

常规的、亲和层析方法分离纯化 HBsAg

传染病研究所 吕新法 张秀芝 蒋成淦*

指导者 何南祥

鉴于目前对HBsAg的需求不断增加,而用于纯化HBsAg的方法多数沿用氯化铯等比重带和蔗糖密度梯度超离心分离等经典方法,由于该法设备昂贵,一般实验室无力购置。为此,我们提出“常规的、亲和层析分离纯化HBsAg法”。结果用该法制得的HBsAg纯度与用经典方法制得的没有什么两样,现报道如下。

一、主要材料

PEG, 4,000 (M、W), 上海合成洗涤剂二厂。

胃蛋白酶, 杭州肉类联合加工厂产品, 活力单位17,000。

DEAE DE11, 英国进口分装。

琼脂糖珠 4 B, Pharmacia。

抗-HBs, 上海生物制品研究所, 亲和层析纯。

溴化氰, 日本进口。

碘化钠, 国产。

所用其他材料均属分析试剂级。

二、方法与结果

本方法的工艺流程如图1所示。

HBsAg阳性血清

↓ 经稀释, 加PEG 到5% (W/V), 离心澄清液

↓ 补加PEG 到20% (W/V), 离心溶解沉淀物, 恢复到血清原体积, 透析

↓ 用浓盐酸调pH, 加NaCl, 胃蛋白酶, 于37℃ 3小时

调pH, 终止胃蛋白酶作用

↓ 对PB透析

上DEAE纤维素柱层析

↓ 合并HBsAg阳性管号

上抗-HBs固相抗体柱层析, 透析, 浓缩得较纯净的HBsAg

图1 HBsAg阳性人血清分离纯化的流程图

现对工艺流程的一些说明:

1. PEG沉淀⁽¹⁾包括两个操作步骤: ① HBsAg阳性血清经pH8.7, 0.1M K_2HPO_4 液适当稀释, 加入PEG 使成5% (W/V) 的浓度, 这时纤维蛋白原和细胞碎片沉淀下来并经低速离心去除; ②再往澄清液里加入PEG, 使最终浓度达到20% (W/V), 这时HBsAg和 γ -球蛋白全部被沉下, 而绝大部分白蛋白却留在上清液中, 从而达到粗分离的目的。沉淀物用pH8.0的0.1M磷酸钾缓冲液洗涤并用它作成悬液, 使恢复到血清的原体积, 再对生理盐水透析除PEG。

2. 胃蛋白酶消化工艺⁽²⁾, 包括胃蛋白酶研磨和消化、失活三个主要步骤, 对生理盐水透析平衡后的HBsAg液, 用浓盐酸把该液pH调到2.0以下, 并用pH2.0以下的盐水研磨冻干的黄白色粉末至粘滞的稀糊状 (用量为1ml血清原液2mg)、用同液作适当稀释再研磨几下移入三角烧杯内。往内加固体NaCl使成0.45M。放37℃水浴消化3小时。时至, 立刻用1N NaOH把pH调到8.0终止胃蛋白酶的作用。并对0.005M磷酸钠 (pH8.0) 缓冲液透析多次至平衡。

*研究生

3. DEAE 纤维素柱层析, 它是利用蛋白质带电基团能与沉积成柱形的纤维素树脂产生静电结合的能力, 并借用缓冲液的不同离子强度或酸碱度, 进行可逆吸附与解吸的方法, 操作程序按先前方法进行⁽³⁾。收集管液除作UV_{280nm}定位外, 并测定HBsAg的滴度(CEP)(见图2), 把HBsAg阳性管号合并上亲和层析柱。

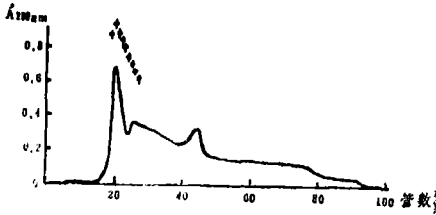


图2 DEAE纤维素柱层析的结果和HBsAg的分布状况

4. 亲和层析法已有专文阐述^(4~7), 此处特别强调活化时要严格控制pH不能低于11, 如pH为11.8时则对结果并无影响, 但低于10.5则可大大降低交联率, 并明显缩短Sephadex 4 B柱的使用寿命。

5. 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 基于不同的蛋白质分子量大小、构形和所带电荷均不相同, 故可人为地控制调节凝胶基质的孔径、缓冲液的类别、pH及电场电位梯度, 使浓缩、分子筛、电荷三效应达到最佳状态, 从而获得尽可能高的分辨率与敏感度。我们将经亲和层析的样品作凝胶电泳, 结果呈单一的一条线带(见图3)。

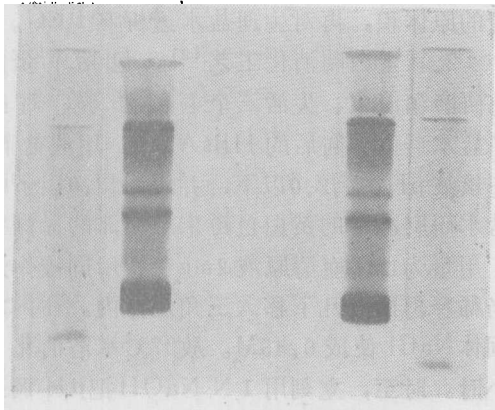


图3 聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果。居中两条是未分离前的HBsAg阳性血清, 两侧是分离后的结果

6. 免疫山羊、主要参考Schuurs和Wolter⁽⁸⁾方法即肌肉内免疫共4次, 各次间隔14天, 第一针用1:16(CEP)0.1ml抗原, 以后几针抗原量加倍, 整个免疫过程均用全佐剂, 每毫升佐剂加有1mg活卡介苗, 结果见附表。

附表 本法提纯的HBsAg免疫山羊的结果
(对流免疫电泳滴度 乙型肝炎抗体 / 非特异抗体)

免疫次数	羊 ₁	羊 ₂	羊 ₃	羊 ₄ *
1				
2	1:64/未测	1:64/未测	>1:128 /未测	未测/ >1:64
3	未测	未测	1:256/(-) ^Δ	
4	1:128/1:8	1:128/1:4		

*羊₄是以正常人血清作抗原而制得的抗正常人全血清抗体 Δ(-)阴性

讨 论

近年来用PEG浓缩HBsAg报道渐多^(2,9~11), 它同Aldosperse ML-14、壬基苯乙烯化氧(NPEO NP-14)同属水溶性非离子化高聚物之列, 是一种新型的蛋白质沉淀剂。由于它价廉易得, 必要时易于精制纯化⁽¹²⁾, 方法简单、操作温和, 其产物通过理化性状测定, 证明能完好地保留原有的天然构型, 又容易从分离到的蛋白质中移去, 因而在分离病毒、蛋白质和酶等方面已得到广泛的应用。但其沉淀病毒、蛋白质的机理目前尚不十分清楚。较多人⁽¹³⁾倾向于PEG引起的蛋白质沉淀是由于蛋白质分子水合膜脱水所致, 其时引起周围介质的介电常数的改变, 而这一变化又招致了蛋白质分子亲水基的位阻关系改变。这些发现与沉淀现象是被高聚物所占据的溶液中把蛋白质排除出来的假设完全一致。由此被排除的体积应该是高聚物浓度的唯一函数, 它与蛋白质浓度或任何别的其它因素无关, 这就是当前

被接受的排挤假说。由于高分子量的PEG（例如，M、W20,000在水中）有很高的粘度，使离心和其它一些操作变得十分困难而未被采用。由于本方法的分离原理与目前沿用的方法有所不同，可为蛋白质纯化和蛋白质鉴定提供另一种手段。

同时大多数病毒（除变性的病毒以外）都对蛋白分解酶和核酸酶有抵抗力，因此可用其作进一步纯化用。其中以胃蛋白酶纯化HBsAg为最多^(2,8,9,14,15)。所谓“胃蛋白酶”⁽¹⁶⁾是指在酸性pH值下（pH1~5）具有活性的胃的蛋白酶类，它是由无活性酶原，胃蛋白酶原部分解脲作用形成的。现有证据表明在哺乳动物胃里，酶的主要成份是胃蛋白酶A，同时还伴有次要成份胃蛋白酶B（Parapepsin I）、胃蛋白酶C（Parapepsin II）和胃蛋白酶D（dephosphopepsin），由于胃蛋白酶的氨基酸组成以酸性氨基酸占绝对优势而碱性氨基酸残基十分贫乏而著称，从而它可在极低pH值下发挥作用。而外层包裹着脂蛋白的HBsAg对胃蛋白酶消化具有很强的抵抗力。在这种酸性很强的环境中而其它蛋白质均失去了原来的紧凑状态（天然蛋白质都是高度卷曲的），其链条也舒展开来，因此易被分解，从而清除了其它的杂蛋白。猪胃蛋白酶来源丰富，价格便宜，故目前越来越多的人⁽¹⁷⁾正用它来作为一种纯化病毒的手段。

本方法的另一优点是省掉了上抗正常人血浆固相柱的步骤，这样可减少由于进口的Pharmacia 琼脂糖珠对HBsAg有非特异性吸附所致的损失，更重要的是排除了因HBsAg颗粒组成中整合有正常人的血清成分，当其通过抗正常人血浆柱时将HBsAg作为同种异质抗原予以吸附的损耗。用本法一个水份（150~180ml）的HBsAg阳性血清（CEP滴度1:32~1:64）可得30ml左右（1:32~1:64）的纯化HBsAg，

抗-HBs固相抗体柱还可反复使用，所得HBsAg经免疫电泳双扩散法和聚丙烯酰胺凝胶电泳均未查见杂组分，其抗原性和免疫动物所产生的抗血清质量均与文献经典方法制备的结果相似，所以是一个值得推荐的方法。

参 考 文 献

1. Moodie JW, et al: J Clin Path 27: 693, 1974
2. Harris RB, et al: J Lab Clin Med 90: 1107, 1977
3. 吕新法等: 浙江医科大学学报 8(4): 173, 1979
4. Lowe CR and Dean PDG: Affinity Chromatography 1974
5. Grabow WOK, et al: J Infect Dis 127(2): 183, 1973
6. 上海生物制品研究所: 生物制品资料选编, 1975年2期
7. 北京生物制品所: 生物制品参考资料(一), 1975年4月
8. Schuurs AHWM, et al: Am J Med Sci 270(1): 173, 1975
9. Nath N, et al: Vox Sang 31 (suppl. 1): 34, 1976
10. Johnson AJ, et al: J Lab Clin Med 83(1): 91, 1976
11. Neurath AR, et al: Pro Soc Exp Biol Med 143: 440, 1973
12. Albertsson P-Å: Methods in virology (Maramorosch K and Koprowsk H, eds), Vol 2, p303, Academic press, New York, 1967
13. Fried M, and Chun PW: Methods in Enzymology Volume XX11: 238, 1971
14. Kim CY, et al: J Clin Invest 52(5): 1176, 1973
15. Kim CY, et al: J Infect Dis 123(5): 470, 1971
16. Fruton JS: Advances in enzymology and related areas of molecular biology V 33: 401, 1970
17. Zuckerman AJ: J Infect Dis 143(2): 301, 1981