

## 牛胰腺中活性蛋白质的液相色谱分离纯化方法进展

杨晓明<sup>1,2</sup>, 耿信笃<sup>2,3\*</sup>

(1. 平凉医学高等专科学校, 甘肃 平凉 744000; 2. 西北大学合成与天然功能分子化学教育部重点实验室, 陕西 西安 710069; 3. 西北大学现代分离科学研究所, 陕西 西安 710069)

**摘要**: 牛胰腺中含有多种活性蛋白, 其中许多蛋白已被开发为有利于人类健康的药物。从牛胰腺中分离纯化得到的蛋白药物是一种有高附加值的高技术产品。现代生物技术中所用的大多数有价值的活性蛋白产品的制备仍然依赖于不同的液相色谱法。本文综述了牛胰腺中活性蛋白质的提取方法以及以色谱分离为主的分离与纯化技术, 为开展从天然产品中提取并应用蛋白质提供一定的参考。

**关键词**: 色谱; 制备色谱; 分离与纯化; 蛋白药物; 牛胰腺

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2011)03-0199-06

## Recent development for purification of active proteins from bovine pancreas with liquid chromatography

YANG Xiaoming<sup>1,2</sup>, GENG Xindu<sup>2,3\*</sup>

(1. Pingliang Medicine College, Pingliang 744000, China; 2. Ministry of Education Key Laboratory of Synthetic and Natural Functional Molecular Chemistry, Northwest University, Xi'an 710069, China; 3. Institute of Modern Separation Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

**Abstract**: Many active proteins exist in bovine pancreas and some of them have become protein drugs for human health. These protein drugs sourcing from bovine pancreas are also high-tech product having high economic benefit. In the modern biological technology, the preparation of most active protein products relies on various liquid chromatographic techniques. The recent development of extraction of the active proteins from bovine pancreas and their separations and purifications, mainly with chromatographic methods are reviewed in this paper. It would be expected to be helpful for the preparation and application of the active proteins from natural products.

**Key words**: chromatography; preparative chromatography; separation and purification; protein drug; bovine pancreas

活性蛋白质可从天然的动、植物产品中提取或经 DNA 重组获得。动物胰腺被称之为一个天然的生化工厂, 含有许多有利于人类健康的活性蛋白质。从动物胰腺中提取蛋白质是一个古老的纯化技术, 又是一个科学家一直在努力研究和不断改进的方法, 其中许多生产和纯化工艺都受到专利保护。分离科学的快速发展出现了许多新理论、新方法、新的分离介质和新工艺, 有的已用于从动物胰腺中提取和纯化蛋白质, 很有必要将这些新的方法和新工艺进行介绍和评论。

### 1 样品处理

蛋白质是包括人类在内的各种生物有机体的重要组成成分, 生物有机体的生长、发育、遗传和繁殖等一切生命活动都离不开蛋白质。研究蛋白质首要的步骤是将目标蛋白质从复杂的大分子混合物中分离纯化出来, 从而得到高纯度的、具有生物学活性的目的物。

样品处理是从生物体内提取蛋白质的第一步。大多数动物蛋白质会因种类的不同处于不同的组织

\* 通讯联系人: 耿信笃, 教授, 博士生导师, 主要研究生物大分子的色谱分离。E-mail: xdgeng@nwu.edu.cn.

基金项目: 西北大学合成与天然功能分子化学教育部重点实验室开放基金资助项目(KF09012).

收稿日期: 2010-12-03

或肌肉内,且脂肪层常常包围在外部。对于其分离和纯化而言,这种脂肪层会影响到组织破碎后的蛋白质分离。因此,在提取前通常应先对动物组织原料进行适当的预处理,仔细地剔除结缔组织和脂肪组织,然后再进行破碎,这样就可以释放出更多的蛋白质。

牛胰腺是牛体内非常重要的腺体,包括外分泌组织和内分泌组织。内分泌组织可分泌胰岛素等,这些激素经过血液散布到动物体的各个部分;外分泌组织分泌胰液,胰液通过胰管进入肠腔中,胰液中含有多种酶,包括胰蛋白酶、胰淀粉酶、胰脂肪酶、胰糖酶与胰凝乳酶;另外牛胰脏中还含有糜蛋白酶、糜蛋白酶原、核糖核酸酶等。由于牛胰脏中含有的活性蛋白质种类太多,提取时的各种因素对蛋白质的活性影响较大。因此从牛胰脏中提取活性蛋白质时,根据提取的蛋白质种类,可以选择合适的破碎细胞的方法、提取液种类及提取液的 pH 值、提取温度等因素。

## 2 粗分离

在大多数情况下,蛋白质提取液中目标蛋白质的浓度都很低,为了提高蛋白质的浓度,减小样品体积,有必要对牛胰腺蛋白质提取液进行浓缩,这样有利于下一步进行蛋白质的色谱纯化。对于大规模应用,提取液的浓缩一般使用盐析法、沉淀法、超滤法、超离心法、双水相萃取和色谱法等。而新近发展的方法主要是聚合电解质沉淀法和亲和超滤法。

### 2.1 聚合电解质沉淀法

沉淀分离是已知的最古老的浓缩方法之一,其操作简便,成本低廉,不仅用于实验室中,也用于某些生产目的的制备过程,是分离纯化生物大分子,特别是制备蛋白质的最常用的方法<sup>[1-2]</sup>。通过沉淀,将目标蛋白质转入固相沉淀或留在液相中,而与杂质得到初步的粗分离。加入中性盐、有机溶剂、有机多聚物和等电点沉淀等都可以促进蛋白质的沉淀。中性盐硫酸铵溶解性高、价格低廉,对多数蛋白质都不引起变性,是应用最普遍的传统蛋白质沉淀剂。各种有机溶剂也能促进蛋白质沉淀,常用的有机溶剂有乙醇、丙酮和乙醚。

有机多聚物是近年来出现的一类重要的沉淀剂,包括不同相对分子质量的聚乙二醇、葡聚糖、右旋糖酐硫酸钠等,这是因为它们具有操作条件温和不易引起生物大分子变性,使用很少量的多聚物就可以沉淀相当多的生物大分子,以及沉淀后有机聚合物容易去除等优点。溶液中的有机多聚物可以吸

收蛋白质周围的溶剂化层中的水分子,能够增加蛋白质与蛋白质的相互作用,提高沉淀量;应用最多的是聚乙二醇<sup>[1]</sup>。

近年来以聚合电解质作为沉淀剂,从大体积生物提取液中分离和浓缩生物大分子的技术发展迅速,提供了浓缩和纯化低含量目标蛋白质的可能性。在合适的 pH 值时,蛋白质所带的净电荷或正或负,带正电荷的蛋白质与阳离子聚合电解质结合形成难溶性的蛋白质-聚合电解质复合物,反之带负电荷的蛋白质与阴离子聚合电解质结合形成难溶性的蛋白质-聚合电解质复合物<sup>[3]</sup>。聚合电解质的有效性依赖溶液的 pH 值,阴离子聚合电解质常用在 pH 值小于蛋白质的等电点时,阳离子聚合电解质应用在 pH 值大于蛋白质的等电点时。在适当的实验条件下,这些蛋白质-聚合电解质相互作用生成不溶的大聚集体沉淀,当改变 pH 值或盐浓度又重新溶解<sup>[4]</sup>,这是一种分离蛋白质的有效方法,具有较高的选择性。总之,可用不同的沉淀机理来进行蛋白质的亲和沉淀,所用的聚合电解质主要有带正电荷的聚乙烯亚胺、带负电荷的聚丙烯酸钠和聚乙烯磺酸盐<sup>[3,5,6]</sup>,如 Boeris 等<sup>[3]</sup>最近用强阴离子聚合物电解质聚乙烯磺酸盐在 pH 2.5 时沉淀、离心,再在 pH 8.0 的条件下溶解的方法从牛胰腺中分离和纯化了糜蛋白酶。通过一步沉淀分离可使糜蛋白酶的活性回收率达到 61%。

聚合电解质被用来从牛胰腺的提取液中通过沉淀分离制备胰岛素、核糖核酸酶、胰蛋白酶、糜蛋白酶和胰蛋白酶原<sup>[3-7]</sup>。例如 Shin 等<sup>[7]</sup>以二-(2-乙基己基)磺基琥珀酸钠作为亲和配基有选择地从牛胰腺中沉淀目标蛋白质  $\alpha$ -糜蛋白酶和核糖核酸酶 A。同时文献<sup>[8]</sup>描述了用亲和沉淀法分离纯化蛋白质的沉淀机制,并认为聚合物的选择是亲和沉淀的关键。

### 2.2 亲和超滤技术

亲和超滤技术是膜分离技术的一种,是亲和相互作用原理与膜分离技术相结合的新型分离技术<sup>[9]</sup>,是从混合物中分离蛋白质的一种极为有效的方法,它经常只需经过一步处理即可使某种待提纯的蛋白质从很复杂的蛋白质混合物中分离出来;它以蛋白质和配体之间的特异性亲和力作为分离的基础,具有高度的选择性和纯化效率,其一步分离操作中的纯化程度有时可达到 1 000 倍以上<sup>[10]</sup>。该技术在生物化学、分子生物学和医药学等领域中有着广泛的应用,近年来医药生物技术产业的快速发展使其在生物工程下游技术中发挥越来越重要的作

用,已从实验室的科学研究应用到大规模的工业化生产中,发展前景引人瞩目<sup>[9-11]</sup>。

随着亲和超滤技术的发展,也有研究者应用亲和超滤技术从牛胰腺中分离纯化活性蛋白质。例如 Teke 与其合作者<sup>[12]</sup>提出了一种新的方法用于有效地纯化牛胰腺磷脂酶 A2。该法利用壳聚糖-戊二醛-磷脂酰乙醇胺混合物,通过亲和超滤技术截留结合了配基的聚合物,以达到从牛胰腺中纯化高纯度、高产量磷脂酶 A2 的目的。亲和超滤技术纯化蛋白质是一种有效的可大规模连续操作的方法。Zhou 等<sup>[13]</sup>利用聚(乙烯-共-乙烯醇)和磷酸胆碱聚(乙烯-共-乙烯醇)中空纤维膜来测量纯水与蛋白质溶液的流量,并对它们的流量进行了比较研究,其流量变化量分别为 27% 和 38%。Mukherjee 等<sup>[14]</sup>以胰蛋白酶抑制剂作为亲和配基,对聚砜膜和聚醚膜分离胰蛋白酶进行了比较研究,在聚醚膜上胰蛋白酶的质量回收率高达 70%,而聚砜膜上回收率仅为 46%;胰蛋白酶的活性回收率在聚醚膜(74%)和聚砜膜(70%)上大体相同。同期发展起来的仿生亲和小分子配基新技术,对要纯化的目标蛋白质在组合生物分子库和组合化学分子库中筛选其相应的亲和配基,然后将其固定到支持介质上,这种组合出来的亲和配基比天然生物分子性质更稳定,特异性及重复性更好<sup>[15]</sup>。

### 3 色谱分离

色谱法是分离纯化蛋白质的一种极为有效的方法,蛋白质在组织或细胞中是以复杂的混合物形式存在的,每种类型的细胞都含有上万种的不同蛋白质,因此蛋白质的分离、提纯、制备和鉴定是当今分离科学中的研究热点之一,在解决实际问题时往往要采取几种色谱方法联合使用。一般情况下,通过离子交换色谱(IEC)、亲和色谱(AFC)、疏水作用色谱(HIC)、反相色谱(RPLC)、排阻色谱(SEC)及多维液相色谱(mD-LC)来分离提纯活性蛋白质。从牛胰腺中分离纯化常用的蛋白质实例见表 1。

表 1 牛胰腺中活性蛋白质的分离纯化实例

Table 1 Examples of the separation and purification of active proteins from the bovine pancreas

Target protein	Separation mode	Ref.
Insulin	IEC/HIC	[ 16 ]
Ribonuclease	IEC	[ 17 ]
Trypsin	IEC/HIC	[ 18 ]
	AFC/IEC	[ 19 ]
Chymotrypsin	IEC/HIC	[ 18 ]

IEC : ion exchange chromatography ; HIC : hydrophobic interaction chromatography ; AFC : affinity chromatography.

因为 RPLC 的分离度高,且胰岛素在 RPLC 柱上不失活,故 RPLC 是分离纯化胰岛素的重要方法之一<sup>[16]</sup>,但该法容易引起牛胰腺中其他蛋白质的失活,因此很少用于胰岛素以外的其他蛋白质的分离纯化。SEC 主要依据分子体积大小进行蛋白质的分离纯化,由于它的峰容量较小,不能分离大小相同或非常相近的分子,因此近年来 SEC 主要用于纯化的最后一步——除盐,有时也与其他色谱方法结合起来进行蛋白质的分离纯化。本文着重对 IEC、AFC、HIC 及 mD-LC 对活性蛋白质分离纯化的研究进展进行描述与评价。

#### 3.1 IEC

IEC 使用方便,费用低廉。因其分离是在接近生理条件(pH 值,盐水溶液,室温)下进行的,故所得蛋白质活性回收率高,是纯化蛋白质应用最广泛的方法之一<sup>[20-23]</sup>。由于大多数蛋白质含酸性基团多于碱性基团,等电点较低,因此 IEC 往往在略偏碱性的条件下采用阴离子交换剂进行蛋白质的分离和纯化。在生理 pH 值时,大多数蛋白质的净电荷是负值,因此阴离子交换色谱应用最普遍。

IEC 广泛地应用于分离各种生物大分子,且在实际工业纯化过程中包括一步或几步离子交换的步骤,或者与其他机理的色谱方法相结合,很少单独使用。例如 Sana 等<sup>[17]</sup>报道了用阳离子交换色谱和阴离子交换色谱纯化核糖核酸酶。Dallas Johnson 与他的合作者<sup>[19]</sup>从糜蛋白酶和胰蛋白酶的混合物中分离纯化胰蛋白酶的最好方案是运用 IEC 和 AFC。利用 IEC 从牛胰腺中提取活性蛋白质的研究报道主要集中在 20 世纪 70-80 年代。在蛋白质分离提纯研究和工业制备中,IEC 是不可缺少的技术<sup>[24]</sup>。研究者利用 IEC 与其他色谱模式构建二维液相色谱(2D-LC)或 mD-LC 来分离提纯蛋白质<sup>[25-31]</sup>。

#### 3.2 AFC

AFC 技术是目前分离纯化生物活性化合物和药物蛋白质等生物大分子最有效的方法之一。AFC 较常规的色谱技术有许多优点,其生物亲和特异性和选择性是其他色谱方法所不能比的,至少在实验室规模可以达到几乎 100% 的回收率,纯度提高 1 000 倍以上<sup>[1]</sup>。因而 AFC 可以大大减少纯化蛋白质所需要的步骤,节约了可观的时间和成本,已经广泛应用于生物分子的分析分离和纯化制备中<sup>[32]</sup>。

近年来发展起来的以金属螯合色谱<sup>[32-36]</sup>、氨基酸和多肽亲和色谱<sup>[32,36-38]</sup>以及染料亲和色谱<sup>[32,38]</sup>为代表的 AFC 技术获得了快速的发展。2001 年 Chaga<sup>[36]</sup>对金属螯合亲和色谱的发展进行了总结性

回顾。例如 Melissis 等<sup>[39]</sup>研究了谷胱甘肽结构类似物亲和吸附剂,用此种亲和吸附剂分别纯化 3 种作用于谷胱甘肽的酶 NAD<sup>+</sup>、甲醛脱氢酶和谷胱甘肽-S-转移酶,效果良好。Ounis 等<sup>[40]</sup>研究指出肝磷脂亲和色谱更适用于碱性蛋白质和酶的提取分离和富集浓缩。AFC 用于从牛胰腺中分离纯化活性蛋白质的文献报道主要出现在 20 世纪 80 年代<sup>[32]</sup>。近年来,AFC 主要用于重组蛋白质和蛋白质折叠液相色谱(PFLC)的表达、复性、分离和同时纯化<sup>[41,42]</sup>,在色谱柱上将目标蛋白质与其他组分分开,还要在色谱柱上进行包涵体蛋白折叠。现代生物技术中所用的大多数有价值蛋白质产品的制备仍然有赖于不同机理的液相色谱法,在文献中列举的 30 种新的蛋白质 PFLC 法的应用实例中,涉及 AFC 法达 12 种,占 40%,并指出其复性并纯化后的蛋白质的纯度均可达到 95% 以上,能够满足于治疗或诊断化蛋白质的纯度的要求<sup>[42]</sup>。

### 3.3 HIC

蛋白质分离纯化的目的是获得具有生物活性的物质,而生物活性的保持与蛋白质的空间结构的完整性密切相关。在分离纯化过程中一旦破坏了蛋白质的空间结构,就可能使蛋白质失去生物活性。与 IEC 和 AFC 一样,HIC 的分离过程采用温和的实验条件,有效地保护了蛋白质的空间结构不受破坏,保证蛋白质有高的生物活性回收率,因此 HIC 也是分离纯化活性蛋白质最有效的手段之一<sup>[43]</sup>。

HIC 是利用盐-水体系中流动相的疏水基团和固定相配基之间的疏水作用力的不同而使样品组分得以分离的一种色谱方法。Tsai 与其合作者<sup>[44]</sup>通过不断的改进和探索,开发出疏水性适中的配基,如聚乙烯二醇和聚丙烯二醇等。在分离过程中,通过改变洗脱液的盐浓度、温度和 pH 值等因素,从而改变其极性,使吸附在固定相上的不同蛋白质根据其疏水性的差异先后被解吸下来,使蛋白质的分离纯化获得理想的效果,达到分离目的。

HIC 正是利用蛋白质之间疏水性的差异进行蛋白质组分的色谱分离<sup>[45]</sup>。Queiroz 等<sup>[46]</sup>对疏水作用色谱的理论、保留机制和发展进行了评述。同样,近年来主要通过 HIC 与其他色谱模式构建二维液相色谱技术来分离纯化活性蛋白质<sup>[16,18,47,48]</sup>。最近,王骊丽等<sup>[43]</sup>用 HIC 柱从包涵体中快速制备重组人干细胞因子,得到的蛋白质纯度为 95.5%,质量回收率为 49.6%。利用 HIC 分离纯化的蛋白质仍然保持着高的天然活性和生物学功能。

### 3.4 mD-LC

现代色谱法已成为分析化学中复杂体系组分分离和分析的强有力的工具,对于复杂样品的分离,使用一种分离模式往往不能提供足够的分辨率;而组合不同的分离模式构建多维体系是解决这一问题的有效途径<sup>[49-51]</sup>。1984 年 Giddings 提出多维分离的概念,随着控制技术和微加工技术的发展,多维分离技术得到较快的发展,并已在生命科学、环境科学、聚合物科学等诸多领域得到了应用。

mD-LC 实现的关键技术是样品在两种分离模式之间的转换。2D-LC 大多使用两支或更多支色谱柱,通过一定的切换接口实现样品的柱间转换。根据切换过程中切割组分是否全部进入第二维中,将二维柱切换系统分为部分切换和整体切换两种模式。部分切换模式只是第一维分离得到的部分感兴趣的组分进入第二维色谱中进行分析,部分模式不能获得样品的所有组分的信息。整体模式就是第一维洗脱分离的全部组分进入第二维中进一步分析,从而获得样品的所有组分的信息,实现真正意义上的全 2D-LC 分离。Regnier 等<sup>[52]</sup>认为,由于细胞组成的复杂性,针对全部蛋白质的分离,采用一维分离模式不可能达到理想的分离效果。mD-LC 的分离技术,因便于组合不同的色谱模式,可以实现对样品分子尺寸大小差异较大的蛋白质、低丰度的蛋白质以及疏水性蛋白质等的分析。同时,易与质谱连接,具有灵敏度高、分析速度快、自动化程度高等优点。因此 mD-LC 作为一项重要技术,在蛋白质组学研究中发挥着重要的作用。

Yuan 等<sup>[53]</sup>建立了一种新的排阻色谱-反相液相色谱组合的二维液相色谱(SEC-RPLC)分离模式和技术平台,能够分离复杂的蛋白质混合样品,并具有较高的分辨率和峰容量。近期文献[18,54,55]报道了一种在线二维液相色谱分离装置用于蛋白质的分离,以商品的 WCX-HIC 双机理柱分别对牛胰腺中的胰凝乳蛋白酶和胰蛋白酶进行 2D-LC-1C(单柱二维液相色谱)分离纯化,经过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和薄层色谱扫描测定,均获得了较高纯度的目标蛋白质,对质量回收率和活性回收率进行了测试,得到了较好的结果。同时也建立了在线单柱二维色谱快速分离活性蛋白质的液相色谱新方法。同时杨云等<sup>[16]</sup>应用 2D-LC 实现了对高纯度胰岛素的快速纯化与制备,该法相对于传统模式的色谱,对胰岛素具有更好的选择性,更适用于胰岛素在工业化生产中的分离和制备,可简化生产工艺,增加产量,提高纯度,减少色谱填料的消耗,降低生产成本。

## 4 大规模制备

规模化分离纯化蛋白质,目的是尽可能地提高产量,降低成本,故分离纯化过程还应尽可能的精简和快速。在规模化地从动物组织中制备蛋白质的过程中,主要步骤通常为3~5个:组织的选择,蛋白质的提取,蛋白质的捕获(分离、浓缩和稳定化),中间纯化(去除大量杂质),精纯(去除痕量杂质和集集体等)<sup>[56,57]</sup>。规模化分离纯化蛋白质时,要保持蛋白质的活性,减少蛋白质的变性和失活,要选择适当的操作温度和pH值,有效地控制蛋白质的变性。

在进行大规模色谱分离时,由于样品的体积很大,加样时间一般很长,成为分离过程的限制性因素,因此可以采取分批分离的方法。新发展的适用于大规模化分离的是快速蛋白质液相色谱(FPLC)<sup>[58]</sup>。FPLC在中等压力条件下工作,比传统色谱分离速度更快,分离效果好,在中试和大规模蛋白质分离纯化中显示出了强大的潜力。FPLC的主要优点是设备用塑料制成,可耐任何缓冲液,因而更加适合分离纯化蛋白质。

## 5 展望

本文所介绍的粗提和精分离技术不仅应用于从牛胰脏中分离纯化活性蛋白质,而且也从动物的其他脏器以及植物中蛋白质的提取和纯化提供了有价值的参考。在实际工作中,重要的是要依据实际样品,实现色谱条件的最优化以达到在保证产品纯度的先决条件下,获得最大的经济效益。所以,高速、高产量、高回收率和低耗、低碳和低污染的“三高”和“三低”便是实现该最大收益的有效途径,而色谱条件的优化是其中最重要的手段。

随着现代分离科学的发展,更先进、更高效的分离纯化蛋白质的方法会不断地出现、发展和完善,从粗提液中经过很少的步骤便可得到所需的高纯度的活性蛋白质,这将是现代分离科学及活性蛋白质分离纯化的发展方向。

### 参考文献:

[1] Walsh G. Proteins Biochemistry and Biotechnology. Wang H L, Tan T W, Su G F, et al, transl. Beijing: Chemical Industry Press (Walsh G. 蛋白质生物化学与生物技术. 王恒樑, 谭天伟, 苏国富, 等, 译. 北京: 化学工业出版社), 2006: 63, 71

[2] Menkhaus T J, Eriksson S U, Whitson P B, et al. Biotechnol Bioeng, 2002, 77: 148

[3] Boeris V, Romanini D, Farruggia B, et al. Process Biochem, 2009, 44: 588

[4] Matsudo T, Ogawa K, Kokufuta E. Biomacromolecules, 2003, 4: 1794

[5] Porfiri M C, Braia M, Farruggia B, et al. Process Biochem, 2009, 44: 1046

[6] Malpiedi L P, Romanini D, Pico G A, et al. Sep Purif Technol, 2009, 65: 40

[7] Shin Y O, Rodil E, Vera J H. Biochem Eng J, 2004, 17: 91

[8] Roy I, Gupta M N. Curr Sci, 2000, 78: 587

[9] Jonsson J A, Mathiasson L. J Chromatogr A, 2000, 902(1): 205

[10] Romero J, Zydney A L. Biotechnol Bioeng, 2002, 77: 256

[11] Klein E. J Membrane Science, 2000, 179(12): 1

[12] Teke M, Telefoncu A. Sep Purif Technol, 2008, 63: 716

[13] Zhou J, Meng S, Guo Z, et al. J Membr Sci, 2007, 305: 279

[14] Mukherjee S, Roy D, Bhattacharya P. Sep Purif Technol, 2008, 60: 345

[15] Li S C, Chen Z L. Pharmaceutical Biotechnology (李世崇, 陈昭烈. 药物生物技术), 2002, 9(3): 175

[16] Yang Y, Kang W Q, Geng X D. Journal of Northwest University: Natural Science Edition (杨云, 康为清, 耿信笃. 西北大学学报: 自然科学版), 2010, 40: 233

[17] Sana B, Ghosh D, Saha M, et al. Microbiol Res, 2008, 163: 31

[18] Zhang H Q. [MS Dissertation]. Xi'an: Northwest University (张会强. [硕士学位论文]. 西安: 西北大学), 2009

[19] Dallas Johnson K, Clark A, Marshall S. Comp Biochem Physiol B, 2002, 131: 423

[20] Chen W D, Dong X Y, Bai S, et al. Biochem Eng J, 2003, 14: 45

[21] Wesselingh J A, Bosma J C. AIChE J, 2001, 47: 1571

[22] Hanco V P, Rohrer J S. Anal Biochem, 2002, 308: 204

[23] Krenkova J, Gargano A, Lacher N A, et al. J Chromatogr A, 2009, 1216: 6824

[24] Gooding K M, Regnier F E. HPLC of Biological Macromolecular. 2nd Edition. New York: Marcel Dekker Inc., 2002

[25] Mawuenyega K G, Kaji H, Yamauchi Y. J Proteome Res, 2003, 2: 23

[26] Washburn M P, Wolters D, Yates J R. Nat Biotechnol, 2001, 19: 242

[27] Jacobs J M, Mottaz H M, Yu L R. J Proteome Res, 2004, 3: 68

[28] Wolters D A, Washburn M P, Yates J R III. Anal Chem, 2001, 73: 5683

[29] Mitulovic G, Stingl C, Smoluch M, et al. Proteomics, 2004, 4: 2545

[30] Maynard D M, Masuda J, Yang X Y, et al. J Chromatogr B, 2004, 810: 69

[31] Peng J M, Elias J E, Thoreen C C, et al. J Proteome Res, 2003, 2: 43

[32] Clonis Y D. J Chromatogr A, 2006, 1101: 1

[33] Devedec F L, Bazinet L, Furtos A, et al. J Chromatogr A, 2008, 1194: 165

[34] Li Y, Agrawal A, Sakon J, et al. J Chromatogr A, 2001, 909: 183

[35] Gelunaite L, Luksa V, Sudziuviene O, et al. J Chromatogr A, 2000, 904: 131

[36] Chaga G S. J Biochem Biophys Methods, 2001, 49: 313

[37] Riggs L, Sioma C, Regnier F E. J Chromatogr A, 2001,

- 924 : 359
- [ 38 ] Arnostova H , Kucerova Z , Tislerova I , et al. *J Chromatogr A* , 2001 , 911 : 211
- [ 39 ] Melissis S C , Rigden D J , Clonis Y D. *J Chromatogr A* , 2001 , 917 : 29
- [ 40 ] Ounis W B , Gauthier S F , Turgeon S L , et al. *Int Dairy J* , 2008 , 18 : 1043
- [ 41 ] Geng X D , Wang L L. *J Chromatogr B* , 2008 , 866 : 133
- [ 42 ] Wang L L , Geng X D. *Science in China Series B : Chemistry* ( 王骊丽 , 耿信笃. 中国科学 B 辑 : 化学 ) , 2009 , 39( 8 ) : 711
- [ 43 ] Wang L L , Wang C Z , Geng X D. *Chinese Journal of Chromatography* ( 王骊丽 , 王超展 , 耿信笃. 色谱 ) , 2011 , 29 ( 1 ) : 36
- [ 44 ] Tsai Y S , Lin F Y , Chen W Y , et al. *Colloids and Surf A* , 2002 , 197 : 111
- [ 45 ] Gustavsson P E , Axelsson A , Larsson P O. *J Chromatogr A* , 1999 , 830 : 275
- [ 46 ] Queiroz J A , Tomaz C T , Cabral J M S. *J Biotechnol* , 2001 , 87 : 143
- [ 47 ] Goheen S C , Gibbins B M. *J Chromatogr A* , 2000 , 890 : 73
- [ 48 ] Conder J R , Hayek B O. *Biochem Eng J* , 2000 , 6 : 225
- [ 49 ] Wang Z C , Zhang Q H , Zhao Z Y , et al. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* , ( 王智聪 , 张庆合 , 赵中一 , 等. 分析化学 ) , 2005 , 33 : 722
- [ 50 ] Li D X , Zhang L Y , Li T , et al. *Chinese Journal of Chromatography* , ( 李笃信 , 张凌怡 , 李彤 , 等. 色谱 ) , 2010 , 28 ( 2 ) : 163
- [ 51 ] Gao L , Qiao X Q , Liang Z , et al. *Chinese Journal of Chromatography* , ( 高亮 , 乔晓强 , 梁振 , 等. 色谱 ) 2010 , 28 ( 02 ) : 146
- [ 52 ] Regnier F , Amini A , Chakraborty A. *LC-GC* , 2001 , 19 : 200
- [ 53 ] Yuan H M , Zhang L H , Zhang W B , et al. *J Chromatogr A* , 2009 , 1216 : 7024
- [ 54 ] Ke C Y , Geng X D. *Chinese Science Bulletin* ( 柯从玉 , 耿信笃. 科学通报 ) , 2008 , 53( 5 ) : 614
- [ 55 ] Geng X D , Ke C Y , Chen G , et al. *J Chromatogr A* , 2009 , 1216 : 3553
- [ 56 ] Amersham Pharmacia Biotech AB. *Protein Purification Handbook*. [ 2010-12-03 ]. [http://www.biochem.uiowa.edu/donelson/Database%20items/protein\\_purification\\_handbook.pdf](http://www.biochem.uiowa.edu/donelson/Database%20items/protein_purification_handbook.pdf)
- [ 57 ] Li X K , Yuan H. *Separation and Purification of Pharmaceutical Proteins*. Beijing : Chemical Industry Press ( 李校堃 , 袁辉. 药物蛋白质分离纯化技术. 北京 : 化学工业出版社 ) , 2005 : 9
- [ 58 ] Lu J. *Protein Purification Technology and Application*. Beijing : Chemical Industry Press ( 陆健. 蛋白质纯化技术及应用. 北京 : 化学工业出版社 ) , 2005 : 9