

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY

УДК 577.218+579

НАКОПЛЕНИЕ И АНТИГЕННОСТЬ УКОРОЧЕННОГО БЕЛКА КАПСИДА ЦИРКОВИРУСА СВИНЕЙ 2-ГО ТИПА В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*

А. Д. ТИТОВА¹⁾, Ю. М. КУЛЕШОВА¹⁾,
М. И. ПОТАПОВИЧ¹⁾, В. А. ПРОКУЛЕВИЧ¹⁾

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

Исследованы особенности накопления укороченного варианта белка капсида цирковируса свиней 2-го типа (белок SOP) в клетках бактерий штамма-продуцента *Escherichia coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL, содержащих ранее сконструированную плазмиду pET-SOP. Ген белка SOP модифицирован путем удаления участка (108 пар нуклеотидов), затрудняющего экспрессию в клетках прокариот, и оптимизации 93 редких для бактерий кодонов. Доля целевого белка в клетках *E. coli* при температуре культивирования 37 °C в течение 2 ч после индукции

Образец цитирования:

Титова АД, Кулешова ЮМ, Потапович МИ, Прокулевич ВА. Накопление и антигенность укороченного белка капсида цирковируса свиней 2-го типа в клетках *Escherichia coli*. Экспериментальная биология и биотехнология. 2022;2:37–47.
<https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-2-37-47>

For citation:

Titova AD, Kuleshova YM, Potapovich MI, Prokulevich VA. Accumulation and antigenicity of truncated porcine circovirus type 2 capsid protein in *Escherichia coli* cells. Experimental Biology and Biotechnology. 2022;2:37–47. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-2-37-47>

Авторы:

Анастасия Дмитриевна Титова – младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории биотехнологии кафедры микробиологии биологического факультета.

Юлия Михайловна Кулешова – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории биотехнологии кафедры микробиологии биологического факультета.

Максим Иосифович Потапович – заведующий научно-исследовательской лабораторией 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

Yuliya M. Kuleshova, PhD (biology); senior researcher at the laboratory of biotechnology, department of microbiology, faculty of biology.

yuliakuleshova@yahoo.co.uk

Maxim I. Potapovich, head of the laboratory of biotechnology, department of microbiology, faculty of biology.

potapovich@bsu.by

Vladimir A. Prokulevich, doctor of science (biology), full professor; head of the department of microbiology, faculty of biology.

prokulevich@mail.ru



достигает 24 % от общего клеточного белка, что позволяет отнести указанный штамм к эффективным производственным продуцентам целевого белка. В ходе культивирования продуцента при 37 °C сразу после индукции целевой белок находится в клетках в растворимом виде, но через 1 ч после добавления индуктора обнаруживается преимущественно в нерастворимой форме (тельца включения). При понижении температуры культивирования до 18–30 °C формирование телец включения замедляется, однако доля рекомбинантного белка в клетках продуцента уменьшается до 15–6 % соответственно, что в значительной степени снижает рентабельность технологического процесса. Также установлено, что модифицированный рекомбинантный белок SOP, получаемый из бактериальных клеток штамма-продуцента, сохраняет свою антигенную активность, это подтверждается специфическим иммуноферментным анализом. Полученные данные позволяют считать исследуемый белок перспективным для разработки вакцины против цирковируса свиней.

Ключевые слова: цирковирус свиней 2-го типа; белок капсида; экспрессия гена; индукция; температура культивирования; растворимая фракция; нерастворимая фракция; иммуноферментный анализ; тельца включения.

ACCUMULATION AND ANTIGENICITY OF TRUNCATED PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 CAPSID PROTEIN IN *ESCHERICHIA COLI* CELLS

A. D. TITOVA^a, Y. M. KULESHOVA^a,
M. I. POTAPOVICH^a, V. A. PROKULEVICH^a

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

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

This work examines accumulation of shortened version of porcine circovirus type 2 capsid protein (SOP protein) in the cells of bacterial strain *Escherichia coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL with plasmid pET-SOP, obtained in previous work. The gene for SOP protein was modified by deletion of the part (108 base pair) interfering expression in prokaryotes, as well as optimisation of 93 rare codons. Under cultivation temperature 37 °C for 2 h after induction the proportion of target protein reaches of 24 % of the total cellular protein, which makes it possible to classify this strain as an effective industrial producer of target protein. During the cultivation of the producer at 37 °C, the target protein is in the cells in the native soluble form right after induction, but 1 h after the addition of the inducer, it is found mostly in insoluble multimeric form (inclusion bodies). When the cultivation temperature is lowered to 18–30 °C, the formation of inclusion bodies slows down, however the proportion of recombinant protein in the cells of the producer decreases to 15–6 % respectively, which significantly reduces the profitability of the technological process. It has been established that the modified recombinant SOP protein obtained from bacterial cells of the producer strain retains its antigenic activity, which is confirmed by specific enzyme-linked immunosorbent assay analysis. These data allow us to consider studied protein as a promising candidate for a porcine circovirus type 2 vaccine.

Keywords: porcine circovirus type 2; capsid protein; gene expression; induction; cultivation temperature; soluble fraction; insoluble fraction; enzyme-linked immunosorbent assay; inclusion bodies.

Введение

Цирковирус свиней 2-го типа (ЦВС-2) – это небольшой ДНК-содержащий икосаэдрический безоболочечный вирус, принадлежащий к роду *Circovirus* семейства Circoviridae [1; 2]. Данный вирус является возбудителем целого ряда синдромов, клинические проявления которых обозначаются общим термином «цирковирусные болезни свиней» (ЦВБС). К ЦВБС относятся синдром послеотъемного мультисистемного истощения, синдром дерматита и нефропатии свиней, а также связанные с ЦВС пневмония, энтерит и репродуктивная дисфункция [3]. Каждое из указанных заболеваний наносит значительный ущерб свиноводству [4].

Наиболее эффективным средством борьбы с ЦВС-2 являются вакцины [5]. При разработке генно-инженерных субъединичных вакцин против цирковируса в качестве антигена используют единственный белок капсидной оболочки вируса [5–7].

Белок-антиген производят путем культивирования бактериальных штаммов-продуцентов, наследующих соответствующий ген вируса. Для успешного производственного процесса зачастую требуется модификация гена, экспрессируемого в клетках нового хозяина, а также подбор оптимальных условий культивирования штамма-продуцента [8].

В ходе разработки вакцины сконструирована плазмида pET-SOP, на основе которой в бактериях синтезируется белок SOP – оптимизированный вариант белка капсида ЦВС-2 [9]. Ген белка SOP был подвергнут модификациям, которые привели к повышению его экспрессии в клетках прокариот (удален участок ДНК размером 108 пар нуклеотидов, соответствующий 36 N-концевым аминокислотным остаткам белка, и заменены 93 редких для бактерий синонимических кодона).

Цель исследования – изучить влияние условий культивирования на формирование целевого продукта (белка-антигена) в клетках штамма-продуцента, несущего плазмиду pET-SOP.

Задачи исследования: 1) проанализировать динамические характеристики биосинтеза белка SOP на ранних стадиях экспрессии; 2) сравнить уровни накопления белка в растворимой и нерастворимой фракциях при различных условиях культивирования; 3) охарактеризовать антигенные свойства оптимизированного белка капсида ЦВС-2 путем иммуноферментного анализа.

Материалы и методы исследования

В работе использовали плазмиды из коллекции кафедры микробиологии биологического факультета БГУ:

- pET-TP3 с укороченным геном белка капсида ЦВС-2б [8];
- pET-SOP с укороченным и оптимизированным по 93 кодонам геном белка капсида ЦВС-2б [9].

Бактерии штамма *Escherichia 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), содержащие указанные плазмиды, обозначены *E. coli* pET-TP3 и *E. coli* pET-SOP соответственно. Клетки исходного штамма *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL без плазмид выступали в качестве отрицательного контроля, а клетки штамма *E. coli* pET-TP3 – в качестве положительного контроля.

Культуры клеток выращивали в жидкой питательной среде LB с добавлением антибиотиков (30 мкг/мл канамицина, 30 мкг/мл хлорамфеникола для *E. coli* pET-TP3 и *E. coli* pET-SOP; 30 мкг/мл хлорамфеникола для *E. coli* без рекомбинантной плазмиды). Для индукции экспрессии рекомбинантных генов в клетках штамма *E. coli* pET-SOP ночную культуру клеток, выращенную на качалке при 160 об/мин и 37 °C, разбавляли питательной средой в 20 раз и культивировали 2 ч при 160 об/мин и 37 °C до оптической плотности культуры 0,6–1,0 при длине волны 600 нм, затем добавляли изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 1 ммоль/л и продолжали культивирование 2 ч при температуре 18; 25; 30 или 37 °C. Перед добавлением индуктора и через каждые 30 мин выращивания отбирали пробы культуры клеток для анализа различных фракций белков. Для получения проб клетки *E. coli* центрифугировали 3 мин при 13 000 об/мин. Выделение белков из клеток *E. coli* осуществляли с помощью B-PERTTM Bacterial Protein Extraction Reagent (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, США) в соответствии с инструкцией производителя. Данный реагент позволяет разрушать клетки и выделять растворимые белки, но не растворяет тельца включения и не нарушает структуру белков [10].

Уровень накопления белков анализировали путем электрофореза в поликарбидном геле (ПААГ-электрофореза) по Лэммли согласно общепринятому протоколу [11]. Для получения проб к образцам клеток, а также к растворимой и нерастворимой фракциям белка добавляли загрузочный буфер для электрофореза, затем кипятили их в течение 5 мин. Объем проб для ПААГ-электрофореза различных фракций рассчитывался таким образом, чтобы в каждой пробе был представлен белок, выделенный из одинакового количества клеток. В качестве маркеров молекулярной массы использовали Protein Marker VI (10–245) Prestained (*ITW Reagents*, Испания) и PageRulerTM Prestained Protein Ladder (*Thermo Fisher Scientific Inc.*). Денситометрический анализ изображений окрашенных поликарбидных гелей проводили с помощью программного пакета *ImageJ* (версия 1.46r) [12]. Долю целевого белка в клетке оценивали путем сравнения интенсивности окрашивания полосы белка SOP с интенсивностью окрашивания полос остальных белков на дорожке. Чтобы оценить соотношение растворимой и нерастворимой фракций целевого белка, сравнивали интенсивность окрашивания полос растворимого и нерастворимого белка SOP, выделенного из одинакового количества клеток.

Антигенные свойства целевого белка в разделенных фракциях изучали посредством иммуноферментного анализа [11]. В пробы для иммуноферментного анализа добавляли додецилсульфат натрия до конечной концентрации 0,54 % и инкубировали 10 мин при 37 °C. Концентрацию белка в образцах определяли путем измерения оптической плотности при 280 нм [11] на спектрофотометре DS-11 (*DeNovix Inc.*, США). Все образцы разводили до конечной концентрации 20 мкг/мл фосфатно-солевым буфером (*Melford Biolaboratories Ltd.*, Великобритания). Пробы (каждый образец брали в четырех повторах) иммобилизовали в лунках полистиролового 96-луночного планшета (*Sarstedt*, Германия) путем инкубирования в течение ночи при 4 °C. Для блокирования свободных сайтов связывания белка в лунки вносили по 300 мкл раствора, содержащего 1 % бычьего сывороточного альбумина и 0,05 % Tween 20

(Sigma Life Science, США) в фосфатно-солевом буфере, и выдерживали в течение 1 ч при 37 °С. Затем в лунки добавляли по 50 мкл первичных антител (использовали свиную поликлональную антисыворотку к ЦВС-2 (Accurate Chemical & Scientific Corporation, США), разбавленную до конечной концентрации в соответствии с инструкцией производителя) и выдерживали в течение 1 ч при 37 °С. Затем точно так же проводили инкубацию проб со вторичными козьими антителами к свиному иммуноглобулину G, конъюгированными с пероксидазой хрена (Abcam, Великобритания). Между этапами инкубации лунки планшета 4 раза промывали фосфатно-солевым буфером. После инкубации образцов с антителами в лунки вносили по 50 мкл субстратной смеси, в качестве которой использовался 3,3',5,5'-тетраметил-бензидин (Thermo Fisher Scientific Inc.), и выдерживали при комнатной температуре до максимального проявления окраски (но не более 15 мин). Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 моль/л серной кислоты. Результаты фиксировали путем считывания оптической плотности на планшетном спектрофлуориметре SpectraMax® M2 (Molecular Devices, США) при длине волны 450 нм.

Статистический анализ (в том числе дисперсионный анализ) проводили в программе *SOFA Statistics* (версия 1.5.3). Количественные данные, обобщающие результаты нескольких экспериментов, указаны в следующем виде: среднее значение плюс-минус стандартная ошибка среднего, в скобках дано количество измерений n , например $(24,06 \pm 1,90)\% (n = 4)$.

Результаты и их обсуждение

Экспрессия укороченного оптимизированного гена белка капсида ЦВС-2 в бактериальных клетках. В исследовании использовали культуру клеток потенциального штамма-продуцента *E. coli* pET-SOP, содержащего сконструированную плазмиду. Клетки исходного штамма *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL без плазмиды выступали в качестве отрицательного контроля, положительным контролем служили клетки штамма *E. coli* pET-TP3, синтезирующие белок TP – укороченный белок капсида ЦВС-2.

В первой серии экспериментов бактерии культивировали при оптимальной для *E. coli* температуре (37 °С). Пробы клеток *E. coli* pET-SOP, а также выделенные из них растворимую и нерастворимую фракции белка подвергали электрофоретическому, а затем и иммуноферментному анализу. Результаты белкового ПААГ-электрофореза представлены на рис. 1.

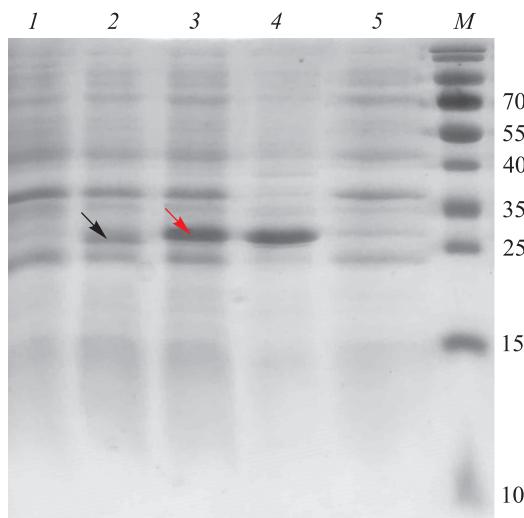


Рис. 1. Оценка распределения целевого белка в растворимой и нерастворимой фракциях бактериального лизата:

1 – отрицательный контроль (общий белок из клеток без рекомбинантных плазмид);

2 – положительный контроль (общий белок из клеток с плазмидой pET-TP3);

3 – общий белок из клеток с плазмидой pET-SOP;

4 – нерастворимая фракция белков из клеток с плазмидой pET-SOP;

5 – растворимая фракция белков из клеток с плазмидой pET-SOP;

M – маркер молекулярной массы (справа указаны размеры белков (кДа)). Красной и черной стрелками обозначены целевой белок SOP (26,35 кДа) и белок TP (25 кДа) соответственно

Fig. 1. Estimation of target protein distribution in soluble and insoluble fractions of bacterial lysate:

1 – negative control (total protein from cells without recombinant plasmids);

2 – positive control (total protein from cells with pET-TP3 plasmid);

3 – total protein from cells with pET-SOP plasmid; 4 – insoluble fraction of proteins from cells with pET-SOP plasmid; 5 – soluble fraction of proteins from cells with pET-SOP plasmid;

M – molecular weight marker (on the right are shown the protein sizes (kDa)).

Red and black arrows indicate the target SOP protein (26.35 kDa) and TP protein (25 kDa) respectively

Выявлено наличие белка SOP ожидаемого размера (около 26 кДа), который накапливается в клетках преимущественно в нерастворимой форме (в виде телец включения). В отрицательном контроле присутствует белок с похожей молекулярной массой в количестве ($2,40 \pm 0,17$) % ($n = 3$) от общего клеточного белка, на что сделана поправка при последующей оценке доли целевого белка в клетках. Дальнейшая идентификация рекомбинантного белка в клетках продуцента проведена с применением иммуноферментного анализа.

Проверка антигенных свойств целевого белка с помощью иммуноферментного анализа. Метод иммуноферментного анализа позволяет определить, взаимодействует ли целевой белок с соответствующими антителами, при этом избежав трудностей с переносом целевого белка на мембрану из поливинилиденфторида, которые возникли при попытке проведения вестерн-блоттинга. Для иммуноферментного анализа использовали образцы белка, отобранные в предыдущем эксперименте, – фракции белка из клеток с плазмидой pET-SOP, культивированных при температуре 37°C , положительный и отрицательный контроль. Пробы доводили до одинаковой концентрации общего белка (каждый образец брали в четырех повторах). В качестве первичных антител в анализе использовали поликлональную антисыворотку к ЦВС-2, а в качестве вторичных – антитела к свиному иммуноглобулину G, коньюгированные с пероксидазой хрина. В конце анализа была измерена оптическая плотность полученных образцов при 450 нм. Обобщенные результаты этих измерений представлены на рис. 2.

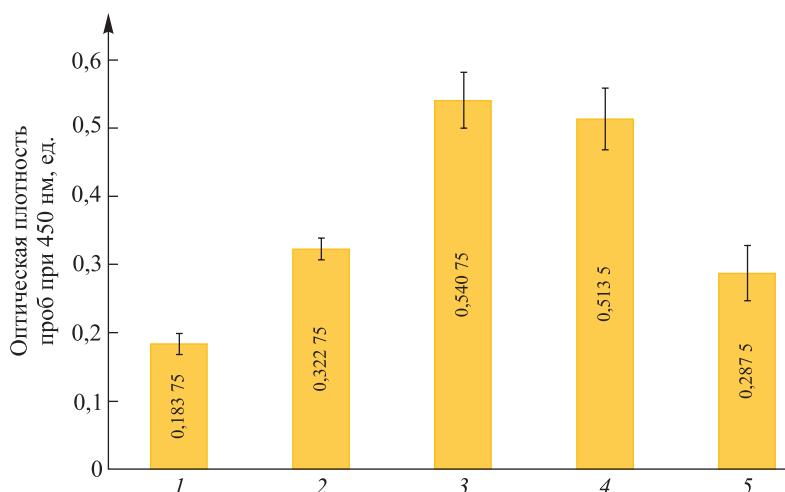


Рис. 2. Результаты иммуноферментного анализа образцов белка из клеток *E. coli* с рекомбинантными плазмидами:

1 – отрицательный контроль (общий белок из клеток без рекомбинантных плазмид);

2 – положительный контроль (общий белок из клеток с плазмидой pET-TP3);

3 – общий белок из клеток с плазмидой pET-SOP;

4 – нерастворимая фракция белков из клеток с плазмидой pET-SOP;

5 – растворимая фракция белков из клеток с плазмидой pET-SOP.

Высота столбцов соответствует средней оптической плотности образцов при 450 нм, усы показывают стандартную ошибку среднего

Fig. 2. Results of enzyme-linked immunosorbent assay of proteins from *E. coli* cells with recombinant plasmids:

1 – negative control (total protein from cells without recombinant plasmids);

2 – positive control (total protein from cells with pET-TP3 plasmid);

3 – total protein from cells with pET-SOP plasmid;

4 – insoluble fraction of proteins from cells with pET-SOP plasmid;

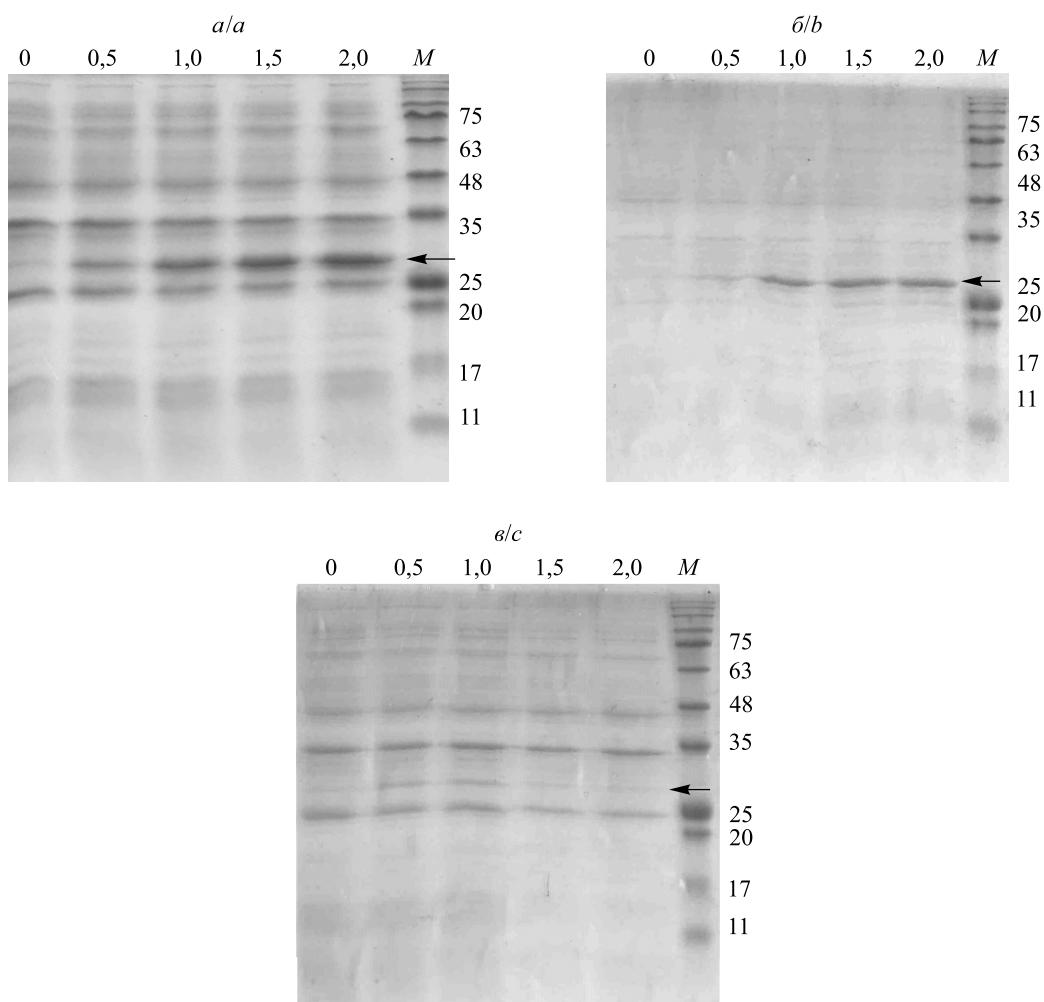
5 – soluble fraction of proteins from cells with pET-SOP plasmid.

The height of the columns corresponds to the average optical density at 450 nm, the whiskers shows standard error of the mean

Как видно из рис. 2, оптическая плотность образцов с белком SOP заметно превышает оптическую плотность отрицательного контроля. Согласно проведенному дисперсионному анализу эта разница в оптической плотности является статистически значимой ($p < 0,001$ ($7,454\text{E}-6$)). Данные иммуноферментного анализа показывают, что в клетках продуцента, содержащих плазмиду pET-SOP, присутствует целевой модифицированный белок, который сохраняет свои эпитопные антигенные свойства. При этом оптическая плотность проб с нерастворимой фракцией значительно превышает оптическую плотность проб с растворимой фракцией, что указывает на преимущественное накопление целевого белка в нерастворимом состоянии, это согласуется с результатами ПААГ-электрофореза.

Динамика накопления целевого белка в нерастворимой и растворимой формах. Проводилась индукция экспрессии гена при 37 °C. Пробы отбирали непосредственно перед добавлением индуктора и через каждые 30 мин после его добавления. Полученные образцы общего клеточного белка, а также растворимой и нерастворимой фракций проанализировали посредством ПААГ-электрофореза (рис. 3).

С помощью денситометрического анализа определяли процентное содержание белка SOP по отношению к общему бактериальному белку, а также соотношение нерастворимой и растворимой фракций целевого белка. Чтобы избежать завышения доли целевого белка в клетке, в этом и последующих экспериментах расчет производился с вычетом 2,4 % белка с молекулярной массой около 26 кДа, имевшегося в отрицательном контроле. Результаты анализа представлены на рис. 4. Согласно полученным данным первоначально белок SOP находится в клетках в растворимом состоянии. Однако примерно через 1 ч после добавления ИПТГ, когда содержание целевого белка достигает ($16,78 \pm 3,16$) % ($n = 4$) от общего клеточного белка, доля растворимой фракции снижается и целевой белок накапливается преимущественно в нерастворимой форме. При этом доля целевого белка через 2 ч после индукции достигает ($24,06 \pm 1,90$) % ($n = 4$) от общего клеточного белка.



*Рис. 3. Динамика накопления целевого белка в клетках *E. coli* при температуре культивирования 37 °C: *a* – общий клеточный белок; *b* – нерастворимая белковая фракция; *c* – растворимая белковая фракция.
 На всех электрофорограммах сверху указано время отбора проб с момента добавления индуктора (0; 0,5; 1,0; 1,5 и 2,0 ч);
M – маркер молекулярного веса (справа указаны размеры белков (кДа)).
 Стрелкой обозначено расположение целевого белка SOP (26,35 кДа)*

*Fig. 3. Target protein accumulation dynamic in *E. coli* cells at cultivation temperature 37 °C:
a – total cellular protein; *b* – insoluble protein fraction; *c* – soluble protein fraction. All figures above indicate the sampling time from the moment the inducer was added (0; 0.5; 1.0; 1.5 and 2.0 h);
M – molecular weight marker (on the right are shown the protein sizes (kDa)).
 The arrow shows the target SOP protein placement (26.35 kDa)*

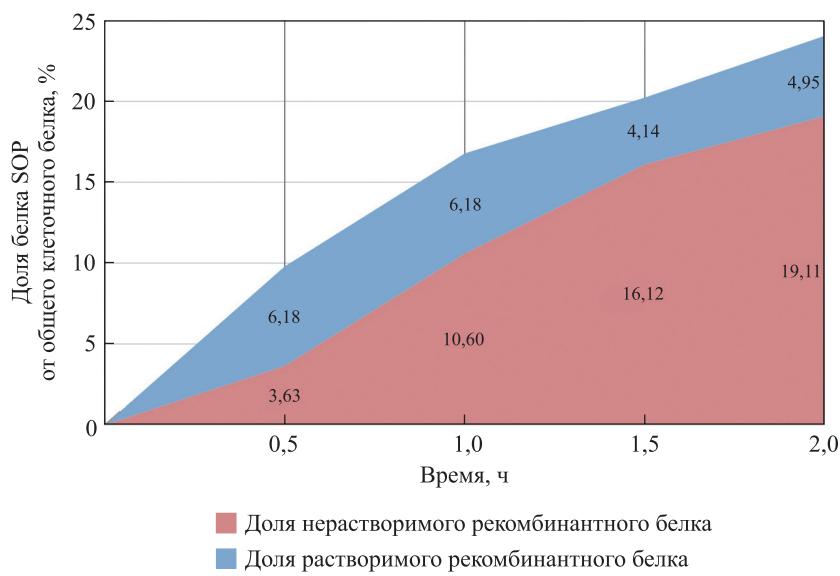
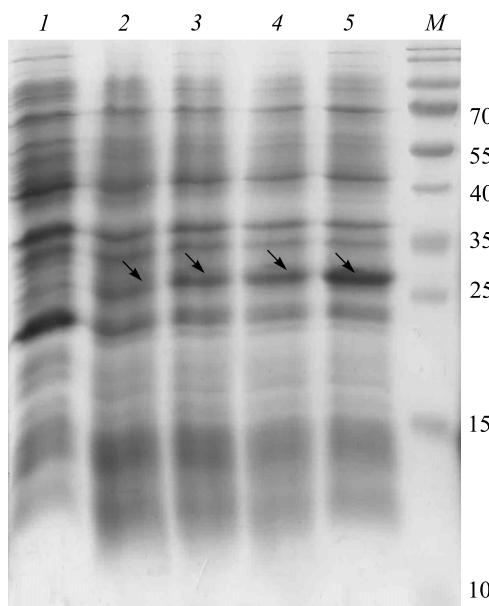


Рис. 4. Динамика накопления растворимой и нерастворимой форм целевого белка в клетках в процессе культивирования продуцента при 37 °C

Fig. 4. Dynamics of soluble and insoluble target protein accumulation in the cells during cultivation at 37 °C

Особенности накопления белка SOP при различной температуре культивирования продуцента. После добавления индуктора клетки продуцента целевого белка культивировали при температуре 37; 30; 25 и 18 °C. Отрицательный контроль (клетки без плазмиды) выращивали при 37 °C. Пробы клеток анализировали с помощью ПААГ-электрофореза (рис. 5).



*Рис. 5. Результаты ПААГ-электрофореза проб, содержащих общий белок из клеток *E. coli* с рекомбинантной плазмидой pET-SOP, культивируемых при различной температуре:*

*1 – отрицательный контроль (белок из клеток без рекомбинантной плазмиды);
2 – белок, синтезирующийся при 18 °C; 3 – белок, синтезирующийся при 25 °C;
4 – белок, синтезирующийся при 30 °C; 5 – белок, синтезирующийся при 37 °C;
M – маркер молекулярной массы (справа указаны размеры белков (кДа)).*

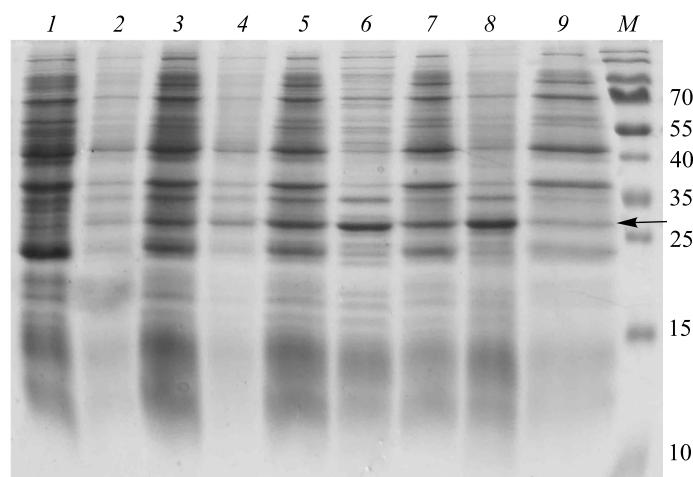
Стрелками обозначен целевой белок SOP (26,35 кДа)

*Fig. 5. Results of PAGE electrophoresis of samples with total protein from *E. coli* cells with recombinant plasmid pET-SOP, cultivated at different temperature:*

*1 – negative control (protein from cells without recombinant plasmids);
2 – protein expressed at 18 °C; 3 – protein expressed at 25 °C; 4 – protein expressed at 30 °C;
5 – protein expressed at 37 °C; M – molecular weight marker (on the right are shown the protein sizes (kDa)).
The arrows indicate the target protein SOP (26.35 kDa)*

Чтобы определить оптимальные условия для накопления белка SOP в растворимом и нерастворимом состоянии, из образцов культур, выращенных при различной температуре, выделяли растворимую и нерастворимую фракции, из которых готовили пробы для ПААГ-электрофореза (рис. 6).

В ходе денситометрического анализа установлено, что наибольшее количество целевого белка ($(24,06 \pm 1,90)$ % от общего белка) синтезируется в клетках, культивируемых при 37°C , при этом он накапливается преимущественно в нерастворимой форме. При 30°C содержание белка SOP достигает ($14,93 \pm 1,23$) % ($n = 5$) от общего количества белка в клетке, при этом он присутствует как в растворимой, так и в нерастворимой фракции примерно в одинаковых пропорциях. При 25°C содержание рекомбинантного белка снижается до ($8,94 \pm 1,33$) % ($n = 5$), а при 18°C – до ($6,45 \pm 0,76$) % ($n = 5$). При $18\text{--}25^{\circ}\text{C}$ белок SOP находится преимущественно в растворимом состоянии, а нерастворимый белок присутствует в незначительных количествах. Результаты анализа представлены на рис. 7.



*Rис. 6. Результаты ПААГ-электрофореза разных фракций белка из клеток *E. coli* с рекомбинантной плазмидой pET-SOP, культивируемых при различной температуре:*

1 – отрицательный контроль (общий белок из клеток без рекомбинантной плазмиды);

- 2 – нерастворимая фракция, образующаяся при 18°C ; 3 – растворимая фракция, образующаяся при 18°C ;*
- 4 – нерастворимая фракция, образующаяся при 25°C ; 5 – растворимая фракция, образующаяся при 25°C ;*
- 6 – нерастворимая фракция, образующаяся при 30°C ; 7 – растворимая фракция, образующаяся при 30°C ;*
- 8 – нерастворимая фракция, образующаяся при 37°C ; 9 – растворимая фракция, образующаяся при 37°C ;*

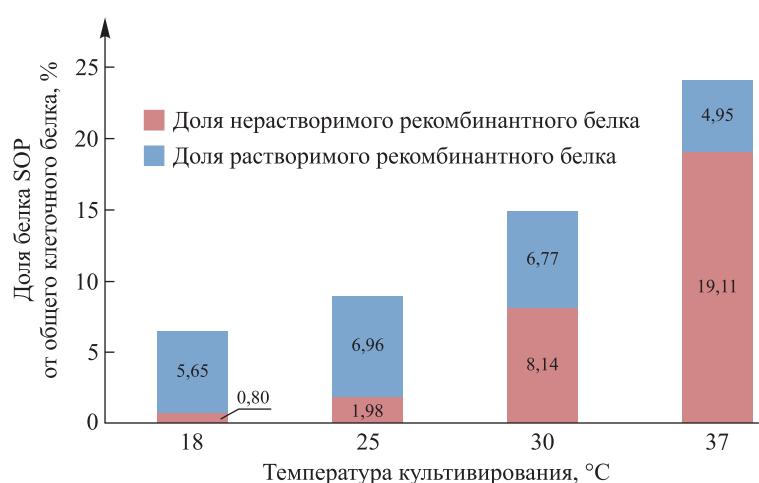
M – маркер молекулярной массы (справа указаны размеры белков (кДа)).

Стрелками обозначен целевой белок SOP (26,35 кДа)

*Fig. 6. Results of PAGE electrophoresis of various protein fractions from *E. coli* cells with recombinant plasmid pET-SOP, cultivated at different temperature:*

- 1 – negative control (total protein from cells without recombinant plasmid); 2 – insoluble fraction formed at 18°C ;*
- 3 – soluble fraction formed at 18°C ; 4 – insoluble fraction formed at 25°C ; 5 – soluble fraction formed at 25°C ;*
- 6 – insoluble fraction formed at 30°C ; 7 – soluble fraction formed at 30°C ; 8 – insoluble fraction formed at 37°C ;*
- 9 – soluble fraction formed at 37°C ; M – molecular weight marker (on the right are shown the protein sizes (kDa)).*

The arrows indicate the target protein SOP (26.35 kDa)



*Rис. 7. Влияние температуры культивирования на биосинтез целевого белка в клетках *E. coli**

*Fig. 7. Effect of cultivation temperature on the biosynthesis of the target protein in *E. coli* cells*

Обсуждение результатов. Белок капсида ЦВС-2 является антигеном, необходимым для получения вакцины, в связи с чем проводится множество исследований по оптимизации его производства. Один из таких способов – получение рекомбинантного белка в клетках *E. coli*, однако ген белка капсида ЦВС-2 требует значительной модификации для повышения уровня его экспрессии в бактериях. Без оптимизации белок капсида ЦВС-2 составляет только 8,6 % от общего количества белка в клетке продуцента [8], тогда как различные варианты модифицированного белка могут составлять от 13–14 % [8; 9; 13] до 22 % [14] от общего количества белка в клетке. Таким образом, уровень экспрессии выше 20 % от общего белка в клетках *E. coli* можно считать достаточно высоким. Модифицированный рекомбинантный белок SOP накапливается в количестве более 24 % от общего клеточного белка, что позволяет отнести сконструированный штамм-продуцент к производственно значимым штаммам-продуcentам. Такой уровень экспрессии достигнут за счет сочетания оптимизации кодонов и удаления N-концевого участка белка, затрудняющего экспрессию.

Также установлено, что наиболее высокий уровень синтеза целевого белка соответствует температуре культивирования штамма-продуцента 37 °C, при которой большая часть рекомбинантного белка накапливается в нерастворимом состоянии (в виде телец включения), это согласуется с результатами других экспериментов по биосинтезу гетерологических белков [15]. Стоит отметить, что в работах по получению растворимого белка капсида цирковируса температура, при которой проводилась индукция экспрессии, отличается: 16 °C [16], 20 °C [17], 30 °C [18], 37 °C [19]. Это может быть связано с тем, что авторы указанных работ получали разные варианты данного белка (полноразмерный или укороченный белок, с оптимизацией кодонов гена или без нее и т. д.), которые имели свои особенности накопления в бактериальной клетке. Также различие результатов может объясняться разными способами разрушения клеток и выделения растворимого белка. Способ выделения белка может повлиять на его третичную структуру и функциональность. Так, в некоторых случаях разрушение клеток ультразвуком позволяло выделить больше белка в растворимой форме, чем при использовании реагента B-PER, однако снижало долю функционального белка [10].

Проведенное исследование показало, что можно получать целевой белок в необходимой форме, варьируя температуру экспрессии. При условиях культивирования и методе разрушения клеток, использованных в данной работе, оптимальная температура для получения растворимого белка SOP составляет 25 °C. Наибольшее содержание рекомбинантного белка достигается при 37 °C, при этом он накапливается преимущественно в нерастворимом состоянии. Таким образом, данная температура является оптимальной для получения большого количества целевого белка, однако затем потребуется либо изменение методов выделения белка, либо солюбилизация и рефолдинг полученного нерастворимого продукта [20], либо его использование непосредственно в виде телец включения [21].

Установлено, что укороченный и оптимизированный рекомбинантный белок капсида ЦВС-2 сохраняет свою антигенную активность. Эффективное связывание с антителами против капсида цирковируса дает надежду, что получаемый целевой рекомбинантный белок может быть использован в качестве антигена для производства вакцины. В связи с этим целесообразны дальнейшие исследования иммуногенности рекомбинантного белка капсида ЦВС-2 для определения наиболее эффективного и экономически выгодного варианта вакцины.

Заключение

В клетках сконструированного бактериального штамма-продуцента, наследующего плазмиду рET-SOP с оптимизированным геном капсидного белка SOP (субъединичного рекомбинантного антигена ЦВС-2b), успешно индуцируется синтез этого целевого продукта. При температуре 37 °C в течение 2 ч после индукции доля целевого белка достигает 24 % от общего количества белка в клетке, при этом он накапливается в основном в виде телец включения. При понижении температуры культивирования до 18–25 °C доля целевого белка в клетке продуцента снижается и он находится преимущественно в растворимом состоянии. Полученные данные позволяют отнести бактериальный штамм, содержащий сконструированную рекомбинантную плазмиду с модифицированным геном вируса, к эффективным производственным продуцентам целевого белка. Особенности его накопления в клетках позволяют получать целевой продукт как в растворимой, так и в нерастворимой форме, варьируя температуру и время экспрессии. Взаимодействие белка SOP с антисывороткой к ЦВС-2 указывает на потенциальную возможность использования данного белка для получения вакцины.

Библиографические ссылки

1. Meehan BM, McNeilly F, Todd D, Kennedy S, Jewhurst VA, Ellis JA, et al. Characterisation 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. Opiressnig 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. Fenaux M, Opiressnig 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 non-pathogenic 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.
7. Matzinger SR, Opiressnig 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.
8. Прокулович 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.
9. Титова АД, Кудин КВ, Прокулович ВА. Особенности экспрессии белка капсида цирковируса свиней 2-го типа в бактериальных клетках. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2021;1:48–57. DOI: 10.33581/2521-1722-2021-1-48-57.
10. Soon Bin Kwon, Ji Eun Yu, Jihoon Kim, Hana Oh, Chan Park, Jinhee Lee, et al. Quality screening of incorrectly folded soluble aggregates from functional recombinant proteins. *International Journal of Molecular Science*. 2019;20(4):907. DOI: 10.3390/ijms20040907.
11. Ausubel M, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, et al., editors. *Current protocols in molecular biology*. New York: John Wiley & Sons; 2003. 2 volumes. DOI: 10.1002/mrd.1080010210.
12. 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.
13. Ji-Yong Zhou, Shao-Bin Shang, Hui Gong, Qing-Xin Chen, Jian-Xiang Wu, Hui-Gang Shen, et al. In vitro expression, monoclonal antibody and bioactivity for capsid protein of porcine circovirus type II without nuclear localisation signal. *Journal of Biotechnology*. 2005;118(2):201–211. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.02.017.
14. 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 optimisation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2011;27:651–657. DOI: 10.1007/s11274-010-0503-7.
15. Peti W, Page R. Strategies to maximise heterologous protein expression in *Escherichia coli* with minimal cost. *Protein Expression and Purification*. 2007;51(1):1–10. DOI: 10.1016/j.pep.2006.06.024.
16. Guoyang Liu, Xuwen Qiao, Chen Chang, Tao Hua, Jichun Wang, Bo Tang, et al. Reduction of postweaning multisystemic wasting syndrome-associated clinical symptoms by virus-like particle vaccine against porcine parvovirus and porcine circovirus type 2. *Viral Immunology*. 2020;33(6):444–456. DOI: 10.1089/vim.2019.0201.
17. Shuanghui Yin, Shiqi Sun, Shunli Yang, Youjun Shang, Xuepeng Cai, Xiangtao Liu. Self-assembly of virus-like particles of porcine circovirus type 2 capsid protein expressed from *Escherichia coli*. *Virology Journal*. 2010;7:166. DOI: 10.1186/1743-422X-7-166.
18. Trundova M, Celer V. Expression of porcine circovirus 2 ORF2 gene requires codon optimised *E. coli* cells. *Virus Genes*. 2007;34(2):199–204. DOI: 10.1007/s11262-006-0043-2.
19. Liu Q, Willson P, Attoh-Poku S, Babiuk LA. Bacterial expression of an immunologically reactive PCV2 ORF2 fusion protein. *Protein Expression and Purification*. 2001;21(1):115–120. DOI: 10.1006/prep.2000.1356.
20. Singh SM, Panda AK. Solubilisation and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2005;99(4):303–310. DOI: 10.1263/jbb.99.303.
21. Kęsik M, Sączyńska V, Szewczyk B, Plucienniczak A. Inclusion bodies from recombinant bacteria as a novel system for delivery of vaccine antigen by the oral route. *Immunology Letters*. 2004;91(2–3):197–204. DOI: 10.1016/j.imlet.2003.12.001.

References

1. Meehan BM, McNeilly F, Todd D, Kennedy S, Jewhurst VA, Ellis JA, et al. Characterisation 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. Opiressnig 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. Fenaux M, Opiressnig 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 non-pathogenic 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.

7. Matzinger SR, Opiressnig 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.
8. Prokulevich VA, Kudzin KV. [Expression of the open reading frame of PCV2 capsid protein in *E. coli* cells]. In: Pruchkovskaya ON, editor. *Mikrobiye biotekhnologii: fundamental'nye i prikladnye aspekty. Tom 5* [Microbial biotechnology: fundamental and applied aspects. Volume 5]. Minsk: Belaruskaja navuka; 2013. p. 131–141. Russian.
9. 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. DOI: 10.33581/2521-1722-2021-1-48-57.
10. Soon Bin Kwon, Ji Eun Yu, Jihoon Kim, Hana Oh, Chan Park, Jinhee Lee, et al. Quality screening of incorrectly folded soluble aggregates from functional recombinant proteins. *International Journal of Molecular Science*. 2019;20(4):907. DOI: 10.3390/ijms20040907.
11. Ausubel M, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, et al., editors. *Current protocols in molecular biology*. New York: John Wiley & Sons; 2003. 2 volumes. DOI: 10.1002/mrd.1080010210.
12. 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.
13. Ji-Yong Zhou, Shao-Bin Shang, Hui Gong, Qing-Xin Chen, Jian-Xiang Wu, Hui-Gang Shen, et al. *In vitro* expression, monoclonal antibody and bioactivity for capsid protein of porcine circovirus type II without nuclear localisation signal. *Journal of Biotechnology*. 2005;118(2):201–211. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.02.017.
14. 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 optimisation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2011;27:651–657. DOI: 10.1007/s11274-010-0503-7.
15. Peti W, Page R. Strategies to maximise heterologous protein expression in *Escherichia coli* with minimal cost. *Protein Expression and Purification*. 2007;51(1):1–10. DOI: 10.1016/j.pep.2006.06.024.
16. Guoyang Liu, Xuwen Qiao, Chen Chang, Tao Hua, Jichun Wang, Bo Tang, et al. Reduction of postweaning multisystemic wasting syndrome-associated clinical symptoms by virus-like particle vaccine against porcine parvovirus and porcine circovirus type 2. *Viral Immunology*. 2020;33(6):444–456. DOI: 10.1089/vim.2019.0201.
17. Shuanghui Yin, Shiqi Sun, Shunli Yang, Youjun Shang, Xuepeng Cai, Xiangtao Liu. Self-assembly of virus-like particles of porcine circovirus type 2 capsid protein expressed from *Escherichia coli*. *Virology Journal*. 2010;7:166. DOI: 10.1186/1743-422X-7-166.
18. Trundova M, Celer V. Expression of porcine circovirus 2 ORF2 gene requires codon optimised *E. coli* cells. *Virus Genes*. 2007;34(2):199–204. DOI: 10.1007/s11262-006-0043-2.
19. Liu Q, Willson P, Attoh-Poku S, Babiuk LA. Bacterial expression of an immunologically reactive PCV2 ORF2 fusion protein. *Protein Expression and Purification*. 2001;21(1):115–120. DOI: 10.1006/prep.2000.1356.
20. Singh SM, Panda AK. Solubilisation and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2005;99(4):303–310. DOI: 10.1263/jbb.99.303.
21. Kęsik M, Sączyńska V, Szewczyk B, Płucienniczak A. Inclusion bodies from recombinant bacteria as a novel system for delivery of vaccine antigen by the oral route. *Immunology Letters*. 2004;91(2–3):197–204. DOI: 10.1016/j.imlet.2003.12.001.

Получена 18.05.2022 / исправлена 20.06.2022 / принята 20.06.2022.
Received 18.05.2022 / revised 20.06.2022 / accepted 20.06.2022.