



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107287166 A

(43)申请公布日 2017.10.24

(21)申请号 201610227302.1

G01N 33/577(2006.01)

(22)申请日 2016.04.13

G01N 33/68(2006.01)

(83)生物保藏信息

PTA-122740 2016.01.12

PTA-122741 2016.01.12

(71)申请人 磨法生物科技股份有限公司

地址 中国台湾新北市深坑区北深路三段
270巷12号8楼之1

(72)发明人 王惠昌

(74)专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限
责任公司 11287

代理人 沈锦华

(51)Int.Cl.

C12N 5/20(2006.01)

C07K 16/14(2006.01)

权利要求书2页 说明书6页

(54)发明名称

抗蕈类免疫调节蛋白的单株抗体及其应用

(57)摘要

本发明涉及抗蕈类免疫调节蛋白(Fungal Immunomodulatory Protein,FIP)之单株抗体,以及应用该单株抗体的检测方法。在某些实施例中,该检测方法包含利用该单株抗体快速、专一地检测各类型产品中FIP之含量。

1. 一种融合瘤, 其为寄存于美国典型菌种保存中心(American Type Culture Collection, ATCC)的融合瘤2C8, 寄存编号为PTA-122740; 或为寄存于美国典型菌种保存中心的融合瘤4E4, 寄存编号为PTA-122741。

2. 一种单株抗体, 其为由寄存于美国典型菌种保存中心(American Type Culture Collection, ATCC)的融合瘤2C8, 寄存编号为PTA-122740, 或融合瘤4E4(寄存编号PTA-122741)所产生; 或所述单株抗体的结合片段。

3. 一种检测样品中蕈类免疫调节蛋白(FIP)的方法, 其包括下列步骤:

(a) 提供由本发明融合瘤所产生的单株抗体2C8或4E4;

(b) 将所述单株抗体粘附在固相支撑物上形成抗体-支撑物结合体;

(c) 将样品与抗体-支撑物结合体结合, 以形成结合复合物;

(d) 提供一讯号产生物质, 并将所述讯号产生物质与所述抗体结合; 及

(e) 将所述结合有讯号产生物质的抗体与步骤(c)中的所述结合复合物接触, 并测量由讯号产生的物质所产生的讯号。

4. 一种检测样品中蕈类免疫调节蛋白(FIP)的方法, 其包括下列步骤:

(a) 提供由本发明融合瘤所产生的第一单株抗体, 其为2C8或4E4;

(b) 提供由本发明融合瘤所产生的第二单株抗体, 其为2C8或4E4;

(c) 将所述第一单株抗体粘附在固相支撑物上形成第一单株抗体-支撑物结合体;

(d) 将样品与步骤(c)中的所述结合体结合, 以形成结合复合物;

(e) 提供一讯号产生物质, 并将所述讯号产生物质与所述第二抗体结合; 及

(f) 将所述结合有讯号产生物质的抗体与步骤(d)中的所述结合复合物接触, 并测量由讯号产生的物质所产生的讯号。

5. 根据权利要求4的方法, 其中所述第一单株抗体为4E4, 及所述第二单株抗体为2C8。

6. 根据权利要求3或4的方法, 其中支撑物质可为微滴盘(microtiter plate)、微球体(bead)、乳胶、硅胶或膜。

7. 根据权利要求6的方法, 其中膜为滤纸、聚氯乙烯膜、聚苯乙烯膜、硝化纤维膜、耐龙膜及玻璃纤维膜。

8. 根据权利要求3或4的方法, 其中讯号产生物质为荧光物、冷光标记物、放射性元素或酶。

9. 根据权利要求8的方法, 其中所述荧光物为镧系荧光物。

10. 根据权利要求8的方法, 其中所述冷光标记物为生物冷光标记物或化学冷光标记物。

11. 根据权利要求8的方法, 其中所述酶为过氧化氢酶、辣根过氧化氢酶、碱性磷酸酯酶或p-半乳糖苷酶。

12. 根据权利要求3或4的方法, 其中所述样品为蕈类。

13. 根据权利要求12的方法, 其中所述蕈类为灵芝、秀珍菇、金针菇或杏鲍菇。

14. 根据权利要求13的方法, 其中所述灵芝为赤芝、松杉灵芝或小孢子灵芝。

15. 一种检测样品中蕈类免疫调节蛋白(FIP)的套组, 包括:(1)固相支撑物,(2)本发明单株抗体2C8或4E4, 及(3)讯号产生物质。

16. 根据权利要求15的套组, 其中所述套组为检验试片。

17. 根据权利要求16的套组,其中所述检验试片包括(1)样品接触区,(2)单株抗体一讯号产生物质区,(3)视需要具有反应测试区,及(4)液体回收区。

抗蕈类免疫调节蛋白的单株抗体及其应用

技术领域

本发明涉及一种单株抗体以及应用该单株抗体的检测方法。特定言之,本发明开发抗蕈类免疫调节蛋白(fungal immunomodulatory protein,FIP)的单株抗体,并以该单株抗体快速、专一地检测各类型产品中FIP含量。

背景技术

[0001] FIP是一群普遍存在于食药菇菌中并具有免疫调节活性的小分子蛋白质。最早发现的FIP是Kino等人于1989年从*Ganoderma lucidum*的菌丝体分离,确认其活性后命名为LZ-8。随后其他研究团队也发现了八种以上的FIPs,包含牛樟芝(*Antrodia camphorate*)的FIP-aca、金针菇(*Flammulina velutipes*)的FIP-fve、草菇(*Volvariella volvacea*)的FIP-vvo、灵芝(*G.lucidum*)的LZ-9、松杉灵芝(*G.tsugae*)的FIP-gts、紫芝(*G.sinensis*)的FIP-gsi、茯苓(*Poria cocos*)的FIP-pcp、云芝的FIP-tve以及小孢子灵芝(*G.microsporum*)的GMI(FIP-gmi)等(Hsu等人,1997,*Biochem J*,323(Pt 2),557-565;Ko等人,1995,*Eur J Biochem*,228,244-249;Xuanwei等人,2008,*Planta Med*,74,197-200;及US 7,601,808)),其中以灵芝属真菌(*Ganoderma spp.*)来源的FIP为大宗。不同来源的FIP具有类似的基因序列及蛋白质立体结构,并以同源双体(Homodimer)的结构存在于自然界中。

[0002] FIPs在*in vitro*及*in vivo*试验中皆显示了免疫调节功能,但不同FIP对不同实验样品具不同程度作用,其效果亦有剂量差异性。FIP具过敏体质调节作用,可抑制全身过敏反应(systemic anaphylaxis reaction)及局部过敏反应(Arthus reaction),推测与刺激活化 T_{H1} (T helper 1)的细胞激素有关。LZ-8可有效抑制老鼠抗体的生产,其可能藉阻断抗体的产生,达到抑制过敏的效果,相似的结论也在其他FIP研究中发现。此外,LZ-8可抑制非肥胖型糖尿病属(nonobese diabetic,NOD)的自体免疫性第一型糖尿病发生,这有可能是藉由调控细胞表面附着的分子进而调节细胞间的交互作用所致。LZ-8亦可提高异体移植的成功率,可显著推迟排斥现象的发生。研究指出FIP-fve可有效活化T细胞,被活化的T细胞可分泌 $IFN-\gamma$,与细胞间黏附分子(adhesion molecular)生成有密切关系。此活化路径与p38活化的Mitogen-activated protein kinase(MAPK)调节有关,故FIP并非直接调节免疫系统,而是透过调控免疫系统中各细胞间的交互作用,进而达到抗肿瘤及免疫调节的功能。另外,以FIP-fve处理脾细胞后,其IL-2及 $IFN-\gamma$ 基因会被诱导,故推测其是影响细胞转录层次的调控。利用巴斯德毕赤氏酵母菌(*Pichia pastoris*)生产的重组蛋白质rLZ-8刺激人体T细胞株Jurkat cells,发现其可能与T细胞受体(T cell receptor,TCR)上的CD45结合,并藉由促进B细胞表面的MHC class II、CD80/B7-1及CD86/B7-2表达,刺激Src酪氨酸蛋白质激酶家族(Src protein tyrosine kinase family,Src PTK family)、活性氧物种(reactive oxygen species,ROS)、钙离子和不同蛋白质激酶的路径,促使IL-2表达。

[0003] FIP的诸多生理活性功能使其成为具有开发成药品、健康食品等产品的潜力目标。此类产品可以各种形式生产、贩卖,包括菇菌子实体、菌丝体或其粗淬物以及异源蛋白表达生产、纯化的纯蛋白质等。然而,目前并无任何方法可检测各类型产品中FIP含量,因而有必

要开发检测产品中FIP含量的方法。

发明内容

本发明提供一种抗FIP的单株抗体,以及利用该抗体检测各类型产品中FIP含量。

[0004] 本发明提供一种融合瘤2C8,其寄存于美国典型菌种保存中心(American Type Culture Collection,ATCC),寄存编号为PTA-122740;或融合瘤4E4,其寄存于美国典型菌种保存中心,寄存编号PTA-122741。本发明另提供一种单株抗体,其是由寄存于美国典型菌种保存中心(American Type Culture Collection,ATCC)的融合瘤2C8,寄存编号为PTA-122740,或融合瘤4E4(寄存编号PTA-122741)所产生;或该单株抗体的结合片段。

[0005] 本发明又提供一种检测样品中免疫调节蛋白(FIP)的方法,其包括下列步骤:

- (a)提供由本发明融合瘤所产生的单株抗体2C8或4E4;
- (b)将该单株抗体粘附在固相支撑物上形成抗体-支撑物结合体;
- (c)将样品与抗体-支撑物结合体结合,以形成结合复合物;
- (d)提供一讯号产生物质,并将该讯号产生物质与该抗体结合;及
- (e)将该结合有讯号产生物质的抗体与步骤(c)中的该结合复合物接触,并测量由讯号产生的物质所产生的讯号。

根据本发明的一具体实施例,本发明检测方法包括提供由本发明融合瘤所产生的第一单株抗体,其为2C8或4E4;提供由本发明融合瘤所产生的第二单株抗体,其为2C8或4E4;将该第一单株抗体粘附在固相支撑物上形成第一单株抗体-支撑物结合体;将样品与步骤(c)中的该结合体结合,以形成结合复合物;提供一讯号产生物质,并将该讯号产生物质与该第二抗体结合;及将该结合有讯号产生物质的抗体与步骤(d)中的该结合复合物接触,并测量由讯号产生的物质所产生的讯号。

[0006] 本发明又提供一种样品中免疫调节蛋白(FIP)的套组,包括(1)固相支撑物,(2)本发明单株抗体2C8或4E4,及(3)讯号产生物质。

具体实施方式

[0007] 本发明首先开发FIP的单株抗体,并优选以酵素联结免疫吸附分析(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)作为检测方法,以快速、专一地检测各类型产品中FIP含量。

[0008] 本发明的一态样提供一种融合瘤,其为寄存于美国典型菌种保存中心(American Type Culture Collection,ATCC)的融合瘤2C8,寄存编号为PTA-122740;或为寄存于美国典型菌种保存中心,寄存编号PTA-122741的融合瘤4E4。

[0009] 本发明的另一态样提供一种单株抗体,其是由寄存于美国典型菌种保存中心(American Type Culture Collection,ATCC)的融合瘤2C8,寄存编号为PTA-122740,或融合瘤4E4(寄存编号PTA-122741)所产生;或该单株抗体的结合片段。

[0010] 在一具体实施例,本发明融合瘤及单株抗体的制备是从小孢子灵芝(*Ganoderma microsporum*)选殖出小孢子灵芝免疫调节蛋白(*G.microsporum immunomodulatory protein,GMI*)基因gmi,该基因序列已揭露于美国第7601808号专利。接着再利用习知的分子生物技术,使用合适的载体及宿主细胞得到包含前述基因DNA的转形细胞株。

[0011] 所得转形细胞株经培养后可获得免疫调节蛋白,经技艺中习知的方法(如胶体管柱过滤)纯化后得到纯化的免疫调节蛋白。使用纯化的免疫调节蛋白作为免疫原免疫动物以产生具特异性的单株抗体。经筛选后得到优选的单株抗体。

[0012] 在另一态样,本发明提供一种检测样品中免疫调节蛋白(FIP)的方法,其包括下列步骤:

- (a)提供由本发明融合瘤所产生的单株抗体2C8或4E4;
- (b)将该单株抗体粘附在固相支撑物上形成抗体-支撑物结合体;
- (c)将样品与抗体-支撑物结合体结合,以形成结合复合物;
- (d)提供一讯号产生物质,并将该讯号产生物质与该抗体结合;及
- (e)将该结合有讯号产生物质的抗体与步骤(c)中的该结合复合物接触,并测量由讯号产生的物质所产生的讯号。

[0013] 在一具体实施例,本发明检测方法包括下列步骤:

- (a)提供由本发明融合瘤所产生的第一单株抗体,其为2C8或4E4;
- (b)提供由本发明融合瘤所产生的第二单株抗体,其为2C8或4E4;
- (c)将该第一单株抗体粘附在固相支撑物上形成第一单株抗体-支撑物结合体;
- (d)将样品与步骤(c)中的该结合体结合,以形成结合复合物;
- (e)提供一讯号产生物质,并将该讯号产生物质与该第二抗体结合;及
- (f)将该结合有讯号产生物质的抗体与步骤(d)中的该结合复合物接触,并测量由讯号产生的物质所产生的讯号。

[0014] 在进一步的具体实施例,该第一单株抗体为4E4,且该第二单株抗体为2C8。

[0015] 在本发明的具体实施例,该支撑物质可为微滴盘(microtiter plate)、微球体(bead)、乳胶、硅胶及适宜蛋白质固定的膜材料;优选地,该膜材料包括,但不限于,滤纸、聚氯乙烯膜、聚苯乙烯膜、硝化纤维膜、耐龙膜及玻璃纤维膜等。在本发明的另一具体实施例,该讯号产生物质包括,但不限于,荧光物,如镧系荧光物;冷光标记物(luminescents),如生物冷光标记物及化学冷光标记物;放射性元素;及酶,如过氧化氢酶、辣根过氧化氢酶、碱性磷酸酯酶、p-半乳糖苷酶等。

[0016] 本发明的另一态样提供一种检测样品中免疫调节蛋白(FIP)的套组,包括(1)固相支撑物,(2)本发明单株抗体2C8或4E4,及(3)讯号产生物质。在本发明的一具体实施例,以免疫分析检验试片为最简便,其可包括(1)样品接触区,(2)单株抗体-讯号产生物质区,(3)视需要具有反应测试区,及(4)液体回收区。该检验试片或套组是由具毛细现象且可并吸附液体的材质所构成,例如滤纸、聚氯乙烯膜、聚苯乙烯膜、硝化纤维膜、耐龙膜及玻璃纤维膜等。讯号产生物质可使用荧光物,如镧系荧光物;冷光标记物(luminescents),如生物冷光标记物及化学冷光标记物;放射性元素;及酵素,如过氧化氢酶、辣根过氧化氢酶、碱性磷酸酯酶、p-半乳糖苷酶。

[0017] 样品接触区位于检验试片的一端,与待测样品相接触。样品吸附于检验试片,并藉毛细现象向检验试片的另一端移动。单株抗体-讯号产生物质区接近样品接触区,该区包括单株抗体,与具有高稳定性、可判读的讯号产生物质结合形成复合体。视需要,该检验试片具有反应测试区,位于单株抗体-讯号产生物质区的上方,该区固定有显色反应物。

[0018] 本发明的一些具体实施例,其中样品为蕈类,更佳为灵芝、木耳、秀珍菇、洋菇、鸿

喜菇、金针菇、香菇或杏鲍菇。优选地,该灵芝为赤芝、松杉灵芝或小孢子灵芝。

[0019] 所有习知的抗体/抗原结合侦测方法及反应试剂皆可适用于实施本发明的检验方法,例如酵素连结免疫吸附分析法(ELISA)、三明治分析法、竞争性分析法、乳胶凝集反应、层析免疫分析法等。这些习知技术包括揭示于下列文献,1.The Protein Protocols Handbooks, John M.(Humana Press).2.Quality control of the latex-fixation test, Am.J.Clin.Pathol.72(4):591-6,1979.3.Usefulness of a rapid immuno-migration test for the detection of canine monocytic ehrlichiosis in Africa,Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.37(1)31-37,2014。

[0020] 为了使本发明的目的、方法、特征及原理更清楚明了,兹以下列实例配合所附的图式作详细叙述,但此等实例并不对本发明范围作任何局限。

实例1本发明单株抗体的制备

[0021] 重组MM-FIP基因选殖及生产菌株建立

[0022] 本法所用的MM-FIP免疫调节蛋白基因是以分子生物技术从小孢子灵芝(*Ganoderma microsporum*)选殖出小孢子灵芝免疫调节蛋白(*G.microsporum immunomodulatory protein*, GMI)基因gmi.PCR所得的DNA片段及载体pPICZ α A经限制酶(EcoRI/XbaI)截切及接合过程既可得表达载体pPICZ α A-GMI,详细过程如专利(US patent 7601808)内文所述。转形用*P.pastoris* KM71H胜任细胞(competent cell)的制备是依照Pichia expression kit(Invitrogen)操作手册进行。表达载体pPICZ α A-GMI经限制酶(PmeI)切反应生成线状的载体DNA后,藉由电穿孔转形技术将此线状载体DNA转入并嵌入宿主基因组中,详细过程如专利(US patent 7601808)内文所述。

[0023] 抗原MM-FIP生产

[0024] 从-80℃取出MM-FIP生产菌株并接种于100ml YPD培养基中,于30℃下震荡培养。将此种菌接种至含2公升BMGY培养基的5L发酵槽发酵生产,并经由饲料及甲醇诱导步骤生产胞外MM-FIP,控制总发酵时间及发酵液中目标蛋白质含量达可接受范围时,即进行菌体分离取得上清液。收取发酵上清液方法为低温高速离心(4℃,13500g,30分钟)。此上清液经0.45 μ m膜过滤后进行超浓缩过滤及缓衡溶液置换,此即为MM-FIP制备液。

[0025] 抗原MM-FIP纯化

[0026] 将MM-FIP制备液藉由高效率液相层析系统及亲和层析管柱(Ni Sepharose)进行初步纯化,目标蛋白以含300mM imidazole的提洗溶液提洗出,所得样品再经由浓缩及缓冲溶液(phosphate-buffered saline)置换步骤后再以胶体过滤管柱(Sephacryl S-100HR)纯化。

[0027] MM-FIP单株抗体细胞株制备

[0028] 将纯化后的MM-FIP与弗氏(Freund's)佐剂(第一次用完全佐剂之后用不完全佐剂)等比例乳化后皮下多点注射入BACB/C小鼠(每只125 μ g),一周一次连续四次后,再每3周注射一次(每只125 μ g)共进行2次并采血做多血清(polysera)分析。进行细胞融合的前三天,再不加佐剂方式静脉注射加强免疫一次,三天后将脾脏细胞与鼠源骨髓瘤细胞株以1:3的比例,用50%的聚乙二醇-400(PEG)进行融合,融合后将细胞悬浮于RPMI(HAT,20%FCS)中,将细胞数稀释成 1×10^5 ,培养于96孔培养盘中(0.2毫升/孔),10天后以吸附有MM-FIP的ELISA96孔盘,测试细胞培养上清液,选取与FIP结合的融合瘤以限制稀释法予以单株化,从

中选出20株正反应细胞株并且筛选掉抗His-tag及c-Myc的细胞株。最后经抗体配对测试选出最佳的抗体细胞株2C8和4E4,将此二株融合瘤予以储存(-80℃,含10%DMSO培养液),并使用标准的哺乳动物细胞培养技术培养。该二株融合瘤寄存于美国典型菌种保存中心(American Type Culture Collection,ATCC),寄存编号分别为PTA-122740及PTA-122741。

[0029] MM-FIP单株抗体生产

[0030] 分别将4E4和2C8融合瘤细胞注射入BACB/C小鼠(每只注射细胞数为10⁶,各5只)。7至10天后,小鼠腹部明显胀大,用弯头滴管采集腹水。经由硫酸胺沉淀步骤及蛋白质G(protein G亲和性纯化法)可分别获得两种单株抗体。最后将2C8细胞株所生产的单株抗体以生物素(biotin)进行偶合联结反应。

[0031] 实例2MM-FIP间接ELISA法检测步骤

[0032] 抗体被覆(antibody coating):

[0033] 以被覆溶液将cAb(capture antibody from 4E4)稀释2000倍,并于96孔微量盘上每孔加入100μl。置于37℃下反应1小时,再以洗涤液清洗三次,每次300μl。

[0034] 阻断反应(blocking):

[0035] 每孔槽加入200μl阻断液,置于37℃下反应30分钟,以洗涤液清洗三次,每次300μl。

[0036] 样品与标准品制备与反应:

[0037] 以稀释液稀释标准品浓度分别为120ng/ml、100ng/ml、80ng/ml、60ng/ml、40ng/ml、20ng/ml、10ng/ml与0ng/ml。

[0038] 以稀释液序列稀释不同浓度的待测样品。将96孔微量盘的每孔槽加入100μl标准品或不同稀释度的样品,置于37℃下反应40分钟。以洗涤液清洗三次,每次300μl。

[0039] 侦测抗体反应(Application of dAb):

[0040] 以稀释液将dAb(detection antibody from 2C8)稀释4000倍,并于96孔微量盘上每孔加入100μl。置于37℃下反应10分钟。以洗涤液清洗三次,每次300μl。

[0041] 偶合辣根过氧化酶偶合反应(Application of streptavidin-HRP):

[0042] 以PBS溶液将streptavidin-HRP稀释30000倍,并于96孔微量盘上每孔加入100μl,置于37℃下反应10分钟。以洗涤液清洗三次,每次300μl。

[0043] 呈色反应(Detection)

[0044] 以PBS溶液将streptavidin-HRP稀释30000倍,并于96孔微量盘上每孔加入100μl。置于37℃下反应30分钟。每孔槽加入100μl反应终止液停止呈色反应。以亮度计读取450nm值,并制作标准曲线求取待测样品浓度。

[0045] 使用本发明单株抗体结合MM-FIP间接ELISA法测定下列菌种的FIP,结果如下表所示,显示本发明抗体确可检测多种真菌中的免疫调节蛋白。

菌种	OD ₄₅₀ *	FIP 浓度 (μg/g)**
赤芝 (<i>Ganoderma lucidum</i>)	0.114±0.0068	0.262±0.024
松杉灵芝 (<i>G. tsugae</i>)	0.226±0.0124	1.673±0.114
小孢子灵芝 (<i>G. microsporum</i>)	0.178±0.0114	0.969±0.079
黑木耳 (<i>Auricularia auricula-judae</i>)	S/N < 2.0	-
秀珍菇 (<i>Pleurotus ostreatus</i>)	0.225±0.0137	1.513±0.119
洋菇 (<i>Agaricus bisporus</i>)	S/N < 2.0	-
鸿禧菇 (<i>Hypsizygus marmoreus</i>)	S/N < 2.0	-
金针菇 (<i>Flammulina velutipes</i>)	0.113±0.0021	0.540±0.018
香菇 (<i>Lentinula edodes</i>)	S/N < 2.0	-
杏鲍菇 (<i>Pleurotus eryngii</i>)	0.162±0.0045	1.801±0.070

*: 各样品于适当稀释度下所测得的OD₄₅₀读值需为空白组的2倍。

** : 此为每克干重所含的FIP量。