



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110470829 A

(43)申请公布日 2019. 11. 19

(21)申请号 201910844679.5

(22)申请日 2019.09.07

(71)申请人 中国农业科学院上海兽医研究所
(中国动物卫生与流行病学中心上海分中心)

地址 200241 上海市闵行区紫月路518号

申请人 尼沃诺斯(苏州)生物工程有限公司

(72)发明人 朱传刚 周志平 冒丽 刘冀
江嘉欣 吴思敏 李嘉静 纪荣毅
沈元曦

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G07K 14/005(2006.01)

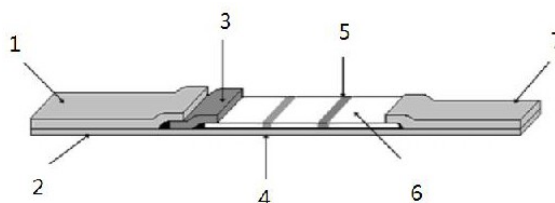
权利要求书1页 说明书4页
序列表1页 附图3页

(54)发明名称

一种氨基酸序列发生变异的轮状病毒VP6基因及免疫层析试纸条

(57)摘要

本发明提供一种氨基酸序列发生变异的轮状病毒VP6基因及免疫层析试纸条,所述轮状病毒胶体金免疫层析试纸条设有载体板、样品垫、胶体金结合垫、层板膜、检测线、质控线和吸收垫。利用重组VP6蛋白作为检测抗原,使用最经典的柠檬酸三钠还原法制备了胶体金颗粒,完成了轮状病毒免疫层析试纸条的研制与猪猪轮状病毒阳性血清可发生特异性结合,初步建立了诊断轮状病毒的快速诊断方法。



1. 一种免疫层析试纸条, 设有载体板、样品垫、胶体金结合垫、层板膜、检测线、质控线和吸收垫; 所述样品垫、胶体金结合垫、层板膜和吸收垫依次粘贴在载体板上表面, 样品垫的一端设在胶体金结合垫的一端上, 胶体金结合垫的另一端设在层板膜的一端上, 吸收垫的一端设在层板膜的另一端上, 检测线、质控线依次设在层板膜上; 在检测线处包被VP6重组蛋白, 在质控线处包被选用链球菌重组蛋白(rSPG)。

2. 如权利要求1所述的一种免疫层析试纸条, 其中的VP6重组蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

3. 如权利要求2所述的一种免疫层析试纸条, 其中VP6重组蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

4. 一种如权利要求1所述的胶体金免疫层析试纸条的制备方法, 所述方法包括:

1) 蛋白表达: 制备表达、纯化一种氨基酸序列发生变异的轮状病毒VP6的表达蛋白;

2) 硝酸纤维素膜的点样: 将VP6稀释至0.5mg/ml, 用于检测线(T线)的划线, 将小鼠抗His标签单克隆抗体稀释至0.5mg/ml用于质控线(C线)的划线; 将NC膜贴于底板上, 之后用胶体金点样系统进行划线, 划线量均为1 μ l/cm, 划线后将底板放置于37℃烘箱中烘干2小时, 密封于锡箔袋, 内置干燥剂, 有效期为15个月;

3) 胶体金的烧制: 按照柠檬酸钠还原法烧制胶体金: 将所有用于烧制、保存胶体金的玻璃器皿放在酸缸中浸泡24h, 取出后冲洗干净烘干备用; 取100mL去离子水与1mL1%氯金酸, 加热至沸腾; 逐滴加入1.5mL 1%柠檬酸三钠, 直到颜色稳定成红色; 此后继续煮沸15min, 冷却至室温;

4) 胶体金探针的制备: 将制备好的胶体金溶液用0.2%K₂CO₃调节pH至5.0, 逐滴加入重组蛋白rSPG, 震荡15min, 静置15min; 加入10mL10%PEG20000稳定液, 室温震荡15min, 静置15min; 溶液进行2000rpm离心20min, 取上清再进行10000rpm离心30min, 取沉淀, 沉淀用20mLTBS重悬; 将此胶体金探针均匀覆盖在金标垫上, -20℃冷冻2h, -80℃冷冻2h后置于多功能冻干机中真空冻干;

5) 胶体金免疫层析试纸条的制备: 将重组VP6蛋白稀释为1.5mg/mL、0.75mg/mL以及0.375mg/mL三种浓度; NC膜贴于底板上, 以重组VP6蛋白为检测线(T线), 蛋白rSPG为质控线(C线), 在胶体金点样系统上点样, 划线量为1 μ L/cm; 划线后的NC膜底板置于37℃烘箱, 过夜烘干; 依次把金标垫、样品垫、吸水纸贴于底板上, 用金标切条机切条, 宽度为3mm; 试纸条放入密封试纸筒中, 并加入干燥剂4℃密封保存。

5. 权利要求1的轮状病毒胶体金免疫层析试纸条在制备诊断、预防或治疗轮状病毒诊断试剂或药物中的应用。

一种氨基酸序列发生变异的轮状病毒VP6基因及免疫层析试纸条

技术领域

[0001] 本发明属于抗原制备技术领域,具体涉及一种新型的轮状病毒疫苗的抗原,即一种氨基酸序列发生变异的轮状病毒VP6基因,和含有该抗原的轮状病毒胶体金快速检测试纸条及其应用。

背景技术

[0002] 轮状病毒(Rotavirus,RV)属于呼肠病毒科,轮状病毒属,于1973年被Bishop等首次发现,因其在电镜下形似车轮辐条而得名轮状病毒。该病毒是引起人类、哺乳动物和鸟类病毒性腹泻的主要病原体,感染病毒的高危人群为6个月-3岁的婴幼儿,临床症状表现为持续多日的腹泻和呕吐,伴随着发烧、便血,严重者可因脱水、中毒性心肌炎和肺炎等并发症而死亡,在我国因猪轮状病毒(Porcine rotavirus)引起的仔猪腹泻给养猪业造成严重经济损失。

[0003] 完整的轮状病毒颗粒具有三层衣壳,其基因组是由11个双链RNA节段组成,每个基因节段编码一个蛋白,基因片段6负责编码内壳结构蛋白VP6。VP6蛋白是轮状病毒中含量最高的蛋白,是病毒的组(亚组)抗原蛋白,在病毒颗粒的组装过程中起着重要的作用,在内壳蛋白基因组RNA的组装和外壳蛋白进入细胞中起到了一个物理受体的作用,同时VP6蛋白的存在对于病毒的转录必不可少。人或动物感染轮状病毒后,在体内会产生抗轮状病毒组(亚组)的抗体,检测到此抗体即可检测到轮状病毒的感染,鉴于VP6蛋白具有的强免疫原性和高度保守性,VP6被广泛应用于轮状病毒的检测。

[0004] VP6蛋白占轮状病毒总蛋白含量的51%,具有重要的生物学功能,在维持病毒形态、病毒进入细胞、基因组复制和组装过程起着重要的作用。VP6蛋白不能刺激机体产生中和抗体,但所产生的IgA具有保护作用,该蛋白还具有一个交叉反应的细胞毒性T淋巴稀薄(CTL)表位。至今还没有治疗轮状病毒感染的特效药物,针对该病毒的疫苗都只能降低病毒感染而引起的死亡率和重症腹泻,不具备保护机体免受轮状病毒感染的功效。该病与其它细菌和病毒引起的腹泻性疾病在临床上难以鉴别,能否准确诊断对治疗该病毒的感染具有非常重要的意义。目前检测轮状病毒的试剂盒主要供临床检测用,且主要是用来检测轮状病毒抗原的,尚无检测RV抗体的试剂盒。因此,有必要研制出一种快速方便、特异性检测轮状病毒抗体的胶体金试纸条。

[0005] 但在目前使用的轮状病毒重组抗原亚单位疫苗研究中,由于轮状病毒基因组的多样性,导致制备的疫苗不能有效的预防不同基因背景的轮状病毒。且轮状病毒血清群和血清型众多,且不同毒株的生物学特性不同,故对轮状病毒的分离鉴定及相关特性的研究,无论是该病毒的基础性研究亦或是对该病的应用性研究均具有十分重要的意义。

发明内容

[0006] 本发明主要解决的技术问题是提供一种快速、高灵敏的免疫检测产品及方法,实

现高效、高密度的免疫检测。

[0007] 本发明的一个目的在于提供一种具有抗原性的轮状病毒结构蛋白VP6,重组蛋白VP6的基因序列如SEQ ID NO.1所示。

[0008] 进一步的,提供一种利用上述VP6重组蛋白制备的轮状病毒胶体金免疫层析试纸条。

[0009] 所述轮状病毒胶体金免疫层析试纸条设有载体板、样品垫、胶体金结合垫、层板膜、检测线、质控线和吸收垫;所述样品垫、胶体金结合垫、层板膜和吸收垫依次粘贴在载体板上表面,样品垫的一端设在胶体金结合垫的一端上,胶体金结合垫的另一端设在层板膜的一端上,吸收垫的一端设在层板膜的另一端上,检测线、质控线依次设在层板膜上;在检测线处包被VP6重组蛋白,在质控线处包被选用链球菌重组蛋白(rSPG)。

[0010] 所述载体板可采用PVC板。

[0011] 利用重组VP6蛋白作为检测抗原,使用最经典的柠檬酸三钠还原法制备了胶体金颗粒,完成了轮状病毒免疫层析试纸条的研制与猪猪轮状病毒阳性血清可发生特异性结合,初步建立了诊断轮状病毒的快速诊断方法。

附图说明

[0012] 图1 ET-32a (+)-VP6重组质粒的PCR鉴定电泳图,1:DNA Market (DM2000);2:PCR产物;

图2 pET-32a (+)-VP6重组质粒的双酶切鉴定电泳图,1:DNA Market (DM5000);2:pET-32a (+)-VP6重组质粒;

图3 Vp6蛋白的诱导表达时相,1:Protein Market (12-120kDa);2:无IPTG诱导;3-6:加入IPTG后诱导表达后1h、2h、3h、4h、6h、8h;

图4 VP6蛋白可溶性鉴定结果,1:Protein Market (12-120kDa);2:超声后的上清;3:超声后的沉淀;

图5 VP6蛋白纯化结果,1:Protein Market (12-120kDa);2:上样前的目的蛋白 3:上样后的目的蛋白 4-8:纯化后的目的蛋白;

图6胶体金免疫层析试纸条示意图,其中,1、样品垫;2、PVC底板;3、胶体金垫;4、测试线;5、控制线;6、硝酸纤维素膜(NC膜);7、吸水垫。

具体实施方式

[0013] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。

[0014] 实施例1轮状病毒VP6重组基因的构建表达及活性鉴定

参考GenBank已发表的VP6蛋白的基因序列,构建具有抗原性的基因序列,应用DNASTAR 软件分析重组序列所表达的氨基酸序列、理论分子量及等电点,5'端加入BamHI (GGATCC)酶切位点,3'端加入TAA终止序列和Hind III (GAATTC)酶切位点,重组基因序列由苏州金唯智生物科技有限公司进行合成,VP6的基因序列如SEQ ID NO.1所示。

[0015] 用T4连接酶将VP6基因序列片段与pET-32a (+)空载体进行连接,构建pET-28a (+)-

r VP6重组质粒,将重组质粒转化至大肠杆菌BL21 (DE3) 中,涂在含卡那青霉素抗体的LB固体培养基上37℃培养过夜,之后挑取若干单个菌落进行扩大培养。进行菌液PCR(图1)和质粒双酶切(图2)及测序鉴定,与预期相符。PCR所用引物为T7通用引物。

[0016] 将5mL测序正确的含有pET-32a (+)-VP6重组质粒的细菌培养物接种于250 mL含氨苄青霉素的LB液体培养基中,置于37℃震荡培养箱中,250 rpm振荡培养。当细菌培养至OD为0.6时,加入浓度为1mmol/L的IPTG进行诱导表达,分别取诱导前,诱导后1h、2h、3h、4h、6h、8h的菌液各1mL,12000rpm离心10min,弃上清,沉淀用40μL的1×PBS重悬,进行SDS-PAGE电泳,分析最佳诱导时间。SDS-PAGE电泳结果表明,轮状病毒Vp6蛋白在大肠杆菌中成功表达,分子量为34.2kDa(图3)。

[0017] 将诱导后的菌液12000rpm离心15min,弃上清,沉淀用15mL的1×PBS重悬,反复冻融3次,超声破碎20min(超声时间2s,停顿时间9.9s),12000rpm离心15min,分别收集上清和沉淀。沉淀用10mL的8mol尿素重悬,12000rpm离心15min,收集上清。SDS-PAGE电泳分析表达产物的可溶性(图4)。使用His亲和层析柱对表达的重组蛋白进行纯化,收集各段洗脱液样品(图5)。

[0018] 实施例2 胶体金免疫层析试纸条的制备

2.1、蛋白表达:如实施例1所述制备表达、纯化重组蛋白VP6。

[0019] 2.2、硝酸纤维素膜的点样:将VP6稀释至0.5mg/ml,用于检测线(T线)的划线,将小鼠抗His标签单克隆抗体稀释至0.5mg/ml用于质控线(C线)的划线。将NC膜贴于底板上,之后用胶体金点样系统进行划线,划线量均为1μl/cm,划线后将底板放置于37℃烘箱中烘干2小时,密封于锡箔袋,内置干燥剂,有效期为15个月。

[0020] 2.3胶体金的烧制

按照柠檬酸钠还原法烧制胶体金:将所有用于烧制、保存胶体金的玻璃器皿放在酸缸中浸泡24h,取出后冲洗干净烘干备用。取100mL去离子水与1mL1%氯金酸,加热至沸腾。逐滴加入1.5mL 1%柠檬酸三钠,直到颜色稳定成红色。此后继续煮沸15min,冷却至室温。

[0021] 2.4胶体金探针的制备

将制备好的胶体金溶液用0.2%K₂CO₃调节pH至5.0,逐滴加入重组蛋白rSPG,震荡15min,静置15min。加入10mL10%PEG20000稳定液,室温震荡15min,静置15min。溶液进行2000rpm离心20min,取上清再进行10000rpm离心30min,取沉淀,沉淀用20mLTBS重悬。将此胶体金探针均匀覆盖在金标垫上,-20℃冷冻2h,-80℃冷冻2h后置于多功能冻干机中真空冻干。

[0022] 2.5胶体金免疫层析试纸条的制备

按图6所示制备试纸条,将重组VP6蛋白稀释为1.5mg/mL、0.75mg/mL以及0.375mg/mL三种浓度。NC膜贴于底板上,以重组VP6蛋白为检测线(T线),蛋白rSPG为质控线(C线),在胶体金点样系统上点样,划线量为1μL/cm。划线后的NC膜底板置于37℃烘箱,过夜烘干。依次把金标垫、样品垫、吸水纸贴于底板上,用金标切条机切条,宽度为3mm。试纸条放入密封试纸筒中,并加入干燥剂4℃密封保存。

[0023] 2.6 试纸条判定标准的建立 猪轮状病毒抗体检测试纸条采用胶体金免疫层析技术,当试纸条插入阳性样品后,样品中的IgG与金标垫上金标记的具有His标签的r-SPG蛋白结合形成复合物,复合物在包被膜迁移的过程中,样品中特异性的IgG与检测线(T)上的VP6

形成金标记His-r-SPG蛋白-IgG-抗原复合物,在检测线处显色,随后在质控线处富余的金标记His-r-SPG蛋白-IgG复合物与质控线处的小鼠抗His标签单克隆抗体形成小鼠抗His标签单克隆抗体-金标记His-r-SPG蛋白-IgG复合物,从而使质控线(C)显色,反之,阴性样品时,检测线(T)无抗原,就不能形成金标记His-r-SPG蛋白-IgG-抗原复合物,检测线(T)也就不显色,只能与质控线上的小鼠抗His标签单克隆抗体结合形成小鼠抗His标签单克隆抗体-金标记His-r-SPG蛋白复合物而显色。所以,我们制定了试纸条的结果判定标准为:阳性 检测线处(T)和质控线处(C)各出现一条紫红色条带,判定为阳性;阴性 仅在质控线处(C)出现一条紫红色条带,检测线(T)处未出现一条紫红色条带,判定为阴性。无效 在质控线处(C)无明显条带出现,判定为无效。

[0024] 2.7 胶体金试纸条的结果检测

取猪轮状病毒小鼠阳性血清以1:10、1:20、1:50、1:100的稀释度稀释。将稀释好的阳性血清分别滴于样品垫上,静置观察。若T、C线均显色,则结果为阳性;若只有C线显色,则结果为阴性;若只有T线显色,则试纸条无效。

[0025] 结果显示(表1),该试纸条与猪轮状病毒阳性血清能够发生反应。其中蛋白量为1.5mg/mL反应迅速且明显,蛋白量为0.75mg/mL有反应但不明显重组蛋白量为0.375mg/mL的试纸条反应则不明显,故判断重组蛋白的划线最佳浓度约为1.5mg/mL;根据不同浓度的血清检测结果,可得血清最佳稀释度为1:10。

[0026] 表1 不同浓度标记的重组蛋白与不同稀释倍数的阳性血清反应结果

血清稀释倍数	重组蛋白浓度 (mg/mL)		
	0.375	0.75	1.5
1:10	+	+	++
1:20	-	-	+
1:50	-	-	-

2.8 试纸条敏感性。采用试制的3批猪轮状病毒抗体检测试纸条对已知阴性样品、发病动物血清样品进行检测,结果显示,检测10份已知阴性血清样品,结果均为阴性;对20份已知发病动物血清样品检出率为100%(20/20)。

<110>中国农业科学院上海兽医研究所(中国动物卫生与流行病学中心上海分中心),
尼沃诺斯(苏州)生物工程有限公司

<120>一种氨基酸序列发生变异的轮状病毒VP6基因及免疫层析试纸条

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 444

<212> DNA

<213> VP6蛋白全长序列

<400>GGATCCAAAGATGCCCCGCGACAAAATCGGCGGCAACGATTTTCAGACCGGCGGTATTGGTGGTAGCG
TGAAAAATGCCCGTGGTGGTGACGTGAAAGCCAGCGCAATGGTATTGCCCCGCAGAGTGAAGGCAGCTTCGACAAC
AGCAGTGACTACATCGAGAACTGGAACCTGCAGAAATCGCCGCCAGGGTGGTAATCGTAGTCAGCCGGCCCATGATAA
TGGCAGCAATGCCCCGGCCAATATTGGTGGCCGTTTTAGCTTTCCGCGCGTGATCAATAGCGCCGATGGTGCAACCA
CCGGTAGCCCGAATATGACCCCGGCCGTGGCCAATCTGTTTCCGCGAGGGTGGTGCAATTCCGGTTGGTCCGGTGTTT
CCGCCGGGCATGAATTGGACCGAACTGATCACCAACTATTCTCCGAGCCGTGAAGATAATTAAGCTT

<210> 2

<211> 145

<212> DNA

<213> VP6蛋白序列

<400>GSKDARDKIGGNDFQTGGIGGSVENARGGARESQRNGIAPQSEGSFDNSSDYIENWNLQRRRQGGNR
SQPAHDNGSNAPANIGGRFSFPRVINSADGATTGSPNMTPAVANLFPQGGAIPVGPVFPPGMNWTELITNYSPSRED
N

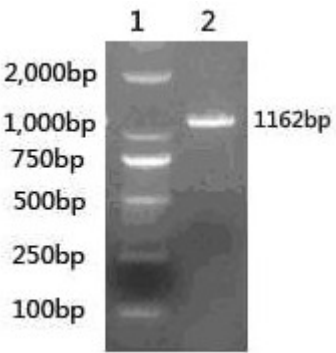


图1

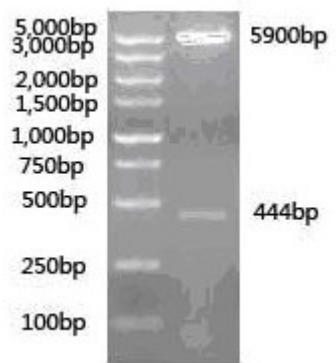


图2

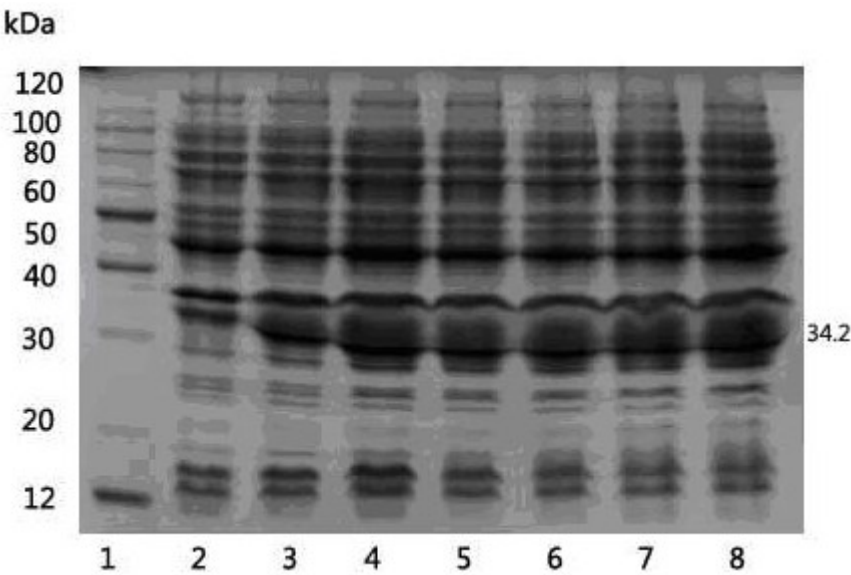


图3

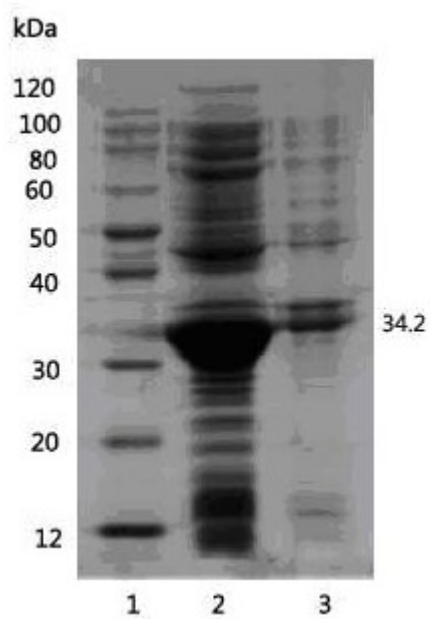


图4

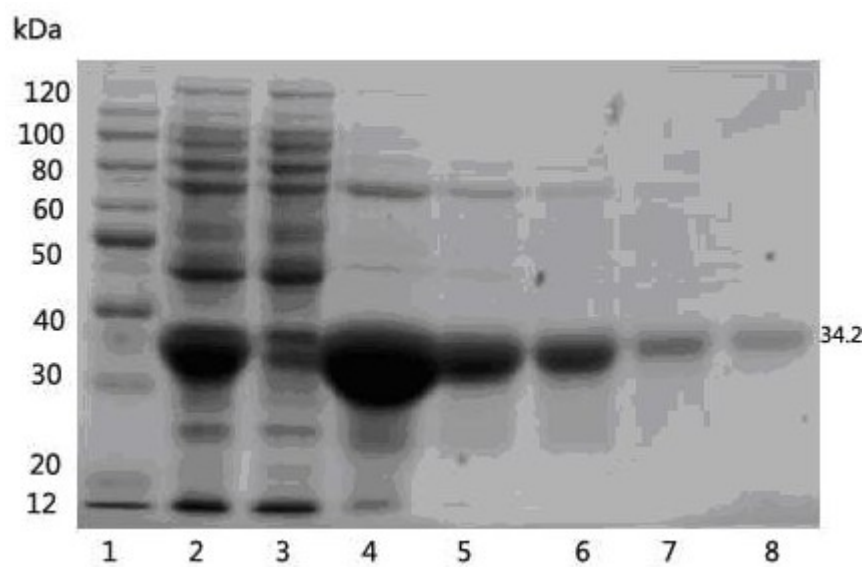


图5

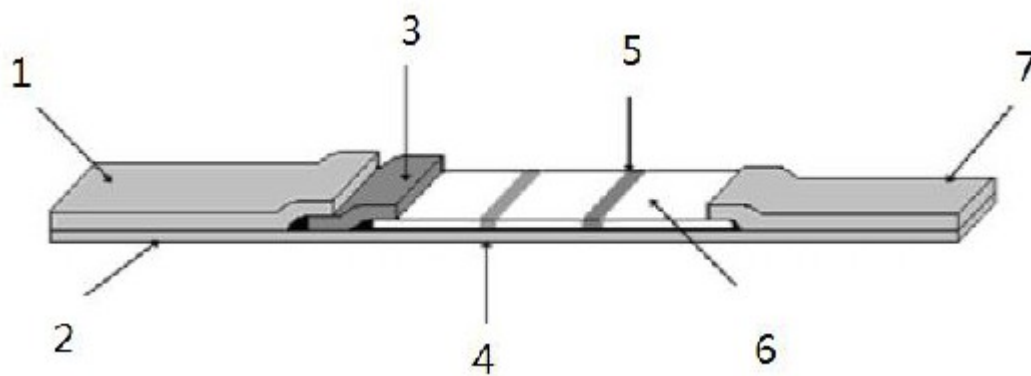


图6

专利名称(译)	一种氨基酸序列发生变异的轮状病毒VP6基因及免疫层析试纸条		
公开(公告)号	CN110470829A	公开(公告)日	2019-11-19
申请号	CN201910844679.5	申请日	2019-09-07
[标]发明人	朱传刚 周志平 刘冀 江嘉欣 吴思敏 李嘉静 沈元曦		
发明人	朱传刚 周志平 冒丽 刘冀 江嘉欣 吴思敏 李嘉静 纪荣毅 沈元曦		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/558 G01N33/569 C07K14/005		
CPC分类号	C07K14/005 C12N2720/12322 G01N33/531 G01N33/558 G01N33/56983		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种氨基酸序列发生变异的轮状病毒VP6基因及免疫层析试纸条，所述轮状病毒胶体金免疫层析试纸条设有载体板、样品垫、胶体金结合垫、层板膜、检测线、质控线和吸收垫。利用重组VP6蛋白作为检测抗原，使用最经典的柠檬酸三钠还原法制备了胶体金颗粒，完成了轮状病毒免疫层析试纸条的研制与猪猪轮状病毒阳性血清可发生特异性结合，初步建立了诊断轮状病毒的快速诊断方法。

