



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112852840 A

(43) 申请公布日 2021.05.28

(21) 申请号 202110074945.8

(22) 申请日 2021.01.20

(71) 申请人 西南民族大学

地址 610041 四川省成都市武侯区一环路  
南四段16号

(72) 发明人 汤承 岳华 王远微 王珍贤

(74) 专利代理机构 成都天汇致远知识产权代理  
事务所(普通合伙) 51264

代理人 韩晓银

(51) Int. Cl.

C12N 15/40 (2006.01)

C07K 14/08 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

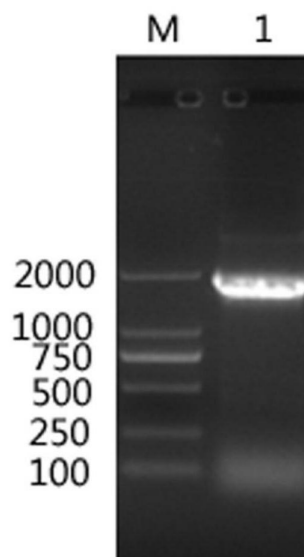
权利要求书1页 说明书11页  
序列表4页 附图3页

(54) 发明名称

一种牛纽布病毒重组VP1基因、重组蛋白及其应用

(57) 摘要

本发明提供一种牛纽布病毒VP1基因、重组蛋白及其应用。所述VP1基因具有SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列。所述重组VP1基因蛋白氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。用以上氨基酸序列构建的原核表达系统可以短期内获得大量优良的重组蛋白,同时缩短了重组蛋白的表达时间、提高了重组蛋白的生产效率。用所表达的重组蛋白包被抗原,成功的建立了一种牛纽布病毒抗体的间接ELISA检测方法,并确定该方法的最佳条件,为免疫牛群抗体检测和进行流行病学调查提供了一种快速简便的血清学方法。



1. 一种牛纽布病毒VP1基因,其特征在于:具有SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列。
2. 一种牛纽布病毒重组VP1基因,其特征在于:是在SEQ ID NO:1所示的核酸序列基础上,在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;具有SEQ ID NO:3所示的核酸序列。
3. 根据权利要求2所述的一种牛纽布病毒重组VP1基因,其特征在于:所述Nde I位点序列为CATATG,所述Xho I位点序列为CTCGAG。
4. 一种牛纽布病毒重组VP1基因蛋白,其特征在于:具有如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。
5. 一种原核表达载体,其特征在于:可表达权利要求2或3所述的牛纽布病毒重组VP1基因蛋白。
6. 根据权利要求5所述的一种原核表达载体,其特征在于:所述原核表达载体为pET-28H-VP1,  
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,在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,合成整个序列,得到SEQ ID NO:3所示的核酸序列;
  - (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;
  - (3) 将所得到的重组原核表达载体转化大肠杆菌表达感受态细胞,用IPTG于20℃过夜诱导重组VP1基因蛋白表达,将所表达的蛋白回收并纯化即得。
7. 权利要求1所述的牛纽布病毒重组VP1基因或权利要求2或3所述的牛纽布病毒重组VP1基因蛋白在制备牛纽布病毒抗体检测试剂盒中的应用。
8. 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所述的牛纽布病毒重组VP1基因或权利要求2或3所述的牛纽布病毒重组VP1基因蛋白。
9. 一种非诊断目的牛纽布病毒抗体的间接ELISA检测方法,其特征在于:包括以下步骤:
  - (1) 包被抗原:将上述的重组VP1蛋白作为抗原,包被于酶标板中,4℃过夜;
  - (2) 洗涤酶标板:次日弃去包被液,用PBST洗涤多次;
  - (3) 封闭:加入封闭液于37℃封闭30min~2h;
  - (4) 洗涤酶标板:弃去封闭液,用PBST洗涤多次;
  - (5) 孵育一抗:将阴性和阳性血清分别稀释后加入酶标板中,37℃孵育30min~2h;
  - (6) 洗涤酶标板:弃去板中的液体,用PBST洗涤多次;
  - (7) 酶标二抗:将HRP标记的兔抗牛IgG稀释后于37℃酶标30min~2h;
  - (8) 洗涤酶标板:弃去板中的液体,用PBST洗涤多次;
  - (9) 显色:加入TMB显色液,37℃避光显色10~30 min;
  - (10) 终止:加入2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应;
  - (11) 读数:在酶标仪上读取D<sub>450nm</sub>值;试验设标准阳性、标准阴性血清对照。

## 一种牛纽布病毒重组VP1基因、重组蛋白及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于基因工程技术领域,具体涉及一种牛纽布病毒重组VP1基因、重组蛋白及其应用。

### 背景技术

[0002] Nebovirus (NeV) 是杯状病毒科 (Caliciviridae) 纽布病毒属 (Nebovirus) 的唯一成员,为无囊膜的单股正链RNA病毒,目前尚无NeV分离培养体系,但通过排除了其他病毒的含NeV腹泻粪便无菌处理后感染新生无菌小牛,引起肠道损伤(尤其在十二指肠和空肠最严重)和严重腹泻,证明其是致腹泻病毒。目前该病毒已在巴西,意大利,美国等12个国家的犊牛腹泻粪便样本中检出,检出率为3.0%~25.2%。本实验室证实,在国内奶牛和牦牛中存在的NeV是国内致牛腹泻的新发病毒;本实验室进一步对新疆维吾尔自治区、四川、辽宁、河南、山东和陕西等省的奶牛、牦牛流行病学调查结果显示,奶牛腹泻样本中 NeV核酸平均检出率为48.1%,显著高于健康粪便样本5.7%的检出率;西藏、四川和云南等省区牦牛腹泻粪便样本中NeV核酸平均检出率为22.0%,场阳性检出率为69.1%。上述结果表明该病毒已经在我国部分地区奶牛和牦牛中广泛流行且与腹泻密切相关。

[0003] VP1是NeV的主要结构蛋白,由ORF1编码,大小为549aa或548aa,由围绕RNA基因组形成衣壳内部的S结构域和从衣壳出发并包含二聚体接触的拱状突起的P结构域组成。P结构域进一步分为相对保守的P1结构和高度突变的P2 结构域,P2结构域含有受体结合位点,参与受体识别并在启动宿主免疫反应中发挥重要作用。目前关于NeV VP1蛋白功能研究的报道仅有一篇,但对人诺如病毒、兔出血症病毒等其它杯状病毒的研究表明,VP1不仅参与受体结合,且诱导中和抗体产生,表明VP1在病毒的感染和免疫过程中起重要作用。

[0004] 目前关于NeV VP1表达和应用的报道很少。2013年ThomasC等人利用昆虫细胞-杆状病毒表达系统构建NeV VP1的病毒样颗粒(Virus-like particles, VLPs),将其作抗原建立了检测抗体的间接ELISA方法;2018年Cho EH等人利用VLPs证实NeV衣壳蛋白能与组织血型抗原(histo-blood group antigens, HBGAs)结合,参与受体识别。尚无操作简单、成本低廉的原核表达的NeV VP1 蛋白制备与应用的报道。

[0005] 目前对于NeV的筛查、检测多应用病原学检测方法如RT-PCR,方法涉及核酸提取耗时、操作繁复且不适合大量操作;缺乏一种用于大量筛选含有纽布病毒抗体的血清学检测方法,限制了对NeV及相关抗体研究的开展。

### 发明内容

[0006] 有鉴于此,本发明旨在提供一种牛纽布病毒VP1基因、重组蛋白及其应用以解决上述问题。该重组蛋白特异性高,易纯化制备、成本低,可作为抗原能够简便、快速、准确的检测出待测血液样品中的纽布病毒抗体。本发明的技术方案为:

[0007] 第一个方面,本发明公开了一种牛纽布病毒VP1基因,具有SEQ ID NO:1 所示的核酸序列。

[0008] 第二个方面,本发明公开了一种牛纽布病毒重组VP1基因,是在SEQ ID NO:1所示的核酸序列基础上,在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;具有SEQ ID NO:3所示的核酸序列。

[0009] 进一步地,所述Nde I位点序列为CATATG,所述Xho I位点序列为 CTCGAG。

[0010] 第三个方面,本发明还公开了一种牛纽布病毒重组VP1基因蛋白,具有如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。

[0011] 第三个方面,本发明还公开了一种可表达上述牛纽布病毒重组VP1基因蛋白的原核表达载体。

[0012] 进一步地,所述的原核表达载体为pET-28H-VP1。

[0013] 第四个方面,本发明还公开了一种制备牛纽布病毒重组VP1基因蛋白的方法,包括:

[0014] (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,在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,合成整个序列,得到SEQ ID NO:3所示的核酸序列;

[0015] (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;

[0016] (3) 将所得到的重组原核表达载体转化大肠杆菌表达感受态细胞,用 IPTG于20℃过夜诱导重组VP1基因蛋白表达,将所表达的蛋白回收并纯化即得。

[0017] 第五个方面,本发明还公开了上述牛纽布病毒重组VP1基因或牛纽布病毒重组VP1基因蛋白在制备牛纽布病毒抗体检测试剂盒中的应用。

[0018] 第六个方面,本发明公开了一种牛纽布病毒抗体检测试剂盒,包括上述牛纽布病毒重组VP1基因或牛纽布病毒重组VP1基因蛋白。

[0019] 第七个方面,本发明还公开了一种非诊断目的的牛纽布病毒抗体的间接 ELISA检测方法,包括以下步骤:

[0020] (1) 包被抗原:将上述的重组VP1蛋白作为抗原,包被于酶标板中,4℃过夜;

[0021] (2) 洗涤酶标板:次日弃去包被液,用PBST洗涤多次;

[0022] (3) 封闭:加入封闭液于37℃封闭30min~2h;

[0023] (4) 洗涤酶标板:弃去封闭液,用PBST洗涤多次;

[0024] (5) 孵育一抗:将阴性和阳性血清分别稀释后加入酶标板中,37℃孵育 30min~2h;

[0025] (6) 洗涤酶标板:弃去板中的液体,用PBST洗涤多次;

[0026] (7) 酶标二抗:将HRP标记的兔抗牛IgG稀释后于37℃酶标30min~2h;

[0027] (8) 洗涤酶标板:弃去板中的液体,用PBST洗涤多次;

[0028] (9) 显色:加入TMB显色液,37℃避光显色10~30min;

[0029] (10) 终止:加入2mol/L  $H_2SO_4$ 终止反应;

[0030] (11) 读数:在酶标仪上读取 $D_{450nm}$ 值;试验设标准阳性、标准阴性血清对照。

[0031] 进一步的,所述步骤(1)中包被的控制参数为:采用的包被液为磷酸盐、碳酸盐或Tris-HCl缓冲液中的一种,抗原的包被浓度为0.5-2 $\mu$ g/ml。

[0032] 优选地,所述步骤(1)中包被的控制参数为:采用的包被液为pH7.6的磷酸盐缓冲

液,抗原的包被浓度为0.5 $\mu$ g/ml。

[0033] 优选地,所述步骤(2)中封闭液为4%PEG6000,封闭时间为30min。

[0034] 优选地,所述步骤(5)中稀释阴性和阳性血清采用1%BSA,稀释度均为 1:750,孵育时间为1h。

[0035] 优选地,所述步骤(7)中稀释兔抗牛IgG采用1%BSA,稀释度为1:4500,酶标时间为1h。

[0036] 优选地,所述步骤(9)中显色时间为25min。

[0037] 进一步地,所述步骤(11)中采用的标准阳性血清为牛纽布病毒阳性血清,标准阴性血清为胎牛标准阴性血清。

[0038] 与现有技术相比,本发明可以获得包括以下技术效果:

[0039] 1) 成本低:原核表达系统比真核系统更廉价。

[0040] 2) 易于推广:原核表达使用的试剂材料容易获得,且无需特殊仪器,在所有实验室均可操作,同时生产周期短,易于形成产业化的规模,适合推广使用。

[0041] 3) 更省时:本发明的表达菌株培养方式简单,培养周期短,可在几天时间内合成大量重组蛋白。

[0042] 4) 更高效:原核表达系统可以短期内获得大量优良的重组蛋白。抗原蛋白通过原核表达系统表达成包涵体,包涵体在变性条件下纯化,然后复性再折叠,再经过自我组装等过程而有效制备,弥补了原核表达系统缺少像真核系统重组蛋白表达后的修饰能力、不能产生正确的二硫键的缺点,同时缩短了重组蛋白的表达时间、提高了重组蛋白的生产效率。

[0043] 5) 更方便:在构建表达载体时,目的基因通常由临床样本或实验室培养物中直接扩增后克隆转化,扩增受样本处理方式和核酸浓度影响大同时需要一对可完全扩增目的基因的引物。本发明在已知基因序列的情况下,利用生物软件对基因序列进行了大肠杆菌偏爱密码子优化,将改造后的序列全序列合成,无需单独设计完全扩增目的基因的引物,避免了直接从临床样本或实验室培养物中扩增的对实验进程的影响,同时也便于对序列进行表达系统相应偏爱密码子优化和改造,有利于提高重组蛋白在表达系统中的产量和表达效率。

[0044] 6) 更安全:本发明是非复制型的,在机体内不增殖,不存在散毒危险。

## 附图说明

[0045] 此处所说明的附图用来提供对本发明的进一步理解,构成本发明的一部分,本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明,并不构成对本发明的不当限定。在附图中:

[0046] 图1是本发明牛纽布病毒重组VP1基因的重组表达质粒pET-28H-VP1鉴定结果,其中M表示DNA标准DL2000,1表示基因扩增产物。

[0047] 图2是本发明牛纽布病毒重组VP1基因蛋白表达形式分析结果,其中M表示蛋白质质量标准,1表示诱导前总蛋白,2表示20 $^{\circ}$ C上清,3表示20 $^{\circ}$ C沉淀,4 表示37 $^{\circ}$ C上清,5表示37 $^{\circ}$ C沉淀。

[0048] 图3是本发明纯化的牛纽布病毒重组VP1基因蛋白SDS-PAGE电泳结果,其中 M表示蛋白质质量标准,1表示上样液,2表示流出液,3表示20mmol/L Imidazole洗脱组分,4表示50mmol/L Imidazole洗脱组分,5表示500mmol/L Imidazole洗脱组分。

[0049] 图4是本发明牛纽布病毒重组VP1基因蛋白的Western blot检测结果,其中M 表示蛋白分子质量标准,1表示VP1蛋白。

[0050] 图5是本发明间接ELISA检测方法灵敏度试验结果图。

## 具体实施方式

[0051] 在本发明的描述中,需要说明的是,实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0052] 下面结合附图和具体的实施例对本发明做进一步详细说明,所述是对本发明的解释而不是限定。

### [0053] 实施例1

[0054] 本实施例提供一种制备牛纽布病毒重组VP1基因蛋白的方法,包括以下步骤:

[0055] 1、VP1基因的扩增:取适量由西南民族大学动物医学实验室保存的牛纽布 B0/LN-13/18/CH株病毒(GenBank登录号MH718898)核酸阳性的粪便样本,按常规方法提取总RNA并反转录合成cDNA,进行RT-PCR扩增,利用生物软件将基因片段拼接,获得一个完整的VP1基因的ORF序列,大小为1647bp,其核酸序列如SEQ ID NO:1所示,编码549个的氨基酸,其氨基酸序列由SEQ ID NO:2所示。

[0056] 2将获得的VP1基因序列进行优化,在不改变任何氨基酸情况下,使其密码子偏爱性接近大肠杆菌,优化后的VP1编码基因如SEQ ID No:3所示,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,然后将序列送至引物合成公司合成,Nde I和Xho I位点序列为CATATG和CTCGAG。将合成的序列作为模板Nde I和Xho I双酶切后,与同样经过Nde I和Xho I双酶切的pET-28H载体连接转化TOP10感受态。挑单克隆菌落,菌落PCR鉴定阳性克隆送测序。其核酸序列如SEQ ID NO.3所示,符合预期。证明成功获得了pET-28H-VP1表达质粒(如图1所示)。

[0057] 3、pET-28H-VP1表达质粒转化BL21 (DE3),涂布LB固体培养基(含卡那霉素30ug/ml),于恒温培养箱中37℃过夜培养。次日,挑单克隆菌落接入10mL LB液体培养基(含卡那霉素30ug/ml)中,37℃振摇培养10h。

[0058] 4、次日,菌种以1:100接入200mL LB液体培养基(含卡那霉素30ug/ml), 37℃振摇培养至OD约为0.6~0.8时,加入终浓度为0.5mmol/L的IPTG,一组 20℃诱导过夜,另一组37℃诱导6h,同时以不添加IPTG组作为阴性对照。离心收集菌体,以PBS 1:100 (W/V) 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(8mol/LUrea,50mmol/LTris-HCl,300mmol/LNaCl, pH8.0) 1:20 (W/V) 溶解,以12%的分离胶进行SDS-PAGE分析,结果显示 VP6融合蛋白以包涵体形式表达(如图2所示)。

[0059] 5、大量诱导表达NeV VP1重组蛋白,制备包涵体溶解液,按照镍琼脂糖亲和层析蛋白纯化说明书使用方法以5mL HisCap 6FF镍离子纯化柱进行纯化,以12%分离胶进行SDS-PAGE电泳(如图3所示)。收集到的组分进行SDS-PAGE 检测后,纯度最好的几组分经6mol/L、4mol/L、2mol/L、0mol/L尿素梯度透析复性,最终透析至50mmol/LTris,300mmol/LNaCl, pH8.0溶液中,经过 PEG20000浓缩,0.45μm滤膜过滤后分装1mL/管,-80℃冻存,按照BCA蛋白浓度测定试剂盒说明书使用方法进行复性后重组蛋白的浓度测定。

[0060] 6、取纯化后的重组蛋白样品,以12%的分离胶进行SDS-PAGE,然后将重组蛋白转移至硝酸纤维素膜,用5%脱脂牛奶进行封闭过夜处理;分别加入1:500 倍稀释的牛NeV阳性血清和胎牛血清,37℃摇床孵育2h,TBST洗涤3次,10min/ 次;加入1:5000倍稀释的HRP标记的兔抗牛二抗,37℃摇床孵育1h,TBST洗涤3次后进行ECL显色(如图4所示),结果显示目的蛋白约60kD,能被NeV 阳性血清所识别,证明重组VP1蛋白具有生物活性和良好的免疫原性。

[0061] 实施例2

[0062] 本实施例提供一种非诊断目的的牛纽布病毒抗体的间接ELISA检测方法,包括以下步骤:

[0063] 1ELISA操作流程

[0064] 将本发明重组VP1蛋白用50mmol/L pH 7.6的磷酸盐缓冲液稀释后包被于酶标板中,100μL/孔,4℃过夜。次日弃去包被液,用PBST洗涤3次,200μL/ 孔。加入2%牛血清白蛋白(BSA)作为封闭液,100μL/孔,7℃1h。弃去包被液,洗涤3次后将阴性和阳性血清用1%牛血清白蛋白(BSA) 分别按比例稀释后加入酶标板中,100μL/孔,37℃1h。弃去板中的液体,洗涤3次后加入用 1%牛血清白蛋白(BSA) 按一定比例稀释的HRP标记的兔抗牛IgG,100μL/孔,37℃1h。弃去板中的液体,洗涤3次后加入TMB显色液,100μL/孔,37℃避光显色20min,然后加入2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应,100μL/孔,在酶标仪上读取OD<sub>450nm</sub> 值,阳性对照的OD<sub>450nm</sub> 读值记为P,阴性对照的OD<sub>450nm</sub> 读值记为N。

[0065] 2重组蛋白包被浓度的确定

[0066] 纯化的重组蛋白稀释浓度为0.5,1,2μg/mL,阴性和阳性血清1:1000倍稀释,兔抗牛IgG HRP酶标抗体1:4000稀释,其余按ELISA操作流程操作,在酶标仪上读取OD<sub>450nm</sub> 值。结果见表1,以P/N最大作为优选依据,确定最适重组蛋白包被浓度为0.5μg/mL。

[0067] 表1抗原包被浓度筛选结果

[0068]	包被浓度	P1	P2	P	N1	N2	N	P/N
	0.5 μg/mL	2.930	2.981	2.956	0.069	0.068	0.069	<b>42.841</b>
	1 μg/mL	3.156	3.183	3.170	0.100	0.098	0.099	32.015
	2 μg/mL	3.450	3.400	3.425	0.128	0.140	0.134	25.560

[0069] 注:阳性对照的OD<sub>450nm</sub> 读值记为P,阴性对照的OD<sub>450nm</sub> 读值记为N,P1、P2 和N1、N2为同一样本平行试验结果,下表同。

[0070] 3方阵法确定待检血清最适工作浓度和酶标抗体最佳稀释度

[0071] 以最佳抗原包被量包被酶标板,将血清按1:500,1:750,1:1000,1:1250稀释,酶标二抗按1:3000,1:3500,1:4000,1:4500,1:500,1:5500稀释,其他按照优化后条件进行操作,在酶标仪上读取OD<sub>450nm</sub> 值。结果见图,以P/N最大作为优选依据,确定血清稀释浓度为1:750,HRP标记的酶标二抗稀释浓度为1:4 500(见表2)。

[0072] 表2一抗和酶标二抗最适工作浓度筛选结果

	一抗稀释 比例	OD <sub>450nm</sub>	酶标二抗稀释比例				
			1:3000	1:3500	1:4000	1:4500	1:5000
[0073]		P	3.942	3.871	3.806	3.477	3.264
	1:500	N	0.179	0.151	0.145	0.130	0.121
		P/N	22.022	25.636	26.248	26.746	26.950
[0074]		P	3.782	3.516	3.457	2.985	2.684
	1:750	N	0.167	0.14	0.129	0.107	0.100
		P/N	22.647	26.239	26.798	<b>27.897</b>	26.840
		P	3.696	3.479	3.229	2.922	2.579
	1:1000	N	0.158	0.132	0.133	0.110	0.106
		P/N	23.392	26.492	24.278	26.564	24.330
		P	3.467	3.358	3.206	2.654	2.452
	1:1250	N	0.152	0.138	0.127	0.128	0.108
		P/N	22.809	24.333	25.244	20.734	22.7044

[0075] 4包被液、封闭液、血清稀释液的优化

[0076] 50mmol/L pH 7.6的磷酸盐缓冲液、用50mmol/L pH 9.6碳酸盐缓冲液、50mmol/L pH 7.6Tris-HCl缓冲液和作为包被液；4%PEG6000、1%牛血清白蛋白 (BSA)、2%牛血清白蛋白 (BSA)、PBS和5%脱脂乳作为封闭液；1%BSA, PB S, PBST, 4%PEG6000作为血清稀释液，其他按照优化后条件分别进行操作，在酶标仪上读取OD<sub>450nm</sub>值。结果见表3、表4、表5，以P/N最大作为优选依据，50mmol/L pH 7.6磷酸盐缓冲液作为包被液，4%PEG6000作为封闭液，1% BSA为血清稀释液。

[0077] 表3包被液筛选结果

	包被液	P1	P2	P	N1	N2	N	P/N
[0078]	磷酸盐	3.183	3.124	3.154	0.078	0.077	0.078	<b>40.436</b>
	碳酸盐	2.885	2.828	2.857	0.083	0.080	0.082	34.841
	Tris-HCl	2.691	2.686	2.689	0.071	0.064	0.068	39.544

[0079] 表4封闭液筛选结果



[0080]

封闭液	P1	P2	P	N1	N2	N	P/N
4%PEG6000	3.329	3.383	3.356	0.099	0.085	0.092	<b>36.478</b>
1%BSA	3.237	3.207	3.222	0.094	0.090	0.092	35.022
2%BSA	3.254	3.057	3.156	0.089	0.094	0.092	34.304
PBS	3.251	3.338	3.295	0.092	0.089	0.091	36.209
5%脱脂乳	3.120	3.090	3.105	0.650	0.545	0.598	5.192

[0082]

表5血清稀释液筛选结果

稀释液	P1	P2	P	N1	N2	N	P/N
1%BSA	3.294	3.247	3.271	0.064	0.065	0.065	<b>50.315</b>
PBS	2.338	2.301	2.320	0.059	0.059	0.059	39.314
PBST	1.916	1.945	1.931	0.070	0.068	0.069	27.978
4%PEG6000	2.245	2.455	2.350	0.060	0.060	0.060	39.167

[0084]

5包被条件的选择

[0085]

包被条件分别按37℃ 2h后4℃过夜, 37℃ 1h后4℃过夜, 4℃过夜, 37℃ 2h, 37℃ 1h, 其他按照优化后条件进行操作, 在酶标仪上读取OD<sub>450nm</sub>值。结果见表6, 以P/N最大作为优选依据, 包被条件为4℃过夜。

[0086]

表6包被时间筛选结果

	37℃ 2h 后 4℃过夜		37℃ 1h 后 4℃过夜		4℃过夜		37℃ 2h		37℃ 1h	
	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N
复孔 1	2.964	0.068	2.858	0.063	2.852	0.057	2.686	0.064	2.579	0.067
复孔 2	2.855	0.063	2.702	0.068	2.856	0.063	2.691	0.071	2.403	0.072
平均值	2.910	0.066	2.780	0.066	2.854	0.060	2.689	0.068	2.491	0.070
P/N	44.420		42.443		<b>47.567</b>		39.830		35.842	

[0088]

[0089]

6封闭时间、血清温育时间、酶标抗体结合时间的选择

[0090]

封闭时间设为30min, 60min, 90min和120min; 血清温育时间分别设为 30min, 60min, 90min和120min; 酶标抗体作用时间分别设为30min, 60min, 90min和120min, 其他按照优化后条件分别进行操作, 在酶标仪上读取OD<sub>450nm</sub>值。结果见表7-9, 以P/N最大作为优选依据, 封闭时间为30min, 血清温育时间为1h, 酶标抗体结合时间为1h。

[0091] 表7封闭时间筛选结果

	30min		60min		90min		120min	
	P	N	P	N	P	N	P	N
复孔 1	3.534	0.091	3.237	0.090	2.298	0.072	3.003	0.078
复孔 2	3.419	0.089	3.207	0.089	2.227	0.072	3.010	0.077
平均值	3.477	0.090	3.222	0.090	2.263	0.072	3.007	0.078
P/N	<b>38.628</b>		35.800		31.431		38.551	

[0093] 表8血清温育时间筛选结果

	30min		60min		90min		120min	
	P	N	P	N	P	N	P	N
复孔 1	2.985	0.057	3.294	0.064	3.488	0.071	3.644	0.073
复孔 2	2.835	0.059	3.247	0.065	3.320	0.070	3.635	0.074
平均值	2.910	0.058	3.271	0.065	3.404	0.071	3.640	0.074
P/N	50.172		<b>50.705</b>		48.284		49.517	

[0095] 表9酶标抗体结合时间筛选结果

	30min		60min		90min		120min	
	P	N	P	N	P	N	P	N
复孔 1	1.964	0.081	3.268	0.118	3.563	0.149	3.617	0.210
复孔 2	2.105	0.079	3.069	0.109	3.424	0.147	3.540	0.234
平均值	2.035	0.080	3.169	0.114	3.494	0.148	3.579	0.222
P/N	25.431		<b>27.798</b>		23.605		16.122	

[0097] 7显色作用时间的选择

[0098] 显色作用时间分别设为15min,20min,25min,30min,其他按照优化后条件进行操作,在酶标仪上读取OD<sub>450nm</sub>值。结果见表10,以P/N最大作为优选依据,底物作用时间为25min。

[0099] 表10显色作用时间筛选结果

		10min		15min		20min		25min		30min	
		P	N	P	N	P	N	P	N	P	N
[0100]	复孔 1	2.135	0.086	2.620	0.096	3.268	0.118	3.283	0.098	3.239	0.104
	复孔 2	1.985	0.086	2.621	0.096	3.067	0.109	3.108	0.101	3.039	0.102
	平均值	2.060	0.086	2.621	0.096	3.168	0.114	3.196	0.100	3.139	0.103
	P/N	23.593		27.297		27.907		32.116		30.476	

[0101] 优化后的ELISA检测程序如下:纯化的重组蛋白用50mmol/L pH 7.6 Tris-HCl缓冲液稀释为0.5μg/mL后包被于酶标板中,100μL/孔,4℃包被过夜。弃去包被液,用PBST洗涤3次,200μL/孔。加入4%PEG6000,37℃封闭30min,100μL/孔,弃去包被液,洗涤3次后将阴性和阳性血清用1%BSA分别按1:750 比例稀释后加入酶标板中,100μL/孔,37℃1h。弃去板中的液体,洗涤3次后加入用1%BSA按1:4500稀释的HRP标记的兔抗牛IgG,100μL/孔,37℃1h。弃去板中的液体,洗涤3次后加入TMB显色液,100μL/孔,37℃25min,然后加入2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应,100μL/孔。

[0102] 8间接ELISA阴、阳性临界值的确定

[0103] 42份BCoV阴性血清样品中,用已建立的间接ELISA方法检测,求得这些样品的D<sub>450nm</sub>的平均值(X)和标准差(s),如果样品D<sub>450nm</sub>>X+3S,即判定为阳性;计算出OD<sub>450nm</sub>值的平均值(X)为0.124,标准差(S)为0.029,则X+3S=0.211。因此,在酶标仪上测定的OD<sub>450nm</sub>>0.211者判为阳性,OD<sub>450nm</sub><0.211者判为阴性。

[0104] 9特异性试验

[0105] 将包被好的酶标板分别加入牛冠状病毒(BCoV)、牛轮状病毒(BRV)、牛病毒性腹泻粘膜病毒(BVDV)、牛肠道病毒(BEV)、牛衣原体(CVM)的阳性血清为待检样品,同时分别设牛纽布病毒阳性和阴性血清对照,每种样品做2 个重复,依据OD<sub>450nm</sub><0.211者为无交叉反应。本次试验中待检样品的OD值均小于0.211(表11),说明重组VP1蛋白用作包被抗原建立的间接ELISA抗体检测方法具有良好的特异性,与牛冠状病毒、牛病毒性腹泻粘膜病毒、牛肠道病毒、牛衣原体、牛结核分枝杆菌无交叉反应。

[0106] 表11特异性实验结果

	待检血清	BCoV	BRV	BVDV	BEV	CVM
[0107]	复孔 1	0.055	0.095	0.050	0.067	0.086
	复孔 2	0.056	0.096	0.054	0.073	0.094

[0108] 10重复性试验

[0109] 10.1批内重复性试验用同一批的ELISA板,按优化后的条件对包括阴阳性血清在内的6份样品进行检测,重复4孔,根据变异系数(CV)判定批内重复性。由表12可以看出同一血清各孔间的变异系数值在0.246%~8.128%之间,小于10%,表明该方法的批内重复性

良好。

[0110] 10.2批间重复性试验在其他条件相同的情况下,用4次不同时间包被的反应板,对包括阴阳性血清在内的6份样品进行检测,根据变异系数(CV)判定批间重复性。由表13可以看出,批间重复试验的变异系数在2.729%~9.735%之间,小于10%,表明不同批次包被的酶标板对同一份血清的检测结果具有较好的重复性,所建的ELISA检测方法的稳定性良好。

[0111] 表12批内重复试验

		不同血清样本					
		1	2	3	4	5	6
[0112]	重复 1	0.564	1.466	0.233	1.528	3.103	0.123
	重复 2	0.541	1.497	0.199	1.542	3.099	0.104
	重复 3	0.504	1.489	0.210	1.466	3.094	0.107
	重复 4	0.524	1.592	0.212	1.464	3.112	0.105
	平均值	0.533	1.511	0.214	1.500	3.102	0.110
	标准差 S	0.025	0.056	0.014	0.041	0.008	0.009
	变异系数 CV	4.777%	3.678%	6.651%	2.722%	0.246%	8.128%

[0113] 表13批间重复试验

		不同血清样本					
		1	2	3	4	5	6
[0114]	重复 1	1.364	0.400	1.207	0.189	2.141	0.097
	重复 2	1.259	0.415	1.168	0.176	2.207	0.090
	重复 3	1.206	0.402	1.191	0.176	2.343	0.113
	重复 4	1.261	0.441	1.246	0.192	2.045	0.104
	平均值	1.273	0.415	1.203	0.183	2.184	0.101
	标准差 S	0.066	0.019	0.033	0.008	0.125	0.010
	变异系数 CV	5.195%	4.554%	2.729%	4.617%	5.730%	9.735%
[0115]	重复 1	1.364	0.400	1.207	0.189	2.141	0.097
	重复 2	1.259	0.415	1.168	0.176	2.207	0.090
	重复 3	1.206	0.402	1.191	0.176	2.343	0.113
	重复 4	1.261	0.441	1.246	0.192	2.045	0.104
	平均值	1.273	0.415	1.203	0.183	2.184	0.101
	标准差 S	0.066	0.019	0.033	0.008	0.125	0.010
	变异系数 CV	5.195%	4.554%	2.729%	4.617%	5.730%	9.735%

[0116] 11灵敏性试验

[0117] 对包括阴阳性血清在内的4份样品从最优稀释比例开始做倍比稀释后进行检测,检测结果为阴性的阳性血清的稀释倍数越大,本方法的灵敏度越好。检测结果如图5所示,当阳性血清1:12000稀释时,3份阳性血清检测结果仍为阳性,表明所建立的方法灵敏度高,具有较好的敏感性。

[0118] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不

不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

## 序列表

&lt;110&gt; 西南民族大学

&lt;120&gt; 一种牛纽布病毒重组VP1基因、重组蛋白及其应用

&lt;130&gt; 2021

&lt;141&gt; 2021-01-20

&lt;160&gt; 3

&lt;170&gt; SIP0SequenceListing 1.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1647

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 牛纽布病毒 (Bovine Nebovirus, NeV)

&lt;400&gt; 1

```

atgagtgaca acaaaagcat cccggagcaa caaatgagt catcgcgtgc gatggacgct 60
ggcgccaccg gctccgccgc agctgcccct gcccacctg tcgcggccgc accggctagt 120
ggcctggtgg gcgcgcttgt tgctgaaccc caatcaggcc cgagcactga acagtggcgg 180
actgcctaca cccttttcgg cactgtctcc tggaacgcta atgccggccc cgggacgata 240
ctcaccgtgg ggcggtctcg gccgggcatg aacccttaca cccaacacat agctgcaatg 300
tacggggggtt gggctggcgg catggacatc aggatcacca tcgctggatc tgggttcatt 360
ggcggcacac tcgccgttgc tgccattcca ccgggcgtgg acccagagag tgtcaatgtg 420
ctgcgcatgc cccatgtgct tattgatgct cgtggcggtg tgccacttga ggtgacgttg 480
gaggacatcc ggacatccct ttatcaccca atgggggaca ccaacaccgc gtcgctgggtg 540
atcgccgtca tgaccgggct tatcaacccc ctgggcaactg acaccctatc ggtcacagtc 600
caacttgaga ccagacccgg tcgtgactgg gtcttctttt cattgctgcc cccaccgca 660
ggcgtggcct cggctgaccc ctcacagctc ctaccagag tggccctcgc cacctcgcca 720
gaggtgcgct ttggcacggg ggttctcggc atccttgggc taccatcaaa cccatctgtc 780
aatcgcgctc acgacgtgca atcccgcacg cgtgggtgga gcttcccat ccctagctcc 840
agcgtgttta tgggggatgc caggaatgtt gagcataacc ggcggtcat ggttcaatcg 900
tcagcaccaa ataatcccct ttcagatgtt ttccccgacg gtttccgga ctttgtgccc 960
cagtcagaca ctgaaccgga tggcggcgct gtcacgccg gccaaagtgt cccgcatccg 1020
ggggacaatg acaacttctg gagactcacc ccagtgggtc gcggcaacac tacagcagcc 1080
atcaaacacca tcccagaacg gttcaaccaa gtgtatttca ttaacctcgc cgatgaggaa 1140
gccgtgagcg cggcgaccga ggagctgagg tttaatggta tccagggtat atttggccag 1200
cgcgccagag ggcgtgctgt tcaagtcatt caggggtatg tcccgcgggc cgagcacatc 1260
attcggcctg ctggattcgc cggcgtgggc ccgcaaggac ctaacgtgcc cattggcttt 1320
gctgggacta tgccaaactt caacgcaaca gccagcgggg cagatgacct ggtgcctgtc 1380
tgggggccta ccctggtgca caccgcctcc ttactggcag gcaccacgta cgagctggca 1440
gagaactcga tgtatgtgtt ctccgtgagc acatccactt ccaccttga gctcgcatg 1500
ctcgccaatg gaacctggct gggccccgca cagcttgctg gcacgggcat tacttgact 1560

```

```

gaagttcttt ctgtcaccta catgggaatg cgctttgcct acaaccccct gagtgggcaa 1620
ggcataggtg gtgaatccag gaggtta 1647
<210> 2
<211> 549
<212> PRT
<213> 牛纽布病毒 (Bovine Nebovirus,NeV)
<400> 2
Met Ser Asp Asn Lys Ser Ile Pro Glu Gln Gln Asn Glu Ser Ser Arg
1          5          10          15
Ala Met Asp Ala Gly Ala Thr Gly Ser Ala Ala Ala Ala Pro Ala Pro
20          25          30
Pro Val Ala Ala Ala Pro Ala Ser Gly Leu Val Gly Ala Leu Val Ala
35          40          45
Glu Pro Gln Ser Gly Pro Ser Thr Glu Gln Trp Arg Thr Ala Tyr Thr
50          55          60
Leu Phe Gly Thr Val Ser Trp Asn Ala Asn Ala Gly Pro Gly Thr Ile
65          70          75          80
Leu Thr Val Gly Arg Leu Gly Pro Gly Met Asn Pro Tyr Thr Gln His
85          90          95
Ile Ala Ala Met Tyr Gly Gly Trp Ala Gly Gly Met Asp Ile Arg Ile
100         105         110
Thr Ile Ala Gly Ser Gly Phe Ile Gly Gly Thr Leu Ala Val Ala Ala
115         120         125
Ile Pro Pro Gly Val Asp Pro Glu Ser Val Asn Val Leu Arg Met Pro
130         135         140
His Val Leu Ile Asp Ala Arg Gly Gly Val Pro Leu Glu Val Thr Leu
145         150         155         160
Glu Asp Ile Arg Thr Ser Leu Tyr His Pro Met Gly Asp Thr Asn Thr
165         170         175
Ala Ser Leu Val Ile Ala Val Met Thr Gly Leu Ile Asn Pro Leu Gly
180         185         190
Thr Asp Thr Leu Ser Val Thr Val Gln Leu Glu Thr Arg Pro Gly Arg
195         200         205
Asp Trp Val Phe Phe Ser Leu Leu Pro Pro Thr Ala Gly Val Ala Ser
210         215         220
Ala Asp Pro Ser Gln Leu Leu Thr Arg Val Ala Leu Ala Thr Ser Pro
225         230         235         240
Glu Val Arg Phe Gly Thr Gly Val Leu Gly Ile Leu Gly Leu Pro Ser
245         250         255

```

Asn Pro Ser Val	Asn Arg Val Tyr	Asp Val Gln Ser	Arg Thr Arg Gly
260	265	270	
Trp Ser Phe Pro	Ile Pro Ser Ser	Val Phe Met Gly	Asp Ala Arg
275	280	285	
Asn Val Glu His	Asn Arg Arg Val	Met Val Gln Ser	Ser Ala Pro Asn
290	295	300	
Asn Pro Leu Ser	Asp Val Phe Pro	Asp Gly Phe Pro	Asp Phe Val Pro
305	310	315	320
Gln Ser Asp Thr	Glu Pro Asp Gly	Gly Ala Val Ile	Ala Gly Gln Val
325	330	335	
Leu Pro His Pro	Gly Asp Asn Asp	Asn Phe Trp Arg	Leu Thr Pro Val
340	345	350	
Val Arg Gly Asn	Thr Thr Ala Ala	Ile Asn Thr Ile	Pro Glu Arg Phe
355	360	365	
Asn Gln Val Tyr	Phe Ile Asn Leu	Ala Asp Glu Glu	Ala Val Ser Ala
370	375	380	
Ala Thr Glu Glu	Leu Arg Phe Asn	Gly Ile Gln Gly	Ile Phe Gly Gln
385	390	395	400
Arg Ala Arg Gly	Arg Ala Val Gln	Val Met Gln Gly	Tyr Val Pro Arg
405	410	415	
Ala Glu His Ile	Ile Arg Pro Ala	Gly Phe Ala Gly	Val Gly Pro Gln
420	425	430	
Gly Pro Asn Val	Pro Ile Gly Phe	Ala Gly Thr Met	Pro Asn Phe Asn
435	440	445	
Ala Thr Ala Ser	Gly Ala Asp Asp	Leu Val Pro Val	Trp Gly Pro Thr
450	455	460	
Leu Val His Thr	Ala Ser Leu Leu	Ala Gly Thr Thr	Tyr Glu Leu Ala
465	470	475	480
Glu Asn Ser Met	Tyr Val Phe Ser	Val Ser Thr Ser	Thr Ser Thr Phe
485	490	495	
Glu Leu Gly Met	Leu Ala Asn Gly	Thr Trp Leu Gly	Pro Ala Gln Leu
500	505	510	
Ala Gly Thr Gly	Ile Thr Trp Thr	Glu Val Leu Ser	Val Thr Tyr Met
515	520	525	
Gly Met Arg Phe	Ala Tyr Asn Pro	Leu Ser Gly Gln	Gly Ile Gly Gly
530	535	540	
Glu Ser Arg Arg	Leu		
545			
<210>	3		



&lt;211&gt; 1647

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 牛纽布病毒 (Bovine Nebovirus, NeV)

&lt;400&gt; 3

```

atgagcgcaca acaaaagcat cccggagcag cagaacgagt ccagccgtgc gatggacgct 60
ggtgcaaccg gttctgcagc agctgcacct gcaccacctg tagcagccgc ccctgtttct 120
ggtctggttag gtgcactggt cgctgaacct cagtctggtc catctacgga acagtggcgt 180
acggcataca ccctgttcgg tacggtctcc tggaacgcta acgcaggctc tggtagatc 240
ctgactgtgg gtcgtctggg tccaggatat aaccataca cccagcacat cgctgcaatg 300
tacggcggct gggctggcgg tatggatatc cgtatcacca tcgctggcag cggtttcatc 360
ggcggtactc tggcagtcgc tgcaatccca ccagggttag accagagag cgtcaacgtg 420
ctgcgtatgc cgcatgtact gatcgacgct cgtgggtggg tgccgctgga agtcaactctg 480
gaagacatcc gcaattccct gtaccacccg atgggtgaca ctaacaccgc gagcctggta 540
atcgagtcga tgaccggtct gatcaacccg ctgggtactg acaccctgag cgtgactgtg 600
cagctggaaa cccgtccggg tcgtgattgg gtgttcttca gcctgctgcc gccgactgca 660
ggtgttgctt ctgctgatcc gtctcagctg ctgactcgtg tggctctggc tacttctccg 720
gaagtgcgtt tcggtactgg tgtgctgggt atcctgggtc tgccgtctaa cccgtctgtg 780
aaccgtgtgt acgacgtgca gtctcgtacc cgtggttggt ctttcccgat cccgtcttcc 840
tccgtgttca tgggcgacgc tcgtaacgtt gagcacaacc gccgtgttat ggttcagtcc 900
agcgcgccga acaaccgct gtctgacgtt ttcccgacg gtttcccgga tttcgttccg 960
cagtcgcgca ccgaaccgga tgggtgtgct gttatcgagg gtcaggttct gccgcatccg 1020
ggtgataacg ataacttctg gcgcctgacc ccggttggtc gtggtaacac caccgcggcg 1080
atcaacacta tcccggagcg tttcaaccag gtttacttca ttaacctggc ggatgaagaa 1140
gcggttagcg cggcgaccga agaactgcgc tttaacggca ttcaggcatc ttttgccag 1200
cgcgcgcgcg gccgtgccgt tcaggtaatg caaggctacg taccgcgcgc ggaacacatt 1260
attcgcccgg cgggcttcgc ggggtgtggc ccgcaaggcc cgaatgttcc gattggcttt 1320
gcgggcacta tgccgaactt taatgccacc gcgtctggcg ccgatgatct ggttccggta 1380
tgggggcccga ctctggttca caccgctctc ctgctggccg gcaccacgta tgaactggcc 1440
gaaaattcca tgtatgtttt ctccgtaagc acctccacct ccaccttga actgggcatg 1500
ctggcgcaatg gcacctggct gggcccggcc caactggcgg gcacgggcat tacctggacc 1560
gaagtctctga gcgtaacctc tatgggcatg cgttttgcgt ataatccgct gtccggccaa 1620
ggcattggcg gcgaatcccc ccgcctg 1647

```

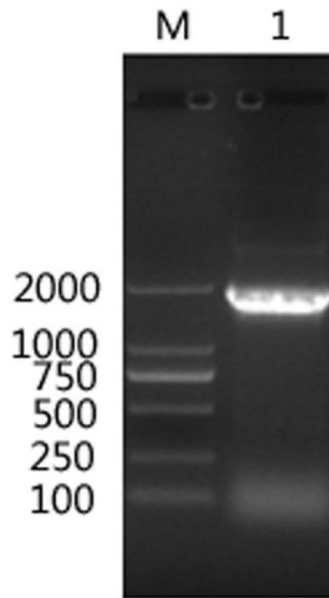


图1

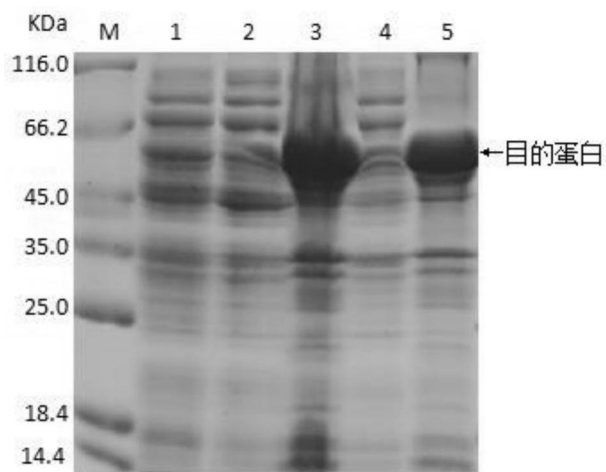


图2

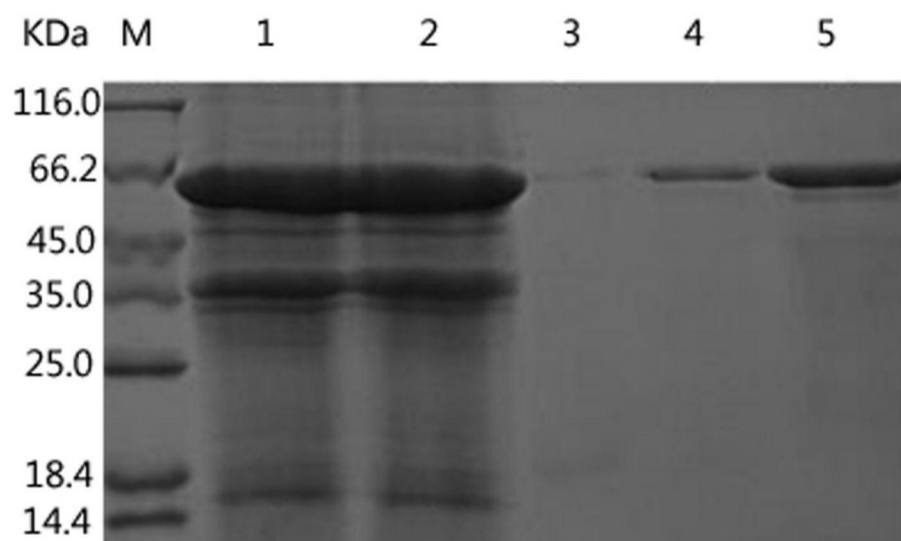


图3

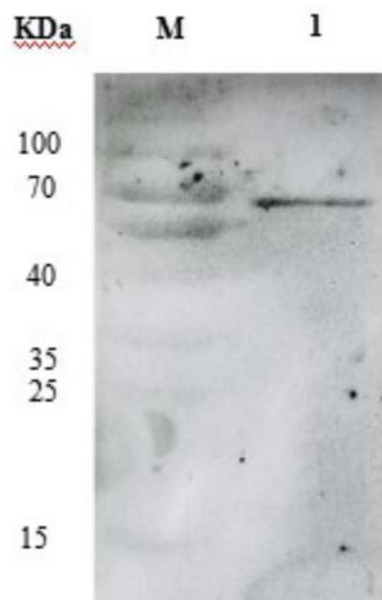


图4

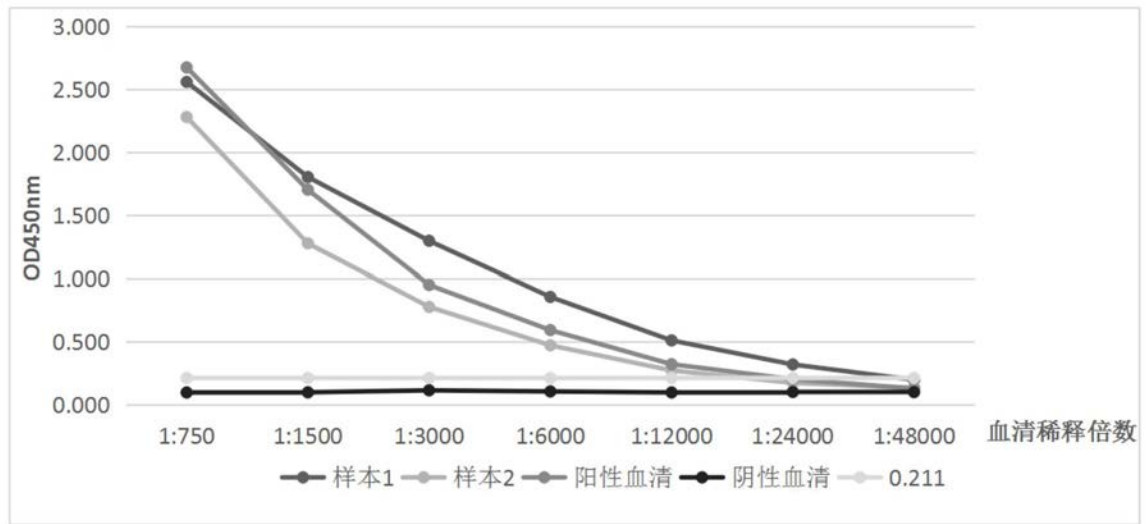


图5