

利用 SUMO 系统高效表达可溶性猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白

陈春丽^{1,2}, 郭宇飞², 陈筱薇¹, 叶 昱¹, 王 强¹, 廖 明¹, 樊惠英¹

(1 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642; 2 四川农业大学 动物医学院, 四川 雅安 625000)

摘要:利用 pCold-SUMO 可溶性原核表达载体, 构建表达猪圆环病毒 2 型缺失核定位信号肽的 Cap 基因的重组表达载体 pCold-SUMO-dCap, 并将其转入 Arctic-Express 表达菌株中 15 °C 低温诱导表达. 表达产物经 SDS-PAGE 分析, 结果表明 SUMO-dCap 融合蛋白获得了高效表达, 可溶性 SUMO-dCap 融合蛋白约占总融合蛋白的 50%; 用 NI-NTA 树脂纯化可溶性的融合蛋白, 然后利用 SUMO 蛋白酶特异性去除 SUMO 标签, 从而得到不含任何标签的 dCap 蛋白, 进一步的 Western-blot 分析表明, 表达的 dCap 蛋白具有良好的反应原性.

关键词:猪圆环病毒 2 型; Cap 蛋白; 原核表达

中图分类号: S852.65

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2012)03-0393-05

Efficient Expression of Cap Gene of Porcine Circovirus Type 2 by pCold-SUMO Expression Vector

CHEN Chun-li^{1,2}, GUO Yu-fei², CHEN Xiao-wei¹, YE Yu¹, WANG Qiang¹,
LIAO Ming¹, FAN Hui-ying¹

(1 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Yaan 625000, China)

Abstract: The objective of this study was to utilize pCold-SUMO expression vector to efficiently express capsid (Cap) protein gene without nuclear localization signal (NLS) of porcine circovirus 2 (PCV2). Cap gene without NLS was subcloned into the pCold-SUMO expression vector, which named as pCold-SUMO-dCap, and the recombinant plasmid was transformed into Arctic-Express competent cells. It was induced by IPTG at 15 °C and efficiently produced active fusion protein of SUMO-dCap. SDS-PAGE analysis of the recombinant protein demonstrated that soluble SUMO-dCap in the supernatant was expressed at approximately 50% of total recombinant fusion proteins. Then, the soluble SUMO-dCap was purified by Ni-NTA resin purification kits, whereas the SUMO tag was removed by SUMO protease. In addition, the purification effect and specificity of recombinant fusion protein and capsid protein without NLS were detected by Western-blot assay. The results showed that both of them had been well purified and possessed good reactionogenicity.

Key words: porcine circovirus 2; Capsid protein; prokaryotic expression

猪圆环病毒 2 型 (Porcine circovirus type 2, PCV2) 是近年来新发现的一种重要病原微生物, 该

收稿日期: 2011-09-06

作者简介: 陈春丽 (1987—), 硕士研究生; 通信作者: 廖 明 (1968—), 男, 教授, 博士, E-mail: mliao@scau.edu.cn; 樊惠英 (1977—), 女, 副教授, 博士, E-mail: fanhy@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (30800826); 农业微生物学重点实验室开发课题 (20090010); 华南农业大学校长基金 (5500-K08240)

病毒被认为是断乳仔猪多系统衰竭综合征 (Post-weaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) 的主要病原^[1]. PCV2 除了引起 PMWS 而外, 还可导致猪皮炎/肾病综合征 (Porcine dermatitis and nephropathy syndrome, PDNS)、猪呼吸道疾病复合征 (Porcine respiratory disease complex, PRDC) 等相关疾病^[2-4]. PMWS 自 1991 年首次在加拿大被发现, 目前多个国家和地区存在该病的流行^[5]. PCV2 感染引起的相关疾病在我国的流行情况也十分严重, 给养猪业造成了巨大的经济损失^[6-7].

PCV2 的基因组共编码 11 个开放阅读框架 (Open reading frames, ORFs), 其中功能上重要的是 ORF1 和 ORF2. ORF1 编码与病毒 DNA 滚环复制相关的蛋白 (Rep)^[8]; ORF2 编码病毒的唯一结构蛋白 (Cap), 构成病毒的核衣壳, 并且编码的该蛋白是病毒主要的免疫原性蛋白^[9-10]. Cap 蛋白的 N 端有一段由 41 个氨基酸组成的核定位信号肽 (Nuclear localization signal, NLS)^[11], 该 NLS 核酸序列含有约 30% 的大肠埃希菌稀有密码子^[12], 因此 Cap 蛋白在大肠埃希菌的原核表达系统里很难得到大量表达^[13]. 另外, 目前 Cap 蛋白在原核表达系统中的表达情况多以包涵体形式表达^[14-15], 对蛋白的纯化带来不便, 其反应原性和免疫原性亦不如可溶性蛋白好. 近年来, 许多研究者尝试在原核表达载体上添加可溶性标签基因, 如 SUMO^[16], 可以大大提高目的基因的可溶性表达. 因此, 本研究利用 pCold-SUMO 原核表达载体的 SUMO 系统高效可溶性表达 PCV2 去核定位信号肽的 Cap 蛋白.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 毒株、菌种与质粒 PCV2 毒株、大肠埃希菌 DH5 α 、Arctic-Express 菌株、pCold-SUMO 质粒由华南农业大学农业部动物疫病防控重点实验室保存.

1.1.2 主要试剂 ExTM TaqDNA 多聚酶、dNTP、T4 DNA 连接酶、BamH I、Pst I 等为大连宝生物工程有限公司产品, SUMO 蛋白酶为广州复能基因有限公司产品, DNA 凝胶纯化试剂盒、质粒抽提试剂盒为北京天根生化科技有限公司产品, 抗 PCV2 的阳性血清由华南农业大学农业部动物疫病防控重点实验室制备并保存, IRDye[®] 800 (GOAT Anti-MOUSE IgG [H&L]) 为 Rockland 化学免疫试剂公司产品.

1.2 方法

1.2.1 PCV2 的 DNA 提取 将 PCV2 接种于无 PCV 污染的 PK15 细胞, 于 37 °C CO₂ 培养箱培养,

收集并处理细胞, 根据 OMEGA 公司的 Blood DNA Kit 说明书抽提 PCV2 的 DNA.

1.2.2 PCR 引物设计 根据 PCV2 ORF2 序列设计 1 对特异性引物, 引物 P1: 5' -ATCAGGATCCAATG-GCATCTTCAACACCCG-3'; 引物 P2: 5' -ATCACTG-CAGAGGGTTAAGTGGGGGGTCTTT-3', 扩增去 NLS 的 ORF2 基因 (579 bp). 其中上游引物包含 BamH I 位点, 下游引物包含 Pst I 位点. 引物由 Invitrogen 公司合成.

1.2.3 去 NLS 的 ORF2 基因的扩增 PCR 反应体系为 50 μ L, 其中模板 DNA 1.5 μ L, 引物 P1、P2 (20 pmol/L) 各 1 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μ L, 10 \times Ex TaqTM Buffer 5 μ L, Ex TaqTM DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.5 μ L, 去离子水 37 μ L. PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 3 min; 进入 PCR 循环, 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 40 s, 进行 30 个循环后, 72 °C 延伸 10 min. 反应结束后, 用琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果, 并对 PCR 产物进行凝胶回收纯化.

1.2.4 重组质粒 pCold-SUMO-dCap 构建 对纯化的 PCR 产物和 pCold-SUMO 质粒分别进行 BamH I、Pst I 双酶切, 回收纯化酶切产物. 用 T4 DNA Ligase 酶连接去 NLS 的 ORF2 基因和 pCold-SUMO 质粒, 将连接产物转化 DH5 α 感受态细胞, 通过 PCR 鉴定、双酶切鉴定、DNA 测序鉴定筛选阳性重组质粒, 命名为 pCold-SUMO-dCap.

1.2.5 融合蛋白 SUMO-dCap 的诱导表达与纯化 将阳性重组质粒转入表达宿主菌 Arctic-Express 感受态细胞后, 阳性单菌落接入含氨苄青霉素的 LB 液体培养基, 37 °C 振荡培养至 $D_{600\text{nm}}$ 约 0.6, 取出培养物冷却至 15 °C, 再静置 30 min, 加入适量异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为 0.4 mmol/L, 15 °C 180 r/min 振荡培养 20~24 h. 离心收集菌体沉淀, 将超声破碎菌体, 超声破碎产物 12 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液和菌体沉淀进行表达产物的可溶性分析. 利用 Ni-NTA 纯化树脂 (哈尔滨海基生物公司产品) 纯化表达的重组蛋白. SDS-PAGE 检测诱导表达和纯化产物.

1.2.6 可溶性 dCap 蛋白的纯化与 Western-blot 鉴定 将方法 1.2.5 获得的 SUMO-dCap 融合蛋白 (质量浓度约 1.02 mg/mL) 用 SUMO 蛋白酶切除 SUMO 标签, 酶切体系: SUMO-dCap 融合蛋白 300 μ L, 10 \times SUMO Protease Buffer (Salt/+) 100 μ L, 10 \times SUMO Protease Buffer (Salt/-) 100 μ L, CoolCutterTM SUMO Protease 40 μ L, 去离子水 1 460 μ L, 混匀后于 30 °C 反应 2 h. 将酶切产物稀释 5 倍后进行 Ni-NTA 树脂

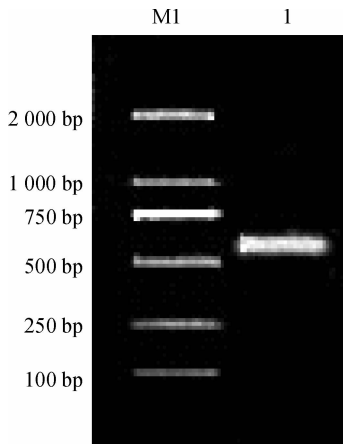
亲和柱层析,收集穿透流出的液体,最后用离心超滤管浓缩 dCap 蛋白。

将纯化后的 SUMO-dCap 融合蛋白和可溶性 dCap 蛋白分别取 5 μL 做 Western-blot 分析。

2 结果与分析

2.1 去 NLS 的 ORF2 基因的扩增

去 NLS 的 ORF2 基因经 PCR 扩增,PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳、溴化乙锭染色后,在紫外线下可见 1 条 579 bp 左右的特异性条带,与预期大小相符(图 1)。



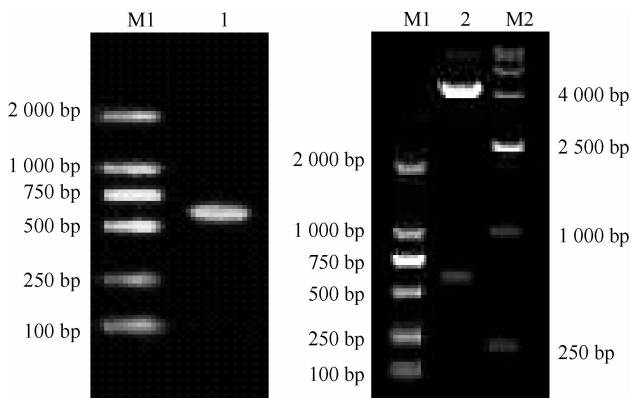
M1: DNA marker DL2000; 1: PCR 扩增产物(约 579 bp)。

图 1 PCR 扩增 PCV2-dORF2 基因

Fig. 1 PCV2-dORF2 gene amplified by PCR

2.2 重组质粒 pCold-SUMO- dCap 的鉴定

将去 NLS 的 ORF2 基因克隆于 pCold-SUMO 载体(4 751 bp)中,对经转化 DH5α 的重组菌进行菌液 PCR 鉴定,得到 579 bp 左右的条带(图 2);对经转化



M1: DNA marker DL2000; M2: DNA marker DL15000; 1: 菌液 PCR 扩增产物(约 579 bp); 2: BamH I、Pst I 双酶切 pCold-SUMO-dCap 产物。

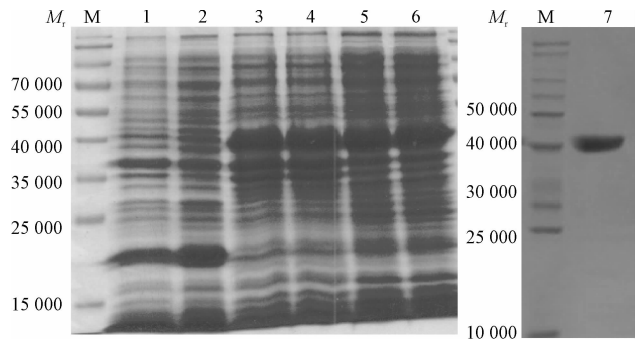
图 2 重组质粒 pCold-SUMO-dCap 的菌液 PCR 鉴定和双酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pCold-SUMO-dCap by PCR and digestion with restriction enzyme

DH5α 的重组菌提取质粒后,进行 BamH I、Pst I 双酶切,得到 4 700 和 579 bp 左右的 2 条基因片段(图 2);测序结果显示该序列与 GenBank 收录的 PCV2-ORF2 相似性均在 99% 以上。结果表明,去 NLS 的 ORF2 基因片段已插入到 pCold-SUMO 载体上,构建了 pCold-SUMO-dCap 表达载体。

2.3 表达产物的 SDS-PAGE

阳性菌经 IPTG 诱导,并与空载体和未诱导阳性菌对照在 SDS-PAGE 电泳后比较发现,诱导阳性菌在蛋白相对分子质量约 43 000 大小处出现一条明显的特异性蛋白条带。由于 SUMO 标签蛋白相对分子质量约 17 000,而 PCV2 去 NLS 的 ORF2 基因表达得到的 dCap 蛋白相对分子质量约 26 000,则 SUMO-dCap 融合蛋白相对分子质量约 43 000,所以表达的融合蛋白与预期的 SUMO-dCap 重组融合蛋白大小一致。对该融合蛋白进行可溶性分析,SDS-PAGE 电泳分析发现融合蛋白同时以可溶性蛋白和包涵体 2 种形式表达,且二者比例约为 1:1;pCold-SUMO 表达载体带有 6 个 His 标签,所以本研究对诱导的阳性菌的菌体上清蛋白进行 Ni-NTA 树脂亲和柱层析纯化,获得了较高纯度的可溶性的 SUMO-dCap 融合蛋白,质量浓度约 1.02 mg/mL(图 3)。



M: 蛋白质相对分子质量标准; 1: pCold-SUMO-dCap 未诱导对照; 2: 诱导的 pCold-SUMO 空载体对照; 3、4: pCold-SUMO-dCap 诱导后菌体裂解沉淀; 5: pCold-SUMO-dCap 诱导后的菌体裂解上清液; 6: pCold-SUMO-dCap 诱导后的菌体蛋白; 7: 纯化后的 SUMO-dCap 融合蛋白。

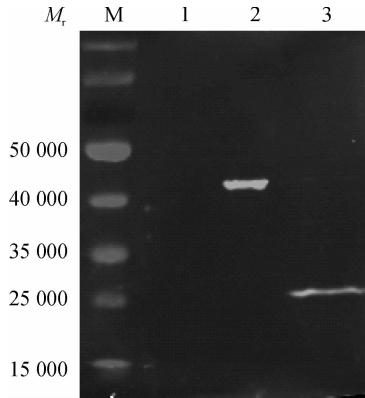
图 3 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the recombinant protein

2.4 Western-blot 鉴定

将纯化后的 SUMO-dCap 融合蛋白和去除 SUMO 标签蛋白的 dCap 蛋白与抗 PCV2 的小鼠阳性血清反应,IRDye® 800(GOAT Anti-MOUSE IgG[H&L])二抗显色,经 Odyssey 双色红外激光成像系统扫描,二者均出现单一且清晰的绿色荧光条带,其蛋白相对分子质量分别为 43 000、26 000 左右,与预期结果一

致. 结果表明 SUMO-dCap 融合蛋白和可溶性 dCap 蛋白均具有很好的反应原性, 且纯化的蛋白纯度均较高(图 4).



M: 蛋白质相对分子质量标准; 1: 诱导的 pCold-SUMO 空载体上清液; 2: 纯化的 SUMO-dCap 融合蛋白; 3: 纯化的 dCap 可溶性蛋白.

图 4 Western-blot 结果

Fig. 4 Western-blot analysis results

3 讨论

猪圆环病毒的基因型按血清学分为 PCV1、PCV2, 但近几年来有研究者发现其新的基因型 PCV1/2a^[17]. PCV1 对猪无致病性; PCV2 有致病性, 感染猪体后可以造成免疫抑制, 引起其他各种病原的继发感染, 对于成年猪则引起长期隐性感染; 目前猪感染 PCV1/2a 情况还较少, 在加拿大 PCV1/2a 感染只占 PCV 感染的 2.5%^[17]. 由此可见 PCV2 对养猪业影响较大, 所以对于 PCV2 的检测与防治显得尤为重要.

PCV1 和 PCV2 均有 2 个主要的开放阅读框, 即 ORF1 和 ORF2. 由于 PCV1 和 PCV2 的 ORF1 基因型相似性很高, 使得 2 个型之间存在抗原交叉性. 因此, 如果用繁殖的 PCV2 全病毒作为检测抗原, 则难以区分产生的抗体是针对 PCV1 还是 PCV2. 然而 ORF2 基因编码的病毒核衣壳蛋白 (Cap) 是病毒的唯一结构蛋白, Cap 蛋白的 N 端 65 ~ 87、113 ~ 147、157 ~ 183 氨基酸区域及 C 端 4 个氨基酸为病毒的主要抗原位点^[13, 18], 其中 N 端 69 ~ 83 和 117 ~ 131 氨基酸抗原位点具有针对 PCV2 型特异性^[19], 能被 PCV2 多抗所识别. 因此 PCV2 ORF2 编码的结构蛋白将会在血清学诊断中发挥重要作用. 然而由于 ORF2 基因编码的 N 端 41 个氨基酸为核定位信号肽, 不包含主要的抗原区域, 但存在着大量大肠埃希菌稀有密码子, 并以 AGG AGG、AGA AGA AGA、AGA AGG 等串联形式存在, 严重影响 ORF2 基因在大肠埃希菌中的

表达. 所以本研究通过构建表达去除核定位信号肽的 Cap 蛋白的原核表达载体, 以获得具有良好反应活性的 dCap 蛋白的高效表达.

在过去的研究中, PCV2 ORF2 基因的原核表达常以包涵体形式表达, 对于表达后的蛋白的纯化常带来不便, 且蛋白的活性较弱. 近年来, SUMO 被发现可以作为重组蛋白表达的融合标签和分子伴侣, 具有抗蛋白酶水解、显著增加重组蛋白表达量以及促进靶蛋白正确折叠、提高可溶性等功能, 且经过 SUMO 蛋白酶切割后不残留氨基酸残基^[16, 20]. 为了改善 PCV2 的原核表达情况, 本研究利用 pCold-SUMO 表达载体中的 SUMO 标签, 使表达的可溶性去 NLS 的 Cap 蛋白约占总融合蛋白的 50%, 大大提高了 SUMO-dCap 的可溶性表达, 增强了活性蛋白的表达比例; 通过 SUMO 蛋白酶切割后得到了较高纯度的去 NLS 的 Cap 蛋白. 用 PCV2 阳性血清与表达的 SUMO-dCap 蛋白和纯化的 dCap 蛋白进行 Western-blot 检测, 结果显示重组蛋白和 dCap 蛋白均与 PCV2 阳性血清呈阳性反应, 呈现清晰的特异性反应条带, 具有良好的反应原性.

本研究利用原核表达系统, 成功高效表达了具有良好反应原性的可溶性的 PCV2 去 NLS 的 Cap 蛋白, 为 ELISA 诊断试剂盒的研制及应用奠定了基础.

参考文献:

- [1] ALLAN G M, MEEHAN B, TODD D. Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes [J]. *Vet Rec*, 1998, 142(17): 467-468.
- [2] ALLAN G M, McNEILLY E, KENNEDY S, et al. PCV2-associated PDNS in Northern Ireland in 1990 [J]. *Vet Rec*, 2000, 146(24): 711-712.
- [3] KIM J, CHUNG H K, CHAE C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex [J]. *Vet J*, 2003, 166(3): 251-256.
- [4] RAMAMOORTHY S, MENG Xiang-jin. Porcine circoviruses: a minuscule yet mammoth paradox [J]. *Anim Health Res Revi*, 2009, 10(1): 1-20.
- [5] KENNEDY S, ALLAN G, McNEILLY E, et al. Porcine circovirus infection in Northern Ireland. [J]. *Vet Rec*, 1998, 142(18): 495-496.
- [6] 朗洪武, 张广川, 吴发权. 断奶猪多系统衰竭综合征血清抗体检测 [J]. *中国兽医科技*, 2000, 30(3): 3-5.
- [7] 张朝霞, 刘长明, 危艳武. 猪圆环病毒 2 型 ELISA 抗体检测试剂盒的研制及应用 [J]. *中国预防兽医学报*, 2008, 30(7): 548-578.

- [8] MANKERTZ A, MANKERTZ J, WOLF K, et al. Identification of a protein essential for replication of porcine circovirus[J]. J Gen Virol, 1998, 79(2):381-384.
- [9] NAWAGITGUL P, MOROZOV I, BOLIN S R, et al. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein[J]. J Gen Virol, 2000, 81(9):2281-2287.
- [10] LEKCHAROENSUK P, MOROZOV I, PAUL P S, et al. Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1, PCV2[J]. J Virol, 2004, 78(15):8135-8145.
- [11] LIU Qiang, 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.
- [12] TRUNDOVA M, CELER V. Expression of porcine circovirus 2 ORF2 gene requires codon optimized *E. coli* cells[J]. Virus Genes, 2007, 34(2):199-204.
- [13] LOU Zhong-zi, LI Xue-rui, LI Zhi-yong, et al. Expression and antigenicity characterization for truncated capsid protein of porcine circovirus type 2[J]. Can J Vet Res, 2011, 75(1):61-64.
- [14] KONG Wen-tao, KONG Jian, HU Shu-min, et al. Enhanced expression of PCV2 capsid protein in *Escherichia coli* and *Lactococcus lactis* by codon optimization[J]. World J Microbiol and Biotechnol, 2011, 27(3):651-657.
- [15] 赵玲, 朱玲, 郭万柱, 等. 猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白的表达及在 ELISA 中的初步应用[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(6):808-814.
- [16] 姜媛媛, 尹成凯, 李晋南, 等. 利用 SUMO 融合系统高效表达可溶性重组蛋白的研究[J]. 东北农业大学学报, 2008, 39(10):57-62.
- [17] GAGNON C A, MUSIC N, FONTAINE G, et al. Emergence of a new type of porcine circovirus in swine (PCV): a type 1 and type 2 PCV recombinant[J]. Vet Microbiol, 2010, 144(1/2):18-23.
- [18] MAHE D, BLANCHARD P, TRUONG C. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes[J]. J Gen Virol, 2000, 81(7):1815-1824.
- [19] TRUONG C, MAHE D, BLANCHARD P, et al. Identification of an immunorelevant ORF2 epitope from porcine circovirus type 2 as a serological marker for experimental and natural infection[J]. Arch Virol, 2001, 146(6):1197-1211.
- [20] BUTT T, EDAVETAL S, HALL J. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. [J]. Protein Expr Purif, 2005, 43(1):1-9.

【责任编辑 柴 焰】

(上接第 387 页)

- [6] RATLEDGE C, WYNN J P. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms[J]. Adv Appl Microbiol, 2002, 51:1-51.
- [7] RATLEDGE C. Lipid biotechnology: A wonderland for the microbial physiologist [J]. J Am Oil Chem Soc, 1987, 64(12):1647-1656.
- [8] COHEN Z, RATLEDGE C. Single Cell Oils[M]. Campaign: AOCS Press, 2005:1-20.
- [9] 赵宗保. 加快微生物油脂研究为生物柴油产业提供廉价原料[J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(2):8-11.
- [10] 朱丹实, 刘贺, 吕艳芳. 产油脂霉菌的研究进展[J]. 粮油加工, 2009(6):54-57.
- [11] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1983:32-34.
- [12] 杨虹, 林娟, 欧阳瑞珍. 产油微生物的培养[J]. 福州大学学报, 1997, 25(5):103-106.
- [13] 王艺红. 食用菌 DNA 提取方法研究[J]. 食用菌, 2008, 30(3):18-20.
- [14] THAKUR M S, PRAPULLA S G, KARANTH N G. Estimation of intracellular lipid by the measurement of absorbance of yeast cells stained with Sudan Black B[J]. Enzyme Microb Technol, 1989, 11(4):252-254.
- [15] BLIGH E G, DYER W J. A rapid method of total lipid extraction and purification [J]. Can J Biochem Physiol, 1959, 37:911-917.
- [16] 刘淑君, 杨文博, 施安辉. 酵母菌 HL 的批次发酵及发酵动力学初探[J]. 微生物学通报, 2000, 27(1):8-11.

【责任编辑 李晓卉】