

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/42

C07K 14/09

G01N 33/53



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 03100579.9

[45] 授权公告日 2005 年 6 月 1 日

[11] 授权公告号 CN 1204256C

[22] 申请日 2003.1.20 [21] 申请号 03100579.9

[71] 专利权人 甘肃亚盛盐化工业集团有限责任公司

地址 730030 甘肃省兰州市城关区张掖路 219 号

[72] 发明人 周长生 张 勇 陶 玲 陈正华
审查员 孙俊荣

[74] 专利代理机构 甘肃省专利服务中心

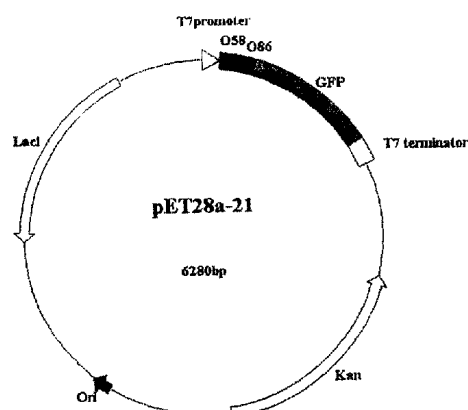
代理人 田玉兰

权利要求书 1 页 说明书 15 页 附图 1 页

[54] 发明名称 用重组口蹄疫疫苗基因表达蛋白建立检测罹病牲畜口蹄疫病毒抗体的技术

[57] 摘要

本发明涉及用一种口蹄疫病毒 (Foot and mouth disease virus, FMDV) 重组基因表达的蛋白检测罹病牲畜 FMDV 抗体技术。其特征在于利用体外重组技术克隆或合成具有 SEQ ID NO1 的核苷酸序列的 FMD 疫苗基因, 使其在一定表达载体系统中高效表达, 产生具有免疫原性的蛋白。经免疫印迹 (Western - blotting) 分析, 其表达蛋白产物能被 FMDV 阳性血清所识别, 显示该蛋白具有免疫学活性, 从而可用该重组蛋白作为具有免疫原性的抗原来代替传统的使用病毒转染细胞制备的抗原, 这样便可避免传统检测 FMDV 抗体中制备免疫抗原时容易发生的病毒扩散的危险性, 因而更加安全, 而且价格低廉。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种重组口蹄疫疫苗基因，具有 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列。
2. 一种根据权利要求 1 所述重组口蹄疫疫苗基因编码的口蹄疫重组抗原蛋白。
3. 一种生产如权利要求 2 所述口蹄疫重组抗原蛋白的方法，其特征在于利用权利要求 1 所述的重组口蹄疫疫苗基因，构建原核表达载体，导入生产性宿主菌中，使转化菌种中的重组基因表达为蛋白，经蛋白纯化，得到具有免疫原性的口蹄疫重组抗原蛋白。
4. 一种利用权利要求 2 所述口蹄疫重组抗原蛋白检测口蹄疫病毒抗体的方法，其特征在于以表达产物纯化后的重组抗原蛋白，经 Western-blotting 分析筛选阳性产物，以此阳性产物作为免疫性抗原，建立 Dot blot ELISA 或间接 ELISA 酶联免疫检测口蹄疫病毒抗体的方法。

用重组口蹄疫疫苗基因表达蛋白建立检测 罹病牲畜口蹄疫病毒抗体的技术

1. 技术领域

本发明涉及口蹄疫罹病牲畜病毒抗体的检测技术，特别是涉及无口蹄疫病毒参与的检测方法。用一种口蹄疫病毒（FMDV）重组疫苗基因表达的蛋白检测罹病牲畜 FMDV 抗体的技术。即用体外重组技术克隆或合成 FMD 疫苗基因，使其在所构建的表达载体系统中高效表达，产生具有免疫原性的蛋白。经免疫印迹（Western - blotting）分析，表达蛋白如显示具有免疫学活性，从而可用该重组蛋白作为抗原来代替传统的使用病毒转染细胞制备的抗原，这样可能避免传统检测 FMDV 抗体中制备免疫抗原发生的病毒扩散的危险性，而且价格低廉。

2. 背景技术

1、口蹄疫（Foot and mouth disease, FMD）是由口蹄疫病毒（Foot and mouth disease virus, FMDV）感染引起的偶蹄类动物共患的一种急性、烈性传染病，以流行广、传播快、发病率高而著称（殷震，刘景华，动物病毒学[M]. 第2版. 北京：科学出版社，1997）。由于猪、牛、羊等主要家畜均可感染此病并形成全球规模流行，危害性、破坏性极大，故被联合国粮农组织和国际兽医局（IEO）列为必须报告和互相通报、采取措施共同防范的16种A类传染病之首（Wong H T, Cheng S C, Chan E W, *et al*, Virology, 2000 Dec 5, 278(1): 27-35.; Chan E W, Wong H T, Cheng S C, *et al*, Vaccine, 2000, 19(4-5): 538-546.）。口蹄疫的危害性很大，可严重影响畜牧业生产和动物及其产品的国际贸易，给国民

经济造成巨大的损失，故有“政治经济病”之称。由此可知控制和消灭该病的前提一口蹄疫的快速检测就显得尤为重要。最初检测和鉴定 FMDV 的方法是动物交叉感染试验，随着实验动物（主要是豚鼠和乳鼠）和细胞培养在病毒研究中的应用，建立了许多种 FMDV 的检测方法，包括补体结合试验、中和试验、凝集试验等（Chan E W, Wong H T, Cheng S C, *et al* , Vaccine, 2000, 19(4-5):538-546. ; De prat-Gray G. , Arch Biochem Biophys , 1997, 34199(2):360-369)。近年来，随着 FMD 研究的深入，其诊断技术也有了一定的发展（Kupper H, Keller W, Kerz C, *et al* . , Nature, 1981, Feb. 12, vol. 289:555-559. ; Suryanarayana V V S, *et al* . E. Coli , Arch Virol, 1999, 144:1701-1712. ; Carland A J. , Vaccine , 1999, Mar 26:17(13-14):1760-1766. ; Barnett PV, Samuel AR, Statham RJ. , Vaccine, 2001, 19(15-16):2107-2117.)。

目前，我国对牲畜 FMDV 抗体检测的方法中，抗原制备均采用病毒接种细胞培养物制备免疫抗原的途径。这样就存在病毒扩散的危险，并且用于检测的抗原和抗体的获得均需花费很大的人力、物力和财力，还要在密闭的严格的隔离区进行，因而检测试剂盒非常昂贵（Volpina O M, Yarov A V, Zhmak M N, *et al* . , vaccine, 1996, 14(14):1375-1380.)。

经检索，我国专利申请 CN1354674A 公开了一种“用于口蹄疫的合成肽疫苗”，其主要涉及一种肽组合物作为免疫原的应用，……，用于预防 FMDV 感染和根除口蹄疫，以及含有一种或多种该肽的免疫分析和 / 或诊断试剂盒。该申请涉及到口蹄疫病毒 VP1 衣壳蛋白的目标抗原位点第 134~168 片段，以这一片段含有一种 T 细胞表位，能诱导 FMDV 专一性的 T 细胞反应为基础，从其免疫构象入手，建立了笼统的模型和合成抗原文库，但未对口蹄疫 VP1 蛋白的 cDNA 序列进行具体的修饰和改造。

其检测方法评价的是目标抗原肽作为免疫原（疫苗）中和 FMDV 活性的血

清学的反应性，得到的也只是“对于抗 FMDV 感染的保护性免疫是高度可预测的”的笼统结果。从其鉴定已知免疫学状态的畜群的反应性的 ELISA 结果来看，该申请所述方法很难使本领域的普通技术人员诊断出哪些牲畜感染了口蹄疫病毒。

为了弥补现有技术的不足，迫切需要一种简单易行、效果确切、成本低廉的 FMDV 抗体的检测技术。

3. 发明内容

本发明的一个目的是提供一种重组口蹄疫多肽基因所表达的蛋白，且该蛋白可作为免疫原性抗原用于检测口蹄疫病毒。

本发明的另一个目的是提供利用此类具有免疫原性的抗原检测口蹄疫病毒的改进的酶联免疫法（ELISA）。

研究表明 FMDV VP1 功能区包含 FMDV 的主要抗原位点，特别是在位点 1，即第 141～160 和 200～213 位氨基酸残基组成 FMDV 的主要抗原区，能诱导动物产生中和抗体。我们利用基因工程的方法构建了 FMDV VP1 编码基因的第 141～160 和 200～213 位氨基酸多肽疫苗基因，在原核系统中进行表达，进一步纯化表达产物，以这种表达蛋白的免疫原性进行了免疫印迹分析，建立了 O 型口蹄疫病毒抗体的快速诊断方法。同时，本方法的建立又对进一步研究 FMDV 结构蛋白 VP1 的结构和功能以及新型疫苗的研制十分有帮助。

根据研究结果，我们认为该检测方法适用范围广，它不仅可以检测单一型的口蹄疫病毒（比如 O 型）抗体，而且还可以通过构建表达其它型（例如 A、C 等型）及多价的口蹄疫病毒重组抗原蛋白用于不同血清型的检测。

本发明还提供了一种利用口蹄疫疫苗基因工程产品为抗原检测口蹄疫病毒的改进的酶联免疫法，包括间接酶联免疫法（Indirective ELISA）、斑点酶联

免疫法 (Dot blot ELISA 法)。该方法包括:

(1) 设计与合成 O 型口蹄疫病毒 VP1 编码基因的第 141~160 和 200~213 位氨基酸多肽片段, 将其与绿色荧光蛋白 (GFP) 串连后与一种载体相连, 构建原核表达载体;

(2) 将所构建的表达载体导入生产型宿主菌中高效表达, 并且纯化后经 Western blotting 分析筛选阳性产物;

(3) 以此阳性产物为免疫原性抗原建立间接和斑点酶联免疫法。

由于 ELISA 的聚苯乙烯微量反应板 (简称酶联板) 比较昂贵且不宜反复使用, 并需在酶联仪上测读, 应用受到限制。Dot blot ELISA 法是以硝酸纤维素膜 (也可用混合纤维素膜) 代替酶联板, 价钱便宜, 重复性好, 具有较高的敏感性, 有更强的结合抗原的能力, 且有所需样品少、白色背景容易用目测分辨阳性和阴性结果、适合于基层和野外操作等优点。

建立 FMD 检测的诊断方法, 就要考虑用何种方法大量生产诊断抗原。本发明应用分子生物学技术, 成功地合成了 FMDV VP1 基因中具有免疫原性的多肽片段, 并将其亚克隆入表达载体 pET-28a 中, 转化大肠杆菌 BL21 菌株, 使合成的多肽疫苗基因与绿色荧光蛋白 (Green fluorescence protein, GFP) 基因形成融合基因, 表达出了融合蛋白, 纯化后经聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分析, 得到了一条分子量为 30 KD 的特异性蛋白带。Western blotting 分析表明该蛋白能与 FMDV 阳性血清发生反应, 说明表达产物具有较好的免疫原性。这为建立以口蹄疫基因工程产品为抗原, 检测 FMDV 抗体技术提供了材料, 为发展我国拥有自主知识产权的 FMDV 诊断技术奠定了基础。

4. 附图说明

图 1. O 型口蹄疫多肽与 GFP 融合基因构建的原核表达载体

5. 具体实施方式

实施例 1. 重组 O 型口蹄疫多肽疫苗融合基因构建及测序

将 O 型口蹄疫多肽疫苗基因（由 BioAsia 上海博亚生物技术有限公司根据 O 型病毒的 058（GeneBank 号：FDI 141469）序列和 086 病毒株（GeneBank 号：FDI141468）的 VP1 蛋白的第 140-160 氨基酸和 200-213 氨基酸组成的多肽，即 058 型和 086 型病毒的 VP1 蛋白的 20 肽、14 肽相串联起来的多肽合成）构建到原核表达载体 pET-28a 中（Novagen 公司）并测序，以确认基因构建的正确性，将 O 型口蹄疫多肽疫苗基因（200bp）片段经酶切后与酶切的绿色荧光蛋白基因（GFP）相连接于 pET-28a 中，形成融合基因。

1. 提取 pEGFP-N1（含 GFP 基因，来自 CLONTECH Laboratories Inc）和 pET-28a 质粒：

按 Sambrook 等（1989）碱法制备 pET-28a 和 pEGFP-N1 质粒

（1）随机挑取大肠杆菌 BL21 的单菌落（已导入目的质粒），分别接种于 3 mL 含卡那霉素 100 mg/L 的 LB 细菌培养基（酵母提取物 5 g/L，胰蛋白胨 10 g/L，NaCl 10 g/L，pH 7.0）中 37℃ 摇动过夜。

（2）在 1.5 mL 的 Eppendorf 管中，12000 rpm 离心 2 min，重复一次，收集 3 mL 菌体。

（3）加入 100 μ L 溶液 I（25 mmol/L 葡萄糖，25 mmol/L Tris.Cl，pH 8.0，10 mmol/L EDTA），震荡均匀。

（4）加入 200 μ L 溶液 II（0.2 mmol/L NaOH，1% SDS），颠倒离心管数次混合内容物，放置冰上 3 min。

（5）加入 150 μ L 溶液 III（5 mmol/L 醋酸钾 60 mL，冰醋酸 11.5 mL，蒸馏水 28.5 mL），混合均匀，放置冰上。

（6）12000 rpm 离心 10 min，取上清移至新的 Eppendorf 管中。

(7) 加入等体积酚：氯仿 (1:1)，充分混合，12000 rpm 离心 5 min，取上清。

(8) 加入 1/10 体积 3 mol/L 醋酸钠 (pH 5.2) 和两倍体积预冷的无水乙醇，-20℃放置 30 min。

(9) 离心弃上清，冰预冷的 70 %乙醇洗沉淀两次，充分吹干。

(10) 加入 50 μL TE (pH 8.0)，溶解 pET-28a 和 pEGFP-N1 质粒 DNA，以待下一步连接之用。

2. 绿色荧光蛋白基因 (GFP 基因 750bp 大小) 的获得：

以 pEGFP-N1 (内含 GFP 基因，已成为一种商品化的基因，来自 CLONTECH Laboratories Inc.) 为模板、利用下列引物，进行 PCR 扩增，扩增出 GFP 基因。

EcoRI

5' GCTGAATTCATGAGTAAAGGAGAAGAACTT

SaII

5' GCGGTCGACTTATTATTTGTATAGTTCAT

PCR 反应体系：10XPCR 缓冲液 5μL，10 mM dNTP 4μL，Pfu DNA 聚合酶 2U，引物 1 (30 ng/μL) 2μL，引物 2 (30 ng/μL) 2μL，pEGFP-N1 质粒 DNA 0.1μL，加水到总体积至 50μL，上述成份均加入到 0.5 mL PCR 管，混均后覆盖一层无菌石蜡油 (20-30μL)。

PCR 程序为：95℃预变性 5 min；然后 94℃变性 1 min，65℃复性 1 min，72℃延伸 3 min，循环 25 次。反应结束后取 10μL PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

对扩增产物进行酚/氯仿抽提纯化。

(1) 加入等体积酚：氯仿 (1:1)，充分混合，12000 rpm 离心 5 min，取

上清。

(2) 加入 1/10 体积 3 mol/L 醋酸钠 (pH 5.2) 和两倍体积预冷的无水乙醇, -20℃放置 30 min。

(3) 离心弃上清, 冰预冷的 70 %乙醇洗沉淀两次, 充分吹干, 得到 GFP 基因的 PCR 产物片段。

3. 口蹄疫多肽疫苗基因 (200bp 大小) 的获得

根据 O 型病毒的 058 (GeneBank 号: FDI 141469) 和 086 (GeneBank 号: FDI141468) 序列的编码 VP1 蛋白的第 140-160 氨基酸和 200-213 氨基酸的核苷酸序列 (杨永钦等, 1997; Dus Santos MJ, 2002), 由 BioAsia 上海博亚生物技术有限公司合成 O 型口蹄疫多肽疫苗基因, 即编码 058 型和 086 型病毒的 VP1 蛋白的 20 肽、14 肽相串联起来的多肽的核苷酸序列, 获得 O 型口蹄疫多肽疫苗基因 (200bp 大小)。

4. 融合基因的构建及克隆:

(1) 片段及质粒酶切

将上海博亚生物技术有限公司合成的 O 型口蹄疫多肽疫苗基因片段的 PCR 产物经检测大小为 200bp, 即与预期的口蹄疫多肽疫苗基因大小相符合, 初步表明它是合成的口蹄疫多肽疫苗基因。用限制性内切酶 *Nco*I 和 *Eco*RI 酶切。

然后再将 GFP 基因 (为 750bp) 扩增产物用限制性内切酶 *Eco*RI 和 *Sa*II 酶切。

将质粒 pET-28a 利用限制性内切酶 *Nco*I 和 *Sa*II 酶切。

(2) 片段电泳回收

为将上述 O 型口蹄疫多肽疫苗基因 PCR 扩增后酶切的片段及绿色荧光蛋白基因 PCR 扩增后酶切的片段进行连接, 从电泳的凝胶上切下这些片段, 利用玻璃奶回收试剂盒进行。其中合成 O 型口蹄疫多肽疫苗基因扩增后酶切片段为 200bp 大小, GFP 基因扩增后酶切片段约为 750bp 大小。

(3) 连接

将上述合成的 O 型口蹄疫多肽疫苗基因扩增后酶切片段和 GFP 基因的扩增后酶切片段及进行了 *Nco*I 和 *Sa*I 酶切的 PET-28a 各取 1 μ L 加入无菌的 0.5 mL 小离心管中, 加入 3 μ L 连接缓冲液 I (大连宝生生物公司) 及 T4DNA 连接酶混匀, 放于 -16°C 连接过夜, 得到合成的 O 型口蹄疫多肽疫苗基因片段和 GFP 基因的连接产物。

(4) 转化

(a) 转化用感受态大肠杆菌的制备:

挑取 BL21 的单菌落于 10 mL 液体 LB 培养基中, 37°C 250 rpm 培养过夜。

取 1 mL 培养菌液加到 100 mL 新鲜 LB 培养基中, 37°C 300 rpm 培养 3 h 左右至 OD_{600} 值为 0.5-0.6。

冰浴菌液 30 min, 4°C 6000 rpm 离心 5 min, 收集菌体。

弃掉上清, 加入 10 mL 冰浴无菌的 0.1 mol/L CaCl_2 溶液中悬浮菌体细胞, 冰浴 15 min。

4°C 6000 rpm 离心 5 min。

弃掉上清, 将菌体重悬于 2 mL 0.1 mol/L CaCl_2 溶液中。

分装到预冷的 1.5 mL 无菌 Eppendorf 管中 (200 μ L/管), 加入 15 % 的无菌甘油于 -70°C 贮存备用。

(b) 大肠杆菌的转化:

将 O 型口蹄疫多肽疫苗基因片段和 GFP 基因的连接产物通过热激法转化感受态大肠杆菌 BL21。

取 1 μ L 的 O 型口蹄疫多肽疫苗基因片段和 GFP 基因的连接产物加到 200 μ L BL21 感受态细胞溶液中, 混匀后, 冰浴 30 min。

42°C 水浴热激 90 sec, 立即置冰浴中 1-2 min。

加入 800 μ L LB 液体培养基, 37°C 150 rpm 摇床培养 1 h。

在 Kan (100 mg/L) LB 固体平板上, 涂布 40 μ L X-gal (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 和 4 μ L

IPTG (200 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 溶液。

从 1 mL 转化菌液中取 100 μL 菌液涂布于平板上，风干。

37℃培养 16 小时，平板上出现兰色和白色菌落，挑取白色菌落进行重组克隆的鉴定。鉴定结果表明，带有目的基因的原核表达载体已导入到生产型原核表达宿主菌 BL21 中，将其命名为 pET28a-21（见图 1）。

5. 转化子鉴定：

（1）电泳法鉴定

按常规碱裂解法提取转化菌落的质粒 pET28a-21，通过电泳确定质粒的大小，提取的质粒大于原始的 PET-28a 质粒，为克隆有目的基因的候选质粒（比对照质粒增大）。

进一步用限制性内切酶 *Nco*I 和 *Eco*RI 酶切进行验证，电泳检测切出片段在 200bp 的为含有 O 型口蹄疫多肽疫苗基因片段的质粒 pET28a-21。

（2）测序法鉴定

将含有 pET28a-21 质粒的菌株用甘油管保存，并交测序公司测序，测序引物为 PET-28a 质粒上的 T7 启动子区的引物，即 T7 引物。得到 SEQ ID NO 1 所示的核苷酸序列，表明目的基因已正确插入表达载体 pET28a(Novagen) 中。其中下划线区域为 058 多肽的编码区（正体是第 140—160 序列 20 肽，斜体是第 200—213 序列 14 肽），方框区域为 086 多肽编码区（正体是第 140—160 序列 20 肽，斜体是第 200—213 序列 14 肽），黑色小写为 PET 载体的序列，其余为 GFP 基因的序列。所构建的原核表达载体见图 1。

实施例 2. 原核表达产物免疫原性的检测

首先将构建好的 pET28a-21 原核表达载体进行诱导表达并进行蛋白纯化（方法按 pET 技术说明书（Novagen 公司）进行），然后检测口蹄疫多肽疫苗及绿色荧光蛋白的融合基因的表达产物的免疫原性。

1. 蛋白纯化

(1)将含有 pET28a-21 的大肠杆菌 BL21 经 IPTG 诱导后培养液在 4℃、6500 g 条件下离心 15 min, 以收集菌体, 去上清 (大肠杆菌 IPTG 诱导培养方法参照 Sambrook 的[分子克隆])。

(2)用原培养液 1/10 体积的 1XIB 缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 10 mmol/L EDTA, 1% TritonX-100) 重悬沉淀。

(3)溶菌酶加超声裂解: 加入溶菌酶至终浓度 100 μ g/mL, 30℃放置 15 min。搅拌后将样品缓冲液置于冰浴中, 利用超声仪 (国产新芝牌), 200-300W 功率, 按 1 秒钟超声, 3 秒种间隔的方式进行 60-90 次。

(4) 加入蛋白酶抑制剂 (PSMF)。

(5) 在 4℃下, 10000 g 离心 10 min。

(6) 去上清, 用原培养液 1/10 体积的 1XIB 缓冲液重悬沉淀。

(7) 重复步骤 (6)。

(8) 重复步骤 (6), 将悬液移入已知重的离心管中。

(9) 4℃ 10000 g 离心 10min。彻底去上清。称重, 计算产量。

2. SDS-PAGE 电泳

SDS-PAGE 电泳检测: 对上述表达产物按常规方法进行 SDS-PAGE 电泳, 分离胶浓度 8%, 考马斯亮兰 R-250 染色, 甲醇-乙酸脱色。

结果表明, 上述纯化蛋白大小大于 30KD, 即大于 GFP 蛋白的大小, 初步确认是含有 pET28a-21 的大肠杆菌表达的含有 O 型口蹄疫多肽疫苗基因和 GFP 基因融合表达的目的蛋白。

3. Western blotting 分析

溶液的配制

(1) 电转移缓冲液: 含 39mmol/L 甘氨酸, 48 mmol/L Tris • HCL (pH 6.8), 0.37% SDS, 20%甲醇;

配制 1000mL: 称取甘氨酸 2.9g, Tris 碱 5.8g, SDS 0.37g, 溶解于 750mL 重蒸水后, 加入 200mL 甲醇, 定容至 1000mL。

(2) 洗液溶液: 150mmol/L NaCl, 50mmol/L Tris·HCl pH7.5;

(3) 封闭液: 10mL PBST+0.3g BSA;

(4) 0.5%氨基黑 10B 染液: 称取氨基黑 10B 0.5g, 加入甲醇 45mL, 冰乙醇 10mL, 重蒸水 45mL;

(5) 氨基黑漂洗液: 45 mL 95%的乙醇, 5mL 冰乙酸, 50 mL 无离子水;

(6) 底物溶液 (30mL): 30mL PBST 中溶解 15mg 的 DAB (二氨基联苯胺) 和 9mg CoCl_2 , 再加入 10 μL 30% H_2O_2 。

电转移

(1) 戴上手套, 剪 6 张与上述检测口蹄疫多肽疫苗及绿色荧光蛋白基因融合表达产物的 SDS-PAGE 电泳凝胶 (用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法, 分离胶浓度 8%) 大小一致的滤纸及一张 NC 膜, 并用转移缓冲液浸泡 3-5 min。

(2) 依次将海绵、滤纸 3 张、上述凝胶、NC 膜、滤纸 3 张、海绵放好, 然后用筛孔板固定好, 插入电转移槽中, 加入转移缓冲液, 确定凝胶在阴极, NC 膜在阳极方向。接通电源, 电压为 50-100V, 4℃下电泳 2-3 h。

(3) 电转移完毕, 取出经过电转移的 NC 膜, 用铅笔或剪去一角以标记膜的方向。切下标准分子量 Marker, 置氨基黑染液浸染 5 min, 取出后用漂洗液脱色, 直至蓝色背景脱尽。其余 NC 膜用 PBS 冲洗, 加 10mL 封闭液浸泡, 室温震荡 1-3h, 以封闭未吸附蛋白质的位点。

免疫学检测

(1) 封闭结束后, 将经过电转移的 NC 膜用 PBS 漂洗液漂洗 4-5 次, 每次 5min。

(2) 将经过电转移的 NC 膜转至一塑料袋内, 加入 PBST 1:800 稀释的口蹄疫病毒阳性血清 10mL (0.1mL/cm²), 封口。37℃ 轻微震荡结合 1.5 h, 用 PBST

冲洗 4—5 次，每次在摇床缓慢摇动。然后加入 1: 800 稀释的兔抗猪 IgG（二抗），室温下轻摇孵育 1h，取出用 PBST 冲洗 3—4 次，每次 10 min。以除去未结合的二抗。

（3）将经过电转移的 NC 膜转入到底物溶液，室温避光轻摇 5-10 min，观察显色情况，等出现条带时，立即转入 PBST 缓冲液终止反应。室温保存，照相。

4. 结果

经 Western blotting 分析，纯化蛋白能被口蹄疫阳性血清所识别，证明表达产物具有免疫学活性。可以作为免疫性诊断抗原。

实施例 3. 用重组口蹄疫多肽疫苗基因表达蛋白检测口蹄疫病毒抗体

1. 用 Dot blot ELISA 法检测 O 型口蹄疫病毒抗体

用 Dot blot ELISA 法检测口蹄疫病毒, 方法简单、快捷, 无需昂贵的设备。是一种易于普及的方法。其程序如下:

（1）将硝酸或醋酸纤维素膜用打孔机间隔一定距离打 5mm 孔径的孔痕。

（2）用制备缓冲液按 1: 10—1: 3 (w/v) 用量稀释纯化抗原（即口蹄疫多肽疫苗与绿色荧光蛋白的融合基因表达蛋白），滴在圆孔中央，每孔加 1 滴（约 2—4 μ L），自然干燥后，于封闭液（含 0.25%BSA 的 PBST）中浸泡 30 min。

（3）取出膜置于室温下干燥。再浸入适当稀释的被检血清中，室温浸泡 1h。

（4）将膜置于 PBST 中轻微荡洗 3 次，每次 3 min。

（5）用稀释液过氧化物酶（HRP）标记的抗种属动物的球蛋白抗体结合物适当稀释，并将膜于此液中浸泡 1.5 h，同步骤（4）洗涤，于邻苯二胺底物溶液中浸泡 5—15 min 显色，用蒸馏水漂洗 2 min 终止反应。试验时须设阴性血清、阳性血清及空白三种对照。

(6) 结果判定：出现颜色判阳性，无色为阴性。

2. 用间接 ELISA 法检测 O 型口蹄疫病毒抗体

器材

酶标仪，96 孔酶标板，滤纸，恒温培养箱

试剂

(1) 包被缓冲液：0.05mol/L 碳酸盐缓冲液，pH9.6

(2) 洗涤液：0.02mol/L PBST 缓冲液，pH7.4

(3) 封闭液：称取 1g BSA 溶于 0.01mol/L PBST 缓冲液中。

(4) 抗原：即口蹄疫多肽疫苗及绿色荧光蛋白的融合基因表达蛋白

(5) 酶结合物：即 HRP 标记的抗种属动物的球蛋白抗体（亦称第二抗体）。

(6) 底物溶液：为含有邻苯二胺（Orth-Phenyenediamine, OPD）的 pH5.0 磷酸盐—柠檬酸缓冲液。0.2M20 μL 0.5mol/L H₂O₂ 磷酸氢二钠（28.4g/L）溶液 25.7mL 加 0.1M 柠檬酸（19.2g/L）溶液 24.3 mL 和蒸馏水 50mL。临用前取上述缓冲液 100mL 加 40mg OPD, 再加 30%过氧化氢（H₂O₂）0.15mL。

(7) 终止液：0.5mol/L H₂SO₂

材料 待测血清

步骤

(1) 包被：在酶标板内每孔中加入 100 μL 溶于包被液的抗原（即重组表达的蛋白）溶液（1-5ng/mL），4℃过夜或 37℃温育 3h。

(2) 洗涤：弃去包被液，用 PBST 洗 3 次，每次 200μL。扣干 PBST 清洗液。

(3) 封闭：每孔中加入封闭液 200 μL，37℃温育 30min。

(4) 洗涤：同步骤 2。

(5) 加样：每孔加入用稀释液（PBST）稀释的待测血清 100μL，置于 37℃ 1h。每块板同时设阴性、阳性血清对照、试剂空白对照。

(6) 洗涤：同步骤 2。

(7) 加入酶结合物：每孔加入 100 μ L 酶结合物，37℃放置 1h。

(8) 洗涤：同步骤 2。

(9) 显色：每孔加入底物溶液 100 μ L，盖上酶标板盖，室温放置 15min。

此时阳性对照应呈绿色。

(10) 终止反应每孔加入 50 μ L 2mol/L H_2SO_4 ，轻轻摇动酶标板，终止反应。

(11) 在酶标仪上测定波长 490nm 下的光密度值。

(12) 绘制标准曲线，从中查出待测样品的浓度，计算样品含量。以被检样品 OD 值>阴性对照平均 OD 值加 2—3 个标准差作为阳性结果的阈值。被检样品 OD 值>阈值为阳性，<阈值为阴性。

SEQ ID NO 1 的信息

序列特征：

(A) (长度)：952 个碱基对

(B) 类型：核酸

(C) 链性：双链

(D) (拓扑结构)：线性

序列描述：SEQ ID NO 1:

```
attccccctctagaaataattttgtttaactttaagaaggagatataccATGGTGACCAAAGTGAGAGGCGATCTGCAGGTGCTGGCGCAG
AAAGCGGCACGCTCTCTGCCGAGACATAAACAGAAGATTGTGGCACCAGGCAAACGCCCTGCTGGTGAGCAACGTGAGAGGCGATCTGCCA
GTGCTGGCGCAGAAAGCGGAAAGAGCGCTGCCGAGACATAAACAGAAGATTGTGGCACCAGCAAACAACCTGCTGGAATTCATGAGTAAA
GGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCAGTGAGAGGGT
GAAGGTGATGCAACATACGGAAACTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAACTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACT
TTCATTATGGTGTTCATGCTTTTCAAGATACCCAGATCATATGAAACGGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTC
AGGAAAGAACTATATTTTCAAAGATGACGGGAACTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCNTTGTTAATAGAATC
GAGTTTAAAAAAGGTATTGGATTTTAAAGAAGATGGGGAACCATTTTTTGGGACACAAAAATTGGAATACAACCTATTAACCTCACA
```

CCAATGGTATNACATTCATTGGCAAGACNAAAACAAT

其中有下列划线区域为 058 多肽的编码区（正体是第 140—160 序列 20 肽，斜体是第 200—213 序列 14 肽），方框区域为 086 多肽编码区（正体是第 140—160 序列 20 肽，斜体是第 200—213 序列 14 肽），黑色小写为 PET 载体的序列，其余为 GFP 基因的序列。

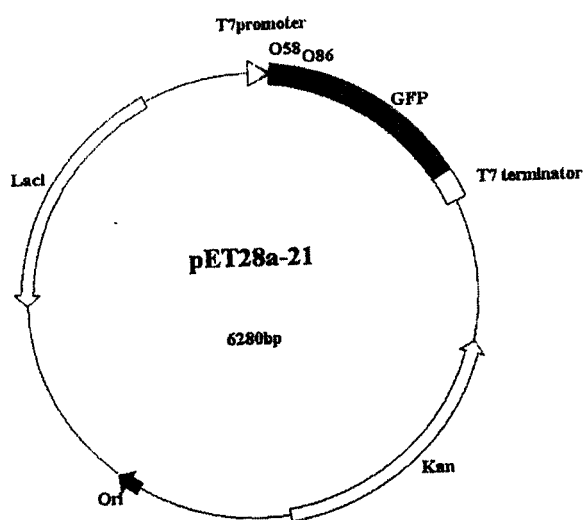


图 1

专利名称(译)	用重组口蹄疫疫苗基因表达蛋白建立检测罹病牲畜口蹄疫病毒抗体的技术		
公开(公告)号	CN1204256C	公开(公告)日	2005-06-01
申请号	CN03100579.9	申请日	2003-01-20
[标]申请(专利权)人(译)	甘肃亚盛盐化工业集团有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	甘肃亚盛盐化工业集团有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	甘肃亚盛盐化工业集团有限责任公司		
[标]发明人	周长生 张勇 陶玲 陈正华		
发明人	周长生 张勇 陶玲 陈正华		
IPC分类号	C07K14/09 C12N15/42 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/68		
代理人(译)	田玉兰		
其他公开文献	CN1467297A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及用一种口蹄疫病毒(Foot and mouth disease virus, FMDV)重组基因表达的蛋白检测罹病牲畜FMDV抗体技术。其特征在于利用体外重组技术克隆或合成具有SEQ ID NO1的核苷酸序列的FMD疫苗基因,使其在一定表达载体系统中高效表达,产生具有免疫原性的蛋白。经免疫印迹(Western-blotting)分析,其表达蛋白产物能被FMDV阳性血清所识别,显示该蛋白具有免疫学活性,从而可用该重组蛋白作为具有免疫原性的抗原来代替传统的使用病毒转染细胞制备的抗原,这样便可避免传统检测FMDV抗体中制备免疫抗原时容易发生的病毒扩散的危险性,因而更加安全,而且价格低廉。

