

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810223406.0

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 5 月 27 日

[11] 公开号 CN 101441217A

[22] 申请日 2008.9.28

[21] 申请号 200810223406.0

[71] 申请人 中国兽医药品监察所

地址 100081 北京市海淀区中关村南大街 8 号

[72] 发明人 范学政 王 琴 徐 璐 赵启祖

[74] 专利代理机构 北京君智知识产权代理事务所
代理人 郑 明

权利要求书 1 页 说明书 12 页 附图 2 页

[54] 发明名称

猪瘟抗体 ELISA 诊断试剂盒

[57] 摘要

本发明涉及一种猪瘟病毒的 ELISA 诊断试剂盒。本发明是应用基因拼接技术在猪瘟病毒 E2 基因的两侧加上分泌信号肽序列和纯化标签，并嵌合至苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒表达载体中，构建重组苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 CGMCC No. 2671，获得包被 ELISA 板猪瘟病毒石门株 E2 基因可溶性表达抗原。使用本发明所涉及的试剂盒对猪瘟诊断及免疫评价快速、敏感、特异，可在 2h 内完成一次检测。

1. 一种猪瘟病毒的 ELISA 诊断试剂盒, 其特征在于该试剂盒包括: 经重组苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 CGMCC No. 2671 制备的抗原包被、封闭的 ELISA 板、HRP 标记 McAb、阳性血清对照、阴性血清对照、10×PBS、10×PBST、脱脂奶粉、TMB 显色液 A 和 B、0.75% 过氧化氢尿素溶液、终止液。
2. 如权利要求 1 所述的一种猪瘟病毒的 ELISA 诊断试剂盒, 其特征在于重组杆状病毒 CGMCC No. 的重组过程包括:
 - 1) 应用基因拼接技术扩增出蜂毒素基因信号肽序列、多肽接头序列及 6×HIS 序列的融合序列, 并将此序列克隆至载体 pFastbac1, 构建了一个命名为 pMEL-HIS 的载体;
 - 2) 应用基因拼接技术, 将猪瘟病毒石门株 E2 基因 SME2 进行 PCR 扩增并突变, 将突变后的猪瘟病毒 E2 基因序列用 EcoRI / SalI 双酶切, 克隆至载体 pMEL-HIS, 转化筛选、测序鉴定。将构建的载体命名为 pMEL-SE2M-HIS;
 - 3) 将载体 pMEL-SE2M-HIS 转化大肠杆菌 DH10Bac, 与菌体中基因组重组后, 经挑斑、PCR 鉴定, 转染 Sf9 细胞, 产生编号为 CGMCC No. 2671 重组的苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 VFBMEL-SE2M-HIS 株。
3. 如权利要求 1 所述的一种猪瘟病毒的 ELISA 诊断试剂盒, 其特征在于其包被抗原是将 CGMCC No. 2671 重组苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 Sf9 细胞的培养物, 经过浓缩、纯化及鉴定, 获得猪瘟病毒石门株 E2 基因可溶性表达抗原。

猪瘟疫抗体 ELISA 诊断试剂盒

【技术领域】

发明涉及一种猪瘟疫抗体 ELISA 诊断试剂盒，属于动物用生物制品制造领域。

【技术背景】

猪瘟又称经典猪瘟(Classical Swine Fever, CSF)，是由猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)引起猪的高度致死性、接触性传染病。是世界粮农组织和各国政府密切关注的主要传染病之一。根据 OIE 制定的《陆生动物卫生法典》2005 年版，CSF 被列为法定报告的疫病之一，在我国被列为“一类动物疫病”，给我国养猪业带来了巨大的经济损失。

世界各国都将猪瘟防疫列为国家动物卫生行政工作的重点，采取预防、防疫及检疫措施，以提高养猪产业的收益。在发达国家，以全场扑杀的方式，成功地扑灭猪瘟，成为非猪瘟区；我国则采取免疫、检疫和淘汰带毒猪的综合防疫措施，促进建立无规定动物疫病区，保证养猪业迅速、稳定发展，以点带面，从而达到全面消灭猪瘟的目标，因此猪瘟兔化弱毒疫苗依然是我国用于猪瘟预防控制的唯一手段。通过抗体水平的监测来制定合理、有效的免疫程序是提高群体免疫水平的保证，为猪瘟的综合防治提供了有力的技术支持。

多年来，人们一直致力于猪瘟抗体检测试剂盒的开发。猪瘟病毒 E2 囊膜糖蛋白是其主要中和性抗原蛋白，它在病毒多聚蛋白上的氨基酸序列为 690aa~1063aa，利用该蛋白进行诊断抗体诊断技术的开发研究一致是人们研究的热点。为了获得猪瘟抗体用诊断抗原，先后采用了原核表达 E2 抗原、真核表达 E2 抗原以及全病毒纯化等各种方法，但各有不同的问题。主要原因有以下两个方面：①原核表达抗原：表达抗原为包涵体、敏感性差、酶联反应不稳定；②全病毒纯化抗原：采用过两种方法，一种为硫酸铵沉淀法，另一种为超滤浓缩后超速离心法，但成本太高、技术难度大、产量极低，猪瘟病毒容易裂解等。在我国建立的方法也有 ELISA 方法、血凝抑制试验等，但均存在不稳定的特点。

【发明内容】

[本发明的目的]

是采用基因工程手段，将猪瘟病毒 E2 基因进行改造以获得蛋白表达量高、稳定性好和免疫原性特异的可溶性 E2 蛋白。采取的技术策略是应用基因拼接技术在猪瘟病毒 E2 基因的两侧加上分泌信号肽序列和纯化标签，并嵌合至杆状病毒表达载体中，构建重组杆状病毒，获得可溶性表达抗原，以用于抗体检测试剂盒的组装工作以及猪瘟单克隆抗体的筛选工作。

[本发明的技术方案]

应用基因拼接技术扩增出蜂素肽基因信号肽序列、多肽接头序列及 6×HIS 序列的融合序列,并将此序列克隆至载体 pFastbac1 (Invitrogen 公司产品),构建了一个命名为 pMEL-HIS 的载体;

应用基因拼接技术,将猪瘟病毒石门株 E2 基因(SME2)进行 PCR 扩增并突变,将突变后的猪瘟病毒 E2 基因序列用 EcoRI / SalI 双酶切,克隆至载体 pMEL-HIS,转化筛选、测序鉴定。将构建的载体命名为 pMEL-SE2M-HIS;

将载体 pMEL-SE2M-HIS 转化大肠杆菌 DH10Bac,与菌体中基因组重组后,经挑斑、PCR 鉴定,转染 Sf9 细胞,产生重组核型多角体病毒,此病毒命名为:苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus, AcMNPV) (参考黎路林编著.杆状病毒表达载体系统.武汉华中师范大学出版社出版, p1 页) VFBMEL-SE2M-HIS 株(2008 年 9 月 26 日本病毒株已送交中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏,编号为:CGMCC No. 2671)。将此病毒培养物进行纯化鉴定,获得猪瘟病毒石门株 E2 基因可溶性表达抗原,此抗原可用于组装猪瘟病毒抗体检测试剂盒。

[具体实施方案]

一、构建路线:

构建含有猪瘟病毒基因 E2 基因的重组 AcMNPV VFBMEL-SE2M-HIS 的 pMEL-SE2M-HIS 载体的技术路线(见附图 1)。

二、载体构建

1. 含信号肽及 6×HIS 纯化标签载体(pMEL-HIS)的构建

设计 4 条引物,将信号肽序列、接头序列及 6×HIS 序列通过应用基因拼接(Gene splicing by over lap extension) 技术进行 PCR 扩增,双酶切(BamHI/KpnI) pFastBac1 载体和 PCR 产物,连接、转化筛选、测序鉴定。重建的载体命名为 pMEL-HIS。

(1) 引物序列为:

MFP: GATCGGATCCATGAAATTCTTAGTCAACGTTGCCCTTGTTTTATGGTCGTAT

MRP: ATTCTGGGTCCGCATAGATGTAAGAAATGTATACGACCATAAAAACAAGGGCA

HFP: CTTACATCTATGCGGACCCAGAAATTCAGATTCCACGAAGTCGACGGCGCCATGGGAC

HRP: AATAGGTACCGTGATGGTGATGGTGATGTCCCATGGCGCCGTCGACTTCGT

将上述引物稀释至 100μm 备用。

(2) 具体操作过程如下:

- 1) 取 2×pfu Taq DNA polymerase mix(Tianz 公司产品)20μl, MFP、MRP 各 5μl, 无酶水补至 40μl, 72℃反应 30min。
- 2) 取 2×pfu Taq DNA polymerase mix(Tianz 公司产品)20μl, HFP、HRP 各 5μl, 无酶水补至 40μl, 72℃反应 30min。
- 3) 取 2×pfu Taq DNA polymerase mix(Tianz 公司产品)20μl, 第 1、第 2 步反应产物各 1μl, MFP、HRP 各 1μl, 无酶水补至 40μl, 94℃预变性 3min, 然后 94℃30sec, 55℃30sec, 72℃10sec, 25cycles, 最后 72℃反应 10min。
- 4) 将 PCR 反应产物电泳, 琼脂糖凝胶回收试剂盒回收纯化。
- 5) 将纯化回收的 PCR 产物及 pFastBac1 用 BamHI/KpnI 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳, 回收纯化。
- 6) 将双酶切及纯化回收的 PCR 产物及 pFastBac1 载体连接, 转化 Top10 感受态细胞(Tianz 公司产品), 涂板、挑斑筛选。
- 7) 将挑取的菌斑进行测序鉴定, 证明 pFastbac1 中克隆的序列为:

GGATCCATGAAATTCTTAGTCAACGTTGCCCTTGTTTTATGGTCGTATACATTTCTTACATCTATGCGGACCCAGAAATT
CAGATTCCACGAAGTCCGACGGCGCCATGGGACATCACCATCACCATCACGGTACC。克隆序列与设计序列一致。

2. 突变序列的 E2 基因

有文献报道, 密码子的使用频率会严重影响基因的表达量, 甚至不表达。E2 基因在昆虫细胞中的密码子使用频率低于 20% 高达 40 多处。设计了 42 条引物, 应用基因拼接技术, 将 SME2 基因进行 PCR 扩增并突变。突变后基因的密码子使用频率均高于 20%。突变后的序列克隆至 pGEM-T-easy (promega 公司产品) 中, 获得的克隆命名为: pBSE2M。

用于突变反应的模板为带有 SME2 基因的质粒载体, 构建过程参考文献(中国兽医学报 2005 年 V25(6):564~566) 进行。

将突变后的序列克隆至 pGEM-T-easy (promega 公司产品) 中进行测序验证, 突变序列与设计序列一致(参见附图 2. 石门株 E2 基因原始序列与突变序列比对)。

3. AcMNPV 重组质粒的构建:

以 pBSE2M 为模板, 用引物 E2MFP(带有 EcoRI 酶切位点)、E2MRP(带有 SalI 酶切位点)重新扩增, 将扩增产物用 EcoRI / SalI 双酶切, 和载体 pMEL-HIS 连接, 转化筛选、测序鉴定。克隆序列与设计的目标序列一致, 将构建的载体命名为 pMEL-SE2M-HIS。

(1) 引物序列为:

E2MFP: AGTAGAATTCAGACTGGCCTGCAAGGAAGATTACA

E2MRP: ACGTGTGACCCAGTACTGATACTCGCCCTTCA

(2) 操作过程为:

1) 2×pfu Taq DNA polymerase mix(Tianz 公司产品)20μl, E2MFP、E2MRP 各 1μl, 无酶水补至 40μl, 94℃预变性 3min, 94℃30sec, 55℃30sec, 72℃1min, 25cycles, 最后 72℃反应 10min。

2) 将 PCR 反应产物电泳, 琼脂糖凝胶回收试剂盒回收纯化。

3) 将纯化回收的 PCR 产物及 pMEL-HIS 用 EcoRI / SalI 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳, 回收纯化。

4) 将双酶切及纯化回收的 PCR 产物及 pMEL-HIS 线性化载体连接, 转化 Top10 感受态细胞(Tianz 公司产品), 涂板、挑斑筛选。

5) 将挑取的菌斑进行测序鉴定, 证明 pMEL-SE2M-HIS 中克隆的序列正确。

三、重组杆粒 DNA

将 pMEL-SE2M-HIS 转化 DH10Bac 构建出的杆粒 DNA 命名为: pFBMEL-SE2M- HIS。

1. 试剂配制:

SOC 培养基: 2%Bacto tryptone, 0.5%Bacto yeast extract, 10.0mM NaCl, 2.5 mM KCl, 将以上组分高压灭菌后, 加入滤菌的 Mg^{2+} 溶液和葡萄糖溶液, 调至浓度为: 20mM $MgSO_4$ 、 $MgCl_2$ (10mM each), 20mM 葡萄糖。

LA-Bac 抗性琼脂平板: 胰蛋白胨 10g, 酵母提取物 5g, NaCl 10g, 琼脂 12g, 1000ml 去离子水溶解, 高压灭菌, 冷却至 55℃左右, 加入卡那霉素至 50μg/ml, 庆大霉素至 7μg/ml, 四环素至 10μg/ml, IPTG(Isopropyl β-D-1-Thiogalactopyranoside)至 40μg/ml, Bluegal(5-Bromo-3-indolyl-β-D-galactopyranoside)至 100μg/ml。

抗性 LB 培养基: 胰蛋白胨 10g, 酵母提取物 5g, NaCl 10g, 1000ml 去离子水溶解, 高压灭菌, 冷却至 55℃左右, 加入卡那霉素至 50μg/ml, 庆大霉素至 7μg/ml, 四环素至 10μg/ml。

2. 具体操作如下:

将 DH10Bac 菌(Invitrogen 公司)37℃ 180r/min 培养过夜, 次日早取 0.5ml 3000r/min 室温离心 5min, 弃上清, 并将残液吸干。加入 50μl 克必隆常态转化液(天泽基因公司)和 5μl pMEL-SE2M-HIS 质粒混匀, -20℃冷冻 30min, 取出后冰上静置 10min, 加入 1ml SOC 培养基, 37℃ 180r/min 培养 4h。取 100μl 涂 LA-Bac 抗性琼脂平板。37℃培养 48h。取白斑接种 5ml 抗性 LB 培养基, 37℃培养过夜。用碱裂解法提取杆粒 DNA。PCR 鉴定, 测序结果与设计序列一致。

四、转染及重组 AcMNPV 的获得

将重组杆粒 pFBMEL-SE2M- HIS 用转染试剂 Cellfectin 转染 sf9 细胞, 扩大培养, 收集培养上清进行 PCR 鉴定。证明获得重组 AcMNPV VFBMEL-SE2M- HIS。

1. 试剂:

转染试剂: cellfectin(Invitrogen)

Grace' s Insect Cell Culture Medium(powder): GIBCOBRL 公司, Cat No:11300-043

Fetal Bovine Serum(FBS): Invitrogen 公司, Cat No:26140-079

水解乳蛋白(Lactalbumin Hydrolysate): GIBCOBRL 公司, Formula No:89-50861N

酵母提取物(Yeast Extract): OXOID 公司, L21

TNM-FH 培养基:取 Grace' s Insect Medium powder(1L 量), 水解乳蛋白 3.333g, 酵母提取物 3.333g, NaHCO₃ 0.35g, 加三蒸水 800ml, 调至 pH6.2, 用三蒸水定容至 1L。加青霉素至终浓度 100μg/ml, 链霉素 0.25μg/ml, 两性霉素 B 0.25μg/ml, 0.22μm 滤膜过滤除菌后加入 10%FBS, 分装, 4℃保存备用。

2. 操作过程:

(1) 将处于对数生长期的 sf9 细胞用弯头巴氏吸管吹散后转移至 60mm 组织培养皿中, 吸附约 0.5h。数量约 2×10^6 个细胞, 约可铺满 70%~80%的面积。

(2) 准备转染液:

1) 100μl Grace 培养基与 9μl cellfectin 混合。

2) 100μl Grace 培养基与 4μl 杆粒 DNA 混合。

3) 将 1)、2) 两部分液体轻轻混合, 室温静置 30min 后加入 800μl Grace 培养基, 即为转染液。

(3) 小心地吸走 60mm 组织培养板上的培养基, 并用 Grace 培养基轻轻漂洗两遍。并吸走所有培养基。

(4) 将 转染液轻轻地全部加入到 60mm 组织培养板中, 与 sf9 细胞室温作用 4h。期间要轻轻摇动数次。

(5) 4h 后将 1ml TNM-FH 加至 60mm 组织培养皿中, 用封口膜封口后于细胞培养箱中 27℃培养。转染后每天观察转染细胞单层的形态变化及生长特征, 细胞出现明显的细胞病变, 72h 后收集上清, 做为病毒基础种子液。记为 P1 Stock。

(6) 将重组病毒提取 DNA 进行 PCR 测序鉴定, 序列正确, 证明获得了 AcMNPV VFBMEL-SE2M-HIS。

五、表达产物分析及鉴定

将鉴定好的病毒传代扩大培养，第二代记为 P2 Stock，第三代记为 P3 Stock。前三代均做为种毒，取第 4 代培养上清包被进行 ELISA 鉴定。

1. 试剂配制：

包被液： Na_2CO_3 1.59g, NaHCO_3 2.93g, 溶于 1L 双蒸水。

PBS: NaCl 8.0g, KCl 0.2g, KH_2PO_4 0.2g, Na_2HPO_4 2.83g, 溶于 1L 去离子水中。

PBSM: PBS 中加入 5%脱脂奶粉，用于封闭液。

PBST: PBS 中加入 0.05%Tween-20，用于洗涤液。

PBSTM: PBST 中加入 5%脱脂奶粉，用于稀释血清样本。

TMB 显色液：

显色液 A: 200mgTMB 加入到 100mL 无水乙醇中，充分溶解。

显色液 B: Na_2HPO_4 14.6g、柠檬酸 9.33g，加注射用水至 900mL，调 pH 至 5.0~5.4，补加注射用水定容至 1000mL。

工作液: 10mL 显色液 B 加入 9mL 双蒸水，再加入 1mL 显色液 A，混匀后加入 50 μL 0.75% 过氧化氢尿素溶液。

终止液: 2M H_2SO_4 。

2. 操作过程：

(1) 取病毒培养上清，用包被液稀释 50 $\times$ ，每孔包被 100 μL ，4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。

(2) 弃包被液，每孔加入 PBSM 300 μL ，37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 40min。

(3) 吸干，用 PBST 洗 3 次，每次 300 μL 。

(4) 将猪瘟高免血清用 PBSTM 稀释 500 $\times$ ，每孔加入 100 μL ，37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 40min。

(5) 吸干，用 PBST 洗 3 次，每次 300 μL 。

(6) 将 HRP 标记二抗(Sigma 公司)用 PBSTM 稀释 2000 $\times$ ，每孔加入 100 μL ，37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30min。

(7) 吸干，用 PBST 洗 3 次，每次 300 μL 。

(8) 每孔加入 100 μL TMB 工作液，避光作用 10min，加入 50 μL 终止液，450nm 波长处测吸光值。

3. 结果如下：

	OD _{450nm}	
VFBMEL-SE2M-HIS	1.429	1.427
Sf9 细胞培养上清	0.039	0.044

4. 结果判定:

AcMNPV VFBMEL-SE2M-HIS 获得了分泌性表达, 且与对照有明显的差异。至此, E2 基因在杆状病毒表达系统得分泌性表达, 对猪瘟病原免疫抗原的制备获得了突破性的进展。该表达产物具有开发猪瘟病毒检测 ELISA 试剂盒的潜力。

六、诊断试剂盒的组装及使用

1. 试剂盒的组分

试剂盒组成包括: 经抗原包被、封闭的 ELISA 板、HRP 标记 McAb、阳性血清对照、阴性血清对照、10×PBS、10×PBST、脱脂奶粉、TMB 显色液 A 和 B、0.75%过氧化氢尿素溶液、终止液。

2. 组分的制备

(1) 抗原的制备

病毒培养: 待 sf9 细胞铺满单层, 弃培养基, 接入重组病毒 P3 种子液至培养液的 0.3%~0.5%, 23~27℃培养至 75%CPE 产生, 收获病毒液。

方法一: 收集病毒培养上清, 用硫酸铵沉淀法浓缩, 用分子筛层析, 收集猪瘟病毒 E2 蛋白组份, 测定蛋白浓度, 分装后-80℃冻存备用。

方法二: 收集病毒培养上清, 加入 0.1%的甲醛溶液灭活病毒, 分装后-80℃冻存备用。

方法三: Ni 离子柱 HisTrap HP (GE Healthcare 产品, 17-5247-01) 纯化。收集病毒培养上清, 加入 0.1%的甲醛溶液灭活病毒后, 用 Ni 离子柱纯化, 按产品说明书进行, 获得的产物为 E2 重组蛋白, 测定蛋白浓度, 分装后-80℃冻存备用。

(2) 试剂配制

1) 包被液: Na₂CO₃ 1.59g, NaHCO₃ 2.93g, 溶于 1L 双蒸水。

2) PBS: NaCl 8.0g, KCl 0.2g, KH₂PO₄ 0.2g, Na₂HPO₄ 2.83g, 溶于 1L 去离子水中。

3) PBSM: PBS 中加入 5%脱脂奶粉, 用于封闭液。

4) PBST: PBS 中加入 0.05%Tween-20, 用于洗涤液。

5) PBSTM: PBST 中加入 5%脱脂奶粉, 用于稀释血清样本。

6) TMB 显色液:

显色液 A: 200mgTMB 加入到 100mL 无水乙醇中, 充分溶解。

显色液 B: Na_2HPO_4 14.6g、柠檬酸 9.33g, 加注射用水至 900mL, 调 pH 至 5.0~5.4, 补加注射用水定容至 1000mL。

7) 工作液: 10mL 显色液 B 加入 9mL 双蒸水, 再加入 1mL 显色液 A, 混匀后加入 50 μL 0.75% 过氧化氢尿素溶液。

8) 终止液: 2M H_2SO_4 。

(3) ELISA 反应板的包被、封闭

1) 将抗原用包被液按一定浓度稀释后, 包被 ELISA 板, 每孔包被 100 μl , 4℃包被 12h。

2) 用 PBST 洗涤 3 次, 每次 300 μl / 孔, 在洗板机上进行。

3) 用 PBSM 进行封闭, 每孔 300 μl , 37℃封闭 40min, 用 PBST 洗涤 3 次, 每次 300 μl / 孔, 在洗板机上进行。

4) 将 HRP 标记标记 McAb、猪瘟阳性血清和猪瘟阴性血清 (均为中国兽医药品监察所制备供应) 及其他成分分装成小份, 一一放入试剂盒中, 封闭, 帖签, 4℃保存。

3. 使用

(1) 猪瘟阳性、阴性和待检血清用 PBSTM 稀释 25 $\times$, 每孔加入 100 μl , 37℃温育 40min。

(2) 吸干, 用 PBST 洗 3 次, 每次 300 μl 。

(3) 将 HRP 标记 McAb 用 PBSTM 稀释 2000 $\times$, 每孔加入 100 μl , 37℃温育 30min。

(4) 吸干, 用 PBST 洗 3 次, 每次 300 μl 。

(5) 每孔加入 100 μl TMB 工作液, 避光作用 10min, 加入 50 μl 终止液, 450nm 波长处读取吸光值。

4. 结果判定

只有阴性对照的平均 OD450nm 大于 0.5, 阳性对照的阻断率大于 50%, 检测结果才有效。

阻断率 = (阴性平均值 OD450nm - 待检 OD450nm) / 阴性 OD450nm $\times$ 100%

阻断率 > 40% 为阳性

阻断率 < 30% 为阴性

阻断率在 30%~40% 为可疑。

【附图说明】

本发明涉及的苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus, AcMNPV) VFBMEL-SE2M-HIS 株 (2008 年 9 月 26 日本病毒株已送交中国

微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏，编号为：CGMCC No. 2671)。

图1 构建含有猪瘟病毒 pMEL-SE2M-HIS 基因的重组核型多角体病毒技术路线

图2 石门株 E2 基因原始序列与突变序列比对

SE2: 石门株 E2 基因原始序列 MUTSE2: 石门株 E2 基因突变序列

【本发明的优点】

- 1 本发明中所用的诊断抗原为猪瘟 E2 蛋白，是评价猪瘟免疫水平的主要蛋白。E2 蛋白为猪瘟诱导产生体液免疫的主要优势抗原，抗体产生时间早，持续时间长。
 - 2 应用基因拼接 (Gene splicing by over lap extension) 的方法对基因进行改造，速度快，准确性高。获得密码子优化的猪瘟病毒 SM 毒株不带 TMR(跨膜区)的全长 E2 基因。
 - 3 将蜂素肽基因 MEL 与目的基因 6His 重组，并在目的基因与 6His 之间引入一段柔性氨基酸接头，能够在连接的同时最大可能的保证两抗原间的空间结构，以保持蛋白的天然活性。
 - 4 用猪瘟 E2 蛋白建立 ELISA 诊断方法，具有操作简便、快捷，所需试剂及实验条件简单的优点，并具有良好的特异性与敏感性，为猪瘟的诊断及免疫评价提供了良好的方法。
- 本发明的积极效果：使用本发明所涉及的试剂盒对猪瘟诊断及免疫评价快速、敏感、特异，可在 2h 内完成一次检测。

<110> 中国兽医药品监察所

<120> 猪瘟抗体 ELISA 诊断试剂盒

<160> 7

<210> 1

<211> 53

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 构建含信号肽及 6×HIS 纯化标签载体 (pMEL-HIS) 的所用引物 MFP:

<400> 1

GATCGGATCC ATGAAATTCT TAGTCAACGT TGCCCTTGTT TTTATGGTCG TAT 53

<210> 2

<211> 53

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 构建含信号肽及 6×HIS 纯化标签载体 (pMEL-HIS) 的所用引物 MRP:

<400> 2

ATTCTGGGTC CGCATAGATG TAAGAAATGT ATACGACCAT AAAAACAAGG GCA 53

<210> 3

<211> 56

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 构建含信号肽及 6×HIS 纯化标签载体 (pMEL-HIS) 的所用引物 HFP:

<400> 3

CTTACATCTAT GCGGACCCAG AATTCAGATT CCACGAAGTC GACGGCGCCA TGGGAC 56

<210> 4

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 构建含信号肽及 6×HIS 纯化标签载体 (pMEL-HIS) 的所用引物 HRP:

<400> 4

AATAGGTACC GTGATGGTGA TGGTGATGTC CCATGGCGCC GTCGACTTCG T 51

<210> 5

<211> 135

<212> DNA

<213> 人工序列

<200>

<223> pFastbac1 中克隆的序列

<400> 5

GGATCCATGA AATTCTTAGT CAACGTTGCC CTTGTTTTTA TGGTCGTATA CATTTCTTAC 60

ATCTATGCGG ACCCAGAATT CAGATTCCAC GAAGTCGACG GCGCCATGGG ACATCACCAT 120

CACCATCACG GTACC 135

<210> 6

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 构建核型多角体病毒重组质粒所用引物 E2MFP:

<400> 6

AGTAGAATTC AGACTGGCCT GCAAGGAAGA TTACA 35

<210> 7

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>构建核型多角体病毒重组质粒所用引物 E2MRP:

<400> 7

ACGTGTCGAC CCAGTACTGA TACTCGCCCT TCA 33

图 1

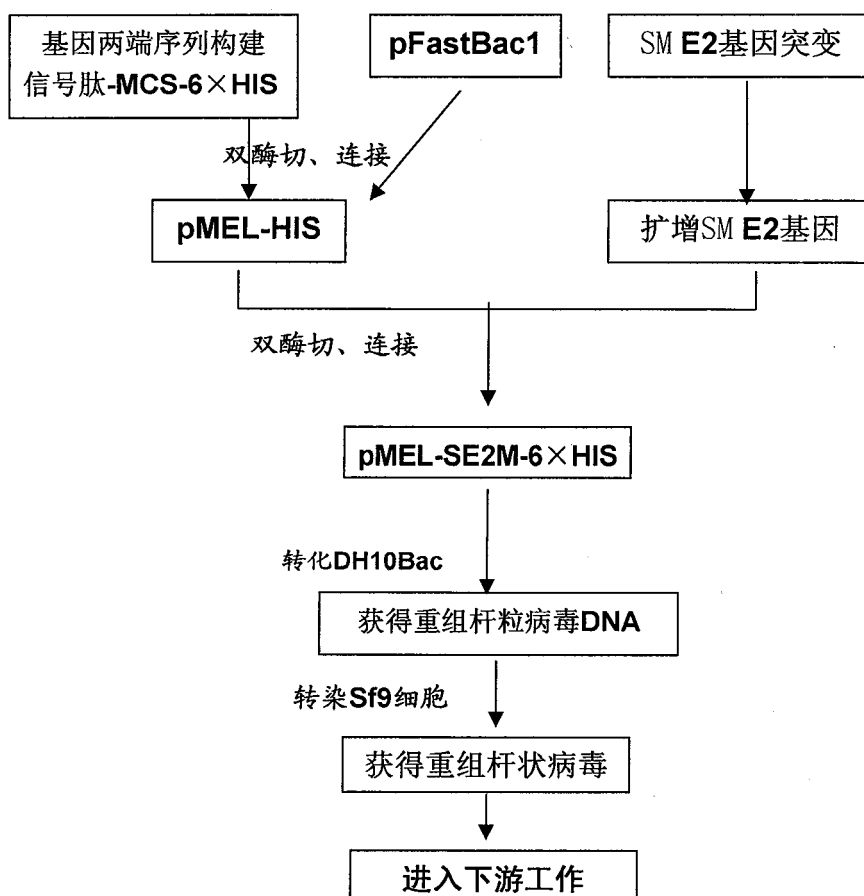


图 2

		10		20		30		40		50																																										
1	C	G	G	C	T	A	G	C	T	T	G	C	A	A	G	G	A	A	G	A	T	T	A	C	A	G	G	T	A	C	G	C	A	A	T	A	T	C	A	T	C	A	A	C	C	A	A	T	G	A	SE2	
1	A	.	A	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	MUTSE2	
		60		70		80		90		100																																										
51	G	A	T	A	G	G	G	C	T	A	C	T	C	G	G	G	C	C	G	G	A	G	G	T	C	T	C	A	C	T	A	C	C	A	C	T	G	G	A	A	A	G	A	A	T	A	C	A	SE2			
51	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	MUTSE2
		110		120		130		140		150																																										
101	G	C	C	A	C	G	A	T	T	T	G	C	A	A	C	T	G	A	A	T	G	A	C	G	G	G	A	C	C	G	T	T	A	A	G	G	C	C	A	T	T	T	G	C	G	T	G	G	C	A	SE2	
101	C	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	MUTSE2
		160		170		180		190		200																																										
151	G	G	T	T	C	T	T	T	T	A	A	A	G	T	C	A	C	A	G	C	A	C	T	T	A	A	T	G	T	G	T	G	T	C	A	G	T	A	G	G	A	G	G	T	A	T	T	T	G	G	C	SE2
151	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	MUTSE2
		210		220		230		240		250																																										
201	A	T	C	A	T	T	G	C	A	T	A	A	G	G	G	G	C	T	T	T	A	C	T	C	A	C	T	T	C	C	G	T	G	A	C	A	T	T	C	G	A	G	C	T	C	T	G	T	SE2			
201	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	MUTSE2
		260		270		280		290		300																																										
251	T	C	G	A	C	G	G	G	A	C	C	A	A	C	C	C	A	T	C	A	A	C	C	G	A	A	G	A	A	A	T	G	G	G	A	G	A	T	G	A	C	T	T	C	G	G	G	T	T	C	SE2	
251	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	MUTSE2
		310		320		330		340		350																																										
301	G	G	G	C	T	G	T	G	C	C	C	G	T	T	T	G	A	T	A	C	G	A	G	T	C	C	T	G	T	T	T	G	T	C	A	A	G	G	G	A	A	A	G	T	A	C	A	A	T	A	C	SE2
301	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	MUTSE2
		360		370		380		390		400																																										
351	A	A	C	T	T	G	T	T	G	A	A	C	G	G	T	A	G	T	G	C	T	T	T	T	C	T	A	C	T	T	T	G	T	C	T	G	C	C	C	A	A	T	A	G	G	G	T	G	G	A	SE2	
351	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	MUTSE2
		410		420		430		440		450																																										
401	C	G	G	G	T	G	T	T	A	T	A	G	A	G	T	G	C	A	C	A	G	C	A	G	T	G	A	G	C	C	C	A	A	C	A	A	C	T	C	T	G	A	G	A	A	C	A	G	A	SE2		
401	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	MUTSE2

16

专利名称(译)	猪瘟抗体ELISA诊断试剂盒		
公开(公告)号	CN101441217A	公开(公告)日	2009-05-27
申请号	CN200810223406.0	申请日	2008-09-28
[标]申请(专利权)人(译)	中国兽医药品监察所		
申请(专利权)人(译)	中国兽医药品监察所		
当前申请(专利权)人(译)	中国兽医药品监察所		
[标]发明人	范学政 王琴 徐璐 赵启祖		
发明人	范学政 王琴 徐璐 赵启祖		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/543 G01N33/531		
代理人(译)	郑明		
其他公开文献	CN101441217B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种猪瘟病毒的ELISA诊断试剂盒。本发明是应用基因拼接技术在猪瘟病毒E2基因的两侧加上分泌信号肽序列和纯化标签，并嵌合至苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒表达载体中，构建重组苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒CGMCC No.2671，获得包被ELISA板猪瘟病毒石门株E2基因可溶性表达抗原。使用本发明所涉及的试剂盒对猪瘟诊断及免疫评价快速、敏感、特异，可在2h内完成一次检测。