

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C07K 14/20

C07K 16/12 G01N 33/571



# [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 00808942.6

[45] 授权公告日 2005 年 1 月 19 日

[11] 授权公告号 CN 1185255C

[22] 申请日 2000.6.14 [21] 申请号 00808942.6

[30] 优先权

[32] 1999.6.14 [33] US [31] 60/138,981

[86] 国际申请 PCT/US2000/016425 2000.6.14

[87] 国际公布 WO2000/077486 英 2000.12.21

[85] 进入国家阶段日期 2001.12.14

[71] 专利权人 美国政府健康及人类服务部, 疾病  
控制和预防中心

地址 美国佐治亚州

[72] 发明人 刘 曦 布雷特·斯坦纳  
伯塔·罗兹

审查员 周 航

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责  
任公司

代理人 王维玉 丁业平

权利要求书 5 页 说明书 44 页 附图 13 页

[54] 发明名称 检测梅毒密螺旋体的组合物和方法

[57] 摘要

本发明提供特异性和高灵敏性检测梅毒密螺旋体感染的方法, 包括使用只有梅毒密螺旋体才有的特异性抗原蛋白和肽。特别是, 本发明提供了基于识别酸性重复蛋白的检测试验。本发明的方法在感染早期阶段检测初期梅毒是特别有用的。此外, 本发明的方法和组合物涉及鉴别检测具体密螺旋体属感染, 能够鉴定针对具体密螺旋体属病状的病原体: 梅毒-梅毒密螺旋体苍白密螺旋体亚种、雅司病-梅毒密螺旋体极细密螺旋体亚种和非性病性梅毒-梅毒密螺旋体地方性密螺旋体亚种。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种检测生物样品中存在梅毒密螺旋体或抗-梅毒密螺旋体抗体的方法，所述的方法包括：

5 将梅毒螺旋体的酸性重复蛋白或其经分离的免疫原性肽与生物样品接触，并且

检测免疫原性蛋白或肽和生物样品中的抗体之间的复合体的形成，其中存在复合体说明存在梅毒密螺旋体或抗梅毒密螺旋体抗体。

10 2. 权利要求 1 的方法，其中经分离的免疫原性梅毒密螺旋体肽含有一种所述酸性重复蛋白的免疫原性的重复区域。

3. 权利要求 2 的方法，其中所述酸性重复蛋白的免疫重复区域具有下列氨基酸序列：  
15 EVEDX<sub>1</sub>PX<sub>2</sub>VVEPASX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>EGGEREVEDX<sub>1</sub>PX<sub>2</sub>VVEPASX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>EGGER，  
其中 X<sub>1</sub> 为 A 或 V；X<sub>2</sub> 为 K 或 G；X<sub>3</sub> 为 E 或 G；以及 X<sub>4</sub> 为 R 或 H。

4. 权利要求 1 的方法，其中免疫原性肽含有选自 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4 和 SEQ ID NO: 6-18 的氨基酸序列及其保守变异体。

20 5. 权利要求 1 的方法，其中免疫原性肽是通过示于 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 5 的核苷酸序列编码的。

6. 权利要求 1 的方法，其中免疫原性肽含有具有示于 SEQ ID NO: 25 15 的序列的氨基酸序列。

7. 权利要求 1 的方法，其中梅毒密螺旋体是梅毒密螺旋体苍白密螺旋体亚种、梅毒密螺旋体极细密螺旋体亚种或梅毒密螺旋体地方性密螺旋体亚种。  
30

8. 权利要求 1 的方法，其中检测存在有复合体说明存在有梅毒、雅司病或非性病性梅毒的疾病。

5 9. 权利要求 1 的方法，其中免疫原性肽含有示于 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列或其保守变异体，其中存在有复合体说明存在有梅毒。

10 10. 权利要求 1 的方法，其中免疫原性肽含有示于 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列或其保守变异体，并且其中存在有复合体说明存在有雅司病。

11. 权利要求 1 的方法，其中免疫原性肽含有示于 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列或其保守变异体，并且其中存在有复合体说明存在有非性病性梅毒。

15 12. 权利要求 1 的方法，其中肽被结合到固相上。

13. 权利要求 1 的方法，其中肽是标记了的。

20 14. 权利要求 13 的方法，其中标记包括电化学发光标记、化学发光标记、酶标记、生物发光标记或荧光标记。

25 15. 权利要求 1 的方法，还包括将肽-抗体复合体与特异于肽的二级抗体温育，其中将二级抗体用可检测的标记来标记并且结合到肽-抗体复合体上。

16. 权利要求 1 的方法，其中生物样品包括伤口、血液、组织、唾液、精液、阴道分泌物、眼泪、尿、骨、肌肉、软骨、脑脊液、皮肤或任何人的组织或体液。

30 17. 一种检测生物样品中存在梅毒密螺旋体的方法，该方法包

括：

将针对梅毒密螺旋体的酸性重复蛋白或其免疫原性肽的抗体与生物样品接触，并且

5 检测生物样品中的梅毒密螺旋体的酸性重复蛋白或其免疫原性肽和抗体之间的复合体的形成，其中存在复合体说明存在梅毒密螺旋体。

18. 权利要求 17 的方法，其中所述免疫原性肽包含所述酸性重复蛋白的免疫原性重复区域。

10

19. 一种经分离的梅毒密螺旋体酸性重复蛋白或其免疫原性肽，其中梅毒密螺旋体是梅毒密螺旋体极细密螺旋体亚种或梅毒密螺旋体地方性密螺旋体亚种。

15

20. 权利要求 19 的免疫原性肽，其中所述免疫原性肽包含所述酸性重复蛋白的免疫原性重复区域。

20

21. 权利要求 19 的免疫原性肽，其中所述免疫原性肽包含示于 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4 和 SEQ ID NO: 6-18 的氨基酸序列或其保守变异体。

22. 一种特异于梅毒密螺旋体酸性重复蛋白或酸性重复蛋白的免疫原性肽的抗体。

25

23. 权利要求 22 的抗体，其中免疫原性肽含有示于 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4 和 SEQ ID NO: 6-18 的氨基酸序列或其保守变异体。

24. 权利要求 22 的抗体，其中免疫原性肽是通过示于 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 5 的核苷酸序列编码的。

30

25. 权利要求 22 的抗体，其中抗体是单克隆抗体。

26. 权利要求 22 的抗体，其中所述免疫原性肽包含所述酸性重复蛋白的免疫原性重复区域。

5

27. 一种免疫原性组合物，含有可药用的载体和足以诱导对哺乳动物中梅毒密螺旋体的保护性免疫应答量的经分离的梅毒密螺旋体酸性重复蛋白或酸性重复蛋白的免疫原性肽。

10

28. 权利要求 27 的组合物，其中梅毒密螺旋体是梅毒密螺旋体苍白密螺旋体亚种、梅毒密螺旋体极细密螺旋体亚种或梅毒密螺旋体地方性密螺旋体亚种。

15

29. 权利要求 27 的组合物，其中对患有梅毒、雅司病或非性病性梅毒的疾病的患者给用所述组合物。

30. 权利要求 27 的组合物，其中免疫原性肽被与载体蛋白质偶联。

20

31. 权利要求 27 的免疫原性组合物，其中所述哺乳动物是人。

32. 权利要求 27 的免疫原性组合物，其中所述免疫原性肽包含示于 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4 和 SEQ ID NO: 6-18 的氨基酸序列或其保守变异体。

25

33. 一种用权利要求 1 的方法检测生物样品中的梅毒密螺旋体的试剂盒，包括酸性重复蛋白或酸性重复蛋白的一种或多种经分离的免疫原性梅毒密螺旋体肽。

30

34. 一种用权利要求 17 的方法检测生物样品中的梅毒密螺旋体

的试剂盒，包括特异于酸性重复蛋白的免疫原性梅毒密螺旋体肽的抗体。

## 检测梅毒密螺旋体的组合物和方法

5            本发明制作于疾病控制和预防中心(Centers for Disease Control and Prevention)。因此，美国政府拥有本发明的确定权利。

### 发明领域

10           本发明涉及微生物学和免疫学领域，具体说，涉及用于诊断因梅毒密螺旋体引起的疾病如梅毒的组合物和方法。特别是，本发明涉及检测只有梅毒密螺旋体才有的特异性抗原蛋白和肽。

### 发明背景

15           梅毒密螺旋体(*T. pallidum*)是微需氧的螺旋体，可引起梅毒，其为具有多种临床表象的全身性病。其它紧密相关的密螺旋体可引起品他病(品他病密螺旋体(*Treponema carateum*))、雅司病(梅毒密螺旋体极细密螺旋体亚种(*Treponema pallidum subspecies pertenuae*))和非性病性梅毒(梅毒密螺旋体地方性密螺旋体亚种(*Treponema pallidum subspecies endemicum*))。

20

          在1996年，据美国疾病控制和预防中心报道，在美国有超过11,000例初期和二期梅毒病例。感染初期会引起被感染部位的溃疡；但细菌移动遍布整个身体，在一段时间内破坏很多器官。尽管早期用青霉素治疗可能会成功，但梅毒的早期症状是非常轻微的，并且很多人第一次被感染时没有及时寻求治疗。这种不及时治疗是有害的，因为晚期梅毒对器官的损害是无法逆转的。而且增加了可能传播和获得人类免疫缺损性病毒(HIV)的担心，HIV会通过梅毒引起的开放溃疡处而导致AIDS。

25

30           医学专家描述了梅毒疾病可以分成初期、二期、潜伏和三期(后

期)阶段。没有经过治疗的病人在头两个阶段期间可能会感染其他人，这两个阶段通常持续 1-2 年。细菌从病人的开始的溃疡处散布到生殖器区域的皮肤或粘膜、嘴或性伙伴的肛门。细菌还可以穿过身体其它部位上的破损皮肤。在其后期阶段，未治疗的梅毒尽管不具触染性，但可以引起严重的心脏异常、精神紊乱、失明、其它神经性问题、甚至死亡。

初期梅毒的第一个症状是溃疡，即所谓的下疳。下疳在暴露后 10 天至 3 个月内出现，但通常在 2-6 周内出现。下疳通常出现在与性伙伴溃疡处接触的身体部位，如阴茎、外阴或阴道。下疳还可以在颈、舌、唇或其它身体部位处发展。由于下疳可能是不痛的并且可能存在于身体内部，因此可能不会被注意到。无论病人是否医治，下疳都会在几周内消失，但如果感染未在初期阶段得到治疗，则约三分之二的患者都会发展成梅毒的慢性阶段。

二期梅毒的标志经常是皮疹，其特征是褐色疮，约美分大小。在下疳出现后 3-6 周，皮疹随处出现，尽管皮疹可能会覆盖全身，但手掌和脚掌是最通常出现的部位。由于这些疮中存在活性细菌，与感染人破损皮肤的任何身体接触，性交或非性交的，都会在此阶段传播感染。皮疹通常在几周或几个月内痊愈。还可能会出现其它症状，如轻微发热、疲劳、头痛、喉咙痛、斑秃和全身淋巴腺肿胀。这些肿胀可以是非常轻微的，并且类似初期梅毒的下疳，无需治疗便会消失。

二期梅毒的征兆可能会在随后的一至两年内反复。如果不医治，梅毒可能会发展成潜伏阶段，在此期间疾病不再是触染性的并且不存在症状。尽管很多没有医治的个体不会遭受疾病进一步后果的痛苦，但大约三分之一的二期梅毒患者会发展出后期或三期梅毒的并发症。

在梅毒的三期阶段，细菌损害心脏、眼睛、大脑、神经系统、骨骼、关节或身体的几乎任何部位。这个阶段可以持续数年，甚至数十

年。后期梅毒可以导致精神病、失明、其它神经性问题、心脏病、甚至死亡。

5 在感染的早期阶段，梅毒细菌还频繁侵袭神经系统，并且大约百分之三至七的未治疗梅毒病人发展出神经梅毒。然而，神经梅毒的发展可以持续最多 20 年并且一些神经梅毒病人从不发展出任何症状。表现症状的患者可能会经历头痛、斜颈和发热，这些都是由于大脑内层发炎引起的。神经梅毒病人也可能会受到中风诸如麻木、虚弱或视觉问题的发作和症状的折磨。尽管神经梅毒可以医治，但治疗可能更  
10 困难并且其过程在 HIV 感染的病人中是不同的。

梅毒对怀孕妇女的影响是特别引人注目的，因为其继续影响胎儿。可能是患有活性梅毒的未医治怀孕妇女的将感染传给她的胎儿。约 25%的这种妊娠会导致死产或新生儿死亡。40-70%的这种妊娠会  
15 出生被梅毒感染的婴儿。一些患先天梅毒的婴儿出生时便具有症状，但大部分发展出症状是在分娩后 2-3 周之间。这些症状可能包括皮疹、皮疹、发热、肝脾肿大、黄疸、贫血和各种畸形。在处理患先天梅毒的婴儿时必须要小心，因为湿疣是传染性的。婴儿的梅毒症状未能被发现的情况很少。随着感染婴儿长成儿童和少年，它们会发展出后期  
20 梅毒的症状，包括骨、牙、眼、耳和脑损害。

由于梅毒感染时常具有严重和生命威胁的结果，以及传递或感染 HIV 的危险，感染的特异性和早期诊断是必要的。然而，梅毒往往被称作"大模仿者"，因为它的早期症状与很多其它疾病相似。因此，  
25 医生通常不会依赖梅毒的征兆和症状识别，而是进行梅毒细菌的显微鉴定和血液检验。

为通过显微鉴定细菌来诊断梅毒，医师可以从溃疡处或下疳的表面刮取试样并且在特定的"暗视野"显微镜下检测生物来检查之。然而，  
30 暗视野显微镜检查需要相当的技巧并且容易错误判断。出于这些原

因，大部分梅毒病例是通过血清学诊断的。最常用来检测梅毒证据的血液检验是 VDRL (性病研究实验室(Venereal Disease Research Laboratory))检验和 RPR (快速血浆反应物) 检验。这些非密螺旋体检验使用天然的脂质、心磷脂和卵磷脂，来检测活性梅毒感染期间的非特异性抗原的抗体。

然而，关于非密螺旋体检验与密螺旋体检验相比的缺陷之一是它们缺乏特异性。由于使用非密螺旋体检验时存在假阳性和假阴性，通常需要进行一次以上的血液检验。在患自身免疫疾病、某些病毒感染和其它涉及实质性组织破坏或牵扯肝脏的疾病的个体中，假阳性的比率和多次血液检验的需要增加。虽然可以使用以密螺旋体为基础的检验如荧光密螺旋体抗体-吸附 (FTA-ABS)和梅毒密螺旋体血细胞凝集试验(TPHA)来确认阳性检验结果，但以密螺旋体为基础的检验比非密螺旋体检验更昂贵并且更难使用。密螺旋体检验还不可能用作对治疗后治愈的检验，因为在感染根除后它们仍然呈阳性。

目前使用的一些密螺旋体检验依靠检测锚定在梅毒密螺旋体细胞质膜中的蛋白质。检测这种蛋白质特别困难，因为梅毒密螺旋体膜的结构不寻常，其主要由脂质组成，脂质容易"屏蔽"这些蛋白质而使其不被检测到。这种屏蔽效果通常会延迟宿主的免疫应答，经常造成假阴性血清结果。

目前可利用的密螺旋体检验主要依靠检测抗细胞质膜锚定的脂蛋白的抗体。由于其外膜主要由脂质组成并且是贫含蛋白质的，使得脂蛋白和抗体缺乏表面接触，对这些蛋白质的应答一般受到延迟。由于这些脂蛋白是高抗原性的并且是造成密螺旋体检验中长期应答的原因，使得检验常常产生困惑的和不准确的结果。由于后一个性质，密螺旋体检验不能区别当前感染还是过去感染。

梅毒通常是通过注射给药用青霉素治疗。治疗对青霉素过敏的患

者使用其它抗生素。患者一般从开始治疗起 24 小时内便失去传播梅毒的能力。然而，一些感染的个体对通常剂量的青霉素不响应。因此，重要的是让接受梅毒治疗的患者通过定期血液检验接受监测以确保传染性物质完全被消灭。患神经梅毒的病人可能需要在治疗后的最多两年内再检验。

在梅毒的所有阶段中，正确的治疗可以使疾病治愈，但在后期梅毒中，身体器官早已受到的损害将无法逆转。筛选和治疗被感染的个体，或二次预防，是可利用的预防梅毒疾病高级阶段的少数选择之一。妊娠病人的早期检验和治疗是防止婴儿患梅毒的最好方式并且应当是孕期护理例行程序的一部分。成功治疗和预防梅毒的关键要点是早期进行并且要准确检测梅毒密螺旋体感染。

#### 与其它密螺旋体感染有关的疾病

品他病(由品他病密螺旋体引起)，变得非常罕见，并且局限于温暖干燥的热带美洲 (特别是，墨西哥、中美洲和哥伦比亚)。这种疾病以初期和二期损害的形式出现。初期损害可能持续数年，是在四肢、脸部、颈部、胸部或腹部出现聚结的瘙痒丘疹。二期损害是分散的小的、鳞状丘疹，称作品他疹。这些可能会变成皮肤变色 (即皮肤从正常颜色变色)。后期损害是无色的 (不含色素)。

非性病性梅毒，由梅毒密螺旋体地方性密螺旋体亚种引起，已知有许多地方名称，是一种非性病传播并且出现在儿童中的梅毒形式的疾病。其的传播可以通过直接接触，还可以经由污染源 (区别于所有的密螺旋体疾病)，例如共有喝水容器和食物用具。除初期损害外(可能是在口腔粘膜)，很少会被觉察，该病实际上与梅毒一样，具有梅毒瘤、梅毒湿疣和骨膜炎。

雅司病，由梅毒密螺旋体极细密螺旋体亚种引起，出现在暖湿的热带地区。雅司病的主要表现形式是损害。初期损害是乳头状瘤皮肤

5 损害，其在二期损害到来之前自动痊愈，二期损害是大的乳头状瘤小结，广泛分布在皮肤表面。该病后期阶段的特征是各种骨和鼻咽的梅毒瘤以及皮肤、淋巴结和骨的破坏性损害。在梅毒瘤上面的皮肤形成溃疡。此病存在于南美、中非和东南亚部分原始热带地区并且通过直接与被感染皮肤接触而传播。

10 尽管一些对密螺旋体感染的治疗是可获得的，但密螺旋体疾病的控制需要通过消除人与人的传播来维持。因此，密螺旋体感染的早期检测是减少相关疾病广泛散布的关键。

能够有效、准确地早期诊断梅毒密螺旋体感染的精确和改进的方法和组合物以及监测梅毒密螺旋体治疗的方法是需要的。

#### 发明概述

15 本发明提供用于检测密螺旋体感染的有效和灵敏的方法和组合物。特别是，本发明提供用于检测梅毒密螺旋体的方法和组合物。根据本方法，分析样品中特定基因如酸性重复蛋白(arp)基因的蛋白质产物的存在。具体说，本发明提供检测梅毒密螺旋体的方法，该方法基于检测被感染的个体中的某些确定的肽和/或分泌型酸性重复蛋白基因产物和抵抗这些蛋白质/肽的抗体。

20 此外，本发明提供一些方法，其中将样品与特异于梅毒密螺旋体抗原的抗体如免疫原性蛋白质在形成抗体-抗原复合体的条件下结合。更特别是，本发明提供一些方法，其中将样品与 arp 基因的蛋白质或肽结合。抗体的检测是为了指示患者中存在梅毒密螺旋体。所述生物样品包括伤口、血液、组织、唾液、精液、阴道分泌物、眼泪、尿、骨、肌肉、软骨、脑脊液（CSF）、皮肤或任何人的组织或体液。

25 在本发明的一个优选实施方案中，提供了一些试验，包括用于检测抗原序列的各种基因产物。

在本发明的另一个优选实施方案中，提供了用于专门检测 arp 基

因、酸性重复蛋白的方法。

5 在本发明的另一个实施方案中，提供了用于鉴别诊断密螺旋体感染的方法和组合物。特别是，提供了能够特异性鉴定梅毒密螺旋体苍白密螺旋体亚种 (*Treponema pallidum* subspecies *pallidum*)、梅毒密螺旋体极细密螺旋体亚种和梅毒密螺旋体地方性密螺旋体亚种的方法。

10 因此，本发明的一个目的是提供一种用于检测梅毒密螺旋体的灵敏试验。

本发明的另一个目的是提供一种能够检测含有梅毒密螺旋体抗原基因产物的蛋白质的试验。

15 本发明的又一个目的是提供用于早期检测初期梅毒的方法。

本发明的另一个目的是提供用于鉴别诊断梅毒、雅司病和非性病性梅毒的方法和组合物。

20 本发明的又一个目的是提供一种特异于梅毒密螺旋体的抗体。

本发明的再一个目的是提供一种用于自动使用点(point-of-use)分析以检测生物样品中梅毒密螺旋体的试剂盒。

25 本发明的另一个目的是提供一种不依赖于全部包含在传染性剂细胞质膜中的抗原蛋白的用于早期检测梅毒密螺旋体的方法。

30 本发明的又一个目的是提供一种用于治疗梅毒密螺旋体感染的方法，包括使用对梅毒密螺旋体的抗原基因产物产生的抗体。

本发明的再一个目的是提供一种用于检测梅毒密螺旋体的抗原基因产物的免疫测定。

本发明的另一个目的是提供一种用于检测酸性重复蛋白的方法。

5

本发明的又一个目的是提供一种使用酸性重复蛋白和/或得自其的肽来检测梅毒、雅司病或非性病性梅毒的免疫测定。

本发明的另一个目的是提供一种可以用于速流细胞计量术型诊断梅毒密螺旋体的固相颗粒。

10

本发明的又一个目的是提供一种可以用于凝集型试验以快速诊断梅毒密螺旋体感染的固相颗粒。

15

本发明的又一个目的是提供一种用于检测梅毒密螺旋体的方法，包括酶促扩增(ELISA)。

本发明的另一个目的是提供一种能够检测梅毒密螺旋体的抗体的试验。

20

本发明的又一个目的是提供一种用于自动使用点分析以检测生物样品中抗-梅毒密螺旋体抗体的试剂盒。

本发明的另一个目的是提供一种用于检测抗梅毒密螺旋体的抗体的免疫测定。

25

本发明的另一个目的是提供一种用于检测酸性重复蛋白的抗体的方法。

30

本发明的另一个目的是提供一种使用酸性重复蛋白和/或得自其

的肽用于检测受梅毒、雅司病或非性病性梅毒感染的病人体内的酸性重复蛋白抗体的免疫测定。

5 本发明的另一个目的是提供一种可以用于使用 arp 蛋白质或肽来速流细胞计量术型诊断梅毒密螺旋体感染的固相颗粒。

本发明的又一个目的是提供一种用于检测抗梅毒密螺旋体的抗体的方法，包括酶促扩增 (ELISA)。

10 在参阅了以下关于所公开实施方案的详细描述和所附的权利要求书之后，本发明的这些和其它目的、特点和优点将变得显而易见。

#### 附图简述

15 图 1 显示了蛋白质印迹凝胶，其中显示了梅毒兔子血清识别重组 arp 蛋白质的能力。

图 2 显示了酸性重复蛋白的结构，其中显示了潜在跨膜结构域、信号肽酶 I 切断位点的潜在位置、蛋白质的亲水性曲线和蛋白质的潜在抗原指数。

20 图 3 显示了从酸性重复蛋白不同区域分离的各种肽与梅毒病人血清之间的反应 (实心正方形表示 SEQ ID NO: 9, 空心圆表示 SEQ ID NO: 10, 实心圆表示 SEQ ID NO: 13 并且空心三角形表示 SEQ ID NO: 14)。

图 4 显示了 ELISA 检测人体中抗-arp 抗体的存在的结果。

图 5 提供了梅毒密螺旋体的核苷酸序列。

25 图 6 提供了梅毒密螺旋体苍白密螺旋体亚种的完整氨基酸序列列表(SEQ ID NO: 2)并且指示了序列中发现的各种类型的重复区。

图 7 提供了梅毒密螺旋体极细密螺旋体亚种 (CDC-2)的核苷酸序列。

30 图 8 提供了梅毒密螺旋体极细密螺旋体亚种，CDC-2 株的完整氨基酸序列列表 (SEQ ID NO: 4) 并且还指示了序列中发现的各种类型

的重复区。

图 9 提供了梅毒密螺旋体地方性密螺旋体亚种(Bosnia)的核苷酸序列。

5 图 10 提供了梅毒密螺旋体地方性密螺旋体亚种 Bosnia 株的完整氨基酸序列表 (SEQ ID NO: 6)并且还指示了序列中发现的各种类型的重复区。

图 11 提供了本发明优选的 arp 蛋白质的蛋白质序列。

图 12 绘制了两个图，显示了基于对 arp 肽的血清应答可以将当前的梅毒感染 (初期梅毒)可以分成三个阶段。

10 图 13 显示了使用 arp 肽的对人梅毒血清的流式细胞术分析结果。

### 发明详述

15 通过参考以下关于具体实施方案的详细描述，可以更容易地理解本发明。尽管本发明是针对某些实施方案作的特定详细的描述，但不应当认为这些详细描述是对本发明范围的限制。本文中提及的参考文献内容均整体引入本文作为参考。

### 定义

20 本文中，术语“一种”和“所述”指“一个或多个”并且包括复数，除非前后关系不相符。

本文中，术语“检测”或“被检测”指使用已知技术来检测生物分子，如免疫化学或组织学方法，并且指定性或定量测定所研究的生物分子的存在或浓度。

25 术语“经分离的”指生物分子中不含至少一些与其天然共存的组分。

30 本文中，术语“可溶”指部分或完全溶解于水溶液中。

## 检测梅毒密螺旋体用的肽和蛋白质

本发明的方法包括使用先前未鉴定的抗原蛋白，利用其进行检测试验以诊断梅毒密螺旋体感染引起的疾病(主要是梅毒)。

5

尽管以前在梅毒的诊断中利用过很多梅毒密螺旋体的蛋白质产物，但特别适合于准确、早期诊断梅毒或鉴别诊断梅毒、雅司病和非性病性梅毒的具体蛋白质迄今没有鉴定。

10

具体在现有技术的试验中使用的蛋白质包括 47kD 脂蛋白、17kD 脂蛋白和 15kD 脂蛋白，其大部分似乎通常通过蛋白质的脂质修饰而被锚定在细胞质膜中并且通过所得的氨基末端脂质部分来锚定。虽然在梅毒密螺旋体中存在大量的这些蛋白质，并且虽然它们是高度抗原性的，但将它们用于诊断的严重缺陷是它们主要含有在完整密螺旋体中应答的蛋白质，由此不能得到比使用完整密螺旋体细胞更快的阳性诊断。

15

本发明者不指望得到以下理论的支持，但相信是梅毒密螺旋体的独特外膜结构造成了在对梅毒感染的宿主应答中的明显延迟，并因此初期梅毒的早期情况经常显示密螺旋体的血清阴性。梅毒密螺旋体的外膜或包膜似乎主要由脂质与极少量的蛋白质组成。另外，据信锚定在细胞质膜内的蛋白质与宿主的免疫系统隔开，从而延迟或减弱了免疫应答。所以，基于膜锚定蛋白质的检测试验经常表现为血清反应性的延迟，使一些初期梅毒患者产生假阴性结果。

20

25

与先前在梅毒密螺旋体检测试验中使用的蛋白质不同，本发明的蛋白质和肽能够在早期准确诊断梅毒密螺旋体感染。本发明者尽管没有指望以下理论的支持，但根据本发明的方法对分泌型蛋白质的检测解决了先前与梅毒密螺旋体外膜结构有关的问题，并因此特别优越于现有试验，它们依赖于克隆化的被膜屏蔽的抗原。另外，分泌型抗原

30

蛋白相比于被膜屏蔽的抗原更可能产生可检测的免疫应答，由此有助于通过识别相应的抗体来进行诊断。此外，蛋白质的重复性使它们是极端抗原性的，由此适合早期检测梅毒。

5           早期检测是治疗的关键，因为它可以防止接下来恶化成二期和三期形式的梅毒，其更严重并且更难治疗。因此，本发明的方法解决了对早期检测初期梅毒的需求，这种检测迄今为止是梅毒血清学中的严重问题区。

10           梅毒密螺旋体的 Nichols 株是梅毒密螺旋体苍白密螺旋体亚种的典型株。如本发明所述，这个株含有独特的重复序列，每个序列 60 个碱基对长，由其得到蛋白质，在蛋白质体内含有十四个重复区，每个重复区由 20 个氨基酸组成(参见图 6)。重复区含有 6 个谷氨酸密码子并且据估计蛋白质产物具有大约 4.3 的 pI 值，因此称作酸性重复蛋白(或 arp)。20 个氨基酸重复区中有一些小的变化，但重复区是至少 90% 保守的，一直至 Nichols 株的最后两个重复区(很少的替换通常认为是保守的)。酸性重复蛋白的核苷酸序列见序列表 SEQ ID NO: 1 (还参见图 5)，并且氨基酸序列见 SEQ ID NO: 2 (还参见图 6)。

20           尽管本发明者不指望得到以下理论的支持，但相信 arp 基因产物，即酸性重复蛋白，含有以膜锚定形式或分泌形式存在的蛋白质。酸性重复蛋白的结构特征示于图 2，其给出蛋白质的疏水性分布以及显示了梅毒密螺旋体 Nichols 株重复元件之一的序列。蛋白质具有弱碱性氨基末端，接着是一段氨基酸的疏水序列，其可以构成膜锚定形式的跨膜区。在潜在跨膜区末端之后不久存在一段四个丙氨酸的序列，其是信号肽酶 I 裂解的潜在位点。在梅毒密螺旋体的 Nichols 株中，蛋白质的剩余部分大多数含有构成此株总读框大约 2/3 的重复序列。

30           酸性重复蛋白免疫原性区的活性部分可以通过从酸性重复蛋白中分离或合成截短肽然后使用本领域技术人员已知的技术和方法测试肽

的免疫原性活性来鉴定。本发明特别涉及酸性重复蛋白免疫原性区的活性部分。

5 例如，酸性重复蛋白的一个优选活性部分含有 SEQ ID NO: 1 所示的蛋白质的大约氨基酸 128-407，更优选 SEQ ID NO: 1 中所示的氨基酸 168-187，首选具有 SEQ ID NO: 15 所示氨基酸序列的肽。

10 在本发明的一个实施方案中，用于本发明方法的优选的蛋白质或肽含有由 SEQ ID NO: 1 所示核苷酸序列编码的酸性重复蛋白或其免疫原性片段。

15 在本发明的另一个实施方案中，用于本发明方法的优选的蛋白质或肽含有具有 SEQ ID NO: 15 所示氨基酸序列的酸性重复蛋白的免疫原性片段。

在本发明的另一个实施方案中，用于本发明方法的优选的蛋白质或肽含有具有 SEQ ID NO: 9 所示氨基酸序列的酸性重复蛋白的免疫原性片段，arp 3 肽。

20 在本发明的另一个实施方案中，用于本发明方法的优选的蛋白质或肽含有具有 SEQ ID NO: 13 所示氨基酸序列的酸性重复蛋白的活性片段。

25 在本发明的另一个实施方案中，用于本发明方法的优选的肽含有具有 SEQ ID NO: 7-18 中任一所示氨基酸序列的酸性重复蛋白的活性片段。

30 本领域技术人员知道，编码序列中改变、增加或删除单个氨基酸或小百分比氨基酸（一般是小于 5%，更典型是小于 1%）的个别替换、缺失或添加是保守修饰变异，其中改变导致某一氨基酸被化学相似的

氨基酸替换。

5 根据本发明方法的一个实施方案，将样品与特异于重复基因序列的蛋白质或肽产物的抗体在形成抗体-抗原复合体的条件下结合。使用抗原捕捉方法检测复合体，来指示患者中梅毒密螺旋体的存在。或者，使用抗原作为探针检测抗原-抗体复合体，指示以前或现在被梅毒密螺旋体感染的存在。优选，重复基因序列的蛋白质产物是酸性重复蛋白或其抗原肽片段。

10 肽或蛋白质片段

将酸性重复蛋白从梅毒密螺旋体生物体中分离，或者通过化学或生物方法合成，如实施例中所所述的细胞培养、重组基因表达和肽合成。重组技术包括使用聚合酶链反应(PCR)从 DNA 源中基因扩增以及使用反转录酶/PCR 从 RNA 源中基因扩增。酸性重复蛋白的氨基酸序列示于 SEQ ID NO: 2。酸性重复蛋白的肽和蛋白质片段优选在氨基酸序列中具有 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列。

20 酸性重复蛋白可以根据上述的方法生产和使用本领域技术人员已知的技术和方法测试免疫原性或抗原活性。例如，可以使用杆状病毒基因表达系统或使用含全部 arp 基因的表达载体质粒转化的大肠杆菌生产全长重组酸性重复蛋白。可以将全长蛋白质裂解成各个结构域或者使用各种方法消化，例如 Enjyoji 等(Biochemistry 34: 5725-5735 (1995))所述的方法。根据 Enjyoji 等的方法，可以用消化酶来处理重组酸性重复蛋白，如人的嗜中性弹性蛋白酶，并且使用肝素柱纯化消化物，以便获得片段，然后可以测试其的免疫原性。

30 或者，通过将整个蛋白质或将其表现免疫原性活性的大片段消化，同时除去一个氨基酸，来制备片段。然后，测试每个逐渐变短的片段的免疫原性活性。同样，可以合成各种长度的片段并且测试其免疫原性活性。通过增加或减小片段的长度，本领域技术人员可以使用

本领域技术人员已知的常规消化、合成和筛选过程确定蛋白质中免疫原性活性所需要的氨基酸的准确的数目、标识和序列。

5 本文中，术语"多肽"、"肽"和"蛋白质"可互换使用并且指由两个或多个通过肽键连接的氨基酸组成的生物分子。

10 术语"肽"指氨基酸(一般是 L-氨基酸)的链，其的 $\alpha$ 碳通过肽键连接，所说的肽键通过一个氨基酸 $\alpha$ 碳上的羧基与另一个氨基酸 $\alpha$ 碳上的氨基之间缩合反应形成。链一端的末端氨基酸(即氨基末端)具有游离的氨基，而链另一端的末端氨基酸(即羧基末端)具有游离的羧基。照此，术语"氨基末端"(简写成 N-末端)指肽氨基末端处的氨基酸上的游离 $\alpha$ -氨基，或指在肽内任何其它位置处的氨基酸上的 $\alpha$ -氨基(当参与肽键时是亚氨基)。同样，术语"羧基末端"(简写成 C-末端)指肽羧基末端处的氨基酸上的游离羧基，或指在肽内任何其它位置处的氨基酸上的羧基。

15

一般来说，构成肽的氨基酸是按顺序编号的，开始于氨基末端并且沿向着肽羧基末端的方向增加。因此，当说到一个氨基酸"接着"另一个，即指氨基酸的位置比前面那个氨基酸更接近肽的羧基末端。

20

本文中，术语"残基"指通过酰胺键掺入到肽中的氨基酸。照此，氨基酸可以是天然存在的氨基酸，或者除非有另外的限定，可以包含作用与天然存在的氨基酸相似的已知天然氨基酸类似物(即氨基酸模拟物)。此外酰胺键模拟物包括本领域技术人员公知的肽主链修饰。

25

本文中，用语"基本上由……组成"不包括任何能本质上改变用语所涉及肽的基本性质的成分。因此，所述的肽"基本上由……组成"不包括任何能本质上改变肽生物活性的氨基酸替换、增加或缺失。

30

另外，本领域技术人员知道，如上所述，编码序列中改变、增加

或删除单个氨基酸或小百分比氨基酸 (一般是小于 5%，更典型是小于 1%)的个别替换、缺失或添加是保守修饰变异，其中改变导致某一氨基酸被化学相似的氨基酸替换。提供功能相似氨基酸的保守替换表是本领域公知的。下面给出六个组，每组中含有彼此是保守替换的氨基酸：

- 5
- 1) 丙氨酸 (A)，丝氨酸 (S)，苏氨酸 (T)；
  - 2) 天冬氨酸 (D)，谷氨酸 (E)；
  - 3) 天冬酰胺 (N)，谷氨酰胺 (Q)；
  - 4) 精氨酸 (R)，赖氨酸 (K)；
- 10
- 5) 异亮氨酸 (I)，亮氨酸(L)，蛋氨酸(M)，缬氨酸(V)；和
  - 6) 苯丙氨酸 (F)，酪氨酸 (Y)，色氨酸 (W)。

15 用语“经分离的”或“生物纯的”指物质本质上或者基本上不含通常在其天然态时伴生的组分。因此，本文所述的肽不包含通常与其原位环境有关的物质。一般来说，本文所述的经分离的免疫原性肽，按照在银染色凝胶上谱带强度测定，为至少约 80% 纯的，通常为至少约 90%，优选至少约 95%纯。

20 蛋白质的纯度或同质性可以通过很多本领域公知的方法来指示，如蛋白质样品的聚丙烯酰胺凝胶电泳，接着染色法显象。出于某些目的，高分离度是必要的并且使用 HPLC 或类似的纯化方法。

25 当免疫原性肽的长度相对较短时 (即小于约 50 个氨基酸)，它们经常通过使用标准化学肽合成技术来合成。

固相合成是化学合成本文所述免疫原性肽的优选方法，其中将序列的 C-末端氨基酸连接在不溶性载体上，接着顺序添加序列中的其余氨基酸。固相合成技术是本领域技术人员已知的。

30 或者，使用重组核酸方法合成所述的免疫原性肽。通常来说，此

方法包括创建一种编码肽的核酸序列，将核酸放入在特定启动子的控制下的表达盒，在宿主中表达肽，分离被表达的肽或多肽，并且如果需要将肽复性。从文献中可以找到足以指导本领域技术人员理解这种流程的技术。

5

表达后，可以根据标准流程纯化重组肽，包括硫酸铵沉淀、亲和柱、柱色谱、凝胶电泳等等。作为治疗剂使用，具有约 50-95%同质性的本质上纯的组合物是优选的，并且首选具有 80-95%或更大的同质性。

10

本领域技术人员知道，经化学合成、生物表达或纯化之后，免疫原性肽的构象可能会不同于组成肽的天然构象，经常必需将免疫原性肽变性或还原，然后使肽重折叠成生物和生化活性构象。还原和变性蛋白质的方法和诱导重折叠的方法本领域技术人员公知的。

15

纯化蛋白质的抗原性可以通过例如显示与梅毒密螺旋体免疫血清的反应，或与在实验室动物中产生的抗-arp 血清的反应来证实。

20

本发明者不指望得到以下理论的支持，但本发明是特别合意的，因为通过例如免疫测定来识别酸性重复蛋白提供了所述蛋白质在诊断梅毒、测定患者免疫态和评估疾病进展中的应用。

25

本发明另一个特别的优势方面是能够从克隆的基因中大量生产所需的蛋白质。如上所述，然后将蛋白质用于通过抗体识别、抗原捕捉进行梅毒检测的诊断试验，或者用于开发治疗梅毒的疫苗。

#### 抗-梅毒密螺旋体抗原抗体

30

本文中，术语“抗体”包括单克隆抗体，多克隆、嵌合、单链、双特异性、猴源化、人源化的抗体以及 Fab 片段，包括 Fab 免疫球蛋白表达文库。

术语"抗原"指可以诱导哺乳动物免疫应答的实体或其片段。该术语包括免疫原以及赋予抗原性或抗原决定簇的区。

5           本文中提供的抗体是对梅毒密螺旋体抗原具有结合特异性的单克隆或多克隆抗体，其中所说的梅毒密螺旋体抗原含有代表免疫原性区的蛋白质或肽。优选的基因靶包括 arp 基因或 arp 基因家族的成员。优选的抗体是单克隆抗体，因为它具有较高的抗原特异性。抗体是 arp 蛋白质特异的并且显出极少或不显出与其它梅毒密螺旋体蛋白质或肽的交叉活性。优选，抗体是对 arp 基因编码的分泌型蛋白质、酸性重复蛋白或其抗原肽片段特异的。

15           优选的单克隆抗体通过用全基因产物蛋白质如酸性重复蛋白或其肽给动物，如小鼠、大鼠或兔子免疫接种来制备。从免疫接种的动物中得到脾细胞和通过用骨髓瘤细胞系融合敏化脾细胞产生杂交瘤，其中所说的骨髓瘤细胞系如鼠 SP2/O 骨髓瘤细胞(ATCC, Manassas, VA)。通过添加聚乙二醇将细胞诱导至融合。通过将细胞平皿接种在含次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸腺嘧啶核苷(HAT)的选择培养基中来化学选择杂交瘤。

20           接下来，筛选能够生产抗梅毒密螺旋体免疫原性蛋白质的单克隆抗体的杂交瘤。用于筛选目的的免疫原性蛋白质从分析标本中获得。或者，这种蛋白质可以含有按照本领域技术人员已知的方法制造的重组肽。将用于生产与免疫原性蛋白质制品结合的抗体的杂交瘤克隆、

25           扩增并且冰冻贮藏作进一步生产用。优选的杂交瘤生产具有 IgG 同种型的单克隆抗体。

30           优选的多克隆抗体通过用上述的免疫原性蛋白质或肽给动物如小鼠或兔子免疫接种来制备。接下来，从动物中收集血液，并且在血清中筛选抗免疫原性蛋白质的结合反应性的抗体，所述免疫原性蛋白质

优选可与上述单克隆抗体反应的抗原。

5 可以如下所述直接用可检测的标记来标记单克隆抗体或多克隆抗体或二者来鉴定生物样品中的梅毒密螺旋体。用于免疫测定的标记通常是本领域技术人员已知的标记，包括酶、放射性同位素和荧光、发光和产色物质，包括带色粒子，如胶体金和胶乳珠。还可以将抗体结合到固相上，以有助于从免疫测定中的未反应组分中分离抗体-抗原复合物。示例性的固相物质包括(但不限于此)微量滴定板、试管、磁性、塑料或玻璃珠和载玻片。将抗体偶联到固相上的方法是本领域技术人员公知的。

10

或者，可以通过与被标记的对免疫球蛋白具亲和性的物质如蛋白质 A 或 G 或二级抗体反应，间接标记抗体。可以将抗体与二级物质偶联并且用对与抗体偶联的二级物质具亲和性的三级物质来检测。例如，可以将抗体与生物素偶联并且使用标记的抗生物素蛋白或链霉抗生物素来检测抗体-生物素偶联体。类似，可以将抗体与半抗原偶联，并且使用标记的抗半抗原抗体检测抗体-半抗原偶联体。这些和其它标记抗体的方法和试验偶联体是本领域技术人员公知的。

15

20 在一个优选的实施方案中，通过与已用可检测标记标记的二级抗体反应来间接标记抗体。二级抗体优选是与产生单克隆抗体的动物中的抗体结合的抗体。换句话说，如果单克隆抗体是小鼠抗体，则标记的二级抗体是抗小鼠的抗体。对欲在下述试验中使用的单克隆抗体，这种标记优选是抗体包被的珠，特别是磁珠。对欲在本文所述免疫测定中使用的多克隆抗体，标记优选是可检测分子，如放射性、荧光或电学发光物质。

25

#### 梅毒密螺旋体免疫测定

30 本发明提供了使用一个或更多用于检测上述梅毒密螺旋体抗体的使用重组或经分离的蛋白质或肽的高灵敏度的梅毒密螺旋体免疫测

定。免疫测定对检测各种样品，特别是生物样品如人或动物生物流体中梅毒密螺旋体感染的存在是有用的。样品可以获得自任何可能存在有梅毒密螺旋体生物体的来源。

5            在第一个优选的实施方案中，免疫测定设计成使用抗原蛋白或肽来检测梅毒密螺旋体抗体的存在。此可以通过用蛋白质或肽包被固相来实现。接下来，将生物样品与包被的表面温育，让抗体与蛋白质/肽结合。示例性的机理是在大于室温的温度下温育生物样品和包被的表面，优选在大约 20°C-45°C 下温育大约 10-150 分钟。更优选，将生物  
10 样品和包被的表面在大约 37°C 下黑暗温育约 60 分钟的期间。这种免疫测定的结果提供了梅毒密螺旋体感染的直接指示。

本领域技术人员知道，上述的一个或更多抗原 (arp 肽或蛋白质) 可以在任何异源或同源(竞争性) 免疫测定中使用以检测梅毒密螺旋体  
15 感染。如上所述，用于本文提供的免疫测定中时，将肽包被在固相上，固相可以包括任何适合此用途的制品。适宜的制品是本领域技术人员公知的，包括(但不限于此)胶乳粒、滤纸和玻璃珠。优选的固相是可商购获得的 ELISA 微量滴定板，如获自 Dynex Technologies (Chantilly, 弗吉尼亚)的 Immulon 2HB™ 板。

20

根据此优选的方法，将结合到固相上的抗原和含抗体的流体在促进抗体与抗原结合的条件下一起反应足够的时间。本领域技术人员知道，免疫测定试剂和样品可以以不同的组合或顺序反应。

25            使用物理手段来将固相结合试剂与未结合的试剂分离，如过滤颗粒、倾析包被管或孔中的反应溶液、磁力分离、毛细管作用和本领域技术人员已知的其它手段。应当理解，该方法中包括固相的分开洗涤。

30            使用本领域技术人员已知的方法检测在免疫测定中形成的抗原-

抗体复合体。将复合体与已用可检测标志标记的抗-人免疫球蛋白抗体接触。这种标志包括化学发光标记，如辣根过氧化物酶；电化学发光标记，如 FITC；和酶标记，如碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶和辣根过氧化物酶。优选，通过添加过氧化物酶标记来修饰检测抗体。

5

然后，使用专门用于检测所用标记的特定技术或仪器来检测被标记的复合体。优选，用 ELISA 读数器如 Ceres 900 HDL (BioTek 仪器公司，Winooski，佛蒙特州) 分析复合体以检测过氧化物酶。或者，可以使用 Becton-Dickinson FACS 分选仪 (Franklin Lakes，新泽西) 来检测 FITC 标记。还可以在同一试验方式中将可溶性抗原或抗体与非特异性抗体包被的磁珠温育，以测定试验分析样品的背景值。

10

在二级个优选的实施方案中，将免疫测定设计成使用抗-arp 单克隆 (或多克隆) 抗体来检测得自生物流体中梅毒密螺旋体的 arp 肽和/或蛋白质的存在。此可以通过温育生物样品让蛋白质或肽与抗体结合来实现。示例性的机理是在大于室温的温度下温育生物样品和包被表面，优选在大约 20°C-45°C 下温育大约 10-150 分钟。更优选，将生物样品和包被的表面在大约 37°C 下黑暗温育约 60 分钟的期间。这种免疫测定的结果提供了梅毒密螺旋体感染的直接指示。

15

20

本领域技术人员知道，上述的一个或更多抗体可以在任何异源或同源的竞争性免疫测定中使用以检测梅毒密螺旋体感染。如上所述，用于本文提供的免疫测定中时，将抗体用可检测的标记来标记或者偶联到固相上。优选，在此试验中同时使用单克隆抗体和多克隆抗体，将单克隆抗体偶联到固相上并且将多克隆抗体用可检测标记来标记。固相可以包括任何本领域技术人员公知的适合此用途的颗粒，包括(但不限于此)胶乳粒、滤纸和玻璃珠。优选的固相是可商购获得的 ELISA 微量滴定板，如获自 Dynex Technologies (Chantilly，弗吉尼亚) 的 Immunlon 2HB™ 板。

25

30

5 根据此优选的方法，将样品和结合到固相上的抗体在促进抗体与样品中免疫原性蛋白结合的条件下一起反应足够的时间。免疫原性蛋白优选包括酸性重复蛋白。本领域技术人员知道，免疫测定试剂和样品可以以不同的组合或顺序反应。使用物理手段来使与固相结合的试剂与未结合的试剂分离，如过滤颗粒、倾析包被管或孔中的反应溶液、磁力分离、毛细管作用和本领域技术人员已知的其它手段。还应当理解，该方法中可包括固相的分开洗涤。

10 使用本领域技术人员已知的免疫测定方法检测在免疫测定中形成的抗原-抗体复合物，包括夹心式免疫测定和竞争免疫测定。将抗体-抗原复合物与类似于捕捉抗原时使用的但用可检测标记所标记的抗体接触。适宜的标记包括化学发光标记，如辣根过氧化物酶；电化学发光标记，如钨和水母发光蛋白；生物发光标记，如萤光素酶；荧光标记如 FITC；和酶标记，如碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶和辣根过氧化物酶。15 优选，通过电化学发光来检测标记。首选，通过添加过氧化物酶标记来修饰检测抗体。

20 然后，使用专门用于检测所用标记的检测技术或仪器来检测被标记的复合物。优选，用 ELISA 读数器如 Ceres 900 HDL (BioTek 仪器公司，Winooski, 佛蒙特州) 分析复合物以检测过氧化物酶。或者，可以使用 Becton-Dickinson FACS 分选仪 (Franklin Lakes, 新泽西) 来检测 FITC 标记。还可以在同一试验方式中将可溶性抗原或抗体与非特异性或特异性抗体包被的磁珠温育，以测定试验分析样品的背景值。

25

### 试验特征

本文提供的免疫测定允许检测样品中的梅毒密螺旋体，由此可以真正指示关于疾病表现形式的感染结果。

30

本文所述的检测试验是有效的，因为它基于检测代表特异基因序

列或这些蛋白质的抗体来检测免疫原性或抗原蛋白。与现有技术的方法不同，本发明的检测试验不关心一般认为与梅毒密螺旋体有关的膜结合抗原蛋白，因此，由于检测涉及分泌型蛋白质的识别，因而结果不受被细胞质膜锚定或屏蔽的蛋白质的影响。基于分泌型蛋白质的检测是优选的，因为它们与膜锚定的蛋白质相比更可能引发早期免疫应答。

本试验对流行病的病因研究也是有价值的，因为它可以用于鉴定患者感染的程度。例如，高含量酸性重复蛋白可能与疾病的已进展阶段有关系。这是特别重要的，因为疾病的早期阶段诊断可以导致进行有效的早期治疗，防止后期恶化成严重病症。与本文描述的试验不同，现有的梅毒密螺旋体试验总体上认为是不准确和无效的，因为它们需要明显的处理时间并且依赖于检测抗原标志，其一般是膜结合的蛋白质。

与本领域当前所用的试验不同，本发明所述的方法是通过识别分泌型抗原蛋白或这些蛋白质的抗体来检测梅毒密螺旋体的。这种识别类型的优点是既不依赖于识别微粒形式的寄生物，也不依赖于检测膜结合蛋白质的存在，所说的膜结合蛋白质通常被屏蔽而不影响宿主免疫系统。

基于分泌型蛋白质抗原存在的检测既增加了方法的灵敏性，又减少了进行精确诊断的时间，由此能够检测初期梅毒。

## 25 梅毒密螺旋体感染的鉴别诊断

除提供梅毒密螺旋体苍白密螺旋体亚种的核苷酸和氨基酸序列(分别见 SEQ ID NO: 1 和 2)，本发明还提供了以前未鉴定的相应于梅毒密螺旋体极细密螺旋体亚种(分别见 SEQ ID NO: 3 和 4 以及图 6)和梅毒密螺旋体地方性密螺旋体亚种(分别见 SEQ ID NO: 5 和 6 以及图 7)的核苷酸和氨基酸序列。因此，本领域技术人员可以使用本发

明教导的技术来鉴别诊断梅毒密螺旋体感染，并由此鉴定如梅毒密螺旋体苍白密螺旋体亚种、梅毒密螺旋体极细密螺旋体亚种或梅毒密螺旋体地方性密螺旋体亚种的疾病病原体。这个发现对感染的早期检测和鉴定是特别具有价值的，因为它有助于控制疾病的进一步散布。此外，各个密螺旋体亚种的特异性鉴定导致能够开发出特异性抗体，从而可以在治疗中使用。特异性鉴定具体亚种的另一个优点是可以预期具体疾病的表现形式，无论是梅毒、雅司病或非性病性梅毒，从而采取适宜的措施预防或至少缓解各种症状。

10 本发明者不指望得到以下理论的支持，但相信当生物体被消灭时抗体的抗 arp 蛋白质的效价将会减退。这意味着可以使用利用 arp 肽/蛋白质进行免疫检测抗密螺旋体的抗体的试验来区别是目前的感染还是过去的感染。

15 本发明还将通过以下实施例作进一步举例说明，这些实施例不解释为对本发明范围的限制。相反，应当明白在阅读了本发明的描述之后，可能提醒本领域技术人员在不背离本发明的实质的前提下诉诸于其它实施方案、改进等。

## 20 实施例 1

### 酸性重复蛋白的特征

克隆用于编码梅毒密螺旋体(Nichols 株、CDC-2 株和 Bosnia 株)中的酸性重复蛋白的基因。核苷酸序列见 SEQ ID NO: 1、3 和 5(Genebank Accession No. AF015824)。

25

Nichols 株的 arp 蛋白质由跨膜结构域、信号肽酶 I 切断位点和 14 个几乎完全相同的重复区 (参见图 2)表征。图 2 的上部表示蛋白质根据其一级序列的疏水性曲线。蛋白质中大部分是亲水的，因此尽管发明者不指望以下理论的支持，但相信这个性质符合蛋白质的抗原性指数 (图 2 的下部)。在 N 末端，有一段疏水氨基酸序列(氨基酸 27-氨基

30

酸 43), 其构成疏水性曲线的下落。这个区是潜在的跨膜结构域。在跨膜结构域之后立即有一个潜在的信号肽酶 I 切断位点。arp 蛋白质的最明显特点是 14 个几乎完全相同的重复区, 每个区长约 20 个氨基酸。重复区中的谷氨酸极高, 是造成已知的 pI 4.3 的原因。根据它们的相似性, 将重复区分成 4 类。II 型重复区占总重复区的 42% (6/14) 并且是主导类型。据预测, 大部分梅毒密螺旋体种都具有这个类型的重复区。本发明的发明者发现由这个重复区构成的肽在血清诊断中是最有用的。以下将证明之。

## 10 实施例 2

### arp 蛋白质在梅毒诊断中的潜在用途

以下研究涉及进一步表征 arp 蛋白质, 尤其是免疫原性肽区。使最新鉴定的免疫原性肽起靶的作用, 用于构成具有改进和优越灵敏性的免疫诊断试剂盒。

15

起初, 在从其蛋白质序列预测了 arp 蛋白质的疏水性曲线及其抗原性指数后, 发明者假定 arp 蛋白质中的某个区可能是免疫原性的。从蛋白质的重复区中制备肽片段并且用于给兔子免疫接种。发现来自肽免疫接种的兔子的血清识别来自含 arp 基因质粒的被表达的重组蛋白质。此外, 来自被感染了密螺旋体的兔子的血清也识别这种重组蛋白质。(图 1 中显示了蛋白质印迹分析: 第 1 道 = 通过抗-梅毒密螺旋体血清鉴定的总梅毒密螺旋体蛋白质; 第 2 道 = 不能在总梅毒密螺旋体蛋白质提取物中鉴定 arp 的抗-肽[1,2,3]血清; 第 3 道 = 通过抗-arp 肽血清鉴定的重组 arp 蛋白质; 第 4 道 = 通过抗梅毒密螺旋体血清鉴定的 arp 蛋白质; 第 5 道 = 取血前 (刚好在注射抗原之前取血) 对照)。

20

25

## 实施例 3

### 对梅毒密螺旋体重复蛋白的肽的免疫应答

30 本实验中使用来自 arp 蛋白质不同区的设计好的肽 (参见表 1)。

在 ELISA 试验中使用梅毒病人的血清来测定对这些肽片段的反应性。根据市售 RPR 试验试剂盒梅毒病人的血清是快速血浆反应物 (RPR) 阳性或阴性(RPR+或 RPR-)。发现大部分 RPR+ 血清与 arp 肽 3、7 和 9 剧烈反应，而没有一个 RPR-血清与任何所述肽发生反应。以 1: 100 稀释度(大部分市售 ELISA 试剂盒使用 1: 20 稀释度进行检测)检测反应性。

其它肽 (肽 1-12, 不包括 3、7 和 9)得自 arp 蛋白质的 N 或 C 末端或得自 I、III 或 IV 型重复区。尽管本发明者不指望得到以下陈述的支持, 但基于梅毒病人血清与肽反应的分析指示了一个免疫原性区被限制于氨基酸 DVPK。

本研究的结果图示于图 3 中。

15

表 1

肽#	氨基酸序列	SEQ ID NO:
Arp 1	LVSPL REVED APKVV EPAS	SEQ ID NO:7
Arp 2	SREVE DAPKVV EPAS EREGG	SEQ ID NO:8
Arp 3	PKVVE PASER EGGER EVEDA	SEQ ID NO:9
Arp 4	PKNTA VEISN LEKNA KAQAVV	SEQ ID NO:10
Arp 5	GHAGI PGLLV SLAPA AAAQL GIGVY	SEQ ID NO:11
Arp 6	VPARPAQRDPLSSPPAGHTVPEYRD	SEQ ID NO:12
Arp 7	VVEPA SEREG GEREV EDVPK V	SEQ ID NO:13
Arp 8	VVEPA SGHEG GEREV ASQHT KQPSH S	SEQ ID NO:14
Arp 9	EVEDV PKVVE PASER EGGER	SEQ ID NO:15
arp 10	EVENV PKVVE PASER EGGER	SEQ ID NO:16
arp 11	EVEDA PKVVE PASER EGGER	SEQ ID NO:17
arp 12	EVEDV PGVVEPASGH EGGER	SEQ ID NO:18

#### 实施例 4

梅毒密螺旋体亚种的 arp 蛋白质之间的序列比较

20

克隆并测试分别来自梅毒密螺旋体亚种, 梅毒密螺旋体极细密螺

旋体亚种和梅毒密螺旋体地方性密螺旋体亚种的两种类型株，CDC-2 和 Bosnia 的 arp 基因。基因序列显示，它们与梅毒密螺旋体苍白密螺旋体亚种的 Nichols 株具有明显的同源性。三个亚种的基因的 5'末端和 3'末端完全相同，重复区显示有一些差异。观察到所翻译的两个亚种的 arp 蛋白质显示单一类型的重复区，II 型重复区，其是 Nichols 株中的主导类型。这个发现证实在具有主导类型的重复区(II 型)的区域中合成的肽是免疫原性的(如图 4 所示)。其它重复区 (I、III 和 IV 型)也是免疫原性的。

10 从前面的详细描述中，本发明的改进和改变对本领域技术人员来说是显而易见的。这种改进和改变属于所附的权利要求书的范围。

#### 实施例 5

使用 arp 肽进行 ELISA 试验将梅毒感染分成两个不同阶段

15 本实验中使用肽 arp #9 (Seq. ID 15)(图 8)。在 ELISA 试验中测试从当前患梅毒感染的患者中获得的血清。本研究中的所有患者在其溃疡标本中都具有阳性 PCR 反应。据发现，可以将患者分成感染早期(IgM 阳性)、感染间歇期 (同时 IgM 和 IgG 阳性)和感染后期 (仅 IgG 阳性)。

20

#### 实施例 6

梅毒感染的快速流式细胞术分析

25 在免疫学实验室中常规使用流式细胞器。Luminex™ 公司开发了一种系统，使多种疾病和疾病标志的诊断可以容易复合。目前已被开发或正在开发的试验包括人细胞因子(IL-2、3、4、6 等)以及病毒和细菌感染(HIV、肝炎等)。将 Arp #9 肽偶联到生物素分子上。将此生物素化的肽进一步结合到链霉抗生物素珠上，其可从 Luminex™ 商购获得。将两种血清在此系统中测试。显然，RPR+ 血清在测试中反应强烈，而 RPR-正常血清具有非常低的荧光应答背景量 (图 9)。这个结果证明了使用 Luminex 系统使其它临床测试与我们的 arp 肽珠相结合的可能性。

30

## 序列表

<110> 美国政府健康及人类服务部 ...

<120>用于检测梅毒密螺旋体的组合物和方法

<130> 6395-61663

<140>

<141>

<150> PCT/US00/16425

<151> 2000-06-14

<150> 60/138,981

<151> 1999-06-14

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2945

<212> DNA

<213> 梅毒密螺旋体

<220>

<221> CDS

<222> (919)..(2217)

<220>

<223> 亚种: 苍白密螺旋体 (Nichols 株)

<400> 1

gtc gatgcac agctgacgct ctcaggtcct gcacatattg cgcggtctgtt gccgacatct 60

ctcctgccac ctgctacagt gtcaggttca tcggggaatt gaggaaactg ttatccgcgc 120

tccccatctt ccgatactgg atcgggtgtcg gggggagtag gagggggaa gcgtctgtgc 180

tgtatcgcgc tggatgatgcg cgcgttctgg tacctcagt cgaaggagtg caglatcgcct 240

tacgtgcccc ttcatcgcag tggggctct caagattcga gcatgagcac agcagtgggc 300

gatacgtcc ttaacgcctt cttagcagag ggaatggtgg ttacggcagt accgccgggt 360  
gtacacgacg gccagactat agcagaaatt gctgcatgtt ttgaagtaat gcccgattac 420  
gcgttggtgg tgcagtttca ttccgctcgt ctccctggtg gggaaagccc tacctcccgt 480  
gcccgcggcg cttggtcttc agagaggttc cgtgctgtgt ggacattagt ggatttgcac 540  
acgcagcgcg cgtgtgtcta tgcgtgtgtc gcccataca gggagagtat tcccgtttct 600  
gagtgtgttg acgtcgttac ccgtgtatt gcggagcagg caatttcgta catacgggtg 660  
ggcacgagca ccgatacagc cggagttcag ttatagaaaa tagggaatac gtaagggtgc 720  
tgcagcgtcg cttcagctgg gaggagtctt atgattaac gccacatgtt cgcaaaaagg 780  
ggtgtcaaag gaagatctta cctggttagg gtgaacactg cgttcttagt gctttgtgtt 840  
gcttctgtca cgccgctttg ggctgtgtgg gaagggaatg cagaaattgg ccccaggga 900  
agttttctgc aggacggc atg ttt gtg cgc agt gac atg ttc ccc aaa aac 951  
Met Phe Val Arg Ser Asp Met Phe Pro Lys Asn  
1 5 10  
act gct gtt gaa att agc aac tta gaa aag aat gcc aag gct cag gca 999  
Thr Ala Val Glu Ile Ser Asn Leu Glu Lys Asn Ala Lys Ala Gln Ala  
15 20 25  
gtg gtt att ggg cac gca ggg atc ccc ggt ctt cta gtt agc ctt gca 1047  
Val Val Ile Gly His Ala Gly Ile Pro Gly Leu Leu Val Ser Leu Ala  
30 35 40  
ccc gct gct gca gca cag ctt ggg att ggc gta tac caa gct gtg cgt 1095  
Pro Ala Ala Ala Ala Gln Leu Gly Ile Gly Val Tyr Gln Ala Val Arg  
45 50 55  
gta cgc gta cgt acc ttg ggt acc gtg cgc ggt ggg tct caa aca agt 1143  
Val Arg Val Arg Thr Leu Gly Thr Val Arg Gly Gly Ser Gln Thr Ser  
60 65 70 75  
cag gac gga ctg tcc ctt gca tct ttg ccg tcc cgt gtg cct gcg cgc 1191  
Gln Asp Gly Leu Ser Leu Ala Ser Leu Pro Ser Arg Val Pro Ala Arg  
80 85 90

ccc gcg cag cgt gat cct ctg tca tcc ccg ccg gca ggt cac act gta 1239  
Pro Ala Gln Arg Asp Pro Leu Ser Ser Pro Pro Ala Gly His Thr Val  
95 100 105

ccg gaa tat cgc gat acg gtt att ttc gat gac ccg cgt ttg gtt tcc 1287  
Pro Glu Tyr Arg Asp Thr Val Ile Phe Asp Asp Pro Arg Leu Val Ser  
110 115 120

cct ttg tct cgt gag gtg gag gac gcg ccg aag gta gtg gag ccg gcc 1335  
Pro Leu Ser Arg Glu Val Glu Asp Ala Pro Lys Val Val Glu Pro Ala  
125 130 135

tct gag cgt gag gga ggg gag cgt gag gtg gag gac gcg ccg aag gta 1383  
Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Ala Pro Lys Val  
140 145 150 155

gtg gag ccg gcc tct gag cgt gag gga ggg gag cgt gag gtg gag gac 1431  
Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp  
160 165 170

gtg ccg aag gta gtg gag ccg gcc tct gag cgt gag gga ggg gag cgt 1479  
Val Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg  
175 180 185

gag gtg gag gac gcg ccg aag gta gtg gag ccg gcc tct gag cgt gag 1527  
Glu Val Glu Asp Ala Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu  
190 195 200

gga ggg gag cgt gag gtg gag gac gtg ccg aag gta gtg gag ccg gcc 1575  
Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val Glu Pro Ala  
205 210 215

tct gag cgt gag gga ggg gag cgt gag gtg gag aac gtg ccg aag gta 1623  
Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asn Val Pro Lys Val  
220 225 230 235

gtg gag ccg gcc tct gag cgt gag gga ggg gag cgt gag gtg gag gac 1671  
Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp  
240 245 250

gcg ccg aag gta gtg gag ccg gcc tct gag cgt gag gga ggg gag cgt 1719  
Ala Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg  
255 260 265

gag gtg gag gac gcg ccg aag gta gtg gag ccg gcc tct gag cgt gag 1767  
Glu Val Glu Asp Ala Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu  
270 275 280

gga ggg gag cgt gag gtg gag gac gtg ccg aag gta gtg gag ccg gcc 1815  
Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val Glu Pro Ala  
285 290 295

tct gag cgt gag gga ggg gag cgt gag gtg gag gac gtg ccg aag gta 1863  
Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val Pro Lys Val  
300 305 310 315

gtg gag ccg gcc tct gag cgt gag gga ggg gag cgt gag gtg gag gac 1911  
Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp  
320 325 330

gtg ccg aag gta gtg gag ccg gcc tct gag cgt gag gga ggg gag cgt 1959  
Val Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg  
335 340 345

gag gtg gag gac gtg ccg aag gta gtg gag ccg gcc tct gag cgt gag 2007  
Glu Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu  
350 355 360

gga ggg gag cgt gag gtg gag gac gtg ccg ggg gta gtg gag ccg gcc 2055  
Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val Pro Gly Val Val Glu Pro Ala  
365 370 375

tct ggg cat gaa gga ggg gag cgt gag gtg gag gac gtg ccg ggg gta 2103  
Ser Gly His Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val Pro Gly Val  
380 385 390 395

gtg gag ccg gcc tct ggg cat gaa gga ggg gag cgt gag gtc gct tct 2151  
Val Glu Pro Ala Ser Gly His Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Ala Ser  
400 405 410

cag cat acg aag cag cca tcc cac tcg gtt tcc aac tca gct ccc aat 2199  
Gln His Thr Lys Gln Pro Ser His Ser Val Ser Asn Ser Ala Pro Asn  
415 420 425

cag ttt cgg aaa ccc tga gggggaactc ccctttacgc tcctgacct 2247  
Gln Phe Arg Lys Pro  
430

atccgagtca gaaattgtgg ttccggagga acagaaagga cgtgcgcac cccaggtgat 2307  
 acccgagggt gcgccacgtg gactgcaacc tggatgaatac tacgtacaga ttgcagtctt 2367  
 tcatgacgct atccaggtgc agagcattgt ccaccgttac ggggtagaat accccatcgc 2427  
 agtggagcag gacatccatg aaggtaaggt gcgtttcacc gtatgcgtcg gtcctgtcca 2487  
 aaaagacgaa cgcggcgcgg tactagagaa ctccaaagg tttggattca aggacgcctt 2547  
 tctgaaaaag gcgcgatgat caggtcggcc ctctcttcc cctcgtgacc gtggtgactc 2607  
 gccccgaagg gggcgcacag agccccgaagg aacggaaggg aaggggcaga cttaactatt 2667  
 tctttgtttt tttgagcacg taaaacggcg ccattctcctt tgaagcttt cctgcgccgg 2727  
 gagcgcctat gtagcgaacg gagttactgt ctatcagctc gtacagctct ttctcgtgcg 2787  
 gtgccttcga ttgctccgag gacacaagcg agagttcgac aattccgtct tcacgtacca 2847  
 tccacgtacc gcgatacgta agaggagaag gtgccgactt cttctcaagg gcaagctcta 2907  
 ccttttgcgc agtgccatcc gcgttgaacg tcacagtc 2945

<210> 2

<211> 432

<212> PRT

<213> 梅毒密螺旋体

<400> 2

Met Phe Val Arg Ser Asp Met Phe Pro Lys Asn Thr Ala Val Glu Ile  
 1 5 10 15

Ser Asn Leu Glu Lys Asn Ala Lys Ala Gln Ala Val Val Ile Gly His  
 20 25 30

Ala Gly Ile Pro Gly Leu Leu Val Ser Leu Ala Pro Ala Ala Ala Ala  
 35 40 45

Gln Leu Gly Ile Gly Val Tyr Gln Ala Val Arg Val Arg Val Arg Thr  
 50 55 60

Leu Gly Thr Val Arg Gly Gly Ser Gln Thr Ser Gln Asp Gly Leu Ser  
 65 70 75 80

Leu Ala Ser Leu Pro Ser Arg Val Pro Ala Arg Pro Ala Gln Arg Asp  
 85 90 95

Pro Leu Ser Ser Pro Pro Ala Gly His Thr Val Pro Glu Tyr Arg Asp  
 100 105 110

Thr Val Ile Phe Asp Asp Pro Arg Leu Val Ser Pro Leu Ser Arg Glu  
 115 120 125

Val Glu Asp Ala Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly  
 130 135 140

Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Ala Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser  
 145 150 155 160

Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val  
 165 170 175

Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Ala  
 180 185 190

Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu  
 195 200 205

Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly  
 210 215 220

Gly Glu Arg Glu Val Glu Asn Val Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser  
 225 230 235 240

Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Ala Pro Lys Val Val  
 245 250 255

Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Ala  
 260 265 270

Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu  
 275 280 285

Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly  
 290 295 300

Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser  
305 310 315 320

Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val  
325 330 335

Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val  
340 345 350

Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu  
355 360 365

Val Glu Asp Val Pro Gly Val Val Glu Pro Ala Ser Gly His Glu Gly  
370 375 380

Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val Pro Gly Val Val Glu Pro Ala Ser  
385 390 395 400

Gly His Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Ala Ser Gln His Thr Lys Gln  
405 410 415

Pro Ser His Ser Val Ser Asn Ser Ala Pro Asn Gln Phe Arg Lys Pro  
420 425 430

<210> 3

<211> 699

<212> DNA

<213> 梅毒密螺旋体

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(699)

<220>

<223> 亚种: 极细密螺旋体 (CDC-2 株)

<400> 3

atg ttt gtg cgc agt gac atg ttc ccc aaa aac act gct gtt gaa att 48  
Met Phe Val Arg Ser Asp Met Phe Pro Lys Asn Thr Ala Val Glu Ile  
1 5 10 15

agc aac tta gaa aag aat gcc aag gct cag gca gtg gtt att ggg cac 96

Ser	Asn	Leu	Glu	Lys	Asn	Ala	Lys	Ala	Gln	Ala	Val	Val	Ile	Gly	His	
		20						25						30		
gca	ggg	atc	ccc	ggt	ctt	cta	gtt	agc	ctt	gca	ccc	gct	gct	gca	gca	144
Ala	Gly	Ile	Pro	Gly	Leu	Leu	Val	Ser	Leu	Ala	Pro	Ala	Ala	Ala	Ala	
		35					40					45				
cag	ctt	ggg	att	ggc	gta	tac	caa	gct	gtg	cgt	gta	cgc	gta	cgt	acc	192
Gln	Leu	Gly	Ile	Gly	Val	Tyr	Gln	Ala	Val	Arg	Val	Arg	Val	Arg	Thr	
		50				55					60					
ttg	ggt	acc	gtg	cgc	ggt	ggg	tct	caa	aca	agt	cag	gac	gga	ctg	tcc	240
Leu	Gly	Thr	Val	Arg	Gly	Gly	Ser	Gln	Thr	Ser	Gln	Asp	Gly	Leu	Ser	
	65				70					75				80		
ctt	gca	tct	ttg	ccg	tcc	cgt	gtg	cct	gcg	cgc	ccc	gcg	cag	cgt	gat	288
Leu	Ala	Ser	Leu	Pro	Ser	Arg	Val	Pro	Ala	Arg	Pro	Ala	Gln	Arg	Asp	
				85					90					95		
cct	ctg	tca	tcc	ccg	ccg	gca	ggt	cac	act	gta	ccg	gaa	tat	cgc	gat	336
Pro	Leu	Ser	Ser	Pro	Pro	Ala	Gly	His	Thr	Val	Pro	Glu	Tyr	Arg	Asp	
			100					105						110		
acg	gtt	att	ttc	gat	gac	ccg	cgt	ttg	gtt	tcc	cct	ttg	tct	cgt	gag	384
Thr	Val	Ile	Phe	Asp	Asp	Pro	Arg	Leu	Val	Ser	Pro	Leu	Ser	Arg	Glu	
		115						120						125		
gtg	gag	gac	gtg	ccg	aag	gta	gtg	gag	ccg	gcc	tct	gag	cgt	gag	gga	432
Val	Glu	Asp	Val	Pro	Lys	Val	Val	Glu	Pro	Ala	Ser	Glu	Arg	Glu	Gly	
	130					135					140					
ggg	gag	cgt	gag	gtg	gag	gac	gtg	ccg	aag	gta	gtg	gag	ccg	gcc	tct	480
Gly	Glu	Arg	Glu	Val	Glu	Asp	Val	Pro	Lys	Val	Val	Glu	Pro	Ala	Ser	
	145				150					155				160		
gag	cgt	gag	gga	ggg	gag	cgt	gag	gtg	gag	gac	gtg	ccg	aag	gta	gtg	528
Glu	Arg	Glu	Gly	Gly	Glu	Arg	Glu	Val	Glu	Asp	Val	Pro	Lys	Val	Val	
			165						170					175		
gag	ccg	gcc	tct	gag	cgt	gag	gga	ggg	gag	cgt	gag	gtg	gag	gac	gtg	576
Glu	Pro	Ala	Ser	Glu	Arg	Glu	Gly	Gly	Glu	Arg	Glu	Val	Glu	Asp	Val	
			180						185					190		
ccg	aag	gta	gtg	gag	ccg	gcc	tct	gag	cgt	gag	gga	ggg	gag	cgt	gag	624

Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu  
 195 200 205  
  
 gtc gct tct cag cat acg aag cag cca tcc cac tcg gtt tcc aac tca 672  
 Val Ala Ser Gln His Thr Lys Gln Pro Ser His Ser Val Ser Asn Ser  
 210 215 220  
  
 gct ccc aat cag ttt cgg aaa ccc tga 699  
 Ala Pro Asn Gln Phe Arg Lys Pro  
 225 230  
  
 <210> 4  
 <211> 232  
 <212> PRT  
 <213> 梅毒密螺旋体  
  
 <400> 4  
 Met Phe Val Arg Ser Asp Met Phe Pro Lys Asn Thr Ala Val Glu Ile  
 1 5 10 15  
  
 Ser Asn Leu Glu Lys Asn Ala Lys Ala Gln Ala Val Val Ile Gly His  
 20 25 30  
  
 Ala Gly Ile Pro Gly Leu Leu Val Ser Leu Ala Pro Ala Ala Ala Ala  
 35 40 45  
  
 Gln Leu Gly Ile Gly Val Tyr Gln Ala Val Arg Val Arg Val Arg Thr  
 50 55 60  
  
 Leu Gly Thr Val Arg Gly Gly Ser Gln Thr Ser Gln Asp Gly Leu Ser  
 65 70 75 80  
  
 Leu Ala Ser Leu Pro Ser Arg Val Pro Ala Arg Pro Ala Gln Arg Asp  
 85 90 95  
  
 Pro Leu Ser Ser Pro Pro Ala Gly His Thr Val Pro Glu Tyr Arg Asp  
 100 105 110  
  
 Thr Val Ile Phe Asp Asp Pro Arg Leu Val Ser Pro Leu Ser Arg Glu  
 115 120 125  
  
 Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly  
 130 135 140



cag ctt ggg att ggc gta tac caa gct gtg cgt gta cgc gta cgt acc 192  
 Gln Leu Gly Ile Gly Val Tyr Gln Ala Val Arg Val Arg Val Arg Thr  
           50                          55                          60

ttg ggt acc gtg cgc ggt ggg tct caa aca agt cag gac gga ctg tcc 240  
 Leu Gly Thr Val Arg Gly Gly Ser Gln Thr Ser Gln Asp Gly Leu Ser  
       65                          70                          75                          80

ctt gca tct ttg ccg tcc cgt gtg cct gcg cgc ccc gcg cag cgt gat 288  
 Leu Ala Ser Leu Pro Ser Arg Val Pro Ala Arg Pro Ala Gln Arg Asp  
                           85                          90                          95

cct ctg tca tcc ccg ccg gca ggt cac act gta ccg gaa tat cgc gat 336  
 Pro Leu Ser Ser Pro Pro Ala Gly His Thr Val Pro Glu Tyr Arg Asp  
                           100                          105                          110

acg gtt att ttc gat gac ccg cgt ttg gtt tcc cct ttg tct cgt gag 384  
 Thr Val Ile Phe Asp Asp Pro Arg Leu Val Ser Pro Leu Ser Arg Glu  
           115                          120                          125

gtg gag gac gtg ccg aag gta gtg gag ccg gcc tct gag cgt gag gga 432  
 Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly  
       130                          135                          140

ggg gag cgt gag gtg gag gac gtg ccg aag gta gtg gag ccg gcc tct 480  
 Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser  
       145                          150                          155                          160

gag cgt gag gga ggg gag cgt gag gtg gag gac gtg ccg aag gta gtg 528  
 Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val  
                           165                          170                          175

gag ccg gcc tct gag cgt gag gga ggg gag cgt gag gtg gag gac gtg 576  
 Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val  
                           180                          185                          190

ccg aag gta gtg gag ccg gcc tct gag cgt gag gga ggg gag cgt gag 624  
 Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu  
           195                          200                          205

gtg gag gac gtg ccg aag gta gtg gag ccg gcc tct gag cgt gag gga 672  
 Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly  
       210                          215                          220

ggg gag cgt gag gtg gag gac gtg ccg aag gta gtg gag ccg gcc tct 720  
 Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser  
 225 230 235 240

gag cgt gag gga ggg gag cgt gag gtg gag gac gtg ccg aag gta gtg 768  
 Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val  
 245 250 255

gag ccg gcc tct gag cgt gag gga ggg gag cgt gag gtg gag gac gtg 816  
 Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val  
 260 265 270

ccg aag gta gtg gag ccg gcc tct gag cgt gag gga ggg gag cgt gag 864  
 Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu  
 275 280 285

gtc gct tct cag cat acg aag cag cca tcc cac tcg gtt tcc aac tca 912  
 Val Ala Ser Gln His Thr Lys Gln Pro Ser His Ser Val Ser Asn Ser  
 290 295 300

gct ccc aat cag ttt cgg aaa ccc tga 939  
 Ala Pro Asn Gln Phe Arg Lys Pro  
 305 310

<210> 6  
 <211> 312  
 <212> PRT  
 <213> 梅毒密螺旋体

<400> 6  
 Met Phe Val Arg Ser Asp Met Phe Pro Lys Asn Thr Ala Val Glu Ile  
 1 5 10 15  
 Ser Asn Leu Glu Lys Asn Ala Lys Ala Gln Ala Val Val Ile Gly His  
 20 25 30  
 Ala Gly Ile Pro Gly Leu Leu Val Ser Leu Ala Pro Ala Ala Ala Ala  
 35 40 45  
 Gln Leu Gly Ile Gly Val Tyr Gln Ala Val Arg Val Arg Val Arg Thr  
 50 55 60

Leu Gly Thr Val Arg Gly Gly Ser Gln Thr Ser Gln Asp Gly Leu Ser  
65 70 75 80

Leu Ala Ser Leu Pro Ser Arg Val Pro Ala Arg Pro Ala Gln Arg Asp  
85 90 95

Pro Leu Ser Ser Pro Pro Ala Gly His Thr Val Pro Glu Tyr Arg Asp  
100 105 110

Thr Val Ile Phe Asp Asp Pro Arg Leu Val Ser Pro Leu Ser Arg Glu  
115 120 125

Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly  
130 135 140

Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser  
145 150 155 160

Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val  
165 170 175

Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val  
180 185 190

Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu  
195 200 205

Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly  
210 215 220

Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser  
225 230 235 240

Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val  
245 250 255

Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val  
260 265 270

Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu  
275 280 285

Val Ala Ser Gln His Thr Lys Gln Pro Ser His Ser Val Ser Asn Ser  
290 295 300

Ala Pro Asn Gln Phe Arg Lys Pro  
305 310

<210> 7  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> 梅毒密螺旋体

<400> 7  
Leu Val Ser Pro Leu Arg Glu Val Glu Asp Ala Pro Lys Val Val Glu  
1 5 10 15

Pro Ala Ser

<210> 8  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 梅毒密螺旋体

<400> 8  
Ser Arg Glu Val Glu Asp Ala Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu  
1 5 10 15

Arg Glu Gly Gly  
20

<210> 9  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 梅毒密螺旋体

<400> 9  
Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu  
1 5 10 15

Val Glu Asp Ala  
20

<210> 10

<211> 21

<212> PRT

<213> 梅毒密螺旋体

<400> 10

Pro Lys Asn Thr Ala Val Glu Ile Ser Asn Leu Glu Lys Asn Ala Lys  
 1                    5                    10                    15

Ala Gln Ala Val Val  
                          20

<210> 11

<211> 25

<212> PRT

<213> 梅毒密螺旋体

<400> 11

Gly His Ala Gly Ile Pro Gly Leu Leu Val Ser Leu Ala Pro Ala Ala  
 1                    5                    10                    15

Ala Ala Gln Leu Gly Ile Gly Val Tyr  
                          20                    25

<210> 12

<211> 25

<212> PRT

<213> 梅毒密螺旋体

<400> 12

Val Pro Ala Arg Pro Ala Gln Arg Asp Pro Leu Ser Ser Pro Pro Ala  
 1                    5                    10                    15

Gly His Thr Val Pro Glu Tyr Arg Asp  
                          20                    25

<210> 13

<211> 21

<212> PRT

<213> 梅毒密螺旋体

<400> 13

Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu  
 1                   5                   10                   15

Asp Val Pro Lys Val  
 20

<210> 14

<211> 26

<212> PRT

<213> 梅毒密螺旋体

<400> 14

Val Val Glu Pro Ala Ser Gly His Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Ala  
 1                   5                   10                   15

Ser Gln His Thr Lys Gln Pro Ser His Ser  
 20                   25

<210> 15

<211> 20

<212> PRT

<213>梅毒密螺旋体

<400> 15

Glu Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu  
 1                   5                   10                   15

Gly Gly Glu Arg  
 20

<210> 16

<211> 20

<212> PRT

<213> 梅毒密螺旋体

<400> 16

Glu Val Glu Asn Val Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu  
 1                   5                   10                   15

Gly Gly Glu Arg  
20

<210> 17

<211> 20

<212> PRT

<213> 梅毒密螺旋体

<400> 17

Glu Val Glu Asp Ala Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu  
1 5 10 15

Gly Gly Glu Arg  
20

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> 梅毒密螺旋体

<400> 18

Glu Val Glu Asp Val Pro Gly Val Val Glu Pro Ala Ser Gly His Glu  
1 5 10 15

Gly Gly Glu Arg  
20

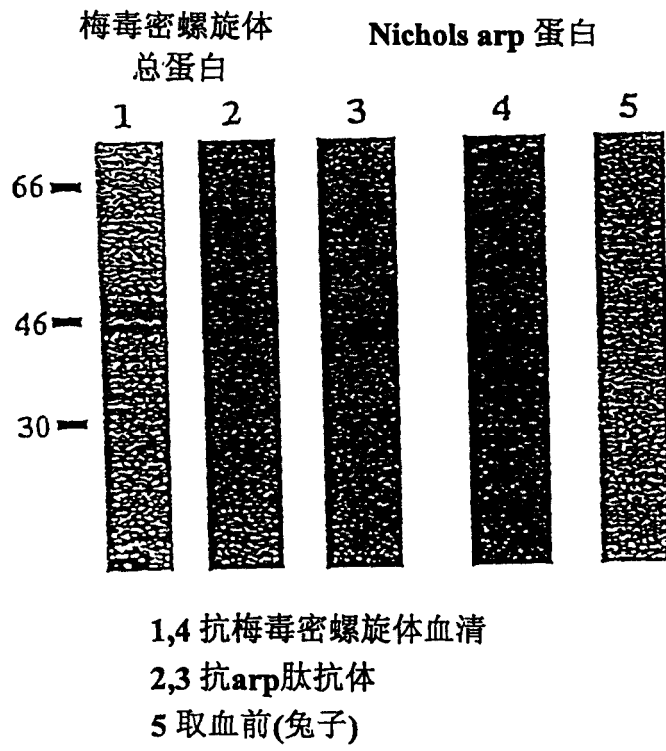


图1

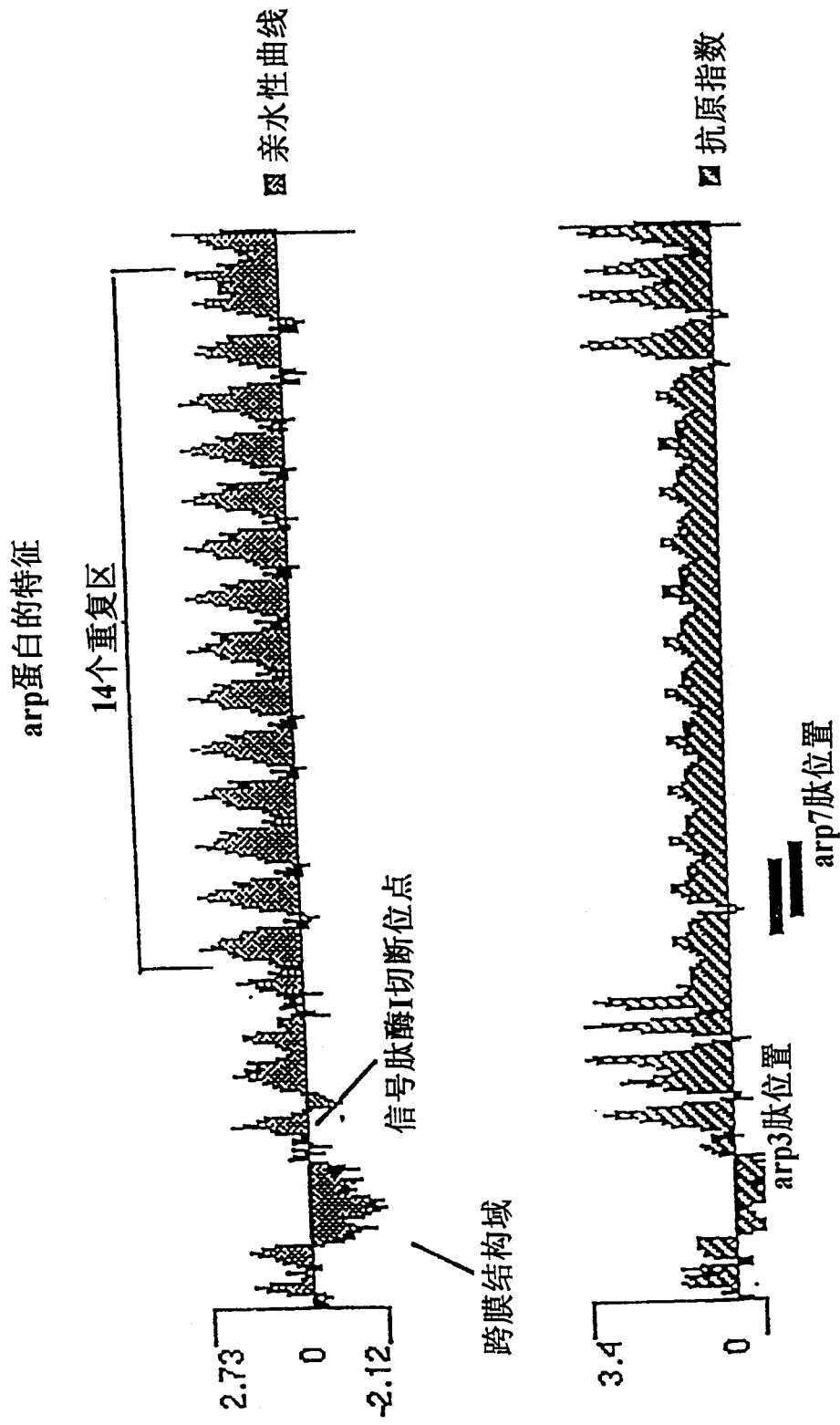


图2

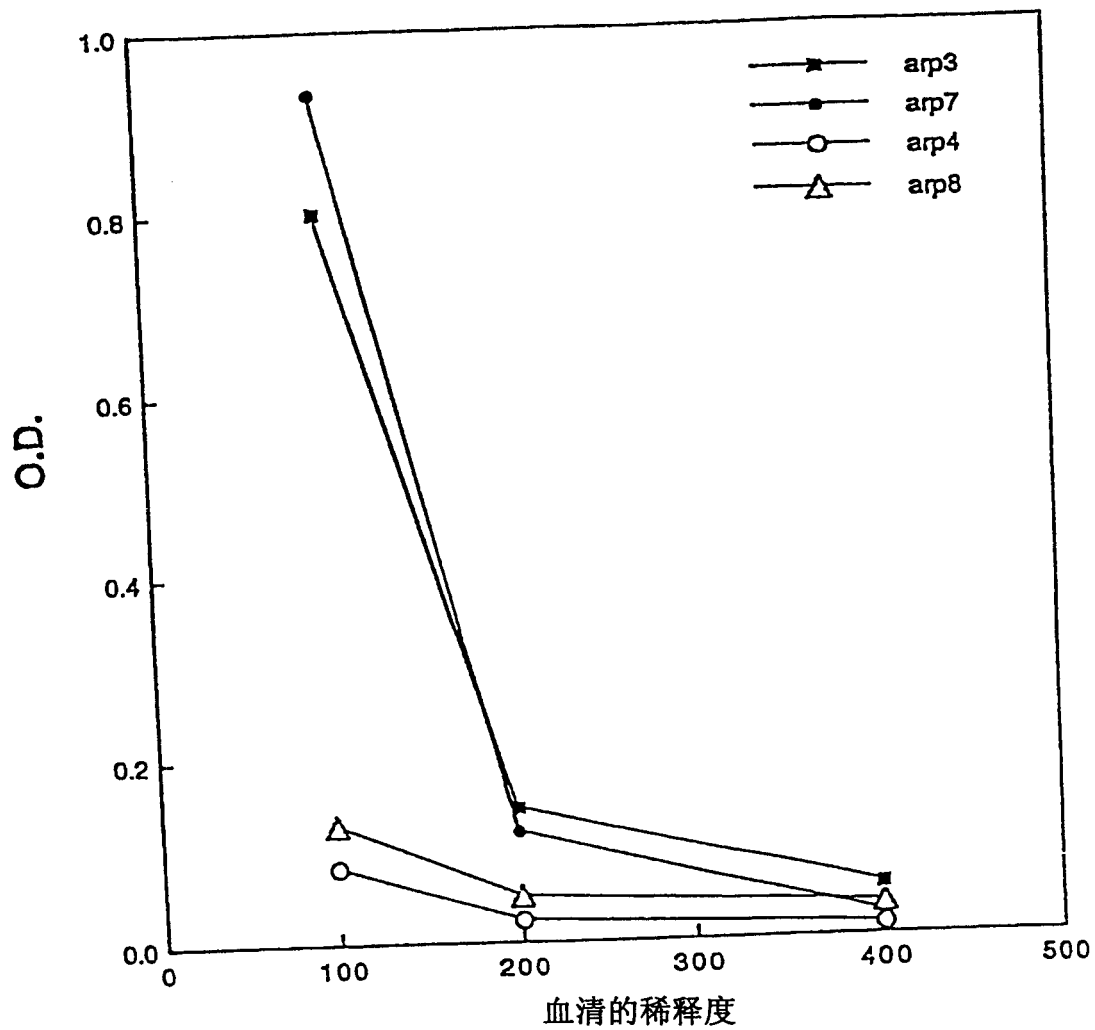


图3

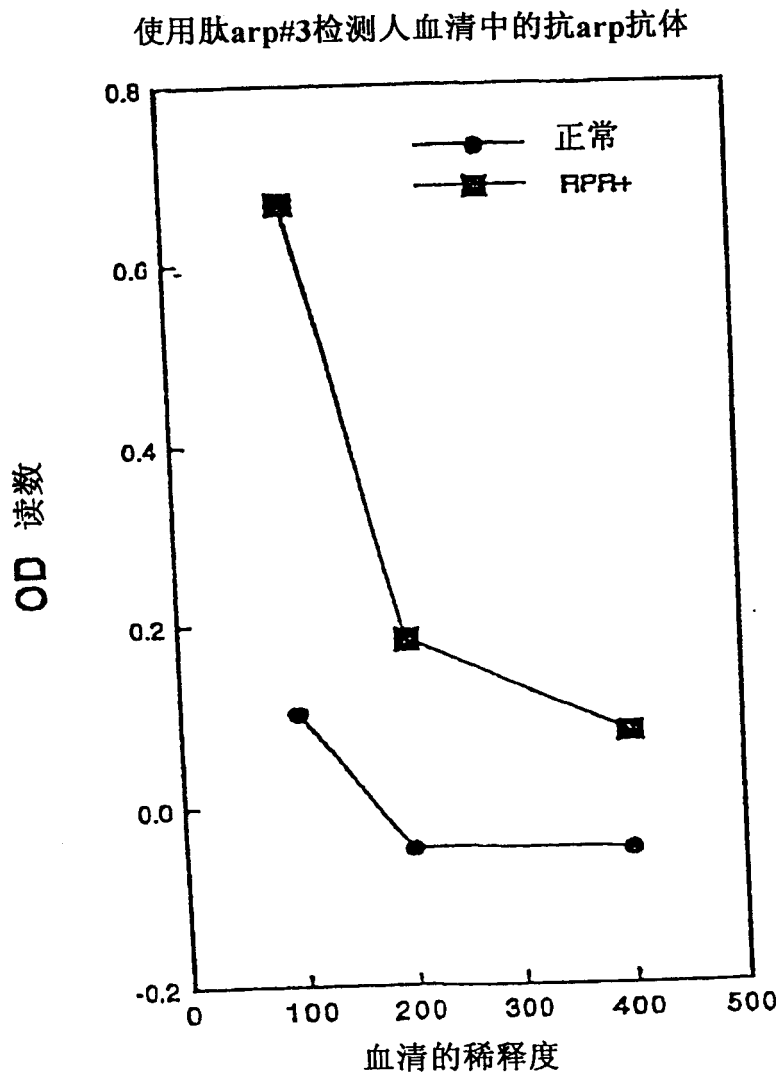


图4



梅毒密螺旋体苍白密螺旋体亚种(Ni)-arp蛋白质序列

MFVRSDFPK NTAVEISNLE KNAKAQAVVI GHAGIPGLLV SLAPAAAQL  
 GIGVYQAVRV RVRTLGTVRG GSQTSQDGLS LASLPSRVPA RPAQRDPLSS  
 PPAGHTVPEY RDTVIFDDPR LVSPLSR  
 I型: 1, 2, 4, 7, 8  
 II型: 3, 5, 9, 10, 11, 12  
 III型: 13, 14  
 IV型: 6

EVE DAPKVVVPAS EREGGER  
 EVE DAPKVVVPAS EREGGER  
 EVE DVPKVVVPAS EREGGER  
 EVE DAPKVVVPAS EREGGER  
 EVE DVPKVVVPAS EREGGER  
 EVE NVPKVVVPAS EREGGER  
 EVE DAPKVVVPAS EREGGER  
 EVE DAPKVVVPAS EREGGER  
 EVE DVPKVVVPAS EREGGER  
 EVE DVPKVVVPAS EREGGER  
 EVE DVPKVVVPAS EREGGER  
 EVE DVPKVVVPAS EREGGER  
 EVE DVPKVVVPAS EREGGER  
 EVE DVPKVVVPAS EREGGER  
 EVE DVPKVVVPAS EREGGER  
 EVE DVPKVVVPAS GHEGGER  
 EVE DVPKVVVPAS GHEGGER

EVA SQHTKQPSHS VSNSAPNQFR KP

图6

## 梅毒密螺旋体极密螺旋体亚种(CDC-2)核苷酸序列

ATGTTTGTGC	GCAGTGACAT	GTTCCCCAAA	AACACTGCTG	TTGAAATTAG
CAACTTAGAA	AAGAATGCCA	AGGCTCAGGC	AGTGGTTATT	GGGCACGCAG
GGATCCCCGG	TCTTCTAGTT	AGCCTTGAC	CCGCTGCTGC	AGCACAGCTT
GGGATTGGCG	TATACCAAGC	TGTGCGTGTA	CGCGTACGTA	CCTTGGGTAC
CGTGCCGGGT	GGGTCTCAAA	CAAGTCAGGA	CGGACTGTCC	CTTGCATCTT
TGCCGTCCCC	TGTGCCTGCG	CGCCCCGGCG	AGCGTGATCC	TCTGTCATCC
CCGCCGGCAG	GTCACACTGT	ACCGGAATAT	CGCGATACGG	TTATTTTCGA
TGACCCCGCGT	TTGGTTTCCC	CTTTGTCTCG	TGAGGTGGAG	GACGTGCCGA
AGGTAGTGA	GCCGGCCTCT	GAGCGTGAGG	GAGGGGAGCG	TGAGGTGGAG
GACGTGCCGA	AGGTAGTGA	GCCGGCCTCT	GAGCGTGAGG	GAGGGGAGCG
TGAGGTGGAG	GACGTGCCGA	AGGTAGTGA	GCCGGCCTCT	GAGCGTGAGG
GAGGGGAGCG	TGAGGTGGAG	GACGTGCCGA	AGGTAGTGA	GCCGGCCTCT
GAGCGTGAGG	GAGGGGAGCG	TGAGGTGGAG	TCTCAGCATA	CGAAGCAGCC
ATCCCACTCG	GTTTCCAAC	CAGCTCCCAA	TCAGTTTCGG	AAACCCTGA

图7

梅毒密螺旋体极细密螺旋体亚种(CDC-2)arp蛋白质序列

MFVRSDFPK NTA VEISNLE KNAKAQAVVI GHAGIPGLLV SLAPAAAQL  
GIGVYQAVRV RVRTLGTVRG GSQTSQDGLS LASLPSRVPA RPAQRDPLSS  
PPAGHTVPEY RDTVIFDDPR LVSPLSR

EVE DVPKVVEPAS EREGGER  
EVE DVPKVVEPAS EREGGER  
EVE DVPKVVEPAS EREGGER  
EVE DVPKVVEPAS EREGGER

EVA SQHTKQPSHS VSNSAPNQFR KP

图8

梅毒螺旋体地方性密螺旋体亚种(*Boxnia*)核苷酸序列

ATGTTTGTGC	GCAGTGACAT	GTTCCCCAAA	AACACTGCTG	TTGAAATTAG
CAACTTAGAA	AAGAA TGCCA	AGGCTCAGGC	AGTGGTTATT	GGGCACGCAG
GGATCCCCGG	TCTTCTAGTT	AGCCTTGCCAC	CCGCTGCTGC	AGCACAGCTT
GGGATTGGCG	TATACCAAGC	TGTGGTGTA	CGCGTACGTA	CCTTGGGTAC
CGTGCGCGGT	GGTCTCAAA	CAAGTCAGGA	CGGACTGTCC	CTTGCACTCT
TGCCGTCCCG	TGTCCCTGCG	CGCCCCGGC	AGCGTGATCC	TCTGTCAATCC
CCGCCGGCAG	GTCACACTGT	ACCGAATAT	CGCGATACGG	TTATTTTCGA
TGACCCCGCT	TTGGTTTCCC	CTTTGTCTCG	TGAGGTGGAG	GACGTGCCGA
AGGTAGTGGA	GCCGGCCTCT	GAGCGTGAGG	GAGGGGAGCG	TGAGGTGGAG
GACGTGCCGA	AGGTAGTGGA	GCCGGCCTCT	GAGCGTGAGG	GAGGGGAGCG
TGAGGTGGAG	GACGTGCCGA	AGGTAGTGGA	GCCGGCCTCT	GAGCGTGAGG
GAGGGGAGCG	TGAGGTGGAG	GACGTGCCGA	AGGTAGTGGA	GCCGGCCTCT
GAGCGTGAGG	GAGGGGAGCG	TGAGGTGGAG	GACGTGCCGA	AGGTAGTGGA
GCCGGCCTCT	GAGCGTGAGG	GAGGGGAGCG	TGAGGTGGAG	GACGTGCCGA
AGGTAGTGGA	GCCGGCCTCT	GAGCGTGAGG	GAGGGGAGCG	TGAGGTGGAG
GACGTGCCGA	AGGTAGTGGA	GCCGGCCTCT	GAGCGTGAGG	GAGGGGAGCG
TGAGGTGGAG	GACGTGCCGA	AGGTAGTGGA	GCCGGCCTCT	GAGCGTGAGG
GAGGGGAGCG	TGAGGTGGCT	TCTCAGCATA	CGAAGCAGCC	ATCCCCACTCG
GTTTCCAAC	CAGTCCCCAA	TCAGTTTTCGG	AAACCCCTGA	

图9

梅毒螺旋体地方性密螺旋体亚种(Bosnia)arp蛋白质序列

MFVRSDFPK NTAVEISNLE KNAKAQAVVI GHAGIPGLLV SLAPAAAAQL  
 GIGVYQAVRV RVRTLGTVRG GSQTSQDGLS LASLPSRVPA RPAQRDPLSS  
 PPAGHTVPEY RDTVIFDDPR LVSPLSR

EVE DVPKVVEPAS EREGGER  
 EVE DVPKVVEPAS EREGGER  
 EVE DVPKVVEPAS EREGGER  
 EVE DVPKVVEPAS EREGGER  
 EVE DVPKVVEPAS EREGGER  
 EVE DVPKVVEPAS EREGGER  
 EVE DVPKVVEPAS EREGGER  
 EVE DVPKVVEPAS EREGGER

EVA SQHTKQPSHS VSNSAPNQFR KP

图10

arp #1 SEQ ID NO: 7	LVSPLE REVEDAPKVVEPAS-
arp #2 SEQ ID NO: 8	-SR-EVED APKVVEPASEREGG-
arp #3 SEQ ID NO: 9	-PK VVEPASEREGGEREVEDA-
TP-arp #4 SEQ ID NO: 10	PKNTAVEISNLE KNAKAQAVV
TP-arp #5 SEQ ID NO: 11	GHAGIPGLLV SLAPAAAAQLGIGVY
TP-arp #6 SEQ ID NO: 12	VPA RPAQRDPLSS PPAGHTVPEY RD
TP-arp #7 SEQ ID NO: 13	VVEPAS EREGGEREVE DVPKV
TP-arp #8 SEQ ID NO: 14	VVEPASGHEGGEREVA SQHT KQPSHS
TP-arp #9 SEQ ID NO: 15	EVEDVPKVVEPASEREGGER
TP-arp #10 SEQ ID NO: 16	EVENVPKVVEPASEREGGER
TP-arp #11 SEQ ID NO: 17	EVEDAPKVVEPASEREGGER
TP-arp #12 SEQ ID NO: 18	EVEDVPGVVEPASGHEGGER

**图11**

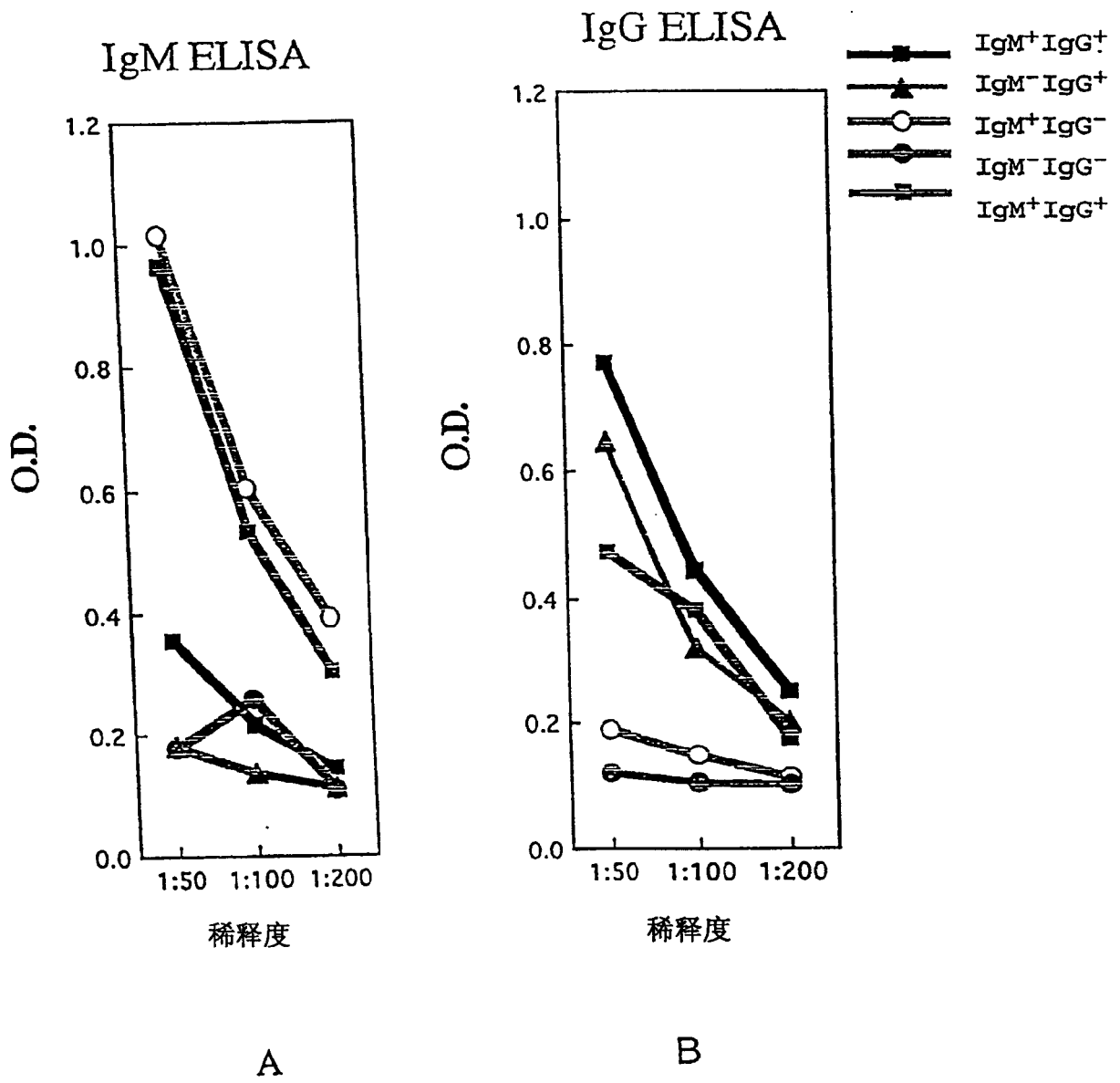


图12

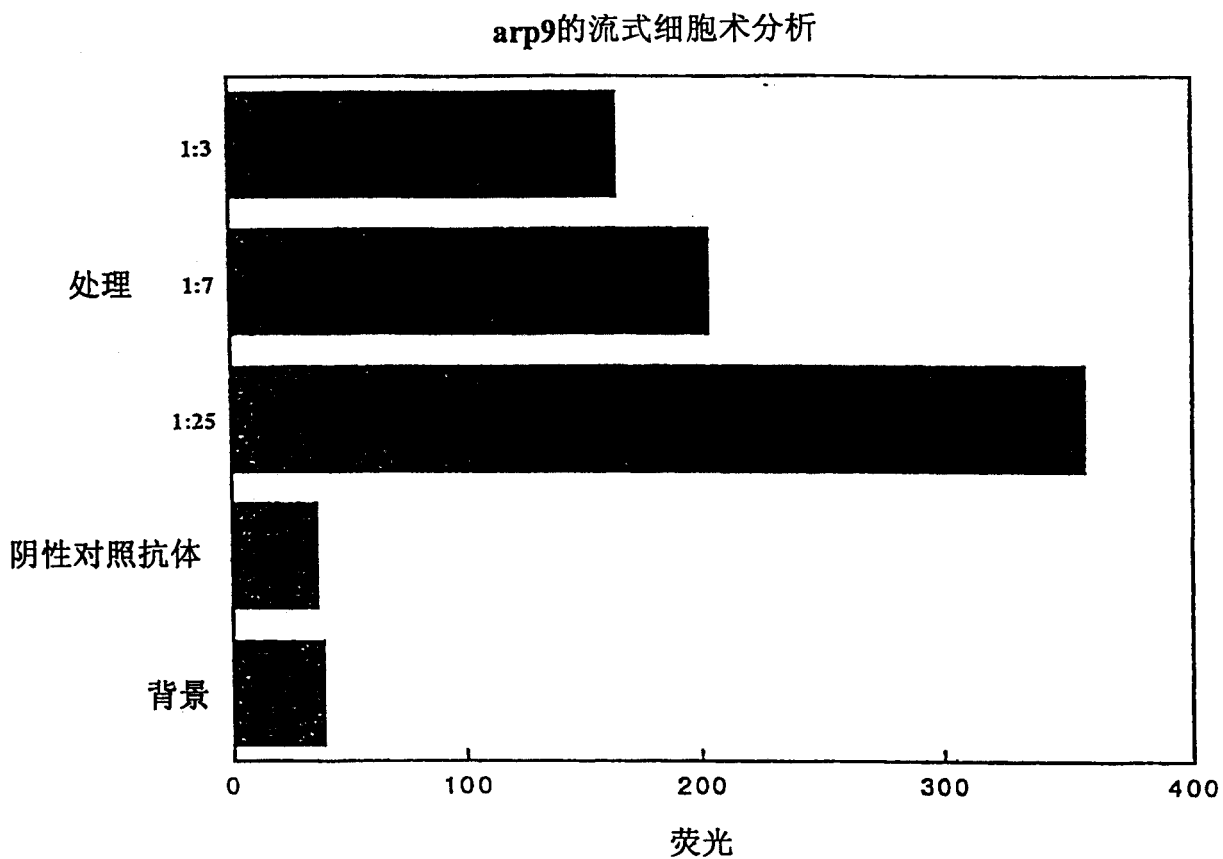
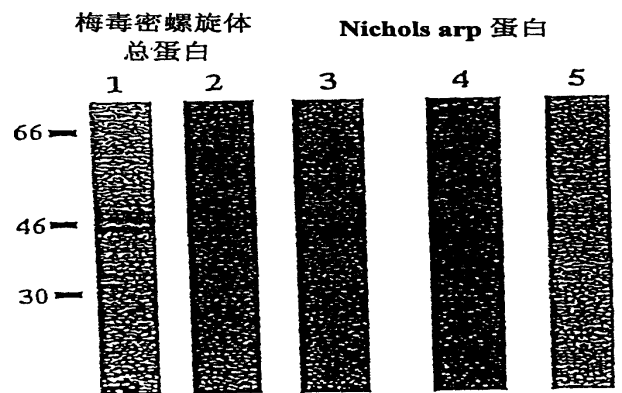


图13

专利名称(译)	检测梅毒密螺旋体的组合物和方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1185255C</a>	公开(公告)日	2005-01-19
申请号	CN00808942.6	申请日	2000-06-14
[标]申请(专利权)人(译)	美国政府健康及人类服务部, 疾病控制和预防中心		
[标]发明人	刘曦		
发明人	刘曦 布雷特·斯坦纳 伯塔·罗兹		
IPC分类号	A61K39/002 A61K39/02 C07K14/20 C07K16/12 C07K16/20 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/569 G01N33/571		
CPC分类号	G01N33/571 G01N2333/20 C07K14/20		
代理人(译)	王维玉 丁业平		
优先权	60/138981 1999-06-14 US		
其他公开文献	CN1399722A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供特异性和高灵敏性检测梅毒密螺旋体感染的方法, 包括使用只有梅毒密螺旋体才有的特异性抗原蛋白和肽。特别是, 本发明提供了基于识别酸性重复蛋白的检测试验。本发明的方法在感染早期阶段检测初期梅毒是特别有用的。此外, 本发明的方法和组合物涉及鉴别检测具体密螺旋体属感染, 能够鉴定针对具体密螺旋体属病状的病原体: 梅毒-梅毒密螺旋体苍白密螺旋体亚种、雅司病-梅毒密螺旋体极细密螺旋体亚种和非性病性梅毒-梅毒密螺旋体地方性密螺旋体亚种。



1,4 抗梅毒密螺旋体血清  
2,3 抗arp肽抗体  
5 取血前(兔子)