



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112457414 A

(43) 申请公布日 2021.03.09

(21) 申请号 202011459756.4

G01N 33/558 (2006.01)

(22) 申请日 2020.12.11

G01N 33/543 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

(71) 申请人 杭州亿米诺生物科技有限公司

地址 310018 浙江省杭州市杭州经济技术开发区3号大街28号2幢四层401室

(72) 发明人 李晓光 何坚锋 王哲侃

(74) 专利代理机构 杭州信义达专利代理事务所 (普通合伙) 33305

代理人 万景旺

(51) Int. Cl.

G07K 19/00 (2006.01)

G12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

G12N 1/21 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

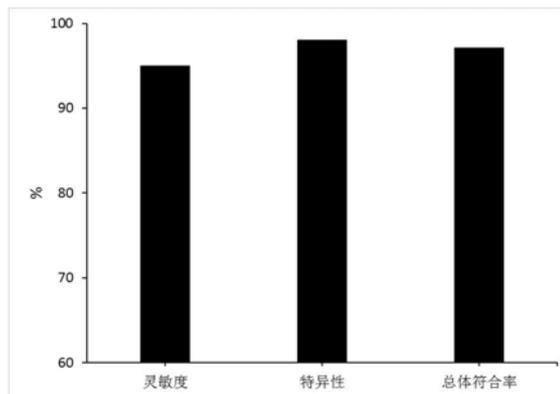
权利要求书1页 说明书8页
序列表2页 附图3页

(54) 发明名称

一种猫疱疹病毒I型gB-gD重组蛋白及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种猫疱疹病毒I型gB-gD重组蛋白,属于动物病毒抗体检测领域。所述重组蛋白包括SEQ ID NO.1所示氨基酸序列或由SEQ ID NO.1所示氨基酸序列组成。本发明还进一步公开了所述重组蛋白的基因,包含所述基因的载体和宿主细胞,以及所述重组蛋白的其制备方法和在检测猫疱疹病毒I型的抗体中应用。利用本发明的重组蛋白检测猫疱疹病毒I型抗体,方便快捷,灵敏度高,与其他病原体无交叉反应,特异性强,具有巨大的临床意义和和广泛的应用前景。



1. 一种猫疱疹病毒I型gB-gD重组蛋白,其特征在于,包括SEQ ID NO.1所示氨基酸序列。
2. 根据权利要求1所述的重组蛋白,其特征在于,由SEQ ID NO.1所示氨基酸序列组成。
3. 一种编码权利要求1或2所述重组蛋白的基因,其特征在于,包括SEQ ID NO.2所示核苷酸序列。
4. 一种表达载体,其特征在于,包括权利要求3所述基因。
5. 一种宿主细胞,其特征在于,含有权利要求4所述表达载体。
6. 一种制备权利要求1或2所述重组蛋白的方法,其特征在于,包括诱导权利要求3所述宿主细胞进行蛋白表达的步骤。
7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述表达载体为pET30a,所述宿主细胞为大肠杆菌。
8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,诱导宿主细胞进行蛋白表达的步骤为:
S1,用含50 μ g/mL卡那霉素的LB培养基37 $^{\circ}$ C培养所述大肠杆菌,
S2,当大肠杆菌培养液OD600至0.5-0.7时,用终浓度为1mM的IPTG进行诱导表达,诱导条件为:25 $^{\circ}$ C,转速200rpm,4h;
S3,将培养液于4 $^{\circ}$ C,7000rpm离心10min,收集菌体;
S4,用缓冲液Binding Buffer破碎菌体;
S5,超声破碎菌体,条件为:600w,超声2s,间隔5s,共80-120次;
S6,4 $^{\circ}$ C,12000rpm离心30min收集上清,所述重组蛋白在上清中。
9. 权利要求1或2所述的重组蛋白在制备用于检测猫疱疹病毒I型抗体的试剂盒中的应用。
10. 一种用于检测猫疱疹病毒I型抗体的试剂盒,其特征在于,包括权利要求1或2所述的重组蛋白。

一种猫疱疹病毒I型gB-gD重组蛋白及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于动物病毒抗体检测领域,具体地,涉及一种猫疱疹病毒I型gB-gD重组蛋白及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 猫疱疹病毒I型(Feline herpesvirus 1,FHV-1)又称猫鼻气管炎病毒,属 α -疱疹病毒科,是具有囊膜的双链DNA病毒,可引起猫科动物急性、高度接触性上呼吸道疾病。该病毒主要侵害仔猫,通过直接接触传播,发病率高达100%,死亡率可达50%。该病最早发现于美国,随后在加拿大、英国等地发现和流行,目前我国也多次报道该病例,并分离到病毒。

[0003] FHV-1隐性感染和感染后康复的猫能长期带毒和排毒,成为传染源。同其他疱疹病毒一样,FHV-1可潜伏在猫的三叉神经节,并在猫免疫力低下时再激活而导致发病,给该病的防控造成困难。因此,加强FHV-1鉴定及诊断方法的建立对该病的防控具有重要意义。

[0004] 病毒分离是鉴定FHV-1最可靠的诊断方法,虽然它不如PCR那样敏感,但却能检测到活的病毒粒子,而不仅仅是它的DNA。虽然病毒分离是最为可靠的检测方法,但其耗时长所以一般不用于常规诊断FHV-1感染。而免疫荧光法、酶联免疫吸附试验(ELISA)、聚合酶链反应(PCR)技术等方法需要使用指定的仪器设备、具备相应的试验条件和技能,难以在基层推广。

发明内容

[0005] 为了解决上述技术问题,本发明采用的技术方案如下:

[0006] 本发明第一方面提供一种猫疱疹病毒I型gB-gD重组蛋白,包括SEQ ID NO.1所示氨基酸序列。

[0007] 在本发明中,重组蛋白也叫融合蛋白或重组融合蛋白,是通过DNA重组技术得到的两个基因重组后的表达产物。

[0008] gB(envelope glycoprotein B)和gD(envelope glycoprotein D)蛋白是猫疱疹病毒主要的免疫原性抗原且高度保守,可诱发和启动机体免疫系统产生免疫应答,诱导宿主细胞产生中和抗体,因此将gB和gD蛋白主要抗原表位融合在一起表达,不仅能够提高诊断的灵敏度,还能减少与其他病原体的交叉反应。

[0009] 在本发明的一些实施方案中,优选地,所述重组蛋白由SEQ ID NO.1所示氨基酸序列组成。

[0010] 本发明的第二方面提供一种编码本发明第一方面所述重组蛋白的基因,其包括SEQ ID NO.2所示核苷酸序列。

[0011] 该基因序列是为了在大肠杆菌中表达所述重组蛋白,根据大肠杆菌对密码子的偏好性,对密码子进行了优化。不同物种对同义密码子的使用频率是不同的,而这种密码子偏好性对翻译过程有影响。如果一条mRNA有很多成簇的稀有密码子,这会对核糖体的运动速度造成负面影响,大大降低蛋白表达水平。在此对基因序列进行密码子优化,适用于大肠杆

菌表达,可以提高蛋白表达效率。

[0012] 本发明的第三方面提供一种表达载体,其包括本发明第二方面所述的基因。

[0013] 在本发明的一些实施方案中,所述表达载体为pET30a,其具有卡那霉素抗性,表达的融合蛋白具有组氨酸(His)标签。

[0014] 本发明的第四方面提供一种宿主细胞,其含有本发明第三方面所述的表达载体。

[0015] 进一步地,所述宿主细胞为真核宿主细胞或原核宿主细胞。

[0016] 在本发明的一些实施方案中,所述宿主细胞为原核宿主细胞。优选地,所述宿主细胞为大肠杆菌,更优选地,大肠杆菌为BL21。利用大肠杆菌进行表达具有周期短、费用低、表达量大等优点。

[0017] 本发明的第五方面提供一种制备本发明第一方面所述重组蛋白的方法,包括诱导本发明第四方面所述宿主细胞进行蛋白表达的步骤。

[0018] 进一步地,所述宿主细胞为真核宿主细胞或原核宿主细胞。

[0019] 在本发明的一些实施方案中,所述宿主细胞为原核宿主细胞。优选地,所述宿主细胞为大肠杆菌,更优选地,大肠杆菌为BL21。利用大肠杆菌进行表达具有周期短、成本低、表达量大等优点。

[0020] 在本发明的一些具体实施方案中,诱导大肠杆菌进行蛋白表达的步骤为:

[0021] S1,用含50 μ g/mL卡那霉素的LB培养基37 $^{\circ}$ C培养所述大肠杆菌,

[0022] S2,当大肠杆菌培养液OD600至0.5-0.7时,用终浓度为1mM的IPTG进行诱导表达,诱导条件为:25 $^{\circ}$ C,转速200rpm,4h;利用该诱导条件,能够使得重组蛋白更加缓慢地表达,有充分的时间进行空间构象的形成,这对重组蛋白发挥功能具有非常重要的作用。

[0023] S3,将培养液于4 $^{\circ}$ C,7000rpm离心10min,收集菌体;

[0024] S4,用缓冲液Binding Buffer破碎菌体;

[0025] S5,超声破碎菌体,条件为:600w,超声2s,间隔5s,共80-120次;

[0026] S6,4 $^{\circ}$ C,12000rpm离心30min收集上清,所述重组蛋白在上清中。

[0027] 优选地,步骤S2中在大肠杆菌培养液OD600至0.6时进行诱导。

[0028] 优选地,步骤S5中,超声破碎100次。采用本发明的破碎方法,避免了破碎过于剧烈,造成重组蛋白损失的情况。

[0029] 在本发明的一些实施方案中,进一步包括对重组蛋白进行纯化的步骤。重组蛋白的纯化方式可以有多种,例如离子交换层析,凝胶过滤层析和亲和层析等方法。在本发明的一些实施方案中,选择亲和层析的方法,由于重组蛋白中加入了His标签,一步纯化能够达到较高的纯度。

[0030] 在本发明的一些具体实施方案中,将包含重组蛋白的上清过Ni柱,然后用洗脱缓冲液Elution Buffer洗脱得到目的蛋白。

[0031] 优选地,所述洗脱缓冲液Elution Buffer的配方为:50mM Tris,0.2M NaCl,0.5M Imidazole,pH8.0。

[0032] 本发明的第六方面提供本发明第一方面所述的重组蛋白在制备用于检测猫疱疹病毒I型抗体的试剂盒中的应用。

[0033] 本发明的第七方面提供一种用于检测猫疱疹病毒I型抗体的试剂盒,包括本发明第一方面所述的重组蛋白。

[0034] 进一步地,所述试剂盒还包括鼠IgG和羊抗鼠IgG。

[0035] 在本发明的一些实施方案中,利用双抗原夹心金标法检测猫疱疹病毒I型抗体。

[0036] 在本发明的一些具体实施方案中,所述试剂盒包括双抗原夹心金标法检测条,所述检测条的试剂方法如下:

[0037] S1,分别制备重组蛋白胶体金复合物和鼠IgG胶体金复合物;

[0038] S2,将所述重组蛋白胶体金复合物和鼠IgG胶体金复合物混合,制备金标垫;

[0039] S3,利用重组蛋白作为检测线,利用羊抗鼠IgG作为质控线,划在硝酸纤维素膜上;

[0040] S4,将滤纸、含有硝酸纤维素膜的聚酯板、金标垫和样本垫安装在底板上,其中滤纸叠加一部分压在聚酯板上,聚酯板叠加一部分压在金标垫上,金标垫叠加一部分压在样本垫上,在聚酯板上分别有测试区和质控区,测试区有检测线(T线),质控区有质控线(C线),检测线靠近金标垫,质控线靠近滤纸,即制备得到检测条。

[0041] 在使用时,滴加生物样本至样本垫处,室温放置10min后判定检测结果,判定标准如下:

[0042] ①两条带出现,其中一条位于质控区,另一条位于测试区,为阳性;

[0043] ②仅质控线出现一条带,在测试区内无条带出现,为阴性;

[0044] ③质控线未出现条带,表明此测试条已损坏,无论检测线是否出现条带,均应当更换新试纸条重新测试。

[0045] 在本发明的一些实施方案中,猫疱疹病毒I型抗体检测结果呈阳性,代表猫生物样本中含有猫疱疹病毒I型抗体,意味着猫具有猫疱疹病毒I型感染或曾被猫疱疹病毒I型感染。

[0046] 在本发明的一些实施方案中,所述生物样本为血清或血浆,或任何其他可能包含抗体的体液。

[0047] 本发明的有益效果

[0048] 相对于现有技术,本发明具有以下有益效果:

[0049] gB和gD蛋白是猫疱疹病毒主要的免疫原性抗原且高度保守,可诱发和启动机体免疫系统产生免疫应答,诱导宿主细胞产生中和抗体,因此将gB和gD蛋白主要抗原表位融合在一起表达,不仅能够提高诊断的灵敏度,还能减少与其他病原体的交叉反应,特异性强,具有巨大的临床意义和广泛的应用前景。

[0050] 通常大多数猫在感染猫疱疹病毒三周时体内抗体水平最高,随后机体内抗体水平快速下降,因此,利用血清学试验检测FHV-1感染急性期和康复之后的双份血清的中和抗体效价,具有回顾性诊断意义。

[0051] 本发明采用的胶体金标记免疫分析法是一种新型分析技术,具有快捷简便、成本低、无污染且无需培训的特点,与传统方法相比更为适合现场检测,具有显色时间短、无需昂贵仪器等优点,有广阔的市场前景和应用价值。

附图说明

[0052] 图1示出了猫疱疹病毒I型gB-gD融合蛋白纯化的凝胶电泳结果。1:细胞破碎后上样;2:流穿;3:50mM Imidazole洗脱;4:0.5M Imidazole洗脱。

[0053] 图2示出了本发明一个实施例的检测试纸条的试剂图。1:样本垫;2:金标垫;3:NC

膜;31:检测线(T线);32:质控线(C线);4:滤纸;5:底板。

[0054] 图3示出了本发明的一个实施例利用试纸条进行检测的结果示意图。T:检测线,C:质控线。

[0055] 图4示出了本发明的一个实施例利用试剂条的临床样本检测结果。S:样本垫,T:检测线,C:质控线,FHV:猫疱疹病毒I型。

[0056] 图5示出了利用本发明的试纸条对临床猫血清样本进行检测的总体结果。

具体实施方式

[0057] 为了使本发明所解决的技术问题、技术方案及有益效果更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明进行进一步详细说明。

[0058] 实施例

[0059] 以下例子在此用于示范本发明的优选实施方案。本领域内的技术人员会明白,下述例子中披露的技术代表发明人发现的可以用于实施本发明的技术,因此可以视为实施本发明的优选方案。但是本领域内的技术人员根据本说明书应该明白,这里所公开的特定实施例可以做很多修改,仍然能得到相同的或者类似的结果,而非背离本发明的精神或范围。

[0060] 除非另有定义,所有在此使用的技术和科学的术语,和本发明所属领域内的技术人员所通常理解的意思相同,在此公开引用及他们引用的材料都将以引用的方式被并入。

[0061] 那些本领域内的技术人员将意识到或者通过常规试验就能了解许多这里所描述的发明的特定实施方案的许多等同技术。这些等同将被包含在权利要求书中。

[0062] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的仪器设备,如无特殊说明,均为实验室常规仪器设备;下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。

[0063] 实施例1猫疱疹病毒I型gB-gD融合蛋白基因表达载体的构建

[0064] 猫疱疹病毒I型gB基因是根据NCBI Gene bank:YP_003331552.2的蛋白序列设计的。根据对蛋白亲疏水性(<https://web.expasy.org/protscale/>)分析后,在预测亲水含量较高区域选取了gB(1-100aa)序列进行融合。gD基因是根据NCBI Gene bank:YP_003331589.1的蛋白序列设计的。根据对蛋白亲疏水性(<https://web.expasy.org/protscale/>)分析后,在预测亲水含量较高区域选取了gD(275-374aa)序列进行融合。

[0065] gB-gD重组蛋白融合蛋白的氨基酸序列序列如下(SEQ ID NO.1):

[0066] MSTRGDLGKRRRGSRWQHGSGYFRQRCFFPSLLGIAATGSRHGNGSSGLTRLARYVSFIWIVLFLVGPR
PVEGQSGSTSEQPRRTVATPEVGGTPPKPTTSGSEDSKRSNDSRGESSGPNWIDIENYTPKNNVPIIISSDDVPTAP
PKGMMNQSVVIPAIIVLSCLIIALILGVIYYILRVKRSRSTAYQQLPPIHTTHHP

[0067] 由于不同物种对同义密码子的使用频率是不同的,而这种密码子偏好性对翻译过程有影响。如果一条mRNA有很多成簇的稀有密码子,这会对核糖体的运动速度造成负面影响,大大降低蛋白表达水平。

[0068] 本发明利用大肠杆菌作为表达系统,为了获得更高的表达效率和更高的表达量,在进行外源蛋白表达时进行了密码子优化,反翻译成核苷酸序列,得到的核苷酸序列如下(SEQ ID NO.2):

[0069] ATGTCCACCCGTGGCGATCTGGGCAAACGTCGTCGTGGCTCCCGTTGGCAGGGCCATTCCGGCTATTTT

CGTCAGCGTTGCTTTTTTCCGTCCTGCTGGGCATTGCGGGCACC GGCTCCC GTCATGGCAATGGCTCCTCCGGCCT
GACCCGTCTGGCGCGTTATGTGTCTTTATTTGGATTGTGCTGTTTCTGGTGGGCCCGCGTCCGGTGAAGGCCAGT
CCGGCTCCACCTCCGAACAGCCGCGTCGTACCGTGGCGACCCCGGAAGTGGGCGGCACCCCGCCGAAACCGACCACC
TCCGGCTCCGAAGATTCCAAACGTTCCAATGATTCCCGTGGCGAATCCTCCGGCCCCGAATTGGATTGATATTGAAAA
TTATACCCCGAAAAATAATGTGCCGATTATTATTTCCGATGATGATGTGCCGACCGCGCCGCCGAAAGGCATGAATA
ATCAGTCCGTGGTGATTCCGGCGATTGTGCTGTCTGCCTGATTATTGCGCTGATTCTGGGCGTGATTTATTATATT
CTGCGTGTGAAACGTTCCCGTTCCACCGCGTATCAGCAGCTGCCGATTATTCATACCACCCATCATCCG

[0070] 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成重组基因序列,并与pET30a质粒连接,形成重组表达载体。

[0071] 实施例2猫疱疹病毒I型gB-gD融合蛋白的表达

[0072] 将猫疱疹病毒I型gB-gD融合基因质粒转化至大肠杆菌BL21中,涂布于含50 μ g/mL卡那霉素(上海生工,货号:K0408)的LB平板上,37 $^{\circ}$ C过夜培养,挑取单克隆菌落,用含有相同浓度的卡那霉素的300mL LB培养基37 $^{\circ}$ C培养至OD600达0.6左右,用终浓度为1mM的IPTG(上海生工,货号:IB0168)进行诱导表达,诱导条件为:25 $^{\circ}$ C,转速200rpm,4h。诱导之后,将培养液4 $^{\circ}$ C,转速7000rpm,离心10min,收集菌体。

[0073] 实施例3猫疱疹病毒I型gB-gD融合蛋白的纯化及复性

[0074] 用50mL上样缓冲液Binding Buffer(50mM Tris,0.2M NaCl,pH8.0)50mL破碎菌体;然后超声破碎,条件为600w,超声2s,间隔5s,共100次;最后12000rpm,30min,4 $^{\circ}$ C离心收集上清,目的蛋白在上清中。接着过Ni柱一步纯化,用洗脱缓冲液Elution Buffer(50mM Tris,0.2M NaCl,0.5M Imidazole,pH8.0)洗脱目的蛋白。利用PAGE凝胶电泳检测目的蛋白,结果如图1所示。

[0075] 由图1可知,纯化后的融合蛋白纯度很高,将纯化后的重组蛋白用透析缓冲液(50mM Tris,0.2M NaCl,pH8.0)透析,每隔12h换一次透析液,共3次。取出透析后的蛋白液,经0.22 μ m滤器过滤后,用BCA法测定浓度后,于-20 $^{\circ}$ C保存备用。

[0076] 实施例4双抗原夹心金标法检测猫疱疹病毒I型抗体

[0077] 1双抗原夹心金标法检测条的制备

[0078] 1.1胶体金的烧制

[0079] 在三角烧瓶中加入1000mL超纯水,在磁力加热搅拌器上加热至沸腾,然后加入10%氯金酸(sigma)4mL,再加入10%柠檬酸三钠溶液6mL,继续加热沸腾5min,然后冷却至室温后用0.22 μ m过滤器过滤胶体金后放置4 $^{\circ}$ C备用。

[0080] 1.2重组猫疱疹病毒I型gB-gD融合蛋白的标记

[0081] 取胶体金溶液100mL放入烧杯中,搅拌加入0.2M K_2CO_3 调节金水pH至9.5,搅拌后加入2mg纯化后的重组猫疱疹病毒I型gB-gD融合蛋白,室温搅拌15min,加入1mL 10%BSA溶液,室温搅拌15min后12000rpm离心10min,将上清小心吸出弃去,沉淀用金标稀释液(20mM Tris,1%BSA,0.03%Proclin300,pH8.0)定容至1mL,此为标记好的重组猫疱疹病毒I型gB-gD融合蛋白胶体金复合物。

[0082] 1.3鼠IgG标记

[0083] 取胶体金溶液100mL放入烧杯中,搅拌加入0.2M K_2CO_3 调节金水pH至7.0,搅拌后加入1mg鼠IgG(杭州隆基生物技术有限公司,货号:AS00901),室温搅拌15min,加入1mL 10%

BSA溶液,室温搅拌15min后12000rpm离心10min,将上清小心吸出弃去,沉淀用金标稀释液(20mM Tris,1%BSA,0.03%Proclin300,pH8.0)定容至1mL,此为标记好的鼠IgG胶体金复合物。

[0084] 将上述金标复合物用金标稀释液稀释100倍后与1.2步骤中稀释后的猫疱疹病毒I型gB-gD融合蛋白胶体金复合物混合后浸泡玻璃纤维,37℃烘干4h后即制成金标垫。

[0085] 1.4重组猫疱疹病毒I型gB-gD融合蛋白的点膜

[0086] 用点膜稀释液(50mM Tris,2%蔗糖,pH8.5)稀释纯化后gB-gD融合蛋白至0.9mg/mL做为胶体金试纸条的检测线(Test-Line,T线),用相同稀释液稀释羊抗鼠IgG(杭州隆基生物技术有限公司,货号:PS00901)至0.3mg/mL做为胶体金试纸条的质控线(Control-Line,C线),将上述两种稀释之后的溶液划线至硝酸纤维素膜上,37℃烘干过夜。

[0087] 1.5双抗原夹心金标法检测猫疱疹病毒I型抗体试纸条的组装

[0088] 将以上金标垫、包被好原料至硝酸纤维素膜(NC膜)的聚酯板及滤纸、样本垫等安装底板上,组装成猫疱疹病毒I型抗体双抗原夹心法检测试纸条。具体安装方式如图2所示:分别将样本垫1、金标垫2、NC膜3和滤纸4安装在底板5上。其中样本垫1叠加一部分压在金标垫2上,金标垫2叠加一部分压在NC膜3上,滤纸4叠加一部分压在NC膜3上。其中NC膜3分为测试区和质控区,测试区设置检测线31(T线),质控区设置质控线32(C线),检测线31靠近金标垫2,质控线32靠近滤纸4。

[0089] 进一步,将组装好的试纸条用切条机切割成3mm条子,然后装入特别制定的塑料卡中,即成为成熟的检测试剂卡。

[0090] 2双抗原夹心金标法检测猫疱疹病毒I型抗体试纸条/卡的检测

[0091] 加入90μL待检测样本(猫血清、血浆)至样本加样处(S),室温放置10min后判定结果,结果判定标准如下(如图3所示):

[0092] ①两条带出现,其中一条位于质控区,另一条位于测试区,为阳性;

[0093] ②仅质控线出现一条带,在测试区内无条带出现,为阴性;

[0094] ③质控线未出现条带,表明此测试条已损坏,无论检测线是否出现条带,均应当更换新试纸条重新测试。

[0095] 3双抗原夹心金标法检测猫疱疹病毒I型抗体试纸条/卡的检测结果

[0096] 一共检测20份猫疱疹病毒I型感染阳性猫血清(样本编号1~20),及50份正常未患病且未经免疫的猫血清(样本编号21~70),部分检测结果如图4所示,其中T线和C线两条线的表示检测结果为阳性,只有C线一条线的表示检测结果为阴性。

[0097] 检测结果如表1所示:20份阳性血清中检测出阳性19例,漏检1例(7号样本7),在50份阴性血清中出现假阳1例(37号样本)。

[0098] 表1猫疱疹病毒I型抗体检测结果

[0099]

样本 编号	血清样本来源	检测结果			样本 编号	血清样本来源	检测结果		
		T线 是否 显示	C线 是否 显示	判断 结果			T线 是否 显示	C线 是否 显示	判断 结果
1	猫疱疹病毒I型 感染阳性猫	是	是	阳性	36	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性
2	猫疱疹病毒I型 感染阳性猫	是	是	阳性	37	正常未患病且 未经免疫猫	是	是	阳性
3	猫疱疹病毒I型 感染阳性猫	是	是	阳性	38	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性
4	猫疱疹病毒I型 感染阳性猫	是	是	阳性	39	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性
5	猫疱疹病毒I型 感染阳性猫	是	是	阳性	40	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性
6	猫疱疹病毒I型 感染阳性猫	是	是	阳性	41	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性
7	猫疱疹病毒I型 感染阳性猫	否	是	阴性	42	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性
8	猫疱疹病毒I型 感染阳性猫	是	是	阳性	43	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性
9	猫疱疹病毒I型 感染阳性猫	是	是	阳性	44	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性
10	猫疱疹病毒I型 感染阳性猫	是	是	阳性	45	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性
11	猫疱疹病毒I型 感染阳性猫	是	是	阳性	46	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性
12	猫疱疹病毒I型 感染阳性猫	是	是	阳性	47	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性
13	猫疱疹病毒I型 感染阳性猫	是	是	阳性	48	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性
14	猫疱疹病毒I型 感染阳性猫	是	是	阳性	49	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性
15	猫疱疹病毒I型 感染阳性猫	是	是	阳性	50	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性
16	猫疱疹病毒I型 感染阳性猫	是	是	阳性	51	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性
17	猫疱疹病毒I型 感染阳性猫	是	是	阳性	52	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性
18	猫疱疹病毒I型 感染阳性猫	是	是	阳性	53	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性
19	猫疱疹病毒I型 感染阳性猫	是	是	阳性	54	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性
20	猫疱疹病毒I型 感染阳性猫	是	是	阳性	55	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性
21	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性	56	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性
22	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性	57	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性

[0100]	23	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性	58	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性
	24	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性	59	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性
	25	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性	60	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性
	26	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性	61	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性
	27	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性	62	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性
	28	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性	63	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性
	29	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性	64	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性
	30	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性	65	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性
	37	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性	66	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性
	32	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性	67	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性
	33	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性	68	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性
	34	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性	69	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性
	35	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性	70	正常未患病且 未经免疫猫	否	是	阴性

[0101] 由此可知,样本检测的灵敏度和特异性分别为95%和98%,整体符合率为97.1%,如图5所示。

[0102] 以上结果表明,利用本发明的重组猫疱疹病毒I型gB-gD融合蛋白检测猫疱疹病毒I型,具有非常高的的灵敏度和特异性,可以作为制作猫疱疹病毒I型抗体检测试纸条的原料,并可以在临床检测中广泛应用。

[0103] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

序列表

<110> 杭州亿米诺生物科技有限公司

<120> 一种猫疱疹病毒I型gB-gD重组蛋白及其制备方法和应用

<130> AJ2010241

<160> 2

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 200

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

```

Met Ser Thr Arg Gly Asp Leu Gly Lys Arg Arg Arg Gly Ser Arg Trp
1           5           10           15
Gln Gly His Ser Gly Tyr Phe Arg Gln Arg Cys Phe Phe Pro Ser Leu
           20           25           30
Leu Gly Ile Ala Ala Thr Gly Ser Arg His Gly Asn Gly Ser Ser Gly
           35           40           45
Leu Thr Arg Leu Ala Arg Tyr Val Ser Phe Ile Trp Ile Val Leu Phe
           50           55           60
Leu Val Gly Pro Arg Pro Val Glu Gly Gln Ser Gly Ser Thr Ser Glu
65           70           75           80
Gln Pro Arg Arg Thr Val Ala Thr Pro Glu Val Gly Gly Thr Pro Pro
           85           90           95
Lys Pro Thr Thr Ser Gly Ser Glu Asp Ser Lys Arg Ser Asn Asp Ser
           100          105          110
Arg Gly Glu Ser Ser Gly Pro Asn Trp Ile Asp Ile Glu Asn Tyr Thr
           115          120          125
Pro Lys Asn Asn Val Pro Ile Ile Ile Ser Asp Asp Asp Val Pro Thr
           130          135          140
Ala Pro Pro Lys Gly Met Asn Asn Gln Ser Val Val Ile Pro Ala Ile
145          150          155          160
Val Leu Ser Cys Leu Ile Ile Ala Leu Ile Leu Gly Val Ile Tyr Tyr
           165          170          175
Ile Leu Arg Val Lys Arg Ser Arg Ser Thr Ala Tyr Gln Gln Leu Pro
           180          185          190
Ile Ile His Thr Thr His His Pro
           195          200

```

<210> 2

<211> 600

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

```
atgtccaccc gtggcgatct gggcaaactg cgtcgtggct cccgttggca gggccattcc 60
ggctatatttc gtcagcggtg cttttttccg tcctgtctgg gcattgcggc gaccggctcc 120
cgtcatggca atggctcctc cggcctgacc cgtctggcgc gttatgtgtc ctttatttgg 180
attgtgctgt ttctggtggg cccgcgtccg gtggaaggcc agtccggctc cacctccgaa 240
cagccgcgtc gtaccgtggc gacccccgaa gtgggcggca ccccgccgaa accgaccacc 300
tccggctccg aagattccaa acgttccaat gattcccgtg gcaatcctc cggccccgaa 360
tgattgata ttgaaaatta tacccccgaa aataatgtgc cgattattat ttccgatgat 420
gatgtgccga ccgcgccgcc gaaaggcatg aataatcagt ccgtggtgat tccggcgatt 480
gtgctgtcct gcctgattat tgcctgatt ctgggcgtga tttattatat tctgcgtgtg 540
aaacgttccc gtccaccgc gtatcagcag ctgccgatta ttcataccac ccatcatccg 600
```

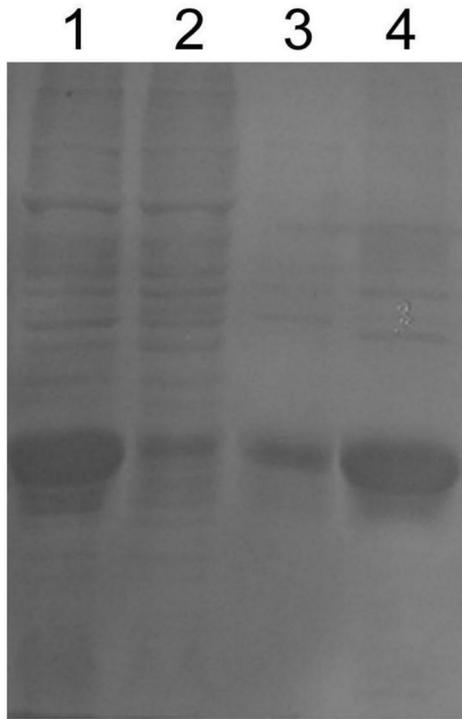


图1

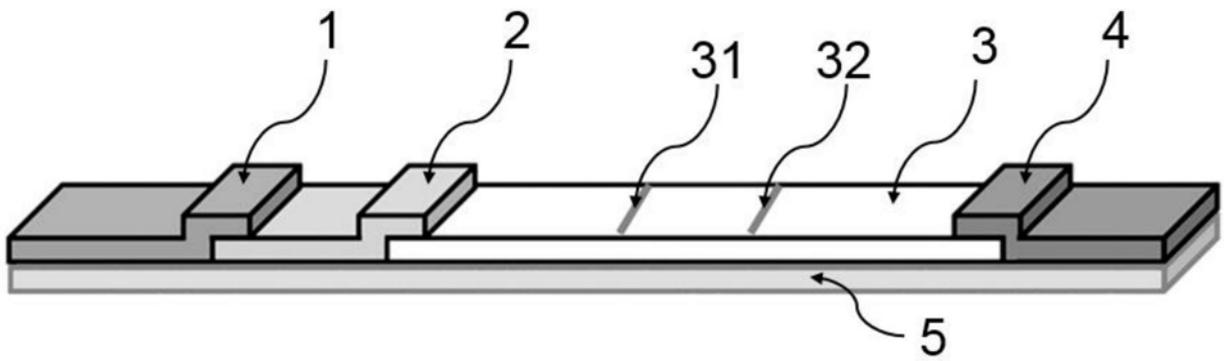


图2

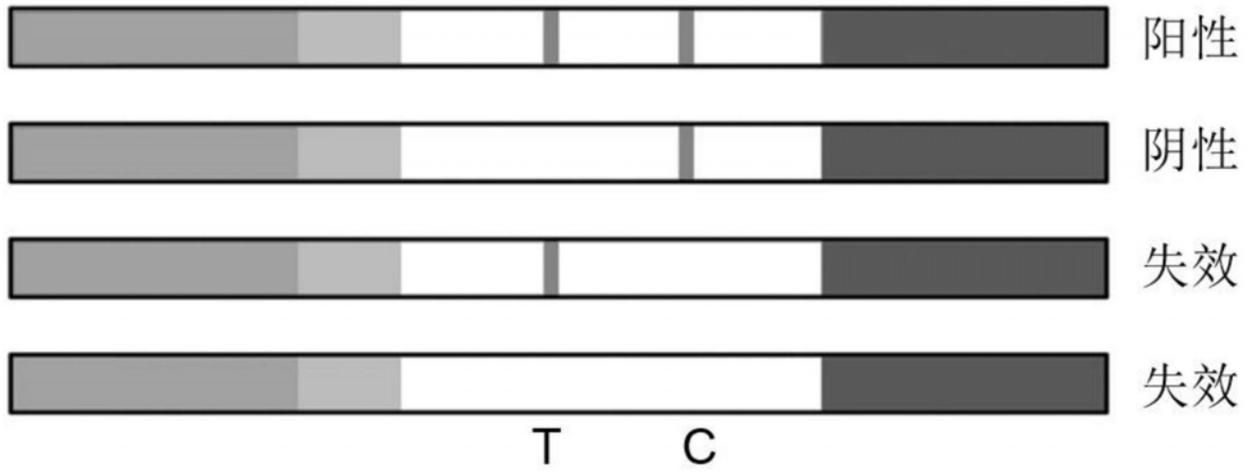


图3

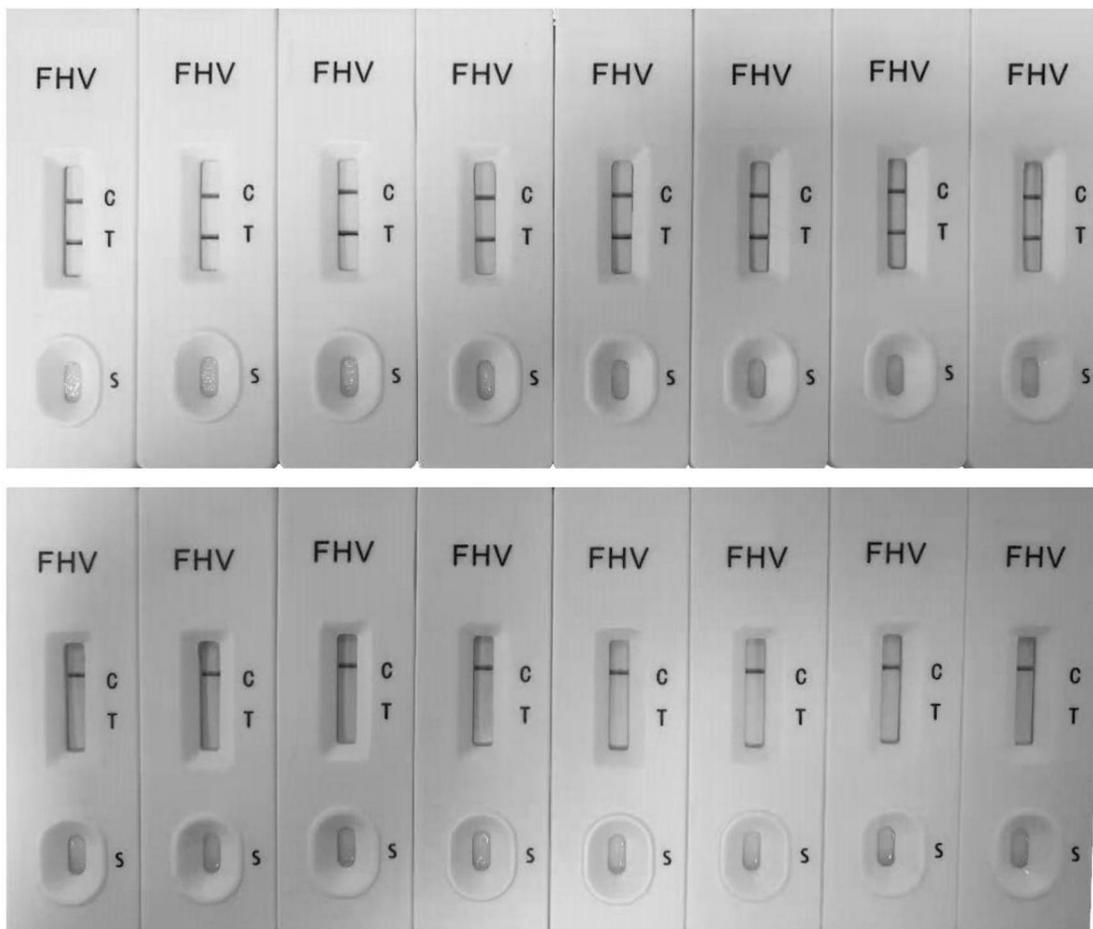


图4

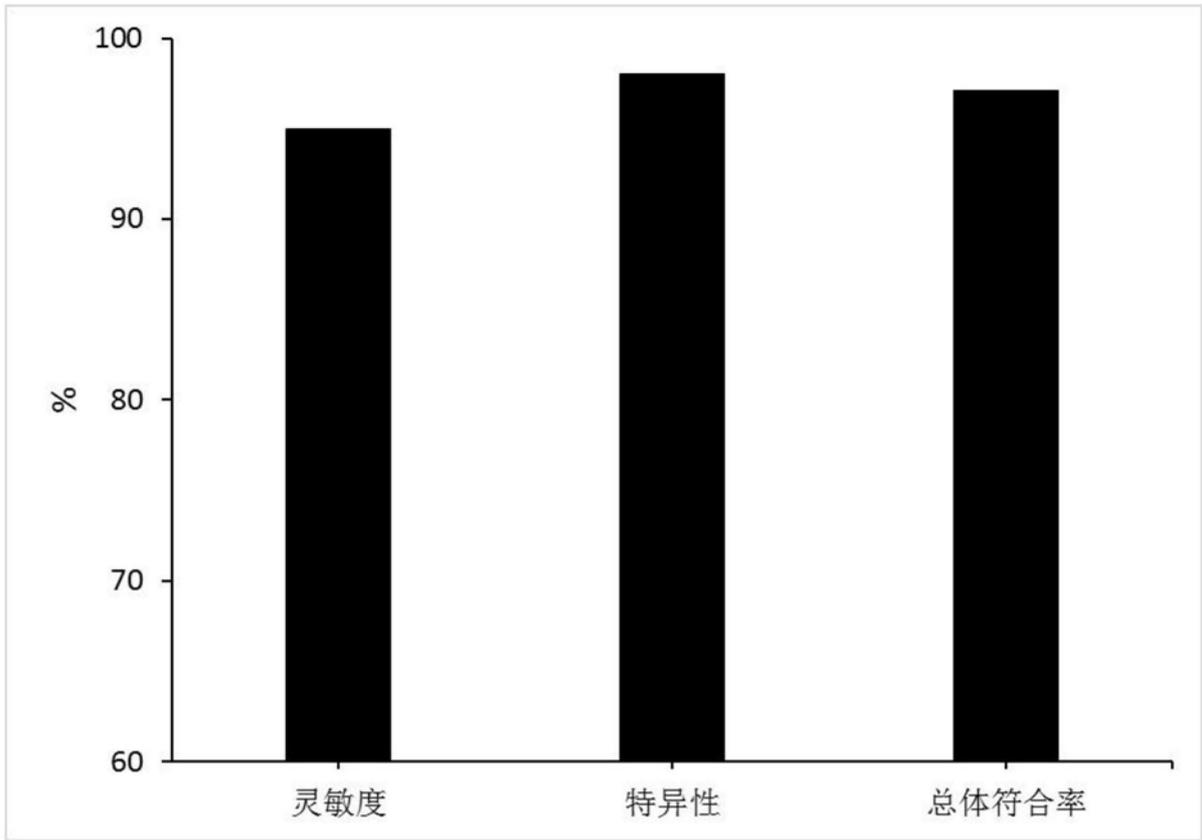


图5