



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108918893 A

(43)申请公布日 2018. 11. 30

(21)申请号 201810954016.4

(22)申请日 2018.08.21

(71)申请人 苏州华益美生物科技有限公司

地址 215421 江苏省苏州市太仓市沙溪镇
生物医药产业园灵溪路31号

(72)发明人 李振勇 郜迎晨 牛莉娜 张文艳
张鑫

(74)专利代理机构 北京万科园知识产权代理有
限责任公司 11230

代理人 张亚军 夏新

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

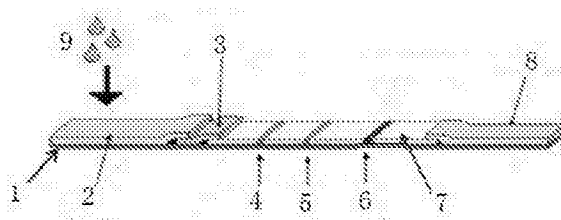
权利要求书1页 说明书11页 附图1页

(54)发明名称

流行性出血热病毒抗体快速检测测试卡及其应用

(57)摘要

本发明提供了流行性出血热病毒人抗体快速检测测试卡,其包括底板、样品垫、硝酸纤维素膜和吸水垫以及荧光微球垫,其中,荧光微球垫吸附流行性出血热病毒抗原标记的荧光微球和质控蛋白标记的荧光微球,硝酸纤维素膜上依次吸附抗人IgG抗体、抗人IgM抗体和抗所述质控蛋白的抗体。另外,本发明还提供了该测试卡的制备方法和快速检测流行性出血热病毒人抗体的应用等。



1. 流行性出血热病毒人抗体快速检测测试卡,其包括底板(1)和依次贴合在底板上的样品垫(2)、硝酸纤维素膜(7)和吸水垫(8),硝酸纤维素膜(7)与吸水垫(8)连接,其特征在于,样品垫(2)与硝酸纤维素膜(7)之间连接有贴合在底板上的荧光微球垫(3),其中,荧光微球垫(3)吸附流行性出血热病毒抗原标记的荧光微球和质控蛋白标记的荧光微球,硝酸纤维素膜(7)上在样品垫(2)至吸水垫(8)的方向上有依次吸附抗人IgG抗体、抗人IgM抗体和抗所述质控蛋白的抗体的三条分离的垂直于样品垫(2)至吸水垫(8)的方向的线。

2. 前述任一项权利要求所述的测试卡,其中,所述流行性出血热病毒抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

3. 前述任一项权利要求所述的测试卡,其中,所述荧光微球是在波长480nm处有吸收峰的带有羧基基团荧光微球。

4. 前述任一项权利要求所述的测试卡,其中,所述标记的荧光微球通过如下方法制备:将所述荧光微球与EDC振荡混合后,用PBS缓冲液洗涤,再加入所述流行性出血热病毒抗原或质控蛋白,振荡混合,然后加入含甘氨酸和B SA的PBS缓冲液振荡封闭,最后用含B SA和Proclin300的PBS缓冲液洗涤并稀释。

5. 前述任一项权利要求所述的测试卡,其中,所述抗人IgG抗体的抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示;和/或,所述抗人IgM抗体的抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。

6. 前述任一项权利要求所述的测试卡,其中,质控蛋白是来自兔的蛋白质,优选是兔IgG。

7. 制备前述任一项权利要求所述的测试卡的方法,其包括:

(a) 制备所述流行性出血热病毒抗原标记的荧光微球和所述质控蛋白标记的荧光微球,然后混合吸附于荧光微球垫(3)上;

(b) 将所述抗人IgG抗体、所述抗人IgM抗体和所述抗所述质控蛋白的抗体分别划线于硝酸纤维素膜(7)上;和,

(c) 将步骤(a)获得的荧光微球垫(3)和步骤(b)获得的硝酸纤维素膜(7)同底板(1)、样品垫(2)和吸水垫(8)组装成所述测试卡。

8. 权利要求1-6之任一项所述的测试卡在制备快速检测流行性出血热病毒人抗体的检测产品中的应用。

9. 权利要求8所述的应用,其中,所述快速是加样后5-10分钟,优选5-8分钟,更优选5-6分钟。

10. 氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示的流行性出血热病毒抗原在制备流行性出血热病毒抗体的检测产品中的应用。

流行性出血热病毒抗体快速检测测试卡及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测技术领域,具体涉及快速检测流行性出血热病毒抗体(包括IgG、IgM)的测试卡及其应用等。

背景技术

[0002] 流行性出血热(epidemic hemorrhagic fever,EHF)是病毒引起的自然疫源性疾病。1982年世界卫生组织(WHO)定名为肾综合征出血热(hemorrhagic fever with renal syndromes,HFRS)。是以发热、出血倾向及肾脏损害为主要临床特征的急性病毒性传染病。本病主要分布于欧亚大陆,但HFRS病毒的传播几乎遍及世界各大洲。

[0003] 流行性出血热的诊断方法为从血清中检测病毒抗原、抗出血热病毒IgG和IgM抗体、病毒RNA等,均作为诊断的依据。人体感染流行性出血热病毒2~3天就可检测到EHF-IgM抗体,7~10天达到高峰,发病2周后出现IgG抗体,可持续数年,单份血清IgM抗体阳性即可诊断;检测急性期和恢复期双份血清IgG抗体,滴度增高4倍以上者也可诊断。目前实验室检测流行性出血热病毒的方法主要有:酶联免疫吸附试验(ELISA)、间接免疫荧光试验(IFA)、逆转录聚合酶链反应法(RT-PCR)、病毒分离法等。市面上销售的检测流行性出血热病毒IgM抗体的试剂盒以酶联免疫吸附试验为主,主要有捕获法等,但是其检测耗时。

[0004] 中国专利申请CN1963516A公开了一种流行性出血热病毒抗体胶体金快速检测测试纸条;中国专利申请CN1267831A公开了一种肾综合征出血热检测方法及检测试剂盒,也是基于胶体金技术;中国专利申请CN105785000A公开了一种快速检测流行性出血热病毒IgM抗体的试剂盒,也是基于胶体金技术;中国专利申请CN103033616A公开了一种肾综合征出血热病毒IgM抗体检测方法及试剂盒,也是基于胶体金技术。然而,本发明人发现,基于胶体金的检测准确性不够,容易出现假阳性和假阴性结果,尤其是假阴性结果非常影响实际推广,以至于尽管专利众多,但是市面上几乎没有销售。

[0005] 中国专利申请CN103063841A公开了一种流行性出血热病毒IgM抗体酶联免疫检测试剂盒及其制备和使用方法。然而,本发明人发现,尽管酶联免疫检测准确性佳,但是不够简便,而且耗时长。

[0006] 为此,本发明人在胶体金检测的基础上,开发了新的流行性出血热病毒IgG、IgM的试剂盒,其不但保持了胶体金检测的快速、简便的特点,而且大幅提高检测的准确性,尤其是避免了假阴性结果,特别适合用于流行性出血热的初筛。

发明内容

[0007] 本发明所要解决的技术问题是提供一种流行性出血热病毒人抗体快速检测测试卡,其能进行快速检测,便于野外现场检测和床边检测等初筛,同时具有高度的准确性,尤其是避免假阴性结果,适合推广使用。另外,本发明还提供了该测试卡的制备方法和应用等。

[0008] 具体而言,在第一方面,本发明提供了流行性出血热病毒人抗体快速检测测试卡,

其包括底板(1)和依次贴合在底板上的样品垫(2)、硝酸纤维素膜(7)和吸水垫(8),硝酸纤维素膜(7)与吸水垫(8)连接,其中,样品垫(2)与硝酸纤维素膜(7)之间连接有贴合在底板上的荧光微球垫(3),其中,荧光微球垫(3)吸附流行性出血热病毒抗原标记的荧光微球和质控蛋白标记的荧光微球,硝酸纤维素膜(7)上在样品垫(2)至吸水垫(8)的方向上有依次吸附抗人IgG抗体、抗人IgM抗体和抗所述质控蛋白的抗体的三条分离的垂直于样品垫(2)至吸水垫(8)的方向的线。

[0009] 优选在本发明第一方面的测试卡中,所述流行性出血热病毒抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。该抗原是本发明人从大量流行性出血热病毒的蛋白上研发出来的,配合本发明的抗人IgG抗体和抗人IgM抗体,对本发明第一方面的测试卡的高准确性起了关键作用。所以,也优选在本发明第一方面的测试卡中,所述抗人IgG抗体的抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示;和/或,所述抗人IgM抗体的抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。

[0010] 荧光微球已经大量商品化,然而本发明人发现,它们用于本发明中的效果参差不齐,经研究发现,波长480nm处有吸收峰的带有羧基基团荧光微球(如购自Ocean Nanotech的)特别适合用于本发明中。所以,优选在本发明第一方面的测试卡中,所述荧光微球是在波长480nm处有吸收峰的带有羧基基团荧光微球。

[0011] 优选在本发明第一方面的测试卡中,所述标记的荧光微球通过如下方法制备:将所述荧光微球与EDC振荡混合后,用PBS缓冲液洗涤,再加入所述流行性出血热病毒抗原或质控蛋白,振荡混合,然后加入含甘氨酸和B SA的PBS缓冲液振荡封闭,最后用含B SA和Proclin300的PBS缓冲液洗涤并稀释。通过上述方法可以分别制备所述流行性出血热病毒抗原标记的荧光微球和所述质控蛋白标记的荧光微球。

[0012] 质控蛋白对本发明的效果影响较小,可以使用常规的质控蛋白及其对应的抗体,如来自非人动物的蛋白质及其抗体。优选在本发明第一方面的测试卡中,质控蛋白是来自兔的蛋白质;相应抗体优选是抗所述来自兔的蛋白质的抗体。在本发明的具体实施方式中,质控蛋白是兔IgG;相应抗体是抗兔IgG的抗体(简称抗兔抗体)。

[0013] 在第二方面,本发明提供了制备本发明第一方面的测试卡的方法,其包括:

[0014] (a) 制备所述流行性出血热病毒抗原标记的荧光微球和所述质控蛋白标记的荧光微球,然后混合吸附于荧光微球垫(3)上;

[0015] (b) 将所述抗人IgG抗体、所述抗人IgM抗体和所述抗所述质控蛋白的抗体分别划线于硝酸纤维素膜(7)上;和,

[0016] (c) 将步骤(a)获得的荧光微球垫(3)和步骤(b)获得的硝酸纤维素膜(7)同底板(1)、样品垫(2)和吸水垫(8)组装成所述测试卡。

[0017] 其中,制备所述流行性出血热病毒抗原标记的荧光微球和所述质控蛋白标记的荧光微球的方法可以是如下方法:

[0018] 将所述荧光微球与EDC振荡混合后,用PBS缓冲液洗涤,再加入所述流行性出血热病毒抗原或质控蛋白,振荡混合,然后加入含甘氨酸和B SA的PBS缓冲液振荡封闭,最后用含B SA和Proclin300的PBS缓冲液洗涤并稀释。通过上述方法可以分别制备所述流行性出血热病毒抗原标记的荧光微球和所述质控蛋白标记的荧光微球。

[0019] 在第三方面,本发明提供了本发明第一方面的测试卡在制备快速检测流行性出血热病毒人抗体的检测产品中的应用。

[0020] 本发明第一方面的测试卡在加样5分钟后即可用荧光仪实时读出各线的荧光值并得出结果,即本发明可以在5分钟后快速得出检测结果。优选在本发明第三方面的应用中,所述快速是加样后5-10分钟,优选5-8分钟,更优选5-6分钟。

[0021] 在第另一方面,本发明提供了氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示的流行性出血热病毒抗原在制备流行性出血热病毒抗体的检测产品中的应用。

[0022] 该方面的应用可以是氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示的流行性出血热病毒抗原的单独应用,也可以是其与针对氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示的抗原的抗人IgG抗体的和/或针对氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示的抗原的抗人IgM抗体的联合应用。

[0023] 另外优选在该方面中,所述流行性出血热病毒抗体的检测产品是本发明第一方面的测试卡。

[0024] 本发明的有益效果在于能进行快速检测流行性出血热病毒人抗体,便于野外现场检测和床边检测等初筛,同时具有高度的准确性,尤其是避免假阴性结果,适合推广使用。

[0025] 本发明引用了公开文献,这些文献是为了更清楚地描述本发明,它们的全文内容均纳入本文进行参考,就好像它们的全文已经在本文中重复叙述过一样。

[0026] 为了便于理解,以下将通过具体的实施例和附图对本发明进行详细地描述。需要特别指出的是,这些描述仅仅是示例性的描述,并不构成对本发明范围的限制。依据本说明书的论述,本发明的许多变化、改变对所属领域技术人员来说都是显而易见了。

附图说明

[0027] 图1显示了本发明的EHF快速检测测试卡的结构示意图,其中,附图标记分别表示:1:PVC底板;2:样品垫;3:荧光微球垫;4:抗人IgG抗体测试线;5:抗人IgM抗体测试线;6:抗兔抗体测试线;7:NC膜;8:吸水垫;9:样品。

具体实施方式

[0028] 以下本文将通过具体的实施例来描述发明。如未特别指明之处,可根据本领域技术人员所熟悉的《分子克隆实验指南》(第三版)(Cold Spring Harbor laboratory Press)、《细胞实验指南》(科学出版社,北京,中国,2001年)、《RNA实验技术手册》(科学出版社,北京,中国,2004年)、《免疫检测技术》(科学出版社,北京,中国,1991)等实验手册以及本文所引用的参考文献中所列方法来实施;其中的试剂均可通过商业渠道获得。

[0029] 实施例1流行性出血热病毒抗原、抗人IgG抗体和抗人IgM抗体的确定

[0030] 根据本发明人的设计,从大量的流行性出血热(EHF)病毒的抗原中设计了如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的抗原作为EHF病毒检测抗原;另外,本发明人发现市售的抗人抗体容易与上述检测抗原发生一定的交叉反应,造成检测准确性下降,因此从大量的人IgG和IgM上中筛选出了两个抗原(其氨基酸序列分别如SEQ ID NO:2和3所示),无需完整的人IgG和IgM即可分别制备有效的抗人IgG抗体和抗人IgM抗体,委托北京中杉金桥生物技术有限公司按照常规方法制备了如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的抗原作为人IgG抗原的抗人IgG抗体和如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的抗原作为人IgM抗原的抗人IgM抗体,有效地避免了直接干扰上述EHF病毒检测抗原。

[0031] 实施例2抗人IgG、抗人IgM单抗在硝酸纤维素上划膜

[0032] 用硝酸纤维素膜分别与实施例1制备的抗人IgG抗体和抗人IgM抗体在硝酸纤维素膜(NC膜)进行划膜,具体采用Sartorius(赛多利斯)CN104NC膜,孔径15 μ m,爬行速度150S/4cm。具体划膜过程如下:

[0033] 1) 划膜缓冲液的配制:配制0.01MPBS(磷酸缓冲液),pH7.0,含1%蔗糖,用0.22 μ m进行过滤。

[0034] 2) 取划膜缓冲液,按照一定浓度分别稀释抗人IgG抗体、抗人IgM抗体和抗兔抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司),其中抗人IgG抗体稀释至2.5mg/ml,抗人IgM抗体稀释至1.0mg/ml,抗兔抗体浓度稀释至1.5mg/ml。

[0035] 3) 用划膜仪(可购自杭州峰航科技有限公司)分别在NC膜上划膜,均按照1 μ L/cm速度划膜,抗人IgG抗体在0.8cm处划膜,抗人IgM抗体在1.2cm处划膜,抗兔抗体在1.8cm处划膜,37 $^{\circ}$ C干燥3-4小时,密封保存在1~30 $^{\circ}$ C。

[0036] 实施例3荧光微球的确定及与抗原、抗体的偶联

[0037] 取不同来源的羧基基团荧光微球,用0.01M PBS以1:10稀释;用0.01M PBS调零,在波长400nm~600nm范围内扫描,看是否在波长480nm处有狭窄吸收峰(说明荧光微球粒径均一);用0.01M PBS稀释荧光微球浓度至2mg/ml,在NC膜上点样10 μ l,检测看是否其荧光值 $\geq 10^4$ 。经测试,购自Ocean Nanotech的带有羧基基团荧光微球效果最好,因此选择该荧光微球。具体抗原、抗体偶联的过程如下:

[0038] 1) EHF抗原标记荧光微球:用活化缓冲液(0.05M MES(2-(N-吗啉代)乙磺酸))将荧光微球稀释到1mg/ml,期间用活化缓冲液清洗两次,每次洗涤后进行离心(10000转,30分钟)。将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)与荧光微球按照质量比1:30的比例加入,在25 $^{\circ}$ C振荡30min,用偶联液(0.01M PBS,pH7.4)洗涤2次,按照每毫克微球加入25 μ g蛋白的浓度,加入实施例1的EHF病毒抗原,2-8 $^{\circ}$ C振荡过夜。用额外加入40mM甘氨酸、1% (w/v) BSA的偶联液作为封闭液封闭,25 $^{\circ}$ C振荡60min。用保存液(0.01M PBS中含0.5% (w/v) BSA(牛血清白蛋白),0.5% (v/v) Proclin300(可购自上海闪晶分子生物科技有限公司))洗涤2次。加保存液至浓度为1mg/ml,放置温度2~8 $^{\circ}$ C保存。

[0039] 2) 兔IgG标记荧光微球:用活化缓冲液(0.05M MES)将荧光微球稀释到1mg/ml,期间用活化缓冲液清洗两次,每次洗涤后进行离心(10000转,30分钟)。将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)与荧光微球按照质量比1:20的比例加入,在25 $^{\circ}$ C振荡30min,用偶联液(0.01M PBS,pH7.4)洗涤2次,按照每毫克微球加入10 μ g蛋白的浓度,加入兔IgG(可购自北京中杉金桥生物技术有限公司),2-8 $^{\circ}$ C振荡过夜。用额外加入40mM甘氨酸、1% (w/v) BSA的偶联液作为封闭液封闭,25 $^{\circ}$ C振荡60min。用保存液(0.01M PBS中含0.5% (w/v) BSA,0.5% (v/v) Proclin300)洗涤2次。加保存液至浓度为1mg/ml,放置温度2~8 $^{\circ}$ C保存。

[0040] 3) 将上述EHF抗原、兔IgG标记的荧光微球等体积混合,混合的荧光微球分别加入玻璃纤维上,每毫升荧光微球铺8平方厘米的玻璃纤维垫,37 $^{\circ}$ C干燥4小时。

[0041] 实施例4 EHF快速检测测试卡的组装

[0042] 将实例2、3中制备的NC膜、荧光微球玻璃纤维垫(荧光微球垫)与样品垫、吸水垫等黏贴于背衬上,切条、组装。具体如下:

[0043] 将上述样品垫切成长度30cm和宽度28mm,荧光玻璃纤维垫切成长度30cm和宽度

10mm,反应膜切成长度30cm和宽度25mm,吸水层剪成长度30cm和宽度27mm,然后依次将其贴在衬卡上,组成大板后,切割成长度8cm和宽度4mm的单个人份试纸条,装入测试卡壳中,将每单人份装有干燥剂的密封袋中,存放于室温。制备成的测试卡结构如图1所示。

[0044] 实施例5 EHF检测测试卡的应用

[0045] 检测样品中EHF抗体的检测方法,其具体过程如下:

[0046] 1) 取实施例4制备的测试卡。

[0047] 2) 血清、血浆样本,用0.01MPBS按照1:10稀释,用移液器吸取100 μ L,加于测试卡样品垫中。

[0048] 3) 测试卡加样5分钟后,立即将测试卡插入荧光仪(可购自杭州和迈科技有限公司)插孔中,检测各条带荧光值,其中:

[0049] IgG条带荧光值大于500以上,质控条带荧光值 \geq 1000以上,可判定为EHF病毒IgG阳性;

[0050] IgM条带荧光值大于500以上,质控条带荧光值 \geq 1000以上,可判定为EHF病毒IgM阳性;

[0051] 质控条带荧光值 $<$ 1000时,重复第1)步重新测量。

[0052] 使用上述方法检测临床样本(用包括酶联免疫法和基因检测双重确诊的病例),结果如下表1。

[0053] 表1 EHF检测结果

项目		酶联免疫法和基因检测双重确诊			
		阳性		阴性	
		IgG	IgM	IgG	IgM
本发明	阳性	38	29	1	0
的方法	阴性	0	0	81	100
合计		38	29	82	100

[0056] EHF-IgG:灵敏度符合率 $=38/38=100\%$;特异性符合率 $=81/82=98.78\%$ 。

[0057] 总符合率 $=119/120=99.16\%$ 。

[0058] EHF-IgM:灵敏度符合率 $=29/29=100\%$;特异性符合率 $=100/100=100\%$ 。

[0059] 总符合率 $=129/129=100\%$ 。

[0060] 本发明的流行性出血热病毒IgM、IgG抗体检测测试卡经过临床患者样本检测并与临床的耗时检测方法进行对比,EHF-IgG临床灵敏度100%,临床特异性98.78%,尽管出现了极少假阳性结果,但是没有出现任何假阴性结果,对于快速、简便的初筛来说是非常合适的;EHF-IgM临床灵敏度100%,临床特异性100%。

[0061] 而用基于胶体金的快速检测技术,临床特异性在92~95%之间,尤其是会出现2%左右的假阴性结果,非常影响推广使用。

序列表

- <110> 苏州华益美生物科技有限公司
- <120> 流行性出血热病毒抗体快速检测测试卡及其应用
- <130> CN
- <160> 3
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 173
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> EHF抗原
- <400> 1

[0062]

Gln Thr Thr Lys Asp Asn Lys Gly Thr Arg Ile Arg Phe Lys Asp Asp
1 5 10 15

Ser Ser Phe Glu Asp Val Asn Gly Ile Arg Lys Pro Lys His Leu Tyr
 20 25 30

Val Ser Leu Pro Asn Ala Gln Ser Ser Met Lys Ala Glu Glu Ile Thr
 35 40 45

Pro Arg Tyr Arg Thr Ala Ile Cys Gly Leu Tyr Pro Ala Gln Ile Lys
 50 55 60

Ala Arg Gln Met Ile Ser Pro Val Met Ser Val Ile Gly Phe Leu Gly
65 70 75 80

Ala Leu Ala Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ile Glu Gln Trp Leu Ser Glu

85

90

95

Pro Cys Lys Leu Leu Pro Asp Thr Ala Ala Val Ser Leu His Gly Gly
 100 105 110

Pro Ala Thr Asn Arg Asp Tyr Leu Arg Gln Arg Gln Val Val Ala Leu
 115 120 125

Gly Asn Met Glu Thr Lys Glu Ser Lys Ala Ile Arg Gln His Ala Glu
 130 135 140

Ser Ala Gly Cys Ser Met Ile Glu Asp Ile Glu Ser Pro Ser Ser Ile
 145 150 155 160

Trp Val Phe Ala Gly Pro Asp Arg Cys Pro Pro Thr Cys
 165 170

[0063]

<210> 2

<211> 181

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Pro Gly Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Gly Ser Ile
 35 40 45

Ser Ser Ser Asn Trp Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly
 50 55 60

Leu Glu Trp Ile Gly Glu Leu Ser His Thr Ala Ser Thr Arg Asp Lys
65 70 75 80

Leu Tyr Gln Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Ser Arg
85 90 95

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

Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly
115 120 125

Gln Arg Ser Tyr Ile Trp Gly Ser Tyr Arg Asp Pro Tyr Phe Asp Tyr
130 135 140

[0064] Trp Gly Leu Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
145 150 155 160

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Gly Gly
165 170 175

Thr Ala Ala Leu Gly
180

<210> 3

<211> 452

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn
1 5 10 15

Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp
 20 25 30

Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser
 35 40 45

Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys
 50 55 60

Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln
 65 70 75 80

Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn
 85 90 95

[0065] Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys
 100 105 110

Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg
 115 120 125

Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile
 130 135 140

Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr
 145 150 155 160

Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr
 165 170 175

Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Gly Gln
 180 185 190

Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln
 195 200 205

Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val
 210 215 220

Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr
 225 230 235 240

Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr
 245 250 255

Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn
 260 265 270

[0066] Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala
 275 280 285

Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr
 290 295 300

Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg
 305 310 315 320

Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro
 325 330 335

Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu
 340 345 350

Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg
 355 360 365

Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro
 370 375 380

Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val
 385 390 395 400

Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Ala His
 405 410 415

[0067]

Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr
 420 425 430

Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala
 435 440 445

Gly Thr Cys Tyr
 450

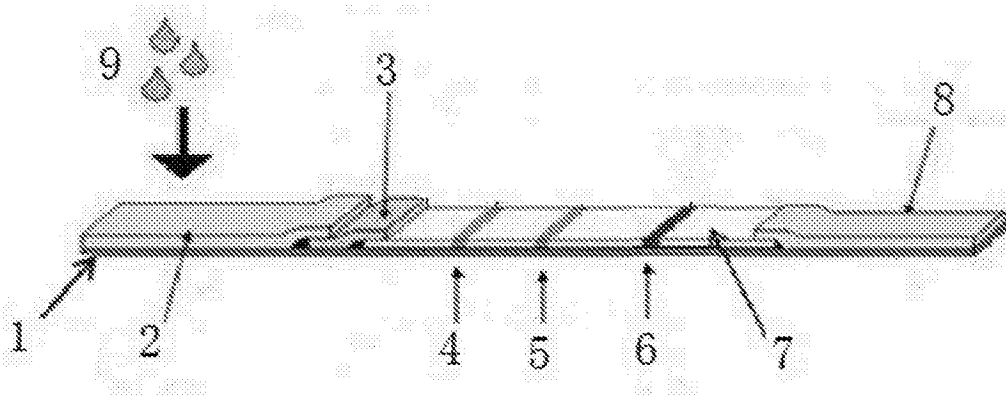


图1