

基因工程乙肝疫苗的研制

—Ⅲ· MT-5细胞的HBsAg纯化与鉴定

周乙华* 谢彦博 邱荣国**

(附属第三医院肝炎研究室)

提 要 采用超过滤、PEG 沉淀和超速离心综合步骤对 MT-5 细胞培养上清中的 HBsAg 进行纯化。所得纯化 HBsAg 经 SDS-PAGE 银染色结果显示两条多肽, 分子量分别为23k和27k, 与血源 HBsAg 的多肽成分相同, 为重组 HBsAg 的两条特异性多肽, 且在凝胶中无其它杂蛋白带存在, 纯度高。经 PAGE 银染色结果证实纯 HBsAg 中的杂蛋白含量符合疫苗生产的要求。经此综合方法提纯的 HBsAg 回收率可达44.1%以上。

关键词 重组 HBsAg 纯化

乙型病毒性肝炎(简称乙肝)是一种常见传染性疾病, 严重危害人类身体健康, 且缺乏对乙肝有效的病原治疗, 所以制备疫苗预防乙肝更加重要。尽管目前已经生产血源乙肝疫苗, 但来源困难, 价格昂贵, 远远不能满足要求, 因此迫切需要用基因工程方法制备乙肝疫苗。我们在原先工作的基础上, 对 MT-5 细胞^[1]分泌的重组乙肝表面抗原(HBsAg)进行了纯化及鉴定, 获得较为理想的结果, 现报告如下。

材料与方 法

细胞培养和传代 MT-5 细胞用Dulbecco改良 Hagle 培养基(DMEM, GIBCO)培养, 添加10%小牛血清, 其它成分按常规加入, 隔天收集培养上清, 细胞长满单层后3~4周用0.25%胰酶消化细胞, 传代分瓶数1:20左右。

HBsAg测定 运用一步夹心法ELISA^[2]测定 HBsAg, 药盒由本室提供, 根据HBsAg 阳性标准作曲线, 求得待测样品中 HBsAg 浓度。

HBsAg 的纯化 将细胞培养上清用超过滤器(Amicon)超过滤, 弃去滤过液, 浓缩的培养上清用不同浓度聚乙二醇(PEG 6 000)沉

淀 HBsAg, 并观察 pH 值对沉淀效果的影响。选择最佳PEG浓度及pH大量沉淀 HBsAg, 然后将粗提的 HBsAg 进行3次超速离心, 离心机型号Beckman L8-M, 第1、2次均为溴化钾密度梯度离心, 第3次为蔗糖沉降法离心。离心后分段收集, 合并所需要部分, 透析后进一步浓缩即为 HBsAg 精品。

纯化HBsAg的鉴定 用 SDS-PAGE 氨银染色法分析纯化 HBsAg 多肽成分和纯度, SDS-PAGE 参考 Laemmli^[3]方法进行, 浓缩胶浓度为4%, 分离胶为15%, 胶厚2mm, 银染色参考蔡晓丹^[4]方法进行, 分子量标准为Sigma 产品, 人血源 HBsAg 由北京生研所提供。杂蛋白含量测定用 PAGE 银染色法进行, 标准牛血清白蛋白由上海生研所提供。纯化 HBsAg 总蛋白定量测定参考 Bradford^[5]方法进行。

结 果

PEG 6 000沉淀 HBsAg 不同浓度 PEG 6 000对 HBsAg 沉淀效果不一, pH 值不同时 HBsAg 的沉淀效果也不一, 结果见表1, 上清液不调 pH 时, PEG 6 000沉淀 HBsAg 效果差, 调整 pH 至4.6时, 以9%或11%PEG 沉淀效果最佳。我们选用10%PEG 6 000 大量沉淀 HBsAg, 经超过滤浓缩的200ml 培养上清, 经 PEG 沉淀后为20ml, HBsAg 浓度由

*研究生, 现在南京铁道医学院传染病学教研室工作 **生物化学教研室

7.1 $\mu\text{g/ml}$ 浓缩为59.8 $\mu\text{g/ml}$, PEG 沉淀率可达84.2%。

表1 不同浓度 PEG 和 pH 对 HBsAg 沉淀影响

PEG浓度 (%)	HBsAg 含量 (ng/ml)			
	未调 pH		调 pH4.6	
	沉淀	上清	沉淀	上清
3	150	505	145	405
5	150	465	156	390
7	156	375	330	258
9	210	263	390	170
11	258	240	390	175

超离心后 HBsAg 纯化结果 第1次超离心后 HBsAg 主要集中于第4~6管, 第2次超离心后集中于第5、6管, 第3次超离心后集中于5~7管, 合并后透析进一步浓缩为2.5ml, HBsAg 浓度为256 $\mu\text{g/ml}$ 。

纯化 HBsAg 鉴定结果 经超离心后所得 HBsAg 纯品 SDS-PAGE 银染色法显示纯化的 MT-5 细胞分泌的 HBsAg 由两条多肽组成, 分子量分别为23k 和27k, 其中27k 为糖基化的 HBsAg, 与人血源 HBsAg 多肽成分相同, 且所纯化的 HBsAg 无其它杂蛋白带存在, 说明所提纯的 HBsAg 纯度高。PAGE 银染色测定杂蛋白显示纯化的 HBsAg 加样孔内无蛋白进入分离胶, 说明纯化的 HBsAg 中杂蛋白含量符合疫苗生产的要求。纯化 HBsAg 总蛋白测定为240 $\mu\text{g/ml}$, 与 HBsAg 定量测定结果基本一致。

纯化 HBsAg 的回收率 结果见表2, 总的回收率为44.1%, 考虑3次超速离心过程中每收集管要取0.1ml 用于检测 HBsAg, 所以从理论上说真正的回收率要比此值高。

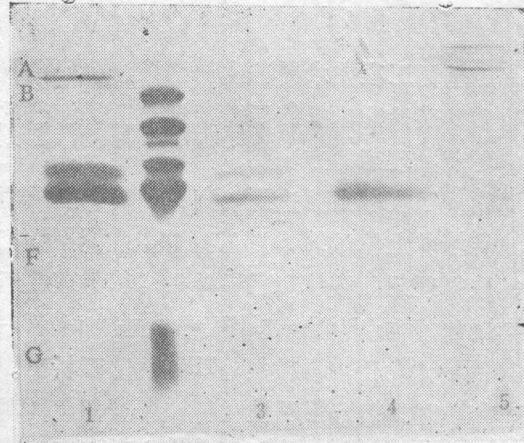


图1 纯化的 HBsAg SDS-PAGE 银染色结果 1 表示人血源 HBsAg。2 表示分子量标准(A66k, B45k, C36k, D29k, E 24k, F20.1k, G14.2k) 3、4 表示第1、2 批纯化的 HBsAg 5 表示小牛血清白蛋白

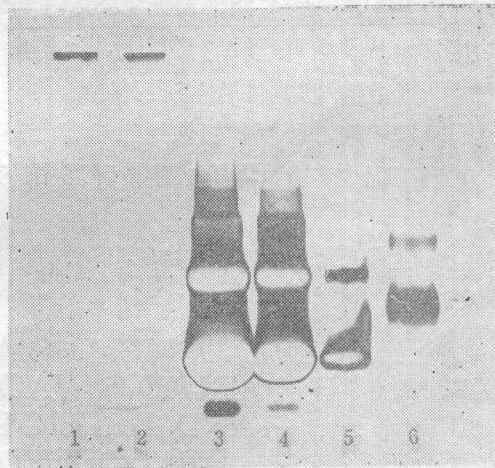


图2 纯化的 HBsAg PAGE 银染色结果 1、2 第1、2 批纯化的 HBsAg 3~6 牛血清白蛋白标准

表2 各步纯化方法 HBsAg 回收率

纯化方法	HBsAg($\mu\text{g/ml}$)	体积(ml)	回收率(%)
培养上清	0.725	2000	100
超过滤	7.1	200	97.9
PEG沉淀	59.8	20	84.2
超离心	256	2.5	53.5

讨 论

用基因工程技术制备生物制品，在获得所需物质的表达后，提纯所需要的物质是相当重要的环节，理想的方法要求简单、经济，所纯化的物质回收率高而达到一定纯度。我们用超滤将培养上清浓缩，再调整 pH 和 PEG 沉淀，取得理想的浓缩和粗提效果，其机理在于 HBsAg 的等电点为 4.4，pH 调至 4.6 左右时 HBsAg 周围的水化层容易破坏，HBsAg 易于析出。超速离心时我们选用了氯化钾和蔗糖，此两种介质价格便宜，来源方便，在水中溶解度高，而对 HBsAg 稳定性无影响，所以对乙肝疫苗的生产有实用价值，虽然用氯化铯作为离心介质会取得更好的效果，但氯化铯价格昂贵，不可能用于大量生产。我们用以上综合方法纯化的 HBsAg 纯度高，在 SDS-PAGE 中仅显示两条特异性 HBsAg 多肽，而无杂蛋白带存在，且总的回收率可达 44.1% 以上，比国内任贵方等^[6]报道的 28% 要高，与国外学者报道的结果^[7]基本相似，所以我们认为上述综合方法纯化基因工程生产的 HBsAg 是一种理想的方法。

(本研究承蒙姚集鲁副教授提供 ELISA 药盒，谨此致谢)

参 考 文 献

- [1] 谢彦博, 等. 利用人摄金蛋白启动子和牛乳突瘤病毒在哺乳动物细胞中表达乙型肝炎表面抗原. 病毒学报 1986; 2(1):1.
- [2] 姚集鲁, 等. 一步夹心法检测 HBsAg 的 ELISA 技术. 中华传染病杂志 1988; 6(1):31.
- [3] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature 1970; 227(5259):681.
- [4] 蔡晓丹, 等. 一种改良的蛋白质双向电泳银染色法. 生物化学与生物物理进展 1986; 26(3):66.
- [5] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72(2):248.
- [6] 任贵方, 等. 乙型肝炎病毒表面抗原基因在中国地鼠卵巢细胞中的高效表达及纯化抗原免疫原性研究. 病毒学报 1987;3(4):313.
- [7] McAleer WJ, et al. Production of purified hepatitis B surface antigen from Alexander hepatoma cells grown in artificial capillary units. J Virol Methods 1983;7 (5,6):263.

DEVELOPMENT OF GENETIC ENGINEERING HEPATITIS B VACCINE III. PURIFICATION AND DETERMINATION OF HBsAg PRODUCED BY MT-5 CELLS

Zhou Yihua Xie Yanbo Qiu Rongguo

(Hepatitis Research Lab, Third Affiliated Hospital)

The purification of HBsAg in MT-5 cells culture supernatant was carried out by three different steps including ultrafiltration, precipitation by PEG 6000 and three-step ultracentrifugations. The purified HBsAg was composed of two specific bands found in the result of SDS-PAGE silver stain. The molecular weights were 23k and 27k respectively, similar to those of human plasma HBsAg. There was no other protein band in the gel. The quantity of other protein in purified HBsAg accorded with the demands of vaccine confirmed by the result of PAGE silver stain. Up to 44.1% of the HBsAg was recovered at the end of purification process.

Key words Recombinant HBsAg Purification