

PEG 沉淀结合层析分离重组乙肝病毒表面抗原

张焱¹, 闭静秀¹, 周卫斌¹, 李岩¹, 董爱华², 孙娟^{1,3}, 苏志国¹

(1. 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;

2. 华北制药集团新药中心, 河北 石家庄 050015; 3. 北京科技大学土木与环境学院, 北京 100083)

摘要: 应用聚乙二醇(PEG)沉淀结合层析技术纯化乙肝病毒表面抗原(HBsAg), 对 PEG 浓度、pH 值、离子强度等影响 PEG 沉淀的因素进行了正交实验研究. 结果表明, 浓度为 0.12 g/mL 的 PEG6000 在 4℃, pH 9.0 条件下沉淀 HBsAg 纯化效果比较理想, 纯化倍数达 3.7, 回收率 96.8%, 有效地去除了生物大分子杂质和牛血清白蛋白(BSA), PEG 在后续的凝胶过滤中可以除去, 整个工艺的回收率可提高到 41%.

关键词: 重组乙肝病毒表面抗原; PEG 沉淀; 分离纯化; 层析技术

中图分类号: Q819 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2006)01-0100-04

1 前言

1991 年, 中国预防医学科学院采用中国仓鼠卵巢细胞(Chinese Hamster Ovary, CHO)表达乙肝表面抗原(Hepatitis B Surface Antigen, HBsAg)获得成功, CHO 细胞培养上清液(Cell Culture Supernatant, CCS)经过疏水层析(HIC)、离子交换层析(IEC)和凝胶过滤(GFC)后可以得到 HBsAg 纯品^[1]. 经 HIC 分离后的样品中仍含有少量 DNA、牛血清白蛋白(BSA)及免疫球蛋白(IgG)的聚集体等生物大分子杂质, 它们的分子量与 HBsAg 接近, 难以去除. 采用离子交换层析和凝胶过滤层析分离效果较好, 但二者的单步回收率偏低(分别为 50%和 60%左右), 导致总活性回收率不到 20%, 成为整个纯化工艺的瓶颈. 应用 PEG 沉淀(PEG Precipitation, PP)替代离子交换层析是解决该问题的一种有益尝试. 在 PEG 沉淀病毒颗粒的相关报道中, 多数工艺都是将 PEG 沉淀用于浓缩样品或结合差速离心及密度梯度离心技术分离样品^[2-4], 分离效果不显著. Hagen 等^[5]报道了 PEG 沉淀结合层析技术分离甲肝病毒颗粒, 但工艺中使用昂贵的核酸酶去除核酸, 成本较高, 并存在安全隐患.

本研究将 PEG 沉淀结合层析技术应用于 HBsAg 颗粒的分离纯化, 通过优化 PEG 沉淀的实验条件, 如 PEG 浓度、pH 值、离子强度等, 选择性沉淀 HBsAg, 去除 HIC 分离后样品残留的 BSA 和生物大分子杂质(如 DNA, IgG 聚集体等), 提高了 HBsAg 的活性回收率, PEG 在最终 HBsAg 样品中的残留达到了国家质检要求.

2 材料与方法

2.1 仪器与材料

酶标仪 550 和 Mini-PROTEIN[®]II 电泳仪(美国

Bio-Rad 公司), 3K30 离心机(美国 Sigma 公司), BioPilot System 层析设备(美国 GE Healthcare 公司), 分析型高效液相系统(美国 Agilent 公司), 层析柱(上海锦华层析设备厂), TSK G5000 PW 分析柱(7.8 mm×300 mm, 德国 Tosohaas 公司).

CCS 和纯度为 98%以上的 HBsAg 纯品(华北制药集团), BSA(德国 Roche 公司), PEG6000(天津天泰精细化学品有限公司), HBsAg 立可读检测试剂盒(上海科华公司), SDS-PAGE 电泳的标准蛋白 marker(美国 GE Healthcare 公司), 疏水层析介质 Butyl-S Sepharose 6FF、离子交换层析介质 DEAE Sepharose FF 和凝胶过滤层析介质 Sepharose 4 FF(美国 GE Healthcare 公司).

2.2 方法

2.2.1 疏水层析

取适量 CCS, 加入(NH₄)₂SO₄ 粉末至其终浓度为 80 g/L, 用 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至 7.0, 0.45 μm 微滤膜过滤. 用 5 个柱床体积的 20 mmol/L PB+80 g/L (NH₄)₂SO₄ (pH 7.0)的缓冲溶液平衡疏水层析柱(50 mm×75 mm). 取适当体积的料液上柱, 监测 280 nm 波长下紫外吸收值. 继续平衡层析柱洗脱未结合杂质后, 用 20 mmol/L PB (pH 7.0)的缓冲溶液洗脱 HBsAg, 收集洗脱峰组分, 作为 PEG 沉淀的样品, 4℃下保存备用. 用 2 个柱床体积的 20 mmol/L PB+30%异丙醇(pH 7.0)和 4 个柱床体积的去离子水洗柱再生. 整个层析过程流速为 5.0 mL/min.

2.2.2 PEG 沉淀

取适量疏水层析目的蛋白峰收集液, 用 1 mol/L NaOH 调节 pH 至所需值, 加入适量 NaCl 调节离子强度, 搅拌条件下滴加 0.5 g/mL PEG6000 溶液至所需浓度,

收稿日期: 2005-04-05, 修回日期: 2005-05-30

基金项目: 国家 863 计划资助项目(编号: 2002AA217031)

作者简介: 张焱(1979-), 男, 江苏省连云港市人, 硕士研究生, 生物化工专业; 苏志国, 通讯联系人, Tel: 010-62561817, E-mail: zgsu@home.ipe.ac.cn.

4℃下静置 2 h, 4℃下 10000 g 离心 30 min, 弃上清液, 用适当体积的 20 mmol/L PB 溶解沉淀, 于 4℃下 4000 g 再次离心 30 min, 收集第 2 次离心上清液。

2.2.3 离子交换层析

用 20 mmol/L PB (pH 7.0)平衡层析柱(50 mm×75 mm), 监测 280 nm 波长下紫外吸收值。取适量疏水样品上柱, 用 20 mmol/L PB+0.12 mol/L NaCl (pH 7.0)的缓冲溶液洗脱, 收集紫外吸收峰对应的洗脱液, 再依次用 20 mmol/L PB+0.5 mol/L NaCl (pH 7.0)的缓冲溶液和去离子水洗柱再生层析柱, 流速 5 mL/min。

2.2.4 凝胶过滤

用 2 个柱床体积的 20 mmol/L PB+0.9% NaCl 的缓冲溶液平衡层析柱(26 mm×800 mm), 280 nm 波长下监测紫外吸收值, 取适量 PEG 沉淀样品或离子交换层析样品上柱, 用 PBS 继续洗脱, 收集紫外吸收峰对应的洗脱液, 流速 0.8 mL/min。

2.2.5 HBsAg 活性检测

HBsAg 含量通过 HBsAg 立可读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 的标准曲线计算样品中 HBsAg 含量。

2.2.6 蛋白质浓度检测

总蛋白浓度采用改良的 Bradford 法^[6]测定, 根据标准品 BSA 的标准曲线计算样品中总蛋白质含量。

2.2.7 PEG 浓度检测

按照《中华人民共和国药典》中检测 PEG 含量的方法^[7]进行测定。

2.2.8 SDS-PAGE 电泳检测

按照 Laemmli 方法^[8]进行, 分离胶浓度为 15%, 银染法显色。

2.2.9 SEC-HPLC 高效液相检测

高效色谱柱为 TSK G5000 PW, 流动相为 50 mmol/L PB (pH 6.8), 流速 0.5 mL/min。

3 实验结果

3.1 PEG 沉淀 HBsAg 的理论探讨

疏水层析样品中分别加入 PEG 至其终浓度为 0.02, 0.04, 0.08 和 0.12 g/mL, 调 pH 至 9.0, 再加入 NaCl 至其终浓度为 0.2 mol/L, 进行 PEG 沉淀, 然后测定上清液和沉淀重悬液中的 HBsAg 含量和总蛋白含量, 用 PEG 沉淀蛋白质的方程^[9]模拟 HBsAg 和主要杂蛋白 BSA(>90%)的沉淀行为。PEG 沉淀蛋白质方程式为

$$\lg S + f_s = \beta - \alpha C,$$

式中, S 为蛋白质溶解度(mg/mL), C 为 PEG 浓度(g/mL), f_s 为溶液中蛋白质自身相互作用摩擦系数, β , α 在一定

pH 值下为常数, 其中 α 受蛋白质分子量的影响。

将不同 PEG 浓度下测定的 HBsAg 浓度和总蛋白(主要是 BSA)浓度代入上式, 以 $\lg S$ 为纵坐标, C 为横坐标, 作图 1, 线性回归求得斜率和截距, HBsAg 和 BSA 的沉淀方程分别为 $\lg S_{\text{HBsAg}} = -4.9162 - 10.496C_{\text{PEG}}$ 和 $\lg S_{\text{BSA}} = -0.4711 - 2.0529C_{\text{PEG}}$ 。

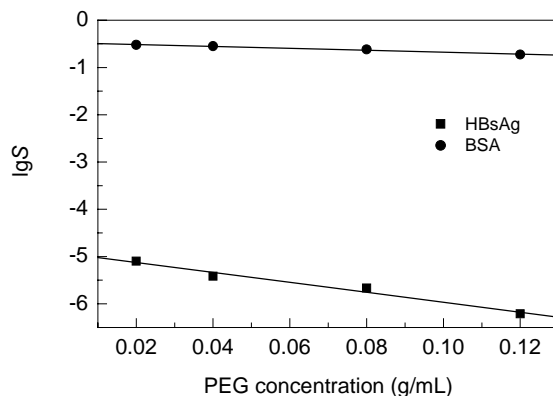


图 1 PEG 浓度与 HBsAg, BSA 溶解度的关系
Fig.1 Relationship of solubility of HBsAg or BSA with PEG concentration

由沉淀方程式可知, S 与 C 负相关, 方程中 α_{HBsAg} 远大于 α_{BSA} , 说明在一定 PEG 浓度下, 分子量大的 HBsAg 的溶解度远低于分子量小的 BSA, 易被沉淀。因此有可能选择一个合适的 PEG 浓度, 使 HBsAg 完全沉淀, 尽量减少 BSA 共沉淀, 达到分离目的。

3.2 PEG 沉淀的正交实验条件优化

为优化 PEG 沉淀操作, 通过正交实验考察 pH 值(A)、离子强度(B)、PEG 浓度(C)及 PEG 分子量(D)对 HBsAg 回收率 R 和纯化倍数 P 的影响。采用 $L_{16}(4^3 \times 2^6)$ 正交表, 通过四因素混合水平确定最佳分离条件(表 1)。实验结果表明(表 2), R 和 P 在 C 中的极差(E)最大, 在 A, B, D 中的极差较小, 说明 PEG 浓度对沉淀 HBsAg 的回收率和纯化倍数影响最大, pH、离子强度和 PEG 分子量的影响不大。

表 1 因素与水平

Level	A, pH	B, NaCl conc. (mol/L)	C, PEG conc. (g/mL)	D, PEG molecular weight
1	6.0	0.2	0.02	6000
2	7.0	0.4	0.04	
3	8.0	0.8	0.08	10000
4	9.0	1.0	0.12	

通过极差分析方法评估正交实验结果, 实验 16 是较理想的分离方案, 其分离条件为: pH 9.0, NaCl 浓度 0.2 mol/L, PEG6000 浓度 0.12 g/mL。在此实验条件下, HBsAg 回收率为 96.8%, 纯化倍数为 3.7。

表 2 $L_{16}(4^3 \times 2^6)$ 正交实验设计与结果
Table 2 Designs and results of $L_{16}(4^3 \times 2^6)$ orthogonal experiments

No.	A	B	C	D	R_i (%)	P_i				
1	1	1	1	1	7.0	14.0				
2	1	2	2	1	8.8	1.3				
3	1	3	3	2	54.0	2.1				
4	1	4	4	2	110.8	2.7				
5	2	2	1	2	7.2	18.0				
6	2	1	2	2	11.0	3.6				
7	2	4	3	1	35.0	1.0				
8	2	3	4	1	112.9	3.0				
9	3	3	1	2	6.9	69.0				
10	3	4	2	2	8.3	4.2				
11	3	1	3	1	59.9	2.8				
12	3	2	4	1	108.7	2.9				
13	4	4	1	1	7.5	6.8				
14	4	3	2	1	11.8	9.1				
15	4	2	3	2	42.7	2.9				
16	4	1	4	2	96.8	3.7				
	ΣR	ΣP	ΣR	ΣP	ΣR	ΣP	ΣR	ΣP	SUM R_i	SUM P_i
$K_1^{1)}$	180.6	20.1	174.7	24.1	28.6	107.8	351.6	40.8		
K_2	166.1	25.5	167.4	25.1	39.9	18.1	337.7	106.1		
K_3	183.8	78.8	185.6	83.2	191.6	8.8				
K_4	158.8	22.5	161.6	14.7	429.2	12.3			689.3	146.9
$E^{2)}$	25.0	58.7	24.0	68.5	400.6	99.0	13.9	65.3		

Note: 1) K_i is the sum of experimental results (R or P) at level i ; 2) $E=K_{i,max}-K_{i,min}$.

3.3 PEG 沉淀样品分析

实验分别采用 SDS-PAGE 和 HPLC 方法对 PEG 沉淀前后的样品进行纯度分析, 图 2 为 SDS-PAGE 结果, 沉淀前样品中除含有 HBsAg 单体(24 kDa)和二聚体(48 kDa)外, 还存在 BSA(68 kDa)及分子量更大的杂质. 经 PEG 沉淀第 1 次离心后, 这些杂蛋白大部分被去除.

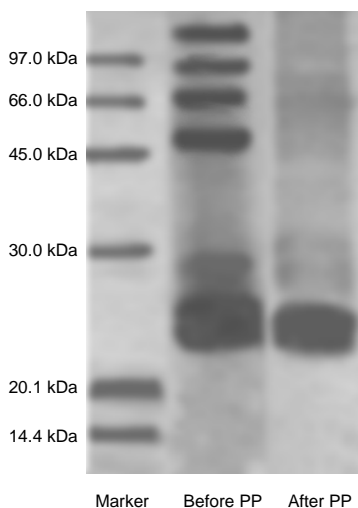


图 2 PEG 沉淀前后样品电泳图

Fig.2 SDS-PAGE profiles of samples before and after PP

图 3 为 HPLC 分析结果, 可知 PEG 沉淀第 2 次离心的主要作用是去除生物大分子杂质(保留时间为 12.5 min, 表明其分子量大于保留时间为 17.2 min 的 HBsAg). 因此, PEG 沉淀 2 次离心分别可除去小分子和大分子杂质, 最终所得样品纯度较高.

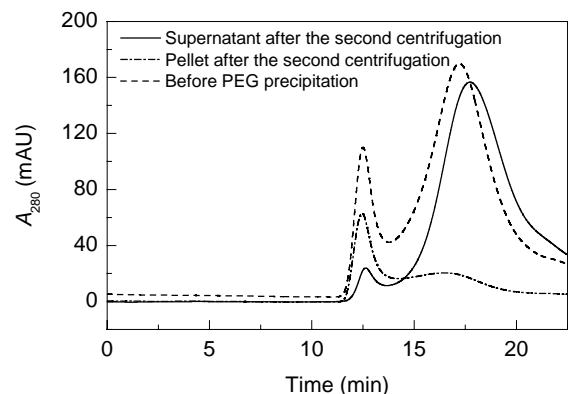


图 3 PEG 沉淀样品的 HPLC 谱图

Fig.3 HPLC assay profiles of PEG precipitation

3.4 终产品纯度检测

对 PEG 沉淀结合层析与传统层析工艺作了对比(表 3), 新工艺中 HIC 与 GFC 层析条件均与传统层析工艺相同, 新工艺 PEG 沉淀的单步 HBsAg 回收率高达 90% 以上, 远高于原工艺中离子交换层析单步 HBsAg 回收率(<50%), 将 HBsAg 纯化总回收率提高到了 41%, 但纯化倍数有所降低. 传统层析工艺中各步的 HBsAg 回收率与纯化倍数与文献报道值^[1]相近.

表 3 两种工艺纯化 HBsAg 结果对比

	Traditional process		Integration process	
	R (%)	P	R (%)	P
HIC	78	51.1	71	53.0
IEC	48	7.5	91	3.6
GFC	60	2.0	63	2.5
Total	22	766.5	41	477.0

对 PEG 沉淀结合疏水和凝胶过滤层析工艺的终产品用 HPLC 检测纯度, 如图 4 所示. 终产品为单峰, 纯度为 95%, 达到了药典对 CHO-HBsAg 纯度的要求^[10].

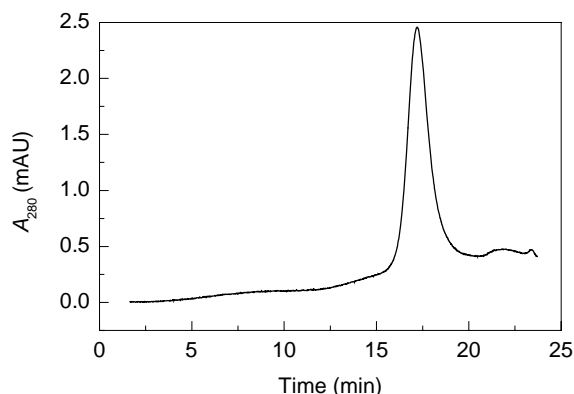


图 4 终产品的 SEC-HPLC 谱图
Fig.4 HPLC assay profile of final product

检测 PEG 沉淀样品和经过凝胶过滤样品的 PEG 含量, 表明 PEG 沉淀重悬液中 PEG 含量由沉淀前的 0.12 g/mL 降低到 0.005 g/mL, 进一步经过凝胶过滤层析后, 终产品中 PEG 含量低于国家规定的 PEG 检测下限^[7].

4 讨论

疏水层析分离后的样品中主要杂质为 BSA 等小分子和一些比 HBsAg 分子量更大的生物大分子(如核酸、IgG 聚集体等). 超滤可以去除小分子杂质, 但对去除分子量超过 HBsAg 的生物大分子杂质则无能为力. 离子交换层析的分离机理是利用蛋白表面的电荷差异来达到分离的目的, 可以很好地去除 BSA 和生物大分子杂质, 但 HBsAg 是由 100 多个单体组成的多聚亚基蛋白质, 分子量大于 2000 kDa, 抗原的生物活性与单体的组装方式密切相关, HBsAg 与离子交换介质易发生多位点吸附, 在洗脱过程中容易发生亚基解离, 导致生物活性的降低或丧失, 所以离子交换层析的回收率较低, 一般为 50%左右. 根据 PEG 沉淀方程, α 与蛋白质分子量有

关, 据此可以将 HBsAg 和与其分子量差异较大的 BSA、生物大分子杂质等分离开. SDS-PAGE 和 HPLC 的分析结果说明了 PEG 沉淀 2 次离心的作用, 第 1 次可以将 HBsAg 及生物大分子杂质沉淀下来, 而小分子量的 BSA 溶解度较大保留在上清液中被去除; 沉淀物重悬后, PEG 浓度较低, HBsAg 溶解, 而分子量更大的生物大分子杂质沉淀, 通过第 2 次离心去除.

5 结论

(1) PEG 沉淀可以有效地去除疏水层析样品中残留的 BSA 和生物大分子杂质.

(2) PEG 沉淀结合疏水和凝胶过滤层析可以将 HBsAg 回收率提高到 41%, 产品纯度检测达到中国药典标准, 残留的 PEG 在后续的凝胶过滤中可以被除去.

参考文献:

- [1] Belew M, Mei Y F, Li B, et al. Purification of Recombinant Hepatitis B Surface Antigen Produced by Transformed Chinese Hamster Ovary (CHO) Cell Line Grown in Culture [J]. *Bioseparation*, 1991, 1: 397-408.
- [2] 冀玲, 常平, 郭润霞, 等. 毛蚶中肠道病毒的浓缩方法 [J]. *卫生研究*, 1995, 24(1): 22-23.
- [3] 张文清, 马文煜, 骆文静, 等. PEG6000 沉淀结合差速离心方法浓缩水中脊髓灰质炎病毒 [J]. *第四军医大学学报*, 2000, 21(1): 38-40.
- [4] 王春奕, 马军武, 伏小平, 等. 口蹄疫病毒的纯化及鉴定 [J]. *中国兽医科技*, 2004, 24(7): 66-69.
- [5] Hagen A J, Oliver C N, Sitrin R D. Optimization of Poly (ethylene glycol) Precipitation of Hepatitis A Virus Used to Prepare VAQTA, a Highly Purified Inactivated Vaccine [J]. *Biotechnol. Prog.*, 1996, 12(3): 406-412.
- [6] 路阳, 王贤舜. 考马斯亮蓝 G-250 迅速、灵敏地测定蛋白质浓度 [J]. *生物学杂志*, 1992, (1): 24-25.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典, 三部 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005. 附录 32.
- [8] Laemmli U K. Cleavage of Structural Protein during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227(259): 680-685.
- [9] 何忠效, 静国志, 许佐良, 等. 现代生物技术概论 [M]. 北京: 北京师范大学出版社, 1999. 153-154.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典, 三部 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005. 118.

Purification of Recombinant Hepatitis B Virus Surface Antigen with PEG Precipitation and Chromatography

ZHANG Yan¹, BI Jing-xiu¹, ZHOU Wei-bin¹, LI Yan¹, DONG Ai-hua², SUN Juan^{1,3}, SU Zhi-guo¹

(1. State Key Lab. Biochem. Eng., Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;

2. North China Pharmaceutical Group Corporation, New Drug Research Centre, Shijiazhuang, Hebei 050015, China;

3. School of Civil and Environment Engineering, Beijing University of Science and Technology, Beijing 100083, China)

Abstract: Chromatography integration is being widely used in the purification of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) expressed by recombinant Chinese hamster ovary cell line. The low final product recovery rate limits manufactory production and HBsAg vaccine application. Polyethylene glycol (PEG) precipitation is applied to improve HBsAg yield. The effects of PEG concentration, pH value and ionic intensity on PEG precipitation were investigated by orthogonal design of the experiments. Under the optimized conditions of 0.12 g/mL PEG6000, 4 °C, pH 9.0, the recovery rate of HBsAg was up to 96.8% while the purification factor was 3.7. Furthermore, the macromolecular impurity and bovine serum albumin were effectively removed by PEG precipitation. The total recovery rate of HBsAg was improved to 41% and PEG could be removed by gel filtration chromatography in the final product.

Key words: recombinant hepatitis B virus surface antigen; PEG precipitation; purification; chromatography