



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109810184 B

(45) 授权公告日 2022. 07. 12

(21) 申请号 201910043667.2

G01N 33/558 (2006.01)

(22) 申请日 2019.01.17

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109810184 A

WO 2016168615 A1, 2016.10.20

WO 2016168615 A1, 2016.10.20

WO 2014151734 A1, 2014.09.25

(43) 申请公布日 2019.05.28

CN 104114572 A, 2014.10.22

(73) 专利权人 武汉明德生物科技股份有限公司
地址 430074 湖北省武汉市高新大道858号
光谷生物医药产业园二期B10栋

US 2018074051 A1, 2018.03.15

Juliane Klehmet等.Neurofascin (NF) 155-and NF186-Specific T Cell Response in a Patient Developing a Central Pontocerebellar Demyelination after 10 Years of CIDP.《Frontiers in Neurology》.2017,第8卷1-4.

(72) 发明人 张崇珍 王颖 郝洪军

审查员 杨啸天

(74) 专利代理机构 武汉智嘉联合知识产权代理
事务所(普通合伙) 42231

专利代理师 黄君军

权利要求书2页 说明书19页
序列表9页 附图1页

(51) Int. Cl.

G07K 14/47 (2006.01)

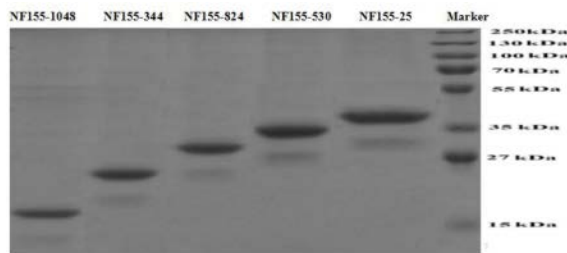
C12N 15/70 (2006.01)

(54) 发明名称

人NF155抗原、人NF155抗体检测试剂盒及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明提供了人NF155抗原、人NF155抗体检测试剂盒及其制备方法与应用。所述人NF155抗原包括SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列,还提供了五种分别含有上述五种人NF155抗原的检测试剂盒,以及一种同时含有上述五种人NF155抗原的检测试剂盒。该人NF155检测试剂盒,检测人血清中的NF155抗体,特异性强,反应灵敏度高,高通量、成本低,能够对慢性炎性脱髓鞘性多发性神经根神经病(CIDP)进行诊断,适于大规模推广应用。



1. 一种人NF155抗原的制备方法,其特征在于,所述人NF155抗原包括以下任意一种片段或者三种片段:

片段1:NF155-25,氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示;

片段4:NF155-824,氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示;

片段5:NF155-1048,氨基酸序列如SEQ ID NO.5所示;

所述人NF155抗原的制备过程包括如下步骤:

步骤1、将NF155-25、NF155-824、NF155-1048的3个片段的DNA序列分别进行基因合成,设计引物PCR扩增后,分别连接进表达载体,构建3个重组表达质粒;

步骤2、将构建好的重组质粒分别转化进入表达菌,构建3个重组表达工程菌;

步骤3、NF155-25、NF155-824、NF155-1048的抗原片段的诱导表达及纯化。

2. 如权利要求1所述人NF155抗原的制备方法,其特征在于,所述步骤1中所述5个片段的引物对分别为:

NF155-25-P1:核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示;

NF155-25-P2:核苷酸序列如SEQ ID NO.7所示;

NF155-824-P1:核苷酸序列如SEQ ID NO.12所示;

NF155-824-P2:核苷酸序列如SEQ ID NO.13所示;

NF155-1048-P1:核苷酸序列如SEQ ID NO.14所示;

NF155-1048-P2:核苷酸序列如SEQ ID NO.15所示。

3. 如权利要求1所述人NF155抗原的制备方法,其特征在于,所述步骤1中PCR扩增的反应体系为:H₂O 38.7ul;Buffer 5ul;dNTP 3ul;上引物1ul;下引物1ul;DNA1ul;Taq E 0.3ul;扩增程序为:94度变性5min;94度变性45sec、57度150sec、72度90sec,32个循环;72度延伸10min。

4. 如权利要求1所述人NF155抗原的制备方法,其特征在于,所述步骤3中诱导表达的具体步骤为:将3个重组菌分别接种于LB培养液中摇菌至OD600至0.6-0.8时,按1:1000加入24mg/ml浓度的IPTG诱导4-6小时;

所述步骤3中诱导表达后的纯化条件是:上样缓冲液:0.5M NaCl、20mM Na₂HPO₃、10mM咪唑;或者上样缓冲液:8M尿素、0.5M NaCl、20mM Na₂HPO₃、10mM咪唑;结合缓冲液:0.5M NaCl、20mM Na₂HPO₃、20mM咪唑;洗脱缓冲液:0.5M NaCl、20mM Na₂HPO₃、500mM咪唑。

5. 一种人NF155抗原的表达载体,其特征在于,所述表达载体为3个,所述3个表达载体的表达区的核苷酸序列分别为:如SEQ ID NO.16、SEQ IDNO.19、SEQ ID NO.20所示。

6. 一种人NF155抗体检测试剂盒,其特征在于,所述检测试剂盒包括:

(A) 包被有权利要求1所述的人NF155抗原的ELISA酶标板;所述的人NF155抗原包括NF155-25、NF155-824、NF155-1048中的任意一种或者三种;

(B) 标准阴性血清:NF155抗体阴性的血清;

(C) 标准阳性血清:NF155抗体阳性的血清;

(D) 辣根过氧化物酶标记的酶标二抗:抗人IGG、IGM和IGA;

(E) 样品稀释液、包被缓冲液、封闭液、ELISA酶标板洗涤液、抗体稀释液、显色液和终止液。

7. 如权利要求6所述的人NF155抗体检测试剂盒,其特征在于,所述人NF155抗原中

NF155-25、NF155-824和NF155-1048的包被浓度分别为200ng/ml、150ng/ml和250ng/ml。

8. 一种人NF155抗体的检测方法,其特征在于,所述的检测方法包括以下步骤:

S1、制备检测ELISA酶标板:包被缓冲液将权利要求1所述的人NF155抗原稀释后加到酶标板中吸附,空干包被用洗液,加包被用封闭液封闭;所述的人NF155抗原包括NF155-25、NF155-824、NF155-1048中的任意一种或者三种;

S2、待检血清、阴性血清、阳性血清分别作为一抗,加样至ELISA酶标板孔中进行孵育;

S3、酶标二抗的孵育:辣根过氧化物酶标记的酶标二抗加入ELISA酶标板,洗涤液洗涤,甩干;

S4、加入显色液,室温避光孵育,加入终止液终止反应;在酶标仪上450nm波长下测定OD值;

所述检测方法为非疾病的诊断和治疗目的。

人NF155抗原、人NF155抗体检测试剂盒及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物制药技术领域,尤其涉及人NF155抗原、人NF155抗体检测试剂盒及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 慢性炎性脱髓鞘性多发性神经根神经病(chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy,CIDP)是一类由免疫介导的慢性运动感觉性周围神经病。该病在世界范围内较为常见,发病率为(1~9)/10万。根据临床表现,CIDP可分为经典型和变异型。经典型CIDP表现为对称的肢体无力和感觉障碍,腱反射减弱或消失,病程为慢性进展或缓解复发并持续 ≥ 8 周。2010年欧盟神经学会/周围神经学会诊断标准将变异型CIDP分为远端获得性脱髓鞘性对称性神经病(distal acquired demyelinating symmetric)、非对称型(Lewis-Sumner syndrome)、纯运动型、纯感觉型和局灶型。在CIDP的发病机制中,细胞及体液免疫均发挥了作用。但长期以来,相关抗体的研究并未取得突破性进展。CIDP特异性抗体的研究首先集中在髓鞘蛋白,但目前并未发现髓鞘蛋白0、髓鞘蛋白2或髓鞘蛋白22(myelinprotein22)参与了CIDP的发病机制。

[0003] 近年来,有关CIDP生物标志物的研究转向朗飞结相关区域,一些重要的细胞黏附分子成为研究的热点。朗飞结是有髓纤维的重要结构,包括结区、结旁区、近结旁区及结间区共5个区域。每个区域由不同的离子通道、蛋白和细胞黏附分子等有序排列,共同维持神经的正常结构及功能。结区分布有密集的Na⁺通道和K⁺通道,主要参与神经冲动的传导;神经束蛋白(neurofascin,NF)186、神经细胞黏附分子(neuronal cell adhesion molecule,NrCAM)和神经胶质蛋白(gliomedin)则参与维持朗飞结的稳定和Na⁺通道的聚集。结旁区的重要结构是由位于轴膜端的接触蛋白1(contactin-1,CNTN1)、接触蛋白相关蛋白1(contactin-associated protein1,CASPR1)以及位于髓鞘端的NF155组成的复合体,该复合体的功能是阻隔结区的Na⁺通道和近结旁区的K⁺通道,并使髓鞘锚定在轴膜上。结构蛋白、细胞黏附分子抗体的发现有助于揭示CIDP的发病机制,寻找特异性的生物标志物并制定个体化的治疗方案。从微观结构角度提出的朗飞结/结旁疾病(nodo-paranodopathy)概念,为深入了解CIDP提供了更加广阔的视角。研究表明,30%的CIDP患者血清中的IgG抗体会与结区、结旁区结构结合,参与CIDP的病理生理机制。此外,结区/结旁区抗体阳性的患者具有特征性的临床表现和特殊的治疗选择。NF155神经束蛋白(Neurofascin)是郎飞氏结的一种蛋白组分,CIDP患者中检出的抗神经束蛋白抗体主要针对的靶点是NF155。NF155主要位于结旁区的髓鞘端,与位于轴膜端的CNTN1和CASPR1组成复合体,隔离结区与近结旁区的离子通道,维持结旁区的正常结构和神经冲动的正常传递。目前还没有人NF155抗体检测试剂盒的相关报道。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于克服现有技术之缺陷,提供了一种人NF155抗原及其制备方法、

人NF155抗体检测试剂盒及其制备方法与应用,该试剂盒具有较高灵敏度和特异性,对慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经根神经病(CIDP)的检测有重要价值。

[0005] 本发明是这样实现的:

[0006] 本发明的目的之一在于一种人NF155抗原,包括以下任意一种片段或者五种片段:

[0007] 片段1:NF155-25,氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示;

[0008] 片段2:NF155-344,氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示;

[0009] 片段3:NF155-530,氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示;

[0010] 片段4:NF155-824,氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示;

[0011] 片段5:NF155-1048,氨基酸序列如SEQ ID NO.5所示。

[0012] 本发明的目的之二在于提供人NF155抗原的制备方法,包括如下步骤:

[0013] 步骤1、将NF155-25、NF155-344、NF155-530、NF155-824、NF155-1048的5个片段的DNA序列分别进行基因合成,设计引物PCR扩增后,分别连接进表达载体,构建5个重组表达质粒;

[0014] 步骤2、将构建好的重组质粒分别转化进入表达菌,构建5个重组表达工程菌;

[0015] 步骤3、NF155-25、NF155-344、NF155-530、NF155-824、NF155-1048的抗原片段的诱导表达及纯化。

[0016] 具体地,所述步骤1中所述5个片段的引物对分别为:

[0017] NF155-25-P1:核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示;

[0018] NF155-25-P2:核苷酸序列如SEQ ID NO.7所示;

[0019] NF155-344-P1:核苷酸序列如SEQ ID NO.8所示;

[0020] NF155-344-P2:核苷酸序列如SEQ ID NO.9所示;

[0021] NF155-530-P1:核苷酸序列如SEQ ID NO.10所示;

[0022] NF155-530-P2:核苷酸序列如SEQ ID NO.11所示;

[0023] NF155-824-P1:核苷酸序列如SEQ ID NO.12所示;

[0024] NF155-824-P2:核苷酸序列如SEQ ID NO.13所示;

[0025] NF155-1048-P1:核苷酸序列如SEQ ID NO.14所示;

[0026] NF155-1048-P2:核苷酸序列如SEQ ID NO.15所示。

[0027] 具体地,所述步骤1中PCR扩增的反应体系为:H₂O 38.7ul;Buffer 5ul;dNTP 3ul;上引物1ul;下引物1ul;DNA 1ul;Taq E 0.3ul;扩增程序为:94度变性5min;94度变性45sec、57度150sec、72度90sec,32个循环;72度延伸10min。

[0028] 具体地,所述步骤3中诱导表达的具体步骤为:将5个重组菌分别接种于LB培养液中摇菌至OD600至0.6-0.8时,按1:1000加入24mg/ml浓度的IPTG诱导4-6小时。

[0029] 具体地,所述步骤3中诱导表达后的纯化条件是:上样缓冲液:0.5M NaCl、20mM Na₂HPO₃、10mM咪唑;或者上样缓冲液:8M尿素、0.5M NaCl、20mM Na₂HPO₃、10mM咪唑;结合缓冲液:0.5M NaCl、20mM Na₂HPO₃、20mM咪唑;洗脱缓冲液:0.5M NaCl、20mM Na₂HPO₃、500mM咪唑。

[0030] 本发明的目的之三在于提供一种人NF155抗原的表达载体,所述表达载体为5个,所述5个表达载体的表达区的核苷酸序列分别为:如SEQ ID NO.16、SEQ ID NO.17、SEQ ID NO.18、SEQ ID NO.19、SEQ ID NO.20所示。

[0031] 本发明的目的之四在于提供一种人NF155抗原的表达工程菌,该工程菌为5个,所述5个工程菌分别包含所述5个人NF155抗原的表达载体。

[0032] 本发明的目的之五在于提供人NF155抗体检测试剂盒,所述的ELISA检测试剂盒包括:

[0033] (A) 包被有所述的人NF155抗原的ELISA酶标板;所述的人NF155抗原包括NF155-25、NF155-344、NF155-530、NF155-824、NF155-1048中的任意一种或者五种;

[0034] (B) 标准阴性血清: NF155抗体阴性的血清;

[0035] (C) 标准阳性血清: NF155抗体阳性的血清;

[0036] (D) 辣根过氧化物酶标记的酶标二抗: 抗人IGG、IGM和IGA;

[0037] (E) 样品稀释液、包被缓冲液、封闭液、ELISA酶标板洗涤液、抗体稀释液、显色液和终止液。

[0038] 其中,所述人NF155抗原中NF155-25, NF155-344、NF155-530、NF155-824和NF155-1048的包被浓度分别为200ng/ml、200ng/ml、250ng/ml、150ng/ml和250ng/ml。

[0039] 本发明的目的之六在于提供人NF155抗体的检测方法,所述的检测方法包括以下步骤:

[0040] S1、制备检测ELISA酶标板: 包被缓冲液将所述的人NF155抗原稀释后加到酶标板中吸附,空干包被用洗液,加包被用封闭液封闭;所述的人NF155抗原包括NF155-25、NF155-344、NF155-530、NF155-824、NF155-1048中的任意一种或者五种;

[0041] S2、待检血清、阴性血清、阳性血清分别作为一抗,加样至ELISA酶标板孔中进行孵育;

[0042] S3、酶标二抗的孵育: 辣根过氧化物酶标记的酶标二抗加入ELISA酶标板,洗涤液洗涤,甩干;

[0043] S4、加入显色液,室温避光孵育,加入终止液终止反应;在酶标仪上450nm波长下测定OD值。

[0044] 本发明的目的之七在于提供所述的检测试剂盒在诊断慢性炎性脱髓鞘性多发性神经根神经病中的应用。

[0045] 本发明具有的有益效果是:

[0046] 本发明提供了人NF155抗体检测试剂盒及检测方法,首先制备得到人NF155抗原(NF155-25, NF155-344、NF155-530、NF155-824和NF155-1048),然后以人NF155抗原为包被抗原对样本血清进行间接ELISA检测,该试剂盒可以用于检测诊断慢性炎性脱髓鞘性多发性神经炎神经病CIDP,特异性强,灵敏度高,稳定性好。

附图说明

[0047] 图1为本发明实施例1提供的构建的重组质粒的酶切图;其中,(A)为包含NF155-25的重组质粒的酶切图;(B)为包含NF155-344的重组质粒的酶切图;(C)为包含NF155-530的重组质粒的酶切图;(D)为包含NF155-824的重组质粒的酶切图;(E)为包含NF155-1048的重组质粒的酶切图;其中1泳道为未酶切的质粒,2泳道为经相应的内切酶酶切的条带;(F)为Marker条带图,该Marker为1Kb ladder;

[0048] 图2为本发明实施例2提供的NF155-25、NF155-344、NF155-530、NF155-824和

NF155-1048片段的纯化产物电泳图。

具体实施方式

[0049] 实施例1构建重组表达质粒以及工程菌

[0050] 1、NF155,相对分子质量为155000,成熟的NF155抗原由1323个氨基酸组成。本研究对象对NF155蛋白的氨基酸序列经过包括亲水性、表面可及性等分析,并结合其空间构象和各个结构域的修饰特点,将成熟的CNTN1蛋白分成了5个片段以分别获取。

[0051] 2、PCR扩增人NF155抗原基因

[0052] 1、将5个片段的DNA序列分别进行基因合成,设计引物(带上酶切位点)PCR扩增,设计PCR引物如表1所示,下划线的部分是限制性核酸内切酶位点。

[0053] 表1

引物 Primers	引物序列 (5'-3') Sequence of Primers (5'-3')
NF155-25上游引物P1	<u>GACGGATCC</u> ATCGAAATTCCTATGGATC(如SEQ ID NO:6所示)
NF155-25下游引物P2	<u>AGCTCGAGAGCAGCCTTTACTCTCAC</u> (如SEQ ID NO:7所示)
NF155-344上游引物 P1	<u>GACGGATCCG</u> TAAAGGCTGCTCCCTAC(如SEQ ID NO:8所示)
NF155-344下游引物 P2	<u>AGCTCGAGGTCTTTGACCTCCAGGCG</u> (如SEQ ID NO:9所示)
[0054] NF155-530上游引物 P1	<u>GACGGATCCAGGAAGACGACTCCCTGAC</u> (如SEQ ID NO:10所示)
NF155-530下游引物P2	<u>AGCTCGAGTCAGGGATAATCTTCTCCG</u> (如SEQ ID NO:11所示)
NF155-824上游引物 P1	<u>GACGGATCCTCCGGAGAAGATTATCCCAG</u> (如SEQ ID NO:12所示)
NF155-824下游引物P2	<u>AGCTCGAGGGTGTAAGCTGCGGTTGGAG</u> (如SEQ ID NO:13所示)
NF155-1048上游引物 P1	<u>GACGGATCC</u> ACCAACAACCAAGCGGACATC(如SEQ ID NO:14所示)
NF155-1048下游引物P2	<u>AGCTCGAG</u> TTAGGCCAGAGAGTAGATAG(如SEQ ID NO:15所示)

[0055] 2、运用PCR扩增体系如表2所示,温度循环参数:94℃,5min→(94℃,45S,→57℃,150S,→72℃,90S)×32→72℃,10min。扩增产物用于后续酶切酶连。

[0056] 表2

	序号	试剂名称	试剂体积
	1	超纯水	38.7 μ l
[0057]	2	10 \times PCR Buffer	5 μ l
	3	dNTPs	3 μ l
	4	上游引物 P1 (10 μ mol/L)	1.0 μ l
	5	下游引物 P2(10 μ mol/L)	1.0 μ l
[0058]	6	Taq 酶	0.3 μ l
	7	合成的 DNA	2 μ l

[0059] 4、PCR扩增后,琼脂糖凝胶电泳回收扩增带,酶切,酶连,分别将5个DNA片段连接进PET-28a表达载体构建重组表达质粒。重组质粒跑胶酶切图见说明书附图1。

[0060] 5、将构建好的重组质粒转化BL21 (DE3) 菌,构建重组菌,重组菌的测序后结果验证本实施例的重组质粒构建成功。

[0061] 实施例2抗原的表达及纯化

[0062] 1、用构建成的重组蛋白表达工程菌进行诱导表达实验。将5个重组菌分别接种于600ml的LB培养液(成分:10g氯化钠/升、10g蛋白胨/升和5g酵母浸膏/升),37度200RPM摇菌至OD600至0.6-0.8时,按1:1000加入24mg/ml浓度的IPTG诱导4小时。离心,收菌,准备纯化。

[0063] 2、纯化选择的填料是GE的Ni Sepharose (货号是17-0729-10),根据其说明书分别配制如下溶液:

[0064] 上样缓冲液A:0.5M NaCl+20mM Na₂HPO₃+10mM咪唑。

[0065] 结合缓冲液B:0.5M NaCl+20mM Na₂HPO₃+20mM咪唑

[0066] 洗脱缓冲液C:0.5M NaCl、20mM Na₂HPO₃、500mM咪唑;

[0067] 以及用于纯化包涵体的溶液:

[0068] 纯化包涵体抗原的上样缓冲液a:0.5M NaCl、20mM Na₂HPO₃、20mM咪唑、8M尿素;

[0069] 结合缓冲液b:0.5MNaCl、20mM Na₂HPO₃、20mM咪唑、8M尿素;

[0070] 洗脱缓冲液c:0.5M NaCl、20mM Na₂HPO₃、300mM咪唑、8M尿素。

[0071] 3、将5种离心收集的细菌用上样缓冲液A分散均匀,超声(250W,超3s,间隔3s,全程20min)、第一次离心(12000RPM,15min,4 $^{\circ}$ C),得到含较高浓度的目的抗原的上清溶液。包涵体抗原需将第一次离心的沉淀用上样缓冲液a再分散均匀,再超声(250W,超3s,间隔3s,全程20min)、再离心(12000RPM,15min,4 $^{\circ}$ C),弃掉沉淀,得到含较高浓度的目的抗原的溶液。将该5种目的蛋白的溶液对填料柱分别进行上样、洗涤、洗脱,分别得到5个目的蛋白。纯化好的包涵体抗原需复性,采用与待复性包涵体抗原同体积的含不同尿素浓度(4.5M、3.5M、2.5M、1.5M、0.5M、0M)的复性缓冲液继续透析复性,每种复性缓冲液透析4小时。

[0072] 可溶性抗原(NF155-824)和复性完的包涵体抗原(NF155-25,NF155-344,NF155-530、和NF155-1048),进行12%浓度凝胶的SDS-PAGE电泳,检测五个目的蛋白纯度分别为:95.5%,94.9%,93.4%,93.8%,和95.1%。见说明书附图2。每种抗原测定浓度后储存备

用。

[0073] 实施例3人NF155抗体检测试剂盒及使用方法

[0074] 1、包被酶标板

[0075] (1) 包被液:NaCl 8.5g,Na₂HPO₄·12H₂O 30.8g,KH₂PO₄2.2g,加ddH₂O至1000ml,调PH至7.4。

[0076] (2) 包被用洗液:NaCl 8.0g、KH₂PO₄0.24g、Na₂HPO₄·12H₂O 2.9g、KCl 0.2g、TWEEN200.5ml,加至ddH₂O至1000ml,调至PH7.4。

[0077] (3) 包被方法:将5个NF155抗原片段分别用0.1M PBS (PH7.4) 包被缓冲液进行包被在酶标板孔内,4度过夜,其中NF155-25,NF155-344、NF155-530、NF155-824和NF155-1048的包被浓度分别为200ng/ml、200ng/ml、250ng/ml、150ng/ml和250ng/ml。96孔酶标板中每孔加100μL,置2-8℃吸附24小时。空去包被液,包被用洗液洗板3次。

[0078] 2、封闭:

[0079] (1) 包被用封闭液:Na₂HPO₄·12H₂O 3.582g,NaH₂PO₄·2H₂O1.561g,NaCl 9.0g,BSA20g,木糖10g,调pH至7.2,定容至1000ml。

[0080] (2) 封闭操作:空干包被用洗液,用1.5%BSA封闭液37度封闭2小时,或者置2-8℃过夜。去除封闭液后自然干燥密封备用。

[0081] 3、阴阳性血清的孵育(一抗孵育)

[0082] 将待检测的血清按10-100倍稀释,分别加入5种抗原的板条内(每种抗原有经过优化的特定的血清稀释倍数),并加入阳性对照和阴性对照,37度孵育1小时,用洗涤液进行洗板,所述洗涤液的配方如下:

[0083] 洗涤液(0.15M):NaCl 8.0g、KH₂PO₄0.24g、Na₂HPO₄·12H₂O 2.9g、KCl 0.2g、TWEEN200.5ml,加至ddH₂O至1000ml,调至PH7.4。

[0084] 操作:待检血清用PBS液作血清稀释液,按1:400的比例稀释,加入包被板孔中,100μL/孔。直接吸取标准阳性血清或标准阴性血清加入包被板孔中,100μL/孔。置酶标板于37℃,30min。

[0085] 4、酶标二抗的孵育

[0086] 加入一定浓度的辣根过氧化物酶标记的二抗(抗人IGG、IGM和IGA),向酶标板孔中加入100μL/孔,置37℃,15min,洗板。

[0087] 5、显色:

[0088] 加入底物液A50μL,底物液B 50μL,轻摇混合,37℃反应15min。

[0089] (1) 底物溶液A:醋酸钠13.6g、柠檬酸1.6g、30%双氧水0.3ml、蒸馏水加至500ml

[0090] (2) 底物溶液B:取0.2g TMB溶于20mlDMSO中、乙二胺四乙酸二钠0.2g、柠檬酸0.95g、甘油50ml、蒸馏水加至500ml。

[0091] 6、终止:

[0092] 终止液:2mol/L H₂SO₄。

[0093] 显色结束后每孔加入50u1终止液进行终止。

[0094] 7、读板:

[0095] 用酶标仪测量OD450值。

[0096] 需要说明的是,血清经5种抗原的板条检测,其中任何一种板条的OD450值达到阳

性值时,则判定该血清对NF155是阳性,对该抗原片段成阳性。该血清个体体内存在对NF155以及该NF155片段的抗体。这5种抗原制备成的5种检测试剂盒可以分开使用也可以组合使用。

[0097] 本发明提供的人NF155抗体检测试剂盒也可用于制备免疫胶体金检测试纸条、免疫荧光、免疫比浊、化学发光等各种形式的产品。

[0098] 实施例4人NF155抗体检测试剂盒的应用

[0099] 一、应用

[0100] 1、本研究对613份神经系统自身免疫性疾病患者血清按照实施例3进行了检测,这613份血清来自于慢性炎性脱髓性多发性神经炎神经病CIDP、格林巴利GBS和重症肌无力MG等患者,其中慢性炎性脱髓性多发性神经炎神经病CIDP患者血清已在医院经临床检测验证是CIDP抗体阳性的血清,本研究也同批检测了300份正常人血清样本。

[0101] 2、实验结果如下表(仅列出60份样本数据),本次检测结果显示,NF155-824抗体检测试剂盒在CIDP阳性患者血清的阳性率达100%,在MG患者血清的阳性率达35%,在正常人血清的阳性率达20%,临界值为0.49。

[0102] 表3-样本数据检测结果

[0103]

组别	编号	OD ₄₅₀	编号	OD ₄₅₀
阴性对照组	N1	0.366	N6	0.313
	N2	0.299	N7	0.568
	N3	0.572	N8	0.386
	N4	0.578	N9	0.381
	N5	0.582	N10	0.324
正常样本	F1	0.389	F11	0.378
	F2	0.364	F12	0.403
	F3	0.314	F13	0.432
	F4	0.251	F14	0.330
	F5	0.458	F15	0.185
	F6	0.320	F16	0.685
	F7	0.355	F17	0.331
	F8	0.708	F18	0.212
	F9	0.460	F19	0.209
	F10	0.280	F20	0.456
CIDP 阳性样本	Y1	0.790	Y11	0.653
	Y2	0.535	Y12	0.905
	Y3	0.663	Y13	0.608
	Y4	0.450	Y14	0.505
	Y5	1.311	Y15	0.866
	Y6	0.703	Y16	0.730
	Y7	0.601	Y17	0.510
	Y8	0.482	Y18	0.586
	Y9	0.580	Y19	0.956

	Y10	0.797	Y20	0.630
[0104]	M1	0.331	M11	0.423
	M2	0.946	M12	0.373
	M3	0.63	M13	0.298
	M4	0.302	M14	0.414
	M5	0.421	M15	0.352
	M6	0.538	M16	1.390
	M7	0.451	M17	0.500
	M8	0.605	M18	0.260
	M9	0.232	M19	0.352
	M10	0.620	M20	0.456

[0105] 4、此外,NF155-25,NF155-344、NF155-530和NF155-1048检测也表明在NF155阳性患者血清的阳性比例是正常人的2倍以上。数据分析如下。结果用SPSS统计分析软件17.0,进行单因素方差分析,并用Student-Newman-Keuls进行多重比较检验。结果如下表:

[0106] 表4-检测结果统计分析表

组别	OD ₄₅₀	S/N
NF155-25 阴性对照组 (Mean±sd)	0.23±0.035 ^a	1.000±0.18 ^a
NF155-344 阴性对照组 (Mean±sd)	0.24±0.042 ^a	1.000±0.17 ^a
[0107] NF155-530 阴性对照组 (Mean±sd)	0.22±0.025 ^a	1.000±0.20 ^a
NF155-824 阴性对照组 (Mean±sd)	0.49±0.013 ^a	0.916±0.14 ^a
NF155-1048 阴性对照组 (Mean±sd)	0.21±0.025 ^a	1.000±0.17 ^a

[0108] 注:检测数据用SPSS 17.0统计分析软件的One-WayANOVA程序的Student-Newman-Keuls检验方法进行多重比较分析,同栏中带有不同字母肩号(a,b,c)的组之间差异显著(P<0.05)。

[0109] 二、5种ELISA检测试剂盒的技术指标

[0110] 1、临界值:按照实施例3进行检测患者血清和正常人血清,确定了试验有效性的判定方法、临界值(CUT OFF)的计算方法、样品阴阳性判定方法。

[0111] (1) NF155-25:

[0112] 试验有效性判定:阳性对照孔平均值 ≥ 0.55 ;阴性对照平均值 ≤ 0.23 ;

[0113] 临界值=阴性对照孔平均值+0.14=0.37;

[0114] 阴性判定:样品OD值<临界值者(0.37)为NF155-25抗体阴性;

- [0115] 阳性判定:样品OD值 \geq 临界值者(0.37)为NF155-25抗体阳性。
- [0116] (2) NF155-344:
- [0117] 试验有效性判定:阳性对照孔平均值 \geq 0.55;阴性对照平均值 \leq 0.24;
- [0118] 临界值=阴性对照孔平均值+0.14=0.38;
- [0119] 阴性判定:样品OD值 $<$ 临界值者(0.38)为NF155-344抗体阴性;
- [0120] 阳性判定:样品OD值 \geq 临界值者为(0.38)NF155-344抗体阳性。
- [0121] (3) NF155-530:
- [0122] 试验有效性判定:阳性对照孔平均值 \geq 0.55;阴性对照平均值 \leq 0.22;
- [0123] 临界值=阴性对照孔平均值+0.14=0.36;
- [0124] 阴性判定:样品OD值 $<$ 临界值者(0.36)为NF155-530抗体阴性;
- [0125] 阳性判定:样品OD值 \geq 临界值者为(0.36)NF155-530抗体阳性。
- [0126] (4) NF155-824:
- [0127] 试验有效性判定:阳性对照孔平均值 \geq 0.55;阴性对照平均值 \leq 0.35;
- [0128] 临界值=阴性对照孔平均值+0.14;
- [0129] 阴性判定:样品OD值 $<$ 临界值者(0.49)为NF155-824抗体阴性;
- [0130] 阳性判定:样品OD值 \geq 临界值者(0.49)为NF155-824抗体阳性。
- [0131] (5) NF155-1048:
- [0132] 试验有效性判定:阳性对照孔平均值 \geq 0.55;阴性对照平均值 \leq 0.21;
- [0133] 临界值=阴性对照孔平均值+0.14=0.35;
- [0134] 阴性判定:样品OD值 $<$ 临界值者(0.35)为NF155-1048抗体阴性;
- [0135] 阳性判定:样品OD值 \geq 临界值者为(0.35)NF155-1048抗体阳性。
- [0136] 2、特异性:除阳性血清外,其他检测样品均为阴性。这些数据表明,本发明提供的试剂盒与其他血清抗体之间不存在交叉反应。
- [0137] 3、灵敏性:阳性血清12800倍稀释能检出(即1 μ L血清加到12800 μ L样品稀释液中,取其中100 μ L加入样品检测孔)能检出。
- [0138] 4、稳定性:将试剂盒置于37 $^{\circ}$ C不少于2天与4 $^{\circ}$ C存放的试剂盒同步检测20份样品,其符合率为100%。
- [0139] 5、精密度:取浓度呈梯度的5种血清标本,分别稀释,分别同批测定10次,批内变异系数为均低于4%;同样5份血清,隔天再测定10次,变异均低于5%;符合试剂盒精密度要求。
- [0140] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

<211> 307
 <212> PRT
 <213> 人 NF155(NF155-530)

<400> 3
 Lys Asp Pro Thr Arg Ile Tyr Arg Met Pro Glu Asp Gln Val Ala Arg
 1 5 10 15
 Arg Gly Thr Thr Val Gln Leu Glu Cys Arg Val Lys His Asp Pro Ser
 20 25 30
 Leu Lys Leu Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Asp Glu Pro Leu Tyr Ile
 35 40 45
 Gly Asn Arg Met Lys Lys Glu Asp Asp Ser Leu Thr Ile Phe Gly Val
 50 55 60
 Ala Glu Arg Asp Gln Gly Ser Tyr Thr Cys Val Ala Ser Thr Glu Leu
 65 70 75 80
 Asp Gln Asp Leu Ala Lys Ala Tyr Leu Thr Val Leu Ala Asp Gln Ala
 85 90 95
 Thr Pro Thr Asn Arg Leu Ala Ala Leu Pro Lys Gly Arg Pro Asp Arg
 100 105 110
 Pro Arg Asp Leu Glu Leu Thr Asp Leu Ala Glu Arg Ser Val Arg Leu
 115 120 125
 Thr Trp Ile Pro Gly Asp Ala Asn Asn Ser Pro Ile Thr Asp Tyr Val
 130 135 140
 Val Gln Phe Glu Glu Asp Gln Phe Gln Pro Gly Val Trp His Asp His
 145 150 155 160
 Ser Lys Tyr Pro Gly Ser Val Asn Ser Ala Val Leu Arg Leu Ser Pro
 165 170 175
 Tyr Val Asn Tyr Gln Phe Arg Val Ile Ala Ile Asn Glu Val Gly Ser
 180 185 190
 Ser His Pro Ser Leu Pro Ser Glu Arg Tyr Arg Thr Ser Gly Ala Pro
 195 200 205
 Pro Glu Ser Asn Pro Gly Asp Val Lys Gly Glu Gly Thr Arg Lys Asn
 210 215 220
 Asn Met Glu Ile Thr Trp Thr Pro Met Asn Ala Thr Ser Ala Phe Gly
 225 230 235 240
 Pro Asn Leu Arg Tyr Ile Val Lys Trp Arg Arg Arg Glu Thr Arg Glu
 245 250 255
 Ala Trp Asn Asn Val Thr Val Trp Gly Ser Arg Tyr Val Val Gly Gln
 260 265 270
 Thr Pro Val Tyr Val Pro Tyr Glu Ile Arg Val Gln Ala Glu Asn Asp
 275 280 285
 Phe Gly Lys Gly Pro Glu Pro Glu Ser Val Ile Gly Tyr Ser Gly Glu
 290 295 300
 Asp Tyr Pro
 305

[0143]

<210> 4
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> 人 NF155(NF155-824)

<400> 4
 Ser Gly Glu Gly Tyr Pro Arg Ala Ala Pro Thr Glu Val Lys Val Arg
 1 5 10 15
 Val Met Asn Ser Thr Ala Ile Ser Leu Gln Trp Asn Arg Val Tyr Ser
 20 25 30
 Asp Thr Val Gln Gly Gln Leu Arg Glu Tyr Arg Ala Tyr Tyr Trp Arg
 35 40 45
 Glu Ser Ser Leu Leu Lys Asn Leu Trp Val Ser Gln Lys Arg Gln Gln
 50 55 60
 Ala Ser Phe Pro Gly Asp Arg Leu Arg Gly Val Val Ser Arg Leu Phe
 65 70 75 80
 Pro Tyr Ser Asn Tyr Lys Leu Glu Met Val Val Val Asn Gly Arg Gly
 85 90 95
 Asp Gly Pro Arg Ser Glu Thr Lys Glu Phe Thr Thr Pro Glu Gly Val
 100 105 110
 Pro Ser Ala Pro Arg Arg Phe Arg Val Arg Gln Pro Asn Leu Glu Thr
 115 120 125
 Ile Asn Leu Glu Trp Asp His Pro Glu His Pro Asn Gly Ile Met Ile
 130 135 140
 Gly Tyr Thr Leu Lys Tyr Val Ala Phe Asn Gly Thr Lys Val Gly Lys
 145 150 155 160
 Gln Ile Val Glu Asn Phe Ser Pro Asn Gln Thr Lys Phe Thr Val Gln
 165 170 175
 Arg Thr Asp Pro Val Ser Arg Tyr Arg Phe Thr Leu Ser Ala Arg Thr
 180 185 190
 Gln Val Gly Ser Gly Glu Ala Val Thr Glu Glu Ser Pro Ala Pro Pro
 195 200 205
 Asn Glu Ala Thr Pro Thr Ala Ala Tyr Thr
 210 215

[0144]

<210> 5
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> 人 NF155(NF155-824)

<400> 5
 Thr Asn Asn Gln Ala Asp Ile Ala Thr Gln Gly Trp Phe Ile Gly Leu
 1 5 10 15
 Met Cys Ala Ile Ala Leu Leu Val Leu Ile Leu Leu Ile Val Cys Phe
 20 25 30
 Ile Lys Arg Ser Arg Gly Gly Lys Tyr Pro Val Arg Glu Lys Lys Asp

	<210> 10	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<400> 10	
	gacggatcca ggaagacgac tcctgac	28
	<210> 11	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<400> 11	
	agctcgagtc agggataatc ttctccg	27
	<210> 12	
	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<400> 12	
[0146]	gacggatcct ccggagaaga ttatcccag	29
	<210> 13	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<400> 13	
	agctcgaggg tgtaagctgc ggttgag	28
	<210> 14	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<400> 14	
	gacggatcca ccaacaacca agcggacatc	30
	<210> 15	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<400> 15	

agctcgagtt aggccagaga gtagatag 28

- <210> 16
- <211> 972
- <212> DNA
- <213> 人 NF155 (NF155-25)

<400> 16
 atcgaattc ctatggatct gacgcagccg ccaaccatca ccaagcagtc agcgaaggat 60
 cacatcgtgg acccccgtga taacatcctg attgagtgtg aagcaaaagg gaaccctgcc 120
 cccagcttcc actggacacg aaacagcaga ttcttcaaca tcgccaagga cccccgggtg 180
 tccatgagga ggaggtctgg gaccctgggtg attgacttcc gcagtggcgg gcggccggag 240
 gaatatgagg gggaatatca gtgcttcgcc cgcaacaaat ttggcacggc cctgtccaat 300
 aggatccgcc tgcaggtgtc taaatctcct ctgtggccca aggaaaacct agaccctgtc 360
 gtggctcaag agggcgctcc ttgacgctc cagtgcaacc ccccgcttg acttccatcc 420
 ccggtcatct tctggatgag cagctccatg gagcccatca cccaagaaa acgtgtctct 480
 cagggccata acggagacct atacttctcc aacgtgatgc tgcaggacat gcagaccgac 540
 tacagttgta acgcccgett ccacttcacc cacaccatcc agcagaagaa cccttcacc 600
 ctcaaggtcc tcaccaacca cccttataat gactcgtcct taagaaacca ccctgacatg 660
 tacagtgcc gagagattgc agaaagaaca ccaagcttca tgtatcccca gggcaccgag 720
 agcagccaga tgggtgcttc tggcatggac ctctctgtgg aatgcatcgc ctccggggtc 780
 ccaacaccag acatcgcgat gtacaagaaa ggtggggacc tcccatctga taaggccaag 840
 tttgagaact ttaataaggc cctgcgtatc acaaatgtct ctgaggaaga ctccggggag 900
 tattttctcc tggcctccaa caagatgggc agcatccggc acacgatctc ggtgagagta 960
 aaggctgctt aa 972

[0147]

- <210> 17
- <211> 567
- <212> DNA
- <213> 人 NF155 (NF155-25)

<400> 17
 gtaaaggctg ctccctactg gctggacgaa cccaagaacc ttattctggc tcctggcgag 60
 gatgggagac tgggtgtgtc agccaatgga aaccccaaac ccaactgtcca gtggatgggtg 120
 aatggggaac ctttgcaatc ggcaccacct aacccaaacc gtgaggtggc cggagacacc 180
 atcatcttcc gggacaccca gatcagcagc agggctgtgt accagtgcaa cacctccaac 240
 gagcatgget acctgctgge caacgccttt gtcagtgtgc tggatgtgce gcctcggatg 300
 ctgtcgcccc ggaaccagct cattcgagtg attctttaca accggacgcg gctggactgc 360
 cttttctttg ggtctcccat ccccacactg cgatggttta agaatgggca aggaagcaac 420
 ctggatgggtg gcaactacca tgtttatgag aacggcagtc tggaaattaa gatgatccgc 480
 aaagaggacc agggcatcta cacctgtgtc gccaccaaca tcctgggcaa agctgaaaac 540
 caagtccgcc tggaggtcaa agactaa 567

- <210> 18
- <211> 924
- <212> DNA

<213> 人 NF155 (NF155-530)

<400> 18

aaagacccca ccaggatcta ccggatgccc gaggaccagg tggccagaag gggcaccacg	60
gtgcagctgg agtgtcgggt gaagcacgac ccctccctga aactcacctg ctccctgctg	120
aaggatgacg agccgctcta tattggaaac aggatgaaga aggaagacga ctccctgacc	180
atctttgggg tggcagagcg ggaccagggc agttacacgt gtgtcgccag caccgagcta	240
gaccaagacc tggccaagge ctacctcacc gtgctagctg atcaggccac tccaactaac	300
cgtttggctg ccctgccc aaaggacggcca gaccggcccc gggacctgga gctgaccgac	360
ctggccgaga ggagcgtgcg gctgacctgg atccccgggg atgctaacia cagccccatc	420
acagactacg tcgtccagtt tgaagaagac cagttccaac ctggggctctg gcatgaccat	480
tccaagtacc ccggcagcgt taactcagcc gtctccggc tgtccccgta tgtcaactac	540
cagttccgtg tcattgccat caacgaggtt gggagcagcc accccagcct cccatccgag	600
cgctaccgaa ccagtggagc accccccgag tccaatcctg gtgacgtgaa gggagagggg	660
accagaaaaga acaacatgga gatcacgtgg acgcccata atgccacctc ggcctttggc	720
cccaacctgc gctacattgt caagtggagg cggagagaga ctcgagaggc ctggaacaac	780
gtcacagtgt ggggctctcg ctacgtgggt gggcagacct cagtctacgt gcctatgag	840
atccgagtcc aggctgaaaa tgacttcggg aagggccttg agccagagtc cgtcatcggt	900
tactccggag aagattatcc ctga	924

<210> 19

<211> 657

<212> DNA

[0148]

<213> 人 NF155 (NF155-824)

<400> 19

tccggagaag attatcccag ggctgcgccc actgaagtta aagtccgagt catgaacagc	60
acagccatca gccttcagtg gaaccgcgtc tactccgaca cgggccaggg ccagctcaga	120
gagtaccgag cctactactg gagggagagc agcttgctga agaacctgtg ggtgtctcag	180
aagagacagc aagccagctt ccctgggtgac cgcctccgtg gcgtgggtgc ccgcctcttc	240
ccctacagta actacaagct ggagatggtt gtggatcaatg ggagaggtga tgggcctcgc	300
agtgagacca aggagttcac caccccggaa ggagtacca gtgcccctag gcgtttccga	360
gtccggcagc ccaacctgga gacaatcaac ctggaatggg atcatcctga gcatccaaat	420
gggatcatga ttggatacac tctcaaatat gtggccttta acgggaccaa agtaggaaag	480
cagatagtgg aaaacttctc tccaatcag accaagtcca cggtgcaaag aacggacccc	540
gtgtcacgct accgctttac cctcagcgcc aggacgcagg tgggctctgg ggaagccgctc	600
acagaggagt caccagcacc cccgaatgaa gctactccaa ccgcagctta cacctga	657

<210> 20

<211> 429

<212> DNA

<213> 人 NF155 (NF155-1048)

<400> 20

accaacaacc aagcggacat cgccaccag ggctggttca ttgggcttat gtgcgccatc	60
gcctcctctg tgctgatcct gctcatcgtc tgtttcatca agaggagtgc cggcggcaag	120

	taccagtac	gagaaaagaa	ggatgttccc	cttggccctg	aagaccccaa	ggaagaggat	180
	ggctcatttg	actatagtga	tgaggacaac	aagcccctgc	agggcagtca	gacatctctg	240
[0149]	gacggcacca	tcaagcagca	ggagagtgac	gacagcctgg	tggactatgg	cgagggtggc	300
	gagggtcagt	tcaatgaaga	cggctccttc	atcgccagc	acacgtcaa	aaaggacaag	360
	gaggaaacag	agggaacga	aagctcagag	gccacgtcac	ctgtcaatgc	tatctactct	420
	ctggcctaa						429

[0039]	Gly Val Ala Glu Arg Thr Pro Ser Phe Met Tyr Pro Gln Gly Thr Ala
[0040]	225 230 235 240
[0041]	Ser Ser Gln Met Val Leu Arg Gly Met Asp Leu Leu Leu Glu Cys Ile
[0042]	245 250 255
[0043]	Ala Ser Gly Val Pro Thr Pro Asp Ile Ala Trp Tyr Lys Lys Gly Gly
[0044]	260 265 270
[0045]	Asp Leu Pro Ser Asp Lys Ala Lys Phe Glu Asn Phe Asn Lys Ala Leu
[0046]	275 280 285
[0047]	Arg Ile Thr Asn Val Ser Glu Glu Asp Ser Gly Glu Tyr Phe Cys Leu
[0048]	290 295 300
[0049]	Ala Ser Asn Lys Met Gly Ser Ile Arg His Thr Ile Ser Val Arg Val
[0050]	305 310 315 320
[0051]	Lys Ala Ala
[0052]	<210> 2
[0053]	<211> 188
[0054]	<212> PRT
[0055]	<213> 人NF155 (NF155-344)
[0056]	<400> 2
[0057]	Val Lys Ala Ala Pro Tyr Trp Leu Asp Glu Pro Lys Asn Leu Ile Leu
[0058]	1 5 10 15
[0059]	Ala Pro Gly Glu Asp Gly Arg Leu Val Cys Arg Ala Asn Gly Asn Pro
[0060]	20 25 30
[0061]	Lys Pro Thr Val Gln Trp Met Val Asn Gly Glu Pro Leu Gln Ser Ala
[0062]	35 40 45
[0063]	Pro Pro Asn Pro Asn Arg Glu Val Ala Gly Asp Thr Ile Ile Phe Arg
[0064]	50 55 60
[0065]	Asp Thr Gln Ile Ser Ser Arg Ala Val Tyr Gln Cys Asn Thr Ser Asn
[0066]	65 70 75 80
[0067]	Glu His Gly Tyr Leu Leu Ala Asn Ala Phe Val Ser Val Leu Asp Val
[0068]	85 90 95
[0069]	Pro Pro Arg Met Leu Ser Pro Arg Asn Gln Leu Ile Arg Val Ile Leu
[0070]	100 105 110
[0071]	Tyr Asn Arg Thr Arg Leu Asp Cys Pro Phe Phe Gly Ser Pro Ile Pro
[0072]	115 120 125
[0073]	Thr Leu Arg Trp Phe Lys Asn Gly Gln Gly Ser Asn Leu Asp Gly Gly
[0074]	130 135 140
[0075]	Asn Tyr His Val Tyr Glu Asn Gly Ser Leu Glu Ile Lys Met Ile Arg
[0076]	145 150 155 160
[0077]	Lys Glu Asp Gln Gly Ile Tyr Thr Cys Val Ala Thr Asn Ile Leu Gly

[0078]		165		170		175
[0079]	Lys Ala Glu Asn Gln Val Arg Leu Glu Val Lys Asp					
[0080]		180		185		
[0081]	<210> 3					
[0082]	<211> 307					
[0083]	<212> PRT					
[0084]	<213> 人NF155 (NF155-530)					
[0085]	<400> 3					
[0086]	Lys Asp Pro Thr Arg Ile Tyr Arg Met Pro Glu Asp Gln Val Ala Arg					
[0087]	1	5		10		15
[0088]	Arg Gly Thr Thr Val Gln Leu Glu Cys Arg Val Lys His Asp Pro Ser					
[0089]		20		25		30
[0090]	Leu Lys Leu Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Asp Glu Pro Leu Tyr Ile					
[0091]		35		40		45
[0092]	Gly Asn Arg Met Lys Lys Glu Asp Asp Ser Leu Thr Ile Phe Gly Val					
[0093]		50		55		60
[0094]	Ala Glu Arg Asp Gln Gly Ser Tyr Thr Cys Val Ala Ser Thr Glu Leu					
[0095]	65	70		75		80
[0096]	Asp Gln Asp Leu Ala Lys Ala Tyr Leu Thr Val Leu Ala Asp Gln Ala					
[0097]		85		90		95
[0098]	Thr Pro Thr Asn Arg Leu Ala Ala Leu Pro Lys Gly Arg Pro Asp Arg					
[0099]		100		105		110
[0100]	Pro Arg Asp Leu Glu Leu Thr Asp Leu Ala Glu Arg Ser Val Arg Leu					
[0101]		115		120		125
[0102]	Thr Trp Ile Pro Gly Asp Ala Asn Asn Ser Pro Ile Thr Asp Tyr Val					
[0103]		130		135		140
[0104]	Val Gln Phe Glu Glu Asp Gln Phe Gln Pro Gly Val Trp His Asp His					
[0105]	145	150		155		160
[0106]	Ser Lys Tyr Pro Gly Ser Val Asn Ser Ala Val Leu Arg Leu Ser Pro					
[0107]		165		170		175
[0108]	Tyr Val Asn Tyr Gln Phe Arg Val Ile Ala Ile Asn Glu Val Gly Ser					
[0109]		180		185		190
[0110]	Ser His Pro Ser Leu Pro Ser Glu Arg Tyr Arg Thr Ser Gly Ala Pro					
[0111]		195		200		205
[0112]	Pro Glu Ser Asn Pro Gly Asp Val Lys Gly Glu Gly Thr Arg Lys Asn					
[0113]		210		215		220
[0114]	Asn Met Glu Ile Thr Trp Thr Pro Met Asn Ala Thr Ser Ala Phe Gly					
[0115]	225	230		235		240
[0116]	Pro Asn Leu Arg Tyr Ile Val Lys Trp Arg Arg Arg Glu Thr Arg Glu					

[0156]	195	200	205
[0157]	Asn Glu Ala Thr Pro Thr Ala Ala Tyr Thr		
[0158]	210	215	
[0159]	<210> 5		
[0160]	<211> 142		
[0161]	<212> PRT		
[0162]	<213> 人NF155 (NF155-824)		
[0163]	<400> 5		
[0164]	Thr Asn Asn Gln Ala Asp Ile Ala Thr Gln Gly Trp Phe Ile Gly Leu		
[0165]	1	5	10 15
[0166]	Met Cys Ala Ile Ala Leu Leu Val Leu Ile Leu Leu Ile Val Cys Phe		
[0167]		20	25 30
[0168]	Ile Lys Arg Ser Arg Gly Gly Lys Tyr Pro Val Arg Glu Lys Lys Asp		
[0169]		35	40 45
[0170]	Val Pro Leu Gly Pro Glu Asp Pro Lys Glu Glu Asp Gly Ser Phe Asp		
[0171]		50	55 60
[0172]	Tyr Ser Asp Glu Asp Asn Lys Pro Leu Gln Gly Ser Gln Thr Ser Leu		
[0173]		65	70 75 80
[0174]	Asp Gly Thr Ile Lys Gln Gln Glu Ser Asp Asp Ser Leu Val Asp Tyr		
[0175]		85	90 95
[0176]	Gly Glu Gly Gly Glu Gly Gln Phe Asn Glu Asp Gly Ser Phe Ile Gly		
[0177]		100	105 110
[0178]	Gln Tyr Thr Val Lys Lys Asp Lys Glu Glu Thr Glu Gly Asn Glu Ser		
[0179]		115	120 125
[0180]	Ser Glu Ala Thr Ser Pro Val Asn Ala Ile Tyr Ser Leu Ala		
[0181]		130	135 140
[0182]	<210> 6		
[0183]	<211> 28		
[0184]	<212> DNA		
[0185]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
[0186]	<400> 6		
[0187]	gacggatcca tcgaaattcc tatggatc 28		
[0188]	<210> 7		
[0189]	<211> 26		
[0190]	<212> DNA		
[0191]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
[0192]	<400> 7		
[0193]	agctcgagag cagcctttac tctcac 26		
[0194]	<210> 8		

- [0195] <211> 27
[0196] <212> DNA
[0197] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0198] <400> 8
[0199] gacggatccg taaaggctgc tccctac 27
[0200] <210> 9
[0201] <211> 26
[0202] <212> DNA
[0203] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0204] <400> 9
[0205] agctcgaggt ctttgacctc caggcg 26
[0206] <210> 10
[0207] <211> 28
[0208] <212> DNA
[0209] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0210] <400> 10
[0211] gacggatcca ggaagacgac tccctgac 28
[0212] <210> 11
[0213] <211> 27
[0214] <212> DNA
[0215] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0216] <400> 11
[0217] agctcgagtc agggataatc ttctccg 27
[0218] <210> 12
[0219] <211> 29
[0220] <212> DNA
[0221] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0222] <400> 12
[0223] gacggatcct ccggagaaga ttatcccag 29
[0224] <210> 13
[0225] <211> 28
[0226] <212> DNA
[0227] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0228] <400> 13
[0229] agctcgaggg tgtaagctgc ggttgag 28
[0230] <210> 14
[0231] <211> 30
[0232] <212> DNA
[0233] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0234]	<400> 14	
[0235]	gacggatcca ccaacaacca agcggacatc	30
[0236]	<210> 15	
[0237]	<211> 28	
[0238]	<212> DNA	
[0239]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0240]	<400> 15	
[0241]	agctcgagtt aggccagaga gtagatag	28
[0242]	<210> 16	
[0243]	<211> 972	
[0244]	<212> DNA	
[0245]	<213> 人NF155 (NF155-25)	
[0246]	<400> 16	
[0247]	atcgaaattc ctatggatct gacgcagccg ccaaccatca ccaagcagtc agcgaaggat	60
[0248]	cacatcgtgg acccccgtga taacatcctg attgagtgtg aagcaaaagg gaaccctgcc	120
[0249]	cccagcttcc actggacacg aaacagcaga ttcttcaaca tcgccaagga cccccgggtg	180
[0250]	tccatgagga ggaggtctgg gaccctggtg attgacttcc gcagtggcgg gcggccggag	240
[0251]	gaatatgagg gggaaatca gtgcttcgcc cgcaacaaat ttggcacggc cctgtccaat	300
[0252]	aggatccgcc tgcaggtgtc taaatctcct ctgtggccca aggaaaacct agaccctgtc	360
[0253]	gtggtccaag agggcgctcc tttgacgctc cagtgcaacc ccccgctgg acttccatcc	420
[0254]	ccggtcatct tctggatgag cagctccatg gagcccatca cccaagacaa acgtgtctct	480
[0255]	cagggccata acggagacct atacttctcc aacgtgatgc tgcaggacat gcagaccgac	540
[0256]	tacagttgta acgcccgtt ccacttcacc cacaccatcc agcagaagaa ccctttcacc	600
[0257]	ctcaaggctc tcaccaacca cccttataat gactcgtcct taagaaacca ccctgacatg	660
[0258]	tacagtgcc gaggagttgc agaaagaaca ccaagcttca tgtatcccca gggcaccgcg	720
[0259]	agcagccaga tgggtgcttcg tggcatggac ctctgctgg aatgcatcgc ctccggggtc	780
[0260]	ccaacaccag acatcgcgat gtacaagaaa ggtggggacc tcccatctga taaggccaag	840
[0261]	tttgagaact ttaataaggc cctgcgtatc acaaatgtct ctgaggaaga ctccggggag	900
[0262]	tatttctgcc tggcctcaa caagatgggc agcatccggc acacgatctc ggtgagagta	960
[0263]	aaggctgctt aa	972
[0264]	<210> 17	
[0265]	<211> 567	
[0266]	<212> DNA	
[0267]	<213> 人NF155 (NF155-25)	
[0268]	<400> 17	
[0269]	gtaaaggctg ctccctactg gctggacgaa cccaagaacc ttattctggc tcctggcgag	60
[0270]	gatgggagac tgggtgtgtc agccaatgga aaccccaaac ccaactgtcca gtggatgggtg	120
[0271]	aatggggaac ctttgaatc ggcaccacct aacccaaacc gtgaggtggc cggagacacc	180
[0272]	atcatcttcc gggacacca gatcagcagc agggctgtgt accagtgcaa cacctccaac	240

[0273]	gagcatggct acctgctggc caacgccttt gtcagtgtgc tggatgtgcc gcctcggatg	300
[0274]	ctgtcgcgcc ggaaccagct cattcagatg attctttaca accggacgcg gctggactgc	360
[0275]	cctttctttg ggtctcccat cccacactg cgatggttta agaatgggca aggaagcaac	420
[0276]	ctggatggtg gcaactacca tgtttatgag aacggcagtc tggaaattaa gatgatccgc	480
[0277]	aaagaggacc agggcatcta cacctgtgtc gccaccaaca tcctgggcaa agctgaaaac	540
[0278]	caagtccgcc tggaggtcaa agactaa	567
[0279]	<210> 18	
[0280]	<211> 924	
[0281]	<212> DNA	
[0282]	<213> 人NF155 (NF155-530)	
[0283]	<400> 18	
[0284]	aaagacccca ccaggatcta ccggatgccc gaggaccagg tggccagaag gggcaccacg	60
[0285]	gtgcagctgg agtgtcgggt gaagcacgac ccctccctga aactcacctg ctccctgctg	120
[0286]	aaggatgacg agccgctcta tattggaac aggatgaaga aggaagacga ctccctgacc	180
[0287]	atctttgggg tggcagagcg ggaccagggc agttacacgt gtgtcgcag caccgagcta	240
[0288]	gaccaagacc tggccaaggc ctacctacc gtgctagctg atcaggccac tccaactaac	300
[0289]	cgtttggtg ccctgccccaa aggacggcca gaccggcccc gggacctgga gctgaccgac	360
[0290]	ctggccgaga ggagcgtgcg gctgacctgg atccccgggg atgctaaca cagccccatc	420
[0291]	acagactacg tcgtccagtt tgaagaagac cagttccaac ctggggctctg gcatgaccat	480
[0292]	tccaagtacc ccggcagcgt taactcagcc gtctccggc tgtccccgta tgtcaactac	540
[0293]	cagttccgtg tcattgccat caacgaggtt gggagcagcc accccagcct cccatccgag	600
[0294]	cgctaccgaa ccagtggagc accccccgag tccaatcctg gtgacgtgaa gggagagggg	660
[0295]	accagaaaga acaacatgga gatcacgtgg acgccccatga atgccacctc ggcctttggc	720
[0296]	cccaacctgc gctacattgt caagtggagg cggagagaga ctcgagagc ctggaacaac	780
[0297]	gtcacagtgt ggggctctcg ctacgtggtg gggcagacc cagtctacgt gccctatgag	840
[0298]	atccgagtcc aggctgaaaa tgacttcggg aagggcctg agccagagtc cgtcatcggt	900
[0299]	tactccggag aagattatcc ctga	924
[0300]	<210> 19	
[0301]	<211> 657	
[0302]	<212> DNA	
[0303]	<213> 人NF155 (NF155-824)	
[0304]	<400> 19	
[0305]	tccggagaag attatcccag ggctgcgccc actgaagtta aagtccgagt catgaacagc	60
[0306]	acagccatca gccttcagtg gaaccgcgtc tactccgaca cggtcaggg ccagctcaga	120
[0307]	gagtaccgag cctactactg gagggagagc agcttgctga agaacctgtg ggtgtctcag	180
[0308]	aagagacagc aagccagctt ccctgggtgac cgcctccgtg gcgtggtgtc ccgcctcttc	240
[0309]	ccctacagta actacaagct ggagatggtt gtggtcaatg ggagaggtga tgggcctcgc	300
[0310]	agtgagacca aggagttcac cccccggaa ggagtacca gtgcccctag gcgtttccga	360
[0311]	gtccggcagc ccaacctgga gacaatcaac ctggaatggg atcatcctga gcatccaaat	420

[0312]	gggatcatga ttgatacac tctcaaatat gtggccttta acgggaccaa agtaggaaag	480
[0313]	cagatagtgg aaaacttctc tccaatcag accaagttca cggtgcaaag aacggacccc	540
[0314]	gtgtcacgct accgctttac cctcagcgcc aggacgcagg tgggctctgg ggaagccgtc	600
[0315]	acagaggagt caccagcacc cccgaatgaa gctactccaa ccgcagctta cacctga	657
[0316]	<210>	20
[0317]	<211>	429
[0318]	<212>	DNA
[0319]	<213>	人NF155 (NF155-1048)
[0320]	<400>	20
[0321]	accaacaacc aagcggacat cgccaccag ggctggttca ttgggcttat gtgcgccatc	60
[0322]	gccctcctgg tgctgatcct gctcatcgtc tgtttcatca agaggagtcg cggcggcaag	120
[0323]	taccagtac gagaaaagaa ggatgttccc cttggccctg aagaccccaa ggaagaggat	180
[0324]	ggctcatttg actatagtga tgaggacaac aagcccctgc agggcagtca gacatctctg	240
[0325]	gacggcacca tcaagcagca ggagagtgac gacagcctgg tggactatgg cgagggtggc	300
[0326]	gagggtcagt tcaatgaaga cggctccttc atcgccagc acacggtcaa aaaggacaag	360
[0327]	gaggaaacag agggcaacga aagctcagag gccacgtcac ctgtcaatgc tatctactct	420
[0328]	ctggcctaa	429

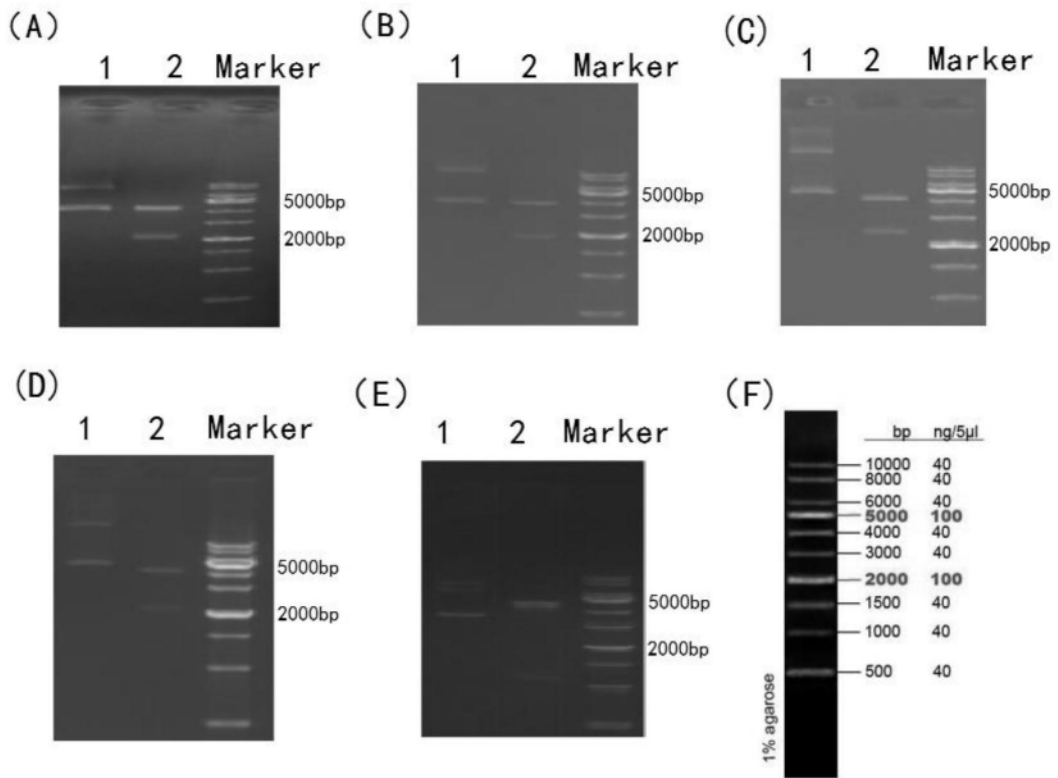


图1

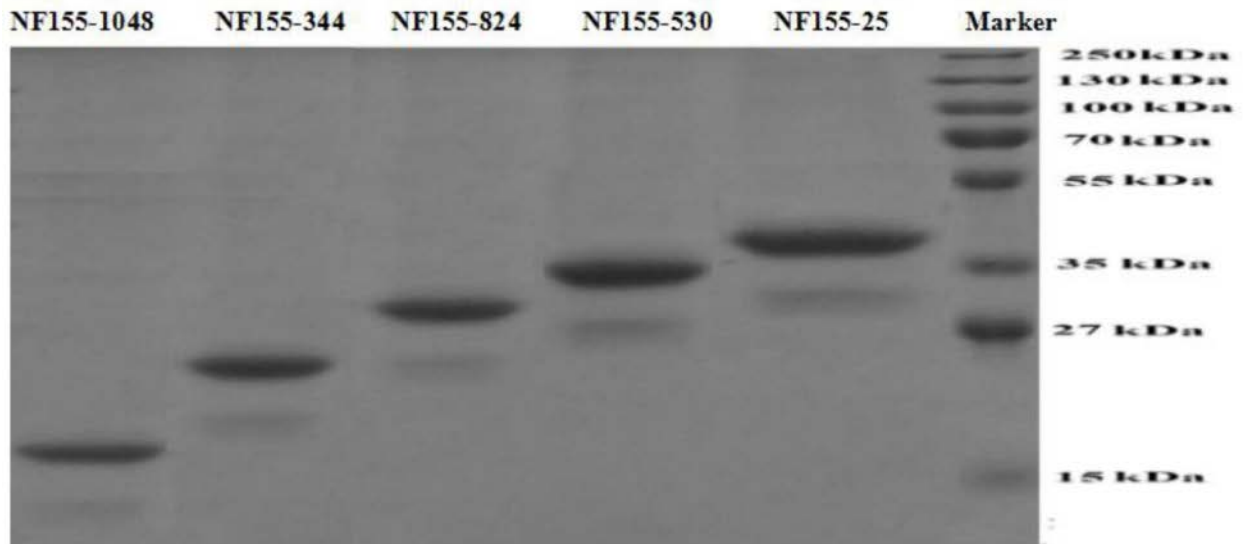


图2