



(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

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

(22) 申请日 2021.04.15

72001

(30) 优先权数据

2020-073236 2020.04.16 JP

专利代理人 李志强 梅黎

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.10.14

(51) Int.Cl.

C07K 16/08 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

C12P 21/08 (2006.01)

PCT/JP2021/015540 2021.04.15

G01N 33/569 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

(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

权利要求书1页 说明书13页

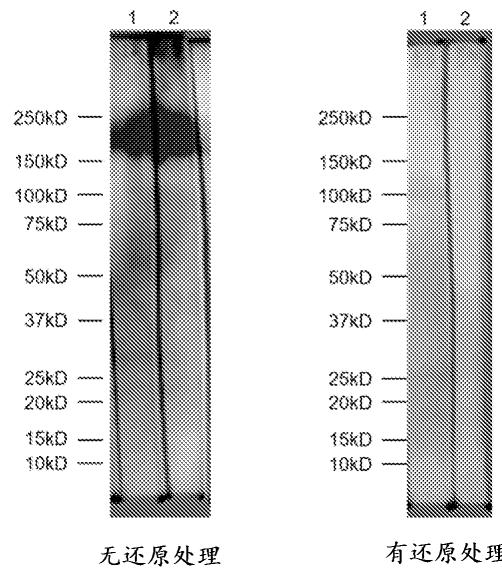
序列表4页 附图5页

(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。



无还原处理

有还原处理

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用于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,本发明不限定于下述实施例。

[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柱的亲和色谱法纯化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50μL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 | MMFQWAYMHIAQGQDA | 肽 002 |
| 3 | AYMHIAQGDASEYLS | 肽 003 |
| 4 | AGQDASEYLS PGLVQ | 肽 004 |
| 5 | SEYLSPGLVQFARAT | 肽 005 |
| 6 | PGLVQFARATDTYFS | 肽 006 |
| 7 | FARATDTYFSMGNKF | 肽 007 |
| 8 | DTYFSMGNKF RNP TV | 肽 008 |
| 9 | MGNKFRNPTVAPTHD | 肽 009 |
| 10 | RNPTVAPTHDVTTDR | 肽 010 |
| 11 | APTHDVTTDRSQR LM | 肽 011 |
| 12 | VTTDRSQR LMLRFVP | 肽 012 |
| 13 | SQR LMLRFVPVDRED | 肽 013 |
| 14 | LRFVPVDREDNTYSY | 肽 014 |
| 15 | VDREDNTYSYKVRYT | 肽 015 |
| 16 | NTYSYKVRYTLAVGD | 肽 016 |
| 17 | KVRYTLAVGDNRVLD | 肽 017 |
| 18 | LAVGDNRVLDMASTF | 肽 018 |
| 19 | NRVLDMASTFFDIRG | 肽 019 |
| 20 | MASTFFDIRGVLD RG | 肽 020 |
| 21 | FDIRGVLD RGPSFKP | 肽 021 |
| 22 | VLD RGPSFKP YSGTA | 肽 022 |
| 23 | PSFKP YSGTAYNSLA | 肽 023 |
| 24 | YSGTAYNSLAPKGAP | 肽 024 |
| 25 | YN SLAPKGAPNTSQW | 肽 025 |
| 26 | PKGAPNTSQWIVTTN | 肽 026 |
| 27 | NTSQWIVTTNGDNAV | 肽 027 |
| 28 | IVTTNGDNAVTTTN | 肽 028 |
| 29 | G DNA VTTTNTFGIA | 肽 029 |
| 30 | TTTTNTFGI ASMKGD | 肽 030 |
| 31 | TFGI ASMKGD NITKE | 肽 031 |
| 32 | SMKGD NITKE GLQIG | 肽 032 |
| 33 | NITKE GLQIG K DITT | 肽 033 |
| 34 | GLQIG K DITT TE GEE | 肽 034 |
| 35 | KDITT TE GEE KPIYA | 肽 035 |
| 36 | TE GEE KPIYADKTYQ | 肽 036 |
| 37 | KPIYADKTYQ PEPQV | 肽 037 |
| 38 | DKTYQ PEPQV GEESW | 肽 038 |
| 39 | PEPQV GEESW TDT DG | 肽 039 |
| 40 | GEE SW TDT DG TNEKF | 肽 040 |
| 41 | TDT DG TNEKF GGR AL | 肽 041 |
| 42 | TNEKF GGR ALKPATN | 肽 042 |
| 43 | GGR ALKPATNMKPCY | 肽 043 |
| 44 | KPATNMKPCY GS FAR | 肽 044 |
| 45 | MKPCY GS FAR PTNIK | 肽 045 |
| 46 | GS FAR PTNIK GG QAK | 肽 046 |
| 47 | PTNIK GG QAK NRKV K | 肽 047 |
| 48 | GG QAK NRKV KPTTEG | 肽 048 |
| 49 | NRKV KPTTEGGVETE | 肽 049 |
| 50 | PTTEGGVETE EP DID | 肽 050 |
| 51 | GVETE EP DID ME FFD | 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 | PEIVLYTENVNLET | 肽 056 |
| 57 | YTENVNLET PDSHV | 肽 057 |
| 58 | NLET PDSHV VYK PET | 肽 058 |
| 59 | DSHV VYK PET SNN SH | 肽 059 |
| 60 | YK PET SNN SHAN LGQ | 肽 060 |
| 61 | SNN SHAN LGQ QAMP N | 肽 061 |
| 62 | AN LGQ QAMP NR PNY I | 肽 062 |
| 63 | QAMP NR PNY IGF RDN | 肽 063 |
| 64 | R PNY IGF RDN FVG LM | 肽 064 |
| 65 | GFR DNF VG I M YN ST | 肽 065 |
| 66 | FV GLM YYN ST GNM FV | 肽 066 |
| 67 | YYN ST GNM GV LAG QA | 肽 067 |
| 68 | GN MG V LAG QAS QLN A | 肽 068 |
| 69 | LAG QAS QLN A VVD LQ | 肽 069 |
| 70 | S QLN A VVD LQ DR NT E | 肽 070 |
| 71 | VVD LQ DR NT ELS YQL | 肽 071 |
| 72 | D R N T ELS YQL L D S L | 肽 072 |
| 73 | L S Y Q L L I D S L G D R T R | 肽 073 |
| 74 | L I D S L G D R T R Y F S M Y | 肽 074 |
| 75 | G D R T R Y F S M W N Q A V D | 肽 075 |
| 76 | Y F S M W N Q A V D S Y D P D | 肽 076 |
| 77 | N Q A V D S Y D P D V R I I E | 肽 077 |
| 78 | S Y D P D V R I I E N H G I E | 肽 078 |
| 79 | V R I I E N H G I E D E L P N | 肽 079 |
| 80 | N H G I E D E L P N Y C F P L | 肽 080 |
| 81 | D E L P N Y C F P L N G I G P | 肽 081 |
| 82 | Y C F P L N G I G P G H T Y Q | 肽 082 |
| 83 | N G I G P G H T Y Q G I K V K | 肽 083 |
| 84 | G H T Y Q G I K V K T D D T N | 肽 084 |
| 85 | G I K V K T D D T N G W E K D | 肽 085 |
| 86 | T D D T N G W E K D A N V A P | 肽 086 |
| 87 | G W E K D A N V A P A N E I T | 肽 087 |
| 88 | A N V A P A N E I T I G N N L | 肽 088 |
| 89 | A N E I T I G N N L A M E I N | 肽 089 |
| 90 | I G N N L A M E I N I Q A N L | 肽 090 |
| 91 | A M E I N I Q A N L W R S F L | 肽 091 |
| 92 | I Q A N L W R S F L Y S N V A | 肽 092 |
| 93 | W R S F L Y S N V A L Y L P D | 肽 093 |
| 94 | Y S N V A L Y L P D V Y K Y T | 肽 094 |
| 95 | L Y L P D V Y K Y T P P N I T | 肽 095 |
| 96 | V Y K Y T P P N I T L P T N T | 肽 096 |
| 97 | P P N I T L P T N T N T Y E Y | 肽 097 |
| 98 | L P T N T N T Y E Y M N G R V | 肽 098 |
| 99 | N T Y E Y M N G R V V S P S L | 肽 099 |
| 100 | M N G R V V S P S L V D S Y I | 肽 100 |
| 101 | V S P S L V D S Y I N I G A R | 肽 101 |
| 102 | V D S Y I N I G A R W S L D P | 肽 102 |

[表4-3]

| 索引 | 序列 | 名称 |
|-----|-------------------|-------|
| 103 | NIGARWSLDPMNDVN | 肽 103 |
| 104 | WSLDPMNDVNPNFH | 肽 104 |
| 105 | MNDVNPNFHHRNAGL | 肽 105 |
| 106 | PFNHHRNAGLRYRSM | 肽 106 |
| 107 | RNAGLRYRSMLLGNG | 肽 107 |
| 108 | RYRSMLLGNGRYVPF | 肽 108 |
| 109 | LLGNGRYVPFHIQVP | 肽 109 |
| 110 | RYVPPFHICQVPQKFFA | 肽 110 |
| 111 | HICQVPQKFFAVKNLL | 肽 111 |
| 112 | QKFFAVKNLLLLPGS | 肽 112 |
| 113 | VKNLLLLPGSYTYEW | 肽 113 |
| 114 | LLPGSYTYEWNFRKD | 肽 114 |
| 115 | YTYEWNFRKDVNML | 肽 115 |
| 116 | NFRKDVNMLQSSLG | 肽 116 |
| 117 | VNMVLQSSLGNDLRT | 肽 117 |
| 118 | QSSLGNDLRTDGATI | 肽 118 |
| 119 | NDLRTDGATISFTSI | 肽 119 |
| 120 | DGATISFTSINLYAT | 肽 120 |
| 121 | SFTSINLYATFFFMA | 肽 121 |
| 122 | NLYATFFFMAHNTAS | 肽 122 |
| 123 | FFFMAHNTASTLEAM | 肽 123 |
| 124 | HNTASTLEAMLRNDT | 肽 124 |
| 125 | TLEAMLRNDTNQSF | 肽 125 |
| 126 | LRNDTNQSFNDYLS | 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 | KTKEPSLGSGFDPY | 肽 136 |
| 137 | PSLGSGFDPYFVYSG | 肽 137 |
| 138 | GFDPYFVYSGSIPYL | 肽 138 |
| 139 | FVYSGSIPYLDGTFY | 肽 139 |
| 140 | SIFYLDGTFYLNHTF | 肽 140 |
| 141 | DGTFYLNHTFKKVSI | 肽 141 |
| 142 | LNHTFKKVSIMFDSS | 肽 142 |
| 143 | KKVSIMFDSSVSWPG | 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 |

[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 | DRMYSFFRNFQPMNR | 肽 157 |
| 158 | FFRNFQPMRSRQVVDE | 肽 158 |
| 159 | QPMSRQVVDEVNYTD | 肽 159 |
| 160 | QVVDEVNYTDYKAVT | 肽 160 |
| 161 | VNYTDYKAVTLPYQH | 肽 161 |
| 162 | YKAVTLPYQHNNSGF | 肽 162 |
| 163 | LPYQHNNSGFVGYLA | 肽 163 |
| 164 | NNSGFVGYLAPTMRQ | 肽 164 |
| 165 | VGYLAPTMRQGEPPYP | 肽 165 |
| 166 | PTMRQGEPPYPANYPY | 肽 166 |
| 167 | GEPYPANYPYPLIGT | 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 | FMSMGALTDLGQNL | 肽 175 |
| 176 | ALTDLGQNLMLYANSA | 肽 176 |
| 177 | GQNMLYANSAHALDM | 肽 177 |
| 178 | YANSAHALDMTDFEVD | 肽 178 |
| 179 | HALDMTDFEVDPMDEP | 肽 179 |
| 180 | TFEVDPMDPEPTLLYL | 肽 180 |
| 181 | PMDEPTLLYLLEVF | 肽 181 |
| 182 | TLLYLLFEVFDVVRV | 肽 182 |
| 183 | LFEVFDVVRVHQPHR | 肽 183 |
| 184 | DVVRVHQPHRGVIEA | 肽 184 |
| 185 | HQPHRGVIEAVYLRT | 肽 185 |
| 186 | GVIEAVYLRTPFSAAG | 肽 186 |
| 187 | AVYLRTPFSAAGNATT | 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 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 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 Pro Gly Ser Tyr Thr Tyr Glu Trp Asn | | |
| 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 |
| 640 | | |
| 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 |
| 720 | | |
| 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 |
| 800 | | |
| Val Asn Tyr Thr Asp Tyr Lys Ala Val Thr Leu Pro Tyr Gln His Asn | | |
| 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
850 855 860
Ile Pro Phe Ser Ser Asn Phe Met Ser Met Gly Ala Leu Thr Asp Leu
865 870 875 880
Gly Gln Asn Met Leu Tyr Ala Asn Ser Ala His Ala Leu Asp Met Thr
885 890 895
Phe Glu Val Asp Pro Met Asp Glu Pro Thr Leu Leu Tyr Leu Leu Phe
900 905 910
Glu Val Phe Asp Val Val Arg Val His Gln Pro His Arg Gly Val Ile
915 920 925
Glu Ala Val Tyr Leu Arg Thr Pro Phe Ser Ala Gly Asn Ala Thr Thr
930 935 940

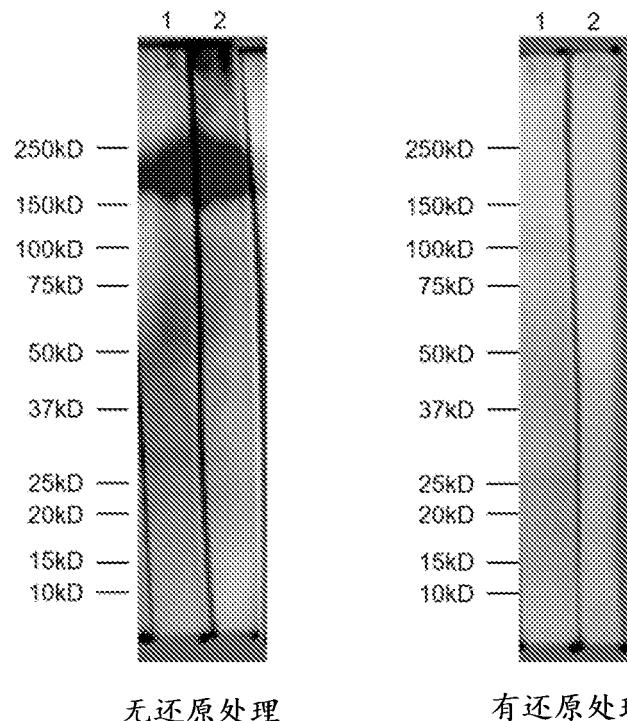


图 1

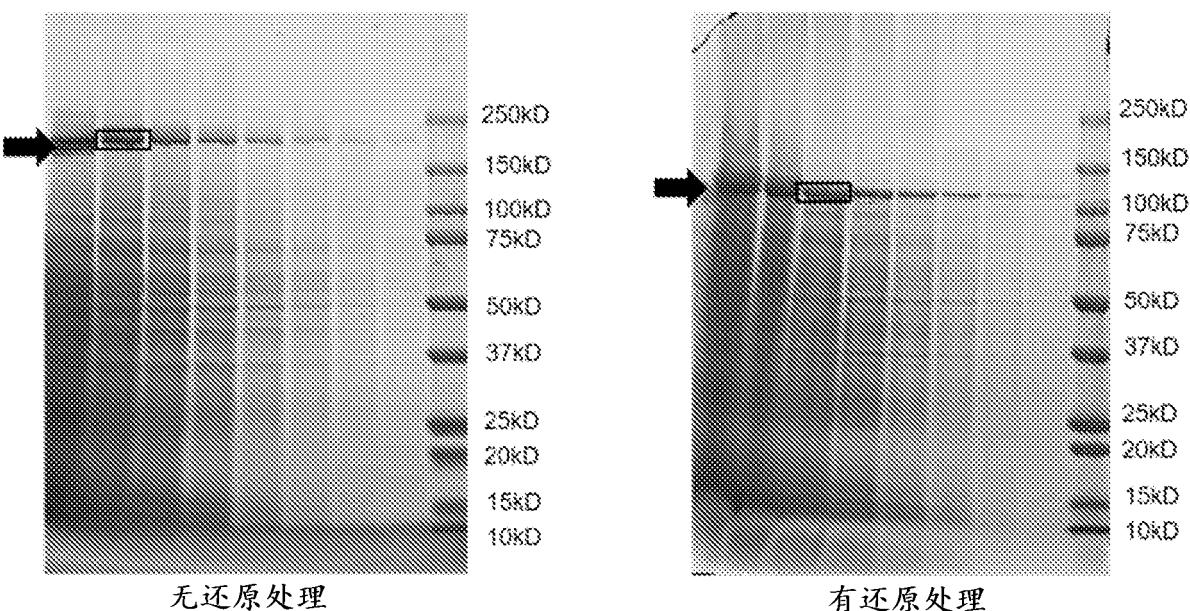


图 2

说 明 书 附 图

2/5 页

| 索引 | 序列 | 名称 | 抗体 1 | 抗体 2 |
|----|------------------|-------|------|------|
| 1 | MATEPSMMPQWAYMHI | 肽_001 | | |
| 2 | MMPQWAYMHIAQDQA | 肽_002 | | |
| 3 | AYMHIAQGDASEYLS | 肽_003 | | |
| 4 | AGQDASEXYLSPGLVQ | 肽_004 | | |
| 5 | SEYLSPGLVQFARAT | 肽_005 | | |
| 6 | PGLVQFARATDTYFS | 肽_006 | | |
| 7 | FARATDTYFSMGNKF | 肽_007 | | |
| 8 | DTYFSMGNKFRNPTV | 肽_008 | | |
| 9 | MGNKFRNPTVAPTHD | 肽_009 | | |
| 10 | RNPTVAPTHDVTTDR | 肽_010 | | |
| 11 | APTHDVTTDRSQRLM | 肽_011 | | |
| 12 | VTTDRSQRLMLRFVFP | 肽_012 | | |
| 13 | SQRLMLRFVPVDRED | 肽_013 | | |
| 14 | LRFVPVDREDNTYSY | 肽_014 | | |
| 15 | VDREDNTYSYKVRYT | 肽_015 | | |
| 16 | NTYSYKVRYTLAVGD | 肽_016 | | |
| 17 | KVRYTLAVGDNRVLD | 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 | PKGAPNTSQWIVTTM | 肽_026 | | |
| 27 | NTSQWIVTTNGDNAV | 肽_027 | | |
| 28 | IVTTNGDNAVTTTTN | 肽_028 | | |
| 29 | GDNAVTTTNTFGIA | 肽_029 | | |
| 30 | TTTTNTFGIASMKGD | 肽_030 | | |
| 31 | TFGIASMKGDNITKE | 肽_031 | | |
| 32 | SMKGDNITKEGLQIG | 肽_032 | | |
| 33 | NITKEGLQIGKDITT | 肽_033 | | |
| 34 | GLQIGKDITTEGEET | 肽_034 | | |
| 35 | KDITTEGEEEKPIYA | 肽_035 | | |
| 36 | TEGEEEKPIYADKTYQ | 肽_036 | | |
| 37 | KPIYADKTYQPEEPQV | 肽_037 | | |
| 38 | DKTYQPEPVGEEESW | 肽_038 | | |
| 39 | PEPVGEEESWTDTDG | 肽_039 | | |
| 40 | GEESWTDTGNEKEF | 肽_040 | | |
| 41 | TD TDGTNEKFGGRAL | 肽_041 | | |
| 42 | TNEKFGGRALKPATN | 肽_042 | | |
| 43 | GGRALKPATNMKPCY | 肽_043 | | |
| 44 | KPATNMKPCYGSFAR | 肽_044 | | |
| 45 | MKPCYGSFARPTNIK | 肽_045 | | |
| 46 | GSFARPTNIKGQQAK | 肽_046 | | |
| 47 | PTNIKGQQAKNRKV | 肽_047 | | |
| 48 | GGQAKNRKVPTTEG | 肽_048 | | |
| 49 | NRKVVKPTTEGGVETE | 肽_049 | | |
| 50 | PTTEGGVETEFPDID | 肽_050 | | |
| 51 | GVETEFPDIDMEFFD | 肽_051 | | |

图 3-1

| 索引 | 序列 | 名称 | 抗体 1 | 抗体 2 |
|-----|-------------------|-------|------|------|
| 52 | EPDIDMEFFFDGRDAV | 肽_052 | | |
| 53 | MEFFFDGRDAVAGALA | 肽_053 | | |
| 54 | GRDAVAGALAPEIVL | 肽_054 | | |
| 55 | AGALAPEIIVLYTENV | 肽_055 | | |
| 56 | PEIVLYTENVNLETPE | 肽_056 | | |
| 57 | YTNENVNLETPESHVV | 肽_057 | | |
| 58 | NLETPESHVVYKPE | 肽_058 | | |
| 59 | DSHVVYKPETSNNSH | 肽_059 | | |
| 60 | YKPETSNNNSHANLGQ | 肽_060 | | |
| 61 | SNNSHANLGQQAMPN | 肽_061 | | |
| 62 | ANLGQQAMPNRPNEYI | 肽_062 | | |
| 63 | QAMPNRPNYIGFRDN | 肽_063 | | |
| 64 | RPNYIGFRDNFVGLM | 肽_064 | | |
| 65 | GFRDNFVGIMYYNST | 肽_065 | | |
| 66 | FVGLIMYYNSTGNMGV | 肽_066 | | |
| 67 | YYNSTGNMGVLAGQA | 肽_067 | | |
| 68 | GNMGVLAGQASQLNA | 肽_068 | | |
| 69 | LAGQASQLNAVVDLQ | 肽_069 | | |
| 70 | SQLNAVVDLQDRNTE | 肽_070 | | |
| 71 | VVDLQDRNTELSYQEL | 肽_071 | | |
| 72 | DRNTELSYQLLLDSDL | 肽_072 | | |
| 73 | LSYQLLLDSDLGDRTR | 肽_073 | | |
| 74 | LLDSLGDRTTRYFSMW | 肽_074 | | |
| 75 | GDRTRYFSMNNQAVD | 肽_075 | | |
| 76 | YFSMWINQAVDSYDPD | 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 | GHTYQGIKVKTDDTN | 肽_084 | | |
| 85 | GIKVKTDDTNGWEKD | 肽_085 | | |
| 86 | TDDTNGWEKDANVAP | 肽_086 | | |
| 87 | GWEKDANVAPANEIT | 肽_087 | | |
| 88 | ANVAPANEITIGNNL | 肽_088 | | |
| 89 | ANEITIGNNLAMEIN | 肽_089 | | |
| 90 | IGNNLAMEINTIQANL | 肽_090 | | |
| 91 | AMEINIQTQANLWRSFL | 肽_091 | | |
| 92 | IQTQANLWRSFLYNSVA | 肽_092 | | |
| 93 | WRSFLYNSVALYLPD | 肽_093 | | |
| 94 | YSNVALYLPDVYKYT | 肽_094 | | |
| 95 | LYLPDVYKYTPPNIT | 肽_095 | | |
| 96 | VYKYTPPNITLPTNT | 肽_096 | | |
| 97 | PPNITLPTNTNTYEX | 肽_097 | | |
| 98 | LPTNTNTYEMNGRV | 肽_098 | | |
| 99 | NTYEYMNGRVVSPSL | 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 | NIGARWSILDPMNDNVN | 肽_103 | | |
| 104 | WSLDPMNDNVNPFNHH | 肽_104 | | |
| 105 | MDNVNPFNHHRNAGL | 肽_105 | | |
| 106 | PFNHHRNAGLRYRSM | 肽_106 | | |
| 107 | RNAGLRYRSMILLGNG | 肽_107 | | |
| 108 | RYRSMLLGNGRYVPPF | 肽_108 | | |
| 109 | LLGNNGRYVPFHIQVP | 肽_109 | | |
| 110 | RYVPFHIQVPQKFFA | 肽_110 | | |
| 111 | HIQVPQKFFAVKNLL | 肽_111 | | |
| 112 | QKFFAVKNLLLLPGS | 肽_112 | | |
| 113 | VKNLLLLPGSYTYEW | 肽_113 | | |
| 114 | LLPGSYTYEWNFRKD | 肽_114 | | |
| 115 | YTYEWNFRKDVNMV | 肽_115 | | |
| 116 | NFRKDVNMVQLQSSLG | 肽_116 | | |
| 117 | VNMVLQSSLGNDLRT | 肽_117 | | |
| 118 | QSSLGNDLRTDGATI | 肽_118 | | |
| 119 | NDLRTDGATISFTSI | 肽_119 | | |
| 120 | DGATISFTSINLYAT | 肽_120 | | |
| 121 | SFTSINLYATFFPMA | 肽_121 | | |
| 122 | NLYATFFPEMAHNTAS | 肽_122 | | |
| 123 | FFPMAHNTASTLEAM | 肽_123 | | |
| 124 | HNTASTLEAMLRNDT | 肽_124 | | |
| 125 | TLEAMLRNDTNQSF | 肽_125 | | |
| 126 | LRNDTNQSFNDYLS | 肽_126 | | |
| 127 | NDQSFNDYLSAANM | 肽_127 | | |
| 128 | NDYLSAANMLYPIPA | 肽_128 | | |
| 129 | AANMLYPIPANATNT | 肽_129 | | |
| 130 | YPIPANATNIPISIP | 肽_130 | | |
| 131 | NATNIPISIPSRNWA | 肽_131 | | |
| 132 | PISIPSRNWAAFRGW | 肽_132 | | |
| 133 | SRNWAAFRGWSFTRI | 肽_133 | | |
| 134 | AFRGWSFTRILKTKE | 肽_134 | | |
| 135 | SFTRILKTKETPSLGS | 肽_135 | | |
| 136 | KTKETPSLGSQFDPY | 肽_136 | | |
| 137 | PSLGSGFDPYFVYSG | 肽_137 | | |
| 138 | GFDPYFVYSGSIPYL | 肽_138 | | |
| 139 | FVYSGSIPYLDGTFY | 肽_139 | | |
| 140 | SIPYLDGTFYLNHTF | 肽_140 | | |
| 141 | DGTFYLNHTFKKVSI | 肽_141 | | |
| 142 | LNHTFKKVSIMFDSS | 肽_142 | | |
| 143 | KKVSIMFDSSVSWPG | 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 | QMLANYNIGYQGFYI | 肽_153 | | |
| 154 | YNIGYQGFYIPEGYK | 肽_154 | | |
| 155 | QGFYIPEGYKDRMYS | 肽_155 | | |
| 156 | PEGYKDRMYSFFRNF | 肽_156 | | |
| 157 | DRMYSFFRNFQPMQR | 肽_157 | | |
| 158 | FFRNFQPMRSRQVVDE | 肽_158 | | |
| 159 | QPMRSRQVVDEVNYTD | 肽_159 | | |
| 160 | QVVDEVNYTDYKAVT | 肽_160 | | |
| 161 | VNYTDYKAVTLPYQH | 肽_161 | | |
| 162 | YKAVTLPYQHNNNSGF | 肽_162 | | |
| 163 | L PYQHNNNSGFVGYLA | 肽_163 | | |
| 164 | NNSGFVGYLAPTMRQ | 肽_164 | | |
| 165 | VGYLAPTMRQGEPEYP | 肽_165 | | |
| 166 | PTMRQGEPEPYPANYPY | 肽_166 | | |
| 167 | GEPYPAKYPLIGT | 肽_167 | | |
| 168 | ANYPYPLIGTTAVKS | 肽_168 | | |
| 169 | PLIGTTAVKSVTQKK | 肽_169 | | |
| 170 | TAVKSVTQKKFLCDR | 肽_170 | | |
| 171 | VTQKKFLCDRTMWRI | 肽_171 | | |
| 172 | FLCDRTMWRIPFSSN | 肽_172 | | |
| 173 | TMWRIPFSSNFMMSG | 肽_173 | | |
| 174 | PFSSNFMMSGALTDL | 肽_174 | | |
| 175 | FMSMGALTDLGQNL | 肽_175 | | |
| 176 | ALTDLGQNLAYNSA | 肽_176 | | |
| 177 | GQNMLYANSAAHALDM | 肽_177 | | |
| 178 | YANSAAHALDMTFEVD | 肽_178 | | |
| 179 | HALDMTFEVDPMDEP | 肽_179 | | |
| 180 | TFEVDPMDPTLLYL | 肽_180 | | |
| 181 | PMDEPTLLYLLFEVF | 肽_181 | | |
| 182 | TLLYLLFEVFDVVVRV | 肽_182 | | |
| 183 | LFEVEDVVVRVHQPHR | 肽_183 | | |
| 184 | DVVRVHQPHRGVIEA | 肽_184 | | |
| 185 | HQPHRGVIEAVYLRT | 肽_185 | | |
| 186 | GVIEAVYLRTPFSAG | 肽_186 | | |
| 187 | AVYLRTPFSAGNATT | 肽_187 | | |

图 3-4