

鸭乙型肝炎病毒复制复合体(DHBV RCs)的 提纯及其对外源模板的利用

邵兴无 陶佩珍 郭巨涛 陈鸿珊

(中国医学科学院医药生物技术研究所,北京 100050)

R373.21

关键词 鸭乙型肝炎病毒复制复合体, DNA聚合酶, 核心抗原, 外源模板

提纯

1 鸭乙型肝炎病毒复制复合体(DHBV RCs)的提纯

根据文献^[1]方法将 DHBV 阳性鸭肝制成匀浆, 经 30% 蔗糖垫层离心(RP50-T, 143000g, 4℃, 3hr), Bio-Gel A_{5m} 柱层析, 10-40% 蔗糖密度梯度离心(RP50-T), 50000g, 4℃, 3.5hr), 提取 DHBV RCs。

1.1 肝匀浆经 Bio-Gel A_{5m} 柱层析后, 收集样品, 每管 8ml, 共 36 管。测管内样品内源性 DNA 聚合酶活性^[2], 蛋白吸光度 A₂₈₀ 和 DHBV DNA^[3,4]。结果表明:

1.1.1 在 DHBV 阳性鸭肝脏样品中有内源性 DNA 聚合酶活性, 阴性鸭肝样品无此酶活性(见图 1), 且 Digoxigenin 标记探针斑点杂交检测 DHBV DNA 结果(见图 2)和内源性 DNA 聚合酶活性高峰一致, 说明此内源性 DNA 聚合酶活性是 DHBV 特异的。

1.1.2 内源性 DNA 聚合酶活性高峰位于第 4 管, 蛋白浓度高峰位于第 3-8 管。收取第 4 管样品, 可去除大量杂蛋白。

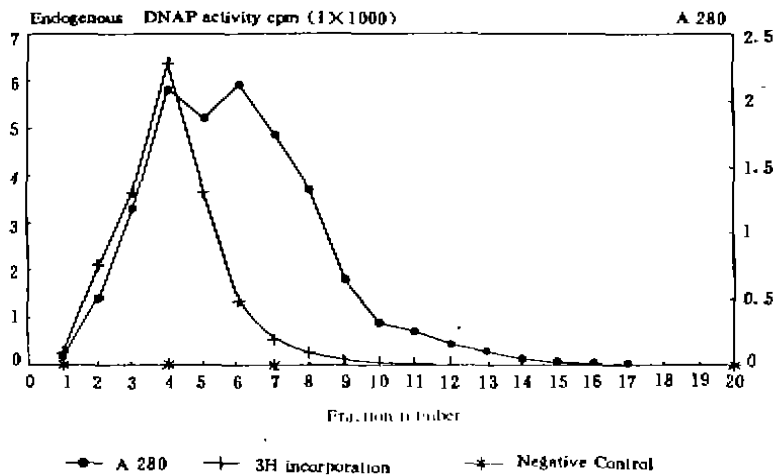


图 1 Bio-Gel A_{5m} 柱层析提纯鸭乙型肝炎病毒复制复合体(DHBV RCs)

Fig. 1 Purification of DHBV RCs by chromatography on Bio-Gel A_{5m}

本文于 1993 年 7 月 19 日收到, 12 月 20 日修回
• 本研究为国家自然科学基金资助项目, 编号 3880167

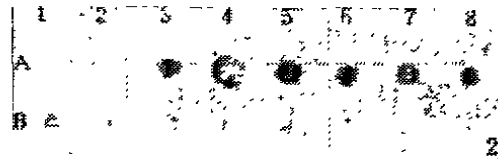


图2 斑点杂交法检测 Bio-Gel A 5m 柱层析后的 DHBV RCs 样品

Fig. 2 Dot-blot analysis of DHBV replicative complexes by Bio-Gel chromatography A₁₋₈; Vials-1; B₁₋₈; Vials-16

1.2 蔗糖密度梯度离心后,自离心管顶端开始取 12 管,每管 3ml,内源性 DNA 聚合酶活性和蛋白吸光度 A₂₈₀测定结果(见图 3)表明:内源性 DNA 聚合酶活性高峰位于第 9/10 管,相当于 A₂₈₀第 2 个高峰的后部。收集高峰管样品,超离心(RP65-T, 63600g, 15hr),可使 DHBV RCs 得到进一步的纯化。

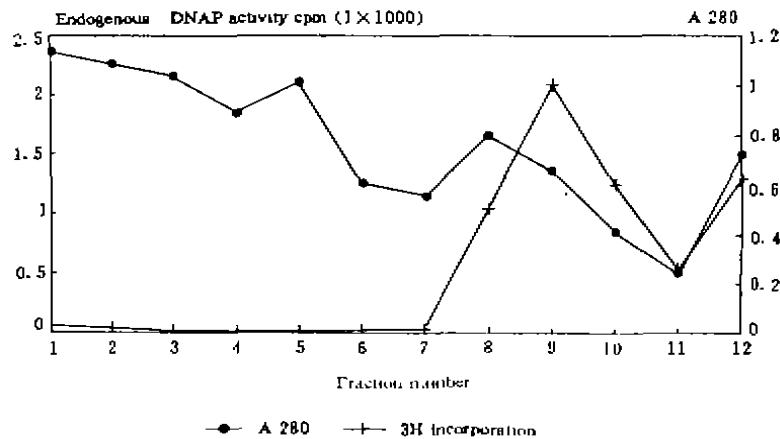


图3 蔗糖梯度分析 Bio-Gel A_{5m}层析后的 DHBV DNA 阳性样品

Fig. 3 Sucrose gradient analysis of pooled DHBV DNA positive fractions from Bio-Gel A_{5m} chromatography

2 DHBV RCs 的纯度鉴定

2.1 测定过柱前、过柱后和蔗糖密度梯度离心后样品的内源性 DNA 聚合酶活性。各阶段样品的比活性分别为 6.28, 13.80 和 521.99cpm/μg。Bio-Gel A_{5m}柱层析和蔗糖密度梯度离心分别使酶比活性提高了 2.20 倍和 37.38 倍,两步纯化步骤使终产物的比活性提高了 83.12 倍(见表 1)。

表 1 ³H-dTTP 掺入法检测 DHBV RCs 的纯度

Tab. 1 Purity of DHBV RCs detected by incorporation of ³H-dTTP

DHBV RCs	相对活性 Relative activity (cpm/μg)	纯度 Purified ratio
A	6.25	1
B	13.80	2.20
C	521.99	83.12

A₁ DHBV RCs unchromatographed

B₁ DHBV RCs purified from Bio-Gel A_{5m} Chromatography

C₁ DHBV RCs purified by sucrose gradient ultracentrifugation

2.2 斑点-酶免疫实验(Dot-EIA)特异性检测鸭乙型肝炎病毒核心抗原(DHBcAg)也证实经柱层析和蔗糖密度梯度离心处理, DHBV RCs 各提纯了近 10 倍。两步纯化步骤使终产物提纯了约 100 倍(见图 4), 与酶活性结果一致。

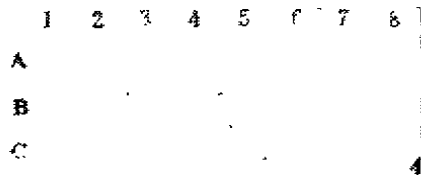


图 4 Dot-EIA 法检测鸭乙型肝炎病毒核心抗原

Fig. 4 Detection of DHBcAg by Dot EIA method

A, DHBV RCs unchromatographed

B, DHBV RCs purified from Bio-Gel A_{5m} chromatography

C, DHBV RCs purified by sucrose gradient ultracentrifugation

1, 100ng 2, 10ng 3, 1ng 4, 100pg 5, 10pg 6, 1pg 7, 0.1pg

8, 0.01pg

2.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western blot-EIA 法检测结果说明 DHBV RCs 的纯度明显增加。

3 DHBV RCs 对外源模板的利用

20 μ l 适当稀释的 DHBV RCs 的最终制品和 17 μ l 酶反应底物缓冲液(终浓度为 50mmol/L Tris · HCl pH8.0, 18.6mmol/L MgCl₂, 0.5%NP40, 0.3% β -ME, 0.25 μ mol/L ³HdTTP)混匀。测定内源酶活性时加 3 μ l 2mmol/L dNTP。测定利用外源模板活性时加适当底物浓度的 Poly(rA)(dT)12-18, 37 $^{\circ}$ C 反应 2 小时, 0 $^{\circ}$ C 水浴终止反应, 三氯乙酸沉淀, 乙醇脱水后烘烤 10 分钟, 测放射性强度 cpm。设阴性鸭提取物对照。

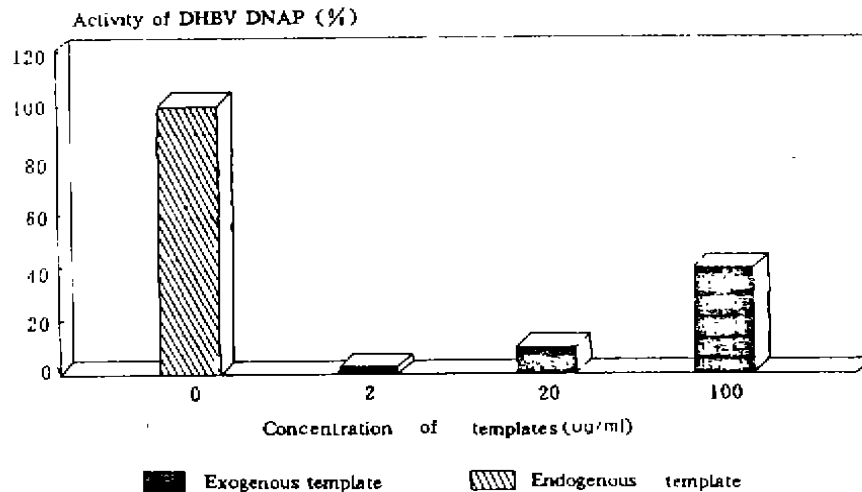


图 5 DHBV 逆转录酶利用外源模板 poly(rA)(dT)12-18 的活性

Fig. 5 Effect of poly(rA)(dT)12-18 on DHBV reverse transcriptase activity by utilizing exogenous templates

3.1 模板浓度的影响 8 批实验结果表明, 当外源模板浓度为 2 μ g/ml 时, DHBV RCs 基本不能利用外源模板, 当模板浓度为 20 μ g/ml 时, ³H 掺入值较 2 μ g/ml 时提高 6 倍左右, 达内源酶活性的 10% 左右。当 Poly(rA)(dT)12-18 浓度为 100 μ g/ml 时, ³H 掺入值较 2 μ g/ml 时提高 20 多倍, 达内源酶活性的 40% 左右(见图 5), 和 Offensperger^[5]结果相同。同批实验中阴性鸭肝提取

物无内源酶和利用外源模板的活性,且 20 μ mol/L PFA 可使 DHBV RCs 利用外源模板的活性降低 80% 以上,说明该活性是病毒逆转录酶特异的,排除了细胞酶污染的可能。

3.2 理化因素的影响 在酶反应之前,先对 DHBV RCs 进行如下处理,以增加核心颗粒对外源模板的通透性。

3.2.1 5% Triton X-100 室温分别处理 10, 20 和 30 分钟。

3.2.2 0.06mol/L Tris/glycine pH2.5 处理 10 分钟。

3.2.3 1mol/L NaCl 室温处理 10 秒钟。去污剂(5% Triton X-100),高盐浓度(1mol/L NaCl)和低 pH(0.06 mol/L Tris/glycine pH2.5)处理不能增加 DHBV RCs 对外源模板的利用。说明在本实验的反应系统内,外源模板能够通过核心颗粒的外膜,通透性不是其低利用率的原因。相反,由于反应条件的改变,酶制品在处理过程中的影响,利用外源模板的活性有不同程度的降低。

参 考 文 献

- 1 Radziwill G, Zentgraf H, Schaller H, et al. The duck hepatitis B virus DNA polymerase is tightly associated with the viral core structure and unable to switch to an exogenous template. *Virology*, 1988, 163(1), 123-132
- 2 郭巨坤, 陈鸿珊. 鸭乙型肝炎病毒复制复合体内源性 DNA 聚合酶测定方法的建立及其应用, 病毒学报, 1990, 6(3), 210-215
- 3 陈鸿珊, 李壮, 钱荷英, 等. 阿糖腺苷单磷酸对鸭乙型肝炎的治疗效果. 实验和临床病毒学杂志, 1989, 3(1), 12-18
- 4 陈渊卿, 顾健人, 蒋嘉秋, 等. 斑点杂交实验直接检测血清中乙型肝炎病毒 DNA. 中华传染病学杂志, 1983, 1(2), 63-65
- 5 Offensperger W B, Walter E, Offensperger S, et al. Duck hepatitis B virus, DNA polymerase and reverse transcriptase activities of replicative complexes isolated from liver and their inhibition in vitro. *Virology*, 1988, 164(1), 48-54

Isolation, Purification and DNA Polymerase Activity Analysis of DHBV Replicative Complexes

Shao Xingwu Tao Peizhen Guo Jutao Chen Hongshan

(*Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050*)

Duck hepatitis B virus replicative complexes (DHBV RCs) were isolated from DHBV-infected duck liver by chromatography through Bio-Gel A 5m followed by sucrose gradient centrifugation. The relative endogenous DNA polymerase activity of the purified RCs was 100 times higher than that of the unchromatographed one, confirmed by detecting their DHBCAg with Dot-EIA method.

The utilization of exogenous template in reverse transcriptase reaction was determined by incorporation of ^3H dTTP into poly(τ A) (dT) $_{12-18}$. The results indicated that DHBV RCs could use the exogenous template, the activity was about 40% of that of the endogenous DNA polymerase. Pretreatment of DHBV RCs with nonionic detergent (5% Triton X-100), high concentration salt (1 mol/L NaCl) and low pH (0.06mol/L Tris/glycine pH2.5) did not enhance the utilization of exogenous template activity.

Key words DHBV replicative complexes, DNA polymerase, DHBCAg, Exogenous template