

Tinh chế nhân tố tăng trưởng nguyên bào sợi người tái tổ hợp từ dịch lên men quy mô một lít

- Trần Tiên Anh Thy
- Nguyễn Thị Mỹ Trinh
- Trần Văn Hiếu

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 30 tháng 10 năm 2014, nhận đăng ngày 19 tháng 06 năm 2015)

TÓM TẮT

Nhân tố tăng trưởng nguyên bào sợi FGF-2, hay còn gọi là bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) là một protein đa chức năng, tham gia điều hòa quá trình tăng sinh và biệt hóa của nhiều loại tế bào. Hiện nay, FGF-2 người tái tổ hợp (rhFGF-2) được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực bao gồm y-dược, mỹ phẩm, nuôi cấy tế bào gốc... Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành lên men chủng *Escherichia coli* mang vector tái tổ hợp chứa gen mã hóa protein FGF-2 ở qui mô một lít để thu nhận một lượng lớn protein FGF-2. Hiệu quả của quá trình lên men được đánh giá dựa trên đường cong tăng trưởng của chủng, lượng sinh khối khô cũng như

lượng FGF-2 thu được từ một lít dịch lên men. Tế bào sau khi thu nhận được phá vỡ bằng áp suất cao. Sau đó, FGF-2 từ dịch đồng nhất tế bào được tinh sạch bằng sắc ký trao đổi cation và sắc ký ái lực với heparin. Độ tinh sạch và hiệu suất tinh chế FGF-2 được đánh giá bằng phương pháp đo Bradford, nhuộm bạc và phần mềm Quantity One. Kết quả thu được từ một lít dịch lên men cho thấy lượng sinh khối khô thu được khoảng 5,2 g/l, lượng FGF-2 đạt khoảng 230 mg/l. FGF-2 qua hai bước tinh chế đạt độ tinh sạch 97,1 % và hiệu suất thu hồi khoảng 46,08 %.

Từ khóa: FGF-2, lên men, sắc ký trao đổi cation, sắc ký ái lực với heparin

MỞ ĐẦU

FGF-2, nhân tố tăng trưởng nguyên bào sợi, được phân lập từ tuyến yên trong phân đoạn pH base là dạng protein có 146 amino acid. FGF-2 là một protein đa chức năng, tham gia điều hòa hoạt động của nhiều quá trình trong cơ thể như cân bằng nội mô, ngăn chặn quá trình xơ hóa ở phổi, duy trì và tăng sinh tế bào thần kinh, chữa lành xương bị tổn thương, kích thích hình thành tế bào bạch cầu, kích thích sự hình thành mạch máu mới từ mạch máu sẵn có, kích thích sự tăng trưởng

của tế bào cơ mềm, chữa lành vết thương và sửa chữa mô...[1, 3].

Do sự đa dạng về chức năng, FGF-2 đang được quan tâm nghiên cứu để ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như sử dụng là thành phần không thể thiếu trong nuôi cấy tế bào gốc phôi người nhờ đặc tính kích thích tăng sinh, ức chế biệt hóa. Trong công nghệ mỹ phẩm, một số nghiên cứu cho thấy FGF-2 có khả năng làm đen tóc, ngăn ngừa sự lão hóa da nên ngày càng được các hãng mỹ phẩm ứng dụng và bổ sung vào các bộ sản

phẩm chăm sóc da, tóc. Bên cạnh đó, trong lĩnh vực y học, việc sử dụng FGF-2 đã đem lại nhiều kết quả khả quan trong việc điều trị nhiều căn bệnh như bệnh thiếu máu tim cục bộ, điều trị bỏng, ngăn ngừa sẹo do phẫu thuật, chữa bệnh viêm nha chu... Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành lên men chủng *Escherichia coli* chứa vector tái tổ hợp mang gen mã hóa protein FGF-2, thu nhận, tinh sạch bằng các phương pháp sắc ký và đánh giá hiệu suất tinh chế cũng như thu hồi [1, 3].

VẬT LIỆU – PHƯƠNG PHÁP

Nguyên vật liệu

Chủng *E. coli* BL21(DE3) (*F dcm ompT hsdSB* (τ -B m^B) *gal* λ (DE3)) mang vector tái tổ hợp pET-FGF2 do Bộ môn Công nghệ Sinh học Phân tử - Môi trường, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM cung cấp.

Phương pháp

Lên men cảm ứng biểu hiện FGF-2

Môi trường lên men (pH = 7): trypton 10 g/l; cao nấm men 5 g/L; KH₂PO₄ 3 g/L; Na₂HPO₄ 6 g/L; NaCl 0,5 g/L; NH₄Cl 0,5 g/L; MgSO₄ 0,5 g/L; CaCl₂.2H₂O 0,025 g/L; citric acid 2 g/L; glucose 0,5 %; yếu tố vi lượng 1 ml/L. Các thông số cài đặt cho quá trình lên men chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET-FGF2 như sau: pH = 7,00; DO > 20 %; khuấy ở tốc độ 250 vòng/phút; sục khí ở 1 vvm. Trong 8 giờ đầu, cài đặt nhiệt độ ở 37 °C. Sau 8 giờ lên men, bổ sung IPTG đạt nồng độ cuối 0,3 mM và chỉnh nhiệt độ về 25 °C, tốc độ khuấy về 150 vòng/phút. Sau lên men, 1 lít dịch lên men được ly tâm thu sinh khối và hòa lại trong 300 mL dịch phá tế bào (Tris: HCl pH 7 50 mM, EDTA 20 mM). Dịch tế bào được phá bằng máy phá tế bào M-110EH-30 Microfluidizer Processor với áp suất 1500 psi ở 4 °C để thu nhận protein FGF-2 tái tổ hợp trong pha tan.

Hiệu quả thu nhận FGF-2 dạng tan ở chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET-FGF2 sau lên men được tính theo các công thức sau:

$$T = \frac{YxZ}{100} \quad E\% = \frac{T \times 100}{X}$$

Với: X: Sinh khối khô (g/L)

Y: Lượng protein tổng thu được trong 1 lít dịch lên men (g)

Z: % FGF-2 trong pha tan (%)

T: Lượng FGF-2 (g/L)

E: Hiệu quả thu nhận FGF-2 (%)

Tinh chế bằng sắc ký trao đổi cation

Do FGF-2 có pI = 9,8, ở pH = 7 protein tái tổ hợp FGF-2 tích điện dương nên phương pháp sắc ký trao đổi cation được sử dụng để tinh chế [2, 4]. Dung dịch A (dung dịch cân bằng cột): Na₂HPO₄ 0,1 M; NaH₂PO₄ 0,1 M; EDTA 1 mM; pH 7. Dung dịch B (dung dịch dung ly): Na₂HPO₄ 0,1 M; NaH₂PO₄ 0,1 M; EDTA 1 mM; NaCl 2 M; pH 7. Hệ thống tinh chế AKTA FPLC được cân bằng bằng nước. Cột tinh chế cation SP FF 5 mL (GE Healthcare) được rửa bằng nước, cân bằng bằng dung dịch A. Mẫu được nạp vào cột với tốc độ dòng 2 ml/phút, tái cân bằng cột bằng dung dịch A. Dung ly theo bậc thang với tốc độ dòng 2 mL/phút, 20 % dung dịch B và 80 % dung dịch A (tương tự với 40 % B : 60 % A, 60 % B : 40 % A, 80 % B : 20 % A và 100 % B). Thu nhận phân đoạn protein tương ứng với 20 %, 40 %, 60 %, 80 % và 100 % dung dịch B.

Tinh chế bằng sắc ký ái lực heparin

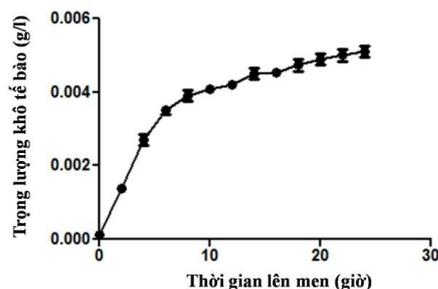
Do FGF-2 có tương tác đặc hiệu với heparin [5] nên cột Hitrap Heparin được sử dụng để tinh chế. Hệ thống tinh chế AKTA FPLC được cân bằng bằng nước. Cột tinh chế Hitrap Heparine HP 5 mL (GE Healthcare) được rửa bằng nước, cân bằng bằng dung dịch A. Mẫu được nạp vào cột với tốc độ dòng 2 mL/phút, tái cân bằng cột bằng dung dịch A. Dung ly theo bậc thang với tốc độ dòng 2 mL/phút, 40 % dung dịch B và 60 % dung

dịch A (tương tự với 60 % B : 40 % A, 80 % B : 20 % A và 100 % B). Thu nhận phân đoạn protein tương ứng với 40 %, 60 %, 80 % và 100 % dung dịch B. Các phân đoạn protein thu nhận được tiến hành phân tích bằng điện di SDS-PAGE và khẳng định bằng phương pháp lai Western Blot để xác nhận sự hiện diện của FGF-2. Phần mềm Quantity One (Biorad) và phương pháp Bradford được sử dụng để tính hiệu suất của phương pháp tinh chế.

KẾT QUẢ - THẢO LUẬN

Bước đầu lên men bằng hệ thống lên men ở quy mô 1 lít để thu nhận protein FGF-2 tái tổ hợp dạng tan

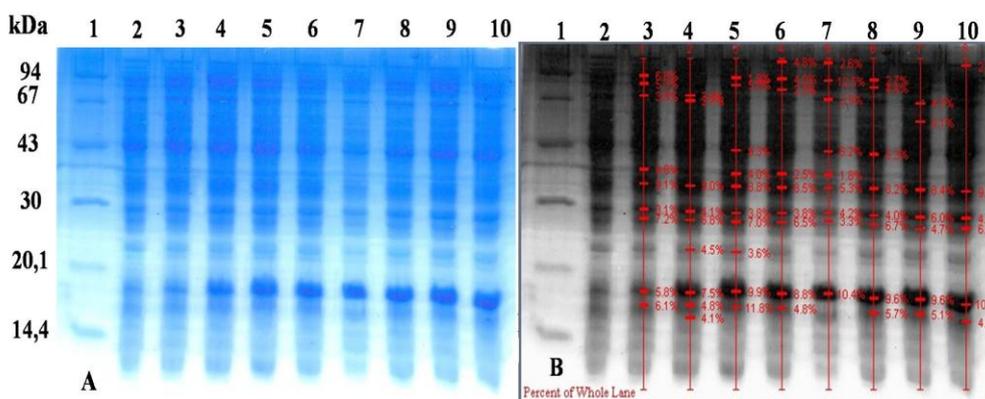
Quá trình lên men sản xuất FGF-2 tái tổ hợp dạng tan trong chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET-FGF2 được tiến hành bằng hệ thống lên men tự động trong vòng 24 giờ với chất cảm ứng là IPTG bổ sung ở giờ thứ 8. Sự tăng trưởng của chủng trong suốt quá trình lên men được theo dõi thông qua việc phân tích trọng lượng khô tế bào sau mỗi 2 giờ lên men. Kết quả phân tích trọng lượng khô tế bào được trình bày trong Hình 1.



Hình 1. Kết quả phân tích trọng lượng khô tế bào trong quá trình lên men

Dựa vào đồ thị nhận thấy trọng lượng khô của tế bào tăng dần trong suốt quá trình lên men và ổn định ở những giờ cuối. Điều này phù hợp với đặc trưng tăng trưởng của chủng, chúng tỏ quá trình lên men và cảm ứng không bị nhiễm. Theo kết quả phân tích trọng lượng khô tế bào, lượng tế bào khô thu nhận được là 5,2 g/lít môi trường lên men.

Trong quá trình lên men, chúng tôi tiến hành thu mẫu sau khi cảm ứng IPTG mỗi 2 giờ để theo dõi sự biểu hiện protein FGF-2 của chủng. Sau đó, mẫu được xử lý và điện di SDS-PAGE. Kết quả điện di SDS-PAGE các mẫu protein hòa tan trong suốt quá trình lên men được trình bày trong Hình 2.



Hình 2. Hình điện di SDS-PAGE (A) và định lượng Quantity One (B) mẫu protein ở pha tan tại các thời điểm lên men. 1, Thang protein phân tử lượng thấp; 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10: lượng protein pha tan tương ứng từ BL21(DE3)/pET-FGF2 sau 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 giờ lên men

Tại thời điểm giờ lên men thứ 8, chất cảm ứng IPTG được bổ sung và protein mục tiêu bắt đầu được tạo thành. Do đó, ở giờ nuôi cấy thứ 8 (giếng 2) không có sự biểu hiện của protein mục tiêu. Kết quả điện di SDS-PAGE cho thấy bắt đầu từ giờ nuôi cấy thứ 10 (giếng 3) vạch protein mục tiêu xuất hiện và mức độ biểu hiện của protein này cũng tăng dần trong suốt quá trình lên men. Để đánh giá chính xác sự biểu hiện FGF-2

dạng tan trong chủng, chúng tôi tiến hành định lượng bằng phần mềm xác định đậm độ Quantity One (Biorad). Kết quả định lượng này được trình bày trong Hình 2 B và Bảng 1.

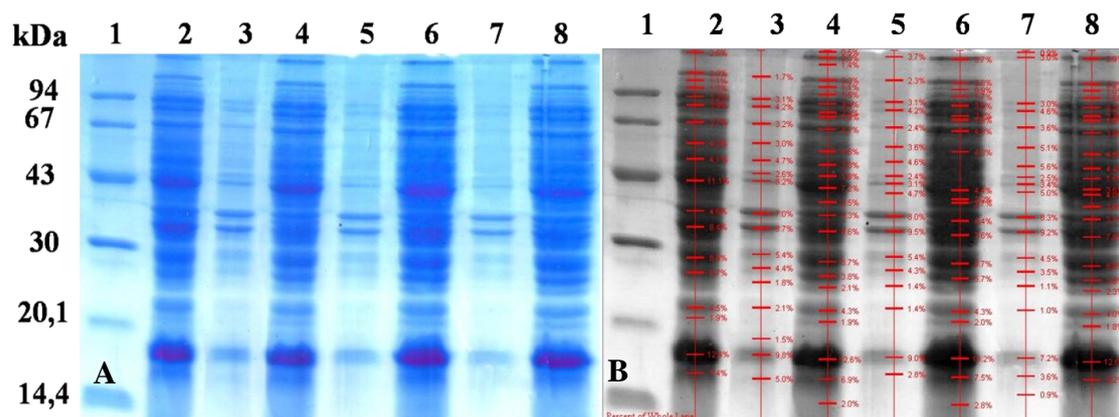
Kết quả ở Bảng 1 cho thấy phần trăm tỉ lệ protein FGF-2 trong pha tan có khuynh hướng tăng dần trong suốt quá trình lên men. Tỉ lệ này đạt cao nhất ở giờ thứ 24, lượng FGF-2 chiếm 10,9 % lượng protein tổng.

Bảng 1. Kết quả định lượng bằng phần mềm Quantity One tỉ lệ FGF-2 trong pha tan (%) sau mỗi 2 giờ lên men

| Thời gian lên men (giờ) | Thời gian sau cảm ứng (giờ) | Tỉ lệ FGF-2 trong pha tan (%) |
|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| 10 | 2 | 5,8 |
| 12 | 4 | 7,5 |
| 14 | 6 | 9,9 |
| 16 | 8 | 8,8 |
| 18 | 10 | 10,4 |
| 20 | 12 | 9,6 |
| 22 | 14 | 9,6 |
| 24 | 16 | 10,9 |

Sau 24 giờ lên men, toàn bộ dịch lên men được ly tâm thu nhận sinh khối *E. coli*. Sinh khối được phá tế bào bằng phương pháp đồng hóa dựa vào áp suất cao. Nhằm đảm bảo lượng FGF-2 dạng tan có thể thu nhận được sau quá trình phá tế bào là cao nhất, chúng tôi tiến hành khảo sát số

chu kỳ phá mẫu. Mẫu protein thể vùi và thể tan sau mỗi chu kỳ phá mẫu được tiến hành điện di SDS-PAGE nhằm xác định lượng FGF-2 thu được sau mỗi chu kỳ. Kết quả điện di này được trình bày trong Hình 3.



Hình 3. Kết quả điện di SDS-PAGE (A) và định lượng bằng phần mềm Quantity One (B) các mẫu protein sau các chu kì phá tế bào bằng phương pháp đồng nhất hóa dựa vào áp suất cao. 1, Thang protein phân tử lượng thấp; 2, dịch protein tổng; 3, 4, Dịch lên men sau 1 chu kì phá tế bào thể vùi (3) và thể tan (4); 5,6, Dịch lên men sau 2 chu kì phá tế bào thể vùi (5) và thể tan (6); 7, 8, Dịch lên men sau 3 chu kì phá tế bào thể vùi (7) và thể tan (8)

Kết quả điện di SDS-PAGE và kết quả Quantity One thì tại chu kì phá tế bào thứ hai, lượng protein mục tiêu thu được ở pha tan là nhiều nhất (Bảng 2). Do đó, dịch sinh khối nên

được phá dưới áp suất cao bằng hai chu kì để tế bào được phá tốt nhất và đạt sản lượng cao nhất (13,6 %).

Bảng 2. Kết quả định lượng bằng phần mềm Quantity One tỉ lệ FGF-2 trong pha tan (%) sau mỗi chu kì phá tế bào

| Số chu kì | % FGF-2 pha tan |
|-----------|-----------------|
| 1 | 12,6 |
| 2 | 13,2 |
| 3 | 12,6 |

Bảng 3. Hiệu quả thu nhận FGF-2 ở chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET-FGF2 sau quá trình lên men

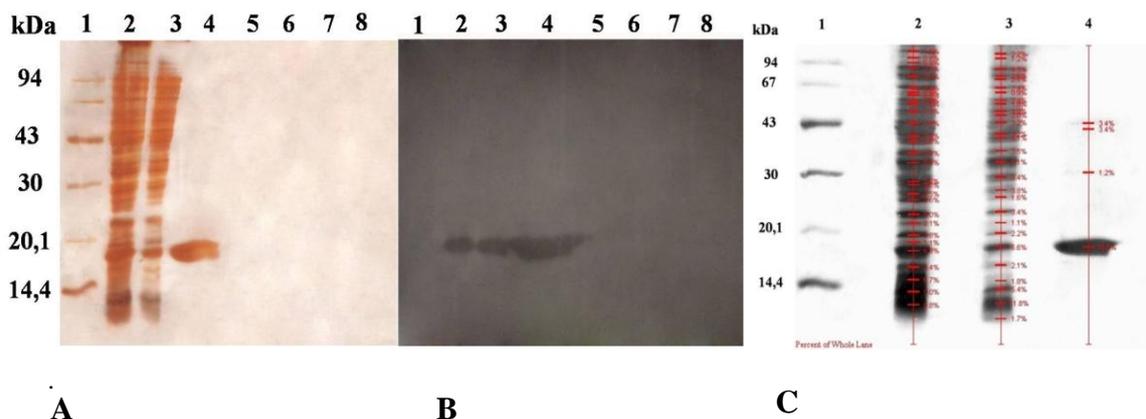
| | |
|--|-------------|
| Sinh khối khô (g/l) (X) | 5,20 ± 0,53 |
| Lượng protein tổng thu được trong 1 lít dịch lên men (g) (Y) | 2,11 ± 0,29 |
| % FGF-2 trong pha tan (Z) | 10,9 |
| Lượng FGF-2 (g/l) (T) | 0,23 ± 0,03 |
| Hiệu quả thu nhận FGF-2 (E%) | 4,42 ± 0,97 |

Dịch nổi thu nhận sau khi ly tâm được định lượng Bradford nhằm đánh giá hiệu quả của quá trình lên men. Kết quả sau xử lý được trình bày ở Bảng 3. Kết quả ghi nhận được ở Bảng 3 cho thấy quá trình lên men chủng BL21(DE3)/pET-FGF2 thu được $0,23 \pm 0,03$ g protein FGF-2 dạng tan trong một lít dịch lên men với tỉ lệ FGF-2

trong pha tan là 10,9 %, đạt hiệu quả thu nhận FGF-2 là 4,42 %.

Tinh sạch FGF-2 bằng sắc ký trao đổi cation và sắc ký ái lực với heparin.

Do FGF-2 có điểm đẳng điện pI = 9,6 nên ở bước tinh chế đầu tiên, chúng tôi sử dụng sắc ký trao đổi cation nhằm thu nhận FGF-2. Kết quả phân tích được trình bày trong Hình 4



Hình 4. Hình điện di SDS-PAGE (A), lai Western Blot (B) với kháng thể kháng FGF-2 và định lượng bằng phần mềm Quantity One (C) các mẫu protein trước và sau tinh chế bằng sắc ký trao đổi cation. 1, thang protein phân tử lượng thấp; 2, mẫu protein trước khi qua cột; 3, phân đoạn protein không gắn lên cột; 4, 5, 6, 7, 8 lần lượt là phân đoạn 20 %, 40 %, 60 %, 80 %, 100 % dung dịch dung ly B.

Kết quả điện di SDS-PAGE được trình bày ở Hình 4 A cho thấy ở phân đoạn 20 % dung dịch B xuất hiện một vạch protein nằm giữa 2 vạch có kích thước 14,4 k Da và 20,1 k Da trên thang chuẩn, phù hợp với khối lượng của FGF-2 (18 k Da) và cho tín hiệu dương tính khi lai với kháng thể kháng FGF-2 (Hình 4 B). Do vậy, chúng tôi kết luận đây chính là vạch FGF-2 mục tiêu. Ở những phân đoạn dung ly tiếp theo, chúng tôi

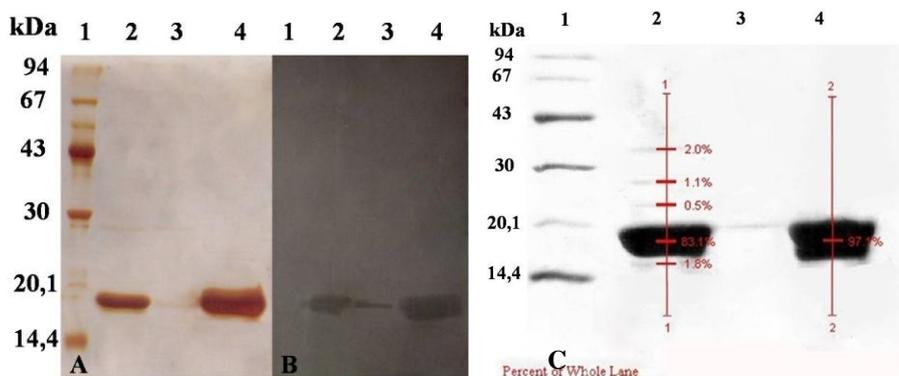
không thấy xuất hiện vạch protein mục tiêu. Như vậy protein mục tiêu đã được dung ly hoàn toàn ở 20 % dung dịch B. Hiệu quả của quá trình tinh chế sắc ký trao đổi cation được đánh giá bằng phần mềm Quantity One (Hình 4 C) và phương pháp Bradford. Kết quả tính toán cho thấy với cột trao đổi cation 5 mL, chúng tôi đã thu nhận protein tái tổ hợp FGF-2 có độ tinh sạch 78,5 % với hiệu suất thu hồi là 60,06 % (Bảng 4).

Bảng 4. Hiệu suất của quá trình tinh chế bằng sắc ký trao đổi cation

| Mẫu | Thể tích (ml) | Nồng độ protein (mg/ml) | Tổng protein (mg) | Độ tinh sạch (%) | Lượng FGF-2 (mg) |
|----------------------|---------------|-------------------------|-------------------|------------------|------------------|
| Trước tinh chế | 30 | 3,34 | 100,20 | 6,90 | 6,91 |
| Phân đoạn chứa FGF-2 | 12 | 0,44 | 5,28 | 78,50 | 4,15 |
| Hiệu suất | | | 60,06 % | | |

Do FGF-2 có thể tương tác đặc hiệu với heparin nên trong thí nghiệm tiếp theo này, chúng tôi sử

dụng cột sắc ký heparin để tinh sạch bước hai nhằm nâng cao độ tinh sạch của sản phẩm protein tái tổ hợp FGF-2.



Hình 5. Hình điện di SDS (A), Western Blot (B) với kháng thể kháng FGF-2 và định lượng bằng phần mềm Quantity One (C) các mẫu protein trước và sau tinh chế bằng sắc ký ái lực với heparin. 1, thang protein phân từ lượng thấp; 2, mẫu trước khi qua cột; 3, mẫu không bám vào cột heparin; 4, mẫu tinh chế thu ở phân đoạn dung ly 60 % dung dịch B.

Kết quả điện di SDS-PAGE sản phẩm tinh chế bằng sắc ký ái lực heparin cho thấy, ở giếng 4 (Hình 5 A) xuất hiện một vạch duy nhất khoảng 18 k Da, ngang với vạch FGF-2 trước tinh chế. Đồng thời, kết quả lai Western Blot với kháng thể đặc hiệu kháng FGF-2 ở hai phân đoạn dự đoán này cho kết quả dương tính (Hình 5 B). Do

đó, chúng tôi khẳng định protein được thu nhận ở giếng 4 chính là FGF-2 mục tiêu. Sử dụng phần mềm Quantity One (Hình 5 C) và phương pháp đo Bradford cho thấy, protein tái tổ hợp FGF-2 thu được sau tinh chế Heparin có độ tinh sạch 97,10 % với hiệu suất thu hồi sản phẩm 76,73 % (Bảng 5).

Bảng 5. Hiệu suất tinh chế FGF-2 trên cột heparin (kết quả tính toán từ phần mềm Quantity One).

| Mẫu | Thể tích (ml) | Nồng độ protein (mg/ml) | Tổng protein (mg) | Độ tinh sạch (%) | Lượng FGF-2 (mg) |
|----------------------|----------------|-------------------------|-------------------|------------------|------------------|
| Trước tinh chế | 30 | 0,34 | 10,20 | 78,50 | 7,65 |
| Phân đoạn chứa FGF-2 | 11 | 0,55 | 6,05 | 97,10 | 5,87 |
| Hiệu suất | 76,73 % | | | | |

Từ các kết quả đạt được ở trên, tính toán cho thấy từ 1 lít dịch lên men dòng *E.coli*

BL21(DE3)/pET-FGF2 chúng tôi thu nhận được 106,15 mg FGF-2 dạng tinh sạch (Bảng 6).

Bảng 6. Tóm tắt hiệu quả quá trình thu nhận FGF-2 từ 1 lít dịch lên men chủng BL21(DE3)/pET-FGF2.

| Bước thu nhận | Khối lượng | | Hiệu suất riêng của bước (%) | Hiệu suất thu hồi (%) |
|-------------------------------|------------|------------------|------------------------------|-----------------------|
| | FGF-2 (mg) | Độ tinh sạch (%) | | |
| Pha tan dịch đồng nhất tế bào | 230,33 | 6,90 | 100 | 100 |
| Tinh chế trao đổi cation | 138,34 | 78,50 | 60,06 | 60,06 |
| Tinh chế ái lực heparin | 106,15 | 97,10 | 76,73 | 46,08 |

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã bước đầu lên men *E. coli* BL21(DE3)/pET-FGF2 biểu hiện FGF-2 người tái tổ hợp ở quy mô một lít và đã đánh giá được một số thông số liên quan tới quá trình lên men. FGF-2 từ dịch đồng nhất tế bào được tinh sạch bằng sắc kí trao đổi cation, sắc kí ái lực với heparin, đánh giá mức độ tinh sạch cũng như hiệu suất thu hồi. Kết quả thu được từ một lít dịch lên men cho thấy lượng sinh khối khô thu được

khoảng 5,2 g/L, lượng FGF-2 đạt khoảng 230 mg/L. FGF-2 qua hai bước tinh chế đạt độ tinh sạch 97,1 % và hiệu suất thu hồi khoảng 46,08 %. Protein tái tổ hợp tinh sạch này có thể dùng làm nguồn nguyên liệu cho các thử nghiệm ứng dụng trong y học và mỹ phẩm tại Việt Nam.

LỜI CẢM ƠN: Nghiên cứu được tài trợ bởi Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh trong khuôn khổ Đề tài mã số C2015-18-26.

Purification of recombinant human fibroblast growth factor-2 from one-liter fermentation broth

- Tran Tien AnhThy
- Nguyen Thi My Trinh
- Tran Van Hieu

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

Fibroblast Growth Factor - 2 (FGF-2), also known as basic FGF is a multi-functional protein that regulates the proliferation and differentiation of multiple types of cell. Recombinant human FGF-2 (rhFGF-2) is currently used in medicine, cosmetics, stem-cell culture, etc. In this study, we conducted one-liter scale fermentation using Escherichia coli strain that carries recombinant vector harboring FGF-2 coding gene to produce a large amount of FGF-2 protein. The evaluation of the fermentation efficacy was based on the growth curve, dry cell weight and amount of

FGF-2 obtaining from one-liter fermentation. After fermentation, cell mass was lysed by high pressure. Then, the FGF-2 in supernatant was purified by cation exchange and heparin-affinity chromatography. The purity and efficiency of the purification process were estimated by Bradford, silver staining and densitometry using Quantity-One software. The result showed that in one-liter fermentation, we obtained 5.2 g/liter dry cell-mass and 230 mg/liter FGF-2. The purity of FGF-2 was about 97.1 % and the purification efficiency was above 46.08 %.

Keywords: FGF-2, fermentation, cation chromatography, heparin affinity

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. A. Bikfalvi, S. Klein, G. Pintucci, D.B. Rifkin, Biological roles of fibroblast growth factor-2, *Endocrine Reviews*, 18, 26-45 (1997).
- [2]. G. Garke, W.D. Deckwer, F.B. Anspach, Preparative two-step purification of recombinant human basic fibroblast growth factor from high-cell-density cultivation of *Escherichia coli*, *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications*. 737, 1-2 (2000).
- [3]. O.B. Mai, J.P. Thiery, J. Jouanneau, Molecules in focus Fibroblast growth factor-2, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 32, 263 – 267 (2000).
- [4]. I.M. Rosenberg, *Protein analysis and purification benchtop techniques*, Boston, Birkhäuser (2004).
- [5]. G.R.R. Venkataraman, V. Sasisekharan, R.Sasisekharan, *Molecular characteristics of fibroblast growth factor – fibroblast growth factor receptor – heparin - like glycosaminoglycan complex*, The National Academy of Sciences (1970).