



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108614121 A

(43)申请公布日 2018.10.02

(21)申请号 201810421308.1

C07K 19/00(2006.01)

(22)申请日 2018.05.04

C12N 15/62(2006.01)

(71)申请人 山东师范大学

地址 250014 山东省济南市历下区文化东路88号

(72)发明人 何洪彬 王洪梅 何成强 李书霞
侯佩莉 赵贵民

(74)专利代理机构 济南圣达知识产权代理有限公司 37221

代理人 王志坤

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

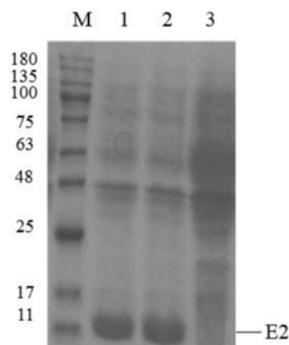
权利要求书2页 说明书14页
序列表4页 附图2页

(54)发明名称

牛病毒性腹泻病毒E2蛋白抗原多表位融合肽及其制备与应用

(57)摘要

本发明公开了BVDV E2多表位融合肽及其制备方法,即基因合成优选出的BVDV-1和BVDV-2的E2蛋白的各2个抗原表位串联序列,并将序列克隆到pET-28a(+)载体,转化大肠杆菌DH-5 α ,将正确的重组载体转化大肠杆菌BL21,经IPTG诱导表达,Ni-NTA纯化,即得BVDV E2多表位融合肽。动物免疫E2抗原多表位融合肽后,能产生BVDV的中和抗体,可用于BVDV表位疫苗的研发;利用E2抗原多表位融合肽制备的ELISA检测试剂盒可用于牛群的BVDV抗体检测,具有特异性强、敏感性高、重复性好、易于操作的优点。



1. 一种BVDV E2抗原多表位融合肽,其特征在于,是包含BVDV-1型2个抗原表位和BVDV-2型2个抗原表位的融合肽。

2. 一种BVDV E2抗原多表位融合肽,其特征在于,N端到C端具有下述氨基酸序列之一的蛋白质:

1) 序列表中SEQ ID NO.1所示氨基酸序列组成的蛋白质;

2) SEQ ID No.1所示氨基酸序列经取代、缺失和/或增加一个或几个氨基酸衍生的并具有与1)所述蛋白具有同等功能的蛋白质。

3. 根据权利要求2所述的BVDV E2抗原多表位融合肽,其特征在于,是由4种抗原表位氨基酸序列构成:序列表中SEQ ID No.2所示的BVDV1-E2中69-79位点的序列、序列表中SEQ ID No.3所示的BVDV1-E2中304-318位点的序列、序列表中SEQ ID No.4所示的BVDV2-E2中67-77位点的序列和序列表中SEQ ID No.5所示BVDV2-E2中302-316位点序列;

所述4种抗原表位通过柔性链串联连接组成。

4. 编码权利要求1~3任一所述BVDV E2抗原多表位融合肽的基因。

5. 根据权利要求4所述基因,其特征在于,是具有下述核苷酸序列之一:

1) 序列表中SEQ ID NO.6所示的DNA序列;

2) 与SEQ ID NO.6具有至少90%的同源性,且能够表达序列表中SEQ ID NO.5蛋白质序列的DNA序列。

6. 含权利要求4或5任一所述基因的重组表达载体、宿主细胞和重组阳性菌;所述重组表达载体是基因插入到大肠杆菌表达载体pET28a (+)中得到的表达BVDV-1型和BVDV-2型E2蛋白的抗原多表位融合肽的重组表达载体;所述重组阳性菌是将含基因的重组表达载体导入大肠杆菌中,筛选得到重组阳性菌。

7. 一种BVDV E2抗原多表位融合肽在BVDV表位疫苗中的应用。

8. 一种BVDV E2抗原多表位融合肽间接ELISA诊断试剂盒,其特征在于,包含BVDV E2抗原多表位融合肽预包被酶标板。

优选地,所述BVDV E2抗原多表位融合肽的包被方法为:将纯化的BVDV E2多表位融合肽用包被缓冲液稀释至4 μ g/mL,包被酶标板,每孔加100 μ L,4 $^{\circ}$ C过夜,用洗涤液洗涤3次,每次2min;然后加入10%马血清200 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育2h,随后用洗涤缓冲液洗涤3次,每次2min,真空包装后置于4 $^{\circ}$ C保存备用。

9. 根据权利要求8所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包含血清稀释液、酶标记结合物稀释液、阳性对照液、阴性对照液、酶标记结合物、洗涤液、底物显色液和终止液;

所述血清稀释液为含BSA和0.5%Tween-20的磷酸盐缓冲液,血清稀释度为1:80,血清反应条件为37 $^{\circ}$ C60min;

所述阴性对照液为BVDV进口试剂盒检测的阴性牛血清,所述阳性对照液为BVDV感染后的阳性牛血清;

所述酶标记结合物为辣根过氧化物酶标记的兔抗牛IgG,所述酶标记结合物稀释度为1:5000,反应条件为37 $^{\circ}$ C下反应1h;

所述洗涤液为0.5%Tween-20的磷酸盐缓冲液;

优选地,所述底物显色液的配方为:每500mL加EDTA-2Na 0.2g、柠檬酸0.95g、甘油50mL和TMB粉末0.15g。

所述底物显色液反应条件为37℃下反应10min；

所述终止液为2mol/L的硫酸溶液。

10. 权利要求8或9任一项所述试剂盒在检测BVDV E2抗原多表位融合肽中的应用。

牛病毒性腹泻病毒E2蛋白抗原多表位融合肽及其制备与应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及BVDV E2蛋白抗原多表位融合肽及其制备与应用,具体涉及BVDV-1型和BVDV-2型E2蛋白的抗原多表位融合肽及其制备方法,以及该BVDV-1型和BVDV-2型E2蛋白的抗原多表位融合肽在BVDV表位疫苗和诊断试剂中的应用。

背景技术

[0002] 牛病毒性腹泻-黏膜病是由牛病毒性腹泻病毒(Bovine viral diarrhea virus, BVDV)引起的一种重要传染病,临床上以发热、腹泻、黏膜糜烂、溃疡、白细胞减少、持续感染、免疫抑制、怀孕母牛流产、产死胎和畸形胎或致死性粘膜炎为主要特征。该病呈世界性分布,给全球养牛业发展造成了巨大的经济损失。我国目前已有20多个省市自治区分离到BVDV或检测到了该病毒的抗体。中华人民共和国农业部发布第96号公告,将牛病毒性腹泻定为三类疫病,世界动物卫生组织(OIE)也将该病列为法定报告的动物疫病及国际动物胚胎交流病原名录三类疫病。目前养牛业发达国家主要采取疫苗免疫并净化持续感染牛为主的综合防制措施,我国仅有灭活疫苗,尚未大范围的推广应用,该病在我国牛群中的流行呈上升趋势,给养殖业造成严重的经济损失。

[0003] 根据BVDV基因组5' -UTR序列差异,将BVDV分为BVDV-1和BVDV-2,其中每种基因型都含有多种毒株,每种毒株的致病差异很大。BVDV基因组只含有一个大的编码区,至少生成11种成熟的蛋白,它们在基因组上的位置从N端到C端依次为5' -P20 (N^{pr0}) -P14 (C) -gp48 (E^{ns}) -gp25 (E1) -gp53 (E2) -P7-P125 (NS2-3) -P10 (NS4A) -P30 (NS4B) -P58 (NS5A) -P75 (NS5B) -3'。其中,C、E^{ns}、E1、E2为病毒的结构蛋白,E2蛋白是主要的保护性抗原,在宿主细胞受体识别、吸附、介导免疫中和反应等方面发挥重要的功能,由于E2糖蛋白变异最大,这也是导致疫苗免疫失败和病毒持续性感染的主要原因。

[0004] 目前BVDV在防制上,还是个很棘手的问题,目前暂无有效药物和预防措施,在国外,主要使用接种BVDV疫苗,检测并淘汰持续期感染的牛只和处于免疫耐受的动物,并辅助消毒净化等预防措施。到目前为止,全世界所研制并投入生产的疫苗为灭活苗和弱毒苗,灭活苗的安全系数高,但免疫期短;弱毒苗安全性低,免疫期长。国内暂无安全有效的BVDV疫苗,虽然有关于疫苗的不少研究,但是都未正式投入生产。BVDV国际标准检测试剂盒基本上被国外公司垄断,价格昂贵,购买周期太长,不适用于中小型养殖场和散养户。

[0005] 因此,建立一种操作简单,准确有效的检测方法尤为重要。间接ELISA方法满足了这个条件,而且敏感性高,同批检测量大,能够标准化生产,适于大规模样品检测的优点,近年来ELISA成为BVDV抗体检测的常用方法,所以同时也有必要建立一种良好的ELISA方法为国产ELISA试剂盒做技术储备。但目前公开的大多数ELISA检测方法,几乎都是采用单抗原表位制备疫苗,且在一些研究中并未公开其效价、其特异性和灵敏性,所以都不适合真正的应用于实际检测中,此外,与国外商品化试剂盒相比的符合率均不高,如钟发刚等,牛病毒性腹泻病毒(BVDV)E2重组蛋白ELISA检测方法的初步建立,只公开了阳性结果与进口试剂检测结果符合率达93.55%;邢思毅,BVDV重组E2蛋白间接ELISA检测方法的建立及初步应用,

公开与国外商品化试剂盒相比,总符合率为91.5%。目前国内外尚无对BVDV E2蛋白抗原多表位(BVDV-1和BVDV-2的E2蛋白抗原表位)融合肽的疫苗及其检测BVDV E2蛋白抗体的诊断试剂盒进行研究。因此,亟待开发价格低廉、敏感特异的BVDV抗体和病原检测试剂盒。

发明内容

[0006] 针对上述问题,本发明首次公开BVDV E2蛋白抗原多表位(BVDV-I和BVDV-II2的E2蛋白抗原多表位)融合肽的疫苗及其检测BVDV E2蛋白抗体的诊断试剂盒。具体的,以BVDV E2蛋白诱导中和抗体的抗原表位作为表位疫苗设计和检测方法建立的靶标分子,在定位BVDV-1和BVDV-2E2蛋白抗原表位的基础上,串联表达BVDV-1和BVDV-2的E2蛋白抗原的多个表位,制备多表位融合肽,将纯化的E2抗原多表位融合肽作为疫苗抗原进行免疫,测定免疫血清中和抗体水平。另外,还将E2抗原多表位融合肽作为包被抗原,建立BVDV E2抗原多表位融合肽的抗体间接ELISA检测方法,并组装试剂盒,与进口试剂盒进行比对评估。

[0007] 本发明的目的之一是提供一种BVDV E2蛋白抗原多表位融合肽及其制备方法。

[0008] 本发明的目的之二的提供该BVDV-1型和BVDV-2型E2蛋白的抗原多表位融合肽在BVDV表位疫苗和诊断试剂盒中的应用。

[0009] 为实现上述目的,本发明采用下述技术方案:

[0010] 一种BVDV E2抗原多表位融合肽,是包含BVDV-1型2个抗原表位和BVDV-2型2个抗原表位的融合肽。

[0011] 本发明公开的BVDV-1型2个抗原表位和BVDV-2型2个抗原表位分别是BVDV-1E2蛋白预测的16个B细胞抗原位点和BVDV-2E2蛋白预测的19个B细胞抗原位点,根据抗原表位序列位置、序列相似性,选择了14个线性抗原表位进行多肽的化学合成及KLH偶联,分别免疫小鼠,采集免疫血清测定ELISA抗体效价,筛选优化得到免疫原性好的上述4个抗原表位肽,其免疫血清ELISA效价均 $>1:10000$ 。

[0012] 上述BVDV E2抗原多表位融合肽,N端到C端具有下述氨基酸序列之一的蛋白质:

[0013] 1) 序列表中SEQ ID NO.1所示氨基酸序列组成的蛋白质;

[0014] 2) SEQ ID No.1所示氨基酸序列经取代、缺失和/或增加一个或几个氨基酸衍生的并具有与1)所述蛋白具有同等功能的蛋白质。

[0015] 上述BVDV E2抗原多表位融合肽是由4种抗原表位氨基酸序列构成:序列表中SEQ ID No.2所示的BVDV1-E2中69-79位点的序列、序列表中SEQ ID No.3所示的BVDV1-E2中304-318位点的序列、序列表中SEQ ID No.4所示的BVDV2-E2中67-77位点的序列和序列表中SEQ ID No.5所示BVDV2-E2中302-316位点序列。

[0016] 上述BVDV E2抗原多表位融合肽,其4种抗原表位通过柔性链串联连接组成。

[0017] 编码上述BVDV E2抗原多表位融合肽的基因。

[0018] 上述BVDV E2抗原多表位融合肽的编码基因是具有下述核苷酸序列之一:

[0019] 1) 序列表中SEQ ID NO.6所示的DNA序列;

[0020] 2) 与SEQ ID NO.6具有至少90%的同源性,且能够表达序列表中SEQ ID NO.5蛋白质序列的DNA序列。

[0021] 上述BVDV E2抗原多表位融合肽的制备方法,包括如下步骤:

[0022] 将SEQ ID NO.6所示的DNA序列进行序列合成,并克隆到pET-28a(+)载体,转化大

肠杆菌DH-5 α ,经DNA测序,重组载体转化大肠杆菌BL21,经IPTG诱导表达,Ni-NTA纯化。

[0023] 一种重组表达载体,是将所述基因插入到大肠杆菌表达载体中得到的表达BVDV-1型和BVDV-2型E2蛋白的抗原多表位融合肽的重组表达载体;所述大肠杆菌表达载体为pET28a(+)质粒。

[0024] 一种重组阳性菌,是将所述的重组表达载体导入大肠杆菌中,筛选得到重组阳性菌。

[0025] 所述的DNA序列、所述重组表达载体、原核表达系统或重组阳性菌在BVDVE2抗原多表位融合肽中的应用。

[0026] 一种BVDV E2抗原多表位融合肽在BVDV表位疫苗中的应用。

[0027] 一种BVDV E2抗原多表位融合肽在BVDV表位疫苗中的应用,所述应用的方法包括如下步骤:

[0028] 将BVDV E2蛋白的抗原多表位融合肽与弗氏佐剂乳化处理,免疫新西兰兔,经3-4次免疫,最后一次免疫3周后,心脏采血,制备BVDV E2抗原多表位融合肽抗血清;通过ELISA方法,测定血清抗体效价;利用western blot技术对免疫血清进行BVDV特异性检测;通过中和试验,测定免疫血清中和抗体。

[0029] 所述新西兰兔的BVDV E2抗原多表位融合肽免疫剂量为200ug/只;

[0030] 本发明BVDV E2抗原多表位融合肽免疫血清ELISA效价高达1:32000;BVDVE2抗原多表位融合肽抗血清对BVDV进行western blot检测,发现具有较好的特异性;BVDV E2抗原多表位融合肽免疫血清的BVDV中和抗体水平可以达到1:22。

[0031] 一种BVDV E2抗原多表位融合肽间接ELISA诊断试剂盒,包含BVDV E2抗原多表位融合肽预包被酶标板。

[0032] 所述BVDV E2抗原多表位融合肽的包被方法为:将纯化的BVDV E2多表位融合肽用包被缓冲液稀释至4 μ g/mL,包被酶标板,每孔加100 μ L,4 $^{\circ}$ C过夜,用洗涤液洗涤3次,每次2min;然后加入10%马血清200 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育2h,随后用洗涤缓冲液洗涤3次,每次2min,真空包装后置于4 $^{\circ}$ C保存备用。

[0033] 上述试剂盒还包含血清稀释液、酶标记结合物稀释液、阳性对照液、阴性对照液、酶标记结合物、洗涤液、底物显色液和终止液。

[0034] 所述血清稀释液为含BSA和0.5%Tween-20的磷酸盐缓冲液,血清稀释度为1:80,血清反应条件为37 $^{\circ}$ C60min。

[0035] 所述阴性对照液为BVDV进口试剂盒检测的阴性牛血清,所述阳性对照液为BVDV感染后的阳性牛血清。

[0036] 所述酶标记结合物为辣根过氧化物酶标记的兔抗牛IgG,所述酶标记结合物稀释度为1:5000,反应条件为37 $^{\circ}$ C下反应1h。

[0037] 所述洗涤液为0.5%Tween-20的磷酸盐缓冲液。

[0038] 所述底物显色液的配方为:每500mL加EDTA-2Na0.2g、柠檬酸0.95g、甘油50mL和TMB粉末0.15g。

[0039] 所述底物显色液反应条件为37 $^{\circ}$ C下反应10min。

[0040] 所述终止液为2mol/L的硫酸溶液。

[0041] ELISA技术操作程序看似简单,但是实验材料和血清抗体以及包被液、封闭液的不

同选择就会有不同的结果。因此,要在去除非特异性反应,不影响正常检测结果的前提下,把各种试剂、血清、抗体稀释到最佳倍数是一个比较困难的摸索过程。本发明通过对上述各指标的优化,使得试剂盒灵敏度高、特异性好、与牛传染性鼻气管炎 (IBRV) 及牛副流感病毒 3 型 (BPIV3) 阳性血清无交叉反应,批内和批间变异系数小;与进口的 iELISA 试剂盒检测符合率达 98% 以上,为更加准确的对 BVDV 做出诊断以及免疫评价提供了更加科学、高效、可靠的抗体检测试剂盒。

[0042] 一种 BVDV E2 抗原多表位融合肽间接 ELISA 诊断试剂盒在检测 BVDV E2 抗原多表位融合肽中的应用。

[0043] 相比于现有技术的缺点和不足,本发明取得了以下有益效果:

[0044] (1) 本发明首次公开 BVDV E2 蛋白抗原多表位 (BVDV-1 和 BVDV-2 的 E2 蛋白抗原多表位) 融合肽,所制备的 BVDV E2 抗原多表位融合肽免疫动物后,能产生中和抗体,可用于 BVDV 表位疫苗的研发;利用 BVDV E2 抗原多表位融合肽所制备的 ELISA 试剂盒可用于牛群的 BVDV 抗体检测,为 BVDV 流行病学调查及疫病诊断提供关键技术。

[0045] (2) 本发明 BVDV E2 抗原多表位融合肽,增加了免疫保护性抗原表位,多表位疫苗能有效的应对病毒的变异和免疫反应中的某些不利因素。多表位疫苗通过串联不同抗原表位,可以选择诱导的免疫方式提高免疫效果。

[0046] (3) 本发明试剂盒灵敏度高、特异性好、与病毒阳性血清无交叉反应,批内和批间变异系数小于 8%;与进口试剂盒相检测符合率达 98% 以上,为更加准确的对 BVDV 做出诊断以及免疫评价提供了更加科学、高效、可靠的抗体检测试剂盒。

[0047] (4) 本发明优化了封闭条件、血清及抗体稀释,建立了 BVDV E2 抗原多表位融合肽间接 ELISA 方法,组装了敏感且价格低廉的 BVDV E2 抗原多表位融合肽间接 ELISA 试剂盒,可改变长期依赖进口 BVDV 抗体 ELISA 试剂盒的局面。

附图说明

[0048] 图 1 为 BVDV E2 多表位融合肽的诱导表达, M: 蛋白分子量标准 (180/135/100/75/63/48/35/25/17/11kDa); 1: 10mmol/L IPTG 的诱导表达; 2: 1mmol/L IPTG 的诱导表达; 3: 未诱导表达。

[0049] 图 2 为 BVDV E2 多表位融合肽的纯化, M: 蛋白分子量标准 (180/135/100/75/63/48/35/25/17/11kDa); 1: E2 多表位融合肽可溶性蛋白纯化; 2: E2 多表位融合肽包涵体蛋白纯化。

[0050] 图 3 为 BVDV E2 多表位融合肽 His 抗体的 Western blot 检测。

[0051] 图 4 为 BVDV E2 多表位融合肽免疫兔血清对 BVDV 的 Western blot 检测, 1: 正常培养的 MDBK 细胞; 2: BVDV 感染的 MDBK 细胞, 3: 纯化的 E2 多表位融合肽。

具体实施方式

[0052] 结合具体实例对本发明作进一步的说明,以下实例仅是为了解释本发明,并不对其内容进行限定。如果实例中未注明的实验具体条件,通常按照常规条件,或按照试剂公司推荐的条件;下述实施例中所用的试剂、耗材等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0053] 试剂: pET28a (+)、限制性内切酶 BamH I 和 EcoR I、T4DNA 连接酶、质粒 DNA 提取试剂

盒;大肠杆菌DH5 α 、BL21;IPTG、NPI-10、溶菌酶、PMSF、胰蛋白酶抑制剂、胃蛋白酶抑制剂、NPI-20、Ni-NTA beads;5 \times 蛋白上样缓冲液、聚丙烯酰胺凝胶预制液、考马斯亮蓝染色液、ECL试剂盒;血清稀释液,血清稀释液优选含BSA和0.5%Tween-20的磷酸盐缓冲液;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔和兔抗牛IgG;包被缓冲液;洗涤液,洗涤液优选0.5%Tween-20的磷酸盐缓冲液;封闭缓冲液;抗免疫球蛋白-酶结合物稀释液;底物显色液,优选每500mL加乙二胺四乙酸二钠0.2g、柠檬酸0.95g、甘油50mL和TMB粉末0.15g;终止液优选为2mol/L的硫酸溶液。

[0054] 仪器:化学发光仪、凝胶成像仪、超声破碎仪、酶联免疫检测仪、单道移液器、8道移液器、加样器、洗板机等。

[0055] 耗材:96孔细胞培养板、100mm细胞培养板;96孔聚苯乙烯微量酶标板;血清稀释板、吸头、离心管等。

[0056] 本发明多肽的合成及其与KLH的偶联,以及DNA由上海生工生物工程有限公司进行序列合成。

[0057] 实施例1 BVDV E2抗原表位肽的筛选

[0058] 1. BVDV E2抗原表位的预测及抗原表位肽的制备

[0059] 将GenBank的BVDV-1和BVDV-2E2的基因序列,通过在线软件进行抗原表位分析,共获得35个B细胞抗原位点,其中BVDV-1E2和BVDV-2E2的B细胞抗原表位分别为16个和19个,根据序列位置、序列相似性,选择了14个线性抗原表位(表1)进行了多肽的化学合成,为增加多肽的免疫原性,将多肽分别与KLH偶联。

[0060] 表1 合成的BVDV抗原表位肽

抗原表位 肽编号	位置	序列	BVDV 基因型
1	23-34	AEGLTTTWYEYS (SEQ ID NO.7)	BVDV-1
2	69-79	LHTRALPTSVV (SEQ ID NO.2)	BVDV-1
3	85-95	DGRKQEDVVEM (SEQ ID NO.8)	BVDV-1
4	156-165	YRRSKPFPHR (SEQ ID NO.9)	BVDV-1
5	212-221	FKESEGLPHY (SEQ ID NO.10)	BVDV-1
6	283-292	IISSEGPVEK (SEQ ID NO.11)	BVDV-1
[0061] 7	304-318	KNKYFEPDRSYFQQY (SEQ ID NO.3)	BVDV-1
8	21-32	PESLTTTWHLPT (SEQ ID NO.12)	BVDV-2
9	67-77	VHERALSTSAE (SEQ ID NO.4)	BVDV-2
10	83-93	DGKKGPDVIDM (SEQ ID NO.13)	BVDV-2
11	154-163	YRRITPFQRR (SEQ ID NO.14)	BVDV-2
12	210-219	FFDSEGLPHY (SEQ ID NO.15)	BVDV-2
13	281-290	VVASEGPVER (SEQ ID NO.16)	BVDV-2
14	302-316	PNKYEPRDRYFQQY (SEQ ID NO.5)	BVDV-2

[0062] 2. 抗原表位肽的免疫

[0063] 将上述KLH偶联的抗原表位肽分别免疫6-8周龄的Balb/c小鼠,首次免疫时,使用弗氏完全佐剂制备的KLH-抗原表位肽,皮下注射,免疫剂量为100 μ g/只;每2周加强免疫1次,共加强免疫2次,加强免疫时,使用弗氏不完全佐剂制备的KLH-抗原表位肽,免疫剂量为50 μ g/只;最后一次免疫14d后,小鼠眼球采血,分离血清,于-20 $^{\circ}$ C保存备用。

[0064] 3. 免疫血清ELISA抗体测定

[0065] 分别将抗原表位肽用包被液进行稀释,包被酶标板,4 $^{\circ}$ C过夜;将包被好的96孔酶标板放置摇床上洗涤,PBST 200 μ L/孔,洗涤3-4次,每次5min;10%马血清封闭,37 $^{\circ}$ C 2h;PBST洗涤3-4次;配制抗体稀释液,将待测的鼠血清作为一抗从1:200和1:2000分别进行倍比稀释,未免疫的鼠血清作阴性对照,37 $^{\circ}$ C孵育1h,甩掉液体,PBST洗涤3-4次;每孔加入100 μ L 1:5000稀释的辣根过氧化物酶山羊抗小鼠IgG,37 $^{\circ}$ C孵育1h,甩掉液体,PBST洗涤3-4次;于反应孔中加入TMB显色液,室温避光,显色10min左右,加入等体积的终止液终止反应,利用酶标仪检测OD450nm吸光值,分析并计算抗血清抗体的效价,其中抗原表位肽2、7、9、14具有较高水平的ELISA效价>1:10000(表2)。

[0066] 表2 BVDV抗原表位肽的免疫抗体ELISA效价测定

0.6-0.8;收集1mL未加IPTG的菌液作为未诱导对照,在上述摇好的菌液中分别加入终浓度为1mmol/L、10mmol/L的IPTG,分别在25℃、37℃条件下诱导4h、6h、9h;分别收集1mL菌液,收集菌体沉淀,加入80uL 1%的SDS溶液,以及20uL的5×蛋白上样缓冲液,混匀,煮沸5min,进行SDS-PAGE检测,考马斯亮蓝染色,分析蛋白表达情况。发现BVDV E2抗原多表位融合肽最佳诱导条件为1mmol/L的IPTG 37℃诱导4h(图1)。

[0074] 3. BVDV E2抗原多表位融合肽的可溶性分析

[0075] 收集1mmol/L IPTG 37℃诱导4h的菌液,收集菌体沉淀,加入适量PBS溶液,在冰浴条件下超声破碎菌体30min,功率400W,开5s,关5s。10000rpm离心2min,收集上清液。沉淀再次超声破碎,离心取上清。利用SDS-PAGE分别对两次上清进行检测,分析蛋白的可溶性。发现E2多抗原表位融合肽在上清与包涵体中均存在(图2)。

[0076] 4. E2抗原多表位融合肽的纯化

[0077] 收集1mmol/L IPTG 37℃诱导4h的菌液300mL,收集菌体沉淀,加入20mLNPI-10裂解液、4.2mL溶菌酶、600U PMSF、30uL胰蛋白酶抑制剂及180uL胃蛋白酶抑制剂,重悬菌体,冰上静置1h,使菌体沉淀裂解完全。冰浴、超声破碎30min,收集上清加入到平衡好的2mL 50%的Ni-NTA beads中,混匀,置于4℃低速摇动,过夜结合。4℃自然沉淀,将管内的液体加入纯化柱中,过滤。用NPI-20连续洗脱10次左右,洗去杂蛋白。加入1mL NPI-250洗脱目的蛋白,收集液体后,连续洗脱10次,-80℃保存。取少量纯化的E2多表位融合肽,进行SDS-PAGE电泳,考马斯亮蓝染色和Western blot检测,检测纯化情况(如图3)。

[0078] 实施例3 E2抗原多表位融合肽在BVDV表位疫苗的应用

[0079] 1. 免疫动物的选择与抗血清的制备:选择1.5kg的雌性新西兰兔6只,其中免疫组和对照组各3只,背部皮下多点注射,E2多表位融合肽免疫剂量为200ug/只,对照组则使用PBS替代多表位融合肽;首次免疫使用弗氏完全佐剂乳化,二次免疫和三次免疫使用弗氏不完全佐剂乳化;每隔14d免疫一次,初次免疫当天及免疫后每7d耳静脉采血,第3次免疫14d后,检测血清中的抗体,待抗体效价>1:10000,方可进行四免,四免后每周采血1次,待抗体效价>1:30000后,心脏采血,血液37℃孵育30min,4℃过夜,3000rpm离心15min收集血清,储存于-80℃备用。用E2多表位融合肽作为包被抗原,通过间接ELISA方法检测兔免疫血清的抗体效价。

[0080] 2. 免疫血清抗体效价的测定:

[0081] 采用ELISA方法对免疫血清抗体效价进行测定,具体操作如下:①包被:将纯化的E2多表位融合肽经包被液适当稀释,100uL/孔,包被96孔酶标板,4℃过夜。

[0082] ②洗涤:包被结束后,取出96孔酶标板放置摇床上洗涤,PBST 200uL/孔,洗涤3-4次,每次5min。

[0083] ③封闭:10%马血清封闭,37℃2h。

[0084] ④洗涤:操作同②。

[0085] ⑤孵育一抗:配制抗体稀释液,将待测的兔血清作为一抗倍比稀释,未免疫的兔血清作阴性对照,实验室保存的BVDV感染后的阳性牛血清为阳性对照。37℃孵育2h。洗涤,操作同②。

[0086] ⑥孵育二抗:选用商品化的HRP标记的山羊抗兔IgG作为二抗,1:5000稀释,37℃孵育2h。洗涤,操作同②。

[0087] ⑦显色:于反应孔中加入适量的TMB显色液,室温避光,显色10min左右。

[0088] ⑧终止反应:加入等体积的终止液终止反应。

[0089] ⑨利用酶标仪检测OD_{450nm}吸光值,分析并计算抗血清抗体的效价。

[0090] 通过ELISA检测免疫血清的抗体效价,将免疫血清做稀释后作为反应的一抗,1:5000稀释的HRP标记的山羊抗兔IgG作为二抗,测定OD_{450nm}值并进行分析与计算。判定标准为P/N>2为阳性,出现阳性孔的血清稀释度即为抗血清抗体的效价,其中P/N=阳性血清OD_{450nm}值/阴性血清OD_{450nm}值。最后一次大量采血获得的免疫血清的抗体效价为1:32000。

[0091] 3. 免疫血清对BVDV的Western Blot检测

[0092] 分别对BVDV细胞培养物和纯化表达的E2多表位融合肽进行兔血清抗体Western Blot检测。将长满单层的MDBK细胞接种10^{6.8}TCID₅₀/mL 100uL,对照细胞以PBS替代病毒液,37℃吸附1h,吸除病毒液,加入2%的细胞维持液,37℃CO₂培养箱培养;48h后收获接毒细胞和对照细胞,经RIPA裂解细胞,冰浴,离心,取上清与E2多表位融合肽分别上样,经SDS-PAGE电泳,转膜,5%的脱脂奶粉4℃封闭过夜,将免疫血清作为一抗1:100稀释,室温孵育1h,经PBST洗3次后,加二抗孵育1h,二抗为HRP标记的山羊抗兔IgG 1:5000稀释,经PBST洗3次后,加入ECL显色液,化学发光仪检测,所制备的免疫血清能检测E2多表位融合肽及BVDV的E2蛋白(图4)。

[0093] 4. 免疫血清的病毒中和实验

[0094] 利用固定病毒稀释血清法测定免疫血清的中和抗体水平,取10^{6.8}TCID₅₀/mL的BVDV,经稀释获得200TCID₅₀/50uL的病毒液。待测血清56℃灭活30min,取上清;在96孔微量细胞培养板上,PBS倍比稀释为1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256、1:512,每孔加入稀释血清50uL,每个稀释度4个孔;每孔加入50uL稀释后的200TCID₅₀病毒液,封好盖,置于37℃温箱中和1h。取出后,每孔加入100uL细胞悬液,37℃CO₂培养箱培养,48h后逐日观察记录。

[0095] 设立阳性和阴性血清与待检血清进行平行试验、病毒回归试验、待测血清毒性试验、正常细胞对照试验。在本试验中,阳性血清对照没有出现细胞病变(CPE),阴性血清对照出现了CPE;0.1TCID₅₀的病毒没有使MDBK细胞出现CPE,而100TCID₅₀的病毒使MDBK细胞出现了CPE,病毒回归试验成立;将待检血清1:2稀释后加入到DMEM培养液中培养MDBK细胞,细胞生长正常,对细胞无毒性作用;正常细胞对照在整个中和试验中一直保持良好的形态和生活特征。

[0096] 结果计算:是计算出能保护50%细胞孔不产生细胞病变的血清稀释度,该稀释度即为该份血清的中和抗体效价。根据表3的数据,用Reed-Muench法(或Karber法)计算结果:距离比例=(80%-50%)÷(80%-20%)=0.5,Ig TCID₅₀=高于50%血清稀释度的对数-距离比例×稀释系数的对数=-1.5-0.5×(-0.3)=-1.35,免疫血清的中和抗体水平为10^{-1.35}为1:22。

[0097] 表3 免疫血清的病毒中和实验

[0098]

血清稀释	CPE 数/总孔数	CPE 数	无 CPE 数	积累		CPE 比率	百分数
				CPE	无 CPE		
1:4($10^{-0.6}$)	0/4	0	4	0	12	0/12	0/4
1:8($10^{-0.9}$)	0/4	0	4	0	8	0/8	0/4
1:16($10^{-1.2}$)	1/4	1	3	1	4	1/5	1/4
1:32($10^{-1.5}$)	3/4	3	1	4	1	4/5	3/4
1:64($10^{-1.8}$)	4/4	4	0	4	0	4/4	4/4
1:128($10^{-2.1}$)	4/4	4	0	4	0	4/4	4/4
1:256($10^{-2.4}$)	4/4	4	0	4	0	4/4	4/4
1:512($10^{-2.7}$)	4/4	4	0	4	0	4/4	4/4

[0099] 实施例4 BVDV E2多表位融合肽ELISA检测试剂盒的制备

[0100] 1. 包被条件及血清孵育条件的优化

[0101] 利用方阵滴定法,将纯化的E2蛋白利用包被液作0.5ug/mL、1ug/mL、4ug/mL、6ug/mL、10ug/mL 5个稀释度稀释,每个稀释度做3个重复,包被96孔酶标板,每孔100uL;设置4℃过夜、4℃过夜加37℃包被1h、4℃过夜加37℃包被2h、37℃包被1h和37℃包被2h五种包被条件;将阴阳性血清作1:10、1:20、1:50、1:80、1:100、1:200 6个稀释度稀释,每个血清做3个重复。设置空白对照,确定最适的包被浓度与阴阳性血清的最佳稀释倍数(如表4)。血清37℃恒温箱内孵育30min、60min、90min、120min、150min。确定最佳的包被条件为每孔包被多表位融合肽0.4ug、4℃包被过夜;血清1:80稀释,血清37℃恒温箱内孵育60min效果最佳。

[0102] 表4 包被抗原及血清的最佳稀释浓度

[0103]

样品稀释度	样品	蛋白包被浓度 (ug/mL)				
		0.5	1	4	6	10
1:10	+	0.921	0.686	0.993	0.721	1.115
	-	0.096	0.101	0.905	0.72	0.54
	P/N	9.557	6.792	1.097	1.001	2.065
1:20	+	0.959	0.602	1.159	0.935	0.538
	-	0.301	0.312	0.498	0.316	0.434
	P/N	3.191	1.928	2.328	2.963	1.239
1:50	+	0.801	0.912	1.024	0.78	0.67
	-	0.232	0.356	0.405	0.467	0.29
	P/N	3.454	2.561	2.53	1.669	2.31
1:80	+	0.882	0.892	1.166	1.043	0.645
	-	0.266	0.266	0.198	0.402	0.217
	P/N	3.316	3.348	5.887	2.595	2.969
1:100	+	0.774	0.809	0.983	0.949	0.265
	-	0.276	0.291	0.41	0.398	0.205
	P/N	2.808	2.779	2.398	2.384	1.291
1:200	+	0.591	0.528	0.52	0.789	0.471
	-	0.202	0.211	0.31	0.304	0.172
	P/N	2.932	2.505	1.678	2.594	2.735

[0104] 2. 封闭条件的优化

[0105] 选用5%脱脂奶粉、10%与20%马血清作封闭液,在37℃培养箱中分别封闭30min、60min、90min、120min、150min,确定最佳的封闭液及封闭时间。当用10%马血清封闭2h时,P/N值最大,此时阳性血清OD_{450nm}值>1,且阴性血清OD_{450nm}值<0.2。因此,最佳封闭液为10%马血清,封闭时间为2h。

[0106] 3. 二抗作用条件及显色条件的优化

[0107] 将HRP标记的兔抗牛IgG分别进行1:2000、1:3000、1:4000、1:5000、1:6000稀释,分别在37℃培养箱孵育30min、60min、90min、120min、150min,确定最佳二抗稀释度及作用时间。加入TMB显色液后,在室温避光显色5min、10min、15min及20min,确定最佳的显色时间。当二抗稀释度为1:5000,作用时间为1h,TMB显色10min时,P/N值最大,此时阳性血清OD_{450nm}值>1,且阴性血清OD_{450nm}值<0.2。因此,二抗最佳的工作浓度为1:5000,最佳作用时间为1h,最佳显色时间为10min。

[0108] 4. 判定标准的建立

[0109] 利用已优化好的ELISA方法,对进口试剂盒检测的BVDV阴性血清23份进行检测,测

定OD_{450nm}值。通过计算得到OD_{450nm}的平均值X(-)为0.2225,标准差SD为0.0589,X(-)+3SD为0.3994。为了便于判定,将判定标准记为0.4。因此,当样本的OD_{450nm}值<0.4时,可以判定此样本为阴性,若>0.4则为阳性。

[0110] 5. BVDV E2多表位融合肽ELISA检测试剂盒的组装

[0111] BVDV E2抗原多表位融合肽预包被酶标板:将纯化的重组蛋白E2用包被缓冲液稀释至4μg/mL,包被酶标板,每孔加100μL,4℃过夜,用洗涤液洗涤3次,每次2min;然后加入最佳封闭液为10%马血清,每孔加200μL,37℃孵育2h,随后用洗涤缓冲液洗涤3次,每次2min,真空包装后置于4℃保存备用。

[0112] 血清稀释液为含BSA和0.5%Tween-20的磷酸盐缓冲液,血清稀释度为1:80,血清反应条件为37℃60min;阴性对照液为BVDV进口试剂盒检测的阴性牛血清,所述阳性对照液为BVDV感染后的阳性牛血清;酶标记结合物为HRP标记的兔抗牛IgG酶标抗体,所述酶标记结合物稀释度为1:5000,反应条件为37℃下反应1h;洗涤液为0.5%Tween-20的磷酸盐缓冲液;底物显色液为每500mL纯水,加乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)0.2g、柠檬酸0.95g、甘油50mL和TMB粉末0.15g;底物显色液反应条件为37℃下反应10min。

[0113] 将BVDV E2抗原多表位融合肽预包被酶标板、血清稀释液、酶标记结合物稀释液、阳性对照液、阴性对照液、酶标记结合物、洗涤液、底物显色液和终止液组装成为BVDV E2多表位融合肽ELISA检测试剂盒。

[0114] 实施例5 BVDV E2多表位融合肽ELISA检测试剂盒的特异性、敏感性、重复性检测

[0115] 1. 特异性实验

[0116] 利用BVDV E2多表位融合肽ELISA检测试剂盒,对实验室保存的牛传染性鼻气管炎(IBRV)及牛副流感病毒3型(BPIV3)阳性血清各10份进行检测,设置BVDV阴阳性血清对照及空白孔对照,测定OD_{450nm}值,结果见表5。经检测,IBRV和BPIV3阳性血清的BVDV抗体均为阴性,说明无交叉反应。

[0117] 表5 ELISA特异性检测

[0118]

样品编号	IBRV	BPIV3
	BVDV 抗体测定平均值	BVDV 抗体测定平均值
OD _{450nm} 值	0.126±0.028	0.131±0.017

[0119] 2. 敏感性实验

[0120] 选取6份实验室保存的BVDV阳性血清进行敏感性测定,经检测,当血清稀释度为1:640时,实验结果仍为阳性,说明该方法敏感性较好。结果见表6。

[0121] 表6 ELISA敏感性检测

[0122]

样品	血清稀释度							
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560
1	1.546	1.444	1.288	0.919	0.743	0.47	0.298	0.188
2	1.596	1.522	1.332	0.987	0.686	0.43	0.282	0.187
3	1.603	1.433	1.422	1.16	0.757	0.508	0.319	0.196
4	1.459	1.268	1.165	0.872	0.583	0.412	0.382	0.158
5	1.396	1.342	1.106	0.869	0.579	0.401	0.364	0.161
6	1.406	1.399	1.297	1.014	0.724	0.473	0.301	0.196

[0123] 3. 重复性实验

[0124] 利用BVDV E2多表位融合肽ELISA检测试剂盒,进行批间重复与批内重复实验,计算变异系数,结果见表7。对结果进行分析,批间重复变异率和批内重复率均<8%,证明该检测方法具有较好的重复性。

[0125] 表7 ELISA重复性检测

[0126]

样品	批间重复		批内重复	
	平均值	变异系数	平均值	变异系数
1	1.263±0.028	2.189	1.128±0.02	1.740
2	1.467±0.066	4.524	1.183±0.037	3.115
3	0.878±0.017	1.919	1.525±0.053	3.469
4	0.302±0.005	1.645	0.305±0.006	1.820

[0127]

5	1.389±0.051	3.682	0.360±0.007	1.938
6	0.282±0.009	3.185	0.224±0.008	3.657

[0128] 实施例6 BVDV E2多表位融合肽ELISA检测试剂盒的临床样本检测

[0129] 1. 检测步骤

[0130] (1) 加样: 包被板室温平衡并稀释待检血清: 取抗原包被板, 打开真空包装后至室温30min; 同时将待检血清分别稀释80倍; 将稀释好的待检血清和对照各取100μL加入到抗原包被板孔中, 其中, 阴性对照和阳性对照各设2孔;

[0131] (2) 感作: 将酶标板封板后, 在振荡器上混合1min后, 37℃下感作60min。

[0132] (3) 洗涤: 弃掉各孔液体, 每孔加入250-300μL的洗涤液, 轻轻振动后甩掉, 洗涤5次, 最后一次洗涤后, 将酶标板在吸水纸上轻拍, 除去孔内残液。

[0133] (4) 加酶标抗体: 每孔加入100μL 1:5000稀释的HRP标记的兔抗牛IgG。

- [0134] (5) 感作和洗涤:将酶标板封膜后,室温感作60min,重复上述洗涤步骤。
- [0135] (6) 加底物:每孔加入100 μ L TMB底物溶液。
- [0136] (7) 感作:20-25 $^{\circ}$ C下黑暗处感作10min,从加完第1孔开始计时。
- [0137] (8) 加终止液:每孔加入100 μ L终止液,终止颜色反应。
- [0138] (9) 测定吸光值(OD):酶标仪以空气作为空白对照,于15min内,在450nm波长下测量和记录样品和对照的OD值。
- [0139] (10) 结果判定:阳性对照孔OD_{450nm}平均值 ≥ 0.4 ,阴性对照孔OD_{450nm}平均值 < 0.4 时,样品OD_{450nm}值 ≥ 0.4 ,判为阳性;OD_{450nm}值 < 0.4 ,判为阴性。

[0140] 2. 临床样本的检测

[0141] 对山东、天津、辽宁等地采集的460份牛血清样本进行了BVDV E2多表位融合肽ELISA检测,检测BVDV阳性血清318份,总体阳性率为69.13%,结果见表8。

[0142] 表8 临床血清BVDV抗体的间接ELISA检测

	省份	血清样本数	阳性个数	阳性率%
	山东	110	63	57.27
[0143]	辽宁	140	106	75.71
	天津	210	149	70.95
	总计	460	318	69.13

[0144] 3. 与进口试剂盒的比较

[0145] 同时利用进口BVDV抗体ELISA试剂盒对460份血清进行检测,结果如表9所示。制备的BVDV E2多表位融合肽抗体ELISA试剂盒与进口iELISA试剂盒符合率为98%以上。

[0146] 表9 BVDV E2表位抗体ELISA试剂盒与进口试剂盒的比较

[0147]

试剂盒	阳性	阴性	阳性率%
BVDV E2 表位抗体 ELISA 试剂盒	318	142	69.13
IDEXX iELISA 试剂盒	320	140	69.56
HIPRA iELISA 试剂盒	314	146	68.69

[0148] 最后应该说明的是,以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,对于本领域的技术人员来说,其依然可以对前述实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分进行等同替换。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。上述虽然结合附图对本发明的具体实施方式进行了描述,但并非对本发明保护范围的限制,所属领域技术人员应该明白,在本发明的技术方案的基础上,本领域技术人员不需要付出创造性劳动即可做出的各种修改或变形仍在本发明的保护范围以内。

SEQUENCE LISTING

<110> 山东师范大学

<120> 牛病毒性腹泻病毒E2蛋白抗原多表位融合肽及其制备与应用

<130> 2010

<160> 16

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 73

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 1

Leu His Thr Arg Ala Leu Pro Thr Ser Val Val Ala Ala Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Ala Ala Lys Asn Lys Tyr Phe Glu Pro Arg Asp Ser Tyr Phe Gln Gln
 20 25 30
 Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Val His Glu Arg Ala Leu Ser Thr
 35 40 45
 Ser Ala Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Pro Asn Lys Tyr Tyr Glu
 50 55 60
 Pro Arg Asp Arg Tyr Phe Gln Gln Tyr
 65 70

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 2

Leu His Thr Arg Ala Leu Pro Thr Ser Val Val
 1 5 10

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 3

Lys Asn Lys Tyr Phe Glu Pro Arg Asp Ser Tyr Phe Gln Gln Tyr
 1 5 10 15

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 4

Val His Glu Arg Ala Leu Ser Thr Ser Ala Glu

1 5 10

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 5

Pro Asn Lys Tyr Tyr Glu Pro Arg Asp Arg Tyr Phe Gln Gln Tyr

1 5 10 15

<210> 6

<211> 219

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 6

ttgcatacaa gggccttacc gaccagtgtg gtagcagcag cagcagcagc agcaaaaaat 60
 aagtattttg agcccagaga cagctacttc cagcaatacg cagcagcagc agcagcagca 120
 gtgcacgaga gagccttata aaccagtgcc gaggcagcag cagcagcagc agcacctaata 180
 aagtattatg agccaaggga ccggtacttc caacaatac 219

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 7

Ala Glu Gly Leu Thr Thr Thr Trp Tyr Glu Tyr Ser

1 5 10

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 8

Asp Gly Arg Lys Gln Glu Asp Val Val Glu Met

1 5 10

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 9

Tyr Arg Arg Ser Lys Pro Phe Pro His Arg

1 5 10

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 10

Phe Lys Glu Ser Glu Gly Leu Pro His Tyr

1 5 10

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 11

Ile Ile Ser Ser Glu Gly Pro Val Glu Lys

1 5 10

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 12

Pro Glu Ser Leu Thr Thr Thr Trp His Leu Pro Thr

1 5 10

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 13

Asp Gly Lys Lys Gly Pro Asp Val Ile Asp Met

1 5 10

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 14

Tyr Arg Arg Ile Thr Pro Phe Gln Arg Arg

1 5 10

<210> 15

<211> 10

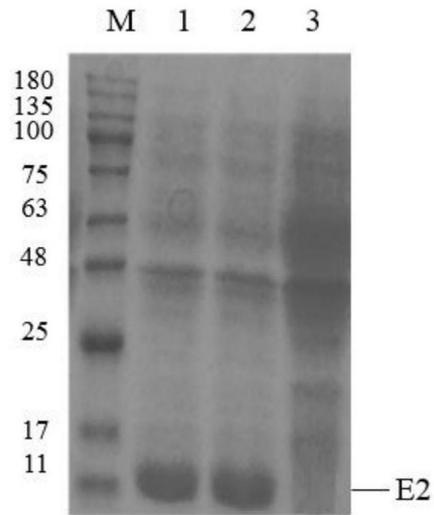


图1

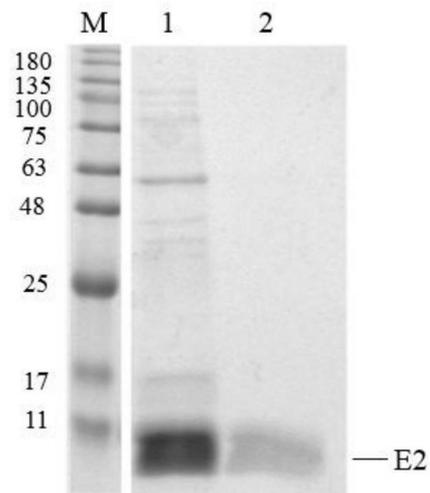


图2

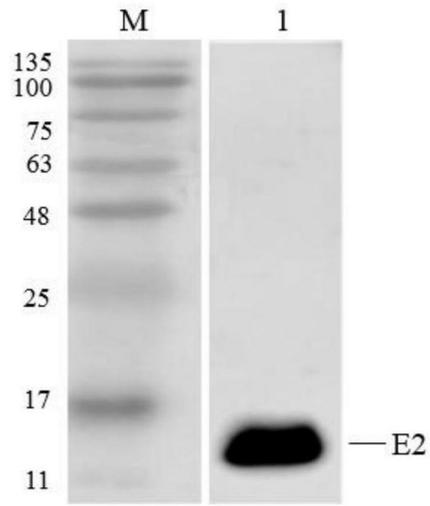


图3

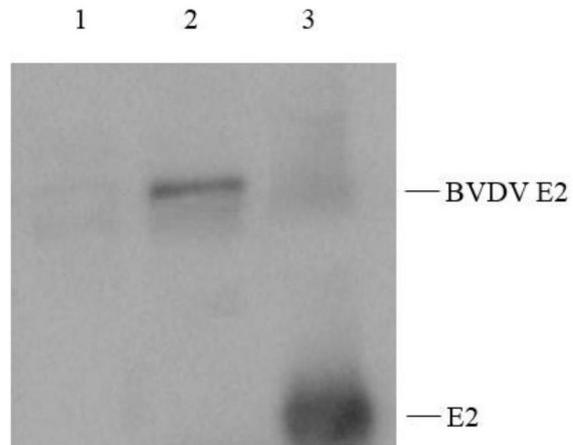


图4

专利名称(译)	牛病毒性腹泻病毒E2蛋白抗原多表位融合肽及其制备与应用		
公开(公告)号	CN108614121A	公开(公告)日	2018-10-02
申请号	CN201810421308.1	申请日	2018-05-04
[标]申请(专利权)人(译)	山东师范大学		
申请(专利权)人(译)	山东师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	山东师范大学		
[标]发明人	何洪彬 王洪梅 何成强 李书霞 侯佩莉 赵贵民		
发明人	何洪彬 王洪梅 何成强 李书霞 侯佩莉 赵贵民		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/569 G01N33/535 G01N33/543 C07K19/00 C12N15/62		
CPC分类号	G01N33/6854 C07K14/005 C07K2319/00 C12N2770/24322 G01N33/535 G01N33/543 G01N33/56983 G01N2333/14		
代理人(译)	王志坤		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了BVDV E2多表位融合肽及其制备方法，即基因合成优选出的BVDV-1和BVDV-2的E2蛋白的各2个抗原表位串联序列，并将序列克隆到pET-28a(+)载体，转化大肠杆菌DH-5α，将正确的重组载体转化大肠杆菌BL21，经IPTG诱导表达，Ni-NTA纯化，即得BVDV E2多表位融合肽。动物免疫E2抗原多表位融合肽后，能产生BVDV的中和抗体，可用于BVDV表位疫苗的研发；利用E2抗原多表位融合肽制备的ELISA检测试剂盒可用于牛群的BVDV抗体检测，具有特异性强、敏感性高、重复性好、易于操作的优点。

