

一种新型的琼脂糖疏水层析介质开发及其在重组乙肝表面抗原(CHO-HBsAg)分离纯化中的应用

Development of a New Hydrophobic Interaction Chromatography Absorbent and its Application to the Purification of Recombinant Hepatitis B Surface Antigen

王阳木^{1,2}, 闭静秀², 赵 岚², 周卫斌², 李 岩², 黄永东², 张 焱², 林 海¹, 苏志国^{2*}

WANG Yang-Mu^{1,2}, BI Jing-Xiu², ZHAO Lan², ZHOU Wei-Bin², LI Yan², HUANG Yong-Dong², ZHANG Yan², LIN Hai¹ and SU Zhi-Guo^{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

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

摘 要 以粒径均一的国产高交联度快速流琼脂糖为基质, 采用活化、交联等步骤合成了针对分离纯化 CHO-HBsAg 的 3C 间臂的丁基琼脂糖疏水介质, 通过控制丁基配基密度提高分离 HBsAg 的纯化倍数和回收率, 获得了纯化倍数约 20、HBsAg 回收率约 80% 的介质。评估了合成介质的理化性质, 流速为 500cm/h 时柱压力小于 0.06MPa, 表明介质具有较高的机械强度和良好的流动性能, 介质经过酸、碱、变性剂等处理后化学性质稳定。将介质合成工艺进一步放大到 2L 介质/批, 应用到 HBsAg 分离纯化的三步层析整和工艺中, 结果表明, 批量合成的疏水介质, HBsAg 回收率与进口介质相当, HBsAg 终产品纯度在 95% 以上, 符合国家药典要求。最后考察了介质合成批次间的配基密度的可控性和单批次合成介质的重复使用性, 结果表明, 合成工艺和介质的重复性能满足产业化要求, 这种成本低的介质有望替代目前工业生产广泛使用的进口疏水介质。

关键词 疏水作用层析, 层析介质, 重组乙肝病毒表面抗原, 纯化

中图分类号 Q939.91 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)02-0278-07

Abstract A new hydrophobic absorbent based on homemade highly cross-linked agarose beads was synthesized by immobilizing butyl derivative onto the matrix linkage. The density of ligand was controlled by adjusting the concentration of butanethiol and the synthesis route was optimized by evaluating the purification efficiency of recombinant Hepatitis B surface antigen (HBsAg) expressed by Chinese hamster ovary (CHO) cell line. A high performance absorbent was finally screened out with up to 80% of HBsAg recovery and purification-fold (PF) about 20. Furthermore, the column pressure was about 0.06 MPa under the flow rate of 500cm/h, and no leaked butyl were detected after exposing the gel in common buffers, chaotropic agents, high concentrations of denaturing agents such as guanidine hydrochloride, urea and polar organic solvents. These results demonstrated that the absorbent have high physico-chemical stability, so it was available for the downstream process. Finally, after scaled up to 2L wet

Received: September 22, 2005; Accepted: December 19, 2005.

This work was supported by a grant from The Hi-Tech Research and Development Program of China (No. 2002AA217031).

* Corresponding author. Tel: 86-10-62561817; E-mail: zgsu@home.ipe.ac.cn

国家 863 高技术研究与项目资助(No. 2002AA217031)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

gel/batch, the absorbent was applied to the integration of three-step chromatography and obtained the purified CHO-HBsAg with 95% purity by SDS-PAGE and HPLC, which meet the requirements of SFDA. The purification efficiency and the reproducible ability of the absorbents were also evaluated from batch-to-batch. The results demonstrated that the absorbent met the requirement of scalable, reproducible, economic effect as well. This absorbent is a promising alternative exported HIC gel for widely being used in Chinese pharmaceutical industries.

Key words hydrophobic interaction chromatography, absorbent, recombinant hepatitis B surface antigen, purification

我国乙型肝炎病毒的感染者占全国总人口的10%,参照世界卫生组织(WHO)扩大免疫接种计划,作为乙肝疫苗的乙肝病毒表面抗原(Hepatitis B Surface Antigen, HBsAg)是我国需求量最大的重组蛋白,因而提高其产量具有重要经济学和社会学意义。目前重组HBsAg的表达系统主要有酵母细胞和中国仓鼠卵巢细胞(CHO)。中国仓鼠卵巢细胞表达的乙肝表面抗原具有糖基化的多聚亚基蛋白,免疫原性强,其分离纯化工艺主要由疏水作用层析(Hydrophobic Interaction Chromatography, HIC)、离子交换层析(Ion-Exchange Chromatography, IEC)、凝胶过滤层析(Gel filtration Chromatography, GF)等过程整合而成^[1-3]。

HIC虽用作初步纯化步骤,但可除去95%以上的杂蛋白、99%以上的糖类、脂类,99%以上的DNA以及大量色素等杂质,成为整个纯化工艺中单步纯化效率最高的步骤。目前用于CHO-HBsAg生产的疏水层析介质Butyl-S-Sepharose FF均为GE Healthcare公司产品,纯化效果好^[2],但价格极其昂贵,同时由于合成工艺对介质配基密度的控制不稳定,导致不同批次介质的纯化效果有较大差别。所以,合成价低质优的HIC介质用于替代进口产品可以大幅度降低生产成本,解决对进口介质的长期依赖问题。王妍等人^[6]曾开发合成了间臂为3C的国产疏水介质(不同于间臂为10C的进口疏水介质^[4,5]),应用效果良好,但该种介质选用进口高交联度快速流琼脂糖为基质,成本较高,相关文献中也并未提及具体的合成与控制配基密度的方法,制备量仅限于实验室规模,且未对介质的性质进行系统考察。

本文在纯化CHO-HBsAg的过程中,研制开发了以国产高交联度快速流琼脂糖为基质、丁基为疏水配基、3C间臂的适合于CHO-HBsAg分离纯化的HIC介质。该介质的理化性能稳定,合成工艺易放大,适合用于HBsAg的工业生产,有望替代目前工业生产广泛使用的进口疏水介质。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞培养上清收集: 2×10^5 cells/mL 重组CHO细胞在转瓶中贴壁培养,培养基为DMEM(Invitrogen)中添加5%(V/V)的胎牛血清(Fetal Calf Serum),当细胞长满瓶壁后开始收集细胞培养上清(cell culture supernatant, CCS),每隔2d收集,同时在转瓶中加入同体积的培养基继续培养。待HBsAg表达量不低于25(RPHA法活性)后,收集细胞培养液8000r/min下离心除去细胞和部分杂质,收集细胞培养上清液(Cell Culture Supernatant, CCS),加入硫柳汞至其终浓度为0.05%(V/V),4℃下保存备用。

1.1.2 疏水层析介质: 国产Butyl-S QZT(间臂为3C),由中国科学院过程工程研究所生化工程技术中心合成;进口Butyl-S-Sepharose(间臂为10C)购自GE Healthcare公司(美国)。

1.1.3 试剂: 牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)购自Roche公司(德国);作为标准品的纯度大于98%的CHO-HBsAg由华北制药集团提供;HBsAg活性测定的立可读试剂盒由上海科华实业提供。所用化学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, USA)。

1.1.4 缓冲液: 缓冲液A:20mmol/L PB缓冲液加入8%(NH₄)₂SO₄(W/V), pH7.0。缓冲液B:20mmol/L PB缓冲液, pH7.0。缓冲液C:30%异丙醇-水溶液。

1.1.5 仪器: 蠕动泵:PERI STAL TIC PUMP P-1, Pharmacia, 瑞典;超滤泵:WATSON-MARLOW 501U(英国);紫外检测仪:Single Path Monitor UV-1, Pharmacia, 瑞典;记录仪:Cole-Parmer, 美国;ÄKTA Explorer 100和Bio-Pilot层析系统购自GE Healthcare(美国);超滤膜:UFP-500-E-3MA 500000NMWC, Serial # 99624070836, Batch # 3-876, 膜表面积110cm² 购自GE Healthcare公司(美国);Bio-Rad酶标仪550和电泳仪Mini-PROTEIN[®] II 购自Bio-Rad

公司(美国);96孔酶标板由 Corstar 公司提供;层析柱均购自上海锦华层析设备厂;COIC XSZ-H3 显微镜;WV-CP230/G 显微镜成像装置,购自日本 Panasonic 公司。

1.2 方法

1.2.1 Butyl-S QZT 介质的合成:按照 Maisson 的合成路线^[7],以交联后的琼脂糖白球为基质,经活化、交联、收获三个步骤,合成 3C 间臂的丁基琼脂糖疏水介质 Butyl-S QZT。

1.2.2 HIC 层析介质理化性质评价:

(1)HIC 层析介质形貌及粒径:形貌使用显微镜成像分析,方法为将显微镜连接成像分析仪,取少量湿胶置于载玻片上,调整显微镜放大倍数至 160,取像。使用粒度分布仪测量粒径分布。

(2)化学和物理稳定性:4℃下将介质置于 NaOH (1mol/L)、HCl(1mol/L)、乙醇(20%)、异丙醇(30%)、磷酸盐缓冲液 1(7.5% A.S pH7.0)、磷酸盐缓冲液 2 (pH7.0)、盐酸胍(6mol/L)、尿素(8mol/L)的溶液中,室温浸泡 50d 后测定疏水配基密度变化来评估介质的化学稳定性。

另外,通过测定介质的压力-流速曲线考察其物理稳定性,方法为将介质装柱(124mm × 10mm I.D.),改变柱压(0~0.06MPa),记录流动相(纯水)的流速。

(3)疏水介质配基密度测定:采用电感耦合等离子体光谱法(ICP法)测定介质配基密度^[7]。

1.2.3 合成介质的动态层析方法评估:用 0.5mol/L NaOH 将合成的介质清洗 5 个柱床体积 (bed volume, BV)后装柱(50mm × 16mm I.D., BV = 10 mL)连接到 ÄKTA Explorer 100 层析系统,用 10 个柱床体积的缓冲液 A 平衡层析柱。60mL 的 CCS 中加入 (NH₄)₂SO₄ 粉末至终浓度为 8%(W/V),用 1mol/L NaOH 溶液调 pH 至 7.0,0.45μm 微滤膜过滤后进料。用 Buffer A 洗脱杂质至基线,收集流穿峰 Fraction A;用 Buffer B 洗脱至基线,收集洗脱的目的蛋白峰 Fraction B,最后用 Buffer C 洗脱与介质结合最强的杂蛋白洗脱峰 Fraction C,流速均为 2.0 mL/min。紫外检测波长 280nm。

1.2.4 HBsAg 的纯化工艺:

(1)疏水层析:利用动态层析方法筛选最佳分离效果的疏水介质,装柱(50mm × 75mm I.D., BV = 150mL),连接到 Bio-Pilot 层析系统,进料量为 CCS 1000mL,层析方法如方法 1.2.3 所述,最后用 Buffer C 和纯水对柱子再生,流速保持为 12mL/min。紫外检测波长 280nm。收集的 Fraction B 经过超滤膜脱

盐后进行离子交换层析。

(2)超滤:将膜设备连接至 WATSON-MARLOW 501U 泵,取适量疏水层析 Fraction B 进料,操作流速为 100cm/s,压力为 68.9kPa。

(3)离子交换层析:将 DEAE-Sepharose FF 离子交换介质层析柱(50mm × 50mm I.D., BV = 100mL)连接到 Bio-Pilot 层析系统,用 20mmol/L PB (pH7.0)平衡 10BV,取适量疏水样品上柱,收集穿透峰,用 20mmol/L PB + 0.12mol/L NaCl (pH7.0)洗脱,收集对应的洗脱峰,用 20mmol/L PB + 1.0 mol/L NaCl (pH7.0)和去离子水先后洗柱再生,流速 12mL/min。紫外检测波长 280nm。洗脱峰经过超滤膜浓缩至蛋白浓度为 0.02mg/mL 后进行凝胶过滤。

(4)凝胶过滤层析:将 Sepharose 4 FF 柱(800mm × 26mm I.D.)连接于 ÄKTA Explorer 100 系统,用 50mmol/L PB + 0.15mol/L NaCl 的缓冲液 (pH7.0)平衡层析柱 3BV,以相对于介质体积 2%~5%的进料量进料,用 50mmol/L PB + 0.15mol/L NaCl 的缓冲液 (pH7.0)连续洗脱,收集紫外吸收峰对应的洗脱峰,用 2BV 50mmol/L PB + 0.15mol/L NaCl 的缓冲液和 3BV 去离子水洗柱再生,流速 0.8mL/min。紫外检测波长 280nm。

1.2.5 HBsAg 活性检测:HBsAg 活性通过 HBsAg 立可检测试剂盒进行检测,按照试剂盒规定的操作步骤进行,根据纯品 HBsAg 的标准曲线求得待测样品中的 HBsAg 含量。

1.2.6 蛋白质浓度检测:总蛋白浓度参照改良 Bradford 法测定^[8],根据标准品 BSA 的标准曲线求得样品中的总蛋白质含量。

1.2.7 SDS-PAGE:按照 Laemmli^[9]方法进行还原型 SDS-PAGE,分离胶浓度为 13.5%,采用银染法显色。

1.2.8 评价指标:主要考察纯化前后 HBsAg 的活性回收率、总蛋白残留率和各步骤纯化倍数。其中,活性回收率为纯化后与纯化前 HBsAg 总活性之比;蛋白回收率为纯化后总蛋白占纯化前总蛋白量的百分比;此活性为样品总活性与总蛋白量之比;纯化倍数为纯化后样品的活性回收率与蛋白回收率之比。

2 结果

2.1 国产 Butyl-S QZT 疏水介质的合成

按照 Maisson 的合成路线^[7],合成 3C 间臂的丁基琼脂糖疏水介质 Butyl-S QZT,合成线路图如图 1 所示。

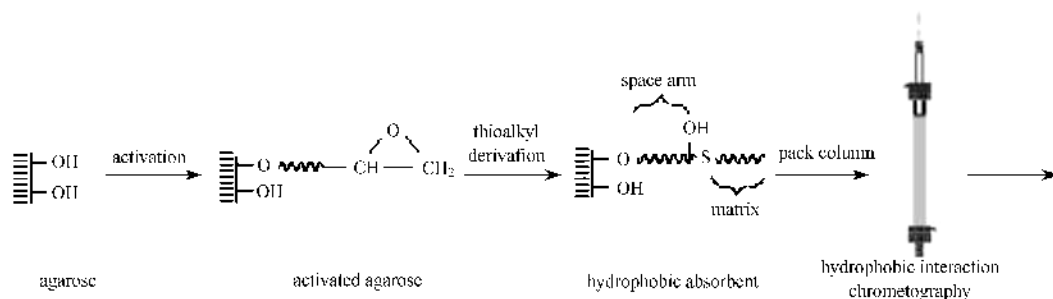


图1 疏水层析介质合成示意图

Fig. 1 Schematic illustration of synthesize method of Butyl-S QZT

2.2 国产 Butyl-S QZT 疏水介质配基密度的筛选

通过调整丁硫醇用量调节配基密度,用电感耦合等离子体光谱法(ICP-MS)测定。合成了间臂为3C的4种不同配基密度的疏水介质,分别记为1、2、3、4号。

将该4个层析介质分别装柱,按照1.2.3进行疏水层析纯化CHO细胞培养收集的上清液中的HBsAg,收集疏水层析过程的流穿峰(Fraction A)、Buffer B洗脱峰(Fraction B)和异丙醇洗脱峰组分(Fraction C),典型的层析图谱如图2所示。对所收集组分分别进行分析(表1)。

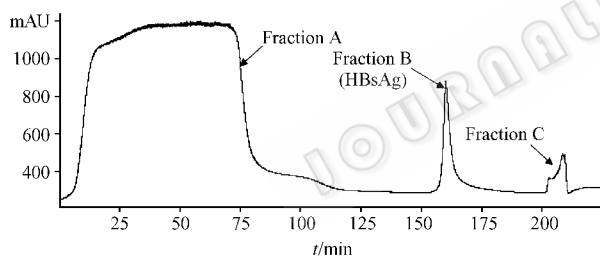


图2 国产疏水介质层析图谱

Fig. 2 Profile of HIC with Butyl-S QZT

表1 不同丁硫醇加入量对疏水层析介质分离效果的影响

Table 1 Comparison of different HIC gel on separation of CCS

Butane-thiol ($\mu\text{mol/g}$)	Fraction A		Fraction B		Fraction C		Purification (fold) ^a
	HBsAg 1%	Total Protein 1%	HBsAg 1%	Total Protein 1%	HBsAg 1%	Total Protein 1%	
20	102.6	105.2	3	0.3	0.26	0.2	10
35	28.3	89.6	58.4	2.7	1.4	0.34	22
40	6.3	88.6	80	4.4	3.4	0.5	18.2
45	6.5	90	70.6	4.3	2.7	0.4	16.5

Note: 60mL CCS was applied in HIC.

^a: purification(fold) was defined as the ratio of specific bioactivity of HBsAg after and before purification. The specific bioactivity of HBsAg is defined as the ratio of HBsAg basing on ELISA assay and total protein basing on Bradford assay.

实验结果表明,随着加入的丁硫醇量增加(20~45 $\mu\text{mol/g}$),连接在白球表面的配基密度增加,介质对HBsAg的吸附能力逐渐增加,表现为Fraction A中的HBsAg漏泄越来越少,Fraction B中的HBsAg收率则先升后降,Fraction C中的HBsAg越来越多,此外,当配基密度增大到一定程度后(加入的硫醇为45 $\mu\text{mol/g}$),吸附在介质表面的目的蛋白HBsAg难以被洗脱下来,三个峰中总活性收率小于100%。由结果可知,丁硫醇加入量为40 $\mu\text{mol/g}$ 湿胶时的分离效果最好,HBsAg回收率约80%,纯化倍数约20。

2.3 介质理化性能评价

Butyl-S QZT是以高度交联的琼脂糖微球为基质,通过硫原子与疏水配基即丁基相连得到的疏水介质。它具有亲水性好、强度高、多孔等特点,适用于多种生物大分子的分离纯化。

2.3.1 介质形貌及粒径:由显微镜照片可知(图3),介质呈规整球形。经粒径仪测定,介质粒径介于45~165 μm 之间,平均粒径为100 μm ,且分布较均匀。

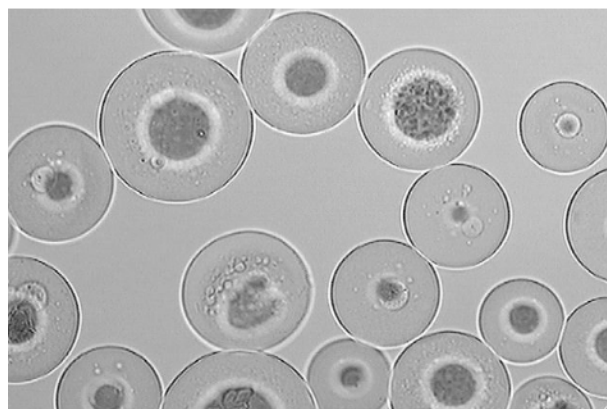


图3 Butyl-S QZT 的光学显微镜照片

Fig. 3 Microscope photo of Butyl-S QZT

2.3.2 介质的化学和物理稳定性:将Butyl-S QZT置于NaOH(1mol/L)、HCl(1mol/L)、乙醇(20%)、异丙

醇(30%)、磷酸盐缓冲液 1(7.5% A.S pH7.0)、磷酸盐缓冲液 2(pH7.0)、盐酸胍(6mol/L)、尿素(8mol/L)等溶液中室温浸泡 50d,比较其处理前后疏水配基密度变化,考察其化学稳定性,结果表明(表 2),该介质在室温时置于上述各种处理液中 50d,用 ICP 法

测定处理前后介质的疏水配基密度,结果表明没有明显减少,说明其具有很好的化学稳定性。通常介质的清洗和再生是在碱液中进行,Butyl-S QZT 在 1mol/L NaOH 溶液中的稳定性为其进行清洗和再生提供了保证。

表 2 Butyl-S QZT 的化学稳定性

Table 2 Chemic stability of Butyl-S QZT

Solution		1mol/L	1mol/L	20%	30%	PBS	PB	6mol/L	8mol/L
		NaOH	HCl	Ethanol	Isopropanol	(7.5%A.S pH7.0)	(pH7.0)	Guanidine-HCl	Urea
ligand density	$t = 0d$	10.45	10.45	10.45	10.45	10.45	10.45	10.45	10.45
$K (\mu\text{mol/g})$	$t = 50d$	10.22	10.18	10.24	9.82	10.36	10.31	10.32	10.07

快速流琼脂糖的层析单元操作中,工作流速一般为 50~150cm/h,但当清洗和再生介质时,为提高效率需要更高的流速(常为 300~700cm/h)。图 4 是 Butyl-S QZT 的柱压力-流速曲线(压力范围 0~0.06MPa),曲线表明,合成的介质在柱直径为 10mm、柱高 124mm 的情况下,流速达到 500cm/h 时,柱压小于 0.06MPa,表明介质具有较高的机械强度和良好的流动性能。

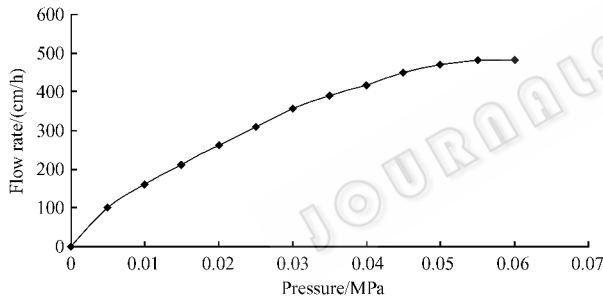


图 4 Butyl-S QZT 的压力-流速曲线

Fig. 4 Pressure-flow rate curve of Butyl-S QZT

2.4 放大批量合成介质的应用和对比

2.4.1 纯化工艺比较 在上述实验筛选出合适的可用于 CHO-HBsAg 分离纯化的 HIC 介质的基础上,控制配基密度,放大介质合成规模(2L/批),按照疏水层析(HIC)-离子交换层析(IEC)-超滤(UF)-凝胶过滤层析(GFC)的整合工艺实验流程纯化 CHO-HBsAg,国产介质 Butyl-S QZT 为实验组(工艺 A),以进口介质 Butyl-S-Sepharose 6 FF 作为对照组(工艺 B)。测定活性回收率和蛋白回收率,计算纯化倍数,结果表明,放大合成的 HIC 介质应用到 CHO-HBsAg 整合工艺中纯化 HBsAg,疏水层析的单步 HBsAg 回收率为 80%,工艺整合的最终 HBsAg 回收率达到 28%,纯化倍数为 2400,均与进口介质工艺相当,结果见表 3。

表 3 两种纯化工艺纯化 HBsAg 结果对比

Table 3 Comparison of HBsAg purification by two different process

Process	HBsAg/%	Total protein/%	Purification(fold)
A	28	0.0116	2400
B	26.5	0.0089	2978

2.4.2 纯度分析:

(1) SDS-PAGE 分析:采用 SDS-PAGE 分析 CCS、国产介质 HIC 后收集的活性峰和纯化的 HBsAg、进口介质 HIC 后收集的活性峰和纯化的 HBsAg、标品 HBsAg,结果见图 5。

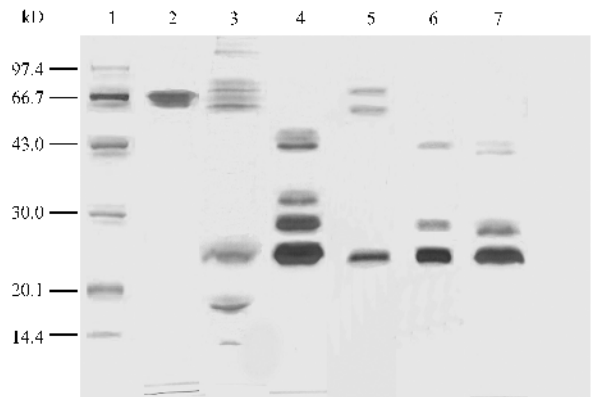


图 5 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis

1: marker; 2: CCS; 3: fraction B from HIC with Butyl-S QZT; 4: purified HBsAg by process A; 5: fraction B from HIC with Butyl-S Sepharose; 6: purified HBsAg by process B; 7: standard HBsAg.

据文献报道^[4],CCS 中主要杂蛋白是分子量为 67 kD 的 BSA,HBsAg 约占 CCS 中总蛋白的 1/1000,其单体分子量为 23kD。从电泳图中可以看出,CCS 中主要蛋白带集中在 67kD,因为 HBsAg 含量与 BSA 相比极少,电泳上观察不到,与文献报道一致。经过 HIC 纯化后,绝大部分 BSA 已被除去,剩余为一些大

分子物质(如核酸、IgG 聚集体等)和小分子(如色素等)。

根据文献报道^[1],CHO 细胞表达的 rHBsAg 纯品经过 SDS 和 β -巯基乙醇处理后,裂解成 HBsAg 特异多肽,三条主带分子量为 23 kD、27 kD 和 30 kD,分别对应于 p23(S 蛋白单体),gp27 和 gp30 蛋白(糖蛋白),其余条带分别为前三者的二聚体。虽然

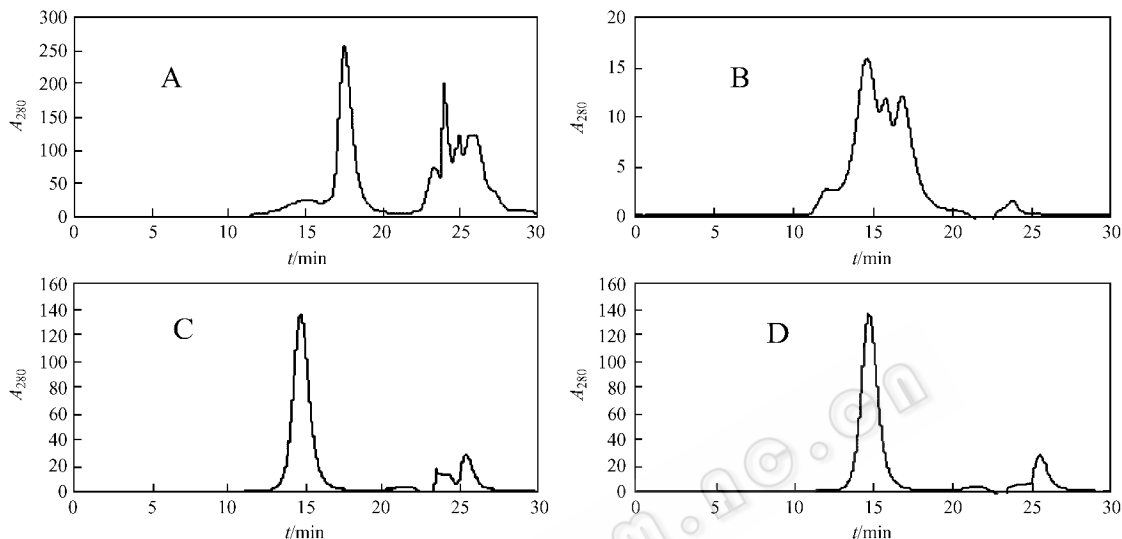


图 6 HPLC-SEC 分析

Fig. 6 HPLC-SEC assay profile

A :CCS ;B :HIC ;C :purified HBsAg ;D :standard HBsAg.

从图中可以看出,纯品 HBsAg 和 BSA 单体的保留时间分别为 14.8min 和 17.6min。CCS 中除少量大分子物质外,主要蛋白是 BSA 单体和一些小分子物质。经过 HIC 纯化后,大部分 BSA 单体和小分子物质被除去。GFC 纯化后得到的终产品谱图与纯品 HBsAg 基本相同,与电泳分析结果一致。纯度分析达 95% 以上,符合中国药典要求^[10]。

2.5 介质分离稳定性与合成工艺重复性评价

介质分离性能的稳定和合成工艺的重复性,对于介质应用于工业生产是至关重要的。单批次介质良好的重复使用性直接影响生产成本的高低,而相同工艺不同批次间介质性能的良好重复性给工业生产条件的稳定和终产品的质量提供了必要的保证。所以,本文对国产介质的重复使用性能与合成工艺的重复性进行了考察,结果表明(图 7、图 8),国产疏水介质 Butyl-S QZT 具有良好的合成工艺重复性和稳定的重复使用性。

2.5.1 合成工艺重复性评价 按照 2.2 中的方法对相同条件下,合成出三批次的介质并进行疏水层析分离 HBsAg,分别测定 HBsAg 活性回收率和蛋白回

与进口 HIC 介质相比,国产介质纯化的样品杂质较多,在二者活性回收率相当的情况下,后者的分离性能与前者还存在一定差距,但是经过整体工艺纯化后的样品与纯品 HBsAg 相比,条带一致,并无其他杂蛋白,达到纯度要求。

(2)HPLC-SEC 分析:采用 HPLC-SEC 分析 CCS、HIC、纯化后的终产品、标品 HBsAg,结果见图 6。

收率,计算纯化倍数。结果表明(图 7)3 次纯化操作,活性回收率在 80% 左右,纯化倍数约为 20,均无明显变化,合成工艺批次间重现性好。

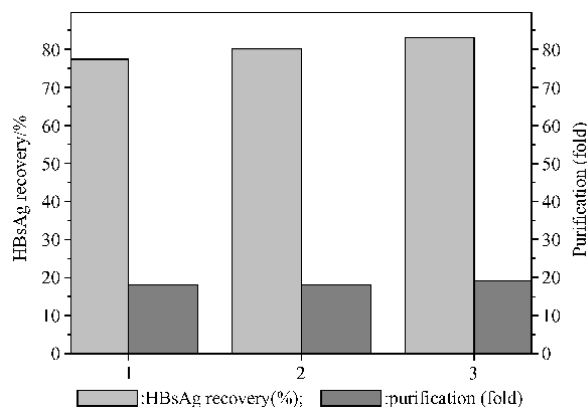


图 7 合成工艺重复性考察

Fig. 7 Evaluation of HIC purification efficiency from batch to batch by the same synthesis route

2.5.2 单批次合成介质的重复使用性能评价 按照 2.2 中的方法对合成出的同一批介质进行疏水层析分离 HBsAg,重复 3 次,分别测定 HBsAg 活性回收率

和蛋白回收率,计算纯化倍数。结果表明(图8),3次纯化操作,活性回收率在80%左右,纯化倍数约为20,单批次介质分离性能稳定。

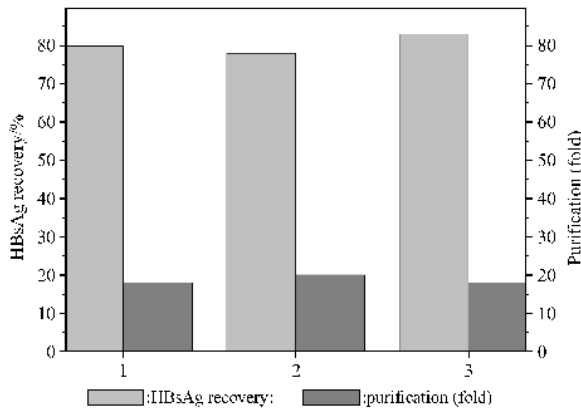


图8 国产介质重复使用性能评价

Fig. 8 Evaluation of reproducibility of HIC absorbent by the same synthesized batch

3 讨论

与用于分离一般重组蛋白质的疏水介质不同,由于 HBsAg 的疏水性较大,采用疏水性较弱的疏水介质有利于将 rHBsAg 与其他杂质分离开^[4]。而且 rHBsAg 是由 100 个聚体以上组成的多聚亚基蛋白,其分子量达 2000kD 以上^[4],亚基之间主要靠非共价键相互作用,在分离纯化过程中,pH、温度、液体剪切力、缓冲盐种类和浓度的变化,都会导致生物学活性丧失,尤其是 rHBsAg 在介质表面存在多步骤吸附-解吸过程,如果使用疏水性较大的介质分离 rHBsAg,在介质表面很容易造成对 rHBsAg 颗粒的多位点吸附,这样在洗脱过程中,容易破坏 rHBsAg 颗粒间二硫键,导致亚基解聚和目的蛋白抗原失活。因此,选择合适的层析介质,避免亚基解聚,对于得到较高 HBsAg 纯化倍数和活性回收率具有决定性作用。所以对于 rHBsAg 而言,介质的疏水性强弱对最终分离效果起着关键性作用。当层析介质具有低疏水性时,疫苗无法结合到层析介质上,随介质表面疏水性增大,疫苗被吸附于介质上,但当介质疏水性增加到一定程度后,介质与疫苗之间结合过强,难以甚至无法洗脱下来,导致部分甚至全部疫苗失去生物活性。

影响 HIC 介质疏水性大小的因素主要有配基种类、配基密度和间臂长度。本文采用 Maisson 的合成路线^[8],以国产高交联度快速流琼脂糖为基质,稳

定合成出了间臂为 3C 的丁基琼脂糖疏水介质,通过改变丁硫醇加入量控制配基密度、优化介质的合成与层析操作条件,最终筛选出一种适合于 rHBsAg 分离纯化的介质,应用国产疏水介质对 CCS 进行粗分离,活性回收率与进口介质相当,约为 80% 左右。经过后续工艺纯化后的终产品纯度在 95% 以上,符合国家药典要求,且单批次介质重复使用性与不同批次间的重现性较好,而价格仅约为进口介质的 1/4。

目前国内已有同类介质合成的研究^[6],但是未见其对介质物理性能、化学稳定与合成是否能放大进行考察。本文在自制疏水介质合成与应用的基础上,进一步对介质的理化性能、合成工艺的放大性与重复使用性进行了系统的考察,证明自制介质理化性能稳定,合成工艺可稳定放大至 2L 介质/批,重复使用性与不同批次间的重现性较好,价格低廉,可满足 HBsAg 工业生产所需较高纯度和较低成本的要求。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Mei YF (梅雅芳), Ren GF (任贵方), Zhu JM (朱既明). Purification of HBsAg secreted by transgenic mammalian cell line. *Chinese Journal Virology* (病毒学报), 1990, (4) 305 - 310
- [2] Li H (李彬), Ye SD (叶世德), Wang Y (王妍). Pilot study on purification process of recombinant HBsAg by column chromatography. *Chinese Journal of Biologicals* (中国生物制品学杂志), 1995, (2) 56 - 59
- [3] Wang Y (王妍), Ye SD (叶世德), Liu DW (刘大维). Study on purification of recombinant HBsAg by hydrophobic interaction chromatography with homemade Bully-S-Sepharose. *Chinese Journal of Biologicals* (中国生物制品学杂志), 1998, (1) 22 - 24
- [4] Belew M, Mei Yafang, Li Bin et al. Purification of recombinant hepatitis B surface antigen produced by transformed Chinese hamster ovary (CHO) cell line grown in culture. *Bioseparation*, 1991, 1 397
- [5] Porath J, Olin B. Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions. *Biochemistry*, 1983, 22 1621
- [6] Wang Y (王妍), Wang Q (王群), Luo X (罗璇). Optimum conditions for purification of HBsAg by hydrophobic interaction chromatography. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 1999, (2) 263
- [7] Maisano F, Belew M, Porath J. Synthesis of new hydrophobic adsorbents based on homologous series of uncharged alkyl sulphide agarose derivatives. *Journal of Chromatography*, 1985, 312 305 - 317
- [8] Lu Y (路阳), Wang XS (王贤舜). Determination of protein by coomassie brilliant blue G250 method. *Journal of Biology* (生物学杂志), 1992, (1) 24 - 25
- [9] Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227 (259) 680 - 685
- [10] National Pharmacopoeia Committee (国家药典委员会). *Chinese Pharmacopoeia* (中华人民共和国药典). Beijing: Chemical Industry Press, 2005. Volume 1, 100-101