

水貂细小病毒 VP2 基因的可溶性表达优化及包涵体蛋白复性研究

朱翔宇^{1,2}, 蔡熙姮¹, 史宁^{1,2}, 王洋^{1,2}, 由海波³, 鲁荣光^{1,2},

闫喜军², 侯金利⁴, 李滋睿¹, 胡博^{1,2*}, 徐超^{1,2*}

(1. 中国农业科学院特产研究所, 吉林长春 130112; 2. 农业农村部经济动物疫病重点实验室, 吉林长春 130112;

3. 吉林农业大学动物科学技术学院, 吉林长春 130118; 4. 辛庄畜牧兽医中心站, 山东烟台 265401)

摘要:为探究水貂细小病毒(MEV)VP2 蛋白的结构和功能,对 MEV VP2 蛋白进行原核表达并纯化,用 ELISA 初步评价重组蛋白在血清学诊断中的价值。通过大肠埃希菌表达外源基因的方法构建 MEV VP2 原核表达体系,经诱导表达得到以包涵体形式存在的目的蛋白,对蛋白进行纯化、透析复性并鉴定;加入分子伴侣 pTf16 质粒构建共表达系统,优化表达条件以提升可溶性目的蛋白的表达量,对表达产物进行纯化及鉴定。将纯化后的可溶性蛋白、复性后的包涵体蛋白及纯化后的全病毒蛋白作为抗原包被酶标板,用间接 ELISA 方法对 MEV 标准阴、阳性血清进行检测,初步对比评价 3 种抗原的血清学诊断价值。结果表明,经过双酶切和测序鉴定,成功构建重组蛋白原核表达载体;重组 VP2 蛋白的分子质量约为 67 ku;优化诱导温度和诱导试剂浓度未能解决包涵体表达问题;构建了共表达系统,优化表达条件后可溶性目的蛋白的表达量得到明显提高;SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定结果表明,两种重组蛋白皆具有良好的反应原性;间接 ELISA 结果表明可溶性表达蛋白更适合作为 MEV 的候选诊断抗原。通过分子伴侣共表达和包涵体蛋白复性的方法获得了大量有活性的目的蛋白,为建立水貂细小病毒血清学诊断方法和制备 MEV 病毒样颗粒(VLPs)及 VP2 蛋白多克隆抗体奠定了基础。

关键词:水貂细小病毒;VP2 基因原核表达;可溶性蛋白;包涵体复性;血清学评价

中图分类号:S852.659.2

文献标识码:A

文章编号:1007-5038(2020)06-0001-06

DOI:10.16437/j.cnki.1007-5038.2020.06.001

水貂细小病毒(Mink enteritis virus, MEV)是引起水貂病毒性肠炎的病原,属于细小病毒科(Parvoviridae)、细小病毒亚科(Parvovirinae)^[1]。细小病毒为无囊膜单链负股 DNA 病毒,基因组全长约 5 kb,病毒基因组包含 2 个主要的开放阅读框(ORF1 和 ORF2),3'端的为 ORF1,编码 DNA 转录与复制所需的非结构蛋白(non-structure protein)NS1 和 NS2,ORF2 位于 5'端,编码组成衣壳结构的结构蛋白(Structure protein)VP1 和 VP2^[2]。MEV 在血清学上与同属的犬细小病毒(Canine parvovirus, CPV)和猫泛白细胞减少症病毒(Feline panleukopenia virus, FPV)存在交叉反应^[3]。细小病毒的中和抗原表位主要位于 VP2 上,VP2 基因全长 1 755 bp,编码 584 个氨基酸,是组成病毒衣壳的主要成分,具有特殊的结构和免疫活性基团,编码细小

病毒的主要抗原决定簇能够诱导机体产生中和抗体,可有效保护易感动物免受细小病毒感染^[4]。

细小病毒各种检测方法的建立和基因工程疫苗的研发也主要依赖 VP2 蛋白。目前,大肠埃希菌(*E. coli*)表达系统是制备重组蛋白应用最广泛的表达系统之一,该系统能够在较短时间内获得基因表达产物,而且所需的成本相对较低廉,但该系统对蛋白质翻译后的修饰功能弱,且外源蛋白常常以包涵体的形式存在。如果需要具有生物学活性的重组蛋白或制备病毒样颗粒(VLPs),需要对包涵体复性,或是利用低温培养、通过引入分子伴侣蛋白 SUMO 的策略促使目的蛋白以可溶性的方式表达,以便重组蛋白组装为正常的折叠结构^[5]。通过对细小病毒 VP2 蛋白结构进行预测后发现,其高分子量和低水溶性的特点使其在原核表达过程中容易聚集生

收稿日期:2019-06-12

基金项目:国家重点研发计划项目(2017YFD0501600)

作者简介:朱翔宇(1995-),内蒙古通辽人,男,硕士研究生,主要从事动物传染病学及其病原分子生物学研究。

*通讯作者

成包涵体^[6-7]。将不同的 MEV VP2 基因截短片段分别与 pProEXHTb 和 pET-32a 载体连接,表达产物为包涵体蛋白^[8-9]。通过对 MEV VP2 基因全长分别与 pET-30a、pET-32a 载体连接进行原核表达,蛋白仍以包涵体的形式存在^[10-12]。张宁^[13]对 MEV VP2 蛋白抗原表位进行分析,决定将 3 个 280 bp 左右的片段分别连接到 pET-32a 载体上,通过低温诱导等条件优化,最终在上清中获得了少量表达的可溶性蛋白,但效果仍不明显。陈胜男^[14]构建了犬细小病毒 GST 融合蛋白载体 pGEX-4T-VP2,这使得上清中 CPV VP2 重组蛋白表达量增加,但效果仍不明显。为解决此问题,徐进^[15]构建了含有 SUMO 标签的犬细小病毒重组 VP2 蛋白载体,低温诱导表达后通过 SDS-PAGE 和 Western blot 证明上清中 CPV VP2 蛋白的量较之前研究提高较大。

分子伴侣蛋白可防止蛋白质在密集细胞环境中发生错误折叠和聚集,在健康和应激细胞中与蛋白质结合从而使其稳定折叠,并在发挥作用后自行离开目的蛋白^[16],这些因素促使其成为了增加原核表达蛋白可溶性的重要手段。因此,本研究通过引入伴侣蛋白重组载体与含 His 标签的 VP2 重组蛋白载体在大肠埃希菌中共表达,并将包涵体复性与之对比进行研究,为建立水貂细小病毒血清学诊断方法、制备 MEV 病毒样颗粒(VLPs)及 VP2 蛋白多克隆抗体奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 病毒及血清 水貂细小病毒 MEVB 株、MEV 标准阴阳性血清、小鼠抗 MEV 腹水单抗、pET-22b(+)载体均由中国农业科学院特产研究所农业农村部经济动物疫病重点实验室保存。

1.1.2 主要试剂及仪器 限制性快速内切酶 *Nde* I、*Xho* I, T4 连接酶、BCA 蛋白定量试剂盒、PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo 公司产品;His 标签蛋白纯化试剂盒(可溶性蛋白)、His 标签蛋白纯化试剂盒(包涵体蛋白),江苏康为世纪生物科技有限公司产品;Ni-NTA His-Band Resin, Millipore 公司产品;Primer STAR Max DNA 聚合酶、分子伴侣 pTf16 质粒、感受态制备试剂盒、DH5 α 感受态细胞、BL21(DE3)感受态细胞,宝生物工程(大连)有限公司产品;Trans2k DNA Marker、Trans15K DNA Marker、DNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、IPTG、Protein Marker,北京全式金生物技术有限公司产品;Anti-6 \times His tag 抗体,Abcam 公司产品;辣根过氧化物酶(HRP)标记

羊抗鼠 IgG(H+L)抗体,Proteintech 公司产品;脱脂乳,BD 公司产品;氨苄青霉素、氯霉素、L-阿拉伯糖,上海生工生物工程技术有限公司产品;HZQ-160 冷冻恒温振荡培养箱,华美生化仪器厂产品;蛋白电泳仪、凝胶成像仪,Bio-Rad 公司产品;紫外分光光度计,Eppendorf 公司产品;Synergy HT 全自动多功能酶标仪,Biotek 公司产品;PCR 仪,Applied Biosystems 公司产品;Heraeus Multifuge X1R Centrifuge 台式离心机,Thermo 公司产品。

1.2 方 法

1.2.1 目的基因及引物合成 参照 GenBank 中发表的 MEVB 株 VP2 基因序列(FJ592174),根据大肠埃希菌密码子偏好性将基因序列进行优化,由上海生工生物工程技术有限公司合成 pUC-MEV-VP2 重组质粒和携带酶切位点的上、下游引物。上游引物 Vp2f: 5'-GCCATATGATGAGT-GATGGAGCAGTTCAA-3';下游引物 Vp2r: 5'-TACTCGAGTTAATATAATTTTCTAGGTGC-3',下划线分别为限制性内切酶 *Nde* I、*Xho* I 的酶切位点。

1.2.2 VP2 基因的扩增与表达载体的构建 利用 PCR 技术从 pUC-MEV-VP2 质粒上扩增 VP2 基因,反应体系总体积为 50 μ L:模板 2 μ L,Primer-STAR Max Permixon 25 μ L,上、下游引物各 1 μ L,加 ddH₂O 至总体积 50 μ L。PCR 扩增程序:98 $^{\circ}$ C 4 min;98 $^{\circ}$ C 10 s,56 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 90 s,共 30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 10 min。反应所得产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定后,用胶回收试剂盒回收目的 DNA 片段。用 *Nde* I 和 *Xho* I 限制性内切酶分别与回收产物和 pET-22b 载体双酶切反应,回收酶切正确的 VP2 基因和载体片段用 T4 连接酶过夜连接,转化到 DH5 α 感受态细胞中,在含有氨苄抗性的平板上涂布过夜,挑取单菌落于含有氨苄抗性的 LB 液体培养基中,提取质粒 DNA 进行酶切鉴定并测序,命名为 pET22b-VP2。

1.2.3 重组蛋白的表达 测序正确的质粒转化到 BL21(DE3)感受态细胞中,在含有氨苄抗性的平板上涂布过夜,将阳性菌落命名为 pET22b-VP2。挑取单菌落于含有氨苄抗性的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养。当 OD_{600 nm} 值达到 0.5~0.7 时,加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG 于 37 $^{\circ}$ C 诱导表达 5 h。4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 20 min,收集菌体后用 PBS 重悬,于冰浴上超声破碎菌体,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min,分别收集上清和沉淀,进行 SDS-PAGE 鉴定重组蛋白 pET22b-VP2 的可溶性。

1.2.4 包涵体的纯化与复性 取超声破碎后的菌体悬液,经 4℃、12 000 r/min 离心 15 min,收集沉淀,按照 His 标签包涵体蛋白纯化试剂盒说明书的步骤进行包涵体蛋白的纯化,最后经 Elution buffer (20 mmol/L Tris-HCl, pH7.9, 500 mmol/L Imidazole, 8 mol/L Urea)洗脱获得较纯的包涵体蛋白,置-80℃保存。使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。复性时将溶于 8 mol/L 尿素的包涵体蛋白溶液稀释到 1 mg/mL,4℃下使用复性缓冲液透析 (50 mmol/L Tris-HCl, pH7.9, 500 mmol/L NaCl, 6 mol/L Urea)3 h,并用磁悬搅拌子低速搅拌,再逐步降低复性缓冲液中尿素的含量:4、2、0 mol/L,其他成分保持不变。

1.2.5 分子伴侣共表达体系的构建及纯化 按照感受态细胞制备试剂盒说明书的步骤,将 pET22b-VP2 制备为感受态细胞,随后将分子伴侣质粒 pTf16 转入到感受态细胞,以含有氨苄青霉素和氯霉素抗性的平板挑选阳性克隆菌落并命名为 pET22b-VP2-Tf16,经鉴定后,扩大培养后冻存于-80℃。按 1:100 的比例接种于含氨苄青霉素、氯霉素和 L-阿拉伯糖的 LB 培养基中,37℃、200 r/min 培养。当 OD_{600 nm} 值达到 0.5~0.7 时,加入 IPTG 到终浓度为 0.2 mmol/L,25℃、160 r/min 诱导培养 16 h,同时设 pET-22b 载体空白对照、未加入 IPTG 的对照及未加入 L-阿拉伯糖的对照。分别收集上清和沉淀,通过 SDS-PAGE 鉴定重组蛋白 pET22b-VP2-Tf16 的可溶性。取超声破碎后的菌体悬液,经 4℃、12 000 r/min 离心 15 min 后,收集上清,按照 His 标签可溶性蛋白纯化试剂盒说明书的步骤进行可溶性蛋白的纯化,最后经 Elution buffer (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9, 500 mmol/L Imidazole)洗脱获得可溶性蛋白,置-80℃保存。使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。

1.2.6 重组蛋白活性检测 对透析前后包涵体蛋白、纯化前后可溶性蛋白进行 Western Blot 分析,一抗为抗 MEV 小鼠腹水单抗及小鼠抗 His 标签单抗,二抗为 HRP 标记羊抗鼠 IgG(H+L)抗体。

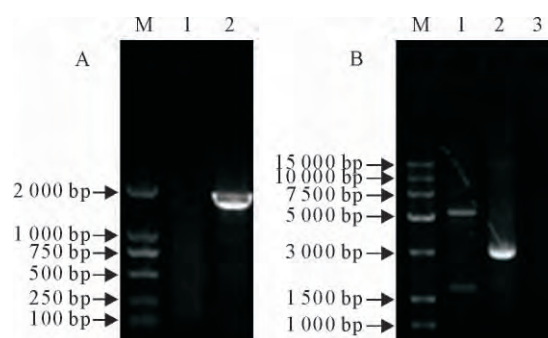
1.2.7 重组蛋白的血清学初步评价 将纯化后的 VP2 可溶性蛋白、复性后的 VP2 包涵体蛋白和纯化后 MEV 全病毒 3 种抗原分别稀释至 10、5、2.5 μg/mL,作为包被抗原于 4℃包被过夜,通过间接 ELISA 方法对 MEV 标准阴、阳性血清进行检测,分析计算结果后对比评价 3 种抗原的血清学诊断价值。

1.2.8 数据统计分析 对 1.2.7 试验所得数据采用 IMB SPSS Statistics 19 软件进行单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 VP2 基因的扩增及重组质粒的构建

以 pUC-MEV-VP2 为模板,对 VP2 基因进行 PCR 扩增,产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定(图 1A),在约 2 000 bp 处有 1 条特异性条带,与重组 VP2 蛋白基因长度相符。通过对阳性克隆质粒的 *Nde* I + *Xho* I 双酶切鉴定,经琼脂糖凝胶电泳显示,在 1 500 bp 和 5 000 bp 附近分别有一条带,与 VP2 基因和 pET-22b 载体长度相符(图 1B)。回收后测序结果表明,获得的 VP2 基因核苷酸序列与 MEV 株 VP2 基因序列同源性超过 99.9%,重组质粒构建成功。



A. 重组质粒 pUC-MEV-VP2 的 PCR 鉴定;M. DNA 标准 DL 2 000; 1. 阴性对照;2. pUC-MEV-VP2

B. 双酶切鉴定;M. DNA 标准 DL 15 000;1. *Nde* I + *Xho* I 的酶切产物;2. pET-22b 空载体对照;3. 阴性对照

A. Identification of recombinant plasmid pUC-MEV-VP2 by PCR;M. DNA Marker DL 2 000; 1. Negative control; 2. pUC-MEV-VP2

B. Identification of recombinant plasmid by double enzyme digestion; M. DNA Marker DL 15 000; 1. Digested products by *Nde* I + *Xho* I; 2. pET-22b vector control; 3. Negative control

图 1 琼脂糖凝胶电泳鉴定结果

Fig. 1 Identification results by agarose gel electrophoresis

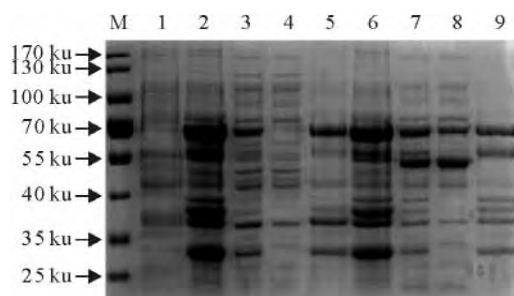
2.2 包涵体蛋白与可溶性蛋白的 SDS-PAGE 分析

如图 2 所示,转化后的重组原核表达质粒 pET22b-VP2 及 pET22b-VP2-Tf16 经 IPTG 诱导表达后,在 70 ku 处可以观察到 VP2 蛋白条带(约 67.5 ku),表明 IPTG 可以成功诱导目的蛋白的表达;重组质粒 pET22b-VP2 表达的蛋白在沉淀中以包涵体形式大量表达,而重组质粒 pET22b-VP2-Tf16 共表达系统的目的蛋白超声破碎后的上清液中 VP2 蛋白表达量明显提高。

2.3 包涵体蛋白和可溶性蛋白的纯化及 Western blot 鉴定

2.3.1 可溶性蛋白纯化 取纯化前后的可溶性蛋

白进行 SDS-PAGE 分析(图 3A),结果表明,通过含 His 标签的镍亲和和柱层析纯化后,得到纯度较高的目的蛋白,经 BandScan 软件分析扫描图像,目的蛋白纯度达到 91.4%。



M. 蛋白分子质量标准;1. pET-22b 空载体对照;2. IPTG 诱导后的 pET22b-VP2 全菌;3. IPTG 诱导前的 pET22b-VP2 全菌;4. 诱导后的 pET22b-VP2 上清;5. 诱导后的 pET22b-VP2 包涵体;6. 诱导后的 pET22b-VP2-Tf16 全菌;7. L-阿拉伯糖诱导后的 pET22b-VP2-Tf16 上清;8. L-阿拉伯糖诱导后的 pET22b-VP2-Tf16 包涵体;9. L-阿拉伯糖和 IPTG 诱导前的 pET22b-VP2-Tf16

M. Protein molecular weight Marker; 1. pET-22b vector control; 2. pET22b-VP2 cells before induction of IPTG; 3. Induced pET22b-VP2 cells; 4. Induced pET22b-VP2 cells lysate; 5. Inclusion body of induced pET22b-VP2 cells; 6. Inclusion body of induced pET22b-VP2-Tf16 cells; 7. Induced pET22b-VP2-Tf16 cells; 8. Induced pET22b-VP2-Tf16 cells lysate; 9. pET22b-VP2-Tf16 cells before induction of IPTG and L-Arabinose

图 2 VP2 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 Analysis of of VP2 fusion protein by SDS-PAGE

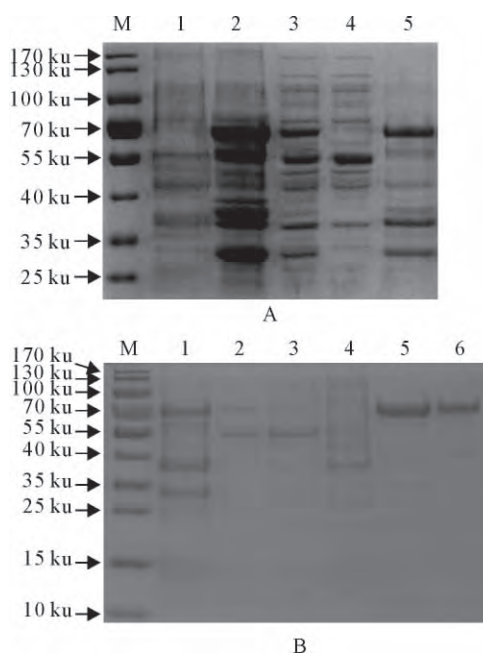
2.3.2 包涵体蛋白的纯化与复性 将梯度透析后的蛋白溶液在 4℃ 下 15 000 r/min 离心 30 min 后,取上清与纯化前后的包涵体蛋白进行 SDS-PAGE 分析(图 3B),结果表明,通过含 His 标签的镍亲和和柱层析纯化后,得到纯度较高的目的蛋白,经 Band-Scan 软件分析扫描图像,目的蛋白纯度达到 93%,并且在梯度透析后,目的蛋白主要存在于上清中。

2.3.3 Western blot 鉴定 经纯化前后的可溶性蛋白及复性前后的包涵体蛋白经 Western blot 检测,在 70 ku 处观察到与预期相符的目的蛋白(图 4),表明目的蛋白正确表达且表达产物均可被 MEV 特异性抗体所识别,具有良好的反应原性。

2.4 间接 ELISA 方法评价

间接 ELISA 方法检测结果表明,3 种抗原在 3 个浓度下均可与 MEV 阳性血清特异性结合。选取 3 种抗原包被浓度均为 5 μg/mL 时的 ELISA 检测结果进行分析,结果显示原核表达的 VP2 蛋白与阳

性血清反应的结果均高于 MEV 全病毒($P < 0.05$),且可溶性蛋白与阳性血清反应的结果高于透析后的包涵体蛋白($P < 0.05$)(图 5)。



A. 可溶性蛋白的纯化;M. 蛋白分子质量标准;1. 空载体对照;2. 诱导后菌体上清;3. 流穿液;4. 洗液;5. 纯化后

B. 包涵体蛋白的纯化与复性;M. 蛋白分子质量标准;1. 诱导后菌体沉淀;2. 流穿液;3. 洗液;4. 透析液;5. 纯化后;6. 透析后

A. Prificaton of soluble proteins; M. Protein molecular weight Marker; 1. pET-22b vector control; 2. Induced pET22b-VP2-Tf16 cells lysate; 3. Flow buffer; 4. Wash buffer; 5. Elution of purification
B. Prificaton and renaturation of inclusion body protein; M. Protein molecular weight Marker; 1. Inclusion body of induced pET22b-VP2 cells; 2. Flow buffer; 3. Wash buffer; 4. Dialysate; 5. Elution; 6. Renatural proteins of purification

图 3 NI-NTA 纯化后 VP2 蛋白的 SDS-PAGE 检测

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of NI-NTA purified VP2 protein

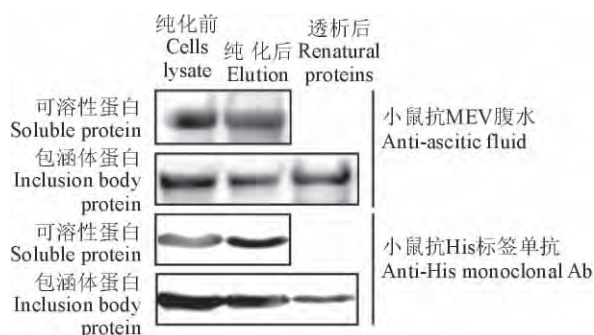


图 4 VP2 蛋白的 Western blot 鉴定

Fig. 4 Western blot identification of VP2 protein

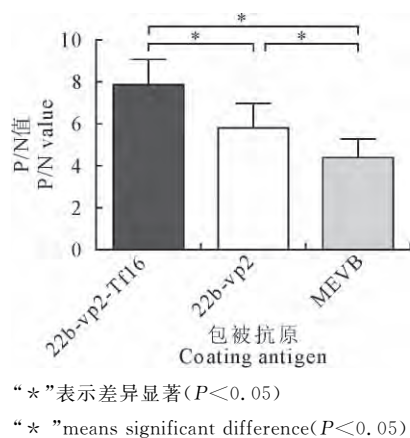


图5 不同包被抗原与MEV阴阳性血清作用结果

Fig. 5 The results of different coating antigen reaction with MEV positive serum and negative serum

3 讨论

根据外源基因表达宿主不同,可以将表达系统分为真核表达系统和原核表达系统,真核表达系统主要包括杆状病毒/昆虫表达系统和酵母表达系统等,原核表达系统主要包括大肠埃希菌表达系统和乳酸菌表达系统等。相对于其他真核表达系统,酵母表达系统具有简单方便、成本低廉及外源蛋白高表达量等优势^[17]。例如,陈蕾等通过马克斯克鲁维酵母表达系统表达CPV VP2蛋白,表达量可达到370 mg/L,远高于Bac-To-Bac表达系统的表达量^[18-19]。原核表达系统中的乳酸菌表达系统逐渐成为活载体疫苗的首选,以乳酸杆菌表达载体研制的口服疫苗可有效激发动植物机体黏膜局部免疫反应和系统免疫反应,因此乳酸杆菌表达载体是一种极具广泛应用前景的抗原递呈载体。段欣强等^[20]将CPV VP2蛋白与pMG36e表达载体相连接并转化至乳酸球菌MG1363中,成功构建重组乳酸菌表达载体,为构建CPV病毒样颗粒口服疫苗提供了理论依据。王建中等^[21]选取的乳酸菌表达载体,将CPV VP2蛋白表达并锚定在乳酸菌表面,并结合靶向树突细胞(DC细胞)的短肽DCpep构建重组乳酸菌,并成功激活了小鼠的体液免疫和黏膜免疫反应。

近年来,已有不少研究人员通过不同表达系统对MEV VP2蛋白进行表达^[8-13,22]。与真核表达系统相比,原核表达系统获得的目的蛋白具有高表达量、纯度高、易纯化等优点,并且在适宜的条件下,大肠埃希菌表达系统获得的VP2蛋白能够通过自组装形成直径、结构与天然病毒粒子相似的VLPs,因此,大肠埃希菌表达系统表达的VP2蛋白具有广泛的应用价值^[7]。但大肠埃希菌表达的目的蛋白多以包涵体形式存在,且蛋白分子质量多比天然VP2蛋

白要大,需要对其复性。本研究对MEV VP2蛋白进行了包涵体复性条件的摸索,并且成功得到了有活性的MEV VP2蛋白。

降低诱导温度和诱导剂浓度不能明显改善目的蛋白的可溶性表达,其表达产物仍主要以包涵体形式存在^[13,20,23]。而分子伴侣可以通过抑制新生肽链不恰当的聚集,保证蛋白质形成正确构象,从而减少包涵体的形成^[16]。原核表达系统中分子伴侣主要包括触发因子(TF)、DnaK/DnaJ/GrpE系统和GroEL/GroES系统,能独立或者通过协同作用促进蛋白正确折叠^[24]。就MEV VP2蛋白而言,pTf16质粒是有效的分子伴侣,可以显著促进MEV VP2蛋白的可溶性表达,但是通过分子伴侣pTf16与目的蛋白共表达得到的可溶性蛋白量仍低于酵母表达系统的表达量。

本研究中,通过分子伴侣共表达以及包涵体复性两种途径均得到有活性的VP2蛋白,为进一步对VP2蛋白的功能和应用研究为建立水貂细小病毒血清学诊断方法、制备MEV病毒样颗粒(VLPs)及VP2蛋白多克隆抗体奠定了基础。

参考文献:

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2版. 北京:科学出版社,1997:1158-1159.
- [2] REED A P, JONES E V, MILLER T J. Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus[J]. J Virol, 1988,62(1):266-276.
- [3] GAMOH K, SENDA M, INOUE Y, et al. Efficacy of an inactivated feline panleucopenia virus vaccine against a canine parvovirus isolated from a domestic cat[J]. Vet Rec, 2005,157(10):285-287.
- [4] SINGH P, DESTITO G, SCHNEEMANN A, et al. Canine parvovirus-like particles, a novel nanomaterial for tumor targeting[J]. J Nanobiotech, 2006,4(1):1-11.
- [5] MOHSEN M O, ZHA L, CABRAL-MIRANDA G, et al. Major findings and recent advances in virus-like particle(VLP)-based vaccines[J]. Semin Immunol, 2017,34(6):123-132.
- [6] 张云霞. 犬细小病毒VP2基因在毕赤酵母中的表达及其间接ELISA方法的初步建立[D]. 北京:中国农业大学,2007.
- [7] XU J, GUO H C, WEI Y Q, et al. Self-assembly of virus-like particles of canine parvovirus capsid protein expressed from *Escherichia coli*, and application as virus-like particle vaccine[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2014,98(8):3529-3538.
- [8] 陈涛,赵建军,张海玲,等. 水貂肠炎病毒VP2基因的原核表达及间接ELISA方法的建立[J]. 中国预防兽医学报,2009,31(9):712-716.
- [9] 钱毓斌. 水貂肠炎病毒灭活苗的研究及VP2基因片段原核表达[D]. 黑龙江哈尔滨:东北林业大学,2012.
- [10] 林鹏,王红梅,王建科,等. 水貂肠炎病毒VP2基因原核表达及鉴定[J]. 经济动物学报,2015,19(3):133-139.
- [11] 王洋,牛登云,刘昊,等. 水貂细小病毒NS1与VP2蛋白的原核表达及免疫原性分析[J]. 中国畜牧兽医,2016,43(6):

- 1630-1634.
- [12] 卞赛赛,梁琳,高雯,等.水貂肠炎病毒 VP2 基因的原核表达及多克隆抗体的制备[J].中国兽医科学,2017(5):597-602.
- [13] 张宁. MEV VP2 截短片段可溶性表达及单克隆抗体制备[D].湖北武汉:华中农业大学,2014.
- [14] 陈胜男.犬细小病毒 VP2 基因的克隆、表达及其重组蛋白的抗原性研究[D].新疆乌鲁木齐:新疆农业大学,2010.
- [15] 徐进.犬细小病毒病毒样颗粒制备及其免疫原性研究[D].四川雅安:四川农业大学,2013.
- [16] HOFFMANN A, BUKAU B, GÜNTER K. Structure and function of the molecular chaperone Trigger Factor[J]. *BBA-Biomembranes*, 2010, 1803(6): 650-661.
- [17] GOMBERT A K, MADEIRA J V, CERDÁN M E, et al. *Kluyveromyces marxianus* a host for heterologous protein synthesis[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(14): 6193-6208.
- [18] 陈蕾,段进坤,朱培霞,等.犬细小病毒病毒样颗粒在马克斯克鲁维酵母中的表达及免疫原性研究[J].复旦学报(自然科学版),2018,57(6):732-739.
- [19] JIN H, XIA X, LIU B, et al. High-yield production of canine parvovirus virus-like particles in a baculovirus expression system[J]. *Arch Virol*, 2016, 161(3): 705-710.
- [20] 段欣强,张洪亮,周保琨,等.犬细小病毒 VP2 基因乳酸菌表达载体的构建及蛋白检测[J].中国兽医杂志,2018,54(10): 15-18,23.
- [21] 王建忠.表面展示犬细小病毒 VP2 蛋白重组乳酸菌的构建及免疫原性评价[C]//中国畜牧兽医学动物微生态学分会第五届第十三次全国学术研讨会论文集.北京:中国畜牧兽医学动物微生态学分会——中国畜牧兽医学,2018:298.
- [22] 倪佳,张蕾,柴秀丽,等.水貂肠炎病毒 VP2 基因在昆虫杆状病毒表达系统中的表达[J].中国畜牧兽医,2011,38(9): 97-100.
- [23] 易立.犬细小病毒的分离鉴定、序列分析及 VP2 基因的融合表达[D].北京:中国农业科学院,2008.
- [24] 南靓靓.犬细小病毒 VP2 蛋白的原核表达及其形成病毒样颗粒的免疫原性研究[D].陕西杨凌:西北农林科技大学,2018.

Optimizing Soluble Expression and Inclusion Body Protein Renaturation of VP2 Protein of Mink Enteritis Virus

ZHU Xiang-yu^{1,2}, CAI Xi-heng¹, SHI Ning^{1,2}, WANG Yang^{1,2}, YOU Hai-bo³,
LU Rong-guang^{1,2}, YAN Xi-jun², HOU Jin-li⁴, LI Zi-rui¹, HU Bo^{1,2}, XU Chao^{1,2}

(1. Institute of Special Wild Economic Animal and Plant Science, Chinese Academy of Agricultural Science, Changchun, Jilin, 130112, China; 2. Key Laboratory of Special Animal Epidemic Disease, Changchun, Jilin, 130112, China; 3. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin, 130118, China; 4. Xinzhuang Veterinary Station, Yantai, Shandong, 265401, China)

Abstract: In order to explore the structure and function of the VP2 protein of Mink enteritis virus (MEV), the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to evaluate the prokaryotic expression and purification of MEV VP2 protein in the value of serological diagnosis in this experiment. The prokaryotic expression system of MEV VP2 was constructed by *E. coli* expression of foreign genes, and the target protein in the form of inclusion body was obtained by induction expression. The inclusion body protein was purified, renatured and identified. The molecular chaperone pTf16 plasmid was added to construct the co-expression system, and the expression conditions were optimized to increase the expression level of the soluble target protein, and the expression product was purified and identified. Three antigens including the purified soluble protein, the renatured inclusion body protein and the purified whole virus protein were used as coating antigens, and indirect ELISA method was used to evaluate the detection values of MEV serum antibodies by three antigens. The results showed that the recombinant plasmid was successfully constructed by double enzyme digestion and sequencing. The molecular weight of recombinant VP2 protein is about 67 ku. Optimization of induction temperature and concentration of induction reagent failed to solve the problem of inclusion body expression. The co-expression system was successfully constructed, and the expression level of soluble target protein was significantly increased after the optimizing conditions. The results of SDS-PAGE and Western blotting showed that the two recombinant proteins have good reactogenicity. The results of indirect ELISA showed that soluble expressed proteins were more suitable for candidate diagnostic antigens for MEV. Conclusion: This experiment obtained a large number of active target proteins by co-expression of foreign genes and molecular chaperone into *E. coli* and renaturation of inclusion bodies, which provided a theoretical basis for the establishment of serological diagnostic methods for MEV. At the same time, it laid a foundation for the preparation of MEV virus-like particles (VLPs) and VP2 protein polyclonal antibodies in the future.

Key words: Mink enteritis virus; prokaryotic expression of VP2 gene; soluble protein; inclusion body renaturation; serologic evaluation