

大肠杆菌合成的乙型肝炎病毒核心抗原的研究

II. HBcAg 的提纯

黄耀焯 王光荣 罗清华

(军事医学科学院基础医学研究所)

本文报道HBcAg基因工程菌MM206株的粗提物通过DEAE柱后,基因表达产物HBcAg与核酸及大部分细菌蛋白分开后,再经凝胶过滤和亲和层析作进一步提纯。经DEAE层析和亲和层析获得的纯制品聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱显示一主带和两小带。从Sepharose 4B柱和亲和层析柱洗出的HBcAg, ELISA检测证明其比活性分别比粗制品高40倍和100倍,以纯制的HBcAg注射家兔,在6只接受免疫的动物中均产生有抗-HBc,能与从人肝提取的HBcAg产生特异的免疫反应,这表明大肠杆菌合成的HBcAg在动物体内具有生物学活性。

关键词: 基因工程; HBcAg; 蛋白提纯

乙型肝炎病毒核心抗原(HBcAg)目前是临床上诊断乙型肝炎的一种重要生物试剂。我所近已报道将克隆到质粒载体上的HBV(乙型肝炎病毒)基因切下,经过体外重组构建表达HBcAg的重组质粒,转化到大肠杆菌并得到表达¹⁾。用该工程菌生产的HBcAg检测了2040个献血员和158例临床乙型肝炎病人血清的抗-HBc,结果证明它能满足临床诊断的实际要求。我们在前一报告中报道了大肠杆菌合成的HBcAg的初步分离与鉴定²⁾。免疫电泳和免疫化学分析证明大肠杆菌产生的与从尸肝提取的,在免疫学性质上是相同的。菌裂解液经硫酸铵沉淀后,通过亲和层析即可得到比较纯的制品,但是制品中仍含有核酸类物质,在此基础上,结合其他层析法我们对菌产的HBcAg进行提纯,并对其某些性质作了分析,本文简要报道研究的结果。

材料与方法

(一) 材料

1. 菌种: HBcAg基因大肠杆菌克隆株MM206¹⁾。
2. 生化药品: Sepharose 4B、溴化氰活化Sepharose 4B、Sephadex G-100均是瑞典Pharmacia产品。DEAE-DE52是英国Whatman产品。

(二) 方法

1. 工程菌细胞的裂解液: 工程菌在含有蛋白胨1%, 牛肉膏0.5%, NaCl 0.5%, pH7.3的培养基中,经37℃振荡培养20h的培养物5l,用20mM pH7.4磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)洗,悬浮于缓冲液中(50mM葡萄糖, 25mM Tris-HCl pH

本文于1984年11月15日收到。

本研究得到黄翠芬教授的支持和帮助,本室中试组提供工程菌培养物一并致谢。

8.0, 10mM EDTA-2Na), 加入 2ml 溶菌酶 (25mg/ml), 冰浴保温 1h, 加等体积预冷的 pH8.0 250mM EDTA-2Na, -40°C 冰箱过夜, 在 JC-2 型超声波破碎仪上间断破碎 80min, 25000rpm 离心 1h, 收集上清。在上清液中加入硫酸铵至 45% 饱和度, 使蛋白沉淀, 离心收集沉淀, 溶以 pH7.2 PBS, 终体积为原培养物的 1%。

2. DEAE 层析: DEAE-DE52 纤维素柱 (2 × 40cm) 先用 0.05M pH6.5 磷酸盐缓冲液 (PB) 平衡, 菌裂解液经充分平衡后上柱。用 PB 洗出 10 管后开始盐浓度梯度洗脱 (PB300ml 0.2—0.7M NaCl), 洗出液紫外描记并分部收集。每管 5ml, 流速 30ml/h, 用酶联免疫吸附法 (ELISA), 检测每管 HBcAg 活性。

3. Sepharose 4B 凝胶过滤: 柱体有两种 (2.4 × 92cm 和 1.5 × 50cm), 以 TN 缓冲液 (0.05M pH7.4 Tris-HCl, 0.05M NaCl, 2mM EDTA-2Na, 0.01% 硫柳汞) 平衡 2 天。菌产 HBcAg 粗制品 (或经 DEAE 层析制品) 溶于 TN 中上柱, 用 TN 洗脱, 自动分部收集并紫外描记, 大柱每管收 10ml, 小柱每管收 5ml, 各管分别用 ELISA 法测定 HBcAg, 确定活性峰位置。

4. Sephadex G-100 凝胶过滤: 凝胶经充分溶胀后装柱, 柱体 2 × 40cm, 用 pH6.5 0.05M 磷酸盐缓冲生理盐水 (PBS) 平衡 2 天。取经 DEAE 层析的 HBcAg 制品溶于 PBS 中上柱, 用 PBS 洗脱, 分部收集洗出液, 测定紫外光吸收并用 ELISA 法检测 HBcAg 活性。

5. HBcAg 与抗-HBc ELISA 法测定: 用上海市医学化验所出售的检测 HBcAg 与抗-HBc 的试剂测定, 测定方法按该所出的成套试剂使用说明书介绍的进行。用夹心法测 HBcAg, 竞争法测抗-

HBc。

6. 人抗-HBc IgG 的制备: 取乙型肝炎患者血清 (抗-HBc 效价 1×10^4 以上, 由石家庄和平医院提供) 50ml, 在 4°C 下加 50% 饱和硫酸铵沉淀蛋白, 离心收集沉淀并溶以生理盐水, 同法重复 3 次 40% 饱和硫酸铵沉淀, 最后溶于 50ml 生理盐水中, 用 DEAE-Sephadex A-50 直接吸附杂蛋白法^[3]提纯。

7. 兔抗受体菌 (RRI) 菌蛋白及兔抗菌产 HBcAg 血清的制备: RRI 菌细胞用超声法制成菌裂解液, 取 1ml 加胞壁酰二肽 1mg, 弗氏佐剂 1ml, 皮下多点注射家兔, 共免疫 3 次。菌产的 HBcAg 经亲和层析提纯的制品, 以相似的方法免疫家兔。从获得高效价抗血清中提取 IgG。

8. 亲和层析: 上述人抗-HBc IgG (或兔抗受体菌 RRI IgG) 溶液 30ml 对 pH8.0 0.1M NaHCO₃ (含 0.5M NaCl) 透析平衡后与经 0.001N HCl 处理的溴化氰激活的 Sepharose 4B 3g 进行偶联, 在 4°C 缓慢搅拌过夜, 抽滤至干, 用上述 NaHCO₃ 溶液洗涤 3 次, 加 12ml 1M pH8.0 氨基乙醇封闭基团, 在室温振摇 2h, 抽滤干后用 pH4.0 1M 醋酸缓冲液 (含 1M NaCl) 和 pH8.0 0.2M 硼酸缓冲液 (含 0.5M NaCl) 交替洗涤, 每次 12ml。CNBr-Sepharose 4B 经洗涤后装柱, 用 pH8.0 0.2M 硼酸缓冲液充分平衡柱体, 取 12ml HBcAg 粗制品即菌细胞裂解液 (或经 DEAE 层析的 HBcAg 制品) 用 pH8.0 0.2M 硼酸缓冲液透析平衡后上柱, 柱体用硼酸缓冲液洗至吸光度 (280nm) 为零。然后用 3M KCNS 将被吸附在柱上的 HBcAg 解吸下来, 自动分部收集洗出液, 每管 1ml, 分别用 ELISA 法检测 HBcAg 活性。合并活性部分作其他分析。

9. 聚丙烯酰胺凝胶电泳: 凝胶含

7.5% 丙烯酰胺, 缓冲液为不连续 Tris-甘氨酸系统, 电压180V, 凝胶条用 0.1% 考马斯亮蓝 (含25% 异丙醇、10% 冰醋酸) 染色后, 用脱色液 (10% 醋酸、25% 异丙醇) 脱色。

10. 回收率的计算与比活性的测定: 提纯前与提纯后制品作连续 2 倍稀释, ELISA 法测出呈阳性反应的最大稀释倍数即为活性单位数, 乘以体积毫升数得总单位数。提纯后总单位数除以提纯前总单位数, 再乘以 100 即得回收率。如以提纯后制品测得的每毫升总单位数除以每毫升所含蛋白毫克数, 得出每毫克蛋白所含单位数即为其比活性。

结 果

(一) 大肠杆菌合成的 HBcAg 的提纯方法

1. DEAE层析: 大肠杆菌合成的 HBcAg 在菌裂解液的离心上清中, 如材料与方法中所述的方法, 硫酸铵 (40% 饱和度) 盐析, 沉下的蛋白质经提取溶解, 对 PB 透析平衡, 上 DEAE 柱层析。洗脱曲线 (图 1) 显示在梯度开始之后有 6 个峰, ELISA 检测 HBcAg 活性分布在 III 峰与 IV 峰之间。将洗出液测紫外光吸收, 表明核酸

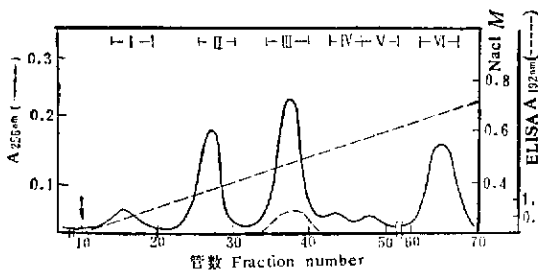


图 1 大肠杆菌合成的 HBcAg 经 DEAE 层析初步提纯
Fig. 1 Initial purification of HBcAg Synthesized in *E. coli* by DEAE chromatography

类物质在 VI 峰, 与 HBcAg 所在部份分开, 但将后者作聚丙烯酰胺凝胶电泳分析证明该部份仍含有多种蛋白质, 电泳图谱未在文中见示。

2. DEAE 层析-Sephrose 4B 凝胶过滤: 菌产的 HBcAg 粗制品如直接上 Sephrose 4B 大柱进行凝胶过滤, TN 先洗出一大而宽的蛋白峰, 该峰过后 ELISA 检测到分布比较宽的 HBcAg 活性区, 然后才是一个较小的蛋白峰。HBcAg 活性部份合并, 纯度较粗制品有明显提高 (见表 1), 低温干燥后提供乙肝临床检测试用, 证明灵敏度和特异性均较好。

为了进一步纯化, HBcAg 粗制品先经 DEAE 层析, 收集活性部份, 然后再上 Sephrose 4B 小柱, 用 TN 洗出 3 个峰, HBcAg 活性在 I 与 II 峰之间 (图 2 斜线区)。

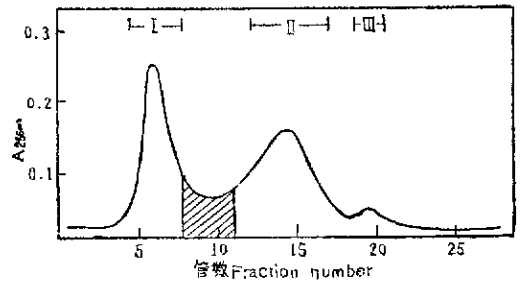


图 2 DEAE 层析活性部份的 Sephrose 4B 胶滤
Fig. 2 Gel filtration of the active fraction from the DEAE column on Sephrose 4B

3. DEAE 层析-Sephadex G-100 胶滤: 以适用于较小分子量蛋白质分离的 Sephadex G-100 对经 DEAE 层析的 HBcAg 活性部份进行胶滤, 也分得 3 个蛋白峰, HBcAg 活性示现比较快, 在 I 峰后半部及其与 II 峰之间 (图 3)。电泳分析证明杂蛋白仍多。

4. DEAE 层析-亲和层析: 凝胶过

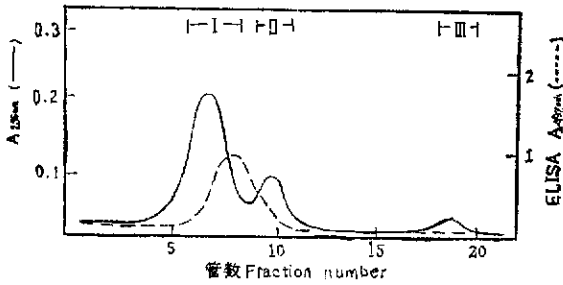


图3 经DEAE层析菌产HBcAg的Sephadex G-100凝胶过滤图谱

Fig. 3 Gel filtration of the active fraction from the DEAE column on Sephadex G-100

滤未能将细菌杂蛋白与HBcAg分开，于是将DEAE层析分得HBcAg活性部份用前一报道^[2]所用的条件进行亲和层析，偶联有人抗-HBc IgG的CNBr活化的Seph-
arose 4B将HBcAg吸附，然后用3M KCNS解吸，除3M KCNS外我们还曾用5M NaI

和pH2.8 0.2M甘氨酸HCl(含2M NaCl)解吸结果相似。

经过DEAE层析和亲和层析提纯所得的制品，紫外光吸收分析证明核酸已去除，但是聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱显示的蛋白区带仍不止一条。为了了解这些区带中是否有的是细菌菌体蛋白，将制品再通过偶联有兔抗大肠杆菌RRI(受体菌)菌体蛋白IgG的CNBr活化Seph-
arose 4B柱，作反向亲和层析，紫外检测、收集流出液中有蛋白部分，用多聚乙二醇浓缩、透析去盐后再作聚丙烯酰胺凝胶电泳，图谱未见明显变化。

(二) 回收率与比活性

三种不同纯度制品的回收率及比活性进行了比较(表1)。比活性提高倍数是以硫酸铵沉淀所得粗制品为基础计算。

表1 三种制品的回收率与比活性的比较

Table 1 Comparison of recovery and specific activity of three kinds of preparation

制 品 Preparation	回 收 率 Recovery (%)	比 活 性 Specific activity			
		单 位 / mg 蛋 白 units / mg protein	提 纯 倍 数 Fold purification	血 清 份 / mg 蛋 白 * Serum Samples / mg protein	提 纯 倍 数 Fold purification
硫 酸 铵 沉 淀 Ammonium Sul- fate precipitation	(100)	12.6	—	0.184	—
Seph- arose 4B 胶 滤 Seph- arose 4B gel filtration	70	470.0	37.0	6.250	34.6
亲 和 层 析 Affinity chroma- tography	40	1,070.0	85.0	—	—

* 此数据由上海医学化验所提供

(三) 检测抗-HBc

HBcAg粗制品曾经与Abbott厂诊断试剂对38份判断血清样品进行平行对比检测试验，符合率达97.3%，阳性预测价值

100/100。我们将其通过Seph-
arose 4B胶滤所得的制品，如表1所示比活性远较前者为高，送上海医学化验所测定100份标本(50份阳性，50份阴性)，与Abbott诊断试剂比较，符合率也达97%。

(四) 紫外光吸收曲线

经过DEAE层析和亲和层析提纯的菌

产HBcAg, 测定它的紫外吸收曲线, 证明是典型的蛋白质紫外吸收曲线(图4)。

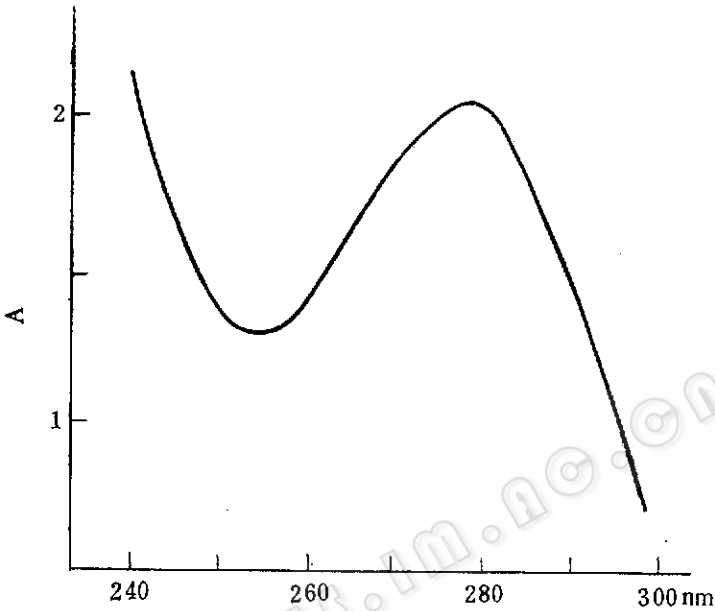


图4 大肠杆菌合成的HBcAg的紫外吸收曲线

Fig. 4 UV absorption curve of HBcAg Synthesized in *E. coli*



(五) 聚丙烯酰胺凝胶电泳

电泳分析表明菌产的HBcAg粗制品中蛋白质成份甚为复杂(图5-A), 前已述及经DEAE层析或Sephrose 4B胶滤后仍有多条蛋白质区带, 只有亲和层析的制品, 电泳图谱呈现一主要蛋白区带和两条淡的带, 位于图5-B箭头处。

(六) 菌产HBcAg的体内生物活性

大肠杆菌合成的HBcAg, 实验结果在体外证明可用于检测乙型肝炎患者血清中

图5 工程菌裂解液与提纯HBcAg制品的聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig.5 Polyacrylamide gel electrophoresis of bacterial lysate of engineered strain and purified HBcAg

的抗-HBc。为了测试由重组质粒 HBcAg 基因指令合成的多肽抗原在体内的生物学活性,我们将工程菌产生的经亲和层析提纯所得的HBcAg制品作为免疫抗原,与等体积完全佐剂及胞壁酰二肽充分混匀后免疫家兔,按 G. L. Vaitukaitis 介绍的方法^[4]在背部皮下多点注射,每隔两周再注射一次(实验细节将另文发表)。一共免疫6只家兔;随时抽血用ELISA法检测血中抗-HBc抗体水平,经过4次注射后,有2只兔子抗体效价达 1×10^5 以上。ELISA 竞争法测兔血中抗-HBc所用的抗原是由上海医学化验所提供的,从人肝提取的HBcAg。这实验结果说明大肠杆菌合成的HBcAg作为抗原在动物体内是有生物活性的,能引起特异抗-HBc的产生。

讨 论

我们将工程菌裂解液直接上亲和层析柱所得制品内含核酸,若先经 DEAE 层析则可将核酸分开。紫外吸收曲线为典型的蛋白吸收光谱。我们的实验结果还表明经DEAE层析后的HBcAg的凝胶过滤行为也有所不同。文献报道根据HBcAg基因核苷酸序列分析结果推导出来的氨基酸序列,发现在羧基端有较多精氨酸^[5],可能由于这些碱性氨基酸的存在,HBcAg与核酸结合得比较牢,不易分离,至于它在生物学上有什么意义,还不大清楚。

亲和层析在基因工程菌表达产物的分离上是很用的方法。因一般表达产物的量在菌裂解液总蛋白量中所占的比例很小,特别是表达水平比较低的时候,基因表达产物的分离提纯遇到的困难是比较大的。亲和层析利用抗原抗体高度特异的免疫反应,选择吸附基因表达产物,一步层析即可达到比较好的纯化效果。但制备抗

-HBc IgG 在血清选择上是很重要的,要选用特异性强、效价高的富含抗-HBc的血清,否则达不到特异吸附 HBcAg 的目的。用亲和层析提纯的HBcAg免疫动物能引起特异抗体的产生,说明该抗原制品在体内有特异的免疫学活性,这一点是很有意义的。同时,通过这样途径获得抗-HBc IgG,有可能代替从病人血清中提取的抗-HBc IgG 用于临床诊断,以减少假阳性的可能性。

经提纯的HBcAg凝胶电泳分析出现3条蛋白区带,它们的分子量未进行测定。关于HBcAg的分子量,不同作者报道的结果有所不同^[6-8],如 Ohori 等(1980)^[8]从人肝中提得纯HBcAg,电泳图谱除1主带(Mr20000)外还有1小带(Mr40000),但能与抗-HBc作用的只有那主带。Stahl 等(1983)^[10]报告有分子量大于40000的聚合物。这可能由于不同研究者所用的材料有异,或是在不同条件下HBcAg以不同形式聚合物出现所致。

有文献提到在亲和层析柱上,有可能HBcAg 转化为 HBeAg。我们在实验中未观察到有明显的转化现象,但是我们注意到超声破碎的工程菌裂解液在一定条件下,蛋白结构不稳定,酶联测到HBcAg活性下降,同时出现 HBeAg 活性。Pesek 等^[6]报道根据他们测定的核苷酸序列推算,氨基酸序列上有4个半胱氨酸,这提供了分子内和分子间形成双硫键的可能性。根据以上两点,同时考虑到我们现用的基因工程菌所带重组质粒上只有HBcAg基因,即其表达产物只是HBcAg,不含HBV其他组份。我们试图通过一些作用于双硫键的试剂使蛋白分子空间结构改变,以达到抗原性转化目的,为乙肝临床诊断提供新型试剂,现已取得初步结果,工作正在继续进行中。

参 考 文 献

- [1] 马贤凯等: 上海免疫学杂志, 4(3):129, 1983.
 [2] 黄耀焯等: 中国人民解放军军事医学科学院院刊, 34:667, 1984.
 [3] 阳及平等: 临床免疫与实验免疫1(3) 18, 1980.
 [4] Vaitukaitis, J. L.: Method of Enzymology, Vol. 73, part B, Academic Press, New York and London, 46, 1981.
 [5] Pesek, M. et al: *Nature*, 282(6):575, 1979.
 [6] Robbinson, W. S.: *A. Rev. Microbiol.* 31:357, 1977.
 [7] Budkowska A. et al: *J. Immunol.*, 118:1300, 1977.
 [8] Neurath, A. R. et al: *J. Gen. Virol.*, 39:91, 1978.
 [9] Ohori, H. et al: *Intervirology*, 13:74, 1980.
 [10] Stahl, S. et al: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:1,606, 1983.

STUDY OF THE HEPATITIS B VIRUS CORE ANTIGEN SYNTHESIZED IN *E. COLI*

II. PURIFICATION OF HBcAg

Huang Yaoxuan Wang Guangrong Luo Qinghua

(*Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences*)

It was described previously that the gene coding for HBcAg had been separated by a single affinity chromatographic technique. But the UV absorption indicated that nucleic acid was not removed. In this paper we passed the crude extract of *E. coli* MM 206 through DEAE column to separate HBcAg from nucleic acid and some of the bacteria proteins. Then gel filtration or affinity chromatography was carried out for further purification. A purified HBcAg was obtained by means of chromatographing it through a DEAE column and an anti-HBc IgG-conjugated Sepharose 4B column. Purified pool of *E. coli*-derived HBcAg gave a major band and two minor bands in PAGE. The specific activity of the purified pool from Sepharose 4B column and affinity chromatography column was 40 and 100 times respectively higher than that of the crude extract. To test the biological activity of the HBcAg synthesized by *E. coli*, purified preparation was injected into rabbits. All six animals gave positive reaction with HBcAg derived from human source in ELISA. Thus, the core antigen synthesized in *E. coli* is serologically active *in vivo*.

Key words

Gene engineering; HBcAg; purification of protein