

制备免疫纯乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 的一种综合方法

谢彦博 王际彰 李岩 舒濬

(北京生物制品研究所, 北京)

本文报告包括胃蛋白酶消化、DEAE 纤维素离子交换层析、亲和层析、凝胶过滤等四个工序的生产纯 HBsAg 的综合方法。所得产品经对流电泳、琼脂免疫扩散、免疫电泳等法检查, 不含正常人血清蛋白质 (HuSP) 成份, 用来免疫动物可获得不含抗-HuSP 高效价的单特异性抗-HBs 血清, 因而证明了它是免疫纯品。本法所需条件一般, 而且结果比较稳定。从 100 毫升 HBsAg 阳性血清 (对流电泳效价 1:16) 一般可以制得纯 HBsAg 13 毫升 (对流电泳效价 1:16, 0.3—0.4 毫克/毫升), 即 3.9—5.2 毫克。

纯化的 HBsAg 对于探讨乙型肝炎病毒的本质, 大量生产 HBsAg 诊断血清, 以及制备供高敏感度检测 HBsAg 的方法所需的纯抗 HBsAg 抗体 (抗-HBs) 都是非常必需的。最近, 用纯 HBsAg 或其亚单位制造试验性乙型肝炎疫苗已获得可喜的成果, 故对纯 HBsAg 的需求更为迫切。国外一般采用密度梯度离心法制造^[1,2], 此法需要长时间的超速离心, 故不易推行, 因此有必要研究其他的提纯方法。已报道的方法有胃蛋白酶消化法^[3]、亲和层析法^[4]、等电聚焦电泳法^[5]、硫酸铵沉淀-加热法^[6]等等, 但在纯度、产量、收率等方面尚存在一些问题。我们曾单独应用上述各方法, 均未能得到纯品。用免疫电泳、琼脂扩散等敏感度较低的方法检查时, 虽检测不到人血清蛋白质 (简称 HuSP), 但用敏感度较高的对流电泳法检查, 则发现有 HuSP 的沉淀线, 免疫动物后所得抗 HBs 血清, 还含有抗 HuSP 抗体。我们认为这是因为 HBsAg 与人血清某些蛋白质的理化性质比较相近, 并且还与多种血清蛋白质结合成复合物, 因此用单独一种方法难以将它提纯。我们应用基于不同原理的分离提纯手

段, 建立了包括胃蛋白酶消化-DEAE 纤维素离子交换层析-亲和层析-凝胶过滤等四个工序的综合方法, 制得高纯度的 HBsAg。经免疫电泳、琼脂免疫扩散, 尤其是对流电泳检查不含 HuSP, 用来免疫动物可获得不含抗 HuSP 的高效价的单特异性抗 HBs 血清。

材料与方 法

一、纯 HBsAg 的制备方法

(一) HBsAg 的来源

用 HBsAg 阳性人血清或胎盘血清。HBsAg 对流电泳效价在 1:16 以上。如用胎盘血清为原料时, 在胃蛋白酶消化前需先经过半饱和硫酸铵沉淀法粗提纯。

(二) 胃蛋白酶消化

取蛋白酶 800 毫克 (北京生物化学制药厂, 活力单位 1:22000), 溶于 900 毫升 0.02N HCl 内 (置 37°C 预先保温), 混匀, 加 HBsAg 阳性血清 100 毫升, 边加边摇匀, 加毕 pH 为 2.0—2.3, 置 37°C 水浴箱内 5 小时, 每小时摇匀一次。取出后用透析纸包袋, 每袋 100—200 毫升, 用 pH7.8 的 M/15 磷酸钠缓冲液 (P. B.)—0.001 M EDTA 于

本文于 1976 年 12 月 4 日收到。

4℃ 透析过夜, 停止酶活性。

(三) DEAE 纤维素离子交换层析

取 DEAE 纤维素(Whatman Chromedia DE11 型)80 克, 按 Peterson 及 Sober 法^[7]处理后, 装床体积为 460 毫升的 $\phi 3.5 \times 47$ 厘米色层柱(在后来的制备中改用 DE 32 型 31 克, 装床体积为 180 毫升的 $\phi 3 \times 25$ 厘米色层柱也得到相同的效果)。用起始缓冲液(pH 8.0 的 0.003 M P. B., 电导率 0.42—0.44 毫姆/厘米)流洗平衡。经胃蛋白酶消化并经起始缓冲液透析平衡之样品约 1000 毫升(相当于原血清 100 毫升), 以 100 毫升/小时的流速上样。上样完毕后用浓度和 pH 梯度洗脱。采用恒容梯度混合瓶及马氏瓶作为梯度发生器。为了使此种梯度混合器产生的凸形梯度曲线在使用部分接近直线, 采用大体积起始缓冲液(2000 毫升)及高浓度上限缓冲液(含 0.5 M NaCl 的 pH 4.0—4.2 的 0.1 M P. B., 电导率 38—40

毫姆/厘米), 流洗速度仍为 100 毫升/小时, 一般使用 1200—1500 毫升的上限缓冲液。用自动部分收集器按 10 分钟一管收集流洗液, 并用 LKB Uvicord II 型紫外光吸收仪自动扫描 280 毫微米光密度。流洗图形每次略有差异(见图 1)。从图 1 可见经胃酶消化的样品经 DEAE 纤维素层析后大致可以分为 A—H 等数峰。经用对流电泳检测, HBsAg 一般集中在 F 或 G 峰(如用 DE 32 则一般集中在 C 或 D 峰, 这是因为 DE 11 与 DE 32 的吸附性能有所不同之故), 其他各峰未测出 HBsAg。其中 A 峰为流穿峰, 代表未被吸附的蛋白质。HBsAg 峰的电导率一般在 9—14 毫姆/厘米之间。将 HBsAg 峰各管合并, 体积在 150 毫升左右, 比原加入样品体积要小, 因而有富集作用。将合并样品用亲和层析所用的 PBS (pH 7.4 的 0.01 M PB—0.1 M NaCl) 透析平衡后上亲和层析柱。

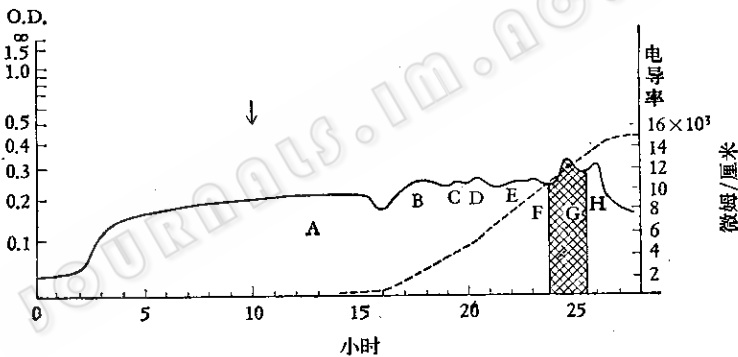


图 1 DEAE 纤维素离子交换层析提纯 HBsAg 的流洗图形。

实线为 280 毫微米波长光密度曲线, 虚线为流出液电导率, 阴影为 HBsAg 阳性部分, 箭头处开始用 pH 及浓度梯度洗脱。

(四) 亲和层析

1. 马抗正常人血清蛋白抗体(马抗 HuSP)亲和层析柱之制备。

主要参考 Cuatrecasas 法^[8]。将效价高、抗体谱较全的马抗 HuSP 血清 250 毫升用半饱和硫酸铵沉淀法制出球蛋白约 11 克, 用 pH 9.0 的 0.1 M NaHCO₃ 透析平衡过夜。将自制 4% 琼脂凝胶珠^[9]在 G2 玻璃滤器中用水充分洗涤, 抽至表面无水, 但不使干裂, 称取 250 克(湿重)。取自制溴化氰(CNBr)25 克, 在乳钵中加水 250 毫升研碎, 使 CNBr 大部分溶解后连同未溶解的颗粒倒入 4% 琼脂凝胶珠中, 在电磁搅拌下滴加 3N NaOH,

同时用 pH 计测定, 维持 pH 11.0, 反应 15—20 分钟, 反应温度不超过 20℃, 然后用含有碎冰块的水 3000 毫升在 G2 玻璃滤器上快速洗涤至中性, 再用含有碎冰块的 pH 9.0 的 0.1 M NaHCO₃ 2500 毫升洗涤, 全部洗涤时间为 3—5 分钟。加入上述平衡后的球蛋白溶液, 并补加 0.1 M NaHCO₃ 至总体积 500 毫升, 放入 500 毫升血浆瓶中, 加塞, 置转鼓上(1 转/2—5 秒)上下翻转 24 小时(10—20℃)。然后装色层柱($\phi 2.8$ 厘米, 胶高 48 厘米, 床体积 350 毫升), 用 pH 9.0 的 0.1 M NaHCO₃、pH 8.5 的 0.1 M 硼酸钠—硼酸—1M NaCl、pH 4.1 的 0.1 M 醋酸钠—醋酸—1M NaCl 缓冲液

依次流洗, 每种 3000 毫升。收集全部流洗液, 测定未结合的蛋白质量即可计算出结合的蛋白质量及结合百分率。根据多次结果, 每克湿重的 4% 琼脂凝胶珠能结合 31—38 毫克蛋白质; 结合的蛋白质量占加入的球蛋白量的 85—92% (即结合率)。最后以亲和层析用的 PBS 流洗平衡备用。

2. 亲和层析吸收正常人血清蛋白质

DEAE 纤维素层析所得 HBsAg 峰以亲和层析用的 PBS 透析平衡后, 上马抗 HuSP 亲和层析柱, 上样流速 20 毫升/小时。上样完毕后用同

一种 PBS 流洗, 流速 10 毫升/小时, 同时用部分收集器按 30 分钟一管收集及用 280 毫微米波长扫描。样品流经该柱时其中的 HuSP 即被吸收, HBsAg 则在流穿峰中。待流洗至光密度为 0.02 后用 350—400 毫升 pH 2.2 的 0.1 M 甘氨酸-盐酸缓冲液解吸再生, 用 3000 毫升水彻底流洗后再用 350—400 毫升 7 M 脲溶液解吸, 用 3000 毫升水彻底流洗后换 PBS 平衡备用。其流穿峰及解吸峰见图 2。将收集各管检测 HBsAg, 强阳性部分位于流穿峰的前部及中部, 后部则为弱

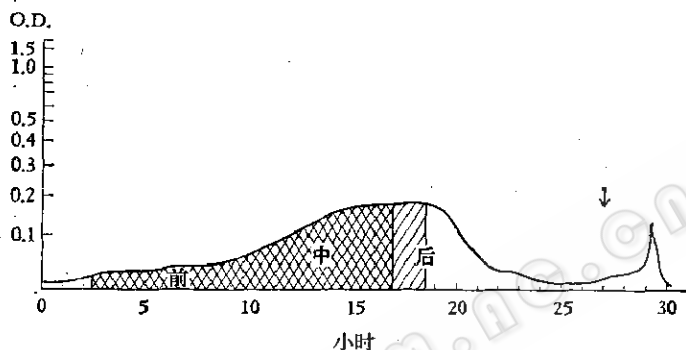


图 2 亲和层析提纯 HBsAg 的 280 毫微米波长光密度曲线。

双斜线阴影代表强阳性 HBsAg, 单斜线阴影代表弱阳性 HBsAg, 箭头为开始用 pH 2.2 甘氨酸缓冲液流洗处。

阳性及阴性部分。前部光密度虽不高, 但 HBsAg 之强度与中部接近或相等, 可见前部 HBsAg 之纯度较中部为佳, 而中部则除了 HBsAg 之外尚含有一部分分子量比 HBsAg 低的杂质, 后部则主要为低分子量杂质。这种低分子量杂质不被抗 HuSP 亲和层析柱所吸收, 可能是 HuSP 的胃蛋白酶消化产物。由于该亲和层析柱是用 4% 琼脂凝胶珠作为载体的, 而它本身即有分子筛效应, 因而将低分子量杂质与 HBsAg 初步分开。解吸峰是 HuSP, 其量虽少, 但用其他方法难以除掉。

将强阳性部分合并, 得 130—150 毫升, 直接进行凝胶过滤。

(五) 凝胶过滤¹⁾ (此工序亦可在亲和层析之前)

用瑞典 Pharmacia 厂的 Sephadex G-200 25 克, 依常规方法装 ϕ 2.5 厘米色层柱, 胶层高 100 厘米, 床体积 490 毫升。平衡及流洗液均为 pH 7.4 的 0.01 M PB-0.1 M NaCl。将经亲和

层析纯化的 HBsAg 强阳性部分约 130—150 毫升直接上样, 上样后用同一种 PBS 流洗, 上样及流洗速度均为 20 毫升/小时。用部分收集器收集及用 280 毫微米波长扫描, 见图 3。在空体积附近即 170 毫升开始出现的 A 峰为 HBsAg。因采用大体积上样法, A 峰跨度较大, 从 170 毫升处至 307 毫升处共 137 毫升; 光密度较小, 但因所用紫外光吸收仪稳定性较好, 多次试验峰形均能重演。在床体积附近出现的 B 及 C 峰为小分子量消化产物。将 A 峰各管合并, 装透析袋中浓缩至 13

1) 在设计凝胶过滤方式之前曾作过预实验。将亲和层析后阳性样品浓缩约 10 倍, 通过 Sephadex G 200 凝胶过滤柱后在空体积及总体积处各得到一个峰, 空体积处的峰为 HBsAg, 总体积处的峰为小分子量消化产物, 两峰之间无其他吸收峰。这提示用 G200 作凝胶过滤时可以加大上样体积至床体积的 20—30%, 因此可将亲和层析后样品直接上柱, 既减少了浓缩手续, 又可以避免浓缩时 HBsAg 聚合沉淀。

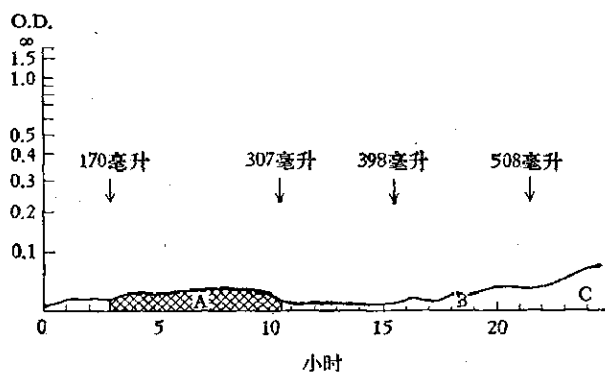


图3 凝胶过滤法提纯 HBsAg 的 280 毫微米波长光密度曲线。

阴影为 HBsAg 阳性部分。床体积为 490 毫升,箭头为该处流出液总体积。

毫升左右,用含有 0.001 M EDTA 的 pH 7.4 PBS 透析平衡,即为纯化的 HBsAg。

二、实验室检查方法

按常规方法进行免疫电泳、琼脂免疫扩散、对流电泳,使用 1.2% 的日本纯琼脂。所用抗血清为 (1) 马抗-HBs: 经亲和层析法提纯,制法见 [9], (2) 马抗-HuSP: 系本所用 HuSP 多次免疫马匹所得血清,抗体谱较全,在免疫电泳中与 HuSP 可生成二十多条沉淀带, (3) 兔抗-HuSP 及 (4) 绵羊抗-HuSP: 均系本所用 HuSP 多次免疫所得血清。

三、HBsAg 动物免疫法

(一) 豚鼠免疫

体重 350 克豚鼠,免疫前用活卡介苗 150 毫克/只分二只脚掌皮下注射。2 周后于每只动物两侧腹股沟淋巴结免疫 HBsAg 0.1 毫升(含 HBsAg

40 微克,加等体积福氏完全佐剂),以后隔 2 周注射一次,剂量为 0.2 毫升(含 HBsAg 80 微克),背部及腹部皮下多处注射,共注射 3 次。

(二) 马匹免疫

按本所生产规程进行。免疫前用活卡介苗致敏,用纯 HBsAg 加福氏佐剂免疫 3—5 针,每针间隔 3—4 周。

结 果

一、HBsAg 纯化过程中样品体积及蛋白质含量的变化

我们曾制备纯 HBsAg 12 批,每批均测定样品体积及 280 毫微米光密度,结果比较稳定。现以 76-2 批为例列出数据如表 1。

表 1 76-2 批纯 HBsAg 制备过程中样品体积及 280 毫微米光密度的变化

测 定 项 目	工 序		胃酶消化		DEAE 纤维素层析		亲和层析		凝胶过滤		纯 HBsAg 成品
	前	后	前	后	前	后	前	后	前	后	
体 积 (毫升)	100	1100	1078*	180	176.4*	135.5	131.5*	135.0			13.0
280 毫微米 O. D.	81.8	3.78	3.78	1.14	1.14	0.429	0.429	0.11			0.853
O. D. 单位 (O. D. × 毫升)	8180	4158	4074	206	201	58.1	56.4	14.9			11.1
本工序 O. D. 单位得率 (%)	100	50.8	100	5.0	100	28.9	100	26.5			
O. D. 单位累计得率 (%)	100	50.8		2.54		0.734		0.195			0.145

* 因取样减量。

从表 1 可见, 100 毫升的阳性血清, 在胃酶消化工序中稀释约 10 倍, 经 DEAE 纤维素层析的富集作用成为 180 毫升, 再经其后两个工序最后浓缩成为 13 毫升。以 O.D. 单位表示的蛋白质量从 8180 逐步降低至 11.1, 为原阳性血清的 0.145%, 即已除去 99.8% 以上的蛋白质成分。在各工序中, 以 DEAE 纤维素层析除去 O.D. 单位最多。残存的少量 HuSP 和小分子消化产物是分别通过亲和层析和凝胶过滤工序除去的。如按 HBsAg 的 $E_{280}^{1\%} = 25$ 计算^[10], 制得的纯 HBsAg 溶液每毫升含 HBsAg 0.3—0.4 毫克。每 100 毫升阳性血清制出纯 HBsAg 约 13 毫升, 即得 3.9—5.2 毫克纯 HBsAg。高桥和明等报道^[11], 用亲和层析加超离心法从 1000 毫升阳性血浆可制得 HBsAg 30 毫克。

二、HBsAg 纯化过程中 免疫化学指标的变化

(一) 对流电泳

用经亲和层析法提纯的马抗-HBs 及马抗-HuSP 检查样品中 HBsAg 及 HuSP 效价。原血清中 HBsAg 效价一般 1:16—1:32, HuSP 效价在数千以上(稀释抗原法)。随着纯化工序进程, HBsAg 略有下降, HuSP 则明显降低。最后经浓缩至 13 毫升的纯 HBsAg 制品, HBsAg 效价仍为 1:16—1:32, 可见对流电泳效价收率为 13% 左右。用原倍至 16 倍稀释的马抗 HuSP 检查均未检出 HuSP。

图版 I-1A 表明抗-HBs (a) 与 HBsAg 阳性血清 (1) 及纯 HBsAg (5) 均出现沉淀线。图版 I-1B 表明马抗-HuSP (b) 只与 HBsAg 阳性血清 (1) 产生多条沉淀线, 与纯 HBsAg (5) 则不出现沉淀线。图版 I-2 表明在提纯过程中 HBsAg 之沉淀线逐渐增强(a 与 2、3、4), 而 HuSP 沉淀线在胃酶

消化后大大减少(b 与 2), 经 DEAE 纤维素层析后还有微量的沉淀线(b 与 3), 经亲和层析后则 HuSP 沉淀线消失(b 与 4)。

(二) 琼脂免疫扩散实验

琼脂扩散法之敏感度虽比对电泳为低, 但它可以检出对电泳检查不出来的、与马抗体 IgG 带电量相近的蛋白质如人 IgG, 因此是 HBsAg 纯度的一个重要指标。为了确证 HBsAg 制品的纯度, 我们用三种动物即马、兔、绵羊的抗 HuSP 血清作琼脂扩散试验。结果均未发现其中有 HuSP (图版 I-3 中 b 与 5、图版 I-4 中 c 及 d 与 5)。图版 I-3 还说明, 随着提纯过程, HuSP 沉淀线减少以至消失(b 与 1—5)。

(三) 免疫电泳

图版 I-5A 表明马抗-HuSP (b) 与 HBsAg 阳性血清 (1) 生成十余条沉淀线, 与纯 HBsAg (5) 不生成沉淀线。图版 I-5B 表明经胃蛋白酶消化后绝大部分的 HuSP 已被除去只剩下 2—3 条沉淀线(b 与 2), 还表明经 DEAE 纤维素层析后, 用免疫电泳法已检测不到 HuSP (b 与 3)。图版 I-5c 是用马抗-HBs (a) 检查 HBsAg 阳性血清 (1) 和纯 HBsAg (5) 的结果, 表明抗 HBs 与阳性血清生成一条较模糊的沉淀线, 和纯 HBsAg 则生成一条清晰的沉淀线, 其位置在 β -球蛋白处, 与一般报告相符。

以上对流电泳、琼脂扩散、免疫电泳实验结果, 均说明所制出的 HBsAg 是纯的。

三、动物免疫试验

10 只豚鼠等分为两组, 第一组免疫 75-4 批纯 HBsAg, 第 2 组免疫 75-1 批 HBsAg (未经凝胶过滤工序)。注射三针后两周采血测定对流电泳效价。第一组 5 只豚鼠效价分别为 640、640、160、160、160, 无抗-HuSP, 所以是单特异性抗-HBs 血

清。第二组效价较低,分别为原倍、原倍、80、80、160,亦无抗-HuSP。由于第二组是注射未经凝胶过滤的 HBsAg 样品,其中虽不含 HuSP,但尚有约 3/4 的小分子消化产物,因此效价较差,可见凝胶过滤工序是必要的。

本法制备的纯 HBsAg 经豚鼠免疫及马匹免疫 3—5 针,得到对流电泳效价 1:256—1:512 的单特异性抗-HBs 血清。

讨 论

一、HBsAg 是含有糖类和脂类^[12]的大分子蛋白质,分子量为 360 万^[13],等电点为 pH 4.0 及 4.4^[13],所以它的理化性质和正常人血清中某些蛋白质如 β -脂蛋白、IgM、 α_2 -巨球蛋白等非常接近。在血清中,HBsAg 又与抗-HBs 及 IgM 等结合成为复合物^[14],因此它的纯化比较困难。Ling 等报道^[10],用密度梯度超速离心法制备的纯 HBsAg,尚含有 5% 的 HuSP。我们综合应用基于不同原理的分离提纯手段,达到制备纯 HBsAg 的目的。胃蛋白酶消化及酸化的目的是使复合物解离和使免疫球蛋白及其他蛋白质分解成为碎片,为以后提纯工序创造有利条件。DEAE 纤维素离子交换层析是根据蛋白质所带电荷的数目和排列方式以分离提纯,凝胶过滤是根据分子量大小分离提纯的,而亲和层析是利用高度专一性的抗原抗体反应,因而能将理化性质与 HBsAg 非常相近的 HuSP 除去。本法不需任何特殊条件,一般生化实验室均可办到。

二、我所过去生产 HBsAg 诊断血清(即抗-HBs 血清)是用对流电泳中 HBsAg 与抗-HBs 生成的复合物沉淀线作为抗原,免疫马匹后产生的抗-HBs 血清效价最高只有 1:128,而抗-HuSP 效价亦在 1:64—

1:128,用免疫电泳检查可以看出尚有十多种抗-HuSP,需用大量的健康人血清进行多次的吸收、多次离心,因此工艺复杂,成本很高,尤其健康人血清较为贵重、来源困难,因而影响生产。经吸收后的诊断血清,因含有可溶性的抗原抗体复合物,在使用上也有限制,只能用作琼脂扩散或对流电泳等敏感度较低的方法。用本法生产的纯 HBsAg,免疫豚鼠及马匹,可以生产高效价的单特异性抗 HBs 血清,不需要健康人血清吸收,用于反向血凝、放射免疫等敏感度较高的方法等不必用亲和层析吸收^[9],直接用 DEAE 纤维素层析提取其 IgG 即可^[15],因此具有较大的使用价值和经济意义。

参 考 资 料

- [1] Dressman, G. R. et al.: *Infection and Imm.*, 5: 213, 1972.
- [2] Tayot, J. L. et al.: *Amer. J. Dis. Child.*, 123: 322, 1972.
- [3] Kim, C. Y. et al.: *J. Clin. Invest.*, 52: 1176, 1973.
- [4] Grabow, W. O. K. et al.: *J. Inf. Dis.*, 127: 183, 1973.
- [5] Howard, C. R. et al.: *J. Gen. Virol.*, 20: 253, 1973.
- [6] Madalinski, K. et al.: *J. Inf. Dis.*, 124: 517, 1971.
- [7] Peterson, E. A. et al.: *Methods in Enzymology*, Vol. 5: 6, 1962.
- [8] Cuatrecasas, P.: *J. Biol. Chem.*, 245: 3059, 1970.
- [9] 北京生物制品研究所生物化学室、诊断用品室: *微生物学通报*, 2 (2): 17, 1975.
- [10] Ling, C. M. et al.: *J. Imm.*, 109: 834, 1972.
- [11] 高桥和明: *日本临床*, No. 12, p. 16, 1974.
- [12] Burrell, C. J. et al.: *Nature, New Biol.*, 243: 260, 1973.
- [13] Dressman, G. R. et al.: *J. Virol.*, 10: 469, 1972.
- [14] Kim, C. Y. et al.: *J. Inf. Dis.*, 123: 470, 1971.
- [15] 谢彦博等: *微生物学报*, 17 (4): 338, 1977.

A COMPOSITE METHOD FOR THE PREPARATION OF PURE HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN (HBsAg)

Xie Yan-bo, Wang Ji-zhang, Li Yan, Shu Jun

(Beijing Institute of Biologicals, Beijing)

Taking account of the fact that the physico-chemical properties of HBsAg were similar to those of some normal human serum proteins (HUSP) and that HBsAg always complexed with some proteins in the serum, the authors believed that it might be quite difficult to purify HBsAg by one single procedure. Therefore, a composite method based on different principles of purification has been developed.

HBsAg positive human sera or placental sera with a counter-current electrophoretic (CCEP) titer equal to or greater than 1:16 were first digested by pepsin at pH 2.0—2.3 for 5 hours at 37°C. HBsAg was freed from complexed components and most of the serum proteins were split into fragments. The digested sera were fractionated into several peaks by DEAE-cellulose ion-exchange chromatography, using gradient elution with 0.003M P. B. pH 8.0 as the starting buffer and 0.1M P. B.—0.5M NaCl pH 4.0 as the upper limiting buffer. The HBsAg was eluted in the peaks at the conductivity about 9—14 mΩ/cm. The partially purified HBsAg were then passed through an affinity chromatographic column, prepared by crosslinking horse

anti-HuSP antibodies to CNBr-activated 4% agar gel beads to absorb the remaining HuSP. The HBsAg containing breakthrough-peak fraction was subsequently passed through a Sephadex G-200 gel filtration column. HBsAg was found in the void volume fraction and was concentrated to 0.3—0.4 mg/ml resulting in a CCEP titer of 1:16. The recovery rate estimated by the CCEP titer was about 13—15%.

CCEP, agar immunodiffusion and immuno-electrophoresis were used to verify the purity of the HBsAg and HuSP was undetectable. 5 guinea pigs were immunized with the purified HBsAg and mono-specific anti-HBs sera with high CCEP titer were obtained. Now, horses are routinely immunized in a production scale in our Institute by 3—5 inoculations of this HBsAg given at 3—4 week-interval. The monospecific anti-HBs sera are obtained and their CCEP titer are recorded up to 1:256—1:512.

This composite method requires no expensive ultracentrifugation equipments, can be accomplished in an ordinary biochemical laboratory and gives reproducible results.