

从虫体提纯 HBsAg 基因表达 产物的新方法

邓日强 龙繁新 王珣章 温小昭 蒲垫龙

(中山大学昆虫学研究所/生物防治国家重点实验室, 广州 510275)

摘要 感染含乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)基因的粉纹夜蛾重组核型多角体病毒 TnNPV-HBs85-OCC⁺的粉纹夜蛾幼虫先经匀浆澄清处理后,再用单克隆抗体亲和柱层析的方法提纯 HBsAg 蛋白。提纯的蛋白经 SDS-PAGE, 出现 3 条电泳带, 分子量分别为 24KD, 27KD 和 45KD。用此法从虫体提纯 HBsAg 基因表达产物, 具有简单、快速、高效的特点。

关键词 分离提纯, 乙型肝炎病毒表面抗原, 粉纹夜蛾核型多角体病毒

分类号 Q789

以昆虫杆状病毒为载体、昆虫虫体为受体的基因工程, 正日益受到各国学者的重视, 并已用于表达多种在医学上有重要意义的蛋白质基因, 如人 α -干扰素、白细胞间素-2、c-myc 蛋白、 β -干扰素、流感病毒血凝素及乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)基因等^[1-3]。昆虫体系较之细菌、酵母及哺乳动物细胞表达体系优越之处, 在于其蛋白质的表达量高, 且通常在抗原性、免疫原性、生物活性方面与天然蛋白相似^[1,2]。

由于昆虫体成分复杂, 虫体匀浆粘性大、杂质多, 因而给外源基因表达产物的分离提纯造成障碍。我们对从虫体中分离提纯 HBsAg 作过研究, 经过几种分离提纯方法的比较后, 提出了 DEAE-纤维素搅拌吸附, 用 NaCl 洗脱的有效方法^[3]。在此基础上, 我们进一步研究出了一种更为简便、高效的提纯方法, 现报道如下。

1 材料和方法

1.1 病毒与细胞

含 HBsAg 基因的粉纹夜蛾重组核型多角体病毒 TnNPV-HBs85-OCC⁺ 为能形成多角体的重组病毒, 系由我们实验室组建^[4]。病毒用草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) IPLB-21 离体培养细胞增殖, 细胞培养和病毒增殖按文献^[5]所述方法。

来稿日期: 1993-05-05

1.2 宿主昆虫及病毒接种

粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 引自湖北荆州地区微生物研究所, 室内人工饲料饲养. 幼虫养至 4 龄时, 饲喂重组病毒多角体, 方法为将 3×10^7 多角体/ml 的多角体悬液涂沫在饲料上, 感染 5 天后收获病虫, 冰冻保存待用.

1.3 感染幼虫匀浆处理

感染重组病毒的粉纹夜蛾幼虫按每克体重加 3ml 1% Triton X-100, 用电动组织捣碎机匀浆, 5000r/min 离心 10min. 取上清通直流电 (10V/cm) 20min, 加活性炭 1g/10ml 搅匀, 室温静置 20min, 15000r/min 离心 10min. 上清经 -20℃ 冻融一次, 15000r/min 离心 10min 后取上清经滤纸过滤即可上亲和层析柱.

1.4 亲和试剂

抗 HBsAg 单克隆抗体购自北京生物制品药品所, 按戴宗汉等所述方法^[6]用纯化的单抗偶联到 CNBr 活化的 Sepharose-4B 上制备免疫亲和层析柱.

1.5 亲和层析

将处理好的幼虫匀浆上清加到单抗亲和柱上后, 在洗脱 HBsAg 之前, 先用 20 倍床体积的 TBS (0.05mol/L Tris, HCl/0.15mol/L NaCl/0.02% NaN₃, pH7.2) 洗去不吸附的杂蛋白, 然后用 0.1mol/L 甘氨酸、盐酸缓冲液 (pH3.0) 洗脱 HBsAg, 洗脱峰迅速用 2mol/L Tris 溶液中和.

1.6 HBsAg 效价测定

用 ¹²⁵I-放射免疫检测盒, 检测盒购自北京中国原子能科学院同位素研究室, 按所附说明操作.

2 结果

2.1 匀浆处理

处理程序如图 1 所示. 感染重组病毒 TnNPV-HBs85-OCC⁺ 的幼虫加 1% Triton 匀浆, 经通电、活性炭吸附及冻融处理后, 得到含 HBsAg 蛋白的澄清液, 再经滤纸过滤即可直接上亲和层析柱进行纯化, 处理过的匀浆过柱后, 用 TBS 容易将杂蛋白及色素洗去.

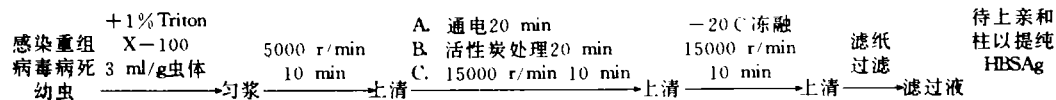


图 1 重组病毒感染的苜蓿丫纹夜蛾幼虫匀浆处理程序示意图

Fig. 1 Steps for treating the homogenates of *T. ni* larvae infected with the recombinant virus TnNPV-HBs85-OCC⁺.

2.2 匀浆通电处理

匀浆经通电处理后, 由混浊变为澄清, 通电时间与 HBsAg 效价的关系曲线见图 2. 从图中可知, 通电 20min 测到的 HBsAg 效价达最高值.

2.3 免疫亲和层析纯化

150mg 纯化的单抗偶联的 Sepharose-4b (约 40ml) 制成的免疫亲和柱可直接用于处理过的幼虫匀浆, 一次可处理 200 头幼虫虫体 (400g). 纯化的 HBsAg 活性分布结果如图 3 所示. 经亲和层析纯化的 HBsAg 在 SDS-PAGE 电泳图上呈现 3 条带, 分子量分别为 24KD、27KD 和 45KD. 柱层析若改用 3mol/L KCNS 与 0.1mol/L 甘氨酸盐酸 (pH3.0) 分步洗脱, 可将 45KD 蛋白与 24KD 和 27KD 蛋白分开 (图 4).

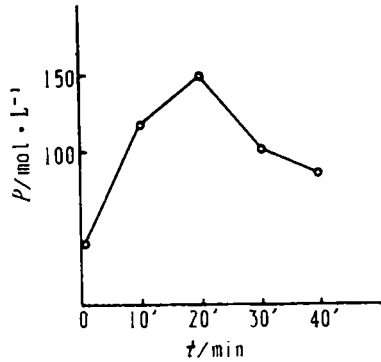


图 2 通电时间与匀浆 HBsAg 效价的关系曲线图

Fig. 2 Kinetics of HBsAg titer in the homogenates during treatment with a directed current

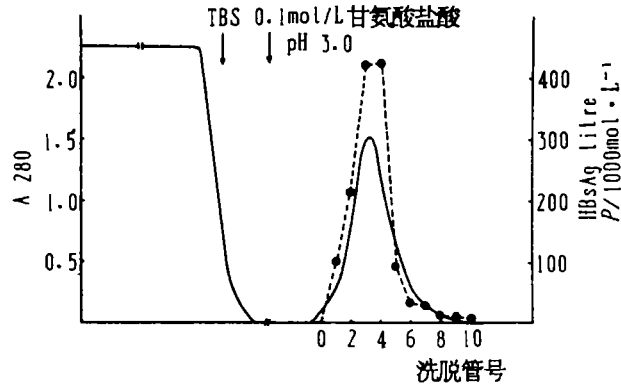


图 3 HBsAg 抗体亲和柱层析图

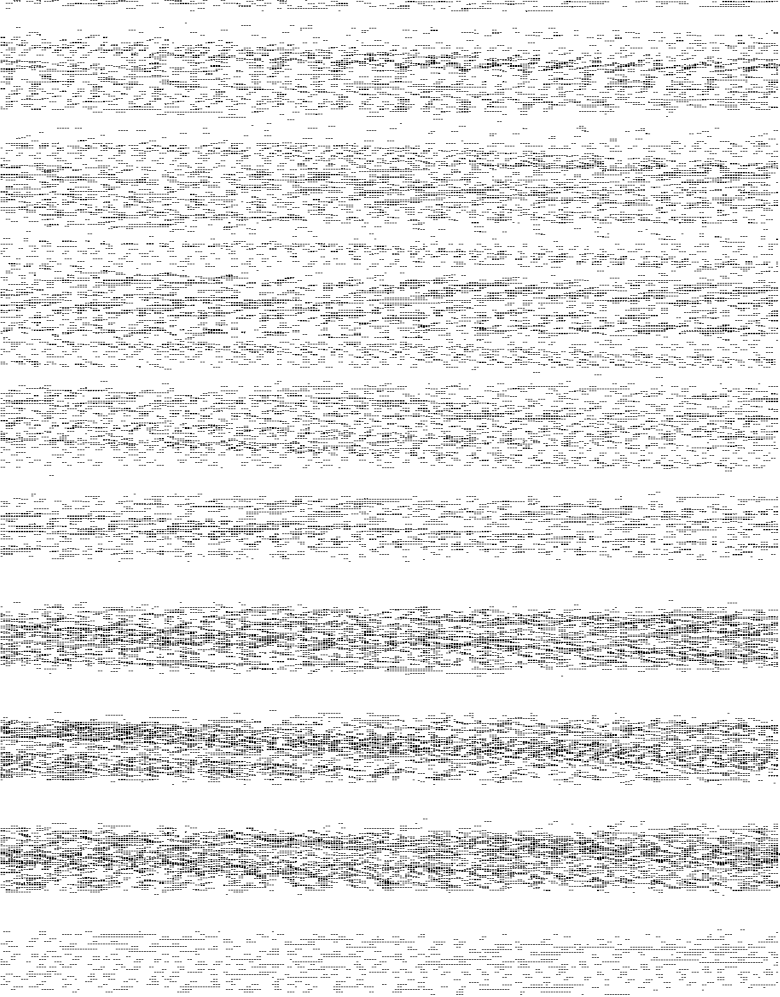
Fig. 3 Purification of HBsAg from homogenates of infected *T. ni* larvae by running through the anti-HBsIgG-conjugated McAb-Sepharose 4B affinity column— — A280, ·····HBsAg titre

3 讨论

乙肝表面抗原由 226 个氨基酸组成, 其分子量为 27KD; 乙肝患者的血清电泳表明, 24KD 和 27KD 蛋白为表面抗原的主要成分, 同时还有少量的 33KD, 35KD, 45KD 及 67KD 等蛋白带^[7,8]. 本文结果, 从虫体中提纯表达的 HBsAg, 分子量主要为 24KD、27KD 和 45KD, 表明昆虫虫体表达的 HBsAg 的分子量与乙肝患者血清中 HBsAg 的分子量相一致.

本文报道的虫体——匀浆——亲和层析柱一步纯化昆虫体系生产外源基因表达产物的方法, 关键在于匀浆在上柱前所能达到的澄清程度及匀浆原有的粘稠性经处理后下降的程度. 利用 Triton X-100 代替蒸馏水或生理盐水作匀浆目的是帮助组织细胞的溶解, 增加匀浆的稳定性, 并可降低匀浆的粘稠度, 上柱时还可减少非特异吸附. 匀浆经通电处理, 血淋巴的黑化在电场的作用下快速反应完毕, 悬浮于匀浆中的带电颗粒被沉淀出来, 使匀浆变为澄清. 活性炭处理则是为了将匀浆中吸附性强的物质除去, 减少过柱时的非特异性吸附, 以达到保护亲和柱, 延长柱寿命的目的. 冻融一次, 可以进一步除去匀浆中的不溶解杂质. 上述匀浆处理程序具有效果好, 设备简单, 经济, 快速等特点.

我们实验室从虫体中提纯 HBsAg 的方法原为先用 DEAE-纤维素粗提, 再用亲和柱纯化^[3], 但由于未能先将昆虫匀浆的粘稠性降低, 亲和柱使用多次后, 效率会有所下降.



参 考 文 献

- 1 Luckow V A, Summers M D. Trends in the development of baculovirus expression vector. *Bio/Technology*, 1988 (6): 47~55
- 2 Kang C Y *et al.* Secretion of particles of Hapatitis B surface antigen from insect cells using a baculovirus vector. *J Gen Virol*, 1987, 68: 2607~2613
- 3 龙繁新等. 乙型肝炎病毒表面抗原基因在昆虫体系中的表达. *生物工程学报*, 1991, 7 (1): 37~46
- 4 何代芬等. 表达乙型肝炎病毒表面抗原基因又形成多角体的杆状病毒. *中国病毒学*, 1993 (4): 389~396
- 5 Wang X, Kelly D C. Baculovirus replication; purification and identification of the *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus-induced DNA polymerase. *J Gen Virol*, 1983, 64: 2229~2236
- 6 戴宗汉, 史赢仙. *生物化学杂志*, 1987, 3 (5): 477~483
- 7 Neurath, A R *et al.* Hepatitis B virus contains pre-s gene encoded domains. *Nature*, 1985, 315: 154~156
- 8 Stibble W, Gerlich WH. Structural relationships between the minor and major proteins of hepatitis B surface antigen. *J Virol*, 1983, 46: 6267~6270
- 9 王珣章等. 形成多角体的杆状病毒载体系统的建立. *病毒学报*, 1991, 7 (3): 253~260
- 10 Sassenfeld H M. *Trends Biotechnol*, 1990, 8: 88~93

A Novel Procedure for Purification of HBsAg Produced by a Baculovirus Vector in Insect Larvae

Deng Riqiang^{} Long Qingxin Wang Xunzhang
Wen Xiaozhao Pu Zhelong*

Abstract A simple, rapid, and efficient procedure was developed to isolate HBsAg produced in insect larvae infected with a recombinant TnNPV containing HBsAg gene. The treated homogenates were loaded onto an affinity column. The eluted proteins were determined to be 24 kilodaltons (KDa), 27KDa and 45KDa. About 200 μ g of HBsAg was obtained from 40g infected larvae. This procedure may be of general utility as a first step in purification of other proteins synthesized by the recombinant baculoviruses in insect larvae.

Keywords purification, HBsAg, TnNPV

^{*} Research Institute of Entomology, Zhongshan University, Guangzhou, 510275