



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101812120 A

(43) 申请公布日 2010.08.25

(21) 申请号 201010111010.4

(22) 申请日 2010.02.10

(71) 申请人 中国检验检疫科学研究院

地址 100123 北京市朝阳区高碑店北路甲3号

(72) 发明人 林祥梅 吴绍强 王彩霞 李雅静

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 王朋飞

(51) Int. Cl.

C07K 7/08 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 9 页 序列表 3 页
附图 2 页

(54) 发明名称

南非 II 型口蹄疫抗原表位多肽及其筛选方法

(57) 摘要

本发明涉及南非 II 型口蹄疫病毒主要抗原表位上的六条多肽及筛选方法。六条多肽的氨基酸序列分别位于 VP1 的 132 ~ 146 和 199 ~ 211 位点, VP2 的 60 ~ 73 和 163 ~ 176 位点, VP3 的 58 ~ 71 和 127 ~ 140 位点, 序列依次为: GECKYTQTSTAIRGD、HQSRDRFDAPIGV; RFFKEKLFDTWTS DK、LG VNRHDQ GK RHQA; DGKPYVVTKNNGDK、PGVNTDEL PKTPEA。本发明筛选出的 6 条多肽抗原性良好, 对 6 条多肽进行动物免疫试验, 免疫后的动物产生了高效价的特异性抗体, 效价较高, 证实其具有良好的免疫原性。

1. 南非 II 型口蹄疫主要抗原表位的六条多肽, 其氨基酸序列分别为: GECKYTQTSTAIRGD、HQSRRDRFDAPIGV、RFFKEKLFDWTSDK、LGVNRHDQGKRHQA、DGKPYVVTKNNGDK 和 PGVNTDELPKTPEA, 或这六条氨基酸序列经替换、缺失或添加一个或几个氨基酸形成的具有同等功能的氨基酸序列。

2. 权利要求 1 所述的南非 II 型口蹄疫病毒主要抗原表位六条多肽的筛选方法, 包括如下步骤:

1) 采用软件分析南非 II 型口蹄疫病毒的三种结构蛋白 VP1、VP2 和 VP3 的氨基酸特性, 根据这些氨基酸特性设计并合成多肽片段;

2) 对合成的多肽进行抗原性分析, 筛选出 6 条多肽, 其氨基酸序列分别为: GECKYTQTSTAIRGD、HQSRRDRFDAPIGV、RFFKEKLFDWTSDK、LGVNRHDQGKRHQA、DGKPYVVTKNNGDK 和 PGVNTDELPKTPEA。

3. 根据权利要求 2 所述的方法, 其特征在于, 合成多肽的抗原性分析包括反应原性检测及免疫原性检测。

4. 根据权利要求 3 所述的方法, 其特征在于, 反应原性检测采用间接 ELISA 法。

5. 权利要求 1 所述的南非 II 型口蹄疫主要抗原表位的六条多肽在检测南非 II 型口蹄疫病毒中的应用。

南非 II 型口蹄疫抗原表位多肽及其筛选方法

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程技术领域,具体地说,涉及南非 II 型口蹄疫病毒主要抗原表位上的六条多肽及筛选方法。

背景技术

[0002] 口蹄疫是由口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus,FMDV)引起的偶蹄动物的一种急性、高度接触性传染病,一度被世界动物卫生组织(OIE)列为 A 类疫病之首。口蹄疫属于世界流行性传染病,它的暴发给全球人类健康以及畜牧业生产造成了极大的危害。

[0003] 口蹄疫病毒属于小 RNA 病毒科,口蹄疫病毒(aphthovirus)属。FMDV 是由单股正链 RNA 组成的 140S 颗粒,它由 VP1(1D)、VP2(1B)、VP3(1C)和 VP4(1A)四种结构蛋白各 60 拷贝组成。FMDV 基因组全长约 8500bp,依次由 5' UTR、ORF 和 3' UTR 及 Poly(A) 尾组成。5' UTR 长约 1300bp,它包括在病毒翻译和 RNA 复制中起作用的 5 个功能区:S 片段、Poly(C)、cre 区、IRES(内部核糖体进入位点)等。3' UTR 可以结合参与 RNA 复制某些小 RNA 病毒蛋白,因此它对于病毒基因组复制具有重要作用。Poly(A) 尾可能也在 FMDV 翻译和小 RNA 病毒的 RNA 复制中起作用。FMDV 的 ORF 长约 6500bp,由 L 基因、P1 结构蛋白基因、P2 和 P3 非结构蛋白基因以及起始密码子和终止密码子组成,编码一个大的聚蛋白。L 区包括 Lab、Lb 两种蛋白。结构蛋白 P1 区包含了 FMDV 的主要抗原位点。P1 基因编码 4 种病毒的结构蛋白,即 VP1、VP2、VP3 和 VP4。VP1 ~ VP3 组成衣壳蛋白亚单位,VP4 位于病毒颗粒内部。P2 基因编码 3 种病毒的非结构蛋白,2A、2B、2C。P3 基因编码非结构蛋白 3A、Vpg、3C^{pro}和 3D^{pol}。

[0004] 目前,关于 FMDV 结构蛋白的研究主要集中在 VP1 上,对 VP1 结构和功能的研究表明,FMDV 的 O、A、C 型和 Asia I 型,其主要抗原位点都在 VP1 上。VP1 暴露于病毒颗粒的表面,承受的选择压力最大,关键氨基酸的改变可导致抗原位点和单克隆抗体反应性的改变,使得 VP1 最容易发生变异,其变异常可导致毒株抗原性的变化,在口蹄疫免疫预防、遗传演化中一直是研究的主要对象。但目前已有研究表明,在病毒的抗原结构中 VP1 ~ VP3 都显示了重要作用。Archarya 对 FMDV 颗粒空间构型的研究表明,VP1 ~ VP3 都有氨基酸位于病毒粒子表面,都能参与抗原位点的形成。

[0005] 口蹄疫病毒的抗原结构十分复杂,不同的血清型有着不同的抗原位点。在口蹄疫病毒的七个血清型中,以 O、A、C 和 Asia I 型的抗原位点研究最多,而对南非型的研究较少。在 FMDV 的四种结构蛋白 VP1、VP2、VP3、VP4 中,VP1 是诱导产生中和抗体的主要成分,VP1 上的 G-H 环和保守的 RGD(Arg-Gly-Asp) 基序参与构成了重要的抗原位点。此外,对 FMDV 空间构型的研究发现 VP2、VP3 都能参与抗原位点的形成。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供南非 II 型口蹄疫病毒主要抗原表位的六条多肽。

[0007] 本发明的另一目的是提供南非 II 型口蹄疫病毒主要抗原表位六条多肽的筛选方

法。

[0008] 为了实现本发明目的,本发明提供南非 II 型口蹄疫病毒主要抗原表位的六条多肽,分别位于抗原 VP1 的 132~146 和 199~211 位点;VP2 的 60~73 和 163~176 位点;VP3 的 58~71 和 127~140 位点,其氨基酸序列分别为:GECKYTQTSTAIRGD、HQSRDRFDAPIGV;RFFKEKLFDWTSKD、LGVNRHDQGKRHQA;DGKPYVVTKNNGDK、PGVNTDELPKTPEA,或这六条氨基酸序列经替换、缺失或添加一个或几个氨基酸形成的具有同等功能的氨基酸序列。

[0009] 前述的南非 II 型口蹄疫病毒主要抗原表位六条多肽的筛选方法,包括如下步骤:1) 采用软件分析南非 II 型口蹄疫病毒的三种结构蛋白 VP1、VP2 和 VP3 的氨基酸特性,根据这些氨基酸特性设计并合成多肽片段;2) 对合成的多肽进行抗原性分析,筛选出 6 条多肽,其氨基酸序列分别为:GECKYTQTSTAIRGD、HQSRDRFDAPIGV、RFFKEKLFDWTSKD、LGVNRHDQGKRHQA、DGKPYVVTKNNGDK 和 PGVNTDELPKTPEA。

[0010] 前述的方法,其中合成多肽的抗原性分析包括反应原性检测及免疫原性检测。

[0011] 前述的方法,其中反应原性检测采用间接 ELISA 法。

[0012] 南非 II 型口蹄疫主要抗原表位的六条多肽在检测南非 II 型口蹄疫病毒中的应用。

[0013] 本发明采用 DNASTAR 软件分析三种结构蛋白 VP1、VP2、VP3 上每个氨基酸的亲水性、柔韧性来判断南非 II 型(SAT II 型)FMDV P1 抗原可能存在的表位,用 Kyte-Doolittle 法分析各结构蛋白的亲水性(结果如图 1 所示),用 Emini 法分析各结构蛋白的表面可能性(结果如图 2 所示),用 Jameson-Wolf 法分析各结构蛋白的抗原指数(结果如图 3 所示),通过分析这些氨基酸残基的特性,综合评价 FMDV 三种结构蛋白 VP1、VP2 和 VP3 上可能成为抗原表位的多肽片段。同时,结合国内外大量有关抗原表位的研究报道,共合成了 8 条长度在 14 个氨基酸左右的小肽,并进行抗原性分析。将这 8 条多肽与载体蛋白 KLH 偶联免疫 BALB/c 小鼠,三免后用裸肽作为包被抗原进行间接 ELISA 检测血清抗体,结果有 6 条多肽免疫小鼠后产生了高效价的特异性抗体,效价较高,证实其具有良好的免疫原性;且这 8 条多肽与 SAT II 型 FMDV 的阳性血清都能结合,显示了良好的反应原性,由此本发明筛选出了 6 条抗原性良好的多肽。

[0014] 本发明的优点在于,筛选出的 6 条多肽抗原性良好,对 6 条多肽进行动物免疫试验,免疫后的动物产生了高效价的特异性抗体,效价较高,证实其具有良好的免疫原性。

附图说明

[0015] 图 1 为用 Kyte-Doolittle 法分析本发明南非 II 型口蹄疫病毒的三种结构蛋白 VP1、VP2 和 VP3 氨基酸的亲水性图谱;

[0016] 图 2 为用 Emini 法分析本发明南非 II 型口蹄疫病毒的三种结构蛋白 VP1、VP2 和 VP3 氨基酸的表面可能性图谱;

[0017] 图 3 为用 Jameson-Wolf 法分析本发明南非 II 型口蹄疫病毒的三种结构蛋白 VP1、VP2 和 VP3 氨基酸的抗原指数图谱;

[0018] 图 4 为本发明合成多肽与 SAT II 型 FMDV 阳性血清的反应原性检测结果示意图;

[0019] 图 5 为本发明合成多肽的小鼠免疫试验间接 ELISA 检测结果示意图。

具体实施方式

[0020] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。

[0021] 实施例 1 六条多肽的筛选方法

[0022] 1 材料和方法

[0023] 1.1 抗原和血清

[0024] 多肽由上海生工生物工程有限公司合成,经 HPLC 鉴定纯度在 95%以上;

[0025] SAT II 型 FMDV 阳性血清由英国口蹄疫参考实验室提供,本实验室保存;

[0026] HRP 标记山羊抗小鼠 IgG、HRP 标记兔抗牛 IgG 购自北京鼎国生物技术公司。

[0027] 1.2 试验动物

[0028] 2 月龄 BALB/c 雌性小鼠,购自军事医学科学院。

[0029] 1.3 主要试剂及溶液配制

[0030] 弗氏完全佐剂 (Freud's complete adjuvant)、弗氏不完全佐剂 (Freud's incomplete adjuvant); (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo, USA)

[0031] ELISA 部分相关试剂的配制:

[0032] (1) 包被缓冲液 (pH9.6, 0.1mol/L 碳酸盐缓冲液)

[0033] Na_2CO_3 3.18g

[0034] NaHCO_3 5.86g

[0035] 加蒸馏水至 1000mL

[0036] (2) 洗涤缓冲液 (pH7.4, 0.01mol/L PBST, 含 0.05% Tween-20)

[0037] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.91g

[0038] $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.30g

[0039] NaCl 8.50g

[0040] Tween-20 0.5mL

[0041] 加蒸馏水至 1000mL

[0042] (3) 封闭液

[0043] 明胶 1g 溶于 100mL PBS 中

[0044] (4) 稀释液

[0045] 鸡卵清白蛋白 (OVA) 0.1g

[0046] 加洗涤缓冲液至 100mL

[0047] (5) 底物缓冲液 (0.05mol/L pH5.0 磷酸-柠檬酸)

[0048] 0.2mol/L Na_2HPO_4 (28.4g/L) 25.7mL

[0049] 0.1mol/L 柠檬酸 (19.2g/L) 24.3mL

[0050] 加蒸馏水至 100mL

[0051] (6) TMB 使用液

[0052] TMB (10mg/mL, 溶解于二甲基甲酰胺 DMF) 150 μL

[0053] 底物缓冲液 10mL

[0054] H_2O_2 6 μL

[0055] (7) 终止液 (1mol/L H_2SO_4)

[0056] 蒸馏水 578.3mL, 逐滴加入浓硫酸 (98%) 217.7mL。

[0057] 1.4 方法

[0058] 1.4.1 SAT II 型 FMDV 结构蛋白抗原表位的筛选及合成

[0059] 利用 DNASTar 软件分析 SAT II 型 FMDV (GenBank 登录号 EF134951) 结构蛋白 VP1 ~ VP3 上每一个氨基酸的亲水性、柔韧性、表面可及性等参数,用 Kyte-Doolittle 法分析各结构蛋白的亲水性 (结果如图 1 所示),用 Emini 法预测各结构蛋白的表面可能性 (结果如图 2 所示),用 Jameson-Wolf 法预测各结构蛋白的抗原指数 (结果如图 3 所示),然后通过这些参数综合评价 FMDV 三种结构蛋白上可能的抗原表位,并结合研究较多的 O、A、C 和 Asia I 型 FMDV 抗原位点的分布和关键氨基酸残基的位置,选择蛋白亲水性和抗原指数均较高 (≥ 0) 且刚好处于蛋白表面可能性区域的 8 条多肽人工合成,其中 4 条位于结构蛋白 VP1 上,2 条位于 VP2 上,2 条位于 VP3 上,每条多肽具体的氨基酸序列及残基位置如表 1 所示。

[0060] 表 18 条多肽的氨基酸残基位置及序列

[0061]

组别	VP 及氨基酸残基位置	序列
1928	VP2 60~73	RFFKEKLFDWTSDK
1929	VP2 163~176	LGVNRHDQGKRHQA
1930	VP3 58~71	DGKPYVVTKNNGDK
1931	VP3 127~140	PGVNTDELPKTPEA
1932	VP1 35~48	VMDRFTHVHTNQTS
1933	VP1 132~146	GECKYTQTSTAIRGD
1934	VP1 147~160	RAVLAAKYANAKHE
1935	VP1 199~211	HQSRDRFDAPIGV

[0062] 1.4.2 合成多肽的反应原性检测

[0063] 采用间接 ELISA 方法进行,具体步骤如下:

[0064] (1) 包被抗原:用包被缓冲液 ($\text{pH}9.6 \text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$) 将 8 组未偶联的合成多肽分别稀释成 $50 \mu\text{g/mL}$ 的浓度,每孔加入 $100 \mu\text{L}$, 4°C 过夜;

[0065] (2) 封闭:次日除去包被液,在纸上轻轻扣打以吸去残留液体,加入洗涤缓冲液 (PBST) $300 \mu\text{L/孔}$,共洗涤 3 次;加入 1% 明胶 (先于 37°C 使其溶解), $200 \mu\text{L/孔}$, 37°C 温育 2h;

[0066] (3) 洗涤:封闭完成后弃去板内液体,用 PBST 洗涤 5 次;

[0067] (4) 加入血清:加入 1 : 200 稀释的 SAT II 型 FMDV 标准阳性血清,以胎牛血清作为阴性对照血清, $100 \mu\text{L/孔}$, 37°C 温育 1h;

[0068] (5) 洗涤:弃去板内液体,用 PBST 洗涤 5 次;

[0069] (6) 加入酶标二抗:加入 1 : 1000 稀释的 HRP- 兔抗牛 IgG, $100 \mu\text{L/孔}$, 37°C 温育 1h;

[0070] (7) 加底物液显色:用 PBST 洗涤 5 次后,在纸上轻轻扣干板内残留液体,加入新鲜配制的 TMB 使用液, $100 \mu\text{L/孔}$, 37°C 避光反应 15min;

[0071] (8) 终止反应 : 每孔加入 50 μ L 1M H_2SO_4 终止反应, 在酶标仪下检测 OD_{450nm} 的值。

[0072] 1.4.3 合成多肽的动物免疫试验

[0073] 将 2 月龄的 BALB/c 雌性小鼠, 随机分成 9 组, 每组 6 只。以合成的 8 组 KLH 偶联多肽分别免疫 BALB/c 雌性小鼠, 免疫剂量为 60 μ g/ 只, 阴性组以 PBS 免疫作为对照。用 PBS 将多肽抗原稀释到 300 μ g/mL, 加入等量的弗氏完全佐剂, 于 2mL 注射器内进行乳化 (以塑胶管连接两个注射器, 在两注射器间来回推送抗原佐剂混合物, 直至形成均匀的乳浊液, 放置半小时后不分层表明已乳化成功)。于小鼠颈部、背部皮下多点注射进行初次免疫, 然后每隔三周, 取同样量抗原加入等量的弗氏不完全佐剂同上法乳化后进行二免, 再三周后加强免疫。

[0074] 1.4.4 合成多肽的免疫原性检测

[0075] 3 免后 8 天自 BALB/c 小鼠尾部各采血 0.1mL, 室温静置 1h, 4 $^{\circ}$ C 放置 2h, 3000rpm 离心 10min, 收集血清, 4 $^{\circ}$ C 保存。将 8 组未偶联的合成多肽分别以 10 μ g/mL 的浓度包被 ELISA 板, 将每组多肽免疫小鼠分离的抗血清以 1 : 1000 稀释后, 按照间接 ELISA 方法, 检测 OD_{450nm} 的值, 再从各组中选择 OD_{450nm} 值最高的小鼠抗血清按 1 : 1000、1 : 2000、1 : 4000、1 : 8000... 进行倍比稀释, 进行血清抗体效价的测定, 计算出 P/N 值, 以 P/N 值 \geq 2.1 的血清最高稀释度作为该血清抗体的效价。间接 ELISA 方法步骤如下:

[0076] (1) 包被抗原 : 用包被缓冲液 (pH9.6 Na_2CO_3 - $NaHCO_3$) 将 8 组未偶联的合成多肽分别稀释成 10 μ g/mL 的浓度, 每孔加入 100 μ L, 4 $^{\circ}$ C 过夜;

[0077] (2) 封闭 : 次日除去包被液, 在纸上轻轻扣打以吸去残留液体, 加入洗涤缓冲液 (PBST) 300 μ L/ 孔, 共洗涤 3 次; 加入 1% 明胶 (先于 37 $^{\circ}$ C 使其溶解) 封闭, 200 μ L/ 孔, 37 $^{\circ}$ C 温育 2h;

[0078] (3) 洗涤 : 封闭完成后弃去板内液体, 用 PBST 洗涤 5 次;

[0079] (4) 加入待检血清 : 加入 1 : 1000 稀释的小鼠血清, 以 PBS 免疫组的小鼠血清作为阴性对照血清, 100 μ L/ 孔, 37 $^{\circ}$ C 温育 1h;

[0080] (5) 洗涤 : 弃去板内液体, 用 PBST 洗涤 5 次;

[0081] (6) 加入酶标二抗 : 加入 1 : 1000 稀释的 HRP- 山羊抗小鼠 IgG, 100 μ L/ 孔, 37 $^{\circ}$ C 温育 1h;

[0082] (7) 加底物液显色 : 用 PBST 洗涤 5 次后, 在纸上轻轻扣干板内残留液体, 加入新鲜配制的 TMB 使用液, 100 μ L/ 孔, 37 $^{\circ}$ C 避光反应 15min;

[0083] (8) 终止反应 : 每孔加入 50 μ L 1M H_2SO_4 终止反应, 在酶标仪下检测 OD_{450nm} 的值。

[0084] 2 结果

[0085] 2.1 合成多肽的反应原性检测

[0086] 将 8 组未偶联的合成多肽用包被缓冲液稀释成 50 μ g/mL, 包被 ELISA 板, 加入 SAT II 型 FMDV 的标准阳性血清, 以胎牛血清作为阴性对照血清, 间接 ELISA 法检测 OD_{450nm} 的值并计算出 P/N 值如表 2 所示。将 8 组合成多肽与 SAT II 型 FMDV 标准阳性血清的反应原性检测结果作成柱形图, 如图 4 所示。经统计学分析, 各组多肽的阳性值与阴性值相比差异显著 ($P < 0.05$), 且 1935 组与其它组相比差异显著 ($P < 0.05$)。结果表明, 8 组多肽与 SAT II 型 FMDV 的标准阳性血清都能结合, 与阴性对照的比值 (P/N) 大于 2.1, 且 1935 组的反应性最强, 故 8 组多肽均具有较好的反应原性。

[0087] 表 2 间接 ELISA 检测合成多肽与 SAT II 型 FMDV 标准阳性血清的反应原性 (OD_{450nm} 、P/N)

[0088]

组别	1928	1929	1930	1931
阳性血清	0.433 ± 0.029	0.640 ± 0.124	0.671 ± 0.096	0.940 ± 0.052
阴性血清	0.116 ± 0.008	0.127 ± 0.006	0.109 ± 0.002	0.118 ± 0.012
P/N	3.7	5.0	6.2	8.0
组别	1932	1933	1934	1935
阳性血清	0.844 ± 0.151	1.004 ± 0.098	0.574 ± 0.028	2.212 ± 0.113
阴性血清	0.114 ± 0.011	0.119 ± 0.013	0.103 ± 0.001	0.124 ± 0.013
P/N	7.4	8.4	5.6	17.8

[0089] 2.2 合成多肽的免疫原性检测

[0090] 将 8 组未偶联的合成多肽分别以 $10 \mu g/mL$ 包被酶标板, 检测每组小鼠的抗血清在 1 : 1000 稀释时的 OD_{450nm} 值, 将各组 OD_{450nm} 取平均数并计算出 P/N 值如表 3 所示, 并将合成多肽小鼠免疫试验间接 ELISA 检测结果作成柱形图, 如图 5 示。由此可见: 1928 ~ 1931、1933、1935 这六组多肽与阴性对照的比值 (P/N) 大于 2.1, 均能引起较强的免疫反应, 经统计学分析差异显著 ($P < 0.05$); 再从各组中选择 OD_{450nm} 值最高的小鼠抗血清按 1 : 1000、1 : 2000、1 : 4000、1 : 8000... 倍比稀释, 测定其效价, OD_{450nm} 及 P/N 值如表 4 和表 5 所示: 其中 1928、1929 组效价达到了 1 : 128000, 1933、1935 组效价达到 1 : 64000, 1930 组效价达到了 1 : 32000, 1931 组效价达到 1 : 128000 以上。因此, 8 条多肽中有 6 条多肽免疫小鼠后产生了高效价的特异性抗体, 具有良好的免疫原性。

[0091] 表 3 合成多肽的小鼠免疫试验间接 ELISA 检测结果 (OD_{450nm} 、P/N)

[0092]

组别	1928	1929	1930	1931
阳性血清	3.403 ± 0.125	1.623 ± 0.183	1.251 ± 0.086	4.100 ± 0.108
阴性血清	0.101 ± 0.004	0.099 ± 0.003	0.095 ± 0.002	0.103 ± 0.011
P/N	33.7	16.4	13.2	39.8
组别	1932	1933	1934	1935
阳性血清	0.116 ± 0.019	2.828 ± 0.125	0.168 ± 0.089	0.768 ± 0.069
阴性血清	0.103 ± 0.015	0.100 ± 0.002	0.097 ± 0.011	0.074 ± 0.014
P/N	1.1	28.3	1.7	10.4

[0093] 表 4 间接 ELISA 检测合成多肽免疫小鼠的效价 (OD_{450nm})

[0094]

组别及编号	1928	1929	1930	1931	1933	1935
	1 号	3 号	6 号	1 号	2 号	2 号
1: 1000	3.86 ± 0.048	4.004 ± 0.026	2.437 ± 0.005	4.266 ± 0.062	3.78 ± 0.016	3.524 ± 0.078
1: 2000	3.476 ± 0.01	3.478 ± 0.002	1.651 ± 0.003	4.068 ± 0.029	3.07 ± 0.17	2.778 ± 0.002
1: 4000	2.922 ± 0.046	2.592 ± 0.049	1.106 ± 0.04	3.738 ± 0.158	1.935 ± 0.011	1.748 ± 0.081
1: 8000	2.058 ± 0.108	1.706 ± 0.091	0.724 ± 0.019	3.240 ± 0.132	1.191 ± 0.008	1.298 ± 0.02
1: 16000	1.429 ± 0.028	1.209 ± 0.084	0.446 ± 0.029	2.679 ± 0.142	0.709 ± 0.033	0.723 ± 0.025
1: 32000	0.801 ± 0.049	0.71 ± 0.037	0.249 ± 0.004	1.889 ± 0.129	0.374 ± 0.035	0.47 ± 0.007
1: 64000	0.437	0.404	0.161	1.207	0.234	0.246

[0095]

	± 0.011	± 0.014	± 0.021	± 0.1	± 0.022	± 0.014
1: 128000	0.279 ± 0.013	0.257 ± 0.026	0.13 ± 0.016	0.745 ± 0.042		
阴性对照	0.1 ± 0.001	0.086 ± 0.017	0.092 ± 0.014	0.119 ± 0.009	0.089 ± 0.003	0.109 ± 0.004

[0096] 表 5 间接 ELISA 检测合成多肽免疫小鼠的效价 (P/N 值)

[0097]

组别	1928	1929	1930	1931	1933	1935
1: 1000	38.6	46.5	26.5	35.8	42.3	32.3
1: 2000	34.8	40.4	17.9	34.2	34.5	25.5
1: 4000	29.2	30.1	12	31.4	21.7	16
1: 8000	20.6	19.8	7.9	27.2	13.4	11.9
1: 16000	14.3	14.1	4.8	22.5	8	6.6
1: 32000	8	8.3	2.7	15.9	4.2	4.3
1: 64000	4.4	4.7	1.8	10.1	2.6	2.3
1: 128000	2.8	2.9		6.3		

[0098] 3 结论

[0099] 综合反应原性试验和免疫原性试验结果,本研究采用间接 ELISA 方法成功的筛选出了六条抗原性良好的多肽。

[0100] 实施例 2 六条多肽在检测南非 II 型口蹄疫病毒中的应用

[0101] 将筛选出的六条抗原性良好的多肽采用柔性 Linker 连接后化学合成相应的 DNA 片段插入到 pGEX-6p-1 原核表达载体中构建成原核表达质粒表达蛋白,并进行纯化。利用获得的纯化蛋白建立南非 II 型间接 ELISA 检测方法,采用此方法对中国检科院动检实验室保存的多批国内临床样品中随机抽取的 39 份样品进行检测,调查国内南非型 FMDV 的感染情况。试验结果显示,39 份样品中,OD₄₅₀ 均小于 0.502,根据判定标准:OD₄₅₀ > 0.562 时,为阳性;OD₄₅₀ 介于 0.502 ~ 0.622 之间为可疑,介于可疑区间的结果需要重复检测,如重复检测结果仍为可疑则判为阳性;OD₄₅₀ < 0.502 时,为阴性,此次检测结果均可判为阴性,如表 6 所示。

[0102] 表 6 临床血清样品的检测结果 (OD₄₅₀)

[0103]

样品编号	相应 OD ₄₅₀ 值	样品编号	相应 OD ₄₅₀ 值
AP080306002	0.477±0.007	AP070410228	0.469±0.029
AP080306014	0.392±0.005	AP060117007	0.355±0.024
AP060117027	0.382±0.009	AP080306011	0.450±0.021
AP080306010	0.351±0.003	AP060117009	0.260±0.016
AP060117008	0.383±0.002	AP060117013	0.334±0.001
AP060117004	0.234±0.017	AP060117012	0.336±0.013
AP060117006	0.410±0.032	AP060117011	0.478±0.046
AP060117018	0.459±0.005	AP060117014	0.422±0.017
AP060117002	0.452±0.013	AP060117015	0.288±0.018
AP070410203	0.449±0.048	AP080306007	0.433±0.004
AP070410314	0.322±0.042	AP060117029	0.273±0.004
AP070410055	0.483±0.005	AP060117030	0.386±0.012
AP060117019	0.284±0.001	AP060117001	0.255±0.015
AP060117025	0.287±0.016	AP060117017	0.359±0.025
AP060117022	0.346±0.006	AP070410251	0.337±0.015
AP080306005	0.410±0.032	AP070410111	0.312±0.027
AP080306013	0.397±0.005	AP060117024	0.457±0.026
AP060117026	0.445±0.011	AP060117021	0.471±0.042
AP060117016	0.405±0.042	AP070410071	0.303±0.023
AP060117028	0.397±0.009		

[0104] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

序列表

<110> 中国检验检疫科学研究院

<120> 南非 II 型口蹄疫抗原表位多肽及其筛选方法

<130>KHP10112125.3

<160>8

<170>PatentIn version 3.5

<210>1

<211>14

<212>PRT

<213>aphthovirus

<400>1

Arg	Phe	Phe	Lys	Glu	Lys	Leu	Phe	Asp	Trp	Thr	Ser	Asp	Lys
1				5					10				

<210>2

<211>14

<212>PRT

<213>aphthovirus

<400>2

Leu	Gly	Val	Asn	Arg	His	Asp	Gln	Gly	Lys	Arg	His	Gln	Ala
1				5					10				

<210>3

<211>14

<212>PRT

<213>aphthovirus

<400>3

Asp	Gly	Lys	Pro	Tyr	Val	Val	Thr	Lys	Asn	Asn	Gly	Asp	Lys
1				5					10				

<210>4

<211>14

<212>PRT

<213>aphthovirus

<400>4

Pro Gly Val Asn Thr Asp Glu Leu Pro Lys Thr Pro Glu Ala

1 5 10

<210>5

<211>14

<212>PRT

<213>aphthovirus

<400>5

Val Met Asp Arg Phe Thr His Val His Thr Asn Gln Thr Ser

1 5 10

<210>6

<211>15

<212>PRT

<213>aphthovirus

<400>6

Gly Glu Cys Lys Tyr Thr Gln Thr Ser Thr Ala Ile Arg Gly Asp

1 5 10 15

<210>7

<211>14

<212>PRT

<213>aphthovirus

<400>7

Arg Ala Val Leu Ala Ala Lys Tyr Ala Asn Ala Lys His Glu

1 5 10

<210>8

<211>13

<212>PRT

<213>aphthovirus

<400>8

His Gln Ser Arg Asp Arg Phe Asp Ala Pro Ile Gly Val

1

5

10

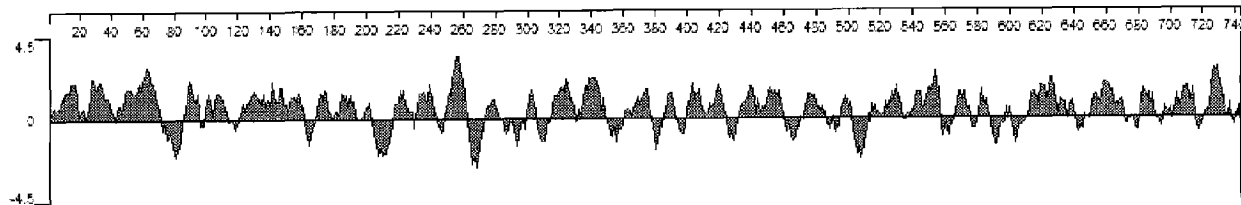


图 1

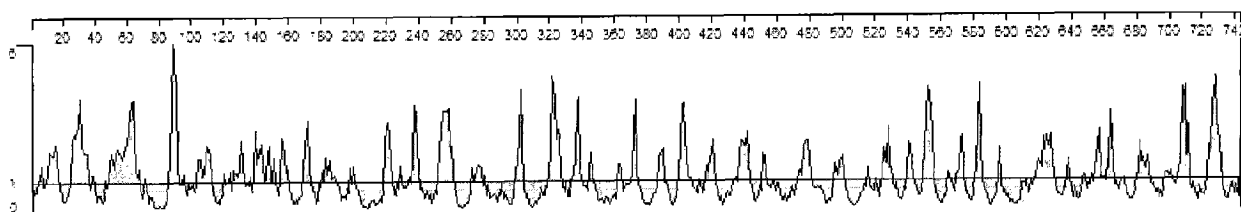


图 2

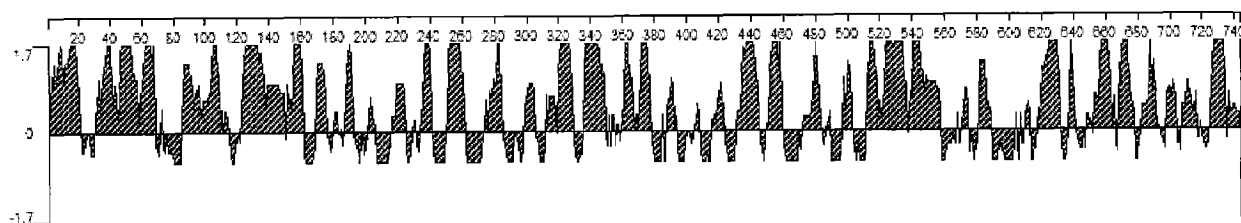


图 3

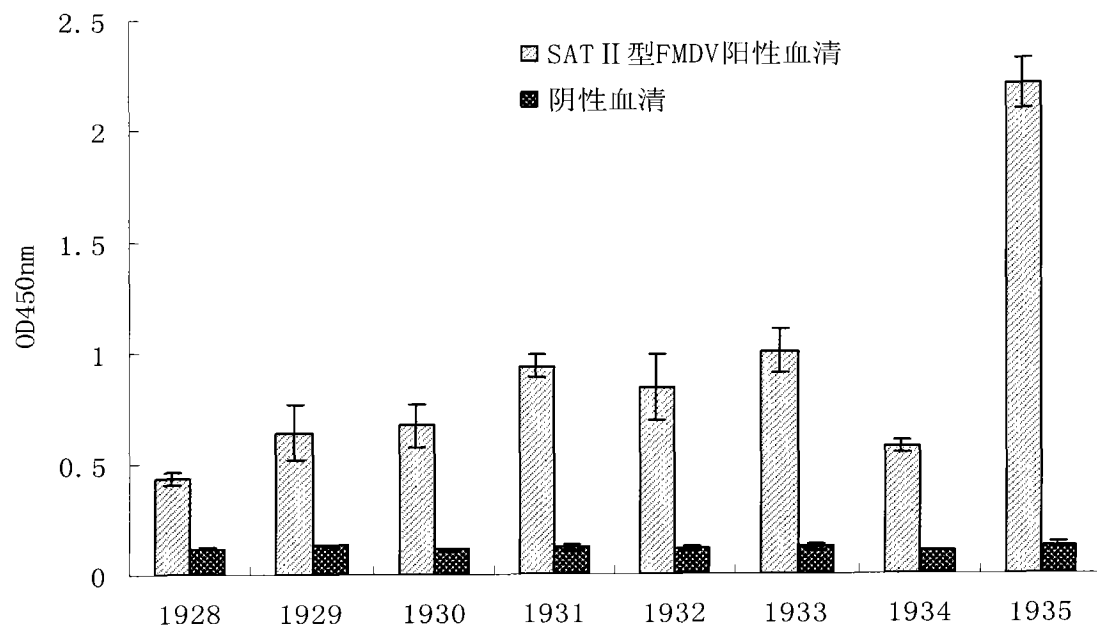


图 4

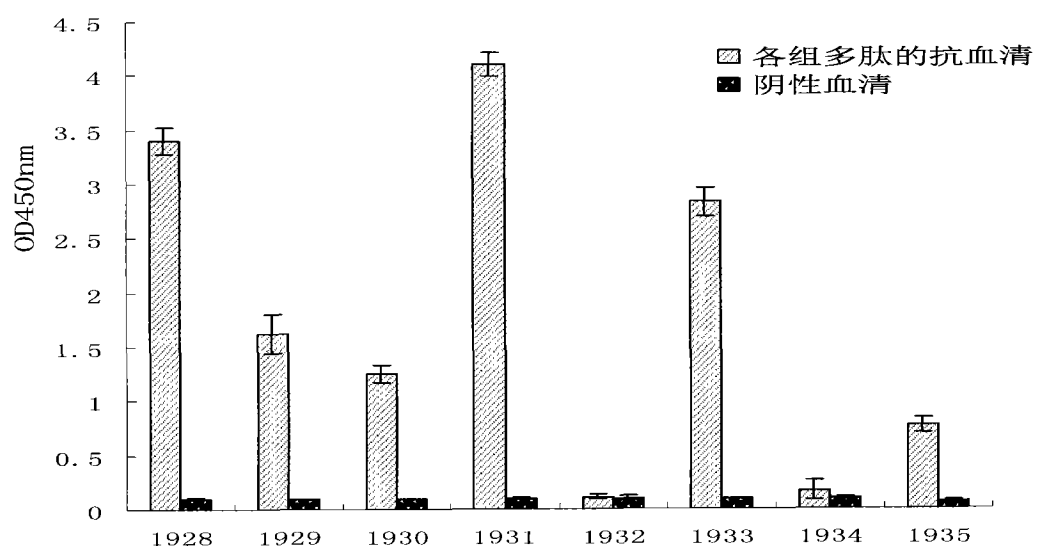


图 5

专利名称(译)	南非II型口蹄疫抗原表位多肽及其筛选方法		
公开(公告)号	CN101812120A	公开(公告)日	2010-08-25
申请号	CN201010111010.4	申请日	2010-02-10
申请(专利权)人(译)	中国检验检疫科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中国检验检疫科学研究院		
[标]发明人	林祥梅 吴绍强 王彩霞 李雅静		
发明人	林祥梅 吴绍强 王彩霞 李雅静		
IPC分类号	C07K7/08 G01N33/53 G01N33/569		
代理人(译)	王朋飞		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)	组别	VP 及氨基酸残基位置	序列
本发明涉及南非II型口蹄疫病毒主要抗原表位上的六条多肽及筛选方法。六条多肽的氨基酸序列分别位于VP1的132~146和199~211位点，VP2的60~73和163~176位点，VP3的58~71和127~140位点，序列依次为：GECKYTQTSTAIRGD、HQSRDRFDAPIGV；RFFKEKLFWDWTSKD、LGVNRHDQGKRHQA；DGKPYVVTKNNGDK、PGVNTDELPKTPEA。本发明筛选出的6条多肽抗原性良好，对6条多肽进行动物免疫试验，免疫后的动物产生了高效价的特异性抗体，效价较高，证实其具有良好的免疫原性。	1928	VP2 60~73	RFFKEKLFWDWTSKD
	1929	VP2 163~176	LGVNRHDQGKRHQA
	1930	VP3 58~71	DGKPYVVTKNNGDK
	1931	VP3 127~140	PGVNTDELPKTPEA
	1932	VP1 35~48	VMDRFTHVHTNQTS
	1933	VP1 132~146	GECKYTQTSTAIRGD
	1934	VP1 147~160	RAVLAAKYANAKHE
	1935	VP1 199~211	HQSRDRFDAPIGV