

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12N 15/33 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610024887.3

[43] 公开日 2007 年 9 月 26 日

[11] 公开号 CN 101041825A

[22] 申请日 2006.3.21

[21] 申请号 200610024887.3

[71] 申请人 中华人民共和国上海出入境检验检疫局

地址 200135 上海市浦东新区民生路 1208 号

共同申请人 上海交通大学

中国人民解放军第二军医大学

[72] 发明人 杨翠云 曹洁 沈禹飞 于翠
郑建中 代光辉 陶庭典

[74] 专利代理机构 上海浦一知识产权代理有限公司
代理人 丁纪铁

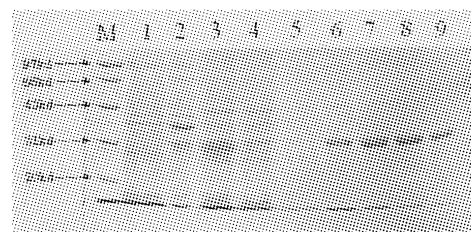
权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 9 页

[54] 发明名称

低含量烟草环斑病毒外壳重组蛋白的原核表达的制备方法

[57] 摘要

本发明公开了提供一种在血清检测中提纯低浓度或较难提纯的病毒用作检测抗原的方法。该制备方法主要包括一些生物学克隆技术和原核表达技术，对一些在寄主体内含量较低或较难提纯的病毒进行克隆，制备的方法取得该病毒的抗原，从而使得利用常规血清学检验方法检验出这些病毒抗原变为可能。



1、一种低含量烟草环斑病毒外壳重组蛋白的原核表达的制备方法，其特征在于它包含下列步骤：

a) 将烟草环斑病毒毒源摩擦接种白肋烟，1~2周后，取除根外的带毒株进行病毒的提纯；

b) 根据烟草环斑病毒的5个分离物的外壳蛋白CP基因的保守序列设计引物；

c) 从所述接种烟草环斑病毒的白肋烟叶片中提取RNA；

d) RT-PCR扩增烟草环斑病毒的cDNA片段；

e) PCR电泳回收产物转化大肠杆菌感受态细胞，挑取克隆，碱法提取质粒进行酶切后电泳分析原PCR产物并进行测序鉴定；

f) 选择与预期大小相符的条带进行回收，通过双酶切得到目的基因片断，连接质粒，转化大肠杆菌感受态细胞，筛选得到重组质粒；

g) 将构建好的重组载体转化入大肠杆菌表达菌株内，挑取单克隆进行目的基因的小量表达；

h) 挑取单克隆进行目的基因的大量表达；

i) 将诱导前的样品、诱导后的样品和过柱后的样品分别进行纯化并进行SDS-PAGE鉴定蛋白纯度；

j) 以烟草环斑病毒抗血清为一抗，碱性磷酸酯酶标记的A蛋白为二抗，用NBT-BCIP显色，Western-Blot鉴定所提纯的蛋白作为抗原进行血清学检测。

2、根据权利要求1所述的低含量烟草环斑病毒外壳重组蛋白的原核表达的制备方法，其特征在于：所述引物的核苷酸序列为序列表中SEQ ID NO. 1和SEQ ID NO. 2。

3、根据权利要求1所述的低含量烟草环斑病毒外壳重组蛋白的原核表达的制备方法，其特征在于：所述RT-PCR的反应条件为：94℃预变性4分钟后进行94℃变性30秒、55℃复性30秒、72℃延伸2分钟的30个循环的扩增，72℃延伸10分钟后保存于4℃。

4、根据权利要求1所述的低含量烟草环斑病毒外壳重组蛋白的原核表达的制备方法，其特征在于：所述大肠杆菌感受态细胞为DH5 α 。

5、根据权利要求1所述的低含量烟草环斑病毒外壳重组蛋白的原核表达的制备方法，其特征在于：所述的双酶切所用酶为EcoRI和XhoI。

6、根据权利要求1所述的低含量烟草环斑病毒外壳重组蛋白的原核表达的制备方法，其特征在于：所述的质粒为质粒pET28a。

低含量烟草环斑病毒外壳重组蛋白的原核表达的制备方法

技术领域

本发明涉及一种抗血清的制备方法，尤其涉及一种低含量烟草环斑病毒外壳重组蛋白的原核表达的制备方法。

背景技术

烟草环斑病毒 (Tobacco ring spot virus, TRSV) 为豇豆花叶病毒科 (Comoviridae) 线虫传多面体病毒属 (Nepovirus) 成员，病毒粒子为等径二十面体，直径约 28nm。基因组含两条线形正义 ss RNA，RNA1 编码复制酶，RNA2 编码运动蛋白 (MP) 和外壳蛋白 (CP)。分布于日本、澳大利亚、新西兰、丹麦、法国、德国、荷兰、英国、美国等 30 多个国家。该病毒寄主范围广，可侵染 54 科 246 种植物，是果树、蔬菜、花卉和经济作物的重要病害之一。引起多种植物病害，严重时导致绝产。

TRSV 为我国进境检疫法规中明确规定的危险性有害生物，寄主范围广、适生性强，进口植物种子和苗木携带该病毒的风险性很大，伴随着我国进出境贸易的高速增长，传入我国定植并危害流行的可能性极大。

本试验以 TRSV 的提纯病毒为试验材料，通过分子生物学方法，克隆 TRSV 病毒的外壳蛋白部分基因，将其在原核细胞中诱导表达，得到纯化的重组蛋白，为制备特异性的抗血清奠定了基础。纯化的重组蛋白不含寄主植物成分，所制备的抗血清特异性强。对一些在寄主体内含量较低或较难提纯的病毒来讲，用传统的提纯病毒制备抗血清十分困难，而用纯化的重组蛋白制备抗血清的方法

就显得十分重要。

发明内容

本发明要解决的技术问题是提供一种在血清检测中提纯低浓度或较难提纯的病毒用作检测抗原的方法。

为解决上述技术问题，本发明提供一种低含量烟草环斑病毒外壳重组蛋白的原核表达的制备方法，它包含下列步骤：a) 将烟草环斑病毒毒源摩擦接种白肋烟，1-2周后，取除根外的带毒株进行病毒的提纯；b) 根据烟草环斑病毒的5个分离物的CP基因的保守序列设计引物；c) 从所述接种烟草环斑病毒的白肋烟叶片中提取RNA；d) RT-PCR扩增烟草环斑病毒的cDNA片段；e) PCR电泳回收产物转化大肠杆菌感受态细胞，挑取克隆，碱法提取质粒进行酶切后电泳分析原PCR产物并进行测序鉴定；f) 选择与预期大小相符的条带进行回收，通过双酶切得到目的基因片断，连接质粒，转化大肠杆菌感受态细胞，筛选得到重组质粒；g) 将构建好的重组载体转化入大肠杆菌表达菌株内，挑取单克隆进行目的基因的小量表达；h) 挑取单克隆进行目的基因的大量表达；i) 将诱导前的样品、诱导后的样品和过柱后的样品分别进行纯化并进行SDS-PAGE鉴定蛋白纯度；j) 以烟草环斑病毒抗血清为一抗，碱性磷酸酯酶标记的A蛋白为二抗，用NBT-BCIP显色，Western-Blot鉴定所提纯的蛋白作为抗原进行血清学检测。

本发明由于提供了一种新的利用重组技术和原核表达技术对一些在寄主体内含量较低或较难提纯的病毒进行克隆，制备的方法取得该病毒的抗原，从而使得利用常规血清学检验方法检验出这些病毒抗原变为可能。

附图说明

图 1 是本发明低含量烟草环斑病毒外壳重组蛋白的原核表达的制备方法

的 TRSV 的 RT-PCR 扩增结果;

图 2 是本发明低含量烟草环斑病毒外壳重组蛋白的原核表达的制备方法的酶切后测序结果比对结果;

图 3 是本发明低含量烟草环斑病毒外壳重组蛋白的原核表达的制备方法的表达产物的 Western blot 分析;

图 4 是本发明低含量烟草环斑病毒外壳重组蛋白的原核表达的制备方法的表达产物的 SDS-PAGE 分析。

具体实施方式

下面结合附图对本发明作进一步详细的说明。

实施例 1

TRSV 的提纯

将 TRSV 毒源摩擦接种白肋烟, 1~2 周时间后, 取带毒全株(根除外)进行病毒的提纯。

选用 TRSV 接种的白肋烟 1000g, 按 1g 叶片加 2ml 0.2M PBS (磷酸盐缓冲液) (pH7.0, 含 0.1% 巯基乙酸), 全部置组织捣碎机里捣碎, 尼龙纱过滤, 滤液加入同等体积的氯仿, 悬浮搅拌 15 min 后, 9000r/min 离心 15min; 上清液加质量浓度为 8%PEG (聚乙二醇) (分子量 6000), 4%NaCl (氯化钠), 置 4℃冰箱悬浮搅拌 4h, 9000gr/min 离心 20min; 沉淀以 0.02 M PBS 悬浮, 置 4℃冰箱悬浮搅拌 4h 或过夜, 9000r/min 离心 15min; 将收集的上清液 30000r/min 离心 3h; 沉淀悬浮于去离子水中, 9000gr/min 离心 20min, 上清液即为病毒粗提液; 将上述病毒粗提液经 25%甘油垫超速离心, 即得提纯病毒。

实施例 2

引物设计

根据最新报道的 TRSV 5 个分离物的 CP 基因(GeneBank 登录号:AF461163、AF461164、AY787756、NC-005096、L09205) 的保守序列设计一对特异性引物 TRSV-F:5'-CGCGAATTCATGTGTGCTGTGACAGTTGTTCC-3' (下划线部分为 EcoR I 酶切位点) 和 TRSV-R: 5'-ATCCTCGAGTCCGCTTATAGTGCCAGACCA-3' (下划线部分为 Xho I 酶切位点)。

实施例 3

病毒 RNA 提取

取 0.1g TRSV 接种的白肋烟叶片置于液氮中研磨成粉末, 加入 1000ml TRIZOL (总 RNA 提取试剂), 迅速转至 1.5 ml 的离心管中, 加 200 μ l 氯仿, 振荡 2 min, 4℃ 11000 r/min 离心 10 min。取上清加入 500 ml 异丙醇, -20℃ 沉淀 10 min, 4℃ 12000 r/min 离心 15 min, 沉淀用 75% 的乙醇洗一次, 4℃ 7500 r/min 离心 5 min, 沉淀溶于 30 μ l ddH₂O 中, 即为提取的 RNA, -70℃ 保存备用。

实施例 4

RT-PCR

cDNA 第一链合成在 20 μ L 体系中进行, 内含 3 μ L 模板 RNA、1 μ L AMV (一种反转录酶) (30U/ μ L)、1 μ L RNase (RNA 酶) 抑制剂 (30U/ μ L)、1 μ L 下游引物 (20 μ mol/L)、2 μ L dNTP (脱氧核苷三磷酸) (10 mmol/L) 和 5 μ L 5 × AMV 缓冲液。42℃ 水浴 60min 后, 分别取 2 μ L 合成好的 cDNA 用于 PCR 扩增。

PCR 反应条件为：94℃预变性 4 min 后进行 94℃变性 30sec、55℃复性 30 sec、72℃延伸 2min 的 30 个循环的扩增，72℃延伸 10min 后保存于 4℃。

实施例 5

PCR 产物的克隆和酶切鉴定

PCR 产物用 1%的琼脂糖进行电泳，与预期大小相符的条带经 DNA（脱氧核糖核酸）回收试剂盒回收后，进行 T-A 克隆，所用载体为 pMD18-T（质粒名称）。并转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞，加入 500ul LB（LB 培养基），37℃，100rpm（每分钟转数）45min，取 200ul 涂布至 Amp（氨苄青霉素）板（100ug/ml），37℃倒置培养过夜，至克隆长出。挑取白色菌落，碱法小量提取质粒，酶切后电泳分析插入片段的大小，并进行测序验证。

实施例 6

原核表达载体的构建

与预期大小相符的条带经 DNA 回收试剂盒回收后以 EcoR I 和 Xho I 双酶切后得到 744 bp（碱基对）的目的基因片段，与经 EcoR I 和 Xho I 双酶切的质粒 pET28a 连接，并转化大肠杆菌 DH5 α ，筛选得到重组质粒。

实施例 7

融合蛋白的小量表达

将构建好的 pET28a 重组载体转化入大肠杆菌表达菌株 BL21（为特定大肠杆菌名称）。挑取单克隆，加入 3ml Kan 抗性/LB 液体培养基中，37℃、250rpm，培养过夜。取 100 μ l 菌液，加入 5ml Kan 抗性/LB 液体培养基中，37℃、250rpm，培养 3hr，至 OD（光密度值）600 为 0.6。加 IPTG（异丙基— β —D—硫代半乳糖苷）至菌液中，终浓度为 0.4mM，30℃继续培养 4 小时。取 0.8ml 菌液离

心后弃上清，沉淀备用。SDS-PAGE 的浓度为 12%，电泳鉴定表明，目的基因已经表达。再按照上述方法进行蛋白诱导表达 10ml，然后收菌。将菌体用 3mlPBS 重悬，超声 10min，功率为 200 瓦。10000g 离心 20 分钟，分别回收上清和沉淀。

实施例 8

目的基因的大量表达

挑取单克隆，加入 20ml Kan（卡那霉素）抗性/LB 液体培养基中，37℃、250rpm，培养过夜。将 20ml 菌液，加入到 1000ml Kan 抗性/LB 液体培养基中，37℃、250rpm，培养 3hr，至 OD 600 为 0.6。加 IPTG 至菌液中，终浓度为 0.4mM，30℃继续培养 4 小时。10000g，4℃离心 10min，弃上清，沉淀备用。

实施例 9

表达蛋白的纯化和 SDS-PAGE 鉴定蛋白纯度

将诱导前的样品、诱导后的样品（包括上清和沉淀）和过柱后的样品各取 20ul 分别加入 20ul 2×蛋白 loading buffer（上样缓冲液），将 1 次洗涤液分别取 20ul 并加入 20ul 2×蛋白 loading buffer 混匀，蛋白洗脱液各取 10ul，加入 10ul 2×蛋白 loading buffer 混匀后，100℃煮 5 分钟，12000g 离心 15 分钟，留取上清做 SDS-PAGE。凝胶浓度为 12%。

实施例 10

Western-Blot 鉴定

以 TRSV 抗血清（agdia 公司）为一抗，碱性磷酸酯酶标记的 A 蛋白为二抗。最后用 NBT/BCIP 显色。分离包涵体，溶解后进行 SDS-PAGE。按照 Hager 等的方法对凝胶染色后，从中切下目标条带，按 1:1 的比例（W/V）加入 0.85%

的生理盐水，于冰浴中研磨，12000g 离心 10 分钟，上清经 0.85%生理盐水透析过夜，-20℃保存。

实施例 11

TRSV CP 基因的 RT-PCR 扩增及克隆

用设计的 TRSV CP 基因特异性引物 TRSV-F 和 TRSV-R 进行 RT-PCR，扩增产物经 1%的琼脂糖凝胶电泳，可见大小 744bp 的特异性扩增片段，与预期的大小相符，结果见图 1。其中 M 为 DNA Marker（标记）（TaKaRa D2000, 1000, 750, 500, 250, 100bp）；1, 2 为 TRSV 纯病毒；3 为健康白肋烟；4 为空白对照。

扩增产物经纯化后克隆到 pMD18-T 载体上。经蓝白斑筛选、酶切鉴定和序列测定，得到了含有目的基因片段的重组子 pETCP1-744。

实施例 12

重组质粒的 PCR 验证和酶切验证

对 pETCP1-744 用引物 TRSV-F:和 TRSV-R 进行扩增，得到一 744bp 的条带，利用 GenBank（核苷酸序列的数据库）中 Blast（比对）程序对测定的序列进行比对，同源性高达 90%以上，结果证明测定序列为 TRSV 的部分序列；对 pETCP1-744 进行双酶切，可见一 744bp 条带，与预期大小相符，说明截短的 TRSV CP 基因（TRSV CP1-744）已连接到 pET28a 载体上。测序结果（见图 2）证明阅读框架正确。其中 AF461163、AF461164、AY787756、NC-005096 和 L09205 为 Genbank 公布的 TRSV 5 个分离物的序列；TRSV-BIAODA 为本实验酶切后测定的序列。

实施例 13

表达产物的 SDS-PAGE 检测和 Western blot 分析

将重组质粒转化大肠杆菌 BL21，并进行诱导表达，SDS-PAGE 后，考马斯亮蓝染色结果表明：经 IPTG 诱导，含重组质粒的菌株特异的产生了一条分子量为 35kDa（千道尔顿）的条带。此条带大小与预期相符（图 3）。其中 M 为蛋白 Marker；1, 2 为纯化的蛋白。Western blot 显示，TRSV 抗血清（agdia 公司）仅与此 35kDa 的诱导表达产物反应，而与其它条带之间均无反应，表明所表达的目的基因产物即为截短的 TRSV CP 基因 (TRSV CP1—744) 产物。

实施例 14

表达产物的纯化及定量

对诱导表达后的菌体反复冻溶，高速离心后，分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE，证明蛋白得到表达，但表达产物主要在沉淀中，即主要以包涵体形式存在。将分离的包涵体电泳后，对 35kDa 的条带切胶、研磨、离心、透析，得到纯度较高的表达产物（图 4）。其中 M 为蛋白 Marker；1 为未诱导；2 为超声上清；3 为超声沉淀；4 为上清沉淀混合；5 为洗液；6~9 为分别洗柱 1~4 次后的诱导产物。

实施例 15

表达产物的 ELISA 酶联免疫吸附试验

选用美国 agdia 公司生产的 TRSV 血清检测试剂盒，将表达的蛋白作为待检样品，设立阳性对照和阴性对照，结果表达的蛋白呈较强的阳性反应。

序列表

<110> 上海出入境检验检疫局、上海交通大学、中国人民解放军第二军医大学基础部

<120> 低含量烟草环斑病毒外壳重组蛋白的原核表达的制备方法

<130> NP-10431

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 32

<212> DNA

<213> Tobacco Ringspot Virus

<400> 1

CGCGAATTCA TGTGTGCTGT GACAGTTGTT CC 32

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Tobacco Ringspot Virus

<400> 2

ATCCTCGAGT CCGCTTATAG TGCCAGACCA 30

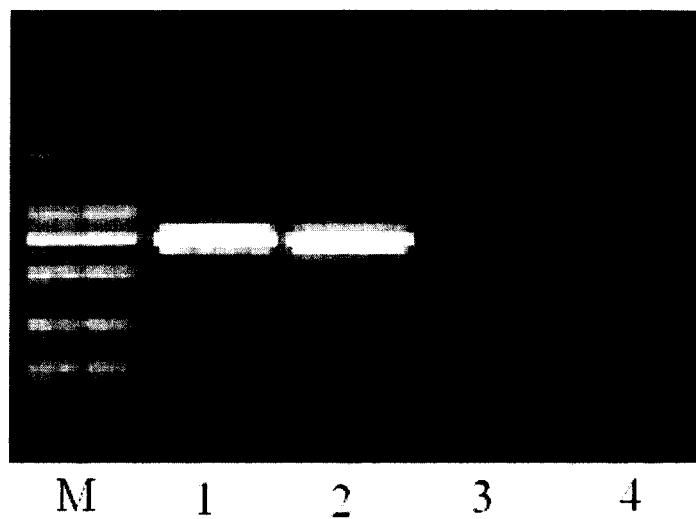


图1

ATGTGTGCTGTGACAGTTGTTCTGATCCC Majority
 -----+-----+-----+
 10 20 30
 -----+-----+-----+
 1 ATGGGTGCTGTGACAGTTGTTCTGATCCC AF461163. SEQ
 1 ATGGGTGCTGTGACAGTTGTTCTGATCCC AF461164. SEQ
 1 ATGTGTGCTGTGACAGTTGTTCTGATCCC AY787756. SEQ
 1 ATGTGTGCTGTGACGTTGTTCCCGATCCC NC-005096. SEQ
 1 ATGTGTGCTGTGACAGTTGTTCTGATCCC L09205
 1 ATGTGTGCTGTGACAGTTGTTCTGATCCC TRSV-BIAODA

ACTTGTTGTGGGACATTGTCCTTTAAAGGTT Majority
 -----+-----+-----+
 40 50 60
 -----+-----+-----+
 31 ACCTGTTGTGGGACATTGTCCTTTAAAGGTT AF461163. SEQ
 31 ACTTGTTGTGGGACGCTGTCCTTTAAAGTT AF461164. SEQ
 31 ACTTGTTGTGGGACATTGTCCTTTAAAGTT AY787756. SEQ
 31 ACTTGTTGTGGGACATTGTCCTTTAAAGTT NC-005096. SEQ
 31 ACTTGTTGTGGGACGCTGTCCTTTAAAGTT L09205
 31 ACTTGCTGTGGGACATTGTCCTTTAAAGTT TRSV-BIAODA

CCCAAAGATGCAAAGAAAGGAAAGCATCTT Majority
 -----+-----+-----+
 70 80 90
 -----+-----+-----+
 61 CCCAAAGATGCAAAGAAAGGAAAGCATCTT AF461163. SEQ
 61 CCCAAAGATGCAAAGAAAGGAAAGCATCTT AF461164. SEQ
 61 CCCAAAGATGCAAAGAAAGGAAAGCATCTT AY787756. SEQ
 61 CCCAAAGATGCGAAGAAAGGAAAGCATCTT NC-005096. SEQ
 61 CCCAAAGATGCAAAGAAAGGAAAGCATCTT L09205
 61 CCCAAAGATGCAAAGAAAGGAAACATCTT TRSV-BIAODA

GGAACTTTTGACATTTCGGCAAGCCATTATG Majority
 -----+-----+-----+
 100 110 120
 -----+-----+-----+
 91 GGAACTTTTGACATTTCGGCAAGCCATTATG AF461163. SEQ
 91 GGAACTTTTGACATTTCGGCAAGCCCTCATG AF461164. SEQ
 91 GGAACTTTTGACATTTCGGCAAGCCATTATG AY787756. SEQ
 91 GGAACTTTTGACATTTCGGCAAGCCATTATG NC-005096. SEQ
 91 GGAACTTTTGACATTTCGGCAAGCCATTATG L09205
 91 GGAACTTTTGACATTTCGGCAAGCCATTATG TRSV-BIAODA

GATTATGGTGGTTTGCATTCCCAAGAAATGG Majority
 -----+-----+-----
 130 140 150
 -----+-----+-----
 121 GATTATGGTGGTTTGCATTCCCAAGAAATGG AF461163. SEQ
 121 GATTATGGAGGTTTGCATTCCCAAGAAATGG AF461164. SEQ
 121 GATTATGGTGGTTTGCATTCCCAAGAAATGG AY787756. SEQ
 121 GAATATGGTGGTTTGCATTCCCAAGAAATGG NC-005096. SEQ
 121 GACTATGGTGGTTTGCATTCCCAAGAAATGG LO9205
 121 GATTATGGTGGTTTGCACCTCCCAAGAAATGG TRSV-BIAODA

TGTGCAAAGGGTATTGTTAATCCCACTTTT Majority
 -----+-----+-----
 160 170 180
 -----+-----+-----
 151 TGTGCAAAGGGTATCGTCAACCCCACTTTT AF461163. SEQ
 151 TGTGCTAAGGGTATTGTCAATCCCACTTTT AF461164. SEQ
 151 TGTGCAAAGGGCATTTGTTAATCCCACTTTT AY787756. SEQ
 151 TGTGCAAAGGGCATTTGTTAATCCCACTTTT NC-005096. SEQ
 151 TGTGCAAAGGGCATTTGTTAACCCCACTTTT LO9205
 151 TGTGCAAAGGGTATTGTCAACCCCACTTTT TRSV-BIAODA

ACAGTGAGGATGCATGCCCCACGCAATGCC Majority
 -----+-----+-----
 190 200 210
 -----+-----+-----
 181 ACAGTGAGGATGCACGCCCCCGCGCAATGCC AF461163. SEQ
 181 ACGGTGAGAAATGCATGCCCCCGCGCAATGCT AF461164. SEQ
 181 ACAGTGAGGATGCATGCCCCACGCAACGCC AY787756. SEQ
 181 ACAGTGAGGATGCATGCCCCACGCAACGCC NC-005096. SEQ
 181 ACAGTGAGGATGCACGCCCCCGCGCAATGCT LO9205
 181 ACAGTGAGGATGCACGCCCCACGCAACGCC TRSV-BIAODA

TTTGCGGGTTTGTCTATAGCGTGACCTTT Majority
 -----+-----+-----
 220 230 240
 -----+-----+-----
 211 TTTGCGGGTTTGTCTATAGCATGACCTTT AF461163. SEQ
 211 TTTGCTGGTCTGTCTATAGCGTGACCTTT AF461164. SEQ
 211 TTTGCAGGTTTGTCTATAGCGTGACCTTT AY787756. SEQ
 211 TTTGCAGGTTTGTCTATAGCGTGACCTTT NC-005096. SEQ
 211 TTTGCGGGTTTGTCTATAGCATGACCTTT LO9205
 211 TTTGCGGGTTTGTCTATAGCATGTACCTTC TRSV-BIAODA

GATGATTATAAACGCATAGACTTACCAGCG Majority
 -----+-----+-----
 250 260 270
 -----+-----+-----
 241 GATGATTATAAACGCATAGACTTACCAGCA AF461163.SEQ
 241 GATGATTATAAGCGCATAGATTTGGCTAGC AF461164.SEQ
 241 GATGATTATAAACGCATAGACTTACCAGCG AY787756.SEQ
 241 GATGATTACAAACGCATAGACTTACCAGCG NC-005096.SEQ
 241 GATGATTACAAACGCATAGACTTACCAGCA L09205
 241 GATGATTATAAACGCATAGACTTACCGGCG TRSV-BIAODA

CTTGGGAATGAATGTCCTCCCTCTGAGATG Majority
 -----+-----+-----
 280 290 300
 -----+-----+-----
 271 CTTGGGAACGAATGCCCCCTCTGAGATG AF461163.SEQ
 271 CTTGGGAGTGAGTGTCCTCCTTCTGAGATG AF461164.SEQ
 271 CTTGGGAATGAATGTCCTCCCTCTGAGATG AY787756.SEQ
 271 CTTGGGAATGAATGTCCTCCCTCCGAGATG NC-005096.SEQ
 271 CTTGGGAACGAATGTCCTCCCTCTGAGATG L09205
 271 CTTGGGAACGAATGTCCTCCCTCTGAGATG TRSV-BIAODA

TTTGAACTGCCTACCAAGGTTTTTCATGCTT Majority
 -----+-----+-----
 310 320 330
 -----+-----+-----
 301 TTTGAACTGCCTACCAAGGTTTTTCATGCTT AF461163.SEQ
 301 TTTGAATTGCCACCCGCGTTTTTATGCTT AF461164.SEQ
 301 TTTGAGCTGCCTACCAAGGTTTTTCATGCTT AY787756.SEQ
 301 TTTGAACTGCCTACCAAGGTTTTTCATGCTT NC-005096.SEQ
 301 TTCGAACTGCCTACCAAGGTCTTTCATGCTT L09205
 301 TTTGAACTGCCTACCAAGGTTTTTCATGCTT TRSV-BIAODA

AAAGATGCAGATGTGCATGAATGGCAGTTC Majority
 -----+-----+-----
 340 350 360
 -----+-----+-----
 331 AAAGATGCAGATGTGCATGAATGGCAGTTC AF461163.SEQ
 331 AAAGATGCAGACGTTTCAGAGTGGCAATTT AF461164.SEQ
 331 AAAGATGCAGATGTGCATGAGTGGCAGTTC AY787756.SEQ
 331 AAAGATGCAGATGTGCATGAATGGCAGTTC NC-005096.SEQ
 331 AAAGATGCAGATGTGCATGAATGGCAGTTC L09205
 331 AAAGATGCAGATGTGCATGAATGGCAGTTC TRSV-BIAODA

A A C T A T G G G G A G C T T A C T G G A C A T G G A T T G Majority
 -----+-----+-----+
 370 380 390
 -----+-----+-----+
 361 A A C T A T G G G G A G C T T A C T G G A C A T G G A C T G AF461163.SBQ
 361 A A C T A T G G G G A G C T T A C T G G A C A T G G A T T G AF461164.SBQ
 361 A A C T A T G G G G A A C T T A C A G G A C A T G G G T T G AY787756.SBQ
 361 A A C T A T G G G G A A C T T A C A G G A C A T G G G T T G NC-005096.SBQ
 361 A A C T A T G G G G A G C T T A C T G G A C A T G G A C T G L09205
 361 A A C T A T G G G G A G C T T A C T G G A C A T G G A T T G TRSV-BIAODA

T G C A A C T G G G C A A A T G T T G T C A C C C A G C C C Majority
 -----+-----+-----+
 400 410 420
 -----+-----+-----+
 391 T G C A A C T G G G C A A A C A T T G T C A C C C A G C C C AF461163.SBQ
 391 T G C A A C T G G G C C A A T G C T G T C A C C C A G C C C AF461164.SBQ
 391 T G C A A T T G G G C A A A T G T A G T T A C C C A G C C C AY787756.SBQ
 391 T G C A A T T G G G C A A A T G T A G T T A C C C A G C C C NC-005096.SBQ
 391 T G C A A C T G G G C A A A C G T T G C C A C C C A G C C C L09205
 391 T G C A A C T G G G C A A A C G T T A T C A C T C A G C C C TRSV-BIAODA

A C G T T G T A T T T T T T T G T T G C G T C C A C A A A T Majority
 -----+-----+-----+
 430 440 450
 -----+-----+-----+
 421 A C G T T G T A T T T C T T T G T T G C G T C C A C A A A T AF461163.SBQ
 421 A A G T T G T A T T T C T T T G T T G C G T C A A C T A A T AF461164.SBQ
 421 A C A T T G T A C T T T T T T G T T G C A T C C A C A A A T AY787756.SBQ
 421 A C A T T G T A C T T T T T T G T T G C G T C C A C A A A T NC-005096.SBQ
 421 A C G T T G T A C T T T T T T G T T G C G T C C A C A A A T L09205
 421 A T G T T G T A T T T C T T T G T T G C T T C C A C A A A T TRSV-BIAODA

C A A G T G A C G A T G G C T G C T G A T T G G C A G T G T Majority
 -----+-----+-----+
 460 470 480
 -----+-----+-----+
 451 C A A G T G A C G A T G G C T G C T G A T T G G C A G T G T AF461163.SBQ
 451 C A A G T G A C G A T G G C T G C T G A T T G G C A G T G T AF461164.SBQ
 451 C A G G T G A C G A T G G C T G C T G A T T G G C A G T G T AY787756.SBQ
 451 C A A G T G A C G A T G G C T G C T G A T T G G C A G T G T NC-005096.SBQ
 451 C A A G T A A C G A T G G C T G C T G A T T G G C A G T G T L09205
 451 C A G G T G A C G A T G G C T G C C G A C T G G C A G T G T TRSV-BIAODA

```

      A T T G T T A C T A T G C A T G T G G A C A T G G G G C C C Majority
      -----+-----+-----+
                490             500             510
      -----+-----+-----+

481 A T T G T T A C T A C G C A T G T G G A C A T G G G G C C C AF461163.SBQ
481 G T T G T T A C T G T G C A T G T T G A C A T G G G G C C C AF461164.SBQ
481 A T T G T T A C T A T G C A T G T G G A C A T G G G G C C C AY787756.SBQ
481 A T T G T T A C T A T G C A T G T G G A C A T G G G G C C C NC-005096.SBQ
481 A T T G T T A C C A T G C A C G T G G A C A T G G G G C C C LO9205
481 A T T G T T A C T A T G C A T G T G G A C A T G G G G C C C TRSV-BIAODA

      G T C A T T G A T C G T T T T G A G T T A G A T C C A A C T Majority
      -----+-----+-----+
                520             530             540
      -----+-----+-----+

511 G T C A T T G A T C G T T T T G A G T T A G A T C C A A C T AF461163.SBQ
511 G T C A T T G A T C G T T T T G A G T T G G A T C C A A C G AF461164.SBQ
511 G T C A T T G A T C G A T T T G A G T T A G A T C C A A C T AY787756.SBQ
511 G T C A T T G A T C G T T T T G A G T T A G T T C C A A C T NC-005096.SBQ
511 G T C A T T G A T C G T T T T G A G T T A A A T C C A A C T LO9205
511 G T C A T C G A T C G A T T T G A G C T A G A T C C G A C T TRSV-BIAODA

      A T G A C G T G G C C C A T T C A A T T G G G T G A T A C T Majority
      -----+-----+-----+
                550             560             570
      -----+-----+-----+

541 A T G A C G T G G C C C A T T C A A T T G G G T G A C A C T AF461163.SBQ
541 A T G A C G T G G C C A A T T C G A T T G G G T G A T A C C AF461164.SBQ
541 A T G A C G T G G C C C A T T C A A T T G G G T G A C A C T AY787756.SBQ
541 A T G A C G T G G C C T A T T C A A T T G G G T G A C A C T NC-005096.SBQ
541 A T G A C G T G G C C T A T T C A A T T G G G T G A T A C T LO9205
541 A T G A C G T G G C C C A T T C A A T T G G G T G A T A C T TRSV-BIAODA

      T T C G C C A T T G A T A G A T A T T A T G A G G C G A A A Majority
      -----+-----+-----+
                580             590             600
      -----+-----+-----+

571 T T C G C C A T T G A T A G A T A T T A T G A G G C G A A A AF461163.SBQ
571 T T T G C C A T A G A C C G T T A T T A T G A G G C A A A G AF461164.SBQ
571 T T C G C C A T T G A T A G A T A T T A T G A G G C G A A A AY787756.SBQ
571 T T C G C C A T T G A T A G A T A T T A T G A G G C G A A A NC-005096.SBQ
571 T T C G C C A T T G A T A G A T A T T A T G A G G C G A A A LO9205
571 T T C G C C A T T G A T A G A T A T T A T G A G G C G A A A TRSV-BIAODA

```

```

G A A A T T A A A C T T G A C G G G T C A A C C T C C A T G Majority
-----+-----+-----+
                        610       620       630
-----+-----+-----+

601 G A G A T T A A A C T T G A C G G G T C A A C C T C C A T G AF461163.SBQ
601 G A A A T A A A A C T T G A C G G G T C A A C C T C C A T G AF461164.SBQ
601 G A A A T A A A G C T T G A T G G G T C G A C C T C C A T G AY787756.SBQ
601 G A A A T T A A A C T T G A C G G G T C A A C C T C C A T G NC-005096.SBQ
601 G A G A T T A A A C T T G A T G G G T C A A C C T C C A T G L09205
601 G A A A T A A A G C T T G A C G G G T C G A C C T C T A T G TRSV-BIA0DA

T T G T C C A T A T C T T A T A A T T T T G G A G G T C C C Majority
-----+-----+-----+
                        640       650       660
-----+-----+-----+

631 T T G T C C A T A T C T T A T A A T T T T G G A G G T C C C AF461163.SBQ
631 T T G T C C A T A T C T T A T A A T T T T G G A G G T C C C AF461164.SBQ
631 T T G T C C A T A T C T T A T A A T T T C G G A G G C C C T AY787756.SBQ
631 T T G T C C A T A T C T T A T A A T T T T G G A G G T C C C NC-005096.SBQ
631 T T G T C C A T A T C T T A T A A T T T T G G A G G T C C C L09205
631 T T G T C C A T A T C C T A T A A T T T T G G G G G C C C T TRSV-BIA0DA

G T T A A G C A T T C T A A G A A A C A T G C C A T T T C A Majority
-----+-----+-----+
                        670       680       690
-----+-----+-----+

661 G T T A A G C A T T C T A A G A A A C A T G C C A T T T T A AF461163.SBQ
661 G T T A A G C A T T C T A A G A A A C A T G C C A T T T C A AF461164.SBQ
661 G T T A A G C A T T C T A A G A A G C A T G C C A T T T C A AY787756.SBQ
661 G T C A A G C A T T C T A A G A A A C A T G C C A T T T C A NC-005096.SBQ
661 G T T A A G C A T T C T A A G A A A C A T G C C A T T T C A L09205
661 G T C A A G C A T T C A A A G A A A C A C G C C A T T T C A TRSV-BIA0DA

T A T T C C C G G G C A G T T A T G T C T A G G A A T C T T Majority
-----+-----+-----+
                        700       710       720
-----+-----+-----+

691 T A T T C C C G G G C A G T T A T G T C T A G G A A T C T T AF461163.SBQ
691 T A T T C C C G G G C A G T T A T G T C T A G G A A T C T T AF461164.SBQ
691 T A T T C T C G G G C A G T T A T G T C C A G G A A T C T T AY787756.SBQ
691 T A T T C C C G G G C A G T T A T G T C T A G G A A T C T T NC-005096.SBQ
691 T A T T C C C G G G C A G T T A T G T C T A G G A A T C T T L09205
691 T A T T C C A G G G C T G T T A T G T C T A G A A A T C T G TRSV-BIA0DA

```

```

      G G G T G G T C T G G C A C T A T A A G C G G A A G T G T C Majority
      -----+-----+-----+
                730           740           750
      -----+-----+-----+
721 G G G T G G T C T G G C A C T A T A A G C G G A A G T G T C AF461163.SEQ
721 G G G T G G T C T G G C A C T A T A A G C G G A A G T G T C AF461164.SEQ
721 G G A T G G T C T G G C A C T A T A A G C G G A A G T G T C AY787756.SEQ
721 G G G T G G T C T G G C A C T A T A A G C G G A A G T G T C NC-005096.SEQ
721 G G G T G G T C T G G C A C T A T A A G C G G A A G T G T C L09205
721 G G G T G G T C T G G C A C T A T A A G C G G A             TRSV-BIAODA

```

图2

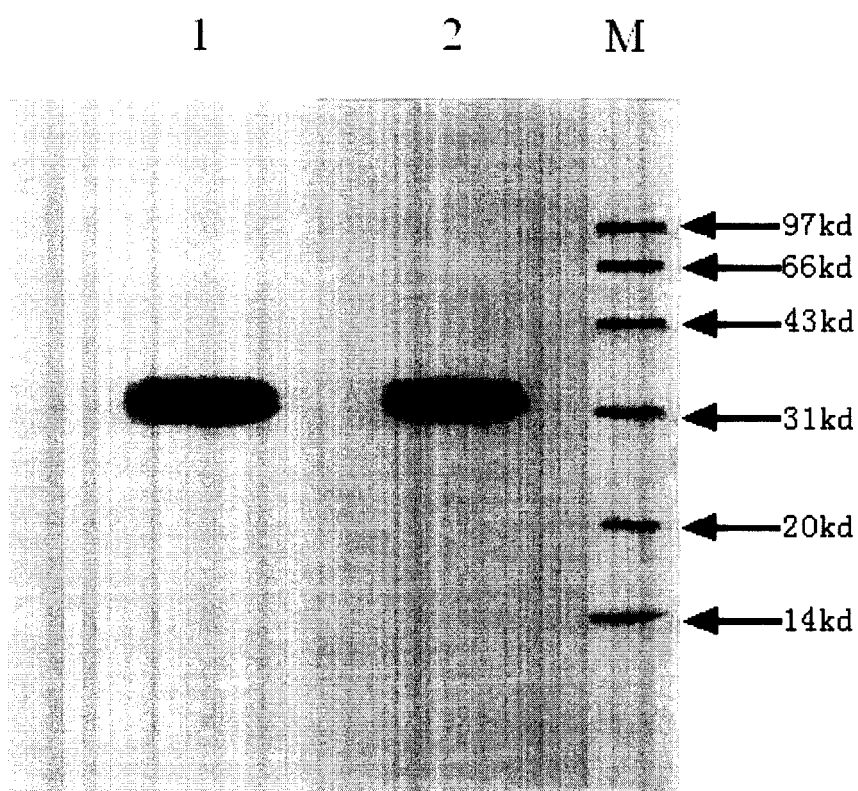


图3

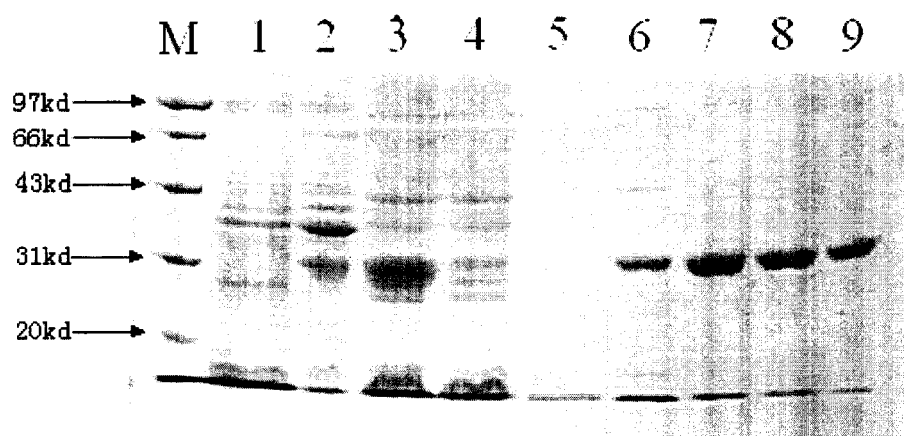


图4

专利名称(译)	低含量烟草环斑病毒外壳重组蛋白的原核表达的制备方法		
公开(公告)号	CN101041825A	公开(公告)日	2007-09-26
申请号	CN200610024887.3	申请日	2006-03-21
[标]申请(专利权)人(译)	中华人民共和国上海出入境检验检疫局 上海交通大学		
申请(专利权)人(译)	中华人民共和国上海出入境检验检疫局 上海交通大学 中国人民解放军第二军医大学		
当前申请(专利权)人(译)	中华人民共和国上海出入境检验检疫局 上海交通大学 中国人民解放军第二军医大学		
[标]发明人	杨翠云 曹洁 沈禹飞 于翠 郑建中 代光辉 陶庭典		
发明人	杨翠云 曹洁 沈禹飞 于翠 郑建中 代光辉 陶庭典		
IPC分类号	C12N15/33 C12N15/70 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了提供一种在血清检测中提纯低浓度或较难提纯的病毒用作检测抗原的方法。该制备方法主要包括一些生物学克隆技术和原核表达技术，对一些在寄主体内含量较低或较难提纯的病毒进行克隆，制备的方法取得该病毒的抗原，从而使得利用常规血清学检验方法检验出这些病毒抗原变为可能。

