



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 111848752 A

(43) 申请公布日 2020. 10. 30

(21) 申请号 202010560561.2

G01N 33/558 (2006.01)

(22) 申请日 2020.06.18

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(71) 申请人 河南省生物工程技术研究中心

地址 450018 河南省郑州市郑东新区商务
外环路12号7层3号

申请人 郑州倍赛泰生物科技有限公司

(72) 发明人 王云龙 王国强 程蕾 王继创

李玉林 张怡青 张永生

(74) 专利代理机构 郑州铭晟知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 41134

代理人 张鹏

(51) Int. Cl.

C07K 14/165 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

权利要求书1页 说明书6页
序列表2页

(54) 发明名称

一种新冠病毒N蛋白优势表位抗原及其应用

(57) 摘要

本发明属于冠状病毒检测技术领域,具体涉及一种新冠病毒N蛋白优势表位抗原及其应用。该N蛋白优势表位抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,所述N蛋白优势表位抗原可与新冠病毒抗体特异性结合,将其用于新冠病毒的抗体检测时,可有效避免假阳性的检测结果。

1. 一种新冠病毒N蛋白优势表位抗原,其特征在于,所述N蛋白优势表位抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,所述N蛋白优势表位抗原可与新冠病毒抗体特异性结合。

2. 一种抗体,其特征在于,所述抗体通过采用如权利要求1所述的N蛋白优势表位抗原作为免疫原免疫动物制备得到。

3. 一种标记复合物,其特征在于,所述标记复合物的组成包括如权利要求1所述的N蛋白优势表位抗原和标记物,所述标记物包括但不限于下述中的任意一种:胶体金、荧光微球或HRP。

4. 一种试纸条/检测卡,其特征在于,制备所述试纸条/检测卡的原料包括下述中的任意一种或几种的组合:如权利要求1所述的N蛋白优势表位抗原、如权利要求2所述的抗体和如权利要求3所述的标记复合物。

5. 根据权利要求4所述的试纸条/检测卡,其特征在于,所述试纸条/检测卡包括样品垫、结合垫、包被膜和吸水垫,所述结合垫上包被有如权利要求3所述的标记复合物;所述包被膜上设有检测线和质控线,所述检测线上包被有所述N蛋白优势表位抗原。

6. 根据权利要求5所述的试纸条/检测卡,其特征在于,所述标记复合物采用包括所述N蛋白优势表位抗原和荧光微球在内的原料制备得到。

7. 根据权利要求6所述的试纸条/检测卡,其特征在于,所述标记复合物采用包括下述步骤的方法制备得到:(1)向采用去离子水洗涤后的 Eu^{3+} 荧光微球中加入硼酸盐缓冲液重悬 Eu^{3+} 荧光微球;(2)向步骤(1)所得重悬液中分别加入EDC和NHS,摇床避光活化20min;(3)4℃条件下15000r/min离心15min,弃上清;(4)加入硼酸盐缓冲液反复吹打复溶;(5)加入所述新冠病毒N蛋白优势表位抗原,超声混匀并置于摇床中偶联1h;(6)15000r/min离心15min,紫外下观察是否有贴壁现象,弃上清;(7)加入1mL微球保护液、50 μL 10%BSA,摇床震荡封闭1h,即得所述标记复合物;所述新冠病毒N蛋白优势表位抗原、EDC和NHS的质量比为1:5:5,所述新冠病毒N蛋白优势表位抗原与 Eu^{3+} 荧光微球的质量体积比为1:1,所述新冠病毒N蛋白优势表位抗原的质量以 μg 计,所述 Eu^{3+} 荧光微球的体积以 μL 计;所述微球保护液的成分为Tris 6.0g/L、蔗糖25.0g/L、海藻糖25.0g/L、BSA20.0g/L、Tween-20 1.0g/L、小牛血清100g/L、酪蛋白钠1g/L、PVP30 1.0g/L和Proclin-300 1g/L。

8. 根据权利要求4-7所述的试纸条/检测卡,其特征在于,所述质控线处包被有0.5mg/mL的羊抗鼠抗体,所述检测线处包被的N蛋白优势表位抗原的浓度为0.4mg/mL。

9. 一种试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括下述中的任意一种或几种的组合:如权利要求4-8中任意一项所述的试纸条/检测卡、如权利要求1所述的N蛋白优势表位抗原、如权利要求2所述的抗体和如权利要求3所述的标记复合物。

10. 如权利要求1所述的新冠病毒N蛋白优势表位抗原/如权利要求2所述的抗体/如权利要求3所述的标记复合物/如权利要求9所述的试剂盒/如权利要求4-8中任意一项所述的试纸条/检测卡中的任意一项或几项在制备新冠病毒检测试剂中的应用。

一种新冠病毒N蛋白优势表位抗原及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于冠状病毒检测技术领域,具体涉及一种新冠病毒N蛋白优势表位抗原及其应用。

背景技术

[0002] 新型冠状病毒(SARS-CoV-2)为 β 属的冠状病毒,是目前已知的第7种可感染人类的冠状病毒,其余6种分别是HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-NL63、HCoV-HKU1、SARS-CoV和MERS-CoV。该疾病以发热、干咳、乏力为主要表现,常伴有气促和呼吸困难等,在严重病例中,新冠肺炎可导致严重急性呼吸窘迫综合征、脓毒症休克,多功能衰竭甚至死亡。

[0003] 新型冠状病毒(SARS-CoV-2)特异IgM和IgG抗体检测写进了国家卫生健康委于2020年3月3日发布的“新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)”,作为临床确诊标准,国家药品监督管理局(NMPA)也应急审批了广州万孚(胶体金试纸条)、英诺特(唐山)(胶体金试剂条)等多个抗体检测试剂盒。徐万洲等在19例核酸检测阴性但基于临床症状确诊的SARS-CoV-2患者中,有16例患者IgM阳性,其阳性率达到84.21%,有18例患者IgG阳性,其阳性率达到94.74%,说明抗体的检测可以有效地弥补核酸检测漏检的风险,发挥其在新型冠状病毒肺炎的及时诊治及防控中的作用。但临床现也有反映出现了较多的假阳性,困扰临床决策。

[0004] 特异IgM和IgG免疫测定假阳性通常有以下两个方面的原因,一是试剂盒所用抗原本身的特异性及阳性判断值(Cut-off value)的设定;二是患者标本中存在导致免疫测定假阳性的内源性或外源性干扰物质。而试剂盒所用抗原本身的特异性是检测特异性的基础。这是由抗原决定簇和抗体的抗原结合区的空间构象决定的。抗体抗原结合区的空间构象是由该区的氨基酸序列来决定。氨基酸的序列则由基因序列决定。抗体的特异性,并不是针对抗原,而是针对某个特定的空间构象。这就是为什么有的抗体可以识别道2个毫不相干的抗原。比如抗梅毒抗体,同时可以识别心磷脂。因此,优选特异性抗原片段对减少特异IgM和IgG免疫测定的假阳性有重要意义。

[0005] SARS-CoV-2核衣壳蛋白(Nucleocapsid,N)位于病毒内部,在 β 属冠状病毒之间相对比较保守,与其它6种冠状病毒(HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-NL63、HCoV-HKU1、SARS-CoV和MERS-CoV)的N蛋白全长具有一定的同源性,检测时容易发生交叉反应性,因此筛选出同源性低,免疫性强的N蛋白片段进行组合,避免交叉反应性,是十分重要的。

发明内容

[0006] 本发明提供一种新冠病毒N蛋白优势表位抗原,以解决现有技术中新冠病毒检测特异性差的问题。

[0007] 本发明的第二目的在于提供了一种抗体。

[0008] 本发明的第三目的在于提供一种标记复合物。

[0009] 本发明的第四目的在于提供一种试纸条/检测卡。

[0010] 本发明的第五目的在于提供一种试剂盒。

[0011] 本发明的目的还在于提供了上述中的任意一项或几项的应用。

[0012] 本发明的新冠病毒N蛋白优势表位抗原采用如下技术方案：一种新冠病毒N蛋白优势表位抗原，所述N蛋白优势表位抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示，所述N蛋白优势表位抗原可与新冠病毒抗体特异性结合。

[0013] 本发明的抗体采用如下技术方案：一种抗体，所述抗体通过采用如上所述的N蛋白优势表位抗原作为免疫原免疫动物制备得到。例如，可通过将所述N蛋白优势表位抗原用于免疫动物，制备得到抗所述N蛋白优势表位抗原的抗体。本发明的抗体可为单克隆抗体或多克隆抗体，其可用于制备新冠病毒检测试剂（例如，用作制备免疫层析试纸条的原料或作为阳性对照等）。

[0014] 本发明的标记复合物采用如下技术方案：一种标记复合物，所述标记复合物的组成包括如上所述的N蛋白优势表位抗原和标记物，所述标记物包括但不限于下述中的任意一种：胶体金、荧光微球或HRP。

[0015] 本发明的试纸条/检测卡采用如下技术方案：一种试纸条/检测卡，制备所述试纸条的原料包括下述中的任意一种或其组合：如上所述的N蛋白优势表位抗原、如上所述的抗体和如上所述的标记复合物。

[0016] 作为进一步优选的技术方案，所述试纸条包括样品垫、结合垫、包被膜和吸水垫，所述结合垫上包被有如上所述的标记复合物；所述包被膜上设有检测线和质控线，所述检测线上包被有所述N蛋白优势表位抗原。

[0017] 作为进一步优选的技术方案，所述标记复合物采用包括所述N蛋白优势表位抗原和荧光微球在内的原料制备得到。

[0018] 作为进一步优选的技术方案，所述标记复合物采用包括下述步骤的方法制备得到：(1) 向采用去离子水洗涤后的 Eu^{3+} 荧光微球中加入硼酸盐缓冲液重悬 Eu^{3+} 荧光微球；(2) 向步骤(1)所得重悬液中分别加入EDC和NHS，摇床避光活化20min；(3) 4℃条件下15000r/min离心15min，弃上清；(4) 加入硼酸盐缓冲液反复吹打复溶；(5) 加入所述新冠病毒N蛋白优势表位抗原，超声混匀并置于摇床中偶联1h；(6) 15000r/min离心15min，紫外下观察是否有贴壁现象，弃上清；(7) 加入1mL微球保护液、50μL 10%BSA，摇床震荡封闭1h，即得所述标记复合物；所述新冠病毒N蛋白优势表位抗原、EDC和NHS的质量比为1:5:5，所述新冠病毒N蛋白优势表位抗原与 Eu^{3+} 荧光微球的质量体积比为1:1，所述新冠病毒N蛋白优势表位抗原的质量以μg计，所述 Eu^{3+} 荧光微球的体积以μL计；所述微球保护液的成分为Tris 6.0g/L、蔗糖25.0g/L、海藻糖25.0g/L、BSA20.0g/L、Tween-20 1.0g/L、小牛血清100g/L、酪蛋白钠1g/L、PVP30 1.0g/L和Proclin-300 1g/L（上述各原料的浓度均为终浓度）。

[0019] 作为进一步优选的技术方案，所述质控线处包被有0.5mg/mL的羊抗鼠抗体，所述检测线处包被的N蛋白优势表位抗原的浓度为0.4mg/mL。

[0020] 本发明的试剂盒采用如下技术方案：一种试剂盒，所述试剂盒包括下述中的任意一种或几种的组合：如上述任意一项所述的试纸条/检测卡、如上所述的N蛋白优势表位抗原、如上所述的抗体和如上所述的标记复合物。

[0021] 本发明的应用采用如下技术方案：如上所述的新冠病毒N蛋白优势表位抗原/如上所述的抗体/如上所述的标记复合物/如上所述的试剂盒/如上述任意一项所述的试纸条/

检测卡中的任意一项或几项在制备新冠病毒检测试剂中的应用。

[0022] 本发明的有益效果是：本发明的新冠病毒N蛋白优势表位抗原可与新冠病毒抗体（对IgG、IgM均可检测）特异性结合，可有效避免新冠病毒检测假阳性的情况。

[0023] 本发明的新冠病毒N蛋白优势表位抗原与其他冠状病毒不会发生特异性结合，可有效提高冠状病毒检测的特异性，避免将其他冠状病毒检测为新冠病毒的情况出现。

具体实施方式

[0024] 下面将结合具体实施例对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

[0025] 实施例1新冠病毒(SARS-CoV-2)N蛋白优势表位抗原的筛选及制备

[0026] 1.1利用生物信息学手段，结合以往经验，筛选出来的SARS-CoV-2的N蛋白优势表位抗原的氨基酸序列为：ERSGARSKQR RPQGLPNNTASWFTALTQHG KEDLKFPGRGQ GVPINTNSSP DDQIGYYRRA TRRIRGGDGK MKDLSRWYF YYLGTGPEAG LPYGANKDGI IWVATEGALN TPKDHIGTRN PANNAIIVLQ LPQGTTLPKG FYAEGSRGGS QASSRSSRS RNSSRNSTPG SSRGTSPARM AGNGDAALALLLDRLNQL ESKMSGKGQQ QQGQTVTKKS AAEASKKPRQ KRTATKAYNV (SEQ ID NO.1)

[0027] 1.2表达载体构建：由上海生工合成编码上述SEQ ID NO.1的氨基酸序列的核苷酸并将其连接在pET28a的BamHI和XhoI之间，得到PET28a-Nx质粒

[0028] 1.3按照《分子克隆》第二版的常规试验方法将构建好的PET28a-Nx质粒转入到BL21 (DE) 3中，进行常规的表达纯化。具体步骤：取-80℃下保存的大肠杆菌BL21 (DE3) 菌株，活化培养后，采用CaCl₂法制备感受态细胞。将含目的基因的重组质粒转化至BL21 (DE3) 感受态细胞中，获得重组工程菌株。对工程菌株表达条件（诱导温度、诱导时间、IPTG浓度）进行优化，目的蛋白以可溶性形式存在，通过镍柱亲和层析，利用SDS-PAGE与Western Blot对可溶性蛋白进行鉴定，得到了免疫原性良好的可溶性蛋白（下述简称为N1蛋白）。具体步骤如下：

[0029] 1.3.1感受态细胞制备

[0030] (1) 从BL21 (DE3) 平板中挑取单克隆，置于50mL LB液体培养基中，37℃摇床培养3小时，至OD=0.5时方可进行下一步；

[0031] (2) 在无菌条件下，将活化后的BL21 (DE3) 菌液转移至离心管中，冰浴10min；

[0032] (3) 4000r/min离心5min，弃上清，将离心管倒置尽可能减少上清残留；

[0033] (4) 加入10mL提前预冷的0.1mol/L的CaCl₂溶液，重悬沉淀；

[0034] (5) 4000r/min离心5min，弃上清，将离心管倒置尽可能减少上清残留；

[0035] (6) 加入2mL提前预冷的0.1mol/L的CaCl₂溶液，重悬沉淀；

[0036] (7) 在无菌条件将感受态细胞分装至无菌EP管中，若制备后无需立刻使用时可加入20%甘油，置于-70℃保存。

[0037] 1.3.2重组质粒转化

[0038] 采用制备的感受态细胞将确认序列正确的重组质粒进行转化。

[0039] (1) 采用无菌枪头吸取200μL BL21 (DE3) 感受态细胞，随后加入2μL确定序列正确

的重组质粒,混匀后,冰浴30min;

[0040] (2) 将离心管立刻转入提前预热至42℃的水浴锅中,静置90s;

[0041] (3) 随后将离心管立即转入冰中,冷却5min;

[0042] (4) 取1.3mL LB液体培养基加入至转化后菌液中,200rpm,37℃摇床过夜培养;

[0043] (5) 无菌条件下,蘸取少量菌液在氨苄卡那霉素平板划线,37℃恒温培养12-16h。

[0044] 1.3.3蛋白表达

[0045] 转化后菌种在一定的培养条件下,通过加入诱导剂能够促使蛋白表达。蛋白表达主要包括:目的蛋白初步诱导表达;目的蛋白表达与否;诱导条件的探究;大量诱导表达。

[0046] (1) 无菌条件下,取1支无菌试管,加入5mL含氨苄LB培养基,从平板中挑取3-5个单克隆至培养基中;

[0047] (2) 37℃过夜培养,作为诱导表达时初始菌液;

[0048] (3) 取少量初始菌液接种至250mL液体培养基中继续培养2-3h;

[0049] (4) 按1:1比例进行扩瓶培养;

[0050] 待菌液培养至OD=2.0,加入IPTG使其终浓度为0.5mmol/L,37℃诱导6h。

[0051] 1.4按照1.2-1.3的方法,分别制备SARS-CoV-2、HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-NL63、HCoV-HKU1、SARS-CoV和MERS-CoV的全长N蛋白(下述按照次序依次简称为N2蛋白、N3蛋白、N4蛋白、N5蛋白、N6蛋白、N7蛋白、N8蛋白)

[0052] 实施例2分别采用上述表达纯化得到的N1-N8蛋白作为抗原免疫兔子(常规程序)

[0053] 具体步骤如下:

[0054] (1) 用将抗原蛋白溶于生理盐水中(溶解为0.8mg/mL的抗原溶液);

[0055] (2) 与等体积的弗氏完全佐剂超声法混匀(此时抗原浓度约0.4mg/mL);

[0056] (3) 经腹部皮下多点注射免疫大约有4周龄的兔子(注射约0.3mL);

[0057] (4) 2周后用等量抗原与不完全弗氏佐剂同上法混匀后免疫;

[0058] (5) 再过1周后连续每周用以上的方法(抗原与不完全佐剂混合)加强免疫1次(抗原减半),共3次;

[0059] (6) 分离纯化分别得到兔多抗血清R1-R8(按照次序依次与N1-N8蛋白相对应):按照(1)-(5)操作对兔子进行免疫,在最后一次免疫结束后再过一周进行采血:具体操作步骤:10%水合氯醛配置方法:称取10.00g的水合氯醛溶于100mL的纯化水中,得到10%水合氯醛。麻醉方式:4-5mL/kg的剂量,经家兔腹腔静脉给药,并边注射边观察家兔的反应情况。当观察到家兔呼吸减慢,肌肉松弛良好钳夹无自主活动,角膜反射迟钝,可视为适宜的麻醉效果。选取采血点:在第三肋间胸骨左缘3mm周围,用手指按压,心脏搏动最强点即为采血点。抽血:一只手的手指找准出血点,另一只手持注射器经肋间向心脏穿刺,针头刺入心脏即有血液进入注射器,取得所需血量后(每只大约30mL左右),迅速将针头拔出,进针点再用75%乙醇消毒。离心收集血清:将采集的血清放在在37℃温箱2h,进而取出放在4℃冰箱2h,5000rpm/min,10min,用移液枪吸取上清,即为兔多抗血清(N1-N8蛋白免疫所对应的兔多抗血清即为R1-R8)。

[0060] 实施例3制备试纸条

[0061] 取N1-N8蛋白分别作为T线和并将N1-N8蛋白分别用微球标记,得到微球标记的N1-N8蛋白,做成总抗体检测试纸条K1-K8。下述以试纸条K1的制备为例,其余试纸条的制备与

K1的方法相同

[0062] 微球-蛋白复合物制备

[0063] (1) 取40 μ L Eu³⁺荧光微球置于离心管中(贴壁加入),加入1mL去离子水洗涤;

[0064] (2) 在4℃条件下15000r/min离心15min,弃上清,重复洗涤两次;

[0065] (3) 加入1mL 0.05mol/L的硼酸盐缓冲液(PH=7.4)重悬微球;

[0066] (4) 分别取20 μ L 10mg/mL的EDC、NHS置于离心管中,充分混匀后,置于摇床避光活化20min(温度:25-30℃);

[0067] (5) 4℃条件下15000r/min离心15min,弃上清;

[0068] (6) 取1mL 0.05mol/L的硼酸盐缓冲液(pH=7.4)反复吹打复溶;

[0069] (7) 加入40 μ g的N1蛋白,超声功率200V,工作3s,间隔3s,重复工作2次;

[0070] (8) 混匀后将离心管置于摇床偶联1h;

[0071] (9) 15000r/min离心15min,紫外下观察是否有贴壁现象,弃上清;

[0072] (10) 分别加入1mL微球保护液,50 μ L 10%BSA,摇床震荡封闭1h,于4℃避光保存。

[0073] 每升微球保护液成分如下表1所示:

[0074] 表1

[0075]	Tris	6.0g/L
	蔗糖	25.0g/L
	海藻糖	25.0g/L
	BSA	20.0g/L
	Tween-20	1.0g/L
	小牛血清	100g/L
	酪蛋白钠	1g/L
	PVP30	1.0g/L
	Proclin-300	1g/L

[0076] 包被膜制备

[0077] (1) 取PVC底板,揭去其中间贴纸,将NC膜粘贴于PVC底板上;

[0078] (2) 将XYZ三维点膜喷金仪参数设置为划膜,清洗泵管后,标定划膜管道与包被膜的位置;

[0079] (3) 将羊抗鼠0.5mg/ml(质控线工作液)填充于1号泵管中,N1蛋白0.4mg/ml(检测线工作液)填充于3号泵管中,调试出液管位置,确保质控线与检测线间隔5mm;

[0080] (4) 以1.5 μ L/cm的速度进行划膜,将制备好的包被膜置于37℃干燥箱中4h。

[0081] 试纸条组装

[0082] 揭开包被有N1蛋白胶板下方的双面胶条(包被膜);取一条标记有N1蛋白的微球垫,使微球垫(12mm)上缘沿包被膜的下缘重叠1-2mm。贴上取样品垫(16mm),使其下缘至胶板下缘平齐处粘贴,重叠压住微球垫宽度1-2mm的下沿,并用揭下来的双面胶条光滑面将其压平。将胶板最上方的双面胶条揭开,把吸水垫沿包被膜贴在胶板的上方,要求吸水垫与包被膜重叠1-2mm,并压平。调整切条机的切条宽度,将全板切成宽度为4.0mm的试纸条,即为K1(N2-N8包被、标记及试纸条组装方法与N1蛋白一样;试纸条的整体结构与本领域常用免疫层析试纸条相同,此处不再赘述)。

[0083] 实施例4检测

[0084] 用上述实施例1制备得到的N1-N8蛋白分别对实施例2制备得到的兔多抗血清R1-R8进行检测,具体检测结果如下表2所示:

[0085] 表2

[0086]

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
K1			—	—	—	—	—	—
K2			—	—		—		—
K3	—	—			—	—	—	
K4	—		—			—		—
K5	—		—	—		—		—
K6	—	—	—		—		—	—
K7	—		—	—	—			—
K8	—		—	—	—	—		

[0087] 由表2可以发现,只有N1蛋白不与其他病毒全长N蛋白抗体反应,表现出良好的特异性。

[0088] 检测步骤:将制备后的试纸条平放于桌面上,吸取80μL样品,在试纸条样品垫2/3处滴加样品并开始计时,10min后通过荧光分析仪进行检测记录检测的荧光值。

[0089] 试纸条结果的判读

[0090] 试纸条在滴加样品10min后,放置于紫外分析仪观察或荧光分析仪下检测,若试纸条中C线(质控线)无荧光,不论与T线(检测线)有无荧光,都说明该试纸条无效或者需重新加样;若试纸条中C线(质控线)有荧光,T线(检测线)无荧光或荧光信号较弱,判定所检测样本为阴性;试纸条T线(检测线)有明显荧光,判定检测样本为阳性。

[0091] 实施例5临床标本检测(采用K1和K2试纸条检测)

[0092] 2018年由于该病毒未传播,所以2018年存的临床发热病人血清样本应为阴性,实际上用N2蛋白(新冠病毒全长N蛋白)对2018年发热病人的血清进行检测,出现7份假阳性。

[0093] 具体结果如下表3所示:

[0094] 表3

[0095]

	2018年临床血清100份阳性率	临床确认总抗体阳性标本10份
K1	0/100	10/10
K2	7/100	10/10

[0096] 100份阴性血清来源于河南省中医院2018年收集的临床上发热病人血清,10份阳性血清来源于郑州市疾病预防控制中心。

[0097] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

序列表

<110> 河南省生物工程技术研究中心

郑州倍赛泰生物科技有限公司

<120> 一种新冠病毒N蛋白优势表位抗原及其应用

<160> 1

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 240

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

```

Glu Arg Ser Gly Ala Arg Ser Lys Gln Arg Arg Pro Gln Gly Leu Pro
1           5           10           15
Asn Asn Thr Ala Ser Trp Phe Thr Ala Leu Thr Gln His Gly Lys Glu
          20           25           30
Asp Leu Lys Phe Pro Arg Gly Gln Gly Val Pro Ile Asn Thr Asn Ser
          35           40           45
Ser Pro Asp Asp Gln Ile Gly Tyr Tyr Arg Arg Ala Thr Arg Arg Ile
          50           55           60
Arg Gly Gly Asp Gly Lys Met Lys Asp Leu Ser Pro Arg Trp Tyr Phe
65           70           75           80
Tyr Tyr Leu Gly Thr Gly Pro Glu Ala Gly Leu Pro Tyr Gly Ala Asn
          85           90           95
Lys Asp Gly Ile Ile Trp Val Ala Thr Glu Gly Ala Leu Asn Thr Pro
          100          105          110
Lys Asp His Ile Gly Thr Arg Asn Pro Ala Asn Asn Ala Ala Ile Val
          115          120          125
Leu Gln Leu Pro Gln Gly Thr Thr Leu Pro Lys Gly Phe Tyr Ala Glu
          130          135          140
Gly Ser Arg Gly Gly Ser Gln Ala Ser Ser Arg Ser Ser Ser Arg Ser
145          150          155          160
Arg Asn Ser Ser Arg Asn Ser Thr Pro Gly Ser Ser Arg Gly Thr Ser
          165          170          175
Pro Ala Arg Met Ala Gly Asn Gly Gly Asp Ala Ala Leu Ala Leu Leu
          180          185          190
Leu Leu Asp Arg Leu Asn Gln Leu Glu Ser Lys Met Ser Gly Lys Gly
          195          200          205
Gln Gln Gln Gln Gly Gln Thr Val Thr Lys Lys Ser Ala Ala Glu Ala

```

210	215	220														
Ser	Lys	Lys	Pro	Arg	Gln	Lys	Arg	Thr	Ala	Thr	Lys	Ala	Tyr	Asn	Val	
225						230					235				240	