

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C 分類：

A6

B6

本案已向：

國(地區) 申請專利，申請日期： 案號： ，☐有 ☐無主張優先權日本 1998 年 7 月 31 日 10-230204 ☒無主張優先權

有關微生物已寄存於： ，寄存日期： ，寄存號碼：

食品工業發展研究所 1999 年 8 月 31 日 CCRC960104

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

五、發明說明（1）

〔技術的分野〕

本發明係關於種種的微生物、特別為對細菌檢測有用的抗體、使用其之微生物檢測法、微生物檢測用試藥組合以及微生物檢測用的特異抗體之製造方法。

本發明可有效地利用於醫藥品工業、特別以細菌為主的微生物感染症之診斷藥劑的製造。

〔過去技術〕

微生物感染症的診斷為一般對感染部位等的病原菌作檢測，以檢測出對於血清、體液中的病原菌之抗體的檢測而確定。特別此診斷係由病原菌的檢測故能迅速對病患進行治療而意義非凡。

感染症病原菌的檢測可分為，經過病原菌的分離培養，其生化學的性狀為基準而進行菌鑑定之培養鑑定法，與以病原菌特異基因為基準的 P C R 法等放大檢測之基因診斷法，以及利用與病原菌表面抗原標誌的抗體特異反應而進行之免疫方法。然而要取得培養鑑定法、基因診斷法的檢測結果必須花費許多時間。一般使用能短時間且高感度地檢測出病原菌，迅速且適宜地對病人進行治療的免疫法作為診斷。

例如衣原體（Chlamydia）屬的情況，已知有作為屬特異抗體脂多醣（LPS）之抗原決定基的存在（Stephens, R. 們：J. Immunol., 128: 1083-89, 1982. Caldwell. M. D.: Inf. Immun., 44:306-14, 1984），對種種診斷用藥組合中特別使

五、發明說明(3)

L P S 使用單株抗體的檢測法。

然而，這些抗體以及檢測法中，對於微生物的種特異性質並不明顯，又因存在同種的複數表面抗原之所有血清型會被覆蓋，造成檢測上困難等問題。

又，使用這些過去的技術之標識抗原，對於各種微生物細胞裡普遍存在的同一機能分子（例如，同一機能的蛋白質、L P S 或表面多醣成分）於微生物的進化過程中，菌種經變化過程的分子並非有統一性可作為標誌而能檢測。以 1 個分子作為基準欲檢測出菌種間抗原性的差異，此想法為基礎的免疫診斷法至今並未被提出。

〔發明的揭示〕

本發明提供一種理想的微生物檢測・免疫診斷方法，其作為統一標識抗原可覆蓋對種種微生物的同一分子之抗體，特別對欲檢測之所有微生物裡使用細胞內的同一機能成分分子，對微生物進化過程所產生變化部分的抗體、使用該抗體的特異性且幾乎所有血清型之微生物檢測方法、微生物檢測用試藥組以及微生物檢測用特異抗體的製作方法。

本發明者們，發現對於所有微生物而言被保存的同一機能蛋白質可作為有用的抗原蛋白質。一般預知此蛋白質的構造變化極少，但驚人地，該蛋白質的抗原決定基對於微生物的種或屬具有特異性，對該蛋白質的抗體、可使用於微生物的種或屬特異性的識別而具有多樣性，同時對於

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

裝

五、發明說明(4)

作為特定微生物可檢測出所有的血清型。

本發明者著眼於，存在於所有微生物細胞，且其胺基酸構造於微生物間有著某程度相異點之細胞內分子，特別為核糖體蛋白質的其中一種之 Ribosomal Protein L7/L12（核糖體蛋白 L 7 / L 1 2）。Ribosomal Protein L7/L12 係作為蛋白質合成所必須的核糖體蛋白質為已知，其已知為分子量約 13 kDa 的蛋白質，特別以大腸菌、枯草菌等幾樣微生物的全胺基酸序列解析正被進行著，而微生物間有 50% ~ 65% 程度的相同胺基酸序列被確認。

本發明者們發現不管此分子於微生物間具類似性，而著眼於其一部份具有各微生物固有的胺基酸序列等構造部分，利用該蛋白質的抗體可對種種微生物的特異性以及同一菌種內的所有血清型作檢測。具體的例子有對流感嗜血桿菌（Haemophilus influenzae）、肺炎鏈球菌（Streptococcus pneumoniae）以及淋病奈氏球菌（Neisseria gonorrhoeae）使用其特異抗體的微生物種免疫法診斷技術開發，其結果，對於各個微生物可取得該蛋白質特異性的抗體，使用該抗體發現可對於所有菌檢測其特異性，而完成本發明。

因此，本發明為有關如以下的微生物檢測用抗體，被使用於微生物檢測方法以及微生物檢測用試藥組合以及微生物檢測用特異抗體的製作方法。

- 1) 一種對微生物的核糖體蛋白質之抗體，其特徵為與該微生物具特異性反應之抗體。

五、發明說明(5)

- 2) 如 1) 所記載的抗體，其中微生物的核糖體蛋白質為 Ribosomal Protein L7/L12。
- 3) 如 1) 或 2) 所記載的抗體，其中微生物為性行為感染症 (STD, Sexually transmitted disease) 的病原微生物。
- 4) 如 1) 或 2) 所記載的抗體，其中微生物為呼吸系統感染症之病原微生物。
- 5) 如 4) 所記載的抗體，其中呼吸系統感染症之病原微生物為流感嗜血桿菌 (Haemophilus influenzae)。
- 6) 如 4) 所記載的抗體，其中呼吸系統感染症之病原微生物為肺炎鏈球菌 (Streptococcus pneumoniae)。
- 7) 如 3) 所記載的抗體，其中性行為感染症 (STD, Sexually transmitted disease) 微生物為淋病奈氏球菌 (Neisseria gonorrhoeae)。
- 8) 如 7) 所記載的抗體，其為對淋病奈氏球菌 (Neisseria gonorrhoeae) 的 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質的抗體，且為可辨認序列表序列號碼：22 的胺基酸序列中第 115 號含丙胺酸 5 至 30 胺基酸長度的連續部分之胺基酸序列的抗體。
- 9) 一種微生物檢測方法，其特徵為對各種微生物而言為使用同一機能的細胞內分子之抗體。
- 10) 一種微生物檢測方法，其特徵為對於各種為微生物

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

裝

五、發明說明（6）

而言使用 1) 至 8) 任一項的抗體。

11) 一種微生物檢測用試藥組合，其特徵為使用對各種微生物而言為同一機能的細胞內分子之抗體。

12) 一種微生物檢測用試藥組合，其特徵為使用如 1) 至 8) 任一項所記載的抗體。

13) 一種如 1) 至 8) 任一項的抗體之製造方法，其特徵為以基因操作方法或自微生物單離純化所得的微生物之 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質，其部分肽，或與此部分肽相當之合成肽作為免疫源。

以下為本發明的詳細說明

序列表中序列號碼 1 以及 2 為流感嗜血桿菌的 Ribosomal Protein L7/L12 基因之 DNA 序列以及所對應的胺基酸序列。序列號碼 3 以及 4 為幽門螺桿菌 (Helicobacter pylori) 的 Ribosomal Protein L7/L12 基因之 DNA 序列以及所對應的胺基酸序列。序列號碼 5 以及 6 為肺炎鏈球菌的 Ribosomal Protein L7/L12 基因之 DNA 序列以及所對應的胺基酸序列。序列號碼 7 以及 8 為淋病奈氏球菌的 Ribosomal Protein L7/L12 基因之 DNA 序列以及所對應的胺基酸序列。序列號碼 9 以及 10 為腦膜炎球菌的 Ribosomal Protein L7/L12 基因之 DNA 序列以及所對應的胺基酸序列。序列表中序列號碼 11 以及 12 為取得來自流感嗜血桿菌的 Ribosomal Protein L7/L12 基因所使用的 PCR 之引發物 DNA (Primer DNA)。序列號碼 13 以

五、發明說明(7)

及 1 4 為取得來自肺炎鏈球菌的 Ribosomal Protein L7/L12 基因所使用的 P C R 之引發物 DNA (Primer DNA) 。序列號碼 1 5 以及 1 6 為取得來自淋病奈氏球菌的 Ribosomal Protein L7/L12 基因所使用的 P C R 之引發物 D N A (Primer DNA) 。序列號碼 1 7 以及 1 8 為取得來自流感嗜血桿菌的 Ribosomal Protein L7/L12 基因的 D N A 序列以及所對應的胺基酸序列。序列號碼 1 9 以及 2 0 為取得來自肺炎鏈球菌的 Ribosomal Protein L7/L12 基因的 D N A 序列以及所對應的胺基酸序列。序列號碼 2 1 以及 2 2 為取得來自淋病奈氏球菌的 Ribosomal Protein L7/L12 基因的 D N A 序列以及所對應的胺基酸序列。

且，如序列表中所記載的胺基酸序列的左端以及右端分別為胺基酸基（以下稱 N 端）以及羧基末端（以下稱 C 端），又鹼基序列的左端以及右端分別為 5 ' 末端以及 3 ' 末端。

又，本發明所述的基因操作的一連串分子生物學實驗可由一般的實驗書籍中所記載的方法進行。前述的一般實驗書籍為，例如可舉出 Molecular Cloning, A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Sambrook, J. 等（1989）。

對於本發明的微生物係指，細菌、酵母、黴菌、放線菌、立克次體類等全體微生物類，大多指特別於微生物感染症的診斷中有問題的細菌。

對於本發明的「對微生物有特異性反應的抗體」係指

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

結

五、發明說明(10)

affinity column)，以純化表現蛋白（expression protein）為目的，取得蛋白抗原。此時因 Ribosomal Protein L7/L12 之全長蛋白質成為抗原，而取得對應於微生物間被保存的胺基酸部分之抗體，但不為本發明的目的。因此本法所取得的抗原以公知的方法使用單株抗體而產生的融合瘤，因選擇生產僅能與該微生物反應的抗體之純系，因此可取得目標抗體。

b) Ribosomal Protein L7/L12 的胺基酸序列對於未知微生物，與其此 Ribosomal Protein L7/L12 的胺基酸序列於菌種間有 50 ~ 60 % 相同，不如使用此胺基酸序列相同部分序列為準，以 PCR 法進行特定序列部分的基因增量或相同部分序列作為模型探測體進行雜交法等，一般基因操作方法較易取得該蛋白質基因。

此後與其他蛋白質基因構成融合基因（fusion gene），以大腸菌等為寄主，使用公知的基因導入方法於寄主內插入該融合基因，使其有大量表現作用（expression）後，對應作為融合蛋白質的蛋白質之抗體親和力柱子法（affinity column），以純化表現蛋白（expression protein）為目的，取得蛋白抗原。此時因 Ribosomal Protein L7/L12 之全長蛋白質成為抗原，而取得對應於微生物間被保存的胺基酸部分之抗體，但不為本發明的目的。因此本法所取得的抗原以公知的方法使用單株抗體而產生的融合瘤，因選擇生產僅能與該微生物反應的抗體之純系，因此可取得目的抗體。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明(12)

粒子上吸著該抗體進行凝集反應，於 E L I S A 板中進行公知技術的 E L I S A 法，既知的免疫色譜法、以著色粒子或具發色能的粒子，或酵素或螢光體標識該抗體同時，使用以捕捉 (capture) 抗體覆蓋的磁性微粒子等之夾心試驗法 (間接螢光抗體法) 等既知的所有免疫測定方法。

又，特別利用抗體於有用的微生物檢測方法的特表平 7 - 5 0 9 5 6 5 號公報中記載有關氧化矽、氮化矽等所形成光學薄膜上不進行抗體反應之光干涉原理等的檢測，即所謂的光免疫測定 (OIA, Optical Immunoassay) 等高感度之檢測方法可利用。

又對於該檢測方法，萃取來自必要微生物的細胞內標識抗原方法，有首先使用 Triton X-100 、 Tween-20 等種種界面活性劑以萃取試藥處理的方法、使用適當的蛋白酶等酵素之酵素處理法、物理方法中有將微生物細胞破碎的使用既知細胞構造之破碎方法，其中對界面活性劑等組合的微生物之試藥而言，設定最適的萃取條件為佳。

又，對於本發明，使用抗體的微生物檢測用試藥組合相當於，與該檢測方法所使用的檢測試藥組合。

例如，取得對於肺炎、支氣管炎、髓膜炎等病原菌具有高度診斷意義的流感嗜血桿菌之特異抗體時，本菌的 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質之胺基酸序列以及 D N A 序列已為表等之記載中為公知。流感嗜血桿菌的 Ribosomal Protein L7/L12 胺基酸序列以及 D N A 序列以序列表序列號碼：1 以及 2 表示。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (15)

。使用公知的 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質之 D N A 序列的部分序列，檢索類似序列 D N A 片段的有無時，相當 Ribosomal Protein L7/L12 基因的 D N A 序列存在著，而取得全 D N A 序列的情報。此淋病奈氏球菌的 Ribosomal Protein L7/L12 基因的全鹼基序列以及所對應的氨基酸序列於序列號碼：7 以及 8 所示

因此，與流感嗜血桿菌與肺炎鏈球菌情況相同，淋病奈氏球菌的 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質之 D N A 序列的 N 末端、C 末端的序列為準之 P C R 前導體，例如設計序列表序列號碼：15 以及 16 所示的 P C R 前導體，以後使用完全相同的方法可取得，以淋病奈氏球菌的 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質全部或一部份作為抗原的淋病奈氏球菌特異目的之抗體。

特別與淋病奈氏球菌為相同的奈瑟氏菌屬 (Neisseria.) 之腦膜炎球菌 (Nesseria meningitidis) 的 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質基因中，該基因序列於電腦網路上已公開且可容易獲得。此腦膜炎球菌的 Ribosomal Protein L7/L12 基因全鹼基序列以及對應的胺基酸序列以序列表序列號碼：9 以及 10 表示。此淋病奈氏球菌與腦膜炎球菌的 Ribosomal Protein L7/L12 基因全鹼基序列作比較下胺基酸序列的相異部分為自 N 末端第 115 號的胺基酸於淋病奈氏球菌為丙胺酸，對於此腦膜炎球菌為谷胺酸僅一個胺基酸不同而已。因此可以種特異性而檢測出淋病奈氏球菌

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

始

五、發明說明 (16)

之淋病奈氏球菌 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質抗體為該當 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質由 N 末端第 1 1 5 號的丙胺酸以及含有此之胺基酸領域作為表位 (epitope) 而辨識的抗體。

以本發明為基礎所製作的抗體，可利用公知的測定方法，將聚苯乙烯乳膠粒子上吸著該抗體進行凝集反應，於 E L I S A 板中進行公知技術的 E L I S A 法，既知的免疫色譜法、以著色粒子或具發色能的粒子，或酵素或螢光體標識該抗體同時，使用以捕捉 (capture) 抗體覆蓋的磁性微粒子等之夾心試驗法 (間接螢光抗體法) 等既知的所有免疫測定方法。

又，對本發明為基礎所製作的抗體對於全部免疫測定方法而言，其功用為可作為該抗原蛋白質於固相或液相中所捕捉的 capture 抗體，同時用過氧化酶或鹼基磷酸酯酶等酵素以公知的方法修飾，即所謂的酵素標識抗體之功能。

[為實施發明時的最佳狀態]

以下面的例子具體說明本發明，但對於本發明並無任何範圍的限定。

[實施例 1]

自 流感嗜血桿菌 的 Ribosomal Protein L7/L12 基因的純系化過程 (cloning)

流感嗜血桿菌 A T C C 9 3 3 4 (I I D 9 8 4) 株

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

裝

五、發明說明 (17)

(自東京大學醫科學研究所所分配、購入) 於巧克力洋菜培養基上適當地植菌， CO_2 培養箱中 37°C 、 CO_2 0.5% 條件下 24 小時培養。所長出的菌落最終成大約 5×10^9 CFU/ml 左右，於 TE 緩衝劑 (和光純藥工業公司製) 中懸濁。此時移入約 1.5 ml 的微量離心試管中以 10000 rpm 離心 2 分鐘，捨棄上清液，沈澱部分以 567 μl 的 TE 緩衝液再懸濁。再加上 30 μl 的 10% 月桂硫酸鈉 (SDS) 與 3 μl 的 20 mg/ml Proteinase K 溶液充分混合，培養 37°C 1 小時。再添加 10% 溴化十六烷基三甲基銨 / 0.7 M NaCl 溶液 80 μl ，充分混合後 65°C 下培養 10 分鐘。再加入體積比 24/1 的氯仿-異戊醇混合物 700 μl 充分攪拌。此溶液以微量離心機 12000 rpm，5 分鐘 (控制於 4°C 下) 離心處理後，水層部分移至新的微量離心管。於此加入 0.6 倍量的異丙醇充分搖動試管使 DNA 形成沈澱，白色 DNA 沈澱以玻璃棒勾取移入放有 1 ml 的 70% 乙醇 (冷卻至 -20°C 者) 之另一微量離心管。

再以 10000 rpm，5 分鐘離心處理，靜靜地將上清液除去後再加上 1 ml 的 70% 乙醇再離心 5 分鐘。再將上清液除去後沈澱物以 100 μl 的 TE 緩衝液溶解得到 DNA 溶液。此基因組 DNA 溶液的濃度依照 Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Eds. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., Cold Spring harbor Laboratory Press 的 E5, Spectrophotometric Determination of

五、發明說明 (18)

the Amount of DNA 或 RNA 之方法定量。

使用此基因組 DNA 中 10 ng 進行 PCR (polymerase chain reaction)。PCR 為使用 Taq 聚合酶 (寶酒造公司製，標號 R001A)。附加於酵素的緩衝液 5 μ l，附加於酵素的 dNTPmixture 4 μ l 與序列表序列號碼：11 所示的合成寡核苷酸 A 以及序列表序列號碼：12 所示的寡核苷酸 B 分別加入 200 pmol，使最終容量為 50 μ l。

此混合物使用 TaKaRa PCR Thermal Cycler 480，95 $^{\circ}$ C 1 分鐘，50 $^{\circ}$ C 2 分鐘，72 $^{\circ}$ C 3 分鐘進行 5 次循環後，再進行 95 $^{\circ}$ C 1 分鐘，60 $^{\circ}$ C 2 分鐘，72 $^{\circ}$ C 3 分鐘 25 次循環。此 PCR 產物的一部份以 1.5% 瓊脂糖凝膠 (agarose) 中進行電泳，經溴化乙錠 (日本 gene 公司製) 染色後，以紫外線觀察，確認有 400 bp 的 cDNA 被增大。且以限制酶 BamHI 以及 XhoI 切斷處理後，以 1.5% 瓊脂糖凝膠中進行電泳經溴化乙錠染色後切出約 370 bp 一帶的膠片再以 Suprec01 (寶酒造公司製) 純化後，併入市販的載體 (vector) pGEX-4T-1 (Pharmacia 公司製)。此載體因併入於適當的目的基因片段之限制酶位置，而能表現 (expression) 與 GST 蛋白質的融合蛋白質，具目的分子的表現載體 (expression vector) 之功能。

具體而言，載體 pGEX-4T-1 與先前的 DNA 其莫耳比成 1 : 3 混合之，以 T4 DNA 連接酶 (

訂

裝

裝

五、發明說明 (19)

ligase, Invitrogen 公司製) 將 D N A 併入載體中。D N A 所併入的載體 p G E X - 4 T - 1 以 One Shot Competent Cells (Invitrogen 公司製) 導入基因大腸菌內，植菌於含安匹西林 (Sigma 公司製) $50 \mu\text{g} / \text{ml}$ 的 L - 培養液 (L-Broth, 寶酒造公司製) 半固體培養基培養皿中，放置於 37°C 12 小時，長出的菌落以逢機選擇植入同濃度的含安匹西林的 L - 培養液 2 ml 中， 37°C 振盪培養 8 小時，回收菌體，使用 Witherdominiprep (Promega 公司製) 並依照所添加的說明書分離質體，此質體以限制酶 B a m H I / X h o I 分解，切出約 370 b p 的 D N A 而確認該 P C R 產物已被併入，對於已確認的群株而言進行所併入的 D N A 之鹼基序列分析。對於所插入的 D N A 片段之鹼基序列分析，使用 Applied Biosystems 公司製的螢光序列分析裝置實施。序列樣品的調製方法使用 PRISM, Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 公司製) 進行。 0.5 ml 容量的微量試管中加入 $9.5 \mu\text{l}$ 的反應保存液、 $4.0 \mu\text{l}$ 的 $0.8 \text{ pmol} / \mu\text{l}$ 的 T 7 起動引發物 (promoter primer, GIBCO BRL 公司製) 以及 $6.5 \mu\text{l}$ 的 $0.16 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ 的序列用模型 D N A 混合， $100 \mu\text{l}$ 的礦物油添加於上層後， 96°C 30 秒、 55°C 15 秒以及 60°C 4 分鐘為一次循環，進行 P C R 增大反應 25 次循環，於 4°C 5 分鐘保溫。反應後加上 $80 \mu\text{l}$ 的滅菌精製水攪拌，離心分離後，此水層進行 3 次的苯酚·氯仿萃取。 $100 \mu\text{l}$

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

編

五、發明說明 (20)

的水層中加入 10 μ l 的 3 M 醋酸鈉 (pH 5.2) 以及 300 μ l 的乙醇攪拌後，室溫下進行離心 14,000 rpm，15 分鐘後回收沈澱。沈澱物以 75% 乙醇沖洗後，真空下靜置 2 分鐘使其乾燥，作為序列用樣品。序列樣品溶解於 4 μ l 含 10 mM 的 EDTA 之甲醯胺 90℃，2 分鐘變性後於冰中冷卻提供於進行序列步驟。

所得的 5 個純系中 1 個序列與使用於 PCR 的探測體 (probe) 的序列有相同性，且其他微生物，例如發現與淋病奈瑟氏菌的 Ribosomal Protein L7/L12 基因序列非常類似的 DAN 序列。此構成基因部分的全鹼基序列以及對應的胺基酸序列係如序列表序列號碼：17 以及 18 的序列。此基因片段明顯地為流感嗜血桿菌流感的 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質的基因密碼 (code)。

[實施例 2]

來自流感嗜血桿菌中的 Ribosomal Protein L7/L12 基因於大腸桿菌裡的大量表現與純化。

併入表現載體的大腸菌於 LB 培養基中 50 ml，37℃ 下 1 晚培養。2 倍量的 TY 培養基 500 ml 於 37℃ 下 1 小時保溫。1 晚培養後的大腸菌液 50 ml 放入前述的 500 ml 培養基中，1 小時後放入 100 mM IPTG (異丙基 - β - D (-) 硫代半乳糖甙) 550 μ l 經 4 小時培養後回收，分別以 250 ml 放入離心試管中進行 7000 rpm，10 分鐘離心。捨棄上清液溶

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

裝

五、發明說明 (21)

解於含 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 2.5 % 蔗糖之溶解 (Lysis) 緩衝液 25 ml 中。

添加 10 % NP-40 1.25 ml, 1 M MgCl₂ 125 μ l 再移入塑膠試管中。1 分鐘 $\times$ 5 次冰冷中實施音波處理 (sonication), 再 12000 rpm, 15 分鐘離心後回收上清液。

再以磷酸緩衝生理食鹽水 (PBS) 作處理的谷胱甘肽瓊脂糖凝膠柱吸著前述上清液。

以含 20 mM Tris 緩衝液 pH 7.4, 4.2 mM MgCl₂, 1 mM DTT (dithiothreitol) 洗淨液將柱子以 2 倍體積洗淨。然後以含 5 mM 的谷胱甘肽之 50 mM Tris 緩衝液 pH 9.6 溶出, 析出的部分中的蛋白質含有量以色素結合法 (布雷德福特法; Biorad 公司) 檢測, 取得主要部分。所得的純化 GST 融合 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質的純度以電泳法確認其為約 75 % 之免疫源而確保其高純度。

[實施例 3]

對應 流感嗜血桿菌 的 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質之單株抗體的製作

首先對於老鼠的免疫 流感嗜血桿菌 之 GST 融合 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質抗原 100 μ g 溶於 200 μ l 的 PBS 後加入福樂因特助劑 (Freund's adjuvant) 200 μ l, 乳化後注射 200 μ l 於腹腔內。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

裝

五、發明說明 (22)

且於 2 週後、4 週後、6 週後同樣的乳化抗原注射於腹腔內，且於 10 週後、14 週後以 2 倍濃度的抗原乳液注射於腹腔內進行最後的免疫，3 天後取出脾臟，提供於細胞融合的步驟。

相對無菌方式取出的老鼠脾細胞 10^8 個而言取出骨髓瘤細胞 2×10^7 個於玻璃試管充分混合後以

1500 rpm，5 分鐘離心，捨棄上清液之後充分混合細胞。

細胞融合時所使用的骨髓腫瘤細胞為使用，NS-1 系的細胞株於含 10% 牛胎兒血清 (FCS) 之

RPMI 1640 培養基中培養，自細胞融合的 2 週前於含 0.13 mM 的氮鳥嘌呤， $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的 MC-210，10% FCS 之 RPMI 1640 培養基中培養 1 週後，於含 10% FCS 之 RPMI 1640 培養基中培養 1 週者。混合的細胞樣品中添加 50 ml 保溫於 37°C 的 RPMI 1640 培養基 30 ml，經離心

1500 rpm 除去上清液後加上保溫 37°C 的 50% 聚乙基乙二醇 1 ml 2 分鐘激烈攪拌處理後，添加保溫

37°C 的 10 ml RPMI 1640 培養基，液體以吸液管 (pipet) 進行吸進，擠出約 5 分鐘的激烈攪拌混合。

於 1000 rpm 離心 5 分鐘，除去上清液後加上 30 ml 的 HAT 培養基調整成細胞濃度成 5×10^6 個 / ml，攪拌均勻後，於 96 洞培養皿型培養皿中分別注入 0.1 ml，以 7% CO_2 條件下， 37°C 培養，第 1 天、第

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

裝

五、發明說明 (23)

1 週、第 2 週分別添加 H A T 培養基 0 . 1 ml 。

為篩選產生目標抗體之細胞，實施以 E L I S A 法進行評價。溶解於含 0 . 0 5 % 迭氮化鹼 P B S 中的流感嗜血桿菌之 G S T 融合 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質以及 G S T 蛋白質分別稀釋至 1 0 μ g / ml 濃度之液體，分別以 1 0 0 μ l 注入 9 6 洞培養皿，4 $^{\circ}$ C 下吸著 1 晚。除去上清液後，添加 1 % 牛血清白蛋白溶液（P B S 中）2 0 0 μ l 於室溫下反應 1 小時後遮蓋（blocking）。除去上清液後以洗淨液（Tween20 0.02 %，P B S）洗淨，其上加入融合細胞培養液 1 0 0 μ l 於室溫下反應 2 小時後除去上清液且以洗淨液洗淨。將此加入 5 0 n g / ml 的過氧化酶標識羊抗老鼠 I g G 抗體液 1 0 0 μ l，於室溫下反應 1 小時，除去上清液以洗淨液洗淨後加入

1 0 0 μ l T M B 溶液（K P L 公司）於室溫下反應

2 0 分鐘，發色後添加 1 N 的硫酸 1 0 0 μ l 停止反應，以 4 5 0 n m 測定其吸光。

此結果中發現僅與 G S T 融合 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質反應而不與 G S T 蛋白質反應的陽性凹穴，其判斷為含有對應於 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質之抗體。

於是分別回收陽性凹穴中的細胞於 2 4 洞塑膠培養皿中，以 H A T 培養基培養。所培養的融合培養基為之細胞數能成 2 0 個 / ml 而以 H T 培養基稀釋，將此 5 0 μ l 與於 H T 培養基中懸濁於 6 週齡的老鼠胸線細胞 1 0 ^{6} 個於

五、發明說明 (24)

9 6 洞培養皿中混合後，以 7 % CO_2 條件下， 37°C 培養培養 2 週培養液上清液中的抗體活性以上述的

E L I S A 法以同樣方法檢測，回收與 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質反應之陽性細胞。

而且，反覆進行同樣的稀釋檢測，純系化過程操作，得到融合瘤 H I R B - 1 ~ 5 的 5 種純系。

[實施例 4]

與 流感嗜血桿菌 的 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質反應的單株抗體之 淋病奈瑟氏菌 以及與其他微生物的反應試驗。

使用如前述取得之陽性融合瘤細胞的一定方法，進行單株抗體生產的回收。

具體而言，使用 P R M I 1 6 4 0 陪地（含 1 0 % F C S ）進行繼代培養的細胞，於 2 週前於腹腔內注射 0 . 5 ml 扎日斯烷（pristan）的 B a l b / C 老鼠腹腔內注射 5×10^6 個（P B S 中），3 週後回收腹水，離心後取得上清液。

取得的含抗體液吸著於 Protein A 柱（5 ml 容積，Pharmacia 公司），以 3 倍容積的 P B S 量洗淨，以 p H 3 的檸檬酸緩衝液溶出，回收抗體部分，得到生產各個融合瘤的單株抗體。

使用來自此 5 株融合瘤的單株抗體以 E L I S A 法進行評價。

五、發明說明(26)

或其他的微生物即使有 10^8 個 / ml 的高濃度亦無顯示反應性，因此確定使用對應 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質的單株抗體，可取得具 流感嗜血桿菌 特異反應性的抗體。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (27)

[表 1]

10 ⁶ 個/ml 檢測結果		
<u>流感嗜血桿菌</u> (<i>Haemophilus influenzae</i>)	ATCC9327	+
<u>流感嗜血桿菌</u> (<i>Haemophilus influenzae</i>)	ATCC9334	+
<u>流感嗜血桿菌</u> (<i>Haemophilus influenzae</i>)	ATCC9007	+
<u>流感嗜血桿菌</u> (<i>Haemophilus influenzae</i>)	ATCC9332	+
<u>流感嗜血桿菌</u> (<i>Haemophilus influenzae</i>)	ATCC8142	+
<u>流感嗜血桿菌</u> (<i>Haemophilus influenzae</i>)	ATCC9833	+
10 ⁸ 個/ml 檢測結果		
<u>腦膜炎球菌</u> (<i>Neisseria meningitides</i>)	ATCC13090	-
<u>嗜乳糖奈瑟氏菌</u> (<i>Neisseria lactamica</i>)	ATCC30011	-
<u>黏膜奈瑟氏菌</u> (<i>Neisseria mucosa</i>)	ATCC35611	-
<u>乾燥奈瑟氏菌</u> (<i>Neisseria sicca</i>)	ATCC9913	-
<u>卡他布蘭漢氏球菌</u> (<i>Branhamella catarrharis</i>)	ATCC25240	-
<u>淋病奈瑟氏菌</u> (<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)	ATCC9793	-
<u>大腸桿菌</u> (<i>Escherichia coli</i>)	ATCC25922	-
<u>肺炎桿菌</u> (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)	ATCC13883	-

(+:陽性反應、-:陰性反應)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (28)

[實施例 5]

自肺炎鏈球菌的 Ribosomal Protein L7/L12 基因的純系化過程，同蛋白質於大腸桿菌中的大量表現與純化，以及對應同蛋白質的單株抗體製作。

肺炎鏈球菌 I I D 5 5 5 株（東京大學醫科學研究所分配、購入）於血液洋菜培養基適當地植菌後，於培養箱中進行 37℃ 48 小時培養。所長出的菌落最終成大約 5×10^9 CFU / ml 左右，於 TE 緩衝劑（和光純藥工業公司製）中懸濁。此時移入約 1.5 ml 的微量離心試管中以 1000 rpm 離心 2 分鐘，捨棄上清液，沈澱部分以 567 μ l 的 TE 緩衝液再懸濁。再加上 30 μ l 的 10% 月桂硫酸鈉（SDS）與 3 μ l 的 20 mg / ml Proteinase K 溶液充分混合，培養 37℃ 1 小時。再添加 10% 溴化十六烷基三甲基銨 / 0.7 M NaCl 溶液 80 μ l，充分混合後 65℃ 下培養 10 分鐘。再加入體積比 24 / 1 的氯仿－異戊醇混合物 700 μ l 充分攪拌。此溶液以微量離心機 12000 rpm，5 分鐘（控制於 4℃ 下）離心處理後，水層部分移至新的微量離心管。於此加入 0.6 倍量的異丙醇充分搖動試管使 DNA 形成沈澱，白色 DNA 沈澱以玻璃棒勾取移入放有 1 ml 的 70% 乙醇（冷卻至 -20℃ 者）之另一微量離心管。

再以 10000 rpm，5 分鐘離心處理，靜靜地將上清液除去後再加上 1 ml 的 70% 乙醇再離心 5 分鐘再將上清液除去後沈澱物以 100 μ l 的 TE 緩衝液溶解得到

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (29)

D N A 溶液。此基因組 D N A 溶液的濃度依照 Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Eds. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., Cold Spring harbor Laboratory Press 的 E5, Spectrophotometric Determination of the Amount of DNA 或 RNA 之方法定量。

使用此基因組 D N A 中 1 0 n g 進行 P C R (polymerase chain reaction)。P C R 為使用 T a q 聚合酶 (寶酒造公司製，標號 R 0 0 1 A)。附加於酵素的緩衝液 5 μ l，附加於酵素的 dNTPmixture 4 μ l 與序列表序列號碼：1 3 所示的合成寡核苷酸 C 以及序列表序列號碼：1 4 所示的寡核苷酸 D 各別加入 2 0 0 p m o l，使最終容量為 5 0 μ l。

此混合物使用 TaKaRa PCR Thermal Cycler 480，9 5 $^{\circ}$ C 1 分鐘，5 0 $^{\circ}$ C 2 分鐘，7 2 $^{\circ}$ C 3 分鐘進行 5 次循環後，再進行 9 5 $^{\circ}$ C 1 分鐘，6 0 $^{\circ}$ C 2 分鐘，7 2 $^{\circ}$ C 3 分鐘 2 5 次循環。此 P C R 產物的一部份以 1 . 5 % 瓊脂糖凝膠 (agarose) 中進行電泳，經溴化乙錠 (日本 gene 公司製) 染色後，以紫外線觀察，確認有 4 0 0 b p 的 c D N A 被增大。且經限制酶 B a m H I 以及 X h o I 切斷處理後，以 1 . 5 % 瓊脂糖凝膠中進行電泳經溴化乙錠染色後切出約 3 7 0 b p 一帶的膠片再以 Suprec01 (寶酒造公司製) 純化後，併入市販的載體 (vector) p G E X - 6 P - 1 (Pharmacia 公司製)。此載體因併入於適當的目的基因片段之限制酶位置，而能表現 (expression) 與

五、發明說明 (36)

G S T 蛋白質的融合蛋白質，作為目的分子的表現載體 (expression vector) 之功能。

具體而言，載體 p G E X - 6 P - 1 與先前的 D N A 其莫耳比成 1 : 5 混合之，以 T 4 D N A 連接酶 (ligase, Invitrogen 公司製) 中將 D N A 併入載體中。D N A 所併入的載體 p G E X - 6 P - 1 於大腸菌以 One Shot Competent Cells (Invitrogen 公司製) 導入基因，植菌於含安匹西林 (Sigma 公司製) $50 \mu\text{g} / \text{ml}$ 的 L - 培養液 (L-Broth, 寶酒造公司製) 半固體培養基培養皿中，放置於 37°C 12 小時，長出的菌落以逢機選擇植入同濃度的含安匹西林的 L - 培養液 2 ml 中， 37°C 振盪培養 8 小時，回收菌體，使用 Witherdominiprep (Promega 公司製) 並依照所添加的說明書分離質體，此質體以限制酶 B a m H I / X h o I 分解，切出約 370 b p 的 D N A 而確認該 P C R 產物已被併入，對於已確認的群株而言進行所併入的 D N A 之鹼基序列分析。對於所插入的 D N A 片段之鹼基序列分析，使用 Applied Biosystems 公司製的螢光序列分析裝置實施。序列樣品的調製方法使用 PRISM, Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 公司製) 進行。 0.5 ml 容量的微量試管中加入 $9.5 \mu\text{l}$ 的反應保存液、 $4.0 \mu\text{l}$ 的 $0.8 \text{ pmol} / \mu\text{l}$ 的 T 7 起動引發物 (promoter primer, GIBCO BRL 公司製) 以及 $6.5 \mu\text{l}$ 的 $0.16 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ 的序列用模型 D N A 混合， $100 \mu\text{l}$ 的礦物油添加於上層後進行

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (31)

96 °C 30 秒、55 °C 15 秒以及60 °C 4 分鐘為一次循環，進行PCR增大反應25次循環，於4 °C 5分鐘保溫。反應後加上80 μ l 的滅菌精製水攪拌，離心分離後，此水層進行3次的苯酚·氯仿萃取。100 μ l 的水層中加入10 μ l 的3M醋酸鈉 (pH 5.2) 以及

300 μ l 的乙醇攪拌後，室溫下進行離心14,000 rpm，15分鐘後回收沈澱物。沈澱物以75%乙醇沖洗後，真空下靜置2分鐘使其乾燥，作為序列用樣品。序列樣品溶解於4 μ l 含10 mM的EDTA之甲醯胺90 °C，2分鐘變性後於冰中冷卻提供於序列步驟。

所得的7個純系中的1個序列與使用於PCR的探測體 (probe) 的序列有相同性，且其他微生物，例如發現與淋病奈瑟氏菌的 Ribosomal Protein L7/L12 基因序列非常類似的DNA序列。此構造基因部分的全鹼基序列以及對應的胺基酸序列係如序列表序列號碼：19以及20的序列。此基因片段明顯地為流感嗜血桿菌流感的 Ribosomal Protein L7/L12蛋白質的基因密碼 (code)。

併入表現載體的大腸菌於2倍濃度的YT培養基中50 ml，37 °C 1晚培養。2倍濃度的TY培養基450 ml於37 °C下1小時保溫。1晚培養後的大腸菌液50 ml放入前述的450 ml培養基中，37 °C 1小時培養後放入500 mM IPTG 100 μ l，25 °C 4小時培養後回收，分別以250 ml放入離心試管中進行5000 rpm，20分鐘離心。捨棄上清液溶解於含

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (32)

50 mM Tris-HCl pH 7.4，含 25% 蔗糖之 (Lysis) 緩衝液 25 ml 中。

添加 10% NP-40 1.25 ml，1 M

MgCl₂ 125 μl 再移入塑膠試管。1 分鐘 × 5 次冰冷中實施音波 (sonication) 處理，再 12000 rpm，15 分鐘離心後回收上清液。

再以 PBS 作處理的谷胱甘肽瓊脂糖凝膠 (Pharmacia 公司製) 柱吸著前述上清液。

再以 PBS 洗淨液將柱子以 3 倍體積洗淨。然後以含 10 mM 的谷胱甘肽之 50 mM Tris-HCl 8.0 溶出，其析出的部分的蛋白質含有量以色素結合法 (布雷德福特法；Biorad 公司) 檢測，取的主要部分。主要部分以 3 L PBS 進行 3 次透析。

所得的 GST 融合 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質 1 mg / ml 溶液 10 ml 加上含 500 mM Tris-HCl pH 7.0，1.5 M NaCl，10 mM EDTA，10 mM DTT 之斷裂緩衝液 (Cleavage buffer) 1 ml，且再添加 2 u / μl 的 PreScission Protease (Pharmacia 公司製) 100 μl 於 4℃ 下反應。GST 部分由 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質部分切離。

再以 PBS 作處理的谷胱甘肽瓊脂糖凝膠柱通過反應液，回收通過液，且 PBS 以 1 倍容積流入，亦將此回收。所取得的純化 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質之純度以電泳法進行確認，確保作為免疫源時約有 90% 的高純度

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (33)

。

首先對於老鼠的免疫，肺炎鏈球菌之 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質抗原 $100\mu\text{g}$ 溶於 $200\mu\text{l}$ 的 P B S 後加入福樂因特助劑 (Freund's adjuvant) $200\mu\text{l}$ ，乳化後 $200\mu\text{l}$ 注射於腹腔內。

且於 2 週後、4 週後、6 週後同樣的乳化抗原注射於腹腔內，且於 10 週後、14 週後以 2 倍濃度的抗原乳化液注射於腹腔內，最後的免疫起 3 天後取出脾臟，提供於細胞融合的步驟。

相對無菌方式取出的老鼠脾細胞 10^8 個而言取出骨髓瘤細胞 2×10^7 個於玻璃試管內充分混合後以 1500rpm ，5 分鐘離心捨棄上清液，之後充分混合細胞。

細胞融合時所使用的骨髓瘤細胞於使用於 NS - 1 系的細胞株，於含 10% 牛胎兒血清 (FCS) 之

RPMI 1640 培養基中培養，自細胞融合的 2 週前於含 0.13mM 的氮烏嘌呤， $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 MC - 210，10% FCS 之 RPMI 1640 培養基中培養 1 週後，使用含 10% FCS 之 RPMI 1640 培養基中培養 1 週者。混合的細胞樣品 30ml 加入保溫於 37°C 下的 RPMI 1640 培養基 50ml ， 1500rpm 離心除去上清液後加入保溫 37°C ，50% 的聚乙基乙二醇 1ml 激烈攪拌，2 分鐘處理後，添加保溫 37°C 的 10ml RPMI 1640 培養基，此液體以吸液管 (pipet) 進行吸進，擠出約 5 分鐘的激烈攪拌混合。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (34)

於 1 0 0 0 r p m 離心 5 分鐘，除去上清液後加上 3 0 ml 的 H A T 培養基調整細胞濃度成 5×10^6 個 / ml，攪拌均勻後，於 9 6 洞培養皿型培養皿中分別注入 0 . 1 ml，以 7 % C O₂ 條件下，3 7 °C 培養，第 1 天、第 1 週、第 2 週分別添加 H A T 培養基 0 . 1 ml。

為篩選產生目標抗體之細胞，實施以 E L I S A 法進行評價。溶解於含 0 . 0 5 % 迭氮化鹼 P B S 中的肺炎鏈球菌之 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質，其稀釋至 1 0 μ g / ml 濃度之液體，分別以 1 0 0 μ l 注入 9 6 洞培養皿，4 °C 下吸著 1 晚。除去上清液後，添加 1 % 牛血清白蛋白溶液 (P B S 中) 2 0 0 μ l 於室溫下反應 1 小時後遮蓋。除去上清液後以洗淨液 (Tween20 0.02 % ， P B S) 洗淨，其上加入融合細胞培養液 1 0 0 μ l 於室溫下反應 2 小時後除去上清液以洗淨液洗淨。將此加入 5 0 n g / ml 的過氧化酶標識羊抗老鼠 I g G 抗體液 1 0 0 μ l，於室溫反應實施 1 小時，除去上清液以洗淨液洗淨後加入 1 0 0 μ l T M B 溶液 (K P L 公司) 於室溫下反應 2 0 分鐘，發色後添加 1 N 的硫酸 1 0 0 μ l 停止反應，以 4 5 0 n m 測定其吸光。

此結果中發現有與 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質反應的陽性凹穴，其判斷為含有相對於 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質之抗體。

於是分別回收陽性凹穴中的細胞於 2 4 洞塑膠培養皿中，以 H A T 培養基培養。所培養的融合培養基為使細胞

五、發明說明 (35)

數能成 20 個 / ml 而以 H T 培養基稀釋，將此 50 μ l 於 H T 培養基中懸濁的 6 週齡的老鼠胸線細胞 1.0^6 個於 96 洞培養皿中混合後，以 7% CO_2 條件下，37℃ 培養培養 2 週培養液上清液中的抗體活性以上述的 E L I S A 法同樣方法檢測，回收與 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質反應之陽性細胞。

而且，反覆進行同樣的稀釋檢測，純系化過程操作，得到融合瘤 A M S P - 1 ~ 4 合計 4 種純系。

[實施例 6]

與肺炎鏈球菌的 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質反應的單株抗體之肺炎鏈球菌以及與其他微生物的反應試驗。

依照使用如前述取得之陽性融合瘤細胞的一定方法，進行單株抗體生產的回收。

具體而言，使用 R P M I 1640 培養基（含 10% F C S）進行繼代培養的細胞於 25 cm^2 培養椎形瓶中以無血清培養基稀釋至 2×10^5 個 / ml， 3.3×10^5 個 / ml 以及 5×10^5 個 / ml 程度的全容量為 5 ml 的菌液。於 7% CO_2 ，37℃ 下進行 3 ~ 5 天的增值，可見到細胞增值的錐形瓶中選擇原來細胞數較少的者，使其最終稀釋至 2×10^5 個 / ml 者能於 3 ~ 4 天內增值至 2×10^6 個 / ml，重複以同樣操作進行無血清培養基培養。再進行細菌培養用 96 洞培養皿中的純系化過程，選擇增值較快且抗體價值較高的細胞，所選擇的細胞於 24 洞培養皿中增

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (36)

值的以無血清培養基稀釋至 2.5×10^5 個 / ml 的程度的全體積為 10 ml 菌液，將此於 7 % CO_2 ， 37°C 下培養 3 ~ 5 天增值至 1×10^6 個 / ml 後，以 7.5×10^5 個 / ml 培養椎形瓶中同樣地進行增值至 1×10^6 個 / ml，再移至 100 ml 大量培養用的瓶子中。此瓶中加入 100 ml 的無血清培養基，邊攪拌邊以 37°C 下培養 2 天後，再加上無血清培養基 200 ml 再培養 2 天。此培養液分為 4 支而加 100 ml 的無血清培養液，2 天培養後分別添加 400 ml 的無血清培養液再培養約 6 天後，回收培養液以 1000 rpm，15 分鐘離心取得含有抗體的培養上清液，此培養上清液添加 0.1 % 迭氮化鹼後 4°C 保存。所取得的含有抗體的液體 100 ml 以 PBS 稀釋 5 倍後以 ProteinG 柱子 (5 ml 容積，Pharmacia 公司) 吸著，以 3 倍容積的 PBS 洗淨，以 pH 3 的檸檬酸緩衝液溶出，回收抗體部分得到可生產各融合瘤的單株抗體。來自此 4 株的融合瘤的單株抗體以特表平 7 - 509565 號公報所記載的 O I A 法進行評價。

即，O I A 法為具有氮化矽的薄膜層之矽晶圓上進行 capture 用抗體的反應所製成的反應用器材，於此抗原物質即微生物萃取液於一定時間進行反應後，被捕捉的抗原與作酵素標識的抗體 (增幅試藥) 進一步地反應，最後加上基質溶液所生成的薄膜沈澱引起的光干涉之色澤濃度，進而可以視覺判斷抗原抗體反應的方法。

所製得的單株抗體作為 O I A 法中具有氮化矽的薄膜

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (39)

[表 2]

10^6 個/ml 檢測結果		
<u>肺炎鏈球菌</u> (<i>Streptococcus pneumoniae</i>)	ATCC27336	+
<u>肺炎鏈球菌</u> (<i>Streptococcus pneumoniae</i>)	IID554	+
<u>肺炎鏈球菌</u> (<i>Streptococcus pneumoniae</i>)	IID555	+
<u>肺炎鏈球菌</u> (<i>Streptococcus pneumoniae</i>)	IID556	+
<u>肺炎鏈球菌</u> (<i>Streptococcus pneumoniae</i>)	IID557	+
<u>肺炎鏈球菌</u> (<i>Streptococcus pneumoniae</i>)	IID5588	+
<u>肺炎鏈球菌</u> (<i>Streptococcus pneumoniae</i>)	IID559	+
<u>肺炎鏈球菌</u> (<i>Streptococcus pneumoniae</i>)	IID1603	+
10^8 個/ml 檢測結果		
<u>大腸桿菌</u> (<i>Escherichia coli</i>)	ATCC25922	-
<u>排泄物腸球菌</u> (<i>Enterococcus faecalis</i>)	ATCC19433	-
<u>流感嗜血桿菌</u> (<i>Haemophilus influenzae</i>)	ATCC10211	-
<u>肺炎桿菌</u> (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)	ATCC13883	-
<u>淋病奈氏球菌</u> (<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)	IID821	-
<u>嗜乳糖奈瑟氏菌</u> (<i>Neisseria lactamica</i>)	ATCC23970	-
<u>腦膜炎球菌</u> (<i>Neisseria meningitidis</i>)	ATCC13090	-
<u>綠膿桿菌</u> (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	ATCC27853	-
<u>鏈球菌 B 群</u> (Group B streptococcus)	ATCC12386	-
<u>金黃色葡萄球菌</u> (<i>Staphylococcus aureus</i>)	ATCC25923	-
<u>膿腫鏈球菌</u> (<i>Streptococcus pyogenes</i>)	ATCC19615	-

(+:陽性反應、-:陰性反應)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (40)

[實施例 7]

自淋病奈氏球菌的 Ribosomal Protein L7/L12 基因的純系化過程中，同蛋白質於大腸桿菌中的大量表現與純化，以及對應同蛋白質的單株抗體之製作。

淋病奈氏球菌 I I D 8 2 1 株（自東京大學醫科學研究所所分配、購入）於巧克力洋菜培養基上適當地植菌， CO_2 培養箱中 $37^\circ C$ 、 CO_2 0.5% 條件下 24 小時培養。所長出的菌落最終成大約 5×10^9 CFU / ml 左右，於 TE 緩衝劑（和光純藥工業公司製）中懸濁。此時移入約 1.5 ml 的微量離心試管中以 10000 rpm 離心 2 分鐘，捨棄上清液，沈澱部分以 567 μ l 的 TE 緩衝液再懸濁。再加上 30 μ l 的 10% 月桂硫酸鈉（SDS）與 3 μ l 的 20 mg / ml Proteinase K 溶液充分混合，培養 $37^\circ C$ 1 小時。再添加 10% 溴化十六烷基三甲基銨 / 0.7 M NaCl 溶液 80 μ l，充分混合後 $65^\circ C$ 下培養 10 分鐘。再加入體積比 24 / 1 的氯仿－異戊醇混合物 700 μ l 充分攪拌。此溶液以微量離心機

12000 rpm，5 分鐘（控制於 $4^\circ C$ 下）離心處理後，水層部分移至新的微量離心管。於此加入 0.6 倍量的異丙醇充分搖動試管使 DNA 形成沈澱白色 DNA 沈澱以玻璃棒勾取移入放有 1 ml 的 70% 乙醇（冷卻至 $-20^\circ C$ 者）之另一微量離心管。

再以 10000 rpm，5 分鐘離心處理，靜靜地將上清液除去後再加上 1 ml 的 70% 乙醇再離心 5 分鐘再將

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (41)

上清液除去後沈澱物以 $100\ \mu\text{l}$ 的 TE 緩衝液溶解得到 DNA 溶液。此基因組 DNA 溶液的濃度依照 Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Eds. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., Cold Spring harbor Laboratory Press 的 E5, Spectrophotometric Determination of the Amount of DNA 或 RNA 之方法定量。

使用此基因組 DNA 中 $10\ \text{ng}$ 進行 PCR (polymerase chain reaction)。PCR 為使用 Taq 聚合酶 (寶酒造公司製, 標號 R001A)。附加於酵素的緩衝液 $5\ \mu\text{l}$, 附加於酵素的 dNTPmixture $4\ \mu\text{l}$ 與 流感嗜血桿菌 等菌的 Ribosomal Protein L7/L12 DNA 序列的類似性可由電腦網路情報 (奧克來荷馬大學, 肺炎鏈球菌 基因設計公開 基因 DNA 情報) 取得 肺炎鏈球菌 的 Ribosomal Protein L7/L12 DNA 序列以原先設計的序列表序列號碼: 15 所示合成核苷酸 E 以及序列表序列號碼: 16 所示的核苷酸 F 作為探測體, 分別加入 $200\ \text{pmol}$, 使最終容量為 $50\ \mu\text{l}$ 。

此混合物使用 TaKaRa PCR Thermal Cycler 480, $95\ ^\circ\text{C}$ 1 分鐘, $50\ ^\circ\text{C}$ 2 分鐘, $72\ ^\circ\text{C}$ 3 分鐘進行 5 次循環後, 再進行 $95\ ^\circ\text{C}$ 1 分鐘, $60\ ^\circ\text{C}$ 2 分鐘, $72\ ^\circ\text{C}$ 3 分鐘 25 次循環。此 PCR 產物的一部份以 1.5% 瓊脂糖凝膠 (agarose) 中進行電泳, 經溴化乙錠 (日本 gene 公司製) 染色後, 以紫外線觀察, 確認有 $400\ \text{bp}$ 的 cDNA 被增大。且經限制酶 BamHI 以

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (42)

及 X h o I 切斷處理後，以 1 . 5 % 瓊脂糖凝膠中進行電泳經溴化乙錠染色後切出約 3 7 0 b p 一帶的膠片再以 Suprec01（寶酒造公司製）純化後，併入市販的載體（vector）p G E X - 4 T - 1（Pharmacia 公司製）。具體而言，載體 p G E X - 4 T - 1 與先前的 D N A 其莫耳比成 1 : 3 混合之，以 T 4 D N A 連接酶（ligase, Invitrogen 公司製）於載體中併入 D N A。D N A 所併入的載體 p G E X - 4 T - 1 於大腸菌以 One Shot Competent Cells（Invitrogen 公司製）導入基因，植菌於含安匹西林（Sigma 公司製） $50 \mu\text{g} / \text{ml}$ 的 L - 培養液（L-Broth，寶酒造公司製）半固體培養基培養皿中，放置於 37°C 12 小時，長出的菌落以逢機選擇植入同濃度的含安匹西林的 L - 培養液 2 ml 中， 37°C 振盪培養 8 小時，回收菌體，使用 Witherdominiprep（Promega 公司製）並依照所添加的說明書分離質體，此質體以限制酶 B a m H I / X h o I 分解，切出約 3 7 0 b p 的 D N A 而確認該 P C R 產物已被併入，對於已確認的群株而言進行所併入的 D N A 之鹼基序列分析。

對於所插入的 D N A 片段之鹼基序列分析，使用 Applied Biosystems 公司製的螢光序列分析裝置實施。序列樣品的調製方法使用 PRISM, Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 公司製) 進行。

0.5 ml 容量的微量試管中加入 $9.5 \mu\text{l}$ 的反應保存液、 $4.0 \mu\text{l}$ 的 $0.8 \text{ pmol} / \mu\text{l}$ 的 T 7 起動引發物

五、發明說明 (43)

(promoter primer, GIBCO BRL 公司製) 以及 $6.5 \mu\text{l}$ 的 $0.16 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ 的序列用模型 DNA 混合，

$100 \mu\text{l}$ 的礦物油添加於上層後，進行 96°C 30 秒、 55°C 15 秒以及 60°C 4 分鐘為一次循環，進行 PCR 增大反應 25 次循環，於 4°C 5 分鐘保溫。反應後加上 $80 \mu\text{l}$ 的滅菌精製水攪拌，離心分離後，此水層進行 3 次的苯酚·氯仿萃取。 $100 \mu\text{l}$ 的水層中加入 $10 \mu\text{l}$ 的 3 M 醋酸鈉 (pH 5.2) 以及 $300 \mu\text{l}$ 的乙醇攪拌後，室溫下進行離心 $14,000 \text{ rpm}$ ，15 分鐘後回收沈澱。沈澱物以 75% 乙醇沖洗後，真空下靜置 2 分鐘使其乾燥，作為序列用樣品。序列樣品溶解於 $4 \mu\text{l}$ 含 10 mM 的 EDTA 之甲醯胺經 90°C ，2 分鐘變性後於冰中冷卻提供於序列步驟。

所得的 5 個純系中 1 個序列與使用於 PCR 的探測體 (probe) 的序列有相同性，且其他微生物，例如發現與流感嗜血桿菌的 Ribosomal Protein L7/L12 基因序列非常類似的 DNA 序列。此構造基因部分的全鹼基序列以及對應的胺基酸序列係如序列表序列號碼：21 以及 22 的序列。此基因片段明顯地為淋病奈氏球菌的 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質的基因密碼 (code)。

使用如此所構成的淋病奈氏球菌的 GST 融合 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質表現載體與實施例 2 所記載的相同方法取得純化淋病奈氏球菌的 GST 融合 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (44)

而且依照實施例 3 所記載的方法取得可產生對應淋病奈氏球菌的 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質之單株抗體的融合瘤 G C R B - 3 株。

[實施例 8]

與淋病奈氏球菌的 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質反應的單株抗體之淋病奈氏球菌以及與其他微生物的反應試驗。

依照使用如前述取得之陽性融合瘤細胞 G C R B - 3 的一定方法，回收生產的單株抗體。

具體而言為使用 P R M I 1 6 4 0 陪地（含 1 0 % F C S ）進行繼代培養的細胞，於 2 週前於腹腔內注射 0 . 5 ml 扎日斯烷（ pristan ）的 B a l b / C 老鼠腹腔內注射 5×10^6 個（ P B S 中），3 週後回收腹水，離心後取得上清液。

取得的含抗體液體吸著於 Protein A 柱（ 5 ml 容積，Pharmacia 公司），以 3 倍容積的 P B S 洗淨，以 p H 3 的檸檬酸緩衝液溶出，回收抗體部分，得到生產各個融合瘤的單株抗體。

使用來自此 G C R B - 3 融合瘤的單株抗體以 E L I S A 法進行評價。

抗體的評價使用夾心試驗法，所製得的單株抗體與過氧化物酶以化學結合作為酵素標識抗體使用。

即，酵素標識為使用 Hosradeishu 過氧化物酶（ Sigma grade VI ），結合使用試藥 S - 乙醯基硫代醋酸 N - 羥基琥

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

五、發明說明 (46)

[表 3]

10 ⁶ 個/ml 檢測結果		
<u>淋病奈氏球菌</u> (<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)	ATCC9793	+
<u>淋病奈氏球菌</u> (<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)	ATCC19424	+
<u>淋病奈氏球菌</u> (<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)	ATCC27628	+
<u>淋病奈氏球菌</u> (<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)	ATCC27629	+
<u>淋病奈氏球菌</u> (<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)	ATCC27630	+
<u>淋病奈氏球菌</u> (<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)	ATCC27631	+
<u>淋病奈氏球菌</u> (<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)	ATCC27632	+
<u>淋病奈氏球菌</u> (<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)	ATCC27633	+
<u>淋病奈氏球菌</u> (<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)	ATCC35541	+
<u>淋病奈氏球菌</u> (<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)	ATCC35542	+
<u>淋病奈氏球菌</u> (<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)	ATCC43069	+
<u>淋病奈氏球菌</u> (<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)	ATCC43070	+
<u>淋病奈氏球菌</u> (<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)	ATCC49226	+
10 ⁸ 個/ml 檢測結果		
<u>腦膜炎球菌</u> (<i>Neisseria meningitidis</i>)	ATCC13090	-
<u>嗜乳糖奈瑟氏菌</u> (<i>Neisseria lactamica</i>)	ATCC30011	-
<u>黏膜奈瑟氏菌</u> (<i>Neisseria mucosa</i>)	ATCC35611	-
<u>乾燥奈瑟氏菌</u> (<i>Neisseria sicca</i>)	ATCC9913	-
<u>卡他布蘭漢氏球菌</u> (<i>Branhamella catarrharis</i>)	ATCC25240	-
<u>流感嗜血桿菌</u> (<i>Haemophilus influenzae</i>)	ATCC10211	-
<u>大腸桿菌</u> (<i>Escherichia coli</i>)	ATCC25922	-
<u>肺炎桿菌</u> (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)	ATCC13883	-
(+:陽性反應、-:陰性反應)		

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (47)

[實施例 9]

取得 奈瑟氏菌屬 特異抗 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質單株抗體

淋病奈氏球菌 I I D 8 2 1 株 (自東京大學醫科學研究所所配合、購入) 於巧克力洋菜培養基上適當地植菌， CO_2 培養箱中 37°C 、 CO_2 0.5% 濃度條件下 24 小時培養。所長出的菌落最終成大約 $5 \times 10^9 \text{ CFU} / \text{ml}$ 左右，於 TE 緩衝劑 (和光純藥工業公司製) 中懸濁。此時移入約 1.5 ml 的微量離心試管中以

10000 rpm 離心 2 分鐘，捨棄上清液，沈澱部分以 567 μl 的 TE 緩衝液再懸濁。再加上 30 μl 的 10% 月桂硫酸鈉 (SDS) 與 3 μl 的 20 mg / ml Proteinase K 溶液充分混合，培養 37°C 1 小時。再添加 10% 溴化十六烷基三甲基銨 / 0.7 M NaCl 溶液 80 μl ，充分混合後 65°C 下培養 10 分鐘。再加入體積比 24 / 1 的氯仿 - 異戊醇混合物 700 μl 充分攪拌。此溶液以微量離心機 12000 rpm，5 分鐘 (控制於 4°C 下) 離心處理後，水層部分移至新的微量離心管。於此加入 0.6 倍量的異丙醇充分搖動試管使 DNA 形成沈澱白色的 DNA 沈澱以玻璃棒勾取移入放有 1 ml 的 70% 乙醇 (冷卻至 -20°C 者) 之另一微量離心管。

再以 10000 rpm，5 分鐘離心處理，靜靜地將上清液除去後再加上 1 ml 的 70% 乙醇再離心 5 分鐘再將上清液除去後沈澱物以 100 μl 的 TE 緩衝液溶解得到

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (48)

D N A 溶液。此基因組 D A N 溶液的濃度依照 Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Eds. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., Cold Spring harbor Laboratory Press 的 E5, Spectrophotometric Determination of the Amount of DNA 或 RNA 之方法定量。

使用此基因組 D N A 中 1 0 n g 進行 P C R (polymerase chain reaction)。P C R 為使用 T a q 聚合酶 (寶酒造公司製，標號 R 0 0 1 A)。附加於酵素的緩衝液 5 μ l，附加於酵素的 dNTPmixture 4 μ l 與其他菌的 Ribosomal Protein L7/L12 DNA 序列的類似性可由電腦網路情報 (奧克來荷馬大學，肺炎鏈球菌基因設計公開 基因 D N A 情報) 取得 肺炎鏈球菌的 Ribosomal Protein L7/L12 DNA 序列以原先設計的序列表序列號碼：1 5 所示合成核苷酸 E 以及序列表序列號碼：1 6 所示的合成核苷酸 F 作為探測體，分別加入 2 0 0 p m o l，使最終容量為 5 0 μ l。

此混合物使用 TaKaRa PCR Thermal Cycler 480，9 5 $^{\circ}$ C 1 分鐘，5 0 $^{\circ}$ C 2 分鐘，7 2 $^{\circ}$ C 3 分鐘進行 5 次循環後，再進行 9 5 $^{\circ}$ C 1 分鐘，6 0 $^{\circ}$ C 2 分鐘，7 2 $^{\circ}$ C 3 分鐘 2 5 次循環。此 P C R 產物的一部份以 1 . 5 % 瓊脂糖凝膠 (agarose) 中進行電泳，經溴化乙錠 (日本 gene 公司製) 染色後，以紫外線觀察，確認有 4 0 0 b p 的 c D N A 被增大。且限制酶 B a m H I 以及 X h o I 切斷處理後，以 1 . 5 % 瓊脂糖凝膠中進行電泳

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (49)

經溴化乙錠染色後切出約 3 7 0 b p 一帶的膠片以 Suprec01 (寶酒造公司製) 純化後，併入市販的載體 (vector) p G E X - 6 P - 1 (Pharmacia 公司製)。同載體因併入目標基因片段而表現與 G S T 蛋白質的融合蛋白質，作為目標分子的表現載體之機能。具體而言，載體 p G E X - 6 P - 1 與先前的 D N A 其莫耳比成 1 : 5 混合之，以 T 4 D N A 連接酶 (ligase, Invitrogen 公司製) 中將 D N A 併入載體中。D N A 所併入的載體 p G E X - 6 P - 1 於大腸菌以 One Shot Competent Cells (Invitrogen 公司製) 導入基因，植菌於含安匹西林 (Sigma 公司製) 5 0 μ g / ml 的 L - 培養液 (L - B r o t h, 寶酒造公司製) 半固體培養基培養皿中，放置於 3 7 $^{\circ}$ C 1 2 小時，長出的菌落以逢機選擇植入同濃度的含安匹西林的 L - 培養液 2 ml 中，3 7 $^{\circ}$ C 振盪培養 8 小時，回收菌體，使用 Witherdominiprep (Promega 公司製) 並依照所添加的說明書分離質體，此質體以限制酶 B a m H I / X h o I 分解，切出約 3 7 0 b p 的 D N A 而確認該 P C R 產物已被併入，對於已確認的群株而言進行所併入的 D N A 之鹼基序列分析。對於所插入的 D N A 片段之鹼基序列分析，使用 Applied Biosystems 公司製的螢光序列分析裝置實施。序列樣品的調製方法使用 PRISM, Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 公司製) 進行。

0 . 5 ml 容量的微量試管中加入 9 . 5 μ l 的反應保存液、4 . 0 μ l 的 0 . 8 p m o l / μ l 的 T 7 起動引發物

五、發明說明 (50)

(promoter primer, GIBCO BRL 公司製) 以及 $6.5 \mu\text{l}$ 的 $0.16 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ 的序列用模型 DNA 混合，

$100 \mu\text{l}$ 的礦物油添加於上層後， 96°C 30 秒、 55°C 15 秒以及 60°C 4 分鐘為一次循環，進行 PCR 增大反應 25 次循環，於 4°C 5 分鐘保溫。反應後加上 $80 \mu\text{l}$ 的滅菌精製水攪拌，離心分離後，此水層進行 3 次的苯酚·氯仿萃取。 $100 \mu\text{l}$ 的水層中加入 $10 \mu\text{l}$ 的 3 M 醋酸鈉 (pH 5.2) 以及 $300 \mu\text{l}$ 的乙醇攪拌後，室溫下進行離心 $14,000 \text{ rpm}$ ，15 分鐘後回收沈澱。沈澱物以 75% 乙醇沖洗後，真空下靜置 2 分鐘使其乾燥，作為序列用樣品。序列樣品溶解於 $4 \mu\text{l}$ 含 10 mM 的 EDTA 之甲醯胺 90°C ，2 分鐘變性後於冰中冷卻提供於序列步驟。

所得的 4 個純系中 1 個序列與使用於 PCR 的探測體 (probe) 的序列有相同性，且其他微生物，例如發現與流感嗜血桿菌的 Ribosomal Protein L7/L12 基因序列非常類似的 DNA 序列。此構成基因部分的全鹼基序列以及對應的氨基酸序列係如序列表序列號碼：21 以及 22 的序列。此基因片段明顯地為淋病奈氏球菌的 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質的基因密碼 (code)。

併入表現載體的大腸菌於 2 倍濃度的 YT 培養基中 50 ml ， 37°C 1 晚培養。2 倍量的 YT 培養基 450 ml 於 37°C 下 1 小時保溫。1 晚培養後的大腸菌液 50 ml 放入前述的 450 ml 培養基中， 37°C 1 小時培養後放入

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (51)

5 0 0 m M I P T G 1 0 0 μ l , 2 5 $^{\circ}$ C 4 小時培養後回收 , 分別以 2 5 0 , ml 放入離心試管中進行 5 0 0 0 r p m , 2 0 分鐘離心。捨棄上清液溶解於含 5 0 m M T r i s - H C l p H 7 . 4 , 含 2 5 % 蔗糖之 (Lysis) 緩衝液 2 5 ml 中。

添加 1 0 % N P - 4 0 1 . 2 5 ml , 1 M

M g C l ₂ 1 2 5 μ l 再移入塑膠試管。1 分鐘 $\times$ 5 次冰冷中實施音波處理 , 再 1 2 0 0 0 r p m , 1 5 分鐘離心後回收上清液。

再以 P B S 作處理的谷胱甘肽瓊脂糖凝膠 (Pharmacia 公司製) 柱吸著前述上清液。

以 P B S 洗淨液將柱子以 3 倍體積洗淨。然後以含 1 0 m M 的谷胱甘肽之 5 0 m M T r i s - H C l 8 . 0 溶出 , 析出的部分中之蛋白質含有量以色素結合法 (布雷德福特法 ; Biorad 公司) 檢測 , 取得主要部分。主要部分以 3 L P B S 進行 3 次透析。

所得的 G S T 融合 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質 1 m g / ml 溶液 1 0 ml 加上含 5 0 0 m M T r i s - H C l p H 7 . 0 , 1 . 5 M N a C l , 1 0 m M E D T A , 1 0 m M D T T 斷裂緩衝液 (Cleavage buffer) 1 ml , 且再添加 2 u / μ l 的 PreScission Protease (Pharmacia 公司製) 1 0 0 μ l 於 4 $^{\circ}$ C 下反應。G S T 部分由 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質部分切離。

再以 P B S 作處理的谷胱甘肽瓊脂糖凝膠柱通過反應

五、發明說明 (52)

液，回收通過液，且 P B S 以 1 倍容積流入，亦將此回收。所取得的純化 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質之純度以電泳法進行確認，確保作為免疫源時約 90% 的高純度。

首先對於老鼠的免疫，淋病奈氏球菌之 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質抗原 100 μ g 溶於 200 μ l 的 P B S 後加入福樂因特助劑 (Freund's adjuvant) 200 μ l，乳化後 200 μ l 注射於腹腔內。

且於 2 週後、4 週後、6 週後同樣的乳化抗原注射於腹腔內，且於 10 週後、14 週後以 2 倍濃度的抗原乳化液注射於腹腔內進行最後的免疫起 3 天後取出脾臟，提供於細胞融合的步驟。

相對無菌方式取出的老鼠脾細胞 10^8 個而言取出骨髓瘤細胞 2×10^7 個於玻璃試管充分混合後以 1500 rpm，5 分鐘離心捨棄上清液，之後充分混合細胞。

細胞融合時所使用的骨髓瘤細胞使用 NS - 1 系的細胞株於含 10% 牛胎兒血清 (FCS) 之

RPMI 1640 培養基中培養，自細胞融合的 2 週前於含 0.13 mM 的氮鳥嘌呤，0.5 μ g / ml 的 MC - 210，10% FCS 之 RPMI 1640 培養基中培養 1 週後，使用含 10% FCS 之 RPMI 1640 培養基中培養 1 週者。混合的細胞樣品添加保溫於 37℃ 下的 50 ml RPMI 1640 培養基 30 ml，進行離心 1500 rpm 除去上清液後加上保溫 37℃ 的 50% 的

五、發明說明 (53)

聚乙基乙二醇 1 ml 激烈攪拌 2 分鐘處理後，添加保溫 37 °C 的 10 ml RPMI 1640 培養基，液體以吸液管 (pipet) 進行吸進，擠出約 5 分鐘的激烈攪拌混合。

於 1000 rpm 離心 5 分鐘，除去上清液後加上 30 ml 的 HAT 培養基調整成細胞濃度成 5×10^6 個 / ml，攪拌均勻後，於 96 洞培養皿型培養皿中分別注入 0.1 ml，以 7% CO₂ 條件下，37 °C 培養，第 1 天、第 1 週、第 2 週分別添加 HAT 培養基 0.1 ml。

為篩選產生目標抗體之細胞，實施 ELISA 法進行評價。溶解於含 0.05% 迭氮化鹼 PBS 中的 淋病奈氏球菌 之 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質稀釋至 10 µg / ml 濃度之液體，分別以 100 µl 注入 96 洞培養皿，4 °C 下吸著 1 晚。除去上清液後，添加 1% 牛血清白蛋白溶液 (PBS 中) 200 µl 於室溫下反應 1 小時後遮蓋。除去上清液後以洗淨液 (Tween20 0.02%，PBS) 洗淨，其上加入融合細胞培養液 100 µl 於室溫下反應 2 小時後除去上清液以洗淨液洗淨。將此加入 50 ng / ml 的過氧化酶標識羊抗老鼠 IgG 抗體液 100 µl，於室溫反應實施 1 小時，除去上清液以洗淨液洗淨後加入 100 µl TMB 溶液 (KPL 公司) 於室溫下反應 20 分鐘，發色後添加 1 N 的硫酸 100 µl 停止反應，以 450 nm 測定其吸光。

此結果中發現與 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質反應的陽性凹穴，其判斷為含有相對於 Ribosomal Protein L7/L12

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (54)

蛋白質之抗體。

於是分別回收陽性凹穴中的細胞於 24 洞塑膠培養皿中，以 HAT 培養基培養。所培養的融合培養基為使細胞數能成 20 個 / ml 以 HT 培養基稀釋，將此 50 μ l 與 HT 培養基中懸濁的 6 週齡的老鼠胸線細胞 10^6 個於 96 洞培養皿中混合後，以 7% CO_2 條件下，37℃ 培養培養 2 週培養液上清液中的抗體活性以上述的 ELISA 法同樣方法檢測，回收與 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質反應之陽性細胞。

而且，反覆進行同樣的稀釋檢測，純系化過程操作，得到融合瘤 HIRB-5 ~ 8 合計 4 種純系。

依照使用如前述取得之陽性融合瘤細胞的定性方法，進行單株抗體生產的回收。

具體而言，使用 RPMI 1640 培養基（含 10% FCS）進行繼代培養的細胞於 25 cm^2 培養椎形瓶中於無血清培養基稀釋至 2×10^5 個 / ml， 3.3×10^5 個 / ml 以及 5×10^5 個 / ml 程度的全容量 5 ml。7% CO_2 ，37℃ 下 3 ~ 5 天進行增值，於可見到細胞增值的錐形瓶中選擇原來細胞數較少的者，使最終稀釋至 2×10^5 個 / ml 者能於 3 ~ 4 天內增值至 2×10^6 個 / ml，重複以同樣操作於無血清培養基培養。再進行細菌培養用 96 洞培養皿中的純系化過程，選擇增值較快且抗體價值較高的細胞所選擇的細胞於 24 洞培養皿中增值的以無血清培養基稀釋至 25 cm^2 培養椎形瓶中 2×10^5 個 / ml 的程度

五、發明說明 (55)

而全體積為 10 ml，將此於 7% CO₂，37℃ 下培養 3～5 天增值至 1×10^6 個/ml 後，以 75 cm² 培養椎形瓶中同樣地進行增值至 1×10^6 個/ml，再移至 100 ml 大量培養用的瓶子中。此瓶中加上 100 ml 的無血清培養基，邊攪拌邊以 37℃ 下培養 2 天後，再加上無血清培養基 200 ml 再培養 2 天。此培養液分為 4 支而加 100 ml 的無血清培養液，2 天培養後分別添加 400 ml 的無血清培養液再培養約 6 天後，回收培養液以 1000 rpm，15 分鐘離心取得含作為目標抗體的培養上清液，此培養上清液添加 0.1% 迭氮化鹼後 4℃ 保存。所取得的含有抗體的液體 100 ml 以 P B S 稀釋 5 倍後以 ProteinG 柱子（5 ml 容積，Pharmacia 公司）吸著，以 3 倍容積的 P B S 洗淨，以 pH 3 的檸檬酸緩衝液溶出，回收抗體部分得到可生產各融合瘤的單株抗體。來自此 4 株的融合瘤單株抗體以特表平 7-509565 號公報所記載的 O I A 法進行評價。

即，O I A 法為具有氮化矽的薄膜層之矽晶圓上進行 capture 用抗體的反應所製成的反應用器材，於此抗原物質即微生物萃取液於一定時間進行反應後，被捕捉的抗原與作酵素標識的抗體（增幅試藥）進一步地反應，最後加上基質溶液所生成的薄膜沈澱引起的光干涉之濃度，可以視覺可判斷抗原抗體反應的方法。

所製得的單株抗體作為 O I A 法中具有氮化矽的薄膜層之矽晶圓上進行固定化的 capture 抗體使用。又作為

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (58)

[表 4]

10 ⁸ 個/ml 檢測結果		
<u>淋病奈氏球菌</u> (Neisseria gonorrhoeae)	IID821	+
<u>嗜乳糖奈瑟氏菌</u> (Neisseria lactamica)	ATCC23970	+
<u>腦膜炎球菌</u> (Neisseria meningitidis)	ATCC13090	+
<u>大腸桿菌</u> (Escherichia coli)	ATCC25922	-
<u>排泄物腸球菌</u> (Enterococcus faecalis)	ATCC19433	-
<u>流感嗜血桿菌</u> (Haemophilus influenzae)	ATCC10211	-
<u>肺炎桿菌</u> (Klebsiella pneumoniae)	ATCC13883	-
<u>綠膿桿菌</u> (Pseudomonas aeruginosa)	ATCC27853	-
<u>鏈球菌 B 群</u> (Group B streptococcus)	ATCC12386	-
<u>金黃色葡萄球菌</u> (Staphylococcus aureus)	ATCC25923	-
<u>肺炎鏈球菌</u> (Streptococcus pneumoniae)	ATCC27336	-
<u>膿腫鏈球菌</u> (Streptococcus pyogenes)	ATCC19615	-

(+:陽性反應、-:陰性反應)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (63)

[表 5]

	10 ⁸ 個/ml 檢測結果	
<u>流感嗜血桿菌</u> (Haemophilus influenzae)	ATCC10211	+
<u>大腸桿菌</u> (Escherichia coli)	ATCC25922	-
<u>排泄物腸球菌</u> (Enterococcus faecalis)	ATCC19433	-
<u>肺炎桿菌</u> (Klebsiella pneumoniae)	ATCC13883	-
<u>淋病奈氏球菌</u> (Neisseria gonorrhoeae)	IID821	-
<u>嗜乳糖奈瑟氏菌</u> (Neisseria lactamica)	ATCC23970	-
<u>腦膜炎球菌</u> (Neisseria meningitidis)	ATCC13090	-
<u>綠膿桿菌</u> (Pseudomonas aeruginosa)	ATCC27853	-
<u>鏈球菌 B 群</u> (Group B streptococcus)	ATCC12386	-
<u>金黃色葡萄球菌</u> (Staphylococcus aureus)	ATCC25923	-
<u>肺炎鏈球菌</u> (Streptococcus pneumoniae)	ATCC27336	-
<u>膿腫鏈球菌</u> (Streptococcus pyogenes)	ATCC19615	-

(+ ; 陽性反應、 - ; 陰性反應)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (64)

[參考例 1]

取得與各種微生物的 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質特異反應的單株抗體。

以 O I A 或 E L I S A 進行微生物檢測時，通常以 capture 抗體與 detect 用標識抗體夾住抗原進行檢測，即所謂的夾心試驗法其特別對檢測感度具有利用性，然而此時與來自特定微生物的抗原物質與特異性反應之抗體為必要的同時，多一種可辨識與特異性抗體相異的抗原表位的抗體亦為必要的。

與來自種種微生物的 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質進行非特異性反應的抗體和，與 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質進行特異性反應的抗體所構成夾心試驗的抗體極為有用。

幸運地因 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質為種種微生物中具有相同胺基酸序列領域，因此試取得與由流感嗜血桿菌的種種微生物之 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質交差反應的多細胞抗抗體，由發現由一種微生物所取得的不具特異性之抗 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質抗體中於種種微生物的夾心試驗法可共通利用。

首先由淋病奈氏桿菌的 Ribosomal Protein L7/L12 基因進行純系化過程，同蛋白質於大腸菌的大量表現、純化以及製得對應同蛋白質地單株抗體。

淋病奈氏球菌 I I D 8 2 1 株（自東京大學醫科學研究所所分配、購入）於巧克力洋菜培養基上適當地植菌，

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (65)

C O₂ 培養箱中 37 °C、C O₂ 0 . 5 % 條件下 24 小時培養。所長出的菌落最終成大約 5×10^9 C F U / ml 左右，於 T E 緩衝劑（和光純藥工業公司製）中懸濁。此時移入約 1 . 5 ml 的微量離心試管中以 10000 r p m 離心 2 分鐘，捨棄上清液，沈澱部分以 567 μ l 的 T E 緩衝液再懸濁。再加上 30 μ l 的 10 % 月桂硫酸鈉（S D S）與 3 μ l 的 20 m g / ml Proteinase K 溶液充分混合，培養 37 °C 1 小時。再添加 10 % 溴化十六烷基三甲基銨 / 0 . 7 M N a C l 溶液 80 μ l，充分混合後 65 °C 下培養 10 分鐘。再加入體積比 24 / 1 的氯仿－異戊醇混合物 700 μ l 充分攪拌。此溶液以微量離心機 12000 r p m，5 分鐘（控制於 4 °C 下）離心處理後，水層部分移至新的微量離心管。於此加入 0 . 6 倍量的異丙醇充分搖動試管使 D N A 形成沈澱。白色 D N A 沈澱以玻璃棒勾取移入放有 1 ml 的 70 % 乙醇（冷卻至 - 20 °C 者）之另一微量離心管。

再以 10000 r p m，5 分鐘離心處理，靜靜地將上清液除去後再加上 1 ml 的 70 % 乙醇再離心 5 分鐘。再將上清液除去後沈澱物以 100 μ l 的 T E 緩衝液溶解得到 D N A 溶液。此基因組 D A N 溶液的濃度依照 Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Eds. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., Cold Spring harbor Laboratory Press 的 E5, Spectrophotometric Determination of the Amount of DNA 或 RNA 之方法定量。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (66)

使用此基因組 D N A 中 1 0 n g 進行 P C R (polymerase chain reaction) 。 P C R 為使用 T a q 聚合酶 (寶酒造公司製，標號 R 0 0 1 A) 。附加於酵素的緩衝液 5 μ l ，附加於酵素的 dNTPmixture 4 μ l 與流感嗜血菌等菌的 Ribosomal Protein L7/L12 DNA 序列的類似性可由網路情報 (奧克來荷馬大學，肺炎鏈球菌基因設計公開 基因 D N A 情報) 取得 肺炎鏈球菌的 Ribosomal Protein L7/L12 DNA 序列以原先設計的序列表序列號碼：1 5 所示合成核苷酸 E 以及序列表序列號碼：1 6 所示的核苷酸 F 作為探測體，分別加入 2 0 0 p m o l ，使最終容量為 5 0 μ l 。

此混合物使用 TaKaRa PCR Thermal Cycler 480 ， 9 5 $^{\circ}$ C 1 分鐘，5 0 $^{\circ}$ C 2 分鐘，7 2 $^{\circ}$ C 3 分鐘進行 5 次循環後，再進行 9 5 $^{\circ}$ C 1 分鐘，6 0 $^{\circ}$ C 2 分鐘，7 2 $^{\circ}$ C 3 分鐘 2 5 次循環。此 P C R 產物的一部份以 1 . 5 % 瓊脂糖凝膠 (agarose) 中進行電泳，經溴化乙錠 (日本 gene 公司製) 染色後，以紫外線觀察，確認有 4 0 0 b p 的 c D N A 被增大。且限制酶 B a m H I 以及 X h o I 切斷處理後，以 1 . 5 % 瓊脂糖凝膠中進行電泳經溴化乙錠染色後切出約 3 7 0 b p 一帶的膠片再以 Suprec01 (寶酒造公司製) 純化後，併入市販的載體 (vector) p G E X - 4 T - 1 (Pharmacia 公司製) 。具體而言，載體 p G E X - 4 T - 1 與先前的 D N A 其莫耳比成 1 : 3 混合之，T 4 D N A 連接酶 (ligase, Invitrogen

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (67)

公司製)中於將DNA併入於載體中。DNA所併入的載體pGEX-4T-1於大腸菌以One Shot Competent Cells (Invitrogen公司製)導入基因,植菌於含安匹西林(Sigma公司製)50 μ g/ml的L-培養液(L-Broth, 寶酒造公司製)半固體培養基培養皿中,放置於37℃12小時,長出的菌落以逢機選擇植入同濃度的含安匹西林的L-培養液2 ml中,37℃振盪培養8小時,回收菌體,使用Witherdominiprep (Promega公司製)並依照所添加的說明書分離質體,此質體以限制酶BamHI/XhoI分解,切出約370 bp的DNA而確認該PCR產物已被併入,對於已確認的群株而言進行所併入的DNA之鹼基序列分析。對於所插入的DNA片段之鹼基序列分析,使用Applied Biosystems公司製的螢光序列分析裝置實施。序列樣品的調製方法使用PRISM, Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems公司製)進行。0.5 ml容量的微量試管中加入9.5 μ l的反應保存液、4.0 μ l的0.8 pmol/ μ l的T7起動引發物(promoter primer,GIBCO BRL公司製)以及6.5 μ l的0.16 μ g/ μ l的序列用模型DNA混合,100 μ l的礦物油添加於上層後,96℃30秒、55℃15秒以及60℃4分鐘為一次循環,進行PCR增大反應25次循環,於4℃5分鐘保溫。反應後加上80 μ l的滅菌精製水攪拌,離心分離後,此水層進行3次的苯酚·氯仿萃取。100 μ l的水

五、發明說明 (68)

層中加入 $10\ \mu\text{l}$ 的 $3\ \text{M}$ 醋酸鈉 ($\text{pH}\ 5.2$) 以及 $300\ \mu\text{l}$ 的乙醇攪拌後，室溫下進行離心 $14,000\ \text{rpm}$ ，15 分鐘後回收沈澱。沈澱物以 75% 乙醇沖洗後，真空下靜置 2 分鐘使其乾燥，作為序列用樣品。序列樣品溶解於 $4\ \mu\text{l}$ 含 $10\ \text{mM}$ 的 EDTA 之甲醯胺中經 90°C ，2 分鐘變性後於冰中冷卻提供於進行序列步驟。

所得的 5 個純系中 1 個序列與使用於 PCR 的探測體 (probe) 的序列有相同性，且其他微生物，例如發現與流感嗜血桿菌的 Ribosomal Protein L7/L12 基因序列非常類似的 DNA 序列。此構成基因部分的全鹼基序列以及對應的胺基酸序列係如序列表序列號碼：21 以及 22 的序列。此基因片段明顯地為淋病奈氏球菌的 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質的基因密碼 (code)。

使用如此所構成的淋病奈氏球菌的 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質表現載體與實施例 2 所記載的相同方法取得純化淋病奈氏球菌的 GST 融合 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質。

而且依照實施例 3 所記載的方法取得可產生對應淋病奈氏球菌的 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質之單株抗體的融合瘤 AMG C 1 株。依照前述所取得的陽性融合瘤細胞 AMG C 1 株的方法，回收單株抗體。

具體而言，使用 RPMI 1640 培養基 (含 10% FCS) 進行繼代培養的細胞於 $25\ \text{cm}^2$ 培養椎形瓶中於無血清培養基稀釋至 2×10^5 個 / ml ， 3.3×10^5 個

五、發明說明 (69)

／ml 以及 5×10^5 個／ml 程度的全容量 5 ml。7% CO_2 ，37℃ 下 3～5 天進行增值，於可見到細胞增值的錐形瓶中選擇原來細胞數較少的者，最終稀釋至 2×10^5 個／ml 者能於 3～4 天內增值至 2×10^6 個／ml，重複以同樣操作於無血清培養基培養。再進行細菌培養用 96 洞培養皿中的純系化過程，選擇增值較快且抗體價值較高的細胞所選擇的細胞於 24 洞培養皿中增值的以無血清培養基稀釋至 25 cm² 培養椎形瓶中 2×10^5 個／ml 的程度而全體積為 10 ml，將此於 7% CO_2 ，37℃ 下培養 3～5 天增值至 1×10^6 個／ml 後，以 75 cm² 培養椎形瓶中同樣地進行增值至 1×10^6 個／ml，再移至 100 ml 大量培養用的瓶子中。此此瓶中加上 100 ml 的無血清培養基，邊攪拌邊以 37℃ 下培養 2 天後，再加上無血清培養基 200 ml 再培養 2 天。此培養液分為 4 支而加 100 ml 的無血清培養液，2 天培養後分別添加 400 ml 的無血清培養液再培養約 6 天後，回收培養液以 1000 rpm，15 分鐘離心取得含作為目標抗體的培養上清液，此培養上清液添加 0.1% 迭氮化鹼後 4℃ 保存所取得的含有抗體的液體 100 ml 以 PBS 稀釋 5 倍後以 ProteinA 柱子（5 ml 容積，Pharmacia 公司）吸著，以 3 倍容積的 PBS 洗淨，以 pH 3 的檸檬酸緩衝液溶出，回收抗體部分得到可生產各融合瘤的單株抗體。來自此 4 株的融合瘤單株抗體以使用 ELISA 法進行評價。

對於抗體的評價，使用以來自於各種微生物的

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (70)

Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質作為抗原作用的 96 洞培養皿，所製成的單株抗體使其反應後與，作為 2 次抗體的抗老鼠 IgG 之 horadeishu 過氧化物酶標識（MBL 公司製，Code 330）進行反應，最後以酵素反應發色試藥檢測。對於 ELISA 反應，含 0.05% 氮迭化鹼的 PBS 中溶解 淋病奈氏球菌、流感嗜血桿菌、肺炎鏈球菌 的重組 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質，將其稀釋至 $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ 濃度的液體 $100 \mu\text{l}$ 分別注入 96 洞培養皿中以 4°C 吸著 1 晚。除去上清液後，添加 1% 牛血清白蛋白溶液（PBS 中） $200 \mu\text{l}$ 於室溫下反應 1 小時後遮蓋。除去上清液後以洗淨液（0.02% Tween20，PBS）洗淨，其上添加自 0.1 至 $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ 的 AMG C1 抗體溶液 $100 \mu\text{l}$ 於室溫下進行 2 小時反應後，除去上清液且以洗淨液洗淨後，加上 $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ 的抗老鼠 IgG 之 horadeishu 過氧化物酶標識（MBL 公司製，Code330）抗體液 $100 \mu\text{l}$ 於室溫，實施 1 小時反應，除去上清液且以洗淨液洗淨後，分別加上 $100 \mu\text{l}$ 的 TMB 溶液（KPL 公司）於室溫下進行反應 20 分鐘，發色後添加 1N 的硫酸 $100 \mu\text{l}$ 反應停止，以 450 nm 的吸光進行測定。

其結果如表 6 所示，使用來自融合瘤 AMG C1 的單株抗體時，確認此抗體能與 淋病奈氏球菌、流感嗜血桿菌、肺炎鏈球菌 的 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質進行反應。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (71)

[表 6]

(AMGC1 抗體與各微生物的 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質檢測結果)

<u>淋病奈氏球菌</u> (Neisseria gonorrhoeae)	+
<u>流感嗜血桿菌</u> (Haemophilus influenzae)	+
<u>肺炎鏈球菌</u> (Streptococcus pneumoniae)	+

(+;陽性反應)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (72)

於此所取得的 A M G C 1 抗體對於 O I A 或 E L I S A 法中的微生物檢測等即所謂的夾心試驗法的微生物檢測，作為與各微生物特異性抗 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質抗體組合而使用的抗體係極為有用的。

〔產業上可利用性〕

本發明使用對於各種微生物為同一機能之細胞內分子之抗體於微生物檢測中，而微生物之特異性或／且為同一種中所有血清型的微生物可精確地檢測出。

作為如此的抗體使用對應微生物之核糖體蛋白質、Ribosomal Protein L7/L12 抗體，可精確地檢測出流感嗜血桿菌、肺炎鏈球菌以及淋病奈氏球菌。

又，使用此抗體構成要素的微生物檢測用試藥組合，使得微生物檢測更能夠廣泛地且高度精確地進行。

又，對於各種微生物同一機能的細胞內分子可作為抗原使用，故可製得使用於各種微生物檢測的特異性抗體。

〔關於寄存微生物〕

所寄存的寄存機構

名稱：通商產業省工業技術院生命工學工業技術研究所

地址：日本國茨城縣筑波市東 1 丁目 1 - 3

寄存微生物於此寄存機構之日期：平成 1 1 年（1 9 9 9）7 月 2 8 日

五、發明說明 (73)

寄存於此寄存機構之寄存號碼： F E R M B P -
6 8 0 7

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (74)

[序列表]

SEQUENCE LISTING

<110> 微生物檢測之抗體

<120> Antibodies for Detecting Microorganisms

<130> ASAHI-2

<150> JP 10/230204

<151> 1998-7-31

<160> 22

<210> 1

<211> 369

<212> DNA

<213> 流感嗜血桿菌(Haemophilus influenzae)

<400> 1

atg tca tta act aac gaa caa atc att gaa gcg att gct tca aaa act 48

Met Ser Leu Thr Asn Glu Gln Ile Ile Glu Ala Ile Ala Ser Lys Thr

1 5 10 15

gta act gaa atc gtt gaa tta atc gca gcg atg gaa gaa aaa ttc ggt 96

Val Thr Glu Ile Val Glu Leu Ile Ala Ala Met Glu Glu Lys Phe Gly

20 25 30

gtt tca gca gcg gca gca gta gca gca gct cca gca gca ggc ggt gca 144

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

裝

五、發明說明(75)

Val Ser Ala Ala Ala Val Ala Ala Ala Pro Ala Ala Gly Gly Ala

35

40

45

gcg gca gca gaa gaa aaa act gaa ttc gac gtt gta ctt aaa tct gca

192

Ala Ala Ala Glu Glu Lys Thr Glu Phe Asp Val Val Leu Lys Ser Ala

50

55

60

ggt gcg aac aaa gta gca gta att aaa gca gta cgt ggt gca act ggt

240

Gly Ala Asn Lys Val Ala Val Ile Lys Ala Val Arg Gly Ala Thr Gly

65

70

75

80

tta ggc tta aaa gaa gct aaa gat tta gtt gaa tct gct cca gct aac

288

Leu Gly Leu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Val Glu Ser Ala Pro Ala Asn

85

90

95

tta aaa gaa ggc gtt tct aaa gaa gaa gct gaa gca ctt aag aaa gaa

336

Leu Lys Glu Gly Val Ser Lys Glu Glu Ala Glu Ala Leu Lys Lys Glu

100

105

110

tta gaa gaa gcg ggt gca gaa gta gaa gtt aaa

369

Leu Glu Glu Ala Gly Ala Glu Val Glu Val Lys

115

120

<210> 2

<211> 123

<212> PRT

<213> 流感嗜血桿菌(Haemophilus influezae)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

裝

五、發明說明(76)

<400> 2

Met Ser Leu Thr Asn Glu Gln Ile Ile Glu Ala Ile Ala Ser Lys Thr

1 5 10 15

Val Thr Glu Ile Val Glu Leu Ile Ala Ala Met Glu Glu Lys Phe Gly

20 25 30

Val Ser Ala Ala Ala Val Ala Ala Ala Pro Ala Ala Gly Gly Ala

35 40 45

Ala Ala Ala Glu Glu Lys Thr Glu Phe Asp Val Val Leu Lys Ser Ala

50 55 60

Gly Ala Asn Lys Val Ala Val Ile Lys Ala Val Arg Gly Ala Thr Gly

65 70 75 80

Leu Gly Leu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Val Glu Ser Ala Pro Ala Asn

85 90 95

Leu Lys Glu Gly Val Ser Lys Glu Glu Ala Glu Ala Leu Lys Lys Glu

100 105 110

Leu Glu Glu Ala Gly Ala Glu Val Glu Val Lys

115 120

<210> 3

<211> 375

<212> DNA

<213> 幽門螺桿菌(Helicobacter pylori)

<400> 3

atg gca att tca aaa gaa gaa gtg tta gag tat att ggt tca ttg agc

48

Met Ala Ile Ser Lys Glu Glu Val Leu Glu Tyr Ile Gly Ser Leu Ser

1 5 10 15

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

備

五、發明說明(11)

gtt tta gag ctt tct gaa ttg gtt aaa atg ttt gag gaa aaa ttt ggc	96
Val Leu Glu Leu Ser Glu Leu Val Lys Met Phe Glu Glu Lys Phe Gly	
20 25 30	
gtg agc gcg act cca acg gtc gta gcg ggt gcg gct gta gct ggc ggt	144
Val Ser Ala Thr Pro Thr Val Val Ala Gly Ala Ala Val Ala Gly Gly	
35 40 45	
gca gcg gct gag agc gaa gaa aaa acc gaa ttt aat gtg att ttg gcc	192
Ala Ala Ala Glu Ser Glu Glu Lys Thr Glu Phe Asn Val Ile Leu Ala	
50 55 60	
gat agc ggt gct gaa aaa att aag gtg att aaa gtg gtt cgt gaa atc	240
Asp Ser Gly Ala Glu Lys Ile Lys Val Ile Lys Val Val Arg Glu Ile	
65 70 75 80	
act gga ctt ggc ctg aaa gaa gct aaa gac gct acc gaa aaa acc cct	288
Thr Gly Leu Gly Leu Lys Glu Ala Lys Asp Ala Thr Glu Lys Thr Pro	
85 90 95	
cat gtg ctt aaa gag ggc gtg aat aaa gaa gaa gct gaa acc atc aag	336
His Val Leu Lys Glu Gly Val Asn Lys Glu Glu Ala Glu Thr Ile Lys	
100 105 110	
aag aaa ctt gaa gaa gta ggc gct aag gtt gaa gtc aag	375
Lys Lys Leu Glu Glu Val Gly Ala Lys Val Glu Val Lys	
115 120 125	

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (78)

<210> 4

<211> 125

<212> PRT

<213> 幽門螺桿菌(Helicobacter pylori)

<400> 4

Met Ala Ile Ser Lys Glu Glu Val Leu Glu Tyr Ile Gly Ser Leu Ser
1 5 10 15

Val Leu Glu Leu Ser Glu Leu Val Lys Met Phe Glu Glu Lys Phe Gly
20 25 30

Val Ser Ala Thr Pro Thr Val Val Ala Gly Ala Ala Val Ala Gly Gly
35 40 45

Ala Ala Ala Glu Ser Glu Glu Lys Thr Glu Phe Asn Val Ile Leu Ala
50 55 60

Asp Ser Gly Ala Glu Lys Ile Lys Val Ile Lys Val Val Arg Glu Ile
65 70 75 80

Thr Gly Leu Gly Leu Lys Glu Ala Lys Asp Ala Thr Glu Lys Thr Pro
85 90 95

His Val Leu Lys Glu Gly Val Asn Lys Glu Glu Ala Glu Thr Ile Lys
100 105 110

Lys Lys Leu Glu Glu Val Gly Ala Lys Val Glu Val Lys
115 120 125

<210> 5

<211> 366

<212> DNA

<213> 肺炎鏈球菌(Streptococcus pneumoniae)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

裝

五、發明說明(19)

<400> 5

atg gca ttg aac att gaa aac att att gct gaa att aaa gaa gct tca 48

Met Ala Leu Asn Ile Glu Asn Ile Ile Ala Glu Ile Lys Glu Ala Ser

1

5

10

15

atc ctt gaa ttg aac gac ctt gta aaa gct atc gaa gaa gaa ttt ggt 96

Ile Leu Glu Leu Asn Asp Leu Val Lys Ala Ile Glu Glu Glu Phe Gly

20

25

30

gta act gca gct gct cct gta gct gtt gct gca gct gat gca gct gat 144

Val Thr Ala Ala Ala Pro Val Ala Val Ala Ala Ala Asp Ala Ala Asp

35

40

45

gct ggt gct gct aaa gat tca ttc gac gtt gaa ttg aca tct gca ggc 192

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

50

55

60

gac aaa aaa gtt ggc gtt atc aaa gtt gta cgt gaa atc act ggt ctt 240

Asp Lys Lys Val Gly Val Ile Lys Val Val Arg Glu Ile Thr Gly Leu

65

70

75

80

ggt ctt aaa gaa gct aaa gaa ctt gtt gac ggt gca cca gca ctt gtt 288

Gly Leu Lys Glu Ala Lys Glu Leu Val Asp Gly Ala Pro Ala Leu Val

85

90

95

aaa gaa ggc gtt gca act gca gaa gct gaa gaa atc aaa gct aaa ttg 336

Lys Glu Gly Val Ala Thr Ala Glu Ala Glu Glu Ile Lys Ala Lys Leu

100

105

110

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(8°)

gaa gaa gct gga gct tca gtt act ctt aaa

366

Glu Glu Ala Gly Ala Ser Val Thr Leu Lys

115

120

<210> 6

<211> 122

<212> PRT

<213> 肺炎鏈球菌(*Streptococcus pneumoniae*)

<400> 6

Met Ala Leu Asn Ile Glu Asn Ile Ile Ala Glu Ile Lys Glu Ala Ser

1

5

10

15

Ile Leu Glu Leu Asn Asp Leu Val Lys Ala Ile Glu Glu Glu Phe Gly

20

25

30

Val Thr Ala Ala Ala Pro Val Ala Val Ala Ala Ala Asp Ala Ala Asp

35

40

45

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

50

55

60

Asp Lys Lys Val Gly Val Ile Lys Val Val Arg Glu Ile Thr Gly Leu

65

70

75

80

Gly Leu Lys Glu Ala Lys Glu Leu Val Asp Gly Ala Pro Ala Leu Val

85

90

95

Lys Glu Gly Val Ala Thr Ala Glu Ala Glu Glu Ile Lys Ala Lys Leu

100

105

110

Glu Glu Ala Gly Ala Ser Val Thr Leu Lys

115

120

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(81)

<210> 7

<211> 369

<212> DNA

<213> 淋病奈氏球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)

<400> 7

atg gct att act aaa gaa gac att ttg gaa gca gtt ggt tct ttg acc 48

Met Ala Ile Thr Lys Glu Asp Ile Leu Glu Ala Val Gly Ser Leu Thr

1 5 10 15

gta atg gaa ttg aat gac ctg gtt aaa gct ttt gaa gaa aaa ttc ggt 96

Val Met Glu Leu Asn Asp Leu Val Lys Ala Phe Glu Glu Lys Phe Gly

20 25 30

gtt tct gct gct gct gtt gca gtt gca ggt cct gct ggt gcc ggt gct 144

Val Ser Ala Ala Ala Val Ala Val Ala Gly Pro Ala Gly Ala Gly Ala

35 40 45

gcc gat gct gaa gaa aaa acc gaa ttt gat gtc gtt ttg gct tct gcc 192

Ala Asp Ala Glu Glu Lys Thr Glu Phe Asp Val Val Leu Ala Ser Ala

50 55 60

ggc gat caa aaa gtc ggc gtg att aaa gtt gtc cgt gca att act ggt 240

Gly Asp Gln Lys Val Gly Val Ile Lys Val Val Arg Ala Ile Thr Gly

65 70 75 80

ttg ggt ctg aaa gaa gct aaa gac atc gtt gac ggc gca cct aaa acc 288

Leu Gly Leu Lys Glu Ala Lys Asp Ile Val Asp Gly Ala Pro Lys Thr

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

裝

五、發明說明(8²)

85	90	95	
att aaa gag ggt gtt tct aaa gct gaa gcc gaa gac atc caa aaa caa			336
Ile Lys Glu Gly Val Ser Lys Ala Glu Ala Glu Asp Ile Gln Lys Gln			
100	105	110	
ctg gaa gca gca ggc gct aaa gtc gaa atc aaa			369
Leu Glu Ala Ala Gly Ala Lys Val Glu Ile Lys			
115	120		
<210> 8			
<211> 123			
<212> PRT			
<213> 淋病奈氏球菌(Neisseria gonorrhoeae)			
<400> 8			
Met Ala Ile Thr Lys Glu Asp Ile Leu Glu Ala Val Gly Ser Leu Thr			
1	5	10	15
Val Met Glu Leu Asn Asp Leu Val Lys Ala Phe Glu Glu Lys Phe Gly			
20	25	30	
Val Ser Ala Ala Ala Val Ala Val Ala Gly Pro Ala Gly Ala Gly Ala			
35	40	45	
Ala Asp Ala Glu Glu Lys Thr Glu Phe Asp Val Val Leu Ala Ser Ala			
50	55	60	
Gly Asp Gln Lys Val Gly Val Ile Lys Val Val Arg Ala Ile Thr Gly			
65	70	75	80
Leu Gly Leu Lys Glu Ala Lys Asp Ile Val Asp Gly Ala Pro Lys Thr			
85	90	95	

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(83)

Ile Lys Glu Gly Val Ser Lys Ala Glu Ala Glu Asp Ile Gln Lys Gln

100

105

110

Leu Glu Ala Ala Gly Ala Lys Val Glu Ile Lys

115

120

<210> 9

<211> 369

<212> DNA

<213> 腦膜炎球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 9

atg gct att act aaa gaa gac att ttg gaa gca gtt ggt tct ttg acc 48

Met Ala Ile Thr Lys Glu Asp Ile Leu Glu Ala Val Gly Ser Leu Thr

1

5

10

15

gta atg gaa ttg aac gac ttg gtt aaa gct ttt gaa gaa aaa ttc ggt 96

Val Met Glu Leu Asn Asp Leu Val Lys Ala Phe Glu Glu Lys Phe Gly

20

25

30

gtt tct gct gct gct gtt gca gtt gca ggt cct gct ggt gcc ggt gct 144

Val Ser Ala Ala Ala Val Ala Val Ala Gly Pro Ala Gly Ala Gly Ala

35

40

45

gcc gat gct gaa gaa aaa acc gaa ttt gat gtc gtt ttg gct tct gcc 192

Ala Asp Ala Glu Glu Lys Thr Glu Phe Asp Val Val Leu Ala Ser Ala

50

55

60

ggt gat caa aaa gtc ggc gtg att aaa gtt gtc cgt gca att acc ggt 240

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

備

五、發明說明 (85)

50

55

60

Gly Asp Gln Lys Val Gly Val Ile Lys Val Val Arg Ala Ile Thr Gly

65

70

75

80

Leu Gly Leu Lys Glu Ala Lys Asp Ile Val Asp Gly Ala Pro Lys Thr

85

90

95

Ile Lys Glu Gly Val Ser Lys Ala Glu Ala Glu Asp Ile Gln Lys Gln

100

105

110

Leu Glu Glu Ala Gly Ala Lys Val Glu Ile Lys

115

120

<210> 11

<211> 31

<212> DNA

<213> 合成序列(artificial sequence)

<220>

<223> 來自流感嗜血桿菌(Haemophilus influezae)的 Ribosomal Protein L7/L12

基因之取得所使用的 PCR 的引發物 DNA。

<400> 11

gtaaggatcc atgtcattaa ctaacgaaca a 31

<210> 12

<211> 34

<212> DNA

<213> 合成序列(artificial sequence)

<220>

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (86)

<223> 來自流感嗜血桿菌(Haemophilus influezae)的 Ribosomal Protein L7/L12 基因之取得所使用的 PCR 的引發物 DNA。

<400> 12

agcatctcga gatttaactt ctacttctgc accc 34

<210> 13

<211> 33

<212> DNA

<213> 合成序列(artificial sequence)

<220>

<223> 來自肺炎鏈球菌(Streptococcus pneumoniae)的 Ribosomal Protein L7/L12 基因之取得所使用的 PCR 的引發物 DNA。

<400> 13

ggaaggatcc atggcattga acattgaaaa cat 33

<210> 14

<211> 33

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> 來自肺炎鏈球菌(Streptococcus pneumoniae)的 Ribosomal Protein L7/L12 基因之取得所使用的 PCR 的引發物 DNA。

<400> 14

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (87)

tactctcgag tttaagagta actgaagctc cag 33

<210> 15

<211> 31

<212> DNA

<213> 合成序列(artificial sequence)

<220>

<223> 來自淋病奈氏桿菌(Nisseria gonorrhoeae) 的 Ribosomal Protein L7/L12 基因
之取得所使用的 PCR 的引發物 DNA。

<400> 15

gtaaggatcc atggctatta ctaaagaaga c 31

<210> 16

<211> 34

<212> DNA

<213> 合成序列(artificial sequence)

<220>

<223> 來自淋病奈氏桿菌(Nisseria gonorrhoeae) 的 Ribosomal Protein L7/L12 基因
之取得所使用的 PCR 的引發物 DNA。

<400> 16

agcatctcga gatttgattt cgactttagc gcct 34

<210> 17

<211> 369

<212> DNA

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(88)

<213> 流感嗜血桿菌(Haemophilus influenzae)

<400> 17

atg tca tta act aac gaa caa atc att gaa gcg att gct tca aaa act 48

Met Ser Leu Thr Asn Glu Gln Ile Ile Glu Ala Ile Ala Ser Lys Thr

1 5 10 15

gta act gaa atc gtt gaa tta atc gca gcg atg gaa gaa aaa ttc ggt 96

Val Thr Glu Ile Val Glu Leu Ile Ala Ala Met Glu Glu Lys Phe Gly

20 25 30

gtt tca gca gcg gca gca gta gca gca gct cca gca gca ggc ggt gca 144

Val Ser Ala Ala Ala Ala Val Ala Ala Ala Pro Ala Ala Gly Gly Ala

35 40 45

gcg gca gca gaa gaa aaa act gaa ttc gac gtt gta ctt aaa tct gca 192

Ala Ala Ala Glu Glu Lys Thr Glu Phe Asp Val Val Leu Lys Ser Ala

50 55 60

ggg gcg aac aaa gta gca gta att aaa gca gta cgt ggt gca act ggt 240

Gly Ala Asn Lys Val Ala Val Ile Lys Ala Val Arg Gly Ala Thr Gly

65 70 75 80

tta ggc tta aaa gaa gct aaa gat tta gtt gaa tct gct cca gct aac 288

Leu Gly Leu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Val Glu Ser Ala Pro Ala Asn

85 90 95

tta aaa gaa ggc gtt tct aaa gaa gaa gct gaa gca ctt aag aaa gaa 336

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(89)

Leu Lys Glu Gly Val Ser Lys Glu Glu Ala Glu Ala Leu Lys Lys Glu

100

105

110

tta gaa gaa gcg ggt gca gaa gta gaa gtt aaa

369

Leu Glu Glu Ala Gly Ala Glu Val Glu Val Lys

115

120

<210> 18

<211> 123

<212> PRT

<213> 流感嗜血桿菌(Haemophilus influenzae)

<400> 18

Met Ser Leu Thr Asn Glu Gln Ile Ile Glu Ala Ile Ala Ser Lys Thr

1

5

10

15

Val Thr Glu Ile Val Glu Leu Ile Ala Ala Met Glu Glu Lys Phe Gly

20

25

30

Val Ser Ala Ala Ala Ala Val Ala Ala Ala Pro Ala Ala Gly Gly Ala

35

40

45

Ala Ala Ala Glu Glu Lys Thr Glu Phe Asp Val Val Leu Lys Ser Ala

50

55

60

Gly Ala Asn Lys Val Ala Val Ile Lys Ala Val Arg Gly Ala Thr Gly

65

70

75

80

Leu Gly Leu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Val Glu Ser Ala Pro Ala Asn

85

90

95

Leu Lys Glu Gly Val Ser Lys Glu Glu Ala Glu Ala Leu Lys Lys Glu

100

105

110

Leu Glu Glu Ala Gly Ala Glu Val Glu Val Lys

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

裝

五、發明說明(9)

115

120

<210> 19

<211> 366

<212> DNA

<213> 肺炎鏈球菌(*Streptococcus pneumoniae*)

<400> 19

atg gca ttg aac att gaa aac att att gct gaa att aaa gaa gct tca 48

Met Ala Leu Asn Ile Glu Asn Ile Ile Ala Glu Ile Lys Glu Ala Ser

1

5

10

15

atc ctt gaa ttg aac gac ctt gta aaa gct atc gaa gaa gaa ttt ggt 96

Ile Leu Glu Leu Asn Asp Leu Val Lys Ala Ile Glu Glu Glu Phe Gly

20

25

30

gta act gca gct gct cct gta gct gtt gct gca gct gat gca gct gat 144

Val Thr Ala Ala Ala Pro Val Ala Val Ala Ala Ala Asp Ala Ala Asp

35

40

45

gct ggt gct gct aaa gat tca ttc gac gtt gaa ttg aca tct gca ggc 192

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

50

55

60

gac aaa aaa gtt ggc gtt atc aaa gtt gta cgt gaa atc act ggt ctt 240

Asp Lys Lys Val Gly Val Ile Lys Val Val Arg Glu Ile Thr Gly Leu

65

70

75

80

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

表

訂

線

五、發明說明(91)

ggt ctt aaa gaa gct aaa gaa ctt gtt gac ggt gca cca gca ctt gtt 288

Gly Leu Lys Glu Ala Lys Glu Leu Val Asp Gly Ala Pro Ala Leu Val

85

90

95

aaa gaa ggc gtt gca act gca gaa gct gaa gaa atc aaa gct aaa ttg 336

Lys Glu Gly Val Ala Thr Ala Glu Ala Glu Glu Ile Lys Ala Lys Leu

100

105

110

gaa gaa gct gga gct tca gtt act ctt aaa 366

Glu Glu Ala Gly Ala Ser Val Thr Leu Lys

115

120

<210> 20

<211> 122

<212> PRT

<213> 肺炎鏈球菌(Streptococcus pneumoniae)

<400> 20

Met Ala Leu Asn Ile Glu Asn Ile Ile Ala Glu Ile Lys Glu Ala Ser

1

5

10

15

Ile Leu Glu Leu Asn Asp Leu Val Lys Ala Ile Glu Glu Glu Phe Gly

20

25

30

Val Thr Ala Ala Ala Pro Val Ala Val Ala Ala Ala Asp Ala Ala Asp

35

40

45

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

50

55

60

Asp Lys Lys Val Gly Val Ile Lys Val Val Arg Glu Ile Thr Gly Leu

65

70

75

80

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(92)

Gly Leu Lys Glu Ala Lys Glu Leu Val Asp Gly Ala Pro Ala Leu Val

85

90

95

Lys Glu Gly Val Ala Thr Ala Glu Ala Glu Glu Ile Lys Ala Lys Leu

100

105

110

Glu Glu Ala Gly Ala Ser Val Thr Leu Lys

115

120

<210> 21

<211> 369

<212> DNA

<213> 淋病奈氏球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)

<400> 21

atg gct att act aaa gaa gac att ttg gaa gca gtt ggt tct ttg acc

48

Met Ala Ile Thr Lys Glu Asp Ile Leu Glu Ala Val Gly Ser Leu Thr

1

5

10

15

gta atg gaa ttg aat gac ctg gtt aaa gct ttt gaa gaa aaa ttc ggt

96

Val Met Glu Leu Asn Asp Leu Val Lys Ala Phe Glu Glu Lys Phe Gly

20

25

30

gtt tct gct gct gct gtt gca gtt gca ggt cct gct ggt gcc ggt gct

144

Val Ser Ala Ala Ala Val Ala Val Ala Gly Pro Ala Gly Ala Gly Ala

35

40

45

gcc gat gct gaa gaa aaa acc gaa ttt gat gtc gtt ttg gct tct gcc

192

Ala Asp Ala Glu Glu Lys Thr Glu Phe Asp Val Val Leu Ala Ser Ala

50

55

60

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明(93)

ggc gat caa aaa gtc ggc gtg att aaa gtt gtc cgt gca att act ggt 240

Gly Asp Gln Lys Val Gly Val Ile Lys Val Val Arg Ala Ile Thr Gly

65 70 75 80

ttg ggt ctg aaa gaa gct aaa gac atc gtt gac ggc gca cct aaa acc 288

Leu Gly Leu Lys Glu Ala Lys Asp Ile Val Asp Gly Ala Pro Lys Thr

85 90 95

att aaa gag ggt gtt tct aaa gct gaa gcc gaa gac atc caa aaa caa 336

Ile Lys Glu Gly Val Ser Lys Ala Glu Ala Glu Asp Ile Gln Lys Gln

100 105 110

ctg gaa gca gca ggc gct aaa gtc gaa atc aaa 369

Leu Glu Ala Ala Gly Ala Lys Val Glu Ile Lys

115 120

<210> 22

<211> 123

<212> PRT

<213> 淋病奈氏球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)

<400> 22

Met Ala Ile Thr Lys Glu Asp Ile Leu Glu Ala Val Gly Ser Leu Thr

1 5 10 15

Val Met Glu Leu Asn Asp Leu Val Lys Ala Phe Glu Glu Lys Phe Gly

20 25 30

Val Ser Ala Ala Ala Val Ala Val Ala Gly Pro Ala Gly Ala Gly Ala

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (94)

35	40	45	
Ala Asp Ala Glu Glu Lys Thr Glu Phe Asp Val Val Leu Ala Ser Ala			
50	55	60	
Gly Asp Gln Lys Val Gly Val Ile Lys Val Val Arg Ala Ile Thr Gly			
65	70	75	80
Leu Gly Leu Lys Glu Ala Lys Asp Ile Val Asp Gly Ala Pro Lys Thr			
85	90	95	
Ile Lys Glu Gly Val Ser Lys Ala Glu Ala Glu Asp Ile Gln Lys Gln			
100	105	110	
Leu Glu Ala Ala Gly Ala Lys Val Glu Ile Lys			
115	120		

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

四、中文發明摘要(發明之名稱： 檢測微生物用抗體)

本發明為提供一種可檢測出以種特異性、且同一種內的所有血清型之微生物檢測用抗體與，其製作方法、微生物檢測方法以及微生物檢測用試藥組。

對於各種微生物的細胞內同一機能分子，特別為製得對核糖體蛋白質、尤其對核糖體蛋白質 Ribosomal Protein L7/L12 之抗體，選擇對於特定微生物具特異性反應的抗體。使用此抗體進行微生物檢測。

作為醫藥工業品、特別以細菌為中心的微生物感染症的診斷藥極為有用。

英文發明摘要(發明之名稱：)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

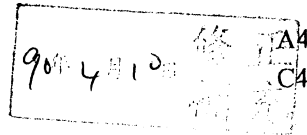
裝

訂

線

申請日期	88 年 8 月 31 日
案 號	88115075
類 別	C07K 16/12, C12P 21/08, C12N 15/00

(以上各欄由本局填註)



公告本

發 明 專 利 說 明 書

一、發明 名稱	中 文	檢測微生物用抗體
	英 文	
二、發明 人	姓 名	(1) 松山健二 (2) 白井孝 (3) 江藤高志
	國 籍	(1) 日本 (2) 日本 (3) 日本
	住、居所	(1) 美國科羅拉多州布德柏金漢路五〇三六號 5036 Buckingham road, Boulder, CO80301, USA (2) 日本國靜岡縣駿東郡長泉町下土狩五四一—三六 (3) 日本國靜岡縣富士市大淵一六八—三〇
	代 表 人 姓 名	(1) 旭化成股份有限公司 旭化成株式会社
三、申請人	國 籍	(1) 日本
	住、居所 (事務所)	(1) 日本國大阪府大阪市北區堂島浜一丁目二番六號
	代 表 人 姓 名	(1) 山本一元

五、發明說明(2)

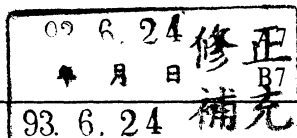
用於砂眼衣原體 (*Chlamydia trachomatis*) 的檢測用試藥抗體。

又，對衣原體屬的外膜主要蛋白質(MOMP; Major Outer Membrane Protein)而言的單株抗體分別有 Ellena M. Peterson 們: Infection and Immunity, 59(11), 4147-4153, 1991 以及 Byron E. Batteiger 們: Infection and Immunity, 53(3), 530-533, 1986 等報告。

特開昭 6 3 - 2 9 8 號公報為記載，使用約 4 3 k D a 的肺炎枝原體 (*Mycoplasma pneumoniae*) 的膜抗原蛋白質之單株抗體以西方吸乾法為基礎的免疫檢測法。

又，特開昭 6 2 - 1 4 8 8 5 9 號公報 (特公平 6 - 6 4 0 6 5 號公報) 中記載有關，對流感嗜血桿菌 (*Haemophilus influenzae*) 的外膜蛋白質而言的多株抗體的製作法與使用製作的抗體之診斷方法。

英國專利申請 2171704 號說明書記載有關，淋病奈氏球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) 株 B S 4 (N C T C 1 1 9 2 2) 外膜小胞的膽酸鈉萃取液中單離出之約 2 0 k D a 的蛋白質，揭示使用此物質之融合瘤製作方法，又 E P 4 1 9 2 3 8 A 1 號記載有關製得淋病奈氏球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) 培養菌體作為免疫源，其與約 1 4 k D a 的蛋白質結合之單株抗體以及其製造方法。又，同樣地對淋病奈氏球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) 加拿大專利申請 1 2 2 0 1 4 7 號說明書中關於對於



五、發明說明(8)

，對於微生物的種或屬有著特異性反應作用的抗體，但對微生物感染症的診斷中，對微生物的種有著特異性反應作用的抗體特別有用。

對於本發明，S T D 的病原微生物雖係指，淋病奈氏球菌、砂眼衣原體、白假絲酵母、徹白密螺旋體、解尿素黴漿菌等但不限定於此微生物。

對於本發明，呼吸系統感染症的病原菌雖係指，流感嗜血桿菌、肺炎鏈球菌、肺炎衣原體、肺炎枝原體、肺炎克雷伯氏菌、金黃色葡萄球菌、綠膿桿菌、A 群鏈球菌、結核分枝桿菌、嗜肺退伍軍人協會桿菌、麴菌屬等但不限定於此微生物。

對於本發明的抗體係指，多株抗體或單株抗體，可使用該核糖體蛋白質的全長或其部分肽而製得。對製得抗體其肽的長度並無特別限定，但對於 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質的抗體時，僅能將特徵賦於此蛋白質的長度即可，較佳為 5 胺基酸以上，特佳為使用 8 胺基酸以上的肽。將此肽或直接使用全長的蛋白質，或與稱為 K L H (鑰恐喊血蘭素，keyhole-limet hemocyanin) 或 B S A (牛血清白蛋白，bovine serum albumin) 之載體蛋白(carrier protein) 交聯後，因應必要與助劑接種於動物體內，再回收血清得到含可識別 Ribosomal Protein L L7/L12 蛋白質的抗體之抗血清。亦可由此抗血清中純化抗體使用。可接種的動物有綿羊、馬、羊、兔子、老鼠、小白鼠等，特別於製作多株抗體時以綿羊、兔子為佳。又，亦可能由公知方法

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

83.6.24日修正A7
補充B7

五、發明說明(9)

製作融合瘤細胞而得到單珠抗體，而此時以兔子為佳。又純化該蛋白質的全長或胺基酸 5 殘基以上、最佳為 8 殘基以上的部分肽與 G S T（穀胱甘肽－S－轉換酶）等融合所成者，或未純化而直接作為抗原使用即可。亦可由使用如書（Antibodies a laboratory manual, E. Harlow et al., Cold Spring Harbor Laboratory）所示各種方法以及基因純系化（gene cloning）法等所分離出的免疫球蛋白基因，於細胞中使其表現的基因重組抗體而製得。

對應本發明中可作為標識抗原使用的 Ribosomal ProteinL L7/L12 蛋白質之抗體為，以下述三種方法或其他類似的方法可製得，但不限定於這些方法中。

a) 對 Ribosomal ProteinL L7/L12 的基因序列以及胺基酸序列為已知的微生物，與其他微生物中該蛋白質之胺基酸序列類似性較少的領域裡，合成此胺基酸數 5 個到 30 個左右的肽片段，此作為免疫原之多株抗體、或單株抗體而製得而取得目的抗體。

又，以已知的該基因兩端部位之 D N A 序列作為探測體（probe），使用 P C R 方法增加基因量，相同部分序列作為模型探測體進行雜交（hibridization）法等一般基因操作法取得該基因的全長序列。

此後與其他蛋白質基因構成融合基因（fusion gene），以大腸菌等為寄主，使用公知的基因導入方法於寄主內插入該融合基因，使其有大量表現作用（expression）後，對應作為融合蛋白質的蛋白質之抗體親和力柱子法（

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

結

93. 6. 24 修正
A7
▲ 月 日 補充
B7

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

五、發明說明 (11)

c)或 Ribosomal Protein L7/L12 的胺基酸序列為未知時的其
他方法，製作與既知的 Ribosomal Protein L7/L12 的胺基
酸序列中微生物間所保存的共通序列部分相當之 5 ~
30 胺基酸的合成肽，以公知的方法製作此肽序列所對
應的多株抗體或單株抗體，使用該抗體於親和力柱色層
法中，純化目的微生物細胞破碎液而可得到高純度的
Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質。

若蛋白質的純度不足時，可用公知的純化方法或離子
交換色譜法、疏水色譜法、膠體過濾等方法純化後，製得
的抗體用於西方吸乾法等方法定性 Ribosomal Protein
L7/L12 蛋白質的溶出部分而得到純化蛋白質。以所得到的
純化 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質抗原為基礎，經公知
的方法取得融合瘤 (hybridoma) 或多株抗體 (polyclonal
antibody)，與 b) 相同方法選擇與目的微生物進行特異反
應之融合瘤或多株抗體進而可取得目的抗體。

前述 a)~c)等方法所取得的本發明之各種微生物特異性
抗體例如有於聚苯乙烯乳膠粒子上吸著該抗體進行凝集反
應，於 ELISA 板中進行公知技術的 ELISA 法，既知的免疫
色譜法、以著色粒子或具發色能的粒子，或酵素或螢光體
標識該抗體同時，使用以捕捉(capture)抗體覆蓋的磁性微粒
子等之夾心試驗法(間接螢光抗體法)等既知的所有免疫測
定方法，而提供種種目的微生物的特異性檢測用試藥組合
。

使用抗體的微生物檢出方法，例如有於聚苯乙烯乳膠

93.6.24 修正 A7
補充 B7

五、發明說明 (13)

因此 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質的胺基酸序列為公知的與本菌同樣狀況，例如序列表序列號碼：3 以及 4 所示為 *Helicobacter pylori* 的同蛋白質等與胺基酸序列作比較下，其相同性較為低的部分之 5 ~ 30 胺基酸之合成肽合成後，可製得對應其肽之流感嗜血桿菌特異性多株抗體或單株抗體。

特別以多株抗體的情況，免疫後的動物之抗血清以 Protein A 柱等純化取的 Ig G 部分後，進一步地實施動物免疫所使用的合成肽之親和力純化方法為佳。

而且，由流感嗜血桿菌的 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質之 DNA 序列的 N 末端、C 末端的序列為準之 PCR 前導體 (primer)，例如設計序列表序列號碼：11 以及 12 所示的 PCR 前導體，利用其相同性，依公知方法，以流感嗜血桿菌的培養菌體所萃取之基因組 DNA 為材料以 PCR 法等進行增大取得 DNA 片段，解析此片段的 DNA 序列情報而可取得流感嗜血桿菌的 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質之全長基因。

所取得的流感嗜血桿菌的 Ribosomal Protein L7/L12 基因，例如與 GST 等構成融合蛋白質基因，使用適當的表現用質體 (expression plasmid) 構成表現載體 (expression vector) 後，大腸菌等進行轉化 (Transformation) 後產生大量該蛋白質。轉化後的大腸菌以適當量培養，回收的菌體破碎液以使用 GST 的親和力柱純化方法，得到流感嗜血桿菌的 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質與 GST 的融合

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (14)

蛋白質。此蛋白質可直接或部分 G S T 以蛋白酶等切斷後，作為抗原蛋白質以公知方法，確立複數的融合瘤，選擇流感嗜血桿菌菌體或菌體破碎液或顯示流感嗜血桿菌的 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質特異反應之抗體可得到目的的特異性單株抗體。

又與流感嗜血桿菌同樣地作為呼吸器官感染症病原菌而高度診斷意義之肺炎鏈球菌之 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質的胺基酸序列與 D N A 序列於表等所記載故為公知。肺炎鏈球菌之 Ribosomal Protein L7/L12 的胺基酸序列以及 D N A 序列以序列表序列號碼：5 以及 6 所示。

因此，本菌的情形亦與流感嗜血桿菌的情形相同，以肺炎鏈球菌 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質的 DNA 序列由 N 末端、C 末端序列為準的 PCR 前導體，例如設計序列號碼：13 以及 14 所示的 PCR 前導體，再以完全相同的方法可取得肺炎鏈球菌特異性的多株抗體或單細胞抗體。

產生肺炎鏈球菌特異性的多株抗體融合瘤 AMSP-2(CCRC 960104，以寄存日民國 88 年 8 月 31 日寄存於我國食品工業發展研究所)於日本國通商產業省工業技術院技術研究所，以平成 11 年 7 月 28 日寄存號碼：FERM BP-6807 作為國際寄存。

又例如作為淋病原因菌的 S T D 代表性原因菌之診斷意義被確認的淋病奈氏球菌而言，其 D N A、胺基酸序列的大部分最近可由美國奧克拉荷馬大學的淋病奈氏球菌基因設計中分析，該菌的 D N A 序列為電腦網路上為公開的

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (25)

抗體的評價使用夾心試驗法，所製得的單株抗體與過氧化物酶以化學結合作為酵素標識抗體使用。

即，酵素標識係使用 Hosradeishu 過氧化物酶 (Sigma grade VI)，結合係使用試藥 S - 乙醯基硫代醋酸 N - 羥基琥珀銑酵亞胺基，依照 Analytical Bio-chemistry 132(1983), 68-73 所敘述的方法進行。對於 E L I S A 反應以含

0 . 0 5 % 迭氮化鹼的 P B S 中所溶解的市販之抗流感嗜桿菌多株抗體 (Biodesign 公司，兔子)，稀釋至 1 0 μ g / ml 濃度之液體，分別以 1 0 0 μ l 注入 9 6 洞培養皿，4 $^{\circ}$ C 下吸著 1 晚。

除去上清液後，添加 1 % 牛血清白蛋白溶液 (P B S 中) 2 0 0 μ l 於室溫下反應 1 小時後遮蓋。除去上清液後以洗淨液 (Tween20 0.02% , P B S) 洗淨，於上加入各種微生物的培養液以 0 . 3 % 濃度的 Triton X-100 於室溫下 5 分鐘進行萃取操作的抗原液 1 0 0 μ l，於室溫 2 小時反應後除去上清液，且以洗淨液洗淨後，加入 5 μ g / ml 的各過氧化物酶標識抗體 Ribosomal Protein L7/L12 抗體液 1 0 0 μ l 於室溫實施 1 小時反應，除去上清液再以洗淨液洗淨後，分別加入 1 0 0 μ l T M B 溶液 (K P L 公司) 於室溫下進行 2 0 分鐘反應，發色後添加 1 N 的硫酸 1 0 0 μ l 停止反應，以 4 5 0 n m 測定其吸光。

其結果，如表 1 所示作為酵素標識抗體使用來自融合瘤 H I R B - 2 的單株抗體時，所試驗的流感嗜血桿菌的所有株檢測出 1 0 ⁶ 個 / ml 的感度時，對其他的奈瑟氏菌屬

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (37)

層之矽晶圓上進行固定化的 capture 抗體使用,並評價之。
又作為 detect 抗體使用與記載於參考例的種種微生物之
Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質進行非特異反應的

A M G C - 1 單株抗體以過氧化物酶酵素標識者。即,酵
素標識為使用 Hosradeishu 過氧化物酶 (Sigma grade VI),
結合使用試藥 S - 以醯基硫代醋酸 N - 羥基琥珀銑酵亞胺
基,依照 Analytical Bio-chemistry 132(1983), 68-73 所敘述
的方法進行。

對於 O I A 反應,含 0 . 0 5 % 迭氮化鹼 P B S 中的
單株抗體以 0 . 1 M H E P E S p H 8 . 0 稀釋至
1 0 μ l / ml 濃度的液體,分別以 5 0 μ l 添加於具氮化
矽的薄膜層的矽晶圓上於室溫下反應 3 0 分鐘後,以蒸餾
水洗淨後使用。

此上於各種微生物懸濁液中添加,以 0 . 5 % 濃度的
Triton X-100 以室溫下 5 分鐘施行萃取操作所得的抗原 1 5
 μ l,室溫下 1 0 分鐘反應後,加入 2 0 μ g / ml 的過氧
化物酶標識 A M G C I 抗體 1 5 μ l 於室溫下進行 1 0 分
鐘反應,以蒸餾水洗淨後,分別加入基質溶液 (KPL 公司)
1 5 μ l 室溫下 5 分鐘反應,以蒸餾水洗淨後檢測信號
強度作為光干涉的顏色強度之目測判定。

其結果如表 2 所示,作為 capture 抗體使用來自融合瘤
A M S P - 2 (C C R C 9 6 0 1 0 4) 的單株抗體時
,測出所試驗的所有肺炎鏈球菌為 1 0 ⁶ 個 / ml 之感度同時
對於其他微生物即使為 1 0 ⁶ 個 / ml 之高感度亦無顯示反應

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (38)

性，因使用對應肺炎鏈球菌的 Ribosomal protein L7/L12 蛋白質之單株抗體，故可明確確認取得具肺炎鏈球菌的特異反應性抗體。

產生肺炎鏈球菌特異單株抗體的融合瘤 A M S P - 2 (C C R C 9 6 0 1 0 4) 以寄託號碼：F E R M B P - 6 8 0 7 於平成 1 1 年 7 月 2 8 日寄託於日本國通商產業省工業技術院生命工學工業技術研究所作為國際寄託。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (45)

珀銑醇亞胺基，依照 Analytical Bio-chemistry 132(1983), 68-73 所敘述的方法進行。對於 E L I S A 反應含 0 . 0 5 % 迭氮化鹼的 P B S 中所溶解的市販之抗淋病多株抗體 (Virostact 公司，兔子) 稀釋至 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ 濃度之液體，分別以 $100 \mu\text{l}$ 注入 96 洞培養皿， 4°C 下吸著 1 晚。

除去上清液後，添加 1 % 牛血清白蛋白溶液 (P B S 中) $200 \mu\text{l}$ 於室溫下反應 1 小時後遮蓋。除去上清液後以洗淨液 (Tween20 0.02% ， P B S) 洗淨，於上加入各種微生物的培養液以 0 . 3 % 濃度的 Triton X-100 於室溫下 5 分鐘進行萃取操作的抗原液 $100 \mu\text{l}$ ，於室溫下 2 小時反應後除去上清液，且以洗淨液洗淨後，加入 $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ 的過氧化物酶標識抗體 Ribosomal Protein L7/L12 抗體液 $100 \mu\text{l}$ 於室溫實施 1 小時反應，除去上清液再以洗淨液洗淨後，分別加入 $100 \mu\text{l}$ T M B 溶液 (KPL 公司) 於室溫下進行 20 分鐘反應，發色後添加 1 N 的硫酸 $100 \mu\text{l}$ 停止反應，以 450nm 測定其吸光。

其結果，如表 3 所示作為酵素標識抗體使用來自融合瘤 G C R B - 3 的單株抗體時，所試驗的淋病奈氏球菌的所有株以 10^6 個 / ml 的感度檢測同時，對其他的奈瑟氏菌屬或其他的微生物即使有 10^8 個 / ml 的高濃度亦無顯示反應性，因此使用對應 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質的單株抗體，明確確認取得具淋病奈氏球菌特異反應性的抗體。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (56)

detect 抗體使用與記載於參考例的種種微生物之 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質進行非特異反應的 A M G C - 1 單株抗體以過氧化物酶酵素標識者。即，酵素標識為使用 Hosradeishu 過氧化物酶 (Sigma grade VI)，結合使用試藥 S - 以醯基硫代醋酸 N - 羥基琥珀銑酵亞胺基，依照 Analytical Bio-chemistry 132(1983), 68-73 所敘述的方法進行。

對於 O I A 反應，含 0 . 0 5 % 迭氮化鹼 P B S 中的單株抗體以 0 . 1 M H E P E S p H 8 . 0 稀釋至 1 0 μ l / ml 濃度，再分別以 5 0 μ l 添加於具氮化矽的薄膜層的矽晶圓上於室溫下反應 3 0 分鐘後，以蒸餾水洗淨後使用。

於上面各種微生物懸濁液中添加，以 0 . 5 % 濃度的 Triton X-100 以室溫下 5 分鐘施行萃取操作所得的抗原 1 5 μ l，室溫下 1 0 分鐘反應後，加入 2 0 μ g / ml 的過氧化物酶標識 A M G C I 抗體於室溫下進行 1 0 分鐘反應，以蒸餾水洗淨後，分別加入基質溶液 (K P L 公司) 1 5 μ l 室溫下 5 分鐘反應，以蒸餾水洗淨後檢測信號強度作為光干涉的顏色強度之目測判定。

其結果如表 4 所示，作為 capture 抗體使用來自融合瘤 A M G C P - 8 的單株抗體時，測出所試驗的所有奈瑟氏屬為 1 0⁸ 個 / ml 之菌濃度同時對於其他微生物無顯示反應性，因使用對奈瑟氏屬的 Ribosomal protein L7/L12 蛋白質之單株抗體，故可明確確認取得具奈瑟氏屬的特異反應性

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (57)

抗 體 。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (59)

〔 實施例 1 0 〕

使用 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質固定化親和性柱子，取得與流感嗜血桿菌 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質特異反應之多株抗體。

以 0 . 5 % 濃度的 Triton X-100 處理的流感嗜血桿菌菌體萃取液之離心上清液作為抗原使用。於含抗原 1 0 0 μ l 的生理食鹽水溶液約 1 . 2 ml 加入 1 . 5 ml 的福樂因特助劑使其乳化後，對 4 隻 SPF Japanese White Rabbit 作皮下注射使其免疫。隔 2 週進行 5 ~ 6 次的免疫，確認抗體價。

對於抗體價的確認以 E L I S A 法實施。溶解於含 0 . 0 5 % 迭氮化鹼 P B S 中的流感嗜血桿菌之 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質稀釋至 1 0 μ g / ml 濃度之液體，分別以 1 0 0 μ l 注入 9 6 洞培養皿，4 $^{\circ}$ C 下吸著 1 晚。除去上清液後，添加 1 % 牛血清白蛋白溶液 (P B S 中) 2 0 0 μ l 於室溫下反應 1 小時後遮蓋。除去上清液後以洗淨液 (Tween20 0.02% , P B S) 洗淨，其上加入正常兔子血清與免疫後的兔子抗血清以階段式稀釋的液體 1 0 0 μ l 於室溫下反應 2 小時後，除去上清液以洗淨液洗淨。將此加入 5 0 n g / ml 的過氧化酶標識羊抗老鼠 I g G 抗體液 1 0 0 μ l ，於室溫反應實施 1 小時，除去上清液以洗淨液洗淨後加入 1 0 0 μ O P D 溶液 (Sigma 公司) 於室溫下反應 2 0 分鐘，發色後添加 1 N 的硫酸 1 0 0 μ l 停止反應，以 4 9 2 n m 測定其吸光。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (60)

為確認抗體價的上升，實施大量採血。取自於耳動脈血液於玻璃製的離心管中，37℃下放置1小時後，4℃下靜置1晚。之後以3000rpm離心5分鐘，回收上清液。所得的抗血清4批於4℃下保存。

再調製固定化流感嗜血桿菌以及淋病奈氏球菌的 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質的親和性柱子。柱子為使用 HiTrap NHS-activated (1 ml, Pharmacia 公司製)。1 mM HCl 6 ml 通過柱子後，立刻注入調製成 1 mg / ml 的 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質的 PBS 溶液 1 ml 以 25℃ 放置 15 分鐘，將此重複 5 次，再將 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質的 PBS 溶液 5 ml 注入柱子內，此後作為遮蓋試藥 (blocking agent) Buffer A (0.5 M 乙醇胺、0.5 M NaCl、pH 8.3) 6 ml、Buffer B (0.1 M 醋酸、0.5 M NaCl、pH 4) 6 ml、流入 Buffer A 6 ml 及 Buffer B 6 ml。此後以 PBS 6 ml 平衡之。

使用此流感嗜血桿菌的 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質固定化親和性柱子，進行流感嗜血桿菌的 Triton X-100 處理菌體上清作為抗原所得的抗血清中之多株抗體的純化。首先該抗血清以 PBS 稀釋 5 倍，通過 0.45 μm 的濾器後，以流速為 0.5 ml / min 吸著於流感嗜血桿菌的 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質固定化柱子。其後以 0.1 M 谷胺酸 pH 2.1 下由柱子溶出，立刻以 1 M Tris-HCl pH 9.0 中和後，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (61)

以與抗體價測定法同樣的 E L I S A 法回收作為目標抗體的溶出部分。再將此部分通過以 P B S 平衡的流感嗜血桿菌的 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質固定化柱子,與流感嗜血桿菌的 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質反應之抗體以吸收除去而回收非被吸著而通過部分。

如此純化的多株抗體以實施例 6 相同方法以 O I A 法評價。

純化後的抗體作為 O I A 法的 capture 抗體使用。又,作為 detect 抗體使用參考例所記載的 A M G C - 1 單細胞抗體以過氧化物酶酵素標識者。酵素標識為使用 Hosradeishu 過氧化物酶 (Sigma grade VI), 結合使用試藥 S-以醯基硫代醋酸 N - 羥基琥珀銑醇亞胺基, 依照 Analytical Bio-chemistry 132(1983), 68-73 所敘述方法進行。

對於 O I A 反應含 0 . 0 5 % 迭氮化鹼 P B S 中的多株抗體以 0 . 1 M H E P E S p H 8 . 0 稀釋至 1 0 μ g / ml 濃度, 再分別以 5 0 μ l 添加於具氮化矽的薄膜層的矽晶圓上於室溫下反應 3 0 分鐘後, 以蒸餾水洗淨後使用。

於上面的各種微生物懸濁液中添加, 以 0 . 5 % 濃度的 Triton X-100 以室溫下 5 分鐘施行萃取操作所得的抗原 1 5 μ l, 室溫下 1 0 分鐘反應後, 加入 2 0 μ g / ml 的過氧化物酶標識 M G C I 抗體於室溫下進行 1 0 分鐘反應, 以蒸餾水洗淨後, 分別加入基質溶液 (K P L 公司) 1 5 μ l 室溫下 5 分鐘反應, 以蒸餾水洗淨後藍色濃度以

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

封

五、發明說明 (62)

目視判定。

其結果如表 5 所示，作為 capture 抗體使用來自融合瘤 A P H I 2 - 2 的純化多株抗體時，測出所試驗的流感嗜血桿菌為 10^8 個 / ml 之菌濃度同時對於其他微生物無顯示反應性，因使用 Ribosomal protein L7/L12 蛋白質固定化親和性柱子所純化之多株抗體，故可明確確認取得具流感嗜血桿菌的特異反應性抗體。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

第 88115075 號專利申請案

中文申請專利範圍修正本

民國 93 年 9 月 22 日修正

1 . 一種可特異性地檢測出流感嗜血桿菌 (*Haemophilus influenzae*) 之抗體，其為具有下述特徵者；

(a) 來自流感嗜血桿菌的對於具序列號碼 2 所示胺基酸之核糖體蛋白質 L7/L12 可進行特異性反應；

(b) 至少不會與來自腦膜炎球菌 (*Neisseria meningitides*)、嗜乳糖奈瑟氏菌 (*Neisseria lactamica*)、粘膜奈瑟菌 (*Neisseria mucosa*)、乾燥球菌 (*Neisseria sicca*)、*Branhamella catarrharis*、淋病奈氏球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、大腸桿菌 (*Escheria coli*)、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 的核糖體蛋白質 L7/L12 進行反應；及

(c) 可辨識作為表位 (epitope) 之序列號碼 2 所示胺基酸序列中胺基酸數為 5 至 30 的部分胺基酸序列，該部分胺基酸序列至少與來自腦膜炎球菌 (*Neisseria meningitides*)、嗜乳糖奈瑟氏菌 (*Neisseria lactamica*)、粘膜奈瑟菌 (*Neisseria mucosa*)、乾燥球菌 (*Neisseria sicca*)、*Branhamella catarrharis*、淋病奈氏球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、大腸桿菌 (*Escherichia coli*)、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 的核糖體蛋白質 L7/L12 之胺基酸序列所對應部分作比較時，至少 1 個胺基酸殘基對於各

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

菌而言為相異者。

2 . 一種可特異性地檢測出肺炎鏈球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 之抗體，其為具有下述特徵者；

(a) 來自肺炎鏈球菌的對於具序列號碼 6 所示胺基酸之核糖體蛋白質 L7/L12 可進行特異性反應；

(b) 至少不會與來自大腸桿菌 (*Escherichia coli*)、排泄物腸球菌 (*Enterococcus faecalis*)、流感嗜血桿菌 (*Haemophilus influenzae*)、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、淋病奈氏球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、嗜乳糖奈瑟氏菌 (*Neisseria lactamica*)、腦膜炎球菌 (*Neisseria meningitides*)、綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、鏈球菌 B 群 (*Group B streptococcus*)、金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、釀膿鏈球菌 (*Streptococcus pyogenes*)；及

(c) 可辨識作為表位 (epitope) 之序列號碼 6 所示胺基酸序列中胺基酸數為 5 至 30 的部分胺基酸序列，該部分胺基酸序列至少與來自大腸桿菌 (*Escherichia coli*)、排泄物腸球菌 (*Enterococcus faecalis*)、流感嗜血桿菌 (*Haemophilus influenzae*)、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、淋病奈氏球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、嗜乳糖奈瑟氏菌 (*Neisseria lactamica*)、腦膜炎球菌 (*Neisseria meningitides*)、綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、鏈球菌 B 群 (*Group B streptococcus*)、金

六、申請專利範圍

黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、膿腫鏈球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 的核糖體蛋白質 L7/L12 之胺基酸序列所對應部分作比較時，至少 1 個胺基酸殘基對於各菌而言為相異者。

3. 一種可特異性地檢測 淋病奈氏球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) 的抗體，其為具有下述特徵者；

(a) 來自 淋病奈氏球菌 的對於具序列號碼 8 所示胺基酸之核糖體蛋白質 L7/L12 可進行特異性反應；

(b) 至少不會與來自 腦膜炎球菌 (*Neisseria meningitides*)、嗜乳糖奈瑟氏菌 (*Neisseria lactamica*)、粘膜奈瑟菌 (*Neisseria mucosa*)、乾燥球菌 (*Neisseria sicca*)、卡他布蘭漢氏球菌 (*Branhamella catarrharis*)、流感嗜血桿菌 (*Haemophilus influenzae*)、大腸桿菌 (*Escherichia coli*)、炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*)；及

(c) 可辨識作為表位 (epitope) 之序列號碼 8 所示胺基酸序列中胺基酸數為 5 至 30 的部分胺基酸序列，該部分胺基酸序列至少與來自 腦膜炎球菌 (*Neisseria meningitides*)、嗜乳糖奈瑟氏菌 (*Neisseria lactamica*)、粘膜奈瑟菌 (*Neisseria mucosa*)、乾燥球菌 (*Neisseria sicca*)、卡他布蘭漢氏球菌 (*Branhamella catarrharis*)、流感嗜血桿菌 (*Haemophilus influenzae*)、大腸桿菌 (*Escherichia coli*)、炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 的核糖體蛋白質 L7/L12 之胺基酸序列所對應部分作比較時，至少 1 個胺基酸殘基對於各菌而言為相異者。

六、申請專利範圍

4．如申請專利範圍第 3 項之抗體，其中該 (c) 的部分胺基酸序列為含有序列號碼 8 的胺基酸序列中第 115 號之丙胺酸者。

5．一種可特異性地檢測出流感嗜血桿菌之方法，其特徵為使用如申請專利範圍第 1 項的抗體。

6．一種可特異性地檢測出肺炎鏈球菌之方法，其特徵為使用如申請專利範圍第 2 項的抗體。

7．一種可特異性地檢測出淋病奈氏球菌之方法，其特徵為使用如申請專利範圍第 3 或 4 項的抗體。

訂