

403785

申請日期	85 年 3 月 12 日	Int. Cl ⁶
案 號	85102984	
類 別	C12N 9/10, 15/54, C12P 2/60	

(以上各欄由本局填註)

A4

C4

公告奉

發明專利說明書

403785

一、發明 名稱	中 文	芽孢桿菌衍生之轉穀胺醯胺酶
	英 文	Bacillus-derived transglutaminase
二、發明人 創作	姓 名	(1) 小林克德 (2) 山中茂 (3) 三輪清志
	國 籍	(1) 日本 (2) 日本 (3) 日本 (1) 日本國神奈川県川崎市川崎區鈴木町一一一 味の素株式会社中央研究所内
	住、居所	(2) 日本國神奈川県川崎市川崎區鈴木町一一一 味の素株式会社 中央研究所内 (3) 日本國神奈川県川崎市川崎區鈴木町一一一 味の素株式会社中央研究所内
三、申請人	姓 名 (名稱)	(1) 味之素股份有限公司 味の素株式会社
	國 籍	(1) 日本
	住、居所 (事務所)	(1) 日本國東京都中央區京橋一丁目一五番一號
	代 表 人 姓 名	(1) 稻森俊介

裝

訂

線

403785

申請日期	85 年 3 月 12 日
案 號	85102984
類 別	

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書

一、發明 新型名稱	中 文	
	英 文	
二、發明人 創作	姓 名	(4) 鈴木俊一 (5) 江藤讓 (6) 谷田有子
	國 籍	(4) 日本 (5) 日本 (6) 日本
	住、居所	(4) 日本國神奈川県川崎市川崎區鈴木町一一一 味の素株式会社中央研究所内 (5) 日本國神奈川県川崎市川崎區鈴木町一一一 味の素株式会社中央研究所内 (6) 日本國神奈川県川崎市川崎區鈴木町一一一 味の素株式会社中央研究所内
三、申請人	姓 名 (名稱)	
	國 籍	
	住、居所 (事務所)	
	代 表 人 姓 名	

裝

訂

線

403785

申請日期	85 年 3 月 12 日
案 號	85102984
類 別	

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、發明 名稱	中 文	
	英 文	
二、發明 創作人	姓 名	(7) 橫関健三 (8) 橋口賢一
	國 籍	(7) 日本 (8) 日本
		(7) 日本國神奈川県川崎市川崎區鈴木町一一一 味の素株式会社中央研究所内
	住、居所	(8) 日本國神奈川県川崎市川崎區鈴木町一一一 味の素株式会社中央研究所内
三、申請人	姓 名 (名稱)	
	國 籍	
	住、居所 (事務所)	
	代 表 人 姓 名	

裝

訂

線

403785

(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	1995 年 2 月 9 日	7-021963	☒ 無主張優先權
日本	1995 年 9 月 4 日	7-226316	☒ 無主張優先權
日本	1996 年 1 月 29 日	8-013072	☒ 無主張優先權

有關微生物已寄存於：

, 寄存日期：

, 寄存號碼：

食品工業發展研究所

1996 年 3 月 12 日

910043

食品工業發展研究所

1996 年 3 月 12 日

910044

食品工業發展研究所

1996 年 3 月 12 日

940113

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

403785

發明說明 (2)

87. 1. 17

補充

基於以上之信念，本發明者將目標集中在自然界，尤其是土壤中所存在之產孢子菌，諸如芽孢桿菌，一般為枯草芽孢桿菌，且對彼等進行篩檢以由其中離析出產 T G 之細菌。

吾人已測定產孢子菌在產孢子階段時之 T G 活性，結果發現可展現強烈 T G 活性之兩種菌型。吾人稱此兩種菌型為 A J 1 2 8 6 6 及 A J 1 3 0 7。

吾人根據 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 對 A J 1 2 8 6 6 及 A J 1 3 0 7 進行一般鑑定，結果顯示此二者為枯草芽孢桿菌者。枯草芽孢桿菌 A J 1 2 8 6 6 係於 1 9 9 5 年 2 月 2 日寄存於 National Institute of Bioscience and Human-Techology, the Agency of Industrial Science and Technology, the Ministry of International Trade and Industry of Japan (其後稱之為 "N I B H"，寄存號為 F E R M P - 1 4 7 5 0) 中。枯草芽孢桿菌 A J 1 2 8 6 6 及繼而於 1 9 9 5 年 1 2 月 4 日 (以布達佩斯盟約為基準) 轉移至國際寄存處中，其乃採用 F E R M B P - 5 3 2 5 之國際寄存號。

枯草芽孢桿菌 A J 1 2 8 6 6 亦寄存於食品工業發展研究所，寄存日為 1 9 9 6 年 3 月 1 2 日，寄存編號為 C C R C 9 1 0 0 4 3。枯草芽孢桿菌 A J 1 3 0 7 係 1 9 9 5 年 8 月 22 日寄存於 N I B H 中，寄存號為 F E R M P - 1 5 1 2 3，枯草芽孢桿菌 A J 1 3 0 7 乃繼而於 1 9 9 6 年 1 月 1 8 日 (以布達佩斯盟約為基準) 轉移至國際寄存處中，其乃採用 F E R M B P - 5 3 6 7 之國際寄存號。

枯草芽孢桿菌 A J 1 3 0 7 係於 1 9 9 5 年 8 月 2 2 日寄存於 N I B H 中，寄存號為 F E R M P - 1 5 1 2 3，枯草芽孢桿菌 A J 1 3 0 7 乃繼而於

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(1)

〔發明之技術範圍〕

本發明係關於(1)由芽孢桿菌諸如由枯草芽孢桿菌等所製之轉穀胺醯胺酶(其後稱之為TG)，(2)具有轉穀胺醯胺酶活性之部分，及(3)製造具有交聯結構之蛋白質，非蛋白質性胺基酸聚合物，肽或其衍生物之方法，其係將蛋白質，非蛋白質性胺基酸，肽或其衍生物中之穀醯胺及賴胺酸殘基藉由TG或具TG活性部分之作用予以交聯以於蛋白質，非蛋白質性胺基酸聚合物，肽或其衍生物之分子間及分子內形成分子間及分子內之交聯 $\epsilon - (\gamma - \text{Glu}) - \text{Lys}$ 鍵。

本發明亦關於(4)編有由芽孢桿菌諸如由枯草芽孢桿菌等所衍出之轉穀胺醯胺酶密碼之DNA，(5)藉將載體DNA鍵結至DNA上所得之再組合DNA，(6)使用再組合DNA所轉化之細胞，及(7)藉將轉化突變型保溫以製造芽孢桿菌衍生性轉穀胺醯胺酶之方法。

藉由TG或具TG活性之部分之作用所形成之具有交聯結構之蛋白質，非蛋白質性胺基酸聚合物，肽及其衍生物在本文中乃稱之為交聯聚合物。

TG為一種可催化肽鏈中所存在之穀醯胺殘基中之 γ -羧基醯胺基質之轉醯作用之酵素，在肽鏈中賴胺酸中之 ϵ -胺基團為醯基接受體之轉醯作用中，分子內及分子間之交聯 $\epsilon - (\gamma - \text{Glu}) - \text{Lys}$ 鍵(其後稱之為“GL鍵”)乃於肽分子內及分子間形成，當水為轉醯作用中之醯基接受體時，則令肽鏈中之穀醯胺殘基接受脫醯胺

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

403785

A7
B7
修正

五、發明說明()

87.1.17 補充

1996年1月18日(以布達佩斯盟約為基準)轉移至國際寄存處中，其乃採用FERMBP-5367之國際寄存號。

枯草芽孢桿菌AJ1307亦寄存於食品工業發展研究所，寄存日為1996年3月12日，寄存編號CCRC910044。

本發明之TG乃廣泛地存在於具有孢子之芽孢桿菌中。亦即，TG不僅存在於枯草芽孢桿菌中，亦存在於下列芽孢桿菌中。

此些芽孢桿菌包括地衣芽孢桿菌，巨大芽孢桿菌，嗜熱脂肪芽孢桿菌，短芽孢桿菌，球形芽孢桿菌，多黏芽孢桿菌，嗜鹼芽孢桿菌等。

其次，此些芽孢桿菌之保溫法及培養物之純化法乃述於下，其中TG係由培養物中獲得。

芽孢桿菌可藉任何液體培養法或固體培養法保溫。尤其，深部通氣及攪拌培養法具有工業上之優點。

作為芽孢桿菌保溫時之培養基中之營養源方面，可用者為一般之碳源，氮源，無機塩及其它微生物保溫中所常用之次要營養物。芽孢桿菌可利用之所有營養源均可予使用。

通氣作用方面，乃使用有氧狀況，有關保溫之溫度方面，芽孢桿菌可於使彼可生長及製造TG之任何溫度下保溫。因此，保溫之溫度並未特別限定，但通常為10至50℃，最好為30至40℃。

然而，歸屬於嗜熱菌群之芽孢桿菌可於高於上述範圍之溫度下保溫。

保溫時間乃依保溫時間及其它保溫狀況而變。例如，芽孢桿菌最好長時間保溫以使彼能製造最大量之TG。通常彼等乃保溫5小時至約7天，最好10小時至約3天。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(2)

作用而使穀醯胺殘基轉換成穀胺酸殘基。

交聯聚合物可藉使用本發明之芽孢桿菌衍生性 T G 製得，所製之交聯聚合物乃用於食品諸如 t o f u (大豆凝乳)，布丁，優格，乳酪，碎魚肉，沸煮魚糊，香腸及其它魚及肉製品中，亦於化粧品中。

[先前技藝]

迄今已知 T G 乃存在於許多動物組織中。例如，存在於天竺鼠肝中之 T G 業已研究過 (參見 Connellan et al., Journal of Biokogical Chemistry, Vol. 246, pp. 1093-1098, 1971)，有關微生物衍生之 T G 方面，至今只有由放線菌或枯草芽孢桿菌所衍出之 T G (參見 M. V. Ramanujam et al., FASEB J. Vol. 4, A 2321) 及由黏菌所衍出之 T G (參見 J. D. Klein et al., J. Bacteriol. Vol. 174, pp. 2599-2605) 報告過。現在，由放線菌所製之 T G 已應用在實際及工業用途上 (參見日本專利公報第 6 - 6 5 2 8 0 號，日本專利公開公報第 1 - 2 7 4 7 1 號)。

由動物諸如天竺鼠所衍出之 T G 在工業用途，尤其在交聯聚合物之製造上具有下列之缺點。

其難以以低成本複取大量之此動物衍生性 T G。此外，既然 T G 具有需要鈣離子之性質，故其用途受到限制。

放線菌衍生之 T G 亦具有某些缺點，既然放線菌之生長較一般細菌為慢，故彼等需要長時間保溫，因而增加

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

403785

A7
修訂

五、發明說明 (25)

87. 1. 17 補充

4. T G 之溶解作用

清洗後，將孢子離心，並於沈澱物部分中收集，再令其懸浮於已事先於 37 °C 下加熱之緩衝液 3 (0.1 莫耳濃度碳酸鈉，1 毫莫耳濃度 EDTA，50 毫莫耳濃度二硫蘇糖醇，pH 10.0) 中，繼而將所得懸浮液之 pH 調整至 10.0，而後將懸浮液於 37 °C 下攪拌 30 分鐘。其次，將其以 20,000 x g 之速離心 30 分鐘，再測量離心上層液及藉令離心沈澱物懸浮於緩衝液 3 中所製之懸浮液之 T G 活性。

結果，T G 活性乃於離心上層液中檢出，結果証實 T G 之溶解作用。含 T G 之溶液乃相關於粗製 T G 溶液。

5. 共存蛋白質於酸性條件下之沈澱及移除作用：

令粗製 T G 溶液通過濾紙中過濾，再將乙酸加至所得濾液中使濾液之 pH 為 5.8。而後，將濾液於 5 °C 下攪拌 1 小時，此操作步驟之結果乃形成白色沈澱物，其經認定為等電蛋白質沈澱物，其次，將其以 20,000 x g 之速離心 30 分鐘，因而將沈澱物由離心上層液中分離出，令沈澱物溶於緩衝液 3 中。再測量離心上層液及沈澱物溶液之 T G 活性。結果，T G 活性乃於離心上層液中檢出。

6. T G 以硫酸銨進行之沈澱作用：

將佔上層液 1 / 20 體積量之 1 莫耳濃度 T r i s -

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(3)

T G 之製造成本。

新墨西哥洲大學之 Ramanujam 等人已報告枯草芽孢桿菌衍生性 T G 之存在，然而，他們所報告之 T G 具有下列之性質。

1) 其所合適之 pH 爲 9 . 5 或更高，2) 既然其活性被螯合劑 (E G T A) 大幅抑制，故認爲 T G 具有需要金屬離子之性質，3) 其被 5 毫莫耳濃度或更高濃度之 Ca^{2+} 所抑制，4) 其被 D T T 所抑制，5) 其係由植物細胞及長孢子細胞所製。

吾人認爲 T G 之實際用途乃因上述之性質而受到限制，尤其是其所合適之 pH 高且其會被金屬離子所影響。

[本發明所解決之問題]

如上所述，這些問題爲 1) 當將動物衍生性 T G 應用至工業用途上時，則由於其本身之需鈣性質而使其受到限制，且製造成本高，2) 當將放線菌 T G 應用至工業用途上時，放線菌之生長較細菌爲慢，因此製造成本高，及 3) 當將新墨西哥洲大學研究著所報告之枯草芽孢桿菌衍生性 T G 應用至工業用途上時，因其被 5 毫莫耳濃度 Ca^{2+} 抑制，故不能用於食品中。

因此，本發明之目的係欲將新穎 T G 由迄今已用於製造食品之芽孢桿菌，諸如枯草芽孢桿菌中離析出，並欲提供藉使用 T G 以製造交聯聚合物之方法。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (4387.1.17補充)

(5) 由 p U C 1 8 選殖 P C R 擴增之 D N A 片段：

約 2 千 鹼 基 對 之 P C R 擴 增 所 得 的 D N A 片 段，係 藉 其 與 p U C 1 8 黏 接 而 予 以 選 殖。選 殖 作 用 係 使 用 S u r e 純 系 黏 接 組 套 (由 Pharmacia 所 製) 進 行。除 非 下 文 另 有 指 定，否 則 下 列 實 驗 係 根 據 附 於 組 套 上 之 說 明 書 中 所 教 示 之 方 法 進 行。將 4 0 0 毫 微 克 約 2 千 鹼 基 對 之 經 擴 增 的 D N A 片 段 加 以 修 飾，以 使 其 兩 端 均 變 鈍，繼 而 予 以 磷 酸 化。磷 酸 化 後，將 D N A 片 段 純 化，而 後 將 其 與 經 S m a I 消 化 之 p U C 1 8 黏 接。再 使 用 含 有 黏 接 D N A 片 段 之 反 應 液，將 大 腸 桿 菌 細 胞 以 該 D N A 轉 形。

由 這 些 轉 形 之 細 胞 中 藉 選 殖 方 法，篩 選 某 些 J M 1 0 9 轉 形 體 此 轉 形 體 係 以 含 約 2 K b D N A 片 段 之 p U C 1 8 有 計 劃 地 轉 形 而 得 者。選 殖 方 法，乃 使 用 Molecular Cloning 2nd E-dition Cold Spring Harbor Pross (1989) 中 所 述 之 方 法。

(6) T G 基 因 之 D N A 序 列 化：

將 質 體 (具 有 篩 選 之 轉 化 突 變 型) 根 據 Molecular Cloning 2nd Edition Cold Spring Harbor Pross (1989) 所 述 之 方 法 製 得，再 由 其 中 測 定 約 2 千 鹼 基 對 之 擴 增 D N A 片 段 之 鹼 基 序 列。序 列 化 係 使 用 終 子 循 環 序 列 組 套 (由 A B I 公 司 所 製) 並 根 據 附 於 組 套 上 之 說 明 書 中 所 教 示 之 方 法 進 行，電 泳 則 使 用 D N A 序 列 機 3 7 3 (

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(4)

〔解決問題之方法〕

本發明者深入之研究以求由芽孢桿菌（為迄今用於食品製造中之微生物），諸如枯草芽孢桿菌中獲得新穎之 T G，結果發現芽孢桿菌，諸如枯草芽孢桿菌具有新穎之 T G。以此發現為基準，吾人完成本發明。

本發明尤其包括具有下列性質之芽孢桿菌衍生性 T G，及藉使用 T G 或含 T G 之部分以製造具有交聯結構之蛋白質，非蛋白質性胺基酸聚合物，肽或其衍生物之方法，此方法包含將蛋白質，非蛋白質性胺基酸聚合物，肽或其衍生物中之穀鹽胺及賴胺酸殘基藉由 T G 或含 T G 之部分之作用予以交聯，因而於蛋白質，非蛋白質性胺基酸聚合物，肽或其衍生物之分子間及分子內形成分子間及分子內之交聯 $\epsilon - (r - G l u) - L y s$ 鍵。

（本發明之芽孢桿菌衍生性 T G 之性質）

- 1) 適合此 T G 之 p H 乃落在約 7 至約 9 之間。
- 2) 其所合適之溫度乃落在約 40 °C 至約 65 °C 之間。
- 3) 其於約 60 °C 或更低之溫度下安定。
- 4) 其活性與 $C a^{2+}$ 無關，亦即，此 T G 與 $C a^{2+}$ 無關，且於 5 毫莫耳濃度 $C a^{2+}$ 之存在下具有 50 % 或更高之活性。
- 5) 其被任何 N E M，脘胺及硫酸銨所抑制。
- 6) 其不被任何 E D T A，D T T 及 2 - M E 所抑制。
- 7) 其分子量為 (a) 由約 18,000 至約 22,000 (以凝膠滲透法所測) 及 (b) 由約

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

修正

年 月 日

五、發明說明 (48) 87.1.17 補充

腸桿菌 J M 1 0 9 測試細胞及以 p U C 1 8 轉化之大腸桿菌 J M 1 0 9 對照細胞。經轉形之細胞, p B S T G 7 5 - 1 1 (in. E. coli JM109) 寄存於食品工業發展研究所, 寄存日為 1 9 9 6 年 3 月 1 2 日, 寄存編號為 C C R C 9 4 0 1 1 3。測試細胞及對照細胞乃分別於含有 1 0 0 毫克/毫升安比西林之 L B 培養基中, 於 3 7 °C 下藉液態搖動培養法培養。具體而言, 乃將細胞植入 3 0 毫升培養基中, 再藉搖動培養法培養過夜。另一方面, 乃製備各含 3 0 毫升新鮮培養基之四個燒瓶。再將以 p B S T G 7 5 - 1 1 轉化之大腸桿菌 J M 1 0 9 測試細胞之種子培養物以 5 % 之細胞濃度植於兩個燒瓶內。兩個燒瓶稱為測試群 1 及測試群 2, 另一方面, 將以 p U C 1 8 轉化之大腸桿菌對照細胞之種子培養物以 5 % 之細胞濃度植入其它兩個燒瓶中。此二燒瓶稱為測試群 3 及測試群 4, 再將每一群之細胞培養。待 6 1 0 n m 下之吸光度變約 0.7 後, 將 I P T G 以 1 毫莫耳濃度之最終濃度僅加至測試群 1 及測試群 3 中。4 小時後, 令每一群細胞之培養作用終止。

(2) 經誘生及表現之蛋白質之確認

待培養終止後, 以顯微鏡觀察每一培養物內之細胞。結果顯示僅有已知入 I P T G 之以 p B S T G 7 5 - 1 1 轉化之細胞 J M 1 0 9 本身含有蛋白質包涵體。

待培養終止後, 將 1 0 毫升之各培養物以 1 2, 0 0 0 x g 之速離心 1 5 分鐘以收集細胞, 而後令細胞懸浮於 2 毫升 1 0 毫莫耳濃度 T r i s - H C l (p H 7.5) 中, 清洗並再度離心以收集細胞。繼而令細

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

403785

五、發明說明(5)

28,000至約30,000)由SDS-PAGE所測)

8)其催化肽鏈中所存在之穀氨酸殘基中之 γ -羧基鹽胺基團之轉鹽作用。

本發明更進一步包括編有由芽孢桿菌諸如一般由枯草芽孢桿菌等所衍出之TG密碼之DNA，藉將載體DNA鍵結至DNA上所得之再組合DNA，使用再組合DNA所轉化之細胞，及藉將轉化突變型保溫以製造芽孢桿菌衍生性轉穀氨酸胺酶之方法。

〔本發明之具體實施例〕

吾人已詳知芽孢桿菌，諸如枯草芽孢桿菌等之孢子具有極高之物理，化學及生物學耐受性，本發明者認為此耐受性乃歸因於芽孢桿菌孢子中之GL鍵。此乃因GL鍵廣泛地存在於動物血管，頭髮等之結締組織中，故而增強結締組織強度之故。

GL鍵廣泛地存在於動物血管，頭髮等之結締組織中，此外，TG亦已知存在於組織中，因此，吾人咸信GL鍵係藉TG之作用而形成，因而增強組織之強度。

在此狀況下，本發明者經由固態核磁共振(NMR)及高效能液體色層分離分析該(HPLC)以分析芽孢桿菌，諸如枯草芽孢桿菌之孢子結構，結果發現孢子內GL鍵之存在。以此發現為基準，本發明者咸信可催化GL鍵形成之TG亦存在於芽孢桿菌中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

403785

發明說明(2)

87. 1. 17

補充

基於以上之信念，本發明者將目標集中在自然界，尤其是土壤中所存在之產孢子菌，諸如芽孢桿菌，一般為枯草芽孢桿菌，且對彼等進行篩檢以由其中離析出產 T G 之細菌。

吾人已測定產孢子菌在產孢子階段時之 T G 活性，結果發現可展現強烈 T G 活性之兩種菌型。吾人稱此兩種菌型為 A J 1 2 8 6 6 及 A J 1 3 0 7。

吾人根據 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 對 A J 1 2 8 6 6 及 A J 1 3 0 7 進行一般鑑定，結果顯示此二者為枯草芽孢桿菌者。枯草芽孢桿菌 A J 1 2 8 6 6 係於 1 9 9 5 年 2 月 2 日寄存於 National Institute of Bioscience and Human-Techology, the Agency of Industrial Science and Technology, the Ministry of International Trade and Industry of Japan (其後稱之為 "N I B H"，寄存號為 F E R M P - 1 4 7 5 0) 中。枯草芽孢桿菌 A J 1 2 8 6 6 及繼而於 1 9 9 5 年 1 2 月 4 日 (以布達佩斯盟約為基準) 轉移至國際寄存處中，其乃採用 F E R M B P - 5 3 2 5 之國際寄存號。

枯草芽孢桿菌 A J 1 2 8 6 6 亦寄存於食品工業發展研究所，寄存日為 1 9 9 6 年 3 月 1 2 日，寄存編號為 C C R C 9 1 0 0 4 3。枯草芽孢桿菌 A J 1 3 0 7 係 1 9 9 5 年 8 月 22 日寄存於 N I B H 中，寄存號為 F E R M P - 1 5 1 2 3，枯草芽孢桿菌 A J 1 3 0 7 乃繼而於 1 9 9 6 年 1 月 1 8 日 (以布達佩斯盟約為基準) 轉移至國際寄存處中，其乃採用 F E R M B P - 5 3 6 7 之國際寄存號。

枯草芽孢桿菌 A J 1 3 0 7 係於 1 9 9 5 年 8 月 2 2 日寄存於 N I B H 中，寄存號為 F E R M P - 1 5 1 2 3，枯草芽孢桿菌 A J 1 3 0 7 乃繼而於

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

403785

A7
B7
修正

五、發明說明()

87.1.17 補充

1996年1月18日(以布達佩斯盟約為基準)轉移至國際寄存處中，其乃採用FERMBP-5367之國際寄存號。

枯草芽孢桿菌AJ1307亦寄存於食品工業發展研究所，寄存日為1996年3月12日，寄存編號CCRC910044。

本發明之TG乃廣泛地存在於具有孢子之芽孢桿菌中。亦即，TG不僅存在於枯草芽孢桿菌中，亦存在於下列芽孢桿菌中。

此些芽孢桿菌包括地衣芽孢桿菌，巨大芽孢桿菌，嗜熱脂肪芽孢桿菌，短芽孢桿菌，球形芽孢桿菌，多黏芽孢桿菌，嗜鹼芽孢桿菌等。

其次，此些芽孢桿菌之保溫法及培養物之純化法乃述於下，其中TG係由培養物中獲得。

芽孢桿菌可藉任何液體培養法或固體培養法保溫。尤其，深部通氣及攪拌培養法具有工業上之優點。

作為芽孢桿菌保溫時之培養基中之營養源方面，可用者為一般之碳源，氮源，無機塩及其它微生物保溫中所常用之次要營養物。芽孢桿菌可利用之所有營養源均可予使用。

通氣作用方面，乃使用有氧狀況，有關保溫之溫度方面，芽孢桿菌可於使彼可生長及製造TG之任何溫度下保溫。因此，保溫之溫度並未特別限定，但通常為10至50℃，最好為30至40℃。

然而，歸屬於嗜熱菌群之芽孢桿菌可於高於上述範圍之溫度下保溫。

保溫時間乃依保溫時間及其它保溫狀況而變。例如，芽孢桿菌最好長時間保溫以使彼能製造最大量之TG。通常彼等乃保溫5小時至約7天，最好10小時至約3天。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(8)

根據本發明，芽孢桿菌顯現其 T G 活性之階段乃限定於僅於產孢子階段。此乃本發明之 T G 基本上異於新墨西哥洲大學所報告之枯草芽孢桿菌衍生性 T G 之最顯著點。

待保溫之芽孢桿菌細胞開始形成孢子後，其 T G 活性開始增加。繼而，T G 活性在產孢子階段 I V 至 V I 期變為最大，其後再降低，T G 活性在培養物中僅略為檢出，但於生長細胞中則大得多。

將所生長之細胞於低溫狀況下弄碎或溶解，再將所加工之細胞以 $20,000 \times g$ 之速離心 10 分鐘。繼而將上層液部分及沈澱物部分彼此分離，再檢定每一部分之 T G 活性，此此方式結果証實含有孢子之沈澱物部分具有活性。

其中已知 T G 存在於孢子之表面上。

欲將芽孢桿菌衍生性 T G 純化，含有芽孢桿菌生長細胞之培養物可直接加工以得純化之 T G，但最好先將生長細胞之孢子囊弄碎或溶解，而後將所得孢子加工以得純化之 T G。

藉將保溫芽孢桿菌後所得之孢子囊弄碎或溶解，則可得到芽孢桿菌之孢子，經過弄碎或溶解處理後，於含有孢子之不可溶部分中收集 T G 活性，因此，亦可將不可溶之部分濃縮以得所欲之酵素製劑。

欲將已於不可溶部分中收集之 T G 活性於可溶部分中復收（亦即，欲將 T G 活性溶解），乃需要下列之操作步驟。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明(9)

一實例係將表面活化劑諸如Triton X-100, 烷基葡萄糖苷等加至不可溶部分中, TG活性乃於所得之可溶部分中復收。亦可將含有孢子之部分以鹼性緩衝劑(例如20毫莫耳濃度碳酸氫鈉緩衝液, pH10)處理, TG活性乃於所得之可溶部分中復收。亦可令含有孢子之部分懸浮於緩衝劑中, 再將所得懸浮液加熱, TG活性乃於所得之可溶部分中復收, 例如, 藉將懸浮液於10℃或更高之溫度下加熱, 則TG活性可於可溶部分中復收。

溶解之TG可用以作為膠凝劑。藉使用供純化酵素所用之任何一般方法, 例如凝膠滲透法, 離子交換色層分離法等, 則溶解之TG可更進一步純化, 結果可得具有較高相對活性之TG。所純化之TG可為具有較高相對TG活性之膠凝劑。

TG活性之測定需以下列方法進行, 標記 ^{14}C 之腐胺及二甲基酪蛋白乃用以作為基質, 而含TG之樣品乃施至彼上以使彼等相互反應。將鍵結腐胺之二甲基酪蛋白以10%三氯乙酸沈澱, 再將所得沈澱物吸附至濾紙上。既然濾紙中所存在之放射活性與樣品中之TG活性成比例, 故可定量地測定樣品中之TG活性。放射活性可以液態閃爍計數器測定。

枯草芽孢桿菌AJ1307衍生性TG其後乃稱之為TG-1, 而枯草芽孢桿菌AJ12866衍生性TG則稱為TG-2, 以TG-1及TG-2之資料為基準, 本發明TG之酵素化學性質乃述於下。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(10)

適合本發明 T G 之 p H 乃落在約 7 至約 9 間。

欲測定使 T G 具適當活性之 p H 範圍，與 T G 進行之各種不同酵素反應乃於 37 °C 下進行 30 分鐘。

T G 所合適之溫度乃落在約 40 °C 至約 65 °C 之間。

欲測定使 T G 具適當活性之溫度範圍，與 T G 進行之各種不同酵素反應乃於 p H 7.5 下進行 30 分鐘。

溫度安定性：

T G 於約 60 °C 或更低之溫度下安定。

令 T G 於 p H 7.5 下接受高溫處理 10 分鐘，而後檢查 T G 之溫度安定性。即使當令 T G 於 60 °C 下接受高溫處理時，仍保持約 80 % 之 T G 活性。

抑制劑之影響：

本發明之芽孢桿菌衍生性 T G 乃被 N E M (N - 乙基馬來醯亞胺) 及胱胺大幅抑制。此外，其亦被硫酸銨大幅抑制。

D T T 及 E D T A 之影響：

本發明之芽孢桿菌衍生性 T G 之活性乃於 D T T (二硫蘇糖醇) 之存在下增加。然而，T G 活性不一定因 E D T A (乙二胺 - 四乙酸) 之存在而受影響。

C a ²⁺ 之影響：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (11)

本發明之 T G 不具有需要 Ca^{2+} 離子之性質。亦即，其為非 Ca^{2+} 依賴性酵素。T G 於 5 毫莫耳濃度 Ca^{2+} 之存在下仍保持 50 % 或更高之活性。

分子量：

T G 之分子量為 (a) 由約 18,000 至約 22,000 (以凝膠滲透法所測) 及 (b) 由約 28,000 至約 30,000 (以 SDS-PAGE 法所測)。

活性：

T G 可催化基質，亦即肽鏈中所存在之穀鹽胺殘基中之 γ -羧基鹽胺基團之轉鹽作用。在肽鏈中賴胺酸殘基中之 ϵ -胺基團為鹽基胺受體之轉鹽作用中，分子間及分子內之交聯 $\epsilon-(\gamma-Glu)-Lys$ 鍵乃於肽分子間及分子間形成。當水為轉鹽作用中之鹽基接受體時，則令肽鏈中之穀鹽胺殘基接受脫鹽胺作用而使穀鹽胺殘基轉換成穀胺酸殘基。

如上所述，由枯草芽孢桿菌 A J 1 2 8 6 6 及枯草芽孢桿菌 A J 1 3 0 7 中所衍出之本發明 T G 之性質乃明顯地異於新墨西哥洲大學群所報告之枯草芽孢桿菌衍生性 T G 者。

其次，藉使用 T G 以製造交聯聚合物之方法乃述於下。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(12)

根據本發明，應用以製造交聯聚合物之 T G 可為下列之任一者 (1) 藉將保溫之芽孢桿菌之孢子囊弄碎或溶解所得之不可溶，含孢子之部分之濃縮物，(2) 藉以各種不同方法將不可溶部分予以溶解所得之具 T G 活性之部分，及 (3) 具有高比較活性之純化 T G 。

亦可使用藉以再組合 D N A 轉化後之轉化細胞保溫所得之芽孢桿菌衍生物 T G，其係藉將編有芽孢桿菌衍生性 T G 密碼之 D N A 以下文所述之方法鍵結至載體 D N A 上而架構。

除上示者之外，具有芽孢桿菌衍生性 T G 活性之任何一種部分均可使用。

作為供 T G 或 T G 活性部分使用之基質方面，應使用一或多種蛋白質，非蛋白質性胺基酸聚合物，肽及其衍生物。

蛋白質之來源及性質並未特別限制，惟蛋白質需具有賴胺酸及穀醯胺殘基，且會被上述催化劑所催化。例如，酪蛋白，凝膠，大豆蛋白質等可用以作為基質。此外，被蛋白酶等所部分切割之蛋白質亦可使用。

非蛋白質性胺基酸聚合物包括藉化學合成法所製之胺基酸聚合物，諸如聚賴胺酸等。

肽可為藉化學合成法所得者，或為藉將天然蛋白質以酸，鹼，蛋白質等分解所得者。

此些基質之衍生物包括糖蛋白，化學改良性蛋白質等。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(13)

任何其它者亦可用以作為供 T G 或 T G 活性部分所用之基質，惟彼等需具有賴胺酸及穀鹽胺殘基。

本發明之 T G 或 T G 活性部分乃加至含蛋白質等之溶液或漿液（基質濃度為 0.1 % 或更高）中，再與之反應，因而獲得交聯聚合產物。根據本發明所得之交聯聚合物可依交聯程度而分類成凝膠產物群，高黏度產物群及僅聚合化產物群，本發明包括所有之這些交聯聚合物。

通常，反應溶液之 pH 由約 4 至約 10，反應溫度由約 5 °C 至約 80 °C，反應時間由約 10 秒至約 24 小時，反應結果，即得交聯聚合物（凝膠產物，高黏度產物等）。

其次，藉本發明再組合 D N A 技術以製備芽孢桿菌衍生性 T G 之方法乃述於下。

有許多藉再組合 D N A 技術以製造有用蛋白質諸如酵素，生理活性基質等之實例為已知。再組合 D N A 技術之一優點為其可大量地製造在自然界僅些微存在之有用蛋白質。

欲根據此再組合 D N A 技術以製造本發明之芽孢桿菌衍生性 T G，乃需要編有芽孢桿菌衍生性 T G 密碼之 D N A。將此 D N A 鍵結至載體 D N A 上以架構所欲之再組合 D N A。宿主細胞則使用再組合 D N A 轉化，再將已經過轉化以得以製造芽孢桿菌衍生性 T G 之轉化細胞於培養基中保溫，因而使細胞可於培養基中或細胞中製造及累積芽孢桿菌衍生性 T G，其後再收集 T G。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

線

五、發明說明(14)

編有芽孢桿菌衍生性 T G 密碼之 D N A 之製法乃述於下。

首先，先測定純化 T G 之胺基酸序列，吾人可根據愛德門 (Edman) 法以測知所欲之胺基酸序列 (參見 Edman, P., Acta Ahem. Scand., 4, 227 (1950))。此外，亦可藉使用 Applied Biosystems 公司所製之序列機以測定胺基酸序列。

本發明之芽孢桿菌衍生性 T G 由 N - 端至第 35 個殘基之胺基酸序列乃予測定，其乃相當於序列表中序列第 1 號之序列。

以所明瞭之胺基酸序列為基準，即可推論出編有此密碼之 D N A 之基元序列。欲推論 D N A 之基元序列，乃使用通用密碼子或芽孢桿菌中最常用之密碼子。

以所推論之基元序列為基準，即可合成約 30 至 50 基元對之 D N A 分子。合成此 D N A 分子之方法乃述於 Tetrahedron Letters, 22, 1859 (1981) 中，D N A 分子亦可藉 Applied Biosystems 公司所製之合成機予以合成。當將編有芽孢桿菌衍生性 T G 密碼之全長 D N A 由芽孢桿菌染色體基團文庫中離析出時，此 D N A 分子可用以作為探子。此外，當將編有芽孢桿菌衍生性 T G 密碼之 D N A 藉聚合酶鏈鎖反應 (P C R) 擴增時，彼等亦可用以作為引子。然而，既然藉 P C R 擴增之 D N A 並不包括編有芽孢桿菌衍生性 T G 密碼之全長 D N A，故藉 P C R 擴增之 D N A 乃用以作為探子，且編

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(15)

有芽孢桿菌衍生性 T G 密碼之全長 D N A 乃由芽孢桿菌染色體基團文庫中離析出。

P C R 之操作步驟乃書寫於 White, T. J. 等人之 Trends Genet, 5, 185 (1989) 等文獻中。製備芽孢桿菌染色體 D N A 之方法乃述於 Molecular Biological Methods for Bacillus, John Wiley & Sons, Ltd. (1990) 等文獻中。架構芽孢桿菌染色體基因文庫之方法乃述於 Molecular Biological Methods for Bacillus, John Wiley & Sons, Ltd. (1990) 等文獻中。藉使用 D N A 分子作為探子以將所欲之 D N A 分子由基因文庫中離析出之方法則述於 Molecular Cloning, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press (1989) 等文獻中。

欲測定編有芽孢桿菌衍生性 T G 密碼且已根據上述方法離析出之 D N A 之基元序列，乃參考 A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley & Sons, Inc. (1985) 中所述之方法。供基元序列分析方面，亦可使用 Applied Biosystems 公司所製之 D N A 序列機。

編有本發明芽孢桿菌衍生性 T G 密碼之一種 D N A 乃以序列表之序列第 2 號展示。此 D N A 係由枯草芽孢桿菌 A J 1307 之染色體 D N A 中離析出。編有本發明芽孢桿菌衍生性 T G 密碼之 D N A 並不限定為序列表中序列第 2 號所示者。根據芽孢桿菌之種類及菌型，D N A 應具有不同之基元序列。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (16)

吾人可將由芽孢桿菌染色體 DNA 所離析出之編有 T G 密碼之 DNA 予以人工突變以改良 DNA 之基元序列。一種供此人工突變用之普遍方法為位點一專一性突變法，諸如於 Method in Enzymol. 1 5 4 (1 9 8 7) 中所述者。任何人工突變之 DNA，如果編有芽孢桿菌衍生性 T G 密碼，則均在本發明編有芽孢桿菌衍生性 T G 密碼之 DNA 之範圍內。

具有再組合 DNA (藉將編有枯草芽孢桿菌 A J 1 3 0 7 衍生性 T G 密碼之 DNA 鍵結至載體 DNA 上所架構) 之大腸桿菌 A J 1 3 1 7 2 之細胞乃於 1 9 9 5 年 1 2 月 2 0 日 (以布達佩斯盟約為基準) 接受國際寄存於 N I B H 中，彼乃採用 F E R M B P - 5 3 4 6 之國際寄存號。

吾人可藉將載體 DNA 鍵結至編有芽孢桿菌衍生性 T G 密碼之 DNA 上以架構再組合 DNA。而後將細胞以再組合 DNA 轉化以得轉化細胞，再將轉化細胞於培養基中保溫以使細胞可於培養基中及 / 或於細胞中製造及累積芽孢桿菌衍生性 T G，其後收集 T G，因而製得大量之芽孢桿菌衍生性 T G。

在期望以再組合 DNA 技術製造大量蛋白質之許多事例中，所製之蛋白質通常為分子內相關性以於製造蛋白質之轉化突變型中提供其包涵體。此製造蛋白質之表現法之優點為所欲之蛋白質可被保護以避免被所用細胞中所存在之蛋白酶消化，且所欲之蛋白質可藉將細胞弄碎，繼而將

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (17)

所得細胞碎屑離心而輕易純化。

將所得之蛋白質包涵體以蛋白質變性劑溶解，而後基本上藉將變性劑移除以使所溶解之蛋白質之活性再生，其後再將可溶性蛋白質轉換成精確折疊之生理活性蛋白質。已有許多有關此法之實例，有一實例係使人類間白來之活性再生（參見日本專利公開公報第 6 1 - 2 5 7 9 3 1 號）。

欲由蛋白質包涵體中製得活化蛋白質，乃需要溶解作用及活性再生作用等一系列操作步驟，此些操作步驟比直接製造活化蛋白質更為複雜。然而，當大量蛋白質於細胞中製得時且當所製蛋白質對細胞之生長具影響力時，則蛋白質可以鈍性蛋白質包涵體形式於細胞中累積，因而可阻斷蛋白質之影響力。

有關製造大量所欲蛋白質包涵體之方法方面，已有藉將其本身於強烈引子之控制下以表現所欲蛋白質之方法以及使用已知大量表現之蛋白質以將所欲蛋白質以稠合蛋白質形式表現之方法。

此外，亦有效以事先將某些限制蛋白酶認知位插至稠合蛋白質之適當位置中，經由彼，則所欲之蛋白質可於表現後由稠合蛋白質中切割出。

轉化以供藉再組合 DNA 技術製造大量蛋白質之宿主細胞包括細菌細胞，放線菌細胞，酵母菌細胞，霉細胞，植物細胞，動物細胞等。通常以大腸桿菌細胞較為理想。此乃因先前許多製造大量蛋白質之技藝技術係使用大腸桿

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (18)

菌細胞所致。藉使用大腸桿菌轉化細胞以製造本發明芽孢桿菌衍生性 T G 之方法乃述於下。

作為供表現編有芽孢桿菌衍生性 T G 密碼之 D N A 之起動子方面，可用者為通常使用以使大腸桿菌製造外來蛋白質之起動子，例如，可用者為強烈起動子諸如 T 7 起動子，t r p 起動子，l a c 起動子，t a c 起動子，P L 起動子等。

欲使宿主細胞得以以稠合蛋白質包涵體形式製得芽孢桿菌衍生性 T G，編有另一種蛋白質密碼，最好編有親水肽密碼之基團需鍵結至每一宿主細胞中之芽孢桿菌衍生性 T G 基團之上游或下游位，以於其中架構稠合蛋白質基團。編有另一種蛋白質密碼之基因可為任何具有可增加所欲之稠合蛋白質於宿主細胞中累積之量之能力且具有可於稠合蛋白質變性及再生後增強稠合蛋白質之溶解度之能力者。候選基因之實例為 T 7 基因 1 0， β -半乳糖苷酶基因，脫水葉酸還原酶基因，干擾素 γ -基因，間白素-2-基因，前凝乳酶基因等。

當將任何這些基團鍵結至編有芽孢桿菌衍生性 T G 密碼之基因上時，供此兩種基因用之密碼子讀碼應相同。不是基因彼此鍵結於適當之核酸內切限制酶位置上，就是使用具有適當序列之任何合成 D N A。

欲增加宿主細胞製造芽孢桿菌衍生性 T G 之量，最好將具有轉錄終止序列之終止子鍵結至稠合蛋白基因之下游位。終止子包括（例如 T 7）終止子，f d 噬菌體終止子

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

403785

五、發明說明 (19)

， T 4 終止子，耐四環黴素基因終止子，大腸桿菌

T r p A 終止子等。

作為編有芽孢桿菌衍生性 T G 密碼或編有由芽孢桿菌衍生性 T G 及另一蛋白質所組成之稠合蛋白質密碼之基因置入大腸桿菌中所經過之載體方面，最好為所謂之多重複製載體。此載體包括（例如）p U C 質粒，p B R 3 2 2 質粒及其衍生物。欲對所得轉化突變型進行篩選，載體最好含有標記諸如抗胺苄青黴素基因等，有關此些質粒方面，有各種不同之具有強烈引子之表現載體係為商用（例如 p U C 質粒由 Takara Shuzo 公司所製，p P R O K 質粒由 Clonetec 公司所製，p K K 2 3 3 - 2 由 Clonetec 公司所製）。

含有引子，編有芽孢桿菌衍生性 T G 密碼或編有由芽孢桿菌衍生性 T G 及另一種蛋白質所組成之稠合蛋白質密碼之基團，及終止子（依此次序鍵結）之 D N A 斷片乃鍵結至載體 D N A 上以架構再組合 D N A。

將大腸桿菌細胞以再組合 D N A 轉化，再將所得轉化細胞保溫以使彼等能表現及製造芽孢桿菌衍生性 T G 或由芽孢桿菌衍生性 T G 及另一種蛋白質所組成之稠合蛋白質。

作為待轉化之宿主方面，可使用一般用以表現外來基因之任何菌型。特別理想者為大腸桿菌 J M 1 0 9 （D E 3）菌型及 J M 1 0 9 菌型。轉化之方法及將所得轉化突變型篩選之方法乃述於 Molecular Cloning 2nd

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明(20)

Edition Cold Spring Harbor Pross (1 9 8 9) 等文獻中。

當將稠合蛋白質表現時，可予以改良以使 T G 可使用具有（作為認知位）T G 中不存在之序列之限制蛋白酶諸如凝血固子 X a，舒血管素等而由稠合蛋白質中切割出。

作為製造培養基方面，可用者為一般用以供將大腸桿菌保溫之任何培養基，諸如 M 9 - Casamino 培養基，L B 培養物等。保溫狀況及誘導製造之狀況應根據載體標記，引子，所用之宿主細胞型式等而加以適當選擇。

欲復收及收集芽孢桿菌衍生性 T G 或由芽孢桿菌衍生性 T G 及另一種蛋白質所組成之稠合蛋白質，可使用各種不同之方法諸如下述者，當 T G 或稠合蛋白質已於保溫細胞中溶解時，收集細胞，再予弄碎或溶解，所得之含細胞碎屑之液體可用以作為粗製之酵素液。如有需要，乃將液體更進一步接受慣用之沈澱作用，過濾作用，柱色層分離作用等，因而於使用前將 T G 或稠合蛋白質純化。

如有需要，亦可使用藉抗體以將 T G 或稠合蛋白質純化之方法。

當形成蛋白質包涵體時，乃使用蛋白質變性劑將其溶解。此狀況下，蛋白質包涵體可與含彼之細胞一起溶解。然而，基於接續之純化步驟之考量，最好於溶解前，先將包涵體離析出。包涵體由細胞中離析之作用可藉任何已知之方法進行。例如，將細胞弄碎，而後離心，因而復收包涵體。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (21)

作為使蛋白質包涵體溶解之蛋白質變性劑方面，可用者為氫氯酸胍（例如，6 莫耳濃度之濃度及 5 至 8 之 pH），脲（例如，8 莫耳濃度之濃度）。

將所用之蛋白質變性劑藉滲析作用等移除，再令活性蛋白質再生。供滲析作用所用之滲析溶液可為 Tris-HCl 緩衝液，磷酸塩緩衝液等。其濃度可由 20 毫莫耳濃度至 0.5 莫耳濃度且其 pH 可為 5 至 8。

再生步驟期間之蛋白質濃度最好限定不高於約 500 微克／毫升。欲避免所再生之芽孢桿菌衍生性 TG 自身交聯滲析溫度最好不高於 5℃，欲移除蛋白質變性劑，除了上述滲析法外，亦可使用稀釋法，超濾法等。任何之這些方法均可用以使蛋白質活性再生。

當使用具有序列表中序列第 2 號之序列之 DNA 作為編有芽孢桿菌衍生性 TG 密碼之 DNA 時，即可獲得具有在序列第 2 號之基元序列之下所示之胺基酸序列之芽孢桿菌衍生性 TG，DNA 中之開放讀碼範圍係由第 118 個之腺甘殘基至第 869 個之胞嘧啶殘基。

〔實例〕

繼而，本發明乃藉由下列實例更詳盡地說明。然而，本發明並不限定僅為這些實例之具體實施例。

(實例 1) TG 之製造及純化

將枯草芽孢桿菌 AJ 1307 細胞保溫以使彼等具有

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

象

五、發明說明 (22)

充份之 T G 活性。使用薛佛氏培養基，保溫作用均於 37 °C 下藉液態搖動培養法或液態充氣及攪拌培養法進行。所用薛佛氏培養基之成分乃含有 8 克 / 升 Bacto-營養肉湯，1 克 / 升氯化鉀，0.12 克 / 升硫酸鎂七水合物 ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)，1 毫莫耳濃度氯化鈣，10 微莫耳濃度氯化錳及 1 微莫耳濃度硫酸鐵，且具有 7.0 之 pH。

首先，將 A J 1307 菌型之細胞於 20 毫升之一培養基中保溫 24 小時以供種子培養，再將 5 毫升含有種子細胞之培養物於一系列各 100 毫升之第三批培養基中再度保溫。待每一培養基中之細胞達到對數生長相之後期階段後，將每一培養物轉移至 900 毫升之另一培養基中，這第三批培養基乃連續連結，此時細胞之保溫作用仍持續。待每一培養基中之細胞再度達到對數生長相之後期階段後，將所有培養物中之三升轉移至 27 升之另一培養基中，再更進一步保溫，同時於 1 / 4 v v m 下充氣及以 350 r p m 之速攪拌。

同樣地，待細胞達到對數生長相之後期階段後，將 30 升培養物轉移至 270 升另一培養基中，再更進一步保溫，同時於 1 / 20 v v m 下充氣及以 200 r p m 之速攪拌。待細胞達到靜止相之階段後，保溫作用乃更進一步持續 6 小時。其後，令最終之保溫作用終止。將最終培養物使用冷水快速冷卻至 20 °C 或更低。繼而使用連續離心機離心以收集細胞。所得細胞乃用以作為初始物質，其

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (23)

中之 T G 則以下述之方法純化。

下文所得之酵素液之 T G 活性係根據下述之酵素活性劑量法測定。令含有 10 微升待測酵素液之 50 微升試液 (100 毫莫耳濃度 T r i s - H C l , p H 7 . 5 , 6 . 3 毫克 / 毫升二甲基酪蛋白 , 10 毫微莫耳濃度 ^{14}C - 腐胺 , 1 . 2 微居里) 於 37 °C 下反應 30 分鐘 , 而後將 40 微升所反應之液體吸附至濾紙上 , 再以 10 % 三氯乙酸固定於其上。其次 , 將其以 5 % 三氯乙酸溶液清洗三次 , 再使用液體閃爍計數器計算其放射活性 , 所計算之值相關於酵素液之 T G 活性。

1 . 細胞之清洗

令保溫後所收集之細胞懸浮於 50 毫莫耳濃度 T r i s - H C l (p H 7 . 5) 中 , 再以 20 , 000 x g 之速離心 30 分鐘以再度收集沈澱部分中之細胞 , 此懸浮及離心之操作步驟係用以清洗細胞。此細胞清洗乃予重覆其兩次。

2 . 細胞之溶解 :

將已以冰冷卻之 9 重量份緩衝液 1 (100 毫莫耳濃度 T r i s - H C l (p H 7 . 5) , 0 . 5 毫克 / 毫升溶菌酶 , 20 微克 / 毫升去氧核糖核酸酶 I , 1 毫莫耳濃度 E D T A , 2 毫莫耳濃度苯甲烷磺醯氟 (P M S F) 加至一重量份所清洗之濕細胞中 , 再令細胞懸浮於緩衝液中

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(24)

。而後將所得懸浮液於冰上攪拌 1 至 3 小時，因而將細胞溶解。

3. 孢子之製備：

溶解後，將所得溶液於 4 °C 及 20,000 x g 下離心 30 分鐘。再測量離心上層液以及藉令離心沈澱物懸浮於緩衝液 2 (100 毫莫耳濃度 Tris-HCl (pH 7.5)，1 毫莫耳濃度 EDTA) 中所製得之懸浮液之 TG 活性。結果，TG 活性乃於沈澱物懸浮液中檢出。將沈澱物懸浮液以顯微鏡觀察，結果顯示懸浮液含有細菌孢子及溶解之細胞碎屑餘留物。

將 TG 活性已被檢出之沈澱物懸浮液攪拌 30 分鐘，同時以冰冷卻。其次，將其再度以 20,000 x g 之速離心 30 分鐘，再測量每一離心上層液以及藉令離心沈澱物懸浮於緩衝液 2 中所製得之懸浮液之 TG 活性。結果，TG 活性乃於沈澱物懸浮液中檢出。

此使用緩衝液之懸浮，攪拌及離心之操作步驟係用以清洗孢子，孢子之清洗步驟乃重覆共四次。操作期間，TG 活性總是於沈澱物部分中檢出。待孢子清洗共四次後，將 TG 活性已被檢出之最後沈澱物部分之懸浮液以顯微鏡觀察，結果顯示懸浮液幾乎不含細胞碎屑餘留物，而僅含有細菌孢子。顯微鏡之觀察則更進一步顯示無任何發芽之孢子存在。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

403785

A7
修訂

五、發明說明 (25)

87. 1. 17 補充

4. T G 之溶解作用

清洗後，將孢子離心，並於沈澱物部分中收集，再令其懸浮於已事先於 37 °C 下加熱之緩衝液 3 (0.1 莫耳濃度碳酸鈉，1 毫莫耳濃度 EDTA，50 毫莫耳濃度二硫蘇糖醇，pH 10.0) 中，繼而將所得懸浮液之 pH 調整至 10.0，而後將懸浮液於 37 °C 下攪拌 30 分鐘。其次，將其以 20,000 x g 之速離心 30 分鐘，再測量離心上層液及藉令離心沈澱物懸浮於緩衝液 3 中所製之懸浮液之 T G 活性。

結果，T G 活性乃於離心上層液中檢出，結果証實 T G 之溶解作用。含 T G 之溶液乃相關於粗製 T G 溶液。

5. 共存蛋白質於酸性條件下之沈澱及移除作用：

令粗製 T G 溶液通過濾紙中過濾，再將乙酸加至所得濾液中使濾液之 pH 為 5.8。而後，將濾液於 5 °C 下攪拌 1 小時，此操作步驟之結果乃形成白色沈澱物，其經認定為等電蛋白質沈澱物，其次，將其以 20,000 x g 之速離心 30 分鐘，因而將沈澱物由離心上層液中分離出，令沈澱物溶於緩衝液 3 中。再測量離心上層液及沈澱物溶液之 T G 活性。結果，T G 活性乃於離心上層液中檢出。

6. T G 以硫酸銨進行之沈澱作用：

將佔上層液 1 / 20 體積量之 1 莫耳濃度 T r i s -

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (26)

H C l (p H 7 . 5) 加至已檢出 T G 活性之離心上層液中，其次，將硫酸銨加入並令之以 5 0 % 飽和度之最終濃度溶於其中。再藉將氫氧化鈉加入以調整所得溶液之 p H 至 7 . 5 。繼而將其於冰上攪拌 2 小時，再以 2 0 , 0 0 0 x g 之速離心 3 0 分鐘。而後將所離心之上層液對緩衝液 4 (2 5 毫莫耳濃度 T r i s - H C l (p H 7 . 5) , 5 毫莫耳濃度疊氮化鈉) 進行滲析，同時令離心沈澱物緩衝液 4 中，繼而對緩衝液 4 進行滲析。經由滲析作用後，硫酸銨乃先全移除，再測量上層液部分及沈澱物部分之 T G 活性。結果，T G 活性乃於離心沈澱物部分中檢出，或者，亦即於在 5 0 % 飽和度之硫酸銨之存在下所形成之沈澱物部分中檢出。

7 . 疏水色層分離作用：

將已檢出 T G 活性之溶液對緩衝液 5 (5 0 毫莫耳濃度 T r i s - H C l , 0 . 7 5 毫莫耳濃度硫酸鎂 , 0 . 0 2 % (w / v) 疊氮化鈉 , p H 9 . 0) 進行滲析。而後將所得滲析液以 2 0 , 0 0 0 x g 之速離心以將上層液離析出。再將所得上層液施至已以緩衝液均衡化之疏水色層分離柱 Phenyl Sepharose HP (由 Pharmacia 公司所製) 上。藉由此操作，T G 乃吸附至膠上。

使用緩衝液 5，將未吸附於膠上之蛋白質（未吸附性蛋白質）清洗掉。繼而使用含乙二醇之緩衝液將吸附之蛋白質洗提出。洗提中，緩衝液中之硫酸鎂濃度及乙二醇濃

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

403785

五、發明說明(27)

度乃呈直線變化。亦即，洗提作用係以所用緩衝液中之硫酸鎂濃度由 0.75 莫耳濃度至 0 莫耳濃度線性變化，同時其內之乙二醇濃度由 0% (v/v) 至 10% (v/v) 線性變化之方式進行。

測量洗提作用所得之每一洗提份之 TG 活性，結果 TG 活性乃於在以約 150 至 200 毫莫耳濃度之硫酸鎂濃度及約 7 至 8% (v/v) 乙二醇濃度洗提出之洗提液中觀察到。

8. 凝膠滲透作用：

使用超濾裝置 (Centriprep, 由 Amicon 公司所製) 將具有 TG 活性之部分濃度，再對緩衝液 6 (25 毫莫耳濃度 Tris-HCl, 150 毫莫耳濃度氯化鈉, 1% (v/v) 乙二醇, 0.02% (w/v) 疊氮化鈉, pH 8.0) 進行滲析。而後將所得滲析液以 20,000 x g 之速離心 10 分鐘以收集所得之上層液。繼而將所得上層液施至已以緩衝液 6 均衡化之凝膠滲透柱，Sephacryl S 200 HR (由 Pharmacia 公司所製) 上。再測量洗提出之每一部分之 TG 活性。結果，TG 活性乃在分子量經測定為約 18,000 至約 22,000 之部分中檢出。

9. 陰離子交換色層分離法：

將所得之 TG 部分經由超濾膜濃縮，再對緩衝液 7 (

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

403785

五、發明說明 (28)

2 5 毫莫耳濃度哌嗪，1 % (v / v) 乙二醇，0 . 0 2 % 疊氮化鈉，p H 1 0 . 5) 進行滲析。而後將所得滲析液以 2 0 , 0 0 0 x g 之速離心 1 0 分鐘以收集上層液。繼而將所得上層液施至已以緩衝液 7 均衡化之陰離子交換色層分離柱，M o n o - Q (Pharmacia公司所製) 上，藉由此操作，T G 乃吸附至膠上。

使用緩衝液 7 將未吸附之蛋白質清洗掉，其後使用含有氯化鈉之緩衝液作為洗提液將吸附之蛋白質洗提。洗提作用係以所用緩衝液中之氯化鈉由 0 毫莫耳濃度至 5 0 . 0 毫莫耳濃度線性變化之方式進行，測量洗提作用所得之每一洗提份之 T G 活性，結果 T G 活性乃在以約 5 0 毫莫耳濃度至 1 5 0 毫莫耳濃度之氯化鈉濃度所洗提出之洗提液中觀察到。

令所得之活性部分接受 S D S - P A G E，再以考馬斯亮藍染色。由此証實 T G 被純化而顯示單一帶，T G 之分子量經估測由約 2 8 , 0 0 0 至 3 0 , 0 0 0 (參見圖 1)。

繼而測定純化部分中相對活性之增加度。具體而言，係測量上述粗製 T G 溶液以及純化活性部分中之 T G 活性。結果顯示，由於一系列之純化操作，每單位蛋白質重之純化部分中之相對活性約比粗製溶液增加約 6 0 0 倍。於本文所用之活性測量法中，純化部分之相對 T G 活性經估測約為 $2 . 5 \times 10^4$ d p m / 毫克 / 3 0 分鐘 (3 7 °C , p H 7 . 5)。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (29)

10. 環繞 N 端之 T G 之胺基酸序列之測定：

環繞依上述方法所純化之 T G 之 N 端之胺基酸序列乃測定如下。

令約 10 微克（根據其內之蛋白質）之純化 T G 部分於 S D S 之存在下接受聚丙烯醯胺膠電泳，再將膠中之 T G 轉錄至濾膜上。由此即可藉使用蛋白質序列機分析 T G 由其 N 端開始之胺基酸序列。

具體而言，使用 Milliblot（由 Millipore 公司所製）並根據半乾燥系統（參見 Protein Structure Analysis, 由 H. Hirano 書寫，由 Tokyo Kagaku Dojin 所公佈），即可將所欲之酵素由電泳所得之膠中轉錄至聚偏二氟乙烯（P V D F）膜上。其後，將轉錄於 P V D F 膜上之所欲酵素之 N 端胺基酸使用蛋白質序列機（476A 機型，由 A B I 公司所製）予以序列化。

故而測出 T G 由其 N 端開始之 35 個殘基之胺基酸序列。環繞所序列化之轉穀胺醯胺酶 N 端之胺基酸序列乃示於序列表中之序列第 1 號中。

T G 之酵素活性之 p H - 依賴性變異乃根據下述方法測量由此乃測知 T G 所合適之 p H 範圍。

作為供酵素反應之緩衝液方面，乃使用甲酸鈉緩衝液（p H：2.0，3.0，3.5，4.0），乙酸鈉緩衝液（p H：4.5，5.0，5.5，6.0），T r i s - H C l 緩衝液（p H：7.0，7.5，

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (30)

8 . 0 , 8 . 5 , 9 . 0) 及碳酸鈉緩衝液 (p H :
9 . 0 , 9 . 5 , 1 0 . 5 , 1 2 . 0) 。

欲測量 T G 活性，乃使用以 ^{14}C - 標記腐胺及二甲基酪蛋白作為基質之上述方法。將每一緩衝液以 5 0 毫莫耳濃度之濃度加至反應系統中，所用之酵素來源為 5 微克 / 毫升濃度之事先製備之純 T G 部分。

吾人根據個別反應系統中 p H 值之變化以測量酵素活性之相對值。於 p H 8 . 2 (當使用 p H 8 . 5 之 T r i s - H C l 作為緩衝液時) 下，反應系統顯示最高之 T G 活性，將此定為 1 0 0 之標準值。結果則示於圖 2 中。

吾人發現，本發明 T G 所合適之 p H 範圍由約 7 至約 9，嚴格為約 7 . 7 至約 8 . 8 (參見圖 2)。另一方面，新墨西哥州大學群所報告之枯草芽孢桿菌衍生性 T G 所合適之 p H 範圍為 9 . 5 或更高。因此，彼等所報告之 T G 明顯地不同於本發明之芽孢桿菌衍生性 T G。

T G 酵素活性中之溫度依賴性變異係根據下述方法測量，由此可測定 T G 所合適之溫度範圍。

欲測量 T G 活性，乃使用以 ^{14}C - 標記腐胺及二甲基酪蛋白作為基質之上述方法。具體而言，乃使用 0 . 1 毫莫耳濃度 T r i s - H C l 以調整反應系統之 p H 至 7 . 5。作為酵素來源之事先製備之純 T G 部分乃以 2 微克 / 毫升之濃度加至反應系統中。再令反應系統於浴中，於由 2 5 ° C 至 8 0 ° C 變化之溫度下反應 3 0 分鐘。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(31)

酵素活性之相對值係根據變化之反應溫度來測量。於 60 °C 下，反應系統顯示最高之 TG 活性，將其定之為 100 之標準值。結果乃示於圖 3 中。

吾人發現，本發明 TG 所合適之溫度範圍由約 40 °C 至約 65 °C，更嚴格則由約 50 °C 至約 62 °C (參見圖 3)。

(實例 3) TG 之溫度安定性之測定

本發明之 TG 之溫度－依賴性安定性係根據下述方法測量。

令事先製備之純 TG 部分於浴中，於由 10 °C 至 80 °C 變化之溫度下反應 10 分鐘。其後，將每一系統中之 TG 活性以與實例 2 相同之方法測量。酵素活性之相對值係根據變化之反應溫度來測量。反應系統所示之最高 TG 活性乃定為 100 之標準值，結果乃示於圖 4 中。

(實例 4) 蛋白質與 TG 之交聯作用

本發明 TG 之蛋白質交聯活性係根據下述之方法測量。

先製備含有 1 毫克／毫升最終濃度之 α - 酪蛋白，0.1 莫耳濃度 Tris-HCl (pH 7.5)，5 毫莫耳濃度二硫蘇糖醇及 5 毫莫耳濃度疊氮化鈉之反應系統。

本文所用之 α - 酪蛋白為 Sigma 公司所製之商業產品

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

像

五、發明說明 (32)

，事先製備之純 T G 部分係以 4 4 0 微克 / 毫升之最終濃度加至此系統中。

令反應系統於浴中，於 3 7 °C 下反應 1 8 小時。再令所反應之系統接受 S D S - P A G E ，結果除了基質， α - 酪蛋白之電泳帶以外，亦於高級聚合物側得到另一個電泳帶。此意指 α - 酪蛋白之交聯聚合作用。結果乃示於圖 5 中。

這些結果証實了本發明之 T G 之蛋白質交聯活性（參見圖 5 ）。

當本發明之 T G 對牛血清白蛋白（B S A）反應時，亦獲得與上示相同之結果。亦即，基質蛋白質 B S A 亦被本發明 T G 所交聯。

（實例 5）各種不同試劑對 T G 活性之效應

吾人乃檢查各種不同試劑對 T G 活性之效應。本文所測試之試劑為 N - 乙基馬來醯亞胺（N E M），脘胺，苯基甲烷磺醯氯（P M S F），硫酸銨，硫酸鈉，E D T A，E G T A，氯化鈣，二硫蘇糖醇（D T T）及 2 - 巰基乙醇（2 - M E），所有試劑均來自 Nacalai Tesque 公司。

作為酵素來源之事先製備之純 T G 部分係以 2 微克 / 毫升之濃度使用，蛋白質濃度係使用蛋白質分析組套（由 B i o R a d 公司所製）測量。

欲測量 T G 活性，乃使用以 ^{14}C - 標記腐胺及二甲基

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

403785

五、發明說明 (33)

酪蛋白作為基質之上述方法（於 pH 7.5 及於 37 °C 下）。作為酵素來源之已事先製備之純 TG 部分係以 2 微克 / 毫升之濃度使用。反應則於 37 °C 下進行 30 分鐘。

TG 活性係以下列方法測量。將上述純 TG 部分與已調整至具有適當濃度之每一種試劑混合，而後令之於冰上置 30 分鐘。將與每一種試劑反應之酵素來源之溶液調整至具有 2 微克 / 毫升之 TG 濃度，繼而與基質反應，其後測量仍保留於所得溶液中之 TG 活性（於 pH 7.5 及於 37 °C 下）。

未與任一種試劑反應之 TG 部分之 TG 活性乃定為 100（作為對照組），已與每一種試劑反應之反應系統中所留下之 TG 活性係以佔對照組之相對值表示。結果乃示於下列表 1 中。

本發明 TG 之 TG 活性乃被 NEM 所抑制，然其不被 DTT 及 2-ME 還原劑所抑制，反而或多或少被彼等所增強。由這些結果可知半胱胺酸殘基參與 TG 活性表現之可能性。

本發明 TG 不被 DTT 所抑制，然而新墨西哥州大學群所報告之枯草芽孢桿菌衍生性 TG 已知會被 DTT 所抑制，亦即，這兩種 TG 具有明顯不同之性質。

此外，本發明 TG 不被硫酸鈉抑制，但被硫酸銨及胱胺所抑制。因此，明瞭本發明 TG 乃具有其活性於含有某些胺之反應系統中受抑制之特性。

而且，本發明之 TG 不被 EGTA 及 EDTA 之螯合

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

403785

五、發明說明 (34)

劑所抑制。有鑒於此性質，本發明 T G 乃異於新墨西哥大學群所報告者。換言之，應該說本發明 T G 不具有需要金屬離子諸如 Ca^{2+} 等之性質。含本發明 T G 之反應系統（於本文中用以測量 T G 活性）確實不含 Ca^{2+} ，且本發明之 T G 於這些不含 Ca^{2+} 之反應系統中能顯現 T G 活性。由此結果可推斷本發明之 T G 與 Ca^{2+} 無關。

此外，本發明之 T G 於不低於 5 毫莫耳濃度之 Ca^{2+} 之存在下仍保留不低於 50 % 之 T G 活性。故本發明之 T G 乃異於新墨西哥州大學群所報告之 T G，其中後者已知會被 5 毫莫耳濃度或更高濃度之 Ca^{2+} 所大幅抑制。

將衍生自枯草芽孢桿菌 A J 1 2 8 6 6 菌型之 T G 予以純化，再測定其性質。

將枯草芽孢桿菌 A J 1 2 8 6 6 之細胞於薛佛氏培養基中，於 37 °C 下藉搖動培養法保溫。再將 3 毫升培養物加至 30 毫升之另一個薛佛氏培養基中，而後更進一步於 37 °C 下保溫 12 小時。所用之薛佛氏培養基乃具有含 8 克 / 升 Bacto-營養肉湯，1 克 / 升氯化鉀，0.12 克 / 升硫酸鎂七水合物，1 毫莫耳濃度氯化鈣，10 微莫耳濃度氯化錳及 1 微莫耳濃度硫酸鐵之組成物且具有 7.0 之 pH。

將培養物以 10,000 x g 之速離心 20 分鐘以將沈澱物由上層液中分離出。

使用玻璃珠將沈澱物碾磨，再測量培養物上層液，培養沈澱物及碾磨沈澱液（細胞碎屑液）之 T G 活性。本文

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

403785

五、發明說明 (35)

所用之測量酵素活性之方法乃示於下，將含有 10 微升待測量酵素樣品之 50 微升反應系統（100 毫莫耳濃度 Tris-HCl，pH 7.5，6.3 毫克／毫升二甲基酪蛋白，10 毫微莫耳濃度 ^{14}C -腐胺，1.2 微居里）於 37℃ 下保持 30 分鐘因而令基質反應。反應後，將 40 微升反應混合物吸附於濾紙上。反應混合物中，腐胺乃由於其內之 TG 之催化而與二甲基酪蛋白反應。

繼而將鍵結之腐胺與二甲基酪蛋白之反應產物吸附於濾紙上。藉加入 10% 三氯乙酸以將鍵結之反應產物固定於濾紙上。而後將濾紙以 5% 三氯乙酸溶液清洗三次，固定至濾紙上之 ^{14}C 放射活性則使用液體閃爍計數器計數。所測量之值相當於酵素樣品之相對 TG 活性。所得結果乃示於下列表 2 中。

這些結果顯示，碾磨沈澱液樣品（其為含有細菌孢子之部分）具有比其它樣品高得多之 TG 活性。

（實例 7）誘生芽孢桿菌衍生性 TG 之階段之測定

將枯草芽孢桿菌 AJ 12866 菌型以與實例 6 相同之方法保溫，同時於既定之間隔時間測量所採樣之細胞碎屑懸浮液之 TG 活性。欲製備細胞碎屑懸浮液及測量 TG 活性，乃使用實例 1 乃實例 6 之方法。待保溫之枯草芽孢桿菌 AJ 12866 細胞之生長程度係以培養物之混濁度表示。欲測量培養物之混濁度，乃將具有 610 nm 波長之光線施至培養物上，再測量光線之吸光度，所得結果乃

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (36)

示於圖 6 中，如同由這些結果所知，培養物之 T G 活性在其內之細胞生長達到靜止相之階段且細胞開始形成其孢子之後開始增加（約開始保溫之約 4 小時後）。

(實例 8) 芽孢桿菌衍生性 T G 之純化

使用如同與實例 7 相同之方法保溫之細胞，以進行下列之實驗。

令枯草芽孢桿菌 A J 1 2 8 6 6 菌型之細胞懸浮於反應系統（0.5 毫克／毫升溶菌酶，20 微克／毫升 D N a s e I，0.1 莫耳濃度 T r i s - H C l (p H 7.5)，2 毫莫耳濃度 D T T，1 毫莫耳濃度 D T T，1 毫莫耳濃度 E D T A，2 毫莫耳濃度 P M S F）中，再於冰上反應 2 小時，因而使細胞溶解，而後將所得反應混合物以 20,000 x g 之速離心 20 分鐘，再令所得之沈澱物部分懸浮於清洗系統（0.1 莫耳濃度 T r i s - H C l (p H 7.5)，1 毫莫耳濃度 E D T A，2 毫莫耳濃度 P M S F）中。繼而將所得懸浮液離心，再收集沈澱物。此操作步驟乃重覆共兩次。

令所得懸浮液之部分懸浮於緩衝液（0.1 莫耳濃度碳酸鈉 (p H 10)，1 毫莫耳濃度 E D T A，2 毫莫耳濃度 P M S F）中，再令之於 37℃ 下置 30 分鐘。其間，有一部分在沈澱物部分中所存在之物質溶於緩衝液中，且 T G 活性乃轉移至可溶性部分中。繼而將之離心，所得上層液乃顯現 T G 活性，再藉將乙酸加入以將上層液之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發 403 明 835)

pH 調整至 6.0。此乃稱之為粗製酵素液。而後將粗製酵素液藉超濾法濃縮，再對緩衝液（50 毫莫耳濃度 Tris-HCl (pH 7.5)，0.1 毫莫耳濃度氯化鈉）進行滲析，因而變換緩衝液，令所得粗製酵素液接受凝膠滲透作用，再收集所洗提之 TG 活性部分，而後測量此部分之酵素活性。

結果乃顯現下列之事實，欲測量諸性質，乃使用實例 1 至 5 之方法。

- (1) 適合此 TG 之 pH 為約 7 至約 9 (參見圖 7)。
- (2) 適合此 TG 之溫度範圍為約 40℃ 至約 65℃，(參見圖 8)。
- (3) 有關其溫度安定性方面，TG 乃於約 60℃ 或更低之溫度下安定 (參見圖 9)。
- (4) TG 乃被胱胺，NEM 及硫酸銨所大幅抑制 (參見圖 10 及表 3)。
- (5) TG 活性不被 DTT 抑制，反而因 1 毫莫耳濃度 DTT 之存在而增加約 1.5 倍或更多 (參見圖 11)。
- (6) EDTA 幾乎不對 TG 活性產生影響 (參見圖 12)。
- (7) TG 活性不被 5 毫莫耳濃度或更高濃度之 Ca^{2+} 所抑制。TG 活性之表現確實不需要 Ca^{2+} 離子之存在。換言之，TG 與 Ca^{2+} 無關 (參見圖 13)。
- (8) TG 分子量為 (a) 由約 18,000 至約 22,000 (以凝膠滲透法所測) 及 (b) 由約 28,000 至約 30,000 (由 SDS-PAGE 所測)。

此外，吾人乃測量 TG 靠近其 N 端之胺基酸序列，亦

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(85)

即測量由其 N 端開始算起之 35 個殘基之胺基酸序列。結果顯示本文所得之 T G 與先前所得之枯草芽孢桿菌 A J 1307 衍生性 T G 具有高度相同性。精確地說，兩種 T G 之胺基酸序列僅於第 22 個胺基酸殘基處彼此相異，A J 1307 衍生性 T G 之第 22 個胺基酸殘基為門冬醯胺殘基，而 A J 12866 衍生性 T G 之第 22 個胺基酸殘基則為門冬胺酸殘基。

上述實驗之結果顯示，由枯草芽孢桿菌 A J 12866 所衍生之 T G 具有與上述枯草芽孢桿菌 A J 1307 衍生性 T G 相同之性質。

(實例 9) 蛋白質與本發明 T G 之凝膠化作用

將實例 8 凝膠滲透作用後所得之 T G 活性部分與 10 % 酪蛋白溶液 (25 毫莫耳濃度 T r i s - H C l (p H 7.5)，5 毫莫耳濃度 D T T) 以 1 : 9 之比率混合，再於 37 °C 下反應 24 小時。反應後，令溶液凝膠化。

將實例 1 所得純 T G 以 2 單位 / 克蛋白質之濃度加至 7 % 凝膠溶液中，再於 35 °C 下反應 2 小時。反應後，令凝膠蛋白質溶液凝膠化。

(實例 10) 芽孢桿菌衍生性 T G 基因之離析

(1) T G 之純化及其 N 端胺基酸序列之測定：

檢查依實例 1 所測定之芽孢桿菌衍生性 T G 之部分胺基酸序列 (其相當於序列表中之序列第 1 號) 是否與已知

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

像

五、發明說明 (39)

肽之任何胺基酸序列一致。然而，吾人發現前者與 GenBank(LASL-GDB), SWISS-PROT及 NBRF (PIR) 所登記之任何胺基酸序列並無相同性。

以通用密碼子為基準，將 T G 之胺基酸序列反轉譯，由此乃推論出編有胺基酸序列密碼之基元序列，而後檢查基元序列是否與已知核酸之任何基元序列具相同性。結果顯示，前者與 GenBank (L A S L - G D B) 所登記之一種基元序列存在有高度相同性。此處所發現之與本發明 T G 之基元序列具一致性之基元序列乃具有 L 2 9 1 8 . 9 之登記號碼，其來源為 D.W.Hanlon & G.W. Ordal, J. Biol.Chem. Vol. 2 6 9 . p p . 1 4 0 3 8 - 1 4 0 4 6 (1 9 9 4)。此參考資料自然地揭示編有枯草芽孢桿菌跨膜接受體密碼之基因之基元序列，此處所揭示之基元序列（且如今於本文發現與本發明 T G 之基元序列一致）乃位在上游之側翼區中。具體而言，吾人發現本發明 T G 之基元序列與所揭示之基元序列之從第 1 至第 6 8 個殘基一致。由 6 8 個基元對所組成之後者基元序列乃位在枯草芽孢桿菌 m c p B 基因之 5' - 上游位上，且其轉錄之方向與 m c p B 基因者相反。由 6 8 個基元對之序列所編碼之肽之功能並未述於 D.W.Hanlon & G.W. Ordal, 之 J. Biol.Chem. Vol. 2 6 9 . p p . 1 4 0 3 8 - 1 4 0 4 6 (1 9 9 4) 中。

本發明者認為，含 6 8 個基元對之序列可能為編有本發明芽孢桿菌衍生性 T G 密碼之基因之一部分，繼而離析

五、發明說明(40)

出全長之基因。

(2) 細胞之收集：

將枯草芽孢桿菌 A J 1 3 0 7 菌型之細胞於下述狀況下保溫。使用薛佛氏培養基，保溫作用均於 37℃ 下藉液體培養法進行。首先，將 A J 1 3 0 7 菌型之細胞於 20 毫升薛佛氏培養冊中保溫過夜以供種子培養。最後再將含有種子細胞之 5 毫升培養物於 100 毫升之另一個薛佛氏培養物中保溫。

(3) 染色體 DNA 由細胞中之離析：

待細胞於上述狀況下達到對數生長相之較後期後，將 100 毫升之培養物離心（以 12,000 x g 之速 15 分鐘），而後收集細胞。繼而令細胞懸浮於 10 毫升 50 : 20 TE（50 毫莫耳濃度 Tris - HCl，pH 8.0），20 毫莫耳濃度 EDTA）中，清洗及離心以再度收集細胞。而後再度令細胞懸浮於 10 毫升 50 : 20 TE 中。再將 0.5 毫升 20 毫克／毫升溶菌酶溶液及 1 毫升 10% SDS 溶液加至所得懸浮液中，並將細胞於其內，於 55℃ 下保溫 20 分鐘。保溫後，將與懸浮液相同量之 10 : 1 經 TE 飽和之酚加至懸浮液中，因而使懸浮液去蛋白。繼與水性層相同量之 2 - 丙醇加至所分離之水性層中，因而令 DNA 沈澱並予收集。再令所得 DNA 沈澱物溶於 0.5 毫升 50 : 20 TE 中，繼而將

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明 (41)

5 微升 10 毫克 / 毫升 R N a s e 及 5 微升 10 毫克 / 毫升蛋白酶 K 加入，再於 5.5 °C 下反應 2 小時。反應後，將與溶液相同量之 10 : 1 經 T E 飽和之酚加至溶液中，因而將蛋白質去蛋白。繼而將與水性層相同量之 24 : 1 氯仿 / 異戊醇加至所分離出之水性層中，並予攪拌，再收集水性層。此操作步驟乃重覆共兩次。將 3 莫耳濃度乙酸鈉溶液 (pH 5.2) 以 0.4 莫耳濃度之最終濃度及將兩倍於水性層量之乙醇加至所得之最終水性層中。而後收集沈澱之 DNA，以 70 % 乙醇清洗，乾燥，繼而令之溶於 1 毫升 10 : 1 T E 中。

(4) 藉聚合酶鏈鎖反應 (PCR) 以製備 DNA 斷片之方法

欲離析及擴增含有編有芽孢桿菌衍生性 T G 密碼之基因之 DNA 分子，乃使用 Takapa LA PCR 試管內選殖組套 (由 Takara Shuzo 公司所製)。除非下文另有指定，否則下列實驗係根據附於組套中之說明書所教示之方法進行。

將 5 微克先前方法 (3) 所製之染色體 DNA 以限制酶 H i n d I I I 消化。其後藉乙醇沈澱法收集 DNA 斷片，再將 H i n d I I I 盒連結入。繼而令其再度接受乙醇沈澱作用，再使用引子 C 1 及引子 S 1 令所收集之 DNA 接受第一次 PCR，所用之引子 C 1 之基元序列乃相當於序列表中之序列第 3 號，而引子 S 1 則相當於表中之序列第 4 號。引子 C 1 乃含於所用之 TakaRa LA PCR 試管內選殖組套中，其中之基元序列乃在 H i n d

五、發明說明(42)

I I I 盒之基元序列範圍內，引子 S 1 之基元序列乃與編有枯草芽孢桿菌跨膜接受體密碼之上述基因之基元序列中第 5 6 6 個鳥嘌呤核苷殘基至第 6 0 0 個腺嘌呤核苷殘基之區域成互補。

P C R 反應係於下述狀況下，使用 G e n e A m p P C R 系統 9 6 0 0 (由 Perkin Elmer 公司所製) 進行共 3 0 個循環。

一個 P C R 循環為：

9 8 °C，2 0 秒

6 8 °C，3 分

其後，將反應混合物稀釋成 1 / 1 0 0，再將引子 C 2 及引子 S 2 加入以供進行第 2 次 P C R，供第 2 次 P C R 所用之狀況乃與第 1 次 P C R 相同。引子 C 2 及引子 S 2 之基元序列分別相當於序列表中之序列第 5 號及序列第 6 號。引子 C 2 乃含於所用之 Takara LA PCR 試管內選殖組套中，其中之基元序列乃在 H i n d I I I 盒之基元序列範圍內。引子 S 2 之基元序列乃與編有枯草芽孢桿菌跨膜接受體密碼之上述基因之基元序列中之第 3 4 個胸腺嘧啶核苷至第 6 8 個胸腺嘧啶核苷之區域成互補。

反應後，令 3 微升反應混合物接受 0 . 8 % 瓊脂糖凝膠電泳，其証實約 2 k b (千對基元) 之 D N A 斷片已擴增。

五、發明說明 (4387.1.17補充)

(5) 由 p U C 1 8 選殖 P C R 擴增之 D N A 片段：

約 2 千 鹼 基 對 之 P C R 擴 增 所 得 的 D N A 片 段，係 藉 其 與 p U C 1 8 黏 接 而 予 以 選 殖。選 殖 作 用 係 使 用 S u r e 純 系 黏 接 組 套 (由 Pharmacia 所 製) 進 行。除 非 下 文 另 有 指 定，否 則 下 列 實 驗 係 根 據 附 於 組 套 上 之 說 明 書 中 所 教 示 之 方 法 進 行。將 4 0 0 毫 微 克 約 2 千 鹼 基 對 之 經 擴 增 的 D N A 片 段 加 以 修 飾，以 使 其 兩 端 均 變 鈍，繼 而 予 以 磷 酸 化。磷 酸 化 後，將 D N A 片 段 純 化，而 後 將 其 與 經 S m a I 消 化 之 p U C 1 8 黏 接。再 使 用 含 有 黏 接 D N A 片 段 之 反 應 液，將 大 腸 桿 菌 細 胞 以 該 D N A 轉 形。

由 這 些 轉 形 之 細 胞 中 藉 選 殖 方 法，篩 選 某 些 J M 1 0 9 轉 形 體 此 轉 形 體 係 以 含 約 2 K b D N A 片 段 之 p U C 1 8 有 計 劃 地 轉 形 而 得 者。選 殖 方 法，乃 使 用 Molecular Cloning 2nd E-dition Cold Spring Harbor Pross (1989) 中 所 述 之 方 法。

(6) T G 基 因 之 D N A 序 列 化：

將 質 體 (具 有 篩 選 之 轉 化 突 變 型) 根 據 Molecular Cloning 2nd Edition Cold Spring Harbor Pross (1989) 所 述 之 方 法 製 得，再 由 其 中 測 定 約 2 千 鹼 基 對 之 擴 增 D N A 片 段 之 鹼 基 序 列。序 列 化 係 使 用 終 子 循 環 序 列 組 套 (由 A B I 公 司 所 製) 並 根 據 附 於 組 套 上 之 說 明 書 中 所 教 示 之 方 法 進 行，電 泳 則 使 用 D N A 序 列 機 3 7 3 (

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (44)

由 A B I 公司所製) 進行。

序列化之結果顯示，P C R 擴增性 D N A 斷片乃具有序列表中序列第 2 號基元序列中由第 1 1 8 個腺嘌呤核苷殘基至第 1 0 4 2 個胸腺嘧啶核苷殘基之區域。序列第 2 號之基元序列中，由第 1 1 8 個腺嘌呤核苷殘基至第 8 5 2 個胞嘧啶核苷殘基之區域為開放式讀碼。編有多肽密碼之開放式讀碼之胺基酸序列可推測以通用密碼子為基準。所提及之胺基酸序列乃與序列第 2 號之基元序列共同示於下文中。

胺基酸序列中，由其 N 端開始至第 3 5 個胺基酸殘基之區域乃與先前方法 (1) 中含有 3 5 個胺基酸殘基之胺基酸序列完全相同。由此推論 P C R 擴增性 D N A 斷片為所欲之芽孢桿菌衍生性 T G 基因。

吾人可推論，序列第 2 號之基元序列與 D.W.Hanlon & G.W. Ordal 之 J. Biol.Chem. Vol. 2 6 9 . p p . 1 4 0 3 8 - 1 4 0 4 6 (1 9 9 4) 所揭示之基元序列間之差異乃在於彼等間所用之菌型之差異。

具有芽孢桿菌衍生性 T G 基因之質粒 (其係以使 p U C 1 8 衍生性 l a c 起動子作用於轉錄用基因上之方向插入) 乃稱之為 p B S T G 7 5 - 1 1 。

(實例 1 1) 芽孢桿菌衍生性 T G 由染色體 D N A 文庫中之選殖：

(1) 染色體 D N A 文庫之形成：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (45)

將 1 微克實例 1 0 所製染色體 D N A 以 H i n d I I I 完全消化。再將 D N A 藉乙醇沈澱法復收，而後溶於 1 0 微升 1 0 : 1 T E 中。繼而將 5 微升所得溶液與 1 毫微克已以 H i n d I I I 消化之 p U C 1 1 8 (由 Takara Shuzo 公司所製) 混合，再以 B A P 脫磷酸化，而後使用 D N A 黏接組套 V e r . 2 (由 Takara Shuzo 公司所製) 將 D N A 與 p U C 1 1 8 黏接。再將 1 0 0 微升大腸桿菌 J M 1 0 9 菌型之細胞 (由 Takara Shuzo 公司所製) 與 3 微升所黏接之反應混合物混合，繼而將大腸桿菌 J M 1 0 9 菌型之細胞以 D N A 轉化，再將轉化細胞塗覆於適當之固態培養基上以製得染色體 D N A 文庫。

(2) 探子之形成：

作為探子方面，乃使用實例 1 所得之全長 T G 基因。使用 p B S T G 7 5 - 1 1 作為模板，並使用引子 S 2 及引子 S 3 以令其進行 P C R。P C R 係使用 Takara LA PCR 組套 V e r 2 來進行。

先製備含有 1 0 毫微克模板，p B S T G 7 5 - 1 1，2 0 微微引子 S 2 及 2 0 微微莫耳引子 S 3 之 1 0 0 微升反應系統，再令之反應。引子 S 3 為一 3 5 聚體，彼乃與 T G 基因基元序列 (序列第 2 號) 第 8 1 8 個基元至第 8 5 2 個基元之區域成互補，且其基元相當於序列表之序列第 7 號。P C R 係於下列狀況下進行共 3 0 個循環：

9 4 °C，3 0 秒

(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)

5 5 °C , 3 0 秒

7 2 °C , 一分鐘

將藉上述反應所擴增之 DNA 斷片藉以 1 % 瓊脂糖凝膠 (Seaplaque GTG, 由 F M C 公司所製) 進行電泳予以分離。再將所欲之電泳帶切斷, 而後使用 Easy Prep 系統 (由 Pharmacia 公司所製) 及 PCR Products Prep 組套 (由 Pharmacia 公司所製) 將 DNA 由其中純化, 故最後可得 2 0 0 微升 DNA (4 毫微克 / 微升) 溶液。

將 DNA 斷片標記上 ^{32}P , 並用以作為探子。使用 Random 引子 DNA 標記組套 Ver. 2 (由 Takara Shuzo 公司所製), 並根據組套中所附說明書所教示之方法, 將探子標記上 [$\alpha - ^{32}\text{P}$] dCTP (3 0 0 0 居里 / 毫莫耳) (由 Amersham 公司所製)。

(3) 菌落雜交作用:

菌落雜交作用之一實例乃述於 Molecular Cloning 2nd Edition Cold Spring Harbor Pross (1 9 8 9) 中, 彼乃示於下。

將染色體 DNA 文庫之菌落轉移至耐綸濾膜 (Hybond-N, 由 Amersham 公司所製) 上, 而後以鹼變性, 中和並固定。雜交作用乃使用 Rapid-hyb 緩衝液 (由 Amersham 公司所製) 進行, 具體而言, 係將濾器滴至緩衝液中, 再令之於 6 5 °C 下接受預雜交作用 4 小時。其後, 將依先前方法

五、發明說明(47)

(2) 所製之標記探子加至緩衝液中，其中雜交作用乃於 65℃ 下進行 2 小時。繼而將濾器於室溫下以含 0.1% SDS 之 2×SSC 清洗 20 分鐘。再將其於 65℃ 下以含 0.1% SDS 之 0.1×SSC 清洗兩次達 15 分鐘。

此方法之結果証實有五個已與探子雜交之菌落產生。

(4) TG 基因之 DNA 序列化：

依與實例 5 相同之方法，以測定已插至 pUC18 中之 DNA 斷片之基元序列。此序列化之結果証實 DNA 具有序列表中序列第 2 號之基元序列。

(實例 12) 芽孢桿菌衍生性 TG 於大腸桿菌中之表現：

(1) 具有再組合 TG 基因之大腸桿菌細胞之保溫以及再組合 TG 基因於細胞中之表現及誘生：

依實例 10 方法所得之質粒 pBSTG75-11 乃具有編有芽孢桿菌衍生性 TG 密碼之 DNA 與編有 lacZ 蛋白質密碼之 DNA，前者 DNA 乃鍵結至後者 DNA 之下游位上。由其基元序列中，吾人乃推測質粒經設計成可表現具有含序列表中序列第 8 號胺基酸序列之肽之稠合蛋白質，序列 8 係由 11 個胺基酸殘基所組成，且已於 TG 序列之第一個蛋胺酸之前加至芽孢桿菌衍生性 TG 中。

此實驗中，乃使用以 pBSTG75-11 轉化之大

修正

年 月 日

五、發明說明 (48) 87.1.17 補充

腸桿菌 J M 1 0 9 測試細胞及以 p U C 1 8 轉化之大腸桿菌 J M 1 0 9 對照細胞。經轉形之細胞, p B S T G 7 5 - 1 1 (in. E. coli JM109) 寄存於食品工業發展研究所, 寄存日為 1 9 9 6 年 3 月 1 2 日, 寄存編號為 C C R C 9 4 0 1 1 3。測試細胞及對照細胞乃分別於含有 1 0 0 毫克/毫升安比西林之 L B 培養基中, 於 3 7 °C 下藉液態搖動培養法培養。具體而言, 乃將細胞植入 3 0 毫升培養基中, 再藉搖動培養法培養過夜。另一方面, 乃製備各含 3 0 毫升新鮮培養基之四個燒瓶。再將以 p B S T G 7 5 - 1 1 轉化之大腸桿菌 J M 1 0 9 測試細胞之種子培養物以 5 % 之細胞濃度植於兩個燒瓶內。兩個燒瓶稱為測試群 1 及測試群 2, 另一方面, 將以 p U C 1 8 轉化之大腸桿菌對照細胞之種子培養物以 5 % 之細胞濃度植入其它兩個燒瓶中。此二燒瓶稱為測試群 3 及測試群 4, 再將每一群之細胞培養。待 6 1 0 n m 下之吸光度變約 0.7 後, 將 I P T G 以 1 毫莫耳濃度之最終濃度僅加至測試群 1 及測試群 3 中。4 小時後, 令每一群細胞之培養作用終止。

(2) 經誘生及表現之蛋白質之確認

待培養終止後, 以顯微鏡觀察每一培養物內之細胞。結果顯示僅有已知入 I P T G 之以 p B S T G 7 5 - 1 1 轉化之細胞 J M 1 0 9 本身含有蛋白質包涵體。

待培養終止後, 將 1 0 毫升之各培養物以 1 2, 0 0 0 x g 之速離心 1 5 分鐘以收集細胞, 而後令細胞懸浮於 2 毫升 1 0 毫莫耳濃度 T r i s - H C l (p H 7.5) 中, 清洗並再度離心以收集細胞。繼而令細

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(49)

胞懸浮於1毫升相同培養物中，再藉使用迷你珠攪打器（由Wakenyaku公司所製）將所得懸浮液與0.1毫米氧化鋯珠共同搖動以將其弄碎。令弄碎之懸浮液接受S D S - P A G E，再以S B B染色。結果顯示測試群1之懸浮液（以p B S T G 7 5 - 1 1轉化且以I P T G誘生之J M 1 0 9細胞）可得約29,000至約30,000之電泳帶。吾人由所鑑定之分子量中推測測試1可表現期望之稠合蛋白質。

(3) T G 活性之確認：

表現蛋白質之T G 活性乃予測定。具體而言，乃將事先製備之含有碎細胞之懸浮液加至含有二甲基酪蛋白及¹⁴C - 標記腐胺之反應系統中，再予反應，反應後，將反應混合物吸至濾紙上，再使用液態閃爍計數器測量濾紙上二甲基酪蛋白所捕捉之腐胺量。結果則示於下列表4中。這些結果証實以p B S T G 7 5 - 1 1轉化及以I P T G誘生之J M 1 0 9細胞（測試群1）及顯現T G 活性。

以p B S T G 7 5 - 1 1轉化之大腸桿菌K M 1 0 9菌型乃稱之為大腸桿菌A J 1 3 1 7 2，其乃於1995年12月20日（以布達佩斯盟約為基礎）接受國際寄存於生物工程實驗室中，彼採用P E R M B P - 5 4 4 6之國際寄存號。

如今確認具有序列表中序列第2號之基元序列之D N A 係編有具T G 活性之酵素之密碼。意即，如今已知

裝

訂

線

五、發明說明(50)

此 DNA 具有芽孢桿菌衍生性 TG 基因。此外，亦確認當將編有不同肽密碼之其它 DNA 加至此 DNA 中時，所得之結合 DNA 可表現芽孢桿菌衍生性 TG 基因，且藉結合 DNA 所表現之稠合蛋白質乃具有 TG 活性，此外，已知稠合蛋白質可藉大腸桿菌之有計劃性轉化細胞以蛋白質包涵體形式予以細胞內表現，且蛋白質之表現可被適當之起動子所控制。

〔本發明之優點〕

根據本發明，吾人可由微生物（食品工業中可用之桿菌，諸如枯草芽孢桿菌）中得到迄今尚未知之新穎 TG。

本發明之新穎 TG 之優點為（1）其不需要鈣，異於任何其它動物衍生性 TG，因此其用途不受限且其可以低成本製得且（2）製造本發明 TG 之芽孢桿菌之生長速度較放線菌為快，因此芽孢桿菌衍生性 TG 可以低於放線菌衍生性 TG 之成本製得。

本發明之 TG 異於新墨西哥州大學群所報告之 TG 之點為（1）前者之活性不被 5 毫莫耳濃度或更高濃度之 Ca^{2+} 所抑制，（2）適合前者之 pH 範圍乃落在中性至弱鹼性間，（3）前者不被 DTT 所抑制，（4）前者不被螯合劑諸如 EDTA 等所抑制，且（5）前者僅於芽孢桿菌之產孢子階段產生。

既然本發明 TG 可用以製造交聯聚合物質，故其可應用在各種不同食品之工業製造上。

五、發明說明(51)

此外，既然本發明 T G 係由實際用於製造食品之芽孢桿菌中所衍生，故其於食品工業中具有高度之實用價值。

〔序列表〕

序列號：1

序列長度：35

序列型式：胺基酸

局部解剖學：線型

序列種類：肽

來源：

生物體名稱：枯草芽孢桿菌

菌型名稱：A J 1 3 0 7

序列：

Met Ile Ile Val Ser Gly Gln Leu Leu Arg Pro Gln Asp Ile Glu Asn

1

5

10

15

Trp Gln Ile Asp Gln Asn Leu Asn Pro Leu Leu Lys Glu Met Ile Glu

20

25

30

Thr Pro Val

35

序列號：2

序列長度：1042

序列型式：核酸

裝

訂

線

403785

A7
B7

五、發明說明(52)

鏈數：二(雙股)

局部解剖學：線型

序列種類：基因組DNA

來源：

生物體名稱：枯草芽孢桿菌

菌型名稱：AJ1307

序列：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

CTGCTTAAAA AGTTTTAAAA TAAAAATGG AAGAAGTTCT TTTTGGCAGT CTTCTGTCTT	60
TTTAGCTTTC ATTGCCCAAG CTCTTTGCAT ATCTTATATA AACAAGGGGG GCTAAAC	117
ATG ATT ATT GTA TCA GGA CAA TTG CTC CGT CCC CAG GAT ATT GAA AAT	165
Met Ile Ile Val Ser Gly Gln Leu Leu Arg Pro Gln Asp Ile Glu Asn	
1 5 10 15	
TGG CAG ATT GAT CAA AAT CTG AAT CCG CTG TTA AAA GAG ATG ATT GAG	213
Trp Gln Ile Asp Gln Asn Leu Asn Pro Leu Leu Lys Glu Met Ile Glu	
20 25 30	

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(53)

ACG CCT GTT CAG TTT GAT TAT CAT TCA ATT GCT GAA CTG ATG TTT GAG 261
 Thr Pro Val Gln Phe Asp Tyr His Ser Ile Ala Glu Leu Met Phe Glu
 35 40 45

CTT AAA CTG CGG ATG AAT ATT GTA GCA GCG GCA AAG ACG CTG CAC AAA 309
 Leu Lys Leu Arg Met Asn Ile Val Ala Ala Ala Lys Thr Leu His Lys
 ATT 50 55 60

AGC GGG GCG AAG TTT GCC ACT TTT TTA AAA ACA TAC GGG AAT ACA ACG 357
 Ser Gly Ala Lys Phe Ala Thr Phe Leu Lys Thr Tyr Gly Asn Thr Thr
 65 70 75 80

TAT TGG AGG GTT TCA CCG GAG GGC GCC TTG GAG CTG AAA TAC AGA ATG 405
 Tyr Trp Arg Val Ser Pro Glu Gly Ala Leu Glu Leu Lys Tyr Arg Met
 85 90 95

CCG CCT TCA AAA GCG ATT CGG GAC ATT GCA GAG AAC GGC CCG TTT TAT 453
 Pro Pro Ser Lys Ala Ile Arg Asp Ile Ala Glu Asn Gly Pro Phe Tyr
 100 105 110

GCG TTT GAA TGC GCA ACC GCA ATC GTT ATC ATT TAT TAC TTG GCC TTA 501
 Ala Phe Glu Cys Ala Thr Ala Ile Val Ile Ile Tyr Tyr Leu Ala Leu

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (54)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

115

120

125

ATC GAT ACA ATC GGT GAA GAT AAA TTC AAT GCC AGC TTT GAC AGA ATT

549

Ile Asp Thr Ile Gly Glu Asp Lys Phe Asn Ala Ser Phe Asp Arg Ile

130

135

140

ATT TTA TAT GAC TGG CAT TAT GAG AAA TTG CCG ATC TAT ACG GAA ACA

597

Ile Leu Tyr Asp Trp His Tyr Glu Lys Leu Pro Ile Tyr Thr Glu Thr

145

150

155

160

GGA CAC CAC TTT TTC CTT GGA GAT TGT TTG TAT TTT AAG AAT CCT GAA

645

Gly His His Phe Phe Leu Gly Asp Cys Leu Tyr Phe Lys Asn Pro Glu

165

170

175

TTT GAT CCG CAA AAG GCG CAA TGG AGA GGC GAA AAT GTG ATT TTA CTG

693

Phe Asp Pro Gln Lys Ala Gln Trp Arg Gly Glu Asn Val Ile Leu Leu

180

185

190

GGG GAA GAT AAA TAT TTT GCC CAT GGT CTT GGA ATC TTA AAC GGA AAG

741

Gly Glu Asp Lys Tyr Phe Ala His Gly Leu Gly Ile Leu Asn Gly Lys

195

200

205

403785

A7
B7

五、發明說明(56)

序列號：3

序列長度：35

序列型式：核酸

鏈數：一(單股)

局部解剖學：線型

序列種類：合成DNA

供PCR用之引子C1

序列：

GTACATATTG TCGTTAGAAC GCGTAATACG ACTCA(35)

序列號：4

序列長度：35

序列型式：核酸

鏈數：一(單股)

局部解剖學：線型

序列種類：合成DNA

供PCR用之引子S1

序列：

TGGCGCTTGT ACATAAGTGC CGTTATCTGC GCCCC(35)

序列號：5

序列長度：35

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

403785

A7
B7

五、發明說明 (57)

序列型式：核酸

鏈數：一（單股）

局部解剖學：線型

序列種類：合成 D N A

供 P C R 用之引子 C 2

序列：

CGTTAGAACG CGTAATACGA CTCACTATAG GGAGA(35)

序列號：6

序列長度：3 5

序列型式：核酸

鏈數：一（單股）

局部解剖學：線型

序列種類：合成 D N A

供 P C R 用之引子 S 2

序列：

ATGATTATTG TATCAGGACA ATTGCTCCGT CCCCCA(35)

序列號：7

序列長度：3 5

序列型式：核酸

鏈數：一（單股）

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明(8)

局部解剖學：線型

序列種類：合成DNA

供PCR用之引子S3

GCGGACGATG CGGAAAAGAG ACGGAACATC CAGTC(35)

序列號：8

序列長度：11

序列型式：胺基酸

鏈數：一(單股)

局部解剖學：線型

序列種類：肽

來源：

生物體名稱：大腸桿菌

序列：

Met(1) Thr Met Ile Thr(5) Asn Ser Ser Ser Val(10) Pro

〔附圖之簡要說明〕

〔圖1〕其顯示純TG-1之SDS-PAGE之結果。

〔圖2〕其顯示相關於TG-1活性之pH曲線。

〔圖3〕其顯示相關於TG-1活性之溫度曲線。

〔圖4〕其顯示TG-1之溫度安定性。

〔圖5〕其顯示與TG-1交聯之 α -酪蛋白。

〔圖6〕其顯示產TG細胞之生長與所製TG-2之活性

五、發明說明 (59)

之間之關聯。

[圖 7] 其顯示相關於 T G - 2 活性之 p H 曲線。

[圖 8] 其顯示相關於 T G - 2 活性之溫度曲線。

[圖 9] 其顯示 T G - 2 之溫度安定性。

[圖 10] 其顯示抑制劑對 T G - 2 之影響。

[圖 11] 其顯示 D T T 對 T G - 2 之影響。

[圖 12] 其顯示 E D T A 對 T G - 2 之影響。

[圖 13] 其顯示 Ca^{2+} 離子對 T G - 2 之影響。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (60)

〔表 1 〕

每一製劑對 T G 活性之效應

製劑	濃度	餘留活性(相對位)
-	-	10
NEVM	1毫莫耳濃度	17
胱胺	2毫莫耳濃度	0
PMSF	5毫莫耳濃度	89
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10毫莫耳濃度	1
Na_2SO_4	10毫莫耳濃度	87
EDTA	10毫莫耳濃度	107
EGTA	10毫莫耳濃度	98
CaCl_2	5毫莫耳濃度	65
DTT	10毫莫耳濃度	119
2-ME	10毫莫耳濃度	111

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(61)

〔表 2〕

相對活性	
培養物上層液	280
培養沈澱物	510
碾磨之沈澱液	10200

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (62)

〔表 3 〕

每一製劑對 T G 活性之效應

製劑	濃度	餘留活性(相對值)
-	-	100
PMSF	5毫莫耳濃度	95
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10毫莫耳濃度	3
Na_2SO_4	10毫莫耳濃度	85
EGTA	10毫莫耳濃度	94
2-ME	10毫莫耳濃度	122

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (63)

表 4

每一轉化突變性之 T G 活性

質粒	以 IPTG 誘生	TG 活性 (dpm)
pBSTG75-11 測試群 1	+	496
pBSTG75-11 測試群 2	-	0
pUC18 測試群 3	+	0
pUC18 測試群 4	-	0

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

四、中文發明摘要(發明之名稱：

芽孢桿菌衍生之穀胺醯胺酶)

本發明係關於小由諸如枯草芽孢桿菌之類的芽孢桿菌分離而得的轉穀胺醯胺酶(文中以TG表示)，(2)具有轉穀胺醯胺酶活性之流份，及(3)製造蛋白質非蛋白質成份之胺基酸聚合物，且交聯結構之肽或其衍生物的方法，其係將穀胺醯胺及離胺酸殘基與TG或具有TG活性之流份交聯，藉此形成分子間或分子內交聯之 ϵ -(γ -Glu)-Lys鍵。

本發明亦關於(4)編碼TG的DNA，該TG係衍自諸如枯草芽孢桿菌之類之芽孢桿菌，(5)含有編碼該TG之DNA的載體，(6)經該載體轉形之細胞，及(7)製造由芽孢桿菌衍生之轉穀胺醯胺酶的方法，其係藉由培養該轉形體。

使用本發明之由芽孢桿菌衍生之TG所製造的經交聯聚合物，可用於食品，例如豆腐(黃豆豆腐)、布丁、優格、乳酪、魚漿、魚鬆，醬油及其它魚與肉製品，以及化粧品等。

英文發明摘要(發明之名稱：Bacillus-derived transglutaminase)

ABSTRACT OF THE DISCLOSURE

The present invention relates to (1) a transglutaminase (hereinafter referred to as TG) isolated from a Bacilli such as those of *Bacillus subtilis*, (2) a fraction having transglutaminase activity, and (3) a method for producing a protein, a non-proteinaceous amino acid polymer, a peptide or derivatives thereof having a crosslinked structure, by crosslinking the glutamine and lysine residues in the same with the TG or the fraction having TG activity to thereby form intermolecular or intramolecular, crosslinked ϵ -(γ -Glu)-Lys bonds.

The present invention also relates to (4) a DNA coding for a TG derived from a Bacilli such as *Bacillus subtilis*, (5) a vector comprising said DNA coding for said TG, (6) a cell transformed with the vector, and (7) a method for producing a Bacillus-derived transglutaminase by incubating the transformant.

The crosslinked polymers produced using the Bacillus-derived TG of the present invention can be used in foods such as tofu (soybean curd), pudding, yogurt, cheese, ground fish meat, boiled fish paste, sausage and other fish

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

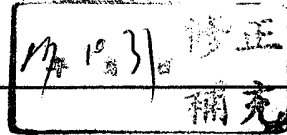
裝

訂

線

403785

A8
B8
C8
D8



六、申請專利範圍

附件一 A:

公 告 本

第 85102984 號 專 利 申 請 案

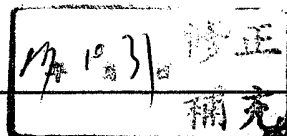
中 文 申 請 專 利 範 圍 修 正 本

民 國 87 年 10 月 修

1. 一種芽孢桿菌衍生之轉穀胺醯胺酶，其特徵為：
 - 1) 其所合適之 pH 乃落在約 7 至約 9 之間，
 - 2) 其所合適之溫度乃落在約 40 °C 至約 65 °C 之間，
 - 3) 其於 60 °C 或更低之溫度下安定，
 - 4) 其與 Ca^{2+} 無關，且其於 5 毫莫耳濃度 Ca^{2+} 之存在下具有 50 % 或更高之活性，
 - 5) 其被任何 NEM，脘胺及硫酸銨所抑制，
 - 6) 其不被任何 EDTA，DTT 及 2-ME 所抑制，
 - 7) 其分子量為 (a) 由約 18,000 至約 22,000 (以凝膠滲透法所測) 及 (b) 由約 28,000 至約 30,000 (由 SDS-PAGE 所測)，
 - 8) 其催化肽鏈中所存在之穀醯胺殘基中之 γ -羧基醯胺基因之轉醯作用，及
 - 9) 其具有如下序列編號 1 所示之胺基酸序列：
- 序列編號 1：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂



六、申請專利範圍

附件一 A:

公 告 本

第 85102984 號 專 利 申 請 案

中 文 申 請 專 利 範 圍 修 正 本

民 國 87 年 10 月 修

1. 一種芽孢桿菌衍生之轉穀胺醯胺酶，其特徵為：
 - 1) 其所合適之 pH 乃落在約 7 至約 9 之間，
 - 2) 其所合適之溫度乃落在約 40 °C 至約 65 °C 之間，
 - 3) 其於 60 °C 或更低之溫度下安定，
 - 4) 其與 Ca^{2+} 無關，且其於 5 毫莫耳濃度 Ca^{2+} 之存在下具有 50 % 或更高之活性，
 - 5) 其被任何 NEM，脘胺及硫酸銨所抑制，
 - 6) 其不被任何 EDTA，DTT 及 2-ME 所抑制，
 - 7) 其分子量為 (a) 由約 18,000 至約 22,000 (以凝膠滲透法所測) 及 (b) 由約 28,000 至約 30,000 (由 SDS-PAGE 所測)，
 - 8) 其催化肽鏈中所存在之穀醯胺殘基中之 γ -羧基醯胺基因之轉醯作用，及
 - 9) 其具有如下序列編號 1 所示之胺基酸序列：
- 序列編號 1：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

Met Ile Ile Val Ser Gly Gln Leu Leu Arg Pro Gln Asp Ile Glu Asn
1 5 10 15

Trp Gln Ile Asp Gln Asn Leu Asn Pro Leu Leu Lys Glu Met Ile Glu
20 25 30

Thr Pro Val
35

3. 一種製造具有交聯結構之蛋白質、非蛋白質性胺基酸聚合物、肽或其衍生物之方法，其係在 pH 為 4 至 10，溫度為 5 至 80 °C 之條件下，將蛋白質、非蛋白質性胺基酸聚合物、肽或其衍生物中之穀醯胺及賴胺酸殘基藉由申請專利範圍第 1 項之轉穀胺醯胺酶之作用予以交聯，藉此在蛋白質、非蛋白質性胺基酸聚合物、肽或其衍生物之分子間及分子內形成分子間及分子內交聯之 ϵ - (γ - G l u) - L y s 鍵。

其具有如下序列編號 2 所示之核苷酸序列：

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

CTGCTTAAAA AGTTTTAAAA TAAAAAATGG AAGAAGTTCT TTTTGGCAGT CTTCTGTCTT	60
TTTAGCTTTC ATTGCCCAAG CTCTTTGCAT ATCTTATATA AACCAAGGGGG GCTAAAC	117
ATG ATT ATT GTA TCA GGA CAA TTG CTC CGT CCC CAG GAT ATT GAA AAT	165
Met Ile Ile Val Ser Gly Gln Leu Leu Arg Pro Gln Asp Ile Glu Asn	
1 5 10 15	
TGG CAG ATT GAT CAA AAT CTG AAT CCG CTG TTA AAA GAG ATG ATT GAG	213
Trp Gln Ile Asp Gln Asn Leu Asn Pro Leu Leu Lys Glu Met Ile Glu	
20 25 30	
ACG CCT GTT CAG TTT GAT TAT CAT TCA ATT GCT GAA CTG ATG TTT GAG	261
Thr Pro Val Gln Phe Asp Tyr His Ser Ile Ala Glu Leu Met Phe Glu	
35 40 45	
CTT AAA CTG CGG ATG AAT ATT GTA GCA GCG GCA AAG ACG CTG CAC AAA	309
Leu Lys Leu Arg Met Asn Ile Val Ala Ala Ala Lys Thr Leu His Lys	
50 55 60	
AGC GGG GCG AAG TTT GCC ACT TTT TTA AAA ACA TAC GGG AAT ACA ACG	357
Ser Gly Ala Lys Phe Ala Thr Phe Leu Lys Thr Tyr Gly Asn Thr Thr	
65 70 75 80	
TAT TGG AGG GTT TCA CCG GAG GGC GCC TTG GAG CTG AAA TAC AGA ATG	405
Tyr Trp Arg Val Ser Pro Glu Gly Ala Leu Glu Leu Lys Tyr Arg Met	
85 90 95	

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

403785

A8
B8
C8
D8

六、申請專利範圍

CCG CCT TCA AAA GCG ATT CGG GAC ATT GCA GAG AAC GGC CCG TTT TAT	453
Pro Pro Ser Lys Ala Ile Arg Asp Ile Ala Glu Asn Gly Pro Phe Tyr	
100 105 110	
GCG TTT GAA TGC GCA ACC GCA ATC GTT ATC ATT TAT TAC TTG GCC TTA	501
Ala Phe Glu Cys Ala Thr Ala Ile Val Ile Ile Tyr Tyr Leu Ala Leu	
115 120 125	
ATC GAT ACA ATC GGT GAA GAT AAA TTC AAT GCC AGC TTT GAC AGA ATT	549
Ile Asp Thr Ile Gly Glu Asp Lys Phe Asn Ala Ser Phe Asp Arg Ile	
130 135 140	
ATT TTA TAT GAC TGG CAT TAT GAG AAA TTG CCG ATC TAT ACG GAA ACA	597
Ile Leu Tyr Asp Trp His Tyr Glu Lys Leu Pro Ile Tyr Thr Glu Thr	
145 150 155 160	
GGA CAC CAC TTT TTC CTT GGA GAT TGT TTG TAT TTT AAG AAT CCT GAA	645
Gly His His Phe Phe Leu Gly Asp Cys Leu Tyr Phe Lys Asn Pro Glu	
165 170 175	
TTT GAT CCG CAA AAG GCG CAA TGG AGA GGC GAA AAT GTG ATT TTA CTG	693
Phe Asp Pro Gln Lys Ala Gln Trp Arg Gly Glu Asn Val Ile Leu Leu	
180 185 190	
GGG GAA GAT AAA TAT TTT GCC CAT GGT CTT GGA ATC TTA AAC GGA AAG	741
Gly Glu Asp Lys Tyr Phe Ala His Gly Leu Gly Ile Leu Asn Gly Lys	
195 200 205	

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

CAA ATT ATA GAT AAG CTG AAT TCT TTT AGG AAA AAA GGA GCC TTA CAG 789
 Gln Ile Ile Asp Lys Leu Asn Ser Phe Arg Lys Lys Gly Ala Leu Gln
 210 215 220

TCA GCC TAC CTT CTG TCT CAG GCG ACC AGA CTG GAT GTT CCG TCT CTT 837
 Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Gln Ala Thr Arg Leu Asp Val Pro Ser Leu
 225 230 235 240

TTC CGC ATC GTC CGC TAAAAGCCC CATCGCCTAT TTTCGGGACG ATGGGGTTTC 892
 Phe Arg Ile Val Arg
 245

AAATGCCTTT CGTTTTTCGAT AGAAGGGGGC TGTGCCGAAA TATTGGTTTCG CAGCCCACTC 952

CATTTTTTCA AGGTCATTTT TTGTCACGAT TGGATCCTGG CTGCTCCATT TGATAAAGCG 1012

GACAAAATAG TAGCCTTTGA TAGGAACCAT 1042

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

5. 如申請專利範圍第4項之DNA，其具有序列編號2所示之至少由第118個鹼基至第852個鹼基之序列。

6. 一種芽孢桿菌衍生之轉穀胺醯胺酶的製法，其係於培養基中培養pBSTG75-11 (in·E·coli JM109)，其寄存編號為CCRC940113，藉此於培養基及／或細胞中製造及累積芽孢桿菌衍生之轉穀胺醯胺酶，藉由選自沈澱法、過濾法及管柱層析法之方法純化該轉穀胺醯胺酶，繼而收集轉穀胺醯胺酶。

7. 一種由申請專利範圍第6項的方法所製得之芽孢桿菌衍生之轉穀胺醯胺酶。

訂

403785

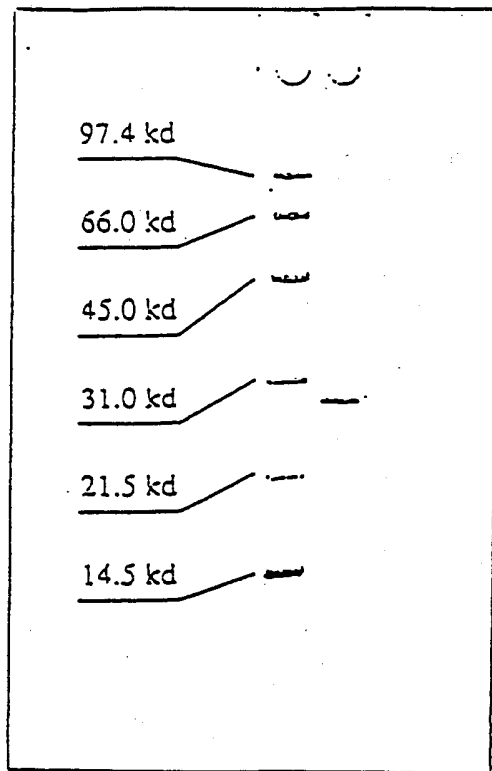
附件三：

第85102984號專利申請案

中文圖式修正本

民國87年1月呈

修正
年 月 日
87. 1. 17 補充



1 2

1 : 分子量標記

2 : 純化之轉穀胺醯胺酶

圖 1

403785

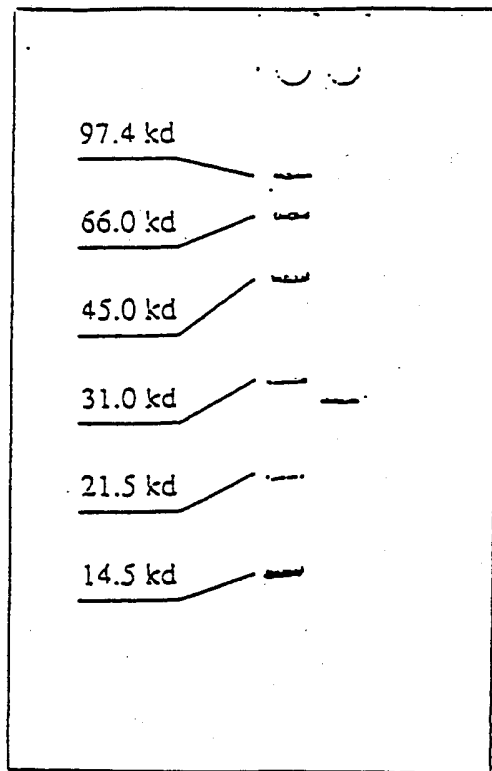
附件三：

第85102984號專利申請案

中文圖式修正本

民國87年1月呈

修正
年 月 日
87. 1. 17 補充



1 2

1 : 分子量標記

2 : 純化之轉穀胺醯胺酶

圖 1

403785

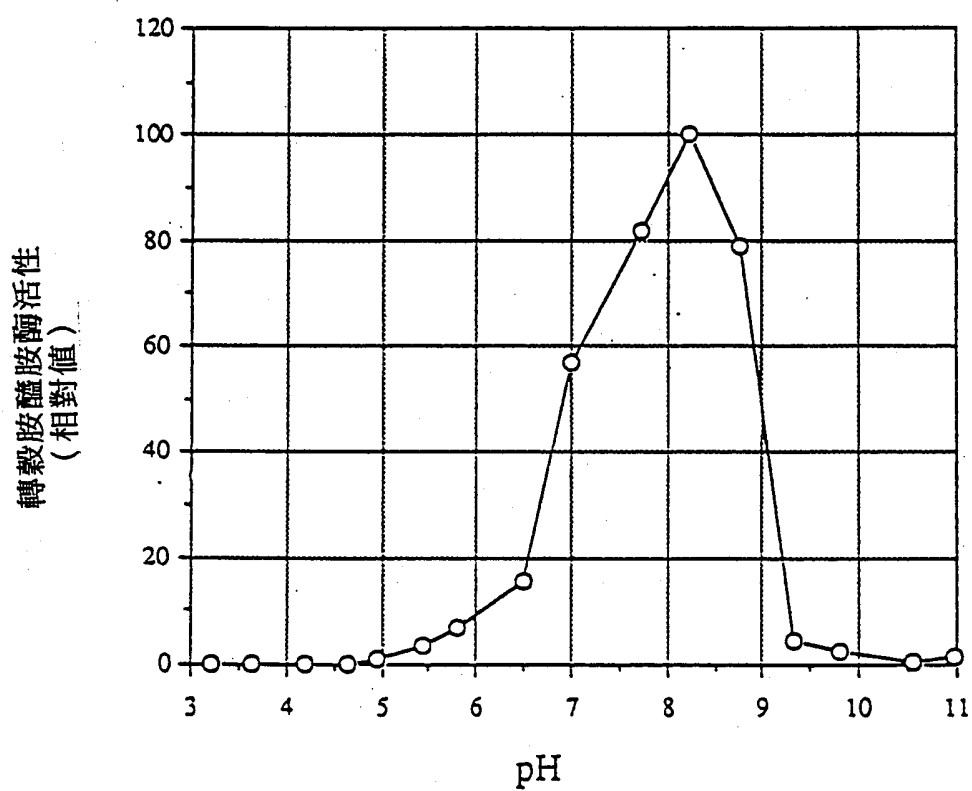


圖 2

403785

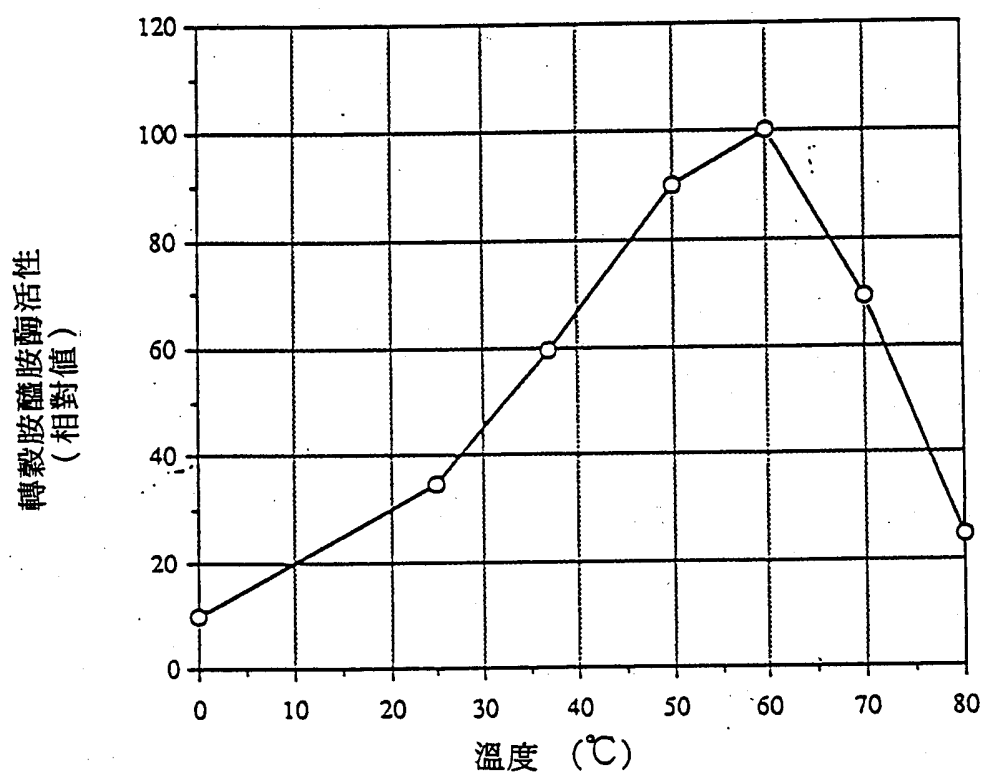


圖 3

403785

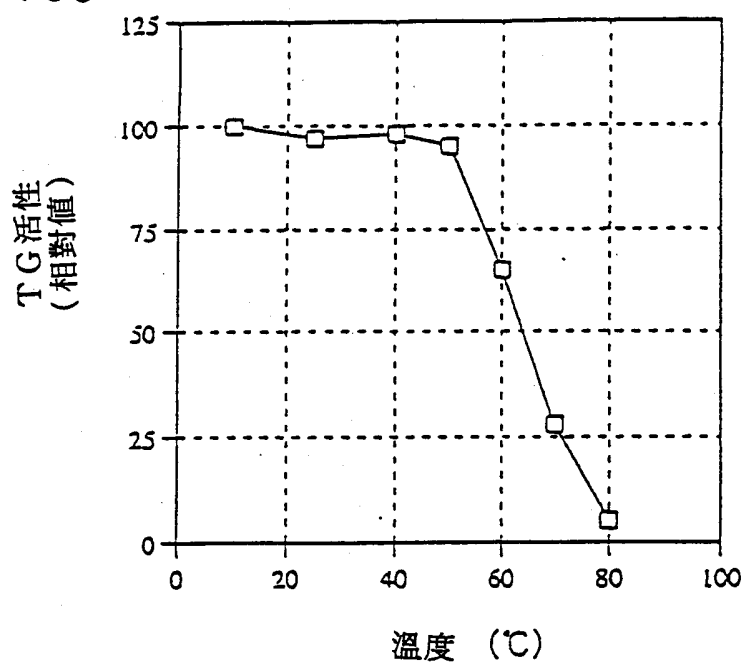
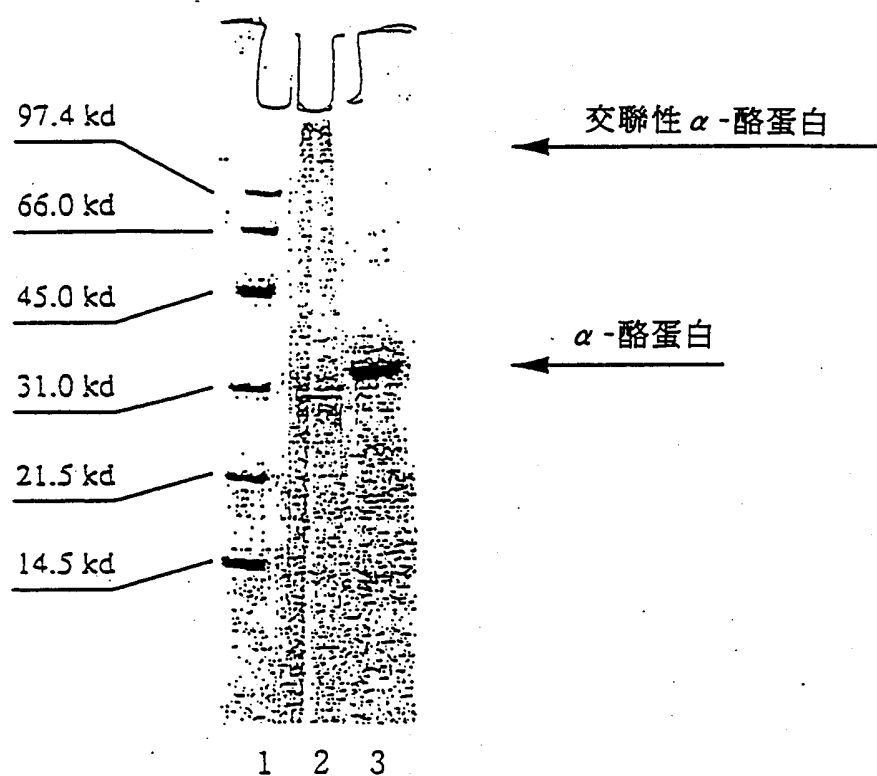


圖 4



1 : 分子量標記

2 : 轉穀胺醯胺酶與 α -酪蛋白之反應混合物

3 : α -酪蛋白 W/O TG 之反應混合物

圖 5

403785

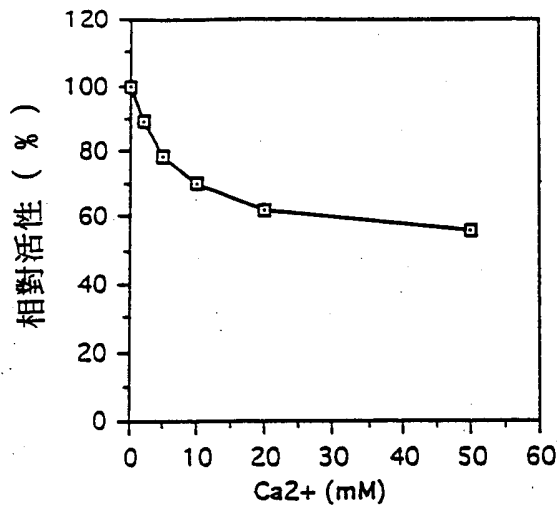


圖 13

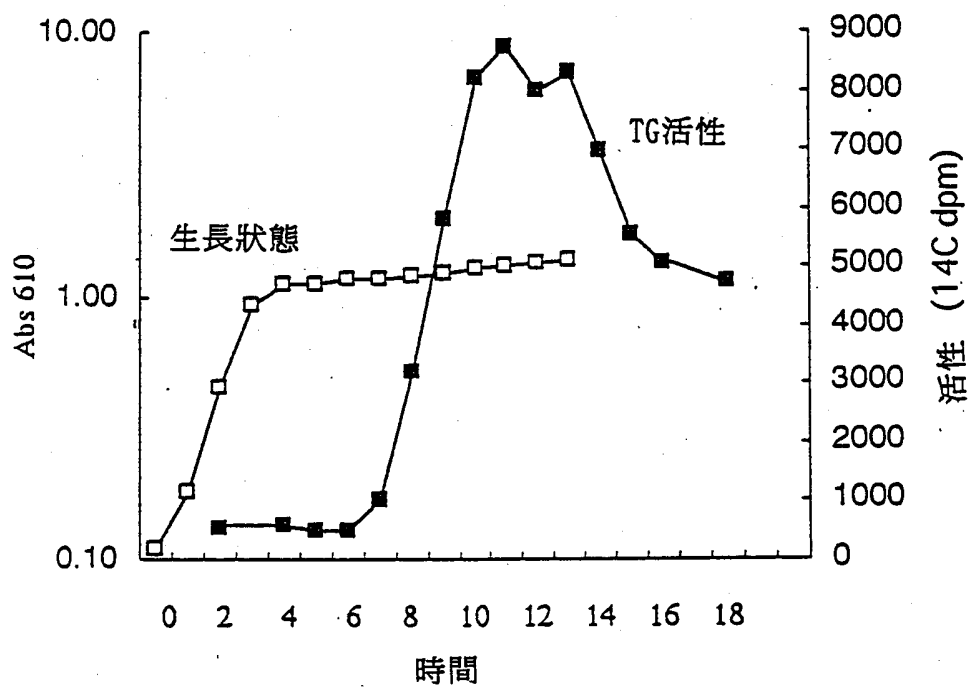


圖 6

403785

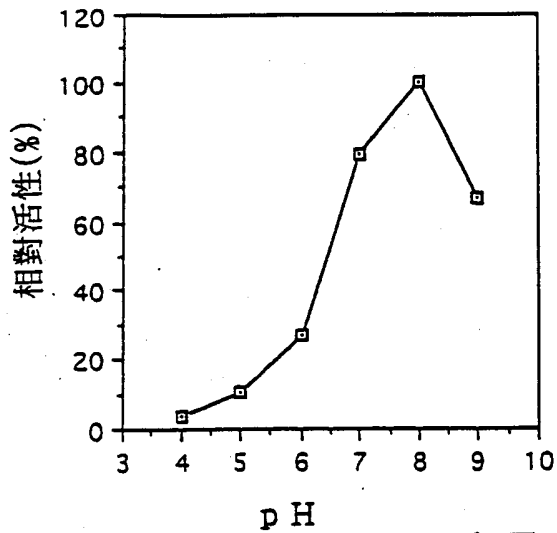


圖 7

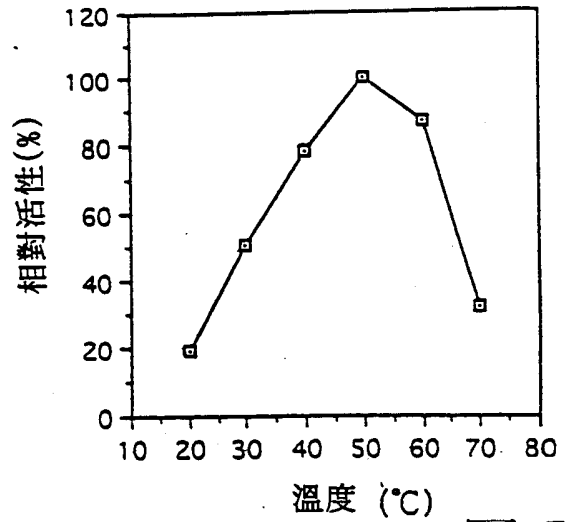


圖 8

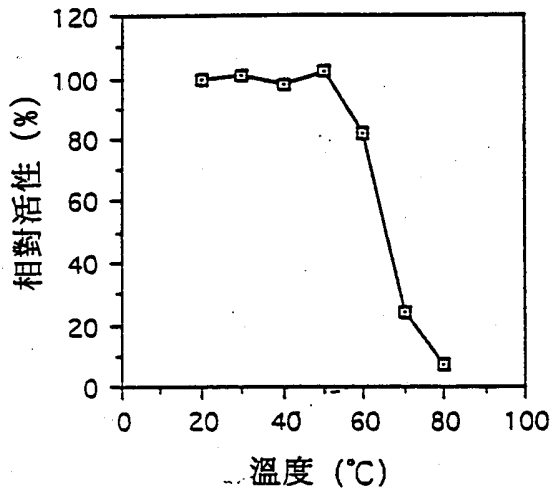


圖 9

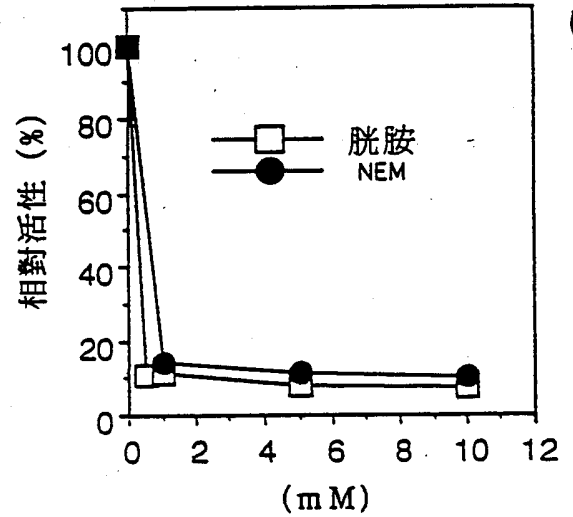


圖 10

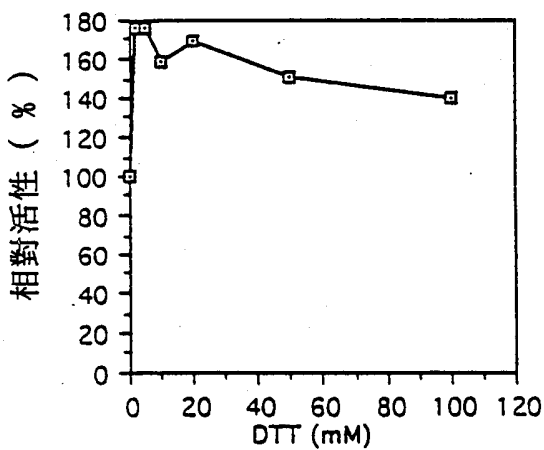


圖 11

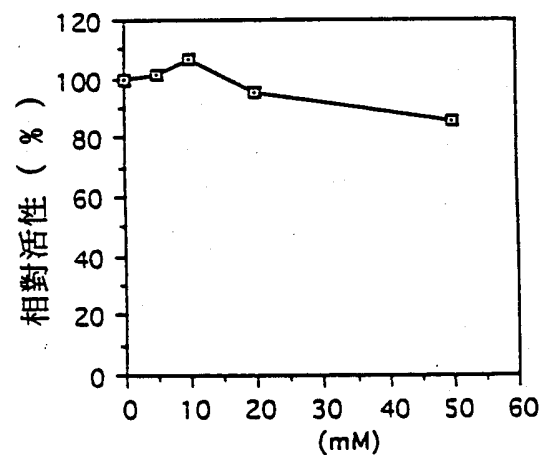


圖 12