



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년04월10일
 (11) 등록번호 10-1253084
 (24) 등록일자 2013년04월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/195 (2006.01) *C07K 16/12* (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2009-7023229
 (22) 출원일자(국제) 2008년03월31일
 심사청구일자 2009년11월06일
 (85) 번역문제출일자 2009년11월06일
 (65) 공개번호 10-2010-0002274
 (43) 공개일자 2010년01월06일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2008/058842
 (87) 국제공개번호 WO 2008/124358
 국제공개일자 2008년10월16일
 (30) 우선권주장
 11/697,769 2007년04월09일 미국(US)
 (56) 선행기술조사문헌
 WO2003087758 A2
 Infection and Immunity, Vol. 74, No. 3, pp.
 1873-1882 (2006.03.)

(73) 특허권자
아이텍스 래보러토리즈, 인코포레이티드
 미국 메인 04092 웨스트브룩 원 아이텍스 드라이브
 (72) 발명자
비얼, 멜리사, 제인
 미국 04107 메인 케이프 엘리자베스 마운틴 뷰 로
 드 4
티렐, 필리스, 아이온
 미국 04096 메인 야머스 샌디 포인트 로드 57
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
남상선, 특허법인 남앤드남

전체 청구항 수 : 총 33 항

심사관 : 노은주

(54) 발명의 명칭 **아나플라스마 플라티스의 검출**

(57) 요약

본 발명은 *아나플라스마 플라티스(Anaplasma platys)* 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드의 검출을 위한 조성물 및 검출 방법을 제공한다.

(72) 발명자

첸드라세커, 라마스와미

미국 04074 메인 스카보로우 파울러 팜 로드 34

리우, 지아유

미국 04074 메인 스카보로우 골렘 로드 79 아파트
먼트 에프36

특허청구의 범위

청구항 1

서열 목록 번호:12의 아미노산 또는 서열 목록 번호:12의 15개 이상의 연속 아미노산으로 이루어진 정제된 폴리펩티드로서, 상기 15개 이상의 연속 아미노산이 서열 목록 번호:12의 아미노산 16-150 또는 209-240으로부터 선택된, 정제된 폴리펩티드.

청구항 2

제 1항의 폴리펩티드를 엔코딩하는 분리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 서열 목록 번호:10, 서열 목록 번호:11, 서열 목록 번호:13, 서열 목록 번호:14 또는 서열 목록 번호:15의 아미노산인 정제된 폴리펩티드.

청구항 4

제 1항에 있어서, 담체를 추가로 포함하는 정제된 폴리펩티드.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 정제된 폴리펩티드가 다합체(multimeric) 형태인 정제된 폴리펩티드.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 정제된 폴리펩티드가 지시약(indicator reagent), 아미노산 스페이서, 아미노산 링커, 신호 서열, 이동 종결 서열(stop transfer sequence), 막횡단 도메인, 단백질 정제 리간드, 이중성 폴리펩티드 또는 이들의 조합물에 연결된 정제된 폴리펩티드.

청구항 7

(a) 폴리펩티드/항체 복합체가 형성되도록 하는 조건하에서 제 1항 또는 제 3항의 정제된 폴리펩티드와 시험 샘플을 접촉시키는 단계; 및 (b) 폴리펩티드/항체 복합체를 검출하는 단계를 포함하는, *아나플라스마 플라티스* (*Anaplasma platys*) 또는 *아나플라스마 파고사이토펜* (*Anaplasma phagocytophilum*) 폴리펩티드, 또는 이 둘 모두에 특이적으로 결합하는 항체를 검출하는 방법으로서, 상기 폴리펩티드/항체 복합체의 검출이 *아나플라스마 플라티스*, *아나플라스마 파고사이토펜*, 또는 *아나플라스마 플라티스* 및 *아나플라스마 파고사이토펜* 둘 모두에 특이적인 항체가 상기 시험 샘플에 존재하는 것을 나타내고, 상기 폴리펩티드/항체 복합체의 부재가 *아나플라스마 플라티스*, *아나플라스마 파고사이토펜*, 또는 *아나플라스마 플라티스* 및 *아나플라스마 파고사이토펜* 둘 모두에 특이적인 항체가 상기 시험 샘플에 존재하지 않는 것을 나타내는, 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 단계 (b)의 수행 전에 상기 단계 (a)의 복합체와 지시약을 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 9

제 7항에 있어서, 상기 시험 샘플 중의 상기 항체의 양이 결정되는 방법.

청구항 10

제 7항에 있어서, 상기 정제된 폴리펩티드가 기관에 부착되는 방법.

청구항 11

제 7항에 있어서, 상기 정제된 폴리펩티드가 융합 단백질이고, 상기 정제된 폴리펩티드가 지시약, 아미노산 스페이서, 아미노산 링커, 신호 서열, 이동 종결 서열, 막횡단 도메인, 단백질 정제 리간드, 이중성 단백질, 또는 이들의 조합물에 융합되는 방법.

청구항 12

제 7항에 있어서, 상기 정제된 폴리펩티드가 다합체 형태인 방법.

청구항 13

제 7항에 있어서, 상기 방법이 미세역가 플레이트 검정, 가역성 유동 크로마토그래피 결합 검정, 효소 면역 측정법, 방사선면역검정, 적혈구응집 검정, 웨스턴 블롯 검정, 형광 분극 면역검정, 또는 간접 면역형광 검정을 포함하는 방법.

청구항 14

(a) 인간을 제외한 피검체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계; (b) 폴리펩티드/항체 복합체가 형성되도록 하는 조건하에서 제 1항 또는 제 3항의 정제된 폴리펩티드와 상기 생물학적 샘플을 접촉시키는 단계; 및 (c) 폴리펩티드/항체 복합체를 검출하는 단계를 포함하는, 인간을 제외한 피검체에서 *아나플라스마 플라티스*, *아나플라스마 파고사이트필룸*, 또는 *아나플라스마 플라티스* 및 *아나플라스마 파고사이트필룸* 둘 모두의 감염 또는 이에 대한 노출을 검출하는 방법으로서, 상기 폴리펩티드/항체 복합체의 검출이 상기 피검체가 *아나플라스마 플라티스*, *아나플라스마 파고사이트필룸*, 또는 *아나플라스마 플라티스* 및 *아나플라스마 파고사이트필룸* 둘 모두의 감염 또는 이에 대한 노출을 갖는 것을 나타내고, 상기 폴리펩티드/항체 복합체의 부재가 상기 피검체가 *아나플라스마 플라티스*, *아나플라스마 파고사이트필룸*, 또는 *아나플라스마 플라티스* 및 *아나플라스마 파고사이트필룸* 둘 모두의 감염 또는 이에 대한 노출을 갖지 않는 것을 나타내는, 방법.

청구항 15

제 14항에 있어서, 상기 단계 (c)의 수행 전에 상기 단계 (b)의 폴리펩티드/항체 복합체와 측정가능한 신호를 발생시키는 지시약을 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 16

제 14항에 있어서, 상기 정제된 폴리펩티드가 융합 단백질이고, 상기 정제된 폴리펩티드가 지시약, 아미노산 스페이서, 아미노산 링커, 신호 서열, 이동 종결 서열, 막횡단 도메인, 단백질 정제 리간드, 이종성 단백질 또는 이들의 조합물에 융합되는 방법.

청구항 17

제 14항에 있어서, 상기 폴리펩티드/항체 복합체가 *아나플라스마 플라티스*, *아나플라스마 파고사이트필룸*, 또는 *아나플라스마 플라티스* 및 *아나플라스마 파고사이트필룸* 둘 모두에 의한 상기 피검체의 노출 또는 감염 10일 후에 검출되는 방법.

청구항 18

아나플라스마 플라티스 p44 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체로서, 상기 폴리펩티드가 서열 목록 번호:12의 15개 이상의 연속 아미노산으로 이루어지고, 상기 15개 이상의 연속 아미노산이 서열 목록 번호:12의 아미노산 16-150 또는 209-240으로부터 선택된 항체.

청구항 19

제 18항에 있어서, 상기 항체가 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, Fab 단편, Fab' 단편, Fab'-SH 단편, F(ab')₂ 단편, Fv 단편, 또는 단일 사슬 항체인 항체.

청구항 20

(a) 폴리펩티드/항체 복합체가 형성되도록 하는 조건하에서 *아나플라스마 플라티스* 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체와 샘플을 접촉시키는 단계로서, 상기 *아나플라스마 플라티스* 폴리펩티드가 서열 목록 번호:12의 15개 이상의 연속 아미노산으로 이루어지고, 상기 15개 이상의 연속 아미노산이 서열 목록 번호:12의 아미노산 16-150 또는 209-240으로부터 선택되는 단계; 및 (b) 폴리펩티드/항체 복합체를 검출하는 단계를 포함하는, 샘플 내의 *아나플라스마 플라티스* 또는 *아나플라스마 파고사이트필룸* 폴리펩티드를 검출하는 방법으로서, 상기 폴리펩티드/항체 복합체의 검출이 *아나플라스마 플라티스* 폴리펩티드가 상기 샘플 내에 존재하는 것을 나

타내고, 상기 폴리펩티드/항체 복합체의 부재가 *아나플라스마 플라티스* 폴리펩티드가 상기 샘플에 존재하지 않는 것을 나타내는, 방법.

청구항 21

제 20항에 있어서, 상기 하나 이상의 항체가 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, Fab 단편, Fab' 단편, Fab'-SH 단편, F(ab')₂ 단편, Fv 단편, 또는 단일 사슬 항체인 방법.

청구항 22

(a) *아나플라스마 플라티스* p44 폴리뉴클레오티드와 프로브 폴리뉴클레오티드 사이에 복합체 하이브리드화를 가능케 하는 조건하에서 서열 목록 번호:6, 7, 8, 9 또는 이들의 조합물을 포함하는 프로브 폴리뉴클레오티드와 시험 샘플을 접촉시키는 단계; 및 (b) *아나플라스마 플라티스* p44 폴리뉴클레오티드/프로브 폴리뉴클레오티드 복합체를 검출하는 단계를 포함하는, *아나플라스마 플라티스* p44 폴리뉴클레오티드를 검출하는 방법으로서, 상기 *아나플라스마 플라티스* p44 폴리뉴클레오티드/프로브 폴리뉴클레오티드 복합체의 부재가 *아나플라스마 플라티스* 폴리뉴클레오티드가 상기 시험 샘플에 존재하지 않는 것을 나타내고, 상기 *아나플라스마 플라티스* p44 폴리뉴클레오티드/프로브 폴리뉴클레오티드 복합체의 존재가 *아나플라스마 플라티스* 폴리뉴클레오티드가 상기 시험 샘플에 존재하는 것을 나타내는, 방법.

청구항 23

(a) 서열 목록 번호:6 및 서열 목록 번호:7의 서열을 포함하는 핵산 프라이머와 시험 샘플을 접촉시키는 단계; 및 (b) 핵산 증폭 반응을 수행하는 단계를 포함하는 *아나플라스마 플라티스* 폴리뉴클레오티드를 검출하는 방법으로서, *아나플라스마 플라티스* 폴리뉴클레오티드가 상기 시험 샘플에 존재하는 경우 *아나플라스마 플라티스* 폴리뉴클레오티드를 포함하는 증폭 생성물이 생성되는, 방법.

청구항 24

제 23항에 있어서, 서열 목록 번호:8 또는 서열 목록 번호:9의 서열 또는 둘 모두를 포함하는 핵산 프로브가 증폭 생성물을 검출하는데 사용되는 방법.

청구항 25

제 23항에 있어서, 시험 샘플에 존재하는 임의의 *아나플라스마 파고사이토피룸* 폴리뉴클레오티드는 증폭되지 않는 방법.

청구항 26

제 23항에 있어서, 상기 핵산 프로브가 검출가능한 표지를 포함하는 방법.

청구항 27

제 23항에 있어서, 상기 핵산 증폭 반응이 중합효소 연쇄 반응(PCR), 종말점(end-point) PCR, 실시간 PCR, 또는 네스티드(nested) PCR 검정인 방법.

청구항 28

제 23항에 있어서, 샘플 내의 상기 *아나플라스마 플라티스* 폴리뉴클레오티드의 양이 결정되는 방법.

청구항 29

시험 샘플 내에서 *아나플라스마 플라티스* p44 폴리펩티드의 전부 또는 일부를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드의 존재를 검출하거나 *아나플라스마 플라티스* p44 폴리펩티드의 존재를 검출하는 단계를 포함하는, 인간을 제외한 피검체에서 *아나플라스마 플라티스* 감염을 진단하는 방법으로서,

상기 폴리펩티드가 서열 목록 번호:12의 15개 이상의 연속 아미노산으로 이루어지고, 상기 15개 이상의 연속 아미노산이 서열 목록 번호:12의 아미노산 16-150 또는 209-240으로부터 선택되는 방법.

청구항 30

(a) 중합효소 연쇄 반응 조건하에서 시험 샘플에 서열 목록 번호:6 및 서열 목록 번호:7의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 프라이머 및 안티센스 프라이머를 첨가하는 단계로서, 상기 프라이머가 *아나플라스마 플라티스* p44 폴리뉴클레오티드와 하이브리드화되어, *아나플라스마 플라티스* p44 폴리뉴클레오티드가 상기 시험 샘플에 존재하는 경우에 증폭 생성물이 형성되는 단계; 및 (b) 상기 증폭 생성물을 검출함으로써, *아나플라스마 플라티스* p44 폴리뉴클레오티드의 존재, 양, 또는 존재 및 양 둘 모두가 검출되는 단계를 포함하는, 시험 샘플 내의 *아나플라스마 플라티스* 폴리뉴클레오티드를 검출하거나, 정량하거나, 검출 및 정량하는 방법.

청구항 31

제 30항에 있어서, 시험 샘플 내에 존재하는 임의의 *아나플라스마 파고사이토티움* 폴리뉴클레오티드는 증폭되지 않는 방법.

청구항 32

제 18항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 서열 목록 번호:10, 서열 목록 번호:11, 서열 목록 번호:13, 서열 목록 번호:14 또는 서열 목록 번호:15의 15개 이상의 연속 아미노산인 항체.

청구항 33

제 20항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 서열 목록 번호:10, 서열 목록 번호:11, 서열 목록 번호:13, 서열 목록 번호:14 또는 서열 목록 번호:15의 15개 이상의 연속 아미노산인 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

[0001]

발명의 배경

[0002]

아나플라스마 플라티스(*Anaplasma platys*, *Apl*)는 개의 혈소판을 감염시키고, 주기적 저혈소판증(thrombocytopenia)을 야기시키는 편성(obligate) 세포내 박테리아다. 현재, 개가 상기 리케치아성(rickettsial) 작용제에 의해 감염되는 유일한 종으로 보이고, 상기 질병은 진드기의 *리피세팔루스*(*Rhipicephalus*) 종에 의해 전염되는 것이 분명해 보인다. *Apl*은 미국에서 1978년에 처음 보고되었으며, 이후 유럽, 아시아, 남아메리카, 중동, 오스트레일리아 및 아프리카에서 보고되었다. 공통의 매개동물로 인해, *Apl*은 종종 *에를리키아 카니스*(*Ehrlichia canis*)와의 공동 감염으로 발견된다. 개에서 임상 질병을 발생시키는 상기 유기체의 능력은 지리에 따라 다양한 것으로 보이며, 이는 균주 다양성이 독력에 기여할 수 있는 것을 암시한다. *Apl*은 개에서 임상 질병을 야기시키는 것으로 공지된 또 다른 *아나플라스마* 종인 *아나플라스마 파고사이토티움*(*Anaplasma phagocytophilum*, *Aph*)과 관련된다. *Aph*는 인간을 포함하는 광범위한 포유동물을 감염시킬 수 있고, 이는 현저한 이환율을 발생시킬 수 있다. 임상 징후는 보통 비-특이적이며, 식욕부진, 기면, 파행, 열, 및 저혈소판증을 포함한다. *Aph*는 진드기의 참진드기 종(*Ixodes spp*)에 의해 점염되고, 전염은 미국, 영국 및 유럽 전역에서 보고되었다.

[0003]

*Aph*와 *Apl*을 구별하는 것을 시도하는 현재의 진단 시험은 제한된 특이성을 갖는다. 16SrRNA를 이용한 *Aph* 및 *Apl*에 대한 PCR 또한 특이성과 관련된 문제점을 갖는다. 따라서, *Apl*의 특이적 검출을 위한 PCR 검정이 당 분야에 필요하다. 추가로, *Aph* 폴리펩티드 또는 *Apl*에 특이적인 항체를 이용하는 *Apl*에 대한 혈청학적 시험은 모든 경우의 *Apl* 감염 또는 노출을 검출하지 않는 경향이 있다. 따라서, 더욱 정확하게 *Apl*을 검출하는 혈청학적 시험이 당 분야에 필요하다.

[0004]

발명의 요약

[0005]

본 발명의 한 구체예는 서열 목록 번호:12의 아미노산 또는 서열 목록 번호:12의 적어도 약 10개의 연속 아미노산을 포함하는 정제된 폴리펩티드를 제공하며, 상기 적어도 약 10개의 연속 아미노산은 서열 목록 번호:12의 아미노산 16-150 또는 209-240으로부터 선택된다. 폴리펩티드는 서열 목록 번호:10; 서열 목록 번호:11; 서열 목록 번호:13, 서열 목록 번호:14 또는 서열 목록 번호:15의 아미노산을 포함할 수 있다. 본 발명은 또한 상기 폴리펩티드를 엔코딩하는 분리된 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 정제된 폴리펩티드는 추가로 담체를 포함할 수 있다. 정제된 폴리펩티드는 다합체(multimeric) 형태일 수 있다. 정제된 폴리펩티드는 지시약(indicator reagent), 아미노산 스페이서(spacer), 아미노산 링커, 신호 서열, 이동 중결 서열(stop transfer sequence),

막횡단 도메인, 단백질 정제 리간드, 이중성 폴리펩티드 또는 이들의 조합물에 연결될 수 있다.

[0006] 본 발명의 또 다른 구체예는 *아나플라스마 플라티스* 또는 *아나플라스마 파고사이토피룸* 폴리펩티드 또는 둘 모두에 특이적으로 결합하는 항체를 검출하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 폴리펩티드/항체 복합체가 형성되도록 하는 조건하에서 본 발명의 정제된 폴리펩티드와 시험 샘플을 접촉시키는 단계, 폴리펩티드/항체 복합체를 검출하는 단계를 포함한다. 폴리펩티드/항체 복합체의 검출은 *아나플라스마 플라티스* 및/또는 *아나플라스마 파고사이토피룸*에 특이적인 항체가 시험 샘플에 존재하는 것을 나타내고, 폴리펩티드/항체 복합체의 부재는 *아나플라스마 플라티스* 및/또는 *아나플라스마 파고사이토피룸*에 특이적인 항체가 시험 샘플에 존재하지 않는 것을 나타낸다. 복합체는 검출 단계 전에 지시약과 접촉될 수 있다. 시험 샘플 내의 항체의 양이 결정될 수 있다. 정제된 폴리펩티드는 기관에 부착될 수 있다. 정제된 폴리펩티드는 이러한 정제된 폴리펩티드가 지시약, 아미노산 스페이서, 아미노산 링커, 신호 서열, 이동 종결 서열, 막횡단 도메인, 단백질 정제 리간드, 이중성 단백질, 또는 이들의 조합물에 용해된 용해 단백질일 수 있다. 정제된 폴리펩티드는 다합체 형태일 수 있다. 상기 방법은 미세역가 플레이트 검정, 가역성 유동 크로마토그래피 결합 검정, 효소 면역 측정법, 방사선면역측정법, 적혈구응집 검정, 웨스턴 블롯 검정, 형광 분극 면역분석, 또는 간접 면역형광 검정을 포함할 수 있다.

[0007] 본 발명의 또 다른 구체예는 피검체에서 *아나플라스마 플라티스* 및/또는 *아나플라스마 파고사이토피룸* 감염 및/또는 *아나플라스마 플라티스* 및/또는 *아나플라스마 파고사이토피룸*에 대한 노출을 검출하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 피검체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계; 폴리펩티드/항체 복합체가 형성되도록 하는 조건하에서 본 발명의 정제된 폴리펩티드와 생물학적 샘플을 접촉시키는 단계; 및 폴리펩티드/항체 복합체를 검출하는 단계를 포함한다. 폴리펩티드/항체 복합체의 검출은 피검체가 *아나플라스마 플라티스* 및/또는 *아나플라스마 파고사이토피룸* 감염 및/또는 *아나플라스마 플라티스* 및/또는 *아나플라스마 파고사이토피룸*에 대한 노출을 가짐을 나타낸다. 폴리펩티드/항체 복합체의 부재는 포유동물이 *아나플라스마 플라티스* 및/또는 *아나플라스마 파고사이토피룸* 감염 및/또는 *아나플라스마 플라티스* 및/또는 *아나플라스마 파고사이토피룸*에 대한 노출을 갖지 않는 것을 나타낸다. 폴리펩티드/항체 복합체는 검출 단계의 수행 전에 측정가능한 신호를 발생시키는 지시약과 접촉될 수 있다. 정제된 폴리펩티드는 이러한 정제된 폴리펩티드가 지시약, 아미노산 스페이서, 아미노산 링커, 신호 서열, 이동 정지 서열, 막횡단 도메인, 단백질 정제 리간드, 이중성 단백질 또는 이들의 조합물에 용해된 용해 단백질일 수 있다. 폴리펩티드/항체 복합체는 *아나플라스마 플라티스* 및/또는 *아나플라스마 파고사이토피룸*에 의한 피검체의 노출 또는 감염 약 10일 후에 검출될 수 있다.

[0008] 본 발명의 또 다른 구체예는 *아나플라스마 플라티스* p44 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체를 제공하며, 상기 폴리펩티드는 서열 목록 번호:12의 적어도 약 10개의 연속 아미노산을 포함하고, 상기 적어도 약 10개의 연속 아미노산은 서열 목록 번호:12의 아미노산 16-150 또는 209-240으로부터 선택된다. 항체는 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, Fab 단편, Fab' 단편, Fab'-SH 단편, F(ab')₂ 단편, Fv 단편, 또는 단일 사슬 항체일 수 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 구체예는 샘플 내의 *아나플라스마 플라티스* 또는 *아나플라스마 파고사이토피룸* 폴리펩티드를 검출하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 폴리펩티드/항체 복합체가 형성되도록 하는 조건하에서 *아나플라스마 플라티스* 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체와 샘플을 접촉시키는 단계; 및 폴리펩티드/항체 복합체를 검출하는 단계를 포함하며, 상기 *아나플라스마 플라티스* 폴리펩티드는 서열 목록 번호:12의 적어도 약 10개의 연속 아미노산을 포함하고, 상기 적어도 약 10개의 연속 아미노산은 서열 목록 번호:12의 아미노산 16-150 또는 209-240으로부터 선택된다. 폴리펩티드/항체 복합체의 검출은 *아나플라스마 플라티스* 폴리펩티드가 샘플에 존재하는 것을 나타내고, 폴리펩티드/항체 복합체의 부재는 *아나플라스마 플라티스* 폴리펩티드가 샘플에 존재하지 않는 것을 나타낸다.

[0010] 본 발명의 또 다른 구체예는 *아나플라스마 플라티스* p44 폴리뉴클레오티드를 검출하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 *아나플라스마 플라티스* p44 폴리뉴클레오티드와 프로브 폴리뉴클레오티드 사이에 복합체 하이브리드화를 가능케 하는 조건하에서 시험 샘플과 서열 목록 번호:6, 7, 8, 9의 아미노산 또는 이들의 조합물을 포함하는 프로브 폴리뉴클레오티드를 접촉시키는 단계; 및 *아나플라스마 플라티스* p44 폴리뉴클레오티드/프로브 폴리뉴클레오티드 복합체를 검출하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 *아나플라스마 플라티스* p44 폴리뉴클레오티드/프로브 폴리뉴클레오티드 복합체의 부재는 *아나플라스마 플라티스* 폴리뉴클레오티드가 시험 샘플에 존재하지 않는 것을 나타내고, *아나플라스마 플라티스* p44 폴리뉴클레오티드/프로브 폴리뉴클레오티드 복합체의 존재는 *아나플라스마 플라티스* 폴리뉴클레오티드가 시험 샘플에 존재하는 것을 나타낸다.

[0011] 본 발명의 또 다른 구체예는 *아나플라스마 플라티스* 폴리뉴클레오티드를 검출하는 방법을 제공한다. 상기 방법

은 시험 샘플과 서열 목록 번호:6 및 서열 목록 번호:7의 서열을 포함하는 핵산 프라이머를 접촉시키는 단계; 및 핵산 증폭 반응을 수행하는 단계를 포함한다. *아나플라스마 플라티스*가 시험 샘플에 존재하는 경우, *아나플라스마 플라티스* 폴리뉴클레오티드를 포함하는 증폭 생성물이 생성된다. 서열 목록 번호:8 또는 서열 목록 번호:9의 서열 또는 둘 모두를 포함하는 핵산 프로브가 증폭 생성물을 검출하기 위해 사용될 수 있다. 시험 샘플에 존재하는 임의의 *아나플라스마 파고사이트필룸* 폴리뉴클레오티드는 증폭되지 않을 수 있다. 핵산 프로브는 검출가능한 표지를 포함할 수 있다. 핵산 증폭 반응은 중합효소 연쇄 반응(PCR), 종말점(end-point) PCR, 실시간 PCR, 또는 네스티드(nested) PCR 검정일 수 있다. 샘플 내의 *아나플라스마 플라티스* 폴리뉴클레오티드의 양이 결정될 수 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 구체에는 *아나플라스마 플라티스* p44 폴리펩티드의 전부 또는 일부를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드의 존재를 검출하는 단계 및/또는 시험 샘플 내의 *아나플라스마 플라티스* p44 폴리펩티드의 존재를 검출하는 단계를 포함하는, 피검체에서 *아나플라스마 플라티스* 감염을 진단하는 방법을 제공한다.

[0013] 본 발명의 또 다른 구체에는 시험 샘플 내의 *아나플라스마 플라티스* 폴리뉴클레오티드를 검출하고/하거나 정량하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 중합효소 연쇄 반응에 적합한 조건하에서 시험 샘플에 센스 프라이머 및 안티센스 프라이머를 첨가하는 단계; 및 증폭 생성물을 검출함으로써 *아나플라스마 플라티스* p44 폴리뉴클레오티드의 존재 및/또는 양이 검출되는 단계를 포함하며, 여기서 상기 프라이머는 *아나플라스마 플라티스* p44 폴리뉴클레오티드와 하이브리드되어, *아나플라스마 플라티스* p44 폴리뉴클레오티드가 시험 샘플에 존재하는 경우에 증폭 생성물이 형성된다. 시험 샘플 내에 존재하는 임의의 *아나플라스마 파고사이트필룸* 폴리뉴클레오티드는 증폭되지 않을 수 있다.

[0014] 따라서, 본 발명은 *아나플라스마 플라티스* 또는 *아나플라스마 파고사이트필룸*의 혈청학적 검출, 및 *아나플라스마 플라티스*의 핵산 기재 특이적 검출을 위한 방법 및 조성물을 제공한다.

[0015] **도면의 간단한 설명**

[0016] 도 1A는 *Apl* p44 폴리뉴클레오티드 서열의 정렬을 도시한다. 도 1B는 *Apl* p44 폴리펩티드 서열의 정렬을 도시한다.

[0017] 도 2A는 *Apl* p44 폴리뉴클레오티드에 대한 실시간 PCR 검정의 분석 민감성을 도시한다. 도 2B는 *Apl* p44 폴리뉴클레오티드에 대한 실시간 PCR 검정의 특이성을 도시한다.

[0018] 도 3은 *A. 플라티스* 풍토성이고 *A. 파고사이트필룸*이 없는 지역에서 사는 개로부터 유래된 혈청 샘플 집단에 대한 *Aph* p44 펩티드 및 *Apl* p44 펩티드를 이용한 ELISA 결과의 비교를 도시한다.

[0019] **발명의 상세한 설명**

[0020] 본 발명은 *Apl* 및 *Aph* 감염 및/또는 노출의 확실한 검출에 사용될 수 있는 *Apl*의 주요 외부 표면 단백질인 p44의 폴리뉴클레오티드 서열, 및 번역된 단백질로부터의 펩티드를 기재한다. 추가로, 이러한 *Apl* p44 서열은, 예를 들어, 하이브리드화 프로브와 함께 실시간 PCR을 이용하여 *Apl* 및 *Aph* 감염을 구별하기 위한 PCR 표적을 제공한다.

[0021] **Apl 폴리펩티드**

[0022] 폴리펩티드는 아미드 결합에 의해서 공유결합되는 3개 이상의 아미노산의 중합체이다. 폴리펩티드는 번역 후 변형될 수 있다. 정제된 폴리펩티드는 세포성 물질, 그 밖의 유형의 폴리펩티드, 화학적 전구체, 폴리펩티드의 합성에 사용되는 화합물, 또는 이들의 조합물이 실질적으로 존재하지 않는 폴리펩티드 제제이다. 세포성 물질, 화학적 전구체, 폴리펩티드의 합성에 사용되는 화합물이 실질적으로 존재하지 않는 폴리펩티드 제제는 약 30%, 20%, 10%, 5%, 1% 이하의 그 밖의 폴리펩티드, 배양 배지, 화학적 전구체, 및/또는 합성에 사용되는 그 밖의 화합물을 갖는다. 따라서, 정제된 폴리펩티드는 약 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%이상 순수하다.

[0023] 본 발명의 한 구체예는 서열 목록 번호:12에 도시된 바와 같은 *Apl* p44 폴리펩티드를 제공한다.

YFYVGLDYXP AFSKINGFEI RESTGETAAV YPYMKDGRV EWKAEKFDWN
 TDPRIKFKN NPIVALEGSV GYSIGVARVE LEIGYEQFKT KGIRDTGSKE
 EEADAVYLLA KKLPHTLVSD QSDKFLEELK NTKAAEIVKF AEAVGTSAKD
 IDXKVCCKXX XNAAWSWCX QXGSXXXXXX KXSXXFTKA GVXXXXXGKA
 WPNGXXXXAA KAEDLSTALN RELTSAEKNK VAGLLTRTIS GGEVVEIRAV
 STTSVMXNAC YDLLS

[0024]

[0025]

본 발명의 한 구체예에서, 위치 9의 아미노산은 S 또는 C이고, 위치 153의 아미노산은 G 또는 K이고, 위치 159의 아미노산은 N 또는 H이고, 위치 160의 아미노산은 T 또는 N이고, 위치 161의 아미노산은 N 또는 G이고, 위치 165의 아미노산은 D, N 또는 G이고, 위치 168의 아미노산은 K 또는 Q이고, 위치 170의 아미노산은 E 또는 T이고, 위치 172의 아미노산은 T 또는 P이고, 위치 175의 아미노산은 G 또는 E이고, 위치 176의 아미노산은 S 또는 T이고, 위치 177의 아미노산은 D, E 또는 S이고, 위치 178의 아미노산은 T이거나 존재하지 않고, 위치 179의 아미노산은 S이거나 존재하지 않고, 위치 180의 아미노산은 G 또는 A이고, 위치 182의 아미노산은 E, A 또는 T이고, 위치 183의 아미노산은 F 또는 L이고, 위치 185의 아미노산은 K 또는 E이고, 위치 186의 아미노산은 L 또는 I이고, 위치 193의 아미노산은 D 또는 N이고, 위치 194의 아미노산은 A 또는 T이고, 위치 195의 아미노산은 N 또는 D이고, 위치 196의 아미노산은 E, G이거나 존재하지 않고, 위치 197의 아미노산은 K이거나 존재하지 않고, 위치 205의 아미노산은 H 또는 S이고, 위치 206의 아미노산은 T이거나 존재하지 않고, 위치 207의 아미노산은 D이거나 존재하지 않고, 위치 208의 아미노산은 S 또는 D이고, 위치 257의 아미노산은 L 또는 I이다. 상기 언급된 대안적 아미노산 잔기의 임의의 조합물을 포함하는 서열 목록 번호:12에 따른 폴리펩티드가 본 발명에 포함된다.

[0026]

본 발명의 한 구체예는 서열 목록 번호:10에 도시된 폴리펩티드이다: **KDGTRV EWKAEKFDWNTDPRI**.

[0027]

본 발명의 한 구체예는 서열 목록 번호:11에 도시된 폴리펩티드이다: **KDGTRV EWKAEKFDWNTDPRIKFKN**.

[0028]

본 발명의 한 구체예는 서열 목록 번호:13에 도시된 폴리펩티드이다: **RVELEIGYEQFKT KGIRDTGSKEEEDA**.

[0029]

본 발명의 한 구체예는 적어도 약 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140개, 또는 이 이상의 연속 아미노산을 포함하는 정제된 폴리펩티드를 제공하며, 상기 연속 아미노산은 서열 목록 번호:12의 아미노산 16-150 또는 209-240으로부터 선택된다. *Aph* p44의 아미노산 서열은 *Apl* p44와 70% 미만의 동일성을 갖는다. 다양한 *Apl* p44 분리체(도 1B) 사이에서 최소 가변성이고, 동시에 *Apl*로부터의 p44와 *Aph*로부터의 p44 사이에 서로 다른 2개의 아미노산 서열 영역은 16-150 및 209-240에 존재한다(참조: 상기 서열 목록 번호:12의 밑줄).

[0030]

본 발명의 정제된 폴리펩티드는 전장 폴리펩티드이거나 폴리펩티드의 단편일 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드의 단편은 본 발명의 폴리펩티드의 약 10, 15, 20, 50, 75, 100, 150, 200, 250개 또는 이 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 변이성 폴리펩티드는 서열 목록 번호:10, 11, 12, 13, 14 또는 15에 나타난 폴리펩티드 서열과 약 80% 이상, 또는 약 90, 96, 98, 또는 99% 이상 동일하며, 이 또한 본 발명의 폴리펩티드이다. 변이성 폴리펩티드는 하나 이상의 보존성 아미노산 변이 또는 그 밖의 작은 변형을 가지며 생물학적 활성을 보유, 즉 생물학적 기능성 증가물이다. 생물학적으로 활성인 증가물은 상응하는 야생형 폴리펩티드와 비교하는 경우 실질적으로 동일한 기능을 한다.

[0031]

서열 동일성 백분율은 당 분야에 인지도된 의미를 가지며, 두 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열 사이의 상동성을 측정하는 다수의 방법이 있다. [참조예: Lesk, Ed., *Computational Molecular Biology*, Oxford University Press, New York, (1988); Smith, Ed., *Biocomputing: Informatics And Genome Projects*, Academic Press, New York, (1993); Griffin & Griffin, Eds., *Computer Analysis Of Sequence Data, Part I*,

Humana Press, New Jersey, (1994); von Heinje, *Sequence Analysis In Molecular Biology*, Academic Press, (1987); and Gribskov & Devereux, Eds., *Sequence Analysis Primer*, M Stockton Press, New York, (1991)]. 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드를 정렬시키는 방법은 GCG 프로그램 패키지(Devereux *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 12:387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul *et al.*, *J. Molec. Biol* 215:403 (1990)), 및 스미스 및 와트만의 로컬 호몰로지 알고리즘(local homology algorithm of Smith and Waterman)(*Adv. App. Math.*, 2:482-489 (1981))를 이용하는 베스트핏 프로그램(Bestfit program)(Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711)을 포함하는 컴퓨터 프로그램에서 분류된다. 예를 들어, -12의 갭 오픈 페널티(gap open penalty)와 -2의 갭 연장 페널티(gap extension penalty)를 부여한 아핀 갭 조사(affine gap search)를 수행하면서, FASTA 알고리즘을 사용하는 컴퓨터 프로그램 ALIGN이 사용될 수 있다.

[0032] 특정의 서열이, 예를 들어, 참조 서열에 약 95% 동일한지를 결정하는 어떠한 서열 정렬 프로그램을 사용하는 경우, 파라미터는 동일성 백분율이 참조 폴리뉴클레오티드의 전장에 걸쳐서 계산되며 참조 폴리뉴클레오티드 중의 전체 뉴클레오티드수의 5%까지의 동일성에서 갭이 허용되도록 설정된다.

[0033] 변이체는 일반적으로 본 발명의 폴리펩티드 서열 중 하나를 변형시키고 변형된 폴리펩티드의 특성을 평가하여 생물학적 균등물인지를 결정함으로써 확인될 수 있다. 변이체는 검정, 예를 들어, 면역조직화학적 검정, 효소 면역측정법(ELISA), 방사면역검정(RIA), 면역효소 검정 또는 웨스턴 블롯 검정에서 본 발명의 폴리펩티드와 실질적으로 동일하게 반응하면, 예를 들어, 본래의 폴리펩티드의 활성의 90 내지 110%를 가지면 생물학적 균등물이다. 한 구체예에서, 검정은 생물학적 균등의 폴리펩티드가 상응하는 반응성 항원 또는 항체에 대한 본 발명의 폴리펩티드의 결합을 약 80, 95, 99, 또는 100%까지 감소되게 할 수 있는 경쟁적 검정이다. 상응하는 야생형 폴리펩티드와 특이적으로 결합하는 항체가 또한 변이성 폴리펩티드와 특이적으로 결합한다. 본 발명의 변이성 폴리펩티드는 약 1, 2, 3, 4, 5, 10, 또는 20개의 보존성 아미노산 치환을 포함할 수 있다.

[0034] 보존성 치환은 아미노산이 유사한 특성을 갖는 또 다른 아미노산으로 치환되어 펩티드 화학분야의 전문가라면 폴리펩티드의 이차 구조 및 감수성질(hydrophobic nature)이 실질적으로 변화되지 않은 것으로 예측할 수 있는 치환이다. 일반적으로 하기 아미노산 군이 보존성 변화를 나타낸다: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; 및 (5) phe, tyr, trp, his.

[0035] 본 발명의 폴리펩티드는 추가로 단백질의 전달을 동시 번역적으로 또는 후 번역적으로 유도하는 신호(또는 리더(leader)) 서열을 포함할 수 있다. 폴리펩티드는 또한 폴리펩티드(poly-His)의 합성, 정제 또는 확인 각각을 용이하게 하거나 고형 지지체에 대한 폴리펩티드의 결합을 향상시키는 링커 또는 그 밖의 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드는 면역글로불린 Fc 영역 또는 소 혈청 알부민에 긴유게이션될 수 있다.

[0036] 폴리펩티드는 이러한 폴리펩티드가 천연 상태에서 정상적으로 결합되지 않은 아미노산 서열, 즉 이중성 아미노산 서열에 공유결합되거나 비공유결합될 수 있다. 이중성 아미노산 서열은 비-Apl 유기체(예를 들어, Aph 유기체), 합성 서열, 또는 본 발명의 폴리펩티드의 카르복시 또는 아미노 말단에 보통 위치되지 않는 Apl 서열로부터 유래될 수 있다. 또한, 폴리펩티드는 아미노산이 아닌 화합물 또는 분자에 공유결합 또는 비공유결합될 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드는 지시약, 아미노산 스페이서, 아미노산 링커, 신호 서열, 이동 종결 서열, 막횡단 도메인, 단백질 정제 리간드, 또는 이들의 조합물에 연결될 수 있다. 본 발명의 한 구체예에서, 단백질 정제 리간드는, 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드의 아미노 말단 또는 카르복시 말단에 하나 이상의 C 아미노산 잔기가 존재할 수 있다. 아미노산 스페이서는 본 발명의 폴리펩티드와 천연상태에서 일반적으로 결합되어 있지 않은 아미노산 서열이다. 아미노산 스페이서는 약 1, 5, 10, 20, 100, 또는 1,000개의 아미노산을 포함할 수 있다.

[0037] 요망시, 폴리펩티드는 그 밖의 아미노산 서열, 예를 들어, 아미노산 링커, 아미노산 스페이서, 신호 서열, TMR 이동 종결 서열, 막횡단 도메인, 및 단백질 정제에 유용한 리간드, 예를 들어, 글루타티온-S-트랜스퍼라아제, 히스티딘 태그(tag), 및 *스태필로코쿠스(staphylococcal)* 단백질 A, 또는 이들의 조합물을 또한 함유할 수 있는 융합 단백질일 수 있다. 본 발명의 하나 이상의 폴리펩티드는 융합 단백질에 존재할 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드의 단편은 본 발명의 융합 단백질에 존재할 수 있다. 본 발명의 융합 단백질은 본 발명의 Apl 폴리펩티드, 또는 이의 단편, 또는 이들의 조합물 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0038] 본 발명의 폴리펩티드는 다합체 형태일 수 있다. 즉, 폴리펩티드는 본 발명의 Apl 폴리펩티드 또는 이의 조합물의 하나 이상의 복사체를 포함할 수 있다. 다량체 폴리펩티드는 다중 항원 펩티드(multiple antigen

peptide, MAP)일 수 있다. [참조예: Tam, J. Immunol. Methods, 196:17-32 (1996)].

[0039] 본 발명의 폴리펩티드는 *Apl* p44 대해 특이적인 항체에 의해서 인지되는 항원을 포함할 수 있다. 항원은 하나 이상의 에피토프(즉, 항원성 결정기)를 포함할 수 있다. 에피토프는 선형 에피토프, 연속성 에피토프 또는 형태적(conformational) 에피토프일 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드 내의 에피토프는 몇 가지 방법에 의해서 확인될 수 있다. (참조예: 미국 특허 번호 제4,554,101호; Jameson & Wolf, *CABIOS* 4:181-186 (1988)). 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드는 분리되고 스크리닝될 수 있다. 전체 폴리펩티드 서열을 함께 스패닝(spanning) 하는 일련의 짧은 펩티드는 단백질분해 절단에 의해서 제조될 수 있다. 예를 들어, 100-머(mer) 폴리펩티드 단편으로 시작함으로써, 각각의 단편은 ELISA에서 인지되는 에피토프의 존재에 대해서 시험될 수 있다. 예를 들어, ELISA 검정에서, *Apl* 폴리펩티드, 예를 들어, 100-머 폴리펩티드 단편이 고품 지지체, 예를 들어, 플라스틱 다중-웰 플레이트의 웰에 부착될 수 있다. 항체 집단은 비-특이적 흡수가 차단되는 조건하에서 표지되고, 고품 지지체에 첨가되고, 비표지된 항원에 결합되게 하며, 어떠한 결합되지 않은 항체 및 그 밖의 단백질은 세척된다. 항체 결합은, 예를 들어, 무색의 기질을 착색된 반응 생성물로 전환시키는 반응에 의해서 검출된다. 점진적으로 더 작으며 중첩되는 단편이 이어서 확인된 100-머로부터 시험되어 관심 에피토프를 맵핑(mapping)한다.

[0040] 본 발명의 폴리펩티드는 재조합적으로 생성될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 당 분야에 널리 공지된 기술을 사용함으로써 적합한 발현숙주 세포 시스템에서 발현될 수 있는 재조합 발현 벡터 내로 도입될 수 있다. 다양한 박테리아, 효모, 식물, 포유동물 및 곤충 발현 시스템이 당 분야에서 이용될 수 있으며 어떠한 그러한 발현 시스템이 사용될 수 있다. 임의적으로는, 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드가 무세포 번역 시스템에서 번역될 수 있다. 폴리펩티드는 또한 화학적으로 합성되거나 *Apl* 세포로부터 얻을 수 있다.

[0041] 본 발명의 면역원성 폴리펩티드는 서열 목록 번호:10, 11, 12, 13, 14, 15에 도시된 아미노산 서열 또는 이의 단편을 포함할 수 있다. 면역원성 폴리펩티드는 서열 목록 번호:12의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드의 에피토프를 인지하는 항체 또는 다른 면역 반응(예를 들어, 면역계의 T-세포 반응)을 유발할 수 있다. 본 발명의 면역원성 폴리펩티드는 또한 서열 목록 번호:12에 도시된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드의 단편일 수 있다. 본 발명의 면역원성 폴리펩티드 단편은 약 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50개 또는 이 이상의 아미노산 길이일 수 있다.

[0042] *Apl* 폴리뉴클레오티드

[0043] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 더 적은 전체 미생물 유전체를 함유하며, 단일 또는 이중 가닥 핵산일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 RNA, DNA, cDNA, 유전체 DNA, 화학적으로 합성된 RNA 또는 DNA 또는 이들의 조합물일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 그 밖의 성분, 예를 들어, 단백질, 지질 및 그외 폴리뉴클레오티드가 없게 정제될 수 있다. 예를 들어, 폴리뉴클레오티드는 50%, 75%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 정제될 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 상기된 폴리펩티드를 엔코딩한다. 본 발명의 한 구체예에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 목록 번호:12에 도시된 폴리펩티드 또는 이의 단편을 엔코딩한다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 그 밖의 뉴클레오티드 서열, 예를 들어, 링커, 신호 서열, TMR 이동 종결 서열, 막횡단 도메인, 또는 글루타티온-S-트랜스퍼라아제, 히스티딘 태그, 및 *스태필로코쿠스* 단백질 A와 같은 단백질 정제에 유용한 리간드를 포함할 수 있다.

[0044] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 분리될 수 있다. 분리된 폴리뉴클레오티드는 자연적으로 결합되어 있는 5' 및 3' 플랭킹(flanking) 유전체 서열 중 하나 또는 둘 모두와 바로 인접되지 않은 천연 발생 폴리뉴클레오티드이다. 분리된 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어, 임의의 길이의 재조합 DNA 분자로서, 천연 발생 유전체에서 재조합 DNA 분자를 바로 플랭킹하는 천연 발견된 핵산 서열이 제거되거나 존재하지 않음을 조건으로 하는 재조합 DNA 분자일 수 있다. 분리된 폴리뉴클레오티드는 또한 비천연 발생 핵산 분자를 포함한다. 예를 들어, cDNA 또는 유전체 라이브러리, 또는 유전체 DNA 제한 절단을 함유하는 겔 슬라이스 내에 수백 내지 수백만의 그 밖의 핵산 분자 중에 존재하는 핵산 분자는 분리된 폴리뉴클레오티드로 여겨지지 않는다.

[0045] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 또한 면역원성 폴리펩티드를 엔코딩하는 단편을 포함할 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 전장 폴리펩티드, 폴리펩티드 단편, 및 변이성 또는 융합 폴리펩티드를 엔코딩할 수 있다.

[0046] 본 발명의 폴리펩티드를 엔코딩하는 축퇴성(degenerate) 뉴클레오티드 서열, 뿐만 아니라 본 발명의 뉴클레오티드 서열과 약 80% 이상, 또는 약 90, 96, 98 또는 99% 이상 동일한 상동 뉴클레오티드 서열, 및 이들의 상보체

(complement)가 또한 본 발명의 폴리뉴클레오티드이다. 서열 동일성 백분율은 "폴리펩티드" 섹션에서 기재된 바와 같이 계산될 수 있다. 축퇴성 뉴클레오티드 서열은 본 발명의 폴리펩티드 또는 이의 단편을 엔코딩하지만, 유전 부호의 축퇴성(degeneracy)에 기인하여 야생형 폴리뉴클레오티드 서열과는 핵산 서열에서 상이한 폴리뉴클레오티드이다. 생물학적 기능성 *ApI* 폴리펩티드를 엔코딩하는 *ApI* 폴리뉴클레오티드의 상보성 DNA (cDNA) 분자, 동족체 중, 및 변이체가 또한 *ApI* 폴리뉴클레오티드이다.

[0047] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어, 감염된 개체로부터의 생물학적 샘플, 예를 들어, 혈액, 혈청, 타액, 또는 조직에 존재하는 핵산 서열로부터 분리될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어, 자동 합성기를 사용함으로써 실험실에서 또한 합성될 수 있다. 증폭 방법, 예를 들어, PCR이 폴리펩티드를 엔코딩하는 유전체 DNA 또는 cDNA로부터의 폴리뉴클레오티드를 증폭시키는데 사용될 수 있다.

[0048] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 천연 발생 폴리펩티드에 대한 코딩 서열을 포함할 수 있거나, 천연 발생하지 않는 변경된 서열을 엔코딩할 수 있다. 요망시, 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어, 복제 기점, 프로모터, 인핸서, 또는 숙주 세포에서 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 발현을 유도하는 그 밖의 조절 요소를 포함한 발현 조절 요소를 포함하는 발현 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 발현 벡터는, 예를 들어, 플라스미드, 예를 들어, pBR322, pUC, 또는 ColE1, 또는 아데노바이러스 벡터, 예를 들어, 아데노바이러스 타입 2 벡터 또는 타입 5 벡터일 수 있다. 임의로, 이로 한정되는 것은 아니지만, 신드비스 바이러스(Sindbis virus), 시미안 바이러스 40(simian virus 40), 알파바이러스 벡터, 포크바이러스 벡터, 및 사이토메갈로바이러스 및 레트로바이러스 벡터, 예를 들어, 뮤린 육종 바이러스, 마우스 유암 바이러스, 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스(Moloney murine leukemia virus) 및 라우스 육종 바이러스를 포함한 그 밖의 벡터가 사용될 수 있다. 미니염색체(Minichromosome), 예를 들어, MC 및 MC1, 박테리오파지, 파이지미드, 효모 인공 염색체, 박테리아 인공 염색체, 바이러스 미립자, 바이러스-유사 미립자, 코스미드(파이지 람다 *cos* 부위가 삽입되는 플라스미드) 및 레플리콘(replicon)(세포내 자체 조절하에 복제될 수 있는 유전적 요소)이 또한 사용될 수 있다.

[0049] 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드를 제조하고, 이들을 숙주내에서 발현시키는 방법이 당 분야에 널리 공지되어 있다. (참조: 미국 특허 제4,366,246호). 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 폴리뉴클레오티드의 전사 및/또는 번역을 유도하는 하나 이상의 발현 조절 요소에 인접되거나 근접되어 위치되는 경우에 작동가능하게 연결된다.

[0050] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어, 프로브 또는 프라이머, 예를 들어, PCR 프라이머로서 사용되어 시험 샘플, 예를 들어, 생물학적 샘플 중의 *ApI* 폴리뉴클레오티드의 존재를 검출할 수 있다. 프로브는, 예를 들어, 하이브리드화를 통해 통상적으로 서열 특이적 방식으로 표적 핵산과 상호작용할 수 있는 분자이다. 프라이머는 효소 조작용을 지지할 수 있고, 효소 조작용이 발생할 수 있도록 표적 핵산과 하이브리드될 수 있는 프로브의 아집단이다. 프라이머는 효소 조작용을 방해하지 않는 당 분야에서 이용가능한 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체 또는 유사체의 임의의 조합물로부터 제조될 수 있다.

[0051] 핵산의 하이브리드화는 당 분야에서 잘 이해되어 있으며, 본원에서 논의된다. 통상적으로, 프로브는 당 분야에서 이용가능한 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체 또는 유사체의 임의의 조합물로부터 제조될 수 있다. *ApI* 폴리뉴클레오티드 서열에 특이적으로 하이브리드화되는 그러한 프로브 및 프라이머의 능력은 이들이 주어진 시험 샘플에서 상보성 서열의 존재를 검출하는데 사용되게 한다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드 프로브 및 프라이머는 시험 샘플, 예를 들어, 생물학적 샘플, 예를 들어, 타액, 담, 혈액, 혈장, 혈청, 뇨, 분변, 뇌척수액, 양수, 상처 삼출액, 또는 조직에서 상보성 서열에 하이브리드화될 수 있다. 샘플로부터의 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어, 겔 전기영동 또는 그 밖의 크기 분리 기술에 적용될 수 있거나 크기 분리 없이 고정될 수 있다. 폴리뉴클레오티드 프로브 또는 프라이머는 표지될 수 있다. 프로브 및 프라이머를 표지시키기 적합한 표지 및 방법은 당 분야에 공지되어 있으며, 예를 들어, 닉(nick) 번역 또는 키나아제에 의해서 혼입된 방사활성 표지, 비오틴 표지, 형광 표지, 화학발광 표지, 생물발광 표지, 금속 길레이터 표지 및 효소 표지를 포함한다. 샘플로부터의 폴리뉴클레오티드는 적합하게 엄격한 하이브리드화 조건하에 프로브 또는 프라이머와 접촉된다.

[0052] 적용에 따라서, 다양한 하이브리드화 조건이 이용되어 표적 서열에 대한 프로브 또는 프라이머의 다양한 선택도를 달성할 수 있다. 높은 선택성을 요하는 적용의 경우, 비교적 엄격한 조건, 예를 들어, 약 50°C 내지 약 70°C의 온도에서 약 0.02M 내지 약 0.15M 염 농도에 의해서 제공된 저염 및/또는 고온 조건이 이용될 수 있다. 선택성이 덜 요구되는 적용의 경우, 덜 엄격한 하이브리드화 조건이 이용될 수 있다. 예를 들어, 염 조건은 약 0.14M 내지 약 0.9M 염의 범위이고, 온도는 약 20°C 내지 약 55°C의 범위일 수 있다. 시험 샘플로부터의 프로브 또는 프라이머를 포함하는 하이브리드화된 복합체 및 상보성 폴리뉴클레오티드의 존재는 샘플 중의 *ApI* 또는

Apl 폴리뉴클레오티드의 존재를 나타낸다.

[0053]

항체

[0054]

본 발명의 항체는 본 발명의 *Apl* p44 폴리펩티드 또는 이의 단편에 특이적으로 및 안정하게 결합하는 항체 분자이다. 본 발명의 항체는 또한 *Aph* p44 폴리펩티드 또는 이의 단편에 특이적으로 및 안정하게 결합할 수 있다. 당업자는 항체가 본원에 기재된 검정을 이용하여 *Aph* 및 *Apl* 폴리펩티드에 특이적인지 용이하게 결정할 수 있다. 본 발명의 항체는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 단쇄 항체(scFv), 또는 항체의 항원 결합 단편일 수 있다. 항체의 항원 결합 단편은 온전한 항체의 항원 결합부위 또는 가변 영역을 포함하는 온전한 항체의 일 부분이며, 이러한 일부는 온전한 항체의 Fc 영역의 불변 중쇄 도메인이 없는 부분이다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ 및 F_v 단편을 포함한다.

[0055]

본 발명의 항체는, 예를 들어, IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE를 포함하는 어떠한 항체 부류일 수 있다. 항체 또는 이의 단편은 본 발명의 폴리펩티드의 에피토프에 결합한다. 항체는 적합한 실험실 동물중에서 생체내에서 제조되거나, 재조합 DNA 기술을 이용하여 시험관내에서 제조될 수 있다. 항체를 제조하고 특성규명하는 수단은 당 분야에 널리 공지되어 있다. [참조예: Dean, *Methods Mol. Biol.* 80:23-37 (1998); Dean, *Methods Mol Biol.* 32:361-79 (1994); Baileg, *Methods Mol. Biol.* 32:381-88 (1994); Gullick, *Methods Mol. Biol.* 32:389-99 (1994); Drenckhahn *et al.* *Methods Cell. Biol.* 37:7-56 (1993); Morrison, *Ann. Rev. Immunol.* 10:239-65 (1992); Wright *et al.* *Crit. Rev. Immunol.* 12:125-68 (1992)]. 예를 들어, 폴리클로날 항체는 본 발명의 폴리펩티드를 동물, 예를 들어, 인간 또는 그 밖의 영장류, 마우스, 래트, 토끼, 기니아 피그, 염소, 돼지, 개, 소, 양, 원숭이, 또는 말에게 투여함으로써 생성될 수 있다. 면역화된 동물로부터 혈청을 수거하고, 항체는, 예를 들어, 황산암모늄으로 침전시킨 다음, 크로마토그래피, 예를 들어, 친화성 크로마토그래피함으로써 혈청으로부터 정제된다. 폴리클로날 항체를 생성시키고 처리하는 기술은 당 분야에 공지되어 있다.

[0056]

용어 "특이적으로 결합" 또는 "특이적"은 제 1항원, 예를 들어, *Apl* 및 *Aph* 폴리펩티드가 다른 비특이적 분자에 비해서 더 큰 친화성으로 본 발명의 항체를 인지하고 그에 결합함을 의미한다. 비특이적 분자는 제 1항원과 공통의 에피토프를 공유하지 않는 항원이다. 이러한 경우, *Apl* 및 *Aph* p44 폴리펩티드는 일반적으로 비-특이적 대조 분자에 대해 바람직하게 선택되지 않을 것이다. 예를 들어, 비특이적 항원에 대해서 보다 더 효능적으로 결합되는 제 1 항원(예를 들어, 폴리펩티드)에 대해서 유도된 항체는 제 1 항원에 대해 특이적으로 결합하는 것으로 기재될 수 있다. 한 바람직한 구체예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 부분은 10⁷ l/mol 이상의 결합 친화성 K_a로 결합되는 경우에 서열 목록 번호:12의 폴리펩티드 또는 이의 단편에 특이적으로 결합된다. 특이적 결합은, 예를 들어, 당 분야에 널리 공지된 방법을 이용하여 효소 면역측정법(ELISA), 방사면역검정(RIA), 또는 웨스턴 블롯 검정을 이용함으로써 시험될 수 있다.

[0057]

또한, 본 발명의 폴리펩티드에 존재하는 에피토프에 대해 특이적인 모노클로날 항체가 또한 용이하게 생성될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드로 면역화된 포유동물, 예를 들어, 마우스로부터의 정상 B 세포가, 예를 들어, HAT-민감성 마우스 미엘로마 세포와 융합되어 하이브리도마(hybridoma)를 생성시킬 수 있다. *Apl*- 또는 *Aph*-특이적 항체를 생성시키는 하이브리도마는 RIA 또는 ELISA를 이용함으로써 확인될 수 있으며, 반고형 아가(agar) 중에서 클로닝시키거나 희석을 제한함으로써 분리될 수 있다. *Apl*- 및 *Aph*-특이적 항체를 생성시키는 클론은 또 다른 스크리닝 과정에 의해서 분리된다. 모노클로날 항체는 표준 기술, 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드를 미세적정 플레이트에 결합시키고 모노클로날 항체의 결합을 ELISA 검정에 의해서 측정함으로써 특이성에 대해서 스크리닝될 수 있다. 모노클로날 항체의 생성 및 처리 기술은 당 분야에 공지되어 있다. [참조예, Kohler & Milstein, *Nature*, 256:495 (1975)]. 모노클로날 항체의 특정 동형(isotype)은 초기 융합으로부터 직접적으로 선택하여 제조되거나, 클래스-스위치 변이체를 분리시키도록 sib 선택 기술을 이용함으로써 상이한 동형의 모노클로날 항체를 분비하는 모체(parental) 하이브리도마로부터 이차적으로 제조될 수 있다. [참조: Steplewski *et al.*, *P.N.A.S. U.S.A.* 82:8653 1985; Spria *et al.*, *J. Immunolog. Meth.* 74:307, 1984]. 본 발명의 모노클로날 항체는 또한 재조합 모노클로날 항체일 수 있다. (참조예: 미국 특허 번호 제4,474,893호; 제 4,816,567호). 본 발명의 항체는 또한 화학적으로 제작될 수 있다. (참조예: 미국 특허 번호 제4,676,980호).

[0058]

본 발명의 항체는 키메라성 항체(참조예: 미국 특허 번호 제5,482,856호), 인간화된 항체[참조예: Jones *et al.*, *Nature* 321:522 (1986); Reichmann *et al.*, *Nature* 332:323 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593 (1992)], 개화된(caninized) 항체, 개 항체, 또는 인간 항체일 수 있다. 인간 항체는, 예를 들어, 직접적인 불멸화(direct immortalization), 파아지 디스플레이, 트랜스제닉 마우스, 또는 트리메라 방법(Trimera

methodology)[참조예: Reisener *et al.*, *Trends Biotechnol.* 16:242-246 (1998)]에 의해서 제조될 수 있다.

- [0059] *Apl* 또는 *Aph* 항원(예를 들어, *Apl* 또는 *Aph* 폴리펩티드)과 특이적으로 결합하는 항체가 *Apl* 또는 *Aph* 감염된 동물로부터의 샘플, 예를 들어, 혈청, 혈액, 혈장, 뇨, 분변 또는 타액 내의 *Apl* 또는 *Aph* 항원의 존재를 검출하는데 특히 유용하다. *Aph* 또는 *Apl* 항원에 대한 면역검정은 하나의 항체 또는 수 개의 항체를 이용할 수 있다. *Aph* 또는 *Apl* 항원에 대한 면역검정은, 예를 들어, *Apl* 에피토프에 대해 특이적인 모노클로날 항체, 하나의 *Apl* 폴리펩티드의 에피토프에 대해 특이적인 모노클로날 항체의 조합물, 다양한 *Apl* 폴리펩티드의 에피토프에 대해 특이적인 모노클로날 항체, 동일한 *Apl* 항원에 대해 특이적인 폴리클로날 항체, 다양한 *Apl* 항원에 대해 특이적인 폴리클로날 항체, 또는 모노클로날 및 폴리클로날 항체의 조합물을 이용할 수 있다. 면역검정 프로토콜은, 예를 들어, 경쟁, 직접적인 반응, 또는, 예를 들어, 표지된 항체를 이용하는 샌드위치형 검정을 기초로 할 수 있다. 본 발명의 항체는, 예를 들어, 형광, 화학발광, 방사성, 효소, 콜로이드성 금속, 방사성동위원소 및 생물발광 표지를 포함한 당 분야에 공지된 어떠한 종류의 표지로 표지될 수 있다.
- [0060] 본 발명의 항체 또는 이의 단편은 지지체에 결합되고, *Aph* 또는 *Apl* 항원의 존재를 검출하는데 사용될 수 있다. 지지체는, 예를 들어, 유리, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 텍스트란, 나이론, 아밀라제, 천연 및 변형된 셀룰로오스, 폴리아크릴아미드, 아가로오스 및 마글레타이트(magletite)를 포함한다.
- [0061] 본 발명의 항체는 면역친화성 컬럼에 의해서 *Apl* 유기체, *Apl* 항원, *Aph* 유기체 또는 *Aph* 항원을 분리시키는데 추가로 사용될 수 있다. 항체는, 예를 들어, 흡착 또는 공유결합에 의해서 고정 지지체에 고정되어서 항체가 그들의 면역선택적 활성을 보유하게 할 수 있다. 임의로, 스페이서 기가 포함되어 항체의 항원 결합부위가 접근 가능하게 유지되게 할 수 있다. 고정된 항체는 이어서 샘플, 예를 들어, 생물학적 샘플, 예를 들어, 타액, 혈청, 담, 혈액, 뇨, 분변, 뇌척수액, 양수, 상처 삼출액, 또는 조직으로부터의 *Apl* 유기체, *Apl* 항원, *Apl* 유기체 또는 *Apl* 항원을 결합시키는데 사용될 수 있다. 결합된 *Apl* 유기체, *Apl* 항원, *Apl* 유기체 또는 *Apl* 항원은, 예를 들어, pH의 변화에 의해서 컬럼 매트릭스로부터 회수된다.
- [0062] 본 발명의 항체는 또한 다양한 세포 현상 또는 생리학적 조건에서의 본 발명의 폴리펩티드의 존재 및 분포를 분석하기 위한 면역편재화(immunolocalization) 연구에 이용될 수 있다. 항체는 또한 수동 면역화와 관련된 분자를 확인하고 비-단백질 항원의 생합성과 관련된 분자를 확인하는데 사용될 수 있다. 이러한 분자의 확인은 백신 개발에 유용할 수 있다. 예를 들어, 모노클로날 항체 및 단백질 항체를 포함한 본 발명의 항체는 *Apl* 또는 *Aph*에 의해서 야기된 질환의 완화 과정을 모니터하는데 사용될 수 있다. 동물로부터의 시험 샘플 중의 *Apl* 항원 및/또는 *Aph* 항원에 대한 *Apl* 항체 및/또는 *Aph* 항체의 증가 또는 감소를 측정함으로써, 질환을 완화시킬 목적의 특정의 치료 방법이 효과적인지 결정될 수 있다. 항체는, 예를 들어, 직접적인 결합 검정, 예를 들어, RIA, ELISA, 또는 웨스턴 블롯 검정을 이용함으로써 검출되고/거나 정량화될 수 있다.
- [0063] **검출 방법**
- [0064] 본 발명의 방법은 시험 샘플, 예를 들어, 생물학적 샘플, 환경 샘플, 또는 실험실 샘플 중의 *Apl*에 대해 특이적인 항체 또는 항체 단편; *Apl* 폴리펩티드; *Aph*; *Aph* 폴리펩티드; *Apl* 폴리뉴클레오티드, 또는 이들의 조합물을 검출하는데 사용될 수 있다. 시험 샘플은 잠재적으로 *Apl* 폴리뉴클레오티드, *Apl* 폴리펩티드, *Aph* 폴리펩티드, *Apl*에 대해 특이적인 항체, 및/또는 *Aph*에 대해 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 생물학적 샘플은 포유동물, 예를 들어, 말, 고양이, 개 또는 인간으로부터의 혈청, 혈액, 세포, 혈장, 또는 조직을 포함할 수 있다. 시험 샘플은 비처리되거나, 침전되거나, 분별되거나, 분리되거나, 회석되거나, 농축되거나, 정제될 수 있다.
- [0065] 한 구체예에서, 본 발명의 방법은 폴리펩티드/항체 복합체, 즉 면역복합체가 형성되도록 하는 조건하에서 *Apl* 폴리펩티드와 시험 샘플을 접촉시키는 단계를 포함한다. 즉, 본 발명의 폴리펩티드는 샘플 내에 위치한 *Apl* 및/또는 *Aph* 항원에 특이적인 항체에 특이적으로 결합한다. 당업자는 항체/폴리펩티드 복합체 결합을 검출하는데 사용되는 검정 및 조건에 친숙하다. 폴리펩티드와 샘플 내의 항-*Apl* 및/또는 항-*Aph* 항체 사이의 복합체의 형성이 검출된다. 본 발명의 한 구체예에서, 항체-폴리펩티드 복합체는 아나플라스마 플라티스 및/또는 아나플라스마 파고사이토피룸에 의한 피검체의 노출 또는 감염 약 10, 15, 20, 25, 30일 이하에서 검출될 수 있다.
- [0066] 본 발명의 항체는 *Apl* 및/또는 *Aph* 감염을 갖는 것으로 예상되는, 예를 들어, 인간 또는 동물로부터 시험 샘플을 얻음으로써 *Apl* 및/또는 *Aph* 감염의 진단 방법에 사용될 수 있다. *Apl* 또는 *Aph*에 대한 노출이 또한 검출될 수 있다. 노출은 *Aph* 또는 *Apl*로 감염되기 전에 임상 증상이 없는 *Aph* 또는 *Apl* 유기체의 존재를 포함한다. 시험 샘플은 항체-항원 복합체(즉, 면역복합체)의 형성을 가능하게 하는 조건하에서 본 발명의 항체와 접촉된다. 항체-항원 복합체의 양은 당 분야에 공지된 방법에 의해서 결정될 수 있다. 대조 샘플 중에서 형성

된 것보다 더 높은 수준은 *Apl* 및/또는 *Aph* 감염을 나타낸다. 대조 샘플은 임의의 *Apl* 및/또는 *Aph* 폴리펩티드, 또는 *Apl* 또는 *Aph*에 대해 특이적인 항체를 포함하지 않는 샘플이다. 본 발명의 한 구체예에서, 항체는 *Apl* 항원에 대해서만 특이하다. 대안적으로, 본 발명의 폴리펩티드가 시험 샘플과 접촉될 수 있다. 양성 신체 샘플 중의 *Apl* 및/또는 *Aph* 항체는 적합한 조건하에서 항원-항체 복합체를 형성할 것이다. 항체-항원 복합체의 양은 당 분야에 공지된 방법에 의해서 결정될 수 있다.

[0067] 본 발명의 한 구체예에서, 폴리펩티드/항체 복합체는 항체에 결합되는 지시약, 예를 들어, 효소 컨쥬게이트가 검출 가능한 반응을 촉진하는 경우에 검출된다. 임의로, 신호 생성 화합물을 포함하는 지시약이 폴리펩티드/항체/지시약 복합체가 형성되게 하는 조건하에서 폴리펩티드/항체 복합체에 적용될 수 있다. 폴리펩티드/항체/지시약 복합체가 검출된다. 임의로, 폴리펩티드 또는 항체는 폴리펩티드/항체 복합체의 형성 전에 지시약으로 표지될 수 있다. 방법은 임의로 양성 또는 음성 대조군을 포함할 수 있다.

[0068] 본 발명의 한 구체예에서, 본 발명의 항체는 고체상 또는 기관에 부착된다. 본 발명의 폴리펩티드를 포함하는 단백질을 잠재적으로 포함하는 시험 샘플이 기관에 첨가된다. 본 발명의 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체가 첨가된다. 항체는 고체상에 사용된 동일한 항체일 수 있거나, 상이한 공급원 또는 종으로부터 유래될 수 있고, 이는 지시약, 예를 들어, 효소 컨쥬게이트에 연결될 수 있다. 각각의 첨가 전에 세척 단계가 수행될 수 있다. 발색단 또는 효소 기질이 첨가되고, 색이 발달된다. 색 반응이 중지되고, 예를 들어, 분광광도계를 이용하여 색이 정량될 수 있다.

[0069] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 본 발명의 항체는 고체상 또는 기관에 부착된다. 본 발명의 폴리펩티드를 포함하는 단백질을 잠재적으로 포함하는 시험 샘플이 기관에 첨가된다. 본 발명의 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 제 2의 항-종(anti-species) 항체가 첨가된다. 이러한 제 2의 항체는 고체상 항체와는 상이한 종으로부터 유래된다. 제 2의 항체와 특이적으로 결합하고 고체상 항체와는 특이적으로 결합하지 않는 제 3의 항-종 항체가 첨가된다. 제 3의 항체는 지시약, 예를 들어, 효소 컨쥬게이트를 포함할 수 있다. 각각의 첨가 전에 세척 단계가 수행될 수 있다. 발색단 또는 효소 기질이 첨가되고, 색이 발달된다. 색 반응이 중지되고, 예를 들어, 분광광도계를 이용하여 색이 정량될 수 있다.

[0070] 본 발명의 검정은, 이로 한정되는 것은 아니지만, 효소 면역측정법(ELISA), 웨스턴 블롯, IFA, 방사면역검정(RIA), 적혈구응집(hemagglutination, HA) 및 형광 분극 면역검정(fluorescence polarization immunoassay, FPIA), 및 미세역가 플레이트 검정(미세역가 플레이트의 하나 이상의 웰에서 수행되는 검정)을 포함한 경쟁, 직접적인 반응, 샌드위치형 검정을 기초로 한 검정을 포함한다. 본 발명의 한가지 검정법은 가역 흐름 크로마토그래피 결합 검정, 예를 들어, SNAP[®] 검정을 포함한다. (참조: 미국 특허 번호 제5,726,010호).

[0071] 검정은 고형 상 또는 기관을 이용할 수 있거나, 면역침전법 또는 고형 상을 이용하지 않는 그 밖의 어떠한 방법에 의해서 수행될 수 있다. 고형 상 또는 기관이 사용되는 경우 본 발명의 폴리펩티드는 고형 지지체 또는 기관, 예를 들어, 미세 적정 웰, 자성 비드, 비자성 비드, 컬럼, 매트릭스, 막, 합성 또는 천연 섬유(예를 들어, 유리 또는 셀룰로오스-기재 물질 또는 열가소성 중합체, 예를 들어, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 또는 폴리에스테르)로 구성된 섬유질 매트, 미립물질(예를 들어, 유리 또는 다양한 열가소성 중합체)로 구성된 소결된 구조체, 또는 니트로셀룰로오스, 나일론, 폴리술폰 등(일반적으로, 본래 합성됨)으로 구성된 주조 막 필름에 직접적으로 또는 간접적으로 부착된다. 바람직한 기관은 다공성 폴리에틸렌으로 일반적으로 알려진 폴리에틸렌의 소결된 미세 입자, 예를 들어, 크로맥스 코포레이션(Chromex Corporation)(Albuquerque, NM)으로부터의 10-15 마이크론 다공성 폴리에틸렌이다. 이들 기관 물질 모두는 적합한 형태, 예를 들어, 필름, 시이트, 또는 플레이트로 사용될 수 있거나 적절한 불활성 담체, 예를 들어, 종이, 유리, 플라스틱 필름, 또는 섬유상에 코팅되거나, 이에 결합 또는 적층될 수 있다. 고형 상에 펩티드를 고정하는 적합한 방법은 이온, 소수성, 공유성 상호작용 등을 포함한다.

[0072] 한가지 검정 형태에서, 하나 이상의 폴리펩티드가 고형 상 또는 기관에 코팅될 수 있다. 항-*Apl* 및/또는 항-*Aph* 항체 또는 이들의 단편을 함유하는 것으로 의심되는 시험 샘플은 *Apl* 및/또는 *Aph*에 특이적인 항체 또는 항체 단편에 컨쥬게이션된 신호 발생 화합물을 포함하는 지시약과 함께 인큐베이션되는데, 고형 상의 폴리펩티드에 대한 *Apl* 및/또는 *Aph*에 대해 특이적인 항체에 컨쥬게이션된 지시약 화합물 또는 고형 상의 폴리펩티드에 대한 시험 샘플의 항체의 항원/항체 복합체를 형성시키기에 충분한 시간 동안 및 조건하에 인큐베이션된다. 고형 상에 대한 항-*Apl* 및/또는 항-*Aph* 항체에 컨쥬게이션된 지시약의 결합의 감소는 정량적으로 측정될 수 있다. 확인된 음성 *Apl* 및/또는 *Aph* 시험 샘플로부터 생성된 신호에 비한 신호에서의 측정 가능한 감소는 시험 샘플에서의 항-*Apl* 및/또는 항-*Aph* 항체의 존재를 나타낸다. 이러한 형태의 검정은 시험 샘플에서의 항-*Apl* 및/또는

항-Aph 항체의 양을 정량할 수 있다.

- [0073] 또 다른 검정 형태에서, 본 발명의 하나 이상의 폴리펩티드는 지지체 또는 기관 상에 코팅된다. 본 발명의 폴리펩티드는 지지체에 컨주게이션되며, 시험 샘플에 첨가된다. 이러한 혼합물은 지지체 또는 기관에 적용된다. *Apl* 및/또는 *Aph* 항체가 시험 샘플에 존재하면, 이들은 지지체에 컨주게이션된 폴리펩티드 및 지지체 상에 고정된 폴리펩티드에 결합할 것이다. 폴리펩티드/항체/지지체 복합체가 이어서 검출될 수 있다. 이러한 형태의 검정은 시험 샘플 중의 항-Apl 및/또는 항-Aph 항체의 양을 정량할 수 있다.
- [0074] 또 다른 검정 형태에서, 본 발명의 하나 이상의 폴리펩티드가 지지체 또는 기관 상에 코팅된다. 시험 샘플은 지지체 또는 기관 상에 적용되고 인큐베이션된다. 샘플로부터의 결합되지 않은 성분은 고형 지지체를 세척용액으로 세척함으로써 세척된다. *Apl* 특이적 및/또는 *Aph* 특이적 항체가 시험 샘플에 존재하는 경우, 이들은 고형 상에 코팅된 폴리펩티드에 결합할 것이다. 이러한 폴리펩티드/항체 복합체는 지지체에 컨주게이션되는 제 2의 종-특이적 항체를 사용함으로써 검출될 수 있다. 폴리펩티드/항체/항-종 항체 지지체 복합체가 이어서 검출될 수 있다. 이러한 검정 형태는 시험 샘플 중의 항-Apl 및/또는 항-Aph 항체의 양을 정량할 수 있다.
- [0075] 폴리펩티드/항체 복합체 또는 폴리펩티드/항체/지지체 복합체의 형성은 방사성계측 방법, 비색계측 방법, 형광계측 방법, 크기 분리, 또는 침전 방법에 의해서 검출될 수 있다. 임의로, 폴리펩티드/항체 복합체의 검출은 신호 발생 화합물을 포함하는 지지체에 결합되는 제 2의 항체의 첨가에 의해 수행된다. 폴리펩티드/항체 복합체와 연관된 신호 발생 화합물(표지)을 포함하는 지지체는 상기 기재된 방법을 이용함으로써 검출될 수 있으며, 발색제, 촉매, 예를 들어, 효소 컨주게이트 형광 화합물, 예를 들어, 플루오레신(fluorescein) 및 로다민, 화학 발광 화합물, 예를 들어, 디옥세탄, 아크리디늄, 페난트리디늄, 루테늄, 및 루미놀, 방사성 원소, 직접적인 가시 표지, 및 보조인자(cofactor), 억제제, 및 자성 입자 등을 포함한다. 효소 컨주게이트의 예는 알카리성 포스파타아제, 호스라디쉬 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase), 및 베타-갈락투시다아제 등을 포함한다. 특정의 표지의 선택은 중요하지는 않지만, 스스로 또는 하나 이상의 추가의 물질과 함께 신호를 생성시킬 수 있어야 할 것이다.
- [0076] 복합체의 형성은 시험 샘플 중의 항-Apl 및/또는 항-Aph 항체의 존재를 나타낸다. 따라서, 본 발명의 방법은 환자에서의 *Apl* 및/또는 *Aph* 감염을 진단하는데 이용될 수 있다.
- [0077] 본 발명의 방법은 또한 시험 샘플 중의 항-Apl 및/또는 *Aph* 항체의 양을 나타낼 수 있다. 많은 지지체, 예를 들어, 효소 컨주게이트의 경우에, 존재하는 항체의 양은 발생하는 신호에 비례한다. 시험 샘플의 형태에 따라서, 시험 샘플은 적합한 완충 시약으로 희석되거나, 농축되거나, 어떠한 조작 없이 고형 상과 접촉될 수 있다. 예를 들어, 항체의 존재 및/또는 존재하는 항체의 양을 결정하기 위해서, 미리 희석된 혈청 또는 혈장 샘플, 또는 농축된 표본, 예를 들어, 뇨를 시험하는 것이 일반적으로 바람직하다.
- [0078] 본 발명은 추가로 샘플 중에 항-Apl 및/또는 항-Aph 항체 또는 항체 단편, *Apl*, *Apl* 폴리펩티드, *Aph*, 및/또는 *Aph* 폴리펩티드를 검출하는 검정 키트(예를 들어, 제품)를 포함한다. 키트는 하나 이상의 본 발명의 폴리펩티드 및 샘플 중의 항-Apl 항체 및/또는 항-Aph 항체 또는 항체 단편에 대한 폴리펩티드의 결합을 결정하는 수단을 포함한다. 키트 또는 제품은 또한 본 발명의 하나 이상의 항체 또는 항체 단편 및 샘플 중의 *Apl*, *Apl* 폴리펩티드, *Aph*, 및/또는 *Aph* 폴리펩티드에 대한 항체 또는 항체 단편의 결합을 측정하는 수단을 포함할 수 있다. 키트는 하나 이상의 본 발명의 폴리펩티드 또는 항체 및, 예를 들어, 포유동물에서의 *Apl* 및/또는 *Aph* 감염의 확인을 위한 하나 이상의 폴리펩티드 또는 항체의 사용에 대한 설명서를 함유하는 장치를 포함할 수 있다. 이러한 키트는 또한 키트의 하나 이상의 폴리펩티드 또는 항체가 *Apl* 및/또는 *Aph* 감염의 확인을 위해서 사용될 수 있음을 나타내는 표지를 포함한 패키징 물질을 포함할 수 있다. 당업자에게는 공지된 그 밖의 성분, 예를 들어, 완충액, 및 대조군 등이 이러한 시험 키트에 포함될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드, 항체, 검정, 및 키트는 환자에서의 *Apl* 및/또는 *Aph* 감염에 대한 개체의 진단, 및 *Apl* 및/또는 *Aph* 발생에 대한 전염성 연구에 유용하다. *Apl* 또는 *Aph*에 대한 노출이 또한 검출될 수 있다. 노출은 *Aph* 또는 *Apl*로 감염되기 전에 임상 증상이 없는 *Aph* 또는 *Apl* 유기체의 존재를 포함한다.
- [0079] 본 발명의 폴리펩티드 및 검정은 *Apl*과 함께 다른 유기체의 존재를 검출하기 위해 다른 폴리펩티드 또는 검정과 조합될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드 및 검정이 심장사상충(heartworm) 및/또는 보렐리아 부르그도페리(*Borrelia burgdorferi*) 및/또는 아나플라스마 파고사이토필룸 및/또는 에를리키아 카니스(*Ehrlichia canis*)를 검출하는 시약과 조합될 수 있다.
- [0080] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 샘플 내의 *Apl* 폴리뉴클레오티드의 존재를 검출하는데 사용될 수 있다. 폴리뉴

클레오티드는 간단한 하이브리드화 반응에 의해 샘플 내의 *Apl* 폴리뉴클레오티드를 검출하는데 사용될 수 있고, 이는 또한, 예를 들어, 중합효소 연쇄 반응(PCR), 예를 들어, 실시간 PCR 반응에서 사용될 수 있다. 본 발명의 방법 및 조성물은 또한 *Aph*로부터 *Apl*의 존재를 구별하여 검출하는데 사용될 수 있다.

[0081] PCR 검정은, 예를 들어, 미국 특허 번호 제4,683,195호; 미국 특허 번호 제4,683,202호; 미국 특허 번호 제 4,965,188호를 포함하여, 당 분야에 잘 기재되어 있다. 일반적으로, 폴리뉴클레오티드 프라이머는 표적 핵산의 변성된 가닥에 어닐링(annealing)된다. 프라이머 신장 생성물이 중합효소에 의한 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트의 중합화에 의해 형성된다. 이후, PCR은 주형 핵산 변성, 프라이머 어닐링, 및 열안정성 중합효소의 작용에 의한 어닐링된 프라이머의 신장의 반복 주기를 포함한다. 상기 과정은 시험 샘플 내의 표적 *Apl* 핵산의 지수적 증폭을 발생시키고, 이는 샘플 내에 매우 낮은 농도로 존재하는 표적 폴리뉴클레오티드의 검출을 가능케 한다.

[0082] 실시간 PCR 검정은 신호, 예를 들어, 형광 리포터 신호의 검출을 기초로 한다. 이러한 신호는 반응에서의 PCR 생성물의 양과 직접적으로 비례하여 증가한다. 실시간 PCR은 진행 중인 증폭 반응의 진전을 모니터링하는 것을 가능하게 하는 임의의 증폭 기술이다. 문헌[Quantitation of DNA/RNA Using Real-Time PCR Detection, Perkin Elmer Applied Biosystems (1999); PCR Protocols (Academic Press New York, 1989)]을 참조하라. 각각의 주기에서의 형광 방출량을 기록함으로써, PCR 생성물의 양에서의 첫번째 유의한 증가가 표적 주형의 최초량과 상관되는 지수기 동안의 PCR 반응을 모니터링하는 것이 가능하다. 핵산 표적의 시작 복사체 수가 높을수록, 형광에서의 유의한 증가가 관찰되는 것이 빨라진다.

[0083] 본 발명의 한 구체예는 시험 샘플 내의 아나플라스마 플라티스 폴리뉴클레오티드를 검출하고/하거나 정량하는 방법을 제공한다. 중합효소 연쇄 반응에 적합한 조건하에서 센스 프라이머 및 안티센스 프라이머가 시험 샘플에 첨가될 수 있다. 프라이머는 아나플라스마 플라티스 p44 폴리뉴클레오티드와 하이브리드되어, 아나플라스마 플라티스 p44 폴리뉴클레오티드가 시험 샘플에 존재하는 경우에 증폭 생성물이 형성된다. 한 구체예에서, 프라이머는 서열 목록 번호:6 및 7의 서열이다. 증폭 생성물이 검출되고, 아나플라스마 플라티스 p44 폴리뉴클레오티드의 존재 및/또는 양이 결정된다. 중합효소 연쇄 반응에 적합한 조건하에서 *Apl* p44 폴리뉴클레오티드 서열과 하이브리드되는 폴리뉴클레오티드 프로브를 이용하여 증폭 생성물이 검출될 수 있다. 프로브의 예는 서열 목록 번호:8 및 9의 서열을 포함한다. 증폭 생성물은 프로브로부터 검출 신호를 측정하고, 정량 표준으로부터의 제 2 프로브 검출 신호와 상기 검출 신호를 비교함으로써 정량될 수 있다. 정량 표준은 시험 샘플과 동시에 추출될 수 있다.

[0084] 본 발명의 또 다른 구체예에서, PCR 프라이머가 *Apl* p44 폴리뉴클레오티드의 가변 영역으로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 10, 15, 20, 25, 30 또는 40개의 연속 뉴클레오티드의 프라이머가 서열 목록 번호:16, 17 및/또는 18의 위치 20과 450 사이의 영역으로부터 선택될 수 있다.

[0085] 본원 어딘가에 언급된 모든 특허, 특허 출원, 및 기타 과학 또는 기술 문헌은 이들의 전체내용이 참조로서 본원에 포함된다. 본원에 예시적으로 기재된 본 발명은 적절하게는 본원에 특별하게 기재되지 않은 임의의 구성요소 또는 구성요소들, 한계 또는 한계들 없이 실시될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 본원의 각각의 예에서, 용어 "포함하는", "본질적으로 -로 구성되는", 및 "-로 구성되는" 중 임의의 것은 이들의 통상적인 의미를 유지하면서 다른 두 용어 중 하나로 대체될 수 있다. 사용되는 용어 및 표현은 제한이 아니라 기재를 위한 용어로 사용되며, 상기 용어 및 표현의 사용이 도시되거나 기재된 특징의 임의의 등가물 또는 이의 일부를 배제하는 것은 아니며, 다양한 변형이 청구된 본 발명의 범위 내에서 가능한 것이 인지된다. 따라서, 본 발명은 구체예에 의해 특이적으로 기재되었으나, 본원에 기재된 개념의 임의의 특징, 변형 및 변화가 당업자에 의해 재분류 될 수 있고, 이러한 변형 및 변화가 발명의 상세한 설명 및 첨부되는 청구의 범위에 의해 정의된 본 발명의 범위에 해당 하는 것으로 간주되는 것이 이해되어야 한다.

[0086] 또한, 본 발명의 특징 또는 관점이 마쿠시 그룹(Markush group) 또는 그 밖의 대안적인 그룹으로 기재되는 경우, 당업자는 본 발명이 또한 마쿠시 그룹 또는 그 밖의 그룹의 개별적인 구성원 또는 구성원들의 서브 그룹으로 기재되고 있음을 인지할 수 있을 것이다.

실시예

[0087] 실시예 1

[0088] *Apl*로부터의 p44 동족체의 클로닝

[0089] *Apl*로부터의 *Aph* p44 유전자의 동족체를 감염된 개의 혈액으로부터 클로닝시켰다. 애리조나의 호피(Hopi) 거주지에 사는 개로부터 획득하였다. 표준 기술을 이용하여 200ul의 전혈로부터 유전체 DNA를 분리시켰다(QiaAmp DNA Blood Miniprep Kit - Part #51104). *Aph* p44, *아나플라스마 마르기날레(Anaplasma marginale)* msp2, *아나플라스마 오비스(Anaplasma ovis)* msp2, 및 *아나플라스마 센트랄레(Anaplasma centrale)* msp2 유전자의 보존된 영역을 표적으로 하는 축퇴성(degenerate) 프라이머를 디자인하였다(정방향 프라이머: 5' TAT TTT TAT GTT GGT YTR GAY TAT WSH CC 3'(서열 목록 번호:1), 역방향 프라이머: 5' GCT CAG CAG ATC GTA RCA NGC RTT YAW CAT 3'(서열 목록 번호:2)).

[0090] 통상적인 열순환기(thermocycler)에서의 축퇴성 프라이머 기재 PCR을 표준 프로토콜(Platinum[®] Taq, Invitrogen)에 따라 *Apl* p44 유전자로부터의 약 800개의 뉴클레오티드 길이를 갖는 폴리뉴클레오티드를 증폭시키는데 사용하였다. PCR 생성물을 클로닝하고, 서열분석하고, 다른 종의 *아나플라스마*에 대해 보고된 것과 비교하였다. 도 1A는 *Apl* p44의 다양한 분리물로부터 획득된 부분적 서열의 정렬을 도시한다. 클로닝된 *Apl* p44 유전자는 5' 및 3' 말단에서 보존된 서열에 의해 플랭킹(flanking)된 과가변(hypervariable) 영역을 함유하였다. 이는 *Aph* p44에 대해서는 유사하나, 이러한 과가변 영역의 길이는 *Apl* p44에 대한 길이보다 짧다. 도 1B는 *Apl* p44와 공개된 *Aph* 서열(*Aph* p44-1; Accession No. ABA26590)로부터의 상응하는 영역의 아미노산 정렬을 도시한다. 본 발명의 *Apl* p44 뉴클레오티드 서열(도 1A 참조)은 서로에 대해 90%를 초과하여 동일하나, 이들은 *Aph* p44의 뉴클레오티드 서열과는 70% 미만의 동일성을 공유하며, 아미노산 서열에 대해서는 동일하다.

[0091] **실시예 2**

[0092] **실시간 PCR 검정에 의한 *Apl*의 검출**

[0093] 유전체 DNA로부터의 *Apl* p44 폴리뉴클레오티드를 검출하기 위해 실시간 PCR 검정을 개발하였다. 분석을 위한 샘플 유형은 개 전혈, 뿐만 아니라 애벌레 및 성체 진드기를 포함하였다. *Apl* p44 유전자에 특이적이고, *Aph*의 p44 유전자를 증폭하지 않는 프라이머 및 하이브리드화 프로브를 선택하였다. 프라이머 및 프로브의 서열은 하기에 도시된다:

[0094] *Apl* p44 정방향 프라이머: 5' CCGCGCTTTAGTAAGATAAATG 3'(서열 목록 번호:6)

[0095] *Apl* p44 역방향 프라이머: 5' GCAAATTTAACGATCTCCGCC 3'(서열 목록 번호:7)

[0096] *Apl* p44 프로브 1129-FITC: 5' ACAGTATCGGGTAGCGAGAGTAGAA 3'(서열 목록 번호:8)

[0097] *Apl* p44 프로브 1183-LC670: 5' GGAGATCGGCTATGAACAGTCAAGAC 3'(서열 목록 번호:9)

[0098] 상기 프라이머 및 프로브를 제조업체에서 합성하였다. 실시간 PCR을 로슈(Roche) 시약(Genotyping Master Mix #04707524001)을 이용하여 로슈 라이트사이클러 480(LightCycler[®] 480)에 대해 최적화시켰다. 프라이머를 정방향 프라이머에 대해 0.3 μM, 및 역방향 프라이머에 대해 0.6 μM의 농도로 사용하였다. 둘 모두의 프로브를 0.3 μM의 농도로 사용하였다. PCR을 다음과 같은 조건하에서 수행하였다: 10분 동안 95°C에서의 1회의 고온-시작(hot-start) 주기 후, 30초 동안 95°C에서의 변성, 25초 동안 58°C에서의 어닐링 및 20초 동안 72°C에서의 신장의 50주기. PCR 생성물을 1분 동안 95°C로 가열하고, 1분 동안 40°C로 냉각시킨 후, 점진적으로 80°C로 가열함으로써 용해 곡선을 수행하였다. 양성 교차점(crossing point) 및 66.5°C +/- 1°C의 용해 곡선 온도 둘 모두를 가짐에 따라 소프트웨어로부터 양성 샘플을 확인하였다. 분석 민감도를 음성 개 유전체 DNA에서 0.1fg 이상으로 결정하였다(도 2A). *Apl* p44 PCR은 미국, 카리브해 및 브라질 전역에서 *Apl*의 균주를 검출하였다. *Apl* p44 PCR은 *Aph* p44 주형 또는 PCR-양성 지역(positive field) 샘플을 함유하는 대조 플라스미드로부터 *Aph* p44 DNA를 검출하지 않았다(도 2B).

[0099] **실시예 3**

[0100] **항-종, 간접 ELISA(Anti-Species, Indirect ELISA)에 의한 *Apl*의 검출**

[0101] *Apl*의 p44 유전자로부터 유래된 합성 펩티드를 ELISA 포맷으로 시험하여 높은 적하량(burden)의 *리피세팔루스(Rhipicephalus)* 진드기 및 *E. 카니스(E. canis)*에 대해 높은 혈청유병률(seroprevalence)을 갖는 지역으로부터 개의 혈청학적 반응을 결정하였다. 이러한 지리적 지역은 PCR에 의해 개에서 비교적 높은 수준의 *A. 플라티스* 감염 및 *A. 파고사이토필름* 감염의 부재를 갖는 것을 나타내었다. 펩티드 서열은 다음에 도시된 바와 같다:

[0102] Cys-Lys-Asp-Gly-Thr-Arg-Val-Glu-Trp-Lys-Ala-Glu-Lys-Phe-Asp-Trp-Asn-Thr-Pro-Asp-Pro-Arg-Ile (서열 목록

번호:15).

[0103] 대안적 펩티드 서열은 다음을 포함한다:

[0104] Cys-Lys-Asp-Gly-Thr-Arg-Val-Glu-Trp-Lys-Ala-Glu-Lys-Phe-Asp-Trp-Asn-Thr-Pro-Asp-Pro-Arg-Ile-Lys-Phe-Lys-Asn (서열 목록 번호:14).

[0105] 서열 목록 번호:15의 합성 펩티드를 DMSO에 용해시키고, 실온에서 밤새 50mM Tris, pH 7.5 중의 0.25 µg/ml의 농도로 이플론 2Hb(Immulon 2Hb) 플레이트(Thermo Electron Corporation #3455)에 코팅시켰다. 플레이트를 4 시간 동안 Tris/TWEEN® 완충용액(2% TWEEN® 20을 갖는 0.1M Tris, pH 7.6)으로 블로킹시켰다. 플레이트를 플레이트 세척액(0.05% TWEEN® 20을 갖는 PBS, pH 7.2)으로 3회 세척하였다. 혈청을 샘플 희석액(0.05% TWEEN® 20 및 1% BSA를 갖는 PBS, pH 7.2) 중의 1:100의 희석액으로 첨가하고, 1시간 동안 실온에서 인큐베이션시켰다. 플레이트를 5회 세척하고, 항-개 컨쥬게이트(Jackson ImmunoResearch # 304-035-003)를 샘플 희석액 중의 1:2000의 희석액으로 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 3회 세척하고, 1개 성분의 TMB 기질을 첨가하고, 5분 동안 인큐베이션하고, 1% SDS를 이용하여 반응을 중지시켰다. 흡광도 측정을 650nm의 파장에서 표준 플레이트 판독기에서 판독하였다. 0.4의 컷-오프(cut-off)를 결정하였다. 샘플을 *Aph* p44(Snap® 4Dx™, IDEXX Laboratories, Inc.)에 대해 유사한 인-클리닉(in-clinic) ELISA와 비교하였고, 결과는 도 3에 제시되어 있다. "SNAP® AP 결과"로 표시된 컬럼은 시각 조사에 의해 수득된 결과를 나타낸다. "SNAP® NET AP"로 표시된 컬럼은 농도계측식 측정에 의해 수득된 양적 결과를 나타낸다.

[0106] 전체 67개 샘플을 시험하였다. 둘 모두의 검정에서 27개의 샘플은 음성으로 시험되었고, 16개의 샘플은 양성으로 시험되었다. *Aph* p44에 대한 인-클리닉 ELISA에서 24개의 샘플이 음성으로 시험되었으나, *ApI* p44 항-중, 간접 ELISA에 의해 양성으로 시험되었다. 따라서, *ApI* 검정은 *Aph* 검정을 시험함으로써 놓칠 수 있는 개에서의 *ApI* 노출을 검출한다.

[0107] *ApI* p44는 *Aph*로부터의 p44에 대한 교차-반응성에 의해 확인되는 것 이상으로 *ApI* 감염을 검출하는 수단을 제공한다. *ApI* p44 폴리뉴클레오티드는 *ApI*과 *Aph* 사이의 구별을 가능케 한다.

[0108] **실시예 4**

[0109] **직접 *ApI* ELISA의 민감성**

[0110] 개를 *ApI*로 실험적으로 감염시키고, 혈청 샘플을 시간 경과에 따라 수집하였다. *ApI*에 대한 혈청 항체를 직접 *ApI* ELISA 및 SNAP® 4Dx를 이용하여 검정하였다. 특히, *ApI*의 p44 유전자로부터 유래된 합성 펩티드(서열 목록 번호:14, 표 1 및 2에서 *ApI*_p44L로 명명됨)를 DMSO에 용해시키고, 실온에서 밤새 50mM 탄산나트륨, pH 9.6 중의 0.25 µg/ml의 농도로 이플론(Immulon™) 2Hb 플레이트(Thermo Electron Corporation #3455) 상에 코팅시켰다. 플레이트를 2시간 동안 (0.1M Tris, pH 7.6 중의 2% TWEEN® 20) 블로킹시켰다. 혈청(25ul)을 50 ul의 특정 컨쥬게이트(컨쥬게이트, *ApI*_p44L:HRPO를 1:1의 비로 제조하고, 50mM Tris pH 7.6, 0.05% TWEEN® 20, 5% BSA 및 10% FBS 중에 0.5 µg/ml로 희석시킴)와 혼합하고, 1시간 동안 실온에서의 인큐베이션을 위해 코팅된 웰에 즉시 첨가하였다. 이후, 플레이트를 6회 세척하고, 1개 성분의 TMB 기질을 색 발달을 위해 첨가하였다. 흡광도 측정을 650nm의 파장에서 표준 플레이트 판독기에서 판독하였다. 0.07의 컷-오프를 결정하였다. 동일한 샘플을 또한 *Aph*에 대해 개발된 인-클리닉 ELISA(Snap® 4Dx™, IDEXX Laboratories, Inc.)를 이용하여 시험하였고, 결과가 표 1에 제시되어 있다("SNAP® NET AP로 표시된 컬럼은 농도계측식 측정에 의해 수득된 양적 결과를 나타내고, "Days PI"는 주입 후 일수를 의미함).

[0111] 표 1. *Apl* p44 펩티드 ELISA에 의한 시간 경과 연구

개 ID	IDEXX ID	<i>Apl</i> _P44L 컷오프 0.07	SNAP® NET AP	Days PI
105376	A1_0	0.03	0	3
	A1_1	0.04	0	7
	A1_2	0.45	0	10
	A1_3	0.68	0	14
	A1_4	0.37	0.01	17
	A1_5	0.17	0.03	21
	A1_6	0.07	0.05	24
	A1_7	0.11	0.2	28
	A1_8	0.26	0.34	35
	A1_9	0.20	0.31	42

[0112]

	A1_10	0.25	0.29	49
	A1_11	0.20	0.13	56
	A1_12	0.46	0.18	63
	A1_13	1.11	0.43	71
	A1_15	0.32	0.17	84
125011	A2_0	0.03	0	3
	A2_1	0.03	0	7
	A2_2	0.24	0.05	10
	A2_3	0.20	0.15	13
	A2_4	0.17	0.02	17
	A2_5	0.10	0.11	21
	A2_6	0.07	0.15	24
	A2_7	0.07	0.29	28
	A2_8	0.15	0.38	35
	A2_9	0.21	0.41	42
	A2_10	0.19	0.29	49
	A2_11	0.18	0.24	56
	A2_12	0.14	0.2	64
	A2_13	0.17	0.11	71
	A2_14	0.20	0.09	78
A2_15	0.19	0.11	86	
257818	A3_0	0.03	0	3
	A3_1	0.03	0	7
	A3_2	0.21	0	10
	A3_3	0.23	0	13
	A3_4	0.23	0.02	17
	A3_5	0.13	0.06	21
	A3_6	0.11	0.01	24
	A3_7	0.15	0.15	28
	A3_8	0.37	0.27	35
	A3_9	0.49	0.24	42
	A3_10	0.58	0.22	49
	A3_11	0.55	0.23	56
	A3_12	0.54	0.16	64
	A3_13	0.49	0.1	71
	A3_14	1.28	0.28	78
A3_15	1.39	0.25	86	
264347	A4_0	0.03	0	3
	A4_1	0.03	0	7
	A4_2	0.04	0	10
	A4_3	0.06	0	14
	A4_4	0.08	0	17
	A4_5	0.05	0.05	21
	A4_6	0.04	0.09	24
	A4_7	0.06	0.05	28
	A4_8	0.07	0.09	35
	A4_9	0.07	0.08	42
	A4_10	0.09	0.07	49
	A4_11	0.11	0.06	56
	A4_12	0.20	0.04	63
	A4_13	0.37	0.06	71

[0113]

	A4_14	1.41	0.27	79
	A4_15	0.24	0.06	84
280610	A5_0	0.03	0	3
	A5_1	0.03	0	7
	A5_2	0.06	0	10
	A5_3	0.58	0	14
	A5_4	0.42	0	17
	A5_5	0.12	0	21
	A5_6	0.07	0.08	24
	A5_7	0.14	0.16	28
	A5_8	0.08	0.07	35
	A5_9	0.40	0.06	42
	A5_10	0.53	0.04	49
	A5_11	0.70	0.06	56
	A5_12	0.88	0.27	63
	A5_13	0.78	0.06	71
	A5_14	1.45	0.14	79
	A5_15	0.73	0.08	84
287099	A6_0	0.03	0	3
	A6_1	0.03	0	7
	A6_2	0.71	0	10
	A6_3	0.95	0.03	13
	A6_4	0.40	0.03	17
	A6_5	0.13	0	21
	A6_6	0.07	0	24
	A6_7	0.10	0.09	28
	A6_8	0.10	0.18	34
	A6_9	0.15	0.16	42
	A6_10	0.22	0.2	49
	A6_11	0.36	0.28	56
	A6_12	0.26	0.11	62
	A6_13	0.41	0.17	70
	A6_14	1.08	0.46	78
	A6_15	0.90	0.36	83

[0114]

[0115]

결과는 펩티드 *Apl*-p44L(서열 목록 번호:14)를 이용한 직접 ELISA 검정이 실험적으로 감염된 개의 혈청에서 *Apl*에 대한 면역 반응을 검출한 것을 나타낸다. 상기 결과는 추가로 *Apl* 검정이 인-클리닉 *Aph* ELISA 보다 조기에 *Apl*에 대한 면역 반응을 검출한 것을 나타낸다. 6마리의 개 중 4마리에서, 감염 10일 후에 반응이 검출되었다.

[0116]

실시예 5

[0117]

Apl ELISA에 의한 *Aph* 감염의 검출

[0118]

Apl-p44L 펩티드(서열 목록 번호:14)에 기초한, 실시예 4에 기재된 것과 동일한 직접 ELISA 과정을 *Aph* 감염에 대해 이전에 양성 시험된 혈청 샘플을 시험하기 위해 사용하였다. 이들은 *Aph*로 실험적으로 감염된 개(즉, Pinky 및 Brain), 뿐만 아니라 높은 *Aph* 혈청양성율을 갖는 지역으로부터의 사냥개(ID에서 접두사로서 ME를 가짐)로부터의 샘플을 포함한다. 높은 *Apl* 혈청양성율을 갖는 지역(즉, ID에서 접두사로서 P 또는 HP)으로부터의 5개의 샘플을 양성 대조군으로 사용하였고, 정상적인 개로부터의 5개의 샘플(ID에서 접두사로서 RAR)을 음성 대조군으로 제공하였다. 동일한 세트의 샘플을 또한 *Aph*에 대해 개발된 인-클리닉 ELISA(Snap[®]4Dx[™], IDEXX Laboratories, Inc.)를 이용하여 시험하였고, 결과는 표 2에 제시되어 있다("SNAP[®] NET AP"로 표지된 컬럼은 농도계측식 측정에 의해 수득된 양적 결과를 나타냄).

[0119] 표 2. *ApI* p44 펩티드 ELISA에 의한 *Aph* 감염의 검출

ID	<i>ApI</i> p44L 컷오프 0.07	SNAP® (net AP)
ME307	0.11	0.55
ME308	0.27	0.30
ME314	0.05	0.09
ME478	0.05	0.12
ME485	0.10	0.52
ME487	0.04	-
ME492	0.55	0.47
ME513	0.09	0.04
ME562	0.05	0.42
ME593	0.04	0.34
ME631	0.10	0.27
ME635	0.26	0.44
ME668	0.06	0.66
ME703	0.04	0.58
ME724	0.14	0.10
ME741	0.08	0.05
ME758	0.08	0.13
pinky 62	0.62	+
Brain 69	0.21	+
p9	0.62	-
p34	1.75	-
p43	0.22	-
HP127	0.12	-
HP145	0.20	-
RAR 1758	0.03	-
RAR 1769	0.04	-
RAR 1755	0.03	-
RAR 1756	0.03	-
RAR 1760	0.03	-
BLK	0.03	-

[0120]

[0121] 상기 결과는 *ApI*_p44 펩티드가 18개의 *Aph* 양성 샘플 중 12개를 검출할 수 있는 것을 나타내고, 이는 *Aph* 뿐만 아니라 *ApI*의 검출을 위한 상기 펩티드의 유용성을 입증한다.

도면

도면1a1

```

Apl_p44-1 TATTTTATG TTGGTYTGA YATWGCCG GCGTTTAGTA AGATAAATGG
Apl_p44-2 TATTTTATG TTGGTTTGA TTATGCCC GCGTTTAGTA AGATAAATGG
Apl_p44-3 TATTTTATG TTGGTTTGA TTATAGTCCG GCGTTTAGTA AGATAAATGG

Apl_p44-1 GTTTGAGATA AGAGAGAGTA CCGGGGAAAC TGCGGCAGTA TATCCGTACA
Apl_p44-2 GTTTGAGATA AGAGAGAGTA CCGGGGAAAC TGCGGCAGTA TATCCGTACA
Apl_p44-3 GTTTGAGATA AGAGAGAGTA CCGGGGAAAC TGCGGCAGTA TATCCGTACA

Apl_p44-1 TGAAAGATGG AACTAGAGTG GAGTGGAAG CTGAGAAGTT CACTGGAAC
Apl_p44-2 TGAAAGATGG AACTAGAGTG GAGTGGAAG CTGAGAAGTT CACTGGAAC
Apl_p44-3 TGAAAGATGG AACTAGAGTG GAGTGGAAG CTGAGAAGTT CACTGGAAC

Apl_p44-1 ACACCAGATC CGAGGATTAA GTTTAAAAAC AATCCTATCG TAGCGTTGGA
Apl_p44-2 ACACCAGATC CGAGGATTAA GTTTAAAAAC AATCCTATCG TAGCGTTGGA
Apl_p44-3 ACACCAGATC CGAGGATTAA GTTTAAAAAC AATCCTATCG TAGCGTTGGA

Apl_p44-1 AGGAAGTGTG GGCTACAGTA TCGGGGTAGC GAGAGTAGAA CTGGAGATCG
Apl_p44-2 AGGAAGTGTG GGCTACAGTA TCGGGGTAGC GAGAGTAGAA CTGGAGATCG
Apl_p44-3 AGGAAGTGTG GGCTACAGTA TCGGGGTAGC GAGAGTAGAA CTGGAGATCG

Apl_p44-1 GCTATGAACA GTTCAAGACG AAAGGAATAA GAGATACGGG AAGTAAGGAA
Apl_p44-2 GCTATGAACA GTTCAAGACG AAAGGAATAA GAGATACGGG AAGTAAGGAA
Apl_p44-3 GCTATGAACA GTTCAAGACG AAAGGAATAA GAGATACGGG AAGTAAGGAA

Apl_p44-1 GAAGAAGCTG ATGCCGTGTA CCTGTTGGCT AAGAAGCTAC CGCATAACCT
Apl_p44-2 GAAGAAGCTG ATGCCGTGTA CCTGTTGGCT AAGAAGCTAC CGCATAACCT
Apl_p44-3 GAAGAAGCTG ATGCCGTGTA CCTGTTGGCT AAGAAGCTAC CGCATAACCT

Apl_p44-1 GGTGAGTGAC CAGAGCGATA AATTCCTGGA GGAGCTGAAG AATACGAAAG
Apl_p44-2 GGTGAGTGAC CAGAGCGATA AATTCCTGGA GGAGCTGAAG AATACGAAAG
Apl_p44-3 GGTGAGTGAC CAGAGCGATA AATTCCTGGA GGAGCTGAAG AATACGAAAG

Apl_p44-1 CGGCGGAGAT CGTTAAATTT GCTGAGGCTG TTGGCACATC GGCAAAGGAT
Apl_p44-2 CGGCGGAGAT CGTTAAATTT GCTGAGGCTG TTGGCACATC GGCAAAGGAT
Apl_p44-3 CGGCGGAGAT CGTTAAATTT GCTGAGGCTG TTGGCACATC GGCAAAGGAT

Apl_p44-1 ATTGATAAGA AGGTTTGTA GAAGCACACT AACAAATGCGG CGAACAGTTG
Apl_p44-2 ATTGATGGAA AGGTTTGTA GAAGCACAAC GGCAATGCGG CAGGCAGTTG
Apl_p44-3 ATTGATGGAA AGGTTTGTA GAAGAACACT AACAAATGCGG CAGACAGTTG
    
```

도면1a2

```

Apl_p44-1 GAAGTGCAG CAGCCTGGAA GCGGCACCGA GACAAGCGCC AAGGCGTTCA
Apl_p44-2 GCAGTGCACG CAGACTGGCA GCGAAACAAG CG...GC... AAGACGTTGA
Apl_p44-3 GAAGTGCAG CAGACTGGCA GCGGCAGCGA CG...GC... AAGGAGTTCA

Apl_p44-1 GTGAAATATT TACGAAGGCA GCGGTAAATA CTGACGGCAA AGGCAAAGCA
Apl_p44-2 GTGAGATATT TACGAAGGCT GCGGTGGATG CTAAC... .GGCAAAGCA
Apl_p44-3 GTAAACTATT TACGAAGGCT GCGGTGGATG CTAACGAGAA AGGCAAAGCG

Apl_p44-1 TGGCCTAACG GGCACACCGA CAGCGCCGCG AAAGCGGAAG ACCTAAGTAC
Apl_p44-2 TGGCCTAACG GA... .AG CGACGCCGCG AAAGCGGAAG ACCTAAGTAC
Apl_p44-3 TGGCCTAACG GGCACACCGA CAGCGCCGCG AAAGCGGAAG ACCTAAGTAC

Apl_p44-1 GGCCTTGAAT AGAGAACTAA CCAGCGCCGA AAAGAACAAG GTAGCTGGGC
Apl_p44-2 TGCCTTGAAT AGAGAACTAA CCAGCGCTGA AAAGAACAAG GTAGCTGGCC
Apl_p44-3 GGCCTTGAAT AGAGAACTAA CCAGCGCCGA AAAGAACAAG GTAGCTGGGC

Apl_p44-1 TGCTAACCAG GACTATATCC GGTGGTGAGG TAGTGGAGAT CCGTGCGGTG
Apl_p44-2 TACTAACCAG GACTATATCC GGTGGCGAGG TAGTGGAGAT CCGTGCGGTG
Apl_p44-3 TGCTAACCAG GACTATATCC GGTGGTGAGG TAGTGGAGAT CCGTGCGGTG

Apl_p44-1 TCGACAACGT CAGTAATGWT AAATGCGTGY TACGATCTGC TGAGC SEQ ID NO:16
Apl_p44-2 TCGACAACGT CAGTAATGAT AAACGCATGT TACGATCTGC TGAGC SEQ ID NO:17
Apl_p44-3 TCGACAACGT CAGTAATGTT AAACGCCTGC TACGATCTGC TGAGC SEQ ID NO:18
    
```

도면1b1

번역된 서열:

```

-----+-----+-----+
              10              20              30
1  Y F Y V G L D Y X P A F S K I N G F E I R E S T G E T A A V  Apl p44-1
1  Y F Y V G L D Y C P A F S K I N G F E I R E S T G E T A A V  Apl p44-2
1  Y F Y V G L D Y S P A F S K I N G F E I R E S T G E T A A V  Apl p44-3
1  Y F Y V G L D Y S P A F S K I R D F S I R E S N G E T K A V  Aph p44-1
-----+-----+-----+
              40              50              60
31 Y P Y M K D G T R V E W K A E K F D W N T P D P R I K F K N  Apl p44-1
31 Y P Y M K D G T R V E W K A E K F D W N T P D P R I K F K N  Apl p44-2
31 Y P Y M K D G T R V E W K A E K F D W N T P D P R I K F K N  Apl p44-3
31 Y P Y L K D G K S V K L E S H K F D W N T P D P R I G F K D  Aph p44-1
-----+-----+-----+
              70              80              90
61 N P I V A L E G S V G Y S I G V A R V E L E I G Y E Q F K T  Apl p44-1
61 N P I V A L E G S V G Y S I G V A R V E L E I G Y E Q F K T  Apl p44-2
61 N P I V A L E G S V G Y S I G V A R V E L E I G Y E Q F K T  Apl p44-3
61 N M L V A M E G S V G Y G I G G A R V E L E I G Y E R F K T  Aph p44-1
-----+-----+-----+
              100             110             120
91 K G I R D T G S K E E E A D A V Y L L A K K L P H T L V S D  Apl p44-1
91 K G I R D T G S K E E E A D A V Y L L A K K L P H T L V S D  Apl p44-2
91 K G I R D T G S K E E E A D A V Y L L A K K L P H T L V S D  Apl p44-3
91 K G I R D S G S K E D E A D T V Y L L A K E L A Y D V V T G  Aph p44-1
-----+-----+-----+
              130             140             150
121 Q S D K F L E E L K N T K A A E I V K F A E A V G T S A K D  Apl p44-1
121 Q S D K F L E E L K N T K A A E I V K F A E A V G T S A K D  Apl p44-2
121 Q S D K F L E E L K N T K A A E I V K F A E A V G T S A K D  Apl p44-3
121 Q T D N L A A A L A K T S G K D I V Q F A K A V E I S Y P S  Aph p44-1
-----+-----+-----+
              160             170             180
151 I D K K V C K - K H T N N A A N S - - - - W K C E Q P G S  Apl p44-1
151 I D G K V C K - K H N G N A A G S - - - - W Q C T Q T G S  Apl p44-2
151 I D G K V C K - K N T N N A A D S - - - - W K C E Q T G S  Apl p44-3
151 I D G K V C S G K H A A L A A N T N A E K K Y A V E P A N G  Aph p44-1
-----+-----+-----+
              190             200             210
175 G T E T S A K A F S E I F T K A G V N T D G - - - - -  Apl p44-1
175 E T S - - G K T L S E I F T K A G V D A N - - - - -  Apl p44-2
175 G S D - - G K E F S K L F T K A G V D A N E - - - - -  Apl p44-3
181 G T D G S T S Q C S G L S N G S A E A A H K Y L S K F V S L  Aph p44-1
-----+-----+-----+
              220             230             240
197 - - - - K G K A W P N G H T D - - - - - S A A K A  Apl p44-1
194 - - - - G K A W P N G S - - - - - D A A K A  Apl p44-2
195 - - - - K G K A W P N G H T D - - - - - S A A K A  Apl p44-3
211 T G V V E G K N W P T G R S S N N S N S I V V G A P N S N A  Aph p44-1
-----+-----+-----+
              250             260             270

```

도면1b2

```

-----+-----+-----+
213 E D L S T A L N R E L T S A E K N K V A G L L T R T I S G G  Apl p44-1
207 E D L S T A L N R E L T S A E K N K V A G L L T R T I S G G  Apl p44-2
211 E D L S T A L N R E L T S A E K N K V A G L L T R T I S G G  Apl p44-3
241 N A M A K D L V K E L T P E E K T I V A G L L A K T I E G G  Aph p44-1
-----+-----+-----+
              280             290
243 E V V E I R A V S T T S V M X N A C Y D L L S  Apl p44-1 SEQ ID NO:3
237 E V V E I R A V S T T S V M I N A C Y D L L S  Apl p44-2 SEQ ID NO:4
241 E V V E I R A V S T T S V M L N A C Y D L L S  Apl p44-3 SEQ ID NO:5
271 E V V E I R A V S S T S V M V N A C Y D L L S  Aph p44-1 SEQ ID NO:19

```

도면2a

Apl p44 실시간 PCR 의 검정 민감도

플라스미드 농도	교차점	융해 온도 (°C)
100pg	17.05	66.42
10pg	21.04	66.44
1pg	24.78	66.35
100fg	28.56	66.33
10fg	32.57	66.73
1fg	34.14	67.13
0.1fg	35.27	67.48
물	음성	음성
개 유전체 DNA 중의 10fg	30.02	66.66
개 유전체 DNA 중의 0.1fg	33.25	66.43

도면2b

Aph 및 *Apl* p44 실시간 PCR 에 대해 시험된 샘플 및 대조군 플라스미드의 PCR 결과

샘플	<i>Aph</i> PCR		<i>Apl</i> PCR	
	교차점	융해 온도	교차점	융해 온도
Turks & Caicos	n/a	n/a	30.53	66.68
Arizona	n/a	n/a	32.01	66.33
Brazil-1	음성	음성	29.76	66.5
Brazil-2	음성	음성	29.43	66.8
Tick-1	음성	음성	35.84	66.88
Tick-2	음성	음성	30.66	66.48
Nymph-1	음성	음성	30.69	66.17
Nymph-2	음성	음성	33.5	66.54
Minnesota	34.98	64.54	음성	음성
Massachusetts	30.89	64.58	음성	음성
<i>Aph</i> 플라스미드 (1fg)	36.44	64.56	음성	음성

도면3

Snap®4Dx™ *Aph* 인-클리닉 ELISA 와 *Apl p44* 펩티드 항-중, 간접 ELISA 의 비교

샘플	SNAP® AP 결과	SNAP® NET AP	<i>Apl p44</i>	샘플	SNAP® AP 결과	SNAP® NET AP	<i>Apl p44</i>
P1	-	0	0.149	HP 116	-	0.00	0.368
P4	-	0	0.383	HP 117	-	0.00	0.3705
P5	+	0.3	2.718	HP 119	-	0.00	0.236
P6	+	0.22	1.773	HP 120	-	0.00	0.220
P7	-	0	0.2715	HP 121	-	0.00	0.441
P8	-	0	0.4275	HP 123	+	0.84	2.309
P9	-	0	0.9595	HP 124	-	0.00	0.316
P12	-	0	0.6725	HP 126	-	0.00	0.173
P13	-	0	0.6115	HP 127	-	0.00	0.524
P15	+	0.32	3.0265	HP 128	-	0.00	0.7555
P16	-	0	0.222	HP 136	+	0.75	2.509
P18	-	0	0.4395	HP 138	-	0.00	0.4125
P19	-	0	0.9025	HP 139	-	0.00	0.204
P20	-	0	1.492	HP 140	-	0.00	0.5165
P21	+	0.07	0.5095	HP 142	-	0.00	0.25
P22	+	0.18	1.716	HP 143	-	0.00	0.348
P23	+	0.56	2.7275	HP 144	-	0.00	0.246
P25	-	0	0.114	HP 145	-	0.00	1.057
P26	+	0.1	0.74	HP 146	-	0.00	0.316
P27	-	0	0.217	HP 148	-	0.00	0.467
P29	-	0	0.489	HP 149	-	0.00	0.656
P32	-	0	0.294	HP 150	-	0.00	0.483
P33	+	0.33	2.658	HP 152	-	0.00	0.167
P34	-	0	2.2985	HP 153	-	0.00	0.721
P35	-	0	0.264	HP 154	-	0.00	0.16
P39	-	0	0.2535	HP 155	-	0.00	0.1685
P40	+	0.15	1.346	HP 156	-	0.00	0.209
P41	-	0	0.678	HP 158	-	0.00	0.32
P43	-	0	0.841	HP 159	-	0.00	0.2745
P45	-	0	0.236	HP 160	-	0.00	0.5665
P48	-	0	1.118	HP 170	+	0.64	2.747
P49	-	0	0.5345	HP 230	+	0.58	2.747
				HP 235	+	0.48	1.563
				HP 242	+	0.75	2.131
				HP 249	+	0.55	1.376

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Beall, Melissa J.
Ione, Phyllis
Chandrashekar, Ramaswamy
Liu, Jiayou

<120> Detection of Anaplasma plays

<130> 06-786

<160> 19

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Degenerate primer to amplify Anaplasma platys p44 polynucleotide

<400> 1
 tatttttatg ttggytrga ytatswhcc 29

<210> 2
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Degenerate primer to amplify Anaplasma playts polynucleotide

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 2
 gctcagcaga tcgtarcang crttyawcat 30

<210> 3
 <211> 265
 <212> PRT
 <213> Anaplasma playts

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (257)..(257)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 3

Tyr Phe Tyr Val Gly Leu Asp Tyr Xaa Pro Ala Phe Ser Lys Ile Asn
 1 5 10 15

Gly Phe Glu Ile Arg Glu Ser Thr Gly Glu Thr Ala Ala Val Tyr Pro
 20 25 30

Tyr Met Lys Asp Gly Thr Arg Val Glu Trp Lys Ala Glu Lys Phe Asp
 35 40 45

Trp Asn Thr Pro Asp Pro Arg Ile Lys Phe Lys Asn Asn Pro Ile Val
 50 55 60

Ala Leu Glu Gly Ser Val Gly Tyr Ser Ile Gly Val Ala Arg Val Glu
 65 70 75 80

Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Gln Phe Lys Thr Lys Gly Ile Arg Asp Thr
 85 90 95

Gly Ser Lys Glu Glu Glu Ala Asp Ala Val Tyr Leu Leu Ala Lys Lys
 100 105 110

Leu Pro His Thr Leu Val Ser Asp Gln Ser Asp Lys Phe Leu Glu Glu
 115 120 125

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

Gly Thr Ser Ala Lys Asp Ile Asp Lys Lys Val Cys Lys Lys His Thr
 145 150 155 160

Asn Asn Ala Ala Asn Ser Trp Lys Cys Glu Gln Pro Gly Ser Gly Thr
 165 170 175

Glu Thr Ser Ala Lys Ala Phe Ser Glu Ile Phe Thr Lys Ala Gly Val
 180 185 190

Asn Thr Asp Gly Lys Gly Lys Ala Trp Pro Asn Gly His Thr Asp Ser
 195 200 205

Ala Ala Lys Ala Glu Asp Leu Ser Thr Ala Leu Asn Arg Glu Leu Thr
 210 215 220

Ser Ala Glu Lys Asn Lys Val Ala Gly Leu Leu Thr Arg Thr Ile Ser
 225 230 235 240

Gly Gly Glu Val Val Glu Ile Arg Ala Val Ser Thr Thr Ser Val Met
 245 250 255

Xaa Asn Ala Cys Tyr Asp Leu Leu Ser
 260 265

<210> 4
 <211> 259
 <212> PRT
 <213> Anaplasma playts

<400> 4

Tyr Phe Tyr Val Gly Leu Asp Tyr Cys Pro Ala Phe Ser Lys Ile Asn
 1 5 10 15

Gly Phe Glu Ile Arg Glu Ser Thr Gly Glu Thr Ala Ala Val Tyr Pro
 20 25 30

Tyr Met Lys Asp Gly Thr Arg Val Glu Trp Lys Ala Glu Lys Phe Asp
 35 40 45

Trp Asn Thr Pro Asp Pro Arg Ile Lys Phe Lys Asn Asn Pro Ile Val
 50 55 60

Ala Leu Glu Gly Ser Val Gly Tyr Ser Ile Gly Val Ala Arg Val Glu
65 70 75 80

Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Gln Phe Lys Thr Lys Gly Ile Arg Asp Thr
85 90 95

Gly Ser Lys Glu Glu Glu Ala Asp Ala Val Tyr Leu Leu Ala Lys Lys
100 105 110

Leu Pro His Thr Leu Val Ser Asp Gln Ser Asp Lys Phe Leu Glu Glu
115 120 125

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

Gly Thr Ser Ala Lys Asp Ile Asp Gly Lys Val Cys Lys Lys His Asn
145 150 155 160

Gly Asn Ala Ala Gly Ser Trp Gln Cys Thr Gln Thr Gly Ser Glu Thr
165 170 175

Ser Gly Lys Thr Leu Ser Glu Ile Phe Thr Lys Ala Gly Val Asp Ala
180 185 190

Asn Gly Lys Ala Trp Pro Asn Gly Ser Asp Ala Ala Lys Ala Glu Asp
195 200 205

Leu Ser Thr Ala Leu Asn Arg Glu Leu Thr Ser Ala Glu Lys Asn Lys
210 215 220

Val Ala Gly Leu Leu Thr Arg Thr Ile Ser Gly Gly Glu Val Val Glu
225 230 235 240

Ile Arg Ala Val Ser Thr Thr Ser Val Met Ile Asn Ala Cys Tyr Asp
245 250 255

Leu Leu Ser

<210> 5
 <211> 263
 <212> PRT
 <213> Anaplasma playts

<400> 5

Tyr Phe Tyr Val Gly Leu Asp Tyr Ser Pro Ala Phe Ser Lys Ile Asn
 1 5 10 15

Gly Phe Glu Ile Arg Glu Ser Thr Gly Glu Thr Ala Ala Val Tyr Pro
 20 25 30

Tyr Met Lys Asp Gly Thr Arg Val Glu Trp Lys Ala Glu Lys Phe Asp
 35 40 45

Trp Asn Thr Pro Asp Pro Arg Ile Lys Phe Lys Asn Asn Pro Ile Val
 50 55 60

Ala Leu Glu Gly Ser Val Gly Tyr Ser Ile Gly Val Ala Arg Val Glu
 65 70 75 80

Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Gln Phe Lys Thr Lys Gly Ile Arg Asp Thr
 85 90 95

Gly Ser Lys Glu Glu Glu Ala Asp Ala Val Tyr Leu Leu Ala Lys Lys
 100 105 110

Leu Pro His Thr Leu Val Ser Asp Gln Ser Asp Lys Phe Leu Glu Glu
 115 120 125

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

Gly Thr Ser Ala Lys Asp Ile Asp Gly Lys Val Cys Lys Lys Asn Thr

<210> 8
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Anaplasma playts

<400> 8
 acagtatcgg ggtagcgaga gtagaa 26

<210> 9
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Anaplasma playts

<400> 9
 ggagatcggc tatgaacagt tcaagac 27

<210> 10
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Anaplasma playts

<400> 10

Lys Asp Gly Thr Arg Val Glu Trp Lys Ala Glu Lys Phe Asp Trp Asn
 1 5 10 15

Thr Pro Asp Pro Arg Ile
 20

<210> 11
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Anaplasma playts

<400> 11

Lys Asp Gly Thr Arg Val Glu Trp Lys Ala Glu Lys Phe Asp Trp Asn
 1 5 10 15

Thr Pro Asp Pro Arg Ile Lys Phe Lys Asn
 20 25

<210> 12
 <211> 265
 <212> PRT
 <213> Anaplasma playts

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> The X at position 9 can be S or C.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (153)..(153)
 <223> The X at position 153 can be G or K.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (159)..(159)
 <223> The X at position 159 can be N or H.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (160)..(160)
 <223> The X at position 160 can be T or N.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (161)..(161)
 <223> The X at position 161 can be G or N.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (165)..(165)
 <223> The X at position 165 can be G or N or D.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (168)..(168)
 <223> The X at position 168 can be K or Q.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (170)..(170)

<223> The X at position 170 can be E or T.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (172)..(172)

<223> The X at position 172 can be T or P.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (175)..(175)

<223> The X at position 175 can be G or E.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (176)..(176)

<223> The X at position 176 can be S or T.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (177)..(177)

<223> The X at position 177 can be D or E or S.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (178)..(178)

<223> The X at position 178 can be T or absent.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (179)..(179)

<223> The X at position 179 can be S or absent.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (180)..(180)

<223> The X at position 180 can be G or A.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (182)..(182)

<223> The X at position 182 can be E or A or T.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (183)..(183)

<223> The X at position 183 can be F or L.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (185)..(185)
 <223> The X at position 185 can be K or E.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (186)..(186)
 <223> The X at position 186 can be L or I.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (193)..(193)
 <223> The X at position 193 can be D or N.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (194)..(194)
 <223> The X at position 194 can be A or T.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (195)..(195)
 <223> The X at position 195 can be N or D.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (196)..(196)
 <223> The X at position 196 can be E or G or absent.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (197)..(197)
 <223> The X at position 197 can be K or absent.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (205)..(205)
 <223> The X at position 205 can be H or S.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (206)..(206)
 <223> The X at position 206 can be T or absent.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (207)..(207)
 <223> The X at position 207 can be D or absent.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (208)..(208)
 <223> The X at position 208 can be D or S.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (257)..(257)
 <223> The X at position 257 can be L or I.

<400> 12

Tyr Phe Tyr Val Gly Leu Asp Tyr Xaa Pro Ala Phe Ser Lys Ile Asn
 1 5 10 15

Gly Phe Glu Ile Arg Glu Ser Thr Gly Glu Thr Ala Ala Val Tyr Pro
 20 25 30

Tyr Met Lys Asp Gly Thr Arg Val Glu Trp Lys Ala Glu Lys Phe Asp
 35 40 45

Trp Asn Thr Pro Asp Pro Arg Ile Lys Phe Lys Asn Asn Pro Ile Val
 50 55 60

Ala Leu Glu Gly Ser Val Gly Tyr Ser Ile Gly Val Ala Arg Val Glu
 65 70 75 80

Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Gln Phe Lys Thr Lys Gly Ile Arg Asp Thr
 85 90 95

Gly Ser Lys Glu Glu Glu Ala Asp Ala Val Tyr Leu Leu Ala Lys Lys
 100 105 110

Leu Pro His Thr Leu Val Ser Asp Gln Ser Asp Lys Phe Leu Glu Glu

Arg Asp Thr Gly Ser Lys Glu Glu Glu Ala Asp Ala
 20 25

<210> 14
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Anaplasma playts

<400> 14

Cys Lys Asp Gly Thr Arg Val Glu Trp Lys Ala Glu Lys Phe Asp Trp
 1 5 10 15

Asn Thr Pro Asp Pro Arg Ile Lys Pro Lys Asn
 20 25

<210> 15
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Anaplasma playts

<400> 15

Cys Lys Asp Gly Thr Arg Val Glu Trp Lys Ala Glu Lys Phe Asp Trp
 1 5 10 15

Asn Thr Pro Asp Pro Arg Ile
 20

<210> 16
 <211> 795
 <212> DNA
 <213> Anaplasma playts

<400> 16
 tatttttatg ttgtytgga ytatwgcccg gcgtttagta agataaatgg gtttgagata 60

agagagagta ccggggaaac tgcggcagta tatccgtaca tgaaagatgg aactagagtg 120

gagtggaaag ctgagaagtt cgactggaac acaccagatc cgaggattaa gtttaaaaac 180

aatcctatcg tagcgttga aggaagtgtg ggctacagta tcgggtagc gagagtagaa 240

ctggagatcg gciatgaaca gttcaagacg aaaggaataa gagatcggg aagtaaggaa 300

gaagaagctg atgccgtgta cctgttggct aagaagctac cgcataccct ggtgagtgc 360

cagagcgata aatcctgga ggagctgaag aatacgaag cggcggagat cgttaaattt 420

gctgaggctg ttggcacatc ggcaaaggat attgataaga aggtttgtaa gaagcacact 480

aacaatgcgg cgaacagttg gaagtgcgag cagcctggaa gcggcaccga gacaagcgcc 540

aaggcgttca gtgaaatatt tacgaaggca ggcgtaaata ctgacggcaa aggcaaagca 600

tggcctaacg ggcacaccga cagcggcgcg aaagcggaag acctaagtac ggcgttgaat 660

agagaactaa ccagcgccga aaagaacaag gtagctgggc tgctaaccag gactatatcc 720

ggtggtgagg tagtggagat ccgtgcggtg tcgacaacgt cagtaatgtw aatgcgtgy 780

tacgatctgc tgagc 795

<210> 17
 <211> 777
 <212> DNA
 <213> Anaplasma playts

<400> 17
 tatttttatg ttggtttgga ttattgcccc gcgttttagta agataaatgg gtttgagata 60

agagagagta ccggggaaac tgcggcagta tatccgtaca tgaagatgg aactagagtg 120

gagtggaaag ctgagaagtt cgactggaac acaccagatc cgaggattaa gtttaaaaac 180

aatcctatcg tagcgttaga aggaagtgtg ggctacagta tcgggtagc gagagtagaa 240

ctggagatcg gciatgaaca gttcaagacg aaaggaataa gagatcggg aagtaaggaa 300

gaagaagctg atgccgtgta cctgttggct aagaagctac cgcataccct ggtgagtgac 360
 cagagcgata aattcctgga ggagctgaag aatacgaag cggcggagat cgtaaagttt 420
 gctgaggctg ttggcacatc ggcaaaggat attgatggaa aggtttgtaa gaagcacaac 480
 ggcaatgcgg caggcagttg gcagtgcacg cagactggca gcgaaacaag cggcaagacg 540
 ttgagtgaga tatttacgaa ggctggcgtg gatgctaacg gcaaagcatg gcctaacgga 600
 agcgacgccg cgaaagcggg agacctaagt actgcgttga atagagaact aaccagcgt 660
 gaaaagaaca aggtagctgg cctactaacc aggactatat ccggtggcga ggtagtgag 720
 atccgtgcgg tgtcgacaac gtcagtaatg ataaacgcat gttacgatct gctgagc 777

<210> 18
 <211> 789
 <212> DNA
 <213> Anaplasma playts

<400> 18
 tatttttatg ttggtttaga ttatagtccg gcgttttagta agataaatgg gtttagata 60
 agagagagta ccggggaaac tgcggcagta tatccgtaca tgaaagatgg aactagagtg 120
 gagtggaaag ctgagaagtt cgactggaac acaccagatc cgaggattaa gtttaaaac 180
 aatcctatcg tagcgttggg aggaagtgtg ggctacagta tcggggtagc gagagtagaa 240
 ctggagatcg gctatgaaca gttcaagacg aaaggaataa gagatcggg aagtaaggaa 300
 gaagaagctg atgccgtgta cctgttggct aagaagctac cgcataccct ggtgagtgac 360
 cagagcgata aattcctgga ggagctgaag aatacgaag cggcggagat cgtaaattt 420
 gctgaggctg ttggcacatc ggcaaaggat attgatggaa aggtttgtaa gaagaacact 480

aacaatgctgg cagacagtgg gaagtgcgag cagactggca gcggcagcga cggcaaggag 540
 ttcagtaaac tatttacgaa ggctggcgtg gatgctaacg agaaaggcaa agcgtggcct 600
 aacgggcaca ccgacagcgc cgcgaaagcg gaagacctaa gtacggcggtt gaatagagaa 660
 ctaaccagcg ccgaaaagaa caaggtagct gggtctgctaa ccaggactat atccggtggt 720
 gaggtagtgg agatccgtgc ggtgtcgaca acgtcagtaa tgttaaagc ctgctacgat 780
 ctgctgagc 789

<210> 19
 <211> 293
 <212> PRT
 <213> Anaplasma phagocytophilum

<400> 19

Tyr Phe Tyr Val Gly Leu Asp Tyr Ser Pro Ala Phe Ser Lys Ile Arg
 1 5 10 15

Asp Phe Ser Ile Arg Glu Ser Asn Gly Glu Thr Lys Ala Val Tyr Pro
 20 25 30

Tyr Leu Lys Asp Gly Lys Ser Val Lys Leu Glu Ser His Lys Phe Asp
 35 40 45

Trp Asn Thr Pro Asp Pro Arg Ile Gly Phe Lys Asp Asn Met Leu Val
 50 55 60

Ala Met Glu Gly Ser Val Gly Tyr Gly Ile Gly Gly Ala Arg Val Glu
 65 70 75 80

Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Arg Phe Lys Thr Lys Gly Ile Arg Asp Ser
 85 90 95

Gly Ser Lys Glu Asp Glu Ala Asp Thr Val Tyr Leu Leu Ala Lys Glu

