

重组猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白在毕赤酵母中的优化表达及疫苗活性研究

王斌, 罗时渝, 谢景毅, 叶燕锐, 潘力

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东省发酵与酶工程重点实验室, 广东广州 510006)

摘要: 猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 是引起断奶猪多系统衰竭综合症 (PMWS) 的主要致病原, 在全世界范围内对养猪业造成了巨大的经济损失。猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白 (PCV2-Cap) 是制备猪蓝耳病疫苗的主要靶蛋白。针对目前 PCV2 疫苗生产工艺复杂、成本较高的问题, 本研究利用毕赤酵母表达系统研究 PCV2-Cap 蛋白的重组表达及疫苗活性, 将 PCV2-Cap 基因序列去除核定位信号序列 (NLS) 后, 经密码子偏好性优化, 构建重组表达载体, 并转化至毕赤酵母宿主菌 X-33, 经 Zeocin 抗性筛选获得重组菌株。SDS-PAGE 和 Western blot 结果显示 Cap 蛋白在酵母表达系统中成功表达, 蛋白质大小为 26 ku。5 L 罐高密度发酵小试, 得到 PCV2-Cap 蛋白在发酵上清液中的浓度约为 0.53 mg/mL, 占总蛋白的 23.5%。动物免疫试验显示重组 Cap 蛋白能刺激机体产生特异性抗体。结果表明, PCV2-Cap 基因在毕赤酵母中实现了分泌表达, 为 PCV2-Cap 毕赤酵母亚单位疫苗的研制提供了数据支持。

关键词: 猪圆环病毒 2 型; 毕赤酵母; 重组表达; 疫苗活性

文章编号: 1673-9078(2018)04-51-55

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.04.009

Optimized Expression and Vaccine Activity of Recombinant Porcine Circovirus Type 2 Capsid Protein in *Pichia Pastoris*

WANG Bin, LUO Shi-yu, XIE Jing-yi, YE Yan-rui, PAN Li

(School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Fermentation and Enzyme Engineering, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Porcine circovirus type2 (PCV2) is the major pathogen of weaning multi-systemic wasting syndrome (PMWS), which has caused significant economic losses to the swine industry worldwide. Porcine circovirus type 2 capsid protein (PCV2-Cap) is the main target protein for the preparation of vaccine against weaning multi-systemic wasting syndrome (PMWS). In this study, the recombinant expression and vaccine activity of PCV2-Cap protein in *Pichia pastoris* were investigated to solve the problems of complex production process and high cost of PCV2 vaccine. After removing the nuclear localization sequence (NLS) from PCV2-Cap gene sequence, a preferential optimization of codon was performed to construct a recombinant expression vector and transformed into the host bacteria (X-33) of *P. pastoris*. The results of SDS-PAGE and Western blot showed that the Cap protein was successfully expressed in the yeast expression system with a protein size of 26 Ku, and the high density fermentation test in 5 L bioreactor suggested that the concentration of PCV2-Cap protein in fermentation supernatant was 0.53 mg/mL, accounting for 23.5% of the total cell protein. In addition, the animal immunization test demonstrated that Cap protein could stimulate the body to produce specific antibodies. Consequently, the PCV2-Cap gene was secreted and expressed *P. pastoris*, which might make a contribution to the development of PCV2-Cap subunit vaccines.

Key words: porcine circovirus type 2; *Pichia pastoris*; recombinant expression; vaccine activity

收稿日期: 2017-09-19

基金项目: 广东省科技计划项目 (2016A050503016、2016A010105004); 广州市科技计划项目 (201510010191); 广东省自然科学基金项目 (2017A030313097)

作者简介: 王斌 (1981-), 男, 博士, 副教授, 主要从事丝状真菌遗传生理研究

通讯作者: 潘力 (1967-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 发酵工程、微生物学、生物工程

断奶猪多系统衰竭综合症 (Post-weaning multi-systemic wasting syndrome, PMWS), 俗称猪蓝耳病, 是一种影响养猪业发展的重要传染病, 该病传播范围广泛、致死率较高、难以治愈, 已在世界范围内对养猪业造成了巨大的经济损失。

猪圆环病毒 2 型 (porcine circovirus type2, PCV2) 是猪蓝耳病的主要致病原^[1], PCV2 通过侵入猪的淋巴组织抑制其免疫系统, 引发猪圆环病毒及其相关疾

病如猪皮炎、肾病综合征 (PDNS) 等^[2,3]。猪圆环病毒 2 型具有 2 个主要的开放阅读框 (ORF)。衣壳蛋白 (Cap) 作为 PCV2 病毒重要的结构和功能蛋白, 由 PCV2 基因的 ORF2 编码合成^[4,5]。目前已经商业化的 PCV2 疫苗基本是以 Cap 蛋白为靶蛋白研制的, 主要包括病毒灭活疫苗和杆状病毒表达的亚单位疫苗^[6], 但杆状病毒表达系统的生产工艺复杂, 生产成本较高, 不能广泛应用于工业生产。

本试验以酵母密码子偏好性优化的 PCV2-Cap 基因为模板, pPICZαA 为表达载体, 利用 AOX1 启动子来诱导高水平表达。通过毕赤酵母表达系统表达去除核定位信号序列的 Cap 基因, 并高密度发酵得到 PCV2-Cap 蛋白, 使用 SDS-PAGE 和 Western Blot 技术对表达的重组蛋白进行检测, 结果表明猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白在 X-33 毕赤酵母中成功表达。随后对猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白的毕赤酵母表达菌株 5 L 发酵罐发酵小试, 将发酵产物纯化后的产物制备成免疫抗原进行动物免疫实验研究, 发现所得 PCV2-Cap 蛋白可作为疫苗用于猪 PMWS 病的免疫预防。目前 PCV2-Cap 的表达研究中, 大肠杆菌和酵母系统是使用最广泛的两种表达系统, 异源表达的 PCV2-Cap 蛋白有研制成疫苗和诊断性试剂的潜力^[7,8]。本试验在毕赤酵母重组表达的基础上研究了疫苗活性, 为开发重组 PCV2-Cap 亚单位疫苗提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 质粒与菌种

pPICZαA 载体、毕赤酵母 *P. pastoris* X-33 菌株均购自美国 Invitrogen 公司; PUC57-Cap-opt 载体 (含酵母密码子偏好性优化的 PCV2-Cap 基因) 由本南京金斯瑞公司合成; 猪圆环病毒 Cap 蛋白质抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 均购自博奥森生物公司。

1.2 实验试剂

Zeocin™ 抗性、限制性内切酶 EcoRI、SalI 和 SacI 均购自美国 Thermo Fisher 公司; DNA Ladder Marker、Protein Ladder、PrimeSTAR DNA 聚合酶均购自宝生物工程 (大连) 有限公司; NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit 购自美国 NEB 公司; 油乳佐剂 ISA206 购自法国 Seppic 公司; 猪圆环病毒 2 型 ELISA 抗体检测试剂盒、猪圆环病毒 2 型灭活疫苗 (WH 株) 均购自武汉科前生物公司。

1.3 引物设计

根据 PUC57-Cap-opt 载体中优化后的 PCV2-Cap 基因序列设计引物 (见表 1)。引物 EcoRI-dcap-F/SalI-dcap-R 用于扩增去除核定位信号的 PCV2-Cap 基因, 在上游引物的 5' 端引入 EcoRI 酶切位点, 下游引物的 5' 端引入 SalI 酶切位点。引物 5' AOX/3' AOX 为通用测序引物。

表 1 本研究所用引物

引物名称	引物序列 (5'-3')	碱基数
EcoRI-dcap-F	<i>ggctgaagct</i> GAATTCAACGGTATCTTC AACACCAG	36
SalI-dcap-R	<i>gatgatgatg</i> GTCGACTGGGTTCAATGG TGGATCC	35
5' AOX	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	21
3' AOX	GCAAATGGCATTCTGACATCC	21

注: 引物中斜体小写部分为 DNA Assembly 克隆的同源序列, 加粗大写部分为酶切位点。

1.4 重组表达载体的构建

将 PCV2-Cap 基因的 PCR 产物与 pPICZαA 载体质粒分别采用 EcoRI/SalI 进行双酶切, 连接 DNA 片段与线性化载体, 转化大肠杆菌感受态细胞, 经 Zeocin 抗性筛选, 通过菌液 PCR 验证阳性克隆, 得到猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白真核表达载体。送样至 Invitrogen 公司测序, 将构建正确的重组表达载体命名为 pPICZαA-Cap-opt(ΔNLS), 使用 SacI 单酶切线性化。

1.5 重组酵母表达菌株的构建

将 10 μg 线性化质粒 pPICZαA-Cap-opt(ΔNLS) 与 80 μL 毕赤酵母宿主菌感受态细胞混合均匀后电转化, 工作参数为 1500 V, 5 ms。电击完毕后迅速加入 1 mL 冰预冷的 1 M 山梨醇溶液。涂布于 YPDZ 平板 (100 μg/mL Zeocin) 上 30 °C 恒温培养。再以 EcoRI-dcap-F/SalI-dcap-R 为验证引物, 进行 PCR 鉴定毕赤酵母转化子, 检测 PCV2-Cap 基因是否整合入酵母菌株基因组中, 得到重组菌株 *P. pastoris* X-33(pPICZαA-Cap-opt)。

1.6 重组酵母表达菌株的甲醇诱导

将重组酵母表达菌株接种于 25 mL BMGY 培养基中, 30 °C, 200 r/min 培养 16~20 h, 2000 g 离心 5 min 收集菌体, 转接到 5 mL BMMY 培养基中, 稀释到 OD₆₀₀=1, 30 °C, 200 r/min 继续培养 96 h。每隔 24 h 加入 1% 的甲醇进行诱导。按 24 h 间隔分别取样, 8000

g 离心, 收集上清液。

1.7 PCV2-Cap 蛋白的 SDS-PAGE 和 Western

blot 分析

将上述诱导表达的上清液分别取样, 按常规方法进行 SDS-PAGE 检测。并将相应的样品电转印至 PVDF 膜, 用 1% BSA-TBS 溶液封闭 1 h, TBST 溶液清洗, 用猪圆环病毒 Cap 蛋白质抗体温育 1 h, TBST 溶液清洗, 加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG-HRP 温育 2 h, 再次用 TBST 溶液洗涤, 加入适量 BeyoECL Plus 化学发光液显色反应, 最后将 PVDF 膜放置到荧光成像仪中曝光。

1.8 PCV2-Cap 蛋白真核表达的发酵小试

将构建的重组菌株 *P. pastoris* X-33(pPICZα A-Cap-opt) 进行 5 L 发酵罐的发酵小试。将活化的重组表达菌株种子液接种 10% 到 2 L YPD 培养基中, 30 °C, 用氨水调节 pH=5.5, 搅拌转速 800 r/min 进行批式发酵。变速流加 50% 甘油分批补料发酵, 碳源饥饿处理 30 min 后进行甲醇补料培养, 总发酵时间 120 h 左右, 8000 g 离心并保存发酵液上清。

1.9 动物免疫试验

取上述发酵上清进行 His 亲和层析纯化后加入等体积的油乳佐剂 ISA206 制备成免疫抗原样品。将 9 头 PCV2 阴性的仔猪 (21~28 日龄) 随机分为 3 组, 试验组用 2 mL 免疫抗原进行颈部肌肉注射, 阳性组用猪圆环病毒 2 型灭活疫苗注射作为对照, 阴性组用相同体积的 PBS 溶液注射作为对照, 首免 2 周后采用相同的剂量进行二免。按照首免后 14、27、40 d 的顺序进行仔猪的采血操作, 无菌分离血清后, 用猪圆环病毒 2 型 ELISA 抗体检测试剂盒测定抗体水平。S/P 值大于 0.16 结果判定为阳性, S/P 值小于 0.16 结果判定为阴性。

2 结果与讨论

2.1 重组表达载体的 PCR 验证

构建的 PCV2-Cap 蛋白真核表达载体质粒全长为 4069 bp, 随机挑取 Zeocin 抗性 LLB 培养基中获得的重组表达载体质粒的转化子, 使用 EcoRI-dcap-F/SalI-dcap-R 这一对引物进行 PCR 验证筛选阳性克隆, 扩增的 PCR 产物长度为 608 bp, 琼脂糖凝胶电泳验证结果如图 1 所示, 挑取的大肠杆菌转化子全部为阳性。选取菌液 PCR 验证正确的菌株送样

至 Invitrogen 公司测序, 确定构建正确的 PCV2-Cap 蛋白表达载体菌株。

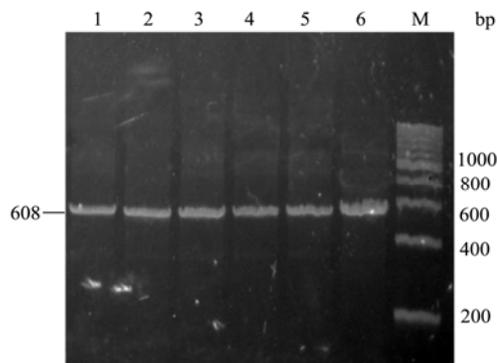


图 1 pPICZα A-Cap-opt(ΔNLS) 载体转化子的 PCR 鉴定

Fig.1 PCR identification of pPICZα A-Cap-opt(ΔNLS) vector transformant

注: 1~6 为毕赤酵母表达载体的菌液 PCR 验证结果, M 为 200 bp DNA Ladder Marker。

2.2 重组酵母表达菌株的筛选

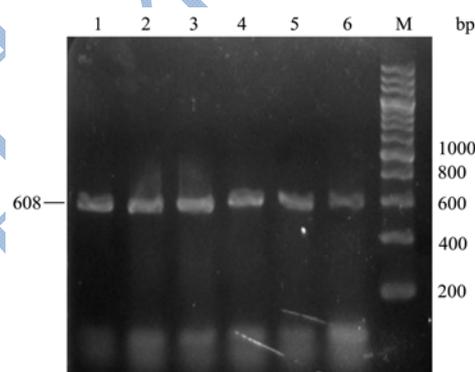


图 2 pPICZα A-Cap-opt(ΔNLS) 毕赤酵母转化子菌落 PCR 鉴定

Fig.2 PCR identification of pPICZα A-Cap-opt(ΔNLS) *Pichia pastoris* transformant

注: 1~6 为毕赤酵母表达重组子的直接 PCR 验证结果, M 为 200 bp DNA Ladder Marker。

随机挑取 6 个毕赤酵母重组转化子, 使用 EcoRI-dcap-F/SalI-dcap-R 这一对引物直接 PCR 验证毕赤酵母电转化表达的重组子, 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 的结果如图 2 所示, 以重组转化子的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 结果为阳性, 表明 PCV2-Cap 基因成功整合到宿主的基因组上, 重组酵母表达菌株中含有目的基因。

2.3 毕赤酵母表达 PCV2-Cap 蛋白的 SDS-PAGE 检测

将毕赤酵母表达菌株 *P. pastoris* X-33(pPICZα A-Cap-opt) 与毕赤酵母宿主菌株 X-33 分别接种培养,

进行甲醇诱导表达。将诱导表达的上清液进行 SDS-PAGE 检测分析。鉴定结果如图3所示,PCV2-Cap 基因在毕赤酵母中表达的蛋白大小约为 26 ku, 与设计的蛋白大小一致, 从甲醇诱导的 48 h 左右开始积累分泌蛋白, 且胞外的上清蛋白中含有较少的杂蛋白。

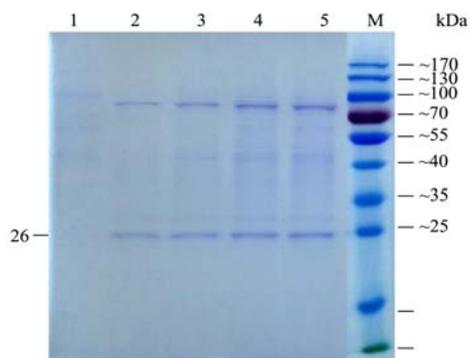


图3 SDS-PAGE 检测甲醇诱导猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白在毕赤酵母中的表达

Fig.3 Expression of PCV2-Cap protein induced by methanol in *P. pastoris* by SDS-PAGE

注: 1 为对照 X-33 宿主甲醇诱导 96 h 的上清, 2~5 为 1 号毕赤酵母表达菌株甲醇诱导 48、72、96、120 h 的上清, M 为 26616 Protein Ladder Marker。

2.4 毕赤酵母表达 PCV2-Cap 蛋白的 Western blot 检测

blot 检测

以猪圆环病毒 2 型 ELISA 抗体检测试剂盒中提供的抗原 PCV2-Cap 蛋白作为对照, 将上述蛋白样品进行 Western blot 鉴定。结果与 SDS-PAGE 检测的结果一致, 宿主菌株 X-33 在没有表达相应的蛋白, 毕赤酵母表达菌株 *P. pastoris* X-33(pPICZα A-Cap-opt) 诱导表达的分泌蛋白与一抗 Rabbit Anti-PCV2 Cap 蛋白的免疫反应呈阳性, 如图 4 所示。结果说明 PCV2-Cap 基因在毕赤酵母宿主菌 X-33 中实现了分泌表达。



图4 Western blot 检测甲醇诱导猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白在毕赤酵母中的表达

Fig.4 Expression of PCV2-Cap protein induced by methanol in *P. pastoris* by western blot

注: 1 为抗原 PCV2-Cap 蛋白对照, 2 为毕赤酵母宿主 X-33 甲醇诱导 120 h 的上清, 3 为 2 号毕赤酵母表达菌株甲醇诱导 120 h 的上清, M 为 26616 Protein Ladder Marker。

2.5 动物免疫试验

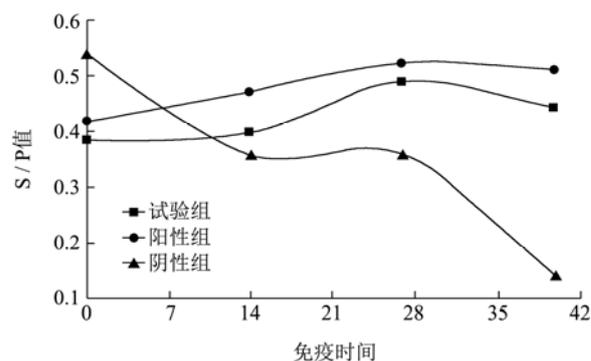


图5 动物免疫试验抗体变化趋势图

Fig.5 Trend chart of antibody change by animal immunization test

高密度发酵得到 PCV2-Cap 蛋白在发酵上清液中的浓度约为 0.53 mg/mL, 占总蛋白定量比例的 23.5%。重组蛋白表达量高于 Tu 等^[8]在毕赤酵母系统表达的摇瓶发酵产量 0.17 mg/mL。在动物免疫试验挑选试验猪体阶段, 由于难以找到符合试验条件的抗体阴性仔猪, 故选取 Elisa 检测 S/P 值接近的 9 头 23 日龄保育猪, 随机分为 3 组进行动物免疫试验研究。如图 5 所示, 以免疫时间为横坐标, 样品血清的 S/P 值为纵坐标, 比较各组抗体检测结果的变化趋势。试验组与阳性组总抗体水平基本类似, 整体抗体水平呈上升趋势, S/P 值的平均值比较接近, Elisa 检测结果为阳性, 符合疫苗免疫后的抗体产生规律。阴性组抗体 S/P 值表现为下降, 尤其在第二次免疫后下降趋势明显, 二免后 26 d 降到阴性值以下, 符合母源抗体逐渐消滅的规律。

3 结论

3.1 Cap 蛋白 N 端 1-41 个氨基酸序列中含有丰富的精氨酸 (Arg), 疏水性较强。这段保守序列是 Cap 蛋白的核定位信号 (NLS)^[9], 不参与形成抗原表位, 影响 Cap 蛋白的识别、运输到细胞核内的过程, 全长的 PCV2-Cap 基因很难在异源表达系统中表达^[10,11]。

3.2 酵母是在科学研究和工业应用领域最常使用的真核表达系统之一, 毕赤酵母表达系统可以进行糖基化、折叠等翻译后修饰, 对异源蛋白的分泌表达有很大优势^[12,13]。本研究构建了包含去除核定位信号的 PCV2-Cap 基因的重组酵母表达菌株, Cap 蛋白经甲醇诱导, 在毕赤酵母表达系统中实现了分泌表达。SDS-PAGE 和 Western blot 结果显示, 重组表达的 PCV2-Cap 蛋白大小为 26 ku, 具有良好的免疫抗原性, 且证明了核定位信号的缺失不影响 PCV2-Cap 基因的免疫性能。动物体内免疫实验对重组 PCV2-Cap 蛋白在仔猪体内的生物安全性和免疫性能做了初步的研

究, 结果表明重组 PCV2-Cap 蛋白具有良好的免疫原性, 可以刺激机体产生相应的抗体, 且与商业化的猪圆环病毒疫苗的抗体产生规律类似, 对比无显著性差异。

参考文献

- [1] Blanchard P, Mahe D, Cariolet R, et al. Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins [J]. *VACCINE*, 2003, 21(31): 4565-4575
- [2] Segalés J, Allan G M, Domingo M. Porcine circovirus diseases [J]. *Animal Health Research Reviews*, 2005, 6(2): 119-142
- [3] Chae C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases [J]. *Veterinary Journal*, 2005, 169(3): 326-336
- [4] Nawagitgul P, Morozov I, Bolin S R, et al. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein [J]. *Journal of General Virology*, 2000, 81(9): 2281-2287
- [5] Liu Q, Tikoo S K, Babiuk L A. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2 [J]. *Virology*, 2001, 285(1): 91-99
- [6] Li W, Wang X, Bai J, et al. Construction and immunogenicity of recombinant porcine circovirus-like particles displaying somatostatin [J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 163(1-2): 23-32
- [7] Liu Q, Willson P, Attah-Poku S, et al. Bacterial expression of an immunologically reactive PCV2 ORF2 fusion protein [J]. *Protein Expression and Purification*, 2001, 21(1): 115-120
- [8] Tu Y, Wang Y, Wang G, et al. High-level expression and immunogenicity of a porcine circovirus type 2 capsid protein through codon optimization in *Pichia pastoris* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(7): 2867-2875
- [9] 芦银华, 华修国, 陈德胜, 等. 猪圆环病毒 2 型分离毒株全基因组的克隆及序列分析 [J]. *病毒学报*, 2003, 19(1): 42-46
- [9] LU Yin-hua, HUA Xiu-guo, CHEN De-sheng, et al. Cloning and sequence analysis of the complete genomes of type 2 porcine circovirus (PCV-2) isolates [J]. *Chinese Journal of Virology*, 2003, 19(1): 42-46
- [10] Zhou J Y, Shang S B, Gong H, et al. *In vitro* expression, monoclonal antibody and bioactivity for capsid protein of porcine circovirus type II without nuclear localization signal [J]. *Journal of Biotechnology*, 2005, 118(2): 201-211
- [11] Shuai J, Zhang X, Chen W, et al. *In vivo* characterization of chimeric PCV DNA clones containing heterogeneous capsid protein nuclear localization signals (NLS) [J]. *Virology Journal*, 2013, 10(16)
- [12] Daly R, Hearn M T. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production [J]. *Journal of Molecular Recognition*, 2005, 18(2): 119-138
- [13] Cereghino J L, Cregg J M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, 24(1): 45-66