

T/EJCCSE

团 体 标 准

T/EJCCSEXXXX—2024

蛋白质高效纯化技术规范

Technical specifications for efficient protein purification

（征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

中国商业股份制企业经济联合会 发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 原料	1
5 仪器设备	1
6 纯化流程	2

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由质肽药业（泰州）有限公司提出。

本文件由中国商业股份制企业经济联合会归口。

本文件起草单位：质肽药业（泰州）有限公司。

本文件主要起草人：XXX。

蛋白质高效纯化技术规范

1 范围

本文件规定了蛋白质高效纯化的原料、仪器设备、纯化流程。
本文件适用于蛋白质高效纯化技术。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原料

- 4.1 组氨酸。
- 4.2 99% 的氯化钠。
- 4.3 99% 的氢氧化钠。
- 4.4 99% 的哌啶。
- 4.5 99% 的氨丁三醇 (*Tris*)。
- 4.6 25% 的氨水。
- 4.7 99.9% 的冰醋酸。
- 4.8 85% 的甲酸。
- 4.9 37% 的盐酸。
- 4.10 99% 的异丙醇。
- 4.11 99% 的磷酸氢二钠十二水合物。
- 4.12 纯化填料。

5 仪器设备

- 5.1 百分之一天平。
- 5.2 万分之一天平。
- 5.3 台秤。
- 5.4 地秤。
- 5.5 层析系统。

- 5.6 水浴锅。
- 5.7 便携式浊度仪。
- 5.8 pH 计。
- 5.9 电导率仪。
- 5.10 磁力搅拌器。
- 5.11 恒温强磁力搅拌器。
- 5.12 高压制备液相。
- 5.13 电动搅拌。
- 5.14 磁力搅拌器。
- 5.15 中低压制备液相。
- 5.16 高压层析系统。
- 5.17 DAC 柱。
- 5.18 落地式电动搅拌。
- 5.19 气动搅拌机罐。
- 5.20 冻干机。
- 5.21 医用冷藏箱。
- 5.22 医用低温保存箱。
- 5.23 超低温冰箱。
- 5.24 高效液相色谱仪。
- 5.25 台式微量离心机。
- 5.26 紫外分光光度计。
- 5.27 超纯水机。
- 5.28 数显涡旋仪。
- 5.29 低速台式离心机。
- 5.30 高速冷冻离心机。
- 5.31 管式离心机。
- 5.32 高压均质机。
- 5.33 冷却水循环机。
- 5.34 高速分散机。
- 5.35 涡旋仪。
- 5.36 超滤膜。
- 5.37 过滤器。

6 纯化流程

6.1 包涵体回收

6.1.1 离心

使用管式离心机收集发酵合格的发酵液以收集菌体，将离心产生的上清液灭活后收集作为固废处置。

6.1.2 破碎

在离心获得的浓缩液中加入由氨丁三醇、冰醋酸、纯水混合制成的破碎缓冲液，混合均匀后用高压均质机破碎，获得重组蛋白包涵体（浓悬浊液，又称“包涵体泥浆”）。

6.1.3 清洗离心

加入由氯化钠、纯水混合制成的缓冲液，将包涵体泥浆清洗 2 次，每次清洗后，使用管式离心机收集。

6.2 主链纯化

6.2.1 溶解

6.2.1.1 在清洗离心获得的包涵体泥浆中加入由氢氧化钠、氨丁三醇、盐酸、纯水混合制成的缓冲液进行稀释溶解，通过台秤或地秤称重控制稀释倍数，使包涵体形成一定的空间结构。

6.2.1.2 进行两步反相色谱纯化，经等电点沉淀后，获取纯化主链。

6.2.2 色谱纯化

6.2.2.1 使用色谱树脂填料进行色谱纯化。

6.2.2.2 使用由氨丁三醇、异丙醇、甲酸、纯水混合制成的缓冲液对层析柱进行冲洗、灭菌、再生、平衡。

6.2.2.3 将溶解稀释后的包涵体溶液上柱，通过层析系统、中低压制备液相、高压制备液相等操控将蛋白液流过层析柱，使目标蛋白吸附至层析柱上。用缓冲液淋洗吸附的杂质，得到纯度更高的目的蛋白溶液。

6.2.2.4 使用缓冲液洗脱层析柱上的目标蛋白，并收集洗脱液，得到目标蛋白。

6.2.2.5 纯化结束后用缓冲液冲洗色谱树脂，进行清洗再生。

6.2.3 等电点沉淀

6.2.3.1 使用由氢氧化钠、盐酸混合制成的 pH 调节剂将色谱纯化得到的蛋白溶液的 pH 值调节至等电点附近，使用 pH 计测定溶液 pH。

6.2.3.2 目的蛋白析出为沉淀，使用管式离心机进行分离，离心过程通过冷却水循环机对管式离心机进行冷却。

6.2.3.3 上清液收集作为固废处置。

6.3 活性分子纯化

6.3.1 色谱纯化

6.3.1.1 使用色谱树脂填料进行色谱纯化。

6.3.1.2 使用由氯化钠、冰醋酸、组氨酸、磷酸氢二钠十二水化合物、纯水混合制成的缓冲液对层析柱进行冲洗、灭菌、再生、平衡。

6.3.1.3 将稀释后的包涵体溶液上柱，通过层析系统、中低压制备液相、高压制备液相等控制蛋白液流过层析柱，使目标蛋白吸附至层析柱上。用缓冲液淋洗吸附的杂质，得到纯度更高的目的蛋白溶液。

6.3.1.4 使用缓冲液洗脱层析柱上的目标蛋白，并收集洗脱液，得到目标蛋白。

6.3.1.5 纯化结束后用缓冲液冲洗色谱树脂，进行清洗再生。

6.3.2 超滤

6.3.2.1 使用过滤孔径为 0.001 μm ~0.1 μm 的过滤膜，在外界压力作用下载留目的蛋白，透过水和其他小分子溶质。

6.3.2.2 超滤产生的滤过废液和少量废膜包收集作为固废处置。

6.3.3 除菌过滤

将产品经 0.2 μm 除菌过滤器，过滤至一次性无菌原液储液袋中，然后分装至无菌原液瓶中。

6.4 样品储存及检测

使用高效液相色谱仪对样品进行检测，并保存在医用低温保存箱及超低温冰箱中。
