

【11】證書號數：I299735

【45】公告日：中華民國97(2008)年8月11日

【51】Int. Cl. : **C07K16/14 (2006.01)** **A61K39/40 (2006.01)**
C12N15/31 (2006.01)

發明 全 9 頁

【54】名稱：由小孢子靈芝選殖之免疫調節蛋白質

AN IMMUNOMODULATORY PROTEIN CLONED FROM GANODERMA MICROSPORUM

【21】申請案號：095100605

【22】申請日：中華民國95(2006)年1月6日

【11】公開編號：200726775

【43】公開日：中華民國96(2007)年7月16日

【72】發明人：林采菱 LIN, TSAI LENG

【71】申請人：沃百特科技公司 WORLD BIO-TECH ALLIANCE CORP.
 英屬維爾京群島

【74】代理人：俞昌璋

【56】參考文獻：

EP 0288959B1

Wen-Huei Lin et al, Dimerization of the N-terminal Amphipathic α -Helix Domain of the Fungal Immunomodulatory Protein from *Ganoderma tsugae* (Fip-gts) Defined by a Yeast Two-hybrid System and Site-directed Mutagenesis, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 272, No. 32, p. 20044-20048, 1997.

1

2

[57]申請專利範圍：

- 1.一種選殖自小孢子靈芝的免疫調節蛋白質，其胺基酸序列係由序列表 SEQ ID NO 1之核苷酸序列所演繹生成。
 - 2.如申請專利範圍第1項的免疫調節蛋白質，係選殖自小孢子靈芝 *Ganoderma microsporum* RSH 0821。
 - 3.如申請專利範圍第1項的免疫調節蛋白質，其MALDI-TOF分析之分子量為 15863.79 Da。
 - 4.如申請專利範圍第1項的免疫調節蛋白質，係以同源雙體形式存在。
 - 5.如申請專利範圍第1項的免疫調節蛋白質，包括序列表 SEQ ID NO 2 及 SEQ ID NO 3 之胺基酸序列。
 - 6.一種核苷酸序列，如序列表 SEQ ID NO 1 所示。
- 圖式簡單說明：
- 第一圖係以 LZ-8引子(LZ8-F/LZ8-R)對 *G. tsugae* 和 *G. microsporum* 進行

PCR 擴增的結果；其中第一 A 圖為擴增片段之電泳結果，第一 B 圖為擴增片段之定序結果；第一 A 圖中箭頭所示為所用引子，其中 3' GW-F 用於 3' genome walking。

第二圖係 *G. microsporum* 免疫調節蛋白基因之 3' genome walking 結果；其中第二 A 圖係以 3' GW-F/MKP24 等引子對模板 DNA 進行 PCR 擴增的片段之定序結果；而第二 B 圖為擴增後之電泳結果；第二 A 圖中箭頭所示為所用引子，0821GW-R1 及 0821GW-R2 用於 5' genome walking。

第三圖係 *G. microsporum* 免疫調節蛋白基因之 5' genome walking 結果；係以 5' GW-R1/MKP24 進行第一次 PCR 擴增後，再以 5' GW-R2/MKP24 進行第二次 PCR 擴增；其中第三 A 圖為擴增片段之定序結果，亦是 *G. microsporum* 免疫調節蛋白基因 *gmi* 全序列；第三 B 圖為擴增後之電泳結果；第三 A 圖中方框所示為 LZ-8 序列的專利區段。

第四圖係 *G. microsporum* 免疫調節蛋白 GMI 以 PICZ α A/*Pichia pastoris* KM71 進行異源表現。

第五圖係重組蛋白 reLZ-8 與 reGMI 以不同濃度之異吡啶流洗液進行親和管柱純化之結果；其中第五 A 圖為 reLZ-8；第五 B 圖為 reGMI。

10. 第六圖係 LZ-8 與 GMI 重組蛋白 reLZ-8、reGMI 之胺基酸序列，其中方框所示為 LZ-8 序列的專利區段。

第七圖係 reGMI 之 MALDI-TOF 分析結果。

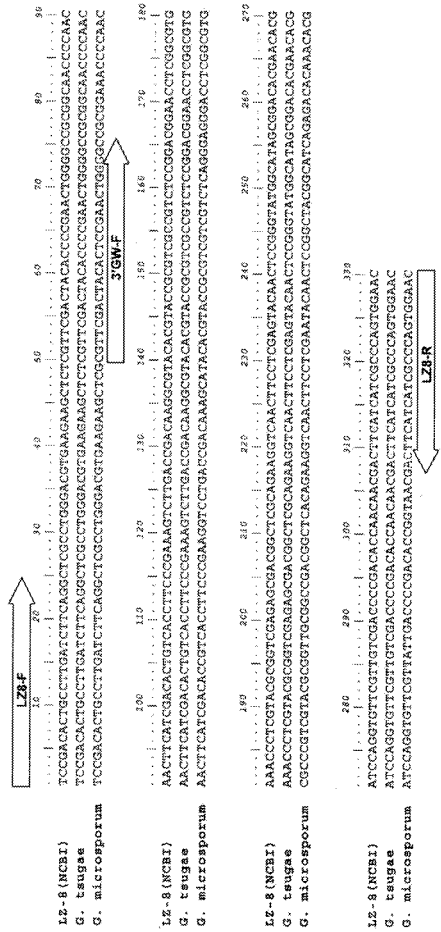
第八圖係 reGMI 以不同濃度之戊二醛進行交聯鍵結圖。

15. 第九圖係等量 reLZ-8 與 reGMI 進行西方雜合反應之結果。

第十圖係 reGMI 促進 BALB/c 老鼠骨髓樹突細胞株分泌 IL-12p40 之結果。

20. 第十一圖係 reGMI 促進老鼠巨噬細胞株 J774A.1 分泌 TNF- α 之結果。

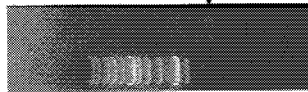
第十二圖係 reGMI 促進人類 T 細胞株 Jurkat cells 分泌 IL-2 之結果。



第一 A 圖

第一 B 圖

第一圖



10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300

310 320 330 340 350 360

CGTTGACTACACCCCGAACTGGGGCCCGGGCGTCCACAGCAAGCTTTAIGACACCGTCCACCTTCCGACGGTCTGACIGACAGGGGTACAGGTACCG

CSTCGTCTTTCCGGAAAGGACCTCGGGGTGGCCCTCATACGGGTGGAGAGCGGGCTCGCAGAAATCAACTTCCCGAATACAACTCCGGGTAC

GGCAATGGGGACACGACACGATCCAGTGTACGTCATTTGACCCCGACCCGGCACAAATTTCAATTGCCCCAGTGGACTAGAGGGGAGGAGTATCC

CCCCAGAGGGCCTGCTCGGGGGGCA TCGAATTCGATCAGCTTGGAGCTCCCATGCTTGCAGCC

← 400 bp

0821GW-R2

0821GW-R1

第二 A 圖

第二 B 圖

第二圖



第三A圖

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
CTTCCGGCAGGTTTCGGGCGCTCGGCGGCCCTCGAATTCGCGAGACTCGCAGACATCCGATACGCGATGAAAGGCCGATACACAGCTGCTGZATACGCCA

110      120      130      140      150      160      170      180      190      200      210      220
TGERGCGCTCAGCTTATCGGGATGSCATAGGCGCTGCGAGCTCGGCACTTACCGAAGCCCTCCGATGCGGCAATCGGAGCTCCGAAAGCTTGTATCGA

230      240      250      260      270      280      290      300      310      320      330
TTCCCTGACCTGCGCCCGCAGCATTAATGTCGACACTGCTTGATCTTCAGGCTCGGCGGAAAGTGGAGGAGAGCTGGGTTGCGATACCTCCAGACTCGGGCCGCG

340      350      360      370      380      390      400      410      420      430      440
GCTCCAGCAGCTTATCGGACGCTTCCGACGCTCTGTGACTGACGAGAGCGGCGAAGCACTACGCGCTCGTGGTTGCGAGAGAGAGCTCGGCGGCGGCGCTCAT

350      360      370      380      390      400      410      420      430      440
BZSFDIEVIFVLPYDXYIYRUVVYSGKRLGVNPSY

450      460      470      480      490      500      510      520      530      540      550
CGCGTCGAGCGAGCGCTCCGCGAATACCTTCGAAATGCAACTCGGCTACGSCATCGCGGACGACAGCAGATCCAGATGATGCTGATGACCCGACCG

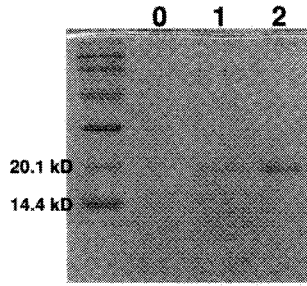
560      570      580      590      600      610      620      630      640      650      660
GCAAAATATATGTTCCCGGAGTGGAACTAGAGGAGAGTGTCCGCGCAAGTGGCCCTCCGAGGCGGCGCATGGAAATTCGATCAAGCTTGGGAGCTGCGATGGCTG

670      680      690      700      710      720      730      740      750      760      770
GNNFIVANN
  
```

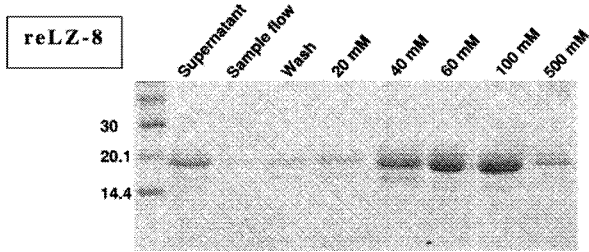
第三B圖

第三圖

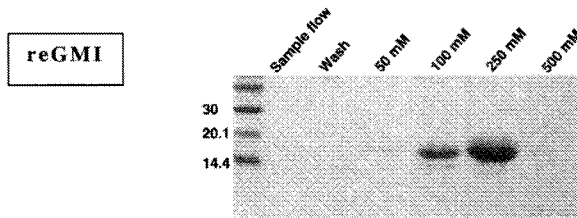
(6)



第四圖



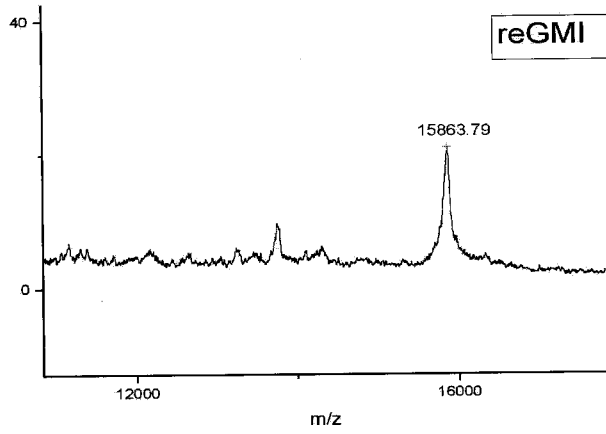
第五 A 圖



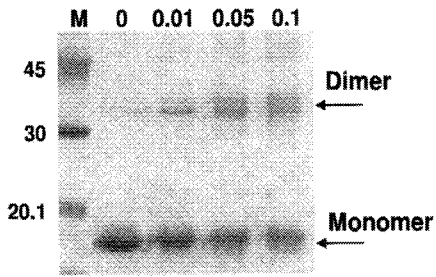
第五 B 圖

第五圖

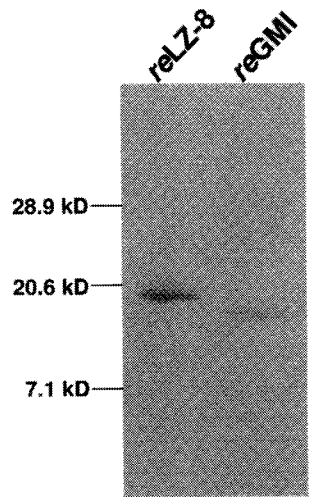
(8)



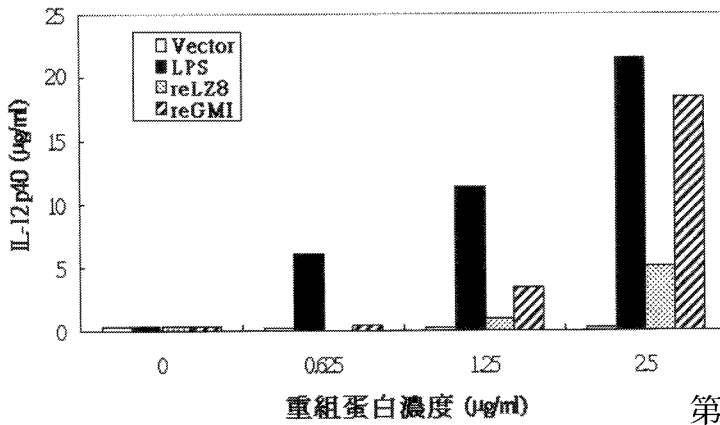
第七圖



第八圖

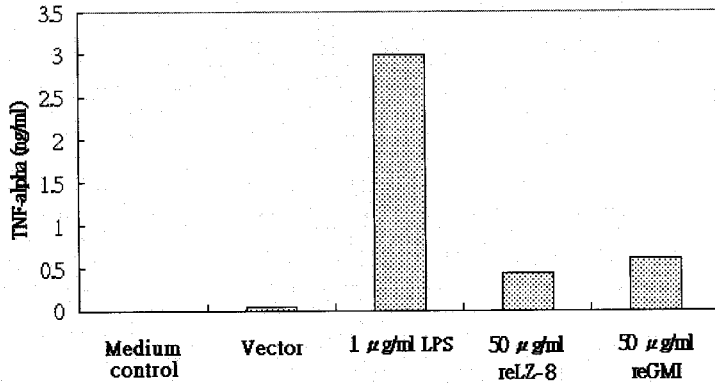


第九圖

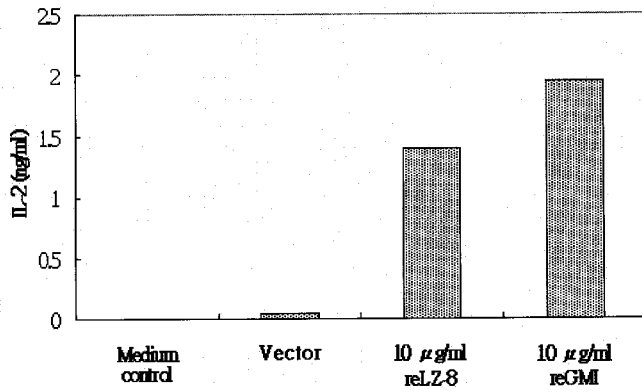


第十圖

(9)



第十一圖



第十二圖

