



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104297477 B

(45)授权公告日 2018.07.06

(21)申请号 201410344742.6

G01N 33/536(2006.01)

(22)申请日 2014.07.18

C07K 19/00(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104297477 A

(43)申请公布日 2015.01.21

(30)优先权数据

13003633.8 2013.07.18 EP

(73)专利权人 弗·哈夫曼-拉罗切有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 E·法特兹 P·沙尔施密特

U·施密特 C·舒尔茨

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51)Int.Cl.

G01N 33/571(2006.01)

(56)对比文件

CN 101591665 A,2009.12.02,

DE 10207135 A1,2003.09.11,

CN 101363860 A,2009.02.11,

CN 101858915 A,2010.10.13,

NCBI.WP_001884984 lipoprotein[Vibrio cholerae].《NCBI-Protein》.2013,

John F. Heidelberg,et al.DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen Vibrio cholerae.《Nature》.2000,第406卷

审查员 许珊萍

权利要求书2页 说明书17页

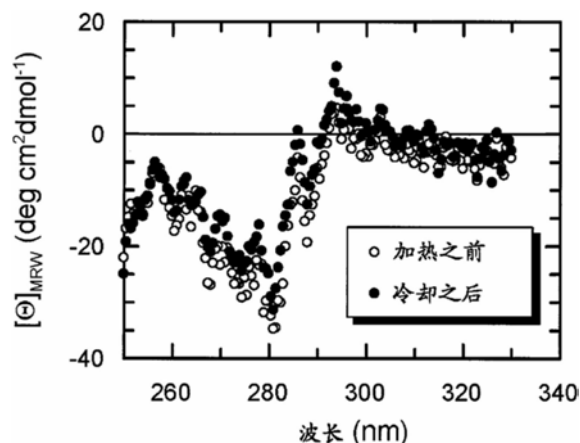
序列表17页 附图2页

(54)发明名称

VcLp15变体在基于TpN17的检测抗密螺旋体抗体的免疫测定中作为抗干扰添加剂

(57)摘要

本发明涉及用于检测分离的样品中的抗苍白密螺旋体的TpN17抗原的抗体的方法,其中用霍乱弧菌脂蛋白15(VcLp15)的肽序列或其部分序列作为用于减少干扰(即用于最少化假阳性结果)的试剂。此外,本发明涉及包含VcLp15肽序列和分子伴侣的融合多肽,它们在免疫测定中作为用于减少干扰和用于最少化假阳性结果的添加剂的用途,及包含TpN17抗原和该VcLp15分子伴侣融合多肽的用于检测分离的样品中的抗苍白密螺旋体抗原的抗体的试剂盒。



1. 用于检测分离的样品中抗苍白密螺旋体的TpN17抗原的抗体的试剂盒, 包含用霍乱弧菌脂蛋白15 (VcLp15) 的肽序列作为用于减少干扰和用于最少化假阳性结果的试剂, 其中所述VcLp15的肽序列包含SEQ ID NO.1的氨基酸残基26-163, 且保持霍乱弧菌脂蛋白15的三维结构不变。

2. 用于检测分离的样品中抗苍白密螺旋体的TpN17抗原的抗体的试剂盒, 包含用霍乱弧菌脂蛋白15 (VcLp15) 的肽序列作为用于减少干扰和用于最少化假阳性结果的试剂, 其中所述VcLp15的肽序列包含SEQ ID NO.1的氨基酸残基26-163, 且其中所述VcLp15的肽序列在SEQ ID NO.1的氨基酸残基26-163的N端或C端或两端截短1至5个氨基酸, 且保持霍乱弧菌脂蛋白15的三维结构不变。

3. 用于检测分离的样品中抗苍白密螺旋体的TpN17抗原的抗体的试剂盒, 包含用霍乱弧菌脂蛋白15 (VcLp15) 的肽序列作为用于减少干扰和用于最少化假阳性结果的试剂, 其中所述VcLp15的肽序列包含SEQ ID NO.1的氨基酸残基26-163, 且其中所述VcLp15的肽序列用保守氨基酸取代来修饰, 由此保持霍乱弧菌脂蛋白15的三维结构不变。

4. 用于检测分离的样品中抗苍白密螺旋体的TpN17抗原的抗体的试剂盒, 包含用霍乱弧菌脂蛋白15 (VcLp15) 的肽序列作为用于减少干扰和用于最少化假阳性结果的试剂, 其中所述VcLp15的肽序列包含SEQ ID NO.1的氨基酸残基26-163, 且其中所述VcLp15的肽序列在SEQ ID NO.1的氨基酸残基26-163的N端或C端或两端截短1至5个氨基酸, 且其中所述VcLp15的肽序列用保守氨基酸取代来修饰, 由此保持霍乱弧菌脂蛋白15的三维结构不变。

5. 权利要求1至4中任一项所述的试剂盒, 其中所述VcLp15肽序列与分子伴侣融合。

6. 融合多肽的用途, 用于制备检测分离的样品中抗苍白密螺旋体的TpN17抗原的抗体的试剂盒, 所述融合多肽包含VcLp15的肽序列和分子伴侣, 其中所述VcLp15的肽序列包含SEQ ID NO.1的氨基酸残基26-163, 且保持霍乱弧菌脂蛋白15的三维结构不变。

7. 融合多肽的用途, 用于制备检测分离的样品中抗苍白密螺旋体的TpN17抗原的抗体的试剂盒, 所述融合多肽包含VcLp15的肽序列和分子伴侣, 其中所述VcLp15的肽序列包含SEQ ID NO.1的氨基酸残基26-163, 且其中所述VcLp15的肽序列在SEQ ID NO.1的氨基酸残基26-163的N端或C端或两端截短1至5个氨基酸, 且保持霍乱弧菌脂蛋白15的三维结构不变。

8. 融合多肽的用途, 用于制备检测分离的样品中抗苍白密螺旋体的TpN17抗原的抗体的试剂盒, 所述融合多肽包含VcLp15的肽序列和分子伴侣, 其中所述VcLp15的肽序列包含SEQ ID NO.1的氨基酸残基26-163, 且其中所述VcLp15的肽序列用保守氨基酸取代来修饰, 由此保持霍乱弧菌脂蛋白15的三维结构不变。

9. 融合多肽的用途, 用于制备检测分离的样品中抗苍白密螺旋体的TpN17抗原的抗体的试剂盒, 所述融合多肽包含VcLp15的肽序列和分子伴侣, 其中所述VcLp15的肽序列包含SEQ ID NO.1的氨基酸残基26-163, 且其中所述VcLp15的肽序列在SEQ ID NO.1的氨基酸残基26-163的N端或C端或两端截短1至5个氨基酸, 且其中所述VcLp15的肽序列用保守氨基酸取代来修饰, 由此保持霍乱弧菌脂蛋白15的三维结构不变。

10. 权利要求6至9中任一项所述的融合多肽的用途, 其中分子伴侣选自SlyD、SlpA、FkpA和Skp。

11. 权利要求6所述的融合多肽的用途, 所述融合多肽包含SEQ ID NO.3。

12. 权利要求6至9中任一项所述的融合多肽作为用于检测分离的样品中抗苍白密螺旋体的TpN17抗原的抗体的免疫测定中的添加剂的用途,用于减少干扰和用于最少化假阳性结果。

13. 用于通过免疫测定检测分离的样品中抗苍白密螺旋体的TpN17抗原的抗体的试剂盒,其包含TpN17抗原和权利要求6至11中任一项所述的融合多肽。

14. 用于检测分离的样品中抗苍白密螺旋体的TpN17抗原的抗体的试剂盒,其包含:

- a) 与存在于所述样品中的所述抗体特异性结合的特异性结合配偶体;和
- b) 权利要求6至11中任一项所述的融合多肽。

15. 权利要求14的试剂盒,其中用两种TpN17抗原作为将要在所述分离的样品中检测的抗体的特异性结合配偶体:

包含TpN17序列和第一分子伴侣的第一TpN17抗原,其中第一TpN17抗原与固相结合;

包含TpN17序列和第二分子伴侣的第二TpN17抗原,其中第二TpN17抗原携带可检测标记;

其中两种TpN17抗原中的TpN17序列相同或在免疫学上交叉反应,使得存在于所述样品中的抗体特异性结合它们;且

其中第一和第二分子伴侣不同。

16. 权利要求15的试剂盒,其中第一TpN17抗原包含大肠杆菌FkpA作为分子伴侣,第二TpN17抗原包含大肠杆菌Skp作为分子伴侣。

VcLp15变体在基于TpN17的检测抗密螺旋体抗体的免疫测定中作为抗干扰添加剂

技术领域

[0001] 本发明涉及用于检测分离的样品中的抗苍白密螺旋体 (*Treponema pallidum*) 的 TpN17 抗原的抗体的方法, 其中用霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 脂蛋白 15 (VcLp15) 的肽序列作为用于减少干扰和用于最少化假阳性结果的试剂。此外, 本发明涉及包含 VcLp15 肽序列和分子伴侣的融合多肽, 它们在免疫测定中作为用于减少干扰和用于最少化假阳性结果的添加剂的用途, 及包含 TpN17 抗原和该 VcLp15 分子伴侣融合多肽的用于检测分离的样品中的抗苍白密螺旋体抗原的抗体的试剂盒。

背景技术

[0002] 梅毒 (Syphilis, 又名 Lues) 是由隶属于螺旋体细菌家族的苍白密螺旋体引起的严重感染性疾病。它主要通过性接触传播, 但也可以在妊娠期间从孕妇传至胎儿。该疾病表征为不同的临床阶段和长的潜伏、无症状感染期。许多感染个体未注意到症状, 因此多年未意识到其梅毒感染。初次感染有限, 且通常引起小的无痛溃疡 (第一阶段, “梅毒 I (Lues I)”)。如果不进行青霉素治疗, 则该疾病进展至第二阶段梅毒 II (Lues II) (感染后约 8 周), 其产生流感样症状、非发痒性皮疹和肿胀淋巴结。几年后, 在梅毒 III (Lues III) 阶段, 全身出现梅毒结节 (syphilitic node)。最后的阶段 (梅毒 IV (Lues IV)) 表征为中枢神经系统的破坏, 最终导致神经和心脏障碍、全身麻痹 (general paralysis)、共济失调、痴呆和失明。

[0003] 虽然由于在 20 世纪中叶引入了青霉素而有有效的疗法可用, 但梅毒仍是重要的全球性健康问题, 估计全世界每年有一千二百万例新的感染。必须可靠地鉴别密螺旋体感染患者, 以起始抗生素疗法, 从而预防梅毒的进一步传播。因此, 有必要提供可靠的诊断工具 (如免疫测定) 来检测抗苍白密螺旋体的抗体。但是, 为了在血清学应用中用作特异性化合物, 重组衍生的蛋白质必须满足几点要求, 如溶解性、稳定性和抗原性。

[0004] TpN17 (苍白密螺旋体菌株 Nichols, 17KDa) (其成熟形式是由 134 个氨基酸残基组成的小蛋白质) 是苍白密螺旋体 (梅毒的病原体) 的免疫显性抗原 (J.Clin.Lab.Immunol. (1998), 50, 27-44; Folia Microbial. (2003) 48 (4), 549-553)。抗 TpN17 的抗体在密螺旋体感染的个体中常见且丰富, 有必要在旨在敏感和可靠地检测密螺旋体感染的免疫测定中使用 TpN17。

[0005] 但是, 我们观察到, 用 TpN17 作为抗原的免疫测定倾向于显示假阳性结果, 即它提供表面看来为阳性的信号, 但实际上样品中不存在抗密螺旋体的抗体。这些干扰是罕见但显著的现象。它们损害了免疫测定的特异性, 且它们显然是由梅毒免疫测定中实际上不可或缺或苍白的密螺旋体抗原 TpN17 的使用引起。

[0006] 因此, 本发明潜在的问题可以视为提供用于检测抗密螺旋体抗体时避免假阳性结果和提高基于 TpN17 的免疫测定的特异性的工具和方法。

[0007] 发明概述

[0008] 通过权利要求所表征的本发明来解决该问题。具体而言, 本发明涉及用于检测分

离的样品中抗苍白密螺旋体的TpN17抗原的抗体的方法,其中用霍乱弧菌脂蛋白15(VcLp15)的肽序列或其部分序列作为用于减少干扰,即用于最少化假阳性结果的试剂。该VcLp15多肽序列的部分序列可以包含SEQ ID NO.1的氨基酸26-163。在另一实施方案中,该VcLp15肽序列或其部分序列与分子伴侣融合。

[0009] 本发明还涉及包含SEQ ID NO.1的VcLp15肽序列或其部分序列和分子伴侣的融合多肽。在优选实施方案中,与VcLp15肽序列融合分子伴侣选自SlyD、SlpA、FkpA和Skp。

[0010] 在另一优选实施方案中,该融合多肽包含SEQ ID NO.3,SEQ ID NO.3是大肠杆菌(E.coli) SlyD和VcLp15的融合多肽(EcSlyD-VcLp15)。

[0011] 本发明还涵盖包含VcLp15肽和可选的分子伴侣的融合多肽作为添加剂在免疫测定中减少干扰和最少化假阳性结果中的用途。

[0012] 在另一实施方案中,本发明涉及用于通过免疫测定检测分离的样品中抗苍白密螺旋体抗原的抗体的试剂盒,其包含TpN17抗原、及含有VcLp15肽和可选的分子伴侣的融合多肽。

[0013] 本发明还涉及用于检测分离的样品中抗苍白密螺旋体的TpN17抗原的抗体的方法,该方法包括:

[0014] a) 通过将体液样品与存在于该样品中的该抗体可以特异性结合的特异性结合配偶体混合来形成免疫反应混合物;

[0015] b) 在向该样品加入该特异性结合配偶体之前、同时或之后向该免疫反应混合物加入包含VcLp15肽和可选的分子伴侣的融合多肽;

[0016] c) 维持该免疫反应混合物足以使存在于该体液样品中的抗体与该特异性结合配偶体进行免疫反应,以形成免疫反应产物的时期;和

[0017] d) 检测该免疫反应产物中的任一种的存在和/或浓度。

[0018] 附图、附表和SEQ ID NO简述

[0019] 图1显示本发明的融合多肽EcSlyD-VcLp15的近UV CD光谱(紫外圆二色谱);更多细节见实施例4,实施例4描述通过CD光谱监测的热诱导的EcSlyD-VcLp15的解折叠。

[0020] 图2显示通过近UV区中的CD光谱监测的本发明的融合多肽EcSlyD-VcLp15的熔解曲线。细节见实施例4。

[0021] 图3显示具有与它的N端符合读框地融合的两个SlyD分子伴侣单位的密螺旋体TpN17全长抗原23-156的示意图。为了表示该SlyD融合配偶体的大肠杆菌来源,将所示融合多肽命名为EcSlyD-EcSlyD-TpN17(23-156);还见SEQ ID NO.8。

[0022] 表1显示用于本研究(实施例2)的融合多肽变体的蛋白质参数。

[0023] 表2至5显示按照实施例5对霍乱弧菌Lp15在梅毒免疫测定中的抗干扰活性进行的实验的结果。

[0024] 表2显示寡聚TpN17作为密螺旋体特异性抗原的结果,其中加入单体VcLp15(与作为分子伴侣的SlyD融合)来减少干扰。

[0025] 表3显示单体TpN17作为密螺旋体特异性抗原的结果,其中加入单体VcLp15(与作为分子伴侣的SlyD融合)来减少干扰。

[0026] 表4显示寡聚TpN17作为密螺旋体特异性抗原的结果,其中加入寡聚VcLp15(与作为分子伴侣的Skp融合)来减少干扰。

[0027] 表5显示单体TpN17作为密螺旋体特异性抗原的结果,其中加入寡聚VcLp15(与作为分子伴侣的Skp融合)来减少干扰。

[0028] SEQ ID NO.1显示可从公共数据库UniProt检索号Q9KQN6检索到的霍乱弧菌脂蛋白15(VcLp15)的完整氨基酸序列(163个残基)。氨基酸残基1-25组成信号序列;成熟VcLp15包含氨基酸残基26-163(下划线)。

[0029]

MMKKSIFALS ALTLILVGCD NQQDAKVEVE KVV DVAAAPA EQSAAQPSTA
SVDAAHNAQN SLDWAGIYQG TLPCADCGGI ETELTLNADG TYALTEKYLD
KEGEPFASQG TFWNEAGNI VTLQTGDQTG RQFMVGENTL SHLDMEGKVI
EGELAEFYVL SKQ

[0030] SEQ ID NO.2显示用于与不同分子伴侣组件融合的VcLp15序列(26-163)。成熟VcLp15序列(氨基酸残基26-163)缺乏N端信号序列(氨基酸残基1-25),且缺乏半胱氨酸残基。用丙氨酸残基(下划线)取代VcLp15的74和77位(前体蛋白的编号)的两个真实的半胱氨酸残基,以便于重折叠过程,并抑制二硫键加合物形成。VcLp15在C端具有六组氨酸标记(下划线),以便于纯化,并使得能够通过金属柱(Ni、Zn、Cu)进行基质偶联的重折叠。

[0031]

KVEVEKVV DV AAPAEQSAA QPSTASVDAA HNAQNSLDWA GIYQGTLPAA
DAGGIETELT LNADGTYALT EKYLDKEGEP FASQGTFWN EAGNIVTLQT

[0032]

GDQTGRQFMV GENTLSHLDM EGKVIEGELA EFYVL SKQLE HHHHHH

[0033] SEQ ID NO.3显示本发明的融合多肽EcSlyD-VcLp15,其包含作为分子伴侣的一分子大肠杆菌SlyD和成熟VcLp15序列(26-163,下划线)。

[0034]

MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDY LHGHGS LISGLETALE GHEVGDKFDV
AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVF MGVD EL QVGM RFLAET DQGPVPVEIT AVEDDHVVVD
GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHH DHDHDGGGSG GSGGGSGGGG
SGGGSGGGKV EVEKVVDVAA APAEQSAAQP STASVDAAHN AQNSLDWAGI YQGTLPAA DA
GGIETELTLN ADGTYALTEK YLDKEGEPFA SQGTFWNEA GNIVTLQTGD QTGRQFMVGE
NTLSHLDMEG KVIEGELAEF YVL SKQLEHH HHHH

[0035] SEQ ID NO.4显示本发明的融合多肽EcSkp-VcLp15,其包含作为分子伴侣的一分子大肠杆菌Skp和成熟VcLp15序列(26-163,下划线)。

[0036]

MADKIAIVNM GSLFQQVAQK TGVSNLENE FRGRASELQR METDLQAKMK KLQSMKAGSD
RTKLEKDVMA QRQTFAQKAQ AFEQDRARRS NEERGKLVTR IQTAVKSVAN SQDIDLVDVA
NAVAYNSSDV KDIADVLKQ VKGGGSGGGS GGGSGGSGG GSGGGKVEVE KVV DVAAAPA
EQSAAQPSTA SVDAAHNAQN SLDWAGIYQG TLPAADAGGI ETELTLNADG TYALTEKYLD
KEGEPFASQG TFVWNEAGNI VTLQTGDQTG RQFMVGENTL SHLDMEGKVI EGELAEFYVL
SKQLEHHHHH H

[0037] SEQ ID NO.5显示从公共数据库UniProt检索号UniProt ID P29722下检索的苍白密螺旋体抗原的完整TpN17序列(氨基酸残基1-156)。

[0038]

**MKGSVRALCA FLGVGALGSA LCVSCTTVCP HAGKAKAEKV ECALKGGIFR
GTLPAADCPG IDTTVTFNAD GTAQKVELAL EKKSAPSPLT YRGTMVRED
GIVELSLVSS EQSKAPHEKE LYELIDSNSV RYMGAPGAGK PSKEMAPFYV
LKKTKK**

[0039] SEQ ID NO.6显示实施例5中所用的TpN17序列。对于此免疫测定,使用了缺乏信号序列(氨基酸残基1-22)的成熟TpN17蛋白质(氨基酸残基23-156)。我们发现,TpN17的四个真实的半胱氨酸残基对蛋白质的抗原性而言可有可无(数据未显示)。因此,用丙氨酸残基(下划线)取代了25、29、42和58位(前体蛋白的编号)的半胱氨酸残基,以便于重折叠过程,并抑制有害的副反应,如二硫键加合物形成。

[0040]

VSATTVAPHA GKAKAEKVEA ALKGGIFRGT LPAADAPGID TTVTFNADGT
AQKVELALEK KSAPSPLTYR GTWMVREDGI VELSLVSSEQ SKAPHEKELY
ELIDSNSVRY MGAPGAGKPS KEMAPFYVLK KTKK

[0041] SEQ ID NO.7显示用于与不同分子伴侣组件融合的TpN17序列氨基酸残基23-156(还见SEQ ID NO.6)。TpN17在C端具有六组氨酸标记(下划线),以便于纯化,并使得能够通过金属柱(Ni、Zn、Cu)进行基质偶联的重折叠。省去了TpN17的N端信号序列(氨基酸残基1-22),以获得处于其天然样构象的成熟(加工)形式的蛋白质。

[0042]

VSATTVAPHA GKAKAEKVEA ALKGGIFRGT LPAADAPGID TTVTFNADGT
AQKVELALEK KSAPSPLTYR GTWMVREDGI VELSLVSSEQ SKAPHEKELY
ELIDSNSVRY MGAPGAGKPS KEMAPFYVLK KTKKLEHHHH HH

[0043] SEQ ID NO.8显示已在N端融合了两分子大肠杆菌SlyD(“串联SlyD”)的TpN17序列(下划线);此分子也称为EcSlyD-EcSlyD-TpN17或EcSS-TpN17。

[0044]

MKVAKDLVVS LAYQVRTEG VLVDESPVSA PLDYLHGHGS LISGLETALE GHEVGDKFDV
 AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFQGVDEL QVGMRFIAET DQGPVPVEIT AVEDDHVVVD
 GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHGH DHDHGGGSG GSGGGSGGG
 SGGSGGGKV AKDLVVSLEY QVRTEGVLV DESPVSAPLD YLHGHGSLIS GLETALEGHE
 VGDKFDVAVG ANDAYGQYDE NLVQRVPKDV FMGVDELQVG MRFLAETDQG PVPVEITAVE
 DDHVVVDGNH MLAGQNLKFN VEVVAIREAT EEELAHGHVH GAHDHHDHHD HDGGSGGGGS
 GGGSGGGSGG GSGGGVSATT VAPHAGKAKA EKVEAALKGG IFRGTLPAAD APGIDTTVTF
 NADGTAQKVE LALEKKSAPS PLTYRGTMV REDGIVELSL VSSEQSKAPH EKELYELIDS
 NSVRYMGAPG AGKPSKEMAP FYVLKTKKL EHHHHHH

[0045] SEQ ID NO.9显示已在N端融合了两分子多杀性巴氏杆菌 (*Pasteurella multocida*) SlyD (“串联SlyD”) 的TpN17序列(下划线);此分子也称为PmSlyD-PmSlyD-TpN17或PmSS-TpN17。

[0046]

MKIAKNVVVS IAYQVRTEG VLVDEAPVNQ PLEYLQGHNN LVIGLENALE GKAVGDKFEV
 RVKPEEAYGE YNENMVQRVP KDVFQGVDEL VVGMRFIADT DIGPLPVVIT EVAENDVVVD
 GNHMLAGQEL LFSVEVVAIR EATLEEIAHG HIHQEGGGGS GGGSGGGGS GGGSGGGKIA
 KNVVVSIAVQ VRTEGVLVD EAPVNQPLEY LQGHNNLVIG LENALEGKAV GDKFEVRVKP
 EEAYGEYNEN MVQRVPKDVQ QGVDELVGM RFIADTDIGP LPVVITEVAE NDVVVDGNHM
 LAGQELLSV EVVATREATL EEIAHGHVH EGGGGSGGGGS GGGSGGGSGG GSGGGVSATT
 VAPHAGKAKA EKVEAALKGG IFRGTLPAAD APGIDTTVTF NADGTAQKVE LALEKKSAPS
 PLTYRGTMV REDGIVELSL VSSEQSKAPH EKELYELIDS NSVRYMGAPG AGKPSKEMAP

[0047]

FYVLKTKKL EHHHHHH

[0048] SEQ ID NO.10显示已在N端融合了一分子大肠杆菌FkpA的TpN17序列(下划线);此分子也称为EcFkpA-TpN17。

[0049]

MAEAAKPATT ADSKAAFKND DQKSAYALGA SLGRYMENSL KEQEKLGKIL DKDQLIAGVQ
 DAFADKSKLS DQEIEQTLQA FEARVKSSAQ AKMEKDAADN EAKGKEYREK FAKEKGVKTS
 STGLVYQVVE AGKGEAPKDS DTVVVNYKGT LIDGKEFDNS YTRGEPLSFR LDGVI PGWTE
 GLKNIKGGK IKLVIPPELA YGKAGVPGIP PNSTLVFDVE LLDVKPAPKA DAKPEADAKA
 ADSAKKGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGV SATTVAPHAG KAKAEKVEAA LKGGIFRGTL
 PAADAPGIDT TVTFNADGTA QKVELALEKK SAPSPLTYRG TWMVREDGIV ELSLVSSEQS
 KAPHEKELYE LIDNSVRYM GAPGAGKPSK EMAPFYVLKK TKKLEHHHHH H

[0050] SEQ ID NO.11显示已在N端融合了一分子大肠杆菌Sklp的TpN17序列(下划线);此分子也称为EcSklp-TpN17。

[0051]

MADKIAIVNM GSLFQQVAQK TGVSNLTENE FRGRASELQR METDLQAKMK KLQSMKAGSD
 RTKLEKDVMA QRQTFAQKAQ AFEQDRARRS NEERGKLVTR IQTAVKSVAN SQDIDLVDVA
 NAVAYNSSDV KDITADVCLKQ VKGGSGGGGS GGGSGGGSGG GSGGGVSATT VAPHAGKAKA
 EKVEAALKGG IFRGTLPAAD APGIDTTVTF NADGTAQKVE LALEKKSAPS PLTYRGTMV
 REDGIVELSL VSSEQSKAPH EKELYELIDS NSVRYMGAPG AGKPSKEMAP FYVLKTKKL
 EHHHHHH

[0052] SEQ ID NO.12显示可以用作几个分子伴侣部分之间的柔性、可溶和蛋白酶抗性间隔区或接头的富含甘氨酸的间隔区(包含由丝氨酸分开的三甘氨酸单位)的氨基酸序列。

[0053] GGGSGGGSGG GSGGGSGGGS GGG

[0054] 发明详述

[0055] 如本发明人可以证明,用于检测抗苍白密螺旋体的抗体的免疫测定倾向于显示假阳性结果。具体而言,在使用密螺旋体抗原TpN17时,假阳性信号的数目显著提高。已用明确表征为抗密螺旋体阴性的人血清观察到了这种现象:在使用TpN17抗原时,发现了显著数目的假阳性(见实施例5)。但是,TpN17是密螺旋体感染中极其重要的免疫原和梅毒血清学中最重要抗原。因此,通过简单地舍弃TpN17抗原来避免此干扰问题不是可行的选择。

[0056] 我们因此开始设计能够可靠和灵敏地检测抗TpN17抗体的重组TpN17变体。更确切地说,我们通过富含甘氨酸和丝氨酸残基的柔性接头将TpN17与赋予溶解性的分子伴侣(串联SlyD,即EcSlyD-EcSlyD和PmSlyD-PmSlyD)融合。由于所融合的助折叠蛋白的有益作用,得到的融合多肽符合用于血清学目的(即用于免疫测定)良好抗原的所有物理化学和免疫学要求。

[0057] 我们设计用于自动梅毒免疫测定的分子伴侣-TpN17融合蛋白质具有高度可溶和反应性,并有利地用于双抗原夹心形式。如上文所提到,在梅毒免疫测定的可行性研究期间,结果证明TpN17确实是具有杰出诊断意义的免疫显性密螺旋体抗原。换言之,为了保证所希望的灵敏度,有必要在梅毒免疫测定中使用TpN17变体。但是,当在双抗原夹心(DAGS)形式中使用TpN17的分子伴侣多肽融合构建体时,此问题变得明显:即使已以不对称方式(即通过在生物素一侧和钯一侧使用不同的融合配偶体来有意地去除DAGS形式的对称性)设计了TpN17融合构建体,且尽管用分子伴侣聚合物作为抗干扰添加剂,在一系列良好表征的抗密螺旋体阴性人血清中还是出现了相当多的阳性结果,导致测定特异性的实质性恶化。显然,一些抗密螺旋体阴性人血清包含至少一种能够与TpN17抗原特异性相互作用的未知因子。

[0058] 令我们惊奇的是,如在实施例5和表2-5中可见,结果证明,向免疫测定混合物中加入重组衍生的来自人病原体霍乱弧菌(尽管存在某些序列同源性,但其是与苍白密螺旋体极不相关的生物)的蛋白质Lp15(VcLp15)将提高的假阳性信号降低至阴性血清的信号水平。我们得出结论,VcLp15(在以非标记形式加入时)能够识别、结合和猝灭(quench)抗TpN17的一种或多种未知的干扰因子。结果确实证明,VcLp15是用于减少基于密螺旋体抗原TpN17的梅毒免疫测定的假阳性结果和改善其特异性的非常宝贵的工具。

[0059] 具体而言,本发明涉及用于检测分离的样品中抗苍白密螺旋体的TpN17抗原的抗体的方法,其中用霍乱弧菌脂蛋白15(VcLp15)的肽序列或其部分序列作为用于减少干扰和用于最少化假阳性结果的试剂。

[0060] 可以使用任意TpN17抗原或其变体,只要该抗原的构象足够像天然构象,以被存在于样品中的抗体识别。在其天然宿主苍白密螺旋体中,TpN17的N端信号序列(残基1-22)从前体蛋白切下,以允许成熟TpN17部分折叠为其天然构象。换言之,在诸如大肠杆菌的原核宿主中重组产生TpN17时,信号序列可有可无。它反而妨碍靶分子的正确折叠,因此将它省去。优选地,使用UniProt ID P29722(SEQ ID NO.5)或SEQ ID NO.6的肽序列或SEQ ID NO.5或6的部分序列。该部分序列包含SEQ ID NO.5或6的至少约100个氨基酸。最优选的是包含SEQ ID NO.5的氨基酸残基23-156或SEQ ID NO.6的氨基酸残基1-134的氨基酸序列。

[0061] 优选的TpN17抗原是SEQ ID NO.7至11的多肽,其中已将TpN17与多种分子伴侣肽

序列融合。为了便于纯化后的重折叠过程,并抑制二硫键加合物形成,可以用其他氨基酸残基(如丙氨酸或丝氨酸)取代所设想的所有TpN17抗体中的半胱氨酸残基。这些残基取代半胱氨酸侧链的对氧化敏感的巯基部分,但大小与半胱氨酸残基几乎相同。因此,它们通常适于嵌入整体三维蛋白质结构而不严重损害无半胱氨酸的蛋白质变体的折叠和稳定性。

[0062] 根据本发明的方法,用霍乱弧菌脂蛋白15 (VcLp15) 的肽序列或其部分序列作为用于减少干扰,即用于最少化假阳性结果的试剂。优选地,该VcLp15的部分序列包含SEQ ID NO.1或2的氨基酸残基26-163。包含SEQ ID NO.1的残基1-25的N端信号序列可有可无。在本发明的另一模式中,SEQ ID NO.1或2的氨基酸残基26-163的该VcLp15部分序列可以在其N端或C端或两端截短1至5个氨基酸。在另一实施方案中,可以以这样的方式修饰SEQ ID NO.1或2的氨基酸残基26-163的该VcLp15部分序列,使得可以引入保守氨基酸取代,如,例如用丝氨酸残基或半胱氨酸取代丙氨酸残基。可以用另外两种氨基酸取代这三种氨基酸中的任一种。本领域技术人员已知的保守氨基酸取代的其他实例是丝氨酸/半胱氨酸/丙氨酸、异亮氨酸/缬氨酸或苯丙氨酸/酪氨酸。对于这些修饰中的任一种,保持霍乱弧菌脂蛋白15 (VcLp15) 的三维结构不变很重要。

[0063] 优选地,将用于上述方法中的VcLp15肽序列或其部分序列与分子伴侣融合来提供高表达产率和便于纯化后的重折叠过程。

[0064] 本发明的另一方面是包含SEQ ID NO.1或2的VcLp15肽序列或SEQ ID NO.1或2的部分序列和分子伴侣的融合多肽。

[0065] 通过将分子伴侣与难溶的靶抗原序列融合来使其增溶并变得更为良性的多肽融合蛋白质的用途为本领域公知,并在之前详细描述于如国际专利申请W02003/000878中。有用的融合分子伴侣的已知和充分记载的实例是SlyD、FkpA、Skp和SlpA,还见欧洲专利申请EP2127678A1。

[0066] 因此,本发明的另一方面是包含VcLp15肽序列和分子伴侣的融合多肽。在优选实施方案中,该分子伴侣选自SlyD、SlpA、FkpA和Skp。这些分子伴侣可以源自多种生物,优选衍生自大肠杆菌的分子伴侣序列。

[0067] 在本发明的另一实施方案中,该包含VcLp15肽序列的融合多肽含有SEQ ID NO.3 (EcSlyD-VcLp15)。

[0068] 包含VcLp15肽序列和分子伴侣的融合多肽作为免疫测定中的添加剂在减少干扰和最少化假阳性结果中的用途也是本发明的一个方面。

[0069] 本发明的另一方面是用于通过免疫测定来检测分离的样品中抗苍白密螺旋体抗原的抗体的试剂盒,其包含TpN17抗原及上文进一步详述的含有VcLp15肽序列和分子伴侣的融合多肽。

[0070] 此外,本发明涵盖用于检测分离的样品中抗苍白密螺旋体的TpN17抗原的抗体的方法,该方法包括步骤:

[0071] a) 通过将体液样品与存在于该样品中的该抗体可以特异性结合的特异性结合配偶体混合来形成免疫反应混合物;

[0072] b) 在向该样品加入该特异性结合配偶体之前、同时或之后向该免疫反应混合物加入上文定义的包含VcLp15肽序列的融合多肽;

[0073] c) 维持该免疫反应混合物足以使存在于该体液样品中的抗体与该特异性结合配

偶体免疫反应,以形成免疫反应产物的时期;和

[0074] d) 检测该免疫反应产物中的任一种的存在和/或浓度。

[0075] 可以在向该样品加入该特异性结合配偶体之前、同时或之后向该免疫测定混合物(包含样品和特异性结合该样品中的分析物抗体的结合配偶体)加入本发明的融合多肽。优选地,在使包含分析物抗体的体液样品与该特异性结合配偶体接触之前向该测试试剂加入该融合多肽。

[0076] 在本发明的一个实施方案中,按照所谓的双抗原夹心概念(DAGS)进行用于检测分离的样品中的抗密螺旋体抗体的免疫测定。此测定概念有时也称为双抗原桥概念,因为两种抗原通过抗体分析物桥接。在这种测定中,需要和使用抗体用它的两个(IgG、IgE)、四个(IgA)或十/十二个(IgM)抗体配位结合给定抗原的至少两个不同分子的能力。

[0077] 更具体而言,通过将包含抗密螺旋体抗体的样品与两种不同的TpN17抗原(即第一(“固相”)TpN17抗原和第二(“检测”)TpN17抗原)孵育来进行按照双抗原桥形式测定抗密螺旋体抗体的免疫测定,其中该抗原中的每一种特异性结合该抗密螺旋体抗体。该第一抗原与固相直接或间接结合或可以直接或间接结合,且通常携带效应基团,该效应基团是如生物素/抗生物素蛋白的生物亲和性(bioaffine)结合对。例如,如果该第一抗原缀合至生物素,则用抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白包被固相。该第二抗原携带可检测标记。然后形成包含第一抗原、样品抗体和第二抗原的免疫反应混合物。然后在向该抗原加入样品之前或在形成免疫反应混合物之后加入该第一抗原可以与之结合的固相。维持此免疫反应混合物足以使体液样品中抗该TpN17抗原的抗密螺旋体抗体与该TpN17抗原免疫反应形成免疫反应产物的时期。下一步是分离步骤,其中将液相从固相分离。最后,在固相或液相或二者中检测该免疫反应产物中的任一种的存在。

[0078] 在该DAGS免疫测定中,“固相抗原”和“检测抗原”的基本结构相同。还可能使用相似但不同的TpN17抗原,该抗原在双抗原桥测定中在免疫学上交叉反应。进行这类测定的基本要求是两种抗原上存在一个或多个相关表位。根据本发明,希望将不同的融合部分用于各TpN17抗原(例如,EcFkpA与固相一侧的TpN17融合,EcSkp与检测一侧的TpN17融合),因为这类区别打破了DAGS形式的对称性,从而减少了抗体介导的融合分子伴侣桥接的问题,该问题可以导致免疫测定的假阳性结果。简言之,在DAGS形式的两侧使用结构上差距大的融合配偶体减少了不想要的免疫学交叉反应,从而改善特异性。

[0079] 因此,本发明涉及用于检测分离的样品中抗苍白密螺旋体的TpN17抗原的抗体的方法,其中用VcLp15的肽序列作为用于减少干扰和用于最少化假阳性结果的试剂。该方法进一步表征为以双抗原夹心形式(DAGS)进行该测定。此外,该测定使用两种TpN17抗原融合多肽(第一和第二TpN17抗原),其中两种TpN17抗原相同、或至少在免疫学上与同一抗体交叉反应,使得可能通过存在于样品中的抗体来在两种抗原之间桥接。此外,如前一段落中所述,该第一和第二抗原与不同分子伴侣融合。

[0080] 此外,如Skp和FkpA的特异性分子伴侣融合配偶体的使用可以便于显著改善的IgM识别和检测。由于其结合的亲合力模式,IgM分子仅可以与具有中至高表位密度的聚合抗原反应。Skp和FkpA都是在革兰氏阴性菌的周质(periplasm)中作为助折叠物发挥作用的寡聚分子伴侣。令我们惊奇地,我们发现,在将大的靶分子与分子伴侣的C端融合时,保持了Skp和FkpA的四级结构。因此,FkpA-TpN17和Skp-TpN17融合蛋白质可再现地形成具有足以检测

IgM分子的确定的表位密度的天然寡聚物。灵敏和特异的IgM检测是保证早期和原发性梅毒感染的可靠检测的非常重要的特征。由于我们旨在发展用于全免疫球蛋白检测(即检测IgG和IgM二者)的免疫测定,可以将寡聚抗原组件FkpA-TpN17和Skp-TpN17有利地用作DAGS形式两侧的指定成分(specifier)(例如FkpA-TpN17-生物素和Skp-TpN17-钉)。由于FkpA和Skp就结构而言彼此非常不同,不想要的免疫学交叉反应和通过融合配偶体桥接的风险非常低。通过向该测定加入化学聚合的FkpA和Skp抗干扰添加剂来进一步降低该风险。

[0081] 用于检测分析物的多种其他形式和原理的免疫测定及不同的检测模式已被广泛描述,且为本领域技术人员所熟知。

[0082] 根据本发明,可以使用可能检测到其中的密螺旋体抗体的任意分离的生物样品。具体而言,人血液、血清、血浆或唾液适合作为样品材料。

[0083] 在实施例部分中进一步说明本发明。

[0084] 实施例1

[0085] TpN17和VcLp15分子伴侣融合多肽的克隆和纯化

[0086] 表达盒的克隆

[0087] 以Novagen(Madison,WI,美国)的pET24a表达质粒为基础,基本上按Scholz,C.等,J.Mol.Biol.(2005)345,1229-1241所述获得了编码TpN17和VcLp15融合蛋白的表达盒。TpN17和VcLp15抗原的序列检索自SwissProt数据库(分别为SwissProt ID P29722和Q9KQN6)。编码具有符合读框地与N端融合的富含甘氨酸的接头区域的成熟TpN17aa23-156(省去了跨越氨基酸残基1-22的信号肽)的合成基因购自Medigenomix(Martinsried,德国)。将TpN17的25、29、42和58位的半胱氨酸残基变为丙氨酸残基,以防止不想要的副作用,如氧化或分子间二硫键桥接。BamHI和XhoI限制位点分别位于TpN17编码区的5'和3'端。另一编码通过富含甘氨酸的接头区连接的两个EcSlyD单位(SEQ ID NO.1的残基1-165,SwissProt检索号P0A9K9)且在C端包含另一接头区部分的合成基因同样购自Medigenomix。NdeI和BamHI限制位点分别位于此表达盒的5'和3'端。设计基因和限制位点来使得能够通过简单的连接来符合读框地融合分子伴侣部分EcSlyD-EcSlyD和TpN17抗原部分。为了避免无意的重组过程和提高表达盒在大肠杆菌宿主中的遗传稳定性,简化编码EcSlyD单位的核苷酸序列,同样对编码延长的接头区的核苷酸序列进行简并,即用不同的密码子组合来编码相同的氨基酸序列。

[0088] 用NdeI和XhoI消化pET24a载体,并插入包含与密螺旋体TpN1723-156符合读框地融合的串联SlyD的表达盒。相应地构建包含多杀性巴氏杆菌SlyD(1-156,SwissProt ID Q9CKP2)或大肠杆菌Skp(21-161,SwissProt ID P0AEU7)或FkpA(26-270,SwissProt ID P45523)的表达盒,以及包含不同于TpN17的靶多肽,尤其是霍乱弧菌脂蛋白Lp15(26-163,SwissProt ID Q9KQN6)的表达盒。与TpN17一样,将VcLp15的74和77位(前体Lp15编号)的真实的半胱氨酸残基变为丙氨酸残基,以防止不想要的副作用,如氧化或分子间二硫键桥接。所有重组融合多肽变体都包含C端六组氨酸标记,以便于Ni-NTA辅助的纯化和重折叠。用QuikChange(Stratagene,La Jolla,CA,USA)和标准PCR技术来在各表达盒中产生点突变、缺失、插入和延长变体或限制位点。

[0089] 图3显示具有与它的N端符合读框地融合的两个SlyD分子伴侣单位的密螺旋体TpN17全长抗原23-156的示意图。为了表示该SlyD融合配偶体的大肠杆菌来源,将所示融合

多肽命名为EcSlyD-EcSlyD-TpN17 (23-156); 还见SEQ ID NO.8。

[0090] 对所得到的质粒的插入片段进行测序,发现它编码希望的融合蛋白质。SEQ ID NO.2至4 (VcLp15) 和7至11 (TpN17) 中显示TpN17和VcLp15融合多肽的完整氨基酸序列。SEQ ID NO.12中显示接头L的氨基酸序列。

[0091] 包含TpN17或VcLp15的融合蛋白的纯化

[0092] 通过使用基本相同的流程来纯化所有TpN17和VcLp15融合蛋白变体。在加入了卡那霉素 (30 μ g/ml) 的LB培养基中37 $^{\circ}$ C培养包含具体的pET24a表达质粒的大肠杆菌BL21 (DE3) 细胞至OD₆₀₀为1.5,通过加入1mM异丙基- β -D-硫代半乳糖苷来诱导胞质过表达。诱导3小时后,通过离心 (5000g 20分钟) 收集细胞,冷冻,并保存在-20 $^{\circ}$ C。对于细胞裂解,将冷冻的沉淀重悬在预冷的50mM磷酸钠pH8.0、7.0M GdmCl、5mM咪唑中,冰上搅拌悬液2小时至细胞完全裂解。离心和过滤 (0.45 μ m/0.2 μ m) 后,将粗裂解物上样至用含5.0mM TCEP的裂解缓冲液平衡的Ni-NTA柱上。随后的洗涤步骤调整适应于各靶蛋白,且在5至15mM咪唑 (在50mM磷酸钠pH8.0、7.0M GdmCl、5.0mM TCEP中) 的范围内。应用至少10-15体积的洗涤缓冲液。然后,用50mM磷酸钾pH8.0、100mM KCl、10mM咪唑、5.0mM TCEP替换GdmCl溶液来诱导基质结合的蛋白质的构象重折叠。为了避免共纯化的蛋白酶的再激活,在重折叠缓冲液中包含蛋白酶抑制剂混合物 (**Complete**[®] 无EDTA, Roche)。在过夜反应中应用了总计15-20柱体积的重折叠缓冲液。然后,通过用3-5个柱体积的50mM磷酸钾pH8.0、100mM KCl、10mM咪唑洗涤来去除TCEP和**Complete**[®] 无EDTA抑制剂混合物二者。随后,将咪唑浓度 (仍然在50mM磷酸钾pH8.0、100mM KCl中) 升高至25-50mM (取决于各靶蛋白),以去除非特异性结合的蛋白质污染物。然后通过含500mM咪唑的相同缓冲液来洗脱天然蛋白质。通过N-[三(羟甲基) 甲基] 甘氨酸-SDS-PAGE来评估含蛋白质的级分的纯度,并混合。最后,对蛋白质进行大小排阻层析 (Superdex HiLoad, Amersham Pharmacia),混合含蛋白质的级分,并在Amicon池 (YM10) 中浓缩至10-20mg/ml。

[0093] 经过偶联的纯化和重折叠流程之后,取决于各靶蛋白,可以从1g大肠杆菌湿细胞获得大约10-30mg的蛋白质产率。

[0094] 实施例2

[0095] 光谱测量

[0096] 用Uvikon XL双光束分光光度计进行蛋白质浓度测量。通过使用Pace (1995), Protein Sci.4,2411-2423所述的方法来测定摩尔消光系数 (ϵ_{280})。用于不同融合多肽的摩尔消光系数 (ϵ_{280}) 在表1中指出。

[0097] 表1:用于本研究的融合多肽变体的蛋白质参数。所有参数都指各蛋白质单体。

[0098]

融合蛋白	靶蛋白的 长度 (aa 残基)	融合多肽的 分子量 (Da)	pI	ϵ_{M280} $M^{-1}cm^{-1}$	Abs 0.1% (=1 mg/ml)
TpN17 变体					
<i>EcSlyD-EcSlyD-TpN17</i>	23-156	54048	5.0	23380	0.433
<i>PmSlyD-PmSlyD-TpN17</i>	23-156	52171	4.9	23380	0.448
<i>EcFkpA-TpN17</i>	23-156	42995	8.3	27390	0.637
<i>EcSkp-TpN17</i>	23-156	32461	9.3	12950	0.399
VcLp15 变体					

[0099]

<i>EcSlyD-VcLp15</i>	26-163	35156	4.6	22920	0.652
<i>EcSkp-VcLp15</i>	26-163	33010	5.3	18450	0.559

[0100] 融合多肽变体的氨基酸序列分别显示在SEQ ID NO.3、4、8、9、10和11中。

[0101] 实施例3

[0102] 生物素和钆部分与TpN17融合蛋白的偶联

[0103] 分别用N-羟基琥珀酰亚胺活化的生物素和钆标记分子在10-30mg/ml的蛋白质浓度下修饰TpN17融合多肽的赖氨酸 ϵ -氨基。取决于各融合多肽,标记/蛋白质比例从2:1至5:1(摩尔:摩尔)变动。反应缓冲液是150mM磷酸钾pH8.0、100mM KCl、0.5mM EDTA。使反应在室温下进行15分钟,并通过加入缓冲的L-赖氨酸至10mM的终浓度来终止。为了避免标记的水解失活,在干燥的DMSO(无水溶剂(seccosolv)质量,Merck,德国)中制备各贮存溶液。所研究的所有融合蛋白都良好地耐受反应缓冲液中至多25%的DMSO浓度。偶联反应后,通过使粗蛋白质缀合物通过凝胶过滤柱(Superdex200HiLoad)来去除未反应的游离标记。

[0104] 实施例4

[0105] CD检测的热诱导的EcSlyD-VcLp15的解折叠

[0106] 用具有恒温试池架(cell holder)的Jasco-720旋光分光计记录近UV CD光谱,并转化为平均残基椭圆率。缓冲液是50mM磷酸钾pH7.0、250mM KCl、0.5mM EDTA。光程为0.2cm,蛋白质浓度为 $\sim 74\mu M$ (2.6mg/ml)。测量范围是250-330nm、带宽为1.0nm、扫描速度为0.5nm的分辨率下20nm/分钟,响应为1秒。为了改善信噪比,测量光谱九次并取平均值。

[0107] 圆二色谱学(CD)是评估蛋白质的二级和三级结构的方法选择。芳香区(260-320nm)中的椭圆率报告蛋白质内的三级接触(即规则折叠的蛋白质的球状结构),并被视为天然样折叠(构象)的指纹区。

[0108] 监测了EcSlyD-VcLp15的近UV CD光谱来解答该融合蛋白是否在基质偶联的重折

叠方法(其是纯化方法中的重要步骤)后采取有序构象的问题。答案非常清楚:EcSlyD-VcLp15的近UV CD信号清楚地报告融合多肽的有序三级结构。EcSlyD-VcLp15的芳香残基明显包埋在亲脂的蛋白质核心中,因此经历不对称环境,其强烈表明融合构建体内的EcSlyD和VcLp15二者的天然样构象(图1)。

[0109] 为了解答热诱导的EcSlyD-VcLp15的解折叠是否可逆的问题,在281nm的检测波长下在近UV区中监测了熔解曲线。温度范围为20-80℃,带宽为1.0nm,温度斜坡为1℃/分钟,响应为4秒(见图2)。

[0110] 在281nm(其是EcSlyD-VcLp15的最大信号振幅的波长)监测热诱导的解折叠。加热时,稳定EcSlyD-VcLp15分子的天然构象的非共价接触变松散,最后打开。此热诱导的解折叠反映为图2中所示的CD信号的增加。在80℃,EcSlyD-VcLp15完全解折叠。令人惊奇地,在将蛋白质溶液冷却至20℃时,天然样CD信号再次恢复。尽管存在轻微的滞后,解折叠曲线和重折叠曲线基本上重叠,强烈指示EcSlyD-VcLp15的可逆重折叠行为。必须承认,解折叠的协同性相当低,在EcSlyD-VcLp15的情况下未观察到蛋白质熔解曲线典型的S形。但是,我们明确地发现,在将蛋白质溶液从80℃冷却至20℃时,EcSlyD-VcLp15能够重新采用其天然样构象。实际上,在热诱导的解折叠之前和之后监测的近UV CD光谱基本上重叠(见图1)。总之,EcSlyD-VcLp15具有对融合多肽而言杰出的稳健的折叠特性,这对在免疫测定中作为抗干扰添加剂的分子而言是高度希望得到的。与杰出的溶解性(在磷酸缓冲盐溶液中>130mg/ml)和在抗密螺旋体免疫测定中的抗干扰潜能组合,这些优良的物理化学特性使EcSlyD-VcLp15成为保证梅毒血清学中的高特异性的非常有吸引力的分子。

[0111] 实施例5:

[0112] 霍乱弧菌Lp15在梅毒免疫测定中的抗干扰活性

[0113] 在自动 **Elecsys**[®] 2010分析仪(Roche Diagnostics GmbH)中评估了霍乱弧菌Lp15的多肽融合变体的抗干扰活性。**Elecsys**[®]是Roche集团的注册商标。以双抗原夹心形式进行测量。

[0114] **Elecsys**[®] 2010中的信号检测基于电化学发光。将生物素-缀合物(即捕获抗原)固定在链霉抗生物素蛋白包被的磁珠表面,而检测抗原具有络合的钌阳离子(在氧化还原态2+和3+之间变换)作为信号发放部分。在特异性免疫球蛋白分析物的存在下,产色的钌络合物与固相桥接,在铂电极处激发后在620nm发光。信号输出为随意光单位。

[0115] 在双抗原夹心(DAGS)免疫测定形式中评估了重组抗干扰Lp15多肽。为此,用重组密螺旋体抗原TpN17分别作为生物素和钌缀合物来检测人血清中的抗TpN17抗体。TpN17是苍白密螺旋体的免疫显性抗原之一,TpN17的可溶性变体(如本专利申请中所公开)是用于检测梅毒感染的非常宝贵的工具。为了检测抗TpN17IgG分子,分别在R1(试剂缓冲液1)和R2(试剂缓冲液2)中使用EcSlyD-EcSlyD-TpN17-生物素和PmSlyD-PmSlyD-TpN17-钌。为了检测抗TpN17IgM和IgG分子二者,分别将EcFkpA-TpN17-生物素和EcSkp-TpN17-钌在R1(试剂缓冲液1)和R2(试剂缓冲液2)使用。R1和R2中抗原缀合物的浓度分别为各200ng/ml。

[0116] 在第一实验中,用前述DAGS免疫测定方案评估了密螺旋体阴性的人血清。为了得到仅靶向TpN17部分的假阳性的发生率的提示,在SS-螺旋(GDA,P)的存在下进行了筛选,其

为常用作抗干扰物质的GDA交联的可溶性异源SlyD聚合物。此外,为了排除由不同于该TpN17部分的部分引起的干扰现象,在测定缓冲液中包含另一抗干扰组件EcSkp-EcSlyD-EcSlyD。以大的过剩量(10 μ g/ml)向R1(包含生物素缀合物的试剂1缓冲液)加入SS-螺旋(GDA,P)和EcSkp-EcSlyD-EcSlyD。然后混合和孵育75 μ l R1(试剂1缓冲液,生物素缀合物和抗干扰聚合物)、75 μ l R2(试剂2缓冲液,钌缀合物)、10 μ l样品(人血清)和40 μ l磁珠悬液,以产生大约200 μ l的反应体积。

[0117] 利用此方法,可以找出约8份人血清(在~2500份阴性人血清中),其清楚地是抗苍白密螺旋体抗体阴性,但在用TpN17作为抗原时在DAGS形式中显示提高的信号。但是,在用诸如TpN15或TpN47的其他密螺旋体抗原取代TpN17时,**Elecsys**[®]信号未增加(数据未显示)。此发现指示特异性抗TpN17干扰因子。

[0118] 表2说明未标记的单体EcSlyD-VcLp15在寡聚TpN17测定方案中的抗干扰作用。用EcFkpA-TpN17-Bi(DDS)和EcSkp-TpN17-BPRu(SK(2)DSS)作为寡聚检测抗原,并按递增浓度向R1加入未标记的EcSlyD-VcLp15。显然,通过加入Lp15显著猝灭了真正的阳性血清的信号。但是,甚至在以高浓度(如1 μ g/ml)向R1加入VcLp15时,该阳性信号也清楚地保持阳性。如所预期,无论是否加入VcLp15,已清楚地排除了密螺旋体感染的良好表征的人血清(Trina Bioreactives AG,**Nänikon**,瑞士)显示接近系统固有背景信号(~450个计数)的非常低的信号。在不加入VcLp15抗干扰组件时,诸如C131839、C132663、C132723、R183554和C132976的干扰血清显示显著提高的信号。由于阴性血清的平均信号总计~770个计数,显而易见,15,146个计数(对于人血清C132663)或8,503个计数(对于人血清C132723)的信号水平将指示梅毒感染的可疑性提高的真正的阳性结果。值得注意的是,按1.0 μ g/ml的浓度在R1中加入VcLp15将提高的信号降低至正常的背景信号水平,揭示假定的阳性结果为假阳性。在单体TpN17DAGS方案中加入未标记的单体EcSlyD-VcLp15时结果是同样的(表3)。同样,在按1.0 μ g/ml的浓度向R1加入EcSlyD-VcLp15时,就人血清C132663而言,显著提高的信号水平从11,128个计数降低至651个计数。相反,在寡聚(表4)和单体(表5)TpN17DAGS方案二者中,寡聚VcLp15(EcSkp-VcLp15)有效地分别将提高的信号和假阳性信号猝灭至阴性信号背景。

[0119] 来自苍白密螺旋体的TpN17和来自霍乱弧菌的脂蛋白15在97个氨基酸残基的序列内具有34%序列同一性和55%同源性。很可能通过此共有的序列(且可能为结构上的)基序发生免疫学交叉反应,产生高信号,从而在基于TpN17抗原的密螺旋体测定中伪装阳性结果。如表2-5中所示,向测定混合物加入VcLp15抗干扰蛋白质将提高的信号降低至正常的阴性。所公开的数据提供了令人信服的证据证明,甚至非常强的干扰(即高假阳性)也可以通过加入单体或寡聚形式的霍乱弧菌脂蛋白15来有效地消除。表2-5中所示的结果的概要如下:由在DAGS免疫测定中使用重组TpN17抗原引起的干扰非常常见(500份阴性血清中>1份),它们可以通过加入来自霍乱弧菌(在系统发生上与苍白密螺旋体相距甚远的细菌属)的脂蛋白15来有效地减轻。简言之,本申请公开了易于获得的重组蛋白质的加入显著改善了基于TpN17的用于检测抗密螺旋体抗体的梅毒免疫测定的特异性。

[0120] 表2:

[0121] 寡聚TpN17;加入单体VcLp15

[0122]

R1 *EcFkpA*-TpN17-Bi(DDS)R2 *EcSkp*-TpN17-BPRu(SK(2)DSS)

R1		<i>EcSlyD</i> -VcLp15					
c (μg/ml)		0	0.1	0.2	0.3	0.5	1.0
		计数	计数	计数	计数	计数	计数
阳性血清							
PLTP_124	未稀释	1,274,726	1,171,468	1,166,110	1,092,657	973,974	793,911
PLTP_124	1:50	154,146	156,165	136,898	131,248	101,395	62,840
PLTP_121	1:50	223,230	211,697	205,298	190,606	151,374	93,737
PLTP_121	1:100	112,031	105,466	103,909	91,727	72,926	47,972
BM 146027	SC_056	1,408,728	1,357,227	1,258,085	1,217,480	1,149,624	1,133,749
BM 146623	SC_058	1,187,013	1,158,037	1,083,204	1,083,952	1,078,868	1,050,374
阴性血清							
Trina #0642	阴性	778	716	722	698	698	661
Trina #0645	阴性	725	703	722	682	715	706
Trina #0646	阴性	797	795	817	802	784	784
Trina #0647	阴性	774	786	764	773	762	742

[0123]

干扰血清							
C131839	假阳性	5,795	5,090	4,464	3,861	2,851	1,555
C132663	假阳性	15,146	2,116	1,110	878	765	724
C132723	假阳性	8,503	7,725	6,811	5,357	2,298	941
R183554	假阳性	11,072	10,030	9,142	7,413	4,488	2,534
C132976	假阳性	5,687	5,174	4,446	3,690	2,509	1,419

[0124] 表3:

[0125] 单体TpN17;加入单体VcLp15

[0126]

R1 *EcSS-TpN17-Bi(DDS)*R2 *PmSS-TpN17-BPRu(SK(2)DSS)*

R1		<i>EcSlyD-VcLp15</i>					
c (μg/ml)		0	0.1	0.2	0.3	0.5	1.0
		计数	计数	计数	计数	计数	计数
阳性血清							
PLTP_124	未稀释	1,467,523	1,374,990	1,272,604	1,272,720	1,208,354	1,164,404
PLTP_124	1:50	167,294	155,940	153,077	136,428	124,244	89,204
BM 146624	未稀释	1,451,271	1,423,730	1,376,393	1,359,799	1,370,884	1,369,198
BM 146624	1:10	436,534	403,003	384,434	365,742	329,370	259,984
BM 145855	SC_055	901,047	816,640	766,258	707,030	616,574	511,011
BM 146027	SC_056	1,721,399	1,708,261	1,678,979	1,651,647	1,641,513	1,641,787
阴性血清							
Trina #0642	阴性	657	613	638	626	623	610
Trina #0643	阴性	698	703	699	704	687	665
Trina #0644	阴性	660	653	638	636	620	616
Trina #0646	阴性	634	617	634	628	621	613
Trina #0647	阴性	623	614	606	620	618	623

[0127]

干扰血清							
C131839	假阳性	4,206	3,707	3,364	2,996	2,309	1,383
C132663	假阳性	11,128	1,812	1,119	895	729	651
R179865	提高的信号	1,630	1,338	1,219	1,114	1,000	873
R183554	提高的信号	1,015	894	883	819	790	740
C132976	假阳性	4,866	4,041	3,454	2,911	2,057	1,230

[0128] 表4:

[0129] 寡聚TpN17;加入寡聚VcLp15

R1 *EcFkpA-TpN17-Bi(DDS)*

R2 *EcSkp-TpN17-BPRu(SK(2)DSS)*

[0130]

R1 c (μg/ml)		<i>EcSkp-VcLp15</i>		
		0	0.1	1.0
		计数	计数	计数
阳性血清				
PLTP_121	1:50	230,387	225,976	104,039
PLTP_121	1:100	116,383	112,747	55,150
BM 140149	SC_052	1,136,096	1,077,292	508,996
BM 200680	SC_054	826,355	737,483	354,883
BM 145855	SC_055	745,762	704,713	322,241
BM 146027	SC_056	1,446,006	1,380,464	1,192,282
阴性血清				
Trina #0642	阴性	750	757	744
Trina #0646	阴性	840	847	815
Trina #0872	阴性	846	805	750
Trina #0873	阴性	764	763	754
干扰血清				
R179865	假阳性	3,951	1,580	782

[0131]

C131839	假阳性	6,142	4,805	1,587
C132663	假阳性	16,565	2,510	755
C132723	假阳性	7,868	4,406	875
R183554	假阳性	10,511	8,747	1,306
C132976	假阳性	6,274	3,062	1,088

[0132] 表5:

[0133] 单体TpN17;加入寡聚VcLp15

R1 *EcSS-TpN17-Bi(DDS)*

R2 *PmSS-TpN17-BPRu(SK(2)DSS)*

[0134]

R1 c (μg/ml)		<i>EcSbp-VcLp15</i>		
		0	0.1	1.0
		计数	计数	计数
阳性血清				
PLTP_121	1:50	235,946	221,210	112,238
PLTP_121	1:100	118,333	113,770	60,259
BM 140149	SC_052	1,142,874	1,048,211	637,784
BM 200680	SC_054	757,518	672,745	382,894
BM 145855	SC_055	861,637	823,346	475,266
BM 146027	SC_056	1,550,267	1,553,275	1,516,740
阴性血清				
Trina #0642	阴性	673	673	632
Trina #0646	阴性	651	659	646
Trina #0872	阴性	680	683	639
Trina #0873	阴性	690	661	651
干扰血清				
C132221	提高的信号	1,301	1,204	950
C131839	假阳性	3,928	3,108	1,144

[0135]

C132663	假阳性	11,457	2,270	671
C132927	提高的信号	1,551	1,284	877
R183554	提高的信号	1,003	858	672
C132976	假阳性	4,476	2,373	829

序列表

<110> Roche Diagnostics GmbH
F.Hoffmann-La Roche AG

<120> 霍乱弧菌脂蛋白 15 变体在基于 TpN17 的用于检测抗密螺旋体抗体的免疫测定中作为
抗干扰添加剂

<130> 31239-IR

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 163

<212> PRT

<213> 霍乱弧菌

<400> 1

[0001]

```
Met Met Lys Lys Ser Ile Phe Ala Leu Ser Ala Leu Thr Leu Ile Leu
1           5           10           15

Val Gly Cys Asp Asn Gln Gln Asp Ala Lys Val Glu Val Glu Lys Val
          20           25           30

Val Asp Val Ala Ala Ala Pro Ala Glu Gln Ser Ala Ala Gln Pro Ser
          35           40           45

Thr Ala Ser Val Asp Ala Ala His Asn Ala Gln Asn Ser Leu Asp Trp
          50           55           60

Ala Gly Ile Tyr Gln Gly Thr Leu Pro Cys Ala Asp Cys Gly Gly Ile
65           70           75           80

Glu Thr Glu Leu Thr Leu Asn Ala Asp Gly Thr Tyr Ala Leu Thr Glu
          85           90           95

Lys Tyr Leu Asp Lys Glu Gly Glu Pro Phe Ala Ser Gln Gly Thr Phe
          100          105          110

Val Trp Asn Glu Ala Gly Asn Ile Val Thr Leu Gln Thr Gly Asp Gln
          115          120          125
```

Thr Gly Arg Gln Phe Met Val Gly Glu Asn Thr Leu Ser His Leu Asp
130 135 140

Met Glu Gly Lys Val Ile Glu Gly Glu Leu Ala Glu Phe Tyr Val Leu
145 150 155 160

Ser Lys Gln

<210> 2

<211> 146

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> C 端具有六组氨酸标记的 VcLp15

<400> 2

[0002] Lys Val Glu Val Glu Lys Val Val Asp Val Ala Ala Ala Pro Ala Glu
1 5 10 15

Gln Ser Ala Ala Gln Pro Ser Thr Ala Ser Val Asp Ala Ala His Asn
20 25 30

Ala Gln Asn Ser Leu Asp Trp Ala Gly Ile Tyr Gln Gly Thr Leu Pro
35 40 45

Ala Ala Asp Ala Gly Gly Ile Glu Thr Glu Leu Thr Leu Asn Ala Asp
50 55 60

Gly Thr Tyr Ala Leu Thr Glu Lys Tyr Leu Asp Lys Glu Gly Glu Pro
65 70 75 80

Phe Ala Ser Gln Gly Thr Phe Val Trp Asn Glu Ala Gly Asn Ile Val
85 90 95

Thr Leu Gln Thr Gly Asp Gln Thr Gly Arg Gln Phe Met Val Gly Glu
100 105 110

Asn Thr Leu Ser His Leu Asp Met Glu Gly Lys Val Ile Glu Gly Glu
115 120 125

Leu Ala Glu Phe Tyr Val Leu Ser Lys Gln Leu Glu His His His His
 130 135 140

His His
 145

<210> 3
 <211> 334
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> EcSlyD-VcLp15

<400> 3

Met Lys Val Ala Lys Asp Leu Val Val Ser Leu Ala Tyr Gln Val Arg
 1 5 10 15

[0003] Thr Glu Asp Gly Val Leu Val Asp Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro Leu
 20 25 30

Asp Tyr Leu His Gly His Gly Ser Leu Ile Ser Gly Leu Glu Thr Ala
 35 40 45

Leu Glu Gly His Glu Val Gly Asp Lys Phe Asp Val Ala Val Gly Ala
 50 55 60

Asn Asp Ala Tyr Gly Gln Tyr Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val Pro
 65 70 75 80
 Lys Asp Val Phe Met Gly Val Asp Glu Leu Gln Val Gly Met Arg Phe
 85 90 95

Leu Ala Glu Thr Asp Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala Val
 100 105 110

Glu Asp Asp His Val Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln
 115 120 125

Asn Leu Lys Phe Asn Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala Thr Glu
 130 135 140

	Glu	Glu	Leu	Ala	His	Gly	His	Val	His	Gly	Ala	His	Asp	His	His	His	
	145					150				155						160	
	Asp	His	Asp	His	Asp	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	
					165					170						175	
	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Lys	Val	Glu	Val	
					180					185						190	
	Glu	Lys	Val	Val	Asp	Val	Ala	Ala	Ala	Pro	Ala	Glu	Gln	Ser	Ala	Ala	
					195					200						205	
	Gln	Pro	Ser	Thr	Ala	Ser	Val	Asp	Ala	Ala	His	Asn	Ala	Gln	Asn	Ser	
					210					215						220	
	Leu	Asp	Trp	Ala	Gly	Ile	Tyr	Gln	Gly	Thr	Leu	Pro	Ala	Ala	Asp	Ala	
	225					230					235					240	
	Gly	Gly	Ile	Glu	Thr	Glu	Leu	Thr	Leu	Asn	Ala	Asp	Gly	Thr	Tyr	Ala	
					245					250						255	
[0004]	Leu	Thr	Glu	Lys	Tyr	Leu	Asp	Lys	Glu	Gly	Glu	Pro	Phe	Ala	Ser	Gln	
					260					265						270	
	Gly	Thr	Phe	Val	Trp	Asn	Glu	Ala	Gly	Asn	Ile	Val	Thr	Leu	Gln	Thr	
					275					280						285	
	Gly	Asp	Gln	Thr	Gly	Arg	Gln	Phe	Met	Val	Gly	Glu	Asn	Thr	Leu	Ser	
					290					295						300	
	His	Leu	Asp	Met	Glu	Gly	Lys	Val	Ile	Glu	Gly	Glu	Leu	Ala	Glu	Phe	
	305					310					315					320	
	Tyr	Val	Leu	Ser	Lys	Gln	Leu	Glu	His	His	His	His	His	His	His	His	
					325						330						
	<210>	4															
	<211>	311															
	<212>	PRT															
	<213>	人工															
	<220>																

<223> EcSkp-VcLp15

<400> 4

Met	Ala	Asp	Lys	Ile	Ala	Ile	Val	Asn	Met	Gly	Ser	Leu	Phe	Gln	Gln
1				5					10					15	
Val	Ala	Gln	Lys	Thr	Gly	Val	Ser	Asn	Thr	Leu	Glu	Asn	Glu	Phe	Arg
			20					25					30		

Gly	Arg	Ala	Ser	Glu	Leu	Gln	Arg	Met	Glu	Thr	Asp	Leu	Gln	Ala	Lys
			35					40					45		

Met	Lys	Lys	Leu	Gln	Ser	Met	Lys	Ala	Gly	Ser	Asp	Arg	Thr	Lys	Leu
	50					55					60				

Glu	Lys	Asp	Val	Met	Ala	Gln	Arg	Gln	Thr	Phe	Ala	Gln	Lys	Ala	Gln
65					70					75					80

Ala	Phe	Glu	Gln	Asp	Arg	Ala	Arg	Arg	Ser	Asn	Glu	Glu	Arg	Gly	Lys
				85					90					95	

[0005]

Leu	Val	Thr	Arg	Ile	Gln	Thr	Ala	Val	Lys	Ser	Val	Ala	Asn	Ser	Gln
			100					105					110		

Asp	Ile	Asp	Leu	Val	Val	Asp	Ala	Asn	Ala	Val	Ala	Tyr	Asn	Ser	Ser
			115					120					125		

Asp	Val	Lys	Asp	Ile	Thr	Ala	Asp	Val	Leu	Lys	Gln	Val	Lys	Gly	Gly
	130					135					140				

Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
145					150					155				160	

Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Lys	Val	Glu	Val	Glu	Lys	Val	Val	Asp	Val	Ala
				165					170					175	

Ala	Ala	Pro	Ala	Glu	Gln	Ser	Ala	Ala	Gln	Pro	Ser	Thr	Ala	Ser	Val
			180						185					190	

Asp	Ala	Ala	His	Asn	Ala	Gln	Asn	Ser	Leu	Asp	Trp	Ala	Gly	Ile	Tyr
			195					200					205		

Gln	Gly	Thr	Leu	Pro	Ala	Ala	Asp	Ala	Gly	Gly	Ile	Glu	Thr	Glu	Leu
	210						215				220				

Thr Leu Asn Ala Asp Gly Thr Tyr Ala Leu Thr Glu Lys Tyr Leu Asp
225 230 235 240

Lys Glu Gly Glu Pro Phe Ala Ser Gln Gly Thr Phe Val Trp Asn Glu
245 250 255

Ala Gly Asn Ile Val Thr Leu Gln Thr Gly Asp Gln Thr Gly Arg Gln
260 265 270

Phe Met Val Gly Glu Asn Thr Leu Ser His Leu Asp Met Glu Gly Lys
275 280 285

Val Ile Glu Gly Glu Leu Ala Glu Phe Tyr Val Leu Ser Lys Gln Leu
290 295 300

Glu His His His His His His
305 310

<210> 5

<211> 156

[0006]

<212> PRT

<213> 苍白密螺旋体

<400> 5

Met Lys Gly Ser Val Arg Ala Leu Cys Ala Phe Leu Gly Val Gly Ala
1 5 10 15

Leu Gly Ser Ala Leu Cys Val Ser Cys Thr Thr Val Cys Pro His Ala
20 25 30

Gly Lys Ala Lys Ala Glu Lys Val Glu Cys Ala Leu Lys Gly Gly Ile
35 40 45

Phe Arg Gly Thr Leu Pro Ala Ala Asp Cys Pro Gly Ile Asp Thr Thr
50 55 60

Val Thr Phe Asn Ala Asp Gly Thr Ala Gln Lys Val Glu Leu Ala Leu
65 70 75 80

Glu Lys Lys Ser Ala Pro Ser Pro Leu Thr Tyr Arg Gly Thr Trp Met
85 90 95

Val Arg Glu Asp Gly Ile Val Glu Leu Ser Leu Val Ser Ser Glu Gln
100 105 110

Ser Lys Ala Pro His Glu Lys Glu Leu Tyr Glu Leu Ile Asp Ser Asn
115 120 125

Ser Val Arg Tyr Met Gly Ala Pro Gly Ala Gly Lys Pro Ser Lys Glu
130 135 140

Met Ala Pro Phe Tyr Val Leu Lys Lys Thr Lys Lys
145 150 155

<210> 6

<211> 134

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 具有 Cys 至 Ala 的突变的 TpN17 23-156

[0007] <400> 6

Val Ser Ala Thr Thr Val Ala Pro His Ala Gly Lys Ala Lys Ala Glu
1 5 10 15

Lys Val Glu Ala Ala Leu Lys Gly Gly Ile Phe Arg Gly Thr Leu Pro
20 25 30

Ala Ala Asp Ala Pro Gly Ile Asp Thr Thr Val Thr Phe Asn Ala Asp
35 40 45

Gly Thr Ala Gln Lys Val Glu Leu Ala Leu Glu Lys Lys Ser Ala Pro
50 55 60

Ser Pro Leu Thr Tyr Arg Gly Thr Trp Met Val Arg Glu Asp Gly Ile
65 70 75 80

Val Glu Leu Ser Leu Val Ser Ser Glu Gln Ser Lys Ala Pro His Glu
85 90 95

Lys Glu Leu Tyr Glu Leu Ile Asp Ser Asn Ser Val Arg Tyr Met Gly

	100	105	110
	Ala Pro Gly Ala Gly Lys Pro Ser Lys Glu Met Ala Pro Phe Tyr Val		
	115	120	125
	Leu Lys Lys Thr Lys Lys		
	130		
<210>	7		
<211>	142		
<212>	PRT		
<213>	人工		
<220>			
<223>	具有六组氨酸的 TpN17		
<400>	7		
	Val Ser Ala Thr Thr Val Ala Pro His Ala Gly Lys Ala Lys Ala Glu		
	1	5	10
			15
[0008]			
	Lys Val Glu Ala Ala Leu Lys Gly Gly Ile Phe Arg Gly Thr Leu Pro		
	20	25	30
	Ala Ala Asp Ala Pro Gly Ile Asp Thr Thr Val Thr Phe Asn Ala Asp		
	35	40	45
	Gly Thr Ala Gln Lys Val Glu Leu Ala Leu Glu Lys Lys Ser Ala Pro		
	50	55	60
	Ser Pro Leu Thr Tyr Arg Gly Thr Trp Met Val Arg Glu Asp Gly Ile		
	65	70	75
			80
	Val Glu Leu Ser Leu Val Ser Ser Glu Gln Ser Lys Ala Pro His Glu		
	85	90	95
	Lys Glu Leu Tyr Glu Leu Ile Asp Ser Asn Ser Val Arg Tyr Met Gly		
	100	105	110
	Ala Pro Gly Ala Gly Lys Pro Ser Lys Glu Met Ala Pro Phe Tyr Val		
	115	120	125

Leu Lys Lys Thr Lys Lys Leu Glu His His His His His His
 130 135 140

<210> 8

<211> 517

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与 TpN17 融合的大肠杆菌串联 SlyD

<400> 8

Met Lys Val Ala Lys Asp Leu Val Val Ser Leu Ala Tyr Gln Val Arg
 1 5 10 15

Thr Glu Asp Gly Val Leu Val Asp Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro Leu
 20 25 30

Asp Tyr Leu His Gly His Gly Ser Leu Ile Ser Gly Leu Glu Thr Ala
 35 40 45

[0009]

Leu Glu Gly His Glu Val Gly Asp Lys Phe Asp Val Ala Val Gly Ala
 50 55 60

Asn Asp Ala Tyr Gly Gln Tyr Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val Pro
 65 70 75 80

Lys Asp Val Phe Met Gly Val Asp Glu Leu Gln Val Gly Met Arg Phe
 85 90 95

Leu Ala Glu Thr Asp Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala Val
 100 105 110

Glu Asp Asp His Val Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln
 115 120 125

Asn Leu Lys Phe Asn Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala Thr Glu
 130 135 140

Glu Glu Leu Ala His Gly His Val His Gly Ala His Asp His His His
 145 150 155 160

Asp His Asp His Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

	165	170	175
	Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Lys Val Ala Lys		
	180	185	190
	Asp Leu Val Val Ser Leu Ala Tyr Gln Val Arg Thr Glu Asp Gly Val		
	195	200	205
	Leu Val Asp Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro Leu Asp Tyr Leu His Gly		
	210	215	220
	His Gly Ser Leu Ile Ser Gly Leu Glu Thr Ala Leu Glu Gly His Glu		
	225	230	235
	Val Gly Asp Lys Phe Asp Val Ala Val Gly Ala Asn Asp Ala Tyr Gly		
	245	250	255
	Gln Tyr Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val Pro Lys Asp Val Phe Met		
	260	265	270
	Gly Val Asp Glu Leu Gln Val Gly Met Arg Phe Leu Ala Glu Thr Asp		
[0010]	275	280	285
	Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala Val Glu Asp Asp His Val		
	290	295	300
	Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln Asn Leu Lys Phe Asn		
	305	310	315
	Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala Thr Glu Glu Glu Leu Ala His		
	325	330	335
	Gly His Val His Gly Ala His Asp His His His Asp His Asp His Asp		
	340	345	350
	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser		
	355	360	365
	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Val Ser Ala Thr Thr Val Ala Pro His		
	370	375	380
	Ala Gly Lys Ala Lys Ala Glu Lys Val Glu Ala Ala Leu Lys Gly Gly		
	385	390	395
			400

Ile Phe Arg Gly Thr Leu Pro Ala Ala Asp Ala Pro Gly Ile Asp Thr
 405 410 415
 Thr Val Thr Phe Asn Ala Asp Gly Thr Ala Gln Lys Val Glu Leu Ala
 420 425 430
 Leu Glu Lys Lys Ser Ala Pro Ser Pro Leu Thr Tyr Arg Gly Thr Trp
 435 440 445
 Met Val Arg Glu Asp Gly Ile Val Glu Leu Ser Leu Val Ser Ser Glu
 450 455 460
 Gln Ser Lys Ala Pro His Glu Lys Glu Leu Tyr Glu Leu Ile Asp Ser
 465 470 475 480
 Asn Ser Val Arg Tyr Met Gly Ala Pro Gly Ala Gly Lys Pro Ser Lys
 485 490 495
 Glu Met Ala Pro Phe Tyr Val Leu Lys Lys Thr Lys Lys Leu Glu His
 500 505 510

[0011] His His His His His
 515

<210> 9

<211> 497

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多杀性巴氏杆菌串联 SlyDTpN17

<400> 9

Met Lys Ile Ala Lys Asn Val Val Val Ser Ile Ala Tyr Gln Val Arg
 1 5 10 15

Thr Glu Asp Gly Val Leu Val Asp Glu Ala Pro Val Asn Gln Pro Leu
 20 25 30

Glu Tyr Leu Gln Gly His Asn Asn Leu Val Ile Gly Leu Glu Asn Ala
 35 40 45

[0012]	Leu	Glu	Gly	Lys	Ala	Val	Gly	Asp	Lys	Phe	Glu	Val	Arg	Val	Lys	Pro
	50						55					60				
	Glu	Glu	Ala	Tyr	Gly	Glu	Tyr	Asn	Glu	Asn	Met	Val	Gln	Arg	Val	Pro
	65					70				75					80	
	Lys	Asp	Val	Phe	Gln	Gly	Val	Asp	Glu	Leu	Val	Val	Gly	Met	Arg	Phe
					85					90					95	
	Ile	Ala	Asp	Thr	Asp	Ile	Gly	Pro	Leu	Pro	Val	Val	Ile	Thr	Glu	Val
				100				105						110		
	Ala	Glu	Asn	Asp	Val	Val	Val	Asp	Gly	Asn	His	Met	Leu	Ala	Gly	Gln
				115				120					125			
	Glu	Leu	Leu	Phe	Ser	Val	Glu	Val	Val	Ala	Thr	Arg	Glu	Ala	Thr	Leu
		130					135					140				
	Glu	Glu	Ile	Ala	His	Gly	His	Ile	His	Gln	Glu	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
	145					150				155						160
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
					165					170					175	
	Gly	Lys	Ile	Ala	Lys	Asn	Val	Val	Val	Ser	Ile	Ala	Tyr	Gln	Val	Arg
				180						185					190	
	Thr	Glu	Asp	Gly	Val	Leu	Val	Asp	Glu	Ala	Pro	Val	Asn	Gln	Pro	Leu
				195					200					205		
	Glu	Tyr	Leu	Gln	Gly	His	Asn	Asn	Leu	Val	Ile	Gly	Leu	Glu	Asn	Ala
		210					215					220				
	Leu	Glu	Gly	Lys	Ala	Val	Gly	Asp	Lys	Phe	Glu	Val	Arg	Val	Lys	Pro
	225					230					235					240
	Glu	Glu	Ala	Tyr	Gly	Glu	Tyr	Asn	Glu	Asn	Met	Val	Gln	Arg	Val	Pro
					245					250					255	
	Lys	Asp	Val	Phe	Gln	Gly	Val	Asp	Glu	Leu	Val	Val	Gly	Met	Arg	Phe
					260					265					270	
	Ile	Ala	Asp	Thr	Asp	Ile	Gly	Pro	Leu	Pro	Val	Val	Ile	Thr	Glu	Val
				275				280						285		

	Ala	Glu	Asn	Asp	Val	Val	Val	Asp	Gly	Asn	His	Met	Leu	Ala	Gly	Gln	
	290							295				300					
	Glu	Leu	Leu	Phe	Ser	Val	Glu	Val	Val	Ala	Thr	Arg	Glu	Ala	Thr	Leu	
	305					310					315					320	
	Glu	Glu	Ile	Ala	His	Gly	His	Ile	His	Gln	Glu	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	
					325					330						335	
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	
				340					345							350	
	Gly	Gly	Gly	Val	Ser	Ala	Thr	Thr	Val	Ala	Pro	His	Ala	Gly	Lys	Ala	
				355					360							365	
	Lys	Ala	Glu	Lys	Val	Glu	Ala	Ala	Leu	Lys	Gly	Gly	Ile	Phe	Arg	Gly	
		370						375					380				
[0013]	Thr	Leu	Pro	Ala	Ala	Asp	Ala	Pro	Gly	Ile	Asp	Thr	Thr	Val	Thr	Phe	
	385					390					395					400	
	Asn	Ala	Asp	Gly	Thr	Ala	Gln	Lys	Val	Glu	Leu	Ala	Leu	Glu	Lys	Lys	
					405					410						415	
	Ser	Ala	Pro	Ser	Pro	Leu	Thr	Tyr	Arg	Gly	Thr	Trp	Met	Val	Arg	Glu	
				420					425						430		
	Asp	Gly	Ile	Val	Glu	Leu	Ser	Leu	Val	Ser	Ser	Glu	Gln	Ser	Lys	Ala	
				435					440						445		
	Pro	His	Glu	Lys	Glu	Leu	Tyr	Glu	Leu	Ile	Asp	Ser	Asn	Ser	Val	Arg	
		450					455					460					
	Tyr	Met	Gly	Ala	Pro	Gly	Ala	Gly	Lys	Pro	Ser	Lys	Glu	Met	Ala	Pro	
	465					470					475					480	
	Phe	Tyr	Val	Leu	Lys	Lys	Thr	Lys	Lys	Leu	Glu	His	His	His	His	His	
					485					490						495	
	His																

<210> 10
 <211> 411
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 大肠杆菌 FkpA-TpN17

<400> 10

Met Ala Glu Ala Ala Lys Pro Ala Thr Thr Ala Asp Ser Lys Ala Ala
 1 5 10 15

Phe Lys Asn Asp Asp Gln Lys Ser Ala Tyr Ala Leu Gly Ala Ser Leu
 20 25 30

Gly Arg Tyr Met Glu Asn Ser Leu Lys Glu Gln Glu Lys Leu Gly Ile
 35 40 45

Lys Leu Asp Lys Asp Gln Leu Ile Ala Gly Val Gln Asp Ala Phe Ala
 50 55 60

[0014]

Asp Lys Ser Lys Leu Ser Asp Gln Glu Ile Glu Gln Thr Leu Gln Ala
 65 70 75 80

Phe Glu Ala Arg Val Lys Ser Ser Ala Gln Ala Lys Met Glu Lys Asp
 85 90 95

Ala Ala Asp Asn Glu Ala Lys Gly Lys Glu Tyr Arg Glu Lys Phe Ala
 100 105 110

Lys Glu Lys Gly Val Lys Thr Ser Ser Thr Gly Leu Val Tyr Gln Val
 115 120 125

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

Val Asn Tyr Lys Gly Thr Leu Ile Asp Gly Lys Glu Phe Asp Asn Ser
 145 150 155 160

Tyr Thr Arg Gly Glu Pro Leu Ser Phe Arg Leu Asp Gly Val Ile Pro
 165 170 175

Gly Trp Thr Glu Gly Leu Lys Asn Ile Lys Lys Gly Gly Lys Ile Lys

	180	185	190
	Leu Val Ile Pro Pro Glu Leu Ala Tyr Gly Lys Ala Gly Val Pro Gly		
	195	200	205
	Ile Pro Pro Asn Ser Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Asp Val		
	210	215	220
	Lys Pro Ala Pro Lys Ala Asp Ala Lys Pro Glu Ala Asp Ala Lys Ala		
	225	230	235 240
	Ala Asp Ser Ala Lys Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
	245	250	255
	Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Val Ser Ala		
	260	265	270
	Thr Thr Val Ala Pro His Ala Gly Lys Ala Lys Ala Glu Lys Val Glu		
	275	280	285
	Ala Ala Leu Lys Gly Gly Ile Phe Arg Gly Thr Leu Pro Ala Ala Asp		
[0015]	290	295	300
	Ala Pro Gly Ile Asp Thr Thr Val Thr Phe Asn Ala Asp Gly Thr Ala		
	305	310	315 320
	Gln Lys Val Glu Leu Ala Leu Glu Lys Lys Ser Ala Pro Ser Pro Leu		
	325	330	335
	Thr Tyr Arg Gly Thr Trp Met Val Arg Glu Asp Gly Ile Val Glu Leu		
	340	345	350
	Ser Leu Val Ser Ser Glu Gln Ser Lys Ala Pro His Glu Lys Glu Leu		
	355	360	365
	Tyr Glu Leu Ile Asp Ser Asn Ser Val Arg Tyr Met Gly Ala Pro Gly		
	370	375	380
	Ala Gly Lys Pro Ser Lys Glu Met Ala Pro Phe Tyr Val Leu Lys Lys		
	385	390	395 400
	Thr Lys Lys Leu Glu His His His His His His		
	405	410	

<210> 11
 <211> 307
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 大肠杆菌 Skp-TpN17

<400> 11

Met Ala Asp Lys Ile Ala Ile Val Asn Met Gly Ser Leu Phe Gln Gln
 1 5 10 15

Val Ala Gln Lys Thr Gly Val Ser Asn Thr Leu Glu Asn Glu Phe Arg
 20 25 30

Gly Arg Ala Ser Glu Leu Gln Arg Met Glu Thr Asp Leu Gln Ala Lys
 35 40 45

Met Lys Lys Leu Gln Ser Met Lys Ala Gly Ser Asp Arg Thr Lys Leu
 50 55 60

[0016]

Glu Lys Asp Val Met Ala Gln Arg Gln Thr Phe Ala Gln Lys Ala Gln
 65 70 75 80

Ala Phe Glu Gln Asp Arg Ala Arg Arg Ser Asn Glu Glu Arg Gly Lys
 85 90 95

Leu Val Thr Arg Ile Gln Thr Ala Val Lys Ser Val Ala Asn Ser Gln
 100 105 110

Asp Ile Asp Leu Val Val Asp Ala Asn Ala Val Ala Tyr Asn Ser Ser
 115 120 125

Asp Val Lys Asp Ile Thr Ala Asp Val Leu Lys Gln Val Lys Gly Gly
 130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 145 150 155 160

Gly Ser Gly Gly Gly Val Ser Ala Thr Thr Val Ala Pro His Ala Gly
 165 170 175

Lys Ala Lys Ala Glu Lys Val Glu Ala Ala Leu Lys Gly Gly Ile Phe
180 185 190

Arg Gly Thr Leu Pro Ala Ala Asp Ala Pro Gly Ile Asp Thr Thr Val
195 200 205

Thr Phe Asn Ala Asp Gly Thr Ala Gln Lys Val Glu Leu Ala Leu Glu
210 215 220

Lys Lys Ser Ala Pro Ser Pro Leu Thr Tyr Arg Gly Thr Trp Met Val
225 230 235 240

Arg Glu Asp Gly Ile Val Glu Leu Ser Leu Val Ser Ser Glu Gln Ser
245 250 255

Lys Ala Pro His Glu Lys Glu Leu Tyr Glu Leu Ile Asp Ser Asn Ser
260 265 270

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

[0017] Ala Pro Phe Tyr Val Leu Lys Lys Thr Lys Lys Leu Glu His His His
290 295 300

His His His
305

<210> 12
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 富含甘氨酸的接头

<400> 12

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
20

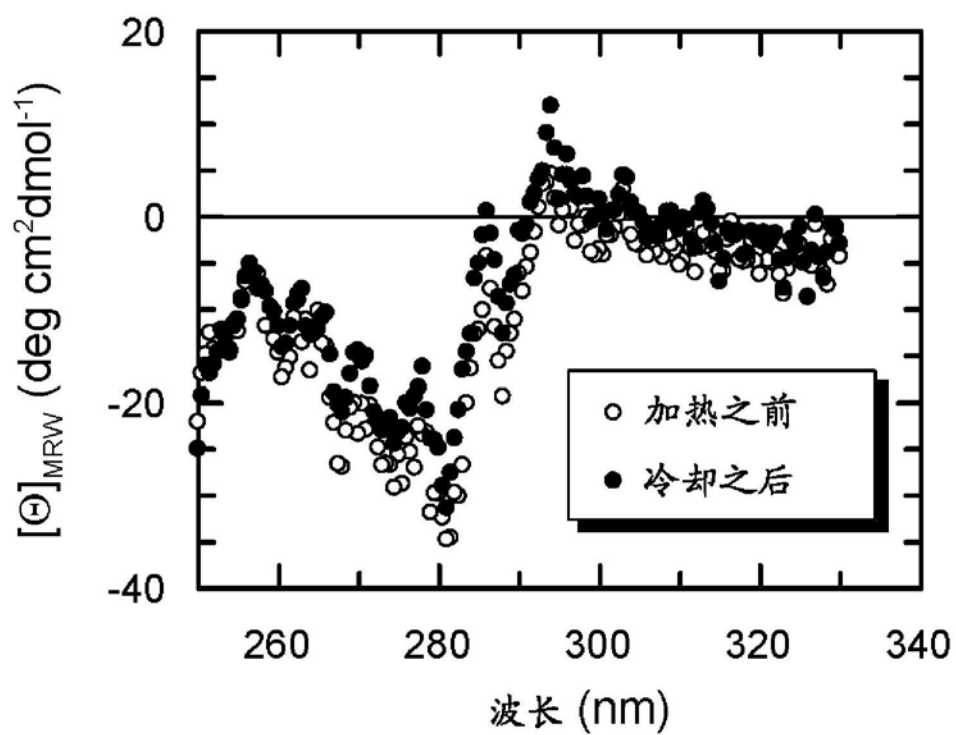


图1

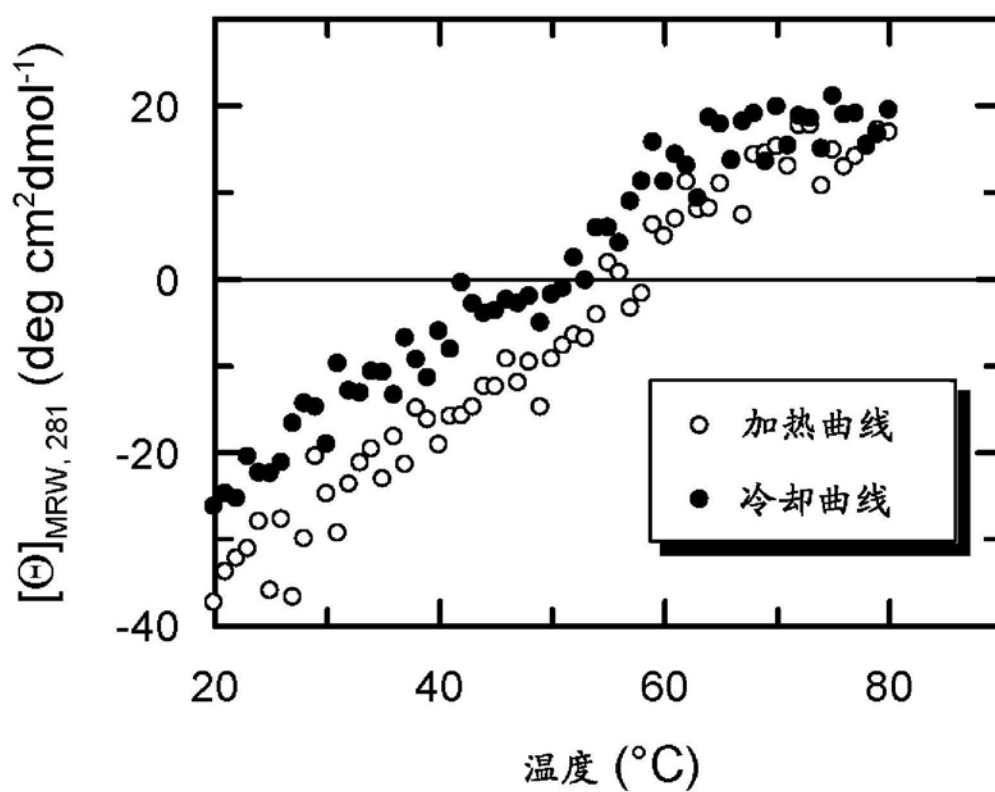


图2

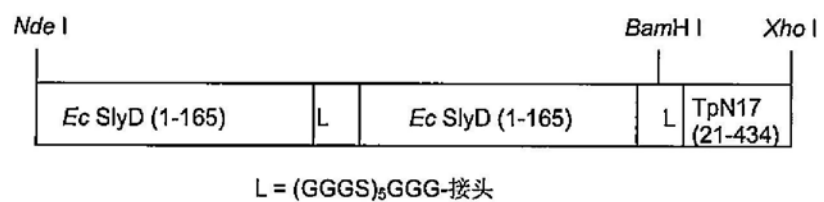


图3

专利名称(译)	VcLp15变体在基于TpN17的检测抗密螺旋体抗体的免疫测定中作为抗干扰添加剂		
公开(公告)号	CN104297477B	公开(公告)日	2018-07-06
申请号	CN201410344742.6	申请日	2014-07-18
申请(专利权)人(译)	弗·哈夫曼-拉罗切有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	弗·哈夫曼-拉罗切有限公司		
[标]发明人	E法特兹 P沙尔施密特 U施密特 C舒尔茨		
发明人	E·法特兹 P·沙尔施密特 U·施密特 C·舒尔茨		
IPC分类号	G01N33/571 G01N33/536 C07K19/00		
CPC分类号	G01N33/6854 C07K14/245 C07K14/28 C07K2319/35 G01N33/5306 G01N33/571 G01N2333/20 G01N2333/28 G01N2469/20 G01N2800/26		
优先权	2013003633 2013-07-18 EP		
其他公开文献	CN104297477A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及用于检测分离的样品中的抗苍白密螺旋体的TpN17抗原的抗体的方法，其中用霍乱弧菌脂蛋白15(VcLp15)的肽序列或其部分序列作为用于减少干扰(即用于最少化假阳性结果)的试剂。此外，本发明涉及包含VcLp15肽序列和分子伴侣的融合多肽，它们在免疫测定中作为用于减少干扰和用于最少化假阳性结果的添加剂的用途，及包含TpN17抗原和该VcLp15分子伴侣融合多肽的用于检测分离的样品中的抗苍白密螺旋体抗原的抗体的试剂盒。

