



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110376385 B

(45) 授权公告日 2022.03.04

(21) 申请号 201910674813.1
 (22) 申请日 2019.07.25
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 110376385 A
 (43) 申请公布日 2019.10.25
 (83) 生物保藏信息
 CCTCC NO:M 2018859 2018.12.05
 (73) 专利权人 扬州大学
 地址 225009 江苏省扬州市大学南路88号
 (72) 发明人 张小荣 王月欣 吴艳涛 郭梦娇
 张成成 曹永忠
 (74) 专利代理机构 南京知识律师事务所 32207
 代理人 卢亚丽
 (51) Int. Cl.
 G01N 33/68 (2006.01)
 G01N 33/558 (2006.01)
 G01N 33/531 (2006.01)
 C12N 15/70 (2006.01)
 C07K 14/165 (2006.01)
 C12R 1/19 (2006.01)

(56) 对比文件
 CN 102093999 A, 2011.06.15
 CN 105092839 A, 2015.11.25
 CN 1763085 A, 2006.04.26
 CN 111766389 A, 2020.10.13
 Hu, JQ等. Production and characterization of monoclonal antibodies to (poly100) S1 protein of avian infectious bronchitis virus. 《ZOO NOSES AND PUBLIC HEALTH》. 2007, 第69-77页.
 Zhang, X.等. 登录号: MH743141.1. 《GenBank》. 2019,
 Zhang, X.等. 登录号: QBQ56812.1. 《GenBank》. 2019,
 王月欣. QX型传染性支气管炎病毒抗体检测方法建立与亚单位疫苗研制. 《中国优秀硕士学位论文全文数据库农业科技辑》. 2020,
 郭建友. 鸡传染性喉气管炎病毒抗体间接ELISA检测方法的建立和亚单位疫苗研制. 《中国优秀硕士学位论文全文数据库农业科技辑》. 2015,

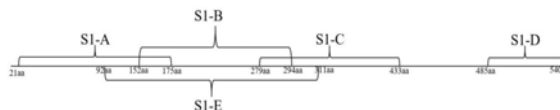
审查员 汪天

权利要求书1页 说明书8页
序列表9页 附图4页

(54) 发明名称
 一种基因工程表达QX型鸡传染性支气管炎病毒S1蛋白抗原的制备方法与应用

(57) 摘要
 本发明属于生物技术领域, 涉及一种基因工程表达QX型鸡传染性支气管炎病毒S1蛋白抗原的制备方法与应用。本发明公开了序列如SEQ ID NO.9所示的S1-E蛋白作为检测IBV抗体的抗原的应用。公开了用于检测IBV抗体的检测试剂盒, 还公开了基因工程表达QX型鸡传染性支气管炎病毒S1蛋白抗原的制备方法。本发明提供的基因工程重组QX型IBV S1蛋白抗原S1-E可与QX型IBV阳性血清发生特异结合, 与非QX型IBV阳性血清交叉反应较弱, 可用于QX型IB疫苗免疫抗体的监测

与评估。



CN 110376385 B

1. S1-E蛋白作为检测IBV抗体的抗原的应用,所述S1-E蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.9所示。

2. 一种用于检测IBV抗体的检测试剂盒,其特征在于,包括包被有S1-E重组蛋白纯化复性产物的酶标板、阳性和阴性对照、HRP标记的兔抗鸡IgG、样品稀释液、显色液以及洗涤液,所述S1-E的氨基酸序列如SEQ ID NO.9所示。

3. 根据权利要求2所述的检测试剂盒,其特征在于,所述包被有S1-E重组蛋白的ELISA酶标板,是通过将纯化复性的S1-E蛋白原核表达产物包被于96孔酶标板而制备。

4. 一种基因工程表达QX型鸡传染性支气管炎病毒S1蛋白抗原的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:根据S1-E的氨基酸序列确定对应的IBVQXL87株S1基因编码区序列为SEQ ID NO.14;根据该基因序列设计引物将该基因片段PCR扩增并克隆入pET-32a(+)载体,将重组表达载体进一步转化到感受态BL21(DE3)大肠杆菌中进行诱导表达;通过Ni-NTA亲和层析法从重组菌中纯化获得重组蛋白命名为S1-E。

一种基因工程表达QX型鸡传染性支气管炎病毒S1蛋白抗原的 制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种优选的QX型传染性支气管炎病毒 (IBV) S1蛋白的抗原制备方法及其在检测QX型IBV抗体中的应用。

背景技术

[0002] 鸡传染性支气管炎 (Infectious bronchitis, IB) 是由传染性支气管炎病毒 (Infectious bronchitis virus, IBV) 引起的一种急性、高度接触性呼吸道传染病,是世界范围内危害养鸡业发展的最主要的传染病之一。IBV可感染所有日龄的鸡,临床表现为咳嗽、喷嚏、气管啰音,雏鸡会表现出更严重的呼吸道症状和更高的死亡率。大多数IBV野毒株既能引起呼吸道症状也能引起肾脏的病变,尤其是雏鸡发生感染后,可引起肾脏肿大且伴有尿酸盐沉积,表现为“花斑肾”,当与其他疾病混合或者继发感染时,死淘率会大大增加。IBV还可以侵害母鸡的生殖系统,但不同毒株致病力存在差异。产蛋期感染IBV会导致产蛋量下降,并出现大量畸形蛋和软壳蛋,蛋品质也会有明显下降。如果在幼龄时期发生IBV早期感染,可引起输卵管严重发育不良,形成所谓的“假母鸡”,至性成熟时虽然卵巢可能发育正常,但由于输卵管退化,不能正常产蛋,卵黄掉入腹腔后可引起卵黄性腹膜炎,有的鸡还可表现输卵管的严重积液。

[0003] 由于IBV很容易发生变异,因此导致新的血清型毒株不断出现,在全球范围内已经发现的IBV血清型有数十种之多。QX型(最近也被命名为GI-19型)IBV是近年来发现的一个新的血清型,1997年首次发现于我国山东省青岛市,随后迅速蔓延至亚洲、欧洲及非洲多个国家和地区,已经成为目前亚洲及欧洲最主要的优势血清型,对世界养禽业造成了巨大的经济损失。根据国内最新的流行病学研究资料,QX型流行毒株已经占国内流行毒株的70%左右。

[0004] IBV基因组主要编码S蛋白、N蛋白、M蛋白、E蛋白四个结构蛋白,其中S、M和N在成熟病毒粒子中含量较为丰富。S蛋白是IBV的主要结构蛋白,是构成病毒粒子最表层纤突的主要成分,含有与病毒中和、诱导宿主血凝抑制抗体产生、细胞吸附、组织嗜性、血清型有关的抗原位点,也是IBV蛋白中变异程度最大的结构蛋白。S蛋白在翻译后经过宿主细胞蛋白酶的裂解产生S1蛋白和S2蛋白,两者之间由二硫键连接,其中S1蛋白氨基酸序列的差异与毒株的血清型相关。Cavanagh D等 (Cavanagh D, Elus MM, Cook JK. Relationship between sequence variation in the S1 spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of cross-protection in vivo[J]. Avian pathology, 1997, 26(1):63-74.) 研究表明,大多数IBV的血清型抗原决定簇位于S1蛋白的N端,其中存在3个高度变异的区域(HVR):N端第37~81氨基酸处、第117~160氨基酸处和第269~298氨基酸处。Ignjatovic等 (Ignjatovic J, Sapats S. Identification of previously unknown antigenic epitopes on the S and N proteins of avian infectious bronchitis virus[J]. Archives of virology, 2005, 150(9):1813-31.) 的研究表明,除上述HVR外,在S1蛋白和

S2蛋白上分别还有2个和1个额外的抗原决定簇区域,可能与中和保护有关,它们分别定位于氨基酸第294~316位,第532~537位和第566~584位。相对于S蛋白的高度变异性,M蛋白和N蛋白在不同血清型的毒株间相对保守。

[0005] 迄今为止,疫苗免疫仍是生产中控制IB的最常用、也是最有效的措施,选择与流行毒株血清型一致的疫苗是确保良好免疫保护效果的重要前提条件。自从QX型IBV在我国首次被发现以来,研制与抗原性相一致的疫苗就成为重要的研究方向,2018年5月10日中华人民共和国农业农村部第24号公告批准了由扬州大学等5家单位联合申报的鸡新城疫-传染性支气管炎二联活疫苗(La Sota株+QXL87株)为新兽药并核发新兽药注册证书[(2018)新兽药证字24号],该疫苗产品中的传染性支气管炎活疫苗毒株(QXL87株)为国内首个研发成功的QX型疫苗株,标志着与QX型流行毒株匹配的疫苗产品在我国正式进入生产应用。

[0006] 目前对于IB疫苗免疫效果的评价主要有两种方法,一种是免疫攻毒保护试验,另外一种检测特异性免疫抗体应答水平。其中免疫攻毒保护试验需要具备特定生物安全防护条件的实验动物实施,且评估周期长、代价大,不适合于鸡场使用。而检测特异性抗体应答水平操作相对简单,成本低,不存在散毒的生物安全风险,因此适合在鸡场进行推广应用。目前商品化的IBV抗体监测试剂盒基本上都是以马萨诸塞型(Mass型)IBV毒株全病毒作为抗原包被酶标板制备而成,检测的抗体水平不具备血清型特异性,无法应用于血清型特异性免疫抗体的评估。因此针对QX型IB疫苗的推广应用,急需研制与之相对应的免疫抗体检测试剂产品用于该血清型疫苗的免疫效果评估。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种优选的基因工程重组QX型IBV S1蛋白抗原的制备方法与应用。

[0008] 本发明的原理和最核心的关键技术是综合运用各种生物信息学方法对IBV S1蛋白进行抗原性分析,选取位于S1高变区且抗原性较好的5个多肽片段,针对对应的S1基因编码区序列分别设计引物,构建原核表达质粒,之后将重组质粒转化到BL21(DE3)感受态中细菌中进行原核表达并对重组蛋白进行纯化,进一步将纯化蛋白作为抗原包被酶标板,通过酶联免疫吸附试验(ELISA)分别对QX型、Mass型、793/B型和t1/ch/LDT3/03型阳性血清IBV阳性血清进行检测,优选出与QX型阳性血清反应效果最佳而且与Mass型、793/B型和t1/ch/LDT3/03型等非QX型IBV阳性血清交叉反应较弱的S1-E重组蛋白作为检测抗原,建立ELISA方法,用于QX型IB疫苗免疫抗体的检测。

[0009] 实现本发明目的的技术方案是:

[0010] 本发明所述的一种基于QX型IBV S1-E重组蛋白为检测抗原,用于检测IBV抗体,包括包被有S1-E重组蛋白纯化复性产物的酶标板、阳性和阴性对照、HRP标记的兔抗鸡IgG、样品稀释液、显色液以及洗涤液。

[0011] 进一步地,所述包被有S1-E重组蛋白的ELISA酶标板,是通过将纯化复性的S1-E蛋白原核表达产物包被于96孔酶标板而制备。

[0012] 本发明所述基于IBV S1蛋白用于检测IBV抗体的抗原制备与应用方法,可以通过以下步骤得到:

[0013] (1) QX型IBV S1基因的生物信息学分析:以QX型IBV疫苗毒株QXL87株为分析对象,

首先根据该毒株的S1基因序列(GenBank登录号:MH743141;SEQ ID NO.1),应用BioEdit7.0、Lasergene 7.0软件包中的MegAlign程序等与Mass型H120株(GenBank登录号:FJ888351.1;SEQ ID NO.2)、793/B型4/91株(GenBank登录号:AF093793.1;SEQ ID NO.3)和t1/ch/LDT3/03型LDT3-A株(GenBank登录号:KR608272.1;SEQ ID NO.4)等序列进行核苷酸和氨基酸序列比对,然后通过Lasergene 7.0软件包中的Protean程序对蛋白序列进行抗原性分析,经综合比较,筛选出位于S1高变区且抗原性较好的A~E 5个多肽片段进行进一步筛选,5个多肽片段对应的氨基酸序列为SEQ ID NO.5~SEQ ID NO.9。

[0014] (2) A~E 5个多肽片段的基因工程表达:根据筛选出的5个多肽片段确定对应的IBVQXL87株S1基因编码区序列,依次为S1-A(SEQ ID NO.10)、S1-B(SEQ ID NO.11)、S1-C(SEQ ID NO.12)、S1-D(SEQ ID NO.13)、S1-E(SEQ ID NO.14)。根据各段基因序列设计引物将5个基因片段分别PCR扩增并克隆入pET-32a(+)载体,将重组表达载体进一步转化到感受态BL21(DE3)大肠杆菌中进行诱导表达。通过Ni-NTA亲和层析法从重组菌中纯化获得重组蛋白,分别命名为S1-A、S1-B、S1-C、S1-D和S1-E。

[0015] (3) 基因工程重组蛋白的优选:将S1-A、S1-B、S1-C、S1-D和S1-E 5种重组蛋白按照2 μ g/mL的浓度100 μ L/孔包被96孔酶标板,将QX型QXL87株、Mass型H120株、793/B型4/91株和t1/ch/LDT3/03型LDT3-A株分别免疫SPF鸡制备的多抗血清作1:100稀释,进行ELISA试验,优选出对QX型特异性抗体检测效果最佳且同时与非QX型IBV抗体交叉反应较弱的重组蛋白应用于QX型疫苗免疫抗体检测。

[0016] 本发明的有益效果体现在:S蛋白是IBV的主要结构蛋白,是构成病毒粒子最表层纤突的主要成分,其中S1蛋白含有与病毒中和、诱导宿主血凝抑制抗体产生、细胞吸附、组织嗜性、血清型有关的抗原位点,也是IBV蛋白中变异程度最大的结构蛋白。相对于以全病毒抗原为基础建立的抗体检测方法,以S1蛋白为基础建立的抗体检测方法可用于血清型特异性IBV抗体检测。本发明提供一种优选的基因工程重组QX型IBV S1蛋白抗原S1-E可与QX型IBV阳性血清发生特异结合,与非QX型IBV阳性血清交叉反应较弱,可用于QX型IB疫苗免疫抗体的监测与评估。

附图说明

[0017] 图1是S1-A~S1-E 5个肽段在S1蛋白上的对应位置示意图

[0018] 图2是S1-A~S1-E基因片段的PCR扩增鉴定电泳图(M:DNA Marker DL2000;1:S1-A;2:S1-B;3:S1-C;4:S1-D;5:S1-E;6:阴性对照)。

[0019] 图3是S1-A~S1-E基因片段插入到pET-32a(+)载体得到的阳性重组质粒的酶切鉴定图片,(M:DNA Marker DL2000;1:S1-A酶切产物;2:S1-B酶切产物;3:S1-C酶切产物;4:S1-D酶切产物;5:S1-E酶切产物)

[0020] 图4是S1-A~S1-E重组菌诱导表达SDS-PAGE鉴定图(M:蛋白Marker;1:S1-A重组菌诱导上清;2:S1-A重组菌诱导沉淀;3:S1-B重组菌诱导上清;4:S1-B重组菌诱导沉淀;5:S1-C重组菌诱导上清;6:S1-C重组菌诱导沉淀;7:S1-D重组菌诱导上清;8:S1-D重组菌诱导沉淀;9:S1-E重组菌诱导上清;10:S1-E重组菌诱导沉淀。箭头所示为目的蛋白条带。)

[0021] 图5是SDS-PAGE鉴定S1-A~S1-E重组蛋白纯化效果图(M:蛋白Marker;1:S1-A纯化滤液;2:S1-B纯化滤液;3:S1-C纯化滤液;4:S1-D纯化滤液;5:S1-E纯化滤液;6:S1-A纯化洗

脱液;7:S1-B纯化洗脱液;8:S1-C洗脱液;9:S1-D洗脱液;10:S1-E纯化洗脱液。箭头所示为目的蛋白条带。)

[0022] 图6是Western-Blot鉴定S1-A重组蛋白纯化复性结果图(箭头标示的为S1-A目的蛋白条带)

[0023] 图7是Western-Blot鉴定S1-B重组蛋白纯化复性结果图(箭头标示的为S1-B目的蛋白条带)

[0024] 图8是Western-Blot鉴定S1-C重组蛋白纯化复性结果图(箭头标示的为S1-C目的蛋白条带)

[0025] 图9是Western-Blot鉴定S1-D重组蛋白纯化复性结果图(箭头标示的为S1-D目的蛋白条带)

[0026] 图10是Western-Blot鉴定S1-E重组蛋白纯化复性结果图(箭头标示的为S1-E目的蛋白条带)。

[0027] 本发明中用于制备抗原的优选重组菌BL21 (DE3) /pET-QXIBV-S1E,于2018年12月5日保藏于中国典型培养物保藏中心,地址中国·武汉·武汉大学,保藏编号CCTCC NO: M2018859;分类命名是:大肠杆菌BL21 (DE3) /pET-QXIBV-S1E,Escherichia coli BL21 (DE3) /pET-QXIBV-S1E。

具体实施方式

[0028] 下面将通过附图和具体实施方例对本发明做进一步的具体描述,但不能理解为是对本发明保护范围的限定,如关于QX型IBV的命名根据公开的文献还可能命名为LX4型或GI-19型等。

[0029] 实施例1QX型IBV S1基因的生物信息学分析

[0030] 以QX型IBV疫苗毒株QXL87株为分析对象,首先根据该毒株的S1基因序列(GenBank登录号:MH743141;SEQ ID NO.1),应用BioEdit7.0、Lasergene 7.0软件包中的MegAlign程序等与Mass型H120株(GenBank登录号:FJ888351.1;SEQ ID NO.2)、793/B型4/91株(GenBank登录号:AF093793.1;SEQ ID NO.3)和t1/ch/LDT3/03型LDT3-A株(GenBank登录号:KR608272.1;SEQ ID NO.4)等序列进行核苷酸和氨基酸序列比对,然后通过Lasergene7.0软件包中的Protean程序对蛋白序列进行抗原性分析,经综合比较,筛选出位于S1高变区且抗原性较好的A~E 5个多肽片段进行进一步筛选,5个多肽片段对应的氨基酸序列为SEQ ID NO.5~SEQ ID NO.9。各肽段在S1蛋白中的相对位置如图1所示,各肽段与H120株、4/91株和LDT3-A株对应肽段氨基酸序列同源性如表1所示。

[0031] 表1多肽片段A~E与其他血清型毒株对应肽段氨基酸序列同源性

毒株	各多肽片段同源性 (%)				
	A	B	C	D	E
[0032] H120	70.3	80.0	77.6	76.2	77.7
4/91	69.7	81.2	79.1	80.4	78.4
LDT3-A	91.6	85.4	80.4	76.2	87.3

[0033] 实施例2:A~E 5个多肽片段在大肠杆菌中的表达

[0034] 引物设计与目的片段的PCR扩增:根据筛选出的A~E5个多肽片段确定对应的IBV QXL87株S1基因编码区序列,依次为S1-A(SEQ ID NO.10)、S1-B(SEQ ID NO.11)、S1-C(SEQ

ID NO.12)、S1-D(SEQ ID NO.13)、S1-E(SEQ ID NO.14)。根据各段基因序列分别设计5对特异引物,为方便克隆,上游引物添加5'端添加BamH I酶切位点识别序列,下游引物5'端添加Xho I酶切位点识别序列,引物序列见表2。以QXL87株基因组RNA为模板利用RT-PCR方法扩增5个目的片段,PCR产物电泳鉴定结果见图2。将5个目的片段分别克隆到pEASY-T3载体(北京全式金生物技术有限公司,产品编号CT301)中,转化到Trans1-T1大肠杆菌感受态细胞(北京全式金生物技术有限公司,产品编号CD401)中,通过菌液PCR鉴定出阳性克隆菌并进行测序鉴定,选择无碱基突变的阳性克隆进行下一步试验。

[0035] 表2引物序列

目的片段	引物名称	引物序列 (5' → 3')	预期产物大小 (bp)
A	S1A-F (SEQ ID NO.15)	CGCGGATCCGCGTTCGATCCTG CTAATACTTATGTG	483
	S1A-R (SEQ ID NO.16)	CCGCTCGAGCGGATCACCATT AGATAAACAGATGTG	
B	S1B-F (SEQ ID NO.17)	CGCGGATCCGCGGTATCTAAAT ACCCTAATTTAAATCT	498
	S1B-R	CCGCTCGAGCGGTGACAAATT	
C	(SEQ ID NO.18)	AAAATTATAATAACCA	483
	S1C-F (SEQ ID NO.19)	CGCGGATCCGCGAATGTAAGT AATGCACAGCCT	
D	S1C-R (SEQ ID NO.20)	CCGCTCGAGCGGCTTATCTAA AGTAATATTATTATAATTGTG	186
	S1D-F (SEQ ID NO.21)	CGCGGATCCGCGGGTCTTAATT ATTACAAGGTCAATC	
E	S1D-R (SEQ ID NO.22)	CCGCTCGAGCGGACGCCTGCG ACGATGT	624
	S1E-F (SEQ ID NO.23)	CGCGGATCCGCGTGGTCTAAG TCACAATTTTGTAGTG	
	S1E-R (SEQ ID NO.24)	CCGCTCGAGCGGATGAAAAGT ATTAACACCACCACTAT	

[0038] 注:下划线部分“GGATCC”为BamH I酶切位点识别序列,“CTCGAG”为Xho I酶切位点识别序列。

[0039] 重组表达载体的构建:分别将5个重组克隆菌进行小量扩增并提取质粒,利用限制性内切酶BamH I和Xho I将目的片段定向亚克隆到原核表达质粒pET-32a (+) (Novagen公司,产品编号69015-3)相应位点之间,获得重组表达载体。重组表达载体经BamH I和Xho I双酶切之后经琼脂糖凝胶电泳鉴定无误后(结果见图3),将重组表达载体转化到BL21 (DE3)大肠杆菌感受态细胞(北京全式金生物技术有限公司,产品编号CD601)中,获得重组表达菌。

[0040] 重组蛋白的诱导表达与鉴定:将培养至对数生长期的重组菌以1:100的比例接种于含100 μ g/mL氨苄青霉素的LB培养基中,220r/min37 $^{\circ}$ C培养至OD_{600nm}值达到0.4~0.6时,加入IPTG至终浓度为0.5mM,进行诱导表达,5h后收集细菌,用PBS洗涤3次后再用PBS重悬菌体沉淀,然后60Hz,间隔3s进行超声破碎,破碎完成后离心分离上清和沉淀。通过SDS-PAGE对表达产物进行分析。图4为诱导5h的细菌裂解产物上清和沉淀的SDS-PAGE电泳图,可见表达产物大部分在沉淀中,说明以包涵体表达为主。

[0041] 重组蛋白的纯化与复性:重组表达菌诱导表达后超声裂解并离心获取沉淀,根据Ni-NTA纯化介质(南京金斯瑞生物科技有限公司,产品编号L00250)说明书,在变性条件下进行重组蛋白纯化,利用SDS-PAGE对纯化效果进行鉴定(见图5),获得的纯化蛋白分别命名为S1-A、S1-B、S1-C、S1-D、S1-E。纯化后的重组蛋白置于透析袋中,将装有重组蛋白的透析袋放入蛋白透析液进行复性,通过含不同浓度尿素(8mmol/L-0mmol/L)的蛋白透析液按照由高浓度到低浓度依次进行梯度透析,间隔12h置换到下一个梯度蛋白透析液中,最后置于PBS中透析12h。将PEG6000包埋透析袋进行蛋白浓缩,利用Western-blot对复性的纯化蛋白进行鉴定(见图6~图10),由图可知重组蛋白均可与QX型IBV阳性血清反应产生特异性条带。

[0042] 实施例3:以纯化的重组蛋白作为包被抗原对QX型IBV阳性血清进行ELISA检测

[0043] 将S1-A、S1-B、S1-C、S1-D和S1-E 5种重组蛋白按照2 μ g/mL的浓度100 μ L/孔包被96孔酶标板,将QX型IBV(QXL87株)免疫SPF鸡制备的多抗血清作1:100稀释,分别用5种抗原包被的酶标板进行ELISA试验,优选出对QX型特异性抗体检测效果最佳的抗原(P/N值最大)用于建立QX型IBV特异性抗体检测的方法。具体操作步骤如下:

[0044] (1) QX型IBV阳性血清制备

[0045] SPF鸡于14日龄进行第一次免疫,免疫用QX型IBV疫苗株QXL87株($10^{6.5}$ EID₅₀/ml)由扬州大学农业部畜禽传染病学重点开放实验室保藏和提供(陈启稳.QX型鸡传染性支气管炎弱毒疫苗的研制.扬州大学硕士学位论文,2014.),免疫方式为每只鸡按照0.2mL的免疫剂量进行胸部肌肉注射;间隔2周按照相同免疫剂量进行第二次免疫;以后每间隔2周加强免疫一次。直到血清中和抗体水平达到1:64,通过心脏采血的方式进行采血,室温静置4h后3000r/min离心10min,收集的血清分装后于-20 $^{\circ}$ C保存备用。

[0046] (2) ELISA检测

[0047] a.按2 μ g/mL稀释抗原,每孔加入100 μ L抗原,4 $^{\circ}$ C包被12h,抗原孵育结束后将液体甩出,每孔加入300 μ L PBST洗涤液,室温放置5min后甩掉其中液体并拍干,洗涤3次;

[0048] b.封闭:每孔加入300 μ L 1%BSA-PBST,置37 $^{\circ}$ C水浴锅孵育3h,孵育结束后将液体甩出,洗涤3次拍干;

[0049] c.一抗孵育:用0.2%BSA-PBST按1:100稀释QX型IBV阳性血清和SPF鸡阴性血清作为一抗,将酶标板置37 $^{\circ}$ C水浴锅孵育1h,孵育结束后将孔中液体甩出,洗涤3次拍干;

[0050] d.二抗孵育:用0.2%BSA-PBST按1:20000稀释HRP标记的兔抗鸡IgG,每孔加入100 μ L作为二抗,置37 $^{\circ}$ C水浴锅孵育1h,孵育结束后将其中液体甩出后用PBST洗涤3次,拍干;

[0051] e.显色:将TMB显色试剂盒(Thermo Scientific公司,产品编号34021)中两种试剂等比例混匀,每孔加入100 μ L,37 $^{\circ}$ C避光孵育10min;

[0052] f.终止:每孔加入50 μ L的2mol/L H₂SO₄;

[0053] g.读数:将酶标板置于酶标仪中读数。结果如表3所示,以重组蛋白S1-E作为包被抗原对QX型IBV阳性血清的抗体水平检测效果最佳,产生的OD₄₅₀读值最高,且P/N值最大。

[0054] 表3.五种重组蛋白作为包被抗原对QX型IBV阳性血清的ELISA检测结果

检测项目	不同包被抗原检测结果				
	S1-A	S1-B	S1-C	S1-D	S1-E
[0055] P	1.738	1.637	1.504	1.314	1.881
N	0.331	0.334	0.323	0.27	0.281
P/N	5.251	4.901	4.656	4.867	6.694

[0056] 注:P为阳性血清,N为阴性血清,P/N为阳性血清和阴性血清的OD450nm读值的比值。

[0057] 实施例4:以优选的重组蛋白作为包被抗原建立检测QX型IBV特异性抗体的ELISA方法

[0058] 将优选的重组蛋白S1-E按照2 μ g/mL的浓度100 μ L/孔包被96孔酶标板,将QX型QXL87株、Mass型H120株、793/B型4/91株和t1/ch/LDT3/03型LDT3-A株分别免疫SPF制备的多抗血清作1:400稀释,进行ELISA试验,比较对不同血清型IBV阳性血清的检测效果。

[0059] 具体操作步骤如下:

[0060] (1) Mass型、793/B型和t1/ch/LDT3/03型IBV阳性血清制备:

[0061] Mass型、793/B型和t1/ch/LDT3/03型IBV阳性血清制备方法同QX型IBV阳性血清制备方法,免疫所用的疫苗均为含对应血清型疫苗毒株的商品化弱毒活疫苗,其中鸡传染性支气管炎活疫苗(H120株)为青岛易邦生物工程有限公司产品、鸡传染性支气管炎活疫苗(4/91株)为MSD公司产品、鸡传染性支气管炎活疫苗(LDT3-A株)为哈尔滨维科生物技术开发公司产品。免疫鸡血清中和抗体水平达到1:64,通过心脏采血的方式进行采血,室温静置4h后3000r/min离心10min,收集的血清分装后于-20 $^{\circ}$ C保存备用。

[0062] (2) ELISA检测:

[0063] a. 按2 μ g/mL稀释抗原,每孔加入100 μ L抗原,4 $^{\circ}$ C包被12h,抗原孵育结束后将液体甩出,每孔加入300 μ L PBST洗涤液,室温放置5min后甩掉其中液体并拍干,洗涤3次;

[0064] b. 封闭:每孔加入300 μ L 1%BSA-PBST,置37 $^{\circ}$ C水浴锅孵育3h,孵育结束后将液体甩出,洗涤3次拍干;

[0065] c. 一抗孵育:用0.2%BSA-PBST按1:100稀释QX型、Mass型、793/B型和t1/ch/LDT3/03型IBV阳性血清以及SPF鸡阴性血清作为一抗,将酶标板置37 $^{\circ}$ C水浴锅孵育1h,孵育结束后将孔中液体甩出,洗涤3次拍干;

[0066] d. 二抗孵育:用0.2%BSA-PBST按1:20000稀释HRP标记的兔抗鸡IgG,每孔加入100 μ L作为二抗,置37 $^{\circ}$ C水浴锅孵育1h,孵育结束后将其中液体甩出后用PBST洗涤3次,拍干;

[0067] e. 显色:将TMB显色试剂盒(Thermo Scientific公司,产品编号34021)中两种试剂等比例混匀,每孔加入100 μ L,37 $^{\circ}$ C避光孵育10min;

[0068] f. 终止:每孔加入50 μ L的2mol/L H₂SO₄;

[0069] g. 读数:将酶标板置于酶标仪中读数。结果如表4所示,以重组蛋白S1-E作为包被抗原进行ELISA检测,仅对QX型IBV阳性血清产生良好反应,而对Mass型、793/B型和t1/ch/LDT3/03型IBV阳性血清检测结果OD450读值较低,该结果说明S1-E蛋白作为检测抗原具有良好的血清型特异性,而非QX型抗体交叉反应较小。

[0070] 表4. 五种重组蛋白作为包被抗原对QX型IBV阳性血清的ELISA检测结果

检测项目	不同包被抗原检测结果
------	------------

	QX	Mass	793/B	tl/ch/LDT3/03	
[0072]	P	1.826	0.435	0.398	0.754
	N	0.258	0.265	0.277	0.271
	P/N	7.078	1.642	1.437	2.782

[0073] 注：P为阳性血清，N为阴性血清，P/N为阳性血清和阴性血清的OD450nm读值的比值。

- [0001] SEQUENCE LISTING
- [0002] <110> 扬州大学
- [0003] <120> 一种基因工程表达QX型鸡传染性支气管炎病毒S1蛋白抗原的制备方法与应用
- [0004] <130>
- [0005] <160> 24
- [0006] <170> PatentIn version 3.3
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 1620
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 传染性支气管炎病毒(Infectious bronchitis virus)
- [0011] <400> 1
- [0012] atgttgggga agtcaactgtt ttttagtgacc attttgtgtg cactatgtag tgcaaattta 60
- [0013] ttcgatcctg ctaataactta tgtgtactac taccaaagtg ccttttaggcc tccaaatgga 120
- [0014] tggcacctac aagggggtgc ttatgcagta gtcaattcca ctaattatac taataatgcc 180
- [0015] ggttctgcac aacattgcac tgttggtgtt attaaggacg tctataatca aagtgcggct 240
- [0016] tccatagcta tgacagcacc tcttcagggt atggcttggc ctaagtcaca atttttagt 300
- [0017] gcacactgta acttttctga aattacagtt tttgtcacac attgttatag tagtggtagc 360
- [0018] gggctctgtc ctacaacagg catgattgca cgtgatcata ttcgtatttc tgcaatgaaa 420
- [0019] aatggtactt tattttataa tttaacagtt agcgtatcta aataccctaa ttttaaatct 480
- [0020] tttcaatgcg ttaataatct cacatctgtt tatctaaatg gtgatcttgt ttttacttcc 540
- [0021] aacaaaacta ctgatgttac gtcagcaggt gtgtatttta aagcaggtgg acctgtaaat 600
- [0022] tatagtatta tgaaagaatt taaggttctt gcttactttg ttaatggtac agcacaagat 660
- [0023] gtaattttgt gcgacaattc cccaagggt ttgctagctt gtcaatataa cactggcaat 720
- [0024] ttttcagatg gcttttatcc ttttactaat agtactttag ttagggaaaa gttcatcgta 780
- [0025] tatcgcgaaa gtagtgtaa tactactctg gcgttaacta atttcaactt tactaatgta 840
- [0026] agtaatgcac agcctaatag tgggtggtgt aatacttttc atctatatca aacacaaaca 900
- [0027] gctcagagtg gttattataa ttttaatttg tcatttctga gtcagtttgt gtataaggca 960
- [0028] agtgatttta tgtatgggtc ctaccacct agttgttctt ttagaccaga caccattaat 1020
- [0029] agtggtttgt ggtttaatc tttgtcagtt tctctagctt acggaccact tcaaggtggg 1080
- [0030] tgtaagcagt cagtttttag tggtagggca acgtgttget atgcctactc ttacaatggc 1140
- [0031] ccgatagcct gtaaagggtt ttattcagc gaattacgga ctaattttga atgtggattg 1200
- [0032] ctgatttatg ttactaagag tgatggttct cgtatacaga ctagaacaga gcccttagta 1260
- [0033] ttaacgcaac acaattataa taatattact ttagataagt gtgttgacta taatatatat 1320
- [0034] ggcagagtag gccaaaggtt tattactaat gtgactgatt ctgctgctaa ttttagttat 1380
- [0035] ttagcagatg gtgggttagc tattttagat acttcgggtg ccatagatgt ctttgttgta 1440
- [0036] cagggcagct atggtcttaa ttattacaag gtcaatcctt gtgaagatgt taacaacag 1500
- [0037] tttgtagtgt ctggtggcaa tatagttggc attcttactt ctagaaatga aacagttct 1560
- [0038] gaacaggttg agaaccagtt ttatgttaag ttaaccaata gctcacatcg tcgcagcgt 1620
- [0039] <210> 2
- [0040] <211> 1611
- [0041] <212> DNA

[0042] <213> 传染性支气管炎病毒(Infectious bronchitis virus)

[0043] <400> 2

[0044] atgttgtaa cacctctttt actagtgact cttttgtgtg cactatgtag tgctgttttg 60

[0045] tatgacagta gttcttacgt gtactactac caaagtgcct tcagaccacc tgatggttgg 120

[0046] cattacatg ggggtgcgta tgcggttgtt aatatttcta gtgaatctaa taatgcaggc 180

[0047] tcttcactcg ggtgtactgt tggattattt catgggtgtc gtgttgtaa tgcttcttct 240

[0048] atagttatga cggcaccgtc atcaggtagt gcttggctca gcagtcagtt ttgtactgca 300

[0049] tactgtaact tttcagatac tacagtgttt gttacacatt gttataaaca tgttgggtgt 360

[0050] cctataactg gcatgcttca acagcattct atacgtgttt ctgctatgaa aaatggccag 420

[0051] cttttttata atttaacagt tagttagctt aagtacccta cttttaaatc atttcagttg 480

[0052] gttataaatt taacatctgt atatttaaat ggtgatcttg tttacacctc taatgagacc 540

[0053] acagatgta catctgcagg tgtttatfff aaagctggg gacctataac ttataaagtt 600

[0054] atgagagaag ttagagccct ggcttatttt gttaatggta ctgcacaaga tgttattttg 660

[0055] tgtgatgggt cacctagagg cttgtagca tgccagtata atactggcaa tttttcagat 720

[0056] ggcttttata cttttactaa tagtagtffa gtttaagcaga agtttattgt ctatcgtgaa 780

[0057] aatagtgta atactacttt tacgttacac aatttcactt ttcataatga gactggcgcc 840

[0058] aacccaatc ctagtgggtg ccagaatatt caaacttacc aaacacaaac agctcagagt 900

[0059] ggttattata attttaatff ttcctttctg agtagttttg tttataagga gtctaatttt 960

[0060] atgtatggat cttatcacc cagttgtaat tttagactag aaactattaa taatggtttg 1020

[0061] tggtttaatt cactttcagt ttcaattgct tacggctctc ttcaaggtgg ttgcaagcaa 1080

[0062] tctgtcttta gtggtagagc aacctgttgt tatgcttact catatggagg tcttttgctg 1140

[0063] tgtaaagggtg tttattcagg tgagttagat cataatfff aatgtggact gttagtttat 1200

[0064] gttactaaga gcggtggctc tcgtatacaa acagccactg aaccgccagt tataactcaa 1260

[0065] cacaattata ataatttac tttaaatact tgtgttgatt ataatatata tggcagaact 1320

[0066] ggccaagggtt ttattactaa tgtaaccgac tcagctgta gttataatta tctagcagac 1380

[0067] gcaggtttgg ctattttaga tacatctggt tccatagaca tctttgtcgt acaaagttaa 1440

[0068] tatggtctta attattataa ggttaaccct tgcaagatg tcaaccagca gttttagatt 1500

[0069] tctggtgta aattagtagg tattcttact tcacgtaatg agactggttc ccagcttctt 1560

[0070] gagaatcagt tttacatcaa aataactaat ggaacacgtc gtttttagacg t 1611

[0071] <210> 3

[0072] <211> 1617

[0073] <212> DNA

[0074] <213> 传染性支气管炎病毒(Infectious bronchitis virus)

[0075] <400> 3

[0076] atgttgggca aaccgctttt actagtgact ctttggtagt cactatgtag tgctttgctt 60

[0077] tatgataaaa atacttacgt ttactactac caaagtgcct ttaggcctgg tcaaggttgg 120

[0078] catctacatg ggggtgctta tgcaatgatg aaggttttta atggaaccaa caatgcagtc 180

[0079] agtgtatctg attgcaactg tggtaacttt tatgaaagct ataattttc tgctgcttct 240

[0080] gtagccatga cagtaccacc tgctggtagt tcttggctcag ttgcacagtt ttgtacagct 300

[0081] cattgtaact tctcagactt tacagtgttt gttacgcatt gttttaaaag tcaacaaggt 360

[0082] agttgtccat tgacaggtat gattcctcag aatcatattc gtattttctgc tatgagatct 420

[0083] ggatttttgt tttataatff aacagtttagc gtatctaaat accctaaatt taaatcgctt 480

[0084] caatgtgttg gcaattctac atctgtctat ttaaattggg atcttgtttt cacttctaata 540
 [0085] gaaacaactc acgttacggg tgcaggcggt tatttttaaaa gtgggtggcc tgtaacttat 600
 [0086] aaagttatga aagaagttaa agccctagcc tactttatta atgggtaccg acaagaggtt 660
 [0087] attttatgtg ataactcacc tagaggttg cttgcatgic agtataacac tggtaatttt 720
 [0088] tcagatggat tctacccttt tactaattct tcttttagtta aggataggtt tattgtatat 780
 [0089] cgagaaagta gactaacac tacttttagag ttaactaatt tcacttttac taatgtaagt 840
 [0090] aatgettctc ctaattcagg tggcggtgat actttccaat tataatcaaac acatactgct 900
 [0091] caggatgggt attataattt taatttatca tttctgagta gttttgtgta taaaccatct 960
 [0092] gattttatgt atgggtcata ccacccaaat tgtaatttta gaccagagaa tattaataat 1020
 [0093] ggcttatggt ttaattcatt atctgtgca cttacttacg gaccattca aggtggttgt 1080
 [0094] aagcaatctg ttttagtaa taaagcaact tggctctatg cttattctta ccgaggtcct 1140
 [0095] actagatgta aggggtttaa tagagggag ctaacgcaat actttgaatg tggacttcta 1200
 [0096] gtttatgtaa ctaagagtga tggctctcgt atacaaacta gaagtgaacc actgggtgta 1260
 [0097] actcaatata attataacaa cttacttta aataagtgtg ttgagtataa tatatatggt 1320
 [0098] agagttggtc aaggttttat tactaatgta actgaagcaa ctgctaatta tagttatcta 1380
 [0099] gcagatgggt gtttagctat tttagatact tcaggagcca tagacatatt tgttgttcga 1440
 [0100] ggtgcatatg gtcttaatta ttataagggt aatccctgtg aagatgttaa ccaacagttt 1500
 [0101] gtagtctctg gtggcaattt aattggcatt cttacatctc ataataaac agattctgaa 1560
 [0102] tttattgaga accagtttta catcaaacc actaacggaa cacgtcgtc tagacgt 1617
 [0103] <210> 4
 [0104] <211> 1620
 [0105] <212> DNA
 [0106] <213> 传染性支气管炎病毒(Infectious bronchitis virus)
 [0107] <400> 4
 [0108] atgttgggga agtcaactgtt ttttagtgacc attttgtgtg cactatgtag tgcaaaattg 60
 [0109] tttgattctg ctaataatta tgtgtactac taccaaagt ctttaggcc tccaaatgga 120
 [0110] tggcatttgc aagggggtgc ttatgcagta gtgaattcta ctaattatac taataatgca 180
 [0111] ggttctgcaa atgagtgcac tattgggtt attaaggacg tctataatca aagtgcggct 240
 [0112] gctatagcta tgacagcacc tcttcagggt atggcttgggt ctaagtcaca atttttagt 300
 [0113] gcacactgta acttttctga aattacagtt tttgtcacac attgttatag tagcggtagt 360
 [0114] tggctctgtc ctataacagg catgattcca cagggtcata ttcgatttc tgcaatgaaa 420
 [0115] aatggctctt tattttataa tttacagtt agcgtgtcta aataccctaa ttttaaatcg 480
 [0116] tttcaatgtg ttaacaactt cacatctgtt tatttaaatg gtgatcttgt ttttacttct 540
 [0117] aacacaacta ctgatgtaa gtcagcaggt gtgtatttta aagcaggtgg acctgtaaat 600
 [0118] tataatatta tgaagaatt taaggttctg gcttattttg tcaatggtac tgtgcgagat 660
 [0119] gtaattctgt gtgatgacac accgagagc ttgcttgcac gtcaatataa taatgtaat 720
 [0120] tttcagatg ggttttacc ttttactaat tctagtttag ttaaagaaaa gtttattgtt 780
 [0121] tatcgtgaga atagtgttaa tactactctt actttaacta actatactt ttataatgtg 840
 [0122] actaatgect cgcctaateg aggtgggtt cagtctatc caacttatca aacacaaca 900
 [0123] gctcagagtg gttattataa ttttaattta tcatttctga gtagttttgt gtataaagag 960
 [0124] tctaattaca tgtatgggtc ttaccacct gcatgtaatt ttagattaga aactattaat 1020
 [0125] aatggcttgt ggtttaattc attgtcagtt tcgcttgett atggaccaact tcaaggtggg 1080

[0126] tgtaagcagt cggtttttag tagtagagcc acttggtggt atgcttattc atataatggt 1140
 [0127] cctcgcgcac gtaagggtgt ttacgcaggc gagttactac aaaattttga atgtggactg 1200
 [0128] ttggtttatg ttactaagag cgatggtctt cgtatacaaa cagccaccgt tccaccagtt 1260
 [0129] gtaactcaac acaattataa taatattact ttaaatactt gtgttgatta taatatatat 1320
 [0130] ggcagagttg gtcgaggttt tattactaat gtaactgact catcatctag ttataattat 1380
 [0131] ttagcagatg cagggttggc tatttttagat acatcagggt ccatagacac ctttggttga 1440
 [0132] caagtgaaac atggtcttaa ttattacaag gttaatccct gtgaagatgt aaaccagcag 1500
 [0133] tttgtagttt ctggtggtaa attagtaggt attcttacct cacgtaatgc aacaggttct 1560
 [0134] cagcctcttg agaatcaatt ctacattaaa ctactaaag agacacgtcg ttttagacgt 1620
 [0135] <210> 5
 [0136] <211> 155
 [0137] <212> PRT
 [0138] <213> 传染性支气管炎病毒(Infectious bronchitis virus)
 [0139] <400> 5
 [0140] Phe Asp Pro Ala Asn Thr Tyr Val Tyr Tyr Tyr Gln Ser Ala Phe Arg
 [0141] 1 5 10 15
 [0142] Pro Pro Asn Gly Trp His Leu Gln Gly Gly Ala Tyr Ala Val Val Asn
 [0143] 20 25 30
 [0144] Ser Thr Asn Tyr Thr Asn Asn Ala Gly Ser Ala Gln His Cys Thr Val
 [0145] 35 40 45
 [0146] Gly Val Ile Lys Asp Val Tyr Asn Gln Ser Ala Ala Ser Ile Ala Met
 [0147] 50 55 60
 [0148] Thr Ala Pro Leu Gln Gly Met Ala Trp Ser Lys Ser Gln Phe Cys Ser
 [0149] 65 70 75 80
 [0150] Ala His Cys Asn Phe Ser Glu Ile Thr Val Phe Val Thr His Cys Tyr
 [0151] 85 90 95
 [0152] Ser Ser Gly Ser Gly Ser Cys Pro Thr Thr Gly Met Ile Ala Arg Asp
 [0153] 100 105 110
 [0154] His Ile Arg Ile Ser Ala Met Lys Asn Gly Thr Leu Phe Tyr Asn Leu
 [0155] 115 120 125
 [0156] Thr Val Ser Val Ser Lys Tyr Pro Asn Phe Lys Ser Phe Gln Cys Val
 [0157] 130 135 140
 [0158] Asn Asn Leu Thr Ser Val Tyr Leu Asn Gly Asp
 [0159] 145 150 155
 [0160] <210> 6
 [0161] <211> 160
 [0162] <212> PRT
 [0163] <213> 传染性支气管炎病毒(Infectious bronchitis virus)
 [0164] <400> 6
 [0165] Val Ser Lys Tyr Pro Asn Phe Lys Ser Phe Gln Cys Val Asn Asn Leu
 [0166] 1 5 10 15
 [0167] Thr Ser Val Tyr Leu Asn Gly Asp Leu Val Phe Thr Ser Asn Lys Thr

[0168]	20	25	30
[0169]	Thr Asp Val Thr Ser Ala Gly Val Tyr Phe Lys Ala Gly Gly Pro Val		
[0170]	35	40	45
[0171]	Asn Tyr Ser Ile Met Lys Glu Phe Lys Val Leu Ala Tyr Phe Val Asn		
[0172]	50	55	60
[0173]	Gly Thr Ala Gln Asp Val Ile Leu Cys Asp Asn Ser Pro Lys Gly Leu		
[0174]	65	70	75
[0175]	Leu Ala Cys Gln Tyr Asn Thr Gly Asn Phe Ser Asp Gly Phe Tyr Pro		
[0176]	85	90	95
[0177]	Phe Thr Asn Ser Thr Leu Val Arg Glu Lys Phe Ile Val Tyr Arg Glu		
[0178]	100	105	110
[0179]	Ser Ser Val Asn Thr Thr Leu Ala Leu Thr Asn Phe Thr Phe Thr Asn		
[0180]	115	120	125
[0181]	Val Ser Asn Ala Gln Pro Asn Ser Gly Gly Val Asn Thr Phe His Leu		
[0182]	130	135	140
[0183]	Tyr Gln Thr Gln Thr Ala Gln Ser Gly Tyr Tyr Asn Phe Asn Leu Ser		
[0184]	145	150	155
[0185]	<210> 7		
[0186]	<211> 155		
[0187]	<212> PRT		
[0188]	<213> 传染性支气管炎病毒(Infectious bronchitis virus)		
[0189]	<400> 7		
[0190]	Asn Val Ser Asn Ala Gln Pro Asn Ser Gly Gly Val Asn Thr Phe His		
[0191]	1	5	10
[0192]	Leu Tyr Gln Thr Gln Thr Ala Gln Ser Gly Tyr Tyr Asn Phe Asn Leu		
[0193]	20	25	30
[0194]	Ser Phe Leu Ser Gln Phe Val Tyr Lys Ala Ser Asp Phe Met Tyr Gly		
[0195]	35	40	45
[0196]	Ser Tyr His Pro Ser Cys Ser Phe Arg Pro Asp Thr Ile Asn Ser Gly		
[0197]	50	55	60
[0198]	Leu Trp Phe Asn Ser Leu Ser Val Ser Leu Ala Tyr Gly Pro Leu Gln		
[0199]	65	70	75
[0200]	Gly Gly Cys Lys Gln Ser Val Phe Ser Gly Arg Ala Thr Cys Cys Tyr		
[0201]	85	90	95
[0202]	Ala Tyr Ser Tyr Asn Gly Pro Ile Ala Cys Lys Gly Val Tyr Ser Gly		
[0203]	100	105	110
[0204]	Glu Leu Arg Thr Asn Phe Glu Cys Gly Leu Leu Ile Tyr Val Thr Lys		
[0205]	115	120	125
[0206]	Ser Asp Gly Ser Arg Ile Gln Thr Arg Thr Glu Pro Leu Val Leu Thr		
[0207]	130	135	140
[0208]	Gln His Asn Tyr Asn Asn Ile Thr Leu Asp Lys		
[0209]	145	150	155

[0252] Pro Asn Ser Gly Gly Val Asn Thr Phe His
 [0253] 195 200
 [0254] <210> 10
 [0255] <211> 465
 [0256] <212> DNA
 [0257] <213> 传染性支气管炎病毒(Infectious bronchitis virus)
 [0258] <400> 10
 [0259] ttgatcctg ctaataactta tgtgtactac taccaaagtg ctttaggcc tccaaatgga 60
 [0260] tggcacctac aagggggtgc ttatgcagta gtcaattcca ctaattatac taataatgcc 120
 [0261] ggttctgcac aacattgcac tgttggtgtt attaaggacg tctataatca aagtgcggct 180
 [0262] tccatagcta tgacagcacc tcttcagggt atggcttggc ctaagtcaca atttttagt 240
 [0263] gcacactgta acttttctga aattacagtt tttgtcacac attgttatag tagtggtagc 300
 [0264] gggctctgtc ctacaacagg catgattgca cgtgatcata ttcgtattc tgcaatgaaa 360
 [0265] aatggtactt tattttataa tttaacagtt agcgtatcta aataccctaa ttttaaatct 420
 [0266] tttcaatgcg ttaataatct cacatctgtt tatctaaatg gtgat 465
 [0267] <210> 11
 [0268] <211> 480
 [0269] <212> DNA
 [0270] <213> 传染性支气管炎病毒(Infectious bronchitis virus)
 [0271] <400> 11
 [0272] gtatctaaat accctaattt taaatctttt caatgcgta ataatctcac atctgtttat 60
 [0273] ctaaaggtg atcttgtttt tacttccaac aaaactactg atgttacgac agcaggtgtg 120
 [0274] tattttaaag caggtggacc tgtaaattat agtattatga aagaatttaa ggttcttgc 180
 [0275] tactttgtta atggtacagc acaagatgta attttgtgcg acaattcccc caagggttg 240
 [0276] ctagcttgtc aatataacac tggcaatttt tcagatgget tttatcctt tactaatagt 300
 [0277] actttagtta gggaaaagtt catcgtatat cgcgaaagta gtgttaatac tactctggcg 360
 [0278] ttaactaatt tcacttttac taatgtaagt aatgcacagc ctaatagtgg tgggtgtaat 420
 [0279] acttttcac tatatcaaac acaaacagct cagagtgggt attataatt taatttgc 480
 [0280] <210> 12
 [0281] <211> 465
 [0282] <212> DNA
 [0283] <213> 传染性支气管炎病毒(Infectious bronchitis virus)
 [0284] <400> 12
 [0285] aatgtaagta atgcacagcc taatagtgg ggtgtaata cttttcatct atatcaaca 60
 [0286] caaacagctc agagtggta ttataattt aatttgcac ttctgagca gtttgtgtat 120
 [0287] aaggcaagtg atttatgta tgggtcctac caccctagt gttcttttag accagacacc 180
 [0288] attaatagt gtttgtggt taattctttg tcagtttctc tagcttacgg accacttea 240
 [0289] ggtgggtgta agcagtcagt ttttagtgg agggaacgt gttgctatgc ctactcttac 300
 [0290] aatggcccga tagcctgtaa aggtgtttat tcaggcgaat tacggactaa ttttgaatgt 360
 [0291] ggattgctga tttatgttac taagagtgat gtttctcgt tacagactag aacagagccc 420
 [0292] ttagtattaa cgcaacacaa ttataataat attactttag ataag 465
 [0293] <210> 13

- [0294] <211> 168
[0295] <212> DNA
[0296] <213> 传染性支气管炎病毒(Infectious bronchitis virus)
[0297] <400> 13
[0298] ggtcttaatt attacaaggt caatccttgt gaagatgta acaaacagtt tgtagtgtct 60
[0299] ggtggcaata tagttggcat tcttacttct agaaatgaaa caggttctga acaggttgag 120
[0300] aaccagtttt atgttaagtt aaccaatagc tcacatcgtc gcaggcgt 168
[0301] <210> 14
[0302] <211> 606
[0303] <212> DNA
[0304] <213> 传染性支气管炎病毒(Infectious bronchitis virus)
[0305] <400> 14
[0306] tggctaaagt cacaattttg tagtgcacac tgtaactttt ctgaaattac agttttttgct 60
[0307] acacattggt atagtagtgg tagcgggtct tgcctacaa caggcatgat tgcacgtgat 120
[0308] catattcgta tttctgcaat gaaaaatgg actttatfff ataatttaac agtttagcgt 180
[0309] tctaaatacc ctaattttaa atcttttcaa tgcgttaata atctcacatc tgtttatcta 240
[0310] aatggtgatc ttgtttttac ttccaacaaa actactgatg ttacgtcagc aggtgtgtat 300
[0311] tttaaagcag gtggacctgt aaattatagt attatgaaag aatttaaggt tcttgcttac 360
[0312] tttgttaatg gtacagcaca agatgtaatt ttgtgcgaca attcccccaa gggtttgcta 420
[0313] gcttgcaat ataacactgg caatfffcca gatggctfff atcctfffac taatagtact 480
[0314] ttagttaggg aaaagttcat cgtatatcgc gaaagtagtg ttaatactac tctggcgta 540
[0315] actaatttca cttttactaa tgtaagtaat gcacagccta atagtgggtg tgtttaact 600
[0316] tttcat 606
[0317] <210> 15
[0318] <211> 36
[0319] <212> DNA
[0320] <213> 人工序列(manual sequence)
[0321] <400> 15
[0322] cgcggatccg cgttcgatcc tgctaatact tatgtg 36
[0323] <210> 16
[0324] <211> 37
[0325] <212> DNA
[0326] <213> 人工序列(manual sequence)
[0327] <400> 16
[0328] ccgctcgagc ggatcacat ttagataaac agatgtg 37
[0329] <210> 17
[0330] <211> 39
[0331] <212> DNA
[0332] <213> 人工序列(manual sequence)
[0333] <400> 17
[0334] cgcggatccg cgttatctaa atacctaata tttaaatct 39
[0335] <210> 18

- [0336] <211> 37
[0337] <212> DNA
[0338] <213> 人工序列(manual sequence)
[0339] <400> 18
[0340] ccgctcgagc ggtgacaaat taaaattata ataacca 37
[0341] <210> 19
[0342] <211> 33
[0343] <212> DNA
[0344] <213> 人工序列(manual sequence)
[0345] <400> 19
[0346] cgcggatccg cgaatgtaag taatgcacag cct 33
[0347] <210> 20
[0348] <211> 42
[0349] <212> DNA
[0350] <213> 人工序列(manual sequence)
[0351] <400> 20
[0352] ccgctcgagc ggcttatcta aagtaatatt attataattg tg 42
[0353] <210> 21
[0354] <211> 37
[0355] <212> DNA
[0356] <213> 人工序列(manual sequence)
[0357] <400> 21
[0358] cgcggatccg cgggtcttaa ttattacaag gtcaatc 37
[0359] <210> 22
[0360] <211> 28
[0361] <212> DNA
[0362] <213> 人工序列(manual sequence)
[0363] <400> 22
[0364] ccgctcgagc ggacgcctgc gacgatgt 28
[0365] <210> 23
[0366] <211> 37
[0367] <212> DNA
[0368] <213> 人工序列(manual sequence)
[0369] <400> 23
[0370] cgcggatccg cgtggtctaa gtcacaattt tgtagtg 37
[0371] <210> 24
[0372] <211> 38
[0373] <212> DNA
[0374] <213> 人工序列(manual sequence)
[0375] <400> 24
[0376] ccgctcgagc ggatgaaaag tattaacacc accactat 38

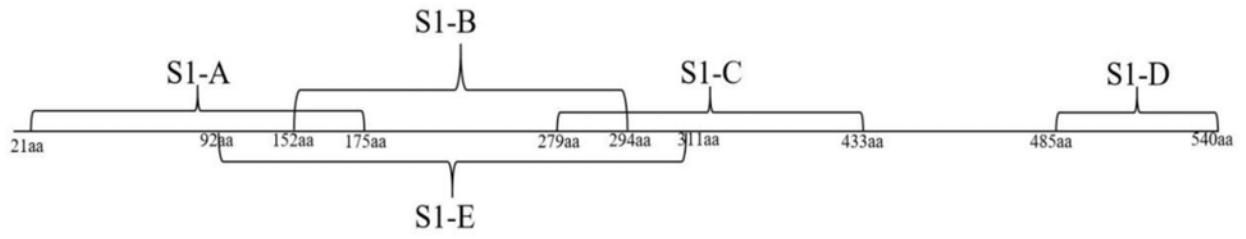


图1

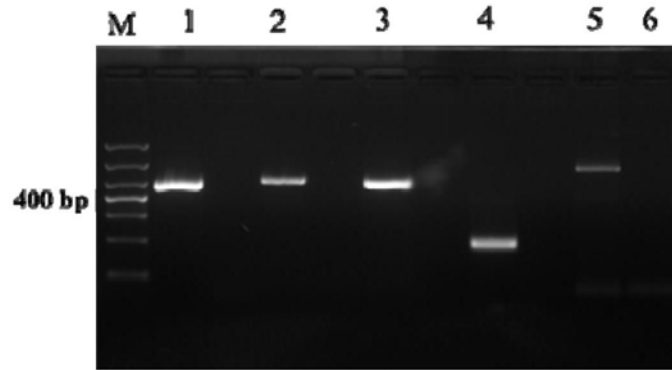


图2

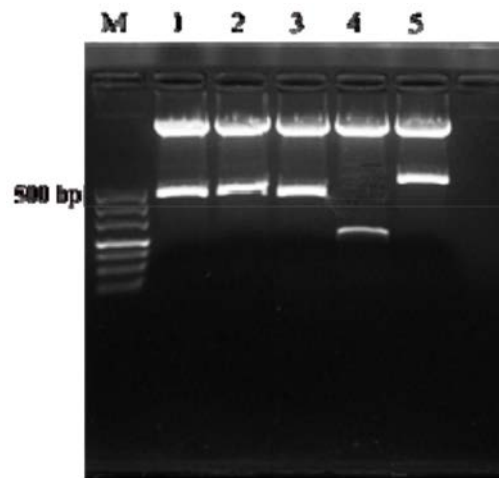


图3

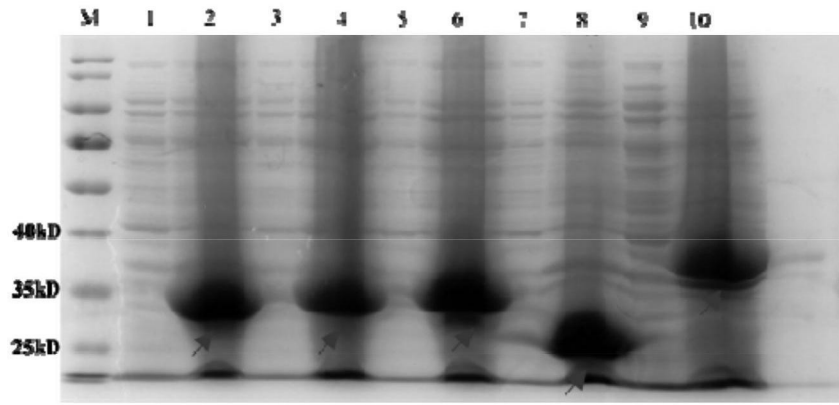


图4

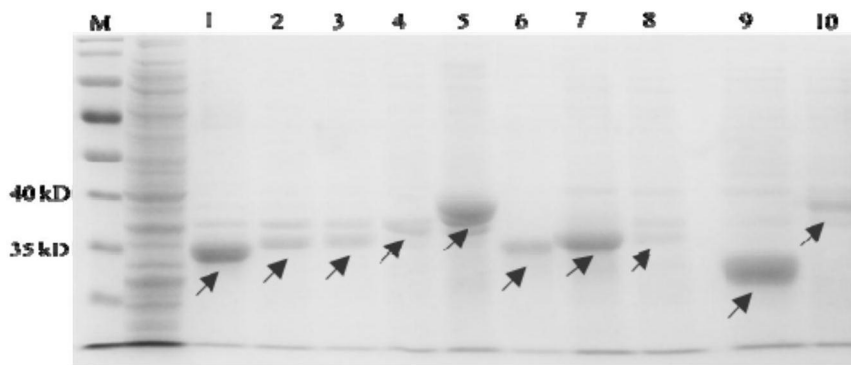


图5

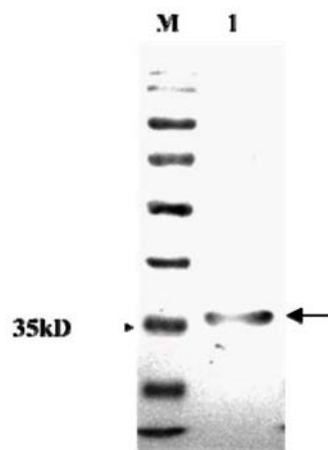


图6

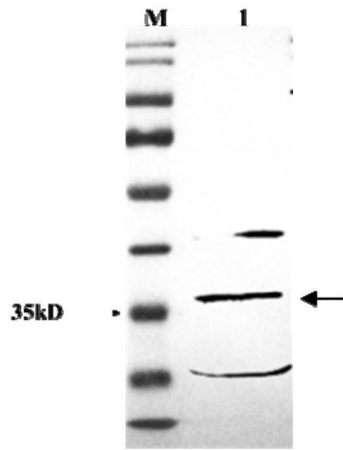


图7

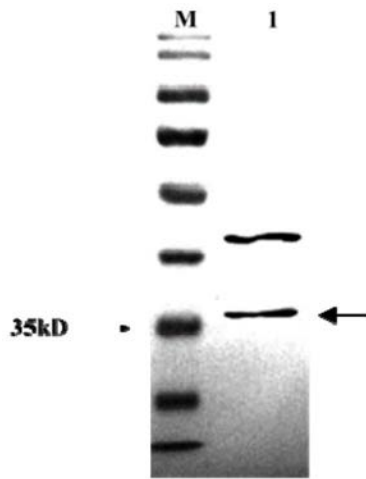


图8

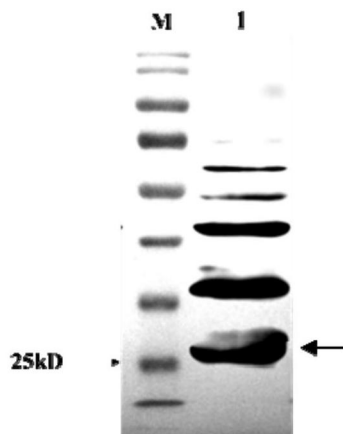


图9

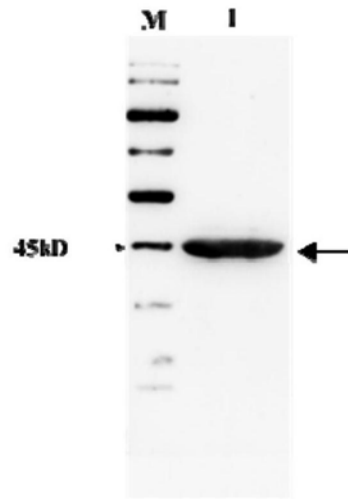


图10