

重组 PCV3 Cap 蛋白在酵母细胞中的表达与鉴定

潘毅平^{1,2}, 郭苗苗², 肖升东², 闫鹏先², 张国庆^{1,2}, 贺笋^{1,2}

(1. 天康生物股份有限公司, 新疆乌鲁木齐 830032;

2. 天康生物(上海)有限公司, 上海 201203)

摘要: 猪圆环病毒 3 型 (PCV3) 是影响我国养猪业的重要病原之一, 目前尚无商品化疫苗用于防控该病。Cap 蛋白是 PCV3 主要的抗原蛋白。为构建高水平表达可溶性 PCV3 Cap 蛋白的工程菌株, 对 Cap 蛋白 NLS 序列进行定点突变, 构建重组表达载体 pPICZαA-PCV3, 经转染、酵母细胞表达以及纯化, 最终获得可溶性 PCV3 Cap 蛋白。随后对纯化蛋白进行 Western Blot 验证及电镜观察。结果显示: 获得的 PCV Cap 蛋白大小约 27 kDa; 电镜下观察可见均一的病毒样颗粒 (VLP), 颗粒直径约 18 nm。PCV3 Cap 蛋白在酵母细胞中的成功表达为进一步开发 Cap 蛋白亚单位疫苗奠定了基础。

关键词: 猪圆环病毒 3 型; 病毒样颗粒; 亚单位疫苗; 酵母表达系统

中图分类号: S852.65 文献标识码: B 文章编号: 1005-944X (2020) 11-0096-04

DOI: 10.3969/j.issn.1005-944X.2020.11.019

Expression and Identification of Recombinant PCV3 Cap Protein in Yeast Cells

Pan Yiping^{1,2}, Guo Miaomiao², Xiao Shengdong², Yan Pengxian², Zhang Guoqing^{1,2}, He Sun^{1,2}

(1. Tecon Biology Co., Ltd., Urumqi, Xinjiang 830032, China;

2. Tecon Biology (Shanghai) Co., Ltd., Shanghai 201203, China)

Abstract: Porcine circovirus type 3 (PCV3) is one of the most serious pathogens that would affect pig industry in China, but no commercial vaccine has been available till now. In order to establish an engineered strain that could express soluble PCV3 Cap protein at a high level, considering that Cap protein was the main antigenic protein of PCV3. The nuclear localization sequence (NLS) of Cap protein was specifically mutated to establish the recombinant plasmid pPICZαA-PCV3, after transfection of the plasmid as well as expression and purification of recombinant protein, the soluble PCV3 Cap protein was obtained. Then the purified protein was verified by Western Blot and observed under electron microscope. It was concluded that the PCV Cap protein obtained was about 27 kDa, and uniform virus-like particles (VLP) with the diameter of 18 nm were observed under electron microscope. The successful expression of PCV3 Cap protein in yeast cells laid a foundation for further development of Cap protein subunit vaccines.

Key words: PCV3; virus-like particle; subunit vaccine; yeast expression system

猪圆环病毒 (porcine circovirus, PCV) 是一种无囊膜的单股环状 DNA 病毒, 是最小的 DNA 病毒之一, 目前已发现 PCV1、PCV2、PCV3 以及 PCV4。PCV1 为非致病性病毒; PCV2 为致病性病

毒, 是断奶仔猪多系统衰竭综合征 (PMWS) 的主要病原; PCV4 与水貂圆环病毒的基因组一致性最高 (66.9%), 与其他 PCV 基因组的一致性仅为 43.2%~51.5%。据报道^[1], PCV4 检出猪群患有严重临床症状, 并有多种病原微生物共感染现象。

2015 年, 美国首次报道了 PCV3 在猪群中流

收稿日期: 2020-07-17 修回日期: 2020-10-10

通信作者: 贺笋

行^[2]。PCV3病毒粒子呈二十面体结构，无囊膜，其基因组为单股DNA，全长约2 000 bp，包含3个主要开放阅读框（open reading frame, ORF），主要抗原Cap蛋白与PCV2 Cap蛋白基因同源性很低，仅30%左右。2016年起，我国在多个猪场检测到PCV3。这些猪场无一例外，均出现母猪繁殖障碍、多系统炎症反应和新生仔猪数量急剧下降等问题^[3-5]。PCV3自发现以来，已经逐渐成为影响我国养猪业的重要病原体。目前还没有体外繁殖PCV3分离株获得成功的报道，这也在一定程度上制约了PCV3灭活疫苗的研发。

研究人员相继将PCV3 Cap蛋白在大肠杆菌和杆状病毒/昆虫表达系统中表达并成功组装成病毒样颗粒（virus-like particle, VLP）^[6-8]。但是大肠杆菌表达的PCV Cap蛋白可溶性低，且有内毒素污染，后期去除内毒素工艺复杂且成本较高；昆虫杆状病毒系统表达的VLP具有很好的免疫效果，但是昆虫杆状病毒系统表达的Cap蛋白VLP产量低、生产成本低、工艺复杂，难以用于动物疫苗的大规模生产及应用推广。酵母表达系统作为一个高效的蛋白表达系统，具有成本低、蛋白可溶性表达等优点。由于PCV3 Cap蛋白自身核定位序列（NLS）的影响，酵母系统直接表达该蛋白时很容易形成不溶性蛋白聚集。本试验通过对PCV3 Cap蛋白NLS进行改造，在酵母系统完成PCV3 Cap蛋白的表达、纯化，成功组装PCV3 VLP，以期为进一步研发PCV3亚单位疫苗奠定基础。

1 材料方法

1.1 菌株与载体

菌株 *Pichia pastoris* X33、载体 pPICZαA，均购自 Invitrogen 公司。

1.2 主要仪器与试剂

1.2.1 主要仪器 离心机，购自 HITACHI 公司；恒温摇床，购自上海智诚分析仪器制造有限公司；分光光度计，购自上海美普达仪器有限公司；电转仪，购自 BIO-RAD 公司。

1.2.2 主要试剂 YEASTEXTRACT (No. 2194133)、tryptone (No. 2330844)，均购自 OXOID 公司；

D-sorbitol (No. BCBX1172/MKCF5469)、DTT (No. SLBW1508)、生物素 (No. SLBZ4553)，均购自 Sigma 公司；HEPES (No. EZ2811E176)，购自 BioFROXX 公司；Zeocin (No. ZEL-40-05)，购自 invivogen 公司；YNB (No. 7332771) 购自 BD 公司；D (+) - 无水葡萄糖 (No. 20180711)、磷酸二氢钾 (No. 20190225)、磷酸氢二钾 (No. 20180323)、甲醇 (No. 20181231)、KOH (No. 20180919)，均购自沪式公司。

1.3 PCV3 Cap 蛋白一级序列预测及合成

根据 NCBI 中 PCV3 Cap 蛋白 (GenBank 登录号 ATD53354.1) 序列信息，利用 cNLS Mapper (<http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp>)，将 PCV3 Cap 蛋白的 NLS 进行突变；优化密码子，并在优化核酸序列的 5' 端添加碱基 GCCACC (与起始密码子 ATG 共同形成 KOZAK 序列)，然后送金唯智公司合成。

1.4 重组 PCV3 Cap 蛋白表达载体构建与转染准备

将合成的序列用 TAKARA 无缝克隆试剂盒，经同源重组的方式整合到 pPICZαA 载体酶切位点 *Pst*I 和 *Xba*I 之间，获得重组质粒 pPICZαA-PCV3。随后，把上述重组质粒转化到 Top10 感受态细胞中培养。在培养平板上挑取单克隆菌落，抽提质粒并经 1% 核酸电泳验证、酶切鉴定为阳性后，将线性化的质粒用冷乙醇沉淀方法回收。冷乙醇沉淀的具体操作，参照《分子克隆实验指南》^[9] 进行。

1.5 酵母表达 PCV3 Cap 蛋白与纯化

1.5.1 电转染 将 10 μL 线性化质粒和 90 μL X33 感受态细胞在电转杯中混匀，冰上孵育 5 min；然后将电转仪设定为时间恒定模式，电转参数为电压 1 200 V、时间 5.5 ms、电转杯直径 0.1 cm；电击后迅速加入 4 °C 遇冷的 YPDS 培养基，即获得稳定表达目标蛋白的细胞库；然后将细胞库置于 29 °C 恒温培养箱中静置培养 3 h；最后将菌液涂布到含有 3 mg/mL zeocin 的 YPDS 平板上，29 °C 避光静置培养 3 d。在此高浓度抗生素筛选出的菌落均是高拷贝菌株。

1.5.2 诱导表达 将上述长出的单菌落转接至含 1 mg/mL zeocin 的 YPD 平板，然后对 PCV3 Cap

蛋白菌株进行菌体培养及诱导表达。培养及表达步骤为：挑取酵母单菌落至 BMGY 培养基中，250 r/min 29 °C 过夜培养至菌液 OD 值为 2~6，20 °C 3 000 g 离心 5 min，抛去上清；用 BMM 培养基重悬菌体至菌液 OD 值为 2 左右，继续放在 29 °C 培养箱中震荡培养 24 h；然后补加 0.5% 甲醇，继续 29 °C 震荡培养 24 h；再次补加 0.5% 甲醇，同样的条件继续培养 24 h。随后离心收集菌体，抛去上清，再用等体积的裂解液（1×protein loading buffer）进行重悬菌体，沸水浴煮沸 10 min。随后进行 SDS-PAGE 分析，根据 SDS-PAGE 结果挑选出表达量最高的菌株。

1.5.3 纯化 用高压冷冻破碎仪裂解细胞，收取上清；然后用 20% 硫酸铵沉淀目标蛋白，最后用 HEPES buffer 重悬。重悬蛋白经过分子排阻层析纯化，获取 PCV3 Cap 蛋白。

1.6 PCV3 Cap 蛋白 VLP 组装及电镜观察

纯化蛋白在 50 mmol/L HEPES、200 mmol/L NaCl、pH7.4 缓冲液中，自组装成大小均一的 VLP，负染电镜观察颗粒，用 4K CCD 相机获取电镜照片。

2 结果

2.1 PCV3 Cap 蛋白序列优化

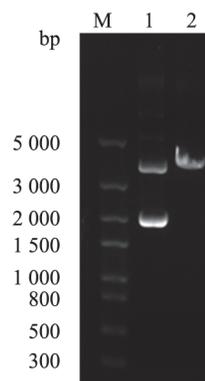
参考 GenBank ATD53354.1 序列，利用在线工具 cNLS Mapper，对 PCV3 Cap 蛋白的 NLS 序列进行突变。突变后的序列（Opti-Cap）经 NLS 预测网站分析发现，不再具有 NLS 序列特点（图 1）。

Wt-Cap	MRHRAIFRRRPRRRRRRHRRRYARRRLLFIRRPATAGTYTKKYSTMNVIS	50
Opti-Cap	MQGRAIFRQQPRGRNQGRNGYARQLFIRNPATAGTYTGGQYSTMNVIS	50
Wt-Cap	VGTPQNNKPWHANHFITRLNEWETAISFEYYKILKMKVTLSPVSPAQQT	100
Opti-Cap	VGTPQNNKPWHANHFITRLNEWETAISFEYYKILKMKVTLSPVSPAQQT	100
Wt-Cap	KTMYGHTAIDLGDGAWTTNTWLQDDPYAESSTRKVMTSKQKHSRYFTPKPI	150
Opti-Cap	KTMYGHTAIDLGDGAWTTNTWLQDDPYAESSTRKVMTSKQKHSRYFTPKPI	150
Wt-Cap	LAGTTSAHPGQSLFFFSRPTPWLNLYDPTVQWGALLWSIYVPEKTGMTDF	200
Opti-Cap	LAGTTSAHPGQSLFFFSRPTPWLNLYDPTVQWGALLWSIYVPEKTGMTDF	200
Wt-Cap	YGTKEVWIRYKSVL	214
Opti-Cap	YGTKEVWIRYKSVL	214

图 1 优化的 PCV3 Cap 蛋白氨基酸序列

2.2 重组 PCV3 Cap 蛋白表达载体构建与鉴定

重组质粒 pPICZαA-PCV3 经 *PmeI* 酶切后进行 1% 核酸电泳验证。结果（图 2）显示，重组质粒 pPICZαA-PCV3 完全线性化。



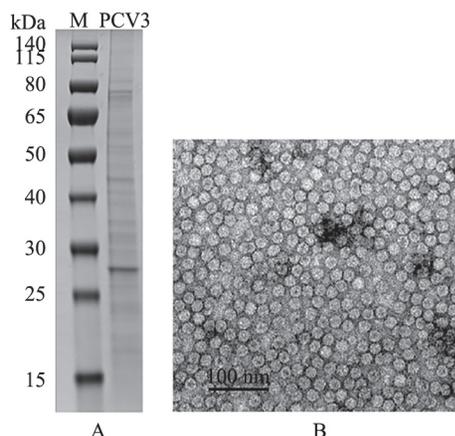
M. Trans 5 000 DNA Marker ; 1. 重组质粒 pPICZαA-PCV3 ; 2. 重组质粒 pPICZαA-PCV3 经 *PmeI* 酶切后产物。

图 2 重组质粒 pPICZαA-PCV3 酶切结果

2.3 重组 PCV3 Cap 蛋白表达与鉴定

表达 PCV3 Cap 蛋白的菌体裂解后进行硫酸铵沉淀及 SEC 纯化，将目的蛋白进行 12% SDS-PAGE 分析，可见大小约 27 kDa 的蛋白条带（图 3-A）。对目的条带进行 MS 分析，鉴定是 PCV3 Cap 蛋白。

PCV3 Cap 蛋白经负染制备样品、电镜观察后，用 4K CCD 相机获取电镜照片（图 3-B），可见均一的颗粒，颗粒直径约 18 nm。



A. Cap 蛋白 SDS-PAGE 电泳图；B. VLP 电镜观察。

图 3 PCV3 Cap 蛋白鉴定结果

3 讨论

2015 年，美国初次分离鉴定出 PCV3 毒株，随后我国多地发现 PCV3 感染^[2-5]。PCV3 阳性猪场出现猪皮炎肾病综合征、母猪繁殖障碍、多系统炎症反应等症状。其中：母猪受孕率降低、流产率增加，产木乃伊胎；仔猪主要表现为呼吸、泌尿、

肠道、淋巴、心血管、神经、繁殖系统以及皮肤的功能紊乱,致使保育猪体质变弱,容易继发感染。

PCV2疫苗在我国已应用推广多年,PCV2疫苗对PCV3感染能否提供保护尚缺乏足够的证据。由于PCV3分离株未能实现体外培养,病原学研究尚未深入开展,导致PCV3的灭活疫苗研发进展受阻。研究人员尝试通过基因工程平台拯救PCV3病毒,并在PK15细胞上传代成功,这或许会推动PCV3疫苗的研发进展^[10]。根据PCV2亚单位疫苗研发经验,利用大肠杆菌或细胞直接表达其Cap蛋白制备亚单位疫苗,是一种简单、有效、安全的疫苗生产方式^[11-12]。已有研究^[7-8]报道,PCV3 VLPs组装成功,并应用于检测试剂盒研发等。

大肠杆菌表达系统产量高,遗传背景清楚,但是表达产物的内毒素含量高,为产业化生产带来不便;杆状病毒/昆虫细胞表达系统对蛋白的折叠和修饰都较好,但是每次蛋白表达都要控制感染病毒的数量(即感染MOI与蛋白表达产量有一定的制约关系),且生产工序复杂,因而影响其扩大生产,此外杆状病毒/昆虫细胞表达系统生产成本也较高。酵母表达系统在研发宫颈癌(HPV)疫苗、人乙肝(HBV)疫苗和人诺如疫苗等方面获得广泛应用。该表达系统具有一定的蛋白修饰功能,而且培养简单、成本低廉,对于兽用生物制品研发、生产有很好的应用前景^[13-15]。PCV3 Cap蛋白的NLS序列对其蛋白稳定具有重要作用。若完全删除NLS序列,其在酵母系统中表达极不稳定;保留NLS序列,则Cap蛋白在酵母表达系统中易发生不溶性表达。因此,本研究通过突变PCV3 Cap蛋白NLS区序列,使PCV3 Cap蛋白在酵母细胞实现可溶性表达,从而为PCV3 Cap蛋白亚单位疫苗的研发奠定了基础。

参考文献:

- [1] ZHANG H H, HU W Q, LI J Y, et al. Novel circovirus species identified in farmed pigs designated as porcine circovirus 4, Hunan province, China[J]. *Transboundary and emerging diseases*, 2020, 67 (3): 1057-1061.
- [2] PALINSKI R, PIÑEYRO P, SHANG P, et al. A novel porcine circovirus distantly related to known circoviruses is associated with porcine dermatitis and nephropathy syndrome and reproductive failure[J]. *Journal of virology*, 2016, 91 (1): e01879-16.
- [3] KU X, CHEN F, LI P, et al. Identification and genetic characterization of porcine circovirus type 3 in China[J]. *Transboundary and emerging diseases*, 2017, 64 (3): 703-708.
- [4] WEN S, SUN W, LI Z, et al. The detection of porcine circovirus 3 in Guangxi, China[J]. *Transboundary and emerging diseases*, 2018, 65 (1): 27-31.
- [5] SHEN H, LIU X, ZHANG P, et al. Genome characterization of a porcine circovirus type 3 in South China[J]. *Transboundary and emerging diseases*, 2018, 65 (1): 264-266.
- [6] BI M, LI X, ZHAI W, et al. Structural insight into the type-specific epitope of porcine circovirus type 3[J]. *Bioscience reports*, 2020, 40 (6). DOI: 10.1042/BSR20201109.
- [7] WANG Y, WANG G, DUAN W T, et al. Self-assembly into virus-like particles of the recombinant capsid protein of porcine circovirus type 3 and its application on antibodies detection[J]. *AMB express*, 2020, 10 (1): 3.
- [8] ZHANG S, WANG D, JIANG Y, et al. Development and application of a baculovirus-expressed capsid protein-based indirect ELISA for detection of porcine circovirus 3 IgG antibodies[J]. *BMC veterinary research*, 2019, 15 (1): 79.
- [9] 格林 M R, 萨姆布鲁克 J. 分子克隆实验指南[M]. 贺福初, 陈薇, 杨晓明, 译. 4版. 北京: 科学出版社, 2017.
- [10] JIANG H, WANG D, WANG J, et al. Induction of porcine dermatitis and nephropathy syndrome in piglets by infection with porcine circovirus type 3[J]. *Journal of virology*, 2019, 93 (4): e02045-18.
- [11] 王宪文, 谢青梅, 曹永长, 等. PCV2 ORF2 基因片段在大肠杆菌中的表达与纯化[J]. *安徽农业科学*, 2007, 35 (23): 7117-7118.
- [12] 胡元春, 吕凤霞. PCV2-Cap 蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达与鉴定[J]. *河南畜牧兽医(综合版)*, 2017, 38 (4): 5-6.
- [13] 赵敏, 张春杰, 李银聚, 等. 鸡 IL-18 在毕赤酵母中的表达与活性分析[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2009 (12): 1088-1091.
- [14] 王强. 猪 O 型口蹄疫病毒多肽基因在毕赤酵母中的表达及其免疫原性分析[D]. 广州: 华南农业大学, 2012.
- [15] 王延群, 张璐, 李玉明等. 牛 α 干扰素在毕赤酵母中的高效分泌表达及活性鉴定[J]. *中国预防兽医学报*, 2013, 35 (10): 845-848.

(责任编辑: 高向向)