



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115362170 A

(43) 申请公布日 2022. 11. 18

(21) 申请号 202180028573.3

(22) 申请日 2021.04.15

(30) 优先权数据

2020-073236 2020.04.16 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.10.14

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2021/015540 2021.04.15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/210632 JA 2021.10.21

(71) 申请人 电化株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 宫泽恭 桑原三和

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

专利代理师 李志强 梅黎

(51) Int.Cl.

C07K 16/08 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

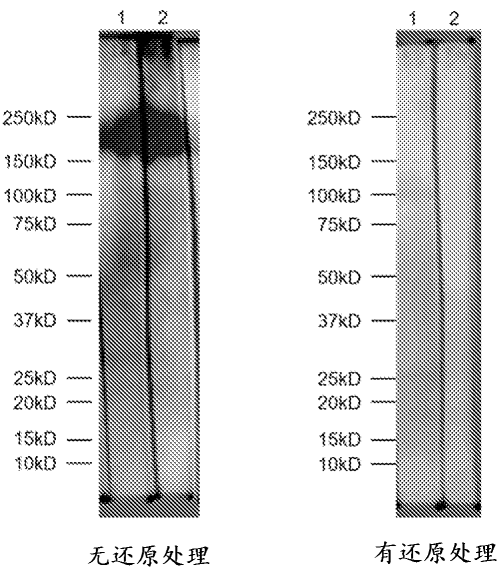
权利要求书1页 说明书13页
序列表4页 附图5页

(54) 发明名称

腺病毒的免疫测定方法及免疫测定器具

(57) 摘要

本发明提供可迅速且简便地、而且高灵敏度地检测和测定被检试样中含有的腺病毒的单克隆抗体、使用该单克隆抗体的腺病毒的免疫测定方法和免疫测定器具。本发明提供与具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的第21~944位序列的多肽发生抗原抗体反应的单克隆抗体或其抗原结合片段、使用该单克隆抗体或其抗原结合片段的免疫测定方法和免疫测定器具。



1. 单克隆抗体或其抗原结合片段,其与具有SEQ ID NO: 1所示氨基酸序列的第21~944位序列的多肽发生抗原抗体反应。

2. 权利要求1所述的单克隆抗体或其抗原结合片段,其与具有选自SEQ ID NO: 1所示氨基酸序列的第21~131位、第266~412位和第448~944位的至少1个范围的序列的多肽发生抗原抗体反应。

3. 权利要求1或2所述的单克隆抗体或其抗原结合片段,其与具有选自SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的第21~115位、第266~385位和第451~944位的至少1个范围的序列的多肽发生抗原抗体反应。

4. 权利要求1或2所述的单克隆抗体或其抗原结合片段,其与具有选自SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的21~45、第56~115位、第266~385位、第451~485位、第526~575位、第581~615位、第656~725位、第766~795位、第801~830位、第851~875位和第886~944位的至少1个范围的序列的多肽发生抗原抗体反应。

5. 腺病毒的免疫测定方法,其包括利用权利要求1~4中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段与检体中的腺病毒的抗原抗体反应来对腺病毒进行免疫测定。

6. 权利要求5所述的方法,其中,所述免疫测定方法为夹心法,所述单克隆抗体或其抗原结合片段用于标记或固相中的至少任一个。

7. 腺病毒的免疫测定器具,其含有权利要求1~4中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段。

腺病毒的免疫测定方法及免疫测定器具

技术领域

[0001] 本发明涉及腺病毒的免疫测定方法及免疫测定器具以及用于其的抗腺病毒抗体。

背景技术

[0002] 腺病毒已知是急性发热性咽炎、咽结膜炎、急性呼吸道炎、病毒性肺炎等呼吸系统疾病,急性滤泡性结膜炎、流行性角结膜炎等眼病,感染性胃肠炎等消化系统疾病,尿道炎等泌尿系统疾病等的病原体。目前,腺病毒分为A~G这7种,存在超过80个类型。51型以前作为血清型报告,而52型以后基于确定的全部碱基序列作为基因型报告(非专利文献1)。在腺病毒感染人时,呈现多种多样的临床症状,由于特异性的病情少,所以难以根据临床症状证明腺病毒的感染。另外,腺病毒的感染性强,为了防止群体感染,需要在早期证明病毒的感染。

[0003] 作为迅速且简便地检测腺病毒的方法,也开发了使用抗腺病毒抗体的免疫色谱法或使用EIA的方法,但在可采集的试样量少的眼科领域阳性率为60%以下,需要更高灵敏度的迅速诊断法或可用于其的抗腺病毒单克隆抗体。

[0004] 在日本国立感染症研究所的发病动向调查中,作为腺病毒相关疾病,掌握了咽结膜热、感染性胃肠炎、流行性角结膜炎的患者发病信息。急性呼吸系统疾病、咽结膜热的原因已知是B、C、E种的腺病毒,感染性胃肠炎的原因已知是A、F、G种的腺病毒,流行性角结膜炎的原因已知是B、D、E种的腺病毒(非专利文献2)。B种的腺病毒3型和E种的腺病毒4型是流行性角结膜炎和咽结膜热的最普遍的病因,D种的腺病毒8型、19型和37型是一些国家、特别是东亚和东南亚的流行性角结膜炎大爆发的原因。腺病毒8型、19型和37型是众所周知的院内感染的流行病学原因。最近,由腺病毒引起的院内感染成为公共卫生中的重要社会问题,成为医院的经济性和伦理性问题。

[0005] 目前制作并报告了多种与腺病毒反应的单克隆抗体。例如,报告了使用与腺病毒的特定亚型反应的单克隆抗体来检测腺病毒的方法(专利文献1和2)。

[0006] 现有技术文献

非专利文献

非专利文献1:Seto D等人, J Virol 85: 5701-5702, 2011

非专利文献2:IASR Vol. 38 p.133-135: 2017年7月号

专利文献1:日本特开2000-290298

专利文献2:日本特开2000-290299。

发明内容

[0007] 发明所要解决的课题

但是,目前所制作的针对腺病毒的单克隆抗体对腺病毒的检测灵敏度均不充分,需要更高灵敏度地反应的单克隆抗体。另外,目前的抗腺病毒单克隆抗体由于未确定表位的氨基酸序列,所以存在重现性差的问题。

[0008] 本发明的目的在于,提供可迅速且简便地、而且高灵敏度地检测和测定被检试样中含有的腺病毒的单克隆抗体、使用该单克隆抗体的腺病毒的免疫测定方法和免疫测定器具。

[0009] 解决课题的手段

本发明人对上述课题进行了深入研究,结果发现,为了更高灵敏度地检测腺病毒,使用以腺病毒所含有的特定氨基酸序列为表位的单克隆抗体是有效的,从而完成了本发明。

[0010] 即,本发明如下所述。

[0011] [1] 单克隆抗体或其抗原结合片段,其与具有SEQ ID NO: 1所示的氨基酸序列的第21~944位序列的多肽发生抗原抗体反应。

[0012] [2] [1]所述的单克隆抗体或其抗原结合片段,其与具有选自SEQ ID NO: 1所示氨基酸序列的第21~131位、第266~412位和第448~944位的至少1个范围的序列的多肽发生抗原抗体反应。

[0013] [3] [1]或[2]所述的单克隆抗体或其抗原结合片段,其与具有选自SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的第21~115位、第266~385位和第451~944位的至少1个范围的序列的多肽发生抗原抗体反应。

[0014] [4] [1]或[2]所述的单克隆抗体或其抗原结合片段,其与具有选自SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的21~45、第56~115位、第266~385位、第451~485位、第526~575位、第581~615位、第656~725位、第766~795位、第801~830位、第851~875位和第886~944位的至少1个范围的序列的多肽发生抗原抗体反应。

[0015] [5] 腺病毒的免疫测定方法,其包括利用[1]~[4]中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段与检体中的腺病毒的抗原抗体反应来对腺病毒进行免疫测定。

[0016] [6] [5]所述的方法,其中,所述免疫测定方法为夹心法,所述单克隆抗体或其抗原结合片段用于标记或固相中的至少任一个。

[0017] [7] 腺病毒的免疫测定器具,其含有[1]~[4]中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0018] 发明的效果

根据本发明,可提供能够迅速且简便地、而且高灵敏度地检测和测定被检试样中含有的腺病毒的单克隆抗体、使用该单克隆抗体的腺病毒的免疫测定方法和免疫测定器具。

附图说明

[0019] [图1] 表示实施例3中进行的蛋白印迹的结果的图。

[0020] [图2] 表示用CBB将实施例3中进行的电泳后的凝胶染色的结果的图。

[0021] [图3-1] 表示3型腺病毒GB株六邻体蛋白的肽文库的索引1~51的图。

[0022] [图3-2] 表示3型腺病毒GB株六邻体蛋白的肽文库的索引52~102的图。

[0023] [图3-3] 表示3型腺病毒GB株六邻体蛋白的肽文库的索引103~152的图。

[0024] [图3-4] 表示3型腺病毒GB株六邻体蛋白的肽文库的索引153~187的图。

具体实施方式

[0025] 以下,对本发明的实施方式进行详细叙述。

[0026] <单克隆抗体或其抗原结合片段>

本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段与具有SEQ ID NO: 1所示氨基酸序列的第21~944位的序列的多肽发生抗原抗体反应。SEQ ID NO: 1的氨基酸序列是由944个氨基酸残基构成的3型腺病毒GB株六邻体单体蛋白(GenBank登录号 AB330084.1)的序列。通过在利用蛋白印迹法的腺病毒的检测中使用本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段,可在分子量100kD左右的被认为是单体的条带和200~300kD的被认为是三聚体的条带处检测到由抗原抗体反应产生的特异性信号。但是,对于被认为是单体的100kD左右的条带,只发现非常弱的反应。

[0027] 在优选方式中,本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段与具有选自SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的第21~131位、第266~412位和第448~944位的至少1个范围的序列的多肽发生抗原抗体反应。需说明的是,SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的第132~265位和第413~447位的序列被认为是在腺病毒亚型之间保守性低的序列。

[0028] 另外,在另一优选方式中,本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段与具有选自SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的第21~115位、第266~385位和第451~944位的至少1个范围的序列的多肽发生抗原抗体反应。

[0029] 此外,在另一优选方式中,本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段与具有选自SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的21~45、第56~115位、第266~385位、第451~485位、第526~575位、第581~615位、第656~725位、第766~795位、第801~830位、第851~875位和第886~944位的至少1个范围的序列的多肽发生抗原抗体反应。

[0030] 通过使用与上述范围的氨基酸序列的多肽发生抗原抗体反应的单克隆抗体或其抗原结合片段,可高灵敏度地检测腺病毒。

[0031] 本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段具有由重链和轻链构成的基本结构,重链和轻链分别具有可与抗原特异性结合的可变区。 V_H 指重链的可变区, V_L 指轻链的可变区。重链和轻链的可变区分别包含互补决定区(CDR)、即CDR1、CDR2和CDR3,以及框架区(FR)的氨基酸序列。例如,可变区包含3个CDR和3或4个FR(例如FR1、FR2、FR3和任选的FR4)。

[0032] 本发明的单克隆抗体包含四链抗体(例如2条轻链和2条重链)、重组抗体或修饰抗体(例如嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、CDR移植抗体、灵长类化抗体、去免疫化抗体、类人源化(synhumanized)抗体、半抗体、双特异性抗体)。另外,单克隆抗体的类别不限定于IgG,也可以是IgM或IgY。

[0033] 在本发明中,单克隆抗体的抗原结合片段是只分离单克隆抗体的抗原结合部位的片段,例如可列举出通过公知的方法制作的Fab、Fab'、F(ab')₂、单链抗体(scFv)等具有特异性抗原结合性的片段。

[0034] (单克隆抗体的制作方法)

本发明的单克隆抗体可通过使用公知的免疫学方法,对被免疫动物免疫含有腺病毒的复合体或提取物、或该腺病毒或它们的部分肽,使用被免疫动物的细胞来制作杂交瘤而得到,所述腺病毒含有本发明的单克隆抗体发生抗原抗体反应的上述特定氨基酸序列。免疫所使用的肽的长度没有特别限定,可使用优选为5个氨基酸以上、更优选为10个氨基酸

以上的肽作为免疫原。

[0035] 免疫原也可由培养液得到,也可通过将编码含有本发明的单克隆抗体发生抗原抗体反应的上述特定氨基酸序列的腺病毒抗原的DNA整合到质粒载体中,将其导入到宿主细胞中进行表达而得到。作为免疫原的腺病毒抗原或其部分肽也可作为与如下所示的蛋白质的融合蛋白质表达,在纯化后或未纯化的状态下直接用作免疫原。在融合蛋白质的制作中,可利用本领域技术人员通常作为“蛋白质表达、纯化标签”使用的谷胱甘肽S-转移酶(GST)、麦芽糖结合蛋白(MBP)、硫氧还蛋白(TRX)、Nus标签、S标签、HSV标签、FRAG标签、聚组氨酸标签等。对于与它们的融合蛋白质,优选使用消化酶将上述腺病毒抗原或其部分肽部分与除其以外的标签部分切割、分离纯化后用作免疫原。

[0036] 由免疫的动物调制单克隆抗体可通过众所周知的Kohler等人的方法(Kohler等人, Nature, vol, 256, p495-497 (1975))容易地进行。即,从免疫的动物回收脾细胞或淋巴细胞等产抗体细胞,通过常规方法使其与小鼠骨髓瘤细胞融合来制作杂交瘤,通过有限稀释法等克隆得到的杂交瘤,在克隆的各杂交瘤产生的单克隆抗体中,选择与动物免疫所使用的抗原发生抗原抗体反应的单克隆抗体。

[0037] 从腹水或培养上清液中纯化单克隆抗体可使用公知的免疫球蛋白纯化法。例如,可列举出基于使用硫酸铵或硫酸钠的盐析的分级法、PEG分级法、乙醇分级法、DEAE离子交换色谱法、凝胶过滤法等。另外,根据免疫动物种类和单克隆抗体的类别,也可通过使用结合有蛋白A、蛋白G、蛋白L中的任一种的载体的亲和色谱法进行纯化。

[0038] <免疫测定方法>

在本发明中,通过使用上述单克隆抗体或其抗原结合片段,可非常高灵敏度地检测腺病毒。以下,在实施例之前的记载中,除了根据上下文明确不是这样的情况以外,“单克隆抗体”指“单克隆抗体或其抗原结合片段”。

[0039] 在本发明中,腺病毒的检测通过利用上述单克隆抗体与检体中的腺病毒的抗原抗体反应对腺病毒进行免疫测定来进行。单克隆抗体与腺病毒发生抗原抗体反应是指单克隆抗体与腺病毒特异性地反应。“特异性”是指在混合有抗原蛋白质和单克隆抗体的液体体系中,该抗体不与抗原蛋白质以外的成分发生可检测水平的抗原抗体反应,或即使发生任何结合反应或缔合反应,也只发生明显比该抗体与抗原蛋白质的抗原抗体反应弱的反应。

[0040] 在本发明中,作为免疫测定法,也可使用竞争法、凝集法、蛋白印迹法、免疫染色法、夹心法等对于本领域技术人员而言众所周知的任意方法。

[0041] 作为本发明的免疫测定方法,优选夹心法。夹心法本身在免疫测定领域是众所周知的,例如可通过免疫色谱法或ELISA法进行。这些夹心法本身都是众所周知的,本发明的方法除了使用上述特定的单克隆抗体以外,可通过众所周知的夹心法进行。

[0042] 在夹心法中使用识别抗原的2种抗体(固定于固相的固定抗体和标记抗体),但在本发明的方法中,在这2种抗体中至少有一种是上述本发明的单克隆抗体。固定于固相的固定抗体由于每单位面积可固定的抗体量有限,所以为了更好地达成提高灵敏度的本发明的目的,优选至少在固定抗体中使用本发明的单克隆抗体。需说明的是,在单一的分子或单一的复合体中至少存在2种被该单克隆抗体识别的抗原的情况下,也可将单一种类的该单克隆抗体用作固相抗体和标记抗体来进行夹心法。

[0043] 在以夹心法为检测原理的免疫测定中,作为固定抗体的固相,可通过公知技术固

定抗体的固相均可使用,例如可任意选择具有毛细管作用的多孔性薄膜(膜)、粒子状物质、试管、树脂平板等公知的固相。另外,作为标记抗体的物质,可使用酶、放射性同位素、荧光物质、发光物质、有色粒子、胶体粒子等。在利用上述各种材料的免疫测定法中,特别是从临床检查的简便性和迅速性的观点出发,优选使用膜的侧流式免疫测定法。

[0044] 在本发明中,即使在使用单克隆抗体对腺病毒进行定量或半定量的情况下,由于定量或半定量必然伴随着“测定”,所以也包含在本发明的“测定”中。即,在本发明中,定量、半定量、检测均包含在免疫测定的“测定”中。

实施例

[0045] 以下,基于实施例对本发明进行更具体的说明。但是,本发明不限于下述实施例。

[0046] (实施例1) 抗腺病毒单克隆抗体的制作

1. 腺病毒抗原的调制

使腺病毒感染具有敏感性的哺乳类细胞,培养数天后通过紫外线照射将腺病毒感染细胞的培养液灭活,使用得到的灭活物。

[0047] 2. 抗腺病毒单克隆抗体的制作

对BALB/c小鼠免疫1.的腺病毒灭活抗原,从饲养一定时间的小鼠摘除脾脏,通过Kohler等人的方法(Kohler等人, Nature, vol, 256, p495-497 (1975))与小鼠骨髓瘤细胞(P3×63)融合,得到多种产生抗腺病毒抗体的杂交瘤细胞株。

[0048] 将取得的细胞株对经姥鲛烷处理的BALB/c小鼠进行腹腔给药,约2周后,采集含有抗体的腹水。由得到的腹水,通过使用蛋白A柱的亲色谱法纯化IgG,得到多种纯化抗腺病毒单克隆抗体。

[0049] 在以下的实施例中,在得到的多种抗腺病毒单克隆抗体中,使用考虑反应性和特异性而选择的2种,抗体1和抗体2。

[0050] (实施例2) 测定腺病毒的免疫测定器具

1. 抗腺病毒抗体在硝酸纤维素膜上的固定

准备用缓冲液将实施例1中制作的抗腺病毒抗体(抗体2)稀释而得到的液体和抗小鼠IgG抗体,在衬有PET薄膜的硝酸纤维素膜的样品垫一侧线状涂布抗腺病毒抗体,在吸收体一侧线状涂布抗小鼠IgG抗体。然后,在暖风下使硝酸纤维素膜充分干燥,得到固定有抗腺病毒抗体的膜。

[0051] 2. 抗腺病毒抗体在着色聚苯乙烯粒子上的固定

使实施例1中制作的抗腺病毒抗体(抗体1)共价结合于着色聚苯乙烯粒子上后,使着色聚苯乙烯粒子悬浮于悬浮液中。接着,通过超声处理得到充分分散的结合有抗腺病毒抗体的着色聚苯乙烯粒子。在本说明书中,将这里得到的粒子称为固定有抗腺病毒抗体的粒子。

[0052] 3. 结合有抗腺病毒抗体的着色聚苯乙烯粒子的涂布、干燥

将规定量的2中制作的固定有抗腺病毒抗体的粒子涂布在玻璃纤维无纺布上,在暖风下使其充分干燥。在本说明书中,将这里得到的垫称为标记抗体垫。

[0053] 4. 腺病毒检查器件的制作

将1中制作的固定有抗腺病毒抗体的膜以及2和3中制作的标记抗体垫与其它部件(背衬片、吸收带、样品垫)贴合,切割成5mm宽,作为腺病毒检查器件。

[0054] 5. 腺病毒检查器件的反应性的确认

用缓冲液将各型的腺病毒感染细胞的培养液稀释,调制各型的腺病毒的2倍稀释系列。

[0055] 将调制的腺病毒稀释液添加到检体悬浮液(10mM Tris (pH 8.0)、1w/v%聚氧乙烯辛基苯基醚、3w/v%精氨酸、3w/v% BSA)中,向4中制作的腺病毒检查器件中滴加50μL后,静置5分钟。

[0056] 在抗小鼠IgG抗体和抗腺病毒抗体这两者的涂布位置可通过目视确认显色的情况下判定为+(阳性)。只在抗小鼠IgG抗体的涂布位置可通过目视确认显色、在抗腺病毒抗体的涂布位置无法通过目视确认显色的情况下判定为-(阴性)。另外,在抗小鼠IgG抗体的涂布位置无法通过目视确认显色的情况下判定为无效。

[0057] 将判定为阳性的最小腺病毒浓度作为最小检测灵敏度,将结果示出于表1中。

[0058] [表1]

腺病毒		最小检测灵敏度	
型	种	TCID ₅₀ /测试	个拷贝/测试
1	C	1.95×10^2	2.50×10^3
2	C	1.95×10^2	6.25×10^3
3	B	2.79×10^2	1.25×10^4
5	C	7.85×10^1	6.25×10^3
6	C	5.58×10^2	3.13×10^3
7	B	1.74×10^2	1.25×10^4
8	D	1.95×10^1	1.25×10^3
11	B	2.79×10^2	5.00×10^4
19	D	2.44×10^1	1.25×10^4
31	A	4.48×10^2	1.25×10^5
37	D	3.14×10^1	2.50×10^3

如表1所示,可确认使用本发明的抗腺病毒抗体的免疫测定器具与属于A~D种的多个类型的腺病毒反应。

[0059] 另外,也可确认与53型、54型、56型、64型、79型、81型、85型的各亚型反应。

[0060] 6. 腺病毒检查器件的特异性的确认

向4中制作的腺病毒检查器件中滴加50μL的含有引起呼吸系统感染的病毒的检体悬浮液,静置5分钟。

[0061] 在抗小鼠IgG抗体和抗腺病毒抗体这两者的涂布位置可通过目视确认显色的情况下判定为+。只在抗小鼠IgG抗体的涂布位置可通过目视确认显色、在抗腺病毒抗体的涂布位置无法通过目视确认显色的情况下判定为-。另外,在抗小鼠IgG抗体的涂布位置无法通过目视确认显色的情况下判定为无效。

[0062] 将结果示出于表2中。

[0063] [表2]

病毒名称	测定结果
柯萨奇病毒A9型	-
柯萨奇病毒B4型	-
柯萨奇病毒B5型	-
柯萨奇病毒B6型	-
艾柯病毒2型	-
艾柯病毒3型	-
艾柯病毒4型	-
艾柯病毒6型	-
艾柯病毒9型	-
艾柯病毒11型	-
艾柯病毒30型	-
单纯疱疹病毒1型	-
人偏肺病毒A型	-
人偏肺病毒B型	-
流感病毒甲型/新喀里多尼亚/20/99 (H1N1)	-
流感病毒甲型/北京/262/95 (H1N1)	-
流感病毒甲型/纽约/55/2004 (H3N2)	-
流感病毒甲型/广岛/52/2005 (H3N2)	-
流感病毒乙型/上海/361/2002 (山形)	-
流感病毒乙型/马来西亚/2506/2004 (维多利亚)	-
麻疹病毒	-
腮腺炎病毒	-
副流感病毒1型	-
副流感病毒2型	-
副流感病毒3型	-
副流感病毒4型	-
呼吸道合胞病毒Long株 (A型)	-
呼吸道合胞病毒CH-8株 (B型)	-

如表2所示,使用本发明的抗腺病毒抗体的免疫测定器具虽然与腺病毒反应,但对其它的呼吸系统感染的致病病毒未显示交叉反应性,由此可确认与腺病毒特异性地反应。

[0064] 7. 腺病毒检查器件的性能比较

将4中制作的腺病毒检查器件(本品)的最小检测灵敏度与市售的腺病毒试剂盒进行比较。

[0065] 分别使用缓冲液将腺病毒感染细胞的培养液稀释,调制2倍稀释系列。向本品中滴加50 μ L的含有腺病毒稀释液的检体悬浮液,静置5分钟后进行判定。对于市售试剂盒,以规定量的腺病毒稀释液作为检体,依据各试剂盒的说明书实施试验并进行判定。

[0066] 在将用本品判定为阳性的最大腺病毒稀释倍率设为“1”时,将市售的腺病毒试剂

盒被判定为阳性的最大稀释倍率设为相对灵敏度,示出于表3中。

[0067] [表3]

试剂盒	各型(种)的相对灵敏度*						
	1 型 (C)	2 型 (C)	3 型 (B)	4 型 (E)	11 型 (B)	37 型 (D)	54 型 (D)
本品	1	1	1	1	1	1	1
试剂盒 A	1	1/2	1	1	1	1	1
试剂盒 B	1/2	1/4	1/2	1/2	1/2	1/2	1/4
试剂盒 C	1/8	1/8	1/8	1/20	1/20	NT	NT
试剂盒 D	1	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2
试剂盒 E	1/16	1/32	1/100	1/80	1/400	NT	NT
试剂盒 F	1/2	1/4	1/2	1/2	1/2	1/2	1/4
试剂盒 G	1/4	1/8	1/8	1/8	1/4	1/4	1/4
试剂盒 H	1/8	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4

NT: 未实施试验

如表3所示,可确认使用本发明的抗腺病毒抗体的免疫测定器具对2型腺病毒的反应性最高,对其它型的腺病毒也与试剂盒A并列具有最高的反应性。

[0068] (实施例3) 抗腺病毒单克隆抗体的抗原识别部位

通过蛋白印迹和LC-MS/MS确认实施例1中得到的抗腺病毒单克隆抗体的抗原识别部位。

[0069] 1. 腺病毒浓缩液的调制

使腺病毒感染A549细胞并培养。在培养第7天回收腺病毒感染细胞,通过超声处理将细胞破碎。通过离心从细胞破碎液中除去细胞残渣,得到腺病毒浓缩液。

[0070] 2. 无还原处理的样品调制

调制1中得到的腺病毒浓缩液的2倍稀释系列,添加各种试剂,使得终浓度为62.5mM Tris-HCl (pH 6.5)、10w/v%甘油、2.3w/v% SDS、0.05% BPB (色素),不进行加热变性处理而进行常规的SDS-PAGE。

[0071] 3. 有还原处理的样品调制

调制1中得到的腺病毒浓缩液的2倍稀释系列,添加各种试剂,使得终浓度为62.5mM Tris-HCl (pH 6.5)、10w/v%甘油、2.3w/v% SDS、0.05% BPB (色素)、5% 2-巯基乙醇,在95℃下进行1分钟的加热变性处理后,进行常规的SDS-PAGE。

[0072] 4. 蛋白印迹

将2和3中得到的泳动后的凝胶转印到PVDF膜上。用脱脂奶进行封闭后,用PBS-Tween充分清洗。使用PBS-Tween调整为3.8μg/mL的抗腺病毒抗体在室温下反应1小时。用PBS-Tween充分清洗后,使稀释为3000倍的HRP标记抗小鼠抗体在室温下反应1小时。用PBS-Tween充分清洗后,使用化学发光检测试剂检测信号。

[0073] 将蛋白印迹的结果示出于图1中。

[0074] 如图1所示,实施例1中制作的2种抗体(抗体1、抗体2)均强烈地与2(无还原处理)

中得到的样品中含有的200kD左右的蛋白质(六邻体三聚体)反应(左图)。通过还原处理,认为六邻体三聚体成为单体,发现在3 (有还原处理)中得到的样品中与100kD左右的蛋白质(六邻体单体)有非常弱的反应(右图)。

[0075] 将用CBB对2和3中得到的泳动后的凝胶进行染色的结果示出于图2中。

[0076] 如图2的箭头所示,2 (无还原处理)中得到的样品中含有的主要蛋白质为200kD左右(左图),3 (有还原处理)中得到的样品为100~150kD (右图)。切出图中用四边形表示的各个染色区域后,经过利用胰蛋白酶的水解,用LC-MS/MS分析氨基酸序列。使用Mascot (Ver. 2.5) (Matrix Science公司)和Scaffold (Proteome Software公司)分析得到的肽片段,结果表明,任一染色区域都以腺病毒的六邻体蛋白作为主要的构成成分。

[0077] 由图1和图2可知,与六邻体单体相比,实施例1中得到的2种抗体均与六邻体三聚体蛋白发生更强的反应,与单体的六邻体蛋白显示弱的反应。虽然本发明的抗体与六邻体单体的反应是弱的反应,但与单体中的特定序列发生抗原抗体反应的本发明的抗体显示对腺病毒的检测非常有效。

[0078] (实施例4) 利用肽微阵列PepStar (JPT Peptide Technologies公司制,以下称为“Pepstar”)的抗腺病毒单克隆抗体对腺病毒六邻体蛋白的反应性分析

1. PepStar的制作

根据3型腺病毒GB株六邻体蛋白 (GenBank登录号AB330084.1) 的氨基酸序列信息,购入固定有表4所示肽文库中所示的肽的肽微阵列Pepstar (JPT Peptide Technologies公司制)。

[0079] [表4-1]

表4 3型腺病毒GB株六邻体蛋白 (GenBank登录号AB330084.1) 的肽文库

索引	序列	名称
1	MATPSMMPQWAYMHI	肽 001
2	MMPQWAYMHIAGQDA	肽 002
3	AYMHIAGQDASEYLS	肽 003
4	AGQDASEYLS PGLVQ	肽 004
5	SEYLS PGLVQ FARAT	肽 005
6	PGLVQ FARATDTYFS	肽 006
7	FARATDTYFSMGNKF	肽 007
8	DTYFSMGNKF RNPTV	肽 008
9	MGNKF RNPTV APTHD	肽 009
10	RNPTV APTHD VTTDR	肽 010
11	APTHD VTTDRSQRIM	肽 011
12	VTTDRSQRIM LRFVP	肽 012
13	SQRIM LRFVP VDRED	肽 013
14	LRFVP VDREDNTYSY	肽 014
15	VDREDNTYSY KVRT	肽 015
16	NTYSY KVRT LAVGD	肽 016
17	KVRT LAVGDNRVLD	肽 017
18	LAVGDNRVLD MASTF	肽 018
19	NRVLD MASTF FDIRG	肽 019
20	MASTF FDIRG VLDRG	肽 020
21	FDIRG VLDRG PSFKP	肽 021
22	VLDRG PSFKP YSGTA	肽 022
23	PSFKP YSGTAYNSLA	肽 023
24	YSGTAYNSLA PKGAP	肽 024
25	YNSLA PKGAP NTSQW	肽 025
26	PKGAP NTSQW IVTTN	肽 026
27	NTSQW IVTTN GDNV	肽 027
28	IVTTN GDNV TTTTN	肽 028
29	GDNAV TTTTN TFGIA	肽 029
30	TTTN TFGIASMKGD	肽 030
31	TFGIASMKGD NITKE	肽 031
32	SMKGD NITKE GLQIG	肽 032
33	NITKE GLQIG KDITT	肽 033
34	GLQIG KDITT EGEE	肽 034
35	KDITT EGEEKPIYA	肽 035
36	EGEEKPIYADKTYQ	肽 036
37	KPIYADKTYQ PEPQV	肽 037
38	DKTYQ PEPQV GEESW	肽 038
39	PEPQV GEESW TDTDG	肽 039
40	GEESW TDTDG TNEKF	肽 040
41	TDTDG TNEKF GGRAL	肽 041
42	TNEKF GGRAL KPATN	肽 042
43	GGRAL KPATN MKPCY	肽 043
44	KPATN MKPCYGSFAR	肽 044
45	MKPCYGSFAR PTNIK	肽 045
46	GSFAR PTNIK GGQAK	肽 046
47	PTNIK GGQAK NRKVK	肽 047
48	GGQAK NRKVK PTTEG	肽 048
49	NRKVK PTTEGGVETE	肽 049
50	PTTEGGVETE EPDID	肽 050
51	GVETE EPDID MEFFD	肽 051

[表4-2]

索引	序列	名称
52	EPDIDMEFFDGRDAV	肽 052
53	MEFFDGRDAVAGALA	肽 053
54	GRDAVAGALAPEIVL	肽 054
55	AGALAPEIVLYTENV	肽 055
56	PEIVLYTENVNLETP	肽 056
57	YTENVNLETPDSHV	肽 057
58	NLETPDSHVVKPET	肽 058
59	DSHVVKPETSNNSH	肽 059
60	YKPETSNNSHANLGQ	肽 060
61	SNNSHANLGQQAMPN	肽 061
62	ANLGQQAMPNRPNYI	肽 062
63	QAMPNRPNYIGFRDN	肽 063
64	RPNYIGFRDNFVGLM	肽 064
65	GFRDNFVGLMYNST	肽 065
66	FVGLMYNSTGNMGV	肽 066
67	YNSTGNMGVLAGQA	肽 067
68	GNMGVLAGQASQLNA	肽 068
69	LAGQASQLNAVVDLQ	肽 069
70	SQLNAVVDLQDRNTE	肽 070
71	VVDLQDRNTELSYQL	肽 071
72	DRNTELSYQLLLDSL	肽 072
73	LSYQLLLDSLGDTR	肽 073
74	LLDSLGDTRTRYFSMW	肽 074
75	GDTRTRYFSMWNAVD	肽 075
76	YFSMWNAVDSYDPD	肽 076
77	NQAVDSYDPDVRIIE	肽 077
78	SYDPDVRIIENHGIE	肽 078
79	VRIIENHGIEDELPN	肽 079
80	NHGIEDELPNYCFPL	肽 080
81	DELPNYCFPLNGIGP	肽 081
82	YCFPLNGIGPGHTYQ	肽 082
83	NGIGPGHTYQGIKVK	肽 083
84	GHTYQGIKVKTDN	肽 084
85	GKVKTDNNGWEKD	肽 085
86	TDDNNGWEKDANVAP	肽 086
87	GWEKDANVAPANEIT	肽 087
88	ANVAPANEITIGNNL	肽 088
89	ANEITIGNNLAMEIN	肽 089
90	IGNNLAMEINIQANL	肽 090
91	AMEINIQANLWRSFL	肽 091
92	IQANLWRSFLYSNVA	肽 092
93	WRSFLYSNVALYLPD	肽 093
94	YSNVALYLPDVYKYT	肽 094
95	LYLPDVYKYTPPNIT	肽 095
96	VYKYTPPNITLPTNT	肽 096
97	PPNITLPTNTNTYFY	肽 097
98	LPTNTNTYFYMNGRV	肽 098
99	NTYFYMNGRVVSPSL	肽 099
100	MNGRVVSPSLVDSYI	肽 100
101	VSPSLVDSYINIGAR	肽 101
102	VDSYINIGARWSLDP	肽 102

[表4-3]

索引	序列	名称
103	NIGARWSLDPMDNVN	肽 103
104	WSLDPMDNVNPFNHH	肽 104
105	MDNVNPFNHHRNAGL	肽 105
106	PFNHHRNAGLRYRSM	肽 106
107	RNAGLRYRSMLLGNG	肽 107
108	RYRSMLLGNGRYVPF	肽 108
109	LLGNGRYVPFHIQVP	肽 109
110	RYVPFHIQVPQKFFA	肽 110
111	HIQVPQKFFAVKNLL	肽 111
112	QKFFAVKNLLLLPGS	肽 112
113	VKNLLLLPGSYTYEW	肽 113
114	LLPGSYTYEWNFRKD	肽 114
115	YTYEWNFRKDVNMVL	肽 115
116	NFRKDVNMVLQSSLG	肽 116
117	VNMVLQSSLGNDLRT	肽 117
118	QSSLGNDLRTDGATI	肽 118
119	NDLRTDGATISFTSI	肽 119
120	DGATISFTSINLYAT	肽 120
121	SFTSINLYATFFPMA	肽 121
122	NLYATFFPMAHTAS	肽 122
123	FFPMAHTASTLEAM	肽 123
124	HNTASTLEAMLNDT	肽 124
125	TLEAMLNDTNDQSF	肽 125
126	LRNDTNDQSFNDYLS	肽 126
127	NDQSFNDYLSAANML	肽 127
128	NDYLSAANMLYPIPA	肽 128
129	AANMLYPIPANATNI	肽 129
130	YPIPANATNIPISIP	肽 130
131	NATNIPISIPSRNWA	肽 131
132	PISIPSRNWAAFRGW	肽 132
133	SRNWAAFRGWSFTRL	肽 133
134	AFRGWSFTRLKTKET	肽 134
135	SFTRLKTKETPSLGS	肽 135
136	KTKETPSLGSGFDPY	肽 136
137	PSLGSGFDPYFVYSG	肽 137
138	GFDPYFVYSGSIPYL	肽 138
139	FVYSGSIPYLDGTFY	肽 139
140	SIPYLDGTFYLNHTF	肽 140
141	DGTFYLNHTFKKVS.I	肽 141
142	LNHTFKKVSIMFDSS	肽 142
143	KKVSIMFDSSVSWPG	肽 143
144	MFDSSVSWPGNDRL	肽 144
145	VSWPGNDRLSPNEF	肽 145
146	NDRLSPNEFEIKRT	肽 146
147	SPNEFEIKRTVDGEG	肽 147
148	EIKRTVDGEGYNVAQ	肽 148
149	VDGEGYNVAQCNMTK	肽 149
150	YNVAQCNMTKDWFLV	肽 150
151	CNMTKDWFLVQMLAN	肽 151
152	DWFLVQMLANYNIGY	肽 152

[表4-4]

索引	序列	名称
153	QMLANYNIGYQGFYI	肽 153
154	YNIGYQGFYIPEGYK	肽 154
155	QGFYIPEGYKDRMYS	肽 155
156	PEGYKDRMYSFFRNF	肽 156
157	DRMYSFFRNFQPMRSR	肽 157
158	FFRNFQPMRSRQVVDE	肽 158
159	QPMRSRQVVDEVNYTD	肽 159
160	QVVDEVNYTDYKAVT	肽 160
161	VNYTDYKAVTLQPYQH	肽 161
162	YKAVTLQPYQHNSGF	肽 162
163	LPYQHNSGFVGYLA	肽 163
164	NNSGFVGYLAPTMRQ	肽 164
165	VGYLAPTMRQGEPPY	肽 165
166	PTMRQGEPPYPANYPY	肽 166
167	GEPPYPANYPYPLIGT	肽 167
168	ANYPYPLIGTTAVKS	肽 168
169	PLIGTTAVKSVTQKK	肽 169
170	TAVKSVTQKKFLCDR	肽 170
171	VTQKKFLCDRTMWRI	肽 171
172	FLCDRTMWRIPFSSN	肽 172
173	TMWRIPFSSNFMSMG	肽 173
174	PFSSNFMSMGALTDL	肽 174
175	FMSMGALTDLGQNML	肽 175
176	ALTDLGQNMLYANSA	肽 176
177	GQNMLYANSAHALDM	肽 177
178	YANSAHALDMTFEVD	肽 178
179	HALDMTFEVDPMDEP	肽 179
180	TFEVDPMDEPTLLYL	肽 180
181	PMDEPTLLYLLFEVF	肽 181
182	TLLYLLFEVFDVVRV	肽 182
183	LFEVFDVVRVHQPHR	肽 183
184	DVVRVHQPHRGVIEA	肽 184
185	HQPHRGVIEAVYLRT	肽 185
186	GVIEAVYLRTPFSSAG	肽 186
187	AVYLRTPFSSAGNATT	肽 187

2. 利用Pepstar的抗腺病毒单克隆抗体的反应性分析

用缓冲液将实施例1中制作的2种抗腺病毒抗体稀释,在30℃下使各种抗体在Pepstar上反应1小时。反应后,在对应的孔中加入1μg/ml的二次荧光标记抗小鼠IgG抗体,反应1小时。将孔上的反应产物清洗并干燥后,用635nm的高分辨率激光扫描仪扫描载玻片,取得荧光强度概况。对得到的结果的图像进行定量,得到各肽的平均像素值。

[0080] 将得到的结果可视化,为了比较各个结合区域,制作表示从白色(无结合)到红色(强结合)进行颜色区分的荧光强度的热图(图3)。

[0081] 由图3的热图的结果明确了实施例1中制作的2种抗腺病毒单克隆抗体与腺病毒六邻体蛋白的反应区域。

<110> Denka Company Limited
 <120> 腺病毒的免疫测定方法及免疫测定器具
 <130> PF703-PCT
 <160> 1
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 944
 <212> PRT
 <213> 腺病毒
 <400> 1
 Met Ala Thr Pro Ser Met Met Pro Gln Trp Ala Tyr Met His Ile Ala
 1 5 10 15
 Gly Gln Asp Ala Ser Glu Tyr Leu Ser Pro Gly Leu Val Gln Phe Ala
 20 25 30
 Arg Ala Thr Asp Thr Tyr Phe Ser Met Gly Asn Lys Phe Arg Asn Pro
 35 40 45
 Thr Val Ala Pro Thr His Asp Val Thr Thr Asp Arg Ser Gln Arg Leu
 50 55 60
 Met Leu Arg Phe Val Pro Val Asp Arg Glu Asp Asn Thr Tyr Ser Tyr
 65 70 75 80
 Lys Val Arg Tyr Thr Leu Ala Val Gly Asp Asn Arg Val Leu Asp Met
 85 90 95
 Ala Ser Thr Phe Phe Asp Ile Arg Gly Val Leu Asp Arg Gly Pro Ser
 100 105 110
 Phe Lys Pro Tyr Ser Gly Thr Ala Tyr Asn Ser Leu Ala Pro Lys Gly
 115 120 125
 Ala Pro Asn Thr Ser Gln Trp Ile Val Thr Thr Asn Gly Asp Asn Ala
 130 135 140
 Val Thr Thr Thr Thr Asn Thr Phe Gly Ile Ala Ser Met Lys Gly Asp
 145 150 155 160
 Asn Ile Thr Lys Glu Gly Leu Gln Ile Gly Lys Asp Ile Thr Thr Thr
 165 170 175
 Glu Gly Glu Glu Lys Pro Ile Tyr Ala Asp Lys Thr Tyr Gln Pro Glu
 180 185 190
 Pro Gln Val Gly Glu Glu Ser Trp Thr Asp Thr Asp Gly Thr Asn Glu
 195 200 205
 Lys Phe Gly Gly Arg Ala Leu Lys Pro Ala Thr Asn Met Lys Pro Cys
 210 215 220

Tyr Gly Ser Phe Ala Arg Pro Thr Asn Ile Lys Gly Gly Gln Ala Lys			
225	230	235	240
Asn Arg Lys Val Lys Pro Thr Thr Glu Gly Gly Val Glu Thr Glu Glu			
	245	250	255
Pro Asp Ile Asp Met Glu Phe Phe Asp Gly Arg Asp Ala Val Ala Gly			
	260	265	270
Ala Leu Ala Pro Glu Ile Val Leu Tyr Thr Glu Asn Val Asn Leu Glu			
	275	280	285
Thr Pro Asp Ser His Val Val Tyr Lys Pro Glu Thr Ser Asn Asn Ser			
	290	295	300
His Ala Asn Leu Gly Gln Gln Ala Met Pro Asn Arg Pro Asn Tyr Ile			
305	310	315	320
Gly Phe Arg Asp Asn Phe Val Gly Leu Met Tyr Tyr Asn Ser Thr Gly			
	325	330	335
Asn Met Gly Val Leu Ala Gly Gln Ala Ser Gln Leu Asn Ala Val Val			
	340	345	350
Asp Leu Gln Asp Arg Asn Thr Glu Leu Ser Tyr Gln Leu Leu Leu Asp			
	355	360	365
Ser Leu Gly Asp Arg Thr Arg Tyr Phe Ser Met Trp Asn Gln Ala Val			
	370	375	380
Asp Ser Tyr Asp Pro Asp Val Arg Ile Ile Glu Asn His Gly Ile Glu			
385	390	395	400
Asp Glu Leu Pro Asn Tyr Cys Phe Pro Leu Asn Gly Ile Gly Pro Gly			
	405	410	415
His Thr Tyr Gln Gly Ile Lys Val Lys Thr Asp Asp Thr Asn Gly Trp			
	420	425	430
Glu Lys Asp Ala Asn Val Ala Pro Ala Asn Glu Ile Thr Ile Gly Asn			
	435	440	445
Asn Leu Ala Met Glu Ile Asn Ile Gln Ala Asn Leu Trp Arg Ser Phe			
	450	455	460
Leu Tyr Ser Asn Val Ala Leu Tyr Leu Pro Asp Val Tyr Lys Tyr Thr			
465	470	475	480
Pro Pro Asn Ile Thr Leu Pro Thr Asn Thr Asn Thr Tyr Glu Tyr Met			
	485	490	495
Asn Gly Arg Val Val Ser Pro Ser Leu Val Asp Ser Tyr Ile Asn Ile			
	500	505	510
Gly Ala Arg Trp Ser Leu Asp Pro Met Asp Asn Val Asn Pro Phe Asn			
	515	520	525
His His Arg Asn Ala Gly Leu Arg Tyr Arg Ser Met Leu Leu Gly Asn			

530	535	540
Gly Arg Tyr Val Pro Phe His Ile Gln Val Pro Gln Lys Phe Phe Ala		
545	550	555
Val Lys Asn Leu Leu Leu Leu Pro Gly Ser Tyr Thr Tyr Glu Trp Asn		560
565	570	575
Phe Arg Lys Asp Val Asn Met Val Leu Gln Ser Ser Leu Gly Asn Asp		
580	585	590
Leu Arg Thr Asp Gly Ala Thr Ile Ser Phe Thr Ser Ile Asn Leu Tyr		
595	600	605
Ala Thr Phe Phe Pro Met Ala His Asn Thr Ala Ser Thr Leu Glu Ala		
610	615	620
Met Leu Arg Asn Asp Thr Asn Asp Gln Ser Phe Asn Asp Tyr Leu Ser		
625	630	635
Ala Ala Asn Met Leu Tyr Pro Ile Pro Ala Asn Ala Thr Asn Ile Pro		
645	650	655
Ile Ser Ile Pro Ser Arg Asn Trp Ala Ala Phe Arg Gly Trp Ser Phe		
660	665	670
Thr Arg Leu Lys Thr Lys Glu Thr Pro Ser Leu Gly Ser Gly Phe Asp		
675	680	685
Pro Tyr Phe Val Tyr Ser Gly Ser Ile Pro Tyr Leu Asp Gly Thr Phe		
690	695	700
Tyr Leu Asn His Thr Phe Lys Lys Val Ser Ile Met Phe Asp Ser Ser		
705	710	715
Val Ser Trp Pro Gly Asn Asp Arg Leu Leu Ser Pro Asn Glu Phe Glu		
725	730	735
Ile Lys Arg Thr Val Asp Gly Glu Gly Tyr Asn Val Ala Gln Cys Asn		
740	745	750
Met Thr Lys Asp Trp Phe Leu Val Gln Met Leu Ala Asn Tyr Asn Ile		
755	760	765
Gly Tyr Gln Gly Phe Tyr Ile Pro Glu Gly Tyr Lys Asp Arg Met Tyr		
770	775	780
Ser Phe Phe Arg Asn Phe Gln Pro Met Ser Arg Gln Val Val Asp Glu		
785	790	795
Val Asn Tyr Thr Asp Tyr Lys Ala Val Thr Leu Pro Tyr Gln His Asn		800
805	810	815
Asn Ser Gly Phe Val Gly Tyr Leu Ala Pro Thr Met Arg Gln Gly Glu		
820	825	830
Pro Tyr Pro Ala Asn Tyr Pro Tyr Pro Leu Ile Gly Thr Thr Ala Val		
835	840	845

Lys	Ser	Val	Thr	Gln	Lys	Lys	Phe	Leu	Cys	Asp	Arg	Thr	Met	Trp	Arg
850															
Ile	Pro	Phe	Ser	Ser	Asn	Phe	Met	Ser	Met	Gly	Ala	Leu	Thr	Asp	Leu
865															
Gly	Gln	Asn	Met	Leu	Tyr	Ala	Asn	Ser	Ala	His	Ala	Leu	Asp	Met	Thr
Phe	Glu	Val	Asp	Pro	Met	Asp	Glu	Pro	Thr	Leu	Leu	Tyr	Leu	Leu	Phe
Glu	Val	Phe	Asp	Val	Val	Arg	Val	His	Gln	Pro	His	Arg	Gly	Val	Ile
Glu	Ala	Val	Tyr	Leu	Arg	Thr	Pro	Phe	Ser	Ala	Gly	Asn	Ala	Thr	Thr

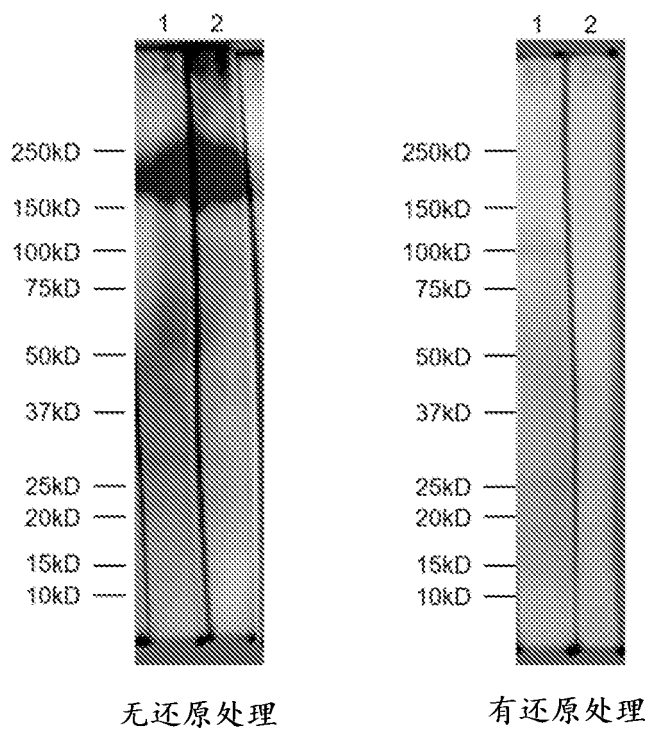


图 1

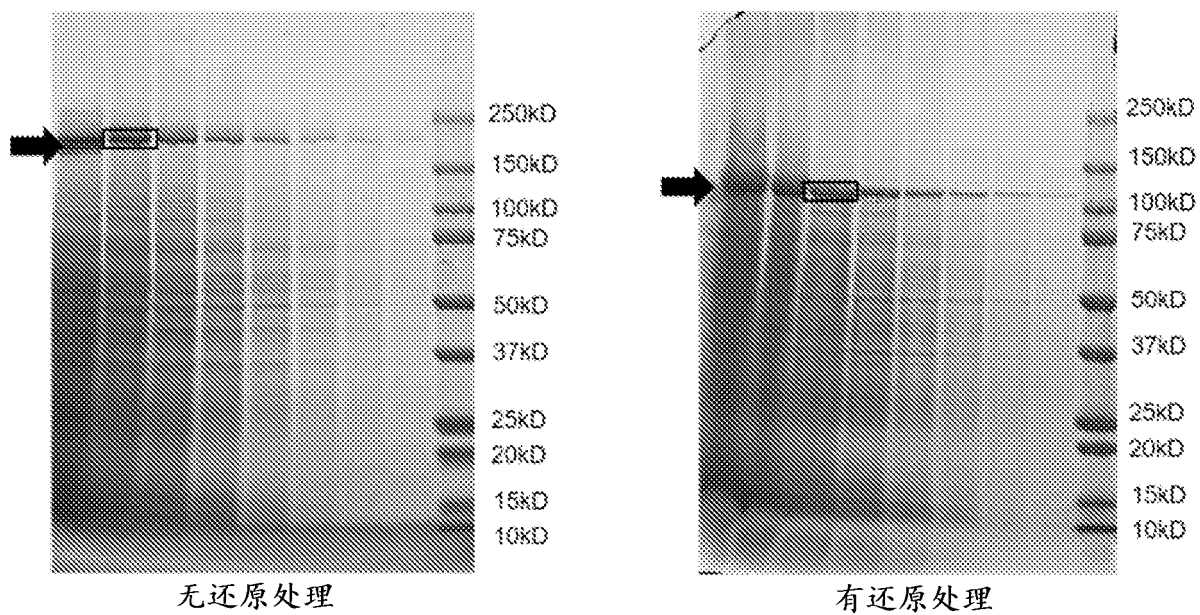


图 2

索引	序列	名称	抗体 1	抗体 2
1	MATPSMMPQWAYMHI	肽_001		
2	MMPQWAYMHIAGQDA	肽_002		
3	AYMHIAGQDASEYLS	肽_003		
4	AGQDASEYLSPLVQ	肽_004		
5	SEYLSPLVQFARAT	肽_005		
6	PGLVQFARATDTYFS	肽_006		
7	FARATDTYFSMGNKF	肽_007		
8	DTYFSMGNKFRNPTV	肽_008		
9	MGNKFRNPTVAPTHD	肽_009		
10	RNPTVAPTHDVTDDR	肽_010		
11	APTHDVTDDRSQLM	肽_011		
12	VTTDRSQLMLRFVF	肽_012		
13	SQRLMLRFVPVDRED	肽_013		
14	LRFVPVDREDNTYSY	肽_014		
15	VDREDNTYSYKVRT	肽_015		
16	NTYSYKVRTLAVGD	肽_016		
17	KVRTLAVGDNRVLD	肽_017		
18	LAVGDNRVLDMASTF	肽_018		
19	NRVLDMASTFFDIRG	肽_019		
20	MASTFFDIRGVLDRG	肽_020		
21	FDIRGVLDRGPSFKP	肽_021		
22	VLDRGPSFKPYSGTA	肽_022		
23	PSFKPYSGTAYNSLA	肽_023		
24	YSGTAYNSLAPKGAP	肽_024		
25	YNSLAPKGAPNTSQW	肽_025		
26	PKGAPNTSQWIVTTN	肽_026		
27	NTSQWIVTTNGDNAV	肽_027		
28	IVTTNGDNAVTTTTN	肽_028		
29	GDNAVTTTTNTFGIA	肽_029		
30	TTTTNTFGIASMKGD	肽_030		
31	TFGIASMKGDNITKE	肽_031		
32	SMKGDNITKEGLQIG	肽_032		
33	NITKEGLQIGKDITT	肽_033		
34	GLQIGKDITTTEGEE	肽_034		
35	KDITTTEGEEKPIYA	肽_035		
36	TEGEEKPIYADKTYQ	肽_036		
37	KPIYADKTYQPEPQV	肽_037		
38	DKTYQPEPQVGEESW	肽_038		
39	PEPQVGEESWTDTDG	肽_039		
40	GEESWTDTDGTNEKF	肽_040		
41	TDTDGTNEKFGRAL	肽_041		
42	TNEKFGRALKPATN	肽_042		
43	GGRALKPATNMKPCY	肽_043		
44	KPATNMKPCYGSFAR	肽_044		
45	MKPCYGSFARPTNIK	肽_045		
46	GSFARPTNIKGGQAK	肽_046		
47	PTNIKGGQAKNRKVK	肽_047		
48	GGQAKNRKVKPTTEG	肽_048		
49	NRKVKPTTEGGVETE	肽_049		
50	PTTEGGVETEEPDID	肽_050		
51	GVETEEDIDMEFFD	肽_051		

图 3-1

索引	序列	名称	抗体 1	抗体 2
52	EPDIDMEFFDGRDAV	肽_052		
53	MEFFDGRDAVAGALA	肽_053		
54	GRDAVAGALAPEIVL	肽_054		
55	AGALAPEIVLYTENV	肽_055		
56	PEIVLYTENVNLETP	肽_056		
57	YTENVNLETPDSHV	肽_057		
58	NLETPDSHVYKRPET	肽_058		
59	DSHVYKRPETSNNSH	肽_059		
60	YKRPETSNNSHANLGQ	肽_060		
61	SNNSHANLGQQAMPN	肽_061		
62	ANLGQQAMPNRPNYI	肽_062		
63	QAMPNRPNYIGFRDN	肽_063		
64	RPNYIGFRDNFVGLM	肽_064		
65	GFRDNFVGLMYYNST	肽_065		
66	FVGLMYYNSTGNMGV	肽_066		
67	YYNSTGNMGVLAGQA	肽_067		
68	GNMGVLAGQASQLNA	肽_068		
69	LAGQASQLNAVVDLQ	肽_069		
70	SQLNAVVDLQDRNTE	肽_070		
71	VVDLQDRNTELSYQL	肽_071		
72	DRNTELSYQLLLDSL	肽_072		
73	LSYQLLLDSLGDRT	肽_073		
74	LLDSLGDRTTRYFSMW	肽_074		
75	GDRTRYFSMWNQAVD	肽_075		
76	YFSMWNQAVDSYDPD	肽_076		
77	NQAVDSYDPDVRIIE	肽_077		
78	SYDEPDVRIIENHGIE	肽_078		
79	VRIIENHGIEDELPN	肽_079		
80	NHGIEDELPNYCFPL	肽_080		
81	DELPNYCFPLNGIGP	肽_081		
82	YCFPLNGIGPGHTYQ	肽_082		
83	NGIGPGHTYQGKVK	肽_083		
84	GHTYQGKVKTDN	肽_084		
85	GKVKTDNNGWEKD	肽_085		
86	TDDNNGWEKDANVAP	肽_086		
87	GWEKDANVAPANEIT	肽_087		
88	ANVAPANEITIGNNL	肽_088		
89	ANEITIGNNLAMEIN	肽_089		
90	IGNNLAMEINIQANL	肽_090		
91	AMEINIQANLWRSFL	肽_091		
92	IQANLWRSFLYSNVA	肽_092		
93	WRSFLYSNVALYLPD	肽_093		
94	YSNVALYLPDVYKYT	肽_094		
95	LYLPDVYKYTPPNIT	肽_095		
96	VYKYTPPNITLPTNT	肽_096		
97	PPNITLPTNTNTYEX	肽_097		
98	LPTNTNTYEXMNGRV	肽_098		
99	NTYEXMNGRVVSPSL	肽_099		
100	MNGRVVSPSLVDSYI	肽_100		
101	VSPSLVDSYINIGAR	肽_101		
102	VDSYINIGARWSLDP	肽_102		

图 3-2

索引	序列	名称	抗体 1	抗体 2
103	NIGARWSLDPMDNVN	肽 ₁₀₃		
104	WSLDPMDNVNPFNNHH	肽 ₁₀₄		
105	MDNVNPFNNHHRNAGL	肽 ₁₀₅		
106	PFNNHHRNAGLRYRSM	肽 ₁₀₆		
107	RNAGLRYRSMLLGNG	肽 ₁₀₇		
108	RYRSMLLGNGRYVPF	肽 ₁₀₈		
109	LLGNGRYVPFHIQVP	肽 ₁₀₉		
110	RYVPFHIQVPQKFFA	肽 ₁₁₀		
111	HIQVPQKFFAVKPLL	肽 ₁₁₁		
112	QKFFAVKPLLPLPGS	肽 ₁₁₂		
113	VKNLLPLPGSYTYEW	肽 ₁₁₃		
114	LLPGSYTYEWNFRKD	肽 ₁₁₄		
115	TYEWNFRKDVNMVL	肽 ₁₁₅		
116	NFRKDVNMVLQSSLG	肽 ₁₁₆		
117	VNMVLQSSLGNDLRT	肽 ₁₁₇		
118	QSSLGNDLRTDGATI	肽 ₁₁₈		
119	NDLRTDGATISFTSI	肽 ₁₁₉		
120	DGATISFTSINLYAT	肽 ₁₂₀		
121	SFTSINLYATFFPMA	肽 ₁₂₁		
122	NLYATFFPMAHNTAS	肽 ₁₂₂		
123	FFPMAHNTASTLEAM	肽 ₁₂₃		
124	HNTASTLEAMLRNDT	肽 ₁₂₄		
125	TLEAMLRNDTNDQSF	肽 ₁₂₅		
126	LRNDTNDQSFNDYLS	肽 ₁₂₆		
127	NDQSFNDYLSAANML	肽 ₁₂₇		
128	NDYLSAANMLYPIPA	肽 ₁₂₈		
129	AANMLYPIPANATNI	肽 ₁₂₉		
130	YPIPANATNIPISIP	肽 ₁₃₀		
131	NATNIPISIPSRNWA	肽 ₁₃₁		
132	PISIPSRNWAAFPGW	肽 ₁₃₂		
133	SRNWAAFPGWSFTRL	肽 ₁₃₃		
134	AFPGWSFTRLTKET	肽 ₁₃₄		
135	SFTRLTKETPSLGS	肽 ₁₃₅		
136	KTETPSLGSFGDPY	肽 ₁₃₆		
137	PSLGSFGDPYFVYSG	肽 ₁₃₇		
138	GDPYFVYSGSIPYL	肽 ₁₃₈		
139	FVYSGSIPYLDGTFY	肽 ₁₃₉		
140	SIPYLDGTFYLNHTF	肽 ₁₄₀		
141	DGTFYLNHTFKKVISI	肽 ₁₄₁		
142	LNHTFKKVISIMFDSS	肽 ₁₄₂		
143	KKVISIMFDSSVSWPG	肽 ₁₄₃		
144	MFDSSVSWPGNDRLL	肽 ₁₄₄		
145	VSWPGNDRLLSPNEF	肽 ₁₄₅		
146	NDRLLSPNEFEIKRT	肽 ₁₄₆		
147	SPNEFEIKRTVDGEG	肽 ₁₄₇		
148	EIKRTVDGEGYNVAQ	肽 ₁₄₈		
149	VDGEGYNVAQCNMTK	肽 ₁₄₉		
150	YNVAQCNMTKDWFLV	肽 ₁₅₀		
151	CNMTKDWFLVQMLAN	肽 ₁₅₁		
152	DWFLVQMLANYNIGY	肽 ₁₅₂		

图 3-3

索引	序列	名称	抗体 1	抗体 2
153	QMLANYNIGYQGFI	肽 ₁₅₃		
154	YNIGYQGFIPEGYK	肽 ₁₅₄		
155	QGFYIPEGYKDRMYS	肽 ₁₅₅		
156	PEGYKDRMYSFFRNF	肽 ₁₅₆		
157	DRMYSFFRNFQPMRS	肽 ₁₅₇		
158	FFRNFQPMRSQVVDE	肽 ₁₅₈		
159	QPMRSQVVDEVNYTD	肽 ₁₅₉		
160	QVVDEVNYTDYKAVT	肽 ₁₆₀		
161	VNYTDYKAVTLPYQH	肽 ₁₆₁		
162	YKAVTLPYQHNNSGF	肽 ₁₆₂		
163	LPYQHNNSGFVGYLE	肽 ₁₆₃		
164	NNSGFVGYLEPTMRQ	肽 ₁₆₄		
165	VGYLEPTMRQGEPPY	肽 ₁₆₅		
166	PTMRQGEPPYPANYPY	肽 ₁₆₆		
167	GEPPYPANYPYPLIGT	肽 ₁₆₇		
168	ANYPYPLIGTTAVKS	肽 ₁₆₈		
169	PLIGTTAVKSVTQKK	肽 ₁₆₉		
170	TAVKSVTQKKFLCDR	肽 ₁₇₀		
171	VTQKKFLCDRTMWRI	肽 ₁₇₁		
172	FLCDRTMWRIPFSSN	肽 ₁₇₂		
173	TMWRIPFSSNFMSMG	肽 ₁₇₃		
174	PFSSNFMSMGALTDL	肽 ₁₇₄		
175	FMSMGALTDLGQNML	肽 ₁₇₅		
176	ALTDLGQNMLYANSA	肽 ₁₇₆		
177	GQNMLYANSAHALDM	肽 ₁₇₇		
178	YANSAHALDMTFEVD	肽 ₁₇₈		
179	HALDMTFEVDPMDEP	肽 ₁₇₉		
180	TFEVDPMDEPTLLYL	肽 ₁₈₀		
181	PMDEPTLLYLLFEVF	肽 ₁₈₁		
182	LLYLLFEVFDVVRV	肽 ₁₈₂		
183	LFEVFDVVRVHQPFR	肽 ₁₈₃		
184	DVVRVHQPFRGVIEA	肽 ₁₈₄		
185	HQPFRGVIEAVYLR	肽 ₁₈₅		
186	GVIEAVYLRTPFSAG	肽 ₁₈₆		
187	AVYLRTPFSAGNATT	肽 ₁₈₇		

图 3-4