

公告本

723832-1

申請日期	84 年 10 月 5 日
案 號	90121023 (由84/10496分署/2) A4 C4
類 別	C12N 9/26, 15/56, 15/51

(以上各欄由本局填註)

575665

發明專利說明書

一、發明 名稱	中 文	製備將麥芽糖轉化為海藻糖之重組型對熱安定之酵素的方法
	英 文	Process for preparing a recombinant thermostable enzyme for converting maltose into trehalose
二、發明 人	姓 名	(1) 津崎桂二 (2) 久保田倫夫 (3) 杉本利行
	國 籍	(1) 日本 (2) 日本 (3) 日本 (1) 日本國岡山縣倉敷市福田町古新田四七二番地
	住、居所	(2) 日本國岡山縣岡山市四御神一番三〇 (3) 日本國岡山縣岡山市東畦六九五番四四號
三、申請人	姓 名 (名稱)	(1) 林原生物化學研究所股份有限公司 株式会社林原生物化学研究所
	國 籍	(1) 日本 (1) 日本國岡山縣岡山市下石井一丁目二番三號
	住、居所 (事務所)	
	代 表 人 名 姓 名	(1) 林原健

裝

訂

線

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C 分類：

A6
B6

本案已向：

國 (地區) 申請專利，申請日期： 案號： ， ☐ 有 ☐ 無主張優先權

日本	1994 年 10 月 1 日	260984/1994	☒ 無主張優先權
日本	1995 年 9 月 8 日	255829/1995	☒ 無主張優先權

有關微生物已寄存於： ， 寄存日期： ， 寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝
訂
線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (1)

< 發明背景 >

(發明範疇)

本發明與一種將麥芽糖轉化為海藻糖的新重組型對熱安定酵素有關。

(先前技術描述)

海藻糖是一種含有兩個葡萄糖分子以還原基鍵結在一起之雙醣類，天然狀態下它以極小的量存在於細菌，黴菌，海藻，昆蟲等等之體內。此分子中無還原基團，海藻糖甚至在與胺基酸或其類似物共同加熱時也不會發生令人不悅的褐化反應，因此它能便利地使食物變甜而不必擔心引起著色及敗壞。然而，以傳統方式海藻糖不易製得合適的量，事實上它很少用在使食物變甜。

得到海藻糖的傳統方法粗略地分成兩組，其一是取自於微生物細胞另一則是利用多重酵素系統作用於醣類。前者揭露於日本專利 Laid-Open 第 1 5 4 , 4 8 5 / 7 5 號是一種包含使細菌及酵母菌生長的營養培養基及由培養液收集海藻糖的方法。後者揭露於日本專利 Laid-Open 第 2 1 6 , 6 9 5 / 8 3 號，是一種包含提供麥芽糖當受質，以令麥芽糖及海藻糖加上磷酸根的多重酵素系統作用於麥芽糖上並且由反應物中分離出海藻糖的方法。雖然前者在微生物的生長上沒有特別的困難，但是有培養液中最多只含有海藻糖 1 5 % w / w (按乾固重計) 的缺點。後者則能分離出具有相當量的海藻糖，但它以酵素作用於相當

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(2)

高濃度之受質來增加海藻糖的產量在理論上是困難的，因為酵素反應就其本身而言是一種具有2種不同型式之酵素的平衡反應，並且平衡點持續地傾向於形成葡萄糖磷酸鹽的那一邊。

以前述的觀點，本發明者全力篩選能直接將麥芽糖轉化為海藻糖之酵素，一種作用於麥芽糖形成海藻糖的全新酵素，屬於揭露於日本專利申請第199,971/93號 *Pimelobacter*及 *Pseudomonas*屬之微生物。這表示能由大量買到且低花費的麥芽糖製備出海藻糖，此酵素的使用完全克服前述的缺點。

這些微生物中所有的酵素最適溫度約為20-40℃，這似乎不適於製造對熱安定的海藻糖。澱粉及含澱粉之受質的糖化作用能在超過55℃的溫度下反應是被認定的：如果糖化反應在小於或等於55℃下進行，會增加細菌污染物，降低反應物pH並使酵素不活化，會使相當大量之受質完全不被作用。如果糖化反應以對熱安定性差的酵素來作用，重要的是要注意pH的改變，一旦pH降低，必須趕快加鹼至反應物中以增加pH值。

以前述的觀點，本發明者更進一步研究由 *Thermus*屬之微生物例如 *Thermus aquaticus*(ATCC 33923)製得具有相當活性的對熱安定酵素，這種酵素在超過55℃之溫度下作用不會完全去活化而能有效地將麥芽糖轉化為海藻糖。這些酵素在酵素生產活性上是不夠的，這導致出海藻糖的工業生產量不可避免地必須考慮到微生物的大量培養。

五、發明說明 (4)

本發明的第一個目的以一種重組型酵素來達成。

本發明的第二個目的以一種編碼此重組型酵素的
D N A 來達成。

本發明的第三個目的以一種含有 D N A 及能自行複製
之載體的可複製重組型 D N A 來達成。

本發明的第四個目的以一種引入可複製重組 D N A 至
合適宿主之轉形體來達成。

本發明的第五個目的以將轉形體培養於營養培養基中
來製造重組型酵素並且由培養後之培養液中收集形成的重
組型酵素來達成。

本發明的第六個目的以一種包含可使重組型酵素作用
於麥芽糖來形成海藻糖之步驟的酵素轉化方法來達成。

< 附圖之簡略說明 >

圖 1 表示由 *Thermus aquaticus*(ATCC 33923)製得酵
素之最適溫度。

圖 2 表示由 *Thermus aquaticus*(ATCC 33923)製得酵
素之最適 p H 值。

圖 3 表示由 *Thermus aquaticus*(ATCC 33923)製得酵
素之對熱安定性。

圖 4 表示由 *Thermus aquaticus*(ATCC 33923)製得酵
素之對 p H 值安定性。

圖 5 表示得自本發明之重組型 D N A P B T M 2 2
結構。

五、發明說明(6)

素實體為具有如下理化特性的多胜肽：

(1) 作用

作用於麥芽糖以形成海藻糖；反之亦然。

(2) 分子量 (M W)

以十二烷硫酸鈉聚丙烯醯胺膠體電泳 (S D S - P A G E) 分析約為 1 0 0 , 0 0 0 - 1 1 0 , 0 0 0 道耳吞；

(3) 等電點 (p I)

以等電電泳分析約為 3 . 8 - 4 . 8 。

(4) 最適溫度

在 p H 7 . 0 下靜置反應 6 0 分鐘約為 6 5 ° C ；

(5) 最適 p H

在 6 0 ° C 下靜置反應 6 0 分鐘約為 6 . 0 - 6 . 7 ；

(6) 對熱安定性

甚至在 p H 7 . 0 下靜置反應 6 0 分鐘溫度升高至 8 0 ° C 仍然安定；及

(7) 對 p H 安定性

甚至在 6 0 ° C 下靜置反應 6 0 分鐘 p H 由 5 . 5 -

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (7)

9 . 5 , 酵素仍然安定。

揭露此由 *Thermus aquaticus*(ATCC 33923)製得之對熱安定酵素之理化特性的實驗如下：

實施例 1

酵素之純化

實施例 1 - 1

酵素之製造

在 5 0 0 - m l Erlenmeyer 培養瓶中置入 1 0 0 m l 含有 0 . 5 w / v % 多胜脲，0 . 1 w / v % 酵母菌萃取物，0 . 0 7 w / v % 硝酸鈉，0 . 0 1 w / v % 磷酸二氫鈉，0 . 0 2 w / v % 十七羥硫酸鎂，0 . 0 1 w / v % 氯化鈣及水之液態培養基 (p H 7 . 5)，培養瓶在壓力鍋中經 1 2 0 °C 2 0 分鐘完成滅菌。培養瓶冷卻後 *Thermus aquaticus*(ATCC 33923)的原始培養液接種至每一個培養瓶中，接著在 2 0 0 r p m 的旋轉震盪條件下於 6 0 °C 靜置反應 2 4 小時以得到種子培養液。

將新配製的相同液態培養基放在 2 0 個 3 0 升之罐狀發酵瓶中，滅菌並冷卻至 6 0 °C，接種 1 v / v % 種子培養液至每個發酵瓶中，將其在 p H 6 . 0 - 8 . 0，6 0 °C 以空氣不斷攪入之條件下培養 2 0 小時。

接下來，最後培養液的酵素活性經分析後顯示約為 0 . 3 5 u n i t s / m l。部分培養液被離心，上清液

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

結

五、發明說明 (8)

經分析顯示具有 $0.02 \text{ units} / \text{m} \ell$ 酵素活性。以 50 mM 磷酸緩衝液 ($\text{pH } 7.0$) 打散細胞並加至原來容積，分析溶液顯示具有 $0.33 \text{ units} / \text{m} \ell$ 酵素活性。

酵素活性以如下分析來測量其效價：放置含有 $20 \text{ w} / \text{v} \%$ 麥芽糖之 10 mM 磷酸緩衝液 ($\text{pH } 7.0$) $1 \text{ m} \ell$ 於試管中，加入 $1 \text{ m} \ell$ 稀釋過的酵素溶液於 60°C 下靜置反應 60 分鐘使酵素作用發生，接下來於 100°C 下靜置反應 10 分鐘來停止酵素反應，其後，部分反應物以 50 mM 磷酸緩衝液 ($\text{pH } 7.5$) 稀釋 11 倍，取出 $0.4 \text{ m} \ell$ 於試管，混入 $0.1 \text{ m} \ell$ 含有 $1 \text{ unit} / \text{m} \ell$ 海藻糖酵素之水溶液，將所得之混合物於 45°C 下靜置反應 120 分鐘並以葡萄糖氧化酶方法測定葡萄糖含量。為了做對照，一置有海藻糖酵素之溶液以 100°C 加熱 10 分鐘去除酵素活性並按上述方法處理。基於上述測葡萄糖含量之方法可評估形成之海藻糖的含量。每一單位酵素活性定義為在上述條件下每一分鐘形成 $1 \mu \text{mol}$ 海藻糖。

實施例 1 - 2

酵素之純化

實施例 1 - 1 得到之培養液經過離心將細胞分離出來，以此方法約可得 0.28 kg 的濕細胞，以 10 mM 磷酸緩衝液 ($\text{pH } 7.0$) 打散，以一般方法瓦解細胞，

五、發明說明 (9)

離心後得到約 1 . 8 升的粗酵素溶液。

溶液以硫酸銨混合達飽和度為 7 0 w / v % , 置於 4 °C 一夜使其鹽析, 離心後得其上清液。此上清液以 1 0 m M 磷酸緩衝液 (p H 7 . 0) 加以混合, 此混合液置於新鮮配製的相同緩衝液中透析 2 4 小時。

透析後袋內的溶液經離心後取其上清液 (1 , 5 6 0 m l) 加入用 5 3 0 m l “DEAE-TOYOPEARL® 650” 裝好的圓柱管中, “DEAE-TOYOPEARL® 650” 是一種由日本東京 Tosoh 公司商品化的離子交換劑, 它事先以 1 0 m M 磷酸緩衝液 (p H 7 . 0) 平衡過, 接著放入其線性梯度為 0 M 至 0 . 4 M 的氯化鈉緩衝液於 1 0 m M 磷酸緩衝液 (p H 7 . 0) 之圓柱管中。由圓柱管流出之液體, 以目標酵素活性分段性地收集, 以含有 1 M 硫酸銨之 1 0 m M 磷酸緩衝液 (p H 7 . 0) 進行透析 1 0 小時, 接著離心得其上清液。此上清液加入以 3 8 0 m l “BUTYL-TOYOPEARL® 650” 裝好的圓柱管中, “BUTYL-TOYOPEARL® 650” 是一種由日本東京 Tosoh 公司商品化用在拒水性色層分析的膠體, 它事先以含有 1 M 硫酸銨之 1 0 m M 磷酸緩衝液 (p H 7 . 0) 平衡過, 接著放入其線性梯度為 1 M 至 0 M 硫酸銨於 1 0 m M 磷酸緩衝液 (p H 7 . 0) 之圓柱管中。

收集 0 . 2 M 硫酸銨階段流出具目標酵素活性之液體, 泡在含有 0 . 2 M 氯化鈉之 1 0 m M 磷酸緩衝液 (p H 7 . 0) 中透析 1 6 小時。透析後之水溶液離心後移除不

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

裝

五、發明說明 (10)

溶物質，加入以 3 8 0 m l “TOYOPEARL® HW-55S” 裝好的圓柱管中，“TOYOPEARL® HW-55S” 是一種由日本東京 Tosoh 公司商品化用在膠體過濾層析法 (gel filtration chromatography) 的膠體，它事先以含有 0 . 2 M 氯化鈉之 1 0 m M 磷酸緩衝液 (p H 7 . 0) 平衡過，接著放入含有 1 M 氯化鈉之 1 0 m M 磷酸緩衝液 (p H 7 . 0) 的圓柱管中。由流出物中收集有酵素活性的段落，加入以 1 0 m M 磷酸緩衝液 (p H 7 . 0) 平衡過的 “MONO Q HR5/S” 裝好的圓柱管中。此圓柱管具有含 0 . 1 M 至 0 . 3 5 M 氯化鈉之 1 0 m M 磷酸緩衝液 (p H 7 . 0) 的線性梯度緩衝液，接著收集有酵素活性的段落。具有專一活性約 1 3 5 u n i t s / m g 的純化酵素其產量約為每升培養液可得 3 3 0 u n i t s 。

純化酵素於 7 . 5 w / v 聚丙烯醯胺膠體中做電泳分析得到具有酵素活性的單一蛋白質帶，意即它具有相當高的純度。

實施例 2

酵素的理化特性

實施例 2 - 1

作用

含有 5 w / w % 麥芽糖或海藻糖當作受酶質並以每克受酶質加入 2 u n i t s 純化酵素的量加入純化酵素之水溶液可於實施例 1 - 2 得到，混合液於 6 0 °C 及

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (11)

p H 7 . 0 下 孵 育 2 4 小 時 。 爲 了 分 析 此 反 應 溶 液 的 醣 類 結 構 ， 以 真 空 乾 燥 ， 以 一 般 方 法 溶 於 吡 啶 及 三 甲 基 甲 矽 烷 化 ， 接 著 進 行 氣 體 色 層 分 析 法 。 此 分 析 中 使 用 之 設 備 及 條 件 如 下 ： 由 日 本 東 京 Shimadzu Seisakusho Ltd. 生 產 的 “ G C - 1 6 A ” 當 作 氣 體 色 層 分 析 儀 ； 具 有 內 部 直 徑 爲 3 m m 長 爲 2 m 有 由 日 本 東 京 GL Sciences Inc. 製 造 之 “ SILICONE OV-17/CHROMOSOLB W ” 裝 好 的 圓 柱 管 ； 離 子 化 之 氬 光 型 式 爲 檢 驗 器 ； 以 氮 氣 爲 搬 運 氣 體 （ 流 動 率 爲 4 0 m l / m i n ） ； 設 定 溫 度 上 升 率 爲 7 . 5 ° C / m i n 此 圓 柱 管 可 耐 1 6 0 - 3 2 0 ° C 。 ， 此 反 應 物 中 的 醣 類 結 構 表 列 於 表 1 ：

表 1

反應物中的醣類組成(%)			
受 酶 質			
	海 藻 糖	葡 萄 糖	麥 芽 糖
麥 芽 糖	70.0	4.4	25.6
海 藻 糖	76.2	3.1	20.7

如 同 表 1 中 表 示 的 ， 當 純 化 酵 素 作 用 於 受 酶 質 麥 芽 糖

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (12)

上可形成約 70 w / w % 海藻糖及約 4 w / w % 葡萄糖，當作用受質酶海藻糖可形成約 21 w / w % 麥芽糖及 3 w / w % 葡萄糖。這些事實顯示此純化酵素具有將麥芽糖轉化為海藻糖及將海藻糖轉化為麥芽糖之活性，以及水解麥芽糖分子內的 $\alpha - 1, 4$ 鍵結和海藻糖分子內的 $\alpha, \alpha - 1, 1$ 鍵結。這個酵素不曾被報導這導致新酵素反應途徑之評量。

實施例 2 - 2

分子量

依據 U.K. Laemmli 在 Nature 227 卷，680 - 685 頁 (1970) 發表的方法，純化酵素在十二烷硫酸鈉聚丙烯醯胺膠體電泳片 (SDS - PAGE) 上電泳可在約 100,000 - 110,000 道耳吞的位置得單一蛋白質帶。此實驗中所使用的標示蛋白質是肌球蛋白 (分子量為 200,000 道耳吞)， β - 半乳糖苷酶 (分子量為 116,250 道耳吞) 磷酸化酶 B (分子量為 97,400 道耳吞)，血清白蛋白 (分子量為 66,200 道耳吞) 及卵白蛋白 (分子量為 45,000 道耳吞)。

實施例 2 - 3

等電點

此純化酵素在 2 w / v % " AMPHOLINE® 中等電電泳

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (13)

可得其等電點約為 3 . 8 - 4 . 8 , "AMPHOLINE® 是一種由位於瑞典 Uppsala 之 Pharmacia LKB Biotechnology AB 製造之聚丙烯醯胺膠體。

實施例 2 - 4

最適溫度

如圖 1 顯示當此純化酵素以一般方法於 1 0 m M 磷酸緩衝液 (p H 7 . 0) 中靜置反應 6 0 分鐘其最適溫度約為 6 5 °C 。

實施例 2 - 5

最適 p H

如圖 2 顯示當此純化酵素於 6 0 °C 下並以磷酸緩衝液，或碳酸鈉 / 碳酸氫鈉緩衝液置於 1 0 m M 中調成不同 p H 條件下以一般方法孵育 6 0 分鐘可得其最適 p H 約為 6 . 0 - 6 . 7 。

實施例 2 - 6

對熱安定性

如圖 3 顯示當此純化酵素於 5 0 m M 磷酸緩衝液 (p H 7 . 0) 中以一般方法靜置反應 6 0 分鐘知其溫度上升至 8 0 °C 仍然安定。

實施例 2 - 7

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (14)

p H 安 定 性

如圖 4 顯示當此純化酵素於 60 °C 下並以磷酸緩衝液，或碳酸鈉 / 碳酸氫鈉緩衝液置於 50 mM 中調成不同 pH 條件下以一般方法靜置反應 60 分鐘知其 pH 約由 5.5 - 9.5 下酵素依然安定。

實 施 例 2 - 8

含有 N - 端之氨基酸序列

含有此純化酵素 N - 端之胺基酸序列以 "MODEL 470A" 來分析，"MODEL 470A" 是由美國 Norwalk 之 Perkin-Elmer Corp. Instrument Div. 生產的氣相蛋白質序列儀，含 N - 端之胺基酸序列揭示於 SEQ ID NO : 1。

SEQ ID NO:1:

Met	Asp	Pro	Leu	Trp	Tyr	Lys	Asp	Ala	Val	Ile	Tyr	Gln	Leu	His	Val
1				5					10					15	
Arg	Ser	Phe	Phe												
			20												

實 施 例 2 - 9

部分胺基酸序列

實施例 1 - 2 所製備含純化酵素之水溶液稱重後以 10 mM Tris - HCl 緩衝液 (pH 9.0) 於 4 °C 下透析 18 小時，以 10 mM Tris - HCl 緩衝液 (pH 9.0) 混合得到大約每 mL 含有 1 mg 酵素之溶液。此酵素於 100 °C 放置 5 分鐘加以變性，取約 1

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (15)

m l 置於試管中，加入 40 μ g 賴胺鹽肽鏈內切酶並於 30 $^{\circ}$ C 下孵育 44 小時部分水解此酵素。水解後的產物置入日本東京 Japan Millipore Ltd. 製造之反轉相高性能液相色層分析儀所使用的圓柱管 " μ BONDASPERE C18" 中，圓柱管以 0.1 v / v % 三氟醋酸平衡，接著在圓柱管中加入以 1.0 % m l / m i n 流動率增加氰化甲烷濃度 (0 v / v % ~ 70 v / v %) 之含氰化甲烷的 0.1 v / v % 三氟醋酸。

由起始算起 58 至 60 分鐘收集含有濾出之胜肽片段的部分，倒在一起，真空乾燥並溶在 0.5 m l 的 10 m M T r i s - H C l 緩衝液 (p H 8.0) 中，混以胰蛋白酶處理過之 T P C K 並在 37 $^{\circ}$ C 下靜置反應 16 小時產生水解。此酵素反應物以冷凍中止，此水解物放入以 " μ BONDASPERE C18" 裝置好的圓柱管中，在圓柱管中加入以 1.0 m l / m i n 流動率增加氰化甲烷水溶液濃度 (15 v / v % 至 55 v / v %) 之含氰化甲烷的 0.1 v / v % 三氟醋酸。由起始算起 42 分鐘收集含有濾出之胜肽片段的部分，倒在一起，真空乾燥並溶在含 50 v / v % 氰化甲烷之 0.1 v / v % 三氟醋酸中。類似於實施例 2 - 8，它揭露胜肽片段之氨基酸序列於

SEQ ID NO:2:

Ile	Leu	Leu	Ala	Glu	Ala	Asn	Met	Trp	Pro	Glu	Glu	Thr	Leu	Pro
1				5					10					15

五、發明說明 (16)

因為從無具有這些生化特性的酵素被瞭解，因此判斷此為一新物質。

本發明者以揭示於實施例 2 - 8 及 2 - 9 氨基酸序列相對應之寡核苷酸當探針來篩選 *Thermus aquaticus* (ATCC 33923) 之染色體 DNA，可得到含有 SEQ ID NO : 4 約 3,600 鹼基對之 DNA 片段。

鹼基序列之譯解標示於 SEQ ID NO : 3，此乃由微生物得到含 963 氨基酸之對熱安定酵素。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

續

五、發明說明 (17)

SEQ ID NO:3:

```

Met Asp Pro Leu Trp Tyr Lys Asp Ala Val Ile Tyr Gln Leu His Val
1      5      10      15
Arg Ser Phe Phe Asp Ala Asn Asn Asp Gly Tyr Gly Asp Phe Glu Gly
      20      25      30
Leu Arg Arg Lys Leu Pro Tyr Leu Glu Glu Leu Gly Val Asn Thr Leu
      35      40      45
Trp Leu Met Pro Phe Phe Gln Ser Pro Leu Arg Asp Gly Tyr Asp
      50      55      60
Ile Ser Asp Tyr Tyr Gln Ile Leu Pro Val His Gly Thr Leu Glu Asp
65      70      75      80
Phe Thr Val Asp Glu Ala His Gly Arg Gly Met Lys Val Ile Ile Glu
      85      90      95
Leu Val Leu Asn His Thr Ser Ile Asp His Pro Trp Phe Gln Glu Ala
      100     105     110
Arg Lys Pro Asn Ser Pro Met Arg Asp Trp Tyr Val Trp Ser Asp Thr
      115     120     125
Pro Glu Lys Tyr Lys Gly Val Arg Val Ile Phe Lys Asp Phe Glu Thr
      130     135     140
Ser Asn Trp Thr Phe Asp Pro Val Ala Lys Ala Tyr Tyr Trp His Arg
145     150     155     160
Phe Tyr Trp His Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Ser Pro Glu Val Glu
      165     170     175
Lys Ala Ile His Gln Val Met Phe Phe Trp Ala Asp Leu Gly Val Asp
      180     185     190
Gly Phe Arg Leu Asp Ala Ile Pro Tyr Leu Tyr Glu Arg Glu Gly Thr
      195     200     205
Ser Cys Glu Asn Leu Pro Glu Thr Ile Glu Ala Val Lys Arg Leu Arg
      210     215     220
Lys Ala Leu Glu Glu Arg Tyr Gly Pro Gly Lys Ile Leu Leu Ala Glu
225     230     235     240
Ala Asn Met Trp Pro Glu Glu Thr Leu Pro Tyr Phe Gly Asp Gly Asp
      245     250     255
Gly Val His Met Ala Tyr Asn Phe Pro Leu Met Pro Arg Ile Phe Met
      260     265     270
Ala Leu Arg Arg Glu Asp Arg Gly Pro Ile Glu Thr Met Leu Lys Glu
      275     280     285
Ala Glu Gly Ile Pro Glu Thr Ala Gln Trp Ala Leu Phe Leu Arg Asn
      290     295     300
His Asp Glu Leu Thr Leu Glu Lys Val Thr Glu Glu Glu Arg Glu Phe
305     310     315     320
Met Tyr Glu Ala Tyr Ala Pro Asp Pro Lys Phe Arg Ile Asn Leu Gly
      325     330     335
Ile Arg Arg Arg Leu Met Pro Leu Leu Gly Gly Asp Arg Arg Tyr
      340     345     350
Glu Leu Leu Thr Ala Leu Leu Leu Thr Leu Lys Gly Thr Pro Ile Val
      355     360     365
Tyr Tyr Gly Asp Glu Ile Gly Met Gly Asp Asn Pro Phe Leu Gly Asp
      370     375     380
Arg Asn Gly Val Arg Thr Pro Met Gln Trp Ser Gln Asp Arg Ile Val
385     390     395     400
Ala Phe Ser Arg Ala Pro Tyr His Ala Leu Phe Leu Pro Pro Val Ser
      405     410     415
Glu Gly Pro Tyr Ser Tyr His Phe Val Asn Val Glu Ala Gln Arg Glu
      420     425     430

```

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (18)

Asn Pro His Ser Leu Leu Ser Phe Asn Arg Arg Phe Leu Ala Leu Arg
 435 440 445
 Asn Gln His Ala Lys Ile Phe Gly Arg Gly Ser Leu Thr Leu Leu Pro
 450 455 460
 Val Glu Asn Arg Arg Val Leu Ala Tyr Leu Arg Glu His Glu Gly Glu
 465 470 475 480
 Arg Val Leu Val Val Ala Asn Leu Ser Arg Tyr Thr Gln Ala Phe Asp
 485 490 495
 Leu Pro Leu Glu Ala Tyr Gln Gly Leu Val Pro Val Glu Leu Phe Ser
 500 505 510
 Gln Gln Pro Phe Pro Pro Val Glu Gly Arg Tyr Arg Leu Thr Leu Gly
 515 520 525
 Pro His Gly Phe Ala Leu Phe Ala Leu Lys Pro Val Glu Ala Val Leu
 530 535 540
 His Leu Pro Ser Pro Asp Trp Ala Glu Glu Pro Ala Pro Glu Glu Ala
 545 550 555 560
 Asp Leu Pro Arg Val His Met Pro Gly Gly Pro Glu Val Leu Leu Val
 565 570 575
 Asp Thr Leu Val His Glu Arg Gly Arg Glu Glu Leu Leu Asn Ala Leu
 580 585 590
 Ala Gln Thr Leu Lys Glu Lys Ser Trp Leu Ala Leu Lys Pro Gln Lys
 595 600 605
 Val Ala Leu Leu Asp Ala Leu Arg Phe Gln Lys Asp Pro Pro Leu Tyr
 610 615 620
 Leu Thr Leu Leu Gln Leu Glu Asn His Arg Thr Leu Gln Val Ser Leu
 625 630 635 640
 Pro Leu Leu Trp Ser Pro Gln Arg Arg Glu Gly Pro Gly Leu Phe Ala
 645 650 655
 Arg Thr His Gly Gln Pro Gly Tyr Phe Tyr Glu Leu Ser Leu Asp Pro
 660 665 670
 Gly Phe Tyr Arg Leu Leu Leu Ala Arg Leu Lys Glu Gly Phe Glu Gly
 675 680 685
 Arg Ser Leu Arg Ala Tyr Tyr Arg Gly Arg His Pro Gly Pro Val Pro
 690 695 700
 Glu Ala Val Asp Leu Leu Arg Pro Gly Leu Ala Ala Gly Glu Gly Val
 705 710 715 720
 Trp Val Gln Leu Gly Leu Val Gln Asp Gly Gly Leu Asp Arg Thr Glu
 725 730 735
 Arg Val Leu Pro Arg Leu Asp Leu Pro Trp Val Leu Arg Pro Glu Gly
 740 745 750
 Gly Leu Phe Trp Glu Arg Gly Ala Ser Arg Arg Val Leu Ala Leu Thr
 755 760 765
 Gly Ser Leu Pro Pro Gly Arg Pro Gln Asp Leu Phe Ala Ala Leu Glu
 770 775 780
 Val Arg Leu Leu Glu Ser Leu Pro Arg Leu Arg Gly His Ala Pro Gly
 785 790 795 800
 Thr Pro Gly Leu Leu Pro Gly Ala Leu His Glu Thr Glu Ala Leu Val
 805 810 815
 Arg Leu Leu Gly Val Arg Leu Ala Leu Leu His Arg Ala Leu Gly Glu
 820 825 830
 Val Glu Gly Val Val Gly Gly His Pro Leu Leu Gly Arg Gly Leu Gly
 835 840 845
 Ala Phe Leu Glu Leu Glu Gly Glu Val Tyr Leu Val Ala Leu Gly Ala
 850 855 860
 Glu Lys Arg Gly Thr Val Glu Glu Asp Leu Ala Arg Leu Ala Tyr Asp

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

A7

B7

五、發明說明 (19)

865		870		875		880
Val Glu Arg Ala	Val His Leu Ala Leu	Glu Ala Leu Glu Ala	Glu Leu			
	885		890		895	
Trp Ala Phe Ala	Glu Glu Val Ala Asp	His Leu His Ala Ala	Phe Leu			
	900		905		910	
Gln Ala Tyr Arg	Ser Ala Leu Pro	Glu Glu Ala Leu	Glu Glu Ala Gly			
	915		920		925	
Trp Thr Arg His	Met Ala Glu Val Ala	Ala Glu His Leu	His Arg Glu			
	930		935		940	
Glu Arg Pro Ala	Arg Lys Arg Ile His	Glu Arg Trp Gln	Ala Lys Ala			
945		950		955		960
Gly Lys Ala						

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (20)

SEQ ID NO: 4:

GTGGACCCCC	TCTGGTACAA	GGACGCGGTG	ATCTACCAGC	TCCACGTCCG	CTCCTTCTTT	60
GACGCCAACA	ACGACGGCTA	CGGGGACTTT	GAGGGCCTGA	GGCGGAAGCT	TCCCTACCTG	120
GAGGAGCTCG	GGGTCAACAC	CCTCTGGCTC	ATGCCCTTCT	TCCAGTCCCC	CTTGAGGGAC	180
GACGGGTACG	ATATCTCCGA	CTACTACCAG	ATCCTCCCCG	TCCACGGGAC	CCTGGAGGAC	240
TTCACCGTGG	ACGAGGCCCA	CGGCCGGGGG	ATGAAGGTGA	TCATTGAGCT	CGTCCTGAAC	300
CACACCTCCA	TTGACCACCC	TTGGTTCCAG	GAGGCGAGGA	AGCCGAATAG	CCCCATGCGG	360
GACTGGTACG	TGTGGAGCGA	CACCCCGGAG	AAGTACAAGG	GGGTCCGGGT	CATCTTCAAG	420
GACTTTGAAA	CCTCCAACCTG	GACCTTTGAC	CCCGTGGCCA	AGGCCTACTA	CTGGCACCCG	480
TTCTACTGGC	ACCAGCCCCG	CCTCAACTGG	GACAGCCCCG	AGGTGGAGAA	GGCCATCCAC	540
CAGGTCATGT	TCTTCTGGGC	CGACCTGGGG	GTGGACGGCT	TCCGCCTGGA	CGCCATCCCC	600
TACCTCTACG	AGCGGGAGGG	GACCTCCTGC	GAGAACCTCC	CCGAGACCAT	TGAGGCGGTG	660
AAGCGCCTGA	GGAAGGCCCT	GGAGGAGCGC	TACGGCCCCG	GGAAGATCCT	CCTCGCCGAG	720
GCCAACATGT	GGCCGGAGGA	GACCCCTCCC	TACTTCGGGG	ACGGGGACGG	GGTCCACATG	780
GCCTACAAC	TCCCCCTGAT	GCCCCCGGATC	TTCATGGCCC	TAAGGCGGGA	GGACCGGGGT	840
CCCATTGAAA	CCATGCTCAA	GGAGGCGGAG	GGGATCCCCG	AAACCGCCCA	GTGGGCCCTC	900
TTCCTCCGCA	ACCACGACGA	GCTCACCCCTG	GAGAAGGTCA	CGGAGGAGGA	GCGGGAGTTC	960
ATGTACGAGG	CCTACGCCCC	CGACCCCAAG	TTCCGCATCA	ACCTGGGGAT	CCGCCGCCGC	1020
CTCATGCCCC	TCCTCGGGGG	CGACCGCAGG	CGGTACGAGC	TCCTCACCGC	CCTCCTCCTC	1080
ACCCTAAAGG	GCACGCCCCAT	CGTCTACTAC	GGGGACGAGA	TCGGCATGGG	GGACAACCCC	1140
TTCTTCGGGG	ACCGGAACGG	TGTCAGGACC	CCCATGCAGT	GGTCCCAAGA	CCGCATCGTC	1200
GCCTTCTCCC	GCGCCCCCTA	CCACGCCCTC	TTCTTCCCC	CCGTGAGCGA	GGGGCCCTAC	1260
AGCTACCACT	TCGTCAACGT	GGAGGCCAG	CGGGAAAACC	CCCACTCCCT	CCTGAGCTTC	1320
AACCGCCGCT	TCCTCGCCCT	GAGGAACCAG	CACGCCAAGA	TCTTCGGCCG	GGGGAGCCTC	1380
ACCCTTCTCC	CCGTGGAGAA	CCGGCGCGTC	CTCGCCTACC	TGAGGGAGCA	CGAGGGGGAG	1440
CGGGTCCTGG	TGGTGGCCAA	CCTCTCCCGC	TACACCCAGG	CCTTTGACCT	CCCCTTGGAG	1500
GCCTACCAAG	GCCTCGTCCC	CGTGGAGTGC	TTCTCGCAGC	AACCTTCCC	CCCGGTGGAG	1560
GGGCGCTACC	GCTTGACCTT	GGGCCCCAC	GGCTTCGCC	TCTTCGCCCT	GAAGCCCGTG	1620
GAGGCGGTGC	TCCACCTCCC	CTCCCCCGAC	TGGGCCGAGG	AGCCCGCCCC	CGAGGAGGCC	1680
GACCTGCCCC	GGGTCCACAT	GCCCCGGGGG	CCGGAGGTCC	TCCTGGTGGA	CACCCTGGTC	1740
CACGAAAGGG	GGCGGGAGGA	GCTCCTAAAC	GCCCTCGCCC	AGACCCTGAA	GGAGAAGAGC	1800
TGGCTCGCCC	TCAAGCCGCA	GAAGGTGGCC	CTCCTGGACG	CCCTCCGCTT	CCAGAAGGAC	1860
CCGCCCTTT	ACCTCACCCCT	GCTCCAGCTG	GAGAACCACA	GGACCCCTCA	GGTCTCCCTC	1920
CCCCTCCTCT	GGTCCCCCCA	GAGGCGGGAA	GGCCCCGGCC	TCTTCGCCCG	CACCCACGGC	1980
CAGCCCGGCT	ACTTCTACGA	GCTCTCCTTG	GACCCAGGCT	TCTACCGCCT	CCTCCTCGCC	2040
CGCCTTAAGG	AGGGGTTTGA	GGGGCGGAGC	CTCCGGGCCT	ACTACCGCGG	CCGCCACCCG	2100
GGTCCCGTGC	CCGAGGCCGT	GGACCTCCTC	CGGCCGGGAC	TCGCGGCGGG	GGAGGGGGTC	2160
TGGGTCCAGC	TCGGCCTCGT	CCAAGACGGG	GGCCTGGACC	GCACGGAGCG	GGTCCTCCCC	2220
CGCCTGGACC	TCCCCTGGGT	TCTCCGGCCC	GAAGGGGGCC	TCTTCTGGGA	GCGGGGCGCC	2280
TCCAGAAGGG	TCCTCGCCCT	CACGGGAAGC	CTCCCCCGG	GCCGCCCCCA	GGACCTCTTC	2340
GCCGCCCTGG	AGGTCCGGCT	CCTGGAAAGC	CTTCCCCGCC	TCCGGGGGCA	CGCCCCCGGG	2400
ACCCACAGGCC	TCCTTCCCCG	GGCCCTGCAC	GAGACCGAAG	CCCTGGTCCG	CCTCCTCGGG	2460
GTGCGCCTCG	CCCTCCTCCA	CCGGGCCCTT	GGGGAGGTGG	AGGGGGTGGT	GGGGGGCCAC	2520
CCCCTCCTAG	GCCGCGGCCT	CGGGGCCTTC	CTGGAGCTGG	AGGGGGAGGT	GTACCTCGTG	2580
GCCCTGGGCG	CGGAAAAGCG	GGGCACGGTG	GAGGAGGACC	TGGCCCGCCT	GGCCTACGAC	2640
GTGGAGCGGG	CCGTGCACCT	CGCCCTCGAG	GCCCTGGAGG	CGGAGCTTTG	GGCCTTTGCC	2700
GAGGAGGTGG	CCGACCACCT	CCACGCCGCC	TTCTTCCAAG	CCTACCGCTC	CGCCCTCCCC	2760
GAGGAGGCC	TGGAGGAGGC	GGGCTGGACG	CGGCACATGG	CCGAGGTGGC	GGCGGAGCAC	2820
CTCCACCGGG	AGGAAAGGCC	CGCCCGCAAG	CGCATCCACG	AGCGCTGGCA	GGCCAAGGCC	2880
GGAAAAGCC						2889

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (21)

用來揭示標示於 S E Q I D N O : 3 及 S E Q I D N O : 4 氨基酸序列及鹼基序列之後續方法概述於下：

(1) 自捐贈者微生物培養液分離出之對熱安定酵素被高度純化並決定其包含 N - 端之胺基酸序列。此純化酵素以蛋白酶部份水解，由其中分離出胜肽片段並決定其胺基酸序列。

(2) 另外，由捐贈者微生物細胞分離出染色體 D N A ，純化並以內切酶部分水解此 D N A 以得到含約 4 , 0 0 0 - 8 , 0 0 0 鹼基對的 D N A 片段。N D A 片段以接合酶接入事先以內切酶切斷之質體載體中以得到重組型 D N A ；

(3) 重組型 D N A 引入 *Escherichia coli* 種之微生物體以得到轉形體，由含有編碼對熱安定酵素之目標轉形體以菌落雜交方法篩選出來，用寡核苷酸當做探針，是以前述的部分氨基酸序列化學合成的；及

(4) 由選出之轉形體得到之重組型 D N A ，以啓動子 (primer) 接合 (anneal) 上去，接下來 D N A 合成酶作用其上以擴展啓動子，以雙去氧長鏈中止方法 (dideoxy chain termination method) 中止互補鏈 D N A 之合成並決定其鹼基序列。以決定出之鹼基序列估計其胺基酸序列與前述編碼對熱安定酵素決定之胺基酸序列互相做比較。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (22)

接下來的實施例 3 及 4 具體闡述上述的 (2) 到 (4) 項，其中所用到的技術是在此領域中普通被使用的方法，舉例而言，這些方法在 J. Sumbruck 等人於冷泉灣實驗室出版 (1 9 8 9) 之 "Molecular Cloning A Laboratory Manual" 第二版中有所描述。

實施例 3

含有編碼對熱安定酵素 D N A 之重組型 D N A 及轉形體的製備

實施例 3 - 1

染色體 D N A 的製備

Thermus aquaticus (ATCC 33923) 之根源培養菌接種於營養培養基 (p H 7 . 0)，置於旋轉震盪器在 6 0 ° C 下培養 2 4 小時。以離心法將細胞由所得之培養液中分離出來，打散於 T E S 緩衝液 (p H 8 . 0) 中，混以 0 . 0 5 w / v % 溶菌酵素，在 3 7 ° C 下孵育 3 0 分鐘。之後於 - 8 0 ° C 冰凍 1 小時，混以 T S S 緩衝液 (p H 9 . 0)，加熱至 6 0 ° C，進一步加入 T E S 緩衝液及酚之混合液，所得之溶液置於冰上冷卻後，離心得其上清液。於上清液中加入 2 倍體積之冰酒精，收集沈澱下來之粗染色體 D N A，以 S S C 緩衝液 (p H 7 . 1) 打散，混以 7 . 5 μ g 核糖核酸酵素及 1 2 5 μ g 蛋白酵素，在 3 7 ° C 下孵育 1 小時。之後，將氯仿及異澱粉酒精之混合液加入其中以萃取目標染色體 D N A，萃取物混以冷酒精

五、發明說明 (23)

，收集含有染色體 D N A 之沈澱物。得到之純化的染色體 D N A 溶在 S S C 緩衝液 (p H 7 . 1) 達到 1 m g / m l 之濃度，並將所得之溶液冷凍於 - 8 0 ° C 。

實施例 3 - 2

重組型 D N A p B T M 2 2 及轉形體 B T M 2 2 之製備

實施例 3 - 1 所得之純化染色體 D N A 取約 1 m l 置於試管中，混以約 1 0 單位之限制酶 S a u 3 A I ，在 3 7 ° C 下進行酵素反應 2 0 分鐘部分切斷染色體 D N A ，藉由蔗糖密度梯度離心法取得含有約 4 , 0 0 0 - 8 , 0 0 0 鹼基對之 D N A 片段。由美國加州

Stratagene cloning system 製造的質體載體 Bluescript II SK(+)，取 1 μ g 放在試管中，以限制酶 B a m H I 處理，將質體載體完全切斷，加入 1 0 μ g 的 D N A 片段及 2 單位的 T 4 D N A 接合酶，置於 4 ° C 作用一夜將 D N A 片段接在質體載體片段上。所得之重組型 D N A 加入美國加州 Stratagene cloning system 製造之勝任細胞 "Epicurian Coli® XLI-Blue" 3 0 μ l ，插在冰上 3 0 分鐘，加熱至 4 2 ° C ，加入 S O C 培養基，在 3 7 ° C 下孵育 1 小時將重組型 D N A 引入大腸桿菌 Esherichia coli 中。

所得之轉形體接種於含有 5 0 μ g / m l 之 5 - 溴 - 4 - 氯 - 3 - 吡啶 - β - 半乳糖苷酶之洋菜平板培養基 (p H 7 . 0) 上，在 3 7 ° C 下培養 1 8 小時，在洋菜平板

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (24)

培養基上放置一張尼龍薄膜來固定洋菜培養基上約 6,000 個菌落。基於如 SEQ ID NO: 1 所示之胺基酸序列 Trp - Tyr - Lys - Asp - Ala - Val, 探針 1 的鹼基序列 5' - TGGTAYAA R GAYGCNGT - 3' 以化學方法合成, 以 ^{32}P 標示於其上, 與固於尼龍薄膜上之轉型體菌落雜交, 篩選出 5 個與探針 1 有極強雜合作用之轉形體。

目標重組型 DNA 以一般方式由 5 個轉形體中被篩選出來, 依照 E.M. Southern 於 Journal of Molecular Biology, 98 卷, 503 - 517 頁 (1975) 描述之方法, 重組型 DNA 與鹼基序列為 5' - AAYATG TGGCCNGARGA - 3 之探針 2 雜合, 探針 2 是基於 SEQ ID NO: 2 之胺基酸序列 (也就是 Asn - Met - Trp - Pro - Glu - Glu) 以化學方法合成, 以 ^{32}P 標示於其上, 篩選出 1 個與探針 2 有強雜合作用之轉形體。被篩選出之重組型 DNA 及轉形體分別命名為 "pBTM22" 及 "BTM22"。

轉形體 BTM22 接種於含有 $100\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 氨比西林之 L - 培養基 (pH 7.0) 上, 在 37°C 下置於旋轉震盪器上培養 24 小時。完成此培養之後, 以離心方式收集培養液中的細胞, 以普通的鹼性方法處理由細胞中萃取重組型 DNA。萃取物以一般方式純化及分解並揭示了重組型 DNA pBTM22 含有約 10,300 鹼基對。如圖 5 所示, 一個含有編碼對熱安定酵素之約

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (25)

2 , 9 0 0 鹼基對的 D N A 片段，位在限制酶 H i n d III 作用位置之下游。

實施例 3 - 3

以轉型 B T M 2 2 製造

重組型酵素

在 5 0 0 m l 培養瓶中置入 1 0 0 m l 含有 2 . 0 w / v % 葡萄糖，0 . 5 w / v % 蛋白胨，0 . 1 w / v % 酵母菌萃取物，0 . 1 w / v % 磷酸氫二鉀，0 . 0 6 w / v % 磷酸二氫鈉，0 . 0 5 w / v % 十七羥硫酸鎂，0 . 5 w / v % 碳酸鈣及水的液態培養基 (p H 7 . 0)，每一個培養瓶以 1 1 5 °C 加熱 3 0 分鐘來滅菌，冷卻後加入氨比西林成 5 0 μ g / m l，接種由實施例 3 - 2 得到之轉形體 B T M 2 2，接著在 3 7 °C 下置於旋轉震盪器上培養轉形體 2 4 小時。所得之培養液以超音波震盪器處理以瓦解細胞，離心所得之懸浮液以移除不溶物。所得之上清液分析其酵素活性可得 1 升培養液中約含有 8 0 0 單位之重組型酵素。

爲了當做對照之用，大腸桿菌 *Escherichia coli* XLI-Blue 或耐熱菌 *Thermus aquaticus* (ATCC 33923) 之種菌接種在具有如上營養成份但無氨比西林，新鮮配製的培養液中，*Thermus aquaticus* (ATCC 33923) 的培養及處理均類似於其上所描述，只除了培養溫度必須設定在 6 5 °C 之外。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (26)

分析其結果之酵素活性，1 升的 *Thermus aquaticus* 培養液含有約 3 5 0 單位之酵素，其產量顯著地低於轉形體 B T M 2 2。*Escherichia coli* XLI-Blue 用來當做宿主，不會產生對熱安定酵素。

接下來，由轉形體 B T M 2 2 製造之酵素以類似實施例 1 及 2 的方法純化，並找出它的理化性質及特徵。結果揭示它實質上具有 *Thermus aquaticus* (ATCC 33923) 對熱安定酵素的相同理化性質，那就是：在 S D S - P A G E 上有約 1 0 0, 0 0 0 - 1 1 0, 0 0 0 daltons 之分子量及在等電電泳上有約 3.8 - 4.8 之等電點，當置於 8 0 °C 水中 (p H 7.0) 靜置反應 6 0 分鐘不會完全喪失活性。其結果指出此對熱安定酵素可用重組型 D N A 技術來製造，且其產量顯著地增多。

實施例 4

互補鏈 D N A 的製備及其鹼基序列和胺基酸序列之決定

實施例 3 - 2 製得之重組型 D N A p B T M 2 2 取 2 μ g 置於試管中，加入 2 M 氫氧化鈉水溶液造成變性，加入足夠量之冰酒精，收集含有模板 D N A 之沈澱物並以真空乾燥其沈澱物。在模板 D N A 中加入 5 0 p m o l e / m μ l 依據鹼基序列 5' - G T A A A A C G A C G G C C A G T - 3' 以化學合成的啟動子，1 0 μ l 含有 2 0 m M 氯化鎂及 2 0 m M 氯化鈉之 4 0 m M T r i s - H C l 緩衝液 (p H 7.5)，此混合液置於 6 5 °C 靜置

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (27)

反應 2 分鐘以產生接合作用 (annealing) 並加入 $2 \mu\ell$ 含有 d A T P , d G T P 及 d T T P 各 $7.5 \mu\text{M}$ 的水溶液, $0.5 \mu\ell$ 的 $[\alpha - ^{32}\text{P}]$ d C T P ($2 \text{ mCi} / \text{m}\ell$), $1 \mu\ell$ 的 0.1 M 二硫代翠醇 (dithiothreitol), $2 \mu\ell$ 的 $1.5 \text{ units} / \text{m}\ell$ T 7 D N A 合成酶, 所得之混合物於 25°C 下靜置反應 5 分鐘由 $5'$ - 端至 $3'$ - 端延長其啓動子。以此方式形成了互補鏈 D N A。

含有互補鏈 D N A 之反應產物等分成 4 份, 每份中加入 $2.5 \mu\ell$ 含有 $80 \mu\text{M}$ d N T P 及 $8 \mu\text{M}$ d d A T P , d d C T P , d d G T P 或 d d T T P 之 50 mM 氯化鈉水溶液, 所得之混合物於 37°C 下靜置反應 5 分鐘, 加入 $4 \mu\ell$ 含有 20 mM E D T A , $0.05 \text{ w} / \text{v} \%$ 溴酚藍, 及 $0.05 \text{ w} / \text{v} \%$ 氰二甲苯 (Xylene cyanol) 之 $98 \text{ v} / \text{v} \%$ 甲醯胺水溶液。此反應混合物以煮沸之熱水浴加熱 3 分鐘, 取一小部分放在 $6 \text{ w} / \text{v} \%$ 聚丙烯醯胺膠體上, 以穩定電壓約 $2,000$ 伏特為能量進行電泳來分離 D N A 片段, 以一般方式固定膠體, 乾燥後進行自動射線曝光。

在 X 光照片上區分出來的 D N A 片段進行分析後, 其含有約 $3,600$ 鹼基對之互補鏈 D N A 的鹼基序列揭示於 S E Q I D N O : 5。由此鹼基序列估計而得之胺基酸序列平行地標示在 S E Q I D N O : 5, 當它與含有 N - 端或標示於 S E Q I D N O s : 1 及 2 的部

五、發明說明 (28)

分胺基酸序列比較，揭示 SEQ ID NO : 1 之胺基酸序列與 SEQ ID NO : 5 中 1 至 20 位置的胺基酸序列是一致的，SEQ ID NO : 2 之胺基酸序列與 SEQ ID NO : 5 中 236 至 250 位置的胺基酸序列是一致的。這些結果顯示本重組型酵素有 SEQ ID NO : 3 的胺基酸序列，由 *Thermus aquaticus* (ATCC 33923) 衍生的 DNA 之胺基酸序列可以 SEQ ID NO : 4 的鹼基序列而得。

SEQ ID NO:5:

GCCCCTCCCT	CCCCCAACCG	GGCCTTCCCG	TGGGGGGGGG	GCACAGCCTG	GAGGAAGGGG	60
TGCTCGACGG	GGAGGTGCGG	CCCCTCTTGC	GCCGTGGGGC	GTGACCCCTT	GCGGGCCAGG	120
CTTCCCTCCT	ACCCCGGGGT	GCGGGTGGAG	GACAAGGGCT	TCGCCCTGGC	CCTGCACTAC	180
CGGGGGGCGG	AGGGCGAGGA	GAAGGCCCGG	GCCTGCCTCG	AGGCCTGGCT	TAAGGCGGTG	240
GAGGGGCTCC	TGGGGGCCTT	GGGCCTCGAG	GCCCTCCCCG	GCAAGAGGGT	CCTGGAGCTC	300
AAGCCCAAGG	GGGTGGACAA	GGGCCAAGCG	GTCTCAGGC	TCCTCGGACG	CCACCCGGAC	360
CACACCCCCG	TTTACATCGG	GGACGACACC	ACCGACGAGG	CCGCCTTCCT	CGCCTTAAGG	420
GGCCGGGGCC	TCACCTTCAA	GGTGGGGGAA	GGCCCCACGG	CGGCCCAAGG	CCGGCTCAAG	480
GACGTGGAGG	AGGTCCTGGC	CTACTTGCAA	ACCTACCTCC	GACCCACTAG	CCTTTAGGCC	540
GTG GAC CCC CTC TGG TAC AAG GAC GCG GTG ATC TAC CAG CTC CAC GTC						588
Met Asp Pro Leu Trp Tyr Lys Asp Ala Val Ile Tyr Gln Leu His Val						
1 5 10 15						
CGC TCC TTC TTT GAC GCC AAC AAC GAC GGC TAC GGG GAC TTT GAG GGC						636
Arg Ser Phe Phe Asp Ala Asn Asn Asp Gly Tyr Gly Asp Phe Glu Gly						
20 25 30						
CTG AGG CGG AAG CTT CCC TAC CTG GAG GAG CTC GGG GTC AAC ACC CTC						684
Leu Arg Arg Lys Leu Pro Tyr Leu Glu Glu Leu Gly Val Asn Thr Leu						
35 40 45						
TGG CTC ATG CCC TTC TTC CAG TCC CCC TTG AGG GAC GAC GGG TAC GAT						732
Trp Leu Met Pro Phe Phe Gln Ser Pro Leu Arg Asp Asp Gly Tyr Asp						
50 55 60						
ATC TCC GAC TAC TAC CAG ATC CTC CCC GTC CAC GGG ACC CTG GAG GAC						780
Ile Ser Asp Tyr Tyr Gln Ile Leu Pro Val His Gly Thr Leu Glu Asp						
65 70 75 80						
TTC ACC GTG GAC GAG GCC CAC GGC CGG GGG ATG AAG GTG ATC ATT GAG						828
Phe Thr Val Asp Glu Ala His Gly Arg Gly Met Lys Val Ile Ile Glu						
85 90 95						
CTC GTC CTG AAC CAC ACC TCC ATT GAC CAC CCT TGG TTC CAG GAG GCG						876
Leu Val Leu Asn His Thr Ser Ile Asp His Pro Trp Phe Gln Glu Ala						
100 105 110						
AGG AAG CCG AAT AGC CCC ATG CGG GAC TGG TAC GTG TGG AGC GAC ACC						924
Arg Lys Pro Asn Ser Pro Met Arg Asp Trp Tyr Val Trp Ser Asp Thr						
115 120 125						

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (29)

CCG	GAG	AAG	TAC	AAG	GGG	GTC	CGG	GTC	ATC	TTC	AAG	GAC	TTT	GAA	ACC	972
Pro	Glu	Lys	Tyr	Lys	Gly	Val	Arg	Val	Ile	Phe	Lys	Asp	Phe	Glu	Thr	
130						135					140					
TCC	AAC	TGG	ACC	TTT	GAC	CCC	GTG	GCC	AAG	GCC	TAC	TGG	CAC	CGC		1020
Ser	Asn	Trp	Thr	Phe	Asp	Pro	Val	Ala	Lys	Ala	Tyr	Tyr	Trp	His	Arg	
145					150					155					160	
TTC	TAC	TGG	CAC	CAG	CCC	GAC	CTC	AAC	TGG	GAC	AGC	CCC	GAG	GTG	GAG	1068
Phe	Tyr	Trp	His	Gln	Pro	Asp	Leu	Asn	Trp	Asp	Ser	Pro	Glu	Val	Glu	
				165					170					175		
AAG	GCC	ATC	CAC	CAG	GTC	ATG	TTC	TTC	TGG	GCC	GAC	CTG	GGG	GTG	GAC	1116
Lys	Ala	Ile	His	Gln	Val	Met	Phe	Phe	Trp	Ala	Asp	Leu	Gly	Val	Asp	
				180					185				190			
GGC	TTC	CGC	CTG	GAC	GCC	ATC	CCC	TAC	CTC	TAC	GAG	CGG	GAG	GGG	ACC	1164
Gly	Phe	Arg	Leu	Asp	Ala	Ile	Pro	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Arg	Glu	Gly	Thr	
		195					200					205				
TCC	TGC	GAG	AAC	CTC	CCC	GAG	ACC	ATT	GAG	GCG	GTG	AAG	CGC	CTG	AGG	1212
Ser	Cys	Glu	Asn	Leu	Pro	Glu	Thr	Ile	Glu	Ala	Val	Lys	Arg	Leu	Arg	
210						215					220					
AAG	GCC	CTG	GAG	GAG	CGC	TAC	GGC	CCC	GGG	AAG	ATC	CTC	CTC	GCC	GAG	1260
Lys	Ala	Leu	Glu	Glu	Arg	Tyr	Gly	Pro	Gly	Lys	Ile	Leu	Leu	Ala	Glu	
225					230					235					240	
GCC	AAC	ATG	TGG	CCG	GAG	GAG	ACC	CTC	CCC	TAC	TTC	GGG	GAC	GGG	GAC	1308
Ala	Asn	Met	Trp	Pro	Glu	Glu	Thr	Leu	Pro	Tyr	Phe	Gly	Asp	Gly	Asp	
				245					250					255		
GGG	GTC	CAC	ATG	GCC	TAC	AAC	TTC	CCC	CTG	ATG	CCC	CGG	ATC	TTC	ATG	1356
Gly	Val	His	Met	Ala	Tyr	Asn	Phe	Pro	Leu	Met	Pro	Arg	Ile	Phe	Met	
			260				265						270			
GCC	CTA	AGG	CGG	GAG	GAC	CGG	GGT	CCC	ATT	GAA	ACC	ATG	CTC	AAG	GAG	1404
Ala	Leu	Arg	Arg	Glu	Asp	Arg	Gly	Pro	Ile	Glu	Thr	Met	Leu	Lys	Glu	
		275					280					285				
GCG	GAG	GGG	ATC	CCC	GAA	ACC	GCC	CAG	TGG	GCC	CTC	TTC	CTC	CGC	AAC	1452
Ala	Glu	Gly	Ile	Pro	Glu	Thr	Ala	Gln	Trp	Ala	Leu	Phe	Leu	Arg	Asn	
		290				295					300					
CAC	GAC	GAG	CTC	ACC	CTG	GAG	AAG	GTC	ACG	GAG	GAG	GAG	CGG	GAG	TTC	1500
His	Asp	Glu	Leu	Thr	Leu	Glu	Lys	Val	Thr	Glu	Glu	Glu	Arg	Glu	Phe	
305					310					315					320	
ATG	TAC	GAG	GCC	TAC	GCC	CCC	GAC	CCC	AAG	TTC	CGC	ATC	AAC	CTG	GGG	1548
Met	Tyr	Glu	Ala	Tyr	Ala	Pro	Asp	Pro	Lys	Phe	Arg	Ile	Asn	Leu	Gly	
				325					330					335		
ATC	CGC	CGC	CGC	CTC	ATG	CCC	CTC	CTC	GGG	GAC	CGC	AGG	CGG	TAC		1596
Ile	Arg	Arg	Arg	Leu	Met	Pro	Leu	Leu	Gly	Gly	Asp	Arg	Arg	Tyr		
				340				345				350				
GAG	CTC	CTC	ACC	GCC	CTC	CTC	CTC	ACC	CTA	AAG	GGC	ACG	CCC	ATC	GTC	1644
Glu	Leu	Leu	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Thr	Leu	Lys	Gly	Thr	Pro	Ile	Val	
			355				360					365				
TAC	TAC	GGG	GAC	GAG	ATC	GGC	ATG	GGG	GAC	AAC	CCC	TTC	CTC	GGG	GAC	1692
Tyr	Tyr	Gly	Asp	Glu	Ile	Gly	Met	Gly	Asp	Asn	Pro	Phe	Leu	Gly	Asp	
		370				375					380					
CGG	AAC	GGT	GTC	AGG	ACC	CCC	ATG	CAG	TGG	TCC	CAA	GAC	CGC	ATC	GTC	1740
Arg	Asn	Gly	Val	Arg	Thr	Pro	Met	Gln	Trp	Ser	Gln	Asp	Arg	Ile	Val	
385					390					395					400	
GCC	TTC	TCC	CGC	GCC	CCC	TAC	CAC	GCC	CTC	TTC	CTT	CCC	CCC	GTG	AGC	1788
Ala	Phe	Ser	Arg	Ala	Pro	Tyr	His	Ala	Leu	Phe	Leu	Pro	Pro	Val	Ser	
				405					410					415		
GAG	GGG	CCC	TAC	AGC	TAC	CAC	TTC	GTC	AAC	GTG	GAG	GCC	CAG	CGG	GAA	1836
Glu	Gly	Pro	Tyr	Ser	Tyr	His	Phe	Val	Asn	Val	Glu	Ala	Gln	Arg	Glu	
				420				425						430		

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (30)

AAC	CCC	CAC	TCC	CTC	CTG	AGC	TTC	AAC	CGC	CGC	TTC	CTC	GCC	CTG	AGG	1884
Asn	Phe	His	Ser	Leu	Leu	Ser	Phe	Asn	Arg	Arg	Phe	Leu	Ala	Leu	Arg	
	435						440					445				
AAC	CAG	CAC	GCC	AAG	ATC	TTC	GGC	CGG	GGG	AGC	CTC	ACC	CTT	CTC	CCC	1932
Asn	Gln	His	Ala	Lys	Ile	Phe	Gly	Arg	Gly	Ser	Leu	Thr	Leu	Leu	Pro	
	450						455					460				
GTG	GAG	AAC	CGG	CGC	GTC	CTC	GCC	TAC	CTG	AGG	GAG	CAC	GAG	GGG	GAG	1980
Val	Glu	Asn	Arg	Arg	Val	Leu	Ala	Tyr	Leu	Arg	Glu	His	Glu	Gly	Glu	
	465						470					475			480	
CGG	GTC	CTG	GTG	GTG	GCC	AAC	CTC	TCC	CGC	TAC	ACC	CAG	GCC	TTT	GAC	2028
Arg	Val	Leu	Val	Val	Ala	Asn	Leu	Ser	Arg	Tyr	Thr	Gln	Ala	Phe	Asp	
					485					490					495	
CTC	CCC	TTG	GAG	GCC	TAC	CAA	GGC	CTC	GTC	CCC	GTG	GAG	CTC	TTC	TCG	2076
Leu	Pro	Leu	Glu	Ala	Tyr	Gln	Gly	Leu	Val	Pro	Val	Glu	Leu	Phe	Ser	
			500						505						510	
CAG	CAA	CCC	TTC	CCC	CCG	GTG	GAG	GGG	CGC	TAC	CGC	TTG	ACC	CTG	GGC	2124
Gln	Gln	Pro	Phe	Pro	Pro	Val	Glu	Gly	Arg	Tyr	Arg	Leu	Thr	Leu	Gly	
			515					520							525	
CCC	CAC	GGC	TTC	GCC	CTC	TTC	GCC	CTG	AAG	CCC	GTG	GAG	GCG	GTG	CTC	2172
Pro	His	Gly	Phe	Ala	Leu	Phe	Ala	Leu	Lys	Pro	Val	Glu	Ala	Val	Leu	
			530					535							540	
CAC	CTC	CCC	TCC	CCC	GAC	TGG	GCC	GAG	GAG	CCC	GCC	CCC	GAG	GAG	GCC	2220
His	Leu	Pro	Ser	Pro	Asp	Trp	Ala	Glu	Glu	Pro	Ala	Pro	Glu	Glu	Ala	
			545												560	
GAC	CTG	CCC	CGG	GTC	CAC	ATG	CCC	GGG	GGG	CCG	GAG	GTC	CTC	CTG	GTG	2268
Asp	Leu	Pro	Arg	Val	His	Met	Pro	Gly	Gly	Pro	Glu	Val	Leu	Leu	Val	
					565					570					575	
GAC	ACC	CTG	GTC	CAC	GAA	AGG	GGG	CGG	GAG	GAG	CTC	CTA	AAC	GCC	CTC	2316

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (31)

Asp	Thr	Leu	Vla	His	Glu	Arg	Gly	Arg	Glu	Glu	Leu	Leu	Asn	Ala	Leu	
			580					585					590			
GCC	CAG	ACC	CTG	AAG	GAG	AAG	AGC	TGG	CTC	GCC	CTC	AAG	CCG	CAG	AAG	2364
Ala	Gln	Thr	Leu	Lys	Glu	Lys	Ser	Trp	Leu	Ala	Leu	Lys	Pro	Gln	Lys	
		595					600					605				
GTG	GCC	CTC	CTG	GAC	GCC	CTC	CGC	TTC	CAG	AAG	GAC	CCG	CCC	CTT	TAC	2412
Val	Ala	Leu	Leu	Asp	Ala	Leu	Arg	Phe	Gln	Lys	Asp	Pro	Pro	Lys	Tyr	
	610					615					620					
CTC	ACC	CTG	CTC	CAG	CTG	GAG	AAC	CAC	AGG	ACC	CTC	CAG	GTC	TCC	CTC	2460
Leu	Thr	Leu	Leu	Gln	Leu	Glu	Asn	His	Arg	Thr	Leu	Gln	Val	Ser	Leu	
	625					630					635				640	
CCC	CTC	CTC	TGG	TCC	CCC	CAG	AGG	CGG	GAA	GGC	CCC	GGC	CTC	TTC	GCC	2508
Pro	Leu	Leu	Trp	Ser	Pro	Gln	Arg	Arg	Glu	Gly	Pro	Gly	Leu	Phe	Ala	
				645					650					655		
CGC	ACC	CAC	GGC	CAG	CCC	GGC	TAC	TTC	TAC	GAG	CTC	TCC	TTG	GAC	CCA	2556
Arg	Thr	His	Gly	Gln	Pro	Gly	Tyr	Phe	Tyr	Glu	Leu	Ser	Leu	Asp	Pro	
			660					665					670			
GGC	TTC	TAC	CGC	CTC	CTC	CTC	GCC	CGC	CTT	AAG	GAG	GGG	TTT	GAG	GGG	2604
Gly	Phe	Tyr	Arg	Leu	Leu	Leu	Ala	Arg	Leu	Lys	Glu	Gly	Phe	Glu	Gly	
		675					680					685				
CGG	AGC	CTC	CGG	GCC	TAC	TAC	CGC	GGC	CGC	CAC	CCG	GGT	CCC	GTG	CCC	2652
Arg	Ser	Leu	Arg	Ala	Tyr	Tyr	Arg	Gly	Arg	His	Pro	Gly	Pro	Val	Pro	
	690					695					700					
GAG	GCC	GTG	GAC	CTC	CTC	CGG	CCG	GGA	CTC	GCG	GCG	GGG	GAG	GGG	GTC	2700
Glu	Ala	Val	Asp	Leu	Leu	Arg	Pro	Gly	Leu	Ala	Ala	Gly	Glu	Gly	Val	
	705				710					715					720	
TGG	GTC	CAG	CTC	GGC	CTC	GTC	CAA	GAC	GGG	GGC	CTG	GAC	CGC	ACG	GAG	2748
Trp	Val	Gln	Leu	Gly	Leu	Val	Gln	Asp	Gly	Gly	Leu	Asp	Arg	Thr	Glu	
				725					730					735		
CGG	GTC	CTC	CCC	CGC	CTG	GAC	CTC	CCC	TGG	GTT	CTC	CGG	CCC	GAA	GGG	2796
Arg	Val	Leu	Pro	Arg	Leu	Asp	Leu	Pro	Trp	Val	Leu	Arg	Pro	Glu	Gly	
				740				745					750			
GGC	CTC	TTC	TGG	GAG	CGG	GGC	GCC	TCC	AGA	AGG	GTC	CTC	GCC	CTC	ACG	2844
Gly	Leu	Phe	Trp	Glu	Arg	Gly	Ala	Ser	Arg	Arg	Val	Leu	Ala	Leu	Thr	
		755					760					765				
GGA	AGC	CTC	CCC	CCG	GGC	CGC	CCC	CAG	GAC	CTC	TTC	GCC	GCC	CTG	GAG	2892
Gly	Ser	Leu	Pro	Pro	Gly	Arg	Pro	Gln	Asp	Leu	Phe	Ala	Ala	Leu	Glu	
	770					775					780					
GTC	CGG	CTC	CTG	GAA	AGC	CTT	CCC	CGC	CTC	CGG	GGG	CAC	GCC	CCC	GGG	2940
Val	Arg	Leu	Leu	Glu	Ser	Leu	Pro	Arg	Leu	Arg	Gly	His	Ala	Pro	Gly	
	785				790					795					800	
ACC	CCA	GGC	CTC	CTT	CCC	GGG	GCC	CTG	CAC	GAG	ACC	GAA	GCC	CTG	GTC	2988
Thr	Pro	Gly	Leu	Leu	Pro	Gly	Ala	Leu	His	Glu	Thr	Glu	Ala	Leu	Val	
				805					810					815		
CGC	CTC	CTC	GGG	GTG	CGC	CTC	GCC	CTC	CTC	CAC	CGG	GCC	CTT	GGG	GAG	3036
Arg	Leu	Leu	Gly	Val	Arg	Leu	Ala	Leu	Leu	His	Arg	Ala	Leu	Gly	Glu	
			820					825					830			
GTG	GAG	GGG	GTG	GTG	GGG	GGC	CAC	CCC	CTC	CTA	GGC	CGC	GGC	CTC	GGG	3084
Val	Glu	Gly	Val	Val	Gly	Gly	His	Pro	Leu	Leu	Gly	Arg	Gly	Leu	Gly	
		835					840					845				
GCC	TTC	CTG	GAG	CTG	GAG	GGG	GAG	GTG	TAC	CTC	GTG	GCC	CTG	GGC	GCG	3132
Ala	Phe	Leu	Glu	Leu	Glu	Gly	Glu	Val	Tyr	Leu	Val	Ala	Leu	Gly	Ala	
	850					855					860					
GAA	AAG	CGG	GGC	ACG	GTG	GAG	GAG	GAC	CTG	GCC	CGC	CTG	GCC	TAC	GAC	3180
Glu	Lys	Arg	Gly	Thr	Val	Glu	Glu	Asp	Leu	Ala	Arg	Leu	Ala	Tyr	Asp	
	865				870				875						880	

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (32)

GTG	GAG	CGG	GCC	GTG	CAC	CTC	GCC	CTC	GAG	GCC	CTG	GAG	GCG	GAG	CTT	3228
Val	Glu	Arg	Ala	Val	His	Leu	Ala	Leu	Glu	Ala	Leu	Glu	Ala	Glu	Leu	
				885					890					895		
TGG	GCC	TTT	GCC	GAG	GAG	GTG	GCC	GAC	CAC	CTC	CAC	GCC	GCC	TTC	CTC	3276
Trp	Ala	Phe	Ala	Glu	Glu	Val	Ala	Asp	His	Leu	His	Ala	Ala	Phe	Leu	
			900					905					910			
CAA	GCC	TAC	CGC	TCC	GCC	CTC	CCC	GAG	GAG	GCC	CTG	GAG	GAG	GCG	GGC	3324
Gln	Ala	Tyr	Arg	Ser	Ala	Leu	Pro	Glu	Glu	Ala	Leu	Glu	Glu	Ala	Gly	
		915					920					925				
TGG	ACG	CGG	CAC	ATG	GCC	GAG	GTG	GCG	GCG	GAG	CAC	CTC	CAC	CGG	GAG	3372
Trp	Thr	Arg	His	Met	Ala	Glu	Val	Ala	Ala	Glu	His	Leu	His	Arg	Glu	
	930					935					940					
GAA	AGG	CCC	GCC	CGC	AAG	CGC	ATC	CAC	GAG	CGC	TGG	CAG	GCC	AAG	GCC	3420
Glu	Arg	Pro	Ala	Arg	Lys	Arg	Ile	His	Glu	Arg	Trp	Gln	Ala	Lys	Ala	
945					950				955					960		
GGA	AAA	GCC														3429
Gly	Lys	Ala														
		963														
TAGGCGCCCG	GTAGCCCTTC	AGCCCCGGGC	CACGGGGGCC	TTGGGGTGGA	AGACGGCCTC											3489
CTCGGGGAGG	AGGCGGCGCT	TCTTGCCCCG	GCGGTAGACG	GCGTCCCACA	TGCGGCAGAA											3549
GGCGCACACC	GCCCCGTGG	TGGGGTAGCC	GCACCGCTCG	CACTCCCTAA	G											3600

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (33)

如上述，本對熱安定酵素能將麥芽糖轉化成海藻糖，反之亦然，這是本發明者們長時間研究發現的結果，不像傳統酵素，此酵素具有特殊的理化特性。本發明旨在於藉由重組型 D N A 技術製造重組型酵素。有關接下來的實施例，此重組型酵素之製造方法及用途將被詳細描述。

本發明所提及的重組型酵素包括那些一般以重組型 D N A 技術製造並有能力將麥芽糖轉化成海藻糖，反之亦然。通常本重組型 D N A 具有揭示的胺基酸序列，例如 S E Q I D N O : 3 之胺基酸序列或與它同源之胺基酸。每一種含有與 S E Q I D N O : 3 同源胺基酸序列之胺基酸序列能以其他胺基酸代替 S E Q I D N O : 3 中一或多個胺基酸而不改變酵素的原本活性。雖然使用相同的 D N A，D N A 的引入仍須視宿主而定，而且要視用來培養轉形體之營養培養基的成份及組成以及他們的培養溫度及 p H 而定，可製造 D N A 編碼出的酵素，在 S E Q I D N O : 3 接近 N - 端和 / 或 C - 端缺少一或數個胺基酸之修正過的酵素具有固有的酵素活性，在 D N A 由宿主表現後之細胞外酵素以在 N - 端增加 1 或數個胺基酸來修飾亦然。這些種類只要他們具有適當的性質都包含於本重組型酵素中。

依據本發明能以含有特殊 D N A 之轉形體的培養來獲得此重組型 D N A。以 S E Q I D N O : 4 鹼基序列，同源的鹼基序列或互補的鹼基序列引入合適宿主以獲得在本發明中使用方便的轉形體。藉著不改變其編碼胺基酸

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (34)

而使其遺傳密碼退化的方法上述的鹼基序列可取代 1 至數個。不用說，編碼本酵素及變化種類的鹼基序列中的 1 或數個鹼基能以允許 D N A 確實於宿主中表現的酵素製造之其他鹼基來取代。

任何以天然來源或人工合成方式得到之 D N A 均能使用於本發明中，只要他有們有前述的鹼基序列。依據本實驗的天然來源 D N A，例如可由含有本實驗用到之 D N A 其基因可由 *Thermus aquaticus* (ATCC 33923) 微生物體獲得。這些微生物接種於營養培養基並在氧條件下培養 1 - 3 天，由培養液中收集所得的細胞令其受超音波震盪或以分解細胞壁的酵素如溶菌酵素或 β - 聚葡萄糖酶處理以萃取含有本 D N A 之基因。此例中，蛋白分解酵素例如蛋白酶可與分解細胞壁之酵素一起使用，並且本例中以超音波震盪可在界面活性劑如十二烷硫酸鈉 (S D S) 存在下進行或以冷凍及解凍方法處理。且標 D N A 以常用於此領域之方法，以酚萃取上述結果以酒精沈澱，離心，蛋白酶處理，和 / 或核糖核酸酶處理來萃取。依據本發明人工合成 D N A，以化學合成 S E Q I D N O : 3 之鹼基序列，或將編碼 S E Q I D N O : 4 胺基酸序列之 D N A 接上質體並引入合適能自行複製之載體來獲得重組型 D N A，將重組型 D N A 引入合適之宿主以獲得轉形體，培養轉形體，由所得之培養液中將增殖的細胞分離出來，並收集具有來自細胞之重組型 D N A 的質體。

此種重組型 D N A，通常引入宿主中。一般含有前述

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (35)

D N A 之轉形體 D N A 及可複製之載體可用傳統方法來製備，在已有 D N A 物質的情況下是相當容易的。實施例中所用到的質體載體例如 p B R 3 2 2，p U C 1 8，Bluescript II SK(+), p K K 2 2 3 - 3，p U B 1 1 0，p T P 4，p C 1 9 4，p H V 1 4，Y R p 7，Y E p 7，p B S 7，等等；及噬菌體載體如 λ g t · λ C， λ g t · λ B， ρ 1 1， ϕ 1， ϕ 1 0 5，等等。在這些質體及噬菌體載體中，p B R 3 2 2，p U C 1 8，Bluescript II BK(+), p K K 2 2 3 - 3， λ g t · λ C 及 λ g t · λ B 適用於本 D N A 表現之大腸桿菌 *Escherichia coli*，而 p U B 1 1 0，p T P 4，p C 1 9 4， ρ 1 1， ϕ 1 及 ϕ 1 0 5 適用於 D N A 在 *Bacillus* 屬微生物中表現。質體載體 p H V 1 4，Y R p 7，Y E p 7 及 p B S 7 適於重組型 D N A 之使用，而能在 2 種以上的宿主中發展。

在本發明中用來將本 D N A 接於載體上的方法乃是傳統上在此研究領域被使用的一般方法。包含本 D N A 之基因及可自行複製載體先以限制酶及／或超音波震盪器處理，然後將得到的 D N A 片段及載體片段接合起來。爲了接合 D N A 片段及載體，若有需要可做接合反應 (anneal)，接著使 D N A 接合之作用在體內或試管中進行。重組型 D N A 引入合適的宿主中並培養所得之轉形體在自行複製上並無太多限制。依據本實驗重組型 D N A 能被引入包括大腸桿菌 *Escherichia coli*，*Bacillus* 屬微生物，放射菌

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (36)

類及酵母菌之合適的宿主微生物中。使用大腸桿菌當宿主的例子中，能在重組型 DNA 及鈣離子存在下被培養，而在使用 *Bacillus* 屬微生物的例子中勝任細胞的方法及菌落雜合方法可被利用。可用菌落雜合方法或將各種轉形體分別培養於含麥芽糖或海藻糖之營養培養基來篩選那一些轉形體形成海藻糖或麥芽糖以選殖出想要的轉形體。

當轉形體培養於營養培養基可得到產生於細胞外之目標酵素。一般而言，普通以液態培養基供應碳源，氮源及／或礦物質，若有必要更供應少量胺基酸及／或可被使用於營養培養基的維生素。用來當做碳源的是醣類例如澱粉，水解澱粉，葡萄糖，果糖及蔗糖。用來當做氮源的是含有氮的有機及無機物質，例如氨，銨鹽，尿素，硝酸鹽，蛋白胨，酵母菌抽取物，脫脂豆類，玉米浸泡液及牛肉萃取物。可以將轉形體接種於營養培養基並在 20 - 50 °C 及 pH 2 - 9 在空氣攪動之有氧條件下培養 1 - 6 天以獲得含有目標酵素之培養物。此培養可得粗酵素之製備，通常培養液中的細胞能以超音波震盪器及／或事先使用細胞壁分解酵素將之分裂，接著以過濾及／或離心方式將酵素由完整細胞及細胞碎物中分離出來，並純化酵素。本發明用來純化酵素的方法包括傳統上常被使用的方法。由培養液移除完整細胞及細胞碎物可用離心，鹽析，透析，沈澱分離法，膠體過濾色層分析法，離子交換色層分析法，拒水色層分析法，親和力色層分析法，膠體電泳法以及等電電泳法。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (37)

如上述，本重組型對熱安定酵素運用其難得的活性在超過 55 °C 的溫度下能將麥芽糖或海藻糖轉化成海藻糖或麥芽糖，這是普通酵素所沒有的活性。海藻糖具有溫和及高品質的甜味並且有一個大優點就是能使食品製造物變甜卻不必擔心導致令人不悅的染色及退化，這是因為它的分子中無還原基因。由於麥芽糖的可還原性有些情況下無法使用，因著本重組型對熱安定酵素的這些特性，可將麥芽糖轉化成操作上令人滿意且無還原性的海藻糖。

現在要細部地解釋本酵素轉化方法，本發明中提及“麥芽糖”意即一種具有麥芽糖成分的醣類，在本發明中使用的任一種物質或方法只要本重組型對熱安定酵素作用於其上或藉此海藻糖被形成。為了在工業上能有效率製造海藻糖，具有相當高含量之麥芽糖的醣類組成，也就是通常指 70 w / w % 或更高，尤其是 80 w / w % 或更高均能任意使用本酵素。

這種醣類成份能以一般使用於本領域之方法來轉化，例如發表於日本專利第 11,437 / 81 及

17,078 / 81 號中所使用之方法，其中 β -澱粉酶用來作用於使澱粉明膠化或液化並以沈澱分離法或透析法將形成的麥芽糖由其中分離出來，或發表於日本專利發表第 13,089 / 72 及 3,938 / 79 號中所使用的方法，其中 β -澱粉酶用來作用於使澱粉明膠化或液化並以澱粉分枝酵素如異澱粉酶或促芽酶一起處理。

依據本發明之酵素轉化方法，本重組型對熱安定酵素

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (38)

的有效量能與含有麥芽糖之水溶液培養基共同存在，且能一直將此混合液之溫度及 pH 維持在能使酵素作用的範圍內直到海藻糖達到所要的量為止。雖然此酵素反應方法在相當低濃度約 0.1 w / w % 以下都能進行，最好還是把濃度設定在 2 w / w % 或 2 w / w % 以上，最好是 5 - 50 w / w %，來進行工業級的酵素轉化方法。設定反應溫度及 pH，在此範圍內不會使重組型酵素去活化也不會影響麥芽糖的形成，也就是溫度超過 55 °C，最好是 56 - 63 °C，pH 約為 5 - 10，最好是約 6 - 7。依據酵素反應條件來設定適當的重組型酵素量及反應時間。本酵素轉化方法能有效地將麥芽糖轉化成轉形體，並且其轉化率在某些情況下可高達約 50 % 或 50 % 以上。

可原封不動使用本酵素轉化方法來得到反應混合物，並通常在使用前被純化。例如，反應物被過濾及離心來移除不溶物，所得的溶液以活化的焦炭吸附其顏色，以離子交換樹脂去鹽類並純化且濃縮成蜜糖產物。取決於使用方式，此蜜糖產物以真空乾燥及噴霧乾燥成固態產物。爲了真正能正到由海藻糖組成的產物，蜜糖產物用一種或一種以上的色層分析法如離子交換，活化的焦炭吸附劑或矽膠處理，用酵母菌發酵，以鹼還原醣類來分解並移除雜質。爲了處理相當大量反應物，日本專利 Laid-Open 第 23,799 / 83 及 72,598 / 83 揭示的離子交換色層分析法諸如固定層，移動層及假移動層之方法在本發明中被任意使用，這些能有效率且大量地生產含海藻糖

五、發明說明 (39)

的產物，在過去要得到這種量是困難的。

海藻糖及含有由產物獲得之海藻糖的醣類組成物，可防止醣類甜味劑的還原，且能任意的使用在各種組成物如食品產物上，化粧品上及製藥上當做甜味劑，味覺改良劑，品質改良劑，安定劑，充填劑，輔藥式賦形劑。

接下來的實施例解釋了重組型對重組型酵素的製備以及依據本發明將麥芽糖轉化的酵素轉化方法：

實施例 A - 1

重組型酵素的製備

在 500 ml Erlenmeyer 培養瓶中加入 100 ml 含有 2.0 w/v % 葡萄糖，0.5 w/v % 蛋白胨，0.1 w/v % 酵母菌抽出物，0.1 w/v % 磷酸氫二鉀，0.06 w/v % 磷酸二氫鈉，0.05 w/v % 七羥硫酸鎂，0.5 w/v % 碳酸鈣及水之營養培養基，每一個培養瓶以 115℃ 加熱 30 分鐘來滅菌，冷卻後加入 50 μg/ml 氨比西林，將由實施例 1 - 2 所得的轉形體 BTM 22 接種於其中，接著在 37℃ 下於旋轉震盪器中培養 24 小時以得到種籽培養液。在 30 升發酵罐中加入 18 升新鮮配製如上成份之液態培養基，以類似上述方法滅菌，加入 50 μg/ml 氨比西林，接種 1 v/v % 的種籽培養液，接著在空氣攪拌及 37℃，pH 6 - 8 條件下培養 24 小時。所得的培養液倒在一起以超音波震盪器處理以打碎細胞，以離心方式移除不溶物，接

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (40)

著分析其上清液的酵素活性。得到的結果為 1 升培養液含有約 8 0 0 單位的重組型酵素。上清液以揭示於實施例 1 - 1 的方法分析可得每 5 m l 水溶液中含有約 1 5 2 u n i t s / m l 的重組型酵素，它的特殊活性為每 m g 蛋白質約 1 3 5 單位。

實施例 A - 2 (a)

轉型體 B T M 2 3 之製備

以實施例 3 - 2 的方法得到的重組型 D N A p B T M 2 2 以限制酶 H i n d Ⅲ 切開，得到含有約 8 , 1 0 0 鹼基對的 D N A 片段，其鹼基對含有 S E Q I D N O : 4 中 1 0 7 到 2 , 8 8 9 位置之鹼基序列。

8 個含如下序列之寡核苷酸：

5'-AGCTTGAATTCTTTTTTAATAAAATCAGGAGGAAAAACCATGGA
CC-3', 5'-CCCTCTGGTACAAGGACGCGGTGATCTACCAGCTCCAC-3', 5'-GTCCGCT
CCTTCTTTGACGCCAACAACGACGGCTACGG-3', 5'-GGACTTTGAGGGCCTGAGG
CGGA-3', 5'-AGCTTCGCTCAGGCCCTCAAAGTCCCCGTAGCCGTCGTTGTTG-3',
5'-GCGTCAAAGAAGGAGCGGACGTGGAGCTGGTAGATCACC-3', 5'-GCGTCCTTG
TACCAGAGGGGGTCCATGGTTTTTCTCC-3', and 5'-TGATTTTATTAAAAAAGAA

以適當量相混合，此混合液各別依次在 1 0 0 °C，
6 5 °C，3 7 °C 及 2 0 °C 靜置反應 2 0 分鐘，使寡核苷酸
發生接合作用 (anneal) 作用。第一個重組型 D N A 含有

五、發明說明 (41)

SEQ ID NO: 6 之鹼基序列以及 SEQ ID NO: 3 1 - 2, 889 位置之鹼基序列且 1 - 963 位置之鳥嘌呤 (G) 均以腺嘌呤 (A) 來代替, 加入上述 DNA 片段至具有 141 個鹼基對且其每個 5' - 端有 4 個鹼基有內聚力之終點的雙股螺旋 DNA 中, 它由 SEQ ID NO: 6 的鹼基序列及 SEQ ID NO: 4 1 - 110 位置之鹼基所組成其中 SEQ ID NO: 4 位置 1 的鳥嘌呤 (G) 以腺嘌呤 (A) 來代替不會改變 SEQ ID NO: 3 1 - 36 位置的胺基酸組成, 並能在 T4 DNA 接合酶存在下將混合液於 4 °C 下過夜以使內容物發生接合作用 (anneal)。

SEQ ID NO:6:

AGCTTGAATT CTTTTTTAAT AAAATCAGGA GGAAAAACC

39

以實施例 3 - 2 的方法得到的重組型 DNA pBTM22 以限制酶 Hind III 切斷, 得到約由 2,400 鹼基對組成之 DNA 片段, 它含有 SEQ ID NO: 4 1,008 至 2,889 位置的鹼基序列, 接著接上由日本東京 Takara Shuzo Co., Ltd. 生產的噬菌體載體 "M13tv 19RF DNA", 先以 BamHI 切斷以得到二級重組型 DNA。

一種含 SEQ ID NO: 5 3,438 至 3,458 位置鹼基序列其中 3,448 位置之 "胸腺嘧啶 (T)" 以 "鳥嘌呤 (G)" 取代, 也就是 5' - CG

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (42)

G T A G C C C T G C A G C C C C G G G - 3' 之寡核苷酸，被以一般的化學方法合成。使用合成的寡核苷酸及由日本東京Takara Shuzo Co., Ltd.生產的特定位置突變系統 "MUTAN-G" 使 S E Q I D N O : 4

1, 008 至 2, 889 位置上的 "胸腺嘧啶 (T)"，也就是 S E Q I D N O : 5 3, 448 位置上之鹼基，以 "鳥嘌呤 (G)" 取代而不改變由二級重組型 D N A 得到之 S E Q I D N O : 5 337 至 963 位置之胺基酸序列。特定位置突變之方法是按附在 "MUTAN-G" 中說明書的方法。

一種含有 S E Q I D N O : 4 1 至 1, 358 位置鹼基序列其中 "鳥嘌呤 (G)" 也就是 S E Q I D

N O : 4 的第 1 個鹼基，以 "腺嘌呤" 來取代由約 1, 390 鹼基對所組成之 D N A 片段，此 D N A 片段以限制酶 E c o R I 及 B g l II 切開，另一三級重組型 D N A 含 S E Q I D N O : 4 中位置 1, 359 至 2, 889 鹼基序列約有 1, 550 鹼基對之 D N A 片段以限制酶 B g l II 及 P s t I 切開，以 T 4 D N A 接合酶接合到位於瑞士 Sweden 之 Pharmacia LKB Biotechnology 生產的質體載體 "p K K 2 2 3 - 3" 上，得到含有 S E Q I D N O : 4 鹼基序列的重組型 D N A p B T M 2 3。

Escherichia coli LE392 (ATCC 33572) 事先依照 J. Sambrook 在第二版 (1989) "Molecular Cloning,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (43)

A Laboratory Manual" (由位於美國冷泉灣實驗室所印行) 1 . 7 4 - 1 . 8 1 頁中所描述的方法製成勝成細胞，再將重組型 D N A p B T M 2 3 引入其中得到含編碼此酵素之 D N A 的轉形體 B T M 2 3 。此轉形體以實施例 3 - 2 的方法培養，增殖細胞由所得之培養液中收集起來，將細胞溶解並萃取重組型 D N A ，接著純化並分析，它的組成是約 7 , 5 0 0 個鹼基對以及 2 , 8 8 9 鹼基對以限制酶 N c o I 接在其下游，重組型 D N A p B T M 2 3 的結構揭示在圖 6 。

實施例 A - 2 (b)

以轉形體製備重組型對熱安定酵素

轉形體 B T M 2 3 以類似實施例 A - 1 的方法培養，只除了它的液態培養基 (p H 7 . 0) 是由 1 w / v % 麥芽糖，3 w / v % 蛋白胨，1 w / v % 日本東京 Asahi Breweries, Ltd. 生產的 "MEAST PIG"，0 . 1 w / v % 二結合水的磷酸二氫鈉，2 0 0 μ g / m l 氨比西林及水所組成。所得的培養液加入日本東京 Seikagaku-kogyo Co 所生產由白蛋白得來的溶菌酵素以及界面活性劑 "TRITON X-100" 各得 0 . 1 m g / m l 及 1 m g / m l 之溶液，接著置於 3 7 °C 靜置反應 1 6 小時，離心由細胞中萃取重組型對熱安定酵素。上清液在 6 0 °C 加熱 1 小時使由 Escherichia coli 而得的其他酵素去活化，離心後移除不純物，分析上清液的酵素活性，得知 1 升培養液含有約

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (44)

1 2 0 , 0 0 0 單位之對熱安定酵素。上清液以實施例 1 的方法純化得到約 1 7 7 m l 上清液含有約 1 , 4 0 0 u n i t s / m l 的重組型對熱安定酵素，其專一活性每 m g 蛋白質約有 1 3 5 u n i t s 。

此純化酵素的性質及特徵以實施例 2 的方法加以研究，得知在十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺膠體電泳分析 (S D S - P A G E) 下它有 1 0 0 , 0 0 0 - 1 1 0 , 0 0 0 道耳吞之分子量並且等電電泳分析下等電點約 3 . 8 - 4 . 8 ，當它於水溶液 (p H 7 . 0) 中在 8 0 ° C 下靜置反應 6 0 分鐘也不會去活性。這些理化性質實質上與當做捐贈者微生物 *Thermus aquaticus* (ATCC 33923) 的理化性質是相同的。

實施例 B - 1

以重組型酵素來製造海藻糖糖漿

將馬鈴薯粉以 1 0 w / w % 的濃度均勻分散於水中，此懸浮液之 p H 調至 5 . 5 ，每克澱粉加入 2 單位 " SPITASE HS " ，這是一種由日本 Kyoto 之 Nagase Biochemicals, Ltd. 生產的 α - 澱粉酶，在 9 5 ° C 下加熱產生膠化及溶解。之後，得到之溶解的水溶液以殺菌斧在 1 2 0 ° C 下滅菌 2 0 分鐘將其中的酵素去活化，迅速冷卻至 5 0 ° C ，將 p H 調至 5 . 0 ，每克澱粉加入 5 0 0 單位異澱粉酶，這是由日本 Okayama 的 Hayashibara Biochemical Laboratories 所生產，以及每克澱粉中加入

五、發明說明 (45)

20 單位的 β - 澱粉酶，由日本 Kyoto 的 Nagase Biochemicals, Ltd. 所生產，在 50 °C 下進行酵素反應 24 小時得到含有約 92 w / w % 麥芽糖的醴類溶液。此醴類溶液在 100 °C 加熱 20 分鐘將其中酵素去活化，冷卻至 60 °C，將 pH 調至 6.5，每克澱粉加入 1 單位由實施例 A - 1 所得的重組型酵素，進行酵素反應 96 小時。反應混合物在 100 °C 下加熱 10 分鐘將其中的酵素去活化，冷卻，過濾，並以常用的方法也就是活性碳脫色，以離子交換樹脂去鹽，去離子，濃縮至 70 w / w % 糖漿，產量約為 95 %。

含有約 68 w / w % 海藻糖的產物，因它的 DE (右旋糖當量) 為 18.4 因此具有相當低的還原性，並且具有溫和的甜味，中度的黏性及保濕能力，這些使它能任意地使用於各種組成物如食品產物，化粧品及製藥上用來當做甜味劑，味覺改良劑，安定劑，充填劑，輔藥或賦形劑。

實施例 B - 2

以重組型 DNA 製造海藻糖海藻糖粉末

實施例 B - 1 得到之反應混合物將其 pH 調至 5.0，每克澱粉加入 10 單位 "GLUCOZYME"，這是一種由日本 Kyoto 的 Nagase Biochemicals, Ltd. 製造的葡萄糖澱粉酶，在 50 °C 下進行酵素 24 小時。加熱反應混合物將其中的酵素去活化且用一般方法脫色，去鹽，純化並通化使

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (46)

用 "X T - 1 0 1 6 (聚合等級為 4 %)" 之離子交換色層分析管，這是一種 Na^+ - 形式之陽離子交換樹脂由日本東京 Tokyo Organic Chemical Industries., Ltd. 所生產，如此一來可增加海藻糖的含量。特別是，離子交換樹脂要事先懸浮於水中裝入 4 根內徑為 5 . 4 c m 其外裹以不銹鋼之中空管中，這些管子彼此相接成 2 0 m 之長度。約 5 v / v % 的反應混合物置入此管子中其內溫度保持在 6 0 °C，在 S V (間隔速率) 0 . 1 5 下以 6 0 °C 熱水同反應物放入管中以分餾，收集具高海藻糖含量的收集液。收集液倒在一起以一般方式濃縮，真空乾燥，粉碎成海藻糖粉末其產率約為 5 0 %。

含有約 9 7 w / w % 海藻糖的產物具有相當低之還原力並且是一種溫和的甜味劑，能任意地使用於各種組成物如食品產物，化粧品及製藥上當做甜味劑，味道改良劑，安定劑，充填劑，輔藥或賦形劑。

實施例 B - 3

以重組型酵素製造結晶狀海藻糖粉末的方法

以實施例 B - 2 的方法得到高海藻糖含量之收集物以一般方法也就是活性碳脫色，離子交換去鹽，濃縮成約 7 0 w / w % 之溶液。此濃縮物放置在結晶器中邊攪拌使其逐漸冷卻得到結晶百分比約 4 5 % 之糖膏。此糖膏從一頂端配有噴嘴的乾燥塔以約 1 5 0 k g / c m ² 的壓力噴出，同時約 8 5 °C 熱氣體由乾燥塔頂端飄下，約 4 5 °C 熱

五、發明說明 (47)

氣體飄過具有金屬線網狀物之運送裝置的下方，此運送裝置配備於乾燥塔的下層，結晶粉末收集於運送裝置之上，粉末逐漸由乾燥塔向外送。之後，結晶粉末送入熟成塔在熱空氣流動中熟成 10 小時完成結晶及乾燥。因此，含水結晶海藻糖粉末可得之產率約為 90 %。

這個產品實質上是不含水的並且容易操作，它可任意用在不同的組成物例如食物製品，化粧品以及藥品，當做甜味劑，味道改良劑，品質改良劑，安定劑，填充劑，輔藥或賦形劑。

實施例 B - 4

以重組型酵素製備無水結晶海藻糖粉末

以實施例 B - 2 的方法得到高海藻糖成份之部分，以實施例 B - 3 中的類似方法加以純化，所得之溶液送入導管並在降壓下沸騰，得到含水量約 3.0 w / w % 的糖漿。此糖漿置於結晶形成器中，摻合約 1.0 w / w % 無水結晶海藻糖當做種籽結晶物，在攪拌下於 120 °C 結晶，並送入平直之鋁導管中，在 100 °C 下熟成此內容物 6 小時成塊狀。此塊狀物以截斷器粉碎，以流體床乾燥器加以乾燥得到含水量約 0.3 w / w % 之無水結晶海藻糖粉末其產率約為 85 %。

此產物有強脫水力可任意用於食物製品，化粧品及藥品，當做原料及中間物，也有溫和甜味之白色粉末甜味劑用在食物製品，化粧品及藥品上。

五、發明說明 (48)

實施例 B - 5

以重組型酵素製備海藻糖粉末

“MALTOSE HHH”是一種由日本 Okayama 之 Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc 製造的高純度麥芽糖，以 40 w / w % 之濃度將其溶解在水中，加熱至 57 °C，pH 調至 6.5，每克麥芽糖加入由實施例 A - 2 之方法得到的重組型對熱安定酵素，接著酵素反應進行 48 小時。反應混合物在 100 °C 加熱 10 分鐘將其中的酵素去活化，冷卻，過濾，用一般方法也就以活性碳脫色，以離子交換樹脂去鹽並純化，真空下乾燥，加以粉碎得到約 73 w / w % 之海藻糖粉末，其產率約為 90 %。

此產物約有 30 % 的麥芽糖並具有 DE (右旋糖當量) 為 19，但它的黏性與麥芽糖相同，並且有溫和的甜味及相當的含水力。因此此產物可任意用在不同的組成物例如食物製品，化粧品以及藥品，當做甜味劑，品質改良劑，安定劑，填充劑，輔藥及賦形劑。

如上所述，本發明基於一種新酵素之發現，此酵素當作用於麥芽糖或海藻糖時可形成海藻糖或麥芽糖。本發明旨在探索一種能以工業產量生產酵素並以重組型 DNA 得到相當高產量之酵素的方法。以本重組型對熱安定酵素以酵素轉化方法將麥芽糖轉化為含有相當高產率海藻糖，葡萄糖和 / 或麥芽糖之醣類組成物。海藻糖具有溫和且高品

五、發明說明 (49)

質之甜味，其分子中無還原基因，因為這些它能普遍地輕易使食品產物變甜而不必擔心引起令人不悅的顏色及惡化。具有已知之氨基酸序列的重組型酵素在製備海藻糖上是非常安全的，這是用於食物製品之前提。

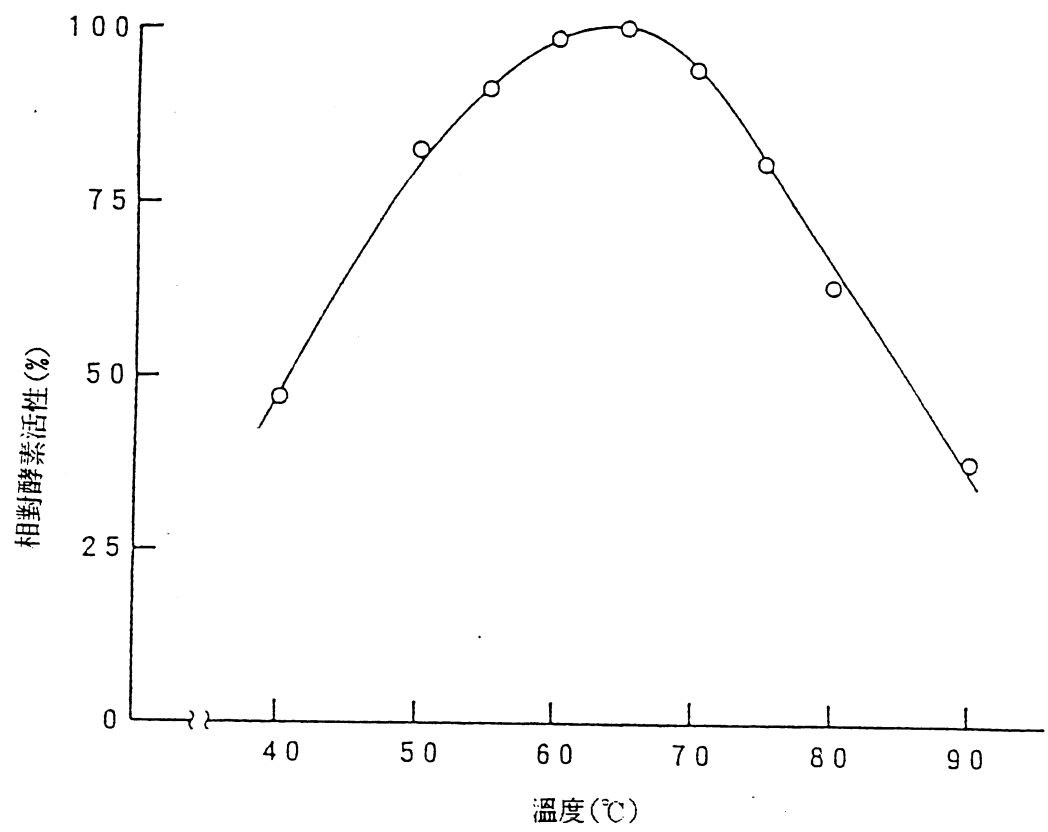
因此，本發明為一運用前述重要反應及效應之有用的發明，並且在此領域有極大的貢獻。

前述者乃視為本發明現今之較佳具體範例，可了解的是，其中可作不同的修正並且在附錄之申請專利範圍中涵蓋所有這種在本發明之精髓及領域中的修飾。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂



第 1 圖

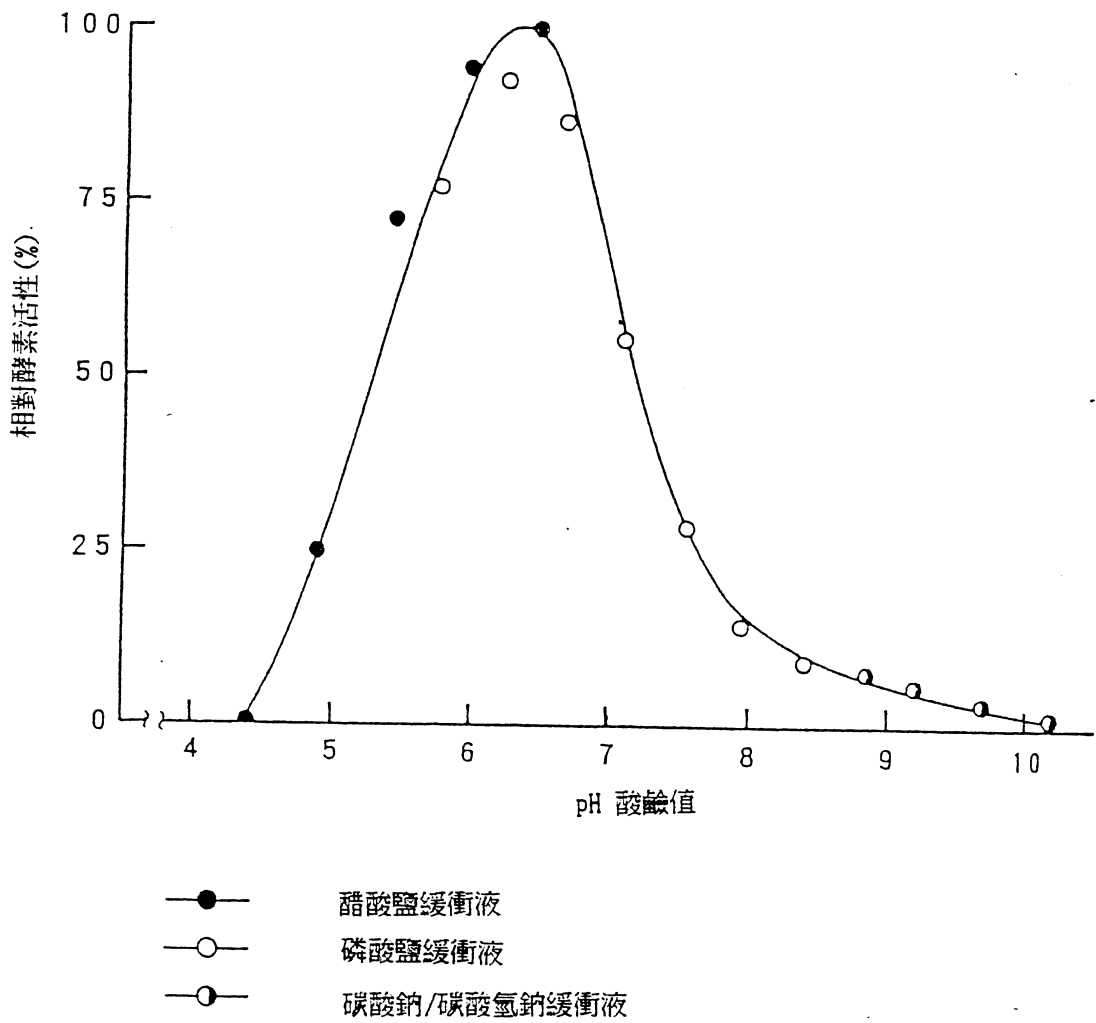


圖 2

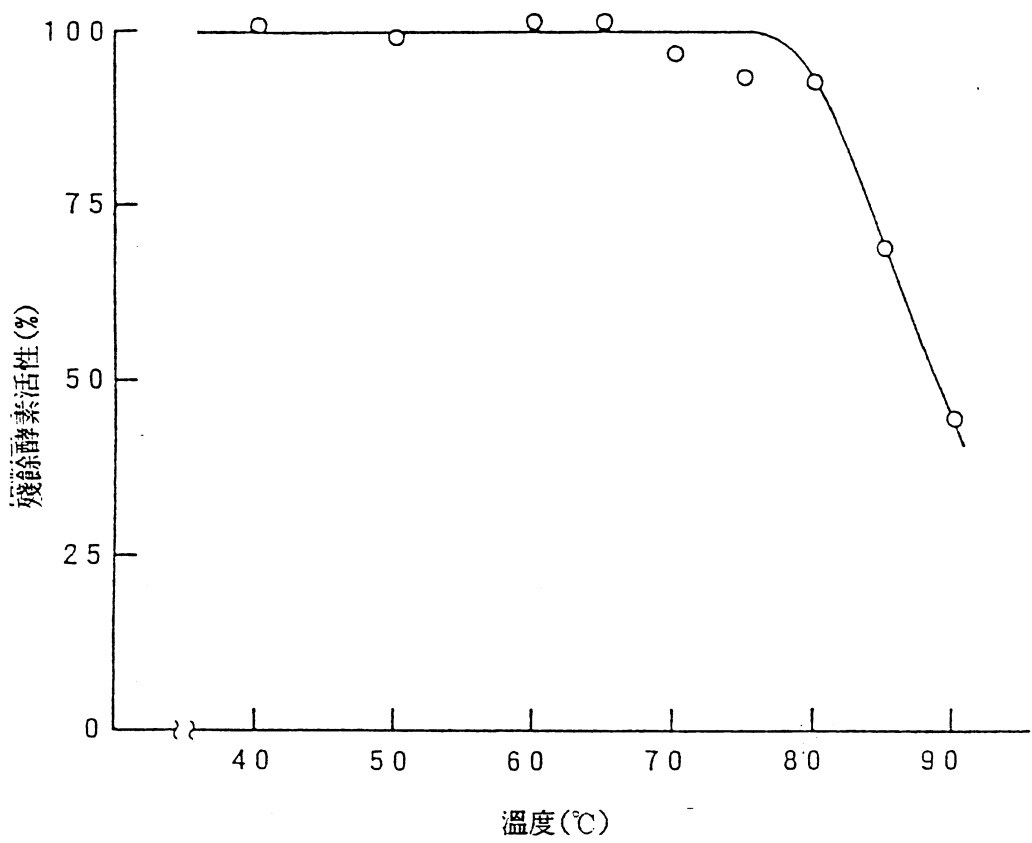
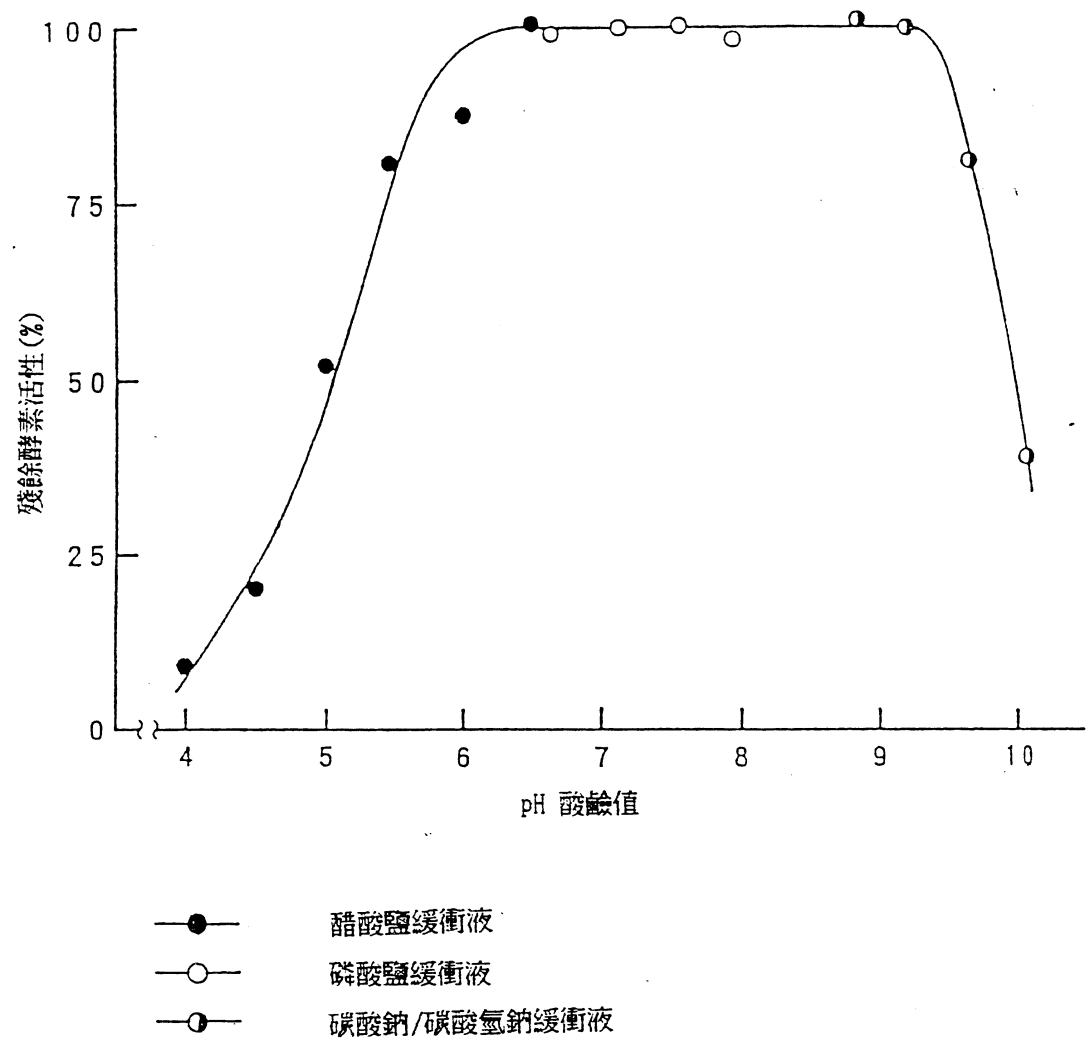
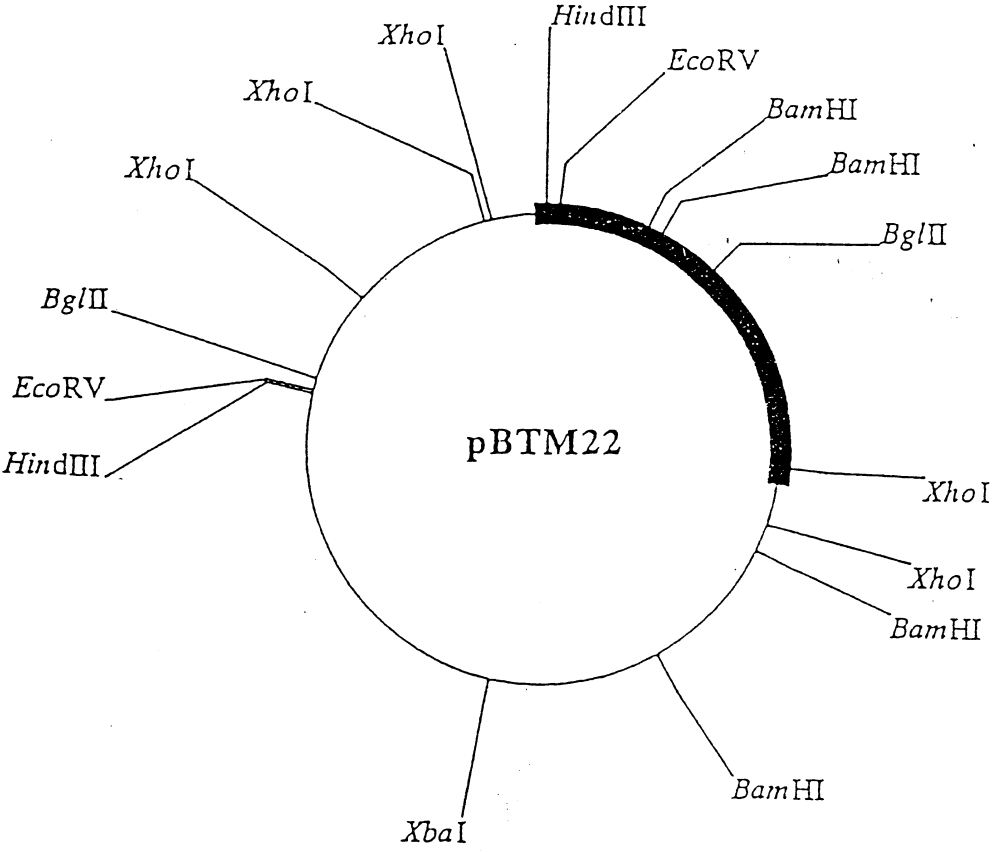


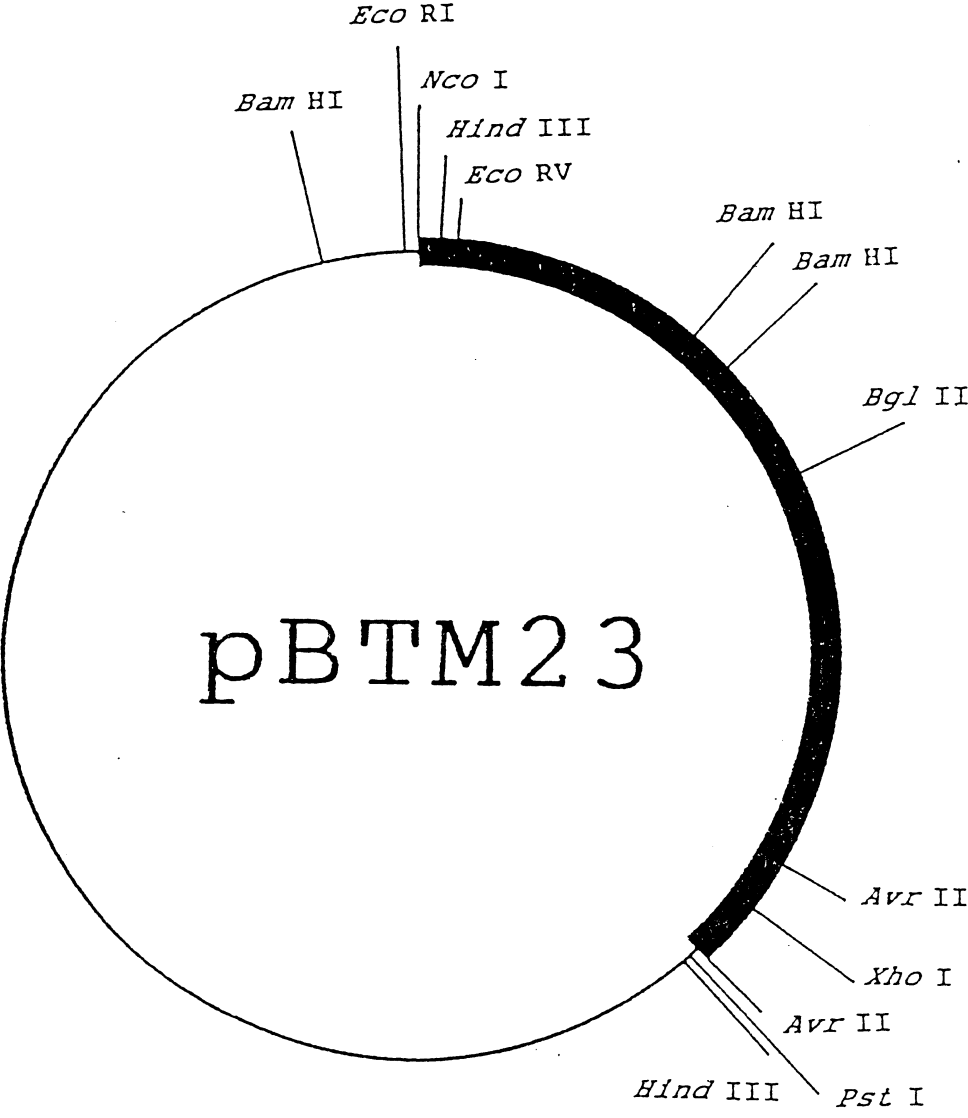
圖 3



第 4 圖



第 5 圖



第 6 圖

修正
92.12.18 補充

A7

B7

五、發明說明⁽³⁾)

重組型 D N A 技術進幾年來有卓越的進展。目前，甚至一種其胺基酸序列沒有全被揭示出來的酵素，只要一旦編碼此酵素之基因被分離出來且鹼基序列被譯解來製造含有編碼此酵素之 D N A 的重組型 D N A，再將重組型 D N A 引入微生物或動植物的細胞內，培養此一合成的轉形體。就能輕易地製出所需要的酵素量。

這些情況下，發現編碼上述對熱安定酵素之基因及譯解其鹼基序列是迫切需要的。

< 發明摘要 >

本發明的目的是提供一種作用於麥芽糖以形成海藻糖之重組型對熱安定酵素。

本發明進一步之目的為提供一種編碼重組型酵素的 D N A。

本發明還有另一目的為提供一種具有 D N A 的可複製的重組型 D N A。

本發明進一步之目的為提供一種引入重組型 D N A 的轉形體。

本發明進一步之目的為提供一種以轉形體製備重組型酵素的方法。

本發明進一步之目的為提供一種以重組型酵素將麥芽糖轉化為海藻糖的方法。

(達到目的的方法)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明⁵)

圖 6 表示得自本發明之重組型 D N A P B T M 2 3 結構。

< 本發明之詳細說明 >

得自本發明之重組型酵素甚至能在超過 55 °C 之下作用於麥芽糖以形成海藻糖而不會完全去活化。

當重組型 D N A 接入合適之可自行複製的載體形成可複製之重組型 D N A 再引入原本無法形成重組型酵素但能快速增殖的合適宿主形成轉形體，以本重組型酵素的製造本發明之 D N A。

當重組型 D N A 接入合適之可自行複製的載體形成可複製之重組型 D N A 再引入原本無法形成重組型酵素但能快速增殖的合適宿主形成轉形體並將此轉形體培養在營養培養基則可使得自本發明之重組型 D N A 表現重組型酵素的製造。

當轉形體以本發明之方法培養後能形成重組型酵素達想要的量。

依據本發明之酵素轉化方法將麥芽糖轉化成包含海藻糖，葡萄糖及／或麥芽寡糖之醣類混合物。

本發明的產生是基於發現一種將麥芽糖轉化成海藻糖之全新且對熱安定的酵素。此酵素可由 *Thermus aquaticus* (ATCC 33923) 之培養獲得，本發明以使用包含圓柱色層分析 (column chromatography) 為主要技術及以屬性特徵為研究之各種方法來分離此酵素，揭露出此酵

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

92.12.18

年 月 日

修正
補充

民國92年12月18日修正

四、中文發明摘要（發明之名稱：

製備將麥芽糖轉化為海藻糖之重組
型對熱安定之酵素的方法

本發明揭示一種可將麥芽糖轉化為海藻糖的重組型對熱安定酵素，在 pH 7.0 下靜置反應 60 分鐘，溫度上達約 80 °C 仍然安定，一種酵素的製備方法，一種編碼此酵素之 DNA，一種含有此 DNA 之重組型 DNA，一種轉形體，以及一種藉酵素轉化麥芽糖的酵素轉化方法。

英文發明摘要（發明之名稱： Process for preparing a recombinant thermostable enzyme for converting maltose into trehalose)

Disclosed are a recombinant thermostable enzyme, which converts maltose into trehalose and is stable up to a temperature of about 80 °C even when incubated at pH 7.0 for 60 min, a preparation of the enzyme, a DNA encoding the enzyme, a recombinant DNA containing the DNA, a transformant, and an enzymatic conversion method of maltose by using the enzyme.

92.12.18 修正
★ 月 日 補充

A8
B8
C8
D8

公告本

六、申請專利範圍

附件：

第 90121023 號專利申請案

中文申請專利範圍修正本

民國 92 年 12 月 18 日修正

1. 一種製備重組型酵素的方法，包含：

於營養培養基中培養一轉形體以形成該酵素，此轉形體之製備係將重組型 D N A 引入合適宿主，該重組型 D N A 包含可自行複製之載體及編碼一重組型酵素的 D N A ；

及

由所得培養液收集所形成之酵素；

該自行複製之載體係為選自下列之質體載體，包括

p B R 3 2 2 , p U C 1 8 , Bluescript II SK(+), p K K 2 2 3 - 3 , p U B 1 1 0 , p T P 4 , p C 1 9 4 , p H V 1 4 , Y R p 7 , Y E p 7 , p B S 7 , λ g t . λ C , λ g t . λ B , ρ 1 1 , ø 1 , 及 ø 1 0 5 , 且

該重組型酵素能夠將麥芽糖轉化成海藻糖，且當於高達至少 5 5 °C 之溫度下靜置反應時實質上不被去活化，該酵素具有 S E Q I D N O : 3 所示之胺基酸序列：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

六、申請專利範圍

SEQ ID NO:3:

Met	Asp	Pro	Leu	Trp	Tyr	Lys	Asp	Ala	Val	Ile	Tyr	Gln	Leu	His	Val
1				5					10					15	
Arg	Ser	Phe	Phe	Asp	Ala	Asn	Asn	Asp	Gly	Tyr	Gly	Asp	Phe	Glu	Gly
		20						25					30		
Leu	Arg	Arg	Lys	Leu	Pro	Tyr	Leu	Glu	Glu	Leu	Gly	Val	Asn	Thr	Leu
		35					40					45			
Trp	Leu	Met	Pro	Phe	Phe	Gln	Ser	Pro	Leu	Arg	Asp	Asp	Gly	Tyr	Asp
	50					55					60				
Ile	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Gln	Ile	Leu	Pro	Val	His	Gly	Thr	Leu	Glu	Asp
65					70					75				80	
Phe	Thr	Val	Asp	Glu	Ala	His	Gly	Arg	Gly	Met	Lys	Val	Ile	Ile	Glu
			85					90						95	
Leu	Val	Leu	Asn	His	Thr	Ser	Ile	Asp	His	Pro	Trp	Phe	Gln	Glu	Ala
			100					105					110		
Arg	Lys	Pro	Asn	Ser	Pro	Met	Arg	Asp	Trp	Tyr	Val	Trp	Ser	Asp	Thr
		115					120					125			
Pro	Glu	Lys	Tyr	Lys	Gly	Val	Arg	Val	Ile	Phe	Lys	Asp	Phe	Glu	Thr
		130			135						140				
Ser	Asn	Trp	Thr	Phe	Asp	Pro	Val	Ala	Lys	Ala	Tyr	Tyr	Trp	His	Arg
145					150					155					160
Phe	Tyr	Trp	His	Gln	Pro	Asp	Leu	Asn	Trp	Asp	Ser	Pro	Glu	Val	Glu
			165						170					175	
Lys	Ala	Ile	His	Gln	Val	Met	Phe	Phe	Trp	Ala	Asp	Leu	Gly	Val	Asp
		180					185						190		
Gly	Phe	Arg	Leu	Asp	Ala	Ile	Pro	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Arg	Glu	Gly	Thr
		195					200					205			

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

六、申請專利範圍

Ser Cys Glu Asn Leu Pro Glu Thr Ile Glu Ala Val Lys Arg Leu-Arg
 210 215 220
 Lys Ala Leu Glu Glu Arg Tyr Gly Pro Gly Lys Ile Leu Leu Ala Glu
 225 230 235 240
 Ala Asn Met Trp Pro Glu Glu Thr Leu Pro Tyr Phe Gly Asp Gly Asp
 245 250 255
 Gly Val His Met Ala Tyr Asn Phe Pro Leu Met Pro Arg Ile Phe Met
 260 265 270
 Ala Leu Arg Arg Glu Asp Arg Gly Pro Ile Glu Thr Met Leu Lys Glu
 275 280 285
 Ala Glu Gly Ile Pro Glu Thr Ala Gln Trp Ala Leu Phe Leu Arg Asn
 290 295 300
 His Asp Glu Leu Thr Leu Glu Lys Val Thr Glu Glu Arg Glu Phe
 305 310 315 320
 Met Tyr Glu Ala Tyr Ala Pro Asp Pro Lys Phe Arg Ile Asn Leu Gly
 325 330 335
 Ile Arg Arg Arg Leu Met Pro Leu Leu Gly Gly Asp Arg Arg Arg Tyr
 340 345 350
 Glu Leu Leu Thr Ala Leu Leu Leu Thr Leu Lys Gly Thr Pro Ile Val
 355 360 365
 Tyr Tyr Gly Asp Glu Ile Gly Met Gly Asp Asn Pro Phe Leu Gly Asp
 370 375 380
 Arg Asn Gly Val Arg Thr Pro Met Gln Trp Ser Gln Asp Arg Ile Val
 385 390 395 400
 Ala Phe Ser Arg Ala Pro Tyr His Ala Leu Phe Leu Pro Pro Val Ser
 405 410 415
 Glu Gly Pro Tyr Ser Tyr His Phe Val Asn Val Glu Ala Gln Arg Glu
 420 425 430
 Asn Pro His Ser Leu Leu Ser Phe Asn Arg Arg Phe Leu Ala Leu Arg
 435 440 445
 Asn Gln His Ala Lys Ile Phe Gly Arg Gly Ser Leu Thr Leu Leu Pro
 450 455 460
 Val Glu Asn Arg Arg Val Leu Ala Tyr Leu Arg Glu His Glu Gly Glu
 465 470 475 480
 Arg Val Leu Val Val Ala Asn Leu Ser Arg Tyr Thr Gln Ala Phe Asp
 485 490 495
 Leu Pro Leu Glu Ala Tyr Gln Gly Leu Val Pro Val Glu Leu Phe Ser
 500 505 510
 Gln Gln Pro Phe Pro Pro Val Glu Gly Arg Tyr Arg Leu Thr Leu Gly
 515 520 525
 Pro His Gly Phe Ala Leu Phe Ala Leu Lys Pro Val Glu Ala Val Leu
 530 535 540
 His Leu Pro Ser Pro Asp Trp Ala Glu Glu Pro Ala Pro Glu Glu Ala
 545 550 555 560
 Asp Leu Pro Arg Val His Met Pro Gly Gly Pro Glu Val Leu Leu Val
 565 570 575
 Asp Thr Leu Val His Glu Arg Gly Arg Glu Glu Leu Leu Asn Ala Leu
 580 585 590
 Ala Gln Thr Leu Lys Glu Lys Ser Trp Leu Ala Leu Lys Pro Gln Lys
 595 600 605
 Val Ala Leu Leu Asp Ala Leu Arg Phe Gln Lys Asp Pro Pro Leu Tyr
 610 615 620
 Leu Thr Leu Leu Gln Leu Glu Asn His Arg Thr Leu Gln Val Ser Leu
 625 630 635 640
 Pro Leu Leu Trp Ser Pro Gln Arg Arg Glu Gly Pro Gly Leu Phe Ala
 645 650 655

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

六、申請專利範圍

Arg Thr His Gly Gln Pro Gly Tyr Phe Tyr Glu Leu Ser Leu Asp Pro
 660 665 670
 Gly Phe Tyr Arg Leu Leu Leu Ala Arg Leu Lys Glu Gly Phe Glu Gly
 675 680 685
 Arg Ser Leu Arg Ala Tyr Tyr Arg Gly Arg His Pro Gly Pro Val Pro
 690 695 700
 Glu Ala Val Asp Leu Leu Arg Pro Gly Leu Ala Ala Gly Glu Gly Val
 705 710 715 720
 Trp Val Gln Leu Gly Leu Val Gln Asp Gly Gly Leu Asp Arg Thr Glu
 725 730 735
 Arg Val Leu Pro Arg Leu Asp Leu Pro Trp Val Leu Arg Pro Glu Gly
 740 745 750
 Gly Leu Phe Trp Glu Arg Gly Ala Ser Arg Arg Val Leu Ala Leu Thr
 755 760 765
 Gly Ser Leu Pro Pro Gly Arg Pro Gln Asp Leu Phe Ala Ala Leu Glu
 770 775 780
 Val Arg Leu Leu Glu Ser Leu Pro Arg Leu Arg Gly His Ala Pro Gly
 785 790 795 800
 Thr Pro Gly Leu Leu Pro Gly Ala Leu His Glu Thr Glu Ala Leu Val
 805 810 815
 Arg Leu Leu Gly Val Arg Leu Ala Leu Leu His Arg Ala Leu Gly Glu
 820 825 830
 Val Glu Gly Val Val Gly Gly His Pro Leu Leu Gly Arg Gly Leu Gly
 835 840 845
 Ala Phe Leu Glu Leu Glu Gly Glu Val Tyr Leu Val Ala Leu Gly Ala
 850 855 860
 Glu Lys Arg Gly Thr Val Glu Glu Asp Leu Ala Arg Leu Ala Tyr Asp
 865 870 875 880
 Val Glu Arg Ala Val His Leu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Ala Glu Leu
 885 890 895
 Trp Ala Phe Ala Glu Glu Val Ala Asp His Leu His Ala Ala Phe Leu
 900 905 910
 Gln Ala Tyr Arg Ser Ala Leu Pro Glu Glu Ala Leu Glu Glu Ala Gly
 915 920 925
 Trp Thr Arg His Met Ala Glu Val Ala Ala Glu His Leu His Arg Glu
 930 935 940
 Glu Arg Pro Ala Arg Lys Arg Ile His Glu Arg Trp Gln Ala Lys Ala
 945 950 955 960
 Gly Lys Ala

2. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該DNA具有選自下列之鹼基序列：包括SEQ ID NO: 4鹼基序列，其同源鹼基序列及與這些鹼基序列互補之鹼基序列，

SEQ ID NO:4:
 GTGGACCCCC TCTGGTACAA GGACGCGGTG ATCTACCAGC TCCACGTCCG CTCCTTCTTT 60
 GACGCCAACA ACGACGGCTA CGGGGACTTT GAGGGCCTGA GGCGGAAGCT TCCCTACCTG 120
 GAGGAGCTCG GGGTCAACAC CCTCTGGCTC ATGCCCTTCT TCCAGTCCCC CTTGAGGGAC 180
 GACGGGTACG ATATCTCCGA CTACTACCAG ATCCTCCCCG TCCACGGGAC CCTGGAGGAC 240
 TTACCCGTGG ACGAGGCCCA CGGCCGGGGG ATGAAGGTGA TCATTGAGCT CGTCCTGAAC 300

六、申請專利範圍

CACACCTCCA	TTGACCACCC	TTGGTTCCAG	GAGGCGAGGA	AGCCGAATAG	CCCCATGCGG	360
GACTGGTACG	TGTGGAGCGA	CACCCCGGAG	AAGTACAAGG	GGGTCCGGGT	CATCTTCAAG	420
GACTTTGAAG	CCTCCAAGTG	GACCTTTGAC	CCCGTGGCCA	AGGCCTACTA	CTGGCACCGC	480
TTCTACTGGC	ACCAGCCCGA	CCTCAACTGG	GACAGCCCCG	AGGTGGAGAA	GGCCATCCAC	540
CAGGTCAATG	TCTTCTGGGC	CGACCTGGGG	GTGGACGGCT	TCCGCTTGGG	CGCCATCCCC	600
TACCTCTACG	AGCGGGAGGG	GACCTCCTGC	GAGAACCTCC	CCGAGACCAT	TGAGGCGGTG	660
AAGCGCCTGA	GGAAGGCCCT	GGAGGAGCGC	TACGGCCCCG	GGAAGATCCT	CCTCGCCGAG	720
GCCAACATGT	GGCCGGAGGA	GACCTCCCC	TACTTCGGGG	ACGGGGACGG	GGTCCACATG	780
GCCTACAAGT	TCCCCCTGAT	GCCCCGGATC	TTTCATGGCC	TAAGGCGGGA	GGACCGGGGT	840
CCCATTGAAA	CCATGCTCAA	GGAGGCGGAG	GGGATCCCCG	AAACCGCCCA	GTGGGCCCTC	900
TTCTCTCCGA	ACCACGACGA	GCTCACCTTG	GAGAAGGTCA	CGGAGGAGGA	GCGGGAGTTG	960
ATGTACGAGG	CCTACGCCCC	CGACCCCAAG	TTCCGCATCA	ACCTGGGGAT	CCGCCGCCGC	1020
CTCATGCCCC	TCCTCGGGGG	CGACCGCAGG	CGGTACGAGC	TCCTCACCGC	CCTCCTCCTC	1080
ACCCTAAAGG	GCACGCCCAT	CGTCTACTAC	GGGGACGAGA	TCCGCGATGG	GGACAACCCC	1140
TTCTCTGGGG	ACCGGAACGG	TGTCAGGACC	CCCATGCAGT	GGTCCCAAGA	CCGCATCGTC	1200
GCCTTCTCCC	GCGCCCCCTA	CCACGCCCTC	TTCTTCCCC	CCGTGAGCGA	GGGGCCCTAC	1260
AGCTACCACT	TCGTCAACGT	GGAGGCCAG	CGGGAAAACC	CCCACTCCCT	CCTGAGCTTC	1320
AACCGCCGCT	TCCTCGCCCT	GAGGAACCAG	CACGCCAAGA	TCTTCGGCCG	GGGGAGCCTC	1380
ACCCTTCTCC	CCGTGGAGAA	CCGGCGCGTC	CTCGCCTACC	TGAGGGAGCA	CGAGGGGGAG	1440
CGGGTCTCTG	TGGTGGCCAA	CCTCTCCCGC	TACACCCAGG	CCTTTGACCT	CCCCTTGGAG	1500
GCCTACCAAG	GCCTCGTCCC	CGTGGAGCTC	TTCTCGCAGC	AACCTTCCCC	CCCGTGGGAG	1560
GGGCGCTACC	GCTTGACCTT	GGGCCCCCAC	GGCTTCGCCC	TCTTCGCCCT	GAAGCCCGTG	1620
GAGGCGGTGC	TCCACCTCCC	CTCCCCCGAC	TGGGCGGAGG	AGCCCGCCCC	CGAGGAGGCC	1680
GACCTGCCCC	GGGTCCACAT	GCCCGGGGGG	CCGGAGGTCC	TCCTGGTGGA	CACCTTGGTC	1740
CACGAAAGGG	GGCGGGAGGA	GCTCCTAAAC	GCCCTCGCCC	AGACCTTGAA	GGAGAAGAGC	1800
TGGCTCGCCC	TCAAGCCGCA	GAAGGTGGCC	CTCCTGGACG	CCCTCCGCTT	CCAGAAGGAC	1860
CCGCCCTTTT	ACCTCACCCCT	GCTCCAGCTG	GAGAACCACA	GGACCTTCCA	GGTCTCCCTC	1920
CCCCTCCTCT	GGTCCCCCCA	GAGGCGGGAA	GGCCCCGGCC	TCTTCGCCCC	CACCCACGGC	1980
CAGCCCGGCT	ACTTCTACGA	GCTCTCCTTG	GACCCAGGCT	TCTACCGCCT	CCTCCTCGCC	2040
CGCCTTAAGG	AGGGGTTTGA	GGGGCGGAGC	CTCCGGGCCT	ACTACCGCGG	CCGCCACCCG	2100
GGTCCCGTGC	CCGAGGCCGT	GGACCTCCTC	CGGCCGGGAC	TCGCGGCGGG	GGAGGGGGTC	2160
TGGGTCCAGC	TCGGCCTCGT	CCAAGACGGG	GGCCTGGACC	GCACGGAGCG	GGTCTCCCC	2220
CGCCTGGACC	TCCCTTGGGT	TCTCCGGCCC	GAAGGGGGCC	TCTTCTGGGA	GCGGGGCGCC	2280
TCCAGAAGGG	TCCTCGCCCT	CACGGGAAGC	CTCCCCCGGG	GCCGCCCCCA	GGACCTCTTC	2340
GCCGCCCTGG	AGGTCCGGCT	CCTGGAAAGC	CTTCCCCGCC	TCCGGGGGCA	CGCCCCCGGG	2400
ACCCAGGCC	TCCTTCCCCG	GACCCGAC	GAGACCGAAG	CCCTGGTCCG	CCTCCTCGGG	2460
GTGCGCCTCG	CCCTCCTCCA	CCGGGCCCTT	GGGGAGGTGG	AGGGGGTGGT	GGGGGGCCAC	2520
CCCCTCCTAG	GCCGCGGCCCT	CGGGGCCCTT	CTGGAGCTGG	AGGGGGAGGT	GTACCTCGTG	2580
GCCCTGGGCG	CGGAAAAGCG	GGGCACGGTG	GAGGAGGACC	TGGCCCGCCT	GGCCTACGAC	2640
GTGGAGCGGG	CCGTGCACCT	CGCCCTCGAG	GCCCTGGAGG	CGGAGCTTTG	GGCCTTTGCC	2700
GAGGAGGTGG	CCGACCACCT	CCACGCCGCC	TTCTTCCAAG	CCTACCGCTC	CGCCCTCCCC	2760
GAGGAGGCCC	TGGAGGAGGC	GGGCTGGACG	CGGCACATGG	CCGAGGTGGC	GGCGGAGCAC	2820
CTCCACCGGG	AGGAAAGGCC	CGCCCGCAAG	CGCATCCACG	AGCGCTGGCA	GGCCAAGGCC	2880
GGAAAAGCC						2889

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

3. 如申請專利範圍第2項之方法，其中該DNA藉著基因密碼簡併性以其他鹼基取代SEQ ID NO：

4中1或多個鹼基而製得，但不改變SEQ ID

NO：3的氨基酸序列。

4. 如申請專利範圍第1項的方法，其中該DNA具有SEQ ID NO：5的鹼基序列，

六、申請專利範圍

SEQ ID NO:5:

```

GCCCCCTCCCT CCCCCAACCG GGCCTTCCCCG TGGGGGGGGG GCACAGCCTG GAGGAAGGGG 60
TGCTCGACGG GGAGGTGCGG CCCCTCTTGC GCCGTGGGCC GTGACCCCTT GCGGGCCAGG 120
CTTCCCTCCT ACCCCGGGGT GCGGGTGGAG GACAAGGCT TCGCCCTGGC CCTGCACTAC 180
CGGGGGGCGG AGGGCGAGGA GAAGGCCCGG GCCTGCCTCG AGGCCTGGCT TAAGGCGGTG 240
GAGGGGCTCC TGGGGGCTT GGGCCTCGAG GCCCTCCCCG GCAAGAGGGT CCTGGAGCTC 300
AAGCCCAAGG GGGTGGACAA GGGCCAAGCG GTCCTCAGGC TCCTCGGACG CCACCCGGAC 360
CACACCCCCG TTTACATCGG GGACGACACC ACCGACGAGG CCGCCTTCCT CGCCTTAAGG 420
GGCCGGGGCC TCACCTTCAA GGTGGGGGAA GGCCCCACGG CGGCCCAAGG CCGGCTCAAG 480
GACGTGGAGG AGGTCTTGGC CTACTTGCAA ACCTACCTCC GACCCACTAG CCTTTAGGCC 540
GTG GAC CCC CTC TGG TAC AAG GAC GCG GTG ATC TAC CAG CTC CAC GTC 588
Met Asp Pro Leu Trp Tyr Lys Asp Ala Val Ile Tyr Gln Leu His Val
1 5 10 15
CGC TCC TTC TTT GAC GCC AAC AAC GAC GGC TAC GGG GAC TTT GAG GGC 636
Arg Ser Phe Phe Asp Ala Asn Asn Asp Gly Tyr Gly Asp Phe Glu Gly
20 25 30
CTG AGG CGG AAG CTT CCC TAC CTG GAG GAG CTC GGG GTC AAC ACC CTC 684
Leu Arg Arg Lys Leu Pro Tyr Leu Glu Glu Leu Gly Val Asn Thr Leu
35 40 45
TGG CTC ATG CCC TTC TTC CAG TCC CCC TTG AGG GAC GAC GGG TAC GAT 732
Trp Leu Met Pro Phe Phe Gln Ser Pro Leu Arg Asp Asp Gly Tyr Asp
50 55 60
ATC TCC GAC TAC TAC CAG ATC CTC CCC GTC CAC GGG ACC CTG GAG GAC 780
Ile Ser Asp Tyr Tyr Gln Ile Leu Pro Val His Gly Thr Leu Glu Asp
65 70 75 80
TTC ACC GTG GAC GAG GCC CAC GGC CGG GGG ATG AAG GTG ATC ATT GAG 828
Phe Thr Val Asp Glu Ala His Gly Arg Gly Met Lys Val Ile Ile Glu
85 90 95
CTC GTC CTG AAC CAC ACC TCC ATT GAC CAC CCT TGG TTC CAG GAG GCG 876
Leu Val Leu Asn His Thr Ser Ile Asp His Pro Trp Phe Gln Glu Ala
100 105 110
AGG AAG CCG AAT AGC CCC ATG CGG GAC TGG TAC GTG TGG AGC GAC ACC 924
Arg Lys Pro Asn Ser Pro Met Arg Asp Trp Tyr Val Trp Ser Asp Thr
115 120 125
CCG GAG AAG TAC AAG GGG GTC CGG GTC ATC TTC AAG GAC TTT GAA ACC 972
Pro Glu Lys Tyr Lys Gly Val Arg Val Ile Phe Lys Asp Phe Glu Thr
130 135 140
TCC AAC TGG ACC TTT GAC CCC GTG GCC AAG GCC TAC TAC TGG CAC CGC 1020
Ser Asn Trp Thr Phe Asp Pro Val Ala Lys Ala Tyr Tyr Trp His Arg
145 150 155 160
TTC TAC TGG CAC CAG CCC GAC CTC AAC TGG GAC AGC CCC GAG GTG GAG 1068
Phe Tyr Trp His Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Ser Pro Glu Val Glu
165 170 175
AAG GCC ATC CAC CAG GTC ATG TTC TTC TGG GCC GAC CTG GGG GTG GAC 1116
Lys Ala Ile His Gln Val Met Phe Phe Trp Ala Asp Leu Gly Val Asp
180 185 190
GGC TTC CGC CTG GAC GCC ATC CCC TAC CTC TAC GAG CGG GAG GGG ACC 1164
Gly Phe Arg Leu Asp Ala Ile Pro Tyr Leu Tyr Glu Arg Glu Gly Thr
195 200 205
TCC TGC GAG AAC CTC CCC GAG ACC ATT GAG GCG GTG AAG CGC CTG AGG 1212
Ser Cys Glu Asn Leu Pro Glu Thr Ile Glu Ala Val Lys Arg Leu Arg
210 215 220
AAG GCC CTG GAG GAG CGC TAC GGC CCC GGG AAG ATC CTC CTC GCC GAG 1260
Lys Ala Leu Glu Glu Arg Tyr Gly Pro Gly Lys Ile Leu Leu Ala Glu
225 230 235 240

```

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

六、申請專利範圍

GCC AAC ATG TGG CCG GAG GAG ACC CTC CCC TAC TTC GGG GAC GGG GAC	1308
Ala Asn Met Trp Pro Glu Glu Thr Leu Pro Tyr Phe Gly Asp Gly Asp	
245 250 255	
GGG GTC CAC ATG GCC TAC AAC TTC CCC CTG ATG CCC CGG ATC TTC ATG	1356
Gly Val His Met Ala Tyr Asn Phe Pro Leu Met Pro Arg Ile Phe Met	
260 265 270	
GCC CTA AGG CGG GAG GAC CGG GGT CCC ATT GAA ACC ATG CTC AAG GAG	1404
Ala Leu Arg Arg Glu Asp Arg Gly Pro Ile Glu Thr Met Leu Lys Glu	
275 280 285	
GCG GAG GGG ATC CCC GAA ACC GCC CAG TGG GCC CTC TTC CTC CGC AAC	1452
Ala Glu Gly Ile Pro Glu Thr Ala Gln Trp Ala Leu Phe Leu Arg Asn	
290 295 300	
CAC GAC GAG CTC ACC CTG GAG AAG GTC ACG GAG GAG GAG CGG GAG TTC	1500
His Asp Glu Leu Thr Leu Glu Lys Val Thr Glu Glu Glu Arg Glu Phe	
305 310 315 320	
ATG TAC GAG GCC TAC GCC CCC GAC CCC AAG TTC CGC ATC AAC CTG GGG	1548
Met Tyr Glu Ala Tyr Ala Pro Asp Pro Lys Phe Arg Ile Asn Leu Gly	
325 330 335	
ATC CGC CGC CGC CTC ATG CCC CTC CTC GGG GGC GAC CGC AGG CGG TAC	1596
Ile Arg Arg Arg Leu Met Pro Leu Leu Gly Gly Asp Arg Arg Arg Tyr	
340 345 350	
GAG CTC CTC ACC GCC CTC CTC CTC ACC CTA AAG GGC ACG CCC ATC GTC	1644
Glu Leu Leu Thr Ala Leu Leu Thr Leu Lys Gly Thr Pro Ile Val	
355 360 365	
TAC TAC GGG GAC GAG ATC GGC ATG GGG GAC AAC CCC TTC CTC GGG GAC	1692
Tyr Tyr Gly Asp Glu Ile Gly Met Gly Asp Asn Pro Phe Leu Gly Asp	
370 375 380	
CGG AAC GGT GTC AGG ACC CCC ATG CAG TGG TCC CAA GAC CGC ATC GTC	1740
Arg Asn Gly Val Arg Thr Pro Met Gln Trp Ser Gln Asp Arg Ile Val	
385 390 395 400	
GCC TTC TCC CGC GCC CCC TAC CAC GCC CTC TTC CTT CCC CCC GTG AGC	1788
Ala Phe Ser Arg Ala Pro Tyr His Ala Leu Phe Leu Pro Pro Val Ser	
405 410 415	
GAG GGG CCC TAC AGC TAC CAC TTC GTC AAC GTG GAG GCC CAG CGG GAA	1836
Glu Gly Pro Tyr Ser Tyr His Phe Val Asn Val Glu Ala Gln Arg Glu	
420 425 430	
AAC CCC CAC TCC CTC CTG AGC TTC AAC CGC CGC TTC CTC GCC CTG AGG	1884
Asn Phe His Ser Leu Leu Ser Phe Asn Arg Arg Phe Leu Ala Leu Arg	
435 440 445	
AAC CAG CAC GCC AAG ATC TTC GGC CGG GGG AGC CTC ACC CTT CTC CCC	1932
Asn Gln His Ala Lys Ile Phe Gly Arg Gly Ser Leu Thr Leu Leu Pro	
450 455 460	
GTG GAG AAC CGG CGC GTC CTC GCC TAC CTG AGG GAG CAC GAG GGG GAG	1980
Val Glu Asn Arg Arg Val Leu Ala Tyr Leu Arg Glu His Glu Gly Glu	
465 470 475 480	
CGG GTC CTG GTG GTG GCC AAC CTC TCC CGC TAC ACC CAG GCC TTT GAC	2028
Arg Val Leu Val Val Ala Asn Leu Ser Arg Tyr Thr Gln Ala Phe Asp	
485 490 495	
CTC CCC TTG GAG GCC TAC CAA GGC CTC GTC CCC GTG GAG CTC TTC TCG	2076
Leu Pro Leu Glu Ala Tyr Gln Gly Leu Val Pro Val Glu Leu Phe Ser	
500 505 510	
CAG CAA CCC TTC CCC CCG GTG GAG GGG CGC TAC CGC TTG ACC CTG GGC	2124
Gln Gln Pro Phe Pro Pro Val Glu Gly Arg Tyr Arg Leu Thr Leu Gly	
515 520 525	

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

六、申請專利範圍

CCC	CAC	GGC	TTC	GCC	CTC	TTC	GCC	CTG	AAG	CCC	GTG	GAG	GCG	GTG	CTC	2172
Pro	His	Gly	Phe	Ala	Leu	Phe	Ala	Leu	Lys	Pro	Val	Glu	Ala	Val	Leu	
530						535				540						
CAC	CTC	CCC	TCC	CCC	GAC	TGG	GCC	GAG	GAG	CCC	GCC	CCC	GAG	GAG	GCC	2220
His	Leu	Pro	Ser	Pro	Asp	Trp	Ala	Glu	Glu	Pro	Ala	Pro	Glu	Glu	Ala	
545					550					555					560	
GAC	CTG	CCC	CGG	GTC	CAC	ATG	CCC	GGG	GGG	CCG	GAG	GTC	CTC	CTG	GTG	2268
Asp	Leu	Pro	Arg	Val	His	Met	Pro	Gly	Gly	Pro	Glu	Val	Leu	Leu	Val	
				565				570						575		
GAC	ACC	CTG	GTC	CAC	GAA	AGG	GGG	CGG	GAG	GAG	CTC	CTA	AAC	GCC	CTC	2316
Asp	Thr	Leu	Vla	His	Glu	Arg	Gly	Arg	Glu	Glu	Leu	Leu	Asn	Ala	Leu	
			580					585					590			
GCC	CAG	ACC	CTG	AAG	GAG	AAG	AGC	TGG	CTC	GCC	CTC	AAG	CCG	CAG	AAG	2364
Ala	Gln	Thr	Leu	Lys	Glu	Lys	Ser	Trp	Leu	Ala	Leu	Lys	Pro	Gln	Lys	
		595					600					605				
GTG	GCC	CTC	CTG	GAC	GCC	CTC	CGC	TTC	CAG	AAG	GAC	CCG	CCC	CTT	TAC	2412
Val	Ala	Leu	Leu	Asp	Ala	Leu	Arg	Phe	Gln	Lys	Asp	Pro	Pro	Lys	Tyr	
	610					615					620					
CTC	ACC	CTG	CTC	CAG	CTG	GAG	AAC	CAC	AGG	ACC	CTC	CAG	GTC	TCC	CTC	2460
Leu	Thr	Leu	Leu	Gln	Leu	Glu	Asn	His	Arg	Thr	Leu	Gln	Val	Ser	Leu	
	625					630					635				640	
CCC	CTC	CTC	TGG	TCC	CCC	CAG	AGG	CGG	GAA	GGC	CCC	GGC	CTC	TTC	GCC	2508
Pro	Leu	Leu	Trp	Ser	Pro	Gln	Arg	Arg	Glu	Gly	Pro	Gly	Leu	Phe	Ala	
				645					650					655		
CGC	ACC	CAC	GGC	CAG	CCC	GGC	TAC	TTC	TAC	GAG	CTC	TCC	TTG	GAC	CCA	2556
Arg	Thr	His	Gly	Gln	Pro	Gly	Tyr	Phe	Tyr	Glu	Leu	Ser	Leu	Asp	Pro	
			660					665					670			
GGC	TTC	TAC	CGC	CTC	CTC	CTC	GCC	CGC	CTT	AAG	GAG	GGG	TTT	GAG	GGG	2604
Gly	Phe	Tyr	Arg	Leu	Leu	Leu	Ala	Arg	Leu	Lys	Glu	Gly	Phe	Glu	Gly	
		675					680					685				
CGG	AGC	CTC	CGG	GCC	TAC	TAC	CGC	GGC	CGC	CAC	CCG	GGT	CCC	GTG	CCC	2652
Arg	Ser	Leu	Arg	Ala	Tyr	Tyr	Arg	Gly	Arg	His	Pro	Gly	Pro	Val	Pro	
	690					695					700					
GAG	GCC	GTG	GAC	CTC	CTC	CGG	CCG	GGA	CTC	GCG	GCG	GGG	GAG	GGG	GTC	2700
Glu	Ala	Val	Asp	Leu	Leu	Arg	Pro	Gly	Leu	Ala	Ala	Gly	Glu	Gly	Val	
	705				710					715					720	
TGG	GTC	CAG	CTC	GGC	CTC	GTC	CAA	GAC	GGG	GGC	CTG	GAC	CGC	ACG	GAG	2748
Trp	Val	Gln	Leu	Gly	Leu	Val	Gln	Asp	Gly	Gly	Leu	Asp	Arg	Thr	Glu	
				725					730					735		
CGG	GTC	CTC	CCC	CGC	CTG	GAC	CTC	CCC	TGG	GTT	CTC	CGG	CCC	GAA	GGG	2796
Arg	Val	Leu	Pro	Arg	Leu	Asp	Leu	Pro	Trp	Val	Leu	Arg	Pro	Glu	Gly	
			740					745					750			
GGC	CTC	TTC	TGG	GAG	CGG	GGC	GCC	TCC	AGA	AGG	GTC	CTC	GCC	CTC	ACG	2844
Gly	Leu	Phe	Trp	Glu	Arg	Gly	Ala	Ser	Arg	Arg	Val	Leu	Ala	Leu	Thr	
		755					760					765				
GGA	AGC	CTC	CCC	CCG	GGC	CGC	CCC	CAG	GAC	CTC	TTC	GCC	GCC	CTG	GAG	2892
Gly	Ser	Leu	Pro	Pro	Gly	Arg	Pro	Gln	Asp	Leu	Phe	Ala	Ala	Leu	Glu	
	770				775						780					
GTC	CGG	CTC	CTG	GAA	AGC	CTT	CCC	CGC	CTC	CGG	GGG	CAC	GCC	CCC	GGG	2940
Val	Arg	Leu	Leu	Glu	Ser	Leu	Pro	Arg	Leu	Arg	Gly	His	Ala	Pro	Gly	
	785				790					795					800	
ACC	CCA	GGC	CTC	CTT	CCC	GGG	GCC	CTG	CAC	GAG	ACC	GAA	GCC	CTG	GTC	2988
Thr	Pro	Gly	Leu	Leu	Pro	Gly	Ala	Leu	His	Glu	Thr	Glu	Ala	Leu	Val	
			805						810					815		
CGC	CTC	CTC	GGG	GTG	CGC	CTC	GCC	CTC	CAC	CGG	GCC	CTT	GGG	GAG		3036
Arg	Leu	Leu	Gly	Val	Arg	Leu	Ala	Leu	His	Arg	Ala	Ala	Gly	Glu		
			820				825					830				

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

六、申請專利範圍

GTG	CAG	GGG	GTG	GTG	GGG	GGC	CAC	CCC	CTC	CTA	GGC	CGC	GGC	CTC	GGG	3084
Val	Glu	Gly	Val	Val	Gly	Gly	His	Pro	Leu	Leu	Gly	Arg	Gly	Leu	Gly	
		835					840					845				
GCC	TTC	CTG	GAG	CTG	GAG	GGG	GAG	GTG	TAC	CTC	GTG	GCC	CTG	GGC	GCG	3132
Ala	Phe	Leu	Glu	Leu	Glu	Gly	Glu	Val	Tyr	Leu	Val	Ala	Leu	Gly	Ala	
		850				855					860					
GAA	AAG	CGG	GGC	ACG	GTG	GAG	GAG	GAC	CTG	GCC	CGC	CTG	GCC	TAC	GAC	3180
Glu	Lys	Arg	Gly	Thr	Val	Glu	Glu	Asp	Leu	Ala	Arg	Leu	Ala	Tyr	Asp	
		865			870				875						880	
GTG	GAG	CGG	GCC	GTG	CAC	CTC	GCC	CTC	GAG	GCC	CTG	GAG	GCG	GAG	CTT	3228
Val	Glu	Arg	Ala	Val	His	Leu	Ala	Leu	Glu	Ala	Leu	Glu	Ala	Glu	Leu	
			885						890					895		
TGG	GCC	TTT	GCC	GAG	GAG	GTG	GCC	GAC	CAC	CTC	CAC	GCC	GCC	TTC	CTC	3276
Trp	Ala	Phe	Ala	Glu	Glu	Val	Ala	Asp	His	Leu	His	Ala	Ala	Phe	Leu	
			900				905						910			
CAA	GCC	TAC	CGC	TCC	GCC	CTC	CCC	GAG	GAG	GCC	CTG	GAG	GAG	GCG	GGC	3324
Gln	Ala	Tyr	Arg	Ser	Ala	Leu	Pro	Glu	Glu	Ala	Leu	Glu	Glu	Ala	Gly	
		915				920					925					
TGG	ACG	CGG	CAC	ATG	GCC	GAG	GTG	GCG	GCG	GAG	CAC	CTC	CAC	CGG	GAG	3372
Trp	Thr	Arg	His	Met	Ala	Glu	Val	Ala	Ala	Glu	His	Leu	His	Arg	Glu	
		930				935					940					
GAA	AGG	CCC	GCC	CGC	AAG	CGC	ATC	CAC	GAG	CGC	TGG	CAG	GCC	AAG	GCC	3420
Glu	Arg	Pro	Ala	Arg	Lys	Arg	Ile	His	Glu	Arg	Trp	Gln	Ala	Lys	Ala	
		945			950				955						960	
GGA	AAA	GCC														3429
Gly	Lys	Ala														
		963														
TAGGCGCCCCG	GTAGCCCTTC	AGCCCCGGGC	CACGGGGGCC	TTGGGGTGGA	AGACGGCCTC											3489
CTCGGGGAGG	AGGCGGCGCT	TCTTGGCCCG	GCGGTAGACG	GCGTCCCACA	TGCGGCAGAA											3549
GGCGCACACC	GCCCCGTGG	TGGGGTAGCC	GCACCGCTCG	CACTCCCTAA	G											3600

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

5．如申請專利範圍第1項之方法，其中該DNA係源自 *Thermus* 屬微生物。

6．如申請專利範圍第1項之方法，其中該宿主為大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 種微生物。

7．如申請專利範圍第1項之方法，其中營養培養基中所形成的重組型酵素之回收是藉著離心，過濾，濃縮，鹽析，透析，分離用的沈澱作用，離子交換色層分析法，膠體過濾色層分析法，厭水性色層分析法，親和力色層分析法，膠體電泳法及／或等電電泳分析法。