

Large-scale purification of hepatitis B surface antigen using affinity chromatography¹

A. R. Neurath, A. M. Prince and J. Giacalone

The Lindsley F. Kimball Research Institute of The New York Blood Center, New York (New York 10021, USA),
27 June 1977

Summary. Large-scale purification of hepatitis B surface antigen, applicable to the preparation of potential vaccines for prevention of hepatitis B, is described. The method involves the following steps: precipitation of serum with polyethylene glycol 6000, affinity chromatography on concanavalin A-Sepharose and on ω -aminononyl-Sepharose, and isopycnic centrifugation.

Isopycnic banding in density gradients is a powerful tool for separation of hepatitis B surface antigen (HB_sAg) from proteins². However, the method becomes cumbersome and expensive when large volumes of HB_sAg-positive serum have to be processed. This disadvantage can be overcome by partial purification and concentration of HB_sAg before centrifugation. We report here the application of affinity chromatography^{4,5} for large-scale purification of HB_sAg potentially useful for the preparation of vaccines for prevention of hepatitis B.

Serum (a pool obtained from several donors) containing either the d or y subtype of HB_sAg was precipitated with 6% polyethylene glycol 6000³. The supernatant fluid containing the spherical forms of HB_sAg approximately 20 nm in diameter was chromatographed on a 3.5 l column (K100/45, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) of concanavalin A linked to Sepharose. 200 ml samples were collected using a PF-30 fraction collector (Pharmacia). HB_sAg was determined in the fractions by radioimmunoassay³⁻⁵. Results shown on figure 1 indicate that 85% of total protein was removed from HB_sAg. Fractions containing HB_sAg were pooled and applied to a column of ω -amino-nonyl-Sepharose. Results on figure 2 indicate that 91% of protein was removed from HB_sAg in this second chromatographic step. Fractions containing HB_sAg (purified approx. 92fold) were concentrated 300fold in a model 2000 ultrafiltration cell (Amicon Corporation, Lexington, Mass.) using a PM30 Diaflo membrane.

The concentrated and partially purified HB_sAg can be further purified by isopycnic gradient centrifugation. We used an SZ-28 reorienting density gradient zonal rotor (Sorvall Instruments Newton, Conn.) for this purpose. The sample (300 ml) adjusted to a density of 1.3 g/cm³ by addition of solid KBr, was pumped into the rotor on top of 150 ml of 40% (w/w) KBr followed by a gradient (900 ml) of 7 to 31% (w/w) KBr. The rotor was centrifuged in the OTD-2 ultracentrifuge (Sorvall) operating in the

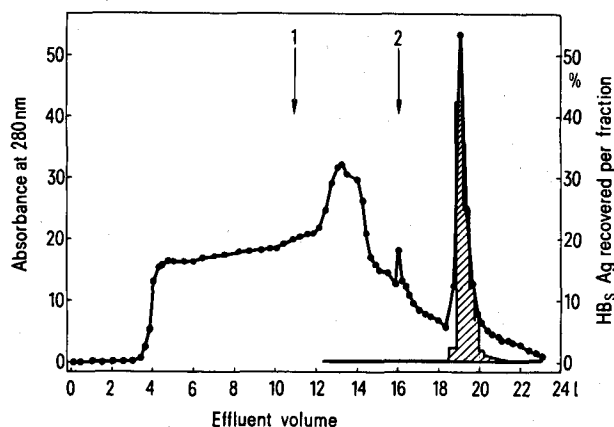


Fig. 1. Partial purification of HB_sAg on a 3.5 l column of concanavalin A linked to Sepharose. Starting material = 9.5 l of serum from which tubular forms of HB_sAg, Dane particles and about 20% of human serum proteins had been removed by precipitation with 6% polyethylene glycol. Arrows indicate start of elution with 0.14 M NaCl 10⁻³ M CaCl₂, 10⁻³ M MnCl₂, 0.01 M Tris pH 7.2 (1) and with 5% α -methylmannoside in 0.14 M NaCl - 0.01 M Tris pH 7.2 (2). Shaded area: HB_sAg.

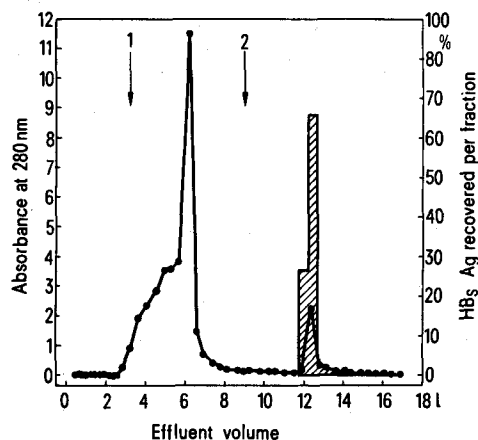


Fig. 2. Partial purification of HB_sAg on a 3.5 l column of ω -amino-nonyl Sepharose. Starting material = HB_sAg partially purified by affinity chromatography on insolubilized concanavalin A (material corresponding to 4 l of original serum). Arrows indicate start of elution with 0.5 M NaCl 0.01 M Tris (1) and with 3 M NaSCN (2). Shaded area: HB_sAg.

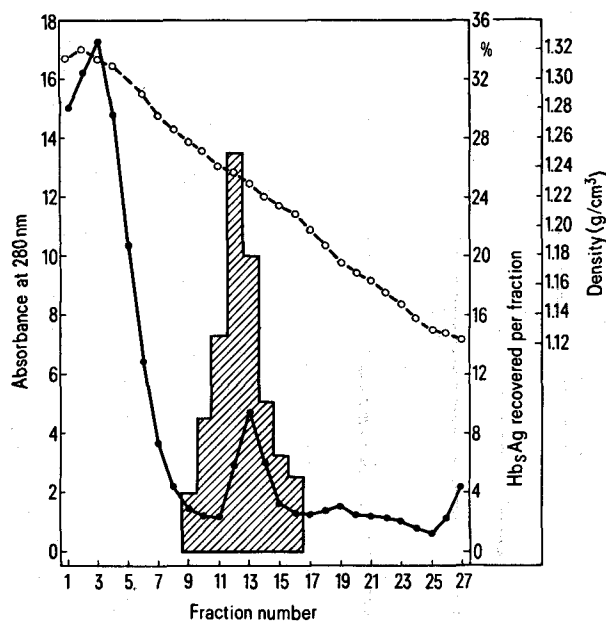


Fig. 3. Isopycnic banding of HB_sAg in a KBr gradient in the Sorvall SZ-28 rotor (volume = 1,350 ml). Partially purified HB_sAg, prepared as described under Figure 1 and 2 and corresponding to 9.5 l of original serum was centrifuged in the rotor for 42 h at 28,000 rpm. Shaded area corresponds to fractions (50 ml each) containing HB_sAg. —●— OD₂₈₀, —○— density.

zonal-reograd mode. HB_sAg and 0.18% of protein originally present in the serum (as determined by measurements of OD at 280 nm) were recovered in the middle of the gradient (figure 3). Due to mixing during gradient reorienting, the resolution of molecules with different buoyant densities was less complete than would be expected for nonreorienting gradient centrifugation. For this reason, the samples containing HB_sAg were re-centrifuged under the same conditions. The final recovery of HB_sAg after all purification steps was approximately 50% as calculated from results of radioimmunoassays and complement fixation tests. The amount of normal human serum protein per mg of HB_sAg was not more than 60 µg as determined by a radioimmunoassay inhibition test⁶ even though this test does not discriminate

between protein impurities and antigenic sites related to normal human protein(s) which are an integral part of HB_sAg particles.

- 1 This study was supported by grant 09011 from the National Heart, Lung and Blood Institute. We thank Dr. B. Hollinger for testing HB_sAg samples by a complement fixation test.
- 2 C. R. Howard and C. J. Burrell, *Prog. med. Virol.* 22, 37 (1976).
- 3 A. R. Neurath, L. Cosio, A. M. Prince, A. Lippin and H. Ikram, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 143, 440 (1974).
- 4 A. R. Neurath, A. M. Prince and A. Lippin, *J. gen. Virol.* 19, 391 (1973).
- 5 A. R. Neurath, S. Lerman, M. Chen and A. M. Prince, *J. gen. Virol.* 28, 251 (1975).
- 6 Own data to be published.

Sur une méthode de récolte de diatomées vivantes après culture A method for collecting living diatoms after culture

J.-L. Boutry et M. Bordes

Laboratoire de biologie et Biochimie Marines, I.U.T., F-1700-La Rochelle (France), 26 août 1977

Summary. The best conditions for collecting living diatoms (*Chaetoceros simplex calcitrans*) after culture and their introduction into a replacement medium have been determined. Traumatism (such as ionic, thermic, gravimetric) have been minimized.

Au cours de recherches précédentes nous avons été amenés à récolter des diatomées intactes à partir d'un milieu de culture et ceci dans des conditions satisfaisantes de stérilité, afin de pouvoir les réintroduire dans un milieu neuf. Dans la présente note nous reportons les conditions qui nous ont fourni les meilleurs résultats. De telles opérations nécessitent en effet de cerner convenablement un ensemble de facteurs traumatisant, qu'il s'agisse de la température, de l'accélération durant la centrifugation, de la pression osmotique et de la force ionique.

Les diatomées ont été séparées du milieu par centrifugation, ce qui amène à circonscrire 4 phénomènes physiques:

1. Nous avons travaillé avec les diatomées *Chaetoceros simplex calcitrans* Paulsen cultivées à $+18 \pm 0,1^\circ\text{C}$; elles doivent être récoltées entre $+1^\circ\text{C}$ et $+5^\circ\text{C}$ afin d'augmenter la résistance de leur protoplasme et de diminuer le pouvoir d'échange de leur membrane cellulaire: d'où le risque d'un choc thermique capable de mettre les algues en «dormance».
2. L'accélération centrifuge utilisée doit être inférieure à la résistance à l'écrasement de la carapace péricellulaire externe des diatomées: le choc dynamique est donc à réduire au minimum.
3. Ces carapaces siliceuses prennent facilement des charges électriques par friction lors de leur déplacement dans un fluide: ces charges maintiennent les diatomées agglomérées entre elles si toute décharge est impossible.
4. Le passage des diatomées d'un milieu usé à pH 8,6–8,7 dans un milieu neuf à pH 7,5 ne se fait pas sans choc ionique: atténuer ce choc et une variation trop brusque de la pression osmotique du milieu par rapport à celle des algues est nécessaire pour qu'elles poursuivent leur croissance normalement.

Méthodes. Après lavage, et double rinçage à l'eau bidistillée, toute la verrerie utilisée est stérilisée à $+140^\circ\text{C}$ à l'étuve durant 1 h; tous les liquides sont filtrés sur coton hydrophile puis stérilisés à l'autoclave à $+120^\circ\text{C}$ durant 20 min: les pertes en volume à l'autoclave sont compensées. Les godets de centrifugation en polypropylène, après lavage et rinçage, sont immergés dans l'éthanol à 98%,

puis emballés dans des feuilles d'aluminium stériles ils sont séchés à l'étuve stérile à $+60^\circ\text{C}$; on opère de même pour les bouchons en duralumin et les joints en latex.

Les erlenmeyers contenant une culture en milieu stérile de diatomées *Chaetoceros simplex calcitrans* Paulsen âgée de 8 à 10 jours^{1,2} sont mis durant 5 h dans une chambre froide stabilisée à $+1^\circ\text{C}$: la température de $+8^\circ\text{C}$ étant atteinte dans la culture, on la transvase stérilement dans les godets de 500 ml en polypropylène qui sont placés dans un rotor angulaire de centrifugeuse climatisé à $+5 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Le rotor est lancé à 10 000 t/min durant 20 min, fournissant ainsi une accélération centrifuge de $16\,500 \times g$ au fond, $9\,000 \times g$ au milieu, et $7\,000 \times g$ en tête des godets. L'arrêt du rotor est obtenu sans freinage et demande 13–15 min (centrifugeuse Martin Christ modèle Zeta 20). Nous avons pu abaisser la force centrifuge utilisée à $15\,000 \times g$ au fond, $8\,000 \times g$ au milieu et $6\,000 \times g$ en tête des godets, durant 15 min (rotor 6 · 500 ml, 9000 t/min): la séparation est tout aussi bonne, mais la décantation du surnageant est plus délicate bien que possible.

La température dans le rotor est surveillée par la thermistance de commande du groupe réfrigérant: de $+1^\circ\text{C}$ en fin d'accélération elle passe à $+5^\circ\text{C}$ à la fin de l'opération. Après décantation du surnageant, les culots sont réunis stérilement dans 50 ml de milieu usé et homogénéisés pendant 6 min à 200 t/min avec un agitateur magnétique: la température progresse ainsi de $+5^\circ\text{C}$ à $+12^\circ\text{C}$. On ajoute alors, par fractions de 50 ml, 150 ml de milieu neuf stérile climatisé à $+12^\circ\text{C}$, et l'homogénéisation est poursuivie 5–6 min à 300 t/min: la température remonte de $+12^\circ\text{C}$ à $+18^\circ\text{C}$.

Sans attendre, on répartit également le volume obtenu (200 ml) dans le volume choisi pour la nouvelle culture stérile et climatisée à $+18^\circ\text{C}$.

- 1 J.-L. Boutry et M. Barbier, *Mar. Chem.* 2, 217 (1974).
- 2 J.-L. Boutry, M. Bordes, A. Février, M. Barbier et A. Saliot, *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 28, 41 (1977).