



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101918445 A

(43) 申请公布日 2010. 12. 15

(21) 申请号 200880124722. 0

代理人 陈文平 尚继栋

(22) 申请日 2008. 12. 12

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C07K 16/18 (2006. 01)

61/013, 603 2007. 12. 13 US

G01N 33/53 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 07. 14

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/086674 2008. 12. 12

(87) PCT申请的公布数据

W02009/076632 EN 2009. 06. 18

(83) 生物保藏信息

PTA-8566 2007. 08. 02

(71) 申请人 孟山都技术公司

地址 美国密苏里州

申请人 密苏里大学管理者

(72) 发明人 N·马赛亚拉甘 R·M·罗伯斯

M·F·麦克格拉斯 J·格林

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

权利要求书 2 页 说明书 32 页 序列表 31 页

附图 20 页

(54) 发明名称

用于早期妊娠诊断的组合物和方法

(57) 摘要

本文公开了用于检测动物怀孕的抗体和方法。在某些方面,使用的抗体免疫学结合至少两种选自 PAG4、PAG6、PAG9、PAG16、PAG17、PAG19、PAG20 和 PAG21 的 PAG。也提供了编码抗体的核酸,以及试剂盒、使用方法和另外的抗体相关组合物。

1. 免疫学结合至少两种选自 PAG4、PAG6、PAG9、PAG16、PAG17、PAG19、PAG20 和 PAG21 的 PAG 的抗体或其片段。

2. 权利要求 1 的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段免疫学结合 PAG4、PAG6、PAG9、PAG16、PAG17、PAG19、PAG20 和 PAG21。

3. 以 ATCC 保藏号 PTA-8566 保藏的杂交瘤产生的抗体或其抗原结合片段。

4. 以 ATCC 保藏号 PTA-8566 保藏的分离的细胞,或其产生抗体 2D9 的后代细胞。

5. 编码抗体重链或轻链结构域的分离的多核苷酸,其中所述重链或轻链结构域选自:

a) 与 SEQ ID NO:1 有至少 97% 的序列同一性的多肽序列;

b) 与 SEQ ID NO:2 有至少 92% 的序列同一性的多肽序列;

c) 包含 SEQ ID NO:1 的多肽序列;和

d) 包含 SEQ ID NO:2 的多肽序列。

6. 权利要求 5 的多核苷酸,其中所述结构域包含与 SEQ ID NO:1 有大于 97% 的序列同一性的多肽序列。

7. 权利要求 6 的多核苷酸,其中所述结构域包含 SEQ ID NO:1。

8. 权利要求 5 的多核苷酸,其中所述结构域包含与 SEQ ID NO:2 有大于 92% 的序列同一性的多肽序列。

9. 权利要求 8 的多核苷酸,其中所述结构域包含 SEQ ID NO:2。

10. 权利要求 5 的多核苷酸,其中所述多核苷酸被进一步定义为编码 SEQ ID NO:3 的多肽序列。

11. 权利要求 5 的多核苷酸,其中所述多核苷酸被进一步定义为编码 SEQ ID NO:4 的多肽序列。

12. 权利要求 5 的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含 SEQ ID NO:5。

13. 权利要求 5 的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含 SEQ ID NO:6。

14. 一种包含抗体重链或轻链结构域的分离的多肽,其中所述重链或轻链结构域选自:

a) 与 SEQ ID NO:1 有至少 97% 的序列同一性的多肽序列;

b) 与 SEQ ID NO:2 有至少 92% 的序列同一性的多肽序列;

c) 包含 SEQ ID NO:1 的多肽序列;和

d) 包含 SEQ ID NO:2 的多肽序列。

15. 权利要求 14 的多肽,其进一步限定为包含与 SEQ ID NO:1 有至少 97% 的序列同一性的序列和与 SEQ ID NO:2 有至少 92% 的序列同一性的多肽序列。

16. 权利要求 15 的多肽,其中所述多肽免疫学结合选自 PAG4、PAG6、PAG9、PAG16、PAG17、PAG19、PAG20 和 PAG21 的至少第一 PAG。

17. 包含权利要求 14 的多肽的抗体或其片段。

18. 一种检测牛动物怀孕的方法,包括:

a) 从牛动物获得样品;

b) 使该样品接触权利要求 1 的抗体或其片段;和

c) 确定该样品是否含有能够被所述抗体或其片段免疫学结合的至少第一妊娠相关抗原 (PAG),其中样品中存在该 PAG 指示怀孕。

19. 权利要求 18 的方法,其中所述抗体或其片段是单克隆抗体 2D9。
20. 权利要求 18 的方法,其中所述 PAG 选自 PAG4、PAG6、PAG9、PAG16、PAG17、PAG19、PAG20 和 PAG21。
21. 权利要求 20 的方法,其中所述 PAG 是 PAG6。
22. 权利要求 18 的方法,其中确定样品是否含有至少第一妊娠相关抗原包括 ELISA 或 Western 印迹法。
23. 权利要求 22 的方法,其中所述 ELISA 是夹心 ELISA,包括 PAG 与固定到基底上的抗体或其片段和酶标记的第二抗体制品的结合。
24. 权利要求 23 的方法,其中所述酶是碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶。
25. 一种试剂盒,包括:
 - (a) 权利要求 1 的抗体或其片段 ;和
 - (b) 所述抗体或其片段的容器。
26. 权利要求 25 的试剂盒,进一步含有用于检测所述抗体或其片段与至少第一妊娠相关抗原 (PAG) 之间的免疫结合的装置。
27. 权利要求 25 的试剂盒,其中所述抗体或其片段附着到支持体上。
28. 权利要求 27 的试剂盒,其中所述支持体是聚苯乙烯板、试管或试条。
29. 权利要求 25 的试剂盒,进一步包括可检测标记。
30. 权利要求 25 的试剂盒,其中所述可检测标记是荧光或化学发光标记。
31. 权利要求 25 的试剂盒,其中所述可检测标记是酶。
32. 权利要求 31 的试剂盒,其中所述酶是碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶。
33. 一种纯化至少第一妊娠相关抗原 (PAG) 的方法,包括:
 - a) 获得包含至少第一妊娠相关抗原 (PAG) 的样品 ;和
 - b) 基于 PAG 对权利要求 1 的抗体或其片段的亲和力,相对于所述样品纯化 PAG。
34. 权利要求 33 的方法,其中所述样品从第 50 天到第 250 天的牛胎盘获得。
35. 权利要求 34 的方法,其中所述样品从第 61 天到第 250 天的牛胎盘获得。
36. 权利要求 33 的方法,其中所述纯化包括免疫沉淀、Western 印迹法或免疫亲和色谱法。

用于早期妊娠诊断的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求享有美国临时申请 61/013,603 (2007 年 12 月 13 日提交) 的优先权, 该美国临时申请的完整公开内容通过参考引入本文。

[0003] 发明背景

[0004] I. 发明领域

[0005] 本发明总的涉及兽医、生殖生物学和诊断学领域。更具体地说, 本发明涉及用于检测早期妊娠的方法和组合物。

[0006] II. 相关技术

[0007] 妊娠诊断允许乳品和牛肉工业进行有效的繁殖管理。通常, 人工授精的成功率不到 50%, 生产者必须依赖于恢复到发情期的明显迹象 (容易忽略) 或推迟再繁殖直到通过上述方法之一证实妊娠失败。这样的推迟具有极高的代价, 并且构成了工业的主要经常损失。

[0008] 长期以来一直在寻找可以早期进行并且具有低假阳性的用于牛的准确的妊娠试验。可以采用几种妊娠试验, 包括牛奶孕酮分析 (Oltenacu 等人, 1990; Markusfeld 等人, 1990)、雌酮硫酸酯分析 (Holdsworth 等人, 1982; Warnick 等人, 1995)、直肠触诊 (Hatzidakis 等人, 1993)、超声 (Beal 等人, 1992; Cameron 和 Malmo, 1993) 和妊娠特异性抗原的血液检验。

[0009] 这些方法中的每一种在实际的现场使用方面都达不到预期。例如, 第 18-22 天前对牛奶或血清孕酮的检测产生高得不可接受的假阳性率 (Oltenacu 等人, 1990; Markusfeld 等人, 1990)。直肠触诊可以用来早在第 35 天检测妊娠, 但是该方法可导致 5-10% 或更高的胚胎死亡率 (Oltenacu 等人, 1990; Hatzidakis 等人, 1993)。第 50 天的直肠触诊对胚胎有较小的伤害, 但是由于太晚而只有极小的经济价值 (Oltenacu 等人, 1990)。超声波检查相对于直肠触诊在准确性方面具有优点, 特别是在第 45 天之前 (Beal 等人, 1992; Cameron 和 Malmo, 1993), 但是设备昂贵, 其应用需要大量的培训, 并且对动物有有限的风险。一种相关的方法, 多普勒超声波检查, 比直肠触诊更准确 (Cameron 和 Malmo, 1993), 但是仍然需要训练良好的人员。尿或血清中雌酮硫酸酯的存在提供了另外一种检验, 但是只在第 100 天后随着浓度升高才有用 (Holdsworth 等人, 1982; Warnick 等人, 1995)。

[0010] 妊娠特异性蛋白 B (PSP-B) 的发现 (Butler 等人, 1982) 提供了一种新的妊娠诊断方法, 因为它可以在妊娠第 4 周的怀孕母牛的血液中检测到 (Sasser 等人, 1986; Humblot 等人, 1988)。其他人开发了基于相同或免疫学相似抗原的免疫测定 (Zoli 等人, 1992a; Mialon 等人, 1993; Mialon 等人, 1994)。在一种情况中, 抗原 ($M_r \sim 67\text{kDa}$) 被称为牛妊娠相关糖蛋白 (boPAG; 现在称为 boPAG-1) (Zoli 等人, 1992a); 在第二种情况中, 它被称为妊娠血清蛋白 60 (PSP60) (Mialon 等人, 1993; Mialon 等人, 1994)。对于 PSP-B/boPAG1/PSP60 的免疫测定具有某些缺点。首先, 妊娠第 4 周的阳性诊断仍然有一些不确定性, 因为血液中的抗原浓度低而且有些不稳定。第二, boPAG1 浓度到期显著升高 (Sasser 等人, 1986; Zoli 等

人,1992a ;Mialon 等人,1993),并且由于该分子的循环半衰期较长 (Kiracofe 等人,1993),在产后 80-100 天仍然可以检测到该抗原 (Zoli 等人,1992a ;Mialon 等人,1993 ;Mialon 等人,1994 ;Kiracofe 等人,1993),这影响了产后早期配种的母牛的妊娠诊断。因此,只有在产后 70 天或之后进行人工授精 (“AI”) 时,才可以在第 30 天对奶牛进行该试验。

[0011] 妊娠相关糖蛋白 (PAG) 在结构上与胃蛋白酶相关。它们被认为限于有蹄类哺乳动物,并且其特征为在胎盘的外上皮细胞层 (绒毛膜 / 滋养外胚层) 特异性表达 (Green 等人,2000 ;Hughes 等人,2003 ;Xie 等人,1997)。至少有些 PAG 没有作为蛋白酶的催化活性,尽管每一种似乎都具有能够结合肽的裂隙 (Guruprasad 等人,1996)。据估计,牛、绵羊和大多数、可能所有偶蹄目 (Artiodactyla) 反刍动物具有几十个 PAG 基因。PAG 在序列上有高度多样性,超变区主要限于表面暴露的环。

[0012] 在发展用于家畜的妊娠试验的尝试中发现了牛妊娠相关糖蛋白 (boPAGs/PSPB/PSP60) (Butler 等人,1982 ;Sasser 等人,1986 ;Zoli 等人,1991 ;Zoli 等人,1992a)。在每次尝试中,给兔注射胎盘绒毛叶提取物,通过用来自未孕动物的组织提取物吸附除去不针对胎盘抗原的抗体。得到的抗血清为早至授精后一个月对牛和绵羊的准确妊娠试验提供了基础。

[0013] 甚至在最初的研究中 (Butler 等人,1982 ;Zoli 等人,1991 ;Xie 等人,1991 ;Xie 等人,1994 ;Xie 等人,1996),清楚知道 boPAG 在分子量和电荷方面是不均匀的,并且由于已经纯化了许多同工型,证明它们的氨基末端序列不同 (Atkinson 等人,1993 ;Xie 等人,1997a)。进一步的文库筛查显示在反刍动物中有额外的转录物 (Xie 等人,1994 ;Xie 等人,1995 ;Xie 等人,1997b) 并且在非反刍动物如猪中存在 PAG (Szafranska 等人,1995)。PAG 样蛋白 (也称为“胃蛋白酶原 F”或“胃蛋白酶 F”) 在马和猫中已有描述 (Green 等人,1999 ;Guruprasad 等人,1996)。已经描述的牛 PAG 包括 boPAG2、boPAG4、boPAG5、boPAG6、boPAG7、boPAG9、boPAG7v、boPAG9v、boPAG15、boPAG16、boPAG17、boPAG18、boPAG19、boPAG20 和 boPAG21 (美国专利 6,869,770)。关于通过测定这些 PAG 诊断早孕的方法的信息可见,例如,美国专利 6,869,770 和美国专利申请公布 No. 20050100975。

[0014] 在配种后第 30 天之前,大多数可以采用的检测牛怀孕的试验具有较低的准确性。此外,许多已有的试验需要熟练的技术人员。因此,需要能够在配种后第 30 天之前快速、容易地进行的准确、灵敏的牛妊娠试验。

发明内容

[0015] 因此,本发明一方面提供灵敏和准确的早孕检测。在一个实施方案中,本发明提供早孕检测,其中包括 PAG 高度特异性结构域的特异性多肽可以在妊娠第四周末期之前以高度的灵敏性和特异性检测到。在这样的早期阶段诊断怀孕的能力在乳品工业特别有用,其中动物通常至少在一天的一部分时间被限制,并且实施集中管理。此外,本发明的实施方案将在其它动物的繁殖计划中得到应用。

[0016] 另一方面,本发明提供检测动物怀孕的方法,包括:(a) 从动物获得样品;(b) 使该样品接触抗体或抗体片段,其中该抗体或抗体片段包括 2D9 抗体或其片段或变体;和 (c) 检测该抗体或抗体片段与样品中至少一种妊娠相关抗原 (PAG) 的接触,其中检测到 PAG 表明该动物已怀孕。在一个实施方案中,使用的抗体包含与 SEQ ID NO:1 有大于 97% 的序列同

一性或 SEQ ID NO :2 有大于 92% 的序列同一性的结构域。在一些实施方案中,所述动物是反刍 (Ruminantia) 亚目的成员。在具体的实施方案中,反刍类动物是牛科 (Bovidae) 的成员。在其它实施方案中,所述动物是山羊、绵羊、奇蹄目 (Perissodactyla) 的成员、马、犀牛、犬、猫、人或大熊猫。

[0017] 产生 2D9 的杂交瘤细胞系于 2007 年 8 月 2 日保藏于美国典型培养物保藏中心专利保藏部门 (Patent Depository of the American Type Culture Collection(ATCC), Manassas, Va., 20110-2209), 专利保藏号为 PTA-8566 (识别号为 MON-PAG-2D9)。该保藏在国际承认用于专利程序的微生物保存布达佩斯条约的条款下进行。进行该保藏只是便于本领域技术人员,而不是承认根据 35U. S. C. § 112 需要保藏。

[0018] 在特定实施方案中,结构域与 SEQ ID NO :1 有 98% 或更高的序列同一性,包括与 SEQ ID NO :1 的 99% 或更高的序列同一性。在进一步的实施方案中,结构域包括 SEQ ID NO :1。

[0019] 在一些实施方案中,结构域与 SEQ ID NO :2 有 92% 或更高的序列同一性,包括与 SEQ ID NO :2 的至少 93%、94%、95%、96%、97%、98% 和 99% 或更高的序列同一性。在一些特定实施方案中,结构域包括 SEQ ID NO :2。

[0020] 在一些实施方案中,抗体或抗体片段进一步被定义为包含至少一个轻链和至少一个重链的抗体。在具体实施方案中,轻链可以与 SEQ ID NO :1 有大于 97% 的序列同一性。在进一步的实施方案中,重链与 SEQ ID NO :2 有大于 95% 的序列同一性。在更特别的实施方案中,重链与 SEQ ID NO :2 有大于 98% 的序列同一性。在其它实施方案中,重链包括 SEQ ID NO :2。

[0021] 在一些另外的特定实施方案中,抗体包含含有 SEQ ID NO :3 的轻链和含有 SEQ ID NO :4 的重链。

[0022] 抗体可以是单克隆抗体或多克隆抗体。在一个实施方案中,抗体是单克隆抗体 2D9。

[0023] 检测的 PAG 可以是任何 PAG, 如 boPAG4、boPAG6、boPAG9、boPAG16、boPAG17、boPAG19、boPAG20 和 boPAG21。在一个实施方案中,PAG 是 boPAG6。

[0024] 在进一步的实施方案中,本发明涉及用于检测牛动物怀孕的方法,包括:(a) 从动物获得样品;(b) 使该样品接触 2D9 单克隆抗体;和(c) 检测该抗体与样品中 boPAG4、boPAG6、boPAG9、boPAG16、boPAG17、boPAG19、boPAG20 或 boPAG21 中的一种或多种的接触,其中检测到一种或多种 PAG 表明该动物已怀孕。用于检测怀孕的方法,例如,可以在人工授精后的第 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 天或更多天后进行。

[0025] 样品可以是已知或怀疑含有 PAG 的任何样品。在具体的实施方案中,样品是唾液、血清、血浆、血液、乳液或尿液。任何有效量的样品可以从动物获得。例如,所述量可以是大约 5 μ l、10 μ l、15 μ l、20 μ l、25 μ l、30 μ l、40 μ l、50 μ l、60 μ l、70 μ l、80 μ l、90 μ l、100 μ l、150 μ l、200 μ l、250 μ l、300 μ l、350 μ l、400 μ l、450 μ l、500 μ l、550 μ l、600 μ l、700 μ l、800 μ l、900 μ l、1ml、1.5ml、2.0ml、2.5ml、3.0ml、3.5ml、4.0ml、4.5ml、5.0ml 或更多。

[0026] 本发明的方法涉及本领域普通技术人员已知的任何检测抗体或抗体片段与 PAG 接触的方法。例如,所述方法可以包括 ELISA 或 Western 印迹法。在具体实施方案中,待检

测的 PAG 是 boPAG2、boPAG4、boPAG5、boPAG6、boPAG7、boPAG9、boPAG7v、boPAG9v、boPAG15、boPAG16、boPAG17、boPAG18、boPAG19、boPAG20 或 boPAG21。在具体的实施方案中，PAG 是 boPAG6。在本发明方法的某些实施方案中，检测每个样品中一种以上的 PAG。当应用于牛以外的物种时，本发明将允许检测在滋养层（胎盘前）开始附着到或植入母亲子宫壁时产生的其它 PAG。这些物种中的“早期”PAG 可以与在检测牛早孕中有用的 PAG 免疫学交叉反应。

[0027] 在具体实施方案中，ELISA 是夹心 ELISA，包括 PAG 与固定到基底上的抗体或抗体片段和酶标记的第二抗体制品的结合。例如，固定抗体或抗体片段的基底可以是管、孔、小瓶、试纸 (strip)、试条 (dipstick) 或生物传感器。例如，酶可以是碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶或任何酶标记。

[0028] 本发明通常也涉及由一种结构域编码的分离的和纯化的多肽，该结构域与 SEQ ID NO :1 有大于 97% 的序列同一性或 SEQ ID NO :2 有大于 92% 的序列同一性。在具体实施方案中，该结构域包含与 SEQ ID NO :1 的大于 98% 的序列同一性。在更特定的实施方案中，该结构域包含 SEQ ID NO :1。可能有一个或多个额外的氨基酸残基连接到该结构域的 N-末端或 C-末端。在一个具体实施方案中，多肽是 SEQ ID NO :1。在一些实施方案中，该结构域包含与 SEQ ID NO :2 的大于 95% 的序列同一性。在更特定的实施方案中，该结构域包含与 SEQ ID NO :2 的大于 98% 的序列同一性。在进一步特定的实施方案中，该多肽是 SEQ ID NO :2。在其它实施方案中，该多肽包含 SEQ ID NO :3。在进一步的实施方案中，该多肽包含 SEQ ID NO :4。

[0029] 本发明也包括编码一种多肽的分离的和纯化的多核苷酸，该多肽具有与 SEQ ID NO :1 有大于 97% 的序列同一性或者与 SEQ ID NO :2 有大于 92% 的序列同一性的结构域。在一些实施方案中，该多核苷酸编码与 SEQ ID NO :1 有大于 98% 的序列同一性的多肽。在具体实施方案中，该多核苷酸编码 SEQ ID NO :1。在一些实施方案中，该多核苷酸编码一种多肽，该多肽包含与 SEQ ID NO :2 有大于 95% 的序列同一性的结构域。在更特定的实施方案中，该多核苷酸编码一种多肽，该多肽具有与 SEQ ID NO :2 有大于 98% 的序列同一性的结构域。在更特定的实施方案中，该多核苷酸编码一种多肽，该多肽包含 SEQ ID NO :2。在一些实施方案中，该多核苷酸包含与 SEQ ID NO :5 有大于 98% 的同一性或 SEQ ID NO :6 有大于 95% 的同一性的核酸序列。在一些具体实施方案中，该多核苷酸是 SEQ ID NO :5，在进一步特定的实施方案中，该多核苷酸是 SEQ ID NO :6。

[0030] 本发明通常也涉及通常也涉及分泌单克隆抗体 2D9 的杂交瘤细胞。

[0031] 本发明也涉及用于检测动物中是否存在 PAG 的试剂盒，其中该试剂盒包括抗体或抗体片段。在一些实施方案中，抗体或抗体片段包含含有 SEQ ID NO :3 的轻链。在进一步的实施方案中，抗体或抗体片段包含含有 SEQ ID NO :4 的重链。在一个实施方案中，抗体或抗体片段附着到支持体上。例如，所述支持体可以是聚苯乙烯板、试管、试纸、试条或生物传感器。

[0032] 在一些实施方案中，试剂盒进一步包括可检测标记。例如，可检测标记可以是连接到抗体或抗体片段上的荧光标记。在其它实施方案中，可检测标记是化学发光标记。在进一步的实施方案中，可检测标记是酶，如碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶。试剂盒还可以包括酶底物。在进一步的实施方案中，试剂盒包括缓冲液或稀释剂。试剂盒也可以任选地包括

一次性移液管。其它试剂盒组分,包括试剂容器、说明书等,是本领域技术人员公知的,并且预期也可用于此处所述的试剂盒中。

[0033] 本发明通常也涉及检测动物怀孕的方法,包括:(a) 从动物获得样品;(b) 使该样品接触本发明提供的抗体或抗体片段;和(c) 通过与该抗体或抗体片段接触检测样品中的PAG,其中检测到 boPAG4、boPAG6、boPAG9、boPAG16、boPAG17、boPAG19、boPAG20 或 boPAG21 中的一种或多种,包括它们所有可能的组合,表明该动物已怀孕。

[0034] 通过以下详细说明,本发明的其它目的、特征和优点将是清楚的。但是应当理解,虽然详细说明和具体实施例说明了本发明的优选实施方案,但是只是说明性的,因为基于此详细说明,本领域技术人员将会明白本发明精神和范围内的多种变化和修改。

附图说明

[0035] 以下附图构成了本发明说明书的一部分,并且用于进一步说明本发明的某些方面。参考这些附图中的一张或多张,结合此处所述的具体实施方案的详细说明,可以更好地理解本发明。

[0036] 图 1. 2D9 轻链的核酸序列 (SEQ ID NO :5)。加工形式的起始密码子 (N- 末端氨基酸) 和终止密码子以粗体示出。

[0037] 图 2. 2D9 重链的核酸序列 (SEQ ID NO :6)。加工形式的起始密码子 (N- 末端氨基酸) 和终止密码子以粗体示出。

[0038] 图 3A、3B. 图 3A-boPAG6 的肽序列 (上图) 和通过 LC-MS-MS 分析确定的肽序列 (下图) (SEQ ID NO :7-18) 表明,在富含 PAG 的制品免疫沉淀后从 2D9- 包被的磁珠上洗脱的 PAG 主要对应于 boPAG6。为了确定所有结合 2D9 的成分,对富含 PAG 的制品进行了免疫亲和色谱纯化。对免疫亲和柱纯化的材料进行 LC-MS-MS 分析。该分析显示,boPAG6 是主要的结合 2D9 的 PAG, boPAG-4、boPAG-9、boPAG-20 和 boPAG21 是次要的结合 2D9 的 PAG。图 3B- 从第 55 天牛胎盘制备的组织提取物经 2D9 免疫亲和色谱纯化的 PAG 的变性凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和 Western 印迹分析。考马斯染色的凝胶和使用 PAG 多克隆抗体的 Western 印迹分析都显示位于 67kD、55kD 和 50kD 处的三条蛋白质条带是结合 2D9 的 PAG。“Mz”= 质荷比:肽的质量与电离的肽的电荷之比,减去水;“电荷”= 离子电荷状态;“Mr (计算)”= 计算的肽分子量;“起点”= 与肽比对的蛋白质的起始氨基酸;“终点”= 与肽比对的蛋白质的终止氨基酸;“得分”= 肽序列置信度的量度。

[0039] 图 4. 考马斯染色的 SDS-PAGE, 显示肉阜 (caruncle) (子宫内膜) 和绒毛叶 (cotyledon) (胎盘) 组织提取物经免疫亲和色谱法纯化的结合 2D9 的 PAG。切下蛋白条带 1-7, 并进行胰蛋白酶消化, 然后进行 LC-MS-MS 分析 (SEQ ID NO :7-18)。

[0040] 图 5. 使用 2D9- 抗体包被的 ELISA 板和使用免疫亲和纯化的 PAG 作为标准建立的 PAG ELISA 标准曲线的 Log-logit 转换。该分析显示从 0.5ng/ml 到 50ng/ml 的线性反应。

[0041] 图 6. 所示表格显示在两个研究地点:威斯康辛州和加利福尼亚州,与第 28 天超声妊娠诊断相比,使用基于实验室的 ELISA 的第 28 天妊娠诊断的准确性。在这一 β 研究中检查了第 28 天妊娠试验在奶牛繁殖管理中的经济性。使用多克隆抗体的基于实验室的 PAG ELISA 用于妊娠诊断。威斯康辛州地点使用严格同步化繁殖,而加利福尼亚州地点使用同步化繁殖 (synchronized breeding) 加上发情繁殖 (breeding to heat)。每个地点的研究使

用大约 1000 头牛。在第 28 天采集血样,并运送至实验室进行妊娠试验。结果在 24 小时内返回农场,以便能够作出繁殖决定。也在第 28 天采血时通过超声确定妊娠状态。

[0042] 图 7. 威斯康辛州地点试验的繁殖参数的分析结果。该地点使用严格同步化繁殖计划,使用第 28 天妊娠试验(早期再同步组)或第 45 天触诊(对照组,晚期再同步)。结果表明与晚期再同步组(对照组)相比,早期再同步组(第 28 天妊娠试验)中授精之间的天数和未孕期(days open)明显减少。

[0043] 图 8. 加利福尼亚州地点试验的繁殖参数的分析结果。该地点使用同步化繁殖加发情繁殖,使用(早期再同步组)及不使用(晚期再同步组)第 28 天妊娠试验。结果表明与晚期再同步组相比,授精之间的天数、授精次数和未孕期明显减少。

[0044] 图 9. 显色试验基础。使用 2D9 单克隆抗体作为捕获抗体和使用生物素标记的兔多克隆抗体作为第二抗体发展的 PAG 免疫测定的结果。妊娠第 28 天和第 55 天采集的血浆测试组(20 个未孕和 20 个怀孕)样品显示未孕母牛(蓝色)与怀孕母牛(粉红色)完全分开。未孕母牛获得的接近零的 PAG 值提示测试血浆中免疫反应性 PAG 的定量检测可能不需要 PAG 标准。

[0045] 图 10. 在显色试验中使用全血样品进行的牛妊娠诊断的结果。目视观察结果。显示蓝色反应溶液的试管(管 1、3、6、9、10、14 和 15)为妊娠状态阳性结果,显示澄清背景的试管(管 2、4、5、7、8、11、12、13 和 16)为妊娠状态阴性(未怀孕)。为了用分光光度计读数,可以向每个试管中加入等体积的(0.4ml)终止溶液(1N HCl)。添加终止溶液将使颜色变为黄色。然后,可以在 630nm 用分光光度计测量每个样品的光密度(OD)。

[0046] 图 11A, 11B. 使用 2D9 包被的塑料管进行的显色试验的结果。图 11A- 第 28 天血浆组。图 11B- 第 55 天血浆组。第 28 天和第 55 天检测组的所有未孕母牛样品都产生 0.20D 或更低的颜色强度,而怀孕血浆样品产生高达 1.00D 单位的颜色强度。在该分析中,当设置 0.20D 颜色强度为截值时,第 28 天血浆样品显示 100%的灵敏性和 100%的特异性。在相同的颜色强度截值时,第 55 天血浆样品在塑料管分析中显示 95%的灵敏性和 100%的特异性。

[0047] 图 12. 新鲜血浆样品的妊娠试验与使用多克隆抗体(多克隆:多克隆,上图)和 2D9 单克隆抗体和多克隆抗体(单克隆:多克隆,下图)进行的 PAG 夹心 ELISA 的比较。注意使用 0.20D 颜色强度截值容易地区分的未孕母牛样品清楚地分开。所有怀孕母牛样品具有 > 0.20D 单位的颜色强度。单克隆:多克隆分析具有 100%的灵敏性和 100%的特异性。

[0048] 图 13. 使用血样的显色试验的现场检测。检测了配种后第 33-34 天采集的 54 个血样,由 3 个对颜色进行目视观察。3 人之间对结果的目视评分未见不一致。

[0049] 图 14. 与 54 个样品的超声结果相比,显色试验的现场检测结果。该试验识别了所有的怀孕母牛(100%灵敏度),与超声结果相比有一个假阳性结果。有 2 个样品在显色试验中为不确定的结果,后来发现为“未孕”母牛。但是,与超声相比,显色试验识别了 40 头未孕母牛中的 37 头(92.5%特异性)。

[0050] 图 15. 利用 BioEdit(v. 7.0.5.3; www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html; Hall, 1999) 内的 PROTDIST(v. 3.5c) 的相邻系统发生树分析包产生的 PAG 同工型蛋白质序列簇。

[0051] 图 16. PAG 同工型 1、4、6、9、16、17、19、20 和 21 的直接比对。PAG 同工型和变体

的蛋白质序列以 SEQ ID NO :51-62 给出,来自于 UniProt 登录号 Q29432、046492、046494、A5PJW4、046497、A4FV16、Q9TTV8、Q9TTV7、A7MBA4、Q9TTV5、Q9TTV4 和 Q9TTV3。

[0052] 图 17. 用考马斯蓝染色的纯化的 PAG 批 (每批 5 μ g) 的 SDS-PAGE 凝胶显示在 50 与 75kD 之间有三个 PAG 条带 (上、中、下条带)。1) 蛋白质标准 (Bio-Rad Cat. #161-0374) ; 2) d55 肉阜 ;3) d55 绒毛叶 ;4) 混合的 d55 肉阜和绒毛叶 ;5) d215 肉阜 ;6) d215 绒毛叶 ;7) 混合的 d215 肉阜和绒毛叶 ;8) 蛋白质标准 (Bio-Rad Cat. #161-0374)。

[0053] 说明性实施方案详述

[0054] 尽管几种分析可以用于检测怀孕,但是仍然需要提供用于准确和早期检测怀孕的改进的分析,特别是对于产后 2 至 3 个月内或更早时配种的牛。本发明的某些实施方案涉及确定牛的妊娠状态的方法,包括进行显色试验以检测从动物获得的样品中的 PAG 与多肽如单克隆抗体 2D9 (表明牛怀孕的一种结合 PAG 的抗体) 的结合。显色试验可以早期进行,如授精后 26 天。显色试验可以使用多种形式中的任一种,如使用试管或 ELISA 板。在具体实施方案中,该试验使用夹心免疫测定原理,其使用第二抗体。颜色,如蓝色,表示阳性试验,而澄清的管表示阴性试验。本方法的实施方案可以在人工授精后 30 天之前容易地进行,并且是高度灵敏和特异性的。此外,可以容易地和快速地同时分析多个样品,这进一步提高了本方法的价值。

[0055] 也提供了某些新的结合 PAG 的多肽,它们可以用于检测受试者怀孕的方法中,以及提供了编码此处所述的多肽的多核苷酸。其余的公开内容描述了本发明的各种特征和它们的实施。

[0056] I. 多肽

[0057] 此处所述的本发明的某些实施方案涉及分离的和纯化的多肽,该多肽包括与 SEQ ID NO :1 有大于 97% 的序列同一性或者与 SEQ ID NO :2 有大于 92% 的序列同一性的 PAG 结合结构域。在一些实施方案中,PAG 结合结构域与 SEQ ID NO :1 有大于 97.1%、97.3%、97.5%、97.7%、97.9%、98.1%、98.3%、98.5%、98.7%、98.9%、99.1%、99.3%、99.5%、99.7%、99.9% 或 100% 的序列同一性。在一些实施方案中,该 PAG 结合结构域与 SEQ ID NO :2 有大于 92.2%、92.6%、93.0%、93.4%、93.8%、94.2%、94.6%、95.0%、95.4%、95.8%、96.2%、96.6%、97.0%、97.4%、97.8%、98.2%、98.6%、99.0%、99.4%、99.8% 或 100% 的序列同一性。

[0058] 此处使用的“多肽”是指任意长度的连续氨基酸区段。在本方法的某些实施方案中,其中使用的多肽是连续氨基酸,在其序列中包括与 SEQ ID NO :1 有大于 97% 的序列同一性或者与 SEQ ID NO :2 有大于 92% 的序列同一性的氨基酸序列。本领域普通技术人员基于此处所述的公开内容,应当理解如何使用本领域技术人员公知的大量实验方法中的任何一种产生这样的多肽。

[0059] 术语“百分序列同一性”,如本领域已知的,是指通过比较序列确定的两个或多个多肽序列或两个或多个多核苷酸序列之间的关系。在本领域中,“同一性”也指多肽或多核苷酸序列之间的序列相关程度,根据具体情况,通过这些序列串之间的匹配来确定。“同一性”和“相似性”可以用已知方法容易地计算,包括但不限于 Computational Molecular Biology(1988);Biocomputing:Informatics and Genome Projects(1993);Computer Analysis of Sequence Data,Part I(1994);Sequence Analysis in Molecular

Biology(1987);和 Sequence Analysis Primer(1991) 中所述的那些方法。优选的确定同一性的方法被设计为提供测试序列之间的最佳匹配。确定同一性和相似性的方法编入公共可获得的计算机程序中。序列比对和百分同一性计算可以使用 LASERGENE 生物信息学计算套件 (DNASTAR Inc., Madison, Wis.) 的 Megalign 程序进行。序列的多重比对可以使用采用缺省参数 (空位罚分 = 10, 空位长度罚分 = 10) 的聚类比对方法进行 (Higgins 和 Sharp(1989)。使用多重方法的逐对比对的缺省参数是 KTUPLE 1, 空位罚分 = 3, 窗口 = 5, DIAGONALS SAVED = 5。

[0060] 技术人员应当理解,“多肽”的定义中固有这样一个概念:在分子的限定部分内可以进行的、仍然产生具有可接受水平的序列同一性或功能(例如结合 PAG 的能力)的分子的变化数目是有限的。

[0061] 此处所述的多肽定义内包括任意长度的氨基酸序列,只要该多肽保留所述的序列同一性。此处所述的多肽的 PAG 结合结构域可以在 C- 末端或 N- 末端具有额外的氨基酸。例如,多肽等价物可以包括连接至 PAG 结合结构域 C- 末端或 N- 末端的 4、5、6、7、8、9、10、15、20、50、75、100、125、150、175、200、300、400、500、600、700、800、900、1000 个或更多的额外的核酸。

[0062] 当然,具有不同取代的多种不同的多肽可以根据本发明容易地制备并使用。

[0063] 本发明可以使用从天然来源或从重组产生的材料纯化的多肽。本领域普通技术人员知道如何从重组产生的材料产生这些多肽。这种材料可以使用 20 种在天然合成蛋白质中常见的氨基酸或一种或多种修饰的或不常见的氨基酸。通常,“纯化的”是指已经进行分级分离除去了各种其它蛋白质、多肽或肽的多肽组合物,该组合物基本上保留其活性。纯化可以是基本纯化,其中多肽是主要的种类或者是均质的,该纯化水平允许准确的降解测序。

[0064] 氨基酸序列突变体包括在本发明中,并且包括在“多肽”的定义中。多肽的氨基酸序列突变体可以是取代突变体或插入突变体。插入突变体一般包括在肽的非末端位点添加材料。这可能包括插入少数残基、免疫反应性表位或只是一个残基。添加的材料可以是修饰的,例如通过甲基化、乙酰化等修饰的。此外,也可以向肽的 N- 末端或 C- 末端添加额外的残基。

[0065] 氨基酸取代通常基于氨基酸侧链取代基的相对相似性,例如,它们的疏水性、亲水性、电荷、大小等。氨基酸侧链取代基的大小、形状和类型的分析显示精氨酸、赖氨酸和组氨酸均是带正电荷的残基;丙氨酸、甘氨酸和丝氨酸均具有类似的大小;苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸均具有通常相似的形状。因此,基于这些考虑,丙氨酸、赖氨酸和组氨酸;丙氨酸、甘氨酸和丝氨酸;以及苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸,在此定义为生物功能等价物。

[0066] 在进行改变时,可以考虑氨基酸的亲水指数 (hydropathic index)。每个氨基酸已经基于其疏水性和电荷特征被分配亲水指数:异亮氨酸 (+4.5);缬氨酸 (+4.2);亮氨酸 (+3.8);苯丙氨酸 (+2.8);半胱氨酸 / 胱氨酸 (+2.5);甲硫氨酸 (+1.9);丙氨酸 (+1.8);甘氨酸 (-0.4);苏氨酸 (-0.7);丝氨酸 (-0.8);色氨酸 (-0.9);酪氨酸 (-1.3);脯氨酸 (-1.6);组氨酸 (-3.2);谷氨酸 (-3.5);谷氨酰胺 (-3.5);天冬氨酸 (-3.5);天冬酰胺 (-3.5);赖氨酸 (-3.9);和精氨酸 (-4.5)。

[0067] 本领域通常理解氨基酸亲水指数在给蛋白质提供相互作用性生物功能中的重要性 (Kyte 和 Doolittle, 1982, 通过参考并入本文)。众所周知,某些氨基酸可以取代其它具

有类似亲水指数或得分的氨基酸,而仍然保留类似的生物活性。在基于亲水指数进行改变时,亲水指数在 +2 以内的氨基酸取代是优选的,在 +1 以内的是特别优选的,在 +0.5 以内的是更加特别优选的。

[0068] 应当理解,氨基酸可以取代其它具有类似亲水性值的氨基酸,而仍然获得生物学等效的蛋白质。如美国专利 4,554,101 所详述的,氨基酸残基被赋予以下亲水性值:精氨酸(+3.0);赖氨酸(+3.0);天冬氨酸(+3.0+1);谷氨酸(+3.0+1);丝氨酸(+0.3);天冬酰胺(+0.2);谷氨酰胺(+0.2);甘氨酸(0);苏氨酸(-0.4);脯氨酸(-0.5+1);丙氨酸(-0.5);组氨酸(-0.5);半胱氨酸(-1.0);甲硫氨酸(-1.3);缬氨酸(-1.5);亮氨酸(-1.8);异亮氨酸(-1.8);酪氨酸(-2.3);苯丙氨酸(-2.5);色氨酸(-3.4)。

[0069] 在基于类似的亲水性值进行改变时,其亲水性值在 +2 以内的氨基酸取代是优选的,在 +1 以内是特别优选的,在 +0.5 以内是更加特别优选的。

[0070] II. 多核苷酸

[0071] 本发明的各方面涉及编码一种多肽的多核苷酸,该多肽包括与 SEQ ID NO:1 有大于 97% 的序列同一性或者与 SEQ ID NO:2 有大于 92% 的序列同一性的结构域。此处所述的其它实施方案涉及编码一种多肽的分离的和纯化的多核苷酸,该多肽具有与 SEQ ID NO:1 有大于 97% 的序列同一性或者与 SEQ ID NO:2 有大于 92% 的序列同一性的结构域。也公开了包含与 SEQ ID NO:5 有大于 98% 的序列同一性或 SEQ ID NO:6 有大于 95% 的序列同一性的核酸序列的多核苷酸。SEQ ID NO:5 是指编码 2D9 轻链的 cDNA 的核酸序列,SEQ ID NO:6 是指编码 2D9 重链的 cDNA 的核酸序列。

[0072] 在一些实施方案中,多核苷酸与 SEQ ID NO:5 有 98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99.0%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9% 或 100% 的序列同一性。在一些实施方案中,多核苷酸与 SEQ ID NO:6 有大于 95.2%、95.4%、95.6%、95.8%、96.0%、96.2%、96.4%、96.6%、96.8%、97.0%、97.2%、97.4%、97.6%、97.8%、98.0%、98.2%、98.4%、98.6%、98.8%、99.0%、99.2%、99.4%、99.6%、99.8% 或 100% 的序列同一性。

[0073] 多核苷酸可以从天然来源获得或者使用本领域普通技术人员已知的任何方法化学合成。本发明也包括化学合成的这些序列的突变体。

[0074] 在特定实施方案中,可能希望使用包括其它元件的构建体,例如,包括 C-5 丙炔嘧啶的构建体。含有尿苷和胞苷的 C-5 丙炔类似物的寡核苷酸已经证明高亲和性地结合 RNA (Wagner 等人,1993)。在一些实施方案中,多核苷酸编码一种或多种额外的能够结合 PAG 的氨基酸区段。

[0075] III. 抗体和抗体片段

[0076] 本发明的具体实施方案涉及抗体或抗体片段。术语“抗体”用来指任何具有抗原结合区的抗体样分子,包括抗体片段,如 Fab'、Fab、F(ab')₂、单域抗体(DAB)、Fv、scFv(单链 Fv)等。制备和使用各种基于抗体的构建体和片段的方法是本领域公知的。制备和表征抗体的方法也是本领域公知的(参见,例如,Antibodies:A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory,1988;通过参考并入本文)。

[0077] “小抗体”或“微抗体”也可用于本发明。小抗体是在 C-末端具有寡聚结构域的 sFv 多肽链,该结构域与 sFv 之间被铰链区隔开。Pack 等人(1992)。寡聚结构域包含自结合的

α -螺旋,例如亮氨酸拉链,它们可以进一步用额外的二硫键稳定化。寡聚化结构域被设计为与跨膜的矢量折叠相容,该过程被认为促进了多肽在体内折叠为功能结合蛋白质。通常,小抗体是使用本领域公知的重组方法产生的。参见,例如, Pack 等人 (1992);Cumber 等人 (1992)。

[0078] 本发明也涉及抗体样结合拟肽。Liu 等人,2003 描述了“抗体样结合拟肽”(ABiP),它们是作为缩小的 (pared-down) 抗体起作用的肽,并且具有较长血清半衰期以及较不繁杂的合成方法的特定优点。

[0079] 单克隆抗体 (MAb) 公认具有某些优点,例如再现性和大规模生产,并且其应用通常是优选的。本发明因此提供人、鼠、猴、大鼠、仓鼠、兔和甚至鸡来源的单克隆抗体。由于容易制备和易于获得试剂,鼠单克隆抗体通常是优选的。

[0080] 但是,也包括“人源化”抗体,以及来自小鼠、大鼠或其它物种、携带人恒定区和/或可变区结构域的嵌合抗体、双特异性抗体、重组和工程化抗体及其片段。此处使用的术语“人源化”免疫球蛋白是指包含人构架区和一个或多个来自非人(通常是小鼠或大鼠)免疫球蛋白的互补决定区(CDR)的免疫球蛋白。提供 CDR 的非人免疫球蛋白被称为“供体”,提供构架的人免疫球蛋白被称为“接受体”。“人源化抗体”是包含人源化轻链和人源化重链免疫球蛋白的抗体。

[0081] 术语“抗体”包括多克隆抗体、单克隆抗体 (mAb)、嵌合抗体、可以以可溶性或结合形式标记的抗体的抗独特型(抗-Id)抗体,以及通过任何已知技术提供的其片段、区域或衍生物,所述方法例如但不限于酶切、肽合成或重组技术。此处所述的抗体能够结合 PAG。

[0082] 此处定义的“多克隆抗体”是指来源于用抗原免疫的动物血清的不均一的抗体分子群体。这些不同的抗体可以识别同一抗原上的几个表位。“单克隆抗体”含有基本均质的抗原特异性抗体群体,该群体含有基本相似的表位结合位点。MAb 可以通过本领域技术人员已知的方法获得。参见,例如,Kohler 和 Milstein,1975;美国专利 No. 4, 376, 110;Ausubel 等人,1992);Harlow 和 Lane 1988;Colligan 等人,1993,其内容均通过参考并入本文。这样的抗体可以是任何免疫球蛋白类别,包括 IgG、IgM、IgE、IgA、GILD 及其任何亚类。产生本发明的 mAb 的杂交瘤可以在体外、原位或体内培养。在体内或原位产生高效价 mAb 使其成为目前优选的生产方法。

[0083] “嵌合抗体”是其不同部分来源于不同动物种的分子,如具有来源于鼠 mAb 的可变区和人免疫球蛋白恒定区的分子,它们主要用于降低应用时的免疫原性以及提高产率。嵌合抗体及其生产方法是本领域已知的。示例性的生产方法在 Cabilly 等人,1984;Boulianne 等人,1984;和 Neuberger 等人,1985 中描述,均通过参考并入本文。

[0084] “抗独特型抗体”(抗-Id)是识别通常与抗体的抗原结合位点相关的独特决定簇的抗体。Id 抗体可以通过用制备其抗-Id 的 mAb 免疫作为 mAb 来源的相同种和属类型的动物(例如小鼠株)来制备。被免疫的动物将通过产生针对这些独特型决定簇的抗体(抗-Id 抗体)识别并且响应于免疫抗体的独特型决定簇。一种示例性的产生这种抗体的方法在美国专利 No. 4, 699, 880 中描述,该专利通过参考并入本文。

[0085] 本发明的抗体可以包括至少一个重链、至少一个轻链、重链恒定区、重链可变区、轻链可变区和/或轻链恒定区,其中多克隆抗体、单克隆抗体、其片段和/或区域包括至少一个结合 PAG 一部分的重链可变区或轻链可变区。

[0086] 本发明的某些实施方案涉及用于检测动物怀孕的方法,包括从该动物获得样品,使该样品接触抗体或抗体片段,其中该抗体或抗体片段包含可以结合 boPAG4、boPAG6、boPAG9、boPAG20 和 / 或 boPAG21 中的一种或多种的结构域,以及检测该抗体或抗体片段与样品中的一种或多种 PAG 的接触,其中检测到 PAG 表明该动物已怀孕。本领域普通技术人员已知的任何方法都可以用来鉴定结合 PAG 的抗体。涉及定义 IgG 可变区的参考文献的例子包括 Mo 等人 (1993) 和 Leibiger 等人 (1999),通过参考引入本文。

[0087] IV. 检测方法和测定形式

[0088] 本发明的某些实施方案涉及检测动物怀孕的方法,包括使从动物获得的样品接触此处提供的抗体,并且检测样品中的至少一种妊娠相关抗原,其中检测到 PAG 表明该动物已怀孕。本领域普通技术人员已知的任何方法都可以用来检测结合样品中的 PAG 的抗体或抗体片段。

[0089] 本发明因此提供抗体在 PAG 的免疫检测中的应用。各种有用的免疫检测方法已经在科学文献中描述,例如, Nakamura 等人 (1987)。免疫测定,在其最简单和直接的意义上来说,是结合测定。某些免疫测定是酶联免疫吸附测定 (ELISA) 和放射免疫测定 (RIA)。使用组织切片的免疫组化检测也特别有用。但是,容易理解,检测不限于这些技术, Western 印迹法、斑点印迹法、FACS 分析等也可以用于本发明。

[0090] 通常,免疫结合方法包括获得怀疑含有蛋白质、肽或抗体的样品,并且根据情况,在允许形成免疫复合物的有效条件下使该样品接触根据本发明的抗体或蛋白质或肽。根据本发明,优选的样品是流体,如乳汁、尿、血液、血清或唾液。

[0091] 在具体实施方案中,抗体连接到固体支持体上,如试管或孔的内壁,怀疑含有 PAG 的样品将加至固定的抗体。

[0092] 抗体包被的试管系统在美国专利 3,646,346 和 WO 98/16832 中有述,该专利均通过参考并入本文。然后可以在特定条件下检测 PAG- 抗体复合物的存在。任选地,这种免疫复合物可以量化。

[0093] 使选择的生物样品在足以允许形成免疫复合物 (第一免疫复合物) 的有效条件和时间下接触抗体,通常是向样品中简单添加抗体组合物,并且温育混合物足以使抗体与样品中存在的任何 PAG 形成免疫复合物 (即结合) 的一段时间。这一时间之后,通常洗涤样品-抗体组合物,以除去任何非特异性结合的抗体种类,只允许在第一免疫复合物内特异性结合的抗体被检测到。

[0094] 通常,免疫复合物形成的检测是本领域公知的,并且可以通过应用多种方法来实现。这些方法通常基于检测标记或标记物,如放射性、荧光、生物和酶标记中的任一种。涉及使用这些标记的美国专利包括 3,817,837 ;3,850,752 ;3,939,350 ;3,996,345 ;4,277,437 ;4,275,149 和 4,366,241,均通过参考并入本文。免疫测定蛋白质的方法和进行该方法的试剂盒可以在美国专利 5,721,105 中找到,该专利通过参考并入本文。

[0095] 在具体实施方案中,该方法包括使用第二结合配体如第二抗体和 / 或本领域已知的生物素 / 亲和素配体结合排列。检测中使用的第二抗体本身可以连接到可检测标记上,其中然后简单地检测该标记,由此允许测定组合物中第一免疫复合物的量。使用免疫捕获、生物素 / 亲和素扩增和辣根过氧化物酶颜色产生来检测测试样品中生物分子的方法可以在美国专利申请公布 2003/508381 中找到。

[0096] 通常,利用具有针对 PAG 或 PAG 特异性第一抗体的结合亲和力的第二结合配体可以检测第一免疫复合物。在这些情况中,第二结合配体可以连接到可检测标记上。第二结合配体本身通常是抗体,因此可命名为“第二”抗体。在足以允许形成第二免疫复合物的有效的条件和时间下,第一免疫复合物接触标记的第二结合配体或抗体。然后通常洗涤第二免疫复合物,以除去任何非特异性结合的标记的第二抗体或配体,然后检测第二免疫复合物中剩余的标记。

[0097] 其它的方法包括通过两步法检测第一免疫复合物。如上所述,具有针对 PAG 或抗 PAG 抗体的结合亲和力的第二结合配体,如抗体,用于形成第二免疫复合物。第二结合配体含有能够将底物加工为可检测产物,因此随时间扩增信号的酶。洗涤后,第二免疫复合物与底物接触,允许检测。

[0098] 在本发明的一个实施方案中,可以采用酶联免疫测定 (ELISA)。参见,例如,Engvall,1980 ;Engvall,1976 ;Engvall,1977 ;Gripenberg 等人,1978 ;Makler 等人,1981 ;Sarangadharan 等人,1984。ELISA 允许将物质被动吸附到固体支持体如塑料上,以便能够在实验室条件下容易地处理。关于 ELISA 的全面论述,本领域技术人员可以参见“ELISA ; Theory and Practise” (Crowther,1995)。

[0099] ELISA 方法的灵敏性取决于使用的酶的更新和检测酶反应产物的容易程度。这些分析系统的灵敏性的提高可以通过使用酶的荧光和放射性底物来实现。本发明涉及的免疫测定包括但不限于美国专利 4,367,110(双单克隆抗体夹心测定)和美国专利 4,452,901(Western 印迹法)所述的方法。其它分析包括体外和体内的标记配体的免疫沉淀和免疫细胞化学。

[0100] 在一个实施方案中,本发明包括“夹心”ELISA,其中本发明的抗 PAG 抗体被固定到选择的表面上,如聚苯乙烯微孔板的孔中、试管或试条。然后,怀疑含有 PAG 的测试组合物如临床样品与所述表面接触。结合并洗涤除去非特异性结合的免疫复合物后,可以用 PAG 的第二抗体检测结合的抗原。

[0101] 在另一种示例性的 ELISA 中,将来自样品的多肽固定到表面上,然后接触抗 PAG 抗体。结合并洗涤除去非特异性结合的免疫复合物后,检测结合的抗体。在初始抗体连接到可检测标记上的情况下,第一免疫复合物可以直接检测。或者,可以使用具有对第一抗体的结合亲和力的第二抗体检测免疫复合物,该第二抗体连接到可检测标记上。

[0102] 其中固定 PAG 的另一种 ELISA 包括在检测中使用抗体竞争。在这种 ELISA 中,将标记的抗体添加到孔中,使其结合 PAG,并利用它们的标记进行检测。通过在与包被孔温育之前或期间将样品与标记的抗体混合来检测样品中的 PAG 的量。样品中 PAG 的存在用来减少可与孔结合的抗体的量,因此降低了最终的信号。

[0103] 无论使用的形式如何,ELISA 都具有某些共同的特点,例如包被、温育或结合、洗涤除去非特异性结合的物质,以及检测结合的免疫复合物。在用抗原或抗体包被板时,通常将板的孔与抗原或抗体的溶液温育过夜或特定的时间。然后洗涤板的孔以除去不完全吸附的物质。然后用相对于测试抗血清为抗原中性的非特异性蛋白质封闭孔的任何剩余的可利用表面。它们可包括牛血清白蛋白 (BSA)、酪蛋白、奶粉溶液或其它抗原中性蛋白质。包被允许封闭固定表面上的非特异性吸附位点,因此减少了抗血清非特异性结合到该表面上产生的背景。

[0104] “在允许免疫复合物（抗原 / 抗体）形成的有效条件下”是指该条件优选地包括用如 BSA、牛 γ 球蛋白 (BGG)、蒸发乳或奶粉和磷酸盐缓冲液 (PBS) / TWEEN 等溶液稀释抗原和抗体。这些添加的试剂也倾向于帮助减少非特异性背景。

[0105] “合适的”条件也指在某一温度下温育一段时间，该温度和时间足以允许有效结合。温育步骤一般是大约 1 小时到 2 小时到 4 小时，温度优选地为 25℃ 至 27℃，或者可以在大约 4℃ 过夜，等等。

[0106] 为了提供检测手段，第二或第三抗体具有结合的标记，以允许检测。通常，这是在与合适的发色底物温育时将产生显色的酶。因此，例如，希望在利于形成进一步的免疫复合物的条件下，第一或第二免疫复合物与脲酶、葡萄糖氧化酶、碱性磷酸酶或过氧化氢酶偶联的抗体接触并温育一段时间（例如，在室温下在含有 PBS 的溶液如 PBS-TWEEN 中温育 2 小时）。

[0107] 与标记的抗体温育后，并且洗涤以除去未结合的物质后，对标记的量进行定量，例如通过与显色底物如尿素和溴甲酚紫或 2,2' - 叠氮 - 二 - (3- 乙基 - 苯并噻唑啉 - 6- 磺酸 [ABTS] 和 H_2O_2 一起温育，在过氧化物酶的情况下作为酶标记。然后通过测定产生颜色的程度，例如，使用可见光谱分光光度计完成定量。

[0108] ELISA 的一个变化形式是酶联凝固分析或 ELCA (美国专利 4, 668, 621)，该方法使用凝固级联与标记酶 RVV-XA 的组合作为通用检测系统。该系统用于本发明的优点是凝固反应可以在生理 pH 下在多种缓冲液的存在下进行。因此能够保持复合分析物的完整性。

[0109] 根据本发明也可以在 PAG 鉴定中使用免疫组织化学 (IHC)。包括检测新鲜冷冻的和福尔马林固定的、石蜡包埋的由 IHC 研究制备的组织块。例如，每个组织块由 50mg 残余的“粉碎的”胎盘组织组成。由这些微粒标本制备组织块的方法已经在以前的各种预后因素（例如胸）的 IHC 研究中成功使用，并且是本领域技术人员公知的 (Brown 等人, 1990 ; Abbondanzo 等人, 1990 ; Allred 等人, 1990)。

[0110] 简言之，冷冻切片可以如下制备：在室温下在小塑料胶囊中在磷酸盐缓冲液 (PBS) 中再水合 50mg 冷冻的“粉碎的”胎盘组织；通过离心沉淀颗粒；将其重悬浮于粘性包埋介质 (OCT) 中；颠倒胶囊并再次离心沉淀；在 -70℃ 异戊烷中急冻；切割塑料胶囊并取出冷冻的组织柱；将组织柱固定在低温恒温器切片机夹具上；切割 25-50 个含有平均大约 500 个明显完整的胎盘细胞的连续切片。

[0111] 永久切片可以通过类似的方法制备，包括在塑料微量离心管中再水合 50mg 样品；沉淀；在 10% 福尔马林中重悬浮 4 小时进行固定；洗涤 / 沉淀；重悬浮于温 2.5% 琼脂中；沉淀；在冰水中冷却以使琼脂变硬；从管中取出组织 / 琼脂块；将该块浸入并包埋到石蜡中；切成最多 50 个连续永久切片。

[0112] V. 蛋白质的纯化

[0113] 某些实施方案涉及分离的或纯化的多肽或使用分离的或纯化的多肽的方法。蛋白质纯化技术是本领域技术人员公知的。这些技术包括在一个水平上将细胞环境粗分级分离为多肽和非多肽级分。在将该多肽与其它蛋白质分离后，感兴趣的多肽可以使用色谱和电泳技术进一步纯化，以实现部分或完全纯化（或纯化至均质）。特别适合于制备纯肽的分析方法是离子交换色谱法、排阻色谱法、聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电聚焦。特别有效的纯化肽的方法是快速蛋白质液相色谱法乃至 HPLC。

[0114] 本发明的某些方面涉及编码的蛋白质或多肽的纯化,在具体实施方案中,涉及其基本纯化。本文使用的术语“纯化的多肽、蛋白质或肽”意指可与其它成分分离的组合物,其中该蛋白质或肽相对于其可天然获得的状态纯化至任何程度。纯化的蛋白质或肽因此也指脱离可能天然存在的环境的蛋白质或肽。

[0115] 通常,“纯化的”是指已经分级分离除去各种其它成分并且该组合物基本保留其表达的生物活性的蛋白质或肽组合物。当使用术语“基本纯化的”时,该术语是指组合物中蛋白质或肽构成该组合物的主要成分,如构成该组合物中蛋白质的大约 50%、大约 60%、大约 70%、大约 80%、大约 90%、大约 95%或更多。

[0116] 适用于蛋白质纯化的各种技术是本领域技术人员公知的。其中包括,例如,硫酸铵、PEG、抗体等沉淀或通过污染蛋白质的热或酸性 pH 变性,然后离心;色谱步骤,如离子交换、凝胶过滤、反相、羟基磷灰石和亲和色谱法;等电聚焦;凝胶电泳;和这些和其它技术的组合。本领域公知,据认为进行各个纯化步骤的顺序可以变化或者某些步骤可以省略,而仍然导致用于制备基本纯化的蛋白质或肽的合适的方法。

[0117] 通常不需要多肽总是以最纯化的状态提供。实际上,想到较低程度基本纯化的产物在某些实施方案中是有用。部分纯化可以通过使用较少的组合纯化步骤或者通过使用相同普通纯化方案的不同形式来实现。例如,应当理解,使用 HPLC 装置进行的阳离子交换柱色谱法通常比使用低压色谱系统的相同技术导致更高的纯化倍数。显示较低相对纯化程度的方法可能在蛋白质产物的总回收率或者保持表达蛋白质的活性方面具有优点。

[0118] VI. 试剂盒

[0119] 在另外的实施方案中,本发明提供了用于通过上述免疫检测方法检测 PAG 的试剂盒,如诊断牛怀孕的免疫检测试剂盒。在具体的实施方案中,试剂盒中包括包含与 SEQ ID NO:1 有大于 97% 的序列同一性或 SEQ ID NO:2 有大于 92% 的序列同一性的结构域的抗体。该试剂盒可以包括一个或多个容器装置。容器,例如,可以是小瓶、试管、瓶、小瓶或注射器。

[0120] 在具体实施方案中,抗体是单克隆抗体 2D9。在具体实施方案中,试剂盒包括一个或多个预结合有抗体的试管或微量滴定板的孔。可替代地,试剂盒可以包括预结合到柱基质上的抗体。试剂盒可以允许测定一个样品或一个以上的样品。在一些实施方案中,试剂盒包括多个用允许同时或连续免疫检测大量样品的抗体包被的微量滴定板或试管。

[0121] 试剂盒的免疫检测试剂可以采用多种形式中任何一种,包括与给定抗体相关的和/或连接的可检测标记。也涉及与第二结合配体相关的和/或连接的可检测标记。示例性的第二配体是具有对于第一抗体的结合亲和力的第二抗体。

[0122] 在一些实施方案中,试剂盒包括具有对于第一抗体的结合亲和力的第二抗体。第二抗体可以与可检测标记连接或不连接。在一些进一步的实施方案中,试剂盒包括具有对于第二抗体的结合亲和力的第三抗体,该第三抗体与可检测标记连接。如上所述,大量示例性的标记是本领域已知的,和/或本发明可以使用所有这些标记。

[0123] 试剂盒可以任选地包括适当等分的 PAG 的组合物,以提供阳性对照。试剂盒的成分可以在水性介质中和/或以冻干形式包装。

VII. 实施例

[0124] 包括以下实施例是为了证明本发明的优选实施方案。本领域技术人员应当理解, 下面这些实施例中公开的技术代表了发明人发现的在实施本发明中工作良好的技术, 因此可以被认为构成了实施本发明的优选方式。但是, 本领域技术人员基于本公开内容应当理解, 可以对公开的具体实施方案进行许多变化, 而仍然获得相同或相似的结果, 而不背离本发明的精神和范围。

[0125] 实施例 1

[0126] 结合 2D9 的 PAG 的鉴定

[0127] 进行了研究来鉴定结合 2D9 的蛋白质、对 2D9 抗体进行表征和测序、以及对 PAG 的 2D9 结合位点作图。为了实现这一点, 采用了两种方法 (如下所述)。

[0128] 材料与方法

[0129] 使用 2D9 包被的磁珠免疫沉淀 PAG。根据厂商说明 (Dyna1), 将纯化的 2D9 偶联至甲苯磺酰基 (Tosyl) 活化的 Dyna1 磁珠上。抗体包被的磁珠与 100 微克富含 PAG 的制品 (从第 55 天的胎盘获得) 在 1x PBS 中温育 30 分钟, 并用相同的缓冲液充分洗涤。使用 pH 3.0 乙酸洗脱结合的蛋白质, 并进行凝胶和 Western 印迹分析。Western 印迹用兔抗 -PAG 多克隆抗体显示。从 SDS-PAGE 上切下免疫反应性蛋白条带, 并在胰蛋白酶消化后进行 LC-MS-MS 分析 (图 3)。

[0130] 由牛妊娠第 55 天的肉阜 (子宫内膜) 和绒毛叶 (胎盘) 组织制备的组织提取物的免疫亲和色谱。简要地说, 根据厂商说明 (Sigma, St. Louis), 将纯化的 2D9 (10mg) 偶联至 1 克 CNBr 活化的 sepharose 上。2D9- 亲和树脂 (大约 5.0ml) 与 25ml 组织提取物在 pH 7.0 下温育过夜, 进行结合。次日, 将树脂装柱, 并用 1x PBS 洗涤, 以除去未结合的材料, 并用 pH 3.0 乙酸洗脱。洗脱的材料在洗脱后立即用 1M Tris 中和至 pH 7.0。对洗脱的材料进行凝胶和 Western 印迹分析。Western 印迹用兔抗 -PAG 多克隆抗体显示。从 SDS-PAGE 上切下蛋白条带 1-7, 并在胰蛋白酶消化后进行 LC-MS-MS 分析 (图 4)。利用 BLAST 分析确定肽序列的身份。

[0131] 通过用 2D9- 结合抗原作为 PAG 标准 (通过免疫亲和色谱法纯化的) 获得的 ELISA 数据的 log-log 转换确定 PAG 对 2D9 的结合亲和力 (图 5)。使用从 0.05ng/ml 到 50ng/ml (0.083nM 到 8.3nM) 的一系列 PAG 标准进行该分析。ELISA 分析重复 8 次。数据用 SoftMax™ (Molecular Devices, Inc., Sunnyvale, CA) 进行分析。

[0132] 结果

[0133] 2D9 偶联的磁珠对 PAG 的免疫沉淀。对磁珠洗脱的材料进行的 SDS-PAGE 和 Western 印迹分析显示在 67kD 处有一条蛋白条带。肽指纹分析和 LC-MS-MS 分析确定该蛋白条带为 boPAG6 (图 3)。但是, 该分析没有显示所有结合 2D9 的 PAG, 因为该分析使用 100 微克富含 PAG 的制品进行免疫沉淀实验。通过在 pH 5.0 下对胎盘组织提取物进行胃酶抑素-亲和色谱以及随后在 pH 9.5 洗脱, 分离该材料。该制品也被称为“酸性 PAG”, 一种富集的早期 PAG 抗原制品。为了鉴定所有结合 2D9 的 PAG, 使用组织提取物进行免疫亲和色谱法 (见下文)。

[0134] 使用 2D9- 免疫亲和色谱法从组织提取物纯化的 PAG 的分析。免疫亲和柱洗脱的材料考马斯蓝染色显示分子量为 67kD、55kD 和 50kD 的 3 个蛋白条带。在使用兔抗 PAG 抗体的 Western 印迹分析中也发现所有这三个蛋白条带都是免疫反应性的。基于这些结果,

在 SDS-PAGE 后切下所有蛋白条带 (图 4), 并进行肽指纹分析和 LC-MS-MS。得到的肽序列的身份通过 BLAST 分析确定。表 1 显示肽序列结果的概况以及通过 BLAST 分析确定它们为对应于 boPAG-4、boPAG-6、boPAG-9、boPAG-20 和 boPAG21 序列的 PAG。关于表 1 中各参数的含义, 参见图 3 的说明。

[0135] 表 1. 肽序列结果的概况

[0136]

蛋白条带编号: 存在于条带 3、5、6 和 7 中						
牛 (gi28603710) 妊娠相关糖蛋白 4						
Mz	电荷	Mr(计算)	起点	终点	评分	肽序列
494.789 7	2	969.5647	323	331	97.72%	VPGQAYILK (SEQ ID NO:19)
523.779 9	2	1027.5127	362	369	99.00%	LYFSVFDR (SEQ ID NO:20)
544.765 7	2	1069.5193	127	136	98.95%	TFSITYGSGR (SEQ ID NO:21)
608.826 2	2	1197.6216	232	241	94.10%	GELNWIPLMK (SEQ ID NO:22)
671.695 3	3	1994.0513	195	212	99.00%	LKNEGAISEPVFAFYLSK (SEQ ID NO:23)
820.457 4	3	2440.2678	172	194	87.95%	FDGVLGLSYTNISPSGAIPFIYK (SEQ ID NO:24)

[0137]

蛋白条带编号: 存在于条带 1、2、4 和 5 中						
牛 (gi28603714) 妊娠相关糖蛋白 6						
Mz	电荷	Mr(计算)	起点	终点	评分	肽序列
886.4235	2	1752.8722	196	211	88.08%	NEGAISEPVFAFYLSK (SEQ ID NO:25)
881.9394	2	1743.8865	147	162	95.46%	IGDLVSTDQPFGCLCLK (SEQ ID NO:26)
809.7131	3	2408.1736	231	250	91.77%	GELNWWPLIQVGDWVHMDR (SEQ ID NO:27)
671.6718	3	1994.0513	194	211	97.94%	LKNEGAISEPVFAFYLSK (SEQ ID NO:28)
615.3026	2	1210.6022	183	193	98.74%	TFSGAFPIFDK (SEQ ID NO:29)
592.9321	3	1757.8154	212	227	99.00%	DKQEGSVVMFGGVDHR (SEQ ID NO:30)
511.9066	3	1514.6936	214	227	90.49%	QEGSVVMFGGVDHR (SEQ ID NO:31)
467.2242	2	914.4286	362	368	91.26%	YFSVFDR (SEQ ID NO:32)

[0138]

蛋白条带编号: 存在于条带 2 和 5 中						
牛 (gi28603720) 妊娠相关糖蛋白 9						
Mz	电荷	Mr(计算)	起点	终点	评分	肽序列
467.2146	2	914.4286	362	368	99.00%	YFSVFDR (SEQ ID NO:33)
521.2636	2	1022.5185	138	146	99.00%	GFLAYDTVR (SEQ ID NO:34)
653.9534	3	1940.8727	214	230	96.15%	QEGSVVMFGGVDHQYYK (SEQ ID NO:35)
654.80054	2	1289.5962	126	137	97.70%	TFTITYGSGSMK (SEQ ID NO:36)
660.8375	2	1301.6768	350	360	94.72%	ETWILGDAFLR (SEQ ID NO:37)
734.6413	3	2183.0105	212	230	87.19%	NKQEGSVVMFGGVDHQYYK (SEQ ID NO:38)
739.9147	2	1459.8439	307	319	99.00%	YLPSITFIINGIK (SEQ ID NO:39)
817.7423	3	2432.2222	147	169	99.00%	IGDLVSTDQPFGLSVVEYGLEGR (SEQ ID NO:40)
875.3999	3	2605.2012	256	280	83.62%	TVIACSDGCEALVHTGTSHIEGPGR (SEQ ID NO:41)

[0139]

蛋白条带编号: 存在于条带 1 和 4 中						
牛 (gi28603736) 妊娠相关糖蛋白 20						
Mz	电荷	Mr(计算)	起点	终点	评分	肽序列
671.6718	3	1994.0513	195	212	97.94%	LKNEGAISEPVFAFYLSK (SEQ ID NO:42)
758.8157	2	1497.7511	215	228	80.98%	QKGSVVMFGGVDHR (SEQ ID NO:43)
886.4235	2	1752.8722	197	212	88.08%	NEGAISEPVFAFYLSK (SEQ ID NO:44)

[0140]

蛋白条带编号: 存在于条带 3、5 和 7 中						
牛 (gi28603738) 妊娠相关糖蛋白 21						
Mz	电荷	Mr(计算)	起点	终点	评分	肽序列
516.7575	2	1013.497	362	369	99.00%	VYFSVFDR (SEQ ID NO:45)
544.7657	2	1069.5193	127	136	98.95%	TFSITYGSGR (SEQ ID NO:46)
694.3238	3	2061.9712	258	277	98.47%	VVACSDGCEAVVDTGTSLIK (SEQ ID NO:47)
753.6964	3	2240.1	148	168	99.00%	IGDLVSTDQPFGLSVSEYGFK (SEQ ID NO:48)
892.1082	3	2655.2744	171	194	99.00%	AYDGILGLNYPDESFSSEAIPIFDK (SEQ ID NO:49)
915.4483	2	1810.8889	346	361	81.37%	FSSSTETWLLGDAFLR (SEQ ID NO:50)

[0141] 该分析显示, 3 个蛋白条带中的每一个都具有一种以上的 PAG (表 1)。67kD 的条带含有对应于 boPAG6 和 boPAG20 的肽。55kD 的蛋白条带含有属于 boPAG6 和 boPAG9 的肽。50kD 的蛋白条带对应于 boPAG4 和 boPAG21, 以及作为次要成分的 boPAG9。这些结果表明, 2D9 单克隆抗体结合 boPAG4、boPAG6、boPAG9、boPAG20 和 boPAG21。该单克隆抗体结合所有 5 种 PAG 共有的表位。序列比较显示这些 PAG 之间具有高度的序列同一性。

[0142] 使用结合 2D9 的 PAG 作为标准获得的 PAG ELISA 结果 (图 5) 用于使用 SoftMax™ 计算 Kd 值。2D9 的 Kd 值确定为 0.9nM (图 5)。因此, 2D9 是 PAG 的高亲和力单克隆抗体。这些结果表明, PAG 单克隆抗体 2D9 结合来自第 55 天胎盘组织提取物的 boPAG4、boPAG6、

boPAG9、boPAG20 和 boPAG21。通过 LC-MS-MS 获得的肽序列的身份符合以前表征的这 5 种 PAG 的序列 (boPAG4、boPAG6、boPAG9、boPAG20 和 boPAG21)。

[0143] 实施例 2

[0144] 蛋白质和 mRNA 测序

[0145] 纯化的 2D9 的蛋白质测序。对 2D9 进行测序以确定 2D9 的 PAG- 抗原结合序列。2D9 的测序利用蛋白质和 DNA 测序方法实现。首先,通过变性凝胶电泳分离 2D9 抗体的重链和轻链。切下凝胶条带,并且分开进行胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶消化。分离得到的肽,并且通过 LC-MS-MS (液相色谱-质谱-质谱) 法测序。选择在质量和序列分析中置信得分 > 90% 的肽。利用得到的肽序列装配大约 80% 的轻链序列和大约 50% 的重链序列。

[0146] 2D9 重链和轻链 mRNA 的测序。在第二种方法中,使用从 2D9PAG 杂交瘤细胞制备的总 RNA,通过使用反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 技术,将对应于 2D9 重链和轻链的 mRNA 进行测序。

[0147] 简要地说,产生 PAG 单克隆抗体的杂交瘤细胞在无血清组织培养基中生长,以产生 1×10^6 个细胞。离心细胞,将得到的细胞沉淀物在液氮中急冻。细胞沉淀物贮存在 -80°C 直到使用。使用购自 Ambion, Inc., Austin, TX 的细胞-cDNA 试剂盒 II 产生第一链互补 DNA (cDNA)。将杂交瘤细胞中的 RNA 进行反转录,以产生 cDNA,而不需单独的 RNA 提取步骤。使用一组为扩增小鼠重链和轻链所有亚类而设计的引物,利用聚合酶链反应 (PCR),用得到的 cDNA 模板扩增轻链和重链 (Chardes 等人, 1999)。分离得到的 PCR 产物。使用 DNA STAR™ 软件包组装序列数据。重复整个研究以确保序列的准确性。PCR 扩增和测序的第二次重复包括额外的引物来提高覆盖率。

[0148] 序列分析显示 2D9 重链来源于小鼠 IgG1 γ 亚类,轻链来源于 κ 型。重链由 448 个氨基酸残基组成,轻链由 219 个氨基酸残基组成。2D9 轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO : 3 所示。2D9 重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO : 4 所示。2D9 轻链的核酸序列如 SEQ ID NO : 5 所示 (图 1)。2D9 重链的核酸序列如 SEQ ID NO : 6 所示 (图 2)。

[0149] 实施例 3

[0150] 基于免疫测定的妊娠试验在牛中的可行性研究

[0151] 进行了大规模研究,以评估第 28 天早孕试验在奶牛繁殖管理中的经济性。研究动物位于两个不同的地点,一个在加利福尼亚州,另一个在威斯康辛州。每个地点有 1,050 只动物。在最初的配种后进行如下所述的基于免疫测定的妊娠试验或标准触诊。将样品连夜运送至实验室。该研究使用对兔抗 PAG 多克隆抗体优化的标准 ELISA。基于试验性研究, PAG ELISA 使用的截值为 1.7ng/ml。在第 28 天采集血样,并运送至实验室进行妊娠试验。通过 PAG ELISA 完成妊娠诊断,产生结果报告,并且农场人员在 24 小时内可以获得。早期再同步 (resynch) 组基于 PAG 试验的妊娠诊断结果进行繁殖决定。晚期再同步组 (对照) 的繁殖决定基于第 35-45 天的触诊进行。两个地点的结果在图 6-8 中示出。

[0152] 图 6 显示与基于超声的妊娠诊断相比,使用 PAG ELISA 的基于实验室的妊娠诊断的准确性。图 6 显示在两个研究地点,威斯康辛州和加利福尼亚州,与基于第 28 天超声的妊娠诊断相比,使用基于实验室的 ELISA 的第 28 天妊娠诊断的准确性。在这一 β 研究中检查了第 28 天妊娠试验在奶牛繁殖管理中的经济性。使用多克隆抗体的基于实验室的 PAG ELISA 用于妊娠诊断。威斯康辛州地点使用严格同步化繁殖,而加利福尼亚州地点使用同步

化繁殖加上发情繁殖。每个地点的研究使用大约 1000 头牛。在第 28 天采集血样,运送至实验室进行妊娠检测。结果在 24 小时内返回农场以便能够作出繁殖决定。在第 28 天采血时也通过超声确定妊娠状态。

[0153] 图 7 和图 8 显示在两个不同的繁殖方案中,用于确定早孕检测在奶牛繁殖管理中的经济性的繁殖参数的结果。结果清楚地显示,与对照相比,在早期同步组中未孕期显著减少 10-15 天。另外,在两个地点都观察到授精之间的天数的减少。

[0154] 这些结果表明,授精 27-30 天后使用 PAG ELISA 的早孕试验比触诊允许更早的繁殖。早孕试验显著减少了母牛再繁殖中的“未孕期”。另外,早孕试验显著减少了授精之间的天数。使用早孕试验的发情繁殖策略显示减少了每次妊娠的授精次数。

[0155] 实施例 4

[0156] 现场 (On-Farm) 试验概念:牛妊娠试验(试纸)

[0157] 进行进一步的研究以评估在开发使用试纸的“现场”妊娠试验中使用 2D9 的可行性。试纸使用侧流技术,该技术与家庭妊娠试验中使用的技术相同。侧流试纸在样品施加末端具有胶体金偶联的抗体,并且在试纸中部具有作为测试线放置的捕获抗体。如果样品中存在测试抗原(PAG),则金偶联的抗体将结合抗原,产生的复合物向测试线迁移。在测试线处,捕获抗体(也针对 PAG)将结合该复合物并且在该线处浓缩。当测试线处有足够的复合物作为抗体夹心体时,由于胶体金标记的抗体与测试抗原结合,将出现可见的紫色线。生产并测试了具有 40 种以上的抗体组合(包括 2D9 作为捕获抗体)的侧流试纸。测试的侧流试纸组合没有一种产生可接受的灵敏性和特异性。结果,评估了用于开发“现场”试验的其它快速诊断试验形式。在评估的形式中,具有内部肋片的塑料管显示有希望的结果。因此,选择这种试管形式作为显色试验进一步优化。

[0158] 实施例 5

[0159] 现场试验概念:牛妊娠试验(多孔板)

[0160] 在进一步的研究中,使用第 28 天从证实怀孕的母牛采集的血浆样品确定显色试验的灵敏性和特异性。颜色强度如下确定:将样品溶液转移到 2D9 包被的多孔板。在读板器(SpectraMax, Molecular Devices, Inc., CA)中读板。血浆组由 20 个怀孕的 20 个未孕的样品组成。每个样品测定两次。基于从 40 个样品获得的颜色强度的光密度,通过使用 0.20D 单位截值作为背景颜色,该试验显示 100%的灵敏性和 100%的特异性(图 9)。

[0161] 实施例 6

[0162] 现场试验概念:牛妊娠显色试验(塑料管)

[0163] 材料与方法。下列方案描述了使用 2D9 包被的塑料管的妊娠试验的优化程序。可以对使用 K3EDTA 采血管采集的全血样品或对血浆样品进行该试验。

[0164] 材料。具有内部肋片的试管(#214-2131-010)购自 Evergreen Scientific Company, Los Angeles, California。PAG 单克隆抗体 2D9 和兔多克隆抗体通过蛋白 G 亲和色谱法纯化。兔多克隆抗体的生物素标记使用 Roche 生物素标记试剂盒(#1-418-165, Roche Applied Science, Indianapolis, Indiana)按照厂商说明进行。链霉亲和素 - **PolyHRP20®** (#RDI-PHRP20-SA) 购自 Research Diagnostics, Inc, Concord, MA。Sure Blue **Reserve®** (#53-00-03) 购自 KPL, Inc, Gaithersburg, MD。含有 **TWEEN20®** 的 SuperBlock(#37516) 从 Pierce Biotech, Rockford, IL 获得。在磷酸

盐缓冲液 (pH7.4) 中具有已知浓度的纯化的 2D9 单克隆抗体 ; 包被缓冲液 : 0.1M Na_2CO_3 , pH 9.3 ; 洗涤缓冲液 : 含有 0.05% Tween20 的 1xPBS ; 稀释缓冲液 : 在洗涤缓冲液中的 10% SuperBlock™。

[0165] 多克隆抗体的生物素标记。纯化的兔多克隆抗体 (1mg) 用于按照试剂盒生产商 (Roche) 推荐的程序进行生物素标记。简言之, 将 7.6 μl 于 DMSO 中的活化的生物素试剂加至 1.5ml 试管中含有 1mg 抗体的 1.0ml PBS 溶液中。将试管置于 45rpm 的旋转摇床上, 室温 2 小时。该步骤后, 将内容物转移到透析 slide-A-lyzer™ (Pierce Biotech, #63380), 并于 4°C 对 1xPBS 透析 16 小时, 更换 2 次缓冲液。从 Slide-A-lyzer 回收生物素标记的 IgG, 并作为用含 1% BSA 的 PBS1 : 100 稀释的贮存液贮存。该溶液在使用前用稀释缓冲液 1 : 2000 稀释, 用于妊娠试验。

[0166] 试管的抗体包被。纯化的单克隆抗体 2D9 在 0.1M 碳酸钠缓冲液 (pH 9.3) 中稀释至浓度为 1.25 $\mu\text{g/ml}$, 用于包被试管。试管用 0.4ml 碳酸钠缓冲液中的 0.5 μg 抗体 4°C 包被 16–18 小时。对于温育, 试管置于具有紧密闭合的气密盖子加用于湿润的湿纸中的塑料容器内部, 并保持于 4°C。温育后, 除去抗体溶液, 用洗涤缓冲液洗涤试管两次。然后用 0.4ml superbloc-TWEEN20 于 37°C 封闭试管 1 小时。温育后, 除去 superbloc, 并将试管置于干燥室中室温干燥 2 小时。该步骤后, 密封试管, 并在不含湿气的塑料容器中 4°C 贮存直到使用。包被的试管在 6 个月内可用, 具有最小的试验性能损失。

[0167] 样品采集。使用 OvSynch 同步方案使母牛达到同步发情。每个同步配种使用大约 200 头母牛。总共 815 头母牛通过人工授精 (AI) 配种, AI 日为第 0 天。将第 26 天和第 28 天的 800 头母牛的血样采集到含有抗凝剂 K3EDTA (BD#366643) 的试管中, 并通过连夜运输在冰上运送到实验室。血样在收到后直接用于显色试验。在大约第 29 天通过超声检查母牛的妊娠状态, 并在大约第 60 天通过直肠触诊再次证实。在该研究结束时可以获得 797 头母牛的妊娠诊断数据, 并用于分析试验的准确性。

[0168] 显色试验程序 :

[0169] 通过颠倒最多 10 次混合血样, 以便于样品转移。将 400 微升 (0.4ml) 血液转移到每个管中, 将试管在 37°C 水浴中温育 15 分钟。温育后, 吸出血样, 向试管中填充洗涤缓冲液 (含有 0.05% Tween20 的 1xPBS)。吸出洗涤缓冲液, 并用洗涤缓冲液再洗涤试管两次。第三次洗涤后, 向每管中加入 0.4ml 用稀释缓冲液 (含有 10% SuperblockT20™ 的洗涤缓冲液) 1 : 2000 稀释的生物素标记的抗 PAG 多克隆抗体, 并在 37°C 水浴中温育 15 分钟。温育后, 吸出试管的内容物, 并用洗涤缓冲液洗涤两次。然后, 向每管中加入含有 0.4ml 链霉亲和素 -PolyHRP20 (1 : 30,000) 的稀释缓冲液, 并在 37°C 水浴中温育 15 分钟。第三次温育后, 吸出每管的内容物, 并用洗涤缓冲液洗涤试管两次。然后, 加入 0.4ml HRP 底物, SureBlueReserve™, 并在室温下温育 15 分钟。温育后, 在接收来自怀孕母牛的样品的试管中观察到深蓝色 (图 10)。接收来自未孕动物的样品的试管保持无色 (图 10)。可以目视观察颜色以推断妊娠状态。但是, 为了在实验室中对颜色进行定量, 向每管中加入等体积的 (0.4ml) 终止溶液 (1N HCl), 使蓝色变为黄色。然后将每一样品的一等份 (0.2ml) 转移到 ELISA 板上, 在 430nm 记录光密度。大于或等于 0.2 的 OD 值被认为是“怀孕的”, 而低于 0.2 的值被认为是“未孕的”。颜色强度截值 0.2OD 是以前使用用于妊娠诊断的血浆测试组样品确定的。

[0170] 以下是试管试验程序步骤的概述：

[0171] 1. 加入 400 μ l 样品, 37°C 15 分钟

[0172] 2. 血液洗涤 3 次, 血浆洗涤 2 次

[0173] 3. 加入 400 μ l 生物素标记, 37°C 15 分钟

[0174] 4. 洗涤 2 次

[0175] 5. 加入 400 μ l Poly-HRP20, 37°C 15 分钟

[0176] 6. 洗涤 2 次

[0177] 7. 加入 400 μ l SureBlue Reserve™

[0178] 8. 读数—5min-15min(蓝色=怀孕;无色=未孕)

[0179] 测试分析参数的定义：

[0180] 灵敏性：血液试验确定怀孕母牛已怀孕的能力

[0181] 特异性：血液试验确定未孕母牛未怀孕的能力

[0182] 显色试验的优点：试验用品包括用于采血的紫色帽采血管 (3.0ml, 含 K₂EDTA)、预包被的试管、试剂、洗瓶和移液管。需要 37°C 孵箱 / 加热水池 (waterback) / 加热部件。与平板 ELISA 不同, 该试验不需要离心机来分离血浆, 因为全血可以直接用于该试验。该试验也不需要如平板振荡器的装置、洗涤装置 (洗板器) 或读数装置 (读板器)。洗涤可以用洗瓶实现, 移液管用于除去洗涤之间的洗涤缓冲液。颜色可以目视观察。但是, 在实验室中, 在显色试验结束时 (第 8 步后), 向所有管中加入 0.4ml 终止溶液 1N HCl, 并将一等份 (0.2ml) 转移到 ELISA 板中, 用读板器记录颜色强度。与常规平板 ELISA (4 小时) 相比, 总分析时间大约为 2 小时。该颜色分析可以任选地是多路分析, 如使用 96 孔、48 孔或 24 孔板。

[0183] 结果。使用第 28 天血浆测试组 (20 个未孕和 20 个怀孕样品) 的显色试验的结果在图 11A 中示出, 使用第 55 天血浆测试组 (20 个未孕和 20 个怀孕样品) 的试验结果在图 11B 中示出。所有未孕样品的颜色强度值均 $\leq 0.20D$, 而怀孕样品显示颜色强度 $> 0.20D$ 。

[0184] 通过使用该截值, 两个测试组 (图 11A 和 11B) 显示 $> 95\%$ 的灵敏性和特异性。也用该系统测试了一组新鲜血浆样品, 显示能够清楚地区分未孕母牛和怀孕母牛 (图 12)。

[0185] 实施例 7

[0186] 现场试验概念：牛妊娠显色试验 (塑料管)

[0187] 该试验如上所述在现场进行, 使用 37°C 水浴, 不使用额外的设备。在该现场试验中, 检测了 58 个血样。使用 0.4ml 血样进行了显色试验 (图 13), 并通过超声进行妊娠的确认 (图 14)。由 3 人观察颜色, 试验结果的目视评分没有不一致。显色试验能够鉴别所有 14 头怀孕母牛。所有 3 人将 2 个样品评为“不确定”, 因为其有蓝色背景, 发现该样品为“未孕的”。与超声相比, 该现场试验显示 100% 的灵敏性和 92.5% 的特异性 (37/40)。

[0188] 实施例 8

[0189] 基于夹心免疫测定的妊娠显色试验 (塑料管)

[0190] 材料与方法。使用 PAG 单克隆抗体 2D9 作为捕获抗体和使用生物素标记的兔多克隆抗体作为第二抗体发展了基于夹心免疫测定的试验。PAG 单克隆抗体包被在透明塑料管或孔的内部, 并作为陷阱。使用的试管是内部具有肋片的试管, 以提高抗体包被的表面积 (Evergreen Scientific, Los Angeles, CA)。使用链霉亲和素-HRP (辣根过氧化物酶)/HRP

底物系统检测复合物。链霉亲和素 Poly-HRP20 获自 Research Diagnostics Inc., Concord, MA, 辣根过氧化物酶获自 KPL, Inc., Gaithersburg, MD。试管或孔中的颜色（蓝色或黄色）显示检测到复合物,表明样品中存在 PAG。关于建立用于检测怀孕母牛和小母牛血清中 PAG 的 ELISA 的信息可见 Green 等人, 2005。分析标准是 0.5ng 至 6.0ng。该试验需要大约 4 小时完成。

[0191] 该试验可以使用农场或类似地点的简单的实验室用品进行。在该实施例中, 37℃ 孵箱和移液器是除试剂以外仅需的物品。显色试验概念可以与 Ovsynch、再同步和定时人工授精 (Ovsynch, Resynch and Timed Artificial Insemination, TAI) 结合作为牛繁殖管理工具的一部分。该试验概念也可以扩展到其它分析物, 如孕酮和其它妊娠抗原, 以提高诊断的准确度或促进第 26 天前妊娠的检测。多路分析可以使用例如 96 孔或 48 孔盘或或使用多个试管来进行。

[0192] 表 2. 分析试剂、用品和供应商信息

[0193]

项目	分析试剂 / 用品	目的	供应商信息
1	2D9 单克隆抗体	包被抗体	
2	兔多克隆抗体	生物素标记的第二抗体	
3	链霉素和素 - 聚辣根过氧化物酶 (HRP) 20	信号扩增	Research Diagnostics Inc., Concord, MA
4	Sure Blue Reserve™	HRP 的显色底物	KPL Inc, Gaithersburg, MD
5	Super Block	用于封闭缓冲液、洗涤缓冲液和稀释 缓冲液中	Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL
6	内部具有肋片的试管, 12X75mm 试管, 聚苯乙烯, 具有 6 个底部肋片	用于试验的试管	Evergreen Scientific, Los Angeles, CA
7	磷酸盐缓冲液	用于生物素 - IgG、HRP 试剂的包被、 封闭、洗涤和稀释的缓冲介质	Roche

8	生物素标记试剂盒 (5 个反应) 和透析试剂盒, Slide-A-Lyzer™	制备生物素标记的 IgG	Roche
9	Tween 20	用于生物素 -IgG、HRP 试剂的包被、封闭、洗涤和稀释的缓冲液中使用的去污剂, 0.05% 浓度	Sigma Aldrich, St. Louis, MO.
10	碳酸钠	抗体包被缓冲液	Sigma Aldrich, St. Louis, MO.

[0194] 结果. 通过与第 29 天超声和第 60 天直肠触诊的结果相比较,对从第 26 天和第 28 天动物采集的 797 个血液样品的妊娠试验的灵敏性和特异性进行了评估。获得血浆样品。妊娠诊断的截值为 0.20D 单位。表 3 显示与第 29 天的基于超声的妊娠诊断和第 60 天的直肠触诊相比,血液检验的准确度。

[0195] 表 3. 与第 29 天超声 (US) 和第 60 天直肠触诊相比,血液检验准确度的分析

[0196]

血液检验日	第26天		第28天	
测试的牛的数目	357	357	797	797
妊娠验证	第29天超声	第60天触诊	第29天超声	第60天触诊
灵敏性	97.4%	97.5%	99.3%	99.3%
特异性	90.1%	91.2%	90.9%	91.2%

[0197] 这些结果表明,用 PAG 单克隆抗体 2D9 发展的牛妊娠试验具有商业上可接受的准确度,以及低假阴性结果。该抗体可以用于开发用来早在配种后第 26 天高灵敏性和特异性地检测牛妊娠状态的快速试验形式。进一步的分析显示,通过将截值调整为 0.350D 单位,测试精度可以提高到 99% 的灵敏性和 94% 的特异性。

[0198] 实施例 9

[0199] 适于发展牛妊娠试验的早期 PAG 蛋白亚群的分离

[0200] 组织采集。授精后 50-60 天从早孕的牛中采集胎绒毛叶组织。妊娠 50-60 天是怀孕的优选时期,因为在这一妊娠阶段或前后,早期 PAG 蛋白亚群占总 PAG 蛋白的高百分比。但是尽管在授精后 50-60 天或前后,希望的早期 PAG 蛋白的百分比较高,但是总蛋白质和可获得的组织的量较少。在授精后 61-250 天或前后,总 PAG 蛋白和胎绒毛叶和肉阜组织的量高的多。

[0201] 可以用于鉴定结合 2D9 的蛋白质以及对 PAG 的 2D9 结合位点作图的方法。有四种方法可用于鉴定结合 2D9 的蛋白质、对 2D9 抗体进行表征和测序,以及对 PAG 的 2D9 结合位点作图。进行以下研究:

[0202] 1. 用 2D9 包被的磁珠免疫沉淀 PAG(从第 55 天胎盘获得的)。根据厂商说明(Dynal),将纯化的 2D9 偶联至甲苯磺酰基活化的 Dynal 磁珠上。抗体包被的磁珠与 100 微克富含 PAG 的制品在 1x PBS 中温育 30 分钟,并用相同的缓冲液充分洗涤。结合的蛋白质使用 pH 3.0 乙酸洗脱,并进行凝胶和 Western 印迹分析。Western 印迹用兔抗 -PAG 多克隆抗体显示。从 SDS-PAGE 上切下免疫反应性蛋白条带,并在胰蛋白酶消化后进行 LC-MS-MS 分析。

[0203] 以下方法是可以进行的替代免疫沉淀法:

[0204] 2. 用 2D9 包被的磁珠免疫沉淀 PAG(从第 61-250 天胎盘获得的)。根据厂商说明(Dynal),将纯化的 2D9 偶联至甲苯磺酰基活化的 Dynal 磁珠上。抗体包被的磁珠与 100 微克 PAG 制品在 1x PBS 中温育 30 分钟,并用相同的缓冲液充分洗涤。结合的蛋白质使用 pH 3.0 乙酸洗脱,并进行凝胶和 Western 印迹分析。Western 印迹可以用兔抗 -PAG 多克隆抗体显示。然后从 SDS-PAGE 上切下免疫反应性蛋白条带,并在胰蛋白酶消化后进行 LC-MS-MS 分析。早期 PAG 蛋白亚群(特别是 PAG 4、6、9、20 和 21)的高度纯化的制品可以利用该程序纯化。

[0205] 进行以下研究:

[0206] 3. 由牛妊娠第 55 天的肉阜(子宫内膜)和绒毛叶(胎盘)组织制备的组织提取

物的免疫亲和色谱。简要地说,根据厂商说明(Sigma, St. Louis),将纯化的 2D9(10mg)偶联至 1 克 CNBr 活化的 sepharose 上。2D9-亲和树脂(大约 5.0ml)与 pH 7.0 的 25ml 组织提取物温育过夜,进行结合。次日,将树脂装柱,并用 1x PBS 洗涤,以除去未结合的材料,并用 pH 3.0 乙酸洗脱。洗脱的材料 pH 在洗脱后立即用 1M Tris 中和至 pH 7.0。对洗脱的材料进行凝胶和 Western 印迹分析。Western 印迹用兔抗 -PAG 多克隆抗体显示。从 SDS-PAGE 上切下蛋白条带 1-7,并在胰蛋白酶消化后进行 LC-MS-MS 分析。利用 BLAST 分析确定肽序列的身份。

[0207] 以下是可以进行的替代色谱方法:

[0208] 4. 由牛妊娠第 61-250 天的肉阜(子宫内膜)和绒毛叶(胎盘)组织制备的组织提取物的免疫亲和色谱。简要地说,根据厂商说明(Sigma, St. Louis),将纯化的 2D9(10mg)偶联至 1 克 CNBr 活化的 sepharose 上。2D9-亲和树脂(大约 5.0ml)与 pH 7.0 的 25ml 组织提取物温育过夜,进行结合。次日,将树脂装柱,并用 1x PBS 洗涤,以除去未结合的材料,并用 pH 3.0 乙酸洗脱。洗脱的材料 pH 在洗脱后立即用 1M Tris 中和至 pH 7.0。洗脱的材料可以进行凝胶和 Western 印迹分析。Western 印迹可以用兔抗 -PAG 多克隆抗体显示。从 SDS-PAGE 上切下蛋白条带 1-7,并在胰蛋白酶消化后进行 LC-MS-MS 分析。然后可以利用 BLAST 分析确定肽序列的身份。早期 PAG 蛋白亚群(特别是 PAG 4、6、9、20 和 21)的高度纯化的制品可以利用该程序纯化。

[0209] 实施例 10

[0210] 另外的结合 2D9 的 PAG 的鉴定

[0211] 如实施例 1 所总结的,发现 MAbs 2D9 可识别五种 PAG 同工型(4、6、9、20 和 21)。通过对从配种后 55 天收集的胎盘组织获得的纯化 PAG 样品进行 LC/MS/MS 肽测序,鉴定这些同工型。MAbs 2D9 进一步用于 PAG 的纯化和鉴定,包括将抗体偶联至 CNBr 活化的树脂,以产生免疫亲和柱。纯化样品中存在的 PAG 可以被 2D9 结合(识别)。以类似的方式,在 PAG ELISA 中,牛全血或血浆样品中存在的 PAG 可以被 2D9 结合并且引发指示怀孕的阳性 ELISA 反应。免疫纯化过程中纯化 PAG 的洗脱进行如下改变:将 pH 从 3.0 调整为 2.5,并在洗脱液收集过程中立即中和至 pH 7.0。使用纯化的样品,通过 SDS-PAGE 显示纯化的 PAG,基本如上所述进行(例如实施例 1)。发现类似的条带图案,具有三个介于 50 和 75kDa 之间的主要条带。

[0212] 除了配种后 55 天从牛收集的胎盘组织以外,也从配种后 215 天的牛胎盘组织纯化了 PAG。PAG 蛋白质家族的某些成员(同工型)比其它成员在妊娠过程中早期表达。这组在妊娠过程中较早表达的 PAG 通常被称为早期 PAG,而那组在妊娠过程中较晚表达的 PAG 通常被称为晚期 PAG。来自配种后 55 天的胎盘组织代表表达早期 PAG 的妊娠期,而来自配种后 215 天的胎盘组织代表包括晚期 PAG 表达的妊娠期。通过 SDS-PAGE 显示来自第 55 天和第 215 天胎盘组织的纯化 PAG,显示了相同的位于 50 和 75kDa 之间的三条带,但是第 215 天胎盘组织的较高分子量条带的比例(强度)较大。

[0213] 使用 2D9 免疫亲和柱纯化来自第 55 天和第 215 天胎盘组织的 PAG 样品的肽,并通过 LC/MS/MS 肽测序进行分析,以鉴定样品中存在的 PAG 同工型。将肽序列与从 UniProt 数据库(www.uniprot.org)获得的 PAG 同工型序列(如表 4 中列出的)进行比较。表 5 显示肽序列结果的概况和它们通过 BLAST 分析被鉴定为对应于 boPAG-16、boPAG-17 和 boPAG-19

序列的 PAG。表 5 中提到的“泳道”和“条带”(下、中)在图 17 中显示。在纯化 PAG 样品中表征的 PAG 同工型的概况在表 6 中示出。

[0214] 表 4. 具有 UniProt 登录号的 PAG 同工型 (SEQ ID NO :51-62)。

[0215]

PAG 同工型	登录号
1	Q29432
4	O46492
6	O46494, A5PJW4
9	O46497, A4FV16
16	Q9TTV8
17	Q9TTV7, A7MBA4
19	Q9TTV5
20	Q9TTV4
21	Q9TTV3

[0216] 表 5. 肽序列结果概况 (包括 SEQ ID NO :63-74)。“MH+”=肽的质荷比,加水;“电荷”=离子电荷状态;“P(pep)”=肽序列的概率;“起点”=与肽比对的蛋白质的起始氨基酸;“终点”=与肽比对的蛋白质的终止氨基酸

[0217]

蛋白条带编号: 存在于条带泳道 2 (下)、泳道 3 (中)、泳道 6 (中)、泳道 7 (中和下)					
牛 (gi75074836) 妊娠相关糖蛋白 16					
MH+	电荷	起点	终点	P(pep)	肽序列
1389.65796	2	215	229	2.54E-05	REGSVVMFGGVDHRY (SEQ ID NO:63)
1046.53052	2	361	370	6.28E-04	RLYFSVFDRG (SEQ ID NO:64)
1770.90613	2	197	212	7.51E-06	NQGAISDPIFAFYLSK (SEQ ID NO:65)

[0218]

蛋白条带编号: 存在于条带泳道 2 (下)、泳道 3 (下)、泳道 4 (下)、泳道 5 (下)、泳道 6 (下)、泳道 7 (下)					
牛 (gi75074835) 妊娠相关糖蛋白 17					
MH+	电荷	起点	终点	P(pep)	肽序列
1389.65796	2	215	229	2.54E-05	REGSVVMFGGVDHRY (SEQ ID NO:66)
1035.58337	2	138	148	1.69E-05	KGLLVYDTVRI (SEQ ID NO:67)
1046.53052	2	361	370	6.28E-04	RLYFSVFDRG (SEQ ID NO:68)
1771.89014	2	196	213	7.53E-07	KNEGAISEPVFAFYLSKD (SEQ ID NO:69)

[0219]

蛋白条带编号: 存在于条带泳道 3 (中)、泳道 4 (中)、泳道 5 (中)、泳道 6 (中)					
牛 (gi75051662) 妊娠相关糖蛋白 19					
MH+	电荷	起点	终点	P(pep)	肽序列
1760.83850	3	212	229	1.00E-06	KDKQEGSVVMFGGVDHRY (SEQ ID NO:70)
1088.53711	2	126	137	4.36E-06	KTFSITYGSGRI (SEQ ID NO:71)
2243.06616	3	213	231	1.32E-03	DKQEGSVVMFGGVDHRYR (SEQ ID NO:72)
1046.53052	2	361	370	9.55E-04	RLYFSVFDRG (SEQ ID NO:73)
1770.90613	2	196	213	6.03E-09	KNQGAISEPVFAFYLSKD (SEQ ID NO:74)

[0220] 表 6. 在第 55 天和第 215 天胎盘组织中表征的 PAG 同工型

[0221]

第 55 天组织型	PAG 同工型	第 215 天组织型	PAG 同工型
肉阜	4,6,9,16,17,21	肉阜	4,6,9,17,19,21
绒毛叶	4,6,9,16,17,19,21	绒毛叶	4,6,9,16,17,19,21
肉阜 / 绒毛叶	4,6,9,17,19	肉阜 / 绒毛叶	4,6,9,16,17,21

[0222] 表 4 所示的多肽序列使用例如来自 PHYLIP 软件包 (Felsenstein,1989) 的 PROTDIST v. 3. 5c 进行比对。对比对的序列应用 PROTDIST 的相邻系统发生树分析包,以产生如图 15 所示的树。PAG 的比对显示在图 16 中。对 PAG 同工型 1、4、6、9、16、17、19、20 和 21 进行这种分析,以基于它们的相似性和差异区显示同工型的相关性。根据该分析,除 PAG 1 以外, PAG 4、6、9、16、17、19、20 和 21 聚类在一起。

[0223] *****

[0224] 根据本申请的公开内容,此处公开和请求保护的所有组合物和方法不需要过多的实验都可以制备和实施。尽管已经通过优选实施方案描述了本发明的组合物和方法,但是本领域技术人员应当明白,可以对此处所述的组合物和方法的步骤或步骤顺序进行改变,而不偏离本发明的概念、精神和范围。更具体而言,应当明白,某些化学和生理学均相关的试剂可以替换此处所述的试剂,而获得相同或相似的结果。本领域技术人员明白的所有这些类似的替代物和改变都被认为处于由所附权利要求书限定的本发明的精神、范围和概念之内。

[0225] 参考文献

[0226] 以下参考文献通过参考具体并入本文,提供用于补充本文所述内容的示例性的程序上的或其它方面的细节:

[0227] 美国专利 3,646,346

[0228] 美国专利 3,817,837

[0229] 美国专利 3,850,752

[0230] 美国专利 3,939,350

[0231] 美国专利 3,996,345

[0232] 美国专利 4,275,149

[0233] 美国专利 4,277,437

[0234] 美国专利 4,366,241

[0235] 美国专利 4,367,110

[0236] 美国专利 4,376,110

[0237] 美国专利 4,452,901

[0238] 美国专利 4,668,621

[0239] 美国专利 4,699,880

[0240] 美国专利 5,721,105

[0241] 美国专利 6,869,770

[0242] 美国专利公布 2003/508381

[0243] 美国专利公布 20050100975

[0244] Abbondanzo 等人, Breast Cancer Res. Treat., 16 :182(151), 1990.

[0245] Allred 等人, Breast Cancer Res. Treat., 16 :182(149), 1990.

[0246] Atkinson 等人, J. Biol. Chem., 268(35) :26679-26685, 1993.

[0247] Ausubel 等人, In:Current Protocols in Molecular Biology, John, Wiley&Sons, Inc, NY, 1994 ;1992.

[0248] Beal 等人, J. Anim. Sci., 70 :924-929, 1992.

[0249] Biocomputing:Informatics and Genome Projects, Smith(Ed.), Academic Press, NY, 1993.

[0250] Boulianne 等人, Nature, 312 :643-646, 1984.

[0251] Brown 等人, Breast Cancer Res. Treat., 16 :192(#191), 1990.

[0252] Butler 等人, Biol. Reprod., 26 :925-933, 1982.

- [0253] Cabilly 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91 :3273-3277, 1984.
- [0254] Cameron 和 Malmo, Austr. Vet. J., 70 :109-111, 1993.
- [0255] Capaldi 等人, Biochem. Biophys. Res. Comm., 76 :425, 1977.
- [0256] Chardes 等人, FEBS Lett., 452(3) :386-394, 1999.
- [0257] Colligan 等人, In :Current Protocols in Immunology, Greene Publ. Assoc. Wiley Interscien, NY, 1993.
- [0258] Computational Molecular Biology, Lesk(Ed.), Oxford University Press, NY, 1988.
- [0259] Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin and Griffin(Eds.), Humana Press, NJ, 1994.
- [0260] Cumber 等人, J. Immunology, 149B :120-126, 1992.
- [0261] Engvall, Lancet, 2(8000) :1410, 1976.
- [0262] Engvall, Med Biol., 55(4) :193-200, 1977.
- [0263] Engvall, Methods Enzymol, 70(A) :419-39, 1980.
- [0264] Felsenstein, Cladistics 5 :164-166, 1989.
- [0265] Green 等人, Theriogenology, 63(5) :1481-1503, 2005.
- [0266] Green 等人, Biol Reprod 62 :1624-1631, 2000.
- [0267] Green 等人, Biol Reprod 60 :1069-1077, 1999.
- [0268] Gripenberg 等人, Scand J Immunol., 7(2) :151-7, 1978.
- [0269] Guruprasad 等人 Protein Eng 9 :849-856, 1996.
- [0270] Hall, Nucl. Acids. Symp. Ser. 41 :95-98, 1999.
- [0271] Harlow 和 Lane, In :Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, pp 139-281, 1988.
- [0272] Hatzidakis 等人, J. Reprod. Fertil., 98 :235-240, 1993.
- [0273] Higgins 和 Sharp CABIOS. 5 :151-153(1989
- [0274] Holdsworth 等人, J. Endocrin., 95 :7-12, 1982.
- [0275] Hughes 等人, Mol Biol Evol. 20 :1940-1945, 2003.
- [0276] Humblot 等人, Theriogenol., 30 :257-268, 1988.
- [0277] Kiracofe 等人, J. Anim. Sci., 71 :2199-2205, 1993.
- [0278] Kohler 和 Milstein, Nature, 256 :495-497, 1975.
- [0279] Leibiger 等人, Biochem J., 338 :529-538, 1999.
- [0280] Liu 等人 Cell Mol. Biol., 49(2) :209-216, 2003.
- [0281] Makler 等人, Transfusion, 21(3) :303-312, 1981.
- [0282] Markusfeld 等人, Br. Vet. J., 146 :504-508, 1990.
- [0283] Mialon 等人, Reprod. Nutr. Dev., 33 :269-282, 1993.
- [0284] Mialon 等人, Reprod. Nutr. Dev., 34 :65-72, 1994.
- [0285] Mo 等人, Eur. J. Immunol., 23 :2503-2510, 1993.
- [0286] Nakamura 等人, In :Handbook of Experimental Immunology(4thEd.), Weir 等人(Eds.), 1 :27, Blackwell Scientific Publ., Oxford, 1987.

- [0287] Neuberger 等人, Nature, 314 :268-270, 1985.
- [0288] Oltenacu 等人, J. Dairy Sci. , 73 :2826-2831, 1990.
- [0289] Pack 等人, Biochem. , 31 :1579-1584, 1992.
- [0290] PCT 申请 W0 98/16832
- [0291] Sarngadharan 等人, Princess Takamatsu Symp. , 15 :301-8, 1984.
- [0292] Sasser 等人, Biol. Reprod. , 35 :936-942, 1986.
- [0293] Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje(Ed.), Academic Press, 1987.
- [0294] Sequence Analysis Primer, Gribskov and Devereux(Eds.), Stockton Press, NY, 1991.
- [0295] Szafranska 等人, Biol. Reprod. , 53 :21-28, 1995.
- [0296] Wagner 等人, Science, 260 (5113) :1510-1513, 1993
- [0297] Warnick 等人, Theriogenol. , 44 :811-825, 1995.
- [0298] Xie 等人, Biol. Reprod. , 51 :1145-1153, 1994.
- [0299] Xie 等人, Biol. Reprod. , 54 :122-129, 1996.
- [0300] Xie 等人, Biol. Reprod. , 57 :1384-1393, 1997.
- [0301] Xie 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88 :10247-10251, 1991.
- [0302] Xie 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94 :12809-12816, 1997.
- [0303] Zoli 等人, Biol. Reprod. , 45 :1-10, 1991.
- [0304] Zoli 等人, Biol. Reprod. , 46 :83-92, 1992.

[0001]

序列表

<110> MONSANTO TECHNOLOGY LLC
MATHIALAGAN, NAGAPPAN
ROBERTS, R. MICHAEL
McGRATH, MICHAEL F.
GREEN, JONATHAN

<120> 用于早期妊娠诊断的组合物和方法

<130> MONS:108WO (37-21(54290))

<140> UNKNOWN
<141> 2008-12-12

<150> 61/013,603
<151> 2007-12-13

<160> 74

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工抗体片段轻链肽序列

<400> 1

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Arg Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 2
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工抗体片段重链肽序列

<400> 2

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Ile Phe Ser Asn Tyr

[0002]

	20	25	30
Trp Met Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile	35	40	45
Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Asp Ile Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe	50	55	60
Lys Asp Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Ser Ser Ser Asn Thr Ala Tyr	65	70	80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	85	90	95
Ala Arg Ala Gly Ser Gly Tyr Tyr Gly Val Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp	100	105	110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser	115	120	
<210> 3			
<211> 193			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工抗体片段轻链肽序列			
<400> 3			
Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly	1	5	10
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Arg Gln Ser Ile Val His Ser	20	25	30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser	35	40	45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro	50	55	60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	65	70	80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly	85	90	95
Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys	100	105	110
Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu	115	120	125
Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe	130	135	140
Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg	145	150	155
			160

[0003]

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
 180 185 190

Arg

<210> 4
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工抗体片段重链肽序列

<400> 4

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Ile Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Trp Met Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Asp Ile Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Ser Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ala Gly Ser Gly Tyr Tyr Gly Val Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr
 115 120 125

Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn
 130 135 140

Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro
 145 150 155 160

Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr
 165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val
 195 200 205

Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg

[0004]

210	215	220	
Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser 225 230 235 240			
Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu 245 250 255			
Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro 260 265 270			
Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala 275 280 285			
Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val 290 295 300			
Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe 305 310 315 320			
Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr 325 330 335			
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile 340 345 350			
Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys 355 360 365			
Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp 370 375 380			
Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp 385 390 395 400			
Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser 405 410 415			
Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly 420 425 430			
Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys 435 440 445			
<210> 5			
<211> 695			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 编码2D9抗体片段轻链的核酸序列			
<400> 5			
cggttcctgc ttccagcagt gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca		60	
gtcttggaga tcaagcctcc atttcttgca gatctaggca gagcattgta catagtaatg		120	
gaaacaccta tttagaatgg ttctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct		180	
acaaagtttc caaccgattt tctgggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga		240	

[0005]

```

cagatttcac actcaagatc agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct 300
ttcaaggttc acatgttccg ctacagttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaacggg 360
ctgatgctgc accaactgta tccatcttcc caccatccag tgagcagtta acatctggag 420
gtgcctcagt cgtgtgcttc ttgaacaact tctaccccaa agacatcaat gtcaagtgga 480
agattgatgg cagtgaacga caaatggcg tcctgaacag ttggactgat caggacagca 540
aagacagcac ctacagcatg agcagcacc ctcagttgac caaggacgag tatgaacgac 600
ataacagcta tacctgtgag gccactcaca agacatctac ttcaccatt gtcaagagct 660
tcaacaggaa tgagtgttag agacaaaggt cctga 695

```

<210> 6
 <211> 1429
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 编码2D9抗体片段重链的核酸序列

```

<400> 6
gctacaggtg tccactccca ggttcagctg cagcagctctg gagctgagct gatgaagcct 60
ggggcctcag tgaagatata ctgcaaggct actggctaca tattcagtaa ctactggatg 120
gagtggtgaa agcagaggcc tggacatggc cttgagtggga ttggagagat ttacactgga 180
agtgatatta ctaactacaa tgagaagttc aaggacaagg ccacattcac tgcagattca 240
tcctccaaca cggcctacat gcaactcage agcctgacat ctgaggactc tgccgtctat 300
tactgtgcaa gagctgggag tggttactac ggggtatatt actatgctat ggactactgg 360
ggtaaggaa cctcagtcac cgtctectca gccaaaacga cacccecatc tgctatcca 420
ctggccctg gatctgctgc ccaactaac tccatggtga ccctgggatg cctggtaag 480
ggctatttcc ctgagccagt gacagtgacc tggaaactctg gatccctgtc cagcgggtgtg 540
cacaccttcc cagctgtcct gcagtcgac ctctacactc tgagcagctc agtgactgtc 600
ccctccagca cctggcccag cgagaccgtc acctgcaacg ttgccacccc ggccagcagc 660
accaaggtag acaagaaaat tgtgcccagg gattgtggtt gtaagccttg catatgtaca 720
gtcccagaag tatcatctgt cttcatcttc ccccaaaagc ccaaggatgt gctcaccatt 780
actctgactc ctaaggtcac gtgtgtgtg gtagacatca gcaaggatga tcccagggtc 840
cagttcagct ggittgtaga tgatgtggag gtgcacacag ctgagacgca accccgggag 900
gagcagttca acagcacttt ccgtcagtc agtgaacttc ccatcatgca ccaggactgg 960
ctcaatggca aggagttcaa atgcagggtc aacagtgcag ctttccttgc ccccatcgag 1020
aaaaccatct ccaaaaccaa aggcagaccg aaggtccac aggtgtacac cattccacct 1080
cccaaggagc agatggccaa ggataaagtc agtctgacct gcatgataac agacttcttc 1140
cctgaagaca ttactgtgga gtggcagtg aatgggcagc cagcggagaa ctacaagaac 1200
actcagccca tcatggacac agatggctct tacttcgtct acagcaagct caatgtgcag 1260
aagagcaact gggaggcagg aaatacttcc acctgctctg tgttacatga gggcctgcac 1320
aaccaccata ctgagaagag cctctccac tctcctggta aatgatccca aagtccttgg 1380
agccctctgg tcctacagga ctactgcagg tgtccactcc cctcaaaca 1429

```

<210> 7

[0006]

<211> 16
<212> PRT
<213> 牛

<400> 7

Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Gly Leu Cys Leu Lys
1 5 10 15

<210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> 牛

<400> 8

Thr Phe Ser Gly Ala Phe Pro Ile Phe Asp Lys
1 5 10

<210> 9
<211> 16
<212> PRT
<213> 牛

<400> 9

Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe Tyr Leu Ser Lys
1 5 10 15

<210> 10
<211> 16
<212> PRT
<213> 牛

<400> 10

Asp Lys Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His Arg
1 5 10 15

<210> 11
<211> 22
<212> PRT
<213> 牛

<400> 11

Ala Leu Val Asp Thr Gly Thr Ser Asp Ile Val Gly Pro Ser Thr Leu
1 5 10 15

Val Asn Asn Ile Trp Lys
20

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> 牛

<400> 12

Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg
1 5

<210> 13
<211> 16
<212> PRT
<213> 牛

<400> 13

[0007]

Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Gly Leu Cys Leu Lys
1 5 10 15

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> 牛

<400> 14

Thr Phe Ser Gly Ala Phe Pro Ile Phe Asp Lys
1 5 10

<210> 15
<211> 16
<212> PRT
<213> 牛

<400> 15

Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe Tyr Leu Ser Lys
1 5 10 15

<210> 16
<211> 16
<212> PRT
<213> 牛

<400> 16

Asp Lys Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His Arg
1 5 10 15

<210> 17
<211> 22
<212> PRT
<213> 牛

<400> 17

Ala Leu Val Asp Thr Gly Thr Ser Asp Ile Val Gly Pro Ser Thr Leu
1 5 10 15

Val Asn Asn Ile Trp Lys
20

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> 牛

<400> 18

Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg
1 5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> 牛

<400> 19

Val Pro Gly Gln Ala Tyr Ile Leu Lys
1 5

<210> 20
<211> 8

[0008]

<212> PRT
<213> 牛

<400> 20

Leu Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg
1 5

<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> 牛

<400> 21

Thr Phe Ser Ile Thr Tyr Gly Ser Gly Arg
1 5 10

<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> 牛

<400> 22

Gly Glu Leu Asn Trp Ile Pro Leu Met Lys
1 5 10

<210> 23
<211> 18
<212> PRT
<213> 牛

<400> 23

Leu Lys Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe Tyr Leu
1 5 10 15

Ser Lys

<210> 24
<211> 23
<212> PRT
<213> 牛

<400> 24

Phe Asp Gly Val Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Asn Ile Ser Pro Ser Gly
1 5 10 15

Ala Ile Pro Ile Phe Tyr Lys
20

<210> 25
<211> 16
<212> PRT
<213> 牛

<400> 25

Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe Tyr Leu Ser Lys
1 5 10 15

<210> 26
<211> 16
<212> PRT
<213> 牛

[0009]

<400> 26

Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Gly Leu Cys Leu Lys
1 5 10 15

<210> 27

<211> 20

<212> PRT

<213> 牛

<400> 27

Gly Glu Leu Asn Trp Val Pro Leu Ile Gln Val Gly Asp Trp Phe Val
1 5 10 15

His Met Asp Arg
20

<210> 28

<211> 18

<212> PRT

<213> 牛

<400> 28

Leu Lys Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe Tyr Leu
1 5 10 15

Ser Lys

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> 牛

<400> 29

Thr Phe Ser Gly Ala Phe Pro Ile Phe Asp Lys
1 5 10

<210> 30

<211> 16

<212> PRT

<213> 牛

<400> 30

Asp Lys Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His Arg
1 5 10 15

<210> 31

<211> 14

<212> PRT

<213> 牛

<400> 31

Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His Arg
1 5 10

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> 牛

<400> 32

[0010]

Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg
1 5

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> 牛

<400> 33

Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg
1 5

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> 牛

<400> 34

Gly Phe Leu Ala Tyr Asp Thr Val Arg
1 5

<210> 35
<211> 17
<212> PRT
<213> 牛

<400> 35

Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His Gln Tyr Tyr
1 5 10 15

Lys

<210> 36
<211> 17
<212> PRT
<213> 牛

<400> 36

Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His Gln Tyr Tyr
1 5 10 15

Lys

<210> 37
<211> 11
<212> PRT
<213> 牛

<400> 37

Glu Thr Trp Ile Leu Gly Asp Ala Phe Leu Arg
1 5 10

<210> 38
<211> 19
<212> PRT
<213> 牛

<400> 38

Asn Lys Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His Gln

[0011]

1	5	10	15
---	---	----	----

Tyr Tyr Lys

<210> 39
<211> 13
<212> PRT
<213> 牛

<400> 39

Tyr Leu Pro Ser Ile Thr Phe Ile Ile Asn Gly Ile Lys
1 5 10

<210> 40
<211> 23
<212> PRT
<213> 牛

<400> 40

Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Gly Leu Ser Val Val
1 5 10 15

Glu Tyr Gly Leu Glu Gly Arg
20

<210> 41
<211> 25
<212> PRT
<213> 牛

<400> 41

Thr Val Ile Ala Cys Ser Asp Gly Cys Glu Ala Leu Val His Thr Gly
1 5 10 15

Thr Ser His Ile Glu Gly Pro Gly Arg
20 25

<210> 42
<211> 18
<212> PRT
<213> 牛

<400> 42

Leu Lys Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe Tyr Leu
1 5 10 15

Ser Lys

<210> 43
<211> 14
<212> PRT
<213> 牛

<400> 43

Gln Lys Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His Arg
1 5 10

<210> 44
<211> 16

[0012]

<212> PRT
<213> 牛

<400> 44

Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe Tyr Leu Ser Lys
1 5 10 15

<210> 45
<211> 8
<212> PRT
<213> 牛

<400> 45

Val Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg
1 5

<210> 46
<211> 10
<212> PRT
<213> 牛

<400> 46

Thr Phe Ser Ile Thr Tyr Gly Ser Gly Arg
1 5 10

<210> 47
<211> 20
<212> PRT
<213> 牛

<400> 47

Val Val Ala Cys Ser Asp Gly Cys Glu Ala Val Val Asp Thr Gly Thr
1 5 10 15

Ser Leu Ile Lys
20

<210> 48
<211> 21
<212> PRT
<213> 牛

<400> 48

Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Gly Leu Ser Val Ser
1 5 10 15

Glu Tyr Gly Phe Lys
20

<210> 49
<211> 24
<212> PRT
<213> 牛

<400> 49

Ala Tyr Asp Gly Ile Leu Gly Leu Asn Tyr Pro Asp Glu Ser Phe Ser
1 5 10 15

Glu Ala Ile Pro Ile Phe Asp Lys
20

[0013]

<210> 50
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 牛

 <400> 50
 Phe Ser Ser Ser Thr Glu Thr Trp Leu Leu Gly Asp Ala Phe Leu Arg
 1 5 10 15

 <210> 51
 <211> 380
 <212> PRT
 <213> 牛

 <400> 51
 Met Lys Trp Leu Val Leu Leu Gly Leu Val Ala Phe Ser Glu Cys Ile
 1 5 10 15

 Val Lys Ile Pro Leu Arg Arg Leu Lys Thr Met Arg Asn Val Val Ser
 20 25 30

 Gly Lys Asn Met Leu Asn Asn Phe Leu Lys Glu His Ala Tyr Ser Leu
 35 40 45

 Ser Gln Ile Ser Phe Arg Gly Ser Asn Leu Thr Thr His Pro Leu Arg
 50 55 60

 Asn Ile Lys Asp Leu Val Tyr Met Gly Asn Ile Thr Ile Gly Thr Pro
 65 70 75 80

 Pro Gln Glu Phe Gln Val Val Phe Asp Thr Ala Ser Ser Asp Leu Trp
 85 90 95

 Val Pro Ser Asp Phe Cys Thr Ser Pro Ala Cys Ser Thr His Val Arg
 100 105 110

 Phe Arg His Leu Gln Ser Ser Thr Phe Arg Leu Thr Asn Lys Thr Phe
 115 120 125

 Arg Ile Thr Tyr Gly Ser Gly Arg Met Lys Gly Val Val Val His Asp
 130 135 140

 Thr Val Arg Ile Gly Asn Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Gly Leu
 145 150 155 160

 Ser Ile Glu Glu Tyr Gly Phe Glu Gly Arg Ile Tyr Asp Gly Val Leu
 165 170 175

 Gly Leu Asn Tyr Pro Asn Ile Ser Phe Ser Gly Ala Ile Pro Ile Phe
 180 185 190

 Asp Lys Leu Lys Asn Gln Arg Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe
 195 200 205

 Tyr Leu Ser Lys Asp Glu Arg Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly
 210 215 220

 Val Asp His Arg Tyr Tyr Glu Gly Glu Leu Asn Trp Val Pro Leu Ile
 225 230 235 240

[0014]

Gln Ala Gly Asp Trp Ser Val His Met Asp Arg Ile Ser Ile Glu Arg
 245 250 255
 Lys Ile Ile Ala Cys Ser Asp Gly Cys Lys Ala Leu Val Asp Thr Gly
 260 265 270
 Thr Ser Asp Ile Val Gly Pro Arg Arg Leu Val Asn Asn Ile His Arg
 275 280 285
 Leu Ile Gly Ala Ile Pro Arg Gly Ser Glu His Tyr Val Pro Cys Ser
 290 295 300
 Glu Val Asn Thr Leu Pro Ser Ile Val Phe Thr Ile Asn Gly Ile Asn
 305 310 315 320
 Tyr Pro Val Pro Gly Arg Ala Tyr Ile Leu Lys Asp Asp Arg Gly Arg
 325 330 335
 Cys Tyr Thr Thr Phe Gln Glu Asn Arg Val Ser Ser Ser Thr Glu Thr
 340 345 350
 Trp Tyr Leu Gly Asp Val Phe Leu Arg Leu Tyr Phe Ser Val Phe Asp
 355 360 365
 Arg Gly Asn Asp Arg Ile Gly Leu Ala Arg Ala Val
 370 375 380
 <210> 52
 <211> 380
 <212> PRT
 <213> 牛
 <400> 52
 Met Lys Trp Leu Val Leu Leu Gly Leu Val Ala Phe Ser Glu Cys Ile
 1 5 10 15
 Val Lys Ile Pro Leu Arg Arg Val Lys Thr Met Thr Lys Thr Leu Ser
 20 25 30
 Gly Lys Asn Met Leu Asn Asn Phe Val Lys Glu His Ala Tyr Arg Leu
 35 40 45
 Ser Gln Ile Ser Phe Arg Gly Ser Asn Leu Thr Ile His Pro Leu Arg
 50 55 60
 Asn Ile Arg Asp Phe Phe Tyr Val Gly Asn Ile Thr Ile Gly Thr Pro
 65 70 75 80
 Pro Gln Glu Phe Gln Val Ile Phe Asp Thr Gly Ser Ser Glu Leu Trp
 85 90 95
 Val Pro Ser Ile Phe Cys Asn Ser Ser Thr Cys Ser Lys His Asp Arg
 100 105 110
 Phe Arg His Leu Glu Ser Ser Thr Phe Arg Leu Ser Arg Arg Thr Phe
 115 120 125

[0015]

Ser Ile Thr Tyr Gly Ser Gly Arg Ile Glu Ala Leu Val Val His Asp
 130 135 140
 Thr Val Arg Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Gln Phe Gly Leu
 145 150 155 160
 Cys Leu Glu Glu Ser Gly Phe Glu Gly Met Arg Phe Asp Gly Val Leu
 165 170 175
 Gly Leu Ser Tyr Thr Asn Ile Ser Pro Ser Gly Ala Ile Pro Ile Phe
 180 185 190
 Tyr Lys Leu Lys Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe
 195 200 205
 Tyr Leu Ser Lys Asp Glu Arg Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly
 210 215 220
 Ala Asp His Arg Tyr Tyr Lys Gly Glu Leu Asn Trp Ile Pro Leu Met
 225 230 235 240
 Lys Ala Gly Asp Trp Ser Val His Met Asp Arg Ile Ser Met Lys Arg
 245 250 255
 Lys Val Ile Ala Cys Ser Gly Gly Cys Lys Ala Leu Val Asp Thr Gly
 260 265 270
 Ser Ser Asp Ile Val Gly Pro Ser Thr Leu Val Asn Asn Ile Trp Lys
 275 280 285
 Leu Ile Gly Ala Thr Pro Gln Gly Ser Glu His Tyr Val Ser Cys Ser
 290 295 300
 Ala Val Asn Ser Leu Pro Ser Ile Ile Phe Thr Ile Lys Ser Asn Asn
 305 310 315 320
 Tyr Arg Val Pro Gly Gln Ala Tyr Ile Leu Lys Asp Ser Arg Gly Arg
 325 330 335
 Cys Phe Thr Ala Phe Lys Gly His Gln Gln Ser Ser Ser Thr Glu Met
 340 345 350
 Trp Ile Leu Gly Asp Val Phe Leu Arg Leu Tyr Phe Ser Val Phe Asp
 355 360 365
 Arg Arg Lys Asp Arg Ile Gly Leu Ala Thr Lys Val
 370 375 380
 <210> 53
 <211> 379
 <212> PRT
 <213> 牛
 <400> 53
 Met Lys Trp Leu Val Leu Leu Gly Leu Val Ala Phe Ser Glu Cys Ile
 1 5 10 15

[0016]

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

[0017]

Arg Leu Pro Ala Arg Ala Tyr Ile His Lys Asp Ser Arg Gly Arg Cys
 325 330 335
 Tyr Thr Ala Phe Lys Glu His Arg Phe Ser Ser Pro Ile Glu Thr Trp
 340 345 350
 Leu Leu Gly Asp Val Phe Leu Arg Arg Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg
 355 360 365
 Gly Asn Asp Arg Ile Gly Leu Ala Arg Ala Val
 370 375
 <210> 54
 <211> 379
 <212> PRT
 <213> 牛
 <400> 54
 Met Lys Trp Leu Val Leu Leu Gly Leu Val Ala Phe Ser Glu Cys Ile
 1 5 10 15
 Val Lys Ile Pro Leu Arg Arg Val Lys Thr Met Arg Asn Ala Ile Ser
 20 25 30
 Gly Lys Asn Thr Leu Asn Asn Ile Leu Lys Glu His Ala Tyr Arg Leu
 35 40 45
 Pro Gln Ile Ser Phe Arg Gly Ser Asn Leu Thr His Pro Leu Arg Asn
 50 55 60
 Ile Arg Asp Leu Phe Tyr Val Gly Asn Ile Thr Ile Gly Thr Pro Pro
 65 70 75 80
 Gln Glu Phe Gln Val Ile Phe Asp Thr Gly Ser Ser Asp Leu Trp Val
 85 90 95
 Ala Ser Ile Phe Cys Asn Ser Ser Ser Cys Ala Ala His Val Arg Phe
 100 105 110
 Arg His His Gln Ser Ser Thr Phe Arg Pro Thr Asn Lys Thr Phe Arg
 115 120 125
 Ile Thr Tyr Gly Ser Gly Arg Met Lys Gly Val Val Val His Asp Thr
 130 135 140
 Val Arg Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Gly Leu Cys
 145 150 155 160
 Leu Lys Asp Ser Gly Phe Lys Gly Ile Pro Phe Asp Gly Ile Leu Gly
 165 170 175
 Leu Ser Tyr Pro Asn Lys Thr Phe Ser Gly Ala Phe Pro Ile Phe Asp
 180 185 190
 Lys Leu Lys Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe Tyr
 195 200 205
 Leu Ser Lys Asp Lys Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val

[0018]

210	215	220
Asp His Arg Tyr Tyr Lys Gly Glu Leu Asn Trp Val Pro Leu Ile Gln 225 230 235 240		
Val Gly Asp Trp Phe Val His Met Asp Arg Ile Thr Met Lys Arg Lys 245 250 255		
Val Ile Ala Cys Ser Asp Gly Cys Lys Ala Leu Val Asp Thr Gly Thr 260 265 270		
Ser Asp Ile Val Gly Pro Ser Thr Leu Val Asn Asn Ile Trp Lys Leu 275 280 285		
Ile Arg Ala Arg Pro Leu Gly Pro Gln Tyr Phe Val Ser Cys Ser Ala 290 295 300		
Val Asn Thr Leu Pro Ser Ile Ile Phe Thr Ile Asn Gly Ile Asn Tyr 305 310 315 320		
Arg Leu Pro Ala Arg Ala Tyr Ile His Lys Asp Ser Arg Gly Arg Cys 325 330 335		
Tyr Thr Ala Phe Lys Glu His Arg Phe Ser Ser Pro Ile Glu Thr Trp 340 345 350		
Leu Leu Gly Asp Val Phe Leu Arg Arg Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg 355 360 365		
Gly Asn Asp Arg Ile Gly Leu Ala Arg Ala Val 370 375		
<210> 55		
<211> 379		
<212> PRT		
<213> 牛		
<400> 55		
Met Lys Trp Ile Val Leu Leu Gly Leu Val Ala Phe Ser Glu Cys Ile 1 5 10 15		
Val Lys Ile Pro Leu Arg Gln Val Lys Thr Met Arg Lys Thr Leu Ser 20 25 30		
Gly Lys Asn Met Leu Lys Asn Phe Leu Lys Glu His Pro Tyr Arg Leu 35 40 45		
Ser Gln Ile Ser Phe Arg Gly Ser Asn Leu Thr Ile His Pro Leu Arg 50 55 60		
Asn Ile Met Asn Leu Val Tyr Val Gly Asn Ile Thr Ile Gly Thr Pro 65 70 75 80		
Pro Gln Glu Phe Gln Val Val Phe Asp Thr Gly Ser Ser Asp Leu Trp 85 90 95		
Val Pro Ser Phe Cys Thr Met Pro Ala Cys Ser Ala Pro Val Trp Phe 100 105 110		

[0019]

Arg Gln Leu Gln Ser Ser Thr Phe Gln Pro Thr Asn Lys Thr Phe Thr
 115 120 125
 Ile Thr Tyr Gly Ser Gly Ser Met Lys Gly Phe Leu Ala Tyr Asp Thr
 130 135 140
 Val Arg Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Gly Leu Ser
 145 150 155 160
 Val Val Glu Tyr Gly Leu Glu Gly Arg Asn Tyr Asp Gly Val Leu Gly
 165 170 175
 Leu Asn Tyr Pro Asn Ile Ser Phe Ser Gly Ala Ile Pro Ile Phe Asp
 180 185 190
 Asn Leu Lys Asn Gln Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe Tyr
 195 200 205
 Leu Ser Lys Asn Lys Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val
 210 215 220
 Asp His Gln Tyr Tyr Lys Gly Glu Leu Asn Trp Ile Pro Leu Ile Glu
 225 230 235 240
 Ala Gly Glu Trp Arg Val His Met Asp Arg Ile Ser Met Lys Arg Thr
 245 250 255
 Val Ile Ala Cys Ser Asp Gly Cys Glu Ala Leu Val His Thr Gly Thr
 260 265 270
 Ser His Ile Glu Gly Pro Gly Arg Leu Val Asn Asn Ile His Arg Leu
 275 280 285
 Ile Arg Thr Arg Pro Phe Asp Ser Lys His Tyr Val Ser Cys Phe Ala
 290 295 300
 Thr Lys Tyr Leu Pro Ser Ile Thr Phe Ile Ile Asn Gly Ile Lys Tyr
 305 310 315 320
 Pro Met Thr Ala Arg Ala Tyr Ile Phe Lys Asp Ser Arg Gly Arg Cys
 325 330 335
 Tyr Ser Ala Phe Lys Glu Asn Thr Val Arg Thr Ser Arg Glu Thr Trp
 340 345 350
 Ile Leu Gly Asp Ala Phe Leu Arg Arg Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg
 355 360 365
 Gly Asn Asp Arg Ile Gly Leu Ala Arg Ala Val
 370 375
 <210> 56
 <211> 379
 <212> PRT
 <213> 牛
 <400> 56

[0020]

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

[0021]

Thr Lys Tyr Leu Pro Ser Ile Thr Phe Ile Ile Asn Gly Ile Lys Tyr
 305 310 315 320
 Pro Met Thr Ala Arg Ala Tyr Ile Phe Lys Asp Ser Arg Gly Arg Cys
 325 330 335
 Tyr Ser Ala Phe Lys Glu Asn Thr Val Arg Thr Ser Arg Glu Thr Trp
 340 345 350
 Ile Leu Gly Asp Ala Phe Leu Arg Arg Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg
 355 360 365
 Gly Asn Asp Arg Ile Gly Leu Ala Gln Ala Val
 370 375
 <210> 57
 <211> 380
 <212> PRT
 <213> 牛
 <400> 57
 Met Lys Trp Leu Val Leu Leu Gly Leu Val Ala Phe Ser Glu Cys Ile
 1 5 10 15
 Val Lys Ile Pro Leu Arg Arg Val Lys Thr Met Arg Lys Thr Leu Ser
 20 25 30
 Gly Lys Asn Thr Leu Asn Asn Phe Leu Lys Glu His Pro Tyr Arg Leu
 35 40 45
 Ser His Ile Ser Phe Arg Gly Ser Asn Leu Thr Thr Leu Pro Leu Arg
 50 55 60
 Asn Ile Arg Asp Met Leu Tyr Val Gly Asn Ile Thr Ile Gly Thr Pro
 65 70 75 80
 Pro Gln Glu Phe Gln Val Val Phe Asp Thr Gly Ser Ser Asp Leu Trp
 85 90 95
 Val Pro Ser Asp Phe Cys Thr Ser Pro Ala Cys Ser Thr His Val Arg
 100 105 110
 Phe Arg His Phe Gln Ser Ser Thr Phe Arg Pro Thr Thr Lys Thr Phe
 115 120 125
 Arg Ile Ile Tyr Gly Ser Gly Arg Met Lys Gly Val Val Ala His Asp
 130 135 140
 Thr Val Arg Ile Gly Asn Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Gly Leu
 145 150 155 160
 Ser Met Ala Glu Tyr Gly Leu Glu Ser Arg Arg Phe Asp Gly Ile Leu
 165 170 175
 Gly Leu Asn Tyr Pro Asn Leu Ser Cys Ser Gly Ala Ile Pro Ile Phe
 180 185 190

[0022]

Asp Lys Leu Lys Asn Gln Gly Ala Ile Ser Asp Pro Ile Phe Ala Phe
 195 200 205
 Tyr Leu Ser Lys Asp Lys Arg Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly
 210 215 220
 Val Asp His Arg Tyr Tyr Lys Gly Glu Leu Asn Trp Val Pro Leu Ile
 225 230 235 240
 Arg Ala Gly Asp Trp Ile Val His Val Asp Arg Ile Thr Met Lys Arg
 245 250 255
 Glu Val Ile Ala Cys Ser Asp Gly Cys Ala Ala Leu Val Asp Thr Gly
 260 265 270
 Thr Ser Leu Ile Gln Gly Pro Gly Arg Val Ile Asp Asn Ile His Lys
 275 280 285
 Leu Ile Gly Ala Thr Pro Arg Gly Ser Lys His Tyr Val Ser Cys Ser
 290 295 300
 Val Val Asn Thr Leu Pro Ser Ile Ile Phe Thr Ile Asn Gly Ile Asn
 305 310 315 320
 Tyr Pro Val Pro Ala Pro Ala Tyr Ile Leu Lys Asp Ser Arg Gly Tyr
 325 330 335
 Cys Tyr Thr Ala Phe Lys Glu Gln Arg Val Arg Arg Ser Thr Glu Ser
 340 345 350
 Trp Leu Leu Gly Asp Val Phe Leu Arg Leu Tyr Phe Ser Val Phe Asp
 355 360 365
 Arg Gly Asn Asp Arg Ile Gly Leu Ala Arg Ala Val
 370 375 380
 <210> 58
 <211> 380
 <212> PRT
 <213> 牛
 <400> 58
 Met Lys Trp Leu Val Leu Leu Trp Leu Val Ala Phe Ser Glu Cys Ile
 1 5 10 15
 Val Lys Ile Pro Leu Arg Gln Val Lys Thr Met Arg Lys Thr Leu Ser
 20 25 30
 Gly Lys Asn Thr Leu Asn Asn Phe Leu Lys Glu His Thr Tyr Ser Leu
 35 40 45
 Ser Gln Ile Ser Ser Arg Gly Ser Asn Leu Thr Ile His Pro Leu Arg
 50 55 60
 Asn Ile Met Asp Met Leu Tyr Val Gly Asn Ile Thr Ile Gly Thr Pro
 65 70 75 80
 Pro Gln Glu Phe Gln Val Val Phe Asp Thr Gly Ser Ser Asp Leu Trp

[0023]

85	90	95
Val Pro Ser Val Phe Cys Gln Ser Leu Ala Cys Ala Thr Lys Val Met 100 105 110		
Phe Ile His Leu His Ser Ser Thr Phe Arg His Thr Gln Lys Val Phe 115 120 125		
Asn Ile Lys Tyr Asn Thr Gly Arg Met Lys Gly Leu Leu Val Tyr Asp 130 135 140		
Thr Val Arg Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Cys Ile 145 150 155 160		
Ser Leu Ala Glu Val Gly Phe Asp Gly Ile Pro Phe Asp Gly Val Leu 165 170 175		
Gly Leu Asn Tyr Pro Asn Met Ser Phe Ser Gly Ala Ile Pro Ile Phe 180 185 190		
Asp Asn Leu Lys Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe 195 200 205		
Tyr Leu Ser Lys Asp Lys Arg Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly 210 215 220		
Val Asp His Arg Tyr Tyr Lys Gly Glu Leu Asn Trp Val Pro Leu Ile 225 230 235 240		
Gln Ala Gly Gly Trp Thr Val His Val Asp Arg Ile Ser Met Lys Arg 245 250 255		
Lys Ile Ile Ala Cys Ser Gly Gly Cys Glu Ala Leu Val Asp Thr Gly 260 265 270		
Thr Ala Leu Ile Lys Gly Pro Arg Arg Leu Val Asn Asn Ile Gln Lys 275 280 285		
Leu Ile Gly Thr Thr Pro Arg Gly Ser Lys His Tyr Val Ser Cys Ser 290 295 300		
Val Val Asn Thr Leu Pro Ser Ile Ile Phe Thr Ile Asn Gly Ile Asn 305 310 315 320		
Tyr Pro Val Pro Ala Arg Ala Tyr Ile Leu Lys Asp Ser Glu Ser Asn 325 330 335		
Cys Tyr Thr Thr Phe Lys Glu Asn Thr Val Arg Thr Ser Arg Glu Thr 340 345 350		
Trp Ile Leu Gly Asp Val Phe Pro Arg Leu Tyr Phe Ser Val Phe Asp 355 360 365		
Arg Gly Asn Asp Arg Ile Gly Leu Ala Arg Ala Val 370 375 380		

<210> 59

[0024]

<211> 380
 <212> PRT
 <213> 牛
 <400> 59
 Met Lys Trp Leu Val Leu Leu Trp Leu Val Ala Phe Ser Glu Cys Ile
 1 5 10 15
 Val Lys Ile Pro Leu Arg Gln Val Lys Thr Met Arg Lys Thr Leu Ser
 20 25 30
 Gly Lys Asn Thr Leu Asn Asn Phe Leu Lys Glu His Thr Tyr Ser Leu
 35 40 45
 Ser Gln Ile Ser Ser Arg Gly Ser Asn Leu Thr Ile His Pro Leu Arg
 50 55 60
 Asn Ile Met Asp Met Leu Tyr Val Gly Asn Ile Thr Ile Gly Thr Pro
 65 70 75 80
 Pro Gln Glu Phe Gln Val Val Phe Asp Thr Gly Ser Ser Asp Leu Trp
 85 90 95
 Val Pro Ser Val Phe Cys Gln Ser Leu Ala Cys Ala Thr Lys Val Met
 100 105 110
 Phe Ile His Leu Tyr Ser Ser Thr Phe Arg His Thr Gln Lys Val Phe
 115 120 125
 Asn Ile Lys Tyr Asn Thr Gly Arg Met Lys Gly Leu Leu Val Tyr Asp
 130 135 140
 Thr Val Arg Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Cys Ile
 145 150 155 160
 Ser Leu Ala Glu Val Gly Phe Asp Gly Ile Pro Phe Asp Gly Val Leu
 165 170 175
 Gly Leu Asn Tyr Pro Asn Met Ser Phe Ser Gly Ala Ile Pro Ile Phe
 180 185 190
 Asp Asn Leu Lys Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe
 195 200 205
 Tyr Leu Ser Lys Asp Lys Arg Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly
 210 215 220
 Val Asp His Arg Tyr Tyr Lys Gly Glu Leu Asn Trp Val Pro Leu Ile
 225 230 235 240
 Gln Ala Gly Gly Trp Thr Val His Val Asp Arg Ile Ser Met Lys Arg
 245 250 255
 Lys Ile Ile Ala Cys Ser Gly Gly Cys Glu Ala Leu Val Asp Thr Gly
 260 265 270
 Thr Ala Leu Ile Lys Gly Pro Arg Arg Leu Val Asn Asn Ile Gln Lys
 275 280 285

[0025]

Leu Ile Gly Thr Thr Pro Arg Gly Ser Lys His Tyr Val Ser Cys Ser
 290 295 300
 Val Val Asn Thr Leu Pro Ser Ile Ile Phe Thr Ile Asn Gly Ile Asn
 305 310 315 320
 Tyr Pro Val Pro Ala Arg Ala Tyr Ile Leu Lys Asp Ser Glu Ser His
 325 330 335
 Cys Tyr Thr Ala Phe Lys Glu Asn Thr Val Arg Thr Ser Arg Glu Thr
 340 345 350
 Trp Ile Leu Gly Asp Val Phe Leu Arg Leu Tyr Phe Ser Val Phe Asp
 355 360 365
 Arg Gly Asn Asp Arg Ile Gly Leu Ala Arg Ala Val
 370 375 380
 <210> 60
 <211> 380
 <212> PRT
 <213> 牛
 <400> 60
 Met Lys Trp Leu Val Val Leu Gly Leu Val Ala Phe Ser Glu Cys Ile
 1 5 10 15
 Val Lys Ile Pro Leu Arg Arg Val Lys Thr Met Arg Lys Ala Leu Ser
 20 25 30
 Gly Lys Asn Met Leu Asn Asn Phe Leu Lys Glu His Ala Tyr Arg Leu
 35 40 45
 Ser Gln Ile Ser Phe Arg Gly Ser Asn Leu Thr Ser His Pro Leu Arg
 50 55 60
 Asn Ile Lys Asp Leu Val Tyr Leu Ala Asn Ile Thr Ile Gly Thr Pro
 65 70 75 80
 Pro Gln Glu Phe Gln Val Phe Leu Asp Thr Gly Ser Ser Asp Leu Trp
 85 90 95
 Val Pro Ser Asp Phe Cys Thr Ser Pro Gly Cys Ser Lys His Val Arg
 100 105 110
 Phe Arg His Leu Gln Ser Ser Thr Phe Arg Leu Thr Asn Lys Thr Phe
 115 120 125
 Ser Ile Thr Tyr Gly Ser Gly Arg Ile Lys Gly Val Val Ala His Asp
 130 135 140
 Thr Val Arg Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Ser Leu
 145 150 155 160
 Ser Met Ala Glu Tyr Gly Leu Glu His Ile Pro Phe Asp Gly Ile Leu
 165 170 175

[0026]

Gly Leu Asn Tyr Pro Asn Val Ser Ser Ser Gly Ala Ile Pro Ile Phe
 180 185 190
 Asp Lys Leu Lys Asn Gln Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe
 195 200 205
 Tyr Leu Ser Lys Asp Lys Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly
 210 215 220
 Val Asp His Arg Tyr Tyr Arg Gly Lys Leu Asn Trp Val Pro Leu Ile
 225 230 235 240
 Gln Ala Gly Asn Trp Ile Ile His Met Asp Ser Ile Ser Ile Glu Arg
 245 250 255
 Lys Val Ile Ala Cys Ser Gly Gly Cys Val Ala Phe Val Asp Ile Gly
 260 265 270
 Thr Ala Phe Ile Glu Gly Pro Lys Pro Leu Val Asp Asn Met Gln Lys
 275 280 285
 Leu Ile Arg Ala Lys Pro Trp Arg Ser Lys His Tyr Val Ser Cys Ser
 290 295 300
 Ala Val Asn Thr Leu Pro Ser Ile Thr Phe Thr Ile Asn Gly Ile Asn
 305 310 315 320
 Tyr Pro Val Pro Gly Arg Ala Tyr Ile Leu Lys Asp Ser Arg Arg Arg
 325 330 335
 Cys Tyr Ser Thr Phe Lys Glu Ile Pro Leu Ser Pro Thr Thr Glu Phe
 340 345 350
 Trp Met Leu Gly Asp Val Phe Leu Arg Leu Tyr Phe Ser Val Phe Asp
 355 360 365
 Arg Gly Asn Asp Arg Ile Gly Leu Ala Arg Ala Val
 370 375 380
 <210> 61
 <211> 380
 <212> PRT
 <213> 牛
 <400> 61
 Met Lys Trp Leu Val Leu Leu Gly Leu Val Ala Phe Ser Glu Cys Ile
 1 5 10 15
 Phe Lys Ile Pro Leu Arg Arg Val Lys Thr Met Arg Lys Thr Leu Ser
 20 25 30
 Gly Lys Asn Met Leu Asn Asn Phe Leu Lys Glu His Pro Tyr Lys Leu
 35 40 45
 Ser Gln Ile Ser Phe Arg Gly Ser Asn Leu Thr Thr Leu Pro Leu Arg
 50 55 60

[0027]

```

Asn Ile Trp Asp Ile Phe Tyr Ile Gly Thr Ile Thr Ile Gly Thr Pro
65          70          75          80

Pro Gln Glu Phe Gln Val Val Phe Asp Thr Ala Ser Ser Asp Leu Trp
          85          90          95

Val Pro Ser Ile Ile Cys Asn Ser Ser Thr Cys Ser Thr His Val Arg
          100          105          110

Phe Arg His Arg Gln Ser Ser Thr Phe Arg Leu Thr Asn Lys Thr Phe
          115          120          125

Gly Ile Thr Tyr Gly Ser Gly Arg Met Lys Gly Val Val Val His Asp
130          135          140

Thr Val Arg Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Gly Leu
145          150          155          160

Ser Val Ala Glu Tyr Gly Phe Glu Gly Arg Arg Phe Asp Gly Val Leu
          165          170          175

Gly Leu Asn Tyr Pro Asn Ile Ser Phe Ser Lys Ala Ile Pro Ile Phe
          180          185          190

Asp Lys Leu Lys Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe
          195          200          205

Tyr Leu Ser Lys Asp Lys Gln Lys Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly
210          215          220

Val Asp His Arg Tyr Tyr Lys Gly Glu Leu Asn Trp Val Pro Leu Ile
225          230          235          240

Arg Ala Gly Asp Trp Ser Val His Val Asp Arg Ile Thr Met Lys Gly
          245          250          255

Glu Val Ile Gly Cys Ser Asp Gly Cys Thr Ala Met Val Asp Thr Gly
          260          265          270

Ser Ser Asn Ile Gln Gly Pro Gly Arg Val Ile Asp Asn Ile His Lys
          275          280          285

Leu Ile Gly Ala Thr Pro Arg Gly Ser Lys His Tyr Val Ser Cys Ser
290          295          300

Ala Val Ser Ala Leu Pro Ser Val Val Phe Thr Ile Asn Gly Ile Asn
305          310          315          320

Tyr Pro Val Pro Ala Arg Ala Tyr Val Leu Lys Asp Phe Thr Gly Asn
          325          330          335

Cys Tyr Thr Thr Phe Lys Glu Lys Arg Val Arg Arg Ser Thr Glu Phe
          340          345          350

Trp Ile Leu Gly Glu Ala Phe Leu Arg Leu Tyr Phe Ser Val Phe Asp
          355          360          365

```

[0028]

```

Arg Gly Asn Asp Arg Ile Gly Leu Ala Arg Ala Val
 370          375          380

<210> 62
<211> 380
<212> PRT
<213> 牛

<400> 62

Met Lys Trp Val Val Leu Leu Gly Leu Val Ala Phe Ser Glu Cys Ile
 1          5          10          15

Val Lys Ile Pro Leu Arg Arg Val Lys Thr Met Arg Lys Thr Leu Ser
 20          25          30

Gly Lys Asn Met Leu Asn Asn Phe Leu Lys Glu His Gly Asn Arg Leu
 35          40          45

Ser Lys Ile Ser Phe Arg Gly Ser Asn Leu Thr Thr Leu Pro Leu Arg
 50          55          60

Asn Ile Glu Asp Leu Met Tyr Val Gly Asn Ile Thr Ile Gly Thr Pro
 65          70          75          80

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

Val Pro Ser Asp Phe Cys Thr Ser Pro Asp Cys Ile Thr His Val Arg
 100         105         110

Phe Arg Gln His Gln Ser Ser Thr Phe Arg Pro Thr Asn Lys Thr Phe
 115         120         125

Ser Ile Thr Tyr Gly Ser Gly Arg Met Arg Gly Val Val Val His Asp
 130         135         140

Thr Val Arg Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Gly Leu
 145         150         155         160

Ser Val Ser Glu Tyr Gly Phe Lys Asp Arg Ala Tyr Asp Gly Ile Leu
 165         170         175

Gly Leu Asn Tyr Pro Asp Glu Ser Phe Ser Glu Ala Ile Pro Ile Phe
 180         185         190

Asp Lys Leu Lys Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Ile Phe Ala Phe
 195         200         205

Tyr Leu Ser Lys Lys Lys Arg Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly
 210         215         220

Val Asp His Arg Tyr Tyr Lys Gly Glu Leu Asn Trp Val Pro Leu Ile
 225         230         235         240

Glu Glu Gly Asp Trp Ser Val Arg Met Asp Gly Ile Ser Met Lys Thr
 245         250         255

Lys Val Val Ala Cys Ser Asp Gly Cys Glu Ala Val Val Asp Thr Gly

```

[0029]

260	265	270
Thr Ser Leu Ile Lys Gly Pro Arg Lys Leu Val Asn Lys Ile Gln Lys 275 280 285		
Leu Ile Gly Ala Thr Pro Arg Gly Ser Lys His Tyr Val Tyr Cys Ser 290 295 300		
Ala Val Asn Ala Leu Pro Ser Ile Ile Phe Thr Ile Asn Gly Ile Asn 305 310 315 320		
Tyr Pro Val Pro Ala Arg Ala Tyr Ile Leu Lys Asp Ser Arg Gly Arg 325 330 335		
Cys Tyr Thr Ala Phe Lys Lys Gln Arg Phe Ser Ser Ser Thr Glu Thr 340 345 350		
Trp Leu Leu Gly Asp Ala Phe Leu Arg Val Tyr Phe Ser Val Phe Asp 355 360 365		
Arg Gly Asn Gly Arg Ile Gly Leu Ala Gln Ala Val 370 375 380		
<210> 63		
<211> 15		
<212> PRT		
<213> 牛		
<400> 63		
Arg Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His Arg Tyr 1 5 10 15		
<210> 64		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> 牛		
<400> 64		
Arg Leu Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg Gly 1 5 10		
<210> 65		
<211> 16		
<212> PRT		
<213> 牛		
<400> 65		
Asn Gln Gly Ala Ile Ser Asp Pro Ile Phe Ala Phe Tyr Leu Ser Lys 1 5 10 15		
<210> 66		
<211> 15		
<212> PRT		
<213> 牛		
<400> 66		
Arg Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His Arg Tyr 1 5 10 15		
<210> 67		

[0030]

<211> 11
<212> PRT
<213> 牛

<400> 67

Lys Gly Leu Leu Val Tyr Asp Thr Val Arg Ile
1 5 10

<210> 68
<211> 10
<212> PRT
<213> 牛

<400> 68

Arg Leu Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg Gly
1 5 10

<210> 69
<211> 18
<212> PRT
<213> 牛

<400> 69

Lys Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe Tyr Leu Ser
1 5 10 15

Lys Asp

<210> 70
<211> 18
<212> PRT
<213> 牛

<400> 70

Lys Asp Lys Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His
1 5 10 15

Arg Tyr

<210> 71
<211> 12
<212> PRT
<213> 牛

<400> 71

Lys Thr Phe Ser Ile Thr Tyr Gly Ser Gly Arg Ile
1 5 10

<210> 72
<211> 19
<212> PRT
<213> 牛

<400> 72

Asp Lys Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His Arg
1 5 10 15

Tyr Tyr Arg

[0031]

<210> 73
<211> 10
<212> PRT
<213> 牛

<400> 73

Arg Leu Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg Gly
1 5 10

<210> 74
<211> 18
<212> PRT
<213> 牛

<400> 74

Lys Asn Gln Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe Tyr Leu Ser
1 5 10 15

Lys Asp

>2D9 轻链

CGGTTCTGCTTCCAGCAGTGATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTT
GGAGATCAAGCCTCCATTTCTTGCAGATCTAGGCAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAG
AATGGTTCTGTCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGG
GGTCCCAGACAGGTTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCT
GAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGCTCAGTTCGGTGCTGGGACCAAGC
TGGAGCTGAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATC
TGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTGAACAACTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGAAGATT
GATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACA
GCATGAGCAGCACCCCTCAGGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCAC
TCACAAGACATCTACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTAGAGACAAAGGTCCTGA

图 1

>2D9 重链

GCTACAGGTGTCCACTCCCAGGTTCACTGTCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCTCAG
TGAAGATATCTGCAAGGCTACTGGCTACATATTCAGTAACTACTGGATGGAGTGGGTAAAGCAGAGGCC
TGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTTACCTGGAAGTGATATTACTAACTACAATGAGAAGTTC
AAGGACAAGGCCACATTCACTGCAGATTCATCTCCAACACGGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACAT
CTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGAAGAGCTGGGAGTGGTTACTACGGGTATATTACTATGCTAT
GGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCA
CTGGCCCTGGATCTGCTGCCAACTAACTCCATGGTGACCTGGGATGCCGTGGTCAAGGGCTATTTCC
CTGAGCCAGTGACAGTGAOCTGGAACCTGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCT
GCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACCGTC
ACCTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCCAGGGATTGTGGTT
GTAAGCCTTGCAATGTACAGTCCCAGAAGTATCATCTGTCTTCTTCTTCCCCCAAGCCCAAGGATGT
GCTACCATTAATCTGACTCCTAAGGTCAGGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCAGGTC
CAGTTCAGCTGGTTTTGTAGATGATGTGGAGTGCCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGAGGAGCAGTTCA
ACAGCACTTTCCGCTCAGTCAGTGAACCTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAA
ATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTTCCCTGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGCAGACCG
AAGGCTCCACAGGTGTACACCATTCACCTCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAAAGTCAGTCTGACCT
GCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTACTGTGGAGTGGCAGTGGAAATGGGCAGCCAGCGGAGAA
CTACAAGAACACTCAGCCCATCATGGACACAGATGGCTTACTTCTGTCTACAGCAAGCTCAATGTGCAG
AAGAGCAACTGGGAGGCAGGAATACTTTCACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCTGCACAACCCACATA
CTGAGAAGAGCCTCTCCACTCTCCTGGTAAATGATCCCAAAGTCCTGGAGCCCTCTGGTCTACAGGA
CTACTGCAGGTGTCCACTCCCTCAAACA

图 2

结合 2D9 的 PAG 抗原的鉴定：LC-MS-MS 分析

牛 (NM176617) 妊娠相关糖蛋白 6					
Mz	电荷	Mr(计算)	起点	终点	得分
853.4334	2	1686.865	147	162	94.87%
615.2964	2	1210.602	183	193	95.45%
886.4468	2	1752.872	196	211	98.95%
592.9523	3	1757.815	212	227	89.57%
767.3938	3	2281.195	266	287	90.78%
467.2134	2	914.4286	362	368	99%
肽序列					
IGDLVSTDQPFGLCLK (SEQ ID NO:7)					
TFSGAFPIFDK (SEQ ID NO:8)					
NEGASEPVFAYLSK (SEQ ID NO:9)					
DKQEGSWMFGGYDHR (SEQ ID NO:10)					
ALVDGTSDNGPSTLVNHWK (SEQ ID NO:11)					
YFSVFDR (SEQ ID NO:12)					
结合 2D9 的 PAG 抗原					
Mz	电荷	Mr(计算)	起点	终点	得分
881.9511	2	1743.886	147	162	99.00%
615.311	2	1210.602	183	193	99.00%
886.4475	2	1752.872	196	211	99.00%
592.966	3	1757.815	212	227	95.84%
767.404	3	2281.195	266	287	97.54%
467.235	2	914.4286	362	368	84.44%
肽序列					
IGDLVSTDQPFGLCLK (SEQ ID NO:13)					
TFSGAFPIFDK (SEQ ID NO:14)					
NEGASEPVFAYLSK (SEQ ID NO:15)					
DKQEGSWMFGGYDHR (SEQ ID NO:16)					
ALVDGTSDNGPSTLVNHWK (SEQ ID NO:17)					
YFSVFDR (SEQ ID NO:18)					

图 3A

使用 2D9 单克隆抗体对 PAG 的免疫亲和纯化

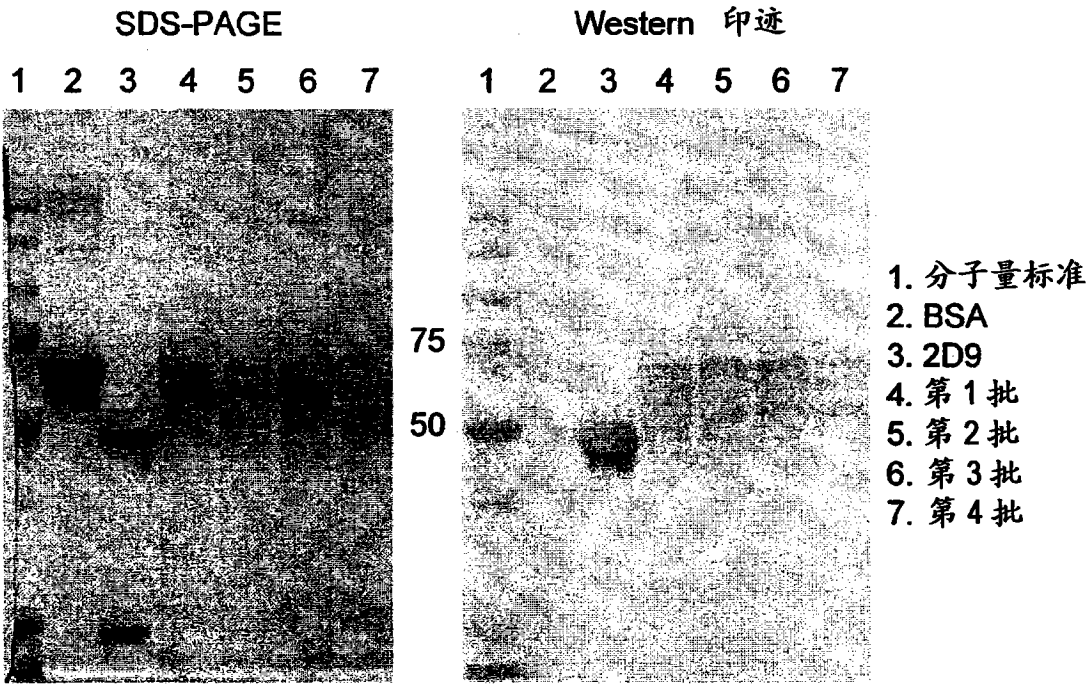
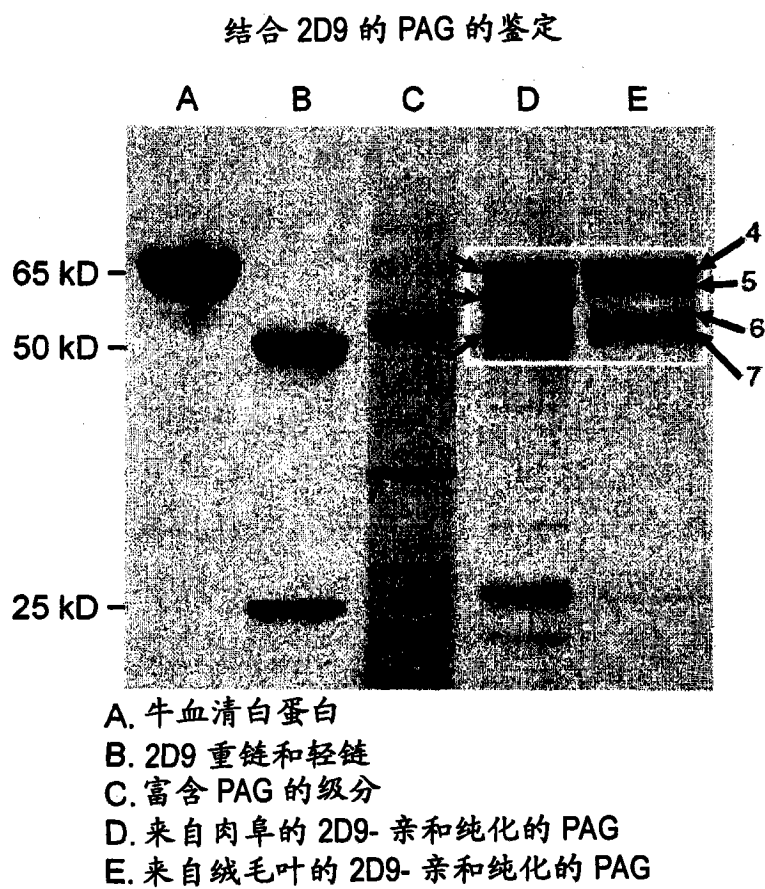


图 3B



切下条带 1-7 进行
胰蛋白酶消化和 LC-MS-MS.

图 4

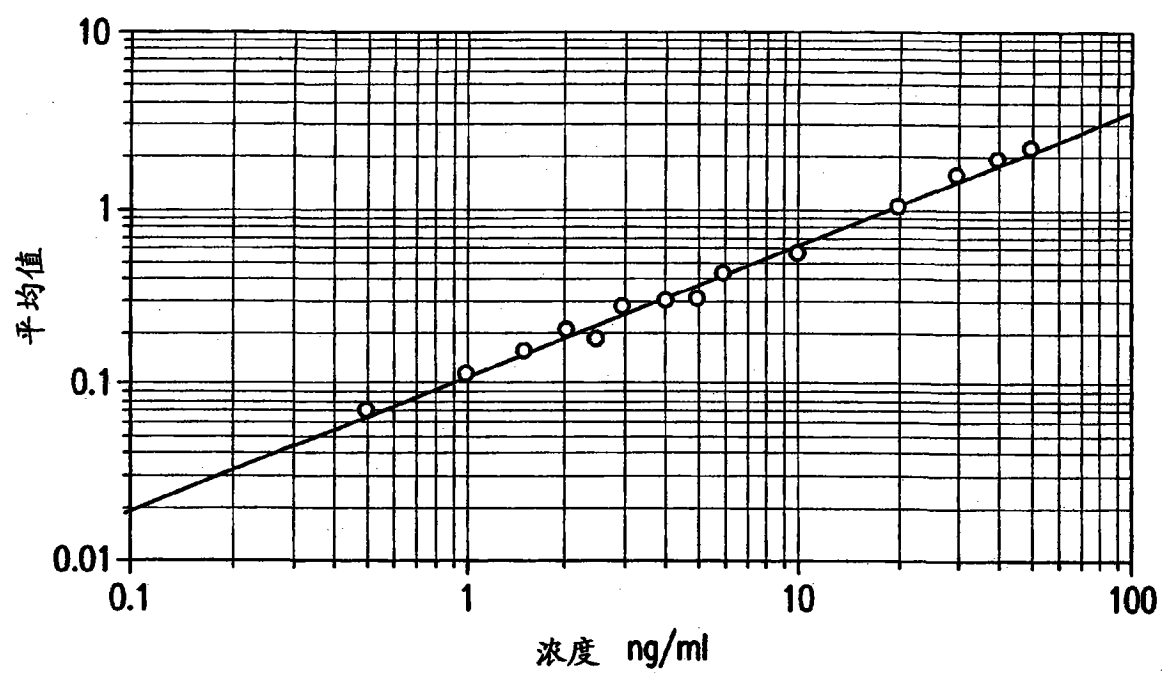


图 5

β - 研究结果
第 28 天 PAG 和超声数据

威斯康辛州地点加利福尼亚州地点

超声	PAGs		百分比	
	怀孕	未孕	怀孕	程度
怀孕	358	11	369	97.0
未孕	44	464	508	91.3
	402	475	877	

超声	PAGs		百分比	
	怀孕	未孕	怀孕	程度
怀孕	391	18	409	95.6
未孕	41	419	460	91.1
	432	437	869	

图 6

β-研究结果:
威斯康辛州同步化繁殖

特征	早期再同步	晚期再同步	显著性
第 1 次 TAI 后可获得的数目	228	226	
第 1 次授精的怀孕 %	46.3	47.9	NS
授精间天数	35.1	42.0	P<0.05
授精数 (NI) NI/ 怀孕	2.60	2.65	NS
	2.29	2.37	NS
到怀孕的天数 (不包括第 1 次 TAI)	45.2	58.3	P<0.05
怀孕 % (不包括第 1 次 TAI)	46.1	51.4	NS

* 分析了 30 头母牛的数据

图 7

β - 研究结果:
加利福尼亚州 -TAI+发情繁殖

特征	早期再同步	晚期再同步	显著性
第 1 次 TAI 后 可获得的数目	321	335	
第 1 次授精的怀孕 %	27.7	28.7	NS
授精间天数	28.9	32.3	P<0.05
授精数 (NI) NI// 怀孕	2.86	3.05	P<0.05
	2.49	2.77	P<0.05
到怀孕的天数 (不包括第 1 次 TAI)	37.9	48.0	P<0.05
怀孕 % (不包括第 1 次 TAI)	36.6	36.2	NS

* 分析了 42 头母牛的数据

图 8

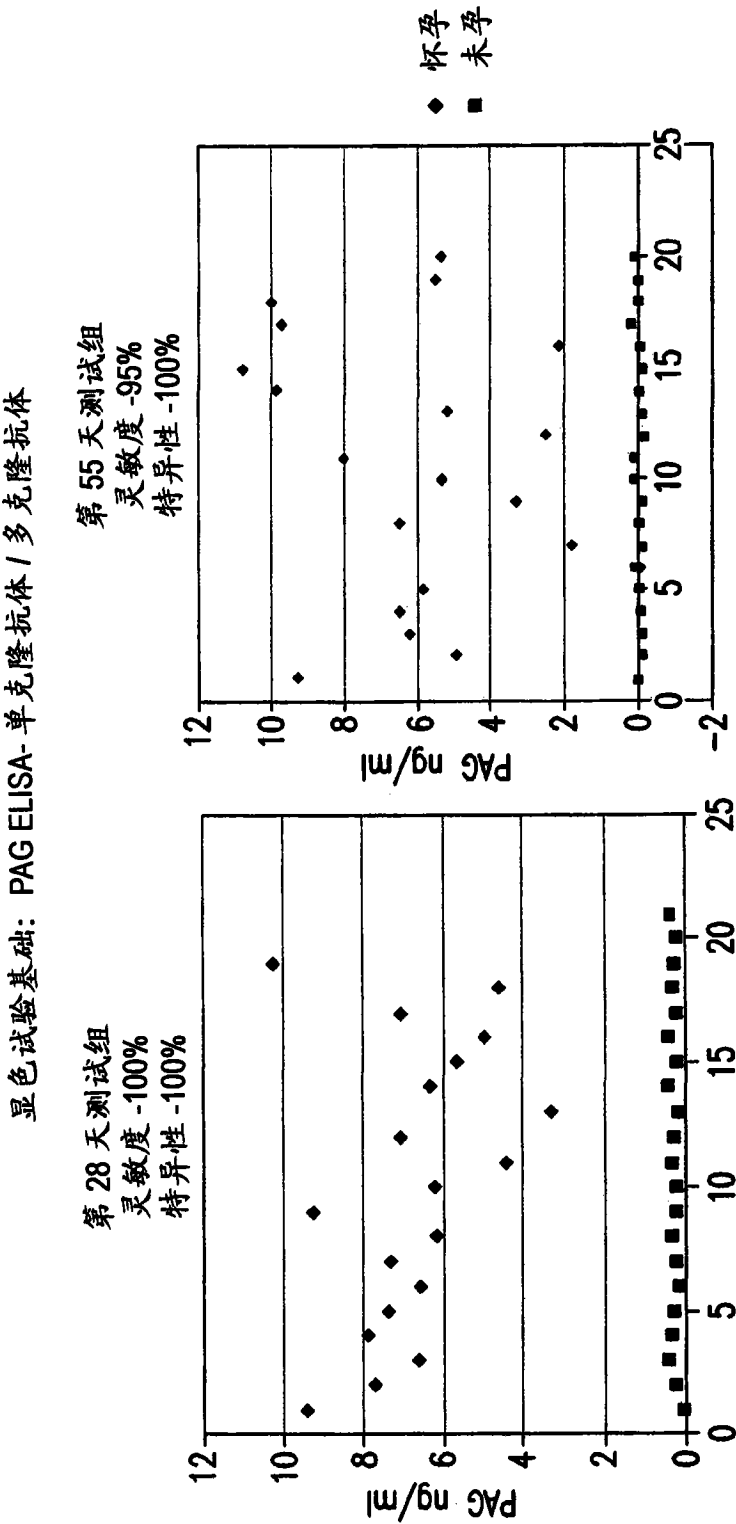
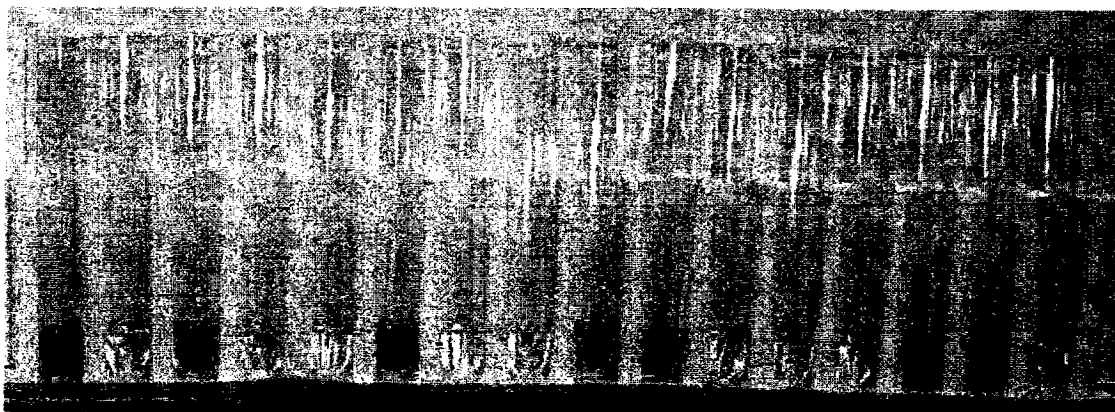


图 9

采用显色试验的牛妊娠诊断



蓝色：怀孕
无色：未孕

图 10

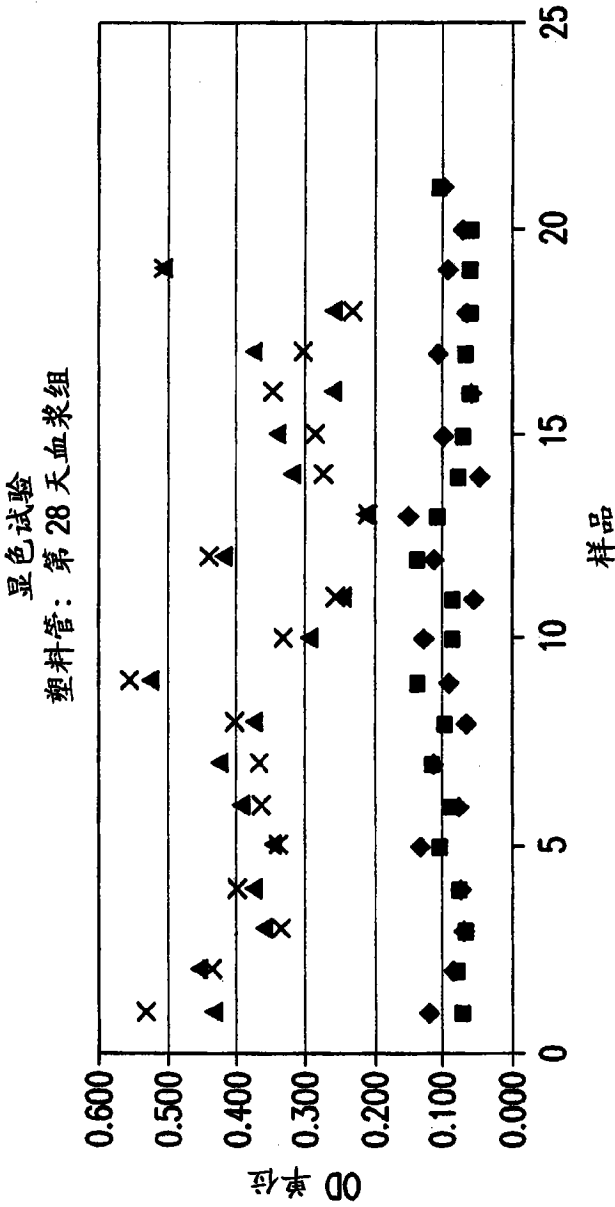


图 11A

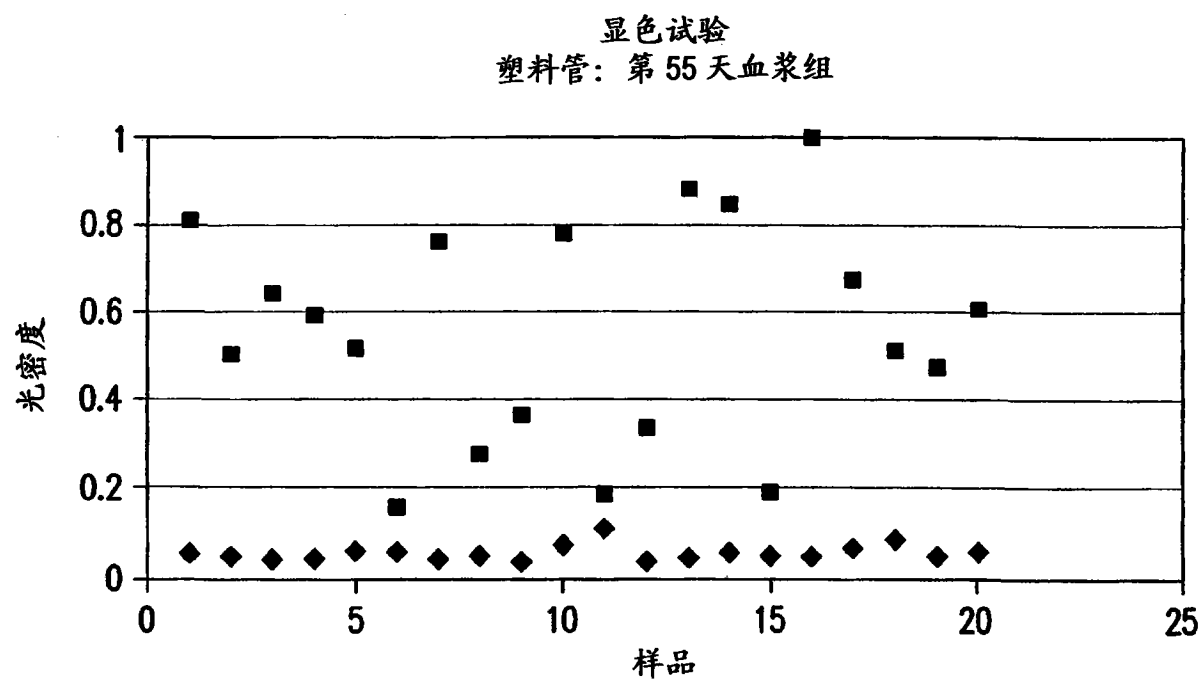


图 11B

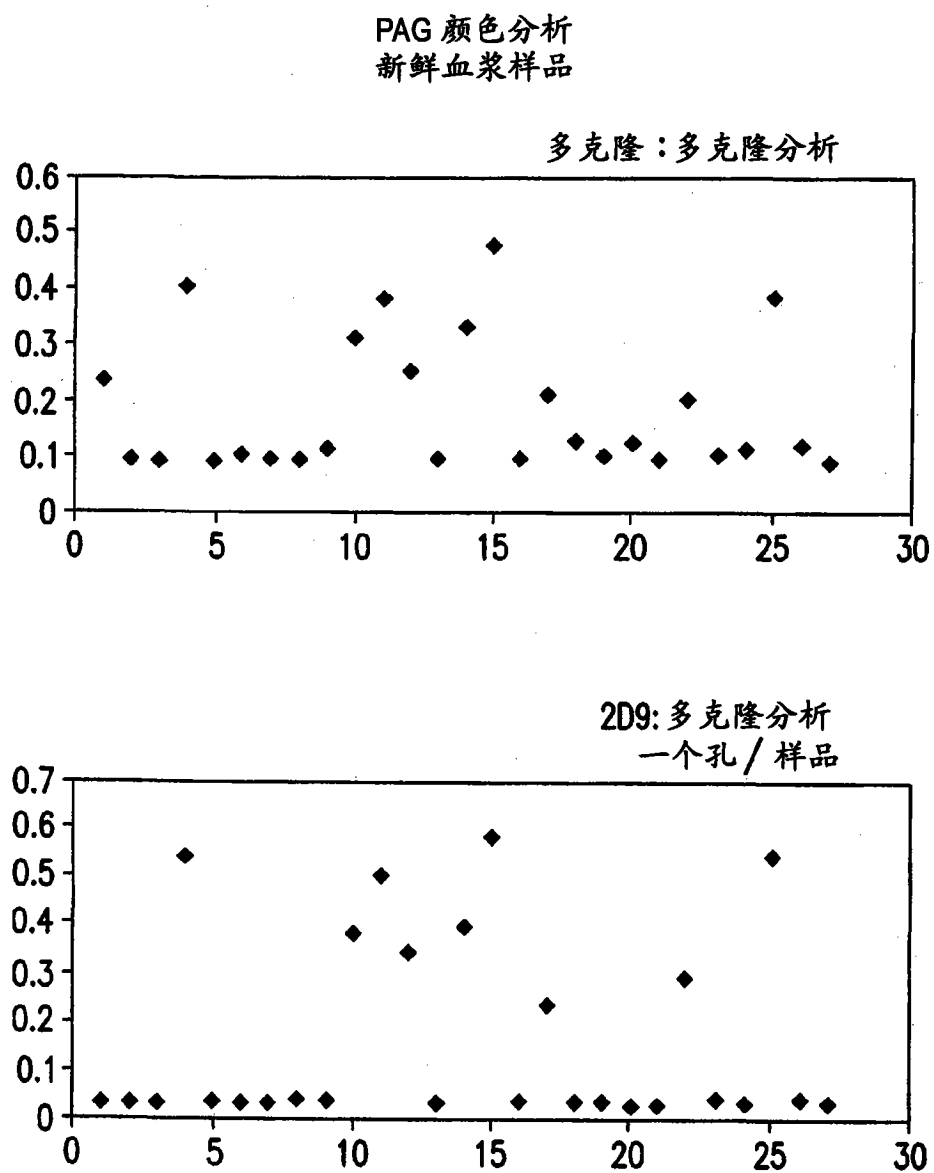


图 12

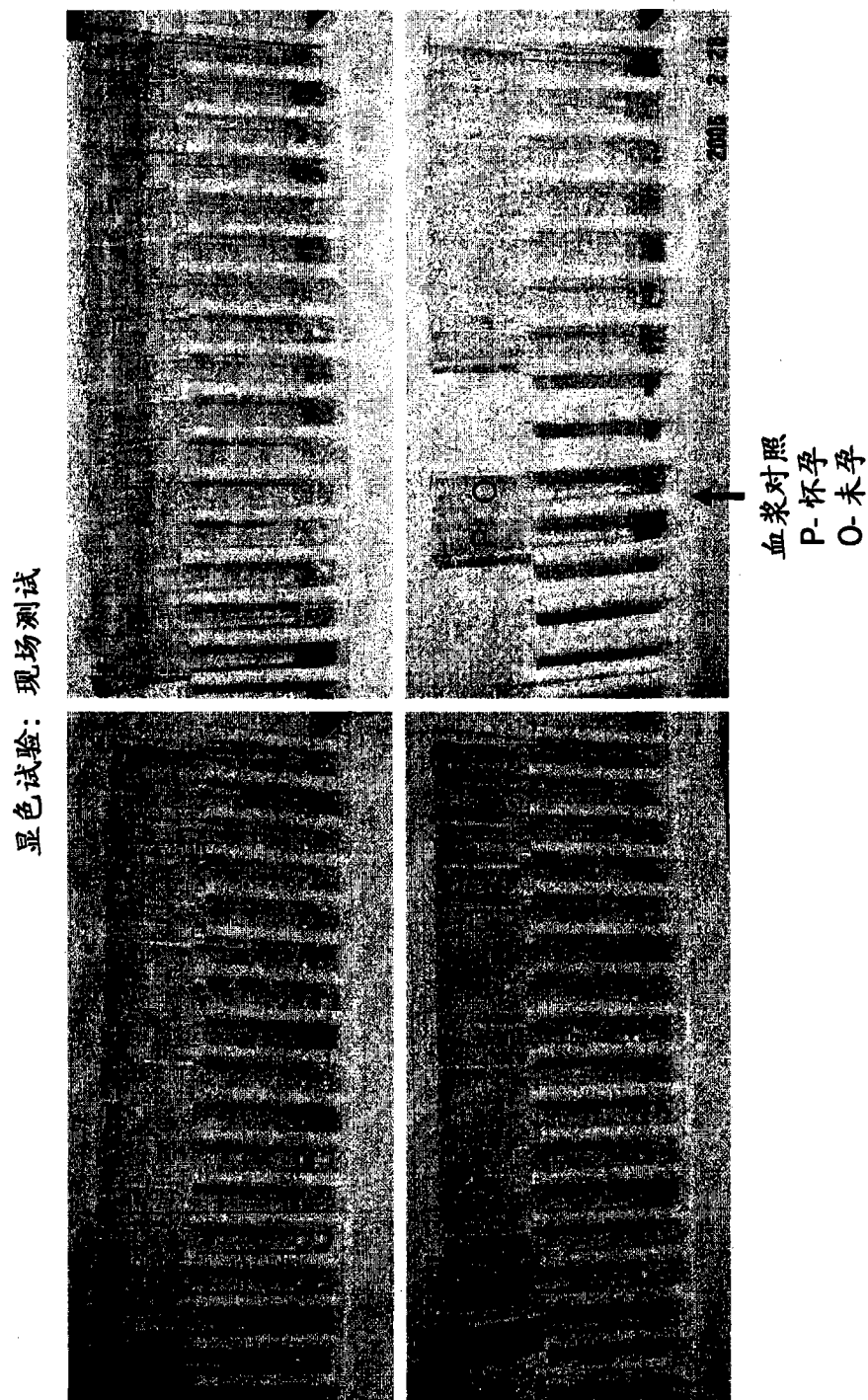


图 13

显色试验：现场测试

检测样品总数：54

配种后第 33-34 天

	怀孕	未孕	复核
PAGs	15	37	2
超声	14	40	
一致	14	36	

测试由 3 人读数

试管试验中有 1 个假阳性

图 14

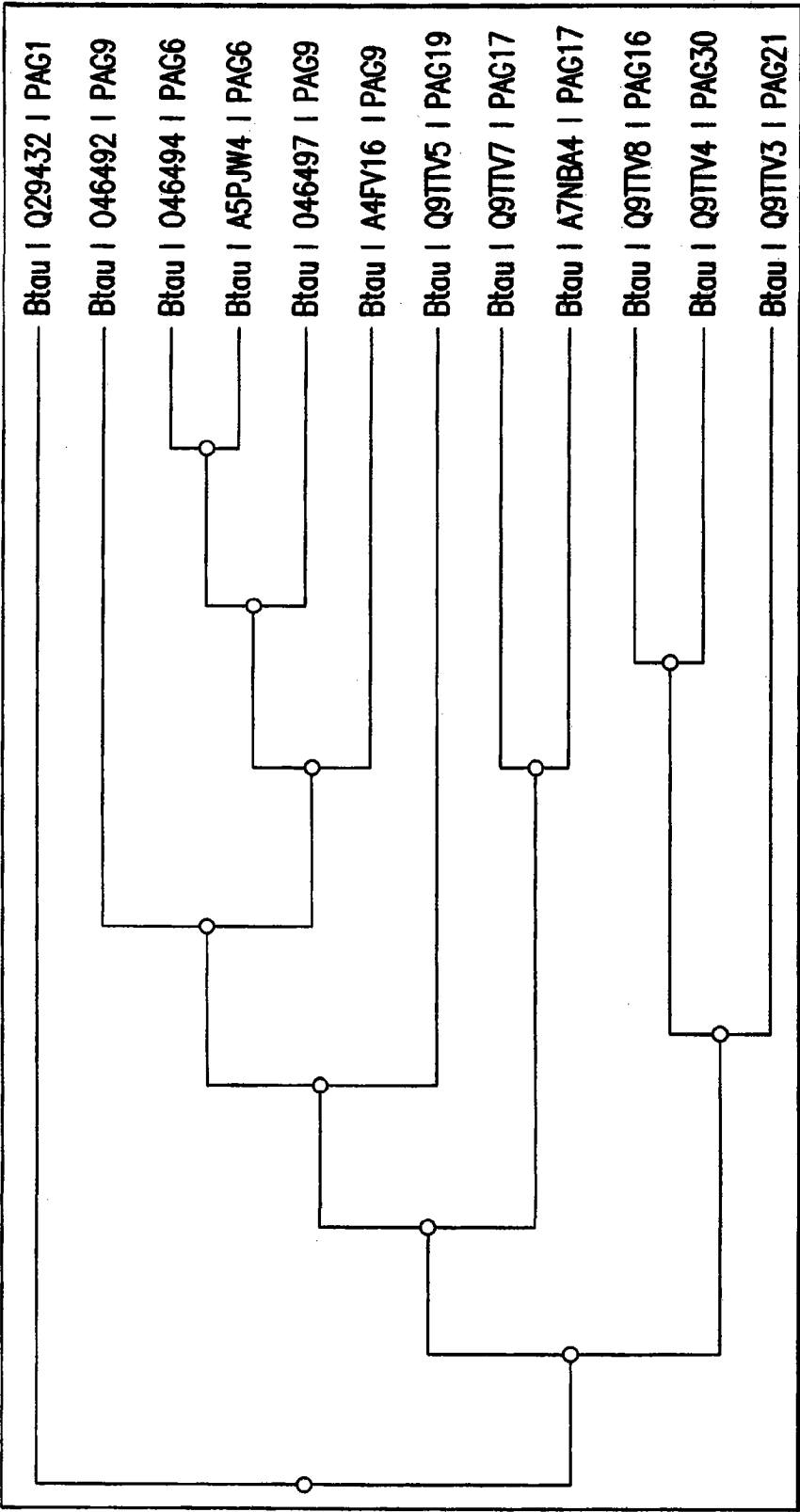


图 15

图 16

	130	140	150	160	170	180
.....I...I	I...I	I...I	I...I	I...I	I...I	I...I
FRLTNKTRFI	TYGSGRMKG	VWHDTVRIGN	LVSTDPFGL	SIEEYGFEG	YDGVGLN	YDGVGLN
...SRR...S	IBAL	D	Q...	CL...S....M	RF.....S	RF.....S
RPTNKTRIT	YGSGRMKG	.HDTVIGDL	VSTDPFGLC	LKDSGFKGIP	FDGILGLSYP	FDGILGLSYP
RPTNKTRIT	YGSGRMKG	.HDTVIGDL	VSTDPFGLC	LKDSGFKGIP	FDGILGLSYP	FDGILGLSYP
QPTNKTRIT	YGSGRMKG	AYDTRIGDL	VSTDPFGLS	WV.YGLEGRN	YDGVGLNYP	YDGVGLNYP
QPTNKTRIT	YGSGRMKG	AYDTRIGDL	VSTDPFGLS	WV.YGLEGRN	YDGVGLNYP	YDGVGLNYP
..P.T.....	I.....	A.....		MA...L.S.	RF..I.....	RF..I.....
..H.Q.V.N.	K.NT.....	L.Y.....	D.....	CI.LA.V.D.I	PF.....	PF.....
..H.Q.V.N.	K.NT.....	L.Y.....	D.....	CI.LA.V.D.I	PF.....	PF.....
.....S.....	I.....	A.....	D.....	S.MA...L.HI	PF..I.....	PF..I.....
.....G.....			D.....	VA.....	RF.....	RF.....
..P.....S.	R.....	D.....		VS....KD.	A..I.....	A..I.....
.....I...I	I...I	I...I	I...I	I...I	I...I	I...I
PNISFSGAIP	IFDKLKNORA	ISBPVFAFYL	SKOEREGSW	MFGGVDRHY	EGELNWP	EGELNWP
T...P.....	...Y...BG			A.....	K.....I..M	K.....I..M
NKTFSGAFPI	FDKLKNEGAI	SBPVFAFYL	KOKQEGSV	M.FG.VDHY	K.GELNWP	K.GELNWP
NKTFSGAFPI	FDKLKNEGAI	SBPVFAFYL	KOKQEGSV	M.FG.VDHY	K.GELNWP	K.GELNWP
NISFSGAIP	FDKLKNQGA	SBPVFAFYL	KOKQEGSV	M.FG.VDHY	K.GELNWP	K.GELNWP
NISFSGAIP	FDKLKNQGA	SBPVFAFYL	KOKQEGSV	M.FG.VDHY	K.GELNWP	K.GELNWP
..L.C.....	G.	D.I.....		K.....	K.....	K.....
..M.....	N..BG			K.....	K.....	K.....
..M.....	N..BG			K.....	K.....	K.....
..V.S.....	G.			KQ.....	R.K.....	R.K.....
.....K.....	BG			KQK.....	K.....	K.....
..DE...E...	BG	I.....		KK.....	K.....	K.....

图 16-1

图 16-2

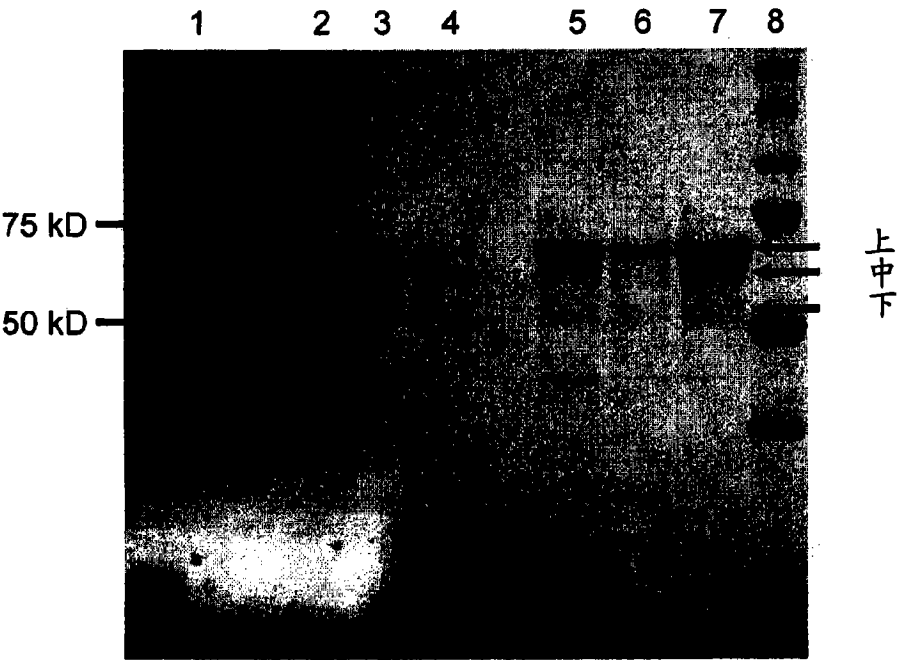


图 17