

乙肝病毒 S 抗原和 preS1 抗原表位融合蛋白(S/preS1)在 CHO 细胞中的稳定高效表达

杨振西^{1,2*}, 李世崇^{2*}, 刘红², 张苗³, 叶玲玲², 吴彦卓³, 徐明波³, 陈昭烈²

1 安徽大学生命科学学院, 安徽 合肥 230601

2 军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071

3 北京双鹭药业股份有限公司, 北京 100049

杨振西, 李世崇, 刘红, 等. 乙肝病毒 S 抗原和 preS1 抗原表位融合蛋白(S/preS1)在 CHO 细胞中的稳定高效表达. 生物工程学报, 2013, 29(12): 1808-1816.

Yang ZX, Li SC, Liu H, et al. Stable and efficient expression of hepatitis B virus S antigen and preS1 epitope fusion protein (S/preS1) in CHO cells. Chin J Biotech, 2013, 29(12): 1808-1816.

摘要: 含前 S 蛋白的重组乙型肝炎疫苗是第 3 代乙肝疫苗研发的重点, 有望替代现在广泛使用的基因工程疫苗。构建表达乙肝病毒 S 抗原和 preS1 抗原表位 (21-47 位氨基酸) 融合蛋白 (S/preS1) 的真核表达载体 HMRCHF53u/Neo-S/preS1 并转染 CHO-S 细胞, 经 ELISA 和有限稀释克隆筛选获得了 S/preS1 表达效率高、体外培养生物学性状好的 CHO 细胞系 10G6。Western blotting 分析证实 10G6 表达的 S/preS1 同时保留 S 和 preS1 的天然免疫原性。10G6 细胞在以活细胞密度和 preS1/S 浓度为评价指标的连续批次培养过程中保持着稳定的目的产物表达效率和良好的生长特性。采用无血清流加培养工艺, 10G6 细胞的活细胞密度和 preS1/S 浓度分别达到 $7 \times 10^6 \sim 10 \times 10^6$ cells/mL 和 17 ~ 20 mg/L。

关键词: 乙肝病毒表面抗原, PreS1 抗原表位, 疫苗, CHO 细胞, 表达

Received: March 12, 2013; **Accepted:** April 8, 2013

Supported by: National Major Special Program of New Drug Research and Development (No. 2012ZX09301-001-005).

Corresponding author: Zhaolie Chen. Tel: +86-10-66948818; E-mail: chenzl23@sina.com

* These authors contributed equally to this study.

“重大新药创制”科技重大专项资助课题 (No. 20012X09301-001-005) 资助。

Stable and efficient expression of hepatitis B virus S antigen and preS1 epitope fusion protein (S/preS1) in CHO cells

Zhenxi Yang^{1,2*}, Shichong Li^{2*}, Hong Liu², Miao Zhang³, Lingling Ye², Yanzhuo Wu³, Mingbo Xu³, and Zhaolie Chen²

1 School of Life Science, Anhui University, Hefei 230601, Anhui, China

2 Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

3 Beijing SL Pharmaceutical Co. Ltd, Beijing 100049, China

Abstract: Hepatitis B surface antigen (HBsAg) carrying preS sequences could be an ideal candidate for a new hepatitis B virus (HBV) vaccine with higher efficacy. Here we report the success in achieving efficient and stable expression of hepatitis B virus S antigen and preS1 epitope fusion protein (S/preS1) in CHO cells. The HMRCHEF53u/Neo-S/preS1 expression vector carrying S/preS1 gene was constructed and transfected into CHO-S cells. A stable and high-expression CHO cell line, named 10G6, was selected by ELISA and limiting dilution analysis. Western blotting analysis showed S/preS1 expressed from 10G6 cells possessed both S and preS1 antigenicity. 10G6 cells displayed characters of favorable growth and stable S/preS1 expression in repeated batch cultures as evaluated by viable cell density, viability and S/preS1 concentration. And cultivation of 10G6 cells in fed-batch mode resulted in S/preS1 production at 17–20 mg/L with viable cell density at 7×10^6 – 10×10^6 cells/mL.

Keywords: HBsAg, PreS1 epitope, vaccine, CHO cells, expression

乙型肝炎病毒 (Hepatitis B virus, HBV) 感染在当今仍然是一种严重影响人类健康的全球性医学问题^[1-2]。接种乙肝疫苗,尤其是在全体新生儿中计划接种乙肝疫苗是预防和控制乙肝传播的最为关键措施^[3-5]。中国是乙肝高发地区,早在20世纪90年代初我国就将普及儿童乙肝疫苗接种作为控制乙肝流行的主要策略。目前我国广泛使用的利用基因工程技术在酵母和哺乳动物细胞中表达的乙肝病毒表面抗原S蛋白(HBsAg)乙肝疫苗,接种疫苗后大约有10%~15%的人群无应答或者低应答,且一般不能诱导细胞免疫应答^[6-8]。研制能克服现有乙肝疫苗缺陷的新型乙肝疫苗成为一项迫切的重要课题。

HBV 包膜蛋白包括 S 蛋白、前 S1 蛋白(preS1) 和前 S2 蛋白(preS2)。研究表明,preS1

的 21~47 位氨基酸序列中存在比 S 更强的 B 细胞和 T 细胞抗原表位,含有 preS1 抗原表位的 S 蛋白比 HBsAg 具有更强的免疫原性^[9-10]。世界范围内含有 preS1 抗原区的乙肝表面抗原已研发成功并且批准上市,如以色列 BiotechGen 公司生产的 Bio-Hep B、Sci-B-Vac 和 Sci-DaPT/HB-Vac 疫苗以及英国 Medeva 公司生产的 Hepacare 疫苗包含 preS1、preS2 和 S 抗原,临床报告显示, Bio-Hep-B 乙型肝炎疫苗相比 S 疫苗能产生更强的免疫血清保护^[11]。国内第 3 代乙肝疫苗研究也取得重要进展,但是至今未有相关产品上市,田淑芳等成功构建得到表达 S 抗原和前 S1 区融合蛋白的 CHO 细胞系,并检测产物具有 preS1 和 S 免疫原性^[12]。制约重组 CHO 乙肝疫苗应用的最大因素为细胞的低表达水平,解决此问题需建立高表达载体、高

效筛选流程以及合适的培养方式和工艺。

本研究将编码 S 抗原和 preS1 抗原表位 (21~47 位氨基酸) 融合蛋白的 cDNA 稳定整合于 CHO 细胞基因组, 通过单克隆筛选和流加培养实现了 preS1 抗原表位和 S 融合蛋白 (S/preS1) 在 CHO 细胞中的稳定高效表达, 为后续的新型乙肝疫苗研发奠定了基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系和细胞培养试剂

CHO-S 细胞和 DME/HIGH MODIFIED 培养基、CD CHO 培养基及 CHO CD Efficient Feed™ B 流加培养基购自 Invitrogen 公司; 新生牛血清 (New born-calf serum, NBS) 购自 DAA 公司; Trypsin EDTA 购自 Corning 公司; Pluronic F68 和硫酸葡聚糖购自 Sigma 公司。

1.1.2 真核表达载体和分子生物学试剂

真核表达载体 HMRCHEF53u/Neo 由军事医学科学院生物工程研究所细胞工程研究室构建; 编码 S 抗原和 preS1 抗原表位 (21-47 位氨基酸) 融合蛋白的 cDNA 由南京金斯瑞公司合成; Taq DNA 聚合酶为奥赛博公司产品; DNA 限制性内切酶购自 NEB 公司; DNA 快速连接酶为 TaKaRa 公司产品; 质粒小量制备盒以及 DNA 胶回收试剂盒为天根公司产品; 转染试剂 Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司。

1.1.3 HBsAg 和 preS1 检测试剂

HBsAg 诊断试剂盒购自北京北方生物技术研究所; preS1 抗原诊断试剂盒购自北京贝尔生物工程有限公司; S 抗体和 preS1 抗体购自 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 S/preS1 基因表达载体的构建

将合成的 S/preS1 cDNA 从质粒 pUC57-S/preS1 中经 *Hind* III 和 *Xma* I 双酶切、琼脂糖凝胶电泳分离、胶回收纯化后, 双粘端连入同样酶切的真核表达载体 HMRCHEF53u/Neo, 构建 S/preS1 基因表达载体 HMRCHEF53u/Neo-S/preS1, 经 PCR 及酶切鉴定后再测序验证序列正确。

1.2.2 转染及克隆筛选

CHO-S 细胞以 7.5×10^5 cells/mL 的密度接种 6 孔培养板, 37 °C、5% CO₂ 培养 24 h。用 Lipofectamine™ 2000 转染试剂将 S/preS1 基因表达载体 HMRCHEF53u/Neo-S/preS1 转染进 CHO-S 中。转染后 24 h, 用 Trypsin EDTA 消化细胞并分种至 24 孔培养板中, 4~5 h 后将培养基换为含 10% (V/V) NBS 和 400 μg/mL G418 的 DME/HIGH MODIFIED 培养基, 37 °C、5% CO₂ 培养。每隔 3~4 d 更换新鲜的筛选培养基, 直到 2 周后形成明显的阳性细胞克隆。

用含 10% (V/V) NBS 的 DME/HIGH MODIFIED 培养基悬浮经 Trypsin EDTA 消化的稳定转染阳性细胞克隆, 通过逐步的梯度稀释调整细胞密度至 10 cells/mL, 将此细胞悬液按 200 μL 孔接种于 96 孔细胞培养板, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养。5 d 后, 在倒置显微镜下观察并标记只含一个细胞集落的孔; 14 d 后将单细胞形成的克隆消化传代至 24 孔或 6 孔细胞培养板。待细胞形成融合单层后, 计数细胞并取上清液检测 S/preS1 的表达水平。

1.2.3 表达 preS1/S 细胞在有血清培养基中的传代

选取经克隆筛选的表达 S/preS1 细胞系接种 T25 方瓶, 用含 10% (V/V) NBS 的 DME/HIGH MODIFIED 培养基置于 37 °C、5% CO₂ 培养。

每 4~5 d 用 Trypsin EDTA 消化传代, 当细胞开始脱落时加入 8 mL 含 10% (V/V) NBS 的 DME/HIGH MODIFIED 培养基终止消化并吹散悬浮, 吸取 2~3 mL 接种于组织培养瓶传代, 取样供 preS/S 表达水平检测及细胞活力分析和计数。

1.2.4 表达 preS1/S 细胞在无血清培养基中的传代

在 T25 方瓶用含 10% (V/V) NBS 的 DME/HIGH MODIFIED 培养基培养的 S/preS1 细胞经 Trypsin EDTA 消化后, 用含 0.2% (W/V) Pluronic F68 和 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫酸葡聚糖的 CD CHO 培养基吹散悬浮, 以 3×10^5 cells/mL 的密度接种 100 mL 的三角玻璃摇瓶, 培养体积为 30 mL, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、转速为 100 r/min 的摇床悬浮培养。每隔 4~5 d 取样供 preS/S 表达水平检测及细胞活力分析和计数, 用含 0.2% (W/V) Pluronic F68 和 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫酸葡聚糖的 CD CHO 培养基调整细胞密度至 3×10^5 cells/mL 接种新的三角玻璃摇瓶。

1.2.5 表达 S/preS1 细胞的流加培养

表达 S/preS1 细胞以 3×10^5 cells/mL 的密度接种含 0.2% (W/V) Pluronic F68 和 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫酸葡聚糖的 CD CHO 培养基的 100 mL 三角玻璃摇瓶, 培养体积为 30 mL, 置转速为 100 r/min 的摇床悬浮培养, 温度设置为 37 $^{\circ}\text{C}$ 。活细胞密度超过 2×10^6 cells/mL (培养 3~4 d) 后, 加入 4 mL CHO CD Efficient FeedTM B。随后再每隔 2 d 加入 4 mL CHO CD Efficient FeedTM B 2 次, 总计加入 CHO CD Efficient FeedTM B 12 mL。每 2 d 计数活细胞密度和活力并留样供 preS1/S 检测, 当细胞活力降至 50% 以下时终止培养。

1.2.6 活细胞密度和细胞活力测定

用移液器吸取待检测细胞样品 100 μL 与

等体积的台盼蓝染色液混匀, 吸取 20 μL 加样、用 Countstar 细胞计数仪测定细胞密度和细胞活力。

1.2.7 表达 S/preS1 细胞培养上清的 Western blotting 分析

表达 S/preS1 细胞培养上清经 SDS-PAGE 后, 电转至硝酸纤维素膜上, 用 5% (W/V) 脱脂奶粉封闭 2 h, 放入含有抗 S 或抗 preS1 抗体的脱脂奶粉溶液中 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。洗膜, 加入辣根过氧化酶偶联的羊抗鼠 IgG 作为二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次后, 室温避光显色 10 min, 压片显影。

1.2.8 S/preS1 的检测

采用 ELISA 测定表达 S/preS1 细胞培养上清的 S/preS1 含量, 所用试剂盒为购自北京北方生物技术研究所的 HBsAg 诊断试剂盒。

2 结果与分析

2.1 HMRCH53u/Neo-S/preS1 表达载体的构建

采用转录水平调控为主、转录后调控为辅的表达载体设计思想, 将从质粒 pUC57-S/preS1 中酶切回收的 S/preS1 cDNA, 双粘端连入真核表达载体 HMRCH53u/Neo 的 hEF-1 α 启动子下游、转录后调控元件 RESE (RNA exporting and stability element) 的上游, 构建了 S/preS1 基因表达载体 HMRCH53u/Neo-S/preS1 (图 1A)。用 *Hind* III 和 *Xma* I 双酶切鉴定 (图 1B) 及测序验证所构建表达载体正确。

2.2 高效表达 S/preS1 CHO 细胞的克隆筛选

HMRCH53u/Neo-S/preS1 转染阳性细胞经至 G418 加压筛选和有限稀释克隆, 在 96 孔

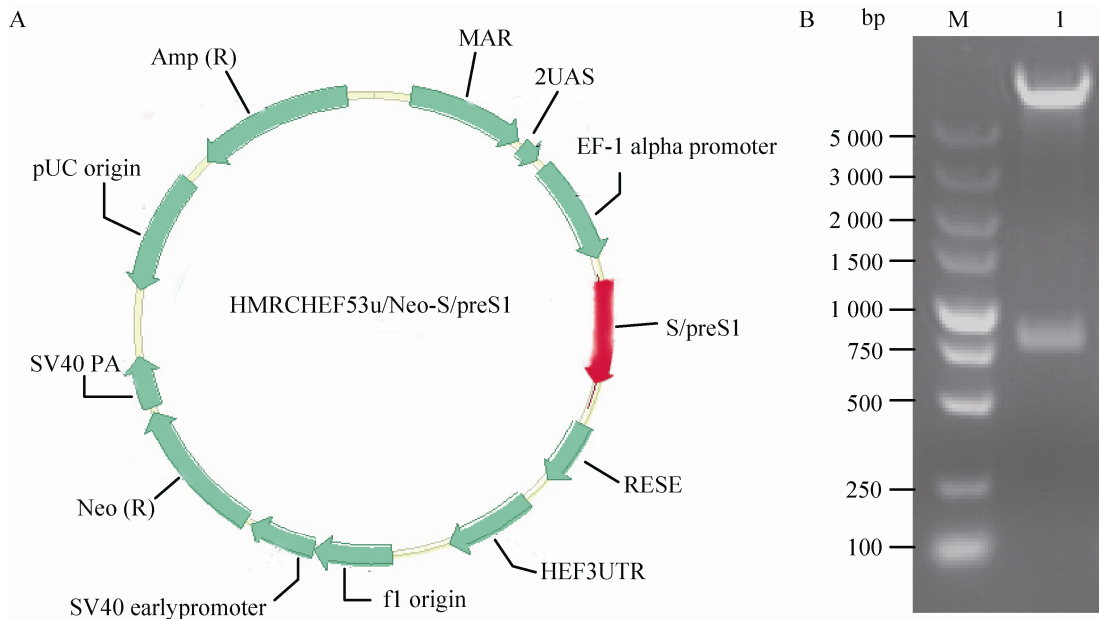


图 1 高效表达 S/preS1 基因的载体(A)及其酶切鉴定电泳图(B)

Fig. 1 Sketch map of HMRCHEF53u/Neo-S/preS1 (A) and identification of HMRCHEF53u/Neo-S/preS1 by restricted enzyme digestion (B). M: DNA marker; 1: S/preS1 cDNA from MARHEF53u/Neo-S/preS1 by restricted enzyme digestion.

板中形成 27 个单克隆。经 24 孔板培养和 S/preS1 检测，得到 S/preS1 表达阳性细胞克隆 13 个。图 2 是各 S/preS1 表达阳性细胞克隆在 T25 方瓶用含 10% (V/V) NBS 的 DME/HIGH MODIFIED 培养基培养的 S/preS1 表达水平，编号为 4F8、5B5、6E9、7F8、8C7、8F9、10G6 和 11G8 等 8 个细胞克隆的 S/preS1 表达水平均在 200 ng/(10⁶ cells·d) 以上。

从生物技术药物需采用无血清培养工艺技术进行生产的现实考虑，以 S/preS1 的生产水平为主要评价指标，在玻璃摇瓶中进一步考察上述 8 个细胞克隆在无血清批次培养条件下的 S/preS1 表达和细胞生长。表 1 所示为在有血清培养基中 S/preS1 表达水平均超过 200 ng/(10⁶ cells·d) 的细胞克隆，在无血清批次培养时的最高

S/preS1 生产水平和最大活细胞密度。10G6 细胞以 3×10⁵ cells/mL 的密度接种，培养 8 d 的最大细胞密度和培养 10 d 的最高 S/preS1 生产水平分别达到 5.42 × 10⁶ cells/mL 和 3.99 μg/mL。

2.3 10G6 细胞培养上清的 Western blotting 分析

图 3 所示为在摇瓶中无血清悬浮培养的 10G6 细胞培养上清的 Western blotting 分析结果，在与 S/preS1 分子质量相应的 27 kDa 区域均能与抗 S 抗体和抗 preS1 抗体特异结合而呈现明显的着色带，表明 10G6 细胞所表达的 S/preS1 融合蛋白保留 S 和 preS1 抗原性。

2.4 10G6 细胞在无血清培养基中连续批次培养的细胞生长和 S/preS1 表达

以批次培养结束时的活细胞密度和细胞活

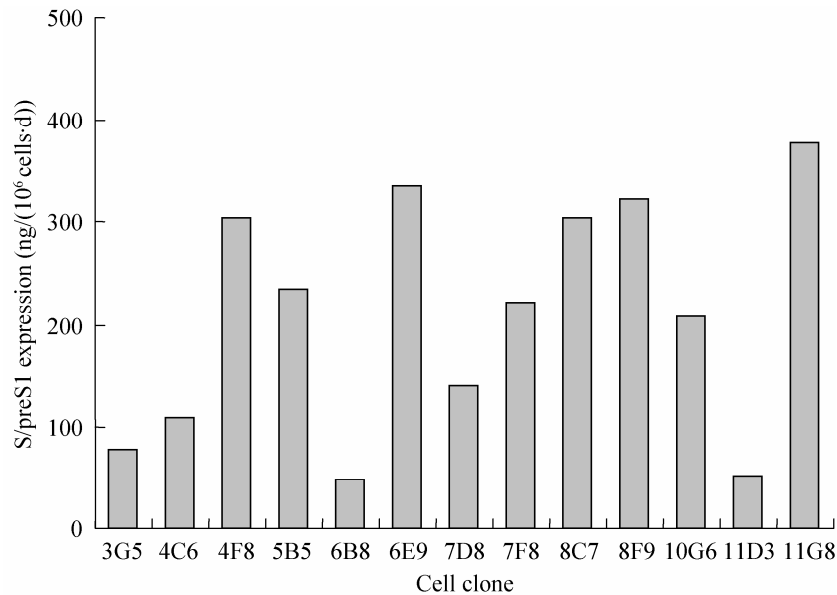


图 2 S/preS1 表达阳性细胞克隆在有血清培养基中的 S/preS1 表达水平

Fig. 2 Expression of S/preS1 in HMRCHF53u/Neo-S/preS1 transfected cell clones in serum-containing medium.

表 1 不同细胞克隆在无血清批次悬浮培养条件下的 S/preS1 表达和细胞生长

Table 1 S/preS1 expression and growth of the cell clones in batch culture in serum-free medium

Cell clone	Peak S/preS1 concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Peak viable cell density (10^6 cells/mL)
4F8	0.82	6.00
5B5	1.08	2.49
6E9	0.63	1.94
7F8	0.43	4.86
8C7	0.60	2.25
8F9	1.48	2.53
10G6	3.99	5.42
11G8	1.14	2.10

力评价 10G6 细胞生长的观察指标,以培养上清中的 S/preS1 浓度为反映 10G6 细胞 S/preS1 表达的评价指标,考察 10G6 细胞在无血清培养基

中连续批次培养的细胞生长和 S/preS1 表达。在为期约 2 个月的连续 12 批次悬浮培养中,各批次的活细胞密度基本保持在 4×10^6 cells/mL 以上、活力维持在 90% 以上(图 4A)。反映 10G6 细胞 S/preS1 表达的 S/preS1 浓度基本稳定在 1~1.25 mg/L 水平(图 4B)。

2.5 10G6 细胞无血清流加培养的细胞生长和 S/preS1 表达

以 10G6 细胞的活细胞密度和 S/preS1 浓度为观察指标,考察 10G6 细胞在无血清流加培养过程中的细胞生长和 S/preS1 表达。图 5 所示为 3 批次 10G6 细胞流加培养的活细胞密度和 S/preS1 浓度变化。不同批次 10G6 细胞流加培养的活细胞密度达到 $7 \times 10^6 \sim 10 \times 10^6$ cells/mL, S/preS1 的累积浓度达到 17~20 mg/L,培养持续时间介于 17~20 d(图 5)。

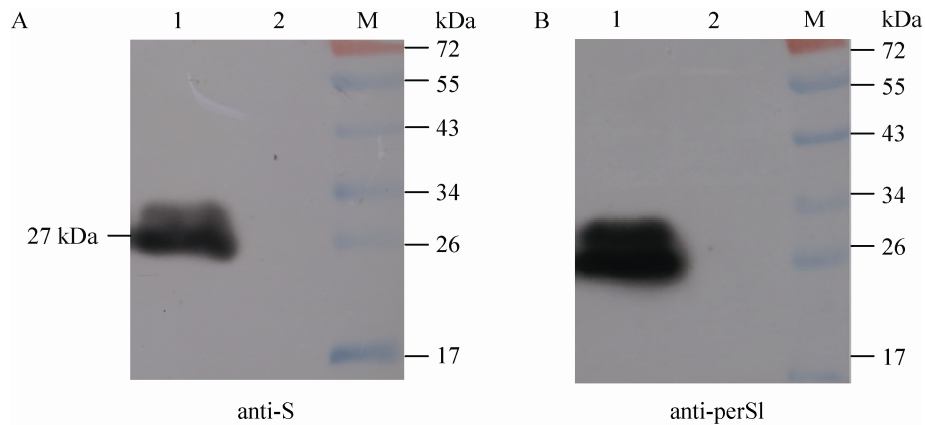


图3 10G6 细胞培养上清的 Western blotting 分析

Fig. 3 Identification of the S (A) and preS1 (B) antigenicity of S/preS1 in 10G6 cells supernatant by Western blotting. 1: 10G6 cells; 2: HMRCHF53u/Neo transfected CHO-S cells; M: Lot specific MW.

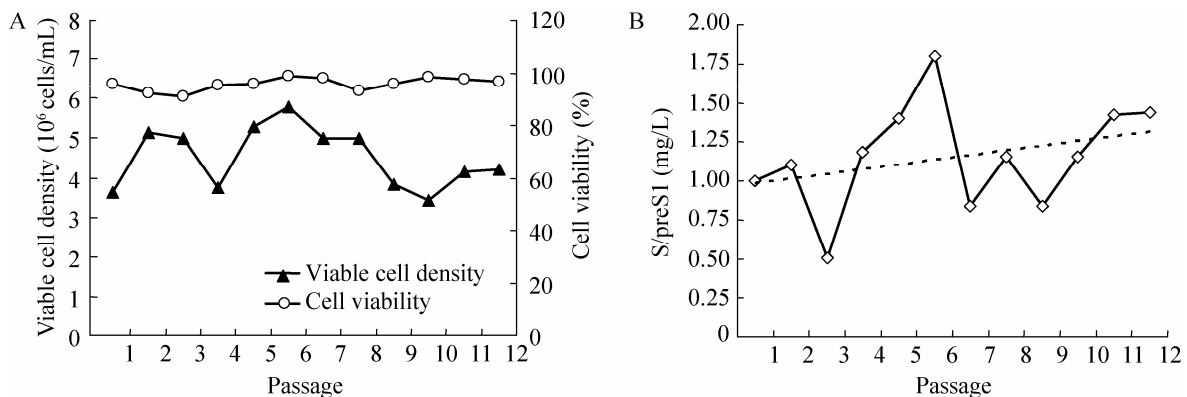


图4 10G6 细胞在连续批次悬浮培养中的细胞生长(A)和 S/preS1 表达(B)

Fig. 4 Growth (A) and S/preS1 expression (B) of 10G6 cells in repeated batch cultures.

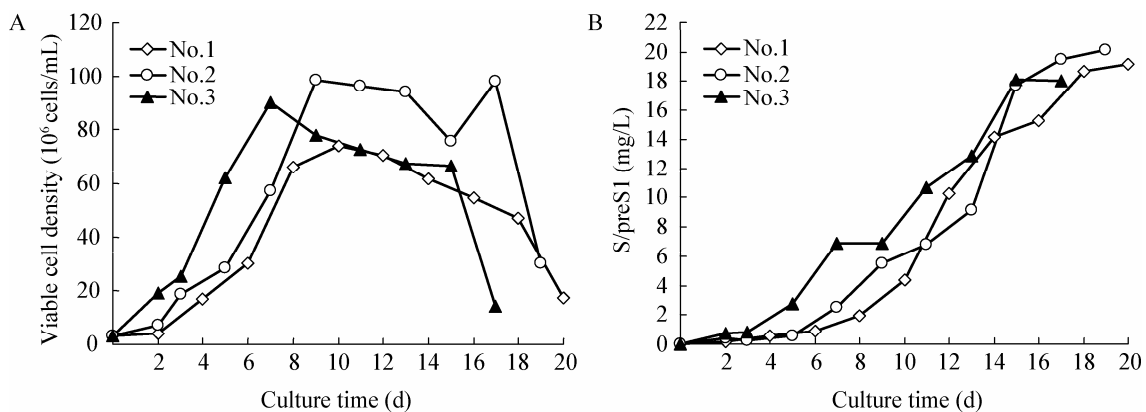


图5 10G6 细胞在无血清培养基中流加培养的细胞生长(A)和 S/preS1 表达(B)

Fig. 5 Growth (A) and S/preS1 expression (B) of 10G6 cells fed-batch cultures in serum-free medium.

3 讨论

HBV包膜蛋白的前S部分具有更强的免疫原性,可使血源性乙肝疫苗和S蛋白基因工程乙肝疫苗无应答者产生抗体,不仅可用于乙肝的预防,还能在慢性乙肝治疗中发挥作用^[13-14]。含前S蛋白的重组乙型肝炎疫苗是第3代乙肝疫苗研发的重点,有望替代现在广泛使用的基因工程疫苗^[15]。

由于蛋白质抗原不是通过完整的分子发挥作用的,单个或多个抗原表位可排除无关氨基酸的影响,更有利于病毒抗原表位在抗原提呈细胞内的加工,能诱导比完整蛋白质抗原更强的免疫应答。preS1的21~47位氨基酸序列中存在比S更强的B细胞和T细胞抗原表位,将preS1抗原表位与S蛋白融合,不仅能提高机体的体液免疫水平,还能通过诱导细胞免疫应答,克服部分人群接种现有乙肝疫苗不应答或低应答的缺陷^[16-17]。田淑芳等通过电镜观察,发现CHO细胞分泌的S抗原和preS1抗原表位(21~47位氨基酸)融合蛋白能够组装成22 nm的颗粒,说明preS1抗原表位并不影响颗粒的形成,并且通过小鼠免疫原性实验证实这种融合蛋白能够诱导更强更早的免疫保护作用^[12]。

与酵母细胞表达系统相比,采用CHO细胞表达系统生产的乙肝疫苗具有糖基化完全、抗原决定簇与天然抗原相似、免疫原性高和免疫力持久的优点^[18-19]。外源蛋白在CHO细胞中的表达水平一般由载体在染色体上的整合位置、启动子强度、转录产物的稳定性、mRNA的翻译效率、目的蛋白的折叠效率以及目的蛋白的稳定性等因素决定的^[20-21]。本研究采用转录水平调控为主、转录后调控为辅的表达载体设计思想,将

S/preS1基因插入含有克服位置效应、细胞内源性启动子及mRNA运输和稳定性调控元件的真核细胞表达载体,从转录和转录后水平调控S/preS1的表达,在CHO细胞中实现了S/preS1的稳定高效表达。此外,10G6细胞表达产物的Western blotting分析表明所表达的S/preS1同时保留S和preS1的天然免疫原性,由此证实了S/preS1分子构建的合理性及其作为新型乙肝疫苗的可行性。

细胞系表达外源目的基因的效率、体外培养的生物性状及其高效培养工艺技术,对细胞表达产品的生产能力和质量起着决定性的影响^[22-23]。10G6细胞在无血清批次培养中的活细胞密度能够达到 4×10^6 cells/mL且其活力维持在90%以上,反映其具备良好的体外培养生物学性状。CHO细胞表达重组乙肝疫苗预防接种的使用剂量为10~20 μ g/剂^[24]。10G6细胞在无血清流加培养中明显提升的活细胞密度和S/preS1表达水平,表明10G6细胞及其无血清培养工艺均能满足乙肝疫苗产业化生产的要求。

REFERENCES

- [1] Assar S, Arababadi MK, Ahmadabadi BN, et al. Occult hepatitis B virus (HBV) infection: a global challenge for medicine. *Clin Lab*, 2012, 58(11/12): 1225-1230.
- [2] Franco E, Bagnato B, Marino MG, et al. Epidemiology and prevention in developing countries. *World J Hepatol*, 2012, 4(3): 74-80.
- [3] Zanetti AR, Van Damme P, Shouval D. The global impact of vaccination against hepatitis B: a historical overview. *Vaccine*, 2008, 26(49): 6266-6273.
- [4] Van Damme P, Zanetti AR, Shouval D, et al. Strategies for global prevention of hepatitis B virus infection. *Adv Exp Med Biol*, 2010, 659: 175-188.
- [5] Romano' L, Paladini S, Van Damme P, et al. The worldwide impact of vaccination on the control and

- protection of viral hepatitis B. *Dig Liver Dis*, 2011, 43(Suppl 1): S2–7.
- [6] Luo ZB, Li LJ, Ruan B. Impact of the implementation of a vaccination strategy on hepatitis B virus infections in China over a 20-year period. *Int J of Infect Dis*, 2012, 16: e82–e88.
- [7] Li HM, Liang ZL, Zhang HY. The appraisal of immunogenicity in hepatitis B vaccine. *Chin J Epidemiol*, 2004, 25: 378–381 (in Chinese).
李河民, 梁争论, 张华远. 关于乙型肝炎疫苗免疫原性的评价. *中华流行病学杂志*, 2004, 25: 378–381.
- [8] Rendi-Wagner P, Shouval D, Genton B, et al. Comparative immunogenicity of PreS/S hepatitis B vaccine in non- and low responders to conventional vaccine. *Vaccine*, 2006, 24: 2781–2789.
- [9] Milich DR, Thornton GB, Neurath AR, et al. Enhanced immunogenicity of the pre-S region of hepatitis B surface antigen. *Science*, 1985, 228(4704): 1195–1199.
- [10] Maeng CY, Ryu CJ, Gripon P, et al. Fine mapping of virus-neutralizing epitopes on hepatitis B virus preS1. *Virology*, 2000, 270: 9–16.
- [11] Dong XL, Jin LJ, Wang LC. Application status of the worldwide Chinese hamster ovary cell recombinant hepatitis B vaccine. *Chin J Vaccines Immun*, 2006, 12(2): 143–147 (in Chinese).
董雪林, 金立杰, 王立成. 国内外重组乙型肝炎疫苗 (中国仓鼠卵母细胞) 应用现状. *中国计划免疫*, 2006, 12(2): 143–147.
- [12] Tian SF, Zong F, Chen H, et al. The physicochemical and biological properties of SS1 fusion antigen of HbsAg secreted by mammalian cells. *Chin J Virol*, 2002, 18(4): 312–316 (in Chinese).
田淑芳, 宗芳, 陈红, 等. 哺乳动物细胞分泌的乙型肝炎病毒表面 S+ PreS1 融合抗原的理化 and 生物学性状. *病毒学报*, 2002, 18(4): 312–316.
- [13] Hoa PT, Huy NT, Thu le T, et al. Randomized controlled study investigating viral suppression and serological response following pre-S1/pre-S2/S vaccine therapy combined with lamivudine treatment in HBeAg-positive patients with chronic hepatitis B. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(12): 5134–5140.
- [14] Ge G, Wang S, Han Y, et al. Removing N-terminal sequences in pre-S1 domain enhanced antibody and B-cell responses by an HBV large surface antigen DNA vaccine. *PLoS ONE*, 2012, 7(7): e41573.
- [15] Chang XY, Lan X, Bai YM, et al. Progress in hepatitis B vaccine. *Lett Biotechnol*, 2011, 7: 22–24 (in Chinese).
常晓依, 兰喜, 白银梅, 等. 乙肝疫苗的研究进展. *生物技术通讯*, 2011, 7: 22–24.
- [16] Holzer GW, Mayrhofer J, Leitner J, et al. Overexpression of hepatitis B virus surface antigens including the PreS1 region in a serum-free Chinese hamster ovary cell line. *Protein Expr Purif*, 2003, 29(1): 58–69.
- [17] Hellström UB, Madalinski K, Sylvan SPE. PreS1 epitope recognition in newborns after vaccination with the third-generation Sci-B-Vac™ vaccine and their relation to the antibody response to hepatitis B surface antigen. *Virology*, 2009, 6: 7.
- [18] Raz R, Dagan R, Gallil A, et al. Safety and immunogenicity of a novel mammalian cell derived recombinant hepatitis B vaccine containing Pre-S1 and Pre-S2 antigens in children. *Vaccine*, 1996, 14(3): 207–211.
- [19] Chen SZ, Gao JH. The type, immunogenicity and security of hepatitis B vaccine. *World Chin J Digestol*, 2006, 14(27): 2696–2700 (in Chinese).
陈仕珠, 高建宏. 乙肝病毒疫苗的类型及其免疫原性和安全性. *世界华人消化杂志*, 2006, 14(27): 2696–2700.
- [20] Li SC, Hang PT, Chen ZL. New technology of Chinese hamster ovary cells expression system. *Lett Biotechnol*, 2009, 20(3): 422–425 (in Chinese).
李世崇, 黄培堂, 陈昭烈. 中国仓鼠卵巢细胞表达新技术. *生物技术通讯*, 2009, 20(3): 422–425.
- [21] Barnes LM, Dickson AJ. Mammalian cell factories for efficient and stable protein expression. *Curr Opin Biotechnol*, 2006, 17: 381–386.
- [22] Dingermann T. Recombinant therapeutic proteins: production platforms and challenges. *Biotechnol J*, 2008, 3(1): 90–97.
- [23] Bulter M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 68(3): 283–291.
- [24] Fan XY, Kong DQ, Zhang MJ. Recombinant hepatitis B (CHO-derived) surface antigen vaccine and its immune effects. *Chin J Vaccines Immun*, 2005, 11(3): 234–237 (in Chinese).
范秀媛, 孔德清, 张茂金. 重组乙型肝炎疫苗 (CHO细胞) 及其应用. *中国计划免疫*, 2005, 11(3): 234–237.

(本文责编 郝丽芳)