

喻昕 主编 赵睿 喻格书 副主编

Separation and Purification
of Biopharmaceuticals

生物药物分离技术

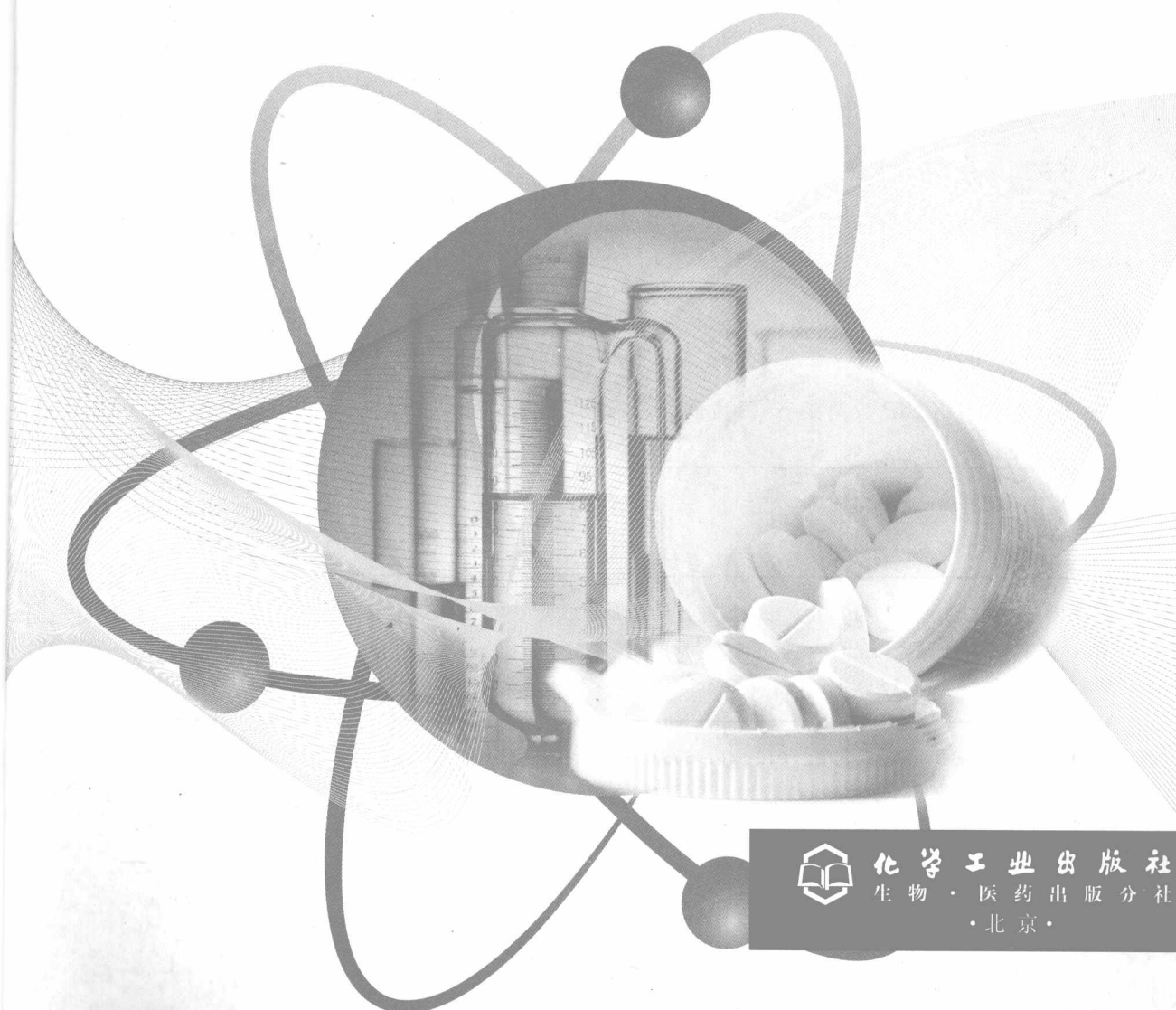


化学工业出版社
生物·医药出版分社

喻昕 主编 赵睿 喻格书 副主编

Separation and Purification
of Biopharmaceuticals

生物药物分离技术



化学工业出版社
生物·医药出版分社
·北京·

本书是一本关于生物药物原料的来源与选择,生物药物从生物体系中分离纯化出来的技术方法、相关材料及其研究进展的工具书。全书以目前常见的生物药物为主,重点介绍了生物来源(包括基因工程来源)的蛋白质和多肽类、氨基酸类、核酸类、糖类、脂类药物的分离技术。本书适于从事生物药物研究的药学及生物医药专业人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物药物分离技术/喻昕主编. —北京:化学工业出版社,
2008.7

ISBN 978-7-122-03120-4

I. 生… II. 喻… III. 生物制品:药物-分离 IV. TQ460.3

中国版本图书馆CIP数据核字(2008)第087027号

责任编辑:邵桂林 尤彩霞 周 旭 装帧设计:张 辉
责任校对:王素芹

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)

印 装:三河市延风印装厂

787mm×1092mm 1/16 印张16 字数382千字 2008年9月北京第1版第1次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

网 址:<http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价:48.00元

版权所有 违者必究

《生物药物分离技术》

编写人员

主 编 喻 昕

副主编 赵 睿 喻格书

编写人员 (按姓氏拼音排序)

郭 鹏 (武汉大学药学院)

何建学 (黄石理工学院医学院)

刘国詮 (中国科学院分子科学中心)

王静晖 (黄石理工学院医学院, 武汉大学药学院)

肖玉秀 (武汉大学药学院)

尹美珍 (黄石理工学院医学院)

喻 昕 (黄石理工学院医学院, 武汉大学药学院)

喻格书 (黄石理工学院医学院)

张 薪 (黄石理工学院医学院, 华中科技大学附属梨园
医院)

赵 睿 (中国科学院分子科学中心)

前 言

生物药物分离技术是随着生物技术在药物研究实践中的应用而提出的新的研究方向，其随着生物、化学、药学及新药筛选等技术的发展而发展，随着人们对药物品质认识的深化而发展。

生物药物分离技术的研究和应用涉及对生物药物来源的选择与处理，对生物药物来源的材料特性、生物药物在其中的含量、生物药物的生物学特性及化学特性等都需要进行了解。对于在人体内含量少而活性高的某些蛋白或细胞因子（如胰岛素、干扰素、肿瘤坏死因子等），通过正常的生物体获得它们将可能是一个步骤繁杂、产率低下、高成本的过程，工艺过程中使用的大量处理因素可能还会对环境造成严重污染。而通过基因工程手段，则可以大大减少对正常生物体的消耗，如胰岛素等蛋白类药物，可以通过基因工程菌或基因工程细胞的培养而大量生产。本书介绍的生物药物分离纯化方法及技术，可对正常生物体中的相关生物活性材料进行分离纯化，提供药物活性筛选的样本，同时也可对基因工程来源产品进行处理，以获得大量的生物活性药物，以利于实验室规模或工业规模的生产。例如，在蛋白类药物的分离纯化中，可利用基因工程技术使蛋白带上相应的标签，如在待分离蛋白的一端接上一段酶识别位点，将蛋白与酶融合表达后，再通过酶将待分离蛋白切割分离出来；将待分离蛋白接上组氨酸标签，再利用与组氨酸有特异相互作用的固定于树脂或其他基质上的金属离子如 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 等，通过适当的洗脱剂，可顺利将该蛋白分离纯化出来。

本书介绍了生化分离纯化方法中的大部分技术，如萃取、盐析、结晶、膜分离、各类色谱技术以及基因工程技术的应用，是生物分离过程科学与化学、生物化学及分子生物学等理论的结合。本书对相关生物药物的分离技术及其研究进展进行了较为详尽的介绍，通过对本书的阅读，读者可以快速了解生物药物的生化及药理活性，掌握其常用的分离纯化方法及相关材料，以及最新进展。在色谱分离中新材料的使用方面，如色谱分离用膜、整体柱技术、氧化锆基质等，一些天然产物中常用的方法以及近年来使用的分子蒸馏等，都仅进行了简单介绍，因为这些技术从分离原理上，基本上还是基于传统的分离技术。对于有新的分离机理的分离技术则都作了详细的介绍，如纳滤膜分离技术、色谱中运用的基因工程标签技术等。

在生物技术日益发展的今天，本书所涉及的生物药物分离及使用材料，正在被有机结合起来用于开发成各种试剂盒，不仅让从事生物分离的科研工作者，而且让从事分子生物学等各个与分离科学相关的科技人员从烦琐的分离理论中摆脱出来，只要按照各个 kit 提供的步骤操作就可得到目标产品，如 Qiagen Plasmid Midi Kit (25) 就是为质粒微量制备所开发的试剂盒，虽然每个生物实验室都可以自行配制相关的溶液以进行质粒制备，在通过 PCR、GE 确定插入碱基序列的分子量后，通常各个生物实验室在制备用于测序的质粒 DNA 时，为了得到高度纯化的 DNA，普遍使用相应的试剂盒，通常这样的试剂盒提供从细菌或细胞培养开始，直到最终得到纯化的质粒 DNA 等全过程的操作及试剂使用方法。另外一个例子，就是组氨酸标签技术，其已经作为一个标准的蛋白纯化技术，被开发成一个以组氨酸标

签为基础的蛋白纯化试剂盒。如今几乎知名的生物技术公司基本上都提供相应的生物分离试剂盒及对应的标准操作步骤，如 Invitrogen、Qiagen、Ambion、Agilent 以及 Amersham Bioscience 等都有相应的试剂盒开发及相应的用户群，如在 siRNA 或 shRNA 方面，Invitrogen、Qiagen、Ambion 等公司不仅提供了相应的表达载体、分离纯化步骤，而且也提供了基于生物信息学及计算机的相应网络设计平台，麻省理工学院（MIT）提供的在线设计平台与 NIH 的序列比对平台连接可能更方便一些，如今在生物通（[www. ebiotrade. com](http://www.ebiotrade.com)）网站上各个主要的生物公司基本都有相关产品介绍。

通过对本书的阅读，读者可以了解各种生物药物的性质及其以性质为基础分离纯化技术、影响因素以及研究进展，从而对于解决实践中所遇到的问题极为有利的。

本书得到了武汉市科技局晨光计划项目的支持，在书稿的写作过程中，始终得到中国科学院分子科学中心刘国诠教授的指导，部分工作是在日本德岛大学基因组研究中心完成的，得到了 Yasuo Shinohara 教授的大力帮助，此外，在本书的编写过程中，我的研究生在资料的整理中给予我一定的帮助，在此一并表示感谢。

由于作者的学术和编写水平有限，难免出现不足之处，恳请广大读者批评指正。

喻 昕

2008 年 4 月

目 录

第 1 章 生物药物材料的选择和处理	1
1.1 材料的选择与处理	1
1.1.1 材料的选择	1
1.1.2 材料的处理	3
1.2 细胞破碎	4
1.2.1 化学破碎法	6
1.2.2 物理破碎法	7
1.2.3 其他细胞破碎方法	9
1.3 生物药物等活性物质分离纯化工艺过程选择	9
1.3.1 生物分离过程选择	10
1.3.2 生物活性物质分离工艺选择举例	11
1.3.3 小结	15
第 2 章 生物活性物质粗分的常用方法	17
2.1 萃取法	17
2.1.1 萃取分离原理	18
2.1.2 选择萃取分离体系的注意事项	19
2.1.3 液-液萃取设备与流程	23
2.1.4 超临界萃取	24
2.1.5 双水相萃取	26
2.1.6 反相胶束萃取	32
2.1.7 液膜分离技术	35
2.1.8 反应萃取法	36
2.1.9 凝胶萃取法	36
2.2 吸附分离法	37
2.2.1 吸附类型	37
2.2.2 常用吸附剂	38
2.2.3 吸附等温线	43
2.2.4 影响吸附的因素	44
2.2.5 亲和吸附	46
2.3 固相析出分离法	52
2.3.1 盐析法	52
2.3.2 有机溶剂沉淀法	55
2.3.3 其他沉淀法	56

2.4	膜分离法	58
2.4.1	透析	58
2.4.2	超滤	60
2.4.3	微孔膜过滤技术	65
2.4.4	纳滤	69
2.4.5	以膜为基础的色谱分离	71
第3章	多肽与蛋白质类药物	73
3.1	多肽和蛋白质类药物基本知识	73
3.1.1	多肽和蛋白质的种类	73
3.1.2	多肽和蛋白质的物化性质	78
3.2	多肽和蛋白质类药物的生产方法	79
3.2.1	用传统的生化提取法生产	80
3.2.2	利用基因工程技术构建工程菌(或细胞)进行生产	80
3.3	多肽及蛋白质类药物的分离	81
3.3.1	反相高效液相色谱	83
3.3.2	疏水作用色谱	85
3.3.3	体积排阻色谱	88
3.3.4	离子交换色谱	93
3.3.5	膜蛋白色谱	97
3.3.6	高效置换色谱	98
3.3.7	贯流色谱	98
3.3.8	亲和色谱	103
3.3.9	蛋白质和多肽色谱中的新材料	120
3.3.10	电泳	120
3.3.11	多肽蛋白质分离工程的系统应用	133
3.4	蛋白质的分析鉴定	134
3.4.1	质谱分析	134
3.4.2	核磁共振	134
3.4.3	其他	135
3.5	几种蛋白质或多肽的分离	135
3.5.1	粒/巨噬细胞集落刺激因子的分离纯化	135
3.5.2	干扰素的分离纯化	136
3.5.3	白细胞介素的分离纯化	138
第4章	氨基酸类药物	141
4.1	氨基酸类药物基本知识	141
4.1.1	氨基酸种类及物化性质	141
4.1.2	氨基酸及其衍生物在医药中的应用	143
4.2	氨基酸的分离	146

4.2.1	溶解度法	146
4.2.2	沉淀法	146
4.2.3	吸附分离法	147
4.2.4	离子交换法	148
4.2.5	膜分离法	150
4.2.6	双水相萃取法	152
4.2.7	离子交换反应萃取法	152
4.2.8	反胶束萃取法	153
4.2.9	其他方法	153
第5章 核酸类药物		155
5.1	概述	155
5.1.1	核酸类药物及分类	155
5.1.2	核酸类药物的主要原料	156
5.1.3	反义核酸	157
5.1.4	RNA 干扰技术 (RNAi)	158
5.2	核酸类药物分离	160
5.2.1	盐析法及沉淀法	160
5.2.2	离心法	161
5.2.3	膜分离法	162
5.2.4	离子交换色谱法	163
5.2.5	亲和色谱法	165
5.2.6	吸附分离法	166
5.2.7	琼脂糖凝胶电泳	166
5.3	主要品种的分纯化工艺简介	173
5.3.1	肌苷	174
5.3.2	三磷酸腺苷	174
5.3.3	辅酶 A	175
5.3.4	5'-核苷酸	176
5.4	核酸类药物纯化技术的进展	178
5.4.1	凝胶电泳和薄层色谱法	178
5.4.2	高效液相色谱法	178
第6章 糖类药物		181
6.1	糖类药物基本知识	181
6.1.1	糖类药物组成及分布	181
6.1.2	糖类药物功能研究	182
6.2	糖类药物的性质	185
6.2.1	糖类药物的性质	185
6.2.2	糖类药物生理活性与其结构关系	187

6.3 糖类药物制备和分离纯化	189
6.3.1 单糖及其衍生物的制备	189
6.3.2 多糖的分离和纯化	190
6.3.3 氨基多糖的分离和纯化	194
6.3.4 几种多糖药物研究概况	195
第7章 脂类药物	201
7.1 脂类药物基本知识	201
7.2 脂类的化学结构和性质	201
7.2.1 单纯脂	201
7.2.2 复合脂	203
7.2.3 萜式脂	203
7.3 脂类药物的制备	205
7.3.1 提取法	205
7.3.2 化学合成或半合成法	206
7.3.3 生物转化法	206
7.4 脂类药物分离	206
7.4.1 有机溶剂分离法	207
7.4.2 色谱分离法	207
7.4.3 尿素包合法	208
7.4.4 结晶法	209
7.4.5 蒸馏法或精馏法	209
7.4.6 超临界流体萃取法	210
7.4.7 Sorbex 分离法	211
7.4.8 膜分离法	211
7.5 几种重要脂类药物的制备和纯化	212
7.5.1 卵磷脂	212
7.5.2 胆酸类	213
7.5.3 胆色素类	215
7.5.4 固醇类	216
7.5.5 前列腺素	216
第8章 海洋生物药物	219
8.1 海洋生物药物及其药理活性	220
8.1.1 甾醇	220
8.1.2 萜类	220
8.1.3 皂苷	221
8.1.4 大环内酯化合物	221
8.1.5 聚醚类药物	221
8.1.6 不饱和脂肪酸	222

8.1.7 多糖和糖苷	222
8.1.8 蛋白质和多肽	223
8.1.9 其他	223
8.2 几种海洋生物药物的分离	224
8.2.1 海带多糖分离提取及 LI 组分的分离鉴定	224
8.2.2 螺旋藻多糖及藻蓝蛋白的分离和纯化	225
第 9 章 其他生物药物的分离及相关材料简介	229
9.1 酶类药物	229
9.1.1 青霉素酶的分离纯化	229
9.1.2 细胞色素 C (细胞色素丙) 的分离纯化	229
9.1.3 β -半乳糖苷酶 (乳糖酶) 的分离纯化	230
9.2 抗生素的分离	230
9.3 维生素类药物分离纯化	234
9.3.1 胡萝卜素	234
9.3.2 维生素 B ₁ 、B ₂ 、B ₁₂	235
9.3.3 维生素 C	237
参考文献	238

第1章

生物药物材料的选择和处理

生物药物是指运用生物学、医学、生物化学等学科的研究成果,利用生物体、生物组织、体液或其代谢产物(初级代谢产物和次级代谢产物),综合应用化学、生物技术、分离纯化和药学等学科的原理与方法进行加工、制成的一类用于预防、治疗和诊断疾病的物质。因此生物药物包括从动物、植物、海洋生物、微生物等生物原料制取的各种天然生物活性物质及其人工合成的天然物质类似物。现代生物技术的发展,为传统的天然来源的生物药物添加了新的概念,使生物药物的用药理论和制备技术也发生了一场革命,如抗生索的功能已不再局限于杀菌或抑菌、胰岛素的生产不再依靠以动物脏器为原料、乙肝疫苗的生产不再需要用人血等。如今基因工程技术已经贯穿于生物药物的生产制备过程中,不仅如此,基因工程技术还被用于药物发现、药理研究等药物研究的各个领域。

现代生物技术的飞速发展,也促进了生物活性物质分离分析理念和技术的发展,新型生物分离所用材料也不断被开发出来。现代生物技术(如基因工程技术)在生物药物制备中具有重要地位,很多生物药物已经可以通过基因工程技术获得,如通过基因体外拼接(splicing)将表达某一种蛋白或多肽的基因构建在某一表达载体(质粒或病毒)上,再通过某一模式生物(构建的工程菌或细胞、转基因动植物等)将该蛋白或多肽表达出来,这样就使得目标物质的分离过程变得相对简单,特别是在利用细胞培养、发酵等手段获得某种生物活性物质时,分离手段将相对简单、明确。对于来源于动植物的某些多基因控制的生理活性物质而言,由于构建相应工程菌(或细胞)的过程相当复杂,仍然需要通过培养细胞提取或直接的分离提取手段由天然动植物(包括海洋生物、微生物等)中得到,当然植物次生代谢产物的获得,很大程度上仍然需要使用巧妙的分离纯化手段才能得到满意的结果。另一方面,中华医药的瑰宝——中草药,其用药理论和有效成分的研究已经得到广大科研工作者的重视,分离分析技术的发展正在改变着中草药几千年来老、大、黑、粗的传统面貌。

1.1 材料的选择与处理

1.1.1 材料的选择

从天然生物体(动植物、微生物)中通过直接分离提取手段获得生物活性物质的方法,也适用于获得生物化学半合成或用现代生物技术制得的生命基本物质及其衍生物、降解物、大分子结构修饰物等(如氨基酸、多肽、蛋白质、酶、辅酶、核苷酸、多糖、脂类等),以

及生物合成药物，即由微生物代谢所产生的药物和必须利用微生物及其酶转化反应共同完成的半合成药物（如有机酸、核苷酸、醇酮类、维生素、生物碱、甾体激素、抗生素、酶及辅酶类等）。直接提取法也适用于提取某些生物制品，如从人血中获得相应的抗体、抗原等。

一般来说，从天然生物材料中进行直接提取获得相关生物药物的过程主要有以下6个阶段或其中几个阶段的组合：①原料的选择和预处理；②原料的粉碎；③提取，主要是根据目标产品的化学特性利用溶剂将有效成分从体系中分离出来，并制成粗产品的工艺过程；④纯化，根据粗产品组成成分的性质、目标产品的化学性质以及产品所要达到的纯度要求，选择适当的手段对粗产品进行纯化，主要手段为沉淀分离法、吸附分离法、色谱法、透析法、离心法、膜分离法、酶法等；⑤干燥及保存；⑥制剂，即将前面得到的相对纯化的目标产品制备成相应的剂型，如片剂、针剂、冻干剂等供临床使用。

蛋白质、酶和核酸的生物活性不仅决定于其一级序列，而且其空间结构、构象也对其功能有一定影响甚至起决定性作用，一旦其空间结构产生变化，其活性会产生变化甚至消失，因此在制备这类药物时一般需要根据目标物质的化学物理特性选择相对于其物化特性产生变化最小的条件，一般在低温下进行较为有利。此外，还要注意环境控制和操作卫生，防止体系中掺入某些金属离子、细胞自身酶系及其他有害物质，防止原料染菌或染上支原体、病毒等。

上面提到的是直接提取法所必须注意的外在因素，生物药物在生物体或体系中含量多少、其活性大小是必须考虑的内在因素，因此应视生产目的来选择相应的材料。一般而言，在选择材料时主要注意以下几个方面：①选择有效成分稳定性好、含量高的新鲜材料；②来源丰富；③制造和提取工艺简单易行；④工艺过程成本比较低，有综合利用价值。但是，有时这几个条件并不一定同时具备，如含量丰富而来源却很困难，甚至违背人道主义精神；有时含量、来源都比较理想，而分离纯化却比较烦琐；在实际操作中，最常遇到的情况则是含量很低、而且分离纯化也较烦琐，如由胰脏中分离纯化胰岛素就是一个明显的例子（现代生物技术则较容易地解决了这个问题，利用基因工程构建表达胰岛素工程菌来大量表达胰岛素，在本书蛋白质类药物章节中有相关介绍），胰脏中胰岛素的含量小于其鲜重的百万分之一，稳定性较差。因此，必须从以上几个方面全面考虑，权衡利弊再进行下一步的工作。

对于不同性质的原料选择，更要综合考虑各种因素。如植物要注意季节性；在微生物生长对数期的后半部分，酶和核酸含量较高，可获得高产量，但必须综合考虑产品在不同生长时期的活性以最后决定收获时机；动物的生理状态不同，材料也有差异，如胸腺只有小牛才有，成年牛已退化了。因此，各种生物体和同一生物体的不同组织细胞，含有的生化药物的量和分布情况是不同的，如牛的胰脏中胰岛素比猪的含量高，但是由于猪的数量比牛多，因此制备胰岛素可以考虑使用猪的胰脏，又如磷酸单酯酶，从含量看，虽然在胰脏、肝脏和脾脏中较丰富，但是因其与磷酸二酯酶共存，两种酶很难在随后的分离中分开，因此在实践中常选用含磷酸单酯酶少、但几乎不含磷酸二酯酶的前列腺作材料。即使对于利用基因工程技术生产的生物活性物质（包括蛋白和酶类、甾体类、维生素类等）物质来说，微生物或细胞的选择也是很重要的，如是否需要糖基化的蛋白、是胞内产物还是分泌到胞外，是原代细胞还是传代细胞，是真核微生物还是原核微生物等。了解了这些知识后，并将相关知识运用材料选择就可开发出合适的工艺用于实际生产中。

对于来源于血液、尿液的生物制品，其原料选择则应根据所制备生物制品的特性决定，

有时对于这些生物制品的来源其健康状况还应有严格的要求,如制备抗血清或者血清,则必须确定其来源是健康的,避免像感染艾滋病、乙型肝炎等类似医疗事故的发生。

1.1.2 材料的处理

选择到合适的新鲜材料后,应及时使用,有时还需要在采集时就进行预处理,否则所需要的有效成分可能会部分甚至全部被破坏,从而影响收率,有的原材料需收集到一定的数量后才能生产。但是也有例外的情况,如骨骼组织在死亡几个小时后,其中的ATP、磷酸肌酸和糖原仍保持较高的水平。对于材料的处理,一般来说,动物组织先要剔除结缔组织、脂肪组织等非活性部分;植物种子先去壳除脂;微生物要进行菌体和发酵液的分离等操作。如采集的原料不能及时投入工业化生产,则需对其进行相应处理,通常是采用冷冻或干燥等方法处理,同时还应将非需物质(如脂类)除去,以防止在存放过程中生物药物遭受酸败、氧化等因素的破坏,以便于贮存和运输。因常用的动物、植物和微生物等生物材料的特点差异,其处理的要求也不同。

1.1.2.1 脱脂

动物脏器中常含有较多的脂肪,其不仅容易氧化酸败,导致原料变质,而且还会影响纯化操作和制品得率,因此,用前须进行脱脂处理。脱脂可在提纯前进行,也可在提纯过程中进行,具体实施依实际情况而定。一般脱脂的方法有:人工剥离脏器外的脂肪组织;浸泡在脂溶性的有机溶剂中(如丙酮、乙醚)脱脂;采用快速加热(50℃左右)、快速冷却的方法,使熔化的油滴冷却后凝聚成油块而被除去;利用油脂分离器使油脂与水溶液得以分离等。

对于植物材料,若油脂含量较多时,也需要进行脱脂处理。

1.1.2.2 冷冻处理

冷冻处理,主要是抑制酶和微生物的作用,降低化学反应速度。有些原料经速冻,细胞内形成微小冰晶,破坏了细胞结构,使细胞膜易破裂,有利于细胞内物质的提取。但要注意,当贮藏温度在-25~-15℃时,溶酶体中的蛋白酶会缓慢释放,在目的产物是易受影响的生物活性物质(如蛋白质)时,要注意贮藏时间不能过长。解冻时,一般是于37℃或40~50℃的温水浴中快速融化。

从刚宰杀的牲畜体内得到的脏器要迅速剥去脂肪和筋皮等结缔组织,冲洗干净,若不及时使用,可于较短的时间内冷冻(-25℃以下)保存,短期保存可在-10℃冰库中,长期保存(数月)则可放于-70℃低温冰箱,但是对于含量小而用量大的原料,低温保存时能源消耗大,长期保存将造成成本大幅度增高。

对于采集的植物材料,若非植物种子,则在水洗净后即时使用,也可在10h内置于-30~-4℃冰箱贮存,否则,则须泡胀或粉碎后才可使用。

对于微生物材料,无论生物活性成分存在于胞内还是胞外,若不及时使用,须经过适当处理,于低温下贮存或制备成冻干粉备用。

1.1.2.3 干燥

动物脏器和组织一般含60%的水分,通过有机溶剂处理,可降低水分至10%以下,以延长保存时间。使用有机溶剂时,注意不能破坏有效成分,常用的有丙酮和乙醇等。经丙酮处理的原料,能脱水脱脂,制成丙酮干粉,不仅减少酶的变性失活,同时因使蛋白质与脂质结合的部分化学键打开,促使某些酶易释放到溶液中,有利于有效成分的分离提取。如像脑

下垂体一类的小组织，可置丙酮液中脱水，干燥后磨粉贮存备用。

对于含耐高温有效成分（如肝素）的肠黏膜，可在沸水中蒸煮处理，烘干后贮存。

1.1.2.4 酶的灭活

由于生物体中不仅存在有效活性成分，而且还存在足以完全破坏有效活性成分的酶类，因此某些材料需要进行酶的灭活处理。一般来说，对于非蛋白类药物，常可通过加入有机溶剂（如丙酮等），如果有机溶剂处理不会造成蛋白类的活性丧失，亦可使用有机溶剂处理的方式，不仅可以脱水脱脂，而且还可达到破坏酶的目的，有利于原料的贮存和下一步工序的进行。对于需要辅助金属离子的酶可加入金属离子螯合剂。对需要合适反应 pH 或温度才能作用的酶可以通过调节溶液的理化性质，使之不利于酶的作用，或通过加入酶的抑制剂同样也可以达到此目的。微生物菌体或发酵液，经热处理后，适宜工艺连续化进行，或冷冻和灭菌后贮存。

1.2 细胞破碎

一些大块的原材料（如动植物组织等），在提取前须先进行粉碎或绞碎成合适的粒度，或将细胞破碎，以使存在于组织间液或组织细胞内的生物活性物质充分释放到溶液中，以有利于提取或吸附等过程的进行，所使用仪器主要为组织捣碎仪或绞碎机等。

微生物的细胞壁一般比较坚韧，如藤黄微球菌（*Micrococcus luteus*）或八叠球菌（*Sarcinalotea*）或藤黄八叠球菌（*Sarcinalutav*）内的内渗透压大约为 2MPa，而耐受这一压力的细胞结构非常牢固。如果生理活性物质在微生物代谢过程中被分泌到细胞外的液相中，因为培养基成分比较明确，因此分离纯化等制备过程相对比较简单，采用过滤和离心等手段进行固-液分离，然后将获得的澄清滤液再进一步纯化即可得到满意的结果，这些主要是一些胞外酶，例如细菌产生的碱性蛋白酶、霉菌产生的糖化酶等。但在实际生产过程中，很多生理活性物质往往以一定形式存在于细胞内部，例如一些胞内酶（如青霉素酰化酶、碱性磷酸酯酶、延胡索酸酶、二氢嘧啶酶、天冬氨酸酶、乙醇脱氢酶等）、有时为了提高目标蛋白的产量及活性的稳定性，常将目标蛋白对应的基因与相关蛋白基因构建在一起融合表达，表达的融合蛋白常常以包涵体（也称为包含体）形式存在于细胞内，因此为了最大量地得到目标蛋白，须先将细胞破碎，使细胞内产物释放到液相中，然后根据蛋白质等物质的特性设计相应的分离纯化过程。如果基因工程产物分泌到胞外，产量也高，则分离纯化要变得相对简单得多，而且不需要破碎细胞，目前基因工程人员非常注重通过胞外分泌途径来生产所需要的生物活性物质。

目前通过将外源基因或片段构建到大肠杆菌内进行表达的蛋白质和多肽占生物技术生产蛋白的 90% 以上，这主要是因为大肠杆菌表达体系具有培养价格低廉、易于操作、表达高效以及稳定等特点，使其在科研生产中得到了广泛应用。在大肠杆菌中表达的大量可溶性蛋白质一部分将积累在菌的胞质内或分泌至培养基中，另一部分则聚集在一起形成不溶性的包涵体。包涵体为菌体外源表达产物存在的一种形式，它是细胞的一种自我保护手段，可以保持其体内环境的稳定。包涵体中除了外源蛋白外还含有核酸和多糖，其中外源蛋白为无规折叠形式，没有活性，包涵体中无活性的重组蛋白质的量可占总重组蛋白表达量的 95%。形成包涵体的原因主要是细菌对外源基因的高水平表达使蛋白质来不及正确折叠而在细菌细胞

中形成小的聚集体造成的，另外外源基因在大肠杆菌中表达时，缺乏一些蛋白折叠过程中需要的酶和辅助因子（如折叠酶和分子伴侣等），也是包涵体形成的一大原因。但是包涵体的形成有时对于获得大量表达而又易于复性的外源基因表达产物来说是有利的，在这种情况下，一般只要对蛋白质进行体外复性后，就可以加以利用。形成包涵体有时是不利的，但可以通过对培养过程进行适当的调节以便获得相当数量的可溶性蛋白，如降低重组菌的培养温度、在培养 *E. coli* 时添加高浓度的多醇类、蔗糖或非代谢糖，可以阻止分泌到周质的蛋白质的聚集反应，但当培养条件不佳时（如供氧不足或 pH 控制不佳时），蛋白质易聚集成包涵体。

细胞破碎的主要目的是破坏细胞壁和细胞膜，使胞内产物获得最大程度的释放。微生物的细胞壁的结构和组成变化较多，遗传和环境等因素的不同使得不同种类微生物的细胞壁的复杂性也不完全相同、G⁺细菌的细胞壁的特点是厚度大和化学组分简单，一般含 90% 肽聚糖和 10% 磷壁酸，磷壁酸有 5 种类型，但主要类型为甘油磷壁酸和核糖磷壁酸类。G⁺细菌细胞壁有 20~80nm 的肽聚糖层，约占细胞壁干重的 50%，而 G⁻细菌的肽聚糖层较薄，仅为 2~3nm，占细胞壁干重的 10% 左右，其有三层：外膜 8~10nm 厚，由含有蛋白质和脂多糖的高聚物组成；第二层较薄，由肽聚糖组成，在第二层下面有一层空间，称作胞浆（周质）空间，厚 12~15nm，其中存在着多种周质蛋白，包括一些水解酶类、合成酶类和运输蛋白等。革兰阳性菌没有第一层外膜，与革兰阴性菌相比，同样具有肽聚糖层和胞浆空间；第三层称为浆膜或内膜。革兰阳性菌和革兰阴性菌均有浆膜或内膜层，它主要由磷脂组成，同时含有分散的蛋白质分子和金属离子，磷脂分子由疏水基团和亲水基团两部分组成，形成磷脂双分子层。G⁺和 G⁻的三层作用不同，外层及肽聚糖层使细胞具有一定的形状和机械强度。构成细胞的肽聚糖是一种难溶性的多聚物，由 N-乙酰葡萄糖胺、N-乙酰胞壁酸和短肽聚合而成原多层网状结构。其中 N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰胞壁酸经 β -1,4-糖苷键连接，并交替重复地组成一条聚糖链。短肽一般是四肽或五肽的链，由不同的氨基酸组成，如四肽侧链的氨基酸顺序为 L-丙氨酸-D-谷氨酸-L-赖氨酸-D-丙氨酸，也常有 D-氨基酸和二氨基庚二酸存在。短肽首位的 L-丙氨酸的氨基连接在 N-乙酰胞壁酸乳酸残基的羧基上，相邻聚糖链上的短肽又交叉相连，构成了细胞壁的三维网状结构。短肽之间的交联方式和交联程度随细菌种类的不同而有相当大的区别。如革兰阴性菌（如大肠杆菌）是由连接在聚糖链上的短肽直接交联，而革兰阳性菌（如金黄色葡萄球菌）是通过另一条由甘氨酸组成的五肽与聚糖链上的短肽相连，作为“肽桥”而进行交联。

真核生物的细胞具有结构完整的细胞核，比原核细胞的结构更为复杂。真核细胞也具有浆膜这一层，结构与原核细胞十分相似，只是真核细胞的浆膜中含有类固醇。此外，真核细胞还含有结构复杂的细胞器，如线粒体、内质网、高尔基体等。每一种细胞器都有其特定的作用，如线粒体与呼吸有关。虽然真核细胞的结构较为复杂，但可以采用与原核细胞相似的方法进行细胞破碎。

不仅要考虑细胞破碎的难易，还要考虑所要分离的物质的生化特性及稳定性，在破碎过程中应采取相应的手段防止其变性或被细胞内存在的酶水解，如提取热稳定性差的蛋白质酶类时，有时超声破碎法由于会产生大量的热而导致酶失活，而体系中含有的其他酶类也会使所要提取的蛋白质等生化物质因酶解而失活，或目标物质本身在破碎条件下不稳定等，因此破碎方法以及相关措施的选择有时是至关重要的。通常可以根据待分离物质的特性选择采取

以下手段：①采用合适的缓冲体系，防止溶液的 pH 变化过大，提取可选择的缓冲体系有磷酸盐缓冲液、Tris 缓冲液、柠檬酸缓冲液等；②加入保护剂，如为保护有巯基易被氧化的蛋白可加入还原剂 DTT（二硫苏糖醇）或 β -ME（ β -巯基乙醇），对会受金属离子抑制活性的蛋白则可加入金属离子螯合剂，如 EDTA 等；③防止水解酶的作用，对于需要辅助金属离子的酶可加入金属离子螯合剂。对需要合适反应的 pH 或温度才能作用的酶可以通过调节溶液的理化性质，使之不利于酶的作用，或通过加入酶的抑制剂同样也可以达到目的。

1.2.1 化学破碎法

细胞化学破碎方法主要是渗透冲击（也称为溶胀）、表面活性剂增溶及脂溶解法等。此外，酶消化法和碱处理法也是细胞化学破碎的有效方法。酶消化条件温和，酶加到细胞悬浮液中能迅速与细胞壁反应使其破碎且选择性强，如溶菌酶和蜗牛酶在实验室中常被用于细胞壁的降解。酶法处理细菌细胞时，先是细胞壁消解，随之而来的是因渗透压差引起的细胞膜破裂，导致细胞内容物质渗漏出来。但酶的价格较昂贵，应用于大规模工业操作较困难。碱处理法与酶解法相比，反应较为剧烈且选择性差。高浓度的碱液易导致多种降解反应及蛋白质失活。因此尽管该法简单易行且价廉，但远不如渗透冲击法、增溶法、脂溶法实用。

(1) 渗透冲击（溶胀）法 细胞破碎化学方法中最简单的是渗透冲击法，此法是将细胞先置于高盐溶液中平衡后再转入低盐溶液中，通过渗透压的改变使细胞破裂，或直接将细胞置于低盐溶液中，细胞外的水在渗透压差的推动下进入细胞，最终将细胞撑破。例如，将一定体积的含细胞液加入两倍体积的水中。由于细胞中的溶质浓度高，水会不断渗进细胞内，致使细胞膨胀变大，最后导致细胞破裂。对于大规模动物细胞（特别是血液细胞），用快速改变介质中盐浓度引起渗透冲击使之破碎，是十分有效的。该法主要是利用渗透压的方法对细胞进行破碎，也可以说是一种物理破碎方法。

(2) 增溶法 表面活性剂（如十二烷基磺酸钠或十二烷基硫酸钠）处理细胞时，利用表面活性剂的两性特性可以将细胞壁细胞膜的结构部分溶解，使细胞内容物渗漏出来，并导致整个细胞破碎。通常是将体积为细胞体积两倍的适当浓度的表面活性剂溶液加入细胞中去，细胞破碎后，悬浮液可通过离心分离除去细胞碎片，然后再通过萃取或吸附等手段制得产品。

阳离子型、阴离子型或非离子型表面活性剂都可用于细胞破碎。SDS（十二烷基磺酸钠）是典型的阳离子型表面活性剂，阴离子型表面活性剂如肥皂（脂肪酸盐）也可用于细胞破碎，但是肥皂的增溶作用依赖于羧酸基团，因此只有在较高 pH 的羧酸基团解离的情况下，肥皂才算是有效的表面活性剂。在硬水中，由于 Ca^{2+} 与羧酸基团形成不可溶性沉淀，使肥皂失去增溶作用。将羧酸基团变成硫酸基团可克服传统型肥皂的缺点。

阳离子型表面活性剂主要是一些烷基胺盐。十六烷基三甲基溴化胺是很典型的例子，它有一个长烷基链（十六烷基）和三个甲基，并全部连在一个带正电的氮原子上，负离子往往是卤素。

用于细胞破碎的非离子型表面活性剂主要是利用其疏水及亲水特性溶解细胞壁中的脂类，从而使细胞破碎。这类表面活性剂的亲水及疏水特性分别由具有亲水和疏水特性的官能团提供，如烷基苯酚醇。

牛黄胆酸钠是胆汁的成分之一，其生理机能是溶解肠中的脂肪，其增溶作用有助于细胞