
БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY

УДК 619+577.112:578.224+579+663.18

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА КАПСИДА ЦИРКОВИРУСА СВИНЕЙ 2-го ТИПА В БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

А. Д. ТИТОВА¹⁾, К. В. КУДИН¹⁾, В. А. ПРОКУЛЕВИЧ¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Для улучшения экспрессии белка капсида цирковируса свиней 2-го типа (ЦВС-2) в клетках *E. coli* проведена оптимизация соответствующего гена и сконструированы два варианта открытой рамки считывания, которые кодировали полноразмерный и укороченный белки капсида в составе вектора экспрессии. При этом заменены редко встречающиеся кодоны, а в случае укороченного гена удален участок, соответствующий N-концевому домену белка. Установлено, что наибольший уровень экспрессии в бактериальных клетках достигается при одновременной оптимизации кодонов и удалении начального (N-концевого) участка гена размером 108 пар нуклеотидов (п. н.), содержащего сигнал ядерной локализации.

Ключевые слова: цирковирус свиней 2-го типа; открытая рамка считывания; белок капсида; сигнал ядерной локализации; N-концевой участок белка; синонимические кодоны; оптимизация кодонов; гетерологичный хозяин; экспрессия гена; индекс адаптации кодонов.

Образец цитирования:

Титова АД, Кудин КВ, Прокулевич ВА. Особенности экспрессии белка капсида цирковируса свиней 2-го типа в бактериальных клетках. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2021;1:48–57.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-1-48-57>

For citation:

Titova AD, Kudzin KV, Prokulevich VA. Properties of expression of protein capsid porcine circovirus type 2 in bacterial cells. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2021; 1:48–57. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-1-48-57>

Авторы:

Анастасия Дмитриевна Титова – младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории биотехнологии кафедры микробиологии биологического факультета.
Кирилл Валерьевич Кудин – кандидат биологических наук; младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории биотехнологии кафедры микробиологии биологического факультета.
Владимир Антонович Прокулевич – доктор биологических наук, профессор; заведующий кафедрой микробиологии биологического факультета.

Authors:

Anastasia D. Titova, junior researcher at the laboratory of biotechnology, department of microbiology, faculty of biology.
titovaad@gmail.com
Kirill V. Kudzin, PhD (biology); junior researcher at the laboratory of biotechnology, department of microbiology, faculty of biology.
kudzinkv@bsu.by
Vladimir A. Prokulevich, doctor of science (biology), full professor; head of the department of microbiology, faculty of biology.
prokulevich@mail.ru

PROPERTIES OF EXPRESSION OF PROTEIN CAPSID PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 IN BACTERIAL CELLS

A. D. TITOVA^a, K. V. KUDZIN^a, V. A. PROKULEVICH^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: A. D. Titova (titovaad@gmail.com)

To improve expression of the porcine circovirus type 2 (PCV2) capsid protein in *E. coli* cells, the corresponding gene was optimized and two variants of the open reading frame were constructed, which encoded the full-sized and shortened capsid proteins as part of the expression vector. Rare codons were replaced, and in the case of a shortened version of the gene, the region corresponding to the N-terminal domain of the protein was deleted. A comparison was made of the expression level of the studied proteins. It was established that the highest level of expression in bacterial cells is achieved by simultaneously optimizing the codons and removing the initial (N-terminal) 108 base pair (bp) portion of the gene, which contains the nuclear localization signal.

Keywords: porcine circovirus type 2; open reading frame; capsid protein; nuclear localization signal; N-terminal portion of the protein; synonymous codons; codon optimization; heterologous host; gene expression; codon adaptation index.

Введение

Цирковир свиней 2-го типа (ЦВС-2) – это небольшой икосаэдрический безоболочечный вирус [1], принадлежащий к роду *Circovirus* семейства *Circoviridae* [2]. ЦВС-2 является возбудителем целого ряда синдромов, клинические проявления которых обозначаются общим термином «цирковирозные болезни свиней» (ЦВБС). К ЦВБС относятся синдром послеотъемного мультисистемного истощения (СПМИ), синдром дерматита и нефропатии свиней (СДНС), связанные с ЦВС пневмония, энтерит и репродуктивная дисфункция [3]. Данные заболевания наносят значительный ущерб свиноводству [4]. Наиболее эффективным средством борьбы с ЦВС-2 являются вакцины [5]. Все известные современные вакцинные препараты основаны на антигенных свойствах капсидного белка вируса генотипа ЦВС-2а [6] и не всегда способны обеспечить достаточный уровень защиты при эпизоотиях, вызванных другими штаммами вируса [7]. В связи с этим необходима разработка вакцин на основе превалирующих на сегодняшний день штаммов подвида ЦВС-2b [8].

Геном ЦВС-2 представлен ковалентно замкнутой кольцевой одноцепочечной ДНК размером 1767 нуклеотидов [1] и имеет по крайней мере три открытые рамки считывания (ОРС) с известными функциями. ОРС2 длиной 702 нуклеотида кодирует единственный белок капсидной оболочки вируса [9]. Размер белка капсида составляет 233 аминокислоты, масса – около 27,8 кДа [9–11]. При разработке генно-инженерных вакцин против цирковируса именно этот белок используется в качестве антигена [12; 13]. В различных исследованиях идентифицированы антигенные детерминанты капсидного белка, важные для распознавания иммунной системой. Они находятся в пределах 47–62; 65–87; 113–147; 157–183; 165–200; 193–207 и 230–233 аминокислотных остатков (а. о.) [14; 15]. N-концевой участок размером 29 а. о. (координаты 12–41 а. о.) белка капсида обуславливает сигнал ядерной локализации [16].

Эффективная продукция гетерологичных белков в клетках бактерий, как правило, требует модификации экспрессируемого гена. Наличие редких синонимических кодонов зачастую является препятствием для успешной экспрессии гена в гетерологичном хозяине, вследствие чего может быть необходимо изменение нуклеотидного состава гена [17]. Подобные затруднения возникают и с экспрессией гена белка капсида цирковируса, в связи с чем проводятся эксперименты по оптимизации данного гена, в частности изменение или удаление фрагмента гена, кодирующего N-концевой домен данного белка [18–20].

Цель настоящей работы – создание оптимизированных вариантов гена белка капсида ЦВС-2 для повышения уровня его экспрессии в клетках *E. coli*.

Материалы и методика исследования

Бактериальные штаммы и плазмиды. В работе использовали плазмиду pET-24b(+) (Novagen[®]) и плазмиду pET-TP3 из коллекции кафедры микробиологии биологического факультета БГУ, включающую укороченный ген белка капсида штамма ЦВС-2b M1 [20]. Клонирование рекомбинантных плазмид проводили в клетках штамма *E. coli* XL1-Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI^qΔM15 Tn10* (Tet^r)] из коллекции кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ. Продукентами рекомбинантных белков служили бактерии штамма *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL (*E. coli* B F⁻ *ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal λ(DE3) endA Hte [argU proL Cam^r] [argU ileY leuW Strep/Spec^r]) фирмы Stratagene (США).*

Генно-инженерные методики и ферменты. Конструирование, выделение, рестрикцию, Ca^{2+} -зависимую трансформацию и электрофорез ДНК осуществляли в соответствии с общепринятыми экспериментальными протоколами [21]. Нуклеотидные последовательности генов согласно разработанному дизайну синтезированы фирмой *Integrated DNA Technologies Inc.* (США), а специфические праймеры для амплификации – ОДО «Праймтех» (Беларусь). Плазмидную ДНК выделяли с помощью наборов реактивов QIAquick® Gel Extraction Kit и QIAprep® Spin Miniprep Kit UAB (*Qiagen*, Германия). В работе использовали ферменты и буферные системы фирмы *Thermo Fisher Scientific Inc.* (США): рестриктазы XhoI и HindIII с 10-кратным буфером FastDigest; ДНК-лигазу T4 с соответствующим 10-кратным буфером; ДНК-полимеразы Pfu и Taq с 10-кратными Pfu- и Taq-буферами соответственно, смесью дНТФ и деионизированной водой в концентрациях, указанных производителем; маркер длины ДНК GeneRuler DNA Ladder Mix. Для определения молекулярной массы полученных белков применяли маркер Protein Marker VI (10–245) prestained от компании *ITW Reagents* (Испания).

ПЦР проводили в смеси стандартного состава [22] с использованием программируемого амплификатора Veriti™ фирмы *Applied Biosystems* (США). Параметры циклов амплификации: первичная денатурация – 5 мин при 94 °С, затем 30 циклов, включавших в себя такие операции, как денатурация – 30 с при 94 °С, отжиг праймеров – 30 с (температура для каждой пары праймеров рассчитывалась как минимальная температура отжига из пары минус 5 °С), элонгация – 72 °С (время элонгации определялось из расчета 1 мин на 1000 пар нуклеотидов (п. н.) для Taq-полимеразы и 1 мин на 500 п. н. для Pfu-полимеразы), заключительная полимеризация – 7 мин при 72 °С.

Индукцию экспрессии рекомбинантных белков в клетках штамма *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL проводили по методу автоиндукции Стюдера [23]. В качестве отрицательного контроля выступали клетки BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL без плазмиды. Результаты экспрессии оценивали путем электрофореза белков в полиакриламидном геле по Лэммли [21]. Денситометрические изображения окрашенных полиакриламидных гелей анализировали с помощью программного пакета *ImageJ 1.46r* [24]. Статистический анализ (сравнение уровня экспрессии и вычисление стандартной ошибки среднего) проводили в программе *SOFA Statistics* (версия 1.5.3).

Результаты и их обсуждение

Анализ и оптимизация полноразмерной кодирующей последовательности гена капсида ЦВС-2.

Анализ кодирующей последовательности ДНК структурной части гена белка капсида показал, что первичная структура вирусного гена насыщена редкими кодонами, которые практически не читаемы в бактериальных клетках. Один из участков ДНК (координаты 555–588 п. н.) содержит подряд 11 трудно-читаемых кодонов (рис. 1). Имеется большое количество кодонов, нехарактерных для тРНК прокариот¹ [25] (например, кодоны для аргинина (AGG – 8 триплетов, AGA – 9 триплетов), пролина (CCC – 12 триплетов), лейцина (CTA – 3 триплета) и изолейцина (ATA – 2 триплета)). Подобный нуклеотидный состав затрудняет экспрессию целевого продукта в бактериях. Интактная ДНК гена белка капсида ЦВС-2 даже при наличии эффективного прокариотического промотора обуславливает крайне низкий уровень экспрессии целевого белка после индукции клонированного гена [20].

С целью увеличить продукцию целевого белка последовательность ДНК структурной части гена капсида ЦВС-2 в процессе синтеза модифицировали для оптимизации экспрессии в клетках прокариот, при этом замены нуклеотидов в гене не привели к изменениям в последовательности аминокислот в соответствующем белке (см. рис. 1). Анализ последовательности в программе *JCat* [26; 27] выявил, что индекс адаптации кодонов для *E. coli* у исходной, неоптимизированной последовательности [28] равен 0,1961, тогда как для оптимизированной полноразмерной последовательности он составляет 0,7098.

Создание генетической конструкции для экспрессии полноразмерного оптимизированного гена белка капсида ЦВС-2. Полноразмерную модифицированную рамку считывания амплифицировали с помощью праймеров CapsP1 и CapsP2 (см. таблицу). Соответствующий ампликон (717 п. н.) введен в вектор pET-24b(+) по сайтам рестрикции XhoI и HindIII. Полученная генетическая конструкция названа pET-LOR (рис. 2). Исследуемый ген, кроме кодирующей последовательности гена белка капсида, содержит последовательности N-концевой Т7-метки и С-концевой 6-His-метки для более удобного обнаружения и очистки белка. Молекулярная масса предполагаемого белкового продукта, названного LOR, составляет 31,23 кДа.

Экспрессия полноразмерного оптимизированного гена белка капсида ЦВС-2. Полноразмерный ген капсида в составе плазмиды pET-LOR демонстрирует индуцибельную экспрессию после передачи плазмиды в клетки штамма *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL, о чем свидетельствуют результаты электрофореза белков в полиакриламидном геле (рис. 3). Анализ изображений окрашенных полиакриламидных гелей показал, что оптимизированный полноразмерный белок LOR вырабатывается в клетках в пропорции $(13,01 \pm 0,75) \%$ ($n = 22$) по отношению к общей массе синтезируемого белка.

¹Codon usage database [Electronic resource]. URL: <http://www.kazusa.or.jp/codon/> (date of access: 16.12.2013).

ORIP	atg acg tat aca agg agg cgt tac cgg aga aga aga cac cgc ccc cgc agc cat ctt ggc cag atc ctc cgc cgc	75
LOP	atg acg tat acc cgt cgt cgt tac cgc cgt cgt cgt cat cgc cgc cgc agc cat ctt ggc cag atc ctc cgc cgc	
CapsP	M T Y T R R R Y R R R R H R P R S H L G Q I L R R	
ORIP	cgc ccc tgg ctc gtc cac ccc cgc cac cgt tac cgc tgg aga agg aaa aat ggc atc ttc aac acc cgc ctc tcc	150
LOP	cgc cgc tgg ctg gtc cat cgc cgc cat cgt tac cgc tgg cgt cgt aaa aac ggc atc ttc aac acc cgc ctc tcc	
CapsP	R P W L V H P R H R Y R W R R K N G I F N T R L S	
ORIP	cgc acc ttc gga tat act atc aag cga acc aca gtc aaa acc ccc tcc tgg gcg gtc gac atg atg aga ttc aat	225
LOP	cgc acc ttc ggc tat acc atc aag cgt acc acc gtc aaa acc cgc tcc tgg gcg gtc gat atg atg cgt ttc aac	
CapsP	R T F G Y T I K R T T V K T P S W A V D M M R F N	
ORIP	att aat gac ttt ctt ccc cca gga ggg ggc tca aac ccc cgc tct gtc ccc ttt gaa tac tac aga ata aga aag	300
LOP	att aac gat ttc ctg ccg ccg ggc ggc ggc tca aac cgc cgt tct gtc ccg ttc gaa tac tac cgt atc cgt aaa	
CapsP	I N D F L P P G G G S N P R S V P F E Y Y R I R K	
ORIP	gtt aag gtt gaa ttc tgg ccc tgc tcc ccg atc acc cag ggt gac agg gga gtc ggc tcc agt gct gtt att cta	375
LOP	gtt aaa gtt gaa ttc tgg ccg tgc tcc ccg atc acc cag ggc gat cgt ggc gtc ggc tcc agc cgc gtt att ctg	
CapsP	V K V E F W P C S P I T Q G D R G V G S S A V I L	
ORIP	gat gat aac ttt gta aca aag gcc aca gcc ctc acc tat gac ccc tat gta aac tac tcc tcc cgc cat acc ata	450
LOP	gat gat aac ttc gtg acc aaa gcc acc gcc ctg acc tat gat ccg tat gtc aac tac tcc tcc cgt cat acc atc	
CapsP	D D N F V T K A T A L T Y D P Y V N Y S S R H T I	
ORIP	acc cag ccc ttc tcc tac cac tcc cgc tac ttt acc ccc aaa cct gtc cta gat tcc act att gat tac ttc caa	525
LOP	acc cag ccg ttc tcc tac cat tcc cgc tac ttc acc ccg aaa ccg gtc ctg gat tcc acc atc gat tac ttc cag	
CapsP	T Q P F S Y H S R Y F T P K P V L D S T I D Y F Q	
ORIP	cca aac aac aaa aga aat cag ctg tgg ctg aga cta caa act act gga aat gta gac cac gta ggc ctc ggc act	600
LOP	ccg aac aac aaa cgt aac cag ctg tgg ctg cgt ctg cag acc acc ggc aac gtc gat cat gtc ggc ctc ggc acc	
CapsP	P N N K R N Q L W L R L Q T T G N V D H V G L G T	
ORIP	gcg ttc gaa aac agt ata tac gac cag gaa tac aat atc cgt gta acc atg tat gta caa ttc aga gaa ttt aat	675
LOP	gcg ttc gaa aac agc atc tac gat cag gaa tac aac atc cgt gtc acc atg tat gtc cag ttc cgt gaa ttc aac	
CapsP	A F E N S I Y D Q E Y N I R V T M Y V Q F R E F N	
ORIP	ctt aaa gac ccc cca ctt atc cct taa	
LOP	ctg aaa gat ccg ccg ctg atc ccg	
CapsP	L K D P P L I P *	

Рис. 1. Сравнение оригинальной (ORIP) и оптимизированной (LOP) нуклеотидных последовательностей. Указана последовательность белка капсида ЦВС-2 (CapsP). Серым цветом выделены измененные при оптимизации кодоны, темно-серым – редкие кодоны для аргинина, лейцина, изолейцина и пролина в оригинальной последовательности. Рамкой обозначены отсутствующие в укороченной последовательности кодоны (см. ниже)

Fig. 1. Comparison of the original (ORIP) and the optimized (LOP) nucleotide sequences. The sequence of the protein capsid PCV2 (CapsP) is shown. The codons changed during optimization are highlighted in gray. Rare codons for arginine, leucine, isoleucine and proline in the original sequence are highlighted in dark gray. The codons removed from the truncated sequence are framed (see below)

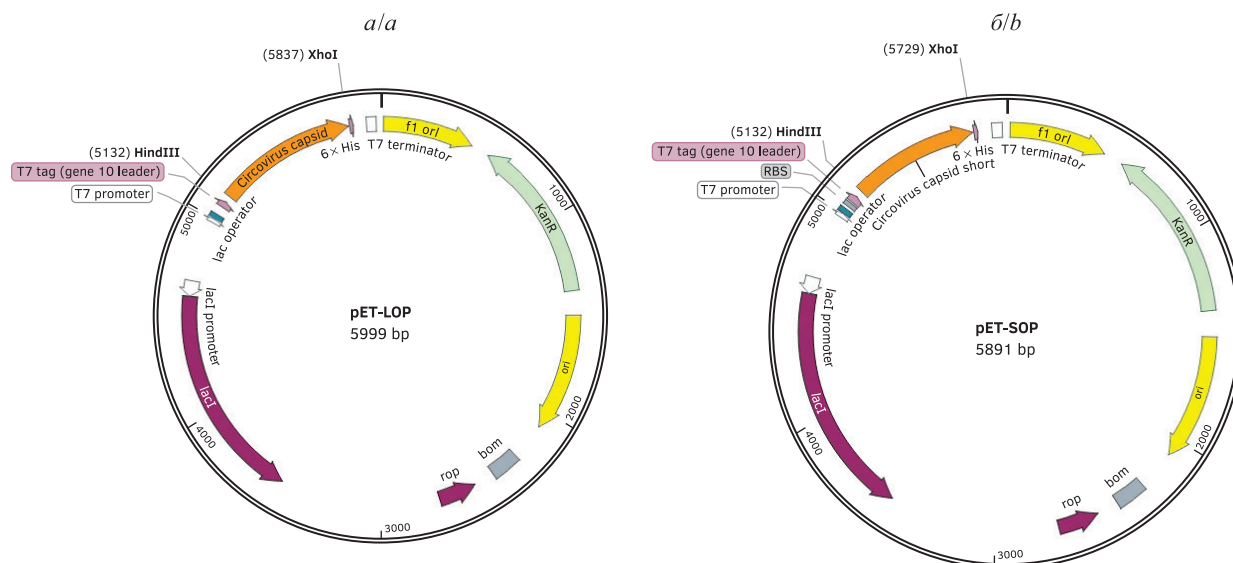


Рис. 2. Карты плазмид, полученных в работе:
а – pET-LOP (плазмида для экспрессии полноразмерного белка капсида);
б – pET-SOP (плазмида для экспрессии укороченного белка капсида (см. ниже))

Fig. 2. Maps of plasmids obtained in the work:
а – pET-LOP (plasmid for expressing the full-length capsid protein);
б – pET-SOP (plasmid for expression of the truncated capsid protein (see below))

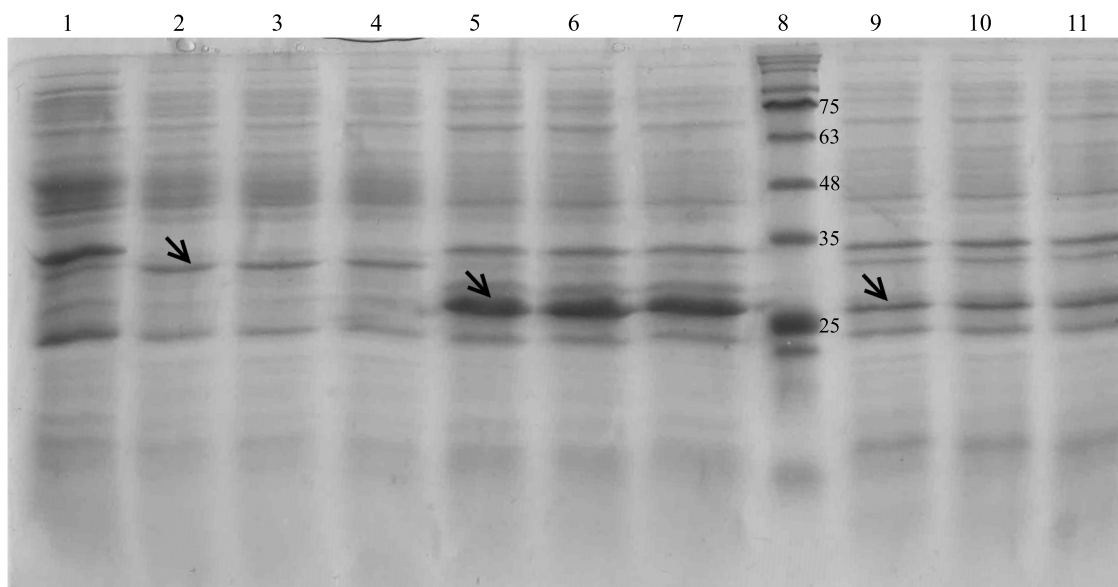


Рис. 3. Результаты ПААГ-электрофореза:
1 – отрицательный контроль; 2–4 – LOP (полноразмерный белок капсида, 31,23 кДа);
5–7 – SOP (укороченный белок капсида, 26,35 кДа (см. ниже));
8 – маркер молекулярной массы с указанием размеров белков;
9–11 – TP (укороченный неоптимизированный белок, 25 кДа).

Стрелками показаны целевые белки

Fig. 3. Results of PAGE electrophoresis:
1 – negative control; 2–4 – LOP (full-length capsid protein, 31.23 kDa);
5–7 – SOP (truncated capsid protein, 26.35 kDa (see below));
8 – molecular weight marker with protein sizes;
9–11 – TP (truncated unoptimized protein, 25 kDa).

Arrows indicate the target proteins

Последовательности праймеров, использованных в работе
Sequences of primers used in the work

Праймер	Сиквенс 5' → 3'	Рестриктазы	Размер, п. н.	Температура плавления, °С	GC-состав, %
CapsPshort	AAAAAGCTTATGTGGCGTCGTAAAA	HindIII	25	56,0	36
CapsP1	AAAAAGCTTATGACGTATACCCGTC	HindIII	25	55,1	40
CapsP2	TTTCTCGAGCGGGATCAGCG	XhoI	20	59,8	60

Примечание. Подчеркнуты сайты для указанных рестриктаз.

Создание генетической конструкции для экспрессии укороченного оптимизированного гена белка капсида ЦВС-2. Ранее установлено, что присутствие нуклеотидной последовательности N-концевого домена белка капсида затрудняет нормальную трансляцию белка капсида в бактериальных клетках [19]. В целях повышения уровня экспрессии сконструирована укороченная оптимизированная последовательность гена. Удаленный участок из 108 п. н. (см. рис. 1) соответствует N-концевому домену белка и не затрагивает его основные антигенные эпитопы [14; 15]. Индекс адаптации кодонов для укороченной и оптимизированной последовательностей равен 0,736 8 [26], что на 3,8 % превышает таковой для полноценного гена.

Укороченная генетическая последовательность амплифицирована из последовательности полно-размерного оптимизированного гена с помощью праймеров CapsP2 и CapsPshort (см. таблицу, рис. 4). Ампликон размером 609 п. н. клонирован в вектор pET-24b(+) по сайтам рестрикции XhoI и HindIII. Полученная конструкция названа pET-SOP (см. рис. 2). Ожидаемая молекулярная масса белкового продукта, названного SOP, составляет 26,35 кДа.

Экспрессия укороченного оптимизированного гена белка капсида ЦВС-2. Анализ результатов электрофореза белков в полиакриламидном геле (см. рис. 3) показал, что укороченный оптимизированный белок SOP составляет $(28,98 \pm 0,70) \%$ ($n = 21$) от общей массы клеточного белка.

Сравнение экспрессии различных вариантов модифицированных генов белка капсида ЦВС-2. Чтобы определить влияние оптимизации редких кодонов и удаления начального участка гена на уровень экспрессии, было проведено сравнение содержания вышеописанных белковых продуктов и белка TP, экспрессируемого с конструкции pET-TP3 [20]. Анализ результатов электрофореза показал, что укороченный неоптимизированный белок TP составлял $(20,49 \pm 1,05) \%$ ($n = 19$) от общей массы белка в клетке. Тест для парных сравнений (*U*-критерий Манна – Уитни) установил статистически значимую разницу в экспрессии исследуемых генов. Укороченный белок SOP нарабатывается в 2,23 раза эффективнее по сравнению с LOP ($p < 0,01$) и в 1,41 раза эффективнее, чем укороченный, но неоптимизированный белок TP ($p < 0,01$). Сравнение уровня экспрессии различных модифицированных вариантов белка капсида ЦВС-2 наглядно представлено в виде диаграммы на рис. 5. Таким образом, и оптимизация кодонов, и удаление N-участка положительно влияют на экспрессию гена белка капсида ЦВС-2, причем для достижения наиболее высокого уровня экспрессии следует использовать оба метода.

Значение полученных результатов и перспектива дальнейших исследований. Уровень экспрессии немодифицированного гена белка капсида относительно невысок для генно-инженерных штаммов – продуцентов целевых рекомбинантных белков [18; 20], в связи с чем необходим поиск эффективных методов оптимизации. Другими авторами проводились эксперименты по замене редких кодонов [20; 29; 30] и удалению 5'-концевого участка гена белка капсида цирковируса [18–20; 30]. Однако изучение экспрессии укороченной и оптимизированной версии гена белка капсида белорусского штамма вируса ранее не выполнялось, к тому же обычно осуществлялась замена относительно небольшого числа редких кодонов [20; 29]. Именно этот пробел и заполняет данная работа. Полученные конструкции демонстрируют статистически значимое повышение уровня экспрессии модифицированного гена белка капсида, что является важным этапом в создании улучшенной вакцины против отечественного варианта ЦВС-2.

В дальнейшем, помимо уровня экспрессии белка в клетке, необходимо изучить и другие факторы. Хотя удаленный фрагмент в укороченном варианте гена белка SOP и не затрагивает его основных антигенных доменов, следует учитывать потенциальное влияние данного участка на образование правильной конформации белка и сборку вирусных частиц, что, в свою очередь, может влиять на иммунизацию хозяина. Так, показано, что N-концевой участок белка капсида необходим для димеризации этого белка и сборки вирусоподобных частиц, похожих по структуре на частицы интактного вируса [31]. В связи с этим требуются дальнейшие исследования различных вариантов модифицированного гена в целях установления их влияния на иммунизацию свиней и выявления наиболее подходящего кандидата для создания вакцины против наиболее распространенных в Беларуси штаммов ЦВС-2.

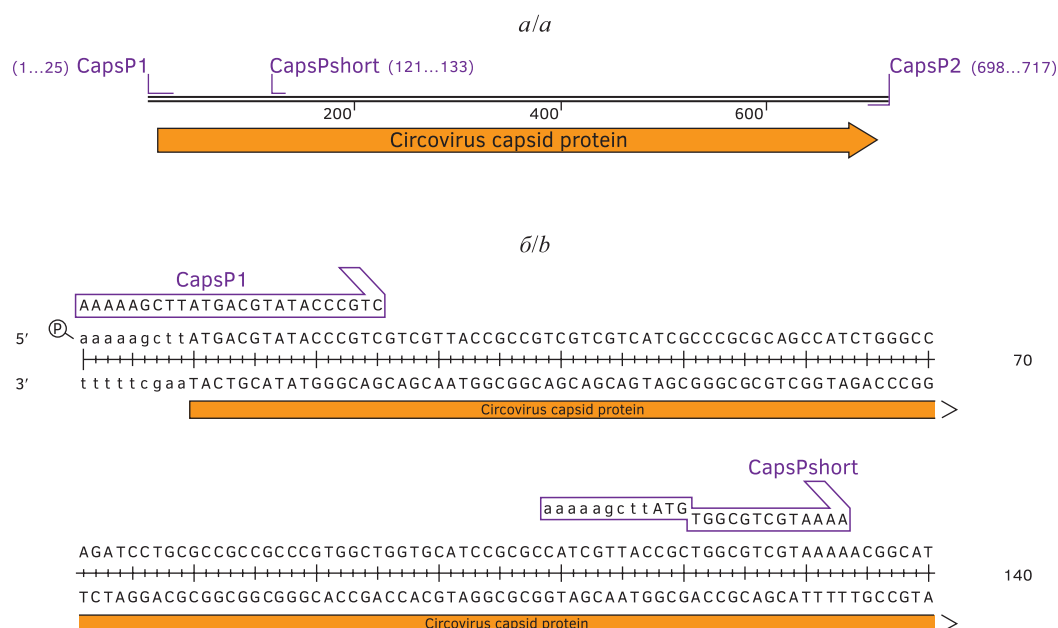


Рис. 4. Открытая рамка считывания оптимизированного гена белка капсида цирковируса. Показаны праймеры, которыми проводилась амплификация: *a* – схематичное изображение последовательности; *б* – 5'-конец генетической последовательности с праймерами для полноразмерного и укороченного гена

Fig. 4. Open reading frame of the optimized circovirus capsid protein gene. The primers used for amplification are shown: *a* – schematic representation of the sequence; *b* – 5'-end of the genetic sequence with primers for the full-length and the truncated gene

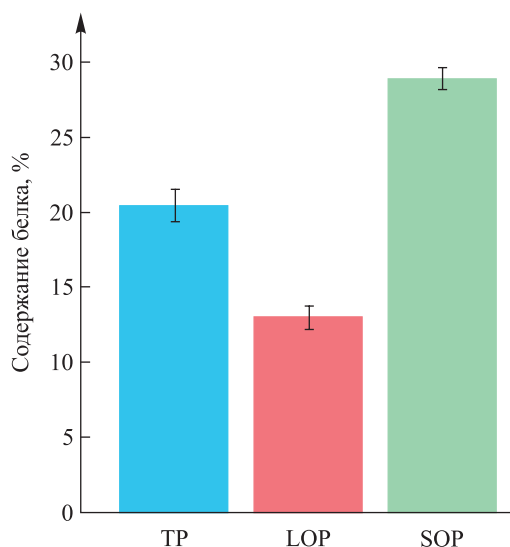


Рис. 5. Сравнение уровня экспрессии исследуемых белков. Высота столбцов соответствует среднему уровню экспрессии; усы показывают стандартную ошибку среднего

Fig. 5. Comparison of the expression level of the studied proteins. The height of the columns indicates the average level of expression; the whiskers show the standard error of the mean

Заключение

Таким образом, показано, что для эффективной экспрессии вирусного белка в клетках *E. coli*, помимо удаления N-концевого домена белка капсида, необходимо дополнительное повышение уровня продукции этого гетерологичного белка за счет оптимизации кодирующей последовательности гена.

Библиографические ссылки

1. Meehan BM, McNeilly F, Todd D, Kennedy S, Jewhurst VA, Ellis JA, et al. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *Journal of General Virology*. 1998;79(9):2171–2179. DOI: 10.1099/0022-1317-79-9-2171.
2. Breitbart M, Delwart E, Rosario K, Segalés J, Varsani A, ICTV Report Consortium. ICTV virus taxonomy profile: Circoviridae. *Journal of General Virology*. 2017;98(8):1997–1998. DOI: 10.1099/jgv.0.000871.
3. Opriessnig T, McKeown NE, Zhou E-M, Meng X-J, Halbur PG. Genetic and experimental comparison of porcine circovirus type 2 (PCV2) isolates from cases with and without PCV2-associated lesions provides evidence for differences in virulence. *Journal of General Virology*. 2006;87(10):2923–2932. DOI: 10.1099/vir.0.82099-0.
4. Alarcon P, Rushton J, Wieland B. Cost of post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type 2 sub-clinical infection in England – an economic disease model. *Preventive Veterinary Medicine*. 2013;110(2):88–102. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2013.02.010.
5. Segalés J. Best practice and future challenges for vaccination against porcine circovirus type 2. *Expert Review of Vaccines*. 2015;14(3):473–487. DOI: 10.1586/14760584.2015.983084.
6. Chae C. Commercial porcine circovirus type 2 vaccines: efficacy and clinical application. *The Veterinary Journal*. 2012;194(2):151–157. DOI: 10.1016/j.tvjl.2012.06.031.
7. Seo HW, Park C, Kang I, Choi K, Jeong J, Park S-J, et al. Genetic and antigenic characterization of a newly emerging porcine circovirus type 2b mutant first isolated in cases of vaccine failure in Korea. *Archives of Virology*. 2014;159(11):3107–3111. DOI: 10.1007/s00705-014-2164-6.
8. Beach NM, Meng X-J. Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Research*. 2012;164(1–2):33–42. DOI: 10.1016/j.virusres.2011.09.041.
9. Nawagitgul P, Morozov I, Bolin SR, Harms PA, Sorden SD, Paul PS. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *Journal of General Virology*. 2000;81(9):2281–2287. DOI: 10.1099/0022-1317-81-9-2281.
10. Mankertz A, Caliskan R, Hattermann K, Hillenbrand B, Kurzendorfer P, Mueller B, et al. Molecular biology of porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication. *Veterinary Microbiology*. 2004;98(2):81–88. DOI: 10.1016/j.vetmic.2003.10.014.
11. Liu J, Chen I, Kwang J. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. *Journal of Virology*. 2005;79(13):8262–8274. DOI: 10.1128/JVI.79.13.8262-8274.2005.
12. Fenaux M, Opriessnig T, Halbur PG, Elvinger F, Meng XJ. A chimeric porcine circovirus (PCV) with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2 (PCV2) cloned into the genomic backbone of the nonpathogenic PCV1 induces protective immunity against PCV2 infection in pigs. *Journal of Virology*. 2004;78(12):6297–6303. DOI: 10.1128/JVI.78.12.6297-6303.2004.
13. Matzinger SR, Opriessnig T, Xiao C-T, Catanzaro N, Beach NM, Slade DE, et al. A chimeric virus created by DNA shuffling of the capsid genes of different subtypes of porcine circovirus type 2 (PCV2) in the backbone of the non-pathogenic PCV1 induces protective immunity against the predominant PCV2b and the emerging PCV2d in pigs. *Virology*. 2016;498:82–93. DOI: 10.1016/j.virol.2016.08.011.
14. Mahé D, Blanchard P, Truong C, Arnauld C, Le Cann P, Cariolet R, et al. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *Journal of General Virology*. 2000;81(7):1815–1824. DOI: 10.1099/0022-1317-81-7-1815.
15. Lekcharoensuk P, Morozov I, Paul PS, Thangthumnyom N, Wajjwalku W, Meng XJ. Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2. *Journal of Virology*. 2004;78(15):8135–8145. DOI: 10.1128/JVI.78.15.8135-8145.2004.
16. Liu Q, Tikoo SK, Babiuk LA. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2. *Virology*. 2001;285(1):91–99. DOI: 10.1006/viro.2001.0922.
17. Elena C, Ravasi P, Castelli ME, Peirú S, Menzella HG. Expression of codon optimized genes in microbial systems: current industrial applications and perspectives. *Frontiers in Microbiology*. 2014;5:21. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00021.
18. Trundova M, Celer V. Expression of porcine circovirus 2 ORF2 gene requires codon optimized *E. coli* cells. *Virus Genes*. 2007;34(2):199–204. DOI: 10.1007/s11262-006-0043-2.
19. Zhou J-Y, Shang S-B, Gong H, Chen Q-X, Wu J-X, Shen H-G, et al. *In vitro* expression, monoclonal antibody and bioactivity for capsid protein of porcine circovirus type II without nuclear localization signal. *Journal of Biotechnology*. 2005;118(2):201–211. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.02.017.
20. Прокулевич ВА, Кудин КВ. Экспрессия открытой рамки трансляции белка капсида ЦВС-2 в клетках *E. coli*. В: Пручковская ОН, редактор. *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. Том 5*. Минск: Беларуская навука; 2013. с. 131–141.
21. Sambrook JF, Russell DW, editors. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. [2100 p.].
22. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, et al., editors. *Current protocols in molecular biology*. New York: John Wiley & Sons; 2003. 4648 p.
23. Studier FW. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*. 2005;41(1):207–234. DOI: 10.1016/j.pep.2005.01.016.
24. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*. 2012;9(7):671–675. DOI: 10.1038/nmeth.2089.
25. Kane JF. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*. 1995;6(5):494–500. DOI: 10.1016/0958-1669(95)80082-4.

26. Grote A, Hiller K, Scheer M, Münch R, Nörtemann B, Hempel DC, et al. *JCat*: a novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host. *Nucleic Acids Research*. 2005;33(suppl_2):W526–W531. DOI: 10.1093/nar/gki376.
27. Sharp PM, Wen-Hsiung Li. The codon adaptation index – a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Research*. 1987;15(3):1281–1295. DOI: 10.1093/nar/15.3.1281.
28. Кудин КВ, Прокулевич ВА. Клонирование гена белка капсида белорусского штамма цирковируса свиней 2 типа. *Вестник БГУ. Серия 2. Химия. Биология. География*. 2011;2:37–41.
29. Wentao Kong, Jian Kong, Shumin Hu, Wenwei Lu, Ke Wang, Mingjie Ji. Enhanced expression of PCV2 capsid protein in *Escherichia coli* and *Lactococcus lactis* by codon optimization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2011;27(3):651–657. DOI: 10.1007/s11274-010-0503-7.
30. Marceková Z, Psikal I, Kosinova E, Benada O, Sebo P, Bumba L. Heterologous expression of full-length capsid protein of porcine circovirus 2 in *Escherichia coli* and its potential use for detection of antibodies. *Journal of Virological Methods*. 2009;162(1–2):133–141. DOI: 10.1016/j.jviromet.2009.07.028.
31. Pei-Ching Wu, Wei-Li Lin, Chi-Ming Wu, Jiun-Ni Chi, Maw-Sheng Chien, Chienjin Huang. Characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) capsid particle assembly and its application to virus-like particle vaccine development. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012;95(6):1501–1507. DOI: 10.1007/s00253-012-4015-2.

References

1. Meehan BM, McNeilly F, Todd D, Kennedy S, Jewhurst VA, Ellis JA, et al. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *Journal of General Virology*. 1998;79(9):2171–2179. DOI: 10.1099/0022-1317-79-9-2171.
2. Breitbart M, Delwart E, Rosario K, Segalés J, Varsani A, ICTV Report Consortium. ICTV virus taxonomy profile: Circoviridae. *Journal of General Virology*. 2017;98(8):1997–1998. DOI: 10.1099/jgv.0.000871.
3. Opriessnig T, McKeown NE, Zhou E-M, Meng X-J, Halbur PG. Genetic and experimental comparison of porcine circovirus type 2 (PCV2) isolates from cases with and without PCV2-associated lesions provides evidence for differences in virulence. *Journal of General Virology*. 2006;87(10):2923–2932. DOI: 10.1099/vir.0.82099-0.
4. Alarcon P, Rushton J, Wieland B. Cost of post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type 2 sub-clinical infection in England – an economic disease model. *Preventive Veterinary Medicine*. 2013;110(2):88–102. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2013.02.010.
5. Segalés J. Best practice and future challenges for vaccination against porcine circovirus type 2. *Expert Review of Vaccines*. 2015;14(3):473–487. DOI: 10.1586/14760584.2015.983084.
6. Chae C. Commercial porcine circovirus type 2 vaccines: efficacy and clinical application. *The Veterinary Journal*. 2012;194(2):151–157. DOI: 10.1016/j.tvjl.2012.06.031.
7. Seo HW, Park C, Kang I, Choi K, Jeong J, Park S-J, et al. Genetic and antigenic characterization of a newly emerging porcine circovirus type 2b mutant first isolated in cases of vaccine failure in Korea. *Archives of Virology*. 2014;159(11):3107–3111. DOI: 10.1007/s00705-014-2164-6.
8. Beach NM, Meng X-J. Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Research*. 2012;164(1–2):33–42. DOI: 10.1016/j.virusres.2011.09.041.
9. Nawagitgul P, Morozov I, Bolin SR, Harms PA, Sorden SD, Paul PS. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *Journal of General Virology*. 2000;81(9):2281–2287. DOI: 10.1099/0022-1317-81-9-2281.
10. Mankertz A, Caliskan R, Hattermann K, Hillenbrand B, Kurzendoerfer P, Mueller B, et al. Molecular biology of porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication. *Veterinary Microbiology*. 2004;98(2):81–88. DOI: 10.1016/j.vetmic.2003.10.014.
11. Liu J, Chen I, Kwang J. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. *Journal of Virology*. 2005;79(13):8262–8274. DOI: 10.1128/JVI.79.13.8262-8274.2005.
12. Fenaux M, Opriessnig T, Halbur PG, Elvinger F, Meng XJ. A chimeric porcine circovirus (PCV) with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2 (PCV2) cloned into the genomic backbone of the nonpathogenic PCV1 induces protective immunity against PCV2 infection in pigs. *Journal of Virology*. 2004;78(12):6297–6303. DOI: 10.1128/JVI.78.12.6297-6303.2004.
13. Matzinger SR, Opriessnig T, Xiao C-T, Catanzaro N, Beach NM, Slade DE, et al. A chimeric virus created by DNA shuffling of the capsid genes of different subtypes of porcine circovirus type 2 (PCV2) in the backbone of the non-pathogenic PCV1 induces protective immunity against the predominant PCV2b and the emerging PCV2d in pigs. *Virology*. 2016;498:82–93. DOI: 10.1016/j.virol.2016.08.011.
14. Mahé D, Blanchard P, Truong C, Arnauld C, Le Cann P, Cariolet R, et al. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *Journal of General Virology*. 2000;81(7):1815–1824. DOI: 10.1099/0022-1317-81-7-1815.
15. Lekcharoensuk P, Morozov I, Paul PS, Thangthumnyom N, Wajjwalku W, Meng XJ. Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2. *Journal of Virology*. 2004;78(15):8135–8145. DOI: 10.1128/JVI.78.15.8135-8145.2004.
16. Liu Q, Tikoo SK, Babiuk LA. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2. *Virology*. 2001;285(1):91–99. DOI: 10.1006/viro.2001.0922.
17. Elena C, Ravasi P, Castelli ME, Peiró S, Menzella HG. Expression of codon optimized genes in microbial systems: current industrial applications and perspectives. *Frontiers in Microbiology*. 2014;5:21. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00021.
18. Trundova M, Celer V. Expression of porcine circovirus 2 ORF2 gene requires codon optimized *E. coli* cells. *Virus Genes*. 2007;34(2):199–204. DOI: 10.1007/s11262-006-0043-2.
19. Zhou J-Y, Shang S-B, Gong H, Chen Q-X, Wu J-X, Shen H-G, et al. *In vitro* expression, monoclonal antibody and bioactivity for capsid protein of porcine circovirus type II without nuclear localization signal. *Journal of Biotechnology*. 2005;118(2):201–211. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.02.017.
20. Prokulevich UA, Kudzin KV. [Expression of the open reading frame of PCV2 capsid protein in *E. coli* cells]. In: Pruchkovskaya ON, editor. *Mikrobye biotekhnologii: fundamental'nye i prikladnye aspekty. Tom 5* [Microbial biotechnology: fundamental and applied aspects. Volume 5]. Minsk: Belaruskaja navuka; 2013; p. 131–141. Russian.

21. Sambrook JF, Russell DW, editors. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. [2100 p.].
22. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, et al., editors. *Current protocols in molecular biology*. New York: John Wiley & Sons; 2003. 4648 p.
23. Studier FW. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*. 2005; 41(1):207–234. DOI: 10.1016/j.pep.2005.01.016.
24. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. *NIH Image to ImageJ*: 25 years of image analysis. *Nature Methods*. 2012;9(7):671–675. DOI: 10.1038/nmeth.2089.
25. Kane JF. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*. 1995;6(5):494–500. DOI: 10.1016/0958-1669(95)80082-4.
26. Grote A, Hiller K, Scheer M, Münch R, Nörtemann B, Hempel DC, et al. *JCat*: a novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host. *Nucleic Acids Research*. 2005;33(suppl_2):W526–W531. DOI: 10.1093/nar/gki376.
27. Sharp PM, Wen-Hsiung Li. The codon adaptation index – a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Research*. 1987;15(3):1281–1295. DOI: 10.1093/nar/15.3.1281.
28. Kudin KV, Prokulevich VA. [Cloning of the capsid gene of the Belarusian porcine circovirus type 2 strain]. *Vestnik BGU. Seriya 2. Khimiya. Biologiya. Geografiya*. 2011;2:37–41. Russian.
29. Wentao Kong, Jian Kong, Shumin Hu, Wenwei Lu, Ke Wang, Mingjie Ji. Enhanced expression of PCV2 capsid protein in *Escherichia coli* and *Lactococcus lactis* by codon optimization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2011;27(3):651–657. DOI: 10.1007/s11274-010-0503-7.
30. Marcekova Z, Psikal I, Kosinova E, Benada O, Sebo P, Bumba L. Heterologous expression of full-length capsid protein of porcine circovirus 2 in *Escherichia coli* and its potential use for detection of antibodies. *Journal of Virological Methods*. 2009;162(1–2): 133–141. DOI: 10.1016/j.jviromet.2009.07.028.
31. Pei-Ching Wu, Wei-Li Lin, Chi-Ming Wu, Jiun-Ni Chi, Maw-Sheng Chien, Chienjin Huang. Characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) capsid particle assembly and its application to virus-like particle vaccine development. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012;95(6):1501–1507. DOI: 10.1007/s00253-012-4015-2.

Статья поступила в редколлегию 18.06.2020.
Received by editorial board 18.06.2020.