



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107430124 A

(43)申请公布日 2017.12.01

(21)申请号 201680010102.9

(22)申请日 2016.01.27

(30)优先权数据

2015-015253 2015.01.29 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.08.11

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2016/052381 2016.01.27

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2016/121831 JA 2016.08.04

(71)申请人 滋吾堂有限公司

地址 日本静冈县

(72)发明人 斋藤宪司

(74)专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事
务所(普通合伙) 11277

代理人 刘新宇 李茂家

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

C07K 16/00(2006.01)

C12N 15/02(2006.01)

C12N 15/09(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/553(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

C12P 21/08(2006.01)

权利要求书2页 说明书13页

序列表3页 附图1页

(54)发明名称

肺炎支原体的免疫学检测法和试剂盒

(57)摘要

本发明的目的在于,提供:能够简便、迅速且高灵敏度地检测作为支原体肺炎的原因菌的肺炎支原体的特异性抗体、进而包含前述抗体的免疫学检测法和试剂盒。制作识别肺炎支原体的P30蛋白的特定的表位的抗体,使用前述抗体进行免疫学检测,从而与现有法相比可以迅速且特异性地诊断肺炎支原体的感染。根据本发明,无需特殊的设备和熟练的技术,在医院等中可以简便且迅速地检测肺炎支原体和诊断感染。

1. 一种肺炎支原体的检测法,其包含使用针对肺炎支原体的P30蛋白的抗体的免疫测定法,所述抗体为针对位于序列号3~5中的任一个氨基酸序列的P30蛋白的表位的抗体。

2. 根据权利要求1所述的检测法,其中,所述抗体为单克隆抗体。

3. 一种肺炎支原体的检测法,其包含使用针对肺炎支原体的P30蛋白的第一抗体和第二抗体的夹心式免疫测定法,所述第一抗体和所述第二抗体中的至少任一者为针对位于序列号3~5中的任一个氨基酸序列的P30蛋白的表位的抗体。

4. 根据权利要求3所述的检测法,其中,所述夹心式免疫测定法为酶联免疫吸附测定ELISA法或免疫色谱测定法。

5. 根据权利要求3或4所述的检测法,其中,所述第一抗体和第二抗体中的至少任一者为单克隆抗体。

6. 根据权利要求5所述的检测法,其中,将所述第一抗体和第二抗体中的任一者预先固定于载体。

7. 一种肺炎支原体检测用的免疫色谱测定法,其为如下的免疫色谱测定法:准备具备捕捉部位的膜载体,所述捕捉部位是将针对肺炎支原体的P30蛋白的第一抗体预先固定于规定位置而形成的,使针对该P30蛋白的第二抗体与规定量的受试试样的混合液朝向所述捕捉部位在所述膜载体上进行色谱展开,使所述捕捉部位捕捉所述受试试样中所含的抗原与所述第二抗体的复合体,

所述第一抗体和所述第二抗体中的至少任一者为针对位于序列号3~5中的任一个氨基酸序列的P30蛋白的表位的抗体。

8. 根据权利要求7所述的免疫色谱测定法,其中,所述第一抗体和第二抗体中的至少任一者为单克隆抗体。

9. 根据权利要求8所述的免疫色谱测定法,其中,所述第二抗体被金属胶体、胶乳或荧光物质中的任一个所标记。

10. 根据权利要求9所述的免疫色谱测定法,其中,所述膜载体为硝化纤维素膜。

11. 一种肺炎支原体的免疫学测定试剂盒,其至少具备针对肺炎支原体的P30蛋白的抗体,所述抗体为针对位于序列号3~5中的任一个氨基酸序列的P30蛋白的表位的抗体。

12. 一种肺炎支原体的夹心式免疫测定试剂盒,其至少具备针对肺炎支原体的P30蛋白的第一抗体和第二抗体,所述第一抗体和所述第二抗体中的至少任一者为针对位于序列号3~5中的任一个氨基酸序列的P30蛋白的表位的抗体。

13. 根据权利要求12所述的夹心式免疫测定试剂盒,其中,所述夹心式免疫测定为ELISA法或免疫色谱测定法。

14. 一种肺炎支原体检测用免疫色谱法试纸条,其至少具备针对肺炎支原体的P30蛋白的第一抗体、第二抗体和膜载体,并且所述肺炎支原体检测用免疫色谱法试纸条以如下方式准备:所述第一抗体预先固定于所述膜载体的规定位置而形成捕捉部位,所述第二抗体被适当的标记物质所标记、且在自所述捕捉部位分隔开的位置在所述膜载体上能进行色谱展开,

所述第一抗体和所述第二抗体中的至少任一者为针对位于序列号3~5中的任一个氨基酸序列的P30蛋白的表位的抗体。

15. 根据权利要求14所述的免疫色谱法试纸条,其中,所述第一抗体和第二抗体中的至

少任一者为单克隆抗体。

16. 根据权利要求15所述的免疫色谱法试纸条,其中,所述第二抗体被金属胶体、胶乳或荧光物质中的任一个所标记。

17. 根据权利要求16所述的免疫色谱法试纸条,其中,所述膜载体为硝化纤维素膜。

18. 一种抗体,其用于识别位于序列号3~5中的任一个氨基酸序列的P30蛋白的表位。

19. 根据权利要求18所述的抗体,其中,所述抗体为单克隆抗体。

肺炎支原体的免疫学检测法和试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及针对肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*) 的P30蛋白的抗体和使用其的肺炎支原体的免疫学检测法和试剂盒。

背景技术

[0002] 支原体肺炎是由肺炎支原体引起的非典型肺炎。支原体肺炎与衣原体肺炎一起占非典型肺炎的30~40%，在城市肺炎中占有高的比例。

[0003] 支原体肺炎多见于婴儿、幼儿、青年期。潜伏期间为2~3周，病原体的气道粘膜的排出在初发症状发现前2~8天可见，在临床症状发现时达到高峰高的水平持续约1周后，持续排出4~6周以上。作为主要的临床症状，为发热、全身倦怠、头痛、其他感冒样症状。以超过38℃的高热、强的干性咳嗽等为特征，咳嗽在解热后也长期持续3~4周。然而，在胸部X射线检查中典型的是毛玻璃样的淡阴影而不是支原体肺炎中特征检查所见。

[0004] 支原体的感染方式为来自感染患者的飞沫感染和接触感染，肺炎支原体以经气道的方式侵入，吸附于支气管、细支气管上皮而感染。

[0005] 支原体感染症被指定为基于感染症法的申报感染症(5类感染症)，指定医疗机构有迅速地申报患者数的义务。

[0006] 肺炎支原体是能够自我增殖的最小的微生物，与其他细菌不同而不具有细胞壁。因此，作为具有细胞壁合成抑制作用的抗菌药的β内酰胺系抗菌药和头孢烷系抗菌药是无效的，治疗时给予大环内酯系抗菌药、四环素系抗菌药和喹诺酮系抗菌药。由此，理想的是，病原体的特定在确定治疗方针的基础上也迅速地进行。

[0007] 目前，肺炎支原体感染的确定诊断使用了分离培养法和血清学检查。

[0008] 分离培养中需要用于检测支原体的专用培养基(PPLO培养基)。另外，与其他细菌相比，增殖较慢，即使增殖快，直至判定为止也花费一周左右，因此，利用分离培养法，在临床现场中，处于难以迅速地特定病原体的情况。

[0009] 另外，支原体对温度敏感，含有支原体的样品与含有一般的细菌的样品不同，无法以冷藏状态保管。因此在样品保管或者输送中，样品中所含的支原体灭绝或者减少，有时通过分离培养法也无法进行检测。

[0010] 作为血清学检查，可以举出：特异性地检测IgG抗体、IgM抗体的冷凝集反应、补体结合反应(Complement Fixation test:CF法)、间接红血细胞聚集反应(Indirect Hemagglutination test:IHA法)、颗粒聚集法(Particle Agglutination:PA法)、酶免疫测定法(Enzyme Immunoassay:EIA法)等。

[0011] 进而，作为简易检查，利用EIA法检测血清或血浆中的肺炎支原体特异性IgM抗体的免疫色谱试剂盒(IMMUNOGUIDE支原体抗体(TFB制))已经被市售，在临床现场中使用。

[0012] 血清学检查中，检测的样品中的IgM抗体在感染初期上升，但有抗体产生应答低时、根据测定时期而判定为假阴性的情况。进而，IgM抗体从血中消失为止耗费时间，因此，血清学检查的结果有难以准确地示出目前感染情况的方面。

[0013] 因此,基于血清学检查的确定诊断不得不使用急性期和恢复期的成对血清进行定量检查,成为事后诊断的情况多。

[0014] 另外,也使用了检测肺炎支原体的DNA的核酸检测法。然而,从核酸检测法的核酸扩增的操作复杂、且需要特殊设备、测定需要几小时等方面出发,不是一般使用的检查。

[0015] 为了更迅速且简便地检测肺炎支原体感染,开发了针对肺炎支原体抗原的特异性抗体,报道了鉴别支原体感染的有无的检测法。

[0016] 肺炎支原体利用烧瓶型的突起部即粘附器官附着于呼吸器官上皮细胞的纤毛后,利用滑行运动向细胞表面移动而进行粘附,从而感染成立。报道了如下检测法:针对作为对该粘附、滑行运动发挥中心作用的粘附蛋白质而已知的P1蛋白(169KDa)制作特异性抗体,使用前述P1蛋白作为检测标记物(专利文献1和2)。

[0017] 还已知,前述报道中的作为检测抗原的P1蛋白存在有2个基因型,在基因型之间,P1蛋白的氨基酸序列不同。因此,为了宽范围地检测肺炎支原体,需要制成与各P1基因型的P1蛋白相对应的抗体、或者用于识别各基因型间的P1蛋白的共通部位的抗体。另外报道了,根据每个季节的流行,与上一个流行期不同的基因型被检测出、即根据流行期而基因型发生变化,因此必须在流行初期充分确认基因型,使用相对应的抗体。

[0018] 另外还报道了,使用已知与P1蛋白相比肺炎支原体的分离株间保存的DnaK蛋白作为检测用标记物的检测法(专利文献3)。成为人的泌尿器官感染症的原因的生殖支原体也具有DnaK蛋白,因此显示出交叉反应性。因此,无法以该蛋白质为检测用标记物特异性地检测肺炎支原体。

[0019] 另外,有关于肺炎支原体的粘附蛋白质即P30蛋白(30kDa)的变异株的报道。(非专利文献1)。本报道中,有关于使用针对P30蛋白的兔子抗血清的SDS-PAGE检测法的报道。使包含P30蛋白的N末端氨基酸序列的多肽(第102-181号)和包含C末端氨基酸序列的多肽(第139-275号)以其与修饰后的小鼠二氢叶酸还原酶(Modified murine dihydrofolate reductase (DHFR))的融合蛋白的形式表达,制成针对该融合蛋白的兔子抗血清。本报道中仅公开了对P30蛋白具有反应性的兔子抗血清,对识别P30蛋白中的特定的表位的抗体没有任何公开。进而,尚未确定本抗血清是否可以用于本发明中的免疫检测法,也不清楚是否具有高的特异性和反应性。

[0020] 支原体肺炎在不进行适当的治疗的情况下,有症状的长期化、重症化、进而导致基于二次感染的感染扩大的担心。因此,为了选择适当的治疗、抗菌药,要求肺炎支原体的迅速且确实的检测。

[0021] 进而,虽然尝试了迅速地检测肺炎支原体,但寻求能够进一步特异性地检测肺炎支原体的特异性抗体、进而包含前述抗体的免疫测定法和试剂盒。

[0022] 现有技术文献

[0023] 专利文献

[0024] 专利文献1:日本特开平5-304990号公报

[0025] 专利文献2:日本特开2013-72663号公报

[0026] 专利文献3:国际公开W02011/068189号公报

[0027] 非专利文献

[0028] 非专利文献1:G.Layh-Schmitt等,“The adhesin related 30-kDa protein of

Mycoplasma pneumoniae exhibits size and antigen variability.”,FEMS Microbiology Letters,152,1997,p.101-108.

发明内容

[0029] 发明要解决的问题

[0030] 本发明通过特异性地检测生物体试样中的肺炎支原体的P30蛋白,从而能够以高于以往的精度进行肺炎支原体所导致的感染的诊断。

[0031] 用于解决问题的方案

[0032] 本发明人等成功地以肺炎支原体的P30蛋白为免疫源,对小鼠进行免疫,取得针对P30蛋白的特定的表位的抗体,从而发现,通过在免疫测定法、特别是夹心式免疫测定法、尤其是免疫色谱测定法中使用该抗体,从而可以比以往特异性地且高灵敏度地检测肺炎支原体,至此完成了本发明。

[0033] 即,根据本发明的一个方面,提供一种肺炎支原体的检测法,其包含使用针对肺炎支原体的P30蛋白的抗体的免疫测定法,前述抗体为针对位于序列号3~5中的任一个氨基酸序列的表位的抗体。

[0034] 同样地,提供一种肺炎支原体的免疫学测定试剂盒,其至少具备针对肺炎支原体的P30蛋白的抗体,前述抗体为针对位于序列号3~5中的任一个氨基酸序列的P30蛋白的表位的抗体。

[0035] 作为该检测法和免疫学测定试剂盒中的免疫测定法,尤其优选ELISA(酶联免疫吸附测定(Enzyme-linked Immunosorbent assay))法、免疫色谱测定法等夹心式免疫测定法。

[0036] 因此,根据本发明的其他方面,提供一种肺炎支原体的检测法,其包含使用针对肺炎支原体的P30蛋白的第一抗体和第二抗体的夹心式免疫测定法,前述第一抗体和前述第二抗体中的至少任一者为针对位于序列号3~5中的任一个氨基酸序列的表位的抗体。

[0037] 同样地,提供一种肺炎支原体的夹心式免疫测定试剂盒,其至少具备针对肺炎支原体的P30蛋白的第一抗体和第二抗体,前述第一抗体和前述第二抗体中的至少任一者为针对位于序列号3~5中的任一个氨基酸序列的P30蛋白的表位的抗体。

[0038] 另外,根据本发明的优选实施方式,提供一种肺炎支原体检测用的免疫色谱测定法,其为如下的免疫色谱测定法:准备具备捕捉部位的膜载体,所述捕捉部位是将针对肺炎支原体的P30蛋白的第一抗体预先固定于规定位置而形成的,使针对该P30蛋白的第二抗体与规定量的受试试样的混合液朝向前述捕捉部位在前述膜载体上进行色谱展开,使前述捕捉部位捕捉前述受试试样中所含的抗原与前述第二抗体的复合体,前述第一抗体和前述第二抗体中的至少任一者为针对位于序列号3~5中的任一个氨基酸序列的表位的抗体。

[0039] 另外,根据本发明的优选实施方式,提供一种肺炎支原体检测用的免疫色谱法试纸条,其至少具备针对肺炎支原体的P30蛋白的第一抗体、第二抗体和膜载体,并且前述肺炎支原体检测用的免疫色谱法试纸条以如下方式准备:前述第一抗体预先固定于前述膜载体的规定位置而形成捕捉部位,前述第二抗体被适当的标记物质所标记、且在自前述捕捉部位分隔开的位置在前述膜载体上能进行色谱展开,前述第一抗体和前述第二抗体中的至少任一者为针对位于序列号3~5中的任一个氨基酸序列的表位的抗体。

[0040] 本发明中必须使用的针对P30蛋白的抗体为针对位于序列号3~5中的任一个氨基酸序列的表位的抗体,可以为多克隆抗体也可以为单克隆抗体,从反应特异性的观点出发,优选设为单克隆抗体。

[0041] 需要说明的是,序列号3~5的氨基酸序列构成序列号1所示的P30蛋白的全部氨基酸序列的一部分,是包含P30蛋白的表位的区域。

[0042] 免疫色谱测定法等夹心式免疫测定法的情况下,其中使用的第一抗体和第二抗体可以分别为多克隆抗体也可以为单克隆抗体,从反应特异性的观点出发,一般优选使至少一者的抗体为单克隆抗体,特别优选使两者的抗体为单克隆抗体。另外,P30蛋白局部存在于菌体表面并大量存在,为了避免基于使用的抗体的竞争反应、具有更高的反应性,也优选的是,第一抗体和第二抗体为针对P30蛋白的不同表位的抗体。

[0043] 需要说明的是,本发明的肺炎支原体检测用抗体反应的肺炎支原体的P30蛋白是在支原体粘附于生物体细胞时所必须的蛋白质,与作为粘附因子的P1蛋白一起发挥作用,作为辅助蛋白之一而被熟知。

[0044] P30蛋白是分子量30KDa的蛋白质,与P1蛋白同样地,是与粘附和病原性有关的粘附蛋白质之一;是肺炎支原体的菌体中,局部存在于粘附器官的前端部的细胞表面、具有埋没于细胞膜内的N末端区域和存在于细胞膜外的C末端区域的膜贯通型蛋白质。另外,在C末端区域存在有包含大量脯氨酸的氨基酸序列且存在前述序列的重复结构。一般已知的是,由包含大量脯氨酸的氨基酸序列形成的区域采用立体的高维结构,已知成为抗体反应的表位的可能性高。

[0045] 本发明中使用的抗体为针对序列号1所示的P30蛋白的全部氨基酸中的、位于序列号3~5中的任一个氨基酸序列的表位的抗体。另外,这些抗体与其他支原体属不发生反应而仅与肺炎支原体发生反应,特异性优异。序列号3~5的氨基酸序列是包含P30蛋白的表位的区域。因此,可以换言之,为本发明中使用的抗体与由序列号3~5的氨基酸序列中的任一个所含的12个~15个氨基酸残基形成的P30蛋白的片段发生抗原抗体反应的抗体。

[0046] 如此,根据本发明的其他方面,提供一种抗体,其用于识别位于序列号3~5中的任一个氨基酸序列的P30蛋白的表位。

[0047] 发明的效果

[0048] 根据本发明,制作针对肺炎支原体P30蛋白特异性地发生反应的抗体,使用前述P30蛋白作为检测标记物进行免疫学测定,从而可以迅速且特异性地诊断肺炎支原体的感染。另外,利用本发明的免疫学测定法和测定器具,无需特殊的设备和熟练的技术,可以在医院等中,简便且迅速地、且以比以往还迅速且安全地进行肺炎支原体所导致的感染的诊断。

[0049] 根据本发明,基于免疫测定法的检测法中,使用针对序列号1所示的P30蛋白的全部氨基酸序列中的、位于序列号3~5中的任一个氨基酸序列的表位的抗体,因此,可以比以往还高的精度进行肺炎支原体所导致的感染的诊断,进而可以以高灵敏度进行检测,从而进行早期检测。

附图说明

[0050] 图1的a为免疫色谱法试纸条的俯视图,图1的b为a所示的免疫色谱法试纸条的纵

向剖面图。

具体实施方式

[0051] 本发明中,抗体的制造和使用该抗体的检测法和测定法中的各步骤分别依据其本身公知的免疫学方法来进行。

[0052] 本发明中,例如,将编码序列号1中记载的氨基酸序列的DNA序列中的、与序列号3~5的氨基酸序列对应的DNA片段进行无性繁殖,利用基因工程学的方式使该克隆化基因在大肠杆菌等宿主中表达,提取和纯化表达蛋白,以该纯化蛋白质为抗原,依据常规方法,对动物进行免疫,从其抗血清中得到多克隆抗体。

[0053] 本发明中,例如以与上述同样得到的纯化蛋白质为抗原,对小鼠那样的动物进行免疫后,将该免疫过的动物的脾脏细胞与骨髓瘤细胞进行细胞融合所得的融合细胞在含HAT培养基中选择后使其增殖。使用前述那样得到的包含序列号3~5的氨基酸序列的多肽,例如通过酶标记免疫法等挑选增殖过的株,从而可以取得单克隆抗体。

[0054] 作为其他方法,例如以用肺炎支原体菌体纯化过的P30蛋白为抗原,对小鼠那样的动物进行免疫后,将该免疫过的动物的脾脏细胞与骨髓瘤细胞进行细胞融合所得的融合细胞在含HAT培养基中选择后使其增殖,从增殖过的株中,挑选与序列号3~5的多肽发生反应的株,从而可以取得上述单克隆抗体。

[0055] 本发明的抗体还包含:对抗体以及包含与该抗体实质上等同的肺炎支原体的P30蛋白中的序列号3~5的氨基酸序列的多肽具有反应性的抗体片段和变异抗体。作为抗体片段,可以举出:Fab片段、F(ab')₂片段、Fab'片段、scFv片段等。

[0056] 用于检测受试试样中的肺炎支原体的本发明的免疫色谱测定法可以依据公知的免疫色谱法试纸条的构成而容易地实施。

[0057] 上述免疫色谱法试纸条一般以如下方式配置而构成:至少具备能够以抗原的第一抗原决定簇进行抗体抗原反应的第一抗体;能够以前述抗原的第二抗原决定簇进行抗体抗原反应且经过标记的第二抗体和膜载体,前述第一抗体预先固定于前述膜载体的规定位置而形成捕捉部位,前述第二抗体在自前述捕捉部位分隔开的位置在前述膜载体上也能够进行色谱展开。第一抗体和第二抗体如上述可以分别为多克隆抗体也可以为单克隆抗体,优选至少任一者为单克隆抗体。通常,第一抗体和第二抗体以“杂化”的组合而使用,即,组合使用分别识别抗原上的位置和结构均不同的各抗原决定簇的第一抗体和第二抗体。然而,如果第一抗原决定簇与第二抗原决定簇在抗原上的位置不同,则在结构上也可以为相同,此时,第一抗体和第二抗体可以为“均化”组合的单克隆抗体,即,第一抗体和第二抗体这两者可以使用相同的单克隆抗体。

[0058] 例如可以举出图1所示的试纸条。图1中,数字1表示粘合片、2表示浸渗构件、3表示膜载体、31表示捕捉部位、32表示对照捕捉部位、4表示吸收用构件、5表示试样添加用构件。

[0059] 图示的例中,膜载体3由宽度5mm、长度36mm的细长的带状硝化纤维素制膜滤器制成。

[0060] 该膜载体3中,在距离该色谱展开开始点侧的末端7.5mm的位置固定第一抗体,形成样品的捕捉部位31。进而,在距离膜载体3的色谱展开开始点侧的末端15mm的位置设置对照捕捉部位32。该对照捕捉部位32无论分析对象物质是否存在,均用于确认进行了反应,通常,

可以通过使与前述第二抗体以免疫学的方式特异性地结合的物质(排除分析对象物质)固定化于膜载体3而形成。例如,使用源自小鼠的抗体作为第二抗体时,可以使用针对该小鼠抗体的抗体。

[0061] 图示的例中,膜载体3使用硝化纤维素制膜滤器,只要能够使受试试样中所含的样品进行色谱展开且能够固定形成上述捕捉部位31的抗体即可,可以为任意物质,也可以使用其他纤维素类膜、尼龙膜、玻璃纤维膜等。

[0062] 浸渗构件2由浸渗有以第二抗原决定簇与前述抗原发生抗体抗原反应的第二抗体的构件构成,所述第二抗原决定簇位于与前述第一抗体所结合的第一抗原决定簇不同的部位。该第二抗体用适当的标记物质预先进行标记。

[0063] 图示的例中,作为浸渗构件2,使用5mm×15mm的带状的玻璃纤维无纺布,但不限定于此,例如也可以使用纤维素类布(滤纸、硝化纤维素膜等)、聚乙烯、聚丙烯等多孔质塑料布类等。

[0064] 作为第二抗体的标记物质,只要能够使用就可以为任意物质,可以举出:显色标记物质、酶标记物质、荧光标记物质、辐射线标记物质等。其中,从以肉眼观察在捕捉部位31的颜色的变化而能够迅速且简便地进行判定的方面出发,优选使用显色标记物质。

[0065] 作为显色标记物质,除金胶体、铂胶体等金属胶体之外,可以举出红色和蓝色等用各颜料着色过的聚苯乙烯胶乳等合成胶乳;天然橡胶胶乳等胶乳,其中,特别优选金胶体等金属胶体。

[0066] 该浸渗构件2可以通过使经过标记的第二抗体的悬浮液浸渗于前述玻璃纤维无纺布等构件并使其干燥等来制作。

[0067] 如图1所示那样,将膜载体3粘贴于粘合片1的中部,在该膜载体3的色谱展开的开始点侧(即图1的左侧,以下记作“上游侧”;另外,将其相反侧、即图1的右侧以下记作“下游侧”)的末端上,重叠浸渗构件2的下游侧末端并连接,同时将该浸渗构件2的上游侧部分粘贴于粘合片1,从而可以制作本发明的免疫色谱法试纸条。

[0068] 进而,根据需要,可以在浸渗构件2的上表面载置试样添加用构件5的下游侧部分,并且将该试样添加用构件5的上游侧部分粘贴于粘合片1,另外,还可以在膜载体3的下游侧部分的上表面载置吸收用构件4的上游侧部分,并且使该吸收用构件4的下游侧部分粘贴于粘合片1。

[0069] 吸收用构件4只要为能够迅速吸收、保持液体的材质即可,可以举出棉布、滤纸、和由聚乙烯、聚丙烯等形成的多孔质塑料无纺布等,特别是滤纸最佳。另外,也可以使用由包含吸水性聚合物的复合材料形成的滤纸。

[0070] 作为试样添加用构件5,例如可以使用:多孔质聚乙烯和多孔质聚丙烯等那样的多孔质合成树脂的片或薄膜、以及、滤纸和棉布等那样的纤维素制的纸或织布或者无纺布。

[0071] 进而,图1的免疫色谱法试纸条被收纳于在试样添加用构件5与捕捉部位31的上方分别有受试试样注入部和判定部开口的适当的塑料制外壳内而提供。出于防止使用者的二次感染的目的,优选的是,免疫色谱法试纸条被收纳于塑料制外壳内而提供。

[0072] 如此,将由生物体试样等形成的受试试样根据需要进行适当的展开溶剂混合,得到能够进行色谱展开的混合液后,将该混合液注入至图1所示的免疫色谱法试纸条的试样添加用构件5上面时,该混合液通过该试样添加用构件5,在浸渗构件2中与经过标记的第二抗

体进行混合。

[0073] 此时,如果该混合液中存在被检测物,则通过抗原抗体反应形成被检测物与第二抗体的复合体。该复合体在膜载体3中进行色谱展开,达到至捕捉部位31,与其中固定的第一抗体发生抗原抗体反应而被捕捉。

[0074] 此时,如果使用金胶体等显色标记物质作为标记物质,则利用该显色标记物质的累积捕捉部位31发生显色,因此,可以直接对样品进行定性地或定量地测定。进而,对于在免疫色谱法试纸条的捕捉部位31中累积的该显色标记物质的显色强度,利用免疫色谱读数仪进行光学读取,从而能够使显色强度数值化,从而能够定量地进行测定。

[0075] 另外,正常进行色谱展开的情况下,未与被检测物发生抗原抗体反应的第二抗体到达至对照捕捉部位32,被此处固定的与第二抗体反应的抗体捕捉。此时,如果使用显色标记物质作为标记物质,则利用该显色标记物质的累积,对照捕捉部位32显色,确认了正常地进行了色谱展开。另一方面,对照捕捉区域32未进行显色的情况下,确认了未进行第二抗体展开等问题发生。

[0076] 作为受试试样,没有特别限制,例如可以举出:鼻腔抽吸液、鼻咽抽吸液、鼻腔拭子液、咽拭子液、鼻咽拭子液喀痰、唾液、支气管清洗液等肺炎支原体能够存在的生物体试样。受试试样可以用生理盐水、展开溶剂等适当的稀释液稀释而注入至膜载体。

[0077] 需要说明的是,使用混入了血液的受试试样时,特别是使用金胶体等显色标记物质作为标记抗体的标记物质的情况下,优选的是,在前述试样添加用构件配置血细胞捕捉膜构件。血细胞捕捉膜构件优选的是,层叠于前述浸渗构件与前述试样添加用构件之间。由此,可以阻止红血细胞在膜载体上展开,因此,膜载体的捕捉部位的显色标记物质的累积的确认变容易。作为血细胞捕捉膜构件,使用羧甲基纤维素膜,具体而言,可以使用由ADVANTEC东洋株式会社销售的离子交换滤纸CM(商品名)、由Whatman Japan销售的离子交换纤维素纸等。

[0078] 实施例

[0079] 根据下述的实施例对本发明进行进一步具体地说明,但本发明不限于该实施例。

[0080] (实施例1:重组P30蛋白的表达和纯化)

[0081] 自DDBJ(国立遗传学研究所数据库)获得肺炎支原体M129株的P30蛋白的氨基酸序列。从前述P30蛋白的氨基酸序列中,特定除膜贯通域之外的细胞外区域即序列号2所示的氨基酸序列(AA74-274),合成对应的基因序列。将His-tag表达用载体即pET302/NT-His用限制性内切酶EcoRI切断后,作为脱磷酸化处理,利用碱性磷酸酶进行处理,与前述基因序列进行混合,使用DNA Ligation Kit Ver.2(Takara Bio)进行连接反应。将组入了目标基因的重组P30质粒导入至重组蛋白表达用宿主E.coli BL(DE3) pLysS(Novagen公司的制品)。将导入菌在LB琼脂平板培养基中进行培养,将所得菌落在LB液体培养基中进行培养。进而添加1mM IPTG(Takara Bio公司的制品),诱导重组P30蛋白的表达后,回收E.coli。将回收的菌再次浮游于增溶化缓冲液[0.5% Triton X-100(Sigma公司的制品)、10mM咪唑(Imidazole)、20mM磷酸盐(Phosphate)和0.5M NaCl(pH7.4)(Amersham公司的制品)],通过超声波处理进行增溶化,然后使用His trap Kit(Amersham公司的制品),对重组P30蛋白进行纯化。使该纯化蛋白质对磷酸缓冲生理盐水(以下,称为PBS)进行透析,从而制作目标重

组P30蛋白。

[0082] (实施例2:针对重组P30蛋白的单克隆抗体的制成)

[0083] 将实施例1中得到的重组P30蛋白作为免疫用抗原,制成针对重组P30蛋白的单克隆抗体(以下,称为抗P30抗体)。单克隆抗体的制成依据常规方法进行。将100 μ g的重组P30蛋白与等量的Aduvant Complete Freund(Difco公司的制品)进行混合,对小鼠(BALB/c、5周龄、日本SLC)进行3次免疫,细胞融合中使用该脾脏细胞。细胞融合中使用作为小鼠的骨髓瘤细胞的Sp2/0-Ag14细胞(Shulman等、1978)。细胞的培养中使用如下培养液:在Dulbecco's Modified Eagle Medium(Gibco公司的制品)中添加L-谷氨酰胺0.3mg/ml、青霉素G钾100单位/ml、硫酸链霉素100 μ g/ml、甘德霉素(Gentacin)40 μ g/ml(以下,称为DMEM),在其中加入胎牛血清(JRH公司的制品)使其成为10%而得到的。细胞融合如下进行:将免疫小鼠的脾脏细胞与Sp2/0-Ag14细胞进行混合,向其中添加聚乙二醇溶液(Sigma公司的制品),从而进行。将融合细胞在HAT-DMEM[包含0.1mM次黄嘌呤钠、0.4 μ M氨嘌呤和0.016mM胸苷(Gibco公司的制品)的血清加DMEM]中进行培养,通过酶联免疫吸附测定法(ELISA),确认培养上清中的抗体产生。将抗体产生阳性的细胞在HT-DMEM[包含0.1mM次黄嘌呤钠和0.16mM胸苷的血清加DMEM]中进行培养,进而在血清加DMEM中继续培养。

[0084] (实施例3:单克隆抗体的调制)

[0085] 将经过无性繁殖的细胞腹腔内接种至预先接种了姥鲛烷(2,6,10,14-Tetramethylpentadecane(Sigma公司的制品))的小鼠(BALB/c、昏迷的(retire)、日本SLC),采集腹水。将该腹水供至蛋白G柱,将单克隆抗体纯化。制成的单克隆抗体的同种型使用小鼠单克隆抗体分型试剂(Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents)(Sigma公司的制品)来进行鉴定。

[0086] 最终,得到6个克隆的针对P30蛋白的单克隆抗体产生细胞。

[0087] (参考例1:试验用标准菌液的制作)

[0088] 将肺炎支原体的M129株和FH株的标准株接种至PPL0液体培养基,在5%CO₂气氛下、以37 $^{\circ}$ C进行培养直至变为规定浓度。将所得培养液在PPL0液体培养基中调制10倍梯度稀释液直至10万倍稀释液,对于该各稀释液,在立体显微镜下测量PPL0琼脂培养基上的发育菌落数,算出菌浓度。将所得培养液作为试验用菌液。

[0089] (比较例1:肺炎支原体P1蛋白的纯化)

[0090] 将肺炎支原体M129株接种至PPL0液体培养基,以37 $^{\circ}$ C进行培养。将所得到的培养液进行离心分离,回收菌体。P1蛋白自菌体的纯化方法基于Nakane等的方法(Journal of Bacteriology,2011)而实施。

[0091] 所得菌体用PBS、pH7.4进行二次清洗。使前述菌体悬浮于包含1%CHAPS的PBS后,将前述悬浮液进行离心分离,进而对于所得沉渣,添加包含2%辛基糖苷的PBS并使其溶解。将前述溶液离心分离,回收上清。将所得上清供至硫酸铵分级沉淀,通过离心分离得到残渣。使所得残渣溶解于包含0.3%Triton X-100的PBS,使用Superdex200的凝胶过滤柱色谱法进行纯化。将包含该纯化蛋白质的级分通过SDS-page进行分析,在约170kDa确认单一的条带,得到目标P1蛋白。

[0092] (实施例4:抗P30抗体的表位解析)

[0093] 根据源自序列号1的肺炎支原体的P30蛋白的氨基酸序列,从大量包含存在于N末

端侧的脯氨酸的区域中,选择有可能成为表位的氨基酸序列,合成包含序列号3~5的氨基酸序列的多肽。合成的多肽是自序列号1的氨基酸序列的N末端起为第178-189号的GMAPRPGMPHP(序列号3);第190-201号的GMAPRPGFPPQP(序列号4)和第250-262号的GMAPRPGMQPPRP(序列号5)。需要说明的是,序列号3所示的序列自N末端起、在第202-213号和第226-237号中存在同样的序列,另外,序列号4所示的序列在第214-225号和第238-249号中存在同样的序列。即,序列号3和4的氨基酸序列在P30蛋白内大量存在,具有重复结构。

[0094] 将包含前述序列号3~5所示的氨基酸序列的肽添加至96孔微板并固相化。作为对照,将肺炎支原体(*M. pneumoniae*)纯化菌体;实施例1中调制的纯化P30蛋白;包含自P30蛋白的N末端侧起第101-125号的KRKEKRLLEEKERQQLORIS(序列号6)、第126-145号的AQQEEQQALEQQAEEAHAE(序列号7)的多肽;和参考例1中调制的肺炎支原体的P1蛋白固相化,与前述同样地,确认实施例3中制成的单克隆抗体的反应性。

[0095] 在以规定浓度固相化肽而得到的微板中添加实施例3中制作的单克隆抗体,在室温下使其反应1小时。接着,将孔内的溶液抽吸去除,清洗后,使生物素标记抗小鼠抗体反应。在反应1小时后,将孔内的溶液抽吸去除,清洗后,添加亲和素标记辣根过氧化物酶使其反应。之后,添加作为显色基质的3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMBZ)溶液使其反应,利用2N的硫酸使反应停止。利用微板读数仪(Biorad公司的制品),在主波长450nm下测定吸光度。将结果示于表1。

[0096] [表1]

[0097]

	固相化抗原							
	序列号 3	序列号 4	序列号 5	P30 蛋白	序列号 6	序列号 7	P1 蛋白	肺炎支原体 纯化菌体
BLMP001	0.894	1.021	1.863	1.813	0.062	0.051	0.012	2.124
BLMP002	2.301	0.541	0.721	1.851	0.051	0.026	0.025	2.052
BLMP003	0.781	2.012	0.621	1.921	0.021	0.047	0.014	1.856
BLMP004	1.729	1.531	1.621	2.120	0.042	0.031	0.037	1.741
BLMP005	0.062	0.051	0.043	1.613	1.593	0.042	0.042	1.684
BLMP006	0.021	0.044	0.025	1.489	0.027	1.626	0.018	1.729

[0098] 根据上述结果表明,单克隆抗体BLMP001对包含序列号5的氨基酸序列的多肽显示出最强的反应。另外,对包含类似序列即序列号3的氨基酸序列的多肽和包含序列号4的氨基酸序列的多肽也显示出反应。

[0099] 单克隆抗体BLMP002对包含序列号3的氨基酸序列的多肽显示出强的反应,单克隆抗体BLMP003对包含序列号4的氨基酸序列的多肽显示出强的反应。与单克隆抗体BLMP001同样地,对包含类似的氨基酸序列的其他多肽也显示出反应性。

[0100] 单克隆抗体BLMP004对包含序列号3、序列号4和序列号5的氨基酸序列的多肽全部显示出反应。推测为识别各氨基酸序列中的共通的序列的单克隆抗体。

[0101] 单克隆抗体BLMP001、BLMP002和BLMP003对肺炎支原体(*M. pneumoniae*)纯化菌体和纯化P30蛋白显示出高的反应,对作为对照的纯化P1蛋白不显示反应性。

[0102] 由此可以确认为如下抗体:单克隆抗体BLMP001识别P30蛋白中的包含序列号5的氨基酸序列的多肽,单克隆抗体BLMP002识别包含序列号3的氨基酸序列的多肽,单克隆抗体BLMP003识别包含序列号4的氨基酸序列的多肽。

[0103] (实施例5:使用了抗P30抗体的免疫色谱法试纸条的制作)

[0104] (1) 抗P30抗体的调制

[0105] 将实施例3中得到的单克隆抗体BLMP001产生细胞和单克隆抗体BLMP004产生细胞接种至小鼠腹腔,将所得腹水分别进一步通过常规方法进行利用蛋白G的IgG纯化,制成抗P30抗体。

[0106] (2) 铂-金胶体颗粒溶液的调制

[0107] 将使用的玻璃器具全部用王水进行清洗。将390ml的超纯水放入至烧瓶使其沸腾,在该沸腾水中加入四氯金酸水溶液(以每1升水溶液中的金计1g、片山化学工业株式会社)30ml,之后,加入1重量%柠檬酸钠水溶液60ml,6分45秒后,加入氯铂酸水溶液(以每1升水溶液中的铂计为1g、和光纯药工业株式会社)30ml。自氯铂酸水溶液添加5分钟后,加入1重量%柠檬酸钠水溶液60ml,进行4小时回流,得到铂-金胶体悬浮液。

[0108] (3) 铂-金胶体标记抗P30抗体溶液的调制

[0109] 作为铂-金胶体标记的抗P30抗体,使用上述(1)中得到的单克隆抗体BLMP001,以下述步骤进行铂-金胶体标记。

[0110] 将抗P30抗体的蛋白换算重量 $1\mu\text{g}$ (以下,表示抗体的蛋白换算重量时,单纯地以基于该纯化蛋白质的重量分析的重量数值来表示)与上述(2)的铂-金胶体溶液1ml进行混合,在室温下静置2分钟,使该抗体全部与铂-金胶体颗粒表面结合后,加入10%牛血清白蛋白(以下,记作“BSA”)水溶液以使得铂-金胶体溶液中的最终浓度成为1%,将该铂-金胶体颗粒的残余的表面全部用该BSA掩蔽,调制铂-金胶体标记抗P30抗体(以下,记作“铂-金胶体标记抗体”)溶液。将该溶液进行离心分离($5600\times G$ 、30分钟),使铂-金胶体标记抗体沉淀,去除上清液,得到铂-金胶体标记抗体。使该铂-金胶体标记抗体悬浮于含有10%蔗糖 \cdot 1%BSA \cdot 0.5%Triton-X100的50mMTris盐酸缓冲液(pH7.4),得到铂-金胶体标记抗体溶液。

[0111] (4) 肺炎支原体的P30蛋白检测用免疫色谱法试纸条的制作

[0112] (4-1) 肺炎支原体的P30蛋白与金胶体标记抗体的复合体的捕捉部位

[0113] 准备宽度5mm、长度36mm的细长的带状硝化纤维素膜作为色谱介质的色谱展开用膜载体3。将含有抗P30抗体 $1.0\text{mg}/\text{ml}$ 的溶液 $0.5\mu\text{l}$ 以线状涂布于距离该色谱展开用膜载体3中的色谱展开开始点侧的末端7.5mm的位置,将其在室温下干燥,制成为肺炎支原体的P30蛋白与铂-金胶体标记抗体的复合体的捕捉部位31。作为该涂布用抗P30抗体,使用上述(1)中得到的单克隆抗体BLMP004。

[0114] (4-2) 铂-金胶体标记抗体浸渗构件

[0115] 使铂-金胶体标记抗体溶液 $37.5\mu\text{l}$ 浸渗于 $5\text{mm}\times 15\text{mm}$ 的带状玻璃纤维无纺布,使其在室温下干燥,制成铂-金胶体标记抗体浸渗构件2。

[0116] (4-3) 免疫色谱法试纸条的制作

[0117] 除上述色谱展开用膜载体3、上述标记抗体浸渗构件2之外,准备:作为试样添加用构件5的棉布;和作为吸收用构件4的滤纸。然而,使用这些构件,制作与图1同样的免疫色谱法试纸条。

[0118] (5) 试验

[0119] 用样品提取液稀释肺炎支原体的M129株和FH株的培养菌液,调制成规定浓度,作为受试试样。然后,使用受试试样 $100\mu\text{l}$,用微量吸液管滴加至上述(4)中得到的试纸条的试

样添加用构件5并进行色谱展开,在室温下放置15分钟后,用肉眼观察被上述捕捉部位31捕捉的P30蛋白与铂-金胶体标记抗体的复合体的捕捉量。用肉眼以-(无着色)、±(微弱的着色)、+(明确的着色)、++(明显的着色)、+++ (极明显的着色)这5个级别区分与其量成比例地增减的黑色的显色程度来判定捕捉量。作为阴性对照,以规定浓度使用生殖支原体(M.genitalium)的培养菌液。

[0120] 将其结果示于表2。由表2可知,对肺炎支原体的2株显示出高的反应性,对作为阴性对照的生殖支原体、在应用的全部浓度下均显示出阴性。通过使用2种抗P30抗体的免疫色谱测定法,可以高灵敏度且高精度地检测肺炎支原体。

[0121] [表2]

		肺炎支原体 M129株	肺炎支原体 FH株	生殖支原体
[0122]	空白	—	—	—
	1x10 ⁴	±	±	—
	1x10 ⁵	+	±~+	—
	1x10 ⁶	++	+	—
	1x10 ⁷	+++	++	—

[0123] (实施例6:P30蛋白检测免疫色谱法试纸条与P1蛋白检测免疫色谱法试纸条的反应性比较试验)

[0124] 将参考例1中调制的肺炎支原体的M129株和FH株的培养菌液用样品提取液调制规定浓度,作为受试试样。在各免疫色谱法试纸条上,将受试试样100μl用微量吸液管分别滴加至试样添加用构件5并进行色谱展开,在室温下放置15分钟后,用肉眼观察被捕捉部位31捕捉的抗原与铂-金胶体标记抗体的复合体来进行判定。用肉眼以-(无着色)、±(微弱的着色)、+(明确的着色)、++(明显的着色)、+++ (极明显的着色)这5个级别区分与其量成比例地增减的黑色的显色程度来判定捕捉量。作为现有法,使用市售的检测肺炎支原体的P1蛋白的试剂。将结果示于表3。

[0125] [表3]

		肺炎支原体 M129株		肺炎支原体 FH株		生殖支原体	
		本发明	现有法	本发明	现有法	本发明	现有法
[0126]	空白	—	—	—	—	—	—
	1x10 ⁴	±	—	±	—	—	—
	1x10 ⁵	±~+	—	+	—	—	—
	1x10 ⁶	++	±	++	±	—	±
	1x10 ⁷	+++	±~+	+++	+	—	±

[0127] 由表3表明,使用本发明的实施例5中制作的P30蛋白检测用免疫色谱法试纸条的情况下,M129株中,以1×10⁷CFU/ml显示出明显的显色;FH株中,以1×10⁶CFU/ml显示出明显的显色;M129株中,以1×10⁶CFU/ml显示出明显的显色;FH株中,以1×10⁵CFU/ml显示出明确的显色。

[0128] 另一方面,现有法中,M129株中,以1×10⁷CFU/ml以上显示出明确的显色;FH株中,以1×10⁷CFU/ml显示出明确的显色。

[0129] 由表3的结果表明,对显示出相同显色强度的受试试样的菌浓度进行比较,结果表明,本发明的实施例5中制作的P30蛋白检测用免疫色谱法试纸条相对于P1蛋白检测用免疫

色谱法试纸条, M129株中显示出约100倍、FH株中显示出100倍的高检测灵敏度。另外, 现有法中, 对生殖支原体稍有显色但显示出交叉反应, 确认了非特异性显色。本发明的P30蛋白检测用免疫色谱法试纸条中未确认到交叉反应。

[0130] 根据以上的结果表明, 通过使用本发明的抗P30抗体的P30蛋白检测用免疫色谱法试纸条, 可以高灵敏度且特异性地检测肺炎支原体。

[0131] (实施例7: 来自咽拭子液的肺炎支原体的检测)

[0132] 将临床上怀疑感染了肺炎支原体的患者20例作为对象, 使用灭菌了的棉棒, 从前述患者采集咽拭子液。前述咽拭子液通过国立感染症研究所报道的核酸扩增法, 确认了咽拭子液中存在肺炎支原体。根据该结果, 选择从采集的咽拭子液中确认了肺炎支原体存在的样品16例(阳性例)和未检测基因的样品4例(阴性例), 调制选择的咽拭子液作为受试试样。受试试样使用本发明的P30蛋白检测免疫色谱法试纸条, 实施肺炎支原体的检测。作为现有法, 使用市售的检测肺炎支原体的P1蛋白的试剂。

[0133] 对实施例5中制作的免疫色谱法试纸条的试样添加用构件5, 用微量吸液管分别滴加受试试样100 μ l并进行色谱展开, 在室温下放置15分钟后, 用肉眼观察被捕捉部位31捕捉的抗原与铂-金胶体标记抗体的复合体并进行判定。用肉眼以-(无着色)、 \pm (微弱的着色)、+(明确的着色)、++(明显的着色)、+++ (极明显的着色)这5个级别区分与其量成比例地增减的黑色的显色程度来判定捕捉量。将试验的结果示于表4。

[0134] [表4]

受试体编号	本发明	现有法	核酸扩增法 (PCR法)
1	++	+	+
2	++	+	+
3	+++	+	+
4	++	\pm	+
5	++	\pm	+
6	+	\pm	+
7	-	\pm	-
8	-	\pm	-
9	\pm	-	+
10	++	+	+
11	-	-	+
12	+	\pm	+
13	+	\pm	+
14	-	-	-
15	\pm	-	+
16	+	-	+
17	\pm	-	+
18	-	-	-
19	+	\pm	+
20	+	\pm	+

[0135]

[0136] 由表4表明, 根据本发明的检测法与核酸扩增法的比较结果, 确认了, 本发明的检测法显示出阳性一致率93.8%、阴性一致率100.0%、和整体一致率95.0%这样非常高的一致率, 可以以与核酸扩增法等同的精度进行检测。与现有法相比, 表明本发明的检测法是具有高的检测灵敏度和特异性的检测法。

[0137] 根据以上的结果确认了, 本发明的免疫色谱法试纸条可以自咽拭子液高灵敏度且高精度地检测肺炎支原体。

[0138] 产业上的可利用性

[0139] 根据本发明, 提供: 包含使用识别肺炎支原体的P30蛋白中的特定的表位的抗体的

免疫测定法的肺炎支原体的检测法和试剂盒,无需特殊的设备和熟练的技术,与现有法相比,可以迅速且特异性地诊断肺炎支原体的感染。

[0140] 附图标记说明

[0141] 1 粘合片

[0142] 2 浸渗构件

[0143] 3 膜载体

[0144] 31 捕捉部位

[0145] 32 对照捕捉部位

[0146] 4 吸收用构件

[0147] 5 试样添加用构件

序列表

<110> BL有限公司 (BL Co., Ltd.)

<120> 肺炎支原体的免疫学检测法和试剂盒

<130> IFP-1347

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 274

<212> PRT

<213> 肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*)

<400> 1

```

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

```

210	215	220
Pro Gly Met Ala Pro Arg	Pro Gly Met Pro Pro	His Pro Gly Met Ala
225	230	235
Pro Arg Pro Gly Phe Pro Pro	Gln Pro Gly Met Ala Pro Arg	Pro Gly
245	250	255
Met Gln Pro Pro Arg Pro Gly	Met Pro Pro Gln Pro Gly	Phe Pro Pro
260	265	270
Lys Arg		
<210> 2		
<211> 201		
<212> PRT		
<213> 肺炎支原体 (<i>Mycoplasma pneumoniae</i>)		
<400> 2		
Phe Ile Pro Thr Val Ala Val Cys Phe Gly Phe Ser Ala Leu Ala Ile		
1	5	10
Ile Leu Gly Leu Ala Ile Gly Leu Pro Ile Val Lys Arg Lys Glu Lys		
20	25	30
Arg Leu Leu Glu Glu Lys Glu Arg Gln Glu Gln Leu Ala Glu Gln Leu		
35	40	45
Gln Arg Ile Ser Ala Gln Gln Glu Glu Gln Gln Ala Leu Glu Gln Gln		
50	55	60
Ala Ala Ala Glu Ala His Ala Glu Ala Glu Val Glu Pro Ala Pro Gln		
65	70	75
Pro Val Pro Val Pro Pro Gln Pro Gln Val Gln Ile Asn Phe Gly Pro		
85	90	95
Arg Thr Gly Phe Pro Pro Gln Pro Gly Met Ala Pro Arg Pro Gly Met		
100	105	110
Pro Pro His Pro Gly Met Ala Pro Arg Pro Gly Phe Pro Pro Gln Pro		
115	120	125
Gly Met Ala Pro Arg Pro Gly Met Pro Pro His Pro Gly Met Ala Pro		
130	135	140
Arg Pro Gly Phe Pro Pro Gln Pro Gly Met Ala Pro Arg Pro Gly Met		
145	150	155
Pro Pro His Pro Gly Met Ala Pro Arg Pro Gly Phe Pro Pro Gln Pro		
165	170	175
Gly Met Ala Pro Arg Pro Gly Met Gln Pro Pro Arg Pro Gly Met Pro		
180	185	190
Pro Gln Pro Gly Phe Pro Pro Lys Arg		
195	200	

<210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*)
 <400> 3
 Gly Met Ala Pro Arg Pro Gly Met Pro Pro His Pro
 1 5 10
 <210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*)
 <400> 4
 Gly Met Ala Pro Arg Pro Gly Phe Pro Pro Gln Pro
 1 5 10
 <210> 5
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*)
 <400> 5
 Gly Met Ala Pro Arg Pro Gly Met Gln Pro Pro Arg Pro
 1 5 10
 <210> 6
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*)
 <400> 6
 Lys Arg Lys Glu Lys Arg Leu Leu Glu Glu Lys Glu Arg Gln Glu Gln
 1 5 10 15
 Leu Ala Glu Gln Leu Gln Arg Ile Ser
 20 25
 <210> 7
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*)
 <400> 7
 Ala Gln Gln Glu Glu Gln Gln Ala Leu Glu Gln Gln Ala Ala Ala Glu
 1 5 10 15
 Ala His Ala Glu
 20

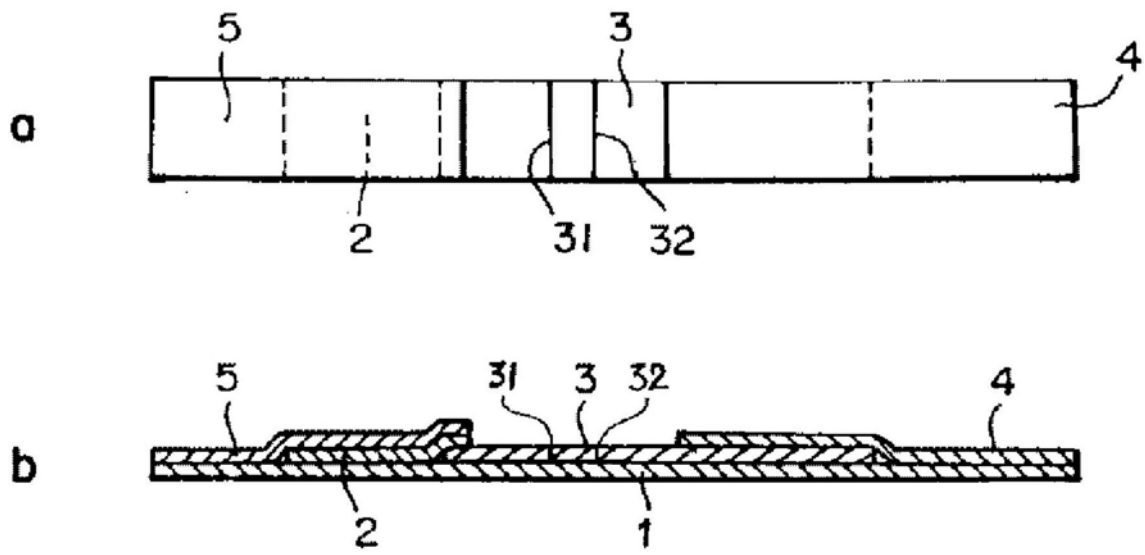


图1

专利名称(译)	肺炎支原体的免疫学检测法和试剂盒		
公开(公告)号	CN107430124A	公开(公告)日	2017-12-01
申请号	CN201680010102.9	申请日	2016-01-27
[标]发明人	斋藤宪司		
发明人	斋藤宪司		
IPC分类号	G01N33/569 C07K16/00 C12N15/02 C12N15/09 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/553 G01N33/577 C12P21/08		
CPC分类号	C07K16/00 C12N15/02 C12N15/09 G01N33/56933 G01N2469/10 C07K16/1253 C12Q1/04 G01N33/553 G01N33/558 G01N33/577 C07K14/30 C12Q1/6888 G01N2333/30 G01N2469/00		
代理人(译)	刘新宇		
优先权	2015015253 2015-01-29 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的目的在于，提供：能够简便、迅速且高灵敏度地检测作为支原体肺炎的原因菌的肺炎支原体的特异性抗体、进而包含前述抗体的免疫学检测法和试剂盒。制作识别肺炎支原体的P30蛋白的特定的表位的抗体，使用前述抗体进行免疫学检测，从而与现有法相比可以迅速且特异性地诊断肺炎支原体的感染。根据本发明，无需特殊的设备和熟练的技术，在医院等中可以简便且迅速地检测肺炎支原体和诊断感染。

	固相化抗原							肺炎支原体 纯化菌体
	序列号3	序列号4	序列号5	P30蛋白	序列号6	序列号7	P1蛋白	
B.JMP001	0.894	1.021	1.863	1.813	0.062	0.051	0.012	2.124
B.JMP002	2.301	0.541	0.721	1.851	0.051	0.026	0.025	2.052
B.JMP003	0.781	2.012	0.821	1.921	0.021	0.047	0.014	1.856
B.JMP004	1.729	1.531	1.621	2.120	0.042	0.031	0.037	1.741
B.JMP005	0.062	0.051	0.043	1.613	1.593	0.042	0.042	1.684
B.JMP006	0.021	0.044	0.025	1.489	0.027	1.626	0.018	1.729