



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115843334 A

(43) 申请公布日 2023.03.24

(21) 申请号 202180030158.1

(22) 申请日 2021.04.22

(30) 优先权数据

201711154.6 2020.04.23 EP

20173315.1 2020.05.06 EP

20178739.7 2020.06.08 EP

16/856162 2020.04.23 US

16/867750 2020.05.06 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.10.21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2021/060578 2021.04.22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/214248 EN 2021.10.28

(71) 申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 F·鲍姆克特 J·本兹

M·厄克尔 P·明奇 A·利德尔

C·朔尔茨

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

专利代理师 权陆军 彭昶

(51) Int.Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

权利要求书2页 说明书38页

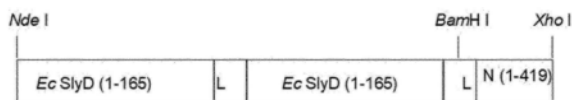
序列表38页 附图15页

(54) 发明名称

用于抗体免疫测定的冠状核衣壳抗原

(57) 摘要

本发明涉及包含冠状核衣壳特异性氨基酸序列的冠状抗原、组合物和包含它们的试剂盒及其生产方法。还包括使用所述冠状抗原来检测样品中的抗冠状抗体的方法,以及鉴别诊断由天然冠状病毒或由针对冠状病毒的疫苗接种而引起的患者中的免疫应答的方法。



L = (GGGS)₃GGG-接头

1. 一种适用于检测分离的生物学样品中针对冠状病毒的抗体的冠状病毒抗原,其包含根据SEQ ID NO:1的冠状病毒核衣壳特异性氨基酸序列或其变体,其中所述冠状病毒抗原进一步包含至少一种伴侣蛋白,并且其中所述抗原不包含其他冠状病毒特异性氨基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的冠状病毒抗原,其中所述冠状病毒为SARS-CoV-2病毒。

3. 根据权利要求1或2所述的冠状病毒抗原,其中所述伴侣蛋白选自由SlyD、SlpA、FkpA和Skp组成的组。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的冠状病毒抗原,其中所述SARSCoV-2冠状病毒核衣壳变体包含根据SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

5. 根据权利要求1至5中任一项所述的冠状病毒抗原,其中所述冠状病毒抗原包含根据SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

6. 一种组合物,其包含至少一种根据权利要求1至5中任一项所述的冠状病毒抗原。

7. 一种生产对冠状病毒核衣壳具有特异性的冠状病毒抗原的方法,所述方法包括以下步骤:

a) 培养用表达载体转化的宿主细胞,特别是大肠杆菌细胞,所述表达载体包含可操作地连接的编码根据权利要求1至5中任一项所述的多肽的重组DNA分子,特别是包含根据SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6的序列的重组DNA分子

b) 表达所述多肽,以及

c) 纯化所述多肽。

8. 一种用于检测分离的样品中对冠状病毒具有特异性的抗体的方法,其中将根据权利要求1至5中任一项所述的冠状病毒抗原、根据权利要求6所述的组合物或通过根据权利要求7所述的方法获得的冠状病毒抗原用作所述抗冠状病毒抗体的捕获试剂和/或结合配偶体。

9. 一种用于检测分离的样品中对冠状病毒具有特异性的抗体的方法,所述方法包括

a) 通过将体液样品与根据权利要求1至5中任一项所述的冠状病毒抗原、根据权利要求6所述的组合物或通过根据权利要求7所述的方法获得的冠状病毒抗原混合来形成免疫反应混合物,

b) 将所述免疫反应混合物保持足以允许存在于所述体液样品中的针对所述冠状病毒抗原的抗体与所述冠状病毒抗原发生免疫反应以形成免疫反应产物的时间段;以及

c) 检测任何所述免疫反应产物的存在和/或浓度。

10. 一种鉴定患者过去是否曾暴露于冠状病毒感染的方法,其包括

a) 通过将所述患者的体液样品与根据权利要求1至5中任一项所述的冠状病毒抗原、根据权利要求6所述的组合物或通过根据权利要求7所述的方法获得的冠状病毒抗原混合来形成免疫反应混合物,

b) 将所述免疫反应混合物保持足以允许存在于所述体液样品中的针对所述冠状病毒抗原的抗体与所述冠状病毒抗原发生免疫反应以形成免疫反应产物的时间段;以及

c) 检测任何所述免疫反应产物的存在和/或不存在,

其中免疫反应产物的存在指示所述患者过去曾暴露于冠状病毒感染。

11. 一种在由天然冠状病毒感染引起的免疫应答和由疫苗接种引起的免疫应答之间进行鉴别诊断的方法,其中所述疫苗接种基于S蛋白、E蛋白或M蛋白衍生的抗原,所述方法包括

a) 通过将体液样品与根据权利要求1至5中任一项所述的冠状病毒抗原、根据权利要求6所述的组合物或通过根据权利要求7所述的方法获得的冠状病毒混合来形成免疫反应混合物，

b) 将所述免疫反应混合物保持足以允许存在于所述体液样品中的针对所述冠状病毒抗原的抗体与所述冠状病毒抗原发生免疫反应以形成免疫反应产物的时间段；以及

c) 检测任何所述免疫反应产物的存在和/或不存在，

其中免疫反应产物的存在指示所述患者中的免疫应答是由于天然冠状病毒感染，并且其中免疫反应产物的不存在指示所述患者中的免疫应答是由于用刺突蛋白衍生的抗原进行的疫苗接种。

12. 根据权利要求1至5中任一项所述的冠状病毒、根据权利要求6所述的组合物或通过根据权利要求7所述的方法获得的冠状病毒在用于检测抗冠状病毒抗体的高通量体外诊断测试中的用途。

13. 根据权利要求1至5中任一项所述的冠状病毒、根据权利要求6所述的组合物或通过根据权利要求7所述的方法获得的冠状病毒在根据权利要求8至12中任一项所述的方法中的用途。

14. 一种用于检测抗冠状病毒抗体的试剂盒，其包含根据权利要求1至5中任一项所述的冠状病毒、根据权利要求6所述的组合物或通过根据权利要求2所述的方法获得的冠状病毒。

用于抗体免疫测定的冠状核衣壳抗原

[0001] 本发明涉及包含冠状核衣壳特异性氨基酸序列的冠状抗原、组合物和包含它们的试剂盒及其生产方法。还包括使用所述冠状抗原来检测样品中的抗冠状抗体的方法,以及鉴别诊断由天然冠状病毒或由针对冠状病毒的疫苗接种而引起的患者中的免疫应答的方法。

背景技术

[0002] SARS CoV-2以前称为nCoV-19(新型冠状病毒2019),是2019年冠状病毒病(COVID-19)的病原体,在2020年初引发了一场大流行,导致全球公共生活受到严重限制和严重的经济影响。允许检测急性感染患者的诊断测试迅速可用。然而,可用测试的量并不能满足大流行期间的高需求。因此,诊所和医院以外的许多患者都没有接受测试,因为可用测试主要是为那些病情非常危急的患者保留的。据统计,感染SARS CoV-2的5名患者中有4名仅出现轻微症状,例如轻微的喉咙痛、干咳或轻微发烧。因此,目前尚不清楚有多少人曾经或仍然被感染,以及有多少人已经从感染中康复。

[0003] 为了评估当前大流行的程度,能够正确评估SARS-2的感染率和真实死亡率将非常有帮助。此外,可使已知已从疾病中康复并获得免疫力的患者解除公共封锁,并使仍然需要例如诊所服务和住院的患者获得帮助。

[0004] 因此,迫切需要能够检测患者体内抗SARS CoV-2病毒抗体的免疫学测试。这样的抗体测试允许鉴定以前受感染影响的患者,这些患者可能会出现该疾病的轻微进展,以至于他们甚至没有意识到这一点。因此,此类测试将允许首次可靠地评估不同群体和整个人群中的真实感染率。此外,此类测试将允许评估针对SARS CoV-2病毒感染开发的疫苗是否真的能有效刺激患者的免疫应答,因此在评估疫苗接种活动的成功与否时完全需要。

[0005] 然而,仍然没有可用的自动化高通量测定以便以所需灵敏度和特异性来检测患者体内的抗SARS CoV-2抗体。以目前获批的抗体测试,仅三分之一的受感染患者可得到正确诊断,而三分之二的受感染患者得到有误报告。这里的主要问题之一是为测试配备能够被抗SARS CoV-2抗体以高灵敏度和特异性识别的抗原。

[0006] 自2002/2003年首次报道SARS出现以来,本领域已知几种冠状抗原。冠状的刺突蛋白,特别是它的受体结合域(RBD),被认为是最有希望的候选物,因为其之前已被证明具有高度的免疫反应性(Wang等人(Clin Chem(2003) 49(12),1989-1996;和He等人(J.Clin.Microbiol.(2004) 42(11),5309-5314),即在感染SARS CoV后的体液免疫应答过程中,对RBD产生了强烈的抗体应答。因此,受体结合域也可作为当前测定开发中的主要抗原(Amanat等人,medRxiv,2020年3月18日)。在这篇最近的手稿中,作者描述了CoV-2受体结合域作为ELISA格式的捕获抗原的用途。然而,灵敏度数据仅基于四个阳性血清(来自三名COVID-19患者)确定,而特异性数据仅依赖于59个阴性血清。分析的样品量太少,无法说明具有统计学意义的灵敏度和特异性。此外,ELISA格式的抗体测定通常需要耗时且费力的手动步骤,并且通常由于测定的可用性有限而排除了高通量应用。

[0007] 与现有技术中认为源自刺突蛋白的抗原最有希望开发冠状抗体测定的偏见相反,本发明涉及一种使用SARS CoV-2病毒的核衣壳蛋白作为抗原来可靠检测抗SARS-CoV-2抗

体的免疫学测试。令人惊讶的是,发明人可以证明,通过使用SARS CoV-2的核衣壳蛋白作为抗原,可以实现所得免疫测试的高灵敏度和高特异性,允许开发出迫切需要和热切期待的自动化高通量冠状抗体测定。

发明内容

[0008] 在第一方面,本发明涉及一种适用于检测分离的生物学样品中的抗冠状病毒抗体的冠状抗原,其包含冠状核衣壳特异性氨基酸序列,特别是根据SEQ ID NO:1的冠状核衣壳特异性氨基酸序列或与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有95%序列同源性的冠状核衣壳特异性氨基酸序列。特别地,所述多肽不包含其他冠状病毒特异性氨基酸序列。

[0009] 在第二方面,本发明涉及包含本发明第一方面的冠状抗原的组合物。

[0010] 在第三方面,本发明涉及一种生产对冠状病毒核衣壳具有特异性的冠状抗原的方法,所述方法包括以下步骤:

[0011] a) 培养用表达载体转化的宿主细胞,特别是大肠杆菌细胞,该表达载体包含可操作地连接的编码本发明第一方面的抗原的重组DNA分子,特别是包含根据SEQ ID NO:3的序列的重组DNA分子

[0012] b) 表达所述多肽,以及

[0013] c) 纯化所述多肽。

[0014] 在第四方面,本发明涉及用于检测分离的样品中对冠状病毒具有特异性的抗体的方法,其中将本发明第一方面的冠状抗原、本发明第二方面的组合物或通过本发明第三方面的方法获得的冠状抗原用作所述抗冠状病毒抗体的捕获试剂和/或结合配偶体。

[0015] 在第五方面,本发明涉及用于检测分离的样品中对冠状病毒具有特异性的抗体的方法,所述方法包括

[0016] a) 通过将体液样品与本发明第一方面的冠状病毒抗原、本发明第二方面的组合物或通过本发明第三方面的方法获得的冠状病毒抗原混合来形成免疫反应混合物

[0017] b) 将所述免疫反应混合物保持足以允许存在于该体液样品中的抗所述冠状病毒抗原的抗体与所述冠状病毒抗原发生免疫反应以形成免疫反应产物的时间段;以及

[0018] c) 检测任何所述免疫反应产物的存在和/或浓度。

[0019] 在第六方面,本发明涉及一种鉴定患者过去是否曾暴露于冠状病毒感染的方法,其包括

[0020] a) 通过将患者的体液样品与本发明第一方面的冠状病毒抗原、本发明第二方面的组合物或通过本发明第三方面的方法获得的冠状病毒抗原混合来形成免疫反应混合物

[0021] b) 将所述免疫反应混合物保持足以允许存在于该体液样品中的抗所述冠状病毒抗原的抗体与所述冠状病毒抗原发生免疫反应以形成免疫反应产物的时间段;以及

[0022] c) 检测任何所述免疫反应产物的存在和/或不存在,其中存在免疫反应产物指示该患者过去曾暴露于冠状病毒感染。

[0023] 在第七方面,本发明涉及一种在由天然冠状病毒感染引起的免疫应答和由疫苗接种引起的免疫应答之间进行鉴别诊断的方法,其中该疫苗接种基于S蛋白、E蛋白或M蛋白衍生的抗原,包括

[0024] a) 通过将患者的体液样品与本发明第一方面的冠状病毒抗原、包含本发明第一方

面的冠状抗原的组合物或通过本发明第三方面的方法获得的冠状病毒抗原混合来形成免疫反应混合物

[0025] b) 将所述免疫反应混合物保持足以允许存在于该体液样品中的抗所述冠状病毒抗原的抗体与所述冠状病毒抗原发生免疫反应以形成免疫反应产物的时间段;以及

[0026] c) 检测任何所述免疫反应产物的存在和/或不存在,其中存在免疫反应产物指示该患者体内的免疫反应是由天然冠状病毒感染引起的,并且其中不存在免疫反应产物指示该患者体内的免疫反应是由于用刺突蛋白衍生的抗原进行疫苗接种引起的。

[0027] 在第八方面,本发明涉及本发明第一方面的冠状抗原、本发明第二方面的组合物或通过第三方面的方法获得的冠状抗原在用于检测抗冠状病毒抗体的高通量体外诊断测试中的用途。

[0028] 在第九方面,本发明涉及一种用于检测抗冠状病毒抗体的试剂盒,该试剂盒包含本发明第一方面的冠状抗原、本发明第二方面的组合物或通过本发明第三方面的方法获得的冠状抗原。

附图说明

[0029] 图1根据以下UniProt ID NO、Gene Bank Acc NO和各自的SEQ ID NO的已知冠状病毒核衣壳序列的比对:

[0030] 严重急性呼吸综合征冠状病毒2N (SARS-CoV-2), β -CoV:UniProt ID P0DTC9;Gene Bank Acc.:MN908947;SEQ ID NO:16严重急性呼吸综合征冠状病毒N (SARS-CoV), β -CoV:UniProt ID P59595;Gene Bank Acc.:AY278741;SEQ ID NO:17

[0031] 中东呼吸综合征相关冠状病毒N (MERS-CoV), β -CoV:UniProt ID T2BBK0;Gene Bank Acc.:KF600632 (SEQ ID NO18)

[0032] 人类冠状病毒NL63 N (HCoV-NL63), α -CoV:UniProt ID Q6Q1R8;Gene Bank Acc.:AY567487;SEQ ID NO:19

[0033] 人冠状病毒229E N (HCoV-229E), α -CoV:UniProt ID P15130;Gene Bank Acc.:X51325;SEQ ID NO:20

[0034] 人冠状病毒OC43 N (HCoV-OC43), β -CoV:UniProt ID P33469;Gene Bank Acc.:AY585228;SEQ ID NO:21

[0035] 人冠状病毒HKU1 N (HCoV-HKU1), β -CoV:UniProt ID Q5MQC6;Gene Bank Acc.:AY597011;SEQ ID NO:22

[0036] 图2:序列比较 (A) SARS CoV-2核衣壳氨基酸序列与不同冠状病毒的核衣壳序列的序列同一性程度(%); (B) SARS CoV-2核衣壳氨基酸序列与不同冠状病毒的核衣壳序列的序列同源性程度(%)。

[0037] 图3:EcSlyD-EcSlyD-CoV-2N (1-419) 抗原的图示

[0038] 图4a:冠状SARS CoV-2S蛋白、E蛋白和M蛋白衍生的抗原的免疫反应性的比较

[0039] 图4b:SARS CoV-2核衣壳蛋白衍生的不同抗原的比较

[0040] 图5:与无、一种或两种SlyD伴侣蛋白融合的全长核衣壳的免疫反应性的比较

[0041] 图6:钎缀合物的珠预处理(作为生产过程中的附加工作流程)对测定性能的影响

[0042] 图7:SARS CoV-2测定的灵敏度;A) 从129名确诊SARS CoV-2患者的样品中获得的

初步结果;以及B)进一步的结果,包括总共214名确诊SARS CoV-2患者;C)另外292名确诊SARS CoV-2患者的额外结果

[0043] 图8:SARS CoV-2测定的特异性;A)来自5192名患者和80个潜在交叉反应样品的第一组测量样品的结果;B)来自5261名患者的第二组测量样品的结果;C)来自所有患者(总共10453名)的结果。普通感冒和冠状病毒交叉反应样品不是常规诊断或献血者,因此在总特异性计算中排除了这些。

[0044] 图9:静脉血清样品对比于毛细血管血液样品获得的测定性能的相关性图10:包含与两种SlyD-或两种SlpA-伴侣蛋白融合的SARS CoV-2核衣壳序列的抗原的免疫反应性的比较

[0045] 图11:来自SARS-CoV-2、0C43、NL63、229E和HKU1的核衣壳蛋白N-末端结构域的反应性。测量在cobas e411自动分析仪上以DAGS格式进行。生物素缀合物(R1)和钆缀合物(R2)的浓度各为100ng/ml。将信号读数(计数)相对于各自阴性值的平均值进行归一化,以产生信号动态(s/n)。

[0046] 图12:SARS CoV-2核衣壳抗原的4个单点突变变体的示意图

[0047] 图13:SARS CoV-2核衣壳抗原的WT对比于3MUT或8MUT单点突变变体的信号恢复

[0048] 序列表

[0049] SEQ ID NO:1:冠状病毒SARS CoV-2核衣壳的氨基酸序列

[0050] SEQ ID NO:2:与一种SlyD伴侣蛋白融合的冠状病毒SARS CoV-2核衣壳的氨基酸序列

[0051] SEQ ID NO:3:与两种SlyD伴侣蛋白融合的冠状病毒SARS CoV-2核衣壳的氨基酸序列

[0052] SEQ ID NO:4:冠状病毒SARS CoV-2核衣壳的核苷酸序列

[0053] SEQ ID NO:5:与一种SlyD伴侣蛋白融合的冠状病毒SARS CoV-2核衣壳的核苷酸序列

[0054] SEQ ID NO:6:与两种SlyD伴侣蛋白融合的冠状病毒SARS CoV-2核衣壳的核苷酸序列

[0055] SEQ ID NO:7:接头肽

[0056] SEQ ID NO:8:SARS CoV-2-N 3MUT变体的氨基酸序列

[0057] SEQ ID NO:9:EcSlyD-EcSlyD-SARS CoV-2-N 3MUT变体的氨基酸序列

[0058] SEQ ID NO:10:SARS CoV-2-N8MUT变体的氨基酸序列

[0059] SEQ ID NO:11:EcSlyD-EcSlyD-SARS CoV-2-N8MUT变体的氨基酸序列

[0060] SEQ ID NO:12:SARS CoV-2-N 12MUT变体的氨基酸序列

[0061] SEQ ID NO:13:EcSlyD-EcSlyD-SARS CoV-2-N12MUT变体的氨基酸序列

[0062] SEQ ID NO:14:SARS CoV-2-N15MUT变体的氨基酸序列

[0063] SEQ ID NO:15:EcSlyD-EcSlyD-SARS CoV-2-N15MUT变体的氨基酸序列

[0064] SEQ ID NO:16:严重急性呼吸综合征冠状病毒2(SARS CoV-2)的氨基酸序列, β -CoV:UniProt ID P0DTC9;Gene Bank Acc.:MN908947

[0065] SEQ ID NO:17:严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS CoV)的氨基酸序列, β -CoV:UniProt ID P59595;Gene Bank Acc.:AY278741

[0066] SEQ ID NO:18:中东呼吸综合征相关冠状病毒(MERS-CoV)的氨基酸序列, β -CoV: UniProt ID T2BBK0;Gene Bank Acc.:KF600632

[0067] SEQ ID NO:19:人冠状病毒NL63(HCoV-NL63)的氨基酸序列, α -CoV:UniProt ID Q6Q1R8;Gene Bank Acc.:AY567487

[0068] SEQ ID NO:20:人冠状病毒229E(HCoV-229E), α -CoV的氨基酸序列:UniProt ID P15130;Gene Bank Acc.:X51325

[0069] SEQ ID NO:21:人冠状病毒OC43(HCoV-OC43)的氨基酸序列, β -CoV:UniProt ID P33469;Gene Bank Acc.:AY585228

[0070] SEQ ID NO:22:人冠状病毒HKU1(HCoV-HKU1), β -CoV的氨基酸序列:UniProt ID Q5MQC6;Gene Bank Acc.:AY597011

具体实施方式

[0071] 在下文详细描述本发明之前,应当理解,本发明不限于本文所述的特定方法、方案和试剂,因为这些方法、方案和试剂可以变化。还应当理解,本文所用的术语仅出于描述特定实施例的目的,并非旨在限制本发明的范围,本发明的范围仅受所附权利要求的限制。除非另外指明,否则本文所用的所有科学技术术语具有如本领域的普通技术人员通常理解相同意义。

[0072] 在本说明书全文中引用了若干文档。本文所引用的文献(包括所有专利、专利申请、科学出版物、制造商的说明书、使用说明等)中的每一篇,无论上文或下文中引用,均通过引用而以其整体并入本文。在此类并入的参考文献的定义或教导与本说明书中引用的定义或教导之间矛盾时,以本说明书文本为准。

[0073] 下面将描述本发明的元件。这些元件与具体实施例一起列出,然而,应理解,它们可以任何方式和任何数目组合以创建另外的实施例。各种描述的实例和优选实施例不应解释为仅将本发明限制为明确描述的实施例。此描述应理解为支持并且涵盖将明确描述的实施例与任何数目的所公开和/或优选元件组合的实施例。此外,除非上下文另有指示,否则本申请中所有所描述元件的任何排列和组合均应视为由本申请的说明书公开。

[0074] 定义

[0075] 词语“包括(comprise)”以及变体诸如“包括(comprises)”和“包括(comprising)”应理解为暗示包括所陈述的整数或步骤或者整数或步骤组,但不排除任何其他整数或步骤或者整数或步骤组。

[0076] 如在本说明书和所附权利要求中所用,除非内容另外明确规定,否则单数形式“一个”、“一种”、“该”和“所述”包括复数指代物。

[0077] 浓度、量和其他数值数据在本文中可以用“范围”格式表达或呈现。应当理解,此类范围格式仅出于方便和简洁而使用,因此应灵活地解释为不仅包括明确列举为范围限值的数值,而且包括该范围所涵盖的所有单独的数值或子范围,就如同明确列举出每个数值和子范围一样。作为说明,数值范围“150mg至600mg”应解释为不仅包括明确列举的值150mg至600mg,而且包括所指示范围内的个体值和子范围。因此,该数值范围中包括个体值诸如150mg、160mg、170mg、180mg、190mg、580mg、590mg、600mg和子范围诸如从150到200、从150到250、从250到300、从350到600等。该相同原则适用于列举仅一个数值的范围。此外,无论所

述范围或特征的广度如何,均适用此类解释。

[0078] 当与数值相连使用时,术语“约”意为涵盖处于一定范围内的数值,该范围具有比所指示的数值小5%的下限和比所指示的数值大5%的上限。

[0079] 疾病的“症状”是指患有这种疾病的组织、器官或生物体可注意到的疾病,并且包括但不限于组织、器官或个体的疼痛、虚弱、压痛、紧张、僵硬和痉挛。疾病的“标志”或“信号”包括但不限于具体指标(诸如生物标志物或分子标志物)的变化或改变(诸如存在、不存在、增加或升高、下降或降低)或者症状的发展、存在或恶化。疼痛的症状包括但不限于可能表现为持续性或不同程度的烧灼痛、搏动性疼痛、瘙痒痛或刺痛的不适感。

[0080] 术语“疾病”和“疾患”在本文中可互换使用,其是指异常状况,尤其是异常医学状况,诸如患病或损伤,其中组织、器官或个体不再能够有效地履行其功能。通常但不一定地,疾病与指示这种疾病存在的具体症状或标志相关联。因此,此类症状或标志的存在可指示组织、器官或个体患有疾病。这些症状或标志的改变可指示这种疾病的进展。疾病的进展的典型特征是此类症状或标志的增加或下降,其可指示疾病的“恶化”或“好转”。疾病的“恶化”的特征是组织、器官或生物体有效履行其功能的能力下降,而疾病“好转”的典型特征是组织、器官或个体有效履行其功能的能力增强。疾病的实例包括但不限于感染性疾病、炎症性疾病、皮肤病、内分泌疾病、肠道疾病、神经系统性疾患、关节疾病、遗传性疾患、自身免疫疾病、创伤性疾病和各种类型的癌症。

[0081] 术语“冠状病毒”是指导致哺乳动物和鸟类疾病的一组相关病毒。在人类中,冠状病毒会引起从轻微到致命的呼吸道感染。轻度疾病包括一些普通感冒病例,而更致命的变种可能导致“SARS”、“MERS”和“COVID-19”。冠状病毒包含一个正义单链RNA基因组。

[0082] 病毒包膜由脂质双层形成,其中锚定了膜(M)、包膜(E)和刺突(S)结构蛋白。在包膜内,核衣壳(N)蛋白的多个拷贝形成核衣壳,它以连续的串珠型构象与正义单链RNA基因组结合。其基因组包括编码复制酶/转录酶多蛋白的Orfs 1a和1b,随后是编码刺突蛋白(S)-包膜蛋白、包膜(E)-蛋白、膜(M)-蛋白和核衣壳(N)-蛋白的序列。散布在这些阅读框之间的是不同病毒株之间不同的辅助蛋白的阅读框。

[0083] 已知几种人类冠状病毒,其中四种会导致患者中相当轻微的症状:

[0084] 人类冠状病毒NL63 (HCoV-NL63), α -CoV

[0085] 人冠状病毒229E (HCoV-229E), α -CoV:

[0086] 人冠状病毒HKU1 (HCoV-HKU1), β -CoV:

[0087] 人冠状病毒OC43 (HCoV-OC43), β -CoV:

[0088] 三种人类冠状病毒会产生可能很严重的症状:

[0089] 中东呼吸综合征相关冠状病毒 (MERS-CoV), β -CoV

[0090] 严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 (SARS-CoV), β -CoV

[0091] 严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2 (SARS-CoV-2), β -CoV

[0092] SARS CoV-2导致了2019年冠状病毒病 (COVID-19)。SARS CoV-2在人类中具有高度传染性,世界卫生组织 (WHO) 已将仍在持续的COVID-19大流行指定为国际关注的突发公共卫生事件。症状包括高烧、喉咙痛、干咳和疲惫。在严重的情况下,可能会发展为肺炎。

[0093] 术语“天然冠状病毒”是指在自然界中发生的冠状病毒,即指上文公开的任何冠状病毒。应当理解,天然冠状病毒包含天然存在的病毒中存在的所有蛋白质和核酸分子。与天

然冠状病毒不同，“病毒片段”、“病毒样颗粒”或冠状病毒特异性抗原仅包含天然存在的病毒中存在的一些但不是所有蛋白质和核酸分子。因此，此类“病毒片段”、“病毒样颗粒”或冠状病毒特异性抗原不具有传染性，但仍能够在患者体内产生免疫应答。因此，用冠状病毒特异性病毒片段、冠状病毒特异性病毒样颗粒或冠状病毒特异性抗原进行疫苗接种会在患者体内产生针对这些病毒片段、病毒样颗粒或抗原的抗体。

[0094] 如本文所用，“患者”是指可受益于本文所述的诊断、预后或治疗的任何哺乳动物、鱼、爬行动物或鸟。特别地，“患者”选自由以下组成的组：实验室动物（例如小鼠、大鼠、兔或斑马鱼）、家畜（包括例如豚鼠、兔、马、驴、牛、绵羊、山羊、猪、鸡、骆驼、猫、狗、乌龟、陆龟、蛇、蜥蜴或金鱼）或灵长类（包括黑猩猩、倭黑猩猩、大猩猩和人类）。特别优选地是，“患者”是人类。

[0095] 术语“样品”或“目标样品”在本文中可互换使用，其是指组织、器官或个体的一部分或切片，通常小于这种组织、器官或个体，旨在代表整个组织、器官或个体。在分析时，样品提供关于组织状态或者器官或个体的健康或患病状态的信息。样品的实例包括但不限于液体样品，诸如血液、血清、血浆、滑液、尿液、唾液和淋巴液；或固体样品，诸如组织提取物、软骨、骨头、滑膜和结缔组织。对样品的分析可在视觉或化学基础上完成。视觉分析包括但不限于组织、器官或个体的显微成像或射线照相扫描，以允许对样品进行形态学评估。化学分析包括但不限于检测具体指标的存在或不存在或其数量、浓度或水平的改变。样品为体外样品，其将在体外进行分析并且不会被移回体内。

[0096] 术语“核酸”和“核酸分子”在本文中同义使用，并且是指脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸碱基或两者的单链或双链寡聚或多聚体。核苷酸单体由核碱基、五碳糖（例如但不限于核糖或2'-脱氧核糖）和1至3个磷酸基团构成。通常，核酸是通过单个核苷酸单体之间的磷酸二酯键形成的，在本发明的上下文中，术语核酸包括但不限于核糖核酸（RNA）和脱氧核糖核酸（DNA）分子，但也包括包含其他键的合成形式的核酸（例如，如Nielsen等人（*Science* 254:1497-1500, 1991）中所述的肽核酸）。通常，核酸是单链或双链分子，并且由天然存在的核苷酸构成。核酸单链的描述也定义了（至少部分地）互补链的序列。核酸可以是单链或双链的，或者可以包含双链和单链序列的部分。示例性的双链核酸分子可以具有3'或5'突出端，因此不需要或假定在其整个长度上完全是双链的。核酸可以通过生物、生化或化学合成方法或本领域熟知的任何方法获得，包括但不限于扩增和RNA的逆转录方法。术语核酸包括染色体或染色体片段、载体（例如表达载体）、表达盒、裸DNA或RNA聚合物、引物、探针、cDNA、基因组DNA、重组DNA、cRNA、mRNA、tRNA、microRNA（miRNA）或小分子干扰RNA（siRNA）。核酸可以是例如单链、双链、或三链，并且不限于任何特定的长度。除非另外指出，除了任何明确指出的序列之外，特定的核酸序列包含或编码互补序列。

[0097] 当核酸与另一个核酸序列置于功能性关系中时，该核酸是“可操作连接的”。例如，如果启动子或增强子影响编码序列的转录，则所述启动子或增强子可操作地连接至所述编码序列，或如果核糖体结合位点被定位以便于翻译，则所述核糖体结合位点可操作地连接至编码序列。

[0098] 术语“互补性”是指两个结构之间遵循锁钥原则的关系。在自然界中，互补性是DNA复制和转录的基本原理，因为它是两个DNA或RNA序列之间共有的属性，因此当它们彼此反平行对准时，序列中每个位置的核苷酸碱基将是互补的。

[0099] 对于术语“序列比较”，是指其中一个序列充当参考序列，与测试序列进行比较的过程。当使用序列比较算法时，将测试序列和参考序列输入计算机程序，必要时指定子序列坐标，并指定序列算法程序参数。通常使用默认程序参数，或者可以指定替代参数。然后基于程序参数，序列比较算法计算相对于参考序列的测试序列的序列同一性或相似性百分比。在序列比对中，术语“比较窗口”是指序列的连续位置的延伸，其与具有相同位置数的序列的连续位置的参考延伸相比较。选择的连续位置数可以在10至1000的范围内，即可以包括20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950或1000个连续位置。通常，连续位置数的范围为约20至800个连续位置、约20至600个连续位置、约50至400个连续位置、约50至约200个连续位置、约100至约150个连续位置。用来比较的序列比对方法是本领域众所周知的。用于比较的最佳序列比对可以例如通过Smith和Waterman的局部算法(Adv. Appl. Math. 2:482, 1970)，通过Needleman和Wunsch的同源性比对算法(J. Mol. Biol. 48:443, 1970)，通过Pearson和Lipman的搜索相似性法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988)，通过这些算法的计算机化执行(例如，威斯康星遗传学软件包中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.)，或者通过手工比对及目检(参见例如Ausubel等人, Current Protocols in Molecular Biology (1995增补))来进行。适用于确定序列同一性和序列相似性百分比的算法是BLAST和BLAST 2.0算法，其分别描述于Altschul等人(Nuc. Acids Res. 25:3389-402, 1977)和Altschul等人(J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990)中。用于执行BLAST分析的软件可通过国立生物技术信息中心(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)公开地获得。该算法涉及：首先通过在查询序列中识别长度W的短字段来识别高分序列对(HSP)，其在与数据库序列的相同长度字段比对时匹配或满足一定阳性阈值评分T。T称为邻近字段评分阈值(Altschul等人, 同上)。这些最初的邻近字段命中作为用于引发搜索的种子以发现包含它们的更长HSP。字段命中沿着各序列双向延伸，只要累计的比对分数可增加。对于核苷酸序列，使用参数M(用于匹配残基对的奖分；始终>0)和N(用于错配残基的罚分；始终<0)来计算累计分数。对于氨基酸序列，使用评分矩阵以计算累计分数。当累计比对分数从其最大实现值降低数量X；由于一个或多个负分残基比对的累积，累计分数达到或低于零时；或者到达任一序列的末端时，字段命中在各方向上的延伸停止。BLAST算法参数W、T和X确定比对的灵敏度和速度。BLASTN程序(用于核苷酸序列)使用默认字长(W) 11，期望值(E) 10，M=5，N=-4，并比较两条链。对于氨基酸序列，BLASTP程序使用默认字长3，期望值(E) 10，和BLOSUM62评分矩阵(参见Henikoff和Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915, 1989)比对(B) 50，期望值(E) 10，M=5，N=-4，以及两条链的比较。BLAST算法也执行两条序列之间相似性的统计分析(参见例如Karlin和Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-87, 1993)。由BLAST算法提供的一种相似性度量是最小总和概率(P(N))，其提供两条核苷酸或氨基酸序列之间匹配偶然发生的概率的指示。例如，如果在测试核酸与参考试核酸的比较中最小总和概率低于约0.2，通常低于约0.01，以及更通常低于约0.001，则核酸被认为与参考序列相似。

[0100] 术语“至少90%的序列同一性”在本文中关于氨基酸或核苷酸序列比较使用。在两个或更多个核酸或多肽氨基酸序列的情况下，术语“相同”是指两个或更多个序列或亚序列相同，即包含相同的核苷酸或氨基酸序列。术语“至少90%的序列同一性”特别是指与相应

的氨基酸或核苷酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性。

[0101] 术语“至少90%的序列同源性”在本文中关于氨基酸或核苷酸序列比较使用。除了相同的残基(序列同一性)之外,具有相似物理化学性质的保守残基(例如亮氨酸和异亮氨酸)的百分比(相似性百分比)通常用来“量化同源性”。术语“至少90%的序列同源性”特别是指与相应的氨基酸或核苷酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同源性。任选地,所讨论的氨基酸序列和参考氨基酸序列在20、30、40、45、50、60、70、80、90、100或更多个氨基酸的连续延伸上或在参考氨基酸序列的整个长度上表现出指定的序列同一性或序列同源性。任选地,所讨论的核酸序列和参考核酸序列在60、90、120、135、150、180、210、240、270、300、400、500、600、700、800、900、1000或更多个核苷酸的连续延伸上或在参考核酸序列的整个长度上表现出指定的序列同一性或序列同源性。

[0102] 术语“重组DNA分子”是指通过DNA序列的两个本来分开的片段的组合制备的分子,其通过基因工程技术或化学合成对分离的多核苷酸片段进行人工操作而实现。在这样做时,可以将具有所需功能的多核苷酸片段连接在一起以产生所需的功能组合。用于在原核或低级或高级真核宿主细胞中表达蛋白质的重组DNA技术是本领域众所周知的。它们已被描述,例如Sambrook等人,(1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual)。

[0103] 术语“载体”和“质粒”在本文中可互换使用,是指能够被引入或能够将其中包含的蛋白质和/或核酸引入细胞的蛋白质或多核苷酸或其混合物。质粒的实例包括但不限于质粒、粘粒、噬菌体、病毒或人工染色体。

[0104] 术语“氨基酸”通常是指包含取代的或未被取代的氨基、取代的或未被取代的羧基、和一种或多种侧链或基团、或这些基团的任一个的类似物的任何单体单元。示例性的侧链包括例如巯基、硒基、磺酰基、烷基、芳基、酰基、酮基、叠氨基、羟基、胍、氰基、卤代、酰肼、烯基、炔基、醚、硼酸酯、硼酸盐、二氧磷基、膦酰基、膦、杂环、烯酮、亚胺、醛、酯、硫代酸、羟胺或这些基团的任意组合。其他代表性的氨基酸包括但不限于,包含光活化交联剂的氨基酸、金属结合氨基酸、自旋标记的氨基酸、荧光氨基酸、包含金属的氨基酸、具有新官能团的氨基酸、与其他分子共价或非共价相互作用的氨基酸、光敏笼形(photocaged)和/或可光异构化的氨基酸、放射性氨基酸、包含生物素或生物素类似物的氨基酸、糖基化氨基酸、其他碳水化合物修饰的氨基酸、包含聚乙二醇或聚醚的氨基酸、重原子取代的氨基酸、可化学裂解的和/或可光裂解的氨基酸、包含碳连接糖的氨基酸、氧化还原活性氨基酸、包含氨基硫代酸的氨基酸和包含一个或多个毒性部分的氨基酸。如本文所用,术语“氨基酸”包括以下二十种天然或遗传编码的 α -氨基酸:丙氨酸(Ala或A)、精氨酸(Arg或R)、天冬酰胺(Asn或N)、天冬氨酸(Asp或D)、半胱氨酸(Cys或C)、谷氨酰胺(Gln或Q)、谷氨酸(Glu或E)、甘氨酸(Gly或G)、组氨酸(His或H)、异亮氨酸(Ile或I)、亮氨酸(Leu或L)、赖氨酸(Lys或K)、甲硫氨酸(Met或M)、苯丙氨酸(Phe或F)、脯氨酸(Pro或P)、丝氨酸(Ser或S)、苏氨酸(Thr或T)、色氨酸(Trp或W)、酪氨酸(Tyr或Y)和缬氨酸(Val或V)。

[0105] 术语“测量(measurement)”、“测量(measuring)”、“检测(detecting)”或“检测(detection)”优选地包括定性、半定量或定量的测量。术语“检测存在”是指定性测量,指示存在或不存在,而不对量进行任何声明(例如,是或否声明)。术语“检测量”是指定量测量,

其中检测到绝对数目 (ng)。术语“检测浓度”是指定量测量,其中根据给定体积确定量(例如 ng/ml)。

[0106] 如本文所用,术语“免疫球蛋白 (Ig)”是指赋予免疫球蛋白超家族的糖蛋白的免疫力。“表面免疫球蛋白”通过其跨膜区附着至效应细胞的膜,并且涵盖的分子诸如但不限于B细胞受体、T细胞受体、I类和II类主要组织相容性复合物 (MHC) 蛋白、 β -2微球蛋白 (约2M)、CD3、CD4和CD5。

[0107] 通常,如本文所用,术语“抗体”是指分泌型免疫球蛋白,其缺乏跨膜区,并且因此可释放到血流和体腔中。人类抗体基于它们所拥有的重链被分为不同的同种型。有五种类型的人类Ig重链,由希腊字母表示: α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 。存在的重链类型定义了抗体的类别,即这些链分别存在于IgA、IgD、IgE、IgG和IgM抗体中,各自发挥不同的作用,并且引导针对不同类型的抗原做出适当的免疫应答。不同的重链在大小和组成上有所不同;并且可包括大约450个氨基酸 (Janeway等人 (2001) *Immunobiology*, Garland Science)。IgA存在于粘膜区域 (诸如消化道、呼吸道和泌尿生殖道) 中以及唾液、泪液和母乳中,并且防止病原体定植 (Underdown&Schiff (1986) *Annu. Rev. Immunol.* 4:389-417)。IgD主要用作未暴露于抗原的B细胞上的抗原受体,并且参与激活嗜碱性粒细胞和肥大细胞以产生抗菌因子 (Geisberger等人 (2006) *Immunology* 118:429-437; Chen等人 (2009) *Nat. Immunol.* 10:889-898)。IgE经由其与过敏原的结合触发从肥大细胞和嗜碱性粒细胞释放组胺而参与过敏反应。IgE还参与防止寄生虫 (Pier等人 (2004) *Immunology, Infection, and Immunity*, ASM Press)。IgG提供针对入侵病原体的基于抗体的免疫的大部分,并且是唯一能够穿过胎盘为胎儿提供被动免疫的抗体同种型 (Pier等人 (2004) *Immunology, Infection, and Immunity*, ASM Press)。在人类中有四种不同的IgG亚类 (IgG1、2、3和4),按照它们在血清中的丰度的顺序命名,其中IgG1的丰度最高 (约66%),随后是IgG2 (约23%)、IgG3 (约7%) 和IgG (约4%)。不同IgG类别的生物学特性由相应较链区的结构决定。IgM以单体形式和分泌型五聚体形式在B细胞的表面上表达,具有非常高的亲和力。在产生足够的IgG之前, IgM在B细胞介导的 (体液) 免疫的早期阶段参与消除病原体 (Geisberger等人 (2006) *Immunology* 118:429-437)。抗体不仅以单体形式存在,而且已知形成两个Ig单元的二聚体 (例如IgA)、四个Ig单元的四聚体 (例如真骨鱼的IgM) 或五个Ig单元的五聚体 (例如哺乳动物的IgM)。抗体通常由四条多肽链组成,包括两条相同的重链和两条相同的轻链,它们经由二硫键连接并且类似于“Y”形大分子。每条链包括许多免疫球蛋白结构域,其中一些是恒定结构域,而另一些是可变结构域。免疫球蛋白结构域由7到9条反向平行的 β -链排列成两个 β -片层的2层夹心结构组成。通常,抗体的重链包括四个Ig结构域,其中三个是恒定结构域 (CH结构域:CH1、CH2、CH3),并且另一个是可变结构域 (VH)。轻链通常包括一个恒定Ig结构域 (CL) 和一个可变Ig结构域 (VL)。例如,人IgG重链由从N端到C端按VwCH1-CH2-CH3顺序联接的四个Ig结构域组成 (也称为VwCy1-Cy2-Cy3), 而人IgG轻链由从N端到C端按VL-CL顺序联接的两个免疫球蛋白结构域组成,其是 κ 型或 λ 型 (VK-CK或VA.-CA.)。例如,人IgG的恒定链包括447个氨基酸。在整个本说明书和权利要求书中,免疫球蛋白中氨基酸位置的编号是“EU索引”的编号,参见Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H.M., Gottesman, K.S., and Foeller, C., (1991) *Sequences of proteins of immunological interest*, 第5版. U.S. Department of Health and Human Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD。“参见Kabat的EU索引”是指人

IgG 1EU抗体的残基编号。因此,IgG上下文中的CH结构域如下:“CH1”是指根据参见Kabat的EU索引的氨基酸位置118-220;“CH2”指根据参见Kabat的EU索引的氨基酸位置237-340;并且“CH3”是指根据参见Kabat的EU索引的氨基酸位置341-447。

[0108] 术语“结合亲和力”通常是指分子(例如,抗体)的单个结合位点与其结合配偶体(例如,抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另有说明,否则如本文所用,“结合亲和力”是指内在结合亲和力,其反映了结合对的成员(例如抗体和抗原)之间的1:1交互作用。分子X对其配偶体Y的亲和力一般可由解离常数(Kd)表示。亲和力可通过本领域已知的常用方法来测量,包括但不限于:基于表面等离子共振的测定法(诸如PCT申请公开号W02005/012359中描述的BIAcore测定法);酶联免疫吸附测定法(ELISA);和竞争测定法(例如RIA)。低亲和力抗体通常缓慢结合抗原并且倾向于容易解离,而高亲和力抗体通常快速结合抗原并且倾向于保持更长的结合时间。测量结合亲和力的各种方法是本领域中已知的,其中任何一种方法均可用于本发明的目的。

[0109] 术语“抗原(Ag)”是与抗原特异性抗体(Ab)或B细胞抗原受体(BCR)结合的分子或分子结构。体内抗原的存在通常会引发免疫应答。在体内,免疫系统的细胞与抗原接触后,会特异性地产生每种抗体以匹配抗原;这允许精确识别或匹配抗原并启动定制反应。在大多数情况下,抗体只能与一种特定抗原反应并结合;然而,在一些情况下,抗体可能会与超过一种抗原发生交叉反应并结合。抗原通常是蛋白质、肽(氨基酸链)和多糖(单糖(monosaccharide)/单糖(simple sugar)链)或其组合。

[0110] 在诊断测试中,抗原通常用于血清学测试,以评估患者是否曾暴露于某种病原体(例如病毒或细菌)并产生了针对该病原体的抗体。通常,这些抗原是重组产生的,并且可以是旨在代表天然抗原的线性肽或更复杂的折叠分子。

[0111] 为了更接近天然抗原并获得高表位密度,可以通过化学交联的方式聚合单体抗原来产生抗原。有大量的同双官能和异双官能交联剂可以非常有利地使用并且在本领域中是众所周知的。然而,在化学诱导的抗原聚合中用作血清学测定中的指定物存在一些严重的缺陷。例如,将交联剂部分插入抗原可能会通过干扰天然样构象或掩盖关键表位而损害抗原性。此外,非天然三级接触的引入可能会干扰蛋白质折叠/解折叠的可逆性,此外,它可能是干扰问题的根源,这些问题必须通过免疫测定混合物中的抗干扰策略来克服。

[0112] 一种更新的技术是将感兴趣的抗原与寡聚伴侣蛋白融合,从而将高表位密度传递给抗原。该技术的优势在于其高重现性和寡聚伴侣蛋白融合配偶体的三重功能:首先,伴侣蛋白提高了融合多肽在宿主细胞(例如大肠杆菌中)的表达率,其次,伴侣蛋白促进靶抗原的重折叠过程并提高其整体溶解度,以及第三,它可重复地将靶抗原组装成有序的寡聚结构。

[0113] 术语“伴侣蛋白”在本领域中是众所周知的并且是指蛋白质折叠辅助剂,其有助于折叠和维持其他蛋白质的结构完整性。折叠辅助剂的实例在W0 03/000877中有详细描述。举例来说,肽基脯氨酰异构酶类的伴侣蛋白如FKBP家族的伴侣蛋白可用于与抗原变体融合。适合作为融合配偶体的FKBP伴侣蛋白的实例是FkpA(aa 26-270,UniProt ID P45523)、SlyD(1-165,UniProt ID P0A9K9)和SlpA(2-149,UniProt ID P0AEM0)。适合作为融合配偶体的另一伴侣蛋白是Skp(21-161,UniProt ID P0AEU7),一种来自大肠杆菌周质的三聚体伴侣蛋白,不属于FKBP家族。并不总是需要使用伴侣蛋白的完整序列。还可以使用仍具有所

需能力和功能的伴侣蛋白的功能片段(所谓的结合能力模块)(参见WO 98/13496)。

[0114] 抗原可以进一步包含“效应基团”,例如,一个“标签”或“标记”。术语“标签”是指为抗原提供结合其他分子或被其他分子结合的能力的那些效应基团。标签的实例包括但不限于例如His标签,该标签附着在抗原序列上以允许其纯化。标签还可以包括生物亲和结合对的配偶体,其允许抗原被结合对的第二配偶体结合。术语“生物亲和结合对”是指具有彼此结合的强亲和力的两个配偶体分子(即一对中的两个配偶体)。生物亲和结合对的配偶体的实例是a)生物素或生物素类似物/抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白;b)半抗原/抗半抗原抗体或抗体片段(例如地高辛/抗地高辛抗体);c)糖类/凝集素;d)互补寡核苷酸序列(例如互补LNA序列),以及通常e)配体/受体。

[0115] 术语“标记”是指允许检测抗原的那些效应基团。标记包括但不限于光谱、光化学、生物化学、免疫化学或化学标签。示例性的合适标记包括荧光染料、发光或电化学发光络合物(例如钆或铽络合物)、电子致密试剂和酶标记。

[0116] 如本文所用,“颗粒”是指小的、局部的物体,可将诸如体积、质量或平均尺寸之类的物理特性归因于所述小的、局部的物体。颗粒因此可以是对称的、球状的、基本上球状的或球形的,或者是不规则的、不对称的形状或形式。颗粒的尺寸可能会有所不同。术语“微粒”是指直径在纳米和微米范围内的颗粒。

[0117] 如上文所定义的微粒可包含本领域技术人员已知的任何合适的材料或由其组成,例如它们可以包含无机或有机材料或由基本上由其组成。通常,它们可包含金属或金属合金、或有机材料或由基本上由其组成,或包含碳水化合物元素或由基本上由其组成。设想的用于微粒的材料实例包括琼脂糖、聚苯乙烯、胶乳、聚乙烯醇、二氧化硅和铁磁金属、合金或复合材料。在一个实施例中,微粒是磁性或铁磁性金属、合金或组合物。在另一实施例中,材料可以具有特定的特性,例如是疏水的或亲水的。这种微粒通常分散在水溶液中并保留小的负表面电荷,从而使微粒保持分离并避免非特异性聚集。

[0118] 在本发明的一个实施例中,微粒是顺磁性微粒,并且在根据本公开的测量方法中这种微粒的分离是通过磁力促进的。施加磁力以将顺磁性或磁性颗粒从溶液/悬浮液中拉出并根据需要保留它们,同时可以去除溶液/悬浮液的液体并且颗粒可以例如被洗涤。

[0119] “试剂盒”是包含至少一种本发明试剂的任何制品(例如,包装或容器),该试剂例如是用于治疗病症的药品,或用于特异性地检测生物标志物基因或蛋白质的探针。试剂盒优选作为用于执行本发明方法的单元来推销、分发或贩售。通常,试剂盒可进一步包括分开的承载装置以紧密地容纳一个或多个容器装置诸如小瓶、管等,特别地,每个容器装置均包含在第一方面的方法中使用的独立元件之一。试剂盒可进一步包含一个或多个包含其他材料的其他容器,该其他材料包括但不限于缓冲剂、稀释剂、过滤器、针头、注射器和带有使用说明书的包装插页。标签可存在于容器上以指示将组合物用于具体应用,并且也可指示体内或体外使用的指南。计算机程序代码可提供于数据存储介质或装置诸如光学存储介质(例如,光盘)上或直接提供于计算机或数据处理装置上。此外,试剂盒可包含如本文别处所述的用于校准目的生物标志物的标准量。

[0120] “包装插页”用于指治疗产品或药品的商业包装中通常包括的说明书,其含有关于涉及此类治疗产品或药品的使用的适应症、用法、剂量、施用、禁忌症、待与所包装产品联用的其他治疗产品和/或警告的信息。

[0121] 实施例

[0122] 目前可用的用于检测患者样品中抗SARS CoV-2病毒抗体的ELISA形式的免疫测定法使用刺突蛋白衍生的抗原作为免疫反应试剂。然而,我们发现这些测定法缺乏特异性,导致相当多的假阳性结果。令人惊讶的是,通过将抗原限制于如下文进一步解释的冠状核衣壳,错误反应样品的数量可以显著减少,同时保持测定法的高灵敏度。

[0123] 此外,目前所有正在进行的疫苗接种策略都集中在基于刺突蛋白的疫苗的开发上。使用刺突蛋白衍生的抗原检测已进行疫苗接种的患者样品中的抗SARS CoV-2病毒抗体,可以确定疫苗接种是否成功以及患者是否产生了抗刺突蛋白抗体。然而,由于尚不清楚疫苗接种和自然SARS CoV-2感染的长期影响将如何相互作用并影响患者,因此重要的是能够区分患者是否暴露于自然SARS CoV-2感染或过去接受过疫苗接种。因此,迫切需要一种抗SARS CoV-2抗体测定法,该测定法不仅可以检测抗刺突蛋白抗体,还可以确定针对其他病毒蛋白的抗SARS CoV-2抗体。

[0124] 因此,在第一方面,本发明因此涉及适用于检测分离的生物学样品中的抗冠状病毒抗体的冠状抗原,该冠状抗原包含根据SEQ ID NO:1的冠状核衣壳特异性氨基酸序列或其变体。在实施例中,冠状抗原检测分离的生物学样品中的抗冠状病毒抗体,该冠状抗原包含根据SEQ ID NO:1的冠状核衣壳特异性氨基酸序列或其变体。

[0125] 在实施例中,抗原不包含其他冠状病毒特异性氨基酸序列。

[0126] 在实施例中,冠状抗原是免疫反应性的,即生物学样品中存在的抗体与所述抗原结合。因此,不包括任何不被抗体结合的衍生自冠状核衣壳的肽。

[0127] 如图1和图2所示,SARS CoV-2的氨基酸序列与其最接近的亲属SARS-CoV表现出约93%的序列同源性和约90%的序列同一性。如图所示,与其他冠状病毒的序列同一性和同源性仍然低得多。因此,已经由于有限的序列同一性和同源性,包含根据SEQ ID NO:1的冠状核衣壳特异性氨基酸序列的冠状抗原对SARS-CoV和SARS CoV-2检测具有特异性。

[0128] 在实施例中,冠状病毒为SARS-CoV或SARS CoV-2病毒,特别是SARS CoV-2病毒。在特定实施例中,冠状核衣壳是SARS CoV-2特异性核衣壳。特别地,包含根据SEQ ID NO:1的冠状核衣壳特异性氨基酸序列的冠状抗原对SARS CoV-2检测具有特异性。

[0129] 在实施例中,对于针对其他冠状病毒的相应核衣壳抗原产生的抗体或抗体子集,冠状抗原不发生免疫交叉反应,即仅显示强烈降低或完全消除的免疫反应性。特别地,冠状抗原不与选自MERS-CoV、HCoV-NL63、HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-HKU1组成的组的冠状病毒株的相应核衣壳抗原发生免疫交叉反应。特别地,冠状抗原不与选自SARS-CoV、MERS-CoV、HCoV-NL63、HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-HKU1组成的组的冠状病毒株的相应核衣壳抗原发生免疫交叉反应。

[0130] 在实施例中,冠状抗原是可溶的。因此,冠状抗原适用于旨在检测分离的生物学样品中针对所述抗原的抗体的体外测定。

[0131] 因此,冠状抗原适用于旨在以高灵敏度和特异性检测抗冠状病毒抗体的体外测定。在实施例中,灵敏度为>95%、>96%、>97%、>98%、>99%、>99.5%。在特定实施例中,灵敏度为>99%或>99.5%。在特定实施例中,灵敏度为100%。在实施例中,特异性为>95%、>96%、>97%、>98%、>99%、>99.5%。在特定实施例中,特异性为>99%或>99.5%。在特定实施例中,特异性为99.8%。在特定实施例中,灵敏度为100%并且特异性为

99.8%。

[0132] 在实施例中, 冠状抗原适用于检测或测试流体样品中抗冠状病毒的抗体。在特定实施例中, 样品是人样品, 特别是人体液样品。在特定实施例中, 样品是人血液或尿液样品。在特定实施例中, 样品是人全血、血浆或血清样品。

[0133] 在实施例中, 冠状抗原是线性抗原或其天然状态。在特定实施例中, 包含在冠状抗原中的冠状核衣壳特异性氨基酸序列以其天然状态折叠。

[0134] 在实施例中, 包括SEQ ID NO:1的冠状核衣壳特异性氨基酸序列的变体。这些变体容易由本领域技术人员通过公开的氨基酸序列的保守或同源置换(例如, 丙氨酸或丝氨酸置换半胱氨酸)来产生。在实施例中, 变体显示出对其氨基酸序列的修饰, 特别是与SEQ ID NO:1的氨基酸序列相比选自由氨基酸交换、缺失或插入组成的组。

[0135] 在实施例中, 氨基酸C末端或N末端缺失或在一端或两端插入1至10个氨基酸, 在一个实施例中1至5个氨基酸。特别地, 变体可以是显示最普遍的蛋白质同种型的同种型。在一个实施例中, 这种基本相似的蛋白质与SEQ ID NO:1具有至少95%、特别是至少96%、特别是至少97%、特别是至少98%、特别是至少99%的序列同源性。

[0136] 在实施例中, 冠状核衣壳变体包含根据SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

[0137] 在实施例中, 变体包含翻译后修饰, 特别是选自由糖基化或磷酸化组成的组。

[0138] 应理解, 此类变体分类为冠状核衣壳变体, 即能够结合和检测分离的样品中存在的抗冠状抗体。

[0139] 在实施例中, 冠状核衣壳的整体三维结构保持不变, 因此以前(即在野生型中)可用于结合抗体的表位在变体中仍然是可接近的。

[0140] 在实施例中, 冠状抗原还包含至少一种伴侣蛋白。因此, 冠状抗原包含如上文或下文所述的SEQ ID NO:1的冠状核衣壳特异性氨基酸序列, 以及伴侣蛋白的氨基酸序列。

[0141] 在特定实施例中, 冠状抗原包含2种伴侣蛋白。在实施例中, 所述伴侣蛋白选自由SlyD、SlpA、FkpA和Skp组成的组。在特定实施例中, 伴侣蛋白是SlyD, 特别是具有在登录号UniProt ID P0A9K9中给出的氨基酸序列。

[0142] 在特定实施例中, 冠状抗原包含根据SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:14的冠状核衣壳特异性氨基酸序列, 以及一种SlyD伴侣蛋白。在特定实施例中, 冠状抗原包含根据SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:14的冠状核衣壳特异性氨基酸序列, 以及两种SlyD伴侣蛋白。

[0143] 两种伴侣蛋白的融合导致所得抗原的更高溶解度。

[0144] 在实施例中, 伴侣蛋白在核衣壳的N-和/或C-末端, 特别是在核衣壳的N-末端融合至冠状核衣壳特异性氨基酸序列。因此, 在特定实施例中, 冠状抗原包含冠状核衣壳特异性氨基酸序列N-末端的一种SlyD伴侣蛋白。在特定实施例中, 冠状抗原包含冠状核衣壳特异性氨基酸序列N-末端的两种SlyD伴侣蛋白。在实施例中, 冠状抗原包含冠状核衣壳特异性氨基酸序列N-末端的一种SlyD伴侣蛋白和冠状核衣壳特异性氨基酸序列C-末端的一种SlyD伴侣蛋白。

[0145] 在实施例中, 冠状抗原进一步包含接头序列。这些序列对抗冠状病毒抗体没有特异性, 并且在体外诊断免疫测定中不被识别。特别地, 冠状抗原包含冠状核衣壳的序列与一

种或多种伴侣蛋白之间的接头序列。在一些实施例中,接头是富含Gly的接头。在一些实施例中,接头具有如SEQ ID NO:7所示的序列。

[0146] 在一个实施例中,冠状病毒包含根据SEQ ID NO:2的氨基酸序列。在实施例中,冠状病毒不包含任何其他氨基酸序列。在特定实施例中,冠状病毒由根据SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成。

[0147] 在一个实施例中,冠状病毒包含根据SEQ ID NO:3的氨基酸序列。在实施例中,冠状病毒不包含任何其他氨基酸序列。在特定实施例中,冠状病毒由SEQ ID NO:3组成。

[0148] 在实施例中,冠状病毒包含根据SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:15的氨基酸序列。在实施例中,冠状病毒不包含任何其他氨基酸序列。在特定实施例中,冠状病毒由SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:15组成

[0149] 应理解,由SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:15组成的冠状病毒不包含任何额外的氨基酸序列,但仍可能包含其他化学分子,例如标记和/或标签。

[0150] 在特定实施例中,与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的序列同源性的至少96%、至少97%、至少98%或至少99%。在特定实施例中,与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的序列同源性为至少98%。

[0151] 在特定实施例中,与SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15的序列同源性为至少96%、至少97%、至少98%或至少99%。在特定实施例中,与SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14,或SEQ ID NO:15为至少98%。

[0152] 在实施例中,冠状病毒进一步包含标签或标记。因此,冠状病毒包含如上文或下文所述的SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:14的冠状病毒核衣壳特异性氨基酸序列,和标签和/或标记,以及任选的一种或多种伴侣蛋白的氨基酸序列。

[0153] 在特定实施例中,标签允许将冠状病毒直接或间接结合至固相。在特定实施例中,标签是生物亲和结合对的配偶体。在特定实施例中,标签选自由以下项组成的组:生物素、地高辛、半抗原或互补寡核苷酸序列(特别是互补LNA序列)。在特定实施例中,标签为生物素。

[0154] 在特定实施例中,标记允许检测冠状病毒。在特定实施例中,冠状病毒特异性核衣壳序列被标记。在其中至少一种伴侣蛋白存在于抗原中的实施例中,冠状病毒特异性核衣壳序列被标记或至少一种伴侣蛋白被标记,或两者都被标记。在特定实施例中,标记是电化学发光钉或铈络合物。在特定实施例中,电化学发光钉络合物是带负电的电化学发光钉络合物。在特定实施例中,标记是带负电荷的电化学发光钉络合物,其以1:1至15:1的化学计量存在于抗原中。在特定实施例中,化学计量为2:1、2.5:1、3:1、5:1、10:1或15:1。

[0155] 在第二方面,本发明涉及一种组合物,该组合物包含适用于检测分离的生物学样品中的抗冠状病毒的抗体的冠状病毒,其包含根据SEQ ID NO:1的冠状病毒核衣壳特异性氨基酸序列或其变体。在实施例中,冠状病毒检测分离的生物学样品中的抗冠状病毒抗体,该冠状病毒抗原包含根据SEQ ID NO:1的冠状病毒核衣壳特异性氨基酸序列或其变体。

[0156] 在实施例中, 冠状抗原不包含其他冠状病毒特异性氨基酸序列。

[0157] 在实施例中, 冠状抗原是免疫反应性的, 即生物学样品中存在的抗体与所述抗原结合。因此, 不包括任何不被抗体结合的衍生自冠状核衣壳的肽。

[0158] 如图1和图2所示, SARS CoV-2的氨基酸序列与其最接近的亲属SARS-CoV表现出约93%的序列同源性和约90%的序列同一性。如图所示, 与其他冠状病毒的序列同一性和同源性仍然低得多。因此, 已经由于有限的序列同一性和同源性, 包含根据SEQ ID NO:1的冠状核衣壳特异性氨基酸序列的冠状抗原对SARS-CoV和SARS CoV-2检测具有特异性。

[0159] 在实施例中, 冠状病毒为SARS-CoV或SARS CoV-2病毒, 特别是SARS CoV-2病毒。在特定实施例中, 冠状核衣壳是SARS CoV-2特异性核衣壳。特别地, 包含根据SEQ ID NO:1的冠状核衣壳特异性氨基酸序列的冠状抗原对SARS CoV-2检测具有特异性。

[0160] 在实施例中, 对于针对其他冠状病毒的相应核衣壳抗原产生的抗体或抗体子集, 冠状抗原不发生免疫交叉反应, 即仅显示强烈降低或完全消除的免疫反应性。特别地, 冠状抗原不与选自MERS-CoV、HCoV-NL63、HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-HKU1组成的组的冠状病毒株的相应核衣壳抗原发生免疫交叉反应。特别地, 冠状抗原不与选自SARS-CoV、MERS-CoV、HCoV-NL63、HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-HKU1组成的组的冠状病毒株的相应核衣壳抗原发生免疫交叉反应。

[0161] 在实施例中, 冠状抗原是可溶的。因此, 冠状抗原适用于旨在检测分离的生物学样品中针对所述抗原的抗体的体外测定。

[0162] 因此, 冠状抗原适用于旨在以高灵敏度和特异性检测抗冠状抗体的体外测定。在实施例中, 灵敏度为>95%、>96%、>97%、>98%、>99%、>99.5%。在特定实施例中, 灵敏度为>99%或>99.5%。在特定实施例中, 灵敏度为100%。在实施例中, 特异性为>95%、>96%、>97%、>98%、>99%、>99.5%。在特定实施例中, 特异性为>99%或>99.5%。在特定实施例中, 特异性为99.8%。在特定实施例中, 灵敏度为100%并且特异性为99.8%。

[0163] 在实施例中, 冠状抗原适用于检测或测试流体样品中抗冠状病毒的抗体。在特定实施例中, 样品是人样品, 特别是人体液样品。在特定实施例中, 样品是人血液或尿液样品。在特定实施例中, 样品是人全血、血浆或血清样品。

[0164] 在实施例中, 冠状抗原是线性抗原或其天然状态。在特定实施例中, 包含在冠状抗原中的冠状核衣壳特异性氨基酸序列以其天然状态折叠。

[0165] 在实施例中, 包括SEQ ID NO:1的冠状核衣壳特异性氨基酸序列的变体。这些变体可以由本领域技术人员通过公开的氨基酸序列的保守或同源置换(例如, 丙氨酸或丝氨酸置换半胱氨酸)容易地产生。在实施例中, 变体显示出对其氨基酸序列的修饰, 特别是与SEQ ID NO:1的氨基酸序列相比选自氨基酸交换、缺失或插入组成的组。

[0166] 在实施例中, 氨基酸C末端或N末端缺失或在一端或两端插入1至10个氨基酸, 在一个实施例中1至5个氨基酸。特别地, 变体可以是显示最普遍的蛋白质同种型的同种型。在一个实施例中, 这种基本相似的蛋白质与SEQ ID NO:1具有至少95%、特别是至少96%、特别是至少97%、特别是至少98%、特别是至少99%的序列同源性。

[0167] 在实施例中, 冠状核衣壳变体包含根据SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

- [0168] 在实施例中,变体包含翻译后修饰,特别是选自由糖基化或磷酸化组成的组。
- [0169] 应理解,此类变体分类为冠状核衣壳变体,即能够结合和检测分离样品中存在的抗冠状抗体。
- [0170] 在实施例中,冠状核衣壳的整体三维结构保持不变,因此以前(即在野生型中)可用于结合抗体的表位在变体中仍然是可接近的。
- [0171] 在实施例中,冠状抗原还包含至少一种伴侣蛋白。因此,冠状抗原包含如上文或下文所述的SEQ ID NO:1的冠状核衣壳特异性氨基酸序列,以及伴侣蛋白的氨基酸序列。
- [0172] 在特定实施例中,冠状抗原包含2种伴侣蛋白。在实施例中,所述伴侣蛋白选自由SlyD、SlpA、FkpA和Skp组成的组。在特定实施例中,伴侣蛋白是SlyD,特别是具有在登录号UniProt ID P0A9K9中给出的氨基酸序列。
- [0173] 在特定实施例中,冠状抗原包含根据SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:14的冠状核衣壳特异性氨基酸序列,以及一种SlyD伴侣蛋白。在特定实施例中,冠状抗原包含根据SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:14的冠状核衣壳特异性氨基酸序列,以及两种SlyD伴侣蛋白。
- [0174] 两种伴侣蛋白的融合导致所得抗原的更高溶解度。
- [0175] 在实施例中,伴侣蛋白在核衣壳的N-和/或C-末端,特别是在核衣壳的N-末端融合至冠状核衣壳特异性氨基酸序列。因此,在特定实施例中,冠状抗原包含冠状核衣壳特异性氨基酸序列N-末端的一种SlyD伴侣蛋白。在特定实施例中,冠状抗原包含冠状核衣壳特异性氨基酸序列N-末端的两种SlyD伴侣蛋白。在实施例中,冠状抗原包含冠状核衣壳特异性氨基酸序列N-末端的一种SlyD伴侣蛋白和冠状核衣壳特异性氨基酸序列C-末端的一种SlyD伴侣蛋白。
- [0176] 在实施例中,冠状抗原进一步包含接头序列。这些序列对抗冠状病毒抗体没有特异性,并且在体外诊断免疫测定中不被识别。特别地,冠状抗原包含冠状核衣壳的序列与一种或多种伴侣蛋白之间的接头序列。在一些实施例中,接头是富含Gly的接头。在一些实施例中,接头具有如SEQ ID NO:7所示的序列。
- [0177] 在一个实施例中,冠状抗原包含根据SEQ ID NO:2的氨基酸序列。在实施例中,冠状抗原不包含任何其他氨基酸序列。在特定实施例中,冠状抗原由根据SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成。
- [0178] 在一个实施例中,冠状抗原包含根据SEQ ID NO:3的氨基酸序列。在实施例中,冠状抗原不包含任何其他氨基酸序列。在特定实施例中,冠状抗原由SEQ ID NO:3组成。
- [0179] 在实施例中,冠状抗原包含根据SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:15的氨基酸序列。在实施例中,冠状抗原不包含任何其他氨基酸序列。在特定实施例中,冠状抗原由SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:15组成
- [0180] 应理解,由SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3组成的冠状抗原不包含任何额外的氨基酸序列,但仍可能包含其他化学分子,例如标记和/或标签。
- [0181] 在特定实施例中,与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的序列同源性为至少96%、至少97%、至少98%或至少99%。在特定实施例中,与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的序列同源性为至少98%。
- [0182] 在特定实施例中,与SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11。

SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15的序列同源性为至少96%、至少97%、至少98%或至少99%。在特定实施例中,与SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:14,或SEQ ID NO:15为至少98%。

[0183] 在实施例中,冠状抗原进一步包含标签或标记。在特定实施例中,冠状特异性核衣壳序列被标记。在其中至少一种伴侣蛋白存在于抗原中的实施例中,冠状特异性核衣壳序列被标记或至少一种伴侣蛋白被标记,或两者都被标记。

[0184] 因此,冠状抗原包含如上文或下文所述的SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:14的冠状核衣壳特异性氨基酸序列,和标签和/或标记,以及任选的一种或多种伴侣蛋白的氨基酸序列。

[0185] 在特定实施例中,标签允许将抗原直接或间接结合至固相。在特定实施例中,标签是生物亲和结合对的配偶体。在特定实施例中,标签选自由以下项组成的组:生物素、地高辛、半抗原或互补寡核苷酸序列(特别是互补LNA序列)。在特定实施例中,标签为生物素。

[0186] 在特定实施例中,标记允许检测抗原。在特定实施例中,标记是电化学发光钉或铀络合物。在特定实施例中,电化学发光钉络合物是带负电的电化学发光钉络合物。在特定实施例中,标记是带负电荷的电化学发光钉络合物,其以1:1至15:1的化学计量存在于抗原中。在特定实施例中,化学计量为2:1、2.5:1、3:1、5:1、10:1或15:1。

[0187] 在实施例中,组合物包含一种或多种另外的冠状抗原。在特定实施例中,组合物包含1、2或3种另外的抗原。在特定实施例中,组合物包含一种或多种另外的冠状抗原,该抗原包含E蛋白、M蛋白和/或S蛋白或其部分的氨基酸序列。在特定实施例中,组合物包含另外的冠状抗原,该抗原包含S蛋白或其部分(例如S蛋白的受体结合结构域)的氨基酸序列。

[0188] 在特定实施例中,另外的冠状抗原是免疫反应性的,即生物学样品中存在的抗体与所述抗原结合。因此,不包括任何不被抗冠状抗体结合的源自冠状的肽。

[0189] 在实施例中,对于针对其他冠状病毒的相应抗原产生的抗体或抗体子集,冠状病毒不发生免疫交叉反应,即仅显示强烈降低或完全消除的免疫反应性。特别是,另外的冠状病毒不与选自由MERS-CoV、HCoV-NL63、HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-HKU1组成的组的冠状病毒株的相应抗原发生免疫交叉反应。特别地,另外的冠状病毒不与选自由SARS-CoV、MERS-CoV、HCoV-NL63、HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-HKU1组成的组的冠状病毒株的相应抗原发生免疫交叉反应。

[0190] 在实施例中,另外的冠状病毒是可溶的。因此,该抗原适用于旨在检测分离的生物学样品中针对所述抗原的抗体的体外测定。

[0191] 在第三方面,本发明涉及一种生产对冠状病毒核衣壳具有特异性的冠状病毒抗原的方法,所述方法包括以下步骤:

[0192] a) 培养用表达载体转化的宿主细胞,该表达载体包含可操作地连接的编码如上文对于本发明的第一方面所述的冠状病毒抗原的重组DNA分子,

[0193] b) 表达所述多肽,以及

[0194] c) 纯化所述多肽。

[0195] 任选地,作为附加步骤d),需要进行功能性溶解,从而通过本领域已知的重折叠技术使冠状病毒核衣壳抗原进入可溶性和免疫反应性构象。

[0196] 在特定实施例中,宿主细胞是大肠杆菌细胞、CHO细胞或HEK细胞。在特定实施例中,宿主细胞是大肠杆菌细胞。

[0197] 在其中抗原包含冠状核衣壳和一种或多种伴侣蛋白的实施例中,根据本发明的重组DNA分子还可以包含编码在冠状抗原之间具有5至100个氨基酸残基的接头肽的序列。这样的接头序列可以例如具有蛋白水解切割位点。在一个实施例中,将非冠状特异性接头或肽融合氨基酸序列添加到冠状核衣壳是可能的,因为这些序列对抗冠状病毒抗体不是特异性的并且不会在体外诊断免疫测定中被识别。

[0198] 在特定实施例中,重组DNA分子包含根据SEQ ID NO:4的序列。

[0199] 在特定实施例中,重组DNA分子包含根据SEQ ID NO:5的序列。

[0200] 在特定实施例中,重组DNA分子包含根据SEQ ID NO:6的序列。

[0201] 在第四方面,本发明涉及用于检测分离的生物学样品中对冠状病毒具有特异性的抗体的方法,其中将根据本发明第一方面的冠状抗原、本发明第二方面的组合物或通过根据本发明第三方面的方法获得的冠状抗原用作所述抗冠状病毒抗体的捕获试剂和/或结合配偶体。

[0202] 在第五方面,本发明涉及用于检测分离的生物学样品中对冠状病毒具有特异性的抗体的方法,所述方法包括

[0203] a) 通过将分离的生物学样品与冠状抗原或包含冠状抗原的组合物混合来形成免疫反应混合物,

[0204] b) 将所述免疫反应混合物维持足以允许存在于分离的生物学样品中的针对所述冠状抗原的抗体与所述冠状抗原免疫反应以形成免疫反应产物的时间段;和

[0205] c) 检测任何所述免疫反应产物的存在、量和/或浓度。

[0206] 在一些实施例中,该方法是体外方法。在实施例中,该方法表现出高灵敏度和特异性。在实施例中,灵敏度为>95%、>96%、>97%、>98%、>99%、>99.5%。在特定实施例中,灵敏度为>99%或>99.5%。在特定实施例中,灵敏度为100%。在实施例中,特异性为>95%、>96%、>97%、>98%、>99%、>99.5%。在特定实施例中,特异性为>99%或>99.5%。在特定实施例中,特异性为99.8%。在特定实施例中,灵敏度为100%并且特异性为99.8%。

[0207] 在实施例中,通过本发明的方法检测的抗体是IgG、IgM或IgA亚类或同一免疫测定中所有三个亚类的抗冠状病毒抗体。

[0208] 在实施例中,检测到的抗体针对冠状病毒的核衣壳,特别是针对SARS-CoV或SARS CoV-2病毒的核衣壳的抗体。在特定实施例中,检测到的抗体针对SARS CoV-2病毒的核衣壳。

[0209] 在实施例中,其中检测到冠状特异性抗体的分离的生物学样品是人样品,特别是在人体液样品中。在特定实施例中,样品是人血液或尿液样品。在特定实施例中,样品是人全血、血浆或血清样品。在特定实施例中,样品是静脉或毛细血管人全血、血浆或血清样品。

[0210] 在实施例中,步骤a)中与分离的生物学样品混合的冠状抗原包含根据SEQ ID NO:1的冠状核衣壳特异性氨基酸序列或其变体。在实施例中,冠状抗原不包含其他冠状病毒特异性氨基酸序列。

[0211] 在实施例中,冠状抗原是免疫反应性的,即生物学样品中存在的抗体与所述抗原

结合。因此,不包括任何不被抗体结合的衍生自冠状病毒核衣壳的肽。

[0212] 如图1和图2所示,SARS CoV-2的氨基酸序列与其最接近的亲属SARS-CoV表现出约93%的序列同源性和约90%的序列同一性。如图所示,与其他冠状病毒的序列同一性和同源性仍然低得多。因此,已经由于有限的序列同一性和同源性,包含根据SEQ ID NO:1的冠状病毒核衣壳特异性氨基酸序列的冠状病毒抗原对SARS-CoV和SARS CoV-2检测具有特异性。

[0213] 在实施例中,冠状病毒为SARS-CoV或SARS CoV-2病毒,特别是SARS CoV-2病毒。在特定实施例中,冠状病毒核衣壳是SARS CoV-2特异性核衣壳。特别地,包含根据SEQ ID NO:1的冠状病毒核衣壳特异性氨基酸序列的冠状病毒抗原对SARS CoV-2检测具有特异性。

[0214] 在实施例中,对于针对其他冠状病毒的相应核衣壳抗原产生的抗体或抗体子集,冠状病毒抗原不发生免疫交叉反应,即仅显示强烈降低或完全消除的免疫反应性。特别地,冠状病毒抗原不与选自MERS-CoV、HCoV-NL63、HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-HKU1组成的组的冠状病毒株的相应核衣壳抗原发生免疫交叉反应。特别地,冠状病毒抗原不与选自SARS-CoV、MERS-CoV、HCoV-NL63、HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-HKU1组成的组的冠状病毒株的相应核衣壳抗原发生免疫交叉反应。

[0215] 在实施例中,冠状病毒抗原是可溶的。因此,冠状病毒抗原适用于旨在检测分离的生物学样品中针对所述抗原的抗体的体外测定。

[0216] 因此,冠状病毒抗原适用于旨在以高灵敏度和特异性检测抗冠状病毒抗体的体外测定。在实施例中,灵敏度为>95%、>96%、>97%、>98%、>99%、>99.5%。在特定实施例中,灵敏度为>99%或>99.5%。在特定实施例中,灵敏度为100%。在实施例中,特异性为>95%、>96%、>97%、>98%、>99%、>99.5%。在特定实施例中,特异性为>99%或>99.5%。在特定实施例中,特异性为99.8%。在特定实施例中,灵敏度为100%并且特异性为99.8%。

[0217] 在实施例中,冠状病毒抗原是可溶的。因此,该抗原适合用于本体外方法。

[0218] 在实施例中,冠状病毒抗原是线性抗原或其天然状态。在特定实施例中,抗原中包含的冠状病毒核衣壳特异性氨基酸序列以其天然状态折叠。

[0219] 在实施例中,包括SEQ ID NO:1的冠状病毒核衣壳特异性氨基酸序列的变体。这些变体可以由本领域技术人员通过公开的氨基酸序列的保守或同源置换(例如,丙氨酸或丝氨酸置换半胱氨酸)容易地产生。在实施例中,变体显示出对其氨基酸序列的修饰,特别是与SEQ ID NO:1的氨基酸序列相比选自氨基酸交换、缺失或插入组成的组。

[0220] 在实施例中,氨基酸C末端或N末端缺失或在一端或两端插入1至10个氨基酸,在一个实施例中1至5个氨基酸。特别地,变体可以是显示最普遍的蛋白质同种型的同种型。在一个实施例中,这种基本相似的蛋白质与SEQ ID NO:1具有至少95%、特别是至少96%、特别是至少97%、特别是至少98%、特别是至少99%的序列同源性。

[0221] 在实施例中,冠状病毒核衣壳变体包含根据SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

[0222] 在实施例中,变体包含翻译后修饰,特别是选自糖基化或磷酸化组成的组。

[0223] 应理解,此类变体分类为冠状病毒核衣壳变体,即能够结合和检测分离的样品中存在的抗冠状病毒抗体。

[0224] 在实施例中,冠状病毒核衣壳的整体三维结构保持不变,因此以前(即在野生型中)可

用于结合抗体的表位在变体中仍然是可接近的。

[0225] 在实施例中, 冠状抗原还包含至少一种伴侣蛋白。因此, 冠状抗原包含如上文或下文所述的SEQ ID NO:1的冠状核衣壳特异性氨基酸序列, 以及伴侣蛋白的氨基酸序列。

[0226] 在特定实施例中, 冠状抗原包含2种伴侣蛋白。在实施例中, 所述伴侣蛋白选自由SlyD、SlpA、FkpA和Skp组成的组。在特定实施例中, 伴侣蛋白是Sly D, 特别是具有在登录号UniProt ID P0A9K9中给出的氨基酸序列。

[0227] 在特定实施例中, 冠状抗原包含根据SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:14的冠状核衣壳特异性氨基酸序列, 以及一种SlyD伴侣蛋白。在特定实施例中, 冠状抗原包含根据SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:14的冠状核衣壳特异性氨基酸序列, 以及两种SlyD伴侣蛋白。

[0228] 两种伴侣蛋白的融合导致所得抗原的更高溶解度。

[0229] 在实施例中, 伴侣蛋白在核衣壳的N-和/或C-末端, 特别是在核衣壳的N-末端融合至冠状核衣壳特异性氨基酸序列。因此, 在特定实施例中, 冠状抗原包含冠状核衣壳特异性氨基酸序列N-末端的一种SlyD伴侣蛋白。在特定实施例中, 冠状抗原包含冠状核衣壳特异性氨基酸序列N-末端的两种SlyD伴侣蛋白。在实施例中, 冠状抗原包含冠状核衣壳特异性氨基酸序列N-末端的一种SlyD伴侣蛋白和冠状核衣壳特异性氨基酸序列C-末端的一种SlyD伴侣蛋白。

[0230] 在实施例中, 冠状抗原进一步包含接头序列。这些序列对抗冠状病毒抗体没有特异性, 并且在体外诊断免疫测定中不被识别。特别地, 冠状抗原包含冠状核衣壳的序列与一种或多种伴侣蛋白之间的接头序列。在一些实施例中, 接头是富含Gly的接头。在一些实施例中, 接头具有如SEQ ID NO:7所示的序列。

[0231] 在一个实施例中, 冠状抗原包含根据SEQ ID NO:2的氨基酸序列。在实施例中, 冠状抗原不包含任何其他氨基酸序列。在特定实施例中, 冠状抗原由根据SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成。

[0232] 在一个实施例中, 冠状抗原包含根据SEQ ID NO:3的氨基酸序列。在实施例中, 冠状抗原不包含任何其他氨基酸序列。在特定实施例中, 冠状抗原由SEQ ID NO:3组成。

[0233] 在实施例中, 冠状抗原包含根据SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:15的氨基酸序列。在实施例中, 冠状抗原不包含任何其他氨基酸序列。在特定实施例中, 冠状抗原由SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:15组成

[0234] 应理解, 由SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3组成的冠状抗原不包含任何额外的氨基酸序列, 但仍可能包含其他化学分子, 例如标记和/或标签。

[0235] 在特定实施例中, 与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的序列同源性为至少96%、至少97%、至少98%或至少99%。在特定实施例中, 与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的序列同源性为至少98%。

[0236] 在特定实施例中, 与SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15的序列同源性为至少96%、至少97%、至少98%或至少99%。在特定实施例中, 与SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、或SEQ ID NO:15为至少98%。

[0237] 在实施例中, 冠状抗原进一步包含标签或标记。因此, 冠状抗原包含如上文或下文所述的SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:14的冠状核衣壳特异性氨基酸序列, 和标签和/或标记, 以及任选的一种或多种伴侣蛋白的氨基酸序列。

[0238] 在特定实施例中, 标签允许将抗原直接或间接结合至固相。在特定实施例中, 标签是生物亲和结合对的配偶体。在特定实施例中, 标签选自由以下项组成的组: 生物素、地高辛、半抗原或互补寡核苷酸序列 (特别是互补LNA序列)。在特定实施例中, 标签为生物素。

[0239] 在特定实施例中, 标记允许检测冠状抗原。在特定实施例中, 冠状特异性核衣壳序列被标记。在其中至少一种伴侣蛋白存在于抗原中的实施例中, 冠状特异性核衣壳序列被标记或至少一种伴侣蛋白被标记, 或两者都被标记。

[0240] 在特定实施例中, 标记是电化学发光钉或铼络合物。在特定实施例中, 电化学发光钉络合物是带负电的电化学发光钉络合物。在特定实施例中, 标记是带负电荷的电化学发光钉络合物, 其以1:1至15:1的化学计量存在于抗原中。在特定实施例中, 化学计量为2:1、2.5:1、3:1、5:1、10:1或15:1。

[0241] 在实施例中, 该方法包括向免疫反应混合物中添加固相的附加步骤。在实施例中, 固相是固相萃取 (SPE) 柱、或珠。在特定实施例中, 固相包含颗粒或由颗粒组成。在实施例中, 颗粒是非磁性的、磁性的或顺磁性的。在实施例中, 颗粒被涂覆。涂层可根据预期用途 (即根据预期的捕获分子) 而有所不同。哪种涂层适用于哪种分析物是技术人员众所周知的。珠可由各种不同的材料制成。珠可具有各种尺寸并且包含具有或不具有孔的表面。

[0242] 在特定实施例中, 颗粒是微粒。在实施例中, 微粒具有50纳米至20微米的直径。在实施例中, 微粒具有在100nm与10 μ m之间的直径。在实施例中, 微粒具有200nm至5 μ m, 特别是750nm至5 μ m, 特别是750nm至2 μ m的直径。在特定实施例中, 微粒是磁性的或顺磁性的。特别地, 微粒是顺磁性的。

[0243] 在实施例中, 在将样品添加至所述抗原之前或在形成免疫反应混合物之后添加固相。因此, 固相的添加可以在本方法的步骤a) 中、在本方法的步骤b) 中、或在本方法的步骤b) 之后进行。

[0244] 在实施例中, 所执行的方法是用于检测分离的生物学样品中的抗冠状病毒的免疫测定。用于检测抗体的免疫测定在本领域中是众所周知的, 进行这种测定的方法以及实际应用和程序也是如此。根据本发明的冠状核衣壳抗原可用于改进检测抗冠状病毒的测定, 而不依赖于所使用的标记并且不依赖于检测模式 (例如, 放射性同位素测定、酶免疫测定、电化学发光测定等) 或测定原理 (例如, 试纸测定、夹心测定、间接测试概念或同质测定等)。

[0245] 在实施例中, 所执行的方法是根据所谓的双抗原夹心概念 (DAGS) 检测分离样品中的抗冠状病毒的免疫测定。有时这种测定概念也称为双抗原桥概念, 因为通过抗体分析物桥接两种抗原。在这样的测定中, 利用了抗体结合给定抗原的至少两个不同分子及其两个 (IgG、IgE)、四个 (IgA) 或十个 (IgM) 互补位的能力。

[0246] 在实施例中, 用于根据DAGS格式确定抗冠状病毒的免疫测定通过将包含抗冠状病毒的样品与两种不同的冠状病毒 (即第一 (“捕获”) 冠状病毒和第二冠状病毒 (“检测”) 抗原) 一起孵育来进行, 其中两种抗原中的每一种都与抗冠状病毒抗体特异性结合。

[0247] 在实施例中, “捕获抗原” 和 “检测抗原” 的结构是免疫交叉反应的。执行本方法的

基本要求是一个或多个相关表位存在于两种抗原上。因此,两种抗原均包含如上文或下文所述的冠状核衣壳特异性氨基酸序列。在实施例中,两种抗原包含相同或不同的融合部分(例如,与标记为被固相结合 的冠状核衣壳特异性抗原融合的S1yD,和例如,与标记为待检测的冠状核衣壳特异性抗原融合的FkpA),因为这样的变化显著减轻了非特异性结合的问题,从而降低了假阳性结果的风险。

[0248] 在实施例中,第一抗原可以直接或间接与固相结合并且通常携带效应基团,该效应基团是生物亲和结合对的一部分。在具体实施例中,第一抗原与生物素缀合,并且互补固相用抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白涂覆。在实施例中,第二抗原携带赋予该抗原分子特异性可检测性的标记,其单独或与其他分子络合。在特定实施例中,第二抗原带有钆络合物标记。

[0249] 因此,在本方法的步骤b)中,形成包含第一抗原、样品抗体和第二抗原的免疫反应混合物。

[0250] 这种由夹在两个抗原分子之间的分析物抗体组成的三元复合物称为免疫复合物或免疫反应产物。

[0251] 在实施例中,该方法可以包括将液相与固相分离的附加步骤。

[0252] 因此,在实施例中,用于检测分离的样品中对冠状病毒具有特异性的抗体的方法包括

[0253] a) 向所述样品添加可直接或间接结合固相并携带作为生物亲和结合对的一部分的效应基团的第一冠状病毒抗原和携带可检测标记的第二冠状病毒抗原,其中所述第一和第二冠状病毒抗原与所述抗冠状病毒抗体特异性结合

[0254] b) 形成包含第一抗原、样品抗体和第二抗原的免疫反应混合物,其中在形成免疫反应混合物之前、期间或之后添加携带所述生物亲和结合对的相应效应基团的固相,

[0255] c) 将所述免疫反应混合物维持足以允许体液样品中针对所述冠状病毒抗原的抗冠状病毒抗体与所述冠状病毒抗原发生免疫反应以形成免疫反应产物的时间段,

[0256] d) 将液相与固相分离

[0257] e) 检测固相或液相或两者中任何所述免疫反应产物的存在。

[0258] 最后,在固相或液相或两者中检测任何所述免疫反应产物的存在。

[0259] 在实施例中,用于检测冠状病毒抗体的方法的最大总持续时间小于一小时,即小于60分钟,在一个实施例中小于30分钟,在另一个实施例中小于20分钟,在一个实施例中在15与30分钟之间,在一个实施例中为15至20分钟之间。持续时间包括移取样品和进行测定所需的试剂以及孵育时间、任选的洗涤步骤、检测步骤以及结果的最终输出。

[0260] 在第六方面,本发明涉及一种鉴定患者过去是否曾暴露于冠状病毒感染的方法,其包括

[0261] a) 通过将患者的体液样品与本发明第一方面的冠状病毒抗原、本发明第二方面的组合物或通过本发明第三方面的方法获得的冠状病毒抗原混合来形成免疫反应混合物

[0262] b) 将所述免疫反应混合物保持足以允许存在于该体液样品中的抗所述冠状病毒抗原的抗体与所述冠状病毒抗原发生免疫反应以形成免疫反应产物的时间段;以及

[0263] c) 检测任何所述免疫反应产物的存在和/或不存在,其中免疫反应产物的存在指示该患者过去曾暴露于冠状病毒感染。

[0264] 在实施例中,患者在执行本方法之前暴露于冠状病毒感染。特别是,患者在执行本方法前至少5天暴露于冠状病毒感染。特别是,患者在执行本方法前至少10天暴露于冠状病毒感染。特别是,患者在执行本方法前至少14天暴露于冠状病毒感染。

[0265] 在第七方面,本发明涉及一种在由天然冠状病毒感染引起的免疫应答和由疫苗接种引起的免疫应答之间进行鉴别诊断的方法,其中该疫苗接种基于S蛋白、E蛋白或M蛋白衍生的抗原,包括

[0266] a) 通过将患者的体液样品与本发明第一方面的冠状病毒抗原、包含本发明第一方面的冠状病毒抗原的组合物或通过本发明第三方面的方法获得的冠状病毒抗原混合来形成免疫反应混合物

[0267] b) 将所述免疫反应混合物保持足以允许存在于该体液样品中的抗所述冠状病毒抗原的抗体与所述冠状病毒抗原发生免疫反应以形成免疫反应产物的时间段;以及

[0268] c) 检测任何所述免疫反应产物的存在和/或不存在,其中存在免疫反应产物指示患者中的免疫应答是由于天然冠状病毒感染,并且其中不存在免疫反应产物指示患者中的免疫应答是由于接种S蛋白、E蛋白或M蛋白衍生的抗原。

[0269] 在实施例中,该方法允许区分自然感染冠状病毒的患者和接种了冠状病毒疫苗的患者,其中接种了冠状病毒疫苗的患者接种了使用源自冠状病毒S蛋白、E蛋白或M蛋白的抗原。

[0270] 在实施例中,感染天然冠状病毒的患者被SARS-Cov-1或SARS-Cov-2,特别是SARS-Cov-2感染。

[0271] 在实施例中,天然冠状病毒包含核衣壳蛋白。

[0272] 在第八方面,本发明涉及根据本发明第一方面的冠状病毒抗原、本发明第二方面的组合物或通过本发明第三方面的方法获得的冠状病毒抗原在检测抗冠状病毒抗体的高通量体外诊断试验中的用途。在特定实施例中,根据本发明第一方面的冠状病毒抗原、本发明第二方面的组合物或通过本发明第三方面的方法获得的冠状病毒抗原用于本发明第四方面或本发明第五方面的方法中。

[0273] 在第九方面,本发明涉及一种用于检测抗冠状病毒抗体的试剂盒,该试剂盒包含根据本发明第一方面的冠状病毒抗原、本发明第二方面的组合物或通过本发明第三方面的方法获得的冠状病毒抗原。

[0274] 在实施例中,试剂盒在单独容器中或在单个容器单元的单独隔室中包含根据本发明第一方面的冠状病毒抗原、本发明第二方面的组合物或通过本发明第三方面的方法获得的冠状病毒抗原。在特定实施例中,所包含的冠状病毒抗原与生物素共价偶联。

[0275] 在实施例中,试剂盒进一步在单独的容器中或在单个容器单元的单独隔室中包含微粒,特别是用抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白涂覆的微粒。

[0276] 在另一些实施例中,本发明涉及以下项目:

[0277] 1. 一种适用于检测分离的生物学样品中抗冠状病毒的抗体的冠状病毒抗原,其包含根据SEQ ID NO:1的冠状病毒核衣壳特异性氨基酸序列或其变体,其中所述多肽不包含其他冠状病毒特异性氨基酸序列。

[0278] 2. 项目1所述的冠状病毒抗原,其中该冠状病毒为CoV-1或CoV-2病毒,特别是CoV-2病毒。

[0279] 3. 项目1或2所述的冠状病毒抗原,其中所述抗原进一步包含至少一种伴侣蛋白,特别是2种伴侣蛋白。

[0280] 4. 项目3所述的冠状病毒抗原,其中所述伴侣蛋白选自由SlyD、SlpA、FkpA和Skp组成的组。

[0281] 5. 项目2至4所述的冠状病毒抗原,其中该伴侣蛋白在该核衣壳的N-和/或C-末端与冠状病毒核衣壳特异性氨基酸序列融合。

[0282] 6. 项目1至5所述的冠状病毒抗原,其中该多肽包含根据SEQ ID NO:1的冠状病毒核衣壳特异性氨基酸序列和两种SlyD伴侣蛋白。

[0283] 7. 项目1至6中任一项所述的冠状病毒抗原,其是可溶性和免疫反应性的。

[0284] 8. 权利要求1至7中任一项所述的冠状病毒抗原,其中该SARS CoV-2冠状病毒核衣壳变体包含根据SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

[0285] 9. 项目1至8中任一项所述的冠状病毒抗原,其进一步包含标签,特别是允许检测抗原的标签(特别是Ru,特别是带负电荷的Ru),和/或将抗原直接或间接结合至固相的标签(特别是作为生物亲和结合对的一部分的效应基团,特别是生物素)。

[0286] 10. 一种组合物,其包含项目1至9中任一项所述的冠状病毒抗原。

[0287] 11. 项目10所述的组合物,其包含另外的冠状病毒抗原,特别是包含含有E蛋白、M蛋白和/或S蛋白或其部分的氨基酸序列的冠状病毒抗原。

[0288] 12. 一种生产对冠状病毒核衣壳具有特异性的冠状病毒抗原的方法,所述方法包括以下步骤:

[0289] a) 培养用表达载体转化的宿主细胞,特别是大肠杆菌细胞,该表达载体包含可操作地连接的编码根据项目1至9中任一项所述的多肽的重组DNA分子,特别是包含根据SEQ ID NO:3的序列的重组DNA分子

[0290] b) 表达所述多肽,以及

[0291] c) 纯化所述多肽。

[0292] 13. 一种用于检测分离的样品中对冠状病毒具有特异性的抗体的方法,其中将根据项目1至9中任一项所述的冠状病毒抗原、项目10至11所述的组合物或通过根据项目12所述的方法获得的冠状病毒抗原用作所述抗冠状病毒抗体的捕获试剂和/或结合配偶体。

[0293] 14. 一种用于检测分离的样品中对冠状病毒具有特异性的抗体的方法,所述方法包括

[0294] a) 通过将体液样品与根据项目1至9中任一项所述的冠状病毒抗原、项目10至11所述的组合物或通过项目12所述的方法获得的冠状病毒抗原混合来形成免疫反应混合物

[0295] b) 将所述免疫反应混合物保持足以允许存在于该体液样品中的抗所述冠状病毒抗原的抗体与所述冠状病毒抗原发生免疫反应以形成免疫反应产物的时间段;以及

[0296] c) 检测任何所述免疫反应产物的存在和/或浓度。

[0297] 15. 根据项目14所述的用于检测分离的样品中对冠状病毒具有特异性的抗体的方法,其中所述免疫反应以双抗原夹心形式进行,包括

[0298] a) 向所述样品添加可直接或间接结合固相并携带作为生物亲和结合对的一部分的效应基团的第一冠状病毒抗原和携带可检测标记的第二冠状病毒抗原,其中所述第一和第二冠状

抗原与所述抗冠状病毒抗体特异性结合

[0299] b) 形成包含第一抗原、样品抗体和第二抗原的免疫反应混合物,其中在形成免疫反应混合物之前、期间或之后添加携带所述生物亲和结合对的相应效应基团的固相,

[0300] c) 将所述免疫反应混合物维持足以允许体液样品中针对所述冠状病毒抗原的抗冠状病毒抗体与所述冠状病毒抗原发生免疫反应以形成免疫反应产物的时间段,

[0301] d) 将液相与固相分离

[0302] e) 检测固相或液相或两者中任何所述免疫反应产物的存在。

[0303] 16. 项目13至15中任一项所述的用于检测分离样品中对冠状病毒具有特异性的抗体的方法,其中检测的抗体是IgA、IgG或IgM抗体,特别是IgG抗体。

[0304] 17. 一种鉴定患者过去是否曾暴露于冠状病毒感染的方法,其包括

[0305] a) 通过将患者的体液样品与项目1至9中任一项所述的冠状病毒抗原、项目10至11所述的组合物或通过项目12所述的方法获得的冠状病毒抗原混合来形成免疫反应混合物,

[0306] b) 将所述免疫反应混合物保持足以允许存在于该体液样品中的抗所述冠状病毒抗原的抗体与所述冠状病毒抗原发生免疫反应以形成免疫反应产物的时间段;以及

[0307] c) 检测任何所述免疫反应产物的存在和/或不存在,

[0308] 其中存在免疫反应产物指示该患者过去曾暴露于冠状病毒感染。

[0309] 18. 一种在由天然冠状病毒感染引起的免疫应答和由疫苗接种引起的免疫应答之间进行鉴别诊断的方法,其中该疫苗接种基于S蛋白、E蛋白或M蛋白衍生的抗原,该方法包括

[0310] a) 通过将患者的体液样品与本发明第一方面的冠状病毒抗原、包含本发明第一方面的冠状病毒抗原的组合物或通过本发明第三方面的方法获得的冠状病毒抗原混合来形成免疫反应混合物

[0311] b) 将所述免疫反应混合物保持足以允许存在于该体液样品中的抗所述冠状病毒抗原的抗体与所述冠状病毒抗原发生免疫反应以形成免疫反应产物的时间段;以及

[0312] c) 检测任何所述免疫反应产物的存在和/或不存在,

[0313] 其中免疫反应产物的存在指示所述患者中的免疫应答是由于天然冠状病毒感染,并且其中免疫反应产物的不存在指示所述患者中的免疫应答是由于用刺突蛋白衍生的抗原进行的疫苗接种。

[0314] 19. 根据目1至9中任一项所述的冠状病毒抗原、项目10至11所述的组合物或通过项目12所述的方法获得的冠状病毒抗原在用于检测抗冠状病毒抗体的高通量体外诊断测试中的用。

[0315] 20. 根据目1至9中任一项所述的冠状病毒抗原、项目10至11所述的组合物或通过项目12所述的方法在项目13至18的方法中的用途。

[0316] 21. 一种用于检测抗冠状病毒抗体的试剂盒,其包含根据目1至9中任一项所述的冠状病毒抗原、项目10至11所述的组合物或通过项目12所述的方法获得的冠状病毒抗原。

[0317] 22. 根据项目18所述的试剂盒,其在单独的容器中或在单个容器单元的单独隔室中至少包含用抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白涂覆的微粒,以及与生物素共价偶联的根据目1至9中任一项所述的冠状病毒抗原、项目10至11所述的组合物或通过项目12所述的方法获得的冠状病毒抗原。

[0318] 23. 根据项目13所述的试剂盒,其在单独的容器中或在单个容器单元的单独隔室中至少包含用抗生素蛋白或链霉抗生素蛋白涂覆的微粒,以及与生物素共价偶联的 μ -捕获结合配偶体。

[0319] 提供以下实例和附图以帮助理解本发明,本发明的真正范围在所附权利要求中阐明。应当理解的是,在不脱离本发明精神的前提下,可以对阐明的程序进行修改。

[0320] 实例

[0321] 实例1:冠状核衣壳抗原的克隆和纯化

[0322] 表达盒的克隆

[0323] 基于Novagen (Madison, WI, USA) 的pET24a表达质粒,基本上如所述获得编码融合蛋白的表达盒 (Scholz, C. et al., J. Mol. Biol. (2005) 345, 1229-1241)。来自SARS冠状病毒2 (SARS CoV-2) 的核衣壳抗原序列从GenBank no. MN90847.3中检索到。编码具有与N末端框内融合的富含甘氨酸的接头区域的核衣壳抗原aa 1-419 (即,核衣壳或N蛋白的全长版本) 的合成基因购自Eurofins (Regensburg, Germany)。由于冠状N蛋白的天然氨基酸序列不含任何半胱氨酸残基,因此无需进行氨基酸置换以防止不希望的副作用,例如氧化或分子间二硫键桥接。BamHI和XhoI限制性位点分别位于N编码区的5'和3'端。编码通过富含甘氨酸的接头区连接并在C-末端包含另一接头区的一部分的一个或两个EcSlyD单元 (SwissProt 登录号P0A9K9的残基1-165) 的另一合成基因同样购自Eurofins。NdeI和BamHI限制位点分别位于该盒的5'和3'端。基因和限制位点被设计成能够通过简单的连接使伴侣蛋白部分EcSlyD-EcSlyD和N抗原部分框内融合。为了避免无意的重组过程并增加表达盒在大肠杆菌宿主中的遗传稳定性,编码EcSlyD单元的核苷酸序列和编码延伸接头区域的核苷酸序列一样简并。即,不同的密码子组合用于编码相同的氨基酸序列。

[0324] 将pET24a载体用NdeI和XhoI消化,并插入包含与冠状核衣壳(1-419)框内融合的串联SlyD的盒。相应地构建了包含大肠杆菌SlpA (2-149, SwissProt ID P0AEM0)、大肠杆菌Skp (21-161, SwissProt ID P0AEU7) 或大肠杆菌FkpA (26-270, SwissProt ID P45523) 的表达盒,以及包含来自SARS冠状病毒2的核衣壳片段的表达盒。所有重组融合多肽变体都包含C-末端六组氨酸标签,以促进Ni-NTA辅助纯化和重折叠。QuikChange (Stratagene, La Jolla, CA, USA) 和标准PCR技术用于在各自的表达盒中产生点突变、缺失、插入和延伸变体或限制性位点。

[0325] 图3显示了核衣壳抗原N1-419的示意图,该抗原具有两个在框架内融合到其N-末端的SlyD伴侣蛋白单元。为了表示SlyD融合配偶体的大肠杆菌来源,所描绘的融合多肽已被命名为EcSlyD-EcSlyD-CoV-2N(1-419)。

[0326] 对所得质粒的插入片段进行测序,发现其编码所需的融合蛋白。抗原变体CoV-2N(1-419)、EcSlyD-CoV-2N(1-419)和EcSlyD-EcSlyD-CoV-2N(1-419)的完整氨基酸序列分别显示在SEQ ID NO.1、2和3中。接头L的氨基酸序列显示在SEQ ID NO:7中。

[0327] 从SARS冠状病毒2中纯化包含核衣壳的重组蛋白

[0328] 通过使用几乎相同的方案纯化所有核衣壳抗原变体。包含特定pET24a表达质粒的大肠杆菌BLR (DE3) 细胞在37°C在LB培养基加卡那霉素(30 μ g/ml)中生长至OD₆₀₀为1.5,并通过添加1mM异丙基- β -D-硫代半乳糖苷诱导胞质过表达。诱导后三小时,通过离心(5000g 20分钟)收获细胞,冷冻并储存在-20°C。对于细胞裂解,将冷冻的沉淀重新悬浮在冷冻的50mM

磷酸钠pH 8.0、7.0M GdmCl、5mM咪唑中,并将悬浮液在冰上搅拌2小时以完成细胞裂解。离心和过滤(0.45 μ m/0.2 μ m)后,将粗裂解物施加到用包括5.0mM TCEP的裂解缓冲液平衡的Ni-NTA柱上。随后的洗涤步骤针对相应的靶蛋白进行了调整,并且范围为5至15mM咪唑(在50mM磷酸钠pH 8.0、7.0M GdmCl、5.0 mM TCEP中)。应用至少10-15体积的洗涤缓冲液。然后,将GdmCl溶液替换为50mM磷酸钾pH 8.0、100mM KCl、10mM咪唑、5.0mM TCEP,以诱导基质结合蛋白的构象重折叠。为了避免共纯化蛋白酶的再激活,在重折叠缓冲液中加入了蛋白酶抑制剂混合物(Complete[®] EDTA-free, Roche)。在过夜反应中应用总共15-20柱体积的重折叠缓冲液。然后,通过用3-5柱体积的50mM磷酸钾pH 8.0、100mM KCl、10mM咪唑洗涤去除TCEP和 Complete[®] 无EDTA抑制剂混合物两者。随后,咪唑浓度(仍然在50mM磷酸钾pH 8.0、100mM KCl中)提高到30-50mM(取决于各自的靶蛋白),以去除非特异性结合的蛋白质污染物。然后用相同缓冲液中的250mM咪唑洗脱天然蛋白质。通过Tricine-SDS-PAGE评估含蛋白质级分的纯度并合并。最后,对蛋白质进行尺寸排阻色谱(Superdex HiLoad, Amersham Pharmacia),并将含蛋白质的级分合并并在Amicon单元(YM10)中浓缩至10-20mg/ml。

[0329] 在耦合纯化和重折叠方案后,根据各自的靶蛋白,从1g大肠杆菌湿细胞中可以获得约10-15mg的蛋白质产量(无伴侣蛋白N蛋白 \sim 10mg/g; EcSlyD-N(1-419) \sim 12mg/g; EcSlyD-EcSlyD-N(1-419) \sim 15mg/ml)。

[0330] 实例2:光谱测量

[0331] 使用Uvikon XL双光束分光光度计进行蛋白质浓度测量。通过使用Pace(1995), Protein Sci. 4, 2411-2423描述的确定摩尔消光系数(ϵ_{280})。用于不同融合多肽的摩尔消光系数(ϵ_{M280})列于表1。

[0332] 表1:本研究中产生并使用的SARS冠状病毒2核衣壳融合多肽变体的蛋白质参数。所有参数均指各自的蛋白质单体。

融合蛋白	目标蛋白 的长度 (aa 残 基)	融合多 肽的分 子量 (Da)	pI	ϵ_{M280} $M^{-1}cm^{-1}$	绝对值 ^{0.1%} (= 1 mg/ml)
[0333]					
N 变体					
SARS-CoV-2					
CoV-2 N	2-419	46560	10.0	43890	0.943
EcSlyD-CoV-2 N	1-419	66132	7.1	49850	0.754
EcSlyD-EcSlyD-CoV-2 N	1-419	85442	5.8	55810	0.653

[0334] 无伴侣蛋白的SARS CoV-2N克隆为全长版本(1-419),但在大肠杆菌中过度生产后N-末端甲硫氨酸被N-甲硫氨酰氨基肽酶共翻译切除。因此,表1中给出了成熟(切割的)SARS CoV-2核衣壳版本(2-419)的数据。冠状抗原变体的氨基酸序列分别显示在SEQ ID NO:1、2和3中。

[0335] 实例3:生物素标签和钆复合物标记与核衣壳抗原的偶联

[0336] 融合多肽的赖氨酸 ϵ -氨基分别用N-羟基-琥珀酰亚胺活化的生物素和钆标记分子

在10-30mg/ml的蛋白质浓度下进行修饰。标记/蛋白质比例从1:1到10:1 (mol:mol) 不等,具体取决于各自的融合蛋白。反应缓冲液是150mM磷酸钾pH 8.0、100mM KCl、0.5mM EDTA。反应在室温下进行15分钟,并通过添加缓冲的L-赖氨酸至终浓度为10mM来停止反应。为了避免标签的水解失活,各自的储备溶液在无水DMSO (seccosolv quality, Merck, Germany) 中制备。所有研究的融合蛋白都能很好地耐受反应缓冲液中浓度高达25%的DMSO。偶联反应后,通过使粗蛋白缀合物通过凝胶过滤柱 (Superdex 200HiLoad) 去除未反应的游离标记。

[0337] 实例4:抗SARS CoV-2免疫测定中不同核衣壳抗原变体的免疫反应性(即抗原性)

[0338] 在自动 Elecsys[®] cobas e 411分析仪 (Roche Diagnostics GmbH) 中评估冠状核衣壳抗原的多肽融合变体的免疫反应性(即抗原性)。Elecsys[®] 是罗氏集团的注册商标。以双抗原夹心形式进行测量。

[0339] Elecsys[®] 和cobas自动分析仪中的信号检测基于电化学发光。生物素缀合物(即捕获抗原)固定在链霉抗生物素蛋白包被的磁珠表面,而检测抗原带有复合钆阳离子(在氧化还原状态2+与3+之间转换)作为信号部分。在存在特定免疫球蛋白分析物的情况下,发光的钆复合物桥接到固相上,并在铂电极激发后发出620nm的光。信号以任意发光度单位输出。

[0340] 以双抗原夹心 (DAGS) 免疫测定形式评估重组冠状核衣壳抗原。为此,重组冠状N抗原分别用作生物素和钆缀合物,以检测人血清中的抗冠状核衣壳抗体。

[0341] 核衣壳蛋白N是冠状病毒的免疫显性抗原之一,并且如本专利申请中所公开的,N的可溶性变体是用于检测冠状病毒感染的宝贵工具。在所有测量中, EcSkp-EcSlyD-EcSlyD (EP2893021 (B1)) 或化学聚合和未标记的EcSlyD-EcSlyD作为抗干扰物质在反应缓冲液中大量(5-30μg/ml)使用以避免通过伴侣蛋白融合单元的免疫交叉反应。

[0342] 特别地,本研究仔细检查了来自SARS冠状病毒2的三种核衣壳变体,即没有任何融合配偶体的全长N(1-419)、与一种SlyD伴侣蛋白融合的全长N(1-419)和与两个SlyD伴侣蛋白单元融合的全长N(1-419)。为了检测抗SARS CoV-2N IgM和IgG分子二者,分别在R1(试剂缓冲液1)和R2(试剂缓冲液2)中使用了EcSlyD-EcSlyD-N(1-419)-生物素和EcSlyD-EcSlyD-N-钆。R1和R2中抗原结合物的浓度分别各自为~100ng/ml(如果没有另外说明)。在分析凝胶过滤实验中,我们发现EcSlyD-EcSlyD-N(1-419)形成可溶性和规则的寡聚体,其表位密度足以结合和检测M型免疫球蛋白。

[0343] 此外,在 Elecsys[®] 测量中评估了冠状抗原的推定的免疫显性片段的EcSlyD融合多肽。值得注意的是,检查了刺突蛋白(617-649,338-516)、E蛋白(8-65,45-75)、M蛋白(1-32,132-163,100-222)和N蛋白(151-178,374-404)的片段的抗原性。所有这些伴侣蛋白融合蛋白都已分别被克隆、纯化、生物素化和钆基化,几乎如对N变体的描述。之所以选择这些片段,是因为文献中暗示来自SARS-CoV-1的相应序列具有免疫反应性。事实上,对于SARS-CoV-1,已经描述了冠状刺突蛋白(He等人, J. Immunol. (2004); 173:4050-4057)、冠状M蛋白(J. Clin. Microbiol. (2005); 43(8):3718-3726)和冠状N蛋白(J. Clin. Microbiol. (2004) 42(2):5309-5314)的免疫显性表位。

[0344] 不幸的是,人类冠状血清转换试剂盒——它是开发改进的体外诊断测定法不可或

缺的工具——尚未商业化。为了评估SARS CoV-2感染早期不同核衣壳变体的抗原特性,我们不得不从诊所和医院重新获得剩余的血清。

[0345] 在第一个实验中,所有的冠状抗原候选者都以上述DAGS格式评估了它们的免疫反应性。为此,在添加链霉抗生物素蛋白包被的珠之前,将研究中的候选抗原的生物素化和钆化变体与样品一起孵育。基于图4a和图4b中的数据很明显,包含冠状蛋白片段的重组融合多肽不显示任何免疫反应性:即使浓度高达500ng/ml,刺突蛋白片段617-649与所测试的抗冠状阳性组的五种血清完全没有反应(见图4a)。检测到的信号在约500个计数的系统固有背景范围内,排除了刺突蛋白(617-649)具有免疫显性表位。来自刺突蛋白的另一个片段(即338-516)也是如此,它包含所谓的受体结合域,并且被认为是冠状蛋白质组中最强免疫显性区域之一。此外,重组衍生的RBD变体EcS1yD-刺突蛋白(338-516)不显示任何反应性,这与之前关于该结构域抗原性的报道形成强烈对比。E蛋白变体(45-75)和(8-65)——它们都融合了提高溶解度的大肠杆菌S1yD蛋白——也不显示任何反应性,冠状M蛋白的片段1-32、132-163和100-222也是如此。M蛋白的100-222区域的结果是显著的,因为这是M蛋白的胞内域部分,即该片段有一定的可能性能够采用天然样构象,因此会呈现构象表位。然而,M胞内域完全没有反应性。N片段1 51-178和374-404也没有反应性(图4b)。相比之下,尽管背景信号非常高,但全长核衣壳抗原(倒数第二列)显示出微弱但显著的免疫反应性。当S1yD单元在N-末端与核衣壳融合时,所得融合多肽的溶解度显著增强,并且背景信号从~490000个计数降低到120000个计数(图4b,最后一列)。结果,信噪比显著增加,并且可以很好地区分抗冠状病毒阳性血清和阴性血清。尽管如此,背景信号仍然非常高,但可以通过降低测定中的抗原浓度来减轻。

[0346] 图4b显示,一个S1yD单元与SARS CoV-2核衣壳抗原的融合将可溶性传递到其靶蛋白并改善其物理化学性质,产生非常适合检测抗冠状抗体的免疫反应性冠状抗原。

[0347] 在下一步中,我们探索了另一个S1yD单元的融合是否会进一步改善核衣壳抗原的物理化学特征。

[0348] 图5显示了无伴侣蛋白形式以及与一个S1yD单元融合和与两个S1yD单元融合的CoV-2核衣壳抗原的 Elecsys[®] 评估。为了确保公平比较,应用了相同摩尔浓度的各变体。引人注目的是,通过添加一个S1yD伴侣蛋白单元,显著降低了背景信号,从而改善了信噪比。当将第二个S1yD伴侣蛋白单元添加到冠状核衣壳抗原时,背景信号进一步改善,并且信噪比进一步增加。简而言之,冠状N蛋白的溶解度极大地受益于诸如S1yD等伴侣蛋白的融合。从图5的比较中可以明显看出,当将两个S1yD单元添加到N而不是仅一个时,甚至信号恢复也得到了显著改善。长期稳定性是免疫测定中使用的任何抗原的关键问题和先决条件。当抗原在热应力条件例如35℃下孵育时,信号恢复和实际上的信噪比恢复不应受到严重影响。表5还显示,两个S1yD伴侣蛋白单元与冠状N抗原的融合改善了整体信号恢复,并使N可用于 Elecsys[®] DAGS格式,以用于可靠检测抗冠状抗体。在35℃下过夜孵育后,EcS1yD-EcS1yD-CoV-2-N缀合物的信噪比恢复率远高于无伴侣蛋白的CoV-2N缀合物。我们发现这同样适用于S1pA(S1yD样蛋白A)-N融合蛋白。大肠杆菌S1pA是大肠杆菌S1yD的近亲,并且在热稳定性方面具有非常有利的特性(参见下面的实施例7)。

[0349] 进一步优化R1(=试剂1;生物素缀合物)和R2(=试剂2;钆缀合物)中的抗干扰添

加剂、缓冲液组成和抗原浓度以及用珠对钉偶联物进行吸附预处理(图6)最终为 Elecsys[®] 兼容的核衣壳抗原铺平了道路,该抗原具有出色的背景值(即阴性血清的信号非常低)和出色的信噪比(s/n),有助于很好地区分抗冠状病毒阳性和阴性血清。

[0350] 总之,我们得出的结论是,被吹捧为免疫显性表位的冠状病毒片段,无论是线性的(例如刺突蛋白617-649)或构象的(例如包含在刺突蛋白中的受体结合域RBD),确实在我们手中没有显示出显著的抗原性。当在 Elecsys[®] 自动分析仪中进行评估时,我们利用有前景的冠状病毒片段没有发现任何抗原性,而仅利用来自CoV-2的全长核衣壳抗原发现了。然而,由于过高的背景信号,天然形式的N蛋白无法用于 Elecsys[®] 测定。两个S1yD伴侣蛋白单元与N抗原的融合解决了这一缺陷,并使N抗原适用于 Elecsys[®] 平台上的高通量应用。

[0351] 实例5:如上所述的抗SARS CoV-2免疫测定的灵敏度和特异性

[0352] 最初,通过我们基于核衣壳抗原的原型抗体免疫测定法,进一步检查了通过PCR分析鉴定为感染SARS CoV-2的129名患者。在阳性PCR测试后的不同时间间隔,采集血清样品并通过上述抗体测定法进行分析,以阐明样品中是否存在任何抗CoV-2抗体。结果分为3类:阳性PCR后7天以下、初始PCR结果后7至13天以及14天和更长的时间。

[0353] 阳性PCR测试后6天,74%的患者可被确定为抗SARS CoV-2阳性。PCR阳性后7至13天,已经有95%的患者被确定为SARS CoV-2阳性。PCR阳性后14天,我们的测定法检测到100%的所有患者为阳性。结果也显示在图7A)中。

[0354] 在另外的实验中,使用如上所述的Elecsys抗-SARS CoV-2测定法对来自69名具有PCR确认的SARS CoV-2感染的有症状患者的总共204个样品进行了测试。在不同时间点进行PCR确认后,收集了来自这些患者的一个或多个连续样本。结果也显示在图7B)中。

[0355] 在第三个实验中,使用如上所述的Elecsys抗-SARS CoV-2检测方法对来自61名具有PCR确认的SARS CoV-2感染的有症状患者的另外292个样品进行了测试。在不同时间点进行PCR确认后,收集了来自这些患者的一个或多个连续样本。结果也显示在图7C)中。一个样品在14天后是非反应性,但在16天后变为反应性。因此,对于该数据集,在16天后,灵敏度为100%。

[0356] 对于特异性测试,最初通过上述抗体测定法分析了2019年12月之前采集的1591个诊断常规血清和血浆样品(“大流行前样品”)。由于捐赠日期,所有样品都被归类为SARS CoV-2抗体阴性。在1591个样品中,只有2个被鉴定为具有抗SARS CoV-2反应性。因此,上述抗体测定具有99.87%的特异性。

[0357] 在另外的实验中,分析了更多的患者样品。分析了来自5272名患者的第一组样品,其中包括上述最初的1591个样品。附上以下样品

[0358] • 来自常规诊断患者的3420个样品

[0359] • 来自献血者的1772个样品

[0360] • 来自诊断为普通感冒的患者组的40个样品,以及

[0361] • 来自过去感染过通过PCR确认的冠状病毒HKU1、NL63、229E或OC43的患者的40个潜在交叉反应样品。

[0362] 所有样品均在2019年12月之前获得,并如上所述使用Elecsys抗-SARS CoV-2测定

法进行了测试。检测到10个假阳性样品。在第一样品组中得到的总体特异性为99.81%。95%的置信下限为99.65%。结果显示在图8A中。

[0363] 在第二组中,分析了来自患者的另外5261个样品。以下样品包含在特异性研究中

[0364] • 来自常规诊断患者的2376个样品

[0365] • 来自献血者的2885个样品

[0366] 此外,还分析了来自4696名透析患者的样品。

[0367] 在第二个样品组中得到的总体特异性为99.79%。95%的置信下限为99.63%。结果显示在图8B中。

[0368] 第一组和第二组样品测量的组合结果(总共10453个)显示在图8C中。

[0369] 实例6:毛细血管血作为上述抗SARS CoV-2免疫测定的合适样品类型

[0370] 为了分析毛细血管血是否适合用作上述抗SARS CoV-2免疫测定中的样品类型,将毛细血管血样品与从静脉血制备的血清样品进行了比较。还分析了三种不同抗凝剂的作用(Li肝素血浆、K2-EDTA血浆、CAT血清)。对于Li肝素血浆、K2-EDTA血浆,检测了10个样品,其中5个为阳性,5个为阴性。对于CAT血清,测试了7个样品,其中5个为阳性,2个为阴性。结果总结在下表2、3和4中,并且分别在图9A、B和C中。

[0371] 表2:静脉血清样品与毛细血管Li肝素血浆样品的相关性

样品	目标	血清 COI	锂- 肝素- 血浆(毛细 血管) COI	COI 恢复[绝对 值]	COI 恢复 [%]
样品 1	阴性	0,049	0,046	0,003	-
样品 2	阴性	0,047	0,045	0,002	-
样品 3	阳性	69,8	67,1	-	96%
样品 4	阳性	87,5	88,1	-	101%
样品 5	阴性	0,052	0,050	0,002	-
样品 6	阳性	16,0	14,9	-	93%
样品 7	阴性	0,048	0,068	0,020	-
样品 8	阴性	0,049	0,046	0,003	-
样品 9	阳性	10,4	9,37	-	90%
样品 10	阳性	10,1	9,30	-	92%
			最小值	0,002	90%
			最大值	0,020	101%
			平均值	0,011	95%

[0373] 表3:静脉血清样品与毛细血管K2-EDTA血浆样品的相关性

样品	目标	血清 COI	K2-EDTA- 血浆(毛细血 管) COI	COI 恢复[绝对 值]	COI 恢复 [%]
样品 1	阴性	0,050	0,050	0,0003	-
样品 2	阳性	1,21	1,38	-	114%
样品 3	阴性	0,957	1,12	0,165	-
样品 4	阳性	1,20	1,23	-	102%
样品 5	阴性	0,811	0,874	0,063	-
样品 6	阴性	0,048	0,048	0,0002	100%
样品 7	阳性	5,03	3,51	-	70%
样品 8	阳性	4,08	4,13	-	101%
样品 9	阳性	6,15	6,28	-	102%
样品 10	阳性	5,80	5,08	-	88%
最小值				0,000	70%
最大值				0,165	114%
平均值				0,083	92%

[0375] 表4: 静脉血清样品与毛细血管CAT血清样品的相关性

样品	目标	血清 COI	血清(毛细 血管) COI	COI 恢复[绝对 值]	COI 恢复 [%]
样品 1	阴性	0,066	0,069	0,003	-
样品 2	阳性	1,34	1,42	-	106%
样品 3	阳性	1,11	1,26	-	113%
样品 4	阳性	1,37	1,10	-	81%
样品 5	阴性	0,071	0,068	0,003	-
样品 6	阳性	10,6	10,0	-	95%
样品 7	阳性	4,47	4,35	-	97%
最小值				0,003	81%
最大值				0,003	113%
平均值				0,003	97%

[0377] 为了解决毛细血管血中样品量的变化,将静脉全血(收集时不含凝块激活剂或抗凝剂)以不同体积转移到装有抗凝剂(300 μ l、400 μ l、600 μ l、800 μ l=参考)的毛细管采集管中,离心并使用Elecsys Anti-SARS-CoV-2在cobas e分析仪上进行了测试。测试了一个阴性样品和一个加标阳性样品。结果如下表5所示。

[0378] 表5: 样品量变化的影响

样品	目标	800 μ l COI	300 μ l COI	COI 恢复 [绝对值/%]	400 μ l COI	COI 恢复 [绝对值/%]	600 μ l COI	COI 恢复 [绝对值/%]
样品 1	阴性	0,050	0,048	0,001	0,049	0,001	0,050	0,000
样品 2	阳性	5,66	5,54	98%	5,68	100%	5,72	101%

[0379]

	COI 恢复 [绝对 值]	COI 恢复 [%]
最小值	0,000	98%
最大值	0,001	101%
平均值	0,001	99%

[0380] 实例7:核衣壳抗原与替代伴侣蛋白融合

[0381] 使用与上述实例1至3中所述相同的方法,来自SARS冠状病毒2 (SARS CoV-2)的核衣壳序列也与替代伴侣蛋白(即SlpA)融合。所得融合多肽与生物素标签或钌复合物标记偶联。如上文实施例4中所述测试免疫反应性并与上述SlpD-抗原构建体的反应性进行比较。结果示于图10。

[0382] 实例8:SARS CoV-2对比于普通感冒冠状病毒229E、0C43、NL63和HKU1的鉴别诊断

[0383] 除了来自SARS-CoV-2的核衣壳抗原外,还值得拥有来自其他六种众所周知的人类致病性冠状病毒,即229E、0C43、SARS-CoV-1、NL63、HKU1和MERS(按其在科学文献中出现的顺序列出)的核衣壳同源物。所谓的普通感冒冠状病毒229E、0C43、NL63和HKU1仍在全世界人群中传播,并且在-特别是在冬季-感冒样疾病的病原体(Human coronavirus circulation in the United States 2014-2017, J.Clin.Virol.101(2018), 52-56)。有了各自的抗原,应该可以促进抗SARS CoV-2免疫测定的抗干扰方法和正在研究的可疑血清的鉴别诊断二者。例如,当利用抗SARS CoV-2测定为假阳性的血清与来自229E和NL63(均为 α -冠状病毒)的rec.EcSlpD-EcSlpD-N构建体反应时,必须排除在相对无害的 α -冠状病毒感染时产生的抗体确实与抗SARS CoV-2抗体测试中使用的rec.EcSlpD-EcSlpD-CoV-2-N指定剂发生交叉反应,从而错误地指示SARS CoV-2感染。通过特异性阻断实验(即,将未标记的普通感冒冠N抗原添加到检查的样品中)或用来自普通感冒冠状病毒的标记的N变体对抗CoV-2反应样品进行鉴别诊断,应该可以分别确认真正的阳性结果或排除它。

[0384] 因此,我们克隆、表达和纯化(在大肠杆菌B121中)了来自229E、0C43、SARS-CoV-1、NL63、HKU1和MERS的N抗原的rec.EcSlpD-EcSlpD-融合蛋白版本,如针对来自SARS-CoV-2的rec.EcSlpD-EcSlpD-N所述的。除0C43和HKU1外,所有N变体都可以从大肠杆菌中以高产量获得,并且在我们手中是可溶和稳定的。蛋白质数据和产量总结在表6中。

[0385] 表6:本研究中克隆、表达和检查的EcSlpD-EcSlpD-N抗原变体的蛋白质特征。将七种已知人类致病性冠状病毒的核衣壳蛋白构建为EcSlpD-EcSlpD融合蛋白,并基本上如实例部分所述纯化。

人致病性冠状病毒		第一次描述的年份	长度N-抗原(AS)	长度SS-N融合抗原(AS)	SS-N (mg)	SS-N ($M^{-1}cm^{-1}$)	SS-N A_{280} (0,1%)	SS-N pI	SS-N MW (Da)	
	229E	α	1965	1-389	772	50	49 850	0.599	5.70	83 251
	OC43	β	1967	1-448	831	14	61 770	0.694	5.52	89 068
[0386]	SARS-CoV-1	β	2002	1-422	805	36	55 810	0.650	5.85	85 841
	NL63	α	2004	1-377	760	51	49 850	0.608	5.58	82 037
	HKU1	β	2005	1-441	824	12	63 385	0.713	5.64	88 918
	MERS	β	2012	1-413	796	42	59 820	0.705	5.80	84 879
	SARS-CoV-2	β	2019	1-419	802	50	55 810	0.653	5.83	85 442

[0387] 此外,根据与对于全长N版本rec.EcSlyD-EcSlyD-CoV-2-N所描述的基本上相同的纯化方案,我们从大肠杆菌BL21过度生产者中克隆、表达和纯化了来自SARS-CoV-2、229E、OC43、NL63和HKU1的N蛋白的所谓N-末端结构域(NTD)。与全长N蛋白相比,N-末端结构域不形成二聚体和四聚体,而是严格单体。因此,NTD特别适用于检测G型免疫球蛋白。然而,当抗原用作双抗原夹心(DAGS)形式的捕获和检测分子时,M型免疫球蛋白不会被严格的单体NTD识别。在生理上,NTD结合并容纳冠状病毒粒子内的聚阴离子单链病毒RNA聚合物。我们可以证明,与全长N蛋白相比,NTD的溶解度显著改善,并且它的热诱导展开是完全可逆的——与全长N抗原形成鲜明对比。通过近UV CD光谱监测的溶解曲线显示出rec.EcSlyD-N_NTD的非常有利的折叠行为,因为近UV CD信号在20°C-80°C-20°C的热展开/重折叠循环后完全恢复(数据未显示),指示展开状态和潜在折叠中间体的高溶解度。热诱导展开的可逆性是蛋白质的一个非常幸运和受欢迎的特征,并且没有任何聚集趋势将NTD表征为用于免疫测定的优秀抗原。各种NTD构建体的蛋白质数据和产量如表7所示。

[0388] 表7:克隆、表达和纯化的EcSlyD-N_NTD抗原变体的蛋白质特征

人致病性冠状病毒		第一次描述 的年份	NTD 的长 度	S-NTD 融合抗 原 (AS) 的长 度	S-NTD (mg)	S- NTD ϵ M ₂₈₀ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	S- NTD A ₂₈₀	S- NTD pI	S- NTD MW (Da)
[0389] 229E	α	1965	19- 144	322	113	31 400	0.894	5.81	35 130
OC43	β	1967	59- 189	327	5	44 350	1.257	4.92	35 295
NL63	α	2004	16- 142	323	121	29 910	0.849	5.71	35 210
HKU1	β	2005	58- 188	327	104	42 860	1.213	5.23	35 347
SARS-CoV-2	β	2019	46- 176	327	63	32 890	0.944	5.37	34 831

[0390] 如所述,所有rec.EcSlyD-N_NTD变体都被生物素化和钆化。各对生物素和钆缀合物在 Elecsys[®] 评估中显示出极好的背景信号,并且非常适合区分阳性和阴性血清。在图11a+b中,描述了来自SARS-CoV-2、OC43、NL63、229E和HKU1的NTD与人血清的反应性。血清已通过recomLine侧向流动测定SARS CoV-2IgG[Avidity]RUO(商品编号7374,Mikrogen GmbH, Neuried, Germany)进行了部分预表征,因为还没有关于普通感冒冠状病毒抗体实际血清阳性率的可靠数据。简而言之,我们希望确保在所研究的血清中,至少有一种对四种普通感冒冠状病毒中的每一种都呈阴性。图11表明,在从2019年开始的大流行前的普通感冒冠状病毒组中,我们没有观察到针对新型病原体SARS CoV-2的任何免疫反应性(图11a+b,第1列)。所有CCC血清均为抗SARS CoV-2阴性,产生接近系统固有背景的电化学发光信号(450至600计数)。至于抗SARS CoV-2阳性组(从2020年开始),SARS CoV-2NTD的信号相对于SARS CoV-2-N的全长版本显著降低。这是意料之中的,因为NTD(46-176)缺乏分子(177-419)的完整C-末端部分,因此缺乏许多天然表位。此外,由于NTD严格的单体特征,多克隆患者血清中可能靶向N的构象折叠二聚体和更高的寡聚体形式的许多抗冠状病毒不再能够识别和结合其靶分子。然而,我们用SARS CoV-2-NTD观察到的相当差的信号水平似乎仍然足以可靠地区分阳性和阴性血清(图11a+b,第1列)。这一发现也适用于来自OC43和HKU1的普通感冒冠状病毒(CCC)NTD(图11a+b,第2列和第5列)。从第2列可以推断,针对OC43的抗体的流行率似乎相当适中。对于这种 β 冠状病毒,我们在 Elecsys[®] 评估中发现许多具有接近系统固有背景的背景信号的血清。这表明OC43抗原通常具有极好的溶解性,特别是OC43抗原-钆缀合物。值得注意的是,我们还发现具有高信号水平和相当好的信号动态的血清,能够很好地区分阳性和阴性血清。至于NL63和229E,在第一次试验中,我们无法找到具有系统固有背景范围内信号的真阴性血清。所有测试的血清似乎都对NL63和229E二者呈抗CoV阳性(图11a+b,第3和4列),并且信号动态非常高。血清的真实阳性由参考测量证实,其中人血清分别被样品位置上的缓冲液和通用稀释剂替代。在这个实验设置中,NL63和229E二者的NTD都表现出在400-650计数范围内的显著低背景信号(图11b,底下三个“缓冲液”行)。这一发现在两个方面很重要:首先,它排除了测定中生物素化和钆化的NL63与229E NTD分子之间的特异性或

非特异性缔合反应,这将导致信号急剧增加。其次,它证实了NL63和229E的NTD-钆缀合物是高度可溶的,并且在 Elecsys[®] 测定中不会与链霉抗生物素蛋白包被的珠表面结合。总之,数据表明用人类血清测量的NL63和229E的高信号是真实有效的结果,突显出抗冠状病毒NL63和229E的抗体的流行率非常高——远高于OC43。图片由HKU1的数据完成(图11a+b,第5列)。这种冠状病毒株的流行率似乎也相当高,但与NL63和229E相比,我们确实发现了HKU1的真正阴性血清,其信号接近系统固有背景。根据我们非常初步的数据并且基于少量测试血清,很容易推断出分析小组中普通感冒冠状病毒OC43<HKU1<<NL63、229E的初步流行率排名。

[0391] 我们的结果可能是由于测试的少量血清而导致的偶然性,但似乎 α 冠状病毒229E和NL63已在分析的队列中传播,在之前的冬季特别有效,而OC43感染似乎相当稀少。

[0392] 总的来说,来自冠状病毒SARS-CoV-2、OC43、NL63、229E和HKU1的N抗原的N末端结构域的表达、纯化和修饰(即生物素化和钆基化)使我们能够建立一个相关普通感冒冠状病毒之间的简单血清学鉴别。鉴于SARS CoV-2在史无前例的大流行中无情地在世界范围内传播,我们的方法可能是一种简单的鉴别诊断的有吸引力的选择,可以将可能危及生命的SARS CoV-2感染与由四种众所周知的普通感冒病毒OC43、NL63、229E和HKU1之一引起的无害感冒区分开来。

[0393] 实例8:野生型SARS CoV-2核衣壳抗原的突变

[0394] 由于新出现的SARS CoV-2突变变体数量不断增加,我们产生了四种突变变体,其包含3、8、12或15个单点突变(见图12),并且其每一个表达为通过SEQ ID NO:7的接头融合到如上所述的两个EcSlyD单元。

[0395] 3MUT:SEQ ID NO:8

[0396] EcSlyD-EcSlyD-SARS CoV-2-N 3MUT:SEQ ID NO:9

[0397] 8MUT:SEQ ID NO:10

[0398] EcSlyD-EcSlyD-SARS CoV-2-N 8MUT:SEQ ID NO:11

[0399] 12MUT:SEQ ID NO:12

[0400] EcSlyD-EcSlyD-SARS CoV-2-N12MUT:SEQ ID NO:13

[0401] 15MUT:SEQ ID NO:14

[0402] EcSlyD-EcSlyD-SARS CoV-2-N15MUT:SEQ ID NO:15

[0403] 引入的单点突变对应于目前在人群中流行的SARS CoV-2突变的自然发生突变。最常见的流行突变是:

[0404] B.1.1.7 (UK) :D3L,S235F

[0405] B.1.525 (UK/尼日利亚) :D3,A12G,T205I

[0406] COH.20G/677H (俄亥俄州) :P67S、P199L、D377Y

[0407] B.1.351 (南非) :T205I

[0408] P.1 (B.1.1.28.1) :P80R,R203K

[0409] P.2 (巴西) :A119S

[0410] P.3 (菲律宾) :R203K,G204R

[0411] N.9 (巴西) :I292T

[0412] EPI_ISL_1360318 (印度) :R203M

[0413] 在图12中,包含在四个突变变体中的单个氨基酸交换用图案条和指定的氨基酸交换指示

[0414] 还引入了其他SARS CoV-2核衣壳单点突变,这些突变在人群中发现的频率低于上述突变,并在图12中以黑色条表示。这些是根据在<http://cov-glu.cvr.gla.ac.uk/#/home> (2021年2月24日17:11:05GMT更新) 上发布的CoV-GLU数据库选择的,是全世界受感染的个体中发现的最常见的突变。

[0415] 评估了包含三个 (3MUT) 或八个 (8MUT) 单点突变的两个变体,以评估核衣壳蛋白内所选突变对检测性能的影响。因此,我们在如上所述的双抗原夹心 (DAGS) 免疫测定形式中使用标记形式的核衣壳变体。

[0416] 来自50个个体的血清与野生型EcSlyD-EcSlyD-核衣壳融合蛋白或包含三个 (3MUT) 八个 (8MUT) 单点突变的蛋白质变体平行测试。计算变体的平均COI恢复并与野生型反应性进行比较 (参见表8和图13)。

[0417] 表8:WT对比于3MUT和8MUT的恢复

n=50	WT	3MUT	8MUT
最小值	100%	88%	71%
最大值	100%	108%	123%
平均值	100%	95%	85%
SD	0%	4%	12%
CV	0%	4%	14%

[0419] 在核衣壳蛋白序列中引入三个单点突变导致所有测试样品的反应性非常轻微降低 (5%)。由于这些点突变对应于在SARS-CoV-2的B.1.1.7 (D3L、S235F) 和B.1.351 (T205I) 变体中发现的氨基酸置换,我们得出结论, Elecsys抗SARS-CoV-2当与来自被广泛的英国或南非变种之一感染的个体的抗血清一起应用时,该测定可提供有效的结果。与野生型序列相比,即使蛋白质序列内多达8个氨基酸的交换仍然导致85%的平均COI恢复和更高的信号变化。重要的是,信号越接近截止 (COI=1.0), 变体与野生型核衣壳序列之间的反应性差异越小,确保样品分类为反应性或非反应性不受变体之一的影响。简而言之,尽管在核衣壳抗原内分别置换了三个 (D3L、T205I、S235F) 和八个 (P67S、D103Y、S194L、G204R、A220V、M234I、H300Y、A376T) 氨基酸残基,但我们在基于N的 Elecsys[®] 抗体测定中观察到几乎野生型反应性。我们从这些观察中得出结论,来自感染了迄今为止已知的SARS CoV-2变体之一的个体的阳性抗血清无论如何都将被检测为阳性。

[0420] 此外,我们发现3MUT、8MUT和15MUT变体采用天然构象 (即它们天然样折叠), 因为它们在分析凝胶过滤 (通过superdex 200柱) 中的洗脱行为等于野生型核衣壳抗原。在由于引入的突变导致部分或全局展开的情况下,预期分子会明显增大。我们的观察是,分别带有3、8和15个突变的N变体保持其全局折叠并显示出与野生型N蛋白几乎相同的洗脱行为。

序列表

<110> Roche Diagnostics Operations, Inc.

Roche Diagnostics GmbH

罗氏公司 (F. Hoffmann-La Roche AG)

<120> 用于抗体免疫测定的冠状核衣壳抗原

<130> P36075-W0

<150> EP 20171154.6

<151> 2020-04-23

<150> US 16/856162

<151> 2020-04-23

<150> EP 20173315.1

<151> 2020-05-06

<150> US 16/867750

<151> 2020-05-06

<150> EP 20178739.7

<151> 2020-06-08

<160> 22

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 419

<212> PRT

<213> 冠状病毒科

<400> 1

Met	Ser	Asp	Asn	Gly	Pro	Gln	Asn	Gln	Arg	Asn	Ala	Pro	Arg	Ile	Thr
1			5					10					15		
Phe	Gly	Gly	Pro	Ser	Asp	Ser	Thr	Gly	Ser	Asn	Gln	Asn	Gly	Glu	Arg
			20					25					30		
Ser	Gly	Ala	Arg	Ser	Lys	Gln	Arg	Arg	Pro	Gln	Gly	Leu	Pro	Asn	Asn
			35				40						45		
Thr	Ala	Ser	Trp	Phe	Thr	Ala	Leu	Thr	Gln	His	Gly	Lys	Glu	Asp	Leu
							55				60				
Lys	Phe	Pro	Arg	Gly	Gln	Gly	Val	Pro	Ile	Asn	Thr	Asn	Ser	Ser	Pro
65					70					75					80
Asp	Asp	Gln	Ile	Gly	Tyr	Tyr	Arg	Arg	Ala	Thr	Arg	Arg	Ile	Arg	Gly
					85					90				95	
Gly	Asp	Gly	Lys	Met	Lys	Asp	Leu	Ser	Pro	Arg	Trp	Tyr	Phe	Tyr	Tyr
							100			105				110	
Leu	Gly	Thr	Gly	Pro	Glu	Ala	Gly	Leu	Pro	Tyr	Gly	Ala	Asn	Lys	Asp

115	120	125
Gly Ile Ile Trp Val Ala Thr Glu Gly Ala Leu Asn Thr Pro Lys Asp		
130	135	140
His Ile Gly Thr Arg Asn Pro Ala Asn Asn Ala Ala Ile Val Leu Gln		
145	150	155
Leu Pro Gln Gly Thr Thr Leu Pro Lys Gly Phe Tyr Ala Glu Gly Ser		
165	170	175
Arg Gly Gly Ser Gln Ala Ser Ser Arg Ser Ser Ser Arg Ser Arg Asn		
180	185	190
Ser Ser Arg Asn Ser Thr Pro Gly Ser Ser Arg Gly Thr Ser Pro Ala		
195	200	205
Arg Met Ala Gly Asn Gly Gly Asp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Leu Leu		
210	215	220
Asp Arg Leu Asn Gln Leu Glu Ser Lys Met Ser Gly Lys Gly Gln Gln		
225	230	235
Gln Gln Gly Gln Thr Val Thr Lys Lys Ser Ala Ala Glu Ala Ser Lys		
245	250	255
Lys Pro Arg Gln Lys Arg Thr Ala Thr Lys Ala Tyr Asn Val Thr Gln		
260	265	270
Ala Phe Gly Arg Arg Gly Pro Glu Gln Thr Gln Gly Asn Phe Gly Asp		
275	280	285
Gln Glu Leu Ile Arg Gln Gly Thr Asp Tyr Lys His Trp Pro Gln Ile		
290	295	300
Ala Gln Phe Ala Pro Ser Ala Ser Ala Phe Phe Gly Met Ser Arg Ile		
305	310	315
Gly Met Glu Val Thr Pro Ser Gly Thr Trp Leu Thr Tyr Thr Gly Ala		
325	330	335
Ile Lys Leu Asp Asp Lys Asp Pro Asn Phe Lys Asp Gln Val Ile Leu		
340	345	350
Leu Asn Lys His Ile Asp Ala Tyr Lys Thr Phe Pro Pro Thr Glu Pro		
355	360	365
Lys Lys Asp Lys Lys Lys Lys Ala Asp Glu Thr Gln Ala Leu Pro Gln		
370	375	380
Arg Gln Lys Lys Gln Gln Thr Val Thr Leu Leu Pro Ala Ala Asp Leu		
385	390	395
Asp Asp Phe Ser Lys Gln Leu Gln Gln Ser Met Ser Ser Ala Asp Ser		
405	410	415
Thr Gln Ala		

<210> 2

Gln Gln Thr Val Thr Leu Leu Pro Ala Ala Asp Leu Asp Asp Phe Ser
 580 585 590
 Lys Gln Leu Gln Gln Ser Met Ser Ser Ala Asp Ser Thr Gln Ala
 595 600 605
 <210> 3
 <211> 794
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> EcSlyD-EcSlyD-CoV-2-N(1-419)
 <400> 3
 Met Lys Val Ala Lys Asp Leu Val Val Ser Leu Ala Tyr Gln Val Arg
 1 5 10 15
 Thr Glu Asp Gly Val Leu Val Asp Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro Leu
 20 25 30
 Asp Tyr Leu His Gly His Gly Ser Leu Ile Ser Gly Leu Glu Thr Ala
 35 40 45
 Leu Glu Gly His Glu Val Gly Asp Lys Phe Asp Val Ala Val Gly Ala
 50 55 60
 Asn Asp Ala Tyr Gly Gln Tyr Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val Pro
 65 70 75 80
 Lys Asp Val Phe Met Gly Val Asp Glu Leu Gln Val Gly Met Arg Phe
 85 90 95
 Leu Ala Glu Thr Asp Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala Val
 100 105 110
 Glu Asp Asp His Val Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln
 115 120 125
 Asn Leu Lys Phe Asn Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala Thr Glu
 130 135 140
 Glu Glu Leu Ala His Gly His Val His Gly Ala His Asp His His His
 145 150 155 160
 Asp His Asp His Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 165 170 175
 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Lys Val Ala Lys
 180 185 190
 Asp Leu Val Val Ser Leu Ala Tyr Gln Val Arg Thr Glu Asp Gly Val
 195 200 205
 Leu Val Asp Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro Leu Asp Tyr Leu His Gly
 210 215 220

530	535	540
Gly Phe Tyr Ala Glu Gly Ser Arg Gly Gly Ser Gln Ala Ser Ser Arg		
545	550	555
Ser Ser Ser Arg Ser Arg Asn Ser Ser Arg Asn Ser Thr Pro Gly Ser		
	565	570
Ser Arg Gly Thr Ser Pro Ala Arg Met Ala Gly Asn Gly Gly Asp Ala		
	580	585
Ala Leu Ala Leu Leu Leu Leu Asp Arg Leu Asn Gln Leu Glu Ser Lys		
	595	600
Met Ser Gly Lys Gly Gln Gln Gln Gln Gly Gln Thr Val Thr Lys Lys		
610	615	620
Ser Ala Ala Glu Ala Ser Lys Lys Pro Arg Gln Lys Arg Thr Ala Thr		
625	630	635
Lys Ala Tyr Asn Val Thr Gln Ala Phe Gly Arg Arg Gly Pro Glu Gln		
	645	650
Thr Gln Gly Asn Phe Gly Asp Gln Glu Leu Ile Arg Gln Gly Thr Asp		
	660	665
Tyr Lys His Trp Pro Gln Ile Ala Gln Phe Ala Pro Ser Ala Ser Ala		
675	680	685
Phe Phe Gly Met Ser Arg Ile Gly Met Glu Val Thr Pro Ser Gly Thr		
690	695	700
Trp Leu Thr Tyr Thr Gly Ala Ile Lys Leu Asp Asp Lys Asp Pro Asn		
705	710	715
Phe Lys Asp Gln Val Ile Leu Leu Asn Lys His Ile Asp Ala Tyr Lys		
	725	730
Thr Phe Pro Pro Thr Glu Pro Lys Lys Asp Lys Lys Lys Lys Ala Asp		
	740	745
Glu Thr Gln Ala Leu Pro Gln Arg Gln Lys Lys Gln Gln Thr Val Thr		
	755	760
Leu Leu Pro Ala Ala Asp Leu Asp Asp Phe Ser Lys Gln Leu Gln Gln		
770	775	780
Ser Met Ser Ser Ala Asp Ser Thr Gln Ala		
785	790	

<210> 4

<211> 1284

<212> DNA

<213> 冠状病毒科

<400> 4

atgagcgaca atggtccgca aaaccagcgt aatgcaccgc gcatcacgtt tggcgggtccg

60

tcagactcca	ccggcagcaa	ccagaatggc	gaacgcagtg	gtgcacgctc	gaaacaacgt	120
cgtccccagg	gtctgccgaa	caataccgcg	tcattggtta	cggccttgac	acaacatggg	180
aaagaggatc	tgaaatttcc	gcgtggtcag	ggcgttccga	tcaacacgaa	ctcttcgcct	240
gatgaccaga	ttggctatta	tcgccgtgct	actcgccgca	ttcgcggtgg	agatggtaaa	300
atgaaggatt	tgagtccccg	gtggtacttc	tactatctgg	gaactggacc	agaggcgggc	360
ttaccgtatg	gcgccaacaa	agatgggatc	atttgggtag	ctacggaagg	tgcgcttaac	420
accccgaag	accacattgg	gacgcgcaat	ccagcgaaca	atgctgcgat	tgtcctgcag	480
ttaccccaag	ggaccacgct	gccaaaaggc	ttctatgccg	aaggctcacg	tgcgcgctct	540
caagcgagta	gtcgcagctc	atcgcgcagc	cgcaactcta	gccggaattc	aacccaggt	600
agctctcgcg	gcaccagtcc	agcccgtatg	gctggtaatg	gaggcgatgc	agctttagcc	660
ctcctgcttc	tcgatcgget	taaccagctg	gagagcaaaa	tgtcgggtaa	agggcagcaa	720
cagcagggtc	agaccgttac	gaaaaaatcc	gcagcagaag	cgtccaaaaa	gccgcgtcag	780
aaacgcacag	ccaccaaaagc	gtataacgtg	actcaagctt	tcggacgtcg	tggtccggaa	840
caaaccagg	ggaatttcgg	tgaccaagaa	ctgattcgcc	aaggcaccga	ttacaaacat	900
tggccgcaga	ttgcgcagtt	tgcacctct	gcaagcgctt	tttccggcat	gagccgcatt	960
ggcatggaag	tactccgctc	gggcacatgg	ctgacctaca	cgggtgcgat	caagctggat	1020
gataaagacc	cgaatttcaa	agatcaggtg	atcctgctga	acaaacacat	cgatgcctac	1080
aaaacctttc	ctccgaccga	accgaaaaag	gacaagaaaa	agaaagcaga	cgagacacaa	1140
gcgctgcctc	agcgtcagaa	gaaacagcag	acggtgacce	tgttacctgc	cgcggtttg	1200
gatgactttt	cgaaacagct	ccaacagtcc	atgagttccg	ccgatagcac	tcaggcgctc	1260
gagcaccacc	accaccacca	ctga				1284

<210> 5

<211> 1848

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> EcSlyD-CoV-2N (1-419)

<400> 5

atgaaagtag	caaaagacct	ggtggtcagc	ctggcctatc	aggtacgtac	agaagacggt	60
gtgttggttg	atgagtctcc	ggtgagtgcg	ccgctggact	acctgcatgg	tcacggttcc	120
ctgatctctg	gcctggaaac	ggcgcctggaa	ggatcatgaag	ttggcgacaa	atttgatgtc	180
gctgttggcg	cgaacgacgc	ttacggtcag	tacgacgaaa	acctggtgca	acgtgttctc	240
aaagacgtat	ttatgggcgt	tgatgaactg	caggtaggta	tgcgtttcct	ggctgaaacc	300
gaccagggtc	cggtagcggg	tgaaatcaact	gcggttgaag	acgatcacgt	cgtggttgat	360
ggtaaccaca	tgctggccgg	tcagaacctg	aaattcaacg	ttgaagttgt	ggcgattcgc	420
gaagcgactg	aagaagaact	ggctcatggt	cacgttcacg	gcgcgcacga	tcaccaccac	480
gatcacgacc	acgacggtgg	cggttccggc	ggtggctctg	gtggcggatc	cggtagcggg	540
tccggcggtg	gctctggtgg	cggtagtagc	gacaatggtc	cgcaaaacca	gcgtaatgca	600
ccgcgcacatca	cgtttggcgg	tccgtcagac	tccaccggca	gcaaccagaa	tgcgcaacgc	660

agtgggtgcac gctcgaaca acgtcgtccc cagggctctgc cgaacaatac cgcgtcatgg	720
tttacggcct tgacacaaca tgggaaagag gatctgaaat ttccgcgtgg tcagggcgtt	780
ccgatcaaca cgaactcttc gcctgatgac cagattggct attatcgccg tgctactcgc	840
cgcattcgcg gtggagatgg taaaatgaag gatttgagtc cccggtggtta cttctactat	900
ctgggaactg gaccagaggc gggcttaccg tatggcgcca acaaagatgg gatcatttgg	960
gtagctacgg aaggtgcgct taacacccc aaagaccaca ttgggacgcg caatccagcg	1020
aacaatgctg cgattgtcct gcagttacc caagggacca cgctgcaaaa aggcttctat	1080
gccgaaggct cacgtggcgg ctctcaagcg agtagtcga gctcatcgcg cagccgcaac	1140
tctagccgga attcaacccc aggtagctct cgcggcacca gtccagcccg tatggctggt	1200
aatggaggcg atgcagcttt agccctctg cttctcgatc ggcttaacca gctggagagc	1260
aaaatgtcgg gtaaagggca gcaacagcag ggtcagaccg ttacgaaaa atccgcagca	1320
gaagcgtcca aaaagccgcg tcagaaacgc acagccacca aagcgtataa cgtgactcaa	1380
gctttcggac gtcgtggtcc ggaacaaacc caggggaatt tcggtgacca agaactgatt	1440
cgccaaggca ccgattacaa acattggccg cagattgcgc agtttgcacc ctctgcaagc	1500
gcctttttcg gcatgagccg cattggcatg gaagtcactc cgtcgggcac atggctgacc	1560
tacacgggtg cgatcaagct ggatgataaa gaccgaatt tcaaagatca ggtgatcctg	1620
ctgaacaaac acatcgatgc ctacaaaacc tttctccga ccgaaccgaa aaaggacaag	1680
aaaaagaaaag cagacgagac acaagcgtg cctcagcgtc agaagaaaca gcagacggtg	1740
accctgttac ctgccgcgga tttggatgac ttttcgaaac agtccaaca gtccatgagt	1800
tccgccgata gcactcaggc gctcgagcac caccaccacc accactga	1848

<210> 6

<211> 2409

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> EcSlyD-EcSlyD-CoV-2-N(1-419)

<400> 6

atgaaagtag caaaagacct ggtggtcagc ctggcctatc aggtacgtac agaagacggt	60
gtgttggttg atgagtctcc ggtgagtgcg ccgctggact acctgcatgg tcacggttcc	120
ctgatctctg gcctggaaac ggcgctggaa ggtcatgaag ttggcgacaa atttgatgtc	180
gctgttggcg cgaacgacgc ttacggtcag tacgacgaaa acctggtgca acgtgttctc	240
aaagacgtat ttatgggcgt tgatgaactg caggtaggtta tgcgtttcct ggctgaaacc	300
gaccagggtc cggtaaccggt tgaaatcaact gcggttgaag acgatcacgt cgtggttgat	360
ggtaaccaca tgctggccgg tcagaacctg aaattcaacg ttgaagttgt ggcgattcgc	420
gaagcgactg aagaagaact ggctcatggt cacgttcacg gcgcgcacga tcaccaccac	480
gatcacgacc acgacggtgg cggttccggc ggtggctctg gtggcggaag cggcggaggc	540
tctgggggcg gatcaggcgg tggaaaggtc gcgaaagatc tcgtagtgag cctcgtttac	600
caagtgcgca ctgaggatgg ggttctggtta gacgaatcac ccgtatcggc accgctcgat	660
tatttgcacg gccatggtag cctaattagt ggtttagaga cagcacttga gggacacgag	720

gtcggtgata agttcgacgt tgcagtggga gctaattgatg cctatgggca atatgatgag	780
aatctcgttc agcgcgtgcc gaaggatgtg ttcatgggtg tagacgagct ccaagtgggc	840
atgcggtttc ttgccgagac ggatcaaggc cctgtgccag tcgagattac cgcagtggag	900
gatgaccatg ttgtcgtgga cggaaatcac atgttagcgg gacaaaattt gaaatttaat	960
gtcagagtcg tcgctatccg tgaggccacc gaagaagagc ttgcacacgg ccatgtccat	1020
ggtgccccatg accatcacca tgaccatgat catgatggcg gtgggtcggg tgggggaagt	1080
gggggtggat ccggtggcgg ttccggcggg ggctctgggt gcggtatgag cgacaatggt	1140
ccgcaaaaacc agcgtaatgc accgcgcac acgtttggcg gtccgtcaga ctccaccggc	1200
agcaaccaga atggcgaacg cagtggtgca cgctcgaac aacgtcgtcc ccagggtctg	1260
ccgaacaata ccgcgtcatg gtttacggcc ttgacacaac atgggaaaga ggatctgaaa	1320
tttccgcgtg gtcagggcgt tccgatcaac acgaactctt cgctgatga ccagattggc	1380
tattatcgcc gtgctactcg ccgcattcgc ggtggagatg gtaaaatgaa ggatttgagt	1440
ccccggtggt acttctaacta tctgggaact ggaccagagg cgggcttacc gtatggcgcc	1500
aacaaagatg ggatcatttg ggtagctacg gaaggtgcgc ttaacacccc gaaagaccac	1560
attgggacgc gcaatccagc gaacaatgct gcgattgtcc tgcagttacc ccaagggacc	1620
acgctgccaa aaggcttcta tgccgaaggc tcacgtggcg gctctcaagc gagtagtcgc	1680
agctcatcgc gcagccgcaa ctctagccgg aattcaaccc caggtagctc tcgcggcacc	1740
agtccagccc gtatggctgg taatggaggc gatgcagctt tagccctcct gcttctcgat	1800
cggcttaacc agctggagag caaaatgtcg ggtaaagggc agcaacagca gggtcagacc	1860
gttacgaaaa aatccgcagc agaagcgtcc aaaaagccgc gtcagaaacg cacagccacc	1920
aaagcgtata acgtgactca agctttcgga cgtcgtggte cggacaacac ccaggggaat	1980
ttcggtgacc aagaactgat tcgccaaggc accgattaca aacattggcc gcagattgcg	2040
cagtttgcac cctctgcaag cgcctttttc ggcatgagcc gcattggcat ggaagtact	2100
ccgtcgggca catggctgac ctacacgggt gcgatcaagc tggatgataa agaccgcaat	2160
ttcaaagatc aggtgatcct gctgaacaaa cacatcgatg cctacaaaac ctttctcctg	2220
accgaaccga aaaaggacaa gaaaaagaaa gcagacgaga cacaagcgt gcctcagcgt	2280
cagaagaaac agcagacggt gaccctgta cctgccgcg atttggatga cttttcgaaa	2340
cagctccaac agtccatgag ttccgccgat agcactcagg cgctcgagca ccaccaccac	2400
caccactga	2409

<210> 7

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头序列

<400> 7

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1

5

10

15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

20

<210> 8

<211> 420

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 3 MUT

<400> 8

Met Ser Leu Asn Gly Pro Gln Asn Gln Arg Asn Ala Pro Arg Ile Thr
1 5 10 15
Phe Gly Gly Pro Ser Asp Ser Thr Gly Ser Asn Gln Asn Gly Glu Arg
 20 25 30
Ser Gly Ala Arg Ser Lys Gln Arg Arg Pro Gln Gly Leu Pro Asn Asn
 35 40 45
Thr Ala Ser Trp Phe Thr Ala Leu Thr Gln His Gly Lys Glu Asp Leu
 50 55 60
Lys Phe Pro Arg Gly Gln Gly Val Pro Ile Asn Thr Asn Ser Ser Pro
65 70 75 80
Asp Asp Gln Ile Gly Tyr Tyr Arg Arg Ala Thr Arg Arg Ile Arg Gly
 85 90 95
Gly Asp Gly Lys Met Lys Asp Leu Ser Pro Arg Trp Tyr Phe Tyr Tyr
 100 105 110
Leu Gly Thr Gly Pro Glu Ala Gly Leu Pro Tyr Gly Ala Asn Lys Asp
 115 120 125
Gly Ile Ile Trp Val Ala Thr Glu Gly Ala Leu Asn Thr Pro Lys Asp
 130 135 140
His Ile Gly Thr Arg Asn Pro Ala Asn Asn Ala Ala Ile Val Leu Gln
145 150 155 160
Leu Pro Gln Gly Thr Thr Leu Pro Lys Gly Phe Tyr Ala Glu Gly Ser
 165 170 175
Arg Gly Gly Ser Gln Ala Ser Ser Arg Ser Ser Ser Arg Ser Arg Asn
 180 185 190
Ser Ser Arg Asn Ser Thr Pro Gly Ser Ser Arg Gly Ile Ser Pro Ala
 195 200 205
Arg Met Ala Gly Asn Gly Gly Asp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Leu Leu
 210 215 220
Asp Arg Leu Asn Gln Leu Glu Ser Lys Met Phe Gly Lys Gly Gln Gln
225 230 235 240
Gln Gln Gly Gln Thr Val Thr Lys Lys Ser Ala Ala Glu Ala Ser Lys

65	70	75	80
Lys Asp Val Phe Met Gly Val Asp Glu Leu Gln Val Gly Met Arg Phe			
	85	90	95
Leu Ala Glu Thr Asp Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala Val			
	100	105	110
Glu Asp Asp His Val Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln			
	115	120	125
Asn Leu Lys Phe Asn Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala Thr Glu			
	130	135	140
Glu Glu Leu Ala His Gly His Val His Gly Ala His Asp His His His			
	145	150	155
Asp His Asp His Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly			
	165	170	175
Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Lys Val Ala Lys			
	180	185	190
Asp Leu Val Val Ser Leu Ala Tyr Gln Val Arg Thr Glu Asp Gly Val			
	195	200	205
Leu Val Asp Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro Leu Asp Tyr Leu His Gly			
	210	215	220
His Gly Ser Leu Ile Ser Gly Leu Glu Thr Ala Leu Glu Gly His Glu			
	225	230	235
Val Gly Asp Lys Phe Asp Val Ala Val Gly Ala Asn Asp Ala Tyr Gly			
	245	250	255
Gln Tyr Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val Pro Lys Asp Val Phe Met			
	260	265	270
Gly Val Asp Glu Leu Gln Val Gly Met Arg Phe Leu Ala Glu Thr Asp			
	275	280	285
Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala Val Glu Asp Asp His Val			
	290	295	300
Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln Asn Leu Lys Phe Asn			
	305	310	315
Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala Thr Glu Glu Glu Leu Ala His			
	325	330	335
Gly His Val His Gly Ala His Asp His His His Asp His Asp His Asp			
	340	345	350
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser			
	355	360	365
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Met Ser Leu Asn Gly Pro Gln Asn Gln			
	370	375	380

Arg Asn Ala Pro Arg Ile Thr Phe Gly Gly Pro Ser Asp Ser Thr Gly			
385	390	395	400
Ser Asn Gln Asn Gly Glu Arg Ser Gly Ala Arg Ser Lys Gln Arg Arg			
	405	410	415
Pro Gln Gly Leu Pro Asn Asn Thr Ala Ser Trp Phe Thr Ala Leu Thr			
	420	425	430
Gln His Gly Lys Glu Asp Leu Lys Phe Pro Arg Gly Gln Gly Val Pro			
	435	440	445
Ile Asn Thr Asn Ser Ser Pro Asp Asp Gln Ile Gly Tyr Tyr Arg Arg			
	450	455	460
Ala Thr Arg Arg Ile Arg Gly Gly Asp Gly Lys Met Lys Asp Leu Ser			
465	470	475	480
Pro Arg Trp Tyr Phe Tyr Tyr Leu Gly Thr Gly Pro Glu Ala Gly Leu			
	485	490	495
Pro Tyr Gly Ala Asn Lys Asp Gly Ile Ile Trp Val Ala Thr Glu Gly			
	500	505	510
Ala Leu Asn Thr Pro Lys Asp His Ile Gly Thr Arg Asn Pro Ala Asn			
	515	520	525
Asn Ala Ala Ile Val Leu Gln Leu Pro Gln Gly Thr Thr Leu Pro Lys			
	530	535	540
Gly Phe Tyr Ala Glu Gly Ser Arg Gly Gly Ser Gln Ala Ser Ser Arg			
545	550	555	560
Ser Ser Ser Arg Ser Arg Asn Ser Ser Arg Asn Ser Thr Pro Gly Ser			
	565	570	575
Ser Arg Gly Ile Ser Pro Ala Arg Met Ala Gly Asn Gly Gly Asp Ala			
	580	585	590
Ala Leu Ala Leu Leu Leu Leu Asp Arg Leu Asn Gln Leu Glu Ser Lys			
	595	600	605
Met Phe Gly Lys Gly Gln Gln Gln Gln Gly Gln Thr Val Thr Lys Lys			
	610	615	620
Ser Ala Ala Glu Ala Ser Lys Lys Pro Arg Gln Lys Arg Thr Ala Thr			
625	630	635	640
Lys Ala Tyr Asn Val Thr Gln Ala Phe Gly Arg Arg Gly Pro Glu Gln			
	645	650	655
Thr Gln Gly Asn Phe Gly Asp Gln Glu Leu Ile Arg Gln Gly Thr Asp			
	660	665	670
Tyr Lys His Trp Pro Gln Ile Ala Gln Phe Ala Pro Ser Ala Ser Ala			
	675	680	685
Phe Phe Gly Met Ser Arg Ile Gly Met Glu Val Thr Pro Ser Gly Thr			

690	695	700
Trp Leu Thr Tyr Thr Gly Ala Ile Lys Leu Asp Asp Lys Asp Pro Asn		
705	710	715
Phe Lys Asp Gln Val Ile Leu Leu Asn Lys His Ile Asp Ala Tyr Lys		
	725	730
Thr Phe Pro Pro Thr Glu Pro Lys Lys Asp Lys Lys Lys Lys Ala Asp		
	740	745
Glu Thr Gln Ala Leu Pro Gln Arg Gln Lys Lys Gln Gln Thr Val Thr		
	755	760
Leu Leu Pro Ala Ala Asp Leu Asp Asp Phe Ser Lys Gln Leu Gln Gln		
	770	780
Ser Met Ser Ser Ala Asp Ser Thr Gln Ala Glu		
785	790	795
<210> 10		
<211> 421		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 8 MUT		
<400> 10		
Met Ser Asp Asn Gly Pro Gln Asn Gln Arg Asn Ala Pro Arg Ile Thr		
1	5	10
Phe Gly Gly Pro Ser Asp Ser Thr Gly Ser Asn Gln Asn Gly Glu Arg		
	20	25
Ser Gly Ala Arg Ser Lys Gln Arg Arg Pro Gln Gly Leu Pro Asn Asn		
	35	40
Thr Ala Ser Trp Phe Thr Ala Leu Thr Gln His Gly Lys Glu Asp Leu		
	50	55
Lys Phe Ser Arg Gly Gln Gly Val Pro Ile Asn Thr Asn Ser Ser Pro		
65	70	75
Asp Asp Gln Ile Gly Tyr Tyr Arg Arg Ala Thr Arg Arg Ile Arg Gly		
	85	90
Gly Asp Gly Lys Met Lys Tyr Leu Ser Pro Arg Trp Tyr Phe Tyr Tyr		
	100	105
Leu Gly Thr Gly Pro Glu Ala Gly Leu Pro Tyr Gly Ala Asn Lys Asp		
	115	120
Gly Ile Ile Trp Val Ala Thr Glu Gly Ala Leu Asn Thr Pro Lys Asp		
	130	135
His Ile Gly Thr Arg Asn Pro Ala Asn Asn Ala Ala Ile Val Leu Gln		

145	150	155	160
Leu Pro Gln Gly Thr	Thr Leu Pro Lys Gly Phe Tyr Ala Glu Gly Ser		
	165	170	175
Arg Gly Gly Ser Gln Ala Ser Ser Arg Ser Ser Ser Arg Ser Arg Asn			
	180	185	190
Ser Leu Arg Asn Ser Thr Pro Gly Ser Ser Arg Arg Thr Ser Pro Ala			
	195	200	205
Arg Met Ala Gly Asn Gly Gly Asp Ala Ala Leu Val Leu Leu Leu Leu			
	210	215	220
Asp Arg Leu Asn Gln Leu Glu Ser Lys Ile Ser Gly Lys Gly Gln Gln			
225	230	235	240
Gln Gln Gly Gln Thr Val Thr Lys Lys Ser Ala Ala Glu Ala Ser Lys			
	245	250	255
Lys Pro Arg Gln Lys Arg Thr Ala Thr Lys Ala Tyr Asn Val Thr Gln			
	260	265	270
Ala Phe Gly Arg Arg Gly Pro Glu Gln Thr Gln Gly Asn Phe Gly Asp			
	275	280	285
Gln Glu Leu Ile Arg Gln Gly Thr Asp Tyr Lys Tyr Trp Pro Gln Ile			
	290	295	300
Ala Gln Phe Ala Pro Ser Ala Ser Ala Phe Phe Gly Met Ser Arg Ile			
305	310	315	320
Gly Met Glu Val Thr Pro Ser Gly Thr Trp Leu Thr Tyr Thr Gly Ala			
	325	330	335
Ile Lys Leu Asp Asp Lys Asp Pro Asn Phe Lys Asp Gln Val Ile Leu			
	340	345	350
Leu Asn Lys His Ile Asp Ala Tyr Lys Thr Phe Pro Pro Thr Glu Pro			
	355	360	365
Lys Lys Asp Lys Lys Lys Lys Thr Asp Glu Thr Gln Ala Leu Pro Gln			
	370	375	380
Arg Gln Lys Lys Gln Gln Thr Val Thr Leu Leu Pro Ala Ala Asp Leu			
385	390	395	400
Asp Asp Phe Ser Lys Gln Leu Gln Gln Ser Met Ser Ser Ala Asp Ser			
	405	410	415
Thr Gln Ala Leu Glu			
	420		

<210> 11

<211> 796

<212> PRT

<213> 人工序列

Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala Val Glu Asp Asp His Val
 290 295 300
 Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln Asn Leu Lys Phe Asn
 305 310 315 320
 Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala Thr Glu Glu Glu Leu Ala His
 325 330 335
 Gly His Val His Gly Ala His Asp His His His Asp His Asp His Asp
 340 345 350
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 355 360 365
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Met Ser Asp Asn Gly Pro Gln Asn Gln
 370 375 380
 Arg Asn Ala Pro Arg Ile Thr Phe Gly Gly Pro Ser Asp Ser Thr Gly
 385 390 395 400
 Ser Asn Gln Asn Gly Glu Arg Ser Gly Ala Arg Ser Lys Gln Arg Arg
 405 410 415
 Pro Gln Gly Leu Pro Asn Asn Thr Ala Ser Trp Phe Thr Ala Leu Thr
 420 425 430
 Gln His Gly Lys Glu Asp Leu Lys Phe Ser Arg Gly Gln Gly Val Pro
 435 440 445
 Ile Asn Thr Asn Ser Ser Pro Asp Asp Gln Ile Gly Tyr Tyr Arg Arg
 450 455 460
 Ala Thr Arg Arg Ile Arg Gly Gly Asp Gly Lys Met Lys Tyr Leu Ser
 465 470 475 480
 Pro Arg Trp Tyr Phe Tyr Tyr Leu Gly Thr Gly Pro Glu Ala Gly Leu
 485 490 495
 Pro Tyr Gly Ala Asn Lys Asp Gly Ile Ile Trp Val Ala Thr Glu Gly
 500 505 510
 Ala Leu Asn Thr Pro Lys Asp His Ile Gly Thr Arg Asn Pro Ala Asn
 515 520 525
 Asn Ala Ala Ile Val Leu Gln Leu Pro Gln Gly Thr Thr Leu Pro Lys
 530 535 540
 Gly Phe Tyr Ala Glu Gly Ser Arg Gly Gly Ser Gln Ala Ser Ser Arg
 545 550 555 560
 Ser Ser Ser Arg Ser Arg Asn Ser Leu Arg Asn Ser Thr Pro Gly Ser
 565 570 575
 Ser Arg Arg Thr Ser Pro Ala Arg Met Ala Gly Asn Gly Gly Asp Ala
 580 585 590
 Ala Leu Val Leu Leu Leu Leu Asp Arg Leu Asn Gln Leu Glu Ser Lys

595	600	605
Ile Ser Gly Lys Gly Gln Gln Gln Gln Gly Gln Thr Val Thr Lys Lys		
610	615	620
Ser Ala Ala Glu Ala Ser Lys Lys Pro Arg Gln Lys Arg Thr Ala Thr		
625	630	635
Lys Ala Tyr Asn Val Thr Gln Ala Phe Gly Arg Arg Gly Pro Glu Gln		
645	650	655
Thr Gln Gly Asn Phe Gly Asp Gln Glu Leu Ile Arg Gln Gly Thr Asp		
660	665	670
Tyr Lys Tyr Trp Pro Gln Ile Ala Gln Phe Ala Pro Ser Ala Ser Ala		
675	680	685
Phe Phe Gly Met Ser Arg Ile Gly Met Glu Val Thr Pro Ser Gly Thr		
690	695	700
Trp Leu Thr Tyr Thr Gly Ala Ile Lys Leu Asp Asp Lys Asp Pro Asn		
705	710	715
Phe Lys Asp Gln Val Ile Leu Leu Asn Lys His Ile Asp Ala Tyr Lys		
725	730	735
Thr Phe Pro Pro Thr Glu Pro Lys Lys Asp Lys Lys Lys Lys Thr Asp		
740	745	750
Glu Thr Gln Ala Leu Pro Gln Arg Gln Lys Lys Gln Gln Thr Val Thr		
755	760	765
Leu Leu Pro Ala Ala Asp Leu Asp Asp Phe Ser Lys Gln Leu Gln Gln		
770	775	780
Ser Met Ser Ser Ala Asp Ser Thr Gln Ala Leu Glu		
785	790	795
<210> 12		
<211> 421		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 12MUT		
<400> 12		
Met Ser Asp Asn Gly Pro Gln Asn Gln Arg Asn Gly Pro Arg Ile Thr		
1	5	10
Phe Gly Gly Pro Ser Asp Ser Thr Gly Ser Asn Gln Asn Gly Glu Arg		
20	25	30
Ser Gly Ala Arg Ser Lys Gln Arg Arg Pro Gln Gly Leu Pro Asn Asn		
35	40	45
Thr Ala Ser Trp Phe Thr Ala Leu Thr Gln His Gly Lys Glu Asp Leu		

50	55	60
Lys Phe Pro Arg Gly Gln Gly Val Pro Ile Asn Thr Asn Ser Ser Arg		
65	70	75
Asp Asp Gln Ile Gly Tyr Tyr Arg Arg Ala Thr Arg Arg Ile Arg Ser		
	85	90
Gly Asp Gly Lys Met Lys Tyr Leu Ser Pro Arg Trp Tyr Phe Tyr Tyr		
	100	105
Leu Gly Thr Gly Pro Glu Ser Gly Leu Pro Tyr Gly Ala Asn Lys Asp		
	115	120
Gly Ile Ile Trp Val Ala Thr Glu Gly Ala Leu Asn Thr Pro Lys Asp		
	130	135
Tyr Ile Gly Thr Arg Asn Pro Ala Asn Asn Ala Ala Ile Val Leu Gln		
145	150	155
Leu Pro Gln Gly Thr Thr Leu Pro Lys Gly Phe Tyr Ala Glu Gly Ser		
	165	170
Arg Gly Gly Ser Gln Ala Tyr Ser Arg Ser Ser Ser Arg Ser Arg Asn		
	180	185
Ser Ser Arg Asn Ser Thr Pro Gly Ser Ser Met Gly Ile Ser Pro Ala		
	195	200
Arg Met Ala Gly Asn Gly Gly Asp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Leu Leu		
	210	215
Asp Arg Leu Asn Gln Leu Glu Ser Lys Met Ser Gly Lys Gly Gln Gln		
225	230	235
Gln Gln Gly Gln Thr Val Thr Lys Lys Ser Ala Ala Glu Ala Ser Lys		
	245	250
Lys Pro Arg Gln Lys Arg Thr Ala Thr Lys Ala Tyr Asn Val Thr Gln		
	260	265
Ala Phe Gly Arg Arg Gly Pro Glu Gln Thr Gln Gly Asn Phe Gly Asp		
	275	280
Gln Glu Leu Thr Arg Gln Gly Thr Asp Tyr Lys His Trp Pro Gln Ile		
	290	295
Ala Gln Phe Ala Pro Ser Ala Ser Ala Phe Phe Gly Met Ser Arg Ile		
305	310	315
Gly Met Glu Val Thr Pro Ser Gly Thr Trp Leu Thr Tyr Thr Gly Ala		
	325	330
Ile Lys Leu Asp Asp Lys Asp Pro Asn Phe Lys Asp Gln Val Ile Leu		
	340	345
Leu Asn Lys His Ile Asp Ala Tyr Lys Thr Phe Pro Pro Thr Glu Pro		
	355	360
		365

Lys Lys Asp Lys Lys Lys Lys Ala Asp Glu Thr Gln Ala Leu Pro Gln
 370 375 380
 Arg Gln Lys Lys Gln Gln Ile Val Thr Leu Leu Pro Ala Ala Asp Leu
 385 390 395 400
 Tyr Asp Phe Ser Lys Gln Leu Gln Gln Ser Met Ser Ser Ala Asp Ser
 405 410 415
 Thr Gln Ala Leu Glu
 420
 <210> 13
 <211> 796
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> EcSlyD-EcSlyD-12MUT
 <400> 13
 Met Lys Val Ala Lys Asp Leu Val Val Ser Leu Ala Tyr Gln Val Arg
 1 5 10 15
 Thr Glu Asp Gly Val Leu Val Asp Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro Leu
 20 25 30
 Asp Tyr Leu His Gly His Gly Ser Leu Ile Ser Gly Leu Glu Thr Ala
 35 40 45
 Leu Glu Gly His Glu Val Gly Asp Lys Phe Asp Val Ala Val Gly Ala
 50 55 60
 Asn Asp Ala Tyr Gly Gln Tyr Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val Pro
 65 70 75 80
 Lys Asp Val Phe Met Gly Val Asp Glu Leu Gln Val Gly Met Arg Phe
 85 90 95
 Leu Ala Glu Thr Asp Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala Val
 100 105 110
 Glu Asp Asp His Val Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln
 115 120 125
 Asn Leu Lys Phe Asn Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala Thr Glu
 130 135 140
 Glu Glu Leu Ala His Gly His Val His Gly Ala His Asp His His His
 145 150 155 160
 Asp His Asp His Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 165 170 175
 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Lys Val Ala Lys
 180 185 190

Asp Leu Val Val Ser Leu Ala Tyr Gln Val Arg Thr Glu Asp Gly Val
 195 200 205
 Leu Val Asp Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro Leu Asp Tyr Leu His Gly
 210 215 220
 His Gly Ser Leu Ile Ser Gly Leu Glu Thr Ala Leu Glu Gly His Glu
 225 230 235 240
 Val Gly Asp Lys Phe Asp Val Ala Val Gly Ala Asn Asp Ala Tyr Gly
 245 250 255
 Gln Tyr Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val Pro Lys Asp Val Phe Met
 260 265 270
 Gly Val Asp Glu Leu Gln Val Gly Met Arg Phe Leu Ala Glu Thr Asp
 275 280 285
 Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala Val Glu Asp Asp His Val
 290 295 300
 Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln Asn Leu Lys Phe Asn
 305 310 315 320
 Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala Thr Glu Glu Glu Leu Ala His
 325 330 335
 Gly His Val His Gly Ala His Asp His His His Asp His Asp His Asp
 340 345 350
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 355 360 365
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Met Ser Asp Asn Gly Pro Gln Asn Gln
 370 375 380
 Arg Asn Gly Pro Arg Ile Thr Phe Gly Gly Pro Ser Asp Ser Thr Gly
 385 390 395 400
 Ser Asn Gln Asn Gly Glu Arg Ser Gly Ala Arg Ser Lys Gln Arg Arg
 405 410 415
 Pro Gln Gly Leu Pro Asn Asn Thr Ala Ser Trp Phe Thr Ala Leu Thr
 420 425 430
 Gln His Gly Lys Glu Asp Leu Lys Phe Pro Arg Gly Gln Gly Val Pro
 435 440 445
 Ile Asn Thr Asn Ser Ser Arg Asp Asp Gln Ile Gly Tyr Tyr Arg Arg
 450 455 460
 Ala Thr Arg Arg Ile Arg Ser Gly Asp Gly Lys Met Lys Tyr Leu Ser
 465 470 475 480
 Pro Arg Trp Tyr Phe Tyr Tyr Leu Gly Thr Gly Pro Glu Ser Gly Leu
 485 490 495
 Pro Tyr Gly Ala Asn Lys Asp Gly Ile Ile Trp Val Ala Thr Glu Gly

500	505	510
Ala Leu Asn Thr Pro Lys Asp Tyr Ile Gly Thr Arg Asn Pro Ala Asn		
515	520	525
Asn Ala Ala Ile Val Leu Gln Leu Pro Gln Gly Thr Thr Leu Pro Lys		
530	535	540
Gly Phe Tyr Ala Glu Gly Ser Arg Gly Gly Ser Gln Ala Tyr Ser Arg		
545	550	555
Ser Ser Ser Arg Ser Arg Asn Ser Ser Arg Asn Ser Thr Pro Gly Ser		
565	570	575
Ser Met Gly Ile Ser Pro Ala Arg Met Ala Gly Asn Gly Gly Asp Ala		
580	585	590
Ala Leu Ala Leu Leu Leu Leu Asp Arg Leu Asn Gln Leu Glu Ser Lys		
595	600	605
Met Ser Gly Lys Gly Gln Gln Gln Gln Gly Gln Thr Val Thr Lys Lys		
610	615	620
Ser Ala Ala Glu Ala Ser Lys Lys Pro Arg Gln Lys Arg Thr Ala Thr		
625	630	635
Lys Ala Tyr Asn Val Thr Gln Ala Phe Gly Arg Arg Gly Pro Glu Gln		
645	650	655
Thr Gln Gly Asn Phe Gly Asp Gln Glu Leu Thr Arg Gln Gly Thr Asp		
660	665	670
Tyr Lys His Trp Pro Gln Ile Ala Gln Phe Ala Pro Ser Ala Ser Ala		
675	680	685
Phe Phe Gly Met Ser Arg Ile Gly Met Glu Val Thr Pro Ser Gly Thr		
690	695	700
Trp Leu Thr Tyr Thr Gly Ala Ile Lys Leu Asp Asp Lys Asp Pro Asn		
705	710	715
Phe Lys Asp Gln Val Ile Leu Leu Asn Lys His Ile Asp Ala Tyr Lys		
725	730	735
Thr Phe Pro Pro Thr Glu Pro Lys Lys Asp Lys Lys Lys Lys Ala Asp		
740	745	750
Glu Thr Gln Ala Leu Pro Gln Arg Gln Lys Lys Gln Gln Ile Val Thr		
755	760	765
Leu Leu Pro Ala Ala Asp Leu Tyr Asp Phe Ser Lys Gln Leu Gln Gln		
770	775	780
Ser Met Ser Ser Ala Asp Ser Thr Gln Ala Leu Glu		
785	790	795

<210> 14

<211> 421

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 15MUT
 <400> 14
 Met Ser Leu Asn Gly Pro Gln Asn Gln Arg Asn Ala Pro Arg Ile Thr
 1 5 10 15
 Phe Gly Gly Pro Ser Asp Ser Thr Gly Ser Asn Gln Asn Gly Glu Arg
 20 25 30
 Ser Gly Ala Arg Ser Lys Gln Arg Arg Pro Gln Gly Leu Pro Asn Asn
 35 40 45
 Thr Ala Ser Trp Phe Thr Ala Leu Thr Gln His Gly Lys Glu Asp Leu
 50 55 60
 Lys Phe Ser Arg Gly Gln Gly Val Pro Ile Asn Thr Asn Ser Ser Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Gln Ile Gly Tyr Tyr Arg Arg Ala Thr Arg Arg Ile Arg Gly
 85 90 95
 Gly Asp Gly Lys Met Lys Asp Leu Ser Pro Arg Trp Tyr Phe Tyr Tyr
 100 105 110
 Leu Gly Thr Gly Pro Glu Ala Gly Leu Pro Tyr Gly Ala Asn Lys Asp
 115 120 125
 Gly Ile Ile Trp Val Ala Thr Glu Gly Ala Leu Asn Thr Pro Lys Asp
 130 135 140
 His Ile Gly Thr Arg Asn Leu Ala Asn Asn Ala Ala Ile Val Leu Gln
 145 150 155 160
 Leu Pro Gln Gly Thr Thr Leu Pro Lys Gly Phe Tyr Ala Glu Gly Ser
 165 170 175
 Arg Gly Gly Ser Gln Ala Ser Ser Arg Ser Ser Ser Arg Ser Arg Asn
 180 185 190
 Ser Leu Arg Asn Ser Thr Leu Gly Ser Ser Lys Arg Ile Ser Pro Ala
 195 200 205
 Arg Met Ala Gly Asn Gly Gly Asp Ala Ala Leu Val Leu Leu Leu
 210 215 220
 Asp Arg Leu Asn Gln Leu Glu Ser Lys Ile Phe Gly Lys Gly Gln Gln
 225 230 235 240
 Gln Gln Gly Gln Thr Val Thr Lys Lys Ser Ala Ala Glu Ala Ser Lys
 245 250 255
 Lys Pro Arg Gln Lys Arg Thr Ala Thr Lys Ala Tyr Asn Val Thr Gln
 260 265 270

Ala Phe Gly Arg Arg Gly Pro Glu Gln Thr Gln Gly Asn Phe Gly Asp
 275 280 285

Gln Glu Leu Ile Arg Gln Gly Thr Asp Tyr Lys His Trp Pro Gln Ile
 290 295 300

Ala Gln Phe Ala Pro Ser Ala Ser Ala Phe Phe Gly Met Ser Arg Ile
 305 310 315 320

Gly Met Glu Val Thr Pro Ser Gly Thr Trp Leu Thr Tyr Thr Gly Ala
 325 330 335

Ile Lys Leu Asp Asp Lys Asp Pro Asn Phe Lys Asp Gln Val Ile Leu
 340 345 350

Leu Asn Lys His Ile Asp Ala Tyr Lys Thr Phe Pro Ser Thr Glu Pro
 355 360 365

Lys Lys Asp Lys Lys Lys Lys Thr Tyr Glu Thr Gln Ala Leu Pro Gln
 370 375 380

Arg Gln Lys Lys Gln Gln Thr Val Thr Leu Leu Pro Ala Val Asp Leu
 385 390 395 400

Asp Asp Phe Ser Lys Gln Leu Gln Gln Ser Met Ser Ser Ala Asp Ser
 405 410 415

Thr Gln Ala Leu Glu
 420

<210> 15
 <211> 796
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> EcSlyD-EcSlyD-15MUT
 <400> 15

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

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

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

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

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

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

Leu Ala Glu Thr Asp Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala Val
 100 105 110
 Glu Asp Asp His Val Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln
 115 120 125
 Asn Leu Lys Phe Asn Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala Thr Glu
 130 135 140
 Glu Glu Leu Ala His Gly His Val His Gly Ala His Asp His His His
 145 150 155 160
 Asp His Asp His Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 165 170 175
 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Lys Val Ala Lys
 180 185 190
 Asp Leu Val Val Ser Leu Ala Tyr Gln Val Arg Thr Glu Asp Gly Val
 195 200 205
 Leu Val Asp Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro Leu Asp Tyr Leu His Gly
 210 215 220
 His Gly Ser Leu Ile Ser Gly Leu Glu Thr Ala Leu Glu Gly His Glu
 225 230 235 240
 Val Gly Asp Lys Phe Asp Val Ala Val Gly Ala Asn Asp Ala Tyr Gly
 245 250 255
 Gln Tyr Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val Pro Lys Asp Val Phe Met
 260 265 270
 Gly Val Asp Glu Leu Gln Val Gly Met Arg Phe Leu Ala Glu Thr Asp
 275 280 285
 Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala Val Glu Asp Asp His Val
 290 295 300
 Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln Asn Leu Lys Phe Asn
 305 310 315 320
 Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala Thr Glu Glu Glu Leu Ala His
 325 330 335
 Gly His Val His Gly Ala His Asp His His His Asp His Asp His Asp
 340 345 350
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 355 360 365
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Met Ser Leu Asn Gly Pro Gln Asn Gln
 370 375 380
 Arg Asn Ala Pro Arg Ile Thr Phe Gly Gly Pro Ser Asp Ser Thr Gly
 385 390 395 400
 Ser Asn Gln Asn Gly Glu Arg Ser Gly Ala Arg Ser Lys Gln Arg Arg

	405	410	415
Pro Gln Gly Leu	Pro Asn Asn Thr	Ala Ser Trp Phe Thr	Ala Leu Thr
	420	425	430
Gln His Gly Lys	Glu Asp Leu Lys Phe	Ser Arg Gly Gln Gly	Val Pro
	435	440	445
Ile Asn Thr Asn	Ser Ser Pro Asp Asp	Gln Ile Gly Tyr Tyr	Arg Arg
	450	455	460
Ala Thr Arg Arg	Ile Arg Gly Gly Asp	Gly Lys Met Lys Asp	Leu Ser
465	470	475	480
Pro Arg Trp Tyr	Phe Tyr Tyr Leu Gly	Thr Gly Pro Glu Ala	Gly Leu
	485	490	495
Pro Tyr Gly Ala	Asn Lys Asp Gly Ile	Ile Trp Val Ala Thr	Glu Gly
	500	505	510
Ala Leu Asn Thr	Pro Lys Asp His Ile	Gly Thr Arg Asn Leu	Ala Asn
	515	520	525
Asn Ala Ala Ile	Val Leu Gln Leu Pro	Gln Gly Thr Thr	Leu Pro Lys
	530	535	540
Gly Phe Tyr Ala	Glu Gly Ser Arg Gly	Gly Ser Gln Ala Ser	Ser Arg
545	550	555	560
Ser Ser Ser Arg	Ser Arg Asn Ser Leu	Arg Asn Ser Thr	Leu Gly Ser
	565	570	575
Ser Lys Arg Ile	Ser Pro Ala Arg Met	Ala Gly Asn Gly Gly	Asp Ala
	580	585	590
Ala Leu Val Leu	Leu Leu Leu Asp Arg	Leu Asn Gln Leu	Glu Ser Lys
	595	600	605
Ile Phe Gly Lys	Gly Gln Gln Gln Gly	Gln Thr Val Thr	Lys Lys
	610	615	620
Ser Ala Ala Glu	Ala Ser Lys Lys Pro	Arg Gln Lys Arg Thr	Ala Thr
625	630	635	640
Lys Ala Tyr Asn	Val Thr Gln Ala Phe	Gly Arg Arg Gly Pro	Glu Gln
	645	650	655
Thr Gln Gly Asn	Phe Gly Asp Gln Glu	Leu Ile Arg Gln Gly	Thr Asp
	660	665	670
Tyr Lys His Trp	Pro Gln Ile Ala Gln	Phe Ala Pro Ser Ala	Ser Ala
	675	680	685
Phe Phe Gly Met	Ser Arg Ile Gly Met	Glu Val Thr Pro Ser	Gly Thr
	690	695	700
Trp Leu Thr Tyr	Thr Gly Ala Ile Lys	Leu Asp Asp Lys Asp	Pro Asn
705	710	715	720

Ser Ser Arg Asn Ser Thr Pro Gly Ser Ser Arg Gly Thr Ser Pro Ala
 195 200 205
 Arg Met Ala Gly Asn Gly Gly Asp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Leu
 210 215 220
 Asp Arg Leu Asn Gln Leu Glu Ser Lys Met Ser Gly Lys Gly Gln Gln
 225 230 235 240
 Gln Gln Gly Gln Thr Val Thr Lys Lys Ser Ala Ala Glu Ala Ser Lys
 245 250 255
 Lys Pro Arg Gln Lys Arg Thr Ala Thr Lys Ala Tyr Asn Val Thr Gln
 260 265 270
 Ala Phe Gly Arg Arg Gly Pro Glu Gln Thr Gln Gly Asn Phe Gly Asp
 275 280 285
 Gln Glu Leu Ile Arg Gln Gly Thr Asp Tyr Lys His Trp Pro Gln Ile
 290 295 300
 Ala Gln Phe Ala Pro Ser Ala Ser Ala Phe Phe Gly Met Ser Arg Ile
 305 310 315 320
 Gly Met Glu Val Thr Pro Ser Gly Thr Trp Leu Thr Tyr Thr Gly Ala
 325 330 335
 Ile Lys Leu Asp Asp Lys Asp Pro Asn Phe Lys Asp Gln Val Ile Leu
 340 345 350
 Leu Asn Lys His Ile Asp Ala Tyr Lys Thr Phe Pro Pro Thr Glu Pro
 355 360 365
 Lys Lys Asp Lys Lys Lys Lys Ala Asp Glu Thr Gln Ala Leu Pro Gln
 370 375 380
 Arg Gln Lys Lys Gln Gln Thr Val Thr Leu Leu Pro Ala Ala Asp Leu
 385 390 395 400
 Asp Asp Phe Ser Lys Gln Leu Gln Gln Ser Met Ser Ser Ala Asp Ser
 405 410 415
 Thr Gln Ala
 <210> 17
 <211> 422
 <212> PRT
 <213> 冠状病毒科
 <400> 17
 Met Ser Asp Asn Gly Pro Gln Ser Asn Gln Arg Ser Ala Pro Arg Ile
 1 5 10 15
 Thr Phe Gly Gly Pro Thr Asp Ser Thr Asp Asn Asn Gln Asn Gly Gly
 20 25 30
 Arg Asn Gly Ala Arg Pro Lys Gln Arg Arg Pro Gln Gly Leu Pro Asn

35	40	45
Asn Thr Ala Ser Trp Phe Thr Ala Leu Thr Gln His Gly Lys Glu Glu		
50	55	60
Leu Arg Phe Pro Arg Gly Gln Gly Val Pro Ile Asn Thr Asn Ser Gly		
65	70	75
Pro Asp Asp Gln Ile Gly Tyr Tyr Arg Arg Ala Thr Arg Arg Val Arg		
	85	90
Gly Gly Asp Gly Lys Met Lys Glu Leu Ser Pro Arg Trp Tyr Phe Tyr		
	100	105
Tyr Leu Gly Thr Gly Pro Glu Ala Ser Leu Pro Tyr Gly Ala Asn Lys		
	115	120
Glu Gly Ile Val Trp Val Ala Thr Glu Gly Ala Leu Asn Thr Pro Lys		
	130	135
Asp His Ile Gly Thr Arg Asn Pro Asn Asn Asn Ala Ala Thr Val Leu		
145	150	155
Gln Leu Pro Gln Gly Thr Thr Leu Pro Lys Gly Phe Tyr Ala Glu Gly		
	165	170
Ser Arg Gly Gly Ser Gln Ala Ser Ser Arg Ser Ser Ser Arg Ser Arg		
	180	185
Gly Asn Ser Arg Asn Ser Thr Pro Gly Ser Ser Arg Gly Asn Ser Pro		
	195	200
Ala Arg Met Ala Ser Gly Gly Gly Glu Thr Ala Leu Ala Leu Leu Leu		
	210	215
Leu Asp Arg Leu Asn Gln Leu Glu Ser Lys Val Ser Gly Lys Gly Gln		
225	230	235
Gln Gln Gln Gly Gln Thr Val Thr Lys Lys Ser Ala Ala Glu Ala Ser		
	245	250
Lys Lys Pro Arg Gln Lys Arg Thr Ala Thr Lys Gln Tyr Asn Val Thr		
	260	265
Gln Ala Phe Gly Arg Arg Gly Pro Glu Gln Thr Gln Gly Asn Phe Gly		
	275	280
Asp Gln Asp Leu Ile Arg Gln Gly Thr Asp Tyr Lys His Trp Pro Gln		
	290	295
Ile Ala Gln Phe Ala Pro Ser Ala Ser Ala Phe Phe Gly Met Ser Arg		
305	310	315
Ile Gly Met Glu Val Thr Pro Ser Gly Thr Trp Leu Thr Tyr His Gly		
	325	330
Ala Ile Lys Leu Asp Asp Lys Asp Pro Gln Phe Lys Asp Asn Val Ile		
	340	345
		350

Leu Leu Asn Lys His Ile Asp Ala Tyr Lys Thr Phe Pro Pro Thr Glu
 355 360 365
 Pro Lys Lys Asp Lys Lys Lys Lys Thr Asp Glu Ala Gln Pro Leu Pro
 370 375 380
 Gln Arg Gln Lys Lys Gln Pro Thr Val Thr Leu Leu Pro Ala Ala Asp
 385 390 395 400
 Met Asp Asp Phe Ser Arg Gln Leu Gln Asn Ser Met Ser Gly Ala Ser
 405 410 415
 Ala Asp Ser Thr Gln Ala
 420
 <210> 18
 <211> 413
 <212> PRT
 <213> 冠状病毒科
 <400> 18
 Met Ala Ser Pro Ala Ala Pro Arg Ala Val Ser Phe Ala Asp Asn Asn
 1 5 10 15
 Asp Ile Thr Asn Thr Asn Leu Ser Arg Gly Arg Gly Arg Asn Pro Lys
 20 25 30
 Pro Arg Ala Ala Pro Asn Asn Thr Val Ser Trp Tyr Thr Gly Leu Thr
 35 40 45
 Gln His Gly Lys Val Pro Leu Thr Phe Pro Pro Gly Gln Gly Val Pro
 50 55 60
 Leu Asn Ala Asn Ser Thr Pro Ala Gln Asn Ala Gly Tyr Trp Arg Arg
 65 70 75 80
 Gln Asp Arg Lys Ile Asn Thr Gly Asn Gly Ile Lys Gln Leu Ala Pro
 85 90 95
 Arg Trp Tyr Phe Tyr Tyr Thr Gly Thr Gly Pro Glu Ala Ala Leu Pro
 100 105 110
 Phe Arg Ala Val Lys Asp Gly Ile Val Trp Val His Glu His Gly Ala
 115 120 125
 Thr Asp Ala Pro Ser Thr Phe Gly Thr Arg Asn Pro Asn Asn Asp Ser
 130 135 140
 Ala Ile Val Thr Gln Phe Ala Pro Gly Thr Lys Leu Pro Lys Asn Phe
 145 150 155 160
 His Ile Glu Gly Thr Gly Gly Asn Ser Gln Ser Ser Ser Arg Ala Ser
 165 170 175
 Ser Val Ser Arg Asn Ser Ser Arg Ser Ser Ser Gln Gly Ser Arg Ser
 180 185 190

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

<210> 19

<211> 377

<212> PRT

<213> 冠状病毒科

<400> 19

Met Ala Ser Val Asn Trp Ala Asp Asp Arg Ala Ala Arg Lys Lys Phe
 1 5 10 15
 Pro Pro Pro Ser Phe Tyr Met Pro Leu Leu Val Ser Ser Asp Lys Ala
 20 25 30
 Pro Tyr Arg Val Ile Pro Arg Asn Leu Val Pro Ile Gly Lys Gly Asn
 35 40 45

Lys Asp Glu Gln Ile Gly Tyr Trp Asn Val Gln Glu Arg Trp Arg Met
 50 55 60
 Arg Arg Gly Gln Arg Val Asp Leu Pro Pro Lys Val His Phe Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gly Thr Gly Pro His Lys Asp Leu Lys Phe Arg Gln Arg Ser Asp
 85 90 95
 Gly Val Val Trp Val Ala Lys Glu Gly Ala Lys Thr Val Asn Thr Ser
 100 105 110
 Leu Gly Asn Arg Lys Arg Asn Gln Lys Pro Leu Glu Pro Lys Phe Ser
 115 120 125
 Ile Ala Leu Pro Pro Glu Leu Ser Val Val Glu Phe Glu Asp Arg Ser
 130 135 140
 Asn Asn Ser Ser Arg Ala Ser Ser Arg Ser Ser Thr Arg Asn Asn Ser
 145 150 155 160
 Arg Asp Ser Ser Arg Ser Thr Ser Arg Gln Gln Ser Arg Thr Arg Ser
 165 170 175
 Asp Ser Asn Gln Ser Ser Ser Asp Leu Val Ala Ala Val Thr Leu Ala
 180 185 190
 Leu Lys Asn Leu Gly Phe Asp Asn Gln Ser Lys Ser Pro Ser Ser Ser
 195 200 205
 Gly Thr Ser Thr Pro Lys Lys Pro Asn Lys Pro Leu Ser Gln Pro Arg
 210 215 220
 Ala Asp Lys Pro Ser Gln Leu Lys Lys Pro Arg Trp Lys Arg Val Pro
 225 230 235 240
 Thr Arg Glu Glu Asn Val Ile Gln Cys Phe Gly Pro Arg Asp Phe Asn
 245 250 255
 His Asn Met Gly Asp Ser Asp Leu Val Gln Asn Gly Val Asp Ala Lys
 260 265 270
 Gly Phe Pro Gln Leu Ala Glu Leu Ile Pro Asn Gln Ala Ala Leu Phe
 275 280 285
 Phe Asp Ser Glu Val Ser Thr Asp Glu Val Gly Asp Asn Val Gln Ile
 290 295 300
 Thr Tyr Thr Tyr Lys Met Leu Val Ala Lys Asp Asn Lys Asn Leu Pro
 305 310 315 320
 Lys Phe Ile Glu Gln Ile Ser Ala Phe Thr Lys Pro Ser Ser Ile Lys
 325 330 335
 Glu Met Gln Ser Gln Ser Ser His Val Ala Gln Asn Thr Val Leu Asn
 340 345 350
 Ala Ser Ile Pro Glu Ser Lys Pro Leu Ala Asp Asp Asp Ser Ala Ile

355	360	365
Ile Glu Ile Val Asn Glu Val Leu His		
370	375	
<210> 20		
<211> 389		
<212> PRT		
<213> 冠状病毒科		
<400> 20		
Met Ala Thr Val Lys Trp Ala Asp Ala Ser Glu Pro Gln Arg Gly Arg		
1	5	10
Gln Gly Arg Ile Pro Tyr Ser Leu Tyr Ser Pro Leu Leu Val Asp Ser		
	20	30
Glu Gln Pro Trp Lys Val Ile Pro Arg Asn Leu Val Pro Ile Asn Lys		
	35	45
Lys Asp Lys Asn Lys Leu Ile Gly Tyr Trp Asn Val Gln Lys Arg Phe		
	50	60
Arg Thr Arg Lys Gly Lys Arg Val Asp Leu Ser Pro Lys Leu His Phe		
65	70	75
Tyr Tyr Leu Gly Thr Gly Pro His Lys Asp Ala Lys Phe Arg Glu Arg		
	85	90
Val Glu Gly Val Val Trp Val Ala Val Asp Gly Ala Lys Thr Glu Pro		
	100	110
Thr Gly Tyr Gly Val Arg Arg Lys Asn Ser Glu Pro Glu Ile Pro His		
	115	125
Phe Asn Gln Lys Leu Pro Asn Gly Val Thr Val Val Glu Glu Pro Asp		
	130	140
Ser Arg Ala Pro Ser Arg Ser Gln Ser Arg Ser Gln Ser Arg Gly Arg		
145	150	155
Gly Glu Ser Lys Pro Gln Ser Arg Asn Pro Ser Ser Asp Arg Asn His		
	165	175
Asn Ser Gln Asp Asp Ile Met Lys Ala Val Ala Ala Ala Leu Lys Ser		
	180	190
Leu Gly Phe Asp Lys Pro Gln Glu Lys Asp Lys Lys Ser Ala Lys Thr		
	195	205
Gly Thr Pro Lys Pro Ser Arg Asn Gln Ser Pro Ala Ser Ser Gln Thr		
	210	220
Ser Ala Lys Ser Leu Ala Arg Ser Gln Ser Ser Glu Thr Lys Glu Gln		
225	230	235
Lys His Glu Met Gln Lys Pro Arg Trp Lys Arg Gln Pro Asn Asp Asp		

	245		250		255
Val Thr Ser Asn	Val Thr Gln Cys Phe	Gly Pro Arg Asp	Leu Asp His		
	260		265		270
Asn Phe Gly Ser	Ala Gly Val Val	Ala Asn Gly Val	Lys Ala Lys Gly		
	275		280		285
Tyr Pro Gln Phe	Ala Glu Leu Val	Pro Ser Thr Ala	Ala Met Leu Phe		
	290		295		300
Asp Ser His Ile	Val Ser Lys Glu	Ser Gly Asn Thr	Val Val Leu Thr		
305		310		315	320
Phe Thr Thr Arg	Val Thr Val Pro	Lys Asp His Pro	His Leu Gly Lys		
	325		330		335
Phe Leu Glu Glu	Leu Asn Ala Phe	Thr Arg Glu Met	Gln Gln His Pro		
	340		345		350
Leu Leu Asn Pro	Ser Ala Leu Glu	Phe Asn Pro Ser	Gln Thr Ser Pro		
	355		360		365
Ala Thr Ala Glu	Pro Val Arg Asp	Glu Val Ser Ile	Glu Thr Asp Ile		
	370		375		380
Ile Asp Glu Val	Asn				
385					
<210>	21				
<211>	448				
<212>	PRT				
<213>	冠状病毒科				
<400>	21				
Met Ser Phe Thr	Pro Gly Lys Gln	Ser Ser Ser Arg	Ala Ser Ser Gly		
1		5		10	15
Asn Arg Ser Gly	Asn Gly Ile Leu	Lys Trp Ala Asp	Gln Ser Asp Gln		
	20		25		30
Phe Arg Asn Val	Gln Thr Arg Gly	Arg Arg Ala Gln	Pro Lys Gln Thr		
	35		40		45
Ala Thr Ser Gln	Gln Pro Ser Gly	Gly Gly Asn Val	Val Pro Tyr Tyr	Ser	
	50		55		60
Trp Phe Ser Gly	Ile Thr Gln Phe	Gln Lys Gly Lys	Glu Phe Glu Phe		
65		70		75	80
Val Glu Gly Gln	Gly Val Pro Ile	Ala Pro Gly Val	Pro Ala Thr Glu		
	85		90		95
Ala Lys Gly Tyr	Trp Tyr Arg His	Asn Arg Arg Ser	Phe Lys Thr Ala		
	100		105		110
Asp Gly Asn Gln	Arg Gln Leu Leu	Pro Arg Trp Tyr	Phe Tyr Tyr Leu		

115	120	125
Gly Thr Gly Pro His Ala Lys Asp Gln Tyr Gly Thr Asp Ile Asp Gly		
130	135	140
Val Tyr Trp Val Ala Ser Asn Gln Ala Asp Val Asn Thr Pro Ala Asp		
145	150	155
Ile Val Asp Arg Asp Pro Ser Ser Asp Glu Ala Ile Pro Thr Arg Phe		
165	170	175
Pro Pro Gly Thr Val Leu Pro Gln Gly Tyr Tyr Ile Glu Gly Ser Gly		
180	185	190
Arg Ser Ala Pro Asn Ser Arg Ser Thr Ser Arg Thr Ser Ser Arg Ala		
195	200	205
Ser Ser Ala Gly Ser Arg Ser Arg Ala Asn Ser Gly Asn Arg Thr Pro		
210	215	220
Thr Ser Gly Val Thr Pro Asp Met Ala Asp Gln Ile Ala Ser Leu Val		
225	230	235
Leu Ala Lys Leu Gly Lys Asp Ala Thr Lys Pro Gln Gln Val Thr Lys		
245	250	255
His Thr Ala Lys Glu Val Arg Gln Lys Ile Leu Asn Lys Pro Arg Gln		
260	265	270
Lys Arg Ser Pro Asn Lys Gln Cys Thr Val Gln Gln Cys Phe Gly Lys		
275	280	285
Arg Gly Pro Asn Gln Asn Phe Gly Gly Gly Glu Met Leu Lys Leu Gly		
290	295	300
Thr Ser Asp Pro Gln Phe Pro Ile Leu Ala Glu Leu Ala Pro Thr Ala		
305	310	315
Gly Ala Phe Phe Phe Gly Ser Arg Leu Glu Leu Ala Lys Val Gln Asn		
325	330	335
Leu Ser Gly Asn Pro Asp Glu Pro Gln Lys Asp Val Tyr Glu Leu Arg		
340	345	350
Tyr Asn Gly Ala Ile Arg Phe Asp Ser Thr Leu Ser Gly Phe Glu Thr		
355	360	365
Ile Met Lys Val Leu Asn Glu Asn Leu Asn Ala Tyr Gln Gln Gln Asp		
370	375	380
Gly Met Met Asn Met Ser Pro Lys Pro Gln Arg Gln Arg Gly His Lys		
385	390	395
Asn Gly Gln Gly Glu Asn Asp Asn Ile Ser Val Ala Val Pro Lys Ser		
405	410	415
Arg Val Gln Gln Asn Lys Ser Arg Glu Leu Thr Ala Glu Asp Ile Ser		
420	425	430

Leu Leu Lys Lys Met Asp Glu Pro Tyr Thr Glu Asp Thr Ser Glu Ile
 435 440 445
 <210> 22
 <211> 441
 <212> PRT
 <213> 冠状病毒科
 <400> 22
 Met Ser Tyr Thr Pro Gly His Tyr Ala Gly Ser Arg Ser Ser Ser Gly
 1 5 10 15
 Asn Arg Ser Gly Ile Leu Lys Lys Thr Ser Trp Ala Asp Gln Ser Glu
 20 25 30
 Arg Asn Tyr Gln Thr Phe Asn Arg Gly Arg Lys Thr Gln Pro Lys Phe
 35 40 45
 Thr Val Ser Thr Gln Pro Gln Gly Asn Thr Ile Pro His Tyr Ser Trp
 50 55 60
 Phe Ser Gly Ile Thr Gln Phe Gln Lys Gly Arg Asp Phe Lys Phe Ser
 65 70 75 80
 Asp Gly Gln Gly Val Pro Ile Ala Phe Gly Val Pro Pro Ser Glu Ala
 85 90 95
 Lys Gly Tyr Trp Tyr Arg His Ser Arg Arg Ser Phe Lys Thr Ala Asp
 100 105 110
 Gly Gln Gln Lys Gln Leu Leu Pro Arg Trp Tyr Phe Tyr Tyr Leu Gly
 115 120 125
 Thr Gly Pro Tyr Ala Asn Ala Ser Tyr Gly Glu Ser Leu Glu Gly Val
 130 135 140
 Phe Trp Val Ala Asn His Gln Ala Asp Thr Ser Thr Pro Ser Asp Val
 145 150 155 160
 Ser Ser Arg Asp Pro Thr Thr Gln Glu Ala Ile Pro Thr Arg Phe Pro
 165 170 175
 Pro Gly Thr Ile Leu Pro Gln Gly Tyr Tyr Val Glu Gly Ser Gly Arg
 180 185 190
 Ser Ala Ser Asn Ser Arg Pro Gly Ser Arg Ser Gln Ser Arg Gly Pro
 195 200 205
 Asn Asn Arg Ser Leu Ser Arg Ser Asn Ser Asn Phe Arg His Ser Asp
 210 215 220
 Ser Ile Val Lys Pro Asp Met Ala Asp Glu Ile Ala Asn Leu Val Leu
 225 230 235 240
 Ala Lys Leu Gly Lys Asp Ser Lys Pro Gln Gln Val Thr Lys Gln Asn
 245 250 255

Ala Lys Glu Ile Arg His Lys Ile Leu Thr Lys Pro Arg Gln Lys Arg		
260	265	270
Thr Pro Asn Lys His Cys Asn Val Gln Gln Cys Phe Gly Lys Arg Gly		
275	280	285
Pro Ser Gln Asn Phe Gly Asn Ala Glu Met Leu Lys Leu Gly Thr Asn		
290	295	300
Asp Pro Gln Phe Pro Ile Leu Ala Glu Leu Ala Pro Thr Pro Gly Ala		
305	310	315
Phe Phe Phe Gly Ser Lys Leu Asp Leu Val Lys Arg Asp Ser Glu Ala		
325	330	335
Asp Ser Pro Val Lys Asp Val Phe Glu Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile		
340	345	350
Arg Phe Asp Ser Thr Leu Pro Gly Phe Glu Thr Ile Met Lys Val Leu		
355	360	365
Glu Glu Asn Leu Asn Ala Tyr Val Asn Ser Asn Gln Asn Thr Asp Ser		
370	375	380
Asp Ser Leu Ser Ser Lys Pro Gln Arg Lys Arg Gly Val Lys Gln Leu		
385	390	395
Pro Glu Gln Phe Asp Ser Leu Asn Leu Ser Ala Gly Thr Gln His Ile		
405	410	415
Ser Asn Asp Phe Thr Pro Glu Asp His Ser Leu Leu Ala Thr Leu Asp		
420	425	430
Asp Pro Tyr Val Glu Asp Ser Val Ala		
435	440	

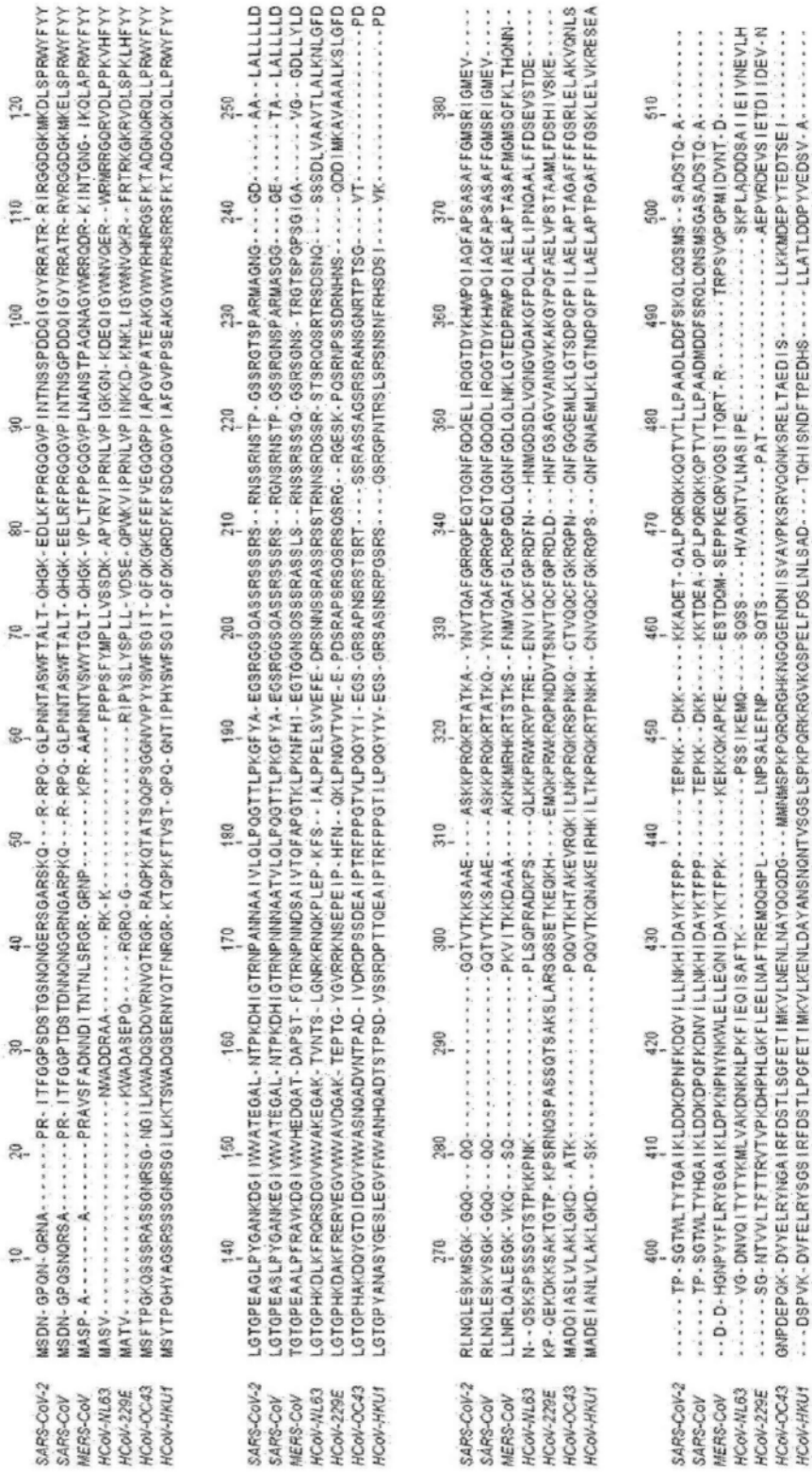


图1

(A) % 同一性

	SARS-CoV-2	SARS-CoV	MERS-CoV	HCoV-NL63	HCoV-229E	HCoV-OC43	HCoV-HKU1
UniProt ID		P59595	T2BBK0	Q6Q1R8	P15130	P33469	U3NAH8
SARS-CoV-2	-	90,3	45,4	22,5	22,0	32,7	30,5
SARS-CoV	-	-	45,8	22,4	22,4	33,1	30,8
MERS-CoV	-	-	-	23,3	21,7	29,6	29,5
HCoV-NL63	-	-	-	-	43,1	20,6	19,4
HCoV-229E	-	-	-	-	-	20,6	21,4
HCoV-OC43	-	-	-	-	-	-	62,6
HCoV-HKU1	-	-	-	-	-	-	-

(B) % 同源性

	SARS-CoV-2	SARS-CoV	MERS-CoV	HCoV-NL63	HCoV-229E	HCoV-OC43	HCoV-HKU1
UniProt ID		P59595	T2BBK0	Q6Q1R8	P15130	P33469	U3NAH8
SARS-CoV-2	-	93,4	58,1	33,2	31,0	45,1	42,2
SARS-CoV	-	-	57,9	33,6	31,8	45,9	43,4
MERS-CoV	-	-	-	35,3	30,0	42,8	41,7
HCoV-NL63	-	-	-	-	54,9	30,4	29,6
HCoV-229E	-	-	-	-	-	29,8	29,7
HCoV-OC43	-	-	-	-	-	-	73,0
HCoV-HKU1	-	-	-	-	-	-	-

图2

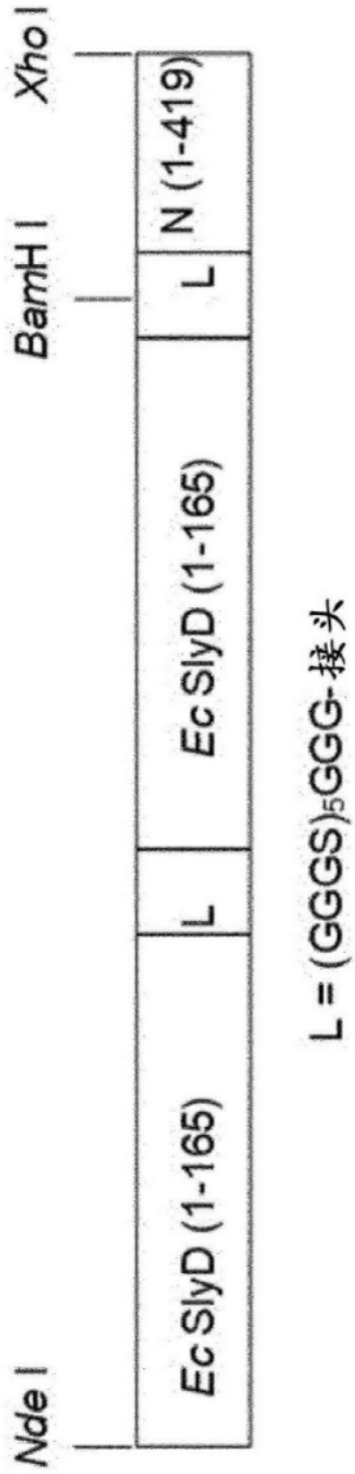


图3

样品	EcSlyD-nCoV-S(617-649,C617A,C649A)-Bi-DDS		SlyD-nCoV-S(338-516,C361A,C391A)-Bi-DDS (RBD)		SlyD-nCoV-E(8-A)-Bi-DDS		EcSlyD-nCoV-E(45-75)-Bi-DDS		nCoV-M(1-32)-Bi-DDS		nCoV-M(132-163)-Bi-DDS		nCoV-M(100-222)-Bi-DDS	
	cts	s/n	cts	s/n	cts	s/n	cts	s/n	cts	s/n	cts	s/n	cts	s/n
P03#004 (阳性)	1.073	0.95	688	1.00	480	0.98	1.158	0.80	773	0.88	528	0.91	484	1.00
P03#005 (阳性)	1.028	0.91	688	1.00	478	0.98	1.186	0.82	731	0.83	526	0.91	498	1.03
P03#006 (阳性)	1.033	0.92	710	1.04	480	0.98	1.187	0.82	759	0.86	526	0.91	495	1.03
P03#007 (阳性)	1.289	1.15	694	1.01	/	/	1.465	1.01	778	0.89	571	0.98	/	/
P03#008 (阳性)	1.039	0.92	702	1.02	/	/	1.201	0.83	1.336	1.52	540	0.93	/	/
探针阴性 1	997	0.89	699	1.02	474	0.97	1.138	0.78	695	0.79	525	0.90	472	0.98
探针阴性 2	1.632	1.45	680	0.99	518	1.06	2.626	1.81	1.053	1.20	826	1.42	484	1.00
探针阴性 3	1.019	0.91	677	0.99	475	0.97	1.189	0.82	880	1.00	524	0.90	491	1.02
探针阴性 4	999	0.89	680	0.99	/	/	1.145	0.79	758	0.86	521	0.90	/	/
探针阴性 5	974	0.87	689	1.01	/	/	1.159	0.80	1.006	1.15	509	0.88	/	/
MW (阴性)	1.124		685		489		1.451		878		581		482	
MW (阳性)	1.092		696		479		1.239		875		538		492	
s/n (阳性/阴性)	0.97		1.02		0.98		0.85		1.00		0.93		1.02	

图4a

R1	nCoV-N(151-178)-Bi-DDS	500 ng/ml	nCoV-N(374-404)-Bi-DDS		nCoV-N(1-419)-Bi-DDS		EcSlyD-nCoV-N(1-419)Bi-DDS	
	cts	s/n	cts	s/n	cts	s/n	cts	s/n
R2	nCoV-N(151-178)-BPRu-Sk(2)-Osu	500 ng/ml	nCoV-N(374-404)-BPRu-Sk(2)-Osu	500 ng/ml	nCoV-N(1-419)-BRRu-Sk(2)-Osu	500 ng/ml	EcSlyD-nCoV-N(1-419)-BPRu-Sk(2)-Osu	500 ng/ml
R1 和 R2	HEPES pH 7.5 0.1% 聚多卡醇		HEPES pH 7.5 0.1% 聚多卡醇		HEPES pH 7.5 0.1% 聚多卡醇		HEPES pH 7.5 0.1% 聚多卡醇	
样品	cts	s/n	cts	s/n	cts	s/n	cts	s/n
P03#004 (阳性)	875	0,80	866	0,85	559.461	1,14	271.037	2,20
P03#005 (阳性)	858	0,78	1.336	1,31	517.245	1,05	224.527	1,82
P03#006 (阳性)	866	0,79	1.316	1,29	2.677.325	5,43	2.525.953	20,51
P03#007 (阳性)	1.024	0,94	946	0,93	808.276	1,64	499.533	4,06
P03#008 (阳性)	880	0,80	921	0,90	568.677	1,15	173.550	1,41
探针阴性 1	1.210	1,11	891	0,88	501.084	1,02	123.460	1,00
探针阴性 2	1.623	1,48	1.732	1,70	550.052	1,12	126.922	1,03
探针阴性 3	878	0,80	826	0,81	461.644	0,94	122.104	0,99
探针阴性 4	866	0,79	829	0,81	477.751	0,97	122.752	1,00
探针阴性 5	889	0,81	812	0,80	473.927	0,96	120.455	0,98

MW (阴性)	1.093	1.018	492.892	123.139
MW (阳性)	901	1.077	1.026.197	738.920
s/n (阳性/阴性)	0,82	1,06	2,08	6,00

图4b

样品	新鲜/无肺道				肺道 o/n @ 35°C				SlyD-SlyD-N(1-419)-Bi											
	cts	s/n	cts	s/n	cts	s/n	WF s/n [%]	WF [%]	cts	s/n	WF s/n [%]	WF [%]	cts	s/n	WF s/n [%]	WF [%]				
R1	nCOV-N(1-419)-Bi 100 ng/ml				SlyD-N(1-419)-Bi 142 ng/ml				SlyD-SlyD-N(1-419)-Bi 183 ng/ml				SlyD-N(1-419)-Bi 142 ng/ml				SlyD-SlyD-N(1-419)-Bi 183 ng/ml			
R2	nCOV-N(1-419)-BPRu (5:1) 100 ng/ml				SlyD-N(1-419)-BPRu (5:1) 142 ng/ml				SlyD-SlyD-N(1-419)-BPRu (5:1) 183 ng/ml				SlyD-N(1-419)-BPRu (5:1) 142 ng/ml				SlyD-SlyD-N(1-419)-BPRu (5:1) 183 ng/ml			
R1 和 R2	HEPES pH 7.5 0.2% Tween 20 15 µg/ml SkpSS				HEPES pH 7.5 0.2% Tween 20 15 µg/ml SkpSS				HEPES pH 7.5 0.2% Tween 20 15 µg/ml SkpSS				HEPES pH 7.5 0.2% Tween 20 15 µg/ml SkpSS				HEPES pH 7.5 0.2% Tween 20 15 µg/ml SkpSS			
CAL1	5734	1.55	2633	1.28	2442	1.24	20937	0.95	61%	9877	1.06	83%	8153	1.12	90%					
CAL2	39555	10.69	28929	14.03	26126	13.31	48112	2.18	20%	32192	3.47	25%	27477	3.78	28%					
探针阴性 1	3682	0.99	1902	0.92	1888	0.96	23080	1.05	105%	9375	1.01	110%	7410	1.02	106%					
探针阴性 2	3695	1.00	1969	0.95	1884	0.96	20587	0.93	93%	9162	0.99	103%	6838	0.94	98%					
探针阴性 3	3766	1.02	2027	0.98	1977	1.01	23462	1.06	104%	9377	1.01	103%	7487	1.03	102%					
探针阴性 4	3333	0.90	1873	0.91	1786	0.91	20617	0.93	104%	8658	0.93	103%	6795	0.93	103%					
探针阴性 5	4692	1.27	3132	1.52	2682	1.37	18313	0.83	65%	9335	1.01	66%	7106	0.98	71%					
探针阴性 6	3557	0.96	1924	0.93	1875	0.96	25562	1.16	120%	9812	1.06	113%	7894	1.08	114%					
探针阴性 7	3823	1.03	2040	0.99	1950	0.99	21804	0.99	96%	9315	1.00	101%	7204	0.99	100%					
探针阴性 8	3390	0.92	1877	0.91	1873	0.95	19236	0.87	95%	8675	0.94	103%	6754	0.93	97%					
探针阴性 9	3520	0.95	1939	0.94	1869	0.95	23912	1.08	114%	9350	1.01	107%	7561	1.04	109%					
探针阴性 10	3557	0.96	1938	0.94	1841	0.94	24207	1.10	114%	9712	1.05	111%	7708	1.06	113%					
P03#004 (阳性)	103101	27.85	85613	41.52	79945	40.74	107582	4.87	17%	81743	8.81	21%	79519	10.93	27%					
P03#005 (阳性)	106400	28.75	108289	52.51	73318	37.36	99891	4.52	16%	93410	10.07	19%	64330	8.84	24%					
P03#006 (阳性)	699247	188.91	831563	403.26	828820	422.33	579231	26.24	14%	714482	77.02	19%	685053	94.16	22%					
P03#007 (阳性)	246911	66.71	199508	96.75	203887	103.69	240109	10.88	16%	201953	21.77	23%	195706	26.90	26%					
P03#008 (阳性)	26580	7.18	17022	8.25	16516	8.42	36397	1.65	23%	22057	2.38	29%	20491	2.82	33%					
MW (阴性)	3702		2062		1963		22078			9277			7276							
MW (阳性)	236448		248399		240497		212642			222729			209020							
中位数 (阳性)	106400		108289		79945		107582			93410			79519							
s/n (阳性/阴性)	63.9		120.5		122.5		9.6			24.0			28.7							

图5

		SlyD-SlyD-N(1-419)-BPRu (2.5:1) 130 ng/ml			
R1 和 R2		HEPES pH 7.5 0.2% Tween 20 15 µg/ml SkpSS		HEPES pH 7.5 0.2% Tween 20 15 µg/ml SkpSS	
样品		具有珠		不具有珠	
		cts	s/n	cts	s/n
Cal1		779	1,19	689	1,30
Cal2		8375	12,80	7755	14,62
Panel3_001 (阴性)		633	0,97	523	0,99
Panel3_002 (阴性)		654	1,00	526	0,99
Panel3_003 (阴性)		676	1,03	542	1,02
Panel3_004 (阳性)		25315	38,69	23274	43,89
Panel3_005 (阳性)		21894	33,46	17875	33,71
Panel3_006 (阳性)		253182	386,93	225449	425,11
Panel3_007 (阳性)		69294	105,90	62778	118,37
Panel3_008 (阳性)		5270	8,05	4819	9,09

MW (阴性)	654	530
MW (阳性)	74991	66839
中位数 (阳性)	25315	23274
s/n (阳性/阴性)	115	126

图6

A)

自...天	至...天	总数	阳性	阴性	%阳性
0	6	65	48	17	74%
7	13	42	40	2	95%
14	32	22	22	0	100%

B)

PCR 确认后天数	n	阳性	阴性	灵敏度 % (95 % CI)
0-6 天	116	76	40	65.5% (56.1-74.1%)
7-13 天	59	52	7	88.1% (77.1-95.1%)
≥14 天	29	29	0	100% (88.1-100%)

C)

PCR 确认后天数	N	反应性	无反应性	灵敏度 %
0-6 天	45	21	24	46.7%
7-13 天	91	76	15	83.5%
≥14 天	156	155	1	99.36%

图7

第 1 天						
	样品	反应性	特异性 (%)	LCL	UCL	
A)	整体	5192	10	99,81%	99,65	99,91
	献血者	1772	3	99,83%	99,51	99,97
	诊断例程	3420	7	99,80%	99,58	99,92
	普通感冒	40	0	100,00%	91,19	100,00
	新冠病毒	40	0	100,00%	91,19	100,00
第 2 天						
	样品	反应性	特异性 (%)	LCL	UCL	
B)	整体 (献血者+例程)	5261	11	99,79%	99,63	99,90
	献血者	2376	6	99,75%	99,45	99,91
	诊断例程	2885	5	99,83%	99,60	99,94
	透析	4696	15	99,68%		
总计 (所有测量值)						
	样品	反应性	特异性 (%)	LCL	UCL	
C)	整体 (献血者+例程)	10453	21	99,80%	99,69	99,88
	献血者	4148	9	99,78%	99,59	99,90
	诊断例程	6305	12	99,81%	99,67	99,9
	透析	4696	15	99,68%	99,47	99,82

图8

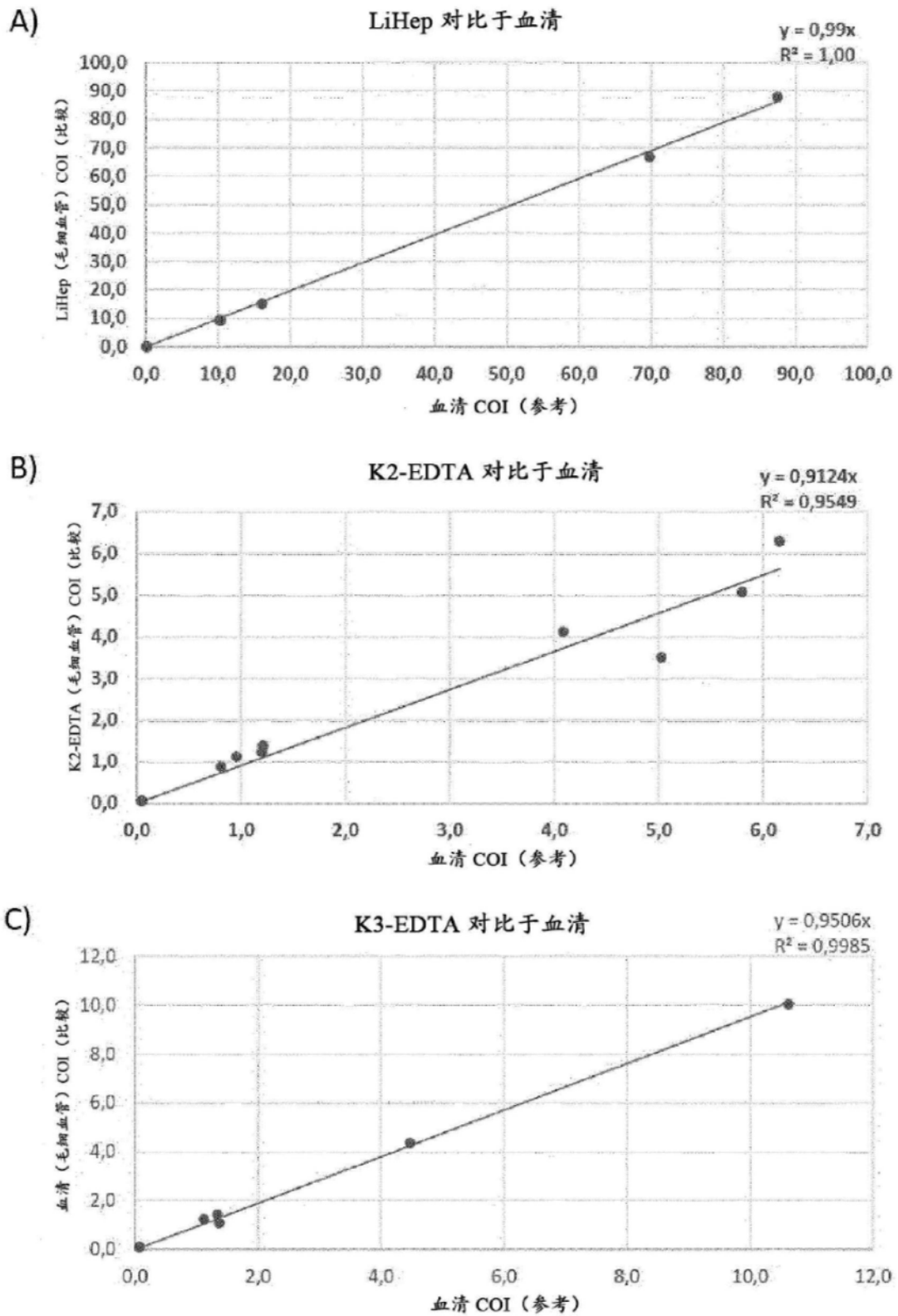


图9

		frisch												5d @35°C											
R1	SlyD-SlyD-CoV N(1-419)-Bi (3:1)						SlpA-SlpA-CoV N(1-419)-Bi (3:1)						SlyD-SlyD-CoV N(1-419)-Bi (3:1)						SlpA-SlpA-CoV N(1-419)-Bi (3:1)						
	130 ng/ml						130 ng/ml						130 ng/ml						130 ng/ml						
R2		SlyD-SlyD-CoV N(1-419)-Ru (2.5:1)						SlpA-SlpA-CoV N(1-419)-Ru (2.5:1)						SlyD-SlyD-CoV N(1-419)-Ru (2.5:1)						SlpA-SlpA-CoV N(1-419)-Ru (2.5:1)					
		4762						5201						5047						5156					
截断		cts	COI	cts	COI	cts	COI	cts	COI	cts	COI	cts	COI	cts	COI	cts	COI	cts	COI	cts	COI	cts	COI		
探针		523	0,07	521	0,06	521	0,06	1016	0,121	1016	0,121	1016	0,121	1018	0,121	1018	0,121	1018	0,121	1018	0,121	1018	0,118		
Cal1		5898	0,74	6459	0,75	6459	0,75	6081	0,723	6081	0,723	6081	0,723	6219	0,724	6219	0,724	6219	0,724	6219	0,724	6219	0,724		
组 1 #001		530	0,07	519	0,06	519	0,06	1018	0,121	1018	0,121	1018	0,121	983	0,114	983	0,114	983	0,114	983	0,114	983	0,114		
组 1 #002		547	0,07	521	0,06	521	0,06	1019	0,121	1019	0,121	1019	0,121	970	0,113	970	0,113	970	0,113	970	0,113	970	0,113		
组 1 #003		538	0,07	503	0,06	503	0,06	1086	0,129	1086	0,129	1086	0,129	1013	0,118	1013	0,118	1013	0,118	1013	0,118	1013	0,118		
组 1 #004		517	0,07	508	0,06	508	0,06	983	0,117	983	0,117	983	0,117	937	0,109	937	0,109	937	0,109	937	0,109	937	0,109		
组 1 #005		778	0,10	793	0,09	793	0,09	1208	0,144	1208	0,144	1208	0,144	1208	0,141	1208	0,141	1208	0,141	1208	0,141	1208	0,141		
组 3 #004		22632	2,85	25390	2,93	25390	2,93	25381	3,02	25381	3,02	25381	3,02	26701	3,11	26701	3,11	26701	3,11	26701	3,11	26701	3,11		
组 3 #005		20833	2,62	23961	2,76	23961	2,76	16852	2,00	16852	2,00	16852	2,00	19127	2,23	19127	2,23	19127	2,23	19127	2,23	19127	2,23		
组 3 #006		231641	29,18	225750	28,05	225750	28,05	225432	26,8	225432	26,8	225432	26,8	207527	24,2	207527	24,2	207527	24,2	207527	24,2	207527	24,2		
组 3 #007		62097	7,82	70067	8,08	70067	8,08	71635	8,52	71635	8,52	71635	8,52	74265	8,64	74265	8,64	74265	8,64	74265	8,64	74265	8,64		
组 3 #008		4810	0,61	5134	0,59	5134	0,59	6137	0,730	6137	0,730	6137	0,730	6398	0,745	6398	0,745	6398	0,745	6398	0,745	6398	0,745		
MW (阴性)		582		569		569		1063		1063		1063		1022		1022		1022		1022		1022			
MW (阳性)		68403		70060		70060		69087		69087		69087		66804		66804		66804		66804		66804			
中位数 (阳性)		22632		25390		25390		25381		25381		25381		26701		26701		26701		26701		26701			

图10

Kohorte	Proben	100ng/ml ACOV2		100ng/ml OC43		100ng/ml NL63		100ng/ml 229E		100ng/ml HKU1	
		计数	s/n	计数	s/n	计数	s/n	计数	s/n	计数	s/n
抗 CoV-2 阴性组											
ACOV2 阴性	BW6	507	1,02	842	1,35	252.028	443,97	48.676	86,05	12.105	18,86
	BW7	504	1,01	14.377	23,02	289.817	510,54	722.145	1276,63	129.691	202,01
	BW8	495	0,99	27.113	43,40	170.390	300,16	79.721	140,93	38.941	60,66
	BW9	487	0,98	21.616	34,60	244.686	431,04	311.160	550,08	114.108	177,74
	BW10	499	1,00	12.284	19,66	40.839	71,94	57.489	101,63	19.949	31,07
抗 CoV-2 阳性组											
ACOV2 阳性	20140	7.903	15,86	42.009	67,25	226.014	398,15	325.713	575,80	-	-
	20177	2.183	4,38	1.002	1,60	149.203	262,84	106.708	188,64	2.282	3,55
	20182	9.292	18,64	2.863	4,58	407.712	718,22	401.637	710,02	24.119	37,57
	20183	1.629	3,27	1.711	2,74	448.832	790,66	528.742	934,72	6.398	9,97
	20185	1.347	2,70	640	1,02	161.005	283,63	140.770	248,86	1.335	2,08
20187	60.409	121,21	538	0,86	408.759	720,07	352.915	623,89	658	1,02	

图11a

Kohorte	Proben	100ng/ml ACOV2		100ng/ml OC43		100ng/ml NL63		100ng/ml 229E		100ng/ml HKU1	
		计数	s/n	计数	s/n	计数	s/n	计数	s/n	计数	s/n
普通感冒冠状病毒组											
普通冠状病毒 阴性	43	503	1,01	896	1,43	64.414	113	91.487	162	541	0,843
	74	493	0,989	2.440	3,91	73.156	129	63.611	112	7.010	10,9
	75	495	0,993	634	1,01	14.457	25,5	13.087	23,1	727	1,13
	88	493	0,989	775	1,24	14.518	25,6	39.390	69,6	6.076	9,46
	90	545	1,09	2.741	4,39	298.462	526	35.826	63,3	12.104	18,9
	22	504	1,01	1.933	3,09	145.437	256	183.965	325	3.489	5,43
	23	681	1,37	692	1,11	341.948	602	122.109	216	1.971	3,07
	30	485	0,973	615	0,985	161.884	285	23.192	41,0	1.220	1,90
	2	494	0,991	1.676	2,68	63.591	112	20.998	37,1	946	1,47
OC43	68	503	1,01	2.838	4,54	121.710	214	158.641	280	2.964	4,62
	87	488	0,979	2.116	3,39	62.885	111	31.265	55,3	3.313	5,16
	57	490	0,983	1.279	2,05	61.931	109	85.112	150	1.355	2,11
HKU1	86	489	0,981	600	0,961	126.398	223	230.710	408	1.289	2,01
	91	500	1,00	1.523	2,44	102.693	181	397.825	703	50.539	78,7
HKU1+229E	11	495	0,993	685	1,10	431.553	760	477.357	844	2.458	3,83
	33	494	0,991	625	1,00	255.241	450	182.610	323	1.763	2,75
229E+NL63	62	581	1,17	1.226	1,96	774.443	1364	620.745	1097	2.076	3,23
	4	661	1,33	3.872	6,20	820.494	1445	615.494	1088	35.716	55,6
普通冠状病毒 阳性	5	507	1,02	2.745	4,39	257.694	454	196.345	347	39.093	60,9
	6	495	0,993	47.330	75,8	254.196	448	230.873	408	80.929	126
缓冲剂	DilM/a	482	0,967	1.223	1,96	520	0,916	634	1,12	2.678	4,17
	UniDil	504	1,01	533	0,853	543	0,957	503	0,889	501	0,780
	缓冲剂	516	1,04	571	0,914	640	1,13	560	0,990	525	0,818

图11b

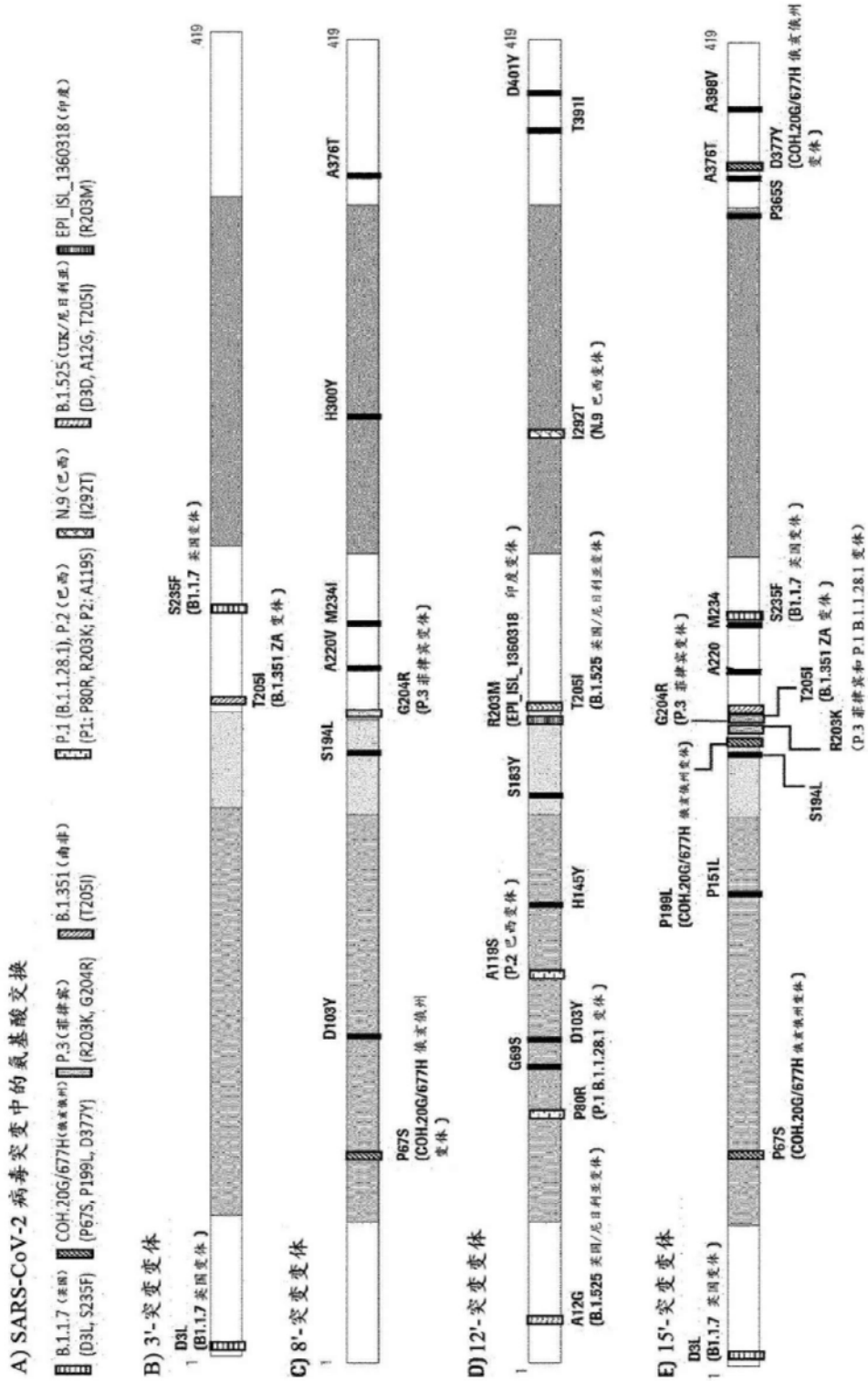


图12

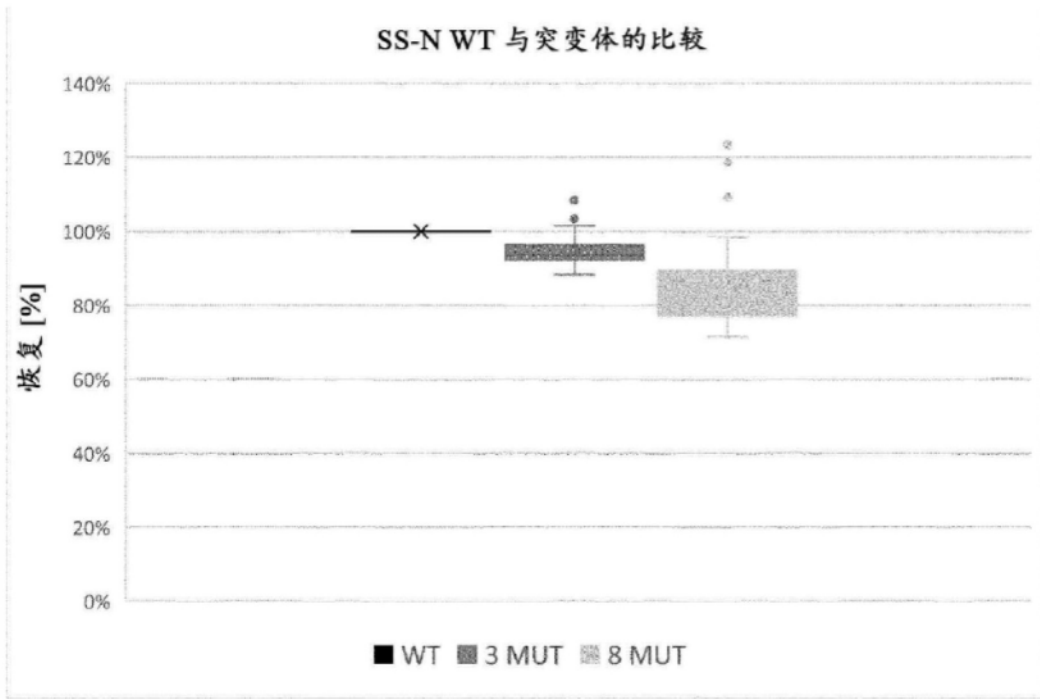


图13