

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410043953.2

[51] Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2006年4月26日

[11] 公开号 CN 1763104A

[22] 申请日 2004.10.20

[21] 申请号 200410043953.2

[71] 申请人 东北农业大学

地址 150030 黑龙江省哈尔滨市香坊区木材街 59 号

[72] 发明人 王君伟 杨玉菊

[74] 专利代理机构 哈尔滨市哈科专利事务所有限责任公司

代理人 祖玉清

权利要求书 3 页 说明书 7 页

[54] 发明名称

基因 VII 型新城疫病毒 NP 抗体的重组原核表达检测抗原及制备方法

[57] 摘要

本发明提供的是一种基因 VII 型新城疫病毒 NP 抗体的重组原核表达检测抗原及制备方法。基因 VII 型新城疫病毒 NP 抗体的重组原核表达检测抗原是应用 RT-PCR 技术扩增基因 VII 型新城疫病毒 NP 基因基础上，将 NP 基因定向亚克隆到原核表达载体 pGEX-6p 上，然后转化大肠杆菌表达系统进行诱导表达所得到的基因工程蛋白，该蛋白的表达形式是融合蛋白，表达的融合蛋白的分子量为 81.9ku。通过本方法制备的基因工程重组蛋白可用于 VII 型新城疫抗 NP 蛋白抗体的检测。

1、一种基因VII型新城疫病毒 NP 抗体的重组原核表达检测抗原，其特征是：基因VII型新城疫病毒 NP 抗体的重组原核表达检测抗原是应用 RT-PCR 技术扩增基因VII型新城疫病毒 NP 基因基础上，将 NP 基因定向亚克隆到原核表达载体 pGEX-6p 上，然后转化大肠杆菌表达系统进行诱导表达所得到的基因工程蛋白，该蛋白的表达形式是融合蛋白，表达的融合蛋白的分子量为 80-82ku。

2、根据权利要求 1 所述的基因VII型新城疫病毒 NP 抗体的重组原核表达检测抗原，其特征是：表达的融合蛋白的分子量为 81.9ku。

3、根据权利要求 1 所述的基因VII型新城疫病毒 NP 抗体的重组原核表达检测抗原，其特征是：

基因VII型新城疫病毒 NP 基因的核苷酸序列及其推倒的氨基酸序列如下：

```

1   ATGTCGTCTGTTTTTCGACGAATACGAGCAGCTTCTCGCTGCTCAGACCCGCCCTAACGGA
1   M S S V F D E Y E Q L L A A Q T R P N G
61  ACTCATGGAGGGGAGAGAAAGGGAGCACTTTAAAGGTTGAGGTCCCAGTATTTACCCTA
21  T H G G G E K G S T L K V E V P V F T L
121 AACAGTGATGATCCAGAGGATAGATGGAATTTTGCGGTATTCTGTCTTCGGATTGCTGTT
41  N S D D P E D R W N F A V F C L R I A V
181 AGCGAGGATGCCAACAAACCACTCAGGCAAGGTGCTCTTATATCCCTCTTATGCTCCCAT
61  S E D A N K P L R Q G A L I S L L C S H
241 TCTCAGGTGATGAGAAACCATGTTGCCCTTGCCAGGGAAACAGAATGAGGCCACACTGGCT
81  S Q V M R N H V A L A G K Q N E A T L A
301 GTTCTTGAGATCGATGGTTTTGCTAACAGTGTGCCCCAGTTCAACAATAGGAGTGGAGTG
101 V L E I D G F A N S V P Q F N N R S G V
361 TCTGAGGAGAGAGCACAGAGATTCATGGTAATCGCAGGATCTCTCCCTCGGGCATGCAGC
121 S E E R A Q R F M V I A G S L P R A C S
421 AACGGTACTCCGTTTGTACAGCTGGGGTTGAAGATGATGCACCAGAAGATATCACTGAC
141 N G T P F V T A G V E D D A P E D I T D
481 ACTCTGGAAAGAATCCTATCTATCCAAGTTCAGGTATGGGTCACAGTAGCAAAGGCCATG
161 T L E R I L S I Q V Q V W V T V A K A M
541 ACTGCATATGAGACAGCAGATGAGTCAGAAACAAGAATAAATAAGTATATGCAGCAA
181 T A Y E T A D E S E T R R I N K Y M Q Q
601 GGTAGAGTTCAGAAGAAGTACATCCTTCATCCTGTATGCAGGAGTGCAATTCAACTCACA
201 G R V Q K K Y I L H P V C R S A I Q L T
661 ATCAGACATTCTCTGGCGGTCCGTATTTTCTAGTTAGTGAGCTCAAGAGGGGCCGCAAT
221 I R H S L A V R I F L V S E L K R G R N
721 ACAGCAGGCGGGAGCTCTACGTATTACAACCTTGGTCGGGGATGTAGACTCATACATCAGA
241 T A G G S S T Y Y N L V G D V D S Y I R
781 AACACCGGGCTTACTGCATTTTTCTAACACTCAAATATGGAATCAATACCAAGACGTCA

```

261 N T G L T A F F L T L K Y G I N T K T S
 841 GCCCTCGCACTCAGCAGCCTCACAGGTGATATCCAAAAAATGAAACAGCTCATGCGTTTA
 281 A L A L S S L T G D I Q K M K Q L M R L
 901 TATCGGATGAAAGGTGAGAATGCACCATACATGACATTGTTAGGTGACAGTGACCAGATG
 301 Y R M K G E N A P Y M T L L G D S D Q M
 961 AGCTTTGCACCAGCTGAGTATGCACAACCTTTATTCTTTTGCCATGGGCATGGCATCAGTC
 321 S F A P A E Y A Q L Y S F A M G M A S V
 1021 TTAGATAAGGGAACTGGCAAGTACCAATTCGCCAGGGACTTTATGAGCACATCATTCTGG
 341 L D K G T G K Y Q F A R D F M S T S F W
 1081 AGACTTGGAGTAGAGTATGCTCAGGCTCAGGGAAGTAGCATCAATGAGGACATGGCTGCT
 361 R L G V E Y A Q A Q G S S I N E D M A A
 1141 GAGCTAAAATAACCCCGGCAGCAAGGAGAGGCCTGGCAGCTGCTGCCAACGAGTATCT
 381 E L K L T P A A R R G L A A A A Q R V S
 1201 GAAGAAATCGGCAGCATGGACATTCCTACTCAACAGGCGGGAGTCTCACCGGGCTCAGT
 401 E E I G S M D I P T Q Q A G V L T G L S
 1261 GACGAAGGCCCCCGAACTCCACAGGGCGGATCAAACAAGCCGCAAGGGCAACCAATGCC
 421 D E G P R T P Q G G S N K P Q G Q P N A
 1321 GGGGATGGGGAGACCCAATTCATGGATTTTATGAGAGCAGTGGCGAACAGCATGCGGGAA
 441 G D G E T Q F M D F M R A V A N S M R E
 1381 GCGCCAAATCCTGCACAGAGCACCACCCATCCAGAGCCTCCCCCAACCCCTGGGGCATCC
 461 A P N P A Q S T T H P E P P P T P G A S
 1441 CAAGACAACGACACTGACTGGGGTACTGA
 481 Q D N D T D W G Y *

4、一种基因VII型新城疫病毒 NP 抗体的重组原核表达检测抗原的制备方法，其特征是：

- 1) 设计扩增基因VII型新城疫病毒 NP 基因的特异性引物；
- 2) 通过 RT-PCR 扩增 NP 基因片段；
- 3) 对 NP 基因进行克隆、测序鉴定；
- 4) 将 NP 基因定向亚克隆至 pGEX-6p 原核表达载体；
- 5) 重组表达质粒 pGEX-6p-NP 转化大肠杆菌中进行诱导表达；
- 6) 重组蛋白的纯化

通过离心收集培养物中的基因工程菌，用 PBS 洗涤 3 次，沉淀用 PBS 溶液重悬，加入溶菌酶至终浓度为 1% 即 1mg/ml，然后进行超声处理，超声处理必须于冰浴条件下进行；以 4℃、10000g 离心 10min，取上清并加入 1% 的 TritonX-100 及 1mmol/L 的 DTT 至终浓度为 1mmol/L；沉淀即为包涵体，将沉淀用组成为 30% 蔗糖，100mol/L NaCl，50mmol/L Tris，pH8.0，1% TritonX-100 的包涵体洗涤液洗涤 2 次，重悬沉淀，加入组成为 1.5% (m/v) N-十二烷基肌氨酸钠，25mmol/L 三乙醇胺，1mmol/L EDTA，pH8.0 的包涵体裂解液重悬，4℃ 处理 2h，再超声处理 20S，以

12000r/m, 4℃离心 20min, 除去不溶性沉淀, 取上清即为可溶性包涵体蛋白, 向其中立即加入终浓度为 2%的 Trition X-100, 加入 9 倍体积的组成为 0.8mmol/L 氧化型谷胱苷肽, 2mmol/L 还原型谷胱苷肽, 2mmol/L EDTA, 20mmol/L Tris, pH8.5 的复性缓冲液, 用 0.01mol/L PBS、pH7.4 透析 48h, 每 12h 更换一次透析液。取出复性的包涵体蛋白液, 经聚乙醇-8000 进行浓缩, 加入 2%的 Trition X-100 后, 于-20℃保存备于纯化;

将复性后的表达蛋白经 SDS-PAGE 电泳后, 用 KCl 染色, 将凝胶中的目的蛋白带切下、研碎, 加入 PBS, 反复冻融, 1000r/min 离心 10min, 上清即为纯化蛋白;

7) 重组蛋白抗原性检测

通过免疫印迹、Dot-ELISA 方法的检测该蛋白的抗原性。

免疫印记试验: 将纯化的重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后, 再将凝胶上的蛋白转印至硝酸纤维膜上, 以 1:150 倍稀释基因 VII 型新城疫阳性的鸡血清作为一抗, 1:10000 倍稀释的辣根标记的兔抗鸡 IgG 作为二抗, 底物为 4-氯-1-萘酚, 结果在约 80ku 处观察到了特异性的反应条带;

Dot-ELISA 实验: 一抗、二抗和底物同上, 结果纯化后的重组蛋白与基因 VII 型新城疫阳性的鸡血清形成了明显的斑点。

基因VII型新城疫病毒 NP 抗体的重组原核表达检测抗原及制备方法

(一) 技术领域

本专利涉及的是一种基因工程制品, 本发明也涉及这种基因工程制品的制备方法, 具体地说是一种应用基因工程技术制备检测基因VII型新城疫抗体的检测抗原及其制备方法。

(二) 背景技术

1997 年以来, 在我国许多地区爆发了以消化道和呼吸道病变为主要特征的基因VII型新城疫, 给养殖业带来了严重的危害。由于该病具有高度发病率和死亡率, 如何对该病进行及时准确的诊断具有重要的意义。

以往对基因VII型新城疫血清抗体的检测都是利用全病毒作为抗原, 此方法必须将病毒浓缩提纯, 再用去污剂裂解后并适当浓缩才能用作抗原, 这就使得全病毒抗原制备过程复杂, 不易于推广, 特别是利用全病毒抗原作为诊断抗原, 在亚单位疫苗或活载体疫苗免疫接种时, 不能鉴别疫苗免疫和自然感染的抗体。利用原核表达系统表达外源蛋白是一种简便和高效的方法。原核表达系统生产的一些基因工程蛋白可保持必要的抗原性, 能够用于病毒感染抗体的检测。研究表明, 基因VII型新城疫病毒 NP 蛋白即属于此类蛋白, 因此应用基因工程 NP 蛋白作为抗原, 能够建立鉴别基因VII型新城疫免疫接种和自然感染抗体的检测方法, 这将为应用基因工程疫苗预防和控制基因VII型新城疫提供重要的技术支撑。

(三) 专利内容

本专利的目的在于提供一种具有无散毒危险、稳定性好、灵敏度高、可实现工业化生产、成本低的用于检测基因VII型新城疫病毒 NP 抗体的重组原核表达检测抗原, 本发明的目的还在于提供这种检测抗原的制备方法。

本发明的目的是这样实现的: 基因VII型新城疫病毒 NP 抗体的重组原核表达检测抗原是应用 RT-PCR 技术扩增基因VII型新城疫病毒 NP 基因基础上, 将 NP 基因定向亚克隆到原核表达载体 pGEX-6p (是一种带有 GST 前导肽的融合表达载体) 上, 然后转化大肠杆菌表达系统进行诱导表达所得到的基因工程蛋白, 该蛋白的表达形式是融合蛋白 (GST-NP), 表达的融合蛋白的分子量为 80-82ku。经 Western blot、Dot-ELISA 进行析表明: 该蛋白具有与天然蛋白相似的免疫反应活性。

基因VII型新城疫病毒 NP 基因的核苷酸序列及其推倒的氨基酸序列如

下:

```

1   ATGTCGTCGTGTTTTTCGACGAATACGAGCAGCTTCTCGCTGCTCAGACCCGCCCTAACGGA
1   M S S V F D E Y E Q L L A A Q T R P N G
61  ACTCATGGAGGGGGAGAGAAAGGGAGCACTTTAAAGGTTGAGGTCCCAGTATTTACCCTA
21  T H G G G E K G S T L K V E V P V F T L
121 AACAGTGATGATCCAGAGGATAGATGGAATTTTTGCGGTATTCTGTCTTCGGATTGCTGTT
41  N S D D P E D R W N F A V F C L R I A V
181 AGCGAGGATGCCAACAAACCACTCAGGCAAGGTGCTCTTATATCCCTCTTATGCTCCCAT
61  S E D A N K P L R Q G A L I S L L C S H
241 TCTCAGGTGATGAGAAACCATGTTGCCCTTGCAAGGAAACAGAATGAGGCCACACTGGCT
81  S Q V M R N H V A L A G K Q N E A T L A
301 GTTCTTGAGATCGATGGTTTTGCTAACAGTGTGCCCCAGTTCAACAATAGGAGTGGAGTG
101 V L E I D G F A N S V P Q F N N R S G V
361 TCTGAGGAGAGAGCACAGAGATTCATGGTAATCGCAGGATCTCTCCCTCGGGCATGCAGC
121 S E E R A Q R F M V I A G S L P R A C S
421 AACGGTACTCCGTTTTGTACAGCTGGGGTTGAAGATGATGCACCAGAAGATATCACTGAC
141 N G T P F V T A G V E D D A P E D I T D
481 ACTCTGGAAGAATCCTATCTATCCAAGTTCAGGTATGGGTACAGTAGCAAAGGCCATG
161 T L E R I L S I Q V Q V W V T V A K A M
541 ACTGCATATGAGACAGCAGATGAGTCAGAAACAAGAATAAATAAGTATATGCAGCAA
181 T A Y E T A D E S E T R R I N K Y M Q Q
601 GGTAGAGTTCAGAAGAAGTACATCCTTCATCCTGTATGCAGGAGTGAATTCAACTCACA
201 G R V Q K K Y I L H P V C R S A I Q L T
661 ATCAGACATTCTCTGGCGGTCCGTATTTTTCTAGTTAGTGAGCTCAAGAGGGGCCGAAT
221 I R H S L A V R I F L V S E L K R G R N
721 ACAGCAGGGGGAGCTCTACGTATTACAACCTGGTTCGGGGATGTAGACTCATAATCAGA
241 T A G G S S T Y Y N L V G D V D S Y I R
781 AACACCGGGCTTACTGCATTTTTCTAACACTCAAATATGGAATCAATACCAAGACGTCA
261 N T G L T A F F L T L K Y G I N T K T S
841 GCCCTCGCACTCAGCAGCCTCACAGGTGATATCCAAAAATGAAACAGCTCATGCGTTTA
281 A L A L S S L T G D I Q K M K Q L M R L
901 TATCGGATGAAAGGTGAGAATGCACCATACATGACATTGTTAGGTGACAGTGACCAGATG
301 Y R M K G E N A P Y M T L L G D S D Q M
961 AGCTTTGCACCAGCTGAGTATGCACAACCTTTATTCTTTTGCCATGGGCATGGCATCAGTC
321 S F A P A E Y A Q L Y S F A M G M A S V
1021 TTAGATAAGGGAAGTGGCAAGTACCAATTCGCCAGGGACTTTATGAGCACATCATTCTGG
341 L D K G T G K Y Q F A R D F M S T S F W
1081 AGACTTGAGTAGAGTATGCTCAGGCTCAGGGAAGTAGCATCAATGAGGACATGGCTGCT
361 R L G V E Y A Q A Q G S S I N E D M A A
1141 GAGCTAAAATAACCCCGGCAGCAAGGAGAGGCCTGGCAGCTGCTGCCAACGAGTATCT
381 E L K L T P A A R R G L A A A A Q R V S
1201 GAAGAAATCGGCAGCATGGACATTCCTACTCAACAGGCGGGAGTCCTCACCGGGCTCAGT
401 E E I G S M D I P T Q Q A G V L T G L S
1261 GACGAAGGCCCCGAACCTCACAGGGCGGATCAAACAAGCCGCAAGGGCAACCAAATGCC
421 D E G P R T P Q G G S N K P Q G Q P N A
1321 GGGGATGGGAGACCCAATTCATGGATTTTATGAGAGCAGTGGCGAACAGCATGCGGGAA

```

```

441      G D G E T Q F M D F M R A V A N S M R E
1381     GCGCCAAATCCTGCACAGAGCACCACCCATCCAGAGCCTCCCCCAACCCCTGGGGCATCC
461      A P N P A Q S T T H P E P P P T P G A S
1441     CAAGACAACGACACTGACTGGGGGTACTGA
481      Q D N D T D W G Y *

```

本发明的产品是采用这样的方法来加工的:

- 1) 设计扩增基因VII型新城疫病毒 NP 基因的特异性引物;
- 2) 通过 RT-PCR 扩增 NP 基因片段;
- 3) 对 NP 基因进行克隆、测序鉴定;
- 4) 将 NP 基因定向亚克隆至 pGEX-6p 原核表达载体;
- 5) 重组表达质粒 pGEX-6p-NP 转化大肠杆菌中进行诱导表达;
- 6) 重组蛋白的纯化

通过离心收集培养物中的基因工程菌,用 PBS 洗涤 3 次,沉淀用 PBS 溶液重悬,加入溶菌酶至终浓度为 1%即 1mg/ml, 然后进行超声处理, 超声处理必须于冰浴条件下进行; 以 4℃、10000g 离心 10min, 取上清并加入 1%的 TritonX-100 及 1mmol/L 的 DTT 至终浓度为 1mmol/L; 沉淀即为包涵体, 将沉淀用组成为 30%蔗糖, 100mol/L NaCl, 50mmol/L Tris, pH8.0, 1%TritonX-100 的包涵体洗涤液洗涤 2 次, 重悬沉淀, 加入组成为 1.5%(m/v)N-十二烷基肌氨酸钠, 25mmol/L 三乙醇胺, 1mmol/L EDTA, pH8.0 的包涵体裂解液重悬, 4℃处理 2h, 再超声处理 20S, 以 12000r/m, 4℃离心 20min, 除去不溶性沉淀, 取上清即为可溶性包涵体蛋白, 向其中立即加入终浓度为 2%的 Triton X-100, 加入 9 倍体积的组成为 0.8mmol/L 氧化型谷胱苷肽 (GSSH), 2mmol/L 还原型谷胱苷肽 (GSH), 2mmol/L EDTA, 20mmol/L Tris, pH8.5] 的复性缓冲液, 用 0.01mol/L PBS、pH7.4 透析 48h, 每 12h 更换一次透析液。取出复性的包涵体蛋白液, 经聚乙醇-8000 进行浓缩, 加入 2%的 Triton X-100 后, 于-20℃保存备于纯化。

将复性后的表达蛋白经 SDS-PAGE 电泳后, 用 KCl 染色, 将凝胶中的目的蛋白带切下、研碎, 加入 PBS, 反复冻融, 1000r/min 离心 10min, 上清即为纯化蛋白。

7) 重组蛋白抗原性检测

通过免疫印迹、Dot-ELISA 方法的检测该蛋白的抗原性。

免疫印记试验: 将纯化的重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后, 再将凝胶上的蛋白转印至硝酸纤维膜上, 以 1:150 倍稀释基因 VII 型新城疫阳性的鸡

血清作为一抗，1:10000 倍稀释的辣根标记的兔抗鸡 IgG 作为二抗，底物为 4-氯-1-萘酚，结果在约 80ku 处观察到了特异性的反应条带。

Dot-ELISA（免疫酶斑点技术）实验：一抗、二抗和底物同上，结果纯化后的重组蛋白与基因 VII 型新城疫阳性的鸡血清形成了明显的斑点。

采用本专利的方法生产的产品可作为检测基因 VII 型新城疫的间接-ELISA 及 Dot-ELISA 等抗体检测方法的检测抗原。

其产品优点体现在：

- 1) 由于所制备检测抗原是 NP 基因原核表达重组蛋白，并非全病毒，因此应用该检测抗原无散毒危险。
- 2) 可用于鉴别亚单位疫苗或活载体疫苗免疫接种与自然感染抗体。
- 3) 所制备的检测基因 VII 型新城疫的检测抗原具有检测灵敏度高，特异性强，无交叉反应的特点。
- 4) 制备工艺简单、产品性能稳定，成本低，产品附加值高，适合工厂化生产，市场应用前景广。

通过该方法制备的重组蛋白可用于基因 VII 型新城疫的自然感染与亚单位疫苗或活载体疫苗免疫抗体的鉴别。

融合表达的优点一是便于亲和层析纯化，二是增加蛋白分子量后免疫原性得到提高；该融合蛋白在表达时，大部分以非可溶性的包涵体形式表达，在纯化之前对包涵体采用了较为温和的包涵体裂解方式，因此包涵体蛋白裂解后又经复性处理后，根据 Dot-ELISA 及 Western blot 鉴定表明，融合蛋白具有与自然感染新城疫病毒 NP 蛋白抗体特异性结合的活性，经裂解的包涵体蛋白经 24 个月仍保持良好的均质胶体状态，无析出和沉淀现象，表明状态稳定。

应用本方法制备的重组蛋白作为检测抗原可以鉴别基因 VII 型新城疫病毒的自然感染与亚单位疫苗或活载体疫苗免疫的抗体；此外制备的重组蛋白是病毒 NP 基因的表达产物，并非全病毒，因此在应用该抗原进行检测过程中绝无散毒危险；同时还具有检测反应灵敏度高，无交叉反应现象的优点。

（四）具体实施方案

- 1) 设计扩增基因 VII 型新城疫病毒 NP 基因的特异性引物；

上游引物：5' CCGGATCCTCTACCGATATGTCGTCTG 3'

下游引物: 5' GGAATTCCGGTGTTCGATCAGTACC 3'

2) 通过 RT-PCR 扩增 NP 基因片段;

3) 对 NP 基因进行克隆、测序鉴定;

基因 VII 型新城疫病毒 NP 基因的核苷酸序列及其推倒的氨基酸序列如下:

```

1      ATGTCGTCTGTTTTTCGACGAATACGAGCAGCTTCTCGCTGCTCAGACCCGCCCTAACGGA
1      M S S V F D E Y E Q L L A A Q T R P N G
61     ACTCATGGAGGGGGAGAGAAAGGGAGCACTTTAAAGGTTGAGGTCACAGTATTTACCCTA
21     T H G G G E K G S T L K V E V P V F T L
121    AACAGTGATGATCCAGAGGATAGATGGAATTTTGCGGTATTCTGTCTTCGGATTGCTGTT
41     N S D D P E D R W N F A V F C L R I A V
181    AGCGAGGATGCCAACAAACCACTCAGGCAAGGTGCTCTTATATCCCTCTTATGCTCCCAT
61     S E D A N K P L R Q G A L I S L L C S H
241    TCTCAGGTGATGAGAAACCATGTTGCCCTTGACAGGGAAACAGAATGAGGCCACACTGGCT
81     S Q V M R N H V A L A G K Q N E A T L A
301    GTTCTTGAGATCGATGGTTTTGCTAACAGTGTGCCCCAGTTCAACAATAGGAGTGGAGTG
101    V L E I D G F A N S V P Q F N N R S G V
361    TCTGAGGAGAGAGCACAGAGATTGATGGAATCGCAGGATCTCTCCCTCGGGCATGCAGC
121    S E E R A Q R F M V I A G S L P R A C S
421    AACGGTACTCCGTTTTGTCACAGCTGGGGTTGAAGATGATGCACCAGAAGATATCACTGAC
141    N G T P F V T A G V E D D A P E D I T D
481    ACTCTGGAAAGAATCCTATCTATCCAAGTTCAGGTATGGGTACAGTAGCAAAGGCCATG
161    T L E R I L S I Q V Q V W V T V A K A M
541    ACTGCATATGAGACAGCAGATGAGTCAGAAACAAGAAGAATAAATAAGTATATGCAGCAA
181    T A Y E T A D E S E T R R I N K Y M Q Q
601    GGTAGAGTTCAGAAGAAGTACATCCTTCATCCTGTATGCAGGAGTGAATTCAACTCACA
201    G R V Q K K Y I L H P V C R S A I Q L T
661    ATCAGACATTCTCTGGCGGTCCGTATTTTCTAGTTAGTGAGCTCAAGAGGGGCCGCAAT
221    I R H S L A V R I F L V S E L K R G R N
721    ACAGCAGGCGGGAGCTCTACGTATTACAACCTGGTCCGGGATGTAGACTCATAATCAGA
241    T A G G S S T Y Y N L V G D V D S Y I R
781    AACACCGGGCTTACTGCATTTTTCTAACACTCAAATATGGAATCAATACCAAGACGTCA
261    N T G L T A F F L T L K Y G I N T K T S
841    GCCCTCGCACTCAGCAGCCTCACAGGTGATATCCAAAAAATGAAACAGCTCATGCGTTTA
281    A L A L S S L T G D I Q K M K Q L M R L
901    TATCGGATGAAAGGTGAGAATGCACCATACATGACATTGTTAGGTGACAGTGACCAGATG
301    Y R M K G E N A P Y M T L L G D S D Q M
961    AGCTTTGCACCAGCTGAGTATGCACAACCTTTATCTTTTGCATGGGCATGGCATCAGTC
321    S F A P A E Y A Q L Y S F A M G M A S V
1021   TTAGATAAGGGAACCTGGCAAGTACCAATTCGCCAGGGACTTTATGAGCACATCATTCTGG
341    L D K G T G K Y Q F A R D F M S T S F W
1081   AGACTTGGAGTAGAGTATGCTCAGGCTCAGGGAAGTAGCATCAATGAGGACATGGCTGCT
361    R L G V E Y A Q A Q G S S I N E D M A A
1141   GAGCTAAAACCTAACCCCGGCAGCAAGGAGAGGCCTGGCAGCTGCTGCCAACGAGTATCT

```

```

381      E L K L T P A A R R G L A A A A Q R V S
1201    GAAGAAATCGGCAGCATGGACATTCTACTCAACAGGCGGGAGTCCTCACCGGGCTCAGT
401      E E I G S M D I P T Q Q A G V L T G L S
1261    GACGAAGGCCCGAACTCCACAGGGCGGATCAAACAAGCCGCAAGGGCAACCAAATGCC
421      D E G P R T P Q G G S N K P Q G Q P N A
1321    GGGGATGGGGAGACCCAATTCATGGATTTTATGAGAGCAGTGGCGAACAGCATGCGGGAA
441      G D G E T Q F M D F M R A V A N S M R E
1381    GCGCCAAATCCTGCACAGAGCACCCACCCATCCAGAGCCTCCCCCAACCCCTGGGGCATCC
461      A P N P A Q S T T H P E P P P T P G A S
1441    CAAGACAACGACACTGACTGGGGGTACTGA
481      Q D N D T D W G Y *

```

4) 将 NP 基因定向亚克隆至 pGEX-6p 原核表达载体;

5) 重组表达质粒 pGEX-6p-NP 转化大肠杆菌中进行诱导表达;
表达的融合蛋白的分子量为 81.9ku。

6) 重组蛋白的纯化

通过离心收集培养物中的基因工程菌,用 PBS 洗涤 3 次,沉淀用 PBS 溶液重悬,加入溶菌酶至终浓度为 1%(1mg/ml),然后进行超声处理,超声处理必须于冰浴条件下进行。以 4℃、10000g 离心 10min,取上清并加入 1%的 TritonX-100 及 1mmol/L 的 DTT 至终浓度为 1mmol/L;沉淀即为包涵体,将沉淀用包涵体洗涤液(30%蔗糖,100mol/L NaCl,50mmol/L Tris,pH8.0,1%TritonX-100)洗涤 2 次,重悬沉淀,加入包涵体裂解液[1.5%(m/v)N-十二烷基肌氨酸钠,25mmol/L 三乙醇胺,1mmol/L EDTA,pH8.0]重悬,4℃处理 2h,再超声处理 20S,以 12000r/m,4℃离心 20min,除去不溶性沉淀,取上清即为可溶性包涵体蛋白,向其中立即加入终浓度为 2%的 Triton X-100,加入 9 倍体积的复性缓冲液[0.8mmol/L 氧化型谷胱苷肽(GSSH),2mmol/L 还原型谷胱苷肽(GSH),2mmol/L EDTA,20mmol/L Tris,pH8.5],用 0.01mol/L PBS(pH7.4)透析 48h,每 12h 更换一次透析液。取出复性的包涵体蛋白液,经聚乙醇-8000 进行浓缩,加入 2%的 Triton X-100 后,于-20℃保存备于纯化。

将复性后的表达蛋白经 SDS-PAGE 电泳后,用 KCl 染色,将凝胶中的目的蛋白带切下、研碎,加入 PBS,反复冻融,1000r/min 离心 10min,上清即为纯化蛋白。

7) 重组蛋白抗原性检测

通过免疫印迹、Dot-ELISA 方法的检测该蛋白的抗原性。

免疫印记试验:将纯化的重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后,再将凝胶上的蛋白转印至硝酸纤维膜上,以 1:150 倍稀释基因 VII 型新城疫阳性的鸡

血清作为一抗，1:10000 倍稀释的辣根标记的兔抗鸡 IgG 作为二抗，底物为 4-氯-1-萘酚，结果在约 80ku 处观察到了特异性的反应条带。

Dot-ELISA (免疫酶斑点技术) 实验：一抗、二抗和底物同上，结果纯化后的重组蛋白与基因VII型新城疫阳性的鸡血清形成了明显的斑点。

专利名称(译)	基因VII型新城疫病毒NP抗体的重组原核表达检测抗原及制备方法		
公开(公告)号	CN1763104A	公开(公告)日	2006-04-26
申请号	CN200410043953.2	申请日	2004-10-20
[标]申请(专利权)人(译)	东北农业大学		
申请(专利权)人(译)	东北农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	东北农业大学		
[标]发明人	王君伟 杨玉菊		
发明人	王君伟 杨玉菊		
IPC分类号	C07K19/00 C12N15/62 G01N33/53 G01N33/68		
其他公开文献	CN100480271C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供的是一种基因VII型新城疫病毒NP抗体的重组原核表达检测抗原及制备方法。基因VII型新城疫病毒NP抗体的重组原核表达检测抗原是应用RT - PCR技术扩增基因VII型新城疫病毒NP基因基础上，将NP基因定向亚克隆到原核表达载体pGEX - 6p上，然后转化大肠杆菌表达系统进行诱导表达所得到的基因工程蛋白，该蛋白的表达形式是融合蛋白，表达的融合蛋白的分子量为81.9ku。通过本方法制备的基因工程重组蛋白可用于VII型新城疫抗NP蛋白抗体的检测。