

权 利 要 求 书

1、一种牦牛源轮状病毒重组 VP6 蛋白抗原，其特征在于，牦牛源轮状病毒重组 VP6 蛋白抗原由重组载体质粒 pET-28H-VP6 质粒转化 Rosetta (DE3) 菌株中表达；其中重组载体质粒 pET-28H-VP6 含有牦牛源轮状病毒 VP6 基因；

所述抗原的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 或 SEQ ID NO.2 所示，所述抗原的氨基酸序列如 SEQ ID NO.3 所示。

~~2、根据权利要求 1 所述的牦牛源轮状病毒重组 VP6 蛋白抗原，其特征在于，所述的牦牛源轮状病毒重组 VP6 蛋白通过以下方法制备得到：提取病毒核酸后进行 RT-PCR，拼接扩增序列，得到序列表中 SEQ ID NO.1 的 DNA 序列；对该基因序列进行优化，5' 增加酶切位点 BamH I，3' 增加酶切位点 Xho I，His 标签在 N 端，然后合成整个序列；将合成的全序列与 pET-28H 载体分别酶切后连接转化 TOP10 感受态，获得 pET-28H-VP6 质粒；将所得到的重组原核表达载体 pET-28H-VP6 转化大肠杆菌 Rosetta(DE3)感受态细胞，用终浓度为 0.8mM 的 IPTG 于 37℃诱导重组 VP6 蛋白的表达 16h，将所表达的蛋白回收并纯化即得。~~

~~3、根据权利要求 2 所述的牦牛源轮状病毒重组 VP6 蛋白抗原，其特征在于，PCR 反应的拼接引物共 2 条引物：两端酶切位点分别是 BamH1 和 Xho1，其序列分别如 SEQ ID NO.4- SEQ ID NO.5 所示。~~

~~42、一种基于牦牛源轮状病毒重组 VP6 蛋白用于制备间接 ELISA 检测方法的包被抗原中的应用一种基于牦牛源轮状病毒重组 VP6 蛋白的间接 ELISA 检测方法，其特征在于，包括以下步骤：0.1μg 权利要求 1-3 中任一权利要求所述的牦牛源轮状病毒重组 VP6 蛋白包被酶标板，37℃孵育 2h；PBST 洗涤后加入 4%PEG6000 封闭 30min；PBST 洗涤后加入 1:1400 稀释的血清，37℃孵育 2h；PBST 洗涤后加入 1:2300 稀释的酶标二抗，37℃孵育 30min；PBST 洗涤后加入显色液，37℃避光显色 10min，加入终止液在 450nm 处读取 OD₄₅₀。~~该应用用于非诊断目的；

~~5、根据权利要求 4 所述的间接 ELISA 检测方法，其特征在于，所述牦牛源轮状病毒重组 VP6 蛋白的包被浓度为 1μg/ml。~~

63、根据权利要求 42 所述的间接 ELISA 检测方法，其特征在于，血清稀释浓度为 1:1400，酶标二抗稀释浓度为 1:2300。

74、一种利用权利要求 1 所述的牦牛源轮状病毒重组 VP6 蛋白生产的亚单位疫苗。

5 85、根据权利要求 74 所述的亚单位疫苗，其特征在于，用权利要求 1 所述的牦牛源轮状病毒重组 VP6 蛋白作为抗原，粘膜佐剂作为佐剂，以滴鼻的方式免疫 BALB/c 成年雌鼠，刺激母鼠体内产生了高水平的血清 IgG 抗体；用牛轮状病毒同时对免疫母鼠所生乳鼠和未免疫母鼠所生乳鼠灌胃攻毒，证实母源抗体传递给乳鼠，免疫母鼠为乳鼠提供保护。

10 96、权利要求 85 所述的牦牛源轮状病毒重组 VP6 蛋白生产的亚单位疫苗在制备预防轮状病毒引起的幼龄动物腹泻药物中的应用。