

重组蛋白药物生产工艺融入生物制药工艺学教学的探索与实践

于海娜

济南大学 生物科学与技术学院 山东 济南 250022

【摘要】生物制药工艺学是从事各种生物药物的研究、生产和制剂的综合性应用技术科学，理论与实践紧密结合。为帮助学生理解抽象理论、增强学生的工程化思维，本文以重组蛋白药物的典型代表——L-天冬酰胺酶 II 的重组表达与分离纯化工艺为教学案例，将其工艺流程与课程核心知识点深度对接。该案例系统涵盖生物药物生产的多个单元操作，能够有效串联生物制药工艺学的多个教学模块。以真实药物生产工艺为载体的案例教学，有助于学生建立从上游构建到下游纯化的完整工艺认知，提升工程化思维能力与综合分析能力，同时通过国产药物案例的引入实现课程思政的有机融入。

【关键词】生物制药工艺学；案例教学；L-天冬酰胺酶 II；重组蛋白；分离纯化

1 引言

《生物制药工艺学》是生物制药专业的专业基础课，主要讨论各类生物药物的来源、结构、性质、制造原理、工艺过程、生产技术操作等。该课程内容涵盖生物活性物质分离纯化的主要原理与方法（包括沉淀、吸附、层析、离心、膜分离等），与生物药物生产紧密联系^[1]。然而，在实际教学中面临若干突出问题。其一，课程涉及大量抽象的理论公式与概念（如分配系数、分离度、理论塔板数、沉降系数等），学生理解困难。其二，授课对象为大三学生，虽已系统学习微生物学、生物化学等先修课程，但对工业化生产的工艺流程和工程化思维尚有欠缺。其三，各单元操作之间的逻辑关联不够清晰，学生易形成“碎片化”的知识结构，难以建立从原料到成品的完整工艺认知。针对上述问题，近年来已有学者探索将案例式教学法、LBL 与 PBL 相结合的教学模式以及科研项目融入课堂教学等方式引入生物制药工艺学课程^[2-5]。本文在此基础上，提出以 L-天冬酰胺酶 II 的重组表达与分离纯化工艺为教学案例，系统覆盖课程核心知识点，帮助学生建立上下游贯通的工程思维。

L-天冬酰胺酶（L-asparaginase）是一种重要的抗肿瘤药物，临床上用于儿童急性淋巴细胞白血病的治疗^[6-7]。该酶的制备经历了从天然提取到基因工程重组表达的跨越式发展，其生产工艺涵盖了基因工程菌构建、发酵培养、细胞破碎、分离纯化等多个单元操作，是生物制药工艺学教学的理想载体。

2 L-天冬酰胺酶 II 生产工艺与课程知识点的对应关系

2.1 基因工程菌构建——对应“生物制药工艺技术基础”模块

L-天冬酰胺酶 II 的生产首先需要构建基因工程菌。以大肠杆菌表达系统为例，研究者利用基因工程核心技术构建天冬酰胺酶 II 的重组表达载体。包括 PCR 扩增大肠杆菌 JM109 的 L-天冬酰胺酶 II 基因（ansB）、连接至 pMD18-T 克隆载体，再通过

双酶切后与表达载体 pET-22b 连接，转化 BL21 (DE3) 感受态细胞，筛选获得重组表达载体 pET-22b-asp。这一过程涵盖了教学大纲中“重组 DNA 技术的基本原理、常见的基因载体、构建基因重组体、DNA 重组体表达系统”等核心知识点，并且与生物制药专业另一专业基础课《基因工程》的核心内容相对应。

在课堂讲授中，教师引导学生思考选择大肠杆菌表达系统的核心问题：（1）选择 pET 系列载体作为表达载体，其优越性表现在哪些方面？（2）BL21 (DE3) 菌株的特点是什么？（3）如何筛选鉴定阳性克隆？通过这些问题链，帮助学生将基因工程技术基础知识与制药工艺的实际需求联系起来，加深学生对重组蛋白药物研发生产的全面认识。

2.2 微生物发酵工艺及预处理——对应“生物制药工艺技术基础”与“生物材料的预处理”模块

获得基因工程菌后，需通过发酵培养获得足量的目标蛋白。发酵过程中需控制溶氧、pH 等关键参数。这部分内容可与教学大纲中“微生物菌种保存”“生物制药工艺中试放大的目的”等知识点对接。此外，发酵结束后需要进行菌体收获，涉及液固分离操作，常用的液固分离操作包括沉降、过滤、离心等。由于 L-天冬酰胺酶 II 是分泌蛋白，其提取可采用蔗糖溶液提取菌体细胞周质中的蛋白，也可采用机械破碎或化学方法破碎细胞后收集总蛋白。教学大纲中“生物材料的预处理和液固分离”部分要求“掌握常用细胞破碎的方法、各种方法的优缺点和适用范围”。教师可借此引导学生比较周质提取与全细胞破碎的优劣，理解细胞破碎方法选择对后续纯化工艺的影响。

2.3 离心分离——对应“离心技术”模块

细胞破碎后，需通过离心去除细胞碎片等不溶性杂质。教学大纲中“离心技术”章节要求学生“掌握超离心机的工作原理，熟悉超离心类型和应用场景”。在 L-天冬酰胺酶 II 生产工艺中，差速离心是去除细胞碎片、获得澄清粗酶液的常用手段。教师

可结合具体工艺参数(离心力、时间、温度等),讲解差速离心、速度区带离心和等密度梯度离心的原理与适用场景。

2.4 初步纯化——对应“固相析出分离法”

获得澄清粗酶液后,通常需要进行初步纯化。L-天冬酰胺酶的传统纯化工艺采用硫酸铵分级沉淀、二乙氨基乙基纤维素(DEAE-C)柱层析和羧甲基纤维素(CM-C)柱层析的组合策略。其中硫酸铵沉淀法对应教学大纲中“各种沉淀法的原理和特点”“各种因素对生物物质溶解度的影响”等知识点。教师可引导学生分析盐析的原理、常用盐析物质、硫酸铵饱和度等对酶活回收率的影响,以及如何通过分级沉淀步骤去除大部分杂蛋白。同时引导学生思考是否有更高效、便捷的分离纯化方法。

2.5 离子交换层析——对应“离子交换法”模块

离子交换层析是L-天冬酰胺酶II纯化的关键步骤之一。教学大纲中“离子交换法”一章要求学生“掌握常用的离子交换剂及其使用场景;熟悉离子交换的基本操作”。在L-天冬酰胺酶II的纯化中,DEAE-C(阴离子交换剂)和CM-C(阳离子交换剂)均有应用。教师可结合酶的等电点(pI约为5.0)信息,引导学生分析为何选择特定类型的离子交换剂、如何设计梯度洗脱条件,通过以上分析深入理解离子交换层析中待分离物质与离子交换剂之间“吸附、解吸”的原理。

2.6 亲和层析——对应“亲和纯化技术”模块

随着基因工程技术的进步,His-tag亲和层析已成为重组蛋白纯化的重要方法,可以一步纯化获得高纯度的重组蛋白。重组L-天冬酰胺酶可通过在C末端添加6个组氨酸残基,利用 Ni^{2+} -NTA亲和层析一步纯化得到电泳级纯酶。L-天冬酰胺酶II的His-tag亲和纯化是讲授亲和层析原理的理想案例。教师可从以下几个层面展开:(1) Ni^{2+} -NTA亲和吸附剂的结构与工作原理,包括亲和吸附剂的组成、亲和层析的过程;(2)His-tag与 Ni^{2+} 的配位结合机制,主要涉及组氨酸侧链与金属离子的特异性结合;(3)上样缓冲液与洗脱缓冲液的设计(通过调整溶液中咪唑浓度,梯度洗脱重组蛋白);(4)一步纯化的优势与局限。此外,部分研究者采用Q-Sepharose离子交换柱一步纯化策略,教师可引导学生比较两种策略的优劣,理解“多种分离技术的组合设计与优化”这一教学难点。

2.7 凝胶过滤层析——对应“凝胶层析”模块

在需要更高纯度的场合,凝胶过滤层析可作为精纯步骤。教学大纲中“凝胶层析”一章要求学生“掌握凝胶层析的理论和实验条件的选择;熟悉凝胶层析的特点和应用范围”。L-天冬酰胺酶II的凝胶过滤纯化涉及 V_0 、 V_i 、 V 、 K_d 等核心参数的理解与计算,以及分离度的评价。教师可结合酶的分子量(L-天

冬酰胺酶II为双亚基蛋白,分子量约135 kDa)及对生物活性的保留要求,引导学生选择适当的凝胶介质(如Sephacryl或Superdex系列),并预测其在凝胶过滤柱上的洗脱行为。

2.8 制备型高效液相色谱——对应“制备型高效液相色谱”模块

对于需要达到药品级纯度的L-天冬酰胺酶II,制备型高效液相色谱是纯化的重要手段。教学大纲中“制备型高效液相色谱”一章要求学生“掌握制备型高效液相色谱的特点;熟悉蛋白质、核酸、多糖等生物分子的色谱条件”。教师可结合L-天冬酰胺酶II的疏水色谱或反相色谱分离条件,讲解理论塔板数N、容量因子 k' 、分离度R、选择因子 α 等参数的计算与调控,以及制备色谱条件优化的策略。

3 教学实施方式

3.1 教学组织与安排

以L-天冬酰胺酶II生产工艺为主线的案例教学可贯穿课程后半段(第8—16周),与各分离纯化技术的理论讲授同步推进。具体安排如下:

第8—10周(凝胶层析、离子交换法):在讲授各章基本原理后,引入L-天冬酰胺酶II纯化中相应步骤的案例分析,布置课后思考题。

第11—13周(亲和纯化技术、离心技术、膜分离技术):继续以该案例串联各单元操作,逐步呈现完整的纯化工艺路线。

第14—16周(制备型HPLC、生化药物制造工艺):以L-天冬酰胺酶II的完整生产工艺为综合案例进行系统讲授,要求学生完成一份完整的工艺设计报告。

3.2 教学方法

(1)问题导向式教学(PBL)。在每个单元操作的教学中,以真实工艺问题驱动学生思考。例如,在讲授离子交换层析时提问:“L-天冬酰胺酶II的等电点约为5.0,应选择阴离子还是阳离子交换剂?上样缓冲液的pH应如何设计?”通过引导学生主动运用理论知识解决实际问题。

(2)流程图构建法。要求学生在学习各单元操作后,在L-天冬酰胺酶II生产工艺流程图上逐步填充相应步骤的工艺参数和原理说明,最终形成完整的工艺认知地图。这有助于克服“碎片化”学习的弊端。

(3)对比分析法。对比传统天然提取工艺与现代基因工程工艺的差异,引导学生理解技术进步对工艺优化的推动作用;对比一步亲和纯化与多步传统纯化的优劣,培养学生的工程决策能力。

(4) 虚拟仿真辅助教学。已有高校开发了“基因工程技术制备门冬酰胺酶(冻干粉针)工艺”的虚拟仿真实验项目,涵盖基因工程菌种子培养、工程菌发酵、产物分离纯化、纯品制剂及灌装等全过程。可借助此类资源弥补真实实验条件的不足,增强学生的沉浸式体验。

3.3 课程思政融入

L-天冬酰胺酶II案例具有丰富的思政元素:

(1) 科技报国情怀。介绍国产L-天冬酰胺酶制剂的研发历程与产业化现状,引导学生认识自主创新对保障人民健康的重要意义。

(2) 科学精神培养。通过展示L-天冬酰胺酶从基础研究到临床应用的发展历程,引导学生理解科学研究的严谨性、长期性与团队协作精神。

(3) 专业使命感。强调L-天冬酰胺酶在儿童白血病治疗中的不可替代作用,让学生切实感受到生物制药工艺工作者的社会责任。

4 教学效果与反思

4.1 教学效果

在中国药科大学的生物制药专业教学中,重组L-天冬酰胺酶制备与检测实验已成为实验课的重要组成部分。教学实践表明,该实验“极大地激发了学生的学习兴趣 and 积极性,教学质量和效果显著提高”,同时“通过实验的训练培养了学生的实验思路,为提高学生的实验操作能力、拓展学生的实验思维打下了良好的基础”。这一经验为理论课中引入该案例提供了有力支撑。

从课程目标达成角度看,L-天冬酰胺酶II生产工艺案例能够有效支撑教学大纲中的两项核心课程目标:在知识层面,覆

盖了从基因工程到分离纯化的全链条知识;在能力层面,要求学生综合运用多种单元操作设计完整的工艺流程,体现了“设计满足特定需求的系统、单元或工艺流程”的能力要求。

4.2 教学反思

(1) 案例深度与广度的平衡。L-天冬酰胺酶II生产工艺涉及的知识点众多,教学中需注意避免“面面俱到、浅尝辄止”。建议在每个单元操作的教学中聚焦2—3个核心问题深入展开,其余内容作为背景信息简要介绍。

(2) 学生先修知识的衔接。该案例涉及基因工程、微生物发酵等先修课程内容。教学前需评估学生的知识储备,必要时安排快速回顾环节,确保案例教学的顺利进行。

(3) 考核方式的配套改革。建议在过程性考核中增加案例分析报告、工艺设计等环节,将学生对案例的理解深度纳入考核范围,避免“听过就忘”。

(4) 案例库的持续建设。除L-天冬酰胺酶II外,还可围绕肝素、胰岛素、单克隆抗体等典型药物开发系列案例,形成覆盖各类生物药物的案例教学资源库,满足不同教学侧重点的需求。

5 结语

以L-天冬酰胺酶II的重组表达与分离纯化工艺为教学案例,能够系统覆盖生物制药工艺学课程中基因工程菌构建、微生物发酵、细胞破碎、离心分离、沉淀、离子交换层析、亲和层析、凝胶过滤、制备型HPLC等多个核心知识点,帮助学生建立从上游到下游的完整工艺认知。案例教学的实施有助于化解抽象理论的理解困难,培养学生的工程化思维与综合分析能力,同时实现课程思政的有机融入。该案例的推广使用对于提升生物制药工艺学课程的教学质量具有积极意义。

参考文献:

- [1] 高向东. 生物制药工艺学[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2019.
- [2] 蒋德旗, 莫昭展. LBL与PBL相结合的教学法在生物制药工艺学教学中的应用研究[J]. 中国医药指南, 2013, 11(11): 784-786.
- [3] 王道才, 刘晓鹏, 周防震, 等. 案例式教学法在《生物制药工艺学》课程中的应用[J]. 化学工程与装备, 2018, (12): 316-318.
- [4] 汤佳立, 岑昊聪, 李泰明. 重组L-天冬酰胺酶制备与检测实验的改进与优化[J]. 高师理科学刊, 2021, 41(9): 57-61.
- [5] 孙静. 科研项目融入生物分离纯化技术教育的探索与实践[J]. 现代商贸工业, 2024, 45(8): 262-264.
- [6] 韦玉军, 陈建华, 吴梧桐. E. coli L-天冬酰胺酶结构与功能及其纯化工艺[J]. 药学进展, 2005, (9): 397-404.
- [7] 张志红, 王利群, 陈驷, 等. 天冬酰胺酶胞外表达的初步研究[J]. 安徽农业科学, 2008, (16): 6653-6654+6659.

作者简介: 于海娜(1987—), 女, 汉族, 山东临沂人, 博士研究生学历, 讲师职称, 研究方向为: 次生代谢关键酶功能研究。