

重组乙肝表面抗原疏水层析工艺的优化

杨峰 余国营

河南师范大学生命科学学院, 中国·河南 新乡 453003

【摘要】为了更好地提纯重组乙肝表面抗原, 优化疏水层析方法, 通过使用线性洗脱方法, 筛选出较好的盐浓度。本研究结果表明采用 0.5mol/L 硫酸铵, 更适宜重组乙肝表面抗原的纯化, 可得到较高的抗原收率和纯化倍数。

【关键词】重组乙肝表面抗原; 纯化; 疏水层析; 盐浓度

乙型肝炎是由乙型肝炎病毒引起的, 是全球最常见的传染病之一。每年因乙肝病毒感染导致死亡的我国人数, 约占全球HBV感染相关死亡人数的50%。目前防控乙型肝炎最重要、最经济的策略, 就是接种乙肝疫苗。目前, 我国市场上的乙肝疫苗全部为基因重组疫苗, 该类疫苗的主要活性物质是重组乙肝表面抗原, 不断优化疫苗生产的纯化方法具有重要意义, 而疏水层析是乙肝表面抗原纯化常用的方法之一, 本文工作主要是针对疏水层析工艺优化。

疏水层析是一种较为常用的层析方法, 是基于溶质、极性流动相和非极性固定相表面间的疏水作用力, 建立起来的层析技术。疏水层析技术具有操作简便、蛋白质收率较高、蛋白质变性可能小、选择性强等优点而得到了广泛的应用。本实验中使用 Butyl-S Sepharose™ 6 Fast Flow 凝胶, 它是基于硬性的、高度交联和多孔性的琼脂糖颗粒, 可以利用盐-水体系中蛋白质的疏水基团和凝胶配基之间的疏水作用强弱不同, 从而分离出杂蛋白。疏水层析也常用于重组乙肝表面抗原纯化, 而该抗原易受多种环境因素影响, 所以需要不断改进纯化工艺, 在疏水层析中, 盐浓度的影响非常显著。疏水层析是根据“高盐吸附, 低盐洗脱”的原理进行的, 当上样量与层析温度等条件保持不变时, 去提高样品的离子强度, 即盐浓度, 可使其与凝胶更多地结合, 但是离子强度高将会导致杂蛋白过多挂柱。本研究主要从盐浓度入手, 优化疏水层析条件, 从而提高纯化效率。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器和试剂

AKTA 层析系统, XK26/20 层析柱 (GE 公司), 紫外可见分光光度计 UV-1700 (日本岛津), 微量移液枪 (Gilson 公司), pH 仪和分析天平 (北京赛多利斯公司), Butyl-S-Sepharose 6FF 胶 (GE 公司), 其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.1.2 样品

基因重组汉逊酵母经培养基增殖, 再经过甲醇诱导表达, 破碎细胞并收集细胞原液, 经离心后除去细胞碎片, 超滤换液后经离心后得到粗纯样品。

1.1.3 层析缓冲液

(1) 平衡液 A

①平衡液 A₁: 含 0.8mol/L 硫酸铵的 20mmol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 磷酸缓冲液中, pH7.0 ± 0.2。

②平衡液 A₂: 含 0.5mol/L 硫酸铵的 20mmol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 磷酸缓冲液中, pH7.0 ± 0.2。

③平衡液 A₃: 含 0.3mol/L 硫酸铵的 20mmol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 磷酸缓冲液中, pH7.0 ± 0.2。

(2) 洗脱液 B: 20mmol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 磷酸缓冲液

(3) 2mol/L 硫酸铵溶液: 含 2mol/L 硫酸铵的 20mmol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 磷酸缓冲液中, pH7.0 ± 0.2。

1.2 方法

1.2.1 盐浓度初步筛选 (线性洗脱)

疏水层析条件中盐浓度影响较大, 本研究在硫酸铵浓度为 0.8 mol/L 以下进行筛选, 首先将样品通过加入浓硫酸铵溶液, 将样品调配成含 0.8mol/L 硫酸铵溶液, 并将离心后得到的层析上样液, 使用平衡液 A₁ 对疏水层析柱进行线性洗脱 (见图 1), 根据洗脱 UV 值峰型分析, 硫酸铵浓度在 0.5mol/L 以上, 样品几乎完全挂柱。硫酸铵浓度在 0.25-0.55mol/L 范围时, 样品洗脱情况变化不大, 计划考察 0.3 mol/L 及 0.5 mol/L 两种不同硫酸铵浓度对抗原纯化结果的影响。

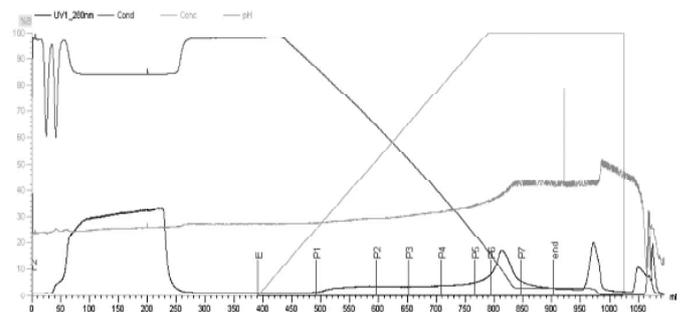


图 1 线性洗脱

1.2.2 层析前样品处理

将粗纯样品加入不同比例的 2mol/L 硫酸铵溶液, 使样品中硫酸铵最终浓度分别为 0.3mol/L 和 0.5mol/L, 经搅拌 20min 后, 进行 7000rpm, 40min 离心收集上清, 检测乙肝疫苗表面抗原含量和蛋白质含量, 计算回收率。

1.2.3 层析

使用 AKTA 层析系统, 用 2-3 倍柱体积的 A 液, 对疏水层析柱 (XK26/20, 柱床体积: 37ml, 柱高: 7cm) 进行前平衡处理, 上样品 150ml, 流速: 2ml/min, 用 A 液继续走 2-4 个柱体积, 以去除掉杂蛋白, 最后以 3ml/min 的速度走 B 液, 对疏水柱进行洗脱, 收集乙肝表面抗原, 检测乙肝表面抗原含量和蛋白质含量, 计算比活、纯化倍数和回收率。

2 结果

疏水层析后经 A₂₈₀ 紫外吸收检测出现 2 个峰。第 1 峰为流穿峰, 所含主要为非疏水性杂蛋白, 第 2 峰为收集峰, 主要是乙肝表面抗原。疏水层析时硫酸铵浓度为 0.5mol/L 时, 流穿峰较 0.3mol/L 时低, 但是抗原收集峰较高 (见图 2 及图 3)。经检测, 流穿峰中的蛋白比活较低, 说明两种浓度的硫酸铵溶液, 均使绝大部分抗原结合到疏水凝胶上。硫酸铵浓度为 0.5mol/L 时, 结合的

抗原量较0.3mol/L时更多,洗脱下来的蛋白比活较高,抗原收率及纯化倍数也较高,说明选择硫酸铵浓度为0.5mol/L,更适合表面抗原的纯化,具体检测结果见表1。

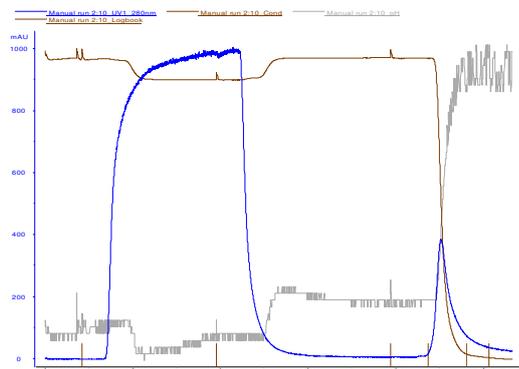


图2 0.3 mol/L硫酸铵溶液疏水层析图谱

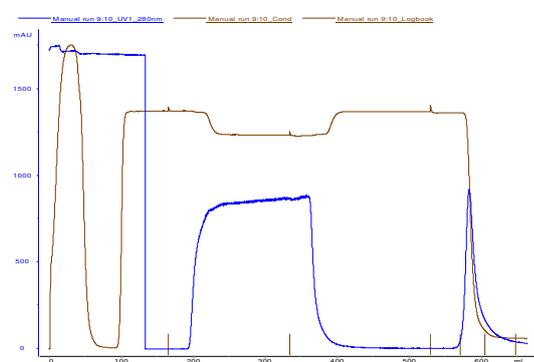


图3 0.5 mol/L硫酸铵溶液疏水层析图谱

表1 不同硫酸铵浓度时疏水层析检测结果

名称	蛋白质含量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	表面抗原含量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	比活	体积 (ml)	纯化 倍数	抗原 收率
粗纯样品	1103.37	733.98	0.67	140	/	/
0.3mol/L硫酸铵上样液	778.98	560.5	0.72	150	1.08	81.82
0.5mol/L硫酸铵上样液	683.3	550.28	0.81	150	1.21	80.33
0.3mol/L硫酸铵流穿	269.15	15.98	0.06	350	/	/
0.5mol/L硫酸铵层析流穿	255.04	10.52	0.04	360	/	/
0.3mol/L硫酸铵洗脱	130.1	245.18	1.88	45	2.62	13.12
0.5mol/L硫酸铵洗脱	317.05	689.47	2.17	43	2.7	35.92

3 讨论

蛋白质分子在HIC凝胶上的分离,是基于凝胶疏水性、样品性质和组成、暴露在表面的疏水性氨基酸残基的情况,以及缓冲液中盐的浓度之间的相互作用。在抗原吸附于疏水凝胶过程中,盐浓度的影响非常显著。盐浓度上升,蛋白质暴露出的疏水集团面积增大,与凝胶结合的机率就大,但随着盐浓度的增高,疏水性越强,会变的不宜洗脱。但是如果盐浓度太低,疏水性会变弱,也不宜吸附于凝胶上。因此,采用疏水层析需要选择适宜的盐浓度,来处理样品及作为层析平衡液使用。本实验采用的盐是硫酸铵溶液,溶液中硫酸根离子不改变蛋白质分子构象,还有提高蛋白质构象稳定性作用。综上所述,在本实验中,经过初步筛选,使用含0.5mol/L硫酸铵的缓冲液,为疏水层析前样品所处的溶液环境,并作为疏水层析的平衡液,所得的抗原收率及纯化倍数较高。

参考文献:

- [1]许宁,李彩梅,张德有,马锐,杨旭琴,柳嵩,沈永才,刘闯,李津.疏水层析纯化乙型肝炎表面抗原峰形规律研究[A].中华预防医学会生物制品分会.2011中国生物制品年会暨第十一次全国生物制品学术研讨会论文集[C].中华预防医学会生物制品分会:中华预防医学会,2011:4.
- [2]蒯芳.硫酸铵浓度对疏水作用层析纯化重组乙肝表面抗原的影响[J].东北农业大学学报,2012,43(09):135-138.
- [3]刘祥义,贾宇,王雪.疏水层析技术及应用[J].河北化工,2012,35(09):68-69.
- [4]路东,董继刚.疏水层析用于纯化重组乙肝表面抗原的研究[J].卫生职业教育,2005(19):82-83.
- [5]许宁,张德有,马锐,冯潇磊,张旭,杨旭琴,李彩梅,柳嵩,沈永才,李津.重组汉逊酵母表达的乙型肝炎病毒表面抗原疏水层析图谱的峰形规律分析[J].中国生物制品学杂志,2013,26(01):109-111.
- [6]姚伟,李建民,毛晓燕,董继刚,张秋峰.疏水层析用于大规模纯化重组HBsAg的工艺研究[J].微生物学免疫学进展,2003(03):29-31.
- [7]王妍,王群,罗璇,官桂范,魏自力,阎昆明.基因工程乙肝病毒表面抗原纯化工艺研究[J].生物工程学报,1999(02):136-139.
- [8]刘闯,朱亭玉,李津,王钊,马锐,王曦,尹长城.汉逊酵母表达乙肝表面抗原的结构研究[J].中国医药生物技术,2009,4(06):441-444.

作者简介:

杨峰(1985.6-),男,汉族,河南新乡人,在读硕士,助力工程师,研究方向:生物制药。