

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

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

G01N 33/53

G01N 33/543 G01N 33/531

G01N 33/68 C12P 21/02



## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03142495.3

[43] 公开日 2004年1月14日

[11] 公开号 CN1467500A

[22] 申请日 2003.6.12 [21] 申请号 03142495.3

[30] 优先权

[32] 2002. 6. 13 [33] JP [31] 173027/2002

[32] 2003. 5. 2 [33] JP [31] 127099/2003

[71] 申请人 佳能株式会社

地址 日本东京

[72] 发明人 本间努 矢野哲哉 野本毅

古崎真也

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利  
商标事务所

代理人 唐伟杰

权利要求书7页 说明书78页

[54] 发明名称 免疫学测定方法、免疫测定用试剂  
及其制造方法

[57] 摘要

本发明公开了一种用于定量或定性测定检测样品中作为测定对象的抗体或抗原的存在的方法，包括将该检测样品与和该测定对象抗体或抗原发生免疫反应的抗原或抗体混合，并测定免疫凝集反应的水平，其中，反应性抗原或抗体通过能与该载体结合的氨基酸序列有效地固定在载体上。

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

1、 对检测样品中作为测定对象的抗体或抗原的存在或其存在量进行测定的方法，包括步骤：准备固定了分别与所述样品中作为测定对象的抗体或抗原相对应的抗原或抗体的载体，使上述载体和上述检测样品混合，和对通过上述混合步骤引起的免疫凝集反应的水平进行测定，其中固定于上述载体上的上述抗原和抗体是借助于对上述载体具有结合能力的氨基酸序列与上述载体结合的。

2、 权利要求 1 记载的测定方法，其中：上述载体是颜料。

3、 权利要求 2 记载的测定方法，其中：上述颜料是铜酞菁。

4、 权利要求 3 记载的测定方法，其中上述颜料为铜酞菁，而且对上述颜料具有结合能力的氨基酸序列含有至少一个从下述序列中选择出来的序列：

Lys-Tyr-Asp-Ser-Arg-His-Leu-His-Thr-His-Ser-His (SEQ  
ID NO 1),

Pro-Asn-Arg-Leu-Gly-Arg-Arg-Pro-Val-Arg-Trp-Glu (SEQ  
ID NO 2),

Lys-Cys-Cys-Tyr-Tyr-Asp-His-Ser-His-Ala-Leu-Ser (SEQ  
ID NO 3),

Glu-Tyr-Leu-Ser-Ala-Ile-Val-Ala-Gly-Pro-Trp-Pro (SEQ  
ID NO 4),

Lys-Leu-Trp-Ile-Leu-Glu-Pro-Thr-Val-Thr-Pro-Thr (SEQ  
ID NO 5),

Gln-Ser-Asn-Leu-Lys-Val-Ile-Pro-Ser-Trp-Trp-Phe (SEQ  
ID NO 6),

Trp-Ile-Pro-Pro-Gln-Trp-Ser-Arg-Leu-Ile-Glu-Pro (SEQ  
ID NO 7),

Asp-His-Pro-Gln-Ala-Lys-Pro-Asn-Trp-Tyr-Gly-Val (SEQ  
ID NO 8),

Gly-Leu-Pro-Pro-Tyr-Ser-Pro-His-Arg-Leu-Ala-Gln (SEQ ID NO 9),  
Lys-Leu-Thr-Thr-Gln-Tyr-Met-Ala-Arg-Ser-Ser-Ser (SEQ ID NO 10),  
Lys-Val-Trp-Met-Leu-Pro-Pro-Leu-Pro-Gln-Ala-Thr (SEQ ID NO 11),  
Asn-Val-Thr-Ser-Thr-Ala-Phe-Ile-Asp-Thr-Pro-Trp (SEQ ID NO 12),  
Arg-Leu-Asn-Leu-Asp-Ile-Ile-Ala-Val-Thr-Ser-Val (SEQ ID NO 13),  
Thr-Leu-Pro-Ser-Pro-Leu-Ala-Leu-Leu-Thr-Val-His (SEQ ID NO 14),  
Thr-Asn-Arg-His-Asn-Pro-His-His-Leu-His-His-Val (SEQ ID NO 15)。

5、 权利要求 2 记载的测定方法，其中上述颜料是炭黑。

6、 权利要求 5 记载的测定方法，其中上述颜料是炭黑，而且对上述颜料具有结合能力的氨基酸序列含有至少一个从下述序列中选择出来的序列：

Trp-Pro-His-Ala-Trp-Lys-Val-Trp-Trp-Pro-Ala-Ser (SEQ ID NO 16),  
Asn-Trp-Trp-Trp-Pro-Pro-Tyr-Ile-Arg-His-Gln-Pro (SEQ ID NO 17),  
Trp-His-Trp-Ser-Trp-Thr-Pro-Trp-Pro-Ser-His-His (SEQ ID NO 18),  
Trp-Pro-Trp-Ala-Trp-His-Pro-Ser-Arg-Asp-Val-Tyr (SEQ ID NO 19),  
Trp-His-Gly-Tyr-Trp-Tyr-Ser-Asn-Leu-Asn-Thr-Thr (SEQ ID NO 20),

Trp-Trp-Thr-Pro-Trp-Met-Ser-His-Ala-Tyr-Pro-Val (SEQ  
ID NO 21),  
Trp-Pro-Asn-Pro-Tyr-Trp-Gly-Trp-Phe-Ala-Ala-Val (SEQ  
ID NO 22),  
Thr-Ser-Trp-His-Thr-Trp-Trp-Trp-Arg-Gln-Pro-Pro (SEQ  
ID NO 23),  
Asn-Ala-Trp-His-Lys-Tyr-Trp-Trp-Pro-Ile-Thr-Lys (SEQ  
ID NO 24),  
His-Pro-Asn-Asn-Asp-Trp-Ser-Lys-Ala-Pro-Gln-Phe (SEQ  
ID NO 25),  
Trp-Trp-Thr-Pro-Gln-Pro-Trp-Trp-Ser-Phe-Pro-Ile (SEQ  
ID NO 26),  
Trp-Pro-His-Thr-Ser-Trp-Trp-Gln-Thr-Pro-Leu-Thr (SEQ  
ID NO 27),  
Trp-His-Val-Asn-Trp-Asp-Pro-Met-Ala-Trp-Tyr-Arg (SEQ  
ID NO 28),  
Ser-Trp-Pro-Trp-Trp-Thr-Ala-Tyr-Arg-Val-His-Ser (SEQ  
ID NO 29),  
Trp-His-Ser-Asn-Trp-Tyr-Gln-Ser-Ile-Pro-Gln-Val (SEQ  
ID NO 30),  
Gly-Tyr-Trp-Pro-Trp-Lys-Phe-Glu-His-Ala-Thr-Val (SEQ  
ID NO 31),  
Ala-Trp-Trp-Pro-Thr-Thr-Phe-Pro-Pro-Tyr-Tyr-Tyr (SEQ  
ID NO 32),  
Asn-Pro-Trp-Trp-Ser-His-Tyr-Tyr-Pro-Arg-Ser-Val (SEQ  
ID NO 33),  
Trp-Pro-His-Asn-Tyr-Pro-Leu-Asn-His-Ser-Asn-Pro (SEQ  
ID NO 34),  
Thr-Trp-Ala-His-Pro-Leu-Glu-Ser-Asp-Tyr-Leu-Arg (SEQ

ID NO 35),  
His-Thr-Tyr-Tyr-His-Asp-Gly-Trp-Arg-Leu-Ala-Pro (SEQ  
ID NO 36),  
Thr-Phe-Val-Gln-Thr-Pro-Leu-Ser-His-Leu-Ile-Ala (SEQ  
ID NO 37),  
Arg-Val-Pro-Pro-Ser-Lys-Leu-Thr-Arg-Pro-Pro-Phe (SEQ  
ID NO 38),  
His-Ser-Ile-Tyr-Ser-Val-Thr-Pro-Ser-Thr-Ala-Ser (SEQ  
ID NO 39),  
Leu-Asn-Thr-Gln-Asn-His-Ala-Pro-Leu-Pro-Ser-Ile (SEQ  
ID NO 40)。

7、 用于对检测样品中作为测定对象的抗体或抗原的存在或存在量进行测定的测定用试剂，其中，与上述抗体或抗原相对应的抗原或抗体被固定于载体上，而固定于上述载体上的所述抗原或抗体是借助于对上述载体具有结合能力的氨基酸序列与上述载体结合的。

8、 用于对检测样品中作为测定对象的抗体或抗原的存在或其存在量进行测定的测定用试剂的制造方法，包括将与上述抗体或抗原相对应的抗原或抗体固定于载体上的步骤，其中固定于上述载体上的抗原或抗体是借助于对上述载体具有结合能力的氨基酸序列与上述载体结合的。

9、 权利要求 8 记载的制造方法，其特征是还包括使用具有上述抗原或抗体生产能力的生物、或导入了与上述生产能力有关的基因的转化体生产上述相对应的抗原或抗体的步骤。

10、 权利要求 9 记载的制造方法，特征是：上述转化体的宿主微生物是大肠杆菌 (Escherichia coli)。

11、 含有至少一个从下述氨基酸序列选出的序列的肽。

Lys-Tyr-Asp-Ser-Arg-His-Leu-His-Thr-His-Ser-His (SEQ  
ID NO 1)

- Pro-Asn-Arg-Leu-Gly-Arg-Arg-Pro-Val-Arg-Trp-Glu (SEQ  
ID NO 2)
- Lys-Cys-Cys-Tyr-Tyr-Asp-His-Ser-His-Ala-Leu-Ser (SEQ  
ID NO 3)
- Glu-Tyr-Leu-Ser-Ala-Ile-Val-Ala-Gly-Pro-Trp-Pro (SEQ  
ID NO 4)
- Lys-Leu-Trp-Ile-Leu-Glu-Pro-Thr-Val-Thr-Pro-Thr (SEQ  
ID NO 5)
- Gln-Ser-Asn-Leu-Lys-Val-Ile-Pro-Ser-Trp-Trp-Phe (SEQ  
ID NO 6)
- Trp-Ile-Pro-Pro-Gln-Trp-Ser-Arg-Leu-Ile-Glu-Pro (SEQ  
ID NO 7)
- Asp-His-Pro-Gln-Ala-Lys-Pro-Asn-Trp-Tyr-Gly-Val (SEQ  
ID NO 8)
- Gly-Leu-Pro-Pro-Tyr-Ser-Pro-His-Arg-Leu-Ala-Gln (SEQ  
ID NO 9)
- Lys-Leu-Thr-Thr-Gln-Tyr-Met-Ala-Arg-Ser-Ser-Ser (SEQ  
ID NO 10)
- Lys-Val-Trp-Met-Leu-Pro-Pro-Leu-Pro-Gln-Ala-Thr (SEQ  
ID NO 11)
- Asn-Val-Thr-Ser-Thr-Ala-Phe-Ile-Asp-Thr-Pro-Trp (SEQ  
ID NO 12)
- Arg-Leu-Asn-Leu-Asp-Ile-Ile-Ala-Val-Thr-Ser-Val (SEQ  
ID NO 13)
- Thr-Leu-Pro-Ser-Pro-Leu-Ala-Leu-Leu-Thr-Val-His (SEQ  
ID NO 14)
- Thr-Asn-Arg-His-Asn-Pro-His-His-Leu-His-His-Val (SEQ  
ID NO 15)
- Trp-Pro-His-Ala-Trp-Lys-Val-Trp-Trp-Pro-Ala-Ser (SEQ

- ID NO 16)  
Asn-Trp-Trp-Trp-Pro-Pro-Tyr-Ile-Arg-His-Gln-Pro (SEQ  
ID NO 17)  
Trp-His-Trp-Ser-Trp-Thr-Pro-Trp-Pro-Ser-His-His (SEQ  
ID NO 18)  
Trp-Pro-Trp-Ala-Trp-His-Pro-Ser-Arg-Asp-Val-Tyr (SEQ  
ID NO 19)  
Trp-His-Gly-Tyr-Trp-Tyr-Ser-Asn-Leu-Asn-Thr-Thr (SEQ  
ID NO 20)  
Trp-Trp-Thr-Pro-Trp-Met-Ser-His-Ala-Tyr-Pro-Val (SEQ  
ID NO 21)  
Trp-Pro-Asn-Pro-Tyr-Trp-Gly-Trp-Phe-Ala-Ala-Val (SEQ  
ID NO 22)  
Thr-Ser-Trp-His-Thr-Trp-Trp-Trp-Arg-Gln-Pro-Pro (SEQ  
ID NO 23)  
Asn-Ala-Trp-His-Lys-Tyr-Trp-Trp-Pro-Ile-Thr-Lys (SEQ  
ID NO 24)  
His-Pro-Asn-Asn-Asp-Trp-Ser-Lys-Ala-Pro-Gln-Phe (SEQ  
ID NO 25)  
Trp-Trp-Thr-Pro-Gln-Pro-Trp-Trp-Ser-Phe-Pro-Ile (SEQ  
ID NO 26)  
Trp-Pro-His-Thr-Ser-Trp-Trp-Gln-Thr-Pro-Leu-Thr (SEQ  
ID NO 27)  
Trp-His-Val-Asn-Trp-Asp-Pro-Met-Ala-Trp-Tyr-Arg (SEQ  
ID NO 28)  
Ser-Trp-Pro-Trp-Trp-Thr-Ala-Tyr-Arg-Val-His-Ser (SEQ  
ID NO 29)  
Trp-His-Ser-Asn-Trp-Tyr-Gln-Ser-Ile-Pro-Gln-Val (SEQ  
ID NO 30)

Gly-Tyr-Trp-Pro-Trp-Lys-Phe-Glu-His-Ala-Thr-Val (SEQ  
ID NO 31)

Ala-Trp-Trp-Pro-Thr-Thr-Phe-Pro-Pro-Tyr-Tyr-Tyr (SEQ  
ID NO 32)

Asn-Pro-Trp-Trp-Ser-His-Tyr-Tyr-Pro-Arg-Ser-Val (SEQ  
ID NO 33)

Trp-Pro-His-Asn-Tyr-Pro-Leu-Asn-His-Ser-Asn-Pro (SEQ  
ID NO 34)

Thr-Trp-Ala-His-Pro-Leu-Glu-Ser-Asp-Tyr-Leu-Arg (SEQ  
ID NO 35)

His-Thr-Tyr-Tyr-His-Asp-Gly-Trp-Arg-Leu-Ala-Pro (SEQ  
ID NO 36)

Thr-Phe-Val-Gln-Thr-Pro-Leu-Ser-His-Leu-Ile-Ala (SEQ  
ID NO 37)

Arg-Val-Pro-Pro-Ser-Lys-Leu-Thr-Arg-Pro-Pro-Phe (SEQ  
ID NO 38)

His-Ser-Ile-Tyr-Ser-Val-Thr-Pro-Ser-Thr-Ala-Ser (SEQ  
ID NO 39)

Leu-Asn-Thr-Gln-Asn-His-Ala-Pro-Leu-Pro-Ser-Ile (SEQ  
ID NO 40)。

**12、抗原蛋白质或抗体蛋白质，其至少含有权利要求 11 记载的氨基酸序列中的一个。**

## 免疫学测定方法、免疫测定 用试剂及其制造方法

### 本发明的背景

#### (1) 本发明的领域

本发明涉及通过使与作为测定对象物的抗体或抗原相对应的抗原或抗体和样品混合后发生免疫凝集反应，然后检测或判定凝集状态来测定样品中测定对象的方法以及该方法中使用的测定用试剂及其制造方法。

#### (2) 相关的背景资料

在临床检查领域中，通过测定血液、尿等生物体样品中含有的各种成分，进行各种疾病的诊断。为此已经开发和利用了各种测定方法，例如利用酶反应的酶学测定方法、利用抗原抗体反应的免疫学测定法等已被广泛利用。特别是近些年来，利用特异性高的抗原抗体反应的免疫学测定法由于其测定精度高而被更广泛采用。

另外在环境分析和食品分析领域中，以往一般都采用从样品中提取并浓缩测定对象物质之后，使用高效液相色谱和气相色谱等分析仪器进行测定的方法。然而近几年，就象二氧芑（ダイオキシン）和内分泌干扰物质（所谓的环境激素）等问题所看到的，对极低浓度的测定对象物质的测定、各种各样的测定对象物的测定、多个样品的迅速测定等的需要增大，用以往方法进行测定变得困难了。因此，近年来利用抗原抗体反应的免疫学测定法也开始在环境分析和食品分析的领域中被利用。

作为免疫学测定法的例子有免疫凝集法（免疫比浊法、乳胶凝集法）、酶免疫测定法、放射免疫测定法等，根据测定目的不同可使用不同的方法。特别是将抗原或抗体固定于不溶性载体上、然后与样品

混合之后使其发生免疫凝集反应，对其凝集状态进行检测和判定的免疫凝集法由于不需要大型、高价的测定仪器，通过目视可以简易判定，故作为简单原位测定法被广泛运用。然而在免疫凝集法中，作为水不溶性载体微粒一般都使用聚苯乙烯乳胶和明胶粒子等（特开平 11-295313 号公报、特开 2000-338108 号公报）、由于其色调呈白色或透明，在通过目视进行判定时，存在着需要专门技术和训练等课题。

作为解决上述课题的方法，尝试着使用颜料（pigment）或染料等容易目视判定的有色调的不溶于水的载体。在特开平 4-274762 号公报中，作为不溶性载体使用酞菁色素，通过物理吸附法将抗体固定于其上实施免疫凝集测定。免疫凝集反应后的凝集物呈青色的色调，使目视判定反应容易。

然而通过物理吸附法将抗原或抗体固定于颜料等不溶性载体时，有时不能获得充分的吸附力，在测定用试剂的制造效率和保存稳定性等方面造成问题。而一般来说，利用物理吸附法将抗原或抗体进行固定时，由于这些抗原或抗体的疏水程度有差异，通常恒定而定量地固定抗原或抗体是困难的。这也成了左右测定体系的性能的大要素，而且也成了产生制造批次误差的原因。

因此，尝试使抗体部分变性，提高疏水性后再吸附于不溶性载体上的方法（生物化学实验法 11，酶免疫分析，东京化学同人、p270、1989 年）。然而在该方法中，有时存在着由于变性使抗体失去活性的情况，由此存在着不能应用于所有种类抗体的问题。

### 发明概述

本发明的目的在于提供改良的免疫学测定法，即通过带有与作为测定对象的抗体或抗原相对应的抗原或抗体的载体与样品混合后使其发生免疫凝集反应，通过检测凝集状态对样品中作为测定对象的抗体或抗原的存在或存在的量进行定性或定量测定的方法；以及该方法中使用的测定用试剂及其制造方法。

本发明人从肽库中筛选对载体、例如颜料有结合能力的具有某种氨基酸序列的肽，使用基因工程手段使该氨基酸序列与抗原或抗体融合，发现该抗原或抗体可有效地固定于载体表面，由此完成本发明。

就是说，本发明涉及到对样品中作为测定对象的抗体或抗原的存在或其存在量进行测定的方法，包括：准备其上固定了分别与作为测定对象的抗体或抗原相对应的抗原或抗体的载体、使上述载体和上述样品混合、对通过上述混合步骤引起的免疫凝集反应（immunological agglutination reaction）的水平进行测定，其中固定于上述载体上的上述抗原和抗体是借助于对上述载体具有结合能力的氨基酸序列与上述载体结合的。

另外本发明还涉及到用于对样品中作为测定对象的抗体或抗原的存在或其存在量进行测定的测定用试剂，其特征为与作为测定对象的上述抗体或抗原相对应的抗原或抗体被固定于上述载体上，这种固定是借助于对上述载体具有结合能力的氨基酸序列来实现的。

另外本发明还涉及到对样品中作为测定对象的抗体或抗原的存在或其存在量进行测定的测定用试剂的制造方法，包括：将与作为测定对象的抗体或抗原相对应的抗原或抗体固定于载体上，其中固定于上述载体上的抗原或抗体是借助于对上述载体具有结合能力的氨基酸序列与上述载体结合的。

本发明中所谓的抗体或抗原的存在或存在量的测定是凝集状态的测定，即包括有无凝集的定性测定和凝集程度的定量测定。

根据本发明，由于抗原或抗体可以有效地被固定在载体上，故制造方法极为有效。

另外载体使用颜料等色材时，色材表面固定了抗原或抗体的测定用试剂由于带有颜色，在应用于临床检查和环境分析及食品分析等场合时，可成为目视判定容易、可靠性高的测定用试剂。

#### 优选实施方案详述

作为本发明中的载体可以使用以往众所周知用于抗原抗体反应中

的抗原或抗体的载体，没有特别的限制。例如可以使用聚苯乙烯、苯乙烯-丁二烯共聚物、苯乙烯-甲基丙烯酸共聚物、聚甲基丙烯酸缩水甘油酯、丙烯醛-乙二醇二甲基丙烯酸酯共聚物等通过乳化聚合得到的有机高分子乳胶那样的有机高分子物质；硅、硅-铝、铝等无机氧化物等。另外作为载体可以使用颜料。颜料没有特别限制，例如可以使用炭黑、氧化铜、二氧化锰、苯胺黑、活性炭、非磁性纯粒铁、磁铁矿等黑色颜料；铬黄、锌黄、黄色氧化铁、镉黄、矿物坚牢黄、钛镍黄、锑黄、萘酚黄 S、汉撒黄 G、汉撒黄 10G、联苯胺黄 G、联苯胺黄 GR、喹啉黄色淀、永固黄 NCG、酒石黄色淀等黄色颜料、红色铬黄、钼橙、永固橙 GTR、吡啶酮橙、硫化橙（Vulcan orange）、联苯胺橙 G、阴丹士林亮橙 RK、阴丹士林亮橙 GK 等橙色颜料；氧化铁红、镉红铅丹、硫化汞、镉、永固红 4R、入漆硃、吡咯啉酮红、沃丘格红（watching red）、钙盐、色淀红 C、色淀红 D、亮胭脂红 6B、亮胭脂红 3B、曙红色淀、若丹明色淀 B、茜素色淀等红色颜料；铁蓝、钴蓝、碱性蓝色淀、维多利亚蓝色淀、酞菁蓝、非金属酞菁蓝、酞菁蓝的部分卤化物、坚牢蓝、阴丹士林蓝 BC 等蓝色颜料；锰紫、坚牢紫 B、甲基紫色淀等紫色颜料；氧化铬、铬绿、颜料绿 B、孔雀绿色淀、终黄绿（ファイナルイエロ-グリーン）G 等绿色颜料；锌华、氧化钛、锑白、硫化锌等白色颜料；重晶石粉、碳酸钡、粘土、硅石、白炭黑、滑石、矾土白等体质颜料等，但并不限于上述颜料。

另外作为载体也可以用颜料或染料使上述有机高分子物质着色后使用。但用染料着色时为了不使着色剂从载体中渗出来，最好是将着色剂包封在聚合物中。

载体的形状可以根据其用途适当选择，例如测定对象物是抗原，将对应的抗体固定于载体表面时，如果使用具有 1nm 到 10 $\mu$ m 范围内粒径的粒子比较好，最好是使用具有 50nm 到 1 $\mu$ m 的范围内粒径的粒子。

在本发明中对应于作为测定对象物的抗体或抗原的抗原或抗体

(对应抗原或抗体)没有特别限制,可以使用能引起与测定对象物之间的抗原抗体反应,来自生物的蛋白质或肽、或部分改变的上述蛋白质或肽、人工设计的蛋白质或肽或它们的片段。例如测定对象物是抗原,将对应的抗体固定于载体表面时,作为上述抗体既可以使用单克隆抗体也可以使用多克隆抗体。测定对象物是抗体,将对应的抗原固定于载体表面时,作为上述抗原可以使用蛋白质或肽。

例如,在将丙型肝炎病毒感染症的诊断作为目的,血液中丙型肝炎病毒抗体(HCV抗体)作为测定对象时,可以将能引起与丙型肝炎病毒抗体的抗原抗体反应的众所周知的丙型肝炎病毒的抗原蛋白质用作上述抗原,例如从丙型肝炎病毒的核心蛋白质或包膜蛋白质那样的结构蛋白质,NS1蛋白质、NS2蛋白质、NS3蛋白质、NS4蛋白质、NS5蛋白质那样的非结构蛋白质和其片段(Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89,10011-10015,1992)中至少选择出一种用作针对上述测定对象物的抗原。另外上述抗原蛋白质的氨基酸序列受到添加、缺失、置换和/或插入氨基酸等修饰后的产物,只要是抗原性足于完成本发明的方法的实施也可以使用。

为了得到对本发明的载体具有结合能力的氨基酸序列(肽,载体结合氨基酸序列),例如可以使用以下叙述的噬菌体展示肽文库法。作为构建噬菌体展示肽文库的方法,例如可以将序列随机的合成基因与M13系噬菌体的表面蛋白质(例如基因III蛋白质)的编码基因连接,以展示与表面蛋白N-端融合的基因产物。该方法在Scott JK.和Smith GP.,Science,249,386,1990,Cwirla SE et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,87,6378,1990等中有报道。插入的基因的大小只要肽能够稳定表达就没有特别限制,但为了使制作的文库可以包含所有的随机序列,而且展示的肽具有结合能力,适宜编码6个氨基酸至40个氨基酸(分子量约相当于600至4,000)的基因长度,其中7个氨基酸到18个氨基酸的长度更好。

为了选择与目的载体结合的噬菌体,将载体固定于柱子或平板上等,使上述文库与载体接触,结合噬菌体留下来,非结合噬菌体经清

洗流出，清洗后剩下的噬菌体经酸等洗脱出来，用缓冲液中和后，感染大肠杆菌扩增噬菌体。经数次反复筛选，具有与目的载体结合能力的克隆被浓缩。为了得到单克隆，通过这些噬菌体再度感染大肠杆菌，在培养板上可以制作单菌落。将各个单菌落于液体培养基中进行培养之后，对存在于培养基上清中的噬菌体用聚乙二醇等沉淀纯化，如果解析它的核苷酸序列，可以知道目的结合肽的序列。作为含有随机的氨基酸序列的肽文库的制作方法，除了使用上述那样的噬菌体方法以外，也可以使用化学合成的肽。这样的方法例如报道有使用玻璃珠的方法（Lam KS et al., Nature, 354, 82, 1991），液相聚焦法（Houghton RA et al., Nature, 354, 84, 1991）、微量培养板法（Fodor SPA et al., Science, 251, 767, 1991）等，无论哪一种方法都可以用于本发明。

当通过噬菌体展示肽文库的筛选获得二种或二种以上的对载体具有结合能力的氨基酸序列时，也可以将所有或部分这些氨基酸序列以适当组合连接用作对载体具有结合能力的氨基酸序列。此时可以在两种氨基酸序列之间设计适当的间隔序列。作为间隔序列最好由3个氨基酸到约400个氨基酸组成，而间隔序列无论含有什么样的氨基酸都可以。间隔序列最重要是不妨碍抗原或抗体与测定对象物之间的作用，而且不妨碍该抗原或抗体与载体的结合。对本发明载体具有结合能力的氨基酸序列除了通过随机肽文库的筛选获得之外，也可以基于载体的化学性质合理设计。

通过上述方法得到的对载体具有结合能力的氨基酸序列通常采用基因工程手法与对应于测定对象物的抗原或抗体融合后来使用。对载体具有结合能力的氨基酸序列可以与对应于测试对象物的抗原或抗体的N末端或C末端表达融合。另外，也可以插入适当的间隔序列之后，使其表达。作为间隔序列最好是由3个氨基酸到约400个氨基酸组成，而间隔序列无论含有什么样的氨基酸都可以。间隔序列最重要的是不妨碍对应抗原或抗体与测定对象物之间的作用，而且不妨碍该抗原或抗体与载体的结合。

含有对载体具有结合能力的氨基酸序列的抗原或抗体融合物的分离纯化方法就像上述那样，只要是保持该抗原或抗体活性的方法，无论什么样的方法都可以采用。

将针对测定对象物的抗原或抗体固定于载体上的步骤可以通过使含有对载体具有结合能力的氨基酸序列的上述抗原或抗体融合物在水性溶剂中与载体接触来完成。

本步骤的水性溶剂的组成没有特别限制，例如可以使用各种缓冲液。优选生物化学中使用的缓冲液，例如醋酸缓冲液、磷酸缓冲液、磷酸钾缓冲液、3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)缓冲液、N-三(羟甲基)甲基-3-氨基丙磺酸(TAPS)缓冲液、Tris-HCl缓冲液、甘氨酸缓冲液、2-(环己氨基)乙磺酸(CHES)缓冲液等。缓冲液的浓度一般在5mM到1.0M范围，最好在10~200mM范围内。而pH可以调到5.5至9.0，最好是调到7.0至8.5，根据使用的条件，在上述范围以外设定pH也不排除在外。

而为了保持载体在水性溶剂中的分散状态，只要是不妨碍后面步骤，也可以添加适当的种类和浓度的表面活性剂。作为这样表面活性剂的例子有如油酸钠、十二烷基磺酸钠、十二烷基硫酸钠、十二烷基-N-肌氨酸钠、胆酸钠、脱氧胆酸钠、牛磺脱氧胆酸钠等阴离子表面活性剂，溴化鲸蜡基三甲基铵、氯化十二烷基吡啶鎓等阳离子表面活性剂，3-[(胆酰胺基丙基(chloamidopropyl))-二甲基铵]-1-丙磺酸(CHAPS)、3-[(胆酰胺基丙基)-二甲基铵]-2-羟基-1-丙磺酸(CHAPSO)、棕榈酰溶血卵磷脂、十二烷基- $\beta$ -丙氨酸等两性离子表面活性剂，辛基葡糖苷、辛基硫代葡糖苷、庚基硫代葡糖苷、癸酰基-N-甲基葡糖胺(MEGA-10)、聚氧乙烯十二烷基醚(Brij、Lubrol)、聚氧乙烯-异辛基苯基醚(Triton X)、聚氧乙烯壬基苯基醚(Nonidet P-40、Triton N)、聚氧乙烯脂肪酸酯(Span)、聚环氧乙烷山梨糖醇酯(Tween)等非离子表面活性剂等。

而为了保持载体在水性溶剂中的分散状态，只要不妨碍后面的步骤，也可以添加适当的种类和浓度的辅助溶剂。作为辅助溶剂可以从

己烷等直链脂肪族烃、甲醇、乙醇等一元醇类和甘油等多元醇类和脂肪酸醚类、羧酸酯类以及其衍生物和组合中选出。

上述抗原或抗体融合物向载体的固定化可以通过使该载体和该抗原或抗体融合物于某种水性溶液中按照某种浓度进行混合来实现。此时为了使抗原或抗体融合物均一地吸附于载体的表面，希望对反应容器进行适当强度的振荡或搅拌。

固定化量的测定可以通过例如向载体添加浓度已知的抗原或抗体溶液，进行固定化处理之后，测定溶液中的蛋白质浓度，利用扣除法求得。

通过上述方法制作的固定化抗原或固定化抗体可以直接使用，也可以冷冻干燥后使用。对抗原或抗体进行固定化处理的时间希望在1分钟至24小时，最好是10分钟至1小时。由于过度长时间的处理会使抗原或抗体的活性下降，所以不希望这样做。

在本发明中，与上述组成要素一起也可以根据需要添加有机溶剂、颜料、染料、指示剂、表面活性剂、防腐剂、保护剂、无机盐等添加剂。

利用本发明由于可以将抗原或抗体有效地固定于载体表面上，所以制造工程非常有效。

另外在载体上使用颜料等色材时，用于临床检查和环境分析、食品分析等场合时，上述抗原或抗体融合物由于高定量性同时目视判定容易，可用作可靠性高的测定用试剂。

### 实施例

以下通过实施例进一步对本发明进行具体地说明。但是以下叙述的实施例仅在于举例说明本发明实施方案，本发明的技术范围不限定于这些实施例。

另外，在以下的实施例中作为载体使用的是颜料，但载体并不限定于颜料，任何在以往抗原抗体反应中使用的已知抗原或抗体的载体都可以使用。

### (参考例1) 针对丙型肝炎病毒抗体的抗原蛋白质的获得

向乙型肝炎阴性且 GPT 值在 100 单位以上的人血清 0.5ml 中加入 2.5ml 硫氰酸胍溶液 (4M 硫氰酸胍、10mM EDTA、0.1M 2-巯基乙醇、2% 肌氨酸 (サルコシル)、50mM Tris-HCl pH7.6), 进行酚/氯仿萃取, 糖原作为载体, 通过乙醇沉淀对血清中的全部 RNA 进行纯化。然后, 按照冈本方法 (Japan J. Exp. Med., 60 (3), 167-177, 1990), 用随机六聚物作为引物, 利用 cDNA 合成系统从得到的 RNA 制作 cDNA。以该 cDNA 为模板, 利用 PCR 法对目的 DNA 片段进行扩增。通过 T4 寡核苷酸激酶使扩增的 DNA 片段的 5' 末端磷酸化后, 与用限制酶 Sma I 消化的 pUC18 质粒 (Amersham pharmacia biotech 公司生产) 连接, 进行克隆。利用 Sequenase 测序试剂盒 (United States Biochemical 公司生产) 确定克隆于质粒中的丙型肝炎病毒的 cDNA 的碱基序列, 从得到的核苷酸序列中选出编码目的抗原蛋白质 NS4 的部份, 按照常规方法插入到质粒 pUC18 的 SmaI 切割位点中, 构建质粒 pUC18-NS。

### (实施例1) 对铜酞菁具有结合能力的氨基酸序列的获得

① 将铜酞菁 ( $\alpha$ 型, Tokyo kasei kogyo 有限公司) 悬浮于含有 0.1% Tween-20 的 TBS 缓冲液 (50mM Tris-HCl pH7.5、150mM NaCl) 中, 使其浓度为 5mg/ml。将其中的 10 $\mu$ l 加入到 Eppendorf 管中, 加入 990 $\mu$ l TBS 缓冲液 (TBS 缓冲液 + 0.1% Tween-20) 进行稀释。

② 将大约  $4 \times 10^{10}$  pfu 的 Ph. D. - 12 噬菌体展示肽库 (New England BioLabs 公司生产) 添加到管中, 于 25 $^{\circ}$ C 下放置 10 分钟。

③ 将离心管离心 (20,630  $\times$ g、5 分钟) 后, 舍去上清, 以沉淀形式回收颜料。将回收的颜料再次悬浮于 TBS 缓冲液中, 通过反复离心分离, 用 TBS 缓冲液将颜料洗 10 次。

④ 加入 100 $\mu$ l 的洗脱缓冲液 (0.2M 甘氨酸-HCl pH2.2、1mg/ml BSA), 悬浮液放置 1 分钟后, 进行离心分离 (20,630  $\times$ g、5

分钟), 将上清移到另外的 Eppendorf 管中, 加入  $15\mu\text{l}$  的  $1\text{M}$  Tris-HCl (pH9.1), 进行中和, 得到洗脱的噬菌体。

⑤ 使洗脱的噬菌体感染对数增殖早期的大肠杆菌 ER2537 (New England BioLabs 公司生产), 以便噬菌体在其中扩增。于  $37^\circ\text{C}$  下培养 4.5 小时。然后通过离心分离使扩增的噬菌体与细胞分开, 利用聚乙二醇沉淀进行纯化。将由此纯化、扩增的噬菌体悬浮于 TBS 缓冲液中, 通过适当的稀释系列液感染大肠杆菌, 测定滴度。

⑥ 使用扩增的噬菌体, 反复 3 次进行①至⑤的操作。但是使用的 TBS 缓冲液中的 Tween-20 的浓度提高到 0.5%, 使洗涤条件更严格。

从第 2 轮循环开始, 对不含颜料的 Eppendorf 管也进行同样的操作, 作为对照。各个循环中洗脱的噬菌体的滴度如表 1 所示。

表 1

各个循环中洗脱的噬菌体的滴度

	原液 (A)	对照结合 (B)	酞菁结合 (C)	C/A	C/B
第 1 轮	$4.0 \times 10^{11}$		$1.2 \times 10^6$	$3.0 \times 10^{-6}$	
第 2 轮	$1.6 \times 10^{11}$	$1.1 \times 10^5$	$1.7 \times 10^5$	$1.1 \times 10^{-5}$	1
第 3 轮	$2.0 \times 10^{11}$	$1.6 \times 10^5$	$3.0 \times 10^8$	$1.5 \times 10^{-3}$	1800
第 4 轮	$1.7 \times 10^{11}$	$2.7 \times 10^6$	$5.3 \times 10^9$	$3.1 \times 10^{-2}$	2000

(A、B 和 C 的单位是 pfu/ml)

通过用最终洗脱的噬菌体感染大大过量的大肠杆菌进行克隆。在噬菌体感染大肠杆菌扩增后, 从各个克隆制备 ssDNA, 对此随机区域的序列进行测定, 以便对展示的肽的氨基酸序列进行确定, 由此获得各克隆中对铜酞菁具有结合能力的氨基酸序列。表 2 给出了得到的氨基酸序列和它们的频率。

表 2  
确定的氨基酸序列和它们的频度

确定的氨基酸序列	个数 (A)	频率 (A/36)
Lys-Tyr-Asp-Ser-Arg-His-Leu-His-Thr- His-Ser-His (SEQ ID NO 1)	6	0.17
Pro-Asn-Arg-Leu-Gly-Arg-Arg-Pro-Val- Arg-Trp-Glu (SEQ ID NO 2)	6	0.17
Lys-Cys-Cys-Tyr-Tyr-Asp-His-Ser-His- Ala-Leu-Ser (SEQ ID NO 3)	4	0.11
Glu-Tyr-Leu-Ser-Ala-Ile-Val-Ala-Gly- Pro-Trp-Pro (SEQ ID NO 4)	3	0.08
Lys-Leu-Trp-Ile-Leu-Glu-Pro-Thr-Val- Thr-Pro-Thr (SEQ ID NO 5)	3	0.08
Gln-Ser-Asn-Leu-Lys-Val-Ile-Pro-Ser- Trp-Trp-Phe (SEQ ID NO 6)	3	0.08
Trp-Ile-Pro-Pro-Gln-Trp-Ser-Arg-Leu- Ile-Glu-Pro (SEQ ID NO 7)	3	0.08
Asp-His-Pro-Gln-Ala-Lys-Pro-Asn-Trp- Tyr-Gly-Val (SEQ ID NO 8)	1	0.02
Gly-Leu-Pro-Pro-Tyr-Ser-Pro-His-Arg- Leu-Ala-Gln (SEQ ID NO 9)	1	0.02
Lys-Leu-Thr-Thr-Gln-Tyr-Met-Ala-Arg- Ser-Ser-Ser (SEQ ID NO 10)	1	0.02
Lys-Val-Trp-Met-Leu-Pro-Pro-Leu-Pro- Gln-Ala-Thr (SEQ ID NO 11)	1	0.02
Asn-Val-Thr-Ser-Thr-Ala-Phe-Ile-Asp- Thr-Pro-Trp (SEQ ID NO 12)	1	0.02
Arg-Leu-Asn-Leu-Asp-Ile-Ile-Ala-Val- Thr-Ser-Val (SEQ ID NO 13)	1	0.02

Thr-Leu-Pro-Ser-Pro-Leu-Ala-Leu-Leu- Thr-Val-His (SEQ ID NO 14)	1	0.02
Thr-Asn-Arg-His-Asn-Pro-His-His-Leu- His-His-Val (SEQ ID NO 15)	1	0.02

(实施例2) 对炭黑具有结合能力的氨基酸序列的获得

① 将炭黑(シグマアルドリッチジャパン公司生产)悬浮于含有0.1% Tween-20的TBS缓冲液(50mM Tris-HCl pH7.5、150mM NaCl)中,使其浓度为5mg/ml。将其中的10 $\mu$ l加入到Eppendorf管中,加入990 $\mu$ l TBS缓冲液(TBS缓冲液+0.1%Tween-20)进行稀释。

② 将约4 $\times 10^{10}$  pfu的Ph.D.-12噬菌体展示肽库(New England BioLabs公司生产)添加到管中,于25 $^{\circ}$ C下放置10分钟。

③ 将离心管离心(20,630 $\times$ g、5分钟)后,舍去上清,以沉淀形式回收颜料。将回收的颜料再次悬浮于TBS缓冲液中,通过反复离心分离,用TBS缓冲液将颜料洗10次。

④ 加入100 $\mu$ l的洗脱缓冲液(0.2M甘氨酸-HCl pH2.2、1mg/ml BSA),放置1分钟后,进行离心分离(20,630 $\times$ g、5分钟),将上清移到另外的Eppendorf管中,加入15 $\mu$ l的1M Tris-HCl(pH9.1),进行中和,得到洗脱的噬菌体。

⑤ 使洗脱的噬菌体感染对数增殖早期的大肠杆菌ER2537(New England BioLabs公司生产),以使噬菌体在其中扩增。于37 $^{\circ}$ C下培养4.5小时。然后经离心分离使扩增的噬菌体与细胞分开,通过聚乙二醇沉淀进行纯化。将纯化、扩增的噬菌体悬浮于TBS缓冲液中,通过适当的稀释系列液感染大肠杆菌,测定滴度。

⑥ 使用扩增的噬菌体,反复4次进行①至⑤的操作。但是使用的TBS缓冲液中的Tween-20的浓度提高到0.5%,使洗涤条件更严格。

从第2轮循环开始,对不含颜料的Eppendorf管也进行同样的操

作，作为对照。各个循环中洗脱的噬菌体的滴度如表 3 所示。

表 3

各个循环中洗脱的噬菌体的滴度

	原液 (A)	对照结合 (B)	炭黑结合 (C)	C/A	C/B
第 1 轮	$4.0 \times 10^{11}$		$8.9 \times 10^6$	$2.2 \times 10^{-5}$	
第 2 轮	$1.6 \times 10^{11}$	$1.1 \times 10^5$	$3.8 \times 10^6$	$2.4 \times 10^{-5}$	35
第 3 轮	$2.0 \times 10^{11}$	$1.6 \times 10^5$	$6.0 \times 10^6$	$3.0 \times 10^{-5}$	40
第 4 轮	$1.7 \times 10^{11}$	$1.1 \times 10^6$	$1.5 \times 10^8$	$8.8 \times 10^{-4}$	140
第 5 轮	$1.9 \times 10^{11}$	$2.0 \times 10^6$	$2.7 \times 10^9$	$1.4 \times 10^{-2}$	1400

(A、B 和 C 的单位是 pfu/ml)

通过用最终洗脱的噬菌体感染大大过量的大肠杆菌进行克隆。在噬菌体感染大肠杆菌进行扩增后，从各个克隆制备 ssDNA，对此随机区域的碱基序列进行解读，以便对展示的肽的氨基酸序列进行确定，获得对炭黑具有结合能力的氨基酸序列。表 4 给出了得到的氨基酸序列和它们的频率。

**表 4**  
**确定的氨基酸序列和它们的频率**

确定的氨基酸序列	个数 (2)	频率 (A/38)
Trp-Pro-His-Ala-Trp-Lys-Val-Trp-Trp-Pro-Ala-Ser (SEQ ID NO 16)	4	0.10
Asn-Trp-Trp-Trp-Pro-Pro-Tyr-Ile-Arg-His-Gln-Pro (SEQ ID NO 17)	3	0.08
Trp-His-Trp-Ser-Trp-Thr-Pro-Trp-Pro-Ser-His-His (SEQ ID NO 18)	2	0.05
Trp-Pro-Trp-Ala-Trp-His-Pro-Ser-Arg-Asp-Val-Tyr (SEQ ID NO 19)	2	0.05
Trp-His-Gly-Tyr-Trp-Tyr-Ser-Asn-Leu-Asn-Thr-Thr (SEQ ID NO 20)	2	0.05
Trp-Trp-Thr-Pro-Trp-Met-Ser-His-Ala-Tyr-Pro-Val (SEQ ID NO 21)	2	0.05
Trp-Pro-Asn-Pro-Tyr-Trp-Gly-Trp-Phe-Ala-Ala-Val (SEQ ID NO 22)	2	0.05
Thr-Ser-Trp-His-Thr-Trp-Trp-Trp-Arg-Gln-Pro-Pro (SEQ ID NO 23)	2	0.05
Asn-Ala-Trp-His-Lys-Tyr-Trp-Trp-Pro-Ile-Thr-Lys (SEQ ID NO 24)	2	0.05
His-Pro-Asn-Asn-Asp-Trp-Ser-Lys-Ala-Pro-Gln-Phe (SEQ ID NO 25)	2	0.05
Trp-Trp-Thr-Pro-Gln-Pro-Trp-Trp-Ser-Phe-Pro-Ile (SEQ ID NO 26)	1	0.03
Trp-Pro-His-Thr-Ser-Trp-Trp-Gln-Thr-Pro-Leu-Thr	1	0.03

---

(SEQ ID NO 27)		
Trp-His-Val-Asn-Trp-Asp-Pro-Met-Ala- Trp-Tyr-Arg	1	0.03
(SEQ ID NO 28)		
Ser-Trp-Pro-Trp-Trp-Thr-Ala-Tyr-Arg- Val-His-Ser	1	0.03
(SEQ ID NO 29)		
Trp-His-Ser-Asn-Trp-Tyr-Gln-Ser-Ile- Pro-Gln-Val	1	0.03
(SEQ ID NO 30)		
Gly-Tyr-Trp-Pro-Trp-Lys-Phe-Glu-His- Ala-Thr-Val	1	0.03
(SEQ ID NO 31)		
Ala-Trp-Trp-Pro-Thr-Thr-Phe-Pro-Pro- Tyr-Tyr-Tyr	1	0.03
(SEQ ID NO 32)		
Asn-Pro-Trp-Trp-Ser-His-Tyr-Tyr-Pro- Arg-Ser-Val	1	0.03
(SEQ ID NO 33)		
Trp-Pro-His-Asn-Tyr-Pro-Leu-Asn-His- Ser-Asn-Pro	1	0.03
(SEQ ID NO 34)		
Thr-Trp-Ala-His-Pro-Leu-Glu-Ser-Asp- Tyr-Leu-Arg	1	0.03
(SEQ ID NO 35)		
His-Thr-Tyr-Tyr-His-Asp-Gly-Trp-Arg- Leu-Ala-Pro	1	0.03
(SEQ ID NO 36)		
Thr-Phe-Val-Gln-Thr-Pro-Leu-Ser-His- Leu-Ile-Ala	1	0.03
(SEQ ID NO 37)		
Arg-Val-Pro-Pro-Ser-Lys-Leu-Thr-Arg- Pro-Pro-Phe	1	0.03
(SEQ ID NO 38)		
His-Ser-Ile-Tyr-Ser-Val-Thr-Pro-Ser- Thr-Ala-Ser	1	0.03
(SEQ ID NO 39)		
Leu-Asn-Thr-Gln-Asn-His-Ala-Pro-Leu- Pro-Ser-Ile	1	0.03
(SEQ ID NO 40)		

---

### (实施例 3) 对铜酞菁具有结合能力的抗原蛋白质的制造

对于编码质粒 pUC18-NS (参考例 1 制备的) 中抗原蛋白质 NS4 的核苷酸序列, 使用上游引物 (5' - TTCACAGGATCCACTGAGCTCG ATGCC CAC-3') 和下游引物 (5' -GATCTGGGCTCGAGCCGACTAGTA GTCGCT - 3'), 将质粒 pUC18-NS 作为模板进行 PCR, 得到上游具有 BamHI 和 SacI 限制位点、下游具有 SpeI 和 XhoI 限制位点而二者间为抗原蛋白质 NS4 基因的 DNA 片段。

利用 BamHI 和 XhoI 对纯化的 PCR 扩增产物进行消化, 然后插入到质粒 pGEX-6P-1 (Amersham pharmacia biotech 公司生产) 的对应位点中, 得到载体 pGEX-NS。

之后, 象下述那样构建可以在表达后借助于间隔序列 GS 将实施例 1 中各个结合氨基酸序列 (序列 1 至序列 15) 融合到抗原蛋白质 NS4 的 N 末端的大肠杆菌表达载体。作为编码这些氨基酸序列的 DNA, 准备下面表 5 列举的合成双链寡核苷酸组。

表 5  
用于表达各个氨基酸序列的合成 DNA

氨基酸序列号	合成 DNA 的核苷酸序列
1	5'- GATCCAAATATGATAGCCGTCATCTGCATACCCATAGCCATG AGCT-3' 5'-CATGGCTATGGGTATGCAGATGACGGCTATCATATTTG- 3'
2	5'- GATCCCCGAACCGTCTGGGCCGTCGTCCGGTGCGTTGGGAAG AGCT-3' 5'-CTTCCAACGCACCGGACGACGGCCCAGACGGTTCGGG- 3'
3	5'- GATCCAAATGCTGCTATTATGATCATAGCCATGCGCTGAGCG AGCT-3' 5'-CGCTCAGCGCATGGCTATGATCATAATAGCAGCATTTG- 3'
4	5'- GATCCGAATATCTGAGCGCGATTGTGGCGGGCCCGTGGCCGG AGCT-3' 5'-CCGGCCACGGGCCCGCCACAATCGCGCTCAGATATTCG- 3'
5	5'- GATCCAAACTGTGGATTCTGGAACCGACCGTGACCCCGACCG AGCT-3' 5'-CGGTCGGGGTCACGGTCGGTTCAGAATCCACAGTTTG- 3'
6	5'- GATCCAGAGCAACCTGAAAGTGATTCCGAGCTGGTGGTTTG AGCT-3'

- 
- 5'-CAAACCACCAGCTCGGAATCACTTTCAGGTTGCTCTGG-  
3'
- 7      5'-  
GATCCTGGATTCCGCCGAGTGGAGCCGTCTGATTGAACCGG  
AGCT-3'  
5'-CCGGTTCAATCAGACGGCTCCACTGCGGCGGAATCCAG-  
3'
- 8      5'-  
GATCCGATCATCCGCAGGCGAAACCGAACTGGTATGGCGTGG  
AGCT-3'  
5'-CCACGCCATAACCAGTTCGGTTTCGCCTGCGGATGATCG-  
3'
- 9      5'-  
GATCCGGCCTGCCGCCGTATAGCCCGCATCGTCTGGCGCAGG  
AGCT-3'  
5'-CCTGCGCCAGACGATGCGGGCTATACGGCGGCAGGCCG-  
3'
- 10     5'-  
GATCCAAACTGACCACCCAGTATATGGCGCGTAGCAGCAGCG  
AGCT-3'  
5'-CGCTGCTGCTACGCGCCATATACTGGGTGGTCAGTTTG-  
3'
- 11     5'-  
GATCCAAAGTGTGGATGCTGCCGCCGCTGCCGCAGGCGACCG  
AGCT-3'  
5'-CGGTCGCCTGCGGCAGCGGCGGCAGCATCCACACTTTG-  
3'
- 12     5'-  
GATCCAACGTGACCAGCACCGCGTTTATTGATACCCCGTGGG  
AGCT-3'  
5'-CCCACGGGGTATCAATAAACGCGGTGCTGGTCACGTTG-  
3'
-

---

13	5'- GATCCCGTCTGAACCTGGATATTATTGCGGTGACCAGCGTGG AGCT-3' 5'-CCACGCTGGTCACCGCAATAATATCCAGGTTTCAGACGG- 3'
14	5'- GATCCACCCTGCCGAGCCCGCTGGCGCTGCTGACCGTGCATG AGCT-3' 5'-CATGCACGGTCAGCAGCGCCAGCGGGCTCGGCAGGGTG- 3'
15	5'- GATCCACCAACCGTCATAACCCGCATCATCTGCATCATGTGG AGCT-3' 5'-CCACATGATGCAGATGATGCGGGTTATGACGGTTGGTG- 3'

---

(SEQ ID NO:43-72)

按照制造业主的说明用 T4 寡核苷酸激酶 (Gibco 生产) 使对应表 5 列举的各个氨基酸序列的 2 种合成的 DNA 磷酸化。然后将两种合成 DNA 等摩尔混合, 于 80℃ 下加热 5 分钟, 然后通过缓慢地冷却至室温, 形成双链 DNA 片段。形成的双链 DNA 片段直接用于以后的克隆。

利用 BamHI 或 SacI 对质粒 pGEX-NS 进行消化, 插入上述任一个双链 DNA 片段。用该载体转化作为宿主微生物的大肠杆菌 (JM109), 得到表达结合氨基酸序列-NS4-谷胱甘肽 S 转移酶 (GST) 融合蛋白质的转化菌株。通过使用 Miniprep (Wizard Minipreps DNA Purification Systems、PROMEGA 公司生产) 制备的质粒 DNA 作为模板, 使用 PGEX 5'测序引物 (Amersham pharmacia biotech 公司生产) 进行测序确定插入的碱基序列来确认转化菌株。将得到的菌株放置于 10ml LB-Amp 培养基中预培养过夜后, 将其中的 0.1ml 转移到 10ml 新鲜 LB-Amp 培养基中, 于 37℃, 170rpm 条件下振荡培养 3 小时。然后添加 IPTG (终浓度 1mM) 继续于 37℃ 下

培养 4~12 小时。

离心 (8,000 ×g、2 分钟、4℃) 收集 IPTG 诱导的大肠杆菌，再悬浮于 1/10 量的 4℃ PBS 中。通过冷冻融解和超声处理破碎菌体，离心 (8,000 ×g、10 分钟、4℃) 除去固形杂质。通过 SDS-PAGE 确认存在于上清中的目的表达蛋白质后，诱导表达的 GST 融合蛋白质通过谷胱甘肽琼脂糖 4B (Glutathion Sepharose 4B beads: Amersham pharmacia biotech 公司生产) 进行纯化。

使用的谷胱甘肽琼脂糖预先进行抑制非特异性吸附的处理。即用等量的 PBS 将谷胱甘肽琼脂糖洗 3 次 (8,000 ×g、1 分钟、4℃ 离心) 后，加入等量的含有 4% BSA 的 PBS 于 4℃ 下处理 1 小时。处理后用等量的 PBS 洗 2 次，再悬浮于 1/2 量的 PBS 中。将 40μl 预处理后的谷胱甘肽琼脂糖添加到 1ml 的无细胞提取液中，于 4℃ 下轻柔搅拌。通过这样操作使 GST 融合蛋白质吸附于谷胱甘肽琼脂糖上。

吸附后通过离心 (8,000 ×g、1 分钟、4℃) 回收谷胱甘肽琼脂糖，用 400 μl 的 PBS 洗 3 次。然后添加 10mM 谷胱甘肽 40 μl，于 4℃ 下搅拌 1 小时，洗脱吸附的 GST 融合蛋白质。离心 (8,000 ×g、2 分钟、4℃) 回收上清后，通过对 PBS 进行透析，对 GST 融合蛋白质进行纯化。通过 SDS-PAGE 确认纯化的蛋白质表现为单一带。

各个 GST 融合蛋白质用 500μg PrepScission 蛋白酶 (Amersham pharmacia biotech 公司生产，5μ) 进行消化后，通过谷胱甘肽琼脂糖除去 PrepScission 蛋白酶和 GST。将流过级分再加入到用 PBS 平衡的 Sephadex G200 柱上，获得最终纯化的表达蛋白质。通过 SDS-PAGE 确认出现单一带。

#### (实施例 4) 对炭黑具有结合能力的抗原蛋白质的制造

对于编码质粒 pUC18-NS (参考例 1 制备的) 中的抗原蛋白质 NS4 的核苷酸基序列，使用上游引物

(5' - TTCACAGGATCCACTGAGCTCGATGCC CAC-3')

和下游引物

(5'-GATCTGGGCTCGAGCCGACTAGTA GTCGCT-3'),

将质粒 pUC18-NS 作为模板进行 PCR, 得到上游具有 BamHI 和 SacI 限制位点、下游具有 SpeI 和 XhoI 限制位点而二者间为抗原蛋白质 NS4 基因的 DNA 片段。

利用 BamHI 和 XhoI 对纯化的 PCR 扩增产物进行消化, 之后插入到质粒 pGEX-6P-1 (Amersham pharmacia biotech 公司生产) 的对应位点中, 作为载体 pGEX-NS。

之后, 象下述那样构建可以在表达后借助于间隔序列 GS 将实施例 2 中各个结合氨基酸序列 (序列 1 至序列 15) 融合到抗原蛋白质 NS4 的 N 末端的大肠杆菌表达载体。为了制作编码这些氨基酸序列的 DNA, 准备下面表 6 列举的合成双链寡核苷酸组。

**表 6**  
**用于表达各个氨基酸序列的合成 DNA 组**

氨基酸序列号	合成 DNA 的碱基序列
16	5'- GATCCTGGCCGCATGCGTGGAAAGTGTGGTGGCCGGCGAGCGAG CT-3' 5'-CGCTCGCCGGCCACCACACTTTCCACGCATGCGGCCAG-3'
17	5'- GATCCAACCTGGTGGTGGCCGCCGTATATTCGTCATCAGCCGGAG CT-3' 5'-CCGGCTGATGACGAATATACGGCGGCCACCACCAGTTG-3'
18	5'- GATCCTGGCATTGGAGCTGGACCCCGTGGCCGAGCCATCATGAG CT-3' 5'-CATGATGGCTCGGCCACGGGGTCCAGCTCCAATGCCAG-3'
19	5'- GATCCTGGCCGTGGGCGTGGCATCCGAGCCGTGATGTGTATGAG CT-3' 5'-CATACACATCACGGCTCGGATGCCACGCCACGGCCAG-3'
20	5'- GATCCTGGCATGGCTATTGGTATAGCAACCTGAACACCACCGAG CT-3' 5'-CGGTGGTGTTCAGGTTGCTATACCAATAGCCATGCCAG-3'
21	5'- GATCCTGGTGGACCCCGTGGATGAGCCATGCGTATCCGGTGGAG CT-3'

- 
- 5' -CCACCGGATACGCATGGCTCATCCACGGGGTCCACCAG-3'
- 22 5' -  
GATCCTGGCCGAACCCGTATTGGGGCTGGTTTGCGGCGGTGGAG  
CT-3'  
5' -CCACCGCCGCAAACCAGCCCCAATACGGGTTCGGCCAG-3'
- 23 5' -  
GATCCACCAGCTGGCATACTGGTGGTGGCGTCAGCCGCCGGAG  
CT-3'  
5' -CCGGCGGCTGACGCCACCACCAGGTATGCCAGCTGGTG-3'
- 24 5' -  
GATCCAACGCGTGGCATAAATATTGGTGGCCGATTACCAAAGAG  
CT-3'  
5' -CTTTGGTAATCGGCCACCAATATTTATGCCACGCGTTG-3'
- 25 5' -  
GATCCCATCCGAACAACGATTGGAGCAAAGCGCCGCAGTTTGAG  
CT-3'  
5' -CAAACGCGGCGCTTTGCTCCAATCGTTGTTTCGGATGG-3'
- 26 5' -  
GATCCTGGTGGACCCCGCAGCCGTGGTGGAGCTTTCGGATTGAG  
CT-3'  
5' -CAATCGGAAAGCTCCACCACGGCTGCGGGGTCCACCAG-3'
- 27 5' -  
GATCCTGGCCGCATACCAGCTGGTGGCAGACCCCGCTGACCGAG  
CT-3'  
5' -CGGTCAGCGGGGTCTGCCACCAGCTGGTATGCGGCCAG-3'
- 28 5' -  
GATCCTGGCATGTGAACTGGGATCCGATGGCGTGGTATCGTGAG  
CT-3'  
5' -CACGATACCACGCCATCGGATCCAGTTCACATGCCAG-3'
- 29 5' -  
GATCCAGCTGGCCGTGGTGGACCGGTATCGTGTGCATAGCGAG
-

---

CT-3'  
5'-CGCTATGCACACGATACGCGGTCCACCACGGCCAGCTG-3'  
30 5'-  
GATCCTGGCATAGCAACTGGTATCAGAGCATTCCGCAGGTGGAG  
CT-3'  
5'-CCACCTGCGGAATGCTCTGATACCAGTTGCTATGCCAG-3'

31 5'-  
GATCCGGCTATTGGCCGTGGAAATTTGAACATGCGACCGTGGAG  
CT-3'  
5'-CCACGGTCGCATGTTCAAATTTCCACGGCCAATAGCCG-3'

32 5'-  
GATCCGCGTGGTGGCCGACCACCTTTCCGCCGTATTATTATGAG  
CT-3'  
5'-CATAATAATACGGCGGAAAGGTGGTCGGCCACCACGCG-3'

33 5'-  
GATCCAACCCGTGGTGGAGCCATTATTATCCGCGTAGCGTGGAG  
CT-3'  
5'-CCACGCTACGCGGATAATAATGGCTCCACCACGGGTTG-3'

34 5'-  
GATCCTGGCCGCATAACTATCCGCTGAACCATAGCAACCCGGAG  
CT-3'  
5'-CCGGGTTGCTATGGTTCAGCGGATAGTTATGCGGCCAG-3'

35 5'-  
GATCCACCTGGGCGCATCCGCTGGAAAGCGATTATCTGCGTGAG  
CT-3'  
5'-CACGCAGATAATCGCTTTCCAGCGGATGCGCCCAGGTG-3'

36 5'-  
GATCCCATACCTATTATCATGATGGCTGGCGTCTGGCGCCGGAG  
CT-3'  
5'-CCGGCGCCAGACGCCAGCCATCATGATAATAGGTATGG-3'

37 5'-  
GATCCACCTTTGTGCAGACCCCGCTGAGCCATCTGATTGCGGAG

---

---

```

CT-3'
5'-CCGCAATCAGATGGCTCAGCGGGGTCTGCACAAAGGTG-3'

38 5'-
GATCCCGTGTGCCGCCGAGCAAACCTGACCCGTCCGCCGTTTGAG
CT-3'
5'-CAAACGGCGGACGGGTGAGTTTGCTCGGCGGCACACGG-3'

39 5'-
GATCCCATAGCATTTATAGCGTGACCCCGAGCACCGCGAGCGAG
CT-3'
5'-CGCTCGCGGTGCTCGGGGTCACGCTATAAATGCTATGG-3'

40 5'-
GATCCCTGAACACCCAGAACCATGCGCCGCTGCCGAGCATTGAG
CT-3'
5'-CAATGCTCGGCAGCGGCGCATGGTTCTGGGTGTTTCAGG-3'

```

---

(SEQ ID NO:73-122)

按照制造业主的说明用 T4 寡核苷酸激酶 (Gibco 生产) 使对应表 6 列举的各个氨基酸序列的 2 种合成的 DNA 磷酸化。然后将两种合成 DNA 等摩尔混合, 于 80℃ 下加热 5 分钟, 然后通过缓慢地冷却至室温, 使其形成双链 DNA 片段。形成的双链 DNA 片段直接用于以后的克隆。

利用 BamHI 或 SacI 对质粒 pGEX-NS 进行消化, 插入上述双链 DNA 片段。用该载体转化宿主微生物大肠杆菌 (JM109), 得到表达结合氨基酸序列-NS4-谷胱苷肽 S 转移酶 (GST) 融合蛋白的转化体。通过使用 Miniprep (Wizard Minipreps DNA Purification Systems、PROMEGA 公司生产) 制备的质粒 DNA 作为模板, 使用 PGEX5' 测序引物 (Amersham pharmacia biotech 公司生产) 进行测序确定插入的核苷酸序列来确认转化菌株。将得到的菌株于 10ml LB - Amp 培养基中预培养过夜后, 将其中的 0.1ml 转移到 10ml 新鲜 LB - Amp 培养基中, 于 37℃、170rpm 下进行振荡培养。然后添加 IPTG

(终浓度 1mM)，于 37℃ 下继续培养 4~12 小时。

离心 (8,000 ×g、2 分钟、4℃) 收集 IPTG 诱导的大肠杆菌，再悬浮于 1/10 量的 4℃ PBS 中。通过冷冻融解和超声处理破碎菌体，离心 (8,000 ×g、10 分钟、4℃) 除去固形杂质。通过 SDS-PAGE 确认存在于上清中的目的表达蛋白质后，诱导表达的 GST 融合蛋白质通过谷胱甘肽琼脂糖 4B (Glutathion Sepharose 4B beads: Amersham pharmacia biotech 公司生产) 进行纯化。

使用的谷胱甘肽琼脂糖预先进行抑制非特异性吸附的处理。即用等量的 PBS 通过离心将谷胱甘肽琼脂糖洗 3 次 (8,000 ×g、1 分钟、4℃) 后，加入等量的含有 4% BSA 的 PBS 于 4℃ 下处理 1 小时。处理后用等量的 PBS 洗 2 次，再悬浮于 1/2 量的 PBS 中。将预处理后的谷胱甘肽琼脂糖 40 μl 添加到 1ml 的无细胞提取液中，于 4℃ 下轻柔搅拌。通过这样操作使 GST 融合蛋白质吸附于谷胱甘肽琼脂糖上。

吸附后通过离心 (8,000 ×g、1 分钟、4℃) 回收谷胱甘肽琼脂糖，用 400 μl 的 PBS 洗 3 次。然后添加 10mM 谷胱甘肽 40 μl，于 4℃ 下搅拌 1 小时，洗脱吸附的 GST 融合蛋白质。离心 (8,000 ×g、2 分钟、4℃) 回收上清后，对 PBS 进行透析，从而对 GST 融合蛋白质进行纯化。通过 SDS-PAGE 确认纯化的蛋白质出现单一带。

各个 GST 融合蛋白质 500 μg 用 PrepScission 蛋白酶 (Amersham pharmacia biotech 公司生产、5U) 进行消化后，通过谷胱甘肽琼脂糖除去 PrepScission 蛋白酶和 GST。将流过级分再加入到用 PBS 平衡的 Sephadex G200 柱上，获得最终纯化的表达蛋白质。通过 SDS-PAGE 确认出现单一带。

#### (实施例 5) 对铜酞菁具有结合能力的抗原蛋白质的制造

将对铜酞菁具有结合能力的两种氨基酸序列，Lys-Tyr-Asp-Ser-Arg-His-Leu-His-Thr-His-Ser-His (SEQ ID NO 1) 和 Pro-Asn-Arg-Leu-Gly-Arg-Arg-Pro-Val-Arg-Trp-Glu (SEQ ID NO 2)，借助于间隔序列 (Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser)，

依此顺序串联形成序列

Lys-Tyr-Asp-Ser-Arg-His-Leu-

His-Thr-His-Ser-His-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-

Pro-Asn-Arg-Leu-Gly-Arg-Arg-Pro-Val-Arg-Trp-Glu (SEQ

ID NO 41) 。

借助于间隔序列 GS 使所获氨基酸序列与抗原蛋白质 NS4 的 N 末端融合进行表达的大肠杆菌表达载体象下面那样构建。编码此氨基酸序列的 DNA 以双链 DNA 片段的形式按如下方式获得：分别用 T4 寡核苷酸激酶 (Gibco 生产) 使 2 种合成寡核苷酸 5'-

GATCCAAATATGATAGCCGTCATCTGCATACCCATAGCCATGGCGGCGGCAGC

GGCGGCGGCAGCCCGAACCGTCTGGGCCGTCGTCCGGTGCCTTGGGAAGAGCT

-3' (SEQ ID NO:123) 和 5'-

CTTCCCAACGCACCGGACGACGGCCCAGACGGTTCGGGCTGCCGCCGCCGCTG

CCGCCGCCATGGCTATGGGTATGCAGATGACGGCTATCATATTTG-3' (SEQ

ID NO:124)

磷酸化，然后等摩尔混合，于 80℃ 下加热 5 分钟，然后缓慢地冷却至室温，形成的双链 DNA 片段象实施例 3 那样插入到质粒 pGEX-NS 的 BamHI/SacI 位点中，用该载体转化大肠杆菌 (JM109)，得到表达转化体。象实施例 3 那样对 NS4 的 N 末端融合了序列 41 氨基酸序列的表达蛋白质进行纯化。

(实施例 6) 对炭黑具有结合能力的抗原蛋白质的制造

将对炭黑具有结合能力的两种氨基酸序列

Trp-Pro-His-Ala-Trp-Lys-Val-

Trp-Trp-Pro-Ala-Ser (SEQ ID NO 16) 和 Asn-Trp-Trp-

Trp-Pro-Pro-Tyr-Ile-Arg-His-Gln-Pro (SEQ ID NO 17),

借助于间隔序列 (Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser),

依此顺序串联形成序列

Trp-Pro-His-Ala-Trp-Lys-Val-Trp-

Trp-Pro-Ala-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Asn-

Trp-Trp-Trp-Pro-Pro-Tyr-Ile-Arg-His-Gln-Pro (SEQ ID NO 42).

借助于间隔序列 GS 使所获氨基酸序列与抗原蛋白质 NS4 的 N 末端融合进行表达的大肠杆菌表达载体象下面那样构建。编码此氨基酸序列的 DNA 以双链 DNA 片段的形式按如下方式获得：分别用 T4 寡核苷酸激酶 (Gibco 生产) 使 2 种合成的寡核苷酸 5'-

GATCCTGGCCGCATGCGTGGAAAGTGTGGTGGCCGGCGAGCGGCGGCGGCAGC  
GGCGGCGGCAGCAACTGGTGGTGGCCGCCGTATATTCGTCATCAGCCGGAGCT  
-3' (SEQ ID NO:125) 和 5'-

CCGGCTGATGACGAATATACGGCGGCCACCACCAGTTGCTGCCGCCGCCGCTG  
CCGCCGCCGCTCGCCGCCACCACACTTCCACGCATGCGGCCAG-3' (SEQ  
ID NO:126)

磷酸化，然后等摩尔混合，于 80℃ 下加热 5 分钟，然后缓慢地冷却至室温，形成的双链 DNA 片段象实施例 4 那样插入到质粒 pGEX-NS 的 BamHI/SacI 位点中，用该载体转化大肠杆菌 (JM109)，得到表达转化体。象实施例 4 那样对 NS4 的 N 末端融合了序列 42 氨基酸序列的表达蛋白质进行纯化。

#### (比较例 1) 抗原蛋白质的制造

对于编码质粒 pUC18-NS (参考例制备的) 中的抗原蛋白质 NS4 的核苷酸序列，使用上游引物

(5'-TTCACAGGATCCACTGAGCTCGATGCC CAC-3')

和下游引物 (5'-GATCTGGGCTCGAGCCGACTAGTA GTCGCT-3')，

将质粒 pUC18-NS 作为模板进行 PCR，得到上游具有 BamHI 和 SacI 限制位点、下游具有 SpeI 和 XhoI 限制位点而二者间为抗原蛋白质 NS4 基因的 DNA 片段。

利用 BamHI 和 XhoI 对纯化的 PCR 扩增产物进行消化，之后插入到质粒 pGEX-6P-1 (Amersham pharmacia biotech 公司生产) 的对应位点中，用产生的载体 pGEX-NS 转化大肠杆菌 (JM109)，得到

NS4-GST 融合蛋白质表达用转化体。通过使用 Miniprep (Wizard Minipreps DNA Purification Systems、PROMEGA 公司生产) 制备的质粒 DNA 作为模板, 使用 PGEX5' 测序引物 (Amersham Pharmacia Biotech) 进行测序, 确定插入片段的核苷酸序列, 从而验证转化体。

将得到的菌株于 10ml LB - Amp 培养基中预培养过夜后, 将其中的 0.1ml 转移到 10ml 新鲜 LB - Amp 培养基中, 于 37℃、170rpm 下振荡培养 3 小时, 然后添加 IPTG (终浓度 1mM) 于 37℃ 继续培养 4~12 小时。

离心 (8,000 ×g、2 分钟、4℃) 收集 IPTG 诱导的大肠杆菌, 再悬浮于 1/10 量的 4℃ PBS 中。通过冷冻融解和超声处理破碎菌体, 离心 (8,000 ×g、10 分钟、4℃) 除去固形杂质。通过 SDS - PAGE 确认存在于上清中的目的表达蛋白质后, 诱导表达的 GST 融合蛋白质通过谷胱甘肽琼脂糖 4B (Glutathion Sepharose 4B beads: Amersham pharmacia biotech 公司生产) 进行纯化。

使用的谷胱甘肽琼脂糖预先进行抑制非特异性吸附的处理。即用等量的 PBS 通过离心将谷胱甘肽琼脂糖洗 3 次 (8,000 ×g、1 分钟、4℃) 后, 加入等量的含有 4% BSA 的 PBS 于 4℃ 下处理 1 小时。处理后用等量的 PBS 洗 2 次, 再悬浮于 1/2 量的 PBS 中。将预处理后的谷胱甘肽琼脂糖 40μl 添加到 1ml 的无细胞提取液中, 于 4℃ 下轻柔搅拌。通过这样操作使 GST 融合蛋白质吸附于谷胱甘肽琼脂糖上。

吸附后通过离心 (8,000 ×g、1 分钟、4℃) 回收谷胱甘肽琼脂糖, 用 400μl 的 PBS 洗 3 次。然后添加 10mM 谷胱甘肽 40μl, 于 4℃ 下搅拌 1 小时, 对吸附的 GST 融合蛋白质进行洗脱。离心 (8,000 ×g、2 分钟、4℃) 回收上清后, 对 PBS 进行透析, 从而对 GST 融合蛋白质进行纯化。通过 SDS - PAGE 确认纯化的蛋白质出现单一带。

各个 GST 融合蛋白质 500μg 用 PrepScission 蛋白酶 (Amersham pharmacia biotech 公司生产, 5U) 进行消化后, 通过谷胱甘肽琼脂糖除去 PrepScission 蛋白酶和 GST。将流过级分再加入到用 PBS 平衡

的 Sephadex G200 柱上，获得最终纯化的表达蛋白质。通过 SDS - PAGE 确认出现单一带。

#### (实施例 7) 在铜酞菁粒子上固定抗原蛋白质

将铜酞菁粒子悬浮于含有 0.1% Tween-20 的 TBS 缓冲液中，最终浓度为 0.5% (w/v)。将其中的 10ml 装入 Teflon 离心管中，然后加入实施例 3 和 5 制备的融合蛋白质，或比较例 1 制备的蛋白质 50  $\mu$ g，于室温下振荡 30 分钟。通过离心 (10,000  $\times$ g、4 $^{\circ}$ C、10 分钟) 操作，铜酞菁粒子作为沉淀回收，与含有不能与铜酞菁粒子结合的抗原的上清分开。将该铜酞菁粒子再次悬浮于含有 0.1% Tween-20 的 TBS 缓冲液中，通过反复离心操作，对铜酞菁粒子进行清洗。对洗涤后的铜酞菁粒子的悬浮液中的蛋白质浓度利用微量 BCA 蛋白质定量试剂盒 (ピラスケミカル公司生产) 进行测定。测定结果如表 7 所示。

表 7  
酶对铜酞菁的结合能力的评价

	氨基酸序列号	蛋白质的量 $\mu\text{g}$
实施例 3	1	6
实施例 3	2	6
实施例 3	3	5
实施例 3	4	5
实施例 3	5	5
实施例 3	6	5
实施例 3	7	5
实施例 3	8	5
实施例 3	9	5
实施例 3	10	5
实施例 3	11	5
实施例 3	12	5
实施例 3	13	5
实施例 3	14	4
实施例 3	15	4
实施例 5	41	11
比较例 1	-	1

与使用比较例 1 的蛋白质相比，使用融合了铜酞菁结合序列的实施例 3 和实施例 5 的融合蛋白质一方的蛋白质浓度更高，由此确认通过此融合蛋白可以将抗原蛋白质有效地固定于颜料表面。

#### (实施例 8) 抗原蛋白质在炭黑粒子上的固定

将炭黑粒子悬浮于含有 0.1% Tween-20 的 TBS 缓冲液中，最终浓度为 0.5% (w/v)。将其中的 10ml 装入 Teflon 离心管中，然后加入实施例 4 和 6 制备的融合蛋白质，或比较例 1 制备的蛋白质 50  $\mu\text{g}$ ，于室温下振荡 30 分钟。通过离心 (10,000  $\times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 分钟) 操作，炭黑粒子作为沉淀回收，与含有不能与炭黑粒子结合的抗原的上清分开。将该炭黑粒子再次悬浮于含有 0.1% Tween-20 的 TBS 缓冲液中，通过反复离心操作，对炭黑粒子进行清洗。对清洗后的炭黑

粒子的悬浮液中的蛋白质浓度利用微量 BCA 蛋白质定量试剂盒（ピアスケミカル公司生产）进行测定。测定结果如表 8 所示。

表 8

## 酶对炭黑的结合能力的评价

	氨基酸序列号	蛋白质的量 $\mu\text{g}$
实施例 4	16	6
实施例 4	17	6
实施例 4	18	5
实施例 4	19	5
实施例 4	20	5
实施例 4	21	5
实施例 4	22	5
实施例 4	23	5
实施例 4	24	5
实施例 4	25	5
实施例 4	26	5
实施例 4	27	5
实施例 4	28	5
实施例 4	29	4
实施例 4	30	4
实施例 4	31	4
实施例 4	32	4
实施例 4	33	4
实施例 4	34	4
实施例 4	35	4
实施例 4	36	4
实施例 4	37	4
实施例 4	38	4
实施例 4	39	4
实施例 4	30	4
实施例 6	42	15
比较例 1	-	1

与使用比较例 1 的蛋白质相比，使用融合了炭黑结合序列的实施

例 4 和实施例 6 的融合蛋白质一方的蛋白质浓度更高，由此确认通过此融合蛋白可以将抗原蛋白质有效地固定于颜料表面。

(实施例 9) 利用免疫凝集法对丙型肝炎病毒抗体的测定

将其上固定有实施例 7 和 8 中制造的融合蛋白质的颜料粒子悬浮于 0.1M 磷酸钾缓冲液 (pH6.5)、1.0% 牛血清清蛋白 (シグマアルドリッチジャパン公司生产)、0.05%  $\text{NaN}_3$  组成的封闭用缓冲液中，通过离心分离 (10,000  $\times g$ 、4℃、10 分钟)，回收颜料粒子，反复进行 3 次操作进行洗涤，然后悬浮于 4ml 封闭用缓冲液中。

使用丙型肝炎病毒抗体阳性患者的血清对上述那样制备的测定用试剂和市售的免疫凝集法的诊断药 (オ-ソ HCV Ab PAII、オ-ソ・ダイアグノステック・システムズ公司生产，以下称之为「市售品」) 进行比较。实验依据上述市售商品的说明书进行。测定结果如表 9 和 10 所示。

表 9

## 丙型肝炎病毒抗体阳性患者的血清测定结果

	氨基酸 序列号	血清的稀释倍数			
		10,000	25,000	50,000	100,000
实施例 7	1	+	+	+	-
	2	+	+	+	-
	3	+	+	+	-
	4	+	+	+	-
	5	+	+	+	-
	6	+	+	+	-
	7	+	+	+	-
	8	+	+	+	-
	9	+	+	+	-
	10	+	+	+	-
	11	+	+	+	-
	12	+	+	+	-
	13	+	+	+	-
	14	+	+	+	-
	15	+	+	+	-
	41	+	+	+	-
市售品	-	+	+	-	-

(表中, + 表示有凝集, - 表示没有凝集)

表 10  
丙型肝炎病毒抗体阳性患者的血清测定结果

	氨基酸 序列号	血清的稀释倍数			
		10,000	25,000	50,000	100,000
实施例 8	16	+	+	+	-
	17	+	+	+	-
	18	+	+	+	-
	19	+	+	+	-
	20	+	+	+	-
	21	+	+	+	-
	22	+	+	+	-
	23	+	+	+	-
	24	+	+	+	-
	25	+	+	+	-
	26	+	+	+	-
	27	+	+	+	-
	28	+	+	+	-
	29	+	+	+	-
	30	+	+	+	-
	31	+	+	+	-
	32	+	+	+	-
	33	+	+	+	-
	34	+	+	+	-
	35	+	+	+	-
36	+	+	+	-	
37	+	+	+	-	
38	+	+	+	-	
39	+	+	+	-	
40	+	+	+	-	
42	+	+	+	-	
市售品	-	+	+	-	-

(表中, + 表示有凝集, - 表示没有凝集)

表 9 和表 10 的结果表明, 本发明的测定用试剂具有与市售品同等以上的灵敏度。另外本发明的测定用试剂由于其中所含不溶性载体为颜料而带有颜色, 所以目视判定非常容易。

另外虽然在上述实施例中用目视进行测定, 但也可以使用 CCD 等视觉画面识别手段测定凝集状态。此时即使载体不用色材也可以进行凝集状态的测定。

序列表

<110> CANON KABUSHIKI KAISHA

<120> 免疫学测定方法、免疫测定用试剂及其制造方法

<130> CFO17318

<150> JP P2002-173027

<151> 2002-06-13

<150> JP P2003-127099

<151> 2003-05-02

<160> 129

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 1

Lys Tyr Asp Ser Arg His Leu His Thr His Ser His  
1                    5                                10

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 2

Pro Asn Arg Leu Gly Arg Arg Pro Val Arg Trp Glu  
1                   5                   10

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 3

Lys Cys Cys Tyr Tyr Asp His Ser His Ala Leu Ser  
1                   5                   10

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 4

Glu Tyr Leu Ser Ala Ile Val Ala Gly Pro Trp Pro  
1                   5                   10

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 5

Lys Leu Trp Ile Leu Glu Pro Thr Val Thr Pro Thr  
1                   5                   10

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 6

Gln Ser Asn Leu Lys Val Ile Pro Ser Trp Trp Phe  
1                   5                   10

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 7

Trp Ile Pro Pro Gln Trp Ser Arg Leu Ile Glu Pro  
1                   5                   10

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 8

Asp His Pro Gln Ala Lys Pro Asn Trp Tyr Gly Val  
1                   5                   10

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 9

Gly Leu Pro Pro Tyr Ser Pro His Arg Leu Ala Gln  
1                   5                   10

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 10

Lys Leu Thr Thr Gln Tyr Met Ala Arg Ser Ser Ser  
1                   5                   10

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 11

Lys Val Trp Met Leu Pro Pro Leu Pro Gln Ala Thr  
1                   5                   10

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 12

Asn Val Thr Ser Thr Ala Phe Ile Asp Thr Pro Trp  
1                   5                   10

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 13

Arg Leu Asn Leu Asp Ile Ile Ala Val Thr Ser Val  
1                   5                   10

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 14

Thr Leu Pro Ser Pro Leu Ala Leu Leu Thr Val His  
1                   5                           10

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 15

Thr Asn Arg His Asn Pro His His Leu His His Val  
1                   5                           10

<210> 16

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 16

Trp Pro His Ala Trp Lys Val Trp Trp Pro Ala Ser  
1                   5                           10

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 17

Asn Trp Trp Trp Pro Pro Tyr Ile Arg His Gln Pro  
1                   5                   10

<210> 18

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 18

Trp His Trp Ser Trp Thr Pro Trp Pro Ser His His  
1                   5                   10

<210> 19

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 19

Trp Pro Trp Ala Trp His Pro Ser Arg Asp Val Tyr  
1                   5                   10

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 20

Trp His Gly Tyr Trp Tyr Ser Asn Leu Asn Thr Thr  
1                   5                   10

<210> 21

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 21

Trp Trp Thr Pro Trp Met Ser His Ala Tyr Pro Val  
1                   5                   10

<210> 22

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 22

Trp Pro Asn Pro Tyr Trp Gly Trp Phe Ala Ala Val  
1                   5                   10

<210> 23

<211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> 结合肽

<400> 23

Thr Ser Trp His Thr Trp Trp Trp Arg Gln Pro Pro  
 1                   5                   10

<210> 24  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> 结合肽

<400> 24

Asn Ala Trp His Lys Tyr Trp Trp Pro Ile Thr Lys  
 1                   5                   10

<210> 25  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> 结合肽

<400> 25

His Pro Asn Asn Asp Trp Ser Lys Ala Pro Gln Phe  
 1                   5                   10

<210> 26  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> 结合肽

<400> 26

Trp Trp Thr Pro Gln Pro Trp Trp Ser Phe Pro Ile  
 1                   5                   10

<210> 27  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> 结合肽

<400> 27

Trp Pro His Thr Ser Trp Trp Gln Thr Pro Leu Thr  
 1                   5                   10

<210> 28  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> 结合肽

<400> 28

Trp His Val Asn Trp Asp Pro Met Ala Trp Tyr Arg  
 1                   5                   10

<210> 29  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 结合肽

<400> 29

Ser Trp Pro Trp Trp Thr Ala Tyr Arg Val His Ser  
1                   5                   10

<210> 30  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 结合肽

<400> 30

Trp His Ser Asn Trp Tyr Gln Ser Ile Pro Gln Val  
1                   5                   10

<210> 31  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 结合肽

<400> 31

Gly Tyr Trp Pro Trp Lys Phe Glu His Ala Thr Val  
1                   5                   10

<210> 32  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 结合肽

<400> 32

Ala Trp Trp Pro Thr Thr Phe Pro Pro Tyr Tyr Tyr  
1                   5                                   10

<210> 33  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 结合肽

<400> 33

Asn Pro Trp Trp Ser His Tyr Tyr Pro Arg Ser Val  
1                   5                                   10

<210> 34  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 结合肽

<400> 34

Trp Pro His Asn Tyr Pro Leu Asn His Ser Asn Pro

1 5 10

<210> 35  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 结合肽

<400> 35

Thr Trp Ala His Pro Leu Glu Ser Asp Tyr Leu Arg  
1 5 10

<210> 36  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 结合肽

<400> 36

His Thr Tyr Tyr His Asp Gly Trp Arg Leu Ala Pro  
1 5 10

<210> 37  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 结合肽

<400> 37

---

Thr Phe Val Gln Thr Pro Leu Ser His Leu Ile Ala  
1                   5                   10

<210> 38  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 结合肽

<400> 38

Arg Val Pro Pro Ser Lys Leu Thr Arg Pro Pro Phe  
1                   5                   10

<210> 39  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 结合肽

<400> 39

His Ser Ile Tyr Ser Val Thr Pro Ser Thr Ala Ser  
1                   5                   10

<210> 40  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 结合肽

<400> 40

Leu Asn Thr Gln Asn His Ala Pro Leu Pro Ser Ile  
1 5 10

<210> 41  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 结合肽

<400> 41

Lys Tyr Asp Ser Arg His Leu His Thr His Ser His Gly Gly  
Gly Ser  
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Pro Asn Arg Leu Gly Arg Arg Pro Val Arg  
Trp Glu  
20 25 30

<210> 42  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 结合肽

<400> 42

Trp Pro His Ala Trp Lys Val Trp Trp Pro Ala Ser Gly Gly  
Gly Ser  
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Asn Trp Trp Trp Pro Pro Tyr Ile Arg His

Gln Pro

20

25

30

<210> 43

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 43

gatccaaata tgatagccgt catctgcata cccatagcca tgagct

46

<210> 44

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 互补于 43

<400> 44

catggctatg ggtatgcaga tgacggctat catatttg

38

<210> 45

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 45

gatccccgaa ccgtctgggc cgtcgtccgg tgcgttggga agagct

46

<210> 46  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 互补于 45

<400> 46  
cttcccaacg caccggacga cggcccagac ggttcggg  
38

<210> 47  
<211> 46  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 结合肽

<400> 47  
gatccaaatg ctgctattat gatcatagcc atgcgctgag cgagct  
46

<210> 48  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 互补于 47

<400> 48  
cgctcagcgc atggctatga tcataatagc agcatttg  
38

<210> 49

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 49

gatccgaata tctgagcgcg attgtggcgg gcccgaggcc ggagct  
46

<210> 50

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 互补于 49

<400> 50

ccggccacgg gcccgccaca atcgcgctca gatattcg  
38

<210> 51

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 51

gatccaaact gtggattctg gaaccgaccg tgaccccgac cgagct  
46

<210> 52

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 互补于 51

<400> 52

cggtcggggt cacggtcggg tccagaatcc acagtttg  
38

<210> 53

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 53

gatcccagag caacctgaaa gtgattccga gctggtggtt tgagct  
46

<210> 54

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 互补于 53

<400> 54

caaaccacca gtcggaatc actttcaggt tgctctgg  
38

<210> 55

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 55

gatcctggat tccgccgcag tggagccgtc tgattgaacc ggagct  
46

<210> 56

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 互补于 55

<400> 56

ccggttcaat cagacggctc cactgcggcg gaatccag  
38

<210> 57

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 57

gatccgatca tccgcaggcg aaaccgaact ggtatggcgt ggagct  
46

<210> 58

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 互补于 57

<400> 58

ccacgccata ccagttcggg ttcgcctgcg gatgatcg  
38

<210> 59

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 59

gatccggcct gccgccgtat agcccgcata gtctggcgca ggagct  
46

<210> 60

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 互补于 59

<400> 60

cctgcgccag acgatgcggg ctatacggcg gcaggccg  
38

<210> 61

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 61  
gatccaaact gaccaccag tatatggcgc gtagcagcag cgagct  
46

<210> 62  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 互补于 61

<400> 62  
cgctgctgct acgcgccata tactgggtgg tcagtttg  
38

<210> 63  
<211> 46  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 结合肽

<400> 63  
gatccaaagt gtggatgctg ccgccgctgc cgcaggcgac cgagct  
46

<210> 64  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 互补于 63

<400> 64  
cggtcgcctg cggcagcggc ggcagcatcc acactttg

38

<210> 65  
<211> 46  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 结合肽

<400> 65  
gatccaacgt gaccagcacc gcgtttattg ataccccgtg ggagct  
46

<210> 66  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 互补于 65

<400> 66  
cccacggggt atcaataaac gcggtgctgg tcacgttg  
38

<210> 67  
<211> 46  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 结合肽

<400> 67  
gatcccgtct gaacctggat attattgcgg tgaccagcgt ggagct  
46

<210> 68

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 互补于 67

<400> 68

ccacgctggc caccgcaata atatccaggc tcagacgg  
38

<210> 69

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 69

gatccaccct gccgagcccg ctggcgctgc tgaccgtgca tgagct  
46

<210> 70

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 互补于 69

<400> 70

catgcacggc cagcagcgcc agcgggctcg gcagggtg  
38

<210> 71

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 71

gatccaccaa ccgtcataac ccgcatcatc tgcacatgt ggagct  
46

<210> 72

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 互补于 71

<400> 72

ccacatgatg cagatgatgc gggttatgac ggttggtg  
38

<210> 73

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 73

gatcctggcc gcatgcgtgg aaagtgtggt ggccggcgag cgagct  
46

<210> 74

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 互补于 73

<400> 74

cgctcgccgg ccaccacact ttccacgcat gcggccag  
38

<210> 75

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 75

gatccaactg gtggtggccg ccgtatattc gtcacagcc ggagct  
46

<210> 76

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 互补于 75

<400> 76

ccggctgatg acgaatatac ggcggccacc accagttg  
38

<210> 77

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 77

gatcctggca ttggagctgg accccgtggc cgagccatca tgagct  
46

<210> 78

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 互补于 77

<400> 78

catgatggct cggccacggg gtccagctcc aatgccag  
38

<210> 79

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 79

gatcctggcc gtgggctgg catccgagcc gtgatgtgta tgagct  
46

<210> 80

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 互补于 79

<400> 80  
catacacatc acggctcgga tgccacgccc acggccag  
38

<210> 81  
<211> 46  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 结合肽

<400> 81  
gatcctggca tggctattgg tatagcaacc tgaacaccac cgagct  
46

<210> 82  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 互补于 81

<400> 82  
cggtggtggt caggttgcta taccaatagc catgccag  
38

<210> 83  
<211> 46  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 结合肽

<400> 83

gatcctggtg gaccccgtgg atgagccatg cgtatccggt ggagct  
46

<210> 84  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 互补于 83

<400> 84  
ccaccggata cgcattggctc atccacgggg tccaccag  
38

<210> 85  
<211> 46  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 结合肽

<400> 85  
gatcctggcc gaaccggtat tggggctggt ttgcggcggt ggagct  
46

<210> 86  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 互补于 85

<400> 86  
ccaccgccgc aaaccagccc caatacgggt tcggccag  
38

---

<210> 87  
<211> 46  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 结合肽

<400> 87  
gatccaccag ctggcatacc tgggtggtggc gtcagccgcc ggagct  
46

<210> 88  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 87

<400> 88  
ccggcggtg acgccaccac caggtatgcc agctggtg  
38

<210> 89  
<211> 46  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 结合肽

<400> 89  
gatccaacgc gtggcataaa tattggtggc cgattaccaa agagct  
46

<210> 90  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 互补于 89

<400> 90  
ctttggtaat cggccaccaa tatttatgcc acgcggtg  
38

<210> 91  
<211> 46  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 结合肽

<400> 91  
gatcccatcc gaacaacgat tggagcaaag cgccgcagtt tgagct  
46

<210> 92  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 互补于 91

<400> 92  
caaactgcgg cgctttgctc caatcgttgt tcggatgg  
38

<210> 93  
<211> 46

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 93

gatcctgggtg gacccccgcag ccgtgggtgga gctttccgat tgagct  
46

<210> 94

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 互补于 93

<400> 94

caatcggaaa gctccaccac ggctgcgggg tccaccag  
38

<210> 95

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 95

gatcctggcc gcataccagc tgggtggcaga ccccgctgac cgagct  
46

<210> 96

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 95

<400> 96

cggtcagcgg ggtctgccac cagctggtat gcggccag  
38

<210> 97

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 97

gatcctggca tgtgaactgg gatccgatgg cgtggatcgc tgagct  
46

<210> 98

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 互补于 97

<400> 98

cacgatacca cgccatcgga tcccagttca catgccag  
38

<210> 99

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 99

gatccagctg gccgtggtgg accgcgtatc gtgtgcatag cgagct  
46

<210> 100

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 互补于 99

<400> 100

cgctatgcac acgatacgcg gtccaccacg gccagctg  
38

<210> 101

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 101

gatcctggca tagcaactgg tatcagagca ttccgcaggt ggagct  
46

<210> 102

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 互补于 101

<400> 102  
ccacctgctg aatgctctga taccagttgc tatgccag  
38

<210> 103  
<211> 46  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 结合肽

<400> 103  
gatccggcta ttggccgtgg aaatttgaac atgcgaccgt ggagct  
46

<210> 104  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 互补于 103

<400> 104  
ccacggctgc atgttcaaat ttccacggcc aatagccg  
38

<210> 105  
<211> 46  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 结合肽

<400> 105  
gatccgcgtg gtggccgacc acctttccgc cgtattatta tgagct

46

<210> 106

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 互补于 105

<400> 106

cataataata cggcggaaag gtggtcggcc accacgcg

38

<210> 107

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 107

gatccaaccc gtggtggagc cattattatc cgcgtagcgt ggagct

46

<210> 108

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 互补于 107

<400> 108

ccacgctacg cggataataa tggctccacc acgggttg

38

<210> 109  
<211> 46  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 结合肽

<400> 109  
gatcctggcc gcataactat ccgctgaacc atagcaacc ggagct  
46

<210> 110  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 互补于 109

<400> 110  
ccgggttgct atggttcagc ggatagttat gcggccag  
38

<210> 111  
<211> 46  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 结合肽

<400> 111  
gatccacctg ggcgcatccg ctggaaagcg attatctgcg tgagct  
46

<210> 112

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 互补于 111

<400> 112

cacgcagata atcgctttcc agcggatgcg cccaggtg

38

<210> 113

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 113

gatcccatatc ctattatcat gatggctggc gtctggcgcc ggagct

46

<210> 114

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 互补于 113

<400> 114

ccggcgccag acgccagcca tcatgataat aggtatgg

38

<210> 115

<211> 46

<212> DNA

---

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 115

gatccacctt tgtgcagacc ccgctgagcc atctgattgc ggagct  
46

<210> 116

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 互补于 115

<400> 116

ccgcaatcag atggctcagc ggggtctgca caaaggtg  
38

<210> 117

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 117

gatcccgtgt gccgccgagc aaactgacc gcgcccggtt tgagct  
46

<210> 118

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 互补于 117

<400> 118

caaacggcgg acgggtcagt ttgctcggcg gcacacgg  
38

<210> 119

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 119

gatcccatag catttatagc gtgacccccga gcaccgag cgagct  
46

<210> 120

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 互补于 119

<400> 120

cgctcgcggg gctcggggtc acgctataaa tgctatgg  
38

<210> 121

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 121  
gatccctgaa cacccagaac catgcgccgc tgccgagcat tgagct  
46

<210> 122  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 互补于 121

<400> 122  
caatgctcgg cagcggcgca tggttctggg tggtcagg  
38

<210> 123  
<211> 106  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 结合肽

<400> 123  
gatccaaata tgatagccgt catctgcata cccatagcca tggcggcggc  
agcggcggcg 60

gcagcccgaa ccgtctgggc cgtcgtccgg tgcgttgga agagct  
106

<210> 124  
<211> 98  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>

<223> 互补于 123

<400> 124

cttcccaacg caccggacga cggcccagac ggttcgggct gccgccgccg  
ctgccgccgc 60

catggctatg ggtatgcaga tgacggctat catatttg  
98

<210> 125

<211> 106

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 结合肽

<400> 125

gatcctggcc gcatgcgtgg aaagtgtggt ggccggcgag cggcggcggc  
agcggcggcg 60

gcagcaactg gtggtggccg ccgtatattc gtcacagcc ggagct  
106

<210> 126

<211> 98

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 互补于 125

<400> 126

ccggctgatg acgaatatac ggcggccacc accagttgct gccgccgccg  
ctgccgccgc 60

cgctcggcgg ccaccacact ttccacgcat gcggccag  
98

<210> 127

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> NS4 的 5'引物

<400> 127

ttcacaggat ccactgagct cgatgccac

30

<210> 128

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> NS4 的 3'引物

<400> 128

gatctgggct cgagccgact agtagtcgct

30

<210> 129

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 间隔区

<400> 129

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1

5

专利名称(译)	免疫学测定方法、免疫测定用试剂及其制造方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1467500A</a>	公开(公告)日	2004-01-14
申请号	CN03142495.3	申请日	2003-06-12
[标]申请(专利权)人(译)	佳能株式会社		
申请(专利权)人(译)	佳能株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	佳能株式会社		
[标]发明人	本间努 矢野哲哉 野本毅 古崎真也		
发明人	本间努 矢野哲哉 野本毅 古崎真也		
IPC分类号	C07K7/00 C07K7/06 C07K16/44 C12N15/09 G01N33/543 G01N33/544 G01N33/58 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/68 C12P21/02		
CPC分类号	C07K7/06 G01N33/585 G01N33/54353		
代理人(译)	唐伟杰		
优先权	2002173027 2002-06-13 JP 2003127099 2003-05-02 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

### 摘要(译)

本发明公开了一种用于定量或定性测定检测样品中作为测定对象的抗体或抗原的存在的方法，包括将该检测样品与和该测定对象抗体或抗原发生免疫反应的抗原或抗体混合，并测定免疫凝集反应的水平，其中，反应性抗原或抗体通过能与该载体结合的氨基酸序列有效地固定在载体上。

确定的氨基酸序列和它们的频度

确定的氨基酸序列	个数 (A)	频率 (A/36)
Lys-Tyr-Asp-Ser-Arg-His-Leu-His-Thr-His-Ser-His (SEQ ID NO 1)	6	0.17
Pro-Asn-Arg-Leu-Gly-Arg-Arg-Pro-Val-Arg-Trp-Glu (SEQ ID NO 2)	6	0.17
Lys-Cys-Cys-Tyr-Tyr-Asp-His-Ser-His-Ala-Leu-Ser (SEQ ID NO 3)	4	0.11
Glu-Tyr-Leu-Ser-Ala-Ile-Val-Ala-Gly-Pro-Trp-Pro (SEQ ID NO 4)	3	0.08
Lys-Leu-Trp-Ile-Leu-Glu-Pro-Thr-Val-Thr-Pro-Thr (SEQ ID NO 5)	3	0.08
Gln-Ser-Asn-Leu-Lys-Val-Ile-Pro-Ser-Trp-Trp-Phe (SEQ ID NO 6)	3	0.08
Trp-Ile-Pro-Pro-Gln-Trp-Ser-Arg-Leu-Ile-Glu-Pro (SEQ ID NO 7)	3	0.08
Asp-His-Pro-Gln-Ala-Lys-Pro-Asn-Trp-Tyr-Gly-Val (SEQ ID NO 8)	1	0.02
Gly-Leu-Pro-Pro-Tyr-Ser-Pro-His-Arg-Leu-Ala-Gln (SEQ ID NO 9)	1	0.02
Lys-Leu-Thr-Thr-Gln-Tyr-Met-Ala-Arg-Ser-Ser-Ser (SEQ ID NO 10)	1	0.02
Lys-Val-Trp-Met-Leu-Pro-Pro-Leu-Pro-Gln-Ala-Thr (SEQ ID NO 11)	1	0.02
Asn-Val-Thr-Ser-Thr-Ala-Phe-Ile-Asp-Thr-Pro-Trp (SEQ ID NO 12)	1	0.02
Arg-Leu-Asn-Leu-Asp-Ile-Ile-Ala-Val-Thr-Ser-Val (SEQ ID NO 13)	1	0.02