

学校编码：10384

分类号_____密级_____

学号：X2010192006

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

鼠神经生长因子纯化工艺的改进研究

The Improvement Of Purification Process for Mouse Nerve
Growth Factor

吴敏华

指导教师姓名：方柏山 教 授

熊玲媛 高级工程师

专业名称：生 物 化 工

论文提交日期：2015 年 12 月

论文答辩日期：2015 年 12 月

学位授予日期：年 月

答辩委员会主席：_____

评 阅 人：_____

2015 年 12 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于2021年01月01日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

鼠神经生长因子（nerve growth factor, NGF）是一种用于治疗正己烷中毒性周围神经病、急性脑血管病、脑萎缩、帕金森病、脊髓损伤及新生儿缺血缺氧性脑病的药物。目前 NGF 的上市产品主要由小鼠的颌下腺提取获得，而雄性小鼠颌下腺是 NGF 和分析其生物活性的主要供体。从颌下腺匀浆中，以离子交换色谱分析法，在中性酸碱度条件下，可以分离出 NGF。由于工艺的限制，目前 NGF 成本较高，规模较小，而如何放大生产规模，缩短生产周期，提高生产效率，从而达到提高经济效益是本文工艺改进的最终目标。本文结合本单位的实际，研究鼠神经生长因子纯化的改进工艺，获得如下主要研究结果：

（1）采用深层过滤器法替代原有的细胞碎片清除剂（CDR）+脱脂棉过滤的方法。对比考察 Pall 公司 PDH4 深层滤器、Millipore 公司 Millistak^R F0HC 深层过滤器和赛多利斯公司 Sartoclear P PB2 滤器过滤离心上清液，结果表明：在滤器通量和蛋白收率两个指标上，型号为 F0HC 是最优的、PB2 次之、PDH4 最差；在浊度指标上：三者均小于 100NTU，符合预期，其中，PDH4 最优、F0HC 次之，PB2 最差。综合比较，型号为 F0HC 的深层滤器最优，运用 F0HC 对比新旧工艺，在蛋白收率和浊度两个指标上，尤其是浊度指标上，使用 F0HC 深层滤器的蛋白收率为 90%、浊度为 54NTU，大大优于脱脂棉结合 CDR 过滤的蛋白收率 76%和浊度为 2000NTU。

（2）选取了 Pall、Millipore、GE 三个厂家的 30KD 和 10KD 的超滤膜包分别进行试验，Pall 公司型号为 OS030T12 和 OS010T12 的膜包在目标蛋白收率和比活性这两个关键指标上均高于 Millipore 以及 GE 公司的膜包，而 Pall 公司生产的这两种型号的膜包在蛋白收率、电导率和比活性这三个关键指标上，没有差异。鉴于原生产工艺一直使用透析袋的孔径为：14KD，同时根据超滤膜截留分子量（MWCO）选择的常用因素 X，其值越大对于所需浓缩的料液损失越小，30KD 膜包对应的 X 值为 4.3，10KD 膜包对应的 X 值为 13，故选择型号为 OS010T12 的膜包作为最终的超滤膜。通过对比实际生产中离心上清液经脱脂棉和 CDR 抽滤得到的料液，与经过 F0HC 澄清过滤得到的料液进行蛋白收率的比对，对比超

滤膜透析方式和透析袋透析方式的蛋白收率和原液 NGF 纯度，结果超滤膜透析方式蛋白收率和原液 NGF 纯度均高于 95%，优于透析袋透析方式，同时其经济性也较好，全年物料成本可节省 6 万。

(3) 采用美国 GE 公司Sephacryl (介质A)，美国Millipore公司Fractogel (介质B)，美国PALL公司UniCM-50替代原有的CM52层析填料，3 种填料对NGF的静态结合载量表明，GE 公司的最新一代填料Sephacryl (介质A) 载量最高，其次为 Millipore 的Fractogel (介质B)，UniCM-50填料II柱静态载量明显低于其他两种，料动态载量实验，Sephacryl (介质A) 蛋白含量为1.87 mg/ml，Fractogel (介质B) 蛋白含量为1.50 mg/ml。Sephacryl (介质A) 优于Fractogel (介质B)，故选用GE 公司Sephacryl (介质A)。

(4) 工艺过程确定。将细胞碎片与油脂去除优化、透析变更为超滤工艺以及填料变更等三个变更贯穿起来，主要考察CM Sephacryl (介质A) 填料应用于1500对鼠颌下腺提取NGF纯化的可行性；考察Pall 10KD超滤应用于1500对鼠颌下腺规模脱盐的可行性，考察深层过滤 (Merck) 替代脱脂棉和CDR进行油脂和细胞碎片去除应用于1500对颌下腺规模脱盐的可行性，结果表明新工艺的回收率为83.43%，5KD超滤后的回收率为101.97%，这表明新工艺比原来工艺的产品质量好。

关键词：鼠神经生长因子 纯化深层过滤 超滤 离子交换填料

Abstract

Mouse NGF is used in the treatment of N-hexane toxic peripheral neuropathy, acute cerebrovascular disease, brain atrophy, Parkinson's, spinal cord injury (sci) and neonatal hypoxic ischemia encephalopathy. Current mouse NGF listed products are mainly extracted from the male mouse submandibular gland. Under the condition of neutral pH value, NGF can be purified from the submandibular gland homogenate with ion exchange chromatography. As a result of the limitation of technology, the current mouse NGF is high in costs and small in size. Thus, how to enlarge the scale of production, shorten the production cycle and improve production efficiency, in order to improve the economic benefit is the ultimate goal of the process improvement. In this article, based on the research of the improvement of mouse nerve growth factor and purification process, we have come to the conclusions as follows:

(1) This paper changes the original CDR + absorbent cotton filter, the method of using deep bed filter to filter, contrast Pall company PDH4 deep filter, Millipore company MillistakR F0HC deep filter, cerlords dolly company Sartoclear P PB2 filter, the results show that the flux in the filter and protein yield of two indicators, the model is optimal for F0HC, PB2, and PDH4 is worst; On turbidity index, they are less than 100 NTU, PDH4 and F0HC are better, PB2 is worst. Above all, optimum model for F0HC deep filter. Contrast old with new craft using F0HC, the protein yield and turbidity on the two indicators, especially on the turbidity index, using deep filter to filter greatly better than that of cotton wool in combination with the CDR.

(2) This paper selectes the Pall, Millipore and GE three manufacturers of 30 kd and 10 kd UF membranes. They were tested respectively, and the ultrafiltration membrane bag type 0S030T12 and 0S010T12 film bag in the target protein yield and activity than on these two key indicators were higher than the other four types of membrane bag, and Pall company produces two types of membrane in protein yield,

conductivity and activity than on the three key indicators, no difference. In view of the original production technology has been using the aperture of dialysis bag: 14 kd, at the same time according to intercept molecular weight (MWCO) ultrafiltration membrane choose common factors of X, the greater its value for the enrichment of the smaller loss of material liquid, 30 kd membrane package corresponding X value is 4.3, 10 kd membrane package corresponding to 13 X value, so the choice model of OS010T12 membrane package as the final ultrafiltration membrane. By comparing the actual production of centrifugal clear liquid on the cotton wool and CDR suction filter material liquid, and after F0HC clarification filtration of material liquid than the yield of protein, and the results ultrafiltration membrane dialysis method and protein yield and concentrate the way of dialysis, dialysis bag model NGF purity, the ultrafiltration membrane dialysis method is better than dialysis, dialysis bag method, at the same time the economics is also better.

(3) This paper selectes three kinds of fillers: Sepharose (Medium A) , Fractogel (Medium B) and UniCM – 50. The original CM52 chromatographic packing is replaced by them. The static combination of loads of them show that GE Sepharose (Medium A) loads is highest, followed by Millipore Fractogel (Medium B) , UniCM - 50 packing column II static loads significantly lower than the other two kinds. GE Sepharose (Medium A) is GE's latest generation of packing medium. On the material dynamic load experiment, Sepharose (Medium A) protein content is 1.87 mg/ml, Fractogel COO protein content is 1.50 mg/ml. Sepharose FF than Fractogel (Medium B) , so GE Sephrose (Medium A) is chose.

(4) Determine the cellular debris and grease removal optimization, dialysis the change for the ultrafiltration process and packing the implementation, this chapter will through the above three changes, mainly inspects the CM Sepharose (Medium A) (GE products) filler used in 1500 for the feasibility of the model NGF and purification; Pall 10 kd ultrafiltration was applied to 1500, the feasibility of scale desalination deep filter (Merck) instead of cotton wool and CDR for oil and cellular debris removal applied in 1500, the feasibility of scale desalination results show that the new technology combined with the peak rate of recovery was 83.43%, the recovery of

5KD after ultrafiltration rate was 101.97%, which indicates that the product quality is better than the original technology, and has economic advantages.

Keywords : Mouse nerve growth factor; Deep purification filtering; Ultrafiltration; Ion-exchange filler

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

摘 要	I
Abstract.....	I
第一章 文献综述	1
1.1 NGF 的结构和功能.....	1
1.1.1 小鼠 NGF.....	1
1.1.2 NGF 的临床应用.....	3
1.2 NGF 的纯化分离.....	5
1.2.1 NGF 产业化.....	5
1.2.2 NGF 的纯化.....	6
1.3 改进研究的意义.....	7
第二章 细胞碎片与油脂去除优化研究	9
2.1 实验材料.....	9
2.1.1 实验原料处理.....	9
2.1.2 主要实验仪器.....	10
2.1.3 主要实验材料.....	10
2.2 实验方法.....	10
2.2.1 实验步骤.....	10
2.2.3 蛋白含量检测.....	12
2.3 结果与讨论.....	12
2.3.1 不同滤器的过滤通量和滤液浊度.....	12
2.3.2 通过不同滤器过滤的蛋白含量及收率.....	14
2.3.3 不同滤器过滤的关键指标比对.....	14
2.3.4 新旧工艺的比对情况.....	15
2.4 小结.....	16
第三章 透析变更为超滤工艺的研究	18
3.1 实验材料.....	18

3.1.1 实验原料处理.....	18
3.1.2 主要实验仪器.....	19
3.1.3 主要实验材料.....	19
3.2 实验方法.....	20
3.2.1 常用溶液配制.....	20
3.2.2 试验步骤.....	21
3.2.3 蛋白含量检测.....	23
3.2.4 电导率检测.....	23
3.2.5 NGF 活性检测.....	23
3.3 结果与讨论.....	25
3.3.1 不同超滤膜的通量及 TMP	25
3.3.1.1 PALL 公司的 OS030T12	25
3.3.1.2 PALL 公司的 OS010T12	26
3.3.3 不同超滤膜过滤的收率及比活性.....	31
3.3.4 不同规格超滤膜包关键指标比对.....	32
3.3.5 旧工艺的比对.....	33
3.4 小结.....	34
第四章 不同型号的填料研究	38
4.1 实验材料.....	38
4.2 实验方法.....	38
4.2.1 填料静态载量检测.....	39
4.2.2 填料动态载量检测.....	39
4.2.3 样品的纯化.....	40
4.3 结果与讨论.....	41
4.3.1 单抗载量.....	41
4.3.2 柱效.....	42
4.3.3 蛋白含量.....	43
4.4 小结.....	45
第五章 纯化组合工艺	47

5.1 实验材料.....	47
5.2 实验方法.....	47
5.3 实验结果.....	48
5.3.1 10KD 超滤+Sephrose FF 填料.....	48
5.3.2 深层过滤+10KD 超滤	52
5.3.3 深层过滤+10KD 超滤+ Sepharose （介质 A） 填料.....	55
5.4 小结.....	58
第六章 总结与展望	60
参考文献	62
致 谢	65

Directory

Chinese Abstract	I
English Abstract	I
Chapter 1 Documents Summary	1
1.1 Structure and Function of NGF	1
1.1.1 Mouse NGF.....	1
1.1.2 Clinical Applications of NGF	3
1.2 Purification and Separation of NGF	5
1.2.1 Industrialization of NGF	5
1.2.2 Purification of NGF	6
1.3 Significance of the Research on Purification Process Improvement	7
Chapter 2 Research On Removal Optimization of Cell Debris and Grease	9
2.1 Experimental Materials.....	9
2.1.1 Experimental Raw Material Handling	9
2.1.2 Main Experimental Apparatus	10
2.1.3 Main Experimental Materials	10
2.2 Experimental Method.....	10
2.2.1 Experimental Procedure.....	10
2.2.2 Protein Content Detection.....	12
2.3 Results and Discussion.....	12
2.3.1 Filtration Flux and Filtrate Turbidity of Different Filters.....	12
2.3.2 The Protein Content and Yield of Different Filters.....	14
2.3.3 Comparison of Key Indexes of Different Filters	14
2.3.4 Comparison of Old and New Process	15
2.4 Summary.....	16

Chapter 3 Research on the Ultrafiltration Process of Dialysis Change

.....18

3.1 Experimental Materials.....18

3.1.1 Experimental Raw Material Handling 18

3.1.2 Main Experimental Apparatus 19

3.1.3 Main Experimental Materials 19

3.2 Experimental Method.....20

3.2.1 Common Solution Preparation..... 20

3.2.2 Experimental Procedure..... 21

3.2.3 Protein Content Detection..... 23

3.2.4 Electrical Conductivity Detection..... 23

3.2.5 NGF Activity Detection 23

3.3 Results and Discussion.....25

3.3.1 Flux and TMP of Different Ultrafiltration Membranes 25

3.3.1.1 OS030T12 PALL..... 25

3.3.1.2 OS010T12 PALL..... 26

3.3.3 Yield and Specific Activity of Different Ultrafiltration Membranes 31

3.3.4 Key Index Comparison of Different Sizes of Ultrafiltration Membranes

..... 32

3.3.5 Comparison of Old and New Process 33

3.4 Summary.....34

Chapter 4 Research On Different Types Of Medium38

4.1 Experimental Materials.....38

4.2 Experimental Method.....38

4.2.1 Static Load Detection..... 39

4.2.2 Dynamic Load Detection 39

4.2.3 Purification of Sample 40

4.3 Results and Discussion.....41

4.3.1 Monoclonal Antibody 42

4.3.2 Column Efficiency	42
4.3.3 Protein Content	43
4.4 Summary.....	45
Chapter 5 Combined Test of Purification Process.....	47
5.1 Experimental Materials.....	47
5.2 Experimental Method.....	47
5.3 Experimental Results.....	48
5.3.1 10KD Ultrafiltration + GE Sepharose (Medium A)	48
5.3.2 Deep Filter + 10KD Ultrafiltration	52
5.3.3 Deep Filter + 10KD Ultrafiltration + GE Sepharose (Medium A)	55
5.4 Summary.....	58
Chapter 6 Conclusions and Prospects.....	60
References	62
Thanks.....	65

第一章 文献综述

1.1 NGF 的结构和功能

神经生长因子 (Nerve Growth Factor, NGF) 是一类感觉和交感神经元生长必需的蛋白质, 在现代医学发展上具有潜在的临床应用价值。NGF 是神经营养因子中第一个被发现以及最早确认的, 根据最早报道, 得知它的活性存在于两种肉瘤组织和蛇毒中^[1]。意大利科学家 Levi Montalcini 在 1953 年研究小鼠肉瘤细胞内发现了 NGF; 美国科学家 Cohen 在 1960 年证明了 NGF 生物活性并成功提取纯化了 NGF; 并且在 10 年之后, 他又证明 NGF 本质就是一个复合蛋白这一生物发现。1986 年, Montalcini 和 Cohen 两位科学家因对 NGF 研究的杰出贡献而荣获诺贝尔生理医学奖^[2]。

神经营养因子家族成员很多, 包括了 NGF、成纤维细胞生长因子、睫状神经营养因子、白血病抑制因子、胶质源神经营养因子、胰岛素样生长因子等为主的神经生长因子。正因为它们所属一个系列的神经生长因子所以它们有着具有高度的同源性的氨基酸序列, 生物学活性也是彼此相似的。NGF 的重要作用不仅对神经元的存活、生长、发育、分化、损伤修复与再生有重要作用, 在其他方面也有着重要的意义, 比如在免疫、内分泌、生殖系统、肿瘤、老年痴呆等疾病上有着重要的治疗作用。

效应神经元支配的靶细胞合成和分泌出 NGF, NGF 与神经末梢上的受体结合后进入轴突, 再经反向进入轴浆转运最终至胞体。NGF 存在于动物体内多种组织中, 如小鼠颌下腺、蛇毒、人体胎盘、牛精囊均含有较多 NGF, 其中以雄性小鼠颌下腺含量最丰富。NGF 的来源是十分广泛的, NGF 的资源相对来说比较丰富。

1.1.1 小鼠 NGF

因为雄性小鼠颌下腺含量最丰富, 所以目前对 NGF 的研究主要是在雄性小鼠颌下腺中进行。在雄性小鼠颌下腺中 NGF 是含有多个 7SNGF, 也就是 7S 复合物。7SNGF 可能是 NGF 生物合成过程的一种过渡形式, NFG 有可能就是由它而演变而来, 7SNGF 中的 α 、 β 、 γ 三种亚单位之间存在非共价键, 而且是按照 $\alpha 2\beta\gamma 2$

比例而组成。其中 α 亚基的等电点在 4.1~4.6 之间，是 7SNGF 中是最具酸性的成分，具有保护 NGF 免受酶降解、调节 β 和 γ 亚单位活性等功能；其中 β 亚基的等电点在 8.9~9.3 之间， β 亚基具有生物活性的单位；其中 γ 亚基的等电点约 5.5，实质上， γ 亚基是一个丝氨酸蛋白酶，因此 γ 亚基具有较强的精氨酸酯酶活性，同时 γ 亚基参与 β NGF 的活化^[3]。

在平时，我们所提到的小鼠 NGF，实质上其实就是 β NGF，是以前体蛋白形式被合成后通过酶修饰而达到成熟状态，形成了 β NGF。一个成熟 β NGF 的分子量为 26.5 KD，它是由氨基酸序列相同的而且存在非共价结合的 118 个氨基酸的两条氨基酸链而组成的二聚体，其中它内部的三对二硫键，这样特殊的结构就造成了 NGF 生物功能的特殊^[4]。1991 年 McDonal^[5] 运用 X-射线衍射方法分析了 NGF 并且成功得出了 NGF 分子的三维结构。每个亚单位的折叠都是由三条伸长的扭曲的反平行 β 折叠形成，对于 NGF 而言，它主要由两个相同的亚单位组成，而且这两个亚单位以非共价键结合而形成的二聚体。在 NGF 分子的中部，也就是二硫键核心，因为两个二硫键 Cys58-Cys108, Cys68-Cys110 以及其内部残基 59-67 及 109 形成一个由 14 个残基组成的环，其中另一对二硫键 Cys15-Cys80 从中间穿过形成紧密包裹的“半胱氨酸结”(cystein knot)，因为二硫键的拓扑结构很特别，所以这种结构使得两个 NGF 单体中的 β 链彼此包裹，组成一个较大的由芳香族氨基酸，沿着两个单体平面的轴形成了 NGF 二聚体的活性分子，这对组成疏水面的氨基酸残基对 NGF 三维结构的形成起了主要作用，因为氨基酸残基通过氢键和盐键，所以辅助支持了其三维结构的稳定性。当 NGF 分子与高亲和力受体结合时，它会保守结构尤其是在 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ 链对形成配体受体复合物中更为明显，这种结合是需在 NGF 二聚体的疏水面上进行。然而在纯化过程中， β NGF 容易丢失 N 端或 C 端少数残基，造成纯化后形成 2.5SNGF，但这不会影响 NGF 的生物活性。

在 NGF 的研究中发现其可变区主要有 NHZ 端(第 1-9 位氨基酸)、I 区(第 23-35 位氨基酸)、II 区(第 40-49 位氨基酸)、III 区(第 59-66 位氨基酸)、V 区(第 94-98 位氨基酸)和 COOH 端(第 III-118)。其中反向平行的 β 链的一端与 I、II、V 区等三个发夹区连接，其中另一端与 III 区相接，即：连续的 β 反折区。这些可变区都是亲水，呈弯曲状，其亲水性决定了在与高亲和力受体结合时所体现的特异

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.