

权 利 要 求 书

1、一种制备牛纽布病毒重组 VP1 基因蛋白的方法，其特征在于：包括：

(1) 提取牛纽布病毒核酸后进行 RT-PCR，拼接扩增序列，然后进行优化，得到 SEQ ID NO: 3 所示的核酸序列，在其 5' 增加酶切位点 Nde I，3' 增加酶切位点 Xho I，N 端添加 His 标签，Nde I 和 Xho I 位点序列为 CATATG 和 CTCGAG，合成整个序列；

(2) 将步骤(1)得到的核酸序列与 pET-28H 载体分别酶切后连接转化 TOP10 感受态，获得重组原核表达载体 pET-28H-VP1；

(3) pET-28H-VP1 表达质粒转化 BL21，涂布 LB 固体培养基，于恒温培养箱中 37℃ 过夜培养；再挑单克隆菌落接入 LB 液体培养基于 37℃ 振摇培养 10h；

(4) 步骤(3)获得的菌种接入 LB 液体培养基，37℃ 振摇培养至 OD 为 0.6~0.8 时，加入终浓度为 0.5mmol/L 的 IPTG，于 37℃ 诱导 6h，离心收集菌体，加入 PBS 重悬，超声破碎、离心后分别收集上清和沉淀，沉淀用包涵体溶解液溶解；

所述包涵体溶解液按照终浓度的组成为：8mol/L Urea，50mmol/L Tris-HCl，300mmol/L NaCl，pH8.0；

(5) 采用 HisCap 6FF 镍离子纯化柱对步骤(4)获得的沉淀-包涵体溶解液进行纯化，收集到的组分依次经 6 mol/L、4 mol/L、2 mol/L、0mol/L 尿素梯度透析复性，最终透析至含有终浓度为 50mmol/L Tris、300mmol/L NaCl、pH8.0 的溶液中，经过 PEG20000 浓缩，0.45 μm 滤膜过滤，得到牛纽布病毒重组 VP1 基因蛋白。

2、一种牛纽布病毒抗体检测试剂盒，其特征在于：包括权利要求 1 所述方法制备得到的牛纽布病毒重组 VP1 基因蛋白。