

李辉, 翟颖超, 窦晓, 等. 重组猪抑制素蛋白质中毒素残留检测及其理化稳定性[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(2): 362-368.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.02.022

## 重组猪抑制素蛋白质中毒素残留检测及其理化稳定性

李辉, 翟颖超, 窦晓, 张甜, 果双双, 施振旦

(江苏省农业科学院畜牧研究所, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 为探索纯化的重组猪抑制素蛋白质毒素残留情况以及重组猪抑制素蛋白质稳定性, 本研究利用鲎试剂、气相色谱和 SDS-PAGE 方法对重组猪抑制素蛋白质中的细菌内毒素  $\beta$ -巯基乙醇的残留量及其蛋白质在不同温度、极端 pH 值和反复冻融条件下的稳定性进行检测。结果显示, 经过 3 次等电点沉淀洗涤后, 重组猪抑制素蛋白质中细菌内毒素和  $\beta$ -巯基乙醇的残留量大幅减少。通过在不同温度下的处理发现, 重组猪抑制素蛋白质在 4 °C 环境下较稳定, 可以长期保存; 但在 37 °C 时, 稳定性快速下降, 随着温度上升而降解加速。通过极端 pH 值和反复冻融试验发现, 重组猪抑制素蛋白质对极端 pH 值和反复冻融具有较好的耐受性。

**关键词:** 重组猪抑制素蛋白质; 内毒素;  $\beta$ -巯基乙醇; 残留; 理化稳定性

中图分类号: Q591.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2015)02-0362-07

## Determination of toxin residue in recombinant pig inhibin protein and its physicochemical stability

LI Hui, ZHAI Ying-chao, DOU Xiao, ZHANG Tian, GUO Shuang-shuang, SHI Zhen-dan

(*Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China*)

**Abstract:** Tachypleus amebocyte lysate, gas chromatography and SDS-polyacrylamide gelelectrophoresis were employed for the determination of residue of bacterial endotoxin and  $\beta$ -mercaptoethanol in recombinant pig inhibin protein, and the stability of protein affected by different temperatures, extreme pH and multigelation, respectively. Results showed that bacterial endotoxin and  $\beta$ -mercaptoethanol residue in the protein were drastically decreased after isoelectric point precipitation washing for three times. The recombinant pig inhibin protein was quite stable at 4 °C for long-term preservation, started to degrade at 37 °C and accelerated degradation along with the rise of temperature. The protein possessed a good tolerance to the extreme pH and multigelation.

**Key words:** recombinant pig inhibin protein; endotoxin;  $\beta$ -mercaptoethanol; residue; physicochemical stability

原核表达的重组药物蛋白质中的有毒物质主要是细菌内毒素 (Endotoxin) 及其加工过程中添加的  $\beta$ -巯基乙醇等辅助性有毒物质。内毒素的主要成分

是脂多糖 (Lipopolysaccharides, LPS), 为革兰氏阴性细菌细胞壁中的一种成分, 在活菌状态不释放, 只有当细菌死亡溶解或人工方法破坏菌体后才释放出来。内毒素对宿主具有毒性, 可引起全身性炎症反应和多器官损伤, 低剂量的内毒素同样可以导致机体的损害<sup>[1-4]</sup>。原核表达的重组蛋白质以无活性包涵体的形式存在于菌体内, 因此, 在破碎细菌提取蛋白质时, 内毒素将污染所提取的重组蛋白质, 并且可能会残留于终产品中。大肠杆菌所表达的无活性包涵体蛋白质需经过复性才能恢复生物学功能<sup>[5-8]</sup>, 而

收稿日期: 2014-09-02

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目 [CX(13)5039]; 江苏省科技支撑计划项目 (BE2012392)

作者简介: 李辉 (1982-), 男, 山东惠民人, 博士, 助理研究员, 主要从事动物繁殖方面的研究。(Tel)025-84390772; (E-mail) lhlydk@126.com

通讯作者: 施振旦, (E-mail) zdshi@scau.edu.cn

在复性过程中常常需要添加 $\beta$ -巯基乙醇作为复性辅助剂,以促进重组蛋白质的折叠,提高蛋白质溶解度<sup>[9]</sup>。然而 $\beta$ -巯基乙醇具有强烈的还原性,对动物机体有毒性<sup>[10]</sup>。总之,如果给动物注射残留有内毒素和 $\beta$ -巯基乙醇的重组蛋白质产品势必会损伤动物机体,从而影响到动物的健康和生产性能<sup>[10-12]</sup>。

重组蛋白质的理化稳定性对药物蛋白质的生产和储存具有重要意义,涉及到重组蛋白质药物的生产和储存条件以及从上市到临床使用的时间。如果因生产和储存条件改变导致重组蛋白质的稳定性下降,不但造成生产和存储上的不便,而且还会缩短存储时间,降低药效,提高生产和使用的成本<sup>[13]</sup>。因此,重组蛋白质的理化稳定性对生物制药,尤其是重组蛋白质药物的制备及其临床应用具有重要意义。

目前,众多研究已经证明重组猪抑制素可以促进动物的繁殖性能<sup>[14-18]</sup>,在实际生产中具有广阔的应用前景。为获得大量的重组猪抑制素蛋白质,动物品种改良与繁育重点实验室已成功实现了大肠杆菌高密度发酵,并且已经获得了大量纯化的重组蛋白质。但对重组蛋白质中内毒素和 $\beta$ -巯基乙醇的残留量及其理化稳定性尚不清楚,因此开展本研究,以期重组猪抑制素蛋白质的大规模推广试验奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 试剂 复性的重组猪抑制素蛋白质溶液(浓度为5 mg/ml)由动物品种改良与繁育重点实验室保存,内毒素检测试剂盒(福州新北), $\beta$ -巯基乙醇标准品(Sigma),甲醇(Merck),其他均为常规试剂。

1.1.2 仪器 全波长酶标仪(Bio-Tek),高效气相色谱,配FID检测器(安捷伦,7890A),气相色谱柱DB-WAX(30 m $\times$ 0.25  $\mu$ m $\times$ 0.32  $\mu$ m,安捷伦),凝胶成像系统(Tanon1600,上海天能),其他仪器为常规实验仪器。

### 1.2 方 法

1.2.1 重组猪抑制素蛋白质溶液的洗涤处理 洗涤重组蛋白质,步骤如下:取20 ml复性的猪重组抑制素蛋白质溶液,用无内毒素水配制的NaOH溶液(2 mol/L)和无内毒素水配制稀HCl(3%)调节pH至等电点(约6.0),使蛋白质沉淀,经离心(8 000 r/min,10 min,4  $^{\circ}$ C)收集沉淀,并用无内毒素PBS重悬沉淀后,用上述的NaOH溶液调pH至9.0,然

后在涡旋仪上剧烈震荡,促进蛋白质溶解。最后将溶解的蛋白质调至中性(浓度仍调至5.0 mg/ml)。然后再重复上述过程2次。

1.2.2 重组猪抑制素蛋白质溶液中内毒素的残留检测 内毒素检测参照中国药典所推荐的检测方法<sup>[19]</sup>,采用商品化鲎试剂检测试剂盒进行。试验中所用移液器的配套吸头和酶标板均需无内毒素污染。取内毒素标准品(冻干品)1支,开启后按标示量加入检查,用水溶解至所需浓度备用,用0 EU/ml和0.5 EU/ml两点法做标准曲线。溶解内毒素标准品时应用漩涡混合器混合10 min,每个试验均用同一批号主试剂。在方法1.2.1处理过程中,分别取处理前样品和每次蛋白质重新溶解并调至中性时采集样品。正式实验前对样品进行稀释并测定内毒素含量,最终使待检测样品中内毒素含量为0~0.5 EU/ml,并记录此时的稀释倍数。详细检测过程如下:取无内毒素水(0 EU/ml)、0.5 EU/ml内毒素标准品及处理好的蛋白质溶液样品各50  $\mu$ l于无内毒素离心管中,分别加入溶解好的主试剂,密封稍震荡后置于37  $^{\circ}$ C培养箱中孵育30 min。孵育结束后向各管中按顺序加入偶氮化试剂亚碱酸钠溶液、氨基磺酸铵溶液和萘基乙烯基氨基盐酸溶液各50  $\mu$ l,混匀后取200  $\mu$ l于酶标板中在545 nm处测定吸光度,将吸光度代入标准曲线,得到测定样品中的内毒素含量,每个样品重复检测3次。蛋白质溶液中实际内毒素含量为检测到内毒素含量 $\times$ 稀释倍数。

1.2.3 重组猪抑制素蛋白质中 $\beta$ -巯基乙醇的残留检测 检测方法参照中国药典所收录的气相色谱法,具体操作过程参照朱九群等<sup>[20]</sup>建立的检测方法进行。标准品的制备及样品的处理:精密称取 $\beta$ -巯基乙醇标准品12 mg,加入含有80 ml甲醇的100 ml容量瓶中,并用甲醇定容至100 ml刻度,配制成120 g/ml的标准品备用。精密吸取原液、1次洗涤、2次洗涤处理的样品10 ml,调节pH值至等电点,12 000 r/min离心(4  $^{\circ}$ C)10 min,尽可能弃去上清液后,加入10 ml甲醇,密封摇匀后超声处理5 min,然后12 000 r/min离心(4  $^{\circ}$ C)10 min除去不溶颗粒,取上清液用孔径为0.45  $\mu$ m的微孔滤膜过滤,滤液作为待测样品备用。

色谱条件:采用程序升温方式,升温程序为:60  $^{\circ}$ C(2 min) $\rightarrow$ 80  $^{\circ}$ C(2 min,升温速率为20  $^{\circ}$ C/min) $\rightarrow$ 100  $^{\circ}$ C(1 min,升温速率为40

℃/min)→230℃(2 min, 60℃/min), 分流比为9:1, 平均线速度为30 cm/s, 进样量为1 μl。

标准曲线绘制样品测定:取β-巯基乙醇标准品1 ml, 用甲醇稀释成浓度分别为74.11 μg/ml、37.06 μg/ml、18.53 μg/ml、9.26 μg/ml和4.63 μg/ml的溶液。设定全自动进样检测程序, 各取1 μl注入气相色谱仪进行检测并记录色谱峰的面积。根据检测到的峰面积(纵坐标)和浓度(横坐标)进行线性回归, 计算回归方程。同时检测待测样品, 记录待测样品的峰面积, 每样品重复检测6次, 以检测精密度, 以峰面积计算相对标准偏差。将待测样品中的峰面积代入标准曲线, 换算出待测样品中β-巯基乙醇的残留量。

1.2.4 重组猪抑制素蛋白质的热稳定性检测 将方法1.2.1中处理的重组猪抑制素蛋白质溶液过滤除菌后放入无菌离心管中, 分别在4℃、37℃、45℃和65℃环境中放置, 每天于超净台中取样10 μl, 加入5×Loading buffer 并且煮沸变性10 min后冻存备用, 试验结束后经过SDS-PAGE分析, 检测蛋白质的降解情况。

1.2.5 重组猪抑制素蛋白质在极端pH环境下的稳定性检测 用2 mol/L的NaOH和3% HCl调节无菌处理的重组猪抑制素蛋白质溶液的pH值分别至12和2, 然后放入4℃冰箱中保存, 每天取样10 μl, 处理方法同方法1.2.4所述, 共保存13 d。最后将所得蛋白质样品进行SDS-PAGE分析, 检测蛋白质的降解程度。

1.2.6 重组猪抑制素蛋白质的复冻融稳定性检测

取同样过滤除菌的重组蛋白质溶液放入无菌离心管中, 置入-25℃冰箱冻存, 每天冻融1次, 并取样处理方法同上。共冻融13 d。将上述处理的蛋白质样品进行SDS-PAGE分析, 检测蛋白质的降解程度。

## 2 结果

### 2.1 重组猪抑制素蛋白质中内毒素的残留检测

按照试剂盒说明书做出标准曲线。根据试验可知, 稀释1 000倍后, 样品中内毒素的含量位于标准曲线范围内。通过对各个样品稀释1 000倍后对进行检测, 分别计算出原液、洗涤1次、洗涤2次和洗涤3次的内毒素残留量(图1)。结果显示:蛋白质原溶液中残留的内毒素含量为4 536.6 EU/ml, 但是经过3次洗涤后, 重组蛋白质溶液中的内毒素残留量已经大幅度降低, 降低至239.8 EU/ml。表明,

所表达的重组蛋白质经过3次洗涤, 可有效除去大部分残留的内毒素。

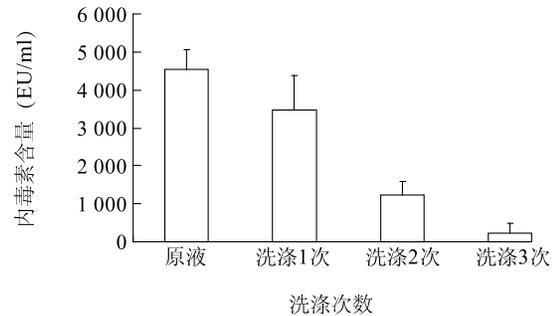


图1 重组蛋白质中内毒素残留

Fig.1 Endotoxin residue in the recombinant protein

### 2.2 重组猪抑制素蛋白质中β-巯基乙醇残留检测

检测的峰面积相对标准偏差均小于3%, 结果符合要求。根据标准品检测所得的峰面积和浓度, 可得标准曲线的回归方程:  $Y = 1.1669x - 4.2333$  ( $R^2 = 0.9984$ )。将待测样品的峰面积代入标准曲线, 换算出β-巯基乙醇的残留量。β-巯基乙醇密度为1.114 g/ml, 在蛋白质复性过程中添加量为1% (体积比), 因此其质量浓度约为 $1.14 \times 10^4$  μg/ml, 经过1次洗涤后降低为7.4842 μg/ml, 经过2次洗涤, 即可使重组猪抑制素蛋白质中β-巯基乙醇的残留量低于检测下限(表1)。

表1 重组蛋白质中β-巯基乙醇残留

Table 1 β-mercaptoethanol residue in the recombinant protein

样品编号	浓度 (μg/ml)	峰面积	相对标准偏差 (%)	保留时间 (min)
标准品1	74.1148	83.2	1.51	9.315
标准品2	37.0574	36.7	1.76	9.318
标准品3	18.5287	17.8	1.96	9.314
标准品4	9.2643	7.3	1.68	9.315
标准品5	4.6322	1.4	2.22	9.317
洗涤1次	7.4842	4.5	2.54	9.319
洗涤2次	-	-	-	-
洗涤3次	-	-	-	-

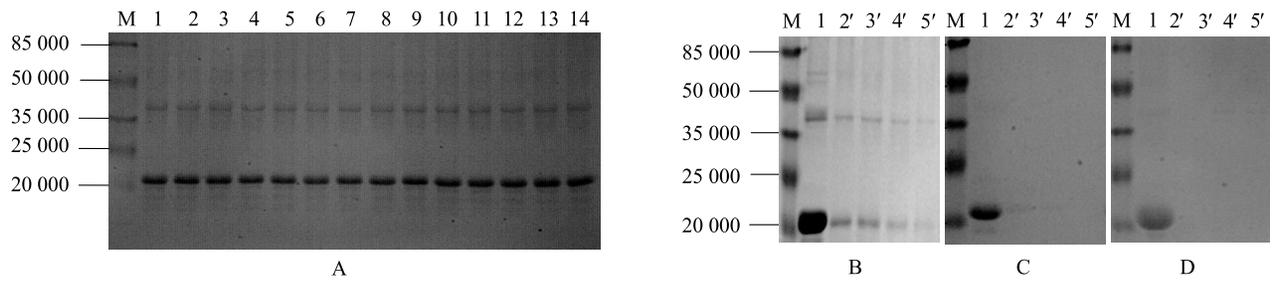
-表示未检出。

### 2.3 重组猪抑制素蛋白质的热稳定性、极端pH值及冻融稳定性

将重组猪抑制素蛋白质分别放置于4℃、37℃、45℃和65℃条件下, 考察重组猪抑制素蛋白质的稳定性。结果显示, 置于4℃下环境下的重组猪

抑制素蛋白质稳定性较好,保存一年后几乎没有降解(图 2A)。而将重组猪抑制素蛋白质放在 37 °C 下,放置第 2 d 重组猪抑制素蛋白质明显降解,第 4 d 重组猪抑制素蛋白质几乎全部降解(图 2B),说明重组猪抑制素蛋白质在 37 °C 下不稳定。45 °C 和 65 °C 下的重组猪抑制素蛋白质放置第 2 d 就几乎全部降解(图 2C ~ 2D),表明重组猪抑制素蛋白质在温

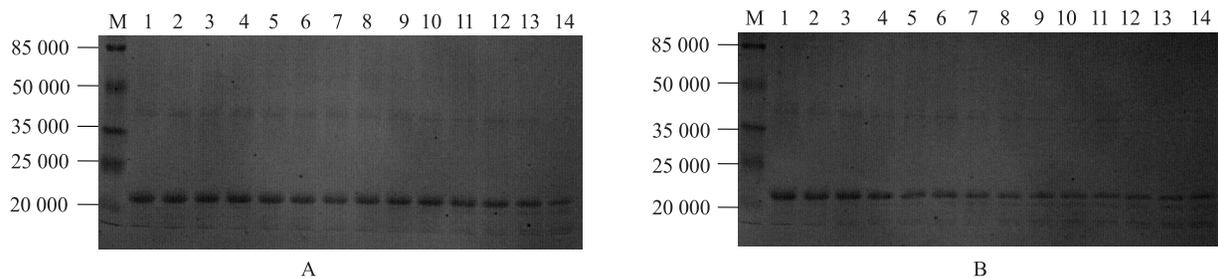
度高于 37 °C 时,重组猪抑制素蛋白质极其不稳定。在极端 pH 值条件下,重组猪抑制素蛋白质随着储存时间延长,略微降解(图 3),相对于酸性环境,碱性环境中的重组猪抑制素蛋白质稳定性较好。而反复冻融 13 次后,重组猪抑制素蛋白质没有明显变化(图 4),说明重组猪抑制素蛋白质反复冻融耐受性较好。



A: 保存温度 4 °C; B: 保存温度 37 °C; C: 保存温度 45 °C; D: 保存温度 65 °C。M: Marker; 1: 原液; 2 ~ 14: 保存 1 ~ 13 个月; 2' ~ 5': 保存 1 ~ 4 d。

图 2 重组猪抑制素蛋白质的热稳定性

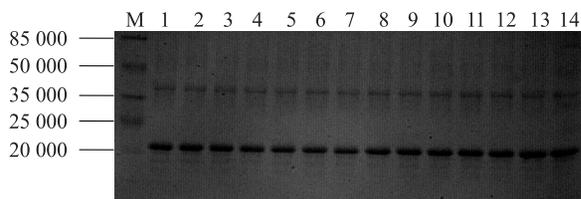
Fig. 2 Thermostability of recombinant pig inhibin protein



A: pH 值 12; B: pH 值 2。M: Marker; 1: 原液; 2 ~ 14: 保存第 1 ~ 13 d。

图 3 重组猪抑制素蛋白质在极端 pH 值下的稳定性

Fig. 3 Stability of recombinant pig inhibin protein affected by extreme pH



M: Marker; 1: 原液; 2 ~ 14: 冻融 1 ~ 13 次。

图 4 反复冻融下的重组猪抑制素蛋白质的稳定性

Fig. 4 Stability of recombinant pig inhibin protein affected by multigelation

### 3 讨论

细菌内毒素是重组药物蛋白质中的重要污染物之一,也是重组药物蛋白质质量控制过程中的重要检测指标。自 1968 年 Levin 等<sup>[21]</sup>发现并建立鲎实验方法以来,由于其具有灵敏度高,方法简便等特点,逐渐得到临床和药检部门的重视,尤其是在临床检验方面的应用更是飞速发展。美国药典第 XXI 版首先将 60 多种抗生素的内毒素检查法由家兔法改为细菌内毒素检查法;而中国在 1991 年也将细菌

内毒素检查法收入卫生部部颁标准,并于 1995 年收录于中国药典中<sup>[22]</sup>。在重组蛋白质复性过程中添加进去的  $\beta$ -巯基乙醇也是重组药物蛋白质中的重要污染物,目前有报道的方法是用高效气相色谱进行检测<sup>[20]</sup>。

作为重要污染物,残留于重组蛋白质中的内毒素和  $\beta$ -巯基乙醇必须除去。现阶段用于去除重组蛋白质中的内毒素方法主要有超滤膜和荷电微孔滤膜法<sup>[23-24]</sup>、石棉和活性炭吸附法、化学降解法<sup>[25]</sup>、相分离法<sup>[26]</sup>、离子交换色谱法<sup>[27]</sup>及亲和色谱法等<sup>[28-34]</sup>,并在上述基础上开发了以下 2 种方法:① 通过 C8 柱反相上样,变性洗脱蛋白质除去内毒素并逐渐复性,② 通过联用离子交换层析,疏水层析和凝胶过滤等多种层析方法<sup>[35]</sup>。其中第 1 种方法比较复杂,费时费力,而且蛋白质变性处理过程中对后续功能试验有影响,第 2 种方法由于需要在无菌低内毒素环境下进行,对试验条件较为苛刻,而且层析柱的成本较高。 $\beta$ -巯基乙醇作为水溶性有机物,目前的大多通过透析方式去除,然而对于工业化大规模制备时,透析效率较低而限制了生产的扩大,基于上述种种因素,我们发明了蛋白质等电点沉淀除去内毒素、 $\beta$ -巯基乙醇及其他杂质的方法,本方法简单可靠,蛋白质回收率高,无需复杂实验设备和严苛实验条件,无需蛋白质变性过程,而且除去内毒素和  $\beta$ -巯基乙醇的效果较好,可以在大规模工业化生产中应用。

蛋白质的稳定性包括两方面内容:天然折叠结构的稳定和生物学功能的稳定,前者描述的是蛋白质的热力学性质,后者是蛋白质保持其酶活性的能力。蛋白质的稳定性主要是由蛋白质本身的结构特点、氨基酸种类、排列序列、肽链的立体结构和周围环境决定。纯化后的蛋白质在保存过程中,会受到温度、pH 值变化、盐浓度变化、反复冻融等外界因素的影响,从而导致蛋白质的结构改变或降解。其中温度和反复冻融是影响蛋白质稳定性的 2 个重要因素。因此我们设计了不同温度和冻融次数对纯化后蛋白质稳定性的影响。试验结果表明,在 4 °C 条件下,重组猪抑制素蛋白质较稳定,放置 1 年后蛋白质未有明显降解,而在 37 °C 下,重组猪抑制素蛋白质第 2 d 就明显降解。在 45 °C 和 65 °C 条件下,第 2 d 重组猪抑制素蛋白质几乎全部降解。说明重组抑制素蛋白质对热的耐受性不高。虽然重组抑制素对热

的耐受性较低,但是它对反复冻融的耐受性较好,连续冻融数 13 次,没有明显的降解。相对于其他类型的重组蛋白质,重组猪抑制素蛋白质主要作为免疫抗原使用,因此,不需要对其生物学活性进行检测,只需保证其一级结构完整即可在动物体内发挥作用。

然而外界因素大多通过作用于内部因素而影响蛋白质稳定性。蛋白质高级结构由疏水、静电、氢键、范德华力这些弱相互作用力及二硫键所维持,因此影响蛋白质的稳定性因素由这些相互作用力所决定。首先,在维持蛋白质稳定性结构中,起突出作用的是氢键。它有利于维持蛋白质的二级结构。氢键主要包括多肽主链上的羰基氧与酰胺基之间形成的氢键,侧链与侧链、侧链与介质水、主链肽基与侧链或主链肽基与水之间形成的氢键。蛋白质分子的稳定性主要与氢键数目有关。氢键主要是以焓的形式来影响蛋白质的稳定性。其次,疏水作用在维持蛋白质三级结构方面起着非常重要的作用。蛋白质折叠的时候总是倾向于把疏水残基埋藏在分子内部,这样使得蛋白质分子形成内部疏水、表面亲水的结构,有利于蛋白质的稳定性。而疏水作用主要是以熵的形式来影响蛋白质的稳定性。

除此之外,还有一些因素如静电作用、二硫键、范德华力等均对蛋白质稳定性有影响。例如:重组人 IFN $\alpha$ 2a 对溶液的 pH 值和温度非常敏感,随着 pH 值的降低和温度的升高,重组人 IFN $\alpha$ 2a 在溶液中的高级结构逐渐降低<sup>[36]</sup>,可能由于加热后,改变蛋白质的各作用力的平衡,导致疏水基团暴露,并使肽键水解成为多肽甚至单个氨基酸,造成蛋白质的彻底降解,本研究同样发现,重组猪抑制素蛋白质对温度的耐受性差,虽然在极端 pH 值中表现出较好的稳定性,但在 pH 值为 2 的溶液中的稳定性明显低于在 pH 值为 3 的环境。同样,重组 GFP 也表现出在酸性环境中活性降低,在中性溶液中可保持较好的稳定性,而且可以耐受 80 °C 的高温<sup>[37]</sup>,重组阮蛋白质 (PrP) 却在 pH 值为 2 的环境中保持较好的稳定性,随着 pH 值的升高逐渐降低<sup>[38]</sup>,而重组阮蛋白质在 170 °C 湿热环境下依然保持稳定<sup>[39]</sup>。

总之,影响蛋白质稳定的因素,除了周围环境条件外,其一级结构至关重要。因此,为提高蛋白质的稳定性,还可以从其一级结构的氨基酸组成上进行改进。例如在工业上广泛应用的葡萄糖异构酶

(GI),为提高其热稳定性,朱国萍等将其第138位甘氨酸(Gly138)定点诱变为脯氨酸(Pro138),结果突变型GI比野生型的热半衰期长一倍;最适反应温度提高10~12℃,且与酶比活变化趋势相似。其原因是脯氨酸替代Gly138后,可能由于引入了一个吡咯环,该侧链刚好能够填充于Gly138附近的空洞,使蛋白质空间结构更具刚性,从而提高了酶的热稳定性<sup>[40]</sup>。因此,在提高重组猪抑制素蛋白质的热稳定性方面仍需深入研究。

### 参考文献:

- [1] DAVIS G S, ANDERSON K E, CARROLL A S. The effects of long-term caging and molt of single comb white leghorn hens on heterophil to lymphocyte ratios, corticosterone and thyroid hormones[J]. Poultry Science, 2000,79 (4):514-518.
- [2] KLASING K C, PENG R K. Influence of cell sources, stimulating agents, and incubation conditions on release of interleukin-1 from chicken macrophages[J]. Developmental and Comparative Immunology, 1987,11 (2):385-394.
- [3] PARMENTIER H K, WALRAVEN M, NIEUWLAND M G. Antibody responses and body weights of chicken lines selected for high and low humoral responsiveness to sheep red blood cells. 1. Effect of *Escherichia coli* lipopolysaccharide[J]. Poultry Science, 1998, 77 (2):248-255.
- [4] 邵英光,李京华,魏桂林,等. 内毒素的去除策略[J]. 广州化学, 2003 (2):38-45.
- [5] 罗莉,李坤,王保成,等. 包涵体变复性技术研究进展[J]. 中国医药生物技术,2012 (4):290-293.
- [6] 包义风,应莲芳,蒋琳. 包涵体蛋白复性技术研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2012 (2):84-88.
- [7] 于德强,何询. 重组蛋白复性技术研究进展[J]. 生物技术通讯, 2004 (1):67-69.
- [8] JUNGBAUER A, KAAR W. Current status of technical protein refolding[J]. Journal of Biotechnology,2007, 128 (3):587-596.
- [9] PATRA A K, MUKHOPADHYAY R, MUKHIJA R, et al. Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*[J]. Protein expression and purification, 2000,18 (2):182-192.
- [10] HEIDRICK M L, HENDRICKS L C, COOK D E. Effect of dietary 2-mercaptoethanol on the life span, immune system, tumor incidence and lipid peroxidation damage in spleen lymphocytes of aging BC3F1 mice[J]. Mechanisms of Ageing and Development, 1984,27 (3):341-358.
- [11] SMITH R T, THOMAS L. The lethal effect of endotoxins on the chick embryo[J]. The Journal of Experimental Medicine, 1956, 104 (2):217-231.
- [12] 董小英,唐胜球,李海云. 内毒素对家禽的影响及其防治措施[J]. 饲料工业,2005 (11):24-27.
- [13] 任勇,丁东平,渠刚,等. 蛋白质类药物的稳定性研究进展[J]. 华南国防医学杂志, 2006 (4):31-33.
- [14] LIU Y P, MAO X B, WEI Y M, et al. Studies on enhancing embryo quantity and quality by immunization against inhibin in repeatedly superovulated Holstein heifers and the associated endocrine mechanisms[J]. Animal Reproduction Science, 2013, 142 (1-2):10-18.
- [15] MEI C, LI M Y, ZHONG S Q, et al. Enhancing embryo yield in superovulated holstein heifers by immunization against inhibin[J]. Reproduction in Domestic Animals, 2009, 44 (5):735-739.
- [16] MEDAN M S, AKAGI S, KANEKO H, et al. Effects of re-immunization of heifers against inhibin on hormonal profiles and ovulation rate[J]. Reproduction, 2004, 128 (4):475-482.
- [17] SASAKI K, MEDAN M S, WATANABE G, et al. Immunization of goats against inhibin increased follicular development and ovulation rate[J]. The Journal of Reproduction and Development, 2006, 52 (4):543-550.
- [18] MEDAN M S, WATANABE G, SASAKI K, et al. Effects of passive immunization of goats against inhibin on follicular development, hormone profile and ovulation rate[J]. Reproduction, 2003, 125 (5):751-757.
- [19] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(三部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010.
- [20] 朱九群,童荣生. 重组人角质细胞生长因子冻干粉剂中 $\beta$ -巯基乙醇残留量的考察[J]. 临床合理用药杂志, 2013 (1):12-13.
- [21] LEVIN J, BANG F B A. Description of cellular coagulation in the limulus[J]. Bulletin of the Johns Hopkins Hospital, 1964, 115:337-345.
- [22] 黄清泉,夏振民. 药品细菌内毒素检查的实验设计[J]. 中国药理学杂志, 1997 (2):10-12.
- [23] 苏建勇,龚承元,芮期义,等. 荷电微孔滤膜去除细菌、病毒效果的初步研究[J]. 军事医学科学院院刊, 1998 (2):22-24.
- [24] 苏建勇,龚承元,朱孟府. 荷电微孔滤膜去除细菌内毒素的试验研究[J]. 军事医学科学院院刊, 1995 (4):289-292.
- [25] CHERKIN A. Destruction of bacterial endotoxin pyrogenicity by hydrogen peroxide[J]. Immunochemistry, 1975, 12 (6-7):625-627.
- [26] LIU S, TOBIAS R, MCCLURE S, et al. Removal of endotoxin from recombinant protein preparations[J]. Clinical Biochemistry, 1997, 30 (6):455-463.
- [27] MINOBE S, WATANABE T, SATO T, et al. Characteristics and applications of adsorbents for pyrogen removal[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 1988, 10 (2):143-153.
- [28] 商振华,周冬梅,郭为,等. 聚酰胺亲和膜色谱用于去除内毒素的研究 II. 去除条件最佳化和应用[J]. 分析测试学报, 1998, 17(2):10-14.
- [29] 商振华,周冬梅,郭为,等. 聚酰胺亲和膜用于去除内毒素的研究 I. 亲和膜的制备和特征[J]. 分析测试学报, 1998, 17 (1):1-4.

- [30] GUO W, SHANG Z, YU Y, et al. Removal of endotoxin from aqueous solutions by affinity membrane[J]. *Biomedical Chromatography*, 1997, 11 (3):164-166.
- [31] MATSUMAE H, MINOBE S, KINDAN K, et al. Specific removal of endotoxin from protein solutions by immobilized histidine[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1990, 12 (2):129-140.
- [32] ANSPACH F B. Endotoxin removal by affinity sorbents[J]. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2001, 49 (1-3): 665-681.
- [33] FOWERS K D, JANATOVA J. Specific inhibition of C<sub>3</sub> to facilitate general complement inhibition on endotoxin affinity sorbents for apheresis applications [J]. *Biomaterials*, 2001, 22 (13): 1749-1761.
- [34] ANSPACH F B, HILBECK O. Removal of endotoxins by affinity sorbents[J]. *Journal of Chromatography A*, 1995, 711 (1):81-92.
- [35] 钟翔, 邵丁丁, 王恒. 三种去除人巨噬细胞迁移抑制因子 (HuMIF)重组蛋白内毒素方法的比较[J]. *寄生虫与医学昆虫学报*, 2009, 16 (4):5.
- [36] SHARMA V K, KALONIA D S. Temperature- and pH-induced multiple partially unfolded states of recombinant human interferon-alpha2a: possible implications in protein stability[J]. *Pharmaceutical Research*, 2003, 20 (11):1721-1729.
- [37] ISHII M, KUNIMURA J S, JENG H T, et al. Evaluation of the pH- and thermal stability of the recombinant green fluorescent protein (GFP) in the presence of sodium chloride[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2007, 137-140 (1-12):555-571.
- [38] SWIETNICKI W, PETERSEN R, GAMBETTI P, et al. pH-dependent stability and conformation of the recombinant human prion protein PrP(90-231) [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272 (44):27517-27520.
- [39] APPEL T, WOLFF M, VON RHEINBABEN F, et al. Heat stability of prion rods and recombinant prion protein in water, lipid and lipid-water mixtures [J]. *The Journal of General Virology*, 2001, 82 (2):465-473.
- [40] 朱国萍, 滕脉坤, 伍传金, 等. G138P 定点突变对葡萄糖异构酶热稳定性的改善 [J]. *生物化学与生物物理学报*, 1998, 30 (6):77-80.

(责任编辑:袁伟)