

# 基因工程乙肝病毒表面抗原纯化工艺研究

王妍 王群 罗璇 官桂范 魏自力 阎昆明

(卫生部长春生物制品研究所 长春 130062)

**关键词** 基因工程 HBsAg, 纯化工艺, 小牛血清, DNA

**分类号** Q789 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)02-0263-66

基因工程乙肝病毒表面抗原(r-HBsAg)是由重组哺乳动物细胞 CHO 系分泌表达的,经过纯化制备基因工程乙肝疫苗。目前在国际上,对从 CHO 细胞培养液中分泌的 r-HBsAg,纯化工艺主要采用多步柱层析和超滤技术,而在国内,CHO 系 r-HBsAg 的大规模生产尚属首次,因此,建立高纯度、高收率、周期短、稳定性好的纯化工艺是十分关键的。针对 r-HBsAg 的特点,我们采用了多种纯化技术,包括盐析技术,超离心技术,柱层析技术,超滤技术等。在对应用的 2 种纯化工艺进行研究<sup>[1]</sup>的基础上又建立了一条新工艺。在对比研究中将纯化工艺中各纯化技术去除杂蛋白和 DNA 的水平及各步骤纯化收率进行了分析比较,以说明各纯化技术和纯化工艺特点,实现根据所纯化的目标蛋白的特性来建立和优选纯化工艺的目的。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 CHO-C28 细胞:由乙肝病毒 S 蛋白基因转化的 CHO 工程细胞株,并筛选 r-HBsAg 高表达的细胞系,由中国预防医科院病毒学研究所组建<sup>[2]</sup>。

1.1.2 CHO 细胞培养液:采用含 5% 小牛血清的 DMEM 培养基,用生物反应器培养 CHO 细胞,以连续离心方法去除细胞残骸后取上清液<sup>[3]</sup>。

1.1.3 试剂和介质:Butyl S Sepharose 6 Fast Flow, Sephadex G-25, DEAE Sepharose Fast Flow, Sepharose 4 Fast Flow 均为瑞典 Pharmacia-LKB 公司产品,100kD 微孔超滤膜为 Millipore 公司产品,r-HBsAg 反相血凝(RPHA)试剂盒由卫生部长春生物制品研究所制备。其它化学药品均为国产分析纯产品。

### 1.2 方法

1.2.1 盐析技术和超离心技术参照文献[4]进行。柱层析采用疏水作用柱层析技术(HIC),阴离子交换柱层析技术(IEC),凝胶过滤柱层析技术(GFC),详见参考文献[5]。

1.2.2 小牛血清残余量:反相血凝法检测<sup>[6]</sup>小于 50 ng/dose(WHO criterion)。残余细胞 DNA:地高辛方法检测<sup>[7]</sup>小于 100 pg/dose(WHO criterion)。r-HBsAg 免疫效价:以 Al(OH)<sub>3</sub> 作免疫佐剂,免疫雌性 Balb/c 小鼠,采用放免法测定血清抗体(抗-HBs),计算 ED<sub>50</sub>和疫苗的相对效力(放免试剂盒为国家检定部门规定药盒)。

## 2 实验结果

### 2.1 3 种纯化工艺流程的建立

在对 r-HBsAg 小试纯化工艺流程的研究中,我室曾和中国预防医科院病毒所,瑞典 Pharmacia 公司

合作,研究设计了2种小试纯化工艺。且逐步改进,设计建立了第Ⅲ条纯化工艺。上述3种纯化工艺流程如下:

I:连续离心去除细胞残骸→ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析→KBr萃取→1次KBr密度梯度离心→2次KBr密度梯度离心→超滤→凝胶过滤柱层析

II:连续离心去除细胞残骸→疏水作用柱层析→(脱盐)阴离子交换柱层析→超滤→凝胶过滤柱层析<sup>[8]</sup>

III:连续离心去除细胞残骸→疏水作用柱层析→(脱盐)KBr密度梯度离心→超滤→凝胶过滤柱层析

## 2.2 3种纯化工艺纯化 HBsAg 结果

采用3种纯化工艺纯化同一批CHO细胞培养液,其HBsAg滴度为1:128,每种纯化工艺纯化50L细胞培养液。比较3种工艺各个纯化步骤的收率和终收率,3次实验平均结果见表1。

表1 应用3种纯化工艺纯化 HBsAg 结果

工艺及周期	纯化步骤	体积/mL	HBsAg/mg	HBsAg收率/%	步骤损失/%
I 6d	细胞培养原液	50000	60.0	100	
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析	1000	55.2	92	8
	1次KBr超离	230	48.0	80	12
	2次KBr超离	210	43.8	73	7
	GFC	280	37.26	62.1	11
II 4d	细胞培养原液	50000	60.0	100	
	HIC	10000	48.72	81.2	19
	IEC	18000	30.0	50	31
	GFC	200	21.90	36.5	13.5
III 4d	细胞培养原液	50000	60.0	100	
	HIC	10000	48.0	80	20
	KBr超离心	260	38.4	64	16
	GFC	220	28.68	47.8	16.2

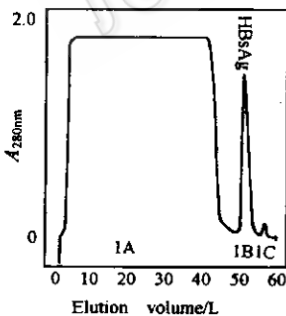


图1 疏水作用柱层析图谱

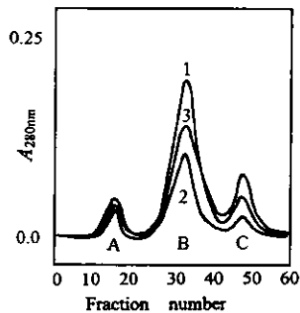


图2 凝胶过滤柱层析图谱

1. Process I; 2. Process II; 3. Process III

工艺III的HIC图谱见图1,3种工艺的GFC图谱见图2。

从表1可见:工艺I HBsAg终收率最高,为62.1%,而工艺III次之,为47.8%,工艺II的收率最低,为36.5%。从纯化周期看,工艺I纯化周期最长且劳动强度大,需6d。工艺II自动化程度高,只需4d。工艺III结合了工艺I和工艺II的纯化步骤,其纯化周期只需4d,但比工艺II提高了HBsAg的终收率。

从3个纯化工艺的各纯化步骤HBsAg损失看,IEC一步损失最大,为31%,其次是HIC为20%左

右,其它各步损失差别不大,均在10%左右。较为明显的是工艺Ⅲ中GFC一步损失显著高于工艺Ⅰ和工艺Ⅱ中的GFC一步,为16%(表1)。从图2可以看出,3个工艺的GFC图上均呈现A、B、C 3个蛋白峰。3个工艺在GFC A峰(大分子蛋白峰,在外水体积出现)上差别不大,在GFC B峰(HBsAg特异蛋白峰)和GFC C峰(小分子蛋白峰包括小牛血清)上差别较大。

### 2.3 纯品 HBsAg 各项指标分析

以上3个工艺纯化出的HBsAg抗原,各项指标的检定结果均合格。其特异蛋白经SDS-PAGE电泳检定均呈现23 kD, 27kD, 30kD, 45kD(电泳图谱见图3)。工艺Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ纯化出的HBsAg纯度经PAGE电泳和HPLC检定分析,分别为95%, 99%, 97%。3个工艺纯化出的HBsAg抗原进行稀释后10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 作动物效力实验,其相对效力均大于1,符合WHO的标准。

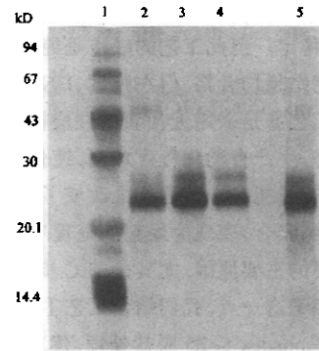


图3 r-HBsAg的SDS-PAGE电泳图谱  
1. Marker; 2. r-HBsAg sample; 3. The final product of r-HBsAg from process I; 4. Process III; 5. Process II

表2 各纯化步骤杂蛋白、小牛血清、DNA分析结果

工艺	纯化步骤	总蛋白/mg	HBsAg /mg	纯化倍数	小牛血清 /( $\text{ng}/10\mu\text{g}$ )	DNA /( $\text{pg}/10\mu\text{g}$ )
I	细胞培养原液	77794	60.0	1	$\gg 100$	$> 3200$
	( $\text{NH}_4$ ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 盐析	7088	55.2	10	$> 100$	$> 1600$
	1次KBr超离	282	48.0	221	$> 100$	$> 800$
	2次KBr超离	194	43.8	293	$= 80$	$= 200$
	GFC	40	37.26	1208	$= 10$	$= 50$
II	细胞培养原液	77794	60.0	1	$\gg 100$	$> 3200$
	HIC	1750	48.72	36	$> 50$	$= 100$
	IEC	40	30.0	972	$> 50$	$= 25$
	GFC	23	21.9	1235	$= 6.5$	$= 6.25$
III	GFC	—	—	—	$= 13$	$= 12.5$

对工艺Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ各纯化步骤去除杂蛋白及小牛血清、DNA的水平进行了分析比较(表2)。结果表明,3个工艺纯化出的HBsAg终产品中的残余小牛血清均合格( $< 50\text{ng}/10\mu\text{g}$ 蛋白)。其中,工艺Ⅱ去除小牛血清最彻底,纯品HBsAg中仅含小牛血清 $6.5\text{ng}/10\mu\text{g}$ 蛋白,而工艺Ⅰ和工艺Ⅲ相近,分别为 $10\text{ng}/10\mu\text{g}$ 蛋白和 $13\text{ng}/10\mu\text{g}$ 蛋白。由于CHO细胞培养液中杂蛋白的主要成分是小牛血清,因此采用纯化工艺去除小牛血清的水平体现了去除和分离杂蛋白的能力。

残存DNA在HBsAg中的含量均合格( $< 100\text{pg}/10\mu\text{g}$ 蛋白)。工艺Ⅱ,工艺Ⅲ,工艺Ⅰ纯化出的HBsAg中DNA残余量分别为 $6.25\text{pg}/10\mu\text{g}$ 蛋白, $12.5\text{pg}/10\mu\text{g}$ 蛋白, $50\text{pg}/10\mu\text{g}$ 蛋白,即工艺Ⅱ $<$ 工艺Ⅲ $<$ 工艺Ⅰ。

同时,对3个工艺纯化出的HBsAg物理性状进行分析,工艺Ⅰ纯化的HBsAg状态最好。可超滤反复处理而不发生蛋白变性、聚合。工艺Ⅱ、工艺Ⅲ均呈现出一定缺陷,尤其是工艺Ⅱ,经其纯化出的HBsAg不稳定,不耐超滤处理,经超滤洗涤后易发生蛋白聚合,变性,溶液中出现絮状沉淀。

### 3 讨论

3种纯化工艺的不同点在于:工艺Ⅰ采用的主要是传统纯化技术,各个纯化步骤主要依据蛋白质分

子量、密度和表面电荷的不同来分离的,在纯化过程中蛋白受到的影响较小,所以 HBsAg 收率高,性状好,较稳定。但此工艺的缺点是纯化周期长,自动化程度低,耗费人力物力较多。同时尽管 HBsAg 终产品检定结果均合格,但在纯度、DNA 残留量等重要指标上,仍低于工艺Ⅱ,工艺Ⅲ得到的 HBsAg 终产品。

工艺Ⅱ是采用近代新型柱层析技术,以 HIC, IEC, GFC 三大柱层析技术为核心,纯化出的 HBsAg 纯度最好,生产自动化程度较高,纯化周期短。但是,由于 HIC 技术和 IEC 技术均对蛋白质的结构、状态有影响,可能在一定程度上改变了蛋白质的空间四级结构,使纯化的蛋白质性状不稳定,易于出现蛋白质变性、聚合,表现为经超滤处理后,溶液中出现少量可见絮状蛋白沉淀。这是工艺Ⅱ HBsAg 纯化终收率不高的主要原因,尤其是 IEC 步骤损失最大。

基于这一点,我们结合工艺Ⅰ和工艺Ⅱ,研究以 KBr 密度梯度超离心替代 IEC,与之相应的以超滤取代 Sephadex G-25 脱盐处理,建立了一条新的纯化工艺流程即工艺Ⅲ。这条纯化工艺结合了传统纯化技术和新型纯化技术的优势,取得了较理想的结果。其 HBsAg 终收率较工艺Ⅱ相比有了提高,而纯度则较工艺Ⅰ有了提高,达到了高纯度,高收率,自动化程度高,周期短的目的,得到的 HBsAg 纯品在理化性状上也较工艺Ⅱ有了很大程度的提高。

### 参 考 文 献

- [1] 李彬,叶世德,王妍等.中国生物制品学杂志,1995,8(1):56~59.
- [2] 任贵方,张一鸣,阮薇琴等.病毒学报,1987,3(4):313~320.
- [3] 李志强,官桂范,王妍等.生物工程学报,1993,9(2):163~165.
- [4] 黄楨祥.医学病毒学基础及实验技术,北京:科学出版社,1990.
- [5] Jan Christer, Janson, Lars Ryden. Protein Purification, New York, VCH Publishers, 1989.
- [6] 刘玉斌,魏继同.医用生物制品手册,长春:吉林科技出版社,1994.
- [7] BOEHRINGER MANNHEIM BIOCHEMICAL, Nonradioactive In Situ Hybridization Application Manual, 1992.
- [8] Makonnen Belew, Mei Yafang, Li Bin *et al.* *Bioseparation*, 1991, 1:397~408.

## Study on Purification Process of Recombinant HBsAg

Wang Yan Wang Qun Luo Xuan Guan Guifan Wei Zili Yan Kunming  
(Changchun Institute of Biological Products, Changchun 130062)

**Abstract** Recombinant HBsAg was excreted and secreted in culturing mammalian cell transferred with hepatitis B virus S protein gene. We have applied and studied two kinds of purification processes to purify r-HBsAg from cell culture supernatant. At the base of it, considering the physicochemical properties of r-HBsAg, we devised and created the third purification process and brought better result. The result showed that the final HBsAg products from three purification processes attained the criteria regulated by WHO in purity and immunity. The operating condition and applying measure of three processes were certain, while the free level of impurities and residual cellular DNA in various steps were analyzed and compared. These research indicated the character of each purification procedure and realized the purpose of adopting purification process based on the feature of target protein.

**Key words** Recombinant HBsAg, purification process, calf serum, DNA