

高速逆流色谱双水相体系分离蛋白质

鄧文波¹, 鄧秋云², 宋江楠¹, 顧 銘¹, 歐陽藩¹

(1. 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 100080 ;
2. 上海同田生化技术有限公司, 上海 200122)

摘要 利用多分离柱高速逆流色谱仪,研究了聚乙二醇 1000(PEG1000)-磷酸盐双水相体系的固定相保留率及该体系对蛋白质混合物和鸡蛋清样品的分离。以 14.0% PEG1000-16.0% 磷酸盐体系的上相为固定相,在流速 0.6 mL/min 和转速 900 r/min 的条件下,固定相的保留率达到 33.3%。在 pH 9.2 的 PEG1000-磷酸盐双水相体系中,细胞色素 C、溶菌酶和血红蛋白的分配系数差异最大,采用该 pH 值的 14.0% PEG1000-16.0% 磷酸盐双水相体系,在流速 1.0 mL/min 和转速 850 r/min 的条件下,成功地分离了这 3 种蛋白质的混合物。鸡蛋清中的主要蛋白质成分——卵转铁蛋白、卵白蛋白和溶菌酶在 pH 9.2 的 15.0% PEG1000-17.0% 磷酸盐体系中也具有最大的分配系数差异。采用该体系,在流速 1.0 mL/min 和转速 850 r/min 的条件下,成功地分离了鸡蛋清样品,得到的卵白蛋白、溶菌酶和卵转铁蛋白的电泳纯度分别为 100%、100% 和 60%,收率均大于 90%。

关键词 高速逆流色谱;双水相体系;蛋白质;分离纯化

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2005)01-0012-06

Separation of Proteins in Aqueous Two-Phase Systems with High-Speed Counter-Current Chromatography

ZHI Wenbo¹, DENG Qiuyun², SONG Jiangnan¹, GU Ming¹, OUYANG Fan¹

(1. National Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China ;
2. TAUTO Biotech Co., LTD, Shanghai 200122, China)

Abstract : High-speed counter-current chromatography (HSCCC) is a continuous liquid-liquid partition chromatography , with remarkable advantages of high separation efficiency and no adsorption or denaturation by solid phase. The retention of stationary phase and the separation of proteins in polyethylene glycol 1000 (PEG1000)-phosphate aqueous two-phase system (ATPs) were studied with a multi-column high speed-counter-current chromatograph. The flow direction and speed of the mobile phase , and the rotation direction and speed of the apparatus showed different effects on the retention of the stationary phase , which reached the maximum at 33.3% with a flow rate of 0.6 mL/min and a rotation speed of 900 r/min in 14.0% PEG1000-16.0% phosphate ATPs. Distinct differences in partition coefficients among cytochrome C , lysozyme and hemoglobin were found at pH 9.2 and these three proteins were successfully separated in 14.0% PEG1000-16.0% phosphate ATPs at pH 9.2 by HSCCC with the apparatus rotating at 850 r/min and the mobile phase flow rate of 1.0 mL/min. The major protein components in hen egg white , including ovaltransferrin , ovalbumin and lysozyme also show distinct differences of partition coefficients in PEG1000-phosphate ATPs at pH 9.2. Ovalbumin and lysozyme were successfully purified to homogeneity and ovaltransferrin to ca 60% purity from the hen egg white sample with yields over 90% in 15.0% PEG1000-17.0% phosphate ATPs at pH 9.2 with the apparatus rotating at 850 r/min and mobile phase flow rate of 1.0 mL/min.

Key words : high-speed counter-current chromatography ; aqueous two-phase system ; protein ; separation and purification

高速逆流色谱(high-speed counter-current chromatography , HSCCC)技术是一种无固体载体的连续液-液分配色谱技术,其固定相通过重力场和离心力场作用被保留在分离柱内^[1,2],避免了固体载体与样品发生化学反应而变性及不可逆吸附;样品回收率高;可从粗制样品中一步制备高纯度单体化合物;既适用于微量分析也可用于大规模制备;已广泛用于生物工程、医药、天然产物、环境分析、食品等领域^[3]。

但 HSCCC 分离天然产物、抗生素、无机物时,基本局限于有机相/水相溶剂体系^[4]。有机溶剂通常会与生物大分子和细胞发生不可逆的结构和性质改变,因此一般选择双水相体系用于这类物质的分离纯化。双水相体系条件温和(含水量高达 70% ~ 90%),特别适用于生物大分子,如蛋白质、核酸和细胞粒子的提取和纯化^[5,6]。但双水相体系界面张力低、粘度高、两相密度差异小^[7],在连续逆流分配过程中会出现两相溶剂易乳化、分相慢、混合不充分、传递阻力较大的问题^[4]。因此, HSCCC 采用双水相体系分离纯化生物大分子还处于研究阶段,研究的内容既包括设备结构的改进,也涉及双水相分离体系工艺条件的探索和研究。目前用于双水相体系的 HSCCC 设备没有实现规模化生产,这些设备主要是实验室研制的正交轴高速逆流色谱仪^[8]和非同步高速逆流色谱仪^[9],其结构较复杂,包括多级齿轮传动或多个电机^[4],离心分离的主体部分又多数采用分离柱和配重物相平衡的方式,不利于分离规模的放大。近几年,我国已有专门的公司批量生产系列 HSCCC 仪器设备,其中具有自有知识产权的 TBE-300V 型高速逆流色谱仪为多分离柱同步行星式,结构简单、三分离柱串联结构自动平衡、色谱柱容积大、无故障运行时间长、稳定性高,与 Amersham 的 ÄKTA PRIME 系统连用,采用有机相/水相体系成功地分离纯化了多种单体化合物。

本文将该设备用于双水相体系分离蛋白质的研究,为 HSCCC 分离生物大分子探索了新的途径。与目前常用的分离技术相比,采用高速逆流色谱双水相技术分离蛋白质具有显著的优点:无固体载体吸附、可以对颗粒或沉淀物质进行分离而不会造成色谱柱填料的堵塞^[2]、简化了样品预处理工作、兼具小规模分析和大规模制备的功能^[4]、回收率高、易于放大等。目前存在的主要不足是分离效率较低、双水相体系成本较高^[10]。这些问题可以通过进一步改进设备结构、优化分离工艺、开发新型实用的双水相体系而得以解决。

针对该设备特点,研究了双水相体系的固定相

保留率及该体系对标准蛋白质混合物和鸡蛋清蛋白质成分的分离工艺。所采用的标准蛋白质包括细胞色素 C、溶菌酶和血红蛋白,这些蛋白质具有独特的颜色和较高的稳定性,适用于分离工艺的研究。鸡蛋清具有来源广泛、成本低廉的特点,其组分如卵转铁蛋白、卵白蛋白和溶菌酶均具有一定的生物学活性和应用价值^[11]。因此,试验采用 HSCCC 技术进行鸡蛋清组分的分离具有研究和应用价值。

1 实验部分

1.1 仪器

TBE-300V 型高速逆流色谱仪(上海同田生化技术有限公司)。聚四氟乙烯管(直径 2.6 mm)缠绕在支架上形成多层螺旋管作为 1 个分离柱,3 个分离柱串联(如图 1 所示),柱容积为 120 mL,分离柱位于恒温夹套内,通过循环水浴(HX-1050,北京博医康实验仪器有限公司)控制分离柱的温度。进样圈体积 20 mL。通过无级变频调速控制主机转速为 700 ~ 1 000 r/min。

主机与 ÄKTA PRIME 系统(Amersham Bioscience, Sweden)联用,进行泵液的检测和收集。

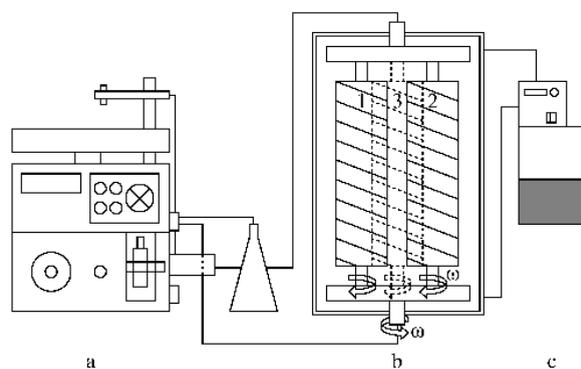


图 1 TBE-300V 型高速逆流色谱仪结构图

Fig. 1 Schematic of high-speed counter-current chromatographic model TBE-300V

a. ÄKTATM prime ; b. TBE-300V ; c. water bath ; 1, 2 and 3. separation columns.

1.2 试剂

聚乙二醇 1000(PEG1000)(化学纯)及磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、柠檬酸、柠檬酸钠(均为分析纯)购自上海化学试剂公司。水为蒸馏水。

标准蛋白:细胞色素 C(牛心)、溶菌酶(鸡蛋清)、卵白蛋白(鸡蛋清)、卵转铁蛋白(鸡蛋清)、血红蛋白(牛)均为 Sigma 公司(USA)产品。

蛋白质的相对分子质量(M_r)标准:低 M_r 标准蛋白质(上海升正生物技术有限公司),含有兔磷酸化酶 B($M_r = 97\ 000$)、牛血清白蛋白(BSA, $M_r = 66\ 000$)、兔肌动蛋白($M_r = 43\ 000$)、牛碳酸酐酶

($M_r = 31\ 000$)、胰蛋白酶抑制剂 ($M_r = 20\ 000$) 和鸡蛋清溶菌酶 ($M_r = 14\ 000$)。

1.3 双水相体系的配制

根据所用双水相体系的组成称取所需的 PEG1000 和成相盐,将两者分别溶于占所需量一半的蒸馏水中,充分混合,并静置分相待用。

1.4 蛋白质分配系数测定

将 1 mg 待测蛋白质溶于装有 2 mL 等体积上、下相的试管中,混匀后静置分相,分别取上、下相各 0.5 mL 在 280 nm 处检测,记录吸光度 A (以相同组成但不含蛋白质的上、下相作为空白对照),计算分配系数 K (K 定义为溶质在上、下相中吸光度之比,即 $K = A_U/A_L$,下标 U 和 L 分别表示上、下相)。

1.5 分离样品制备

1.5.1 标准蛋白质样品制备

将 1 mg 细胞色素 C、5 mg 血红蛋白和 20 mg 溶菌酶溶于 2 mL 蒸馏水中,加入一定量的 PEG1000 和磷酸盐,使其组成与所用分离体系相同,轻微搅拌使所有固体物完全溶解。

1.5.2 鸡蛋清样品制备

按照 Awadé 等^[11]的方法制备鸡蛋清样品:用 2 倍体积的含 0.4 mol/L NaCl 和 10 mmol/L β -巯基乙醇的 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 9.0) 缓冲液稀释鸡蛋清并轻微搅拌过夜。取 4 mL 鸡蛋清样品,加入一定量的 PEG1000 和磷酸盐,使其组成与所用分离体系相同,轻微搅拌使所有固体物完全溶解。

1.6 高速逆流色谱分离

将“1.3”节所得上相(即固定相)充满 HSCCC 分离柱,以所需流速泵入下相(即流动相),并以一定转速和旋转方向运转主机;当流动相从溢出口稳定流出时,表明分离柱内已建立起两相平衡,将制备好的样品经由进样圈进样。

1.7 固定相保留率测定

将“1.3”节所得固定相充满 HSCCC 分离柱,在以所需流速泵入流动相的同时收集从溢出口流出的固定相,并以一定的转速和旋转方向运转主机;当流动相从溢出口稳定流出时,记录所排出的固定相体积 V_e 。固定相保留率 R 定义为保留在分离柱内的

固定相体积占分离柱总容积 V_t 的比例,即 $R = (V_t - V_e) / (V_t)$ 。

1.8 蛋白质浓度的测定

蛋白质浓度的测定采用 Bradford 法^[12],以不含任何蛋白质而其余组成与待测样品相同的体系作为空白在 595 nm 波长下测定,用牛血清白蛋白绘制标准曲线。

1.9 电泳分析

参考文献[13]的方法进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析,分离胶质量浓度为 100 g/L,采用考马斯亮蓝进行染色。

采用 BandScan 软件(V4.30, Glyko)进行电泳图谱分析。

2 结果与讨论

2.1 仪器参数对固定相保留率的影响

高速逆流色谱是无固相载体的液-液分配色谱,其固定相是通过重力场与离心力场的共同作用被保留在分离柱内的,固定相的保留率直接影响体系的分辨率。一般来说,固定相的保留率越高,分辨率越高^[14],因此首先研究了仪器参数对双水相体系固定相保留率的影响。PEG1000-无机盐双水相体系的上相中富含 PEG1000,具有较高的粘度,流动性差,适于作为固定相^[15],因此如未特别指出,本文均以上相作为固定相。

2.1.1 流向与转向

流动相的流动方向和主机的旋转方向是可调的。任意确定色谱柱的首尾端,当流动相从首端流入定义为正向;主机的旋转方向根据电机的旋转方向定义,一般规定为面对电机轴时顺时针方向为正向。由于电机与主机是通过皮带传动,因此,二者的旋转方向相同。

流动相的流动方向和主机的旋转方向对固定相保留率的影响如表 1 所示,其中流动方向和旋转方向的组合一共有 4 种。流动相的流动方向对固定相的保留率和流失有着显著的影响,流动相正向流动得到的保留率要远高于流动相反向流动,这可能与阿基米德螺线力的作用方向有关。主机的旋转方向

表 1 流动相的流动方向和主机的旋转方向对双水相体系固定相保留率的影响

Table 1 Effects of flow direction of mobile phase and rotation direction of the apparatus on the retention of stationary phase

No.	Status		Rotation speed/ (r/min)	Flow rate/ (mL/min)	Retention/ %	Flow-away/ (mL/h)	Baseline
	rotation	flow					
1	forward	backward	800	1.0	16.7	>5	unstable
2	backward	backward	800	1.0	17.0	>5	unstable
3	forward	forward	800	1.0	24.8	<0.5	stable
4	backward	forward	800	1.0	25.7	<0.5	stable

对固定相的保留影响不大,但反向旋转产生的固定相保留率要略高于正向旋转。

2.1.2 转速与流速

高速逆流色谱设备的固定相保留率也取决于主机的旋转速度和流动相的流速。在有机相-水相体系中,旋转速度越高,固定相保留率越高。但是,对

于界面张力比较低、粘度比较高的双水相体系而言,虽然需要较高的转速以使高粘度的固定相保留在色谱柱内,但是过高的旋转速度所产生的两相剧烈混合,对固定相保留率又将产生不利影响。流动相流速的变化通过影响流体动力学平衡而改变固定相的保留率。实验结果如图 2 所示。

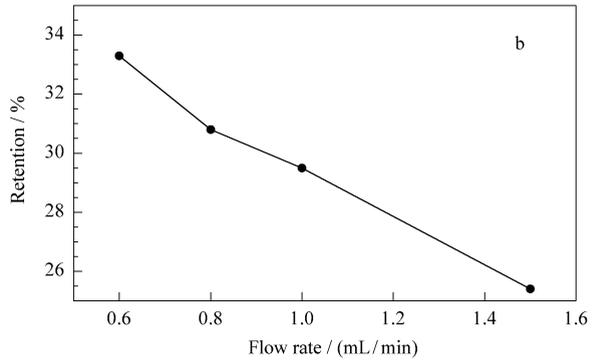
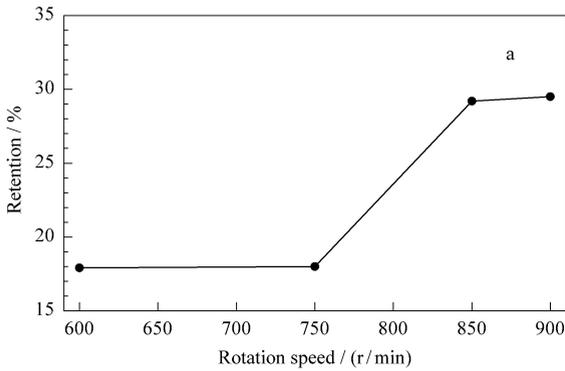


图 2 主机的旋转速度(a)和流动相的流速(b)对双水相体系固定相保留率的影响

Fig.2 Effects of rotation speed of the apparatus (a) and flow rate of mobile phase (b) on the retention of stationary phase in 14.0% PEG1000-16.0% phosphate ATPs

a. flow rate : 0.6 mL/min ; flow direction : forward. b. rotation speed : 900 r/min , rotation direction : backward.

从图 2-a 中可以看出,设备转速较低时(600 和 750 r/min)得到的固定相保留率低于 20%,转速提高到 850 r/min 后保留率显著上升到约 30%,说明对于高粘度的双水相体系需要较高转速产生强的离心力场才能有效地将固定相保留在色谱柱内。在所测试的转速范围内并未出现由于转速过高而产生两相的过度乳化现象,这是因为该设备设计分离柱时选取了合适的自转和公转半径,从而在高流速下也不会产生过强的混合使双水相体系乳化。

流动相的流速对固定相保留率的影响没有转速影响那么显著。当流动相流速从 0.6 提高到 1.5 mL/min,固定相的保留率仅从 33% 下降至 25%,因此为了缩短分离时间,可适当提高流动相的流速。

固定相保留率是 HSCCC 分离体系中的重要参数,双水相体系由于自身的高粘度、易乳化等特点导致其保留率(30% ~ 50%)低于有机相/水相体系的保留率(40% ~ 85%)^[4],但能够满足物质分离的基本要求。固定相保留率受主机转向、转速及流动相流动方向、流速等因素的影响,理论上讲,保留率越高,系统分辨率越高,但在实际分离过程中,应以物质的有效分离为目的,兼顾仪器的特点和运行时间等因素,单纯追求高保留率并不利于蛋白质的分离^[16]。

2.2 pH 值对标准蛋白质分配系数的影响及标准蛋白质混合物的 HSCCC 分离

高速逆流色谱对混合样品有效分离依赖于样品中各组分分配系数的差异。在双水相体系中影响

物质分配系数的因素很多,包括双水相体系的组成、pH 值、离子强度等。其中 pH 值对蛋白质的分配系数影响很大,而且对不同蛋白质的影响程度有差异。研究了 PEG1000-磷酸盐双水相体系中 pH 值对不同种类蛋白质分配系数的影响,结果如图 3 所示。

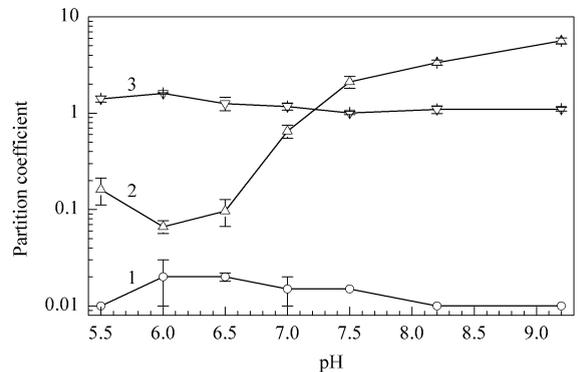


图 3 pH 对 PEG1000-磷酸盐体系中蛋白质分配系数的影响
Fig.3 Effect of pH on the protein partition coefficients in PEG1000-phosphate system

1. cytochrome C ; 2. hemoglobin ; 3. lysozyme.

从图 3 可见,细胞色素 C、血红蛋白和溶菌酶等 3 种蛋白质的分配系数随体系 pH 的变化都很典型,细胞色素 C 在所测试 pH 条件下都分配在下相中,溶菌酶则是基本等量分配在上下相中,而血红蛋白分配系数则随 pH 的增加呈 S 型变化。从图 3 中可以看出在 pH 9.2 条件下,3 种蛋白质的分配系数差异明显。分配系数差异越大,分离度越高。通过研究 pH 值对分配系数的影响,可以找到使蛋白质混合物得以有效分离的 pH 范围,将其与蛋白质活性

pH 范围结合 ,可以确定双水相体系的 pH。

采用 pH 9.2 的 PEG1000-磷酸盐体系对细胞色素 C、血红蛋白和溶菌酶的混合物进行了分离试验 ,结果如图 4 所示。图 4 中洗脱峰的蛋白质类型由 3 种蛋白质的特征颜色(细胞色素 C 为玫瑰红色、溶菌酶无色、血红蛋白为黄色)和相应峰的电泳结果进行确定。

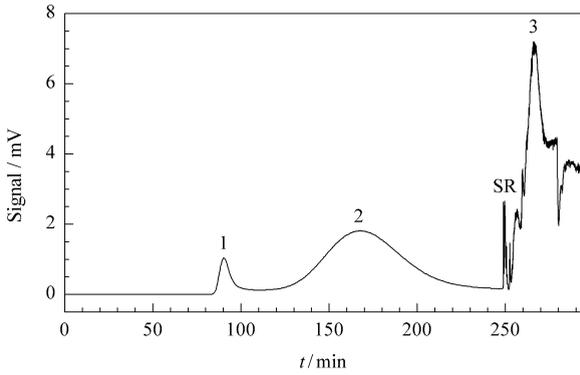


图 4 3 种蛋白质混合物的高速逆流色谱洗脱曲线
Fig.4 HSCCC chromatogram of a mixture of cytochrome C , hemoglobin and lysozyme

Conditions : separation column , 120 mL , coiled PTFE tube (i. d. 2.6 mm) ; mobile phase , lower phase ; flow rate , 1.0 mL/min ; rotation speed , 850 r/min ; sample solution , 2 mL , containing 1 mg cytochrome C , 5 mg hemoglobin , and 20 mg lysozyme ; solvent system : pH 9.2 , 14.0% (w/w) polyethylene glycol 1000-16.0% (w/w) dipotassium hydrogen phosphate in distilled water.

1. cytochrome C ; 2. lysozyme ; 3. hemoglobin ; SR : stationary phase backward elution.

从图 4 可见 3 种蛋白质按照其分配系数由小到大的顺序被洗脱 ,细胞色素 C 和溶菌酶两个洗脱峰的分辨率 (R_s) 为 1.15。由于血红蛋白的分配系数很大 ,基本上完全分配于上相(固定相) ,难以被洗脱 ,在前面两种蛋白质被完全洗脱后 ,以上相为流动相进行反流向洗脱(图 4 中的 SR) ,使含有血红蛋白的固定相被反向洗出 ,得到了血红蛋白的洗脱峰。但由于反向洗脱时会带出部分流动相 ,因此基线波动较大。

2.3 pH 值对鸡蛋清中主要蛋白质成分分配系数的影响及鸡蛋清的 HSCCC 分离

鸡蛋清中的主要蛋白质成分包括 4 种^[11] :卵白蛋白、卵转铁蛋白、溶菌酶和卵粘蛋白。测试了其中 3 种主要蛋白质成分(卵白蛋白、卵转铁蛋白和溶菌酶)在不同 pH 的 PEG1000-磷酸盐双水相体系中的分配系数变化情况 ,结果如图 5 所示。在 pH 9.2 条件下 3 种蛋白质的分配系数差异最大 ,利于实现有效的分离。另外 ,包括卵粘蛋白在内的其他相对分子质量较大的糖蛋白在 PEG1000-磷酸盐双水相体系中基本完全分配于上相(分配系数 > 10) ,不随

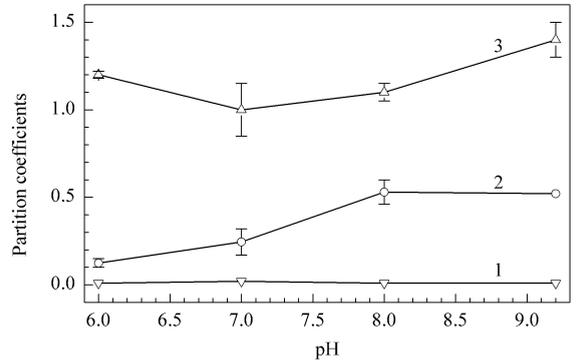


图 5 在 PEG1000-磷酸盐体系中 pH 对鸡蛋清中蛋白质分配系数的影响

Fig.5 Effect of pH on the protein in a hen egg white sample partition coefficients in PEG 1000-phosphate system

1. ovaltransferrin ; 2. ovalbumin ; 3. lysozyme.

pH 发生明显改变^[17]。因此 ,这些蛋白质在 pH 9.2 的 PEG1000-磷酸盐双水相体系中应可以得到有效的分离。

采用 pH 9.2 的 PEG1000-磷酸盐体系对鸡蛋清样品进行了高速逆流色谱分离试验 ,得到的洗脱图谱如图 6 所示。图 6 中洗脱峰的蛋白质类型由 3 种蛋白质的特征颜色(卵转铁蛋白为粉红色 ,其余两种蛋白质无色)、相对含量和电泳结果(见图 7)确定。卵转铁蛋白、卵白蛋白和溶菌酶按照分配系数从小到大的顺序被洗脱 ;卵粘蛋白由于分配系数过大没有被洗脱 ,仍然保留在上相 ,由于其含量较低 ,未采用固定相反向洗脱的方式进行洗脱 ,而是直接将其从体系中吹出后从固定相(上相)回收。

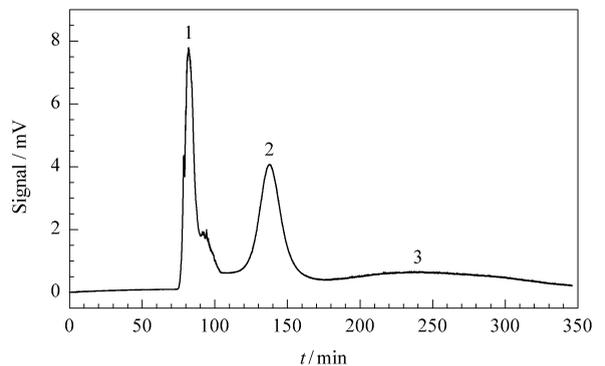


图 6 鸡蛋清的高速逆流色谱洗脱曲线

Fig.6 HSCCC chromatogram of a hen egg white sample

Conditions : sample solution , 4 mL hen egg white preparation ; solvent system : pH 9.2 , 15.0% (w/w) polyethylene glycol 1000-17.0% (w/w) dipotassium hydrogen phosphate in distilled water. Other conditions as in Fig.4.

1. ovaltransferrin ; 2. ovalbumin ; 3. lysozyme.

分离得到的 4 种蛋白质的凝胶电泳结果如图 7 所示。其中 ,卵白蛋白(图 7 中条带 4)和溶菌酶(图 7 中条带 5)均为单一条带 ,纯度较高。卵转铁蛋白

(图 7 中条带 3)在 M_r 为 50 000 和 35 000 处各有一条杂蛋白条带存在,该条带可能是鸡蛋清中存在的其他相对分子质量较小的糖蛋白^[11]。通过 HSCCC 分离得到的卵转铁蛋白纯度为 60% 左右,与 Awadé 等人^[11]通过凝胶渗透和阴离子交换色谱两步纯化得到的结果类似。在吹出固定相的电泳图谱上有 2 条明显的蛋白质条带(图 7 中条带 6),对应于几种不同聚合程度的糖蛋白,包括卵粘蛋白、ovalstatin 等^[11]。

对图 7 中鸡蛋清样品的条带采用 BandScan 软件分析蛋白质的相对含量,可知卵转铁蛋白约占 17%,卵白蛋白约占 55%,溶菌酶约占 10%,卵粘蛋白约占 1%。鸡蛋清样品上样量为 550 mg(体积为 6 mL),经纯化后得到的卵转铁蛋白约为 90 mg(收率约为 95%),卵白蛋白为 283 mg(收率约为 94%),溶菌酶为 51 mg(收率约为 93%)。

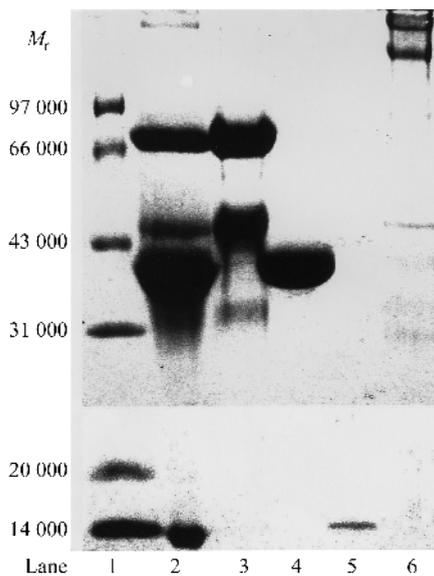


图 7 鸡蛋清样品高速逆流色谱洗脱峰的 SDS-PAGE 分析结果

Fig.7 SDS-PAGE results of elution peaks of hen egg white by HSCCC

Lane 1: protein marker; lane 2: hen egg white sample; lane 3: peak 1 in Fig. 6; lane 4: peak 2 in Fig. 6; lane 5: peak 3 in Fig. 6; lane 6: stationary phase.

3 结论

在同步式、多分离柱高速逆流色谱仪上,研究了仪器参数对双水相体系固定相保留率的影响,探索了双水相体系分离蛋白质的工艺。当以 14.0% PEG1000-16.0% 磷酸盐体系的上相为固定相,流动相以 0.6 mL/min 的速度正向流动,HSCCC 设备以

900 r/min 的速度反转,固定相的保留率为 33.3%。研究了 pH 值对不同种类蛋白质分配系数的影响,在 pH 9.2 时细胞色素 C、溶菌酶和血红蛋白的分配系数差异最大,可实现有效分离。采用 pH 9.2 的 14.0% PEG1000-16.0% 磷酸盐体系,调整流速为 1.0 mL/min,转速为 850 r/min,成功地分离了细胞色素 C、溶菌酶和血红蛋白的混合物。采用 pH 9.2 的 15.0% PEG1000-17.0% 磷酸钾盐体系,在 1.0 mL/min 流速和 850 r/min 转速下,成功地进行了鸡蛋清样品的分离,得到电泳纯度为 100% 的卵白蛋白和溶菌酶,收率均大于 90%。这些结果说明该设备可有效地用于蛋白质样品的分离纯化,为生物大分子的高效分离开辟了一条新的途径。

参考文献:

- [1] Ito Y, Bowman R L. J Chromatogr, 1977, 136(2): 189
- [2] Ito Y. Countercurrent Chromatography: Theory and Practice. New York: Marcel Dekker, 1988. 79
- [3] Dai Deshun, Wang Yiming, Luo Guoan. Chinese Journal of Analytical Chemistry(戴德舜,王义明,罗国安.分析化学), 2001, 29(5): 586
- [4] Zhang Tianyou. The Technology of Countercurrent Chromatography. Beijing: Science and Technology Press(张天佑.逆流色谱技术.北京:科学技术出版社), 1991. 285
- [5] Diamond A D, Hsu J T. Adv Biochem Eng/Biotechnol, 1992, 47(1): 89
- [6] Ohlsson R, Hentschel C C, Williams J G. Nucleic Acids Res, 1978, 5(2): 583
- [7] Albertsson P A. Partition of Cell Particles and Macromolecules. 3rd ed. New York: Wiley, 1986. 24
- [8] Lee Y W. In: Menet J M, Thibaut D, eds. Countercurrent chromatography. New York: Marcel Dekker, 1999. 149
- [9] Shinomiya K, Kabasawa Y, Yanagidaira K, Sasaki H, Muto M, Okada T, Ito Y. J Chromatogr A, 2003, 1 005(1-2): 103
- [10] Tan Tianwei, Shen Zhongyao. Microbiology(谭天伟,沈忠耀.微生物学通报), 1996, 23(6): 368
- [11] Awadé A C, Moreau S, Mollé D, Brulé G, Maubois J L. J Chromatogr A, 1994, 677(2): 279
- [12] Bradford M M. Anal Biochem, 1972, 72(2): 248
- [13] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 880
- [14] Shibusawa Y, Ito Y. J Liq Chromatogr, 1992, 15(15-16): 2 787
- [15] Shibusawa Y, Yamaguchi M, Ito Y. J Liq Chromatogr Relat Technol, 1998, 21(1-2): 121
- [16] Ito Y, Yang F Q, Fitze P, Powell J, Ide D. J Chromatogr A, 2003, 1 017(1-2): 71
- [17] Shibusawa Y, Lino S, Shindo H, Ito Y. J Liq Chromatogr Relat Technol, 2001, 24(13): 2 007