



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102869991 B

(45) 授权公告日 2016. 04. 27

(21) 申请号 201180016822. 3

(22) 申请日 2011. 03. 31

(30) 优先权数据

2010-083822 2010. 03. 31 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 09. 28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2011/058282 2011. 03. 31

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/125872 JA 2011. 10. 13

(73) 专利权人 积水医疗株式会社

地址 日本东京都

专利权人 日本羔羊有限公司

(72) 发明人 原康之 大田哲也 川本道子

佐藤真也 岩本繁久 岛冈达郎

须藤薰雄

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

公司 11227

代理人 金世煜 苗堃

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

C07K 14/20(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/545(2006. 01)

G01N 33/571(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 00/47613 A1, 2000. 08. 17,

JP 2003-337134 A, 2003. 11. 28,

WO 88/02403 A1, 1988. 04. 07,

CN 1370782 A, 2002. 09. 25,

郭清顺 等. 梅毒螺旋体 47 ku 抗原的分段表达及抗原表位分析. 《厦门大学学报(自然科学版)》. 2008, 第 47 卷 (第 6 期), 第 874-878 页.

杜兰英 等. 梅毒螺旋体 TPN17 重组抗原的表达及其在鲜血筛查中的应用. 《中国输血杂志》. 2001, 第 14 卷 (第 1 期), 第 11-13 页.

审查员 赵晓明

权利要求书1页 说明书13页

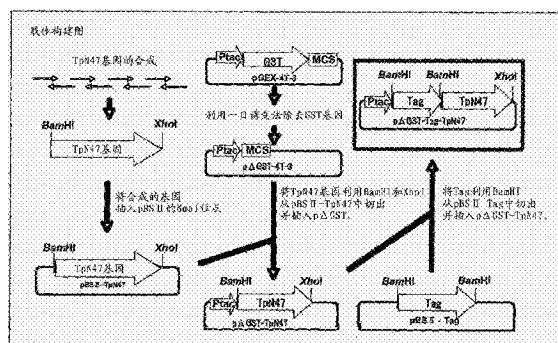
序列表10页 附图4页

(54) 发明名称

抗梅毒螺旋体抗体测定试剂

(57) 摘要

本发明提供高灵敏度且高特异性地测定抗梅毒螺旋体抗体的使用了多肽抗原的抗梅毒螺旋体抗体测定试剂以及利用该抗梅毒螺旋体抗体测定试剂的测定方法。一种抗梅毒螺旋体抗体测定试剂,其特征在于,在利用了抗原抗体反应的、用于测定抗梅毒螺旋体抗体的试剂中,将至少包含梅毒螺旋体 47kDa 抗原中的结构域 C 和 D 而不包含梅毒螺旋体 47kDa 抗原中的结构域 A1 的重组多肽用作抗原。



1. 一种抗梅毒螺旋体抗体测定试剂,其特征在于,在利用了抗原抗体反应的、用于使用免疫凝聚测定抗梅毒螺旋体抗体的试剂中,将至少包含梅毒螺旋体 47kDa 抗原中的结构域 C 和 D 而不包含梅毒螺旋体 47kDa 抗原中的结构域 A1 的重组多肽用作抗原,

所述抗原被固定于作为不溶性载体的由高分子聚合物构成的乳胶粒子,

其中,从氨基酸序列的 N 末端开始数,所述结构域 A1 由第 1 ~ 34 个构成,所述结构域 C 由第 208 ~ 335 个构成,所述结构域 D 由第 336 ~ 415 个构成。

2. 根据权利要求 1 所述的抗梅毒螺旋体抗体测定试剂,其中,抗原为由梅毒螺旋体 47kDa 抗原中的结构域 C 和 D,结构域 A2、C 和 D,或者结构域 B、A2、C 和 D 构成的重组多肽,

其中,从氨基酸序列的 N 末端开始数,所述结构域 A2 由第 157 ~ 207 个构成,所述结构域 B 由第 35 ~ 156 个构成。

3. 根据权利要求 2 所述的抗梅毒螺旋体抗体测定试剂,其中,所述重组多肽不受到翻译后的修饰。

4. 一种抗梅毒螺旋体抗体测定方法,其特征在于,使用权利要求 1 所述的抗梅毒螺旋体抗体测定试剂。

5. 一种抗梅毒螺旋体抗体测定方法,其特征在于,使用权利要求 2 所述的抗梅毒螺旋体抗体测定试剂。

6. 一种抗梅毒螺旋体抗体测定方法,其特征在于,使用权利要求 3 所述的抗梅毒螺旋体抗体测定试剂。

抗梅毒螺旋体抗体测定试剂

技术领域

[0001] 本发明涉及灵敏度和特异性高的抗梅毒螺旋体抗体测定试剂以及使用该抗梅毒螺旋体抗体测定试剂的测定方法。

背景技术

[0002] 梅毒是由梅毒螺旋体菌(梅毒螺旋体, *Treponema Pallidum*) 的感染引起的疾病。由于开发出了青霉素等有效的治疗药,梅毒的患病率在 1940 年以后减少,但近年来再次显示增加的趋势。作为近年来的梅毒新患病患者的特征,可举出大多并发 HIV 感染病这一点。作为高并发率的原因,认为梅毒、HIV 均为性感染病,并且梅毒提高 HIV 感染风险。在这样的状况下,为了防止扩大梅毒和 HIV 的感染,要求早期发现并治疗梅毒患者。

[0003] 是否患有梅毒是通过在免疫学上检查血液中是否存在抗梅毒螺旋体抗体来进行诊断的。在梅毒螺旋体菌体的菌体表面存在大量的表面抗原,通过利用该表面抗原与样品中的抗梅毒螺旋体抗体的抗原抗体反应而进行免疫测定。作为在梅毒螺旋体菌体的菌体表面存在的表面抗原中的主要抗原,已知有分子量为 47kDa、42kDa、37kDa、17kDa 和 15kDa 的抗原。

[0004] 现在,作为用于梅毒诊断的梅毒螺旋体菌体的表面抗原,利用如下得到的抗原:在家兔睾丸中培养梅毒螺旋体菌,用表面活性剂等进行增溶溶解、提取,进而用各种方法进行不溶物除去、必要成分的纯化。这样制备的来自梅毒螺旋体菌的抗原由于与抗梅毒螺旋体抗体的特异性高,能够早期发现梅毒患者。但是,在如上所述的使用了家兔的抗原制造方法中,由于将家兔睾丸作为宿主,所以产量受到限制,而且梅毒螺旋体菌的增殖状态存在家兔个体差异,难以确保大量稳定的产量。应予说明,目前,直接人工培养梅毒螺旋体菌未获得成功。

[0005] 近年来,提出了利用了基因重组技术的梅毒螺旋体菌的菌体表面抗原的制造方法。对于梅毒 47kDa 抗原,克隆了编码的基因,确定了由 415 个氨基酸构成的氨基酸序列(例如,非专利文献 1、非专利文献 3)。另外,关于其晶体结构、生物学作用也进行了报告,已知 A、B、C 和 D 这 4 个结构域结构(例如,非专利文献 2、非专利文献 3)。

[0006] 根据非专利文献 3,从氨基酸序列的 N 末端开始数,结构域 A 由第 1 ~ 34 个(A1 结构域)和第 157 ~ 207 个(A2 结构域)构成,结构域 B 由第 35 ~ 156 个构成,结构域 C 由第 208 ~ 335 个构成,结构域 D 由第 336 ~ 415 个构成(参照非专利文献 3、图 1)。

[0007] 进而,关于上述 47kDa 抗原的抗体识别部位,还报告了显示抗原活性的氨基酸序列(例如,非专利文献 4)。

[0008] 作为使用了上述抗原的抗梅毒螺旋体抗体测定方法,公开了利用基因重组技术制作梅毒 47kDa 抗原并利用该梅毒 47kDa 抗原在免疫学上测定抗梅毒螺旋体抗体的方法(参照专利文献 1)。另外,还公开了使用在 15kDa 和 17kDa 的抗原的 N 末端融合有谷胱甘肽-S-转移酶的蛋白质的方法(参照专利文献 2)。

[0009] 另一方面,除了利用基因重组技术的抗原制作以外,关于 47kDa 抗原,还公开了通

过合成具有抗原活性的肽并将其用作抗原而测定抗梅毒螺旋体抗体的方法(参照专利文献3)。

[0010] 专利文献

[0011] 专利文献1:国际公开 W01988/02403 号小册子

[0012] 专利文献2:日本特开平 7-287017 号公报

[0013] 专利文献3:日本特开 2001-264334 号公报

[0014] 非专利文献

[0015] 非专利文献1:Infection and Immunity, Vol. 60 (4), p. 1568-1576, (1992)

[0016] 非专利文献2:The Journal of Biological Chemistry, Vol. 277 (44), p. 41857-41864, (2002)

[0017] 非专利文献3:NCBI (National Center for Biotechnology Information), MMDB ID :21051

[0018] 非专利文献4:Journal of immunology, Vol. 157, p. 720-731, (1996)

发明内容

[0019] 虽然用由这样的方法制备的梅毒螺旋体的重组抗原以及合成肽抗原也能够进行抗梅毒螺旋体抗体的测定,但是利用基因重组技术制作的梅毒螺旋体的重组抗原存在灵敏度、特异性低的问题。另外,关于合成肽抗原,除了同样的问题以外,还存在如下问题:要精度良好地测定抗梅毒螺旋体抗体,就需要组合多种肽,在操作上繁杂。

[0020] 作为产生这些问题的因素,虽然详细情况还不明确,但可以考虑以下原因。即,认为利用基因重组技术制作的梅毒螺旋体的重组抗原与来自梅毒螺旋体菌的天然抗原相比,其立体结构以及脂质的修饰等存在不同。一般地,蛋白质在进行翻译后受到各种修饰。糖或者脂质的修饰等是它们中的代表性修饰,蛋白质通过受到这样的修饰而使其立体结构发生变化。另一方面,在基因重组技术中主要使用的利用大肠杆菌的表达体系中,不进行蛋白质的翻译后的修饰。蛋白质的立体结构在显示其抗原性上是重要的因素,但是利用基因重组技术制作的重组蛋白质由于不受到翻译后的修饰,所以与天然抗原相比,在立体结构上产生不同,考虑这对灵敏度、特异性带来影响的可能性。

[0021] 本发明鉴于上述内容,目的在于提供高灵敏度且高特异性地测定抗梅毒螺旋体抗体的使用了多肽抗原的抗梅毒螺旋体抗体测定试剂以及使用该抗梅毒螺旋体抗体测定试剂的测定方法。

[0022] 因此,本发明的发明人着眼于属于梅毒螺旋体菌体表面抗原的分子量 47kDa 抗原,利用基因重组技术制作该 47kDa 抗原及其一部分的多肽,并研究了使用其的抗梅毒螺旋体抗体试剂系中的灵敏度和特异性,结果发现尽管由结构域 C 构成的重组多肽、以及由结构域 D 构成的重组多肽的各自单独几乎不反应,但对于由结构域 C 和 D 构成的重组多肽,由结构域 A2、C 和 D 构成的重组多肽,由结构域 B、A2、C 和 D 构成的重组多肽而言,与重组 47kDa 抗原相比,灵敏度显著提高,其灵敏度能够匹敌天然抗原,从而完成了本发明。

[0023] 即,本发明如下。

[0024] (1) 一种抗梅毒螺旋体抗体测定试剂,其特征在于,在利用了抗原抗体反应的、用于测定抗梅毒螺旋体抗体的试剂中,将至少包含梅毒螺旋体 47kDa 抗原中的结构域 C 和 D

而不包含梅毒螺旋体 47kDa 抗原中的结构域 A1 的重组多肽用作抗原。

[0025] (2) 根据(1)所述的抗梅毒螺旋体抗体测定试剂,其中,抗原为由梅毒螺旋体 47kDa 抗原中的结构域 C 和 D,结构域 A2、C 和 D,或者结构域 B、A2、C 和 D 构成的重组多肽。

[0026] (3)根据(1)所述的抗梅毒螺旋体抗体测定试剂,其中,抗原被固定于不溶性载体。

[0027] (4)根据(2)所述的抗梅毒螺旋体抗体测定试剂,其中,抗原被固定于不溶性载体。

[0028] (5)一种抗梅毒螺旋体抗体测定试剂,其中,(3)所述的不溶性载体为由高分子聚合物构成的乳胶。

[0029] (6)一种抗梅毒螺旋体抗体测定试剂,其中,(4)所述的不溶性载体为由高分子聚合物构成的乳胶。

[0030] (7)一种抗梅毒螺旋体抗体测定方法,其特征在于,使用(1)所述的抗梅毒螺旋体抗体测定试剂。

[0031] (8)一种抗梅毒螺旋体抗体测定方法,其特征在于,使用(2)所述的抗梅毒螺旋体抗体测定试剂。

[0032] (9)一种抗梅毒螺旋体抗体测定方法,其特征在于,使用(3)所述的抗梅毒螺旋体抗体测定试剂。

[0033] (10)一种抗梅毒螺旋体抗体测定方法,其特征在于,使用(4)所述的抗梅毒螺旋体抗体测定试剂。

[0034] (11)一种抗梅毒螺旋体抗体测定方法,其特征在于,使用(5)所述的抗梅毒螺旋体抗体测定试剂。

[0035] (12)一种抗梅毒螺旋体抗体测定方法,其特征在于,使用(6)所述的抗梅毒螺旋体抗体测定试剂。

[0036] 根据本发明,使用能够大量稳定地获得品质均一的抗原的重组梅毒螺旋体抗原多肽,能够高灵敏度且特异性地测定抗梅毒螺旋体抗体,能够进行更正确的梅毒诊断。

附图说明

[0037] 图 1 表示递归 PCR 图像图。

[0038] 图 2 表示表达载体构建的图像图。

[0039] 图 3 是表示使用了各抗原时的 38T. U. 下的吸光度变化量的图。

[0040] 图 4 是表示使用了各抗原时的 119T. U. 下的吸光度变化量的图。

[0041] 图 5 是表示使用了各抗原时的 240T. U. 下的吸光度变化量的图。

具体实施方式

[0042] 本发明的利用了抗原抗体反应的抗梅毒螺旋体抗体的测定试剂的特征是将至少包含梅毒螺旋体 47kDa 抗原中的结构域 C 和 D 而不包含梅毒螺旋体 47kDa 抗原中的结构域 A1 的重组多肽用作抗原。

[0043] 作为用于本发明的重组多肽抗原的具体例,是由属于梅毒螺旋体菌体表面抗原的 47kDa 抗原的一部分的结构域 C 和 D,结构域 A2、C 和 D,或者结构域 B、A2、C 和 D 构成的重组多肽,优选分子量小且与用来自梅毒螺旋体菌的抗原制作的试剂(Mediate (注册商标) TPLA,积水医疗公司制)相关性良好的由结构域 C 和 D 构成的重组多肽,由结构域 A2、C 和 D

构成的重组多肽,进一步优选由结构域 C 和 D 构成的重组多肽。

[0044] 作为上述各多肽,含有氨基酸序列中同源性的 90% 以上的多肽,更优选同源性为 95% 以上的多肽,进一步优选同源性为 98% 以上的多肽。

[0045] 作为获得使作为上述 47kDa 抗原的一部分的多肽表达的 DNA 片段的方法,有 i) 由梅毒菌体通过基因的克隆、或者通过基因合成而得到 47kDa 抗原基因全长,用适当的限制性内切酶等将编码不需要的多肽部分的 DNA 片段删除后导入表达载体的方法; ii) 制作梅毒菌体的 cDNA 库,使用适当的 DNA 引物,利用 PCR 法等扩增编码各多肽的 DNA 片段后,导入表达载体的方法; iii) 将编码各多肽的 DNA 片段直接合成或者利用 PCR 法等而合成后导入表达载体的方法等,但不特别限定。

[0046] 关于上述表达载体,也没有特别限定。例如,可举出质粒、粘粒、噬菌体、病毒等。

[0047] 作为表达被纳入到表达载体的各多肽抗原的宿主,可以是培养细胞、大肠杆菌等微生物,蚕等,没有特别限定,但大肠杆菌、培养细胞等是代表性宿主。

[0048] 为了有效率地表达上述各多肽、或者使其表达后的纯化容易,也可以使其与其它蛋白质(以下称为标记蛋白质)的融合蛋白质的形式表达。作为标记蛋白质,有 β -半乳糖苷酶、谷胱甘肽 S 转移酶、6 $\times$ 组氨酸、作为来自苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis* 菌)的杀虫蛋白质的 Cry 蛋白质(WO2010/013789 中记载)等,但没有特别限定。另外,使其以融合蛋白质的形式表达后,在纯化过程中不需要一定除去标记蛋白质,可以直接使用。

[0049] 本发明的免疫学测定试剂没有用特别限定,例如,能够使用免疫凝集、酶免疫测定(EIA)、荧光免疫测定(FIA)、免疫层析等,优选用于使上述抗原担载于不溶性载体的免疫凝集的方法。

[0050] 上述不溶性载体没有特别限定,例如,可举出有机高分子粉末、微生物、血球、细胞膜片等。其中,优选有机高分子粉末。作为上述有机高分子粉末,例如,可举出天然高分子粉末、合成高分子粉末等。作为上述天然高分子粉末,例如,可举出不溶性琼脂糖、纤维素、不溶性葡聚糖等。作为上述合成高分子粉末,例如,可举出聚苯乙烯、苯乙烯-磺酸(盐)共聚物、苯乙烯-甲基丙烯酸共聚物、丙烯腈-丁二烯-苯乙烯共聚物、氯乙烯-丙烯酸酯共聚物、乙酸乙烯酯-丙烯酸酯共聚物等。

[0051] 另外,上述不溶性载体可以使用在表面导入有磺酸基、羧基、氨基等的的不溶性载体。

[0052] 作为上述不溶性载体,特别优选使合成高分子粉末均匀地悬浮的乳胶粒子。此外,还可以使用塑料制微量滴定板;动物的红血球、细菌细胞等生物学粒子;膨润土、火棉胶、胆固醇结晶、二氧化硅、高岭土、碳粉等非生物学粒子等。

[0053] 上述乳胶粒子的粒径没有特别限定,但在用电子显微镜的测定中,优选的下限为 0.05 μm 、优选的上限为 1.5 μm 。若上述乳胶粒子的粒径小于 0.05 μm ,则有时由凝集所致的光学变化量小,得不到测定所必需的高灵敏度。若上述乳胶粒子的粒径超过 1.5 μm ,则有时由乳胶粒子的凝集所致的光学变化量超过可测定区域,测定范围变小。上述乳胶粒子的粒径的优选的下限为 0.1 μm 、更优选的上限为 0.8 μm 。

[0054] 作为使上述梅毒螺旋体重组抗原固定于上述不溶性载体的方法,没有特别限定,可以使用通过物理或化学结合而使之担载的现有公知的方法。作为物理性吸附的方法,例如,可以通过在一定条件下混合重组抗原与不溶性载体而使之担载。进而,在上述固定工序

后,也可以用白蛋白、酪蛋白、表面活性剂等免疫学非活性物质来被覆不溶性载体,优选使用白蛋白。

[0055] 上述白蛋白没有特别限定,可使用存在于动物血液中的白蛋白。作为动物种类,可举出牛、马、兔子、山羊和人等。在上述被覆工序中,白蛋白的浓度没有特别限定,优选的下限为 0.01 重量%,优选的上限为 10 重量%。若上述白蛋白的浓度小于 0.01 重量%,则不溶性载体表面未被充分被覆,因此发生非特异性凝集,若多于 10 重量%,则校正曲线灵敏度反而降低,因此更优选 0.1 ~ 5 重量%。

[0056] 作为用非活性物质被覆上述不溶性载体的方法,例如,可通过使重组抗原担载于不溶性载体后,在一定条件下混合非活性物质而进行被覆。另外,反应时的 pH 没有特别限定,优选的下限为 2,优选的上限为 12。若上述 pH 小于 2、或者高于 12,则产生重组抗原发生变性等问题,因此更优选 pH4 ~ 10。反应时的温度没有特别限定,优选的下限为 2℃,优选的上限为 50℃。就上述温度而言,若小于 2℃,则不能充分反应,或者反应体系冷冻,难以得到具有必要灵敏度的载体,若高于 50℃,则产生重组抗原发生变性等问题,因此更优选 2 ~ 10℃。

[0057] 这样得到的担载有重组抗原的载体没有特别限定,但使之悬浮于含有免疫学非活性的物质的缓冲液中。作为免疫学非活性的物质,没有特别限定,可以使用白蛋白、酪蛋白、表面活性剂(合成高分子化合物)、合成磷脂质、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇等,优选白蛋白、合成磷脂质。

[0058] 在担载于上述不溶性载体的工序、进一步利用非活性物质进行被覆的工序、以及使担载有抗原的载体悬浮的工序中,所使用的溶剂没有特别限定,例如,可举出磷酸缓冲液、Tris 盐酸缓冲液、甘氨酸缓冲液、Good 缓冲液等。

[0059] 对这样得到的担载有抗原的乳胶粒子悬浮液添加样品,使之反应一定时间。反应后,以光学测定或目视来确定利用担载于乳胶粒子的重组抗原与样品中的抗梅毒螺旋体抗体的抗原抗体反应而产生的凝集的程度,从而能够测定样品中的抗梅毒螺旋体抗体量。

[0060] 作为光学测定上述凝集程度的方法,没有特别限定,可使用公知的方法,例如,可举出以浊度增加的方式捕获凝集形成的比浊法、以粒度分布或者平均粒径变化的方式捕获凝集形成的方法、用积分球测定由凝集形成所致的前方散射光的变化并比较与透射光强度之比的积分球光度浊度法等。另外,还可以并用这些方法。

[0061] 在上述测定法中,可以利用在不同时刻至少得到 2 个测定值并基于这些时刻间的测定值的增加速度求出凝集程度的速度试验(速度分析),或者在某一时刻(通常为被认为是反应终点的时刻)得到 1 个测定值并基于该测定值求出凝集程度的终点试验(终点分析)。从测定的简便性、迅速性方面考虑,优选进行利用比浊法的速度试验。

[0062] 进行上述测定时的光波长优选 250 ~ 1000nm,更优选 540 ~ 800nm。

[0063] 用于上述光学测定方法的装置可举出能够检测散射光强度、透射光强度、吸光度等的装置,只要是通常使用的生物化学自动分析装置,就可以使用任意装置。

[0064] 以目视观察上述凝集程度的方法通常可以使用在判定板上混合含有样品和乳胶粒子悬浮液的溶液,摇动混合液后,判定有无凝集的方法等。应予说明,对于凝集程度的观察,除了利用目视的方法以外,还可以使用用摄像机等拍摄凝集状态并实施图像处理的方法。

[0065] 作为上述样品,只要是有存在抗螺旋体抗体的可能性的样品,就没有特别限定,例如,可举出人或者动物的血液、血浆、血清等。

[0066] 作为进行上述抗原抗体反应时的反应体系的反应液,只要是满足能够引起抗原抗体反应的生理条件的水溶液,就没有特别限定,例如,可举出磷酸缓冲液、柠檬酸缓冲液、甘氨酸缓冲液、Tris 缓冲液、Good 缓冲液等。反应液的 pH 优选 4 ~ 10,更优选 6 ~ 8。

[0067] 在上述反应液中可以进一步根据需要添加牛血清白蛋白、蔗糖等稳定剂,叠氮化钠等防腐剂,氯化钠等盐浓度调节剂等。

[0068] 反应温度只要是能够引起上述免疫反应的温度就没有特别限定,优选以恒温在 10 ~ 50℃ 的范围内进行,更优选 30 ~ 40℃。反应时间可适当决定。

[0069] 实施例

[0070] 用比较例和实施例说明本发明,但本发明不限于此。

[0071] (用于制备 TpN47 基因的引物)

[0072] 将为了制备 TpN47 基因而使用的引物(用 DNA 合成装置合成)示于表 1。应予说明,在表 1 所示的碱基序列中,下划线部表示向载体进行亚克隆所必需的限制性内切酶位点。

[0073] [表 1]

[0074] 在 TpN47 基因的制作中使用的引物

名称	序列 (5'→3')	长度
TpN47_1f	GGATCCTGTGGCTCGTCTCATCAG (序列号1)	25
TpN47_2r	CCGGCCCAGTAATCCGCATAGCTCAGCGTCGCATAGCCATAATGCGTT TCGTGATGAGACGAGCC (序列号2)	65
TpN47_3f	GGATTACTGGGCGGTTGAGCTGGGGCAGAGTCGCGACGTGCTGTTGG CGGGTAATGCCGAAGCCGATCGCGCGGG (序列号3)	75
TpN47_4r	AACGCGCCATGCCCATGGGTTGCGCGGAAACTGCATCGAACATGCCCT GCGTCGAGATCACCCGCGCGATCGGCT (序列号4)	75
TpN47_5f	TGGGCATGGCGCGTTCCGTCAGCAATTCAGTATGCGGTTGAGGTAAT GGGCGAAAAGGTCTCTGCGAAACAAGA (序列号5)	75
TpN47_6r	AGTTTCGTAATCCGATTTCTTACGACCGCGGCTATCTTCGGTCTCTGT TTCGACAGG (序列号6)	58
TpN47_7f	TGGGAGTACGAAACTGACCCAAGCGTTACCAA (序列号7)	33
TpN47_8r	TTCAAACCTTAATCTGCGCGTCTTTCGCCAGATCTGAAATGACGCAGA GGCAGCGACCATTTTGGTAACGCTTGG (序列号8)	75
TpN47_9f	GAGATTAAGTTTGAAGCAGTCGAAGGTGCAGTAGCCTTAGCGGATCGT GCCAGTTCCTTCATGGTTGACAGCGAG (序列号9)	75
TpN47_10r	AGGAACCGCAACTGGGACAACTTCATACCGTGAACTTTTAAGTTCTGT AATTTTGTATTCCTCGCTGTCAACCAT (序列号10)	75
TpN47_11f	CCAGTTGCGGTTCCCTCATGAACTGAAAGGCATTGCAAAAGAGAAGTTT CACTTCGTGGAAGATTCCCGCGTTACG (序列号11)	75
TpN47_12r	TACTTTACGTGCGGAAAACTATCTTCGGTGAGCATTGTTTAAGGCCG TTGGTATTCTCCGTAACCGCGGAATC (序列号12)	75
TpN47_13f	TCCGCACGTAAAGTAAGCTCGATGGAAGCCCC (序列号13)	33
TpN47_14r	TGCGTCCGAACCAAAACGGCTATGGTAACCGGTACCCACCGTATCTAC CACAAGGTCTGCGGGCTTTCCATCGA (序列号14)	75
TpN47_15f	TTTGGTTCCGACGCGAGAAGCTTCTGTGATGCTGAAACGGGCTGATGGC TCCGAACTGAGCCATCGTGAGTTCATC (序列号15)	75
TpN47_16r	GTAGCTGGCGTCATCACCATAGTAATCATAGCGGACCGTGTGAAGTT CATCACATAGTCGATGAACCTACCGATG (序列号16)	75
TpN47_17f	GATGACGCCAGCTACACCAATCTGATGGCGAGTTATGGCACCAAAACAC TCGGCTGATTCTGGTGGGAAGCAGGT (序列号17)	75
TpN47_18r	ACGTGAGCCTTTAAAGCGATCGAACCCATAGTTGATACGCGACGAAAT GCGCGGCACACGACCTGTCTTCCACCA (序列号18)	75
TpN47_19f	TTTAAAGGCTCAGGTCCGGGTTATTACGGTCTGACTTTG (序列号19)	39
TpN47_20r	CCCTTCGTATTTCGGCAGGAAGCGCACATCAGCAACTACGTACGATA GCCGTTGGCAATCAAAGTCAGACGGTA (序列号20)	75
TpN47_21f	CCGAAATACGAAGGGAACATCGATATTGGCTTGAAGGGCAAAGTGCTG ACCATCGGGGGTGCGGACGCCGAAACC (序列号21)	75
TpN47_22r	TTGATCGCTGACAAAGTTTAGGTTGGCCATCGGCAACACGTCAACTGC AGCATCCATCAGGGTTTCGGCGTCCGC (序列号22)	75
TpN47_23f	CTTGTCAGCGATCAAGCGGTGAGCCTGGGGCAGAATGTCTCTCTGCG GATTTCACTCCGGGCACCGAATACAGG (序列号23)	75
TpN47_24r	GTCCGAGCTACTGGGCCACTACTTTCCGACGACAGAACCGAAGTCTTT GAAGCGCACTTCAACCGTGTATTCCGGT (序列号24)	75

[0075]

[0076] (TpN47 基因的人工制备)

[0077] TpN47 基因是以数据库上的碱基序列为参考(GenBank AE000520) 利用递归(recursive)PCR 而合成的。即,使用在一端具有相互互补的序列的引物对 TpN47 __ 1f 和 TpN47 __ 2r,利用 PCR 制作 DNA 片段,使用该 DNA 片段和在互补的序列的末端具有的一系列引物对 TpN47 __ 3f、TpN47 __ 4r、TpN47 __ 5f、TpN47 __ 6r、TpN47 __ 7f、TpN47 __ 8r、TpN47 __ 9f、TpN47 __ 10r、TpN47 __ 11f、TpN47 __ 12r、TpN47 __ 13f、TpN47 __ 14r、TpN47 __ 15f、TpN47 __ 16r、TpN47 __ 17f、TpN47 __ 18r、TpN47 __ 19f、TpN47 __ 20r、TpN47 __ 21f、TpN47 __ 22r、TpN47 __ 23f 和 TpN47 __ 24r,制作编码 TpN47 基因的整体的 DNA。将递归(recursive)PCR 的图像图示于图 1。

[0078] (TpN47 抗原表达用载体的构建)

[0079] 将制备的 TpN47 基因连接于 pBluscript II SK(+)(Stratagene 公司制)的 SmaI 位点,利用钙法将其向大肠杆菌 DH5 α (Takara Bio 公司制)转化。利用钙法的转化方法

如下。将大肠杆菌 DH5 α 的一晚培养液 0.1mL 接种到 5mL 的 LB 培养基(表 2 记载)中,于 37℃ 振荡培养至浊度达到 0.5。将 1mL 利用离心分离进行集菌,使之悬浮于 0.5mL 冰冷的 50mM CaCl_2 ,在冰上静置 30 分钟。量取 0.2mL 悬浮液,添加连接后的质粒 DNA,在冰上放置 30 分钟后,在 42℃ 施加 30 秒热激,添加(总量 1mL)SOB 培养基(表 2 记载)0.8mL。于 37℃ 培养 1 小时后,在含有异丙基- β -吡喃半乳糖苷(以下称为 IPTG)(NACALAITESQUE 公司制)、5-氯-4-溴-3-D-半乳糖(以下称为 X-gal)(NACALAI TESQUE 公司制)和 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素(和光纯药公司制)的 LB 琼脂培养基(表 2 记载)中展开,于 37℃ 培养一夜。利用蓝白筛选选择单一菌落,接种于含有终浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的氨苄青霉素的 TB 培养基(表 2 记载)2mL 并培养一晚。将培养的大肠杆菌利用 FavorPrep 质粒 DNA 提取试剂盒(FavorPrep Plasmid DNA Extraction Mini Kit, FAVORGEN BIOTECH CORP 公司制)提取质粒 DNA。将提取的质粒利用限制性内切酶处理和序列分析进行碱基序列的确认。

[0080] 确认为正确的碱基序列后,将 TpN47 基因导入从作为市售载体的 pGEX-4T-3 (GE HEALTHCARE BIO SCIENCES 公司制)利用一日诱变(One day mutagenesis)法删除 GST 基因而得到的 p Δ GST 的 BamHI 和 XhoI 位点,构建 p Δ GST-TpN47。构建向该 p Δ GST-TpN47 的 BamHI 位点导入有作为 W02010/013789 记载的来自苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*)的 Cry 蛋白质的氨基酸序列的一部分的 4AaCter (696-851) (序列号 42:以下称为 Tag)的 p Δ GST-Tag-TpN47。具体而言,最初利用递归(recursive)PCR 制作编码 Tag 的基因。编码 Tag 的基因以在 5' 末端附加 BamHI 位点、以及在 3' 末端附加编码连接序列的碱基序列和 BamHI 位点的方式制作。将制作的编码 Tag 的基因插入 pBluscript II SK (+)的 SmaI 位点,进行克隆,利用序列解析确认为正确的碱基序列。接着由 pBluscript II SK (+)利用 BamHI 切出编码 Tag 的基因,插入 p Δ GST-TpN47 的 BamHI 位点,构建 p Δ GST-Tag-TpN47。将表达载体构建的图像图示于图 2。将构建的 p Δ GST-Tag-TpN47 导入大肠杆菌 BL21(Takara Bio 公司制)而进行转化。转化方法如上所述。

[0081] [表 2]

[0082] *1) LB 培养基组成 (1L)

[0083]	胰蛋白胨(NACALAI TESQUE公司制)	10 g
	干燥酵母提取液(NACALAI TESQUE公司制)	5 g
	氯化钠(KISHIDA CHEMICAL公司制)	1 g
	定容至	1000 mL

[0084] 定容(mess up)后高压灭菌

[0085] *2) LB 琼脂培养基组成 (1L)

[0086]	胰蛋白胨(NACALAI TESQUE公司制)	10 g
	干燥酵母提取液(NACALAI TESQUE公司制)	5 g
	氯化钠(KISHIDA CHEMICAL公司制)	10 g
	琼脂粉末(和光纯药社制)	15 g
	定容至	1000 mL

[0087] 定容后高压灭菌

[0088] *3) SOB 培养基组成 (1L)

[0089]

胰蛋白胨 (NACALAI TESQUE公司制)	20 g
干燥酵母提取液 (NACALAI TESQUE公司制)	5 g
氯化钠 (KISHIDA CHEMICAL公司制)	0.5 g
氯化钾 (KISHIDA CHEMICAL公司制)	0.186 g
定容至	1000 mL

[0090] 定容后高压灭菌,溶液冷却后,加入 5mL 的 2M 氯化镁

[0091] (KISHIDA CHEMICAL 公司制)

[0092] *4) TB 培养基组成 (1L)

[0093] • A 液

[0094]

胰蛋白胨 (NACALAI TESQUE公司制)	12 g
干燥酵母提取液 (NACALAI TESQUE公司制)	24 g
甘油 (KISHIDA CHEMICAL公司制)	4 mL
定容至	900 mL

[0095] • B 液

[0096]

磷酸二氢钾	2.3 g
磷酸氢二钾	12.5 g
定容至	100 mL

[0097] 将 A 液、B 液分别高压灭菌,溶液冷却后,混合

[0098] (TpN47 的表达)

[0099] 将导入了 p Δ GST-Tag-TpN47 表达载体的大肠杆菌 BL21 用加入了终浓度为 100 μ g/mL 的氨苄青霉素的 TB 培养基 5mL 预培养一晚。将该一晚培养液的 0.5mL 加入到 50mL 的添加有终浓度为 100 μ g/mL 的氨苄青霉素的 LB 培养基中。培养是利用振荡培养机 (SANYO 公司制, MIR-S100), 在 240rpm、37℃ 下培养至 OD600 达到 0.6 ~ 0.8。向培养液以最终浓度达到 0.5mM 的方式加入 IPTG。进一步培养 3 小时 (240rpm, 37℃), 诱导表达。

[0100] (TpN47 的纯化)

[0101] 回收表达诱导的菌体后,使之在 10mL 的 10mM 磷酸缓冲食盐水 (10mM 磷酸缓冲液 (pH7.4), NaCl 0.9 重量%) 中进行悬浮,超声波破碎,以 9000rpm 离心 10 分钟,得到不溶性组分。将含有目标蛋白质的不溶性组分以适当量的超纯水离心清洗,将沉淀利用尿素溶液 (8M Urea, 20mM Tris-HCl, pH8.0) 进行增溶溶解,将其作为目标蛋白质溶液 (浓度: 4mM)。

[0102] (用于制备多肽 1-8 基因的引物)

[0103] 将用于制备与序列号 34 ~ 41 记载的多肽 1-8 对应的基因的引物 (用 DNA 合成装置合成) 示于表 3。

[0104] [表 3]

[0105] TpN47 缺失变异体的制作中使用的引物

[0106]

名称	序列 (5' $\rightarrow$ 3')	长度
PP-Bam_3'	GGATCCCGGACCCTGGAAC (序列号 25)	19
r47_2F	GGTAATGCCGAAGCCGATCGC (序列号 26)	21

r47_3R	CTTCATACCGTGAACCTTTTAC (序列号 27)	21
r47_3_5F	TTTGTCGAGTTGCGGTTCC (序列号 28)	20
r47_4R	TTGCATCGAGCTTACTTTACG (序列号 29)	21
r47_5F	AGCCCGCACGACCTTGT (序列号 30)	17
r47_6R	GTATTTCGGCAGGAAGCGCAC (序列号 31)	21
r47_7F	GAAGGGAACATCGATATTGG (序列号 32)	20
pGEX_TAA-Xho 5'	TAACTCGAGCGGCCGCATC (序列号 33)	19

[0107] (多肽 1-8 基因的人工制备)

[0108] 多肽 1-8 的基因利用将 p Δ GST-Tag-TpN47 作为模板的一日诱变法。即以夹持需从 p Δ GST-Tag-TpN47 删除的部分的形式设计引物,朝向各个载体的外侧地利用 PCR 反应来扩增 DNA,制成编码各多肽的 DNA。制作各多肽时的引物对按照表 4。多肽 1~8 的碱基序列分别如序列号 34~41 所示。

[0109] [表 4]

	结构域	模板	引物对	
多肽1	CD	p Δ GST-Tag-TpN47	PP-Bam_3'	r47_5F
多肽2	A2CD	p Δ GST-Tag-TpN47	PP-Bam_3'	r47_3.5F
多肽3	BA2CD	p Δ GST-Tag-TpN47	PP-Bam_3'	r47_2F
多肽4	A1BA2C	p Δ GST-Tag-TpN47	r47_6R	pGEX_TAA_Xho5'
多肽5	A1BA2	p Δ GST-Tag-TpN47	r47_4R	r47_5F
多肽6	B	多肽3制作载体	r47_3R	pGEX_TAA_Xho5'
多肽7	C	多肽4制作载体	PP-Bam_3'	r47_5F
多肽8	D	p Δ GST-Tag-TpN47	PP-Bam_3'	r47_7F

[0111] (多肽 1-8 表达用载体的构建)

[0112] 在上述 PCR 产物中加入 T4DNA 连接酶(Takara Bio 公司制)和 10X 连接缓冲液(Takara Bio 公司制)进行自身连接。在该连接溶液中加入限制性内切酶 DpnI (东洋纺公司制),于 37℃ 孵育 1 小时。插入到大肠杆菌以后,与 TpN47 的载体构建同样地进行。

[0113] (多肽 1-8 的表达)

[0114] 除了使用各多肽的表达载体以外,按照 TpN47 的表达进行。

[0115] (多肽 1-8 的纯化)

[0116] 除了使用使多肽 1-8 表达诱导的菌体以外,按照 TpN47 的纯化进行。

[0117] (乳胶粒子的制作)

[0118] 在具备搅拌器、回流用冷凝器、温度检测器、氮导入管和护套的玻璃制反应容器(容量 2L)中加入蒸馏水 1100g、苯乙烯 200g、苯乙烯磺酸钠 0.2g、和在蒸馏水 50g 中溶解过硫酸钾 1.5g 而得到的水溶液,将容器内用氮气置换后,一边于 70℃ 搅拌,一边进行 48 小时聚合。

[0119] 聚合结束后,将上述溶液用滤纸进行过滤处理,取出乳胶粒子。得到的乳胶粒子的

粒径是通过用透射型电子显微镜装置(日本电子公司制,“JEM-1010 型”)以 10000 倍的倍率拍摄乳胶粒子并对于最低 100 个以上的粒子进行图像解析而测定平均粒径的。得到的平均粒径为 $0.4\ \mu\text{m}$ 。

[0120] (抗梅毒螺旋体抗体测定试剂的制备)

[0121] (实施例 1)

[0122] 在平均粒径为 $0.4\ \mu\text{m}$ 的乳胶溶液(固体成分 10% (w / v))100 μL 中添加 100 μL ($0.4\ \mu\text{mol}$)的溶解于 20mM 的 Tris 缓冲液(以下称为 Tris-HCl, pH8.0)中的多肽 1 (4mM), 于 4℃ 搅拌 1 小时。接着, 添加含有 1% (W / V) 牛血清白蛋白(以下称为 BSA, Fraction V, 试剂级, Miles Corp. 公司制)的 Tris 盐酸缓冲食盐水(20mM Tris-HCl, 食盐浓度 0.9 重量 %, pH8.0) 1mL, 搅拌 1 小时。将得到的液体于 10℃ 以 15000rpm 离心分离 15 分钟, 在得到的沉淀物中添加含有 1 (w / v)%BSA 的 100mM 磷酸缓冲液(pH7.5)溶液 20mL, 使乳胶悬浮, 从而制备抗梅毒螺旋体抗体测定试剂。

[0123] (实施例 2)

[0124] 将多肽 2 溶液用作抗原液, 除此以外, 与实施例 1 同样进行而制备了抗梅毒螺旋体抗体测定试剂。

[0125] (实施例 3)

[0126] 将多肽 3 溶液用作抗原液, 除此以外, 与实施例 1 同样进行而制备了抗梅毒螺旋体抗体测定试剂。

[0127] (比较例 1)

[0128] 将纯化的 TpN47 溶液用作抗原液, 除此以外, 与实施例 1 同样进行而制备了抗梅毒螺旋体抗体测定试剂。

[0129] (比较例 2)

[0130] 将多肽 4 溶液用作抗原液, 除此以外, 与实施例 1 同样进行而制备了抗梅毒螺旋体抗体测定试剂。

[0131] (比较例 3)

[0132] 将多肽 5 溶液用作抗原液, 除此以外, 与实施例 1 同样进行而制备了抗梅毒螺旋体抗体测定试剂。

[0133] (比较例 4)

[0134] 将多肽 6 溶液用作抗原液, 除此以外, 与实施例 1 同样进行而制备了抗梅毒螺旋体抗体测定试剂。

[0135] (比较例 5)

[0136] 将多肽 7 溶液用作抗原液, 除此以外, 与实施例 1 同样进行而制备了抗梅毒螺旋体抗体测定试剂。

[0137] (比较例 6)

[0138] 将多肽 8 溶液用作抗原液, 除此以外, 与实施例 1 同样进行而制备了抗梅毒螺旋体抗体测定试剂。

[0139] (测定)

[0140] 使用在实施例 1 ~ 3、比较例 1 ~ 6 中制备的抗梅毒螺旋体抗体测定试剂, 利用下述方法进行测定。

[0141] (1) 抗梅毒螺旋体抗体标准液的测定

[0142] 作为抗梅毒螺旋体抗体标准液,采集梅毒阳性标准血清(积水医疗公司制,5个浓度,单位:T.U. *) 15 μ L,向其中混合样品稀释液(在含有1%的BSA的100mM磷酸缓冲液(pH7.4)中添加Lipidure(日油公司制:Lipidure-BL)0.8(w/v)%而成的)100 μ L,于37℃适时保持。向其中添加抗梅毒螺旋体抗体测定试剂100 μ L并进行搅拌后,测定在约80秒至300秒之间的波长700nm下的吸光度的变化量,作为吸光度变化量(Δ Abs)。应予说明,测定使用自动分析装置7170型。

[0143] 将结果示于表5和图3~图5。如表5、图3~图5所示,可知在实施例制备的试剂的反应性高。

[0144] * T.U. 是利用Mediace(注册商标)TPLA(积水医疗公司制)测定的抗螺旋体抗体效价的单位TITER UNITS的简称,测定国际标准品时,1T.U.为2mIU。

[0145] [表5]

[0146] 各结构域的灵敏度比较

	结构域		38T.U.	119T.U.	240T.U.
多肽1	CD	实施例1	0.0435	0.1828	0.2972
多肽2	A2CD	实施例2	0.0424	0.1826	0.2918
多肽3	BA2CD	实施例3	0.0365	0.1490	0.2429
[0147] TpN47	A1BA2CD	比较例1	0.0286	0.1044	0.1823
多肽4	A1BA2C	比较例2	0.0000	0.0046	0.0153
多肽5	A1BA2	比较例3	0.0000	0.0000	0.0002
多肽6	B	比较例4	0.0000	0.0000	0.0000
多肽7	C	比较例5	0.0000	0.0000	0.0000
多肽8	D	比较例6	0.0000	0.0000	0.0013

[0148] Δ Abs

[0149] (2) 阳性样品测定

[0150] 将被判定为梅毒阳性的血清样品(10T.U.以上)作为样品,除此以外,与(1)同样进行而求出吸光度变化量(Δ Abs),由基于(1)的标准品测定结果而制成的校正曲线算出抗体效价。求出在实施例和比较例中制备的抗梅毒螺旋体抗体测定试剂中的抗体效价与市售品试剂(积水医疗公司制,Mediace(注册商标)TPLA)的抗体效价的相关性。将结果示于表6(x:市售品试剂,y:实施例1~3和比较例1中制备的抗梅毒螺旋体抗体测定试剂)。可知,在实施例制备的试剂与现有的试剂的相关性良好。

[0151] [表6]

[0152] 相关性试验

[0153]

	实施例1	实施例2	实施例3	比较例1
肽	多肽1	多肽2	多肽3	TpN47
结构域	CD	A2CD	BA2CD	A1BA2CD
回归式	y=0.95x+2.71	y=0.90x+1.85	y=0.92x+14.0	y=0.93x+24.8

相关系数	0. 965	0. 958	0. 886	0. 798
------	--------	--------	--------	--------

[0154] x :Mediace TPA, y :实施例和比较例制备试剂

[0155] (3) 阴性样品测定

[0156] 将判定为梅毒阴性的血清样品(0T. U.)作为样品,除此以外,与(1)同样进行而求出吸光度变化量(Δ Abs),由基于(1)的标准品测定结果制成的校正曲线算出抗体效价。

[0157] 将结果示于表7。在该测定方法中,将10T. U. 以上判定为阳性。在比较例1中,发现非特异反应大多为假阳性,与此相对,在实施例1~3中,几乎没有非特异反应,没有发现假阳性。

[0158] [表7]

[0159] 阴性样品测定

[0160]

	实施例1	实施例2	实施例3	比较例1
结构域	CD	A2CD	BA2CD	A1BA2CD
阴性1	0	0	0	20
阴性2	0	6	9	26
阴性3	0	0	0	7
阴性4	0	0	2	4
阴性5	0	0	0	9
阴性6	0	0	1	5

[0161] T. U.

[0162] 产业上的可利用性

[0163] 若使用本发明的重组抗原,则可以提供灵敏度、特异性高的能够测定抗梅毒螺旋体抗体的抗梅毒螺旋体抗体测定试剂。

[0001]

序列表

<110> 积水医疗株式会社；日本羔羊有限公司
 <120> 抗梅毒螺旋体抗体测定试剂
 <130> DC0079
 <150> JP2010-083822
 <151> 2010-03-31
 <160> 42
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 用于梅毒螺旋体基因的引物
 <400> 1
 ggatccctgtg gctcgtctca tcacg 25
 <210> 2
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 用于梅毒螺旋体基因的引物
 <400> 2
 ccggccacagt aatccgcata gctcagcgtc gcatagccat aatgcgttgc gtgatgagac 60
 gagcc 65
 <210> 3
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 用于梅毒螺旋体基因的引物
 <400> 3
 ggattactgg gccggtgagc tggggcagag tcgcgacgtg ctgttggcgg gtaatgccga 60
 agccgaicgc gcggg 75
 <210> 4
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 用于梅毒螺旋体基因的引物
 <400> 4
 aacgcgccat gcccatgggt tgcgcgggaa actgcacaga acatgcctgc gtegagaica 60
 cccgcgcgat cgget 75
 <210> 5
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> 人工序列

[0002]

<220>		
<223>	用于梅毒螺旋体基因的引物	
<400>	5	
	tgggcatggc gcgticcgtc agcaattica gtaigcggtt gaggtactgg gcgaaaaggt	60
	cctgtcgaaa caaga	75
<210>	6	
<211>	58	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于梅毒螺旋体基因的引物	
<400>	6	
	agtttcgtac tccatttct tacgaccgag gctatcttcg gtctcttgtt tcgacagg	58
<210>	7	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于梅毒螺旋体基因的引物	
<400>	7	
	tgggagtacg aaacigaccc aagcgttacc aaa	33
<210>	8	
<211>	75	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于梅毒螺旋体基因的引物	
<400>	8	
	ttaaaactta atctcgccgt cttegccag atcctgaaat gacgcagagg cacgcacat	60
	tittgtaacg cttgg	75
<210>	9	
<211>	75	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于梅毒螺旋体基因的引物	
<400>	9	
	gagattaagt ttgaagcagt cgaaggtgca gtagccttag cggatcgtgc cagttccttc	60
	aiggttgaca gcgag	75
<210>	10	
<211>	75	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于梅毒螺旋体基因的引物	
<400>	10	
	aggaaaccga actgggacaa acttcatacc gtgaactttt acgttcgtaa ttitgtattc	60

[0003]

ctcgtgtgca accat	75
<210> 11	
<211> 75	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于梅毒螺旋体基因的引物	
<400> 11	
ccagttgcgg tictcatga actgaaagc atgcaaaag agaagttica cticgtggaa	60
gattcccgcg ttacg	75
<210> 12	
<211> 75	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于梅毒螺旋体基因的引物	
<400> 12	
tactttacgt gcgaaaaaac tatcttcggt gageattgit ttaagccgt tggattctc	60
cgtaacgcgg gaac	75
<210> 13	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于梅毒螺旋体基因的引物	
<400> 13	
tccgcacgta aagtaagtc gatggaaagc ccg	33
<210> 14	
<211> 75	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于梅毒螺旋体基因的引物	
<400> 14	
tgcgtccgaa ccaaaacggc tatgtaacc ggtaccacc gtatctacca caagtcgtg	60
eggctttcc atcga	75
<210> 15	
<211> 75	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于梅毒螺旋体基因的引物	
<400> 15	
tttggttcgg acgcagaagc tictgigaig ctgaaacggc ctgatggctc cgaactgagc	60
catcgtgagt tcate	75
<210> 16	
<211> 75	

[0004]

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于梅毒螺旋体基因的引物	
<400>	16	
	gtagctggcg tcaacacat agtaacata gcggaccgtg tgaagttca tscatagtc	60
	gatgaactca cgatg	75
<210>	17	
<211>	75	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于梅毒螺旋体基因的引物	
<400>	17	
	gatgaagcca gctaacacaa tcgatggcg agttatggca ccaaacacac ggtgattcc	60
	tgggtgaaga caggt	75
<210>	18	
<211>	75	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于梅毒螺旋体基因的引物	
<400>	18	
	acctgagcct ttaaagegat cgaacccata gtigataccg cagcaaatgc gggcacacg	60
	acctgtcttc cacca	75
<210>	19	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于梅毒螺旋体基因的引物	
<400>	19	
	tttaaaggct caggtccggg ttattaccgt ctgactttg	39
<210>	20	
<211>	75	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于梅毒螺旋体基因的引物	
<400>	20	
	cccttcgtat ttggcagga agcgcacatc agcaactacg tcacgatagc cgttggcaat	60
	caaagtcaga cggta	75
<210>	21	
<211>	75	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于梅毒螺旋体基因的引物	

[0005]

<400> 21	
ccgaataacg aaggaacat cgatatggc tgaaggga aagtgetgac catcgggggt	60
gcggaagcgc aaacc	75
<210> 22	
<211> 75	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于梅毒螺旋体基因的引物	
<400> 22	
ttgatcgtg acaagittag gtggcraic ggcaascacg tcaactgcag catccatcag	60
ggtttcggcg tccgc	75
<210> 23	
<211> 75	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于梅毒螺旋体基因的引物	
<400> 23	
cttgtcagcg atcaagcgtg gagcctgggg cagaatgtcc tctctgcgga tticactccg	60
gxcaccgaat acacg	75
<210> 24	
<211> 75	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于梅毒螺旋体基因的引物	
<400> 24	
ctcagctac tggccacac ctttcgcacg cacagaaccg aactcttga agegcacitc	60
aaccgtgtat teggt	75
<210> 25	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于梅毒螺旋体基因的引物	
<400> 25	
ggatcccga ccctggac	19
<210> 26	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于梅毒螺旋体基因的引物	
<400> 26	
ggtaatgcc agccgatcg c	21

[0006]

<210>	27	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于梅毒螺旋体基因的引物	
<400>	27	
	cttcataaccg tgaactttta c	21
<210>	28	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于梅毒螺旋体基因的引物	
<400>	28	
	tttgtcccag ttgcggttcc	20
<210>	29	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于梅毒螺旋体基因的引物	
<400>	29	
	ttccatcgag cttactttac g	21
<210>	30	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于梅毒螺旋体基因的引物	
<400>	30	
	agcccgcaag accttgt	17
<210>	31	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于梅毒螺旋体基因的引物	
<400>	31	
	gtatttcggc aggaagegca c	21
<210>	32	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于梅毒螺旋体基因的引物	
<400>	32	
	gaagggaaca tegatatgg	20
<210>	33	

[0007]

<211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 用于梅毒螺旋体基因的引物

<400> 33
 taactcgagc ggccgcac 19

<210> 34
 <211> 639
 <212> DNA
 <213> 梅毒螺旋体基因的CD结构域

<400> 34
 ggatccagcc cgcacgacct tgtggtagat acggigggta ccggitacca tagccgittt 60
 ggctcgagc cagaagcttc tggatgcig aaacggcctg atggetccga acigagccat 120
 cgtgagttca tgcactatgt gatgaacttc aacacggctc gctatgatta ctatggtagt 180
 gacgcaagct acacacatct gaigggcagt taiggcacca aacacteggc tgaticctgg 240
 tggaaagacag gtctgtgccc gccatttcg tgggtagca actatgggtt cgatecttt 300
 aaaggtcagc giccgggta ttaacgtctg acittgattg ccaacggcta tcgtgacgta 360
 gttgcigatg tgccttctc gccgaatac gaagggaaca tcgatattgg ctigaagggc 420
 aaagtctga ccacggggg tgggagccc gaaaccciga tggatctgc agtgcagctg 480
 ttgcagatg gccaacctaa acitgtcagc gatcaagcgg tggcctggg gcagaaatgc 540
 ctctctcggc attcaactcc gggcaccgaa tacacgggtg aagtgcctt caaagattc 600
 ggttctgtgc gtgcgaaagt agiggcccag tagctcgag 639

<210> 35
 <211> 792
 <212> DNA
 <213> 梅毒螺旋体基因的A2CD结构域

<400> 35
 ggalectttg tcccagtgc ggctctcat gaactgaag gcattgcaa agagaagttt 60
 caattcgigg aagattccg cgttacggag aataccaacg gccitaaaac aatgtcacc 120
 gaagatagtt tttccgacg taaagtaagc tcatggaaa gcccgacga ccttgtggta 180
 gatacggtag gtaacggta ccatagccgt tttggttcgg acgcagaagc ttctgtgatg 240
 ctgaaacgcg ctgatggctc cgaacigagc catcgtgagt tcatcgacta tgigatgaac 300
 ttcaacacgg tccgctatga ttactatggt gatgacgcca gctacacca tetgatggcg 360
 agtatggca ccaaacactc gccgatgcc tggggaaga caggicgtgt gccgcgcat 420
 tctgctggta tcaactatgg gticgatgc tttaaggct caggctcggg ttattacgt 480
 ctgacttga ttgccaacgg ctatcgtgac gtagttgtg atgtgcctt ccgcccga 540
 tacgaaggga acatcgatat tggctgaag ggcaagtc tgaacatcg gggtgaggac 600
 gccgaacccc tgatggatgc tgcagttgac ggttttgcg atggccaacc taaactgtc 660
 agcgatcaag cgttgagcct ggggcagaat gtctctctc cggatttacc tccggcacc 720
 gaatacagg ttgaagtgcg cttaacagag ttccgttctg tgcgtgcgaa agtagtgccc 780
 cagtagctcg ag 792

[0008]

<210>	36	
<211>	1158	
<212>	DNA	
<213>	梅毒螺旋体基因的BA2CD结构域	
<400>	36	
ggatccggta atgccgaagc cgatcgcgcg ggtgactctg acgcaggeat gticgatgca	60	
gttccccgcg caacccttgg gcatggcgcg ticcgtcagc aatttcagta tgcggttgag	120	
gtactggcg aaaaggtcct gtgaaacaa gagaccgaag atagctcgcg tctgaagaaa	180	
tgggagtaac aaactgacc aagcgtaac aaaatggtgc gtcctctgc gtcatttcag	240	
gatacggcg aagacggcga gattaaagti gaagcagtcg aaggtgcagt agccttagcg	300	
gatactgcca gtctcttcac ggttgacagc gaggaataca aaattacgaa cgtaaaagti	360	
cacggtatga agtllgtccc agttgcggtt cctcatgaac tgaaggcat tgcanaagag	420	
aagtcttact tctgggaaga ticcgcgtt acggagaata ccaacggcct taaaacaatg	480	
ctcacgaag atagtitttc cgcacgtaaa glaagctcga tggaaagccc gcacgacctt	540	
gtggtagata cggigggtac eggttaccat agcgttttg gticggacgc agaagcttct	600	
gtgatgcga aacgcctga tggctcga ctagccatc gtgagttcat cgaactatg	660	
atgaacttca acacggctcg ctatgattac tatgggatg acgccagcta caccaatctg	720	
atggcgagtt aaggcaccaa acatcggct gattcctggt ggaagacagg tctgtgcgcg	780	
cgcatttcgt gcggtatcaa ctatgggtc gatcgcttta aaggtcagg tccgggttat	840	
tacgctcga ctttgattgc caacggctat cgtgacgtag ttctgatgt gcgttctctg	900	
ccgaaatcag aagggaacat cgataatggc tgaagggca aagtgtcagc catcgggggt	960	
gggaacgcg aaaccctgat ggatgcicga gttagcgtgt ttgcgatgg caaacctaaa	1020	
cttgcagcg atcaagcgt gagcctgggg cagaatgtcc tctcgcgga ttctactcgc	1080	
ggcaccgaat acacggttga agtgcgcctc aaagagttcg gtctgtgcg tgcgaaagta	1140	
gtggcccagt agctcgag	1158	
<210>	37	
<211>	1020	
<212>	DNA	
<213>	梅毒螺旋体基因的A1BA2C结构域	
<400>	37	
ggatcctgtg gctcgtctca tcaagaaacg catlatggt atgcgacgt gagctatgcg	60	
gattactggg ccggtgagct ggggcagagt cgcgacgtgc tgttggcggg taatgccgaa	120	
gcgacgcg cggtgatct cgacgcagc algttcgaig cagtltcccg cgaacccat	180	
ggcatggcg cgltccgtca gcaatttcag tatcggttg aggtactgg cgaaaaggtc	240	
ctgtcgaac aagagaccga agatagccgc ggicglaaga aatgggagta cgaactgac	300	
ccaagctta ccaaatggt gcgtgccct gcgtcatttc aggatecgg cgaagacgc	360	
gagattaaat tgaagcagt cgaaggtgca gtacgttag cggatcgtc cagtctcttc	420	
algttgaca gcgaggaata caaattacg aacgtanaag ttacgggtat gaagttlgc	480	
ccagttgcgg ttctctatga actgaaagc attgcanaag agaagttica ctctgtgaa	540	

[0009]

```

gattcccgcg ttacggagaa taccaacggc cttaaaacaa tgctcaccga agatagtitt 600
tcgcacgta aagtaagctc gatgaaaagc ccgcacgacc ttgtggtaga tacggtaggt 660
accggtacc atagccgttt tggttcggac gcagaagctt ctgtgatget gaaacgcgt 720
gatggtccg aactgagcca tcgtgagtic atcgactatg tgaatgaact caacacggtc 780
cgctatgatt aetatggtag tgacgccagc tacaccaatc tgaatggcgag ttaatggcacc 840
aaacaatcgg ctgattcccg gtagaagaca ggtagctgc ccgcacattc gtagcgatc 900
aactatgggt tcgacgctt taaagctca ggtagcggtt aataccgtct gactttgatt 960
gccaacgggt atcgtgacgt agttgctgat gtgcgcttcc tgccgaata ctaactcgag 1020

```

<210> 38
 <211> 636
 <212> DNA
 <213> 梅毒螺旋体基因的A1BA2结构域

```

<400> 38
ggatcctgtg gctcgtctca tcacgaaacg cattatggt atgcgacgt gagctatgcg 60
gattactggg ccggtgagct ggggcagagt cgcgacgtgc tgttggcggg taatgccgaa 120
gccgacgcgc cgggtgatct cgacgcaggc atgttcgatg cagtctcccg cgcaaccat 180
gggcatggcg cgctccgta gcaatttcag tatcggttig aggtactggg cgaagagtc 240
ctgtcgaaac angagacga agatagccgc ggtagtaaga aatgggagta cgaaactgac 300
ccaagcgta ccaaatggg gctgctctc gctcattc aggaactggg cgaagacggc 360
gagattaagt ttgaagcagt cgaagggtca gtagccttag cggatcgtgc cagtctctc 420
atggttgaca gcgaggaata caaattacg aacgtaaaag ttcacggtat gaagtttgc 480
ccagttcgcg ttccctatga actgaaagcg attgtaaaag agaagttca ctctgtgaa 540
gattcccgcg ttacggagaa taccaacggc cttaaaacaa tgctcaccga agatagtitt 600
tcgcacgta aagtaagctc gatgaaaagc ccgcacgacc ttgtggtaga tacggtaggt 636

```

<210> 39
 <211> 381
 <212> DNA
 <213> 梅毒螺旋体基因的B结构域

```

<400> 39
ggaaccgta atccgaagc cgaacgcgc ggtagctcg acgcaggcat gtctgatga 60
gtttcccgcg caaccatgg gcatggcgcg ttccgicagc aatttcagta tgcggttag 120
gtactggcg aaaaggtct gtagaaacaa gagaccgaag atagccgcgg tcgtaagaaa 180
tggtgagtag aaactgacc aagcgttacc aaaaatgtgc gtgcctctgc gtcatttcag 240
gatctggcg agacggcga gattatggt gaagcagtc aggttgcagt agccttagcg 300
gatcgtgcca gtccctcat ggttgacgc gaggaataca aaattacgaa cgtaaaagti 360
caaggtaaga agtaactga g
381

```

<210> 40
 <211> 399
 <212> DNA
 <213> 梅毒螺旋体基因的C结构域

<400> 40

[0010]

```

ggatccagcc cgcacgacct tgggttagat acggttaggt cgggtiacea tagccgtttt    60
ggttcggacg cagaagcttc tgtgatgtg aaacgcgctg atggctccga acigagccat    120
cgtgagttca tcgactatgt gatgaacitc aacacggtec gctatgatta ctatggtgat    180
gacgcacgci acaccaatct gatggcgagt tatggcacca aacactcggc tgaitccigg    240
tggaagacag gtcgtgtgcc gcgcatttcg tgcggatca actaigggit cgaicgcitt    300
aaaggetcag gtcgggtta tiaccgtcig actttagtig ccaacggcta tcgtgacgtia    360
gttgcgtatg tgcgttccct gccgaaatac taactcgag    399

```

<210> 41
 <211> 255
 <212> DNA
 <213> 梅毒螺旋体基因的D结构域

```

<400> 41
ggatccgaag ggaacataga tatfgcttg aaggcnaag tctgaccat cgggggtgcg    60
gacgccgaaa cctgatgga tcttcagtt gacgtgttg ccgatggcca acctaaacti    120
gtcagcgalc aagcggtag cctggggcag aatgtccct ctgcggattt cactccgggc    180
accgaatata cggttgaagt gcgttcaaa gatttcggtt ctgtcgtgc gaaagtagtg    240
gcccgatgac tcgag    255

```

<210> 42
 <211> 507
 <212> DNA
 <213> Cry蛋白质基因的DNA片段

```

<400> 42
ggatccatca tcaacacctt ctacgcaaac ccgatcaaga acaccttga atcggaactg    60
accgactaag acatcgacca agcggcaaat ctggtggaat giatlaga gaagtgtgac    120
ccgaaagaaa agatgtgtt gttagacgaa gtagaagacg caaagcaact gagccaatcg    180
cgtaacgtgc tgcaaaacgg cgacttcgaa tcggtacgc tgggttgac cagagcgac    240
aatatcacca ttcaagaaga cgatccgatt ttcaaggcc attaccigca caigtccgc    300
gcgcgtgaca tcgatgttac catcttccg acctacatct tccaaaagat cgaatgaatg    360
aaattgaage cgtacacccg ttacciggtg cgtggtttcg tgggtgacg caaggacgtc    420
gaactggtag tctcgctata cggcgaagaa atcgaigcaa tcatgaatgt gccggcactg    480
gaagtgcigt tccagggtcc gggaicc    507

```

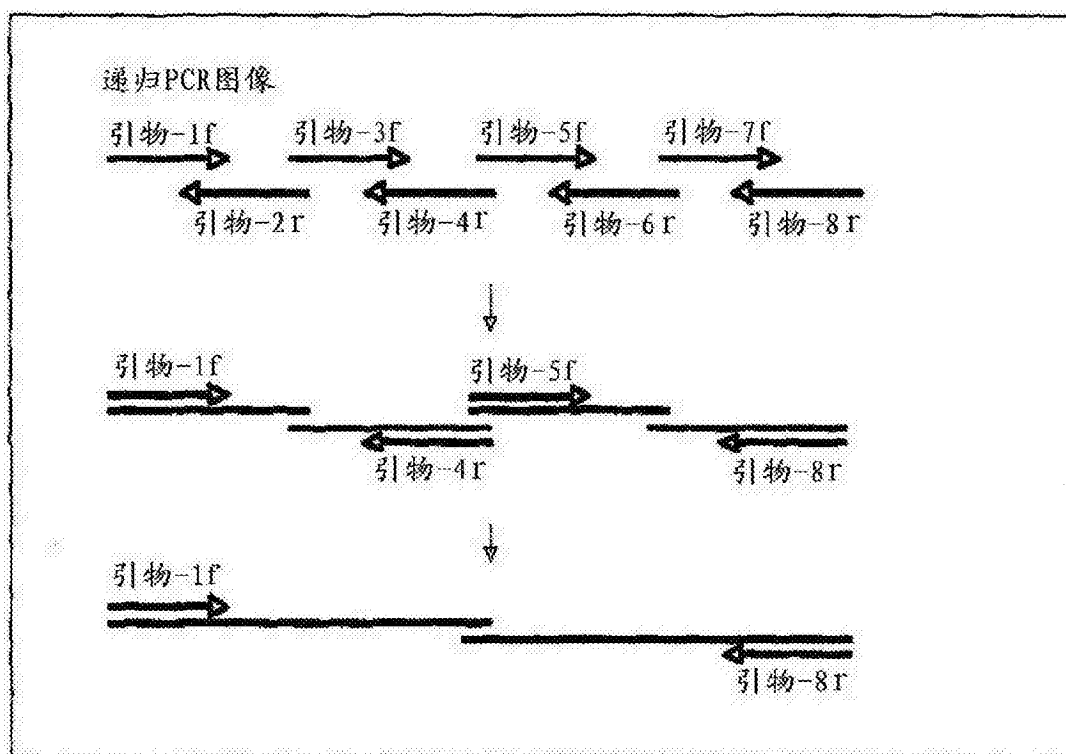


图 1

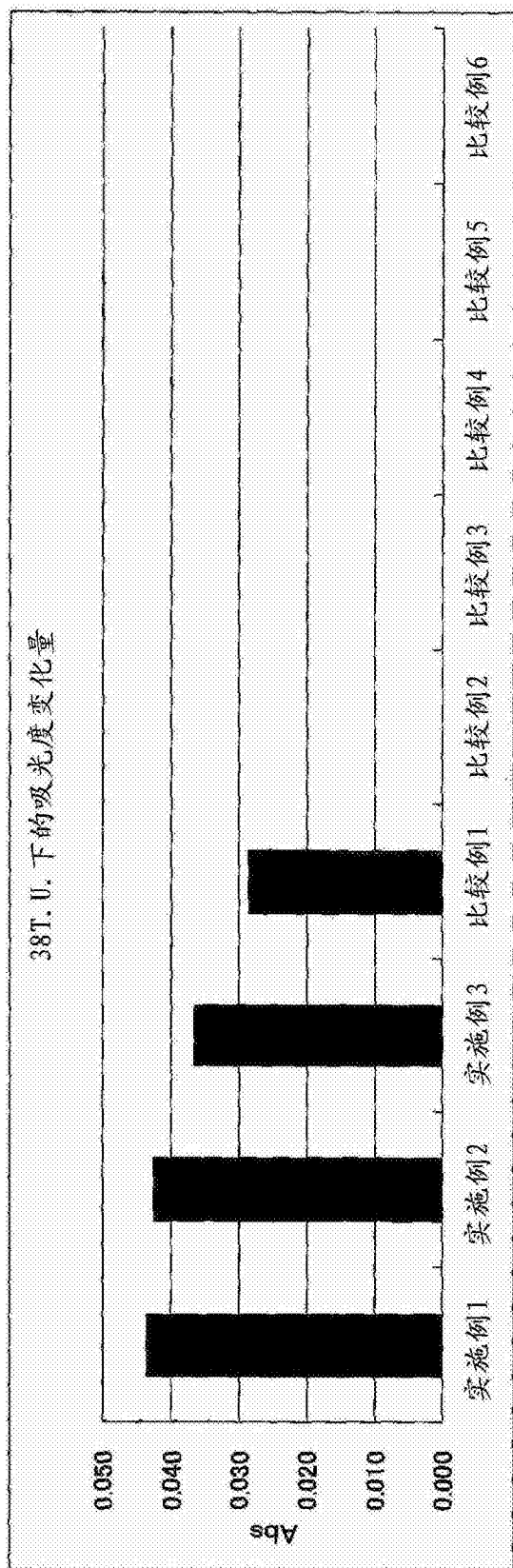


图 3

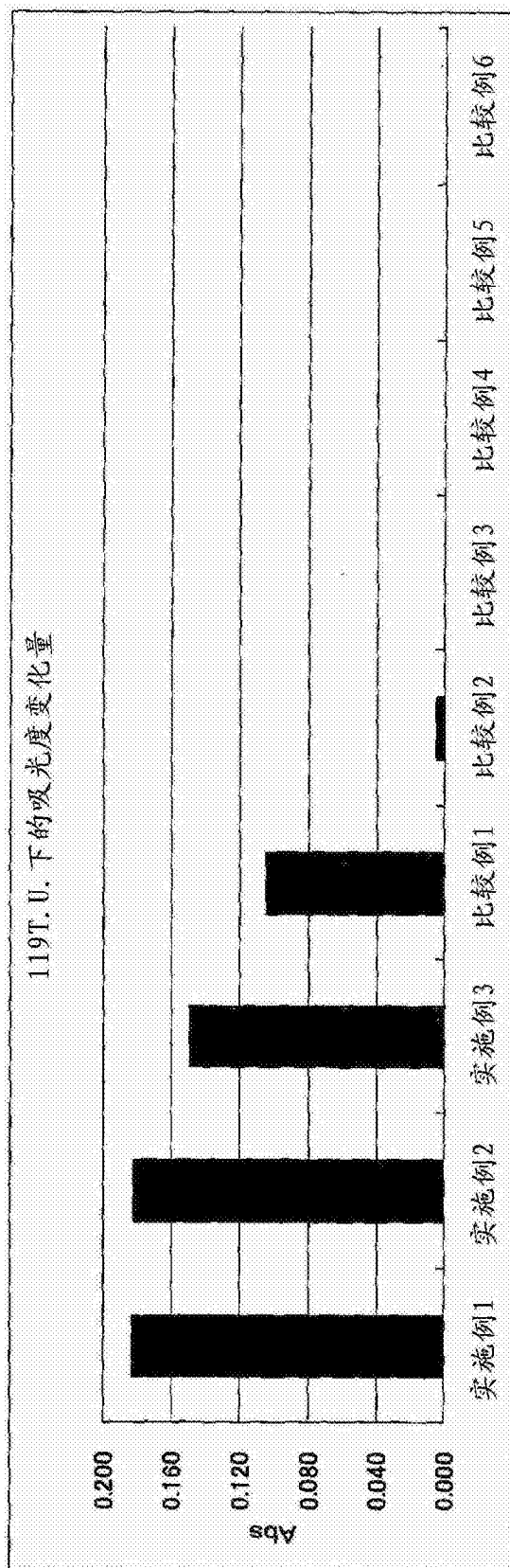


图 4

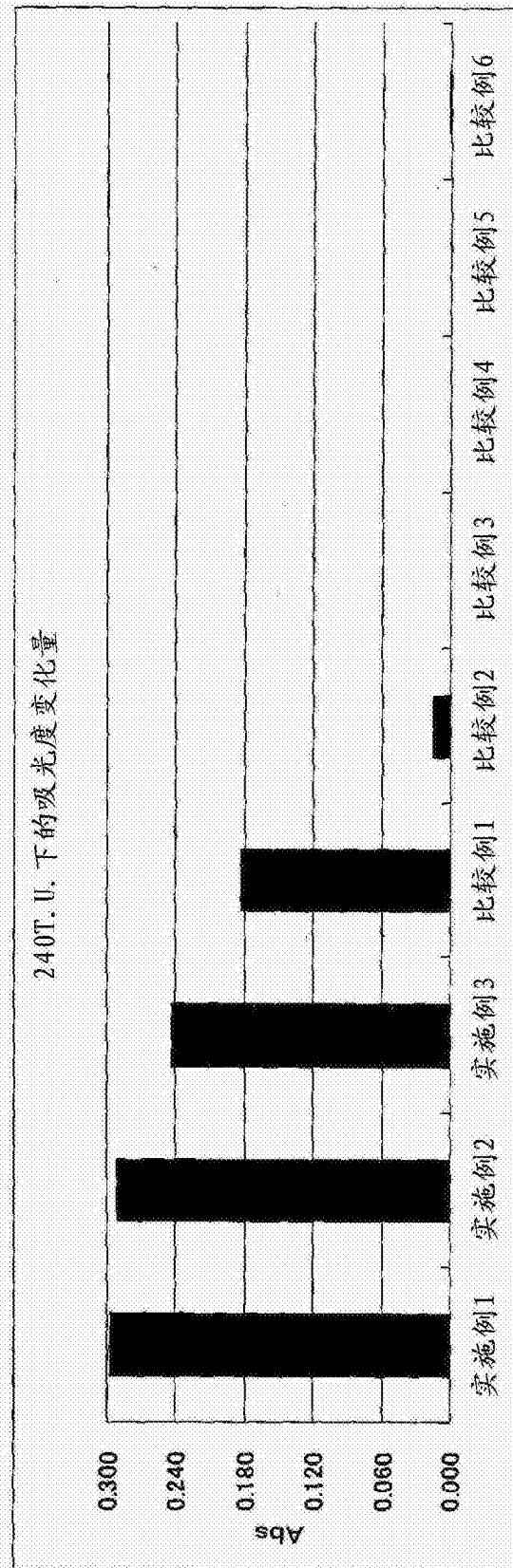


图 5

专利名称(译)	抗梅毒螺旋体抗体测定试剂		
公开(公告)号	CN102869991B	公开(公告)日	2016-04-27
申请号	CN201180016822.3	申请日	2011-03-31
[标]申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
[标]发明人	原康之 大田哲也 川本道子 佐藤真也 岩本繁久 岛冈达郎 须藤薰雄		
发明人	原康之 大田哲也 川本道子 佐藤真也 岩本繁久 岛冈达郎 须藤薰雄		
IPC分类号	G01N33/531 C07K14/20 G01N33/53 G01N33/545 G01N33/571		
CPC分类号	C07K14/20 G01N33/545 G01N33/571 G01N2333/20 G01N2469/20 G01N33/6854		
代理人(译)	苗堃		
审查员(译)	赵晓明		
优先权	2010083822 2010-03-31 JP		
其他公开文献	CN102869991A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供高灵敏度且高特异地测定抗梅毒螺旋体抗体的使用了多肽抗原的抗梅毒螺旋体抗体测定试剂以及利用该抗梅毒螺旋体抗体测定试剂的测定方法。一种抗梅毒螺旋体抗体测定试剂，其特征在于，在利用了抗原抗体反应的、用于测定抗梅毒螺旋体抗体的试剂中，将至少包含梅毒螺旋体47kDa抗原中的结构域C和D而不包含梅毒螺旋体47kDa抗原中的结构域A1的重组多肽用作抗原。

