维普资讯 http://www.cqvip.com

第19卷2期
2004年4月

中国病毒学
VIROLOGICA SINICA

19（2）：101—104
April 2004

酿酒酵母表达的rHBcAg颗粒的纯化和鉴定及其透射电镜观察

陈 恒[1,2,3]，梁婉琪[3]，张大兵[3**]

（1. 上海交通大学生命科学技术学院，上海 200030; 2. 上海大学生命科学学院，上海 200436;
3. 上海市农业科学研究院生物技术中心，上海 201106）

Purification and Observation of the Recombinant Hepatitis B Virus Core Antigen (rHBcAg) Particles Produced in the Yeast

CHEN-Heng[1,2,3], LIANG Wan-qi[3], ZHANG Da-Bing[3**]

(1.School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030,China; 2. School of Life Science, Shanghai University, Shanghai 200436,China; 3. Biological Technology Center of Shanghai Agriculture Science Institute, Shanghai 201106,China)

Abstract: *Hepatitis B virus* core antigen protein gene (*C* gene) was expressed in *Saccharomyces cerevisiae* and the products (rHBcAg particles) were purified from crude lysate of the yeast by three steps: Sephrose CL-4B chromatography, sucrose step-gradient ultracentrifugation, and CsCl-isopycnic ultracentrifugation. rHBcAg was synthesized in yeast cells as a particle consisting of polypeptides which have a molecular weight of 21.5 kDa (p21.5). ELISA and CsCl- isopycnic ultracentrifugation purification products (rHBcAg particles) in each fraction indicated that the particle densities of the fraction with higher rHBcAg antigenicity mainly distributed at the densities of 1.27g • mL^{-1} and 1.40 g • mL^{-1}, respectively. Observation of the purified products (rHBcAg particles) by TEM indicated that rHBcAg peptides could self-assemble into two kinds of different sizes of rHBcAg particles (core particles); the large particle was about 30.1±2.4 nm in diameter and the small particle about 21.5±3.3 nm. This indicated that the rHBcAg particles displayed dimorphism, but the biological significance of this dimorphism is not clear and needs to be studied further.

Key words: rHBcAg; *Saccharomyces cerevisiae*; rHBcAg particles; Ultracentrifugation; Transmission electron microscopy

摘要：乙肝核心抗原（HBcAg）蛋白基因(C基因)在酿酒酵母中表达，表达产物经过分离和Sepharose CL-4B柱子的初步纯化。产物经SDS-PAGE和Western blotting鉴定为一分子量约21.5kDa的多肽。再经蔗糖密度梯度超离心和CsCl等密度梯度超离心等过程而被纯化。分管收集的超离心纯化产物经ELISA抗原活性检测和密度分析，可知ELISA反应强度较高的收集管中的颗粒密度主要分布在1.27g/mL和1.40 g/mL两个峰值处。将rHBcAg抗原活性最高的收集管合并，再经TEM观察，发现酵母表达的rHBcAg蛋白（核心蛋白）能自主装配成大小不同的两种核心颗粒，大颗粒直径约为30.1±2.4 nm，小颗粒直径约为21.5±3.3 nm。这表明，酿酒酵母表达的rHBcAg颗粒具有大小不同的二态性，其生物学意义还未明了，需进一步研究和探讨。

关键词：重组乙肝核心抗原蛋白(rHBcAg protein)；酿酒酵母（*Saccharomyces Cerevisiae*）;核心抗原颗粒(rHBcAg particles)；超离心；透射电子显微镜

中图分类号：Q5　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1003-5152(2004)02-0101-04

收稿日期：2003-09-15，修回日期：2003-11-25

作者简介：陈 恒（1966-），男，湖南籍，讲师，博士，研究方向为纳米生物学。
** 通讯作者：张大兵（1967-），男，江苏籍，研究员，博士，研究方向为植物基因工程。
Corresponding author. Tel: 021-62208750; Fax: 021-62208750; E-mail: zdb30@hotmail.com

维普资讯 http://www.cqvip.com

乙型肝炎是由乙肝病毒（*Hepatitis B Virus*, HBV）感染而在人群中比较普遍流行的一种病毒性疾病。HBV 是一种嗜肝的 DNA 病毒，它的 DNA 为部分双链，约 3.2kb 长[1~3]，当 DNA 分子到达宿主细胞核时，它便会转变为一种超螺旋的形式，并作为宿主 RNA 聚合酶Ⅱ的模板。病毒基因组的转录产生基因组 mRNAs 和亚基因组 mRNAs，这些 mRNAs 主要编码下列关键病毒蛋白：C 蛋白或 HBcAg 蛋白（核心蛋白即核衣壳或核心颗粒的组成成份）；P 蛋白（多聚酶即逆转录酶）、pre-S/S 蛋白（表面蛋白或包裹蛋白）和 X 蛋白（其功能尚不清楚），在细胞质中，聚合好的 C 蛋白亚基将 P 蛋白和基因组 RNA 的复合物包装成一个正二十面体的颗粒（即核衣壳 nucleicapsid 或核心抗原颗粒）[4~8]，在此颗粒中病毒 DNA 便开始合成和复制[2]。HBcAg 蛋白（或核心蛋白）是 HBV 的一个重要成份，由 21.5kDa 左右的多肽链（含 183 个氨基酸）构成，该多肽链的 C-末端富含碱性氨基酸，推测可能具有核酸的结合位点和活性。此外，核心蛋白还参与病毒的复制和调节的全过程，包括 RNA 的包装、DNA 合成、病毒的成熟、病毒包膜蛋白的识别及从细胞的出芽等过程[9]。核心蛋白在大肠杆菌、昆虫细胞、哺乳动物细胞和酵母中的表达以前均曾有过报导[10~13]。在本文中，我们在前人表达、纯化和分析核心蛋白方法的基础上，改进了研究方法，对酵母表达的 rHBcAg 蛋白（核心蛋白）及其自主装配成的核心颗粒（core particles）的纯化、鉴定和电镜观察作了比较翔实的研究，不但得到了预期的结果，而且还发现了新的现象。

1 材料和方法

1.1 实验材料

带有 HBcAg 蛋白全长片段基因 *L* 的质粒 PEJ24 由上海农科院生物技术中心梁婉琪构建。醋酸锂转化的酿酒酵母（*Saccharomyces Cerevisiae*）菌株 EGY48 由农科院生物技术中心本室保存。

酵母培养所用试剂及培养基购自上海普飞生物技术有限公司；ELISA 反应 HBeAg 药盒为科华生物技术有限公司产品；Western blotting 反应中，一抗为多克隆抗体兔抗 HBcAg，购自美国 NEOMARKERS 公司；二抗为碱性磷酸酶偶联的羊抗兔 IgG，购自美国 Promega 公司；硝酸纤维膜为英国 Amersham 公司产品。

超离心机为美国 SORVALL 公司生产的 SORVALL ULTRA Pro80 Superspeed centrifuge；酶标仪为美国 Bio-RAD 公司生产的 Bio-RAD Model 550 Microplate Reader；透射电镜为荷兰 PHILIPS 公司生产的 CM120 型（BioTWin，CRYO）TEM。

1.2 HBcAg 基因在酿酒酵母中的表达

从-70℃冰箱取出被保存的转化酿酒酵母菌株 EGY48 在 SD-trp 平板上划线，30℃培养 2~5 d，挑选出单菌落，接种到 5 mL SD 培养瓶中，过夜培养，次日接种到 200 mL 的 SD 培养瓶中培养，第三天在装有 20 L SD 培养基的发酵罐中，30℃扩大培养 4~5 d。

取出罐中的培养液，3000 r/min 离心 10min，收集菌体；菌体用无菌蒸馏水洗三次；加入等体积的破菌缓冲液和少许石英砂，超声波破碎 10min 后；13 000 r/min 离心 45min，取上清液，用 50%饱和度的硫酸铵沉淀 4~6 h；13 000 r/min 离心 30min，沉淀用 5 mmoL/L Tris-HCl（pH7.4）溶解并透析过夜，次日更换透析液一次，13 000 r/min 离心 30min，取 60 μL 上清液鉴定目的蛋白（HBcAg 蛋白），其余上清液低温保存备用。

取上述收集的上清液过 Sepharose CL-4B 柱（Pharmacia），以 TE pH7.4（由 10 mmoL/L Tris-HCl（pH 7.4）+ 1 mmoL/L EDTA 配制）平衡洗脱，分管收集，用 ELISA 法检测 HBcAg 活性，将活性组分合并，用 50%的硫酸铵沉淀，对 5 mmoL/L Tris-HCl（pH 7.4）透析后，12 000 r/min 离心 30 min，收集上清液，冷冻抽干备用。

按文献[14]对表达产物进行 Western blotting 分析，一抗为多抗兔抗 HBcAg（1∶100）；二抗为碱性磷酸酶偶联的羊抗兔 IgG（1∶5000）。

1.3 表达的目的蛋白超离心纯化

超离心管依次加入浓度为 60%、50%、40%、30%、20%、10%各 1.5 mL 的蔗糖溶液（用 10 mmoL/L Tris-HCl pH 7.4；1 mmoL/L EDTA，pH8.0；0.2% TritonX-100 配制），加初步纯化的样品 1 mL；32 000 r/min 4℃离心 22 h。从上往下以每管 500 μL 收集样品，共收集 18 管。利用 HBeAg 药盒分别测定每管的抗原反应强度，然后将抗原反应强度较高的管合并。再用 5 mmoL/L Tris-HCl（pH 7.4）缓冲液透析除去蔗糖等杂质，冷冻抽干，留待进一步 CsCl 等密度梯度超离心。

用 5 mmoL/L Tris-HCl（pH 7.4）的缓冲液约 500 μL 溶解上面得到的冻干粉备用。向超离心管缓缓铺入 40%CsCl 5 mL 和 10%CsCl 5 mL 各一层，再将样品 500 μL 加到最上层，30 000 r/min、4℃离心 60 h。从上往下以每管 500 μL 收集样品，共收集 20 管。用阿贝折射仪对每管进行折光率的测定和密

维普资讯 http://www.cqvip.com

度的确定；用 HBeAg 试剂盒测定每管的抗原反应强度。根据上面的数据在一张图上绘制出抗原反应强度曲线和 CsCl 密度梯度曲线。最后将免疫反应强度比较高的管合并，再用 5 mmoL/L Tris-HCl（pH 7.4）的缓冲液透析过夜，次日更换透析液以除去 CsCl 等盐离子。透析好的样品冷冻抽干，留待电镜观察。

1.4 透射电镜（TEM）观察

经 CsCl 超离心的冷冻抽干样品，用 10μL 5 mmoL/L Tris-HCl（pH 7.4）的缓冲液溶解，取小滴滴在铜网上，2%醋酸铀负染，在透射电镜观察下拍照，本工作由上海第二医科大学电镜室完成。

2 结果

2.1 表达产物的 Western blotting 鉴定

初步纯化的表达产物的印迹杂交结果示于图 1。

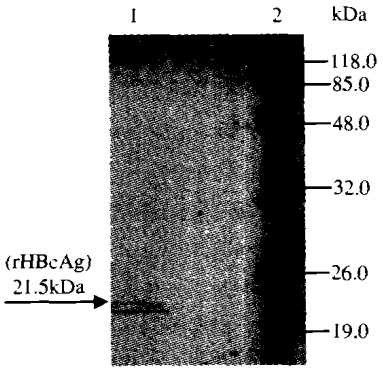

图 1 *L* 基因表达产物的 Western blot 分析

Fig.1 Western blot analysis of *L* gene expression

1. expression products of EGY48/pBJ24-L; 2. protein marker.

2.2 表达产物的纯化

初步纯化的表达产物进行蔗糖密度梯度超离心。对收集的 18 管样品分别进行蛋白浓度测定和 ELISA 反应，以管号为横坐标，ELISA 反应强度为纵坐标，绘制 ELISA 反应峰值曲线.结果示于图 2。

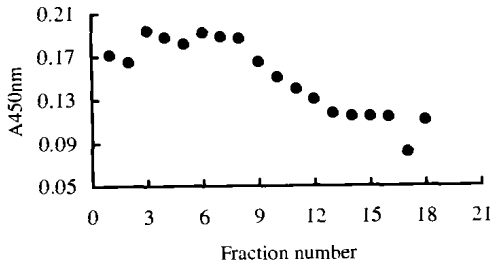

图 2 收集管所含 rHBcAg 蛋白的 ELISA 鉴定分析

Fig.2 ELISA reaction intensity(A_{450}nm) of rHBcAg protein in each fraction

从图 2 可知，高 ELISA 反应强度的管集中在管 3～管 8，说明 rHBcAg 主要存在在这 6 管中。将此 6 管合并成一管，以备下面进一步 CsCl 超离心纯化。

将蔗糖密度梯度超离心纯化的产物再进行 CsCl 密度梯度超离心。对收集的 20 管样品分别进行 ELISA 反应和密度测定，以管号为横坐标，ELISA 反应强度和密度为纵坐标，绘制 ELISA 反应强度和密度曲线。结果示于图 3。从图 3 分析可知，ELISA 反应强度最高的管集中在管 3 和管 11，它们的密度分别为：1.27g • mL^{-1} 和 1.40 g • mL^{-1} 将此两管合并成一管，进行电镜观察。

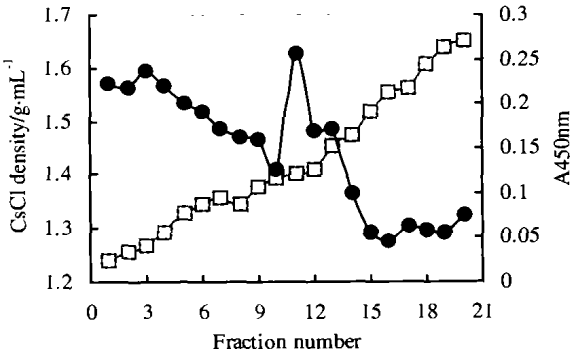

图 3 收集管所含 rHBcAg 蛋白的 ELISA 和密度分析

Fig.3 ELISA reaction intensity (●) and CsCl density (□) of rHBcAg protein in each fraction

2.3 超离心纯化的表达产物的电镜(TEM)观察

电镜观察结果见图 4。在 CsCl 超离心纯化的产物中，具有大小两种不同的 HBcAg 颗粒（核心颗粒），经统计分析可知，大颗粒直径约为 30.1±2.4 nm，小颗粒直径约为 21.5±3.3 nm（n=148）。这与肝细胞来源的 HBcAg 颗粒大小接近。且大小颗粒的数目基本相等。

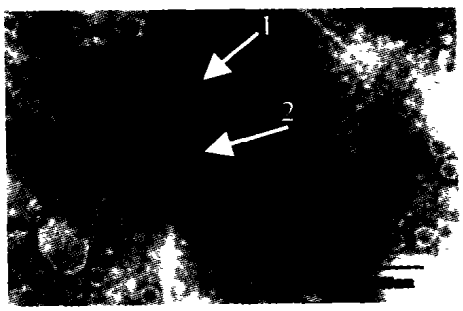

图 4 HBcAg 颗粒的电镜图片

Fig.4 TEM image of rHBcAg particles

Arrow shows negatively stained purified rHBcAg particles.

Arrow 1 indicates the small rHBcAg particle; Arrow 2 indicates the large rHBcAg particle.

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 讨论

我们从酿酒酵母（*Saccharomyces Cerevisiae*）表达体系中，成功地分离和纯化出了人重组 HBcAg 颗粒（核心颗粒）。Masashi Y 等人曾研究发现，酵母表达的 rHBcAg 蛋白及其自组装而成的 rHBcAg 颗粒与人肝细胞来源的 HBcAg 蛋白及其自组装而成的 HBcAg 颗粒大小、形态非常类似，且其抗原性也比较接近[15]。我们的实验结果也部分证实了 Masashi Y 等人的发现。这说明，酵母表达的 rHBcAg 颗粒具有天然 HBcAg 颗粒的性质，能很好地被用作免疫制剂的疫苗；在嵌合抗原中，能被用作其它免疫原性不强的抗原的载体[16]；在研究生物的发育过程中，能被用作蛋白质自组装机制和模型研究的很好材料[17]。在分离纯化 rHBcAg 颗粒的过程中，我们采用了差速密度梯度超离心和等密度梯度超离心两步分离结合法，获得了较纯的 rHBcAg 颗粒样品。经过 CsCl 密度梯度超离心纯化的 rHBcAg 颗粒产物的密度比较集中分布在 1.27g • mL^{-1} 和 1.40 g • mL^{-1} 两个峰值上。这说明通过两次超离心，尽管可以将酵母表达的 rHBcAg 颗粒较好纯化，但同时也损失了部分表达产物，而且，这种纯化过程是否能完全将大小两种不同的 rHBcAg 颗粒分开，还有待进一步研究，还需要对纯化过程作进一步的改进。通过透射电镜（TEM）对 rHBcAg 颗粒的观察发现，酵母表达的大小不同的两种 rHBcAg 颗粒的直径分别约为 30.1±2.4 nm 和 21.5±3.3 nm，这与 Crowther、Bènèdicte 和 Zlotnick 等人报导的结果基本一致[18~20]。这表明，在体外表达的 rHBcAg 颗粒具有大小不同的二态性，而在乙肝患者体内的 HBcAg 颗粒是否也具有类似的二态性，未见有过报导。关于 rHBcAg 颗粒二态性的生物学意义，还不得而知，需进一步研究和探讨[19]。

参考文献

[1] Robinson W S, Clayton D A, Greenman R L. DNA of a human hepatitis B virus canditate[J]. J Virol, 1974, 14: 384-391.

[2] Summers J, Mason W S. Replication of genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate[J]. Cell, 1982, 29: 403-415.

[3] Summers J, Connell A O, millman I. Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1975, 72: 4597-4601.

[4] Bartenschlager R, Junker-Nepmann M, Schaller H. The P gene product of the hepatitis B virus is required as a structure component for genomic RNA encapsidation[J]. J Virol 1990, 64: 5324-5332.

[5] Bartenschlager R and Schaller H. Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome[J]. EMBO J, 1992, 11: 3413-3420.

[6] Hirsch R, Lavine J, Chang L, *et al*. Polymerase gene products of hepatitis B viruses are required for genomic RNA packaging as well as for reverese transcription[J]. Nature(London), 1990, 344: 552-555.

[7] Mason W S, Aldrich C, Summers J, *et al*. Asymmetric replication of duck hepatitis B virus DNA in liver cells: free minus strand DNA[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1982, 79: 3007-4001.

[8] Pollack J R and Ganem D. An RNA stem-loop structure directs hepatitis B virus genomic RNA encapsidation[J]. J Virol, 1993, 67: 3254-3263.

[9] Kann M and Gerlich W H. The Molecular Medicine of Viral Hepatitis(Harrison,T.J. and Zuckerman,A.J.Eds.) [M]. New Youk: John Wiley and Sans, 1997. 63-87.

[10] Edman J C, Hallewell R A, Valenzuela P, *et al*. Synthesis of hepatitis B surface and core antigen in *E.coli*[J]. Nature, 1981, 291(5815): 503-506.

[11] Lanford R E, Notvall L. Expression of hepatitis B virus core and precore antigens in Insect cells and characterization of a core-associated kinase activity[J]. Virology, 1990, 176(1): 222-233.

[12] Imamura T, Sugahara K, Adachi S, *et al*. Purification and characterization of the hepatitis B virus core antigen produced in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. J Biotech, 1988, 8: 149-162.

[13] Roossinck M J, Jameel S, Loukin S H, *et al*. Expression of hepatitis B viral core region in mammalian cells[J]. Mol Cell Biol, 1986, 6: 1393-1400.

[14] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning:A Laboratory Manul, 2nd, [M] New Youk: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[15] Masashi Y, Tadashi H, Keishin S, *et al*. Electron microscopy of hepatitis B virus core antigen expressing yeast cells by freeze-substitution fixation[J]. Euro. J. of Cell Biology, 1988, 47: 138-143.

[16] Stahl S and Murray K. Immunogenicity of peptide fusion to hepatitis B virus core antigen[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86: 6283-6287.

[17] Paul P, Elmars G. Hepatitis B core particles as a universal display model: a structure-function basis for development[J]. FEBS letters, 1999, 442: 1-6.

[18] Crowther R A, Kiselev N A, Bottcher B, *et al*. Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy[J]. Cell, 1994, 77(6): 943-950.

[19] Zlotnick A, Cheng N, Conway J F, *et al*. Dimorphism of hepatitis B virus capsid is strongly influenced by the C-terminus of the capsid protein[J]. Biochem, 1996, 35: 7412-7421.

[20] Bènèdicte W, Martine Q, Dominique R, *et al*. Characterization and diagnostic potential of hepatitis B virus nucleocapsid expressed in *E.coli* and P.pastoris[J]. J Virol method, 2002, 102: 175-190.