

溶液环境对百日咳疫苗分离纯化的影响

吴铁^{1,2}, 闭静秀², 黄永东^{2,3}, 张焱^{2,3}, 孙李靖^{2,3}, 孙春宝¹, 苏志国²

1 北京科技大学土木与环境工程学院, 北京 100083

2 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

3 中国科学院研究生院, 北京 100049

摘要: 针对百日咳疫苗在低盐条件下不稳定, 容易聚集而导致层析过程收率低、分离度低的难题, 实验中选择脲作为稳定剂来改善百日咳疫苗所处的溶液环境, 并采用离子交换层析和凝胶过滤层析进行百日咳疫苗的分离纯化, 通过 ELISA 抗原活性测定和还原性 SDS-PAGE 等方法研究了脲对百日咳疫苗分离纯化的影响。结果表明, 在流动相中加入 2 mol/L 脲作为稳定剂, 能显著提高离子交换层析和凝胶过滤层析中的 PT 和 FHA 活性回收率、凝胶过滤层析的分离度、PT 和 FHA 的纯度。这些结果对百日咳疫苗的分离纯化和层析工艺优化提供了重要的依据和参考。

关键词: 溶液环境, 脲, 百日咳疫苗, 百日咳毒素, 丝状血凝素

Effect of Solution Environment on the Purification of Pertussis Toxin

Tie Wu¹, Jingxiu Bi², Yongdong Huang^{2,3}, Yan Zhang^{2,3}, Lijing Sun^{2,3}, Chunbao Sun¹, and Zhiguo Su²

1 Civil & Environmental Engineering School, University of Science and Technology of Beijing, Beijing 100083, China

2 National Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China

3 Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: The low recovery of pertussis toxin (PT) and the low resolving efficiency of chromatography, due to the instability of PT in low salt condition, are the main challenges for its purification. We applied 2 mol/L urea to prevent the aggregation and disassociation of PT during the purification by ion-exchange chromatography (IEC) and gel filtration chromatography (GFC). The effect of urea on the purification of PT was studied by ELISA assay and non-reduced SDS-PAGE. The activity recoveries of PT and filamentous hemagglutinin (FHA) in IEC and GFC, the resolution efficiency in GFC and the purities of PT and FHA were improved obviously by adding 2 mol/L urea in the mobile phase. The results highlight the potential application of urea in the acellular pertussis vaccine (APV) manufacture procedure.

Keywords: solution environment, urea, pertussis vaccine, pertussis toxin (PT), filamentous hemagglutinin (FHA)

百日咳是由鲍特氏百日咳杆菌 (*Bordetella pertussis*) 引起的具有高度传染性的急性呼吸道传染病^[1]。1940 年左右研制出来的全细胞百日咳疫苗

(Whole cell pertussis vaccine, WPV) 是将灭活的百日咳杆菌作为接种疫苗, 但是存在的弊端是其频繁发生的副作用, 以及导致急性或慢性神经性疾病。这

Received: October 26, 2007; **Accepted:** November 21, 2007

Supported by: the National Natural Science Foundation of China (Nos. 20536050, 20576136 & 20636010).

Corresponding author: Zhiguo Su. Tel: +86-10-62561817; Fax: +86-10-62562813; E-mail: zgus@home.ipe.ac.cn

国家自然科学基金项目 (Nos. 20536050, 20576136 & 20636010) 资助。

促使人们研制更加安全、高效的无细胞百日咳疫苗(Acellular pertussis vaccine, APV)。20世纪70年代日本的Sato等人研制出了由纯化的百日咳杆菌抗原PT和FHA组成的无细胞百日咳疫苗,证实了在婴幼儿中有良好的安全性和免疫原性^[2]。不同厂家生产的APV组分差异较大,但所有的无细胞百日咳疫苗都包含了百日咳毒素(Pertussis toxin, PT)。不同组分和比例的疫苗对接种人群的保护率差异很大,每种物质都有不同的生物活性,在免疫过程中所起的作用也不同,导致无细胞混合组分百日咳疫苗对人群的保护率难于控制,因而有必要将各个组分特别是最主要的抗原组分分别纯化出来,明确各自的生理特性之后,再按照不同的配比组成新的能够有效保护接种人群的新剂型疫苗。

从20世纪80年代起,国内外研究机构就开始进行无细胞百日咳疫苗单组分的纯化研究,研究过程中使用了密度梯度离心和各种层析方法,并且几乎都用到了亲和层析。密度梯度离心和亲和层析由于成本高,不太适用于工业化生产廉价的百日咳疫苗。近几年有人尝试用离子交换、珍珠岩层析、羟基磷灰石层析等方法,大大降低了生产成本。

本文采用CM离子交换层析,并辅以凝胶过滤层析分离出了高纯度的单组分PT和FHA,但是整个层析过程的疫苗活性回收率比较低。鉴于PT和FHA都是具有高疏水性的蛋白,在低盐水溶液中不稳定,容易形成聚集体,只能在高离子强度或者含有2 mol/L 脲的环境下才可以稳定存在^[3]。本研究利用脲具有稳定PT和FHA结构的特点,在整个层析过程中加入2 mol/L 脲,研究了脲对PT和FHA的活性、离子交换层析和凝胶过滤层析的影响,并与不加脲的层析过程进行对比,为百日咳疫苗的分离纯化和层析工艺优化提供指导。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

细胞培养上清(CCS)(华兰生物工程股份有限公司),百日咳毒素(PT)和丝状血凝素(FHA)标准品(英国NIBSC公司),BSA(北京欣经科生物技术有限公司),SDS-PAGE低分子量电泳Marker(中国科学院上海生物化学研究所),离子交换层析介质CM SepharoseTM FF和凝胶过滤层析介质 Sephacryl

S-200(美国GE公司),其他试剂均为国产分析纯试剂,所用纯水由Q-plus超纯水机制备(Millipore,美国)。

酶标仪550(美国Bio-Rad公司),Hofer miniVE电泳仪(美国GE公司),AllegraTM 21R Centrifuge(美国BACKMAN COULTER公司),AKTA Explorer层析设备(美国GE公司),常压层析泵PERISTALTIC PUMP P-1和常压层析检测器SINGLE PATH MONITOR UV-1(美国GE公司),层析柱(上海锦华层析设备厂)。

1.2 实验方法

1.2.1 配置不同脲浓度的百日咳细胞培养上清液

在8支编号为0~7的1.5 mL离心管内分别加入100 μ L细胞培养上清,按顺序分别加入900、775、650、575、400、275、150和25 μ L的纯水,然后分别加入0、125、250、375、500、625、750和875 μ L浓度为8 mol/L的脲溶液,混合均匀,最终得到脲浓度分别为0、1、2、3、4、5、6和7 mol/L的细胞培养上清。

1.2.2 硫酸铵沉淀

取适量CCS,磁力搅拌的条件下缓慢加入固体硫酸铵至20%(W/V,%)的终浓度,待硫酸铵完全溶解后,调节体系的pH值到7.0,室温下继续搅拌4 h,离心(10 000 g, 20°C, 30 min)取沉淀,用1 mol/L的NaCl将沉淀溶解。

1.2.3 离子交换层析

取硫酸铵沉淀的溶解液进行透析(透析袋截留分子量为8 000~10 000, Spectrum Medical Industries Inc, USA),透析液为25 mmol/L PB, pH 8.0。透析完全后调节pH值到6.0,离心取上清。CM离子交换柱用50 mmol/L PB, pH 6.0的缓冲液平衡后上样进行离子交换层析,接着继续用50 mmol/L PB, pH 6.0的缓冲液淋洗,最后用50 mmol/L PB+0.5 mol/L NaCl, pH 8.0的缓冲液洗脱。加脲的层析过程所用透析液和平衡缓冲液均为含2 mol/L 脲的相应缓冲液。

1.2.4 凝胶过滤层析

用3个柱床体积的100 mmol/L PB+0.15 mol/L NaCl, pH 7.0的缓冲液平衡层析柱,280 nm波长下监测紫外吸收值,取适量离子交换层析样品上柱,用平衡缓冲液继续洗脱,收集紫外吸收峰对应的洗脱液,流速0.8 mL/min。加脲的层析过程所用洗脱液为100 mmol/L

PB+0.5 mol/L NaCl+2 mol/L Urea, pH 7.0。

1.2.5 PT 和 FHA 活性检测

PT 和 FHA 活性回收率采用 ELISA 法^[4]检测。

1.2.6 蛋白质浓度检测

总蛋白浓度采用改良的 Bradford 法^[5]测定, 根据标准品 BSA 的标准曲线计算样品中总蛋白质含量。

1.2.7 PT 和 FHA 纯度检测

采用 SDS-PAGE 检测 PT 和 FHA 纯度, 分离胶浓度为 15%^[6], 银染法显色。

2 结果

2.1 不同浓度的脲对原料活性的影响

由于 PT 和 FHA 都具有较高的疏水性, 因此在低盐水溶液中不稳定, 容易形成聚集体。虽然 PT 和 FHA 在高盐体系下较稳定, 但是高浓度 NaCl(如 0.5~1.0 mol/L)的存在将导致原料液无法采用常规的离子交换层析进行分离纯化。文献报道高浓度变性剂脲容易导致蛋白的变性^[9], 但在合适的浓度下, 脲却可以提高 PT 的稳定性^[3]。因此, 实验考察了不同脲浓度对百日咳原料液活性的影响, 活性检测结果如表 1 所示。

表 1 脲浓度对原料中 PT 和 FHA 活性的影响
Table 1 Effect of urea concentration on the activity of PT and FHA

Sample	Urea concentration (mol/L)	PT recovery (%) ^a	FHA recovery (%) ^b
S0	0	100	100
S1	1.0	101.2 ± 6.2	84.1 ± 3.5
S2	2.0	78.7 ± 5.3	112.1 ± 5.2
S3	3.0	81.2 ± 5.7	74.4 ± 2.8
S4	4.0	73.0 ± 4.9	84.3 ± 4.9
S5	5.0	60.4 ± 4.6	69.9 ± 3.6
S6	6.0	48.1 ± 3.2	66.6 ± 3.9
S7	7.0	44.6 ± 2.1	21.4 ± 3.3

a: the average PT recovery was calculated by tri-repeated experiment; b: the average FHA recovery was calculated by tri-repeated experiment

由表 1 可知, 随着脲浓度的增大(0~7.0 mol/L), PT 的活性回收率逐步从 100%降低到 44.6%, 而 FHA 的活性则先增大到 112.1%后再逐步减小到 21.4%。脲浓度在 2 mol/L 时, FHA 回收率达到最高值, 为 112%, 此时的 PT 回收率也较高, 为 78%。因此本研究选用 2 mol/L 的脲浓度来考察脲对层析效果的影响。

2.2 脲对离子交换层析的影响

在离子交换层析过程中加入 2 mol/L 脲, 并与不加脲的层析过程进行对比。百日咳发酵液经 (NH₄)₂SO₄ 沉淀和透析处理后即可上样进行离子交换层析。层析谱图如图 1 所示。从图 1 可以看出, 两次层析的谱图形状基本一致, 但采用 2 mol/L 脲缓冲液为流动相洗脱得到的洗脱峰(图 1-B Fraction B)的峰面积比较大。蛋白和活性回收率的分析结果如表 2 所示。

表 2 脲对离子交换层析过程中的蛋白和活性回收率的影响
Table 2 Effect of urea on the recoveries of protein and activity in IEC

Sample	Protein recovery (%) ^c	PT recovery (%) ^d	FHA recovery (%) ^e
CCS	100	100	100
1 IE before ^a	7.0 ± 0.9	60.8 ± 3.1	8.5 ± 0.9
1 fraction A	114.3 ± 3.1	25.9 ± 1.2	36.7 ± 1.9
1 fraction B	7.6 ± 1.0	53.89 ± 3.0	50.2 ± 2.2
2 IE before ^{ab}	9.8 ± 1.1	84.3 ± 4.6	51.0 ± 2.5
2 fraction A ^b	91.3 ± 3.2	48.6 ± 2.7	20.9 ± 1.1
2 fraction B ^b	9.6 ± 0.8	71.7 ± 3.5	56.0 ± 2.0

a: IE before represents the dialysate (CCS followed by ammonium sulfate precipitation, dissolution and dialysation) loaded onto IEC column; b: the samples include 2 mol/L urea; c: the average protein recovery was calculated by tri-repeated experiment; d: the average PT recovery was calculated by tri-repeated experiment; e: the average FHA recovery was calculated by tri-repeated experiment

表 2 中 IE before 百分数数值以 CCS 为参照, 各峰的百分数数值以 IE before 为参照, 从中可以看出, 透析过程中, 在不加脲的情况下, PT 有 40%的活性损失, FHA 有高达 90%左右的活性损失; 在加入 2 mol/L 脲的情况下, PT 只有 15%的活性损失, FHA 的活性损失也降低到 50%左右。离子交换过程中, 2 mol/L 脲的加入将 PT 的活性回收率从 54%提高到 72%, FHA 的活性回收率从 50%提高到 56%。综合考虑透析和离子交换层析, 2 mol/L 脲的加入使 PT 的活性回收率从 33%提高到 60%, FHA 的活性回收率从 5%提高到 29%。

离子交换各个组分的 SDS-PAGE 分析结果如图 2 所示。从图中可以看出, 在不加脲的情况下, PT 和 FHA 混合组分的电泳条带在 60~90 kD 之间有一些比较明显的杂带(Lane 5); 加入 2 mol/L 脲后发现, 杂蛋白的相对含量有所降低, 目标蛋白的纯度得到进一步的提高(Lane 8)。

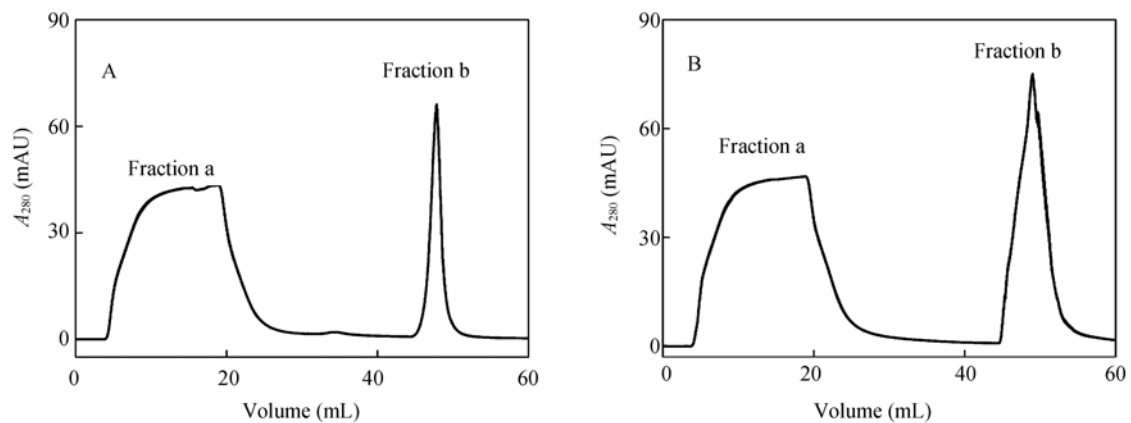


图1 离子交换层析谱图(A: 不含脲, B: 含 2 mol/L 脲)

Fig. 1 Elution profiles of ion-exchange chromatography(A: in the absence of urea, B: in the presence of 2 mol/L urea)

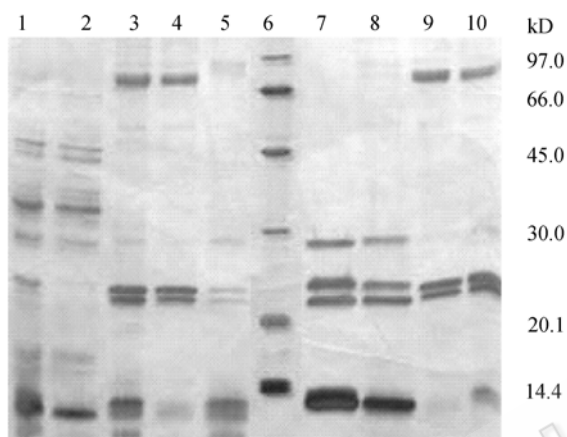


图2 离子交换洗脱组分的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of PT and FHA eluted from IEC in the presence and absence of 2 mol/L urea in the elution buffer

1: CCS; 2: ASP-S; 3: IEB in the absence of 2 mol/L urea; 4: fraction A in the absence of 2 mol/L urea; 5: fraction B in the absence of 2 mol/L urea; 6: marker; 7: standard PT; 8: fraction B in the presence of 2 mol/L urea; 9: fraction A in the presence of 2 mol/L urea; 10: IEB in the presence of 2 mol/L urea

2.3 脲对凝胶过滤层析的影响

取适量离子交换层析样品上柱,用平衡缓冲液洗脱,收集紫外吸收峰对应的洗脱液,流速 0.8 mL/min。不加脲的层析过程洗脱液为 100 mmol/L PB+0.15 mol/L NaCl, pH 7.0, 加脲的层析过程所用洗脱液为 100 mmol/L PB+0.5 mol/L NaCl+2 mol/L urea, pH 7.0。层析谱图如图 3 所示。加脲与不加脲的层析谱图存在明显的差异。2 mol/L 脲的加入,明显提高了洗脱峰(图 3B)的峰面积。提高了分离度(如 Fraction a 和 b),洗脱峰的数目也从 5 个降低到 3 个。蛋白和活性分析结果如表 3 所示。

表 3 各峰的百分数数值以 GF before 为参照,从

中可知, 2 mol/L 脲的加入,明显提高了凝胶过滤层析的蛋白和活性回收率。各洗脱峰累加的蛋白回收率从 57.1% 提高到 94.1%, PT 回收率从 25.3% 提高到 90.4%, FHA 回收率从 60.6% 提高到 119.2%。此外, PT 和 FHA 的活性分别也更加集中, FHA 主要分布在第一个洗脱峰中(图 3B, Fraction a), 而 PT 主要分布在第二个洗脱峰中(图 3B, Fraction b), 取得了更好的分离效果。

表 3 脲对凝胶过滤层析过程中的蛋白和活性回收率的影响

Table 3 Effect of urea on the recoveries of protein and activity in GFC

Sample	Protein Recovery (%) ^c	PT Recovery (%) ^d	FHA Recovery (%) ^e
GF before ^a	100	100	100
1 fraction A	27.6 ± 2.2	2.8 ± 0.5	20.2 ± 1.9
1 fraction B	4.1 ± 1.0	5.9 ± 1.2	13.1 ± 1.1
1 fraction C	16.1 ± 1.2		
1 fraction D	0	16.6 ± 1.0	27.3 ± 1.7
1 fraction E	9.3 ± 1.3		
2 fraction A ^b	54.2 ± 2.5	3.2 ± 0.7	105.2 ± 5.4
2 fraction B ^b	25.9 ± 2.1	84.0 ± 2.5	7.6 ± 1.0
2 fraction C ^b	14.0 ± 1.3	3.2 ± 0.5	6.4 ± 1.2

a: GF before represents the sample loaded onto GFC column; b: the samples include 2 mol/L urea; c: the average protein recovery was calculated by tri-repeated experiment; d: the average PT recovery was calculated by tri-repeated experiment; e: the average FHA recovery was calculated by tri-repeated experiment

凝胶过滤层析各个组分的 SDS-PAGE 分析结果如图 4 所示。从图 4 可以看出, 在不加脲的情况下, PT 及其亚基在各个洗脱峰中均有一定的分布(Lanes 6~9), 不利于 PT 的回收, 而且相应的洗脱峰中还含

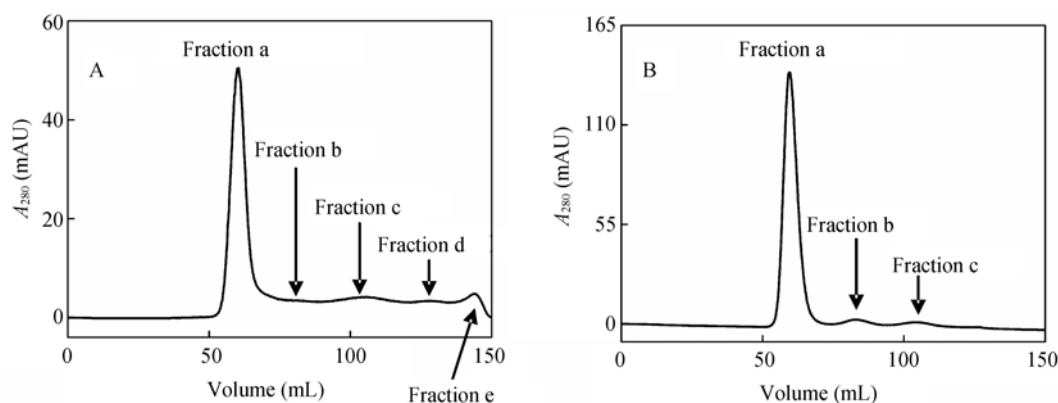


图3 凝胶过滤层析谱图(A: 不含脲, B: 含 2 mol/L 脲)

Fig. 3 Elution profiles of gel filtration chromatography(A: in the absence of 2mol/L urea , B: in the presence of 2mol/L urea)

有少量的杂蛋白, 纯度有待于进一步提高。加入 2 mol/L 脲后, 凝胶过滤的分辨率得到进一步提高, 具有完整亚基结构的 PT 分布于 Fraction b 中, 只含有部分亚基的 PT 分布于 Fraction c 中。

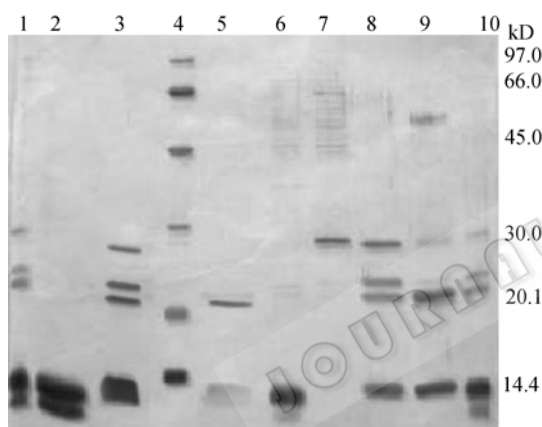


图4 凝胶过滤洗脱组分的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of PT and FHA eluted from GFC in the presence and absence of 2 mol/L urea in the elution buffer

1,10: GF before; 2: fraction a in the presence of 2 mol/L urea; 3: fraction b in the presence of 2 mol/L urea; 4: marker; 5: fraction c in the presence of 2 mol/L urea; 6: fraction a in the absence of 2 mol/L urea; 7: fraction b in the absence of 2 mol/L urea; 8: fraction c in the absence of 2 mol/L urea; 9: fraction e in the absence of 2 mol/L urea

3 讨论

PT 和 FHA 是 APV 最重要的两种组分。PT 是百日咳杆菌产生的一种主要的活性成分, 具有血凝活性, 促使淋巴细胞增多, 对组织胺致敏, 增加胰岛素活性等诸多生物学活性, 同时也是非常重要的免疫原。PT 由 5 个亚基(S1-S5)构成。各亚基分子量

分别为 28 kD、23 kD、22 kD、11.7 kD、9.3 kD, 摩尔比为 1:1:1:2:1, 其中 S2 与 S4, S3 与 S4 分别形成了二聚体。PT 总分子量为 103~117 kD^[7]。FHA 是分子量约为 220 kD 的无毒丝状蛋白。新鲜制备的 FHA 在 SDS-PAGE 中显示 3~4 条带, 分别为 230、140、125 和 98 kD。随着储存时间的延长, 230 kD 的条带会消失, 新出现 75 和 58 kD 的两条带^[8]。

针对百日咳疫苗在低盐条件下不稳定, 容易聚集, 后续的分离纯化操作难以展开, 纯化效率低的难题, 本文利用脲具有稳定 PT 和 FHA 结构的特点, 在整个层析过程中加入 2 mol/L 脲, 研究结果表明在缓冲液中加入 2 mol/L 脲能显著提高透析、离子交换层析和凝胶过滤层析操作的效果。通过考察不同脲浓度对原料活性的影响, 发现随着脲浓度的逐步增加, PT 的活性回收率逐步降低, 而 FHA 的活性回收率先增大后减小, 在 2 mol/L 的浓度时达到最大值。在较低的脲浓度(如 2 mol/L)下, PT 和 FHA 的稳定性得到提高, 有利于后续分离纯化操作的实施^[3]。但是, 继续增加脲浓度将导致 PT 和 FHA 的变性和失活。根据文献报道, 在 5 mol/L 脲溶液中放置 4 d, PT 将降解成 S-1, S-5 亚基, S-2 和 S-4 的二聚体, 以及 S-3 和 S-4 的二聚体; 在 8 mol/L 脲的条件下放置 16 h, PT 将降解为 5 个独立的亚基, 即 S-1、S-2、S-3、S-4 和 S-5^[9]。透析过程中, 由于 2 mol/L 脲的加入, 避免了盐浓度的降低导致的 PT 和 FHA 的聚集和沉淀, 提高了目标蛋白的活性回收率(表 1)。离子交换过程中, 2 mol/L 脲的加入, 稳定了 PT 和 FHA 的结构, 抑制了 PT 和琼脂糖基质的相互作用^[10], 将 PT 的活性

回收率从 54% 提高到 72%, FHA 的活性回收率从 50% 提高到 56%, 提高了离子交换层析的分辨率和目标蛋白的纯度。同样地, 在凝胶过滤层析中 2 mol/L 脲的加入, 提高了 PT 和 FHA 的活性回收以及凝胶过滤层析的分辨率, PT 和 FHA 的活性分布更加集中, FHA 主要分布在第一个洗脱峰中, 回收率接近 100%, PT 主要分布在第二个洗脱峰中, 回收率接近 85%。此外, SDS-PAGE 分析结果表明, 在缓冲液中加入 2 mol/L 脲的凝胶过滤层析中, 使具有完整亚基结构的 PT 和缺少部分亚基的 PT 得到了很好的分离。在凝胶过滤层析各组份的电泳分析中, PT 和 FHA 各亚基形成的多聚体的分子量大小和凝胶过滤蛋白洗脱峰大致吻合。在缓冲液中加入 2 mol/L 脲的凝胶过滤层析(图 3B)中, 第一个洗脱峰(图 4 Lane 2)主要为 FHA 和 PT 的 S4、S5 亚基组成, 分子量较大, 由于原料中 FHA 含量较低, 我们只能看到 PT 亚基的条带; 第二个洗脱峰(图 4 Lane 3)为完整亚基的 PT, 分子量次之; 第三个洗脱峰(图 4 Lane 5)为不完整亚基的 PT, 分子量较小。在缓冲液中不含脲的凝胶过滤层析(图 3A)中, 第一个洗脱峰(图 4 Lane 6)为 FHA 和 PT 部分亚基, 另外还有一些杂蛋白, 分子量较大, 由于原料中 FHA 含量低, 导致洗脱峰中 FHA 浓度低于 PT 亚基; 第二个洗脱峰(图 4 Lane 7)为 FHA 和 PT 不完整亚基 S1 的结合体, 另外还有一些杂蛋白, 分子量次之; 第三个洗脱峰(图 4 Lane 8)为 PT, 分子量较小; 第四个洗脱峰(图 4 Lane 9)为 PT 不完整亚基 S1、S3、S4, 分子量最小。

综上所述, 2 mol/L 脲的加入明显提高了 PT 和 FHA 的分离纯化效果, 采取两步层析的方法, PT 的活性总回收率从 5.5% 提高到 50.4%, FHA 的活性总回收率从 1.0% 提高到 30.5%。2 mol/L 脲的加入, 不仅抑制由于较强的疏水性引起的蛋白聚集现象, 还抑制了 PT 和琼脂糖基质的相互作用^[10], 从而提高了层析效果和活性回收率。理论上, 2 mol/L 脲的加入, 还可能会使包埋在分子内部的部分疏水性氨基酸残基暴露出来, 导致蛋白质表面电荷分布和分子结构的变化^[11], 从而引起蛋白质离子交换层析行为和凝胶过滤层析行为的变化。

整个纯化过程(硫酸铵沉淀加两步层析)中,

PT 总回收率为 7.37%(不含脲)和 50.77%(含脲); FHA 总回收率为 1.42%(不含脲)和 28.56%(含脲)。

REFERENCES

- [1] Ivanoff B, Robertson SE. Pertussis: a worldwide problem. *Development in Biological Standardization*, 1997, **89**: 3-13.
- [2] Liu GA, Yang XM, Ge RC, *et al.* The determination of isoelectric point and purification by chromatography of pertussis. *Journal of Northwest Normal University*, 2004, **40**(4): 68-70.
刘国安, 杨晓明, 葛瑞昌, 等. 百日咳的等电点测定及层析分离. 西北师范大学学报, 2004, **40**(4): 68-70.
- [3] Özcengiz E, Kılınç K, Büyüktanır Ö, *et al.* Rapid purification of pertussis toxin (PT) and filamentous hemagglutinin (FHA) by cation-exchange chromatography. *Vaccine*, 2004, **22**(12): 1570-1575.
- [4] Gillenius P, Jäättmä E, Askelöf P, *et al.* The standardization of an assay for pertussis toxin and antitoxin in microplate culture of Chinese hamster ovary cells. *J Biol Stand*, 1985, **13**(1): 61-66.
- [5] Lu Y, Wang XS, Wang PZ, *et al.* Coomassie blue G-250 rapid, sensitive to the determination of protein concentration. *Journal of Biology*, 1992, **1**: 24-26.
路阳, 王贤舜, 王培之, 等. 考马斯亮蓝 G-250 迅速、灵敏地测定蛋白质浓度. 生物学杂志, 1992, **1**: 24-26.
- [6] Qin L. The purification and detection of pertussis toxin and filamentous hemagglutinin. *Progress in Microbiology and Immunology*, 1997, **25**(1): 87-89.
秦力. 百日咳毒素和丝状血凝素的纯化和检测现状. 微生物学免疫学进展, 1997, **25**(1): 87-89.
- [7] Sheu GC, Wo YYP, Yao SM, *et al.* Characteristics and potency of an acellular pertussis vaccine composed of pertussis toxin, filamentous hemagglutinin, and pertactin. *J Microbiol Immunol Infect*, 2001, **34**(4): 243-251.
- [8] Sekura RD, Fish F, Manclark CR, *et al.* Pertussis toxin-affinity purification of a new ADP-ribosyltransferase. *J Bio Chem*, 1983, **258**(23): 14647-14651.
- [9] Tamura M, Nogimori K, Murai S, *et al.* Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model. *Biochemistry*, 1982, **21**(22): 5516-5522.
- [10] Arai H, Sato Y. Separation and characterization of two distinct hemagglutinins contained in purified leukocytosis-promoting factor from Bordetella pertussis. *Biochim Biophys Acta*, 1976, **444**(3): 765-782.
- [11] Geng XD, Bai Q, Wang CZ. A Method of Protein Folding: Liquid Chromatography. Beijing: Science Press, 2006.
耿信笃, 白泉, 王超展. 蛋白折叠液相色谱法. 北京: 科学出版社, 2006.