



(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 201410700 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 03 月 16 日

(21)申請案號：101133239

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 09 月 12 日

(51)Int. Cl.：

C07K1/30 (2006.01)

C12N15/70 (2006.01)

(71)申請人：鄭至玉 (中華民國) CHENG, CHIH YU (TW)

高雄市楠梓區海專路 142 號厚生樓 428 室

蔡嘉煌 (中華民國) TSAI, CHIA HUANG (TW)

高雄市楠梓區海專路 142 號厚生樓 428 室

(72)發明人：鄭至玉 CHENG, CHIH YU (TW)；蔡嘉煌 TSAI, CHIA HUANG (TW)；柳佩君
LIU, PEI JYUN (TW)

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：7 項 圖式數：5 共 14 頁

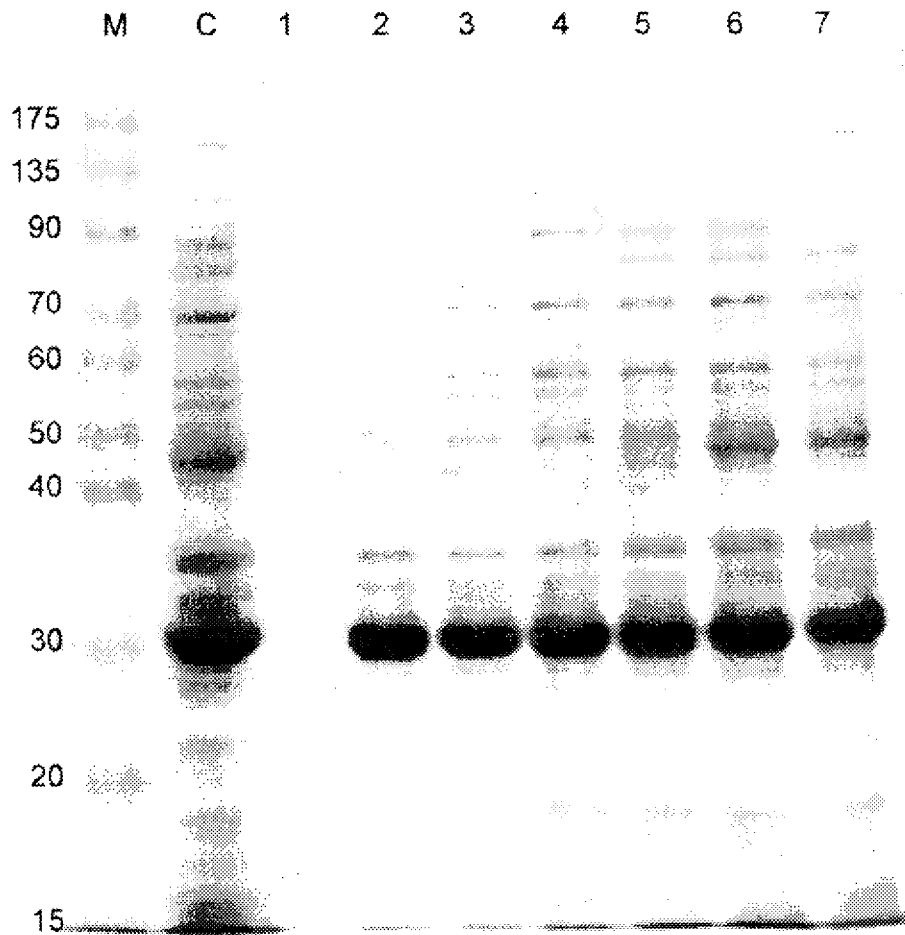
(54)名稱

快速純化大腸桿菌中重組蛋白幾丁聚醣酶的方法

PURIFICATION OF RECOMBINANT CHITOSANASE FROM E. COLI

(57)摘要

本發明係關於一種分離蛋白質之方法。詳言之，該方法是以選擇性沉澱法將雜蛋白固化沉澱，並留下目標蛋白的方法。尤其用以磷酸鹽類去除大腸桿菌的雜蛋白，有效分離重組蛋白幾丁聚醣酶的方法。本發明之方法經證實在無需合併其他純化方法之情況下，即可大幅增加重組蛋白幾丁聚醣酶的純度，達到快速、便捷、大量操作與降低成本的目的。



第2圖

不同 pH 值的 300 mM 磷酸緩衝液對選擇性沉澱影響之 SDS-PAGE 分析圖

C：對照組，菌體以 20 mM、pH 7.0 磷酸緩衝液進行選擇性沉澱的上清液

M：蛋白質標準品

1：菌體以 pH 3.0 磷酸緩衝液進行選擇性沉澱後的上清液

2：菌體以 pH 4.0 磷酸緩衝液進行選擇性沉澱後的上清液

3：菌體以 pH 4.5 磷酸緩衝液進行選擇性沉澱後的上清液

4：菌體以 pH 5.0 磷酸緩衝液進行選擇性沉澱後的上清液

5：菌體以 pH 6.0 磷酸緩衝液進行選擇性沉澱後的上清液

6：菌體以 pH 7.0 磷酸緩衝液進行選擇性沉澱後的上清液

7：菌體以 pH 8.0 磷酸緩衝液進行選擇性沉澱後的上清液

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： 101133238

※申請日： 101 9 18

※IPC 分類： C07K 1/30 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

快速純化大腸桿菌中重組蛋白幾丁聚醣酶的方法

Purification of recombinant chitosanase from *E. coli*

二、中文發明摘要：

本發明係關於一種分離蛋白質之方法。詳言之，該方法是以選擇性沉澱法將雜蛋白固化沉澱，並留下目標蛋白的方法。尤其用以磷酸鹽類去除大腸桿菌的雜蛋白，有效分離重組蛋白幾丁聚醣酶的方法。本發明之方法經證實在無需合併其他純化方法之情況下，即可大幅增加重組蛋白幾丁聚醣酶的純度，達到快速、便捷、大量操作與降低成本的目的。

三、英文發明摘要：

The present invention provides a method for isolating protein and in particular a process for purifying recombinant protein from contamination proteins by selective precipitation. Such methods are particularly useful for purify recombinant chitosanase from *E. coli*. It has been confirmed to increase the purity of chitosanase without others purification. Furthermore, the present invention facilitates the purification and cost reduction.

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：

不同 pH 值的 300 mM 磷酸緩衝液對選擇性沉澱影響之 SDS-PAGE 分析圖

M：蛋白質標準品；

C：對照組，菌體以 20 mM、pH 7.0 磷酸緩衝液進行選擇性沉澱的上清液；

1：菌體以 pH 3.0 磷酸緩衝液進行選擇性沉澱後的上清液；

2：菌體以 pH 4.0 磷酸緩衝液進行選擇性沉澱後的上清液；

3：菌體以 pH 4.5 磷酸緩衝液進行選擇性沉澱後的上清液；

4：菌體以 pH 5.0 磷酸緩衝液進行選擇性沉澱後的上清液；

5：菌體以 pH 6.0 磷酸緩衝液進行選擇性沉澱後的上清液；

6：菌體以 pH 7.0 磷酸緩衝液進行選擇性沉澱後的上清液；

7：菌體以 pH 8.0 磷酸緩衝液進行選擇性沉澱後的上清液。

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】

本發明係關於一種分離蛋白質之方法，尤其是關於一種以選擇性沉澱法將基因重組後的宿主雜蛋白固化沉澱，而使重組蛋白以溶解態存在於溶液中的方法。

【先前技術】

由於基因工程的成熟發展，使用基因重組的方式，將外來基因送入其他物種以進行蛋白質的大量生產，已經是一種廣泛應用且快速有效的方法。然而，由於宿主細胞內除了重組蛋白質之外，仍有許多宿主本身的蛋白質，所以須經由許多繁複的分離純化步驟，將重組蛋白質與宿主蛋白分離，增加許多製造過程的成本。

一般常用來分離純化蛋白質的方式包括：萃取、沉澱法、離子交換法、透析(dialysis)、膠體過濾法(gel filtration)、親合性層析法(affinity chromatography)、超過濾(ultrafiltration)、電泳法(electrophoresis)、離心法(centrifugation)等。依據酵素的特性，常常需要以多個純化步驟從粗萃取物中分離出目標重組蛋白質。然而，每個純化步驟不僅會增加製造成本，也可能使目標蛋白減損，使產率降低。因此，減少純化步驟是很重要的。

目前，親和性層析法是分離度極高的純化方法之一。一般而言，這類純化系統需要以融合蛋白質(fusion protein)的形式，將標記蛋白(Tag)連接於目標蛋白質之上，藉此標記蛋白提供在純化過程中的專一性結合，以單一管柱層析將目標蛋白分離出來。必要時，須再以特殊的酵素將標記蛋白與目標蛋白質截切、移除。然而，此方法的施行仍須要有專業昂貴的膠體管柱與試劑，加上處理容量低及操作不穩定等原因，尚未被廣泛應用在工業規模的酵素純化上。

沉澱法則是處理容量高、操作簡便與成本低廉的純化方法之一，常用來作為蛋白質濃縮或是初步分離的方法。此法主要是利用蛋白質溶解度特性的不同，以添加鹽類、極性或非極性溶液、聚合物、沉澱劑、

親和性配位基或是物理方法等，改變混合蛋白溶液中的離子強度、溫度、pH 值等，使其產生沉澱的固相或是可溶性的液相而將之分離。其中較常用的方法包括：PEG 沈澱法、三氯乙酸 (TCA) 沉澱法、丙酮沉澱法、酒精沉澱法與硫酸銨沈澱法等。

此類沉澱法中，三氯乙酸、丙酮與酒精沉澱法可有效沉澱蛋白質，但易造成蛋白質的不可逆變性現象而失去原有生物活性；反之，硫酸銨沈澱法可回復活性蛋白質 (active form)，但分離率相對較差，需配合其他形式的純化方法，才得以獲得較純的蛋白質；此外，硫酸銨沈澱法在大量應用常會遭遇到氣體氨不當產生的困擾。

由於重組蛋白的不同特性，目前已有不少可產業利用的製備方式，例如：以酒精沉澱製備胜肽 (US20100273983: Method of purifying peptides by selective precipitation)、以檸檬酸沉澱製備抗體 (US8063189: Protein purification by citrate precipitation)。因此，適當的沉澱法可以是在產業上生產酵素的有效工序。

幾丁聚醣酶由於可做為生物防治以及應用在甲殼多醣的製備，其應用與需求近年來有日益增加的趨勢，然而，此酵素的大量生產仍是產業應用的最大瓶頸。

【發明內容】

爰此，本發明揭露一種分離蛋白質之沉澱方法，藉由特定條件的磷酸緩衝液對大腸桿菌雜蛋白質的選擇性沉澱，可大量操作並有效去除宿主雜蛋白，留下目標重組蛋白--幾丁聚醣酶。

【實施方式】

使用基因重組的方式，先將含目標重組蛋白的基因送入大腸桿菌以進行重組蛋白質的生產。大腸桿菌經繁殖及誘導生產之後，以 100-800 mM pH 3-5 之磷酸緩衝液處理菌體或胞內萃取物使其產生失活沉澱，再經離心工序，即可將大腸桿菌的雜蛋白去除，並留下重組蛋白--幾丁聚醣酶。以下較佳實施例並非完全表示本發明所能涵蓋之完全範圍。在此僅舉例解釋本發明。

【較佳實施例之詳細說明】（附流程圖如第 1 圖）

現在參照以下非限制性實例說明本發明。該製程（如第 1 圖）包括以下步驟：

- 1、步驟 1（培養基之備製）：Luria-Bertani 培養基（LB medium）以滅菌釜高溫高壓滅菌。
- 2、步驟 2（純種培養）：將單一菌落的重組大腸桿菌（指含有外來基因片段的重組大腸桿菌，如本發明實施例所採用之含有 pET20b-csn 質體之大腸桿菌 BL21（DE3））接種至步驟 1 所製備的 5 ml 培養基內，並加入抗生素 ampicillin 至濃度達 0.1 mg/ml。在攝氏 37-42 度下震盪培養 12 小時。
- 3、步驟 3（菌株之繼代培養）：將步驟 2 之菌體轉移至 100 ml LB-Amp medium 於攝氏 37-42 度、培養 4-8 小時或分光光度計測菌體濃度達 OD_{600nm} 吸光值至 2.5。
- 4、步驟 4（誘導培養）：轉移上述細菌細胞至 500 ml LB-Amp medium（含 1 mM IPTG）中，於攝氏 37-42 度培養 2-4 小時，或菌體濃度在 OD_{600nm} 為 2.0。
- 5、步驟 5（取得菌體）：將上述培養菌液離心（8,400 g，10 min，4°C）獲得菌體。
- 6、步驟 6（懸浮、破菌與選擇性沉澱）：以 25 ml 300 mM 磷酸緩衝液懸浮、超音波破菌、離心（8,400 g，20 min，4°C），上層液即為可溶的重組蛋白質。

在步驟 6 中，不同溶液的濃度與 pH 值對此發明分離出重組蛋白幾丁聚糖酶（分子量約 27 kDa）之影響如第 2 至第 5 圖所示。第 2 圖與第 3 圖為 300 mM 磷酸緩衝液 pH 值 3.0 至 8.0 進行選擇性沉澱影響後上清液之分析結果；由此實驗可看出，磷酸緩衝液 pH 越低，上清液所獲得的蛋白質濃度越低，酵素活性略為下降，表示目標蛋白質純度越高，並在 pH 4.5 時會得到一最大比活性。第 4 圖與第 5 圖則為不同濃度的 pH 4.5 磷酸緩衝液對選擇性沉澱影響之分析結果；結果顯示，磷酸緩衝液濃度越高，上清液所獲得的蛋白質濃度越低，酵素活性略為

下降，表示目標蛋白質純度越高，並在 350 mM 之後得到一穩定的最大比活性。

當利用 300 mM pH 4.5 的磷酸緩衝液對 500 ml 大腸桿菌進行選擇性沉澱可得重組蛋白幾丁聚糖酶的純度至 80% 以上。

【圖式簡單說明】

第 1 圖 快速純化大腸桿菌中重組蛋白幾丁聚糖酶流程圖。

- 3：純種培養含有重組質體之菌體（如實施例步驟 2 與步驟 3）；
- 4：大量培養含有重組質體之菌體並以 IPTG 誘導其生產幾丁聚糖酶（如實施例步驟 4）；
- 5：施以離心工序以回收菌體（如實施例步驟 5）；
- 6A：加入磷酸緩衝液（如實施例步驟 6）；6B：超音波破菌；
- 6C：離心；SS：離心後之上清液，亦即為可溶的目標蛋白所在；
- P：離心後大腸桿菌雜蛋白之沉澱物。

第 2 圖 不同 pH 值的 300 mM 磷酸緩衝液對選擇性沉澱影響之 SDS-PAGE 分析圖

- M：蛋白質標準品；
- C：對照組，菌體以 20 mM、pH 7.0 磷酸緩衝液進行選擇性沉澱的上清液；
- 1：菌體以 pH 3.0 磷酸緩衝液進行選擇性沉澱後的上清液；
- 2：菌體以 pH 4.0 磷酸緩衝液進行選擇性沉澱後的上清液；
- 3：菌體以 pH 4.5 磷酸緩衝液進行選擇性沉澱後的上清液；
- 4：菌體以 pH 5.0 磷酸緩衝液進行選擇性沉澱後的上清液；
- 5：菌體以 pH 6.0 磷酸緩衝液進行選擇性沉澱後的上清液；
- 6：菌體以 pH 7.0 磷酸緩衝液進行選擇性沉澱後的上清液；
- 7：菌體以 pH 8.0 磷酸緩衝液進行選擇性沉澱後的上清液。

第 3 圖 磷酸緩衝液 pH 值對選擇性沉澱影響之量化分析圖。

- ：以 20-800 mM、pH 4.5 磷酸緩衝液做選擇性沉澱後，上清液的蛋白質濃度；
- ◆：以 20-800 mM、pH 4.5 磷酸緩衝液做選擇性沉澱後，上清液的相對酵素活性；
- ▲：以 20-800 mM、pH 4.5 磷酸緩衝液做選擇性沉澱後，上清液的比活性 (U/mg)。
- 、◇、△分別為對照組的濃度、相對活性 (原始酵素活性 122 U/ml) 以及比活性。

第 4 圖 pH 4.5 磷酸緩衝液濃度對選擇性沉澱影響之 SDS-PAGE 分析圖。

M：蛋白質標準品；

C：對照組，以 20 mM、pH 7.0 磷酸緩衝液處理的上清液。

- 1：菌體以 20 mM 磷酸緩衝液進行選擇性沉澱後的上清液；
- 2：菌體以 100 mM 磷酸緩衝液進行選擇性沉澱後的上清液；
- 3：菌體以 200 mM 磷酸緩衝液進行選擇性沉澱後的上清液；
- 4：菌體以 250 mM 磷酸緩衝液進行選擇性沉澱後的上清液；
- 5：菌體以 300 mM 磷酸緩衝液進行選擇性沉澱後的上清液；
- 6：菌體以 350 mM 磷酸緩衝液進行選擇性沉澱後的上清液；
- 7：菌體以 400 mM 磷酸緩衝液進行選擇性沉澱後的上清液；
- 8：菌體以 500 mM 磷酸緩衝液進行選擇性沉澱後的上清液；
- 9：菌體以 600 mM 磷酸緩衝液進行選擇性沉澱後的上清液；
- 10：菌體以 700 mM 磷酸緩衝液進行選擇性沉澱後的上清液；
- 11：菌體以 800 mM 磷酸緩衝液進行選擇性沉澱後的上清液。

第 5 圖 緩衝液濃度對選擇性沉澱影響之量化分析圖。

- ：以 20-800 mM、pH 4.5 磷酸緩衝液做選擇性沉澱後，上清液的蛋白質濃度；
- ◆：以 20-800 mM、pH 4.5 磷酸緩衝液做選擇性沉澱後，上清液的酵素活性；

▲：以 20-800 mM、pH 4.5 磷酸緩衝液做選擇性沉澱後，上清液的比活性 (U/mg)。

□、◇、△分別為對照組的濃度、相對活性 (原始酵素活性 122 U/ml) 以及比活性。

【主要元件符號說明】

M：蛋白質分子量標準品；

C：誘導生產重組蛋白之大腸桿菌全蛋白；

■：實驗組的蛋白質濃度；

◆：實驗組的酵素活性；

▲：實驗組的比活性；

□：對照組的蛋白質濃度；

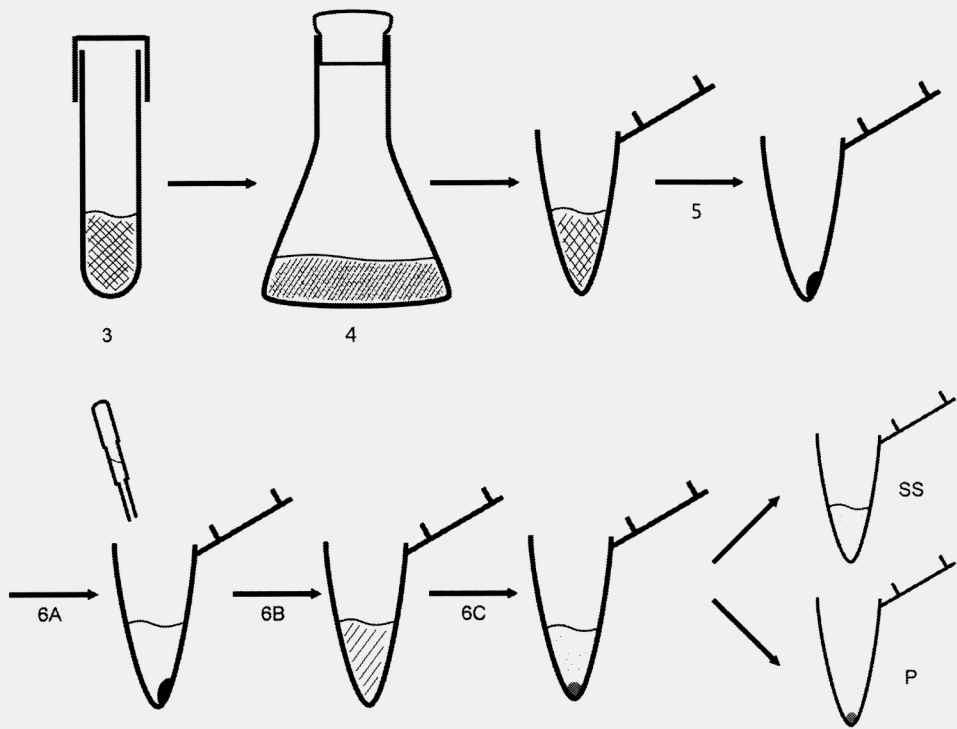
◇：對照組的酵素活性；

△：對照組的比活性。

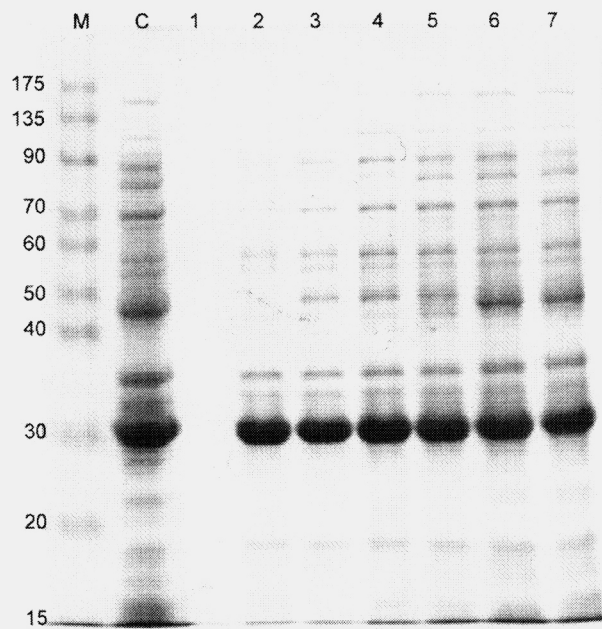
七、申請專利範圍：

1. 一種分離純化蛋白質之方法，包含以下的步驟：a.) 提供一重組大腸桿菌（指含有外來基因片段的重組大腸桿菌）；b.) 將誘導生產重組蛋白後的重組大腸桿菌菌體，以鹽類溶液懸浮；c.) 利用超音波破菌；d.) 過濾雜質藉以取得目標蛋白。
2. 如專利申請範圍第 1 項所述之方法，其中步驟 b 之鹽類溶液為 100-800 mM，pH 3-5 之磷酸鹽溶液。
3. 如專利申請範圍第 1 項所述之方法，其中步驟 c 可以為其他破菌方法，如冷凍/解凍、化學法、酵素法、高壓法等。
4. 如專利申請範圍第 1 項所述之方法，其中步驟 b、c 可同時進行。
5. 如專利申請範圍第 1 項所述之方法，其中步驟 d 可以為離心法、沉降法、過濾法等固液分離方法。
6. 如專利申請範圍第 1 項所述之方法，其中步驟 d 的目標蛋白可以為幾丁聚醣酶、幾丁質酶、胃蛋白酶、10 個胺基酸以內的短鏈胜肽、70 個胺基酸以內的聚胜肽、胰蛋白酶、脂肪分解酶、轉氨酶、葡萄糖氧化酶、超氧歧化酶、酪胺酸氧化酶、纖維素水解酶、玻尿酸分解酶、耐酸性酵素等。
7. 如專利申請範圍第 3 項所述之磷酸鹽溶液，可以為鉀鹽、鈉鹽或鉀鈉鹽混合之磷酸鹽溶液。

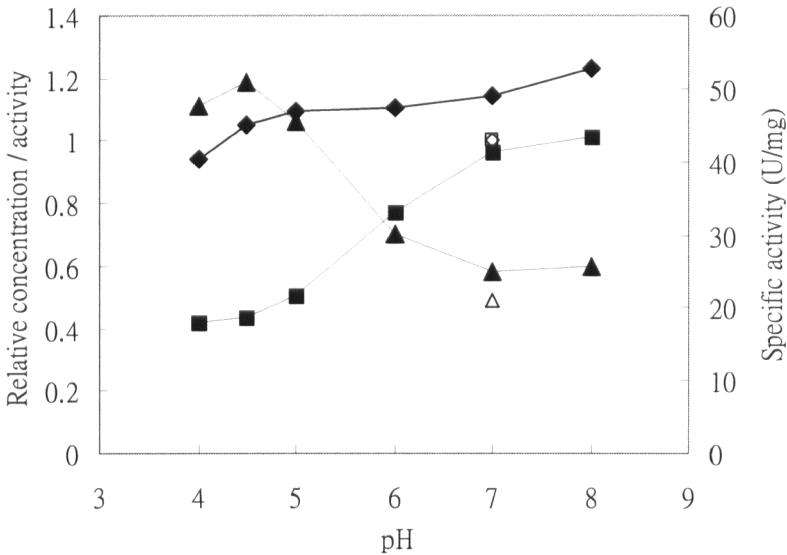
八、圖式：



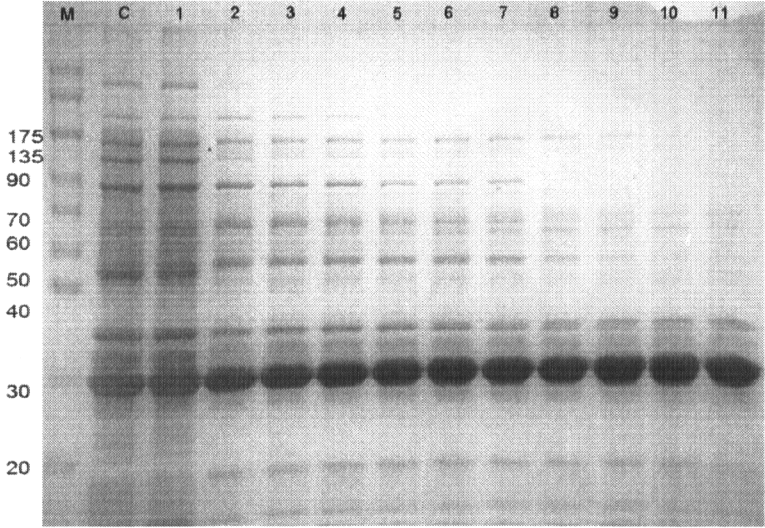
第 1 圖



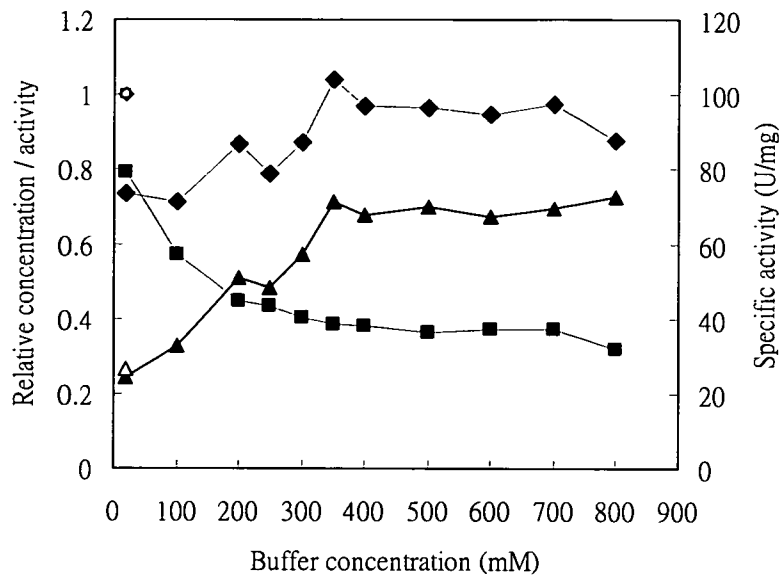
第 2 圖



第3圖



第4圖



第5圖