(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) **1-0033666**

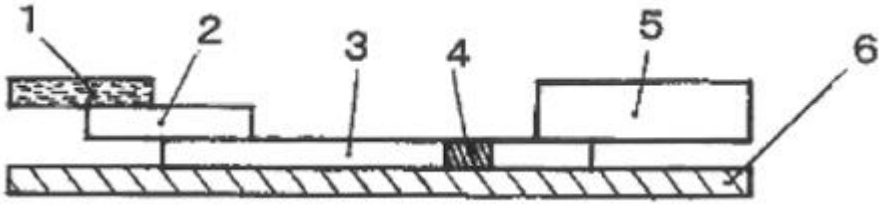
(51)[8] **G01N 33/569**; G01N 33/543; C07K 16/08; G01N 33/531

(13) **B**

(21) 1-2018-05068
(22) 17/05/2017
(86) PCT/JP2017/018540 17/05/2017
(87) WO/2017/200008 23/11/2017
(30) 2016-098845 17/05/2016 JP
(45) 25/10/2022 415
(43) 25/02/2019 371A
(73) TANAKA KIKINZOKU KOGYO K.K. (JP)
7-3, Marunouchi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 1006422 (JP)
(72) SUZUKI Keita (JP); IWAMOTO Hisahiko (JP).
(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) THIẾT BỊ, BỘ KIT VÀ PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH SẮC KÝ MIỄN DỊCH ĐỂ PHÁT HIỆN VIRUT ZIKA

(57) Sáng chế đề cập đến thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch mà cho phép chẩn đoán nhiễm virut Zika đơn giản và nhanh, và mục tiêu của sáng chế là tạo ra thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch mà có thể làm giảm phản ứng chéo với virut thuộc họ *Flaviviridae* mà không phải là virut Zika và có thể phát hiện virut Zika một cách đặc hiệu. Sáng chế đề cập tới thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch để phát hiện virut Zika bao gồm bộ phận thêm mẫu (1), bộ phận giữ chất đánh dấu (2), bộ phận môi trường sắc ký (3) có bộ phận phát hiện (4) và bộ phận hấp thụ (5), trong đó mỗi bộ phận giữ chất đánh dấu (2) và bộ phận phát hiện (4) có chứa kháng thể nhận biết protein không có cấu trúc NS1 của virut Zika có SEQ ID số 1. Sáng chế cũng đề cập đến bộ kit và phương pháp phân tích sắc ký miễn dịch để phát hiện virut Zika.



**Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch để phát hiện virut Zika, bộ kit phân tích sắc ký miễn dịch và phương pháp phân tích sắc ký miễn dịch.

**Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Virut Zika, mà gây ra nhiễm virut Zika, là virut thuộc họ *Flaviviridae* (Flavivirus) cùng với virut dengue, virut gây viêm não Nhật Bản, virut West Nile và các loại tương tự. Biết rằng virut Zika có mặt phổ biến ở động vật có xương sống bao gồm con người và lan truyền qua các vật chủ trung gian như là muỗi và ve. Đã có báo cáo rằng virut Zika lan truyền bằng đường truyền dọc từ mẹ sang con, lây truyền qua đường tình dục, lây truyền qua đường máu và các đường tương tự.

Khi một người bị nhiễm virut Zika, người bị sốt cấp tính (được gọi là sốt Zika) sau giai đoạn ủ bệnh từ ba đến mười hai ngày và có nhiều triệu chứng khác nhau như là viêm màng kết không mưng mủ, đau đầu, đau cơ và đau khớp.

Các loại dược phẩm hoặc vắc xin hiệu quả chống xâm nhiễm virut Zika cho đến nay chưa được tạo ra. Để ngăn chặn sự lan truyền lây nhiễm virut Zika, việc chẩn đoán nhiễm virut Zika ở giai đoạn sớm được mong muốn.

Phép chẩn đoán nhiễm virut Zika cho đến nay đã được thực hiện bằng cách phát hiện ARN của virut Zika qua xét nghiệm máu, xét nghiệm nước tiểu hoặc xét nghiệm nước bọt (Tài liệu phi sáng chế 1). Kháng thể (IgM hoặc IgG) chống lại virut Zika mà bệnh nhân nhiễm virut Zika có trong cơ thể được phát hiện bởi ELISA hoặc kỹ thuật kháng thể huỳnh quang (Tài liệu phi sáng chế 2) làm phương pháp huyết thanh.

Tài liệu trong tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: Chen, LH; Hamer, DH (ngày 2 tháng 2 năm 2016). "Zika Virus: Rapid Spread in Western Hemisphere." Annals of Internal Medicine

Tài liệu phi sáng chế 2: Hayes, Edward B. "Zika Virus Outside Africa". Emerging Infectious Diseases 15 (9): 1347-50

Vấn đề kỹ thuật được giải quyết bởi sáng chế

Tuy nhiên, việc chẩn đoán nhiễm virut Zika thông qua việc phát hiện ARN yêu cầu thiết bị, các hóa chất đặc biệt và tương tự và vì vậy có chi phí cao. Đồng thời, việc kiểm tra này cần có thời gian từ nửa ngày đến khoảng một ngày, và mất thời gian lâu để có được kết quả kiểm tra.

Trong phương pháp phát hiện kháng thể chống lại virut Zika, việc chẩn đoán nhiễm virut Zika được thực hiện gián tiếp bằng cách phát hiện IgM hoặc IgG mà được tạo ra trong cơ thể người sau một thời gian nhất định sau khi nhiễm virut Zika, chứ không trực tiếp phát hiện virut Zika. Vì vậy, phương pháp này không phù hợp để chẩn đoán nhiễm virut Zika ở giai đoạn sớm. Hơn nữa, bởi vì phương pháp này không nhằm trực tiếp phát hiện virut Zika, nên trong suốt quá trình chẩn đoán, khó phân biệt việc nhiễm virut này với, ví dụ, nhiễm virut dengue và virut West Nile, mà thuộc họ *Flaviviridae* giống như virut Zika. Theo đó, phương pháp chẩn đoán nhiễm virut Zika từ giai đoạn nhiễm virut sớm bằng cách trực tiếp phát hiện virut Zika được mong muốn.

**Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Vì vậy, mục đích của sáng chế là tạo ra thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch mà cho phép chẩn đoán nhiễm virut Zika đơn giản và nhanh chóng. Hơn nữa, mục đích khác của sáng chế là tạo ra thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch mà có thể phát hiện nhiễm virut Zika ở giai đoạn sớm bằng cách trực tiếp phát hiện chính virut Zika và có thể làm giảm phản ứng chéo với virut thuộc họ *Flaviviridae* mà không phải virut Zika và phát hiện virut Zika một cách đặc hiệu.

Giải pháp cho vấn đề

Nhờ thành quả của nghiên cứu chuyên sâu để giải quyết các vấn đề này, các tác giả sáng chế phát hiện được rằng các vấn đề này có thể được giải quyết khi các kháng thể mà nhận biết protein không có cấu trúc NS1 của virut Zika được sử dụng trong thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch, và nhờ đó, các tác giả sáng chế đã hoàn thành sáng chế.

Cụ thể là, sáng chế được mô tả dưới đây.

1. Thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch để phát hiện virut Zika trong chất phân tích, bao gồm bộ phận thêm mẫu, bộ phận giữ chất đánh dấu, bộ phận môi trường sắc ký có bộ phận phát hiện và bộ phận hấp thụ,

trong đó mỗi bộ phận giữ chất đánh dấu và bộ phận phát hiện có chứa kháng thể nhận biết protein không có cấu trúc NS1 của virut Zika có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1.

2. Thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch theo mục 1 ở trên, trong đó ít nhất một trong hai bộ phận giữ chất đánh dấu và bộ phận phát hiện chứa kháng thể nhận biết ít nhất một trình tự axit amin trong số ba trình tự axit amin SEQ ID từ 2 đến 4 mà có mặt trong toàn bộ các trình tự axit amin của protein không có cấu trúc NS1.

3. Thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch theo mục 2 ở trên, trong đó mỗi bộ phận giữ chất đánh dấu và bộ phận phát hiện có chứa kháng thể nhận biết ít nhất một trình tự axit amin trong số ba trình tự axit amin SEQ ID từ 2 đến 4 mà có mặt trong toàn bộ các trình tự axit amin của protein không có cấu trúc NS1.

4. Bộ kit phân tích sắc ký miễn dịch bao gồm thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 3 và dung dịch pha loãng chất phân tích để pha loãng và nhuộm màu chất phân tích.

5. Phương pháp phân tích sắc ký miễn dịch để phát hiện virut Zika trong chất phân tích sử dụng bộ kit phân tích sắc ký miễn dịch theo mục 4 ở trên trong đó phương pháp phân tích sắc ký miễn dịch này bao gồm các bước từ (1) đến (4) sau đây:

(1) bước bổ sung dung dịch chứa chất phân tích thu được bằng cách pha loãng chất phân tích bằng dung dịch pha loãng chất phân tích làm mẫu vào bộ phận thêm mẫu,

(2) bước làm cho kháng thể nhận biết protein không có cấu trúc NS1 của virut Zika được giữ trong bộ phận giữ chất đánh dấu để nhận biết virut Zika trong chất phân tích,

(3) bước nhuộm màu chất phân tích và kháng thể là pha động trên bộ phận môi trường sắc ký, và

(4) bước phát hiện virut Zika trong pha động đã được nhuộm màu bằng

kháng thể nhận biết protein không có cấu trúc NS1 của virut Zika có chứa trong bộ phận phát hiện.

Hiệu quả của sáng chế

Theo sáng chế, việc sử dụng các kháng thể mà nhận biết protein không có cấu trúc NS1 mà virut Zika có trong thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch, phản ứng chéo với virut hoặc loại tương tự mà không phải virut Zika có thể được ức chế, và virut Zika có thể được phát hiện một cách nhanh chóng và đặc hiệu. Cụ thể là, sử dụng kháng thể mà nhận biết ít nhất một trình tự axit amin trong số ba trình tự axit amin SEQ ID từ 2 đến 4 mà có mặt trong toàn bộ các trình tự axit amin của NS1 của virut Zika, virut Zika có thể được phát hiện một cách đặc hiệu hơn.

**Mô tả vắn tắt hình vẽ**

Fig.1 là mặt cắt ngang để giải thích kết cấu của thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch theo phương án của sáng chế.

**Mô tả chi tiết sáng chế**

Các phương án thực hiện sáng chế được giải thích dưới đây.

Theo bản mô tả này, "cố định" nghĩa là kháng thể được bố trí trên chất mang như là màng theo cách thức mà kháng thể không di chuyển, và "tiếp tục" nghĩa là kháng thể được bố trí theo cách thức mà kháng thể có thể di chuyển trong chất mang như là màng hoặc trên bề mặt của nó.

Theo bản mô tả này, kháng thể "nhận biết" protein đặc hiệu nghĩa là kháng thể gắn với một phần của các trình tự axit amin mà thông qua đó, protein này có phản ứng kháng nguyên-kháng thể. Hơn nữa, kháng thể "nhận biết" trình tự axit amin đặc hiệu nghĩa là kháng thể gắn với toàn bộ hoặc một phần trình tự axit amin đặc hiệu thông qua phản ứng kháng nguyên-kháng thể.

Chất phân tích

Thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch của sáng chế phát hiện virut Zika trong chất phân tích. Chất phân tích mà có thể được sử dụng cho sáng chế không bị giới hạn cụ thể, miễn là chất phân tích có thể có chứa virut Zika. Cụ thể là, chất phân tích là huyết thanh, huyết tương, máu toàn phần, tinh dịch, dịch tủy hoặc tương tự của cá

thể bị nhiễm virut Zika. Máu toàn phần, huyết thanh và huyết tương được ưu tiên khi xét về việc chẩn đoán nhanh.

Thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch

Thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch để phát hiện virut Zika của sáng chế có bộ phận thêm mẫu mà mẫu có chứa chất phân tích (dưới đây, đơn giản được gọi là mẫu) được đưa vào đó, bộ phận giữ chất đánh dấu giữ chất đánh dấu, bộ phận môi trường sắc ký có bộ phận phát hiện để phát hiện virut Zika và bộ phận hấp thụ để hấp thụ chất lỏng đã đi qua bộ phận phát hiện, và thiết bị này khác biệt ở chỗ mỗi bộ phận giữ chất đánh dấu và bộ phận phát hiện có chứa kháng thể nhận biết protein không có cấu trúc NS1 của virut Zika.

Kháng thể

Các kháng thể được sử dụng cho thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch của sáng chế là các kháng thể mà nhận biết protein không có cấu trúc NS1 của virut Zika (dưới đây cũng đơn giản được gọi là NS1).

NS1 của virut Zika bao gồm 352 gốc axit amin có SEQ ID số 1. Mặc dù khuyến nghị rằng NS1 của virut Zika là protein tham gia vào việc sao chép virut hoặc tương tự như trong các loại vi rụt thuộc họ Flavivirus khác, nhưng các chức năng chi tiết và cấu trúc chưa được biết đến.

Theo sáng chế, sử dụng các kháng thể nhận biết đặc biệt NS1 trong số các loại protein khác nhau mà virut Zika có, phản ứng chéo với virut hoặc tương tự mà không phải là virut Zika có thể bị ức chế, và virut Zika có thể được phát hiện một cách đặc hiệu. Khi các kháng thể của sáng chế được sử dụng, ví dụ, phản ứng chéo với virut dengue, mà thuộc họ *Flaviviridae* giống như virut Zika, hoặc tương tự có thể được giảm. Cụ thể là, như được thể hiện trong các ví dụ được mô tả dưới đây, phản ứng chéo với protein không có cấu trúc NS1 của virut dengue có SEQ ID số 6 không bị gây ra.

Cụ thể là, tốt hơn là ít nhất một trong hai bộ phận giữ chất đánh dấu và bộ phận phát hiện của thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch có chứa kháng thể nhận biết ít nhất một trình tự axit amin trong số ba trình tự axit amin SEQ ID từ 2 đến 4 mà có mặt trong toàn bộ các trình tự axit amin của NS1 của các kháng thể nhận biết NS1.

Khi kháng thể nhận biết ít nhất một trong số các trình tự axit amin được sử dụng, phản ứng chéo với kháng nguyên chứ không phải virut Zika có thể được giảm hơn nữa, và virut Zika có thể được phát hiện một cách đặc hiệu hơn.

Trình tự axit amin SEQ ID số 2 (ENGVQLTVVV GSVKNPMWRG PQRLPVPVNE LPHGWKAWGK) tương ứng với trình tự axit amin của các gốc từ thứ 81 đến 120 của toàn bộ trình tự axit amin của NS1, và trình tự axit amin SEQ ID số 3 (SYFVRAAKTN NSFVVDGDTL KECPLEHRAW NSF) tương ứng với trình tự axit amin của các gốc từ thứ 121 đến 153 của toàn bộ trình tự axit amin của NS1. Trình tự axit amin có SEQ ID số 4 (GP LSHHNTREGY RTQVKGPWHS EELEIRFEEC PGTKVYV) tương ứng với trình tự axit amin của các gốc từ thứ 249 đến 287 của toàn bộ trình tự axit amin của NS1. Mặc dù cùng có thể phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể nhận biết SEQ ID số 5 (CGTRGPSLRS TTASGRVIEE WCCRECTMPP), mà gần đầu C hơn và tương ứng với trình tự axit amin của các gốc từ thứ 291 đến 320 của toàn bộ trình tự axit amin của NS1, nghiên cứu được rằng các đặc tính tương đồng với các protein NS1 của các virut khác cao và vì vậy, tính đặc hiệu không thỏa đáng.

Các ví dụ về các kháng thể theo sáng chế bao gồm các kháng thể tự nhiên như là các kháng thể đa dòng và các kháng thể đơn dòng, các kháng thể khảm, các kháng thể được làm giống như của người  hoặc các kháng thể chuỗi đơn mà có thể được tạo ra bằng cách sử dụng tái tổ hợp gen, các kháng thể ở người mà có thể được tạo ra bằng cách sử dụng động vật chuyển gen tạo ra kháng thể ở người hoặc tương tự, các kháng thể được tạo ra bằng cách hiển thị thể thực khuẩn và các phân mảnh của nó với khả năng gắn kết. Các kháng thể đơn dòng là tốt hơn khi xét về độ nhạy.

Phương pháp tạo ra kháng thể

Các ví dụ về phương pháp tạo ra kháng thể mà nhận biết NS1 của virut Zika được giải thích dưới đây.

Về loài động vật tạo ra kháng thể, ví dụ, con người, chuột nhắt, chuột cống, thỏ, dê, ngựa và tương tự có thể được sử dụng. Globulin miễn dịch có thể là loại bất kỳ trong số IgG, IgM, IgA, IgE và IgD.

Theo một phương án, peptit NS1 của virut Zika là chất sinh miễn dịch có thể

được tạo ra bằng phương pháp sản xuất đã biết thông thường. Cụ thể là, peptit NS1 của virut Zika mà được tách và tinh sạch từ virut Zika, peptit NS1 của virut Zika mà thu được bằng cách biểu hiện gen đã tách dòng của NS1 của virut Zika trong vật chủ như là *Escherichi coli* bằng kỹ thuật di truyền và tách và tinh sạch peptit này hoặc polypeptit mà bao gồm một phần của peptit NS1 của virut Zika có thể được sử dụng làm chất sinh miễn dịch.

Đối với kháng thể đơn dòng, theo phương pháp chung, sau khi lai các tế bào lá lách của chuột được tạo miễn dịch bằng chất sinh miễn dịch và các tế bào u tủy, tế bào lai mà tạo ra kháng thể đích được chọn lọc, và thu được kháng thể đơn dòng được tạo ra bởi tế bào lai (ví dụ, xem kỹ thuật của Köhler và Milstein (Nature 256 (1975) 495-497)). Kháng thể đa dòng thu được bằng cách tách kháng thể đích từ huyết thanh miễn dịch thu được bằng cách làm miễn dịch động vật để tạo ra kháng thể (ví dụ, con người, chuột nhắt, chuột cống, thỏ, dê, ngựa hoặc tương tự) bằng chất sinh miễn dịch theo phương pháp chung.

Sàng lọc để thu được dòng tế bào lai mà tạo ra kháng thể đơn dòng có thể được tiến hành bằng cách nuôi cấy các tế bào lai, ví dụ trong khay vi thể và đo các độ phản ứng của các dịch nổi nuôi cấy của các giếng, trong đó sự sinh trưởng được quan sát với chất sinh miễn dịch bằng xét nghiệm miễn dịch enzym như là ELISA.

Tế bào lai có thể được nuôi cấy sử dụng môi trường (ví dụ, DMEM có chứa 10% huyết thanh thai bò), và dịch nổi nuôi cấy thu được bằng cách quay ly tâm có thể được sử dụng làm dung dịch kháng thể đơn dòng. Đồng thời, hiện tượng cổ trướng có thể do việc tiêm tế bào lai vào khoang bụng của động vật gốc, và hiện tượng cổ trướng thu được có thể được sử dụng làm dung dịch kháng thể đơn dòng. Kháng thể đơn dòng tốt hơn là được phân lập và/hoặc được tinh sạch.

Theo cách thức này, kháng thể mà nhận biết NS1 của virut Zika có thể được tạo ra.

Về vấn đề này, các kháng thể thương mại mà nhận biết NS1 của virut Zika có thể cũng được mua và sử dụng. Ví dụ, dòng 2801116 (kháng thể đơn dòng chống protein Ns1 của virut Zika, Aalto Bio Reagent), dòng 2901126 (kháng thể đơn dòng chống protein Ns1 của virut Zika, Aalto Bio Reagent) hoặc tương tự có thể được

mua và sử dụng.

Khi các kháng thể mà nhận biết NS1 của virut Zika được tạo ra theo cách thức nêu trên, ví dụ, các kháng thể mà nhận biết ít nhất một trình tự axit amin trong số ba trình tự axit amin có SEQ ID từ 2 đến 4, của các kháng thể mà nhận biết NS1 của virut Zika, có thể thu được và được sử dụng bằng cách lựa chọn các tế bào lai mà tạo ra các kháng thể biểu hiện độ phản ứng mạnh hơn với ba trình tự axit amin SEQ ID từ 2 đến 4 từ các tế bào lai mà tạo ra các kháng thể nhận biết NS1 của virut Zika bằng xét nghiệm ELIS, kỹ thuật western blot hoặc tương tự sử dụng các phân mảnh peptit tương ứng với ba trình tự axit amin có SEQ ID từ 2 đến 4.

Thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch

Tiếp theo, phương án của thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch của sáng chế được giải thích có tham chiếu đến hình vẽ.

Theo phương án, thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch của sáng chế gồm có bộ phận thêm mẫu (1), bộ phận giữ chất đánh dấu (2), bộ phận môi trường sắc ký (3), bộ phận phát hiện (4), bộ phận hấp thụ (5) và tấm đáy (6) như được thể hiện trên Fig.1.

Bộ phận thêm mẫu (1) là bộ phận trong thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch mà mẫu có chứa chất phân tích được đưa vào đó. Bộ phận thêm mẫu (1) có thể gồm có tấm có lỗ rỗng có các tính chất mà hấp thụ nhanh chóng mẫu nhưng cho phép mẫu di chuyển nhanh chóng. Các ví dụ về tấm có lỗ rỗng bao gồm giấy lọc xenluloza, sợi thủy tinh, polyuretan, polyaxetat, xenluloza axetat, ni lông, vải sợi bông và tương tự.

Bộ phận giữ chất đánh dấu (2) giữ kháng thể được đánh dấu mà được đánh dấu bằng chất đánh dấu được mô tả dưới đây (dưới đây còn đơn giản được gọi là kháng thể được đánh dấu) và là bộ phận mà trong đó kháng thể được đánh dấu gắn với chất cần được phát hiện trong chất phân tích. Kháng thể được đánh dấu là kháng thể mà nhận biết NS1 của virut Zika, và kháng thể gắn với NS1 của virut Zika trong chất phân tích khi mẫu di chuyển trong bộ phận giữ chất đánh dấu (2).

Đối với bộ phận giữ chất đánh dấu (2), màng làm bằng sợi thủy tinh, xenluloza hoặc tương tự thường được sử dụng.

Lượng kháng thể được đánh dấu trong bộ phận giữ chất đánh dấu (2) thường là từ 0,05 μg/thiết bị đến 0,5 μg/thiết bị, tốt hơn là từ 0,05 μg/thiết bị đến 0,25 μg/thiết bị, tốt hơn nữa là từ 0,07 μg/thiết bị đến 0,1 μg/thiết bị. Lượng kháng thể được đánh dấu trên một đơn vị diện tích của bộ phận giữ chất đánh dấu (2) thường là từ 0,05 $\mu g/cm^2$ đến 1,0 $\mu g/cm^2$, tốt hơn là từ 0,1 $\mu g/cm^2$ đến 0,8 $\mu g/cm^2$, tốt hơn nữa là từ 0,17 $\mu g/cm^2$ đến 0,6 $\mu g/cm^2$.

Enzym hoặc tương tự cũng thường được sử dụng làm chất đánh dấu để đánh dấu kháng thể trong quá trình phân tích sắc ký miễn dịch, nhưng chất mang không tan tốt hơn là được sử dụng làm chất đánh dấu bởi vì chất mang không tan phù hợp để xác định bằng mắt sự có mặt của chất cần được phát hiện. Tức là, theo sáng chế, kháng thể được đánh dấu mà được đánh dấu bằng cách làm nhạy kháng thể nhận biết NS1 của virut Zika bởi chất mang không tan tốt hơn được sử dụng làm kháng thể có chứa trong bộ phận giữ chất đánh dấu (2). Về mặt này, phương pháp đã biết có thể được sử dụng làm phương pháp làm nhạy kháng thể nhận biết NS1 của virut Zika bởi chất mang không tan.

Các hạt kim loại như là vàng, bạc hoặc platin, các hạt oxit kim loại như là oxit sắt, các hạt phi kim như là lưu huỳnh, các hạt nhựa mủ polyme tổng hợp hoặc các chất mang không tan khác có thể được sử dụng là chất mang không tan được sử dụng làm chất đánh dấu, Như được mô tả ở trên, chất mang không tan là chất đánh dấu mà phù hợp để xác định bằng mắt sự có mặt của chất cần được phát hiện và tốt hơn là có màu để làm cho việc xác định bằng mắt được dễ dàng. Chính các hạt kim loại và các hạt oxit kim loại có màu tự nhiên riêng biệt theo đường kính hạt, và các màu có thể được sử dụng làm dấu hiệu.

Chất mang không tan được sử dụng làm chất đánh dấu đặc biệt tốt hơn là các hạt vàng bởi vì các hạt vàng đơn giản để được phát hiện và không dễ dàng dính vào nhau và bởi vì sự tạo ra màu không đặc hiệu không có khả năng xảy ra. Đường kính hạt trung bình của các hạt vàng là, ví dụ, 10 nm đến 250 nm, tốt hơn là 35 nm đến 120 nm. Đường kính hạt trung bình có thể được tính toán bằng cách đo các đường kính tương đương đường tròn diện tích được chiếu của 100 hạt bất kỳ sử dụng các bức ảnh được chiếu được chụp bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM: sản xuất bởi JEOL Ltd., JEM-2010) và tính từ giá trị trung bình. Lượng các hạt vàng trong bộ

phận giữ chất đánh dấu thường là 0,006 $\mu g/cm^2$ đến 0,42 $\mu g/cm^2$, tốt hơn là 0,01 $\mu g/cm^2$ đến 0,3 $\mu g/cm^2$, tốt hơn nữa là 0,01 $\mu g/cm^2$ đến 0,2 $\mu g/cm^2$ tính trên diện tích của bộ phận giữ chất đánh dấu. Điều này là bởi vì, bằng cách xác định lượng trong khoảng này, các hạt được đánh dấu có thể được nhuộm màu trong khi các hạt được phân tán, và các vị trí nhận biết kháng thể không bị ức chế, dẫn đến tăng độ nhạy.

Bộ phận môi trường sắc ký (3) là bộ phận để nhuộm màu sắc ký. Bộ phận môi trường sắc ký (3) là màng trơ gồm có các chất có lỗ rỗng rất nhỏ mà gây ra hiện tượng mao dẫn. Ví dụ, các màng làm bằng nitroxenluloza (dưới đây cũng được gọi là các màng nitroxenluloza) và các màng làm bằng xenluloza axetat (dưới đây cũng được gọi là các màng xenluloza) là tốt hơn, và các màng nitroxenluloza là tốt hơn nữa, bởi vì các màng không có tính chất phản ứng với chất phát hiện hoặc chất cố định được sử dụng cho sắc ký hoặc với chất cần được phát hiện hoặc tương tự và bởi vì các hiệu quả của sáng chế được nâng cao. Về mặt này, các màng xenluloza, các màng ni lông và các vải làm từ chất dẻo có lỗ rỗng (ví dụ, polyetylen, polypropylen hoặc tương tự) có thể cũng được sử dụng.

Các màng nitroxenluloza có thể là các màng nitroxenluloza bất kỳ miễn là các màng chủ yếu có chứa nitroxenluloza, và các màng có chứa nitroxenluloza làm vật liệu chính, như là sản phẩm tinh khiết hoặc sản phẩm được trộn lẫn nitroxenlulozat, có thể được sử dụng.

Các màng nitroxenluloza có thể cũng có chứa chất mà nâng cao hơn nữa hiện tượng mao dẫn. Chất này tốt hơn là chất mà làm giảm sức căng bề mặt của bề mặt màng và có tính ưa nước. Ví dụ, chất mà có hai tác động, vừa ưa nước, vừa kỵ nước, tương tự các sacarit, các dẫn xuất của axit amin, các este của axit béo, các chất hoạt động bề mặt tổng hợp khác nhau, các loại rượu hoặc tương tự, và chất mà không ảnh hưởng đến sự di chuyển của chất cần được phát hiện và không ảnh hưởng đến sự nhuộm màu của chất đánh dấu là tốt hơn.

Các màng nitroxenluloza có lỗ rỗng và gây ra hiện tượng mao dẫn. Chỉ số của hiện tượng mao dẫn có thể được xác nhận bằng cách đo tốc độ hấp thụ nước (thời gian hấp thụ nước: thời gian dòng mao dẫn). Tốc độ hấp thụ nước ảnh hưởng đến độ nhạy phát hiện và thời gian thí nghiệm.

Dạng và kích thước của bộ phận môi trường sắc ký (3), mà thường là màng bất kỳ trong số các màng nitroxenluloza hoặc các màng xenluloza được mô tả ở trên, không bị giới hạn cụ thể và có thể là bất kỳ dạng nào hoặc bất kỳ kích thước nào miễn là chúng phù hợp cho vận hành thực tế và để quan sát các kết quả phản ứng.

Để làm cho việc vận hành đơn giản hơn, bệ đỡ làm bằng chất dẻo hoặc tương tự tốt hơn được tạo ra trên bề mặt đáy của bộ phận môi trường sắc ký (3). Các tính chất và trạng thái của bệ đỡ không bị giới hạn cụ thể, nhưng khi các kết quả đo được quan sát bằng cách đánh giá bằng mắt, bệ đỡ tốt hơn là bệ đỡ có màu mà không tương tự với màu thu được bởi chất đánh dấu, và bệ đỡ thường tốt hơn là không màu hoặc màu trắng.

Để ngăn chặn sự suy giảm độ chính xác của phép phân tích do hấp thụ không đặc hiệu trên bộ phận môi trường sắc ký (3), bộ phận môi trường sắc ký (3) có thể trải qua xử lý phong tỏa bằng phương pháp đã biết theo nhu cầu. Đối với xử lý phong tỏa, thông thường, protein như là huyết thanh bò albumin, sữa gầy, cazein hoặc gelatin tốt hơn được sử dụng. Sau khi xử lý phong tỏa, bộ phận môi trường sắc ký (3) có thể được rửa bằng một hoặc sự kết hợp của hai hoặc nhiều hơn hai chất hoạt động bề mặt như là Tween 20, Triton X-100 hoặc SDS theo nhu cầu.

Bộ phận phát hiện (4) được tạo ra ở vị trí bất kỳ trên bộ phận môi trường sắc ký (3) và có chứa kháng thể mà nhận biết NS1 của virut Zika. Kháng thể mà nhận biết NS1 của virut Zika có thể được cố định trên bộ phận phát hiện (4) theo phương pháp chung.

Trong bộ phận phát hiện (4), virut Zika trong chất phân tích mà đã đi qua trên bộ phận môi trường sắc ký là pha động gắn một cách đặc hiệu theo cách thức mà virut Zika bị kẹp ở giữa kháng thể nhận biết NS1 của virut Zika mà được cố định trên bộ phận phát hiện (4) và kháng thể nhận biết NS1 của virut Zika mà chất đánh dấu gắn với nó.

Lượng kháng thể nhận biết NS1 của virut Zika chứa trong bộ phận phát hiện (4) thường là 0,1 μg/thiết bị đến 3,0 μg/thiết bị, tốt hơn là 0,3 μg/thiết bị đến 2,0 μg/thiết bị, tốt hơn nữa là 0,3 μg/thiết bị đến 1,0 μg/thiết bị. Lượng kháng thể nhận biết NS1 của virut Zika trên đơn vị diện tích của bộ phận phát hiện (4) thường là

0,04 μg/cm$^2$ đến 1,0 μg/cm$^2$, tốt hơn là 0,125 μg/cm$^2$ đến 0,8 μg/cm$^2$, tốt hơn nữa là 0,125 μg/cm$^2$ đến 0,42 μg/cm$^2$.

Bộ phận hấp thụ (5) được tạo ra ở đầu của bộ phận môi trường sắc ký (3) để hấp thụ chất lỏng như là chất phân tích và dung dịch nhuộm màu mà đã đi qua bộ phận phát hiện (4). Theo sáng chế, ví dụ, sợi thủy tinh, bột giấy, sợi xenluloza hoặc các loại vải không dệt này mà polyme như là các polyme acrylic và chất ưa nước có nhóm etylen oxit hoặc tương tự được bổ sung vào đó được sử dụng cho bộ phận hấp thụ (5), và sợi thủy tinh đặc biệt tốt hơn.

Tấm đáy (6) là vật liệu đế. Một bề mặt của nó dính bởi vì chất dính được bôi lên bề mặt hoặc băng dính được gắn vào, và bộ phận thêm mẫu (1), bộ phận giữ chất đánh dấu (2), bộ phận môi trường sắc ký (3), bộ phận phát hiện (4) và bộ phận hấp thụ (5) được gắn chặt một phần hoặc toàn bộ và được tạo ra trên bề mặt dính. Vật liệu đế không bị giới hạn cụ thể miễn là tấm đáy (6) không thẩm thấu hoặc không cho dung dịch mẫu đi qua do có chất dính.

Thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch của sáng chế thường trải qua xử lý sấy khô trước khi được hoàn thiện thành sản phẩm. Nhiệt độ sấy khô, ví dụ, 20°C đến 50°C, và thời gian sấy khô là từ 0,5 giờ đến 1 giờ.

Trong thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch của sáng chế, ít nhất một trong hai bộ phận giữ chất đánh dấu và bộ phận phát hiện tốt hơn là có chứa kháng thể nhận biết ít nhất một trình tự axit amin trong số ba trình tự axit amin có SEQ ID từ 2 đến 4 mà có mặt trong toàn bộ các trình tự axit amin của NS1 của virut Zika. Khi kháng thể nhận biết ít nhất một trong số các các trình tự axit amin được sử dụng, phản ứng chéo với kháng nguyên khác có thể được giảm hơn nữa, và virut Zika có thể được phát hiện một cách đặc hiệu hơn.

Ở đây, ngay cả khi chỉ một trong hai bộ phận giữ chất đánh dấu và bộ phận phát hiện có chứa kháng thể nhận biết ít nhất một trình tự axit amin trong số ba trình tự axit amin có SEQ ID từ 2 đến 4 mà có mặt trong toàn bộ các trình tự axit amin của NS1 của virut Zika, bộ phận còn lại trong hai bộ phận giữ chất đánh dấu và bộ phận phát hiện, mà không chứa kháng thể, có thể có chứa kháng thể nhận biết các trình tự axit amin bất kỳ trong các trình tự axit amin có SEQ ID số 1.

Tốt hơn nữa là cả bộ phận giữ chất đánh dấu và bộ phận phát hiện có chứa kháng thể nhận biết ít nhất một trình tự axit amin trong số ba trình tự axit amin có SEQ ID từ 2 đến 4 mà có mặt trong toàn bộ các trình tự axit amin của NS1 của virut Zika.

Các kháng thể chứa trong cả bộ phận giữ chất đánh dấu và bộ phận phát hiện có thể là các kháng thể nhận biết ít nhất một trình tự axit amin trong số ba trình tự axit amin có SEQ ID từ 2 đến 4 mà có mặt trong toàn bộ các trình tự axit amin của NS1 của virut Zika, và các kháng thể chứa trong cả bộ phận giữ chất đánh dấu và bộ phận phát hiện có thể là các kháng thể mà nhận biết các trình tự axit amin thuộc cùng số SEQ ID. Trong trường hợp này, nghiên cứu rằng kháng thể chứa trong bộ phận giữ chất đánh dấu và kháng thể chứa trong bộ phận phát hiện gắn với các trình tự các axit amin ở các vị trí khác nhau trong các trình tự axit amin thuộc cùng số SEQ ID.

Thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch của sáng chế có thể cũng được thiết kế như được giải thích dưới đây để cho thiết bị có thể phát hiện virut Zika trong chất phân tích và đồng thời phát hiện kháng thể (IgM ở người và/hoặc IgG ở người) chống virut Zika trong chất phân tích.

Trong thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch của sáng chế, kháng thể nhận biết kháng thể (IgM ở người và/hoặc IgG ở người) trong chất phân tích chứa riêng biệt trong bộ phận giữ chất đánh dấu (2) ngoài kháng thể nhận biết NS1 của virut Zika.

Trong trường hợp này, bộ phận phát hiện mà có chứa peptit có toàn bộ các trình tự axit amin của NS1 của virut Zika có SEQ ID số 1 hoặc các trình tự axit amin có SEQ ID số 1 đã mất, thay thế, thêm từ một đến một vài gốc axit amin, peptit thu được bằng cách bổ sung protein khác hoặc tương tự cho peptit hoặc tương tự được tạo ra riêng biệt trên bộ phận môi trường sắc ký (3) ngoài bộ phận phát hiện (4) được mô tả ở trên. Tốt hơn là, bộ phận phát hiện mà có chứa ít nhất một peptit trong số các peptit có trình tự các axit amin có SEQ ID từ 2 đến 4 được mô tả ở trên, bất kỳ pepti nào trong số các peptit có trình tự các axit amin có SEQ ID từ 2 đến 4 bị xóa, thay thế hoặc bổ sung từ một đến một vài gốc axit amin hoặc ít nhất một peptit trong số các peptit thu được bằng cách bổ sung protein khác hoặc tương tự vào các peptit được tạo ra riêng biệt ngoài bộ phận phát hiện (4) được mô tả ở trên.

Khi thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch có cấu trúc như vậy, kháng thể chống virut Zika trong chất phân tích có thể cũng được phát hiện.

Điều này nghĩa là, khi máu hoặc tương tự được thu thập từ cá thể nhiễm virut Zika được sử dụng làm chất phân tích ví dụ, kháng thể (IgM ở người và/hoặc IgG ở người) nhận biết NS1 của virut Zika chứa trong chất phân tích được nhận biết bởi kháng thể nhận biết IgM ở người và/hoặc IgG ở người chứa trong bộ phận giữ chất đánh dấu (2), và kháng thể nhận biết IgM ở người và/hoặc IgG ở người gắn với peptit chứa trong bộ phận phát hiện mà được tạo ra riêng biệt trên bộ phận môi trường sắc ký (3) ngoài bộ phận phát hiện (4), điều này cho phép phát hiện kháng thể chống virut Zika trong chất phân tích.

Như được mô tả ở trên, khi thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch được sử dụng, virut Zika trong chất phân tích có thể được phát hiện trực tiếp, và, đồng thời, nhiễm virut Zika có thể được chẩn đoán gián tiếp bằng cách phát hiện kháng thể (IgM ở người và/hoặc IgG ở người) chống virut Zika trong chất phân tích.

Bởi vì tỉ lệ của virut Zika trong chất phân tích so với kháng thể chống virut Zika cũng phụ thuộc vào thời gian (ngày) từ khi nhiễm virut Zika hoặc tương tự, nên thời gian (ngày) từ khi nhiễm virut Zika có thể được dự đoán tương đối bằng cách phát hiện đồng thời cả hai.

Về mặt này, khi bộ phận giữ chất đánh dấu có chứa cả kháng thể nhận biết NS1 của virut Zika và kháng thể nhận biết kháng thể chống virut Zika như được mô tả ở trên, tốt hơn là lựa chọn các kháng thể mà không phản ứng với nhau hoặc dính vào nhau làm các kháng thể. Khi các kháng thể phản ứng với nhau và dính vào nhau, thiết bị có thể được thiết kế theo cách thức mà các kháng thể không tiếp xúc với nhau giữa bộ phận giữ chất đánh dấu và bộ phận phát hiện.

Bộ kit phân tích sắc ký miễn dịch

Bộ kit phân tích sắc ký miễn dịch của sáng chế bao gồm thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch và dung dịch pha loãng chất phân tích để pha loãng và nhuộm màu chất phân tích.

Trong bộ kit phân tích sắc ký miễn dịch của sáng chế, dung dịch pha loãng chất phân tích có thể cũng được sử dụng làm dung dịch nhuộm màu. Nước thường

được sử dụng làm dung môi của dung dịch pha loãng chất phân tích, và dung dịch đệm, muối và chất hoạt động bề mặt không ion chứa. Một hoặc hai hoặc nhiều hơn hai loại protein, hợp chất polyme (như là PVP), chất hoạt động bề mặt ion hoặc polyanion để, ví dụ, thúc đẩy phản ứng kháng nguyên-kháng thể hoặc ức chế phản ứng không đặc hiệu, chất kháng khuẩn, chất tạo chelat và tương tự có thể được bổ sung thêm.

Khi dung dịch pha loãng chất phân tích được sử dụng làm dung dịch nhuộm màu, chất phân tích và dung dịch nhuộm màu có thể được trộn lẫn trước và sau đó được cung cấp/đưa vào, làm mẫu, bộ phận thêm mẫu để nhuộm màu hoặc dung dịch nhuộm màu có thể được cung cấp/đưa vào bộ phận thêm mẫu để nhuộm màu sau khi cung cấp/bổ sung mẫu có chứa chất phân tích vào bộ phận thêm mẫu trước đó.

Phương pháp phân tích sắc ký miễn dịch

Phương pháp phân tích sắc ký miễn dịch của sáng chế bao gồm các bước từ (1) đến (4) sau đây, và virut Zika chứa trong chất phân tích được phát hiện sử dụng bộ kit phân tích sắc ký miễn dịch.

(1) Bước bổ sung dung dịch chứa chất phân tích thu được bằng cách pha loãng chất phân tích bằng dung dịch pha loãng chất phân tích làm mẫu vào bộ phận thêm mẫu

(2) bước làm cho kháng thể nhận biết protein không có cấu trúc NS1 của virut Zika được giữ trong bộ phận giữ chất đánh dấu để nhận biết virut Zika trong chất phân tích

(3) Bước nhuộm màu chất phân tích và kháng thể là pha động trên bộ phận môi trường sắc ký

(4) Bước phát hiện virut Zika trong pha động đã được nhuộm màu bằng kháng thể nhận biết protein không có cấu trúc NS1 của virut Zika chứa trong bộ phận phát hiện.

Mỗi bước được giải thích dưới đây.

(1) Bước bổ sung dung dịch chứa chất phân tích thu được bằng cách pha loãng chất phân tích bằng dung dịch pha loãng chất phân tích làm mẫu vào bộ phận thêm mẫu

Trong bước (1), đầu tiên, dung dịch chứa chất phân tích tốt hơn là thu được bằng cách điều chỉnh hoặc pha loãng chất phân tích bằng dung dịch pha loãng chất phân tích đến nồng độ mà ở đó chất phân tích di chuyển nhẹ nhàng trong môi trường sắc ký miễn dịch mà không làm suy giảm độ chính xác của phép đo. Các chất được mô tả ở trên có thể được sử dụng làm dung dịch pha loãng chất phân tích. Thứ hai, lượng nhất định (thường là từ 0,1 ml đến 2 ml) dung dịch chứa chất phân tích được đưa vào bộ phận thêm mẫu (1) làm mẫu. Khi mẫu được đưa vào bộ phận thêm mẫu (1), mẫu bắt đầu di chuyển trong bộ phận thêm mẫu (1).

Chất phân tích được sử dụng trong sáng chế là chất phân tích mà có thể có chứa virut Zika, mà là chất cần được phát hiện, như được mô tả ở trên. Các ví dụ cụ thể bao gồm huyết thanh, huyết tương, máu toàn phần, tinh dịch, dịch tủy hoặc tương tự của bệnh nhân nhiễm virut Zika, nhưng chất phân tích không bị giới hạn ở các ví dụ này.

(2) Bước làm cho kháng thể nhận biết protein không có cấu trúc NS1 của virut Zika được giữ trong bộ phận giữ chất đánh dấu để nhận biết virut Zika trong chất phân tích

Bước (2) là bước chuyển mẫu đã được đưa vào bộ phận thêm mẫu trong bước (1) đến bộ phận giữ chất đánh dấu (2) và làm cho kháng thể nhận biết NS1 của virut Zika mà chất đánh dấu được gắn vào đó và được giữ trong bộ phận giữ chất đánh dấu để nhận biết virut Zika, mà là chất cần được phát hiện, trong chất phân tích. Các chất được mô tả ở trên có thể được sử dụng làm chất đánh dấu.

(3) Bước nhuộm màu chất phân tích và kháng thể là pha động trên bộ phận môi trường sắc ký

Bước (3) là bước trong đó, sau khi virut Zika, mà là chất cần được phát hiện, đã được nhận biết bởi kháng thể nhận biết NS1 của virut Zika mà chất đánh dấu được gắn vào đó trong bộ phận giữ chất đánh dấu trong bước (2), chất phân tích và kháng thể được làm cho đi qua trên bộ phận môi trường sắc ký làm pha động.

(4) Bước phát hiện virut Zika trong pha động đã được nhuộm màu bằng kháng thể nhận biết protein không có cấu trúc NS1 của virut Zika chứa trong bộ phận phát hiện

Bước (4) là bước trong đó virut Zika trong chất phân tích mà đã đi qua trên

bộ phận môi trường sắc ký làm pha động gắn một cách đặc hiệu bởi phản ứng gắn kháng nguyên-kháng thể đặc hiệu theo cách thức mà virut Zika ở giữa kháng thể nhận biết NS1 của virut Zika mà bị cố định trên bộ phận phát hiện và kháng thể nhận biết NS1 của virut Zika mà chất đánh dấu đã được gắn vào đó trong bước (2), dẫn đến bộ phận phát hiện có màu.

Khi virut Zika, mà là chất cần được phát hiện, có mặt, chất đánh dấu được hòa tan trong hàm lượng nước của mẫu không gây ra phản ứng gắn đặc hiệu ngay cả khi chất đánh dấu đi xuyên qua bộ phận phát hiện trên bộ phận môi trường sắc ký, và vì vậy bộ phận phát hiện không có màu.

Cuối cùng, hàm lượng nước trong dung dịch chứa chất phân tích di chuyển đến bộ phận hấp thụ (5).

Các ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được giải thích thêm dưới đây với các ví dụ, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ sau.

Ví dụ tạo ra 1 (tạo ra các kháng thể)

Các kháng thể mà nhận biết NS1 của virut Zika được tạo ra như sau.

Đầu tiên, peptit có trình tự axit amin của NS1 của virut Zika có SEQ ID số 1 được tổng hợp. Vật chủ trung gian biểu hiện His-tag, pET302/NT-His, bị cắt bằng enzym giới hạn, *Eco*RI, sau đó được xử lý bằng phosphataza có tính kiềm là xử lý khử phôtphat và được trộn lẫn với peptit, và phản ứng thắt được gây ra mà sử dụng bộ kit thắt DNA phiên bản. 2 (Takar Bio Inc.).

Plasmit NS1 tái tổ hợp mà gen đích đã được kết hợp vào được đưa vào vật chủ biểu hiện protein tái tổ hợp, *E. coli* BL(DE3)pLysS (Novagen). Vi khuẩn được chuyển được nuôi cấy trên khay thạch aga, và khuẩn lạc thu được nuôi cấy bằng môi trường chất lỏng LB. Sự biểu hiện của NS1 tái tổ hợp được gây ra bằng cách bổ sung 1 mM IPTG (Takar Bio Inc.), và sau đó *E. coli* được thu thập. Vi khuẩn được thu thập được để lơ lửng một lần nữa trong đệm hòa tan [0,5% Triron X-100 (sigma), 10 mM imidazol, 20 mM phosphat và 0,5 M NaCl (pH 7,4) (Amersham)] và được hòa tan bằng xử lý siêu âm, và NS1 tái tổ hợp được làm tinh khiết sử dụng bộ kit Histrap

(Amersham). Protein đã được làm tinh khiết được phân tích sử dụng nước muối đệm phosphat (dưới đây được gọi là PBS), và vì vậy thu được NS1 tái tổ hợp đích.

Các kháng thể đơn dòng chống NS1 tái tổ hợp được tạo ra bằng cách sử dụng NS1 tái tổ hợp thu được làm kháng nguyên để tạo miễn dịch. Các kháng thể đơn dòng được tạo ra như sau theo phương pháp chung. NS1 tái tổ hợp với lượng 100 μg và lượng tương đương tá chất Freund hoàn chỉnh (Difco) được trộn lẫn, và chuột (BALB/c, năm tuần tuổi, Japan SLC, Inc.) được tạo miễn dịch ba lần. Các tế bào lá lách được sử dụng để dung hợp tế bào. Các tế bào u tủy của chuột, các tế bào Sp2/0-Ag14 (Shulman *và cộng sự*, 1978) được sử dụng để dung hợp tế bào. Môi trường nuôi cấy thu được bằng cách bổ sung 0,3 mg/ml L-glutamine, 100 U/ml penicillin G kali, 100 μg/ml streptomycin sulfat và 40 μg/ml Gentacin vào môi trường Eagle biến đổi của Dulbecco (Gibco) (DMEM) và bổ sung thêm huyết thanh thai bò (JRH) ở nồng độ 10% được sử dụng để nuôi cấy các tế bào. Các tế bào được dung hợp bằng cách trộn lẫn các tế bào lá lách của chuột được tạo miễn dịch và các tế bào Sp2/0-Ag14 và bổ sung dung dịch polyetylen glycol (Sigma) vào đó. Các tế bào đã dung hợp được nuôi cấy trong HAT-DMEM [huyết thanh có chứa DMEM chứa natri hypoxantine 0,1 mM, aminopterin 0,4 μM và thymidine 0,016 mM (Gibco), và việc tạo ra các kháng thể trong chất nổi trên mặt nuôi cấy được xác nhận bằng xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym (ELISA). Các tế bào dương tính tạo ra kháng thể được nuôi cấy trong HT-DMEM [huyết thanh-có chứa DMEM có chứa natri hypoxantine 0,1 mM và thymidine 0,16 mM] và được nuôi cấy thêm trong huyết thanh có chứa DMEM.

Các tế bào được tách dòng được tiêm vào ổ bụng của các con chuột (BALB/c, sống ẩn dật, Japan SLC, Inc.) mà 2,6,10,14-tetramethylpentadecane (Sigma) đã được tiêm vào đó, và các vết xưng cổ trướng được thu thập. Các vết xưng cổ trướng được đưa vào cột G protein, và các kháng thể đơn dòng được làm tinh khiết.

Các kháng thể đơn dòng vì vậy thu được được sàng lọc bằng phương pháp ELISA trực tiếp mà sử dụng khay 96 giếng trong đó NS1 tái tổ hợp được cố định.

Kết quả là, thu được ba loại kháng thể nhận biết NS1 của virut Zika. Ba loại

kháng thể được gọi là các kháng thể từ số 1 đến số 3 trong phần giải thích sau đây.

Ví dụ tham chiếu 1 (xét nghiệm ELIS)

Các kháng thể nhận biết NS1 của virut Zika được kiểm tra xem có được tạo ra trong ví dụ tạo ra 1 hay không (các kháng thể từ số 1 đến số 3) nhận biết ít nhất một trình tự axit amin trong số ba trình tự axit amin SEQ ID từ 2 đến 4 bằng xét nghiệm ELIS. Các peptit được sử dụng cho xét nghiệm ELISA là ba loại peptit có các trình tự axit amin SEQ ID từ 2 đến 4 (các peptit từ 1 đến 3 được thể hiện dưới đây) và được tạo ra bằng cách tổng hợp peptit pha rắn, mà là phương pháp chung để tổng hợp peptit bằng phương pháp hóa học.

Peptit 1: ENGVQLTVVV GSVKNPMWRG PQRLPVPVNE LPHGWKAWGK (SEQ ID số 2)

Peptit 2: SYFVRAAKTN NSFVVDGDTL KECPLEHRAW NSF (SEQ ID số: 3)

Peptit 3: GP LSHHNTREGY RTQVKGPWHS EELEIRFEEC PGTKVYV (SEQ ID số 4)

Đầu tiên, hỗn hợp của các peptit từ 1 đến 3 (dưới đây được gọi là hỗn hợp peptit) được cố định ở nồng độ 100 ng/mL trong các mô-đun Nunc Immuno (sản xuất bởi Thermo Fisher Scientific, mã 469949) khay 96 giếng ELISA.

Là các kháng thể sơ cấp, 100 µL các dung dịch của các kháng thể từ số 1 đến số 3 được tạo ra ở trên (1 µg/mL) được cho vào các giếng riêng biệt và được nuôi cấy ở 37°C trong một giờ. Sau đó, các dung dịch kháng thể sơ cấp được loại bỏ, và các giếng được rửa ba lần bằng 300 µL PBST (Tween 20 0,05% trong PBS). Tiếp theo, 100 µL dung dịch BS 1% được bổ sung vào các giếng, và khay được nuôi cấy ở 7°C trong 1,5 giờ. Sau đó, dung dịch BS được loại bỏ, và các giếng được rửa ba lần bằng 300 µL PBST (Tween 20 0,05% trong PBS). Các chất lỏng còn lại trong các giếng được loại bỏ bằng cách đập khay vào khăn giấy.

Là kháng thể thứ cấp, 100 µL kháng thể kháng chuột IgG (H+L) 1 mg/mL, thỏ, IgG Whole (toàn bộ phân tử), peroxidaza tiếp hợp (sản xuất bởi Wako Pure Chemical Industries, Ltd., mã 014-17611) được bổ sung vào các giếng, và khay được

nuôi cấy ở 37°C trong 1,5 giờ. Sau đó, dung dịch kháng thể thứ cấp được loại bỏ, và các giếng được rửa ba lần bằng 300 µL PBST (Tween 20 0,05% trong PBS). Các chất lỏng còn lại trong các giếng được loại bỏ bằng cách đập khay vào khăn giấy.

Cơ chất Sure Blue Reserve TMB Microwell peroxidaza (1 thành phần) (sản xuất bởi KPL, mã 53-00-01) với lượng 100 µL được bổ sung vào các giếng làm cơ chất tạo màu, và phản ứng được đẩy mạnh trong 15 phút. Phản ứng bị ngừng lại bằng cách bổ sung 100 µL axit sulfuric 2N. Sau đó, các độ hấp thụ ở 450 nm được đo mà sử dụng máy đọc khay vi thể (sản xuất bởi BIORAD). Dấu + được đưa ra khi phản ứng được quan sát so sánh với mẫu trắng và dấu – được đưa ra khi phản ứng không được quan sát. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1

| Kháng thể | Số 1 | Số 2 | Số 3 |
|---|---|---|---|
| Hỗn hợp peptit | + | + | - |

Từ các kết quả trên, phát hiện ra rằng các kháng thể số 1 và số 2 nhận biết ít nhất một trình tự axit amin trong số ba trình tự axit amin SEQ ID từ 2 đến 4.

Ví dụ 1

Bộ kit phân tích sắc ký miễn dịch gồm có dung dịch pha loãng chất phân tích và thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch bao gồm bộ phận thêm mẫu (1), bộ phận giữ chất đánh dấu (2), bộ phận môi trường sắc ký (3) có bộ phận phát hiện (4) và bộ phận hấp thụ (5) được tạo ra.

Kháng thể số 1 được tạo ra ở trên được sử dụng làm kháng thể chứa trong bộ phận giữ chất đánh dấu, và kháng thể số 2 được tạo ra ở trên được sử dụng làm kháng thể chứa trong bộ phận phát hiện. Chi tiết được giải thích dưới đây.

(1) Tạo ra bộ phận thêm mẫu

Vải không dệt làm bằng sợi thủy tinh (sản xuất bởi Millipore Corporation: 300 mm ×30 mm) được sử dụng làm bộ phận thêm mẫu.

(2) Tạo ra bộ phận giữ chất đánh dấu

0,1 ml kháng thể số 1 mà đã được pha loãng đến nồng độ 0,05 mg/ml bằng

đệm phosphat (pH 7,4) được bổ sung vào 0,5 ml huyền phù vàng dạng keo (sản xuất bởi Tanak Kikinzoku Kogyo K.K.: LC 40 nm), và hỗn hợp được để yên ở nhiệt độ phòng trong 10 phút.

Tiếp theo, 0,1 ml đệm phosphat (pH 7,4) có chứa huyết thanh bò albumin (BSA) 1% tính theo khối lượng được bổ sung vào, và hỗn hợp được để yên tiếp ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Sau đó, sau khi khuấy kỹ, hỗn hợp được quay ly tâm ở 8000× g trong 15 phút, và chất nổi trên mặt được loại bỏ. Sau đó, 0,1 ml đệm phosphat (pH 7,4) có chứa BS 1% tính theo khối lượng được bổ sung vào. Dung dịch chất đánh dấu được tạo ra bằng các quá trình nêu trên.

Dung dịch thu được bằng cách bổ sung 300 μL dung dịch nước trehalose 10% tính theo khối lượng và 1,8 mL nước cất vào 300 μL dung dịch chất đánh dấu được tạo ra ở trên được bôi đều lên miếng sợi thủy tinh có kích thước 12 mm ×300 mm (sản xuất bởi Millipore Corporation) và sau đó được sấy khô bằng máy sấy chân không, và bộ phận giữ chất đánh dấu vì vậy được tạo ra.

(3) Tạo ra bộ phận môi trường sắc ký và bộ phận phát hiện

Tấm này làm bằng nitroxenluloza (sản xuất bởi Millipore Corporation, tên sản phẩm: HF120, 300 mm ×25 mm) được sử dụng làm màng.

Tiếp theo, 150 μL dung dịch thu được bằng cách pha loãng kháng thể số 2 đến nồng độ 1,0 mg/ml bằng đệm phosphat (pH 7,4) có chứa rượu isopropyl 5% tính theo khối lượng được đưa vào bộ phận phát hiện trên màng đã được sấy khô theo hàng với chiều rộng 1 mm mà sử dụng ống định lượng dùng cho sắc ký miễn dịch "XYZ3050" (sản xuất bởi BIODOT) ở lượng 1 μL/mm (25 μL trên mỗi tấm).

Hơn nữa, để kiểm tra xem chất đánh dấu hạt nano vàng có được nhuộm màu hay chưa và kiểm tra tốc độ nhuộm màu, dung dịch thu được bằng cách pha loãng huyết thanh miễn dịch dẫn xuất từ dê có khoảng ái lực rộng với chất đánh dấu hạt nano vàng với đệm phosphat (pH 7,4) được đưa vào phần đối chứng (vạch đối chứng) ở phía dòng ra của bộ phận phát hiện. Sau đó, bằng cách sấy khô ở 50°C trong 30 phút và sấy khô ở nhiệt độ phòng qua đêm, bộ phận môi trường sắc ký và bộ phận phát hiện được tạo ra.

(4) Tạo ra thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch

Tiếp theo, bộ phận thêm mẫu, bộ phận giữ chất đánh dấu, bộ phận môi trường sắc ký có bộ phận phát hiện và vải không dệt làm bằng sợi thủy tinh làm bộ phận hấp thụ để hấp thụ mẫu đã được nhuộm màu và chất đánh dấu được gắn lần lượt từng chất một vào vật liệu đế gồm có tấm đáy. Sau đó, sản phẩm thu được được cắt với chiều rộng 5 mm bằng thiết bị cắt, và vì vậy thu được thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch. Chiều dài của bộ phận giữ chất đánh dấu theo hướng nhuộm màu mẫu được điều chỉnh đến 12 mm.

(5) Điều chế dung dịch pha loãng chất phân tích

50 mM đệm HEPES (pH 7,5) có chứa 1% tính theo khối lượng chất hoạt động bề mặt không ion (hỗn hợp 1:1 của NP-40 sản xuất bởi Nacalai Tesque, Inc. và Nonidet MN-811 sản xuất bởi NOF Corporation) được điều chế và được sử dụng làm dung dịch pha loãng chất phân tích để pha loãng chất phân tích.

Ví dụ 2

Bộ kit phân tích sắc ký miễn dịch của ví dụ 2 được tạo ra theo cùng cách thức như trong ví dụ 1 ngoại trừ việc kháng thể số 2 được tạo ra ở trên được sử dụng làm kháng thể chứa trong bộ phận giữ chất đánh dấu và ngoại trừ việc kháng thể số 1 được tạo ra ở trên được sử dụng làm kháng thể chứa trong bộ phận phát hiện trong ví dụ 1.

Ví dụ 3

Bộ kit phân tích sắc ký miễn dịch của ví dụ 3 được tạo ra theo cùng cách thức như trong ví dụ 1 ngoại trừ việc kháng thể số 2 được tạo ra ở trên được sử dụng làm kháng thể chứa trong bộ phận giữ chất đánh dấu trong ví dụ 1.

Ví dụ 4

Bộ kit phân tích sắc ký miễn dịch của ví dụ 4 được tạo ra theo cùng cách thức như trong ví dụ 2 ngoại trừ việc kháng thể số 3 được tạo ra ở trên được sử dụng làm kháng thể chứa trong bộ phận giữ chất đánh dấu trong ví dụ 2.

Ví dụ 5

Bộ kit phân tích sắc ký miễn dịch của ví dụ 5 được tạo ra theo cùng cách

thức như trong ví dụ 1 ngoại trừ việc kháng thể số 3 được tạo ra ở trên được sử dụng làm kháng thể chứa trong bộ phận giữ chất đánh dấu trong ví dụ 1.

Ví dụ thử nghiệm 1 (Phép đo sử dụng kháng nguyên tái tổ hợp NS1 của virut Zika)

Trong thí nghiệm này, phép đo được thực hiện sử dụng các bộ kit phân tích sắc ký miễn dịch của các ví dụ từ 1 đến 5 được tạo ra ở trên và sử dụng kháng nguyên tái tổ hợp NS1 của virut Zika làm chất phân tích. Kháng nguyên tái tổ hợp NS1 của virut Zika (sản xuất bởi MeridianLife Science) được sử dụng làm chất phân tích, và các dung dịch chứa chất phân tích được điều chế bằng cách pha loãng chất phân tích đến nồng độ 5 ng/mL hoặc 20 ng/mL bằng dung dịch pha loãng chất phân tích và được sử dụng làm các mẫu phân tích dương tính.

Mỗi dung dịch chứa chất phân tích đã được điều chế với lượng 90 μL được đưa vào các bộ phận thêm mẫu của các thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch và được nhuộm màu, và các vạch phát hiện được quan sát bằng mắt sau 15 phút. Bất kỳ dấu nào trong số các dấu sau được đưa ra: "+++" khi vạch phát hiện màu đỏ hiển thị rõ nét hơn; "++" khi vạch màu đỏ hiển thị rõ nét; "+" khi đường màu đỏ hiển thị; "±" khi vạch màu đỏ hiển thị mờ nhạt; và "-" khi vạch màu đỏ có thể không quan sát được. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 2.

Các mẫu chất phân tích làm đối chứng âm được tạo ra mà sử dụng PBS và huyết thanh người chuẩn (sản xuất bởi Access Bio) thay vì các chất phân tích làm đối chứng dương, và thử nghiệm giống nhau được tiến hành. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2

| | | Ví dụ 1 | Ví dụ 2 | Ví dụ 3 | Ví dụ 4 | Ví dụ 5 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Bộ phận giữ chất đánh dấu | | Số 1 | Số 2 | | Số 3 | |
| Bộ phận phát hiện | | Số 2 | Số 1 | Số 2 | Số 1 | Số 2 |
| Chất phân tích làm đối chứng dương | NS1 của virut Zik 5 ng/mL | ++ | ++ | + | ± | - |
| | NS1 của virut Zik 20 ng/mL | +++ | ++ | ++ | + | + |
| Chất phân tích làm đối chứng âm | PBS | - | - | - | - | - |
| | Huyết thanh người chuẩn | - | - | - | - | - |

Kết quả là, phát hiện ra rằng virut Zika trong chất phân tích có thể được phát hiện khi các thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch của sáng chế mà sử dụng các kháng thể nhận biết NS1 của virut Zika được sử dụng. Cụ thể là, phát hiện ra rằng các thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch của các ví dụ từ 1 đến 3, trong đó bộ phận giữ chất đánh dấu và bộ phận phát hiện có chứa kháng thể số 1 hoặc số 2 nhận biết ít nhất một trình tự axit amin trong số ba trình tự axit amin SEQ ID từ 2 đến 4, có thể phát hiện virut Zika với độ nhạy cao hơn.

Ví dụ thử nghiệm 2 (phép đo sử dụng virut Zika bất hoạt)

Trong thí nghiệm này, phép đo được thực hiện mà sử dụng các bộ kit phân tích sắc ký miễn dịch của các ví dụ từ 1 đến 4 được tạo ra ở trên và sử dụng virut Zika bất hoạt làm chất phân tích. Virut Zika bị bất hoạt bằng nhiệt (sản xuất bởi ZeptMetrix, nồng độ của dung dịch ban đầu: $TCID_{50}=1\times10^{5,23}$ U/mL) được sử dụng làm chất phân tích, và các dung dịch chứa chất phân tích được điều chế bằng cách pha loãng chất phân tích để có được nồng độ ban đầu, pha loãng 10 lần, pha loãng 100 lần và pha loãng 1000 lần bằng dung dịch pha loãng chất phân tích.

Phép đo được thực hiện theo cùng cách thức như trong ví dụ thử nghiệm 1

mà sử dụng các dung dịch chứa chất phân tích đã được điều chế làm các mẫu. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3

| | | Ví dụ 1 | Ví dụ 2 | Ví dụ 3 | Ví dụ 4 |
|---|---|---|---|---|---|
| | Bộ phận giữ chất đánh dấu | Số 1 | Số 2 | | Số 3 |
| | Bộ phận phát hiện | Số 2 | Số 1 | Số 2 | Số 1 |
| Tỉ lệ pha loãng | ×1 | +++ | +++ | ++ | ++ |
| | ×10 | +++ | +++ | + | + |
| | ×100 | +++ | ++ | + | - |
| | ×1000 | ++ | ++ | ± | - |

Kết quả là, các bộ kit phân tích sắc ký miễn dịch của các ví dụ từ 1 đến 4, mà thể hiện phản ứng dương tính khi chất phân tích là kháng nguyên tái tổ hợp NS1 của virut Zika, cũng thể hiện phản ứng dương tính khi chất phân tích là virut Zika bất hoạt.

Cụ thể là, phát hiện ra rằng các bộ kit phân tích sắc ký miễn dịch của các ví dụ từ 1 đến 3, trong đó bộ phận giữ chất đánh dấu và bộ phận phát hiện có chứa kháng thể số 1 hoặc số 2 nhận biết ít nhất một trình tự axit amin trong số ba trình tự axit amin SEQ ID từ 2 đến 4, có thể phát hiện virut Zika bất hoạt với độ nhạy cao hơn.

Ví dụ thử nghiệm 3 (phép đo sử dụng virut dengue)

Trong thí nghiệm này, phép đo được thực hiện mà sử dụng các bộ kit phân tích sắc ký miễn dịch của các ví dụ từ 1 đến 4 được tạo ra ở trên và sử dụng virut dengue bất hoạt làm chất phân tích. Virut dengue loại 2 AbD (sản xuất bởi serotec) được sử dụng làm chất phân tích, và dung dịch chứa chất phân tích được điều chế bằng cách pha loãng chất phân tích đến nồng độ $1\times10^7$ pfu/mL bằng dung dịch pha loãng chất phân tích.

Phép đo được thực hiện theo cùng cách thức như trong ví dụ thử nghiệm 1 mà sử dụng dung dịch chứa chất phân tích được điều chế làm mẫu. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4

| | Ví dụ 1 | Ví dụ 2 | Ví dụ 3 | Ví dụ 4 |
|---|---|---|---|---|
| Bộ phận giữ chất đánh dấu | Số 1 | Số 2 | | Số 3 |
| Bộ phận phát hiện | Số 2 | Số 1 | Số 2 | Số 1 |
| Virut dengue | - | - | - | - |

Kết quả là, phát hiện ra rằng các bộ kit phân tích sắc ký miễn dịch của sáng chế không gây ra phản ứng chéo với virut dengue, mà tương đồng cao với virut Zika, và có thể phát hiện virut Zika một cách đặc hiệu.

Từ các kết quả của các ví dụ ở trên, phát hiện ra rằng virut Zika trong chất phân tích có thể được phát hiện khi các thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch của sáng chế sử dụng các kháng thể nhận biết NS1 của virut Zika được sử dụng. Cụ thể là, phát hiện ra rằng các bộ kit phân tích sắc ký miễn dịch trong đó mỗi bộ phận giữ chất đánh dấu và bộ phận phát hiện có chứa một trong hai kháng thể số 1 và số 2, mà là các kháng thể nhận biết ít nhất một trình tự axit amin trong số ba trình tự axit amin SEQ ID từ 2 đến 4, có thể phát hiện virut Zika với độ nhạy đặc biệt cao.

Hơn nữa, phát hiện ra rằng virut Zika có thể được phát hiện một cách đặc hiệu không gây ra phản ứng chéo với virut khác mà tương đồng cao với virut Zika khi các thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch của sáng chế mà sử dụng các kháng thể nhận biết NS1 của virut Zika được sử dụng.

Mặc dù sáng chế đã được giải thích chi tiết mà sử dụng các phương án cụ thể, nhưng điều hiển nhiên đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật là các thay đổi và các biến thể khác nhau có thể được thực hiện mà không xa rời tinh thần và phạm vi của sáng chế. Sáng chế dựa trên đơn sáng chế Nhật Bản nộp ngày 17, tháng 5 năm 2016 (đơn sáng chế số 2016-098845), mà được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn tính toàn vẹn của nó.

Danh sách số chỉ dẫn

1 Bộ phận thêm mẫu
2 Bộ phận giữ chất đánh dấu
3 Bộ phận môi trường sắc ký
4 Bộ phận phát hiện
5 Bộ phận hấp thụ
6 Tấm đáy

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch để phát hiện virut Zika trong chất phân tích, bao gồm bộ phận thêm mẫu, bộ phận giữ chất đánh dấu, bộ phận môi trường sắc ký có bộ phận phát hiện và bộ phận hấp thụ,

trong đó mỗi bộ phận giữ chất đánh dấu và bộ phận phát hiện có chứa kháng thể nhận biết protein không có cấu trúc NS1 của virut Zika có SEQ ID số 1.

2. Thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch theo điểm 1, trong đó ít nhất một trong hai bộ phận giữ chất đánh dấu và bộ phận phát hiện có chứa kháng thể nhận biết ít nhất một trình tự axit amin trong số ba trình tự axit amin có SEQ ID từ 2 đến 4 mà có mặt trong toàn bộ trình tự axit amin của protein không có cấu trúc NS1.

3. Thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch theo điểm 2, trong đó mỗi bộ phận giữ chất đánh dấu và bộ phận phát hiện có chứa kháng thể nhận biết ít nhất một trình tự axit amin trong số ba trình tự axit amin có SEQ ID từ 2 đến 4 mà có mặt trong toàn bộ trình tự axit amin của protein không có cấu trúc NS1.

4. Bộ kit phân tích sắc ký miễn dịch bao gồm thiết bị phân tích sắc ký miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 và dung dịch pha loãng chất phân tích để pha loãng và nhuộm màu chất phân tích.

5. Phương pháp phân tích sắc ký miễn dịch để phát hiện virut Zika trong chất phân tích sử dụng bộ kit phân tích sắc ký miễn dịch theo điểm 4, trong đó phương pháp phân tích sắc ký miễn dịch bao gồm các bước từ (1) đến (4) sau đây:

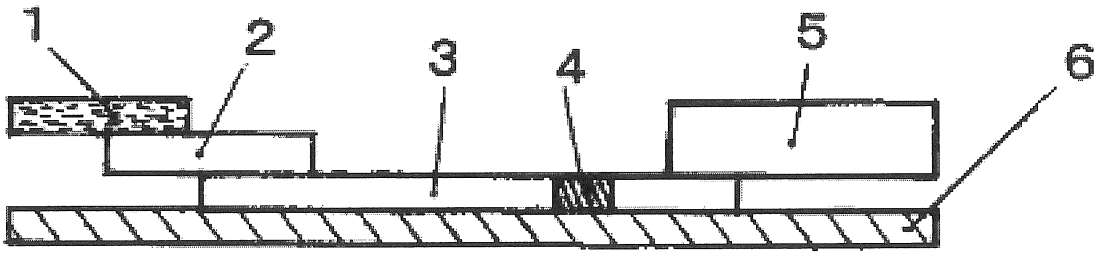
(1) bước bổ sung dung dịch chứa chất phân tích thu được bằng cách pha loãng chất phân tích bằng dung dịch pha loãng chất phân tích làm mẫu vào bộ phận thêm mẫu,

(2) bước làm cho kháng thể nhận biết protein không có cấu trúc NS1 của virut Zika được giữ trong bộ phận giữ chất đánh dấu để nhận biết virut Zika trong chất phân tích,

(3) bước nhuộm màu chất phân tích và kháng thể là pha động trên bộ phận môi trường sắc ký, và

(4) bước phát hiện virut Zika trong pha động đã được nhuộm màu bằng kháng thể nhận biết protein không có cấu trúc NS1 của virut Zika chứa trong bộ phận phát hiện.

**Fig. 1**



# DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> TANAKA KIKINZOKU KOGYO K.K.

<120> THIẾT BỊ, BỘ KIT VÀ PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH SẮC KÝ MIỄN DỊCH ĐỂ PHÁT HIỆN VIRUT ZIKA

<130> W522652

<150> JP2016/098845
<151> 2016-5-17

<160> 6

<170> Sáng chế phiên bản 3.5

<210> 1
<211> 352
<212> PRT
<213> Virut Zika

<400> 1

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

Thr Gly Val Phe Ile Tyr Asn Asp Val Glu Ala Trp Arg Asp Arg Tyr
20 25 30

Lys Tyr His Pro Asp Ser Pro Arg Arg Leu Ala Ala Ala Val Lys Gln
35 40 45

Ala Trp Glu Glu Gly Ile Cys Gly Ile Ser Ser Val Ser Arg Met Glu
50 55 60

Asn Ile Met Trp Lys Ser Val Glu Gly Glu Leu Asn Ala Ile Leu Glu
65 70 75 80

Glu Asn Gly Val Gln Leu Thr Val Val Val Gly Ser Val Lys Asn Pro
85 90 95

Met Trp Arg Gly Pro Gln Arg Leu Pro Val Pro Val Asn Glu Leu Pro
100 105 110

His Gly Trp Lys Ala Trp Gly Lys Ser Tyr Phe Val Arg Ala Ala Lys
115 120 125

Thr Asn Asn Ser Phe Val Val Asp Gly Asp Thr Leu Lys Glu Cys Pro
130 135 140

Leu Glu His Arg Ala Trp Asn Ser Phe Leu Val Glu Asp His Gly Phe
145 150 155 160

Gly Val Phe His Thr Ser Val Trp Leu Lys Val Arg Glu Asp Tyr Ser
165 170 175

Leu Glu Cys Asp Pro Ala Val Ile Gly Thr Ala Val Lys Gly Arg Glu
180 185 190

Ala Ala His Ser Asp Leu Gly Tyr Trp Ile Glu Ser Glu Lys Asn Asp
195 200 205

Thr Trp Arg Leu Lys Arg Ala His Leu Ile Glu Met Lys Thr Cys Glu
210 215 220

Trp Pro Lys Ser His Thr Leu Trp Thr Asp Gly Val Glu Glu Ser Asp
225 230 235 240

Leu Ile Ile Pro Lys Ser Leu Ala Gly Pro Leu Ser His His Asn Thr
245 250 255

Arg Glu Gly Tyr Arg Thr Gln Val Lys Gly Pro Trp His Ser Glu Glu
260 265 270

Leu Glu Ile Arg Phe Glu Glu Cys Pro Gly Thr Lys Val Tyr Val Glu
275 280 285

Glu Thr Cys Gly Thr Arg Gly Pro Ser Leu Arg Ser Thr Thr Ala Ser
290 295 300

Gly Arg Val Ile Glu Glu Trp Cys Cys Arg Glu Cys Thr Met Pro Pro

305 310 315 320

Leu Ser Phe Arg Ala Lys Asp Gly Cys Trp Tyr Gly Met Glu Ile Arg
325 330 335

Pro Arg Lys Glu Pro Glu Ser Asn Leu Val Arg Ser Met Val Thr Ala
340 345 350

<210> 2
<211> 40
<212> PRT
<213> Virut Zika

<400> 2

Glu Asn Gly Val Gln Leu Thr Val Val Val Gly Ser Val Lys Asn Pro
1 5 10 15

Met Trp Arg Gly Pro Gln Arg Leu Pro Val Pro Val Asn Glu Leu Pro
20 25 30

His Gly Trp Lys Ala Trp Gly Lys
35 40

<210> 3
<211> 33
<212> PRT
<213> Virut Zika

<400> 3

Ser Tyr Phe Val Arg Ala Ala Lys Thr Asn Asn Ser Phe Val Val Asp
1 5 10 15

Gly Asp Thr Leu Lys Glu Cys Pro Leu Glu His Arg Ala Trp Asn Ser
20 25 30

Phe

<210> 4

<211> 39
<212> PRT
<213> Virut Zika

<400> 4

Gly Pro Leu Ser His His Asn Thr Arg Glu Gly Tyr Arg Thr Gln Val
1 5 10 15

Lys Gly Pro Trp His Ser Glu Glu Leu Glu Ile Arg Phe Glu Glu Cys
20 25 30

Pro Gly Thr Lys Val Tyr Val
35

<210> 5
<211> 30
<212> PRT
<213> Virut Zika

<400> 5

Cys Gly Thr Arg Gly Pro Ser Leu Arg Ser Thr Thr Ala Ser Gly Arg
1 5 10 15

Val Ile Glu Glu Trp Cys Cys Arg Glu Cys Thr Met Pro Pro
20 25 30

<210> 6
<211> 380
<212> PRT
<213> Virut Dengue

<400> 6

Met Asn Ser Arg Ser Thr Ser Leu Ser Val Ser Leu Val Leu Val Gly
1 5 10 15

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

Val Val Ser Trp Lys Asn Lys Glu Leu Lys Cys Gly Ser Gly Ile Phe
35 40 45

```
Ile Thr Asp Asn Val His Thr Trp Thr Glu Gln Tyr Lys Phe Gln Pro
    50                  55                  60

Glu Ser Pro Ser Lys Leu Ala Ser Ala Ile Gln Lys Ala His Glu Glu
65                  70                  75                  80

Gly Ile Cys Gly Ile Arg Ser Val Thr Arg Leu Glu Asn Leu Met Trp
                85                  90                  95

Lys Gln Ile Thr Pro Glu Leu Asn His Ile Leu Ser Glu Asn Glu Val
            100                 105                 110

Lys Leu Thr Ile Met Thr Gly Asp Ile Lys Gly Ile Met Gln Ala Gly
        115                 120                 125

Lys Arg Ser Leu Gln Pro Gln Pro Thr Glu Leu Lys Tyr Ser Trp Lys
    130                 135                 140

Thr Trp Gly Lys Ala Lys Met Leu Ser Thr Glu Ser His Asn Gln Thr
145                 150                 155                 160

Phe Leu Ile Asp Gly Pro Glu Thr Ala Glu Cys Pro Asn Thr Asn Arg
                165                 170                 175

Ala Trp Asn Ser Leu Glu Val Glu Asp Tyr Gly Phe Gly Val Phe Thr
            180                 185                 190

Thr Asn Ile Trp Leu Lys Leu Arg Glu Lys Gln Asp Val Phe Cys Asp
        195                 200                 205

Ser Lys Leu Met Ser Ala Ala Ile Lys Asp Asn Arg Ala Val His Ala
    210                 215                 220

Asp Met Gly Tyr Trp Ile Glu Ser Ala Leu Asn Asp Thr Trp Lys Ile
225                 230                 235                 240
```

```
Glu Lys Ala Ser Phe Ile Glu Val Lys Ser Cys His Trp Pro Lys Ser
                245                 250                 255

His Thr Leu Trp Ser Asn Gly Val Leu Glu Ser Glu Met Ile Ile Pro
            260                 265                 270

Lys Asn Phe Ala Gly Pro Val Ser Gln His Asn Tyr Arg Pro Gly Tyr
        275                 280                 285

His Thr Gln Thr Ala Gly Pro Trp His Leu Gly Lys Leu Glu Met Asp
    290                 295                 300

Phe Asp Phe Cys Glu Gly Thr Thr Val Val Val Thr Glu Asp Cys Gly
305                 310                 315                 320

Asn Arg Gly Pro Ser Leu Arg Thr Thr Thr Ala Ser Gly Lys Leu Ile
                325                 330                 335

Thr Glu Trp Cys Cys Arg Ser Cys Thr Leu Pro Pro Leu Arg Tyr Arg
            340                 345                 350

Gly Glu Asp Gly Cys Trp Tyr Gly Met Glu Ile Arg Pro Leu Lys Glu
        355                 360                 365

Lys Glu Glu Asn Leu Val Asn Ser Leu Val Thr Ala
    370                 375                 380
```