



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201040529 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 11 月 16 日

(21)申請案號：099109999

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 03 月 31 日

(51)Int. Cl.：

G01N33/554 (2006.01)

G01N33/566 (2006.01)

G01N33/68 (2006.01)

G01N33/569 (2006.01)

(30)優先權：2009/03/31

日本

2009-087816

(71)申請人：日本煙草產業股份有限公司 (日本) JAPAN TOBACCO INC. (JP)

日本

病毒醫學科學研究所股份有限公司 (日本) VIRUS IKAGAKU KENKYUSHO INC.

(JP)

日本

(72)發明人：高倉由光 TAKAKURA, YOSHIMITSU (JP)；岡直美 OKA, NAOMI (JP)；近藤一博 KONDO, KAZUHIRO (JP)；小林伸行 KOBAYASHI, NOBUYUKI (JP)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：14 項 圖式數：10 共 101 頁

(54)名稱

生物學樣品中之 S I T H - 1 抗體之檢測方法

METHOD FOR DETECTING ANTIBODY AGAINST SITH-1 IN BIOLOGICAL SAMPLE

(57)摘要

本發明提供一種檢測生物學樣品中之由 HHV-6 之隱性感染中期轉錄物所編碼之小蛋白(Small protein encoded by the Intermediate stage Transcript of HHV-6)(SITH-1)的抗體之方法。本發明之方法包括以下步驟：1)準備 SITH-1 蛋白質；2)使步驟 1)中準備之 SITH-1 蛋白質結合於載體上；3)使生物學樣品 2 接觸結合有步驟 2)中製成之 SITH-1 蛋白質之載體而檢測 SITH-1 蛋白質抗體。



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201040529 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 11 月 16 日

(21)申請案號：099109999

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 03 月 31 日

(51)Int. Cl.：

G01N33/554 (2006.01)

G01N33/566 (2006.01)

G01N33/68 (2006.01)

G01N33/569 (2006.01)

(30)優先權：2009/03/31

日本

2009-087816

(71)申請人：日本煙草產業股份有限公司 (日本) JAPAN TOBACCO INC. (JP)

日本

病毒醫學科學研究所股份有限公司 (日本) VIRUS IKAGAKU KENKYUSHO INC.

(JP)

日本

(72)發明人：高倉由光 TAKAKURA, YOSHIMITSU (JP)；岡直美 OKA, NAOMI (JP)；近藤一博 KONDO, KAZUHIRO (JP)；小林伸行 KOBAYASHI, NOBUYUKI (JP)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：14 項 圖式數：10 共 101 頁

(54)名稱

生物學樣品中之 S I T H - 1 抗體之檢測方法

METHOD FOR DETECTING ANTIBODY AGAINST SITH-1 IN BIOLOGICAL SAMPLE

(57)摘要

本發明提供一種檢測生物學樣品中之由 HHV-6 之隱性感染中期轉錄物所編碼之小蛋白(Small protein encoded by the Intermediate stage Transcript of HHV-6)(SITH-1)的抗體之方法。本發明之方法包括以下步驟：1)準備 SITH-1 蛋白質；2)使步驟 1)中準備之 SITH-1 蛋白質結合於載體上；3)使生物學樣品 2 接觸結合有步驟 2)中製成之 SITH-1 蛋白質之載體而檢測 SITH-1 蛋白質抗體。

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種定性地及/或定量地檢測生物學樣品中之由 HHV-6 之隱性感染中期轉錄物所編碼之小蛋白 (Small protein encoded by the Intermediate stage Transcript of HHV-6)(SITH-1) 的抗體之方法。藉由本發明之方法，亦可檢測尤其是微量地存在於生物學樣品中、通常難以檢測之 SITH-1 蛋白質之抗體。

【先前技術】

疱疹病毒科之病毒係如下病毒：於核心蛋白質之周圍，分子量 $80\sim 150\times 10^6$ dalton 之雙鏈線狀 DNA 進入包含 162 個次蛋白衣 (capsomere) 之直徑約 100 nm 的 20 面體之蛋白衣 (capsid) 中，包膜 (envelope) 包圍該核蛋白衣 (nucleocapsid)，整體約為 150~200 nm 之大小。疱疹病毒發現於幾乎所有哺乳動物及兩棲類，尤其是將以人為宿主之疱疹病毒科之病毒稱為人疱疹病毒 (HHV; human herpesvirus)。HHV 分別分類為 α (單純疱疹病毒、水痘·帶狀疱疹病毒等)、 β (細胞巨大病毒 (cytomegalovirus) 等)、及 γ (EB 病毒 (Epstein-Barr virus) 等) 亞科。

此種疱疹病毒之特徵在於「隱性感染 (latent infection)」。所謂「隱性感染」，係指病毒於宿主細胞內並不產生感染性病毒粒子而繼續存在之感染狀態，於此隱性感染中，病毒基因及輔助該病毒基因之存在的基因產物亦保持於宿主細胞內。已知表現出隱性感染之疱疹病毒會由

於宿主之某些原因(例如，年齡增長、身體不適(包括疲勞))而重新產生病毒粒子，並複製大量病毒(再活化)。

即，疱疹病毒具有如下特異性質：若宿主無異常，則繼續隱性感染，一旦宿主之身體產生異常，察覺到宿主之危機，則為了探尋其他健康宿主而再活化。

為了研究此種疱疹科病毒之生態，關於病毒之隱性感染・再活化之理解必不可少。然而，疱疹病毒之中，關於隱性感染之見解較多的僅為屬於 γ -疱疹病毒之EB病毒，關於其他疱疹病毒則不清楚之方面較多。

尤其是關於參與 β -疱疹病毒之隱性感染之因素，事實情況是本發明者等人之一部分並未獲得以前已知之見解以外之資訊。例如，於非專利文獻1中揭示有，HHV-6於末梢血中之分化度相對較高之巨噬細胞中隱性感染，並明確宿主中之HHV-6之隱性感染部位。又，於非專利文獻2中記載有，HHV-6於初感染時以非常高之百分率移動至腦內，產生持續感染・隱性感染。於非專利文獻3中，對於HHV-6之隱性感染時所表現之基因(隱性感染基因)進行了揭示，暗示該基因具有控制病毒之隱性感染與再活化之作用。

於非專利文獻4中揭示有，於HHV-6之隱性感染狀態中，存在相對穩定且基因表現活躍之狀態即「中期：intermediate stage」，大量地表現隱性感染基因與由該基因所編碼之蛋白質(隱性感染基因蛋白質)。進而於非專利文獻5中記載有，於慢性疲勞症候群患者之血清中存在針對於中期表現亢進之隱性感染基因蛋白質的抗體。

[先前技術文獻]

[非專利文獻]

[非專利文獻1]

Kondo. K et al. Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes /macrophages, J Gen Virol 72: 1401-1408, 1991

[非專利文獻2]

Kondo. K et al. Association of human herpesvirus 6 infection of the central nervous system with recurrence of febrile convulsions. J Infect Dis 167: 1197-1200, 1993

[非專利文獻3]

Kondo. K et al. Identification of human herpesvirus 6 latency-associated transcripts., J Virol. 76: 4145-4151, 2002

[非專利文獻4]

Kondo K et al. Recognition of a Novel Stage of Beta-Herpesvirus Latency in Human Herpesvirus 6., J Virol. 77: 2258-2264, 2003

[非專利文獻5]

近藤一博著，「疱疹病毒感染與疲勞」，病毒，第55卷
第1號 p9-18 2005

【發明內容】

[發明所欲解決之問題]

本發明者等人之一部分鑑定出：於HHV-6之隱性感染時

特異性基因活躍表現之中期(intermediate stage)所表現之新穎基因、及由其編碼之新穎蛋白質 Small protein encoded by the Intermediate Transcript of HHV-6(SITH)-1。並且，對該等基因及該基因所編碼之蛋白質 SITH-1 之功能進行解析，結果發現如下新事實：(i)SITH-1 蛋白質具有使細胞內鈣濃度上升之功能，(ii)又，針對該等 SITH-1 蛋白質之抗體於情感疾患患者中會被明顯地檢測到，另一方面，健康者幾乎檢測不到；從而進行專利申請(PCT/JP2008/67300)。

如此顯示出，藉由檢測來自人體之生物學樣品中所含有之針對 SITH-1 蛋白質之抗體，而可用於精神障礙等之診斷。

然而，針對上述 SITH-1 蛋白質之血清抗體效價係以表現 SITH-1 蛋白質之 293T 細胞作為抗原，藉由通常進行之螢光抗體法進行測定。本發明者等人進一步繼續研究，發現：螢光抗體法必須製成表現 SITH-1 之哺乳類細胞，且必須製成標本玻片，需要較多勞力；針對 SITH-1 蛋白質之人血清中之抗體效價較低，檢測作業必須技術熟練；SITH-1 蛋白質不穩定，而需要謹慎之操作等。又，於螢光抗體法中，因於與血清樣本反應後，於顯微鏡下目視判斷螢光，故較為煩雜，不適合同時處理多個樣本。進而，若利用血清樣本，則非特異性結合成為問題，時常存在難以測定之情況。

依據上述本發明者等人之新見解，本發明之目的在於提

供一種簡便且定性及/或定量地檢測生物學樣品中之針對 SITH-1 蛋白質之抗體的方法。

本發明之目的尤其是提供一種抑制背景訊號、並且簡便且定性及/或定量地檢測、測定生物學樣品中針對 SITH-1 蛋白質之抗體的方法。

[解決問題之技術手段]

本發明者等人發現使 SITH-1 蛋白質結合於載體之體系對於抗體檢測較為有效，從而想到本發明。

尤其是於該體系中，為檢測微量地存在於生物學樣品中之 SITH-1 蛋白質抗體，而對於背景訊號之處理成為問題，因此進而設法使其降低。具體而言，藉由向生物學樣品中添加細胞破碎萃取液，而可降低非特異結合。又，於使用生物素-生物素結合性蛋白質間之結合而將 SITH-1 蛋白質固定化於載體上之情形時，若除細胞破碎萃取液以外亦向生物學樣品中添加生物素結合性蛋白質，則降低非特異結合之效果更加顯著。或者於此情形時，即便添加由利用基因工程技術來表現生物素結合性蛋白質之細胞所製備之細胞破碎萃取液，來代替添加生物素結合性蛋白質，亦可獲得同樣之效果。

本發明基於以上見解，提供一種於將 SITH-1 蛋白質固定化於載體之體系中，減少非特異結合、靈敏度更高之 SITH-1 蛋白質抗體之檢測方法。

雖無限定，但本發明包括以下態樣。

[態樣 1]

一種生物學樣品中之SITH-1抗體之檢測方法，其係檢測生物學樣品中之由HHV-6之隱性感染中期轉錄物所編碼之小蛋白(Small protein encoded by the Intermediate stage Transcript of HHV-6)(SITH-1)的抗體之方法；且其包括以下步驟：

- 1)準備SITH-1蛋白質；
- 2)使步驟1)中準備之SITH-1蛋白質結合於載體上；
- 3)使生物學樣品接觸步驟2)中製成之結合有SITH-1蛋白質之載體，而檢測SITH-1蛋白質抗體。

[態樣2]

如態樣1之方法，其中SITH-1蛋白質係選自以下之群：

- (a)具有序列編號1之胺基酸序列之蛋白質；
- (b)具有序列編號1之胺基酸序列中有1個或複數個胺基酸之缺失、置換、插入及/或附加而成之胺基酸序列，並且具有使細胞內鈣濃度上升之活性之蛋白質；
- (c)具有相對於序列編號1之胺基酸序列具有至少80%之同一性之胺基酸序列，並且具有使細胞內鈣濃度上升之活性之蛋白質；
- (d)具有由包含序列編號2之鹼基序列之核酸所編碼的胺基酸序列之蛋白質；
- (e)具有如下胺基酸序列、並且具有使細胞內鈣濃度上升之活性之蛋白質，該胺基酸序列由包含序列編號2之鹼基序列中有1個或複數個核苷酸之缺失、置換、插入及/或附加而成的鹼基序列之核酸而編碼；

(f)具有由包含與序列編號2之鹼基序列具有80%以上之同一性之鹼基序列的核酸所編碼之胺基酸序列，並且具有使細胞內鈣濃度上升之活性之蛋白質；及

(g)由與包含與序列編號2之鹼基序列互補之鹼基序列的核酸於嚴格之雜交條件下雜交之核酸而編碼，並且具有使細胞內鈣濃度上升之活性之蛋白質。

[態樣3]

如態樣1或2之檢測方法，其中於態樣1之步驟3)中，向步驟2)中製成之結合有SITH-1蛋白質之載體中混合、添加

(a)生物學樣品、及

(b)由與用以表現步驟1)之SITH-1蛋白質之宿主細胞同種之細胞所製備的細胞破碎萃取液。

[態樣4]

如態樣1至3中任一項之檢測方法，其中於態樣1之步驟2)中，利用生物素-生物素結合性蛋白質間結合使SITH-1蛋白質結合於載體上。

[態樣5]

如態樣4之檢測方法，其中於態樣1之步驟3)中，向步驟2)中製成之結合有SITH-1蛋白質之載體中混合、添加

(a)生物學樣品，以及

(b-i)由與用以表現步驟1)或2)之SITH-1蛋白質、生物素化SITH-1蛋白質、及/或生物素結合性蛋白質之宿主細胞同種之細胞所製備的細胞破碎萃取液、與生物素結合性蛋白質，或

(b-ii)由如下細胞製備之細胞破碎萃取液：該細胞係利用基因工程技術使與用以表現步驟1)或2)之SITH-1蛋白質、生物素化SITH-1蛋白質、及/或生物素結合性蛋白質之宿主細胞同種之細胞表現生物素結合性蛋白質者。

[態樣6]

如態樣3至5中任一項之方法，其中於態樣3之步驟3(b)或態樣5之步驟3(b-i)中，添加自含有任意之載體之細胞所萃取之細胞破碎萃取液來作為細胞破碎萃取液。

[態樣7]

如態樣4至6中任一項之方法，其中生物素結合性蛋白質為塔馬維啉或其變異體。

[態樣8]

如態樣1至7中任一項之方法，其中生物學樣品係選自由血液、血清、腦脊髓液、唾液、咽喉擦拭液、汗、尿、淚、淋巴液、精液、腹水及母乳所組成之群。

[態樣9]

一種載體，其結合有上述SITH-1蛋白質，該載體係用以檢測生物學樣品中之由HHV-6之隱性感染中期轉錄物所編碼之小蛋白(Small protein encoded by the Intermediate stage Transcript of HHV-6)(SITH-1)之抗體。

[態樣10]

如態樣9之載體，其中SITH-1蛋白質與載體係利用生物素-生物素結合性蛋白質間結合而結合。

[態樣11]

一種套組，其用以檢測生物學樣品中之由HHV-6之隱性感染中期轉錄物所編碼之小蛋白(Small protein encoded by the Intermediate stage Transcript of HHV-6)(SITH-1)之抗體；且其包含：

A)結合有上述SITH-1蛋白質之載體；以及

B)用以稀釋生物學樣品之劑，該劑包含由與用以表現A)之SITH-1蛋白質之宿主細胞同種之細胞所製備的細胞破碎萃取液。

[態樣12]

如態樣11之套組，其中

A)之載體為SITH-1蛋白質利用生物素-生物素結合性蛋白質間結合而結合之載體；並且

B)之劑係用以稀釋生物學樣品之劑，該劑包含

i)由與用以表現A)之SITH-1蛋白質、生物素化SITH-1蛋白質、及/或生物素結合性蛋白質之宿主細胞同種之細胞所製備的細胞破碎萃取液、與生物素結合性蛋白質；或

ii)由如下細胞製備之細胞破碎萃取液：該細胞係利用基因工程技術使與用以表現A)之SITH-1蛋白質、生物素化SITH-1蛋白質、及/或生物素結合性蛋白質之宿主細胞同種之細胞表現生物素結合性蛋白質者。

[態樣13]

一種套組，其係用以檢測生物學樣品中之由HHV-6之隱性感感染中期轉錄物所編碼之小蛋白(Small protein encoded by the Intermediate stage Transcript of HHV-6)(SITH-1)的

抗體；且包含

A)上述 SITH-1 蛋白質；

B)用以將 A)之 SITH-1 蛋白質固定化之載體；以及

C)用以稀釋生物學樣品之劑，該劑包含由與用以表現 A)之 SITH-1 蛋白質之宿主細胞同種之細胞所製備的細胞破碎萃取液。

[態樣 14]

如態樣 13 之套組，其中 A)之 SITH-1 蛋白質經生物素化；

B)之載體與生物素結合性蛋白質直接或間接地結合；

C)之劑係用以稀釋生物學樣品之劑，該劑包含

i)由與用以表現 A)或 B)之 SITH-1 蛋白質、生物素化 SITH-1 蛋白質、及/或生物素結合性蛋白質之宿主細胞同種之細胞所製備的細胞破碎萃取液、與生物素結合性蛋白質；或

ii)由如下細胞製備之細胞破碎萃取液：該細胞係利用基因工程技術使與用以表現 A)或 B)之 SITH-1 蛋白質、生物素化 SITH-1 蛋白質、及/或生物素結合性蛋白質之宿主細胞同種之細胞表現生物素結合性蛋白質者。

[發明之效果]

藉由本發明之方法，於生物學樣品中之 SITH-1 蛋白質抗體之檢測中，可抑制背景訊號，穩定地進行更高靈敏度之檢測。藉由本發明之方法，亦可檢測・測定尤其是微量地存在於生物學樣品中、利用通常之方法難以檢測之 SITH-1 蛋白質抗體。

【實施方式】

I. 檢測生物學樣品中之SITH-1之抗體之方法

本發明提供一種檢測生物學樣品中之由HHV-6之隱性感
染中期轉錄物所編碼之小蛋白(Small protein encoded by
the Intermediate stage Transcript of HHV-6)(SITH-1)的抗體
之方法。

本發明之檢測方法包括以下步驟：

- 1) 準備SITH-1蛋白質；
- 2) 使步驟1)中準備之SITH-1蛋白質結合於載體上；
- 3) 使生物學樣品接觸步驟2)中製成之結合有SITH-1蛋白質之載體，而檢測SITH-1蛋白質抗體。

1. 生物學樣品

本發明係關於一種檢測生物學樣品中之SITH-1蛋白質之
抗體之方法。

作為本發明中之生物學樣品，若為來源於人、感染
HHV-6之實驗動物、或者來源於導入SITH-1基因之實驗動
物、可含有成為檢測對象之SITH-1蛋白質抗體者，則無特
別限定。具體而言，為包含自人、感染HHV-6之實驗動物
(猴子等)、或者導入SITH-1基因之實驗動物(小白鼠等)採
集之細胞、組織或其碎片等之樣品，例如為體液，進而較
好的是血液、血清、腦脊髓液、唾液、咽喉擦拭液、汗、
尿、淚、淋巴液、精液、腹水及母乳等。

該等體液視需要加以稀釋而使用。稀釋率通常為10倍至
10000倍左右，較好的是100倍至1000倍左右，但並不限定

於此。用以稀釋之溶液可使用任意之緩衝液，亦可含有適當之阻斷劑。作為阻斷劑，抑制非特異性結合之效果較高者較好，可使用BSA(Bovine Serum Albumin，牛血清白蛋白)或酪蛋白等業者眾所周知之阻斷劑。

藉由本發明，亦可進行例如利用先前之方法則非特異結合較多、難以檢測或準確地定量之、來自來源於自體免疫疾患之患者、或者雖為健康人但自身抗體等之背景較高之受檢者的樣品之SITH-1蛋白質抗體之測定。SITH-1蛋白質抗體之抗體效價較低，必須抑制血清之稀釋率，其結果，導致來源於血清中成分之非特異性結合亦增加，因此利用已存之方法難以檢測或定量該抗體，但利用本發明之方法則可容易地檢測、或者更準確地定量。

2.SITH-1蛋白質

於本發明中，所謂SITH-1蛋白質，係指Small protein encoded by the Intermediate Transcript of HHV-6(由HHV-6之隱性感感染中期轉錄物所編碼之小蛋白)及其變異體。

基於PCT/JP2008/67300之記載內容之SITH-1

(1)SITH-1蛋白質、核酸

SITH-1蛋白質、核酸之結構及功能係揭示於PCT/JP2008/67300中，將其全部內容援用於本說明書中。

SITH-1係參與疱疹病毒之隱性感感染之因素，更詳細而言，係於疱疹病毒之隱性感感染時特異性表現之蛋白質。此處所謂「於疱疹病毒之隱性感感染時特異性表現」，係指於感染疱疹病毒之宿主中，在疱疹病毒隱性感感染(未增殖感

染)時，來源於疱疹病毒之基因或基因產物特異性表現。

SITH-1之蛋白質較好的是選自以下之群。

(a)具有序列編號1之胺基酸序列之蛋白質；

(b)具有序列編號1之胺基酸序列中有1個或複數個胺基酸之缺失、置換、插入及/或附加而成之胺基酸序列，並且具有使細胞內鈣濃度上升之活性之蛋白質；

(c)具有相對於序列編號1之胺基酸序列具有至少80%之同一性之胺基酸序列，並且具有使細胞內鈣濃度上升之活性之蛋白質；

(d)具有由包含序列編號2之鹼基序列之核酸所編碼的胺基酸序列之蛋白質；

(e)具有如下胺基酸序列、並且具有使細胞內鈣濃度上升之活性之蛋白質，該胺基酸序列由包含序列編號2之鹼基序列中有1個或複數個核苷酸之缺失、置換、插入及/或附加而成的鹼基序列之核酸而編碼；

(f)具有由包含與序列編號2之鹼基序列具有80%以上之同一性之鹼基序列的核酸所編碼之胺基酸序列，並且具有使細胞內鈣濃度上升之活性之蛋白質；及

(g)由與包含與序列編號2之鹼基序列互補之鹼基序列的核酸於嚴格之雜交條件下雜交之核酸而編碼，並且具有使細胞內鈣濃度上升之活性之蛋白質

SITH-1之蛋白質典型的是具有序列編號1之胺基酸序列。序列編號1之胺基酸序列較好的是由包含序列編號2之鹼基序列之核酸所編碼。

包含序列編號1所示之胺基酸序列之SITH-1蛋白質如後述參考例所示般，係作為於人疱疹病毒-6(HHV-6)之隱性感染時特異性表現之蛋白質而分離・鑑定者。SITH-1蛋白質係具有序列編號2所示之胺基酸序列、包含159胺基酸之分子量約17.5 kDa之蛋白質。

SITH-1蛋白質係由SITH-1基因之核酸而編碼。如序列編號3所示，該SITH-1基因之cDNA具有1795鹼基對(約1.79 kbp)之尺寸，第954號至第956號之鹼基序列為起始密碼子(Kozak ATG)，第1431號至第1433號之鹼基序列為終止密碼子(TAA)。因此，上述SITH-1核酸於序列編號3所示之鹼基序列中，具有第954號至第1430號之鹼基序列作為開放閱讀框(ORF)，該ORF具有477鹼基對(約0.48 kbp)之尺寸。將SITH-1之cDNA中表示ORF區域之鹼基序列示於序列編號3。再者，序列編號2所示之鹼基序列含有並記載終止密碼子之3鹼基。

SITH-1核酸經常於HHV-6隱性感染之細胞之細胞質中表現，另一方面，於增殖感染細胞中未發現表現。編碼SITH-1蛋白質之核酸由與迄今為止所報告之HHV-6隱性感染特異性基因(H6LT)具有互補鏈之關係之DNA所編碼，其表現於HHV-6之隱性感染之中期增強。根據該等事實而認為，SITH-1蛋白質為於HHV-6之隱性感染時特異性表現之蛋白質。

SITH-1蛋白質與作為宿主蛋白質之CAML(calcium-modulating cyclophilin ligand(鈣離子訊號調節親環素配

體)、Accession # ; U18242)結合，而使神經膠細胞內鈣濃度上升。CAML係已知於宿主生物體內較多地存在於腦與淋巴球中、使細胞內之鈣濃度上升之蛋白質。又，認為SITH-1蛋白質之表現所引起之細胞內鈣濃度之上升會導致隱性感染細胞內之所有的訊號傳遞之活化，並有助於HHV-6之有效的再活化。

已知HHV-6於腦內之神經膠細胞內隱性感染，並認為，若處於隱性感染時或作為活性較高之隱性感染狀態之中期的HHV-6表現SITH-1，則神經膠細胞內之鈣濃度上升。並且認為腦細胞中之細胞內鈣濃度之上升與情感疾患等精神障礙有很大關係(理研年報2003)。

SITH-1蛋白質具有保持與作為宿主之蛋白質的CAML結合之活性、並使細胞內鈣濃度上升之功能。又，藉由使SITH-1蛋白質於認為該蛋白質最強表現之腦內之神經膠細胞內進行表現，可誘導精神障礙。因此，認為SITH-1蛋白質具有於疱疹病毒之隱性感染時或再活化初期進行表現、使宿主產生精神障礙之功能。

(b)作為SITH-1蛋白質之變異體之一例，亦可為：具有序列編號1之胺基酸序列中有1個或複數個胺基酸之缺失、置換、插入及/或附加而成之胺基酸序列，並且具有與SITH-1蛋白質同樣之使細胞內鈣濃度上升之活性的蛋白質。

具體而言，為如下蛋白質：其包含序列編號1所示之胺基酸序列中1個或複數個(較好的是1個或數個(例如，1~40

個、1~30個、1~20個、1~15個，更好的是10、9、8、7、6、5、4、3、2或1個))之胺基酸缺失、置換、插入及/或附加而成之胺基酸序列，並且具有本發明之上述活性。此處，所謂胺基酸序列缺失、置換、插入及/或附加，係指於同一序列中之任意且1個或複數個胺基酸序列中之位置有1個或複數個胺基酸殘基之缺失、置換、插入及/或附加。關於該缺失、置換及/或附加，該等中之2種以上可同時產生，該缺失、置換、插入及/或附加之數量一般越少越好。

上述之中，置換較好的是保存性置換。所謂保存性置換，係指將特定之胺基酸殘基以具有類似之物理化學特徵之殘基置換，若未使與原先序列之結構相關之特徵發生實質性變化，則可為任意置換。保存性置換之非限定性例子中包含Ile、Val、Leu或Ala相互之置換之類的含脂肪族基之胺基酸殘基間之置換，Lys及Arg、Glu及Asp、Gln及Asn相互之置換之類的極性殘基間之置換等。

於非保存性置換之情形時，上述種類之中，可將某一成員與其他種類之成員交換，於此情形時，為保持本發明之蛋白質之生物學功能，較好的是考慮胺基酸之親水性指數(親水性胺基酸指數)(Kyte等人，J. Mol. Biol., 157: 105-131(1982))。又，於非保存性置換之情形時，亦可基於親水性進行胺基酸之置換。

包含以序列編號1表示之胺基酸序列中1個或複數個胺基酸缺失、置換或附加而成之胺基酸序列之蛋白質，可藉由

《Molecular Cloning, A Laboratory Manual 3rd ed.》(Cold Spring Harbor Press(2001))等中記載之部位特異性變異體誘導法等方法而製備。於本說明書中，所謂「1個或複數個胺基酸」，較好的是指可藉由部位特異性變異體誘導法而缺失、置換、插入及/或附加之程度的胺基酸。

再者，作為在保持其活性之同時於蛋白質之胺基酸序列中導入1個或複數個胺基酸之缺失、置換或附加之方法，除上述部位特異性變異體誘導法以外，亦可列舉：利用變異源對基因進行處理之方法，及選擇性地裂解基因並除去、置換或附加所選擇之核苷酸後進行連接之方法。

(c)本發明之SITH-1蛋白質之變異體亦可為如下蛋白質：其具有相對於序列編號1之胺基酸序列具有至少80%之同一性之胺基酸序列，並且具有使細胞內鈣濃度上升之活性。

胺基酸序列之同一性較好的是至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%，更好的是99.3%。

2個胺基酸序列之同一性%可藉由視覺檢查及數學計算而確定。或者，2個蛋白質序列之同一性百分數亦可藉由以下方法確定：基於Needleman, S. B. 及 Wunsch, C. D.(J. Mol. Biol., 48: 443-453, 1970)之演算法，並使用可自威斯康辛大學遺傳學電腦小組(UWGCG)獲得之GAP電腦程式，來比較序列資訊。GAP程式之較好的內定參數包括：(1)如Henikoff, S. 及 Henikoff, J. G.(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 10915-10919, 1992)所記載之計分矩陣 (scoring

matrix)、blosum62；(2)12之空位權重(gap weight)；(3)4之空位長度權重(gap length weight)；及(4)無對末端空位之罰分。

亦可使用業者所使用之序列比較以外之程式。同一性之百分數例如可使用 Altschul 等 (Nucl. Acids. Res., 25, p.3389-3402, 1997)記載之BLAST程式來與序列資訊加以比較而確定。該程式可於因特網上自 National Center for Biotechnology Information(NCBI)、或者DNA Data Bank of Japan(DDBJ)之網站來加以利用。利用BLAST程式進行同一性檢索之各種條件(參數)詳細地記載於該網站，可適當改變一部分之設定，但檢索通常係使用內定值進行。或者，2個胺基酸序列之同一性%亦可使用遺傳資訊處理軟體 GENETYX Ver.7(GENETYX製)等程式、或使用FASTA演算法等而確定。此時，檢索亦可使用內定值。

(e)本發明之SITH-1蛋白質之變異體亦可為如下蛋白質：其具有由包含序列編號2之鹼基序列中有1個或複數個核苷酸之缺失、置換、插入及/或附加而成的鹼基序列之核酸而編碼的胺基酸序列，並且具有使細胞內鈣濃度上升之活性。

具體而言，亦可使用如下核酸：其含有序列編號2所示之鹼基序列中缺失、置換、插入及/或附加1個或複數個(較好的是1個或數個(例如，1~120個、1~90個、1~60個、1~30個、1~20個、1~15個，更好的是10、9、8、7、6、5、4、3、2或1個))核苷酸而成的鹼基序列，並且包含編碼

本發明之具有上述活性之蛋白質之鹼基序列。此處，所謂於鹼基序列中缺失、置換、插入及/或附加核苷酸，係指同一序列中之任意且1個或複數個鹼基序列中之位置有1個或複數個核苷酸之缺失、置換及/或附加。至於該缺失、置換、插入及/或附加，該等之中2種以上可同時產生，該缺失、置換、插入及/或附加之數量一般越小越好。

(f)本發明之SITH-1蛋白質之變異體亦可為如下蛋白質：其具有由包含與序列編號2之鹼基序列具有80%以上之同一性之鹼基序列的核酸所編碼之胺基酸序列，並且具有使細胞內鈣濃度上升之活性。

鹼基序列之同一性較好的是至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%，更好的是99.3%。

2個鹼基序列之同一性%可藉由視覺檢查與數學計算而確定，或者更好的是，該比較係藉由使用電腦程式來比較序列資訊而進行。代表性之較好的電腦程式為遺傳學電腦小組(GCG；威斯康辛州麥迪遜)之Wisconsin Package、Version 10.0程式「GAP」(Devereux, et al., 1984, Nucl. Acids Res., 12: 387)。藉由使用該「GAP」程式，除2個鹼基序列之比較以外，亦可進行2個胺基酸序列之比較、鹼基序列與胺基酸序列之比較。

(g)本發明之SITH-1蛋白質之變異體亦可為如下蛋白質：其由與包含與序列編號2之鹼基序列互補之鹼基序列的核酸於嚴格之雜交條件下雜交之核酸而編碼，並且具有使細胞內鈣濃度上升之活性。

雜交條件之強度主要由雜交條件、更好的是由雜交條件及清洗條件來確定。本說明書中之「嚴格條件」包括中等程度或高度嚴格之條件。

具體而言，作為中等程度嚴格之條件，例如作為雜交條件，可舉出 $1\times\text{SSC}\sim 6\times\text{SSC}$ 、 $42^{\circ}\text{C}\sim 55^{\circ}\text{C}$ 之條件，更好的是 $1\times\text{SSC}\sim 3\times\text{SSC}$ 、 $45^{\circ}\text{C}\sim 50^{\circ}\text{C}$ 之條件，最好的是 $2\times\text{SSC}$ 、 50°C 之條件。於雜交溶液中例如含有約 50% 之甲醯胺之情形時，採用比上述溫度低 5 至 15°C 之溫度。作為清洗條件，可舉出 $0.5\times\text{SSC}\sim 6\times\text{SSC}$ 、 $40^{\circ}\text{C}\sim 60^{\circ}\text{C}$ 。雜交及清洗時一般可添加 0.05%~0.2%、較好的是約 0.1% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate，十二烷基硫酸鈉)。

作為高度嚴格(高嚴格)之條件，包括於比中等程度嚴格之條件高之溫度及/或低之鹽濃度下進行之雜交及/或清洗。例如，作為雜交條件，可舉出 $0.1\times\text{SSC}\sim 2\times\text{SSC}$ 、 $55^{\circ}\text{C}\sim 65^{\circ}\text{C}$ 之條件，更好的是 $0.1\times\text{SSC}\sim 1\times\text{SSC}$ 、 $60^{\circ}\text{C}\sim 65^{\circ}\text{C}$ 之條件，最好的是 $0.2\times\text{SSC}$ 、 63°C 之條件。作為清洗條件，可舉出 $0.2\times\text{SSC}\sim 2\times\text{SSC}$ 、 $50^{\circ}\text{C}\sim 68^{\circ}\text{C}$ ，更好的是 $0.2\times\text{SSC}$ 、 $60\sim 65^{\circ}\text{C}$ 。

作為雜交條件，例如可舉出：於 $5\times\text{SSC}$ 、1% SDS、50 mM Tris-HCl (pH 值 7.5) 及 50% 甲醯胺中 42°C 之條件下進行預雜交後，添加探針於 42°C 保持一夜而進行雜種形成，其後於 $0.2\times\text{SSC}$ 、0.1% SDS 中、 65°C 進行 3 次 20 分鐘之清洗；但並不限定於該等。

(2) 針對 SITH-1 之抗體

針對SITH-1之抗體係將SITH-1蛋白質或其變異體、或者該等之部分胜肽作為抗原，藉由公知之方法製成多株抗體或單株抗體而獲得。作為公知之方法，例如可列舉文獻(Harlow等人之「Antibodies: A laboratory manual(Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1988))」、岩崎等人之「單株抗體 融合瘤與ELISA、講談社(1991)」)中記載之方法。如此獲得之抗體可利用於SITH-1蛋白質之檢測、測定等。

術語「抗體」表示免疫球蛋白(IgA、IgD、IgE、IgG、IgM及該等之Fab片段、F(ab')₂片段、Fc片段)，作為例子，可列舉多株抗體、單株抗體、單鏈抗體、抗個體基因型抗體及人化抗體，但並不限定於該等。

術語「識別SITH-1蛋白質之抗體」表示包含可特異性結合於SITH-1蛋白質之完整之分子及抗體片段(例如，Fab及F(ab')₂片段)。Fab及F(ab')₂以及SITH-1抗體之外的片段可根據本說明書中揭示之方法、或公知之方法而使用。此種片段代表性的是藉由蛋白質分解之切斷而產生，該蛋白質分解係使用木瓜酶(生成Fab片段)或胃蛋白酶(生成F(ab')₂片段)之類的酶。

認為情感疾患患者、或可能患有情感疾患之個體之SITH-1蛋白質的表現量會增加，其結果SITH-1抗體效價亦上升。本發明能夠於一個態樣中藉由檢測生物學樣品中之SITH-1抗體，而鑑定情感疾患患者或可能患有情感疾患之個體。

3.結合SITH-1蛋白質之載體

本發明之檢測方法係

1)準備SITH-1蛋白質，

2)使步驟1)中準備之SITH-1蛋白質結合於載體上，

而利用結合有SITH-1蛋白質之載體。

SITH-1蛋白質之準備

用以檢測SITH-1抗體之SITH-1蛋白質之準備可使用用以製備蛋白質之公知之方法來進行。並無限定，例如可以如下方式製備。

表現SITH-1蛋白質時可藉由如下方式進行：將編碼SITH-1蛋白質之基因組入表現載體，於所需宿主細胞中進行表現。作為宿主細胞，可列舉哺乳類細胞(例如，非限定性地來源於人、猴子等靈長類，小白鼠、大白鼠、中國倉鼠等齧齒類，或者狗等之細胞)、昆蟲細胞(利用桿狀病毒之表現體系或果蠅(*Drosophila*)之體系等)、酵母、大腸桿菌、植物、枯草菌等。較好的是可舉出大腸桿菌。又，例如亦可較好地使用人之HEK293、HeLa、HepG2、293T，齧齒類之CHO、NIH3T3、PC12，其他哺乳類之COS-1、COS-7、MDCK、Vero，昆蟲細胞之Sf9、S2等確立之培養細胞系。或者亦可使用利用小麥胚芽萃取液或昆蟲細胞萃取液等之無細胞表現體系來表現蛋白質。

關於表現載體，業者可適當選擇適於所使用之宿主細胞者。

所表現之SITH-1蛋白質亦可進行純化。又，於後述之利

用抗生物素蛋白-生物素結合之類之強結合而固定化於載體上之情形時，亦可無需預先純化，而使結合有抗生物素蛋白或者生物素之載體直接與SITH-1蛋白質表現細胞萃取液反應，同時進行純化與固定化。

作為SITH-1蛋白質之純化方法，可使用業者眾所周知之方法。既可組合使用通常之離子交換層析法、疏水層析法、凝膠過濾層析法等層析法，亦可使用純化用之標記序列。於此情形時，例如亦可製成與麩胱甘肽-S-轉移酶、麥芽糖結合蛋白質、纖維素結合蛋白質、甲殼素結合蛋白質、硫氧化還原蛋白結合蛋白質等之融合蛋白質，而於大腸桿菌或哺乳類等任意之宿主中表現SITH-1蛋白質，利用與各麩胱甘肽、麥芽糖、纖維素、甲殼素、硫氧化還原蛋白之親和性(例如使用麩胱甘肽固定化管柱)進行純化。

又，若預先向與SITH-1之融合部位導入蛋白酶之識別部位，則亦可於純化後以該蛋白酶對標記序列進行處理而除去。作為蛋白酶，例如可為腸激酶或Factor Xa等業者眾所周知者。此外，亦可使用HisTag或FlagTag、或者Strep(II)-Tag等，使用將各離子化之鎳、抗Flag抗體、StrepTactin固定化之管柱進行純化。為進一步提高純化度，亦可使複數個標記序列融合於SITH-1蛋白質，將純化法加以組合。例如，亦可使HisTag與BioEASETM等生物素化序列融合於SITH-1蛋白質之末端，於宿主中作為重組蛋白質進行表現後，利用鎳管柱進行純化，進而利用低親和性抗生物素蛋白或低親和性抗生蛋白鏈菌素(例如SA Mutein、Roche公

司)管柱進行純化。

載體

構成固體載體之材料包括纖維素、特氟綸、硝化纖維素、瓊脂糖、高交聯球形瓊脂糖、葡聚糖、殼聚糖、聚苯乙烯、聚丙烯醯胺、聚酯、聚碳酸酯、聚醯胺、聚丙烯、尼龍、聚偏二氟乙烯、乳膠、聚苯乙烯乳膠、二氧化矽、玻璃、玻璃纖維、金、鉑、銀、銅、鐵、不鏽鋼、鐵氧體、矽晶圓、聚乙烯、聚乙烯亞胺、聚乳酸、樹脂、多糖類、蛋白質(白蛋白等)、碳或該等之組合等，但並不限定於該等。又，較好的是具有固定強度、組成穩定、且非特異結合較少者。

固體載體之形狀包括微球、磁珠、薄膜、微細管、濾片、微孔板、微量盤、奈米碳管、感測片等，但並不限定於該等。如該技術領域所知，薄膜或微孔板等平坦之固體載體可設置凹坑、溝槽、濾底等。

於發明之一個態樣中，微球可具有約25 nm~約1 mm之範圍之球體直徑。於較好之態樣中，微球具有約50 nm~約10 μm 之範圍之直徑。

雖無限定，但例如於期望高檢測靈敏度之情形時，就應檢測之物質與特異性地結合於其之物質的接觸頻率或清洗操作之容易性之觀點而言，可較好地使用如上所述之微球作為固體載體。

將SITH-1蛋白質與載體結合之方法

使步驟1)中準備之SITH-1蛋白質結合於載體上。

作為將SITH-1蛋白質與載體結合之方法，可採用用以將蛋白質結合於載體上之任意方法。例如，雖並不限定於此，但有疏水結合、共價結合、使用各種標記之方法、或者利用生物素-生物素結合性蛋白質間之結合之方法等。於利用疏水結合、共價結合之情形時，較好的是預先將SITH-1蛋白質純化。

於利用疏水結合之情形時，係利用載體之疏水性表面與SITH-1蛋白質之疏水性部分的相互作用而結合。具體而言，使SITH-1蛋白質溶液直接接觸例如微量盤等(例如並不限定於該等，Nunc-Immuno™ Plate(Nunc公司)、SpectraPlate-96 HB(Perkin Elmer公司)、或者 Reacti-Bind™ 96-Well Plates Corner Notch(PIERCE公司)等)之載體表面，放置固定時間，藉此利用SITH-1蛋白質之疏水性部分與載體之疏水性部分的相互作用而結合、固定化。

另一方面，於共價結合之情形時，使官能基配置於載體之表面，使其與SITH-1蛋白質中之官能基結合。為了進行此種結合，市售有表面配置有各種官能基之各種載體，而可較好地使用。例如雖並不限定於該等，但作為表面配置有官能基之微量盤，作為順丁烯二酸酐微孔板，例如可舉出 Reacti-Bind(商標)Maleic Anhydride Activated Polystyrene 96-Well Plates(PIERCE公司)，作為活性型胺基微孔板，例如可舉出 Immobilizer(商標)-Amino Modules/Plates(Nunc公司)，或者作為羧基微孔板，例如可舉出 ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay，酶聯免疫吸附分析法)用微

孔板MS-8796F(96孔・C型・平底・碳)(SUMITOMO BAKELITE公司)。SITH-1蛋白質與固體載體之連接根據載體所隨附之說明書即可。具體而言，雖並不限定於此，但可使用如下業者公知之蛋白質與固體載體之偶合法進行。例如，可於作為交聯試劑之1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳二醯亞胺(EDC)之存在下，使對表面進行修飾而使羧基露出之固體載體之羧基與蛋白質之胺基進行偶合反應，藉此連接蛋白質與固體載體。或者，可於表面藉由N-羥基丁二醯亞胺(NHS)而活性酯化之固體載體上，於不含一級胺基之pH值6.5~9之緩衝液中混和蛋白質，而使固體載體表面之羧基與蛋白質之胺基結合。或者可使用交聯試劑BS3(辛二酸雙磺基丁二醯亞胺酯)或DSS(辛二酸二丁二醯亞胺酯)，連接固體載體表面之胺基與蛋白質之胺基，或者可使用交聯試劑SPDP(3-(2-吡啶二硫代)丙酸-N-丁二醯亞胺酯)或GMBS(N-(4-馬來醯亞胺丁醯氧基)-丁二醯亞胺)，連接固體載體表面之胺基與蛋白質之硫醇基。

此外，亦可使用基因工程使SITH-1與固定化用之標記融合。作為該等固定化之標記，例如除後述之利用抗生物素蛋白-生物素結合之方法以外，亦可利用HisTag、HaloTag(商標)、Flag等。例如於HisTag之情形時，使鎳離子化之載體表面與融合有複數(通常5-10個)個組胺酸之SITH-1反應，利用HisTag與鎳離子之親和性進行固定化即可。

利用生物素-生物素結合性蛋白質間結合之SITH-1蛋白

質向載體之結合

作為將本發明中之SITH-1蛋白質結合於載體上之方法，可較好地使用任意之方法。然而，最好的是利用生物素-生物素結合性蛋白質間結合。於本發明中，有時將「生物素-生物素結合性蛋白質間之結合」稱為「抗生物素蛋白-生物素結合」。

作為利用生物素-生物素結合性蛋白質間結合之將SITH-1蛋白質結合於載體上之方法，例如可列舉：A)於結合有生物素結合性蛋白質之載體上結合生物素化之SITH-1蛋白質之方法；B)利用生物素結合性蛋白質之大多數為四聚物這一情況，使生物素結合性蛋白質結合於結合有生物素之載體，進而結合生物素化之SITH-1蛋白質之方法；C)於結合有生物素之載體上結合生物素結合性蛋白質-SITH-1融合蛋白質之方法等。

以下進行詳細敘述。

生物素

所謂「生物素」，係指D-[(+)-順式六氫-2-氧-1H-噻吩-(3,4)-咪唑-4-戊酸]之俗稱。係分類於維生素B群之水溶性維生素之一種，有時亦稱為Vitamin B₇(維生素B₇)，或者亦稱為維生素H、輔酶R。生物素為蛋白中所含有之糖蛋白質之一種，與抗生物素蛋白非常強力地結合而阻礙其吸收。因此，有時會由於生蛋白之大量攝取而產生生物素缺乏症。

於本說明書中，所謂「生物素」，除上述生物素以

外，亦包括亞胺基生物素(iminobiotin)(Hofmann et al. (1980) Proc Natl Acad Sci USA 77: 4666-4668)、或去硫生物素(desthiobiotin)(Hirsch et al. (2002) Anal Biochem 308: 343-357)、或者生胞素(biocytin)或生物素亞砜(Biotin sulfoxide)等生物素類似物。

使用生物素-抗生物素蛋白(生物素結合性蛋白質)複合物之體系於生化學、分子生物學、組織免疫學或DNA分析、或者臨床檢驗等領域中得到廣泛利用。於本發明中，作為將SITH-1蛋白質結合於載體上之方法之一，可舉出利用抗生物素蛋白-生物素結合而使之結合於載體上之方法。

生物素結合性蛋白質

作為生物素結合性蛋白質，若為抗生物素蛋白、抗生蛋白鏈菌素、中性鏈親和素、AVR蛋白質(Biochem. J., (2002), 363: 609-617)、巴達維啉(Bradavidin)(J. Biol. Chem., (2005). 280: 13250-13255)、利查維啉(Rhizavidin)(Biochem. J., (2007), 405: 397-405)、塔馬維啉(Tamavidin)(WO02/072817)或該等之變異體等與生物素強力地結合之蛋白質，則可較好地使用任一者。較好的是與生物素之解離常數(KD)為 10^{-8} M以下，更好的是 10^{-10} M以下，進而較好的是 10^{-12} M以下。其中，關於添加至受檢樣品中之生物素結合性蛋白質、以及用於載體阻斷之生物素結合性蛋白質，並不限定於此。

作為生物素結合性蛋白質，尤其是可較好地使用於大腸桿菌中高表現之塔馬維啉及其變異體。塔馬維啉係自作為

食用蘑菇之擔子菌姬菇 (*Pleurotus cornucopiae*) 發現之生物素結合性蛋白質 (WO02/072817、Takakura et al. (2009) FEBS J 276: 1383-1397)。作為塔馬維啖之變異體，例如可舉出高結合能・低非特異結合塔馬維啖 (PCT/JP2009/64302) 等。

本發明中之「塔馬維啖」係表示塔馬維啖1(TM1)、塔馬維啖2(TM2)、或該等之變異體。具體而言，本發明之塔馬維啖典型的亦可為包含序列編號5或序列編號7之胺基酸序列而成之蛋白質、或由包含序列編號4或序列編號6之鹼基序列而成之核酸所編碼之蛋白質。

或者，本發明之塔馬維啖為包含序列編號5或序列編號7之胺基酸序列而成之蛋白質、或由包含序列編號4或序列編號6之鹼基序列而成之核酸所編碼之蛋白質之變異體，亦可為具有與塔馬維啖1或2相同之生物素結合活性之蛋白質、或者具有高結合能・低非特異結合之活性之蛋白質。於本說明書中，有時將塔馬維啖1、塔馬維啖2、及該等之變異體統稱為塔馬維啖。

塔馬維啖1或2之變異體係包含序列編號5或7之胺基酸序列中有1個或複數個胺基酸之缺失、置換、插入及/或附加之胺基酸序列而成之蛋白質，亦可為具有與塔馬維啖1或2相同之生物素結合活性之蛋白質。

關於「1個或複數個胺基酸之缺失、置換、插入及/或附加」之定義，係如上文中對SITH-1蛋白質所述般。

塔馬維啖1或2之變異體為進而包含與序列編號5或7之胺

基 酸 序 列 具 有 至 少 60% 以 上 、 較 好 的 是 65% 以 上 、 70% 以 上 、 75% 以 上 、 80% 以 上 、 85% 以 上 、 90% 以 上 、 95% 以 上 、 96% 以 上 、 97% 以 上 、 98% 以 上 或 99% 以 上 、 更 好 的 是 99.3% 以 上 之 胺 基 酸 同 一 性 的 胺 基 酸 序 列 而 成 之 蛋 白 質 ， 亦 可 為 具 有 與 塔 馬 維 啉 1 或 2 相 同 之 生 物 素 結 合 活 性 之 蛋 白 質 、 或 者 具 有 高 結 合 能 、 低 非 特 異 結 合 之 活 性 之 蛋 白 質 。

關 於 「 胺 基 酸 序 列 之 同 一 性 % 」 之 定 義 ， 係 如 上 文 中 對 SITH-1 蛋 白 質 所 述 般 。

塔 馬 維 啉 之 變 異 體 進 而 亦 包 含 以 下 者 。

(i) 具 有 由 包 含 序 列 編 號 4 或 序 列 編 號 6 之 鹼 基 序 列 中 有 1 個 或 複 數 個 核 苷 酸 之 缺 失 、 置 換 、 插 入 及 / 或 附 加 而 成 的 鹼 基 序 列 之 核 酸 所 編 碼 的 胺 基 酸 序 列 ， 並 且 具 有 與 塔 馬 維 啉 1 或 2 相 同 之 生 物 素 結 合 活 性 之 蛋 白 質 ； 或 者 具 有 高 結 合 能 、 低 非 特 異 結 合 之 活 性 之 蛋 白 質 ；

(ii) 具 有 由 包 含 與 序 列 編 號 4 或 序 列 編 號 6 之 鹼 基 序 列 具 有 80% 以 上 之 同 一 性 之 鹼 基 序 列 的 核 酸 所 編 碼 之 胺 基 酸 序 列 ， 並 且 具 有 與 塔 馬 維 啉 1 或 2 相 同 之 生 物 素 結 合 活 性 之 蛋 白 質 ； 或 者 具 有 高 結 合 能 、 低 非 特 異 結 合 之 活 性 之 蛋 白 質 ；

(iii) 由 與 包 含 與 序 列 編 號 4 或 序 列 編 號 6 之 鹼 基 序 列 互 補 之 鹼 基 序 列 的 核 酸 於 嚴 格 雜 交 條 件 下 雜 交 之 核 酸 所 編 碼 ， 並 且 具 有 與 塔 馬 維 啉 1 或 2 相 同 之 生 物 素 結 合 活 性 之 蛋 白 質 ； 或 者 具 有 高 結 合 能 、 低 非 特 異 結 合 之 活 性 之 蛋 白 質 ；

關 於 「 1 個 或 複 數 個 核 苷 酸 之 缺 失 、 置 換 、 插 入 及 / 或 附

加」、「鹼基序列之「80%以上之同一性」、「嚴格雜交條件」等之定義，係如上文中對SITH-1蛋白質所述般。

再者，於利用生物素-生物素結合性蛋白質間結合使SITH-1蛋白質結合於載體上之情形時，為此所利用之「生物素結合性蛋白質」較好的是具有生物素結合能。因此，並無限定，較好的是上述塔馬維啉1或塔馬維啉2之變異體與利用該等之野生型來形成融合蛋白質之情形時相比較，生物素結合活性未大幅度減少。

因此，非限定性地較好的是塔馬維啉1之變異體於序列編號5之胺基酸序列中不改變N14、S18、Y34、S36、S78、W82、W98、W110、D118。再者表述之例如Y34係表示序列編號5之胺基酸序列的第34號之酪胺酸殘基。或者於改變該等之情形時，較好的是改變為性質或者結構類似之胺基酸，例如於天冬醯胺(N14)之情形時，改變為麩醯胺(Q)或天冬胺酸(D)，較好的是改變為天冬胺酸，於絲胺酸(S18、S36、S78)之情形時，改變為蘇胺酸(T)或者酪胺酸(Y)，較好的是改變為蘇胺酸，於酪胺酸(Y34)之情形時，改變為絲胺酸(S)或蘇胺酸(T)或者苯丙胺酸(F)，較好的是改變為苯丙胺酸，於色胺酸(W82、W98、W110)之情形時，改變為苯丙胺酸(F)，於天冬胺酸(D118)之情形時，改變為麩醯胺酸(E)或天冬醯胺(N)，較好的是改變為天冬醯胺。

又，較好的是塔馬維啉2之變異體於序列編號7之胺基酸序列中不改變4個色胺酸殘基(W69、W80、W96、W108)。

或者於改變該等之情形時，較好的是改變為性質或者結構類似之胺基酸、例如苯丙胺酸(F)。又，較理想的是對於認為與生物素直接相互作用之胺基酸殘基(N14、S18、Y34、S36、S76、T78、D116)亦不改變。或者於改變該等之情形時，較好的是改變為性質或者結構類似之胺基酸，以維持與生物素之結合，例如於天冬醯胺(N14)之情形時，改變為麩醯胺(Q)或天冬胺酸(D)，較好的是改變為天冬胺酸，於天冬胺酸(D40)之情形時，改變為天冬醯胺(N)，於絲胺酸(S18、S36、S76)之情形時，改變為蘇胺酸(T)或者酪胺酸(Y)，較好的是改變為蘇胺酸，於酪胺酸(Y34)之情形時，改變為絲胺酸(S)或蘇胺酸(T)或者苯丙胺酸(F)，較好的是改變為苯丙胺酸，於蘇胺酸(T78)之情形時，改變為絲胺酸(S)或酪胺酸(Y)，較好的是改變為絲胺酸，於天冬胺酸(D116)之情形時，改變為麩醯胺酸(E)或天冬醯胺(N)，較好的是改變為天冬醯胺。

於本發明中，較好之塔馬維啉改變體中包含以下者。(PCT/JP2009/64302)。

一種改變型生物素結合蛋白質，其係包含序列編號7中記載之胺基酸序列、或者該序列中具有1個至數個胺基酸變異之胺基酸序列、或與該序列具有80%以上之同一性之胺基酸序列，且顯示出生物素結合活性之蛋白質；其特徵在於：自以下之群

- 1)序列編號7之第104號之精胺酸殘基；
- 2)序列編號7之第141號之離胺酸殘基；

3) 序列編號7之第26號之離胺酸殘基；及

4) 序列編號7之第73號之離胺酸殘基

中選擇之1個或複數個殘基被置換為酸性胺基酸殘基或中性胺基酸殘基。

更好的是選自由以下改變型生物素結合蛋白質所組成之群的改變型生物素結合蛋白質：

於序列編號7中，第104號之精胺酸殘基被置換為麩醯胺酸殘基，並且第141號之離胺酸殘基被置換為麩醯胺酸殘基之改變型生物素結合蛋白質(R104E-K141E)；

於序列編號7中，第40號之天冬胺酸殘基被置換為天冬醯胺殘基，並且第104號之精胺酸殘基被置換為麩醯胺酸殘基之改變型生物素結合蛋白質(D40N-R104E)；

於序列編號7中，第40號之天冬胺酸殘基被置換為天冬醯胺殘基，並且第141號之離胺酸殘基被置換為麩醯胺酸殘基之改變型生物素結合蛋白質(D40N-K141E)；以及

於序列編號7中，第40號之天冬胺酸殘基被置換為天冬醯胺殘基，第104號之精胺酸殘基被置換為麩醯胺酸殘基，並且第141號之離胺酸殘基被置換為麩醯胺酸殘基之改變型生物素結合蛋白質(D40N-R104E-K141E)。

結合生物素結合性蛋白質之載體

作為利用生物素-生物素結合性蛋白質間結合將SITH-1蛋白質結合於載體上之方法，例如可列舉：A)於結合有生物素結合性蛋白質之載體上結合生物素化之SITH-1蛋白質之方法；B)利用生物素結合性蛋白質之大多數為四聚物這

一情況，使生物素結合性蛋白質結合於結合有生物素之載體上，進而結合生物素化之SITH-1蛋白質之方法；C)於結合有生物素之載體上結合生物素結合性蛋白質-SITH-1融合蛋白質之方法等。

作為製作結合生物素結合性蛋白質之載體之方法，亦可使生物素結合性蛋白質直接結合於載體上(上述態樣A)。或者亦可購入預先將生物素結合性蛋白質固定化之載體(上述態樣A)。或者亦可利用生物素-生物素結合性蛋白質間結合，使生物素結合性蛋白質結合於生物素化之載體上(上述態樣B)。或者亦可利用生物素-生物素結合性蛋白質間結合，使生物素結合性蛋白質-SITH-1融合蛋白質結合於生物素化之載體上(上述態樣C)。

作為使生物素結合性蛋白質直接結合之方法，有如將上述SITH-1蛋白質與載體結合之方法中所詳細記載之使用疏水結合或共價結合之方法等。或者亦可根據套組所隨附之說明書使生物素結合性蛋白質直接結合、固定化於NEW ELISA微孔板套組(SUMITOMO BAKELITE公司)之類的微量盤上。再者，抗生物素蛋白或抗生蛋白鏈菌素例如自SIGMA公司等購買。

作為將生物素結合性蛋白質固定化之載體，例如亦可列舉 Reacti-Bind™ Streptavidin Coated Plates(PIERCE 公司)、Nunc Streptavidin Coated 96 Micro Well™ Plates(Nalge Nunc 公司)等微量盤類，或者 Dynabeads M-280 Streptavidin(Dynal 公司)、MagnaBind™ Streptavidin

Beads(PIERCE公司)等磁珠類等市售品，但並不限定於該等。

又，生物素結合性蛋白質亦可如上所述，將載體生物素化，利用生物素-生物素結合性蛋白質間結合而結合。

作為將載體生物素化之方法，例如可舉出使用生物素化試劑之方法。作為生物素化試劑，例如可利用PIERCE公司製造之(括弧內依序為連接子長度、反應基)EZ-Link(註冊商標)Sulfo-NHS-Biotin(13.5 Å、一級胺)、EZ-Link(註冊商標)Sulfo-NHS-LC-Biotin(22.4 Å、一級胺)、EZ-Link(註冊商標)Sulfo-NHS-LCLC-Biotin(30.5 Å、一級胺)、EZ-Link(註冊商標)PFP-Biotin(9.6 Å、胺)、EZ-Link(註冊商標)Maleimide-PEO₂-Biotin(29.1 Å、硫醇基)、EZ-Link(註冊商標)Biotin-PEO₂ Amine(20.4 Å、羧基)、EZ-Link(註冊商標)Biotin-PEO₃-LC Amine(22.9 Å、羧基)、EZ-Link(註冊商標)Biotin-Hydrazide(15.7 Å、醛基)、EZ-Link(註冊商標)Biotin-LC-Hydrazide(24.7 Å、醛基)、EZ-Link(註冊商標)NHS-Iminobiotin(13.5 Å、一級胺)等，但並不限定於該等。

可使用上述生物素化試劑，使用公知之方法使生物素結合於微量盤、微球、或者感測片等所需載體上。例如，有使用具有胺基、羧基、硫醇基、甲苯磺醯基、環氧基、順丁烯二醯亞胺基、活化酯等各種官能基之載體(例如磁珠、瓊脂糖凝膠珠、瓊脂糖珠、乳膠珠、微量滴定盤等)之方法。於此情形時，例如於使用含有NHS酯之生物素化

試劑之情形時，可藉由利用DMSO(二甲基亞砷)之類的有機溶劑或pH值7-9之磷酸緩衝液進行溶解，並添加至具有胺基之固定化載體中，而使生物素結合。又，例如於使用含有胺基之生物素化試劑之情形時，亦可於使用EDC(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride，1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳二醯亞胺鹽酸鹽)之類的碳二醯亞胺使固定化載體之羧基轉變為活化酯後，添加以pH值5左右之緩衝液溶解之生物素化試劑，而使生物素結合。再者，生物素化之固定化載體較好的是使未反應之官能基不活化後以BSA等進行阻斷。

又，亦可利用生物素化之市售載體。作為生物素化之微量盤，例如可利用Reacti-BindTM Biotin Coated Polystyrene Plates(PIERCE公司製造)，但並不限定於此。作為生物素化之微球，例如，作為磁珠，可利用BioMag Biotin(Polysciences公司製造)，作為奈米磁珠，可利用Corefront公司製造之nanomag(註冊商標)-D biotin、nanomag(註冊商標)-silica biotin，作為聚苯乙烯製微球，可利用Beadlyte(註冊商標)Biotin Beads(Upstate公司製造)，作為瓊脂糖，可利用Sigma公司製造之Biotin Agarose、2-iminobiotin-Agarose，作為高交聯瓊脂糖，可利用Biotin-Sepharose(Biotin-Sepharose公司製造)，但並不限定於該等。

連接載體與生物素之連接子之長度較好的是至少長於5 Å，更好的是13.5 Å以上。

生物素化 SITH-1 蛋白質

於本發明中，亦可使生物素結合於 SITH-1 蛋白質，而製作生物素化 SITH-1 蛋白質，利用生物素-生物素結合性蛋白質間結合，使之結合於結合有生物素結合性蛋白質之載體上。

結合有生物素結合性蛋白質之載體既可如上所述般使生物素結合性蛋白質直接結合於載體上，亦可購入預先將生物素結合性蛋白質固定化之載體(態樣A)。或者亦可利用生物素-生物素結合性蛋白質間結合，使生物素結合性蛋白質結合於生物素化之載體上(態樣B)。

作為生物素化 SITH-1 蛋白質之製作方法，並無特別限定。例如，亦可使用生物素標記套組(例如，非限定性的為 EZ-Link(註冊商標)NHS-Lc-Biotin PIERCE 公司)、或 Biotin Labeling Kit-NH2(DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES INC.公司)等)使生物素結合於 SITH-1 蛋白質上。或者亦可將 SITH-1 基因與編碼包含生物素化序列之胜肽之 DNA 融合，構築表現該融合基因之載體，使之於任意之宿主中表現為與生物素化序列之融合蛋白質，藉此製作生物素化 SITH-1 (Schwarz et al., (1988). J. Biol. Chem. 263: 9640-9645.)。

作為此種載體，並不限定於此，例如可舉出包含 Invitrogen 公司之 BioEase(商標)標記之載體。其中用於哺乳類細胞表現的有 pcDNA(商標)6 載體，用於大腸桿菌表現的有 pET104 載體，或者用於果蠅表現的有 pMT/BioEase 載

體。

進而，較好的是於SITH-1蛋白質之生物素化時亦可利用與使上述載體生物素化時使用之方法相同之方法。即，可舉出使用生物素化試劑之方法。作為生物素化試劑，例如可利用PIERCE公司製造之(括弧內依序為連接子長度、反應基)EZ-Link(註冊商標)Sulfo-NHS-Biotin(13.5 Å、一級胺)、EZ-Link(註冊商標)Sulfo-NHS-LC-Biotin(22.4 Å、一級胺)、EZ-Link(註冊商標)Sulfo-NHS-LCLC-Biotin(30.5 Å、一級胺)、EZ-Link(註冊商標)PFP-Biotin(9.6 Å、胺)、EZ-Link(註冊商標)Maleimide-PEO₂-Biotin(29.1 Å、硫醇基)、EZ-Link(註冊商標)Biotin-PEO₂ Amine(20.4 Å、羧基)、EZ-Link(註冊商標)Biotin-PEO₃-LC Amine(22.9 Å、羧基)、EZ-Link(註冊商標)Biotin-Hydrazide(15.7 Å、醛基)、EZ-Link(註冊商標)Biotin-LC-Hydrazide(24.7 Å、醛基)、EZ-Link(註冊商標)NHS-Iminobiotin(13.5 Å、一級胺)等，但並不限定於該等。

可使用此種生物素化試劑，使用公知之方法使生物素結合於SITH-1蛋白質。例如，於使用含有NHS酯之生物素化試劑之情形時，可利用DMSO(二甲基亞砷)之類的有機溶劑或pH值7-9之磷酸緩衝液進行溶解，並添加至SITH-1蛋白質中，藉此使生物素結合。又，例如於使用含有胺基之生物素化試劑之情形時，亦可使用EDC(1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳二醯亞胺氯氫氧化物)之類的碳二醯亞胺，使SITH-1蛋白質之羧基轉變為活化酯後，添加以pH值5左

右之緩衝液溶解之生物素化試劑，而使生物素結合。

再者，於如此使用生物素化試劑來製作生物素化SITH-1蛋白質之情形時，較好的是預先如上所述般將SITH-1蛋白質純化。

生物素化SITH-1蛋白質向載體之結合

於本發明中，藉由準備結合有生物素結合性蛋白質之載體與生物素化SITH-1蛋白質，並使兩者接觸，而可經由生物素-生物素結合性蛋白質間結合而使SITH-1蛋白質結合於載體上。

雖無限定，但將生物素化SITH-1蛋白質結合於載體上例如可利用如下方式進行。以0.1 mg/ml至5 mg/ml、較好的是0.2 mg/ml至2 mg/ml之總蛋白質濃度準備包含生物素化SITH-1蛋白質之細胞破碎粗萃取液。使其於4℃至40℃、較好的是15℃至30℃與結合有生物素結合性蛋白質之載體接觸5分鐘至2小時、較好的是30分鐘至1小時。藉由此操作，將生物素化SITH-1蛋白質固定化於結合有生物素結合性蛋白質之載體上。進而其後，較好的是於含有0.05%至1%、較好的是0.1%至0.3%之Tween20等界面活性劑之PBS (Phosphate Buffered Saline，磷酸鹽緩衝液)或者TBS(Tris buffer solution，Tris緩衝溶液)等緩衝液中，清洗剩餘之細胞破碎粗萃取物。

再者，於藉由如此方式使之接觸細胞破碎粗萃取液而結合生物素化SITH-1蛋白質之情形時，事實上同時進行純化與固定化。因此，於此情形時，無需另外之純化作業。

或者亦可使調整為0.1 µg/ml至5 µg/ml之濃度之純化生物素化SITH-1蛋白質與結合有生物素結合性蛋白質之載體相接觸。

4.生物學樣品與結合有SITH-1蛋白質之載體之接觸

本發明之方法中，於步驟2)中準備結合有SITH-1蛋白質之載體後，使生物學樣品接觸步驟2)中製成之結合有SITH-1蛋白質之載體，檢測SITH-1蛋白質抗體，來作為步驟3)。

生物學樣品與載體之接觸並無特別限定，可利用任意之方法進行。一般已知如下方法：於利用載體之檢測方法中，為減少成為背景訊號之原因的非特異結合，而使細菌成分萃取液包含於檢測用試劑中之方法(日本專利特開昭59-99257)；將導入有如下載體之宿主細胞之培養成分添加至樣品中之方法，該載體係與用於產生特異性地結合於受檢物質之重組蛋白質的載體同種且不含編碼該蛋白質之基因的載體(日本專利特開平8-43392)；對來自與產生特異性地結合於受檢物質之重組蛋白質之細胞同種且不含該蛋白質的細胞之水萃取液進行加熱處理後，將其水溶性餾分添加至樣品中之方法(日本專利特開2004-301646)等。

細胞萃取液之添加

先前之方法中，來自來源於自體免疫疾患之患者或者雖為健康人，但自身抗體等背景較高之受檢者的樣品之SITH-1蛋白質抗體之測定中，非特異結合較多，而難以進行。

本發明者等人進行銳意研究之結果發現，即便為來源於此類受檢者之樣品，藉由在使生物學樣品接觸載體時存在細胞破碎萃取液，亦可進行SITH-1蛋白質抗體之測定。

因此，本發明作為一個態樣，較好的是於步驟3)中向步驟2)中製成之結合有SITH-1蛋白質之載體中混合、添加

(a)生物學樣品、及

(b)由與用以表現步驟1)之SITH-1蛋白質之宿主細胞同種之細胞所製備的細胞破碎萃取液。

尤其是於利用生物素-生物素結合性蛋白質間結合使SITH-1蛋白質結合於載體之體系中，藉由以下方法可獲得更顯著之效果。

於步驟3)中，向步驟2)中製成之結合有SITH-1蛋白質之載體中混合、添加

(a)生物學樣品、及

(b)由與用以表現步驟1)或2)之SITH-1蛋白質、生物素化SITH-1蛋白質、及/或生物素結合性蛋白質之宿主細胞同種之細胞所製備的細胞破碎萃取液。

細胞破碎萃取液之來源細胞為大腸桿菌細胞、酵母細胞、哺乳類細胞、昆蟲細胞、植物細胞等，並無特別限制，較好的是與用以表現SITH-1蛋白質、生物素化SITH-1蛋白質、及/或生物素結合性蛋白質之宿主細胞同種之細胞。例如於利用大腸桿菌製備SITH-1蛋白質、生物素化SITH-1蛋白質、及/或生物素結合性蛋白質之情形時，較理想的是細胞破碎萃取液亦由大腸桿菌製備。又，於藉由

無細胞系來表現 SITH-1 蛋白質、生物素化 SITH-1 蛋白質、及/或生物素結合性蛋白質之情形時，可直接使用或者使所使用之細胞破碎萃取液懸浮於所需緩衝液中而使用。

又，SITH-1 蛋白質及/或生物素結合性蛋白質並非藉由基因工程技術而表現者，亦可為由原本具有該等蛋白質之細胞萃取・純化而成者。例如，於使用塔馬維啉作為生物素結合性蛋白質之情形時，亦可利用擔子菌姬菇 (*Pleurotus conucopiae*) 細胞之細胞破碎萃取液。如此原本含有生物素結合性蛋白質及/或 SITH-1 蛋白質之細胞之破碎萃取液亦包含於本發明之細胞萃取液中。

又，用以製備細胞破碎萃取液之細胞亦可包含任意之載體、較好的是空載體。所謂空載體，可為與表現 SITH-1 蛋白質、生物素化 SITH-1 蛋白質、及/或生物素結合性蛋白質時使用之載體同種、且不含編碼該等蛋白質之基因之載體，又，例如亦可為該等空載體進而含有任意核酸之任意載體。又，亦可為與表現 SITH-1 蛋白質、生物素化 SITH-1 蛋白質、及/或生物素結合性蛋白質時使用之載體不同種之載體。

作為細胞之破碎萃取液，若為來源於細胞之成分則並無特別限制，例如可使用其蛋白質成分、糖質成分、脂質成分或其混合成分。較好的是可使用細胞之可溶性萃取物。

作為細胞之破碎萃取液之製備方法，並無特別限制，可使用各種方法。通常可利用超音波等物理方法或者使用界面活性劑等之化學方法或者酶處理等將以合適之培養基培

養之細胞破碎或可溶化，藉由離心分離或過濾等操作而製備為可溶性成分。又，為延長保存壽命，較好的是對藉由離心分離或過濾等而澄清之液實施例如蛋白酶抑制劑之添加或高壓釜處理等加熱處理，而抑制來源於細胞之各種酶等或使之失活。添加細胞之破碎萃取液之濃度可根據所產生之非特異反應之強度而改變，可適當設定對於吸收該非特異反應而言充分之濃度。

作為製備細胞破碎萃取液之具體方法之例，並不限定於此，例如於大腸桿菌細胞之情形時，將大腸桿菌(既可含有載體，又載體中亦可含有編碼生物素結合性蛋白質之基因)接種於含有抗生素之LB培養基，於25℃至37℃進行振盪培養直至OD600下之吸光度達到0.1至1、較好的是0.3至0.8後，添加0.01 mM至5 mM、較好的是0.1 mM至1 mM之IPTG(Isopropyl β -D-Thiogalactoside，異丙基- β -D-硫代半乳糖苷)，進而於4℃至37℃、較好的是15℃至37℃、更好的是25℃至37℃進行2小時至48小時、較好的是4小時至24小時振盪培養。利用離心自培養液回收菌體，使菌體懸浮於所需緩衝液中後，進行破碎，對破碎液進行離心，將其上清液作為大腸桿菌粗萃取液加以回收即可。

於生物學樣品中混合細胞破碎粗萃取液之情形時，並無限定，於樣品中，使以所需緩衝液(可含有BSA或酪蛋白、市售之阻斷劑等)製備為0.05 mg/ml至5 mg/ml、較好的是0.5 mg/ml至5 mg/ml之總蛋白質濃度的細胞破碎粗萃取液於4℃至37℃、較好的是15℃至30℃反應1分鐘至24小時、

較好的是10分鐘至4小時、更好的是30分鐘至2小時。再者，於生物學樣品為血清等之情形時，通常將血清以細胞破碎萃取液稀釋為10倍至10000倍、較好的是100倍至1000倍、更好的是100倍至500倍而使用。

生物素結合性蛋白質之添加

本發明者發現，於使生物學樣品接觸載體時，更好的是使生物素結合性蛋白質與細胞破碎萃取液同時存在。

因此，本發明於其較好之一個態樣中，於步驟3)中，向步驟2)中製成之結合有SITH-1蛋白質之載體中混合、添加

(a)生物學樣品、以及

(b-i)由與用以表現步驟1)或2)之SITH-1蛋白質、生物素化SITH-1蛋白質、及/或生物素結合性蛋白質之宿主細胞同種之細胞所製備的細胞破碎萃取液、與生物素結合性蛋白質；或

(b-ii)由如下細胞製備之細胞破碎萃取液：該細胞係利用基因工程技術使與用以表現步驟1)或2)之SITH-1蛋白質、生物素化SITH-1蛋白質、及/或生物素結合性蛋白質之宿主細胞同種之細胞表現生物素結合性蛋白質者。

於本發明之方法中，藉由向生物學樣品中添加生物素結合性蛋白質，而可有效地抑制背景訊號。

此種生物素結合性蛋白質可為上述生物素結合性蛋白質之任一者，並無特別限制。又，既可為野生型，亦可為變異體，生物素結合能力與野生型相比，既可同等，亦可較高，亦可較低。

又，作為添加之態樣，既可直接添加生物素結合性蛋白質(既可來自天然，亦可為以基因工程之方式所表現者)之粉末，亦可溶解於適當之液中後添加。又例如，亦可為如下態樣(步驟b-i)：並不是直接將生物素結合性蛋白質添加至樣品中，而是將樣品與細胞破碎萃取液之混合物於固定有生物素結合性蛋白質之載體上進行處理(例如通過管柱)。

於將生物素結合性蛋白質添加至細胞破碎粗萃取液中之情形時，並無限定，以生物素結合性蛋白質之濃度之最終濃度為1 $\mu\text{g/ml}$ 至500 $\mu\text{g/ml}$ 、較好的是10 $\mu\text{g/ml}$ 至100 $\mu\text{g/ml}$ 來添加。關於在該細胞中以基因工程之方式表現生物素結合性蛋白質之情形時之生物素結合性蛋白質之濃度，亦並不限定於此，亦可為相同之濃度。

或者，將編碼生物素結合性蛋白質之基因導入宿主細胞並使之表現，並製成含有將該宿主細胞破碎所獲得之生物素結合性蛋白質之細胞萃取液而使用(步驟b-ii)。於此情形時，使生物素結合性蛋白質於所需宿主中利用業者眾所周知之方法進行表現即可，但於使步驟1)或2)之SITH-1蛋白質、生物素化SITH-1蛋白質、及/或生物素結合性蛋白質以基因工程之方式進行表現之情形時，較好的是與其宿主同種者。又，於生物素結合性蛋白質與使SITH-1蛋白質或生物素化SITH-1蛋白質以基因工程之方式進行表現之宿主不同之情形時，並不限定於此，添加至生物學樣品並進行反應之細胞萃取液亦可使用來源於兩者之宿主細胞者。

於宿主為大腸桿菌之情形時，將編碼生物素結合性蛋白質之基因組入表現載體中，將其導入大腸桿菌中，誘導蛋白質表現，同時進行大腸桿菌之培養。表現載體或宿主大腸桿菌株、培養基成分、IPTG濃度或培養溫度等誘導條件可適當選擇。

向載體中添加生物學樣品等

向載體中添加生物學樣品、細胞破碎萃取液、及生物素結合性蛋白質可利用任意之方法進行。其中，必須於生物學樣品接觸載體之同時、或之前使生物學樣品接觸細胞破碎萃取液及生物素結合性蛋白質。即，生物學樣品於接觸載體之同時、或之前充分地接觸細胞破碎萃取液即可，來源於細胞破碎萃取液之成分未必最終與生物學樣品一起添加至載體中。例如，亦可使用製成結合有細胞破碎萃取液成分之載體、於其中處理生物學樣品者。具體而言，可舉出於使生物學樣品接觸載體之前使細胞破碎萃取液成分通過管柱等態樣。

再者，添加後雖無特別限定，但使生物學樣品及細胞破碎萃取液與載體於10℃至30℃、較好的是20℃至30℃、反應10分鐘至4小時、較好的是30分鐘至2小時。

5.SITH-1蛋白質抗體之檢測方法

本發明之檢測方法係於步驟3)中檢測SITH-1蛋白質之抗體。

本技藝者可適當選擇檢測SITH-1蛋白質抗體之方法。作為較好者，可舉出：酶聯免疫吸附分析法(ELISA)或放射

免疫分析法(RIA, Radio immuno assay)等免疫分析法；表面等離子共振法等之類的分析法。使生物學樣品與使用生物素-生物素結合性蛋白質間之結合而固定化之SITH-1蛋白質反應後，檢測該SITH-1蛋白質抗體。

於免疫分析中，將作為抗原之SITH-1蛋白質固定化，使存在於生物學樣品中之SITH-1蛋白質抗體反應，利用本技藝者眾所周知之方法進行檢測。例如，對於結合於SITH-1蛋白質之SITH-1蛋白質抗體，使用識別並結合人抗體之例如抗人抗體作為二次抗體進行檢測。此時，預先將抗人抗體以螢光或酶、或者放射性同位素進行標記，最終測定螢光量或酶活性、或者放射性量，藉此間接地測定、定量抗體之量。

上述標記利用本技藝者眾所周知之方法進行即可，又，亦可使用市售之經螢光或酶標記之抗人抗體等。作為螢光標記，亦可考慮例如利用螢光素及玫瑰紅等之標記、或利用GFP(綠色螢光蛋白質)等螢光蛋白質之標記。作為酶標記，可利用過氧化酶或鹼性磷酸酶、或者螢光酶或葡萄糖氧化酶等，但並不限定於該等。用於利用該等酶所進行之測定之基質有市售，例如於過氧化酶之情形時，可使用TBA(硫巴比妥酸)或化學發光用之基質。又，作為放射性同位素，例如可列舉碘(^{125}I 、 ^{121}I)、碳(^{14}C)、硫(^{35}S)及氫(^3H)，於核酸之情形，可舉出磷(^{32}P)等。

生物學樣品(樣本)中存在之抗體之量例如可使用線性回歸電腦演算法，藉由與標準製備物(例如於臨床樣本之情

形時，為健康者之標準樣品或典型之患者之標準樣品)中存在之量之比較而簡便地算出。用以檢測抗體之此種分析法，例如關於ELISA，記載於Iacobelli等人、Breast Cancer Research and Treatment 11: 19-30 (1988)。

或者於SITH-1抗體效價較低之情形時、或非特異結合所致之背景訊號之影響變大之情形時，抗體之量可藉由如實施例所示般自測定值減去未將抗原固相化之區的測定值，而更準確地求得。例如，於生物學樣品中之SITH-1抗體較少之情形時(抗體效價較低之情形時)、或血清等生物學樣品本身之非特異性結合較多之情形時，非特異結合所致之背景訊號之影響變大。因此，藉由自測定值適當地減去背景訊號，而可更準確地測定所欲檢測之物質。本技藝者可根據實驗體系適當地判斷減去之背景訊號。

例如實施例2至4所記載般，自將SITH-1抗原固定化之載體之測定值減去未將SITH-1抗原固定化之區(其中與將SITH-1抗原固定化之區同樣地進行利用BSA等之阻斷操作、並且添加含有抗SITH-1抗體之血清(生物學樣品)之區)的測定值之態樣亦有效。

或者較好的是，藉由減去將人不具有抗體之任意蛋白質(並無限制，例如可舉出GFP等)固定化之區的測定值，而可更準確地求出。作為固定化之方法，並無特別限定，較好的是使對象之蛋白質生物素化，藉由生物素-生物素結合性蛋白質間之結合而固定化於結合有生物素結合性蛋白質之載體上。

本發明之檢測方法可於血清中特異性地檢測抗體效價較低之SITH-1蛋白質抗體。

II. 結合有SITH-1蛋白質之載體

本發明又提供一種用以檢測生物學樣品中之SITH-1蛋白質抗體之載體。

本發明之載體係結合有SITH-1蛋白質之載體，作為結合方法，如上所述，可列舉利用疏水結合、共價結合、抗生物素蛋白-生物素結合等之方法，使用各種標記之方法等。

本發明之載體之特徵更好的是SITH-1蛋白質與載體藉由生物素-生物素結合性蛋白質間結合而結合。本發明之載體較好的是藉由以下方法製備：

1)準備結合有生物素結合性蛋白質之載體、及生物素化SITH-1蛋白質；

2)經由生物素-生物素結合性蛋白質間之結合而使生物素化SITH-1蛋白質結合於步驟1)中準備之載體。1)之生物素結合性蛋白質既可直接結合於載體，亦可經由生物素而結合於載體。

III. 套組

本發明又提供一種用以檢測生物學樣品中之SITH-1蛋白質抗體之套組。本發明之套組包含

A)結合有上述SITH-1蛋白質之載體；以及

B)用以稀釋生物學樣品之劑，該劑包含由與用以表現A)之SITH-1蛋白質之宿主細胞同種之細胞所製備的細胞破碎

萃取液。

關於「結合有 SITH-1 蛋白質之載體」，如上所述。

用以稀釋生物學樣品之劑既可為細胞破碎萃取液(及生物素結合性蛋白質)其本身，或者亦可為與生物學樣品一起進一步稀釋細胞破碎萃取液之劑，並可含有適當之緩衝液或市售之細胞稀釋液或者血清稀釋液等溶劑。

又，本發明之套組較好的是

A)之載體為 SITH-1 蛋白質利用生物素-生物素結合性蛋白質間結合而結合之載體，並且

B)之劑包含

i)由與用以表現 A)之 SITH-1 蛋白質、生物素化 SITH-1 蛋白質、及/或生物素結合性蛋白質之宿主細胞同種之細胞所製備的細胞破碎萃取液、與生物素結合性蛋白質；或

ii)由如下細胞製備之細胞破碎萃取液：該細胞係利用基因工程技術使與用以表現 A)之 SITH-1 蛋白質、生物素化 SITH-1 蛋白質、及/或生物素結合性蛋白質之宿主細胞同種之細胞表現生物素結合性蛋白質者。

關於「SITH-1 蛋白質利用生物素-生物素結合性蛋白質間結合而結合之載體」，如上所述。

又，關於「由與用以表現 A)之 SITH-1 蛋白質、生物素化 SITH-1 蛋白質、及/或生物素結合性蛋白質之宿主細胞同種之細胞所製備的細胞破碎萃取液」、「生物素結合性蛋白質」、「由如下細胞製備之細胞破碎萃取液：該細胞係利用基因工程技術使與用以表現 SITH-1 蛋白質、生物素化

SITH-1蛋白質、及/或生物素結合性蛋白質之宿主細胞同種之細胞表現生物素結合性蛋白質者」，如上所述。

又，本發明之套組包含

A)上述SITH-1蛋白質；

B)用以將A)之SITH-1蛋白質固定化之載體；以及

C)用以稀釋生物學樣品之劑，該劑包含由與用以表現A)之SITH-1蛋白質之宿主細胞同種之細胞所製備的細胞破碎萃取液。

關於「上述SITH-1蛋白質」，於利用疏水結合、共價結合等而與載體結合之情形時，較好的是進行純化。又，於使用上述使用各種標記之方法、利用生物素-生物素結合性蛋白質間之結合之方法之情形時，如上所述，較好的是使該標記或生物素結合之SITH-1蛋白質。

關於「用以將A)之SITH-1蛋白質固定化之載體」，可利用上述載體，較好的是實施有用以與「上述SITH-1蛋白質」結合之處理之載體。

關於「由與用以表現A)之SITH-1蛋白質之宿主細胞同種之細胞所製備的細胞破碎萃取液」、「用以稀釋生物學樣品之劑」，如上所述。

上述本發明之套組較好的是

A)之SITH-1蛋白質經生物素化；

B)之載體與生物素結合性蛋白質直接或間接地結合；

C)之劑為用以稀釋生物學樣品之劑，該劑包含

i)由與用以表現A)或B)之SITH-1蛋白質、生物素化

SITH-1蛋白質、及/或生物素結合性蛋白質之宿主細胞同種之細胞所製備的細胞破碎萃取液、與生物素結合性蛋白質；或

ii)由如下細胞製備之細胞破碎萃取液：該細胞係利用基因工程技術使與用以表現A)或B)之SITH-1蛋白質、生物素化SITH-1蛋白質、及/或生物素結合性蛋白質之宿主細胞同種之細胞表現生物素結合性蛋白質者。

關於SITH-1蛋白質之生物素化之方法、與生物素結合性蛋白質直接或間接地結合之載體，如上所述。

又，關於「由與用以表現A)或B)之SITH-1蛋白質、生物素化SITH-1蛋白質、及/或生物素結合性蛋白質之宿主細胞同種之細胞所製備的細胞破碎萃取液」、「生物素結合性蛋白質」、「由如下細胞製備之細胞破碎萃取液：該細胞係利用基因工程技術使與用以表現A)或B)之SITH-1蛋白質、生物素化SITH-1蛋白質、及/或生物素結合性蛋白質之宿主細胞同種之細胞表現生物素結合性蛋白質者」、「用以稀釋生物學樣品之劑」，亦如上所述。

[實施例]

以下，藉由實施例具體地說明本發明，但該等並非用以限定本發明之技術範圍者。業者可基於本說明書之記載而容易地對本發明進行修飾、變更，該等包含於本發明之技術範圍內。

本說明書中之實施例1至3中，使來源於人疱疹病毒6(HHV-6)之SITH-1蛋白質與生物素化序列(Invitrogen公司

之BioEase標記)之融合蛋白質於大腸桿菌中進行表現，使由此所獲得之大腸桿菌粗萃取液直接於固定化有塔馬維啉2(以下記載為「TM2」)之微量盤上反應，藉由塔馬維啉-生物素結合使融合蛋白質結合於微量盤。

使以大腸桿菌粗萃取液稀釋之人血清(含有兔子抗SITH-1抗體。因市售之人血清中不含抗SITH-1抗體，故於本試驗中使用向市售之人血清中添加兔子之抗SITH-1抗體(抗血清)進行階段稀釋而成者作為樣本)於如此獲得之SITH-1蛋白質結合微孔板上反應，而測定人血清中所含有之抗SITH-1抗體效價。

實施例1 SITH-1與生物素化序列(BioEase標記)之融合蛋白質表現用載體之構築

於SITH-1蛋白質之N末側設計編碼配置有BioEase標記之融合蛋白質之基因。該BioEase標記係於生物體內(於此情形時為大腸桿菌)包含藉由生物體中之生物素化酶而生物素化之序列的胜肽標記。將BioEase-SITH-1融合蛋白質之胺基酸序列示於序列編號8，將編碼之鹼基序列示於序列編號9。

1-1.引子之設計

為構築BioEase-SITH-1融合基因，首先設計用以使SITH-1基因擴增之引子。即，設計包含編碼SITH-1蛋白質之N末端部位的DNA序列之引子(SITH1NtermGW-F)、與包含逆向編碼SITH-1蛋白質之C末端部位的DNA序列之引子(SITH1CtermGW-R)。

將 SITH-1 與 BioEase 標記之融合基因構築用引子匯總於表 1。

[表 1]

SITH-1 基因擴增用引子		
名稱	序列	長度
SITH1NtermGW-F	GGATATGAAGAAAAAGTGTC	20 mer
SITH1CtermGW-R	TTACACATTCATTTTCAGTTT	20 mer

(序列編號 10-11)

1-2. PCR (Polymerase Chain Reaction, 聚合酶鏈反應)

以 SITH-1 基因 (ORF) (序列編號 2) 具有 FLAG 標記之表現載體 (PCT/JP2008/67300) 之 DNA 作為模板，使用引子 SITH1NtermGW-F 與 SITH1CtermGW-R 進行 SITH-1 部位之擴增。PCR 反應條件為，於 20 μ l 之反應液中添加 500 ng 之模板 DNA、2 μ l 之 10 $\times$ ExTaq buffer (TaKaRa 公司)、1.6 μ l 之 2.5 mM dNTP、各 20 pmoles 之引子、0.1 μ l 之 5 U/ μ l ExTaq，使用 GeneAmp PCR System 9600 (PERKIN ELMER) 以 96 $^{\circ}$ C 3 分鐘進行 1 次，以 95 $^{\circ}$ C 1 分鐘、60 $^{\circ}$ C 1 分鐘、72 $^{\circ}$ C 2 分鐘各進行 20 次，以 72 $^{\circ}$ C 6 分鐘進行 1 次。其結果，獲得 477 bp 之 PCR 產物。

1-3. 克隆

將藉由 PCR 所獲得之 SITH-1 基因克隆至載體 pCR8/GW/TOPO (Invitrogen 公司製造)。連接反應係根據載體套組隨附之說明書。使用電穿孔法向大腸桿菌 TB1 中導入

DNA，根據常規方法(Sambrook et al. 1989, Molecular Cloning, A laboratory manual, 2nd edition)萃取質體DNA。關於確認插入之存在的質體，係使用M13引子(TaKaRa公司)與ABI PRISM 螢光定序儀(Model 310 Genetic Analyzer, Perkin Elmer公司)而確定鹼基序列，與所設計之基因之序列相比較，而確認無變異體。

將組入有SITH-1基因之質體作為入門克隆(entry clone)，使用Gateway System與作為BioEase標記融合蛋白質表現載體之pET104.1目標載體(Invitrogen公司製造)進行重組反應。將重組產物轉形為大腸桿菌TB1，萃取質體DNA，進一步將該質體轉形為大腸桿菌BL21(DE3)。將所獲得之大腸桿菌群落作為模板，使用SITH1NtermGW-F與SITH1CtermGW-R利用PCR進行插入基因部位之擴增，而確認有無插入基因。

利用以上方法，完成BioEase標記融合SITH-1蛋白質表現用之載體BioEase-SITH1/pET104.1。

1-4.大腸桿菌表現

將導入有BioEase-SITH1/pET104.1之大腸桿菌BL21(DE3)、或作為對照之僅導入有pTrc99A之大腸桿菌BL21接種於包含抗生素安比西林(最終濃度100 $\mu\text{g/ml}$)之LB培養基50 ml中，於30°C進行振盪培養直至OD600下之吸光度達到0.5為止。其後，添加1 mM IPTG，進而於30°C振盪培養5小時。利用離心自培養液50 ml回收菌體。將菌體懸浮於0.1M HEPES/KOH(pH值7.4)3 ml中後，藉由超音波進行破

碎。對破碎液進行離心(15,000 rpm)，將其上清液作為大腸桿菌粗萃取液。

為確認BioEase標記融合SITH-1蛋白質之表現，而利用SDS-PAGE(Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamid Gel Electrophoresis，十二烷基硫酸鈉聚丙稀醯胺凝膠電泳)將粗萃取液中所含之蛋白質分離，進行西方墨點法。利用西方墨點法之BioEase標記融合SITH-1之檢測中使用兔子抗SITH-1抗體(未發表)與鹼性磷酸酶標記抗兔子IgG抗體(BIO RAD公司製造)。

將結果示於圖1A。自BioEase標記融合SITH-1表現大腸桿菌檢測到對照中不存在之約30 kDa之條帶。該尺寸與BioEase標記融合SITH-1之分子量28.6 kDa大致一致。

進而使用辣根過氧化酶標記抗生蛋白鏈菌素代替抗SITH-1抗體，來檢測訊號。將結果示於圖1B。對照中幾乎檢測不到訊號，另一方面，自表現BioEase標記融合SITH-1之大腸桿菌粗萃取液檢測到來源於與抗生蛋白鏈菌素反應(因此認為經生物素化)之蛋白質的2條粗條帶。並且其中上方之條帶之尺寸與先前之西方墨點法時所檢測到之條帶大致相同。由以上內容顯示，成功地進行生物素化SITH-1之表現。

再者，除上述以外，為了用於後述ELISA實驗，關於導入有pTrc99A或TM2/pTrc99A(WO 02/072817)之大腸桿菌BL21，亦與上述同樣地於IPTG存在下進行培養後，製備大腸桿菌粗萃取液。

實施例2 利用ELISA之人血清中抗SITH-1抗體之檢測

使用New ELISA微孔板套組(SUMITOMO BAKELITE)將純化TM2固定化於微量盤。固定化方法係根據套組隨附之說明書。

以總蛋白質濃度達到2 mg/ml之方式利用0.1M HEPES/KOH(pH值7.4)製備實施例1中獲得之表現BioEase標記融合SITH-1蛋白質之大腸桿菌粗萃取液後，向TM2固定化微孔板(SUMITOMO BAKELITE、New ELISA)中添加100 μ l。藉由於室溫下靜置1小時，利用塔馬維啉-生物素結合使BioEase標記融合SITH-1蛋白質結合於TM2固定化微孔板。其後，將微孔板之各孔利用含有0.1%Tween20之TBS緩衝液(TBST)清洗3次，向各孔中添加250 μ l之5 μ g/ml的BSA/TBST溶液，於室溫下靜置1小時，進行阻斷。其後，將各孔以TBST清洗3次。

繼而，向將人血清(Human Serum pool，Cosmo-Bio公司製造)利用PBS、或實施例1之(1-4)中製備之導入有1 mg總可溶性蛋白質/ml之pTrc99A之大腸桿菌粗萃取液、或導入有1 mg總可溶性蛋白質/ml之TM2/pTrc99A之大腸桿菌粗萃取液稀釋100倍而成之溶液中，以體積比達到1/500、1/1000、1/2000、1/4000、1/8000之方式添加兔子抗SITH-1抗體進行階段稀釋。將該(含有抗SITH-1抗體)經稀釋之人血清以每個孔100 μ l之方式添加至利用生物素-塔馬維啉2結合將BioEase標記融合SITH-1蛋白質固定化之微孔板，使之於室溫下反應1小時。

推測兔子抗 SITH-1 抗體(抗血清)之血清中抗體效價與典型之抑鬱症(情感疾患)患者之血清中抗 SITH-1 抗體效價相比，大約高 50 倍左右。因此認為若於市售(健康者)人血清中混合以體積比計為 1/50 量之兔子抗 SITH-1 抗體(抗血清)，則成為典型之抑鬱症患者血清之疑似樣本。因此，可認為上述抗體稀釋率與將抑鬱症患者血清稀釋大約 10 倍至 80 倍而使用之情形時為相同程度。

進而，為確認用於稀釋血清之大腸桿菌粗萃取液中之 TM2 之效果，而製備以最終濃度達到 50 $\mu\text{g/ml}$ 之方式向 PBS 或上述導入有 pTrc99A 之大腸桿菌粗萃取液中添加純化 TM2 而成之溶液，向使用該溶液而將人血清稀釋 100 倍之溶液中，與上述同樣添加兔子抗 SITH-1 抗體，以體積比計達到 1/500、1/1000、1/2000、1/4000、1/8000 之方式進行階段稀釋，以每個孔 100 μl 之方式添加至固定化有 BioEase 標記融合 SITH-1 之微孔板，使之於室溫下反應 1 小時。又作為對照，對未進行任何結合之 TM2 固定化微孔板進行上述阻斷操作後，與上述同樣地以每個孔 100 μl 之方式添加向如下人血清中添加經階段稀釋之兔子抗 SITH-1 抗體而成者，使之於室溫下反應 1 小時；上述人血清係利用 PBS 溶液、或導入有 pTrc99A 或者導入有 TM2/pTrc99A 之大腸桿菌粗萃取液(1 mg 總可溶性蛋白質/ml)、進而添加有純化 TM2 之 PBS、或添加有純化 TM2 之導入有 pTrc99A 之大腸桿菌粗萃取液稀釋 100 倍者。

使向如上所述以各種稀釋液稀釋之人血清中添加兔子抗

SITH-1 抗體進行階段稀釋而成者與固定化於載體上之 BioEase 標記融合 SITH-1 蛋白質反應後，以 TBST 清洗 3 次。其後，為分別檢測結合於 SITH-1 之兔子抗 SITH-1 抗體、以及認為於各孔中非特異性結合之血清中之人 IgG，而以每個孔 100 μ l 之方式添加將辣根過氧化酶標記山羊抗兔子 IgG 抗體、以及過氧化酶標記山羊抗人 IgG 抗體分別以 TBST 稀釋 5000 倍之混合溶液，於室溫下靜置 1 小時。其後，以 TBST 清洗 3 次，檢測過氧化酶活性。活性係向每個孔中添加 100 μ l 之 SuperSignal ELISA Pico Chemiluminescent Substrate(PIERCE)並於室溫下靜置 5 分鐘後藉由光吸收酶標儀 Infinite M200(TECAN 公司製造)測定發光量。再者，作為資料值，係於兔子抗 SITH-1 抗體之各濃度區中，亦同時進行對照區樣本(並未於 TM2 微孔板上固定 BioEase 標記融合 SITH-1，但藉由 BSA 進行阻斷操作，並且對含有各濃度之抗 SITH-1 抗體之人血清進行處理之區)之各發光量之測定，自將 BioEase 標記融合 SITH-1 固定化之區的發光量之值減去該對照區之值。將其作為血清中所含之抗 SITH-1 抗體之檢測量。進而，為進行各血清稀釋液之效果之比較，而根據以下所示之式算出 S/N 比。

$$S/N \text{ 比} = \frac{\text{以各濃度添加抗 SITH-1 抗體之區的抗 SITH-1 抗體檢測量}}{\text{未添加抗 SITH-1 抗體之區的抗 SITH-1 抗體檢測量}}$$

因此，S/N 比越大，表示檢測靈敏度越高。

將結果示於圖 2、圖 3。血清中所含之抗 SITH-1 抗體於將

血清以PBS加以稀釋之區中非特異結合較多，於未添加抗SITH-1抗體之區中亦檢測到較高之發光量。又，該非特異結合於50 $\mu\text{g/ml}$ 之TM2存在下亦未得到改善。另一方面，於將血清以導入有pTrc99A之大腸桿菌粗萃取液或導入有TM2/pTrc99A之大腸桿菌粗萃取液、或者向導入有pTrc99A之大腸桿菌粗萃取液中添加50 $\mu\text{g/ml}$ 之TM2而成者進行稀釋之區中，未添加SITH-1抗體之區中之發光值相當低，非特異結合急遽減少(圖2)。

又，如圖3所示，關於S/N比，尤其是於向導入有pTrc99A之大腸桿菌粗萃取液中添加50 $\mu\text{g/ml}$ 的TM2之區與添加導入有TM2/pTrc99A之大腸桿菌粗萃取液之區中較高。

由以上內容顯示，於使用在TM2微孔板上將BioEase標記融合SITH-1固定化之微孔板之測定體系中，藉由利用含有TM2之大腸桿菌粗萃取液稀釋人血清，而可減少來源於人血清之非特異結合，並且濃度極低之抗SITH-1抗體亦可高靈敏度地定量地檢測。

實施例3.使用來源於患者之血清樣本之ELISA分析

3-1.使用TM2微孔板與生物素化SITH-1之人血清中抗SITH-1抗體效價測定

使用判定具有SITH-1抗體之患者血清6例(慢性疲勞症候群2例、抑鬱症3例、克隆氏病1例)、及雖為健康人但自身抗體等背景較高、而利用螢光抗體法難以判別之血清6例，進行血清抗體效價測定。再者，患者血清及健康人對

照血清獲得東京慈惠會醫科大學、大阪大學醫學系研究科、或大阪市立大學醫學系研究科之倫理委員會之承認而進行採集、檢查。

患者之抗SITH-1抗體效價以螢光抗體計係使用40倍~160倍者。於此研究中，健康人對照之血清係使用具有40倍~80倍之抗核抗體或抗細胞質抗體、利用螢光抗體法難以測定SITH-1抗體之樣本6例。

螢光抗體法係以如下方式實施。螢光抗體法中使用之抗原係使用將SITH-1表現載體(將Clontech公司製造之pEGFP-N1載體之EGFP部分以SITH-1之開放閱讀框(open reading frame)置換者)轉移感染至以Lab-Tek公司製造之8 Chamber Slide培養之293T細胞、於24小時後以冷丙酮固定5分鐘者。血清係將人血清以0.2%BSA與包含0.2%Tween20之PBS(-：不含鈣與鎂)每種成2倍之方式稀釋為20倍、40倍、80倍、160倍，而製成1次抗體。使1次抗體與抗原於37℃反應1小時後，於含有0.2% Tween20之PBS(-)中進行3次30分鐘之清洗。2次抗體係將Invitrogen公司製造之Alexa Fluor(註冊商標)488抗人IgG稀釋500倍，使之於37℃反應1小時。於含有0.2% Tween20之PBS(-)中進行30分鐘之清洗後，利用螢光顯微鏡進行觀察。以顯示SITH-1特有之染色圖像之1次抗體之最大稀釋倍率，而作為螢光抗體之抗體效價。

使用TM2 NEW微孔板之ELISA法係根據實施例2之方法。以達到2 mg總蛋白質/ml之方式將BioEase標記融合

SITH-1表現大腸桿菌粗萃取液以0.1M之HEPES/KOH(pH值7.4)加以稀釋，以每個孔100 μ l之方式添加至TM2 New ELISA微孔板。藉由於室溫下靜置1小時，利用塔馬維啉-生物素結合而結合BioEase標記融合SITH-1蛋白質。其後，將微孔板之各孔以含有0.1%Tween20之TBS緩衝液(TBST)清洗3次。如此製成固定化有重組SITH-1蛋白質之微孔板。

繼而，將上述來源於患者之人血清利用以下之溶液1)~3)之任一者稀釋100倍。

1)於TBS-T(三羥甲基胺基甲烷緩衝液生理鹽水、0.1% Tween 20)中含有酪蛋白1%之溶液；

2)大腸桿菌粗萃取液

對每1 g大腸桿菌(BL21)顆粒使用5 ml之BugBuster Protein Extraction Reagent(Novagen公司製造)之溶解液，進行3,000 g、10分鐘離心分離而獲得之上清液(無IPTG誘導)

3)如實施例1所製備之5 mg總蛋白質/ml之TM2表現大腸桿菌粗萃取液(有IPTG誘導)

將該等以每個孔100 μ l之方式添加至結合有BioEase標記融合SITH-1蛋白質之微孔板，於室溫下靜置1小時，進而以TBST清洗3次。

作為對照，以每個孔100 μ l之方式添加不含血清之PBS、或不含血清之大腸桿菌粗萃取液、或不含血清之TM2表現大腸桿菌粗萃取液，於室溫下靜置1小時，進而

以 TBST 清洗 3 次。

其後，作為 2 次抗體，以每個孔 100 μ l 之方式添加將抗人 IgG · HRP 抗體 (Jackson Immuno Research 公司製造) 以 TBST 稀釋 5000 倍而成之溶液，於室溫下靜置 1 小時。其後，以 TBST 清洗 3 次，為檢測過氧化酶活性，而使用 TMB1 Component HRP Microwell Substrate (BioFX laboratories 公司製造) 進行顯色反應。再者自各試驗區之吸光度減去僅加入有顯色液 TMB1 之孔之吸光度。

將觀察到之吸光度示於圖 4~圖 6。如圖 4 所示，於將血清以含有酪蛋白之 TBS-T 加以稀釋(前處理)而供給至 ELISA 之情形時，吸光度為患者： 3.56 ± 0.12 ，健康人： 3.65 ± 0.19 ，患者與健康人未發現較大之差。相對於此，如圖 5 所示，將血清以大腸桿菌粗萃取液加以稀釋者，吸光度為患者： 1.84 ± 1.14 ，健康人： 1.26 ± 0.14 ，發現患者有顯示更大之值之傾向。進而，如圖 6 所示，於將血清以 TM2 表現大腸桿菌粗萃取液加以稀釋之情形時，吸光度為患者： 1.05 ± 0.27 ，健康人： 0.43 ± 0.09 ，發現顯著差異(於 0.1% 顯著性水平下，存在顯著差異)。

於此研究中，即便使用螢光抗體法難以判別之血清，患者與健康人之間亦出現充分之差，暗示著使用 TM2 微孔板與生物素化 SITH-1、並且尤其是使用 TM2 表現大腸桿菌粗萃取液作為血清稀釋液之 ELISA 法為實用之方法。

3-2. 使用鎳微孔板與 His 標記融合 SITH-1 蛋白質之人血清中抗 SITH-1 抗體效價測定

於本實施例中，使用於作為ELISA用微孔板而市售之QIAGEN公司之鎳微孔板上附加組胺酸標記(His標記)之SITH-1蛋白質，利用ELISA法進行抗體測定。

His標記SITH-1蛋白質，為防止SITH-1蛋白質於大腸桿菌內形成不溶性之內含體(包涵體，inclusion body)，而表現為與由pET-32a-ru(+)DNA所獲得的包含109胺基酸之Trx·Tag(Thioredoxin，硫氧還蛋白)之融合蛋白質。

將由pET-32a(+)DNA所獲得之包含109胺基酸之Trx(Thioredoxin)與His標記及框一併插入大腸桿菌冷性休克載體pCold I(TaKaRa Bio公司製造)中。進而，將SITH-1或EGFP與框一併插入至Trx之下游。如此構築His標記-Trx-SITH-1、His標記-Trx-EGFP。將完成之質體導入至大腸桿菌(BL21)中。將該大腸桿菌於LB液體培養基中(添加IPTG，使最終濃度達到1.0 mM)於15℃振盪培養24小時，而誘導蛋白質表現。利用離心分離回收大腸桿菌顆粒後，每1 g大腸桿菌顆粒使用5 ml之BugBuster Protein Extraction Reagent(Novagen公司製造)，萃取大腸桿菌蛋白質，使用對該萃取液進行3,000 g、10分鐘離心分離所得之上清液作為His標記·SITH-1蛋白質表現大腸桿菌粗萃取液。

使用鎳微孔板之ELISA法以如下方式進行。使上述His標記·SITH-1表現大腸桿菌粗萃取液於Ni-NTA HisSorb Strips(QIAGEN公司製造)中於室溫下反應1小時。以PBS(-)、0.5% Tween20溶液清洗3次後，添加抗SITH-1兔子血清、或上述來源於患者之人血清，使之於室溫下反應1小

時。以PBS(-)、0.5% Tween 20溶液清洗3次後，使用抗兔子IgG·HRP抗體(Roche公司製造、稀釋5,000倍)、或抗人IgG·HRP抗體(Jackson Immuno Research公司製造、稀釋5,000倍)作為2次抗體。顯色反應係使用TMB1 Component HRP Microwell Substrate(BioFX laboratories公司製造)進行。

首先，為確認鎳微孔板與His標記SITH-1蛋白質之有用性，而使用抗SITH-1兔子血清，利用ELISA法進行抗體測定。兔子血清使用稀釋100倍與稀釋500倍者。將結果各示於圖7及8。其結果顯示，於使用兔子血清之情形時，鎳微孔板與His標記SITH-1蛋白質可用於抗體測定。

繼而，使用上述3-1中所使用之人血清(患者血清6例與健康人對照血清6例)，進行使用鎳微孔板與His標記SITH-1蛋白質之抗體測定。作為用以確認非特異結合之蛋白質之對照，係使用His標記EGFP蛋白質。

血清係對稀釋100倍與稀釋500倍之兩者進行研究。作為稀釋劑，係使用1%牛血清白蛋白(BSA)及與上述(3-1)中所使用者相同之大腸桿菌粗萃取液。再者，用於血清反應之緩衝液為PBS(-)，阻斷係以含有0.2% BSA之PBS來進行。又，清洗係以含有0.05% Tween 20之PBS(-)來進行。

將結果示於圖9及10。將血清稀釋100倍者、1% BSA、大腸桿菌粗萃取液均未於患者與健康人中發現抗體效價存在較大之差。另一方面，將血清稀釋500倍者，與(3-1)之方法相比，其差較小，但1% BSA、大腸桿菌粗萃取液均

發現顯示出患者之抗體效價高於健康人之傾向。

實施例4 利用使用磁珠之ELISA的人血清存在下之抗SITH-1抗體之檢測

於本實施例中，對於檢測非常稀薄之濃度之SITH-1抗體之情形，係調查將TM2融合SITH-1固定化於生物素化磁珠上之體系中之各種血清稀釋液之效果。

4-1.引子之設計

為構築SITH1-TM2融合基因，首先設計經由連接子(5×linker：GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS)(序列編號12)使SITH-1與TM2之兩基因融合之引子。

即，於5'側設計SITH-1之C末端部位，於中央設計連接子，於3'側設計包含編碼TM2之N末端部位的DNA序列之引子(SITH1C-5×link-TM2N-F)(序列編號13)；於5'側設計TM2之N末端部位、連接子，於3'側設計包含逆向編碼SITH-1之C末端部位的DNA序列之引子(SITH1C-5×link-TM2N-R)(序列編號14)。

繼而，設計包含SITH-1之N末端部位之5'部分、及於其上游配置有EcoR I限制酶切斷部位(CCATGG)之引子(SITH1 5' EcoRI-F)(序列編號15)；又，設計TM2基因之3'部分及於其下游包含編碼BamH I限制酶切斷部位(GGATCC)之序列之引子(TM2CtermBam)(序列編號16)。將SITH-1與TM2之融合基因構築用引子匯總於表2。

[表 2]

SITH-1與 TM2之融合基因構築用引子

名稱	序列	長度
SITH1 5' EcoRI-F	AAAGAATTTCGGATATGAAGAAAAAGTGTC	29 mer
SITH1C-5×link-TM2N-F	CCGAAAACTGAAATGAATGTGggtggcgggtggc agcgggtggcgggtggcagcgggtggcgggtggcagcgggtggc gtggcagcgggtggcgggtggcagcTCAGACGTTCAATCTTCACTC	117 mer
SITH1C-5×link-TM2N-R	GAGTGAAGATTGAACGTCTGAgctgccaccgcca ccgctgccaccgcccaccgctgccaccgcccaccgctgccacc gccaccgctgccaccgcccaccCACATTCAATTCAGTTTTTCGG	117 mer
TM2CtermBam	TTTGGATCCTTACTTCAACCTCGGTGCG	28 mer

用下畫線表示限制酶識別部位。以小寫字母表示連接子序列。

4-2.PCR

為構築 SITH1-TM2融合基因而進行兩階段之PCR。

至於第一階段之PCR，係以將 SITH-1基因(ORF)(序列編號2)組入至FLAG Expression Vector(SIGMA)之質體作為模板，使用引子SITH1 5' EcoRI-F與SITH1C-5×link-TM2N-R進行SITH-1部位之擴增，又，以將TM2基因組入至載體pTrc99A之質體(WO02/072817)作為模板，使用引子SITH1C-5×link-TM2N-F與TM2CtermBam進行TM2部位之擴增。

PCR反應與上述實施例1-2.同樣進行。其結果，於SITH-

1 部分獲得 579 bp 之 PCR 產物，於 TM2 部分獲得 528 bp 之 PCR 產物。以該等 PCR 產物作為模板，使用引子 SITH1 5' EcoRI-F 與 TM2CtermBam 進行第二階段之 PCR。其結果，獲得 990 bp 之 PCR 產物。

4-3. 克隆

於載體 pCR4Blunt TOPO(Invitrogen 公司製造)上，將藉由 PCR 所獲得之 SITH1-TM2 融合基因與上述實施例 1-3 同樣地進行克隆。進而，將組入有融合基因之質體以 EcoRI 以及 BamHI 進行雙酶切，回收含有融合基因之 DNA 片段。將該片段克隆至預先以 EcoRI 與 BamHI 酶切之大腸桿菌用之表現載體 pTrc99A(Pharmacia 公司製造)。如上所述，完成 SITH-1 與 TM2 之融合蛋白質表現用之載體 SITH1-TM2/pTrc99A。將編碼表現用載體 SITH1-TM2/pTrc99A 中之 SITH1-TM2 之鹼基序列示於序列編號 17，將所編碼之胺基酸序列示於序列編號 18。

由於 SITH1-TM2 於 5' 側係使用 EcoRI 部位組入至 pTrc99A，故而於翻譯起始蛋胺酸之後附加 2 個胺基酸殘基(序列編號 17 之鹼基編號 4~9、序列編號 18 之胺基酸殘基編號 2~3)。繼而，連接 SITH-1 之序列(序列編號 17 之鹼基編號 10-483、序列編號 18 之胺基酸殘基編號 4-161)、5×linker(序列編號 17 之鹼基編號 484-558、序列編號 18 之胺基酸殘基編號 162-186)、TM2 之序列(除去 Met 者)(序列編號 17 之鹼基編號 559-981、序列編號 18 之胺基酸殘基編號 187-326)。

4-4.大腸桿菌表現

與上述實施例 1-4. 同樣地培養導入有 SITH1-TM2/pTrc99A之大腸桿菌 BL21。利用離心自培養液 50 ml 回收菌體。使菌體懸浮於 0.1M 之 HEPES/KOH(pH 值 7.4) 3 ml 中後，藉由超音波進行破碎。對破碎液進行離心 (15,000 rpm)，將其上清液作為大腸桿菌粗萃取液。藉由西方墨點法確認 TM2 融合 SITH-1 蛋白質之表現。

於 SITH-1 之檢測中，係將兔子抗 SITH-1 抗體(將於大腸桿菌中表現之 SITH-1 純化，對兔子進行免疫而製成之抗 SITH-1 抗體(抗血清))與鹼性磷酸酶標記抗兔子 IgG 抗體(BIO RAD 公司製造)各稀釋 1000 倍而使用。其結果，自 TM2 融合 SITH-1 表現大腸桿菌於 35 kDa 附近檢測到條帶。該尺寸與 TM2 融合 SITH-1 之分子量 34.8 kDa 大致一致。再者，關於導入有 pTrc99A 或 TM2/pTrc99A 之大腸桿菌 BL21 (Takakura et al. (2009) FEBS J.276: 1383-1397)，亦與上述同樣於 IPTG 存在下培養後，製備大腸桿菌粗萃取液。

4-5.TM2 融合 SITH-1 固定化磁珠之製備

於磁珠之 Dynabeads M-270 Amine(DynalBiotech 公司製造)1 mL(30 mg 珠粒/mL)中添加 10 mM 之 NHS-Lc-Lc-Biotin (PIERCE 公司製造)1 mL。藉由於室溫下顛倒混和 30 分鐘而使胺基與 NHS 活性酯基反應，使生物素與磁珠共價結合。其後，將磁珠以 0.1% BSA/0.01% Tween20/PBS 溶液清洗 2 次，最後懸浮於 PBS 緩衝液。將所獲得之磁珠(30 mg 珠粒/mL 之 PBS)作為生物素化磁珠。

使 TM2 融合 SITH-1 與上述實施例 4-4 同樣於大腸桿菌中進行表現，利用 0.1 M 之 HEPES/KOH (pH 值 7.4) 將所製備之大腸桿菌粗萃取液以總可溶性蛋白質濃度達到 5 mg/ml 之方式加以稀釋，向其中添加生物素化磁珠。藉由於室溫下顛倒混合 1 小時，而利用塔馬維啉-生物素結合將 TM2 融合 SITH-1 固定化於磁珠上。其後，將磁珠以含有 0.2% Tween20 的 TBS 緩衝液 (TTBS) 清洗 3 次。

進而，利用 0.1 M 之 HEPES/KOH (pH 值 7.4)，將 TM2 表現之大腸桿菌 (Takakura et al. (2009) FEBS J 276: 1383-1397) 之粗萃取液以總可溶性蛋白質濃度達到 5 mg/ml 之方式加以稀釋，向其中添加生物素化磁珠。藉由於室溫下顛倒混合 1 小時，而利用塔馬維啉-生物素結合將 TM2 固定化。與上述同樣地清洗後，將完成之 TM2 固定化磁珠 (30 mg 珠粒 / mL 之 PBS) 用於抵消血清樣本固有之非特異結合。

4-6. 使用磁珠之 ELISA 分析

向市售之人血清 (Human Serum pool, Cosmo-Bio 公司製造) 中添加 1/50 量之實施例 2 之兔子抗 SITH-1 抗體，而製備含有 SITH-1 抗體之人血清。另一方面，將未添加 SITH-1 抗體之人血清作為對照。

將人血清或含有兔子 SITH-1 抗體之人血清以 PBS 或、總可溶性蛋白質濃度以 0.1 M 之 HEPES/KOH (pH 值 7.4) 調整為 5 mg/ml 之 pTrc99A 載體產物表現大腸桿菌粗萃取液、或總可溶性蛋白質濃度以 0.1 M 之 HEPES/KOH (pH 值 7.4) 調整為 5 mg/ml 之 TM2 表現大腸桿菌粗萃取液稀釋 1000 倍，向如此

所得之溶液中進而添加BSA，使最終濃度達到2%(w/v)。再者，於上述實施例2中，將人血清稀釋100倍後，添加兔子抗SITH-1抗體，使相對於該稀釋後之血清之體積比達到0.00025至0.002。然而，於本實施例4~6中，將兔子抗SITH-1抗體向人血清中添加1/50量(以體積比計為0.02)後，稀釋1000倍，因此兔子SITH-1抗體之稀釋率達到1/50000。因此，上述抗體稀釋率與將抑鬱症患者血清大約稀釋1000倍而使用之情形為相同程度。

於如此製備之稀釋血清1 mL中各添加10 μ l之TM2融合SITH-1固定化磁珠或TM2固定化磁珠，於室溫下顛倒混和1小時而使之反應。以TBST清洗3次後，為檢測結合於固定化於磁珠上之SITH-1抗原之兔子抗SITH-1抗體，而將辣根過氧化酶標記山羊抗兔子IgG抗體，又為檢測非特性異結合於各磁珠之人IgG，而將過氧化酶標記山羊抗人IgG抗體，分別以含有2%BSA之TBST稀釋5000倍後加以混合，將該過氧化酶標記二次抗體混合溶液於每個磁珠上添加1000 μ l，於室溫下顛倒混合1小時。其後進而以TBST清洗3次，添加100 μ l之檢測試劑1 step ELISA ultraTMB (PIERCE)，使之於室溫下反應1分鐘。藉由添加2 M硫酸100 μ l而使反應停止，利用光吸收酶標儀Infinite M200 (TECAN公司製造)測定顯色程度(波長450 nm下之吸光度、A450)。對每個處理區實施2次測定並求得平均值。

作為資料值，係使用自於TM2融合SITH-1固定化磁珠中使用各血清稀釋液(PBS、pTrc99A載體產物表現大腸桿菌

粗萃取液、TM2表現大腸桿菌粗萃取液)時之A450之值，減去各血清稀釋液分別使用TM2固定化磁珠時之A450之值所得者。將結果示於表3。

表3.人血清中之SITH-1抗體檢測時之血清稀釋液之效果

血清稀釋液	A450		S/N比
	有SITH-1抗體之血清 (S)	無SITH-1抗體之血清 (N)	
PBS	0.64	0.25	2.6
導入有pTrc99A之BL21粗萃取液	0.14	0.04	3.5
導入有TM2/pTrc99A之BL21粗萃取液	0.22	0.02	11.0

其結果，如表3所示，人血清中之SITH-1抗體之A450之值(S)於使用PBS作為血清稀釋液時顯示最高之值，但同時不含SITH-1抗體之血清中之A450值(N)亦極高，結果使用PBS時S/N比(添加有兔子抗SITH-1抗體之人血清中之顯色程度/未添加兔子抗SITH-1抗體之血清中之顯色程度)最低。

另一方面，於使用血清稀釋液作為pTrc99A載體產物表現大腸桿菌粗萃取液、或TM2表現大腸桿菌粗萃取液之情形時，不含SITH-1抗體之血清中之A450值遠遠低於使用PBS之情形，可較大地抑制非特異結合。由此顯示，於使用TM2融合SITH-1固定化磁珠之情形時，藉由將pTrc99A載體產物表現大腸桿菌粗萃取液、或TM2表現大腸桿菌粗萃取液混合至人血清中，可減少非特異結合而檢測抗SITH-1抗體。

[序列表自由內容]

序列編號1：SITH-1之胺基酸序列。

序列編號2：SITH-1 ORF之鹼基序列。

序列編號3：SITH-1 cDNA之鹼基序列。

序列編號4：塔馬維啉1之鹼基序列。

序列編號5：塔馬維啉1之胺基酸序列。

序列編號6：塔馬維啉2之鹼基序列。

序列編號7：塔馬維啉2之胺基酸序列。

序列編號8：BioEase-SITH-1融合蛋白質之胺基酸序列

序列編號9：編碼BioEase-SITH-1融合蛋白質之鹼基序列

序列編號10：PCR用引子SITH1NtermGW-F

序列編號11：PCR用引子SITH1NtermGW-R

序列編號12：5×連接子

序列編號13：PCR用引子SITH1C-5×link-TM2N-F

序列編號14：PCR用引子SITH1C-5×link-TM2N-R

序列編號15：PCR用引子SITH1C-5'EcoRI-F

序列編號16：PCR用引子TM2CtermBam

序列編號17：SITH-1-TM2之鹼基序列

序列編號18：SITH-1-TM2之胺基酸序列

【圖式簡單說明】

圖1表示BioEase標記(生物素化標記)融合SITH-1蛋白質之表現。具體而言，圖1A為用以檢測SITH-1蛋白質之西方墨點法之結果，圖1B為用以檢測生物素化蛋白質之活性染色之結果。

對表現BioEase標記融合SITH-1蛋白質之大腸桿菌BL21 (DE3)進行超音波破碎，將所獲得之大腸桿菌粗萃取液餾分以達到20 μg 總蛋白質/區帶之方式利用SDS-PAGE(15% 丙烯醯胺凝膠)展開，其後轉錄至PVDF膜。

具體而言，圖1A為使抗SITH-1抗體(1/1000稀釋)反應後，使鹼性磷酸酶(AP)標記抗兔子IgG抗體(1/1000稀釋)反應，其後利用AP進行染色。圖1B為辣根過氧化物酶(HRP)標記鏈黴親和素(1/1000稀釋)反應後之染色圖像。圖1A、圖1B均表示對照係僅具有表現載體之來源於大腸桿菌之萃取樣本。以箭頭表示BioEase標記融合SITH-1蛋白質之位置。

於圖1B之Streptavidin-HRP染色中，檢測到2條粗條帶。下方之條帶由於未被圖1A之抗SITH-1抗體檢測到，因此認為係SITH-1部位之一部分分解而成之附BioEase標記之蛋白質。

圖2為表示對於各種血清稀釋液之非特異結合所產生之效果之圖表。以白方框(虛線)表示將血清以PBS加以稀釋之區，以白方框(實線)表示將血清以於PBS中添加純化塔馬維啉2(TM2)而成之液加以稀釋之區，以星號(虛線)表示將血清以僅具有表現載體之大腸桿菌破碎萃取液加以稀釋之區，以星號(實線)表示將血清以於僅具有表現載體之大腸桿菌破碎萃取液中添加純化TM2而成之液加以稀釋之區，以黑圓點(實線)表示將血清以表現TM2之大腸桿菌破碎萃取液加以稀釋之區。各圖表之縱軸(發光)表示抗

SITH-1抗體之檢測量，橫軸表示階段稀釋之抗SITH-1抗體之稀釋比例。

圖3為根據圖2所示之結果、分別針對抗SITH-1抗體之稀釋比例而求得S/N比之圖表。

以白方框(虛線)表示將血清以PBS加以稀釋之區，以白方框(實線)表示將血清以於PBS中添加純化塔馬維啉2(TM2)而成之液加以稀釋之區，以星號(虛線)表示將血清以僅具有表現載體之大腸桿菌破碎萃取液加以稀釋之區，以星號(實線)表示將血清以於僅具有表現載體之大腸桿菌破碎萃取液中添加純化TM2而成之液加以稀釋之區，以黑圓點(實線)表示將血清以表現TM2之大腸桿菌破碎萃取液加以稀釋之區。

圖4表示使用結合有生物素化SITH-1之TM2微孔板之情形時之人血清中的抗SITH-1抗體效價測定之結果。使將人血清以於TBS-T(三羥甲基胺基甲烷緩衝液生理鹽水、0.1% Tween 20)中含有酪蛋白1%之溶液加以稀釋者接觸TM2微孔板。

圖5表示使用結合有生物素化SITH-1之TM2微孔板之情形時之人血清中的抗SITH-1抗體效價測定之結果。使將人血清以大腸桿菌粗萃取液加以稀釋者接觸TM2微孔板。

圖6表示使用結合有生物素化SITH-1之TM2微孔板之情形時之人血清中的抗SITH-1抗體效價測定之結果。使將人血清以5 mg總蛋白質/ml之TM2表現大腸桿菌粗萃取液加以稀釋者接觸TM2微孔板。

圖7表示使用結合有His標記融合SITH-1蛋白質之鎳微孔板之情形時之抗SITH-1兔子血清中的抗SITH-1抗體效價測定之結果。抗SITH-1兔子血清係添加以含有0.2% BSA之PBS(-)稀釋100倍者。使用未進行任何表現之大腸桿菌、以及His標記EGFP作為對照。

圖8表示使用結合有His標記融合SITH-1蛋白質之鎳微孔板之情形時之抗SITH-1兔子血清中的抗SITH-1抗體效價測定之結果。抗SITH-1兔子血清係添加以含有0.2% BSA之PBS(-)稀釋500倍者。使用未進行任何表現之大腸桿菌、以及His標記EGFP作為對照。

圖9表示使用結合有His標記融合SITH-1蛋白質之鎳微孔板之情形時之人血清中的抗SITH-1抗體效價測定之結果。人血清係添加稀釋100倍者。使用His標記EGFP作為對照。又，血清稀釋液係使用1%BSA、或大腸桿菌粗萃取液。

圖10表示使用結合有His標記融合SITH-1蛋白質之鎳微孔板之情形時之人血清中的抗SITH-1抗體效價測定之結果。人血清係添加稀釋500倍者。使用His標記EGFP作為對照。又，血清稀釋液係使用1% BSA、或大腸桿菌粗萃取液。

序列表

<110> 日商日本煙草産業股份有限公司

<120> 生物學樣品中之SITH-1抗體之檢測方法

<130> FA0392-09155

<140> 099109999

<141> 2010-03-31

<150> JP 2009-087816

<151> 2009-03-31

<160> 18

<170> PatentIn3.1版

<210> 1

<211> 159

<212> PRT

<213> 人疱疹病毒6

<400> 1

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

<210> 2

<211> 480

<212> DNA

<213> 人疱疹病毒6

<400> 2

atgggatag aagaaaaagt gtcagctact ggaagactc gtttaagat actggcatgt 60
ctgatcggtt taatactagc tgcggcaata actatgttaa cgttgaaat tatatcgaac 120
caaaaacgta ccactactga tctcgaagct gtgactgtgg cgtgaagca tgaagcaca 180
tctctgccg gctgcactga atccactact tctgtacata ccgattctgt gacgagccaa 240
cccacgaaaa acaaagaatc gaggaaaaaa attgaaggga aatctccaag ttgggttcag 300
gttttaacta cagcatctgg aattatecta ctgttttgta taatgatgat attcattaca 360
tgttcttggg ccacagaaaa agatacagag aagagtgaag tgcaatctta tgcttcttca 420

gtagagactt tagactcttt aaataggct attataccga aaactgaaat gaatgtgtaa 480

<210> 3

<211> 1795

<212> DNA

<213> 人疱疹病毒6

<400> 3

aggctctgct ggaggctctg ctggaggctt tctgaaggc tctctggag gccctgctgg 60
 aggtcttctt ggaggctctg ctggaggctt tctctggag gctctgctgg 120
 aggtcttctt ggaggctctg ctggaggctt tctcagagac ctccgtgaaa gttttactca 180
 gaggtttatc agagttttcg ccattagttt ggttagaagt ttcagattta ttttcggtgg 240
 aactgcagtt aggtttcatg tcagtacatt catcaccgtt agaagtgcta ttcattggtg 300
 tgttgccact gtttgatttg ttaaaagcag taaatgagct aggtattgaa tgactcggaa 360
 tagctaataa atttgagcat tttcttcgaa tggatcataa tcagagggat agccatctaa 420
 tttaaagact tccattttat cactgttgca atcacttcta atggagtatc tggatacatt 480
 tttctacat ctttttcate cctccaaca tggatctgtg cagcgttaat aagccagcgg 540
 agttaataa atcgtcttcc atgttagaca gttcctgttt catggcagcc ttcactgatg 600
 caccaatctt ttggatgcaa gtgccaacgg actgagctag gatgtaaaag aagatattct 660
 aattttgaat tcttcagatg ctctcttctt cacattactg gaataggaca cattcttggg 720
 agcgtatctg ttggaagact ctgggatgaa aagatcacag gcttcagtt ctggaaaaag 780
 caggctttca aaggacacat cacacttgag actctcttcc aatatttctt tgatggattc 840
 ttccaccact ggatcgggat ggtagctata tatactatat aaggagatta ccaccaccac 900
 ctctttctt gcagagatta ttctctgctt gaaaatctgt aacactgac atgatgggat 960
 atgaagaaaa agtgcagct actggaaga ctctgtttaa gatactggca tgcctgatcg 1020
 ttttaatact agtgcggca ataactatgt taacgctgga aattatctg aaccaaaaac 1080
 gtaccactac tgatctgaa gctgtgactg tggcgtgaa gcatgtaagc acatctcttg 1140
 ccagctgcac tgaatccact acttctgtac ataccgattc tgtgacgagc caaccacga 1200
 aaaacaaaga atcgaggaaa aaaattgaag ggaatctcc aagtgggtt caggctttaa 1260
 ctacagcatc tggaaattat ctactgtttt gtataatgat gatattcatt acatgtccct 1320
 ggaccacaga aaaagataca gagaagatg aagtgcattc ttatgtcctt tcagtagaga 1380
 ctttagacct ttttaatgag gctattatc cgaaaactga aatgaatgtg taatgtctgt 1440
 atttttctt acagagatgt acggagagtt tatatttggg gaaaatacct gactgttctg 1500
 cctatgtcg aatgttaaag tatgtataat ataattctt acctttaaag agtgattcaa 1560
 ggtggaggtt tctttggaga ttgattccag gtggtggtt cgggtgcaat caatctttct 1620
 tctggcggg aagaaaatcc agcaatcaa taattgatgg gatgtaatca atgtcacaaa 1680
 tctgtaagat taaatgtgaa cagtataat tcttctgtgc ttatcaaatt acaattatgc 1740
 gcatgaaaat atcattaaat tgttttaaac attcttaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1795

<210> 4

<211> 432

<212> DNA

<213> 姬菇

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(432)

<223>

<400> 4

atg aaa gac gtc caa tct ctc ctc acc gga acc tgg tac aat gaa ctc 48
 Met Lys Asp Val Gln Ser Leu Leu Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Glu Leu
 1 5 10 15

ggc tca aca atg aat ttg act gca aat aaa gac ggt tcg ctc acc gga 96
 Gly Ser Thr Met Asn Leu Thr Ala Asn Lys Asp Gly Ser Leu Thr Gly
 20 25 30

acg tac cac tcc aac gtc ggc gag gtt ccc cca act tat cac ctt tct 144
 Thr Tyr His Ser Asn Val Gly Glu Val Pro Pro Thr Tyr His Leu Ser
 35 40 45

ggc cgg tac aac ctc cag ccc ccc tcg ggt caa ggc gtt act ctg gga 192
 Gly Arg Tyr Asn Leu Gln Pro Pro Ser Gly Gln Gly Val Thr Leu Gly
 50 55 60

tgg gcg gtg tct ttc gaa aac act agt gcg aat gtt cat tct gtc tca 240
Trp Ala Val Ser Phe Glu Asn Thr Ser Ala Asn Val His Ser Val Ser
65 70 75 80

aca tgg agc ggg cag tac ttc tct gaa ccc gcc gag gtg atc ctc acc 288
Thr Trp Ser Gly Gln Tyr Phe Ser Glu Pro Ala Glu Val Ile Leu Thr
85 90 95

cag tgg ctg ttg tca agg agc tct gag cgc gaa gat ttg tgg cag tcc 336
Gln Trp Leu Leu Ser Arg Ser Ser Glu Arg Glu Asp Leu Trp Gln Ser
100 105 110

acc cat gtg ggg cat gat gag ttc agc aag aca aag cca acc aag gag 384
Thr His Val Gly His Asp Glu Phe Ser Lys Thr Lys Pro Thr Lys Glu
115 120 125

aag att gcc cag gct caa ctc ctt cgt cgc ggg ttg aag ttc gag tga 432
Lys Ile Ala Gln Ala Gln Leu Leu Arg Arg Gly Leu Lys Phe Glu
130 135 140

<210> 5
<211> 143
<212> PRT
<213> 姬菇

<400> 5
Met Lys Asp Val Gln Ser Leu Leu Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Glu Leu
1 5 10 15

Gly Ser Thr Met Asn Leu Thr Ala Asn Lys Asp Gly Ser Leu Thr Gly
20 25 30

Thr Tyr His Ser Asn Val Gly Glu Val Pro Pro Thr Tyr His Leu Ser
35 40 45

Gly Arg Tyr Asn Leu Gln Pro Pro Ser Gly Gln Gly Val Thr Leu Gly
50 55 60

Trp Ala Val Ser Phe Glu Asn Thr Ser Ala Asn Val His Ser Val Ser
65 70 75 80

Thr Trp Ser Gly Gln Tyr Phe Ser Glu Pro Ala Glu Val Ile Leu Thr
85 90 95

Gln Trp Leu Leu Ser Arg Ser Ser Glu Arg Glu Asp Leu Trp Gln Ser
100 105 110

Thr His Val Gly His Asp Glu Phe Ser Lys Thr Lys Pro Thr Lys Glu
115 120 125

Lys Ile Ala Gln Ala Gln Leu Leu Arg Arg Gly Leu Lys Phe Glu
130 135 140

<210> 6
<211> 426
<212> DNA
<213> 姬菇

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(426)
<223>

<400> 6

atg tca gac gtt caa tct tca ctc acc gga acc tgg tac aat gaa ctc 48
Met Ser Asp Val Gln Ser Ser Leu Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Glu Leu
1 5 10 15

aac tcc aag atg gaa ttg act gca aac aaa gac ggt act ctc act gga 96
Asn Ser Lys Met Glu Leu Thr Ala Asn Lys Asp Gly Thr Leu Thr Gly
20 25 30

aag tac ctc tcc aaa gtt ggg gat gtc tac gtg ccc tac cca ctc tct 144
Lys Tyr Leu Ser Lys Val Gly Asp Val Tyr Val Pro Tyr Pro Leu Ser
35 40 45

ggg cgc tat aac ctc caa ccc ccc gcg gga caa ggc gtc gct ctt ggg 192
Gly Arg Tyr Asn Leu Gln Pro Pro Ala Gly Gln Gly Val Ala Leu Gly
50 55 60

tgg gcg gta tcc tgg gag aac agt aaa att cat tcc gct acg aca tgg 240
Trp Ala Val Ser Trp Glu Asn Ser Lys Ile His Ser Ala Thr Thr Trp
65 70 75 80

agc gga cag ttc ttc tct gag tcg tct cca gtg att ctt act cag tgg 288
Ser Gly Gln Phe Phe Ser Glu Ser Ser Pro Val Ile Leu Thr Gln Trp
85 90 95

ttg ttg tca tcg agc act gcg cgt ggg gac gta tgg gaa tcc aca ctt 336
Leu Leu Ser Ser Thr Thr Ala Arg Gly Asp Val Trp Glu Ser Thr Leu
100 105 110

gtg ggg aat gat tcg ttt aca aag acg gcg ccg act gag cag cag atc 384
Val Gly Asn Asp Ser Phe Thr Lys Thr Ala Pro Thr Glu Gln Gln Ile
115 120 125

gct cat gct caa ctc cat tgt cgc gca ccg agg ttg aag taa 426
Ala His Ala Gln Leu His Cys Arg Ala Pro Arg Leu Lys
130 135 140

<210> 7

<211> 141

<212> PRT

<213> 姬菇

<400> 7

Met Ser Asp Val Gln Ser Ser Leu Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Glu Leu
1 5 10 15

Asn Ser Lys Met Glu Leu Thr Ala Asn Lys Asp Gly Thr Leu Thr Gly
20 25 30

Lys Tyr Leu Ser Lys Val Gly Asp Val Tyr Val Pro Tyr Pro Leu Ser
35 40 45

Gly Arg Tyr Asn Leu Gln Pro Pro Ala Gly Gln Gly Val Ala Leu Gly
50 55 60

Trp Ala Val Ser Trp Glu Asn Ser Lys Ile His Ser Ala Thr Thr Trp
65 70 75 80

Ser Gly Gln Phe Phe Ser Glu Ser Ser Pro Val Ile Leu Thr Gln Trp
85 90 95

Leu Leu Ser Ser Ser Thr Ala Arg Gly Asp Val Trp Glu Ser Thr Leu
100 105 110

Val Gly Asn Asp Ser Phe Thr Lys Thr Ala Pro Thr Glu Gln Gln Ile
115 120 125

Ala His Ala Gln Leu His Cys Arg Ala Pro Arg Leu Lys
130 135 140

<210> 8
<211> 271
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 融合蛋白質BioEase標記-SITH-1

<400> 8
Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Ile Met Gly Ala Gly
1 5 10 15
Thr Pro Val Thr Ala Pro Leu Ala Gly Thr Ile Trp Lys Val Leu Ala
20 25 30
Ser Glu Gly Gln Thr Val Ala Ala Gly Glu Val Leu Leu Ile Leu Glu
35 40 45
Ala Met Lys Met Glu Thr Glu Ile Arg Ala Ala Gln Ala Gly Thr Val
50 55 60
Arg Gly Ile Ala Val Lys Ala Gly Asp Ala Val Ala Val Gly Asp Thr
65 70 75 80
Leu Met Thr Leu Ala Gly Ser Gly Ser Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp
85 90 95
Lys Gly Ile Ile Thr Ser Leu Tyr Lys Lys Ala Gly Ser Glu Phe Ala
100 105 110
Leu Gly Tyr Glu Glu Lys Val Ser Ala Thr Gly Lys Thr Arg Leu Lys
115 120 125
Ile Leu Ala Cys Leu Ile Val Leu Ile Leu Ala Ala Ala Ile Thr Met
130 135 140
Leu Thr Leu Glu Ile Ile Ser Asn Gln Lys Arg Thr Thr Thr Asp Leu
145 150 155 160
Glu Ala Val Thr Val Ala Leu Lys His Val Ser Thr Ser Leu Ala Ser
165 170 175
Cys Thr Glu Ser Thr Thr Ser Val His Thr Asp Ser Val Thr Ser Gln
180 185 190
Pro Thr Lys Asn Lys Glu Ser Arg Lys Lys Ile Glu Gly Lys Ser Pro
195 200 205
Ser Trp Val Gln Ala Leu Thr Thr Ala Ser Gly Ile Ile Leu Leu Phe
210 215 220
Cys Ile Met Met Ile Phe Ile Thr Cys Ser Trp Thr Thr Glu Lys Asp
225 230 235 240
Thr Glu Lys Ser Glu Val Gln Ser Tyr Ala Ser Ser Val Glu Thr Leu
245 250 255
Asp Ser Leu Asn Glu Ala Ile Ile Pro Lys Thr Glu Met Asn Val
260 265 270 271

<210> 9
<211> 816
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> DNA編碼融合蛋白質BioEase標記-SITH-1

<400> 9
atggtctagca tgactggtgg acagcaaatg ggtattatgg gcgccggcac cccggtgacc 60
gccccgctgg cgggcactat ctggaagggtg ctggccagcg aaggccagac ggtggccgca 120
ggcgaagggtc tgctgattct ggaagccatg aagatggaaa ccgaaatcgg cgccgcgtag 180
gccgggaccg tgcgcggtat cgcggtgaaa gccggcgacg cggtgccggt cggcgacacc 240
ctgatgacc ttgcgggctc tggatccgat ctgtacgacg atgacgataa gggaattatc 300
acaagtttgt acaaaaaagc aggtctcgaa ttgcccttg gatatgaaga aaaagtgtca 360
gctactggaa agactcggtt aaagatactg gcatgtctga tcgttttaac actagctgcg 420
gcaataacta tgtaacgct ggaaattata tcgaacaaa aacgtaccac tactgatctc 480
gaagctgtga ctgtggcgct gaagcatgta agcacatctc ttgccagctg cactgaatcc 540

actacttctg tacataccga ttctgtgacg agccaacca cgaaaaacaa agaatcgagg 600
aaaaaaattg aagggaatc tccaagttgg gttcaggctt taactacagc atctggaatt 660
atcctactgt ttgtataat gatgatattc attacatgtt cctggaccac agaaaaagat 720
acagagaaga gtgaagtgca atcttatgct tcttcagtag agactttaga ctctttaaat 780
gaggctatta taccgaaaac tgaaatgaat gtgtaa 816

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子 SITH1NtermCW-F

<400> 10
ggatatgaag aaaaagtgtc 20

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子 SITH1CtermGW-R

<400> 11
ttacacattc atttcagttt 20

<210> 12
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 胜肽连接子

<400> 12
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
20 25

<210> 13
<211> 117
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子 SITHIC-5xlink-TM2N-F

<400> 13
ccgaaaactg aaatgaatgt ggggtggcggg ggcagcggg ggcgtggcag cgggtggcggg 60
ggcagcggg ggcgtggcag cgggtggcggg ggcagctcag acgttcaatc ttactc 117

<210> 14
<211> 117
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子 SITH1C-5xlink-TM2N-R

<400> 14
gagtgaagat tgaacgtctg agctgccacc gccaccgctg ccaccgccac cgctgccacc 60
gccaccgctg ccaccgccac cgctgccacc gccaccacaca ttcatttcag ttttcgg 117

<210> 15
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子 SITH1C-5' EcoRI-F

<400> 15
aaagaattcg gatatgaaga aaaagtgtc 29

<210> 16
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子 TM2CtermBam

<400> 16
ttggatcct tacttcaacc tcggtgcg 28

<210> 17
<211> 981
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> DNA編碼融合蛋白質 SITH-1-TM2

<400> 17
atg gaa ttc gga tat gaa gaa aaa gtg tca gct act gga aag act cgt 48
Met Glu Phe Gly Tyr Glu Glu Lys Val Ser Ala Thr Gly Lys Thr Arg
1 5 10 15

tta aag ata ctg gca tgt ctg atc gtt tta ata cta gct gcg gca ata 96
Leu Lys Ile Leu Ala Cys Leu Ile Val Leu Ile Leu Ala Ala Ala Ile
20 25 30

act atg tta acg ctg gaa att ata tcg aac caa aaa cgt acc act act 144
Thr Met Leu Thr Leu Glu Ile Ile Ser Asn Gln Lys Arg Thr Thr Thr
35 40 45

gat ctg gaa gct gtg act gtg gcg ctg aag cat gta agc aca tct ctt 192
Asp Leu Glu Ala Val Thr Val Ala Leu Lys His Val Ser Thr Ser Leu
50 55 60

gcc agc tgc act gaa tcc act act tct gta cat acc gat tct gtg acg 240
Ala Ser Cys Thr Glu Ser Thr Thr Ser Val His Thr Asp Ser Val Thr
65 70 75 80

agc caa ccc acg aaa aac aaa gaa tcg agg aaa aaa att gaa ggg aaa 288
Ser Gln Pro Thr Lys Asn Lys Glu Ser Arg Lys Lys Ile Glu Gly Lys
85 90 95

tct cca agt tgg gtt cag gct tta act aca gca tct gga att atc cta 336
Ser Pro Ser Trp Val Gln Ala Leu Thr Thr Ala Ser Gly Ile Ile Leu
100 105 110

ctg ttt tgt ata atg atg ata ttc att aca tgt tcc tgg acc aca gaa 384
 Leu Phe Cys Ile Met Met Ile Phe Ile Thr Cys Ser Trp Thr Thr Glu
 115 120 125

aaa gat aca gag aag agt gaa gtg caa tct tat gct tct tca gta gag 432
 Lys Asp Thr Glu Lys Ser Glu Val Gln Ser Tyr Ala Ser Ser Val Glu
 130 135 140

act tta gac tct tta aat gag gct att ata ccg aaa act gaa atg aat 480
 Thr Leu Asp Ser Leu Asn Glu Ala Ile Ile Pro Lys Thr Glu Met Asn
 145 150 155 160

gtg ggt ggc ggt ggc agc ggt ggc ggt ggc agc ggt ggc ggt ggc agc 528
 Val Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 165 170 175

ggt ggc ggt ggc agc ggt ggc ggt ggc agc tca gac gtt caa tct tca 576
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Asp Val Gln Ser Ser
 180 185 190

ctc acc gga acc tgg tac aat gaa ctc aac tcc aag atg gaa ttg act 624
 Leu Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Glu Leu Asn Ser Lys Met Glu Leu Thr
 195 200 205

gca aac aaa gac ggt act ctc act gga aag tac ctc tcc aaa gtt ggg 672
 Ala Asn Lys Asp Gly Thr Leu Thr Gly Lys Tyr Leu Ser Lys Val Gly
 210 215 220

gat gtc tac gtg ccc tac cca ctc tct ggt cgc tat aac ctc caa ccc 720
 Asp Val Tyr Val Pro Tyr Pro Leu Ser Gly Arg Tyr Asn Leu Gln Pro
 225 230 235 240

ccc gcg gga caa ggc gtc gct ctt ggg tgg gcg gta tcc tgg gag aac 768
 Pro Ala Gly Gln Gly Val Ala Leu Gly Trp Ala Val Ser Trp Glu Asn
 245 250 255

agt aaa att cat tcc gct acg aca tgg agc gga cag ttc ttc tct gag 816
 Ser Lys Ile His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Phe Phe Ser Glu
 260 265 270

tcg tct cca gtg att ctt act cag tgg ttg ttg tca tcg agc act gcg 864
 Ser Ser Pro Val Ile Leu Thr Gln Trp Leu Leu Ser Ser Ser Thr Ala
 275 280 285

cgt ggg gac gta tgg gaa tcc aca ctt gtg ggg aat gat tcg ttt aca 912
 Arg Gly Asp Val Trp Glu Ser Thr Leu Val Gly Asn Asp Ser Phe Thr
 290 295 300

aag acg gcg ccg act gag cag cag atc gct cat gct caa ctc cat tgt 960
 Lys Thr Ala Pro Thr Glu Gln Gln Ile Ala His Ala Gln Leu His Cys
 305 310 315 320

gcg gca ccg agg ttg aag taa 981
 Arg Ala Pro Arg Leu Lys
 325

<210> 18
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合蛋白質 SITH-1-TM2

<400> 18

Met Glu Phe Gly Tyr Glu Glu Lys Val Ser Ala Thr Gly Lys Thr Arg
 1 5 10 15
 Leu Lys Ile Leu Ala Cys Leu Ile Val Leu Ile Leu Ala Ala Ala Ile
 20 25 30
 Thr Met Leu Thr Leu Glu Ile Ile Ser Asn Gln Lys Arg Thr Thr Thr
 35 40 45
 Asp Leu Glu Ala Val Thr Val Ala Leu Lys His Val Ser Thr Ser Leu
 50 55 60
 Ala Ser Cys Thr Glu Ser Thr Thr Ser Val His Thr Asp Ser Val Thr
 65 70 75 80
 Ser Gln Pro Thr Lys Asn Lys Glu Ser Arg Lys Lys Ile Glu Gly Lys
 85 90 95
 Ser Pro Ser Trp Val Gln Ala Leu Thr Thr Ala Ser Gly Ile Ile Leu
 100 105 110
 Leu Phe Cys Ile Met Met Ile Phe Ile Thr Cys Ser Trp Thr Thr Glu
 115 120 125
 Lys Asp Thr Glu Lys Ser Glu Val Gln Ser Tyr Ala Ser Ser Val Glu
 130 135 140
 Thr Leu Asp Ser Leu Asn Glu Ala Ile Ile Pro Lys Thr Glu Met Asn
 145 150 155 160
 Val Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 165 170 175
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Asp Val Gln Ser Ser
 180 185 190
 Leu Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Glu Leu Asn Ser Lys Met Glu Leu Thr
 195 200 205
 Ala Asn Lys Asp Gly Thr Leu Thr Gly Lys Tyr Leu Ser Lys Val Gly
 210 215 220
 Asp Val Tyr Val Pro Tyr Pro Leu Ser Gly Arg Tyr Asn Leu Gln Pro
 225 230 235 240
 Pro Ala Gly Gln Gly Val Ala Leu Gly Trp Ala Val Ser Trp Glu Asn
 245 250 255
 Ser Lys Ile His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Phe Phe Ser Glu
 260 265 270
 Ser Ser Pro Val Ile Leu Thr Gln Trp Leu Leu Ser Ser Ser Thr Ala
 275 280 285
 Arg Gly Asp Val Trp Glu Ser Thr Leu Val Gly Asn Asp Ser Phe Thr
 290 295 300
 Lys Thr Ala Pro Thr Glu Gln Gln Ile Ala His Ala Gln Leu His Cys
 305 310 315 320
 Arg Ala Pro Arg Leu Lys
 325

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：99109999

※申請日：99.7.31

※IPC 分類：A61K, C12N

G01N³³/554 (2006.01)
G01N³³/566 (2006.01)
G01N³³/68 (2006.01)
G01N³³/59 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

生物學樣品中之SITH-1抗體之檢測方法

METHOD FOR DETECTING ANTIBODY AGAINST SITH-1 IN
BIOLOGICAL SAMPLE

二、中文發明摘要：

本發明提供一種檢測生物學樣品中之由HHV-6之隱性感
染中期轉錄物所編碼之小蛋白(Small protein encoded by
the Intermediate stage Transcript of HHV-6)(SITH-1)的抗體
之方法。本發明之方法包括以下步驟：

- 1)準備SITH-1蛋白質；
- 2)使步驟1)中準備之SITH-1蛋白質結合於載體上；
- 3)使生物學樣品2接觸結合有步驟2)中製成之SITH-1蛋
白質之載體而檢測SITH-1蛋白質抗體。

三、英文發明摘要：

The present invention provides a method for detecting an antibody against a small
protein encoded by the intermediate stage transcript of HHV-6 (SITH-1) in a biological
sample.

The method of the present invention comprises:

- 1) providing the SITH-1 protein;
- 2) binding the SITH-1 protein provided in step 1) to a carrier; and
- 3) contacting the biological sample with the SITH-1 protein-bound carrier prepared
in step 2) to detect the SITH-1 protein antibody.

七、申請專利範圍：

1. 一種生物學樣品中之SITH-1抗體之檢測方法，其係檢測生物學樣品中之由HHV-6之隱性感染中期轉錄物所編碼之小蛋白 (Small protein encoded by the Intermediate stage Transcript of HHV-6)(SITH-1)的抗體之方法；且其包括以下步驟：
 - 1)準備SITH-1蛋白質；
 - 2)使步驟1)中準備之SITH-1蛋白質結合於載體上；
 - 3)使生物學樣品接觸步驟2)中製成之結合有SITH-1蛋白質之載體，而檢測SITH-1蛋白質抗體。
2. 如請求項1之方法，其中SITH-1蛋白質係選自以下之群：
 - (a)具有序列編號1之胺基酸序列之蛋白質；
 - (b)具有序列編號1之胺基酸序列中有1個或複數個胺基酸之缺失、置換、插入及/或附加而成之胺基酸序列，並且具有使細胞內鈣濃度上升之活性之蛋白質；
 - (c)具有相對於序列編號1之胺基酸序列具有至少80%之同一性之胺基酸序列，並且具有使細胞內鈣濃度上升之活性之蛋白質；
 - (d)具有由包含序列編號2之鹼基序列之核酸所編碼的胺基酸序列之蛋白質；
 - (e)具有如下由包含序列編號2之鹼基序列中有1個或複數個核苷酸之缺失、置換、插入及/或附加而成的鹼基序列之核酸而編碼之胺基酸序列、並且具有使細胞內鈣濃

度上升之活性之蛋白質；

(f)具有由包含與序列編號2之鹼基序列具有80%以上之同一性之鹼基序列的核酸所編碼之胺基酸序列，並且具有使細胞內鈣濃度上升之活性之蛋白質；及

(g)由與包含與序列編號2之鹼基序列互補之鹼基序列的核酸於嚴格之雜交條件下雜交之核酸而編碼，並且具有使細胞內鈣濃度上升之活性之蛋白質。

3. 如請求項1或2之檢測方法，其中於請求項1之步驟3)中，向步驟2)中製成之結合有SITH-1蛋白質之載體中混合、添加

(a)生物學樣品、及

(b)由與用以表現步驟1)之SITH-1蛋白質之宿主細胞同種之細胞所製備的細胞破碎萃取液。

4. 如請求項1至3中任一項之檢測方法，其中於請求項1之步驟2)中，利用生物素-生物素結合性蛋白質間結合使SITH-1蛋白質結合於載體上。

5. 如請求項4之檢測方法，其中於請求項1之步驟3)中，向步驟2)中製成之結合有SITH-1蛋白質之載體中混合、添加

(a)生物學樣品，以及

(b-i)由與用以表現步驟1)或2)之SITH-1蛋白質、生物素化SITH-1蛋白質、及/或生物素結合性蛋白質之宿主細胞同種之細胞所製備的細胞破碎萃取液、與生物素結合性蛋白質，或

(b-ii)由如下細胞製備之細胞破碎萃取液，該細胞係利用基因工程技術使與用以表現步驟1)或2)之SITH-1蛋白質、生物素化SITH-1蛋白質、及/或生物素結合性蛋白質之宿主細胞同種之細胞表現生物素結合性蛋白質者。

6. 如請求項3至5中任一項之方法，其中於請求項3之步驟3(b)或請求項5之步驟3(b-i)中，添加自含有任意之載體之細胞所萃取之細胞破碎萃取液來作為細胞破碎萃取液。
7. 如請求項4至6中任一項之方法，其中生物素結合性蛋白質為塔馬維啉(tamavidin)或其變異體。
8. 如請求項1至6中任一項之方法，其中生物學樣品係選自由血液、血清、腦脊髓液、唾液、咽喉擦拭液、汗、尿、淚、淋巴液、精液、腹水及母乳所組成之群。
9. 一種載體，其結合有上述SITH-1蛋白質，該載體係用以檢測生物學樣品中之由HHV-6之隱性感染中期轉錄物所編碼之小蛋白(Small protein encoded by the Intermediate stage Transcript of HHV-6)(SITH-1)之抗體。
10. 如請求項9之載體，其中SITH-1蛋白質與載體係利用生物素-生物素結合性蛋白質間結合而結合。
11. 一種套組，其用以檢測生物學樣品中之由HHV-6之隱性感染中期轉錄物所編碼之小蛋白(Small protein encoded by the Intermediate stage Transcript of HHV-6)(SITH-1)之抗體；且其包含：

A)結合有上述SITH-1蛋白質之載體；以及

B)用以稀釋生物學樣品之劑，該劑包含由與用以表現A)之SITH-1蛋白質之宿主細胞同種之細胞所製備的細胞破碎萃取液。

12. 如請求項11之套組，其中A)之載體為SITH-1蛋白質利用生物素-生物素結合性蛋白質間結合而結合之載體；並且B)之劑係用以稀釋生物學樣品之劑，該劑包含

i)由與用以表現A)之SITH-1蛋白質、生物素化SITH-1蛋白質、及/或生物素結合性蛋白質之宿主細胞同種之細胞所製備的細胞破碎萃取液、與生物素結合性蛋白質；或

ii)由如下細胞製備之細胞破碎萃取液：該細胞係利用基因工程技術使與用以表現A)之SITH-1蛋白質、生物素化SITH-1蛋白質、及/或生物素結合性蛋白質之宿主細胞同種之細胞表現生物素結合性蛋白質者。

13. 一種套組，其用以檢測生物學樣品中之由HHV-6之隱性感染中期轉錄物所編碼之小蛋白(Small protein encoded by the Intermediate stage Transcript of HHV-6)(SITH-1)之抗體；且包含

A)上述SITH-1蛋白質；

B)用以將A)之SITH-1蛋白質固定化之載體；以及

C)用以稀釋生物學樣品之劑，該劑包含由與用以表現A)之SITH-1蛋白質之宿主細胞同種之細胞所製備的細胞破碎萃取液。

14. 如請求項13之套組，其中A)之SITH-1蛋白質經生物素

化；

B)之載體與生物素結合性蛋白質直接或間接地結合；

C)之劑係用以稀釋生物學樣品之劑，該劑包含

i)由與用以表現A)或B)之SITH-1蛋白質、生物素化SITH-1蛋白質、及/或生物素結合性蛋白質之宿主細胞同種之細胞所製備的細胞破碎萃取液、與生物素結合性蛋白質；或

ii)由如下細胞製備之細胞破碎萃取液：該細胞係利用基因工程技術使與用以表現A)或B)之SITH-1蛋白質、生物素化SITH-1蛋白質、及/或生物素結合性蛋白質之宿主細胞同種之細胞表現生物素結合性蛋白質者。

八、圖式：

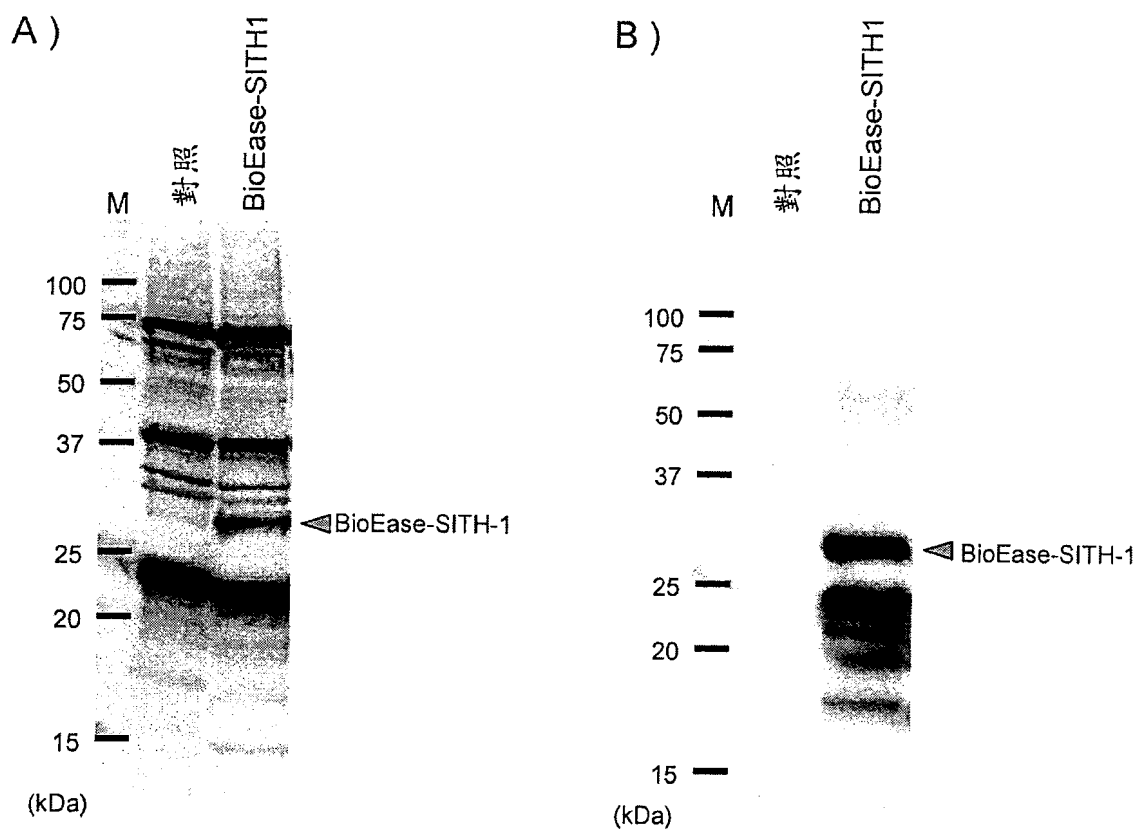


圖1

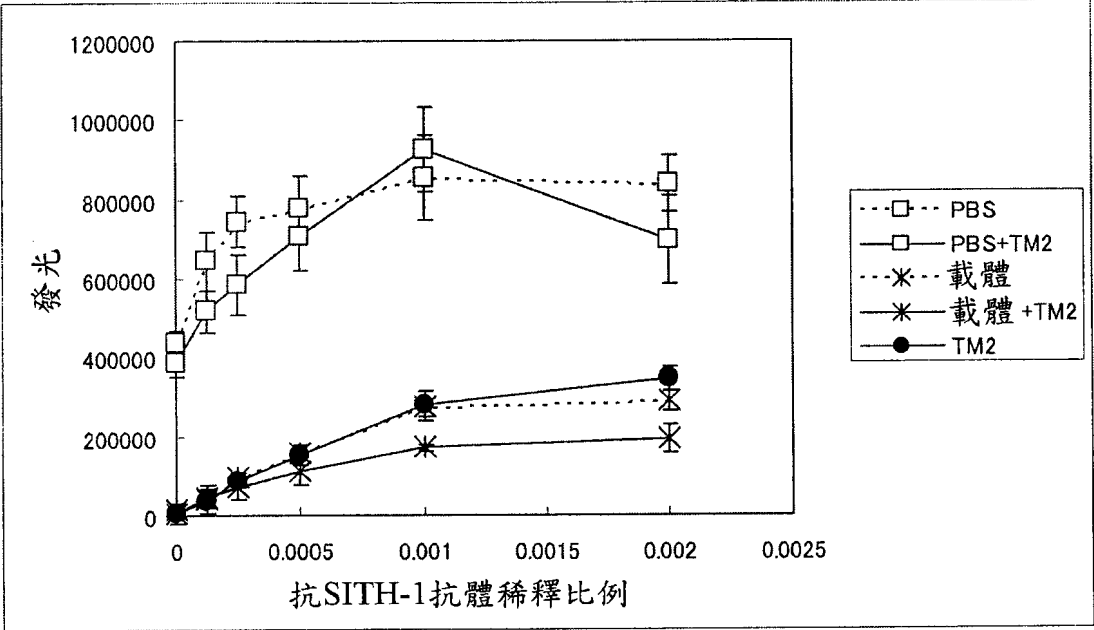


圖2

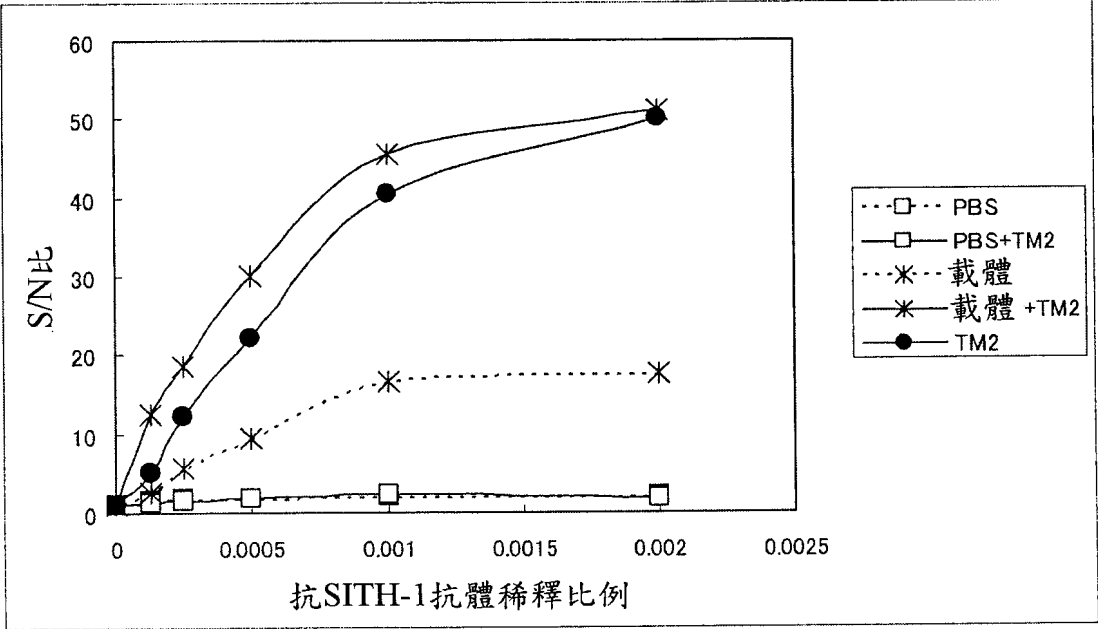


圖3

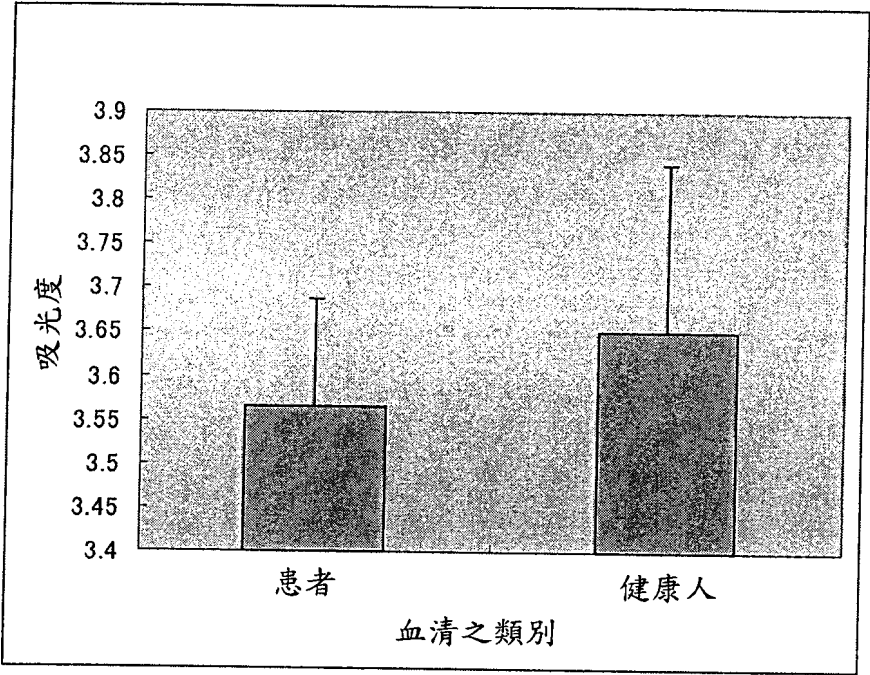


圖4

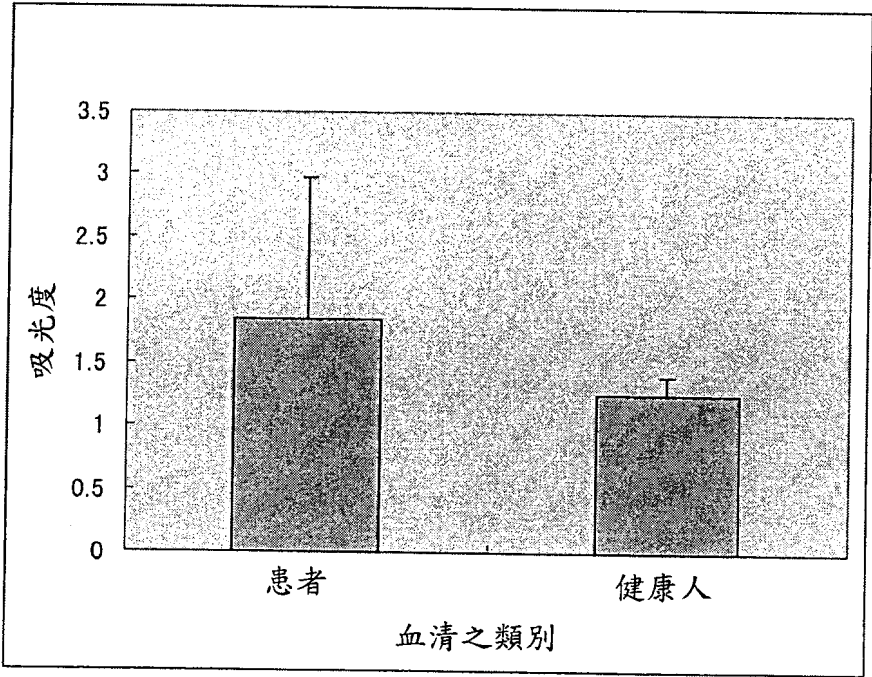


圖5

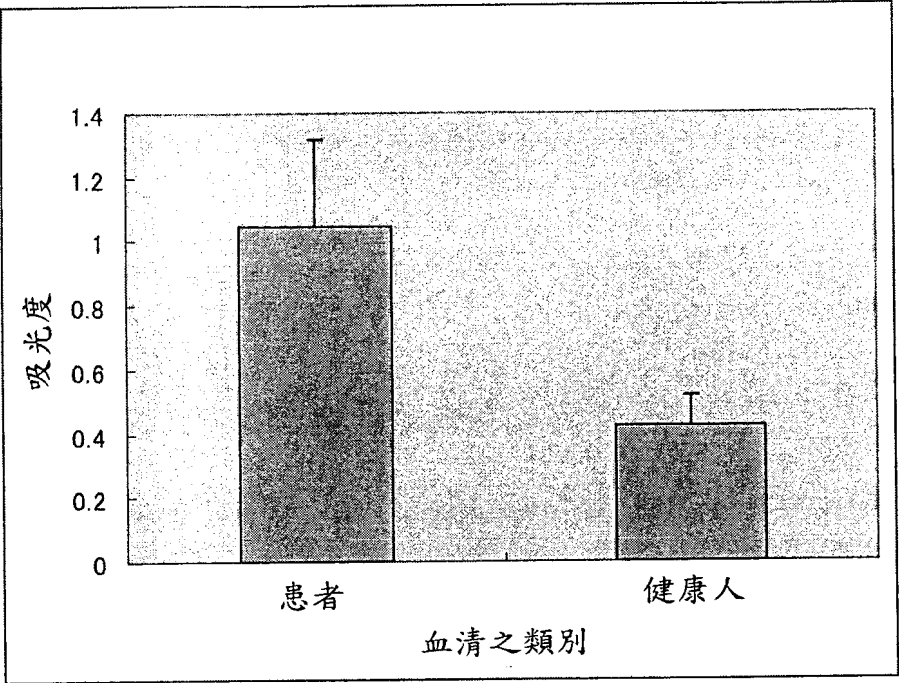


圖6

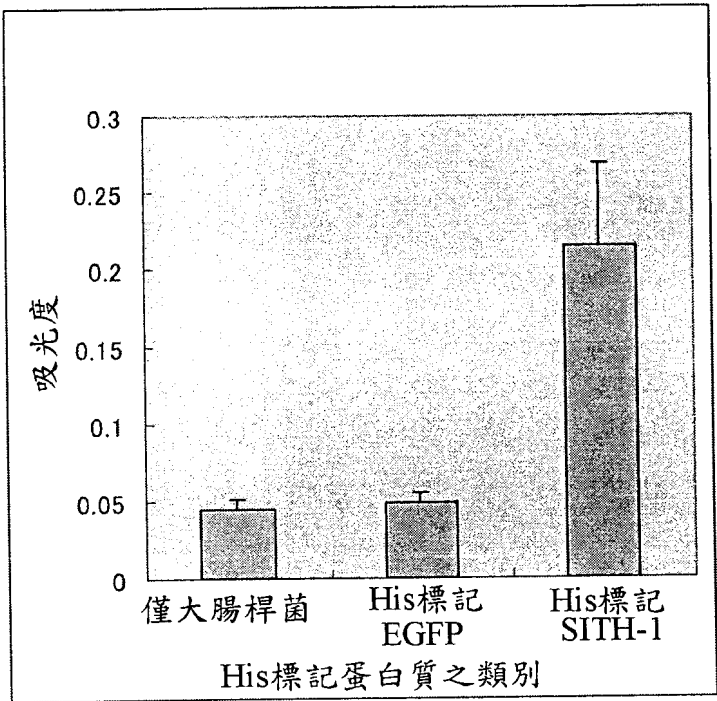


圖7

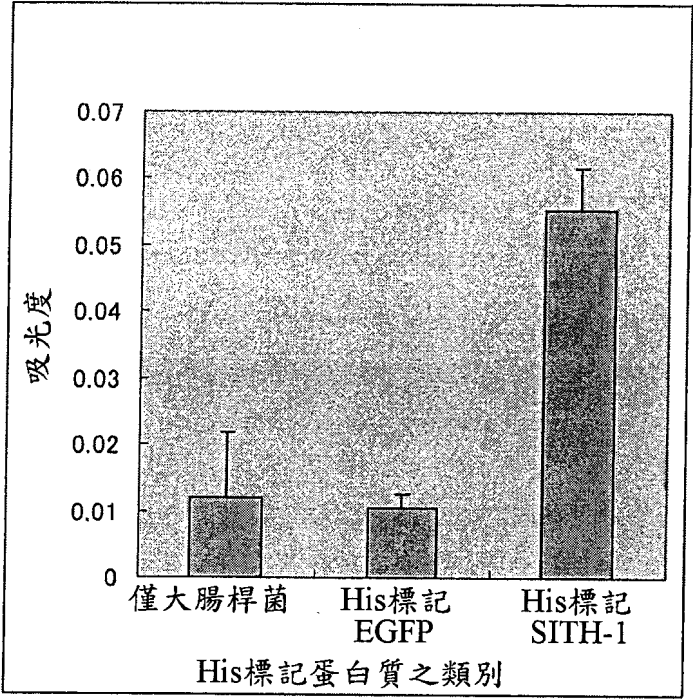


圖8

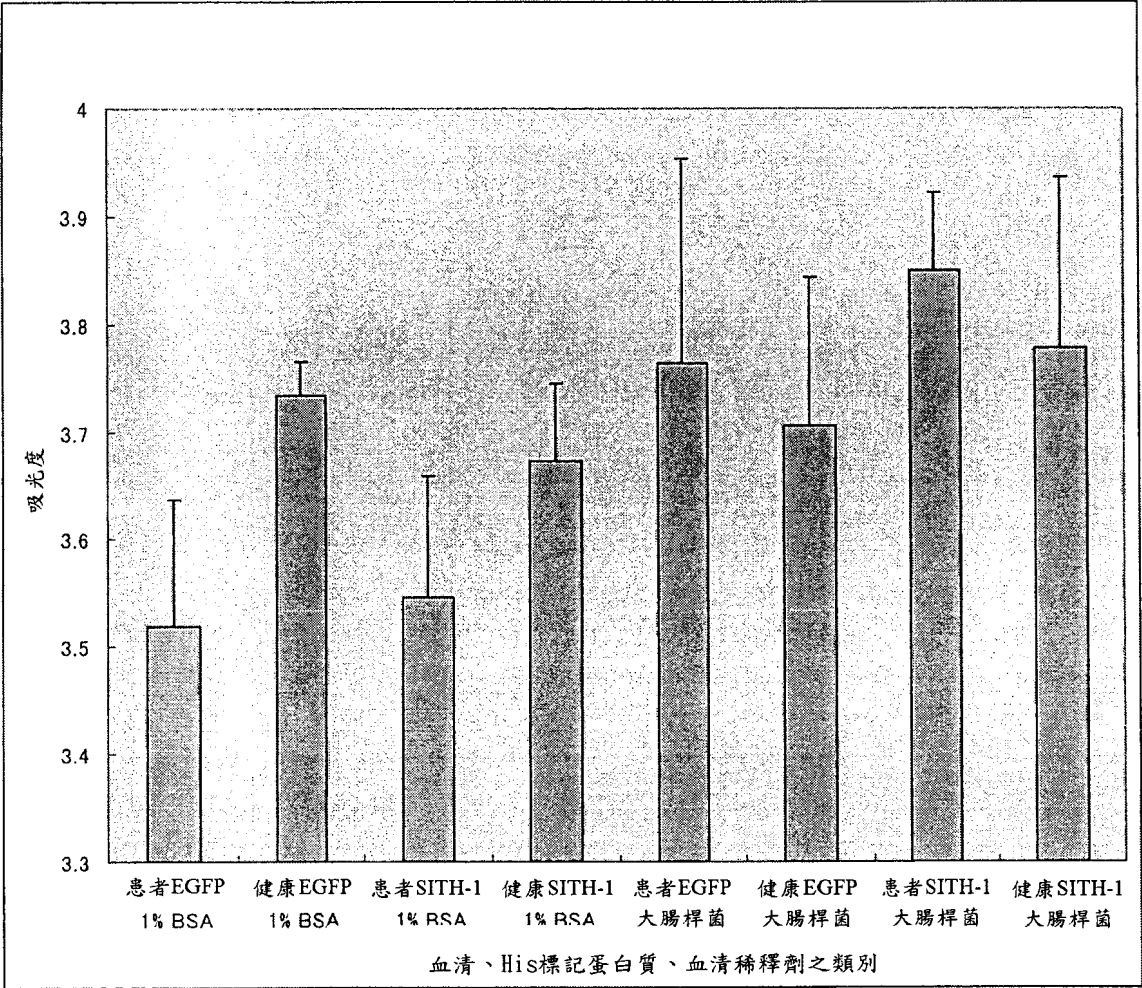


圖9

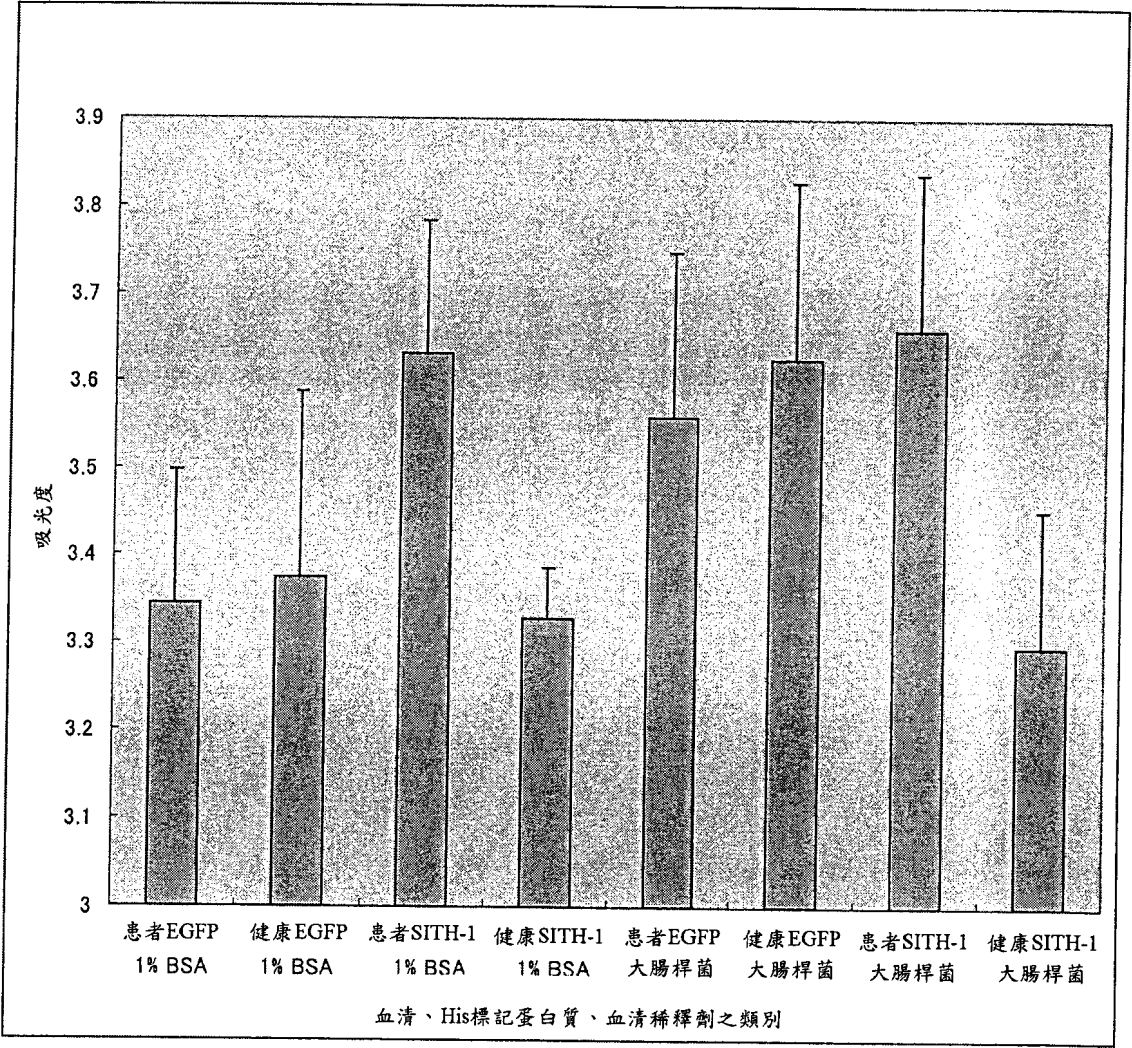


圖10

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：(無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)