



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106754934 A

(43)申请公布日 2017.05.31

(21)申请号 201611063897.8

(22)申请日 2016.11.28

(71)申请人 北京市农林科学院

地址 100097 北京市海淀区曙光花园中路9号

(72)发明人 李永清 许健 张喜喜 黄秀芬

(74)专利代理机构 北京智为时代知识产权代理
事务所(普通合伙) 11498

代理人 王加岭 杨静

(51)Int.Cl.

C12N 15/115(2010.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

A61K 31/711(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页
序列表3页 附图1页

(54)发明名称

一种牛传染性鼻气管炎病毒的核酸适配体及其用途

(57)摘要

本发明提供了一种牛传染性鼻气管炎病毒的核酸适配体,该核酸适体结合力最高,特异性良好,能够一定程度抑制病毒对细胞的感染,并且在进行FAM标记后,能够进行间接免疫荧光试验(IFA)。该核酸适配体可以用于抑制病毒对细胞的感染,起到抗病毒作用,也可以作为抗IBRV的探针或靶点,用于制备抗牛传染性鼻气管炎病毒的药物或试剂。

1. 一种核酸适配体,其序列如SEQ ID No.4所示。
2. 权利要求1所述的核酸适配体在制备抗牛传染性鼻气管炎病毒药物中的应用。
3. 权利要求1所述的核酸适配体在制备结合牛传染性鼻气管炎病毒试剂中的应用。
4. 一种含有权利要求1所述核酸适配体的药物。
5. 一种含有权利要求1所述核酸适配体的试剂。

一种牛传染性鼻气管炎病毒的核酸适配体及其用途

技术领域

[0001] 本发明属分子免疫领域,具体涉及牛传染性鼻气管炎病毒的核酸适配体及其用途。

背景技术

[0002] 牛传染性鼻气管炎(IBR),又称“红鼻病”或“坏死性鼻炎”,是由牛传染性鼻气管炎病毒(IBRV)引起的牛的一种急性、热性、接触性传染病。临床症状分为5大类型,呼吸道型、生殖道型、结膜炎型、流产型、脑炎型。1980年,我国从新西兰进口牛中分离到该病毒,由于当时免疫防护措施不当,该病呈上升趋势,对牛群肥育率、产奶量及繁殖带来极大的影响,给我国养牛业造成巨大的经济损失。该病被世界动物卫生组织(OIE)列为B类动物传染病,也是我国进境动物必检疾病之一。牛传染性鼻气管炎主要高发于春、冬季节,由于该病当前暂无特效药物治疗,因此病畜的死亡率较高,尤其是在粗放式饲养管理地区或防疫基础设施落后的地区,其发病率及传播速度更高、更快,不仅威胁到饲养人员的生命安全,还造成严重的经济损失。发病率为20-100%,奶牛继发性流产有时高达50%,死亡率为1-12%。

[0003] IBRV属疱疹病毒科 α -疱疹病毒亚科,是球形双股DNA病毒。牛传染性支气管炎病毒又命名为1型牛疱疹病毒(BHV-1),为双股DNA病毒,全长约138kb。IBRV大约编码40种结构蛋白,有11种为结构蛋白。IBRV在多种牛源细胞,如肾、胚胎、皮肤、肾上腺等细胞培养生长良好,1-2天即可产生明显的细胞病变,并有嗜酸性核内包涵体。IBRV抵抗力较强,据Griffin等报道,IBRV在4℃以下保存30天感染滴度几乎无变化,56℃条件下经21分钟可将其灭活,-70℃保存,病毒可存活数年。IBRV基因组可编码大约70个蛋白质,其主要糖蛋白gB、gC、gD和gE负责病毒的吸附、渗透和病毒在细胞之间的扩散,同时也是刺激宿主免疫应答的主要抗原蛋白。

[0004] 现有检测IBR的方法主要以中和试验和ELISA为主。王冰用IBRV的gG基因片段表达的产物免疫小鼠得到单抗,并用辣根过氧化物酶标记的单抗和表达蛋白建立了竞争性ELISA实验室内检测方法,国内暂时没有检测IBR的商品化ELISA试剂盒,进口试剂盒价格又过于昂贵。也有很多人依赖普通PCR,杨娟根据IBRV gB基因序列设计引物,建立了IBRV的PCR检测方法,但是特异性不是很高,会有假阳性。还有使用胶体金的报道,王武军等建立了斑点免疫金渗滤法检测IBR抗体的试剂盒方法,还有石建平用胶体金标记IBRV单克隆抗体检测IBRV,但是胶体金存在带现象,质控指标不一等缺点。

[0005] 核酸适配体相比抗体具有很多优点,核酸适配体是一段DNA或者RNA序列,是利用体外筛选技术——指数富集的配体系统进化技术,从核酸分子文库中得到的寡核苷酸片段。

[0006] 核酸适配体靶物质十分广泛,大至完整的细胞、病毒颗粒、蛋白质,小至氨基酸、金属离子等均有适配体筛选成功的报道。核酸适配体在很多方面优于抗体,抗体结合力单位达nM,而适配体能达到pM;适配体分子量大小要比抗体小;抗体须在稳定的理化环境表达其作用,易变性不容易恢复,而核酸适配体可适应任何环境,非常稳定,具有可复性;关于制备

过程,抗体制备需要饲养动物、进行接毒、抗体提纯等,需要花费一个月以上,而核酸适配体进行化学合成仅仅需要3-4天,合成快速;抗体是有限标记或修饰,而核酸适配体改造方便。由于现有检测IBRV的方法都存在不同的缺陷,尤其是要那些基于抗体建立的检测方法,由于抗体的不稳定性和制备技术的落后,导致这些方法很难适合临床应用,而核酸适配体在很多方面优于抗体,因此稳定的核酸适配体可能在未来的诊断中成为抗体的替代品。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种可特异性结合牛传染性鼻气管炎病毒的核酸适配体。

[0008] 本发明的目的还在于提供所述牛传染性鼻气管炎病毒核酸适配体的用途。

[0009] 本发明利用SELEX技术,以IBRV作为结合抗原从核酸文库中筛选挑选出核酸序列重复率最高的9条核酸适配体,然后经过结合力粗测定、特异性实验、活性实验、应用实验。结果鉴定出其中一条(编号为4号)核酸适体结合力最高,特异性良好,能够一定程度抑制病毒对细胞的感染,并且在进行FAM标记后,能够进行间接免疫荧光试验(IFA)。基于此,本发明的技术方案如下:

[0010] 一种核酸适配体,其序列如SEQ ID No.4所示。此外,本领域技术人员可以基于此序列进行适当的修饰,以改善其性能。

[0011] 进一步,本发明提供所述的核酸适配体在制备抗牛传染性鼻气管炎病毒药物中的应用。

[0012] 进一步,本发明提供所述的核酸适配体在制备结合牛传染性鼻气管炎病毒试剂中的应用。

[0013] 进一步,本发明提供含有所述核酸适配体的药物。将所述核酸适配体与病毒结合能够抑制病毒对细胞的感染。

[0014] 进一步,本发明提供含有所述核酸适配体的试剂。例如,将该核酸适配体连接修饰标记,可以用来对病毒进行鉴定或检测。

[0015] 总之本发明成功筛选到一条能够结合牛传染性鼻气管炎病毒的核酸适配体。该核酸适配体具有类似抗体的活性和应用价值,可以用于抑制病毒对细胞的感染,起到抗病毒作用。另外,该核酸适配体可作为抗IBRV的探针或靶点,用于制备抗牛传染性鼻气管炎病毒的药物或试剂。

附图说明

[0016] 图1显示的是核酸适配体用于间接免疫荧光试验结果;

[0017] 图2显示的是核酸适配体用于病毒抑制试验结果。

具体实施方式

[0018] 以下实施例用于进一步说明本发明,但不应理解为对本发明的限制。在不背离本发明精神和实质的情况下,对本发明所作出的修改或润饰,均属于本发明的范围。

[0019] 实施例中所涉及到的方法如无特别说明,为本领域常规方法,例如基因工程中的常规操作。实施例中所涉及到的材料如果特别说明,亦未本领域的常规实验材料。

[0020] 实验材料

[0021] 1. 病毒和细胞

[0022] MDBK细胞、IBRV Bartha Nu/67标准株北京市农林科学院畜牧兽医研究所高技术实验室保存。

[0023] 2. 血清和抗体

[0024] IBRV标准阳性、阴性血清来自IDEXX IBRgE抗体检测试剂盒中的血清；IBRV阳性、阴性牛血清由实验室保存；IBRV阳性、阴性小鼠血清由实验室提供；特级马血清购自Solarbion公司，由北京市农林科学院畜牧兽医研究所高技术实验室保存。

[0025] 3. 主要试剂与器材：

[0026] Super Mix购自康为试剂、96孔板购自costar、TBE购自包被液、洗脱液、封闭液、PBST、Low Molecular weight DNA Ladder购自、小片段胶回收试剂盒、琼脂糖凝胶、普通PCR仪购自德国耶拿、凝胶成像仪。

[0027] 4. 初始文库序列：5'-GCTGCAATACTCATGGACAG-(N)40-GTCTGGAGTACG-ACCCTGAA。预处理：使用时溶于200 μ L PBS，煮沸处理10min，冰浴20min，备用。

[0028] 5. PCR引物序列：上游引物FP：GCTGCAATACTCATGGACAG；

[0029] 下游引物BP：TTCAGGGTCGTACTCCAGAC

[0030] 实施例1

[0031] 一、试验方法

[0032] 1. 按1%病毒量接种IBRV至单层生长的MDBK细胞，待CPE达80%~90%时收毒。-40 $^{\circ}$ C反复冻融3次，5000r/min (4500 \times g) 离心30min，去除细胞碎片，将上清置经处理过的透析袋中，然后以PEG6000对病毒液进行浓缩。再将浓缩的病毒液35000r/min (54200 \times g) 超速离心2h，最后以0.01M的PBS溶解沉淀原细胞培养物的1/100。在测定稀释物蛋白浓度后，分装并冻存于-20 $^{\circ}$ C待用。

[0033] 2. 采用蔗糖密度梯度 (20%、40%、60%) 超速离心的方法将上述获得的浓缩病毒液进行纯化，经30000rpm，90min超速离心后获得分离的病毒液，加等体积的STE溶液于病毒糖混合液中脱糖，PBS洗涤沉淀物获得纯化的IBRV。纯化病毒后提取DNA，进行PCR检测，确实是IBRV病毒。分光光度计测病毒OD值。

[0034] 3. 微孔板SELEX技术筛选适配体

[0035] (1) 包被：用0.05M碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 将病毒稀释至1mg/mL，包被2个孔于ELISA微孔板，每孔100 μ L，4 $^{\circ}$ C过夜包被。

[0036] (2) 洗板：甩去包被液，使用PBST (0.05% Tween 20PBS) 300 μ L洗孔三次，拍干。

[0037] (3) 封闭：每孔加入200 μ L含5% BSA的PBS，37 $^{\circ}$ C孵育2h。

[0038] (4) 洗板：甩去封闭液，使用PBST (0.05% Tween 20PBS) 300 μ L洗孔三次，拍干。(5) 加适配体：将初始适配体库加入封闭好的孔中，每孔100 μ L，37 $^{\circ}$ C孵育30min。

[0039] (6) 洗板：甩去包被液，使用PBST (0.05% Tween 20PBS) 300 μ L洗孔四次，拍干

[0040] (7) 洗脱：每孔加入100 μ L洗脱液，80 $^{\circ}$ C水浴10min。

[0041] (8) 提取：吸出洗脱液，用25:24:1酚:氯仿:异戊醇提取洗脱液中的适配体，取上清，加入1/10体积的溶液A，1 μ L的溶液B和2倍体积的冷无水乙醇，混匀后4 $^{\circ}$ C冰箱放置10-30分钟，12000rpm离心10分钟，弃上清，晾干沉淀，将沉淀 (DNA) 重新溶解于30 μ L ddH₂O中，-20 $^{\circ}$ C保存。提取的适配体即为每轮与牛传染性鼻气管炎病毒结合的适配体。

[0042] (9) 对称PCR:提取的适配体先进行一次对称PCR反应,3%琼脂糖凝胶、140V电泳分析,切取目的条带(80bp左右),胶回收。

[0043] (10) 非对称PCR:将胶回收产物溶解后,再进行一次非对称PCR,进行3%琼脂糖凝胶、140V电泳分析,切取目的条带(50bp左右)进行胶回收,回收产物作为次级适配体库用于下一轮的筛选。

[0044] 筛选参数:随着筛选的进行,改变包被病毒量,提高筛选效率,从而增加筛选到病毒高结合力适配体的概率,筛选参数(表1)。

[0045] 表1 核酸适配体的筛选参数

轮数	病毒量(μg/孔)	轮数	病毒量(μg/孔)
1	100	5	50
[0046] 2	100	6	25
3	100	7	10
4	100	8	5

[0047] 1) 对称PCR反应液配制(25μL体系):

2×Easy Taq PCR SuperMix 12.5×20=250μL

[0048] 上游引物(10μM) 1×20=20μL

下游引物(10μM) 1×20=20μL

[0049] 模板 10.5×19=199.5μL

阴性对照 ddH₂O 10.5μL

[0050] 反应条件:95℃预变性5min;然后95℃20s,60℃20s,72℃30s,共19个循环;72℃延伸5min,最后95℃变性5min。

[0051] 2) 非对称PCR反应液配制(25μL体系):

2×Easy Taq PCR SuperMix 12.5×16=200μL

上游引物(10μM) 1×16=16μL

[0052] 下游引物(1μM) 0.2×16=3.2μL

模板 11.3×15=169.5μL

阴性对照 ddH₂O 11.3μL

[0053] 反应条件:95℃预变性5min;然后95℃20s,57℃20s,72℃30s,共29个循环,再72℃终延伸5min,最后95℃变性5min。

[0054] 3) 胶回收:按百泰克公司短片段DNA胶回收试剂盒步骤回收所要片段。

[0055] 对称PCR回收80bp左右片段,非对称PCR回收50bp左右片段。

[0056] (1)用琼脂糖凝胶电泳分离DNA,紫外灯下切取目的片段,放入管中的DNA分离棉上,下接一只1.5mL离心管,12000rpm离心10分钟,使液体完全从凝胶中挤出

[0057] (2)于收集管中加入等体积酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)混合液,12000rpm离心5分

钟。取上清再加等体积酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)混合液,12000rpm离心5分钟。

[0058] (3)取上清,加入1/10体积的溶液A,1 μ L的溶液B和2倍体积的冷无水乙醇,混匀后4 $^{\circ}$ C冰箱放置10-30分钟,12000rpm离心10分钟,弃上清,晾干沉淀,将沉淀(DNA)重新溶解于30 μ L ddH₂O中,-20 $^{\circ}$ C保存。

[0059] 4.核酸适配体的基因克隆与序列测定。

[0060] 将筛选后获得的双链DNA产物连接到PGEM-T载体(Promega公司)上,构建重组质粒,然后转化大肠杆菌TOP10感受态细胞,选取阳性菌落送去上海生工公司进行测序。

[0061] 5.间接ELAA测定适配体的结合力

[0062] (1)包被:用0.05M碳酸盐缓冲液(pH9.6)将病毒稀释至0.2mg/mL,每孔100 μ L,4 $^{\circ}$ C过夜24包被。

[0063] (2)洗板:甩去包被液,使用PBST(0.05%Tween 20PBS)300 μ L洗孔三次,拍干。

[0064] (3)封闭:每孔加入200 μ L含5%BSA的PBS,37 $^{\circ}$ C孵育2h。

[0065] (4)洗板:甩去封闭液,使用PBST(0.05%Tween 20PBS)300 μ L洗孔三次,拍干。

[0066] (5)加适配体:将9条适配体用PBS稀释至100nM,经95 $^{\circ}$ C冰浴10min、20min处理,再分别稀释浓度梯度,每孔100uI,37 $^{\circ}$ C孵育45min。

[0067] (6)洗板:甩去孔中液体,使用PBST)300 μ L洗孔三次,拍干

[0068] (7)加二抗:用PBS将HRP-SA稀释至1:2000,每孔加入100 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育45min。

[0069] (8)洗板:甩去孔中液体,使用PBST300 μ L洗孔五次,拍干。

[0070] (9)显色:每孔加入100 μ L新鲜配制的TMB显色液,37 $^{\circ}$ C显色10min。

[0071] (10)终止:每孔加入50 μ L 2M H₂SO₄终止显色。

[0072] (11)读数:使用酶标仪测定各孔450nm波长的吸光光度值(OD值)。

[0073] 6.适配体的特异性试验

[0074] 分别将牛传染性鼻气管炎病毒(IBRV),病毒性腹泻粘膜病病毒(BVDV),马立克氏病病毒(MDV RB1B)以及猪的伪狂犬病病毒(SPR)以0.2mg/mL的浓度包被酶联板,然后将生物素标记的核酸适配体按0.625 μ M的浓度进行孵育,再以辣根过氧化物酶标记的联酶亲和素进行结合反应,最后以3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)为底物进行显色,酶标仪读取OD值。

[0075] 7.核酸适配体用于间接免疫荧光试验(IFA)

[0076] 将100TCID₅₀的IBRV病毒按每孔1mL加入到6孔细胞培养板中,孵育90min后换成每孔2mL维持液继续培养约48小时,出现明显的细胞病变时,以4%多聚甲醛固定感染了IBRV的MDBK细胞。经0.5%BSA封闭30min后,将FAM标记5'端的核酸适配体以2 μ M的浓度加到细胞表面,37 $^{\circ}$ C孵育1h,充分洗涤后以荧光显微镜观察。

[0077] 8.抑制病毒试验

[0078] 将获得的核酸适配体稀释成如下8个浓度:5 μ M、2.5 μ M、1.25 μ M、0.625 μ M、0.3125 μ M、0.15625 μ M、0.078125 μ M、0.0390625 μ M,然后每个浓度分别与100TCID₅₀的IBRV病毒37 $^{\circ}$ C混合作用1h,再将上述混合物接种到事先准备好的MDBK细胞上,每个浓度设8个重复孔,同时设立IBRV单独感染的阳性对照和只加维持液的阴性对照,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养至阳性对照孔全部出现细胞病变,统计各浓度的出现细胞病变孔数,以病变孔小于50%的最小浓度作为中和效价。

[0079] 二. 试验结果

[0080] 1. 利用微孔板SELEX技术, 从合成的核酸库里经8轮反复筛选获得能够结合IBRV的核酸片段混合体, 然后将此混合体进行基因克隆, 挑取100个克隆子序列测定后, 进行基因序列比较后, 获得重复性高的9条核酸序列, 即为候选的核酸适配体(表2)。

[0081] 表2 候选核酸适配体的基因序列

[0082]

编号	序列
1	GCTGCAATACTCATGGACAGGGGAGGTGGGCGGGTGTACGTGCCACGCTTTCGTGTATGGTCTGGAGTACGACCCTGAA
2	GCTGCAATACTCATGGACAGGGGAGGTGGGTGGGCGTCCATACGTGACGGCTACTGTGGGTCTGGAGTACGACCCTGAA
3	GCTGCAATACTCATGGACAGGTGGTCCGGGTGGGTGGGTTTGTATTGCCTGTGACGCTCTGGAGTACGACCCTGAA
4	GCTGCAATACTCATGGACAGGGCGGGGGTGGGCGGGTTGATTCCCATGGGTGCGTCTGGAGTACGACCCTGAA
5	GCTGCAATACTCATGGACAGGGGAGGCGGGTGGGGCTGCTGCACAGTGTGTACGGTTGGTCTGGAGTACGACCCTGAA
6	GCTGCAATACTCATGGACAGGGGAGGCGGGTGGGCCATATTCGCAGATCTTTGTCTGTGCGTCTGGAGTACGACCCTGAA
7	GCTGCAATACTCATGGACAGGGGAGGCGGGTGGTTCGTCGGGTGCGTCGTTCTGTGTGGTCTGGAGTACGACCCTGAA
8	GCTGCAATACTCATGGACAGGGGAGGCGGGTGGCTTGCGGTCAGCGTTATGTGCGGGTCTGGAGTACGACCCTGAA
9	GCTGCAATACTCATGGACAGGGCACATTGCAGGGGAGGCGGGTGGGATGCATCGGCCCGTCTGGAGTACGACCCTGAA

[0083] 2. 将候选的9条核酸适配体进行间接ELAA试验, 利用其与IBRV的结合活性。结果表明4号核酸适配体与IBRV具有最高的结合活性(表3)

[0084] 表3 粗测9条核酸适配体结合力

[0085]

适配体编号 \ 浓度 μM	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.15625
1	0.64	0.37	0.24	0.199	0.191	0.173	0.164	0.172
2	0.442	0.326	0.229	0.186	0.179	0.213	0.179	0.186
3	1.474	1.017	0.838	0.590	0.325	0.245	0.193	0.175
4	1.845	1.509	1.387	1.073	0.627	0.339	0.241	0.239
5	0.686	0.487	0.258	0.210	0.178	0.184	0.175	0.252
6	0.982	0.655	0.378	0.267	0.179	0.198	0.164	0.176
7	1.142	0.727	0.500	0.324	0.279	0.205	0.184	0.189
8	0.899	0.624	0.394	0.281	0.222	0.191	0.175	0.187
9	0.958	0.898	0.530	0.418	0.306	0.262	0.266	0.229
阴性对照	0.193	0.201	0.176					

[0086] 3. 核酸适配体的特异性:

[0087] 通过不同病毒作为包被抗原的ELAA试验检测所获得的9条核酸适配体的特异性试验结果表明,9条核酸适配体均与牛传染性鼻气管炎病毒(IBRV)发生了不同程度的结合,并以4号适配体的结合活性最高,而与牛病毒性腹泻粘膜病病毒(BVDV),马立克氏病病毒(MDV RB1B)以及猪的伪狂犬病病毒(SPR)均具有非常低的结合力(表4)。

[0088] 表4 核酸适配体的特异性试验结果

[0089]

病毒种类 适配体编号	IBRV	BVDV	FMDV	RBIB	SPW-6
1	0.188	0.098	0.134	0.199	0.154
2	0.189	0.078	0.114	0.195	0.149
3	0.373	0.086	0.113	0.303	0.156
4	0.724	0.082	0.115	0.193	0.211
5	0.190	0.078	0.120	0.230	0.147
6	0.205	0.085	0.103	0.217	0.134
7	0.219	0.078	0.106	0.198	0.179
8	0.194	0.080	0.104	0.188	0.134

[0090]

9	0.210	0.088	0.103	0.215	0.160
阴性对照	0.163	0.092	0.103	0.180	0.144

[0091] 4. 核酸适配体用于间接免疫荧光试验(IFA)

[0092] 以感染了IBRV的MDBK细胞及正常的MDBK细胞作为被检物,将FAM标记5'端的核酸适配体对上述细胞进行了间接免疫荧光试验,荧光显微镜观察结果表明,4号核酸适配体与IBRV感染的细胞发生特异性反应(出现黄绿色荧光),而与未经IBRV感染细胞作用后,不能检测到荧光,即没有发生特异性结合(图1)。

[0093] 5. 病毒抑制性试验结果表明,在IBRV感染组所有的细胞孔出现明显的细胞病变时,浓度为0.3125 μ M的核酸适配体的细胞出现病变孔数小于50%,且大于0.3125 μ M浓度的孔都没有细胞病变,说明所获得的核酸适配体最小抑制病毒的浓度为0.3125 μ M(图2)。

[0094] 以上试验利用SELEX技术,以IBRV作为结合抗原从核酸文库中筛选挑选出核酸序列重复率最高的9条核酸适配体,然后经过结合力粗测定、特异性实验、活性实验、应用实验。结果鉴定出其中一条(编号为4号)核酸适配体结合力最高,特异性良好,能够一定程度抑制病毒对细胞的感染,并且在进行FAM标记后,能够进行间接免疫荧光试验(IFA)。该核酸适配体具有类似抗体的活性和应用价值,可以用于抑制病毒对细胞的感染,起到抗病毒作用。另外,该核酸适配体可作为抗IBRV的探针或靶点,用于制备抗牛传染性鼻气管炎病毒的药物或试剂。

序列表

- <110> 北京市农林科学院
 <120> 一种牛传染性鼻气管炎病毒的核酸适配体及其用途
 <130> P1610226
 <160> 12
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 80
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 1
 gctgcaatac tcatggacag gggaggtggg cgggtgttac gtgccacgct ttcgtgtatg 60
 gtctggagta cgaccctgaa 80
 <210> 2
 <211> 80
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 2
 gctgcaatac tcatggacag gggaggtggg tgggcgtgcc atacgtgacg gctactgtgg 60
 gtctggagta cgaccctgaa 80
 <210> 3
 <211> 79
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 3
 gctgcaatac tcatggacag gtggtcgggg tgggtggtgg gtttgtattg cctgtcgacg 60
 tctggagtac gaccctgaa 79
 <210> 4
 <211> 80
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 4
 gctgcaatac tcatggacag ggcggcgggg tgggtgggc ggtttgattc ccatgggtgc 60
 gtctggagta cgaccctgaa 80
 <210> 5
 <211> 79
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<400> 5	
gctgcaatac tcatggacag gggaggcggg tggggctgct gcacagtgtg ttacggttgg	60
tctggagtac gaccctgaa	79
<210> 6	
<211> 80	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 6	
gctgcaatac tcatggacag gggaggcggg tgggceatat tcgcagatct ttgtctgtgc	60
gtctggagta cgaccctgaa	80
<210> 7	
<211> 80	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 7	
gctgcaatac tcatggacag gggaggcggg tgggtcgtcg gggtgcgtcg ttctgtgtgg	60
gtctggagta cgaccctgaa	80
<210> 8	
<211> 80	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 8	
gctgcaatac tcatggacag gggaggcggg cgggtggcett gcggtcagcg ttatgtgcgg	60
gtctggagta cgaccctgaa	80
<210> 9	
<211> 79	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 9	
gctgcaatac tcatggacag ggcacattgc aggggagcgg ggtggggatg catcggcccc	60
tctggagtac gaccctgaa	79
<210> 10	
<211> 80	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (21)..(60)	
<223> n is a, c, g, or t	

<400> 10	
gctgcaatac tcatggacag nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn	60
gtctggagta cgaccctgaa	80
<210> 11	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 11	
gctgcaatac tcatggacag	20
<210> 12	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 12	
ttcagggtcg tactccagac	20

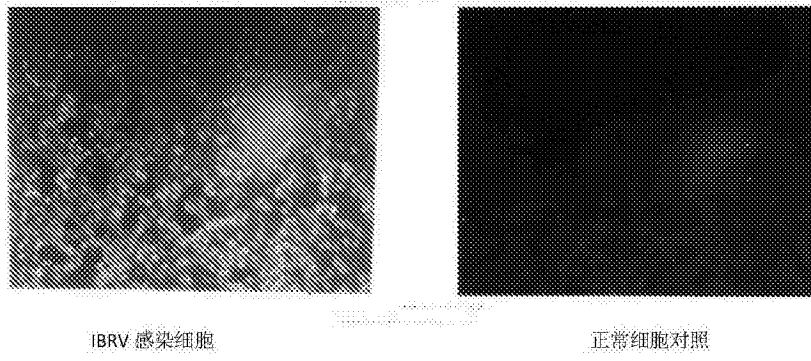


图1

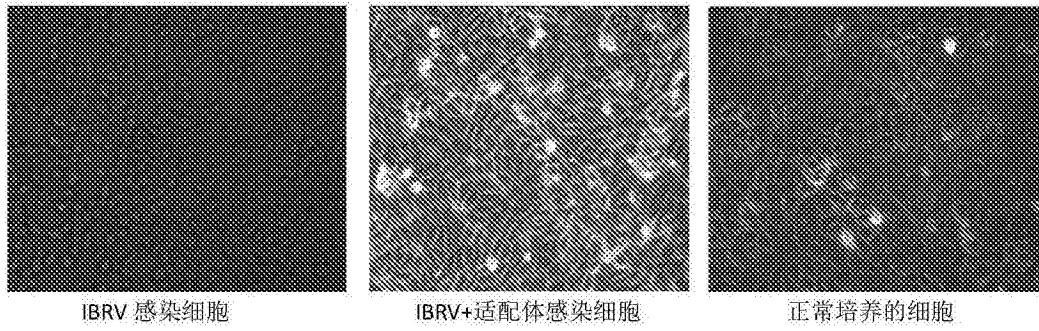


图2

专利名称(译)	一种牛传染性鼻气管炎病毒的核酸适配体及其用途		
公开(公告)号	CN106754934A	公开(公告)日	2017-05-31
申请号	CN201611063897.8	申请日	2016-11-28
[标]申请(专利权)人(译)	北京市农林科学院		
申请(专利权)人(译)	北京市农林科学院		
当前申请(专利权)人(译)	北京市农林科学院		
[标]发明人	李永清 许健 张喜喜 黄秀芬		
发明人	李永清 许健 张喜喜 黄秀芬		
IPC分类号	C12N15/115 G01N33/569 G01N33/53 A61K48/00 A61K31/711		
CPC分类号	A61K31/711 C12N15/115 C12N2310/16 G01N33/5308 G01N33/56983		
代理人(译)	杨静		
其他公开文献	CN106754934B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种牛传染性鼻气管炎病毒的核酸适配体，该核酸适体结合力最高，特异性良好，能够一定程度抑制病毒对细胞的感染，并且在进行FAM标记后，能够进行间接免疫荧光试验(IFA)。该核酸适配体可以用于抑制病毒对细胞的感染，起到抗病毒作用，也可以作为抗IBRV的探针或靶点，用于制备抗牛传染性鼻气管炎病毒的药物或试剂。

轮数	病毒量 (µg/孔)	轮数	病毒量 (µg/孔)
1	100	5	50
2	100	6	25
3	100	7	10
4	100	8	5