



(21) 申請案號：104107616

(22) 申請日：中華民國 104 (2015) 年 03 月 10 日

(51) Int. Cl. : C12Q1/00 (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)；張家瑜 CHANG, CHIAYU (TW)；李博仁 LI, BORRAN (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：10 項 圖式數：4 共 23 頁

(54) 名稱

生物感測裝置及分離生物分子的方法

BIOLOGICAL SENSING DEVICE AND METHOD FOR SEPARATING BIOMOLECULE

(57) 摘要

本發明提供一種生物感測裝置及分離生物分子的方法。生物感測裝置包含胺基酸序列以及信號產生元件。胺基酸序列包含 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 2 所示之序列，係用以與標記於生物分子上之 UlaG 蛋白鍵結。信號產生元件係與胺基酸序列連接。

A biological sensing device and a method for separating a biomolecule are provided. The biological sensing device includes an amino acid sequence and a signal-producing unit. The amino acid sequence includes SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 2, and is for binding with UlaG protein labeled on a biomolecule. The signal-producing unit connects to the amino acid sequence.

指定代表圖：

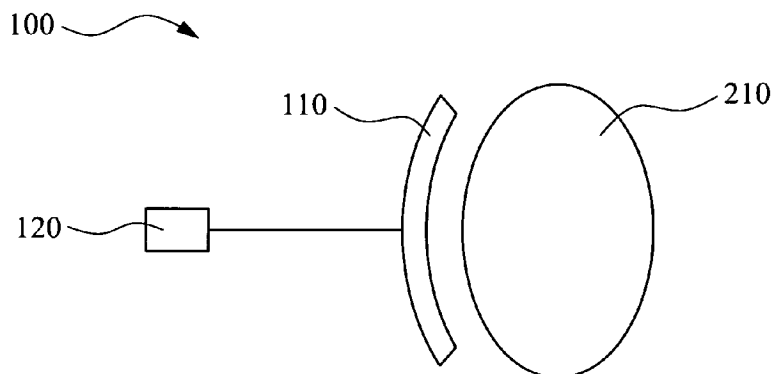
符號簡單說明：

100 . . . 生物感測裝置

110 . . . 胺基酸序列

120 . . . 信號產生元件

210 . . . UlaG 蛋白



第 1 圖

## 【發明摘要】

C12Q 1/00 (2006.01)

104107616  
104.3.10

【中文發明名稱】生物感測裝置及分離生物分子的方法

【英文發明名稱】BIOLOGICAL SENSING DEVICE  
AND METHOD FOR SEPARATING BIOMOLECULE

## 【中文】

本發明提供一種生物感測裝置及分離生物分子的方法。生物感測裝置包含胺基酸序列以及信號產生元件。胺基酸序列包含 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 2 所示之序列，係用以與標記於生物分子上之 UlaG 蛋白鍵結。信號產生元件係與胺基酸序列連接。

## 【英文】

A biological sensing device and a method for separating a biomolecule are provided. The biological sensing device includes an amino acid sequence and a signal-producing unit. The amino acid sequence includes SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 2, and is for binding with UlaG protein labeled on a biomolecule. The signal-producing unit connects to the amino acid sequence.

【指定代表圖】第1圖

【代表圖之符號簡單說明】

100：生物感測裝置

110：胺基酸序列

120：信號產生元件

210：UlaG蛋白

**【特徵化學式】**

無

## 【發明說明書】

【中文發明名稱】生物感測裝置及分離生物分子的方法

【英文發明名稱】BIOLOGICAL SENSING DEVICE  
AND METHOD FOR SEPARATING BIOMOLECULE

### 【技術領域】

【0001】 本發明是有關於一種生物感測裝置及分離生物分子的方法，特別是有關於一種利用胺基酸序列之生物感測裝置及分離生物分子的方法。

### 【先前技術】

【0002】 生物感測技術是以測定生物或生物性材料對外來物的刺激之反應，其應用範圍廣泛，可促進醫藥、生醫檢測、環境工程、食品分析與生物技術等領域的發展。目前習知常用的生物感測技術大多使用不確定性高的多株抗體，抑或價格昂貴的單株抗體用以檢測所欲分析之樣品，且檢測結果大多靈敏度不佳，容易造成誤判。

【0003】 有鑑於此，目前需要一種生物感測裝置及分離生物分子的方法，其具有快速、精確、成本低廉等優點。

### 【發明內容】

【0004】 本發明之一態樣係提供一種生物感測裝置及分離生物分子的方法。生物感測裝置包含胺基酸序列以及信號產生元件。胺基酸序列包含SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO:

2所示之序列，係用以與標記於生物分子上之U1aG蛋白鍵結。信號產生元件係與胺基酸序列連接。

**【0005】** 在本發明之一實施方式中，生物分子係蛋白質、細胞、菌體或其組合。

**【0006】** 在本發明之一實施方式中，生物分子係革蘭氏陽性菌。

**【0007】** 在本發明之一實施方式中，革蘭氏陽性菌係鏈球菌。

**【0008】** 在本發明之一實施方式中，鏈球菌係肺炎鏈球菌。

**【0009】** 在本發明之一實施方式中，信號產生元件係電晶體、螢光分子或晶片。

**【0010】** 本發明之另一態樣係提供一種分離生物分子的方法，包含提供樣品，樣品包含具有U1aG蛋白之生物分子。然後，將樣品與包含SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 2所示序列之胺基酸序列接觸。胺基酸序列與該U1aG蛋白鍵結。接著，移除樣品中未與胺基酸序列鍵結之部分，以將生物分子自樣品中分離。

**【0011】** 在本發明之一實施方式中，分離生物分子的方法更包含將U1aG蛋白修飾於生物分子上。

**【0012】** 在本發明之一實施方式中，分離生物分子的方法更包含將樣品修飾於基板上。

**【0013】** 在本發明之一實施方式中，分離生物分子的方法更包含將胺基酸序列與信號產生元件連接。

**【0014】** 本發明之生物感測裝置以及分離生物分子的方法係利用胺基酸序列與U1aG蛋白的高度親和作用，藉以篩選出具有U1aG蛋白標記之生物分子。本發明之目的係提供一種快速、精確且成本低廉之生物感測裝置以及分離生物分子的方法。

### **【圖式簡單說明】**

**【0015】** 為使本發明之特徵、優點與實施例能更明顯易懂，所附圖式之說明如下：

第1圖係繪示本發明一實施方式之生物感測裝置與U1aG蛋白鍵結的示意圖。

第2圖係繪示本發明一實施例之生物感測裝置偵測生物分子的示意圖。

第3圖係繪示本發明一實施例進行偵測實驗的電位差-菌液濃度關係圖。

第4圖係繪示比較例進行偵測實驗的電位差-菌液濃度關係圖。

### **【實施方式】**

**【0016】** 為了使本揭示內容的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；但這並非實施或運用本發明具體實施例的唯一形式。以下所揭露的各實施例，在有益的情形下可相互組合或取代，也可在一實施例中附加其他的實施例，而無須進一步的記載或說明。在以下描述中，將詳細敘述許多特定細節以使讀者能夠充分理解以下

的實施例。然而，可在無此等特定細節之情況下實踐本發明之實施例。

**【0017】** 請參照第1圖，其係繪示本發明一實施方式之生物感測裝置100與UlaG蛋白210鍵結的示意圖。生物感測裝置100包含胺基酸序列110以及信號產生元件120。UlaG蛋白210係標記於生物分子(未繪示)上。胺基酸序列110包含SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 2所示之序列，係用以與標記於生物分子上之UlaG蛋白210鍵結。信號產生元件120係與胺基酸序列110連接。

**【0018】** UlaG 蛋白 210 (L-ascorbate-6-phosphate lactonase)係一種細胞壁蛋白質，常見於鏈球菌菌體表面。胺基酸序列110對UlaG蛋白210具有高度結合能力，故生物感測裝置100藉由此鍵結關係可辨識出含有UlaG蛋白210之生物分子。

**【0019】** 生物分子可為任何所欲偵測之物質。在本發明之一實施方式中，生物分子係蛋白質、細胞、菌體或其組合。在本發明之另一實施方式中，生物分子係革蘭氏陽性菌。革蘭氏陽性菌可為鏈球菌。在本發明之一實施方式中，鏈球菌係肺炎鏈球菌。

**【0020】** 在本發明之一實施方式中，UlaG蛋白210係生物分子之表面蛋白。在本發明之另一實施方式中，UlaG蛋白210係透過修飾而標記於生物分子上。生物感測裝置100係藉由胺基酸序列110與UlaG蛋白210鍵結，以辨識出生物分子。另，藉由胺基酸序列110與UlaG蛋白210鍵結之後，

信號產生元件120所產生之信號，可分析生物分子的含量。舉例而言，藉由測量胺基酸序列110與U1aG蛋白210鍵結前後，信號產生元件120所產生之信號的差異，可判斷標記有U1aG蛋白210之生物分子的含量。

**【0021】** 胺基酸序列110係作為U1aG蛋白210之辨識分子使用，其為包含7個胺基酸之短序列，故容易以化學合成方式大量取得，且以低純化成本僅可取得高純度之標的蛋白。

**【0022】** 胺基酸序列110與U1aG蛋白210之鍵結會使信號產生元件120產生信號。信號產生元件120可為電晶體、螢光分子或晶片，而信號產生元件120產生之信號可為色度信號、螢光信號或電子信號。

**【0023】** 在本發明之一實施方式中，生物感測裝置更包含固定元件，藉以將胺基酸序列與信號產生元件連接。固定元件可為His-tag、二價離子、NCS-NTA (Isothiocyanate nitrilotriacetic acid)、3-氨基丙基-三甲氧基硅烷 ((3-Aminopropyl) trimethoxysilane, APTMS) 或其組合。

**【0024】** 本發明之生物感測裝置100係藉由U1aG蛋白210標記生物分子，並透過胺基酸序列110與U1aG蛋白210鍵結，進而分離出生物分子。當分離出生物分子之後，由於胺基酸序列110與U1aG蛋白210之鍵結，信號產生元件120會產生信號，故可藉由產生之信號判斷生物分子的含量。本發明之生物感測裝置可以與現有的各種檢測方法(例如：螢



光染色、石英微天平、場效應電晶體等)結合，並可應用於臨床檢驗、居家照顧等相關之生醫產業。

**【0025】** 本發明之另一態樣係提供一種分離生物分子的方法，包含提供樣品，且樣品包含具有U1aG蛋白之生物分子。然後，將樣品與包含SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 2所示序列之胺基酸序列接觸。胺基酸序列與該U1aG蛋白鍵結。接著，移除樣品中未與胺基酸序列鍵結之部分，以將生物分子自樣品中分離。

**【0026】** 在本發明之一實施方式中，U1aG蛋白係生物分子之表面蛋白。在本發明之另一實施方式中，分離生物分子的方法更包含將U1aG蛋白修飾於所欲偵測之生物分子上，藉由與胺基酸序列接觸以分離出生物分子，進而可分析樣品中生物分子的含量。

**【0027】** 在本發明之一實施方式中，分離生物分子的方法包含於樣品與胺基酸序列接觸前，將樣品修飾於基板上。在此實施方式中，分離生物分子的方法係將胺基酸序列與含有樣品之基板接觸，使胺基酸序列與樣品中之生物分子的U1aG蛋白反應並鍵結，進而分離出含有U1aG蛋白之生物分子。基板可為一般生物感測器常用之基板，例如：矽基板、玻璃基板、金屬基板等。在此實施方式中，胺基酸序列可與信號產生元件連接，其中信號產生元件可為螢光分子。

**【0028】** 在本發明之一實施方式中，分離生物分子的方法包含於樣品與胺基酸序列接觸前，將胺基酸序列修飾於基板上。在此實施方式中，分離生物分子的方法係將樣品與含有

胺基酸序列之基板接觸，使樣品中之生物分子的U1aG蛋白與胺基酸序列反應並鍵結，進而分離出含有U1aG蛋白之生物分子。基板可為信號產生元件，例如：場效應電晶體 (field-effect transistor)。

【0029】 在本發明之一實施方式中，分離生物分子的方法包含於樣品與胺基酸序列接觸前，將胺基酸序列與信號產生元件連接。當移除樣品中未與胺基酸序列鍵結之部分以分離出生物分子之後，由於胺基酸序列與U1aG蛋白之間的鍵結，信號產生元件會產生並發出信號，藉由信號以偵測樣品中具有U1aG蛋白之生物分子及其含量。胺基酸序列與信號產生元件之間的連接可透過固定元件，以固定胺基酸序列與信號產生元件。固定元件可為His-tag、二價離子、NCS-NTA (Isothiocyanate nitrilotriacetic acid)、3-氨基丙基-三甲氧基硅烷 ((3-Aminopropyl) trimethoxysilane, APTMS)或其組合。

【0030】 本發明之分離生物分子的方法係藉由U1aG蛋白標記樣品中之生物分子，並透過胺基酸序列與U1aG蛋白鍵結，自樣品中分離出含有U1aG蛋白並與胺基酸序列鍵結之生物分子，進而偵測樣品中之生物分子及其含量。生物分子之含量可藉由與胺基酸序列連接之信號產生元件所產生的信號判斷。本發明之分離生物分子的方法可以與現有的各種檢測方法結合，並可應用於臨床檢驗、居家照顧等相關之生醫產業。

**【0031】** 以下列舉數個實施例以更詳盡闡述本發明之方法，然其僅為例示說明之用，並非用以限定本發明，本發明之保護範圍當以後附之申請專利範圍所界定者為準。

**【0032】 胺基酸序列的篩選方法**

**【0033】** 本發明一實施方式之胺基酸序列的篩選方法包含以下步驟：

1. 將U1aG蛋白以大腸桿菌(*Escherichia coli*)進行蛋白大量表現。
2. 步驟1之U1aG蛋白經純化後，修飾於酵素分析盤(ELISA plate)中。
3. 以嗜菌體展現胜肽系統(Phage display peptide system)進行篩選。嗜菌體展現胜肽系統係將帶有多種胜肽片段之噬菌體與U1aG蛋白接觸，透過反覆結合、清洗、洗提、放大、再結合的過程，篩選出能與U1aG蛋白鍵結之噬菌體。
4. 將步驟3篩選出之噬菌體透過聚合酵素連鎖反應(Polymerase Chain Reaction)放大並定序，即可獲得能與U1aG蛋白鍵結之胺基酸序列。

**【0034】** 運用此篩選方法技術，篩選出SEQ ID NO: 1與SEQ ID NO: 2所示之序列皆可以與U1aG蛋白鍵結，且序列與U1aG蛋白之間具有高度結合能力，故包含SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 2所示序列之胺基酸序列可用來作為U1aG蛋白之辨識使用。

**【0035】 肺炎鏈球菌的偵測**

**【0036】** 肺炎鏈球菌(*Streptococcus pneumonia*)是造成細菌性肺炎(Sepsis)的主要原因。每年在全球有超過四億人感染，並造成超過一百萬人死亡，而其中絕大多數是兒童。因此，建立一個快速偵測肺炎鏈球菌的技術，將有助於肺炎鏈球菌的快速篩選與後續治療，並能拯救數以百萬的病患。然而，目前常用於檢測肺炎鏈球菌之技術，大多靈敏度不佳，容易造成誤診，或是需要數天的時間進行細菌培養。舉例而言，連鎖聚合反應(polymerase chain reaction, PCR)技術是利用特定的引子(primer)序列對檢體進行連鎖聚合反應，以放大特定的DNA序列，藉以判斷檢體中是否含有肺炎鏈球菌相關之序列，進而判斷受試者是否感染肺炎鏈球菌。優點為檢測快速，而缺點為靈敏度非屬上乘。此外，目前商品化之篩檢套組(BinaxNOW<sup>®</sup>)係一種尿液抗原檢測技術，其利用免疫色層膜分析法，檢測尿液中是否含有肺炎鏈球菌之可溶性抗原(pneumococcal antigen)，藉以判斷受試者是否感染肺炎鏈球菌。優點為快速判讀，而缺點為肺炎鏈球菌之尿液抗原可以維持一個月，因而容易造成誤診。因此，目前不論是否確認感染肺炎鏈球菌，臨床上多以抗生素直接逕行治療。此種非確診式的投藥，往往造成醫療資源的浪費、損害病人身體健康以及增加產生多重抗藥性細菌的風險。

**【0037】** UlaG蛋白會於肺炎鏈球菌之細胞壁表現。本實驗例係使用本發明之生物感測裝置偵測樣品中是否含有肺炎鏈球菌，偵測方法包含以下步驟：

1. 將包含SEQ ID NO: 1所示序列之胺基酸序列以大腸桿菌(*Escherichia coli*)進行大量表現。
2. 步驟1之胺基酸序列經純化後，修飾於場效應電晶體之表面上。
3. 將不同濃度之肺炎鏈球菌菌液與步驟2之經胺基酸序列修飾之場效應電晶體接觸，並偵測場效應電晶體表面電位的變化。本實驗例所使用之肺炎鏈球菌菌株為ATCC 49136。

【0038】 本實驗例所用之生物感測裝置請參照第2圖。第2圖係繪示本發明一實施方式之生物感測裝置300偵測生物分子400的示意圖。生物感測裝置300包含胺基酸序列310、信號產生元件320以及固定元件330。UlaG蛋白410係標記於生物分子400上。胺基酸序列310包含SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 2所示之序列，係用以與標記於生物分子400上之UlaG蛋白410鍵結。信號產生元件320與胺基酸序列320係透過固定元件330連接。固定元件330包含His-tag 332、二價離子334、NCS-NTA 336以及APTMS 338。在此實施方式中，生物分子400係肺炎鏈球菌，信號產生元件320係場效應電晶體，且二價離子334係鎳離子( $\text{Ni}^{2+}$ )。His-tag 332與二價離子334具有高度親合力，而二價離子334與NCS-NTA 336螯合，且NCS-NTA 336與APTMS 338共價鍵結以固定在信號產生元件320上。藉由His-tag 332、鎳離子334、NCS-NTA 336以及APTMS 338之間的連接關係，將胺基酸序列310固定於信號產生元件320上。

【0039】 請參照第3圖，其係繪示本發明一實施例進行偵測實驗的電位差-菌液濃度關係圖，其中菌液濃度係以每毫升(mL)菌液中之菌落數表示。由第3圖之結果可知，隨著菌液濃度增加，電位差亦隨之增加，故本實施例之生物感測裝置對肺炎鏈球菌的濃度具有正相關的表面電位變化。藉由此一表面電位變化，可用以偵測肺炎鏈球菌。

【0040】 本實驗例另以口腔鏈球菌 (*Streptococcus mutans*) 做為比較例，以上述之生物感測裝置300及偵測方法，將不同濃度之口腔鏈球菌菌液與經胺基酸序列修飾之場效應電晶體接觸，並偵測場效應電晶體表面電位的變化。

【0041】 請參照第4圖，其係繪示比較例進行偵測實驗的電位差-菌液濃度關係圖，其中菌液濃度係以每毫升菌液中之菌落數表示。由第4圖之結果可知，比較例之電位差並未隨著菌液濃度增加而產生相對應之變化，代表本實施例之生物感測裝置中的胺基酸序列不會與口腔鏈球菌反應。雖然口腔鏈球菌菌體表面亦具有U1aG蛋白，然而口腔鏈球菌菌體表面之U1aG蛋白並不會表現，故無法被本發明之生物感測裝置的胺基酸序列所辨識與鍵結。

【0042】 根據第3圖及第4圖的結果可知，本實施例之生物感測裝置300的胺基酸序列310可有效地分離出並偵測表現U1aG蛋白410之肺炎鏈球菌(生物分子400)，且不與未表現U1aG蛋白之口腔鏈球菌反應。藉由胺基酸序列310與U1aG蛋白410鍵結所產生的電位變化，可以用來對肺炎鏈球菌(生物分子400)進行快速檢測。本發明之生物感測裝置利用與U1aG蛋

白具有高度結合能力之胺基酸序列，藉以偵測菌體表面表現 U1aG 蛋白之肺炎鏈球菌。由此可知，本發明之生物感測裝置可以廉價且快速地進行肺炎鏈球菌的檢測及判讀，可作為各種肺炎鏈球菌之檢測平台。

**【0043】** 綜上所述，本發明之生物感測裝置以及分離生物分子的方法係利用胺基酸序列與 U1aG 蛋白之間的高度親和作用，藉以篩選出具有 U1aG 蛋白標記之生物分子。本發明之生物感測裝置以及分離生物分子的方法可以用來結合現有的各種檢測方法(例如：螢光染色、石英微天平、場效應電晶體等)，開創一個新的檢測平台。本發明之生物感測裝置以及分離生物分子的方法不需使用不確定性高的多株抗體，抑或價格昂貴的單株抗體，具有快速、精確、成本低廉等優點，可以用以建立供臨床檢驗使用之高靈敏度、高選擇性的生物感測系統。

**【0044】** 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。

#### **【符號說明】**

##### **【0045】**

100、300：生物感測裝置

110、310：胺基酸序列

120、320：信號產生元件

210、410：UlaG蛋白

330：固定裝置

332：His-tag

334：二價離子

336：NCS-NTA

338：APTMS

400：生物分子



【序列表】

< 110 > 國立交通大學

< 120 > 生物感測裝置及分離生物分子的方法

< 160 > 2

< 210 > SEQ ID NO: 1

< 211 > 7

< 212 > PRT

< 213 > 人工序列

< 220 >

< 223 > 與U1aG蛋白鍵結之序列

< 400 > 1

Glu Asn Ile Met Pro Val Leu

1

5

< 210 > SEQ ID NO: 2

< 211 > 7

< 212 > PRT

< 213 > 人工序列

< 220 >

< 223 > 與UlaG蛋白鍵結之序列

< 400 > 2

Glu Arg Ile Met Pro Val Leu

1

5

## 【發明申請專利範圍】

【第 1 項】一種生物感測裝置，包含：

一胺基酸序列，包含 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 2 所示之序列，用以與標記於一生物分子上之一 U1aG 蛋白鍵結；以及

一信號產生元件，與該胺基酸序列連接。

【第 2 項】如申請專利範圍第 1 項所述之生物感測裝置，其中該生物分子係蛋白質、細胞、菌體或其組合。

【第 3 項】如申請專利範圍第 1 項所述之生物感測裝置，其中該生物分子係革蘭氏陽性菌。

【第 4 項】如申請專利範圍第 3 項所述之生物感測裝置，其中該革蘭氏陽性菌係鏈球菌。

【第 5 項】如申請專利範圍第 4 項所述之生物感測裝置，其中該鏈球菌係肺炎鏈球菌。

【第 6 項】如申請專利範圍第 1 項所述之生物感測裝置，其中該信號產生元件係電晶體、螢光分子或晶片。

【第 7 項】一種分離生物分子的方法，包含：

提供一樣品，該樣品包含一具有 U1aG 蛋白之生物分子；

將該樣品與一包含 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 2 所示序列之胺基酸序列接觸；

該胺基酸序列與該 U1aG 蛋白鍵結；以及

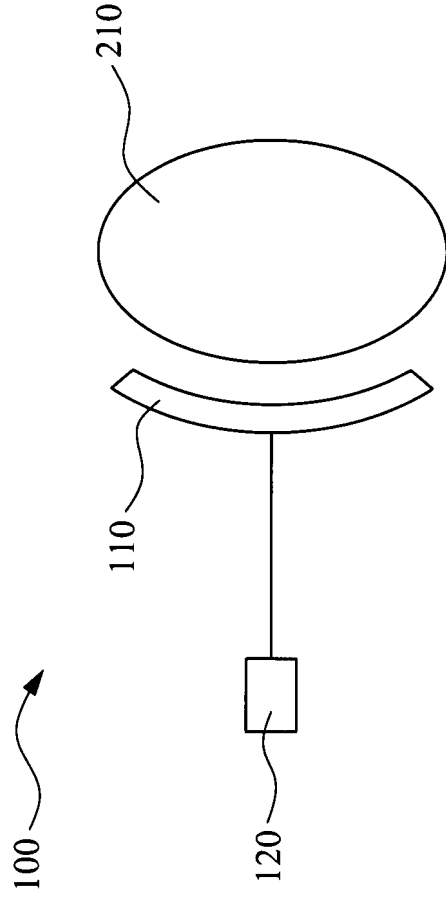
移除該樣品中未與該胺基酸序列鍵結之部分，以將該生物分子自該樣品中分離。

【第 8 項】如申請專利範圍第 7 項所述之方法，更包含將該 U1aG 蛋白修飾於該生物分子上。

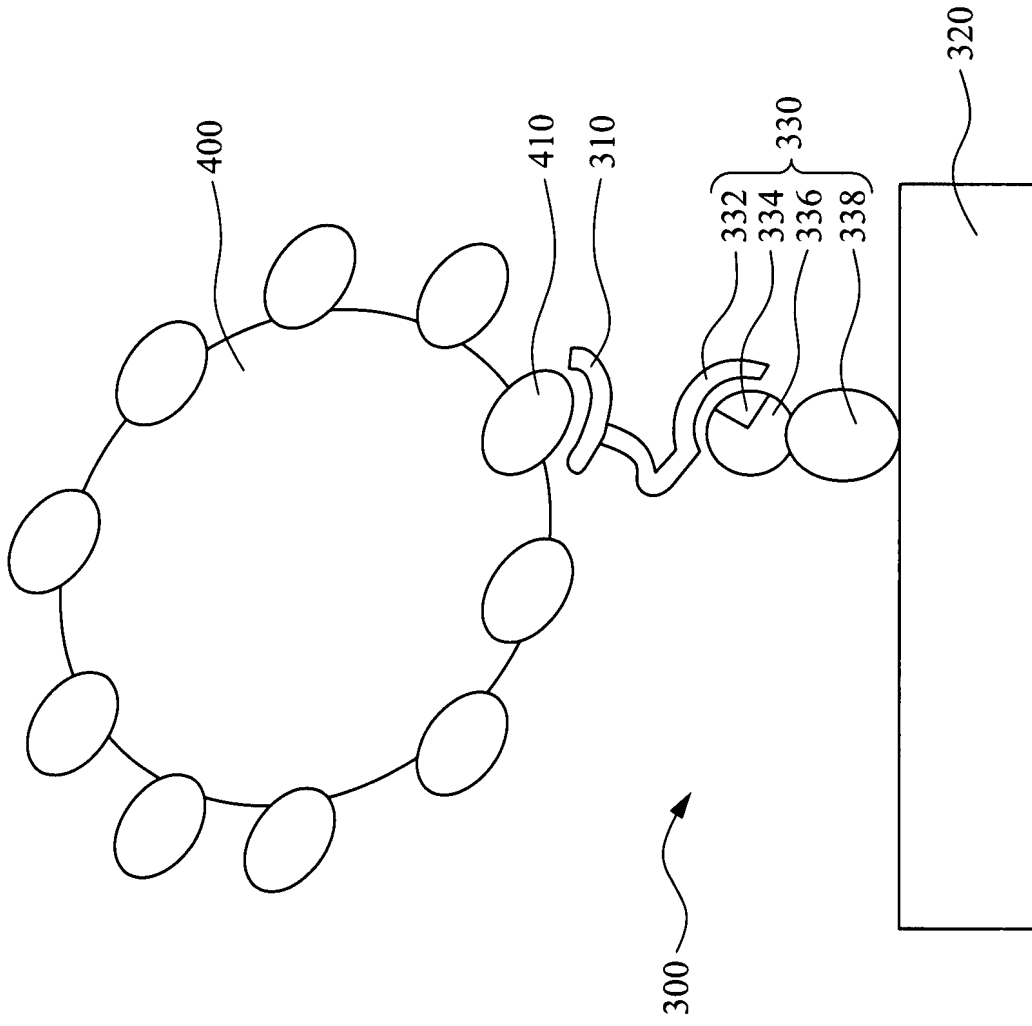
【第 9 項】如申請專利範圍第 7 項所述之方法，更包含將該樣品修飾於一基板上。

【第 10 項】如申請專利範圍第 7 項所述之方法，更包含將該胺基酸序列與一信號產生元件連接。

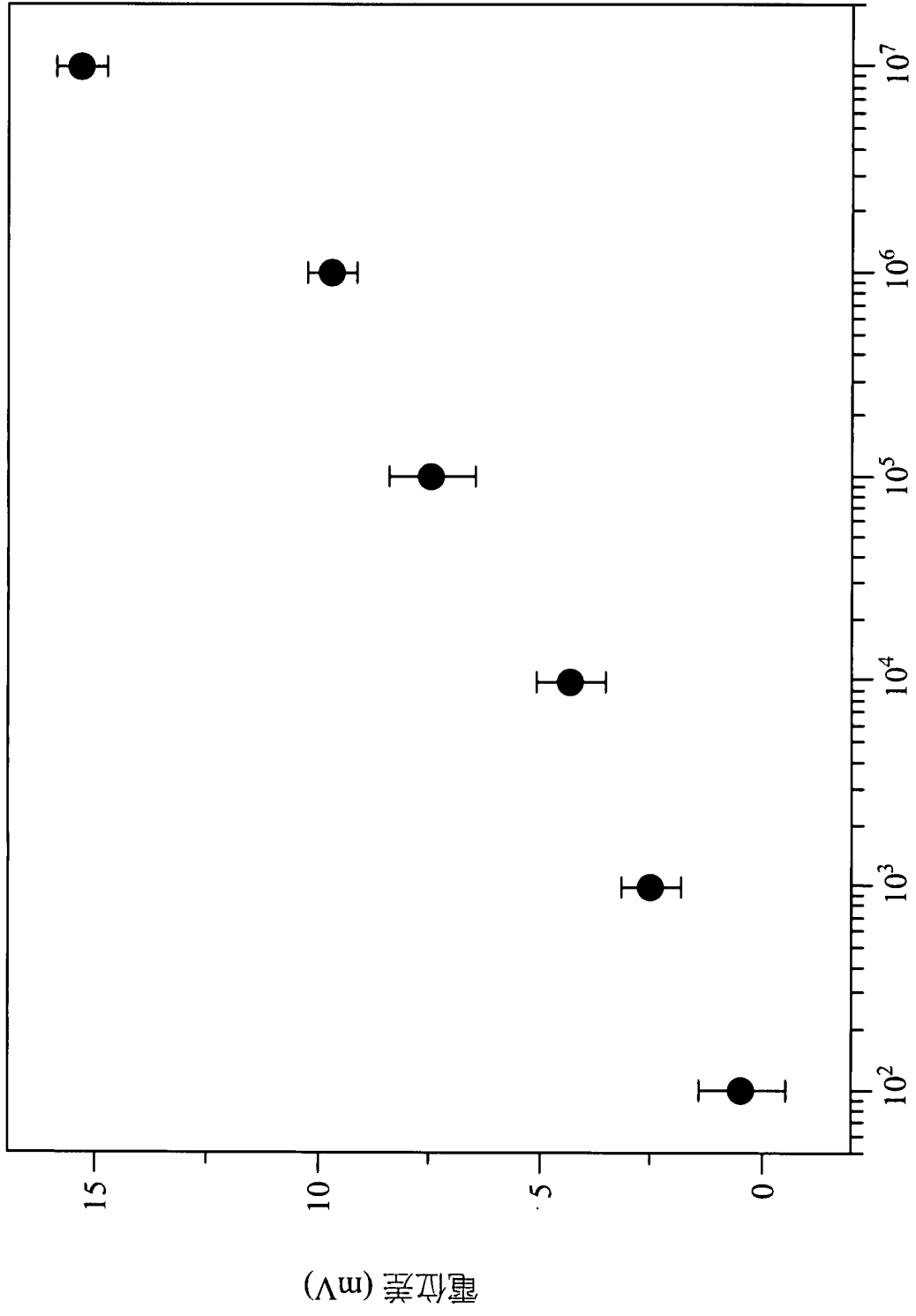
圖式



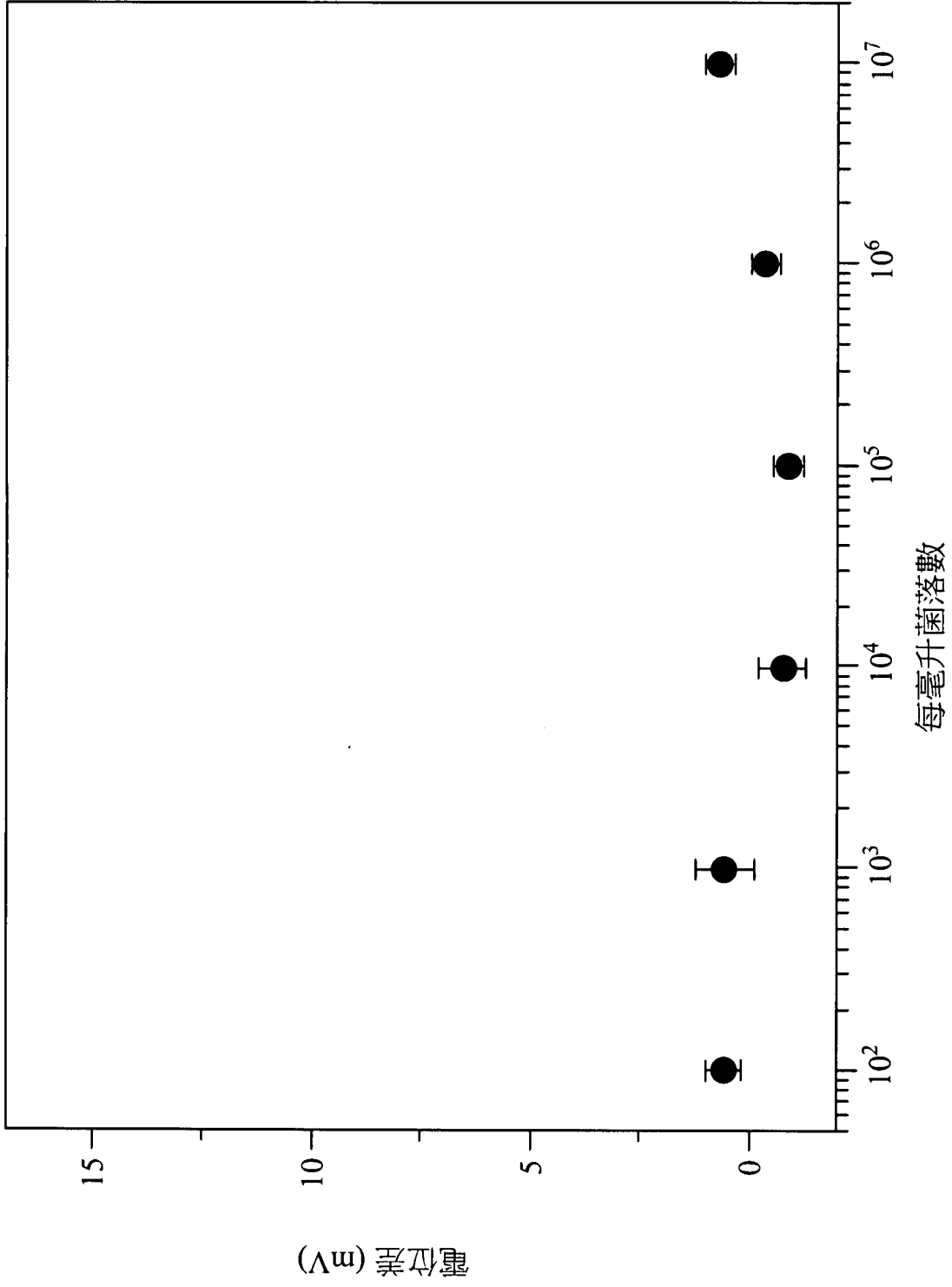
第 1 圖



第2圖



第3圖



第 4 圖