

# 间臂和丁基密度对疏水层析分离纯化重组乙肝病毒表面抗原的影响 Comparison of Adsorbent with Varying Arm Length and Ligand Density for the Purification of Recombinant Hepatitis B Virus Surface Antigen

李瑞红<sup>1,2</sup>, 李 岩<sup>2</sup>, 闭静秀<sup>2</sup>, 赵 岚<sup>2</sup>, 周卫斌<sup>2</sup>, 黄永东<sup>2</sup>, 张 焱<sup>2</sup>, 孙李靖<sup>2</sup>, 王化军<sup>1</sup>, 苏志国<sup>2\*</sup>  
LI Rui-Hong<sup>1,2</sup>, LI Yan<sup>2</sup>, BI Jing-Xiu<sup>2</sup>, ZHAO Lan<sup>2</sup>, ZHOU Wei-Bin<sup>2</sup>, HUANG Yong-Dong<sup>2</sup>, ZHANG Yan<sup>2</sup>, SUN Li-Jing<sup>2</sup>, WANG Hua-Jun<sup>1</sup> and SU Zhi-Guo<sup>2\*</sup>

1 北京科技大学土木与环境工程学院, 北京 100083

2 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

1 Civil & Environmental Engineering School, University of Science and Technology of Beijing, Beijing 100083, China

2 National Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China

**摘 要** 以国产高交联度的快流速琼脂糖为基质, 合成了针对纯化中国仓鼠卵巢细胞表达乙肝病毒表面抗原(CHO-HBsAg)的不同间臂(3C、8C和10C)和不同配基密度的丁基疏水介质。配基密度的增加和间臂C链的延长都会增加介质的疏水性, 从而影响其对CHO-HBsAg的分离效果。采用正交实验考察了配基密度、盐浓度、pH值三个影响因素对不同间臂疏水介质性能的影响。以分离CHO表达的乙肝病毒表面抗原(CHO-HBsAg)的收率和纯化倍数为主要指标。根据正交试验结果, 分离效果最佳的介质间臂为8C、配基密度为22 $\mu\text{mol/mL}$ 。该介质在硫酸铵浓度9%、pH7.0条件下, CHO-HBsAg的收率可以接近100%, 纯化倍数达到60。

**关键词** 疏水层析介质, 间臂, 配基密度, 重组乙肝病毒表面抗原, 分离纯化, 正交试验

中图分类号 Q939.91 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)04-0692-08

**Abstract** Novel hydrophobic adsorbents were synthesized by immobilizing butyl derivative onto the highly cross-linked agarose beads manufactured in China, which are used as matrix. The effect of the spacer arm length (3C, 8C and 10C) and ligand density (from 13 to 45 $\mu\text{mol/mL}$ ) on the hydrophobicity were investigated using purified Hepatitis B surface antigen (HBsAg) expressed by CHO cell lines. Also considering the effects of salt concentration and pH on HBsAg recovery and purification factor, orthogonal experiment design method was used to evaluate the adsorbents. The results showed the butyl-S adsorbent with the spacer arm length of C8, the ligand density of 22 $\mu\text{mol/mL}$  gel showed the best performance for the separation of HBsAg. Approximately 100% HBsAg recovery and 60 as purification fold were achieved by this media under the operating condition of pH 7.0 and 9% of salt concentration.

**Key words** hydrophobic adsorbent, spacer arm, ligand density, recombinant hepatitis B surface antigen, purification, orthogonal experiment design

Received: November 24, 2006; Accepted: December 18, 2006.

This work was supported by the grants from the Hi-tech Research and Development Program of China (No. 2002AA217031) and the National Natural Science Foundation of China (No. 20636010).

\* Corresponding author. Tel: +86-10-62561817; Fax: +86-10-62562813; E-mail: zgsu@home.ipe.ac.cn

国家 863 高技术资助项目(No.2002AA217031)和国家自然科学基金(No.20536050, 20576136 and 20636010)资助 http://journals.im.ac.cn

疏水相互作用层析技术适用范围广,洗脱条件温和,已成为蛋白质分离纯化中非常重要的一种手段。但是蛋白质可能在疏水层析过程中发生聚集或变构,比如 $\beta$ -乳球蛋白在疏水层析过程中会出现多个洗脱峰,这些峰中存在 $\beta$ -乳球蛋白的聚集体<sup>[1]</sup>。另外,由多个亚基组成的多聚亚基蛋白在疏水层析过程也可能发生亚基解聚。比如肿瘤坏死因子(TNF)在疏水层析过程中会出现包括TNF亚基的多个洗脱峰<sup>[2]</sup>。介质的配基密度对蛋白质的层析行为影响非常大。Hearn等人发现不同配基密度的丁基疏水介质对蛋白质的最大吸附容量和亲和性都存在明显的不同<sup>[3]</sup>。CHO-HBsAg是一种复杂的多聚亚基蛋白质,它由100多个亚基组成,分子量超过2000kD<sup>[4]</sup>,而且分子中含有糖链和脂类<sup>[5]</sup>。分离纯化过程中,如果使用疏水性较强的介质,介质表面对CHO-HBsAg颗粒的吸附非常强,这可能会破坏蛋白质的结构,或者产生不可逆吸附,影响抗原的生物活性和回收率。因此,选择表面吸附能力适中的疏水层析介质对CHO-HBsAg的纯化非常重要。

本文研究可应用于CHO-HBsAg分离纯化的疏水层析介质,前期的研究表明了CHO-HBsAg纯化工艺主要由疏水层析、离子交换、凝胶过滤等层析工艺组合而成。其中疏水层析作为初步纯化步骤可除去95%以上的杂蛋白质、99%以上的糖类和脂类、99%以上的DNA以及色素等杂质<sup>[6-10]</sup>,是整个纯化工艺中的关键步骤。目前用于纯化CHO-HBsAg的商品化疏水层析介质Butyl-S Sepharose FF为GE Healthcare公司产品,其价格昂贵。而且疏水层析作为第一步的初分离步骤,疏水介质Butyl-S Sepharose FF受原料的污染比较严重,所以使用周期有限。自主开发分离性能优越、成本低的疏水介质可以降低CHO-HBsAg的生产成本,解决目前国内医药企业中制备乙型肝炎病毒疫苗所用介质长期依赖进口的问题,这对于我国(乙型肝炎病毒携带者数量高达1.5亿)乙型肝炎疫苗的生产非常重要。王妍等人<sup>[11]</sup>曾开发合成了间臂为3C的国产疏水介质(进口疏水介质Butyl-S Sepharose FF的间臂为10C),应用效果良好,但该种介质选用进口高交联度快流速琼脂糖为基质,成本较高。本实验室以国产高交联度快流速琼脂糖为基质,以丁基为疏水配基,开发了间臂为3C的疏水介质<sup>[12]</sup>,并成功应用于CHO-HBsAg的分离纯化。本研究主要探索自主合成的间臂为3C、8C和10C的不同配基的丁基疏水介质对乙肝表面抗原的分离特性。

本文首先考察了配基密度和间臂对CHO-HBsAg层析行为的影响,然后采用正交实验优化介质的间臂和配基密度,以及分离体系的pH值和盐

浓度,从中筛选出了分离性能更好的疏水层析介质。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞培养上清(CCS):由华北制药集团提供。

1.1.2 疏水层析介质:作为疏水介质基质的高交联度快流速琼脂糖(QZT 6%琼脂糖)由中国科学院过程工程研究所生化工程技术中心合成;商品化丁基琼脂糖疏水介质Butyl-S-Sepharose FF(间臂为10C)购自GE Healthcare公司(美国)。

1.1.3 试剂:牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)购自Roche公司(德国);作为标准品的纯度大于98%的CHO-HBsAg由华北制药集团提供;HBsAg活性测定的立可读ELISA试剂盒由上海科华实业提供。所用化学试剂均为国产分析纯试剂,所用纯水由Milli Q-plus超纯水机制备(Millipore,美国)。

1.1.4 仪器:蠕动泵:PERI STAL TIC PUMP P-1(Pharmacia,瑞典);紫外检测仪:Single Path Monitor UV-1(Pharmacia,瑞典);检测器与Agilent Interface 95000E(Agilent,美国)连接,由计算机记录数据;Bio-Rad酶标仪550和电泳仪Mini-PROTEIN(II)购自Bio-Rad公司(美国);96孔酶标板由Costar公司提供;层析柱均购自上海锦华层析设备厂。

### 1.2 方法

1.2.1 Butyl-S QZT介质的合成:按照Maisson的合成路线<sup>[13]</sup>,以国产的快流速琼脂糖(QZT)为基质,经活化、交联、收获三个步骤,合成3C、8C、10C间臂的丁基琼脂糖疏水介质Butyl-S QZT。对于间臂为3C的介质,配基密度控制在25~45 $\mu$ mol/mL;对于8C的介质,配基密度控制在13~25 $\mu$ mol/mL;对于10C的介质,配基密度控制在13~40 $\mu$ mol/mL。(对反应后的溶液进行测定,里面没有残余的丁硫醇。对洗胶的溶液进行测定,其中也不含硫醇,可以认为硫醇全部结合在介质上。这里介质的丁基配基密度以反应时丁硫醇的加入量来表示)。

1.2.2 层析方法:合成的介质充分清洗后装柱(50mm $\times$ 10mm I.D.,BV=4mL),用0.5mol/L NaOH清洗5个柱床体积(bed volume, BV)后,连接到常压层析系统。对于CHO-HBsAg的层析实验,按实验所需的盐浓度和pH值配制相应的缓冲液A(20mmol/L PB,含一定浓度的硫酸铵)和B(20mmol/L PB,不含硫酸铵)。先用10个柱床体积的缓冲液A平衡层析柱,然后将HBsAg溶液的pH和电导率调到与缓冲液A一致。进料量为10 $\mu$ g CHO-HBsAg,每毫升介质,进料后用缓冲液A再淋洗两个柱体积,得到穿透峰(Fraction APO),然后用缓冲液B进行洗脱,收

集得到洗脱峰 Fraction B (P1)。流速为 0.8mL/min, 紫外检测波长为 280nm。

对于细胞培养液上清分离的实验按与正交试验计划表中相应实验序号所对应的盐浓度和 pH 值配制相应的缓冲液 A (20mmol/L PB, 含一定浓度的硫酸铵) 和 B (20mmol/L PB, 不含硫酸铵)。用 10 个柱床体积的缓冲液 A 平衡层析柱。20mL 的 CCS 中加入硫酸铵粉末至终电导与缓冲液 A 的电导一致, 用 1mol/L NaOH 溶液调 pH 与缓冲液 A 的相等。0.45 $\mu$ m 微滤膜过滤后进料。用缓冲液 A 洗脱杂质至基线, 收集穿透峰 Fraction A (P0); 用缓冲液 B 洗脱至基线, 收集洗脱峰(目的峰) Fraction B (P1), 最后用 30% 异丙醇进行介质再生, 流速均为 0.8mL/min。紫外检测波长 280nm。

对各个峰进行的活性和蛋白含量进行测定。实验结果为三次层析的平均值。

**1.2.3 酶联免疫吸附法(ELISA)检测 HBsAg 活性:** HBsAg 活性通过 ELISA 试剂盒进行检测, 按照试剂盒说明书的操作步骤进行, 利用纯品 HBsAg 做标准曲线求得待测样品中的 HBsAg 含量。

**1.2.4 蛋白质浓度检测:** 总蛋白质浓度参照 Bradford 法测定<sup>[14]</sup>, 根据标准品 BSA 的标准曲线求得样品中总蛋白质含量。

**1.2.5 凝胶过滤高效液相分析** 液相系统为 Agilent 1100 (Agilent, 美国), 紫外检测器波长 280nm。多角度激光散射检测器为 DAWN EOS (Wayyt, 美国), 所用激光波长为 690nm。色谱柱为 TSK G5000PW (300mm (7.5 mm, I. D. ) Tosohaas, 日本), 保护柱为 TSK GPW guardcolumn (75mm (7.5mm, I. D. ) (Tosohaas, 日本)。流动相为 100mmol/L PBS, pH6.8, 流速为 0.5mL/min, 上样量为 100 $\mu$ L。

**1.2.6 圆二色光谱(CD)分析:** 圆二色光谱仪为 Jasco-810 (Jasco, 日本)。检测波长为 200~260nm, 分辨率为 1nm。用与待测样品中溶液相同的体系作为空白, CD 谱图为三次测量结果的平均值。

**1.2.7 评价指标:** 主要考察纯化前后 HBsAg 的活性收率和纯化倍数。其中, 活性收率为纯化后与纯化前 HBsAg (ELISA 测定) 之比; 蛋白质残余率为纯化后总蛋白质占纯化前总蛋白质质量 (Bradford 测定) 的百分比; 纯化倍数为纯化前后样品的比活之比, 用活性回收率与蛋白残余率之比来计算。

## 2 结果与讨论

### 2.1 介质疏水性对 CHO-HBsAg 层析行为的影响

疏水层析介质由亲水性固定相基质通过一定长度的间臂偶联短链的烷基、苯基等弱疏水性配基所

构成。配基以及间臂对介质的疏水性都有影响。这里我们考察了介质的配基和间臂对 CHO-HBsAg 层析行为的影响。

**2.1.1 配基密度对 CHO-HBsAg 收率的影响:** 此实验以纯化后的 CHO-HBsAg 为研究对象, 考察了 CHO-HBsAg 在间臂为 8C 的不同配基密度 (13、18、22 和 25 $\mu$ mol/mL) 的介质上吸附和解吸过程的失活现象。在盐浓度 9.0%, pH 值为 7.0 条件下进料, 进料 4mL HBsAg 溶液 (10 $\mu$ g/mL), 然后用上述溶液淋洗一个柱体积 (4mL), 再用 20mmol/L PB (pH = 7.0) 洗脱吸附的蛋白。进料后开始收集, 收集 10mL 作为穿透峰 (P0), 按紫外信号收集洗脱峰 (P1)。层析图谱如图 1 所示, 穿透和洗脱下来的蛋白质分析结果见表 1。

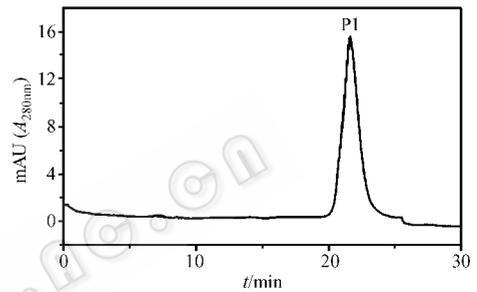


图 1 CHO-HBsAg 在国产疏水介质上的层析谱图

Fig. 1 Profile of HIC with Butyl-S QZT for purified CHO-HBsAg

通过表中数据可以看出, 当进料量为 10 $\mu$ g CHO-HBsAg 每毫升介质时, 较低配基密度 (13 $\mu$ mol/mL) 的介质对 rHBsAg 吸附能力低, 有大约 15% 的 HBsAg 流穿, 而当配基密度为 18 $\mu$ mol/mL 时 HBsAg 的回收率最高, 达到 86.3%, 随着配基密度逐渐增加, P1 峰的 HBsAg 活性回收率逐渐下降。除了配基密度为 13 $\mu$ mol/mL 有部分穿透之外, CHO-HBsAg 在其余的介质都没有穿透, 而且穿透峰的收率与主要活性峰收率的总和也低于 100%。这说明 CHO-HBsAg 的活性损失不仅仅是由于穿透造成的, 部分生物活性的损失可能是由于蛋白质在介质表面吸附和解吸造成蛋白质变构和解聚。对 HBsAg 在超滤和离子交换过程中的研究发现, 在超滤过程中 HBsAg 容易发生聚集<sup>[15]</sup>。

表 1 配基密度对 CHO-HBsAg 纯品收率的影响  
Table 1 The effect of ligand density to the recovery of purified CHO-HBsAg

Ligand density ( $\mu$ mol/mL)	HBsAg recovery P1/%	Flow-through HBsAg in P0/%
13	61.1 $\pm$ 2.6	15.1 $\pm$ 1.6
18	86.3 $\pm$ 1.3	ND
22	69.1 $\pm$ 3.8	ND
25	67.8 $\pm$ 2.8	ND

由此我们分析 HBsAg 在层析后活性损失的原因可能是 HBsAg 在层析过程中的构象变化、聚集、解聚或者在介质上的不可逆吸附。为了分析 HBsAg 在层析过程中活性损失的原因,对从不同介质上得到的活性峰进行了检测构象变化的圆二色分析,检测 HBsAg 分子量和 HBsAg 聚集体和解聚的分子体积排阻高效液相联用多角度激光(HPSEC-MALLS)结果见图 2 和图 3。

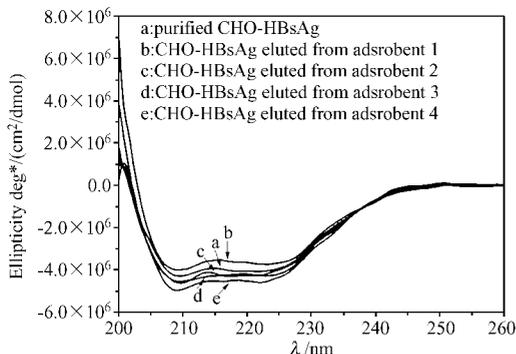


图 2 不同配基密度介质洗脱下来的 HBsAg 的圆二色谱图

Fig. 2 Circular dichroism spectrum of HBsAg eluted from adsorbent with different ligand density

The ligand densities of adsorbent 1 to 4 were 13, 18, 22 and 25  $\mu\text{mol/mL}$  respectively.

图 2 的结果表明,HBsAg 在进料前和经过疏水层析后,其二级结构没有明显变化,疫苗的活性损失不是由 HBsAg 在层析过程中的变构造成的。进一步用 HPSEC-MALL 分析经过疏水层析后的样品(见图 3)左图为 MALLS 信号,右图为 UV 信号。由于 MALLS 信号对于大分子非常敏感,适于对聚集体的分布检测,文献 [15] 中用 MALLS 检测出了汉逊酵母表达的 HBsAg 中的聚集体,而 UV 信号则可以检测出解聚后的蛋白质亚基。图 3 的结果表明,层析之后, MALLS 信号中对应于 12min 的大分子聚集体的信号基本不变,说明在此过程中 HBsAg 没有聚集。而紫外 UV 信号的监测表明,对应于停留时间为 22min 的 HBsAg 解聚亚基在层析前后信号也基本不变,这说明层析之后的 HBsAg 也没有解聚。所以造成疫苗活性损失的原因很可能是 HBsAg 在疏水介质上的不可逆吸附。

**2.1.2 间臂对 CHO-HBsAg 收率的影响**:这里对配基密度为 13  $\mu\text{mol/mL}$  间臂分别为 8C 和 10C 的介质,以及配基密度为 40  $\mu\text{mol/mL}$  间臂分别为 3C 和 10C 的介质进行了间臂影响的考察。在 pH 值为 7.0,盐浓度为 8.0% 条件下进行疏水层析,实验结果见表 2。

通过表中的数据可以看出,对于配基密度为 13  $\mu\text{mol/mL}$  的介质,间臂由 8C 增加到 10C 时,CHO-HBsAg 的收率提高了 10%;但是,对于配基密度为 40  $\mu\text{mol/mL}$  的介质,间臂由 3C 增加到 10C 时,HBsAg

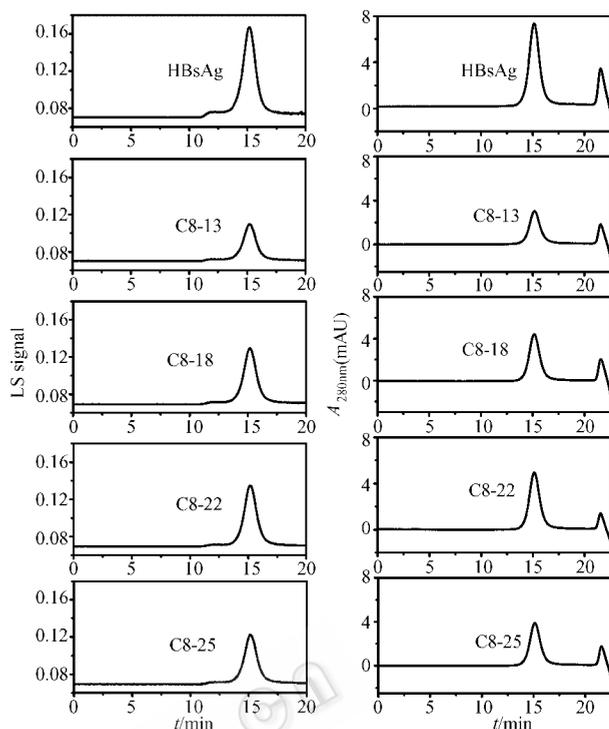


图 3 从不同配基密度介质洗脱下来的 HBsAg 的 HPSEC-MALLS 图谱

Fig. 3 SEC-HPLC profile of CHO-HBsAg eluted from adsorbent with different ligand density

Left : MALLS signal ; Right : UV signal. Conditions : TSK G5000 PW (10  $\mu\text{m}$ , 300mm  $\times$  7.5mm I. D.) with TSK GPW Guardecolumn (75mm  $\times$  7.5mm, I. D.) ; eluted by PBS (0.1mol/L PB added with 0.1mol/L  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , pH 6.8) at room temperature (20 ~ 25  $^\circ\text{C}$ ) with 0.5mL/min flow rate ; 100  $\mu\text{L}$  of injection volume.

表 2 间臂对 CHO-HBsAg 纯品收率的影响

Table 2 The effect of spacer arm to recovery of purified CHO-HBsAg

Ligand density ( $\mu\text{mol/mL}$ )	Arm	HBsAg recovery of P1/%	HBsAg recovery of P2/%
13	8C	61.1 $\pm$ 2.6	15.1 $\pm$ 1.6
13	10C	71.6 $\pm$ 2.7	ND
40	3C	71.2 $\pm$ 1.6	ND
40	10C	36.4 $\pm$ 1.6	ND

ND : No detectable.

的收率下降 30%。所以间臂和配基密度的匹配对介质的分离性能非常重要。目前对于此方面的研究较少,可以将间臂当成整个疏水配基的一部分,这样在配基密度相同的条件下,间臂越长,则介质的疏水性越强。当配基密度较低时(13  $\mu\text{mol/mL}$ ),间臂长度的增加会导致介质的疏水性增强,这会减少 HBsAg 的穿透,HBsAg 的收率由 61% 增加到 71%。但是,当配基密度较高时(40  $\mu\text{mol/mL}$ ),长间臂和高配基密度导致疏水性过强,造成疫苗在介质上的不可逆吸附,从而导致其活性由 71% 下降到 36%。表 2 的结果也表明,低配基密度和长间臂的匹配,以及高配基

密度和短间臂的匹配能获得最好的分离效果。

通过以上实验可以看出,用 HBsAg 进行实验,可以清楚地考察介质间臂和配基对 HBsAg 活性影响的规律。但要找出对 CCS 具有最佳分离效果的介质,必须用 CCS 对介质的配基和间臂以及具体的分离操作条件进行优化实验。

## 2.2 采用正交试验对不同间臂和配基密度的介质分离性能的考察

影响疏水层析过程的参数非常多,包括介质类型、pH 值、盐浓度、蛋白质浓度等等,这些参数之间的作用也非常复杂。对疏水层析过程影响最大的实验条件包括介质类型、pH 值和盐浓度。介质是纯化过程的核心,介质的性能对于分离的效果起到决定性的作用;pH 值影响蛋白质的带电性和构象,从而影响蛋白质与疏水配基的相互作用;盐浓度则可以从蛋白质构象以及溶液体系中水的活度两个方面来影响蛋白质与介质之间的相互作用。下面的实验对这些条件进行系统的考察。

正交试验具有数据分布均匀,实验量相对较少的特点,而且其实验结果容易分析,所以我们采用这种试验设计方案对试验条件进行考察。在对不同间臂的疏水介质进行考察前,首先通过单因素实验初步确定操作条件的范围。

**2.2.1 pH 值和盐浓度范围的初步确定** pH 值对蛋白质的性质有很大影响,在层析过程中是一个非常重要的参数。这里从 pH6.0 考察到 pH8.0,层析图谱见图 4,实验结果见表 3。

结果表明随着 pH 值的升高,HBsAg 的活性收率先升后降,在 pH 7.0 时活性收率最高,达到 88.2%。我们对穿透峰 Fraction A (见图 4)进行了分析,结果显示在 pH7.0 的条件下,穿透峰中的活性最少。这可能是因为 pH 值对 CHO-HBsAg 的构象或带电性质影响较大,使蛋白质在 pH 7.0 条件下与介质的疏水相互作用最强。而纯化倍数随着 pH 值的增加逐渐降低,当 pH 值达到 7.5、8.0 时,纯化倍数保持在 37 左右不再变化。根据以上实验结果,确定正交试验的 pH 值范围为 6.5~8.0。

表 3 pH 值对层析过程影响  
Table 3 The effect of pH value

pH	HBsAg recovery/%	Purification factor
6.0	55.4 ± 3.9	53 ± 3
6.5	61.6 ± 4.1	47 ± 5
7.0	88.2 ± 6.7	38 ± 3
7.5	64.8 ± 1.3	36 ± 9
8.0	67.4 ± 6.5	37 ± 5

Ligand density: 25 μmol/mL, spacer arm: 8C, ammonium sulfate concentration: 8%.

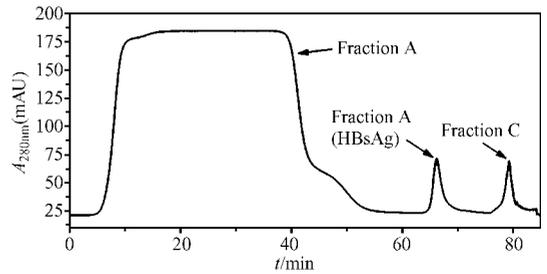


图 4 国产疏水介质层析图谱

Fig. 4 Profile of HIC with Butyl-S QZT

下面在 pH 7.0 条件下对硫酸铵浓度进行考察,结果见表 4。由表中的数据可以看出,随着硫酸铵的浓度从 7% 增加到 11%,CHO-HBsAg 的活性收率从 56.0% 逐渐增加到 100%。当硫酸铵浓度达到 9% 时,收率达到 92.3%。

表 4 硫酸铵浓度对层析过程影响

Table 4 The effect of ammonium sulfate concentration

concentration/%	HBsAg recovery/%	Purification factor
7	56.0 ± 2.4	52 ± 9
8	69.6 ± 2.8	48 ± 10
9	92.3 ± 7.2	24 ± 4
10	88.1 ± 8.6	19 ± 2
11	100 ± 4.8	12 ± 2

Ligand density: 25 μmol/mL, spacer arm: 8C, pH7.0.

但是当硫酸铵浓度的进一步增加至 11% 时,纯化倍数由 24 迅速下降到 12。这可能是由于随着硫酸铵浓度的增加,CHO-HBsAg 以及杂蛋白与介质之间的疏水相互作用都增强。由此,确定正交试验的盐浓度范围为 7%~10%。

**2.2.2 正交试验考察间臂为 3C 的 Butyl-S QZT 疏水介质的分离性能** 根据以上实验确定的 pH 值和盐浓度范围,对间臂为 3C 的 Butyl-S QZT 疏水介质进行了 3 因素 4 水平的正交实验(因素 A 配基密度的 4 个水平为:25、35、40、45;因素 B 盐浓度的 4 个水平为:7.0%、8.0%、9.0%、10.0%;因素 C pH 值的 4 个水平为:6.5、7.0、7.5、8.0),采用正交表  $L_{16}(4^3)$  进行实验,实验结果以及数据分析见表 5 和图 5。

图 5 的对比结果表明对于间臂为 3C 的 Butyl-S QZT 疏水介质,随着配基密度的增加,CHO-HBsAg 的活性收率增加,但纯化倍数下降,原因主要是 HBsAg 在介质上的不可逆吸附。随着硫酸铵浓度的增加,CHO-HBsAg 收率明显增加,但是超过 8.0% 以上,目的蛋白质的活性收率略有下降。这可能是硫酸铵浓度过高造成目的蛋白质在介质上的不可逆吸附所致。活性收率在不同 pH 值下变化不大,但是 pH 值对纯化倍数的影响非常明显,在 pH 7.0 达到最大的纯化

倍数。通过表中数据可以得出对于间臂为 3C 的介质, 当配基密度为  $40\mu\text{mol/mL}$ , 盐浓度为 8%, pH 值为 7.0 时, HBsAg 的回收率达到 79.8% 纯化倍数为 14。

表 5 间臂为 3C 的丁基疏水介质正交试验结果  
Table 5 Orthogonal experiment results of the butyl-S media with spacer arm of 3C

Experiment Number	Factor			Traget	
	A( Ligand density ) ( $\mu\text{mol/mL}$ )	B ammonium sulfate concentration ) / %	C /pH	HBsAg activity recovery / %	Purification factor
1	25	7.0	6.5	39.6 ± 0.6	38 ± 2
2	25	8.0	7.0	61.5 ± 4.8	44 ± 6
3	25	9.0	7.5	64.6 ± 1.3	16 ± 1
4	25	10.0	8.0	59.1 ± 0.7	9 ± 0
5	35	7.0	7.0	27.3 ± 4.6	37 ± 10
6	35	8.0	6.5	81.3 ± 5.5	27 ± 2
7	35	9.0	8.0	68.2 ± 1.2	13 ± 1
8	35	10.0	7.0	65.5 ± 7.4	11 ± 2
9	40	7.0	7.5	58.0 ± 9.5	26 ± 7
10	40	8.0	8.0	60.7 ± 5.8	15 ± 2
11	40	9.0	6.5	72.0 ± 8.3	16 ± 3
12	40	10.0	7.0	79.8 ± 7.1	14 ± 2
13	45	7.0	8.0	56.0 ± 7.2	15 ± 2
14	45	8.0	7.5	77.0 ± 4.3	12 ± 1
15	45	9.0	7.0	72.4 ± 4.0	10 ± 1
16	45	10.0	6.5	65.6 ± 4.4	11 ± 1

## Results analysis

Mean of HBsAg recovery	I <sub>j</sub>	56.2	45.2	64.6
	II <sub>j</sub>	60.6	70.1	60.2
	III <sub>j</sub>	67.6	69.3	66.3
	IV <sub>j</sub>	67.8	67.5	61.0
	Max difference	R <sub>j</sub>	11.5	24.9
Mean of purification factor	I <sub>j</sub>	27.1	29.1	22.8
	II <sub>j</sub>	22.0	24.6	26.2
	III <sub>j</sub>	17.5	13.8	16.4
	IV <sub>j</sub>	12.1	11.2	13.1
	Max difference	R <sub>j</sub>	15.0	18.0

2.2.3 正交实验考察间臂为 8C 的 Butyl-S QZT 疏水介质的分离性能: 对间臂为 8C 的 Butyl-S QZT 疏水介质进行 3 因素 4 水平的正交实验( 因素 A 配基密度的 4 个水平为 :13、18、22、25 ; 因素 B 盐浓度的 4 个水平为 :6.0%、7.0%、8.0%、9.0% ; 因素 C pH 值的 4 个水平为 :6.5、7.0、7.5、8.0 ), 采用正交表  $L_{16}(4^3)$  进行实验, 正交实验结果以及数据分析见表 6 和图 6。

通过图 6 可以看出对于间臂为 8C 的 Butyl-S QZT 疏水介质, 当其配基密度为  $22\mu\text{mol/mL}$  时, CHO-HBsAg 的活性收率达到最大值 100%。当配基密度增加到  $25\mu\text{mol/mL}$  时, 活性收率反而下降。这是因为随着配基密度增加, 介质对 HBsAg 的不可逆吸附

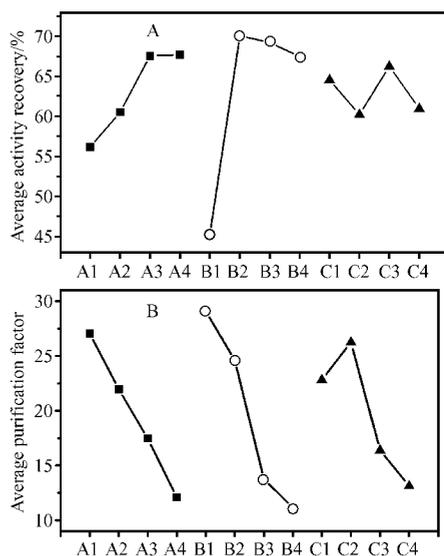


图 5 正交试验结果分析

Fig. 5 Analysis of the Orthogonal experiment results

A : ligand density ,  $\mu\text{mol/mL}$  ; B : ammonium sulfate concentration , % ; C : pH

也在增强。随着硫酸铵浓度的增加, CHO-HBsAg 活性收率逐渐增加, 纯化倍数逐渐下降。pH 值对于活性收率和纯化倍数的影响都不太明显。通过表中数据可以得出, 对于间臂为 C8 的丁基疏水介质, 当配基密度为  $22\mu\text{mol/mL}$ , 盐浓度为 9%, pH 值为 7.0 时, HBsAg 的回收率大于 98%, 纯化倍数大于 60, 分离效果明显优于间臂为 3C 的介质。

2.2.4 正交实验考察间臂为 10C 的 Butyl-S QZT 疏水介质的分离性能: 对间臂为 10C 的 Butyl-S QZT 疏水介质进行了 3 因素 4 水平的正交实验( 因素 A 配基密度的 4 个水平为 :13、15、20、40 ; 因素 B 盐浓度的 4 个水平为 :7.0%、8.0%、9.0%、10.0% ; 因素 C pH 值的 4 个水平为 :6.5、7.0、7.5、8.0 ) 采用正交表  $L_{16}(4^3)$  进行实验, 正交实验结果以及数据分析见表 7 和图 7。

通过图 7 可以看出对于间臂为 10C 的 Butyl-S QZT 疏水介质, 当其配基密度由  $13\mu\text{mol/mL}$  增加到  $20\mu\text{mol/mL}$  时, CHO-HBsAg 的活性回收率达到 90% , 同样继续增大配基密度至  $40\mu\text{mol/mL}$  时, 活性收率下降。当硫酸铵浓度超过 9% , CHO-HBsAg 活性收率略有下降, 这可能是目的蛋白质在高盐溶液中在介质上的不可逆吸附所致。当 pH 值为 6.5 时, CHO-HBsAg 的活性收率和纯化倍数达到最佳值。对于间臂为 10C 的介质, 当配基密度为  $20\mu\text{mol/mL}$ , 盐浓度为 9%, pH 值为 6.5 时, HBsAg 的回收率约为 90% , 纯化倍数约为 56, 此结果优于间臂为 3C 的介质而稍逊于间臂为 8C 的介质。

进一步对比目前广泛使用的商用 Butyl-S FF 介

表6 间臂为8C的丁基疏水介质正交试验结果  
Table 6 Orthogonal experiment results of the butyl-S media with spacer arm of 8C

Experiment Number	Factor			Target	
	A (Ligand density) ( $\mu\text{mol/mL}$ )	B (ammonium sulfate concentration) (%)	C (pH)	HBsAg activity recovery (%)	Purification factor
1	13	6.0	6.5	1.4 ± 0.7	4 ± 3
2	13	7.0	7.0	4.6 ± 1.3	7 ± 2
3	13	8.0	7.5	26.9 ± 5.8	40 ± 10
4	13	9.0	8.0	44.5 ± 1.5	33 ± 1
5	18	6.0	7.0	12.4 ± 0.6	100 ± 9
6	18	7.0	6.5	25.8 ± 3.0	96 ± 7
7	18	8.0	8.0	53.2 ± 1.9	56 ± 2
8	18	9.0	7.0	59.7 ± 7.8	70 ± 3
9	22	6.0	7.5	34.6 ± 2.1	107 ± 6
10	22	7.0	8.0	58.5 ± 9.2	84 ± 9
11	22	8.0	6.5	82.0 ± 9.1	98 ± 5
12	22	9.0	7.0	100 ± 8	63 ± 8
13	25	6.0	8.0	24.9 ± 9.8	47 ± 10
14	25	7.0	7.5	54.1 ± 2.3	48 ± 6
15	25	8.0	7.0	64.1 ± 4.1	33 ± 5
16	25	9.0	6.5	60.6 ± 4.7	25 ± 2

Results analysis					
Mean of HBsAg activity recovery	I <sub>j</sub>	25.8	24.4	56.6	
	II <sub>j</sub>	50.4	47.7	62.6	
	III <sub>j</sub>	93.9	75.4	58.4	
	IV <sub>j</sub>	67.9	90.5	60.4	
Max difference	R <sub>j</sub>	68.1	66.1	6.0	
	I <sub>j</sub>	28.3	85.7	74.3	
	II <sub>j</sub>	107.3	78.4	67.7	
	III <sub>j</sub>	117.5	76.3	88.7	
Max difference	R <sub>j</sub>	89.2	22.2	2.1	

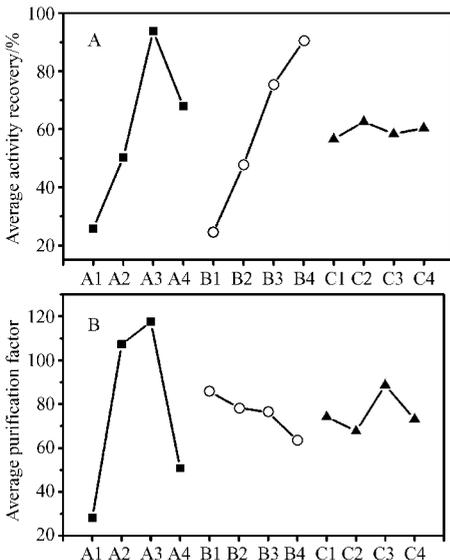


图6 正交试验结果分析

Fig. 6 Analysis of the Orthogonal experiment results

A: ligand density,  $\mu\text{mol/mL}$ ; B: ammonium sulfate concentration, %; C: pH.

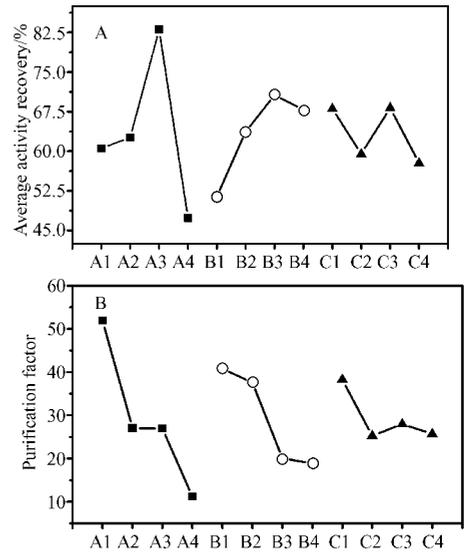


图7 正交试验结果分析

Fig. 7 Analysis of the orthogonal experiment results

A: ligand density,  $\mu\text{mol/mL}$ ; B: ammonium sulfate concentration, %; C: pH.

质(间臂10C,配基密度约 $16\mu\text{mol/mL}$ )和自制丁基疏水介质(间臂为8C,配基密度为 $22\mu\text{mol/mL}$ )的分离性能。按照文献[5]中报道的分离条件,商用Butyl-S FF介质采用的层析条件为缓冲液A为 $20\text{mmol/L}$  PB, pH7.0, 8%硫酸铵;缓冲液B为 $20\text{mmol/L}$  PB, pH7.0;自制介质的层析条件为硫酸铵浓度提高到9%,其它条件都与用商用介质时的条件相同,两种介质用于分离CCS,商用介质的CHO-HBsAg的收率为95%,纯化倍数为42。而自制介质的收率为100%,纯化倍数为63。这说明我们开发的介质在分离性能上要优于进口介质。

综上所述,在配基密度相近时,间臂为8C的介质纯化效果最好,但间臂对于目的蛋白质的分离效果的作用机理原因有待进一步探索。

### 3 结论

疏水介质的间臂和配基密度对于CHO-HBsAg的活性收率影响较大。不同间臂的介质,具有与之最佳匹配的配基密度,这是因为间臂的延长会增加介质的疏水性。配基密度过低会造成HBsAg的穿透,使其收率下降,而配基密度过高又会引起HBsAg在介质上的不可逆吸附,也会导致收率下降。pH值对活性收率的影响不大,对纯化倍数有一定影响。盐浓度对活性收率和纯化倍数的影响都较大,一般随着盐浓度的增加,活性收率增加,纯化倍数下降。

采用正交试验筛选出的最佳介质其间臂为8C,配基密度为 $22\mu\text{mol/mL}$ 。当操作条件为pH值7.0,盐浓度9%,此介质分离CCS的HBsAg活性收率可

表7 间臂为10C的丁基疏水介质正交试验结果  
Table 7 Orthogonal experiment results of the butyl-S media with spacer arm of 10 C

Experiment Number	Factor			Traget	
	A( Ligand density ) ( $\mu\text{mol/mL}$ )	B ammonium sulfate concentration ) / %	C ( pH )	HBsAg activity recovery / %	Purification factor
1	13	7.0	7.0	34.0 ± 3.7	54 ± 4
2	13	8.0	6.5	53.4 ± 3.5	89 ± 9
3	13	9.0	8.0	64.7 ± 2.3	27 ± 1
4	13	10.0	7.0	90.2 ± 6.8	39 ± 9
5	15	7.0	7.5	38.8 ± 4.9	40 ± 5
6	15	8.0	8.0	55.9 ± 9.8	22 ± 5
7	15	9.0	6.5	85.6 ± 9.9	29 ± 5
8	15	10.0	7.0	70.2 ± 8.3	16 ± 2
9	20	7.0	8.0	89.0 ± 9.7	52 ± 8
10	20	8.0	7.5	82.6 ± 5.1	23 ± 4
11	20	9.0	7.0	71.1 ± 9.9	15 ± 2
12	20	10.0	6.5	89.5 ± 4.9	18 ± 4
13	40	7.0	6.5	43.9 ± 5.0	17 ± 3
14	40	8.0	7.0	62.8 ± 4.4	16 ± 3
15	40	9.0	7.5	61.3 ± 8.0	10 ± 2
16	40	10.0	8.0	21.6 ± 3.3	2 ± 0
Results analysis					
Mean of HBsAg activeity recovery	I <sub>j</sub>	60.6	51.4	68.1	
	II <sub>j</sub>	62.6	63.7	59.5	
	III <sub>j</sub>	83.0	70.7	68.2	
	IV <sub>j</sub>	47.4	67.8	57.8	
Max difference	R <sub>j</sub>	35.7	19.2	10.4	
Mean of purification factor	I <sub>j</sub>	51.9	40.8	38.3	
	II <sub>j</sub>	27.1	37.6	25.2	
	III <sub>j</sub>	27.0	20.0	28.0	
	IV <sub>j</sub>	11.2	18.8	25.7	
Max difference	R <sub>j</sub>	40.7	21.9	13.0	

以达到 100% 纯化倍数接近 60。用此疏水介质,可有效地对 CHO-HBsAg 的培养液上清进行纯化,纯化效果优于间臂为 3C 和 10C 的自制疏水介质以及进口商用介质。

## REFERENCES (参考文献)

[ 1 ] Grinberg N , Blanco R , Yarmush D , Karger B. Protein aggregation in high-performance liquid chromatography : hydrophobic interaction chromatography of  $\beta$ -lactoglobulin A. *Analytical Chemistry* , 1989 , **61** : 514 - 520.

[ 2 ] Kunitani M , Cunico R , Staats S. Reversible subunit dissociation of tumor necrosis factor during hydrophobic interaction chromatography. *Journal of Chromatography* , 1988 , **443** : 205 - 220.

[ 3 ] Lin FY , Chen WY , Hearn M. Microcalorimetric studies on the interaction mechanism between proteins and hydrophobic solid surfaces in hydrophobic interaction chromatography : effects of salts , hydrophobicity of the sorbent , and structure of the protein. *Analytical Chemistry* , 2001 , **73** : 3875 - 3883.

[ 4 ] Weibin Zhou , Jingxiu Bi , Jan-Christer Janson , et al. Molecular characterization of recombinant Hepatitis B surface antigen from Chinese hamster ovary and Hansenua polymorpha cells by high-performance size exclusion chromatography and multi-angle laser light scattering. *Journal of Chromatography B* , 2006 , **838** : 71 - 77.

[ 5 ] Gavilanes F , Gonz lez-Ros J , Peterson D. Structure of hepatitis B surface antigen. *Journal of Biological Chemistry* , 1982 , **257** : 7770 - 7777.

[ 6 ] Belew M , Mei Y , Li B , et al. Purification of recombinant hepatitis B surface antigen produced by transformed Chinese hamster ovary ( CHO ) cell line growth in culture. *Bioseparation* , 1991 , **1** : 397 - 408.

[ 7 ] Huang YD , Bi JX , Zhou WB , et al. Improving recovery of recombinant hepatitis B virus surface antigen by ion exchange chromatographic supports with low ligand density , *Process Biochemistry* , 2006 , **41** : 2320 - 2326.

[ 8 ] Zhou WB , Bi JX , Janson JC , et al. Ion-exchange chromatography of hepatitis B virus surface antigen from a recombinant Chinese hamster ovary cell line. *Journal of Chromatography A* , 2005 , **1095** : 119 - 125.

[ 9 ] Zhang Y( 张焱 ) , Bi JX( 闭静秀 ) , Zhou WB( 周卫斌 ) , et al. Purification of recombinant hepatitis B virus surface antigen with PEG precipitation and chromatography. *The Chinese Journal of Process Engineering( 过程工程学报 )* 2006 ( 1 ) : 100 - 103.

[ 10 ] Bi JX( 闭静秀 ) , Zhou WB( 周卫斌 ) , Li Y( 李岩 ) , et al. Polyethylene glycol accompanied ion exchange chromatography to purify recombinant hepatitis B virus surface antigen. *Chinese Journal of Biotechnology( 生物工程学报 )* , 2005 , **21**( 6 ) : 947 - 953.

[ 11 ] Wang Y( 王妍 ) , Ye SD( 叶世德 ) , Liu DW( 刘大维 ) . Study on purification of recombinant HBsAg by hydrophobic interaction chromatography with homemade Butyl-S-Sepharose. *Chinese Journal of Biologicals( 中国生物制品学杂志 )* , 1998 , **11**( 1 ) : 22 - 24.

[ 12 ] Wang YM( 王阳木 ) , Bi JX( 闭静秀 ) , Zhao L( 赵岚 ) , et al. Chromatography adsorbent and its application to the purification of recombinant Hepatitis B surface antigen. *Chinese Journal of Biotechnology( 生物工程学报 )* , 2006 , **22**( 2 ) : 278 - 284.

[ 13 ] Maisano F , Belew M , Porath J. Synthesis of new hydrophobic adsorbents based on homologous series of uncharged alkyl sulphide agarose derivatives. *Journal of Chromatography* , 1985 , **312** : 305 - 317.

[ 14 ] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analysis Biochemistry* , 1976 , **72** : 248 - 254.

[ 15 ] Li Y , Bi JX , Zhou WB , et al. Characterization of the large size aggregation of hepatitis B virus surface antigen ( HBsAg ) formed in ultrafiltration process. *Process Biochemistry* , Available online , 2006.