

溶剂环境对乙肝表面抗原 (HBsAg) 结构的影响

原航, 李岩, 黄永东, 罗坚, 马光辉, 苏志国

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 100190

摘要: HBsAg 作为乙肝疫苗的主要成分, 是一种病毒样颗粒, 由蛋白质和脂类通过非共价键作用形成。HBsAg 保持完整结构对其功能非常重要, 而目前未见对其在溶液中结构变化的研究。考察了不同溶剂环境 (温度、pH 值、离子类型和盐浓度) 对 HBsAg 结构的影响。实验发现, HBsAg 在常温下比较稳定, 但在温度超过 60°C 时稳定性明显下降; pH 值小于 4.0 时引起不可逆聚集, 但在 pH 5.0 时的聚集部分可逆; 不同离子对 HBsAg 的影响基本符合 Hofmeister 序列, 不同之处是 SO_4^{2-} 比 F^- 更易引起 HBsAg 颗粒的聚集, 在所考察的盐中, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 对 HBsAg 有着较大的影响, 0.4 mol/L 时就会引起 HBsAg 聚集, 随着浓度增加, 聚集现象更加严重, 所以在 HBsAg 的疏水层析中要谨慎使用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。

关键词: HBsAg, 结构变化, 溶剂环境, 凝胶过滤高效液相色谱

Effects of solvent environment on the structure of hepatitis B surface antigen (HBsAg)

Hang Yuan, Yan Li, Yongdong Huang, Jian Luo, Guanghui Ma, and Zhiguo Su

National Key Laboratory of Biochemistry Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

Abstract: As a virus-like particle, hepatitis B surface antigen (HBsAg) was the primary component of hepatitis B vaccine. HBsAg was maintained by the non-covalent interaction of proteins and lipids. The intact structure of HBsAg particle was vital to its function. However, there was no report about the effects of solvent environment on HBsAg structure. In this paper, we studied the effects of temperature, pH, ionic type and salt concentration on HBsAg structure. The results showed that HBsAg was stable at normal temperature, but began to denature above 60°C. The aggregation of HBsAg at pH 3.0 and 4.0 was nearly irreversible, but partly reversible at pH 5.0. The influence of ionic type on HBsAg was generally in accordance with Hofmeister sequence, except that SO_4^{2-} caused more aggregation than F^- . HBsAg aggregates started to be visible in 0.4 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, and the extent of aggregation increased with the salt concentration. Therefore, caution must be taken when using $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in the hydrophobic chromatography purification of HBsAg.

Keywords: HBsAg, structural change, solvent environment, gel filtration-high performance liquid chromatography

随着蛋白质大规模制备技术的不断进步, 目前很多种蛋白类药物可实现规模化、高纯度的制备, 但是蛋白质在纯化和保存过程中容易发生结构变化, 从而导致失活, 降低产品质量, 而且变性的蛋

Received: March 15, 2010; **Accepted:** May 14, 2010

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 20906093, 20820102036), National Basic Research Program of China (Nos. 2007CB714305, 2009CB724705).

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

国家自然科学基金 (Nos. 20906093, 20820102036), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (Nos. 2007CB714305, 2009CB724705) 资助。

白质不仅无用而且可能有害。因此, 提高蛋白质在生产 and 保存过程中的稳定性是当前面临的一个重大问题^[1]。

维持蛋白质结构稳定的主要作用包括疏水相互作用、氢键、静电力、范德华力和二硫键等, 其中最主要的是疏水相互作用^[1]。溶剂环境如温度^[2-3]、pH 值^[4-5]、缓冲体系^[6-7]、离子类型及强度^[8-10]和添加剂^[11-14]等通过影响这些作用力而改变蛋白质稳定性。

一般来说, 分子体积越大, 蛋白质柔性越大, 越容易变性, 因此分子量超过 200 kDa 的蛋白质一般含有多个亚基以提高其稳定性。以病毒衣壳蛋白和脂类组成的病毒样颗粒为例, 它可以作为有效性和安全性都很高的疫苗使用, 应用前景广阔。由于其主要成分是蛋白质, 且整体结构主要靠非共价键维持, 所以上述影响蛋白质结构稳定的因素同样会引起其结构变化。另外与单体蛋白的不同之处是, 溶剂环境可能造成其四级结构的改变, 从而影响其功能。

HBsAg 正是一种病毒样颗粒, 它是一种非常成功的疫苗, 对预防乙型肝炎的扩散作出了巨大贡献。在我国, 乙型肝炎的携带率约为 10% (约 1.3 亿), 为乙型肝炎的高流行区^[15], 因此乙肝疫苗的研发和改进有着重大的意义。汉逊酵母 *Hansenula polymorpha* 细胞表达的 HBsAg (*Hansenula*-HBsAg) 颗粒具有表达量高、免疫应答率强等特点^[16], 正逐渐取代中国仓鼠卵巢细胞和其他酵母细胞成为 HBsAg 的主要表达体系。HBsAg 由多个单体靠非共价键作用形成, 完整疫苗颗粒的免疫原性比单体高 1 000 倍以上^[17], 所以保持 HBsAg 的颗粒完整性对于这种疫苗非常重要。*Hansenula*-HBsAg 只含未糖基化的疏水性很强的 S 蛋白, 单体分子量为 24 kDa, 含 3~4 个自由巯基, 极易发生聚集。电镜照片显示其分子大小为 20 nm, 动态光散射的粒径分析结果显示, 89% 的 *Hansenula*-HBsAg 颗粒大小是 (30±8) nm, 11% 的颗粒聚集成 (208±79) nm^[16], 不同方法测得的 HBsAg 的分子量在 2 000~4 000 kDa 之间^[18-19]。本研究小组采用凝胶过滤高效液相色谱偶联多角度激光散射仪测得其分子量为 3 010 kDa, 由 86 个亚

基组成^[20]。*Hansenula*-HBsAg 中, 脂类和蛋白质的质量比为 40:60, 其中脂类包括磷脂、麦角固醇、麦角固醇酯和甘油三酸酯等。HBsAg 颗粒中蛋白质与脂类的结合方式目前还有争论, 一种观点认为 HBsAg 具有类似脂蛋白的结构, 其中磷脂或者胆固醇作为被膜, 内核为中性脂和部分蛋白质; 另一种观点认为 HBsAg 是一个表面有大孔的非密闭囊泡, 允许一些小分子扩散到内部^[16]; 而 Satoh 等认为脂类结合在蛋白质表面, 暴露在 HBsAg 的最外层^[21]。

目前关于蛋白质在溶液中结构变化的研究大多采用结构简单的单体蛋白为模型, 如 BSA、lysozyme 等, 对结构复杂的蛋白-脂类聚集体的研究还未见报道, 而这类结构是病毒样颗粒疫苗普遍具有的, 并且在其纯化和保存等方面存在许多实际问题, 因此开展此方面研究具有指导意义。本研究采用酶联免疫法 (ELISA) 对 HBsAg 进行定量检测, 采用圆二色谱仪对二级结构变化, 荧光光谱对蛋白质侧链氨基酸残基的微环境变化, 凝胶过滤高效液相色谱 (HPSEC) 对四级结构变化进行分析, 综合研究溶剂环境对 HBsAg 结构影响的规律。

1 材料与方法

1.1 实验材料

HBsAg 纯品由华兰生物股份有限公司提供, Lowery 法测得其蛋白浓度为 1 093 mg/L。实验所用各种盐类试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 温度对 HBsAg 的影响

10 mL 离心管中加入 1.8 mL 20 mmol/L 磷酸钠盐缓冲液 (PB), pH 7.0, 再加入 0.2 mL HBsAg 原料, 保证 HBsAg 的终浓度约为 100 mg/L, 然后分别维持在 4℃、20℃、37℃、60℃、90℃ 环境中, 并于 1、2、4、8、12 h 取样, 用 ELISA 试剂盒检测抗原量, 同时用 HPSEC 对其进行解聚和聚集分析, 圆二色谱和荧光光谱检测蛋白质二级结构和三级结构的变化, 实验重复 3 次, 取平均值。

1.2.2 pH 值对 HBsAg 的影响

使用磷酸二氢钠-柠檬酸缓冲体系配制 pH 值分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 的缓冲液, Tris-HCl

缓冲体系配制 pH 值为 8.0 的缓冲液, 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲体系配制 pH 值为 9.0、10.0 的缓冲液, 取不同 pH 值的缓冲液各 1.8 mL, 分别加入 0.2 mL HBsAg 原料, 保证 HBsAg 的终浓度约为 100 mg/L, 室温条件下放置 2 h 后用 ELISA 试剂盒检测抗原量, 并用 HPSEC 和荧光光谱检测不同 pH 值时 HBsAg 的结构变化。然后再从维持在不同 pH 值的样品体系中各取 100 μ L 加入到 900 μ L 的 pH 7.0 的缓冲液中, 室温放置 2 h, 通过此方法将 pH 值调回 7.0, 最后进行 ELISA、HPSEC 和荧光光谱检测。每个实验重复 3 次, 取平均值。

1.2.3 离子类型对 HBsAg 的影响

考察硫酸盐 ((NH₄)₂SO₄、Na₂SO₄、Li₂SO₄) 和铵盐 (NH₄F、NH₄Cl、NH₄Br、NH₄I、NH₄NO₃、NH₄Ac) 对 HBsAg 的影响, 分别配制相同浓度的上述各种盐溶液, 加入相同体积的 HBsAg 原料, 保证 HBsAg 终浓度约为 100 mg/L, 室温放置 2 h 后, 进行 ELISA、HPSEC 和荧光光谱检测, 实验重复 3 次, 取平均值。

1.2.4 盐浓度对 HBsAg 的影响

配制浓度为 2 mol/L 的 (NH₄)₂SO₄ 溶液, 分别稀释成 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 mol/L 等不同浓度, 加入一定量 HBsAg 原料, 确保 HBsAg 终浓度约为 100 mg/L, 室温放置 2 h 后进行 ELISA、HPSEC 和荧光光谱检测, 实验重复 3 次, 取平均值。

1.3 分析方法

1.3.1 圆二色谱仪

圆二色谱仪为 Jasco-810 spectropolarimeter (Jasco, 日本), 扫描范围为 190~250 nm, 分辨率为 1 nm, 用样品所处的缓冲液为空白进行校正, 每个样品重复测 3 次, 溶液中蛋白质二级结构的估算软件为 Jasco secondary structure estimation (version 1.00)。

1.3.2 HPSEC

液相系统为 Agilent 1100 (Agilent, 美国) 色谱柱 TSK G3 000 SW (300 mm \times 7.5 mm I.D.), 用于检测蛋白质的解聚, 分析条件: 流动相为 50 mmol/L PB+0.1 mol/L Na₂SO₄, pH 6.8, 流速为 0.5 mL/min,

温度为室温, 检测波长为 280 nm, 进样量为 100 μ L。

色谱柱 TSK G5 000 PWxl (300 mm \times 7.5 mm I.D.), 用于检测蛋白质的聚集, 分析条件: 流动相为 50 mmol/L PB, pH 6.8, 流速为 0.5 mL/min, 温度为室温, 检测波长为 280 nm, 进样量为 100 μ L。

1.3.3 HBsAg 抗原量测定

通过 ELISA 方法检测 HBsAg 的抗原量, 试剂盒为上海科华立可读乙肝表面抗原测定试剂盒 (中国)。测定前, 样品需稀释 10 000 倍, 按 10 \times 10 \times 10 \times 10 的步骤稀释, 然后参照试剂盒说明书进行操作, 最后在双波长 (测定波长 450 nm, 参考波长 630 nm) 下用酶标仪测定反应终止 OD 值, 相对抗原量 = (处理后样品 OD 值 - 空白 OD 值) / (未处理样品 OD 值 - 空白 OD 值) \times 100%。

1.3.4 荧光光谱

荧光分光光度计为 F-4 500 (Hitachi, 日本), 用于检测蛋白质三级结构的变化, 激发光波长为 280 nm, 发射光检测范围为 300~400 nm, 扫描速度为 1 200 nm/min, 每个样品重复测 3 次, 数据分析软件为 FL Solutions 2.0。

2 结果与分析

2.1 温度对 HBsAg 稳定性的影响

由图 1 可以看出, 虽然 HBsAg 为分子量很大的多亚基蛋白, 疏水性也较强, 但却具有较好的热稳定性。60 $^{\circ}$ C 条件下处理 12 h, 相对抗原量仍保持在 40% 左右, 但是在 90 $^{\circ}$ C 的高温条件下处理 2 h 便会引起 HBsAg 相对抗原量的急剧下降, 随着处理时间的延长, 相对抗原量持续下降, 但下降程度有所减缓。圆二色谱显示 HBsAg 中含有大量的 α -螺旋结构 (图 2), 这与大多数病毒的衣壳蛋白质主要含有 β -折叠有很大的区别, 但这与 Wynne 等^[22]的研究一致。随着处理温度的升高, 圆二色谱值有一个渐变的趋势, 190 nm 处正峰, 210、220 nm 处负峰都逐渐变得不太明显, 90 $^{\circ}$ C 时的圆二色谱曲线明显区别于其他温度, α -螺旋特征吸收峰变的非常不明显, 原因可能是高温使蛋白质结构打开, α -螺旋变少, 或者是蛋白质发生沉淀或吸附, 浓度变小所致。

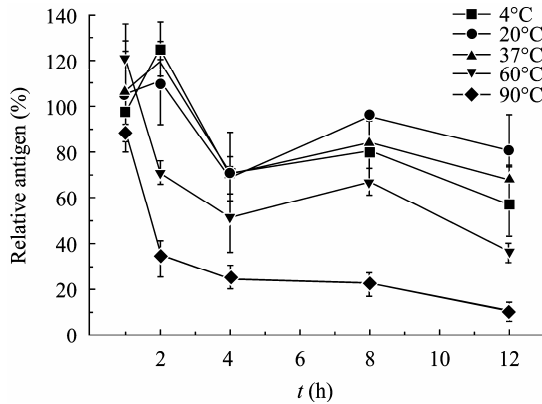


图1 HBsAg 在不同温度下的相对抗原量
Fig. 1 Relative antigen of HBsAg at different temperatures.

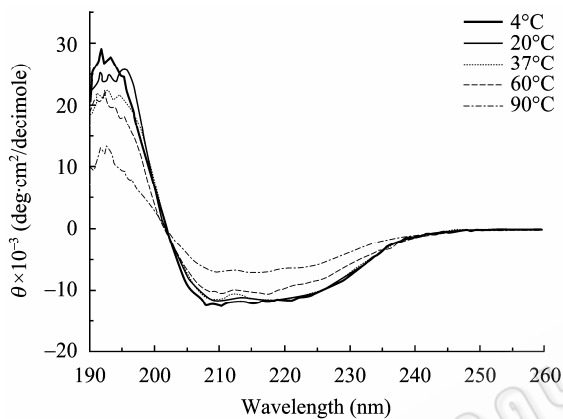


图2 HBsAg 在不同温度下的圆二色谱图
Fig. 2 CD spectra of HBsAg at different temperatures.

荧光光谱和 ELISA 结果以及圆二色谱结果相吻合。在图 3 中, 只在 60°C、90°C 的高温条件下发生了一些变化, 最直观的结果是荧光强度明显变低, 90°C 时几乎看不到明显的峰形, 并且最大发射波长有轻微的红移现象, 因为随着温度的升高, 分子之间碰撞加剧, 能量发生转移, 造成荧光淬灭, 同时, 聚集体的形成也可能造成荧光淬灭^[23], 另外, 温度升高, 蛋白质结构变得舒展, 荧光基团 (酪氨酸和色氨酸) 处于极性更强的环境中, 造成了红移现象。在图 4 中, 也没有明显的解聚现象, 虽然图 4B 中, 90°C 时的谱图在 27 min 左右出现一个小峰, 但已超出外水体积, 不是蛋白质解聚的产物。另外, 高温条件下 HBsAg 没有发生聚集 (图 4A), 但是峰高却逐渐降低, 90°C 时的峰高降低最明显, 可能是蛋白质变性后沉淀或者吸附在离心管上。Gombotz 等^[24]研究发现 BSA 在尼龙膜片上的吸附量为 220 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 而在聚偏二氟乙烯和醋酸纤维素膜片上的吸附量为

120 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 所用离心管的表面足以引起 HBsAg 含量的降低。上述结果表明 HBsAg 颗粒对温度并不十分敏感。

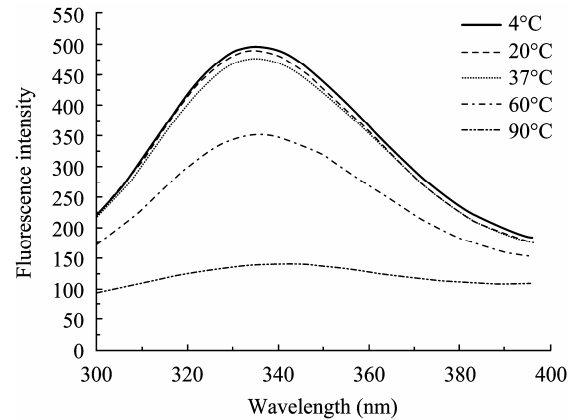


图3 HBsAg 在不同温度下的荧光图谱
Fig. 3 Fluorescence spectra of HBsAg at different temperatures.

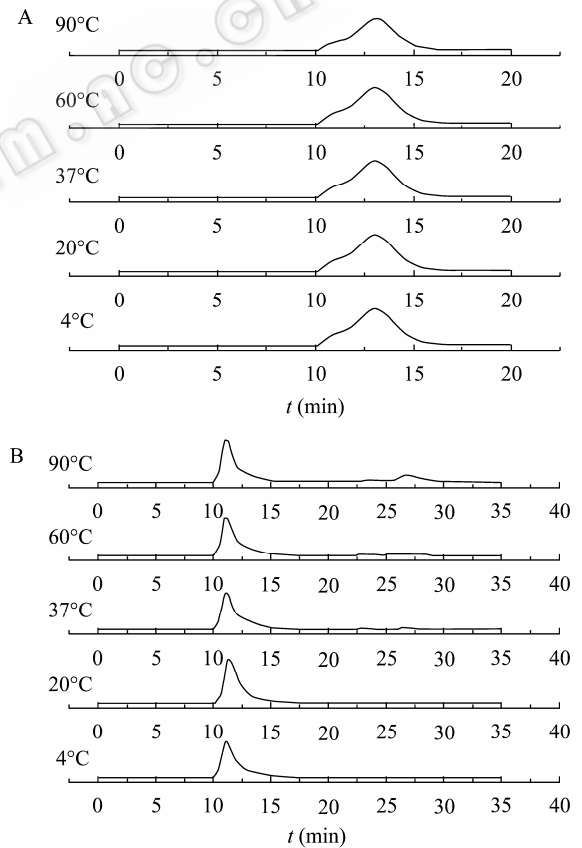


图4 HBsAg 在不同温度的 HPSEC 图谱
Fig. 4 HPSEC of HBsAg at different temperatures. (A) Column size: TSK G5000 PWxl (300 mm \times 7.5 mm I.D.); mobile phase: 50 mmol/L PB, pH 6.8; flow rate: 0.5 mL/min; temperature: (20–25) $^{\circ}\text{C}$; detection: 280 nm; loading volume: 100 μL . (B) Column size: TSK G3000 SW (300 mm \times 7.5 mm I.D.); mobile phase: 50 mmol/L PB + 0.1 mol/L Na_2SO_4 , pH 6.8; flow rate: 0.5 mL/min; Temperature: (20–25) $^{\circ}\text{C}$; Detection: 280 nm; loading volume: 100 μL .

2.2 pH 值对 HBsAg 稳定性的影响

图 5 显示, 低 pH 值时, 即当 pH 值为 3.0、4.0、5.0 时, 相对抗原量明显很低, 都不超过 20%, 但是重新调回 pH 7.0 的溶液环境后, 相对抗原量均有了一定程度的提高, 说明虽然低 pH 值会对蛋白结构产生影响, 但是所引起的变性是部分可逆的。与此相对的是高 pH 值, 即 pH 值为 9.0、10.0 时, 相对抗原量则高于 100%, 即使调回 pH 7.0 的溶液环境, 相对抗原量依然很高, 可能是高 pH 值改变了 HBsAg 抗原决定簇局部的结构, 从而更加有利于其与 ELISA 抗体的结合。

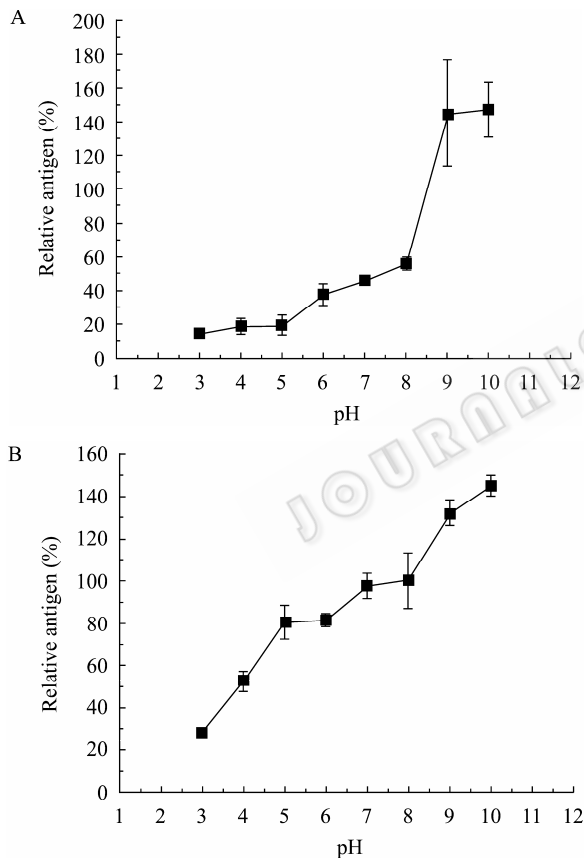


图 5 HBsAg 在不同 pH 下的相对抗原量

Fig. 5 Relative antigen of HBsAg at different pH values. (A) pH values range from 3.0 to 10.0. (B) Different pH values are readjusted to pH 7.0 respectively.

图 6 (部分数据未列) 显示, 低 pH 值时, HBsAg 发生聚集, 因为 HBsAg 纯品的出峰位置是 13 min, 而 pH 3.0、4.0 时的出峰位置是 11 min, 明显前移, 但当 pH 值调回 7.0 后, 峰形略微有向后移动的趋势, 即靠近 HBsAg 纯品的出峰位置。pH 5.0 的凝胶过滤

高效液相色谱显示的这种过渡更加明显, 可以看到有 2 个峰形, 当调回 pH 7.0 后, 13 min 的峰高明显高于 11 min 的峰高, 说明 pH 5.0 时引起的变性是可逆的, 并且与 ELISA 结果吻合, 但 pH 值在 3.0、4.0 时引起的 HBsAg 聚集几乎是不可逆的。此外, 无论是否调回 pH 7.0, pH 值从 6.0 增至 10.0 时 HBsAg 的出峰位置都一致, 说明没有引起 HBsAg 的聚集。

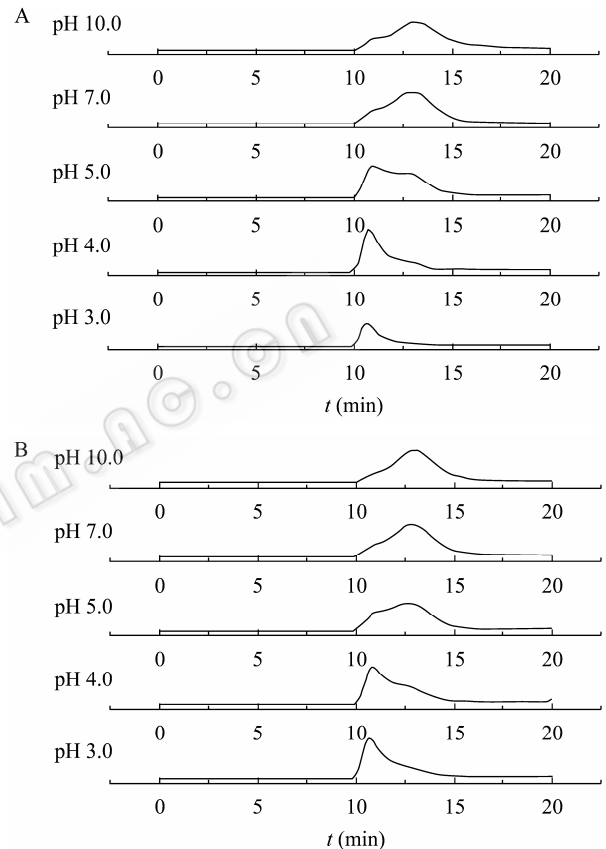


图 6 不同 pH 条件下 HBsAg 的 HPSEC 图谱

Fig. 6 HPSEC of HBsAg at different pH values. (A) pH values range from 3.0 to 10.0. (B) Different pH values are readjusted to pH 7.0 respectively. Column size: TSK G5000 PWxl, for more details see Fig. 4.

pH 值的改变也造成荧光光谱的变化 (部分数据未列), pH 3.0、4.0、5.0 时的荧光强度明显很低, 并且随着 pH 值的降低而减弱; pH 值大于 6.0 时的荧光强度较高, 且都相差很少, 当 pH 值都调回 7.0 时, HBsAg 的荧光强度近似一致 (图 7), 这也说明了 pH 值引起的侧链氨基酸残基微环境的变化可能是可逆的, 但 pH 值本身也会造成荧光强度的变化, 研究人员发现^[23], 色氨酸和酪氨酸的量子产率与 pH 直接相关。在 pH 10.9 时, 色氨酸量子产率最高为

0.51, 在 pH 4.0~8.0 时, 量子产率为 0.2, 在 pH 小于 4 时, 量子产率最低, 只有 0.085。与此同时, 中性溶液中, 酪氨酸量子产率较高, pH 小于 4 时, 量子产率大大降低。

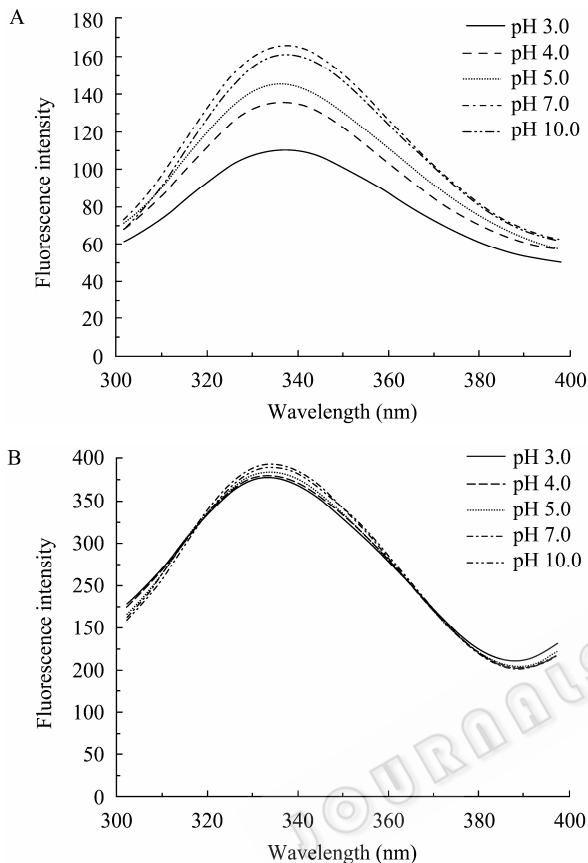


图 7 不同 pH 条件下 HBsAg 的荧光光谱

Fig. 7 The fluorescence spectra of HBsAg at different pH values. (A) pH values range from 3.0 to 10.0. (B) Different pH values are readjusted to pH 7.0 respectively.

2.3 离子类型对 HBsAg 稳定性的影响

选用不同的硫酸盐比较阳离子对 HBsAg 的影响, 不同的铵盐比较阴离子对 HBsAg 的影响。图 8 和图 9 的结果表明, HBsAg 的相对抗原量偏低, 则其 HPSEC 图谱必然提前出峰或者峰形异常, 且有如下规律: 阳离子中, 按 HBsAg 的相对抗原量由大到小排序为: $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{NH}_4^+$; 阴离子中, SO_4^{2-} 对 HBsAg 的影响最大, 因为对比 F^- 和 SO_4^{2-} 的 HPSEC 图谱可以发现, F^- 引起 HBsAg 的聚集, 而 SO_4^{2-} 引起 HBsAg 的沉淀 (色谱峰面积较小), 所以按 HBsAg 的相对抗原量由大到小排序为: $\text{Ac}^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{F}^- > \text{SO}_4^{2-}$ 。从荧光图谱 (部分数据未

列) 上也可得到类似的结果, 由于 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 Na_2SO_4 、 Li_2SO_4 溶液对 HBsAg 抗原量的影响较大, 所以荧光强度明显低于 NH_4F 、 NH_4Cl 、 NH_4Br 、 NH_4Ac 等溶液, 也说明 SO_4^{2-} 对 HBsAg 的影响强于其他阴离子 (图 10)。而 NH_4I 、 NH_4NO_3 溶液荧光强度非常低, 这与文献报道的 I^- 和无机的硝化物都能引起有机物的荧光淬灭^[23]相一致。

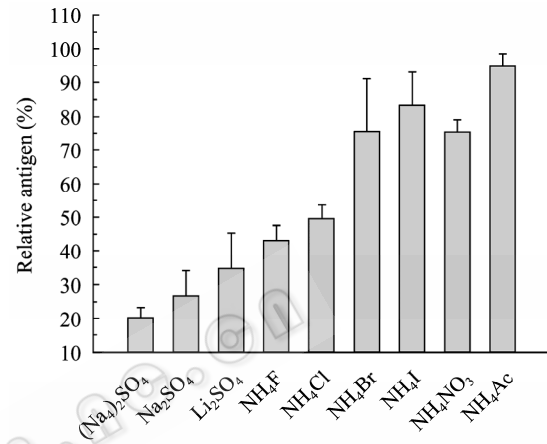


图 8 离子类型对 HBsAg 相对抗原量的影响

Fig. 8 Influence of different ions on the relative antigen of HBsAg.

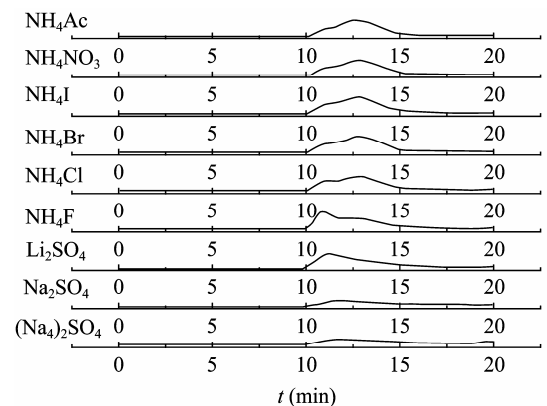


图 9 不同离子环境中 HBsAg 的 HPSEC 图谱

Fig. 9 HPSEC of HBsAg in different ionic environments. Column size: TSK G5 000 PWxl, for more details see Fig. 4.

此实验结果基本符合 Hofmeister 序列。Hofmeister^[25]在研究不同离子对蛋白沉淀性质的影响时, 发现阴离子的作用大于阳离子, 且有如下规律:

$\text{F}^- \approx \text{SO}_4^{2-} > \text{HPO}_4^{2-} > \text{acetate} > \text{Cl}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{ClO}_3^- > \text{I}^- > \text{ClO}_4^- > \text{SCN}^-$;

$\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+ > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$ 。

一般认为, 序列中越靠前的离子, 盐析作用越

强,对疏水作用的增强效果越明显。因为 HBsAg 疏水性较强,所以更易靠疏水作用聚集在一起。不同的是 SO_4^{2-} 比 F^- 更易引起 HBsAg 颗粒的聚集,这可能与 SO_4^{2-} 和 HBsAg 的特异作用有关,并且 Hofmeister 序列是经验序列,不一定适用于所有实验体系。

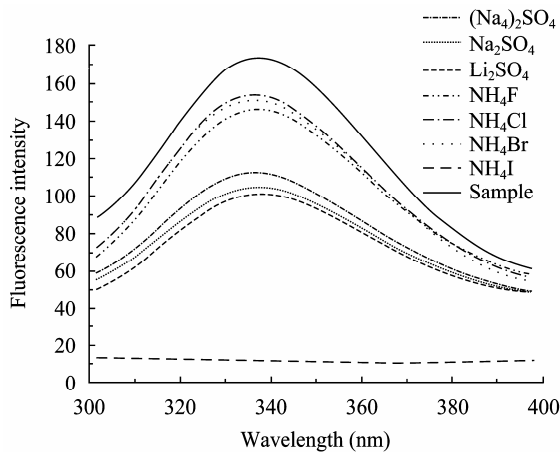


图 10 不同离子环境中 HBsAg 的荧光图谱

Fig. 10 Fluorescence spectra of HBsAg in different ionic environments.

2.4 盐浓度对 HBsAg 稳定性的影响

前面实验已证明 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 对 HBsAg 的影响最显著,因此选择 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 考察不同盐浓度对 HBsAg 的影响。由图 11 可以看出,当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度增至 0.4 mol/L 时,相对抗原量大幅降低,随着浓度的继续增加,相对抗原量也不断降低,到浓度为 1.8 mol/L 时降至 30% 左右。可以认为,HBsAg 颗粒较大, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 加入后,与蛋白质竞争性地争夺水分子,破坏了 HBsAg 表面的水化层,使 HBsAg 进一步形成更大的聚集体。

荧光图谱显示出明显的规律性(部分数据未列),并且与 ELISA 结果相符。随着 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度的不断增加,荧光强度逐渐降低,最大发射波长也轻微的蓝移,1.8 mol/L 时荧光强度降到最低,且蓝移现象最明显(图 12)。这说明蛋白质的三级结构发生了细微的变化,可能是因为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 引起 HBsAg 聚集,荧光基团(酪氨酸或色氨酸残基)所处微环境发生变化,被深埋于聚集体内部更加疏水的环境,从而引起最大发射波长蓝移^[23]。

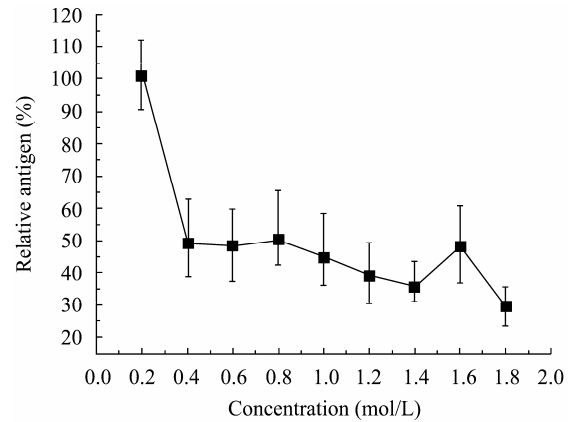


图 11 盐浓度对 HBsAg 相对抗原量的影响

Fig. 11 Influence of salt concentration on the relative antigen of HBsAg.

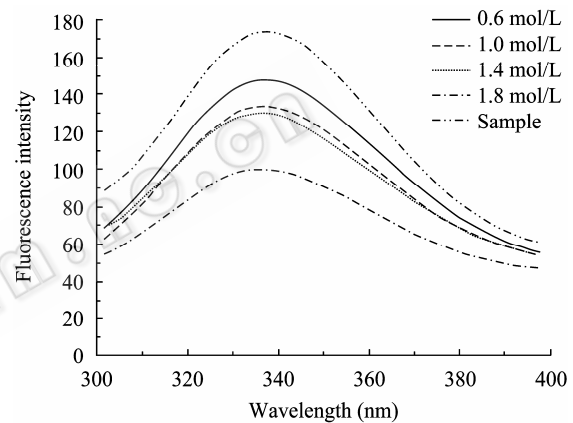


图 12 不同盐浓度下 HBsAg 的荧光图谱

Fig. 12 Fluorescence spectra of HBsAg at different salt concentrations.

HPSEC 与 ELISA 和荧光光谱的结果也是吻合的。当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度增至 0.4 mol/L 时,HBsAg 开始在 11 min 提前出峰,浓度为 0.6 mol/L 时,11 min 处的峰高明显高于 13 min,说明大部分 HBsAg 已发生聚集。随着 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度的继续增加,13 min 处不再有峰,而 11 min 处的峰形更加明显(图 13),说明聚集现象越来越严重。在 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度大于 1.4 mol/L 时,11 min 处峰形反而变得很不明显,可能是高盐浓度引起蛋白质沉淀或者蛋白质吸附于离心管壁,使溶液中 HBsAg 浓度降低,这也解释了 HBsAg 在高盐浓度时荧光强度的降低。

3 结论

HBsAg 结构复杂,为蛋白质-脂类复合体,并且蛋白质未糖基化,疏水性强,亚基数目多,但对于

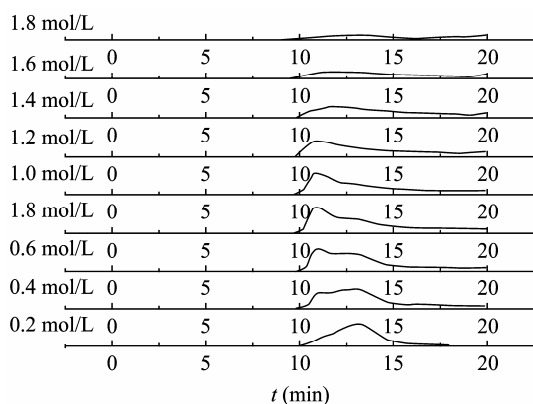


图 13 不同盐浓度下 HBsAg 的 HPSEC 图谱

Fig. 13 HPSEC of HBsAg at different salt concentrations. Column size: TSK G5000 PWxl, for more details see Fig. 4.

其在溶剂环境中的稳定性却少见报道, 本文通过考察不同条件对 HBsAg 结构的影响, 旨在为类似疫苗在保存和纯化过程中遇到的问题提供参考。

实验发现, HBsAg 有较好的热稳定性, 当温度低于 37℃ 时, 延长处理时间并不会改变其结构, 但 60℃、90℃ 的高温却会在短时间内引起其高级结构变化。pH 3.0、4.0 时引起的 HBsAg 四级结构的变化几乎不可逆; 与之相对的是, pH 5.0 时引起的四级结构变化大部分可逆, 但 pH 3.0、4.0、5.0 时引起的侧链氨基酸残基的微环境变化则完全可逆, 当 pH 值大于等于 6.0 时, HBsAg 的四级结构没有改变。高 pH 值能极大提高 HBsAg 的相对抗原量, 可能是因为高 pH 值改变了 HBsAg 抗原决定簇的局部结构。不同离子类型对 HBsAg 的影响基本符合 Hofmeister 序列, 不同之处是 SO_4^{2-} 比 F^- 更易引起 HBsAg 的聚集, 这可能与 SO_4^{2-} 和 HBsAg 的特异作用有关。所考察盐中以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 对 HBsAg 的聚集作用最显著, 较低浓度即引起 HBsAg 的聚集, 随着离子浓度的增加, HBsAg 的三级结构和四级结构也随之变化, 并且聚集现象也越来越严重, 甚至发生沉淀。因此, 在 HBsAg 及类似疫苗的保存和分离纯化过程中, 可能偏碱性的溶剂环境更有利于保持其结构稳定, 当需要添加不同离子, 尤其是疏水层析需要通过盐来调节电导时, 要谨慎使用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 或者硫酸盐。

REFERENCES

[1] Wang W. Instability, stabilization, and formulation of liquid

protein pharmaceuticals. *Int J Pharm*, 1999, **185**(2): 129–188.

- [2] Vermeer AWP, Norde W. The thermal stability of immunoglobulin: unfolding and aggregation of a multi-domain protein. *Biophys J*, 2000, **78**(1): 394–404.
- [3] Zhang J, Peng XD, Jonas A, *et al.* NMR study of the cold, heat, and pressure unfolding of ribonuclease A. *Biochemistry*, 1995, **34**(27): 8631–8641.
- [4] Chi EY, Krishnan S, Randolph TW, *et al.* Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. *Pharm Res*, 2003, **20**(9): 1325–1336.
- [5] Wang W. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceuticals. *Int J Pharm*, 2005, **289**(1/2): 1–30.
- [6] Son K, Kwon C. Stabilization of human epidermal growth factor (hEGF) in aqueous formulation. *Pharm Res*, 1995, **12**(3): 451–454.
- [7] Chen BL, Arakawa T, Hsu E, *et al.* Strategies to suppress aggregation of recombinant keratinocyte growth factor during liquid formulation development. *J Pharm Sci*, 1994, **83**(12): 1657–1661.
- [8] Kohn WD, Kay CM, Hodges RS. Salt effects on protein stability: two-stranded α -helical coiled-coils containing inter- or intrahelical ion pairs. *J Mol Biol*, 1997, **267**(4): 1039–1052.
- [9] Li M, Janson JC, Su ZG. Protein denaturation and refolding during chromatographic processes. *J Chem Ind Eng*, 2004, **55**(7): 1033–1040.
- 李明, Janson JC, 苏志国. 蛋白质在层析过程中的失活与复性. *化工学报*, 2004, **55**(7): 1033–1040.
- [10] Spencer DS, Xu K, Logan TM, *et al.* Effects of pH, salt, and macromolecular crowding on the stability of FK506-binding protein: an integrated experimental and theoretical study. *J Mol Biol*, 2005, **351**(1): 219–232.
- [11] Lee CS, Kim BG. Improvement of protein stability in protein microarrays. *Biotech Lett*, 2002, **24**(10): 839–844.
- [12] Timasheff SN. Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: the simplicity of the complicated. *Adv Protein Chem*, 1998, **51**: 355–432.
- [13] Wang W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm*, 2000, **203**(1/2): 1–60.
- [14] Wang W, Wang YJ, Wang DQ. Dual effects of Tween 80 on protein stability. *Int J Pharm*, 2008, **347**(1/2): 31–38.
- [15] Blumberg BS. Hepatitis B virus, the vaccine, and the control of primary cancer of the liver. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(14): 7121–7125.
- [16] Diminsky D, Schirmbeckt R, Reimant J, *et al.* Comparison between Hepatitis B surface antigen (HBsAg) particles derived from mammalian cells (CHO) and yeast

- cells (*Hansenula polymorpha*): composition, structure and immunogenicity. *Vaccine*, 1997, **15**(6/7): 637-647.
- [17] Valenzuela P, Medina A, Rutter WJ, *et al.* Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature*, 1982, **298**(5872): 347-350.
- [18] Dreesman GR, Hollinger FB, Suriano JR, *et al.* Biophysical and biochemical heterogeneity of purified Hepatitis B antigen. *J Virol*, 1972, **10**(3): 469-476.
- [19] Kim CY, Tilles JG. Purification and biophysical characterization of Hepatitis B antigen. *J Clin Invest*, 1973, **52**(5): 1176-1186.
- [20] Zhou WB, Bi JX, Janson JC, *et al.* Molecular characterization of recombinant Hepatitis B surface antigen from Chinese hamster ovary and *Hansenula polymorpha* cells by high-performance size exclusion chromatography and multi-angle laser light scattering. *J Chromatogr B*, 2006, **838**(2): 71-77.
- [21] Satoh O, Imai H, Yoneyama T, *et al.* Membrane structure of the Hepatitis B virus surface antigen particle. *J Biochem*, 2000, **127**(4): 543-550.
- [22] Wynne SA, Crowther RA, Leslie AGW. The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. *Molecular Cell*, 1999, **3**(6): 771-780.
- [23] Guo XJ. *Fluorescence Technology and Application in Molecular Biology*. Beijing: Science Press, 1979: 106-127. 郭晓君. 荧光实验技术及其在分子生物学中的应用. 北京: 科学出版社, 1979: 106-127.
- [24] Pearlman R, Wang YJ. *Formulation, Characterization, and Stability of Protein Drugs*. New York: Plenum Press, 1996: 219-245.
- [25] Kunz W, Henle J, Ninham BW. 'Zur Lehre von der Wirkung der Salze' (about the science of the effect of salts): Franz Hofmeister's historical papers. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 2004, **9**(1/2): 19-37.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

生物营养强化农产品开发和应

生命科学前沿

〔美〕 G.S. 巴纽埃洛斯 林治庆 编著 尹雪斌 李飞 刘颖 周守标 译

开本: B5 营销分类: 农业科学 装帧: 平装

ISBN 978-7-03-029334-3 ¥ 60.00 2010年11月出版

内容简介

我国农业历经了从高产到无公害,再到绿色有机的发展阶段。但是,安全仅仅是对食品要求的一个方面,在中国科学院农业领域战略研究组编撰的《中国至2050年农业科技发展路线图》中,食品的营养化和功能化已被提上日程,代表了我国未来农业发展的新方向。

本书从生物营养强化的概念出发,寻求目前世界上普遍存在的营养失衡的解决之道。本书的撰稿人都是活跃在农产品生物营养强化领域有经验的科学家。他们从缺乏现象最为普遍的硒、铁、锌、碘出发,着力于通过品种选育、肥料施用、农艺管理以及现代基因工程等技术手段来改善或解决这个问题,对改善我国民众的微量营养水平和提高我国有关研究、实践均有着非常重要的启发意义。

本书适合生命科学、农学等相关方向的研究人员参考使用。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 周文宇 (010-64031535)

网上订购: www.dangdang.com www.joy.com www.amazon.cn www.beifabook.com

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目