

## 中试规模高效纯化重组人核苷二磷酸激酶 A

# Efficient Purification of Recombinant Human NDPK-A in Pilot-scale

熊 盛<sup>1,2\*</sup>, 钱垂文<sup>1,2</sup>, 郭朝万<sup>2</sup>, 黄 立<sup>1</sup>, 刘秋英<sup>1</sup>, 张美英<sup>1</sup>, 王一飞<sup>2\*</sup>

XIONG Sheng<sup>1,2\*</sup>, QIAN Chui-Wen<sup>1,2</sup>, GUO Chao-Wan<sup>2</sup>, Huang Li<sup>1</sup>, LIU Qiu-Ying<sup>1</sup>, Zhang Mei-Ying<sup>1</sup> and WANG Yi-Fei<sup>2\*</sup>

1 暨南大学生物医药研究开发基地, 广州 510630

2 暨南大学药学院, 广州 510630

1 Biomedical Research and Development Center of Jinan University, Guangzhou 510630, China

2 Pharmacy College of Jinan University, Guangzhou 510630, China

**摘 要** 中试规模纯化重组人核苷二磷酸激酶 A (rhNDPK-A)。菌体高压匀浆, 然后微滤去除菌体碎片, 超滤浓缩, 所得样品上样 DEAE-sepharose Fast Flow, 收集目的峰, 上样 Cibacron Blue 3GA Sepharose CL-4B, 含 ATP 的缓冲液洗脱目的蛋白, 超滤精制。结果表明, 1500g 菌体经过 2 次匀浆后, 所得匀浆液中含 NDPK 47.6g, 经过微滤超滤处理后, 可回收目的蛋白 27.3g。再经过两步柱层析及超滤精制后, 最终可得纯度为 96.3% 的目的蛋白 17.2g, 总回收率为 36.2%, 每 100 g 湿菌体的蛋白产率为 1.15g。比较每个步骤的回收率, 发现精制 > 亲和层析 > 离子交换层析 > 样品前处理过程。与前期报道发酵工艺联用, rhNDPK-A 的纯化产量达到 510mg/L。工艺简便、得率高的 rhNDPK-A 纯化工艺的建立为 NDPK 的应用开发提供了物质基础; 另外, 本文结果也提示, 对于非分泌型重组蛋白来说, 影响目的蛋白回收的最主要因素可能不是柱层析, 而是样品前处理过程。

**关键词** 核苷二磷酸激酶, 纯化, 微滤, 超滤

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)03-0508-06

**Abstract** To purify recombinant human nucleoside diphosphate kinase A (rhNDPK-A) efficiently in pilot scale, cells of rhNDPK-A producing *E. coli* were homogenized by high pressure under 4°C, 950 Pa. The insoluble debris was removed by microfiltration and the soluble portion was concentrated by ultrafiltration. The resulted crude sample was loaded on DEAE-sepharose Fast Flow. The target fraction was collected and then load on Cibacron Blue 3GA Sepharose CL-4B. Eluted with buffer containing ATP from the AC column, rhNDPK-A was polished with ultrafiltration. The results showed that after homogenized 2 rounds, 1500g cells of *E. coli* brought crude sample containing 47.6g NDPK-A. Treated with microfiltration and ultrafiltration, 27.3g of NDPK-A were recovered from this bacteria homogenate. After 2-step purification with column chromatography and then polished with ultrafiltration, 17.2 g rhNDPK-A were collected with purity of 96.3%. The recovery of the whole purification process was 36.2%, and the productivity of rhNDPK-A was 1.15 g per 100 g wet cells. Comparing the recovery of each purification step, it was found that the recovery of polish is higher than that of affinity chromatography, which is higher than that of ion exchange chromatography. The limit step was the process of sample pretreatment among the 4 purification steps. Combine

Received: October 26, 2006; Accepted: December 4, 2006.

This work was supported by the grants from the National High-Tech R&D Program (863) (No. 2001AA215041), the National Natural Science Foundation (No. 30400071) and the Research Team Program of Guangdong Natural Science Foundation (No. 2004E039213).

\* Corresponding author. Tel: +86-20-85223426; Fax: +86-20-85223426; E-mail: twangyf@jnu.edu.cn

国家十五 863 项目 (No. 2001AA215041), 国家自然科学基金 (No. 30400071), 广东省自然科学基金团队项目 (No. 2004E039213) 资助。

with the fermentation results reported before, it was deduced that the productivity of rhNDPK-A was 510 mg/L. In conclusion, an easily controlled purification condition with high yield provides material for the translation researches of NDPK; In addition, it was suggested the crucial step determine the recovery of non-secretive recombinant proteins might be the process of sample pretreatment, not be the process of column chromatography.

**Key words** nucleoside diphosphate kinase, purification, microfiltration, ultrafiltration

核苷二磷酸激酶(nucleoside diphosphate kinase, NDPK)是一种多功能蛋白,具有维持细胞内 NTP 浓度,调节细胞增殖、分化、发育和凋亡等多种生物学功能<sup>[1]</sup>。在基础研究领域,研究 NDPK 的多能性及其调控机制对于阐明细胞增殖和分化、肿瘤发生、发展和转移<sup>[2-3]</sup>,甚至个体发育,都有重要意义。在应用开发领域,利用 NDPK 的磷酸转移酶活性,可以开发抗病毒增敏药物(<http://www.pasteur.fr/recherche/RAR/RAR2003/Reac-en.html>)。除此之外,NDPK 还可以作为抗癌药物增效剂<sup>[4]</sup>、白血病标志物<sup>[5]</sup>,或者开发为新药靶<sup>[6]</sup>。

重组蛋白的高效制备是决定一种候选蛋白能否最终作为药物进入临床的关键因素之一。虽然以 CHO 为代表的哺乳动物细胞表达系统是技术发展的主流,但 *E. coli* 系统仍是重组蛋白的首选。近年来对 *E. coli* 系统的研究热点主要是两方面:(1)改造表达系统,以简化下游纯化工艺或有利于蛋白在宿主中的折叠,Intein 自剪切系统<sup>[7]</sup>和一些分子伴侣表达系统<sup>[8]</sup>是这方面的典范;(2)提高包涵体的复性效率和规模<sup>[9]</sup>。对于可溶性蛋白下游纯化工艺的优化报道反而很少,这可能与大肠杆菌中较难获得胞质可溶性表达,而周质空间可溶性表达的蛋白难以产业化有关。截止 2006 年 4 月,我国 SFDA 批准上临床的 145 种重组蛋白药物中,能够在 *E. coli* 中获得胞质可溶表达的屈指可数,KGF-2、bFGF 等是这类蛋白的代表,我室过去也有制备这一类蛋白的研究报道<sup>[10]</sup>,在中试规模,纯化后产量一般在 30~60 mg/L,很难超过 100mg/L。

在前期工作中,我们已经构建了能高效表达人 NDPK-A 的工程菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ [pBV-nm23H1]<sup>[11]</sup>,并完成了 50L 规模高密度培养,菌体产量为(2220.00 $\pm$ 169.71)g/批,蛋白表达量为(22.00 $\pm$ 0.42)%<sup>[12]</sup>。在此,我们报道 rhNDPK-A 的中试规模高效纯化工艺,这是决定 rhNDPK-A 的各项应用开发能否顺利进行的先决条件之一。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 表达质粒 pBV-Nm23H1 由本室

侯宇等构建并保存,pBV-Nm23H1 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  得工程菌 DH[pBV-Nm23]

1.1.2 主要试剂:层析基质 DEAE-sepharose Fast Flow 和 Sephadex G-100 购自 Amersham Bioscience 公司;Cibacron Blue 3GA Sepharose CL-4B 购自 Millipore 公司;Agarose、Glycine、Tris Base、SDS、丙烯酰胺、N-N'-亚甲基双丙烯酰胺等均购自 Promega 公司;考马斯亮蓝 G-250、R-250 等染料购自华美生物工程公司;低分子量蛋白标准(97.4,66.2,43.0,31.0,20.1,14.4kD)购自上海丽珠东风生物技术公司;其余试剂为国产或进口分析纯。

1.1.3 缓冲液:Buffer A:20 mmol/L Tris-HCl,1 mmol/L EDTA,2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,1 mmol/L DTT,pH7.5; Buffer B:含 0.05 mol/L NaCl 的 buffer A;Buffer C:含 0.1 mol/L NaCl 的 buffer A;Buffer D:含 1.5mmol/L ATP 的 buffer C。

1.1.4 主要仪器:高压匀浆机购自 Sartoris;微滤器为 Pellicon II 系统(0.16 $\mu$ m 膜包两块);超滤器为 Minisette 系统(30kD 膜包一块);凝胶图像分析系统为 Bio-Rad PEC300。

### 1.2 方法

1.2.1 50L 补料分批培养<sup>[13]</sup>:摇瓶培养一级种子,10%比例接种 7L 发酵罐制备二级种子,再以 10%接种量转入 50L 发酵培养基中,自动控制温度为 32 $^{\circ}$ C(增菌阶段)或 42 $^{\circ}$ C(目的蛋白诱导表达阶段),转速与溶氧偶联( $\leq$ 650r/min)以控制溶氧水平,通风量自 1~3vvm,NaOH 和 HCl 调节 pH 为 7.0~7.2,并在需要时补加碳源和/或氮源、糖蜜。

1.2.2 菌体破碎:发酵菌体用 TE 缓冲液以 1:8(W:V)比例重悬,4 $^{\circ}$ C、950Pa 压力下匀浆,每匀浆一次后取 1 $\mu$ L 菌液,在载玻片上涂成直径为 50mm 的圆圈,革兰氏染色,1000 $\times$ 镜检,每视野内完整菌体不超过 10 个即为匀浆终点。

1.2.3 微滤:微滤器装配 0.3m<sup>2</sup>膜包后,分别用 0.2mol/L NaOH $\rightarrow$ 纯水 $\rightarrow$ TE 缓冲液清洗、平衡,对菌体破碎液进行微滤,微滤过程中补加 TE 至菌液体积为原体积的 5 倍,收集滤出液。

1.2.4 超滤:微滤滤出液上超滤器浓缩,超滤器装

配 0.3m<sup>2</sup> 膜包, 同样方法去热原处理, 将入口与回收口放在一起, 弃滤过液, 至体积为原体积的 1/10, 此即为供纯化用的菌液上清。

**1.2.5 离子交换层析**<sup>[11, 13-15]</sup>: 装置 DEAE Sephadex Fast Flow 层析柱(规格: 110mm × 30cm), 1mol/L NaOH + 1mol/L NaCl 去热原 → Buffer A 平衡, 流速 80mL/min → 上样 → Buffer A 淋洗至基线 → Buffer B 洗脱杂蛋白 → Buffer C 洗脱目标蛋白, 收集于 2.5L 已除热原的玻璃瓶中 → Buffer A + 0.5mol/L NaCl 洗脱其它杂蛋白 → 0.2mol/L NaOH 柱再生, 注射用水平衡至中性 → 20% 乙醇保存。

**1.2.6 亲和层析**<sup>[11, 13-15]</sup>: 离子交换洗脱样品用 30kD 膜包浓缩 8~10 倍后, 上样经去热原处理过的亲和层析柱 Cibacron blue 3-GA(规格: XK50mm × 30cm) 缓冲液 C 洗平至基线, 换缓冲液 D 洗脱目的蛋白, 收集于无热原的玻璃瓶中。0.2mol/L NaOH 清洗层析柱, 乙醇保存。

**1.2.7 精制**: 超滤法, 装置 Maximate 超滤系统, 0.2mol/L NaOH 清洗并循环 40min, 注射用水平衡 pH 值至中性, 对亲和层析样品进行超滤, 分装于已除热原的样品瓶中。

**1.2.8 用具前处理**: 所有的玻璃器具均 180℃ 干烤 2h 以上 2 日内使用, 所有的塑料用具均用 0.2mol/L NaOH 浸泡过夜, 注射用水洗至中性, 烘干 2 日内使用 50L 桶装 WFI 配备三孔桶盖, 质控热源检测合格, 所有纯化操作均在洁净程度万级区域进行。

**1.2.9 蛋白纯度分析**: 蛋白质样品先参照文献方法, 以 SDS-PAGE 分离, 然后上 Bio-Rad PEC300 系统, 分析蛋白纯度。

**1.2.10 蛋白含量测定**: Bradford 法<sup>[16]</sup>。取 0.5g/L BSA 15~75 $\mu$ L 至各测量管中, 分别补足 0.15mol/L NaCl 至 300 $\mu$ L, 加 Bradford 试剂 3ml, 室温反应 2min, 测 A<sub>595</sub>, 绘制标准曲线。测量时, 根据蛋白质所在溶液性质的不同, 参照不同标准曲线进行定量计算, 同

时在每次测量时, 以 BSA 作为质控物校正系统误差。Lowry 法(1)样品稀释: 冻干样品根据标示量稀释至 1mg/mL, 再稀释 20 倍; 未知浓度的样品(纯品)可以有 2 种方法得出其大概浓度范围: 先根据 OD<sub>280</sub>/OD<sub>260</sub> 得出大概值, 若 OD<sub>280</sub>/OD<sub>260</sub> ≥ 1.5, 则一般情况下蛋白浓度 C = 1.45OD<sub>280</sub> - 0.74 OD<sub>260</sub>, 再稀释至 50  $\mu$ g/mL; 也可查文献得该蛋白质在某一波长下的吸光系数 E, 再读取该波长下的吸收值 A, 蛋白浓度 C = A/E。(2)显色: 稀释后样品 1mL, 加碱性铜试剂 5mL, 混匀, 室温静置 10min, 然后加入酚试剂 0.5mL, 混匀, 室温静置 30min。(3)比色: 500nm 比色(单波长)比色, 平行测定 2 次, 以蛋白质浓度为横坐标, 光吸收值平均值为纵坐标, 绘制标准曲线, 并计算样品蛋白含量。

**1.2.11 酶活性测定**: HPLC 法测定纯化过程中样品的磷酸转移酶活性, 参照文献<sup>[11]</sup>进行。

## 2 结果与讨论

### 2.1 样品前处理

取发酵菌体 1500g, 重悬于 TE 缓冲液中, 950 Bar 压力匀浆两次, 得 12L 匀浆液, 7000 × g 离心 20min, 得菌体碎片 66g, 上清用 Pellicon II 系统(0.16 $\mu$ m 膜包两块)微滤 1 次, 同时补加 TE 缓冲液 20L, 滤出液以 Maximate 系统(30kD 膜包四块)浓缩, 从实验结果(Table 1)看, 经过 2 次匀浆后, 总蛋白含量有所增加, 但目的蛋白含量下降, 可能与二次匀浆时温度控制失常有关。经过第 1 次微滤和超滤后, 目的蛋白回收率只有 27.3%。由于 NDPK-A 在溶液中形成六聚体, 分子量为 102 kD, 基本不可能透过 30kD 超滤膜, 推测回收率低可能与微滤时补加缓冲液不足, 导致大部分目的蛋白被弃于微滤残渣中有关。

SDS-PAGE 分析结果证明了上述推测(Fig. 1), 遂对微滤后的残渣进行第 2 次处理, 重悬于 8L 缓冲液中, 在微滤过程中补加 TE 缓冲液 40L, 结果表明,

表 1 NDPK-A 菌体前处理过程的蛋白回收率

Table 1 Protein recovery of the pretreatment of rhNDPK-A bacteria

Sample	Total protein(g/L)	Volume/L	NDPK-A Con./%	NDPK-A yield/g	NDPK-A recovery/%
1 <sup>st</sup> homogenate	21.56	12	22.7	58.7	—
2 <sup>nd</sup> Homogenate	22.79	12	17.4	47.6	81.1
before 1 <sup>st</sup> micro-filtration	18.64	12	24.1	53.9	91.8
after 1 <sup>st</sup> ultra-filtration*	9.14	7.56	23.1	16.0	27.3
Residue of 1 <sup>st</sup> micro-filtration	25	4.3	15.70	16.9	—
After 2 <sup>nd</sup> micro&ultra-filtration**	9.3	5.5	22	11.3	66.9
			Total	27.3	46.5

\* defined as sample F01-1; \*\* defined as sample F01-2;

NDPK-A Con. was obtained by SDS-PAGE analysis. NDPK-A yield = total protein(g/L) × Volume(L) × NDPK-A Con.(%)

经过第 1 次微滤后, 28.8% ( $16.9/58.7 \times 100\%$ ) 的目的蛋白被弃于微滤残留液中, 对这一部分样品进行处理, 以 5 倍体积缓冲液进行微滤, 目的蛋白回收率可达 66.9%, 整个样品前处理过程的蛋白回收率为 46.5%。

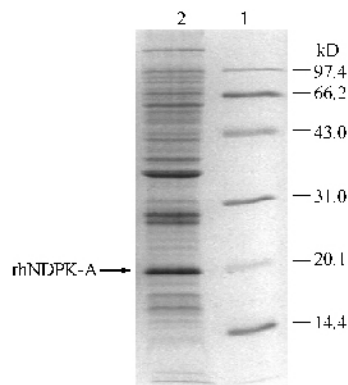


图 1 SDS-PAGE 分析微滤后菌体残渣

Fig. 1 SDS-PAGE analysis residue of the 1st microfiltration  
1: residue of the 1st micro-filtration; 2: LMW.

## 2.2 离子交换层析

对 F01 批次超滤液进行纯化, 每次上柱 1L 样品, 共 6 个批次上柱完成, 经过离子交换层析 (Ion exchange chromatography, IEC) 后, 共回收蛋白含量为 ( $6.26 \pm 2.51$ ) g/L 的目的组分 6.65L, 其中目的蛋白纯度为 ( $53.82 \pm 10.37$ )%, 总量为 18.70g (Table 2)。Fig. 2 是 IEC 过程的典型洗脱图谱。

表 2 F01-1 样品离子交换层析的蛋白回收量  
Table 2 Protein recoveries of 6 batches of IEC

Batch	Con. (g/L)	Volume/L	Purity/%	NDPK yield/g
IEC01-1(0.1)*	2.1	2.0	49.8	2.09
IEC01-2(0.1)	8.9	0.75	57.8	3.86
IEC01-3(0.1)	7.0	0.8	68.6	3.84
IEC01-4(0.1)	6.8	0.8	52.4	2.85
IEC01-5(0.1)	6.5	2.3	40.5	6.05
IEC01-6(0.1)	—	—	—	—
Total	—	6.65	—	18.70
Average ( $\bar{x} \pm s$ )	$6.26 \pm 2.51$	—	$53.82 \pm 10.37$	—

\* The batch No. IEC01-1(0.1) means the elution of buffer with 0.1mol/L NaCl in the 1<sup>st</sup> batch of IEC.

## 2.3 亲和层析

IEC 收集的 NDPK-A 样品用 30kD 膜包浓缩 8 ~ 10 倍, 所得样品进行 9 批次亲和层析 (Affinity chromatography, AC), 共收得蛋白浓度为 ( $3.65 \pm 2.62$ ) g/L 的样品 6.24L, 其中 NDPK-A 纯度为 ( $83.60 \pm 9.20$ )%, 即: 回收目的蛋白 17.7g, 回收率为 94.6% (原始数据略)。

Fig. 3 是 NDPK-A 亲和层析洗脱图谱, 其中 P1 是目的蛋白峰, 由于洗脱缓冲液中的 ATP 在 280nm

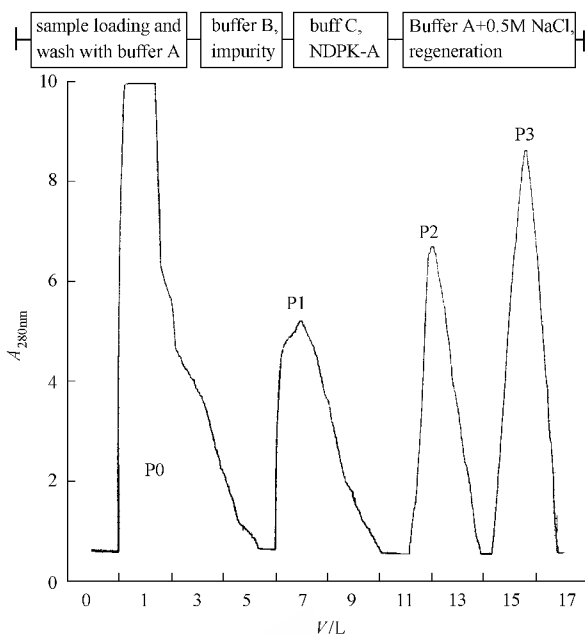


图 2 NDPK-A 离子交换层析洗脱图谱

Fig. 2 Elution profile of IEC of NDPK-A

P0: peak of sample loading; P1: peak of impurity; P2: peak of target protein; P3: regeneration.

处有吸收, 所以基线升高; 层析柱经过清洗后, 基线重新归零。Fig. 4 是部分批次亲和层析收集样品的 SDS-PAGE 分析原始结果, 可见主要杂质的分子量在 28kD 和 43kD 处, 鉴于 NDPK-A 在水溶液中形成六聚体, 分子量为 100kD, 因此, 可用凝胶过滤或者超滤对其进行最后的精制, 由于超滤还具有浓缩作用, 所以在较大规模纯化时, 选择超滤作为 NDPK-A 的精制步骤。

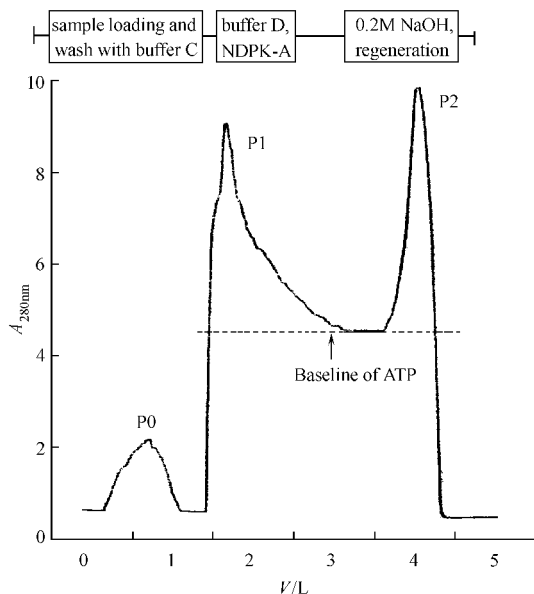


图 3 NDPK-A 亲和层析洗脱图谱

Fig. 3 Elution profile of AC of NDPK-A

P0: peak of sample loading; P1: peak of target protein; P2: regeneration.  
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

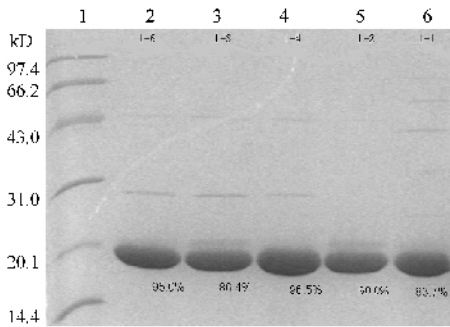


图4 部分批次亲和层析收集样品纯度分析结果

Fig. 4 Purity of NDPK-A collected in certain batches of AC  
1: LMW; 2~6: samples of certain batches of AC.

## 2.4 精制及样品后处理

混合各批次 AC 收集样品,以 0.9% NaCl 为缓冲液,超滤浓缩,调整蛋白浓度为 10g/L,共获得纯度为 96.3% 的 rhNDPK-A 溶液 1790mL,其中 NDPK-A 总量为 17.2g。Fig. 5 中 Lane 5 是精制后样品的纯度分析照片(96.3%),Lane 2 是离子交换柱上样样品,Lane 3 是 IEC01-1(0.1)批次样品,Lane 4 是 AC02-8 批次样品,目的蛋白纯度为 87.8%。

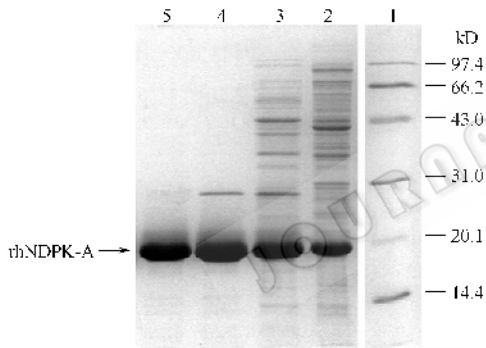


图5 精制样品及其它纯化样品的纯度分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis the purity of rhNDPK-A product and other samples

1: LMW; 2: fraction loaded on IEC column; 3: IEC01-1(0.1); 4: AC02-8; 5: rhNDPK-A product.

## 2.5 NDPK-A 纯化小结

对 NDPK-A 纯化各步骤的蛋白回收率和比活性进行小结,结果示于 Table 3 中,可见(1)伴随着样品纯度的增加,比活性平行升高,纯化前后比活性增加

约 4.5 倍,另外,总活性回收率接近 200%,这可能与样品在纯度较低时,杂蛋白干扰活性测定,导致比活性测定负误差有关(2)影响目的蛋白最终得率的因素主要不在柱层析,而在于样品前处理过程。匀浆后的样品,经过 2 次微滤和超滤后,回收率虽然只有 57.4%,但与我们在小试阶段(2~10L 规模发酵)所采用的流程(超声破碎→4℃低温离心→0.45μm 滤膜抽滤)相比<sup>[4,11]</sup>,回收率有倍数提高,并且工艺简化,时间大大缩短。根据我室纯化 NDPK-A 及其它蛋白的经验,采用超声破碎这一工艺,最多回收 20% 左右的目的蛋白,大部分蛋白都弃于超声破碎后的沉淀中。

IEC 和 AC 过程的回收率分别是 68.5% 和 94.6%,与小试阶段的回收率大致相当,最终回收率为 36.2%,与文献报道的小规模优化纯化工艺的回收率相当<sup>[13-15]</sup>。在柱层析过程中,离子交换层析对蛋白纯度和得率的影响较亲和层析大。我们在前期研究中,发现 Macro-Prep DEAE Support 树脂的纯化效果要明显优于 DEAE sephadex Fast Flow 树脂,与 DEAE sephadex Fast Flow 相比,Macro-Prep DEAE Support 所得 NDPK-A 纯度可提高 49%,蛋白得率可提高 170%(比较含 NDPK-A 的主要组份的数据),DEAE sephadex Fast Flow 的主要劣势在于目的蛋白洗脱不彻底<sup>[17]</sup>。但因为实验材料限制,在放大生产时,没有采用 Macro-Prep DEAE Support。如果采用更优填料,目的蛋白的纯度和回收率有望进一步提高。

采用本文报道的工艺,rhNDPK-A 的纯化得率为 1.15%(W/W,NDPK-A/wet cell)。前文已经报道,rhNDPK-A 经 50L 高密度培养后,菌体产量为 (2220.00 ± 169.71)g/batch<sup>[12]</sup>,也就是说,每批次发酵菌体经纯化后,可得纯度为 96.3% 的重组蛋白 25.5g,纯化产量为 510 mg/L,这远远超过目前报道的绝大多数重组蛋白产量。rhNDPK-A 能最终得到高产,一方面与目的蛋白的可溶性表达有关,但更重要的是与样品前处理过程有关。在柱层析技术日趋

表3 rhNDPK-A 纯化过程总结

Table 3 Summary of the purification of rhNDPK-A

Process	Protein con. (g/L)	Volume/L	Purity/%	Quantity of NDPK-A/g	Recovery/% (Step/step)	Recovery/% (Step/homogenated)	Bioactivity (u/mg)
Homogenate	22.79	12.00	17.40	47.6	-	-	220
Micro&Ultra-filter	9.22 ± 0.11	13.06	22.55 ± 0.78	27.3	57.4	57.4	300
IEC	6.26 ± 2.50	6.65	53.82 ± 10.37	18.7	68.5	39.3	680
AC	3.65 ± 2.62	6.24	83.60 ± 9.20	17.7	94.6	37.2	1000
Polish	10.0	1.79	96.3	17.2	97.4	36.2	1200

成熟的今天,样品前处理过程的回收率逐渐成为决定重组蛋白纯化产量的关键因素。另外,本文所采用的工艺也比较简便,通过充分应用切向过滤技术,对样品进行分级过滤、浓缩,省去了大量的离心过程,这更有利于工业化应用。

事实上,按照本文所报道纯化工艺,若对样品前处理条件、IEC 洗脱液离子强度和盐浓度、AC 缓冲液中 DTT 含量等关键参数精细控制或者进一步优化,蛋白得率还可以进一步提高。中试规模高效纯化 rhNDPK-A 为核苷二磷酸激酶的大规模生产奠定了基础,也为其它重组蛋白的 Kg 级制备提供了可供借鉴的经验。

致谢 衷心感谢原北京凯正生物工程发展有限公司全体员工对本论文工作的大力支持! 特别感谢张晓伟、王小宁、李军、严玖凤、周代福、曹嘉庚、申晓阳、高群松、李先钟、王意等老师为本论文所作的实质性贡献!

## REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Fan Z, Beresford PJ, Oh DY, *et al.* Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell*, 2003, **112**(5): 659 - 672.
- [ 2 ] Roymans D, Willems R, Van Blockstaele DR, *et al.* Nucleoside diphosphate kinase (NDPK/NM23) and the waltz with multiple partners: possible consequences in tumor metastasis. *Clin Exp Metastasis*, 2002, **19**(6): 465 - 476.
- [ 3 ] Salerno M, Palmieri D, Bouadis A, *et al.* Nm23-H1 metastasis suppressor expression level influences the binding properties, stability, and function of the kinase suppressor of Ras1 (KSR1) Erk scaffold in breast carcinoma cells. *Mol Cell Biol*, 2005, **25**(4): 1379 - 1388.
- [ 4 ] Wang YF(王一飞), Xing SJ(邢少璟), Zhang MY(张美英), *et al.* Purification, identification of nucleoside diphosphate kinase A and its potentiation on antitumor effect of cisplatin. *Chin J Pharmacol Toxicol*(中国药理学与毒理学杂志), 2003, **17**(1): 40 - 43.
- [ 5 ] Xiong S(熊盛), Li XL(李雪玲), Wang YF(王一飞), *et al.* Determination of serum NDPK-A and its clinical significance. *Chin J Health Lab Technol*(中国卫生检验杂志), 2004, **14**(5): 522 - 523.
- [ 6 ] Cheng YX(陈宇霞), Zhang MY(张美英), Xiong S(熊盛), *et al.* Analysis of the relationship between nm23-H1 gene and human chronic myeloblastic leukemia using siRNA. *Chin J Biotechnol*(生物工程学报), 2006, **22**(3): 403 - 407.
- [ 7 ] Banki MR, Gerngross TU, Wood DW. Novel and economical purification of recombinant proteins: intein-mediated protein purification using in vivo polyhydroxybutyrate matrix association. *Protein Sci*, 2005, **14**(6): 1385 - 1386.
- [ 8 ] Schlapschy M, Grimm S, Skerra A. A system for concomitant overexpression of four periplasmic folding catalysts to improve secretory protein production in *Escherichia coli*. *Protein Eng Des Sel*, 2006, **19**(8): 385 - 390.
- [ 9 ] Vallejo LF, Rinas U. Optimized procedure for renaturation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 at high protein concentration. *Biotechnol Bioeng*, 2004, **85**(6): 601 - 609.
- [ 10 ] Xiong S(熊盛), Lin J(林剑), Yao RH(姚汝华), *et al.* Fermentation condition of recombinant bovine fibroblast growth factor in *Escherichia coli*. *Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition)*(华南理工大学学报·自然科学版), 2001, **29**(4): 52 - 58.
- [ 11 ] Hou Y(侯宇), Zhao LG(赵利淦), Zhang MY(张美英), *et al.* Study on high level expression and purification of Nm23-H1/NDPK-A in *Escherichia coli*. *Chin J Biochem Mol Biol*(中国生物化学与分子生物学学报), 1998, **14**(6): 655 - 660.
- [ 12 ] Xiong S(熊盛), Qian CW(钱垂文), Huang L(黄立), *et al.* Pilot-scale fermentation of rhNDPK-A producing *E. coli* in 50L culture. *China Biotechnol*(中国生物工程杂志), 2006, **26**(10): 1 - 6.
- [ 13 ] Gilles AM, Presecan E, Vonica A, *et al.* Nucleoside diphosphate kinase from human erythrocytes. *J Biol Chem*, 1991, **266**(14): 8784 - 8789.
- [ 14 ] Fukuchi T, Shimada N, Hanai N, *et al.* Recombinant rat nucleoside diphosphate kinase isoforms (alpha and beta): purification, properties and application to immunological detection of native isoforms in rat tissues. *Biochim Biophys Acta*, 1994, **1205**(1): 113 - 122.
- [ 15 ] Kim SY, Chang KH, Doh HJ, *et al.* Rapid purification and characterization of nucleoside diphosphate kinase isoforms using ATP-sepharose affinity column chromatography. *Mol Cells*, 1997, **7**(5): 630 - 634.
- [ 16 ] Ausubel F, Brent R, Kingston RE, *et al.* Using the Bradford method to determine protein concentration. In: *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sons, Inc., 1987.
- [ 17 ] Qian CW(钱垂文), Luo Y(罗勇), Zhang MY(张美英), *et al.* Purification of rNM23-H1/NDPK-A in middle-scale. *Biotechnology (China)*(生物技术), 2002, **12**(1): 23 - 24.