

聚乙二醇伴随式离子交换层析分离重组乙肝病毒表面抗原 Polyethylene Glycol-accompanied Ion-exchange Chromatography to Purify Recombinant Hepatitis B Virus Surface Antigen

闭静秀¹, 周卫斌¹, 李 岩¹, 黄永东¹, 张 焱¹, 董爱华², 苏志国^{1*}

BI Jing-Xiu¹, ZHOU Wei-Bin¹, LI Yan¹, HUANG Yong-Dong¹, ZHANG Yan¹, DONG Ai-Hua² and
SU Zhi-Guo^{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, 石家庄 050000

1. National Laboratory of Biochemical Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China

2. North China Pharmaceutical Group Corporation, Shijiazhuang 050000, China

摘 要 针对由中国仓鼠卵巢细胞(CHO)表达的多聚亚基蛋白 HBsAg 在离子交换层析过程中容易因亚基解离而导致蛋白解聚和丧失生物活性的难题, 实验中选择聚乙二醇(PEG)作为保护剂伴随式(Polyethylene Glycol-Accompanied)离子交换层析分离纯化 HBsAg。实验表明, 在流动相中加入 1% PEG10000 (W/V) 作为纯化伴侣, HBsAg 的回收率由 55% 左右提高到 80% 以上, 纯化倍数基本保持在 12 左右。对纯化产物进行 SDS-PAGE 分析表明, 1% PEG10000 的纯化伴侣伴随式离子交换层析能全部保留 HBsAg 的糖基化蛋白单体(27kD 和 30kD)。高效液相色谱联用多角度激光散射(High Performance Size Exclusion Chromatography-Multiangle Laser Light Scattering, HPSEC-MALLS)进一步分析阐明了 PEG 能促使 HBsAg 颗粒尺寸分布更均一, 结构更接近天然乙肝表面抗原。

关键词 纯化伴侣, 聚乙二醇, 乙肝表面抗原, 离子交换层析

中图分类号 R374.2 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)06-0947-07

Abstract The dissociation of virus-like particles of Hepatitis B surface antigen (HBsAg) during the adsorption-desorption on the solid-phase of chromatography is a main challenge for its purification. Herein, poly(ethylene glycol) (PEG) was applied as an additive during the purification of HBsAg from recombinant Chinese hamster ovary (CHO) cell culture to improve the HBsAg recovery and protect its structural assembly. The presence of 1% of PEG10000 in the mobile phase of ion-exchange chromatography (IEC) of DEAE-Sepharose FF column could increase the recovery of HBsAg from about 55% to 80%, with a similar purification(-fold) (about 12) compared with the absence of PEG. Importantly, glycosylated protein forms of HBsAg were reserved well by PEG-accompanied chromatography. Furthermore, size exclusion chromatography-multiangle laser light scattering (SEC-MALLS) analysis was performed on line to monitor the aggregates, particle size and molecular weight distribution of HBsAg. The results demonstrated that the HBsAg particle size and assembly are more homogenous after adding PEG in the mobile

Received: July 9, 2005; Accepted: August 18, 2005.

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

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

国家高技术研究与发展计划(863计划)基金资助项目(No. 2002AA217031).

phase of IEC than no PEG added in the mobile phase.

Key words recombinant Hepatitis B surface antigen (rHBsAg), purification chaperon , ion-exchange chromatography , poly (ethylene glycol) (PEG)

我国的乙肝病毒感染者已达 1.3 亿 , 占全世界感染者的 1/3 左右 , 因此 , 自 20 世纪 90 年代起 , 对新生儿进行乙肝疫苗——乙肝表面抗原 (Hepatitis B Surface Antigen , HBsAg) 接种被列入 WHO 和我国的免疫接种计划。来源于血液的第一代 HBsAg 疫苗由于产量低、来源受限 , 尤其是存在传播 HIV 等血液传染病的潜在威胁而被 WHO 取缔^[1]。20 世纪 90 年代初 , 我国从美国 Merck 公司全套引进了酿酒酵母表达的乙肝疫苗生产线 , 逐步取代了原有的血源疫苗 , 但是酵母表达的乙型肝炎表面抗原没有糖基化 , 其在诱导体内免疫上不如动物细胞表达的糖基化 HBsAg , 突出表现为 5% ~ 10% 的接受者没有免疫应答^[2-4]。由我国预防医学科学院成功研制的中国仓鼠卵巢细胞 (CHO-C28) 表达的乙肝疫苗是有我国自主知识产权的产品^[5-7] , 已投入生产。但是 , 生产上采用的多步层析纯化工艺的活性回收率常常不到 20%。因此 , 如何通过下游分离纯化过程提高目的蛋白抗原的回收率 , 是生产安全、有效、低成本乙肝疫苗的关键所在。

从 CHO 细胞表达的 HBsAg 的分离纯化工艺由疏水相互作用 (Hydrophobic Interaction Chromatography , HIC) 离子交换层析 (Ion-Exchange Chromatography , IEC) 凝胶过滤 (Gel Filtration , GF) 层析集合而成^[8]。离子交换层析在一般基因工程蛋白的分离纯化中作用显著 , 不仅能有效分离目的蛋白和浓缩样品 , 单步活性回收率往往更能高达 90% 以上。但对于分子量超过 2000 kD 的 HBsAg 蛋白颗粒而言 , 在离子交换介质上的交换容量剧烈下降 , 更为严重的是 , HBsAg 属于多聚亚基蛋白 , 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、尤其是吸附-洗脱等过程常常造成亚基之间的解离和立体结构的变化 , 导致生物学活性丧失 , 致使 IEC 的单步回收率往往不到 60% , 是整个层析纯化工艺的瓶颈。如何在 IEC 纯化过程中保持 HBsAg 的结构稳定性和提高 HBsAg 的活性回收率是提高整个层析纯化工艺的关键。近年来亲水性多羟基化合物 (蔗糖、甘油、葡萄糖、海藻糖、聚乙二醇等) 作为稳定剂对蛋白质结构具有稳定作用。在理论上 , Timasheff 等人的优先水化理论 (Preferential hydration theory) 为应用

亲水性羟基化合物作为保护剂奠定了理论基础^[9]。该理论认为 , 羟基化合物在蛋白质水溶液中优先与水分子结合而不是与蛋白质结合 , 羟基化合物表面的水分子有序排列 , 使溶液的热力学性质改变 , 松散的蛋白质趋向于变紧凑 , 此作用有可能防止蛋白质变性。亲水性羟基化合物曾被应用于提高蛋白质在凝胶过滤层析、离子交换层析、Protein A 亲和层析等纯化步骤中蛋白之间的分离度^[10,11]。因此 , 在蛋白质分离纯化过程中亲水性羟基化合物可作为纯化伴侣 , 在伴随式分离纯化过程中提高纯化过程的分辨率和样品分离度。以前我们对基因工程细胞表达的人肿瘤坏死因子 (Human Tumor Necrosis Factor , hTNF , 三聚体) 血红蛋白分离的研究表明 , 在离子交换层析过程中加入亲水性羟基化合物 PEG 能稳定多聚亚基蛋白的生物结构和提高活性回收率^[12,13]。

本文通过选择聚乙二醇 (PEG) 添加到层析流动相中提高离子交换层析对 HBsAg 和杂蛋白的分离度 , 研究了 PEG 的分子量和浓度对 HBsAg、牛血清白蛋白 (BSA) 在 HBsAg 离子交换层析过程中保留时间和分离度的影响 , 非常重要的探索是利用分子排阻色谱联用多角度激光散射技术 (size exclusion chromatography-multiangle laser light scattering , SEC-MALLS) 在线监测 HBsAg 在纯化过程中的颗粒大小、均一性和分子量变化^[14,15] , 从而为探讨大分子、多聚亚基蛋白在层析过程的活性丧失机理和优化层析工艺打下基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验中选用的疏水层析介质 (Butyl-S Sepharose 6 FF) , 离子交换层析介质 (DEAE Sepharose FF) 均购自 GE Healthcare 公司 (美国) ; 牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin , BSA) 购自 Roche 公司 (德国) ; 作为标准品的色谱纯大于 98% 的乙肝表面抗原由华北制药集团提供 , 其它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) 。 HBsAg 活性测定采用乙型肝炎病毒表面抗原立可读诊断试剂盒 (上海科华实业) 。

ÄKTA Explorer 100 和 Bio-Pilot 层析系统购自 GE

Healthcare(美国)酶标仪(550型)和 Mini-PROTEIN® II 电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司;96 孔酶标板由 Corstar 公司提供;层析柱(20cm × 5.5cm I.D., 20cm × 1.6cm I.D.)购自上海锦华层析设备厂。

1.2 重组中国仓鼠卵巢细胞培养液的收集

2 × 10⁵ 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。

1.3 培养液中疏水层析粗分离 HBsAg

400mL 细胞培养上清(CCS)中加入硫酸铵至浓度为 8%(W/V),调节 pH 值为 7.0,通过 Bio-Pilot 层析系统将料液泵入 Butyl-S Sepharose 6FF 疏水层析柱(7.0cm × 5.5cm I.D.)进行粗分离。用缓冲液 A(20mmol/L PB + 8% (NH₄)₂SO₄, pH 7.0)平衡后,分别用缓冲液 B(20mmol/L PB, pH7.0)及缓冲液 C(30% 异丙醇)洗脱。紫外 280nm 检测,收集目标组分。收集的组分用超滤膜(MWCO 100kD, Millipore)脱盐后作为离子交换的样品。

1.4 离子交换层析和纯化伴侣聚乙二醇的添加

AKTA Explorer 100 系统连接 DEAE-Sepharose FF 离子交换介质层析柱(5cm × 1.6cm I.D., BV = 10mL),用起始缓冲液(Buffer A 20 mmol/L PB, pH 7.0)平衡,室温下进料,流速为 2mL/min,继续用起始缓冲液淋洗至基线后,依次用含 12%和 50% Buffer B(Buffer B: Buffer A + 1.0mol/L NaCl, pH7.0)的缓冲液洗脱两个柱体积,最后用 1.0mol/L NaOH 清洗和再生柱。在 280nm 下检测,分别收集穿透峰和洗脱峰组分。

考察 PEG 对离子交换层析影响的实验中,在流动相 A、B 中均加入一定浓度的 PEG,以同样条件不加 PEG 的流动相作对照。实验过程中,除进料流速为 2mL/min 外,其余均为 5mL/min,在波长 260 和 280nm 下监测紫外吸收变化。洗脱过程依次用含 15%和 50% 含 PEG 的 Buffer B 缓冲液洗脱。

1.5 HBsAg 活性和总蛋白的定量分析

通过 ELISA 法检测 HBsAg 活性蛋白含量,在双波长下(测定波长 450nm,参考波长 630nm)用酶标仪测定反应终止 OD 值,根据标准品 HBsAg 的标准曲线计算样品中的 HBsAg 含量。总蛋白的浓度采用 Bradford 法定定^[16]。

1.6 SDS-PAGE

采用还原 SDS-PAGE,样品缓冲液含 2% 巯基乙

醇。经样品缓冲液处理后的样品在 100℃ 下煮沸 10min,分离胶浓度为 15%,染色方法为银染法^[17]。

1.7 HPSEC-RI-MALLS

HPSEC-MALLS 为高效液相分子排阻色谱(HPSEC, Agilent 1100)多角度激光散射(Multi-Angle Laser Light Scattering Detector, MALLS)和示差检测器的联用系统(Wyatt Technology Inc. Santa Barbara, USA)。被测样品经过分子排阻色谱柱(TSK G5000 PW(300mm × 7.5mm), Tosohaas, Germany)后得到不同的洗脱峰(较低浓度),再经过多角度激光检测器检测,采用 Astra® 软件计算分子量。BSA 单体标品(Sigma)作为校正 MALLS 的标准蛋白。

2 结果与分析

2.1 离子交换层析分离 HBsAg 和 BSA

用于表达 HBsAg 的重组中国仓鼠卵巢细胞是由乙肝病毒 S 蛋白基因转化的工程细胞株,其表达 HBsAg 为胞外分泌。通过反应器培养收集后离心得到的细胞培养上清液(CCS),主要成分为 rCHO 胞外分泌产物 HBsAg、乳酸等代谢产物、培养基中添加的牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)、血清 IgG、培养基色素和小分子有机添加物等。根据 Belew 报道^[8],HBsAg 的疏水性大于 BSA,采用配基(丁基)密度较低的疏水介质 Butyl-S Sepharose 6FF 对 CCS 进行粗分离,BSA 直接流穿而 HBsAg 结合在疏水介质上可实现初步分离 HBsAg 和 BSA,实验证明, HIC 单步层析可有效去除 CCS 中 95% 以上的 BSA、培养基色素、小分子有机添加物、无机盐等, HBsAg 回收率达到 90% 以上(数据未给出),目的蛋

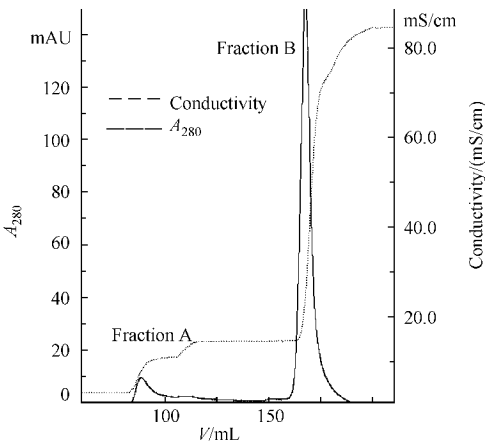


图 1 HIC 收集液的离子交换层析洗脱图谱

Fig. 1 IEC profile of the HIC eluate
The DEAE Sepharose FF column was eluted with 0.12 mol/L NaCl followed by 1.0 mol/L NaCl.

白 HBsAg 纯度为 5% 左右。HIC 收集液经过后续离子交换层析进行纯化,目的是去除残留的 DNA 和 BSA 是整个层析工艺的关键步骤,实验分别采用 0.12mol/L 和 0.5mol/L NaCl 的阶梯洗脱得到两个洗脱峰 A 和 B(图 1),测定这两个洗脱峰收集液的 HBsAg 和总蛋白含量,6 批重复实验得到的 A 和 B 峰 HBsAg 回收率和纯化倍数如表 1 所示。

表 1 采用 NaCl 阶梯洗脱的 6 批离子交换层析结果评估

Table 1 Recovery and purity of HBsAg in the fractions eluted from DEAE Sepharose FF column with 0.12 and 1.0 mol/L NaCl				
Series No.		HBsAg recovery/ %	Total protein recovery/ %	Purification (-fold)*
HIC-sample		100.0	100.0	1
No. 1	Fraction A	61.8 ± 5.5	5.23	11.8
	Fraction B	21.8 ± 8.1	89.5	0.24
No.2	Fraction A	55.3 ± 3.8	3.05	18.1
	Fraction B	33.0 ± 9.4	98.3	0.33
No.3	Fraction A	69.9 ± 2.5	8.42	8.3
	Fraction B	20.8 ± 5.8	87.0	0.35
No.4	Fraction A	61.9 ± 10.3	9.8	6.3
	Fraction B	26.4 ± 6.2	90.4	0.28
No.5	Fraction A	48.9 ± 5.2	4.25	11.5
	Fraction B	45.9 ± 6.0	94.1	0.48
No.6	Fraction A	53.9 ± 8.4	4.5	11.97
	Fraction B	35.9 ± 11.2	93.8	0.38

Note : 2800 ~ 3250mL CCS was applied in HIC
* Purification(-fold) is defined as the ratio of the specific bioactivity of HBsAg after purification to that before purification. The specific bioactivity of the active HBsAg is defined as the ratio of HBsAg determined by ELISA assay to the total proteins.

由于 HBsAg 和 BSA 的等电点分别是 4.7 和 4.8^[18,19],采用阴离子交换层析介质 DEAE-Sepharose FF 分离 HBsAg 和 BSA 时,在 pH 值大于等电点条件下 HBsAg 和 BSA 全部被吸附在 DEAE-Sepharose FF 介质中,根据被吸附强度不同,通过改变洗脱盐浓度将它们分别洗脱下来而达到分离的目的。图 1 和表 1 结果表明,由较低浓度的 NaCl(0.12mol/L)洗脱得到的 A 峰组分中含有进料前 50% ~ 70% 的 HBsAg 和少量杂蛋白,在较高浓度 NaCl 下(1.0mol/L)洗脱得到的 B 峰组分是与介质结合比较紧密的组分,主要是杂蛋白(占进料前样品总蛋白量的 90% 以上)和少量的 HBsAg(约占进料前 HBsAg 的 20% ~ 30%)。

离子交换层析流穿峰里没有检测到目标蛋白(结果未给出),而 A 和 B 峰收集的目标蛋白 HBsAg 总和约占进料前的 83% ~ 94%,表明多聚亚基蛋白

HBsAg 在离子交换吸附和解析过程中存在部分解聚和失活。HBsAg 的表面电荷和颗粒的不均一性,以及多聚亚基在离子交换层析介质上的解聚失活是离子交换层析纯化过程回收率偏低的主要因素。所以我们的研究思路是利用聚乙二醇作为纯化伴侣,保护多聚亚基蛋白的结构,同时改变 HBsAg 和 BSA 在离子交换层析的保留时间以达到提高二者分离度的目的。

2.2 聚乙二醇纯化伴侣提高 HBsAg 在 IEC 分离过程的回收率和生物活性

在 DEAE Sepharose FF(5cm × 1.6cm I. D.)阴离子交换柱中考察在原离子交换流动相(buffer A : 20mmol/L PB, pH 7.0; buffer B : buffer A + 1.0mol/L NaCl)中加入不同分子量(600,6000,10000)不同浓度的 PEG(0%,1.0%,4.0%)对 HBsAg 回收率的影响,结果如图 2 所示。在流动相中加入不同分子量的 PEG 对纯化效果影响差异很大,低分子量 PEG(600)对 HBsAg 的回收率影响甚微,而在流动相中加入高分子量 PEG(6000 或 10000)能明显提高 HBsAg 的单步回收率,其中 PEG10000 的效果相比 PEG6000 更为明显(由 55% 提高到 80% 左右)。当 PEG 10000 的浓度由 1% 提高到 4% 时,回收率基本维持在 80% 左右。与此同时,随着 PEG 浓度的增加,流动相的粘度增加显著,为减少粘度增加对离子交换层析洗脱效果的影响,建议采用离子交换层析的流动相中加入 1% 的 PEG10000。

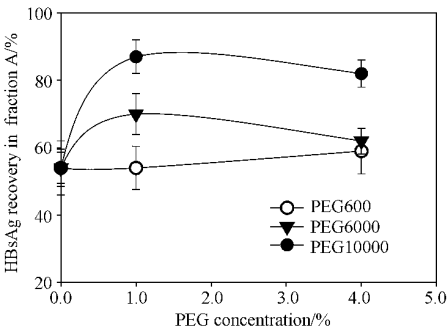


图 2 PEG 分子量和浓度对离子交换单步 HBsAg 回收率的影响

Fig. 2 Effect of PEG molecular weight and concentration on the HBsAg recovery from IEC
5mL (concentration : 5mg/mL) of desalted HIC fraction was loaded onto EAE-Sepharose FF column (5.0cm × 1.6cm I. D., BV = 10mL) at the flow rate of 150cm/h followed by the elution with 20mmol/L phosphate buffer added 1.0mol/L NaCl.

在相同条件下重复 5 批实验在 IEC 流动相中加入浓度为 0%、1% 的 PEG10000,分别考察纯化伴侣

对 HBsAg 回收率、纯化倍数和抗原活性的影响,结果如图 3 所示。离子交换的流动相中加入纯化伴侣 PEG10000,HBsAg 的回收率提高到 75% 左右,高于不加保护剂的对照(约 60%);同时,比较 IEC 单元操作的纯化倍数表明,流动相加入 PEG10000 条件下纯化倍数与无 PEG 伴随下层析的纯化倍数相当(约 11~13)。说明在 IEC 分离过程中,高分子量 PEG 在不改变 HBsAg 与杂蛋白的分离度前提下,避免多聚亚基蛋白 HBsAg 在洗脱过程的解聚和失活,提高单步回收率。

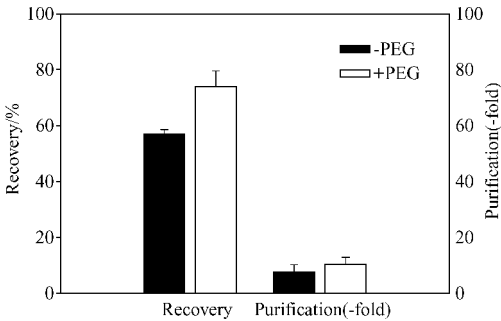


图 3 1% PEG10000 对 IEC 回收率和纯化倍数的影响

Fig. 3 Effect of 1% PEG10000 on rHBsAg recovery and purification-fold (PF) in the absence of PEG (black bar) and in the presence of PEG (grey bar) during IEC

2.3 离子交换分离组分的特性和结构分析

根据文献报道^[6],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 23kD、27kD 和 30kD,分别对应于 p23 (S 蛋白单体),gp27 和 gp30 蛋白(糖蛋白)。

实验将 IEC 分离过程的收集组分 A 和 B 进行 SDS-PAGE 电泳分析,结果如图 4 所示。无论在流动相中是否加入 PEG,A 峰组分的 SDS-PAGE 电泳均得到 6 条带(图 4,lane2 和 lane4),其中 5 条带分子量为 23kD、27kD、30kD、45kD 和 52kD,是 CHO 细胞表达的 HBsAg 多肽特异成分,依次是 S 蛋白的单体和两种糖基化形式及其二聚体,第 6 条带分子量为 67kD,为牛血清白蛋白。如果流动相中不加 PEG,B 峰组分的电泳结果与 A 峰基本相同(图 4,lane5,lane 4),而流动相中添加 PEG 的伴随式离子交换层析所得到的 B 峰组分中只有非糖蛋白(23kD)和杂蛋白白蛋白带(67kD)(图 4,lane3)。可见在流动相中添加的 PEG 在离子交换层析过程中使 rHBsAg 的糖基化蛋白表面电荷分布发生变化,洗脱时全部保留在洗脱的 A 峰中。与此相反,没有 PEG 伴随的层析过程中,部分 HBsAg 糖基化蛋白出现在高盐浓度的洗脱

峰(峰 B)中,而糖基化蛋白对提高抗原的免疫原性十分重要,因此,PEG 作为保护剂的伴随式离子交换层析所得到的 HBsAg 具有更高的蛋白抗原免疫原性。此外,由于 HBsAg 由其单体和二聚体依靠链间和链内二硫键和疏水键共同作用形成颗粒状,在 SDS-PAGE 电泳所采用的还原条件下链间二硫键不能完全打开,实验也表明了即使在更强烈的还原条件下(样品处理液含 65% β -巯基乙醇、1.3mol/L DTT、4% SDS)也不能将 HBsAg 完全解离成单体形式(数据未给出),这主要是因为 HBsAg 中还含有的脂类物质,影响了还原剂作用,因而在 SDS-PAGE 中有少量二聚体存在^[20]。

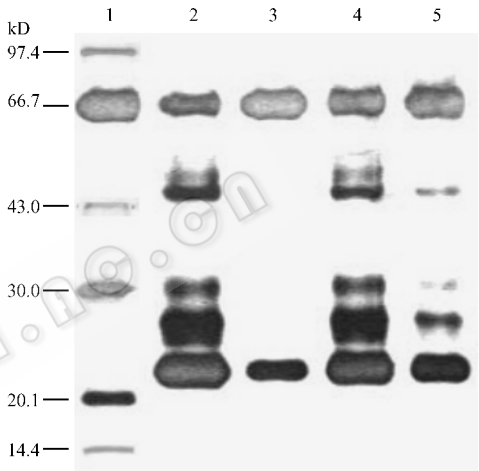


图 4 离子交换洗脱组分的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of HBsAg elution in the absence and presence of PEG in IEC mobile phase

About 5 μ g of total protein was loaded on each lane. lane 1: marker; lane 2: fraction A from IEC in the presence of PEG; lane 3: fraction B from IEC in the presence of PEG; lane 4: fraction A from IEC in the absence of PEG; lane 5: fraction B from IEC in the absence of PEG.

为检测 HBsAg 在离子交换层析过程中的结构变化情况,我们采用高效液相分子排阻色谱-多角度激光散射-示差联用(HPSEC-MALLS-RI)技术对离子交换层析纯化后组分 A 中的 rHBsAg 进行检测分析。HPSEC-MALLS-RI 联用技术已广泛应用于生物大分子的分子量和分子粒径测定^[14],其中,HPSEC 将待检测蛋白与其它杂质蛋白分离开,激光散射的信号强弱与蛋白质的浓度和分子量大小的乘积成正比;而示差检测器(RI)检测样品流经流动池的折光率变化,直接给出样品浓度信号,通过 ASTRA[®] 软件(Wyatt 公司,USA)分析层析前后的不同样品的光散射强度信号和示差信号即可得到分子量、示差和激光信号变化情况与相互关系,进而可得到分子结构和装配等方面的信息。由 HPSEC-MALLS-RI 联用分

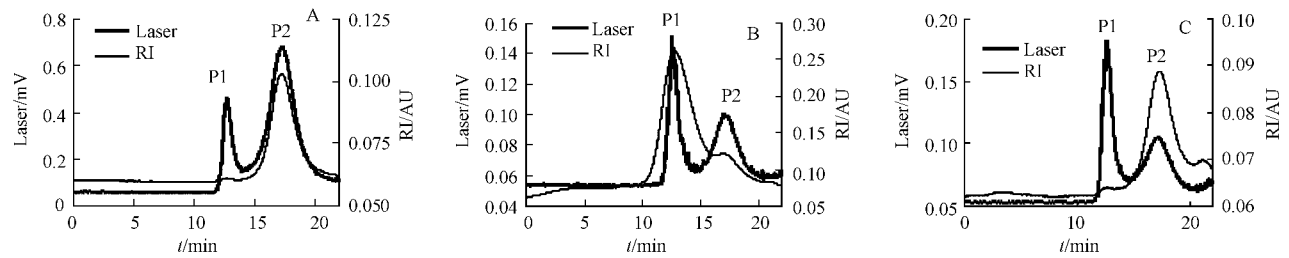


图 5 HPSEC-MALLS 联用分析离子交换层析 A 峰中 HBsAg 分子量尺寸分布

Fig. 5 HPSEC-MALLS analysis of HBsAg elution fraction from IEC in the absence (B) and presence (C) of PEG in IEC mobile phase compared with pure HBsAg (A)

100 μ L samples (about 10 times concentrated fraction A from IEC by ultrafiltration) were loaded onto the TSK G5000 PW (300mm \times 7.5mm, I. D.) with a flow of 0.5mL/min in PBS.

析 HBsAg 的图谱可知(图 5),无论流动相是否加入 PEG,组分 A 中的激光散射信号相似(图 5-B、5-C 粗线),但二者所得到的 RI 信号有所不同,在无 PEG 存在时分离得到的组分 A 的 RI 信号峰(图 5-B 中细线)与加 PEG 条件下得到的 RI 信号峰(图 5-C 中细线)的主峰保留时间相比存在较大差异,前者保留时间为 12.8min,后者为 17.4min,更接近 HBsAg 纯品的 RI 图谱(纯品图谱如图 5-A)。由此可见,在无 PEG 存在条件下,由 IEC 所得组分 A 中含有更高比例的比 HBsAg 分子量更大的大分子物质,形成这种大分子物质的原因可能是颗粒间的聚集;而在 PEG 伴随式层析条件下得到的组分 A 中大分子物质所占比例很小。可见 PEG 伴随式层析有助于维持 HBsAg 的颗粒和分子量大小。

3 讨论

聚乙二醇(PEG)是一类线性或带支链的聚合大分子,分子量可从几百到几万;分子量大于 400D 以上的 PEG 具有低毒、低免疫原性和低抗原性,被 FDA 批准可应用于医药、食品、保健品、化妆品等多个领域,如蛋白质、核酸、多肽、小分子药物和酯等修饰,在保持修饰物生物活性的条件下可延长其半寿期,降低免疫原性和抗原性。

本文首次将 PEG 作为纯化伴侣应用于离子交换层析纯化 rHBsAg 过程,研究证明了在流动相中加入 1% PEG10000 能将 rHBsAg 的回收率从 55% 提高到 80%,并维持相近的纯化倍数,同时 PEG 对 rHBsAg 的糖基化蛋白起保护作用,分离组分中 rHBsAg 的颗粒装配结构更接近纯品 rHBsAg;并且,后续的超滤和凝胶过滤步骤可有效地去除终产品中 PEG,PEG 残留量符合中国药典要求(数据未给出)。文献报道 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,是直径大约为 22nm 的 Dane 颗粒^[3],离子交换层析过程的吸附、解吸过程复杂,rHBsAg 在离子交换介质表面存在多步骤吸附-解吸过程,容易造成 rHBsAg 颗粒的亚基解聚和目的蛋白抗原失活。综合上述电泳和 HPSEC-MALLS-RI 实验结果可知,PEG 伴随式层析可得到更多糖基化 HBsAg,并在层析过程中减少 HBsAg 聚集体的形成,因而有助于形成装配更加接近 HBsAg 纯品的分子结构,PEG 对 rHBsAg 的保护作用可能是通过 PEG 与 HBsAg 分子间疏水相互作用改变 HBsAg 所处环境的熵值,进而维护目的抗原的颗粒完整性。另外,从理论上推测,在水溶液中 PEG 由于键合水而表现为大的空间立体排阻效应,改变了流动相的微环境,排斥 rHBsAg 蛋白质的自身黏附与和杂蛋白的结合,提高了 IEC 分离过程中 rHBsAg 与 BSA 的分离度,从而提高分离效果。另外,由于 PEG 良好的链段柔顺性,PEG 的加入不会破坏 rHBsAg 的生物活性。

REFERENCES(参考文献)

[1] Stephenne J. Recombinant versus plasma derived hepatitis B vaccines: issues of safety, immunogenicity and cost-effectiveness. *Vaccine*, 1988, **6**: 299-303

[2] Valenzuela P, Medina A, Rutter WJ *et al.* Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature*, 1982, **298**: 347-350

[3] Diminsky D, Schimbeck R, Reimann 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**: 637-647

[4] Lee YS, Kim BK, Choi EC. Immunological properties of recombinant hepatitis B surface antigen expressed in mammalian cell (C127). *Arch Pharm Res*, 1997, **21**: 543-548

- [5] Ren GF(任贵方),Zhang YM(张一鸣),Ruan WQ(阮薇琴) *et al.*. Study of high expression and immunogenicity of hepatitis B virus surface antigen by Chinese hamster ovary cell line. *Chinese J Virol* (病毒学报),1987,(4):313-319
- [6] 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 J Viro*(病毒学报),1990,(4):305-310
- [7] Wang Y(王妍),Wang Q(王群),Luo X(罗璇) *et al.*. Study on purification process of recombinant HBsAg. *Chinese J Biotech* (生物工程学报),1999,(15)2:263-266
- [8] Belew M, Mei Y, Li B *et al.*. Purification of recombinant hepatitis B virus surface antigen produced by transformed Chinese Hamster Ovary (CHO) cell line grown in culture. *Bioseparation*, 1991, 1: 397-408
- [9] Arakawa T, Timasheff SN. Mechanism of poly(ethylene glycol) interaction with proteins. *Biochemistry*, 1985, 24:6756-6762
- [10] Gagnon P, Godfrey B, Ladd D. Method for obtaining unique selectivities in ion-exchange chromatography by addition of organic polymers to the mobile phase. *J Chromatogr A*, 1996, 743:51-55
- [11] De Ligny CL, Gelesma WJ, Roozen AMP. Gel permeation chromatography of proteins in partly aqueous eluents. *J Chromatogr*, 1984, 294:223-233
- [12] Feng XL, Gu ZY, Jin YT *et al.*. Polyethylene glycol improves the purification of recombinant human tumor necrosis factor during ion exchange chromatography. *Bio/Tech*, 1998, 12:293-298
- [13] Lu XL, Zhao DX, Ma GH *et al.*. Polyethylene glycol increases purification and recovery, alters retention behavior in flow-through chromatography of hemoglobin. *J Chromatogr A*, 2004, 1059:233-237
- [14] Wyatt PJ. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. *Analytical Chimica Acta*, 1993, 272:1-40
- [15] Barackman J, Prado I, Karunatilake C *et al.*. Evaluation of on-line high-performance size-exclusion chromatography, differential refractometry, and multi-angle laser light scattering analysis for the monitoring of the oligomeric state of human immunodeficiency virus vaccine protein antigen. *J Chromatogr A*, 2004, 1043:57-64
- [16] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72:248-254
- [17] Swain M, Ross NW. A silver stain protocol for proteins yielding high resolution and transparent background in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 1995, 16:948-951
- [18] Esquibel-King MA, Dias-Cabral AC, Pinto JA *et al.*. Study of hydrophobic interaction adsorption of bovine serum albumin under overloaded conditions using flow microcalorimetry. *J Chromatogr A*, 1999, 865:111-122
- [19] Diminsky D, Schimbeck R, Reimann J *et al.*. Comparison between hepatitis B surface antigen (HBsAg) particles derived from mammalian cells (CHO) and yeast cells (Hansenula pplymorma): composition, structure and immuneogenicity. *Vaccine*, 1997, 15:637-647
- [20] Tleugabulova D. Size-exclusion chromatography study of the reduction of recombinant hepatitis B surface antigen. *J Chromatogr B*, 1998, 713:401-407

(上接 933 页)

答 读 者 问

12. 我想尽早得到审稿结果,或者提前发表,有没有好的办法能使审稿老师快点。比如我们增加审稿费等方法?

答 我们已经告知了我刊处理稿件的程序和大致时间进度。在作者向我刊投稿之前,应详细了解我刊的规定。审稿人评审一篇文章,并给出谨慎的评审意见是需要一定时间的。所以,作者在投稿之前应该留出足够多的时间给编辑部,以便于编辑部进行评审。我们的承诺是在3个月之内给予答复,6~8个月之内刊出。如要求提前发表,请在投稿的同时提出书面报告,说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性,经过我刊编委会讨论并通过后,可予提前刊出,无需另加费用。

13. 我想问一下作者及单位署名顺序的修改问题。投稿后经过专家审查通过后,即将发表,如果想增加新的作者并且修改作者及单位署名的顺序是否可以?是否需要提供什么证明或者相关的材料?

答 如变更单位署名顺序,需要原第一署名单位的证明信,证明内容:原署名顺序-现署名顺序-盖章。如变更作者署名顺序,需要所有作者同意的签字证明。证明内容:原作者姓名及顺序,修改之后的作者姓名及顺序,并且在证明信的下方,需要有全部原作者和新作者的亲笔签字。将此证明信邮寄回编辑部,新的作者顺序即可生效。

14. 我漏订了今年的《生物工程学报》,如何补订?费用多少?

答 如您错过了邮局订刊的时间,可以直接汇款到本刊编辑部补订,费用为每本38元,全年228元,本刊作者8折优惠,免收邮费。汇款单上请务必写明您的地址、邮编,我们会按期寄上期刊。