

## 密度梯度区带离心大量提纯乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 的研究

谢彦博 王际彰 张国强 王立新

(卫生部生物制品研究所, 北京)

文献上通常用于大量制备纯 HBsAg 的方法为两次氯化铯等比重分带和一次蔗糖速率区带沉降法。但在我们实验中, 此法似乎不太理想, 因为所得的 HBsAg 通常含有极微量的正常人血清蛋白。我们采用了一种复合的纯化方法, 它包括胃蛋白酶消化、DEAE 纤维素层析, 氯化铯浮升区带离心及蔗糖速率区带离心。此法可以制出纯 HBsAg, 其浮密度在氯化铯梯度中为 1.19—1.23 克/厘米<sup>3</sup>, 在蔗糖梯度中为 1.15—1.16 克/厘米<sup>3</sup>。在纯化的 HBsAg 中未测出正常人血清蛋白, 给豚鼠及马匹免疫 3—4 次可产生单特异抗-HBs 血清, 不含抗正常人抗体, 因此纯度较高。电子显微镜观察, 可见均匀的小球形颗粒, 未见 Dane 颗粒及杆状颗粒。

我们曾用此复合方法制备大量的 HBsAg, 供研制乙型肝炎试验性疫苗之用。

高度纯化的 HBsAg, 对于生产乙型肝炎诊断制剂和研制乙型肝炎疫苗, 都是非常必需的。国外常用的制备方法是密度梯度离心法<sup>[1-3]</sup>, 但由于操作步骤不尽相同, 结果也不完全一致。我们曾报告<sup>[4]</sup>合并应用胃蛋白酶消化-DEAE 纤维素层析-亲和层析-凝胶过滤法, 可以制得高纯度的 HBsAg, 免疫动物可以产生高效价的单特异性抗血清, 但此法收率较低。近年, 我们对单纯密度梯度区带离心法和合并应用密度梯度区带离心法及生物化学法提纯 HBsAg 作了对比研究, 为大量制备纯 HBsAg 提供了经验。

### 材 料 和 方 法

#### (一) 仪器

英国 MSE65 型制备超离心机和 B-XIV 型钛合金区带转头及有关附件, 转头容量 650 毫升。

#### (二) HBsAg 的来源

HBsAg 阳性的人血清或胎盘血清, 经对流电泳法检查, 效价在 1:6 以上者, 置 -20℃ 冰箱中保存备用, 目前 3,000 转/分钟离心 20 分钟, 除去

沉淀物。

#### (三) 各单项提纯方法

在本工作中, 我们单独或合并应用各种方法。各单项方法如下:

##### 1. 生物化学提纯法

① 硫酸铵沉淀法: 将一体积血清加一体积生理盐水, 再加入两体积的饱和硫酸铵。将沉淀再用半饱和硫酸铵洗涤一次后, 透析除去硫酸铵。其他为常规操作。

② 胃蛋白酶消化、DEAE 纤维素离子交换层析、亲和层析均按参考文献<sup>[4]</sup>进行。

##### 2. 生物物理提纯法

① 氯化铯密度梯度浮升区带离心法(简称浮升区带法): 在 300 毫升 HBsAg 阳性血清或 100—150 毫升粗提纯的 HBsAg 溶液中加入固体 CsCl (北京化工厂, 二级), 使其密度 (1.30 克/厘米<sup>3</sup>) 大于 HBsAg 的浮密度 (1.20 克/厘米<sup>3</sup>左右), 经离心后 HBsAg 即浮升到相应的密度形成区带, 而与低密度脂蛋白 (密度 1.06 克/厘米<sup>3</sup>) 和大部分的血清蛋白 (密度 1.30 克/厘米<sup>3</sup>) 分离。

本文于 1979 年 2 月 17 日收到。

电镜工作由中国医学科学院病毒学研究所庞其方大夫进行, 特此致谢。

配制下列密度的溶液和样品:

a. 0.01M 磷酸钠缓冲液 (P.B.)-0.001M EDTA, pH7.4 (简称 PBE)。

b. 用 PBE 配制的 CsCl 溶液, 密度  $1.0 \pm 0.01$  克/厘米<sup>3</sup>。

c. 同 b, 密度  $1.25 \pm 0.01$  克/厘米<sup>3</sup>。

d. HBsAg 样品, 加 CsCl 至密度  $1.30 \pm 0.01$  克/厘米<sup>3</sup>。

e. 同 b, 密度  $1.35 \pm 0.01$  克/厘米<sup>3</sup>。

所有密度均用液体比重天平测定。a—e 的体积见各次实验。

开动超离心机, 当 B-XIV 转头的转速为 3,000 转/分钟时, 从边孔用蠕动泵以 20 毫升/分钟的流速按 a—e 次序加样, 直到中孔出现 a 液为止, 共加入液体 650 毫升。加毕, 加盖, 升速到 30,000 转/分钟 (平均  $44,000 \times g$ ), 离心 20 小时。然后降速至 3,000 转/分钟, 从边孔用蠕动泵顶入密度为 1.50 克/厘米<sup>3</sup> 的 CsCl 溶液, 从中孔流出含有区带的密度梯度液, 流速亦为 20 毫升/分钟。流出液经 280 毫微米波长的紫外线监测记录透光百分率后, 每 10 毫升收集一管。测定各管密度、HBsAg 的反向血凝 (RPHA) 滴度, 将所得数据绘图。根据密度曲线及 HBsAg 分布情况, 将 RPHA 滴度在 1:64 以上各管合并, 体积为 120—150 毫升。用 Millipore 超过滤器以 Pellicon PSJM 滤膜 (公称分子量限度 100,000), 在 20 磅/时<sup>2</sup> 压力下浓缩至 50 毫升左右, 装透析袋并对 PSE 透析。

② 氯化铯等密度区带离心法 (简称等密度区带): 经浮升区带法初步提纯浓缩的 HBsAg 粗品加到 1.15—1.35 克/厘米<sup>3</sup> 的不连续 CsCl 梯度上 (即加到区带转头的里圈), 其上再覆盖以 PBE。经离心后, HBsAg 和其中所含的杂蛋白即在转头内的密度层内依各自的密度排列成区带。

配制 a. PBE 液, b. HBsAg 粗品加固体 CsCl 至密度  $1.05 \pm 0.01$  克/厘米<sup>3</sup>, 体积约 50 毫升; c—f 用 PBE 配制的 CsCl 溶液, 密度分别为 1.15、1.25、1.30、 $1.35 \pm 0.01$  克/厘米<sup>3</sup>。

开动超离心机, 转头为 3,000 转/分钟时, 同上法从边孔按 c—f 次序加入密度梯度液至中孔出现 c 液体。然后再从中孔按 b—a 次序加入样品和 PBE, 同时从边孔顶出 f 液 (垫液)。30,000

转/分钟, 离心 20 小时。然后降速至 3,000 转/分钟, 从中孔顶入无离子水, 从边孔出样。记录波长 280 毫微米的透光率, 收集流出液, 测定密度、HBsAg 滴度, 绘图同前。将 RPHA 滴度在 1:64 以上各管合并, 体积 120—150 毫升。同上法用超过滤浓缩至 50 毫升左右, 对 PBE 透析除去 CsCl 即为 HBsAg 精品。

③ 蔗糖速率区带离心法 (简称速率区带): HBsAg 精品, 根据其中 HBsAg 和残余杂蛋白的沉降速度不同, 再经速率区带离心法进一步分离。

配制下列密度梯度溶液和样品:

a. PBE 液; b. HBsAg 精品, 按 5% (重量百分比, 下同) 加入固体蔗糖 (北京化工厂出品, 挑选在波长 280 毫微米下光密度较低的批号, 45% 时光密度小于 0.05), 体积约 50 毫升, c、d、e 依次为用 PBE 配制的 15%、30%、45% 蔗糖溶液。

当转头转速为 3,000 转/分钟时, 同上法从边孔按 c—e 次序加入密度梯度液至中孔出现 e 液。然后再从中孔按 b—a 次序加入样品和 PBE, 同时从边孔顶出 e 液 (垫液)。30,000 转/分钟离心 20 小时, 后降速至 3,000 转/分钟, 从中孔顶入无离子水, 从边孔出样。记录、收集、测定同前。将 RPHA 滴度在 1:64 以上各管合并, 体积在 120—150 毫升。用超过滤合并透析法除去蔗糖。

#### (四) 实验室检查方法

1. 对流电泳: 按常规方法进行, 使用 1.2% 的日本纯琼脂, 测定 HBsAg 时用本所出品的 HBsAg 诊断血清, 测定正常人血清蛋白 (HuSP) 时用高价马抗 HuSP 血清, 该抗血清的抗体谱较全, 在免疫电泳中与 HuSP 可生成二十多条沉淀线。

2. 反向被动血凝 (RPHA): 使用本所出品的 HBsAg 冻干诊断血球, 按所附使用说明进行 HBsAg 的测定。

3. 被动血凝 (PHA): 使用本所研制的 PHA 血球测定抗-HBs。

4. 电子显微镜观察: 使用日本 JEM-100B 型电镜, 标本用磷钨酸负染。

#### (五) 动物免疫法

1. 免疫原的制备: 在高浓度的 HBsAg 纯品中 (0.3—0.5 毫克/毫升), 按 100:1 体积加入 20% 甲醛溶液, 摇匀, 在 4—10℃ 冰箱中放置一

周以上灭活，加等体积完全弗氏佐剂研磨成乳白色。

2. 取体重为 350—500 克的豚鼠 5 只，免疫前用活卡介苗 (150 毫克/只) 分两只脚掌皮下注射。两周后于两侧肿大的腹股沟淋巴结免疫已加佐剂的纯抗原 0.2 毫升 (两侧共 0.4 毫升，佐剂在内)，以后每隔 3 周免疫一次，共 4 次，注射部位为腹部皮下。剂量为 0.3×2，0.5×2，0.6×2 毫升。免疫后定期采血检测。

结 果

为了便于比较，我们作了几种方法的组合试验，结果如下：

**第 I 法：**包括浮升区带离心、等密度区带离心、蔗糖速率区带离心三步。

1. 浮升区带离心所得曲线见图 1。密度曲线表明，虽然离心前加入的是不连续 CsCl 密度梯度，由于长时间超速离心的结果，形成了比较平滑的直线梯度。透光率曲线表示出，在整个梯度层内均有大量蛋白质存在。在第 10 管以前为一个蛋白质峰，其密度小于 1.1 克/厘米<sup>3</sup>，外观为浅黄色乳浊液，这是低密度的脂蛋白。第 11—66 管包含数个区分不明显的蛋白质峰，其中第 30—37 管含有较高滴度的 HBsAg，其密度范围为 1.20—1.23。第 38 管以后外观为茶棕色，为其他血清蛋白质。将第 27—37 管合并，得 109 毫升，用分光光度计测定波长 280 毫微米下，光密度为 21.0，光密度单位 (光密度单位 = 光密度 × 体

积，是蛋白质的一种定量单位) 为 2,289，因原来 300 毫升血清的光密度单位为 23,400，故此次离心可除去 90.2% 的蛋白质。将所得 HBsAg 部分用超过滤浓缩至 50 毫升。由于使用了公称分子量限度为 100,000 的超滤膜，一部分分子量小于 100,000 的蛋白质可通过滤膜，其量为 324 光密度单位，而 HBsAg 因分子量较大不能通过，所以超过滤法兼有浓缩和纯化的作用。表 1 列出全部超离心过程中体积、光密度、光密度单位、光密度单位剩余百分数的数据。

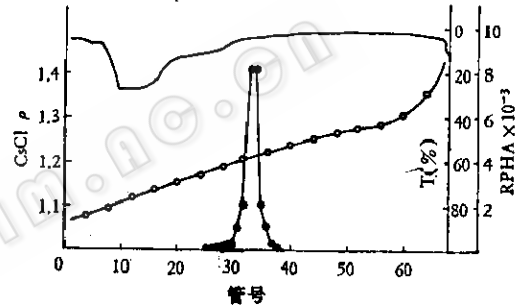


图 1 第 I 法第一步 (浮升区带离心)

B-XIV 转头, 30,000 转/分钟 20 小时。

— 透光%  
—○—○—密度  
—●—●—HBsAg 滴度  
横坐标为收集管号

梯度排列: a. PBE 100 毫升; b. CsCl, 密度 1.10, 200 毫升; c. HBsAg 阳性胎盘血清 300 毫升, 加 CsCl 130 克, 体积共 330 毫升, 密度 1.30; d. CsCl, 密度 1.35, 20 毫升。

2. 等密度区带离心所得曲线见图 2。HBsAg 粗品经离心后可得两个区分不很明

表 1 第 I 法提纯 HBsAg 过程中各项指标变化情况 (78-7 批)

测定项目	CsCl 浮升区带离心			CsCl 等密度区带离心			蔗糖速率区带离心		
	离心前	离心后	超滤后	离心前	离心后	超滤后	离心前	离心后	透析、浓缩后
体积(毫升)	300	109	50	48	124	56	56	154	132
光 密 度	78.0	21.0	39.3	41.0	4.2	8.82	8.82	—	—
光密度单位	23,400	2,289	1,965	1,965	521	495	495	—	173.1
光密度单位剩余(%)	100	9.8	8.4	8.4	2.23	2.12	2.12	—	0.74

表 2 蔗糖速率区带离心各分段的性质(第 I 法)

分段	管号	离心后 体积(毫升)	透析后体 积(毫升)	光密度	光密度 单 位	HBsAg (毫克/毫升)*	HBsAg 收量(毫克)	RPHA 滴度	对流电 泳滴度	杂蛋白
I	17—18	20						1:64	1:2	
II	19—23	52	60	0.73	43.8	0.292	17.5	1:1,024	1:8	±
III	24—28	50	34	2.24	76.1	0.896	30.5	1:32,768	1:64	++
IV	29—33	52	38	1.40	53.2	0.560	21.3	1:8,192	1:16	+
合计	II—IV 段	154	132		173.1		69.3			
原血清								1:512	1:16	++++

\* 按 HBsAg 的  $E_{280}^{1\%1cm} = 25$  计算<sup>(7)</sup>。

显的大峰和另一个小峰(在第 59—62 管)。  
RPHA 结果表明, 第 27—37 管为 HBsAg  
峰, 其比重范围在 1.22—1.18。第 38—58  
管为黄色的杂蛋白, 第 59—62 管为混浊的  
低密度脂蛋白。HBsAg 峰体积为 124 毫  
升, 光密度为 4.2, 光密度单位为 521, 因  
加入的粗制品的光密度单位为 1965, 故这  
一步离心可除去加入蛋白质质量的 73.4%。  
将所得 HBsAg 部分再经超过滤浓缩至 56  
毫升。过滤后光密度单位为 495, 即又除  
去了 26 个光密度单位的杂蛋白(表 1)。

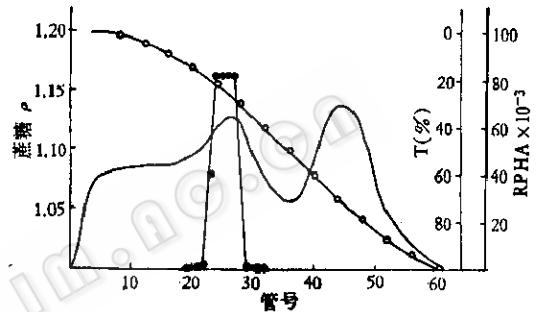


图 3 第 I 法第三步(蔗糖速率区带离心)

梯度排列: a. PBE100 毫升; b. HBsAg 精品,  
按 5% (W/W) 加入固体蔗糖, 共 50 毫升; c—c  
依次为 15%、30%、45% 蔗糖溶液 100、150、250  
毫升。其他同图 1。

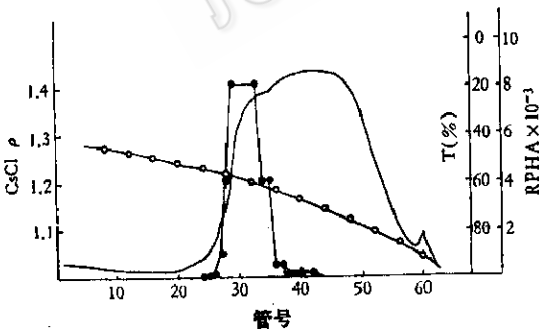


图 2 第 I 法第二步(等密度区带离心)

梯度排列: a. PBE100 毫升; b. HBsAg 粗品加  
CsCl 至密度 1.05, 50 毫升; c. CsCl 溶液, 密度  
1.15, 140 毫升; d. 同 c, 密度 1.25, 100 毫升;  
e. 同 c, 密度 1.30, 250 毫升; f. 同 c, 密度  
1.35, 160 毫升(垫液)。其他同图 1。

3. 速率区带离心的结果见图 3。HBsAg  
精品经速率区带离心后, 按沉降速度的不

同, 又可分为三个成份, HBsAg 集中在第  
22—29 管, 其密度为 1.15—1.16 克/厘米<sup>3</sup>,  
其两侧仍有较弱的 HBsAg 滴度。将第  
17—18、19—23、24—28、29—33 管分别  
合并, 透析除去蔗糖, 浓缩后作 RPHA、对  
流电泳、光密度、HuSP 检测, 结果见表 1、  
2。

从表 1、2 可见, 300 毫升的 HBsAg 阳  
性胎盘血清, 经三次区带离心后, 可以得  
到滴度不同的 HBsAg 溶液 132 毫升, 含  
HBsAg 69.3 毫克。其中分段 III 的 RPHA  
滴度高达 32,768, 对流电泳滴度为 1:64。  
但用马抗 HuSP 检查, 尚含有少量的 HuSP,  
如用作免疫原, 制备高价的单特异抗-HBs  
血清, 则尚需马抗 HuSP 制成的亲和层析



从表 3 可见, 300 毫升的 HBsAg 阳性胎盘血清, 经提纯后可以得到纯 HBsAg 85 毫升, 其对流电泳滴度为 1:16, 共可得到纯 HBsAg 32.6 毫克, 未检出 HuSP。

**第 III 法:** 在第 II 法之前, 先用半饱和和硫酸铵沉淀提纯。这样可以减少超离心时间和次数。结果表明, 在浮升区带离心后, HBsAg 峰的分离较单纯第 II 法为佳 (图 7), 在速率区带离心后, 只有 HBsAg 一个峰 (图 8), 未见杂蛋白峰, 可见 HBsAg 纯度更加提高。

**第 IV 法:** 包括半饱和和硫酸铵沉淀和一次浮升区带离心。结果 (图 9) 表明, HBsAg 峰的分离较好, 但用马抗-HuSP 检查尚有少量的 HuSP。

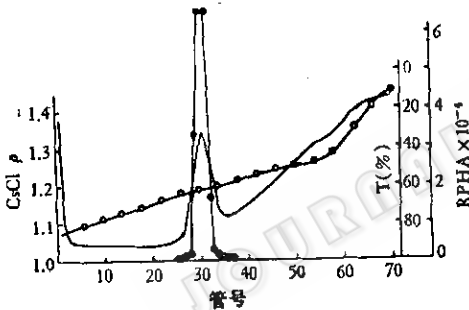


图 7 第 III 法第四步 (浮升区带离心)

梯度排列: a. PBE82 毫升; b、c. CsCl 溶液, 密度分别为 1.10、1.25, 体积分别为 200 毫升、225 毫升; d. 样品 118 毫升, 密度 1.30; e. CsCl 溶液, 密度 1.35、1.25 毫升。其他同图 1。

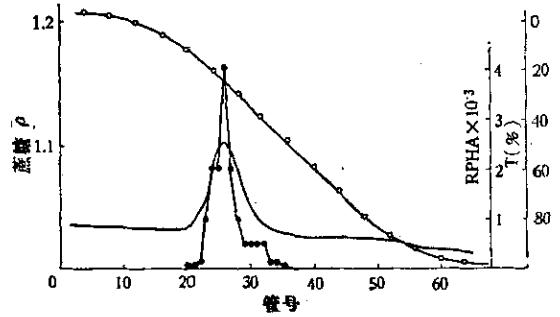


图 8 第 III 法第五步 (蔗糖速率区带离心)

梯度排列: a. PBE 100 毫升; b. 样品 48 毫升加蔗糖 2.4 克; c. 15% (W/W, 下同) 蔗糖 100 毫升; d. 30% 蔗糖 150 毫升; e. 45% 蔗糖 250 毫升。其他同图 1。

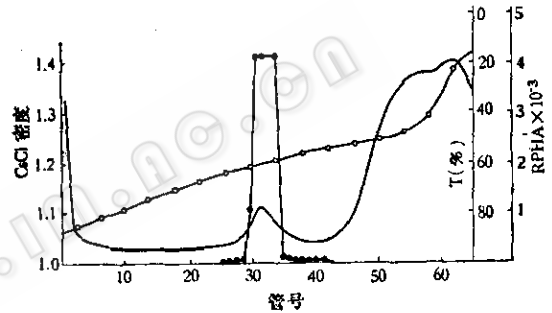


图 9 第 IV 法第二步 (浮升区带离心)

梯度排列: a. PBE 100 毫升; b. CsCl 密度 1.1, 200 毫升; c. CsCl 密度 1.25, 225 毫升; d. 样品 104 毫升 + CsCl 41 克; e. CsCl 密度 1.35, 21 毫升。其他同图 1。

### 豚鼠用 HBsAg 高价免疫试验结果:

为了最终判定提纯的 HBsAg 中是否有残余的 HuSP, 采用豚鼠高价免疫法。第 II

表 4 第 II 法制备 HBsAg 豚鼠高价免疫结果

动物号	第二针后 14 天			第三针后 14 天			第四针后 11 天		
	PHA 滴度	对流电泳 (原倍)	抗-HuSP	PHA 滴度	对流电泳滴度	抗-HuSP	PHA 滴度	对流电泳滴度	抗-HuSP
11	2 <sup>5</sup>	+	-	2 <sup>11</sup>	64	-	2 <sup>10</sup>	64	-
12	2 <sup>5</sup>	+	-	2 <sup>13</sup>	128	-	2 <sup>20</sup>	64	-
13	2 <sup>7</sup>	+	-	2 <sup>19</sup>	128	-	2 <sup>20</sup>	128	-
14	2 <sup>6</sup>	+	-	2 <sup>17</sup>	128	-	2 <sup>20</sup>	128	-
15	2 <sup>3</sup>	+	-	2 <sup>8</sup>	64	-	2 <sup>12</sup>	32	-

法提纯的 HBsAg 免疫结果见表 4。免疫四针后仍未见抗-HuSP 产生,抗-HBs 对流电泳效价一般在 1:64—1:128,可见纯度和免疫原性较好。

## 讨 论

用区带离心大量提纯 HBsAg 最早见于 Gerin 等人的报道<sup>[1]</sup>。他们用两次氯化铯等密度区带离心和一次蔗糖速率区带离心制备纯 HBsAg。其后, Tayot 等报告<sup>[2]</sup>用蔗糖密度梯度区带离心四次,可以得到纯品,但有些批号的 HBsAg 尚含有痕迹量的 IgM,需用 Pronase 处理后再离心一次,才可得到纯品。Bond 等报告<sup>[3]</sup>用三次氯化铯区带离心可以得到纯品。但这些报告均无免疫动物的资料。Dressman 等报告<sup>[5]</sup>,合并应用差别离心、超声处理、酸处理、两次氯化铯密度梯度离心和一次蔗糖速率区带离心,可得到纯 HBsAg。免疫山羊三针后,可以得到高效价抗-HBs 单特异性血清,但第二免程后则出现微量抗-HuSP 抗体。我们试验的结果说明,用两次氯化铯等密度区带离心和一次蔗糖速率区带离心(第 I 法)所得的 HBsAg 尚含有少

量 HuSP,用胃蛋白酶消化-DEAE 纤维素层析-浮升区带离心-速率区带离心(第 II 法)所得的 HBsAg 则不含有 HuSP,高价免疫豚鼠亦不产生抗-HuSP,已达到单特异抗-HBs 血清水平,可见抗原纯度较佳。增加半饱和硫酸铵沉淀工序亦可提高纯度,减少离心时间。关于 HBsAg 浮密度(克/厘米<sup>3</sup>), Kim 等报告<sup>[6]</sup>在氯化铯梯度中为 1.216,在蔗糖梯度中为 1.17, Gerin 等报告<sup>[1]</sup>在氯化铯梯度中为 1.20, Tayot 等报告<sup>[2]</sup>在蔗糖梯度中为 1.16。我们几次试验的结果是:在氯化铯梯度中为 1.20—1.23、1.18—1.22、1.19—1.23,在蔗糖梯度中为 1.15—1.16、1.13—1.16,与文献报道相近。

## 参 考 文 献

- [1] Garin, J. L. et al.: *J. Virol.*, 7:569, 1971.
- [2] Tayot, J. L. et al.: *Amer. J. Dis. Child.*, 123:322, 1972.
- [3] Bond, H. E. et al.: *J. Inf. Dis.*, 125:263, 1972.
- [4] 谢彦博等: *微生物学报*, 18(2):140, 1978.
- [5] Dressman, G. R. et al.: *Inf. and Imm.*, 5: 213, 1972.
- [6] Kim, C. Y. et al.: *J. Clin. Invest.*, 52:1176, 1973.
- [7] Ling, C. M. et al.: *J. Imm.*, 109:834, 1972.

## A STUDY ON THE LARGESCALE PREPARATION OF HBsAg BY DENSITY-GRADIENT ZONAL CENTRIFUGATION

Xie Yan-bo Wang Ji-zhang Zhang Guo-quiang Wang Li-xin

(National Vaccine and Serum Institute, Beijing)

In literatures, the usual methods for the large-scale preparation of pure HBsAg involved two cycles of cesium chloride isopycnic banding and one cycle of sucrose rate zonal sedimentation. In our hands, however, this seemed inadequate because the HBsAg obtained usually contained trace of normal human serum proteins. A composite purification procedure has been worked out in our laboratory. It consisted of pepsin digestion, DEAE-cellulose chromatography (fig. 4), floating type of cesium chloride zonal centrifugation (fig. 5) and sucrose rate zonal centrifugation (fig. 6). It can give pure HBsAg with bouyant densities

ranging from 1.19 to 1.23 g/cm<sup>3</sup> in cesium chloride gradient and from 1.15 to 1.16 g/cm<sup>3</sup> in sucrose gradient. Normal human serum proteins were undetectable in the purified HBsAg and 3—4 times immunizations to guinea pigs and horses gave rise to monospecific anti-HBs sera. These verified its high purity. Electron microscopic studies revealed a monodispersed small spherical particles (photo. No. 3) without detectable Dane particles or filaments.

Now, large quantity of HBsAg are produced by this composite procedures in our laboratory for the purpose of making an experimental Hepatitis B vaccine.