



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109799345 B

(45) 授权公告日 2021.08.03

(21) 申请号 201811492145.2

(22) 申请日 2018.12.07

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109799345 A

(43) 申请公布日 2019.05.24

(73) 专利权人 中国农业科学院兰州兽医研究所
地址 730046 甘肃省兰州市盐场堡徐家坪1号

(72) 发明人 孙世琪 白满元 郭慧琛 张韵
茹嘉喜 杨志元

(74) 专利代理机构 兰州振华专利代理有限公司 62102
代理人 张晋

(51) Int.Cl.
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 101270155 A, 2008.09.24

EP 1632247 A1, 2006.03.08
CN 105675886 A, 2016.06.15
WO 02095074 A1, 2002.11.28
B. M. de C. Bronsvort, et al..Comparison of Two 3ABC Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Diagnosis of Multiple-Serotype Foot-and-Mouth Disease in a Cattle Population in an Area of Endemicity..《JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY》.2004,
Stewart Goodwin, et al..Foot-and-Mouth Disease Virus Assembly: Processing of Recombinant Capsid Precursor by Exogenous Protease Induces Self-Assembly of Pentamers In Vitro in a Myristoylation-Dependent Manner..《JOURNAL OF VIROLOGY》.2009,11275-11282.
高闪电,等.C型口蹄疫病毒型特异性抗原的表达与鉴定.《安徽农业科学》.2009,

审查员 张绚

权利要求书1页 说明书5页
序列表2页

(54) 发明名称
一种基于病毒样颗粒的C型口蹄疫病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒

(57) 摘要
本发明公开一种采用C型口蹄疫病毒样颗粒(VLPs)制备的检测试剂盒及制备方法。本发明的试剂盒的制备方法是将HRP直接标记在跟被检抗体同时作用的竞争性抗体上,其内酶标板包被的C型口蹄疫病毒样颗粒是由C型口蹄疫病毒的结构蛋白VP0、VP1和VP3组装而成。本发明采用的VLPs能高效组装,且不影响其诊断效率,有利于降低诊断制剂的成本。本发明方法相对现有技术的检测步骤有所减少,实验操作简单,工作量小,用时短,并可提高诊断试剂的特异性和敏感性。

1. 一种C型口蹄疫病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒,检测试剂盒内包括有:包被C型口蹄疫病毒样颗粒的酶标版、HRP标记的兔抗、含有吐温和磷酸盐缓冲液的样品稀释液和含有吐温和磷酸盐缓冲液的洗涤液、TMB底物、阳性对照血清、阴性对照血清、以及浓硫酸与水混合的终止液,其特征在于酶标板包被的C型口蹄疫病毒样颗粒是由C型口蹄疫病毒的结构蛋白VP0、VP1和VP3组装而成的C型口蹄疫病毒样颗粒;C型FMD VLPs的制备步骤为:

1.1 目的蛋白的表达及纯化

(1) 将C型阳性重组质粒p-SMK-VP0VP3和p-SMK-VP1共转化至感受态细胞BL21 (DE3) - RIL,表达菌按1:100的比例接种到含有10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素和25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素的经高压灭菌的新鲜LB液体培养基中,在37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min摇床上培养至菌液OD₆₀₀为0.6~0.8,加入终浓度为0.5 mmol/L的IPTG,并于16 $^{\circ}\text{C}$ 条件下诱导16 h;

C型阳性重组质粒p-SMK-VP0VP3和p-SMK-VP1序列中,VP0、VP3和VP1的序列分别为:SEQ ID No.1、SEQ ID No.3和 SEQ ID No.2.;

(2) 4 $^{\circ}\text{C}$ 4000 r/min离心30 min收集菌体,超声破碎20~24 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 11000 r/min离心30 min收集上清;

(3) 将上清与已平衡好的Ni²⁺亲和层析柱于4 $^{\circ}\text{C}$ 结合1 h,弃掉流穿液,先用10个柱体积Buffer A洗液洗脱杂蛋白,Buffer A洗液为20mM Tris-HCl,500mM NaCl,20mM咪唑,3% TritonX-100,pH=8.0,然后Buffer B洗液将目的蛋白洗脱,Buffer B洗液为20mM Tris-HCl,500mM NaCl,500mM咪唑,3% TritonX-100,pH 8.0;

(4) 收集洗脱液,然后用SDS-PAGE电泳实验鉴定得到的蛋白,测定蛋白浓度后于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用;

1.2 VLPs的体外组装

将带有His-SUMO标签的目的蛋白与SUMO酶按100:1的比例于透析袋中,在500 mL的酶切缓冲液中,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜酶切和组装,收集VLPs,进行SDS-PAGE和WB鉴定,于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用;

将VLPs室温吸附到碳膜包被的铜网上5min,用滤纸吸去铜网上多余的液体,用3%的磷酸钨负染5 min后,滤纸吸去多余液体,最后在透射电镜下观察样品VLPs,大小20-40nm,DLS检测的VLPs直径与TEM的一致。

2. 权利要求1所述的C型口蹄疫病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒,其特征在于HRP直接标记在跟被检抗体同时作用的竞争性抗体上,其制备过程包括:用C型口蹄疫病毒样颗粒免疫兔,免疫结束后,从兔心脏采血,分离血清并用Protein A亲和层析法分离纯化得到IgG,采用过碘酸钠方法将HRP标记到IgG上。

3. 根据权利要求1或2所述的C型口蹄疫病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒,其特征在于其中的酶标板制备是用0.05% pH=9.6的碳酸盐包被缓冲液将C型FMDV VLPs稀释为5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,以每孔100 μL 的量加入酶标板,4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜,洗涤液洗板3次;加入以酶标板稳定剂配制的含1%BSA封闭液,每孔120 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱封闭1 h,洗板3次,干燥,真空包装。

一种基于病毒样颗粒的C型口蹄疫病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种C型口蹄疫病毒样颗粒的竞争ELISA抗体检测试剂盒。

背景技术

[0002] 口蹄疫 (Foot-and-mouth Disease, FMD) 是由口蹄疫病毒引起的人兽共患的一种急性、热性、高度接触性传染病, 传播迅速, 流行面广, 幼龄动物死亡率较高。FMDV属于小RNA病毒, 宿主范围广, 可通过多种途径传播, 造成世界范围内的大流行。其临床症状是在口腔黏膜、四肢下端及乳房等处皮肤形成水疱和烂斑。FMD流行给世界养殖业造成了巨大经济损失。目前, 国际动物卫生组织 (OIE) 将FMD列为法定上报传染病。FMDV具有多型性、易变异的特点, 根据其血清型特性, 可分为7个血清型, 即A型、O型、C型、SAT1型、SAT2型、SAT3型及Asia I型。C型口蹄疫最早于1962年被报道, 与其他各型口蹄疫相比流行范围较小, 目前仅在欧洲、南美、东非、北非、安哥拉以及南亚有报道。最近一次报道C型口蹄疫的爆发是2004年在巴西和肯尼亚。目前C型口蹄疫在我国还未见报道, 但是我国周边国家和地区的口蹄疫疫情很严重, 且有C型口蹄疫流行史, 这使得我国的口蹄疫防控局势异常严峻。因此, 快速、高效的诊断和监测技术对FMD的防控至关重要。

发明内容

[0003] 本发明提供一种可克服现有技术不足, 用于检测C型口蹄疫病毒抗体的竞争ELISA检测试剂盒及其制备方法。

[0004] 本发明的C型口蹄疫病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒内包括有: 包被C型口蹄疫病毒样颗粒的酶标板、HRP标记的兔抗、含有吐温和磷酸盐缓冲液的样品稀释液和洗涤液、TMB底物、阳性对照血清、阴性对照血清、以及浓硫酸与水混合的终止液。

[0005] 本发明的C型口蹄疫病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒制备方法是将HRP直接标记在跟被检抗体同时作用的竞争性抗体上, 其制备过程包括: 用C型口蹄疫病毒样颗粒免疫兔, 免疫结束后, 从兔心脏采血, 分离血清并用ProteinA亲和层析法分离纯化得到IgG, 采用过碘酸钠方法将HRP标记到IgG上。

[0006] 优选地, 本发明的C型口蹄疫病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒制备方法, 其内酶标板包被的C型口蹄疫病毒样颗粒是由C型口蹄疫病毒的结构蛋白VP0、VP1和VP3组装而成, VP0、VP1和VP3的序列分别为SEQ ID No.1、SEQ ID No.2和SEQ ID No.3。

[0007] 优选地, 本发明的C型口蹄疫病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒制备方法, 其酶标板制备是用0.05% (pH=9.6) 的碳酸盐包被缓冲液将C型FMDV VLPs稀释为5 μ g/mL, 以每孔100 μ L的量加入酶标板, 4 $^{\circ}$ C包被过夜, 洗涤液洗板3次; 加入以酶标板稳定剂配制的含1%BSA封闭液, 每孔120 μ L, 37 $^{\circ}$ C恒温箱封闭1h, 洗板3次, 干燥, 真空包装。

[0008] 病毒样颗粒 (VLPs) 是由口蹄疫病毒的结构蛋白 (VP1、VP2和VP3) 组装形成的空心颗粒, 具有和天然病毒粒子相同形态结构, 不含病毒遗传物质, 不能自主复制。同时结构蛋

白组装成VLPs时,通过各亚单位之间的相互作用可以形成单个蛋白不具有的立体构象。因此相对于全病毒和单个病毒蛋白,本发明以VLPs作为抗原检测抗体具有更好的安全性和免疫原性。

[0009] 目前已在不同的表达系统中成功表达出许多病毒的衣壳蛋白并检测到组装好的VLPs,这为VLPs作为ELISA试剂盒抗原和疫苗的利用及开发提供了条件。现在应用在疫苗研究方面的VLPs主要有:HPV、HEV、EV71、HBV、HCV、HIV。VLPs还可以通过融合表达或化学方法连接外源肽构建嵌合VLPs,以增强其作为预防和治疗性疫苗的潜力。VLPs可以替代天然病毒在免疫学检测中发挥重要的作用,有研究显示,以基因工程制备的HPV VLPs作抗原,通过ELISA方法检测HPV患者血清中的抗体,与HPV DNA检测结果一致。FMDV结构蛋白在体外可自组装成为VLP,以大肠杆菌表达系统表达的FMDV结构蛋白组装成的VLPs,具有良好的免疫原性,可以作为包被抗原建立用于C型FMDV抗体检测的诊断方法。

[0010] 本发明具有如下优点:

[0011] 1. 本发明首次用C型FMDV VLPs作为包被抗原,建立的竞争ELISA方法相对于传统的以灭活病毒为抗原的ELISA方法具有安全性高,特异性好的特点,可对血清中的C型FMDV的抗体水平进行快速检测。

[0012] 2. 本发明使用HRP标记竞争抗体,使得反应过程只需两步就可以完成,相对于专利CN105445457A、CN107064501A等ELISA方法用时短,操作简单,整个过程只需45分钟就可完成。

[0013] 3. 由于病毒的结构蛋白在组装成VLPs的过程中可以形成单个蛋白不具有的立体结构,且抗原位点重复展示,因此相对于蛋白或多肽使用VLPs作为包被抗原具有更高的敏感性和特异性,也可以有效的避免种属交叉反应。

[0014] 4. 本发明应用大肠杆菌表达系统表达病毒的衣壳蛋白组装VLPs,具有经济、廉价、易于推广的优点。

具体实施方式

[0015] 本发明以下结合实施例解说。

[0016] 1. C型FMD VLPs的制备

[0017] 1.1 目的蛋白的表达及纯化

[0018] (1) 将本实验室保存的C型阳性重组质粒p-SMK-VP0VP3和p-SMK-VP1共转化至感受态细胞BL21 (DE3) -RIL,表达菌按1:100的比例接种到含有10 μ g/mL卡那霉素、50 μ g/mL氨苄青霉素和25 μ g/mL氯霉素的经高压灭菌的新鲜LB液体培养基中,在37 $^{\circ}$ C、220r/min摇床上培养至菌液OD₆₀₀为0.6~0.8。加入终浓度为0.5mmol/L的IPTG,并于16 $^{\circ}$ C条件下诱导16h。

[0019] C型阳性重组质粒p-SMK-VP0VP3和p-SMK-VP1序列分别为:SEQ ID No.1、SEQ ID No.2和SEQ ID No.3。

[0020] (2) 4 $^{\circ}$ C 4000r/min离心30min收集菌体。超声破碎20~24min,4 $^{\circ}$ C 11000r/min离心30min收集上清。

[0021] (3) 将上清与已平衡好的Ni²⁺亲和层析柱于4 $^{\circ}$ C结合1h。弃掉流穿液,先用10个柱体积Buffer A洗液(20mM Tris-HCl,500mM NaCl,20mM咪唑,3% TritonX-100,pH=8.0)洗脱杂蛋白,然后Buffer B洗液(20mM Tris-HCl,500mM NaCl,500mM咪唑,3% TritonX-100,pH

8.0) 将目的蛋白洗脱,

[0022] (4) 收集洗脱液, 然后用SDS-PAGE电泳实验鉴定得到的蛋白。测定蛋白浓度后于-80℃保存备用。

[0023] 1.2 VLPs的体外组装

[0024] 将带有His-SUMO标签的目的蛋白与SUMO酶按100:1的比例于透析袋中, 在500mL的酶切缓冲液中, 4℃过夜酶切和组装。收集VLPs, 进行SDS-PAGE和WB鉴定, 于-80℃保存备用。

[0025] 将VLPs室温吸附到碳膜包被的铜网上5min, 用滤纸吸去铜网上多余的液体, 用3%的磷酸钨负染5min后, 滤纸吸去多余液体, 最后在透射电镜下观察样品VLPs, 大小约20-40nm, DLS检测的VLPs直径与TEM的基本一致。

[0026] 2. 高免血清的制备

[0027] 2.1 动物免疫

[0028] 将4只实验兔分为两组即A组(3只)和B组(1只), A组为实验组, B组为对照组, 以C型口蹄疫VLPs免疫兔子, 具体免疫方法见下表。每次免疫前于耳缘静脉处采血, 测定效价。最后一次抗原免疫后第14d, 从兔心脏采血, 分离血清, 经离心去掉细胞等组织碎片后, 分装保存-80℃备用。

	免疫接种	抗原形式	注射剂量	注射部位
	一免	完全佐剂 +C-VLPs	0.2mg/只	脊部、颈部皮下多点注射
[0029]	二免(一免后14d)	不完全佐剂 +C-VLPs	0.2mg/只	脊部、颈部皮下多点注射
	三免(一免后28d)	不完全佐剂 +C-VLPs	0.2mg/只	脊部、颈部皮下多点注射
	四免(一免后42d)	完全佐剂 +C-VLPs	0.2mg/只	脊部、颈部皮下多点注射

[0030] 2.2 IgG的纯化和HRP标记

[0031] 2.2.1 IgG的纯化

[0032] 将制备的高免血清用PBS按1:1比例稀释, 用0.22μm的过滤器过滤后用proteinA柱子在目标蛋白快速分离系统分离纯化IgG, 经过SDS-PAGE和ELISA方法鉴定。

[0033] 2.2.2 简易过碘酸钠法进行HRP标记

[0034] 将5mg HRP溶于0.5mL蒸馏水中, 加入新配制的0.5mL 0.1M的过碘酸钠, 混匀, 4℃静置30min。加入0.16M乙二醇溶液, 混匀, 室温静置30min。然后加入含5mg IgG的水溶液1mL, 混匀, 装入透析袋, 在pH=9.5的碳酸盐缓冲液中4℃透析过夜。加入0.2mL新配的5mg/mL的硼氢化钠溶液, 混匀, 4℃静置2h。在液体中逐滴加入等体积的饱和硫酸铵, 4℃静置1h。3000r/min离心30min, 弃上清, 将沉淀溶于少量0.015M pH=7.4的PBS中, 通过透析去除铵离子。10000r/min离心30min, 去除沉淀, 上清液即为酶结合物, 检测HRP-IgG的效价, 分装, -20℃保存备用。

[0035] 3. 竞争ELISA方法的建立

[0036] 3.1 ELISA方法的建立及条件优化:

[0037] 3.1.1应用Bradford蛋白定量试剂盒检测浓缩蛋白的浓度

[0038] 首先将标准品 (1mg/mL的BSA) 稀释成浓度为0、50、100、150、200、250、300、350μg/mL的BSA,在酶标板上每孔加入20μL稀释成不同浓度的BSA标准品,做2个重复孔,之后每孔加入200μLBradford试剂,混匀后室温放置5-10min,用酶标仪测定595nm的吸光值,绘制标准曲线。然后将待测蛋白样品用去离子水稀释至适当浓度,按上述方法测定样品595nm的吸光值,并计算样品蛋白浓度。

[0039] 3.1.2最佳抗原包被量和酶标抗体稀释度的确定

[0040] 用0.05% pH 9.6的碳酸盐缓冲液将定量后的VLPs稀释为1、5、10、15、20μg/mL,4℃过夜包被,然后用1%BSA 37℃封闭1h。加入待检阴、阳性血清原液50μL,将酶标抗体按1:10000、1:12000、1:14000、1:16000、1:18000加入50μL,置于37℃作用30min,洗涤,每孔加入50μL的TMB,置于37℃显色15min后,每孔加入50μL终止液 (2M H₂SO₄),酶标仪上于450nm检测其OD值,依据P/N值确定最佳抗原包被浓度为5μg/mL和酶标抗体稀释度1:14000。

[0041] 3.1.3血清和酶标抗体最佳作用时间的确定

[0042] 按3.1.1确定的最佳抗原包被板子,酶标抗体按最佳稀释度与血清在37℃条件下作用15、30、45、60、90min,在确保其他条件保持不变的情况下检测其OD值,依据P/N值确定最佳作用时间为37℃30min。

[0043] 3.1.4最佳封闭液的确定

[0044] 在确定的最佳反应条件的基础上分别用5% milk、5% 马血清、1%BSA、5%明胶作为封闭液,在确保其他条件保持不变的情况下依据P/N值确定最佳封闭液为1%BSA。

[0045] 3.1.5抗原包被时间及温度的优化

[0046] 将抗原用最佳包浓度分别于4℃过夜包被、37℃包被1h、37℃包被1.5h、37℃包被2h、37℃包被2.5h、37℃包被3h,在其他条件相同的情况下,检测各待检血清,根据P/N值确定抗原最佳作用时间及温度为4℃包被过夜。

[0047] 3.1.6封闭液作用时间及温度的优化

[0048] 用最佳封闭液对包被好的酶标板分别封闭,即37℃封闭30min、37℃封闭60min、37℃封闭90min、37℃封闭120min。其他条件不变的情况下,检测各种待检血清,根据P/N值确定封闭液最佳作用时间及温度为37℃封闭30min。

[0049] 3.1.7最佳显色时间的确定

[0050] 在其他条件保持在最佳状态时,加入TMB底物溶液,于37℃避光反应5、10、15、20min,根据P/N值确定最佳底物显色时间为15min。

[0051] 3.1.8竞争ELISA方法的阴阳性判定标准的建立

[0052] 用建立的ELISA方法检测100份已确定阴阳性的猪血清,依据统计结果确定阴阳性判定标准为:PI=35%,即当血清PI≥35%时,判为阳性,当血清PI<35%时,判为阴性。

[0053]
$$\text{抑制率(PI)} = 100\% - \frac{\text{被检血清的 OD 值}}{\text{病毒抗原对照平均 OD 值}} \times 100\%$$

[0054] 3.1.9交叉反应试验

[0055] 以建立的竞争ELISA方法检测PCV2、PRRSV、PPV、A型FMDV、O型FMDV和C型FMDV阳性血清,确定此方法不与其他病原体抗体发生阳性反应。

[0056] 3.1.10敏感性、特异性和符合率试验

[0057] 分别用已建立竞争ELISA方法和商品试剂盒检测172份猪血清样本,并对检测结果进行对比,分析该方法的敏感性、特异性和这两种试剂盒的符合率。结果显示本实验建立的竞争ELISA方法的特异性为98.5%,敏感性为94.7%,符合率为96.3%。

$$[0058] \quad \text{敏感性} = \frac{\text{阳性数}}{(\text{阳性数} + \text{假阴性数})} \times 100\%$$

$$[0059] \quad \text{特异性} = \frac{\text{阴性数}}{(\text{阴性数} + \text{假阳性数})} \times 100\%$$

$$[0060] \quad \text{符合率} = \frac{(\text{阳性数} + \text{阴性数})}{\text{总数}} \times 100\%$$

[0061] 3.1.11批内、批间重复性试验

[0062] 分别用同一批次内和不同批次组装的试剂盒检测10份猪血清样本,结果显示批内和批间变异系数均小于5%,说明本试验建立的诊断方法具有良好的重复性。

[0063] 3.2试剂盒的制备

[0064] 3.2.1酶标板的制备:

[0065] 以0.05M pH=9.6的碳酸盐缓冲液将抗原VLPs按最佳包被浓度(25μg/mL)稀释,每孔100μL均匀的包被在酶标板孔上,4℃过夜;然后每孔加入300μL PBST洗涤液洗板3次,拍干后,每孔加入120μL的1%BSA,37℃封闭1h;用PBST洗涤液洗板3次,拍干备用。

[0066] 3.2.2辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗IgG酶结合物的制备:

[0067] 以实验室制备的C型FMDV VLPs免疫新西兰大白兔制备高免血清,经Protein A纯化柱纯化IgG,然后利用简易过碘酸钠法进行HRP标记,获得HRP-IgG。

[0068] 3.2.3试剂盒其他溶液配制:

[0069] ①洗涤液:在1000mL的0.01M PBS溶液中加入1mL吐温-20(Tween-20);②酶底物:底物TMB购置SURMODICS™公司;③终止液:取54.34mL浓度为98%的浓硫酸加蒸馏水至1000mL可得。

[0070] 4.C型FMDVVLPs竞争ELISA抗体检测试剂盒的操作步骤:

[0071] 将待检测血清样本每孔50μL加入酶标板,同时加入阳性和阴性对照液,每孔建议设置2孔,再同时往每孔加入50μL按最佳稀释比例(1:14000)稀释的酶标抗体,混匀。置于37℃恒温箱中作用30min,每孔加入300μL洗涤液洗板3次,拍干,再每孔加入50μL酶底物溶液,37℃避光显色15min,加入终止液50μL。最后在酶标仪测定450nm处各样品吸收值。

[0072] 结果判定:当被检血清的PI≥35%时,可判定为阳性;当被检血清PI<35%时,可判定为阴性。

[0001]	序列表						
[0002]	<110>	中国农业科学院兰州兽医研究所					
[0003]	<120>	一种基于病毒样颗粒的C型口蹄疫病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒					
[0004]	<160>	3					
[0005]	<170>	SIP0SequenceListing 1.0					
[0006]	<210>	1					
[0007]	<211>	936					
[0008]	<212>	DNA					
[0009]	<213>	C型口蹄疫病毒结构蛋白 (VP0)					
[0010]	<400>	1					
[0011]	ggatgaagtc	actgaggtgg	agctgggcaa	tccagcccag	cgaccggttc	acagaaccaa	60
[0012]	tctggcaaca	ctggcagcat	aattaacaac	tactatatgc	agcagtacca	aaactccatg	120
[0013]	gacacacaac	tcggcgacaa	cgccatcagt	ggaggtcca	atgaaggctc	cacggacaca	180
[0014]	acctctacac	acacaaccaa	caccagaac	aacgactggg	tttccaaact	tgccagttca	240
[0015]	gccttcagcg	gtcttttcgg	cgcccttctc	gctgataaga	aaacggagga	aaccactctc	300
[0016]	cttgaagacc	gcattctcac	taccgtaac	gggcacacga	cctcgacaac	ccagtcgagc	360
[0017]	gtcggagtca	cattcgggta	tgcaaccgct	gaagatagca	cgtctggacc	caatacatct	420
[0018]	ggtctagaga	cgcgcgttca	tcaggcagag	aggtttttca	aatggcact	ttttgattgg	480
[0019]	gttccttcac	aaaattttgg	acacatgcac	aaggttggtc	tgccccacga	acaaaaggt	540
[0020]	gtttacgggg	gtctcgtcaa	gtcatacgcg	tacatgcgca	atggctggga	cgtcgaggtg	600
[0021]	accgctgttg	gaaaccagtt	caacggcggt	tgccctctgg	tggcgctcgt	ccccgagatg	660
[0022]	gacgacatca	gtgacaggga	aaagtaccaa	ctaactcttt	acccccacca	gttcatcaac	720
[0023]	ccacgcacca	acatgacggc	acacatcact	gtgccctatg	tgggtgtcaa	caggtatgac	780
[0024]	cagtacaaac	agcacaggcc	ctggaccctc	gtggtcatgg	ttgtcgcgcc	actcaccaca	840
[0025]	aacacagcag	gtgcccacaa	gatcaaagtg	tatgccaaca	tagccccaac	caacgtgcac	900
[0026]	gtggcgggtg	agctcccctc	caaggagtaa	ggatcc			936
[0027]	<210>	2					
[0028]	<211>	654					
[0029]	<212>	DNA					
[0030]	<213>	C型口蹄疫病毒结构蛋白 (VP1)					
[0031]	<400>	2					
[0032]	ggatgaagtc	actgaggtac	tacgaccact	ggtgaatctg	ctgaccccggt	caccactacc	60
[0033]	gttgagaact	acggaggaga	gactcaggtc	caacgtcgcc	accacaccga	cgttgccttc	120
[0034]	gttcttgacc	ggtttgtgga	ggtcacagtg	tcggataacc	aacacacact	cgacgtgatg	180
[0035]	caggcacaca	aagacaatat	cgtgggcgcg	cttcttcgcg	cagccacgta	ctatctttct	240
[0036]	gattttgaaa	tagcagtgc	ccacactggg	aagctcacat	gggtgcccac	cggtgcacca	300
[0037]	gtttctgcac	ttaacaacac	aaccaatccc	actgcctacc	acaagggccc	ggtgactcga	360
[0038]	ctggctctcc	catacaccgc	gccacaccgt	gtgttggtta	cggcgtacac	tggcactacg	420

[0039]	acctacaccg ccagtgacag cggggattcg gctcacctaa cgacgacgca tgctcggcat	480
[0040]	ttgccgacat cgttcaactt tgggtgcagtt aaagcagaaa caatcactga gttgctcgtg	540
[0041]	cgcatgaagc gtgctgaact ctattgtcct aggccgattc ttccgattca gccaacgggc	600
[0042]	gatagacgca agcaacagct cgtcgcacct gcaaaacaac tgctgtaagg atcc	654
[0043]	<210> 3	
[0044]	<211> 677	
[0045]	<212> DNA	
[0046]	<213> C型口蹄疫病毒结构蛋白 (VP3)	
[0047]	<400> 3	
[0048]	ggtctcaagg tgggatcttc cccgttgcgt gttctgacgg ttacggcaac atggtgacaa	60
[0049]	ctgacccgaa aacggctgac cccgtctacg ggaaggttta caacccccct cggactgctc	120
[0050]	tgccggggcg gttcacaaac tacctggatg ttgccgaggc ttgtcccacc ttcctgatgt	180
[0051]	tcgagaacgt accttaagtc tcaacacgaa ctgacgggca aaggctactg gccaagttcg	240
[0052]	acgtgtcgtt ggcagcgaaa cacatgtcaa acacctactt ggccggtttg gccagttact	300
[0053]	acacacagta caccgggaca atcaacctac acttcatgtt cactggggcg accgacgcga	360
[0054]	aagctcggtt catggtggcg tacgtgcccc ctggcatgga cgcaccagac aaccagaag	420
[0055]	aggctgcccc ctgcatacac gcagaatggg aacttggtct gaactccaag ttcacgtttt	480
[0056]	caatcccgtt catctcggcc gctgactacg cgtacaccgc gtcccacaag gctgaaacaa	540
[0057]	caagtgtaca ggggtgggtc tgtgtgtacc aaatcactca cggcaaggca gacgccgacg	600
[0058]	cgctcgtcgt ctccgcatca gcggggaaag actttgagct ccggctacct gtggacgcta	660
[0059]	gaaaacaata aggatcc	677