



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I593967 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：103115717

(22)申請日：中華民國 103 (2014) 年 05 月 01 日

(51)Int. Cl. : G01N33/566 (2006.01)

(71)申請人：高雄醫學大學(中華民國) KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY (TW)

高雄市三民區十全一路 100 號

(72)發明人：羅傳倫 ROFFLER, STEVEN R. (US)；鄭添祿 CHENG, TIAN LU (TW)；林文瑋
LIN, WEN WEI (TW)；陳怡如 CHEN, I JU (TW)

(74)代理人：林文杰

(56)參考文獻：

TW 200906849A1

TW 201326204A1

TW 201335366A1

US 2005/0064395A1

Protein Marker for Fluorescent Western Blotting, GenScript product
information, Cat. No. M00124, Version:07/29/2008.

審查人員：蔡付樺

申請專利範圍項數：14 項 圖式數：5 共 59 頁

(54)名稱

二級抗體所辨識之抗原決定位及其用途

SECONDARY ANTIBODY DETECTED EPITOPE AND USE THEREOF

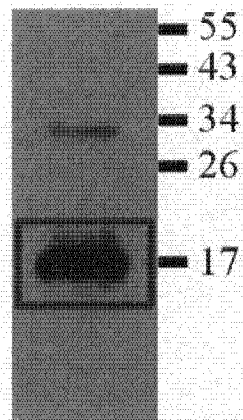
(57)摘要

本發明係關於一種抗原決定位用於製備二級抗體所辨識之蛋白質標籤之用途，其中該抗原決定位係選自一該二級抗體所辨識之一級抗體上一 Fc 區。本發明亦關於一種蛋白質標記用於建構一蛋白質標記階梯(protein marker ladder)的用途，其中該蛋白質標記為二級抗體所辨識之重組蛋白質，該重組蛋白質包含一抗原決定位之胺基酸序列。本發明進一步關於一種二級抗體所辨識之蛋白質標籤，其包含兩種二級抗體所辨識之一級抗體的抗原決定位。

The present invention is related to a use of an epitope for preparing a secondary antibody detected protein tag, wherein the epitope is selected from a Fc area of a primary antibody which is detected by the secondary antibody. The present invention is also related to a use of a protein tag for constructing a protein marker ladder, wherein the protein tag is a secondary antibody detected recombinant protein, and the recombinant protein comprises an amino sequence of an epitope. The present invention is related to a secondary antibody detected protein tag, wherein the protein tag comprises two epitopes from two kinds of primary antibodies which are detected by secondary antibody.

指定代表圖：

(A)

pRSETB-
M2R2 (kDa)

(B)

pRSETB-
M2R2 (kDa)

圖 2

(C)

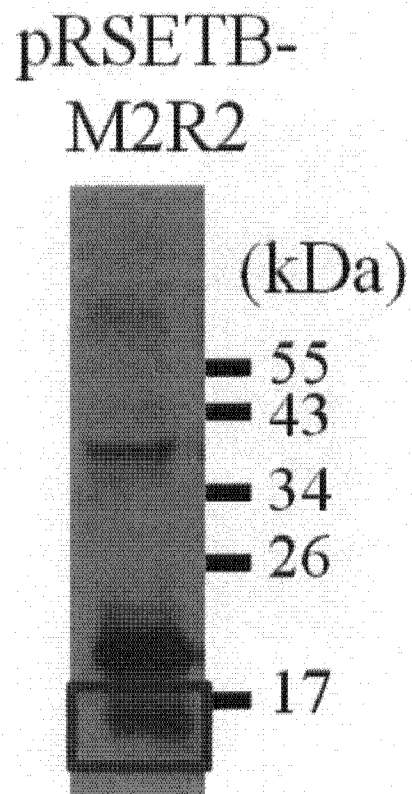


圖 2

公告本

發明摘要

※ 申請案號：103115717

※ 申請日：103. 5. 01

※IPC 分類：G01N33/566 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

二級抗體所辨識之抗原決定位及其用途/SECONDARY ANTIBODY

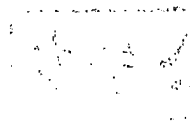
DETECTED EPITOPE AND USE THEREOF

【中文】

本發明係關於一種抗原決定位用於製備二級抗體所辨識之蛋白質標籤之用途，其中該抗原決定位係選自一該二級抗體所辨識之一級抗體上一 Fc 區。本發明亦關於一種蛋白質標記用於建構一蛋白質標記階梯（protein marker ladder）的用途，其中該蛋白質標記為二級抗體所辨識之重組蛋白質，該重組蛋白質包含一抗原決定位之胺基酸序列。本發明進一步關於一種二級抗體所辨識之蛋白質標籤，其包含兩種二級抗體所辨識之一級抗體的抗原決定位。

【英文】

The present invention is related to a use of an epitope for preparing a secondary antibody detected protein tag, wherein the epitope is selected from a Fc area of a primary antibody which is detected by the secondary antibody. The present invention is also related to a use of a protein tag for constructing a protein marker ladder, wherein the protein tag is a secondary antibody detected recombinant protein, and the recombinant protein comprises an amino sequence



of an epitope. The present invention is related to a secondary antibody detected protein tag, wherein the protein tag comprises two epitopes from two kinds of primary antibodies which are detected by secondary antibody.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 2 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

二級抗體所辨識之抗原決定位及其用途/SECONDARY ANTIBODY
DETECTED EPITOPE AND USE THEREOF

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種抗原決定位用於製備二級抗體所辨識之蛋白質標籤之用途，其特徵在於該抗原決定位係選自一該二級抗體所辨識之一級抗體上一 Fc 區。

【先前技術】

【0002】 隨著後基因體時代的來臨，蛋白質標記在蛋白質體的研究占有重要的角色。目前市面上有下列不同種類的蛋白質標籤及其於西方點墨法 (western blotting) 之蛋白質標記 (Protein marker) 之應用：

【0003】 (1) 預染標記 (Pre-stain markers)：像是多重顏色蛋白質標記 (multicolored protein marker)，強調的是有多樣色彩的蛋白質標記，可以使觀測時清楚明瞭，但其缺點在於經由染劑預染 (pre-stain) 的蛋白分子量標記會因電性改變而無法呈現出準確的分子量大小；

【0004】 (2) 無染劑蛋白質標記 (Dye-free protein marker)：先前文獻揭示綠色螢光蛋白質 (green fluorescent protein, GFP) 及其他蛋白質之融合蛋白，構築無染劑蛋白質分子量標記，使蛋白質標記在受激發後能自動呈現出蛋白質分子量大小。此類蛋白質標記雖然方便，但因為不能加熱 (因為綠色螢光蛋白質加熱會使其螢光失效) 而無法呈現出準確的分子量

位置；

【0005】（3）生物素修飾之蛋白質標記（Biotinylated protein marker）：此種標記雖然不含染劑，但該標記需要另外標定生物素（biotin），偵測時亦需要額外以標定辣根過氧化酶之抗生物素抗體（HRP-conjugated anti-biotin antibody）或標定辣根過氧化酶之卵白素（HRP-conjugated avidin），進行後續呈色步驟，相當不便。此外，生物素標定亦可能影響了其帶電性，造成蛋白質分子量標記不準確性的情形發生；

● 【0006】（4）HIS 標籤（HIS tag）、S 標籤之蛋白質標記：此產品雖可使該標記於實驗過程中自動呈現於底片上，但其通用性不高，因為只有當使用者是使用抗 HIS 標籤或抗 S 標籤抗體偵測其蛋白質表現時才能使該標記呈色，否則亦需額外標定辣根過氧化酶之抗 HIS 標籤或抗 S 標籤抗體才能呈色，使用亦造成不便；及

● 【0007】（5）蛋白質 A 融合校正蛋白質（Protein A fusion calibration proteins）及 EasySee Western marker：此類蛋白質標記含有能結合免疫球蛋白 G（IgG）抗體的蛋白質 A 或蛋白質 G，使二級抗體能於反應過程中，將蛋白質標記主動呈色於底片上，但由於蛋白質 A 或蛋白質 G 的蛋白結構對其結合抗體的能力相當重要，因此這類產品同樣面臨不能加熱的問題，使該蛋白質標記無法呈現出準確的分子量大小。

【0008】總結來說，現今蛋白質標記仍有諸多限制與不便有待解決，如不方便性、不可加熱、不準確性及不具廣泛應用性。故基於以上缺點，開發出一種可加熱、可被二級抗體辨識且可自動呈色於底片之蛋白質標記，將可提昇研究人員於蛋白質體研究上的準確度及方便性。

【發明內容】

【0009】 本發明利用市面上最廣泛使用的兩種二級抗體（Goat anti-mouse 及 Goat anti-rabbit）所辨認的老鼠及兔子的抗體上 Fc 區（Fragment crystallizable region，Fc；可結晶區域片段）之線性抗原決定位（linear epitopes）作為蛋白質分子量標籤（含有老鼠抗體及兔子抗體之線性抗原決定位的蛋白質標籤之多肽），以方便使用者在使用二級抗體偵測標的蛋白質的同時，將含有老鼠抗體及兔子抗體的線性抗原決定位標籤之多肽即時自動呈現於底片上，故本發明能讓使用者在蛋白質研究上更加準確、方便。且本發明進一步利用在此多肽後依序接上不同分子量大小的蛋白質片段，以形成具有分子量規則之含老鼠抗體及兔子抗體之線性抗原決定位的融合標籤之重組蛋白質標記。

【0010】 因此蛋白質標記（Protein marker）若能在西方點墨法（Western blotting）中直接被目前市面上最廣泛使用的任何抗老鼠/兔子之二級抗體辨識且自動呈色於底片上，將能讓使用者更有效率、方便且準確的進行實驗。故本發明開發了一種含有老鼠抗體及兔子抗體之線性抗原決定位的融合標籤，該融合標籤能被抗老鼠/兔子之二級抗體辨識且自動呈色於底片上。本發明利用結構模擬軟體篩選老鼠抗體及兔子抗體之線性抗原決定位（Mouse antibody 1-3；M1-3 及 Rabbit antibody 1-3；R1-3），其中該些抗體之線性抗原決定位係選自免疫球蛋白 G（IgG）抗體上 Fc 區的線性抗原決定位（Linear epitope，LE），以作為蛋白質標籤的候選序列，而 M1、M2 和 M3 之胺基酸序列依序為 SEQ ID NO：1、SEQ ID NO：2 及 SEQ ID NO：3；而 R1、R2 和 R3 之胺基酸序列依序為 SEQ ID NO：4、SEQ ID NO：

5 及 SEQ ID NO：6。本發明進一步利用西方點墨法證實老鼠抗體之線性抗原決定位（M2）及兔子抗體之線性抗原決定位（R2）能成功分別被 BL21 大腸桿菌所表現，且可被抗老鼠/兔子之二級抗體直接辨識、自動呈色於底片上。

【0011】 此外，本發明進一步將 M2（SEQ ID NO：2）及 R2（SEQ ID NO：5）結合成大小約 15 kDa 的含有老鼠抗體及兔子抗體之線性抗原決定位的融合標籤，並在其後依序接上不同分子量大小之蛋白，以組成具有分子量規則的含老鼠抗體及兔子抗體之線性抗原決定位的融合標籤之重組蛋白質標記，其中該分子量規則是以 15 至 120 kDa 依序排列。故本發明利用西方點墨法證實該些重組蛋白質標記能成功被 BL21 大腸桿菌表現且可被抗老鼠/兔子之二級抗體直接辨識，自動呈現出規則的分子量大小於底片上，形成一具有依分子量大小排序規則之蛋白質標記階梯。

【0012】 本文中的用語「一」或「一種」係用以敘述本發明之元件及成分。此術語僅爲了敘述方便及給予本發明之基本觀念。此敘述應被理解爲包括一種或至少一種，且除非明顯地另有所指，表示單數時亦包括複數。

【0013】 本文所用「抗原（antigen）」一詞意指能夠與選擇性結合劑結合的分子或部分分子，並能夠額外地使用在動物上，產生能夠與該抗原之抗原決定位結合的抗體。一抗體可具有一或多個抗原決定位。

【0014】 本發明所述之「抗原決定位（epitope）」一詞包括任何的決定位，最好是多肽決定位，能夠專一地結合免疫球蛋白或 T-細胞受體。在某些具體實施例中，抗原決定位包括具有化學活性之表面基團的分子，像是胺基酸、糖側鏈、磷醯基或磺醯基，且在某些具體實施例中，可具有特定

的三維結構特徵，及/或特定的電荷特徵。抗原決定位是在抗原中與抗體結合的地方。在某些具體實施例中，當抗體在蛋白質及/或大分子之複雜混合物中，優先認出其標靶抗原時，便說該抗體專一地與抗原結合。

【0015】 「抗體 (antibody)」意指完整的抗體或其結合片段，其與完整抗體競爭專一結合，並包括嵌合型、人類化、完全人類的和雙重專一性抗體。在某些具體實施例中，藉著重組 DNA 技術產生結合片段。在額外的具體實施例中，藉著完整抗體的酵素或化學切開作用，產生結合片段。結合片段包括但不限於抗原結合區段 (fragment antigen-binding, Fab)、Fab'、F(ab')₂、Fv 和單鏈抗體。而抗體上有重鏈和輕鏈，而不論是重鏈還是輕鏈中，抗原結合區段均包括一個可變區和一個恆定區。

【0016】 而抗體上包含一 Fc 區 (Fragment crystallizable region, 可結晶區域片段)，由兩條重鏈組成。根據抗體類型不同，該區域的每一條重鏈由 2 個或者 3 個恆定結構域組。因此，Fc 區可通過與特定類型的 Fc 受體，或者其它免疫分子如補體蛋白質相結合，來確保每個抗體可對一特定抗原產生一個正確的免疫反應。

【0017】 本文中所使用的術語「一級抗體 (primary antibodies)」係指是針對抗原目標，如蛋白質、多肽、糖類或其它小分子等特異性結合的抗體。這種抗體通常不與染色劑結合，不能顯色。目前有許多單克隆/多克隆的一級抗體，可以和各種不同的生物分子的特定抗原表位高度特異、親和的結合。這些一級抗體不僅可以用於檢測特特定的生物分子，而且可以測定它們的變化量，以及諸如磷酸化、甲基化、或糖基化的特定修飾情況。

【0018】 本文中所使用的術語「二級抗體 (secondary antibodies)」

代表以一級抗體為抗原之抗體，又或係指與一級抗體或其片段相結合的抗體；因此，二級抗體辨識一特定物種之免疫球蛋白。於是，該二級抗體包含：抗兔子 IgG、抗小鼠 IgG、抗大鼠 IgG、抗牛 IgG、抗犬 IgG、抗豬 IgG、抗山羊 IgG、抗馬 IgG、抗豚鼠 IgG、抗雞 IgG、抗貓 IgG、抗駱駝 IgG 或抗人類 IgG。其中例如：抗人類 IgG 即代表以人類一級抗體為抗原之二級 IgG 抗體；而抗多株抗體之 IgG 則包含：抗兔子 IgG、抗小鼠 IgG、抗大鼠 IgG、抗牛 IgG、抗犬 IgG、抗豬 IgG、抗山羊 IgG、抗馬 IgG、抗豚鼠 IgG、抗雞 IgG、抗貓 IgG 或抗駱駝 IgG。因此二級抗體通常可接合有生物素、同位素、酵素或螢光染料等進行標記，用以檢測、純化以及細胞篩選上之應用。

【0019】 目前二級抗體通常用於多種不同的生化分析中，如酵素免疫分析法（ELISA）、西方墨點法（western blotting）、免疫染色法、免疫組織化學染色法或免疫細胞化學染色法。

【0020】 本發明提供一種二級抗體（secondary antibody）所辨識之蛋白質標籤（protein tag），其包含兩種該二級抗體所辨識之一級抗體的抗原決定位，其中該抗原決定位係選自該一級抗體上一 Fc 區。

【0021】 於一較佳具體實施例中，該抗原決定位為一線性抗原決定位（Linear epitope）。本文所述之線性抗原決定位係指抗體或蛋白質上屬於連續的胺基酸序列。

【0022】 如用於本文，蛋白質標籤（protein tag）包含但不限於意指一段短的胺基酸序列或殘基，其相當於有助經附加該蛋白質標籤之蛋白質或胜肽（peptide）進行後續生化及免疫學分析之抗原表位。附加蛋白質標

籤係藉由將蛋白質標籤之序列加至存在適當表現載體中之蛋白質的編碼序列。經附加蛋白質標籤之蛋白質或胜肽可使用針對對抗該標籤之高度專一性抗體親和性純化。於一較佳具體實施例中，該蛋白質標籤（protein tag）包含但不限於一蛋白質標記（protein marker）或一蛋白質標示（protein label）。

【0023】 於一具體實施例中，該兩種該二級抗體所辨識之一級抗體分別為老鼠抗體及兔子抗體。於另一具體實施例中，該一級抗體包含但不限於係指由一物種所自體產生之抗體，用以辨識抗原，如由兔子產生之抗體，即兔子抗體（rabbit antibody），而由老鼠產生之抗體，即老鼠抗體（mouse antibody）。像目前單株抗體之製備方法，將一抗原注射至一老鼠體中，使該老鼠針對該抗原於體內產生老鼠抗體。本文所述之「物種（species）」一詞包含但不限於哺乳動物。於一較佳之具體實施例中，該物種係指老鼠或兔子。

【0024】 於一具體實施例中，該兩種二級抗體所辨識之一級抗體分別為老鼠抗體（mouse antibody）及兔子抗體（rabbit antibody）。於一較佳具體實施例中，該老鼠抗體的抗原決定位之胺基酸序列包含 SEQ ID NO：1、SEQ ID NO：2 或 SEQ ID NO：3。於一更佳具體實施例中，該兔子抗體的抗原決定位之胺基酸序列包含 SEQ ID NO：4、SEQ ID NO：5 或 SEQ ID NO：6。

【0025】 於另一具體實施例中，該兩種該二級抗體所辨識之一級抗體的抗原決定位之胺基酸序列包含一第一種一級抗體的抗原決定位之胺基酸序列及一第二種一級抗體的抗原決定位之胺基酸序列，其中該第一種一級

抗體的抗原決定位之胺基酸序列包含 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3，而該第二種一級抗體的抗原決定位之胺基酸序列包含 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:6。於一較佳具體實施例中，該兩種該二級抗體所辨識之一級抗體的抗原決定位之胺基酸序列分別為 SEQ ID NO:2 及 SEQ ID NO:5。

【0026】 於一較佳具體實施例中，該二級抗體為抗老鼠（anti-mouse）之二級抗體或抗兔子（anti-rabbit）之二級抗體。於一更佳具體實施例中，該二級抗體為一免疫球蛋白 G（IgG）抗體。

【0027】 於另一具體實施例中，該蛋白質標籤進一步用於酵素免疫分析法、螢光免疫分析法、冷光免疫分析法、放射線免疫分析法、免疫凝膠法、快速免疫色層分析、免疫點墨法、聚丙烯酰胺膠體電泳（SDS-PAGE）或抗體晶片。

【0028】 本發明亦提供一種抗原決定位用於製備二級抗體所辨識之蛋白質標籤之用途，其中該抗原決定位係選自一該二級抗體所辨識之一級抗體上一 Fc 區。

【0029】 於一較佳具體實施例中，該二級抗體為抗老鼠及/或抗兔子之二級抗體。於一更佳具體實施例中，該二級抗體為一免疫球蛋白 G（IgG）抗體。

【0030】 於一具體實施例中，該一級抗體係指一物種自體產生之抗體，可辨識抗原。於一較佳具體實施例中，該一級抗體為哺乳類抗體。於一更佳具體實施例中，該一級抗體為包含老鼠抗體及/或兔子抗體。

【0031】 於一具體實施例中，該抗原決定位為一線性抗原決定位。於

一較佳具體實施例中，該抗原決定位包含一種一級抗體或由兩種一級抗體組成之抗原決定位。

【0032】 於另一具體實施例中，其中該抗原決定位之胺基酸序列包含 SEQ ID NO：1、SEQ ID NO：2、SEQ ID NO：3、SEQ ID NO：4、SEQ ID NO：5 或 SEQ ID NO：6。於一較佳具體實施例中，其中該抗原決定位之胺基酸序列為 SEQ ID NO：2 或 SEQ ID NO：5。本文所述的抗原決定位之胺基酸序列包含但不限於選自於一級抗體上 Fc 區之整段或部分的抗原決定位之序列。

【0033】 於一具體實施例中，該由兩種一級抗體組成之抗原決定位包含一第一種一級抗體的抗原決定位之胺基酸序列及一第二種一級抗體的抗原決定位之胺基酸序列之組合，其中該第一種一級抗體的抗原決定位之胺基酸序列包含 SEQ ID NO：1、SEQ ID NO：2 或 SEQ ID NO：3，而該第二種一級抗體的抗原決定位之胺基酸序列包含 SEQ ID NO：4、SEQ ID NO：5 或 SEQ ID NO：6。於一較佳具體實施例中，該抗原決定位之胺基酸序列包含 SEQ ID NO：2 及 SEQ ID NO：5。

【0034】 於另一具體實施例中，該二級抗體所辨識之蛋白質標籤進一步用於酵素免疫分析法、螢光免疫分析法、冷光免疫分析法、放射線免疫分析法、免疫凝膠法、快速免疫色層分析、免疫點墨法、聚丙烯醯胺膠體電泳（SDS-PAGE）或抗體晶片。

【0035】 本發明進一步提供一種蛋白質標記用於建構一蛋白質標記階梯（protein marker ladder）的用途，其中該蛋白質標記階梯係由至少兩個不同分子量之該重組蛋白質所形成，其中該蛋白質標記為二級抗體所辨識

之重組蛋白質，該重組蛋白質包含一抗原決定位之胺基酸序列，而該抗原決定位之胺基酸序列係選自一該二級抗體所辨識之一級抗體上一 Fc 區，。

【0036】 於一具體實施例中，該至少兩個不同分子量之該重組蛋白質係指以該抗原決定位之胺基酸序列為基礎，再連接不同分子量之蛋白質或多肽。於一較佳具體實施例中，該不同分子量之蛋白質或多肽包含 His 標籤（His tag，SEQ ID NO：7）、訊息胜肽（signal peptide，SP，SEQ ID NO：8）、連接蛋白（connected protein，CP，SEQ ID NO：9）、O157 大腸桿菌膜外蛋白（*E.coli* outer membrane protein intimin domain 2，D2，SEQ ID NO：10）、麥芽糖結合蛋白質（Maltose-binding protein，MBP，SEQ ID NO：11）、大腸桿菌轉錄因子（*E.coli* transcription factor，Nus，SEQ ID NO：12）或大腸桿菌載體蛋白（Carrier protein of *E. coli*，YebF，SEQ ID NO：13）。於一更佳具體實施例中，該不同分子量之蛋白質或多肽包含 SEQ ID NO：7、SEQ ID NO：8、SEQ ID NO：9、SEQ ID NO：10、SEQ ID NO：11、SEQ ID NO：12 或 SEQ ID NO：13。於另一具體實施例中，該不同分子量之蛋白質或多肽係選自 SEQ ID NO：7、SEQ ID NO：8、SEQ ID NO：9、SEQ ID NO：10、SEQ ID NO：11、SEQ ID NO：12 和 SEQ ID NO：13 所組成之群組。

【0037】 於一具體實施例中，該抗原決定位為一線性抗原決定位。於一較佳具體實施例中，該抗原決定位選自一種或多種一級抗體上之抗原決定位的序列所組成。於一較佳具體實施例中，該抗原決定位包含 SEQ ID NO：1、SEQ ID NO：2、SEQ ID NO：3、SEQ ID NO：4、SEQ ID NO：5 或 SEQ ID NO：6。

【0038】 於另一具體實施例中，該抗原決定位係由兩種一級抗體之抗原決定位所組成。於一較佳具體實施例中，該兩種一級抗體分別為一老鼠抗體及一兔子抗體。於一更佳具體實施例中，該抗原決定位之胺基酸序列包含 SEQ ID NO：2 及 SEQ ID NO：5。於一具體實施例中，該老鼠抗體的抗原決定位之胺基酸序列包含 SEQ ID NO：1、SEQ ID NO：2 或 SEQ ID NO：3。於一較佳具體實施例中，該兔子抗體的抗原決定位之胺基酸序列包含 SEQ ID NO：4、SEQ ID NO：5 或 SEQ ID NO：6。

【0039】 於另一具體實施例中，該一級抗體包含多個一級抗體。於一較佳具體實施例中，該一級抗體包含一老鼠抗體及/或一兔子抗體。於一更佳具體實施例中，該一級抗體包含一老鼠抗體及一兔子抗體。

【0040】 於一具體實施例中，該二級抗體為抗老鼠及/或抗兔子之二級抗體。於一較佳具體實施例中，該二級抗體為一免疫球蛋白 G (IgG) 抗體。

【0041】 於一具體實施例中，其中該蛋白質標記階梯 (protein marker ladder) 係指一組具有蛋白質分子量大小排列規則之複數個蛋白質標記。於一較佳具體實施例中，該蛋白質標記階梯 (protein marker ladder) 可作為陽性控制組。

【0042】 在某些實施例中，以二級抗體所辨識之重組蛋白質以建構一蛋白質標記階梯 (protein marker ladder) 的排列及建構策略，而該重組蛋白質包含一抗原決定位之胺基酸序列，在不降低西方點墨法 (western blotting) 的顯影效果下，可進行的調整包括但不限於：

【0043】 (1) 為了達到組成分子量規則、例如形成階梯式排列

(ladder-like) 之蛋白質分子量標記之目的，使相鄰之標籤共用一或多個胺基酸，以利分子量的調整；

【0044】 (2) 爲了避免特定限制酶於序列中的截切，或爲了符合表現重組蛋白之細胞的密碼子使用偏性 (codon usage bias)，可置換一或多個表一中所列之各標籤編碼 DNA 序列中的鹼基，以利組成分子量規則之蛋白質分子量標記的重組蛋白之建構及表現；

【0045】 (3) 爲了新增較短的人工胜肽序列以調整重組蛋白質之分子量，或可爲了新增限制酶切位，而增加及/或減少表一中所列之各標籤編碼 DNA 序列中的鹼基，以利組成分子量規則之蛋白質分子量標記的重組蛋白之建構及表現；及/或

【0046】 (4) 爲了提高抗標籤抗體 (anti-tag antibody) 辨識靈敏度，而增加及/或減少表一中所列之各標籤編碼 DNA 序列中的鹼基，以增加有利於抗標籤抗體辨識靈敏度之胺基酸。

【0047】 本發明所提供的以二級抗體所辨識之抗原決定位直接作爲蛋白質標籤之技術內容，與其他習用技術相互比較時，更具有下列之優點：

【0048】 (1) 方便性：可以伴隨著二級抗體染色自動呈色在底片上，功能相當實用。

【0049】 (2) 準確性：此標籤是無染劑 (dye-free)，所以分子量準確。

【0050】 (3) 可加熱：能使蛋白質標記標籤呈現出最準確的分子量。

【0051】 (4) 廣泛應用性：能被任何抗老鼠/兔子之二級抗體辨識。

【0052】 (5) 可作爲陽性控制組：此標籤除可當作蛋白質標記

(Protein marker) 或重組蛋白質 (Recombinant protein) 的偵測標籤 (tag) 外，更可當做實驗的陽性控制組 (Positive control)，讓使用者能更方便且精準的判斷實驗結果。

【圖式簡單說明】

【0053】 圖 1 為老鼠及兔子抗體之線性抗原決定位的表現及被抗老鼠/兔子之二級抗體辨識的能力。(A)為將老鼠抗體之線性抗原決定位(linear epitope) (Mouse antibody 1-3, M1-3)及兔子抗體之線性抗原決定位(Rabbit antibody 1-3, R1-3)合成出來，並利用基因選殖(Cloning)技術將上述線性抗原決定位之基因序列建構至 pRSETB 質體中，形成含有老鼠抗體之線性抗原決定位之 pRSETB 質體(pRSETB-M1、pRSETB-M2 及 pRSETB-M3)及含有老鼠抗體之線性抗原決定位之 pRSETB 質體 (pRSETB-R1、pRSETB-R2 及 pRSETB-R3)，並使上述基因序列具有 HIS 標籤(His tag)，最後將所得之 pRSETB-M1、pRSETB-M2 和 pRSETB-M3 質體及 pRSETB-R1、pRSETB-R2 和 pRSETB-R3 質體分別送入 BL21 大腸桿菌 (BL21 *E.coli*) 進行表現。利用抗 HIS 標籤抗體 (anti-His tag antibody) 以西方點墨法 (Western blotting) 證明所建構的老鼠抗體之線性抗原決定位 (M1-3) 及兔子抗體之線性抗原決定位 (R1-3) 能夠被 BL21 大腸桿菌所表現。(B) 為利用西方點墨法證明含有老鼠抗體之線性抗原決定位之 pRSETB 質體 (pRSETB-M1、pRSETB-M2 及 pRSETB-M3) 上之老鼠抗體的線性抗原決定位 (M1-3) 的胺基酸序列能夠直接被抗老鼠二級抗體 (anti mouse secondary antibody) 辨識且呈色。(C) 為利用西方點墨法證明含有兔子抗體之線性抗原決定位之 pRSETB 質體 (pRSETB-R1 和 pRSETB-R2)

上之兔子抗體的線性抗原決定位 (R1-2) 的胺基酸序列能夠直接被抗兔子二級抗體 (anti rabbit secondary antibody) 辨識且呈色。

【0054】 圖 2 為結合老鼠抗體及兔子抗體之線性抗原決定位的融合標籤之表現及被抗老鼠/兔子之二級抗體辨識的能力。(A) 為將結合後的老鼠抗體之線性抗原決定位 (M2) 及兔子抗體之線性抗原決定位 (R2) 的融合標籤 (M2R2) 建構至 pRSETB 質體中, 形成含有該融合標籤之 pRSETB 質體 (pRSETB-M2R2), 並利用抗 HIS 標籤抗體以西方點墨法證實含有該融合標籤之 pRSETB 質體 (pRSETB-M1R1) 上之該融合標籤該能夠被 BL21 大腸桿菌 (BL21 *E.coli*) 表現。(B) 利用西方點墨法證明含有該融合標籤之 pRSETB 質體 (pRSETB-M2R2) 上之融合標籤 (M1R1) 能夠直接被抗老鼠二級抗體 (anti mouse secondary antibody) 辨識且呈色。(C) 利用西方點墨法證明含有該融合標籤之 pRSETB 質體 (pRSETB-M2R2) 上之融合標籤能夠直接被抗兔子二級抗體 (anti rabbit secondary antibody) 辨識且呈色。

【0055】 圖 3 為含有老鼠及兔子抗體之線性抗原決定位的融合標籤的重組蛋白標記 (protein marker) 建構一蛋白質標記階梯 (protein marker ladder)。以結合後的老鼠抗體 (M2) 及兔子抗體 (R2) 之線性抗原決定位的融合標籤 (M2R2) 為基本單位, 並在其後依序接上不同分子量之蛋白質 (大腸桿菌載體蛋白 (YebF): 10kDa、大腸桿菌膜外蛋白 (D2): 10 kDa、麥芽糖結合蛋白質 (MBP): 40 kDa 及大腸桿菌轉錄因子 (Nus): 60 kDa), 形成可加熱、自動呈色於底片且具有分子量規則之含有老鼠及兔子抗體之線性抗原決定位的融合標籤之重組蛋白標記。H 表示 His 標籤, CP 表示連

接蛋白（connected protein），SP 表示訊息胜肽（Signal peptide）。

【0056】 圖 4 為含有老鼠及兔子抗體之線性抗原決定位的融合標籤之重組蛋白標記之表現。將具有不同分子量（15-120 kDa）之含有老鼠及兔子抗體之線性抗原決定位的融合標籤之重組蛋白質標記的質體轉型至 BL21 大腸桿菌中，並經異丙基- β -D-硫代半乳糖苷（IPTG）誘導後，將細菌之上清培養液，置於 10% 的十二烷基磺酸鈉-聚丙烯醯胺膠凝體（SDS-PAGE）中進行電泳，然後轉漬到硝化纖維素（NC）膜上，利用抗 HIS 標籤抗體進行偵測，證實該些重組蛋白質標記可被 BL21 大腸桿菌所表現且呈現出有規則分子量排序之階梯狀訊號。

【0057】 圖 5 為含有老鼠及兔子抗體之線性抗原決定位的融合標籤之重組蛋白標記被抗老鼠二級抗體辨識之能力。將具有不同分子量（15-120 kDa）之含有老鼠及兔子抗體之線性抗原決定位的融合標籤之重組蛋白質標記的質體轉型至 BL21 大腸桿菌中，並經異丙基- β -D-硫代半乳糖苷（IPTG）誘導後，將細菌之上清培養液，置於 10% 的十二烷基磺酸鈉-聚丙烯醯胺膠凝體（SDS-PAGE）中進行電泳，然後轉漬到硝化纖維素（NC）膜上，利用抗老鼠二級抗體進行偵測，證實該些重組蛋白質標記可被 BL21 *E.coli* 所表現且呈現出有規則分子量排序之階梯狀訊號。

【實施方式】

【0058】 本發明可能以不同的形式來實施，並不僅限於下列文中所提及的實例。下列實施例僅作為本發明不同態樣及特點中的代表。所述實施例不限制在申請權利範圍中所描述的本發明的範圍。

【0059】 （1）老鼠及兔子抗體之線性抗原決定位的製備

【0060】 本發明利用 ABC prep、Bepi prep 及 C.V.C.等蛋白質結構模擬軟體，根據老鼠抗體（mouse antibody）及兔子抗體（rabbit antibody）結構，篩選上述抗體之免疫球蛋白 G（IgG）抗體上 Fc 區片段（Fragment crystallizable region，Fc，可結晶區域片段）中能被二級抗體（secondary antibody；如 goat anti-mouse secondary antibody 和 goat anti-rabbit secondary antibody）辨識的部位，並優先挑選結構較外露且為線性抗原決定位（linear epitope，LE），分別選出三段老鼠抗體之線性抗原決定位（Mouse antibody 1-3，M1-3）及一兔子抗體之線性抗原決定位（Rabbit antibody 1-3，R1-3）（如表一所示），其中該些抗體之線性抗原決定位係選自免疫球蛋白 G 抗體上 Fc 區片段，以作為蛋白質標記的候選序列。一般抗體上之抗原決定位，可分為：線性抗原決定位（Linear epitope）：線性抗原決定位在蛋白質上屬於連續的胺基酸序列；結構性抗原決定位（Conformational epitope）：結構性抗原決定位在蛋白質上屬不連續的胺基酸序列，但當蛋白質折疊成立體結構時，這些不連續的胺基酸序列將會聚在一起，成為可被抗體辨識的結構。

【0061】 表一、老鼠抗體及兔子抗體之線性抗原決定位的胺基酸序列及分子量大小

代號	胺基酸序列	蛋白質大小 (kDa)
M1	QPIMNT NGSYFVYSKL NVQKSNWEAG NTFTCSVLHE GLHNHHTEKS LSHSPGL	5.94
M2	EFK CRVNSAAFPA PIEKTISKTK GRPKAPQVYT IPPPKEQMAK DKVSLTCMITD	5.99
M3	QPIMNTNGSYFVYSKLVNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGL HNHHTEKSLSHSPGL	5.94
R1	PKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQDD PEVQFTWYIN	7.26

	NEQVRTARPLREQQFNSTI RVVSTLPIT	
R2	GKEFK CKVHNKALPA PIEKTISKAR GQPLEPKVYT MGPPREELSS RSVSLTCMIN GFYPSDISVE W	7.37
R3	KNGKAEDN YKTTPAVLDS DGSYFLYNKLSVPTSEWQRG DVFTCSVMHEALHNHYTQKS ISRSPGK	7.33

【0062】 (2) 老鼠抗體及兔子抗體之線性抗原決定位的表現及被抗老鼠/兔子之二級抗體辨識的能力

【0063】 本發明利用聚合酶連鎖反應 (PCR) 將三段老鼠抗體之線性抗原決定位 (M1, 即 SEQ ID NO : 1、M2, 即 SEQ ID NO : 2 及 M3, 即 SEQ ID NO : 3) 及三段兔子抗體之線性抗原決定位 (R1, 即 SEQ ID NO : 4、R2, 即 SEQ ID NO : 5 及 R3, 即 SEQ ID NO : 6) 合成出來, 並利用選殖 (Cloning) 技術將上述線性抗原基因序列建構至 pRSETB 質體中, 之後將含有老鼠抗體之線性抗原決定位之 pRSETB 質體 (pRSETB-M1、pRSETB-M2 及 pRSETB-M3) 及含有兔子抗體之線性抗原決定位之 pRSETB 質體 (pRSETB-R1、pRSETB-R2 及 pRSETB-R3) 分別送入 BL21 大腸桿菌 (*E.coli*) 進行表現。由於將老鼠抗體及兔子抗體之線性抗原決定位建構至 pRSETB 質體後, 會使該基因序列帶有 His 標籤 (His tag)。故本發明利用抗 His 標籤抗體 (anti-His tag antibody) 以西方點墨法測試該老鼠抗體及兔子抗體之線性抗原決定位是否能被 BL21 大腸桿菌所表現。而其結果證明所建構的老鼠抗體及兔子抗體上 Fc 區片段之線性抗原決定位 (pRSETB-M1、pRSETB-M2、pRSETB-M3、pRSETB-R1、pRSETB-R2 及 pRSETB-R3) 能夠被 BL21 大腸桿菌所表現 (如圖 1A 所示)。

【0064】 本發明亦進一步利用西方點墨法去測試該含有老鼠抗體之

線性抗原決定位之 pRSETB 質體及含有兔子抗體之線性抗原決定位之 pRSETB 質體上之線性抗原決定位是否能被抗老鼠和抗兔子之二級抗體（anti-mouse 或 anti-rabbit secondary antibody）所辨識。而其結果證明老鼠抗體（pRSETB-M1、pRSETB-M2 及 pRSETB-M3）可直接被抗老鼠之二級抗體辨識且呈色（如圖 1B 所示）。此外兔子抗體上 Fc 區片段之線性抗原決定位（pRSETB-R1 及 pRSETB-R2）亦可直接被抗兔子之二級抗體辨識且呈色（如圖 1C 所示），而 pRSETB-R3 也可被抗兔子之二級抗體所辨識。

● 【0065】 （3）結合抗老鼠抗體及抗兔子抗體之線性抗原決定位的融合標籤之表現及被抗老鼠/兔子之二級抗體辨識的能力

● 【0066】 透過上述實驗證實老鼠抗體及兔子抗體的線性抗原決定位能成功表現及可分別被抗老鼠或抗兔子之二級抗體辨識後，本發明進一步透過選殖技術，利用限制酶將上述被二級抗體所辨識的老鼠抗體之線性抗原決定位（M2，SEQ ID NO：2）及兔子抗體之線性抗原決定位（R2，SEQ ID NO：5）之基因序列融合在一起，成為結合老鼠抗體及兔子抗體之線性抗原決定位的融合標籤（M2R2），並建構至 pRSETB 質體，形成含有該融合標籤之 pRSETB 質體（pRSETB-M2R2）。為證實該含有該融合標籤之 pRSETB 質體上之融合標籤能被 BL21 大腸桿菌所表現，本發明利用抗 His 標籤抗體（anti-His tag antibody）以西方點墨法來檢驗結合後的老鼠及兔子線性抗原決定位之融合標籤（M2R2）被 BL21 大腸桿菌（BL21 *E.coli*）之表現情況，其結果證明結合後的老鼠及兔子線性抗原決定位之融合標籤能夠被 BL21 大腸桿菌所表現（如圖 2A 所示）。

● 【0067】 本發明亦進一步利用西方點墨法去測試該含有該融合標籤

之 pRSETB 質體 (pRSETB-M2R2) 上之融合標籤 (M2R2) 是否能分別被抗老鼠和抗兔子之二級抗體 (secondary antibody) 所辨識。其結果證實結合後的該融合標籤能夠直接被抗老鼠之二級抗體 (anti-mouse secondary antibody) 辨識且呈色 (如圖 2B 所示)。此外, 該融合標籤能夠直接被抗兔子之二級抗體 (anti-rabbit secondary antibody) 辨識且呈色 (如圖 2C 所示)。

【0068】 (4) 建構含有老鼠及兔子抗體之線性抗原決定位的融合標籤之重組蛋白質標記胺基酸序列

【0069】 爲了建構出具有不同分子量大小之含有老鼠抗體及兔子抗體線性抗原決定位之融合標籤之重組蛋白質標記, 本發明挑選了具有分子量規則的蛋白質作爲重組蛋白標記的成分, 包括 His 標籤 (His tag, SEQ ID NO: 7)、訊息胜肽 (signal peptide, SP, SEQ ID NO: 8)、連接蛋白 (connected protein, CP, SEQ ID NO: 9)、O157 大腸桿菌膜外蛋白 (*E.coli* outer membrane protein intimin domain 2, D2, SEQ ID NO: 10)、麥芽糖結合蛋白質 (Maltose-binding protein, MBP, SEQ ID NO: 11)、大腸桿菌轉錄因子 (*E.coli* transcription factor, Nus, SEQ ID NO: 12) 及大腸桿菌載體蛋白 (Carrier protein of *E. coli*, YebF, SEQ ID NO: 13) (如表二所示)。藉由選殖 (Cloning) 技術, 將不同分子量的蛋白質排列成分子量規則的大小, 連結於結合老鼠抗體及兔子抗體線性抗原決定位之融合標籤 (M2R2, SEQ ID NO: 2 及 SEQ ID NO: 5) 的基因下游, 以完成重組蛋白標記的建構。最後所得之不同分子量的重組蛋白質建立分子量大小排列規則性, 便可形成西方點墨法中顯影時的蛋白質標記階梯 (protein marker ladder), 用

以評估待測物之分子量或分子量間的線性關係（如圖 3 所示）。

【0070】 表二、所使用之蛋白質的胺基酸序列及分子量大小

代號	胺基酸序列	蛋白質 大小 (kDa)
H	HHHHHH	0.72
SP	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMELDIGINSDP	3.7
CP	EFGGGGSGTASRPVDKLAAALE	2.6
D2	NKVDIIGNNVRGELPNIWLQYGQFKLKASGGDGTYSWYSENTS IATVDASGKVTLNGKGSVVIKATSGDKQTVSY	10
MBP	KIEEGKLVWINGDKGYNGLAEVGKKFEKDTGIKVTVEHPDKL EEKFPQVAATGDGPDIIFWAHDRFGGYAQSGLLAEITPDKAFQD KLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALSLIYNKDLLPNPPKTWEE IPALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGK YDIKDVGVNDAGAKAGLTFLVDLIKHKHMNADTDYSIAEAAFNK GETAMTINGPWAWSNIDTSKVNYGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSA GINAASPKNELAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDKPLGAVALKSYYYY LAKDPRIAATMENAQKGEIMPNIQMSAFWYAVRTAVINAASGRQ TVDEALKDAQTRITK	40
Nus	MNKEILAVVEAVSNEKALPREKIFEALESALATATKKKYEQEIDVR VQIDRKSGDFDTFRRWLVDDEVTPQTKETLEAARYEDESINLGD YVEDQIESVTFDRITTQTAKQVIVQKVREAERAMVVDQFREHEG EIITGVVKKVNRDNISLDLGNNAEAVILREDMLPRENFRPGDRVR GVLYSVRPEARQAQLFVTRSKPEMLIELFRIEVP EIGEEVIEIKAA ARDPGSRAKIAVKTNDRIDPVGACVGMRGARVQAVSTELGGER IDIVLWDDNPAQFVINAMAPADVASIVVDEDKHTMDIAVEAGNLA QAIGRNGQNVRLASQLSGWELNVM TVDDLQAKHQAEAHAAIDT FTKYLDIDEDFATVLVEEGFSTLEELAYVPMKELLEIEGLDEPTVE ALRERAKNALATIAQAQEE SLGDNKPADDLLNLEGVDRDLAFKL	60

	AARGVCTLEDLAEQGIDDLADIEGLTDEKAGALIMAARNICWFG DEA	
YebF	ANNETSKSVTFPKCEDLDAAGIAASVKRDYQQNRVARWADDQK IVGQADPVAWVSLQDIQGKDDKWSVPLTVRGKSADIIHYQVSVD CKAGMAEYQRR	10

【0071】 （5）含有老鼠抗體及兔子抗體之線性抗原決定位的融合標籤之重組蛋白質標記之表現

【0072】 本發明證明結合老鼠抗體及兔子抗體之線性抗原決定位的融合標籤（M2R2）能成功被抗老鼠/兔子之二級抗體辨識後，且亦利用選殖技術將具有不同蛋白質分子量大小的基因序列建構至該結合老鼠抗體之線性抗原決定位（M2，SEQ ID NO：2）及兔子抗體之線性抗原決定位（R2，SEQ ID NO：5）的融合標籤（M2R2）之下游，以形成帶有不同分子量（15-120 kDa）的含有老鼠抗體及兔子抗體之線性抗原決定位的融合標籤之重組蛋白質標記，之後將含有上述該些重組蛋白標記的質體轉型至 BL21 大腸桿菌中，經異丙基-β -D-硫代半乳糖苷（IPTG）誘導後，將細菌之上清培養液，置於 10%的十二烷基磺酸鈉-聚丙烯醯胺膠凝體（SDS-PAGE）中進行電泳，然後轉漬到硝化纖維素（NC）膜上，利用抗 HIS 標籤抗體進行偵測，證實該些重組蛋白質標記可被 BL21 大腸桿菌（BL21 *E.coli* ）所表現且呈現出有規則分子量排序之階梯狀訊號（如圖 4 所示）。

【0073】 （6）含有老鼠抗體及兔子抗體之線性抗原決定位的融合標籤之重組蛋白質標記被抗老鼠二級抗體辨識之能力

【0074】 在證明了含有老鼠抗體及兔子抗體之線性抗原決定位的融合標籤（M2R2）之重組蛋白質標記能成功被 BL21 大腸桿菌表現後，本發

明進一步確認該些重組蛋白質標記被二級抗體直接辨識的能力。將含有該些老鼠抗體及兔子抗體之線性抗原決定位的融合標籤之重組蛋白質標記（15-120 kDa，如圖 3 所示）的質體轉型至 BL21 大腸桿菌中，經異丙基- β -D-硫代半乳糖苷（IPTG）誘導後，將細菌之上清培養液，置於 10% 的十二烷基磺酸鈉-聚丙烯醯胺膠凝體（SDS-PAGE）中進行電泳，然後轉漬到硝化纖維素（NC）膜上，利用抗老鼠二級抗體進行偵測，證實該些重組蛋白質標記可被 BL21 大腸桿菌所表現且呈現出有規則分子量排序之階梯狀訊號（如圖 5 所示）。

【符號說明】

【0075】 無。

【生物材料寄存】

無。

【序列表】

<110> 高雄醫學大學

<120> 二級抗體所辨識之抗原決定位及其用途

<130> 2300-KMU-TW

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 53

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mouse antibody 1

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(53)

<400> 1

Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu
1 5 10 15

Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser
20 25 30

Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser
35 40 45

His Ser Pro Gly Leu
50

<210> 2

<211> 54

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mouse antibody 2

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(53)

<400> 2

Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu
1 5 10 15

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr
20 25 30

Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu
35 40 45

Thr Cys Met Ile Thr Asp
50

<210> 3
<211> 53
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mouse antibody 3

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(53)

<400> 3

Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu
1 5 10 15

Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser
20 25 30

Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser

35 40 45

His Ser Pro Gly Leu

50

<210> 4
<211> 63
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> rabbit antibody 1

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(63)

<400> 4

1 5 10 15

20 25 30

35 40 45

50 55 60

<223> rabbit antibody 2

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(66)

<400> 5

Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val His Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
1 5 10 15

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Pro Leu Glu Pro Lys
20 25 30

Val Tyr Thr Met Gly Pro Pro Arg Glu Glu Leu Ser Ser Arg Ser Val
35 40 45

Ser Leu Thr Cys Met Ile Asn Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ser Val
50 55 60

Glu Trp

8

Ser Glu Trp Gln Arg Gly Asp Val Phe Thr Cys Ser Val Met His Glu
35 40 45

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser Arg Ser Pro Gly
50 55 60

Lys
65

- <210> 7
- <211> 6
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> His tag

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(6)

<400> 7

His His His His His His

1 5

<210> 8

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> signal peptide

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(31)

<400> 8

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Glu Leu Asp Ile Gly Ile Asn Ser Asp Pro
20 25 30

<210> 9
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> connected protein

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(22)

<400> 9

Glu Phe Gly Gly Gly Gly Ser Gly Thr Ala Ser Arg Pro Val Asp Lys

1 5 10 15

Leu Ala Ala Ala Leu Glu

20

<210> 10

<211> 75

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> E.coli outer membrane protein intimin domain 2

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(75)

<400> 10

Asn Lys Val Asp Ile Ile Gly Asn Asn Val Arg Gly Glu Leu Pro Asn

1 5 10 15

Ile Trp Leu Gln Tyr Gly Gln Phe Lys Leu Lys Ala Ser Gly Gly Asp
20 25 30

Gly Thr Tyr Ser Trp Tyr Ser Glu Asn Thr Ser Ile Ala Thr Val Asp
35 40 45

Ala Ser Gly Lys Val Thr Leu Asn Gly Lys Gly Ser Val Val Ile Lys
50 55 60

Ala Thr Ser Gly Asp Lys Gln Thr Val Ser Tyr
65 70 75

- <210> 11
- <211> 370
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence

<223> Maltose-binding protein

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(370)

<400> 11

Lys Ile Glu Glu Gly Lys Leu Val Ile Trp Ile Asn Gly Asp Lys Gly
1 5 10 15

Tyr Asn Gly Leu Ala Glu Val Gly Lys Lys Phe Glu Lys Asp Thr Gly
20 25 30

Ile Lys Val Thr Val Glu His Pro Asp Lys Leu Glu Glu Lys Phe Pro
35 40 45

Gln Val Ala Ala Thr Gly Asp Gly Pro Asp Ile Ile Phe Trp Ala His
50 55 60

Asp Arg Phe Gly Gly Tyr Ala Gln Ser Gly Leu Leu Ala Glu Ile Thr
65 70 75 80

Pro Asp Lys Ala Phe Gln Asp Lys Leu Tyr Pro Phe Thr Trp Asp Ala
85 90 95

Val Arg Tyr Asn Gly Lys Leu Ile Ala Tyr Pro Ile Ala Val Glu Ala
100 105 110

Leu Ser Leu Ile Tyr Asn Lys Asp Leu Leu Pro Asn Pro Pro Lys Thr
115 120 125

Trp Glu Glu Ile Pro Ala Leu Asp Lys Glu Leu Lys Ala Lys Gly Lys
130 135 140

Ser Ala Leu Met Phe Asn Leu Gln Glu Pro Tyr Phe Thr Trp Pro Leu
145 150 155 160

Ile Ala Ala Asp Gly Gly Tyr Ala Phe Lys Tyr Glu Asn Gly Lys Tyr
165 170 175

Asp Ile Lys Asp Val Gly Val Asp Asn Ala Gly Ala Lys Ala Gly Leu
180 185 190

Thr Phe Leu Val Asp Leu Ile Lys Asn Lys His Met Asn Ala Asp Thr
195 200 205

Asp Tyr Ser Ile Ala Glu Ala Ala Phe Asn Lys Gly Glu Thr Ala Met
210 215 220

Thr Ile Asn Gly Pro Trp Ala Trp Ser Asn Ile Asp Thr Ser Lys Val
225 230 235 240

Asn Tyr Gly Val Thr Val Leu Pro Thr Phe Lys Gly Gln Pro Ser Lys
245 250 255

Pro Phe Val Gly Val Leu Ser Ala Gly Ile Asn Ala Ala Ser Pro Asn

260

265

270

Lys Glu Leu Ala Lys Glu Phe Leu Glu Asn Tyr Leu Leu Thr Asp Glu

275

280

285

Gly Leu Glu Ala Val Asn Lys Asp Lys Pro Leu Gly Ala Val Ala Leu

290

295

300

Lys Ser Tyr Glu Glu Glu Leu Ala Lys Asp Pro Arg Ile Ala Ala Thr

305

310

315

320

Met Glu Asn Ala Gln Lys Gly Glu Ile Met Pro Asn Ile Pro Gln Met

325

330

335

Ser Ala Phe Trp Tyr Ala Val Arg Thr Ala Val Ile Asn Ala Ala Ser

340

345

350

Gly Arg Gln Thr Val Asp Glu Ala Leu Lys Asp Ala Gln Thr Arg Ile

355 360 365

Thr Lys

370

<210> 12

<211> 495

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> E.coli transcription factor

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(495)

<400> 12

Met Asn Lys Glu Ile Leu Ala Val Val Glu Ala Val Ser Asn Glu Lys
1 5 10 15

Ala Leu Pro Arg Glu Lys Ile Phe Glu Ala Leu Glu Ser Ala Leu Ala
20 25 30

Thr Ala Thr Lys Lys Lys Tyr Glu Gln Glu Ile Asp Val Arg Val Gln
35 40 45

Ile Asp Arg Lys Ser Gly Asp Phe Asp Thr Phe Arg Arg Trp Leu Val
50 55 60

Val Asp Glu Val Thr Gln Pro Thr Lys Glu Ile Thr Leu Glu Ala Ala
65 70 75 80

Arg Tyr Glu Asp Glu Ser Leu Asn Leu Gly Asp Tyr Val Glu Asp Gln
85 90 95

Ile Glu Ser Val Thr Phe Asp Arg Ile Thr Thr Gln Thr Ala Lys Gln
100 105 110

Val Ile Val Gln Lys Val Arg Glu Ala Glu Arg Ala Met Val Val Asp
115 120 125

Gln Phe Arg Glu His Glu Gly Glu Ile Ile Thr Gly Val Val Lys Lys
130 135 140

Val Asn Arg Asp Asn Ile Ser Leu Asp Leu Gly Asn Asn Ala Glu Ala
145 150 155 160

Val Ile Leu Arg Glu Asp Met Leu Pro Arg Glu Asn Phe Arg Pro Gly
165 170 175

Asp Arg Val Arg Gly Val Leu Tyr Ser Val Arg Pro Glu Ala Arg Gly
180 185 190

Ala Gln Leu Phe Val Thr Arg Ser Lys Pro Glu Met Leu Ile Glu Leu
195 200 205

Phe Arg Ile Glu Val Pro Glu Ile Gly Glu Glu Val Ile Glu Ile Lys
210 215 220

Ala Ala Ala Arg Asp Pro Gly Ser Arg Ala Lys Ile Ala Val Lys Thr
225 230 235 240

Asn Asp Lys Arg Ile Asp Pro Val Gly Ala Cys Val Gly Met Arg Gly
245 250 255

Ala Arg Val Gln Ala Val Ser Thr Glu Leu Gly Gly Glu Arg Ile Asp
260 265 270

Ile Val Leu Trp Asp Asp Asn Pro Ala Gln Phe Val Ile Asn Ala Met
275 280 285

Ala Pro Ala Asp Val Ala Ser Ile Val Val Asp Glu Asp Lys His Thr

290

295

300

Met Asp Ile Ala Val Glu Ala Gly Asn Leu Ala Gln Ala Ile Gly Arg

305

310

315

320

Asn Gly Gln Asn Val Arg Leu Ala Ser Gln Leu Ser Gly Trp Glu Leu

325

330

335

Asn Val Met Thr Val Asp Asp Leu Gln Ala Lys His Gln Ala Glu Ala

340

345

350

His Ala Ala Ile Asp Thr Phe Thr Lys Tyr Leu Asp Ile Asp Glu Asp

355

360

365

Phe Ala Thr Val Leu Val Glu Glu Gly Phe Ser Thr Leu Glu Glu Leu

370

375

380

Ala Tyr Val Pro Met Lys Glu Leu Leu Glu Ile Glu Gly Leu Asp Glu

385

390

395

400

Pro Thr Val Glu Ala Leu Arg Glu Arg Ala Lys Asn Ala Leu Ala Thr

405

410

415

Ile Ala Gln Ala Gln Glu Glu Ser Leu Gly Asp Asn Lys Pro Ala Asp

420

425

430

Asp Leu Leu Asn Leu Glu Gly Val Asp Arg Asp Leu Ala Phe Lys Leu

435

440

445

Ala Ala Arg Gly Val Cys Thr Leu Glu Asp Leu Ala Glu Gln Gly Ile

450

455

460

Asp Asp Leu Ala Asp Ile Glu Gly Leu Thr Asp Glu Lys Ala Gly Ala

465

470

475

480

Leu Ile Met Ala Ala Arg Asn Ile Cys Trp Phe Gly Asp Glu Ala
485 490 495

<210> 13

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Carrier protein of E. coli

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(97)

<400> 13

Ala Asn Asn Glu Thr Ser Lys Ser Val Thr Phe Pro Lys Cys Glu Asp
1 5 10 15

Leu Asp Ala Ala Gly Ile Ala Ala Ser Val Lys Arg Asp Tyr Gln Gln

20 25 30

Asn Arg Val Ala Arg Trp Ala Asp Asp Gln Lys Ile Val Gly Gln Ala

35 40 45

Asp Pro Val Ala Trp Val Ser Leu Gln Asp Ile Gln Gly Lys Asp Asp

50 55 60

Lys Trp Ser Val Pro Leu Thr Val Arg Gly Lys Ser Ala Asp Ile His

65 70 75 80

Tyr Gln Val Ser Val Asp Cys Lys Ala Gly Met Ala Glu Tyr Gln Arg

85 90 95

Arg

申請專利範圍

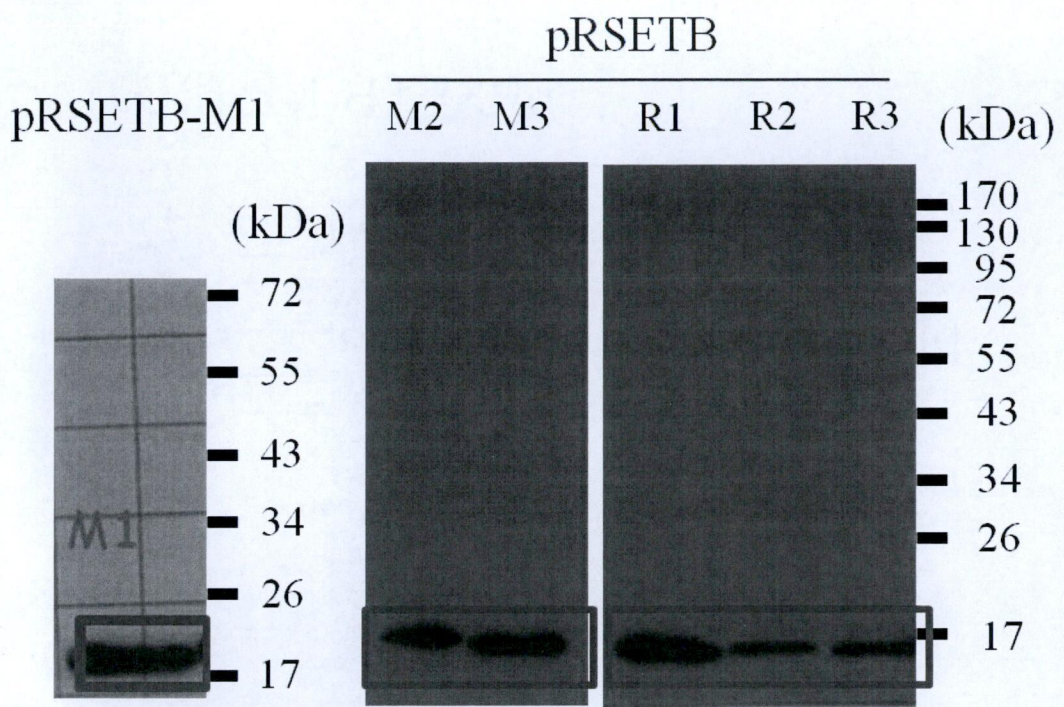
1. 一種胺基酸序列用於製備與一標的蛋白質融合之蛋白質標籤之用途，其中該蛋白質標籤被二級抗體所辨識，其中該胺基酸序列為一線性抗原決定位之胺基酸序列，其中該線性抗原決定位之胺基酸序列係選自一該二級抗體所辨識之一級抗體上一 Fc 區。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之用途，其中該一級抗體為一老鼠抗體及/或一兔子抗體。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述之用途，其中該線性抗原決定位包含一種一級抗體或由兩種一級抗體組成之線性抗原決定位。
4. 如申請專利範圍第 3 項所述之用途，其中該線性抗原決定位之胺基酸序列係選自於由 SEQ ID NO：1、SEQ ID NO：2、SEQ ID NO：3、SEQ ID NO：4、SEQ ID NO：5 及 SEQ ID NO：6 所組成的群組。
5. 如申請專利範圍第 3 項所述之用途，其中該線性抗原決定位之胺基酸序列包含 SEQ ID NO：2 及 SEQ ID NO：5。
6. 一種蛋白質標記用於建構一蛋白質標記階梯（protein marker ladder）的用途，其中該蛋白質標記階梯係由至少兩個不同分子量之該重組蛋白質所形成，其中該蛋白質標記為二級抗體所辨識之重組蛋白質，該重組蛋白質包含一抗原決定位之胺基酸序列，而該抗原決定位之胺基酸序列係選自一該二級抗體所辨識之一級抗體上一 Fc 區。
7. 如申請專利範圍第 6 項所述之用途，其中該至少兩個不同分子量之該重組蛋白質係以該抗原決定位之胺基酸序列為基礎，再連接不同分子量之

蛋白質或多肽。

8. 如申請專利範圍第 7 項所述之用途，其中該不同分子量之蛋白質或多肽係選自於由 SEQ ID NO：7、SEQ ID NO：8、SEQ ID NO：9、SEQ ID NO：10、SEQ ID NO：11、SEQ ID NO：12 及 SEQ ID NO：13 所組成的群組。
9. 如申請專利範圍第 6 項所述之用途，其中該抗原決定位係由兩種一級抗體組成之抗原決定位所組成。
10. 如申請專利範圍第 9 項所述之用途，其中該兩種一級抗體分別為一老鼠抗體及一兔子抗體。
11. 如申請專利範圍第 6 項所述之用途，其中該抗原決定位為一線性抗原決定位。
12. 如申請專利範圍第 6 項所述之用途，其中該抗原決定位之胺基酸序列包含 SEQ ID NO：2 及 SEQ ID NO：5。
13. 一種二級抗體所辨識之蛋白質標籤，其包含兩種該二級抗體所辨識之一級抗體的抗原決定位之胺基酸序列，其中該兩種該二級抗體所辨識之一級抗體的抗原決定位之胺基酸序列分別為 SEQ ID NO：2 及 SEQ ID NO：5，其中該抗原決定位係選自該一級抗體上一 Fc 區。
14. 如申請專利範圍第 13 項所述之蛋白質標籤，其中該兩種該二級抗體所辨識之一級抗體分別為老鼠抗體及兔子抗體。

圖式

(A)



(B)

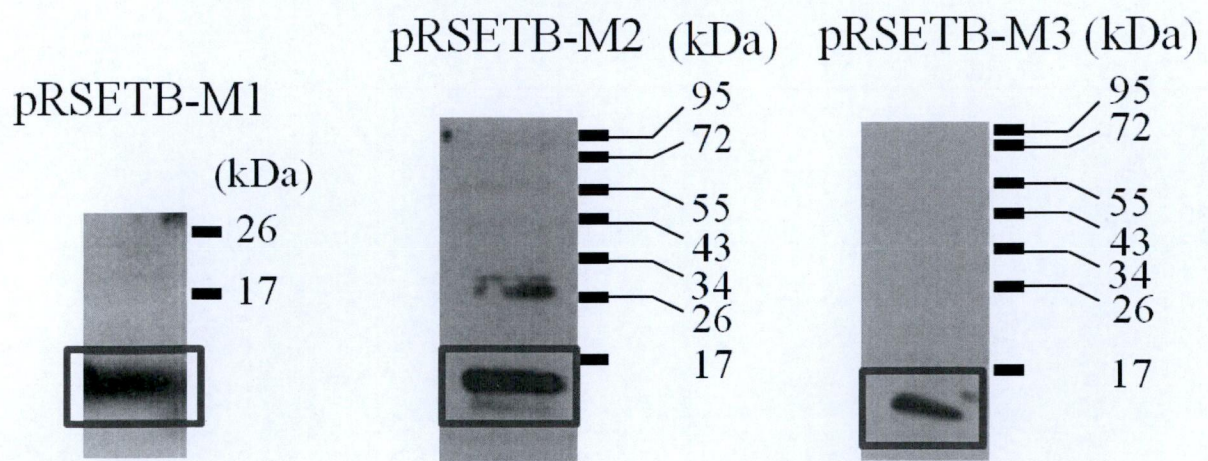


圖 1

(C)

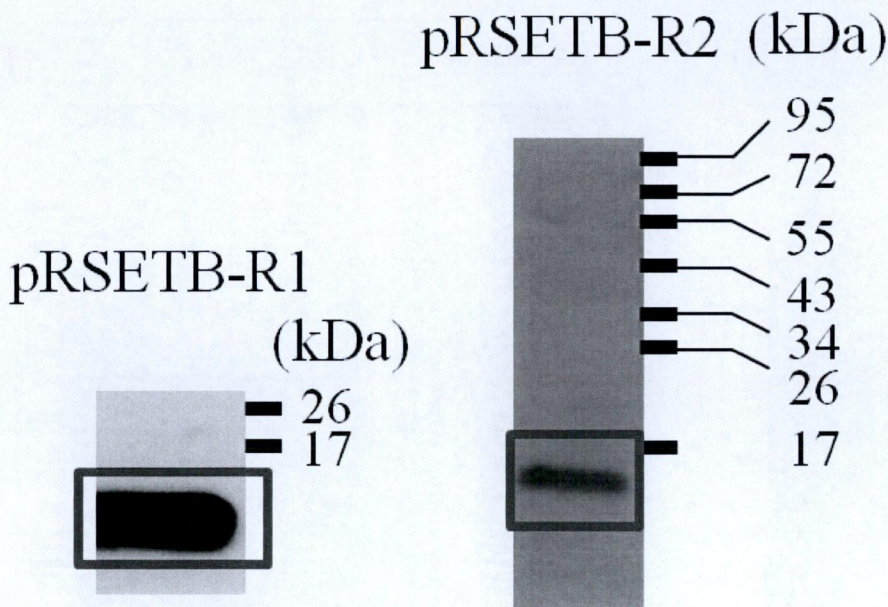
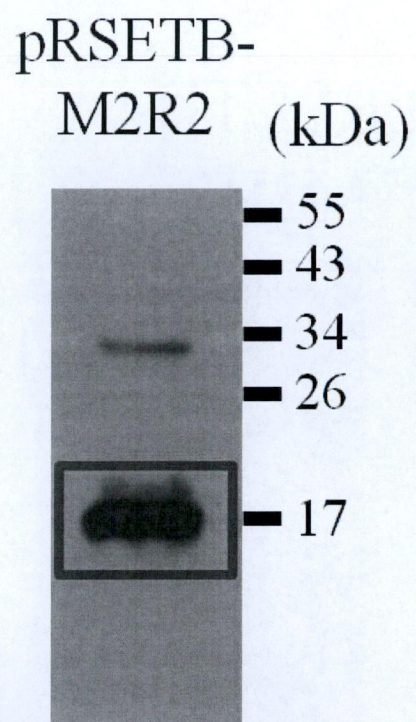


圖 1

(A)



(B)

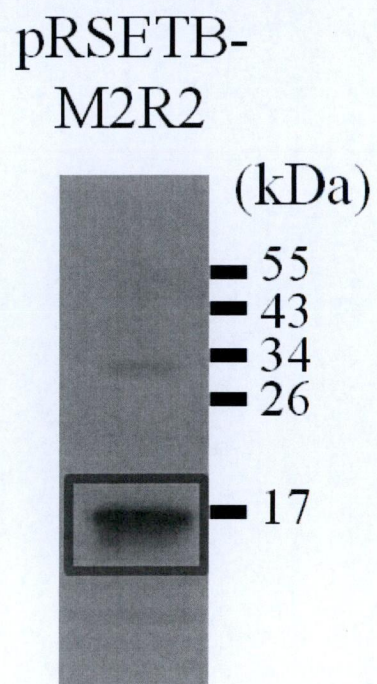


圖 2

(C)

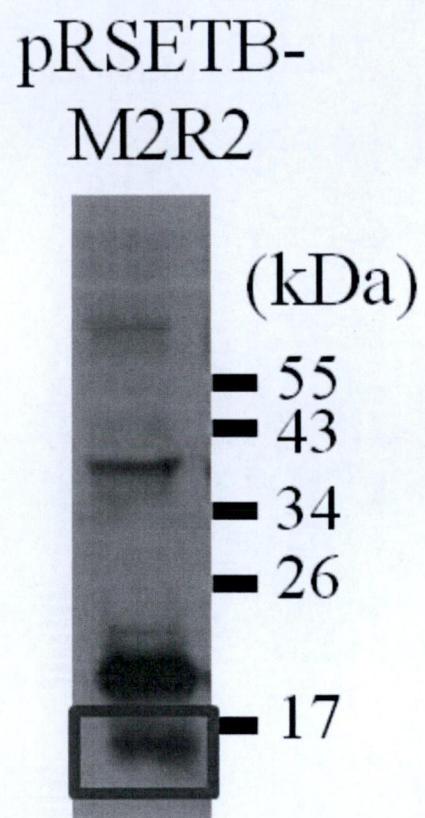


圖 2

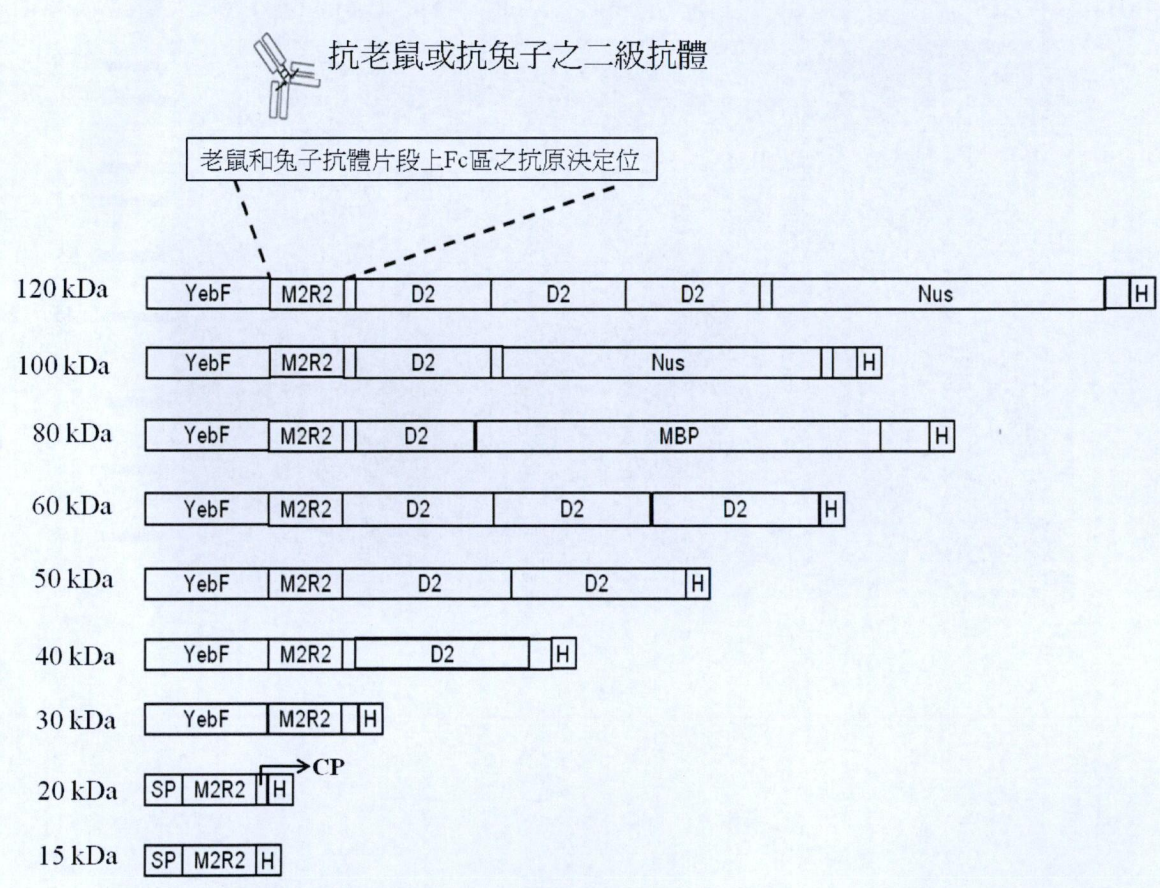


圖 3

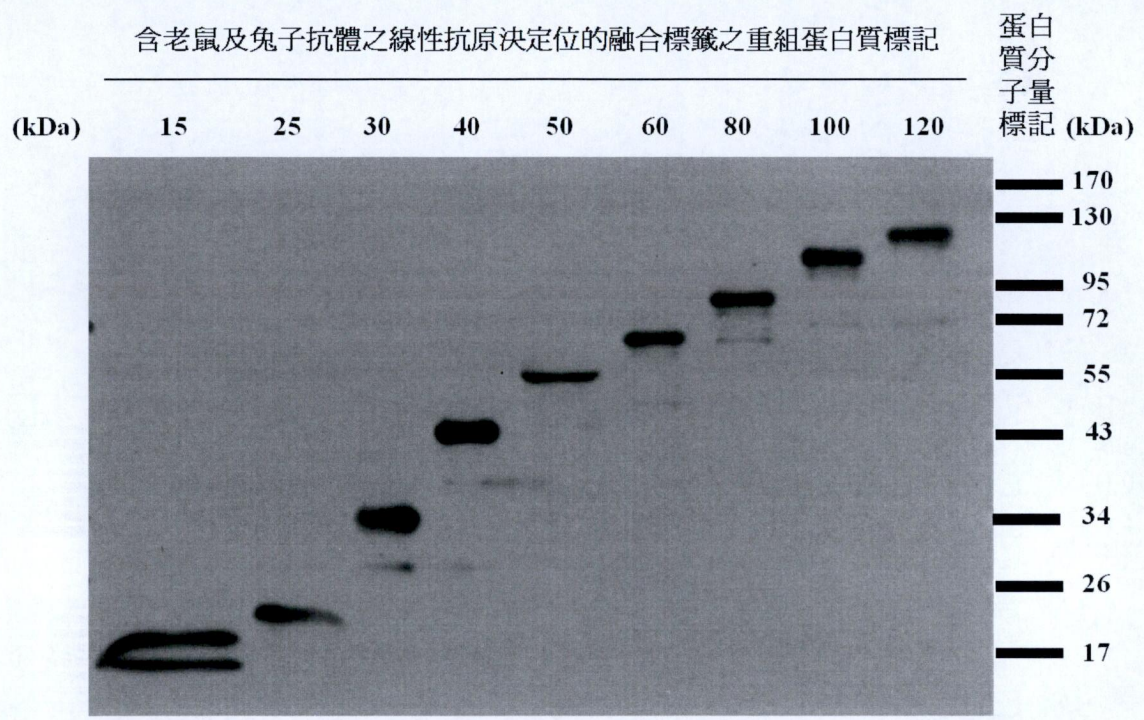


圖 4

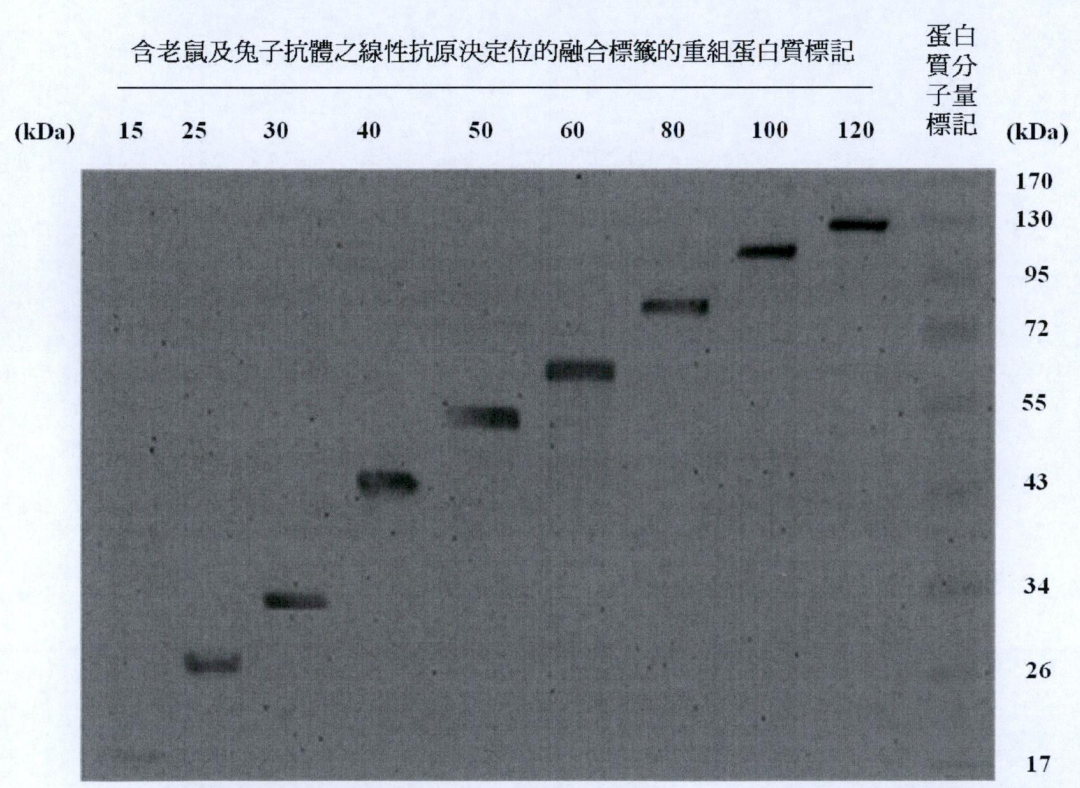


圖 5