

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680037843.2

[51] Int. Cl.

G12N 15/00 (2006.01)

C07K 16/08 (2006.01)

G12N 5/10 (2006.01)

G12N 15/02 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

[43] 公开日 2008年10月8日

[11] 公开号 CN 101283093A

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/545 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

[22] 申请日 2006.10.11

[21] 申请号 200680037843.2

[30] 优先权

[32] 2005.10.11 [33] JP [31] 296542/2005

[86] 国际申请 PCT/JP2006/320330 2006.10.11

[87] 国际公布 WO2007/043582 日 2007.4.19

[85] 进入国家阶段日期 2008.4.11

[71] 申请人 希森美康株式会社

地址 日本兵库县

[72] 发明人 藤本幸太郎 梶田忠宏 武田和彦
冈本尚

[74] 专利代理机构 北京金之桥知识产权代理有限公司

代理人 梁朝玉

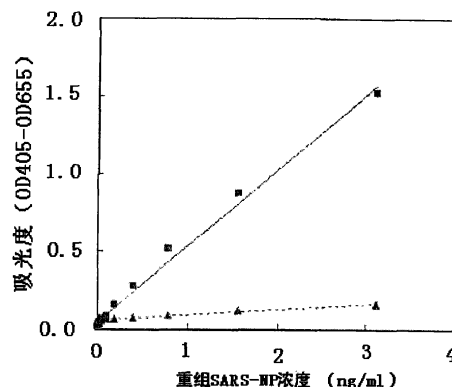
权利要求书 4 页 说明书 35 页 序列表 7 页
附图 4 页

[54] 发明名称

测定 SARS 病毒核衣壳蛋白的测定方法、测定用试剂盒、试验器具、SARS 病毒核衣壳蛋白单克隆抗体及其产生上述单克隆抗体的杂交瘤

[57] 摘要

本发明提供一种用与 SARS 病毒核衣壳蛋白 (SARS - NP) 特异性结合的第一抗体和与 SARS - NP 特异性结合的第二抗体测定 SARS - NP 的方法, 上述第一抗体或上述第二抗体是能识别位于 SARS - NP 氨基酸序列的 N 端从第 283 ~ 第 422 个氨基酸的区域 (C 区) 的表位的抗体。



1. 一种 SARS-NP 测定方法, 用与 SARS 病毒核衣壳蛋白 (SARS-NP) 特异性结合的第一抗体和与 SARS-NP 特异性结合的第二抗体测定 SARS-NP 的方法;

所述第一抗体或所述第二抗体是能识别位于 SARS-NP 氨基酸序列的 N 端从第 283~第 422 个氨基酸的区域 (C 区) 的表位的抗体。

2. 权利要求 1 所述 SARS-NP 测定方法, 其特征在于: 所述第二抗体是能识别位于所述 C 区表位的抗体, 所述第一抗体是能识别位于 SARS-NP 氨基酸序列的 N 端起第 1~第 141 区域 (A 区) 的表位、或能识别位于 SARS-NP 氨基酸序列的 N 端起第 142~第 282 区域 (B 区) 的表位的抗体, 该第一抗体固定在固相上使用。

3. 权利要求 1 所述 SARS-NP 测定方法, 其特征在于: 所述第一抗体是能识别位于所述 C 区表位的抗体, 所述第二抗体是能识别位于 SARS-NP 氨基酸序列的 N 端起第 1~第 141 区域 (A 区) 的表位、或能识别位于 SARS-NP 氨基酸序列的 N 端起第 142~第 282 区域 (B 区) 的表位的抗体, 该第一抗体固定在固相上使用。

4. 权利要求 1~3 某一项所述 SARS-NP 测定方法, 其特征在于: 所述第一抗体和所述第二抗体中至少有一方是单克隆抗体。

5. 权利要求 1~4 某一项所述 SARS-NP 测定方法, 其特征在于: 所述第二抗体被标记物标记。

6. 权利要求 1~5 某一项所述 SARS-NP 测定方法, 其特征在于: 所述测定方法是透射比浊法、胶乳免疫测定法、放射免疫测定法、酶免疫测定法、荧光免疫测定法、化学发光免疫测定法或免疫层析法。

7. 一种 SARS-NP 测定用试剂盒, 这是用与 SARS 病毒核衣壳蛋白

(SARS-NP) 特异性结合的第一抗体和与 SARS-NP 特异性结合的第二抗体测定 SARS 病毒核衣壳蛋白 (SARS-NP) 的试剂盒;

由固定所述第一抗体的固相和含有被标记物标记的所述第二抗体的试剂组合而成;

所述第一抗体或所述第二抗体是能识别位于 SARS-NP 氨基酸序列的 N 端起第 283~第 422 的区域 (C 区) 的表位的抗体。

8. 权利要求 7 所述测定用试剂盒, 其特征在于: 所述第二抗体是能识别位于 C 区表位的抗体, 所述第一抗体是能识别位于 SARS-NP 氨基酸序列的 N 端起第 1~第 141 区域 (A 区) 的表位、或能识别位于 SARS-NP 氨基酸序列的 N 端起第 142~第 282 区域 (B 区) 的表位的抗体。

9. 权利要求 7 所述测定用试剂盒, 其特征在于: 所述第一抗体是能识别位于所述 C 区表位的抗体, 所述第二抗体是能识别位于 SARS-NP 氨基酸序列的 N 端起第 1~第 141 区域 (A 区) 的表位、或能识别位于 SARS-NP 氨基酸序列的 N 端起第 142~第 282 区域 (B 区) 的表位的抗体。

10. 权利要求 7~9 某一项所述测定用试剂盒, 其特征在于: 所述第一抗体和所述第二抗体中至少有一方是单克隆抗体。

11. 一种免疫层析法用试验器具, 这是一种用与 SARS 病毒核衣壳蛋白 (SARS-NP) 特异性结合的第一抗体和与 SARS-NP 特异性结合的第二抗体测定 SARS-NP 的免疫层析法用试验器;

所述第一抗体固定在固相上, 所述第二抗体被标记物标记;

所述免疫层析法用试验器具有添加待测试样的加样部分和添加到所述加样部分的待测试样展开的试样展开部分, 该试样展开部分有一固定了

第一抗体的判断部分，添加到所述加样部分的待测试样至少向该判断部分扩散；

所述第一抗体或所述第二抗体是能识别位于SARS-NP氨基酸序列的N端起283~422区域（C区）的表位的抗体。

12. 权利要求11所述免疫层析法用试验器具，其特征在于，所述第二抗体是能识别位于C区表位的抗体，所述第一抗体是能识别位于SARS-NP氨基酸序列的N端起第1~第141区域（A区）的表位的抗体或能识别位于SARS-NP氨基酸序列的N端起第142~第282区域（B区）的表位的抗体。

13. 权利要求 11 所述免疫层析法用试验器具，其特征在于，所述第一抗体是能识别位于所述 C 区表位的抗体，所述第二抗体是能识别位于 SARS-NP 氨基酸序列的 N 端起第 1~第 141 区域（A 区）的表位的抗体或能识别位于 SARS-NP 氨基酸序列的 N 端起第 142~第 282 区域（B 区）的表位的抗体。

14. 权利要求11~13某一项所述免疫层析法用试验器具，其特征在于，所述第一抗体和所述第二抗体中至少有一方是单克隆抗体。

15. 权利要求 11~14 某一项所述免疫层析法用试验器具，其特征在于，所述测定试样含有被标记物标记的第二抗体。

16. 权利要求11~14某一项所述免疫层析法用试验器具，其特征在于，所述试样展开部分有一固定被标记物标记的第二抗体的标记固定部分，该标记固定部分配置于与测定试样向判断部分扩散的展开方向相对的比判断部分靠上游一侧。

17. 一种能与SARS病毒核衣壳蛋白（SARS-NP）特异性结合的、由保藏号为FERM ABP-10678的杂交瘤产生的单克隆抗体。

18. 一种能与SARS病毒核衣壳蛋白（SARS-NP）特异性结合的、由保藏号为FERM ABP-10679的杂交瘤产生的单克隆抗体。

19. 一种能与SARS病毒核衣壳蛋白（SARS-NP）特异性结合的、由保藏号为FERM ABP-10680的杂交瘤产生的单克隆抗体。

20. 一种能与SARS病毒核衣壳蛋白（SARS-NP）特异性结合的、由保藏号为FERM ABP-10686的杂交瘤产生的单克隆抗体。

21. 一种能与SARS病毒核衣壳蛋白（SARS-NP）特异性结合的、由保藏号为FERM ABP-10687的杂交瘤产生的单克隆抗体。

22. 一种以保藏号FERM ABP-10678托管的杂交瘤。

23. 一种以保藏号FERM ABP-10679托管的杂交瘤。

24. 一种以保藏号FERM ABP-10680托管的杂交瘤。

25. 一种以保藏号FERM ABP-10686托管的杂交瘤。

26. 一种以保藏号FERM ABP-10687托管的杂交瘤。

测定SARS病毒核衣壳蛋白的测定方法、测定用试剂盒、试验器具、SARS病毒核衣壳蛋白单克隆抗体及其产生上述单克隆抗体的杂交瘤

技术领域：

本发明涉及测定SARS病毒核衣壳蛋白（SARS-NP）的测定方法、测定用试剂盒及试验器具。本发明还涉及针对SARS-NP的单克隆抗体及其产生上述单克隆抗体的杂交瘤。

背景技术：

严重急性呼吸系统综合症（Severe Acute Respiratory Syndrome:SARS）是近年才发现的传染病，已确认SARS的起因病原体是分类为冠状病毒科的新型病毒（SARS病毒）。作为感染SARS的诊断方法，已经有利用免疫学测定方法检测标本中的SARS病毒。其中一例有非专利文献1和非专利文献2所记述的方法。

非专利文献1记述了用针对SARS-NP的多克隆抗体进行酶联免疫测定（ELISA）的测定方法。具体而言，将多克隆抗体固定在ELISA的酶标板上，在此依次添加标本和已标记多克隆抗体，形成复合物，并检测之。

非专利文献2则记述了用针对SARS-NP的单克隆抗体和针对SARS-NP的多克隆抗体进行ELISA法测定的测定方法。具体而言，将三种单克隆抗体固定在ELISA的酶标板上，在此依次添加标本和已标记多克隆抗体，形成复合物，并检测之。

非专利文献1和非专利文献2所记述的方法均为ELISA。一般来说，ELISA被称为免疫学测定方法中灵敏度较高的测定方法。另一方面，在病毒诊断中，便捷的免疫层析法也经常得到利用。然而，免疫层析法是比较ELISA灵敏度低的测定方法，即使将非专利文献1和非专利文献2所记述的多克隆抗体和单克隆抗体用于免疫层析法，也可能无法得到足够的灵敏度。

非专利文献1: Susanna K.P.Lau,Patrick C.Y.Woo,Beatrice H.L.Wong, Hoi-Wah Tsoi,Gibson K.S.Woo,Rosana W.S.Poon,Kwok-Hung Chan,William I.Wei,J.S.Malik Peiris,and Kwok-Yung Yuen,《酶联免疫检测法检测严重急性呼吸系统综合症(SARS)患者中的SARS冠状病毒核衣壳蛋白(Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome(SARS)Coronavirus Nucleocapsid Protein in SARS Patients by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)》,Journal of Clinical Microbiology,Vol.42, No.7, P.2884-2889.

非专利文献2: Xiao-yan Che, Li-wen Qiu, Yu-xian Pan, Kun Wen, Wei Hao, Li-ya Zhang, Ya-di Wang, Zhi-yong Liao, Xu Hua, Vincent C.C.Cheng,and Kwok-yung Yuen,《从严重急性呼吸系统综合症患者检测核衣壳蛋白抗原用基于高灵敏度特异性单克隆抗体的捕捉酶免疫测定(Sensitive and Specific Monoclonal Antibody-Based Capture Enzyme Immunoassay for Detection of Nucleocapsid Antigen in Sera from Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome)》, Journal of Clinical Microbiology, Vol.42, No.6, P.2629-2635.

发明内容:

本发明要解决的课题

本发明的目的是提供一种比传统方法灵敏度高的测定方法及测定用试剂盒、试验器具、单克隆抗体和产生单克隆抗体的杂交瘤，使之在SARS-NP的测定中，不仅可以应用于免疫学测定方法中灵敏度较高的ELISA测定方法，也可以应用于免疫学测定方法中灵敏度较低的免疫层析法。

解决课题的手段

鉴于上述课题，本发明提供一种SARS-NP测定方法，该方法是利用与SARS病毒核衣壳蛋白（SARS-NP）特异性结合的第一抗体和与SARS-NP特异性结合的第二抗体测定SARS-NP，上述第一抗体或上述第二抗体是能识别位于SARS-NP氨基酸序列的N端起第283~第422的区域（C区域）的表位的抗体。

本发明还提供一种SARS-NP测定用试剂盒，这是用与SARS病毒核衣壳蛋白（SARS-NP）特异性结合的第一抗体和与SARS-NP特异性结合的第二抗体测定SARS-NP的试剂盒，由固定上述第一抗体的固相和含有被标记物标记的上述第二抗体的试剂组合而成。上述第一抗体和上述第二抗体是与SARS-NP特异性结合的抗体。上述第一抗体或上述第二抗体是能识别位于SARS-NP氨基酸序列的N端起第283~第422的区域（C区域）的表位的抗体。

本发明提供一种免疫层析法用的试验器具，该免疫层析法用试验器具用于用与SARS病毒核衣壳蛋白（SARS-NP）特异性结合的第一抗体和与SARS-NP特异性结合的第二抗体测定SARS-NP，

上述第一抗体固定在固相上，上述第二抗体被标记物标记，

上述免疫层析法用试验器具有添加测定试样的加样部分和添加到上述加样部分的测定试样扩散的试样展开部分，该试样展开部分有一固定了第一抗体的判断部分，添加到上述加样部分的测定试样至少向该判断部分扩散，上述第一抗体或上述第二抗体是能识别位于SARS-NP氨基酸序列的N端起第283~第422的区域（C区域）的表位的抗体。

本发明提供一种能与SARS病毒核衣壳蛋白（SARS-NP）特异性结合的、由保藏号为FERM ABP-10678的杂交瘤产生的单克隆抗体。

本发明提供一种能与SARS病毒核衣壳蛋白（SARS-NP）特异性结合的、由保藏号为FERM ABP-10679的杂交瘤产生的单克隆抗体。

本发明提供一种能与SARS病毒核衣壳蛋白（SARS-NP）特异性结合的、由保藏号为FERM ABP-10680的杂交瘤产生的单克隆抗体。

本发明提供一种能与SARS病毒核衣壳蛋白（SARS-NP）特异性结合的、由保藏号为FERM ABP-10686的杂交瘤产生的单克隆抗体。

本发明提供一种能与SARS病毒核衣壳蛋白（SARS-NP）特异性结合的、由保藏号为FERM ABP-10687的杂交瘤产生的单克隆抗体。

本发明提供一种以保藏号FERM ABP-10678托管的杂交瘤。

本发明提供一种以保藏号FERM ABP-10679托管的杂交瘤。

本发明提供一种以保藏号FERM ABP-10680托管的杂交瘤。

本发明提供一种以保藏号FERM ABP-10686托管的杂交瘤。

本发明提供一种以保藏号FERM ABP-10687托管的杂交瘤。

发明效果

本发明提供的测定方法可以以高于以往的灵敏度测定SARS-NP。以此可以简便、灵敏地检测SARS病毒。

附图说明：

[图1]为试验器具的一实施方式的示意图，显示了在使用本发明的单克隆抗体的免疫层析法中使用的试验器具。

[图2]为试验器具的一实施方式的示意图，显示了在使用本发明的单克隆抗体的免疫层析法中使用的试验器具。

[图3]为显示将SARS-NP的氨基酸序列和该序列分成三段时各区域（A区域、B区域、C区域）的示意图。

[图4]为实施例3的结果显示图。

[图5]为实施例4的结果显示图。

[图6]为实施例5的结果显示图。

具体实施方式：

本发明是用免疫学方法测定SARS-NP。具体而言，由SARS-NP、与SARS-NP特异性结合的第一抗体和与SARS-NP特异性结合的第二抗体形成复合物，测定SARS-NP。本发明人着眼于这种测定所用的抗体特异性及其组合锐意研究，终于完成了本发明。

核蛋白SARS-NP被认为比较难以发生突变。因此，本发明的测定方法以能与SARS-NP特异性结合的抗体作为第一抗体和第二抗体测定SARS-NP。

美国基因数据库(GenBank) (accession Number;AY274119,protein id; AAP41047.1)中有SARS TOR2株核衣壳蛋白的氨基酸序列（全长422个残

基)。本发明将此SARS-NP的氨基酸序列如图3所示分成三个区域,获得若干识别位于各区域的表位的抗体。将这些抗体组成各种各样的组合来测定SARS-NP。由此得知,使用能识别位于SARS-NP的氨基酸序列N端起第283~第422个的区域(C区域)的表位的抗体作为第一抗体或第二抗体获得了高灵敏度的测定结果。

作为第一抗体和第二抗体的理想组合有:识别位于SARS-NP的氨基酸序列N端起第1~第141个的区域(A区域)的表位的抗体和识别位于C区域的表位的抗体组合,或识别位于SARS-NP的氨基酸序列N端起第142~第282个的区域(B区域)的表位的抗体和识别位于C区域的表位的抗体组合。

当将第一抗体固定于固相上时,适于作为第一抗体使用的抗体有识别位于A区域的表位的抗体或识别位于C区的表位的抗体。当将第一抗体固定于固相上时,第一抗体和第二抗体的理想组合有,第一抗体为识别位于A区域的表位的抗体或识别位于B区的表位的抗体、第二抗体为识别位于C区域的表位的抗体。作为其他组合,还有第一抗体为识别位于C区域的表位的抗体,第二抗体为识别位于A区域的表位的抗体或识别位于B区的表位的抗体。

SARS-NP的氨基酸序列不必与美国基因数据库(accession Number;AY274119,protein id;AAP41047.1)所公开的SARS-NP氨基酸序列完全一致。也可以是对于上述美国基因数据库(accession Number;AY274119,protein id;AAP41047.1)所公开的SARS-NP氨基酸序列缺失、取代或增加部分氨基酸的SARS-NP氨基酸序列。

第一抗体或第二抗体既可以是多克隆抗体也可以是单克隆抗体。从特异性的观点看，第一抗体或第二抗体有一方是单克隆抗体为好，最好第一抗体和第二抗体都是单克隆抗体。

作为免疫学测定方法，比如有透射比浊法(Turbidometric Immunoassay: TIA)、散射比浊法(Nephelometric Immunoassay: NIA)、胶乳免疫测定法(Latex Agglutination Immunoassay: LIA)、放射免疫测定法(Radio Immunoassay: RIA)、酶免疫测定法(Enzyme Immunoassay: EIA或 Enzyme Linked Immunosorbent Assay: ELISA)、荧光免疫测定法(Fluorescent Immunoassay: FIA)和化学发光免疫测定法(Chemiluminescent Immunoassay: CLIA)等。还有使用具有固定抗体的膜状载体的试验器具的免疫层析法。在病毒感染的诊断中，从便捷性来看，作为免疫学测定方法，免疫层析法较为理想。为防止与含病毒的标本接触引起感染，最好使测定自动化。从测定的自动化、灵敏度和通用性来说，作为免疫学测定方法ELISA较为理想。

也可根据测定方法不同，用标记物标记抗体并将其固定到载体上。标记抗体的标记物根据测定方法适当选择。比如：如果测定方法为RIA，则标记物可以是 ^{125}I 、 ^{14}C 和 ^{32}P 等放射性同位素。如果测定方法为EIA和ELISA，则可以是 β -半乳糖苷酶(β -gal)、过氧化物酶、碱性磷酸酶等酶。若是FIA，则可以是荧光素衍生物等荧光色素。若是CLIA，则标记物可以是鲁米诺、异鲁米诺、吖啶脂衍生物等化学发光物质。若是免疫层析法，则标记物有胶体金、染色胶乳粒子、荧光胶乳粒子等。

作为固定抗体的载体只要与抗体结合性高即可，无特别限定，比如有聚氯乙烯、聚偏氟乙烯（PVDF）、聚苯乙烯、苯乙烯-二乙烯苯共聚物、苯乙烯-无水马来酸共聚物、尼龙、聚乙烯醇、聚丙烯酰胺、聚丙烯腈、聚丙烯等合成有机高分子化合物、右旋糖苷衍生物、琼脂糖凝胶、纤维素等多糖类、玻璃、硅胶、硅等无机高分子化合物。以上这些也可以是插入氨基、氨基酰基、羧基、酰基、羟基、硝基等功能基后的物质。作为载体的形状，比如有酶标板（ELISA板）、磁盘等平板状、微珠等粒子状、试管、软管等管状、纤维状、膜状等，可根据测定方法适当选择。将SARS-NP抗体固定在载体上的方法可以使用物理吸附法、离子结合法、共价结合法和包埋法等众所周知的方法。

含有用于测定方法的抗体的试剂根据测定方法也可以是溶液。此时，该试剂可以在抗体之外组合其他众所周知的成份。即也可以组合给予抗原抗体反应所需的pH值的缓冲剂、促进抗原抗体反应的反应增强剂、抑制非特异反应的反应稳定剂和阻断剂、提高试剂保存性的防腐剂等。

用于测定方法的测定试样是可能含有SARS病毒的标本本身或用缓冲液等处理该标本所得物质，只要不影响测定反应，无特别限定。作为该标本如有：血液、血清、鼻涕、痰和咽喉擦拭液等体液。

下面就运用本发明测定方法的免疫层析法进行说明。

作为免疫层析法的典型案例是让待测物质、固定在载体的第一抗体和用标记物标记的第二抗体发生反应，在膜状载体上形成由待测物质、第一抗体和第二抗体构成的复合物，通过检测上述第二抗体的标记物来检测或定量此复合物的存在。这种免疫层析法又分为渗透式免疫层析法和侧流

(lateral flow) 式免疫层析法。渗透式免疫层析法是让含有待测物质的溶液垂直向固定有第一抗体的膜状载体渗透。而侧流免疫层析法则是使含有待测物质的溶液水平向固定有第一抗体的膜状载体扩散。

图1为侧流式用试验器具的示意图。图1的(a)为试验器具的平面图，(b)为试验器具的侧面图。如图1所示，侧流式用试验器具包括表面有粘接层的基材1以及在其上的加样层2、标记保存层3、层析用膜状载体4和吸收层5。标记保存层3接触加样层2配置，用于保存标记物标记的第二抗体。层析用膜状载体4接触标记保存层3配置，有一固定了第一抗体的判断器件6。吸收层5接触层析用膜状载体4配置。

本发明的某一实施方式，向图1的加样层2滴入测定试样后，由于毛细管现象，测定试样依次从加样层2向标记保存层3、层析用膜状载体4和吸收层5移动。当测定试样中混入待测物质时，该待测物质与标记保存层3中的第二抗体反应，形成复合物。这些复合物再被固定在层析用膜状载体4的判断器件6上的第一抗体捕获。于是，如图1所示，判断器件6出现第二抗体标记物的条带，目测即可检出待测物质。

层析用膜状载体4也可以在判断器件6的下游装配有对比层，以便确认滴入的测定试样通过了判断器件6。比如，当将生物素固定在此对比层上、用标记物标记与生物素结合的抗原并保存到标记保存层3时，标记保存层3中的抗原与测定试样一同在层析用膜状载体4上移动。抗原无法被判断器件6的第二抗体捕获，而被对比层的生物素捕获。这样，对比层就会出现抗原的标记物条带。对比层设置在比判断器件6靠下游方向，因此通过确认此条带就可确认试样已通过判断器件6。也可将抗原固定到

此对比层，用标记物标记生物素并保存到标记保存层3。固定在对比层的物质和保存在标记保存层3的物质也可以是抗生肌和生物素组合以外的其他物质。保存到标记保存层3的物质使用不与待测物质和固定在判断器件的二次抗体反应的物质。

试验器具如图2所示，也可以没有标记保存层。此时，可以预先将第二抗体与标本混合，制备测定试样，将此测定试样滴入试验器具的加样层2。

本发明可适用于包括上述试验器具在内的检测SARS病毒的免疫层析法用检测试剂盒。这种试剂盒比如可含有处理标本制备测定试样的前处理液、试验器具和含各种抗体等的试剂等。

下面就适用本发明测定方法的ELISA进行说明。

ELISA使用固定待测物质相对的抗体或抗原的ELISA板等酶标板。比如，当待测物质为抗原时，使用固定有待测物质相对的第一抗体的酶标板。首先，将测定试样加入酶标板，形成测定试样中的待测物质与上述固定的第一抗体的复合物。然后添加用酶等标记物标记的第二抗体，在酶标板上形成固定的第一抗体、待测物质和标记的第二抗体组成的复合物。最后利用上述复合物的第二抗体的标记物检测和定量待测物质。

作为标记上述第二抗体的标记物如有过氧化物酶、半乳糖苷酶和碱性磷酸酶等酶。

因此，本发明可以适用于上述含酶标板在内的检测SARS病毒的ELISA用检测试剂盒。这种试剂盒比如可包括冲洗酶标板的样池内部的清

洗液、标记第二抗体的酶的底物以及包括各种抗体等在内的试剂。作为上述清洗液如有一定盐浓度的缓冲液。

下面，就单克隆抗体的制作方法进行说明。单克隆抗体可以用Koehlar & Milstein法（Koehlar & Milstein, Nature 256,495~497,1975年）产生。即，可以融合用抗原免疫的动物脾脏细胞和骨髓瘤细胞，从所得融合细胞（以后称杂交瘤）选择对抗原产生特异性抗体的细胞，大量培养或在动物腹腔内增殖此杂交瘤，从该培养液或腹水中分离出单克隆抗体。在以下[I]~[V]中就获得对SARS-NP的单克隆抗体的方法进行说明。

[I]抗原；用于制作对SARS-NP的单克隆抗体的抗原可以由含有SARS病毒的试样中提炼获得。作为含有SARS病毒的试样比如可以对从SARS患者采集的血液和SARS病毒进行人工培养获得培养液等。抗原也可以通过基因工程技术获得。

[II]免疫步骤；将提纯SARS-NP或经基因工程技术获得重组SARS-NP和其部分肽溶解或悬浊于磷酸缓冲液等适当缓冲液中，将该溶液或悬浊液作为抗原液使用。抗原液一般调制为抗原浓度50~500 μ g/ml即可。肽抗原等仅一个抗原性过低时，可以与白朊和钥孔戚血蓝素(Keyholelimpet hemo cyanin, KLH)等适当校准蛋白质桥连使用。

用抗原免疫的动物（以后称被免疫动物）如有小鼠、大鼠、仓鼠、马、羊、兔等哺乳类动物。最好是啮齿类动物，其中尤以小鼠为佳。

免疫可以通过向被免疫动物皮下、皮内、腹腔或静脉等注射抗原液进行。此时，为提高被免疫动物对抗原的应答性，也可将抗原液与辅药混合注射。所谓辅药（Adjuvant）其本身没有抗原的作用，但与抗原一起注射，

可以增强被免疫动物的免疫反应。作为可用的辅药如有弗氏完全佐剂（FCA）、弗氏不完全佐剂（FIA）、Ribi（MPL）、Ribi（TDM）、百日咳疫苗（*Bordetella pertussis* vaccine）、胞壁酰二肽(MDP)、白矾（ALUM）及其组合。

最好在初次对被免疫动物注射抗原液时用FCA，追加注射时使用FIA和Ribi辅药的组合。

下面就免疫方法具体举例说明。比如，当以小鼠为被免疫动物时，在小鼠腹腔内、皮下、肌肉或尾部静脉注射混合了辅药的抗原液0.05~1ml（抗原含量10~200 μ g），从此次的第一次注射起每间隔约4~21天追加注射一次，约1~4周后进行最后一次注射。关于最后一次注射，最好使用不含辅药的抗原液。最后一次注射约3~5天后，从被免疫动物获取脾细胞。在此所得脾细胞为抗体生产细胞。

[III]细胞融合步骤；在此步骤中，使取自被免疫动物的脾细胞和骨髓瘤细胞融合，制作杂交瘤。作为骨髓瘤细胞可以使用来自小鼠、大鼠和人的细胞，比如有小鼠骨髓瘤P3X63-Ag8、P3X63-Ag8-U1、P3NS1-Ag4、SP2/o-Ag14、P3X63-Ag8-653等骨髓瘤细胞株。骨髓瘤细胞有的产生免疫球蛋白轻链，将此用于细胞融合，可能会出现脾细胞产生的免疫球蛋白重链与此轻链无序结合的情况。因此，最好使用不产生免疫球蛋白轻链的骨髓瘤细胞、比如P3X63-Ag8-653和SP2/o-Ag14等。脾细胞和骨髓瘤细胞最好为来源于同种动物、特别是同系动物。骨髓瘤细胞的保存方法按众所周知的技术即可，比如关于添加了兔或牛胎儿血清的普通培养基进行繁殖培养的细胞用冷冻保存。细胞融合最好使用对数生长期的细胞。

融合脾细胞和骨髓瘤细胞制作杂交瘤的方法如有使用聚乙二醇的方法、使用仙台病毒(sendai virus)的方法和使用电融合仪的方法等。比如，当使用PEG法时，以1~10比1最好是5~10比1的混合比率将脾细胞和骨髓瘤细胞悬浊于约含30~60%PEG（平均分子量1000~6000）的适当培养基或缓冲液中，在温度约25~37℃、pH值6~8的条件下，让其反应约30秒~3分钟即可。反应结束后，冲洗细胞，除去PEG溶液再悬浊于培养基，在酶标板中播种，继续培养。

[IV]杂交瘤的选择：融合操作后的细胞在选择培养基培养，进行杂交瘤的选择。选择培养基是一种使母细胞株死亡、仅让杂交瘤生长的培养基，一般使用系次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶脱氧核苷（HAT）培养基。杂交瘤的选择一般在融合操作1~7天之后，将培养基的一部分、最好是约一半与选择培养基交换，再每二、三天重复同样的培养基交换进行培养。通过显微镜观察确认杂交瘤群生育的样池。

要想知道生育的杂交瘤是否产生所希望的抗体，只要收集培养上清液，用公认的方法测定抗体价即可。比如在固定在载体上的抗原蛋白中加入阶段性稀释的该上清液进行反应，再使被荧光物质、酶或放射性同位素（RI）等标记的二次抗体（抗球蛋白抗体、抗IgG抗体、抗IgM抗体等）发生反应，即可检测出在该上清液中产生的抗体，可以测定抗体价。当抗原是酶时，可在该酶与该上清液反应后，让适当底物发生反应，根据有无酶抑制活性检测出抗体并测定抗体价。这样，筛选各样池中的培养上清，获得产生所需抗体的杂交瘤。

再通过有限稀释法、软琼脂法和使用荧光激活细胞分类仪的方法等分离单克隆抗体。比如当使用有限稀释法时，在培养基阶段性稀释杂交瘤群体，使之形成每样池1个细胞左右进行培养，即可克隆化分离出分泌目标抗体的杂交瘤。所得分泌抗体的克隆杂交瘤在约10% (v/v) 二甲基亚砜(DMSO)或丙三醇等冷冻保护剂的存在下冷冻，在-70~-196℃下保存，可以保存约半年到半永久性保存。细胞使用时，在37℃前后的恒温槽中快速融化使用。最好充分冲洗后使用，以免冷冻保护剂的细胞毒性残留。

要想知道杂交瘤分泌的抗体的免疫球蛋白亚类，可以在普通条件下培养该杂交瘤，用市场出售的抗体类型·亚类判断用试剂盒等分析分泌在上述培养上清中的抗体，即可知道。

[V]单克隆抗体的制备；从杂交瘤获取单克隆抗体的方法可根据单克隆抗体的需要量和杂交瘤的性状等适当选择。比如有从接种了该杂交瘤细胞的小鼠腹腔内的腹水获取的方法、通过细胞培养从培养上清获取的方法等。只要是可在小鼠腹腔内增殖的杂交瘤，即可从腹水中获得数mg/ml的高浓度单克隆抗体。不能在in vivo增殖的杂交瘤从培养细胞的培养上清中获取单克隆抗体。由培养细胞获取单克隆抗体其抗体产量比in vivo低，但具有小鼠腹腔内所含免疫球蛋白和其他杂物混入少、易于提纯的优点。

当从接种了杂交瘤的小鼠腹腔内腹水获取单克隆抗体时，比如取BALB/c小鼠，预先注射朴日斯烷（2，6，10，14-四甲基十五烷）等有免疫抑制作用的物质，再向该小鼠腹腔内接种杂交瘤细胞（约 10^6 个以上），约1~3周后抽取腹水。当为异种杂交瘤（比如小鼠和大鼠）时，最好使用裸鼠、放射线处理鼠。

另一方面，当从细胞培养上清液获取单克隆抗体时，比如，除用于维持细胞的静置培养法外，还可以使用高密度培养法或旋转生物反应器培养方法等培养法培养该杂交瘤，提取含有单克隆抗体的培养上清液。可添加到培养基的血清含有其他抗体和白朊等杂物，往往从培养液中提取单克隆抗体非常烦琐，因此，最好减少向培养基的添加。更理想的做法是用常法在无血清培养基上驯养杂交瘤，用无血清培养基培养。用无血清培养基培养易于提纯单克隆抗体。

从腹水和培养上清液提炼单克隆抗体可用众所周知的方法进行。比如运用一直作为免疫球蛋白的提纯法为人所知的加入硫酸铵和硫酸钠进行盐析的区分法、聚乙二醇区分法、乙醇区分法、纤维素离子交换层析法及凝胶过滤法等，可以轻易地提炼单克隆抗体。另外，当单克隆抗体是小鼠IgG时，使用蛋白A结合载体或抗小鼠免疫球蛋白结合载体的亲和标记层析法可以提取，且很方便。

实施例

以下就本发明的实施例进行说明。

实施例1：对SARS-NP的单克隆抗体的产生

本例的单克隆抗体经过以下[I]~[V]步骤产生。具体而言，[I]运用基因工程技术制备含重组SARS-NP的抗原液，[II]用此抗原液免疫小鼠，[III]融合从免疫的小鼠获得的脾细胞和骨髓瘤细胞，[IV]从所得杂交瘤细胞中选择产生对SARS-NP有特异性的抗体的细胞，[V]在小鼠腹腔内增殖该杂交瘤，从其腹水中分离单克隆抗体。详细如下。

[I]抗原液的制备

首先，用基因分析用软件BioEdit version7.0.0(BioEdit公司)，将SARS TOR2株的核衣壳蛋白cDNA碱序列（在美国基因数据库（accession Number;AY274119,protein id;AAP41047.1)公开）中在大肠杆菌内使用频率低的密码子转换为使用频率高的密码子。（以后称此序列为SARS-NP cDNA (E.coli)。）合成此SARS-NP cDNA (E.coli)（全长1269dp）中相当于5'端起第1到第660的cDNA片断和相当于第600到第1269的cDNA片断，将合成物用限制酶连结起来，合成全长1269 dp的SARS-NP cDNA。利用此合成SARS-NP cDNA序列，制备二种重组SARS-NP（GST融合型、His-tag附加型）。以下详述。

（1）含碱序列1~660的cDNA片断的载体的制备

利用PCR法和TA克隆法制备含SARS-NP cDNA序列的第1到660的cDNA片断的载体。首先合成八种引物（序列号3~10），用这些引物进行PCR（第一PCR）。第一PCR的反应条件为95℃30秒、56.1℃30秒、72℃30秒循环16次。第一PCR的反应液成份如下：

（第一PCR反应液）

含10 μ M引物（序列号3）的引物溶液 0.5 μ L

含10 μ M引物（序列号4）的引物溶液 0.5 μ L

含10 μ M引物（序列号5）的引物溶液 0.5 μ L

含10 μ M引物（序列号6）的引物溶液 0.5 μ L

含10 μ M引物（序列号7）的引物溶液 0.5 μ L

含10 μ M引物（序列号8）的引物溶液 0.5 μ L

含10 μ M引物（序列号9）的引物溶液 0.5 μ L

含10 μ M引物（序列号10）的引物溶液 0.5 μ L
2.5mM dNTP溶液（takara-bio株式会社）1.6 μ L
1.5U/ μ L Ex-Taq（takara-bio株式会社）0.1 μ L
10 \times Ex-Taq缓冲液（takara-bio株式会社）2 μ L
消毒蒸馏水 12.3 μ L

第一PCR一结束，用其反应液进行第二PCR。第二PCR的反应条件为95 $^{\circ}$ C30秒、58.5 $^{\circ}$ C30秒、72 $^{\circ}$ C30秒循环30次。第二PCR的反应液成份如下：

（第二PCR反应液）

第一PCR结束后的反应液 1 μ L
含10 μ M引物（序列号11）的引物溶液 0.5 μ L
含10 μ M引物（序列号12）的引物溶液 0.5 μ L
2.5mM dNTP溶液（takara-bio株式会社）1.6 μ L
1.5U/ μ L Ex-Taq（takara-bio株式会社）0.1 μ L
10 \times Ex-Taq缓冲液（takara-bio株式会社）2 μ L
消毒蒸馏水 14.3 μ L

用第二PCR结束后的反应液4 μ L进行TA克隆，制备含碱序列1~660 cDNA片断的载体。TA克隆使用了TOPO TA克隆试剂盒（Invitrogen公司）。以此获得含碱序列1~660 cDNA片断的载体pCR TOPO（1~660）。

（2）含碱序列600~1269cDNA片断的载体的制备

用与上述（1）同样的方法制备含SARS-NP cDNA序列从第600到第1269 cDNA片断的载体。合成八种引物（序列号13~20），用这些引物进行PCR（第一PCR）。第一PCR的反应条件为95 $^{\circ}$ C30秒、55.1 $^{\circ}$ C30秒、72 $^{\circ}$ C30

秒循环16次。第一PCR的反应液成份使用含序列号13~20的引物的引物液，其他成份与上述（1）相同。继第一PCR之后也用与上述（1）相同的方法进行第二PCR和TA克隆，最终得到含碱序列600~1269 cDNA片断的载体pCR TOPO（600~1269）。

（3）含全长SARS-NP cDNA序列的载体的制备

用pCR TOPO（1~660）和pCR TOPO（600~1269）制备含全长SARS-NP cDNA序列的载体。首先，用限制酶SmaI和HindIII处理pCR TOPO（1~660），从pCR TOPO（1~660）制备含载体位点和碱序列1~660的cDNA片断。同样，用限制酶SmaI和HindIII处理pCR TOPO（600~1269），从pCR TOPO（600~1269）制备含载体位点和碱序列600~1269的cDNA片断。然后，用含载体位点和碱序列1~660的cDNA片断、含碱序列600~1269的cDNA片断和DNA Ligation Kit Ver2.1（takara-bio株式会社）获取含全长1269dp的SARS-NP cDNA序列的载体pCR TOPO（1~1269）。pCR TOPO（1~1269）所含SARS-NP cDNA碱序列表示为序列号1。比较此碱序列和SARS-NP cDNA（E.coli）碱序列，虽然第675个碱序列从G置换到A、第1107个碱序列从C置换到A，但这些碱序列编码的氨基酸与TOR2 SARS-NP cDNA（E.coli）相同。由序列号1记述的SARS-NP cDNA碱序列预测的氨基酸序列表示为序列号2。

（4）GST融合型重组SARS-NP的制备

用限制酶EcoRI和BamHI对GST融合型大肠杆菌重组蛋白表达载体pGEX-2TK（Amersham Bioscience）进行处理，经碱性磷酸酶处理制备4.9kb p的载体片断。同样，用限制酶EcoRI和BamHI对含全长1269dp的SARS-NP

cDNA的pCR TOPO (1~1269) 进行处理, 制备含全长1269dpSARS-NP cDNA的DNA片断。再用4.9kbp的载体片断、含SARS-NP cDNA的DNA片断和DNA Ligation Kit Ver2.1 (takara-bio株式会社) 制作含全长1269dp的SARS-NP cDNA的大肠杆菌表达载体pGEX-2TK (SARS-NP)。

接下来, 在LB培养基培养含大肠杆菌表达载体pGEX-2TK (SARS-NP) 的大肠杆菌。培养开始后, 在达到对数生长期的大肠杆菌培养液中添加最终浓度1mM IPTG, 室温培养18小时。培养后回收大肠杆菌体, 悬浊于PBS (1%TritonX)。用超声波粉碎机破碎悬浊液中的大肠杆菌后, 用100mM Tris缓冲液 (150 mMNaCl、pH8.0) 冲洗沉淀区分, 溶解到100mM Tris缓冲液 (8M尿素、150 mM KCl、pH8.0) 中。以此为GST融合型重组SARS-NP抗原液。

(5) His-tag附加型重组SARS-NP的制备

用限制酶EcoRI和BamHI对载体pCDNA3.1 (Invitrogen公司) 进行处理, 经碱性磷酸酶处理制备5.0kbp的载体片断。同样, 用限制酶EcoRI和BamHI对上述 (4) 获得的大肠杆菌表达载体pGEX-2TK (SARS-NP) 进行处理, 制备含全长1269dpSARS-NP cDNA的DNA片断。再用5.0kbp的载体片断、含SARS-NP cDNA的DNA片断和DNA Ligation Kit Ver2.1 (takara-bio株式会社) 制作含全长1269dp的SARS-NP cDNA的pCDNA3.1 (SARS-NP)。

接下来, 用限制酶BamHI和XhoI对pCDNA3.1 (SARS-NP) 进行处理, 制备含全长1269dpSARS-NP cDNA的DNA片断。同样, 用限制酶BamHI和XhoI对大肠杆菌表达载体pQE30 (Qiagen) 进行处理, 制备3.4kbp的载

体片断。再用3.4kbp的载体片断、含SARS-NP cDNA的DNA片断和DNA Ligation Kit Ver2.1 (takara-bio株式会社) 制作含全长1269dp的SARS-NP cDNA的大肠杆菌表达载体pQE30 (SARS-NP)。

然后, 在含有100 μ g/mL氨比西林的LB培养基培养含大肠杆菌表达载体pQE30 (SARS-NP) 的大肠杆菌。培养开始后, 在达到对数生长期的大肠杆菌培养液中添加最终浓度1mM IPTG, 室温培养3.5小时。培养后回收大肠杆菌体, 悬浊于20mM磷酸钠缓冲液 (0.5M NaCl、1mM DTT、1mg/mL Pefablock (蛋白酶抑制剂)、20 mM咪唑 pH7.4) 30mL中, 在冰上进行超声波处理 (2分 \times 7次), 回收离心分离后所得可溶性区分, 用His-T rapHP柱 (QIAGEN公司) 提纯His-tag附加型重组SARS-NP。以含有此His-tag附加型重组SARS-NP的20mM磷酸钠缓冲液 (pH7.4) 为His-tag附加型重组SARS-NP抗原液。

[II]免疫步骤

作为被免疫动物使用了Balb/c小鼠 (8周龄母)。用上述[I] (4) 获得的GST融合型重组SARS-NP抗原液和上述[I] (5) 获得的His-tag附加型重组SARS-NP抗原液按下列时间表对Balb/c小鼠进行免疫。

(1) 将与FCA混合的GST融合型重组SARS-NP抗原液 (GST融合型重组SARS-NP的最终浓度为50 μ g) 接种到小鼠腹腔。

(2) 二周后, 将与RIBI混合的GST融合型重组SARS-NP抗原液 (GST融合型重组SARS-NP的最终浓度为50 μ g) 接种到小鼠腹腔。

(3) 三周后, 再将与RIBI混合的GST融合型重组SARS-NP抗原液 (GST融合型重组SARS-NP的最终浓度为50 μ g) 接种到小鼠腹腔。

(4) 三周后, 将与RIBI混合的His-tag附加型重组SARS-NP抗原液(His-tag附加型重组SARS-NP的最终浓度为50 μ g) 接种到小鼠腹腔。

(5) 三周后, 将与RIBI混合的His-tag附加型重组SARS-NP抗原液(His-tag附加型重组SARS-NP的最终浓度为50 μ g) 接种到小鼠腹腔。

(6) 三周后, 尾部静脉注射His-tag附加型重组SARS-NP抗原液(His-tag附加型重组SARS-NP的最终浓度为50 μ g)。

[III]细胞融合步骤

在此步骤, 使从被免疫动物获得的脾细胞和骨髓瘤细胞融合, 制备杂交瘤。脾细胞是从[II] (6) 的免疫化处理三天后的Balb/c小鼠身上摘取的。骨髓瘤细胞使用的是从来源于Balb/c小鼠骨髓瘤培养的细胞株(X63细胞株) 获得的X63细胞。细胞融合即让细胞在含有约50%聚乙二醇4000(希格玛公司) 的RPMI-1640培养液中悬浊并反应, 悬浊到上述脾细胞和上述X63细胞的混合比达到7.5: 1。然后, 在HT培养基(加入10%非动物胎牛血清的RPMI-1640培养液中含有0.1mM 次黄嘌呤和0.016mM 胸腺嘧啶脱氧核苷)和克隆培养基(三光纯药) 之比为1: 1的培养液中悬浊脾细胞, 使每1ml达到250万个, 向96孔酶标板(Corning Inc.) 的各样池中播种、培养。

[IV]杂交瘤的选择

融合处理后的细胞在选择培养基培养, 进行杂交瘤的选择。融合处理的第二天, 在播种细胞的96孔酶标板的各样池中添加HAT培养基培养。细胞融合四天后、六天后和八天后分别加HT培养基培养, 确认生育有杂交瘤群的样池。

(1) 对SARS-NP的反应性进行确认

运用用固定有重组SARS-NP的酶标板的ELISA法检测杂交瘤产生的单克隆抗体对SARS-NP的反应性。在此，首先在ELISA板上固定His-tag附加型重组SARS-NP。在此板添加杂交瘤培养液上清，使其反应。之后添加过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体，加过氧化物酶底物溶液，使之显色，测定其吸光度。以此获得30个能产生对His-tag附加型重组SARS-NP反应性强烈的单克隆抗体的杂交瘤（杂交瘤No.1~30）。

（2）单克隆抗体表位的研究

如图3所示将SARS-NP的氨基酸序列分成A区（1-141）、B区（142-282）和C区（282-422）三个区域，调查各单克隆抗体的表位在哪个区域。

在此，使用了二种重组蛋白。各种重组蛋白的制备首先是以上述[1]（4）中所得大肠杆菌表达载体pGEX-2TK（SARS-NP）为模型，分别合成编码SARS-NP氨基酸序列（第1~422的氨基酸序列）中N端第1个~第282个氨基酸序列区域的cDNA片断和编码第142个~第422个氨基酸序列区域的cDNA片断。利用合成的cDNA片断获得相当于SARS-NP氨基酸序列中第1个~第282个氨基酸序列区域的重组蛋白（SARS-NP N端蛋白）和相当于第142个~第422个氨基酸序列区域的重组蛋白（SARS-NP C端蛋白）。以下详细叙述获得重组蛋白的方法。

（含编码第1个~第282个氨基酸序列区域的cDNA片断的载体的制备）

用大肠杆菌表达载体pGEX-2TK（SARS-NP）和序列号11及序列号21的引物进行PCR。PCR的反应条件为95℃30秒、58.5℃30秒、72℃30秒循环30次。PCR的反应液成份如下：

10μg/mL的大肠杆菌表达载体pGEX-2TK（SARS-NP） 1μL

含10 μ M引物（序列号11）的引物溶液 0.5 μ L
含10 μ M引物（序列号21）的引物溶液 0.5 μ L
2.5mM dNTP溶液（takara-bio株式会社）1.6 μ L
1.5U/ μ L Ex-Taq（takara-bio株式会社）0.1 μ L
10 \times Ex-Taq缓冲液（takara-bio株式会社）2 μ L
消毒蒸馏水 14.3 μ L

用PCR结束后的反应液4 μ L进行TA克隆，制备含相当于全长1269bpSARS-NP cDNA序列的第1个到第846个的cDNA片断的载体。TA克隆使用了TOPO TA克隆试剂盒（Invitrogen公司）。以此获得含有相当于碱序列1~846的cDNA片断的载体pCR N（1~846）。

（含编码第142个~第422个氨基酸序列区域的cDNA片断的载体的制备）

用大肠杆菌表达载体pGEX-2TK（SARS-NP）和序列号22及序列号23的引物进行PCR。PCR的反应条件与制备含编码第1个~第282个氨基酸序列区域的cDNA片断的载体时一样。以此获得含有相当于SARS-NPcDNA序列第427到第1269的cDNA片断的载体pCR C（427~1269）。

（SARS-NP N端蛋白的制备）

用限制酶BamHI处理上述pCR N（1~846），制备5.0kbp的cDNA片断。同样，用限制酶BamHI和XhoI对大肠杆菌表达载体pQE30（Qiagen公司）进行处理，制备3.4kbp的载体片断。再用3.4kbp的载体片断、上述5.0kbp的cDNA片断和DNA Ligation Kit Ver2.1（takara-bio株式会社）制作含相当于碱序列1~846的cDNA片断的大肠杆菌表达载体pQE30 N（1~846）。

接着，导入含大肠杆菌表达载体pQE30 N（1~846）的大肠杆菌，在含有100 μ g/mL氨比西林的LB培养基培养。培养开始后，在达到对数生长期时在大肠杆菌培养液中添加最终浓度1mM IPTG，培养3.5小时。培养后回收大肠杆菌，悬浊于20mM磷酸钠缓冲液（0.5M NaCl、1mM DTT、1 mg/mL Pefablock（蛋白酶抑制剂）、20 mM咪唑 pH7.4）30mL中，在冰上进行超声波处理（2分 \times 7次），回收离心分离后所得可溶性区分，用His-TrapHP柱（QIAGEN）提取SARS-NP N端蛋白。

（SARS-NP C端蛋白的制备）

用上述PCR C（427~1269）以与上述制备His-tag附加型重组SARS-NP N端蛋白同样的方法，提取SARS-NP C端蛋白。

将所得各种蛋白（SARS-NP N端蛋白和SARS-NP C端蛋白）分别固定于ELISA板上。在各个板添加上述杂交瘤（No.1~30）的培养液上清，反应后添加过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体，加过氧化物酶底物溶液，使之显色，测定其吸光度。由此得知，只对SARS-NP N端蛋白显示反应性的杂交瘤产生在图3的A区有表位的单克隆抗体，只对SARS-NP C端蛋白显示反应性的杂交瘤产生在图3的C区有表位的单克隆抗体，对两种蛋白均显示反应性的杂交瘤则产生在图3的B区有表位的单克隆抗体。

以上（1）和（2）的结果（吸光度）归纳如表1。

[表1]

杂交瘤	有表位的区域	反应性		
		His-tag 附加型重组 SARS-NP	SARS-NP N 端蛋白	SARS-NP C 端蛋白
No.1	A	3.955	3.955	0.138
No.2		3.267	3.529	0.011

No.3		3.252	3.614	0.036
No.4		3.431	3.460	0.012
No.5		3.308	3.957	0.015
No.6		3.522	3.619	0.015
No.7		2.979	3.667	0.021
No.8		2.663	3.492	0.049
No.9		2.004	3.619	0.011
No.10		3.543	3.737	0.012
No.11		2.687	3.436	0.011
No.12	B	3.554	3.679	1.988
No.13		2.955	3.151	2.444
No.14	C	1.914	0.014	2.617
No.15		2.073	0.080	3.096
No.16		3.628	0.121	3.639
No.17		2.906	0.053	3.512
No.18		3.448	0.051	3.550
No.19		3.318	0.031	3.537
No.20		3.314	0.031	3.541
No.21		3.438	0.048	4.009
No.22		2.849	0.062	3.422
No.23		3.401	0.083	3.415
No.24		2.452	0.042	3.367
No.25		3.380	0.061	3.662
No.26		3.169	0.037	3.573
No.27		3.365	0.061	3.582
No.28		3.045	0.028	3.438
No.29		3.557	0.077	3.511
No.30		2.460	0.032	4.002

[V] 单克隆抗体的制备

提纯上述表1的杂交瘤中杂交瘤No.1、2、3、12、13、14、15、16及17产生的各单克隆抗体。提纯首先是将杂交瘤移植到BALB/c小鼠的腹腔内，10天后收集积蓄的腹水。从收集的腹水中用作为蛋白A柱的HyperD(Perseptive Biosystems)提纯单克隆抗体。通过以上操作，获得9种单克隆抗体（单克隆抗体No.1、2、3、12、13、14、15、16及17）。

实施例2：在免疫层析法的应用

用实施例1获得的9种单克隆抗体（单克隆抗体No.1、2、3、12、13、14、15、16及17）实施免疫层析法。

（免疫层析法用试验器具的制作）

在本例中，使用了图2所示形状的试验器具。本例的试验器具的基材1使用了有粘接面的垫片，吸收层5使用了瓦特曼纸WF1.5，层析用载体4使用了硝化纤维素膜。层析用载体4有固定了上述9种中的某一种单克隆抗体的判断器件6。在本例中，将试验器具的加样层浸入从标本制备的测定试样，凭借毛细管现象使试样液向判断器件扩散。

（抗体感作胶乳液）

将上述9种中的某一种单克隆抗体固定到兰色苯乙烯树脂胶乳粒子（平均粒径为0.3 μm ），将此兰色苯乙烯树脂胶乳粒子悬浊于10mM磷酸缓冲液（pH8.0），浓度达到0.2%（w/v），以此作为抗体感作胶乳液使用。

（标本的制备）

使用POCTEM（SYSMEX株式会社）标本用缓冲液调制[I]（5）获得的His-tag附加型重组SARS-NP，使浓度达到18.2ng/ml，以此为阳性标本。使用不含His-tag附加型重组SARS-NP的标本用缓冲液作为阴性标本。

（测定方法）

将标本20 μl 、POCTEM（SYSMEX株式会社）提取液25 μl 和抗体感作胶乳液30 μl 混合，制备测定试样。将试验器具放入装有此测定试样的软管，使加样层2浸入测定试样，室温下静置20分钟后，观察层析用载体4的判断器件6上出现的兰色条带。

测定结果见表2。各条带根据兰色的显色程度，分成“—”、“W”“1+”、“2+”和“3+”五个阶段判断。表中的“No.”表示所用的单克隆抗体的编号，A、B、C表示各抗体表位所在的区域。关于非特异性反应，作为阴性标本测定了不含His-tag附加型重组SARS-NP的标本用缓冲液，在所有情况下确认有无非特异性反应。表中的▲表示有非特异性反应。

[表2]

层析用载体 显色胶乳粒子	A			B		C				
	No.1	No.2	No.3	No.12	No.13	No.14	No.15	No.16	No.17	
A	No.1	-	-	-	-	3+	2+	1+	2+	
	No.2	-	-	-	▲1+	3+	2+	1+	2+	
	No.3	-	-	-	-	3+	1+	1+	1+	
B	No.12	-	-	-	-	3+	2+	1+	2+	
	No.13	2+	2+	1+	▲3+	3+	2+	1+	1+	
C	No.14	2+	2+	1+	3+	-	-	-	-	
	No.15	1+	1+	1+	2+	-	-	-	-	
	No.16	2+	2+	1+	3+	-	1+	-	-	
	No.17	W	W	1+	1+	-	-	-	-	-

另外，“—”、“W”“1+”、“2+”和“3+”根据用TRS3000MembraneStrip Reader(BioDot公司)测定出现的条带时所得的测定值，按表3所记录的标准设定。表中的ROD值指从条带测定值减去测定硝化纤维素膜浓淡所得的值作为背景的值。顺便说明一下，用肉眼可以确认兰色条带的是“W”“1+”、“2+”和“3+”。

[表3]

	ROD值
—	0.000~0.006
W	0.007~0.014
1+	0.015~0.029
2+	0.030~0.079
3+	0.080以上

从表2可以看出，关于固定在免疫层析法中的层析载体上的抗体和用显色胶乳标记的抗体的组合，以判断达到“1+”的抗体组合为宜，判断达到“2+”的抗体组合更好，最好是判断达到“3+”的抗体组合。产生本例中显示出高灵敏度测定结果的三个抗体（单克隆抗体No.2、No.12和No.14）的杂交瘤（杂交瘤No.2、No.12和No.14）已于2005年2月15日寄存到独立行政法人产业技术综合研究所专利微生物托管中心（茨城县筑波市东1-1-1 中央第6）。各杂交瘤的保藏号如下：

杂交瘤No.2的保藏号：FERM ABP-10678

杂交瘤No.12的保藏号：FERM ABP-10679

杂交瘤No.14的保藏号：FERM ABP-10680

在此，以表位在A区的单克隆抗体为A组抗体，以表位在B区的单克隆抗体为B组抗体，以表位在C区的单克隆抗体为C组抗体。从表2得知，作为固定在层析载体上的抗体或显色胶乳标记的抗体使用C组抗体可获得高灵敏度的测定结果。

可以看出，作为固定在层析载体上的抗体和用显色胶乳标记的抗体组合，A组抗体和C组抗体组合或B组抗体和C组抗体组合可获得较高灵敏度的测定结果。

可以看出，固定在层析载体上的抗体，使用A组抗体或C组抗体可获得较高灵敏度的测定结果。还可以看出，当固定在层析载体上的抗体为A组抗体时，组合C组抗体作为用显色胶乳标记的抗体可获得较高灵敏度的测定结果。而当固定在层析载体上的抗体为C组抗体时，组合A组抗体或B组抗体作为用显色胶乳标记的抗体可获得较高灵敏度的测定结果。当使用属于B组抗体的单克隆抗体No.12作为固定在层析载体上的抗体时，组合C组抗体作为用显色胶乳标记的抗体可获得较高灵敏度的测定结果。

上述抗体的理想组合不限于免疫层析法，也可适用于其他免疫学测定方法。

实施例3：在ELISA的应用

用实施例1获得的单克隆抗体No.1和No.14实施ELISA法。在此，单克隆抗体No.14固定在ELISA板上，单克隆抗体No.1用碱性磷酸酶标记。用10mM磷酸缓冲液(pH7.0)，调制[I](5)获得的His-tag附加型重组SARS-NP，使浓度达到0、0.195、0.39、0.78、1.56、3.12ng/ml，以此作为试样。

作为测定方法，首先在固定有单克隆抗体No.12的ELISA板添加试样100 μ l，室温搅拌30分钟。用10mM磷酸缓冲液（pH7.0）冲洗酶标板后，添加实施例1中获得的His-tag附加型重组SARS-NP抗原液（20ng/ml）100 μ l，室温搅拌30分钟。用磷酸缓冲液冲洗酶标板后，添加含有5U/mL碱性磷酸酶标记单克隆抗体No.1的10mM磷酸缓冲液（pH7.0）100 μ l，室温搅拌30分钟。冲洗酶标板后，加过氧化物酶底物溶液100 μ l显色，测定其吸光度。

作为比较例，使用市场销售产品：SARS-核壳体活性（Nucleocapsid Active）ELIZA(IMGENEX公司)中使用的二种抗体，用同样的方法实施了ELISA法。

结果如图4所示。图中的纵轴为吸光度（OD405/OD655），横轴为标本所含His-tag附加型重组SARS-NP浓度（ng/mL）。实线为使用单克隆抗体No.1和No.14时的结果，虚线为使用市场销售的抗体时的结果。

在图4中，当使用单克隆抗体No.1和No.14时，显示出非常高的信号强度。以此可以判断，在ELISA法中，使用单克隆抗体No.1和No.14可以非常灵敏地进行测定。

用在实施例3中使用的抗体（单克隆抗体No.1和No.14）和试样（His-tag附加型重组SARS-NP浓度：0、0.195、0.39、0.78、1.56、3.12ng/ml）实施了免疫层析法。其结果见表4。免疫层析法用实施例2同样的方法进行。在此，将单克隆抗体No.14固定在层析载体上，将单克隆抗体No.1用显色胶乳标记。

[表4]

标本中的SARS-NP浓度 (ng/ml)	判断
0	—
0.195	W
0.39	1+
0.78	1+
1.56	2+
3.12	2+

在表4中，当标本中的SARS-NP浓度为0.195 (ng/ml) 时，判断结果为“W”。由此可以知道，在免疫层析法中，使用单克隆抗体No.1和No.14时，标本中的SARS-NP浓度至少为0.195(ng/ml)以上，才可以检测出SARS-NP。

实施例4：在ELISA法中抗体组合的探讨

用实施例1中获得的单克隆抗体No.1、3、8、12、14、15、16和23实施ELISA法。将其分别固定到ELISA板上，用生物素分别进行标记，探讨在何种组合下可用ELISA法灵敏地检测。

分别用0.1M磷酸缓冲液 (pH7.5、0.1%叠氮化钠) 稀释上述单克隆抗体至浓度为1 μ g/ml。将此抗体液100 μ l加入ELISA板的样池，4 $^{\circ}$ C下静置一晚。用酶标板清洗机，用缓冲液II (10mM磷酸钠、150mM NaCl、0.05%Tween20) 冲洗酶标板。将缓冲液I (10mM磷酸钠 pH7.0、2.5mM EDTA、1%BSA、150mM NaCl) 300 μ l加入样池，4 $^{\circ}$ C下静置一晚。在如此获得的固定有抗体的酶标板上加入用缓冲液I稀释的实施例1获得的His-tag附加型重组SARS-NP抗原液 (20ng/ml) 100 μ l，室温搅拌30分钟。用缓冲液II冲洗样池，加入用缓冲液I稀释的0.5 μ g/ml的各生物素标记单克

隆抗体，室温搅拌30分钟。用缓冲液II冲洗样池，加入用缓冲液I稀释的过氧化物酶标记链亲和素（20mU/ml）100 μ l，室温搅拌30分钟。用缓冲液II冲洗样池，加入过氧化物酶底物溶液100 μ l，室温搅拌2.5分钟后，加入2N硫酸100 μ l。测定酶标板的吸光度（OD492/OD690）。测定按每一种试样在二个样池进行，求其平均值。再从上述平均值减去用不含抗原的上述抗原液（即SARS-NP0ng/ml的上述抗原液）测得的空白测定值，得差为结果。

结果如图5所示，图中的纵轴为吸光度（OD492/OD690），横轴为固定在酶标板上的标本。

从图5可以看出，关于在ELISA法中固定于ELISA板的抗体与生物素标记的抗体组合，以判断器件上显示吸光度（OD492/OD690）为1.000以上的抗体组合为宜，1.200以上的抗体组合更好，最好是1.450以上的抗体组合。产生在本例中显示出高灵敏度测定结果的四个抗体（单克隆抗体No.1、No.12、No.14、No.15）中的单克隆抗体No.1和No.15的杂交瘤（杂交瘤No.1和No.15）已于2006年9月26日寄存到独立行政法人产业技术综合研究所专利微生物托管中心（茨城县筑波市东1-1-1 中央第6）。各杂交瘤的保藏号如下：

杂交瘤No.1的保藏号：FERM ABP-10687

杂交瘤No.15的保藏号：FERM ABP-10686

在此，以表位在A区的单克隆抗体为A组抗体，以表位在B区的单克隆抗体为B组抗体，以表位在C区的单克隆抗体为C组抗体。从图5得知，作为固定于ELISA板上的抗体或生物素标记的抗体使用C组抗体可获得较高灵敏度的测定结果。

可以看出，作为固定于ELISA板的抗体和用生物素标记的抗体组合，A组抗体和C组抗体组合或B组抗体和C组抗体组合可获得较高灵敏度的测定结果。

还可以看出，当固定在ELISA板上的抗体为A组抗体时，组合C组抗体作为用生物素标记的抗体可获得较高灵敏度的测定结果。而当固定在ELISA板上的抗体为B组抗体时，组合C组抗体作为用生物素标记的抗体可获得较高灵敏度的测定结果。当使用属于C组抗体的单克隆抗体No.14作为固定在ELISA板上的抗体时，组合A组抗体作为用生物素标记的抗体可获得较高灵敏度的测定结果。

实施例5：用ELISA法测定各种浓度的抗原

根据上述结果，按下列表5所示组合，用单克隆抗体与实施例4同样进行ELISA。His-tag附加型重组SARS-NP抗原用缓冲液I稀释到0~3.125 $\mu\text{g/ml}$ 。生物素标记的抗体浓度为1 $\mu\text{g/ml}$ 。与过氧化物酶底物溶液反应时间设定为10分钟。

测定以每一种试样四个样池进行，平均所得值作为结果。结果如图6所示。

[表5]

实施例	酶标板固定抗体	生物素标记抗体
5-1	No.14	No.1
5-2	No.12	No.15
5-3	No.12	No.14

从图6得知，吸光度与标本中的SARS-NP浓度成正比增加。因此，运用组合本例抗体的ELISA法可以测定SARS的浓度。

此申请与2005年10月11日申请的日本国专利申请专利申请第2005-296542号有关，该专利申请的保护范围、说明书、附图及概要全部作为参考纳入本说明书中。

- <110> 希森美康株式会社
 <120> 测定SARS病毒核衣壳蛋白的测定方法、测定用试剂盒、试验器具、SARS病毒核衣壳蛋白单克隆抗体及其产生上述单克隆抗体的杂交瘤
- <150> JP 2005-296542
 <151> 2005-10-11
- <160> 23
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
 <211> 1269
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 基于TOR2 SARS-NP cDNA合成DNA
- <400> 1
 atgagcgata acggcccgca gagcaaccag cgtagcgcgc cgcgtattac ctttggcggc 60
 ccgaccgata gcaccgataa caaccagaac ggcggccgta acggcgcgcg tccgaaacag 120
 cgtcgtccgc agggcctgcc gaacaacacc gcgagctggt ttaccgcgct gaccagcat 180
 ggcaaagaag aactgcgttt tccgcgtggc cagggcgtgc cgattaacac caacagcggc 240
 ccggatgata agattggeta ttatcgtcgt gcgacccgtc gtgtgcgtgg cggcgtggc 300
 aaaatgaaag aactgagccc gcgttggat ttttattatc tgggcaccgg cccggaagcg 360
 agcctgccgt atggcgcgaa caaagaagcg attgtgtggg tggcgcaccg aggcgcgctg 420
 aacaccccca aagatcatat tggcaccctg aacccgaaca acaacgcggc gaccgtgctg 480
 cagctgccgc agggcaccac cctgccgaaa ggcttttatg cggaaggcag ccgtggcggc 540
 agccaggcga gcagccgtag cagcagccgt agccgtggca acagccgtaa cagcaccctg 600
 ggcagcagcc gtggcaacag cccggcgcgt atggcgagcg gcggcggcga aaccgcgctg 660
 gcgctgctgc tgctagatcg tctgaaccag ctggaaagca aagtgagcgg caaaggccag 720
 cagcagcagg gccagaccgt gaccaaaaa agcgcggcgg aagcgagcaa aaaaccgcgt 780
 cagaaacgta ccgcgaccaa acagtataac gtgacccagg cgtttggccg tcgtggcccc 840
 gaacagacc agggcaactt tggcgatcag gatctgattc gtcagggcac cgattataaa 900
 cattggccc agattgcgca gtttgcgccc agcgcgagcg cgttttttgg catgagccgt 960
 attggcatgg aagtgacccc gagcggcacc tggctgacct atcatggcgc gattaaactg 1020
 gatgataaag atccgcagtt taaagataac gtgattctgc tgaacaaaca tattgatgcg 1080
 tataaacct ttccgccgac cgaacaaaa aaagataaaa aaaaaaaaaac cgatgaagcg 1140
 cagccgctgc cgcagcgtca gaaaaaacag ccgaccgtga ccctgctgcc ggcggcggat 1200
 atggatgatt ttagccgtca gctgcagaac agcatgagcg gcgcgagcgc ggatagcacc 1260
 caggcgtaa 1269
- <210> 2
 <211> 422
 <212> PRT
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 源自重组SARS-NP cDNA的氨基酸序列

<400> 2

Met Ser Asp Asn Gly Pro Gln Ser Asn Gln Arg Ser Ala Pro Arg Ile
1 5 10 15

Thr Phe Gly Gly Pro Thr Asp Ser Thr Asp Asn Asn Gln Asn Gly Gly
20 25 30

Arg Asn Gly Ala Arg Pro Lys Gln Arg Arg Pro Gln Gly Leu Pro Asn
35 40 45

Asn Thr Ala Ser Trp Phe Thr Ala Leu Thr Gln His Gly Lys Glu Glu
50 55 60

Leu Arg Phe Pro Arg Gly Gln Gly Val Pro Ile Asn Thr Asn Ser Gly
65 70 75 80

Pro Asp Asp Gln Ile Gly Tyr Tyr Arg Arg Ala Thr Arg Arg Val Arg
85 90 95

Gly Gly Asp Gly Lys Met Lys Glu Leu Ser Pro Arg Trp Tyr Phe Tyr
100 105 110

Tyr Leu Gly Thr Gly Pro Glu Ala Ser Leu Pro Tyr Gly Ala Asn Lys
115 120 125

Glu Gly Ile Val Trp Val Ala Thr Glu Gly Ala Leu Asn Thr Pro Lys
130 135 140

Asp His Ile Gly Thr Arg Asn Pro Asn Asn Ala Ala Thr Val Leu
145 150 155 160

Gln Leu Pro Gln Gly Thr Thr Leu Pro Lys Gly Phe Tyr Ala Glu Gly
165 170 175

Ser Arg Gly Gly Ser Gln Ala Ser Ser Arg Ser Ser Ser Arg Ser Arg
180 185 190

Gly Asn Ser Arg Asn Ser Thr Pro Gly Ser Ser Arg Gly Asn Ser Pro
195 200 205

Ala Arg Met Ala Ser Gly Gly Gly Glu Thr Ala Leu Ala Leu Leu Leu
210 215 220

Leu Asp Arg Leu Asn Gln Leu Glu Ser Lys Val Ser Gly Lys Gly Gln
225 230 235 240

Gln Gln Gln Gly Gln Thr Val Thr Lys Lys Ser Ala Ala Glu Ala Ser
245 250 255

Lys Lys Pro Arg Gln Lys Arg Thr Ala Thr Lys Gln Tyr Asn Val Thr
260 265 270

Gln Ala Phe Gly Arg Arg Gly Pro Glu Gln Thr Gln Gly Asn Phe Gly
275 280 285

Asp Gln Asp Leu Ile Arg Gln Gly Thr Asp Tyr Lys His Trp Pro Gln

290	295	300	
Ile Ala Gln Phe Ala	Pro Ser Ala Ser Ala	Phe Phe Gly Met Ser Arg	
305	310	315	320
Ile Gly Met Glu Val	Thr Pro Ser Gly Thr	Trp Leu Thr Tyr His Gly	
	325	330	335
Ala Ile Lys Leu Asp	Asp Lys Asp Pro Gln Phe Lys Asp	Asn Val Ile	
	340	345	350
Leu Leu Asn Lys His	Ile Asp Ala Tyr Lys Thr Phe	Pro Pro Thr Glu	
	355	360	365
Pro Lys Lys Asp Lys	Lys Lys Thr Asp Glu Ala Gln Pro Leu Pro		
	370	375	380
Gln Arg Gln Lys Lys	Gln Pro Thr Val Thr Leu Leu Pro Ala Ala Asp		
385	390	395	400
Met Asp Asp Phe Ser	Arg Gln Leu Gln Asn Ser Met Ser Gly Ala Ser		
	405	410	415
Ala Asp Ser Thr Gln	Ala		
	420		
<210> 3			
<211> 98			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 基于TOR2 SARS-NP cDNA设计的DNA			
<400> 3			
atgagcgata acggcccgca gagcaaccag cgtagcgcgc cgcggtattac ctttggcggc			60
ccgaccgata gcaccgataa caaccagaac ggcggccg			98
<210> 4			
<211> 100			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 基于TOR2 SARS-NP cDNA设计的DNA			
<400> 4			
gtttaccgcg ctgaccaccg atggcaaaga agaactgcgt tttccgcgtg gccagggcgt			60
gccgattaac accaacagcg gcccgatga tcagattggc			100
<210> 5			
<211> 101			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 基于TOR2 SARS-NP cDNA设计的DNA			
<400> 5			
cgcgttggtat tttttattat ctgggcaccg gcccggaagc gagcctgccg tatggcgcga			60
acaaagaagg cattgtgtgg gtggcgaccg aaggcgcgct g			101

<210> 6	
<211> 99	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 基于TOR2 SARS-NP cDNA设计的DNA	
<400> 6	
cagctgccgc agggcaccac cctgccgaaa ggcttttatg cggaaggcag ccgtggcggc	60
agccaggcga gcagccgtag cagcagccgt agccgtggc	99
<210> 7	
<211> 103	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 基于TOR2 SARS-NP cDNA设计的DNA	
<400> 7	
gctgggtcag cgcggtaaac cagctcggg tgttgttcgg caggccctgc ggacgacgct	60
gtttcggacg cgcgccgta cggccgccgt tctggttgtt atc	103
<210> 8	
<211> 102	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 基于TOR2 SARS-NP cDNA设计的DNA	
<400> 8	
gataataaaa ataccaacgc gggctcagtt ctttcatttt gccatcgccg ccacgcacac	60
gacgggtcgc acgacgataa tagccaatct gatcatccgg gc	102
<210> 9	
<211> 101	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 基于TOR2 SARS-NP cDNA设计的DNA	
<400> 9	
gtggtgccct gcggcagctg cagcacggtc gcccggttgt tgttcgggtt acgggtgcca	60
atatgatctt tcggggtgtt cagcgcgcct tcggtcgcca c	101
<210> 10	
<211> 101	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 基于TOR2 SARS-NP cDNA设计的DNA	
<400> 10	
cagcgcggtt tcgccgccgc cgtcgcctat acgcgccggg ctgttgccac ggctgctgcc	60
cggggtgctg ttacggctgt tgccacggct acggctgctg c	101
<210> 11	
<211> 29	
<212> DNA	

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 基于TOR2 SARS-NP cDNA设计的DNA	
<400> 11	
cccggatcca tgagcgataa cggcccgcga	29
<210> 12	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 基于TOR2 SARS-NP cDNA设计的DNA	
<400> 12	
cccacagccg taacagcacc ccg	23
<210> 13	
<211> 104	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 基于TOR2 SARS-NP cDNA设计的DNA	
<400> 13	
acagccgtaa cagcaccocg ggcagcagcc gtggcaacag cccggcgcgt atggcgagcg	60
gcggcggcga aaccgcgctg gcgctgctgc tgctggatcg tctg	104
<210> 14	
<211> 106	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 基于TOR2 SARS-NP cDNA设计的DNA	
<400> 14	
aaagcgcggc ggaagcgagc aaaaaaccgc gtcagaaaacg taccgcgacc aaacagtata	60
acgtgacceca ggcgtttggc cgtcgtggcc cggaacagac ccaggg	106
<210> 15	
<211> 103	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 基于TOR2 SARS-NP cDNA设计的DNA	
<400> 15	
gcgcagtttg cgccgagcgc gagecgcgttt ttggcatga gccgtattgg catggaagtg	60
accccagcgc gcacctggct gacctatcat ggcgcgatta aac	103
<210> 16	
<211> 100	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 基于TOR2 SARS-NP cDNA设计的DNA	
<400> 16	
acctttccgc cgaccgaacc gaaaaaagat aaaaaaaaaa aaaccgatga agcgcagccc	60
ctgccgcagc gtcagaaaaa acagccgacc gtgacctgc	100

<210> 17	
<211> 104	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 基于TOR2 SARS-NP cDNA设计的DNA	
<400> 17	
gctcgccttc gccgcgttt ttttggtcac ggtctggccc tgctgctgct ggcctttgcc	60
gctcactttg cttccagct ggttcagacg atctagcagc agca	104
<210> 18	
<211> 102	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 基于TOR2 SARS-NP cDNA设计的DNA	
<400> 18	
cgcgctcggc gcaaactgcg caatctgcgg ccaatgttta taatcgggtc cctgacgaat	60
cagatcctga tcgccaagt tgccctgggt ctgttccggg cc	102
<210> 19	
<211> 108	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 基于TOR2 SARS-NP cDNA设计的DNA	
<400> 19	
ggttcggctg gcggaaggt tttatacgca tcaatatgtt tgttcagcag aatcacgta	60
tctttaaact gcggatcttt atcatccagt ttaatcgcgc catgatag	108
<210> 20	
<211> 102	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 基于TOR2 SARS-NP cDNA设计的DNA	
<400> 20	
ttacgccttg gtgctatccg cgctcgcgcc gctcatgctg ttctgcagct gacggctaaa	60
atcatccata tccgccgccc gcagcagggt cacggtcggc tg	102
<210> 21	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 基于TOR2 SARS-NP cDNA设计的DNA	
<400> 21	
ggatccctgt tcctgttccg ggccacgacg gc	32
<210> 22	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>		
<223>	基于TOR2 SARS-NP cDNA设计的DNA	
<400>	22	
	ggatccacc cgaagatca tattgg	26
<210>	23	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	基于TOR2 SARS-NP cDNA设计的DNA	
<400>	23	
	cccttacgcc tgggtgctat ccg	23

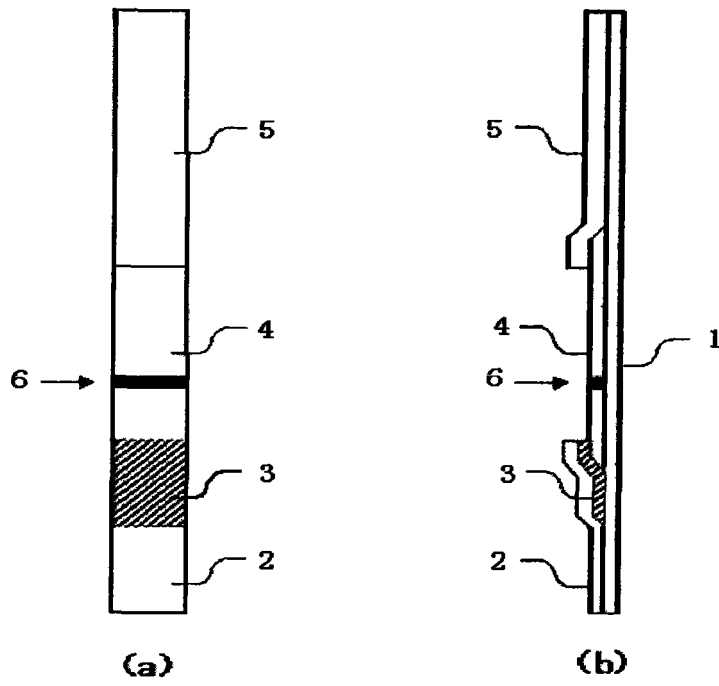


图 1

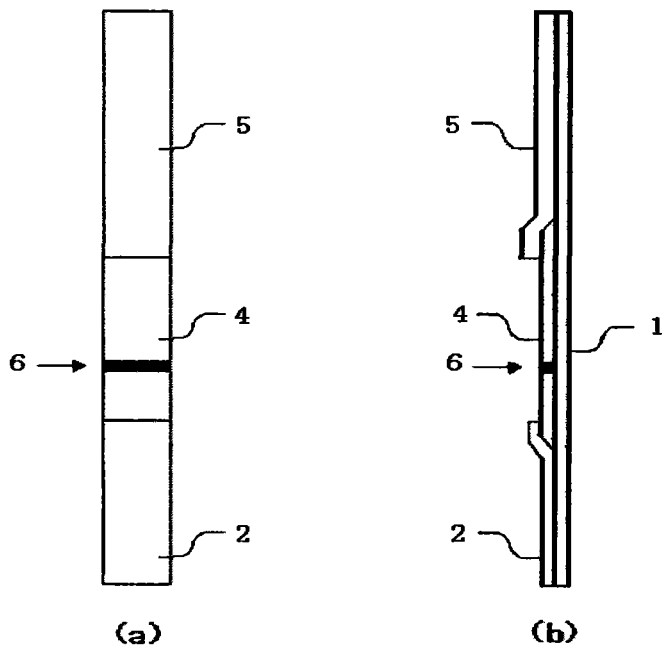


图 2

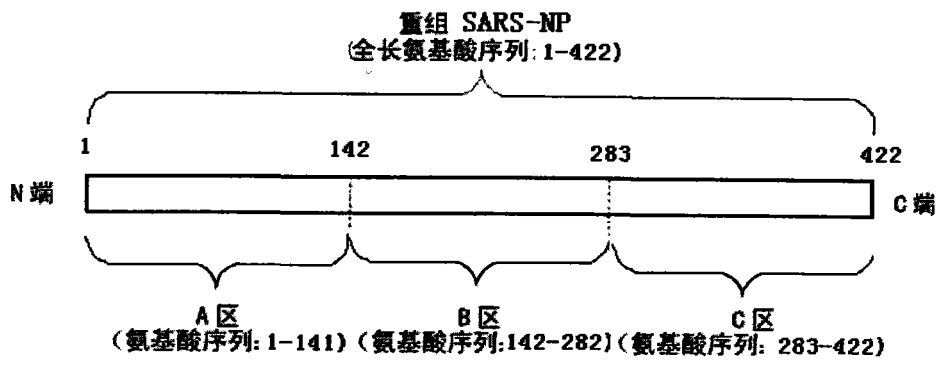


图 3

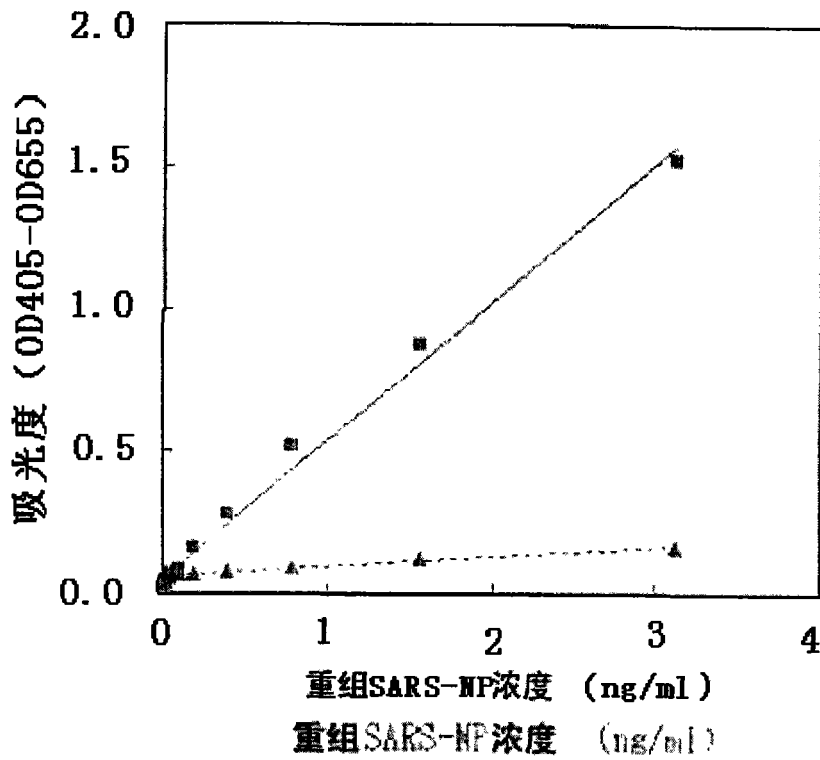
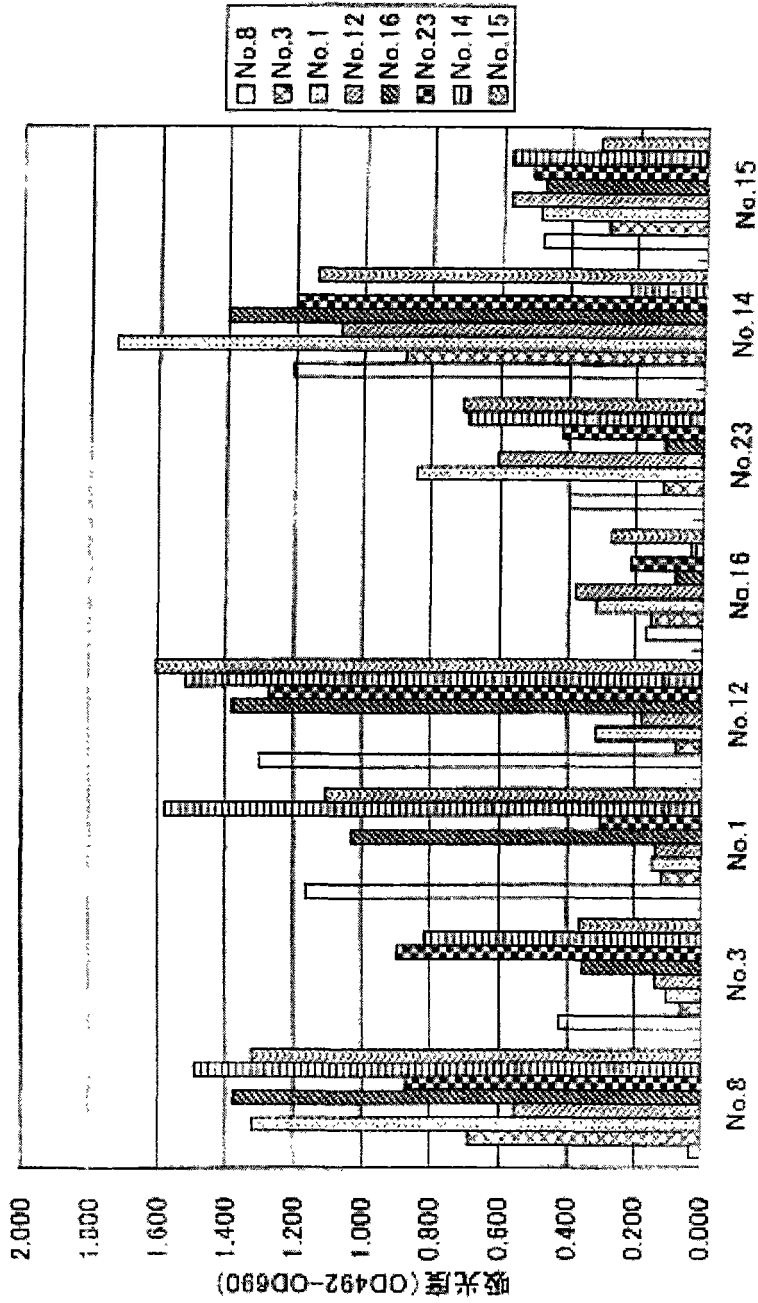


图 4



固定于酶标板的抗体

图 5

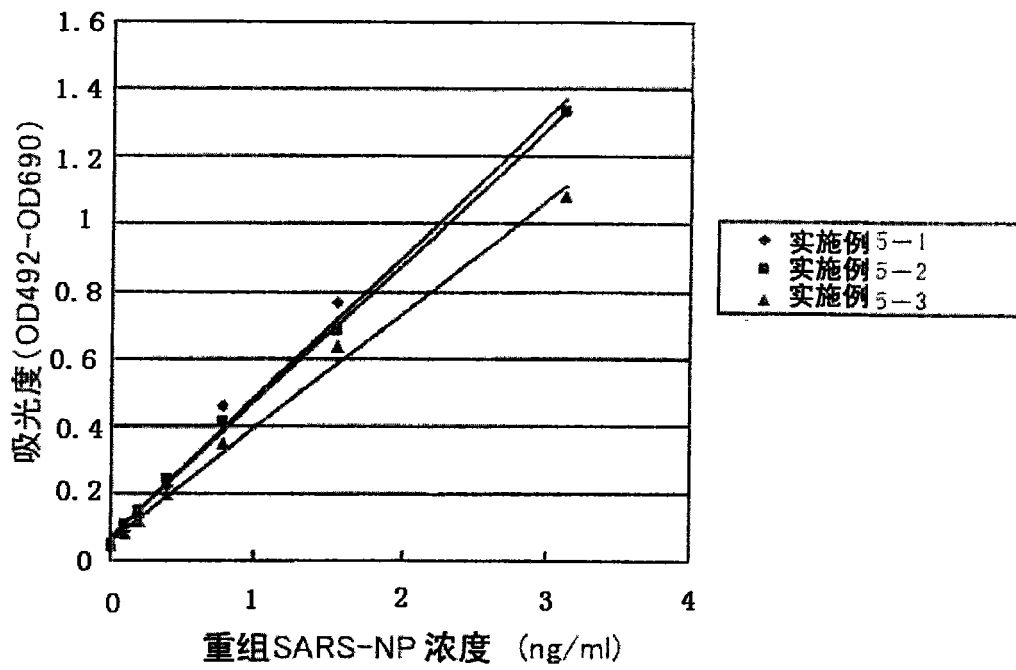


图 6

专利名称(译)	测定SARS病毒核衣壳蛋白的测定方法、测定用试剂盒、试验器具、SARS病毒核衣壳蛋白单克隆抗体及其产生上述单克隆抗体的杂交瘤		
公开(公告)号	CN101283093A	公开(公告)日	2008-10-08
申请号	CN200680037843.2	申请日	2006-10-11
[标]申请(专利权)人(译)	希森美康株式会社		
申请(专利权)人(译)	希森美康株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	希森美康株式会社		
[标]发明人	藤本幸太郎 梶田忠宏 武田和彦 冈本尚		
发明人	藤本幸太郎 梶田忠宏 武田和彦 冈本尚		
IPC分类号	C12N15/00 C07K16/08 C12N5/10 C12N15/02 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/545 G01N33/569 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/56983 C07K14/005 C07K16/10 C12N2770/20022		
代理人(译)	梁朝玉		
优先权	2005296542 2005-10-11 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种用与SARS病毒核衣壳蛋白(SARS - NP)特异性结合的第一抗体和与SARS - NP特异性结合的第二抗体测定SARS - NP的方法，上述第一抗体或上述第二抗体是能识别位于SARS - NP氨基酸序列的N端从第283 ~ 第422个氨基酸的区域(C区)的表位的抗体。

