



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00817358.3

[43] 公开日 2003 年 4 月 16 日

[11] 公开号 CN 1411513A

[22] 申请日 2000.11.15 [21] 申请号 00817358.3

[30] 优先权

[32] 1999.11.15 [33] KR [31] 1999/50510

[86] 国际申请 PCT/KR00/01305 2000.11.15

[87] 国际公布 WO01/36688 英 2001.5.25

[85] 进入国家阶段日期 2002.6.18

[71] 申请人 迪吉株式会社

地址 韩国汉城

[72] 发明人 金善荣 朴银珍 罗英顺 柳承信

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公
司

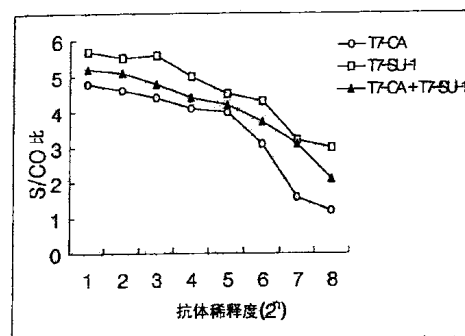
代理人 李 悦

权利要求书 2 页 说明书 17 页 序列表 11 页
附图 10 页

[54] 发明名称 一种检测接受基因治疗的受治者血清中有复制能力的病毒的方法

[57] 摘要

本发明提供一种检测接受基因治疗的受治者血清中是否存在有复制能力的病毒的方法，该方法包括用特异性抗原检测血清中的抗逆转录病毒的抗体的步骤。该抗原的基因不存在于用于基因治疗的病毒载体中，而仅存在于该病毒载体来源的病毒基因组中，并且该抗原优选地选自鼠白血病病毒的部分的 Gag 和部分的 Env 蛋白。同时还提供了其氨基酸序列包括 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 6 的序列的抗原，由于其特异性和灵敏度，它们在基于免疫反应的 RCR 检测中用处很大。



1. 一种检测接受使用病毒载体的基因治疗的受治者中有复制能力
5 的病毒的方法，该方法包括受治者的血清与一种抗原蛋白进行反应，
该蛋白是由不存在于病毒载体上，而存在于该病毒载体所来源的病毒
基因组中的基因所编码的；并在受治者的血清中检测抗体蛋白。
2. 权利要求 1 的方法，其中的病毒载体来源于逆转录病毒，腺病
毒，腺伴随病毒或慢病毒。
- 10 3. 权利要求 2 的方法，其中的逆转录病毒是鼠白血病病毒。
4. 权利要求 1 的方法，其中的抗原蛋白是鼠白血病病毒的 Gag 或
Env 蛋白的部分。
5. 权利要求 4 的方法，其中的鼠白血病病毒的 Gag 蛋白的部分具
有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列。
- 15 6. 权利要求 4 的方法，其中的鼠白血病病毒的 Env 蛋白的部分具
有 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列。
7. 权利要求 1 的方法，其中的抗原蛋白呈与麦芽糖结合蛋白或由
11 个氨基酸残基构成的 T7 标记的融合蛋白形式。
8. 权利要求 1 的方法，其中的抗原检测步骤是由选自酶联免疫吸
20 附测定，Western 印迹和荧光联免疫吸附的方法进行的。
9. 权利要求 1 的方法，在反应步骤前进一步包括用自动微阵列布
放系统将抗原固定在蛋白芯片上。
10. 一种用来检测接受使用病毒载体的基因治疗的受治者中有复
制能力的病毒的诊断试剂盒，它包括一种抗原蛋白，该蛋白是由不存
25 在于病毒载体上，而存在于该病毒载体所来源的病毒的基因组中的基
因所编码的。
11. 权利要求 10 的诊断试剂盒，其中的病毒载体来源于逆转录病
毒，腺病毒，腺伴随病毒或慢病毒。
12. 权利要求 10 的诊断试剂盒，其中的抗原蛋白是鼠白血病病毒
30 的 Gag 或 Env 蛋白的部分。

13. 权利要求 12 的诊断试剂盒，其中的鼠白血病病毒的 Gag 蛋白的部分具有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列。

14. 权利要求 12 的诊断试剂盒，其中的鼠白血病病毒的 Env 蛋白的部分具有 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列。

5 15. 权利要求 10 的诊断试剂盒，其中的抗原蛋白固定在蛋白芯片的微基片上。

16. 一种表达载体，该载体包含编码用于检测有复制能力的病毒的抗原蛋白的 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列（KCCM-10173）。

10 17. 一种表达载体，该载体包含编码用于检测有复制能力的病毒的抗原蛋白的 SEQ ID NO: 5 的核苷酸序列（KCCM-10224）。

一种检测接受基因治疗的受治者血清中 有复制能力的病毒的方法

发明背景

本发明涉及一种通过测定病人血清中是否存在抗体来检测基因治疗过程中是否存在有复制能力的病毒（RCV）的方法，该方法是利用
10 逆转录病毒 Gag 或 Env 蛋白的特定抗原部分来实现的，基因治疗中所使用的病毒载体来源于该逆转录病毒。

基因治疗是一种医学干涉方法，通过将正常基因导入到病人细胞中，来治疗由基因突变或代谢紊乱引起的疾病。毫无疑问，生物和遗传工程技术在将来会继续快速发展，所以预计基因治疗会成为一种治
15 疗目前不能治愈或难以治愈的疾病的最有效的方法。

基因治疗的最重要部分是载体系统，它用来将用于治疗基因导入生物体。目前广泛使用的病毒载体包括逆转录病毒，腺病毒和腺伴随病毒。逆转录病毒载体是最常用的，目前用于约 50%的临床试验中。大多数逆转录病毒载体来源于鼠白血病病毒（MLV）。

虽然病毒载体是基因治疗的具代表性的选择，但在它们的应用中有一定的安全性问题。治疗性的病毒载体通过遗传工程设计为复制缺陷型，但通过载体和病人中与病毒基因组类似的核苷酸序列之间的同源重组，可以产生有复制能力的病毒（RCV）。这在用病毒载体进行基因治疗中存在严重危险。因此，为确保基因治疗的安全性，已经发
20 展了几种方法来检测 RCV。美国食品和药品管理局（FDA）指南规定，不仅要在重组病毒的产生阶段筛查是否有具有复制能力的逆转录病毒（RCR）存在，而且需在对病人给药病毒载体后进行定期筛查。

应该在两个阶段检测 RCR 是否存在。第一个阶段是在病毒载体从生产者细胞系的产生阶段或在用逆转录病毒载体体外转导靶细胞之前。第二个阶段是在将进行遗传工程操作的细胞给药受治者后，其中
30 细胞含有通过逆转录病毒导入的用于治疗基因。典型的做法是 10-20

个受治者参与 I 期的临床试验,以一年三次的频率监测 RCR 是否存在。因此在该过程中耗费了大量的人力,时间和物力。

已经有几种方法用于 RCR 的检测,包括用 *Mus dunni* 细胞进行检测,逆转录酶检测和聚合酶链式反应 (PCR)。

- 5 用 *Mus dunni* 细胞检测 RCR 如下所述。产病毒的细胞或含病毒的培养上清与含标记基因(如潮霉素, LacZ 基因)的 *Mus dunni* 细胞共培养。从该共培养物中获得的上清用来感染适当的靶细胞,通过标记基因的表达监测病毒的存在 (Forestell 等, *J Virol Methods* 60: 171-178, 1996)。该方法基于以下原理:含有标记基因的 RCR 仅能通过具有包装序列而不含有其他病毒序列的逆转录病毒与不含有包装序列的 *Mus dunni* 细胞之间进行重组而产生。*Mus dunni* 细胞也用于 S⁺L⁻病灶(focus)检测 (Haapala DK 等 *J Virol.* 53: 827-833, 1985)。RCR 可通过 *Mus dunni* 细胞与产病毒细胞或从产病毒细胞获得的上清共培养后病灶的形成来进行检测。这些方法要花费多于一个月的时间,因为需要几轮上清或产病毒细胞与 *Mus dunni* 细胞的共培养以增加 RCR 的滴度。另外, S⁺L⁻检测本身也要另外花费 5-7 天。
- 10
- 15

逆转录酶检测方法需要根据以下假设进行,只有通过重组产生的 RCR 具有逆转录酶活性,而用于治疗的反转录病毒没有。

- PCR 方法对 RCR 的检测是通过一对引物进行的,其中一个引物序列存在于逆转录病毒载体上,而另一个存在于原始病毒上,但不存在于逆转录病毒载体上。这是临床试验中最常用的一个方法,但其自身存在重现性低的问题 (Long 等, *Human Gene Ther.* 9: 1165-1172, 1998; Otto 等, *Human Gene Ther.* 5: 567-575, 1994)。上述方法都需要耗费大量的时间和劳力,而且受低重现性和灵敏度的问题的困扰。
- 20

- 25 因此,已经进行研究以发展更为经济的方法,使其需要更短的时间和更少的样品,但是仍能保持高的灵敏度。已报道的一种此类的研究是通过 ELISA 检测是否产生抗 MLV 的抗体来检测 RCR (Martineau 等, *Human Gene Ther.* 8: 1231-1241, 1997)。然而,由于整个 MLV 病毒被作为一个抗原,该方法的特异性和灵敏度仍不能令人满意。因此,需要生产具有高特异性和灵敏度的抗原来解决基于抗原-抗体相互
- 30

作用进行 RCR 测定中抗原的特异性，灵敏度及其导致的使用上受限的问题，

为了克服原有 RCR 检测方法中的问题，本发明人开发了一种高通量的 RCR 检测方法，它可以在逆转录病毒基因治疗后，使用从 MLV 衍生的特异抗原与病人的血清反应，从而很容易的筛查抗体的产生。该方法基于以下发现：Gag 或 Env 蛋白的特定片段具有 RCR 检测所需的特异性和灵敏度水平。

发明概述

因此，本发明的一个目的是提供一种精确的却简单的方法来检测受治者中 RCR 的产生。

本发明的进一步的目的是提供一种高灵敏度和经济的方法，可以高效地并用最少量的样品来检测受治者中 RCR 的产生。

本发明更进一步的目的是提供一种通过病人血清与从 MLV 的 Gag 或 Env 衍生的抗原反应来检测 RCR 的方法，该方法是通过检测受治者中抗 RCR 的免疫反应所产生的抗体是否存在来进行的。

附图简述

图 1 所示的是 MLV 的基因组结构和基因产物。

图 2 表示重组质粒的构建的示意图，其中编码病毒蛋白的相应 DNA 片段插入到 pMAL-c2 载体中，以使 MLV Gag 的 p30 (CA) 或 Env 的 p15E (TM) 可以作为麦芽糖结合蛋白 (MBP) 融合蛋白而被表达。

图 3 表示重组质粒的构建的示意图，其中相应的编码 DNA 插入到 pET-17b 或 pET-3a 载体中，以使它们可以表达 MLV Env 的 CA, TM 或 gp70 (SU-1) 用来作为 T7 标记的蛋白。

图 4a 为 SDS-PAGE 照片，所示的是 IPTG 诱导前后 MLV Gag (CA) 蛋白在大肠杆菌中的表达水平。

泳道 1:对照 (IPTG 诱导的 pMAL-c2)

泳道 2 和 3: IPTG 诱导前后的 MBP-CA (70kDa)

泳道 4 和 5: IPTG 诱导前后的 T7-CA (31kDa)

图 4b 为 SDS-PAGE 照片，所示的是 IPTG 诱导前后 MLV Env (TM 和 SU-1) 蛋白在大肠杆菌中的表达水平。

泳道 1:对照 (IPTG 诱导的 pMAL-c2)

泳道 2 和 3: IPTG 诱导前后的 MBP-TM (57kDa)

5 泳道 4 和 5: IPTG 诱导前后的 T7-TM (17kDa)

泳道 6 和 7: IPTG 诱导前后的 T7-SU-1 (24kDa)

图 5 为凝胶照片，所示的为收获在大肠杆菌中产生的抗原蛋白后经柱层析的纯化结果 (MBP 融合蛋白用直链淀粉树脂柱，T7-标记的蛋白用 Sepharose 柱)。

10 泳道 1:CA，其中 MBP 部分用蛋白酶因子 Xa 除去

泳道 2: T7-CA

泳道 3: MBP-TM

泳道 4: T7-TM

泳道 5: T7-SU-1

图 6a 所示的为显示 Western 印迹的结果的照片，其中从 pMAL-c2，pET-17b 或 pET-3a 中表达的重组蛋白 CA，TM 和 SU-1 与兔抗-CA 血清反应。

泳道 1:CA

泳道 2: T7-CA

泳道 3: MBP-TM

泳道 4: T7-TM

泳道 5: T7-SU-1

20 图 6b 所示的为显示 Western 印迹的结果的照片，其中从 pET-17b 或 pET-3a 中表达的重组蛋白 CA，TM 和 SU-1 与小鼠抗-MLV 血清反应。

泳道 1:T7-CA

泳道 2: T7-TM

泳道 3: T7-SU-1

25 图 7a 所示的为进行 ELISA 反应后 T7-CA 以 S/CO (样品吸收值与临界值(cutoff value)的比)表示的特异性的图，其中兔抗-CA 血清作为阳性样品，而正常兔血清作为阴性对照。

图 7b 所示的为进行 ELISA 反应后 T7-SU-1 以 S/CO (样品吸收值与临界值的比)表示的特异性的图，其中小鼠抗-MLV 血清作为阳性对照，而正常小鼠血清作为阴性对照。

30 图 7c 所示的为进行 ELISA 反应后 T7-CA 和 T7-SU-1 的特异性的

照片，其中每个蛋白单独或者共同用作抗原，并且与小鼠抗-MLV 血清反应。

图 8 所示的为特异性测验的结果，其中 T7-CA，T7-TM 和 T7-SU-1 制成蛋白芯片的形式，并且与兔抗-CA 血清 (a)，小鼠抗-MLV 血清 (b) 和正常小鼠血清 (c) 进行反应。

发明详述

本发明提供一种通过检测病人血清中是否存在抗体来检测基因治疗中是否存在有复制能力的病毒 (RCV) 的方法，该方法是利用逆转录病毒 Gag 或 Env 蛋白的一些抗原部分来实现的，基因治疗中所使用的病毒载体来源于该逆转录病毒。

本发明的 RCV 检测方法通过抗原-抗体反应检测病人血清中抗体是否存在。反应中所用的与病人血清反应的抗原蛋白的编码基因不存在于基因治疗中所用的病毒载体上，而存在于该载体所来源的病毒基因组中。

在基因治疗中所用的病毒载体通常不能进行复制，因为大部分的 gag, pol 和 env 从原始病毒基因组中除去了。要将它们包装到病毒颗粒中，需要转染到可以反式(in trans)提供 Gag, Pol 和 Env 的包装细胞的步骤。因此，Gag 或 Env 的部分作为抗原蛋白是优选的，因为其编码基因不存在于基因治疗中所用的病毒载体上，而存在于该病毒载体所来源的病毒基因组中。因此，有可能消除病毒载体自身可能产生的假阳性信号，从而使本发明具有高度特异性。

本发明中的 RCR 检测方法可用于以逆转录病毒，腺病毒，腺伴随病毒及慢病毒作为治疗所用的载体的各种情况。而且，本发明中的 RCR 检测方法也可用于使用逆转录病毒，特别是鼠白血病病毒 (MLV) 进行的基因治疗。

抗原是 MLV 的 Gag 或 Env 蛋白的部分是尤其优选的。而且，对于更高的特异性和灵敏度更为优选的是，MLV Gag 蛋白的部分包括 SEQ ID: 2 所代表的氨基酸序列，以及 MLV Env 蛋白的部分包括 SEQ ID: 6 所代表的氨基酸序列。

上述抗原性蛋白可以融合蛋白形式生产-与麦芽糖结合蛋白或由

个氨基酸构成的 T7 标记进行融合-以便于纯化。

本发明的基于抗原-抗体反应的 RCR 检测方法可通过各种方法进行
操作，包括 ELISA（酶联免疫吸附测定），Western 印迹，FLISA（荧
光联免疫吸附测定）及其他可检测抗原-抗体结合的分析方法。虽然
5 ELISA 和 FLISA 是优选的方法，但偶连 ELISA 或 FLISA 的 Western
印迹和中和测定方法可提高分析的精确性。而且，本发明与已知的 PCR
方法偶连可用于得到同样的效果。

本发明中的抗原蛋白可以用自动微阵列布放系统(microarrayer)以蛋
白芯片的形式进行制造，以用来进行分析。应用蛋白芯片可完成高通
10 量的自动化的高效的反应，因为大量的样品可以用一个芯片在一个反
应中进行分析。蛋白芯片是一个小规模固相的矩阵，在其上排列数
十个到几百个点，每个点包含 1-100pg 抗原，并被固定在小规模固相
矩阵上。芯片可以用来大规模分析(mass-analysis)，因为它可以用自动
化的微阵列布放系统产生。所用的产生上述蛋白芯片的基片可由各种
15 材料制作。优选的材料包括玻璃和改性的硅氧烷，和常用的聚合物（例
如四氟乙烯，聚苯乙烯和聚丙烯）和凝胶，但并不限于这些材料。虽
然包被该微基片的优选的材料是氨基烷基硅烷，但也可以使用其他的
材料，包括塑料，树脂，碳水化合物，硅石，硅石衍生物，碳，金属，
无机玻璃，膜或者化学物质，以固定抗原蛋白。

20 包被了抗原的蛋白芯片可浸入浓度高于 50%的醇中。基于用上述
包被了抗原的蛋白芯片进行的 RCV 分析，如果病人的血清与使用微
阵列布放系统的抗原反应，然后与作为第二抗体的结合了荧光染料的
抗人 IgG 抗体反应，那么可进行大量-分析(mass-analysis)。结果可通
过自动记录仪，如高速荧光扫描仪获得。

25 本发明也提供一种诊断试剂盒，可分析接受基因治疗的病人血
清中 RCV 的产生。本发明的试剂盒包含抗原，其编码基因不存在于
基因治疗所用的病毒载体上，而存在于该载体所来源的病毒基因组
上。

作为上述过程中的抗原蛋白，MLV 的 Gag 或 Env 蛋白的部分是优
30 选的。特别是，当 Gag 蛋白的部分包括 SEQ ID NO: 2 所代表的氨基

酸序列或 MLV Env 蛋白的部分包括 SEQ ID NO: 6 的所代表的氨基酸序列时更为优选。上述的 RCR 诊断试剂盒可以以蛋白芯片的形式提供，其中的抗原蛋白固定在小规模的固相矩阵中。

上述的试剂盒包括附加的 ELISA, FLISA 或 Western 印迹通常所需的合适的试剂或者器材。

本发明的 RCR 检测方法中所用的抗原蛋白可通过构建表达质粒，该质粒包含来自用于产生治疗用重组病毒的病毒基因组的一些基因，以及在大肠杆菌中表达这些基因等来进行大规模生产。本发明提供一种包含 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列（编码 SEQ ID NO: 2 的抗原）的表达载体，和一种包含 SEQ ID NO: 5 的核苷酸序列（编码 SEQ ID NO: 6 的抗原）的表达载体，它们保藏在韩国微生物保藏中心，保藏号为：KCCM-10173（1999 年 11 月 11 日）和 KCCM-10224（2000 年 11 月 10 日）。

在本发明的优选的实例中，p30（衣壳蛋白：CA，MLV Gag 蛋白的部分），p15E(TM)和 gp70（包括脯氨酸-富集序列的上游区；SU-1）被选作抗原来检测抗 MLV 的抗体。已知衣壳蛋白 p30 在大部分逆转录病毒中高表达，其氨基酸序列在不同的亚型中高度保守。Env 抗原被选作诊断试剂中的主要抗原。虽然 Env 的氨基酸序列没有衣壳蛋白的序列保守，但预期其免疫性却更高。而且 Env 蛋白的跨膜结构域（TM）和胞外结构域（SU-1）均被克隆，因为二结构域的抗原性显得不同。所选择的抗原（CA，TM 和 SU-1）在基因组中的位置如图 1 所示。

根据 MLV Gag 和 Env 的氨基酸序列选择高度保守的区域。然后通过 PCR 得到编码 CA，TM 和 SU-1 的部分的基因，并插入到表达载体中。可形成 MBP 融合蛋白的 pMAL-c2 载体，pET17b 和 pET3a（表达 T7 标记的蛋白）被用来作为表达载体以利于蛋白的纯化。在大肠杆菌中的蛋白表达结果表明，蛋白质的表达水平和抗原性因序列而异。最明显的是，由 263 个氨基酸构成的 CA 和由 197 个氨基酸构成的 SU-1 表现出最高的表达水平和抗原性。另一方面，插入到 pET17b 中的 SU-1 蛋白的表达水平太低，不能用于进一步的实验。

在大肠杆菌中的蛋白表达，通过加入 IPTG 进行诱导，并在 SDS-PAGE 上进行检测，然后蛋白通过柱层析进行纯化。本发明中的抗原蛋白的表达水平在加入 IPTG 之前非常低，但加入 IPTG 后，增加到总蛋白的 10-20%。在纯化后所检测到的抗原几乎为单一的条带，这表
5 明其纯度很高（见图 5）。

在本发明的其他例子中，Western 印迹和 ELISA 被用来检测抗原对抗 MLV 抗体的特异性和灵敏度。融合蛋白 MBP-CA 用蛋白酶因子 Xa 进行处理，以获得纯的 CA 蛋白。纯化的 CA 腹膜腔内注射到兔中，获得含抗 CA 抗体的兔血清。抗 MLV 抗体是通过将 MLV(作为整个病
10 毒)注射到小鼠尾静脉中，并从免疫的小鼠中收获阳性小鼠血清得到的。在该例子中使用兔抗 CA 血清和小鼠抗 MLV 血清，因为 MLV 在人类中感染的病例很少，并且不可能获得阳性的人血清。Western 印迹是通过本发明的抗原性蛋白与上述兔抗-CA 血清或小鼠抗-MLV 血清反应进行的。结果表明每个抗原与该抗体特异性地反应（见图 6a
15 和 6b）。对 Gag 而言，CA 和 T7-CA 都非常强烈地与 1:5000 稀释度的兔血清反应。但 Env 蛋白的 TM 和 SU-1 没有反应。而且，只有 T7-CA 和 T7-SU-1 与小鼠抗 MLV 血清反应。在两个蛋白中，SU-1 比 CA 表现出更强的反应性。T7-TM 根本没有反应。

在本发明的其他例子中，通过抗原性蛋白与抗体的 ELISA 反应，
20 来评估测定的灵敏度和特异性。ELISA 的临界值(cutoff)为高于阴性对照的平均吸收值（正常兔血清或正常小鼠血清）0.3 的值。结果表示为 S/CO（样品 OD/临界值），当 S/CO 大于 1 时，被认为是阳性的。

CA 和 T7-Ca 对兔抗 CA 血清的 S/CO 高于 4，并且被认为是阳性的，但 MBP-TM，T7-TM，和 T7-SU-1 对兔抗 CA 血清的 S/CO 低于 1，并
25 且被认为是阴性的。这些结果与前面实验中的 Western 印迹是一致的，而且表明本实验的 CA 抗原具有高特异性。CA，T7-CA 和 T7-SU-1 对小鼠抗 MLV 血清的 S/CO 高于 3，而 MBP-TM 和 T7-TM 的 S/CO 在 1-2 之间。这些结果表明这些蛋白的抗原性是不同的。

根据这些结果，用显示高抗原性的 T7-CA 和 T7-SU-1 评估 ELISA
30 的敏感性。

在 ELISA 中，这些抗原的灵敏度的评估是通过 2 倍系列稀释样品来进行的。ELISA 反应用稀释到 1:640,000 的兔血清和稀释到 1:2560 的小鼠血清进行。最初的小鼠血清在人血清中进行 10 倍稀释，以模拟人暴露于 MLV 的状态。T7-CA 的 S/CO 直到兔抗-CA 血清稀释到 1:160,000 时仍大于 3(见图 7a)，表明其具有高灵敏度。T7-SU-1 的 S/CO 直到小鼠抗 MLV 血清稀释到 1:64 时仍大于 4 (见图 7b)。T7-CA 和 T7-SU-1 的 S/CO 分别在直到小鼠抗 MLV 血清 1:64 的稀释度和 1:256 的稀释度时仍然大于 3。当两个抗原混合时，S/CO 在直到稀释到 1:256 时仍大于 2 (见图 7c)，上面的结果表明 CA 和 SU-1 抗原均有高灵敏度和高特异性，这证明它们可以在接受基因治疗的病人血清中通过检测 MLV 抗体，来检测通过同源重组产生的 RCR。T7-SU-1 的 S/CO 随血清稀释度的降低比 T7-CA 的慢。这表明即使 T7-SU-1 被用作单独的抗原，它也能作为一种有效的抗原来检测任何抗 MLV 的抗体。

本发明的其他例子中，其中 T7-CA，T7-TM，和 T7-SU-1 抗原被固定在氨基烷基硅烷包被的玻片上的蛋白芯片被用来研究大规模分析的应用的可行性。T7-CA 和 T7-SU-1 在蛋白芯片上的抗原-抗体反应中表现出高的灵敏度和特异性，因此已证实本发明的抗原适于应用蛋白芯片进行 RCR 的大规模分析。

本发明在以下的实施例中进行详细描述。

显然，对本领域的普通技术人员来说，以下的实施例是为了举例说明本发明而非限定其范围。

实施例

实施例 1: MLV 抗原的克隆和表达载体的构建

在大规模生产抗原和证实这些抗原检测 RCR 的有效性之前，将编码 MLV 的衣壳蛋白 (CA) p30, p15E (TM)，和 gp70 (富含脯氨酸序列的上游区: SU-1) 的 DNA 片段通过 PCR 进行扩增。

pMLV (Shinnick 等,《自然》 293: 543-548, 1981) 被用来作为模板，合成的包含适当的限制酶位点的寡核苷酸被用来作为 5'和 3'引物扩增 CA, TM 和 SU-1。在 PCR 中所用的引物序列根据目的基因

和限制酶位点以 SEQ ID NOs:7-14 表示并列于表 1 中。

表 1

目的基因	方向	限制酶酶切位点	SEQ ID NO
CA	5'引物	EcoRI	7
		BamHI	8
	3'引物	Sall	9
TM	5'引物	EcoRI	10
		BamHI	11
	3'引物	Sall	12
SU-1	5'引物	BamHI	13
	3'引物	BamHI	14

5 用 MLV HIT456 基因组作为模板进行 PCR 反应。反应包括 30 个循环，94℃变性 1 分钟，55℃退火 1 分钟，72℃延伸 1 分 30 秒。反应包括每种引物 1ul (10pmol/ul) 和 0.75mM 高保真 PCR 系统 (Roche, 美国)。PCR 产物连接到 pCR Blunt (Invitrogen, The Netherlands) 或 pCR2.1 (Invitrogen, The Netherlands) 上。详细描述如下，CA 基因
10 片段通过序列为 SEQ ID NOs:7 和 9, 或 7 和 8 的引物的组合进行扩增，TM 基因片段通过序列为 SEQ ID NOs:10 和 12, 或 11 和 12 的引物的组合进行扩增，并将它们插入到 pCR Blunt 载体上。同时，SU-1 基因片段通过序列为 SEQ ID NOs:13 和 14 的引物的组合进行扩增，并将它们插入到 pCR2.1 载体上。

15 上述基因克隆到 pMAL-c2 (New England Biolabs, 美国), pET-17b (Novagen, 美国), 或 pET-3a (Novagen, 美国) 上, 以 MBP (麦芽糖结合蛋白) 融合蛋白, 或 T7-标记的 (Met-Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Glu-Glu-Met-Gly) 蛋白质的形式进行抗原表达。表达载体的构建方案如图 2 和 3 所示。

20 首先, 将用一对引物 SEQ ID NOs:7 和 9 扩增的 CA PCR 产物

(768bp) 插入到 pMAL-c2 的 EcoRI/SalI 位点, 得到 MBP-CA。将用一对引物 SEQ ID NOs:8 和 9 扩增的 CA PCR 产物 (734bp) 插入到 pET-17b 的 BamHI/XhoI 位点, 得到 T7-CA。将用一对引物 SEQ ID NOs:10 和 12 扩增的 TM PCR 产物 (396bp) 插入到 pMAL-c2 的 EcoRI/SalI 位点, 得到 MBP-TM。将用一对引物 SEQ ID NOs:11 和 12 扩增的 TM PCR 产物 (369bp) 插入到 pET-17b 的 BamHI/XhoI 位点, 得到 T7-TM。

将用一对引物 SEQ ID NOs:13 和 14 扩增的 SU-1 PCR 产物 (591bp) 插入到 pET-3a 的 BamHI 位点, 得到 T7-SU-1。来源于 pET-17b 和 pET-3a 的表达质粒转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株中。

用 T7-CA 转化的大肠杆菌菌株 (BL21-T7-p30) 和用 T7-TM 转化的大肠杆菌菌株 (BL21-T7-p15E) 在 1999 年 11 月 11 日保藏在韩国微生物保藏中心 (保藏号: KCCM-10173, KCCM-10174)。用 T7-SU-1 转化的大肠杆菌菌株 (BL21-T7-gp70) 在 2000 年 11 月 10 日保藏在同一中心 (保藏号: KCCM-10224)。

实施例 2: 在大肠杆菌中表达和纯化 MLV 抗原

用实施例 1 中制备的 MLV Gag 或 Env 表达质粒所转化的大肠杆菌在 1 升 LA 肉汤 (2%细菌用胰蛋白胨, 1%酵母抽提物, 2%氯化钠, 1x 氨苄青霉素) 中, 37℃培养至 OD₆₀₀ 为 0.5。加入异丙基-β-D-硫代吡喃型半乳糖苷(Isopropyl-β-D- thiogalactopyranoid) (IPTG) 至终浓度 1mM 以诱导 Gag 的 CA, Env 的 TM 和 SU-1 的表达。4℃, 5000rpm 离心 10 分钟收获细胞。然后将细胞沉淀重新悬浮到裂解缓冲液 (20mM Tris, 2mM EDTA, 1mM 苯基-甲基磺酰化氟, pH8.0) 中, 冰上放置 20 分钟。超声 5 分钟使细胞裂解, 离心得到上清和沉淀。

用 SDS-PAGE 来鉴定目的抗原是否存在于上清或沉淀中。上清中的抗原不需要进一步的纯化, 但是在沉淀中的抗原根据表达载体用两种方法进行纯化。

对从 pET-17b 中表达的抗原, 将其沉淀溶解在 8M 尿素溶液中, 调节 pH 到 5.6, 上样到用平衡缓冲液 (醋酸钠中的 8M 尿素, pH5.6) 平衡的 Q Sepharose Fastflow 柱 (Amersham Pharmacia, 瑞典) 中。

上样后，用多于 3 倍床体积的平衡缓冲液洗柱。监测洗脱液的光密度后，用梯度从 50mM 到 500mM 的氯化钠纯化目的蛋白。从 pET-3a 中表达的 SU-1 抗原用同样的方案进行纯化，除了：溶液的 pH 调到 pH9.6，用含 8M 尿素的碳酸盐缓冲液（碳酸钠含 8M 尿素，pH9.6）作为平衡缓冲液，及使用 SP Sepharose Fastflow 柱（Amersham Pharmacia，瑞典）进行纯化。

对于从 pMAL-c2 载体中表达的抗原，将其沉淀溶解在直链淀粉树脂平衡缓冲液（20mM Tris-HCl，2mM NaCl，1mM EDTA，10mM 巯基乙醇，pH7.4）中，并加样到用平衡缓冲液平衡的直链淀粉柱（New England Biolabs，美国）中。上样后，用多于 10 倍床体积的平衡缓冲液洗柱。用洗脱缓冲液（在平衡缓冲液中含 10mM 麦芽糖）纯化目的抗原，并在 280nm 监测洗脱液的光密度。用因子 Xa 除去 MBP 标记，并且该产物用于以后的实验中。

通过上述过程得到的抗原纯度用 SDS-PAGE 进行鉴定。在加入 IPTG 前表达的抗原很少，而加入 IPTG 后表达水平增加到总蛋白的 10-20%（见图 4a 和 4b）。使用柱层析对收集的包涵体进行纯化后，检测到的抗原几乎为单一条带，表明其具有高纯度（见图 5）。每个抗原蛋白的表达水平列于表 2 中。

表 2

	CA	TM	SU-1
PMa1-c2	+++++	+++++	
PET-17b	+++++	+++	+
PET-3a			+++++

插入到 pET-17b 上的，通过一对序列为 SEQ ID NOs:13 和 14 的引物扩增的 SU-1 片段（591bp）不用于以后的实验中，因为其表达水平太低，如上表所示。

实施例 3：用 MLV 抗原进行动物免疫

从用 MLV 转染的细胞中获得的病毒上清和通过除去 MBP 标记

来源于 MBP-CA 的 CA 抗原被用来作为动物免疫中的免疫原。用 DO-A2-CAT 质粒通过 3 质粒转染方法(Yuco 等,《核酸研究》,23-24,1995)转染人胚胎肾细胞系(293T 细胞),并且在转染 48 小时后,用 0.45um 的滤膜过滤培养液,制备包含病毒的上清。对 20 只小鼠(5 周龄)的尾静脉用 100uL 病毒上清在两周内注射 4 次。

对 CA 抗原,通过用因子 Xa 处理在实施例 3 中纯化的 MBP-CA 获得 CA 部分。将它按照 1:1 的比例与弗氏完全佐剂(GibcoBTL,美国)混合,以 100ug/ml 的浓度对两只兔(8 周龄)在 4 周内腹腔内注射 3 次。

免疫后从动物心脏采血,以获得抗 MLV 的血清,并且血清与纯化的抗体一起用于 Western 印迹与 ELISA 中。

实施例 4: Western 印迹

用 CA, TM 和 SU-1 抗原与实施例 3 中获得的抗 CA 或 MLV 的抗体通过 Western 印迹分析抗原抗体的相互作用,以检测在实施例 2 中产生的 MLV 抗原是否能有效地与 MLV 抗体反应。在实验中使用的是兔抗 CA 血清和小鼠抗 MLV 血清,因为在人类中 MLV 感染的病例非常稀少。

纯化的抗原用小型凝胶设备(#SE280, Hoefer Pharmacia Biotech, 美国)进行 SDS-PAGE 分离,然后转到硝酸纤维素膜上。将膜在封闭缓冲液(5% 脱脂乳, 0.1% Tween 20, Tris 缓冲盐)中缓慢振荡温育 1 小时,然后与 1:5000 稀释度的兔抗 CA 血清或 1:500 稀释度的小鼠抗 MLV 血清在室温下温育 1 小时。用 TBST 洗膜 3 次,然后与 1:10000 稀释度(在封闭缓冲液中)的连接辣根过氧化物酶(HRP)的羊抗兔或抗小鼠 IgG 抗体温育 30 分钟。接着,用 TBST 洗膜 3 次。然后,加入 1ml ECL 溶液(鲁米诺/增强剂及稳定的过氧化物溶液, Amersham)。然后,将它在室温下温育 1 分钟,在暗室中曝光底片,然后用显影液显示条带。

Western 印迹的结果表明纯化的抗原与抗体特异性地发生相互作用。对 Gag 而言, CA 和 T7-CA 都能与 1:5000 稀释度的兔血清强烈地相互作用。TM 和 SU-1 都不能与兔血清作用(见图 6a)。T7-CA 和

T7-SU-1 都能与小鼠抗 MLV 血清相互作用。SU-1 比 CA 表现出更强的反应性。T7-TM 没有任何相互作用（见图 6b）。

实施例 5: ELISA

病毒感染性的诊断通常是通过 ELISA 进行的。用 ELISA 来确定
5 是否本发明中的抗原具有 RCR 检测的 ELISA 所需的特异性和灵敏度。
将实施例 2 中纯化的抗原在 50mM 碳酸钠缓冲液（pH9.6）中稀释到
终浓度 5ug/ml，然后将 100ul 稀释的抗原加入到 96 孔板的每个孔中，
室温下放置 18 小时。然后，在每个孔中加入 100 ul 含有 0.5%牛血清
白蛋白（BSA）的磷酸盐缓冲液（PBS）（Ph7.2）。室温下温育 1 小时
10 后，将血清样品加入到板中。兔抗 CA 血清和小鼠抗 MLV 血清作为
阳性对照，正常兔或小鼠血清作为阴性对照。100ul 1:1000 和 1:10 稀
释度的每种血清（封闭缓冲液中含 0.25% Tween 20）加入到每个孔中，
在 37℃温箱里温育 1 小时。温育后，用 PBST（在 PBS 中含 0.05%的
Tween 20）洗板 5 次，然后在每个孔中加入 100ul 1:10000 稀释度的 HRP-
15 连接的羊抗兔或抗小鼠 IgG 抗体。板在 37℃温箱里温育 30 分钟，用
PBST（在 PBS 中含 0.05%的 Tween 20）洗板 5 次。然后加入 100ul 四
甲氧基联苯胺（tetramethoxybensidine）（TMB），室温下温育 30 分钟。
加入 100ul 0.5N 的硫酸终止反应。在 450nm 测定吸收值。

本实验中的 ELISA 临界值为高于阴性对照的平均值 0.3 的值。
20 结果以 S/CO（样品 OD/临界值）的形式给出，并且当 S/CO 大于 1 时，
该样品被认为是阳性（表 3）。

表 3

S/CO 值	CA	T7-CA	MBP-TM	T7-TM	T7-SU-1
兔抗- CA	4.72	4.75	0.92	0.50	0.69
小鼠抗- MLV	3.01	3.18	2.18	1.48	3.82

CA 和 T7-CA 对兔抗 CA 血清的 S/CO 高于 4, 并且被认为是阳性的。但是, MBP-TM, T7-TM 和 T7-SU-1 的 S/CO 低于 1, 并且被认为是阴性的。这些结果与 Western 印迹的结果是一致的, 而且表明本发明所用的 CA 抗原具有很高的特异性。该实验中所用蛋白的抗原性是不同的, 因为 CA, T7-CA 和 T7-SU-1 对小鼠抗-MLV 血清的 S/CO 高于 3, 而 MBP-TM 和 T7-TM 的 S/CO 在 1-2 之间。根据这些结果, 用显示高抗原性的 T7-CA 和 T7-SU-1 对 ELISA 的灵敏度进行了评价。

实施例 6: CA 和 SU-1 的 ELISA 灵敏度

实施例 5 的结果表明, T7-CA 和 T7-SU-1 对兔抗-CA 和小鼠抗-MLV 血清具有很高的特异性。由于灵敏度是大量分析中一个很重要的因素, 所以用 ELISA 评估抗原的灵敏度。将 2 倍系列稀释的血清样品加到包被了 T7-CA 和 T7-SU-1 的孔板中, 这些蛋白在前面的实验中表现出良好的反应性, 并且 ELISA 如实施例 5 所述进行操作。兔血清稀释到 1:640000 的最终稀释度, 而小鼠血清稀释到 1:2560 的最终稀释度。最初的小鼠血清在人血清中进行 10 倍稀释, 以模拟人暴露于 MLV 的情况。

抗原的灵敏度以 S/CO 值的形式如图 7 所示; T7-CA 对兔抗 CA 的 S/CO 见图 7a, T7-SU-1 对小鼠抗 MLV 的 S/CO 见图 7b, T7-CA 和 T7-SU-1 对小鼠抗 MLV 的 S/CO 见图 7c。

如图 7a 所示, T7-CA 表现出高灵敏度, 其与高到 1:640000 稀释度的兔抗 CA 血清的 S/CO 仍大于 3, 而与正常兔血清的 S/CO 小于 1 (图 7a)。T7-SU-1 对正常小鼠血清是阴性的, 但对小鼠抗 MLV 血清为阳性的, 并且与高到 1:64 稀释度的 S/CO 仍大于 4 (图 7b)。T7-CA 和 T7-SU-1 与高达 1:64 稀释度和 1:256 稀释度的小鼠抗 MLV 血清的 S/CO 分别大于 3。当两种抗原混合时, 与高达 1:256 稀释度的 S/CO 仍大于 2 (图 7c)。这些结果表明, CA 和 SU-1 抗原具有足够水平的灵敏度和特异性, 可以被用来通过检测接受基因治疗的病人血清中 MLV 抗体, 来检测通过同源重组产生的 RCR。

T7-SU-1 的 S/CO 随稀释度的降低的速率比 T7-CA 慢。因此, 即使 T7-SU-1 作为单独抗原, 其也可以作为有效的抗原来检测抗 MLV

抗体的存在。

实施例 7：应用蛋白芯片进行 FLISA

在应用本发明的抗原进行 RCR 检测时，如使用由自动微阵列布放系统产生的蛋白芯片，则可在短时间内对大量的样品进行分析。为了考察用这种蛋白芯片进行 RCR 检测的可行性，本发明人用 GMS 417 Arrayer™（Genetic MicroSystems，美国）将纯化的抗原固定在载玻片上制成蛋白芯片，并通过 FLISA 评估其反应性。

T7-CA，T7-TM 和 T7-SU-1 以浓度 100 微克/毫升加到 96 孔板上，将板放在微阵列布放系统中。将 10 皮升的每种抗原点到 2.5x7.5 厘米的显微镜载玻片（Sigma，美国）上，包括 4 组，每组由 400 个点组成。用 4 个针孔和环以一种排列模式进行点样，所用的玻片用氨基烷基硅烷进行包被。

将包含样点的载玻片在室温下放置 40 分钟，然后将载玻片浸入到 100%的乙醇中对包被的抗原进行固定。通过乙醇处理，抗原通过其氨基基团与包被在载玻片上氨基烷基硅烷的烷基基团结合而被固定，然后将载玻片进行彻底干燥。

用实施例 5 所述的每种抗原制得的蛋白芯片进行 ELISA。在实验中使用兔抗 CA 血清，小鼠抗 MLV 血清和正常小鼠血清。单独的抗体与每个芯片进行反应，并且点在封口膜(parafilm)上的抗体紧密附着在该载玻片的表面，以一致性地应用抗体。抗原-抗体反应后，用高速荧光扫描仪 GMS 418 Array Scanner（Genetic MicroSystems，GM200）检测荧光，该荧光是由荧光相连的抗-兔或抗-小鼠 IgG 抗体产生的。载玻片的表面用飞点显微镜在 532nm 进行读数，得到的数据用 Imagen™（Genetic MicroSystems，2.0 版本）分析该表达的数据的软件进行分析（见图 8）。

图 8a 所示的为使用兔抗 CA 血清的结果，而图 8b 和 c 为使用小鼠抗 MLV 血清和正常血清的结果。T7-CA 与兔抗-CA 血清和小鼠-抗 MLV 均强烈反应。另一方面，T7-TM 不与兔抗 CA 血清反应，而与小鼠抗 MLV 血清反应。但 T7-TM 与兔血清的反应性低于 T7-CA 的。T7-SU-1 与兔抗 CA 血清显示阴性反应，而与小鼠抗 MLV 血清有强烈

的阳性反应。这些结果与实施例 5 和实施例 6 中的 ELISA 结果是一致的。T7-CA, T7-TM 和 T7-SU-1 不与正常的小鼠血清反应。以上结果清楚地表明本发明的 CA 和 SU-1 抗原既具有高灵敏度, 也具有高度的特异性。

5

<110>	金善荣	
<120>	一种检测接受基因治疗的受治者血清中有复制能力的病毒的方法	
<130>	OPF0068/PCT	
<150>	KR 99-50510	
<151>	1999-11-15	
<160>	14	
<170>	KOPATIN 1.5	
<210>	1	
<211>	768	
<212>	DNA	
<213>	鼠白血病病毒	
<220>		
<221>	CDS	
<222>	(1).. (768)	
<223>	编码部分的Gag 蛋白的DNA, p30 (CA)	
<400>	1	
	gga aac gga cag ctt caa tac tgg cgg ttc tcc tct tct gac ctt tac	48
	Gly Asn Gly Gln Leu Gln Tyr Trp Pro Phe Ser Ser Ser Asp Leu Tyr	
	1 5 10	
	15	
	aac tgg aaa aat aat aac cct tct ttt tct gaa gat cca ggt aaa ctg	96
	Asn Trp Lys Asn Asn Asn Pro Ser Phe Ser Glu Asp Pro Gly Lys Leu	
	20 25	30
	aca gct ctg atc gag tct gtt ctc atc acc cat cag ccc acc tgg gac	144
	Thr Ala Leu Ile Glu Ser Val Leu Ile Thr His Gln Pro Thr Trp Asp	
	35 40	45
	gac tgt cag cag ctg ttg ggg act ctg ctg acc gga gaa gaa aaa caa	192
	Asp Cys Gln Gln Leu Leu Gly Thr Leu Leu Thr Gly Glu Glu Lys Gln	
	50 55	60
	cgg gtg ctc tta gag gct aga aag gcg gtg cgg ggc gat gat ggg cgc	240
	Arg Val Leu Leu Glu Ala Arg Lys Ala Val Arg Gly Asp Asp Gly Arg	

65								70							75	
				80												
ccc act caa ctg ccc aat gaa gtc gat gcc gct ttt ccc ctc gag cgc																288
Pro Thr Gln Leu Pro Asn Glu Val Asp Ala Ala Phe Pro Leu Glu Arg																
						85								90		
				95												
cca gac tgg gat tac acc acc cag gca ggt agg aac cac cta gtc cac																336
Pro Asp Trp Asp Tyr Thr Thr Gln Ala Gly Arg Asn His Leu Val His																
				100						105						110
tat cgc cag ttg ctc cta gcg ggt ctc caa aac gcg ggc aga agc ccc																384
Tyr Arg Gln Leu Leu Leu Ala Gly Leu Gln Asn Ala Gly Arg Ser Pro																
				115						120						125
acc aat ttg gcc aag gta aaa gga ata aca caa ggg ccc aat gag tct																432
Thr Asn Leu Ala Lys Val Lys Gly Ile Thr Gln Gly Pro Asn Glu Ser																
				130						135					140	
ccc tcg gcc ttc cta gag aga ctt aag gaa gcc tat cgc agg tac act																480
Pro Ser Ala Phe Leu Glu Arg Leu Lys Glu Ala Tyr Arg Arg Tyr Thr																
				145						150					155	
																160
cct tat gac cct gag gac cca ggg caa gaa act aat gtg tct atg tct																528
Pro Tyr Asp Pro Glu Asp Pro Gly Gln Glu Thr Asn Val Ser Met Ser																
										165					170	
				175												
ttc att tgg cag tct gcc cca gac att ggg aga aag tta gag agg tta																576
Phe Ile Trp Gln Ser Ala Pro Asp Ile Gly Arg Lys Leu Glu Arg Leu																
				180											185	
																190
gaa gat tta aaa aac aag acg ctt gga gat ttg gtt aga gag gca gaa																624
Glu Asp Leu Lys Asn Lys Thr Leu Gly Asp Leu Val Arg Glu Ala Glu																
				195						200						205
aag atc ttt aat aaa cga gaa acc ccg gaa gaa aga gag gaa cgt atc																672
Lys Ile Phe Asn Lys Arg Glu Thr Pro Glu Glu Arg Glu Glu Arg Ile																
				210						215						220
agg aga gaa aca gag gaa aaa gaa gaa cgc cgt agg aca gag gat gag																720

Arg Arg Glu Thr Glu Glu Lys Glu Glu Arg Arg Arg Thr Glu Asp Glu
 225 230 235
 240
 cag aaa gag aaa gaa aga gat cgt agg aga cat aga gag atg agc taa 768
 Gln Lys Glu Lys Glu Arg Asp Arg Arg Arg His Arg Glu Met Ser ***
 245 250
 255
 <210> 2
 <211> 255
 <212> PRT
 <213> 鼠白血病病毒
 <400> 2
 Gly Asn Gly Gln Leu Gln Tyr Trp Pro Phe Ser Ser Ser Asp Leu Tyr
 1 5 10
 15
 Asn Trp Lys Asn Asn Asn Pro Ser Phe Ser Glu Asp Pro Gly Lys Leu 30
 20 25
 Thr Ala Leu Ile Glu Ser Val Leu Ile Thr His Gln Pro Thr Trp Asp 45
 35 40
 Asp Cys Gln Gln Leu Leu Gly Thr Leu Leu Thr Gly Glu Glu Lys Gln 60
 50 55
 Arg Val Leu Leu Glu Ala Arg Lys Ala Val Arg Gly Asp Asp Gly Arg 75
 65 70
 80
 Pro Thr Gln Leu Pro Asn Glu Val Asp Ala Ala Phe Pro Leu Glu Arg
 85 90
 95
 Pro Asp Trp Asp Tyr Thr Thr Gln Ala Gly Arg Asn His Leu Val His 110
 100 105
 Tyr Arg Gln Leu Leu Leu Ala Gly Leu Gln Asn Ala Gly Arg Ser Pro 125
 115 120

Thr Asn Leu Ala Lys Val Lys Gly Ile Thr Gln Gly Pro Asn Glu Ser
 130 135 140

Pro Ser Ala Phe Leu Glu Arg Leu Lys Glu Ala Tyr Arg Arg Tyr Thr
 145 150 155

160

Pro Tyr Asp Pro Glu Asp Pro Gly Gln Glu Thr Asn Val Ser Met Ser
 165 170

175

Phe Ile Trp Gln Ser Ala Pro Asp Ile Gly Arg Lys Leu Glu Arg Leu
 180 185

190

Glu Asp Leu Lys Asn Lys Thr Leu Gly Asp Leu Val Arg Glu Ala Glu
 195 200 205

Lys Ile Phe Asn Lys Arg Glu Thr Pro Glu Glu Arg Glu Glu Arg Ile
 210 215 220

Arg Arg Glu Thr Glu Glu Lys Glu Glu Arg Arg Arg Thr Glu Asp Glu
 225 230 235

240

Gln Lys Glu Lys Glu Arg Asp Arg Arg Arg His Arg Glu Met Ser ***
 245 250

255

<210> 3
 <211> 396
 <212> DNA
 <213> 鼠白血病病毒

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (396)
 <223> 编码部分的Env 蛋白的DNA , p15E (TM)

<400> 3

gaa ccg gtg tcg tta acc ctg gcc cta tta ttg ggt gga cta acc atg
 Glu Pro Val Ser Leu Thr Leu Ala Leu Leu Leu Gly Gly Leu Thr Met
 1 5 10

15

48

ggg gga att gcc gct gga ata gga aca ggg act act gct cta atg gcc	96
Gly Gly Ile Ala Ala Gly Ile Gly Thr Gly Thr Thr Ala Leu Met Ala	
20 25	30
act cag caa ttc cag cag ctc caa gcc gca gta cag gat gat ctc agg	144
Thr Gln Gln Phe Gln Gln Leu Gln Ala Ala Val Gln Asp Asp Leu Arg	
35 40	45
gag gtt gaa aaa tca atc tct aac cta gaa aag tct ctc act tcc ctg	192
Glu Val Glu Lys Ser Ile Ser Asn Leu Glu Lys Ser Leu Thr Ser Leu	
50 55	60
tct gaa gtt gtc cta cag aat cga agg ggc cta gac ttg tta ttt cta	240
Ser Glu Val Val Leu Gln Asn Arg Arg Gly Leu Asp Leu Leu Phe Leu	
65 70 75	
80	
aaa gaa gga ggg ctg tgt gct gct cta aaa gaa gaa tgt tgc ttc tat	288
Lys Glu Gly Gly Leu Cys Ala Ala Leu Lys Glu Glu Cys Cys Phe Tyr	
85 90	95
gcg gac cac aca gga cta gtg aga gac agc atg gcc aaa ttg aga gag	336
Ala Asp His Thr Gly Leu Val Arg Asp Ser Met Ala Lys Leu Arg Glu	
100 105	110
agg ctt aat cag aga cag aaa ctg ttt gag tca act caa gga tgg ttt	384
Arg Leu Asn Gln Arg Gln Lys Leu Phe Glu Ser Thr Gln Gly Trp Phe	
115 120	125
gag gga ctg taa	
396	
Glu Gly Leu ***	
130	
<210> 4	
<211> 131	
<212> PRT	
<213>鼠白血病病毒	
<400> 4	
Glu Pro Val Ser Leu Thr Leu Ala Leu Leu Leu Gly Gly Leu Thr Met	

1	15	5	10	
Gly Gly Ile Ala Ala Gly Ile Gly Thr Gly Thr Thr Ala Leu Met Ala				
20			25	
30				
Thr Gln Gln Phe Gln Gln Leu Gln Ala Ala Val Gln Asp Asp Leu Arg				
35		40		45
Glu Val Glu Lys Ser Ile Ser Asn Leu Glu Lys Ser Leu Thr Ser Leu				
50		55		60
Ser Glu Val Val Leu Gln Asn Arg Arg Gly Leu Asp Leu Leu Phe Leu				
65		70		75
80				
Lys Glu Gly Gly Leu Cys Ala Ala Leu Lys Glu Glu Cys Cys Phe Tyr				
85		90		95
Ala Asp His Thr Gly Leu Val Arg Asp Ser Met Ala Lys Leu Arg Glu				
100		105		
110				
Arg Leu Asn Gln Arg Gln Lys Leu Phe Glu Ser Thr Gln Gly Trp Phe				
115		120		125
Glu Gly Leu ***				
130				
<210>	5			
<211>	591			
<212>	DNA			
<213>	鼠白血病病毒			
<220>				
<221>	CDS			
<222>	(1).. (591)			
<223>	编码部分的Env 蛋白的DNA, gp70 (SU-1)			
<400>	5			
agc ccc cat cag gtc ttt aat gta acc tgg aga gtc acc aac ctg atg				48
Ser Pro His Gln Val Phe Asn Val Thr Trp Arg Val Thr Asn Leu Met				
1	5		10	

15		
act ggg cgt acc gcc aat gcc acc tcc ctc ctg gga act gta caa gat	96	
Thr Gly Arg Thr Ala Asn Ala Thr Ser Leu Leu Gly Thr Val Gln Asp		
20	25	30
gcc ttc cca aaa tta tat ttt gat cta tgt gat ctg gtc gga gag gag	144	
Ala Phe Pro Lys Leu Tyr Phe Asp Leu Cys Asp Leu Val Gly Glu Glu		
35	40	45
tgg gac cct tca gac cag gaa ccg tat gtc ggg tat ggc tgc aag tac	192	
Trp Asp Pro Ser Asp Gln Glu Pro Tyr Val Gly Tyr Gly Cys Lys Tyr		
50	55	60
ccc gca ggg aga cag cgg acc cgg act ttt gac ttt tac gtg tgc cct	240	
Pro Ala Gly Arg Gln Arg Thr Arg Thr Phe Asp Phe Tyr Val Cys Pro		
65	70	75
80		
ggg cat acc gta aag tcg ggg tgt ggg gga cca gga gag ggc tac tgt	288	
Gly His Thr Val Lys Ser Gly Cys Gly Gly Pro Gly Glu Gly Tyr Cys		
85	90	
95		
ggt aaa tgg ggg tgt gaa acc acc gga cag gct tac tgg aag ccc aca	336	
Gly Lys Trp Gly Cys Glu Thr Thr Gly Gln Ala Tyr Trp Lys Pro Thr		
100	105	110
tca tcg tgg gac cta atc tcc ctt aag cgc ggt aac acc ccc tgg gac	384	
Ser Ser Trp Asp Leu Ile Ser Leu Lys Arg Gly Asn Thr Pro Trp Asp		
115	120	125
acg gga tgc tct aaa gtt gcc tgt ggc ccc tgc tac gac ctc tcc aaa	432	
Thr Gly Cys Ser Lys Val Ala Cys Gly Pro Cys Tyr Asp Leu Ser Lys		
130	135	140
gta tcc aat tcc ttc caa ggg gct act cga ggg ggc aga tgc aac cct	480	
Val Ser Asn Ser Phe Gln Gly Ala Thr Arg Gly Gly Arg Cys Asn Pro		
145	150	155
160		
cta gtc cta gaa ttc act gat gca gga aaa aag gct aac tgg gac ggg	528	

Leu Val Leu Glu Phe Thr Asp Ala Gly Lys Lys Ala Asn Trp Asp Gly
 165 170 175

ccc aaa tgc tgg gga ctg aga ctg tac cgg aca gga aca gat cct att 576
 Pro Lys Ser Trp Gly Leu Arg Leu Tyr Arg Thr Gly Thr Asp Pro Ile
 180 185 190

acc atg ttc tcc ctg
 591
 Thr Met Phe Ser Leu
 195

<210> 6
 <211> 197
 <212> PRT
 <213> 鼠白血病毒

<400> 6
 Ser Pro His Gln Val Phe Asn Val Thr Trp Arg Val Thr Asn Leu Met
 1 5 10
 15

Thr Gly Arg Thr Ala Asn Ala Thr Ser Leu Leu Gly Thr Val Gln Asp
 20 25
 30

Ala Phe Pro Lys Leu Tyr Phe Asp Leu Cys Asp Leu Val Gly Glu Glu
 35 40 45

Trp Asp Pro Ser Asp Gln Glu Pro Tyr Val Gly Tyr Gly Cys Lys Tyr
 50 55 60

Pro Ala Gly Arg Gln Arg Thr Arg Thr Phe Asp Phe Tyr Val Cys Pro
 65 70 75
 80

Gly His Thr Val Lys Ser Gly Cys Gly Gly Pro Gly Glu Gly Tyr Cys
 85 90 9

5

Gly Lys Trp Gly Cys Glu Thr Thr Gly Gln Ala Tyr Trp Lys Pro Thr
 100 105 110

Ser Ser Trp Asp Leu Ile Ser Leu Lys Arg Gly Asn Thr Pro Trp Asp

115	120	125
Thr Gly Cys Ser Lys Val Ala Cys Gly Pro Cys Tyr Asp Leu Ser Lys 130	135	140
Val Ser Asn Ser Phe Gln Gly Ala Thr Arg Gly Gly Arg Cys Asn Pro 145	150	155
160		
Leu Val Leu Glu Phe Thr Asp Ala Gly Lys Lys Ala Asn Trp Asp Gly 165	170	
175		
Pro Lys Ser Trp Gly Leu Arg Leu Tyr Arg Thr Gly Thr Asp Pro Ile 180	185	190
Thr Met Phe Ser Leu 195		
<210> 7		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> CA的 PCR的EcoRI-标记的 5' 引物		
<400> 7		
gaattcggaa acggacagct t		21
<210> 8		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> CA的 PCR的 BamHI-标记的 5' 引物		
<400> 8		
ggatccgttc tcctcttct		19
<210> 9		
<211> 26		

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	CA的 PCR的SalI-标记的3' 引物	
<400>	9	
	gtcgacttag ctcatctctc tctatg	26
<210>	10	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	TM的 PCR的 EcoRI-标记的 5' 引物	
<400>	10	
	gaattcgaac cgggtgctgtt aacc	24
<210>	11	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	TM的 PCR的BamHI-标记的 5' 引物	
<400>	11	
	ggatccgcta ttattgggtg ga	22
<210>	12	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	TM的 PCR的SalI-标记的3' 引物	
<400>	12	
	gtcgacttac agtccctcaa acca	24
<210>	13	
<211>	24	
<212>	DNA	

<213> 人工序列

<220>

<223> SU-1的PCR 的BamHI-标记的5' 引物

<400> 13

ggatccagcc cccatcaggt cttt

2

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> SU-1的PCR 的BamHI-标记的3' 引物

<400> 14

ggatccttac agggagaaca tggt

24

13

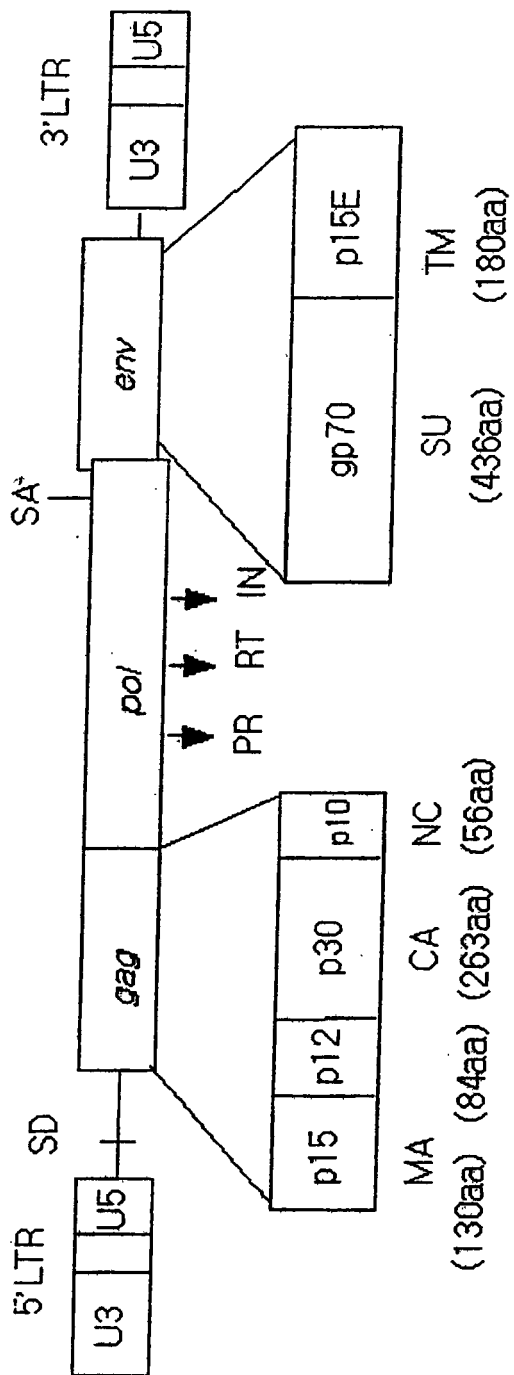


图 1

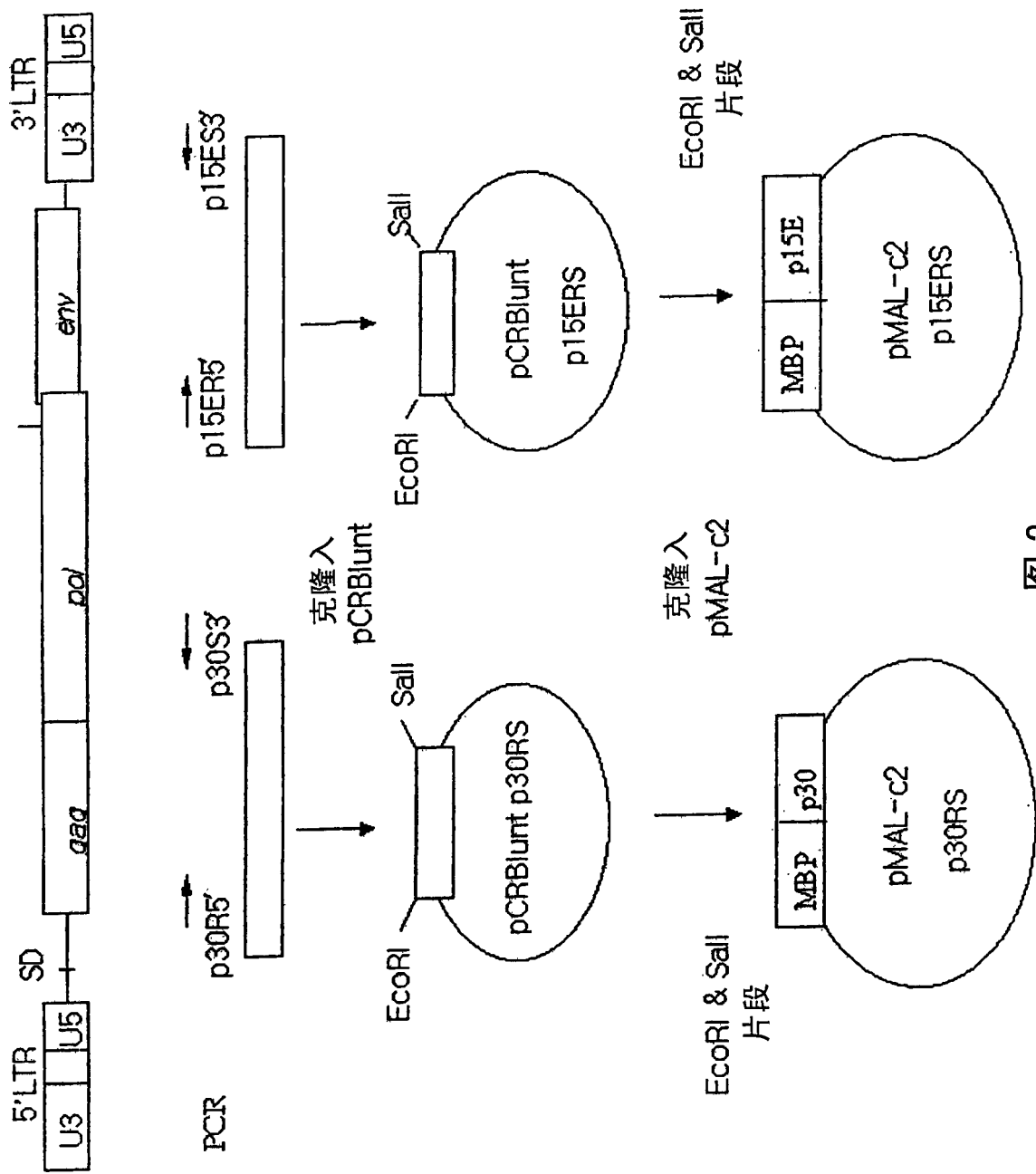
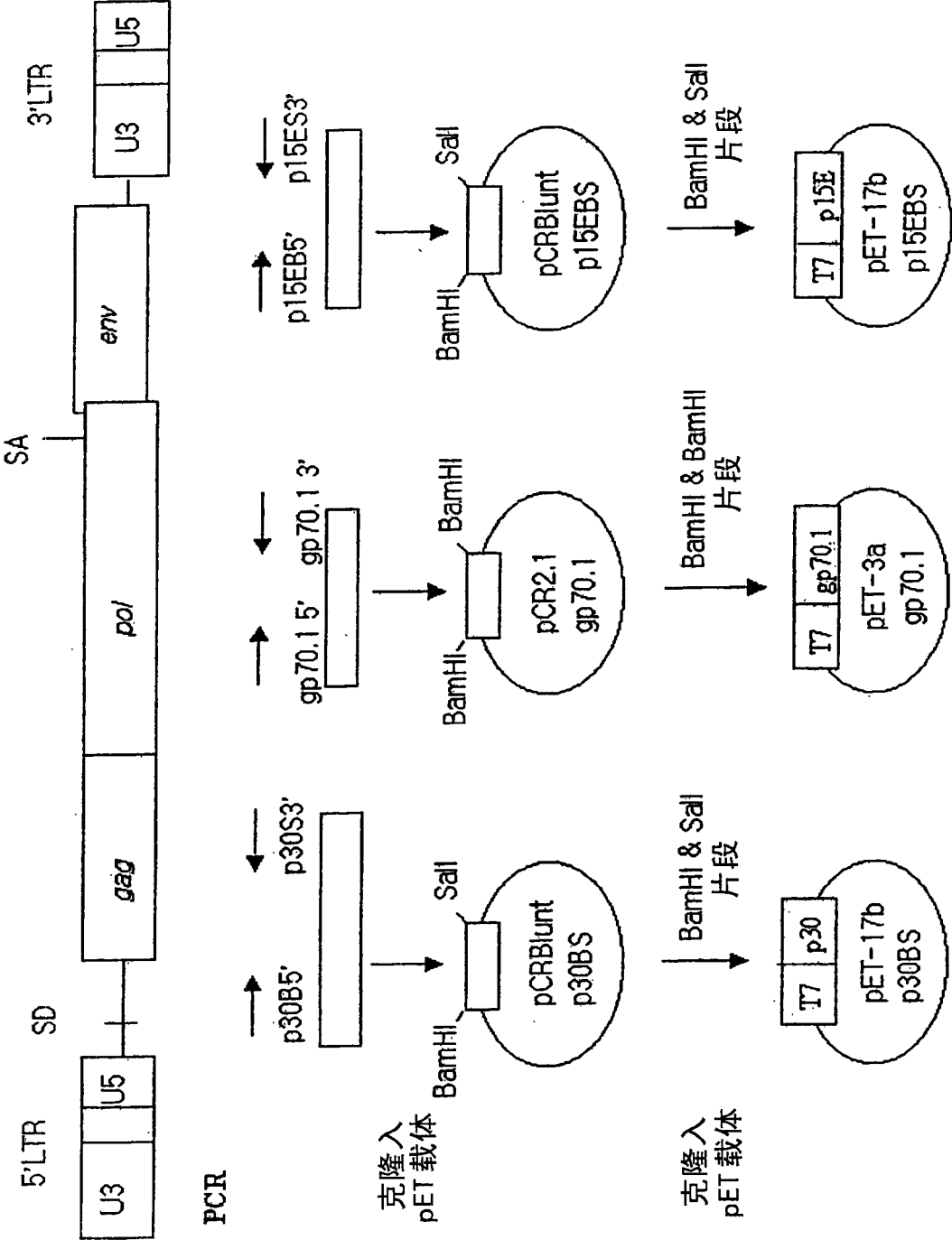


图 2



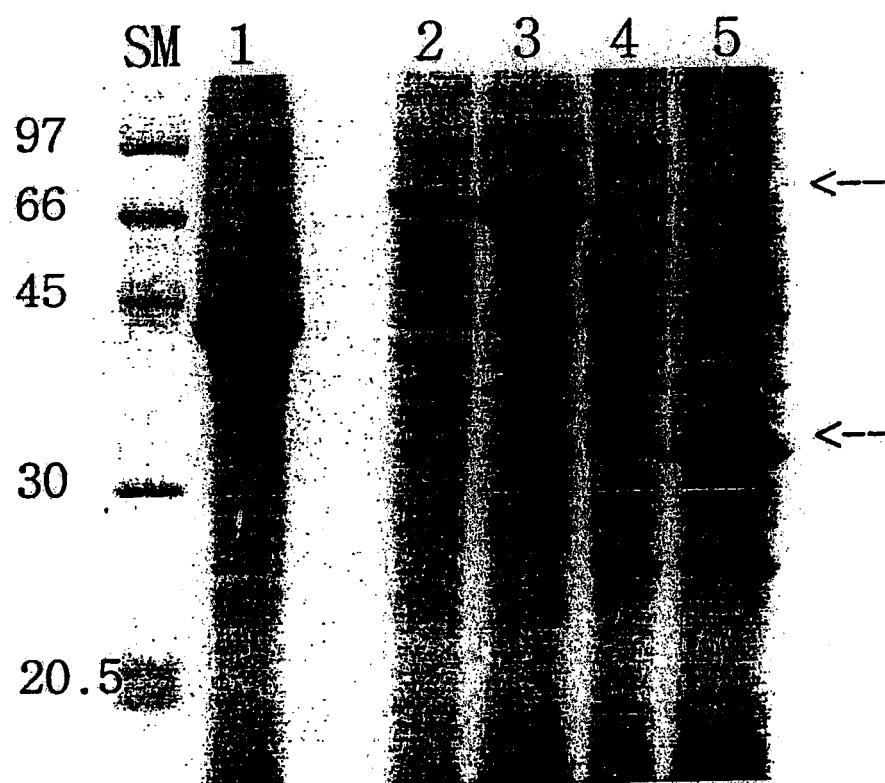


图 4a

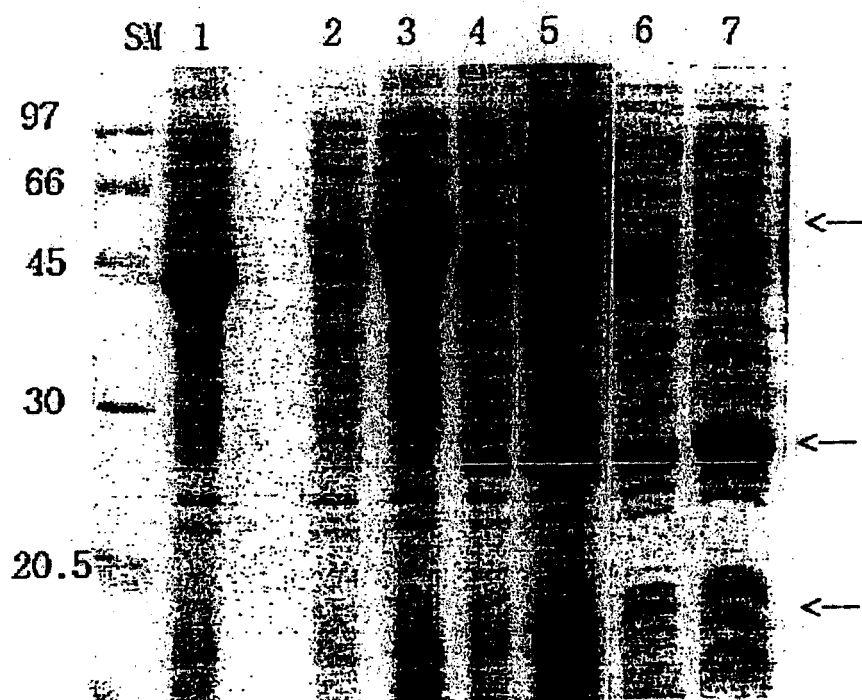


图 4b

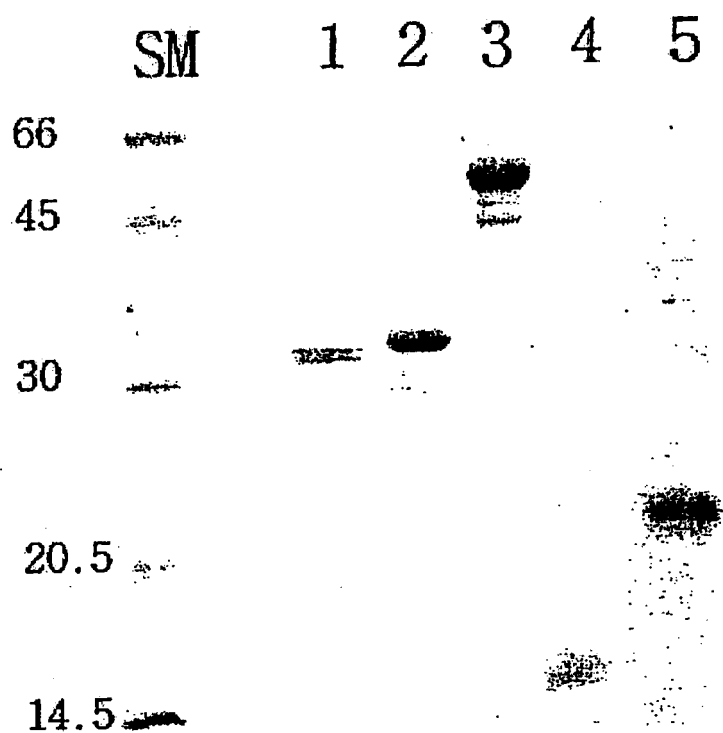


图 5

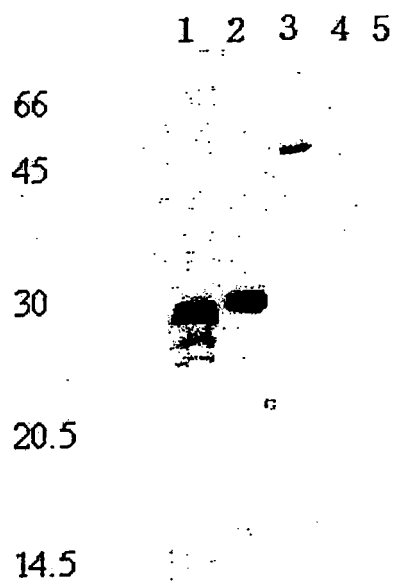


图 6a

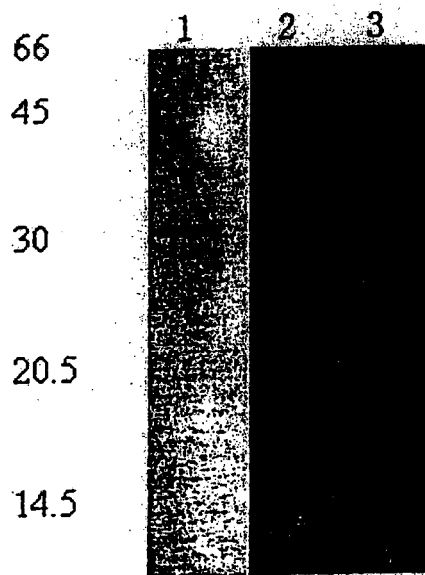


图 6b

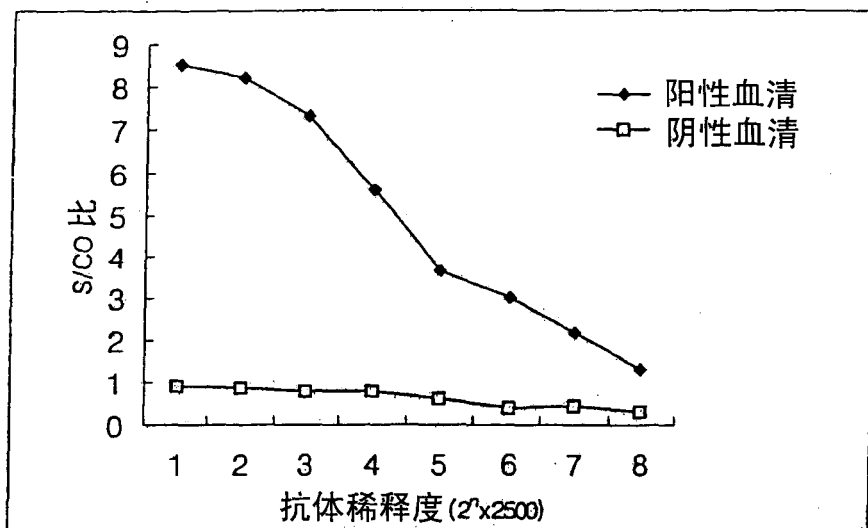


图 7a

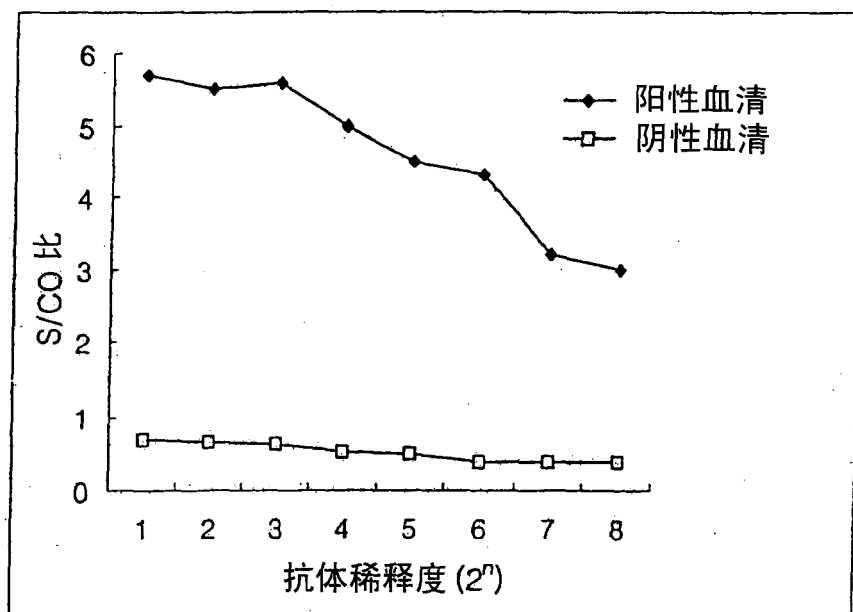


图 7b

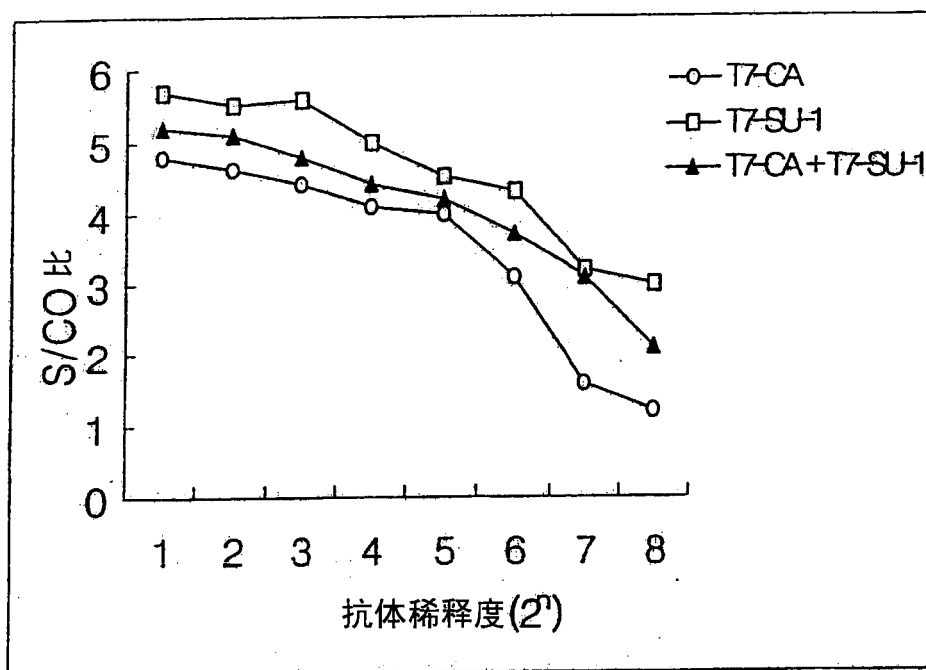


图 7c

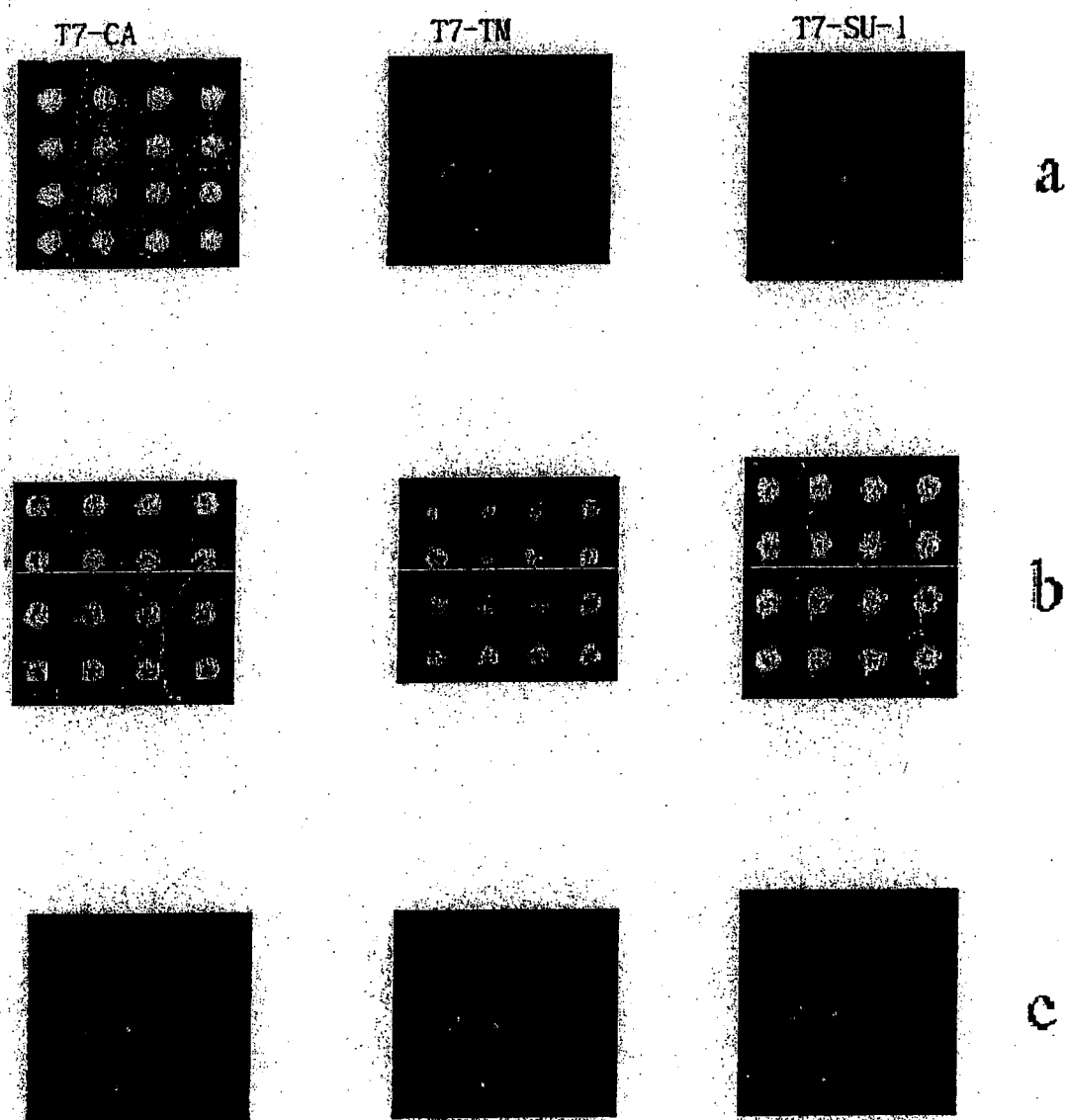


图 8

专利名称(译)	一种检测接受基因治疗的受治者血清中有复制能力的病毒的方法		
公开(公告)号	CN1411513A	公开(公告)日	2003-04-16
申请号	CN00817358.3	申请日	2000-11-15
[标]发明人	金善荣 朴银珍 罗英顺 柳承信		
发明人	金善荣 朴银珍 罗英顺 柳承信		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/10 C12N15/09 C12Q1/70 G01N33/569		
CPC分类号	C07K16/1036		
代理人(译)	李悦		
优先权	1019990050510 1999-11-15 KR		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种检测接受基因治疗的受治者血清中是否存在有复制能力的病毒的方法，该方法包括用特异性抗原检测血清中的抗逆转录病毒的抗体的步骤。该抗原的基因不存在于用于基因治疗的病毒载体中，而仅存在于该病毒载体来源的病毒基因组中，并且该抗原优选地选自鼠白血病病毒的部分的Gag和部分的Env蛋白。同时还提供了其氨基酸序列包括SEQ ID NO：2或SEQ ID NO：6的序列的抗原，由于其特异性和灵敏度，它们在基于免疫反应的RCR检测中用处很大。

