



中国科学院过程工程研究所
国家生化工程技术研究中心（北京）

National Engineering Research Center
for Biotechnology (Beijing)

二〇〇九年

目 录

| | |
|---------------------------------------|----|
| 1 国家生化工程技术研究中心简介 | 2 |
| 2 学术带头人介绍 | 3 |
| 3 分离纯化介质产品 | 5 |
| 3.1 琼脂糖介质 | 5 |
| 3.1.1 亲和层析介质 | 5 |
| 3.1.1.1 金属螯和层析介质 | 7 |
| 3.1.1.2 谷胱甘肽（Glutathione）亲和层析介质 | 8 |
| 3.1.1.3 肝素（Heparin）亲和层析介质 | 9 |
| 3.1.1.4 蓝色琼脂糖凝胶介质 | 10 |
| 3.1.1.5 活化偶联介质 | 12 |
| 3.1.2 凝胶过滤介质 | 13 |
| 3.1.3 离子交换介质 | 14 |
| 3.1.3 疏水作用层析介质 | 15 |
| 3.2 聚苯乙烯微球介质 | 18 |
| 4 联系方式 | 21 |

1 国家生化工程技术研究中心简介

国家生化工程技术研究中心是根据国家生物技术产业化研究的需要，于 1996 年由中国科学院过程工程研究所（原化工冶金研究所）与华东理工大学、南京工业大学联合申请成立的国家级生化工程技术研究中心。中国科学院过程工程研究所负责国家生化工程技术研究中心（北京）的建设，于 2000 年通过国家科技部的验收。

国家生化工程技术研究中心（北京）的研究队伍由一支年轻、高水平的人员组成，包括国家杰出青年科学基金获得者 3 人，中国科学院“百人计划”入选者 5 人以及多名研究员（博导）、高级工程师等高级研究人员。在中国科学院过程工程研究所副所长马光辉研究员（主任）的带领下，中心各团队成员分工协作，组成了一支充满活力、开拓进取的研究团队，为中心的发展和我国生物技术工程化起到了积极作用。

国家生化工程技术研究中心（北京）与生化工程国家重点实验室相互协作，以分离纯化介质和分离纯化技术为主要核心技术，在中药有效成分、多肽、蛋白质（包括基因工程疫苗）等生物活性分子的分离纯化以及药物缓控释等领域取得了突破性进展，并与生物技术上游单位和部分制药企业合作，进行了技术的放大和产品的规模化生产，形成了对生物产品制备过程进行理论研究及应用开发的科研基地。

2 学术带头人介绍

马光辉研究员，现任中国科学院过程工程副所长，生化工程国家重点实验室副主任，国家生化工程技术研究中心主任。1984 年公派去日本读大学本科，1988 年获得日本群馬大学纤维高分子工学科学士学位，1990 年和 1993 年分别获东京工业大学高分子工学科硕士和博士学位。1994-2001 年任东京农工大学生物系统应用科学研究科助理教授，2001 年回国后入选中国科学院“百人计划”，任中国科学院过程工程研究所研究员，博士生导师。

马光辉研究员主要研究生化分离用微球介质的制备和应用、生物活性药物的包埋和应用、生物活性药物的修饰及其修饰剂的开发。建立了尺寸均一的微球介质的制备技术平台，并应用与各种生物活性物质的分离。主要包括尺寸均一的天然高分子凝胶微球介质（琼脂糖、葡聚糖）及合成高分子（聚合物）微球介质（聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸酯）。实现了纳米级到微米级的药物包埋微囊的粒径控制技术，有效保证了药物活性、精确控制药物释放和靶向性的目的。包括尺寸均一的乳液载体、生物降解性药物载体及智能型药物载体。开发了 PEG 系列药物修饰剂，对蛋白质（如干扰素、粒细胞集落刺激因子）等生物活性药物进行化学修饰，以提高生物药物的疗效。

马光辉研究员目前已在相关国际刊物上发表了 100 多篇学术论文，其中 80 多篇被 SCI 收录；编著有《Rate Equations of Polymerization Reactions》、《新型高分子材料》、《高分子微球材料》等 8 部学术书籍，并在其他学者编辑的 6 本英文学术书中任作者，申请了 20 多项国家专利，其中，有近 10 项获得授权。2002 年获国家杰出青年科学基金，2005 中央国家机关“巾帼建功”先进个人称号和中国科学院第二届“十大女杰”称号，2005 年获北京市科学技术一等奖。

苏志国研究员，现任生化工程国家重点实验室主任，国家生化工程技术研究中心（北京）首席科学家。1982 年毕业于大连工学院并赴英国留学，1985 年获英国曼彻斯特大学博士学位，1986-87 年在荷兰 Delft 大学从事博士后研究，1987 年到大连理工大学工作，1991 年被聘为教授，1990 年和 1992 年前往美国麻省理

工学院做高级访问学者。1997 年被聘为中国科学院过程工程研究所研究员。

苏志国研究员自 1982 年以来一直从事生物产品大规模制备理论和工程技术的研究，承担并完成国家自然科学基金重点基金、863 高技术项目、国家科技攻关项目等多项研究课题，专长于蛋白质、中草药有效成分的分离纯化和修饰的理论及应用技术，在纯化和修饰基因工程蛋白质药物、纯化和修饰血红蛋白制备血液代用品等研究上取得了创新性的成果。

苏志国研究员在国内外学术刊物上发表论文 200 多篇，其中有 120 多篇被 SCI 收录。参与撰写中英文学术专著 8 部。国家发明专利 26 项已授权，其中 5 项涉及血液代用品的专利为国家保密专利。领导的研究队伍在 2000 年被国家科技部评为在国家高技术研究发展中做出突出贡献的先进集体，2001 年被中国科学院评为“百人计划优秀团队”。2005 年获北京市科学技术一等奖。任《生物工程学报》副主编、《生物加工工艺》副主编，*Artificial Cells ,Blood Substitutes and Biotechnology* , *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 等国际期刊编委。国家有突出贡献的留学回国人员，国家教委《跨世纪优秀人才计划》入选者，国家杰出青年科学基金获得者，中国科学院“百人计划”入选者。

3 分离纯化介质产品

3.1 琼脂糖介质

琼脂糖层析介质是目前应用最为广泛的生化分离介质,主要用于疫苗、抗体、酶制剂等蛋白质分子的分离纯化。目前,国家生化工程技术研究中心(以下简称中心)已成功开发了亲和层析(包括金属螯和)、凝胶过滤、离子交换、疏水作用等多系列、多品种的琼脂糖层析介质,其中,还包括针对不同产品的专用介质,如用于分离纯化乙肝疫苗(CHO 或酵母表达的 HBsAg)的特种丁基疏水层析介质和离子交换介质,以及用于分离纯化抗凝血酶的亲和层析介质。中心可依据用户需要提供不同包装、不同品种及不同配基密度的各种琼脂糖层析介质(如图 1 所示),并接受用户委托开发新的分离介质及分离纯化工艺。

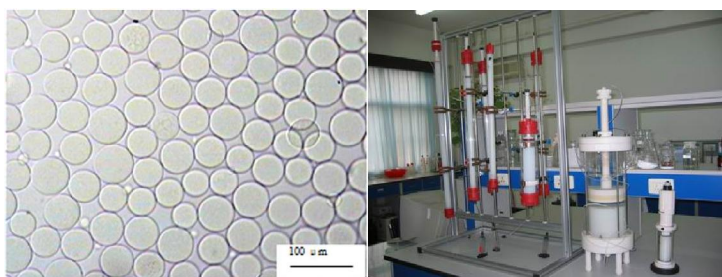


图 1 琼脂糖层析介质及预装的层析柱

3.1.1 亲和层析介质

生物分子之间存在很多特异性的相互作用,如抗原与抗体、酶与底物(包括酶的竞争性抑制剂和辅助因子)、激素与受体、核酸中的互补链、多糖与蛋白复合体等,他们之间能够形成一种特异性的可逆结合,这种结合被称为亲和吸附。亲和层析(affinity chromatography)就是基于生物分子与其他分子(称为配基)之间的亲和吸附的原理建立和发展起来的,亲和层析具有高度选择性、高活性回收率等特点,对分离含量极少又不稳定的生物活性物质极为有效,成为生物制药领域中分离纯化生物活性物质的一种重要方法。



图 2. 亲和层析原理图（左图样品通过亲和介质时，目标分子被吸附在介质表面的亲和配基上；右图为洗脱时，目标分子从亲和配基上解离）

亲和层析是通过层析介质上的配基与目标分子之间的特异性吸附和解离来实现分离纯化的（如图 2 所示）。琼脂糖亲和层析介质是以琼脂糖微球作为基质，以偶联上各种特异性的功能基团作为配基。本中心提供的亲和层析介质产品有 Ni 离子亲和层析介质（又称金属螯和层析介质）、谷胱甘肽（Glutathione）亲和层析介质、肝素（Heparin）亲和层析介质、蛋白 A 亲和层析介质以及蓝色琼脂糖凝胶介质，另外还可提供亲和介质前体（即活化的琼脂糖介质，用于偶联不同的亲和配基），并能依据用户的实际需求生产具有不同亲和配基的琼脂糖介质。

表 1 本中心生产的亲和层析介质的品种及其理化性质

| 产品货号 | IPE-NI | IPE-GST | IPE-Heparin | IPE-Blue | IPE-Protein A |
|-----------------------|----------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------|
| 产品名称 | 镍琼脂糖凝胶 | 谷胱甘肽琼脂糖凝胶 | 肝素琼脂糖凝胶 | 蓝色琼脂糖凝胶 | Protein A 琼脂糖凝胶 |
| 配基密度 | 15~120 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ | 20~30 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ | | | 6mg/ml |
| pH 稳定性 | 3-13 | 3-12 | 4-12 | 4-12 | 2-11 |
| 粒径范围(μm) | 45-165 | 45-165 | 45-165 | 45-165 | 45-165 |
| 最大流速(cm/h) | 400 | 450 | 400 | 400 | 400 |
| 应用 | 用于含组氨酸标签蛋白的纯化 | 用于含 GST 标签蛋白的纯化 | 用于抗凝血酶 III 和其他含有类似氨基酸序列的蛋白的纯化 | 用于白蛋白、需要核苷酸的酶、凝集因子等生物大分子的纯化 | 用于多种抗体的纯化 |

3.1.1.1 金属螯和层析介质

1. 概述

金属螯和层析, 又称固定化金属离子亲和层析(Immobilized metal ion affinity chromatography, IMAC)。该法利用蛋白质表面的某些氨基酸(如组氨酸、色氨酸、半胱氨酸等)能和金属离子 (Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 等过渡金属离子) 发生特殊的相互作用的原理来实现蛋白质的分离。Ni 离子亲和层析介质是将金属离子 Ni^{2+} 螯和在琼脂糖凝胶上形成的一种亲和层析介质, 具有吸附容量大、选择性好、通过性强、易于再生、成本低等优点, 广泛用于生物制药和生物工程下游蛋白质及多肽的分离纯化, 尤其是组氨酸标记蛋白质的高效制备。本中心目前可以提供 IDA 亚氨基二乙酸 (IDA) 及 N- (5-氨基-1-羧戊基) 亚氨基二乙酸 (NTA) 两种间臂的金属螯合介质。

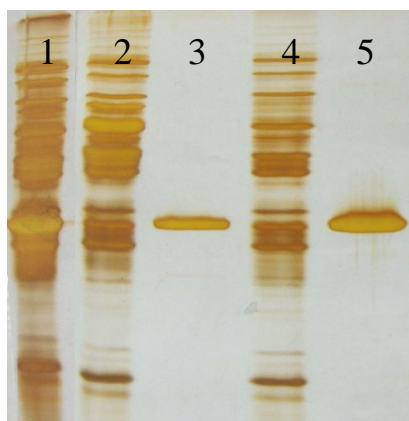
2. Ni 离子亲和层析介质的应用

采用本中心生产的 Ni 离子亲和层析介质从发酵液中纯化 His-tag LDH(组氨酸标记的乳酸脱氢酶), 并与进口介质相比较 ($6.4 \text{ cm} \times 1.0 \text{ cm I.D.}$, $\text{CV}=5\text{ml}$)。

平衡缓冲液: $20\text{mM PB} + 0.1\text{M NaCl} + 50\text{mM}$ 咪唑, $\text{pH } 7.4$

洗脱缓冲液: $20\text{mM PB} + 0.1\text{M NaCl} + 0.5\text{M}$ 咪唑, $\text{pH } 7.4$

流速: 1ml/min



- 1: 发酵液
- 2: 中心生产的 Ni 离子亲和层析介质流穿液
- 3: 中心生产的 Ni 离子亲和层析介质洗脱液
- 4: 进口介质的流穿液
- 5: 进口介质的洗脱液

图 3 本中心生产的 Ni 离子亲和层析介质与进口介质的分离效果比较

图 3 为采用 Ni 离子亲和层析介质纯化前后的 LDH 的电泳图,结果显示两种介质均能实现电泳纯 LDH 的制备。活性分析结果表明,采用本中心生产的金属螯和介质进行分离纯化,LDH 的活性回收率达到 80% 以上,可以实现对进口介质的替代。

3.1.1.2 谷胱甘肽 (Glutathione) 亲和层析介质

1. 概述

谷胱甘肽-琼脂糖凝胶亲和层析介质是以自制的琼脂糖凝胶为基质,以谷胱甘肽为配基,将谷胱甘肽偶联到活化的琼脂糖凝胶上。可用于分离纯化不同来源(如胎盘、肝脏、胞液、大片吸虫、昆虫、血吸虫、玉米螟等)的谷胱甘肽 S-转移酶(GST)以及谷胱甘肽 S-转移酶的重组融合蛋白或依赖 S-转移酶或谷胱甘肽的蛋白。

2. 谷胱甘肽亲和层析介质的应用

GST是由三个亚基组成的三聚体,主要亚基1、2、3的分子量分别为25,000、26,500和28,000道尔顿。图4是本中心生产的谷胱甘肽亲和介质与进口介质洗脱峰的 SDS - PAGE电泳图谱。从图中可以看出,第4、5条谱带均只有GST对应的3条特征条带,纯度达到电泳纯,证明本中心生产的介质和进口介质一样具有良好的 GST分离的专一性,可以实现对进口介质的替代。

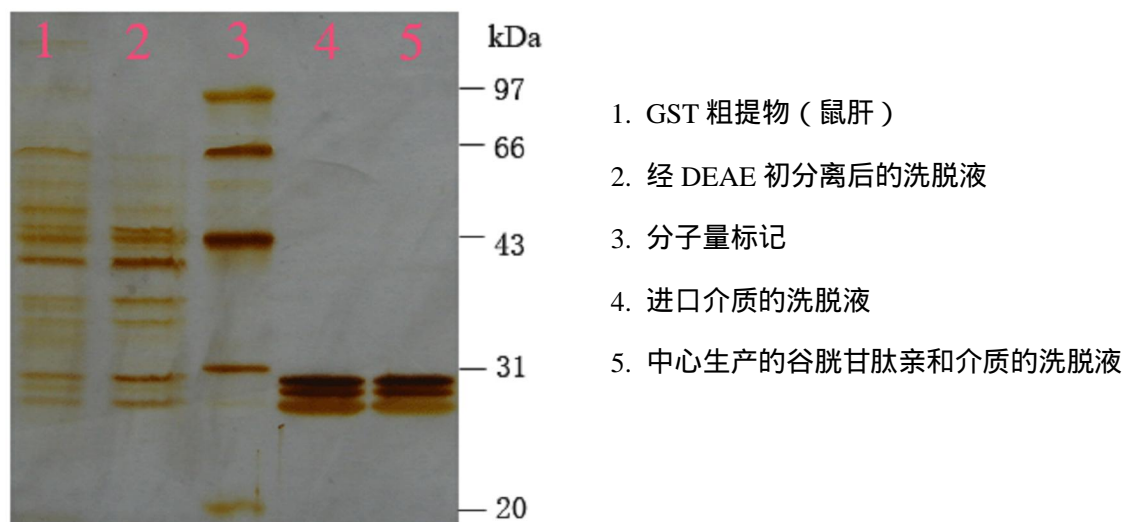


图 4 本中心生产的谷胱甘肽亲和层析介质与进口介质的分离效果比较

3.1.1.3 肝素（Heparin）亲和层析介质

1. 概述

肝素亲和层析介质的制备是以琼脂糖凝胶为基质，将肝素偶联到琼脂糖凝胶上。肝素亲和层析介质主要用来分离纯化抗凝血酶 III，也可用于分离纯化凝血酶、人凝血因子 IX、XI、VIII，脂蛋白、脂酶、蛋白合成因子、激素、类固醇受体、核酸结合酶、限制性内切酶、蛙蛙蛭抗凝血蛋白、盐源山蛭抗凝血蛋白、眼镜蛇毒蛋白酶、岩栖蝮蛇类凝血酶乳铁蛋白、眼镜蛇毒纤维蛋白原溶解因子、蝮蛇毒纤溶酶、大肠杆菌表达的人白介素 8、人前列腺生长因子、重组人血管内皮生长因子、软骨生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、重组人酸性成纤维细胞生长因子、重组人中期因子、重组肝细胞生长因子、重组鼠肝素辅因子 II、重组人血小板第四因子、重组人内皮抑素、重组人角质细胞生长因子、干扰素等。

2. 肝素亲和层析介质的应用

图 5 为采用本中心生产的肝素亲和介质和对应的进口介质纯化 AT-（抗凝血酶）的结果。如图所示，P₁、P₂和 P₃ 分别为穿透峰、淋洗峰和洗脱峰。从图中可以看出，中心生产的介质与进口介质的层析行为相似，淋洗峰和洗脱峰具有对称性好、峰窄的特点，可以实现对进口介质的替代。

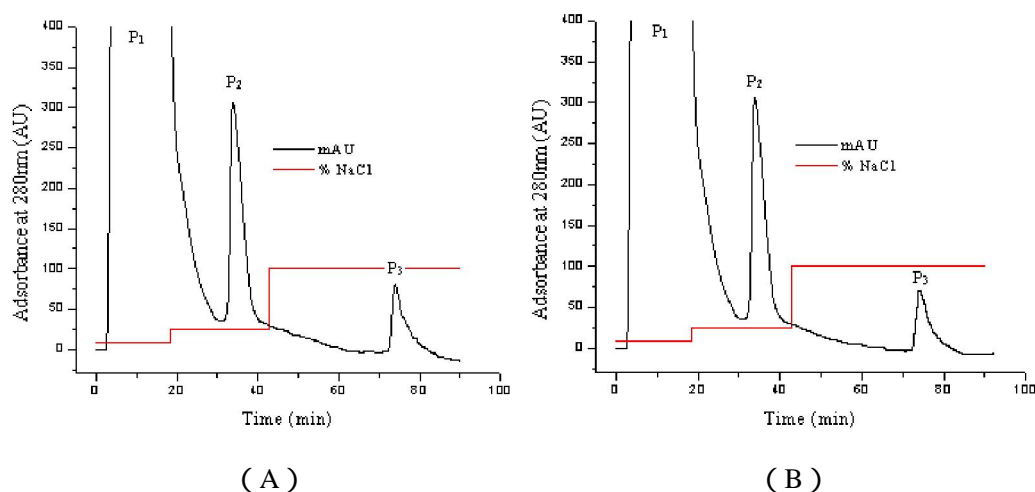


图 5 本中心生产的肝素亲和层析介质与进口介质对 AT- 的纯化效果比较：(A) 中心生产的介质；(B) 进口介质

3.1.1.4 蓝色琼脂糖凝胶介质

1. 概述

蓝色琼脂糖凝胶介质（简称蓝胶）是一种染料类亲和介质，其配基即蓝色染料 Cibacron Blue F3GA 是一种多芳香环的磺化物，具有与 NAD^+ 相似的空间结构，能与各种激酶、脱氢酶、血清清蛋白、DNA 聚合酶等产生亲和力，从而可以纯化这些物质，用途广泛。蓝色琼脂糖凝胶介质以高度交联琼脂糖为基质，具有高机械强度、高流速的特点，非特异性吸附少，配基泄漏低，已被广泛用于蛋白纯化生产领域。本中心生产的蓝色琼脂糖凝胶介质光学显微镜照片如图 6 所示。

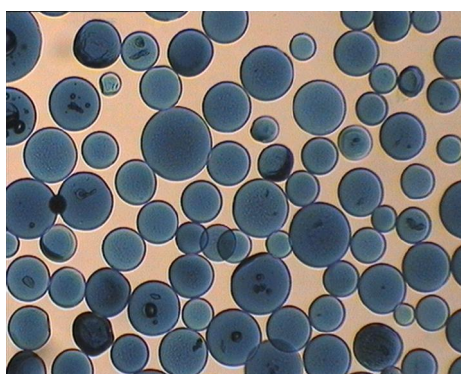


图 6 本中心生产的蓝胶的光学显微镜照片

2. 蓝胶介质的应用

蓝胶在酶纯化领域具有广泛的应用，可以用于纯化磷酸激酶、水解酶、DNA 和 RNA 核酸酶和聚合酶、合成酶、羟化酶、糖分解酶、磷酸二酯酶、脱羧酶以及血清白蛋白、凝固因子、血清脂蛋白、铁传递蛋白、干扰素、光敏色素等。本中心研发生产的蓝胶已被生物工程国家重点实验室、中科院生物物理所等单位广泛使用，应用效果良好。

使用蓝胶从百日咳硫酸铵沉淀透析液中提纯百日咳毒素（PT）和丝状血凝素（FHA），制备两者纯度均大于 85% 的混合组分疫苗。图 7 是纯化百日咳混合组分疫苗的层析图谱（ P_2 峰为目标组分）。图 8 是不同 pH 洗脱实验的三个 P_2 峰的 SDS-PAGE。经本中心生产的蓝胶纯化后，活性峰 P_2 中 PT 和 FHA 纯化倍数分别达到了 9.2 和 13.6。

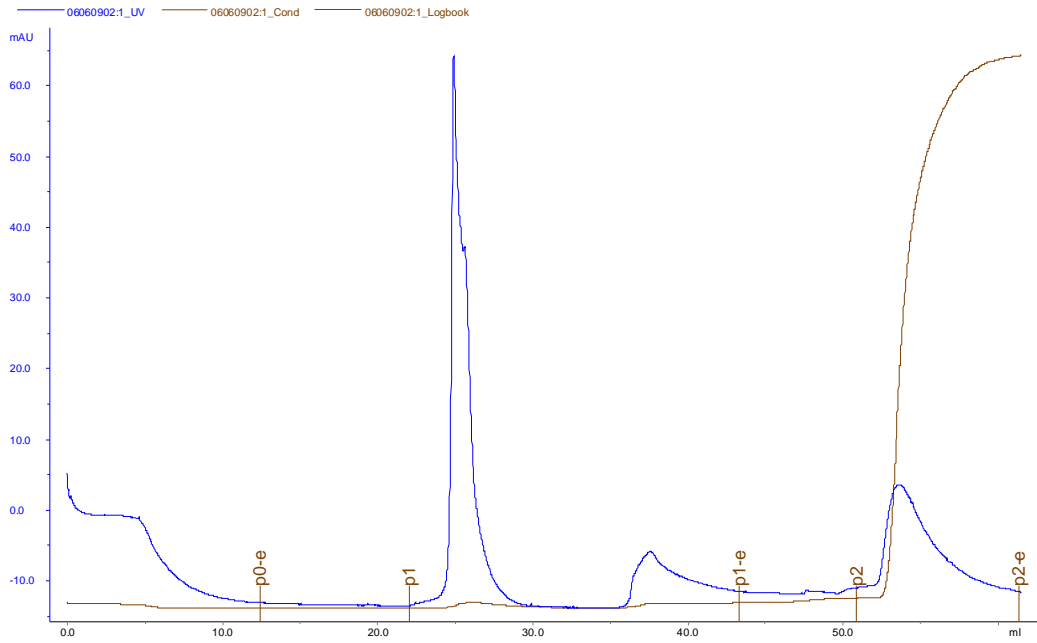
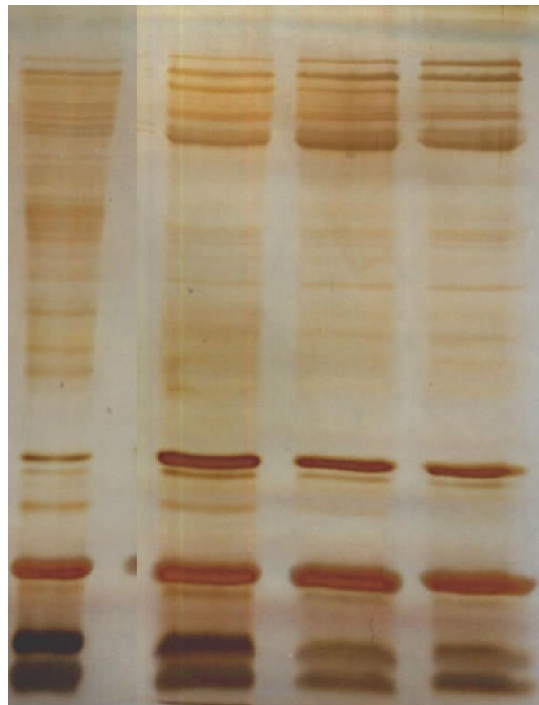


图 7 本中心生产的蓝胶纯化百日咳混合组分疫苗的层析图谱



透析液 pH6.0-P₂ pH7.4-P₂ pH8.5-P₂

图 8 不同 pH 洗脱活性峰的 SDS-PAGE 分析

3.1.1.5 活化偶联介质

为了适应不同的亲和层析要求,本中心还开发了多种活化偶联介质(中间体),再依据客户的特殊需求,通过简单的化学反应即可在此中间体上偶联特异性配基(如 Protein A),来制备各种亲和层析介质。

中心目前可提供的活化偶联介质有**溴化氰 (CNBr) 活化琼脂糖凝胶**、**环氧基活化琼脂糖凝胶**及 **N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)** 三种系列,详细技术参数如表 2 所示。

表 2 本中心生产的活化偶联介质理化性质

| 产品货号 | IPE-CN | IPE-EPO | IPE-NHS |
|------------|--------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| 产品名称 | CNBr 活化琼脂糖凝胶 | Epoxy 活化琼脂糖凝胶 | NHS 活化琼脂糖凝胶 |
| pH 稳定性 | 2-11 | 2-14 | 3-13 |
| 粒径范围(μm) | 45-165 | 45-165 | 45-165 |
| 最大流速(cm/h) | 700 | 450 | 450 |
| 偶联条件 | 室温 pH 8-10 ,1-16 小时 | 室温 pH 9-13 , 15 小时 | 室温 pH 6-8 ,2-16 小时 |
| 应用 | 含 NH ₂ 的配基的偶联 | 含 NH ₂ ,OH 或 SH 的配基的偶联 | 含 NH ₂ 的配基的偶联 |

3.1.2 凝胶过滤介质

凝胶过滤（Gel Filtration）是一种典型的液相层析技术。这种方法是根据料液中溶质分子的大小和形状进行分离，与其他分离技术相比，凝胶过滤层析具有如下优点：（1）操作条件温和，介质对溶质无不良反应，产品回收率高；（2）循环操作容易，重复性好；（3）分离机制简单，操作易放大，参数易于控制。

凝胶过滤介质作为凝胶过滤层析柱的固定相来实现目标组分的分离，琼脂糖介质由于具有良好的亲水性、非特异性吸附弱等优点，而成为目前最常用的分离生物活性物质的凝胶过滤介质。本中心目前已开发出两种高流速琼脂糖凝胶介质，其技术参数见表 3。

表 3 本中心生产的凝胶过滤介质的理化性质

| 产品货号 | IPE-SEC1 | IPE-SEC2 |
|-----------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| 产品名称 | 高流速琼脂糖凝胶 1 | 高流速琼脂糖凝胶 2 |
| 分离范围 | $7 \times 10^4 \sim 2 \times 10^7$ | $1 \times 10^4 \sim 4 \times 10^6$ |
| pH 稳定性 | 2-12 | 2-12 |
| 粒径范围(μm) | 45-165 | 45-165 |
| 耐压(MPa) | 0.1 | 0.1 |
| 最大流速(cm/h) | 450 | 500 |
| 应用 | 用于生物制药过程中大分子蛋白质、DNA、病毒的分离纯化 | 用于生物制药过程中大分子蛋白质、DNA、病毒的分离纯化 |



图 9 用于规模化制备的琼脂糖凝胶柱

琼脂糖凝胶过滤介质广泛用于疫苗等蛋白质药物的分离纯化工艺中，图 9 为本中心开发的用于规模化生产的琼脂糖凝胶柱，经过对乙肝疫苗（Hans-HBsAg）进行凝胶过滤层析，目标产品的活性回收率和纯化倍数分别达到 75.1% 和 1.8，产品纯度达到电泳纯和色谱纯。

3.1.3 离子交换介质

离子交换层析是各种分离层析工艺中应用较广的一种，它是通过带电的溶质分子与离子交换层析介质上可交换的离子基团通过交换而达到分离纯化的方法，也可认为是蛋白质分子中带电的氨基酸残基与带相反电荷的层析介质的骨架相互作用达到分离纯化的方法。该方法主要依赖电荷间的相互作用，利用带电分子中电荷的微小差异来进行分离。

离子交换层析介质是一类能呈现离子交换功能的材料，它由三部分组成：第一部分是交联的三维网状骨架，即母体结构；第二部分是固定在骨架上的功能基团，它是带电基团，标志离子交换层析介质的基本性能；第三部分是与功能基团带相反电荷、可移动、能进行交换的自由离子。这种可以移动进行交换的离子称为反离子或平衡离子，它与骨架上固定基团的电荷极性相反，二者之间以静电力相结合。

表 4 本中心生产的离子交换介质的理化性质

| 货号 | IPE-DEAE | IPE-CM | IPE-Q | IPE-SP |
|------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| 产品名称 | DEAE 琼脂糖凝胶 | CM 琼脂糖凝胶 | Q 琼脂糖凝胶 | SP 琼脂糖凝胶 |
| 离子交换类型 | 弱阴离子 | 弱阳离子 | 强阴离子 | 强阳离子 |
| 离子交换容量 | 110mg/mL (HSA) | 50mg/mL (核糖核酸酶) | 120mg/mL (HSA) | 70mg/mL (核糖核酸酶) |
| pH 稳定性 | 2-13 | 4-13 | 2-13 | 4-13 |
| 粒径范围(μm) | 45-165 | 45-165 | 45-165 | 45-165 |
| 耐压(MPa) | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 |
| 最大流速(cm/h) | 750 | 750 | 750 | 750 |
| 应用 | 用于带负电荷的生物大分子的分离纯化 | 用于带正电荷的生物大分子的分离纯化 | 用于带负电荷的生物大分子的分离纯化 | 用于带正电荷的生物大分子的分离纯化 |

本中心目前开发的离子交换层析介质有 DEAE(N,N-二乙基氨基乙基)离子交换介质、CM(羧甲基)离子交换介质、Q(N,N-二乙基氨基-2-羟丙基)离子交换介质、SP(磺丙基)离子交换介质，详细资料请见表 4。

3.1.3 疏水作用层析介质

1. 概述

疏水作用层析也是蛋白质分离纯化工艺中常用的一种方法。由于蛋白质分子中的氨基酸残基具有大量的疏水性基团，这些基团与层析介质表面的疏水性配基会产生疏水作用而结合在一起，由于蛋白质分子疏水性存在区别，与分离介质相互作用时相互结合的强度不同，从而可以达到多种蛋白质的分离效果。

由于蛋白质是一类三维有序结构的生物活性大分子，其空间排列很容易受到外界环境的影响，极易从有序结构变成无序，当立体结构发生变化时，常常失去原有的活性，即蛋白质的失活。因此，层析介质的疏水性就显得尤为关键，疏水性过强的层析介质会导致蛋白质分子的强吸附而难以洗脱，即使洗脱下来也是失活的蛋白质分子，疏水性过弱，蛋白质分子的吸附力不足以使得不同蛋白质之间实现有效分离。

表 5 本中心生产的疏水作用介质的理化性质

| 货号 | IPE-P | IPE-B | IPE-BS | IPE-BN |
|----------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|
| 产品名称 | 苯基琼脂糖凝胶 | 丁基琼脂糖凝胶 | 丁基硫琼脂糖凝胶 | 丁基氮琼脂糖凝胶 |
| 配基密度 | 20-40 μ mol/mL (苯基) | 50 μ mol/mL (正丁基) | 4-10 μ mol/mL (正丁基) | 40 μ mol/mL (正丁基) |
| pH 稳定性 | 3-13 | 3-13 | 3-13 | 3-13 |
| 粒径范围(μ m) | 45-165 | 45-165 | 45-165 | 45-165 |
| 最大流速(cm/h) | 600 | 600 | 600 | 600 |
| 应用 | 用于含芳香配体的蛋白的纯化 | 用于含脂配体的蛋白的纯化 | 用于 CHO 细胞表达的乙肝疫苗的纯化 | 用于酵母细胞表达的乙肝疫苗的纯化 |

国家生化工程技术研究中心（北京）总结多年的蛋白质分离纯化经验，用以指导层析介质的生产，目前已开发出了丁基(含丁基硫)琼脂糖及苯基琼脂糖两

种系列的疏水层析介质，详细资料见表 5。

2. 丁基硫琼脂糖疏水介质的应用

作为纯化重组乙肝病毒表面抗原（r-HBsAg）的专用疏水层析介质，丁基硫琼脂糖介质具有粒径均一、机械强度高、配基密度可控等优点，用于纯化分别由 CHO 细胞表达和酵母细胞表达的 r-HBsAg，纯化效果良好。由于具有上述优点，本中心研发生产的丁基硫琼脂糖介质已被生物工程国家重点实验室、珠海健康元生物医药公司等单位广泛使用，获得了较高的评价。

1) 用于 CHO 细胞表达 r-HBsAg 分离纯化

将丁基硫琼脂糖介质用于纯化 CHO 细胞体系表达 r-HBsAg。柱子规格：(I.D.1.6cm × 5cm)，流速 2mL/min。图 10 是丁基硫琼脂糖介质纯化 r-HBsAg 层析图。图 11 是层析各步活性峰电泳图。图 12 是 r-HBsAg 经疏水层析前后的高效凝胶过滤色谱分析图谱。疏水层析过程的疫苗活性回收率为 86%左右，单步纯化倍数 22。

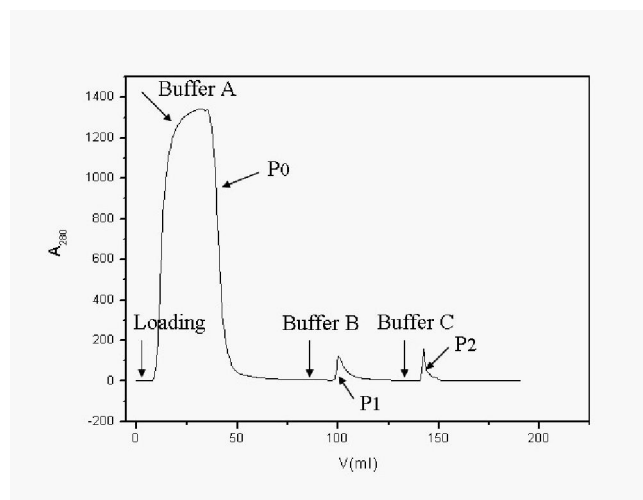


图 10 丁基硫琼脂糖介质纯化 r-HBsAg 的谱图

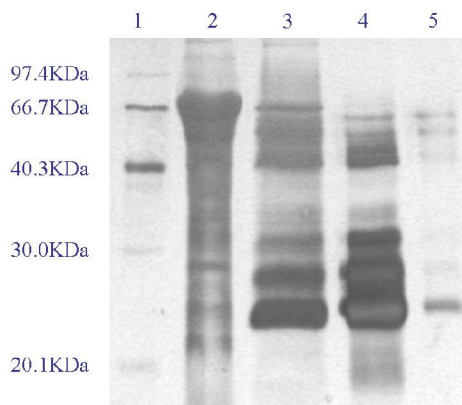


图 11 CCS 表达的 r-HBsAg 层析各步电泳图

(1 : Marker ; 2 : CCS ; 3 : HIC 活性峰 ; 4 : IEC 活性峰 ; 5 : GFC 活性峰)

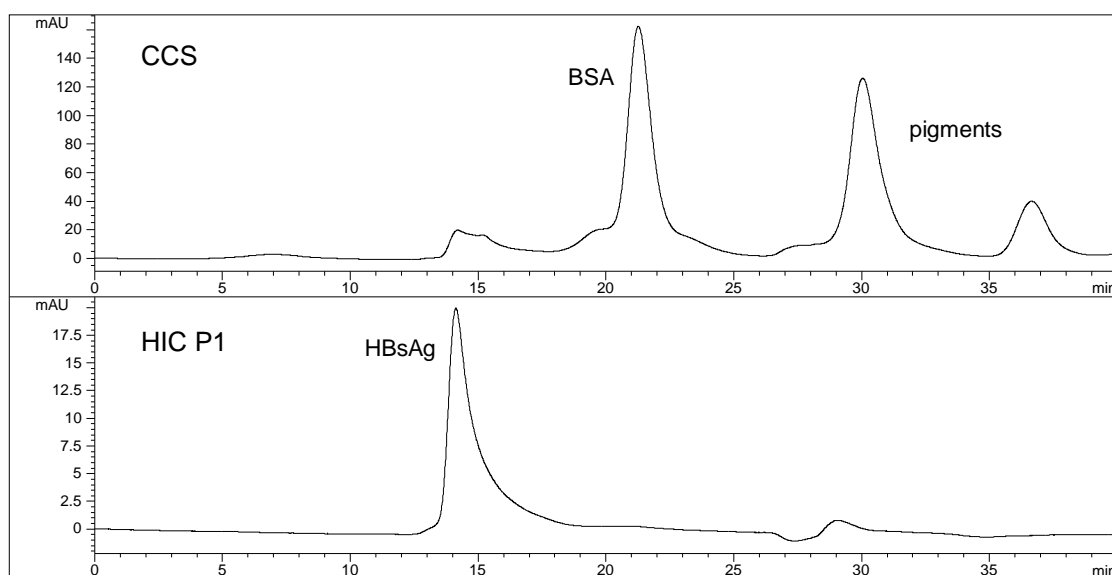


图 12 CCS 表达的 r-HBsAg 经疏水层析前后的 SEC-HPLC 谱图

2) 用于酵母细胞表达 HBsAg 分离纯化

将丁基硫琼脂糖介质用于分离酵母细胞体系表达乙肝疫苗表面抗原，系酵母 CD 液直接疏水层析。柱子规格：(I.D.1.6cm × 5cm)，流速 2mL/min。疫苗活性回收率为 90%左右，单步纯化倍数 3。将酵母提取液经离子交换层析后的活性组分进行疏水层析，疫苗活性回收率 90%以上，纯化倍数 11。

3.2 聚苯乙烯微球介质

1. 概述

聚合物微球作为层析介质的基质，品种繁多，可以选择多种单体和交联剂，并可采用不同的聚合方法得到多种类型的聚合物微球介质。同多糖型凝胶微球相比较，交联聚合物微球的骨架结构具有更高的机械强度和化学稳定性，所以更适合能经受高流速高压操作的液相色谱使用。聚苯乙烯微球是苯乙烯与二乙烯基苯的交联共聚物，它由于具有较高的机械强度、耐酸碱、易清洗等优点，而成为目前应用最为广泛的一类聚合物微球介质。

2. 聚苯乙烯微球介质的理化性质

国家生化工程技术研究中心（以下简称本中心）研发生产的聚苯乙烯微球介质粒径均一，粒径、孔径、比表面积可控，其理化性质如下：

表 6 聚苯乙烯微球介质的理化性质

| 产品货号 | 平均粒径 (μm) | 比表面积 (m ² /g) | 压力耐受性 (MPa) | pH 稳定性 |
|-----------|-----------|--------------------------|-------------|--------|
| IPE-PST5 | 5 | 500 | 40 | 2-12 |
| IPE-PST15 | 15 | 500 | 10 | 2-12 |
| IPE-PST30 | 30 | 500 | 5 | 2-12 |

注：如需其他粒径的聚苯乙烯微球介质，请来电咨询（010-62550875）

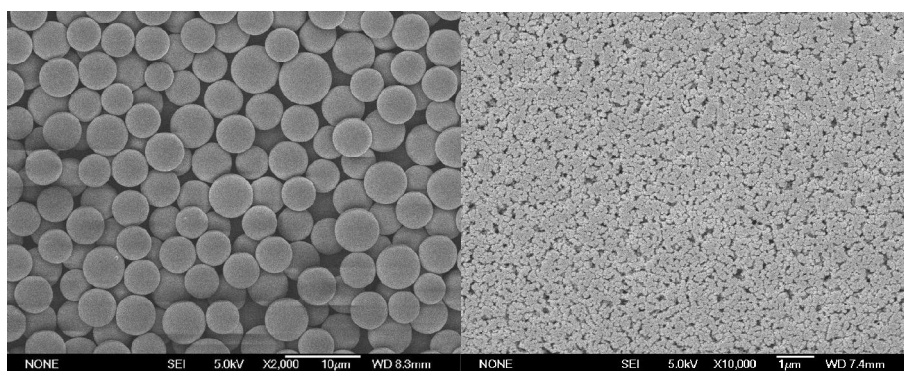


图 13 聚苯乙烯微球介质（左）及表面孔结构（右）的电镜照片

目前市场上也存在一些其他公司的类似产品，诸如美国 GE 公司的 Source

系列，美国 Rohm-Haas 公司的 Amberlite XAD 系列，日本 Hitachi 公司的 Hitachi gel 系列，英国 Polymer Labs 公司的 PLRP-S 系列等等。

3. 聚苯乙烯微球介质的应用

聚苯乙烯微球由于是强疏水性的苯乙烯和二乙烯基苯的共聚物，因此可以直接用作反相层析（色谱）介质。本中心研发生产的聚苯乙烯微球介质的突出优点是粒径分布均一、且粒径可控，因此在实际的层析（色谱）分离过程中可以有效避免沟流、压降不稳定等缺点。此外，该聚苯乙烯微球还具有较高的比表面积 $500 \text{ m}^2/\text{g}$ ，最高可达 $1000 \text{ m}^2/\text{g}$ ，因此在高流速下可以获得更高的分辨率、载量和更低的反压。由于具有上述优点，本中心研发生产的聚苯乙烯微球介质已获得生物工程国家重点实验室、山东省天然药物工程技术研究中心以及部分企业的应用，成功实现了紫杉醇、淫羊藿甙、石杉碱甲（乙）、白藜芦醇等天然产物以及多肽组分的分离纯化。

3.1 聚苯乙烯微球介质在苯同系物分离纯化中的应用

图 14 为 IPE-PST30 介质分离苯同系物（苯、甲苯、二甲苯）的色谱图，结果显示三种苯同系物在聚苯乙烯反相层析柱（ $300 \times 10 \text{ mm ID}$ ）上实现了有效分离，表明该介质装填的层析柱具有很高的分辨率，适用于精细分离。

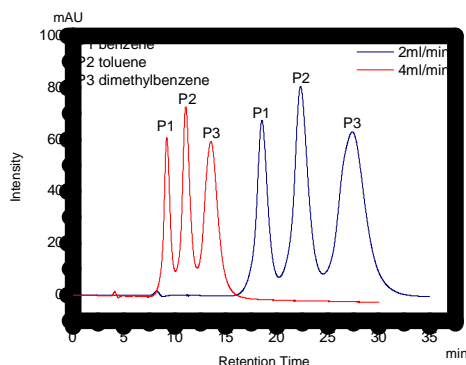


图 14 聚苯乙烯微球介质对苯同系物的分离效果

3.2 聚苯乙烯微球介质在天然产物分离纯化中的应用

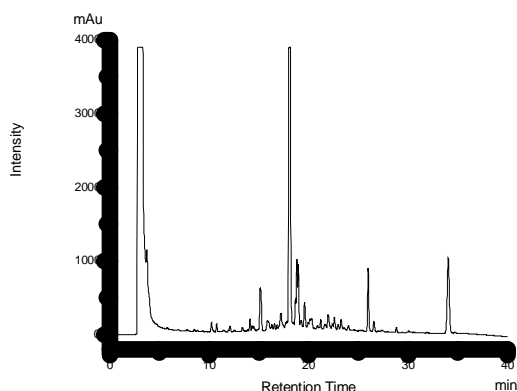
表 7 为聚苯乙烯微球介质对多醇类天然产物白藜芦醇苷、白藜芦醇及蒽苷 B 的分离效果。结果显示，本介质对于上述三种结构类似物具有分辨率、产品纯度及回收率各项技术指标均优良的分离效果，纯度及回收率均达到进口产品 Source30 的水平，而优于 C18 的水平。

表 7 三种反相介质的分离结果

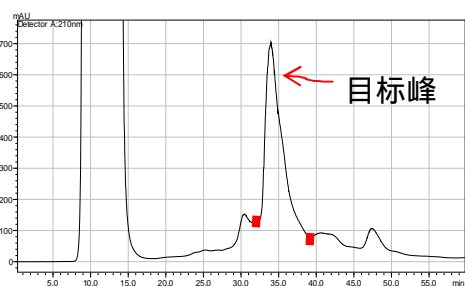
| 层析柱 | 白藜芦醇 | | 葱苷 B | | 白藜芦醇苷 | |
|-----------|------|------|------|------|-------|------|
| | 纯度 % | 回收率% | 纯度 % | 回收率% | 纯度 % | 回收率% |
| C18 | 87.6 | 75.2 | 83.6 | 82.1 | 86.2 | 75.4 |
| IPE-PST30 | 93.1 | 92.5 | 93.8 | 92.2 | 92.8 | 92.1 |
| Source 30 | 94.6 | 90.5 | 93.1 | 91.7 | 92.6 | 93.7 |

3.3 聚苯乙烯微球介质在多肽组分纯化中的应用

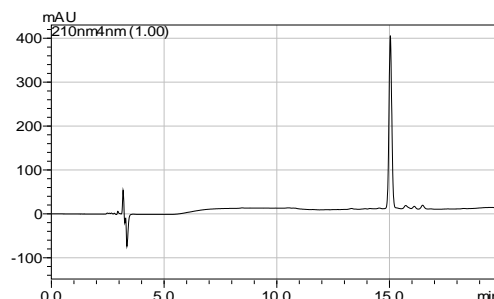
图 15 为对三种合成多肽进行分离的结果。实验表明，该产品（IPE-PST30）具有高分辨率和高回收率的优点。其中，对人工合成 15 肽一步纯化后可使纯度由 38.1% 提高到 78.6%；对人工合成 16 肽纯化后可使纯度由 35.7% 提高到 89.1%；对人工合成 18 肽纯化后可使纯度 35.7% 提高到 92.0%，回收率达到 22%。



(a) 粗品的 HPLC 分析谱图



(b) 半制备柱纯化谱图（300×10mm ID）



(c) 纯化后的多肽 HPLC 分析

图 15 人工合成 18 肽的分离纯化

本中心生产的聚苯乙烯微球介质经过客户的广泛使用，已经在天然产物、多肽的分离纯化中获得了良好的应用效果。如需更多的详细资料，欢迎各位新老客户来电详洽。

4 联系方式

联系人：宋老师（产业经营部）

电话：010-82544957 15101042483

传真：010-82544957

邮箱：cysong@home.ipe.ac.cn

网址：<http://113.142.1.134:8080/nercb/>

地址：北京市海淀区中关村北二条1号中国科学院过程工程研究所国家生化工程技术研究中心（100190）