

毛细管电泳用于测定人绒毛促性素的解离亚基及其质量控制

邓钦培, 安然, 徐通泽, 何丽秀, 孙梦梅, 杨嘉明*, 彭育才*

(珠海市丽珠单抗生物技术有限公司, 广东 珠海 519045)

摘要: 人绒毛促性素 (hCG) 是用于治疗不孕症等的常用药物。其由 α 亚基和 β 亚基组成, 研究发现 hCG 在生产及储存过程中均可能产生亚基的解离, 从而影响其活性。本文旨在建立 hCG 解离亚基的测定方法, 通过考察样品制备缓冲体系、样品制备温度、分离电压、毛细管温度等, 建立了毛细管电泳 (CE-SDS) 定量测定 hCG 解离亚基的方法。方法验证结果表明, α 亚基和 β 亚基含量具有良好的灵敏度、线性、准确度和精密度, 优于传统的凝胶电泳 SDS-PAGE。本文所开发的方法适用于不同来源的 hCG, 并可应用于指导工艺开发及稳定性研究。因此, 该方法应作为 hCG 生物制品的重要质控方法。

关键词: 人绒毛促性素; 毛细管电泳; 凝胶电泳; 解离亚基; 质量控制

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 03-0430-06

Quality control of human chorionic gonadotrophin subunit dissociation

DENG Qin-pei, AN Ran, XU Tong-ze, HE Li-xiu, SUN Meng-mei, YANG Jia-ming*, PENG Yu-cai*

(Livzon Mabpharm Inc., Zhuhai 519045, China)

Abstract: Human chorionic gonadotrophin (hCG), a glyco-hormone widely used in treatment of infertility, is a heterodimer composed of an alpha- and a beta-subunit. The heterodimer could be dissociated during production and storage with an impact on its bioactivity. A CE-SDS method for quantitative analysis of hCG subunit dissociation was established in this study by optimization of a variety of method conditions including sample preparation buffer compositions, incubation temperature, separation voltage, and capillary temperature. This method was validated for good sensitivity, linearity, precision, and accuracy for both α - and β -subunit. CE-SDS also showed much better precision and accuracy than SDS-PAGE. The method was successfully used in both recombinant hCG (r-hCG) produced by cell culture and hCG (u-hCG) derived from urine. The CE-SDS method was used in the study of hCG development and stability. Therefore, it is an useful tool for the quality control of hCG.

Key words: human chorionic gonadotrophin; CE-SDS; SDS-PAGE; subunit dissociation; quality control

人绒毛促性素 (human chorionic gonadotrophin, hCG), 又称人绒毛膜促性腺激素, 是人胎盘滋养层

分泌的一种促性腺激素。注射用人绒毛促性素属国家基本药物, 在临床用于不孕症、黄体功能不足、功能性子宫出血、先兆性流产或习惯性流产等。在国内外已上市销售的 hCG 包括从尿中提取纯化的 u-hCG 和通过 DNA 重组技术表达的 r-hCG。无论 u-hCG 还是 r-hCG, 均由 α 亚基和 β 亚基非共价组成。从生物学功能上看, α 亚基与信号传导、亚基折叠有重要关系^[1, 2], 而 β 亚基与 hCG 体内清除及体内生物活性密切相关^[3, 4]。因此, 治疗用 hCG 须以全蛋白的形式才

收稿日期: 2016-09-22; 修回日期: 2016-12-07.

基金项目: 国家发展和改革委员会资助专项: 丽珠医药集团股份有限公司国家级企业技术中心创新能力建设 (抗体药物实验室) (发改投资[2013]535 号、粤发改高技术[2013]243 号、珠发改产业[2013]70 号)。

*通讯作者 Tel: 86-756-8135273, E-mail: yangjiaming@livzon.cn;

Tel: 86-756-8135396, E-mail: pengyucai@livzon.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-0746

具有预期的药效, 而游离 α 亚基或游离 β 亚基可能会失去其生物学活性。根据文献报道, 蛋白在高盐^[5]、高温^[6]、酸性^[7]、光照^[8]等条件下, 其亚基容易发生解离从而使其活性受到影响。因此, hCG 会由于上述因素可能在生产、运输、货架期过程中产生解离亚基, 从而影响产品的有效性甚至安全性。

对于 hCG 的质量控制, 在各国药典的各论中有一些基本的控制。2015 年版中国药典各论中, 对尿源 hCG 产品相关杂质 (包括解离亚基) 未做要求。国内外文献^[9-11]有一些深入研究的报道, 如使用反向液相色谱 (RP-HPLC)、分子排阻色谱 (SEC-HPLC)、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)、等电聚焦 (IEF) 等方法对产品的杂质及批间一致性进行评价; 但少有提及对解离亚基的控制, 主要原因之一是缺乏稳定可靠的定量测定方法。hCG 在有机溶剂、酸、高温等条件下均容易发生解离^[2], 因此 RP-HPLC 因有机溶剂的使用不适用于解离亚基的测定; SEC-HPLC 则因全蛋白与两种亚基 (及其他工艺或产品相关物质) 分子量接近而难以实现有效分离^[11]; SDS-PAGE 的方法是蛋白分析的经典方法, 但使用考马斯亮蓝染色的方法灵敏度较低, 而银染等染色方法灵敏度较高但准确度和精密度却难以用于定量分析。对于其他蛋白的解离亚基分析, 文献中曾使用凝胶电泳^[12]、质谱^[13]、光散射及 X 射线衍射等^[8]技术进行表征研究, 但并不能满足制药行业对解离亚基含量作为常规质控的要求。本文采用的十二烷基硫酸钠-毛细管电泳法 (CE-SDS) 使用高精密度的全自动毛细管电泳仪, 具有高的分离度、精密度、灵敏度和准确性。在生物制药领域, 如单克隆抗体药物, CE-SDS 法被广泛用于质量控制^[14, 15]。

本文为了实现对 r-hCG 中解离亚基含量的控制, 通过优化样品处理方法和电泳分离条件, 并经过方法学验证, 建立了定量分析 r-hCG 解离亚基的 CE-SDS 方法。应用 CE-SDS 测定法, 对本单位生产的 r-hCG 的纯化工艺和制剂工艺过程中间品的解离亚基进行监控, 指导工艺开发。此外, 该方法亦可使用于 u-hCG 和重组人促卵泡激素 (r-FSH) 的解离亚基检测。

材料与amp;方法

试剂 分离胶为 SDS-MW 凝胶溶液购于 Sciex 公司 (原 Beckman, 美国); 50 μm 内径熔融石英毛细管购于 Sciex 公司或 Polymicro Technologies (Molex, 美国)。样品 (制备) 缓冲液、酸洗液 (0.1 mol·L⁻¹

HCl)、碱洗液 (0.1 mol·L⁻¹ NaOH) 为自制, 所使用其他化学试剂均为分析纯, 超纯水为 Milli-Q 制备。

仪器 PA800 plus 毛细管电泳仪 (美国 Sciex 公司), 配备二极管阵列检测器及 32Karat 数据处理工作站。Mini-PROTEAN Tetra 凝胶电泳系统 (美国 Bio-Rad 公司), 配备制胶装置、电源、垂直电泳槽等。Agilent 1200 高效液相色谱 (美国 Agilent 公司), 配备 VWD 检测器及 Chem Station 工作站。

样品 r-hCG 重组人绒毛促性素为自产或购自默克-雪兰诺 (商品名: 艾泽), u-hCG 尿源人绒毛促性素购买自中国食品药品检定研究院 (绒毛促性素标准品) 或由丽珠制药厂 (注射用绒毛促性素) 提供, r-FSH 重组人促卵泡激素购自默克-雪兰诺 (商品名: 果纳芬)。

RP-HPLC 选用美国 Sepax 公司 Bio-C18 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 设定流速 0.8 mL·min⁻¹, 检测波长 214 nm, 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$ 。使用梯度洗脱, 流动相 B 在 28 min 内从 20% 至 40%。流动相 A: 0.1% TFA, 100% 超纯水; 流动相 B: 0.1% TFA, 100% 乙腈。在反向液相色谱中, 通过流分收集, 经浓缩及置换溶剂, 获得完全解离的 α 亚基、 β 亚基。将获得的流分重新进行 RP-HPLC 分析, 两亚基具有很好的纯度。

电泳样品制备 样品制备: 取 r-hCG 45 μg , 加样品缓冲溶液至 100 μL , 暂存于 10 $^{\circ}\text{C}$ 待检。含 4% 解离亚基样品制备 (系统适应性样品): 取 r-hCG 样品溶液, 沸水浴加热 10 min, 冷却至室温, 取 4 μL 与新制 r-hCG 溶液 96 μL 混合。其他含不同比例解离亚基样品的制备, 可按比例进行调整。

CE-SDS 设置毛细管温度为 20 $^{\circ}\text{C}$, 样品盘温度为 10 $^{\circ}\text{C}$ 。PDA 波长为 220 nm, 带宽为 10 nm。样品分析方法: 依次设置如下, 使用碱洗液在 70 psi (1 psi≈6.9 kPa) 冲洗 3 min, 酸洗液在 70 psi 冲洗 1 min, 超纯水在 70 psi 冲洗 1 min, SDS-MW 凝胶溶液在 70 psi 冲洗 10 min 进胶, 超纯水中蘸洗毛细管 2 次, 然后在 10 kV 反相电极中进样 20 s, 超纯水中蘸洗毛细管 1 次, 最后在 15 kV 20 psi 反相电极中电泳分离 40 min。

样品制备缓冲体系优化 配制并考察不同样品制备缓冲体系 (Tris-盐酸缓冲、磷酸缓冲、硼酸硼砂缓冲、碳酸缓冲体系); 然后配制考察 pH 值为 6、7、8、9、10, 盐浓度为 20、50、100、150、200 mmol·L⁻¹ Tris-盐酸缓冲, 以及添加 0.2%、0.5%、1%、2%、5% SDS 对分离的影响。

电泳分离条件优化 分别考察分离高压为 10、15、20 和 25 kV, 分离温度为 15、20、30、40 和 50 $^{\circ}\text{C}$,

毛细管有效长度为 10、20、30 和 40 cm。

SDS-PAGE 按“电泳样品制备”方法制备含解离亚基为 0%、0.5%、1%、5%、10%、100% 的 r-hCG 样品, 采用 5% 浓缩胶 10% 分离胶的聚丙烯酰胺凝胶, 每孔上样 10 μL (约 4 μg), 在 Tris-甘氨酸缓冲体系中电泳分离。凝胶根据需要进行考马斯亮蓝染色或银染染色。

制剂筛选 将 r-hCG 通过超滤置换至一定浓度的磷酸缓冲液中 (pH 6.5~7.5, 含蔗糖), 即配方 1; 或超滤置换至不含蔗糖的相同缓冲溶液中, 即配方 2。在两种配方中的 r-hCG 放入经过校验的培养箱中, 40 $^{\circ}\text{C}$ 温育 0~1 个月待检。

结果

1 CE-SDS 方法建立及验证

1.1 CE-SDS 方法建立

1.1.1 解离 α 亚基和 β 亚基的确认 将使用 RP-HPLC 制备获得的纯 α 亚基、 β 亚基进行 CE-SDS 分析, 确认 CE-SDS 中 α 亚基、 β 亚基及全蛋白的迁移时间。

1.1.2 实验条件优化选定 通过考察不同缓冲体系、pH 范围、缓冲盐浓度范围、SDS 浓度范围等进行样品制备体系及分离条件优化, 选定样品制备缓冲液为 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-盐酸缓冲液 (pH 9.0), 含 1% SDS; 选择电泳分离电压为 15 kV, 毛细管温度为 20 $^{\circ}\text{C}$, 毛细管长 30 cm (有效长度 20 cm)。

1.2 CE-SDS 方法验证

1.2.1 专属性 样品 (制备) 缓冲溶液、r-hCG 制剂缓冲溶液在亚基及全蛋白处均无吸收峰。添加 4% 解离亚基 (解离 α 亚基和解离 β 亚基占总蛋白的量) 的 r-hCG 样品, α 亚基与 β 亚基、 β 亚基与全蛋白的分离度均大于 1.5, 该方法具有很好的专属性。

1.2.2 精密度 不同分析人员在 3 天里分别每次制备 3 个含约 4% 总解离亚基的 r-hCG 样品。结果表明, 全蛋白含量 RSD < 0.5%, 解离 α 亚基和解离 β 亚基等低含量组分 RSD 均小于 10%, 方法的精密度良好。

1.2.3 准确度 制备含解离亚基为 0.5%、1%、2%、4%、6%、8% 和 10% 的 r-hCG 样品, 进行 CE-SDS 分

析 ($n=3$)。图 1A 为选取其中一次的 1%~10% 解离亚基添加的 CE-SDS 电泳图, 可见 α 亚基、 β 亚基的峰面积随总添加量显著增加。将样品总解离亚基峰面积百分比实测值与总解离亚基理论添加量作比值, 计算回收率。测得当总解离亚基添加量 1%~10% 时, 回收率在 80%~120% (表 1)。

1.2.4 线性及范围 在总解离亚基添加量为 1%~10% 内, 分别以 α 亚基和 β 亚基的峰面积 (纵坐标) 与总添加量 (横坐标) 进行线性拟合 (图 1B)。 α 亚基的线性回归方程为: $y=616853x+138$ ($r^2=0.999$), β 亚基的线性回归方程为: $y=940114x+3321$ ($r^2=0.984$)。

1.2.5 定量限 当总解离亚基为 1% 时, α 亚基 (0.4%) 测定的信噪比为 10, 同时具有很好的精密度 ($n=3$, RSD < 10%) 与准确度 (回收率 = 118%)。定量限以 α

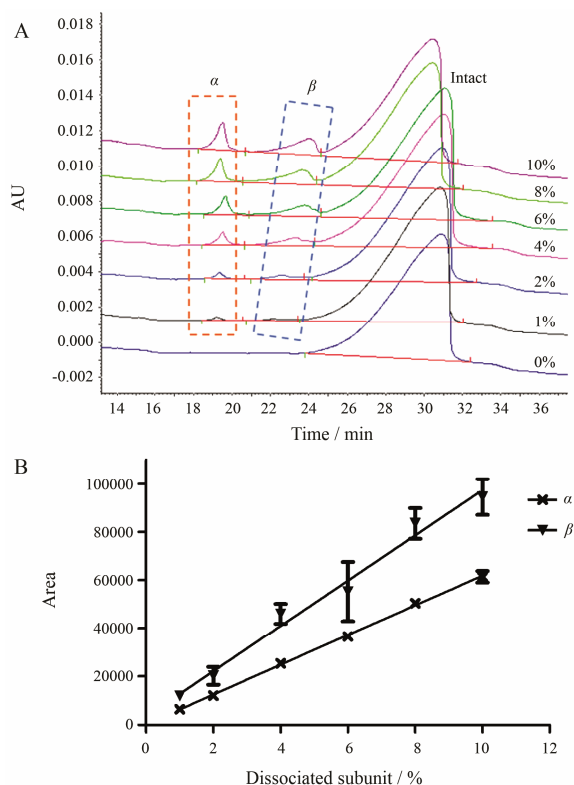


Figure 1 Representative electrophorograms (A) of spiked samples with 0–10% dissociated subunits from bottom to top, and Calibration curves (B) of the peak areas (y-values) of α -subunit (\times) and β -subunit (\blacktriangledown) over concentrations (x-values) of 1%–10% total spiked dissociated subunits. Peak areas are expressed as mean \pm SD ($n=3$)

Table 1 Recovery of spiked samples ($n=3$)

Spiked free α - and β -subunit	0.5%	1%	2%	4%	6%	8%	10%
Recovered of free α - and β -subunit	0.15%	1.18%	2.06%	4.53%	5.95%	9.02%	10.72%
Recovery rate	31%	118%	103%	113%	99%	113%	107%
RSD	1.5%	1.1%	7.5%	5.7%	11.9%	4.0%	4.8%

亚基计算, 相当于蛋白总量的 0.4%, 即 $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

1.3 SDS-PAGE

当 SDS-PAGE 使用考马斯亮蓝染色时, 全蛋白及低含量解离亚基均几乎不可见。仅当使用银染时有较强的显色。如图 2 所示, 解离亚基的黑度在一定程度上随含量递增, α 亚基仅在 2% 总解离亚基水平能重复观察。因此, SDS-PAGE 的方法可用于 r-hCG 的限度或半定量分析, 其检出限为 2% 总解离亚基, 或以 α 亚基计算相当于蛋白总量的 0.8%。

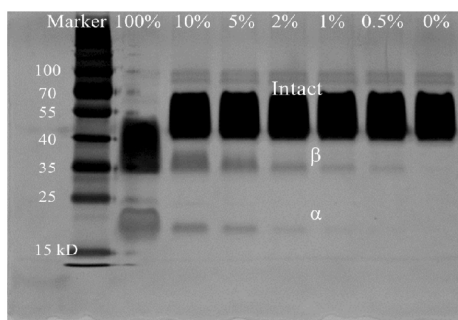


Figure 2 SDS-PAGE analysis with silver staining of r-hCG spiked with 0.5%–10% dissociated subunits. Numbers on the top indicate the percentage of spiked dissociated subunits. α - and β -subunit could be observed when more than 2% dissociated subunits were spiked

2 CE-SDS 方法在解离亚基检测中的应用

2.1 r-hCG 工艺开发中的游离亚基质量研究及控制

2.1.1 纯化工艺 通过细胞培养获得的产品, 在经过工艺步骤 1 (step 1) 时含约 3% 总解离亚基 (及少量其他杂质), 在工艺步骤 2 时解离亚基被去除约 1%, 到工艺步骤 3 时解离亚基被全部去除, 最终收获的原液 (drug substance) 不含解离亚基 (表 2)。结果表明, 本方法能对 hCG 纯化工艺进行有效监控, 精确评估每一步工艺对解离亚基的清除效率。

Table 2 Dissociated subunit content as determined by CE-SDS during process development and stability study. ND: Not detected

Item	Free α / %	Free β / %	Intact / %
Process development			
Purification Step1	0.4	2.7	96.9
Step2	–	2.2	97.9
Step3	ND	ND	100
Drug Substance	ND	ND	100
Formulation development			
Lot2 40 °C, 0 day	ND	ND	100
40 °C, 30 days	6.2	14.6	79.2
Lot1 40 °C, 0 day	ND	ND	100
40 °C, 30 days	1.8	3.1	95.1

2.1.2 制剂筛选及稳定性 采用 40 °C 高温破坏性实验, 产品在配方 1 (Lot 1) 和配方 2 (Lot 2) 中储存, 均逐渐产生解离亚基; 但在配方 2 中生成解离亚基的速率显著高于配方 1, 至 30 天时配方 2 为 21%, 配方 1 为 5%。因此可判定配方 1 在维持 r-hCG 亚基稳定性中更为有效 (表 2)。在选定配方 1 后进行正式稳定性研究中, 在 4 °C 冷藏保存 6 个月及 -20 °C 冷冻保存 24 个月, 产品均未检出解离亚基。结果表明, 方法可用于稳定性研究, 以评估产品的有效期及研究降解路径。

2.2 CE-SDS 分析尿源人绒毛促性素 (u-hCG) 与重组人促卵泡激素 (r-FSH)

2.2.1 u-hCG 如图 3A 曲线 3 所示, u-hCG 产品中发现含有大量的解离亚基, 特别是解离 β 亚基, 及其他未知低分子量物质。与 r-hCG 相比, u-hCG 含有大量的解离亚基及其他杂质, 而 r-hCG 产品在有效期内均几乎不含解离亚基。鉴于尿源 hCG 单位重量活性远低于重组 hCG, 大量的解离亚基可能是其比活性较低的一个重要原因。

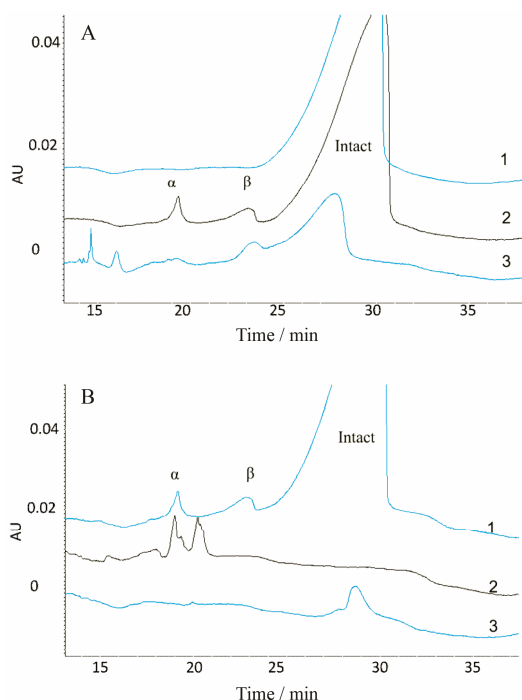


Figure 3 CE-SDS analysis of subunit dissociation of u-hCG (A) and r-FSH (B). A: Compared with intact r-hCG (A1) and r-hCG spiked with dissociated subunits (A2), u-hCG (A3) had much more content of dissociated subunits and unknown low-molecular-weight species. B: r-FSH was analyzed directly (B3) or under condition that all intact protein was dissociated (B2). Compared with r-hCG spiked with dissociated subunits (B1) and forced dissociated r-FSH (B2), native r-FSH (B3) might have little dissociated subunit

2.2.2 r-FSH 采用与 hCG 相同的 CE-SDS 方法分析测定 r-FSH。当不经加热处理时, 全蛋白迁移时间与 r-hCG 相当 (图 3B 曲线 3); 当经沸水浴加热后, r-FSH 发生解离 (图 3B 曲线 2), 同样产生 α 亚基和 β 亚基。由于 FSH 与 hCG 的 α 亚基氨基酸序列相同, 两者迁移时间基本一致, 而 β 亚基氨基酸序列不同, 两者迁移时间则有一定差异。从图 3 可知, 本 r-FSH 产品解离亚基含量基本低于检出限。对 u-hCG 与 r-FSH 的分析, 反映了本方法对不同类型促性腺激素药物解离亚基测定的普遍适用性, 另一方面也证实了解离亚基的普遍存在。

讨论

考虑到解离亚基对 hCG 生物学活性的潜在影响, 作者曾测定尿素变性解离后 r-hCG (>95% 解离) 的生物学活性, 发现其几乎丧失促小鼠卵巢增重的功能。基于这个发现, 建立解离亚基含量的定量测定方法在这类生物制品中显得尤为重要。

在方法建立过程中, 本文考察了不同缓冲体系、pH 范围、缓冲盐浓度范围、SDS 浓度范围对分离的影响。实验观察到 Tris-盐酸缓冲液与磷酸缓冲液较优; 盐浓度较大或 pH 较低时抑制进样, 降低灵敏度。同时, 对毛细管电泳分离条件进行优化, 并观察到电压越高、温度越高、毛细管越短, 分析时间越短; 但同时分离度或基线噪音可能随之变差。综合考虑分离度、进样量、缓冲能力、分离时间等选定当前条件。实验中还发现 hCG 在制备过程中对温度较为敏感, r-hCG 全蛋白与样品缓冲混合后 30 °C、1 h 检出少量解离亚基, 沸水浴 10 min 完全解离, 应注意控制制备条件。

然而, 即使进行了上述优化, 仍发现 β 亚基与全蛋白有较显著的前伸。作者认为该现象可能与 hCG 复杂的糖基化有关。 β 亚基有 2 个 *N*-糖和 4 个 *O*-糖修饰, 根据文献报道, 蛋白的糖基化可能显著影响电泳行为, 包括使亚基电泳峰 (或条带) 展宽、分子量偏移、产生多个电泳峰 (或条带)^[16, 17]。进一步优化分离条件, 特别是对商品化分离胶配方的优化选择, 可能改善分离。尽管如此, 目前这种影响在解离亚基含量较低时也相对较小。系统的方法学验证结果表明, 在总解离亚基 1%~10% 内, 该 CE-SDS 方法具有较好的专属性、精密度、准确度、线性, 满足产品质量控制的要求。相对于文献报道的结构表征类方法, 以及本文建立的 SDS-PAGE 方法, CE-SDS 方法更能有效分离并准确定量 hCG 的各解离亚基。

结论

综上所述, 本文通过优化样品制备及电泳分离条件, 建立并验证了定量分析 hCG 解离亚基的 CE-SDS 方法。方法可应用于不同厂家、不同生产工艺、不同来源 (尿源、重组) 的 hCG 的质量研究与控制, 甚至推广到其他促性腺激素 (如 FSH) 解离亚基的分析。该方法被证明适用于指导工艺开发、制剂筛选及产品稳定性研究等质量控制。因此对于 hCG 这类生物制品的解离亚基含量测定, 本文建立的 CE-SDS 方法将是其中最快速有效的定量工具。

致谢: 本单位工艺开发部门的丁建坤、卢懿在工艺研究样品的提供, 临床前研究部门的陈序在生物测定法研究中给予帮助。

References

- [1] Matzuk MM, Boime I. The role of the asparagine-linked oligosaccharides of the alpha subunit in the secretion and assembly of human chorionic gonadotrophin [J]. *J Cell Biol*, 1988, 106: 1049–1059.
- [2] Carvalho CM, Oliveira JE, Almeida BE, et al. Efficient isolation of the subunits of recombinant and pituitary glycoprotein hormones [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 1431–1438.
- [3] Fares FA, Suganuma N, Nishimori K, et al. Design of a long-acting follitropin agonist by fusing the C-terminal sequence of the chorionic gonadotropin beta subunit to the follitropin beta subunit [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89: 4304–4308.
- [4] Fares F. The role of *O*-linked and *N*-linked oligosaccharides on the structure-function of glycoprotein hormones: development of agonists and antagonists [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1760: 560–567.
- [5] Mio K, Ogura T, Kiyonaka S, et al. Subunit dissociation of TRPC3 ion channel under high-salt condition [J]. *J Electron Microsc*, 2007, 56: 111–117.
- [6] Tolan DR, Schuler B, Beernink PT, et al. Thermodynamic analysis of the dissociation of the aldolase tetramer substituted at one or both of the subunit interfaces [J]. *Biol Chem*, 2003, 384: 1463–1471.
- [7] Zhao MM, Yuan BB, Luo DH, et al. Subunit dissociation of soybean protein isolates in acid conditions [J]. *J South China Univ Sci Technol Nat Sci Ed (华南理工大学学报 自然科学版)*, 2011, 39: 22–27, 40.
- [8] Conrad KS, Bilwes AM, Crane BR. Light-induced subunit dissociation by a light-oxygen-voltage domain photoreceptor from *Rhodobacter sphaeroides* [J]. *Biochemistry*, 2013, 52:

- 378–391.
- [9] van de Weijer BH, Mulders JW, Bos ES, et al. Compositional analyses of a human menopausal gonadotrophin preparation extracted from urine (menotropin). Identification of some of its major impurities [J]. *Reprod Biomed Online*, 2003, 7: 547–557.
- [10] Wolfenson C, Groisman J, Couto AS, et al. Batch-to-batch consistency of human-derived gonadotrophin preparations compared with recombinant preparations [J]. *Reprod Biomed Online*, 2005, 10: 442–454.
- [11] Zheng LX, Shi ZW, Wu LH, et al. Study on the purity determination of chorionic gonadotrophin for injection [J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2012, 32: 333–336, 326.
- [12] Shoemaker CJ, Eyley DE, Green R. Dom34: Hbs1 promotes subunit dissociation and peptidyl-tRNA drop-off to initiate no-go decay [J]. *Science*, 2010, 330: 369–372.
- [13] Boeri Erba E, Ruotolo BT, Barsky D, et al. Ion mobility-mass spectrometry reveals the influence of subunit packing and charge on the dissociation of multiprotein complexes [J]. *Anal Chem*, 2010, 82: 9702–9710.
- [14] Nunnally B, Park SS, Patel K, et al. A series of collaborations between various pharmaceutical companies and regulatory authorities concerning the analysis of biomolecules using capillary electrophoresis [J]. *Chromatographia*, 2006, 64: 359–368.
- [15] Shi Y, Li Z, Lin J. Advantages of CE-SDS over SDS-PAGE in mAb purity analysis [J]. *Anal Methods*, 2012, 4: 1637–1642.
- [16] Bharadwaj D, Harris RJ, Kisiel W, et al. Enzymatic removal of sialic acid from human factor IX and factor X has no effect on their coagulant activity [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270: 6537–6542.
- [17] Garcia-Campayo V, Sugahara T, Boime I. Unmasking a new recognition signal for *O*-linked glycosylation in the chorionic gonadotropin beta subunit [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2002, 194: 63–70.