



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110540578 A

(43)申请公布日 2019.12.06

(21)申请号 201910804796.9

(22)申请日 2019.08.28

(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 上海杰一生物技术有限公司

(72)发明人 朱传刚 周志平 冒丽 刘冀  
吴思敏 纪荣毅 沈元曦

(51) Int. Cl.

C07K 14/03(2006.01)

C12N 15/38(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

权利要求书2页 说明书6页

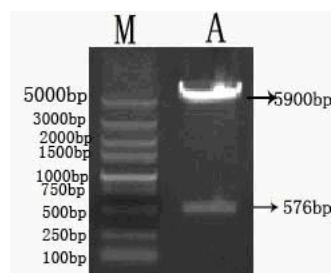
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

一种伪狂犬病病毒GE基因主要抗原表位区域重组蛋白制备及胶体金免疫层析试纸条

(57)摘要

本发明提供一种伪狂犬病病毒GE蛋白及其胶体金免疫层析试纸条的制备,所述伪狂犬病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。本发明的表达重组蛋白存在于上清,方便纯化,经过亲和层析纯化的重组蛋白作为诊断抗原建立的检测方法成本较低,检测方法简便。特别是集中了gE抗原主要的抗原表位作为诊断抗原,检测的灵敏性和特异性都较完全的gE蛋白更好。



1. 一种伪狂犬病病毒GE基因主要抗原表位区域重组蛋白,其特征在于,所述重组蛋白GE的基因序列如SEQ ID NO.1所示。

2. 如权利要求1所述一种伪狂犬病病毒GE基因主要抗原表位区域重组蛋白在制备诊断、预防或治疗伪狂犬病诊断试剂或药物中的应用。

3. 一种用于免疫分析的产品,所述产品包括权利要求1的重组蛋白。

4. 如权利要求3的产品,所述产品的形式可为探针(传感器)、试纸条、芯片、试剂盒等,在使用时,将本发明所述的融合蛋白与其它现有的商业试剂(如酶标抗体、荧光标记抗体、显色剂、底物等)混合,可用于各种形式的免疫分析,例如抗体检测、抗体筛选、抗原检测、病原检测、蛋白检测、蛋白相互作用筛查、高通量靶标蛋白检测、蛋白-核酸相互作用分析、药物筛选等。

5. 一种包括权利要求1中所述一种伪狂犬病病毒GE基因主要抗原表位区域重组蛋白的胶体金免疫层析试纸条,所述伪狂犬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GE重组蛋白,在质控线处包被选用链球菌重组蛋白(rSPG)。

6. 如权利要求5所述的胶体金免疫层析试纸条的制备方法,所述方法包括如下步骤:1) 蛋白表达 制备纯化重组蛋白;

2) 硝酸纤维素膜的点样:将GE重组蛋白稀释至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 $\mu$ l/cm,划线后将底板放置于37 $^{\circ}$ C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;

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;

胶体金探针的制备:将制备好的胶体金溶液用0.2%K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>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 $^{\circ}$ C冷冻2h,-80 $^{\circ}$ C冷冻2h后置于多功能冻干机中真空冻干;

胶体金免疫层析试纸条的制备:制备试纸条,将重组GE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GE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 $\mu$ L/cm;划线后的NC膜底板置于37 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C密封保存;

试纸条判定标准的建立:伪狂犬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GE重组蛋白形

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。

## 一种伪狂犬病病毒gE基因主要抗原表位区域重组蛋白制备及胶体金免疫层析试纸条

### 技术领域

[0001] 本发明涉及动物病毒学与免疫学检测技术领域,更具体涉及一种用于检测猪血清中伪狂犬病抗体的病毒gE蛋白的构建,同时还涉及一种利用上述蛋白制备免疫胶体金试纸的方法,还涉及一种用于检测猪血清中伪狂犬病病的病毒gE蛋白的免疫胶体金试纸的用途。

### 背景技术

[0002] 伪狂犬病病毒(Pseudorabies Virus, PRV)是引起牛、羊、猪、犬和猫等多种家畜和野生动物发热、奇痒(除猪外)和急性脑脊髓炎等为主要症状的疱疹病毒,由该病毒引起的疾病症状似狂犬病,故称伪狂犬病。猪是PRV的贮存宿主和传染源,健康猪与患猪、带毒猪直接接触可感染该病。主要引起母猪繁殖障碍、流产、产木乃伊胎、死胎和产弱仔,初生仔猪表现为腹泻及神经症状,感染率和死亡率高达100%,给养猪业造成了严重的经济损失。病毒可以通过体液、精液、乳汁、粪便等排泄物传播,也可以通过空气传播,通常可引起猪场的季节性爆发(Lisa E. Pomeranz et al., 2005)。

目前诊断PRV常用的血清学有乳胶凝集试验(LAT),琼脂免疫扩散试验(AGID),血凝试验(HA),胶体金免疫层析技术(ICG)等,其中胶体金免疫层析技术使用方便快捷,便于基层使用和现场使用,所有反应能在15分钟内完成;成本低,不需要特殊的仪器设备;应用范围广,可适应多种检测条件;可以进行多项检测,若阳性样本比较难获得,多项检测标记物稳定,标记样品在4℃贮存两年以上,无信号衰减现象;胶体金本身为红色,不需要加入发色试剂,省却了酶标的致癌性底物及终止液的步骤,对人体无毒害。

[0003] 中和试验是目前学界普遍认为最标准的伪狂犬检测方法,但是在实际检测工作中,中和试验会对非特异性病毒出现阳性反应,这对检测结果来说就增加了假阳性率的存在,且通常中和试验需要 24h 进行孵育。临床上存在简便的、快速的检测猪伪狂犬病病毒的迫切需求。

### 发明内容

[0004] 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。

[0005] 本发明的一个目的在于提供一种具有抗原性的伪狂犬病毒gE基因,选择gE蛋白N端的连续性抗原表位,即52-238位的氨基酸序列,根据原核表达系统的细菌密码子的偏向性重构这段蛋白的基因序列,构建一个新型的碱基序列,通过原核细菌表达具有相同氨基酸序列的gE蛋白的N端抗原表位。

[0006] 进一步的,本发明提供上述gE蛋白表位在制备诊断、预防或治疗伪狂犬病毒诊断试剂或药物中的应用。

[0007] 进一步的,本发明提供一种利用上述gE重组蛋白制备的伪狂犬病毒胶体金免疫层

## 析试纸条

产品以试纸条的形式存在时,可将本发明GE重组蛋白置于检测线,用于捕获目标分子,采用金标纳米粒子等进行检测;进一步的,当复合物融合不同的功能配体时,可实现多种目标分子的同时检测。

[0008] 所述伪狂犬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GE重组蛋白,在质控线处包被选用链球菌重组蛋白(rSPG)。

[0009] 所述载体板可采用PVC板。

[0010] 本发明提供了一种采用胶体金免疫层析技术建立弓形快速检测试剂,可用于全血、血清、血浆及脑脊液等标本中伪狂犬病毒的检测。检测时所需的标本量极小,不需要特殊仪器,肉眼直接判读结果,且检测简便快速,特异性强,灵敏度高,准确可靠,成本低,应用广泛。

[0011] 有益效果

本发明的伪狂犬病毒结构蛋白GE表位,为GE蛋白的核心表位。通过亲和层析获得该蛋白的纯度可达85%。经Western-blot 的结果验证,此蛋白具有一定的免疫原性,可以作为诊断抗原。

[0012] 利用重组GE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,完成了伪狂犬病毒免疫层析试纸条的研制与猪伪狂犬病毒阳性血清可发生特异性结合,初步建立了诊断伪狂犬病毒的快速诊断方法。

## 附图说明

[0013] 图1 重组质粒的PCR鉴定电泳图,1 M:DNA分子质量标准(DL2000);A:重组pET-32a(+)-rGE基因PCR产物

图2重组质粒的双酶切鉴定电泳图,M:DNA分子质量标准(DL5000);A:双酶切产物;

图3 GE蛋白的诱导表达时相,M:蛋白分子质量标准;1:未诱导细菌裂解产物;2-7诱导1h,2h,3h,4h,6h,8h后的细菌裂解产物;

图4 GE蛋白可溶性鉴定结果,M:蛋白分子质量标准;A:重组pET-28a(+)-rGE/BL21(DE3)转染菌后的上清B:重组pET-28a(+)-rGE/BL21(DE3)转染菌后的裂解于8M尿素的沉淀;

图5 GE蛋白免疫原性Western Blotting结果,其中M:蛋白分子质量标准;A:重组蛋白。

[0014] 图6 胶体金标记的检测试纸条结构示意图,其中,1为待检样品,2为样品吸垫,3为金标垫,4为NC膜,5为吸收垫,6为PVC底板,7为检测线(T线),8为控制线(C线)。

## 具体实施方式

[0015] 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。

[0016] 实施例1伪狂犬病毒GE重组基因的构建表达及活性鉴定

根据GeneBank中给出的已公布的猪瘟病毒的GE糖蛋白主要抗原结构域基因序列,找出主要抗原结构域A区、B区、C区、D区,得到GE基因序列,最后3'端加入TAA的终止序列。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,基因序列由苏州金唯智生物科技有限公司进行优化并合成,添加5' BamHI和3' HindIII,后将优化的基因克隆至表达载体pET-32a(+),得到重组质粒,命名为pET-32a(+)-rGE,GE的基因序列如SEQ ID NO.1所示。

[0017] 将重组质粒干粉按4 $\mu$ g中加入200 $\mu$ l无菌水,之后转入BL21(DE3),42 $^{\circ}$ C水浴45s转化,加入不含抗生素的LB培养基上,37 $^{\circ}$ C,250rpm孵育45min,然后将其涂布在含Amp<sup>+</sup>抗性LB平板上37 $^{\circ}$ C培养12h后,挑取若干阳性克隆菌落置于含Amp<sup>+</sup>抗性的LB培养基中,37 $^{\circ}$ C震荡培养12h。

[0018] 将转化后的重组质粒菌液进行PCR反应,1%琼脂糖凝胶鉴定(图1),并送去测序。将测序正确的PCR菌液按Axygen质粒小量提取试剂盒抽提重组质粒后,进行双酶切鉴定(图2)。PCR目的片段大小约为1300bp(如图1); BamHI和HindIII双酶切鉴定得到5900bp(载体片段)和576bp(目的基因片段)(如图2),与预期相符。

[0019] 实施例2 蛋白的制备和纯化

#### (一) 重组质粒的表达

(1) 将测序正确的含有重组质粒pET-32a(+)-GE的宿主菌BL21(DE3)接种于250 mL含50  $\mu$ g/mL Amp<sup>+</sup>的LB液体培养基中,置于37 $^{\circ}$ C培养箱中,250 r/min振荡培养至细菌生长对数期(OD<sub>600</sub>约为0.6)。

[0020] (2) 加入终浓度为1mmol/L的IPTG溶液,诱导8 h,分别于诱导前、诱导后第1 h、2 h、3 h、4 h、6 h、8h时,各取菌液1 mL,进行SDS-PAGE电泳鉴定,观察最佳诱导表达时间。

[0021] (3) 于诱导4 h后,将菌液4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min离心15min,收集菌体沉淀。

[0022] (4) 菌体沉淀用12 mL 1 $\times$ PBS重悬,反复冻融3次后,冰浴超声破碎20 min(超声2 s,间隔9.9 s)。

[0023] (5) 将超声后的菌液4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min离心15 min,收集上清与沉淀,沉淀溶于10 mL 8 M尿素中,然后同样条件离心收集上清。

[0024] (6) 分别取超声后上清和沉淀溶解上清,用SDS-PAGE鉴定重组蛋白表达形式。(图3)。

[0025] (二) 重组蛋白的纯化

根据SDS-PAGE鉴定结果分析重组蛋白表达形式,采用His $\cdot$ resin Bind树脂柱层析的方法纯化目的蛋白:

(1) 装脂:取一个空柱,加入3 mL树脂进行预装柱,待保存液降至树脂表明时,依次用3倍树脂体积双蒸水清洗,5倍树脂体积1 $\times$ charge Buffer进行树脂离子化,3倍树脂体积1 $\times$ binding buffer平衡色谱柱。

[0026] (2) 柱层析纯化:

①待1 $\times$ binding buffer降至树脂表面时,加入含重组蛋白的溶液,并保留过柱后的溶液;

②加入10倍树脂体积1 $\times$ binding buffer,并保留过柱后的溶液;

③加入6倍树脂体积1 $\times$ washing buffer,洗脱未能结合到树脂上的杂蛋白,并保留洗

脱液；

④加入6倍树脂体积1×Elute buffer,将结合到树脂上的目的蛋白洗脱下来,洗脱液依次保留在1.5 mL的EP管中；

⑤加入6倍树脂体积的1×Strip buffer,洗涤树脂；

⑥将树脂保存于适量的20%乙醇中；

(3) 用SDS-PAGE鉴定重组蛋白纯化效果。

[0027] 经SDS-PAGE分析显示,pET-32a (+)-rGE在大肠杆菌BL21 (DE3) 中经IPTG诱导,得到大量表达。在约37kDa处有清晰的目的条带,与预期的重组蛋白的分子质量大小相符(见图3)。经IPTG诱导1h,2h,3h,4h,6h,8h后,在3h后表达量达到最高,但表达8h后,表达量有所下降,而未经诱导的菌液(0h)未出现目的蛋白条带(图3),故取诱导表达3h的菌液进行可溶性表达鉴定。SDS-PAGE分析显示目的蛋白为包涵体表达,且在8M尿素中包涵体裂解(图4)。

[0028] (三) 重组蛋白的复性

将纯化后的重组蛋白用梯度尿素溶液进行透析复性(依次为含5 mol/L、4 mol/L、3 mol/L、2 mol/L、1 mol/L尿素的 PBS溶液及1×PBS),各个浓度溶液低温透析2 h。重组蛋白rGE的包涵体经过纯化后,得到一条清晰的目的条带,大小约为37kDa,与目的蛋白大小一致,经尿素梯度逐步透析,完成重组蛋白的复性。

[0029] (四) 蛋白浓度的测定

复性后的蛋白用TaKaRa BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度,按操作说明进行：

工作液的配制:按照BCA Reagent A: BCA Reagent B =100:1的比例混合后配制成工作液

BSA标准品曲线制备:BSA标准品溶液的稀释,2 mg/mL BSA Standard按24uL、18uL、12uL、9uL、6uL、3uL、2uL、0uL加入孔板中,用1×PBS将各孔板补足至终体积为25uL后,加入200uL工作液,立即混匀；

检测蛋白的测定:透析后的蛋白在孔板中加入25uL,加入200uL工作液,立即混匀；

37℃水浴槽中反应30分钟后,冷却至室温。使用酶标仪测定562nm处的吸光值。

[0030] 绘制标准曲线,分析待测蛋白的浓度。

[0031] 实施例3重组蛋白的免疫原性鉴定

按以下步骤检测重组蛋白的免疫原性：

(1) 将纯化透析后重组蛋白进行SDS-PAGE电泳,电泳结束后,在冰浴条件下,用260 mA电流转移1h,将重组蛋白电转移至硝酸纤维素膜上；

(2) 硝酸纤维素膜的封闭:称取5 g脱脂奶粉溶于100 mL的1×PBST中,将硝酸纤维素膜浸泡在溶液中,37℃封闭2 h；

(3) 一抗孵育:封闭结束后,用PBST洗掉未结合的脱脂奶粉(每次10 min,4次),然后以PRV Ab (+) (1:100稀释)为一抗,37℃孵育2 h；

(4) 二抗孵育:用PBST洗掉未结合的一抗(每次10 min,4次),以羊抗猪IgG(1:3000稀释)为二抗,37℃孵育1 h；

(5) 显色:用PBST洗掉未结合的二抗(每次10 min,4次),使用沉淀型HRP-DAB显色试剂盒显色,当有清晰的蛋白条带出现时,立即使用清水终止显色,证实获得的重组蛋白具有较好的免疫原性(图5)。

#### [0032] 实施例4胶体金免疫层析试纸条的制备

##### 4.1蛋白表达 如实施例2制备纯化重组蛋白

4.2硝酸纤维素膜的点样:将重组GE蛋白稀释至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 $\mu$ l/cm,划线后将底板放置于37 $^{\circ}$ C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。

##### [0033] 4.3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。

##### [0034] 4.4胶体金探针的制备

将制备好的胶体金溶液用0.2%K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>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 $^{\circ}$ C冷冻2h,-80 $^{\circ}$ C冷冻2h后置于多功能冻干机中真空冻干。

##### [0035] 4.5 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GE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GE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 $\mu$ L/cm。划线后的NC膜底板置于37 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C密封保存。

##### [0036] 4.6试纸条判定标准的建立

伪狂犬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)上的重组GE蛋白形成金标记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。

##### [0037] 4.7、试纸条敏感性。

[0038] 采用试制的3批伪狂犬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)。

[0039] 4.8、试纸条特异性。

[0040] 采用3批伪狂犬抗体检测试纸条对10份伪狂犬阳性血清、36份伪狂犬阴性血清、10份猪瘟阳性血清、10份猪蓝耳病阳性血清进行检测,结果显示,本研究对10份已知伪狂犬阳性血清的阳性检出率为100%(10/10);对36份已知伪狂犬阴性血清的检测结果均为阴性(36/36),对其它非伪狂犬的阳性血清检测不存在交叉反应,表明本试纸条特异性良好。

[0041] 以上全面描述了本发明的优选实施例,但是可对它们进行各种替代和修改。因此,不应参照以上描述来决定本发明的范围,而是应参照所附权利要求书及其全部等同物来决定本发明的范围。任何特征,(不论是否为优选)均可与任何其他特征(不论是否为优选)相结合。本发明的权利要求书不应被理解为具有方法+功能的限制,除非在某一权利要求中通过术语“…的方法”明确地列举出此类限制。

<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),  
上海杰一生物技术有限公司

<120>一种伪狂犬病病毒GE基因主要抗原表位区域重组蛋白制备及胶体金免疫层析试  
纸条

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 498

<212> DNA

<213> GE蛋白全长序列

<400>GGATCCGGTCTGACCACCACCTGGAAAGAATATAGCCACGACCTGCAGCTGAACGATGGTGGTGGTG  
GTACCAATCCGAGCACCGAAGAAATGGGCGACGATTTTGGCTTTGGCCTGTGCCCCGTTTGATACCAGCCC  
GTTGGTGAAGGCAAAGGCAGCGTGAGTCCGACCACCTGGGTGGTCGAGAAAAACCGTTTCCGGGTAGCACC  
ACCGTGGAAAGGTGGTACCTGCGTGAAAGGCGAACCGGTGGTGTATACCGGTGGTCAGGTGGGTAGCTTTAAT  
GAACCGGATGGCCTGCGCATTATGGCGGTTACCGCATCGTGGATAGCACCATTGCAATCGCGGCAGCGAAGGCAG  
CGGTGGTAAAGTGCATGCAAGCGATGAACGCCTGGGTCCGATGCCGTGTCGTCCGAAAGAAATCGTGAGCAGCGC  
AGGTCCGGTGCGCAAAGGCAGCAAGAACAAGTACTACGAGCCGCGCGATAGCTATTTAAAAGCTT

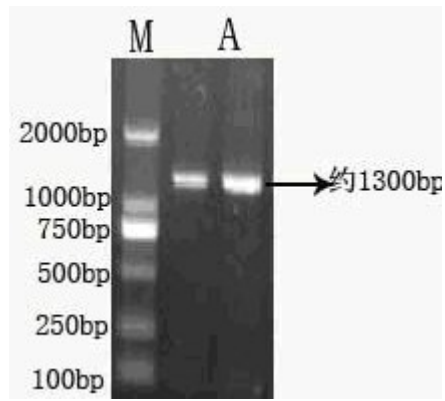


图1

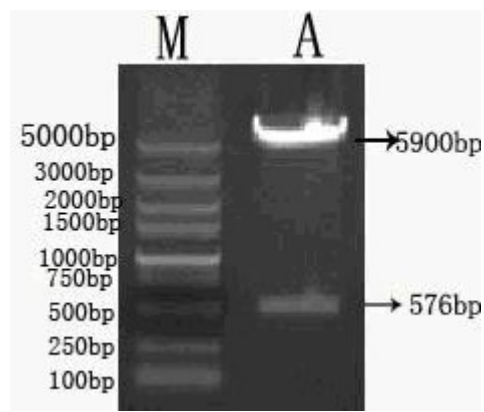


图2

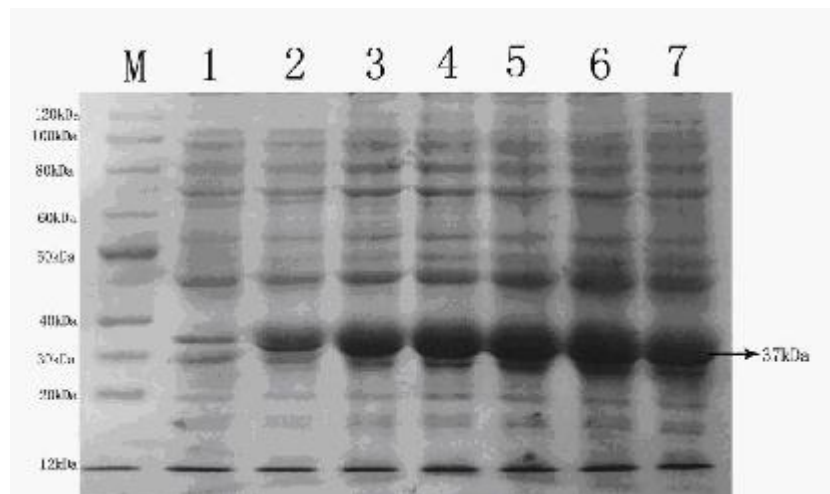


图3

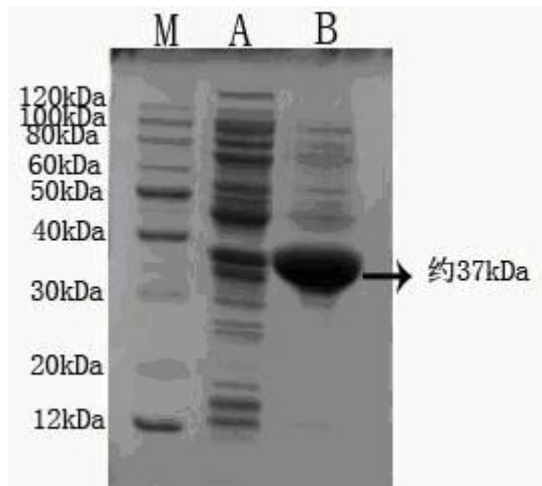


图4

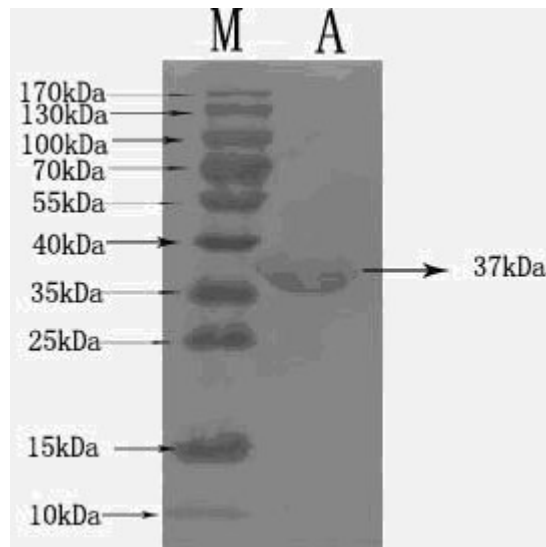


图5

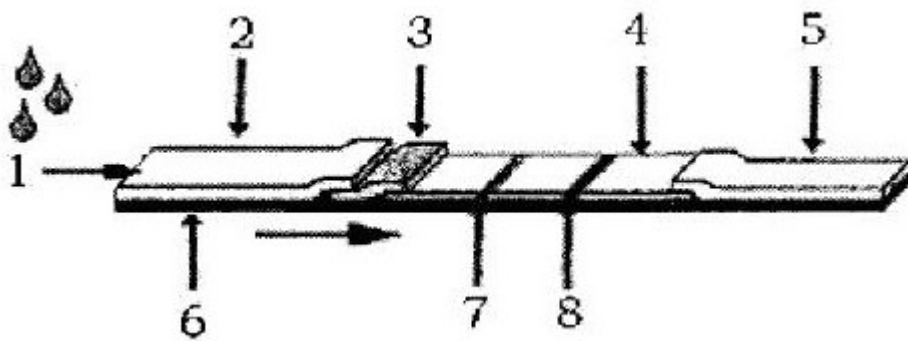


图6

专利名称(译)	一种伪狂犬病病毒GE基因主要抗原表位区域重组蛋白制备及胶体金免疫层析试纸条		
公开(公告)号	<a href="#">CN110540578A</a>	公开(公告)日	2019-12-06
申请号	CN201910804796.9	申请日	2019-08-28
[标]发明人	朱传刚 周志平 刘冀 吴思敏 沈元曦		
发明人	朱传刚 周志平 冒丽 刘冀 吴思敏 纪荣毅 沈元曦		
IPC分类号	C07K14/03 C12N15/38 G01N33/569 G01N33/532 G01N33/558 G01N33/58		
CPC分类号	C07K14/005 C12N2710/16722 G01N33/532 G01N33/558 G01N33/56983 G01N33/587 G01N2333/032		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供一种伪狂犬病病毒GE蛋白及其胶体金免疫层析试纸条的制备，所述伪狂犬病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。本发明的表达重组蛋白存在于上清，方便纯化，经过亲和层析纯化的重组蛋白作为诊断抗原建立的检测方法成本较低，检测方法简便。特别是集中了gE抗原主要的抗原表位作为诊断抗原，检测的灵敏性和特异性都较完全的gE蛋白更好。

