

發明專利說明書

※申請案號：094136100

※IPC 分類：

一、發明名稱：

基於油體之蛋白純化方法

OIL BODY-BASED PURIFICATION OF PROTEINS

二、中文發明摘要：

本發明關於一種製備蛋白質的方法。詳言之，本發明係關於一種製造蛋白質之方法，該方法藉表現有關蛋白質與結合油體蛋白質組成之雜合分子，純化該雜合分子，然後由雜合分子剩下部份分離目標蛋白質。此外，加入分離產物蛋白質之內含肽，可使純化步驟較快速便捷並能降低成本。

三、英文發明摘要：

The present invention provides a method of preparing proteins, and in particular, a process for producing proteins by expression of hybrid molecules composed of the protein of interest and an oil body-binding protein, purifying the hybrid molecules and then separating the protein of interest from the rest of the hybrid molecules. Furthermore, the self-splicing intein used in the hybrid molecule of the present invention facilitates the purification and lowers the cost.

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：

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】

[0001] 本發明係關於一種製造蛋白質之方法，該方法藉表現有關蛋白質與結合油體蛋白質組成雜合分子，純化該雜合分子，然後由雜合分子剩下部份分離目標蛋白質。

【先前技術】

[0002] 使用重組核酸系統進行蛋白質的表現與純化是一種有效且廣泛應用的技術。大體而言，蛋白質純化須經由多重步驟，其產製過程通常也較昂貴。

[0003] 純化方式如沉澱法、分子篩色層分析法(molecular sieve chromatography)、電泳、親合性色層分析法(affinity chromatography)和共價色層分析法(covalent chromatography)係已知技藝且已常用於細胞萃取物中純化蛋白質。此類純化方法經常表現目標蛋白質當作一種融合蛋白質或嵌合蛋白質。融合蛋白質技術經常用在蛋白質的純化過程中提供"標記"或"操作"。

[0004] 一般而言，這些系統表現的融合蛋白質包含一親合性標記，如穀胱甘肽S-轉移酶(glutathione S-transferase)、麥芽糖結合蛋白(maltose-binding protein)、纖維素結合域(cellulose-binding domain)、聚組胺酸(polyhistidine)、聚半胱胺酸蛋白A(polycysteine, protein A)及鏈黴親合素(streptavidin)，且以共價鍵結合於目標蛋白之N-端或C-端(Smith D.B. and Johnson K.S. 1998 Gene 67:31-40., Sakhamuru K., et al. 2000. Biotechnol Prog 16:296-298., Mateo C., et al. 2001. J Chromatogr A 915:97-106.)。為利於親合性純化，對此標記具專一性之配體(ligand)通常被固定於一佈於管柱的固態相上。結合至親合性管柱之後，高純度之融合蛋白質則藉由加入過量之

配體或調整緩衝液pH值而沖提出。目標蛋白質從標記分子上之分離係在通入管柱或沖提後，以限定量的蛋白水解酶切割於其接合子序列(Schauer-Vukasionovic V., et al. 2002. Anal. Bioanal. Chem. 373:501-507.)。其中所用親合性管柱之準備與操作上，雖簡易但價格昂貴。例如，美國專利第4782137號揭露一抗體固定式(antibody-immobilized)免疫親合技術，結合一種表現的融合蛋白，包含一具抗原性之寡肽標記，該標記有一"抗原性前端"("antigenic head")部分及一"連接尾端"("linking tail")部分。該抗原性部分組成係為一些可迅速引發抗原性反應之親水性胺基酸。而連接部分則允許該標記在融合蛋白質從細胞分離後，由所需蛋白質上被切割分離。

- [0005] 其他牽涉表現及純化技術的方法結合使用酵素性標記如穀胱甘肽轉移酶(glutathione transferase)、 β -半乳糖苷酶(beta-galactosidase)及氯黴素乙醯轉移酶(chloramphenicol acetyl transferase)，這些標記可與適當受質結合。詳見Smith D. B. 等, Gene, 67, 31-40(1988)。在這些例子中，作為標記的酶係與目標蛋白質融合，使該融合產物結合於一固定受質上，再以生化方法將該標記酶從所需蛋白質上切除。以上所有實例之施行皆須特殊管柱及昂貴之試劑。
- [0006] 植物種子油體是萌芽和爾後幼株成長所需燃料的貯藏胞器(Huang A. H. C. 1996. Plant Physiol. 110: 1055-1061., Peng C. C. and Tzen J. C. T. 1998. Plant Cell Physiol. 39: 35-42., Frandsen G. I., 2001. Physiol. Plant. 112: 301-307.)。油體係由三酸甘油酯基質(triacylglycerol)，外被單層磷脂(phospholipids)及蛋白質所圍繞，其大小為一直徑0.5-2 μ m之球體。(Chen J. C. F., et al., 1999. Plant Cell Physiol. 40: 1079-1086.)。油體因含有油膜蛋白質，該蛋白提供的立體結構排除性及電負性排斥，使得油體在細胞中或在分離製備中都特別穩定(Tzen J. T. C. and Huang A. H. C. 1992. J. Cell Biol. 117:327-335., Tzen J. T. C., et al. 1992. J. Biol. Chem. 267:15626-15634.)。
- [0007] 從能夠表現油膜蛋白融合體的轉殖植物提取的種子油體，已經被用為重組蛋白質生產和純化的攜帶載體(Van Rooijen G. J. H. and Moloney M. M. 1995. Biotechnology. 13:72-77.)。一經離心，於油體表面之目標蛋白質與油膜蛋白質之融合體，猶如"浮滓(scum)"懸浮於溶液表面，可以容易被分離回收(Tzen J. T. C., et al. 1997. J. Biochem. 121:762-768.)。回收的油體可直接在設計過的接合子(linker)序列上以專一性蛋白酶水解切割，使目標蛋白質從油膜蛋白分離。從重組油體釋出的高純度目標蛋白隨即可由離心上清層回收。利用重組油體的操作方法，與配體交換純化方法比較，相對地較廉價，但仍須使用高價的蛋白酶。
- [0008] 此外，在先前的發明如美國專利第5650554號中，為使目標蛋白質從結合油體蛋白質分離出，於純化時所加入之蛋白酶必須對接合子序列中切割位點具備專一性。同樣地，目標蛋白質不能包含相同的切割位多肽序列(cleavage site)以避免目標蛋白質被切割。這些考量限制了能用於以此油體為基礎的純化方法中蛋白酶的選擇。
- [0009] 內含肽(intein)為可自我裂解的多肽，一開始係由酵母菌*Saccharomyces cerevisiae* TFP1基因中發現(Kane, P. M., et al, Science 1990, 250, 651-657)。在爾後的研究中揭示，在Sce VMA內含肽的分離區之胺基酸修改後，可以產生在體外自我裂解(in vitro splicing)的系統(Chong, S., et al, J. Biol. Chem. 1996, 271, 22159-22168)。
- [0010] 在所有經基因工程改造過的內含肽中，內含肽Mxe GyrA與Ssp DnaB特別引人注目，因為其分別可以二硫蘇糖醇(1,4-dithiothreitol, DTT)(Mathys, S., et al, Gene 1999, 231, 1-13)及溫度的改變來誘導其自我裂解(Southworth, M. W., et al, BioTechniques 1999, 27, 110-120)。由內含肽引發的肽鏈分離開始於一個在Mxe GyrA內含肽的氮端，經由N-S acyl重整(rearrangement)形成的硫酯(thioester)鍵。而DTT可切斷這個硫酯鍵並引發氮端的斷裂(Telenti, A., et al, J. Bacteriol. 1997, 179, 6378-6382)。相對的，在可容許的溫度下，在Ssp DnaB內含肽的碳端天門冬胺會促成琥珀醯亞胺(succinimide)的形成並造成在碳端的分離。
- [0011] 市場上亦有一種蛋白融合表達及純化系統IMPACT^{T M} -TWIN System (New England Biolabs, Catalog Number E6950S)，其原理係透過將表達的目標蛋白質與內含肽及幾丁質結合區域(Chitin binding domain)形成融合蛋白質，再通過利用內含肽的可誘導自我裂解活性，在幾丁質層析柱上將目標蛋白釋放出來，達到用層析柱進行蛋白分離純化的方法。此方法的優點之一，為利用蛋白連接反應，可另將非編碼的胺基酸片段或標記物連接至已表達的蛋白質序列上。此外，將目標蛋白質連接到該產品所使用載體intein1的碳端，利用溫度/pH的改變可誘導內含肽發生裂解，避免了還原劑對敏感蛋白的破壞。此

外，插入到兩個內含肽標記之間的目標蛋白經剪切分離後，尚可通過N末端的半胱氨酸和C末端的硫酯鍵連接兩端形成肽鍵，而產生環狀蛋白。

- [0012] 這類產品具有以下容易操作的優點，包括單管柱一步驟純化，無需額外步驟切除或移去親和管柱結合蛋白質；無需蛋白酶作用即可將目標蛋白質從融合體上分離釋放；使用巰基化合物或pH和溫度的改變誘導與親合柱的裂解作用；能表達含有N末端半胱氨酸和/或C末端硫酯鍵的蛋白表達系統，可用於蛋白質的標記、連接和環化。
- [0013] 然而要有效降低蛋白質的純化成本，仍必須減低純化管柱的使用。如中華民國專利公告第00589322號，油體和做為親和性母質之締合蛋白質，提供一種“從樣品分離標的的分子方法”，以油體締合蛋白質之特性，進行非管柱式純化方法如離心，浮動或尺寸排斥法。
- [0014] 目前，尚未有提供既能無需蛋白酶作用即可將目標蛋白質從融合體上分離釋放，又同時使用簡易經濟的非管柱式純化方法。

【發明內容】

- [0015] 在本發明中，發明者利用人工油體(artificial oil bodies, AOBs)系統，將油膜蛋白質與欲純化之蛋白質以一內含肽連接，如此可減少純化的成本並且不需要使用昂貴的蛋白酶來釋出目標蛋白質。
- [0016] 利用轉殖(transgenic)植物表現和純化蛋白質較為昂貴且效果不彰。根據天然油體其中三個重要的成份，即三酸甘油酯、磷脂和油膜蛋白質的相對比例，可以在體外(in vitro)建構穩定之人工油體(artificial oil bodies, AOBs)(Tzen, C. et al, J. Biochem. 1998, 123, 319-324., Tai, K. et al, Biosci. Biotech. Biochem. 2002, 66, 2146-2153., Peng, C. et al, Biotechnol. Prog. 2003, 19, 1623-1626.)。藉由此可行的技術，本發明之AOB系統可以提供生產純度相同且能提升產量，較傳統利用來自轉殖植物中的油體更為簡單快速。
- [0017] AOB系統亦具有一種優勢，即在純化重組蛋白質時，可回收因大腸桿菌過度表現使得異源性可溶蛋白質被包覆於包涵體(inclusion bodies)成非可溶性的蛋白質型態。許多在大腸桿菌中過度表現的異源性可溶蛋白質會傾向形成不可溶之包涵體。為使表現後重組蛋白質功能可被還原，已有數項蛋白質復性(renature)技術被發展出來(Middelberg A. P. J. 2002. Trends Biotech. 20:437-443.)。在AOB系統中，目標蛋白質的摺疊過程是先與結合油體蛋白質之厭水端纏結。於形成AOB結構過程中將厭水部份包埋入三酸甘油酯基質，如此在AOB分子表面留下所欲得的蛋白質自行摺疊成正確構形，並正確恢復它的功能。這種情形類似發生在伴侶蛋白複體(Chaperone Complex)中厭水袋(hydrophobic pocket)中由伴侶蛋白協助的摺疊(Hartl F. U. 1996. Nature 381:571-579.)。
- [0018] 然而，即便利用AOB可以有效的節省純化蛋白質的成本，但利用蛋白酶如factor Xa或thrombin來將目標蛋白質自重組油膜蛋白結合多肽分離仍相當昂貴，因此限制了這項技術的實用性。
- [0019] 在本發明中，發明者利用AOB系統，將油膜蛋白質與欲純化之蛋白質以一內含肽連接，如此可減少純化的成本並且不需要使用昂貴的蛋白酶來釋出目標蛋白質。
- [0020] 本發明突出之特色，在於達成以微生物和較高等的生物體進行表現和以基於油體及蛋白質自剪接元件內含肽(intein)的方法實施便捷的目標蛋白質之純化。所利用的表現生物體之較佳實施例為大腸桿菌及酵母菌。本發明亦有關於表現及純化此產品多肽所使用之生物成份。詳言之，本發明特別包括一結合產品多肽之蛋白純化構體(construct)。
- [0021] 一般而言，本發明所包括的生物成份如下：a. 一個表達的蛋白純化構體，其係由三個部分構成，分別是一必須的結合油體蛋白質或多肽，一包含內含肽(intein)之連接多肽，及目標蛋白質。
- [0022] b. 一建立蛋白純化構體所用的重組基因；c. 一重組表現載體，其中包含此重組基因；d. 已經表現載體轉形(transform)該表現載體的細胞或較高等生物體；e. 一與連接多肽相連之結合油體蛋白基因；f. 此目標蛋白質與連接多肽在碳端或氮端相連；及g. 此目標蛋白質可再與其對應前蛋白多肽(proprotein, propeptide)相連接。
- [0023] 換言之，本發明係關於一種多肽，包括：a. 一結合油體之末端肽；及b. 一內含肽(intein)胺基酸片段，其係連接至末端肽。
- [0024] 此多肽另包含一目標多肽，該目標多肽亦連接至內含肽。
- [0025] 本發明使用的蛋白純化構體含『結合油體的蛋白部分—連接多肽(connecting peptide)—目標蛋白質』、『目標蛋白質—連接多肽(connecting peptide)—結合油體的蛋白部分』、『結合油體的蛋白部分—連接多肽(connecting peptide)—前肽—目標蛋白質』

質』及『前肽—目標蛋白質—連接多肽(connecting peptide)—結合油體的蛋白部分』等組合模式。第一片段與結合油體蛋白部分能結合到人工油體(AOB)。第二片段是連接序列，該序列之內含肽可誘導自我裂解活性，對銜接目標蛋白進行切割。第三個片段是目標蛋白質，其可以是任何來自自然界或人工合成的多肽，且功能為蛋白質，較佳之實例為酶。一般而言，目標蛋白質由單一多肽或多單位產品多肽組成。此蛋白質是符合消費需求的最終產品。

- [0026] 此目標蛋白可為多種形式。第一種為單一產品多肽。第二種為單一產品多肽的多次重複，其中以互連多肽相連。在這兩種情況中，皆含有相通的內含肽序列，因此可以同樣的溫度、pH值或化合物刺激來裂解。裂解所使用之較佳化合物為二硫蘇糖醇(dithiothreitol, DDT)；裂解使用之溫度範圍為0°C至50°C，較佳之溫度範圍為4°C至37°C，更佳之溫度範圍為25°C至37°C，最佳之溫度為37°C；裂解使用之pH值範圍為pH6.5至pH9.5，較佳之pH值範圍為pH7至pH9，最佳之pH值為pH7.5。
- [0027] 蛋白純化構體中的結合油體片段通常為結合油體蛋白(oilbody-binding protein)，其包括一個被截斷的，改變過或功能上修飾的(這裡指功能較佳的)。結合油體的蛋白具有對油體或油體衍生物的高親合力，特別對人造的油體(AOB)的親合力更高。因具有強親合力，因此一般而言，結合油體蛋白對油體的結合可使結合混合物能容易地與其他細胞萃取物分離。結合油體蛋白的較佳實例包括從任何來源得到的油膜蛋白，尤其在是源於植物及一改進其功能的版本。結合油體蛋白的最佳實例為油膜蛋白(oleosin)。油膜蛋白可源於植物，較佳之來源為菜籽油(canola oil)。
- [0028] 其他結合油體蛋白，與油體能強力地結合也能夠以同樣方式實施同樣功能以獲得相同效果，基於它們是蛋白純化構體中結合油體蛋白的部分，故被納入本發明內作為結合蛋白。
- [0029] 此種用於純化目標蛋白質之混合物，包含本發明之雜合多肽及用於和此雜合多肽中結合油體肽結合之油體，此結合油體肽與油體有高度親合性。本發明之雜合多肽係利用酵母菌或細菌宿主細胞所生產，較佳之實例為大腸桿菌。雜合多肽係指一結合油體之末端肽；一位於結合油體肽與目標蛋白質間的內含肽(intein)胺基酸片段序列，該片段自我剪接反應功能可用化合物、溫度或pH值改變誘導啟動；及一目標多肽，其係單一產品肽或單一產品肽之多重複製品，而鄰接產品肽間以內含肽(intein)相連。另目標多肽之前肽亦可與目標多肽以操作性方向相連，而再透過內含肽與油膜蛋白相連。雜合多肽較佳之實例係指油膜蛋白一半胱胺酸蛋白質，其與三酸甘油酯，磷脂與而組成AOB系統。油體係由三酸甘油酯與磷脂組成，從植物中提煉，較佳之來源為菜籽油(canola oil)。AOBs係於1 mL的10 mM磷酸鈉緩衝液(pH 7.5)中，加入15 mg三酸甘油酯(自Leader Price CO., TW 取得的菜籽油(canola)中分離而得)，150 μ g磷脂，及含550 μ g油膜蛋白—雜合多肽大腸桿菌碎片沉澱層所組成。油體由菜籽油中提煉後，以人工合成，油體中三酸甘油酯與磷脂之比例為50:1至1:50，較佳之實例為100:1至1:100，最佳之實例為100:1。磷脂與雜合多肽之比例為1:10至10:1，較佳之實例為1:4至4:1，最佳之實例為1:4。
- [0030] 本發明中蛋白質剪接是由蛋白質內含肽介導的，屬於一種在蛋白質層次上轉譯後的加工過程。它由一系列分子內的剪切—連接反應組成。蛋白質內含肽是一個蛋白質前體中的多肽序列，可以催化自身從蛋白質前體中斷裂，使兩側的蛋白質外顯肽連接成成熟的蛋白質。本發明以內含肽作為目標蛋白質在重組雜合多肽中扮演的剪接元件。
- [0031] 重組基因所編碼之蛋白純化構體包含三個DNA片段，各為本構築之三段多肽序列編碼。片段之排列以使結合油體蛋白基因或目標蛋白質之基因片段能優先被讀取。較佳的蛋白純化構體為使結合油體蛋白基因片段能優先被讀取。基因片段可以是以人工合成或由天然來源取得。
- [0032] 目標蛋白質的DNA序列來自cDNA或自然分離之基因組或合成之DNA序列。
- [0033] 包含重組基因之表現載體能指導原核或真核細胞表現本發明之蛋白純化構體。該表現載體包含蛋白純化構體基因與基礎載體片段。基礎載體片段可包括能進行適當之轉錄，轉譯，表現型，短暫型或其他表現調控片段，RNA結合調控或與對產品進行表現後操控的DNA序列。該表現載體一般而言包括結構性特色如一啟動子，一操作子，一調控序列與一轉譯終止訊息。表現載體可從任何能提供前述特色之宿主細胞或高等生物體相容的基礎載體合成之。表現載體的調控序列將能專一性地，或者某些情形下適度地相容於原核或真核宿主細胞或高等生物。
- [0034] 能指導蛋白純化構體之分泌的表現後(post-expression)之調控序列亦能被包含於表現載體內。較佳的表現載體為具備同時能作用於宿主細胞或高等生物體中，可受刺激調控而使得蛋白純化構體過度表現。

- [0035] 經轉形之原核或真核細胞或攜帶適當重組之原核或真核載體之較高等生物體組成本發明中的轉形微生物與高等生物體。原核細胞宿主者包括任何能順從表現外源蛋白之原核細胞。較佳實施例為大腸桿菌。真核細胞包括單細胞生物體如酵母細胞，以及源自高等生物體如植物，昆蟲或哺乳動物的不死細胞。較佳的真核宿主為酵母菌。有用的高等生物體宿主包括具有能被轉形的生殖細胞之高等植物及動物。植物包括煙草，玉米，黃豆，及產果植物，無脊椎與脊椎動物如魚，鳥和哺乳類特別包括羊，山羊，牛，馬以及豬。
- [0036] 本發明也包括一個經培養的，由上述表現載體轉形的宿主細胞或能夠表現這個為純化蛋白方法而設計的質體構築的轉殖植物或動物。
- [0037] 一般而言，本發明所要求的方法包含以下：(a)被攜帶蛋白純化構體之重組基因序列的重組表現載體所調節的宿主細胞或宿主生物體；(b)以一基於油體之分離技術來純化蛋白純化構體產品；及(c)在一次或多次程序中以溫度或化學品的刺激使蛋白純化構體自我切割以製備產品多肽。
- [0038] 本發明所載之表現方法的步驟係依據微生物或較高等生物蛋白表現。步驟需要將重組基因插入適當的基本載體，再以此重組載體轉形宿主細胞或較高等生物。較佳情況下，該重組載體於宿主細胞或較高等生物內表現蛋白純化構體之可溶性產品，或表現於細胞質中之不可溶產品，或成為宿主細胞或較高等生物泌出產品。當選擇較高等生物為表現宿主，該生物受精生殖細胞將被轉形，且轉形後生物以一般的成熟技術養殖。
- [0039] 純化方法的步驟需使蛋白純化構體結合於人工油體上，並將之與其他的細胞性組成物、碎片及培養液中分離。目標蛋白質之獲得，係對蛋白純化構體上內含肽，在溫度、pH值或化合物的刺激下進行自我裂解，進而將該目標蛋白質與切割酶分開。
- [0040] 此純化步驟的另一方法為將蛋白純化構體從AOB分離後，經過純化過程及用溫度或化學品的刺激，產生包含目標蛋白質及結合油體蛋白之混合物。此混合物可利用AOB分離油體蛋白，並純化目標蛋白質。
- [0041] 本發明係關於一種純化目標蛋白質方法，包括以下步驟：a. 製備雜合多肽，其包含：i. 一結合油體之末端肽；ii. 一位於結合油體肽與目標蛋白質間的內含肽(intein)胺基酸片段，該片段自我剪接反應功能可用化合物、溫度或pH值改變誘導啟動；及iii. 一目標多肽，其係單一產品肽或單一產品肽之多重複製品，而鄰接產品肽間以內含肽(intein)相連；b. 混合多肽與油體，而形成產生油體混合物；c. 將油體混合物從其餘細胞萃取物之碎片分離；d. 將目標多肽從結合油體部分切割；及e. 將目標多肽從其餘油體混合物分離。
- [0042] 根據本發明之方法，其中步驟b之混合物可使用超音波震盪產生；步驟c之分離可用離心處理；步驟e之目標多肽可用離心將其與油體混合物之剩餘物中分離。
- [0043] 本方法較佳的具體實施例包括重組基因的表現，其中重組基因的組成核酸片段包括油膜蛋白(或關於其改進功能的版本)，內含肽及和單一產品多肽或多單位產品多肽。此外較佳的具體實施例包括使用大腸桿菌或酵母菌為表現宿主，並以任一如溫度，營養物，異丙基硫代半乳糖苷(isopropyl thiogalactoside, IPTG)，吲哚丙烯酸(indole acrylic acid)，碳源或類似物等誘導系統調控對於宿主細胞內含的蛋白純化構體之表現。更佳的實施例包括原核細胞之表現載體系統，其中合併雙質體的構築，和酵母細胞之載體表現系統，其中合併的穿梭載體(shuttle vector)具有一大腸桿菌和一酵母菌的複製起始點(origin of replication)。
- [0044] 結合運用重組載體及宿主細胞或宿主生物體的生物合成機制，用於表現一個外源蛋白質已屬生化蛋白合成中廣泛習知的技術。本發明運用新穎的改良表現技術方法結合一種以油體為基礎的分離技術，建立一種前所未有而成本低廉，高效率的生物合成方法。透過選用內含肽作為分離目標蛋白之裂解機制。本發明免除昂貴機器和試劑之使用以及漫長化學合成所需時間。
- [0045] 本發明的方法整合能提供充分高效率以及降低純化技術花費的因素。為本發明使用的AOB系統所設計的蛋白純化構體中，獨特的蛋白與結合油體部分，可實現乾淨且輕易的將目標蛋白質由其他成分中分離。離心是本發明中的最常使用的分離技術，從而減少各式純化管柱和昂貴的試劑的費用。
- [0046] IA. 表現方法一宿主細胞本發明使用微生物學方法，利用具備重組蛋白純化構體之表現載體轉形宿主細胞，以驅使宿主細胞表現該蛋白純化構體。載體中蛋白純化構體基因的製備，係將蛋白純化構體的編碼核酸片段插入適當基礎載體中。在一種載體構築方案中，結合油體蛋白的DNA片段，以植物的油膜蛋白基因為例，將該基因插入一相容於待轉形宿主的基礎質體內。該基礎質體包含必須的調控序列以利大量表現置於下游的基因片段。

- [0047] 一合成的DNA序列，其中序列編碼為內含肽，被插入靠近結合油體蛋白基因的3'端。在靠近結合蛋白基因3'端需有一限制酶切割位以便內含肽之DNA序列能插入。此外，至少一個便利的限制酶切割位(載體中間限制酶切割位)也必須設計於此合成的內含肽之DNA序列中，如此，目標蛋白質的DNA片段隨後才能插入正確讀框內。若無這些限制酶切割位存在，依照Sambrook, J., et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)之標準程序實施後以定點突變設計導入該位置。
- [0048] 得到的載體構築是為使蛋白純化構體基因於原處併入較大之載體之中間基礎載體。任何來自自然界或人工合成的DNA序列皆可插入該中間基礎載體的限制酶切割位中以併入表現載體之蛋白純化構體基因。恰當的插入與讀框排列可用已知技術如依照Sambrook實驗手冊之核酸定序法定序結合蛋白與各種融合DNA多肽序列之接合區域予以證實。
- [0049] 替代的合成途徑亦可製備同樣的表現載體。其中一種替代合成途徑，係任何蛋白純化構體中鄰接之兩DNA片段可連接形成一中間基因，接著與第三段DNA片段結合產生獨立的蛋白純化構體基因(即分開實體)。經前述之限制酶切割及連接方法處理之後，該獨立的蛋白純化構體基因可被插入適當基礎載體。若基礎載體具備適當的獨特限制酶切割位，可應用Sambrook實驗手冊發表之程序插入載體內。
- [0050] 第二種替代方式，在連接任何鄰接兩DNA片段後，獲得之中間基因可用前述之限制切割與連接方法轉入載體。第三DNA片段(即功能性的結合油體蛋白基因或目標蛋白質基因)，用依照Sambrook實驗手冊之程序，包括構築適當之限制酶切割位及需要時再用連接方法插入攜帶中間基因的基本載體。
- [0051] 與構築最終表現載體之相同方法，亦可用於製備一攜帶蛋白純化構體基因之載體，該構築基因讀碼為蛋白純化構體反向序列，即讀碼是『目標蛋白質—內含肽—油體結合多肽蛋白』。此例中，內含肽之基因與/或目標蛋白質基因被插入結合油體蛋白與/或目標蛋白質基因之5'端。所有限制酶切割，基因段插入，連接及後續相關基本程序可參考Sambrook之實驗手冊。
- [0052] 最後完成之重組表現載體將攜帶一適當啟動子，一核糖體結合位編碼序列、用於篩選的表現型基因、轉錄調控區段、轉譯及細胞內轉譯後修飾蛋白純化構體之產品蛋白質。
- [0053] 依據前揭的基本方案構築的原核與真核載體可作用或經修改後作用於適當宿主細胞內之生物體合成機構。以真核細胞而言，載體最好攜帶訊息序列與/或其他調控序列以利於蛋白純化構體表現後可分泌至細胞外或允許其被轉譯後之修飾。
- [0054] 本發明方法較佳之基礎載體包含任何質體，該質體與特定宿主相容，穩定並可允許轉形質成功宿主之篩選。這樣的載體包括P. H. Pouwels, et al., Cloning Vectors, Elsevier Science Pub. 1985.所發表之一系列載體在內。
- [0055] 較佳的中間載體限制酶切割位因內含肽DNA序列而異，換言之，即取決於切割的形式。任何限制酶切割位只要能相容於內含肽DNA序列，或能被DNA改變酵素處理(如T4DNA聚合酶，S1 nuclease, Klenow片段，mung bean nuclease或不同的exonucleases)或藉由加入接合子或轉接予以確保在接合區域中序列正確且讀框排列正確皆可使用。
- [0056] 用最終重組表現載體轉形之宿主細胞之分離係利用表現型或其他設計於重組載體的特性來篩選。基本上，此類篩選特性包括抗生素抗藥性或互補宿主缺失功能者。本發明較佳的重組載體用表現型基因包括抗生素抗藥性表現型，必需胺基酸表現型及其他必需複合物表現型。
- [0057] 經過篩選之轉型宿主細胞，培養於含有營養成分生長因子及維生素供應之培養液，可用非誘導型表現系統產出蛋白純化構體產品蛋白，更佳者可用誘導型表現系統，使經篩選之轉型宿主細胞於細胞生長至前一中對數期以誘導物質處理產出蛋白純化構體產品蛋白。一般而言，將宿主持續培養數小時，收集並溶解細胞以將細胞中所含蛋白純化構體產品。若轉形宿主細胞之設計為分泌蛋白純化構體產品，則可將細胞培養直至蛋白純化構體產品在培養液中達需求濃度。若宿主細胞屬於將蛋白純化構體產品溶於細胞質者，則培養細胞直至其成長達最佳成熟度。接著以適當試劑溶解該培養成熟之細胞使釋出細胞質之中的蛋白純化構體產品。若蛋白純化構體產品以不可溶顆粒形式沉積宿主細胞內，則將培養成熟之細胞溶解並釋出不可溶顆粒，再以離液序列高 chaotropic) 試劑溶解此不可溶顆粒並於體外進行重新摺疊。此培養、增殖與溶解之程序可以批次或持續形式執行。
- [0058] 在兩項可供選擇的蛋白純化構體蛋白生產方法的選擇上，皆將自細胞獲取的蛋白純化構體的培養液皆用作純化方法中的粗製混合物原料。

- [0059] IB. 表現方法—於高等生物本發明使用的多細胞方法利用被基因轉殖，攜帶重組蛋白純化構體基因之基因表現系統且能表現此蛋白純化構體之高等生物。攜帶蛋白純化構體基因之卡匣(cassette)係由將蛋白純化構體之DNA編碼片段插入適當基礎卡匣製備。該基礎卡匣被設計為能與宿主生物體生殖細胞相容且可合適地與這些細胞的基因物質結合。它能攜帶或經改變而攜帶適當的啟動子，操縱子或調控及表現形區域等供操作細胞內蛋白純化構體之產品蛋白轉錄，轉譯與轉譯後修飾過程所需。
- [0060] 高等生物如包括芝麻，玉米，黃豆及菸草等植物，或包括如魚或哺乳動物(如山羊，牛，馬，兔及鼠)等動物皆可作為此方法的宿主。在宿主之單倍體生殖細胞行有性接合並將受精之生殖細胞以重組表現組合體轉形後，轉殖動物可以藉由在子宮裡重新植入經轉殖的生殖細胞後培養。植物亦可作為宿主。轉殖植物能藉細菌性癌腫菌(*Agrobacterium*)媒介轉形，或將植物原生質體以電穿孔法(electroporation)或顯微注射方法產生。在轉殖動物或轉殖植物成長後，可於植物的物質中如葉，種子，果實或動物組織如肉，器官或組織分泌如體液，尿液或乳汁中發現表現的蛋白純化構體。均質化與/或濃縮提取這些物質，組織或分泌物能產生包含蛋白純化構體等物質之初步混合物。該混合物之後用於純化目標蛋白。
- [0061] 一般而言，這些方法係依照表一所列文獻提供之技術程序表一 製備轉殖羊與轉殖鼠之方法1. Gordon K., Lee L., Vitale J. A., Smith A. E., Westphal H., and Hennighausen L. (1987) *Bio/Technology*, 5, 1183–1187.
- [0062] 2. Pittius C. W., Hennighausen L., Lee L., Westphal H., Nichols E., Vitale J. A., and Gordon K. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 5874–5878.
- [0063] 3. Clark A. J., Bessos H., Bishop J. D., Brown P., Harris S., Lathe R., McLenaghan M., Prouse C., and Simons J. P. (1989) *Bio/Technology*, 7, 487–492.
- [0064] 製備轉殖兔之方法1. Buhler Th. A., Bruyere Th., Went D. F., Stranzinger G., and Burki K. (1990) *Bio/Technology*, 8, 140–143.
- [0065] 製備轉殖植物之方法1. Hooykaas P. J. J., and Schilperoort R. A. (1987) *Methods in Enzymology*, 153, 305–313.
- [0066] 2. Shillito R. D., and Potrykus I., (1987) *Methods in Enzymology*, 153, 313–336.
- [0067] 3. Weissinger A., Thomes D., Maddock S., Fromm M., and Sanford J. (1988) *Current Communications in Molecular Biology*, (Fralely R. T., Frey N. M., and Schell J., eds.) Cold Spring Harbor, NY.
- [0068] 4. Lichtenstein C., and Draper J. (1986) in *DNA Cloning*, vol. II, (Glover D. M. ed.), IRL Press Ltd., Oxford UK.
- [0069]
- [0070] II. 純化方法採用AOB系統的純化方法如圖九所示。為實施純化，將粗糙混合物與AOB結合於結合油體蛋白。蛋白純化構體由於具有結合油體的部分而可結合到AOB。粗糙混合物中剩餘組成及粗糙碎片利用離心移除。
- [0071] 為了分離目標蛋白質，純化的蛋白純化構體受溫度或化學品刺激(於固定相或溶液相)以將該蛋白純化構體裂解成兩部份，一為結合油體蛋白—內含肽部分，另一為目標蛋白質。其中結合油體部—內含肽部分具厭水性端，目標蛋白質屬親水性。故目標蛋白質可以於溶液中再溶，經反覆的離心步驟從結合油體蛋白—內含肽部分分離。
- [0072] 根據所選用的表現基因，自外連序列釋出的目標蛋白質組成含：(a)單一目標蛋白質之分離型式，或(b)多單元之目標蛋白質，且需要進一步處理。
- [0073] 上述數種形式之多單元可合理存在。在第一種形式中，多個單元可由一系列相同產品多肽，以內含肽片段連接組成。
- [0074] 另一形式中，多個單位的組成可為一系列相異產品多肽重複的串連，或由數個相同或相異產品多肽組成之非重複單元。各單位間以上述內含肽連接。不同的產品多肽會被選擇使它們的物理或化學性質允許以傳統方式分離。為利於單獨產品多肽之分離，內含肽序列除作為多肽裂解位置外，且其裂解後的殘基對個別產品多肽的分離的亦可提供化學或物理性區別。單獨或與附著產品多肽結合的內含肽殘基的離子性、厭脂性、酸性、鹼性或抗原性功能允許利用其他已知多肽分離方法裂解之後，使用親合性色層分析法、離子交換色層分析法、逆相或正相色層分析法、對流式分布、酸或鹼萃取使個別的產品多肽分離。

- [0075] 在選擇這些內含肽片段時要考慮的一個因素是內含肽與其編碼之基因片段位置及改變以提供各種融合肽之基因序列多樣性。此多樣性允許多單元小肽被有效率的表達。目前已知持續重複的基因序列通常在重組之前被宿主生物體重排或刪除。
- [0076] 由於本發明利用內含肽自我裂解的特性，因此僅需要改變溫度、pH值或以化合物刺激，便能裂解分離目標單白與油體蛋白。因此可以保存產品多肽的完整性，並且不會傷害到產品多肽的功能性。
- [0077] III. 較佳的具體實施例一般而言，任何蛋白質皆可用本發明大量生產與純化。本方法在大量生產寡肽時特別有用，寡肽在宿主細胞中以非融合形式存在而不穩定。
- [0078] 根據以油膜蛋白作為結合油體蛋白之較佳方法，本發明特定的具體實施例將進一步說明本發明之優點。本方法的實施說明之組合與各組成物基於油膜蛋白。
- [0079] III. A. 生物性組成物1. 蛋白純化構體的DNA及胺基酸序列a. 結合油體蛋白部分較佳的結合油體蛋白是油膜蛋白或其修飾或改進功能的版本。詳言之，完整的油膜蛋白基因序列可被插入與大腸桿菌兼容之表現載體。切割載體上調控區下游處之DNA序列，接著經由平端或黏端之連接將基因插入並形成重組載體。額外地，可在位於油膜蛋白基因5' 或3' 端處導入一可供選擇的限制酶切割位置序列，如此可完成接續之操作。
- [0080] III. A. 1. b. 內含肽片段一段短DNA序列，該序列譯碼產物為一內含肽，其可插入完整或部分的油膜蛋白基因之3' 或5' 端。插入基因時，連接處之DNA序列仍然須經前述 Sambrook et al. 中之標準DNA定序法確認。
- [0081] 本發明的特色之一在於內含肽，可在溫度、pH值改變或化合物的刺激下自動裂解。在此領域中已知的內含肽皆可應用於本發明的範圍之中。較佳的實施例為內含肽 *Mxe* GyrA 與 *Ssp* DnaB。較佳的裂解反應啟動方式為以溫度、pH值或化合物刺激。
- [0082] III. A. 1 c. 可變的融合多肽部分序列的第三部分由目標蛋白質的核酸編碼序列組成，其中較佳的具體實施例是一單一產品多肽或多個產品多肽單元。其中的單元能依次容納一或兩個產品多肽。為製備單一產品多肽，單一拷貝基因與由前述列表選擇出之內含肽的DNA片段連接。為製備合併於多個單元內的二個拷貝產品多肽，此二產品多肽的核酸序列間之結合係由內含肽之DNA序列連接，單元間再由前述列表選擇出來之互連多肽之核酸序列連接起來。經反覆的選殖(clone)，此基因的多個單元能互相結合。此多單元基因構成可變的融合多肽片段編碼。
- [0083] III. A. 2. 重組基因併入表現載體最終合併了蛋白純化構體基因之重組表現載體可與宿主細胞相容。使用的載體具備許多共同特色。這些特色包括一相容於宿主細胞的複製起始點，用於轉錄調控的DNA序列以及轉錄之控制(用於可誘導系統)，一有效的核糖體結合位(原核宿主)，一poly-A訊息(真核宿主)。此外，此載體也可包括表現型基因，調控區域與領導序列。
- [0084] 原核載體，如大腸桿菌的表現其特點為具有以一複製起始點，一用於轉形菌株篩選的基因標記(表現型)以及一指導目標基因表現的DNA調控序列。基本的調控序列包含一啟動子(P)以啟動轉錄。一操縱子(O)以控制轉錄(開/關轉變)，一有效核糖體結合位(RBS)以開始轉譯，以及一轉錄終止訊息。起始與終止密碼是由插入基因段(蛋白純化構體)提供。
- [0085] 原核載體特別包括一適合之"表現卡匣(expression cassette)"，其係基於任何可應用的啟動子/操縱子系統。典型內含於原核載體之啟動子包括半乳糖、色胺酸(tryptophan)、T7、脂蛋白、鹼性磷酸酶(alkaline phosphatase)、lambda左向或右向啟動子或以上啟動子之組合。半乳糖及色胺酸操縱子，及溫度敏感性lambda啟動子同樣屬於能包含於原核載體中典型之開/關型。典型包含於原核載體中之表現型標記包括發展對ampicillin, tetracycline, kanamycin, Chloramphenicol之抗藥基因。
- [0086] 原核的雙質體系統包括用於啟動目標基因(蛋白純化構體基因)表現的T7啟動子。第二個質體提供一用於嚴密控制表現的T7溶菌蛋白。T7RNA聚合酶基因，在任何前述之啟動子/操縱子之組合控制下，可置於一低拷貝數質體之中，結合入染色體或由一lambda噬菌體於感染時。第二個質體較佳者同時攜帶一個不同的基因標記(即一個不同的表現型標記)。
- [0087] 真核載體如在酵母菌表現所用者，基本上包含大腸桿菌及酵母菌各一個之複製起始點，一用於兩種細胞的基因標記，及一控制酵母菌表現的DNA調控序列的穿梭載體(shuttle vector)。該調控序列一般包括一啟動子，一調控序列及一轉錄終止訊息(包括一polyadenylation訊息)。亦可選擇插入指導細胞分泌的訊息序列至此真核載體中。
- [0088] 典型可併入之正向篩選標記包括提供需用於製造尿嘧啶(uracil)，白胺酸(leucine)，組胺酸(histidine)，腺嘌呤(adenine)，色胺酸及其他相似品的基因突變互補標記。併入

真核載體中較佳的啟動子序列，包含酒精去氫酶I或II型(alcohol dehydrogenase I or II)、甘油醛磷酸脫氫酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase)、磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerokinase)、半乳糖、色胺酸、mating factor alpha啟動子及其他相似品。

- [0089] 昆蟲細胞之表現系統，包括美國專利第4745051號所載之BEVS系統。III. A. 3. 微生物之轉形用於轉移感染或轉形表現載體的微生物可以是以單細胞的原核或從哺乳動物或昆蟲的細胞為基礎的真核多細胞生物體。單細胞或簡單多細胞生物體為較佳的宿主細胞。較佳的宿主細胞包括大腸桿菌和酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)。
- [0090] 一較佳的具體實施例，如大腸桿菌株BL21 (DE3) pLysS可用於雙質體的原核表現系統。其他的大腸桿菌菌株亦能被利用並發揮此表現系統的特性。在以過度表現方法生產蛋白純化構體蛋白時，具有某些蛋白酶表現缺陷的酵母菌為較佳的真核宿主。溫度敏感酵母突變株也是較佳的真核宿主。
- [0091] III. B. 表現步驟的實施方法重組載體的構築是以標準的程序步驟進行，限制酶切割、插入、連接、轉形、篩選及分析皆載於前述之Sambrook實驗手冊。
- [0092] III. B. 1 重組載體的構築方法重組載體構築可用限制酶切割，即在基本載體中特定限制酶切割位置以適當的限制酶切割，繼續進行核酸插入及連接的步驟以完成蛋白純化構體基因。如前述，限制酶切割、核酸插入及連接步驟皆載於前述之Sambrook實驗手冊。
- [0093] III. B. 2 多單元基因方法二種策略可用於構築目標蛋白質的多單元基因。第一種方法包括將所有單獨的基因單位以及互連多肽之DNA序列相接成一中間多單元基因。此中間多單元基因接著被直接與相鄰內含肽編碼之DNA序列連接而轉移至融合表現載體上。第二種方法包括依序將每一單獨的基因單位以及互連多肽之DNA序列連接至融合表現載體上。在單一基因及DNA序列被插入後，第二組直接連接於第一組旁，以此方式重複繼續連接。在兩種情況中，一個或多個產品多肽之單獨基因單位與其相對應的內含肽，在所有的單位及互連多肽序列都完成插入時，單元基因才形成。
- [0094] III. B. 3 轉形宿主細胞的方法轉形的過程根據被轉形的菌種類型，可歸為幾個範疇。轉形大腸桿菌及線蟲細胞較佳之實施可見Sambrook實驗手冊。簡言之，大腸桿菌首先培養生長至一定密度，在此時間點運用一種溶液處理以使其細胞壁或細胞膜產生通透性。這些細胞接著與重組核酸混合。經過重組載體的吸收和再度回復，轉形細胞繼續以選擇性培養液篩選出所欲得的特定菌落。
- [0095] 根據本發明的一項實施例，表現組合體(expression cassette)以一穩定併入宿主細胞基因組之表現組合體形式被導入宿主細胞。顯而易見的，亦可將此表現組合體導入宿主細胞以成為能夠於宿主細胞中複製及表現的重組DNA序列的一部分，而無須將其併入宿主細胞基因組。此方法的實例可見於各種載體諸如病毒或能於宿主細胞中複製及表現蛋白質的質體載體。一特定實施例為一個攜帶一複製起始點之質體，其允許高拷貝數如大腸桿菌的pUC系質體。額外地，可改變該質體以使之包含一可誘導啟動子，例如能用半乳糖或IPTG誘導的LacZ啟動子。
- [0096] III. B. 4 細胞的培養方法細胞經轉形和篩選出需要菌落，繼續培養以使蛋白純化構體之生產達最佳量。為了充分的培養，將含單一重組選殖的菌落接種至適當量培養液，在適量生長培養液與所需的溫度條件下培養，直至細胞濃度讀數符合需要。
- [0097] III. B. 5 分離方法將油膜蛋白結合到AOB可實現一簡易且有效率的蛋白純化構體。融合於油膜蛋白末端的多肽不影響蛋白與AOB結合的能力。利用油體蛋白作為載體或運送的方法提供一簡易之回收重組蛋白質機制。與油體或重新組成的油體部分連接的雜合蛋白質可在一個單一步驟達成與大部分細胞性組成物的分離(如離心或浮選法)。
- [0098] IV. 程序、準備及實例以下的程序、準備及實例進一步闡明關於本發明的特定方面。唯它們並不代表上面提出之本發明所完全涵蓋的範圍。
- [0099] IV. A. 合成基因程序1. 產品多肽之多肽及DNA序列代表目標蛋白質DNA序列之寡核酸一般可使用根據S. L. Beaucage及M. H. Caruthers之自動技術合成，Tet. Letters, 1981. 221, 859-62。或者，天然所需蛋白質的編碼DNA可應用公開於Sambrook實驗手冊的純化技術分離。
- [0100] IV. B. 基因插入及轉形之程序本發明中基因的限制酶切割、連接、細胞的轉形、篩選培養及溶解方法之程序，基本上遵守本領域公開的基本方法。提供細節之文獻含前文引述之Sambrook等著作。
- [0101] 在一較佳實施例中，DNA序列可以根據前文引述之Sambrook實驗手冊之程序接合起來。

- [0102] IV. B. 1. 限制酶切割程序a. 以內限制酶切割DNA一般而言，0.5至2g質體DNA於20L之1倍限制酶緩衝液中以1—20單位內限制酶切割。該反應混合液依限制酶供應商建議於室溫下反應1至16小時。反應混合液接著進行凝膠電泳使依分子量分離或進一步根據前文引述之Sambrook實驗手冊之標準程序純化DNA。
- [0103] IV. B. 2. 基因插入及連接之程序一般而言，該選殖載體依前述限制酶切割程序以適當限制酶切割。線性化載體接著可在熟悉本領域者以牛小腸鹼性磷酸酶(calf intestinal phosphatase, CIP)或細菌鹼性磷酸酶(bacterial alkaline phosphatase, BAP)進行去磷酸化。進一步根據前文引述之Sambrook實驗手冊之標準程序純化該DNA，其中程序通常使用石碳酸萃取及酒精沉澱。
- [0104] 該待插入之DNA片段接著以3—5倍(大片段時)或20—30倍(短片段寡核酸)過量的切割之選殖載體混合。連接反應係於1倍連接酶緩衝液(20 mM Tris pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 0.4 mM beta-mercaptoethanol, 0.4—1.0 mM ATP)，在T4 DNA連接酶存在下，在16°C反應16小時。將少量連接好之載體用於轉形大腸桿菌勝任細胞及重組質體之篩選。
- [0105] IV. B. 3. 大腸桿菌之轉形程序在一較佳實施例中，可根據本領域技術使重組質體轉形入大腸桿菌。
- [0106] IV. B. 4. 酵母菌之轉形程序現已有數項酵母菌之轉形程序。其中兩種主要被應用者為Spheroplast—及lithium方法，兩者皆引用自Rothstein, R., DNA Cloning pp. 45—66, IRL Press Ltd., Oxford (1986)。
- [0107] IV. C. 篩選程序在一較佳實施例中，可以將轉形後之大腸桿菌菌落塗佈於含有適量抗生素之選擇性培養基來篩選它們的表現形(對抗生素抗藥性)。篩選轉形後之酵母菌細胞較佳方法則是據本領域技術，利用營養省略培養基來篩選。其他本領域已知的篩選技術也可使用。
- [0108] IV. D. 培養程序在一較佳實施例中，培養細胞方法可根據前文引述之Sambrook程序處理。簡言之，該方法必須將單一菌落轉移至一小量(3—5 ml)含適當抗生素細菌培養液(如Luria培養液)。將培養菌培養於37°C。(或其他適當溫度下)並放大於更大體積量。酵母菌細胞之培養情形類似，培養於30°C酵母菌營養省略培養基。
- [0109] IV. E. 溶解程序所需蛋白質可用各種技術依同型合子宿主細胞特性擇其優者萃取之，包括用水溶液、緩衝液萃取培養液及諸如磨碎、打破、研磨或其他使細胞破裂方式。宿主細胞可被萃取(例如，以離心或將碎片沉積)為三部份：沉澱物或不可溶沉渣、液樣上清層及一包含種子貯藏脂質之與油體之漂浮層。這些油體包含原生性油體蛋白及嵌合(Chimeric)油體蛋白，後者包含欲純化的產品多肽。
- [0110] IV. F. 基於油體蛋白的分離程序及準備在培養後，所需蛋白質如以下方式純化：在離心後，因為油性雜物可浮於表層，在油體表面與油體蛋白融合之所需蛋白質可輕易地與其他細胞萃取物分開。再度懸浮的油體可直接以目標蛋白質的固定相加以利用，或在設計接合子序列上以溫度或化學品誘導將所需蛋白質從蛋白油體部分分開。
- [0111] 在本發明中，若一接合子包含內含肽，則將此懸浮緩衝液以特定的溫度或化學品處理，此步驟將所需多肽釋出於水層。第二次離心步驟則將使處理過的油體漂浮於溶液上層，留下釋出多肽或所需蛋白質於水層。釋出之多肽或所需蛋白質可依其性質或應用上需求或許以沉澱、化學性改變或冷凍乾燥。
- [0112] IV. G. 最後分離程序在所需蛋白質被以溫度或化學品從結合油體蛋白上裂解後，組成物之分離可應用本領域公知技術達成。
- [0113] 從重組油體釋出之所需蛋白質可高純度地用一次以上離心後於上清液收集之(Van Rooijen G. J. H. and Moloney M. M. 1995. Biotechnology. 13: 72—77.)。
- [0114] 因此，發明者發明了一基於細菌表現與油體技術，可功能性的表達並純化蛋白質的新方法。發明者並以納豆激酶(nattokinase)的表現與功能證明此新方法的功效。在此方法中，先將目標蛋白以不可溶的油膜蛋白融合多肽形式過度表現，輕易的以離心方式自細胞溶解中的碎片沈積中回收，重組入AOB並以內含肽的自我裂解功能自AOB中分離出來，最後再以離心最終上清液的方式濃縮並獲得目標蛋白。相較於過去利用AOB系統必須使用昂貴的蛋白酶進行特定的切割(Peng, C. C., et al, J. Biotechnology 2004, 111, 51—57)，本方法利用溫度、pH值的調整或化學品二硫蘇糖醇(dithiothreitol, DTT)的刺激來啟動內含肽的自我裂解，可顯著的降低操作成本。任一目標蛋白可與油膜蛋白的氮端或碳端融合，皆可達到約300 mg/L的產量與60%左右的回收率。因此，使用者可選用任一融合方案，端視目標蛋白既有的限制而定。很顯然的，這個系統提供一簡易且便宜的蛋白

質表現與純化方法。

[0115] 以下實施例並非完全表示本發明所能涵蓋之完全範圍。更進一步言，本發明亦可以使用於其他實施方式。在此舉出例證解釋本發明在此說明書所及的申請範圍。

【實施方式】

[0116] 本實例中所使用進行PCR的寡核酸列於表二。發明者在數個步驟之中建構最終載體pOSP1與pOSP2，這兩個載體分別具有在氮端與碳端與油膜蛋白連接的內含肽。將載體pET-265(Wang, Z. W., et al, lacI. Biotechnol.Prog. 2004, 20, 1352-1358)利用引子CH015與CH016增幅成含有T7啟動子與lacIts(將Gly265以lacI的Asp替換)的DNA片段。利用引子CH017與CH018，自載體pPL450(LoVe, C. A., et al, Escherichia coli. Gene1996, 176, 49-53)產生含有bla基因的DNA。其後的兩個PCR DNA的接合產生了載體pWIN20。類似pwIN20，將載體pET29a(Novagen, WI)以限制酶XhoI-MluI切割，並以同樣的限制酶切割的pWIN20片段接合，因此產生了含有載體pET29a的多重選殖位(multiple cloning site)的載體pJ01。為了獲得油膜蛋白，發明者利用引子01e8與01e9來增幅載體pET2901e(Peng, C. C., et al, J. Agric. Food Chem. 2004, 52, 3115-3119)中的油膜蛋白基因。將獲得DNA再次選殖入載體pJ01的NcoI-BamHI位置以產生載體pJ01-ole4。再以引子Ssp2與Ssp3自載體pTWIN1(New EnglandBioLabs, MA)產生含有內含肽Ssp DnaB的PCR DNA。再將由PCR增幅的DNA與 pJ01-ole4以EcoRI-SalI限制酶切割，再連接後成為載體pOSP1。類似的，將以引子Jo7與Jo8產生的油膜蛋白次選殖入pJ01的NotI-XhoI位置以產生載體pJ01-ole2。同樣將載體pJ01-ole2與含有內含肽Mxe GyrA的DNA以限制酶NotI與HindIII切割，再接合成為載體pOSP2。這個含有內含肽的DNA則是來自用引子Mxe2與Jo6增幅載體pTWIN1所得。

[0117] 表二。本實例所用的引子列表。

引子編號	序列*
CH015	TGCAGGCTACAGGGCGCTCCATTC (<i>StuI</i>)
CH016	GATCCTGCAGCCTAATGAGTGAGCTAAC (<i>PstI</i>)
CH017	TCGAGGCTGCGAGCTTGG (<i>StuI</i>)
CH018	CGCTCTGCAGCTTCCTCGCTCCACTG (<i>PstI</i>)
CH0112	TGCGGAATTCGCGGAAAAAGCAGTACAG (<i>EcoRI</i>)
Jo6	GACCGCGGCCCGCCAGTAGCGTG (<i>NotI</i>)
Jo7	TCGGGCGGCCGCAAAATGGCTGAGCATTATG (<i>NotI</i>)
Jo8	AGAAACTCGAGTAAAGAAGTTGAGAC (<i>XhoI</i>)
Mxe2	GCGAATTAAGCTTGGGCTCTTCTGC (<i>HindIII</i>)
01e8	TCTTAGATCTAATGGTGAGCATTATGGTC (<i>BglII</i>)
01e9	TGAGCCATGGCAACAGGCTGCTGCTGCGAG (<i>NcoI</i>)
RC0310	TAGAGTCGACTAATGTGCAGCTGCTGTAC (<i>SaI</i>)
RC0325	ACATGAATTCGCGCAAATCTGTTCC (<i>EcoRI</i>)
RC0436	CCATAGATCTGGCCGAAAAAGCAG (<i>BglII</i>)
RC0437	AGGTGAATTCCTTGTGCAGCTGCTTG (<i>EcoRI</i>)
Ssp2	GGTCCCATGGTGGCGGAGTCC (<i>NcoI</i>)
Ssp3	GCCGGATCCGGCTCTCCGTTGTG (<i>BamHI</i>)

*引入的限制酶位置以括號表示，並以底線標示於序列下方。

[0118] 發明者再利用兩組引子對CH0112-RC0310與RC0436-RC0437以PCR自載體pTrC-prONAT(Y. P. Chao)合成帶有能轉錄納豆激酶基因與其前驅多肽(propeptide)、前納豆激酶(pronattokinase)的DNA。再以限制酶EcoRI-SalI或BglII-EcoRI處理，將所得的PCR產物接合至pOSP1與pOSP2指定的限制酶切位，分別產生載體pNAT1與pNAT2。為了產生類似

pNAT1，但沒有攜帶前驅多肽納豆激酶基因的載體pNAT3，發明者將pOSPI與經由引子RC0310與RC0325增幅的納豆激酶基因增幅片段接合。以類似的步驟，發明者將這個PCR片段中以載體pTrc-proNAT內的前納豆激酶基因替換成為載體pTrc-NAT。

- [0119] 發明者將指定的載體轉形入大腸桿菌菌株BL21(DE3)(Novagene)並以抗青黴素(ampicillin)藥性篩選。將轉形的細胞在Luria-Bertain(LB)培養液中培養，並且使用分光光度計(V530, Jasco)以吸光值550 nm(OD_{550})來測定細胞生長密度。為表現重組蛋白，準備過夜的培養液並分別置入新鮮的培養液中。將細胞培養液維持在37°C，直到細胞密度達到 OD_{550} 值0.5時，以100 μ M IPTG誘導啟動蛋白生產。在4小時的誘導之後，以離心收集細胞，並以1 mL的0.01 M磷酸鈉緩衝液(pH7.5)再懸浮細胞以利之後續的檢測。
- [0120] 重組納豆激酶或是其前驅蛋白，亦即帶有一先導前驅肽前納豆激酶，分別在大腸桿菌中在trc啟動子的控制與IPTG的誘導下表現(圖一)。表現的納豆激酶(28 kDa)或前納豆激酶(37 kDa)主要出現在細胞溶解後的不可溶部分(圖二)。如此產生的納豆激酶或是前納豆激酶並沒有任何的酵素活性。
- [0121] AOB系統係三酸甘油酯，磷脂與油膜蛋白一半胱胺酸蛋白質之雜合多肽組成。AOB依照已揭示方式準備(Peng, C. C., et al, Biotechnol. Prog. 2003, 19, 1623-1626)。將再懸浮於1 mL磷酸鈉緩衝液中的細胞(達到 OD_{550} 值10)以French press打破，接著以離心分離成上清液與沈積碎片。AOBs係於1 mL的10 mM磷酸鈉緩衝液(pH 7.5)中，加入15 mg三酸甘油酯(自Leader Price CO., TW 取得的菜籽油(canola)中分離而得)，150 μ g磷脂，及含550 μ g油膜蛋白一雜合多肽大腸桿菌碎片沉澱層所組成。將混合物以超音波在強度30%下處理20秒。隨後將AOB用離心收回並以緩衝液沖洗。為獲得目標蛋白，將AOB以指定的溫度處理或以40 μ M DTT處理16個鐘頭。最後，以離心分離油層與水層，並以SDS-PAGE或是酵素活性檢定分析在水層或在油層中的蛋白質。
- [0122] 發明者以領域中已知之SDS-PAGE方法(Peng, C. C., et al, J. Biotechnol. 2004, 111, 51-57)分析蛋白質。納豆激酶的活性檢測方法是先加入蛋白質樣本0.01 mL至反應液0.9 mL中，反應液為0.5%caseins在0.1 M磷酸鈉緩衝液(pH7.5)中。將酵素反映在37°C下進行5分鐘再加入0.1 mL 2N HCl停止反應。離心之後，回收上清液並在275 nm下測量。酵素活性的一個CU定義為每分鐘每mL所產生的1 μ mol 酪胺酸(tyrosine)。
- [0123] 為了功能性表達與純化，發明者先將納豆激酶(NK)或前納豆激酶(proNK)以經由內含肽Ssp DnaB(內含肽S)連接到油膜蛋白的碳端的形式，在大腸桿菌中過度表現(圖一)。這兩個過度表現的蛋白，亦即油膜蛋白-內含肽S-NK或油膜蛋白-內含肽S-proNK，皆主要發現於離心後的不溶層中(圖三A，四A)。AOB主要由不溶的碎片沈積，其中主要包含膜蛋白-內含肽S-NK或油膜蛋白-內含肽S-proNK所組成。在離心後，AOB形成一乳狀的『浮渣』漂浮於上，而上清液(sup-2)則相對透明而幾乎不含有碎片沈積(ppt-2)。膜蛋白-內含肽S-NK或油膜蛋白-內含肽S-proNK，以及其他的不溶細菌蛋白，主要都出現在AOB層(圖三B，四B)。這些AOB極穩定且可保持其結構數天，類似文獻中由TAG，PL與其他與油膜蛋白融合的蛋白所組成的AOB(Peng, C. C., et al, J. Biotechnol. 2004, 111, 51-57, Peng, C. C., et al, J. Agric. Food Chem. 2004, 52, 3115-3119)。利用將溫度由4°C提高至37°C，內含肽可自我裂解，並將AOB中的納豆激酶或前納豆激酶釋出。隨後離心，發現成熟的納豆激酶在兩種表現方案中都主要在上清液(sup-3)中出現，而油膜蛋白-內含肽S則主要出現在AOB中(圖三C，四C)。前納豆激酶的前導先驅多肽似乎在與油膜蛋白-內含肽S分離之後便自動裂解。濃縮最後的上清液可得到高產量的可溶納豆激酶。
- [0124] 為得到最佳的純化方法，發明者測試了在不同pH值情況下的純化產量。在兩種表現方案中(利用與膜蛋白-內含肽S-NK或與油膜蛋白-內含肽S-proNK融合)，在pH7-9的蛋白產量是類似的(圖五A)。重組納豆激酶在低於pH6的產量則未測量，因為AOB在酸性條件傾向聚集，可能是因為表面的電負性互斥作用因中和而削弱。基於酪蛋白(casein)較佳的水解性，自油膜蛋白-內含肽S-proNK釋放的表現的納豆激酶其專一活性較自油膜蛋白-內含肽S-NK釋放的高五倍之多(圖五B)。納豆激酶的生產的最佳條件，為在pH 7.5，以AOB表現/純化系統利用油膜蛋白-內含肽S-proNK作為重組載體。一如預期，在重組納豆激酶中可測到血纖維蛋白溶解活性(fibrinolytic activity)(圖六)。
- [0125] 為了測試利用AOB表現純化系統，可否將目標蛋白融合在油膜蛋白的氮端，發明者將前納豆激酶以另一個連接子，內含肽Mxe GyrA(內含肽M)，其可以化合物DTT刺激自我裂解，與油膜蛋白融合(圖一)。此重組蛋白質依前述與油膜蛋白碳端融合的同樣方法過度表現、收

回、融入與自AOB釋放(圖七)。同樣地,成熟的納豆激酶可自最終上清液中收回,而前導前驅多肽亦已自動裂解了。發明者測量了自AOB釋放的重組納豆激酶在4、25與37°C下的產量(圖八A)。發明者發現在37°C可得到相當有效率的產量,並在此溫度下測試不同pH值對產量的影響。發明者發現依此方案,最佳的重組納豆激酶的表現方案是在pH 7.5時(圖八B,八C)。

[0126] 因此,發明者發明了一基於細菌表現與油體技術,可功能性的表達並純化蛋白質的新方法。發明者並以納豆激酶的表現與功能證明此新方法的功效。在此方法中,先將目標蛋白以不可溶的油膜蛋白融合多肽形式過度表現,輕易的以離心方式自細胞溶解中的碎片沈積中回收,重組入AOB後,再以內含肽的自我裂解功能自AOB中分離出來,最後以離心最終上清液的方式濃縮並獲得目標蛋白(圖九)。發明者並發現任一目標蛋白不論與油膜蛋白的氮端或碳端融合,皆可達到約300 mg/L的產量與60%左右的回收率。

【圖式簡單說明】

- [0128] 圖一係一卡通圖顯示所有本發明實例所用的到融合蛋白。納豆激酶、前驅多肽、油膜蛋白、內含肽S、內含肽M的相對位置以及他們的分子量皆顯示於每一重組多肽的圖上。
- [0129] 圖二係在大腸桿菌中表現的納豆激酶與前納豆激酶的SDS-PAGE圖。在有或沒有IPTG的誘導下,發明者將所有大腸桿菌表現的(A)納豆激酶與(B)前納豆激酶萃取、分離成上清液(sup-1)與沈積層(ppt-1)之中,並以SDS-PAGE檢驗。納豆激酶(28 kDa)與前納豆激酶(37 kDa)的位置皆被標示出來。分子量的標記包括 β -galactosidase(116 kDa), bovine serum albumin(66.2 kDa), ovalbumin (45 kDa), lactatedehydrogenase (35 kDa), 限制酶Bsp981 (25 kDa)與 β -lactoglobulin(18.4 kDa)。
- [0130] 圖三係分析在大腸桿菌中表現的油膜蛋白-內含肽S-NK。(A)所有含有油膜蛋白-內含肽S-NK的大腸桿菌皆被萃取、分離至上清液(Sup-1)與沈積層(ppt-1)之中。並以SDS-PAGE分析。(B)AOB與沈積層(ppt-1)和含有油膜蛋白-內含肽S-NK的大腸桿菌的溶解細胞重組。重組後,在10,000 g, 15分鐘的離心後,產生了三個分層,上清層(sup-2), 沈積層(ppt-2)與AOB。以SDS-PAGE分析這三層。(C)將溫度自4提高到25°C以刺激與AOB重組的油膜蛋白-內含肽S-NK的自我裂解。再以離心方式分離成油層(裂解的AOB)與上清液(sup-3)。兩者皆以SDS-PAGE分析之。納豆激酶(28 kDa)與油膜蛋白-內含肽S-NK(63 kDa)的位置皆被標示出來。
- [0131] 圖四係分析在大腸桿菌中過度表現的油膜蛋白-內含肽S-proNK。(A)所有含有油膜蛋白-內含肽S-proNK的大腸桿菌皆被粹取、分離至上清液(Sup-1)與沈積層(ppt-1)之中。並以SDS-PAGE分析。(B) AOB與沈積層(ppt-1)和含有油膜蛋白-內含肽S-proNK的大腸桿菌的溶解細胞重組。重組後,在10,000 g, 15分鐘的離心後,產生了三個分層,上清層(sup-2), 沈積層(ppt-2)與AOB。以SDS-PAGE分析這三層。(C)將溫度自4提高到25°C以刺激與AOB重組的油膜蛋白-內含肽S-proNK的自我裂解。再以離心方式分離成油層(裂解的AOB)與上清液(Sup-3)。兩者皆以SDS-PAGE分析之。納豆激酶(28 kDa)與油膜蛋白-內含肽S-proNK(72 kDa)的位置皆被標示出來。
- [0132] 圖五係在不同pH下利用AOB產生的納豆激酶。自與油膜蛋白-內含肽S-NK(○)油膜蛋白-內含肽S-proNK(●)重組的AOB獲得的納豆激酶的(A)產量與(B)相對專一活性分別在pH 7到9之間測量。
- [0133] 圖六係自AOB生產的納豆激酶的血纖維蛋白溶解活性(fibrinolytic activity)。將一滴雞血凝結置於一瓊脂凝膠上,再以水(控制組)或獲得的納豆激酶處理,測量4-U caseinolytic的活性。在室溫下觀測4小時血凝集的水解。
- [0134] 圖七係分析大腸桿菌中過度表現的proNK-內含肽M-油膜蛋白。(A)所有含有proNK-內含肽M-油膜蛋白的大腸桿菌皆被粹取、分離至上清液(sup-1)與沈積層(ppt-1)之中。並以SDS-PAGE分析。(B)AOB與沈積層(ppt-1)和含有proNK-內含肽M-油膜蛋白的大腸桿菌的溶解細胞重組。重組後,在10,000 g, 15分鐘的離心後,產生了三個分層,上清層(sup-2), 沈積層(ppt-2)與AOB。以SDS-PAGE分析這三層。(C)加入DTT以刺激與AOB重組的proNK-內含肽M-油膜蛋白的自我裂解。再以離心方式分離成油層(裂解的 AOB)與上清液(sup-3)。兩者皆以SDS-PAGE分析之。納豆激酶(28 kDa)與proNK-內含肽M-油膜蛋白(77 kDa)的位置皆被標示出來。
- [0135] 圖八係自與proNK-內含肽M-油膜蛋白重組的AOB產生納豆激酶。(A)分別在4, 25與37°C測量與proNK-內含肽M-油膜蛋白重組的AOB產生的納豆激酶的產量(pH 7.5)。在pH 7到9之間測量這個重組納豆激酶的(B)產量與(C)相對專一活性。

[0136] 圖九係AOB表現/純化系統的示意圖。步驟1(以阿拉伯數字顯示)：在大腸桿菌中過度表現目標蛋白，該蛋白為一不溶性的融合油膜蛋白。步驟2：AOB與不溶的油膜蛋白一內含肽融合蛋白的組成。步驟3：以離心收集AOB。步驟4：透過溫度改變或加入DTT將目標蛋白自結合於AOB的油膜蛋白一內含肽融合蛋白分離。步驟5：收集離心後在最終上清液中的目標蛋白。

【主要元件符號說明】

[0127]

七、申請專利範圍：

1. 一種多肽，係包括：c. 一結合油體之末端肽；及d. 一內含肽(intein)胺基酸片段，其係連接至末端肽。
2. 根據申請專利範圍第1項之多肽，其另包含一目標多肽，該多肽連接至內含肽。
3. 根據申請專利範圍第1項之多肽，其係利用酵母菌或細菌宿主細胞生產。
4. 根據申請專利範圍第3項之多肽，其中細菌宿主細胞係大腸桿菌。
5. 根據申請專利範圍第1項之多肽，其中內含肽之自我剪接反應功能可用化合物、溫度或pH值改變誘導啟動。
6. 根據申請專利範圍第1項之多肽，其中內含肽(intein)為Mxe GyrA或Ssp DnaB。
7. 根據申請專利範圍第1項之多肽，其中結合油體肽係指油膜蛋白質(oleosin)，其對結合油體有高度親合性。
8. 根據申請專利範圍第2項之多肽，其中目標多肽係單一產品肽或單一產品肽之多重複製品。
9. 根據申請專利範圍第2項之多肽，其中目標多肽與該多肽之前肽(propeptide)以操作性方向連接。
10. 根據申請專利範圍第9項之多肽，其中前肽與目標多肽皆可直接與內含肽連接。
11. 根據申請專利範圍第2項之多肽，其中目標多肽係指納豆激酶(nattokinase)。
12. 根據申請專利範圍第5項之多肽，其中化合物係指二硫蘇糖醇(dithiothreitol, DTT)。
13. 根據申請專利範圍第5項之多肽，其中溫度係指0°C至50°C。
14. 根據申請專利範圍第13項之多肽，其中溫度係指4°C至37°C。
15. 根據申請專利範圍第14項之多肽，其中溫度係指25°C至37°C。
16. 根據申請專利範圍第15項之多肽，其中溫度係指37°C。
17. 根據申請專利範圍第5項之多肽，其中pH值係指pH 6.5至pH 9.5。
18. 根據申請專利範圍第17項之多肽，其中pH值係指pH 7至pH 9。
19. 根據申請專利範圍第18項之多肽，其中pH值係指pH 7.5。
20. 根據申請專利範圍第7項之多肽，其中油膜蛋白質係來自於植物。
21. 根據申請專利範圍第7項之多肽，其中油膜蛋白質係來自菜籽油(canola oil)。
22. 一種混合物，包含申請專利範圍第1項之多肽及用於和此多肽中結合油體肽結合之油體。
23. 根據申請專利範圍第22項之混合物，係用於純化目標多肽。
24. 根據申請專利範圍第22項之混合物，其中油體係從植物中提煉。
25. 根據申請專利範圍第22項之混合物，其中油體係從菜籽油中提煉。
26. 根據申請專利範圍第22項之混合物，其中油體為人工合成。
27. 根據申請專利範圍第22項之混合物，其中油體係由三酸甘油酯與磷脂組成。
28. 根據申請專利範圍第27項之混合物，其中油體中三酸甘油酯與磷脂之比例為50：1至1：50。
29. 根據申請專利範圍第28項之混合物，其中油體中三酸甘油酯與磷脂之比例為100：1至1：100。
30. 根據申請專利範圍第29項之混合物，其中油體中三酸甘油酯與磷脂之比例為100：1。
31. 根據申請專利範圍第22或27項之混合物，其中油體中之磷脂與多肽之比例為1：10至10：1。
32. 根據申請專利範圍第31項之混合物，其中油體中之磷脂與多肽之比例為1：4至4：1。
33. 根據申請專利範圍第32項之混合物，其中油體中之磷脂與多肽之比例為1：4。
34. 一種純化目標多肽之方法，包括以下步驟：a. 製備多肽，其包含：i. 一結合油體之末端肽；ii. 一內含肽(intein)胺基酸片段，其係連接至末端肽；及iii. 一目標多肽，該多肽連接至內含肽；b. 混合多肽與油體，而產生油體混合物；c. 將油體混合物從其餘細胞萃取物之碎片分離；d. 將目標多肽從結合油體部分切割；及e. 將目標多肽從其餘油體

混合物分離。

35. 根據申請專利範圍第34項之多肽，其中內含肽之自我剪接反應功能可用化合物、溫度或pH值改變誘導啟動。

36. 根據申請專利範圍第34項之多肽，其中目標多肽係單一產品肽或單一產品肽之多重複製品。

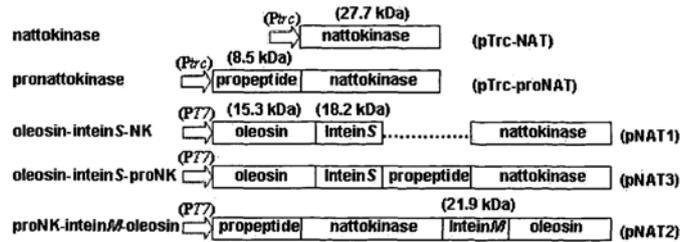
37. 根據申請專利範圍第34項之方法，其中步驟b之混合物可使用超音波震盪產生。

38. 根據申請專利範圍第34項之方法，其中步驟c之分離可用離心處理。

39. 根據申請專利範圍第34項之方法，其中步驟e之目標多肽可用離心將其與油體混合物之剩餘物中分離。

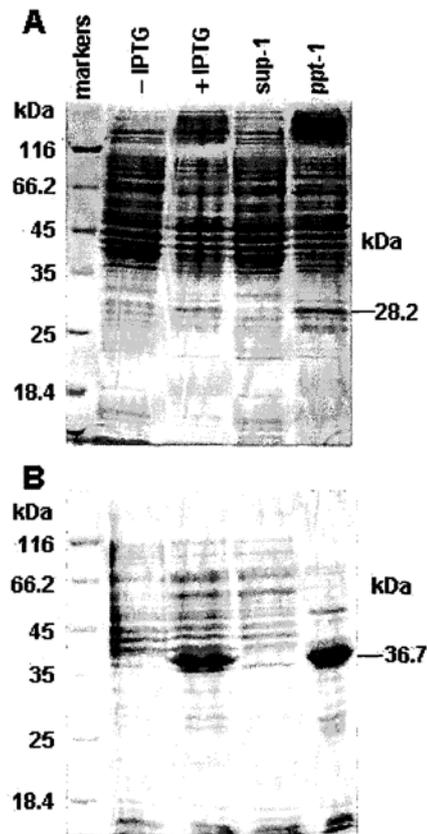
八、圖式：

圖一



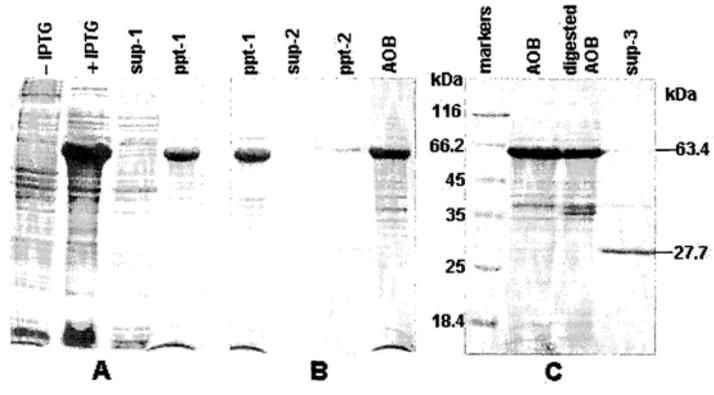
圖一

圖二



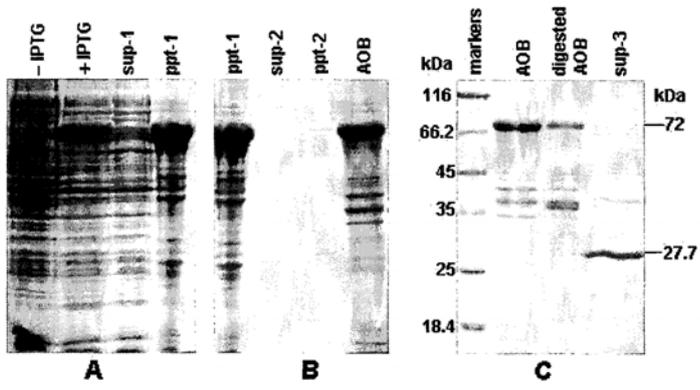
圖二

圖三



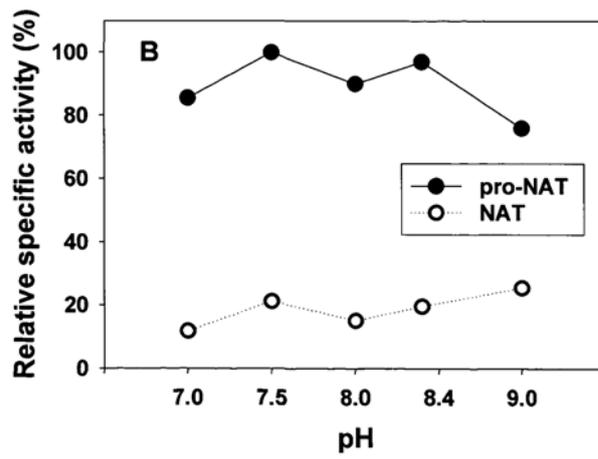
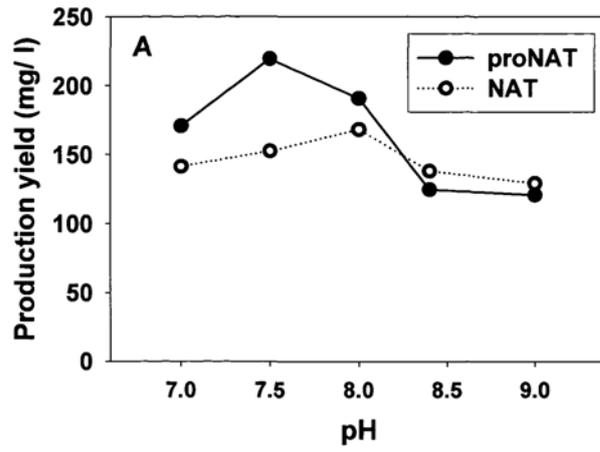
圖三

圖四



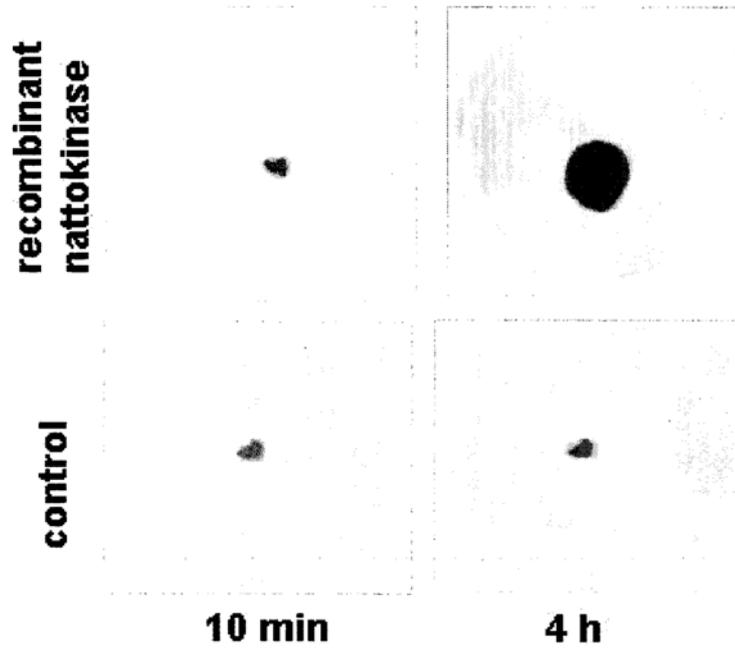
圖四

圖五



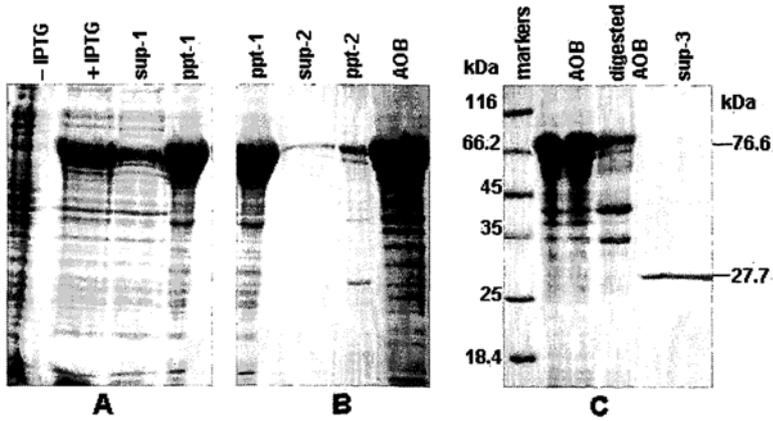
圖五

圖六



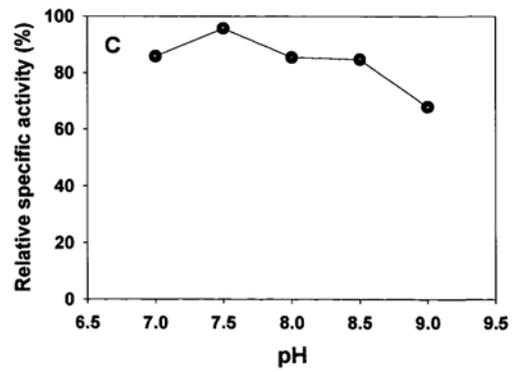
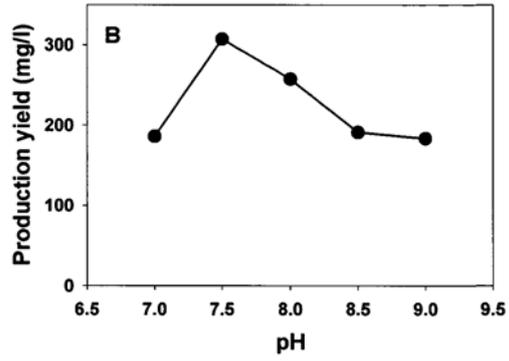
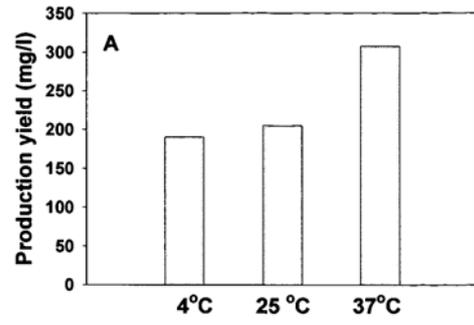
圖六

圖七



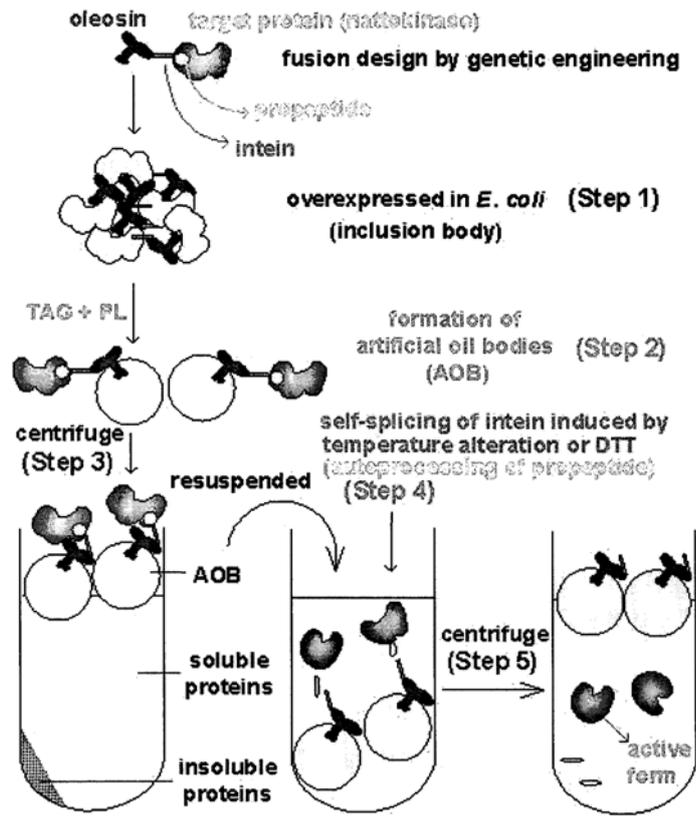
圖七

圖八



圖八

圖九



圖九