



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 110028590 A

(43)申请公布日 2019.07.19

(21)申请号 201910323871.X

G01N 33/558(2006.01)

(22)申请日 2019.04.22

G01N 33/68(2006.01)

(71)申请人 福建省农业科学院畜牧兽医研究所

地址 350013 福建省福州市晋安区新店埔
档

(72)发明人 吴学敏 陈如敬 陈秋勇 王隆柏
车勇良 周伦江 王晨燕 刘玉涛
严山

(74)专利代理机构 福州元创专利商标代理有限公司 35100

代理人 蔡学俊

(51)Int.Cl.

C07K 19/00(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页
序列表3页 附图6页

(54)发明名称

一种pCzn1-gC融合蛋白及其应用

(57)摘要

本发明提供一种pCzn1-gC融合蛋白及其应用,所述蛋白氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,本发明所述pCzn1-gC融合蛋白具有与PRV-gC蛋白相同的生物学活性,包被于ELISA板可检测猪血液中PRV-gC蛋白抗体,PRV-gC蛋白抗体可阻止PRV病毒与靶细胞的黏附,因此,本发明成果能检测猪血液中PRV-gC蛋白抗体,进一步评定猪伪狂犬病疫苗免疫效果及猪抗PRV感染的能力。并且,pCzn1-gC融合蛋白容易表达,大大降低了表达生产成本,可用于商品化生产及推广使用。

1. 一种pCzn1 -gC融合蛋白,其特征在于:所述蛋白氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。
2. 一种编码如权利要求1所述蛋白的基因,其序列如SEQ ID NO.2所示。
3. 如权利要求1所述的pCzn1 -gC融合蛋白在制备检测猪血液中PRV-gC蛋白抗体试剂中的应用。

一种pCzn1 -gC融合蛋白及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种pCzn1 -gC融合蛋白及其应用。

背景技术

[0002] 伪狂犬病(Pseudorabies,PR)是由伪狂犬病病毒(Pseudorabies virus,PRV)引起的多种家畜和野生动物以发热、奇痒(猪除外)、繁殖障碍、脑脊髓炎为主要症状的一种高度接触性传染病。世界卫生组织将其列为B类动物传染病,我国也将其列为二类动物传染病。猪是PRV的天然宿主,该病对猪危害性大,具有高度隐性感染的特点,可引起持续性感染,特别是耐过的母猪常呈潜伏感染,长期带毒。尽管当前临床上已广泛使用了PRV疫苗,但2011年以来,许多规模化猪场爆发了PRV流行,主要表现为猪群gE抗体阳性率显著升高,发病母猪群流产、仔猪神经症状和死亡率高等典型伪狂犬病症状。随后,该病在我国多地规模化猪场相继爆发和流行。

[0003] PRV为线形双股DNA病毒,基因组大小约为143kb,包括70多个开放性阅读框,可以编码70~100种病毒蛋白,基因组G+C含量在疱疹病毒中最高达73%。病毒粒子最外层是病毒囊膜,囊膜上镶嵌有病毒编码的囊膜蛋白,大多是糖蛋白,在PRV感染细胞时介导着病毒与细胞之间的相互作用,并对病毒在细胞之间的扩散发挥着重要的作用,也是动物机体的免疫系统识别的主要靶抗原。其中有11种糖蛋白,分别命名为gB(gI1)、gC(gIII)、gD(gp50)、gE(gI)、gG(gx)、gH、gI(gp63)、gK、gL、gM和gN。

[0004] gC糖蛋白是介导PRV病毒与靶细胞的黏附所必须,其表面的3个肝素结合区域(HBDs)是gC糖蛋白N端的抗体结合区域(44~290氨基酸)的一部分,用gC特异性抗体结合该区域可干扰病毒的黏附作用。对国内新分离毒株研究发现,gC糖蛋白氨基酸序列在ABD区域均存在8个连续氨基酸的插入,这可能会改变该区的环状结构,从而影响gC抗体与其有效结合,这可能也是造成Bartha株疫苗对当前PRV流行株免疫效果低下的原因之一。目前,养猪生产临床上使用的猪伪狂犬病血清学检测试剂盒只有针对gE和gB抗体检测,亟需研发生产一种能检测猪血液中PRV-gC蛋白抗体的试剂及方法,用以评定猪伪狂犬病疫苗免疫效果及猪抗PRV感染的能力。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种pCzn1 -gC融合蛋白及其应用。

[0006] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

一种pCzn1 -gC融合蛋白,所述蛋白氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0007] 一种编码所述蛋白的基因,其序列如SEQ ID NO.2所示。

[0008] 所述的pCzn1 -gC融合蛋白在制备检测猪血液中PRV-gC蛋白抗体试剂中的应用。

[0009] 本发明的优点在于:

本发明所述pCzn1 -gC融合蛋白具有与PRV-gC蛋白相同的生物学活性,包被于ELISA板可检测猪血液中PRV-gC蛋白抗体,PRV-gC蛋白抗体可阻止PRV病毒与靶细胞的黏附,因此,

本发明成果能检测猪血液中PRV-gC蛋白抗体,进一步评定猪伪狂犬病疫苗免疫效果及猪抗PRV感染的能力。并且,pCzn1 -gC融合蛋白容易表达,大大降低了表达生产成本,可用于商品化生产及推广使用。

附图说明

- [0010] 图1 PCR扩增结果,M:Marker;Line1:PCR扩增产物;Line2:空白对照。
- [0011] 图2部分序列比对结果图。
- [0012] 图3 基因酶切鉴定图,M:Marker;Line1:酶切前质粒;Line2: 酶切后质粒。
- [0013] 图4 载体构建图谱。
- [0014] 图5蛋白表达鉴定 SDS-PAGE 分析结果,M: 蛋白质分子质量标准;1: 未诱导;2: 诱导后;3: 诱导破碎后上清;4: 诱导破碎后沉淀。
- [0015] 图 6 蛋白纯化 SDS-PAGE 分析结果,M: 蛋白质分子质量标准,1: 破碎后处理样品,2: 流出,3: 洗脱。
- [0016] 图7蛋白 Western Blot 鉴定分析结果,M: 蛋白质分子质量标准 ,1: 纯化后样品。
- [0017] 图8包被不同抗原浓度的反应结果。
- [0018] 图9血清不同稀释度的反应结果。

具体实施方式

[0019] 实施例1

一、试剂和耗材

pCzn1 质粒、TOP10 菌株、Arctic-Express™ 表达菌:福建省农业科学院畜牧兽医研究所保种;

Protein Marker:Thermo 公司;

IPTG、Acr、Bis、Tris:Sigma 公司;

SDS:Amresco 公司;

TEMED:BIO-RAD 公司;

限制性内切酶: TaKaRa公司;

Pfu DNA 聚合酶: zoonbio公司,货号 PC12;

Tyrptone、Yeast Extract: OXOID 公司; ,

PCR SuperMix试剂盒、Agarose:北京全式金生物技术有限公司;

DNA 胶纯化试剂盒、质粒小提试剂盒:AXYGEN 公司;

PCR 管、枪头等耗材:Fisher 公司;

0.22 μm 无菌滤器和透析袋:Millipore 公司;

Ni-IDA 亲和层析胶:Novagen 公司;

其它试剂均为国产分析纯或化学纯。

[0020] 二、主要实验仪器

Allegra 21R 台式高速冷冻离心机 (美国 BECKMAN 公司)

台式高速离心机 (德国 SORVAL 公司)

Biologic LP 层析系统、Mini Protean II 垂直平板电泳系统、Gel Doc2000 成像系统、水平电泳系统(美国 BIO-RAD 公司)

PTC-200 基因扩增仪(美国 MJ Research 公司)

320-S pH计(美国 Mettler Toledo 公司)

AR5120 电子天平(美国 AHOM S 公司)

MultiTemp III 恒温水浴锅、Hofer MV-25 紫外透射仪(美国 Amersham Pharmacia 公司)

雪花状制冰机(日本 SANYO 公司)

JY92-2D 超声波细胞粉碎机(中国新芝科器研究所)

超净工作台(中国苏净集团)

NANODROP2000(Thermo 公司)

三、实验方法及结果

1. pCzn1-gC 重组质粒的构建

1.1 引物设计

采用基于 PAS (PCR-based Accurate Synthesis) 的方法,设计全长拼接引物,引物序列为:

上游-F:5'-CATATGGGCACGACGCCCACCGGG-3',

下游-R:5'-TCTAGATTAGCTGGTCACGACGGGCCAGC-3'。

[0021] 1.2 PCR扩增反应

PCR反应的体系为:PCR SuperMix 12.5微升、上下游引物各0.5微升、模板3微升、无菌去离子水补充至25微升。以提取的DNA为模板、以引物(上游-F、下游-R)进行PCR反应,反应程序为:94℃预变性5 min,94℃变性30s,61℃退火45s,72℃延伸1min,进行35个循环,最后72℃延伸10min。反应结束后,取5微升PCR产物,用1%琼脂糖凝胶,80V电泳30min,凝胶成像仪拍照观察,在1302bp处出现一条带,与预期结果相一致,如图1所示。

[0022] 1.3 . pCzn1-gC 测序验证

将获得的重组质粒 pCzn1-gC 转入 TOP10 克隆菌株,挑取阳性克隆子测序,测序结果拼接如下所示,单划线区域 gC 基因区域:

CATATGGGTACCACCCCGACCGGTGGTGGTGGCGTAATAGCA GCGCCGGTGAAGTGAAGCCGAGCCCGCC
TAGTACCCCGGAACCGGTGAGC GGTACCACCGGTGCAGCAGCAAGTACCCCGCCGCGTTAGCACCCGCG TG
TTCCTCCGCCGAGCGTTAGCCGCCGTAAACCGCAGCGCAATGGCAATCG CACCCGCGTGCATGGTGACGAAGCAA
CCAGCCATGGTCGTAAACGTATTGT GTGTCGTGAACGCCTGTTTAGTGCCCGTGTGGTGACGCAGTTAGTTTTGG
CTGCGCCGTTGTGCCGCGTGCCGGCGAGACATTTGAAGTGCCTTTTGCCG TCGCGTGCCTTTTCGAGCCCGGA
TGCCGATCCGGAATATTTTGATGAACC GCCGCGTCCGGAAGTGCCTGACGCTGCTGTTTAGCAGCGCCAA
TGC AAGCCTGGCACATGCAGATGCACTGGCCAGTGCAGTTGTTGTGGAAGGTG GTCGTGCCACCGTGGCAAATG
TTAGCGGCGAAGTTAGTGTGCGCGTTGCCG CCGCCGATGCAGAAACCGAAGGCGTTTATACCTGGCGTGTCTGA
GCGCAAATGGCACCGAAGTGCAGCGCAAATGTTAGTCTGGTTCTGTATCATCAGC CGGAATTTGGTCTGAGCG
CCCCGCCGGTGCTGTTTGGTGAACCGTTTCGCG CCGTTTGTGTTGTTTCGTGATTATTATCCGCGCCGTAGCGTTC
GTCTGCGTTG GTTTGGCGATGAACATCCGGTGGATGCAGCATTTGTGACCAATAGCACC GTGCCGATGAAGT
GGCCGTGCTACCCGTGTGAGTGTGGTTAATGTTACCCG CGCCGATGTGCCGGGCTGGCTGCAGCAGATGATGCA

GATGCATTAGCACC GAGCCTGCGCTGTGAAGCAGTGTGGTATCGCGATAGTGTGGCAAGTCAGC GTTTTAGTGA
AGCCCTGCGCCCGCATGTTTATCATCCGGCAGCCGTTAGTGT TCGTTTTGTTGAAGGCTTTGCCGTTTGCGATGG
TCTGTGCGTGCCGCCGGA AGCACGTCTGGCATGGAGTGATCATGCAGCCGATACCGTGTATCATCTGGG CGCAT
GCGCAGAACATCCGGGCCTGCTGAATGTTTCGCAGTGCACGTCCGCT GAGCGATCTGGATGGCCCGGTGGATTATA
CCTGCCGTCTGGAAGGTATGCC GAGTCAGCTGCCGATTTTTGAAGATACCCAGCGTTATGATGCAAGTCCGAC C
AGTGTGAGTTGGCCGTTGTTACCAGCTAATCTAGA。

[0023] 测序结果(gC-F)与预期序列(target)进行比对,截取部分比对序列如图2所示。测序结果与预期序列的相似度高达99.7%。

[0024] 2. 质粒酶切鉴定

2.1 酶切体系

质粒	3μL
内切酶 1	0.25 μL
内切酶 2	0.25 μL
10×Buffer	1.0 μL
DDW Up to	10 μL

2.2 酶切鉴定结果

酶切结果显示,在1302bp和4400bp出现了与预期相符合的条带。结果如图3所示。

[0025] 2.3 载体构建图谱

pCzn1质粒载体大小为4400bp,具有抗Amp特性,将目的基因连接于pCzn1质粒上,形成表达质粒。如图4所示。

[0026] 3. 原核蛋白表达

3.1 原核蛋白的表达鉴定

蛋白大小理论分子量为 47.5kd 左右(含 His-tag),氨基酸序列翻译如下:

MNHKVHHHHHMGTTPTGGGGGNSSAGELSPSPSTPEPVSGTTGAAASTPAAVSTPRVPPPSVSRKPQRN
GNRTRVHGDEATSHGRKRIVCRERLFSARVGDAVSFGCAVVPRAGETFEVRFRCRRGRFRSPDADPEYFDEPPRPEL
PRERLLFSSANASLAHADALASAVVVEGGRATVANVSGEVSVRVAAADAETEGVYTWVLSANGTEVRSANVSLVL
YHQPEFGLSAPPVLFGEPPFRAVCVVRDYYPRRSVRLRWFADHPVDAAFVTNSTVADELGRRTVSVVNVTRADVP
GLAAADDADALAPSLRCEAVWYRDSVASQRFSEALRPHVYHPAAVSVRFVEGFVCDGLCVPPEARLAWSDHAADT
VYHLGACAEHPGLLNVR SARPLSDLDGPVDYTCRLEGMPSQLPIFEDTQRYDASPTSVSWPVVTS。

[0027] 3.1.1 pCzn1 -gC 载体转化至大肠杆菌 Arctic Express

- (1)将质粒 1 μl 加入 100 μl 感受态细菌中,置冰上 20 min;
- (2)42℃热激 90sec,迅速置冰中 5min;加入 600 μl LB 培养液;
- (3)37℃,220 r/min 振摇 1h,离心后全部涂布于含 50 μg/ml Amp 的 LB 平板,37℃倒置培养过夜。

[0028] 3.1.2 IPTG 诱导 pCzn1 -gC 载体融合蛋白的表达

- (1)挑取转化平板上的单克隆接种于含 50 μg/ml Amp 的 3 ml LB 培养液的试管中,37℃ 220 r/min 振摇过夜;
- (2)次日按 1:100 接种于 50 μg/ml Amp 的 30 ml LB 培养液中,37℃ 220 r/min振摇至菌体 OD600 为 0.6-0.8 (约 2h);

(3)取出 1 ml 培养物,10000 r/min 室温离心 2 min,弃上清,用 100 μ l 1 $\times$ 上样缓冲液重悬菌体沉淀;

(4)向剩余的培养物中加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mM,37 $^{\circ}$ C 220 r/min 振摇 4h,诱导融合蛋白表达;

(5)取出 1 ml 培养物,10000 r/min 室温离心 2 min,弃上清,用 100 μ l 1 $\times$ 上样缓冲液重悬菌体沉淀。剩余培养物 4000 r/min,离心 10 min,弃上清,用 PBS重悬菌体沉淀;重悬液进行超声波破碎后,分别取上清液与沉淀液加入上样缓冲液重悬。

[0029] (6)进行 12% SDS-PAGE 检测分析,考马斯亮蓝染色显带,结果如图5 所示。

[0030] 3.1.3 表达鉴定结果分析

利用 IPTG 诱导蛋白表达,经 12% SDS-PAGE 分析显示表达的目的条带与预期的相一致,目标蛋白主要存在于沉淀中,目标蛋白命名为“pCzn1 -gC融合蛋白”,结果如图5所示。

[0031] 3.2 包涵体蛋白的变复性

(1)将菌体沉淀重悬于 20 ml 裂解液 (20 mM Tris-HCl containing 1 mM PMSF and bacteria protease inhibitor cocktail,pH 8.0),超声破碎(功率 400 W,工作4sec,间歇 8sec,共 20min);

(2)将超声破碎的细胞裂解液 4 $^{\circ}$ C 10000 r/min 离心 20 min,收集沉淀;

(3)使用包涵体洗涤液(20mM Tris,1mM EDTA,2M 尿素,1M NaCl, 1%Triton X-100, pH8.0)洗涤包涵体 3 次;

(4)用溶解缓冲液(20mM Tris,5mM DTT,8M 尿素,pH8.0),按一定比例溶解包涵体,4 $^{\circ}$ C 放置过夜;室温,10000 r/min 离心 15min;

(5)将上述溶液滴加 20 mM Tris-HCl ,0.15 M NaCl,pH8.0 缓冲液中,逐步成倍梯度稀释缓慢搅拌,将蛋白溶液装入透析袋于 20 mM Tris-HCl,0.15 M NaCl,pH8.0 溶液中透析过夜。

[0032] 3.3 融合蛋白的 Ni 柱亲和纯化及结果分析

3.3.1 Ni 柱纯化

(1)利用低压层析系统,上清溶液以 0.5 ml/min 流速上样至 Ni-IDA Binding-Buffer 预平衡的 Ni-IDA -Sepharose CL-6B 亲和层析柱;

(2)用 Ni-IDA Binding-Buffer 以 0.5 ml/min 流速冲洗,至流出液 OD280 值到达基线;

(3)用 Ni-IDA Washing-Buffer(20 mM Tris-HCl,20 mM 咪唑,0.15 M NaCl,pH8.0)以 1 ml/min 流速冲洗,至流出液 OD280 值到达基线;

(4)用 Ni-IDA Elution-Buffer(20 mM Tris-HCl,250 mM 咪唑,0.15 M NaCl,pH8.0)以 1 ml/min 流速洗脱目的蛋白,收集流出液;

(5)上述收集的蛋白溶液加入透析袋中,使用 20 mM Tris-HCl,0.15 M NaCl,pH8.0 进行透析过夜;

(6)进行 12% SDS-PAGE 分析,结果如图6 所示。

[0033] 3.3.2 纯化结果分析

包涵体经过变复性的方式,重溶目标蛋白,通过 Ni 柱亲和纯化获得目标蛋白,进行 12% SDS-PAGE 分析。纯化后的目标蛋白,经12% SDS-PAGE 分析,于47.5kd处出现单独一条

条带,与预期结果相一致。结果如图 6所示。

[0034] 3.3 Western Blot 方法及结果分析

3.3.1 Western Blot 步骤

(1) 取样品上样 5 μ l

(2) 上样完毕后,聚丙烯酰胺凝胶先 90 V 跑完积层胶,再将电压升至 200 V 直到电泳结束。

[0035] (3) 电泳结束后,取下凝胶进行转膜,恒压 100 V 转膜,约为 1.5h,恒流 250 mA。

[0036] (4) 电转结束后,取下膜后先用 PBST 洗涤 4 次,每次 5min。

[0037] (5) 将膜置于 5%脱脂奶粉封闭液中封闭 37℃ 1h。

[0038] (6) 用封闭液稀释一抗,膜在一抗稀释液中 4℃过夜。

[0039] (7) 次日将膜取出后用 PBST 洗膜 4 次,每次 5 min,

(8) 用含 5%牛奶的封闭液稀释二抗。膜在二抗中 37℃反应 1h。

[0040] (9) 反应完毕后,把膜取出后置于干净的盒子中洗膜 4 次,每次 5 min。

[0041] (10) ECL 显影,曝光。

[0042] 3.3.2 Western Blot 结果分析

一抗以及二抗稀释比例:

编号	抗体名称	稀释比例	二抗名称	稀释比例
1	His	1:1000	羊抗兔	1:5000

Western Blot 结果显示,于47.5kd处出现免疫反应条带,与预期结果相一致。结果如图 7所示。

[0043] 4、ELISA方法的建立

用纯化后的目标蛋白“pCzn1 -gC融合蛋白”为包被抗原制备ELISA板,检测猪血清中 PRV-gC抗体水平,优化获得最佳实验检测条件。

[0044] 4.1抗原包被最佳浓度和血清最佳稀释度

采用矩阵滴定法,横排选择抗原浓度(15ug/mL、10ug/mL、7ug/mL、4ug/mL),纵排选择血清抗体稀释度(1:20、1:50、1:100、1:150),每个滴度重复一次,当抗原包被浓度为10 ug/mL,P/N值为2.103(如图8),血清为1:50稀释时,P/N值为2.11(如图9),因此,最佳抗原包被浓度为10ug/mL,最佳血清抗体稀释度为1:50。

[0045] 4.2抗原包被时间

包被时间:37℃作用30min;37℃作用60min;37℃作用90min;37℃作用120min;4℃作用过夜。其中,37℃作用60min的效果最好。

[0046] 4.3血清反应时间

加入血清后反应的时间15min、30min、45min、60min、90min,其中30min反应的效果最好。

[0047] 4.4酶标二抗反应时间

加入酶标二抗后反应的时间15min、30min、45min、60min、90min,其中30min反应的效果最好。

[0048] 4.5底物显色反应时间

加入底物(TMB)显色反应的时间5min、10min、15min、20min、30min,其中10min反应的效果最好。

[0049] 4.6 ELISA临界值

在最佳工作浓度和最适反应时间条件下,对收集的30份PRV抗体(gE抗体和gB抗体)阴性的猪血清进行间接ELISA方法检测,确定阴阳性临界值($X+3SD$)值为0.249, ($X+2SD$)值为0.207。

[0050] 4.7间接ELISA方法的特异性和重复性试验

利用表达的pCzn1 -gC融合蛋白作为诊断抗原包被ELISA板检测猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)阳性血清、猪流行性腹泻病毒(PEDV)阳性血清、猪圆环病毒2型(PCV-2)阳性血清、猪瘟病毒(PEDV)阳性血清、猪细小病毒(PPV)阳性血清,所测得 OD_{650} 值分别为0.067、0.073、0.065、0.069、0.058,均小于0.207,表明所建立的方法与上述病毒血清无交叉反应,特异性好。对PRV抗体效价高、中、低的三份血清进行测定,其中高效价的S/N值为0.064、中效价的S/N值为0.243、低效价的S/N值为0.536,计算板内、板间的变异系数,种血清板内检测的变异系数分别为2.4%、3.1%、1.8%,以及板间的变异系数分别为2.3%、2.8%、2.0%。结果均小于5%,表明建立的间接ELISA方法有较好的重复性。

[0051] 4.8临床样品检测

利用4.1-4.7步骤所优化好的条件包被的ELISA板,并对13份未免疫PRV疫苗的猪血清,50份已免疫勃林格公司PRV疫苗30天的猪血清,结果显示,13份未免疫的猪血清 OD_{650} 值均小于0.207,为阴性;来自某规模化猪场的50份有免疫勃林格公司PRV疫苗的猪血清 OD_{650} 值均大于0.733,为阳性;完全符合实验预期,表明本申请利用所述pCzn1 -gC融合蛋白建立的间接ELISA方法可用于PRV抗体的临床检测。

[0052] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,凡依本发明申请专利范围所做的均等变化与修饰,皆应属本发明的涵盖范围。

SEQUENCE LISTING

<110> 福建省农业科学院 畜牧兽医研究所

<120> 一种pCzn1 -gC融合蛋白及其应用

<130> 4

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 441

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 1

```

Met Asn His Lys Val His His His His His His Met Gly Thr Thr Pro
1           5           10           15
Thr Gly Gly Gly Gly Gly Asn Ser Ser Ala Gly Glu Leu Ser Pro Ser
          20           25           30
Pro Pro Ser Thr Pro Glu Pro Val Ser Gly Thr Thr Gly Ala Ala Ala
          35           40           45
Ser Thr Pro Ala Ala Val Ser Thr Pro Arg Val Pro Pro Pro Ser Val
          50           55           60
Ser Arg Arg Lys Pro Gln Arg Asn Gly Asn Arg Thr Arg Val His Gly
65           70           75           80
Asp Glu Ala Thr Ser His Gly Arg Lys Arg Ile Val Cys Arg Glu Arg
          85           90           95
Leu Phe Ser Ala Arg Val Gly Asp Ala Val Ser Phe Gly Cys Ala Val
          100          105          110
Val Pro Arg Ala Gly Glu Thr Phe Glu Val Arg Phe Cys Arg Arg Gly
          115          120          125
Arg Phe Arg Ser Pro Asp Ala Asp Pro Glu Tyr Phe Asp Glu Pro Pro
          130          135          140
Arg Pro Glu Leu Pro Arg Glu Arg Leu Leu Phe Ser Ser Ala Asn Ala
145          150          155          160
Ser Leu Ala His Ala Asp Ala Leu Ala Ser Ala Val Val Val Glu Gly
          165          170          175
Gly Arg Ala Thr Val Ala Asn Val Ser Gly Glu Val Ser Val Arg Val
          180          185          190
Ala Ala Ala Asp Ala Glu Thr Glu Gly Val Tyr Thr Trp Arg Val Leu
          195          200          205
Ser Ala Asn Gly Thr Glu Val Arg Ser Ala Asn Val Ser Leu Val Leu

```

210	215	220
Tyr His Gln Pro Glu Phe Gly Leu Ser Ala Pro Pro Val Leu Phe Gly		
225	230	235
Glu Pro Phe Arg Ala Val Cys Val Val Arg Asp Tyr Tyr Pro Arg Arg		240
	245	250
Ser Val Arg Leu Arg Trp Phe Ala Asp Glu His Pro Val Asp Ala Ala		255
	260	265
Phe Val Thr Asn Ser Thr Val Ala Asp Glu Leu Gly Arg Arg Thr Arg		270
	275	280
Val Ser Val Val Asn Val Thr Arg Ala Asp Val Pro Gly Leu Ala Ala		285
	290	295
Ala Asp Asp Ala Asp Ala Leu Ala Pro Ser Leu Arg Cys Glu Ala Val		300
305	310	315
Trp Tyr Arg Asp Ser Val Ala Ser Gln Arg Phe Ser Glu Ala Leu Arg		320
	325	330
Pro His Val Tyr His Pro Ala Ala Val Ser Val Arg Phe Val Glu Gly		335
	340	345
Phe Ala Val Cys Asp Gly Leu Cys Val Pro Pro Glu Ala Arg Leu Ala		350
	355	360
Trp Ser Asp His Ala Ala Asp Thr Val Tyr His Leu Gly Ala Cys Ala		365
	370	375
Glu His Pro Gly Leu Leu Asn Val Arg Ser Ala Arg Pro Leu Ser Asp		380
385	390	395
Leu Asp Gly Pro Val Asp Tyr Thr Cys Arg Leu Glu Gly Met Pro Ser		400
	405	410
Gln Leu Pro Ile Phe Glu Asp Thr Gln Arg Tyr Asp Ala Ser Pro Thr		415
	420	425
Ser Val Ser Trp Pro Val Val Thr Ser		430
	435	440

<210> 2

<211> 1302

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

catatgggta ccaccccgac cgggtggtggt ggcggttaata gcagcgccgg tgaactgagc 60
ccgagcccg ctagtaccac ggaaccggtg agcggtagca cgggtgcagc agcaagtacc 120
ccggccgccc ttagcacccc gcgtgttcc cgcgcgagcg ttagccgccc taaaccgcag 180
cgcaatggca atcgcacccg cgtgcatggt gacgaagcaa ccagccatgg tcgtaaactgt 240
attgtgtgtc gtgaacgcct gtttagtgcc cgtgttggtg acgcagttag ttttggtgc 300

gccgttgtgc cgcgtgccgg cgagacattt gaagtgcgct tttgccgtcg cggtcgcttt 360
cgcagccccg atgccgatcc ggaatatattt gatgaaccgc cgcgtccgga actgccgcgt 420
gaacgtctgc tgttttagcag cgccaatgca agcctggcac atgcagatgc actggccagt 480
gcagttgttg tggaagggtg tcgtgccacc gtggcaaata ttagcggcga agttagtgtg 540
cgcgttgccg ccgccgatgc agaaaccgaa ggcgtttata cctggcgtgt tctgagcgca 600
aatggcaccg aagtgcgcag cgcaaagtgt agtctggttc tgtatcatca gccggaattt 660
ggtctgagcg ccccgccggt gctgttttgt gaaccgtttc gcgccgtttg tgttgttcgt 720
gattattatc cgcgccgtag cgttcgtctg cgttggtttg ccgatgaaca tccggtggat 780
gcagcatttg tgaccaatag caccgttgcc gatgaactgg gccgtcgtac ccgtgtgagt 840
gtggttaatg ttaccgcgc cgatgtgccg ggcttggtg cagcagatga tgcagatgca 900
ttagcaccga gcctgcgtg tgaagcagtg tggatcgcg atagtgtggc aagtcagcgt 960
tttagtgaag ccctgcgcc gcatgtttat catccggcag ccgttagtgt tcgttttgtt 1020
gaaggctttg ccgtttgcga tggctctgtg gtgccgccg aagcacgtct ggcatggagt 1080
gatcatgcag ccgataccgt gtatcatctg ggcgcgtcg cagaacatcc gggcctgctg 1140
aatgttcgca gtgcacgtcc gctgagcgat ctggatggcc cgggtggatta tacctgccgt 1200
ctggaaggta tgccgagtca gctgccgatt tttgaagata cccagcgta tgatgcaagt 1260
ccgaccagtg tgagttggcc ggttggtacc agctaata ga 1302

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

catatgggca cgacgccac cggg 24

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

tctagattag ctggcacga cgggccagc 29

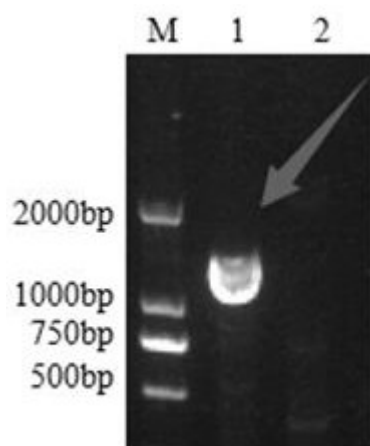


图1

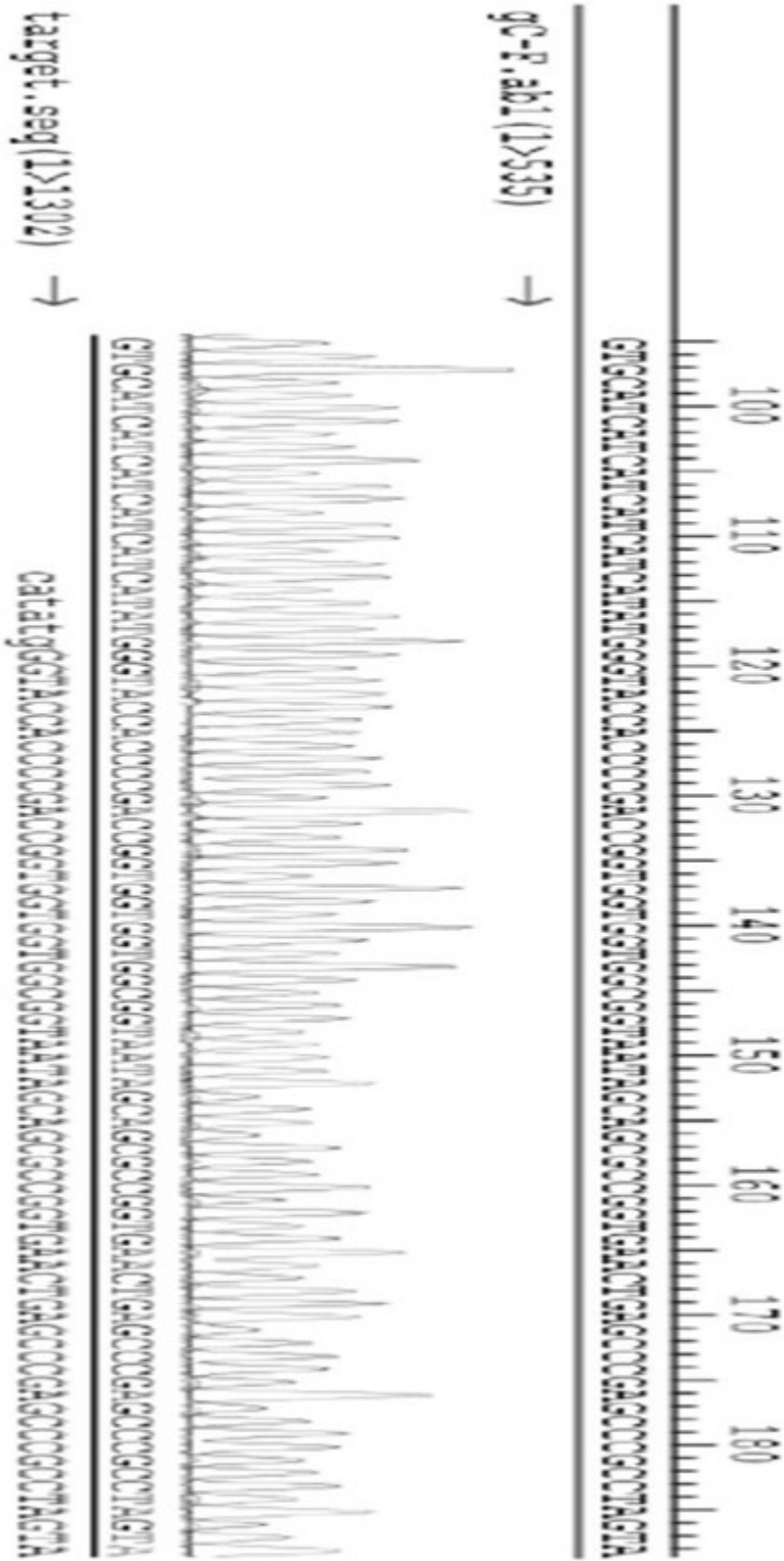


图2

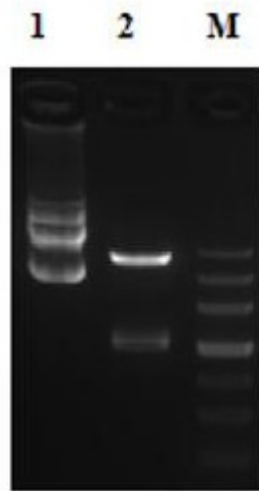


图3

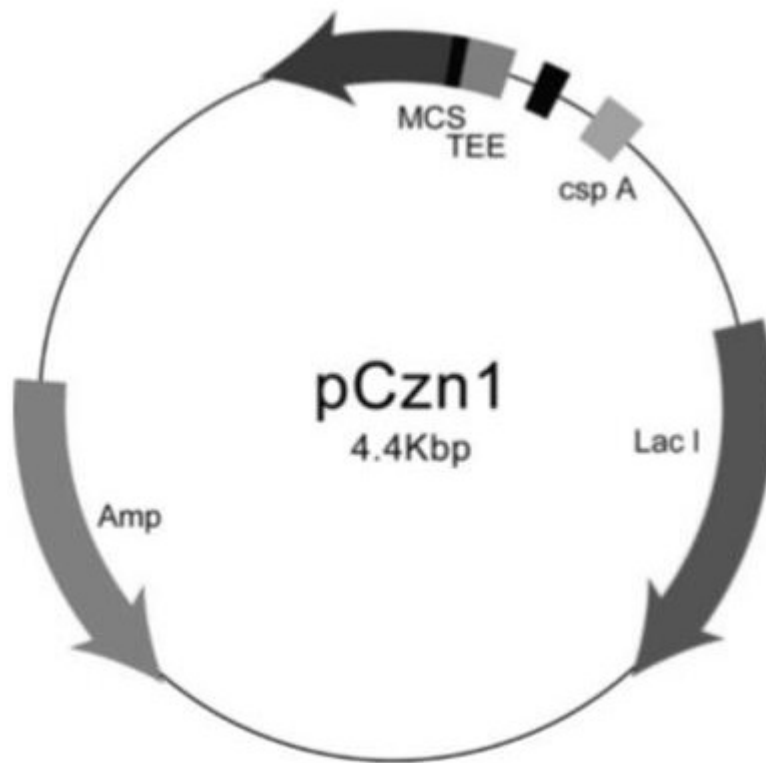


图4

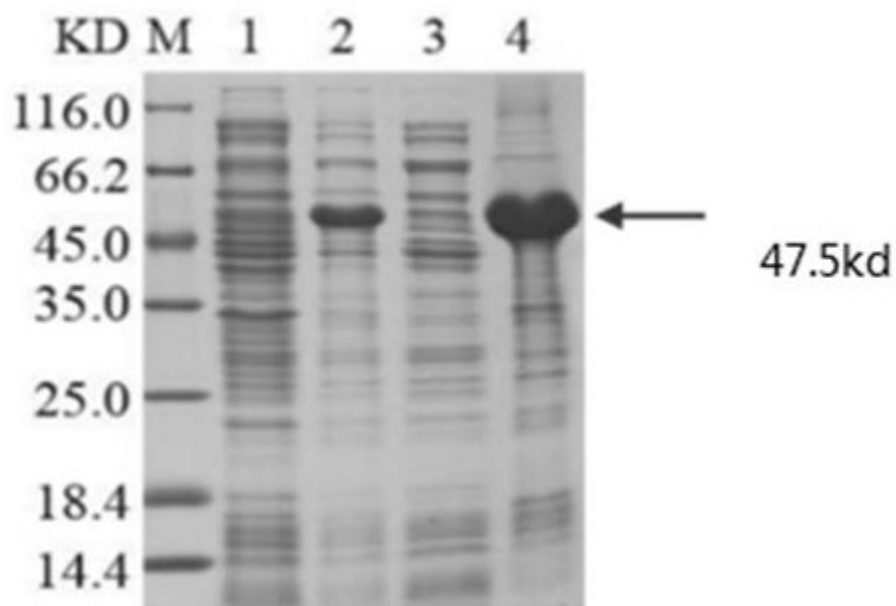


图5

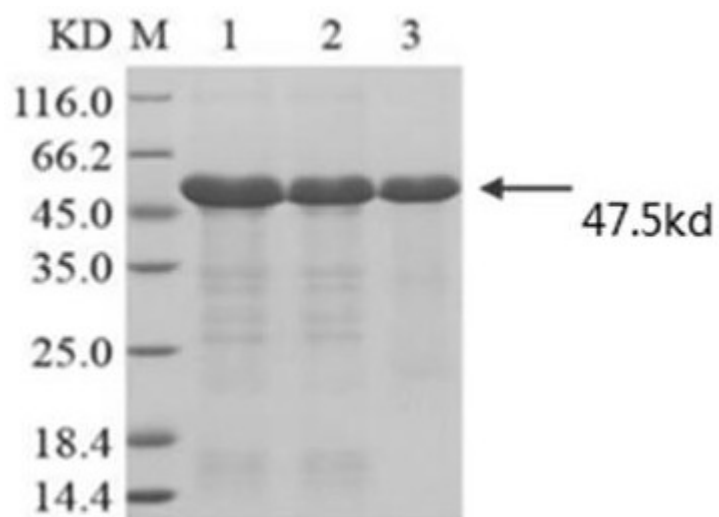


图6

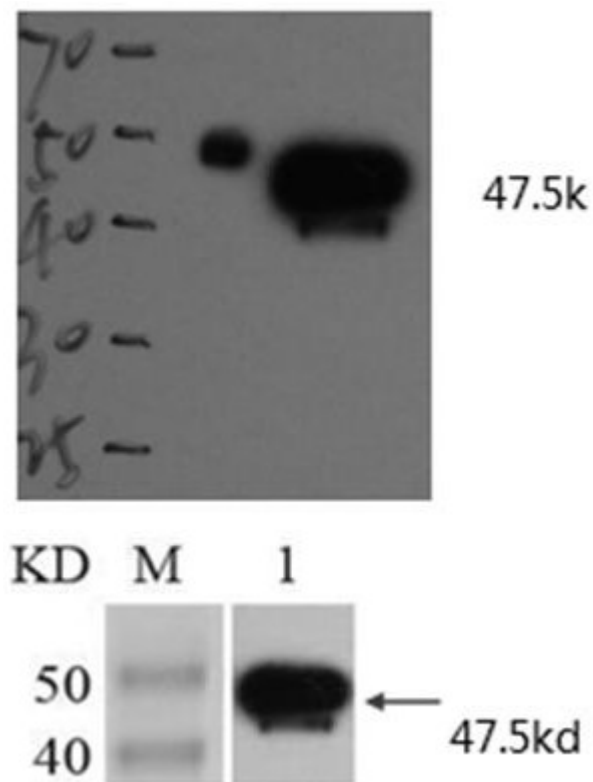


图7

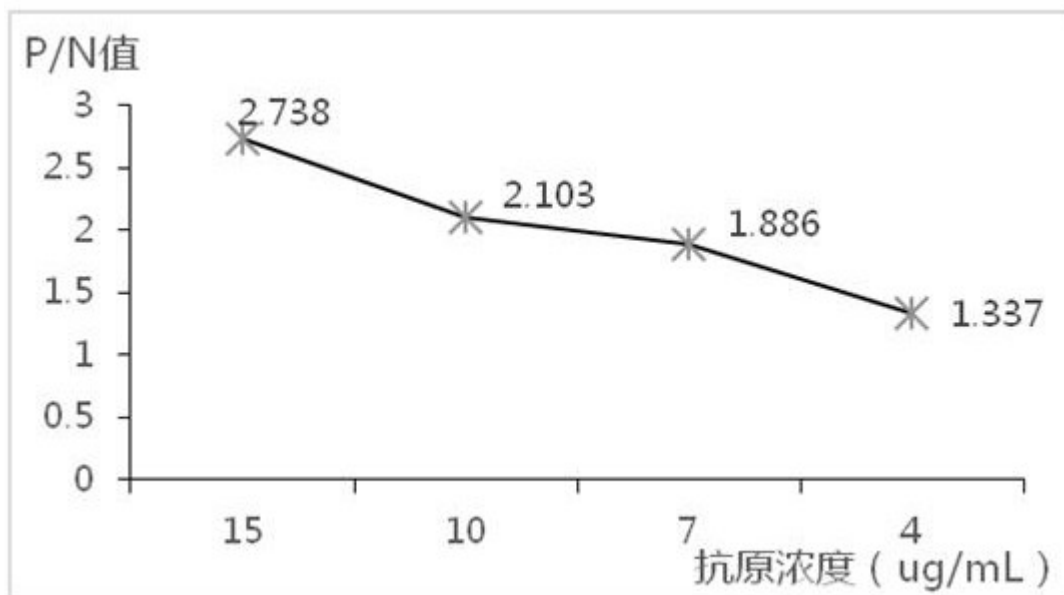


图8

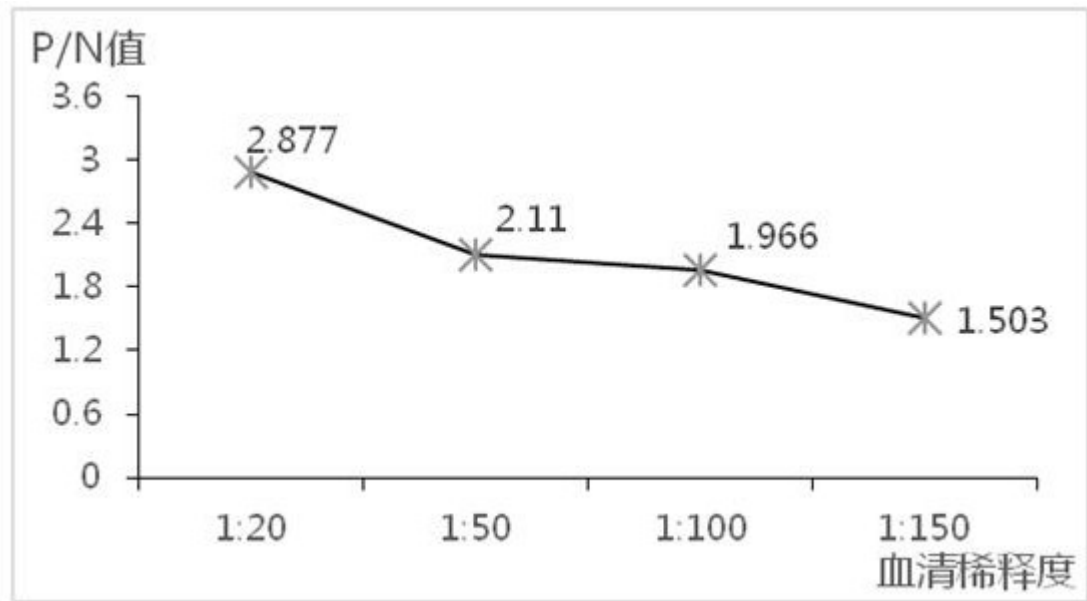


图9

专利名称(译)	一种pCzn1 -gC融合蛋白及其应用		
公开(公告)号	CN110028590A	公开(公告)日	2019-07-19
申请号	CN201910323871.X	申请日	2019-04-22
[标]申请(专利权)人(译)	福建省农业科学院畜牧兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	福建省农业科学院畜牧兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	福建省农业科学院畜牧兽医研究所		
[标]发明人	吴学敏 陈如敬 陈秋勇 王隆柏 车勇良 周伦江 王晨燕 刘玉涛 严山		
发明人	吴学敏 陈如敬 陈秋勇 王隆柏 车勇良 周伦江 王晨燕 刘玉涛 严山		
IPC分类号	C07K19/00 C12N15/62 G01N33/531 G01N33/558 G01N33/68		
CPC分类号	C07K14/005 C07K2319/40 C12N2710/16722 G01N33/531 G01N33/558 G01N33/6854 G01N2333/032		
代理人(译)	蔡学俊		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种pCzn1-gC融合蛋白及其应用，所述蛋白氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示，本发明所述pCzn1-gC融合蛋白具有与PRV-gC蛋白相同的生物学活性，包被于ELISA板可检测猪血液中PRV-gC蛋白抗体，PRV-gC蛋白抗体可阻止PRV病毒与靶细胞的黏附，因此，本发明成果能检测猪血液中PRV-gC蛋白抗体，进一步评定猪伪狂犬病疫苗免疫效果及猪抗PRV感染的能力。并且，pCzn1-gC融合蛋白容易表达，大大降低了表达生产成本，可用于商品化生产及推广使用。

编号	抗体名称	稀释比例	二抗名称	稀释比例
1	His	1:1000	羊抗兔	1:5000