

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.32.042

蛋白质纯化技术研究进展*

王启迪¹ 罗 坚² 全 灿^{4△} 周俊波^{1△} 李增兰^{2,3}

(1 北京化工大学机电工程学院 北京 100029; 2 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室 北京 100190;

3 中国科学院大学 北京 100049 ; 4 中国计量科学研究院化学计量与分析科学研究所 北京 100029)

摘要: 蛋白质组学研究的基础就是蛋白质的分离。对于天然蛋白来说,可能需要一系列的纯化步骤才能获得纯度满足研究要求的蛋白质,但是蛋白质在分离过程中常常由于溶液环境变化或外力作用造成构象变化而引起失活。本文首先介绍了常用的蛋白质分离纯化技术及其研究进展,包括膜分离技术、沉淀分离技术、电泳分离技术以及层析分离技术等常用的蛋白质纯化技术,总结了现有技术存在的问题,并对近年来发展的新型蛋白质分离技术--非对称流场流分离技术进行了介绍和展望。

关键词: 蛋白质; 纯化; 层析; 非对称流场流分离

中图分类号: Q51; Q591.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2017)32-6389-04

Research Progress of Protein Purification Techniques*

WANG Qi-di¹, LUO Jian², QUAN Can^{4△}, ZHOU Jun-bo^{1△}, LI Zeng-lan^{2,3}

(1 College of Mechanical and Electrical Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing, 100029, China;

2 National Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing,

100190, China; 3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100493, China;

4 Division of Metrology in Chemistry, National Institute of Metrology, Beijing, 100029, China)

ABSTRACT: The basis of proteomics is protein separation. For natural protein, it could take a series of purification procedures to obtain targeted protein with required purity for research purposes. But the protein may lose its activity for conformational changing caused by the environmental change of solution or external force. In this review, we introduced the frequently used protein purification technologies, such as membrane separation, precipitation, electrophoresis and chromatography, and summarized the existing problems in nowadays protein purification technologies. Moreover, we introduced and prospected the application of the asymmetrical flow field-flow fractionation separation technology in protein separation and purification.

Key words: Protein; Purification; Activity; Asymmetrical flow field-flow fractionation

Chinese Library Classification(CLC): Q51; Q591.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)32-6389-04

前言

蛋白质的分离纯化是蛋白质组学研究的重要环节,蛋白质纯化技术的发展对现代生命科学的发展起着决定性的作用。蛋白质的分离纯化通常是利用蛋白质的分子量,荷电性质,疏水程度,亲和结合力和生物学活性的差异等来实现的。

常用的蛋白质分离纯化技术有膜分离技术、沉淀分离技术、电泳分离技术以及层析分离技术等。目前层析技术是蛋白纯化领域的核心技术,也是应用最多最为广泛的技术。非对称流场流分离技术 (Asymmetrical flow field-flow fractionation, AF4)是场流分离技术(field-flow fractionation, FFF)的一种,由于其能够在温和、天然的条件下进行纯化,使天然蛋白能很好地保持其活性,已被美国食品药品监督管理局(Food and Drug Ad-

ministration, FDA)列为优先发展的蛋白纯化技术。

本文介绍了常用的蛋白质纯化技术的原理及应用,分析了现有技术的局限性,并对非对称流场流分离技术在活性分离纯化中的应用进行了介绍和展望。

1 常用蛋白质分离纯化技术简介

1.1 膜分离技术

对于蛋白质这样的生物大分子来说,超滤是比较常用的膜分离技术^[1]。超滤是一种加压的膜分离技术,在一定的压力下使小分子溶质或溶剂穿过一定孔径的薄膜,而大分子溶质不能透过,留在膜的另一边,从而使大分子物质得到分离。因此,可以根据蛋白质分子大小的不同,选择不同规格的滤膜来进行超滤,就可以使蛋白质得到分离纯化。

* 基金项目:国家质检总局公益性行业科研专项(201410234);国家自然科学基金项目(21406239);

国家重点基础研究发展计划(2013CB733604)

作者简介:王启迪(1991-),硕士研究生,主要研究方向:生物分离工程,电话:010-64524731, E-mail: hbwqd0904@sina.com

△ 通讯作者:全灿,博士学位,研究员,主要研究方向:化学计量, E-mail: superfluidcan@hotmail.com;

周俊波,博士学位,教授,主要研究方向:化工分离技术与设备设计, E-mail: zhogab@163.com

(收稿日期:2016-12-30 接受日期:2017-01-25)

膜分离技术作为蛋白质的粗提取技术有着广泛的应用。Loginov^[2]等通过超滤技术分离了亚麻籽壳中提取的多酚和蛋白质,并研究了 pH 值从 13.2-3.0 变化时对分离过程的影响,他们发现 pH 值为 4.4 时的分离效果是最好的,并且 pH 值从 13.2-4.4 逐步下降的过程中过滤速度会越来越快,并且分离度也逐步调高,通过超滤分离后的多酚纯度可以达到 76%。近年来荷电膜在蛋白质分离纯化中显示出了良好的应用前景。针对特定的分离体系研究开发出荷电膜材料,有可能大幅度提高目标产物的分离纯化过程的效率。Guoqiang Chen^[3]等研究一种分离蛋白组分和聚乙二醇(PEG)的电泳超滤法,在电场的作用下,PEG 分子的通量显著升高而蛋白分子的通量下降,在超滤过程速度加快的前提下蛋白质的收率也有所提升。

1.2 沉淀分离技术

蛋白质的沉淀指的是蛋白质分子凝聚后在溶液中析出的现象。蛋白质的溶解和析出主要受两个因素影响:电荷和水化膜。去除蛋白质的水化膜并且中和其电荷,蛋白质就可以从溶液中沉淀出来。

沉淀技术一般作为蛋白质的粗提手段,其可以很好的对蛋白质进行浓缩。常用的沉淀法有盐析法、有机溶剂法、聚乙二醇法、等电点沉淀法等。沉淀分离技术在血浆蛋白的制备中有着广泛的应用,特别是低温乙醇沉淀技术。低温乙醇沉淀技术是 1946 年 E.J.Cohn^[4]等为应对二战的需求发明的,最初用于纯化制备白蛋白以及免疫球蛋白,由此也奠定了血浆蛋白分离工艺的基础。时至今日其依然是白蛋白和免疫球蛋白的主要生产手段。

低温乙醇法具有许多的优点:① 工艺成熟,可靠性较高,已经得到包括美国食品药品监督管理局(FDA)的认可;② 反应条件较为温和,对比其他几种沉淀分离技术,低温乙醇沉淀法能在零度以下进行,更有利于保持蛋白质分子的天然理化和生物学性质;③ 由于乙醇本身具有杀菌作用,因此生产的蛋白质产品具有更高的安全性;④ 乙醇的价格低廉,操作也相对简单,适合大规模的生产;⑤ 对于血浆中含量较多的蛋白组分来说,低温乙醇沉淀法的回收率较高。

1.3 电泳分离技术

电泳是指带电粒子或分子在电场中向着与其电性相反的电极移动的现象。大分子的蛋白质在电场中都可以定向泳动,这也为蛋白质的纯化研究提供了重要的手段。

1.3.1 聚丙烯酰胺凝胶电泳 聚丙烯酰胺凝胶电泳是蛋白质分析时必不可少的手段。根据蛋白质在电泳体系中的状态可分为变性和非变性两种形式。变性聚丙烯酰胺凝胶电泳中引进变性剂如十二烷基硫酸钠(SDS),使蛋白质在变性条件下电泳,这种电泳由于能准确的测定蛋白质分子量大小而被广泛应用;非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳中,蛋白质保持完整的结构和状态,其电泳会受到分子量、形态、电荷等多种因素的影响。目前凝胶电泳的使用更多的是为了进行分析以及纯度鉴定,也可以用于少量的制备。

1.3.2 等电聚焦电泳 等电聚焦电泳(Isoelectric Focusing, IEF)是一种拥有很高的分辨率的电泳分离技术,可将等电点差异极小的蛋白质进行分离,并且可用于微量样品的检测中。通过等

电聚焦电泳也可以测定一个蛋白质的等电点。目前该方法也主要用于分析检测中。

1.3.3 毛细管电泳 毛细管电泳(Capillary Electrophoresis, CE)是指以高压直流电场为驱动力、毛细管为分离通道,依据样品中各组分淌度和分配行为上的差异而实现分离的一类分离技术。20 世纪 80 年代以来此技术得到了飞速的发展。Yu Tian^[5]等首次报道了一种 CN-4-CnPB 表面活性剂以及 CN-4-CnPB 与 HFIP 结合的表面活性剂,通过在毛细管电泳过程中添加这种活性剂可以使酸性和碱性蛋白成功的分离,解决了酸性和碱性蛋白吸附在毛细管壁上而分离受到限制的问题。

1.4 层析分离技术

层析分离技术是 20 世纪初由俄国化学家茨维特首先提出的,根据被分离物与层析固定相之间的物理化学性质以及生物学性质的相互作用来进行分离。层析法的种类繁多,应用较为广泛的有凝胶过滤层析、离子交换层析、疏水层析以及亲和层析。

1.4.1 凝胶过滤层析 凝胶过滤层析,也称分子筛层析、尺寸排阻层析,其原理是根据蛋白质分子间的大小或者形状的差异来将目标蛋白质与其他杂质进行分离。这种方法依据分子的大小进行分级分离,蛋白质不用和凝胶介质之间产生吸附,这也减少了蛋白质分子由于不可逆的吸附作用而造成的结构变化。它可以用于分子量差距比较悬殊的蛋白质之间的分离,也可以用于分子量差距比较接近,但是与凝胶介质之间相互作用有区别的蛋白质之间的分离纯化。Costa^[6]等利用了离子交换和凝胶过滤层析从农产品加工厂产生的残留物中纯化了菠萝蛋白酶,得到的蛋白酶分子量在 30 kDa,并且活性回收率达到了 89%,16.93 的纯化因子也要优于以前的文献中报道的方法,该方案可以充分利用农业以及工业中的菠萝残渣,并且得到大规模的应用,带来可观的经济效应。

1.4.2 离子交换层析 离子交换层析是利用离子交换介质与不同蛋白质分子间的作用力不同来进行分离的,其主要依赖的是蛋白质分子表面静电荷的差异。离子交换层析中,固定相由带电荷的树脂、琼脂糖或者葡聚糖等组成。带有正电荷的称为阴离子交换树脂;带有负电荷的称为阳离子交换树脂^[7-9]。阴离子交换基团吸附带负电荷的蛋白质,阳离子交换基团吸附带正电荷的蛋白。当蛋白质分子处于不同的 pH 值条件下,其带电状况会不同,可以通过调节洗脱液的盐浓度或洗脱液的 pH 值将吸附在层析介质上的蛋白质洗脱下来。离子交换层析是所有层析技术中应用最为广泛的一种^[9,10]。Tiia Koho^[11]等通过建立基于离子交换技术的层析方法纯化出了柯萨奇 B3 病毒,通过表征显示出了其优异的效果和高纯度,而且该方法尤其适用于疫苗的开发以及工业规模的生产。秦宗华^[12]等利用强阴离子交换层析法结合凝胶过滤层析从动物血清中纯化了免疫球蛋白和白蛋白,在 pH6.0 时以 0.3 mL/min 低流速洗脱得到高纯度的免疫球蛋白,继续在 pH4.0 时洗脱,再辅以 Sephadex G-75 分子排阻层析获得了纯度大于 95% 的白蛋白。该方案最大的优点在于操作便捷快速,离子交换层析柱和分子排阻层析柱可反复使用,成本较低,具有很好的实用性,便于后续的工艺放大。可见,离子交换层析在分离纯化以及工业规模的放大应用中有着显著的优势。

1.4.3 疏水层析 疏水层析的原理由 Hofstee^[13]在 1973 年首先提出。疏水层析的固定相上偶联具有适度疏水性的疏水基团,根据蛋白质与疏水吸附剂之间的疏水作用差异进行分离。生物分子表面一般都存在疏水区域,高盐浓度下分子内部的疏水基团会外露,使得蛋白质的疏水区疏水作用加强,蛋白质与层析固定相结合后,降低盐浓度,蛋白质就会因为疏水作用力的减弱而被洗脱下来。疏水层析法的广泛应用得益于其所具有的独特优势:^① 基于高盐吸附低盐洗脱的特点,可以直接纯化盐析后的样品;^② 疏水吸附剂的种类较多,有较大的选择余地;^③ 可以通过疏水配基密度来调节吸附力,因此可根据目标产物来灵活的选择疏水配基。

Dong Gao^[14]等研究了一种新型的疏水层析,在固定相上键入能提供静电相互作用的 B- 苯乙胺官能团后,不仅能像传统的疏水层析一样分离生物大分子,而且对于疏水层析不能分离的一些蛋白质也可以进行纯化,他们将这种层析用于分离鸡蛋清中的蛋白时发现,引入静电相互作用对于提高疏水层析的分辨率有着显著的作用,这种新型层析在生物大分子的分离纯化有望得到广泛的应用;Yuesheng Dong^[15]等在研究较难纯化的重组人白蛋白时,应用了一套乙醇/ K_2HPO_4 双水相系统(Aqueous two-phase system, ATPS) 和疏水层析整合的方法从高密度发酵液中提取和纯化了重组人白蛋白 (Recombinant Human Serum Albumin, rHSA), 通过 HPLC 检测纯化后的蛋白纯度为 99.1%, 收率为 75%, 是普通纯化方法的 1.1-2.0 倍, 这项研究中所采用的方法具有操作简单, 时间短, 能耗低的优点, 有望应用于未来 rHSA 大量制备的生产工艺中。

1.4.4 亲和层析 亲和层析是根据生物活性物质与特异性配体间的特异性亲和力来达到分离目的一种技术,亲和层析是目前最为有效的蛋白质分离纯化方法^[16,17]。亲和层析根据目标蛋白的专一性而设计,如酶与底物、抗原与抗体等。亲和层析具有高纯度、高收率以及能保持生物大分子的自然活性等优点,因此具有良好的选择性,被广泛的应用于从复杂体系中高效提取特定的目标蛋白。Ahirwar^[18]等研发了一种快速高效的一步亲和层析技术纯化了刀豆蛋白 A, 该层析的固定相为携带刀豆蛋白 A 抗体的琼脂糖, 一步层析得到的目标蛋白纯度可以达到 90%, 收率大于 66%, 纯化倍数达到了 336。Caramelo^[19]等利用 berenil 作为配体的亲和层析技术纯化了质粒 DNA, 该质粒 DNA 的收率和纯度分别为 87% 和 99%, 由于其使用较低量的盐和单步的层析方法, 因此极大的减少了操作时间和成本。亲和层析的分离效率相比其他的层析技术有着明显的优势, 仅需一步分离就可以达到预期的效果, 即简化了实验步骤又节约了时间^[20]。

亲和层析面临的主要问题是成本高, 相比于离子交换层析以及疏水层析等常用的技术来说, 亲和层析的成本还是远高于他们, 如何解决亲和配体的生产成本问题是制约亲和层析发展的主要瓶颈。

2 现有技术存在的局限性

目前以层析技术为核心的蛋白质纯化技术已能将大多数蛋白进行分离纯化, 但是蛋白分子结构复杂、易失活, 蛋白质粗品又含有多种蛋白杂质, 往往需要各种分离技术的联用才能使

目标蛋白得到分离纯化, 这势必会使蛋白分子在分离纯化过程中受到不同于生理条件的物理、化学乃至机械等因素作用, 导致蛋白质的空间结构发生不可逆的变化, 从而丧失活性。例如层析过程中温度、pH 值以及离子强度的改变, 电泳过程中添加的表面活性剂, 都有可能引起蛋白质的空间结构变化。失活的蛋白对于研究者来说就失去了意义, 因此如何在分离纯化过程中保持蛋白质的天然活性是一个亟待解决的问题。

3 非对称流场流分离技术研究进展

对于有生物活性的蛋白质, 提供温和的操作条件以及与生理情况接近的分离环境是保证蛋白空间结构和生物活性最好的方法。场流分离技术在分离蛋白分子时, 分离条件温和, 能很好的保护蛋白分子的三维结构和天然活性, 因此也被美国食品药品监督管理局列为优先发展的蛋白分离纯化技术。

场流分离技术(field-flow fractionation, FFF)是一种类似于层析的分离分析方法, 最早由 Giddings 在 1966 年提出^[21]。非对称流场流分离技术 (Asymmetrical flow field-flow fractionation, AF4)最初在 1987 年提出^[22], 是流场流分离的一种。在非对称流场流分离过程中, 主体流速与聚集流速之和等于横向流速与样品进入检测器流速之和。在聚集阶段, 聚集流速与主体流速产生聚集流场, 使得蛋白样品在流场中聚集, 不随主体流速进入检测器。在洗脱阶段, 聚集流速减小至零, 此时聚集好的蛋白样品随着呈抛物形流速分布的主体流速进入检测器^[23]。非对称流场流技术不借助于固定相, 不使用有机溶剂, 仅仅依靠控制流动相来实现蛋白质混合物的分离, 避免了蛋白质分子与固定相的作用, 能很好地保持蛋白稳定性和三维折叠形态。与常规的分离手段相比较, AF4 具有许多的优势, 如: 无需对复杂的样品进行预处理; 不使用固定相, 所以几乎不存在剪切力; 温和的分离条件; 能实现快速的分析; 人为因素影响降至最低, 没有排阻极限等。基于其这些优势, AF4 在蛋白质的分离、表征过程中扮演着越来越重要的角色^[22,24]。

本实验室在 AF4 的分离研究方面取得了一定的进展, 刘攀攀等^[25]利用非对称流场流分离技术实现了对两种聚苯乙烯颗粒的分离表征, 并与扫描电镜的结果进行了对比, 结果表明 AF4 的表征结果比扫描电镜更接近于聚苯乙烯颗粒的标准粒径, 具有更高的稳定性和准确度; 鄂云龙^[26]等通过对肌红蛋白和牛血清白蛋白混合蛋白样品的分离, 研究了 AF4 分离蛋白时的膜材料、缓冲盐浓度、分离腔室厚度对分离效果的影响, 为 AF4 的应用研究奠定了基础。AF4 技术的应用研究在国外也有许多报道, John^[27]等应用 AF4 技术对人血清白蛋白进行了基于纳米颗粒的表征, 并在线组合了 AF4 和动态光散射来监测 HSA 纳米颗粒粒径在聚乙二醇化过程中的变化。Schachermeyer^[28]等首次将非对称流场流分级应用于适体-靶蛋白结合的研究中, 并且表明 AF4 在适体-靶蛋白的研究时在不同的缓冲环境中能更好地解释适体的结构与功能的关系。AF4 技术具有非常好的发展前景, 有望在蛋白质等大分子的研究过程中发挥更重要的作用。

4 展望

蛋白失活问题在分离纯化过程中普遍存在且无法完全避

免,我们只能利用现有的知识来优化条件并利用新的技术来保护蛋白质的天然活性。不可否认层析技术依然是蛋白质类生物大分子分离纯化过程的核心技术^[29-32],但是像 AF4 技术这样的新型分离技术在活性分离方面所展现的优点也值得我们进行更深入的研究。目前 AF4 技术经过 40 多年的研究和发展,在欧美、日本等发达国家已经得到了比较广泛的应用^[33],而我国在这一领域尚处于起步阶段,缺乏系统的研究。当务之急,需要建立相应的活性回收率评价体系,建立活性分离技术研究的基础。同时,场流设备制造昂贵制约着这一技术的应用和推广,设备成本问题也是研究者们必须考虑的。但是随着我国研究者对 AF4 技术研究的不断深入,上述问题有望获得解决。AF4 技术的发展为蛋白质纯化提供了全新的方法,我们相信未来 AF4 技术一定能更多的应用到蛋白质的纯化过程中,并有望解决纯化中蛋白质失活的难题。

参考文献(References)

- [1] Zydney A L. Membrane technology for purification of therapeutic proteins[J]. *BiotechnolBioeng*, 2009, 103(2): 227-230
- [2] Loginov M, Boussetta N, Lebovka N, et al. Separation of polyphenols and proteins from flaxseed hull extracts by coagulation and ultrafiltration[J]. *J Membrane Sci*, 2013, 442(1-2): 177-186
- [3] Chen G, Song W, Qi B, et al. Separation of human serum albumin and polyethylene glycol by electro-ultrafiltration [J]. *Biochem Eng J*, 2016, 109(02): 127-136
- [4] Cohn E J, Strong L E, Hughes W L, et al. Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. IV. A System for the Separation into Fractions of the Protein and Lipoprotein Components of Biological Tissues and Fluids1a, b, c, d [J]. *J Am ChemSoc*, 1946, 68 (03): 459-475
- [5] Tian Y, Li Y, Mei J, et al. Simultaneous separation of acidic and basic proteins using gemini pyrrolidinium surfactants and hexafluoroisopropanol as dynamic coating additives in capillary electrophoresis[J]. *J Chromatogr A*, 2015, 1412(01): 151-158
- [6] Costa H B, Fernandes P M B, Romão W, et al. A new procedure based on column chromatography to purify bromelain by ion exchange plus gel filtration chromatographies[J]. *Ind Crop Prod*, 2014, 59(01): 163-168
- [7] Huuk T C, Hahn T, Osberghaus A, et al. Model-based integrated optimization and evaluation of a multi-step ion exchange chromatography[J]. *Sep Purif Technol*, 2014, 136(02): 207-222
- [8] 王红颖, 王倩, 黄瑾. 蛋白质分离纯化方法的研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11(24): 5168-5170
Wang Hong-ying, Wang Qian, Huang Jin. Research Advances of Separation and Purification for Protein [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2011, 11(24): 5168-5170
- [9] Levison P R, Mumford C, Streater M, et al. Performance comparison of low-pressure ion-exchange chromatography media for protein separation[J]. *J Chromatogr A*, 1997, 760(01): 151-158
- [10] 张罗敷, 胡晓芳, 徐学敏. 多维液相色谱分离技术在复杂蛋白质组学样品鉴定中的应用 [J]. *现代生物医学进展*, 2013, 13(01): 161-166
Zhang Luo-fu, Hu Xiao-fang, Xu Xue-min. Application of Multi-dimensional Liquid Chromatography in Complex Proteome Sample [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2013, 13(01): 161-166
- [11] Koho T, Koivunen M R L, Oikarinen S, et al. Cocksackievirus B3 VLPs purified by ion exchange chromatography elicit strong immune responses in mice[J]. *Antivir Res*, 2014, 104(01): 93-101
- [12] 秦宗华, 陈婷, 李任强. 强阴离子交换色谱结合分子排阻色谱纯化血清中免疫球蛋白和白蛋白[J]. *色谱*, 2012, 30(08): 851-855
Qin Zong-hua, Chen Ting, LI Ren-qiang. Purification of immunoglobulin and serum albumin from serum via strong anion exchange chromatography coupled with molecular exclusion chromatography [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2012, 30 (08): 851-855
- [13] Hofstee B H J. Protein binding by agarose carrying hydrophobic groups in conjunction with charges [J]. *BiochemBioph Res Co*, 1973, 50(03): 751-757
- [14] Gao D, Tan F C, Wang W P, et al. Resolution enhancement in hydrophobic interaction chromatography via electrostatic interactions [J]. *Chinese Chem Lett*, 2013, 24(05): 419-421
- [15] Dong Y, Zhang F, Wang Z, et al. Extraction and purification of recombinant human serum albumin from *Pichia pastoris* broths using aqueous two-phase system combined with hydrophobic interaction chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1245(01): 143-149
- [16] Ayyar B V, Arora S, Murphy C, et al. Affinity chromatography as a tool for antibody purification[J]. *Methods*, 2012, 56(02): 116-129
- [17] Wang Z, Liang Q, Wen K, et al. Antibody purification using affinity chromatography: A case study with a monoclonal antibody to ractopamine[J]. *J Chromatogr B*, 2014, 971(01): 10-13
- [18] Ahirwar R, Nahar P. Development of an aptamer-affinity chromatography for efficient single step purification of Concanavalin A from *Canavalia ensiformis* [J]. *J Chromatogr B*, 2015, 997 (01): 105-109
- [19] Caramelo-Nunes C, Gabriel M F, Almeida P, et al. Negative pseudo-affinity chromatography for plasmid DNA purification using berenil as ligand[J]. *J Chromatogr B*, 2014, 944(01): 39-42
- [20] Béhar G, Renodon-Cornière A, Mouratou B, et al. Affitins as robust tailored reagents for affinity chromatography purification of antibodies and non-immunoglobulin proteins [J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1441(01): 44-51
- [21] Giddings J C. A new separation concept based on a coupling of concentration and flow nonuniformities [J]. *Sep Sci Technol*, 1966, 1 (01): 123-125
- [22] Yohannes G, Jussila M, Hartonen K, et al. Asymmetrical flow field-flow fractionation technique for separation and characterization of biopolymers and bioparticles [J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(27): 4104-4116
- [23] 鄂玉龙. 非对称流场分离技术联用质谱对蛋白分子的分离表征 [D]. 北京: 北京化工大学, 2015
E Yun-long. Separation and Characterization of Proteins by The System of Asymmetrical Flow Field-flow Fractionation-Mass Spectrometry [D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2015
- [24] Håkansson A, Ulmius M, Nilsson L. Asymmetrical flow field-flow fractionation enables the characterization of molecular and supramolecular properties of cereal β -glucan dispersions [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 87(01): 518-523

- Sun Yan-na, Zhang Hua, Zhang Rui-li, et al. Prognostic analysis of 353 pancreatic cancer patients in hospital treatment between Uygur and Han nationality in Xinjiang[J]. Chin J Cancer prev treat, 2013, 20(18): 1436-1440
- [6] 杨媚, 艾尼瓦尔·艾木都拉, 张月芬, 等. 8713 例消化系统恶性肿瘤统计分析[J]. 中国病案, 2014, 15(11): 56-57
Yang Mei, Ainiwaer Aimudula, Zhang Yue-fen, et al. Epidemiological Analysis of 8713 cases of digestive system malignant tumor[J]. Chinese Medical Record, 2014, 15(11): 56-57
- [7] Zhang KJ, Zhang DL, Jiao XL, et al. Effect of phospholipase A2 silencing on acute experimental pancreatitis [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2013, 17(24): 3279-3284
- [8] Zhang MS, Zhang KJ, Zhang J, et al. Phospholipases A-II (PLA2-II) induces acute pancreatitis through activation of the transcription factor NF-kappaB [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2014, 18(8): 1163-1169
- [9] Abbenhardt C, Poole EM, Kulmacz RJ, et al. Phospholipase A2G1B polymorphisms and risk of colorectal neoplasia [J]. Int J Mol Epidemiol Genet, 2013, 4(3): 140-149
- [10] Nakano E, Geisz A, Masamune A, et al. Variants in pancreatic carboxypeptidase genes CPA2 and CPB1 are not associated with chronic pancreatitis [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2015, 309(8): G688-694
- [11] Szabó A, Pilsak C, Bence M, et al. Complex Formation of Human Proelastases with Procarboxypeptidases A1 and A2 [J]. J Biol Chem, 2016, 291(34): 17706-17716
- [12] 金霆, 费政芳. Cpb1 基因在乳腺癌中差异表达的初步研究 [J]. 分子诊断与防治杂志, 2009, 1(1): 10-13
Jin Ting, Fei Zheng-fang. Preliminary study of differential expression of Cpb1 genes in breast cancer [J]. J Mol Diagn Ther, 2009, 1(1): 10-13
- [13] Bouchal P, Dvořáková M, Roumeliotis T, et al. Combined Proteomics and Transcriptomics Identifies Carboxypeptidase B1 and Nuclear Factor κ B (NF- κ B) Associated Proteins as Putative Biomarkers of Metastasis in Low Grade Breast Cancer [J]. Mol Cell Proteomics, 2015, 14(7): 1814-1830
- [14] Sophors P, Kim YM, Seo GY, et al. A synthetic isoflavone, DCMF, promotes human keratinocyte migration by activating Src/FAK signaling pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 472(2): 332-338
- [15] Ungewiss C, Rizvi ZH, Roybal JD, et al. The microRNA-200/Zeb1 axis regulates ECM-dependent β 1-integrin/FAK signaling, cancer cell invasion and metastasis through CRKL[J]. Sci Rep, 2016, 6: 18652
- [16] Béraud-Dufour S, Devader C, Massa F, et al. Focal Adhesion Kinase-Dependent Role of the Soluble Form of Neurotensin Receptor-3/Sortilin in Colorectal Cancer Cell Dissociation [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(11)
- [17] Kang CG, Lee HJ, Kim SH, et al. Zerumbone Suppresses Osteopontin-Induced Cell Invasion Through Inhibiting the FAK/AKT/ROCK Pathway in Human Non-Small Cell Lung Cancer A549 Cells[J]. J Nat Prod, 2016, 79(1): 156-160
- [18] Trerotola M, Ganguly KK, Fazli L, et al. Trop-2 is up-regulated in invasive prostate cancer and displaces FAK from focal contacts [J]. Oncotarget, 2015, 6(16): 14318-14328
- [19] Gao Z, Zhang J, Bi M, et al. SRPX2 promotes cell migration and invasion via FAK dependent pathway in pancreatic cancer [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(5): 4791-4798
- [20] Ning Z, Wang A, Liang J, et al. USP22 promotes epithelial-mesenchymal transition via the FAK pathway in pancreatic cancer cells[J]. Oncol Rep, 2014, 32(4): 1451-1458
- [21] Dao P, Smith N, Scott-Algara D, et al. Restoration of TRAIL-induced apoptosis in resistant human pancreatic cancer cells by a novel FAK inhibitor PH11[J]. Cancer Lett, 2015, 360(1): 48-59

(上接第 6392 页)

- [25] 刘攀攀, 全灿, 李红梅, 等. 非对称场流分离技术用于纳米颗粒的表征[J]. 分析化学, 2013, 41(07): 1063-1068
Liu Pan-pan, Quan Can, Li Hong-mei, et al. Characterization of Nanoparticle Diameter by Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2013, 41(07): 1063-1068
- [26] 鄂云龙, 全灿, 金君素, 等. 基于非对称流场流分离技术的蛋白分离研究[J]. 北京化工大学学报(自然科学版), 2015, 42(02): 30-34
E Yun-long, Quan Can, Jin Jun-Su, et al. Research of Protein Separation Based on Asymmetrical Flow Field-flow Fractionation[J]. Journal of Beijing University of Chemical Technology (Natural Science), 2015, 42(02): 30-34
- [27] John C, Langer K. Asymmetrical flow field-flow fractionation for human serum albumin based nanoparticle characterisation and a deeper insight into particle formation processes [J]. J Chromatogr A, 2014, 1346(01): 97-106
- [28] Haiyang Dou, Bing Zhou, Hae-Dong Jang, et al. Study on antidiabetic activity of wheat and barley starch using asymmetrical flow field-flow fractionation coupled with multiangle light scattering [J]. J Chromatogr A, 2014, 1340(01): 115-120
- [29] Chon J H, Zarbis-Papastoitsis G. Advances in the production and downstream processing of antibodies [J]. New Biotechnol, 2011, 28(5): 458-463
- [30] Cramer S M, Holstein M A. Downstream bioprocessing: recent advances and future promise [J]. Curr Opin Chem Eng, 2011, 1(01): 27-37
- [31] Guiochon G, Beaver L A. Separation science is the key to successful biopharmaceuticals[J]. J Chromatogr A, 2011, 1218(49): 8836-8858
- [32] Janson J C. Protein purification: principles, high resolution methods, and applications[M]. John Wiley & Sons, 2012
- [33] 尹海燕, 左春桢. 场流分离蛋白质技术研究进展 [J]. 现代化工, 2013, 33(1): 34-36
Yin Hai-yan, Zuo Chun-cheng. Field flow fractionation in protein: recent trends[J]. Modern Chemical Industry, 2013, 33(1): 34-36