[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C07K 14/11
C12N 15/44 C12N 15/70
G01N 33/569 G01N 33/531

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03132415.0

[43] 公开日 2003 年 11 月 26 日

[11] 公开号 CN 1458168A

[22] 申请日 2003.6.2 [21] 申请号 03132415.0

[71] 申请人 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所
地址 150001 黑龙江省哈尔滨市南岗区马端街 427 号
[72] 发明人 童光志 倪健强 李海燕 仇华吉 王云峰

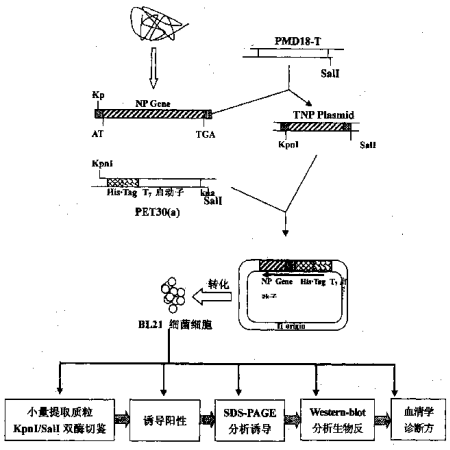
[74] 专利代理机构 哈尔滨东方专利事务所
代理人 陈晓光

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 2 页

[54] 发明名称 重组猪流感病毒 NP 抗原、其制备方法及在诊断中的应用

[57] 摘要

重组猪流感病毒 NP 抗原、其制备方法及在诊断中的应用。 A 型流感病毒基因组由 8 个分节段的 RNA 组成，其中核蛋白(NP)具有型和种群特异性，是分型诊断的基础。 本发明是重组猪流感病毒 NP 抗原，它采用大肠杆菌原核表达系统表达了我国猪流感病毒分离株完整的 NP 基因，利用表达的 NP 蛋白作为抗原检测 A 型流感病毒感染产生的抗 NP 蛋白抗体，虽然 A 型流感病毒亚型众多，但其 NP 基是流感病毒型的分类和诊断的基础，因此，基于重组 SIV 核蛋白抗原建立的诊断技术可以检测猪、禽、马和人 A 型流感病毒的感染。



ISSN1008-4274

1，重组猪流感病毒 NP 抗原，其特征是：所述的抗原是诊断 A 型流感病毒感染的重组核蛋白抗原，它采用大肠杆菌原核表达系统表达了我国猪流感病毒（SIV）分离株（H3N2 亚型）完整的 NP 基因，利用表达的 NP 蛋白作为抗原检测 A 型流感病毒感染产生的抗 NP 蛋白抗体。

2，根据权利要求 1 所述重组猪流感病毒 NP 抗原，其特征是：采用大肠杆菌表达系统表达猪流感病毒 H3N2 亚型的 NP 蛋白，纯化后作为 A 型流感病毒感染诊断用抗原。

3．一种重组猪流感病毒 NP 抗原的培养方法，其特征是：利用 RT-PCR 方法克隆了分离于 H3N2 亚型猪流感病毒的 NP 基因，然后将完整的 NP 基因用限制性内切酶消化下来再与相同处理的原核表达载体 pET30 进行连接，获得含有 SIV NP 基因的表达质粒 pETNP；

用 pETNP 转化受体菌 BL21，挑取单个菌落，用诱导剂以不同浓度进行诱导驯化，并在不同时间收集样品。经 SDS-PAGE 电泳分析证实 NP 的表达并确定 IPTG 的最佳诱导浓度及诱导时间分别为 1mM 和 6 小时；

将 SDS-PAGE 后的蛋白带进行转膜，Western-blot 试验证实了所表达的重组核蛋白大小相符具有反应活性。通过特异性、敏感性及工作条件的选择性实验，建立了猪流感病毒感染的重组核蛋白琼扩诊断技术。

4，一种重组猪流感病毒 NP 抗原在诊断中的应用，该重组核蛋白抗原用于琼扩诊断技术(AGIP)，酶联免疫吸附试验（ELISA），斑点酶联免疫吸附试验（Dot-ELISA），免疫荧光抗体检测（IF）及免疫印渍试验（Western Blot）。

5，一种重组猪流感病毒 NP 抗原及其在诊断中的应用，该重组核蛋白抗原可用于检测 A 型流感病毒感染，包括猪流感病毒，禽流感病毒，马流感病毒和人流感病毒感染。

重组猪流感病毒 NP 抗原、其制备方法及在诊断中的应用

技术领域：本发明涉及兽医生物技术领域，利用大肠杆菌表达系统表达猪流感病毒（SIV）H3N2 的 NP 蛋白，纯化后作为诊断用抗原。

背景技术：

猪流感（Swine Influenza）是正粘病毒科 A 型流感病毒属的猪流感病毒引起的猪的一种急性呼吸道传染病，表现为突然发生，迅速传播，呼吸急促困难兼有阵发性咳嗽。此后即可康复并产生坚强持久的免疫力，但也成为长期的带毒者和排毒者。1918 年美国首先报道发生猪流感，现在认为这次流感与 1918 年人类流感大流行相互关联。1930 年 Shope 等人从衣阿华分离到第一株 H1N1 亚型猪流感。这之后先后又从猪体中分离到了各种亚型的流感病毒。猪流感呈地方性流行、全球性分布，在我国各省市也均有猪流感特别是 H3N2 亚型的分布。此外，通过对 1968 年香港流感病毒 H3N2 亚型进行起源分析时，人们推测并逐步得到证实猪在人流感的发生中起着中间宿主的作用，猪是对禽源和哺乳动物流感病毒均为敏感的唯一动物。它可使禽流感病毒通过重组感染给人，也可使人早期的流感病毒得以在猪体内贮存，并可在一定时期内再次感染人。这使得猪流感的公共卫生意义更加突出，有希望成为人类下次流感大流行的预警信号。

流感病毒是负链 RNA 病毒，病毒基因组是由 8 个分节段的 RNA 组成的，主要编码的病毒蛋白质有 5 种多肽，即血凝素（HA），神经氨酸酶（NA），基质蛋白（MA），核蛋白（NP）和多聚糖（PB1、PB2、PA）。HA 和 NA 是病毒的主要免疫原性蛋白，可诱导机体产生抗病毒感染的保护能力。NP 具有型和种群特异性，是流感病毒分型和诊断的基础，但不是病毒的主要免疫原性蛋白。因此，利用 NP 检测流感病毒感染，不影响 HA/NA 亚单位疫苗或活载体疫苗免疫猪的鉴别诊断。

发明内容：

本发明的目的是利用原核表达系统高效表达猪流感病毒的核蛋白作为抗原，建立猪流感病毒和其他 A 型流感病毒感染的抗体诊断技术。

本发明的目的是这样实现的：

重组猪流感病毒 NP 抗原，所述的抗原是诊断 A 型流感病毒感染的重组核蛋白抗原，它采用大肠杆菌原核表达系统表达了我国猪流感病毒（SIV）分离株（H3N2 亚型）完整的 NP 基因，利用表达的 NP 蛋白作为抗原检测 A 型流感病毒感染产生的抗 NP 蛋白抗体。

所述重组猪流感病毒 NP 抗原，采用大肠杆菌表达系统表达猪流感病毒 H3N2 亚型的 NP 蛋白，纯化后作为 A 型流感病毒感染诊断用抗原。

一种重组猪流感病毒 NP 抗原的培养方法，利用 RT-PCR 方法克隆了分离于 H3N2 亚型猪流感病毒的 NP 基因，然后将完整的 NP 基因用限制性内切酶消化下来再与相同处理的原核表达载体 pET30 进行连接，获得含有 SIV NP 基因的表达质粒 pETNP；

用 pETNP 转化受体菌 BL21，挑取单个菌落，用诱导剂以不同浓度进行诱导驯化，并在不同时间收集样品。经 SDS-PAGE 电泳分析证实 NP 的表达并确定 IPTG 的最佳诱导浓度及诱导时间分别为 1mM 和 6 小时；

将 SDS-PAGE 后的蛋白带进行转膜，Western-blot 试验证实了所表达的重组核蛋白大小相符具有反应活性。通过特异性、敏感性及工作条件的选择性实验，建立了猪流感病毒感染的重组核蛋白琼扩诊断技术。

一种重组猪流感病毒 NP 抗原在诊断中的应用，该重组核蛋白抗原用于琼扩诊断技术(AGIP)，酶联免疫吸附试验（ELISA），斑点酶联免疫吸附试验（Dot-ELISA），免疫荧光抗体检测（IF）及免疫印渍试验（Western Blot）。

一种重组猪流感病毒 NP 抗原及其在诊断中的应用，该重组核蛋白抗原可用于检测 A 型流感病毒感染，包括猪流感病毒，禽流感病毒，马流感病毒和人流感病毒感染。

本发明具有如下积极效果：

1. 基于重组 SIV 核蛋白抗原的诊断技术的建立为在我国对猪流感的流行病学普查及现地养殖户对该病的诊断提供了重要的技术基础。

2. 所生产的重组核蛋白不仅生产容易，操作简单而且纯度较高，具有良好的特异性和敏感性。建立的琼扩诊断技术也易于被使用者接受。

3. 将重组核蛋白纯化后包被聚苯乙烯微量反应板也可建立敏感性更高的 ELISA 诊断方法。由于核蛋白是 A 型流感病毒型特异性抗原，基于重组 SIV

核蛋白抗原建立的诊断技术也可用于 A 型禽流感病毒、马流感病毒和人流感病毒感染的检测。

4. 建立了简单、方便、快速易于推广的猪流感诊断方法，解决了我国急需解决的主要问题。制作过程简单，而且成本低，便于推广使用。

5. 由于 HA/HI 技术除需要一定的技术条件外也容易产生非特异性的结果。而在原核表达系统中表达的核蛋白不仅表达量高而且具有生物反应活性，是近来用于生产诊断性抗原的一种新型方法，利用表达产物的生物活性可直接检测病毒的感染，而且所表达的重组蛋白融合了组氨酸标签，这同时也使蛋白质的纯化易于操作。为建立更为敏感的 ELISA 等诊断方法提供了技术支持。

6. 猪流感是一种世界性分布的群发性传染病，在中国猪流感不仅分布广而且发生频繁，对猪流感的防制其意义不仅在于兽医传染病学的意义，而且还有深远的公共卫生意义。猪流感是猪的主要免疫抑制病，除引起呼吸道疾病外也是规模化猪场中影响育肥猪的生长及导致母猪流产的主要诱因。猪在流感病毒“禽-猪-人”的种间传播链中，充当了病毒重组及复制的“混合器”。相对于禽流感，我国的猪流感的研究起步较晚，摆在科研工作者面前的任务也是任重道远。而对一种传染病的研究，首要是必须建立合适的诊断方法，从流行病学上完成该病的普查及为防制制定合理的程序，控制其流行达到预防的目的。本产品为防治工作开创了新的途径。

7. 猪流感病毒感染的重组核蛋白琼扩诊断技术的建立为在我国对该病的流行进行普查及及时准确的诊断和防止本病提供了技术基础。以猪流感病毒重组核蛋白为基础可以进行多方面的开发应用，例如：a.以重组核蛋白为基础的琼扩诊断技术可实现对接种 HA/NA 亚单位疫苗或活载体疫苗的猪场猪流感感染的鉴别诊断;b.以重组核蛋白为基础可进行 NP 蛋白的纯化，进而可用于研究 NP 蛋白的功能结构等；c.以重组核蛋白为基础可进行 NP 蛋白的纯化，进而建立比琼扩更为敏感的 ELISA，Dot-ELISA,免疫荧光和免疫印渍等诊断方法。

附图说明：

图 1, 猪流感病毒重组核蛋白表达载体 PETNP 质粒结构示意图。

图 2, 表达质粒 pET-NP 在受体菌 BL21 中诱导表达产物 SDD-PAGE 电泳结果。1．蛋白分子量 Marker。2．空载体诱导产物对照；3-6．IPTG 诱导不同时间后

的表达产物。

图 3，猪流感病毒 NP 基因的原核表达及血清学诊断技术的构建流程图。

本发明的具体实施方式：

实施例 1：

重组猪流感病毒 NP 抗原，所述的抗原是诊断 A 型流感病毒感染的重组核蛋白抗原，它采用大肠杆菌原核表达系统表达了我国猪流感病毒（SIV）分离株（H3N2 亚型）完整的 NP 基因，利用表达的 NP 蛋白作为抗原检测 A 型流感病毒感染产生的抗 NP 蛋白抗体。

实施例 2：

所述重组猪流感病毒 NP 抗原，采用大肠杆菌表达系统表达猪流感病毒 H3N2 亚型的 NP 蛋白，纯化后作为 A 型流感病毒感染诊断用抗原。

实施例 3：

一种重组猪流感病毒 NP 抗原的培养方法，利用 RT-PCR 方法克隆了分离于 H3N2 亚型猪流感病毒的 NP 基因，然后将完整的 NP 基因用限制性内切酶消化下来再与相同处理的原核表达载体 pET30 进行连接，获得含有 SIV NP 基因的表达质粒 pETNP；

用 pETNP 转化受体菌 BL21，挑取单个菌落，用诱导剂以不同浓度进行诱导驯化，并在不同时间收集样品。经 SDS-PAGE 电泳分析证实 NP 的表达并确定 IPTG 的最佳诱导浓度及诱导时间分别为 1mM 和 6 小时；

将 SDS-PAGE 后的蛋白带进行转膜，Western-blot 试验证实了所表达的重组核蛋白大小相符具有反应活性。通过特异性、敏感性及工作条件的选择性实验，建立了猪流感病毒感染的重组核蛋白琼扩诊断技术。

实施例 4：

一种重组猪流感病毒 NP 抗原在诊断中的应用，该重组核蛋白抗原用于琼扩诊断技术(AGIP)，酶联免疫吸附试验（ELISA），斑点酶联免疫吸附试验（Dot-ELISA），免疫荧光抗体检测（IF）及免疫印渍试验（Western Blot）。

实施例 5：

一种重组猪流感病毒 NP 抗原及其在诊断中的应用，该重组核蛋白抗原可用于检测 A 型流感病毒感染，包括猪流感病毒，禽流感病毒，马流感病毒和人

流感病毒感染。

实施例 6：

重组 SIV 核蛋白抗原的表达和制备方法：

一，SIV 的培养及 RNA 的提取

取 H1N1 种毒尿囊腔接种 9-11 日龄 SPF 鸡胚，4 天后收获尿囊液，低速离心后超速离心，无 Rnase A 的 TE（PH=8.0）缓冲液溶解沉淀，RNA 的提取按 Trizol 试剂盒说明书进行；所提取的 RNA 用于 RT-PCR。

二，设计合成用于扩增 SIV NP 基因的引物

根据 GeneBank 中 A/Swine/Hong Kong/126/82(H3N2)株流感病毒 NP 基因序列设计一对针对 NP 基因的特异性引物。

上游引物为：5' ACTCACTGGGTACCATCAAAGTCATGG 3'；

下游引物为：5' ACAAGCTTATTTTTCTTCAATTGTCGT 3'。

三，NP 基因的 RT-PCR

1、SIV RNA 的反转录

取上述的病毒 RNA 溶液，加入反转录试剂盒中的 5×Buffer 5μl、10m mol/L 的 dNTPs 4μl 、20pmol/L 的 NP 上游引物 1μl ，瞬时离心后置 95℃水浴中 1 分钟，迅速取出后置冰浴中 5 分钟；再加入 40U/μl RNasin 1μl ，10U/μl AMV-RNase 1μl ，混匀后于 42℃水浴 1.5 小时。最后置 95℃水浴 5 分钟灭活 AMV-RNase，迅速取出后置冰浴中 5 分钟。

2、NP 基因的 PCR

取上述的 5μl cDNA 产物用作 PCR 模板，PCR 反应组成（50μl 反应体系）：

TaKaRa LA Taq(5u/μl) 0.5μl

10×LA pCR^{TM}Buffer Ⅱ(含 Mg^{2+}) 5μl

dNTP Mixture（各 2.5mM） 4μl

引物 P1(10pmol/μl) 2μl

引物 P2(10pmol/μl) 2μl

灭菌去离子水 31.5μl

PCR 反应条件：95℃预变性 10 分钟，94℃1 分钟，55℃1 分钟，72℃1.5 分钟，进行 35 个循环，反应结束前 72℃延伸 10 分钟。

四，表达载体 pET-NP 的构建

1、将 PCR 产物用胶回收试剂盒（上海华舜生物工程公司产品）胶回收后，与 PMD18- T 载体（大连宝生物公司）连接，其体系为：PCR 产物 4μl，T 载体 1μl，Solution I 5μl。于 16℃连接 6 小时后将连接产物转化 DH5α感受态细菌后，随机提取一些白色菌落，用碱裂解法小量提取质粒，然后用 KpnI 进行酶切，0.8%琼脂糖凝胶电泳，从中筛选出含有 1.5kb 大小的外源片段的重组质粒（命名为 TNP）。

2、将上述的重组质粒 TNP 和原核表达载体 PET30(a)用 KpnI 限制性内切酶进行消化，然后用胶回收试剂盒回收，再用 SalI 限制性内切酶消化处理，胶回收试剂盒回收含有 NP 基因的片段和同样处理的原核表达载体。将回收后的片段和载体质粒 PET30(a)以摩尔比 3:1 混匀，用 T4 DNA 连接酶（上海生物工程公司）16℃过夜连接，连接产物转化 BL21 菌种制备的感受态。随机挑取一些菌落，于含卡那霉素（购自上海华舜生物公司）的 LB 中 37℃培养过夜后小量提取质粒并保留菌种。质粒用 KpnI/SalI 双酶切筛选阳性重组质粒，并命名为 pET-NP。将 pET-NP 送上海博亚生物公司测序。

五，NP 基因的诱导表达

将上述含有重组质粒 pET-NP 的 BL21 菌种在含卡那霉素的 LB 平板上划线，37℃培养过夜，随机挑取单个菌落，于 10ml 含 Kna 抗生素的 LB 中 37℃摇床中培养至 OD_{600} 为 0.6-0.7 时加入诱导剂 IPTG（异丙基-β-D 硫代半乳糖苷、大连宝生物公司产品）至终浓度 1mM，继续振摇培养 3-6 小时，收获细菌。离心后将菌体用 0.5M Nacl、20mM Tris·cl(pH=7.6)的缓冲液洗两次，然后用 1ml PBS（PH=7.4）悬浮细胞，经超声波裂解后，加入 2×上样缓冲液（100m mol/L Tris•HCl PH=6.8、200mmol/L 二硫苏糖醇、4%SDS、0.2%溴酚蓝、20%甘油），煮沸变性后进行 10%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 PETNP 质粒的细菌经诱导后表达了约 60ku 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 30%左右。

六，蛋白活性的测定

1、Western-blot 分析：表达蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转移至硝酸纤维素

膜（NC 膜）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；然后加入含 5%脱脂奶粉、1%猪流感标准阳性血清的 PBS 37℃温育 1 小时；PBS 洗涤膜三次后用 150mmol/L NaCl、50mmol/L Tris•Cl(PH=7.5)洗涤一次，然后加入用 Tris•Cl 缓冲液 1/5000 稀释的辣根过氧化物酶标记的兔抗猪 IgG 37℃温育 1 小时；用 150mmol/L NaCl、50mmol/L Tris•Cl(PH=7.5)洗涤三次，加入含 6mg 二氨基联苯胺、10μl 30%H_2O_2的 Tris•Cl(0.01mol/L PH=7.6)的显色液进行反应，观察当形成的蛋白带颜色深度达到要求时用水漂洗，放入 PBS 中保存。结果能见到与 SDS-PAGE 特异性条带相对应的反应条带。

2、琼脂扩散试验：用生理盐水配制含 1%琼脂粉的平板，打孔器打孔后用酒精灯加热底部封底，然后中心孔加入表达产物，周边孔加入各种亚型猪流感阳性血清。同时用全病毒抗原及 BL21 细菌裂解产物做阳性和阴性对照，于 37℃湿盒中放置过夜后观察结果。结果在表达产物和全病毒抗原与阳性血清之间形成了特异性的反应沉淀线，而 BL21 细菌裂解产物与阳性血清之间未形成沉淀线；表达产物和全病毒抗原与阴性血清之间没有形成沉淀线。

猪流感病毒（H3N2）NP 基因全部核苷酸序列:

ATGGCGCTTCAAGGCACCAAACGATCTTATGAGCAGATGGAAACTGGTGGGGAACGCCAGAAT

GCTACTGAGATCAGAGCATCTGTTGGGAGAATGGTTGGTGGAATCGGAAGATTCTACATACAGA

TGTGCACTGAACTCAAACTCAGCGACTACGAAGGCAGGCTGATCCAAAACAGCATAACAATAG

AGAGAATGGTCCTCTCTGCATTTGATGAGAGGAGAAACAGATACCTGGAAGAAAATCCCAGTG

CGGGGAAGGACCCGAAGAAAACTGGAGGCCCTATCTACAAAAGGAGGGAAGGAAAGTGGGTG

AGAGAGCTGATTTTGTATGATAAGGAGGAGATCAGGAGAATTTGGCGTCAAGCGAACAATGGA

GAAGACGCAACTGCTGGTCTCACCCATCTGATGATCTGGCATTCCAATCTGAATGATGCCACAT

ATCAAAGAACAAGAGCTCTCGTGCGTACTGGAATGGACCCCAGAATGTGCTCTCTGATGCAAG

GATCAACTCTCCCGAGGAGATCTGGAGCTGCGGGTGCAGCGGTAAAGGGAGTTGGAACGATG

GTAATGGAACTAATTCGGATGGTAAAGCGAGGGATCAATGATCGGAATTTCTGGAGAGGTGAAA

ATGGACGAAGAACAAGAATTGCATATGAGAGGATGTGCAACATCCTCAAAGGGAAATTCCAAAC

AGCAGCACAGCGAGCAATGATGGACCAGGTGAGAGAAAGCAGGAATCCTGGGAATGCTGAGA

TTGAAGACCTTATCTTTCTGGCTCGGTCTGCACTCATTCTGAGAGGATCAGTGGCTCATAAGTC

CTGCTTGCCTGCTTGTGTATATGGACTTGCTGTGGCCAGTGGATACGACTTTGAGAGAGAGGG

GTACTCTCTGGTCGGAATAGATCCTTTCCGTCTGCTTCAAAACAGCCAGGTGTTAAGCCTCATT
AGACCAAATGAGAATCCGGCACATAAGAGTCAACTGGTATGGATGGCATGCCATTCTGCAGCAT
TTGAAGACCTGAGAGTATCAAGCTTCATCAGAGGGACAAGAGTGATCCCAAGAGGACAACTGT
CCACCAGAGGAGTTCAAATAGCTTCTAATGAGAACATGGAAACAATGGACTCCAGTACTCTTGA
ACTGAGAAGCAGATACTGGGCTATAAGGACTAGGAGTGGAGGAAACACCAACCAACAGAGAGC
ATCTGCAGGGCAAATCAGTGTGCAACCCACTTTCTCGGTACAGAGAAATCTTCCTTTCGAGAGA
GCGACCATCATGGCGGCATTTACAGGGAACACTGAAGGCAGAACATCTGACATGAGGACTGAA
ATCATAAGAATGATGGAAAGTGCCAGACCAGAAGATGTGTCTTTCCAGGGGCGGGGAGTCTTC
GAGCTCTCGGACGAAAAGGCAACGAACCCGATCGTGCCTTCCTTTGACATGAGTAATGAGGGA
TCTTATTTCTTCGGAGACAATGCAGAGGAGTATGACAATTAA

猪流感病毒（H3N2）NP 基因编码的氨基酸序列：

GTIKVMALQGTKRSYEQMETGGERQNATEIRASVGRMVGGIGRFYIQMCTELKLSDYEGRLIQNSI
TIERMVLSAFDERRNRYLEENPSAGKDPKKTGGPIYKRREGKWVRELILYDKEEIRRIWRQANNGE
DATAGLTHLMIWHSNLNDATYQRTRALVRTGMDPRMCSLMQGSTLPRRSGAAGAAVKGVGTMV
MELIRMVKRGINDRNFWRGENGRRTRIAYERMCNILKGKFQTAAQRAMMDQVRESRNPGNAEIE
DLIFLARSALILRGSVAHKSCLPACVYGLAVASGYDFEREGYSLVGIDPFRLLQNSQVLSLIRPNENPA
HKSQLVWMACHSAAFEDLRVSSFIRGTRVIPRGQLSTRGVQIASNENMETMDSSTLELRSRYWAIRT
RSGGNTNQQRASAGQISVQPTFSVQRNLPFERATIMAAFTGNTEGRTSDMRTEIIRMMESARPEDVS
FQGRGVFELSDEKATNPIVPSFDMSNEGSYFFGDNAEEYDNZ

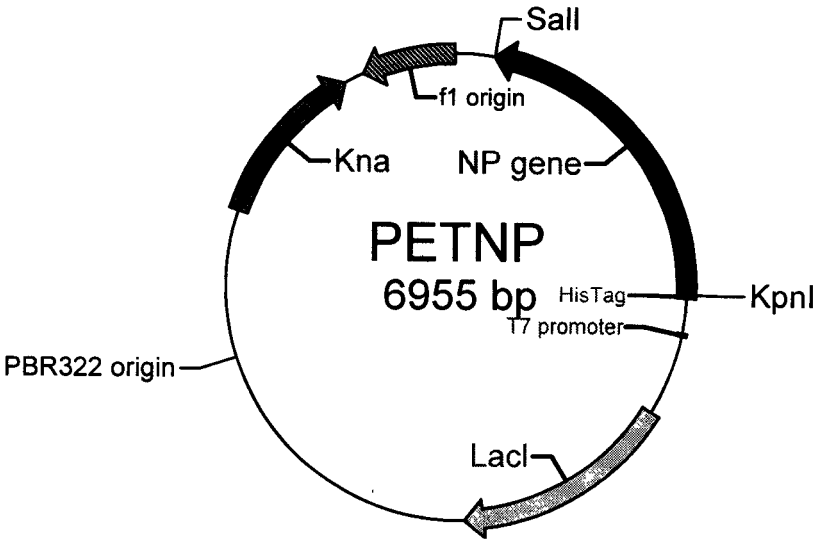

SalI
f1 origin
Kna
NP gene
PETNP
6955 bp
HisTag
KpnI
T7 promoter
PBR322 origin
LacI

图 1,

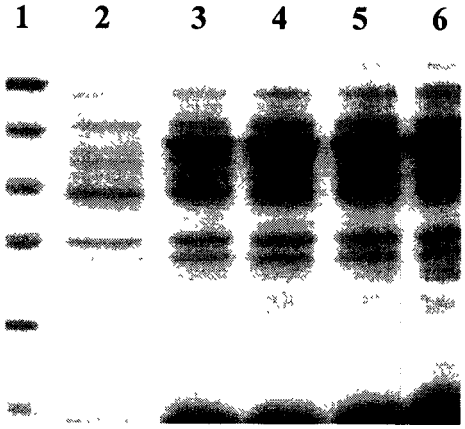

1
2
3
4
5
6

图 2

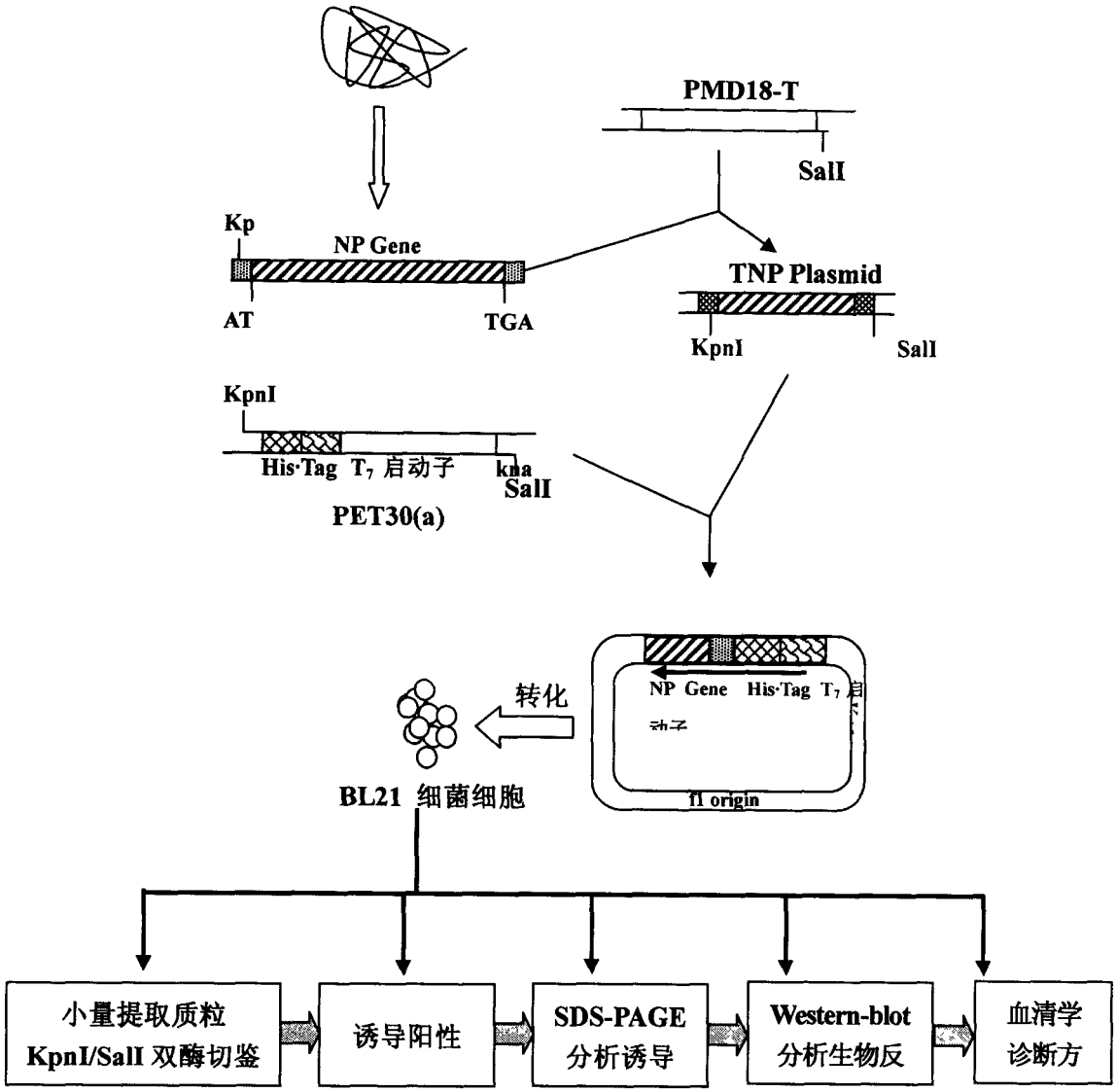
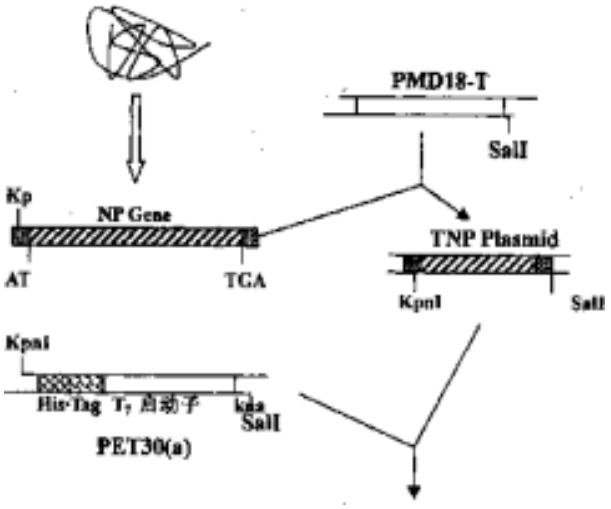

PMD18-T
SalI
Kp
NP Gene
AT
TGA
TNP Plasmid
KpnI
SalI
KpnI
His·Tag T7 启动子
kna
SalI
PET30(a)
转化
NP Gene His·Tag T7 启
动子
f1 origin
BL21 细菌细胞
小量提取质粒
KpnI/SalI 双酶切鉴
诱导阳性
SDS-PAGE
分析诱导
Western-blot
分析生物反
血清学
诊断方

图 3

专利名称(译)	重组猪流感病毒NP抗原、其制备方法及在诊断中的应用		
公开(公告)号	CN1458168A	公开(公告)日	2003-11-26
申请号	CN03132415.0	申请日	2003-06-02
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所		
[标]发明人	童光志 倪健强 李海燕 仇华吉 王云峰		
发明人	童光志 倪健强 李海燕 仇华吉 王云峰		
IPC分类号	C07K14/11 C12N15/44 C12N15/70 G01N33/531 G01N33/569		
代理人(译)	陈晓光		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

重组猪流感病毒NP抗原、其制备方法及在诊断中的应用。A型流感病毒基因组由8个分节段的RNA组成，其中核蛋白(NP)具有型和种群特异性，是分型诊断的基础。本发明是重组猪流感病毒NP抗原，它采用大肠杆菌原核表达系统表达了我国猪流感病毒分离株完整的NP基因，利用表达的NP蛋白作为抗原检测A型流感病毒感染产生的抗NP蛋白抗体，虽然A型流感病毒亚型众多，但其NP基是流感病毒型的分类和诊断的基础，因此，基于重组SIV核蛋白抗原建立的诊断技术可以检测猪、禽、马和人A型流感病毒的感染。