



(21)申請案號：101127230

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 07 月 27 日

(51)Int. Cl. :

C07K1/14 (2006.01)

C12N9/00 (2006.01)

(71)申請人：國立交通大學(中華民國) NATIONAL CHIAO TUNG UNIVERSITY (TW)

新竹市大學路 1001 號

(72)發明人：李耀坤 LI, YAWKUEN (TW)；吳岳進 WU, YUEJIN (TW)

(74)代理人：蔡坤財；李世章

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：26 項 圖式數：8 共 37 頁

(54)名稱

純化蛋白質的方法

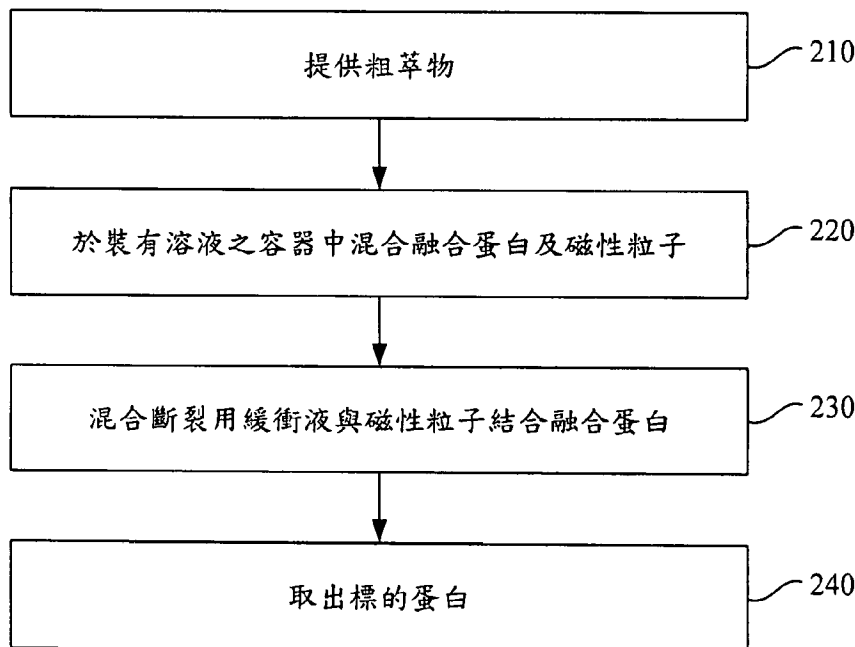
METHOD FOR PROTEIN PURIFICATION

(57)摘要

在此揭露一種產生標的蛋白的方法，其包含下列步驟。提供粗萃物，其包含融合蛋白。此融合蛋白包含標記物、標的蛋白以及連接子，此連接子插入到標記物及標的蛋白間。然後，結合磁性粒子與融合蛋白，以形成磁性粒子結合融合蛋白。最後，藉由斷裂用緩衝液使磁性粒子結合融合蛋白的連接子自我斷裂，以釋出標的蛋白。在此亦提供一種用以產生純化標的蛋白的一鍋化製程。

200

200：用以產生純化標的蛋白之一鍋化製程



210：步驟

220：步驟

230：步驟

240：步驟

第 2 圖

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：101127230

※申請日：101.7.27 ※IPC 分類：C07K1/14 (2006.01)
C12N9/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

純化蛋白質的方法

METHOD FOR PROTEIN PURIFICATION

二、中文發明摘要：

在此揭露一種產生標的蛋白的方法，其包含下列步驟。提供粗萃物，其包含融合蛋白。此融合蛋白包含標記物、標的蛋白以及連接子，此連接子插入到標記物及標的蛋白間。然後，結合磁性粒子與融合蛋白，以形成磁性粒子結合融合蛋白。最後，藉由斷裂用緩衝液使磁性粒子結合融合蛋白的連接子自我斷裂，以釋出標的蛋白。在此亦提供一種用以產生純化標的蛋白的一鍋化製程。

三、英文發明摘要：

A method for producing a target protein is provided, which includes steps described below. A crude extract including a fusion protein is provided. The fusion protein includes a marker, a target protein and a linker inserted between the marker and the target protein. The fusion protein and magnetic particles are then bound to form a magnetic particle-binding fusion protein. Finally, the linker of the magnetic particle-binding fusion protein undergoes

auto cleavage in a cleavage buffer solution to release the target protein. A one-pot process for producing a purified target protein is also provided.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (2) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

200：用以產生純化標的蛋白之一鍋化製程

210、220、230、240：步驟

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明是有關於一種產生標的蛋白的方法，以及一種用以產生純化標的蛋白之一鍋化製程(one-pot process)。

【先前技術】

純化蛋白質的最佳方式是利用與具有特定官能基之凝膠進行親和性結合來達到分離及純化的目的。但目前盛行的蛋白質管柱層析法尚有許多缺陷有待克服。

一般而言，蛋白質管柱層析法可分為三個步驟，依序為結合(binding)、清洗(washing)以及沖提(elution)。但在清洗的過程中，需使用不同 pH 值之含咪唑(imidazole)緩衝溶液沖洗管柱來洗去雜質，而使得製程時間很長。並且，在沖提過程中，需使用蛋白酵素來使連接子斷裂，以獲得標的蛋白；但若選擇的蛋白酵素與連接子間的專一性低，則不易獲得高純度的標的蛋白。此外，用過的管柱並不能重複使用。由此可知，此種管柱層析法的製程速度及純化效果仍有待改善。

有鑑於此，需提出一種具經濟效益的產生純化標的蛋白的方法，而可用以大量生產高純度的標的蛋白。

【發明內容】

本發明之一態樣係提供一種產生標的蛋白的方法，其包含下列步驟。提供粗萃物，其包含融合蛋白。此融合蛋白包含標記物、標的蛋白以及連接子，此連接子插入到標

記物及標的蛋白間。然後，結合磁性粒子與粗萃物之融合蛋白，以形成磁性粒子結合融合蛋白。最後，藉由斷裂用緩衝液使磁性粒子結合融合蛋白的連接子自我斷裂，以釋出標的蛋白。

本發明之另一態樣是在提供一種用以產生純化標的蛋白之一鍋化製程，其包含下列步驟。提供粗萃物，其包含融合蛋白。融合蛋白包含標記物、標的蛋白以及連接子，此連接子插入到標記物及標的蛋白間。於容器中混合粗萃物、溶液及磁性粒子，以形成磁性粒子結合融合蛋白。混合斷裂用緩衝液與磁性粒子結合融合蛋白，使磁性粒子結合融合蛋白之連接子自我斷裂，以釋出標的蛋白。取出標的蛋白。

本發明之又一態樣是在提供一種融合蛋白，係應用於上述的一鍋化製程。此融合蛋白包含標記物、連接子與標的蛋白。標記物為複數個組胺酸。連接子與標記物相連，而連接子包含至少一主胺基酸序列，係選自由 $(EA_{m1}K)_{n1}$ 、 $(EA_{m2}R)_{n2}$ 、 $(EG_{m3}K)_{n3}$ 、 $(EG_{m4}R)_{n4}$ 、 $(DA_{m5}K)_{n5}$ 、 $(DA_{m6}R)_{n6}$ 、 $(DG_{m7}K)_{n7}$ 、 $(DG_{m8}R)_{n8}$ 、 $(KA_{m9}E)_{n9}$ 、 $E(N_{p1})K$ 、 $E(N_{p2})R$ 、 $D(N_{p3})K$ 、 $D(N_{p4})R$ 和其組合所構成之群組，其中 $m1$ 、 $m2$ 、 $m3$ 、 $m4$ 、 $m5$ 、 $m6$ 、 $m7$ 、 $m8$ 和 $m9$ 係介於 2 至 4 之間， $n1$ 、 $n2$ 、 $n3$ 、 $n4$ 、 $n5$ 、 $n6$ 、 $n7$ 、 $n8$ 和 $n9$ 係介於 2 至 5 之間， N 係為甘氨酸 (glycine (G))、纈氨酸 (valine (V))、白氨酸 (leucine (L))、異白氨酸 (isoleucine (I))、絲氨酸 (serine (S))、蘇氨酸 (threonine (T)) 或半胱氨酸 (cysteine (C))， $p1$ 、 $p2$ 、 $p3$ 和 $p4$ 係介於 2 至 4 之間。標的蛋白與連接子相連。

以下將詳細說明本發明的一或多種實施方式。在參閱過詳細說明以及請求範圍後，將可更了解本發明的特徵與優點。

需知以下的說明及附隨圖式是為闡述本發明而提供，本發明範疇並不限於所述實施方式。

【實施方式】

為了使本發明之敘述更加詳盡與完備，下文將參照附隨圖式來描述本發明之實施態樣與具體實施例；另一方面，眾所週知的元件與步驟並未描述於實施例中，以避免模糊本發明實施例的原理與精神或對其成不必要的限制。

本發明之一態樣係提供一種產生標的蛋白的方法，請參考第 1 圖。第 1 圖係顯示方法 100 的流程圖。

在步驟 110 中，提供粗萃物，其包含融合蛋白。此融合蛋白包含標記物、標的蛋白以及連接子，此連接子插入到標記物及標的蛋白間。詳細而言，此「融合蛋白」是指一種可經由載體表現的重組蛋白質，其從 N 端到 C 端依序為標記物、連接子和標的蛋白。而有關 DNA 表現載體的建構方式乃是此領域中具有通常知識者所熟知的技術，故在此不再贅述。

此標記物需能夠與磁性粒子結合。在此不限標記物的種類。但舉例來說，標記物可為組胺酸標籤(His-tag)，例如可為六個以上的組胺酸。由於組胺酸標籤與諸如鎳離子之金屬離子的親和性極強，因此在後續操作步驟中，可藉由混合磁性粒子與粗萃物，讓磁性粒子表面上的鎳離子與

融合蛋白中的組胺酸標籤結合，而形成磁性粒子結合融合蛋白。

在本文中，「標的蛋白」代表感興趣的分子。合適的標的蛋白包括，但不限於，如幾丁聚醣酶(chitosanase)、幾丁質酶(chitinase)、破壞以產生五聚醣之 $-\beta-1,3-$ 葡聚醣酶(laminaripentose-producing- $\beta-1,3$ -glucanase, LPHase)、水解酶、轉移酶、裂解酶、異構酶、甲基化酶、內切酶或連接酶之類的酵素；諸如卵白蛋白之類的儲存蛋白質；諸如血球蛋白之類的傳送蛋白質；諸如肌動蛋白、肌凝蛋白、膠原蛋白、彈性蛋白、 α -角質蛋白、醣蛋白與纖維蛋白之類的結構蛋白質；諸如抗原或抗原性決定部位之類可用來製備疫苗的免疫球蛋白；諸如凝血原和纖維原之類的血液蛋白；可與抗原結合並將之中和的抗體或免疫球蛋白類的結合用蛋白質；諸如生長因子、生長激素抑制素、泌乳激素、雌激素、黃體素、胰島素、白介素、白血球生長激素和干擾素之類的荷爾蒙；以及合成蛋白質與胜肽。在一實施例中，標的蛋白是一種綠色螢光蛋白(green fluorescent protein, GFP)。在另一實施例中，標的蛋白是一種紅色螢光蛋白(m-Cherry)。在又一實施例中，標的蛋白是 NCTU2 蛋白。

連接子包含至少一主胺基酸序列。在一實施方式中，主胺基酸序列係選自由 $(EA_{m1}K)_{n1}$ 、 $(EA_{m2}R)_{n2}$ 、 $(EG_{m3}K)_{n3}$ 、 $(EG_{m4}R)_{n4}$ 、 $(DA_{m5}K)_{n5}$ 、 $(DA_{m6}R)_{n6}$ 、 $(DG_{m7}K)_{n7}$ 、 $(DG_{m8}R)_{n8}$ 、 $(KA_{m9}E)_{n9}$ 、 $E(N_{p1})K$ 、 $E(N_{p2})R$ 、 $D(N_{p3})K$ 、 $D(N_{p4})R$ 和其組合所構成之群組，其中 $m1$ 、 $m2$ 、 $m3$ 、 $m4$ 、 $m5$ 、 $m6$ 、 $m7$ 、 $m8$ 和 $m9$ 係介於 2 至 4 之間， $n1$ 、 $n2$ 、 $n3$ 、 $n4$ 、 $n5$ 、 $n6$ 、 $n7$ 、 $n8$ 和 $n9$ 係介於 2 至 5 之間， N 係為甘氨酸(glycine (G))、

纈氨酸 (valine (V))、白氨酸 (leucine (L))、異白氨酸 (isoleucine (I))、絲氨酸 (serine (S))、蘇氨酸 (threonine (T)) 或半胱氨酸 (cysteine (C))，p1、p2、p3 和 p4 係介於 2 至 4 之間。連接子例如可為 (EAAAK)₃、(EAAAR)₃、(EGGGK)₃、(EGGGR)₃、(DAAAR)₃、(DAAAK)₃、(DGGGR)₃、(DGGGK)₃、(EAAAANK)₃、(KAAAE)₄、(KAAAE)₂(EAAAK)₂ 或 (EAAAK)₂(KAAAE)₂。

在一實施方式中，連接子更包含 (G_{x1}S)_{y1}，G 係連接標記物，S 係連接主胺基酸序列，x1 係介於 3 至 4 之間，y1 係介於 2 至 3 之間。連接子例如可為 (GGGGS)₃(EAAAK)₂。

在一實施方式中，連接子更包含 (G_{x2}S)_{y2} 插入到於兩相同或相異之主胺基酸序列之間，x2 係介於 3 至 4 之間，y2 係介於 2 至 3 之間。連接子例如可為 (KAAAE)₂(GGGS)₂(EAAAK)₂。

在一實施方式中，連接子更包含 (SG_{x3})_{y3}H_z(G_{x4}S)_{y4} 插入到兩相同或相異之主胺基酸序列之間，x3 和 x4 係介於 3 至 4 之間，y3 和 y4 係介於 2 至 3 之間，z 係大於或等於 6。連接子例如可為 (KAAAE)₂(SGGG)₂HHHHHH(GGGGS)₂(EAAAK)₂。

在一實施方式中，連接子更包含一插入蛋白，插入到該標記物及該主胺基酸序列之間。

在一實施例中，插入蛋白為幾丁質結合蛋白 (chitin binding protein, CBP)。連接子例如可為 CBP21—(EAAAK)₃。

在另一實施例中，插入蛋白為綠色螢光蛋白 (green fluorescent protein, GFP)。連接子例如可為 GFP — (EAAAK)₂。

上述粗萃物可利用任何習知技術來製備。例如可以機械或化學方式破壞宿主細胞的細胞膜，再藉由離心方式收集粗萃物。粗萃物中除了有「含標的蛋白的融合蛋白」之外，還可能有雜質。雜質可能是載體在表現時所產生的其他產物。例如，雜質可能含有「含非標的蛋白的融合蛋白」。詳細而言，「含非標的蛋白的融合蛋白」可為一種從 N 端到 C 端依序為標記物、連接子和非標的蛋白的融合蛋白。因此，在純化製程中需完全去除雜質，再讓連接子自我斷裂，以得到高純度的標的蛋白。而在下列步驟中，將詳細說明如何達到上述目的。

在步驟 120 中，結合磁性粒子與粗萃物之融合蛋白，以形成磁性粒子結合融合蛋白。由於磁性粒子表面具有某些可與標記物產生鍵結的基團，因而可形成磁性粒子結合融合蛋白 (magnetic particle-binding fusion protein)。但在此混合步驟中，仍可能有某些的融合蛋白未與磁性粒子結合。

磁性粒子可為磁性奈米粒子。與一般管柱相較之下，磁性粒子具有幫助流程簡化、可重複使用、和成本低等優點。在一實施方式中，磁性粒子之表面具有至少一基團係選自由鎳離子、1,6-己烷二胺 (1,6-diaminohexane)、1-辛胺 (1-Octylamine)、油胺 (Oleylamine)、三正辛基氧化磷 (Tri-n-octylphosphine oxide) 以及三正辛基磷 (Tri-n-octylphosphine) 和其組合所構成之群組。

在一實施方式中，磁性奈米粒子的表面可先修飾氨基三乙酸(nitrilotriacetic acid, NTA)基團，再修飾鎳離子(Ni^{2+})。這是因為氨基三乙酸基團可與鎳離子(Ni^{2+})形成配位鍵結，而鎳離子可與組胺酸標籤形成配位鍵結。若需重複使用磁性奈米粒子，可先使用乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)來移除磁性奈米粒子上的鎳離子及殘留的蛋白質。然後洗去乙二胺四乙酸，再於磁性奈米粒子上依序修飾鎳離子與氨基三乙酸基團，而可重複使用。

在另一實施方式中，合成一種可應用於純化蛋白質製程的磁性奈米粒子。在一實施例中，首先將 10 克氯化鎳(NiCl_2)在乙二醇(200mL)下加入 25 克共沉澱劑。共沉澱劑可為氫氧化鈉(NaOH)、碳酸氫鈉(NaHCO_3)、醋酸鈉(CH_3COONa)或其混合物。然後，讓氯化鎳與共沉澱劑在 80°C 下溶解，再慢慢升溫至 200°C 反應 12 小時。在另一實施例中，使用不同比例的氯化鐵(FeCl_2)與氯化鎳(NiCl_2)來合成出合金磁性奈米粒子。在數個實施例中，氯化鐵與氯化鎳的比例($\text{NiCl}_2 : \text{FeCl}_2$)為 1 : 1、1 : 2、1 : 3、1 : 5、1 : 7、2 : 1、3 : 1 或 4 : 1。在又一實施例中，於合成過程中加入不同的試劑以修飾磁性奈米粒子的表面，使其表面帶有不同性質的配位基。此配位基可為親水基，如 1,6-己烷二胺(1,6-diaminohexane)；配位基可為疏水基，如 1-辛胺(1-Octylamine)、油胺(Oleylamine)、三正辛基氧化磷(Tri-n-octylphosphine oxide) 或 三正辛基磷(Tri-n-octylphosphine)。

在一實施方式中，步驟 120 包含於一溶液中混合融合蛋白與磁性粒子。在此不限溶液的組成。在一實施例中，此溶液可為一種濃度為 10 mM、pH 值為 9 的三羥甲基氨基甲烷緩衝溶液(Tris buffer)。

在一實施方式中，在步驟 120 後，更包含固定磁性粒子結合融合蛋白以移除溶液。在移除溶液的同時，也移除了大部分雜質，此雜質可能包含未與磁性粒子結合的融合蛋白與其他物質。

在一實施方式中，在移除溶液後，步驟 130 前，更包含以清洗用緩衝液清洗磁性粒子。此清洗步驟是用以完全地沖洗掉雜質，以盡可能地只留下含標的蛋白的磁性粒子結合融合蛋白。在一實施方式中，清洗用緩衝液之 pH 值係大於或等於 8。在此不限清洗用緩衝液的組成。在一實施例中，是使用 pH 值為 9 的三羥甲基氨基甲烷緩衝溶液(Tris buffer)作為清洗用緩衝液，來沖洗磁性粒子數次。由此可知，移除溶液步驟與清洗磁性粒子步驟皆可用以除去雜質。

在步驟 130 中，藉由斷裂用緩衝液使磁性粒子結合融合蛋白的連接子自我斷裂，以釋出標的蛋白。在一實施方式中，磁性粒子結合融合蛋白的連接子是在 pH 值為 6 至 9 的緩衝液中自我斷裂。而適用的斷裂用緩衝液的 pH 值與連接子的種類有關。在此不限斷裂用緩衝液的組成。舉例來說，斷裂用緩衝液可為三羥甲基氨基甲烷緩衝溶液(Tris buffer)或磷酸緩衝液。

在一實施方式中，上述之步驟係屬一鍋化製程(one-pot process)。「一鍋化製程」是指從混合粗萃物與磁性粒子的

步驟至取出標的蛋白步驟，皆在同一容器中進行。因此，本實施方式之一鍋化製程可應用於大量製造高純度的標的蛋白，而此製程同時也具有生產快速且製程方便的優點。

本發明之另一態樣是在提供一種用以產生純化標的蛋白之一鍋化製程，請參考第 2 圖及第 3 圖。第 2 圖係顯示方法 200 的流程圖。第 3 圖係顯示依照本發明一實施方式之一種用以純化蛋白質裝置之示意圖。

在步驟 210 中，提供粗萃物，其包含融合蛋白 310。融合蛋白 310 包含標記物、標的蛋白 310c 以及連接子，此連接子插入到標記物及標的蛋白 310c 間。步驟 210 的實施方式可與步驟 110 相同。

在步驟 220 中，於容器 320 中混合粗萃物(包含有融合蛋白 310 與雜質 312)、溶液 330 及磁性粒子 340，以形成磁性粒子結合融合蛋白 320，如第 1 圖所示。磁性粒子 340 表面上的基團 340a 可與標的物結合。步驟 220 的實施方式可與步驟 120 相同。

在一實施方式中，在步驟 220 後，步驟 230 前，固定磁性粒子結合融合蛋白 320，以移除溶液 330，如第 2 圖所示。在一實施例中，使用磁鐵吸引磁性粒子結合融合蛋白 320 來移除溶液 330。然而，仍可能有一部分雜質 312 卡在磁性粒子結合融合蛋白 320 之間。

因此，在一實施方式中，在移除溶液 330 後，步驟 230 前，更包含以清洗用緩衝液來清洗磁性粒子 340。此清洗步驟是用以沖洗掉剩餘的雜質 312，而只留下含有標的蛋白 310c 之磁性粒子結合融合蛋白 320。在一實施方式中，清洗用緩衝液之 pH 值係大於或等於 8。由此可知，移除溶

液 330 步驟與清洗磁性粒子 340 步驟皆可用以除去雜質 312。較佳的是，先進行移除溶液 330 步驟，再進行清洗步驟。

在步驟 230 中，混合斷裂用緩衝液 350 與磁性粒子結合融合蛋白 320，使連接子開始自我斷裂，以釋出標的蛋白 310c 與磁性片段 322，如第 3 圖所示。磁性片段 322 可包含有磁性粒子 340 和片段 310a。在一實施方式中，斷裂用緩衝液 350 之 pH 值為 6 至 9。步驟 230 的實施方式可與步驟 130 相同。

在一實施方式中，片段 310a 係為標記物。

在一實施方式中，連接子更包含一插入蛋白，插入到標記物及主胺基酸序列之間。因此，在步驟 230 中，片段 310a 包含標記物和插入蛋白。

在步驟 240 中，固定磁性片段 322，以取出標的蛋白 310c。在一實施方式中，使用磁鐵吸引磁性片段 322。所以，在步驟 240 中形成的上清液即為具有高純度標的蛋白 310c 的溶液。

以下透過特定實施例來說明本揭示內容，且本發明範疇並不限於所揭示的特定實施例中。

實例

實驗例 1：藉由 $(\text{His})_6$ — $(\text{EAAAK})_3$ —GFP 產生 GFP

首先，在一燒瓶中混合包含有 $(\text{His})_6$ — $(\text{EAAAK})_3$ —GFP 的粗萃物、濃度為 10 mM，pH 值為 7 之磷酸緩衝溶液與磁

性奈米粒子，使標的物(即(His)₆)與磁性奈米粒子充分結合。磁性奈米粒子係由 GE Healthcare 公司提供。

然後，以磁鐵吸引磁性奈米粒子而移除溶液。在此步驟中，可移除掉未與磁性奈米粒子結合之物質。

隨後，使用 pH 值為 9 之緩衝溶液沖洗三次，再使用 pH 值為 7 之緩衝溶液沖洗一次，以確實去除剩餘雜質。

最後，將磁性奈米粒子浸泡於 pH 值為 7 之緩衝溶液中，並於室溫下反應 48 小時，使連接子斷裂，釋出標的蛋白。

如第 4 圖所示，磁性粒子結合融合蛋白(即第三道)的分子量與綠色螢光蛋白(GFP)的分子量(即第四道)有些微差異，顯示連接子已斷裂，而使標的蛋白被釋放至溶液中。由此可知，此一鍋化製程確實是一種可行的純化蛋白質製程，並可藉此獲得高純度的標的蛋白。

實驗例 2：藉由(His)₈—GFP—(EAAAK)₂—m-Cherry 產生 m-Cherry

實驗例 2 之步驟與實驗例 1 相同，差異僅在於實驗例 2 之粗萃物中包含的是(His)₈—GFP—(EAAAK)₂—m-Cherry。

如第 5 圖所示，磁性粒子結合融合蛋白(即第三道)含有不同的分子量，並且在紫外光下呈現黃色。此結果代表磁性粒子結合融合蛋白中尚含有其他分子量的物質。

在混合斷裂用緩衝液與磁性粒子結合融合蛋白後，連接子斷裂，而可取得高純度之標的蛋白 m-Cherry (即第四

道)和仍與磁性粒子結合的物質(即第五道)。此兩物質在紫外光下分別呈現紅色和綠色。由第 5 圖中的第五道可知，仍與磁性粒子結合的物質可能包含有連接子未斷裂的部分磁性粒子融合蛋白(His)₈—GFP—(EAAAK)₂—m-Cherry 與 (His)₈—GFP—(EAAAK)₂。

實驗例 3: 藉由 (His)₆—CBP21—(KAAAE)₂(EAAAK)₂—AF 產生 AF

實驗例 3 之步驟與實驗例 1 相同，差異僅在於實驗例 3 之粗萃物中包含的是 (His)₆ — CBP21 — (KAAAE)₂(EAAAK)₂—AF。

如第 6 圖中的第二道(磁性粒子結合融合蛋白)和第三道(AF 蛋白與 CBP 蛋白)可知，連接子已斷裂，而可獲得 AF 蛋白和 CBP 蛋白。因此，對於本發明之實施方式而言，(KAAAE)₂(EAAAK)₂ 屬於有效的連接子。

實驗例 4 : 藉由 (His)₆ — CBP21 — (KAAAE)₂(GGGS)₂(EAAAK)₂—AF 產生 AF

實驗例 4 之步驟與實驗例 1 相同，差異僅在於實驗例 2 之粗萃物中包含的是 (His)₆ — CBP21 — (KAAAE)₂(GGGS)₂(EAAAK)₂—AF。

如第 7 圖中的第二道(磁性粒子結合融合蛋白)和第三道(AF 蛋白與 CBP 蛋白)可知，連接子已斷裂，而可獲得 AF 蛋白和 CBP 蛋白。因此，對於本發明之實施方式而言，(KAAAE)₂(GGGS)₂(EAAAK)₂ 屬於有效的連接子。

實驗例 5: (His)₆—CBP21—(EAAAR)₃—NCTU2 在不同 pH 值的緩衝溶液下，連接子自我斷裂的情況

以下實驗例 5 至 13 之步驟與實驗例 1 相同，差異在於使用不同連接子的融合蛋白與不同 pH 值的斷裂用緩衝溶液。詳細而言，實驗例 5 至 13 之粗萃物包含不同連接子之融合蛋白(即(His)₆—CBP21—主胺基酸序列—NCTU2)。其中 NCTU2 為標的蛋白，(CBP21—主胺基酸序列)為連接子，(His)₆為標的物。當連接子斷裂時，上述融合蛋白將分裂為 36kD 的 NCTU2 與 18kD 的 CBP21，而可明確觀察到兩者分子量的不同。另外，實驗例 5 至 13 中還使用了不同 pH 值的斷裂用緩衝溶液，以瞭解各種連接子適用的斷裂用緩衝溶液的 pH 值範圍為何。

在實驗例 5 中，融合蛋白包含 (His)₆—CBP21—(EAAAR)₃—NCTU2。在第 8A 圖中可知，在 pH 值為 6 至 9 的緩衝溶液下，連接子可斷裂，而可釋出 NCTU2。

實驗例 6: (His)₆—CBP21—(EGGGK)₃—NCTU2 在不同 pH 值的緩衝溶液下，連接子自我斷裂的情況

在實驗例 6 中，融合蛋白包含 (His)₆—CBP21—(EGGGK)₃—NCTU2。在第 8B 圖中可知，在 pH 值為 6 至 8 的緩衝溶液下，連接子可斷裂，而可釋出 NCTU2。

實驗例 7: (His)₆—CBP21—(EGGGR)₃—NCTU2 在不同 pH 值的緩衝溶液下，連接子自我斷裂的情況

在實驗例 7 中，融合蛋白包含 (His)₆—CBP21—

(EGGGR)₃—NCTU2。在第 8C 圖中可知，在 pH 值為 6 至 8 的緩衝溶液下，連接子可斷裂，而可釋出 NCTU2。

實驗例 8: (His)₆—CBP21—(DAAAK)₃—NCTU2 在不同 pH 值的緩衝溶液下，連接子自我斷裂的情況

在實驗例 8 中，融合蛋白包含 (His)₆—CBP21—(DAAAK)₃—NCTU2。在第 8D 圖中可知，在 pH 值為 6 至 8 的緩衝溶液下，連接子可斷裂，而可釋出 NCTU2。

實驗例 9: (His)₆—CBP21—(DAAAR)₃—NCTU2 在不同 pH 值的緩衝溶液下，連接子自我斷裂的情況

在實驗例 9 中，融合蛋白包含 (His)₆—CBP21—(DAAAR)₃—NCTU2。在第 8E 圖中可知，在 pH 值為 6 至 8 的緩衝溶液下，連接子可斷裂，而可釋出 NCTU2。

實驗例 10: (His)₆—CBP21—(DGGGK)₃—NCTU2 在不同 pH 值的緩衝溶液下，連接子自我斷裂的情況

在實驗例 10 中，融合蛋白包含 (His)₆—CBP21—(DGGGK)₃—NCTU2。在第 8F 圖中可知，在 pH 值為 6 至 8 的緩衝溶液下，連接子可斷裂，而可釋出 NCTU2。

實驗例 11: (His)₆—CBP21—(DGGGR)₃—NCTU2 在不同 pH 值的緩衝溶液下，連接子自我斷裂的情況

在實驗例 11 中，融合蛋白包含 (His)₆—CBP21—(DGGGR)₃—NCTU2。在第 8G 圖中可知，在 pH 值為 6 至 9 的緩衝溶液下，連接子可斷裂，而可釋出 NCTU2。

實驗例 12: $(\text{His})_6$ —CBP21— $(\text{EAAK})_3$ —NCTU2 在不同 pH 值的緩衝溶液下，連接子自我斷裂的情況

在實驗例 12 中，融合蛋白包含 $(\text{His})_6$ —CBP21— $(\text{EAAK})_3$ —NCTU2。在第 8H 圖中可知，在 pH 值為 6 至 9 的緩衝溶液下，連接子可斷裂，而可釋出 NCTU2。

實驗例 13: $(\text{His})_6$ —CBP21— $(\text{EAAAANK})_3$ —NCTU2 在不同 pH 值的緩衝溶液下，連接子自我斷裂的情況

在實驗例 13 中，融合蛋白包含 $(\text{His})_6$ —CBP21— $(\text{EAAAANK})_3$ —NCTU2。在第 8I 圖中可知，在 pH 值為 6 至 9 的緩衝溶液下，連接子可斷裂，而可釋出 NCTU2。

將上述實驗例 5 至 13 之主胺基酸序列及其適用之斷裂用緩衝溶液之 pH 值範圍列於表一中。

表一

	主胺基酸序列	適用之斷裂用緩衝溶液之 pH 值
實驗例 5	$(\text{EAAAR})_3$	6-9
實驗例 6	$(\text{EGGGK})_3$	6-8
實驗例 7	$(\text{EGGGR})_3$	6-8
實驗例 8	$(\text{DAAAK})_3$	6-8
實驗例 9	$(\text{DAAAR})_3$	6-8
實驗例 10	$(\text{DGGGK})_3$	6-8
實驗例 11	$(\text{DGGGR})_3$	6-9
實驗例 12	$(\text{EAAK})_3$	6-9

實驗例 13	(EAAAAK) ₃	6-9
--------	-----------------------	-----

如表一所示，斷裂用緩衝溶液之 pH 值範圍會根據不同的連接子而有些許的差異。

綜上所述，磁性粒子具有幫助流程簡化、可重複使用和成本低等優點。並且，本製程所需的材料少、製程快速，而可應用於大量純化蛋白質之製程上。若使用上述的一鍋化製程，則更可大幅節省製程時間及提昇製程的便利性。而與先前技術相比，本製程不需使用不同 pH 值之含咪唑(imidazole)的緩衝溶液來清洗，也不需使用蛋白酵素來使連接子斷裂，因此本製程的流程相當簡單。此外，本製程所得到的標的蛋白不含標記物和連接子，也就是說，此標的蛋白可完全不含非天然蛋白。

由此可知，本製程除了能夠有效解決先前技術中的問題之外，更提供了一種高經濟效益的純化蛋白質製程，且可應用於生產純化天然蛋白。

雖然本發明已以實施方式揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作各種之更動與潤飾，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

【圖式簡單說明】

為讓本發明之上述和其他目的、特徵、優點與實施例能更明顯易懂，所附圖式之說明如下：

第 1 圖係顯示依照本發明一實施方式之一種產生標的

蛋白的方法的流程圖；

第 2 圖係顯示依照本發明一實施方式之一種產生純化標的蛋白的一鍋化製程的流程圖；

第 3 圖係顯示依照本發明一實施方式之一種用以純化蛋白質之裝置之示意圖；

第 4 圖係純化(His)₆—(EAAAK)₃—GFP 之 SDS-PAGE 結果，第一道，標記；第二道，粗萃物；第三道，磁性粒子結合融合蛋白；第四道，綠色螢光蛋白(GFP)；

第 5 圖係純化(His)₈—GFP—(EAAAK)₂—m-Cherry 之 SDS-PAGE 結果，第一道，標記；第二道，粗萃物；第三道，磁性粒子結合融合蛋白；第四道，紅色螢光蛋白(m-Cherry)；第五道，在混合斷裂用緩衝液與磁性粒子結合融合蛋白後，仍與磁性粒子結合的物質；

第 6 圖係純化(His)₆—CBP21—(KAAAE)₂(EAAAK)₂—AF 之 SDS-PAGE 結果，第一道，標記；第二道，磁性粒子結合融合蛋白；第三道，AF 蛋白與 CBP 蛋白；

第 7 圖係純化 (His)₆ — CBP21 — (KAAAE)₂(GGGS)₂(EAAAK)₂—AF 之 SDS-PAGE 結果，第一道，標記；第二道，磁性粒子結合融合蛋白；第三道，AF 蛋白與 CBP 蛋白；

第 8A 圖係以 SDS-PAGE 分析 (His)₆ — CBP21 — (EAAAR)₃—NCTU2 在不同 pH 值的緩衝溶液下，其連接子自我斷裂的情況：第一道，pH 值為 4；第二道，pH 值為 5；第三道，pH 值為 6；第四道，pH 值為 7；第五道，pH 值為 8；第六道，pH 值為 9；第七道，標記；

第 8B 圖係以 SDS-PAGE 分析 $(\text{His})_6$ —CBP21— $(\text{EGGGK})_3$ —NCTU2 在不同 pH 值的緩衝溶液下，其連接子自我斷裂的情況：第一道，標記；第二道，pH 值為 4；第三道，pH 值為 5；第四道，pH 值為 6；第五道，pH 值為 7；第六道，pH 值為 8；第七道，pH 值為 9；

第 8C 圖係以 SDS-PAGE 分析 $(\text{His})_6$ —CBP21— $(\text{EGGGR})_3$ —NCTU2 在不同 pH 值的緩衝溶液下，其連接子自我斷裂的情況：第一道，pH 值為 4；第二道，pH 值為 5；第三道，pH 值為 6；第四道，pH 值為 7；第五道，pH 值為 8；第六道，pH 值為 9；第七道，標記；

第 8D 圖係以 SDS-PAGE 分析 $(\text{His})_6$ —CBP21— $(\text{DAAAK})_3$ —NCTU2 在不同 pH 值的緩衝溶液下，其連接子自我斷裂的情況：第一道，標記；第二道，pH 值為 4；第三道，pH 值為 5；第四道，pH 值為 6；第五道，pH 值為 7；第六道，pH 值為 8；第七道，pH 值為 9；

第 8E 圖係以 SDS-PAGE 分析 $(\text{His})_6$ —CBP21— $(\text{DAAAR})_3$ —NCTU2 在不同 pH 值的緩衝溶液下，其連接子自我斷裂的情況：第一道，標記；第二道，pH 值為 4；第三道，pH 值為 5；第四道，pH 值為 6；第五道，pH 值為 7；第六道，pH 值為 8；第七道，pH 值為 9；

第 8F 圖係以 SDS-PAGE 分析 $(\text{His})_6$ —CBP21— $(\text{DGGGK})_3$ —NCTU2 在不同 pH 值的緩衝溶液下，其連接子自我斷裂的情況：第一道，標記；第二道，pH 值為 4；第三道，pH 值為 5；第四道，pH 值為 6；第五道，pH 值為 7；第六道，pH 值為 8；第七道，pH 值為 9；

第 8G 圖係以 SDS-PAGE 分析 (His)₆—CBP21—(DGGGR)₃—NCTU2 在不同 pH 值的緩衝溶液下，其連接子自我斷裂的情況：第一道，標記；第二道，pH 值為 4；第三道，pH 值為 5；第四道，pH 值為 6；第五道，pH 值為 7；第六道，pH 值為 8；第七道，pH 值為 9；

第 8H 圖係以 SDS-PAGE 分析 (His)₆—CBP21—(EAAK)₃—NCTU2 在不同 pH 值的緩衝溶液下，其連接子自我斷裂的情況：第一道，標記；第二道，pH 值為 4；第三道，pH 值為 5；第四道，pH 值為 6；第五道，pH 值為 7；第六道，pH 值為 8；第七道，pH 值為 9；

第 8I 圖係以 SDS-PAGE 分析 (His)₆—CBP21—(EAAAAK)₃—NCTU2 在不同 pH 值的緩衝溶液下，其連接子自我斷裂的情況：第一道，標記；第二道，pH 值為 4；第三道，pH 值為 5；第四道，pH 值為 6；第五道，pH 值為 7；第六道，pH 值為 8；第七道，pH 值為 9。

【主要元件符號說明】

100：產生標的蛋白的方法

200：用以產生純化標的蛋白之一鍋化製程

110、120、130、210、220、230、240：步驟

302：容器

310：融合蛋白

310a：片段

310c：標的蛋白

312：雜質

320：磁性粒子結合融合蛋白

322：磁性片段

330：溶液

340：磁性粒子

340a：基團

350：斷裂用緩衝液

七、申請專利範圍：

1. 一種產生標的蛋白的方法，其步驟依序包含：

(a) 提供一粗萃物，該粗萃物包含一融合蛋白，該融合蛋白包含一標記物、一標的蛋白以及一連接子插入到該標記物及該標的蛋白間；

(b) 結合磁性粒子與該粗萃物之該融合蛋白，以形成磁性粒子結合融合蛋白；以及

(c) 藉由一斷裂用緩衝液使該磁性粒子結合融合蛋白之連接子自我斷裂，以釋出該標的蛋白。

2. 如請求項 1 所述之方法，其中該斷裂用緩衝液之 pH 值為 6 至 9。

3. 如請求項 1 所述之方法，其中步驟(b)包含於一溶液中結合該磁性粒子與該粗萃物之該融合蛋白。

4. 如請求項 3 所述之方法，在步驟(b)後，步驟(c)前，更包含(b1)移除該溶液，留下該磁性粒子結合融合蛋白。

5. 如請求項 4 所述之方法，在步驟(b1)後，步驟(c)前，更包含(b2)清洗該磁性粒子。

6. 如請求項 5 所述之方法，其中步驟(b2)包含使用一清洗用緩衝液清洗該磁性粒子，該清洗用緩衝液之 pH 值係大於或等於 8。

7. 如請求項 1 所述之方法，其中該標記物為複數個組胺酸。

8. 如請求項 1 所述之方法，其中該磁性粒子之表面具有至少一基團係選自由鎳離子、1,6-己烷二胺(1,6-diaminohexane)、1-辛胺(1-Octylamine)、油胺(Oleylamine)、三正辛基氧化磷(Tri-n-octylphosphine oxide)以及三正辛基磷(Tri-n-octylphosphine)和其組合所構成之群組。

9. 如請求項 1 所述之方法，其中該連接子包含至少一主胺基酸序列，係選自由 $(EA_{m1}K)_{n1}$ 、 $(EA_{m2}R)_{n2}$ 、 $(EG_{m3}K)_{n3}$ 、 $(EG_{m4}R)_{n4}$ 、 $(DA_{m5}K)_{n5}$ 、 $(DA_{m6}R)_{n6}$ 、 $(DG_{m7}K)_{n7}$ 、 $(DG_{m8}R)_{n8}$ 、 $(KA_{m9}E)_{n9}$ 、 $E(N_{p1})K$ 、 $E(N_{p2})R$ 、 $D(N_{p3})K$ 、 $D(N_{p4})R$ 和其組合所構成之群組，其中 $m1$ 、 $m2$ 、 $m3$ 、 $m4$ 、 $m5$ 、 $m6$ 、 $m7$ 、 $m8$ 和 $m9$ 係介於 2 至 4 之間， $n1$ 、 $n2$ 、 $n3$ 、 $n4$ 、 $n5$ 、 $n6$ 、 $n7$ 、 $n8$ 和 $n9$ 係介於 2 至 5 之間， N 係為甘氨酸(glycine (G))、纈氨酸(valine (V))、白氨酸(leucine (L))、異白氨酸(isoleucine (I))、絲氨酸(serine (S))、蘇氨酸(threonine (T))或半胱氨酸(cysteine (C))， $p1$ 、 $p2$ 、 $p3$ 和 $p4$ 係介於 2 至 4 之間。

10. 如請求項 1 至 9 中任一項所述之方法，其中該些步驟係屬一鍋化製程(one-pot process)。

11. 一種用以產生純化標的蛋白之一鍋化製程，該步驟包含：

(A) 提供一粗萃物，該粗萃物包含一融合蛋白，該融合蛋白包含一標記物、一標的蛋白以及一連接子插入到該標記物及該標的蛋白間；

(B) 於一容器中混合該粗萃物、溶液及磁性粒子，以形成磁性粒子結合融合蛋白；

(C) 混合斷裂用緩衝液與該磁性粒子結合融合蛋白，使該磁性粒子結合融合蛋白之該連接子自我斷裂，以釋出該標的蛋白及磁性片段；以及

(D) 取出該標的蛋白。

12. 如請求項 11 所述之製程，其中該斷裂用緩衝液之 pH 值為 6 至 9。

13. 如請求項 11 所述之製程，在步驟(B)後，步驟(C)前，更包含(B1)移除該溶液，留下該磁性粒子結合融合蛋白。

14. 如請求項 13 所述之製程，其中該步驟(B1)包含藉由一磁鐵固定該磁性粒子結合融合蛋白，以移除該溶液。

15. 如請求項 13 所述之製程，在步驟(B1)後，步驟(C)前，更包含(B2)清洗該磁性粒子。

16. 如請求項 15 所述之製程，其中步驟(B2)包含使用一清洗用緩衝液清洗該磁性粒子，該清洗用緩衝液之 pH 值係大於或等於 8。

17. 如請求項 11 所述之製程，其中該步驟(D)包含藉由一磁鐵固定該磁性片段，以取出該標的蛋白。

18. 如請求項 11 所述之製程，其中該標記物為複數個組胺酸。

19. 如請求項 11 所述之製程，其中該磁性粒子之表面具有至少一基團係選自由鎳離子、1,6-己烷二胺(1,6-diaminohexane)、1-辛胺(1-Octylamine)、油胺(Oleylamine)、三正辛基氧化磷(Tri-n-octylphosphine oxide)以及三正辛基磷(Tri-n-octylphosphine)和其組合所構成之群組。

20. 如請求項 11 所述之製程，其中該連接子包含至少一主胺基酸序列，係選自由 $(EA_{m1}K)_{n1}$ 、 $(EA_{m2}R)_{n2}$ 、 $(EG_{m3}K)_{n3}$ 、 $(EG_{m4}R)_{n4}$ 、 $(DA_{m5}K)_{n5}$ 、 $(DA_{m6}R)_{n6}$ 、 $(DG_{m7}K)_{n7}$ 、 $(DG_{m8}R)_{n8}$ 、 $(KA_{m9}E)_{n9}$ 、 $E(N_{p1})K$ 、 $E(N_{p2})R$ 、 $D(N_{p3})K$ 、 $D(N_{p4})R$ 和其組合所構成之群組，其中 $m1$ 、 $m2$ 、 $m3$ 、 $m4$ 、 $m5$ 、 $m6$ 、 $m7$ 、 $m8$ 和 $m9$ 係介於 2 至 4 之間， $n1$ 、 $n2$ 、 $n3$ 、 $n4$ 、 $n5$ 、 $n6$ 、 $n7$ 、 $n8$ 和 $n9$ 係介於 2 至 5 之間， N 係為甘氨酸(glycine (G))、纈氨酸(valine (V))、白氨酸(leucine (L))、異白氨酸(isoleucine (I))、絲氨酸(serine (S))、蘇氨酸(threonine (T))

或半胱氨酸(cysteine (C))，p1、p2、p3 和 p4 係介於 2 至 4 之間。

21. 一種融合蛋白，係應用於請求項 11 至 20 中任一項之用以產生純化標的蛋白之一鍋化製程，該融合蛋白包含：

一標記物，該標記物為複數個組胺酸；

一連接子，與該標記物相連，該連接子包含至少一主胺基酸序列，係選自由 $(EA_{m1}K)_{n1}$ 、 $(EA_{m2}R)_{n2}$ 、 $(EG_{m3}K)_{n3}$ 、 $(EG_{m4}R)_{n4}$ 、 $(DA_{m5}K)_{n5}$ 、 $(DA_{m6}R)_{n6}$ 、 $(DG_{m7}K)_{n7}$ 、 $(DG_{m8}R)_{n8}$ 、 $(KA_{m9}E)_{n9}$ 、 $E(N_{p1})K$ 、 $E(N_{p2})R$ 、 $D(N_{p3})K$ 、 $D(N_{p4})R$ 和其組合所構成之群組，其中 m1、m2、m3、m4、m5、m6、m7、m8 和 m9 係介於 2 至 4 之間，n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8 和 n9 係介於 2 至 5 之間，N 係為甘氨酸(glycine (G))、纈氨酸(valine (V))、白氨酸(leucine (L))、異白氨酸(isoleucine (I))、絲氨酸(serine (S))、蘇氨酸(threonine (T)) 或半胱氨酸(cysteine (C))，p1、p2、p3 和 p4 係介於 2 至 4 之間；以及

一標的蛋白，與該連接子相連。

22. 如請求項 21 所述之融合蛋白，其中該連接子更包含 $(G_{x1}S)_{y1}$ ，G 係連接該標記物，S 係連接該主胺基酸序列，x1 係介於 3 至 4 之間，y1 係介於 2 至 3 之間。

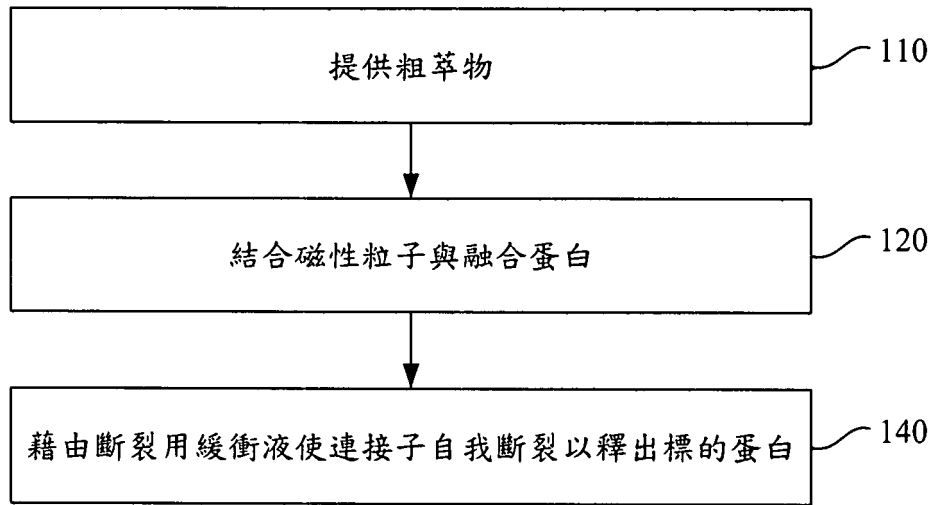
23. 如請求項 21 所述之融合蛋白，其中該連接子更包含 $(G_{x_2}S)_{y_2}$ 插入到於兩相同或相異之主胺基酸序列之間， x_2 係介於 3 至 4 之間， y_2 係介於 2 至 3 之間。

24. 如請求項 21 所述之融合蛋白，其中該連接子更包含 $(SG_{x_3})_{y_3}H_z(G_{x_4}S)_{y_4}$ 插入到兩相同或相異之主胺基酸序列之間， x_3 和 x_4 係介於 3 至 4 之間， y_3 和 y_4 係介於 2 至 3 之間， z 係大於或等於 6。

25. 如請求項 21 所述之融合蛋白，其中該連接子更包含一插入蛋白，插入到該標記物及該主胺基酸序列之間。

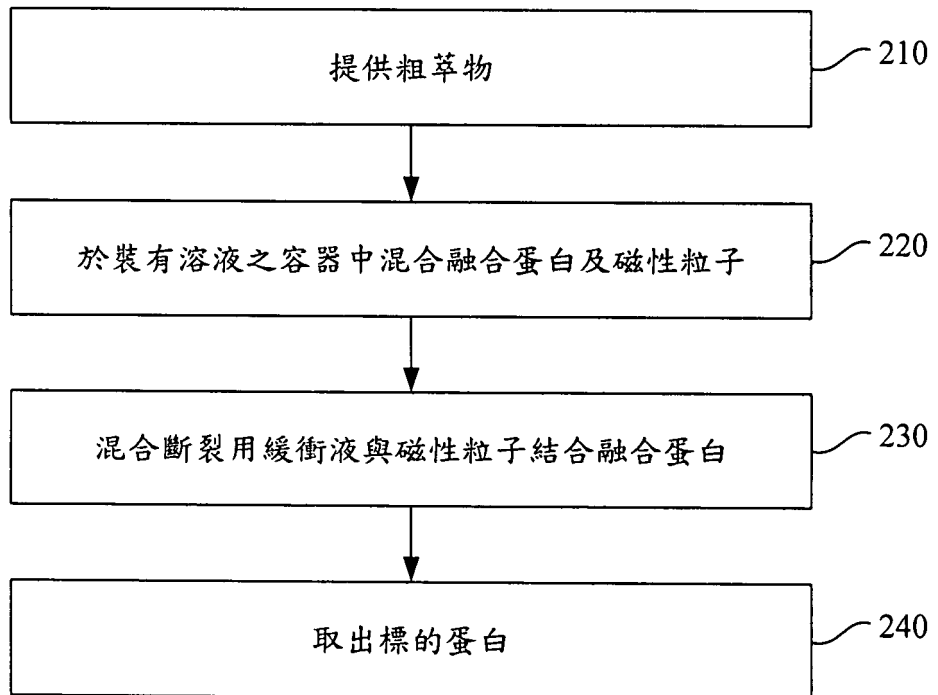
26. 如請求項 25 所述之融合蛋白，其中該插入蛋白為幾丁質結合蛋白(chitin binding protein, CBP)或綠色螢光蛋白(green fluorescent protein, GFP)。

100

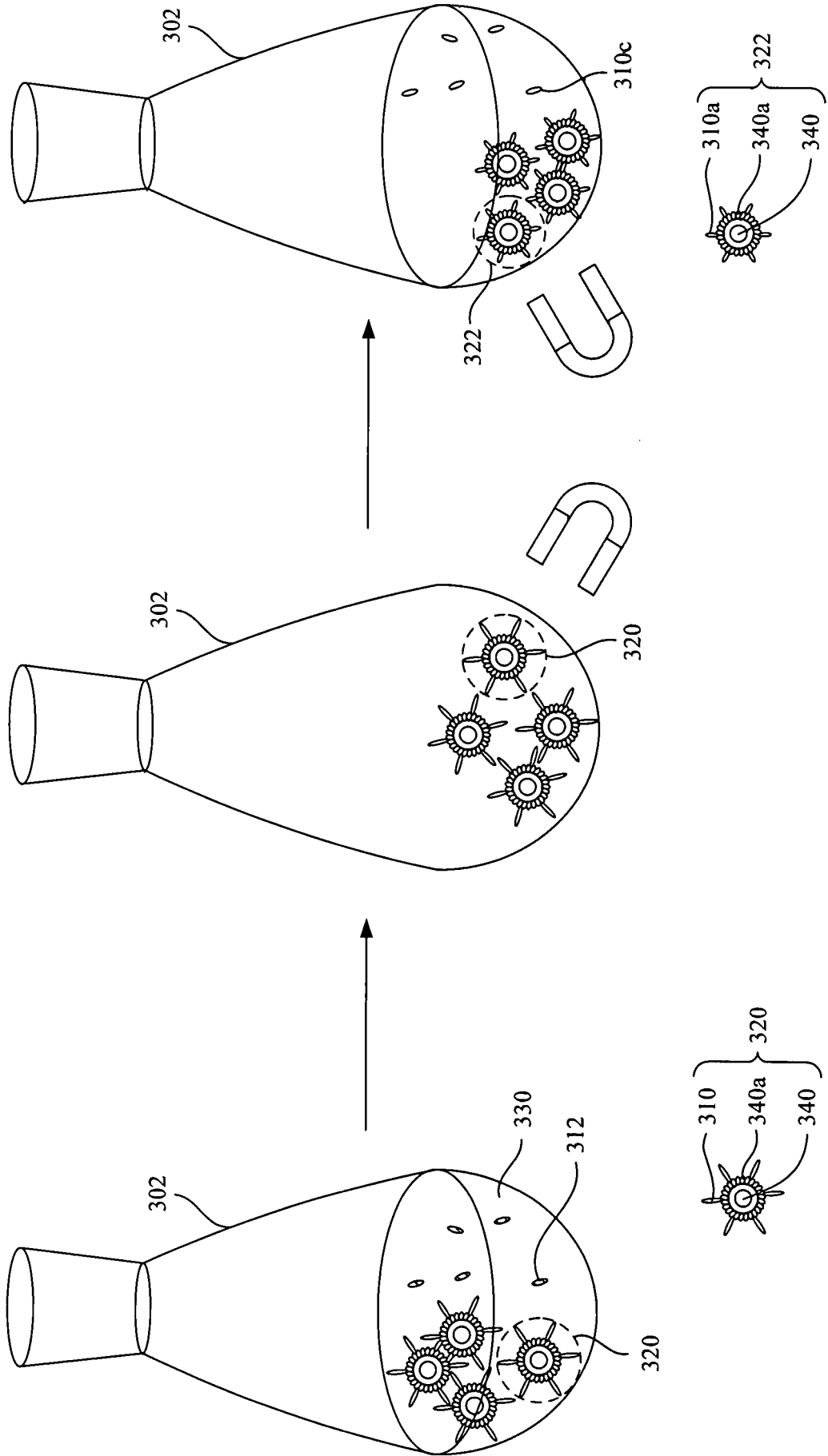


第 1 圖

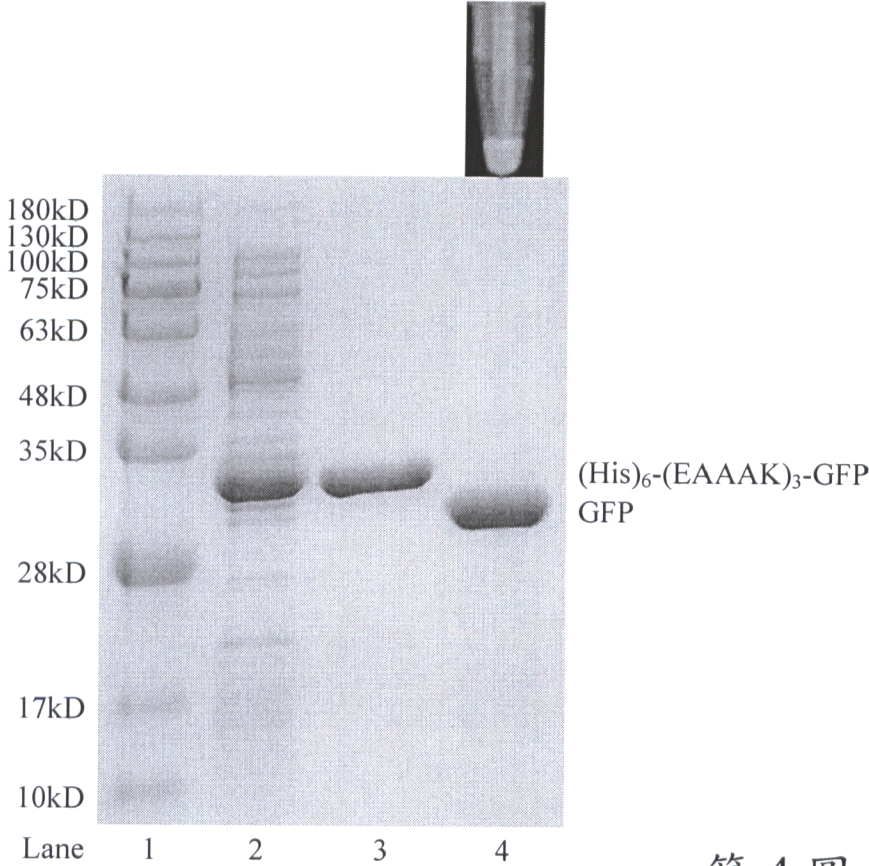
200



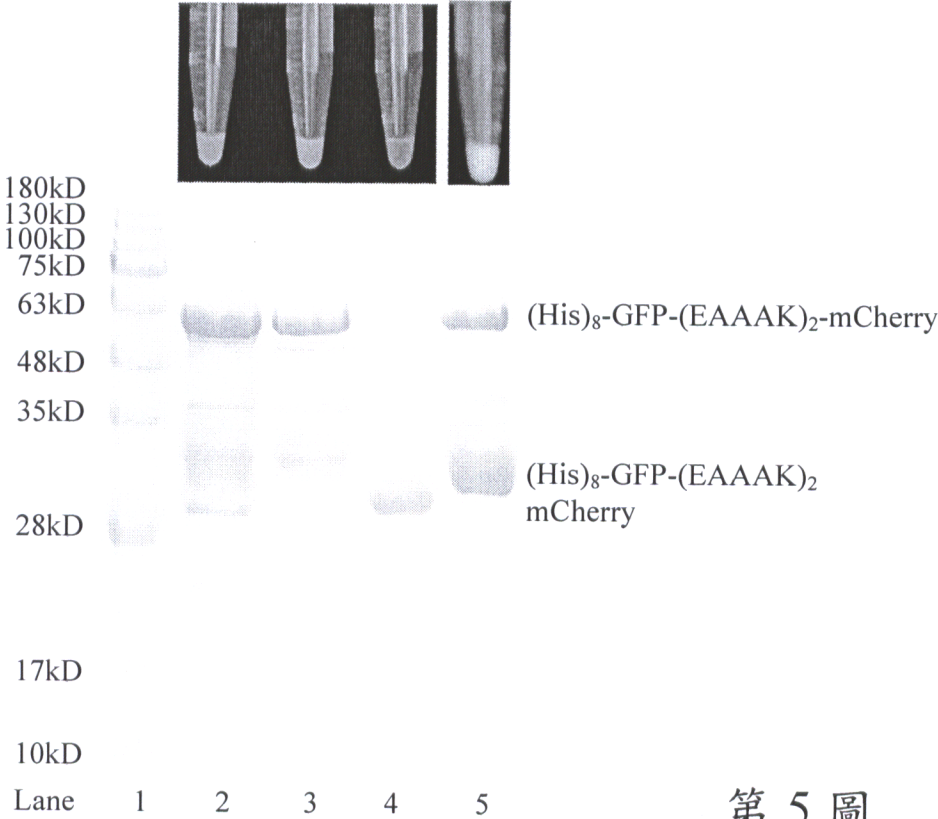
第 2 圖



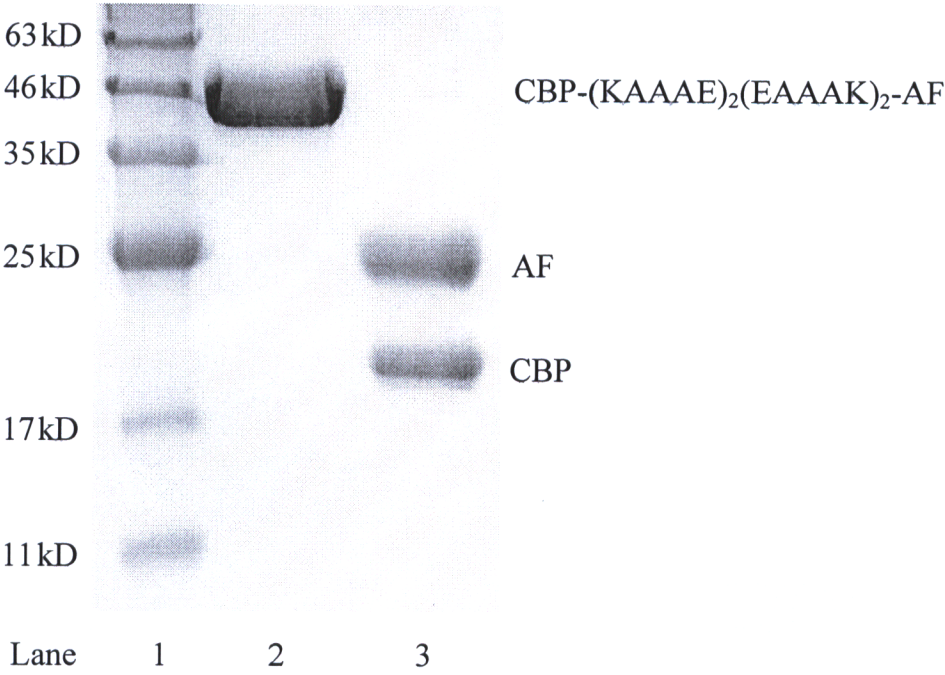
第 3 圖



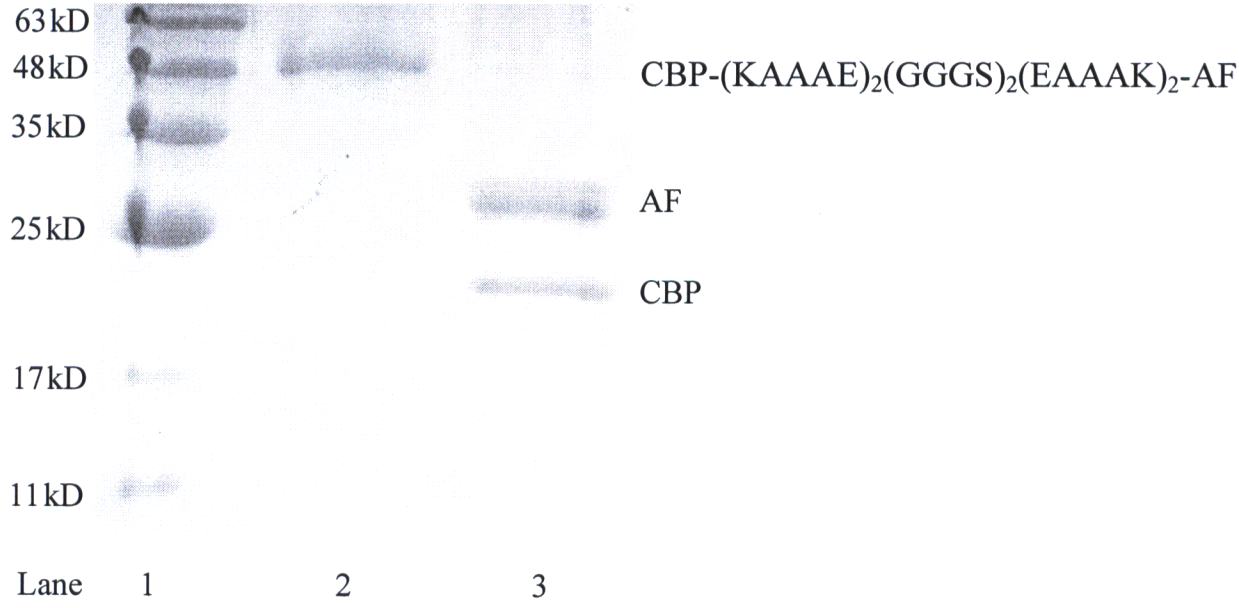
第 4 圖



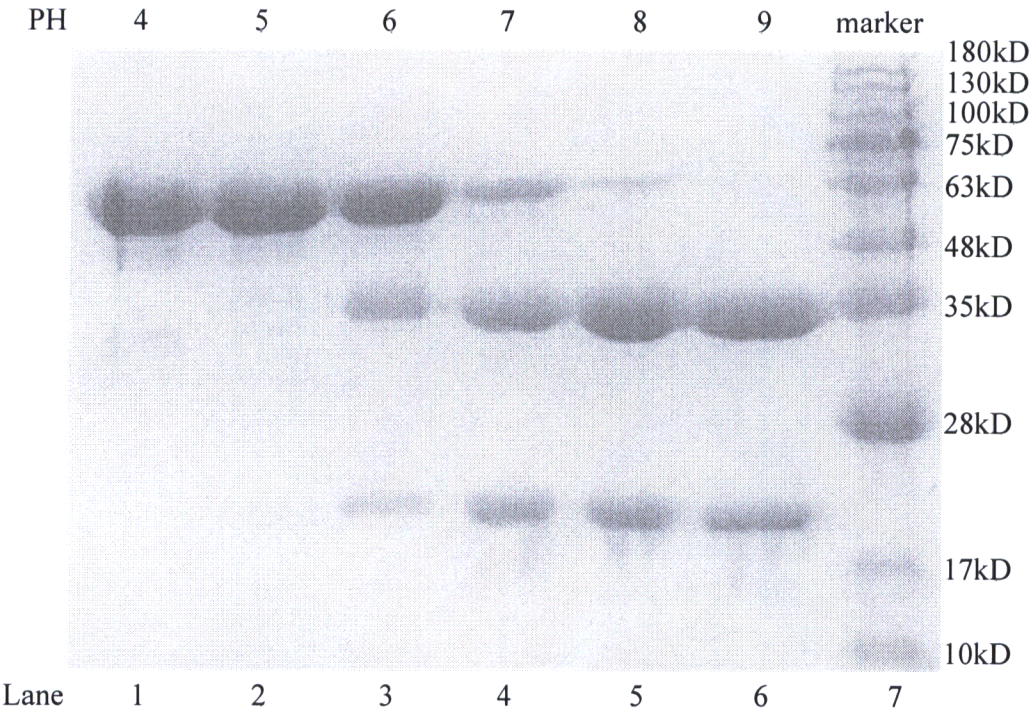
第 5 圖



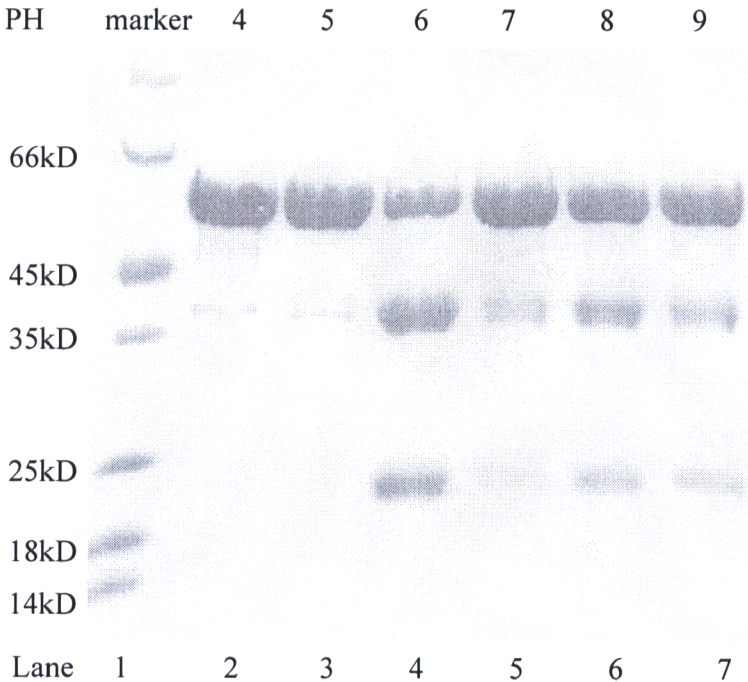
第 6 圖



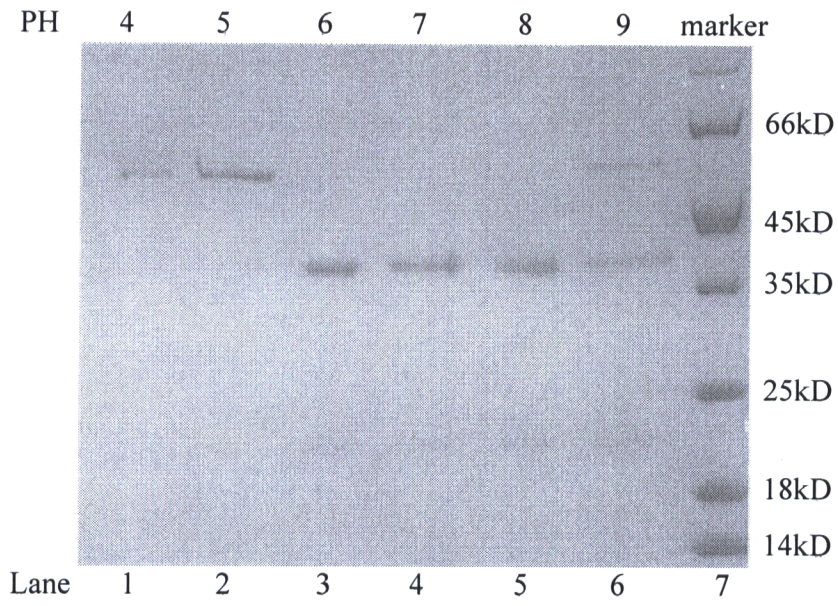
第 7 圖



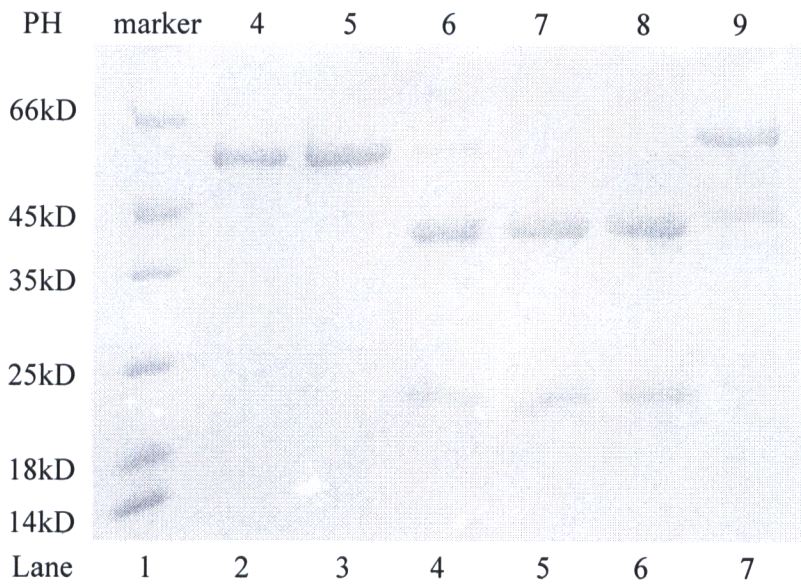
第 8A 圖



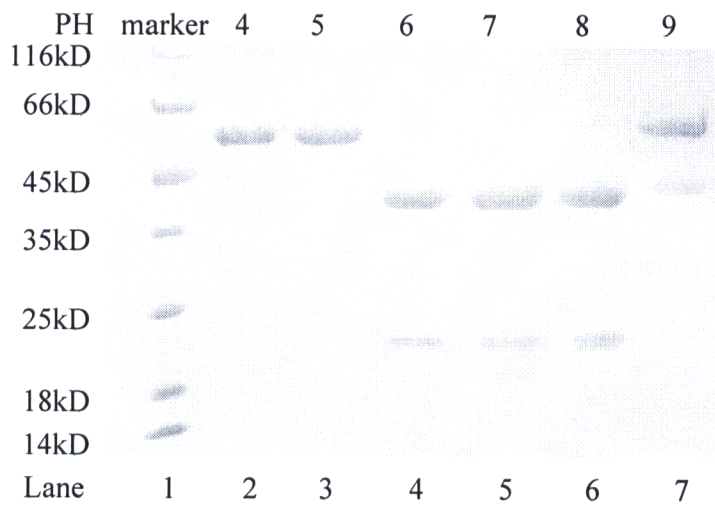
第 8B 圖



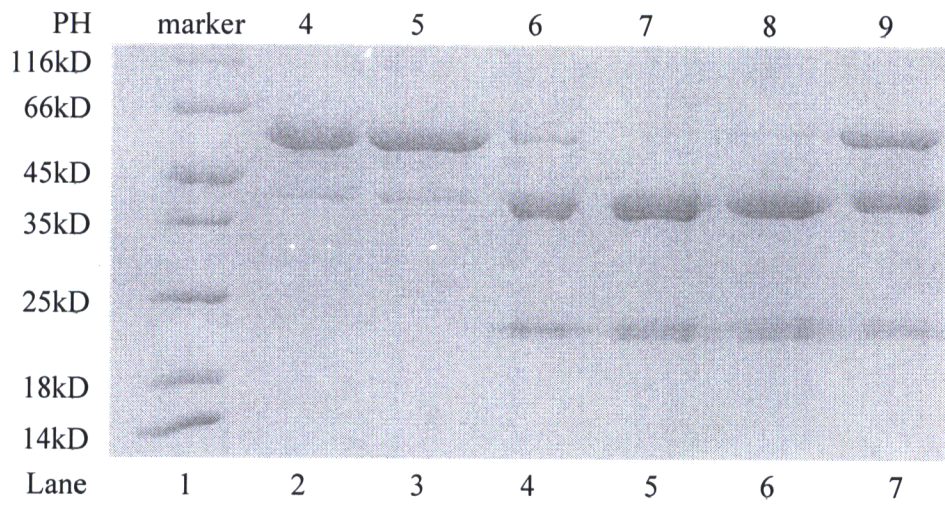
第 8C 圖



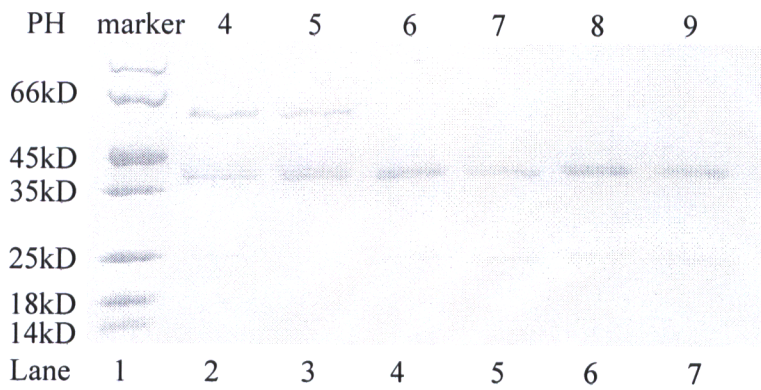
第 8D 圖



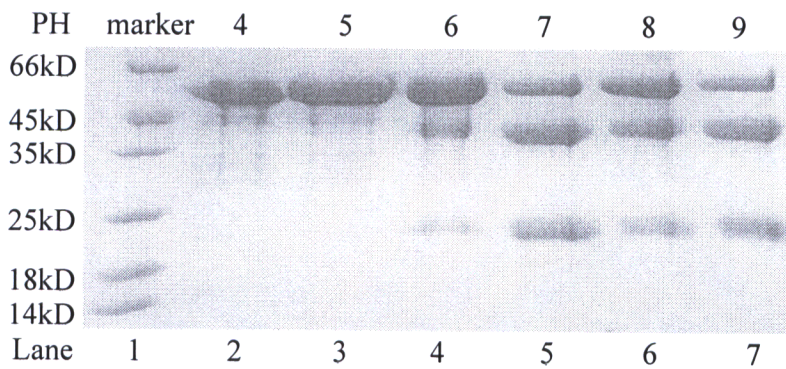
第 8E 圖



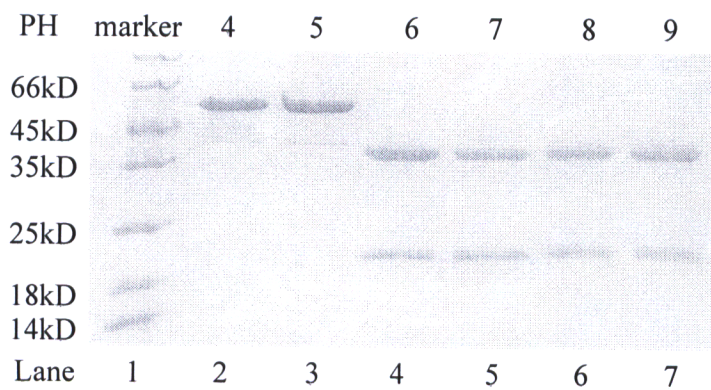
第 8F 圖



第 8G 圖



第 8H 圖



第 8I 圖