aa 糖基化蛋白，22.5 ku
- 工艺特点：分泌表达，产量低，成本高，过程严格

3、干扰素生产工艺路线（5）

基因工程假单胞杆菌发酵生产工艺：

- 宿主：腐生型假单胞杆菌 (*Pseudomonas putida*)
- 上市产品：IFN α -2b/安福隆
- 表达产物：无糖基化可溶性蛋白质，具有天然分子结构和生物活性
- 工艺特点：
 - ✓ 发酵周期短：几个小时
 - ✓ 无需变性、复性过程，获得有活性产品
 - ✓ 纯化过程：淘汰抗体亲和层析

3.4.2 基因工程假单胞杆菌的构建与保藏

- 1、基因工程假单胞杆菌菌种建立
- 2、基因工程假单胞杆菌菌种特性
- 3、菌种库的建立与保藏

1、基因工程假单胞杆菌菌种建立

第一步：干扰素 α -2b 基因的克隆

第二步：表达载体的构建

第三步：工程菌的构建

1、基因工程假单胞杆菌菌种建立

第一步：干扰素基因的克隆 (RT-PCR)

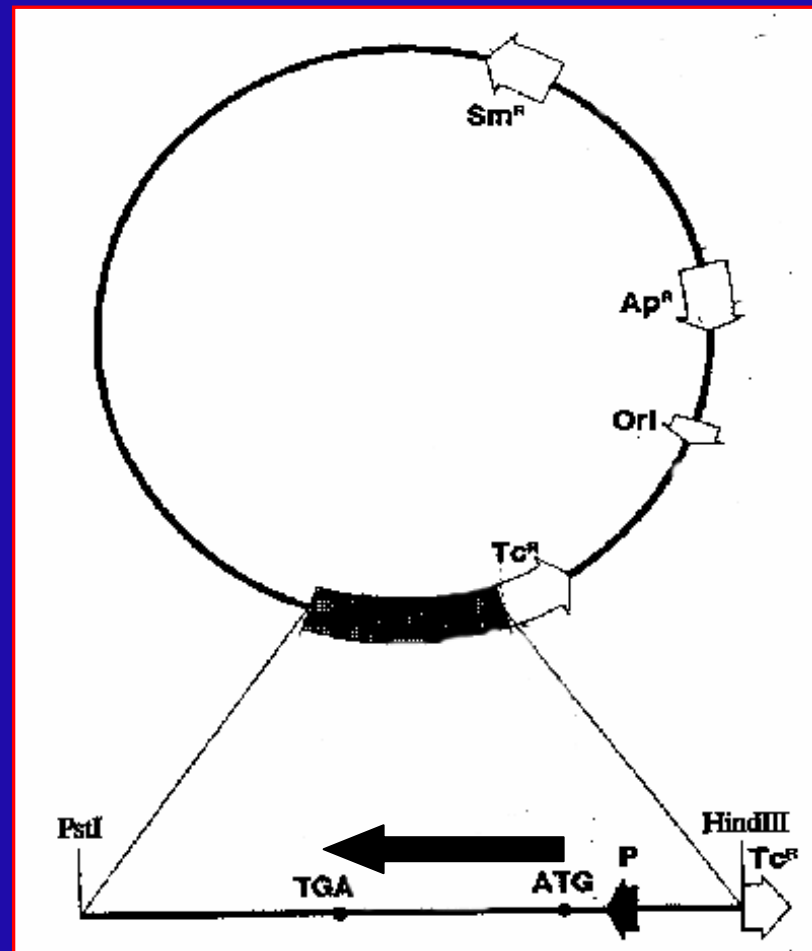
- 制备白细胞，病毒诱导，分离mRNA，反录酶合成cDNA，PCR，基因连接质粒，转化*E. coli*，筛选鉴定克隆。
- 测序：编码人IFN α -2b基因序列，501bp，165aa。

ATGTGTGATCTGCCTCAGACCCACAGCCTGGGTAGCAGGAGGACCTTGATGCTCCTGGCACAG
ATGAGGAGAATCTCTCTTTTCTCCTGCTTGAAGGACAGACATGACTTTGGATTTCCCCAGGAG
GAGTTTGCCAACCAGTTCCAAAAGGCTGAAACCATCCCTGTCCTCCATGAGATGATCCAGCAG
ATCTTCAATCTCTTCAGCACAAAGGACTCATCTGCTGCTTGGGATGAGACCCTCCTAGACAAA
TTCTACACTGAACTCTACCAGCAGCTGAATGACCTCGAAGCCTGTGTGATACAGGGGGTGGGG
GTGACAGAGACTCCCCTGATGAAGGAGGACTCCATTCTGGCTGTCAGGAAATACTTCCAAAGA
ATCACTCTCTATCTGAAAGAGAAGAAATACAGCCCTTGTGCCTGGGAGGTTGTCAGAGCAGAA
ATCATGAGATCTTTTTCTTTGTCAACAACTTGCAAGAAAGTTTAAGAAGTAAGGAATGA

1、基因工程假单胞杆菌菌种建立

第二步：表达载体构建

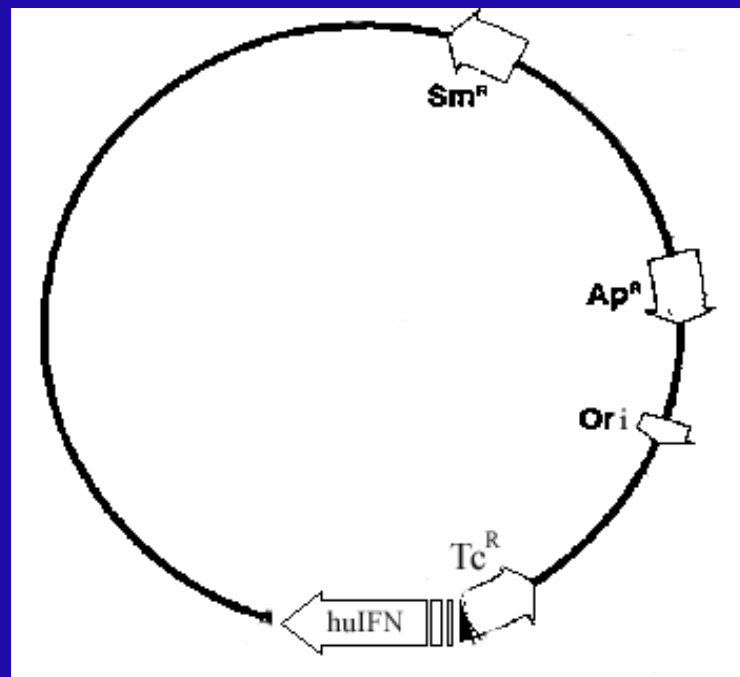
- IFN基因与表达载体连接
- 转化大肠杆菌
- 筛选阳性克隆
- 获得序列正确表达载体



1、基因工程假单胞杆菌菌种建立

第三步：工程菌构建

- 转化假单胞杆
- 筛选高表达、稳定遗传的工程菌
- 获得原始菌种



2、基因工程菌的特性

(1) 具有宿主菌的特征：

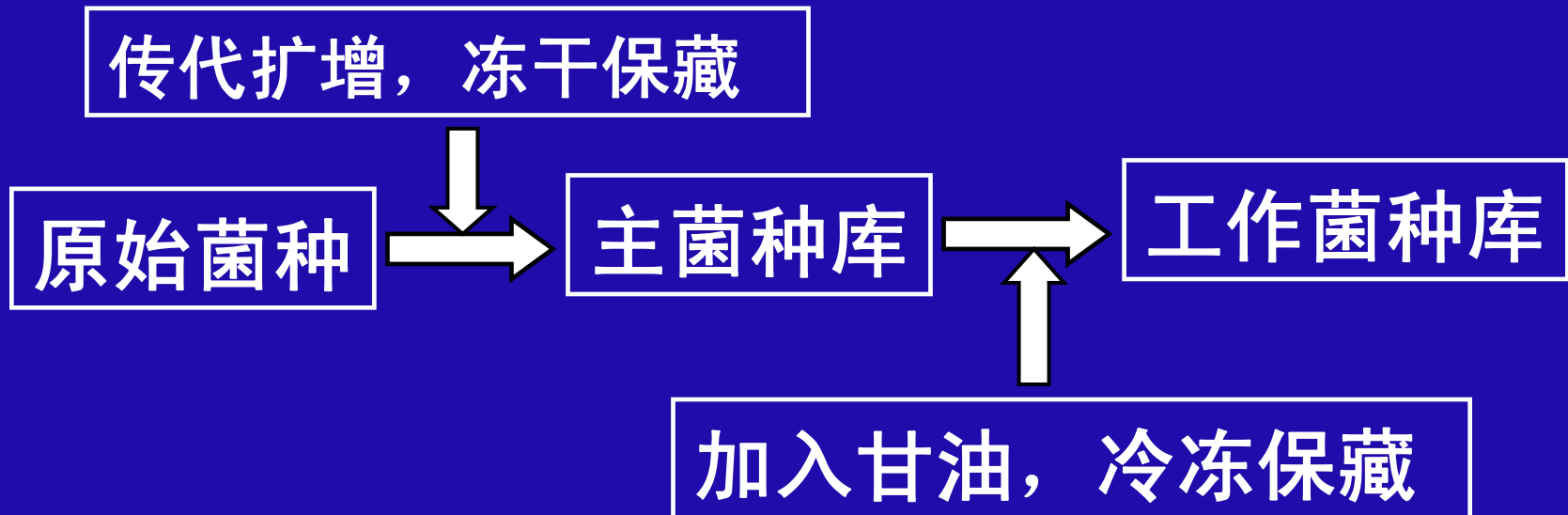
- 细菌：革兰氏阴性菌，有荚膜，无芽孢，杆状。
- 菌落：直径2.5-3.0 mm，灰绿色半透明状，粘稠。
- 生化特性： Ser^- ，L-Val、D/L-Arg和L-Thr为碳源。

(2) 工程菌的特征： Sm^R 、 Tc^R 、 Ap^R

(3) 具有生产干扰素能力：

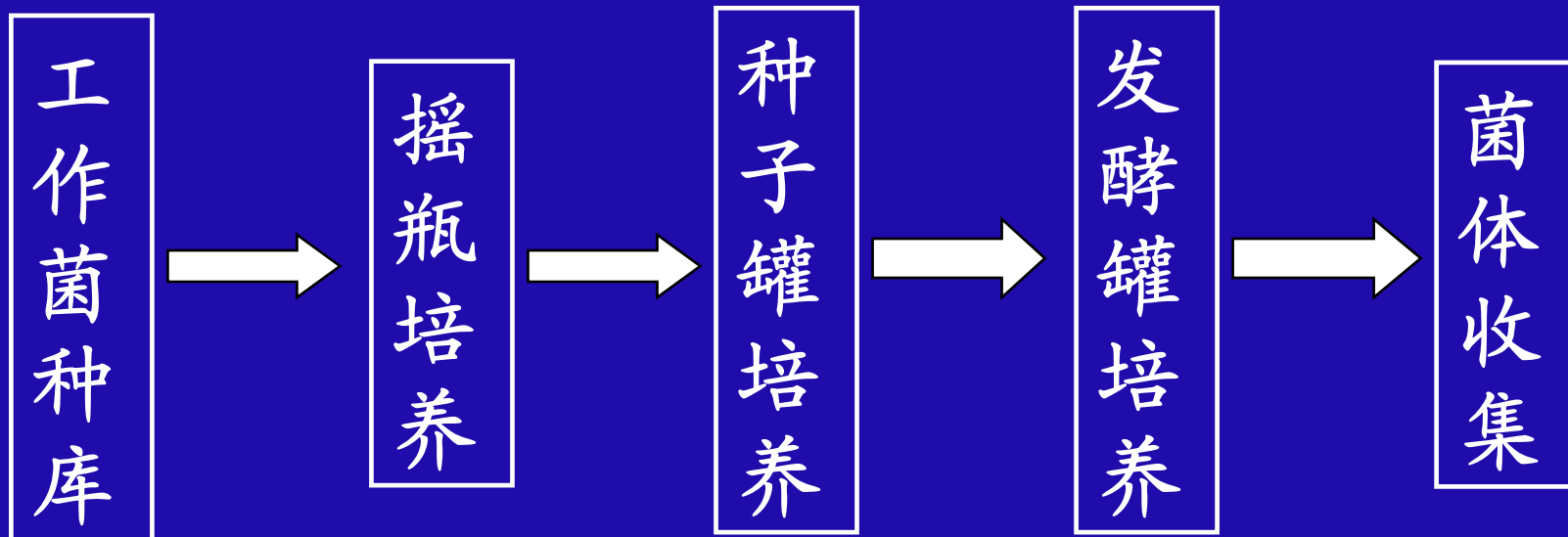
- 放射性免疫学效价不低于 2.0×10^9 IU/L。

3、菌种库的建立与保藏



- QC: 菌种特性、生产能力、质粒稳定性
- 菌种检查合格后，方可投产。

3.4.3 干扰素的发酵工艺过程



1. 摇瓶培养

- 取保存工作种子批菌种，室温融化
- 摇瓶培养：30℃，pH7.0，250 r/min，18±2h
- 检测：OD值和发酵液杂菌检查。

2. 种子罐培养

- 接种：接入50L种子罐，接种量10%。
- 培养：30℃，pH7.0。
- 控制：级联调节通气量和搅拌转速
DO为30%，3~4h，OD>4.0。
- 检测：显微镜和LB培养基划线检查，控制杂菌。

3. 发酵罐培养

- 接种：通入300L培养基的发酵罐，接种量10%。
- 控制：级联调节通气量和搅拌转速。
- 前4h：30℃，pH7.0，D0为30%。
- 4h后：20℃，pH6.0，D0为60%，5~6.5h。
- 终点控制：OD值达 9.0 ± 1.0 ，5℃冷却水快速降温至15℃以下。
- 检测：发酵液杂菌检查

4. 菌体收集

- 连续流离心机：冷却的发酵液，16000 r/min 离心收集。
- 菌体保存：-20℃冰柜，不超过12个月。
- 检测：干扰素含量、菌体蛋白含量、菌体干燥失重、质粒结构一致性、质粒稳定性。

思考题 (1)

- 1、干扰素生产工艺路线有哪几条，有何特点？
- 2、干扰素发酵工段的关键控制点是什么，如何实现最优化过程控制？
- 3、根据现有工艺路线，提出研发仿制重组干扰素生产新工艺。

3.4.4 干扰素的分离纯化工艺过程

- 1、干扰素分离工艺过程
- 2、干扰素的纯化工艺过程

1、干扰素分离工艺过程

- 菌体裂解
- 预处理
- 初级分离

(1) 菌体裂解

- 裂解缓冲液：纯化水， $2^{\circ}\text{C} \sim 10^{\circ}\text{C}$ (pH7.5)
- 使用保护剂：EDTA, PMSF。
- 破碎— 20°C 菌体：2厘米
- 搅拌：加裂解缓冲液， $2^{\circ}\text{C} \sim 10^{\circ}\text{C}$ ，2hr
- 冻融：细胞完全破裂，释放干扰素。

(2) 预处理

- 加絮凝剂聚乙烯亚胺：
2°C~10°C，搅拌，对菌体碎片进行絮凝。
- 加凝聚剂醋酸钙溶液：
2°C~10°C，搅拌，对菌体碎片、DNA等进行沉淀。

沉淀作用

离心

- 连续流离心机：2°C~10°C，16000 r/min
- 收集上清液：含有重组干扰素蛋白质
- 杂质沉淀：121°C、30min 蒸汽灭菌，焚烧处理。

(3) 初级分离

- 盐析：4M硫酸铵， $2^{\circ}\text{C} \sim 10^{\circ}\text{C}$ ，搅匀静置过夜。
- 离心：连续流离心机，16000 r/min
- 保存：收集沉淀，粗干扰素， 4°C 。

2、干扰素纯化工艺过程

- 溶解粗干扰素
- 沉淀与疏水层析
- 阴离子交换层析与浓缩
- 阳离子交换层析与浓缩
- 凝胶过滤层析
- 无菌过滤分装

(1) 溶解粗干扰素

- 配制纯化缓冲液:

超纯水, pH7.5磷酸缓冲液, 0.45 μm 过滤器和10 ku超滤系统, 百级层流下收集。冷却至 $2^{\circ}\text{C}\sim 10^{\circ}\text{C}$ 。

- 检查: 缓冲液的pH值和电导值。

- 溶解:

$2^{\circ}\text{C}\sim 10^{\circ}\text{C}$, 匀浆, 完全溶解。

(2) 沉淀与疏水层析

- 等电点沉淀（1）：磷酸调节至pH5.0，沉淀杂蛋白，离心收集上清液。
- 疏水层析：干扰素吸附在疏水层析柱中
- 除非疏水性蛋白：
- 洗脱与收集：0.01M磷酸缓冲液（pH8.0）。

(2) 沉淀与疏水层析

- 等电点沉淀（2）：磷酸调节pH4.5，调节电导值40 ms/cm，2°C~10°C，静置过夜
- 超滤：1000 ku超滤膜过滤，除去大蛋白。
- 透析除盐：调整溶液pH 8.0，电导值，10 ku超滤膜，0.005 M缓冲液。

(3) 阴离子交换层析与浓缩

- 0.01M磷酸缓冲液（pH8.0）平衡树脂。
- 盐浓度线性梯度5~50 ms/cm进行洗脱，
- 配合SDS-PAGE收集干扰素峰。
- 浓缩：调整溶液和电导，10 ku超滤膜，0.05M醋酸缓冲液（pH5.0）中透析。

(4) 阳离子交换层析与浓缩

- 用0.1M醋酸缓冲液（pH 5.0）平衡树脂。
- 上样，相同缓冲液冲洗。
- 盐浓度线性梯度5~50 ms/cm进行洗脱
- 配合SDS-PAGE收集干扰素峰。
- 浓缩：10 ku超滤膜进行。

(5) 凝胶过滤层析

- 洗涤液：0.15 M NaCl的0.01M磷酸缓冲液（pH7.0）清洗系统和树脂
- 上样，相同缓冲液进行洗脱。
- 合并干扰素部分

(6) 无菌过滤分装

- 0.22 μm 滤膜过滤干扰素溶液
- 分装
- -20°C 以下的冰箱中保存。

(7) 检测项目

- 干扰素鉴别试验
- 干扰素效价测定
- 蛋白质含量，纯度测定，分子量
- 宿主残余蛋白、残余DNA
- 干扰素结构鉴定：紫外光谱，肽谱，N端序列
- 其他：热原，内毒素，残留抗生素

思考题（2）

- 1、干扰素纯化工艺的原理是什么？
- 2、干扰素纯化工艺过程中各工段的目的是什么？
- 3、根据干扰素的理化和生物学特性，设计纯化工艺路线？