



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103003694 A

(43) 申请公布日 2013. 03. 27

(21) 申请号 201180033738. 2
 (22) 申请日 2011. 07. 05
 (30) 优先权数据
 2010-154937 2010. 07. 07 JP
 (85) PCT申请进入国家阶段日
 2013. 01. 07
 (86) PCT申请的申请数据
 PCT/JP2011/065343 2011. 07. 05
 (87) PCT申请的公布数据
 W02012/005238 JA 2012. 01. 12
 (71) 申请人 富士瑞必欧株式会社
 地址 日本东京都
 (72) 发明人 藤井信之 本多秀夫 内田好昭
 小见和也
 (74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
 72001
 代理人 孔青 孟慧岚

(51) Int. Cl.
G01N 33/569 (2006. 01)
C07K 14/045 (2006. 01)
G01N 33/53 (2006. 01)

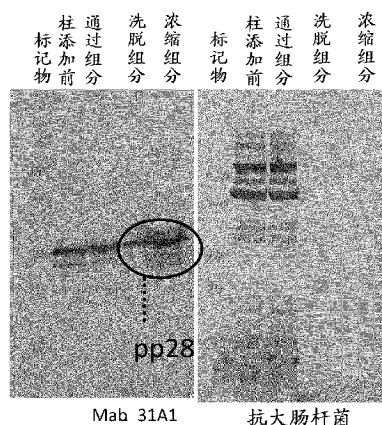
权利要求书 1 页 说明书 7 页
 序列表 3 页 附图 1 页

(54) 发明名称

人巨细胞病毒感染的检测方法

(57) 摘要

本发明公开了可以高灵敏度地检测 HCMV 感染的实用性高的新方法。本申请的发明人合成了 15 种 HCMV 蛋白的全长蛋白, 对其与 HCMV 感染患者血清的反应性进行了深入研究, 结果发现: 使用 pp28 全长蛋白作为抗原时, 可以无遗漏地检测所有的感染患者。可以使用大肠杆菌以重组蛋白的形式大量合成、纯化 pp28 全长蛋白, 并可以将其作为用于检查 HCMV 的抗原进行商业利用。



1. 人巨细胞病毒感染的检测方法,该检测方法包括:通过使用人工多肽作为抗原的免疫测定,测定从受试者中分离的样品中所能含有的抗 pp28 的抗体,所述人工多肽由与 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列具有 90% 以上同源性的氨基酸序列构成、且具有与针对人巨细胞病毒所产生的 pp28 而在生物体内诱导的抗体通过抗原抗体反应进行结合的反应性。

2. 权利要求 1 所述的方法,其中,上述人工多肽由 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列或该氨基酸序列中有 1 个或多个氨基酸被取代、缺失、插入和 / 或添加而得到的氨基酸序列构成。

3. 权利要求 2 所述的方法,其中,上述人工多肽由 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列构成。

4. 权利要求 1 ~ 3 中任一项所述的方法,其中,上述人工多肽是利用基因工程学方法制作的重组多肽。

5. 人巨细胞病毒感染的检测试剂,其中包含人工多肽,所述人工多肽由与 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列具有 90% 以上同源性的氨基酸序列构成、且具有与针对人巨细胞病毒所产生的 pp28 而在生物体内诱导的抗体通过抗原抗体反应进行结合的反应性。

6. 人巨细胞病毒感染的检测试剂盒,其中包含权利要求 5 所述的检测试剂。

人巨细胞病毒感染的检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及人巨细胞病毒感染的检测方法。

背景技术

[0002] 在以人巨细胞病毒 (HCMV) 为病因的感染症的血清学诊断中,通常使用病毒抗原(天然抗原)。但在天然抗原中,不可忽视因制备方法而产生的批间差异。另外,由于是处理病毒本身,因此在安全性或简便性上也存在问题。

[0003] 为了实现 HCMV 血清学诊断的标准化,人们希望实现抗原的重组化,但在只使用重组抗原时,已知检查的灵敏度、特异性尚不充分。这是由于难以从多个病毒抗原中选择适合重组化的适当的抗原的缘故。除此之外,认为使用各抗原蛋白的部分表达片段也是一个原因。

[0004] 例如,作为主要的抗原而已知的 pp150 是分子量为约 150kDa 的蛋白,因此不可能使用大肠杆菌进行大量合成,且难以在检查中使用全长蛋白。因此,在市售的检查试剂盒中,是将 pp150 的片段(代表性的是 30 个残基~40 个残基左右)与其他 HCMV 蛋白片段适当混合用作抗原。但是,有报道称:只使用部分表达片段时,检查的灵敏度为 60% 左右,并不充分。

[0005] 但是,还已知:在采用免疫测定的血清检查领域,虽然必需使用全长抗原,但检测灵敏度未必有所提高。例如,在非专利文献 1 中,对于 HCMV 的天然抗原(包含全长病毒蛋白),研究 HCMV 阳性患者血清组的抗体反应性,并给出了对于每个蛋白评价其抗体反应性的结果,但能够达到接近 100% 的检测灵敏度的只有 pp150,根据蛋白的种类,检测灵敏度变得非常低,达到 50% 左右以下。

[0006] 现有技术文献

专利文献

专利文献 1:日本特表 2000-514300 号公报;

非专利文献

非专利文献 1:Journal of Clinical Microbiology: 37(1), 第 179-188 页, 1999。

发明内容

[0007] 发明所要解决的课题

本发明的目的在于提供:可以高灵敏度地检测 HCMV 感染的实用性高的新方法。

[0008] 解决课题的方法

本发明人等合成了 15 种 HCMV 蛋白的全长蛋白,并深入研究了其与 HCMV 感染患者血清的反应性,结果发现:使用 pp28 全长蛋白作为抗原时,可以无遗漏地检测所有的感染患者,还可以使用大肠杆菌以重组蛋白的形式大量合成、纯化 pp28 全长蛋白,并将其作为用于检查 HCMV 的抗原进行商业利用,从而完成了本发明。

[0009] 即,本发明提供人巨细胞病毒感染的检测方法,该检测方法包括:通过使用人工多

肽作为抗原的免疫测定,测定从受试者中分离的样品中所能含有的抗 pp28 的抗体,所述人工多肽由与 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列具有 90% 以上同源性的氨基酸序列构成、且具有与针对人巨细胞病毒所产生的 pp28 而在生物体内诱导的抗体通过抗原抗体反应进行结合的反应性。另外,本发明还提供人巨细胞病毒感染的检测试剂,其中包含人工多肽,所述人工多肽由与 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列具有 90% 以上同源性的氨基酸序列构成、且具有与针对人巨细胞病毒所产生的 pp28 而在生物体内诱导的抗体通过抗原抗体反应进行结合的反应性。本发明还提供人巨细胞病毒感染的检测试剂盒,其中包含上述本发明的检测试剂。

[0010] 发明效果

根据本发明,提供检测灵敏度极其优异的 HCMV 感染的检测方法。根据本发明,通过简便的免疫测定,可以无遗漏地准确检测所有的 HCMV 感染患者。在公知的抗体检查方法中,有使用 pp28 片段作为抗原的方法,例如非专利文献 1 中还记载着:使用 pp28 的 30 个残基左右的大小的片段检测血清中的抗 HCMV 抗体的方法。但是,根据非专利文献 1,使用 pp28 片段时,在一成以上的患者中出现假阴性。若出现假阴性,则漏掉了感染患者,因此在临床检查中成为重大问题。根据本发明的方法,不会漏掉感染患者,可以准确地进行检测,可以对临床检查作出重大贡献。

附图说明

[0011] 图 1 是通过蛋白质印迹确认使用抗体柱纯化在大肠杆菌中表达的 pp28 重组蛋白的过程的结果。左部分是使用实施例中制备的抗 pp28 单克隆抗体进行检测的结果,右部分是使用抗大肠杆菌抗原的抗体进行检测的结果。Ma :标记物、元 :柱添加前、pass :通过组分、elute :洗脱组分、conc. :浓缩组分。

具体实施方式

[0012] pp28 是作为 HCMV 的结构蛋白之一的 28kDa 的磷蛋白,由于其编码在 UL99 基因中,所以有时还被称作 UL99。SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列是 HCMV AD169 株所具有的 pp28 的氨基酸序列,在 GenBank 中也以 X17403(全基因组)等检索号注册。编码 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的病毒 DNA 的核苷酸序列见 SEQ ID NO: 1。

[0013] 在本发明中,使用由 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列构成的人工 pp28 作为抗原。或者,使用人工多肽作为抗原,所述人工多肽由 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列中有少数氨基酸残基被取代、缺失、插入和 / 或添加而得到的氨基酸序列构成、且具有与针对 HCMV 产生的 pp28 而在生物体内诱导的抗体通过抗原抗体反应进行结合的反应性。后一种多肽与 SEQ ID NO: 2 的同源性为 90% 以上、优选为 95% 以上、更优选为 98% 以上。作为后一种多肽,还优选由 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列中有 1 个或多个氨基酸残基被取代、缺失、插入和 / 或添加而得到的氨基酸序列构成的多肽。

[0014] 在实施例中,只使用由 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列构成的 pp28 全长蛋白作为抗原,可以检测所有的来自 HCMV 感染患者的 100 个检体。病毒的基因组突变频繁,关于 pp28 的氨基酸序列,在临床分离株中就发现了各种各样的突变序列。因此,在采集了上述检体的 100 名感染患者中,认为在 HCMV 的 pp28 的氨基酸序列上存在一部分差异。即使是

针对由上述的各种氨基酸序列构成的天然的 pp28 而在生物体内诱导的抗体,也均与由 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列构成的多肽反应而被检测出来,因此即使是以与 SEQ ID NO: 2 在氨基酸序列上存在一部分差异的多肽作为抗原的情形,认为也同样可以检测抗 pp28 的抗体(抗 pp28 抗体)。当为与 SEQ ID NO: 2 的同源性足够高的多肽时,与在 HCMV 感染者体内诱导的抗 pp28 抗体的反应性和由原始的 SEQ ID NO: 2 构成的 pp28 同等的几率高。

[0015] 需要说明的是,由任意的氨基酸序列构成的多肽是否具有与针对 HCMV 所产生的 pp28 而在生物体内诱导的抗体通过抗原抗体反应进行结合的反应性,这例如可以通过使由已知的 HCMV 感染患者分离的血清等样品与该多肽反应而容易地进行确认。如果可以确认存在于血清中的抗体与多肽结合,则可以判断该多肽具有上述的反应性。

[0016] 这里,氨基酸序列的“同源性”是指,将应该进行比较的两个氨基酸序列排列整齐,使这两个氨基酸序列的氨基酸残基尽可能多地一致,用一致的氨基酸残基数除以总氨基酸残基数,所得的值用百分率表示,即为同源性的值。进行上述排比时,根据需要,在进行比较的两个序列的一方或双方中插入适当的间隙。关于这样的序列的排比化,例如可以使用 BLAST、FASTA、CLUSTAL W 等众所周知的程序容易地进行。插入间隙时,上述总氨基酸残基数是指将 1 个间隙作为 1 个氨基酸残基来计数的残基数。如此计数的总氨基酸残基数在进行比较的两个序列间不同时,同源性(%)用一致的氨基酸残基数除以长的序列的总氨基酸残基数来计算。

[0017] 需要说明的是,已知构成天然蛋白的 20 种氨基酸可以分成具有类似性质的组,如具有低极性侧链的中性氨基酸(Gly、Ile、Val、Leu、Ala、Met、Pro)、具有亲水性侧链的中性氨基酸(Asn、Gln、Thr、Ser、Tyr、Cys)、酸性氨基酸(Asp、Glu)、碱性氨基酸(Arg、Lys、His)、芳族氨基酸(Phe、Tyr、Trp),当为这些组间的取代时,多肽的性质往往不会发生变化。因此,当 SEQ ID NO: 2 的少数氨基酸残基在上述各组内被取代时,与针对 HCMV 所产生的 pp28 而在生物体内诱导的抗体的反应性、与由原始的 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列构成的多肽同等的可能性特别高。在本发明中用作抗原的多肽中,由如此取代的氨基酸序列构成的多肽是由不同于 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列构成的多肽的一个优选例子。

[0018] “人工多肽”是指,通过化学合成、基因工程学方法及其他方法人工制造的多肽,不包含对在感染了 HCMV 的细胞内由 HCMV 基因组表达产生的蛋白进行回收而得到的多肽。如上所述,pp28 的氨基酸序列和编码该氨基酸序列的核苷酸序列注册在数据库中并众所周知,本申请序列表中也有记载。另外,编码各氨基酸的密码子是公知的,因此可以容易地鉴定编码特定的氨基酸序列的多核苷酸的核苷酸序列。因此,即使是由不同于 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列构成的多肽,也可以容易地鉴定编码该多肽的多核苷酸的核苷酸序列。根据上述序列信息,本发明中用作抗原的多肽可以通过任一种方法来制造。

[0019] 作为化学合成法的具体例子,例如可以列举:Fmoc 法(苄氧羰基法)、tBoc 法(叔丁氧羰基法)等。另外,还可以利用各种市售的肽合成仪按照常规方法进行合成。进行化学合成时,只根据氨基酸序列,即可合成所期望的多肽。

[0020] 利用基因工程学方法来制作多肽的方法也众所周知,简而言之,制备编码上述多肽的多核苷酸,将该多核苷酸插入适当的表达载体中,再使用适当的表达系统使之表达并回收、纯化,从而可以以重组多肽的形式得到目标抗原多肽。本发明中用作抗原的多肽具有百数十残基以上的大小,因此为了以低成本进行大量合成,优选利用基因工程学方法,使用

大肠杆菌等宿主细胞制作重组多肽。根据使用的宿主细胞的种类,重组多肽可以接受各种翻译后修饰(N末端甲硫氨酸的脱离、N末端乙酰化、添加糖链、在细胞内利用蛋白酶进行的有限分解、肉豆蔻酰化、异戊二烯化、磷酸化等),但这样的翻译后被修饰的形态的多肽,只要其具有与针对 HCMV 所产生的 pp28 而在生物体内诱导的抗体的反应性,在本发明的方法中也可用作抗原。

[0021] 通过基因工程学方法制作由 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列构成的多肽时,编码该多肽的多核苷酸(SEQ ID NO: 1)可以如下制备:用具有由 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列构成的 pp28 的 HCMV(AD169 株等)感染适当的宿主细胞,从该感染细胞中提取病毒 DNA,再通过 PCR 合成 DNA,即可制得。关于 PCR 中使用的引物,本领域技术人员根据 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列可以容易地进行设计、制备,例如可以使用实施例中使用的由 SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 4 所示的核苷酸序列构成的引物。使用表达由其他的氨基酸序列构成的 pp28 的 HCMV 株时,可以制备编码由不同于 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列构成的多肽的多核苷酸。另外,关于编码由所期望的氨基酸序列构成的多肽的多核苷酸,可以使用市售的核酸合成仪、或者如上所述利用常规方法向已制备的 DNA 中导入适当的突变而得到。将制备的多核苷酸插入适当的载体中,使其在适当的表达系统中表达,再将其回收、纯化,从而可以得到所期望的多肽。使用的载体或各种表达系统(细菌表达系统、酵母细胞表达系统、哺乳动物细胞表达系统、昆虫细胞表达系统、无细胞表达系统等)也众所周知,各种载体或宿主细胞、试剂类、试剂盒均有销售,所以本领域技术人员可以适当选择使用。HCMV 株也有市售,另外还可以从感染患者中分离得到,因此容易获取。病毒 DNA 的提取、PCR、向载体中插入 DNA、向宿主细胞中导入载体、所表达的多肽的回收、纯化等方法本身均为众所周知的常规方法。

[0022] 如下述实施例中具体所述,由 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列构成的重组多肽可以使用大肠杆菌表达系统进行表达,该已表达的多肽例如可以使用固定有与 pp28 特异性结合的单克隆抗体的抗体柱简便地进行纯化。若使用如此操作而得到的重组多肽作为免疫测定的抗原,则可以无遗漏地检测所有的 HCMV 感染患者。需要说明的是,单克隆抗体的制作方法是众所周知的常规方法,本领域技术人员可以容易地进行制作。例如,如下述实施例中记载的那样,用灭活病毒对动物进行免疫,再从该动物中采集脾细胞等产生抗体的细胞,使其与骨髓瘤细胞融合制作杂交瘤,再选择产生具有所期望的结合性的抗体的杂交瘤使之增殖,从而可以从培养上清中回收与 pp28 进行特异性结合的单克隆抗体。

[0023] 免疫测定本身在该领域众所周知。若将免疫测定按照反应方式进行分类,则分成夹层法、竞争法、凝聚法、免疫层析法、蛋白质印迹法等;若按照标记进行分类,则分成放射免疫测定、荧光免疫测定、酶免疫测定(EIA)、生物素免疫测定等。另外,使用抗原的抗体检查方法也已知有各种方法,作为具体例子并不限于这些,可以列举:EIA(ELISA、CLEIA(化学发光酶免疫测定法)、蛋白质印迹等)、凝聚法(乳胶凝聚法等)、补体结合反应(CF)等。按照本发明的方法测定样品中的抗 pp28 抗体时,可以采用公知的任一种免疫测定法。需要说明的是,在本发明中,“测定”一词包含检测、定量和半定量。

[0024] 用于免疫测定时,上述的人工多肽抗原可以在单末端或两末端添加有任意的氨基酸序列的形态(作为由包含这样的添加序列的氨基酸序列构成的多肽)进行使用。在该领域,即使是与不同的蛋白融合而得到的融合蛋白,也可以使用识别一方的蛋白的抗体进

行检测,这是广为人知的事实。因此,即使以这样的形态使用上述人工多肽,也可以对样品中的抗 pp28 抗体进行免疫测定。例如,即使是以与其他蛋白的融合蛋白的形态进行使用的情形,在该融合蛋白中发挥抗 pp28 抗体的抗原的功能的也是上述的人工多肽部分,因此包含在“使用人工多肽作为抗原”中。如上所述,将上述人工多肽抗原以在单末端或两末端添加有任意的氨基酸序列的形态进行使用的情形也包含在本发明的方法中。上述人工多肽中所添加的氨基酸序列可以是构成任何的功能性蛋白或其功能性片段的氨基酸序列,也可以是接头等不具有生理活性的序列。当为重组多肽时,有时在制造步骤中添加 GST 或 His 等标记序列,但即使是添加有这样的标记序列的状态,也可以直接用作抗原。

[0025] 例如,进行 ELISA 或 CLEIA 时,将上述人工多肽抗原分别在板或颗粒等上固化,使其与样品反应,将样品中的抗 pp28 抗体捕集到固相上,进行清洗,之后与酶标记的抗 IgG 抗体和 / 或抗 IgM 抗体反应,再进行清洗,之后添加底物。根据酶反应量,可以测定捕集到固相上的抗 pp28 抗体。进行蛋白质印迹时,将上述人工多肽抗原电泳后转移到薄膜上,使该薄膜与样品反应,之后与上述同样地与酶标记的抗 IgG 抗体和 / 或抗 IgM 抗体反应即可。当为凝聚法时,例如将上述人工多肽抗原固定在乳胶颗粒等上,使其与样品反应,再根据吸光度等测定颗粒的凝聚量即可。

[0026] 在生物体内针对 HCMV 而诱导的抗体主要是 IgG 和 IgM。初感染时,首先 IgM 上升,感染数天后达到最大值,之后减少,IgG 在感染后 1 周左右开始上升,以后长期持续。因此,当为可以将样品中的抗 pp28 抗体分为 IgG 和 IgM 进行检测的方法时(例如上述的 ELISA 或蛋白质印迹等),从准确检测 HCMV 感染的角度考虑,在用抗原补足的抗 pp28 抗体的检测中,优选使用抗 IgG 抗体和抗 IgM 抗体两者。

[0027] 本发明的方法所适用的样品为从受试者体内分离的样品,优选为血液样品(全血、血浆、血清等)。

[0028] 实施本发明的方法时,可以同时使用上述人工多肽以外的 HCMV 抗原蛋白或其片段。例如,进行 ELISA 时,将所有的抗原混合固化在板上、或者分别固化在分开的孔中,使其与样品反应即可。进行 CLEIA 时,将所有的抗原混合固化在颗粒上,使其与样品反应即可。进行蛋白质印迹时,例如将所有的抗原混合进行电泳,之后转移到薄膜上,使其与样品反应即可。进行凝聚法时,将已混合的抗原固定在颗粒上,或者将抗原各自单独固定的颗粒混合,使该颗粒与样品反应即可。

[0029] 上述的人工多肽可以作为 HCMV 感染的检测试剂来提供。该试剂可以仅含有上述的多肽,也可以进一步含有 pp28 以外的一种以上的抗原蛋白或其片段。另外,还可以进一步含有对这些多肽的稳定化等有用的其他成分。另外,还可以以抗原多肽被固定在板或颗粒等固相上的形态来提供。

[0030] 上述检测试剂可以与其他试剂类等适当组合,以 HCMV 感染的检测试剂盒的形式来提供。免疫测定所必需的其他试剂类众所周知。例如,在本发明的检测试剂盒中,除上述的检测试剂外,还可以包含可用作样品稀释液或清洗液等的缓冲液、用于检测与抗原多肽结合的抗体的标记抗免疫球蛋白抗体等。

实施例

[0031] 以下,根据实施例来更具体地说明本发明。但本发明并不限于下述实施例。

[0032] 1. 候选抗原的选择

利用小麦胚芽无细胞表达系统合成 HCMV 蛋白中的 15 种（下述表 1）蛋白的全长蛋白。合成中使用セルフリースサイエンス公司的 Protomist DT。载体中所插入的插入 DNA 可以如下获得：用 HCMV AD169 株（从理研バイオリソースセンター购入）感染 MRC-5 细胞，从该感染细胞中提取病毒 DNA，通过使用市售试剂盒的 PCR 扩增编码各全长蛋白的 DNA 即可得到。将各 DNA 克隆到包含 SP6 启动子的质粒载体中，使用所得的质粒 DNA，利用 5mL 的反应系统（25 μ g 质粒 DNA）进行 37 $^{\circ}$ C、6 小时的转录反应和 15 $^{\circ}$ C、20 小时的翻译，合成各全长蛋白。需要说明的是，在 pp28 的 DNA 的扩增中，使用由 SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 4 所示的核苷酸序列构成的引物（分别包含 BamHI 识别序列和 NotI 识别序列），并使用 Pfu Ultra DNA 聚合酶（Agilent Technologies 公司）在 95 $^{\circ}$ C 2 分钟的变性处理、30 个循环的 95 $^{\circ}$ C 20 秒—55 $^{\circ}$ C 20 秒—72 $^{\circ}$ C 1 分钟、最后 72 $^{\circ}$ C 3 分钟的反应条件下进行 PCR。

[0033] [表 1]

蛋白名称	氨基酸数
ppUL32 (pp150)	1048
ppUL44 (pp52)	433
ppUL83 (pp65)	561
ppUL80a (pp38)	373
ppUL99 (pp28)	190
ppUL55 (gp130)	907
UL75	743
UL123	491
UL122	411
pUL57	1235
UL115	306
UL100	372
UL73	138
UL74	466
UL82	559

2. 候选抗原的确定

关于上述合成的各全长蛋白，通过蛋白质印迹法研究其与 100 例 HCMV 感染患者血清的反应性。将各全长蛋白进行电泳，之后转移到薄膜上，使薄膜与 100 例 HCMV 感染患者血清反应，之后利用抗人 IgG+IgM 进行检测。其结果，如下述表 2 所示，pp150、pp28、gp130 这三种均显示出 100% 的反应性。

[0034] [表 2]

100例HCMV感染患者血清的结果		
	血清阳性数	%
ppUL32(pp150)	100	100
ppUL44(pp52)	52	52
ppUL83(pp65)	67	67
ppUL80a(pp38)	65	65
ppUL99(pp28)	100	100
ppUL55(gp130)	100	100
UL75	25	25
UL123	65	65
UL122	67	67
pUL57	27	27
UL115	2	2
UL100	95	95
UL73	1	1
UL74	0	0
UL82	18	18

3. 利用大肠杆菌表达系统制作抗原

为了大量生产重组蛋白,优选利用大肠杆菌表达系统。于是,对于显示出100%的反应性的三种抗原,使用常规方法的大肠杆菌表达系统研究全长蛋白的制作。将编码上述制备的各抗原蛋白的cDNA插入大肠杆菌用的表达载体中,再导入大肠杆菌中使之表达。其结果,可以确认pp28的表达。而pp150、gp130(膜蛋白)不可能在大肠杆菌中表达。

[0035] 关于可以在大肠杆菌中表达的pp28,使用抗体柱对其进行纯化。用灭活病毒对小鼠进行免疫,利用常规方法制作pp28抗原特异性单克隆抗体,将该抗体固定在CNBr-活化Sepharose 4B柱(GE Healthcare公司)上,作为纯化用的抗体柱。其结果,只通过一次的柱处理即可纯化pp28蛋白,而且没有来自大肠杆菌的蛋白的污染(图1)。利用该重组pp28蛋白,也可以100%检测HCMV感染患者。

[0001]

<110> 富士瑞必欧株式会社
 <120> 人巨细胞病毒感染的检测方法
 <130> PF432-PCT
 <160> 4
 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1
 <211> 573
 <212> DNA
 <213> 人巨细胞病毒

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(573)
 <223>

<400> 1
 atg ggt gcc gaa ctc tgc aaa cga ata tgt tgt gag ttc ggt acc acg 48
 Met Gly Ala Glu Leu Cys Lys Arg Ile Cys Cys Glu Phe Gly Thr Thr
 1 5 10 15
 ccc ggt gag ccc ctg aaa gat get ctg ggt cgc cag gtg tet cta cgc 96
 Pro Gly Glu Pro Leu Lys Asp Ala Leu Gly Arg Gln Val Ser Leu Arg
 20 25 30
 tcc tac gac aac atc cct ccg act tcc tcc tcg gac gaa ggg gag gac 144
 Ser Tyr Asp Asn Ile Pro Pro Thr Ser Ser Ser Asp Glu Gly Glu Asp
 35 40 45
 gat gac gac ggg gag gat gac gat aac gag gag cgg caa cag aag ctg 192
 Asp Asp Asp Gly Glu Asp Asp Asp Asn Glu Glu Arg Gln Gln Lys Leu
 50 55 60
 egg ctc tgc ggt agt ggc tgc ggg gga aac gac agt agt age ggc age 240
 Arg Leu Cys Gly Ser Gly Cys Gly Gly Asn Asp Ser Ser Ser Gly Ser
 65 70 75 80
 cac cgc gag gcc acc cac gac ggc tcc aag aaa aac gcg gtg cgc tcg 288
 His Arg Glu Ala Thr His Asp Gly Ser Lys Lys Asn Ala Val Arg Ser
 85 90 95
 acg ttt cgc gag gac aag gct ccg aaa ccg agc aag cag tca aaa aag 336
 Thr Phe Arg Glu Asp Lys Ala Pro Lys Pro Ser Lys Gln Ser Lys Lys
 100 105 110

[0002]

aaa aag aaa ccc tca aaa cat cac cac cat cag caa agc tcc att atg	384
Lys Lys Lys Pro Ser Lys His His His His Gln Gln Ser Ser Ile Met	
115 120 125	
cag gag acg gac gac cta gac gaa gag gac acc tca att tac ctg tcc	432
Gln Glu Thr Asp Asp Leu Asp Glu Glu Asp Thr Ser Ile Tyr Leu Ser	
130 135 140	
ccg ccc ccg gtc ccc ccc gtc cag gtg gtg gct aag cga ctg ccg cgg	480
Pro Pro Pro Val Pro Pro Val Gln Val Val Ala Lys Arg Leu Pro Arg	
145 150 155 160	
ccc gac aca ccc agg act ccg cgc caa aag aag att tca caa cgt cca	528
Pro Asp Thr Pro Arg Thr Pro Arg Gln Lys Lys Ile Ser Gln Arg Pro	
165 170 175	
ccc acc ccc ggg aca aaa aag ccc gcc gcc tcc ttg ccc ttt taa	573
Pro Thr Pro Gly Thr Lys Lys Pro Ala Ala Ser Leu Pro Phe	
180 185 190	
<210> 2	
<211> 190	
<212> PRT	
<213> 人巨细胞病毒	
<400> 2	
Met Gly Ala Glu Leu Cys Lys Arg Ile Cys Cys Glu Phe Gly Thr Thr	
1 5 10 15	
Pro Gly Glu Pro Leu Lys Asp Ala Leu Gly Arg Gln Val Ser Leu Arg	
20 25 30	
Ser Tyr Asp Asn Ile Pro Pro Thr Ser Ser Ser Asp Glu Gly Glu Asp	
35 40 45	
Asp Asp Asp Gly Glu Asp Asp Asp Asn Glu Glu Arg Gln Gln Lys Leu	
50 55 60	
Arg Leu Cys Gly Ser Gly Cys Gly Gly Asn Asp Ser Ser Ser Gly Ser	
65 70 75 80	
His Arg Glu Ala Thr His Asp Gly Ser Lys Lys Asn Ala Val Arg Ser	
85 90 95	
Thr Phe Arg Glu Asp Lys Ala Pro Lys Pro Ser Lys Gln Ser Lys Lys	

[0003]

100	105	110
Lys Lys Lys Pro Ser Lys His His His His Gln Gln Ser Ser Ile Met		
115	120	125
Gln Glu Thr Asp Asp Leu Asp Glu Glu Asp Thr Ser Ile Tyr Leu Ser		
130	135	140
Pro Pro Pro Val Pro Pro Val Gln Val Val Ala Lys Arg Leu Pro Arg		
145	150	155
Pro Asp Thr Pro Arg Thr Pro Arg Gln Lys Lys Ile Ser Gln Arg Pro		
165	170	175
Pro Thr Pro Gly Thr Lys Lys Pro Ala Ala Ser Leu Pro Phe		
180	185	190

<210> 3
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 用于扩增 pp28 基因的引物

<400> 3
 agtggatcca tgggtgccga actctgcaaa c

31

<210> 4
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 用于扩增 pp28 基因的引物

<400> 4
 agagcggccg cttaaaaggg caaggaggcg

30

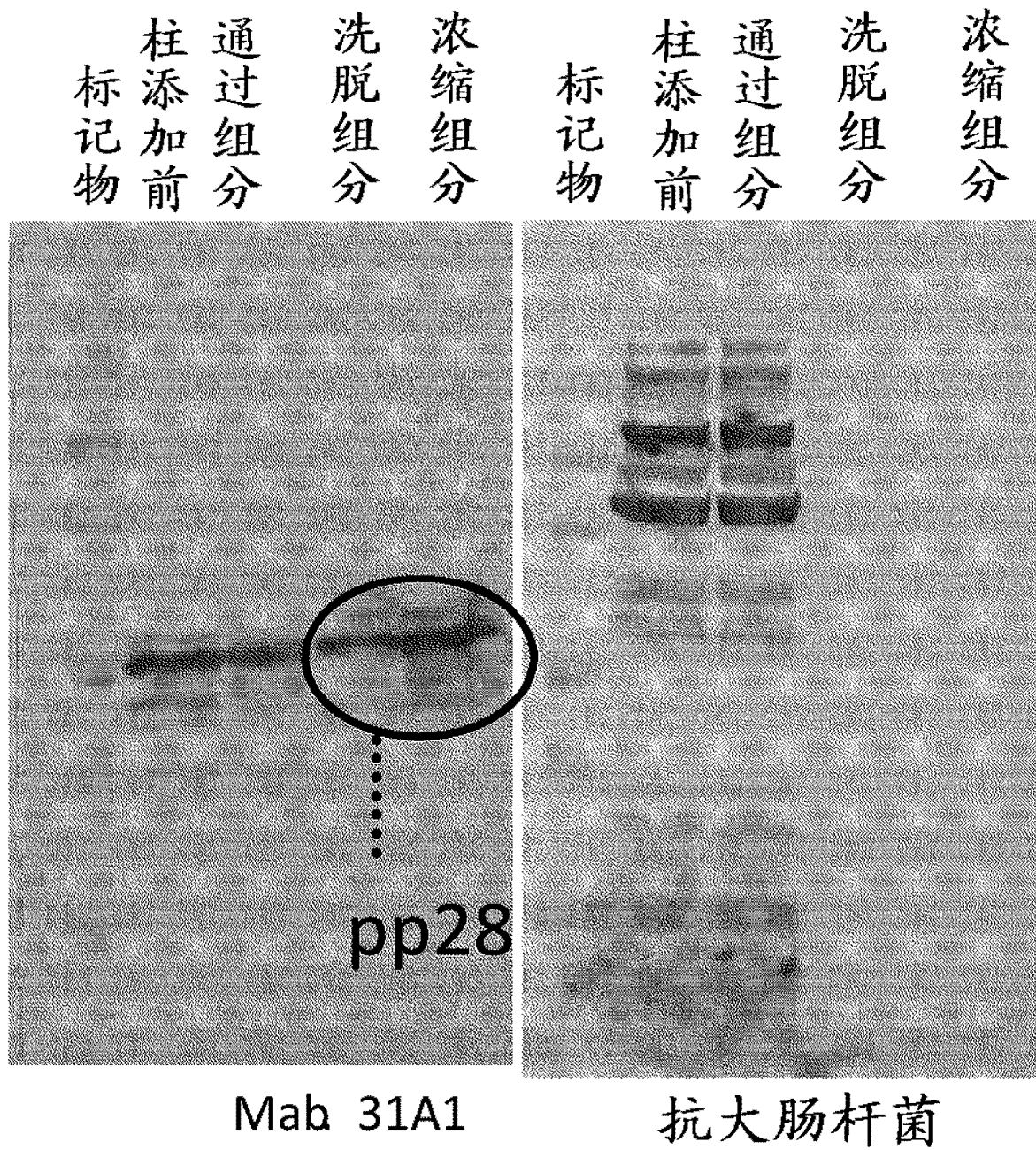


图 1

专利名称(译)	人巨细胞病毒感染的检测方法		
公开(公告)号	CN103003694A	公开(公告)日	2013-03-27
申请号	CN201180033738.2	申请日	2011-07-05
[标]申请(专利权)人(译)	富士瑞必欧株式会社		
申请(专利权)人(译)	富士瑞必欧株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	富士瑞必欧株式会社		
[标]发明人	藤井信之 本多秀夫 内田好昭 小见和也		
发明人	藤井信之 本多秀夫 内田好昭 小见和也		
IPC分类号	G01N33/569 C07K14/045 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/53 C07K14/045 G01N2469/20 C12N2710/16122 C07K14/005 G01N33/569 G01N2333/045 G01N33/56994 G01N33/6854		
代理人(译)	孔青		
优先权	2010154937 2010-07-07 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了可以高灵敏度地检测HCMV感染的实用性高的新方法。本申请的发明人合成了15种HCMV蛋白的全长蛋白，对其与HCMV感染患者血清的反应性进行了深入研究，结果发现：使用pp28全长蛋白作为抗原时，可以无遗漏地检测所有的感染患者。可以使用大肠杆菌以重组蛋白的形式大量合成、纯化pp28全长蛋白，并可以将其作为用于检查HCMV的抗原进行商业利用。

