

2012年执业药师药物化学知识点：蛋白质纯化及复性 PDF转换可能丢失图片或格式，建议阅读原文

[https://www.100test.com/kao\\_ti2020/648/2021\\_2022\\_2012\\_E5\\_B9\\_B4\\_E6\\_89\\_A7\\_c23\\_648432.htm](https://www.100test.com/kao_ti2020/648/2021_2022_2012_E5_B9_B4_E6_89_A7_c23_648432.htm)

蛋白质纯化及复性：复性效率低。工艺路线烦琐，生产周期长。生产成本低，设备投资大。生产成本低，设备投资大。重组蛋白在大肠杆菌（*E. coli*）高效表达时，往往以不溶的、无活性的蛋白聚集体，即包涵体(inclusion body)的形式存在于细胞内。必须从细胞内分离出包涵体，采用高浓度变性剂（如7.0mol/L盐酸胍、8.0mol/L脲）溶解包涵体，然后除去变性剂或降低变性剂的浓度，使包涵体蛋白得以复性，最后再用色谱法使目标蛋白质得到纯化。其中包涵体蛋白的复性和纯化是整个过程中的核心。目前重组蛋白生产中普遍存在的问题是：（1）复性效率低。传统的复性方法稀释法和透析法。稀释复性法对样品几十倍，甚至上百倍的稀释会使样品的体积急剧增大，给后续的分选纯化带来很大的困难，而且复性过程中需要较大的复性容器。透析法耗时较长，而且要多次更换透析溶液。这两种方法的共同缺点是蛋白质在复性过程中会发生聚集而产生大量沉淀，复性效率低，通常蛋白质的活性回收率只有5~20%，而且复性后的蛋白质溶液中含有大量的杂蛋白，需要进行进一步的分离纯化。（2）工艺路线烦琐，生产周期长。在传统的重组蛋白质分离纯化工艺中，大多采用经典的软凝胶分离介质，由于这种介质的颗粒较大，分离效率较差，因此常常需要采用多种不同模式的色谱操作联用对目标蛋白质进行纯化，才能得到纯度符合一定标准的目标蛋白质。另外，这种色谱介质的耐压性很差，只能在流速较低的情况下进行操作

，分离纯化时间较长。分离纯化步骤多和分离时间长使得蛋白质的质量回收率和活性回收率很低。而且在传统的重组蛋白质生产工艺中，蛋白质的复性和纯化是生产过程中两个独立的单元操作，也在很大程度上制约着生产效率。（3）生产成本高，设备投资大。由于复性和分离纯化分别单独进行，而且分离纯化步骤多，每一步都需要有与之配套的设备，致使设备投资大，生产成本高。随着生产规模的增加，这种弊端会愈来愈严重。1991年耿信笃教授首先将高效疏水相互作用色谱(HPHIC)用于变性蛋白的复性，很好的解决了上述问题，现已成功用于重组人干扰素-g(rhIFN-g)、重组人干扰素-a(rhIFN-a)、人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF)、重组人胰岛素原(proinsulin)、重组牛朊病毒(prion)等重组蛋白以及溶菌酶和核糖核酸酶等标准模型蛋白的复性与同时纯化中。目前，排阻色谱法、离子交换色谱法和亲和色谱法也已用于蛋白质的复性和同时纯化中。与传统的稀释法及透析法比较，用色谱法进行蛋白复性的优点是：在进样后可很快除去变性剂；由于色谱固定相对变性蛋白质的吸附，可明显地减少、甚至完全消除复性过程中蛋白质聚集体和沉淀的产生，从而提高蛋白质复性的质量和活性回收率；在蛋白质复性的同时可使目标蛋白质与杂蛋白分离以达到纯化的目的，使复性和纯化同时进行；便于回收变性剂，以降低废水处理成本。简言之，色谱法复性可以提高蛋白质的活性和质量回收率，将蛋白复性和纯化集成在一步操作完成，缩短了操作步骤和生产时间，减少了设备投资，使生产成本大大降低，已经引起了全世界范围内许多生化研究者和重组蛋白药物生产厂家的关注。由于高效液相色谱(HPLC)分离效率高，往

往在一步操作中便可得到纯度符合要求的蛋白质，而且分离速度快，在应用方面具有更大的优势。相关推荐：[#0000ff>常用有机溶剂的物理常数](#) [#0000ff>药物与受体的作用](#) [#0000ff>药物的解离度对药效的影响](#) 特别推荐：[blue>2011年执业药师考试成绩查询时间及方式](#) 100Test 下载频道开通，各类考试题目直接下载。详细请访问 [www.100test.com](http://www.100test.com)