

动物医学制药专业中蛋白纯化教学改革探索

张二芹¹, 潘佳佳¹, 陈红英¹, 张同旭²

(1. 河南农业大学动物医学院, 国家动物免疫学国际联合研究中心, 河南郑州 450046; 2. 河南南阳市第四职业中等专业学校, 河南南阳 473000)

摘要 生物制品的质量关系到人类和动物的健康, 而蛋白纯化是生物制品的质量保证, 因此通过课堂教学、实验操作和考核方式, 学生掌握蛋白纯化的基本策略和方法, 其目的让学生做到学以致用, 为研发单位和企业培养一批应用型人才。**关键词** 动物医学制药专业; 生物制品; 蛋白纯化; 教学方法

中图分类号 S-01 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)21-0277-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.21.072



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Exploration of Protein Purification Teaching Reform in Animal Medicine and Pharmaceutical Specialty**ZHANG Er-qin, PAN Jia-jia, CHEN Hong-ying et al** (College of Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, National Animal Immunology International Joint Research Center, Zhengzhou, Henan 450046)**Abstract** The quality of biological products is related to human and animal health, and protein purification is the quality guarantee of biological products. Therefore, students can master the basic strategies and methods of protein purification through classroom teaching, experimental operations and assessment methods, the purpose of which is to enable students to apply what they have learned and cultivate a batch of application-oriented talents for research and development units and enterprises.**Key words** Animal medicine and pharmaceutical specialty; Biological products; Protein purification; Teaching methods

生物制品在预防和治疗人类和动物传染病方面作出了巨大的贡献, 如流感疫苗、猪瘟血清、流感 HA 重组蛋白、细胞因子 IL-2 和 IFN(干扰素)、蛋白酶、犬瘟热单克隆抗体、DNA 重组产品、体外免疫诊断制品等^[1]。然而这些生物制品大多数是从生物材料中提取或者通过表达系统(真核或原核)获得的, 除了目的蛋白外, 还包括许多生物材料和表达系统(包括培养基)杂蛋白, 其中有些杂蛋白对人和动物产生不良反应(如过敏反应)^[2], 并且影响目的蛋白的活性和使用剂量, 因此为了获得具有高度安全、高效、易保存和低成本工厂化生产等特点的生物制品, 必须对生物制品进行纯化, 使生物制品活性、安全以及纯度达到临床应用级别。

蛋白纯化工艺是生物制品加工的下流环节, 也是生物制药企业最重要的生产环节。所以, 为了获得更优质的生物产品、为了适应当前生物制品发展的需要, 为生物制药企业和相关科研院所培养高质量的学生, 该研究从教学内容、教学实训和教学方法等^[3]方面进行生物制品教学以及加强学生对生物制品的后期纯化的工艺教学和实验的培养等方面探索进行总结。

1 蛋白纯化工艺教学实验改革必要性

随着自然环境和社会环境的改变, 人类和动物的新老旧病不断的出现, 如 2018 年以来非洲猪瘟^[4]、2019—2020 年全球新冠肺炎^[5]、2020 年美国暴发的乙型 H1N1 流感^[6], 以及世界各地暴发的禽流感 H5N1、H5N6 和 H5N8 等^[7]重大传染病。这些传染病对人类和动物造成极大的危害, 因此亟需对这些重大传染病及时采取防控和治疗措施, 研发诊断试剂盒、制备疫苗和单克隆抗体等。生物技术的发展, 疫苗、抗体

和细胞因子等生物制品研究时间大大地缩短, 随之也在不断地更新换代, 但对蛋白质量和纯度也要求越来越高。为了在短时间内获得高纯度的生物制品, 为了让制药学生适应新形势的发展需求, 为社会培养应用型人才, 因此对河南农业大学动物医学制药专业学生的抗原分离与纯化教学提出了新的要求, 并且要精选蛋白纯化工艺教学改革内容。

2 蛋白纯化工艺教学改革的主要内容

蛋白质纯化技术和方法的发展已经成为许多生物技术进步的必要先决条件, 所以为了激发本科生学习蛋白纯化的浓厚兴趣, 蛋白纯化内容从几个方面进行改革。

2.1 蛋白纯化的重要性 从生物材料中分离蛋白或者利用基因工程方法获得蛋白, 研究其结构与功能, 了解生命活动的规律、各种生物相互之间关系, 制备重大传染病的疫苗、研发抗体及抗病毒药物等具有重要的科学意义。2019 年 Wang 等^[8]解析了非洲猪瘟(ASFV)晶体结构, 2020 年 Yao 等^[9]解析了新冠肺炎病毒(COVID-19)的晶体结构, 这为今后研究蛋白的功能、制备疫苗及筛选抗体奠定基础; 在生物研究领域, 应用酶如蛋白酶、RNA 酶、DNA 酶和连接酶等为实验的顺利进行提供了有力保障; 食品、发酵、纺织、制革等工业需要活性酶, 为人们的生活提供方便; 在医疗方面, 干扰素、细胞因子 IL-2、单抗以及基因工程苗等为人类和动物的健康作出了重大贡献。通过给学生介绍蛋白纯化技术在病毒、各种酶以及生物药品等领域应用, 让学生认识到纯化蛋白的重要性, 引导学生学习纯化蛋白的兴趣。

2.2 蛋白纯化的策略及原则 为了让学生尽快掌握蛋白纯化方法, 首先了解蛋白纯化策略和原则^[10]: 制备的生物产品用途; 原材料的选择; 处理原材料的条件; 根据应用确定产品的纯度; 除去对人或动物有害物质和过敏原以及依据需求, 确定产品的纯化规模等。使学生在上课期间, 带着问题认真听讲, 加深对纯化知识的理解。同时在准备纯化的过程当

基金项目 转基因生物新品种培育重大专项(2016ZX08001006-010)。**作者简介** 张二芹(1976—), 女, 河南焦作人, 副教授, 博士, 从事动物免疫研究。**收稿日期** 2021-03-29

中,要让学生明白纯化的蛋白纯度、生物活性和数量;掌握目标蛋白和关键杂质的性质,简化技术选择和优化;提前准备快速检测蛋白活性/回收率和临界污染物的方法;减少每个阶段的样品处理时间,保持抗原活性;减少添加物;尽早除去有害物质(生物材料中的蛋白酶,可能降解目的蛋白);依据层析技术的特性,进行组合,除去杂质;减少纯化步数,提高产品的回收率,缩短纯化时间。循循善诱的方式引发学生学习的积极性。

2.3 缓冲液对蛋白结构和活性的影响 蛋白质氨基酸残基的化学完整性(如 Asn 去酰胺化和 Met 氧化)和蛋白质高级结构的维持都高度依赖于溶液的 pH。因此用缓冲试剂来控制 pH 和优化蛋白质稳定性,常用缓冲液包括三羟甲基氨基甲烷、磷酸盐、醋酸、柠檬酸和甘氨酸液等, pH 为 3~10。在已知的溶液 pH 下,不同的缓冲离子会对蛋白质的化学稳定性和构象稳定性产生特定的离子效应,在自然界中既有稳定作用,也有破坏作用。例如,不同的缓冲溶液会影响干扰素和粒细胞集落刺激因子的物理化学稳定性。如柠檬酸多价羧酸缓冲液可以影响溶解度,并导致单抗在高蛋白浓度下形成凝胶,众所周知,Tris(三羟甲基氨基甲烷)和磷酸盐溶液的 pH 会分别随温度或冷冻而改变。盐影响蛋白质构象的完整性和稳定性^[11]。举例说明缓冲试剂对蛋白结构和活性的影响,促使学生巩固学过的专业理论知识,主动参与蛋白纯化方案制作,练习 DoE(Design of Experiment) 试验设计,在今后的实验中能认真分析、思考,提高解决问题的能力。

2.4 填料对蛋白纯化的影响 蛋白色谱层析是将目的蛋白从复杂的蛋白溶液中分离出来。常用的色谱层析包括离子

交换层析、疏水层析、亲和层析、凝胶过滤层析和反相层析(表 1)。离子交换层析根据蛋白表面净电荷的不同进行分离蛋白;疏水层析和反向层析都是依据蛋白的疏水性的不同分离蛋白,只是反向层析填料的表面通常比疏水填料更加疏水;亲和层析是以一个蛋白与特异性配基配对到色谱填料上,并且与配基具有可逆性的相互作用,如抗原和抗体;凝胶过滤层析也称为分子筛,根据蛋白分子量的大小分离蛋白。每种填料依据颗粒大小和分辨率又分为许多种类,以 Q 阴离子填料为例,填料颗粒越大,分标率越低,相反,填料颗粒越小,分辨率越高。生产这些填料的公司有中国的博格隆生物技术有限公司和纳微科技有限公司,美国的 GE 公司和 BIO-RAD 公司,日本的 TOSOH 公司等。大多数纯化方案都涉及多种形式的色谱层析法,因此色谱层析已经成为蛋白纯化必要工具。不同的色谱层析技术具有不同的选择性,可以形成强大的组合用于任何生物分子的纯化,以最大限度地提高产量和减少所需的步骤。学生根据蛋白纯化需要组合不同的色谱层析,才能达到自己想要的蛋白纯度。理想情况下,蛋白纯化过程^[10]包括样品制备、萃取和澄清(透析过滤和超滤)以及蛋白纯化的 3 个环节,即蛋白捕获、中间纯化和精细纯化(图 1)。在捕获阶段,分离、集中和稳定目标产品;在中间纯化阶段,去除大部分的杂质,如其他蛋白质、核酸、内毒素和病毒;在精细纯化阶段,去除任何剩余的痕量杂质或密切相关的物质来达到高纯度。因此让学生掌握每个环节的不同,除掉的杂物也不相同,只有 3 个环节的填料最佳组合,才是保证快速方法开发以及较短时间获得纯产品的关键。

表 1 纯化填料在 CIPP 中的应用
Table 1 Application of purified fillers in CIPP

纯化层析 Purification chromatography	蛋白性质 Protein properties	主要特征 Main features	捕获 Capture	中间纯化 Intermediate purification	精细纯化 Polishing	蛋白上样缓冲液 Protein loading buffer	蛋白洗脱缓冲液 Protein elution buffer
IEX	带电性质	高分辨率高结合能力, 高速度	+++	+++	+++	低离子强度缓冲液	含 1M NaCl 上样缓冲液
HIC	疏水性	良好的分辨率, 良好的结合能力, 高速	++	+++	+	高离子强度缓冲 (NH) ₂ SO ₄	低离子强度缓冲液
GF	蛋白大小	高分辨率		+	+++	水溶性缓冲液	蛋白上样缓冲液
AC	配体特异性	高分辨率高结合能力, 高速度	+++	+++	++	特异的结合缓冲液	特异的洗脱缓冲液
RPC	疏水性	高分辨率		+	+++	水溶液中添加三氟乙酸、乙腈	三氟乙酸、乙腈影响生物活性

注: CIPP. 捕获、中间纯化以及精细纯化; IEX. 离子交换层析; HIC. 疏水相互作用层析; RPC. 反相层析; GF. 凝胶过滤层析; AC. 亲和层析。“+”表示填料在 CIPP 中的应用适合程度, + 较适合, ++ 适合, +++ 最适合

Note: CIPP. Capture, intermediate purification, polishing; IEX. Ion exchange chromatography; HIC. Hydrophobic interaction chromatography; RPC. Reverse phase chromatography; GF. Gel filtration; AC. Affinity chromatography. "+" indicates the suitability of the filler in CIPP, + More suitable; ++ Suitable; +++ Most suitable

3 教学实训

兽生物制品学是一门应用性学科,学生须将课本上学到的纯化理论知识与生产实践结合起来,才能更好地融会贯通。所以课堂实验操作^[12-15]练习之前,回顾蛋白纯化目的和意义、纯化策略以及蛋白纯化遵循原则,如建立蛋白纯化快速的检测方法、不同填料之间的如何搭配等。实验课上给定已知蛋白,让学生学会使用分子生物学软件,分析蛋白的性

质,自己设计试验,挑选缓冲液和试剂,装填料柱,进行手动操作练习蛋白纯化,初步掌握蛋白纯化流程;其次教师组织学生到科研单位(动物免疫学重点实验室)观看蛋白纯化自动化仪器操作过程,认识纯化仪器 AKTA、过滤仪器以及离心机等仪器,学会使用仪器,带着问题进行仔细观察教师和博士生纯化蛋白的整个流程,加深认知蛋白纯化工艺;最后带领学生参观生物制品制造企业,了解生物制品规模化生产,

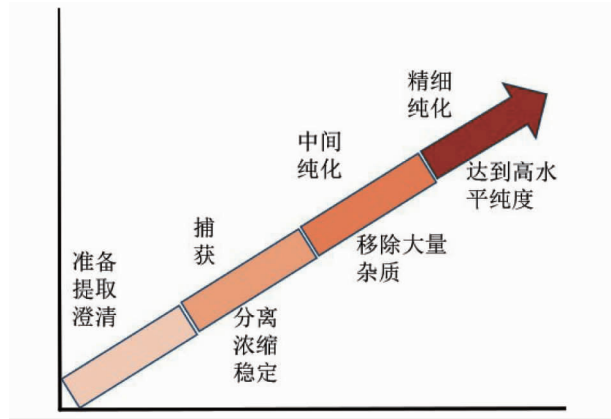


图1 蛋白纯化过程

Fig.1 Protein purification process

实地观察蛋白纯化工艺放大过程,逐步地从课堂理论知识过渡到实验室基本操作过程以及进一步了解蛋白纯化自动化操作流程,让学生更深一步掌握蛋白纯化一系列工艺流程,真正做到学以致用,为研发单位和企业培养一批应用型人才。

4 教学手段与方法

4.1 课堂教学 通过上课讲解,首先让学生获得大量的纯化蛋白知识理论,及时进行提问,与学生进行互动,把理论知识掌握的更牢固,充分提高教学效率。其次教师每天要查阅大量的新知识,及时给学生补充新内容。课堂上列举生活中经常应用的药物或者蛋白,例如流感 HA 蛋白、猪瘟 E2 蛋白和白蛋白等,讲解这些蛋白的纯化过程,激发学生学习的兴

趣和热情。同时借助多媒体教学,添加一些图片、动画以及蛋白纯化视频,丰富教学内容,吸引学生的注意力,学生发现问题,课堂当场解决,提高学生积极主动学习的乐趣^[14-15]。

4.2 网络教学 2020 年受新冠肺炎的影响,大中小學生不能走进教室进行正常上课,为了不耽误学生学习的进程,国家主张“停课不停学”政策,所以在特殊时期,网络教学^[16-18]成为另一种教学方式。在网上开课之前,教师们纷纷响应国家的号召,录制网络视频,或者通过超星、金课建设、钉钉和腾讯视频直播给同学们上课。学生能在上课时间准时听课和学习,通过视频与教师们进行互动交流、讨论问题,也可以下载课件回放多次听课,弥补课堂中的不足,起到了加深理解、解惑问题的作用。同时教师在网络上布置作业,再次巩固当天学习的知识。为了让学生充分利用现代化信息技术,教师给学生介绍一些生物制品相关的网站如生物谷和中国生物技术网,学生利用课余时间浏览网站,可以查看各种期刊发布的新内容、新技术和新方法,如新冠、非洲猪瘟和流感疫苗等的不同制备方法、免疫保护效果,调动学生主动学习新知识、新内容的积极性。

4.3 学生考核方式 为了让学生在短时间内掌握抗原纯化方法,提高学生的分析能力、动手能力以及主动解决问题的能力,对学生的实验技能按照百分制进行考核,例如纯化水稻中的新城疫 F 蛋白^[19],进行百分制考核^[20](表 2)。总之对学生进行多方面考核,既锻炼学生的思考、动手以及解决问题的能力又体现了学生们团结合作精神。

表 2 实验考核的内容

Table 2 Contents of experimental assessment

实验分数 Experimental score	实验考核内容 Experimental assessment content	实验具体方案 Experimental specific plan
20	设计方案	首先利用软件分析 F 蛋白性质,其次筛选缓冲液,然后筛选填料,最后写出纯化的具体方案
20	实验技能	配制 F 蛋白提取液、填料平衡液和 F 蛋白洗脱液,手动装填料,进行实验操作,检测 F 蛋白的活性及纯度
20	互帮互助	遇到问题,学生之间进行沟通、讨论,共同解决问题协作能力,如实验中缓冲液出现问题或者填料柱子中有气泡,影响纯化,怎么解决等
20	实验报告	考查学生的前期整体设计方案,分析实验结果,思考实验中遇到的问题
20	蛋白纯化环境	蛋白纯化需在干净卫生的实验条件下操作,学生多、实验室中的灰尘和杂物多,影响填料的使用寿命、实验进程和结果,因此每次做实验学生应自觉进行分工合作

5 总结

生物药物的品质关系到人类和动物安全,蛋白的纯度决定生物品质,这充分说明蛋白纯化的重要性,因此尝试着通过教学内容、教学实训以及教学方法改革蛋白纯化的内容,让学生掌握蛋白纯化的意义、纯化蛋白遵循的原则以及不同填料的组合和应用,使得学生在蛋白纯化技术方面得到全面的锻炼,也为制药专业学生今后发展和就业奠定了基础。

参考文献

[1] 姜平. 兽医生物制品学[M]. 3 版. 北京:中国农业出版社,2015.
 [2] HUBY R D, DEARMAN R J, KIMBER I. Why are some proteins allergens? [J]. *Toxicol Sci*, 2000, 55(2): 235-246.
 [3] 陈瑞爱, 贺东生. 《兽医生物制品学》教学改革的探索[J]. *中国兽药杂志*, 2014, 48(6): 62-64.
 [4] GALINDO I, ALONSO C. African swine fever virus: A review[J]. *Viruses*, 2017, 9(5): 1-10.

[5] 郎明健, 张智, 付国齐, 等. 新型冠状病毒肺炎向重型发展的临床特征及实验室指标[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2020, 27(1): 23-26.
 [6] 李刚. 甲型 H1N1 流感病毒的分子特征[J]. *首都医科大学学报*, 2009, 30(3): 267-270.
 [7] ZENG X Y, CHEN P C, LIU L L, et al. Protective efficacy of an H5N1 inactivated vaccine against challenge with lethal H5N1, H5N2, H5N6, and H5N8 influenza viruses in chickens[J]. *Avian Dis*, 2016, 60: 253-255.
 [8] WANG N, ZHAO D M, WANG J L, et al. Architecture of African swine fever virus and implications for viral assembly [J]. *Science*, 2019, 366(6455): 640-644.
 [9] YAO H P, SONG Y T, CHEN Y, et al. Molecular architecture of the SARS-CoV-2 Virus[J]. *Cell*, 2020, 183(3): 730-738.
 [10] GE Healthcare. Protein purification handbook [M]. GE Healthcare, 2010: 1-98.
 [11] KAMERZELL T J, ESFANDIARY R, JOSHI S B, et al. Protein-excipient interactions: Mechanisms and biophysical characterization applied to protein formulation development [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, 63(13): 1118-1159.

所有与论文数据、图表相关的 Design-expert 软件截图,任课教师以审稿专家标准根据大论文完成质量,按投稿期刊要求给予成绩评定,课程最后要求学生上交课堂报告及大论文的所有材料(大论文、报告 PPT、Design-expert 文件、案例文章)。

课程期末大论文撰写是对学生课程知识掌握情况检验的最后环节,通过该过程的训练,学生分析解决问题的能力、试验设计及软件应用的能力、论文撰写的能力得到进一步提高,为研究生发表学术论文和撰写学位论文打下坚实的基础。东北林业大学农业机械化专业 2018 级 8 名硕士研究生采用了改革后的教授、考核方式,大论文中有 6 名选择 BBD 试验,2 名选择正交试验,由于 CCD 试验较难因此无人选择,大论文存在一定的抄袭问题,硬性的软件数据分析在一些细节知识上,仍存在知其然不知其所以然的问题,如响应面回归模型的失拟检验、参数优化的图形解、试验设计的编码等问题,课程平均成绩 83.6 分,标准差 10.8,达到良好水平,其中优秀 3 名、良好 3 名、中等 1 名、及格 1 名,中等及及格成绩的学生课程报告和大论文皆存在一定的问题。经调查,该级研究生直至毕业,有 3 名参与过文章发表,毕业学位论文中有 7 名研究生用到单因素试验、正交试验和响应面试验,并由 Design-expert 进行的数据分析,做到了将所学的知识用到解决实际问题当中。

3 结语

为实现试验设计与统计的教学目的,激发学生学习兴趣,调动学生自主性,降低学习难度,培养学生利用课程所学知识解决实际问题的能力,将 Design-expert 试验设计分析软件引入到农业机械化专业研究生试验设计与统计的课程教学中,对包括教学内容、课程资源、教学模式及考核方式等方

面进行了改革实践。实践结果表明,利用 Design-expert 完成试验设计与统计分析,可改善学生知识结构,提升学生应用能力,同时课程的改革实践锻炼了学生的文献查阅、语言表达、写作技能、科学研究等方面的能力,提升了学生的综合素质,整体教学质量显著提高。但是,要使 Design-expert 与试验设计与统计有机结合,促进课程教学水平的持续提升,尚需在今后的教学研究中进一步深入探索,建议其他兄弟院校可结合 Design-expert 软件进行试验设计类课程教学,因为学生需要掌握实际的试验设计与数据处理的能力,而非单纯的理论知识。

参考文献

- [1] 任晓锋,朱文静. 农业推广硕士《现代农业知识产权与保护》课程的教学实践与探讨[J]. 农业工程,2013,3(6):137-139.
- [2] 周玉梅,马稚昱,韦鸿钰,等. 农业机械化农业推广硕士教学质量保障体系构建的初步探讨[J]. 科技资讯,2017,15(12):124-125.
- [3] 王雯,张雄. 涉农专业试验设计与统计分析教学改革与实践[J]. 安徽农业科学,2015,43(19):382-383.
- [4] 马娟娟. Excel 和 DPS 在《试验设计与分析》教学中的互补优势[J]. 教育现代化,2019,6(47):257-258.
- [5] 孙海艳,汤青林,魏大勇,等. SPSS 统计软件在生物统计及试验设计课堂及实验教学中的应用[J]. 安徽农业科学,2020,48(19):273-275.
- [6] 谭启玲,任涛,党丽娜,等. SPSS 统计软件在提高生物统计学课程教学效果中的应用[J]. 安徽农业科学,2016,44(31):245-246,251.
- [7] 李国雷,刘勇. SPSS 统计软件在林业试验设计课程中的应用[J]. 中国林业教育,2010,28(5):66-68.
- [8] 张东,赵娟,鲍露. SPSS 软件在试验设计与分析课程教学中的应用[J]. 安徽农业科学,2013,41(23):9847-9849,9852.
- [9] 郑杰,赵肃清. R 软件在《试验设计与数据处理》教学中的应用[J]. 广东化工,2013,40(9):180-181,165.
- [10] 李彦杰,周大祥,杨俊年,等. 基于 Minitab 辅助的生物统计教学实践[J]. 湖北函授大学学报,2014,27(11):115-116.
- [11] 刘旭华,杜晓林,张录达. Excel 软件在《试验设计与分析》课程教学中的应用[J]. 天津农学院学报,2010,17(2):36-39.
- [12] 王超峰. 基于响应面法的汽车发电机磁极锻造成形工艺多目标优化[D]. 郑州:华北水利水电大学,2017.
- [13] 洪璇,陈仲巍,李鹤宾,等. 生物制药技术专业“发酵工程”教学改革探索与实践[J]. 微生物学通报,2016,43(4):786-792.
- [14] 赵卓,郭刚,吴超,等. 以科研优势带动研究型教学的《生物技术制药》教学改革[J]. 西南师范大学学报(自然科学版),2014,39(8):155-157.
- [15] 夏潇潇,葛春梅,吴茜茜,等. 生物工程与工艺模块化改革的探索与实践[J]. 生物学杂志,2016,33(1):116-118.
- [16] 邹祥,胡昌华,刘雪梅. 生物制药工艺学课程教学改革的探索与实践[J]. 微生物学通报,2006,33(1):166-168.
- [17] 曾浩,罗萍,郭刚,等. 药学专业生物技术制药教学改革的实践[J]. 现代医药卫生,2008,24(4):630-631.
- [18] 樊斌治,侯亚义. 生物制药专业中免疫学教学的改革探讨[J]. 中国免疫学杂志,2016,32(9):1377-1380.
- [19] 张学新. 对分课堂:大学课堂教学改革的新探索[J]. 复旦教育论坛,2014,12(5):5-10.
- [20] MA F S,ZHANG E Q,LI Q M,et al. A plant-produced recombinant fusion protein-based Newcastle disease subunit vaccine and rapid differential diagnosis platform[J]. Vaccines,2020,8(1):1-15.
- [21] 史玲玲,马超. 北京林业大学“生物制药”课程实验教学改革初探[J]. 中国林业教育,2014,32(6):63-65.

(上接第 279 页)