

含前 S1、前 S2 和 S 表位的乙型肝炎病毒表面抗原不同组分的 SDS-PAGE 定量分析

胡波 谭昌耀 蒋丽明 袁进 金瓯

【摘要】 目的 通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对含前 S1、前 S2 和 S 三种抗原成分的乙型肝炎病毒表面抗原 SS1S2(由 SS1 和 SS2 两种抗原组成)不同组分进行定量分析,建立 SS1S2 原液中 SS1 和 SS2 抗原的 SDS-PAGE 定量测定方法。**方法** 对 SDS-PAGE 条件进行优化,确立 SS1S2 中 SS1 和 SS2 抗原的分离条件。用 Gel-Pro Analyzer 图形分析软件分析电泳图谱上不同蛋白带的相对含量。取 3 批制品对该含量测定方法进行重复性验证。运用该方法测定不同批次 SS1S2 原液中 SS1 和 SS2 抗原的相对含量并进行统计分析,确定 SS1 和 SS2 抗原的取值范围。**结果** 通过优化 SDS-PAGE 电泳条件,SS1S2 中的 SS1 和 SS2 组分得以有效分离,进而通过软件分析得到其含量百分比。利用 3 批制品对该方法进行重复性验证,SS1 和 SS2 抗原含量的变异系数分别为 5.38%~6.21% 和 6.27%~6.97%。通过对 12 批 SS1S2 原液的 SS1 和 SS2 抗原含量进行测定,以均值 $\pm 3 \times$ 标准差(99%可信区间)作为取值标准,确定 SS1S2 原液中 SS1 和 SS2 抗原的取值范围分别为 55.10% \pm 16.20% 和 44.90% \pm 16.20%。**结论** 建立了 SS1S2 原液中 SS1 和 SS2 抗原的 SDS-PAGE 定量测定方法并初步确定了该疫苗原液不同组分的限量标准。

【关键词】 肝炎表面抗原,乙型; 前 S1; 前 S2; 电泳,聚丙烯酰胺凝胶

【中图分类号】R373.21 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1673-4211(2008)06-0252-04

Quantitative SDS-PAGE analysis for different components in recombinant HBsAg vaccine bulks containing preS1, preS2 and S epitopes HU Bo, TAN Chang-yao, JIANG Li-ming, et al. Department of Biotechnology, Chengdu Institute of Biological Products, Chengdu 610023, China
Corresponding author: TAN Chang-yao, Email: changyaotan@gmail.com

【Abstract】 Objective To develop a quantitative SDS-PAGE method to determine the percentages of SS1 and SS2 polypeptides in recombinant HBsAg vaccine bulks containing preS1, preS2 and S epitopes.

Methods Optimization of SDS-PAGE procedure was performed to ensure the separation of SS1 and SS2 subunits and their relative percentages were determined according to the band intensities in the gel with Gel-Pro Analyzer software. The repeatability of the test was validated based on multi-measurements of 3 separate samples, and then the quality standards of SS1 and SS2 contents in bulks of the vaccine were inferred by statistic analysis of the testing results from different batches of vaccine bulks. **Results** SS1 and SS2 bands were effectively separated after optimization of SDS-PAGE procedure and their relative contents were obtained. The repeatability validation results showed that the coefficients of variation of SS1 and SS2 contents were 5.38%-6.21% and 6.27%-6.97%, respectively. The quality control limits for the SS1 and SS2 contents were determined as 55.10% \pm 16.20% and 44.90% \pm 16.20%, respectively, based on the criterion of mean $\pm 3 \times$ SD. **Conclusion** The quantitative SDS-PAGE method for the measurement of SS1 and SS2 contents has been established and validated. The quality standards of SS1 and SS2 contents in bulks of the vaccine have also been established based on the test method.

【Key words】 Hepatitis B surface antigens; PreS1; PreS2; Electrophoresis, polyacrylamide gel

前 S1、前 S2 和 S 抗原表位的乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)表面抗原(SS1S2),以期开发出一种免疫效果更好、成本更为低廉的新型乙型肝炎疫苗。该抗原由羧基端含前 S1 表位的 HBV 表面抗原融合基因 SS1 和羧基端含前 S2 表位的 HBV 表面抗原融合基因 SS2 在同一个菌株中表达而成,同时具有前 S1、前 S2 和 S 抗原性^[1]。对这样一种含前 S 抗原的疫苗而言,前 S1、前 S2 和 S 抗原在疫苗中的组成比例及其在制备过程中是否稳定都会对疫苗质量产生直接影响,而对前 S 抗原进行定量,是疫苗质量标准研究的重要内容之一。SS1 和 SS2 多肽分别含有 254 和 252 个氨基酸残基,分子大小略有不同,如能通过凝胶电泳的方法将两条多肽链分开,就可以通过对电泳条带扫描来进行定量分析。我们通过对十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)条件进行优化,确立了 SS1S2 中 SS1 和 SS2 抗原的分离条件,建立了 SS1 和 SS2 组分的定量测定方法,并对该方法进行了重复性验证。进一步应用该方法对多批 SS1S2 原液的 SS1 和 SS2 抗原含量进行测定并进行统计分析,初步确定了疫苗原液 SS1 和 SS2 抗原的含量标准。

1 材料与方法

1.1 主要材料

毕赤酵母表达的含前 S1、前 S2 和 S 表位的 HBV 表面抗原 SS1S2、独立表达的 SS1 和 SS2 抗原均由本课题组自行制备。SDS-PAGE 电泳样品处理液 A [4×浓度,含 8% SDS、20% β-巯基乙醇、20% 甘油、40 mmol/L Tris-HCl(pH8.0)、4 mmol/L 乙二胺四乙酸、溴酚蓝少许]、样品处理液 B [2×浓度,含 4% SDS、65% β-巯基乙醇、1.3 mol/L 二硫苏糖醇、0.25 mol/L Tris-HCl(pH8.0)、溴酚蓝少许^[2]]均为本课题组自行配制。Hoefer miniVE 垂直电泳系统(玻璃板 10 cm×10 cm)购自美国安玛西亚公司。

1.2 SS1S2 原液中 SS1 和 SS2 组分电泳分离条件的确定

采用常规 SDS-PAGE(还原型)电泳流程进行实验,对其中的部分试剂或参数进行调整和优化。重点比较不同的样品处理液、胶浓度、上样量等对电泳分离效果的影响,通过参数优化形成完整的电泳分离流程。

1.3 SS1S2 原液中 SS1 和 SS2 组分的鉴别

将 SS1S2 抗原和单独制备的 SS1、SS2 抗原同时进行 SDS-PAGE(还原型)电泳分离,确定 SS1S2

抗原分离条带与 SS1、SS2 抗原带的位置关系,从而对 SS1S2 抗原的组成成分进行鉴别。

1.4 电泳胶片拍照及分析

用 Gel Media System 凝胶成像系统对电泳胶片进行拍照并用 Gel-Pro Analyzer 软件分析各个电泳条带的含量百分比。

1.5 测定方法的重复性验证

取 3 个批次的 SS1S2 原液,采用优化后的电泳分离条件,在不同时间重复进行 5 次 SDS-PAGE 电泳分离实验,确定各次实验中 SS1 和 SS2 组分的含量百分比,计算不同测定结果间的变异系数(CV)。

1.6 SS1S2 原液中 SS1 和 SS2 抗原含量标准的确定

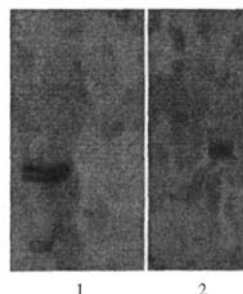
测定 12 批 SS1S2 原液中的 SS1、SS2 抗原含量百分比并进行统计分析。以均值(\bar{x})±3×标准差(s)(99%可信区间)作为取值标准,确定 SS1、SS2 抗原含量百分比的取值范围。

2 结果

2.1 SS1 和 SS2 抗原的电泳分离

2.1.1 不同样品处理液对电泳分离效果的影响

取 SS1S2 原液,分别加入样品处理液 A 和 B,100 ℃加热处理 10 min,用 15% 的分离胶进行 SDS-PAGE 并银染显色。结果显示,样品经样品处理液 B 处理后电泳,可以得到比较好的分离效果(见图 1)。



注:1:样品处理液 B;2:样品处理液 A

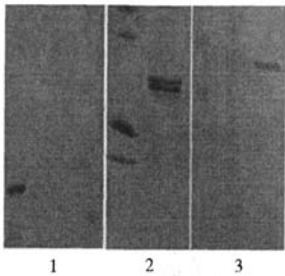
图 1 两种样品处理液的效果比较

2.1.2 不同分离胶浓度对电泳分离效果的影响

采用样品处理液 B 处理样品,用 12%、15% 和 18% 3 种浓度的分离胶对 SS1S2 进行电泳分离。结果显示,采用 15% 的分离胶能够得到最佳分离效果(见图 2)。

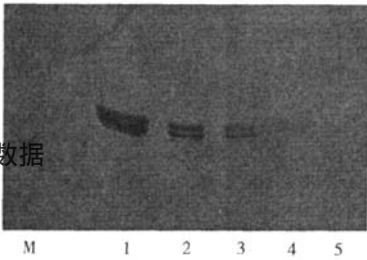
2.1.3 上样量对电泳分离效果的影响 分别取 SS1S2 纯化抗原 0.25、0.5、1.2 和 5 μg,经样品处理液 B 处理后,用 15% 的分离胶进行电泳分离并经银染显色。从图 3 可以看出,各个泳道前 S1 和前 S2

抗原都能得到一定程度的分离,但 5 μg 样品着色较深,条带也较粗,前 S1 和前 S2 抗原分隔不明显;而 0.5 和 0.25 μg 样品着色太浅,不利于拍照分析。1 和 2 μg 样品着色适中,条带分隔也比较明显,可以得到比较好的分离和染色效果。



注:1:12%分离胶;2:15%分离胶;
3:18%分离胶

图 2 不同分离胶浓度的效果比较

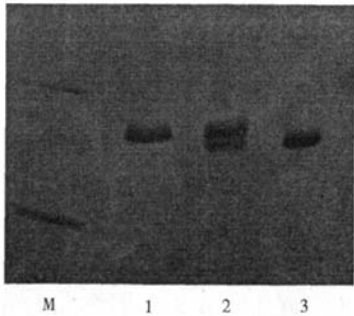


注:M:分子量标准;1:5 μg ;2:2 μg ;3:1 μg ;
4:0.5 μg ;5:0.25 μg

图 3 不同上样量的效果比较

2.2 SS1 和 SS2 抗原的鉴别

按照优化的电泳条件,将 SS1S2 与分别制备的 SS1 和 SS2 抗原同时进行电泳并银染显色,结果如图 4。SS1S2 经电泳后分离为主要的两条带,上面的条带与 SS1 抗原对应,下面的条带与 SS2 抗原对应。这一结果显示,SS1S2 在经电泳分离后,上面的染色带是 SS1 抗原,下面的染色带是 SS2 抗原。



注:M:分子量标准;1:SS1;2:SS1S2;3:SS2

图 4 SS1S2 中 SS1 和 SS2 组分的分离与鉴别

2.3 测定方法的重复性验证

取 20061107、20070208 和 20070302 3 批 SS1S2 纯化抗原,对 SS1 和 SS2 抗原的含量百分比进行 5 次重复测定,计算每批制品 SS1 和 SS2 抗原含量百分比的 CV,结果如表 1。3 批制品中,SS1 重复测定的 CV 分别为 5.38%、5.49%和 6.21%,SS2 重复测定的 CV 分别为 6.97%、6.83%和 6.27%,说明该测定方法具有比较好的重复性。

表 1 3 批制品 SS1 和 SS2 抗原含量百分比的

重复性测定结果

实验 编号	20061107 批		20070208 批		20070302 批	
	SS1(%)	SS2(%)	SS1(%)	SS2(%)	SS1(%)	SS2(%)
1	51.16	48.84	57.55	42.45	49.72	50.28
2	56.80	43.20	53.57	46.43	49.17	50.83
3	57.88	42.12	59.80	40.20	54.34	45.66
4	58.84	41.16	53.18	46.82	46.02	53.98
5	57.45	42.55	53.21	46.79	51.95	48.05
\bar{x}	56.43	43.57	55.46	44.54	50.24	49.76
s	3.036	3.036	3.043	3.043	3.121	3.121
CV(%)	5.38	6.97	5.49	6.83	6.21	6.27

2.4 SS1S2 中 SS1 和 SS2 抗原含量标准的确定

测定 12 批 SS1S2 原液的 SS1 和 SS2 抗原含量,以 $\bar{x} \pm 3s$ (99%可信区间)作为取值标准,确定 SS1、SS2 抗原含量百分比的取值范围。12 批样品中,SS1 含量百分比平均为 55.10%,取值范围 38.9%~71.3%;SS2 含量百分比平均为 44.90%,取值范围 28.7%~61.1%(见表 2)。

表 2 12 批 SS1S2 原液中 SS1 和 SS2 抗原含量

百分比的测定和统计分析

制品批号	SS1(%)	SS2(%)
050609	51.24	48.76
060317	50.86	49.14
060519	52.33	47.67
061013	50.30	49.70
061107	56.43	43.57
070208	56.26	43.74
070301	60.17	39.83
070302	50.24	49.76
070518	62.08	37.92
071102	64.15	35.85
071116	59.48	40.52
071201	47.70	52.30
\bar{x}	55.10	44.90
s	5.399	5.399
CV(%)	9.798	12.02
取值区间(%)	38.9~71.3	28.7~61.1

3 讨论

HBV 表面抗原颗粒由 100 个左右的蛋白质亚基组成^[3],每个亚基含有 14 个半胱氨酸残基,可以形成多对链内或链间二硫键。在还原型 SDS-PAGE 中,样品处理液需要较强的还原能力才能使样品处理比较完全。在本研究中,样品处理液 B 比样品处理液 A 具有更强的还原性,样品分离的效果也比较好,其结果与 HBV 表面抗原的这一结构特点是相符的。

组成 SS1S2 的 SS1 和 SS2 肽链分别由 254 和 252 个氨基酸残基组成,分子量差别很小,电泳分离有一定难度。本研究在对 SDS-PAGE 过程进行优化以后,SS1 和 SS2 组分仍然得到了一定程度的分离,这为测定前 S1、前 S2 组分的相对含量奠定了基础。值得一提的是,通过比较电泳条带的染色深浅确定被分离组分的含量只是一种相对定量的方法,并不能代表其绝对量的多少。我们用单一的 SS1 和 SS2 抗原等量混合电泳后进行银染,SS1 条带比 SS2 条带着色要深(未发表资料),说明这两种多肽链由氨基酸组成的差异,在电泳染色时显色程度不同。

对含前 S 抗原疫苗的前 S1 和前 S2 含量进行检

测并建立相应的质控标准,是疫苗质量管理的一项重要内容。我们通过对 SDS-PAGE 的部分关键参数进行优化,确立了 SS1S2 不同组分的分离条件,使含量分析成为可能。虽然 SDS-PAGE 通常不用于定量分析,但在本研究对同一样品的重复性测定中,CV 均在 10% 以下,表现出较好的重复性。这说明在特定条件下,只要严格控制实验过程,SDS-PAGE 用于定量分析还是可行的。通过对 12 批 SS1S2 原液中 SS1 和 SS2 抗原含量的分析,确定了各自含量百分比的范围,使疫苗原液前 S 抗原的含量指标有了初步判断标准。

参考文献

- [1] 谭昌耀,蒋丽明,葛永红,等. 修饰的含前 S1、前 S2 免疫决定簇乙肝表面抗原融合多肽在毕赤酵母中的共表达. 生物工程学报,2006,22(4):604-608.
- [2] Tleugabulova D. Size-exclusion chromatographic study of the reduction of recombinant hepatitis B surface antigen. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1998, 713(2):401-407.
- [3] Heermann KH, Goldmann U, Schwartz W, et al. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-S sequence. J Virol, 1984, 52(2):396-402.

(收稿日期:2008-06-27)

• 简讯 •

治疗性高血压疫苗进入 IIa 期临床试验

英国 Protherics 公司启动了一项用于治疗高血压的治疗性血管紧张素疫苗(ATV)的双盲安慰剂对照 IIa 期临床试验。试验包括 124 例轻至中度高血压患者,在 6 周内给予一个疗程疫苗注射。此项研究的目的是接种加新佐剂 CoVaccine HT™ 的 ATV 的安全性和可耐受性。

高血压是一种常见病,可引起严重心血管疾病(如心脏病发作和心力衰竭)和肾功能损害。目前高血压患者需要每天服用降压药片。然而,许多患者不能坚持服药。因此,仅需注射几次的治疗性疫苗可提高患者的依从性,与每天服药相比,是更可取的选择。

Protherics 公司的 ATV 含有与载体蛋白匙孔螯血蓝蛋白结合的血管紧张素 I 的多肽类似物。疫苗的目的是诱导中和血管紧张素 I 的免疫应答,从而控制高血压患者的血压。

先前的一项以铝胶(Alhydrogel®)作佐剂的 ATV IIa 期临床试验表明,ATV 可调节高血压患者的激素水平和血压。在此项试验中,将以新佐剂 CoVaccine HT™ 取代 Alhydrogel®。

参考文献:Therapeutic Vaccine for hypertension enters a phase IIa clinical trial. Expert Rev Vaccines, 2008, 7(6):709.

(史久华摘)