



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101949936 A

(43) 申请公布日 2011. 01. 19

(21) 申请号 201010245482. 9

C12N 15/70 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 08. 02

C07K 16/10 (2006. 01)

C07K 16/06 (2006. 01)

(71) 申请人 宁波检验检疫科学技术研究院
地址 315012 浙江省宁波市马园路 9 号

(72) 发明人 张吉红 闻伟刚 吴东来 李如松
黄素文

(74) 专利代理机构 宁波奥圣专利代理事务所
(普通合伙) 33226

代理人 程晓明

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/558 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

C12N 15/40 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页 序列表 3 页
附图 0 页

(54) 发明名称

检测赤羽病抗体的胶体金试纸条及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了检测赤羽病抗体的胶体金试纸条及其制备方法,试纸条色括底衬,底衬上设置有吸水垫、硝酸纤维素膜、玻璃纤维膜和样品垫,硝酸纤维素膜上设置有检测带和质控带,检测带中包被有 G1 重组蛋白,质控带中包被有赤羽病抗体,玻璃纤维膜中包被有胶体金-G1 重组蛋白,G1 重组蛋白的氨基酸序列如序列表 SEQ ID NO. 2 所示;本发明具有检测简便、快捷、特异、敏感和成本低等优点;制备方法包括 RNA 制备、G1 重组蛋白制备、胶体金-G1 重组蛋白制备、赤羽病抗体制备和胶体金试纸条制备,该制备方法得到特异性好和敏感度高的本发明试纸条,该制备方法较简单,成本也较低。

1. 检测赤羽病抗体的胶体金试纸条,包括底衬,所述底衬上设置有吸水垫、硝酸纤维素膜、玻璃纤维膜和样品垫,所述硝酸纤维素膜上设置有检测带和质控带,其特征在于所述检测带中包被有 G1 重组蛋白,所述质控带中包被有赤羽病抗体,所述玻璃纤维膜中包被有胶体金-G1 重组蛋白,所述 G1 重组蛋白的氨基酸序列如序列表 SEQ IDNO. 2 所示。

2. 如权利要求 1 所述的检测赤羽病抗体的胶体金试纸条,其特征在于所述赤羽病抗体为多克隆抗体。

3. 权利要求 2 所述的检测赤羽病抗体的胶体金试纸条的制备方法,其特征在于包括下述步骤:

1) RNA 制备:用病毒 RNA 抽提试剂盒从赤羽病病毒中抽提分离囊膜糖蛋白 G1 基因,以该 G1 基因为模板进行 RT-PCR 扩增反应,测序,得到 G1 基因,所述 G1 基因的核苷酸序列如序列表 SEQ ID NO. 1 所示, RT-PCR 扩增反应的上游引物的核苷酸序列如序列表 SEQ ID NO. 3 所示,下游引物的核苷酸序列如序列表 SEQ ID NO. 4 所示;

2) G1 重组蛋白制备:将上述 G1 基因构建到表达载体 pET-28a(+) 中得到重组质粒,再将该重组质粒导入表达宿主大肠杆菌 BL21 中,将该大肠杆菌 BL21 夜培养,按体积比 1 : 200,将上述大肠杆菌 BL21 接种至 LB 培养基中,37°C 培养至 OD₆₀₀ 为 1 时,加入异丙基硫代-β-D-半乳糖苷至其终浓度为 1mmol/L,诱导表达 4h,得到诱导菌液,将该诱导菌液 5000r/min 离心 10min,收集细菌沉淀,所述细菌沉淀先用 0.01mol/L PH7.4 磷酸盐缓冲液洗溶,然后 5000r/min 离心 10min,重复洗离 3 次,得到去杂的细菌,根据 Novagen 公司的 His. Bind Purification Kit 说明书将去杂的细菌破碎、提取、纯化、层析、洗脱得到 G1 重组蛋白溶液,测序 G1 重组蛋白,该 G1 重组蛋白的氨基酸序列如序列表 SEQ ID NO. 2 所示,4°C 冰箱保存备用;

3) 胶体金-G1 重组蛋白制备:用浓度为 0.1mol/L K₂CO₃ 将胶体金溶液的 pH 值调节至 7.9,然后在 1mL 的胶体金溶液中加入 15.9ug 的 G1 重组蛋白溶液,磁力搅拌混合均匀 30min,加入质量百分浓度为 10% 的牛血清白蛋白溶液,至牛血清白蛋白终浓度为 1%,继续搅拌 15min,再加入质量百分浓度为 5% 的聚乙二醇溶液,至聚乙二醇终浓度为 0.5%,再继续搅拌 15min,然后置于 4°C 冰箱过夜,次日以 1500rpm 离心 10min,取上清液以 13000rpm 离心 1h,在沉淀中边搅拌边加入胶体金溶液至沉淀溶解,得到胶体金-G1 重组蛋白溶液,4°C 冰箱保存备用;

4) 赤羽病抗体制备:按体积比 1 : 1,在赤羽病病毒中加入弗氏完全佐剂乳化为乳化液,用 2ml 注射器吸取上述乳化液 1mL,注射至兔的腋下和腹股沟中,间隔 14 天,再吸取上述乳化液 1.5mL,注射至兔的腋下和腹股沟中,间隔 10 天后,从耳静脉采血 0.5 ~ 1.0ml,分离血清,以双相琼脂扩散试验测定免疫血清的抗体效价,在抗体效价不低于 1 : 16 时,放兔血并分离血清,该血清即为多克隆的赤羽病抗体溶液;

5) 胶体金试纸条制备:将上述 G1 重组蛋白溶液喷在硝酸纤维素膜的检测带上烘干备用,将上述赤羽病抗体溶液喷在硝酸纤维素膜的质控带上烘干备用,将上述胶体金-G1 重组蛋白溶液喷在玻璃纤维膜上烘干备用,在不干胶的底衬上按顺序贴附吸水垫、含有 G1 重组蛋白和赤羽病抗体的硝酸纤维素膜、含有胶体金-G1 重组蛋白的玻璃纤维膜、样品垫,然后切割成 4mm 宽的纸条,得到胶体金试纸条。

检测赤羽病抗体的胶体金试纸条及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及赤羽病抗体的检测试剂,具体涉及检测赤羽病抗体的胶体金试纸条及其制备方法。

背景技术

[0002] 赤羽病又称阿卡斑病,由阿卡斑病毒(AKAV)引起,可导致流产、早产、死产以及产出先天性关节弯曲-积水性无脑综合征胎儿,是牛的四大流产病之一,我国农业部也将该病列为禁止进出境的重要传染病。该病分布于热带和温带地区,李昌林等 0994 年对全国 2639 份牛、羊血清进行检测,牛阳性率为 39.18%,羊的阳性率为 12.6%,且南方的阳性率比北方高。卫龙兴等 19999 年对上海两家流产率较高的奶牛场进行抽样调查,阳性率竟高达 92.85%。1996 年-1997 年上海爆发本病,牛场中流产、早产、死产和畸形胎儿约占 20%-30%,给牧场带来巨大损失。从上述数据可以看出,这种病在我国南方已经流行,个别地区还相当严重,已经给养牛业造成严重损失。目前,我国检测赤羽病抗体的方法主要是琼脂免疫扩散试验、病毒中和试验和酶联免疫试验(ELISA)。琼脂免疫扩散试验特异性很好,但灵敏度不高;病毒中和试验中细胞易受污染,检测周期长;酶联免疫试验试剂昂贵,且需配套仪器。上述三种方法均能够准确检测到赤羽病抗体,但具体操作复杂,均需要较为熟练的专业技术人员和配备相应的仪器设备,不利于基层赤羽病快速验放,尤其是养殖场的日常监测。

[0003] 免疫胶体金技术是 60 年代继三大标记技术(荧光素、放射性同位素和酶)后发展起来的固相标记免疫测定技术,免疫胶体试纸条技术,具有单份测定、简单快速、特异敏感,不需任何仪器设备和试剂,几分钟就可用肉眼观察到颜色鲜明的实验结果,并可保存实验结果的优点;免疫胶体金层析技术现已成为当今最快速敏感的免疫学检测技术之一,特别适合于广大基层单位、医院、野外作业人员以及大批量时间紧的检测和大面积普查等,因此该技术具有巨大的发展潜力和应用前景。如授权公告号为 CN100494352,名称为“检测牛结核抗体的免疫胶体金试纸条及其制备方法”的发明专利,就公开了由样品垫、结合垫(玻璃纤维膜)、硝酸纤维素膜、吸水垫和背衬(底衬)组装而成的免疫胶体金试纸条,其中结合垫上包被有 MPB83 蛋白-胶体金标记物,硝酸纤维素膜上包被有由纯化 MPB70 蛋白构成的检测线和纯化的免疫 MPB83 蛋白 1gG 构成的质控线。

[0004] 赤羽病抗体为赤羽病病毒的免疫应答蛋白,目前本领域技术人员用常规纯化技术都可以得到单克隆抗体或多克隆抗体,如公开号为 CN101200709,名称为“抗赤羽病病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞系、单克隆抗体及其试剂盒和用途”的发明专利申请,就公开了单克隆抗体的制备,其制备方法较复杂。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是提供了检测赤羽病抗体的胶体金试纸条,该胶体金试纸条具有检测简便、快捷、特异、敏感和成本低等优点,使普通作业人员,在基层也可以方

便检测赤羽病抗体。

[0006] 本发明还公开了上述胶体金试纸条的制备方法,该制备方法较简单,成本也较低,得到胶体金试纸条特异性好,敏感度高。

[0007] 本发明解决上述技术问题所采用的技术方案为:检测赤羽病抗体的胶体金试纸条,包括底衬,所述底衬上设置有吸水垫、硝酸纤维素膜、玻璃纤维膜和样品垫,所述硝酸纤维素膜上设置有检测带和质控带,所述检测带中包被有 G1 重组蛋白,所述质控带中包被有赤羽病抗体,所述玻璃纤维膜中包被有胶体金-G1 重组蛋白,所述 G1 重组蛋白的氨基酸序列如序列表 SEQ ID NO. 2 所示。

[0008] 所述赤羽病抗体为多克隆抗体。

[0009] 检测赤羽病抗体的胶体金试纸条的制备方法,包括下述步骤:

[0010] 1) RNA 制备:用病毒 RNA 抽提试剂盒从赤羽病病毒中抽提分离囊膜糖蛋白 G1 基因,以该 G1 基因为模板进行 RT-PCR 扩增反应,测序,得到 G1 基因,所述 G1 基因的核苷酸序列如序列表 SEQ ID NO. 1 所示,RT-PCR 扩增反应的上游引物的核苷酸序列如序列表 SEQ ID NO. 3 所示,下游引物的核苷酸序列如序列表 SEQ ID NO. 4 所示;引物由大连宝生生物有限公司合成;

[0011] 2) G1 重组蛋白制备:将上述 G1 基因构建到表达载体 pET-28a(+) 中得到重组质粒,再将该重组质粒导入表达宿主大肠杆菌 BL21 中,将该大肠杆菌 BL21 夜培养,按体积比 1 : 200,将上述大肠杆菌 BL21 接种至 LB 培养基中,37°C 培养至 OD₆₀₀ 为 1 时,加入异丙基硫代-β-D-半乳糖苷(IPTG)至其终浓度为 1mmol/L,诱导表达 4h,得到诱导菌液,将该诱导菌液 5000r/min 离心 10min,收集细菌沉淀,所述细菌沉淀先用 0.01mol/L PH7.4 磷酸盐(PBS)缓冲液洗溶,然后 5000r/min 离心 10min,洗溶离心重复 3 次,得到去杂的细菌,根据 Novagen 公司的 His. Bind Purification Kit 说明书将去杂的细菌破碎、提取、纯化、层析、洗脱得到 G1 重组蛋白溶液,测序 G1 重组蛋白,该 G1 重组蛋白的氨基酸序列如序列表 SEQ ID NO. 2 所示,4°C 冰箱保存备用;表达载体 pET-28a(+) 和大肠杆菌 BL21 由哈尔滨兽医研究所提供;蛋白制备请依上述说明书操作,在此不作详述;

[0012] 3) 胶体金-G1 重组蛋白制备:用浓度为 0.1mol/L K₂CO₃ 将胶体金溶液的 pH 值调节至 7.9,然后在 1mL 的胶体金溶液中加入 15.9ug 的 G1 重组蛋白溶液,磁力搅拌混合均匀 30min,加入质量百分浓度为 10% 的牛血清白蛋白(BSA)溶液,至牛血清白蛋白终浓度为 1%,继续搅拌 15min,再加入质量百分浓度为 5% 的聚乙二醇溶液,至聚乙二醇终浓度为 0.5%,再继续搅拌 15min,然后置于 4°C 冰箱过夜,次日以 1500rpm 离心 10min,取上清液以 13000rpm 离心 1h,在沉淀中边搅拌边加入胶体金溶液至沉淀溶解,得到胶体金-G1 重组蛋白溶液,4°C 冰箱保存备用;胶体金溶液配制为常规方法,在此不作表述;

[0013] 4) 赤羽病抗体制备:按体积比 1 : 1,在赤羽病病毒中加入弗氏完全佐剂(FCA)乳化为乳化液,用 2ml 注射器吸取上述乳化液 1mL,注射至兔的腋下和腹股沟中,间隔 14 天,再吸取上述乳化液 1.5mL,注射至兔的腋下和腹股沟中,间隔 10 天后,从耳静脉采血 0.5 ~ 1.0ml,分离血清,以双相琼脂扩散试验测定免疫血清的抗体效价,在抗体效价不低于 1 : 16 时,放兔血并分离血清,该血清即为多克隆的赤羽病抗体溶液;该抗体制备操作简单,成本低,时间短,得到抗体符合要求;当然也可以用如 CN101200709 所述的单抗;

[0014] 5) 胶体金试纸条制备:将上述 G1 重组蛋白溶液喷在硝酸纤维素膜的检测带上烘

干备用,将上述赤羽病抗体溶液喷在硝酸纤维素膜的质控带上烘干备用,将上述胶体金-G1重组蛋白溶液喷在玻璃纤维膜上烘干备用,在不干胶的底衬上按顺序贴附吸水垫、含有G1重组蛋白和赤羽病抗体的硝酸纤维素膜、含有胶体金-G1重组蛋白的玻璃纤维膜、样品垫,然后切割成4mm宽的纸条,得到胶体金试纸条。

[0015] 与现有技术相比,本发明的优点在于检测赤羽病抗体的胶体金试纸条,包括底衬,底衬上设置有吸水垫、硝酸纤维素膜、玻璃纤维膜和样品垫,硝酸纤维素膜上设置有检测带和质控带,检测带中包被有G1重组蛋白,质控带中包被有赤羽病抗体,玻璃纤维膜中包被有胶体金-G1重组蛋白,G1重组蛋白的氨基酸序列如序列表SEQ ID NO. 2所示;该胶体金试纸条在养殖场等基层就可以检测赤羽病抗体,也无需实验室检测仪器,对检测技术要求也不高,普通作业人员依说明书说可实施,且检测快捷、特异、敏感和成本低,因此本发明具有检测简便、快捷、特异、敏感和成本低等优点。通过RNA制备、G1重组蛋白制备、胶体金-G1重组蛋白制备、赤羽病抗体制备和胶体金试纸条制备步骤制备方法,得到特异性好和敏感度高的该胶体金试纸条,该制备方法较简单,成本也较低。

具体实施方式

[0016] 以下结合实施例对本发明作进一步详细描述。

[0017] 实施例

[0018] 检测赤羽病抗体的胶体金试纸条的制备过程

[0019] 1)RNA制备:用病毒RNA抽提试剂盒从赤羽病病毒中抽提分离囊膜糖蛋白G1基因,以该G1基因为模板进行RT-PCR扩增反应,测序,得到G1基因,G1基因的核苷酸序列如序列表SEQ ID NO. 1所示,RT-PCR扩增反应的上游引物的核苷酸序列如序列表SEQ ID NO. 3所示,下游引物的核苷酸序列如序列表SEQ ID NO. 4所示;具体RT-PCR扩增反应为常规方法,在此不作详述;引物由大连宝生生物有限公司合成。

[0020] 2)G1重组蛋白制备:将上述G1基因构建到表达载体pET-28a(+)中得到重组质粒,再将该重组质粒导入表达宿主大肠杆菌BL21中,将该大肠杆菌BL21夜培养,按体积比1:200,将上述大肠杆菌BL21接种至LB培养基(市售)中,37℃培养至OD₆₀₀为1时,加入IPTG至其终浓度为1mmol/L,诱导表达4h,得到诱导菌液,将该诱导菌液5000r/min离心10min,收集细菌沉淀,所述细菌沉淀先用0.01mol/L PH7.4自配的PBS缓冲液洗溶,然后5000r/min离心10min,洗溶离心重复3次,得到去杂的细菌,根据Novagen公司的His-Bind Purification Kit说明书将去杂的细菌破碎、提取、纯化、层析、洗脱得到G1重组蛋白溶液,测序G1重组蛋白,该G1重组蛋白的氨基酸序列如序列表SEQ ID NO. 2所示,4℃冰箱保存备用。表达载体pET-28a(+)和大肠杆菌BL21由哈尔滨兽医研究所提供。PBS缓冲液的配制:将8g NaCl、0.2g KCl、1.44g Na₂HPO₄、0.24g KH₂PO₄溶解在800mL蒸馏水中,用HCL调节溶液的pH至7.4,加水至1000.00mL。蛋白制备请依上述说明书操作:用Denaturing Binding Buffer(pH7.9)按菌液1:20的比例重悬细菌沉淀,超声透明后,10000r/min离心15min,取10mL上清加入到处理好的Ni²⁺NTA(1mL)柱中,上清与树脂悬浮作用30min后,依次用10mL denaturing bindingbuffer(pH7.9)、40mL denaturing washing buffer(pH7.9)、8mL denaturing elutionbuffer(pH7.9)过柱,取不同时间的洗液进行SDS-PAGE电泳分析纯化结果;薄层扫描分析纯化蛋白的浓度。

[0021] 3) 胶体金 -G1 重组蛋白制备 :用浓度为 0.1mol/L K_2CO_3 将胶体金溶液的 pH 值调节至 7.9,然后在 1mL 的胶体金溶液中加入 15.9ug 的 G1 重组蛋白溶液,磁力搅拌混合均匀 30min,加入质量百分浓度为 10% 的 BSA(市售)溶液,至 BSA 终浓度为 1%,继续搅拌 15min,再加入质量百分浓度为 5% 的聚乙二醇溶液,至聚乙二醇终浓度为 0.5%,再继续搅拌 15min,然后置于 4℃ 冰箱过夜,次日以 1500rpm 离心 10min,取上清液以 13000rpm 离心 1h,在沉淀中边搅拌边加入胶体金溶液至沉淀溶解,得到胶体金 -G1 重组蛋白溶液,4℃ 冰箱保存备用。

[0022] 4) 赤羽病抗体制备 :按体积比 1 : 1,在赤羽病病毒中加入 FCA 溶液(市售)乳化为乳化液,用 2ml 注射器吸取上述乳化液 1mL,注射至兔的腋下和腹股沟中,间隔 14 天,再吸取上述乳化液 1.5mL,注射至兔的腋下和腹股沟中,间隔 10 天后,从耳静脉采血 0.5 ~ 1.0ml,分离血清,以双相琼脂扩散试验测定免疫血清的抗体效价,在抗体效价不低于 1 : 16 时,放兔血并分离血清,该血清即为多克隆的赤羽病抗体溶液。

[0023] 5) 胶体金试纸条制备 :将上述 G1 重组蛋白溶液喷在硝酸纤维素膜的检测带上烘干备用,将上述赤羽病抗体溶液喷在硝酸纤维素膜的质控带上烘干备用,将上述胶体金 -G1 重组蛋白溶液喷在玻璃纤维膜上烘干备用,在不干胶的底衬上按顺序贴附吸水垫、含有 G1 重组蛋白和赤羽病抗体的硝酸纤维素膜、含有胶体金 -G1 重组蛋白的玻璃纤维膜、样品垫,然后切割成 4mm 宽的纸条,得到本发明用于检测赤羽病抗体的胶体金试纸条。

[0024] 上述赤羽病抗体也可以用如 CN101200709 所述的单抗,在此不作叙述。

[0025] 检测赤羽病抗体的胶体金试纸条的应用

[0026] 检测 :取上述胶体金试纸条,平放于桌上,在样品垫上分别滴入待测血清 200uL,当待检血清滴到样品点上后,根据虹吸原理会往上渗透,玻璃纤维膜上胶体金 -G1 重组蛋白随着待检血清上行,若待检血清为阳性,在上行至检测带时,待检血清中抗体与胶体金 -G1 重组蛋白以及检测带上的抗原形成复合体,显色,一般 20 分钟后就可判定结果。测定标准分为无效、阴性、弱阳性、阳性。无效 :检测带和质控带均不出现紫红色线,说明本试纸已失效 ;阴性 :检测带不出现色线,质控带带出现一条颜色较深的紫红色线,说明检测样品无 AKAV 抗体或有 AKAV 抗体,但抗体水平很低 ;弱阳性 :检测带出现一条颜色很浅的紫红色线,质控带出现一条颜色较深的紫红色线,说明检测样品中的 AKAV 抗体水平刚好达到阳性值 ;阳性 :检测带和质控带带都出现颜色较深的紫红色线,说明样检测品中的 AKAV 抗体水平较高 ;检测带颜色越深,检测样品中的抗体水平越高。用 AKAV 标准阳性和阴性血清进行 8 次重复试验,结果一致 ;用本发明的胶体金试纸条对 14 份赤羽病临床样品进行检测,初步结果与进口 ELISA 试剂盒比较,阳性符合率为 83.33%。

[0001]

序列表

<110> 宁波检验检疫科学技术研究院

<120> 检测赤羽病抗体的胶体金试纸条及其制备方法

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 960

<212> RNA

<213> 赤羽病病毒

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(960)

<223> 赤羽病病毒囊膜糖蛋白 G1 基因

<400> 1

```

Atg ata gca ttt gac  cca atg gtg ata gac  gag aat ata caa aaa  ctg gat tgt tat agc  60
Met Ile Ala Phe Asp Pro Met Val Ile Asp Glu Asn Ile Gln Lys Leu Asp Cys Tyr Ser
      5              10              15              20
Cta gct gca aca gac  caa tca gat gga atg  ctg aaa cct gag agg  tct att cga ctc ctc  120
Leu Ala Ala Thr Asp Gln Ser Asp Gly Met Leu Lys Pro Glu Arg Ser Ile Arg Leu Leu
      25              30              35              40
Aaa aca ggc gaa tgt  aag ata gca ggg gca  tta tcc aga att gca  gta tca ata aat caa  180
Lys Thr Gly Glu Cys  Lys Ile Ala Gly Ala  Leu Ser Arg Ile Ala Val Ser Ile Asn Gln
      45              50              55              60
Aaa aat tat aaa tac  tcc act ata gtt cat  aag aag agc gat tta  gtt gat gag tat tgt  240
Lys Asn Tyr Lys Tyr Ser Thr Ile Val His Lys Lys Ser Asp Leu Val Asp Glu Tyr Cys
      65              70              75              80
Cta agc cca aat tgt  gac cta gat tgc tac  cct tat tac cca gcc  aac cta gtt gac tgc  300
Leu Ser Pro Asn Cys Asp Leu Asp Cys Tyr Pro Tyr Tyr Pro Ala Asn Leu Val Asp Cys
      85              90              95              100
Tct tgg agt gaa tcg  act cat tct acc cta  aac cag aaa gtg ata  tct cac aca gat ata  360
Ser Trp Ser Glu Ser Thr His Ser Thr Leu Asn Gln Lys Val Ile Ser His Thr Asp Ile
      105             110             115             120
Gaa tca ttt ata tct  agt gtt aag ctc tcc  ttg cat aat gat cta  atc cag cac cat ttt  420
Glu Ser Phe Ile Ser Ser Val Lys Leu Ser Leu His Asn Asp Leu Ile Gln His His Phe
      125             130             135             140
Agg ccg cta agt aat  atg cca cat gta aag  ccc aac ttc aag tca  ata aat gtt caa gga  480
Arg Pro Leu Ser Asn Met Pro His Val Lys Pro Asn Phe Lys Ser Ile Asn Val Gln Gly
      145             150             155             160

```

[0002]

Aca att tct ggt ggc aag att caa gac agc tac ata aca ttc tca ata cca tta atg act 540
 Thr Ile Ser Gly Gly Lys Ile Gln Asp Ser Tyr Ile Thr Phe Ser Ile Pro Leu Met Thr
 165 170 175 180
 Gga cta tcg caa ggt ttc aca ttg caa gac cat aaa ggc aat acc ctc ttc gac att ata 600
 Gly Leu Ser Gln Gly Phe Thr Leu Gln Asp His Lys Gly Asn Thr Leu Phe Asp Ile Ile
 185 190 195 200
 Gca tat gtg aaa agt gca cgt gta att gca aca tat aat cat gag tac aag aca gga cct 660
 Ala Tyr Val Lys Ser Ala Arg Val Ile Ala Thr Tyr Asn His Glu Tyr Lys Thr Gly Pro
 205 210 215 220
 Aca gta agt atc gat gtt cag cat aat gag caa tgc acg ggg tct tgt ccc agc agt ata 720
 Thr Val Ser Ile Asp Val Gln His Asn Glu Gln Cys Thr Gly Ser Cys Pro Ser Ser Ile
 225 230 235 240
 Cct aaa aag gat aat tgg cta acc ttc tct cgt gaa cat act agc acc tgg ggt tgc gaa 780
 Pro Lys Lys Asp Asn Trp Leu Thr Phe Ser Arg Glu His Thr Ser Thr Trp Gly Cys Glu
 245 250 255 260
 Gaa tgg ggc tgc tta gca ata ggc acg ggg tgc gta tat ggg tct tgc caa gat gtc atc 840
 Glu Trp Gly Cys Leu Ala Ile Gly Thr Gly Cys Val Tyr Gly Ser Cys Gln Asp Val Ile
 265 270 275 280
 Agg gag gaa gca aca gtt att tcc aga gta aat aat gaa cag cta gaa gtt gaa ttt tgc 900
 Arg Glu Glu Ala Thr Val Ile Ser Arg Val Asn Asn Glu Gln Leu Glu Val Glu Phe Cys
 285 290 295 300
 Gtt tca gag cct aca agc aca atg tgc aat act atc aat gta ctc gaa cca gta ttg gga 960
 Val Ser Glu Pro Thr Ser Thr Met Cys Asn Thr Ile Asn Val Leu Glu Pro Val Leu Gly
 305 310 315 320

<210>2

<211> 320

<212> 蛋白质

<213> 赤羽病病毒

<220>

<223> 赤羽病病毒囊膜糖蛋白 G1 基因翻译的 G1 重组蛋白

<400>2

Met Ile Ala Phe Asp Pro Met Val Ile Asp Glu Asn Ile Gln Lys Leu Asp Cys Tyr Ser
 5 10 15 20
 Leu Ala Ala Thr Asp Gln Ser Asp Gly Met Leu Lys Pro Glu Arg Ser Ile Arg Leu Leu
 25 30 35 40
 Lys Thr Gly Glu Cys Lys Ile Ala Gly Ala Leu Ser Arg Ile Ala Val Ser Ile Asn Gln
 45 50 55 60
 Lys Asn Tyr Lys Tyr Ser Thr Ile Val His Lys Lys Ser Asp Leu Val Asp Glu Tyr Cys
 65 70 75 80
 Leu Ser Pro Asn Cys Asp Leu Asp Cys Tyr Pro Tyr Tyr Pro Ala Asn Leu Val Asp Cys
 85 90 95 100

[0003]

Ser Trp Ser Glu Ser Thr His Ser Thr Leu Asn Gln Lys Val Ile Ser His Thr Asp Ile			
105	110	115	120
Glu Ser Phe Ile Ser Ser Val Lys Leu Ser Leu His Asn Asp Leu Ile Gln His His Phe			
125	130	135	140
Arg Pro Leu Ser Asn Met Pro His Val Lys Pro Asn Phe Lys Ser Ile Asn Val Gln Gly			
145	150	155	160
Thr Ile Ser Gly Gly Lys Ile Gln Asp Ser Tyr Ile Thr Phe Ser Ile Pro Leu Met Thr			
165	170	175	180
Gly Leu Ser Gln Gly Phe Thr Leu Gln Asp His Lys Gly Asn Thr Leu Phe Asp Ile Ile			
185	190	195	200
Ala Tyr Val Lys Ser Ala Arg Val Ile Ala Thr Tyr Asn His Glu Tyr Lys Thr Gly Pro			
205	210	215	220
Thr Val Ser Ile Asp Val Gln His Asn Glu Gln Cys Thr Gly Ser Cys Pro Ser Ser Ile			
225	230	235	240
Pro Lys Lys Asp Asn Trp Leu Thr Phe Ser Arg Glu His Thr Ser Thr Trp Gly Cys Glu			
245	250	255	260
Glu Trp Gly Cys Leu Ala Ile Gly Thr Gly Cys Val Tyr Gly Ser Cys Gln Asp Val Ile			
265	270	275	280
Arg Glu Glu Ala Thr Val Ile Ser Arg Val Asn Asn Glu Gln Leu Glu Val Glu Phe Cys			
285	290	295	300
Val Ser Glu Pro Thr Ser Thr Met Cys Asn Thr Ile Asn Val Leu Glu Pro Val Leu Gly			
305	310	315	320

<210>3

<211> 24

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223>根据赤羽病病毒囊膜糖蛋白 G1 基因设计的上游引物序列

<400>3

CGCGGATCCA TGATAGCATT TGAC 24

<210>4

<211> 27

<212>RNA

<213>根据赤羽病病毒囊膜糖蛋白 G1 基因设计的下游引物序列

<400>4

CCGCTCGAGT TATCCAATA CTGGTTC 27

