



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 116987155 B

(45) 授权公告日 2024. 08. 27

(21) 申请号 202211121266.2

A61K 39/12 (2006.01)

(22) 申请日 2022.09.15

A61P 31/20 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

G01N 33/569 (2006.01)

申请公布号 CN 116987155 A

G01N 33/68 (2006.01)

(43) 申请公布日 2023.11.03

(56) 对比文件

(73) 专利权人 河南农业大学

CN 114940705 A, 2022.08.26

地址 450000 河南省郑州市郑东新区龙子

CN 112724203 A, 2021.04.30

湖高校园区15号

审查员 蔡锐铍

(72) 发明人 庄国庆 孙爱军 张帅 张改平

(74) 专利代理机构 西安铭泽知识产权代理事务

所(普通合伙) 61223

专利代理师 庄华红

(51) Int. Cl.

C07K 14/01 (2006.01)

权利要求书1页 说明书10页

C07K 16/08 (2006.01)

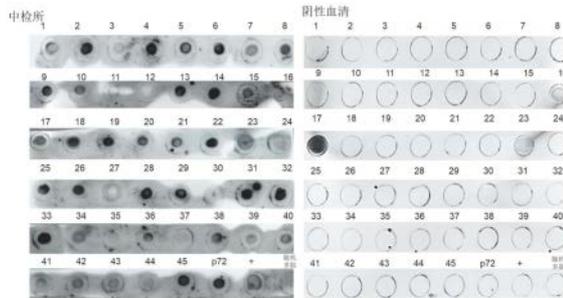
序列表(电子公布) 附图5页

(54) 发明名称

一种非洲猪瘟病毒抗原表位肽及应用

(57) 摘要

本发明涉及免疫技术、分子生物学和分子病毒学领域,尤其涉及一种非洲猪瘟病毒抗原表位肽及应用。该非洲猪瘟病毒抗原表位肽的氨基酸序列如SEQIDNO:1~9所示。本发明利用非洲猪瘟病毒感染阳性灭活血清结合扩增高通量测序技术筛选得到非洲猪瘟病毒抗原表位肽,该抗原表位肽及其衍生的具有同等功能的抗原表位肽能够用于制备非洲猪瘟病毒的特异性抗体以及检测非洲猪瘟病毒的试剂、试剂盒或生物芯片,为研发预防和/或治疗非洲猪瘟病毒感染疫苗提供了支撑。



1. 一种非洲猪瘟病毒抗原表位肽,其特征在于,所述抗原表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:1。
2. 一种权利要求1所述的非洲猪瘟病毒抗原表位肽在制备检测非洲猪瘟病毒的试剂、试剂盒和/或生物芯片中的用途。
3. 一种非洲猪瘟病毒抗原,其特征在于,其是由权利要求1所述非洲猪瘟病毒抗原表位肽与载体蛋白偶联制备而成。
4. 一种用于预防或治疗非洲猪瘟病毒的药物,其特征在于,其包括权利要求1所述非洲猪瘟病毒抗原表位肽。
5. 一种核酸分子,其特征在于,其编码权利要求1所述非洲猪瘟病毒抗原表位肽。
6. 一种表达载体,其特征在于,其含有权利要求5所述核酸分子。

一种非洲猪瘟病毒抗原表位肽及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫技术、分子生物学和分子病毒学领域,尤其涉及一种非洲猪瘟病毒抗原表位肽及应用。

背景技术

[0002] 非洲猪瘟病毒(ASFV)作为非洲猪瘟病毒科、非洲猪瘟病毒属的唯一成员,感染家猪、野猪后,能够引起急性、出血性的临床症状,感染3-7d就可引起感染猪只死亡且感染致死率高达100%。

[0003] ASFV是双链DNA病毒,基因组长170-193Kb,病毒颗粒直径为260-300nm,编码超过150种蛋白。ASFV具有外膜、外衣壳、内膜、内衣壳、核壳五层囊膜结构,结构复杂。ASFV感染过程中不同结构的抗原在感染过程中发挥不同作用。

[0004] 非洲猪瘟作为重点监控的I类动物疫病,目前尚无安全有效的疫苗,已有的疫苗研究中包括灭活疫苗、亚单位疫苗、载体疫苗、天然弱毒疫苗、基因工程缺失疫苗等,这些疫苗在保护率、广谱性、安全性方面存在一定的不足,制约ASFV疫苗研发的主要原因包括ASFV关键保护性抗原不明确、对天然免疫及适应性免疫在ASFV保护过程中发挥的作用未知。现有的研究表明ASFV的p72、p30、p54、CD2v可能是ASFV的保护性抗原。I177L、DP148R、A238L、9GL、DP96R及MGF家族部分基因缺失的毒株对ASFV具有保护作用。

[0005] 抗原的线性表位具有广谱保护效应,表位是病毒结构蛋白的重要抗原元件,一般为3~20氨基酸序列,在诱导机体体液免疫和细胞免疫反应中发挥重要作用。表位的研究对于完善病毒蛋白结构及病毒与宿主作用关系的研究意义重大,同时对病毒的检测以及表位疫苗的制备提供材料基础。因此,不断研究新的有效、安全、广谱的ASFV抗原表位对开发ASFV感染疫苗具有重要的意义。

发明内容

[0006] 鉴于以上技术问题,本发明利用ASFV感染阳性灭活血清结合扩增子高通量测序技术筛选得到ASFV抗原,并对筛选的抗原片段进行了验证。

[0007] 本发明第一方面,提供一种非洲猪瘟病毒抗原表位肽,所述抗原表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:1~9所示。

[0008] 本发明第二方面,提供一种所述非洲猪瘟病毒抗原表位肽在制备检测非洲猪瘟病毒的试剂、试剂盒和/或生物芯片中的用途。

[0009] 本发明第三方面,提供一种非洲猪瘟病毒抗原,其是由所述抗原表位肽与载体蛋白偶联制备而成。

[0010] 本发明第四方面,提供一种非洲猪瘟病毒特异性抗体,其是由所述非洲猪瘟病毒抗原制备而成的单克隆抗体或多克隆抗体。

[0011] 本发明第五方面,提供一种用于预防或治疗非洲猪瘟病毒的药物,其包括所述非洲猪瘟病毒抗原表位肽和/或所述非洲猪瘟病毒抗原表位肽经修饰或改造后的产物。

[0012] 优选地,所述修饰的形式选自磷酸化、乙酰化、糖基化、酰胺化和/或利用已知的保护基团、封闭基团衍生化;所述改造选自蛋白酶水解和/或生产重组蛋白。

[0013] 本发明第六方面,提供一种核酸分子,其含有编码所述非洲猪瘟病毒抗原表位肽的序列。

[0014] 本发明第七方面,提供一种表达载体,其含有所述核酸分子。

[0015] 对比现有技术,本发明的有益效果:

[0016] 本发明通过ProtinA+G磁珠纯化非洲猪瘟病毒感染阳性灭活血清,利用商品化的噬菌体随机十二肽库通过减性淘选和扩增子高通量测序以及本地化的Short-blastp分析筛选得到非洲猪瘟病毒抗原表位肽,并对筛选获得的非洲猪瘟病毒抗原表位肽进行验证,该非洲猪瘟病毒抗原表位肽及其衍生的具有同等功能的抗原表位肽能够用于制备非洲猪瘟病毒的特异性抗体以及检测非洲猪瘟病毒的试剂、试剂盒或生物芯片,对非洲猪瘟病毒的血清学检测具有重要意义,为研发预防和/或治疗非洲猪瘟病毒感染疫苗提供了支撑。

附图说明

[0017] 图1为ProtinA+G磁珠纯化血清SDS-PAGE结果示意图;

[0018] 图2为使用Goat anti pig-HRP通过Westernblotting鉴定ProtinA+G磁珠纯化血清的结果示意图;

[0019] 图3为四轮噬菌体减性淘选滴度测定结果示意图,图中①~④表示四轮淘选;

[0020] 图4为PCR扩增噬菌体随机肽区域的扩增子结果示意图;

[0021] 图5为扩增子高通量测序数据处理示意图;

[0022] 图6为扩增子片段长度分布结果示意图;

[0023] 图7是扩增子高通量测序reads数据QC结果示意图;

[0024] 图8为本地化Short-blastp结果重叠分析筛选部分表位在结构上展示的示意图;

[0025] 图9为ASFV阳性血清Dot-blot检测ASFV抗原区段结果示意图;其中1~40为表5中编号1~40对应的抗原表位肽,41~45为表6中P72蛋白的抗原表位肽。

具体实施方式

[0026] 为能清楚说明本方案的技术特点,下面通过具体实施方式,结合附图,对本发明进行详细阐述。本发明的范围并不限于下述实施例。本领域的专业人员能够理解,在不背离本发明的精神和范围的前提下,可以对本发明进行各种变化和修饰。

[0027] 下述实施例中所涉及的仪器、试剂、材料等,若无特别说明,均为现有技术中已有的常规仪器、试剂、材料等,可通过正规商业途径获得。下述实施例中所涉及的实验方法,检测方法等,若无特别说明,均为现有技术中已有的常规实验方法,检测方法等。

[0028] 实施例1

[0029] 非洲猪瘟病毒(ASFV)体液免疫相关抗原的筛选

[0030] 1、试验材料

[0031] 商品化噬菌体随机十二肽库购自NEB生物,ASFV阳性血清购自中国兽医药品监察所,ASFV抗原区域多肽由上海肽谷生物技术公司合成,Primer STAR Max购自宝日医生物,扩增子测序建库、上机测序、拆分、分析均由苏州金唯智生物技术有限公司完成。

[0032] 2、溶液配制

[0033] (1) TBS缓冲液:称取8.77g NaCl、7.88g Tris,溶于800mL的去离子水中,用浓HCl调节溶液的pH值至7.4,加水定容至1L,121°C高压灭菌20min,室温保存备用;

[0034] (2) 0.1% TBST缓冲液:在TBS缓冲液的基础上,加入1mL Tween-20,121°C高压灭菌20min,室温保存备用;

[0035] (3) 0.3% TBST缓冲液:在TBS缓冲液的基础上,加入3mL Tween-20,121°C高压灭菌20min,室温保存备用;

[0036] (4) 0.5% TBST缓冲液:在TBS缓冲液的基础上,加入5mL Tween-20,121°C高压灭菌20min,室温保存备用;

[0037] (5) 盐酸四环素贮存液:称取0.5g盐酸四环素粉末,加入去离子水定容到100mL,使用0.22 μ m滤膜过滤除菌后,分装-20°C保存;

[0038] (6) 甘氨酸-HCl洗脱液:称取甘氨酸1.5g、BSA 0.1g,溶解于80mL去离子水中,使用浓盐酸调节pH至2.2,4°C保存。

[0039] (7) Tris-HCl缓冲液 (pH 9.2):称取Tris 15.8g溶于80mL去离子水中,浓盐酸调节pH至9.2,去离子水定容至100mL,121°C高压灭菌20min,室温保存备用;

[0040] (8) NaI溶液:取适量NaI溶解于pH 8.0且加入EDTA (1mM) 的Tris-HCl (10mM) 的缓冲液中,使NaI终浓度为4M/L;

[0041] (9) PEG/NaCl溶液:称取10g PEG 8000、7.3g NaCl溶解定容至50mL,高压灭菌后,室温保藏,PEG质量比为20%,NaCl浓度为2.5M。

[0042] (10) PBS缓冲液:称取8.0gNaCl、0.2g KCl、1.44g Na₂HPO₄、0.24g KH₂PO₄,溶于800mL的去离子水中,用HCl调节溶液的pH值至7.4,加水定容至1L,121°C高压灭菌20min,室温保存备用;

[0043] (11) PBST缓冲液:向1L高压灭菌后的PBS中加入500 μ L的Tween-20,混匀,4°C保存;

[0044] (12) 封闭液:称取5.0g脱脂牛奶,加入到100mL PBST缓冲液中,溶解后置于4°C保存;

[0045] (13) 包被缓冲液:称取8.58g Na₂CO₃ · 10H₂O和5.8g NaHCO₃加入去离子水中,定容至1L,调节PH至9.5,4°C保存;

[0046] (14) IPTG:将2g IPTG溶解至8mL超纯水中,定容至10mL,用0.22 μ m滤器过滤除菌。分装至1.5mL EP管中,-20°C保存;

[0047] (15) 20mg/ml X-gal:称取200mg X-gal粉末溶解于二甲基甲酰胺 (DMF) 溶液,分装到无菌1.5mL EP管中,-20°C保存;

[0048] (16) 卡那霉素:将100mg卡那霉素溶解于足量的超纯水中,定容至10mL,使用0.22 μ m滤膜过滤除菌后,分装至1.5mL EP管中,-20°C保存;

[0049] (17) LB培养基:称取10g胰蛋白胨、5g酵母提取物、5g NaCl,溶于800mL去离子水中,用NaOH调PH至7.4,定容至1L,121°C高压灭菌20min,室温保存备用;

[0050] (18) LB/IPTG/X-gal平板:每1L LB培养基添加15g琼脂粉,高压灭菌后,温度下降至55°C左右加入IPTG 1mL、20mg/ml X-gal 2mL、相应浓度的抗生素,配制LB平板。

[0051] 3、试验方法

[0052] 3.1、ProteinA+G磁珠纯化血清中抗体

[0053] 用移液器轻轻吹打重悬ProteinA+G磁珠,按照每500 μ l样品10 μ l或20 μ l磁珠悬浊液,取适量ProteinA+G磁珠至一洁净离心管中,加入1X TBS至最终体积为约0.5ml;用移液器轻轻吹打重悬ProteinA+G磁珠。置于磁力架上分离10秒,去除上清。重复上述步骤两次;按照初始体积的量,用1X TBS重悬Protein A+G磁珠,吸除上清,加入500 μ L抗体工作液或正常IgG工作液,重悬后在室温翻转混合仪上翻转孵育15~60min。用抗体种属相同的正常IgG配制以用于去除非特异性结合或作为阴性对照。加入500 μ L的1X TBS,用移液器轻轻吹打重悬ProteinA+G磁珠。置于磁力架上分离10秒,去除上清。重复洗涤三次。按照初始体积的量,用1X TBS重悬ProteinA+G磁珠。

[0054] 3.2、聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)鉴定ProteinA+G磁珠纯化血清

[0055] 将纯化血清后的磁珠加入5*蛋白上样缓冲液,加热变性后,进行12.5% SDS-PAGE(电压80V,30min压线,150V,60min),使用0.05%考马斯亮蓝染色液室温染色1h,摇床振动脱色过夜。

[0056] 3.3、Westernblotting评估ProteinA+G磁珠纯化血清

[0057] ProteinA+G磁珠纯化血清在12.5% SDS-PAGE凝胶进行电泳分离,将蛋白转印到PVDF膜,使用5%脱脂牛奶封闭1h后,用稀释度为1:5000的HRP标记山羊抗猪IgG作为二抗孵育。室温下孵育1h后,PBST洗3次,每次10min,然后加入Super SignalWest Pico化学发光膜底物(Thermo Fisher Scientific,USA)使用Amersham Imager 680发光显影。

[0058] 3.4、噬菌体随机十二肽库减性淘选

[0059] (1)取-80 $^{\circ}$ C保存的E.coli ER2738甘油菌,在LB-Tet平板上划线,37 $^{\circ}$ C,过夜培养。划线平板放于4 $^{\circ}$ C贮存,有效期为1个月。

[0060] (2)挑取E.coli ER2738单克隆接种于30mL LB液体培养基,37 $^{\circ}$ C、170rpm下培养5h,OD₆₀₀值在0.3~0.8为对数生长期。将培养好的菌液放4 $^{\circ}$ C冰箱贮存。

[0061] (3)E.coli ER2738培养至对数生长期前期OD₆₀₀在0.01~0.05,4 $^{\circ}$ C贮存备用。

[0062] (4)封闭液加入包被抗体的磁珠或磁珠中室温封闭1h。

[0063] (5)取出已经封闭好的磁珠,磁力架分离,去除封闭液。

[0064] (6)每轮筛选均使用TBS缓冲液500 μ L稀释10 μ L含10¹¹个噬菌体的原始文库或上一轮淘选后扩增的噬菌体文库,加入到未包被的proteinA+G的磁珠中,室温温和震荡孵育。磁力架分离未结合的稀释液上清加入到包被ASFV阴性血清的proteinA+G的磁珠中,室温温和震荡孵育。磁力架分离未结合的稀释液上清加入到包被ASFV阳性血清的proteinA+G的磁珠中,室温温和震荡孵育(详情见表1)。

[0065] (7)磁力架分离未结合的稀释液中未结合的噬菌体,用磁力架分离,使用TBST洗5~10次。

[0066] (8)取100 μ L甘氨酸-盐酸(0.2mol/L,pH 2.2)加入包被ASFV阳性血清的proteinA+G的磁珠中来洗脱与ASFV阳性血清靶分子结合的噬菌体,加入后放于振荡器上轻微摇动10min,磁力架分离上清,将洗脱液吸入洁净无菌的1.5ml离心管里;然后加15 μ L Tris-HCL(pH 9.2)中和上述洗脱液,混匀后4 $^{\circ}$ C可贮存过夜,加入等量无菌甘油后,-20 $^{\circ}$ C冰箱长期保存。

[0067] 3.5、噬菌体滴度测定

[0068] 取10 μ L洗脱物在含有IPTG与X-gal LB琼脂平板上测其噬菌体滴度,使用对数生长

期E.coil ER 2738 (OD₆₀₀值0.5)对洗脱噬菌体进行10倍梯度稀释。取适当稀释度涂布LB-IPTG-X-gal平板,37°C过夜培养,计数蓝色噬斑数量和对应稀释度,计算噬菌体滴度。滴度定量好的噬菌体可放于4°C冰箱贮存,加入等量无菌甘油后,-20°C冰箱长期保存。

[0069] 3.6、噬菌体洗脱液扩增与富集

[0070] (1) 测完滴度后剩余洗脱物一半加入到已培养到处于对数前期的30mL E.coli ER2738培养物中,37°C,300rpm培养5h。

[0071] (2) 收集培养物于无菌的50mL离心管中,4°C、10,000rpm,离心10min;将上清转移至新的无菌离心管中;4°C、10,000rpm,离心6min。

[0072] (3) 将上清的80%体积转移到新的离心管,加入转移液体体积1/6的PEG/NaCl,4°C静置4-8h或者沉淀过夜。

[0073] (4) 4°C、10,000rpm,离心10min,弃上清,噬菌体沉淀溶解于1mLTBS,加入1/6体积的PEG/NaCl,4°C静置2h。

[0074] (5) 4°C、15,000rpm,离心15min,弃上清,将噬菌体沉淀溶解于150μL TBS中,4°C、15,000rpm,离心1min,将上清转移到新的洁净的离心管中。参照3.5测定扩增后噬菌体滴度。

[0075] 表1噬菌体多轮淘选条件汇总表

淘选 轮次	Protein A+G 磁珠结合 时间及 TBST 洗 脱浓度	Protein A+G 磁珠—猪阴性 血清结合时间及 TBST 洗 脱浓度	Protein A+G 磁珠—猪阳性 血清结合时间及 TBST 洗 脱浓度
[0076] 1	45 min, 0.1%TBST	45 min, 0.1%TBST	90 min, 0.1%TBST
2	60 min, 0.3%TBST	60 min, 0.3%TBST	60 min, 0.3%TBST
3	90 min, 0.5%TBST	90 min, 0.5%TBST	45 min, 0.5%TBST
4	90 min, 0.5%TBST	90 min, 0.5%TBST	45 min, 0.5%TBST

[0077] 3.7、噬菌体DNA提取

[0078] (1) 扩增后的噬菌体加入等体积的PEG/NaCl,室温静置10-20min。

[0079] (2) 4°C、15,000rpm,离心15min,弃上清,沉淀重悬于100μL 4 M的NaI溶液中,加入无水乙醇250μL,室温静置10-20min。

[0080] (3) 4°C、15,000rpm,离心15min,弃去上清,加入500μL -20°C预冷的70%乙醇重悬后离心。重复2次,风干后加入30μL去离子水溶解DNA沉淀。

[0081] 3.8、噬菌体随机肽区域扩增子PCR扩增

[0082] 以提取的噬菌体单链DNA为模板,使用Primer STARMax,条件98°C、10s,58°C、5s,72°C、30s扩增30个循环,扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,回收目的片段。高通量测序建库及测序由金维智生物进行。

[0083] 3.9、测序数据质量分析

[0084] 对测序结果原始图像数据利用软件CASAVA (v1.8.2) 进行图像碱基识别 (Base calling),初步质量分析,得到测序样本的原始数据 (Pass Filter Data, PF),测序数据以

FASTQ(简称fq)文件格式存储。

[0085] 高通量测序中通常会出现一些点突变等测序错误,而且序列末端的质量比较低,为了得到更高质量及更准确的生物信息分析结果,需要对测序原始数据进行优化处理。使用Cutadapt 1.9.1软件优化处理,1)去除引物及接头序列;2)去除两端质量值低于20的碱基;3)去除N碱基比率大于10%的序列。

[0086] 3.10、目标序列丰度统计

[0087] 根据目标序列上下游10nt进行目标序列抓取,并根据密码子表批量转换为氨基酸序列,并且进行丰度统计。

[0088] 3.11、本地化Blast分析

[0089] 将扩增子高通量测序后,截取随机肽区域DNA序列,去除低质量序列、非有效读长序列,将序列转换为Fasta文件格式,使用ASFV Pig/HLJ/2018毒株氨基酸序列建立比对库,将测序获得氨基酸序列的Fasta格式与比对库进行Blastp分析,分析模式选择short-blastp,E-value \leq 0.05,序列最大匹配度为5。对应分析代码如下:blastp-query序列结果.fasta-db hlj-out比对结果-outfmt"7qacc sacc sstart send qseq sseq length pident score evalue"-task blastp-short-word_size 2-evalue 0.05-max_target_seqs 5-num_threads 4。比对结果使用Notepad++、Excel软件进行后续合并处理。

[0090] 表2引物序列表

引物名称	引物序列(5' -3')	引物长度(nt)
PhageM13-seq-R	CCCTCATAGTTAGCGTAACGA	21
PhageM13-seq-F	CCGATACAATTAAAGGCT	18

[0092] 3.12、ASFV抗原区段重叠性分析

[0093] 根据序列比对结果,对比对氨基酸匹配区域开始(升序排列)和结束(降序排列)位置,去除包含区域广泛的抗原区域,对应统计的丰度进行叠加,作为筛选ASFV抗原表位区域的丰度值。

[0094] 3.13、Dotblotting实验

[0095] 根据获得ASFV抗原区段信息合成ASFV抗原多肽,使用适当的溶质将多肽稀释为2mg/mL。在醋酸纤维膜(NC)上每孔点样5 μ L,室温风干,使用5%脱脂牛奶封闭1h后,ASFV猪阳性血清、猪阴性血清(阴性对照)(1:500)作为一抗,在室温下孵育1h,然后用PBST洗涤3次,每次10min,用稀释度为1:5000的HRP标记山羊抗猪IgG抗体作为二抗孵育。室温孵育1h, PBST洗3次,然后加入Super SignalWestPico化学发光膜底物(Thermo Fisher Scientific,USA)使用Amersham Imager 680发光检测。

[0096] 3.14、数据分析

[0097] 所有统计分析均采用GraphPadPrism 9.3.0软件(GraphPad software Inc,San Diego,CA,USA)进行T检验,P<0.05为差异有统计学意义。Short-blastp使用本地化Blast⁺软件,版本号2.11,比对ASFV毒株为Pig/HLJ/2018,GenBank登录号:MK333180.1。蛋白结构与抗原表位区段标注使用Pymol 2.4教育版。

[0098] 4、结果

[0099] 4.1、ProteinA+G磁珠对ASFV阳性和阴性血清的纯化与鉴定

[0100] ProteinA+G磁珠纯化血清后,制备蛋白样品,SDS-PAGE结果显示(图1)在25KDa出

现了ProteinA+G蛋白条带,在45-60KDa为抗体的重链区域。Western blotting分析表明(图2),纯化的血清中抗体的重链区能够被HRP标记的羊抗猪IgG抗体识别。在25KDa为ProteinA+G与抗体的结合条带。

[0101] 4.2、噬菌体随机十二肽库淘选结果及随机肽区域扩增结果

[0102] 经过四轮的噬菌体淘选与扩增,测得噬菌体滴度(表3,图3),目标噬菌体得到了有效的富集,富集倍数为 3.27×10^3 。

[0103] 使用随机肽区域扩增通用引物扩增目的区域,结果显示(图4),PCR获得了目标区域的DNA片段,大小与预期相符合为256bp。回收目的片段区域,用于下一步扩增子高通量测序建库。

[0104] 表3噬菌体四轮淘选洗脱噬菌体滴度测定

淘选代次	噬菌体滴度 (pfu/mL)	淘选比例
1	1.1×10^5	9.09×10^5
2	1.3×10^6	7.69×10^4
3	3.2×10^7	3.13×10^3
4	3.6×10^8	2.78×10^2

[0106] 4.3、扩增子高通量测序结果QC分析

[0107] 扩增子高通量测序及流程示意图如图5所示,测序数据Clean data结果如表4所示,能够较好的获得目的区域的序列信息。clean data的碱基平均质量结果见图6-7,误差率低于0.05%,表明扩增子高通量测序获取的序列质量较好的,扩增子建库的片段长度在5-298bp,长度主要集中在250bp左右。

[0108] 表4 Clean data统计

测序样品名称	reads平均长度	Reads数目	总碱基数量	Q20 (%)	Q30 (%)	GC (%)	N (ppm)
Phage4-1	149.13	99437588	14828874914	95.74	88.95	40.57	5.99
Phage4-2	149.10	122768982	18304663438	95.63	88.70	40.16	6.00
Phage4-3	149.11	91731414	13677770588	95.60	88.77	40.34	5.97

[0110] 注:各样本clean data统计:01_QC/*trim.stat

[0111] Q20 (%):测序错误率小于1%的碱基数量百分比;

[0112] Q30 (%):测序错误率小于0.1%的碱基数量百分比;

[0113] GC (%):C+G的碱基占有所有碱基的数量百分含量;

[0114] N (ppm):测序无法判定的碱基N在每百万碱基中含量。

[0115] 4.4、ASFV高丰度抗原区段分析

[0116] 通过本地化的Short-Blast分析,根据抗原的丰度进行排序,筛选出丰度排名靠前的前40种抗原区段信息,这些可能是ASFV感染过程中抗体丰度较高的抗原区段,有助于ASFV血清学诊断方法的建立与应用。

[0117] 表5高丰度抗原区段Top 40汇总表

编号	蛋白名称	起始	结束	氨基酸序列	编号	蛋白名称	起始	结束	氨基酸序列
	A859L	576	581	HAIRYG	21	F1055L	714	723	QTISNHQLSF
[0118]	02 ASFVChACD017 60	112	121	MWKVNDQGFL	22	F334L	286	294	VGNPFPQMT
	B475L	316	322	SKPLDNY	23	F778R	259	265	YANQGGL
	B602L	78	88	MPSYSKPTHHT	24		586	593	VLTPKRWS
		419	428	PGLSIYNSTF	25	G1340L	442	452	FPRGGSPLPS
	B962L	335	343	VKNPLTAKV	26		115	1156	DVLYG
							2		
	07 C257L	141	146	TALPDK	27	H171R	116	126	YHKKHASQQVN
	08 C475L	456	461	FSYEKN	28	I177L	1	10	MWKVNDQGFL
	09 C717R	147	156	VHIFPYNKGGH	29	I329L	293	300	HRHPETAV
	10 C962R	263	270	GSLVRPVY	30	I7L	95	102	RPLYRYKP
		769	780	SNPYEKKEDPRF	31	K421R	309	314	SYELVP
	13 CP2475L	1020	1027	IVQEARTM	32	M1249L	999	1011	TPSTETQPKPPQE
		1064	1073	TQTPKWRPA	33	MGF-360-8L	53	59	FKGELLH
		1702	1709	VIYYNNNN	34	MGF360-10L	78	87	TEWGADINYG
	15 D1133L	304	314	DAFPPHQAPRA	35	MGF360-13L	284	289	DLGGNA
		742	751	LPLSPSITPA	36	MGF360-4L	275	284	LIFNSINRE
	17 E423R	302	312	SDNGKTFFTKN	37	MGF505-10	17	26	YPLAKHVLQQ
	18 EP1242L	952	959	DRSVMYGF	38	R	179	188	RWIGYSLHIH
		1189	1194	YNASHP	39	NP1450L	63	74	SHQRKQCMGHPG
	20 EP364R	100	107	PAFPNPQK	40	O174L	62	71	LKHVLPNIRI

[0120] 表中编号为2的抗原表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示,编号为7的抗原表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示,编号为21的抗原表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示,编号为25的抗原表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示,编号为26的抗原表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示,编号为31的抗原表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示,编号为36的抗原表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示,编号为37的抗原表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示,编号为38的抗原表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示。

[0121] 实施例2

[0122] 部分抗原区段结构性展示

[0123] 将筛选获得抗原表位区段在已经解析结构的部分抗原表面进行标注展示,共标注了p72(PDB登录号:6KU9)、S273R(PDB登录号:6LJB)、p15(PDB登录号:6LNL)、A238L(PDB登录号:4F0Z)、NP419L(PDB登录号:6IMK)、p35(PDB登录号:7BQA)、O174L(PDB登录号:1JQR)、NP868R(PDB登录号:7D8U)、EP296R(PDB登录号:6KI3)。由于G1340L蛋白晶体结构尚未被解析,故以上表位肽展示未包含G1340L表位信息。

[0124] 结果显示,筛选获得的抗原区段均位于蛋白结构的表面位置(图8),这与噬菌体随机肽区域展示的蛋白多与线性结构相关。

[0125] 表6蛋白结构表面展示抗原区段信息表

编号	蛋白	起始	终止	氨基酸序列	编号	蛋白	起始	终止	氨基酸序列		
[0126]	p72	41	69	75	PVGF EYN	63	CP530R-p15	115	122	NGEAVLVP	
		42	107	120	HHILGACHSSWQDA	64			128	133	PFDDR
		43	156	164	TLVDPFGRP	65	S273R	45	50	CDESEC	
		44	232	239	VSVEGTSG	66			77	82	KAPGPR
		45	563	568	PFHYGG	67			149	154	PCNTFG
	NP868R	46	593	600	TGIYRAQT	68	O174L	190	196	GNSPPGP	
		47	735	740	PGGMVW	69			46	51	MLNDVD
		48	797	803	PFSNGDF	70			81	86	CGERKC
		49	819	826	KHHGFSLV	71			89	93	FI EWK
		50	851	863	EADKTWTSLFGFI	72			115	120	HFTGPV
	NP419L	51	6	12	PGQYSNN	73	A238L	30	35	FFKTDP	
		52	116	122	GAHTNRG	74			40	44	RCDKN
		53	166	173	SILLYSRT	75			54	61	IYGRIDFL
		54	302	311	YEPGYNNYHS	76			151	160	DYHRGFTA WD
		55	363	368	YADRYA	77			170	176	LVKSLNH
		56	368	375	ALFQKLTP	78			197	203	GLRKSPK
	EP296R	57	11	18	WSDSGCTT	79	CP530R-p35	299	305	VPICYS	
		58	88	94	RKSAFVT	80			329	336	VTPNLVV
		59	149	154	HTYKYS	81			346	353	NTIRHYGP
		60	205	211	NIHSVIP	82			382	387	HRTLMD
		61	221	229	DAATECGSG	83			406	412	SRPGNNY
		62	282	288	TALTAEF	84			423	429	MYGDKHT

[0127] 实施例3

[0128] ASFV抗原表位区段鉴定

[0129] 利用人工合成的表5中编号1~40的抗原表位肽和表6中p72蛋白的ASFV抗原区段肽(即表6中编号41~45的抗原表位肽)与中检所ASFV阳性血清和ASFV阴性血清进行DotBlot检测,p72蛋白作为阳性对照,随机多肽作为阴性对照。

[0130] 检测结果显示(图9),筛选的表5中编号1~40的抗原表位肽和表6中p72蛋白的ASFV抗原表位区域与阳性血清的平均有效反应率为86.67%。其中,ASFVChACD01760蛋白的抗原表位对应表5中02号多肽、C257L蛋白的抗原表位对应表5中07号多肽、F1055L蛋白的抗原表位对应表5中21号多肽、G1340L蛋白的抗原表位对应表5中25号及26号多肽、K421R蛋白的抗原表位对应表5中31号多肽、MGF360-4L蛋白的抗原表位对应表5中36号多肽、MGF505-10R蛋白的抗原表位对应表5中37号及38号多肽,这些抗原表位多肽均能够特异性的结合ASFV阳性血清,其中02号、21号、25号、26号、31号、36号、38号多肽与ASFV阳性血清的反应原性较强,表明该表位肽与ASFV阳性血清具有较好的反应性;07号、37号多肽能特异性的结合ASFV阳性血清,但反应原性弱于其他其他几种多肽表位,这也可能与显影曝光过程中,07号、37号多肽曝光不足相关,以上多肽与不同来源的ASFV阳性血清的有效反应率为100%。表5中11号、12号、16号、27号、30号多肽表位在Dotblot检测中与ASFV阳性血清无反应;17号多肽表位与阴性血清也能发生反应,说明17号多肽表位可能属于非特异性的结合抗体的表位多肽。

[0131] 上述具体实施方式不能作为对本发明保护范围的限制,对于本技术领域的技术人员来说,对本发明实施方式所做出的任何替代改进或变换均落在本发明的保护范围内。

[0132] 本发明未详述之处,均为本技术领域技术人员的公知技术。

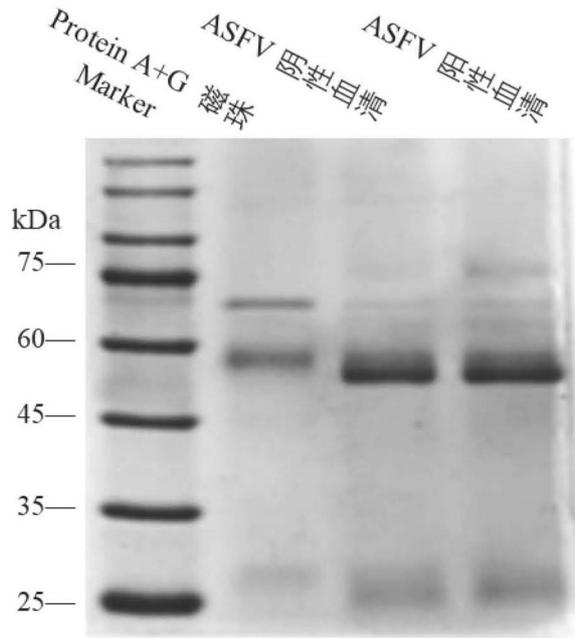


图1

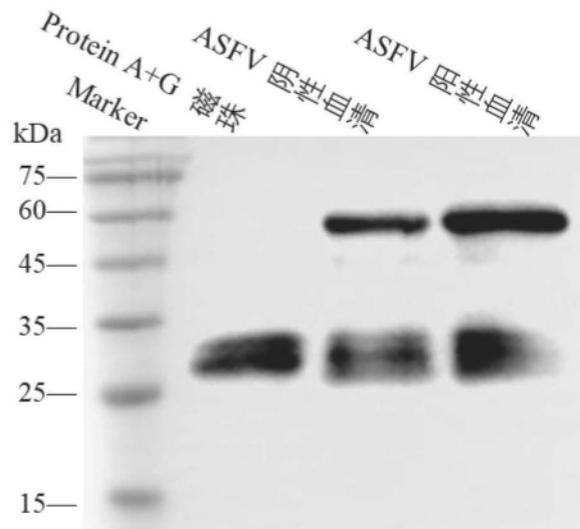


图2

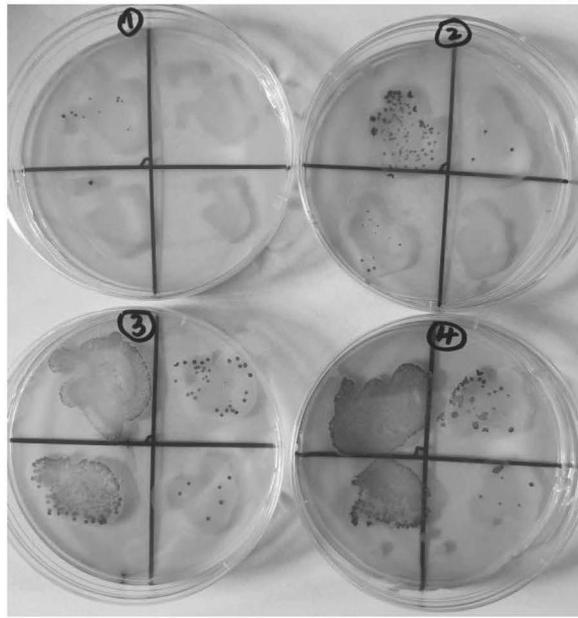


图3

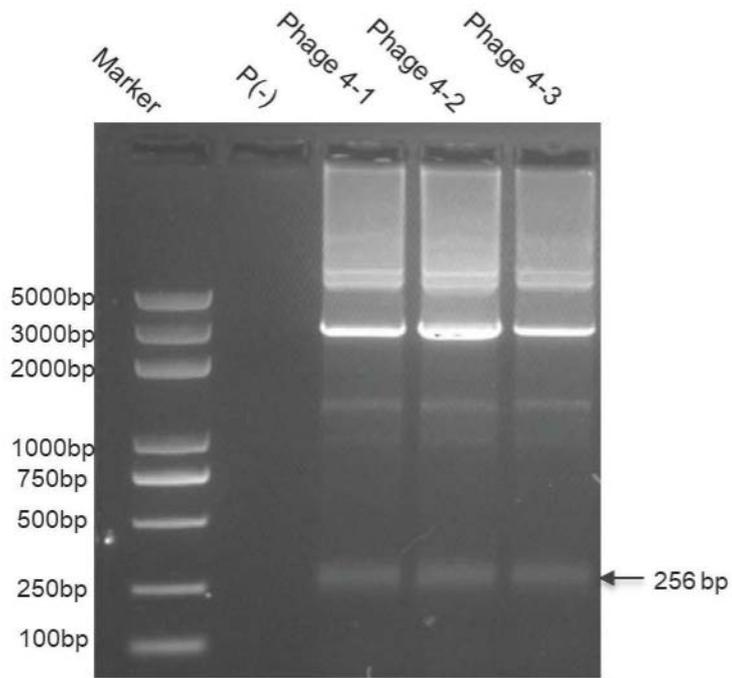


图4

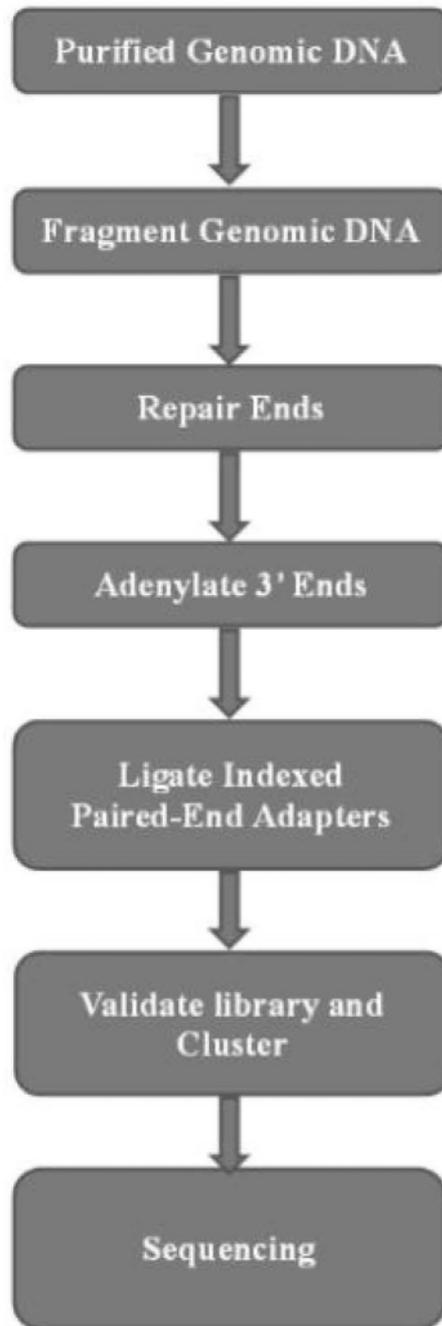


图5

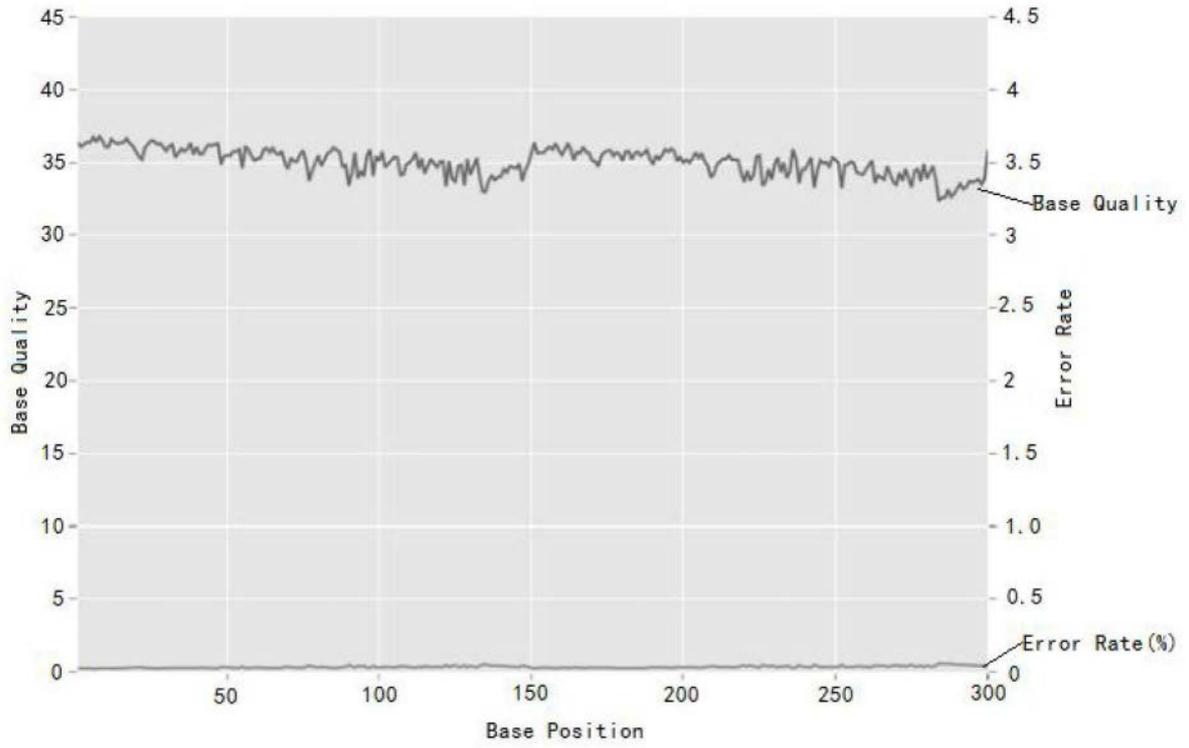


图6

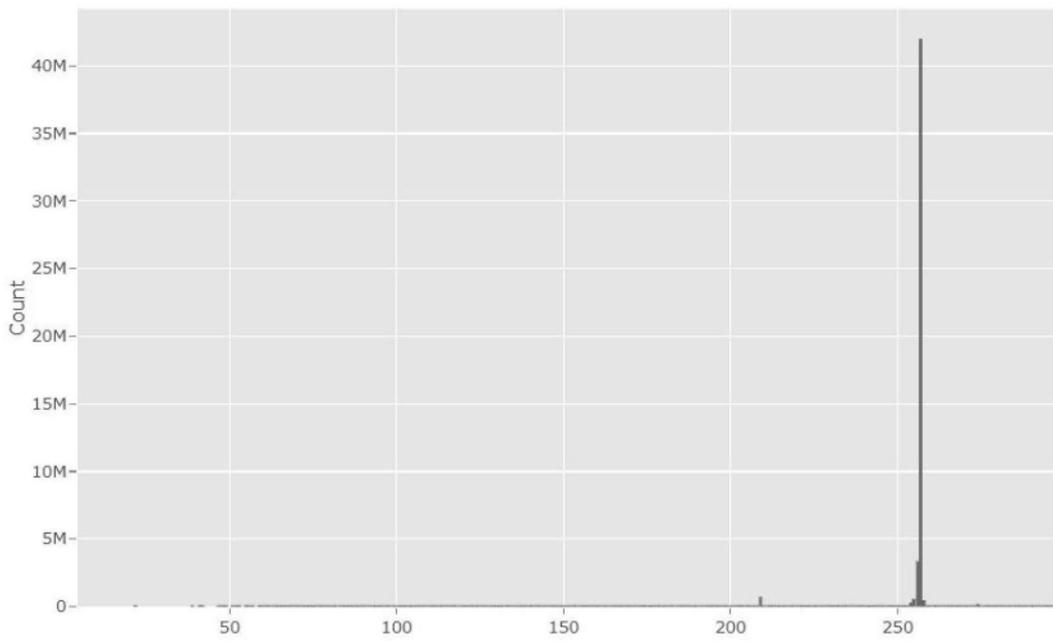


图7

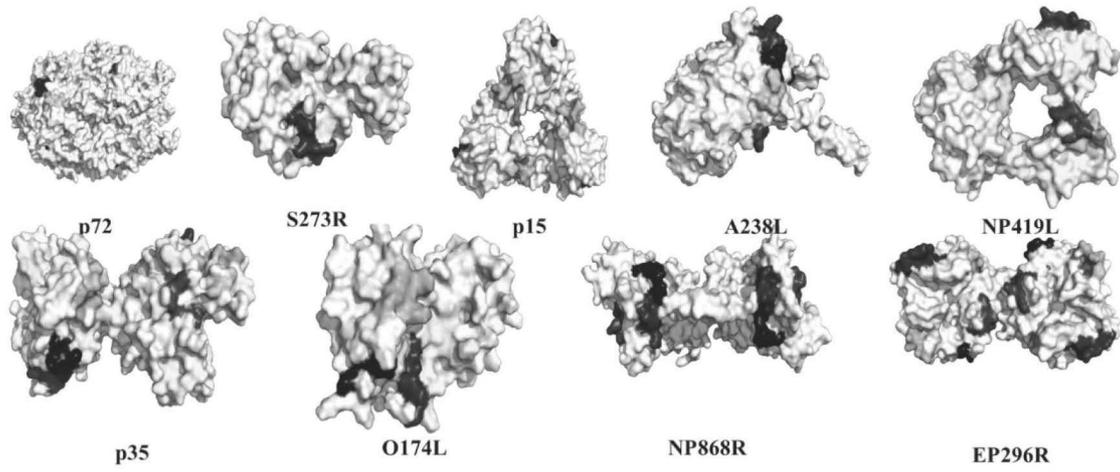


图8

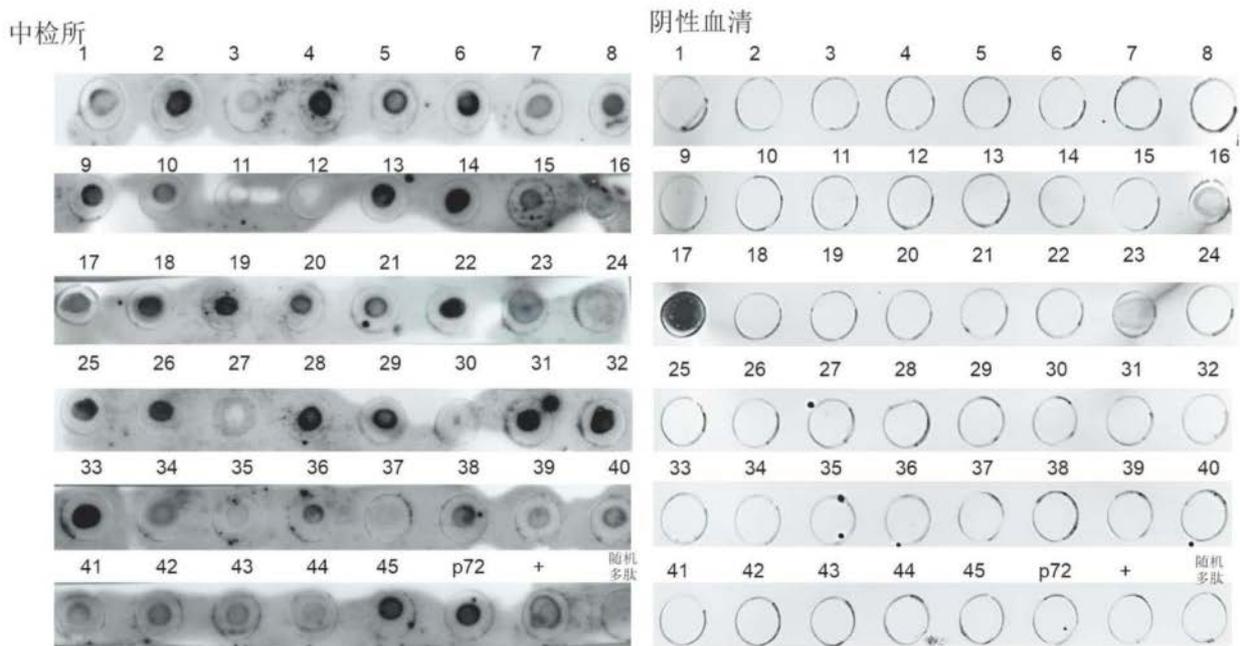


图9