[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07K 14/165 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510061375.X

[43] 公开日 2006 年 4 月 26 日

[11] 公开号 CN 1763085A

[22] 申请日 2005.11.2

[21] 申请号 200510061375.X

[71] 申请人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路 38 号

[72] 发明人 周继勇 吴建祥 胡金强 张德勇

[74] 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公司

代理人 张法高

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 1 页

[54] 发明名称

鸡传染性支气管炎病毒 S1 重组蛋白抗原、制备方法及用途

[57] 摘要

本发明公开了一种鸡传染性支气管炎病毒 S1 重组蛋白抗原、制备方法及其用途。这些核苷酸序列分别由 SEQ ID NO.1 ~ 3 所示。本发明提供了含有编码 3 种截短 S1 蛋白的原核表达方法，分别能够表达三株 IBV(ZJ971 株，M41 株，J 株)S1 蛋白氨基端 288bp 或 309bp 部分片段，提供了三株 IBV S1 蛋白表达产物的纯化方法。用 IBV 阳性血清检测，表达的部分 S1 蛋白具有很好的抗原反应性，可作为诊断抗原应用于琼脂扩散诊断技术，酶联免疫吸附试验，免疫荧光检测，免疫组织化学检测等检测 IBV 感染或免疫产生的抗体。此外，表达的部分 S1 蛋白还可进一步制备单克隆抗体、多克隆抗体利用 ELISA 等实验方法来检测 IBV 抗原的存在或配以适当疫苗佐剂制备亚单位疫苗。

1.一种鸡传染性支气管炎病毒 S1 重组蛋白抗原、其特征在于：IBV 核糖核酸为模板，通过反转录聚合酶链式反应扩增获得截短 IBV S1 核苷酸序列，并克隆于大肠杆菌原核表达载体 pET-28a，转化入大肠杆菌 BL21 宿主细胞后用 IPTG 诱导表达，经 Ni-NTA Argarose 纯化，获得截短表达的 IBV S1 蛋白抗原。

2.根据权利要求 1 所述的一种鸡传染性支气管炎病毒 S1 重组蛋白抗原，其特征在于：所述的 IBV S1 核苷酸序列具有 SEQ ID No.1～3 所示的核苷酸序列，并分别编码具有 SEQ ID No.1～3 所示的多肽序列。

3. 一种鸡传染性支气管炎病毒 S1 重组蛋白抗原的制备方法，其特征在于，方法的步骤如下：

1）分别以 IBV ZJ971 株或 M41 株或 J 株的核糖核酸为模板，分别以
pIBV-ZJ971-S1D:5'-GGAATTCGTTTTGTATGACAGTAGTTCT-3'；
pIBV-ZJ971-S1D:5'-GCCAAGCTTTTAACAATGTGTAACAAACAC-3'；
或 pIBV-M41-S1D：5'-GGGATCCGCTTTGTATGACAGTAGTTCT-3'；
pIBV-M41-S1D:5'-GCCAAGCTTTTAACAATGTGTAACAAACAC-3'；
或 pIBV-J-S1D:5'-GGGATCCAATTTGTTTGATTCTGATAAT-3'；
pIBV-J-S1D:5'-GAAGCTTTTAACAATGTGTAGCAAACAC-3'；
为引物，通过反转录聚合酶链式反应方法扩增分别获得三株 IBV 截短的 S1 核苷酸序列；

2） 将上述三株 IBV 截短 S1 核苷酸序列分别插入到原核表达载体 pET-28a，分别获得含有三株 IBV 截短的 S1 核苷酸序列的重组原核表达载体；

3）将含上述三株 IBV 截短的 S1 核苷酸序列的重组载体分别转化宿主细胞 BL21(DE3)，并用 IPTG 诱导表达；

4）诱导表达的蛋白分别经 Ni-NTA Argarose 纯化得到纯的三株 IBV 截短表达 S1 蛋白抗原。

4.一种鸡传染性支气管炎病毒 S1 重组蛋白抗原的用途，其特征在于，鸡传染性支气管炎病毒 S1 蛋白抗原应用于酶联免疫吸附试验检测 IBV 感染产生的抗体或者用于制备 IBV 基因工程亚单位蛋白疫苗。

鸡传染性支气管炎病毒 S1 重组蛋白抗原、制备方法及用途

技术领域

本发明涉及生物技术领域，尤其涉及一种鸡传染性支气管炎病毒 S1 重组蛋白抗原、制备方法及其用途。

背景技术

传染性支气管炎是由传染性支气管炎病毒（infectiou bronchitis virus，IBV）引起的家禽的一种急性，高度接触性传染病，传染性支气管病毒为单链正义，不分节段的 RNA 病毒，是当前危害世界养禽业的主要病原之一。自 1931 年在美国被发现以来，分离到的传染性支气管病毒已达 100 多株，30 多种血清型，而且它们在组织嗜性、毒力等方面存在较大的差异，给诊断和预防该病带来极大的难度。目前，防制该病的主要措施就是应用灭活疫苗和减毒活疫苗对鸡群进行免疫接种。实践表明，这三种疫苗都在一定程度上存在着不足，原因是传支病毒血清型众多且各血清型间缺乏或仅有较弱的交叉保护，用此三类疫苗只能针对一种血清型，不能有效的控制该病的发生和流行。再加上灭活疫苗的免疫效果不佳，致弱苗容易散毒且可能与野毒发生基因重组而产生新的变异株，因而存在着潜在的危险性。核酸疫苗的研究还刚刚起步，在短期内不可能推广应用，而且其免疫效果和安全性还有待于进一步的深入研究。因而，建立特异敏感的诊断方法及研制开发有效基因工程亚单位蛋白疫苗预防该病显得十分必要。

发明内容

本发明的目的是提供一种鸡传染性支气管炎病毒 S1 重组蛋白抗原、制备方法及其用途。

鸡传染性支气管炎病毒 S1 重组蛋白抗原：IBV 核糖核酸为模板，通过反转录聚合酶链式反应扩增获得截短 IBV S1 核苷酸序列，并克隆于大肠杆菌原核表达载体 pET-28a, 转化入大肠杆菌 BL21 宿主细胞后用 IPTG 诱导表达，经 Ni-NTA Argarose 纯化, 获得截短表达的 IBV S1 蛋白抗原;

所述的 IBV S1 核苷酸序列具有 SEQ ID No.1～3 所示的核苷酸序列;

鸡传染性支气管炎病毒 S1 重组蛋白抗原的制备方法的步骤如下：

1）分别以 IBV ZJ971 株或 M41 株或 J 株的核糖核酸为模板，分别以 pIBV-ZJ971-S1D:5'-GGAATTCGTTTTGTATGACAGTAGTTCT-3'；

pIBV-ZJ971-S1D:5'-GCCAAGCTTTTAACAATGTGTAACAAACAC-3'；

或 pIBV-M41-S1D：5'-GGGATCCGCTTTGTATGACAGTAGTTCT-3'；

pIBV-M41-S1D:5'-GCCAAGCTTTTAACAATGTGTAACAAACAC-3'；

或 pIBV-J-S1D:5'-GGGATCCAATTTGTTTGATTCTGATAAT-3'；

pIBV-J-S1D:5'-GAAGCTTTTAACAATGTGTAGCAAACAC-3'；

为引物，通过反转录聚合酶链式反应方法扩增分别获得三株 IBV 截短的 S1 核苷酸序列；

2） 将上述三株 IBV 截短 S1 核苷酸序列分别插入到原核表达载体 pET-28a，分别获得含有三株 IBV 截短的 S1 核苷酸序列的重组原核表达载体；

3）将含上述三株 IBV 截短的 S1 核苷酸序列的重组载体分别转化宿主细胞 BL21(DE3)，并用 IPTG 诱导表达；

4）诱导表达的蛋白分别经 Ni-NTA Argarose 纯化得到纯的三株 IBV 截短表达 S1 蛋白抗原。

鸡传染性支气管炎病毒 S1 蛋白抗原应用于酶联免疫吸附试验检测 IBV 感染产生的抗体或者用于制备 IBV 基因工程亚单位蛋白疫苗。

本发明的优点：

1) 经用 IBV 阳性血清检测，表达的三种截短的 IBV S1 蛋白均具有良好的抗原反应性，可作为诊断抗原应用于琼扩诊断技术，酶联免疫吸附试验，免疫荧光检测，免疫组织化学和免疫印迹等检测 IBV 感染后产生的抗体。此外，这三种截短的 IBV S1 蛋白还可用于制备单克隆抗体或多克隆抗体以检测 IBV 抗原的存在以及配以适当疫苗佐剂制备基因工程亚单位蛋白疫苗；

2) 国内对于 IBV 诊断和流行病学调查多采用传统的血凝实验，血凝抑制实验，琼脂扩散实验以及 PCR、RFLP 等方法等对病原进行检测。这些方法有的耗时耗力，有的容易造成假阳性结果，所以用 ELISA 对 IBV 病原和血清中抗体进行检测具有上述实验方法不可替代的优势；

3) S1 蛋白是 IBV 主要的宿主保护性抗原，具有很强的免疫原性。通过软件预测得知，S1 蛋白的抗原表位和亲水区域主要位于 S1 蛋白基因的氨基末端，尤其是 S1 基因信号肽后的 288bp 和 309bp 的区域。本发明在此方面取得了进步；

4) 此三种重组蛋白具有显著的抗原反应性，通过 PCR 技术从以前构建好的重组载体上拉出 288bp 和 309bp 目的序列，利用原核表达载体 pET-28a 克隆并表达了三株 IBV 部分 S1 基因，并通过鸡 IBV 阳性血清的间接 ELISA，证实了重组蛋白的抗原反应性；

5) 此三种重组蛋白具有良好的免疫原性。利用原核表达系统表达的三株 IBV 部分 S1 蛋白经纯化后制备鼠源单克隆抗体，将此单克隆抗体和 IBV 混合接种 9~11 日龄鸡胚，多数鸡胚未发生病变和死亡，进一步证明了所表达的重组 S1 部分蛋白具有较强的免疫原性。

附图说明

图 1 ZJ971 S1288 表达载体构建图，S1288 代表插入到载体 pET-28a 中的 ZJ971 S1288 基因；

图 2 M41 S1288 表达载体构建图，S1288 代表插入到载体 pET-28a 中的 J S1288 基因；

图 3 J S1309 表达载体构建图，S1309 代表插入到载体 pET-28a 中的 J S1309 基因；

图 4 重组质粒 pET-ZJ971-S1288 的 PCR 和双酶切鉴定图；

图 5 重组质粒 pET-M41-S1288 的 PCR 和双酶切鉴定图；

图 6 重组质粒 pET-J-S1309 的 PCR 和双酶切鉴定图；

图 7 ZJ971S1288 蛋白 SDS-PAGE（聚丙烯凝胶电泳）及 Western-blotting（蛋白印迹）。ohr 代表没有加入诱导剂 IPTG 所取的样品。1hr,2hr,3hr,4hr 分别代表加入诱导剂后 1，2，3，4 小时所取样品。蛋白印迹所用的一抗为鼠源抗 His 的单克隆抗体，二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 多克隆抗体。HRP 的显色底物为 TMB.；

图 8 M41 S1288 SDS-PAGE（蛋白聚丙烯凝胶电泳）及 Western-blotting（蛋白印迹）。ohr 代表没有加入诱导剂 IPTG 所取的样品。1hr,2hr,3hr,4hr 分别代表加入诱导剂后 1，2，3，4 小时所取样品。蛋白印迹所用的一抗为鼠源抗 His 的单克隆抗体，二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 多克隆抗体。HRP 的显色底物为 TMB.；

图 9 J S1309 SDS-PAGE（蛋白聚丙烯凝胶电泳）及 Western-blotting（蛋白印迹）。ohr 代表没有加入诱导剂 IPTG 所取的样品。1hr,2hr,3hr,4hr 分别代表加入诱导剂后 1，2，3，4 小时所取样品。蛋白印迹所用的一抗为鼠源抗 His 的单克隆抗体，二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 多克隆抗体。HRP 的显色底物为 TMB。

具体实施方式：

截短表达的三株鸡传染性支气管炎病毒 S1 蛋白抗原，利用原核表达系统表达了三株 IBV S1 蛋白基因氨基端 288bp、309bp 部分， S1 基因前的信号肽序列以及部分羧基端被去除，只保留靠近氨基端的 288bp 和 309bp 部分，并在大肠杆菌中得到表达。

截短表达的三株鸡传染性支气管炎病毒 S1 蛋白抗原的用途：该三种截短的重组 S1 蛋白抗原可应用于琼脂扩散试验、酶联免疫吸附试验，免疫荧光检测、免疫组织化学、免疫印迹等检测 IBV 感染后产生的抗体；截短表达的三株鸡传染性支气管炎病毒 S1 蛋白抗原可用于制备鼠源单克隆抗体或其他动物来源的多克隆抗体，应用血凝抑制实验等来检测 IBV 抗原的存在；截短表达的三株鸡传染性支气管炎病毒 S1 蛋白抗原可用于制备预防 IBV 的发生和流行的亚单位蛋白疫苗。

实施例 1

IBV S1 蛋白抗原的截短表达与纯化过程；

一、IBV ZJ971(M41、J)培养及 RNA 的提取

取 ZJ971(M41、J)株种毒经尿囊腔途径接种于 9-11 日龄 SPF 鸡胚，37℃温箱孵育，收集 24h－72h 之间鸡胚尿囊液，粗离后去除杂质，上清用 30%PEG6000(含 7.85%NaCl)沉淀，沉淀再用 TEN(pH8.0)悬浮，RNA 提取按 Trizol 试剂盒说明书进行；提取的 RNA 用于 RT-PCR。

二、ZJ971-S1D(M41-S1D、J-S1D)基因的 RT-PCR

1、IBV ZJ971(M41、J)反转录

取上述病毒 RNA，加入 12μmol/L 的 IBV ZJ971-S1D(M41-S1D、J-S1D)下游引物 1μl，置 70℃孵育 5 分钟，取出置冰上；然后加入 5×reaction buffer 4μl、20U/μl Rnasin 1μl、10mM dNTPs 2μl，混匀后置 37℃孵育 5 分钟，取出置冰上；再加入 200U/μl AMV-Rnase 1μl，混匀后置 42℃孵育 1 小时。最后置 70℃水浴 10 分钟灭活 AMV-Rnase，取出后立即用于 PCR。

2、ZJ971-S1D(M41-S1D、J-S1D)基因的 PCR

PCR 反应体系（25μl 体系）：

10×PCR Buffer:	2.5μl
dNTPs Mixture:	0.5μl
上游引物：	0.5μl
下游引物：	0.5μl
cDNA 模板：	2ul
ddH_2O:	19μl

PCR 反应条件：95℃预变性 3min;94℃25s，45℃25s、72℃45，进行 30 个循环，最后 72℃延伸 10min 结束。

pIBV-ZJ971-S1D(P1):5'-GGAATTCGTTTTGTATGACAGTAGTTCT-3'

pIBV-ZJ971-S1D(P2):5'-GCCAAGCTTTTAACAATGTGTAACAAACAC-3'

pIBV-M41-S1D(P3):5'-GGGATCCGCTTTGTATGACAGTAGTTCT-3'

pIBV-M41-S1D(P4):5'-GCCAAGCTTTTAACAATGTGTAACAAACAC-3'

pIBV-J-S1D(P5):5'-GGGATCCAATTTGTTTGATTCTGATAAT-3'

pIBV-J-S1D(P6):5'-GAAGCTTTTAACAATGTGTAGCAAACAC-3'

三、pET-ZJ971-S1D(pET-M41-S1D、pET-J-S1D)表达载体的构建

1. PCR 产物纯化试剂盒回收目的片段，利用 T-A 克隆策略直接连接于 pMD18-T 载体，连接产物转化 E.coli TOP10 感受态细胞，挑取单克隆，进行 PCR 鉴定。

2. 以 PCR 鉴定正确的阳性克隆再进行 PCR 扩增，PCR 产物用 DNA 纯化试剂盒进行纯化后，经 *EcoR*Ⅰ（*BamH*Ⅰ）、*Hind* III 双酶切，回收目的片段并亚克隆于表达质粒 pET-28a 的 *EcoR*Ⅰ(*BamH*Ⅰ)+*Hind* III 酶切位点之间，构建重组表达质粒 pET-ZJ971-S1D（pET-M41-S1D、pET-J-S1D），转化感受态宿主菌 TOP10，抽取重组质粒进行 PCR、双酶切鉴定和序列测定。

四、IBV S1 蛋白抗原基因的诱导表达

将鉴定正确的重组质粒转化 BL21（DE3）宿主菌，挑取单克隆接种到含 Kan 抗性 LB 液体培养基中，37℃培养过夜，按 1：100 的比例将培养物接种于含 Kan 抗性的液体 LB 培养基中，250rpm/min 振荡培养 2 小时左右，使 OD600≈0.5,再按 1：100 的比例加入终浓度为 1mM IPTG 诱导表达 4 小时，离心收集菌体。将菌体加入适量的 1×SDS 上样缓冲液，采用 15%的聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）分析，考马斯亮兰染色，观察结果。结果在带有 pET-28a 质粒的细菌经诱导后表达了约 14kD 的融合蛋白。而对照细菌没有相应的条带。薄层扫描分析，该蛋白可占菌体蛋白总量的 20-25%。

五、重组蛋白的测定

Western-blotting 分析：表达蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转移至硝酸纤维素膜（NC）上，用含有 5%（w/v）脱脂奶粉的 PBS（PH=7.4）37℃温育 1-2 小时封闭 NC 膜；然后加入用 5%脱脂奶粉稀释的抗 His 鼠源单克隆抗体于 37℃温育 1 小时；PBST 洗涤膜 3 次后，再加入用含 5%（w/v）脱脂奶粉稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗于 37℃温育 1 小时；PBST 洗涤膜 3 次后，加入 TMB 显色液进行显色，结果能观察到特异性的反应条带。

截短表达的三株鸡传染性支气管炎病毒 S1 蛋白抗原，利用原核表达系统克隆表达了三株禽传染性支气管炎 S1 蛋白基因氨基端 288bp 和 309bp 部分，表达产物经纯化后用作诊断 IBV 感染的抗原，S1 基因信号肽序列和部分羧基端去除，只保留了位于信号肽序列后的近氨基端部分 S1 基因，并在大肠杆菌中表达。

六、重组蛋白的纯化

按已经优化的表达条件，表达 IBV-ZJ971-S1D(IBV-M41-S1D、IBV-J-S1D)菌液 100ml，收获菌液 4℃，以 8000rpm/min，离心 20min，菌体沉淀用裂解液 Buffer B（pH8.0）重悬，超声波处理 40 次，冰上放置 10 分钟，然后转入细胞培养瓶中振摇 1.5 小时，然后 4℃，10000rpm，离心 15min，弃沉淀保留上清。将上清过装有 1mL 琼脂糖填料的 Ni-NTA Argarose 纯化柱中，依次用洗涤液 Buffer C（pH6.3） 、洗脱液 Buffer D（pH5.9）和 Buffer E（pH4.5），分别收集用洗脱液洗下来的样品 D1、D2、D3、D4 和 E1、E 2、E 3、E 4 然后进行 SDS-PAGE 分析。SDS-PAGE 分析表明，目的蛋白在洗脱下来的 E1~E4 中，其中以 E2 和 E3 中的含量最高。

实施例 2

截短表达的三株鸡传染性支气管炎病毒 S1 蛋白作为诊断抗原具体过程：

将重组菌诱导大量表达后，离心收集菌体用裂解液 Buffer B(pH8.0)重悬沉淀，超声波破碎后离心,上清用 Ni-NTA Argarose 柱纯化，用此纯化的表达产物用 PH8.5 Tris-Cl 包被缓冲液稀释后包被酶标反应板，先在 37℃孵育 2 小时，然后在 4℃吸附 16~18 小时。PBST 洗涤 3 次，每次 10 分钟。用含 5%脱脂奶粉的 PBST 封闭 2 小时，同上洗涤。将待测 IBV 阳性血清和 SPF

鸡的阴性血清分别用 PBS 作 2 倍倍比连续稀释后加入孔中，在 37℃作用 1 小时，同上洗涤。用辣根过氧化物标记的羊抗鸡 IgG 的二抗（1：3000）加入各孔中，作用 1 小时，同上洗涤。然后加入用底物缓冲溶液稀释的 TMB，显色 10~15 分钟。最后每孔加入 50μL 的 2M H_2SO_4 终止反应。酶标检测仪在 450nm 波长下读取各孔的光密度值，P/N 比值>2.1 判为阳性。结果重组表达的蛋白可与待检鸡阳性血清发生反应，但与阴性血清不反应。本项发明可取代 IBV 全病毒用于检测 IBV 感染以及 IBV 疫苗免疫所产生的抗体水平。

实施例 3

三种截短的重组 S1 蛋白抗原具有较强的免疫原性，可制备 IBV 基因工程亚单位蛋白疫苗：

利用此三种截短的重组 S1 蛋白抗原制备的鼠源单抗和 IBV 共同接种 9~11 日龄的 SPF 鸡胚，同时设单独接种 IBV 实验对照组，每组 6 枚鸡胚，结果接种有鼠源单克隆抗体组中有 4 枚得到了有效保护，而实验对照组的鸡胚发生传染性支气管炎特征性的病变或死亡，有力地证实了所表达的重组蛋白抗原具有较强的免疫原性，能产生中和 IBV 感染的中和抗体，从而可用截短的重组 S1 蛋白抗原可制备 IBV 的基因工程亚单位蛋白疫苗。

序 列 表

(1)SEQ ID NO.1 的信息：

(a)序列特征：

长度：288 个碱基

类型：核酸

链型：单链

拓扑结构：线性

(b)分子类型：cDNA

(c)最初来源：鸡传染性支气管炎病毒

(d)序列描述：SEQ ID NO.1：

SEQ ID NO.1

GTTTTGTATGACAGTAGTTCTTACGTGTACTACTACCAAAGTGCCTTCAGACCACCTGATGATTGGCATTTACATGGGGG
TGCGTATGCGGTTGTTAATATTTCTAGTGAATCTAATAATGCAGGCTCTTCATCTGGGTGTACTGTTGGTATTATTGATG
GTGGTCGTGTTGTTAATGCTTCTTCTATAGCTATGACGGCACCGTCATCAGGTATGGCTTGGTCTAGCAGTCAGTTTTGT
ACTGCATACTGTAACTTTTCAGATACTACAGTGTTTGTTACACATTGT

(2)SEQ ID NO.2 的信息：

(a)序列特征：

长度：288 个碱基

类型：核酸

链型：单链

拓扑结构：线性

(b)分子类型：cDNA

(c)最初来源：鸡传染性支气管炎病毒

(d)序列描述：SEQ ID NO.2：

SEQ ID NO.2

GCTTTGTATGACAGTAGTTCTTACGTTTACTACTACCAAAGTGCCTTTAGACCACCTAATGGTTGGCATTTACACGGGGG
TGCTTATGCGGTAGTTAATATTTCTAGCGAATCTAATAATGCAGGCTCTTCACCTGGGTGTATTGTTGGTACTATTCATG
GTGGTCGTGTTGTTAATGCTTCTTCTATAGCTATGACGGCACCGTCATCAGGTATGGCTTGGTCTAGCAGTCAGTTTTGT
ACTGCACACTGTAACTTTTCAGATACTACAGTGTTTGTTACACATTGT

(3)SEQ ID NO.3 的信息：

(a)序列特征：

长度：309 个碱基

类型：核酸

链型：单链

拓扑结构：线性

(b)分子类型：cDNA

(c)最初来源：鸡传染性支气管炎病毒

(d)序列描述：SEQ ID NO.3：

SEQ ID NO.3

AATTTGTTTGATTCTGATAATTATGTGTACTACTACCAAAGTGCCTTTAGACCACCAAATGGATGGCATTTGCATGGGGG
TGCTTATGCAGTAGTGAATTCTACTACTAAAACTAACAATGCAGGCGACGCTGCCGAGTGTTCTGTAGGTGTTCTTTTTA
ATTATACTAACGGAAAAGACGTTGGTTATAATAATAATGCTTCTTCCGTAGCCATGACAGCACCGTTGTCTGGTATGTCT
TGGTCTAAATCAGAATTTTGTACTGCCCACTGTAACTTTTCGGATTTTACAGTGTTTGCTACACATTGT

(4)SEQ ID No.4 的信息：

(a)序列特征：

长度：96 个氨基酸

类型：氨基酸

拓扑结构：线性

(b)分子类型：多肽

(c)序列描述：SEQ ID No.4：

SEQ ID NO.4

VLYDSSSYVYYYQSAFRPPDDWHLHGGAYAVVNISSESNNAGSSSGCTVGIIDGGRVVNASSIAMTAPSSGMAWSSSQFC
TAYCNFSDTTVFVTHC

(5)SEQ ID No.5 的信息：

(a)序列特征：

长度：96 个氨基酸

类型：氨基酸

拓扑结构：线性

(b)分子类型：多肽

(c)序列描述：SEQ ID No.5：

SEQ ID NO.5

ALYDSSSYVYYYQSAFRPPNGWHLHGGAYAVVNISSESNNAGSSPGCIVGTIHGGRVVNASSIAMTAPSSGMAWSSSQFC
TAHCNFSDTTVFVTHC

(6)SEQ ID No.6 的信息：

(a)序列特征：

长度：96 个氨基酸

类型：氨基酸

拓扑结构：线性

(b)分子类型：多肽

(c)序列描述：SEQ ID No.6：

SEQ ID NO.6

NLFDSDNYVYYYQSAFRPPNGWHLHGGAYAVVNSTTKTNNAGDAAECSVGVLFNYTNGKDVGYNNNASSVAMTAPLSGMS
WSKSEFCTAHCNFSDFTVFATHC

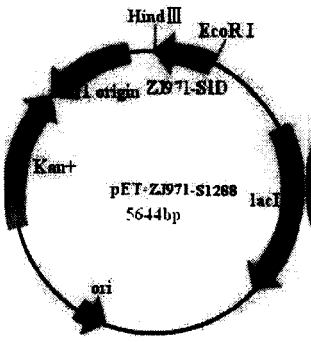


图 1

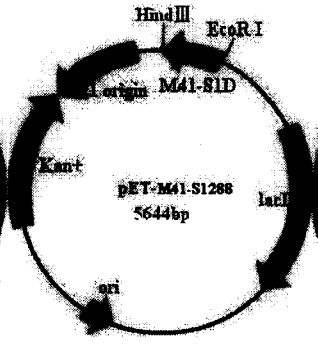


图 2

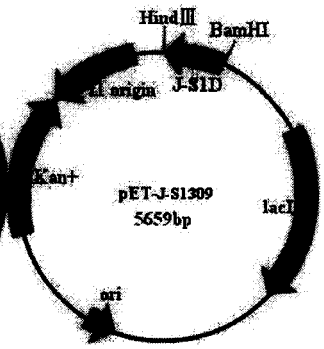


图 3

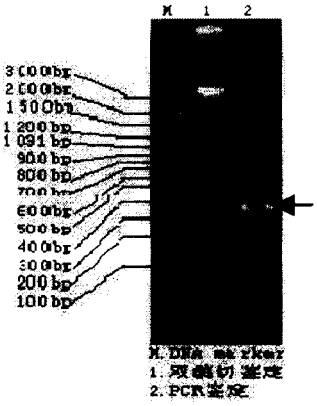


图 4

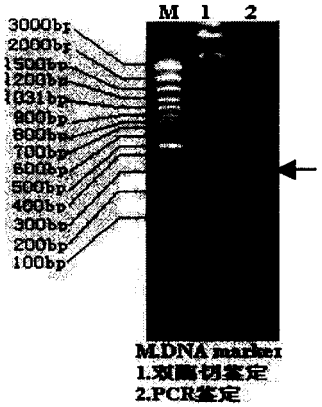


图 5

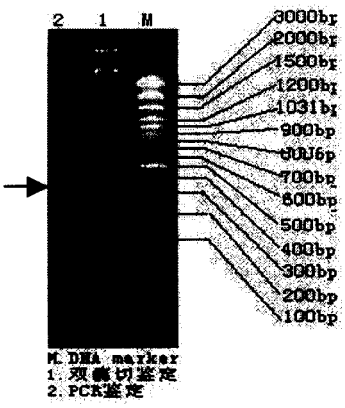


图 6

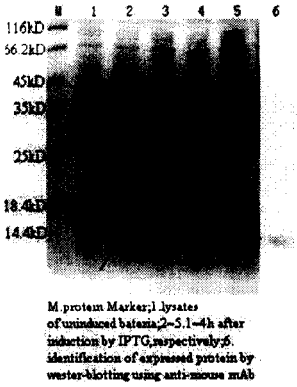


图 7

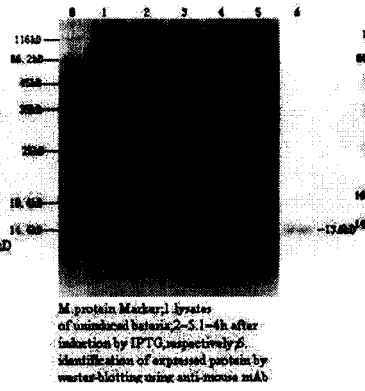


图 8

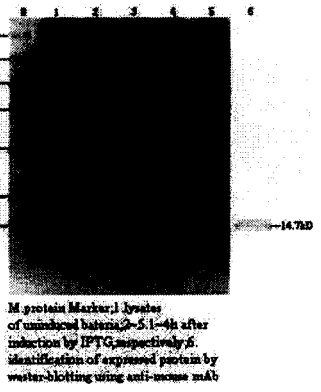
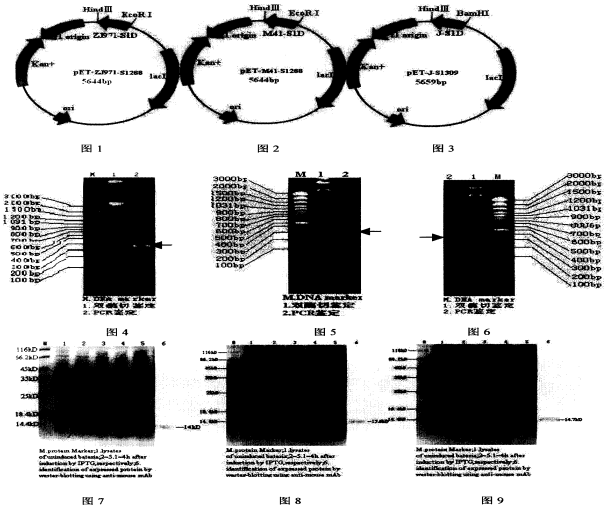


图 9

专利名称(译)	鸡传染性支气管炎病毒S1重组蛋白抗原、制备方法及用途		
公开(公告)号	CN1763085A	公开(公告)日	2006-04-26
申请号	CN200510061375.X	申请日	2005-11-02
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	周继勇 吴建祥 胡金强 张德勇		
发明人	周继勇 吴建祥 胡金强 张德勇		
IPC分类号	C07K14/165 C12N15/09 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种鸡传染性支气管炎病毒S1重组蛋白抗原、制备方法及其用途。这些核苷酸序列分别由SEQ ID NO.1～3所示。本发明提供了含有编码3种截短S1蛋白的原核表达方法，分别能够表达三株IBV(ZJ971株，M41株，J株)S1蛋白氨基端288bp或309bp部分片段，提供了三株IBV S1蛋白表达产物的纯化方法。用IBV阳性血清检测，表达的部分S1蛋白具有很好的抗原反应性，可作为诊断抗原应用于琼脂扩散诊断技术，酶联免疫吸附试验，免疫荧光检测，免疫组织化学检测等检测IBV感染或免疫产生的抗体。此外，表达的部分S1蛋白还可进一步制备单克隆抗体、多克隆抗体利用ELISA等实验方法来检测IBV抗原的存在或配以适当疫苗佐剂制备亚单位疫苗。