



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201122110 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 07 月 01 日

(21)申請案號：098143738

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 12 月 18 日

(51)Int. Cl.：

C12P21/00 (2006.01)

C12N15/64 (2006.01)

C12N15/74 (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：18 項 圖式數：7 共 45 頁

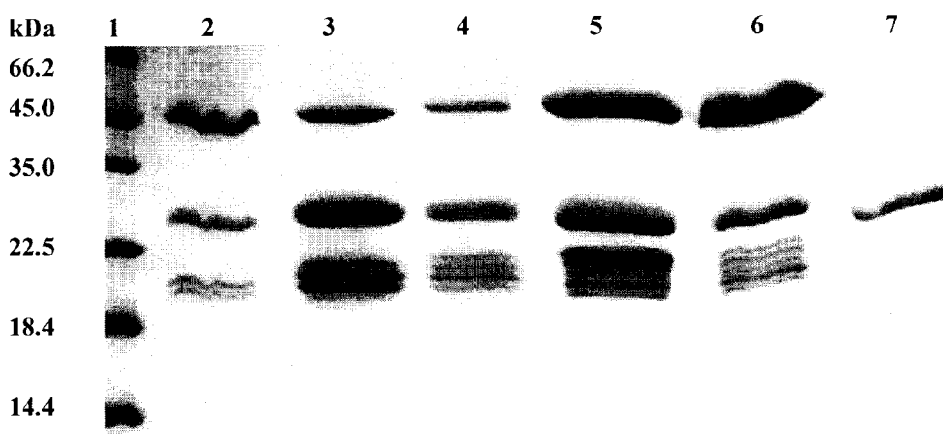
(54)名稱

用於純化蛋白質之載體、方法、系統與套組

VECTORS, METHODS, SYSTEMS AND KITS FOR PROTEIN PURIFICATION

(57)摘要

在此揭示可自我斷裂的胜肽連接子，其可用來生產純化蛋白質。所述之可自我斷裂的胜肽連接子是插入到幾丁質結合蛋白(CBP)與一標的蛋白之間，進而形成一種融合蛋白。讓此融合蛋白通過一幾丁質基質管柱，使此融合蛋白中的 CBP 部分與幾丁質基質結合，接著讓融合蛋白中該可自我斷裂的胜肽連接子在 pH 值介於約 5.5-7.5 間的緩衝溶液中進行自我斷裂，以釋出標的蛋白。此幾丁質基質管柱還可以 pH 值介於約 3-4 間的緩衝溶液加以再生，亦即，將其上所結合的 CBP 洗出，回復成原先的幾丁質基質，此幾丁質基質可重複使用至少 6 次仍不會喪失活性。



發明專利說明書

C12P 21/00 (2006.01)

※申請案號：98143738

C12N 15/64 (2006.01)

※申請日：98.12.18

※IPC 分類：

C12N 15/74 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

用於純化蛋白質之載體、方法、系統與套組/VECTORS,
METHODS, SYSTEMS AND KITS FOR PROTEIN PURIFICATION

二、中文發明摘要：

在此揭示可自我斷裂的胜肽連接子，其可用來生產純化蛋白質。所述之可自我斷裂的胜肽連接子是插入到幾丁質結合蛋白(CBP)與一標的蛋白之間，進而形成一種融合蛋白。讓此融合蛋白通過一幾丁質基質管柱，使此融合蛋白中的CBP部分與幾丁質基質結合，接著讓融合蛋白中該可自我斷裂的胜肽連接子在pH值介於約5.5-7.5間的緩衝溶液中進行自我斷裂，以釋出標的蛋白。此幾丁質基質管柱還可以pH值介於約3-4間的緩衝溶液加以再生，亦即，將其上所結合的CBP洗出，回復成原先的幾丁質基質，此幾丁質基質可重複使用至少6次仍不會喪失活性。

三、英文發明摘要：

Disclosed herein are autocleaved peptide linkers for producing purified proteins. The autocleaved peptide linkers are inserted between a chitin binding protein (CBP) and a target protein to form a fusion protein. Upon expression of the fusion protein, it is allowed to pass a chitin matrix so that the CBP portion of the fusion protein may be bound with the chitin matrix, the peptide linker then undergoes autocleavage in a buffer solution at a pH value of about

5.5-7.5 to release the target protein. The chitin matrix may be regenerated with another buffer solution at a pH value of about 3-4, that is, to release the bound CBP and returns to its unbond form. The chitin matrix may be reused for at least 6 times without losing activity.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(5)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明是有關於一種可自我斷裂的胜肽連接子 (autocleaved peptide linkers)，以及此胜肽連接子與幾丁質結合蛋白(chitin-binding protein, CBP)在純化蛋白質上的用途。

【先前技術】

蛋白質純化一般涉及多個與管柱層析有關的操作，例如離子交換、疏水性交互作用和凝膠過濾等。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，這類具有特定官能基的凝膠管柱層析法包括，例如，鎳管柱層析、穀胱氨酸改質之管柱層析、麥芽糖改質之凝膠管柱層析或其他等等。但是，目前盛行的這類蛋白質管柱層析法尚有許多缺陷有待克服，例如，通常所獲得的是一種融合蛋白，因此後續會需要用到蛋白酶來去除不要的融合部位，或是需要用到可進行親和性結合但價格高昂的凝膠。

有鑑於此，相關領域亟需提出一種可用來產生純化蛋白質且不需用到蛋白酶處理之改良的方法和/或系統，此種改良的方法和/或系統本身易於使用、具經濟效益且可在不犧牲標的蛋白本身功能的情況下，用來大量生產出純化的標的蛋白質。

【發明內容】

本發明在此提出一種可自我斷裂的胜肽連接子，以及此胜肽連接子在純化蛋白質上的用途。詳言之，本發明揭示一種用來表現融合蛋白質的載體設計，其包含幾丁質結合蛋白質(chitin-binding protein, CBP)與標的蛋白質，兩蛋白質間則以本發明之一種可自我斷裂的胜肽連接子相連。讓由此載體表現出來的融合蛋白質通過一種幾丁質基質(a chitin matrix)，並在不使用蛋白酶的情況下，使上述可自我斷裂的胜肽連接子在一種 pH 值約 5.5 至 7.5 間的緩衝溶液中自我斷裂，而使該標的蛋白質自融合蛋白質中釋出。因此，本發明非常適合用於有關欲求蛋白質之純化的相關應用，包括在診斷、研究及產業上的應用。

因此，本發明第一態樣是提供一種載體，包括：一啟動子；一第一多核苷酸，其係可操作地與該啟動子相連並可編碼產生一幾丁質結合蛋白質(CBP)；一第二多核苷酸，其係可操作地與該第一多核苷酸相連並可編碼產生一連接子，該連接子是一胜肽並具有一選自以下之氨基酸序列：序列編號：1、序列編號：2、序列編號：3 或序列編號：4，且此胜肽能在不需使用蛋白酶的情況下自我斷裂；以及一第三多核苷酸，其係可操作地與該第二多核苷酸相連且可編碼產生一標的蛋白質。

本發明第二態樣是提供一種用來產生標的蛋白質的方法，此方法包括以下步驟：

- (a) 以一載體轉染一宿主細胞，使該宿主細胞表現一融合蛋白質，其中該載體包含：

一啟動子，

一第一多核苷酸，其係可操作地與該啟動子相連並可編碼產生一幾丁質結合蛋白質(CBP)；

一第二多核苷酸，其係可操作地與該第一多核苷酸相連並可編碼產生一連接子，該連接子是一胜肽並具有一選自以下之氨基酸序列：序列編號：1、序列編號：2、序列編號：3 或序列編號：4，且此胜肽能在不需使用蛋白酶的情況下自我斷裂：以及

一第三多核苷酸，其係可操作地與該第二多核苷酸相連且可編碼產生一標的蛋白質；

- (b) 裂解該宿主細胞以產生該融合蛋白質之粗萃物，其中該粗萃物之 pH 值至少大於 8；
- (c) 使該粗萃物通過一幾丁質基質；
- (d) 以一第一緩衝液來浸潤並清洗該幾丁質基質，透過不使用蛋白酶且該連接子胜肽自我斷裂的方式來洗脫出該標的蛋白質，其中該第一緩衝液具有一介於約 5.5 至 7.5 間的第一 pH 值。

在某些實施方式中，此方法更包含步驟(c1)，此步驟(c1)是在步驟(c)之後及步驟(d)之前實施：(c1) 以一第二緩衝液來清洗該幾丁質基質，該第二緩衝液具有一介於約 3 至 4 間的第二 pH 值。

在某些實施方式中，該第一 pH 值約在 6 至 7 之間。在一實例中，該第一 pH 值約為 6.0。在另一實例中，該第二 pH 值約為 3.6。

本發明第三態樣是提供一種用來產生標的蛋白質的系

統。此系統包括：

一用來表現一融合蛋白質的載體，包括：

一啟動子，

一第一多核苷酸，其係可操作地與該啟動子相連並可編碼產生一幾丁質結合蛋白質(CBP)；

一第二多核苷酸，其係可操作地與該第一多核苷酸相連並可編碼產生一連接子，該連接子是一胜肽並具有一選自以下之氨基酸序列：序列編號：1、序列編號：2、序列編號：3 或序列編號：4，且此胜肽能在不需使用蛋白酶的情況下自我斷裂；以及

一第三多核苷酸，其係可操作地與該第二多核苷酸相連且可編碼產生一標的蛋白質；

一用來表現由該載體所編碼之該融合蛋白質的宿主細胞；以及

一幾丁質基質，其可利用如下之一種方法來純化出該標的蛋白質，該方法包含：

- (a) 以該載體轉染該宿主細胞；
- (b) 裂解該宿主細胞以產生該融合蛋白質之一粗萃物，其中該粗萃物之 pH 值至少大於 8；
- (c) 使該粗萃物通過一幾丁質基質；
- (d) 以一第一緩衝液來浸潤並清洗該幾丁質基質，透過不使用蛋白酶且該連接子胜肽自我斷裂的方式來洗脫出該標的蛋白質，其中該第一緩衝液具有一介於約 5.5 至 7.5 間的第一 pH 值；

其中可利用一 pH 值約在 3 至 4 之間緩衝溶液來使該幾丁質基質再生。

本發明第四態樣是提供一種用來純化一標的蛋白質的套組。此套組包括：如上所述之載體；一可用來表現由該載體所編碼之該融合蛋白質的宿主細胞；一用來結合該融合蛋白質的幾丁質基質；一種緩衝溶液，用來將該標的蛋白質從該幾丁質基質中洗脫出來，且該緩衝溶液之 pH 值在約 6 至約 7 之間；以及指示如何使用此套組的說明書，可以是 CD、VCD 或 DVD 的形式。在某些實施方式中，該幾丁質基質包含由低價幾丁質來源物-烏賊軟骨所製成的 β -幾丁質。

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。

以下將描述使用可重複使用且低價之幾丁質基質之純化標的蛋白質用的方法與系統之相關細節。為達此目地，設計出一種用來表現一重組蛋白質(即，融合蛋白質)的載

體，該重組蛋白質包含一幾丁質結合蛋白質(chitin-binding protein, CBP)與一標的蛋白質，且兩蛋白質間以一種可自我斷裂的胜肽連接子相連，使得純化時可不需使用任何蛋白酶處理即可將標的蛋白質分離出來。該用於純化的幾丁質基質則可透過以適當的緩衝液清洗而再生，並可重複使用至少 6 次才失去活性，因此也使本發明的方法與系統較相關技藝更具競爭力。

本發明第一態樣是提供一種可表現出一融合蛋白質的載體。此載體包括：一啟動子；一第一多核苷酸，其係可操作地與該啟動子相連並可編碼產生一幾丁質結合蛋白質(CBP)；一第二多核苷酸，其係可操作地與該第一多核苷酸相連並可編碼產生一連接子，該連接子是一胜肽並具有一選自以下之氨基酸序列：序列編號：1、序列編號：2、序列編號：3 或序列編號：4，且此胜肽能在不需使用蛋白酶的情況下自我斷裂；以及一第三多核苷酸，其係可操作地與該第二多核苷酸相連且可編碼產生一標的蛋白質。

上述之融合蛋白質在此是指一種可由該載體表現的重組蛋白質，且此重組蛋白質從 N-端到 C-端依序包含：CBP、本發明之一種可自我斷裂之連接子胜肽、及一種標的蛋白質。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，或是可參考本文實施例中的說明。為了製作表現載體，首先依據一般引子的設計原則或是使用市面上現有的引子設計工具，針對特定基因設計出適當的引子。為了能以這類引子設計工具來產生多對恰當的引子，較佳是依據引子及諸如標的核酸之二級結構等其他因

素來挑選出具有高黏合效率的引子對。接著利用聚合酶鏈反應(polymerase chain reaction, PCR)對所設計出來的引子對進行擴增，以獲得欲求的核苷酸序列，再將這些核苷酸序列轉殖入轉殖載體中，例如 pREST A，並以此轉殖載體來轉染宿主細胞，例如，大腸桿菌細胞，而使標的蛋白質能在宿主細胞內被大量表現。此領域中具有通常技藝的人士應可在不需過度實驗的情況下，選擇出適當的載體、適用此載體的啟動子、宿主細胞等來實施本發明。

在本文中，多核苷酸是指一種核酸分子，其包含必要的調控元件，使得當此多核苷酸被引入到一宿主細胞內時，其可導引該宿主細胞內的機制產生由包含此多核苷酸之基因所編碼產生的轉譯產物。在本文中，「可操作地…連接(operably linked to)」一詞代表一多胜肽之編碼序列以及其之轉譯和轉錄控制序列的連接方式是使得當恰當的分子(例如，轉錄活化蛋白質)與該些調控序列結合時，該多胜肽可被表現。

本發明之可自我斷裂的胜肽連接子具有一選自序列編號：1、序列編號：2、序列編號：3 或序列編號：4 之氨基酸序列，或是其為具有一重複之(EAAAK) n 之氨基酸序列，其中 n 是 2、3、4 或 5。任何一種上述的胜肽連接子均能於 pH 值約 5.5 至 7.5 間的緩衝溶液中自我斷裂，進而將該標的蛋白質自該融合蛋白中釋出。在一實例中，該胜肽連接子可於 pH 值約 6 至 7 間的緩衝溶液中自我斷裂。在另一實例中，該胜肽連接子可於 pH 值約 6 的緩衝溶液中自我斷裂。

在本文中「標的蛋白質」一詞代表感興趣的分子，包括可由一載體在一轉形之宿主細胞內表現的原核或真核蛋白質。合適的標的蛋白質包括，但不限於，諸如幾丁聚醣酶(chitosanase)、幾丁質酶(chitinase)、破壞以產生五聚醣之 $-\beta$ -1,3-葡聚醣酶(laminaripentose-producing- β -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。在一實例中，此標的蛋白質是幾丁聚醣酶。在另一實施例中，此標的蛋白質是幾丁質酶。在又另一實施例中，此標的蛋白質是 LPHase。

在此所述之幾丁質基質指的是任何一類能與 CBP 結合的幾丁質。幾丁質基質的實例包括，但不限於， α -幾丁質和 β -幾丁質。在一實例中，此幾丁質基質是從一種低價原料(如，烏賊軟骨)中分離出來的 β -幾丁質，其價格大約美金 1 元/每公斤軟骨。與 α -幾丁質不同的是， β -幾丁質的製備較環保，不需使用到太多的酸或鹼處理，因此可減少廢棄物的量。可將所述的幾丁質基質製成珠粒、膠、管柱、薄

膜、海綿、過濾器、塗層形式或其他可與 CBP 結合的適當表面，以便分離或純化標的蛋白質或在一檢驗測試中分析是否有該標的蛋白質的存在。在一實例中，是將此幾丁質基質製成管柱的形式。

「宿主細胞」一詞在此是指可表現出該標的蛋白質、CBP 和/或融合蛋白質的細胞，且其包括原核或真核系統中已知的表現系統，包括細菌、酵母菌、昆蟲、無脊椎動物、和包含人類細胞在內的哺乳類動物細胞。在一實例中，此宿主細胞是大腸桿菌細胞。培養此轉形的大腸桿菌細胞並依據已知的各種方法進行篩選，例如利用營養成分和/或抗生素等進行篩選。

依據本發明第二態樣，提供一種用來產生一種純化之標的蛋白質的方法。此方法包括以下步驟：

(a) 以本發明所述之載體來轉染一宿主細胞，使該宿主細胞表現一融合蛋白質；

(b) 裂解該宿主細胞以產生該融合蛋白質之一粗萃物，其中該粗萃物之 pH 值至少大於 8；

(c) 使該粗萃物通過一幾丁質基質；

(d) 以一第一緩衝液來浸潤並清洗該幾丁質基質，透過不使用蛋白酶且該連接子胜肽自我斷裂的方式來洗脫出該標的蛋白質，其中該第一緩衝液具有一介於約 5.5 至 7.5 間的第一 pH 值。

以經由前述步驟所建構而成之一載體來對一宿主細胞，例如，大腸桿菌，進行轉形。利用任何已知方法來培育並開選該轉形的宿主細胞，所述方法包括，但不限於利

用營養物和/或抗生素進行篩選。接著，以習知技術來製備出一種含有該表現出來之融合蛋白質的粗萃物，例如，以機械或化學方式破壞細胞膜，接著利用離心收集該萃出物。所得該融合蛋白質之萃出物的特徵在於其 pH 值至少為 8。在一實例中，讓此萃出物通過一幾丁質基質，例如，從烏賊軟骨所製備而成的 β -幾丁質，該融合蛋白質中的 CBP 部分會與 β -幾丁質基質結合並形成一複合物。插入到 CBP 與標的蛋白質間之可自我斷裂的连接子胜肽，例如具有任一序列編號：1 至 4 之氨基酸序列的连接子胜肽，將可在一 pH 值約在 5.5 至 7.5 間的一第一緩衝溶液中進行自我斷裂，進而釋出該標的蛋白質；該標的蛋白質是從幾丁質基質-融合蛋白質之複合物中釋出，並可以傳統方式洗脫與收集。在一實例中，自我斷裂是發生在一介於約 6 至 7 間的 pH 值範圍。在另一實例中，自我斷裂是發生在一約為 6 的 pH 值範圍。

在某些實施方式中，此方法更包含步驟(c1)，此步驟(c1)是在步驟(c)之後及步驟(d)之前實施：(c1) 以一第二緩衝液來清洗該幾丁質基質，該第二緩衝液具有一介於約 3 至 4 間的第二 pH 值。在一實例中，此第二 pH 值約為 3.6。

在某些實施方式中，該第一 pH 值約在 6 至 7 之間。在一實例中，該第一 pH 值約為 6.0。在另一實例中，該第二 pH 值約為 3.6。

依據本發明第三態樣，提供一種用來產生一純化之標的蛋白質的系統。此系統包括：依據上述實施方式所建構成之用來表現一融合蛋白質的載體，一用來表現由該載體

所編碼之該融合蛋白質的宿主細胞；以及一幾丁質基質，其可利用所揭示方法來純化出該標的蛋白質；其中該幾丁質基質可以一 pH 值約在 3 至 4 之間的緩衝溶液使其再生。「再生」一詞在此係指以一種具有恰當 pH 值的溶液，例如，pH 值約在 3 至 4 之間的緩衝溶液，清洗該幾丁質基質，將其上所結合的 CBP 蛋白洗出，回復到原先未結合 CBP 時的狀態。在某些實施方式中，此幾丁質基質可重複使用至少 6 次，例如 2、3、4、5 或 6 次，才失去活性。

本發明第四態樣是提供一種用來純化一標的蛋白質的套組。此套組包括：如上所述之載體；一可用來表現由該載體所編碼之該融合蛋白質的宿主細胞；一用來結合該融合蛋白質的幾丁質基質；一種緩衝溶液，用來將該標的蛋白質從該幾丁質基質中洗脫出來，且該緩衝溶液之 pH 值在約 6 至約 7 之間；以及用來指示如何使用此套組的說明書，可以是 CD、VCD 或 DVD 的形式。在某些實施方式中，該幾丁質基質包含由低價幾丁質來源物-烏賊軟骨所製成的 β -幾丁質。

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。

實施例

1. 材料與方法

1.1 轉殖幾丁質結合蛋白質(CBP)

以沙雷氏黏質菌(*S. marcescens*)基因體 DNA 當作模板，透過 PCR 反應擴增出 CBP 基因。以沙雷氏黏質菌(存

取編號 AAU88202，且購自食品工業研究所，新竹，台灣，產品編號 ATCC 990)的 *cbp* 基因為基礎，分別設計出引子 1 與引子 2(表 1 提供所有引子的詳細序列)。以 Vent DNA 聚合酶來執行 PCR 擴增反應，總計循環 25 次，且每次循環條件為變性：94°C、30 秒；黏合：58°C、30 秒；延長：72°C、4 分鐘。將擴增出來的 PCR 片段插入 pREST A 中的 *Nde* I 及 *Xho* I 切割位置處，構築出 pREST/CBP。

1.2 構築 CBP 融合蛋白質之表現載體

構築含有連接子及第 I 型基因酶(*genenase* I)辨識位置之 CBP 融合蛋白質之表現載體的方法涉及以下數個步驟。在第一步驟中，以 PCR 引子 3 及引子 4 透過位置導引誘變將 pREST/CBP 中的 *Nde* I 位置移除，將所得的表現載體稱為 de- *Nde* I-pREST/CBP。在第二步驟中，在 CBP 基因後插入第 I 型基因酶和 *Nde* I 的切割位置，同時移除終止碼，引子 5 及 6 即係為此目地而設計的，在將其用於 PCR 反應前，並先以 T4 多核苷酸激酶將其磷酸化。將 PCR 擴增後的序列自我連接成為 pREST/CBP-G。接著，引入各式連接子(所有連接子的序列均列於表 2 中)。當要在 pREST/CBP-G 中加入氨基酸序列為(EAAAK)₅(序列編號：4)的連接子時，可於反向 PCR 擴增反應中使用引子 7 及 8。類似第二步驟，同樣事先對引子 7 及 8 進行磷酸化反應，使得擴增後的 DNA 片段可自我連接成為 pREST/CBP-V5G。以類似方式，分別利用引子 9、10，引子 9、11 和引子 9、12 構築出含有(EAAAK)₂(序列編號：1)、(EAAAK)₃(序列編號：2)和(EAAAK)₄(序列編號：3)的表現載體。同時，還可以引子

13 及 14 構築出不含入第 I 型基因酶蛋白水解位置的載體，所構築出的載體稱為 pREST/CBP-V5。接著，以引子 15、16 來構築出沒有 CBP 的載體。為了評估此系統的功能，分別將源自 *Streptomyces matensis* 的 β -1,3-葡聚糖酶(LPHase)基因插入到 pREST/CBP-V5G 載體的 *Nde* I/*EcoR* I 位置、將源自 *Bacillus cereus* 的幾丁質酶基因插入到 pREST/CBP-V5G 載體的 *Nde* I/*Nco* I 位置、及將源自 *Aspergillus fumigatus* 的幾丁聚糖酶基因插入到 pREST/CBP-V5G 載體的 *Nde* I/*Hin* III 位置中，並轉形入大腸桿菌細胞中進行表現。接著，以 β -幾丁質管柱分別對 3 種融合蛋白進行純化，包括 CBP-V5G-LPHase、CBP-V5G-幾丁質酶和 CBP-V5G-幾丁聚糖酶。

表 1 引子序列

引子編號	序列 (5'→3')	序列編號
1	5'-GGAATTCCATATGAACAAAACCTTCCCGTACC-3'	5
2	5'-CCGCTCGAGCTCTTATTTGCTCAGGTTGAC-3'	6
3	5'-GGAGATATAGGGATGAACAAAAC-3'	7
4	5'-GTTTTGTTCCATCCCTATATCTCC-3'	8
5	5'-CCGGGTGCGGCACACTACCATATGGAGCTCG AGATCTGCAGCTGGTAC-3'	9
6	5'-GATCCAACCACGTTTAGCTTTGCTCAGGTTGA CGTCGATC -3'	10
7	5'-CTGCTAAAGAAGCTGCTGCTAAAGAAGCTGCT GCTAAACCGGGTGCAGGCACACTAC-3'	11
8	5'-CAGCTTCTTTAGCAGCAGCTTCTTTAGCAGCA GCTTCTTTGCTCAGGTTGACGTC-3'	12
9	5'-GAAGCTGCTGCTAAAGAAGCTGCTGCTAAACC GGGTGCGGCACACTACCATATG-3'	13
10	5'-TTTGCTCAGGTTGACGTCCATCGC-3'	14
11	5'-TTTAGCAGCAGCTTCTTTGCTCAGGTTGACGT C-3'	15
12	5'-TTTAGCAGCAGCTTCTTTAGCAGCAGCTTCTT TGCTCAGGTGACGTC-3'	16
13	5'-GTAGTGTGCCGCACCCGGCATATGTTTAGCAG CAGCTTC-3'	17
14	5'-GGAATTCCATATG TACAATTTGCCAAAC-3'	18
15	5'-GCGATCGACGTCAACCTGCTCGAGGAAGCTG CTGCT-3'	19
16	5'-CGATTCGACATACTCGAGAGCATTGCGCTGTT GCGA-3'	20

表 2 CBP 融合蛋白之胜肽連接子

連接子 編號	氨基酸序列 (EAAAK) _n n = 2, 3, 4, 5	序列編號
1	(EAAAK) ₂ EAAAKEAAAK	1
2	(EAAAK) ₃ EAAAKEAAAKEAAAK	2
3	(EAAAK) ₄ EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	3
4	(EAAAK) ₅ EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4

1.3 製備β-幾丁質基質

以烏賊軟骨來製造β-幾丁質基質及包含此基質的管柱。將烏賊軟骨浸泡在 NaOH (3%, 1 公升) 中並加熱到 100 °C 約 3 小時。接著，以水清洗該烏賊軟骨並移除殘留的 NaOH。將該烏賊軟骨進一步泡在 HCl 中 (6M, 1 公升) 並保持在約 25°C 的溫度下約 12 小時。待以清水清洗過數次後將 pH 值調至大於 6。將軟骨均質化後過篩獲得直徑約在 0.3 至 0.6 毫米的β-幾丁質基質，相當於網目約 30-50 目的大小。將此β-幾丁質基質保存在 4°C 下。

1.4 純化 CBP 與融合蛋白

以大腸桿菌 BL21 (DE3) 做為宿主細胞來表現蛋白質。將單株 pREST/CBP 種到內含氨比黴素(0.1 毫克/毫升)的 LB 培養基中(5 毫升)，並於 37°C 下培育 12 小時。將隔夜培育的培育物轉移到圓錐瓶中，其中含有氨比黴素(0.1 毫克/毫升)、IPTG 之 LB 培養基(1 公升)，並在 37°C 下培育 15 小時。將培養基以 7000g 的速度在 4°C 下離心約 10 分鐘。將所收集的細胞重新懸浮在磷酸鈉緩衝溶液中(10 毫升，20 mM，pH 7.0)，接著以超音波震盪使細胞破裂。離心移除細胞殘屑，取上清液與實施例 1.3 之 β -幾丁質基質混合(100 毫升，Tris 50 mM，硫酸銨 1M，pH 8.0，5%(v/w)，直徑 0.3-0.6 毫米之 β -幾丁質)並在 4°C 下培育隔夜。將所得的混合物填入 2.5 公分 x 60 公分(內徑)的管柱內，並以 250 毫升的緩衝溶液清洗(Tris 50 mM，硫酸銨 1M，pH 8.0)(其為 β -幾丁質固體體積的 10 倍)，以移除任何沒有結合的蛋白質部分。以 50 毫升的醋酸緩衝液(20mM, pH 3.6)(流速 2 毫升/分鐘)將 CBP 洗脫出來。並每隔 5 毫升收集一次洗出液，依據上述一般方法將所有的 CBP 融合蛋白純化出來，包括 CBP-V5G-LPHase、CBP-V5G-幾丁質酶和 CBP-V5G-CNS (即，不含 CBP 之重組幾丁質酶)。以相對應的多醣當作酵素反應的受質，接著以 SDS-PAGE 來分析所純化出來之蛋白質的活性。依據酵素活性以及所獲得的蛋白質量來計算蛋白質回收比例及純化的效果。依據文獻中已公開的方法來純化上述不含 CBP 之重組幾丁質酶(即，V5G-CNS)。

1.5 蛋白質之定量

依據供應商所提供之 BCA-1 套組 (BCA-1 kit,

Sigma-Aldrich, St Louis, MO)中附隨的操作流程，以 BCA 法來定量所製備出來蛋白質。

1.6 測量酵素活性

以 β -1,3-葡聚糖、幾丁質凝膠及幾丁聚糖為受質分別測量 LPHase、幾丁質酶和不含 CBP 之重組幾丁質酶(CNS)的酵素活性。以二硝基水楊酸法透過評估還原端的糖含量來估算酵素活性。將 0.3 毫升的多糖受質(1%)和 0.3 毫升的酵素兩者混合，並在 37°C 下培育 4 小時，加入 0.6 毫升的二硝基水楊酸，將混合物煮沸約 15 分鐘，冷卻，離心去除沉澱。以光譜儀在 540 nm 下分析所得還原性糖的加成產物。

1.7 離子阱電噴霧質譜(electrospray mass-spectrometric, ESI-MS)分析

以四極飛行時間質譜器來紀錄質譜，並以其掃描 500-3000 u 之荷質比範圍來進行蛋白質分析，每次掃描時間 2 秒且每一掃描彼此間隔 0.1 秒。

2. 結果

2.1 從沙雷氏黏質菌中轉殖、表現及利用親和性管柱層析分離出 CBP

依據沙雷氏黏質菌之幾丁質結合蛋白基因，設計出兩種寡核苷酸做為 PCR 擴增反應用的引子對。以沙雷氏黏質菌的染色體 DNA 當作模板，擴增出一段 DNA 片段(0.6kb)並定序確認其為 CBP。序列分析顯示所擴增的 CBP 基因包含一段約 594 鹼基對的開放譯讀框，可編碼產生一段長約 197 個氨基酸的序列，其中約 27 個氨基酸為訊號勝肽。接著將

整段完整的 CBP 基因轉殖入 pREST A 質體中。以所得的質體來轉形大腸桿菌(DE3)使其表現欲求的蛋白質。接著，以 β -幾丁質基質來純化出所表現的可溶性重組蛋白。為了解 CBP 與幾丁質間的親和性結合程度，將重組蛋白的粗萃物與適量的幾丁質基質混合，然後充填入一管柱中，先以鹽水(50 mM NaCl)清洗，接著以 pH 值 4~8 間的各種緩衝液將標的蛋白質洗出，這些緩衝液包括 NaOAc (50mM, pH 4-8)、磷酸緩衝液(50mM, pH 6-7)和 Tris-HCl (50mM, pH 7-8)。接著，以 SDS-PAGE 來分析所洗脫出來的蛋白質。結果顯示當 pH 值小於 7 時，可有效地從 β -幾丁質基質中將標的蛋白質洗脫出來。經過 SDS-PAGE 分析，可知所得的重組蛋白質具有均一性(>90%)(第 1 圖，左圖)。分子量估算約為~20 kDa。以 ESI-MS 分析來提供更精確的分子量，其分子量為 18785 Da (第 1 圖，右圖)，與不含訊號肽時的預測分子量大致相同。

以 pREST A 為基礎來構築其它表現載體。載體構築方式如第 2 圖所示。首先，將擴增後的 *cbp* 基因插入至 *Nde* I 及 *Xho* I 切割位置處。進一步將所得載體中的 *Nde* I 位置移除，可構築出 de-*Nde*I/pREST/CBP，並可在 *cbp* 基因後插入各式胜肽連接子與第 I 型基因酶切割位置序列(PGAAHY)。接著，在第 I 型基因酶切割位置後插入 *Nde*I 位置序列，以便於後續插入標的蛋白質基因之用。所得載體即可用來插入各種基因。為了測試此載體的功效，插入幾丁聚醣酶(chitosanase, CNS)基因並進行測試。以融合蛋

白被第 I 型基因酶加以裂解的可能性和融合蛋白之幾丁聚醣酶活性當作評估如表 2 所示之各種連接子胜肽的關鍵因素。在所測試的連接子中，具有(EAAAK)₅(序列編號：4) 序列或具有 GTGGEGPGGGPGEGGTGGTGGEGPGG 或 (GGGS)₅ 序列之連接子(本文並未提供後面提及的兩序列的相關數據)都會表現出明顯的幾丁聚醣酶活性。此外，所有上述 3 種融合蛋白均可利用幾丁質基質管柱進行分離，並在以第 I 型基因酶處理後可釋出幾丁聚醣酶(約 25 kDa) (未提供數據)，顯示這些連接子胜肽並未干擾上述這些蛋白質的結構且融合蛋白中特定的蛋白酶裂解位置也保持在可被蛋白酶觸及的位置。已知(EAAAK)₅(序列編號：4) 序列可形成一種螺旋結構且在經過幾丁質管柱層析純化後，可獲得較其他兩種融合蛋白更好的產率，及更佳的純度。因此，本研究挑選了此種連接子胜肽進行後續研究，並將可表現這種胜肽的載體稱為 pREST/CBP-V5G。

為了確認這個載體的功能，選擇了另外兩種蛋白質進行測試，分別是來自仙人掌桿菌(*Bacillus cereus*)的幾丁質酶以及來自煙麴黴(*Aspergillus fumigates*)的幾丁聚醣酶，並使大腸桿菌過量表現這兩種蛋白質。所表現出來的含有 CBP、連接子胜肽與上述蛋白質的融合蛋白，均為可溶性蛋白，並可透過上述的幾丁質基質管柱加以純化。由於幾丁質基質與幾丁質結合蛋白(CBP)兩者間的獨特作用，使得本案發

明人可構築出一種多樣性系統，並透過此系統以親和性結合方式來純化出重組蛋白質。本發明的系統提供一種簡單、快速的方式，可大量地純化出融合蛋白質。相對於含有 LPHase、幾丁質酶和幾丁聚醣酶的融合蛋白質來說，本發明系統可提高含有 LPHase 之融合蛋白質的純化產率約 27% 並提高其純度 53 倍；至於含有幾丁質酶之融合蛋白質的純化產率可增加約 29%，純度則提高約 30 倍；含有幾丁聚醣酶之融合蛋白質的純化產率可增加約 58%，純度則提高約 137 倍。SDS-PAGE 分析顯示本發明系統可獲得高度均一的蛋白質(第 3 圖)。接著以第 I 型基因酶對融合蛋白進行蛋白酶裂解，以便從結合了融合蛋白的幾丁基質中釋放出重組蛋白。由於存在有 NdeI 位置，因此預期在以第 I 型基因酶處理後的重組蛋白的 N-端中，將會含有組織胺酸殘基。

2.2 控制(EAAAK)₅ 連接子之酸依賴型自我斷裂過程

本申請案發明人在研究如何洗脫重組蛋白時，意外發現(EAAAK)₅ 連接子(序列編號：4)可自我斷裂。CBP 對β-幾丁質的親和性結合與 pH 值有關，當 pH 值<7 時，CBP 將無法與幾丁質結合。在一項前置研究中，當 CBP-V5G-CNS 與磷酸緩衝液(pH 6~7, 25°C)一起培育 12 小時，可在沒有第 I 型基因酶處理的情況下，即可從融合蛋白中釋出相當大量的 CNS。當初推斷此種預期外的結果可

能來自少量污染的蛋白酶，為了測試這種可能性，以約 pH 值 3.6 的溶液從幾丁質管柱中純化出 CBP-V5G-CNS，使得重組蛋白保持在其原來仍是融合蛋白質的狀態。接著，在 pH 值 3.6 下將此融合蛋白質在 100°C 下加熱約 10 分鐘。以 pH 值約 4.2-8.0 的溶液置換所得樣品中的溶液，並保存在 25°C 下約 12 小時。SDS-PAGE 分析(第 4 圖)顯示此融合蛋白質仍保留其自我斷裂的特性，且此自我斷裂的現象只會出現在 pH 值約 6~7 的範圍內。

2.3 具有各式 EAAAK 連接子之融合蛋白質的自我斷裂現象分析

為了了解此自我斷裂的現象，在融合蛋白中引入具有不同重複次數的(EAAAK)_n 連接子，其中 n 等於 2、3、4 或 5(分別為序列編號：1 至 4 之序列)。將所有這些融合蛋白質放在含有 NaCl (300 mM)的磷酸緩衝液(100 mM, pH 7.0)中培育約 12 小時。在這樣情況下，發現自我斷裂的現象並不完全。如第 5 圖所示，SDS-PAGE 分析顯示所有融合蛋白都出現系統性的蛋白質帶模式。靠近 20 kDa 的蛋白帶可能是來自具有不同重複次數之(EAAAK)_n 連接子分別斷裂後的結果。舉例來說，在出現部分自我斷裂後，融合蛋白 CBP-V2G-CNS 出現 4 個清楚的蛋白帶(第 5 圖，第 2 條)，其預估分子量分別為 45、26、20 及 19 kDa，分別相當於完整的融合蛋白質、PGYAAHY-CNS (具有第 I 型基因

酶辨識位置之 CNS 融合蛋白)、CBP-(EAAAK)₂ 和 CBP-(EAAAK)。類似的，對 CBP-V3G-CNS 來說，所出現的 5 條蛋白帶，從大分子量到小分子量，分別代表完整的融合蛋白質、連接有 PGYAAHY 的 CNS、CBP-(EAAAK)₃、CBP-(EAAAK)₂ 和 CBP-(EAAAK)。其他具有較長連接子的融合蛋白質也會出現相同的自我斷裂模式。發明人進一步將融合蛋白中的第 I 型基因酶切割位置的胜肽序列或 CBP 序列移除，並測試此融合蛋白質的自我斷裂特性。結果顯示，當融合蛋白中沒有 CBP 或第 I 型基因酶辨識位置胜肽時，本發明之(EAAAK)₅ 連接子在 pH 值 6.0 下仍然具有自我斷裂的能力。

接著以 ESI/MS 分析來確認上述具有不同重複次數之 EAAAK 連接子的自我斷裂特性(第 6 圖)。計算出來的 CBP-(EAAAK)₅、CBP-(EAAAK)₄、CBP-(EAAAK)₃、CBP-(EAAAK)₂、CBP-(EAAAK)₁ 之分子量分別為 20996、20526、20056、19586 和 19115 kDa，至於 PGAAHY-CNS 的分子量則是 24430 kDa。如第 6 圖所示，每一光譜中質量/電荷(m/z)的訊號與預計的 CBP-(EAAAK)_n 部分及 PGAAHY-CNS 之間有相當的關連性。對 CBP/CNS 融合蛋白來說，從最鄰近 CNS 處切下 EAAAK 單元是最有效率的方式，因為以 ESI/MS 分析整個反應並未發現有任何 EAAAK 單元仍與 CNS 相連。EAAAK 單元會持續地從

CBP-(EAAAK)_n 部分斷裂，且每次斷裂後就會釋出一個 EAAAK 胜肽(分子量約為 470 Da)，同時此種斷裂，並不需要任何蛋白酶的協助，換言之，不需使用任何蛋白酶即可達成自我斷裂。

2.4 以本發明 CBP 蛋白質純化系統進行蛋白質純化

首先，依上述方式分別建構出含有 CBP、本發明 EAAAK 單元胜肽連接子及沙雷氏黏質菌之 LPHase 的載體；或是含有 CBP、本發明 EAAAK 單元胜肽連接子及煙麴黴之幾丁聚醣酶的載體。再以此兩種載體分別轉染大腸桿菌宿主，使分別合成出含有 CBP-(EAAAK)₅-沙雷氏黏質菌之 LPHase 的融合蛋白以及含有 CBP-(EAAAK)₅-煙麴黴之幾丁聚醣酶的融合蛋白。

其次，依上述方式製備出充填有β-幾丁質的管柱，接著，將分離出來的融合蛋白載入管柱中，再以 pH 值 6.0 的緩衝溶液洗滌管柱，藉此純化出標的蛋白，結果示於第 7 圖中。由第 7A 及 7B 圖知結果可確認，本發明 CBP 蛋白質純化系統可藉由插入在 CBP 及標的蛋白間之連接子的自我斷裂，而能在不需使用蛋白酶的情況下，輕易地分離出欲求的標的蛋白。

其他實施例

以上說明書中所提及的任何特點均可自由組合，且每一特點也可以其他相同、等效或類似的方式取代，因此，除非特別指明，否則每一在此指出的特徵僅是類似特徵的一種實例。從上述的說明中，習知技藝人士可在不脫離本發明之精神和範圍內，了解並確認本發明的各項內容，並作各種適當的更動與潤飾，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 圖是 CBP 的 SDS-PAGE 結果與 MS 分析結果，(A) 第 1 道，蛋白質標記物，第 2 道，純化的 CBP；(B) 重組 CBP 的質譜分析；

第 2 圖顯示如何構築 pREST/CBP-V5G 載體的操作步驟，其中 V5G 代表具有 5 個 EAAAK 重複單元及第 I 型基因酶切割位置之胜肽；

第 3 圖是純化後的 3 種融合蛋白之 SDS-PAGE 結果，該些融合蛋白中分別包含源自 *Streptomyces matensis* 的 LPHase 基因、源自 *Bacillus cereus* 的幾丁質酶基因及源自 *Aspergillus fumigatus* 的幾丁聚醣酶基因：第 1 道，蛋白質標記物；第 2 道，CBP-V5G-LPHase 粗萃蛋白；第 3 道，CBP-V5G-LPHase 純化蛋白；第 4 道，CBP-V5G-幾丁質酶粗萃蛋白(分子量 65 kDa)；第 5 道，CBP-V5G-幾丁質酶純化蛋白(分子量 58 kDa)；第 6 道，CBP-V5G-CNS 粗萃蛋

白；第 7 道，CBP-V5G-CNS 純化蛋白(分子量 45 kDa)；

第 4 圖是以 SDS-PAGE 分析 CBP-V5G-CNS 融合蛋白在各式 pH 值溶液下，其連接子自我斷裂的結果：第 1 道，蛋白質標記物；第 2 道，Tris, pH 8.0；第 3 道，Tris, pH 7.5；第 4 道，磷酸緩衝液，pH 7.0；第 5 道，磷酸緩衝液，pH 6.0；第 6 道，NaOAc, pH 5.1；第 7 道，NaOAc, pH 4.2。需知，在第 5 道中，上方蛋白帶與下方蛋白帶被分別推定為 CNS 與 CBP，在 45 kDa 處的蛋白帶為完整的融合蛋白；

第 5 圖是以 SDS-PAGE 分析連接子自我斷裂的結果，其是將融合蛋白培育在磷酸緩衝液(pH 6.0, 16°C)中，以便獲得僅部分自我斷裂的結果；第 1 道，蛋白質標記物；第 2 道，CBP-V2G-CNS；第 3 道，CBP-V3G-CNS；第 4 道，CBP-V4G-CNS；第 5 道，CBP-V5G-CNS；第 6 道，CBP-V5-CNS (不含第 I 型基因酶切割位置序列的蛋白質)；第 7 道，V5G-CNS (不包含 CBP 的蛋白質)；

第 6 圖是自我斷裂後之融合蛋白的 ESI-MS 分析結果，此是將從第 4 圖中 SDS-PAGE 分析取得的樣品繼續進行質譜分析後的結果，(A) CBP-V2G-CNS；(B) CBP-V3G-CNS；(C) CBP-V4G-CNS；(D) CBP-V5G-CNS；(E) CBP-V5-CNS；(F) V5G-CNS；其中質譜分析出來 EAAAK 胜肽的分子量為 470 kDa；

第 7A 圖是以 SDS-PAGE 分析本發明 CBP 系統用來純化重組之沙雷氏黏質菌之 LPHase 的效果，其中，第 1 道，蛋白質標記物；第 2 道，粗融合蛋白質；第 3 道，經 β -幾丁質純化後之 CBP-V5G-LPHase 融合蛋白；第 4 道，連接

子斷裂後釋出之 LPHase 標的蛋白；及

第 7B 圖是以 SDS-PAGE 分析本發明 CBP 系統用來純化重組之煙麴黴之幾丁聚醣酶的效果，其中，第 1 道，蛋白質標記物；第 2 道，粗融合蛋白質；第 3 道，經 β -幾丁質純化後之 CBP-V5G-幾丁聚醣酶融合蛋白；第 4 道，連接子斷裂後釋出之幾丁聚醣酶標的蛋白。

【主要元件符號說明】

Organization Applicant

 Street : 大學路1001號
 City : 新竹
 State : 台灣
 Country : R. O. C.
 PostalCode :
 PhoneNumber :
 FaxNumber :
 EmailAddress :
 <110> OrganizationName : 國立交通大學

Application Project

 <120> Title : 用於純化蛋白質之載體、方法、系統與套組
 <130> AppFileReference :
 <140> CurrentAppNumber :
 <141> CurrentFilingDate : ____-__-__

Sequence

 <213> OrganismName : unknown
 <400> PreSequenceString :
 EAAAKEAAAK 10
 <212> Type : PRT
 <211> Length : 10
 SequenceName : SEQ ID NO 1
 SequenceDescription :

Sequence

 <213> OrganismName : unknown
 <400> PreSequenceString :
 EAAAKEAAAK EAAAK 15
 <212> Type : PRT
 <211> Length : 15
 SequenceName : SEQ ID NO 2
 SequenceDescription :

Sequence

 <213> OrganismName : unknown
 <400> PreSequenceString :
 EAAAKEAAAK EAAAKEAAAK 20
 <212> Type : PRT
 <211> Length : 20
 SequenceName : SEQ ID NO 3
 SequenceDescription :

Sequence

 <213> OrganismName : unknown
 <400> PreSequenceString :
 EAAAKEAAAK EAAAKEAAAK EAAAK 25
 <212> Type : PRT
 <211> Length : 25
 SequenceName : SEQ ID NO 4
 SequenceDescription :

Sequence

 <213> OrganismName : S. marcescens
 <400> PreSequenceString :
 ggaattccat atgaacaaaa ctccccgtac c 31
 <212> Type : DNA
 <211> Length : 31
 SequenceName : SEQ ID NO 5
 SequenceDescription :

Sequence

 <213> OrganismName : S. marcescens
 <400> PreSequenceString :
 ccgctcgagc tcctatttgc tcaggttgac 30
 <212> Type : DNA

```

<211> Length : 30
      SequenceName : SEQ ID NO 6
      SequenceDescription :

Sequence
-----
<213> OrganismName : artificial DNA
<400> PreSequenceString :
ggagatatag ggatgaacaa aac                23
<212> Type : DNA
<211> Length : 23
      SequenceName : SEQ ID NO 7
      SequenceDescription :

Sequence
-----
<213> OrganismName : artificial DNA
<400> PreSequenceString :
gttttgttca tcctatatac tcc                23
<212> Type : DNA
<211> Length : 23
      SequenceName : SEQ ID NO 8
      SequenceDescription :

Sequence
-----
<213> OrganismName : artificial DNA
<400> PreSequenceString :
ccgggtgctg cacactacca tatggagctc gagatctgca gctggtac 48
<212> Type : DNA
<211> Length : 48
      SequenceName : SEQ ID NO 9
      SequenceDescription :

Sequence
-----
<213> OrganismName : artificial DNA
<400> PreSequenceString :
gatccaacca cgtttagctt tgctcagggt gacgtcgatc 40
<212> Type : DNA
<211> Length : 40
      SequenceName : SEQ ID NO 10
      SequenceDescription :

Sequence
-----
<213> OrganismName : artificial DNA
<400> PreSequenceString :
ctgctaaaga agctgctgct aaagaagctg ctgctaaacc ggggtcggca cactac 56
<212> Type : DNA
<211> Length : 56
      SequenceName : SEQ ID NO 11
      SequenceDescription :

Sequence
-----
<213> OrganismName : artificial DNA
<400> PreSequenceString :
cagcttcctt agcagcagct tccttagcag cagcttcctt gctcaggttg acgtc 55
<212> Type : DNA
<211> Length : 55
      SequenceName : SEQ ID NO 12
      SequenceDescription :

Sequence
-----
<213> OrganismName : artificial DNA
<400> PreSequenceString :
gaagctgctg ctaaagaagc tgctgctaaa ccgggtgctg cacactacca tatg 54
<212> Type : DNA
<211> Length : 54
      SequenceName : SEQ ID NO 13

```


SequenceDescription :

Sequence

```

-----
<213> OrganismName : artificial DNA
<400> PreSequenceString :
tttgctcagg ttgacgtcca tcgc                24
<212> Type : DNA
<211> Length : 24
SequenceName : SEQ ID NO 14
SequenceDescription :

```

Sequence

```

-----
<213> OrganismName : artificial DNA
<400> PreSequenceString :
ttagcagca gcttctttgc tcaggttgac gtc       33
<212> Type : DNA
<211> Length : 33
SequenceName : SEQ ID NO 15
SequenceDescription :

```

Sequence

```

-----
<213> OrganismName : artificial DNA
<400> PreSequenceString :
ttagcagca gcttcttag cagcagcttc ttgctcagg tgacgtc 47
<212> Type : DNA
<211> Length : 47
SequenceName : SEQ ID NO 16
SequenceDescription :

```

Sequence

```

-----
<213> OrganismName : artificial DNA
<400> PreSequenceString :
gtagtgtgcc gcaccggca tatgttagc agcagcttc   39
<212> Type : DNA
<211> Length : 39
SequenceName : SEQ ID NO 17
SequenceDescription :

```

Sequence

```

-----
<213> OrganismName : artificial DNA
<400> PreSequenceString :
ggaattccat atgtacaatt tgccaaac           28
<212> Type : DNA
<211> Length : 28
SequenceName : SEQ ID NO 18
SequenceDescription :

```

Sequence

```

-----
<213> OrganismName : artificial DNA
<400> PreSequenceString :
gcgatcgacg tcaacctgct cgaggaagct gctgct   36
<212> Type : DNA
<211> Length : 36
SequenceName : SEQ ID NO 19
SequenceDescription :

```

Sequence

```

-----
<213> OrganismName : artificial DNA
<400> PreSequenceString :
cgattcgaca tactcgagag cattcgctg ttgcga   36
<212> Type : DNA
<211> Length : 36
SequenceName : SEQ ID NO 20
SequenceDescription :

```

七、申請專利範圍：

1. 一種用來產生一融合蛋白質的載體，包含：
一啟動子；

一第一多核苷酸，其係可操作地與該啟動子相連並可編碼產生一幾丁質結合蛋白質(CBP)；

一第二多核苷酸，其係可操作地與該第一多核苷酸相連並可編碼產生一連接子，該連接子是一胜肽並具有一選自以下之氨基酸序列：序列編號：1、序列編號：2、序列編號：3 或序列編號：4，且此胜肽能在不需使用蛋白酶的情況下自我斷裂；以及

一第三多核苷酸，其係可操作地與該第二多核苷酸相連且可編碼產生一標的蛋白質。

2. 如請求項 1 所述之載體，其中該標的蛋白質為酵素、儲存蛋白質、傳送蛋白質、結構蛋白質、免疫球蛋白、血液蛋白、結合用蛋白質、荷爾蒙、合成蛋白質或胜肽。

3. 如請求項 2 所述之載體，其中該酵素為幾丁質酶、幾丁聚糖酶或破壞以產生五聚糖之 $-\beta-1,3-$ 葡聚糖酶(laminaripentose-producing- $\beta-1,3$ -glucanase, LPHase)。

4. 一種產生一標的蛋白質的方法，包含：

(a) 以如請求項 1 所述之載體來轉染一宿主細胞，使該宿主細胞表現該融合蛋白質；

(b) 裂解該宿主細胞以產生該融合蛋白質之一粗萃物，其中該粗萃物之 pH 值至少大於 8；

(c) 使該粗萃物通過一幾丁質基質；及

(d) 以一第一緩衝液來浸潤並清洗該幾丁質基質，透過不使用蛋白酶且該連接子自我斷裂的方式而純化出該標的蛋白質，其中該第一緩衝液具有一第一 pH 值，介於約 5.5 至 7.5 間。

5. 如請求項 4 所述之方法，更包含步驟(c1)，此步驟(c1)是在步驟(c)之後及步驟(d)之前實施：

(c1) 以一第二緩衝液來清洗該幾丁質基質，該第二緩衝液具有一第二 pH 值，介於約 3 至 4 間。

6. 如請求項 5 所述之方法，其中該第二 pH 值約為 3.6。

7. 如請求項 4 所述之方法，其中該第一 pH 值約在 6 至 7 之間。

8. 如請求項 7 所述之方法，其中該第一 pH 值約為 6。

9. 如請求項 4 所述之方法，其中該宿主細胞包含大腸桿菌細胞。

10. 如請求項 4 所述之方法，其中該幾丁質基質包含 β -幾丁質。

11. 如請求項 10 所述之方法，其中該 β -幾丁質是以烏賊軟骨製成。

12. 一種用於產生一純化之標的蛋白質的方法，包含：

如請求項 1 所述之載體；

一宿主細胞，用來表現由該載體所編碼產生的融合蛋白質；及

一幾丁質基質，其可透過使用如請求項 4 所述之方法而純化出該標的蛋白質；

其中該幾丁質基質可以一種 pH 值在約 3 至約 4 之間的緩衝溶液而再生。

13. 如請求項 12 所述之方法，其中該宿主細胞包含大腸桿菌細胞。

14. 一種純化一標的蛋白質的套組，包含：

如請求項 1 所述之載體；

一宿主細胞，用來表現由該載體所編碼產生的融合蛋白質；

一幾丁質基質，用來與該融合蛋白質結合；

一緩衝溶液，其 pH 值在約 5.5 至約 7.5 間，用來從該幾丁質基質中將該標的蛋白質洗脫出來；以及

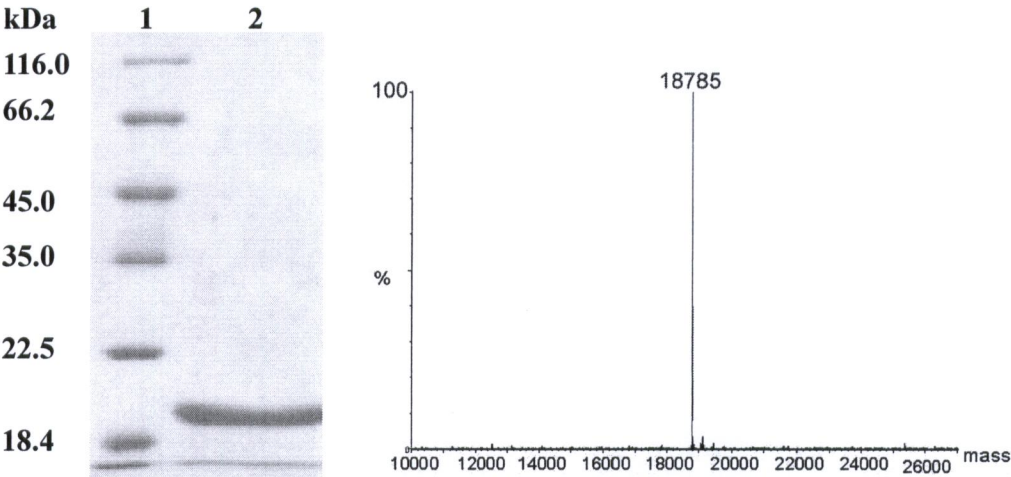
如何使用該套組之說明。

15. 如請求項 14 所述之套組，其中該宿主細胞包含大腸桿菌細胞。

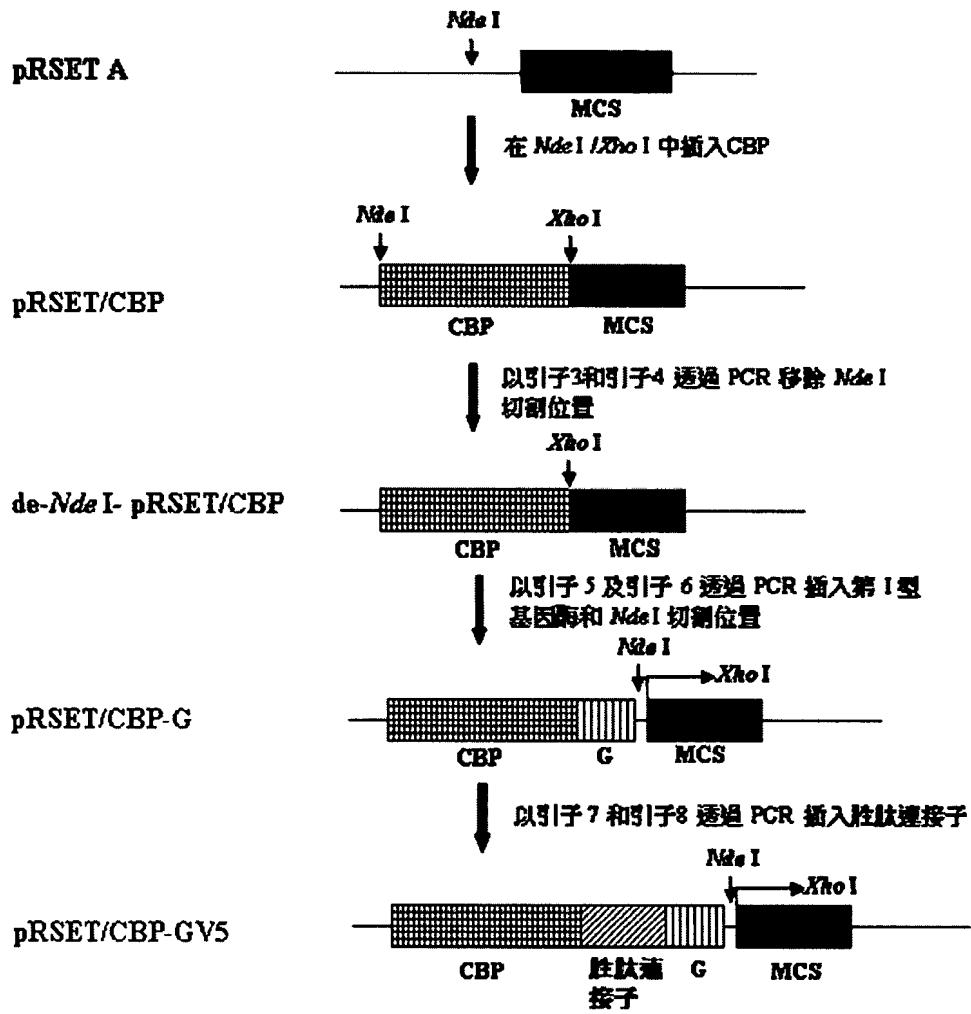
16. 如請求項 14 所述之套組，其中該緩衝溶液是一種磷酸緩衝液。

17. 如請求項 14 所述之套組，其中該幾丁質基質包含 β -幾丁質。

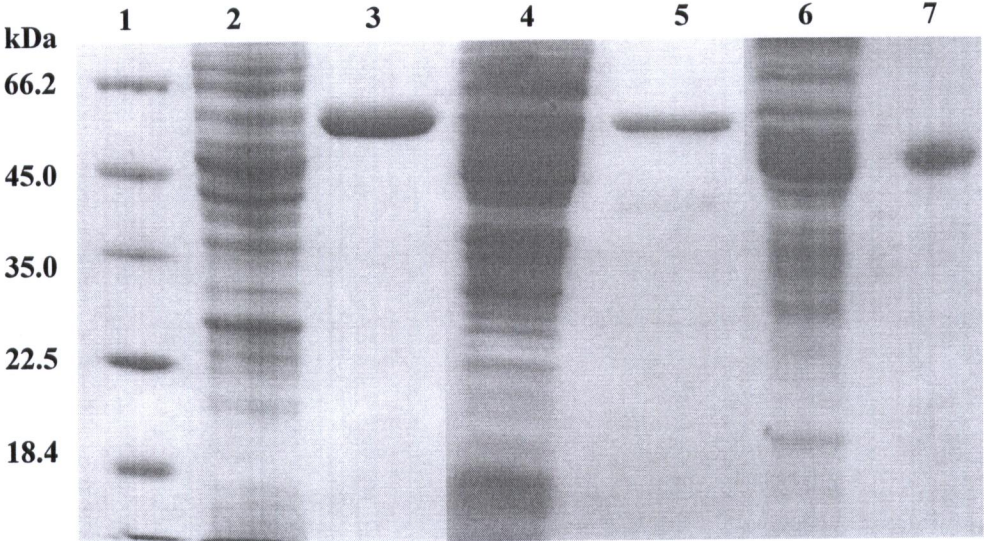
18. 如請求項 17 所述之套組，其中該 β -幾丁質是以烏賊軟骨製成。



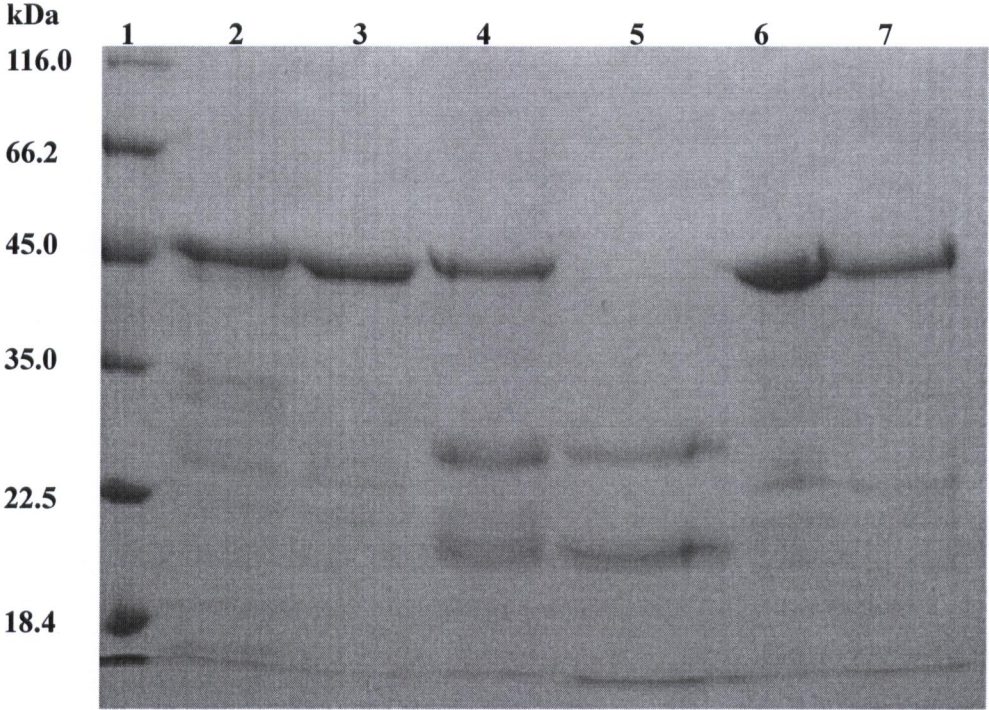
第 1 圖



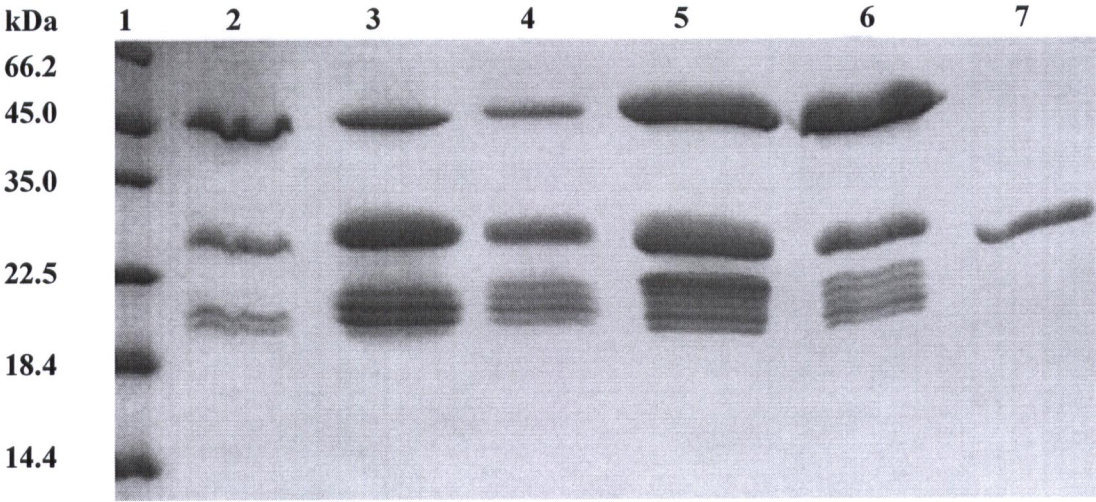
第 2 圖



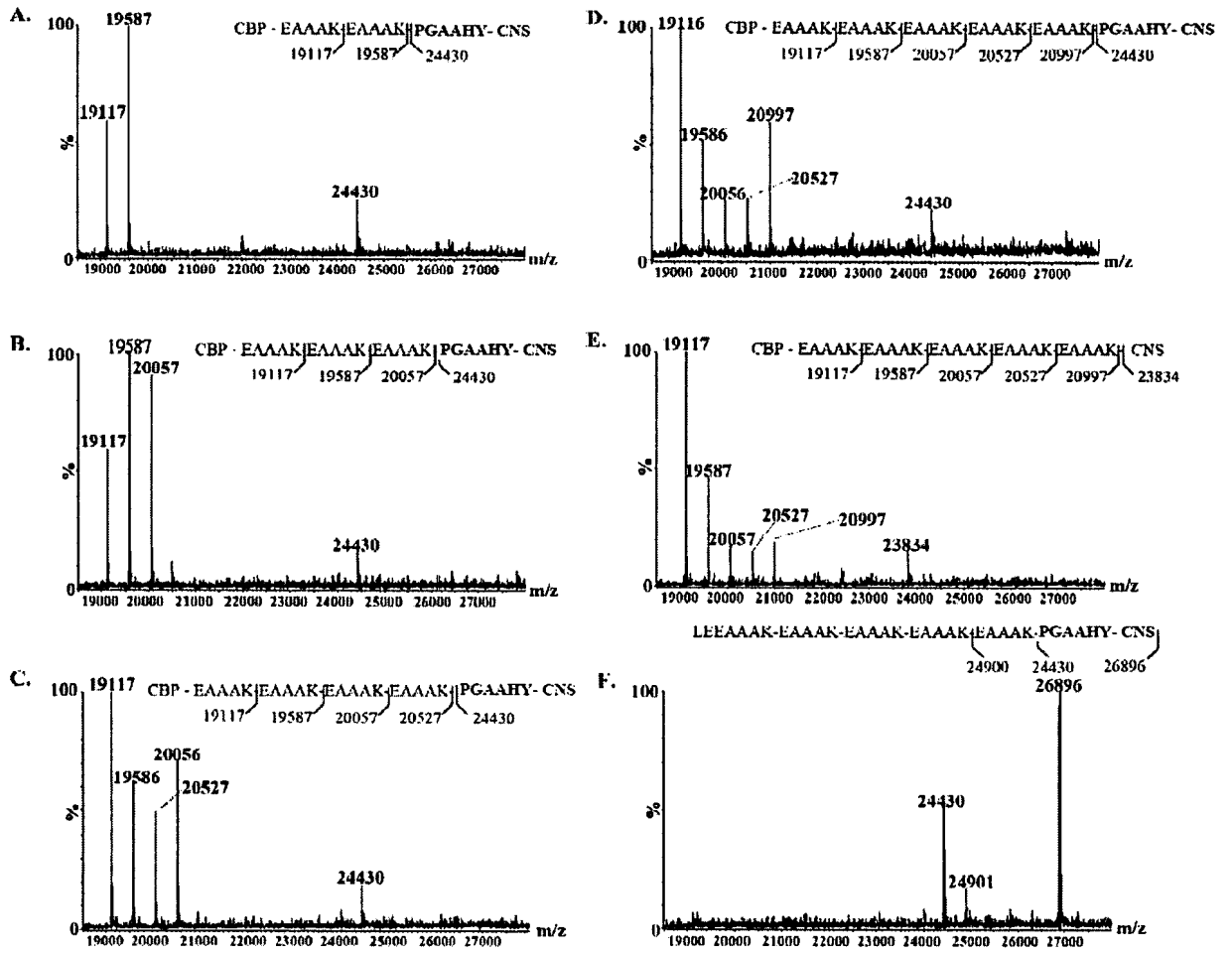
第 3 圖



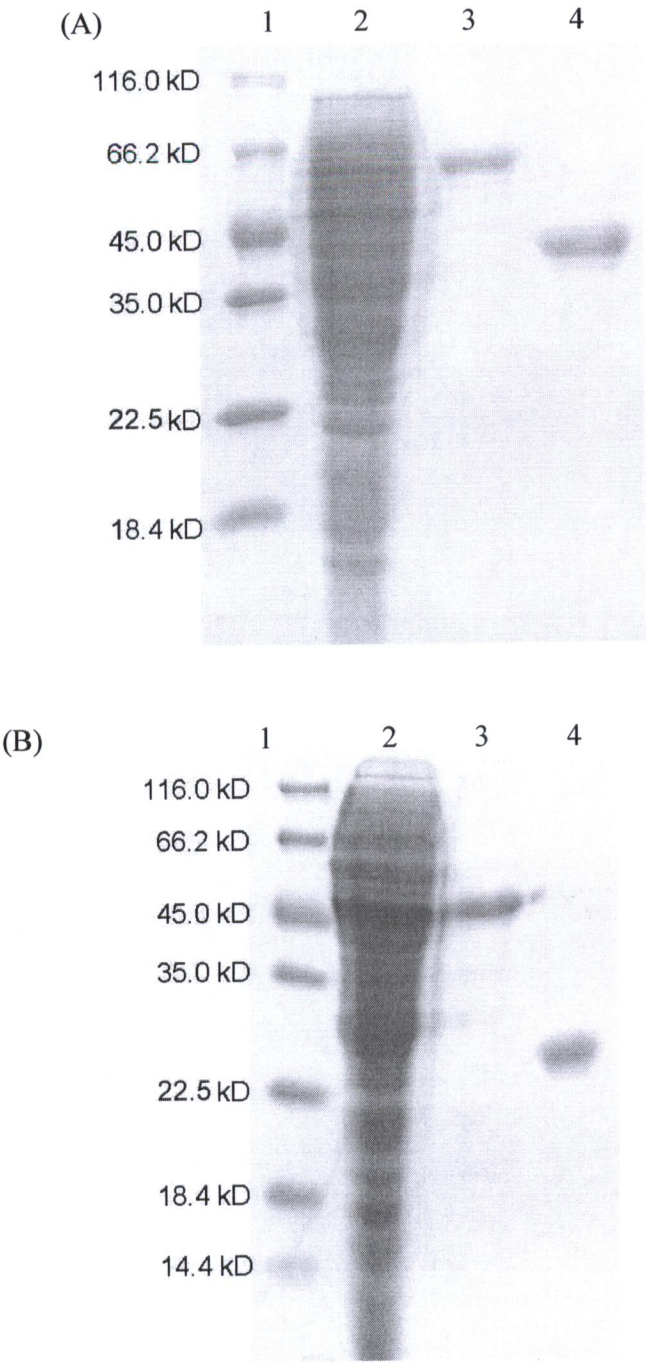
第 4 圖



第 5 圖



第 6 圖



第 7 圖