



(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 I728264 B

(45)公告日：中華民國 110 (2021) 年 05 月 21 日

(21)申請案號：107131752

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 09 月 10 日

(51)Int. Cl. : A01N63/30 (2020.01)

A01N33/00 (2006.01)

C12P21/04 (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：鄭添祿 CHENG, TIAN LU (TW)；黃建喬 HUANG, CHIEN CHIAO (TW)；林文瑋 LIN, WEN WEI (TW)

(74)代理人：林文杰

(56)參考文獻：

WO 2006/012366A2

WO 2010/077672A2

Olsen JV et al., "Trypsin Cleaves Exclusively C-terminal to Arginine and Lysine Residues" Molecular & Cellular Proteomics, Vol.3, No.6, P.608-614, 2004/03/19

Chan SW et al., "Unusual Amino Acid Determinants of Host Range in the Mtx2 Family of Mosquitocidal Toxins", The Journal of Biological Chemistry, Vol. 271, No. 24, P.14183-14187, 1996/06/14

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：13 項 圖式數：6 共 66 頁

(54)名稱

控制蚊媒傳染疾病傳播之微生物製劑

(57)摘要

本發明提供一種多肽鏈，包括一段具有類胰蛋白酶(trypsin like protease)切位之胺基酸序列，以供蚊蟲腸道消化，以及兩端用以穩定該胺基酸序列之短肽，其中，該段胺基酸序列至少包括一離胺酸(K)或一精胺酸(R)。本發明另係關於利用該多肽鏈將一蚊蟲毒殺蛋白表現於細菌載體之細胞膜上的一種控制蚊媒傳染疾病傳播之微生物製劑，包括一細菌載體、一本發明之多肽鏈、以及一殺蚊蛋白。

The present invention provides a polypeptide which comprises an amino acid sequence with trypsin like protease cutting site for digesting in larval gut, and short peptides of N- and C- terminus for stabilizing the amino acid sequence, in which, the amino acid sequence comprises at least one lysine (K) cutting site or arginine (R). The present invention is also related to a microbial agent for controlling transmission of mosquito borne diseases, which expresses a mosquito killing protein on cell membrane of bacterial carrier by using the polypeptide of present invention, comprising a bacterial carrier, the peptide, and a mosquitocidal toxin.

指定代表圖：

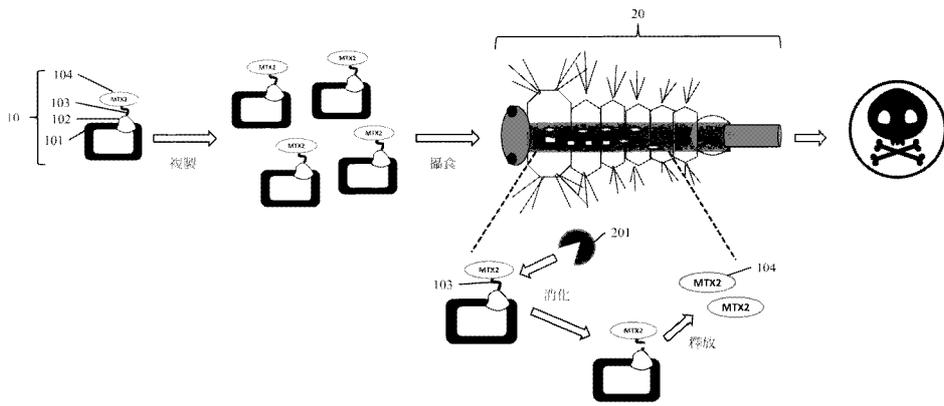


圖 1

符號簡單說明：

10 . . . 控制蚊媒傳染疾病傳播之微生物製劑

101 . . . 細菌載體

102 . . . 胞膜結合蛋白

103 . . . 多肽鏈

104 . . . 蚊蟲毒殺蛋白

20 . . . 子子

201 . . . 子子的腸道酵素

I728264

發明摘要

【發明名稱】(中文/英文)

控制蚊媒傳染疾病傳播之微生物製劑 / A MICROBIAL AGENT FOR CONTROLLING TRANSMISSION OF MOSQUITO-BORNE DISEASES

【中文】

本發明提供一種多肽鏈，包括一段具有類胰蛋白酶酵素 (trypsin like protease) 切位之胺基酸序列，以供蚊蟲腸道消化，以及兩端用以穩定該胺基酸序列之短肽，其中，該段胺基酸序列至少包括一離胺酸 (K) 或一精胺酸 (R)。本發明另係關於利用該多肽鏈將一蚊蟲毒殺蛋白表現於細菌載體之細胞膜上的一種控制蚊媒傳染疾病傳播之微生物製劑，包括一細菌載體、一本發明之多肽鏈、以及一殺蚊蛋白。

【英文】

The present invention provides a polypeptide which comprises an amino acid sequence with trypsin like protease cutting site for digesting in larval gut, and short peptides of N- and C- terminus for stabilizing the amino acid sequence, in which, the amino acid sequence comprises at least one lysine (K) cutting site or arginine (R). The present invention is also related to a microbial agent for controlling transmission of mosquito borne diseases, which expresses a mosquito killing protein on cell membrane of bacterial carrier by using the polypeptide of present invention, comprising a bacterial carrier, the peptide, and a mosquitocidal toxin.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

- 10 控制蚊媒傳染疾病傳播之微生物製劑
- 101 細菌載體
- 102 胞膜結合蛋白
- 103 多肽鏈
- 104 蚊蟲毒殺蛋白
- 20 孢子
- 201 孢子的腸道酵素

【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)

控制蚊媒傳染疾病傳播之微生物製劑 / A MICROBIAL AGENT FOR CONTROLLING TRANSMISSION OF MOSQUITO-BORNE DISEASES

【技術領域】

【0001】 本發明涉及一種微生物製劑，尤其係指一種用於控制蚊媒傳染疾病傳播之微生物製劑。

【先前技術】

【0002】 臺灣、中國、東南亞國家或其他地處熱帶及亞熱帶氣候區的國家，因蚊蟲肆虐而容易造成如日本腦炎、茲卡病毒或登革熱等蚊媒傳染疾病之流行。以登革熱為例，我國已於民國93年就將登革熱列為第二類傳染病，在過去10年中，我國每年都有800件到10000件不等的登革熱確診病例，而在2015年，登革熱確診病例更上升到4萬多件，雖現今醫療發達，加上政策實施得當，登革熱病例正在逐漸減少中，但隨著全球暖化的影響，蚊蟲得以大量繁殖的區域正在逐漸擴散，以我國疾病管制署公告之統計表顯示，2017年開始，大臺北地區登革熱確診的病例數已經開始高於臺南及高雄了。

【0003】 針對環境驅蚊的方式大多採用大範圍噴藥的方式，一者，殺蟲藥劑為化學產物，對環境影響甚大；二者，孑孓好生長於水中，噴灑殺蟲藥劑間接污染了水質，民眾的生活用水品質及健康影響堪慮，開發環境友善的殺蚊方法自是當務之急。目前全世界皆致力於生物防治工作，主張以生物的食物鏈及天敵的相對關係來防治害蟲，本發明便係以食物鏈的概

念設計一種可以讓子孓於攝食當中，將蚊蟲毒殺蛋白一併攝入，並達到殺滅蚊蟲的效果。

【0004】 過去研究已經指出，芽孢桿菌屬的蘇雲金芽孢桿菌 (*Bacillus thuringiensis*) 及球形芽孢桿菌 (*Bacillus sphaericus*) 本身具有可殺死蚊蟲的蚊蟲毒殺蛋白，也有一些利用蘇雲金芽孢桿菌作成的殺蟲劑，但其缺點在於1. 蘇雲金芽孢桿菌並非環境益生菌，2. 蘇雲金芽孢桿菌僅在孢子期才具有殺蚊的特性、3. 蘇雲金芽孢桿菌製劑本身沒有複製的能力，故，本發明提供了一個新的構想，利用一段可被子孓腸道酵素消化之多肽鏈，將蚊蟲毒殺蛋白表現在環境益生菌的細胞膜的胞膜結合蛋白上，利用該細菌載體在環境中具有自我增殖的特性，使得殺蟲劑具有複製性，且該蚊蟲毒殺蛋白可以更快又更有效率地被釋放。

【發明內容】

【0005】 本發明所述之「短肽」係指3至9個胺基酸序列之短肽鏈。

【0006】 本發明之精神在於提供一種微生物製劑之平台，並表現一蚊蟲毒殺蛋白在細菌載體之上，其中，該細菌載體及該蚊蟲毒殺蛋白依其目的之不同而有不同之選擇。

【0007】 本發明之目的係提供一種環境友善之控制蚊媒傳染疾病之傳播的新穎微生物製劑，其主要概念係利用一環境微生物當作載體，並表現一蚊蟲毒殺蛋白於其細胞膜上。

【0008】 本發明之主要技術特徵之一為一種多肽鏈，包括一段具有類胰蛋白酶酵素 (trypsin like protease) 切位之胺基酸序列，以供蚊蟲腸道消化，以及兩端之短肽，用以穩定該胺基酸序列。其中，該胺基酸序列至少

包括一離胺酸 (K) 或一精胺酸 (R)。

【0009】 本發明之另一主要技術特徵係利用該多肽鏈將蚊蟲毒殺蛋白連接於細菌載體之細胞膜上的一種控制蚊媒傳染疾病傳播之微生物製劑，包括一細菌載體、一多肽鏈、以及一蚊蟲毒殺蛋白，其中該蚊蟲毒殺蛋白係指殺蚊蛋白。

【0010】 依據本發明之微生物製劑，於一較佳實施方式中，該細菌載體係為一環境益生菌，包括芽孢桿菌屬 (*Bacillus*) 的細菌、光合細菌及硝化細菌等。

【0011】 依據本發明之微生物製劑，於一較佳實施方式中，該多肽鏈之該胺基酸序列至少包括一離胺酸 (K) 或一精胺酸 (R)。

【0012】 依據本發明之微生物製劑，於一較佳實施方式中，該蚊蟲毒殺蛋白係包括第一型殺蚊蛋白 (Mosquitocidal Toxin 1)、第二型殺蚊蛋白 (Mosquitocidal Toxin 2)、第三型殺蚊蛋白 (Mosquitocidal Toxin 3)、Cry 蛋白 (Cry family proteins)、Cyt 蛋白 (Cyt family proteins)、CLP 蛋白 (Cyclic lipopeptide protein) 或其之任意組合。

【0013】 依據本發明之微生物製劑，於一更佳實施方式中，該蚊蟲毒殺蛋白係第二型殺蚊蛋白 (Mosquitocidal Toxin 2)，其中，當該蚊蟲毒殺蛋白係截短修飾後的第二型殺蚊蛋白 (truncated Mosquitocidal Toxin 2) 時，其效果更佳。

【0014】 依據本發明之微生物製劑，於一較佳實施方式中，該多肽鏈係接合於該細菌載體之細胞膜上的胞膜結合蛋白上，其中，該胞膜結合蛋白依據細菌載體不同而有不同之選擇，如於大腸桿菌 (*E. coli*) 上，則該胞

膜結合蛋白可選擇AIDA蛋白或OmpA蛋白；若於枯草桿菌 (*B. subtilis*) 之上，則該胞膜結合蛋白可選擇YhcR蛋白。

【0015】 本發明之主要技術特徵又包含了一重組基因，包括可轉錄出該微生物製劑之一胞膜結合蛋白基因、一多肽鏈基因、及一蚊蟲毒殺蛋白基因，其中，該多肽鏈基因係設置於該胞膜結合蛋白基因及該蚊蟲毒殺蛋白基因之間。

【0016】 依據本發明之重組基因，於一較佳實施方式中，該多肽鏈基因具有一類胰蛋白酶 (trypsin like protease) 切位之胺基酸序列之基因，其中該胺基酸序列之基因至少包括一離胺酸 (K) 或一精胺酸 (R) 之基因。

【0017】 依據本發明之重組基因，於一較佳實施方式中，該蚊蟲毒殺蛋白的基因係包括第一型殺蚊蛋白 (Mosquitocidal Toxin 1) 基因、第二型殺蚊蛋白 (Mosquitocidal Toxin 2) 基因、第三型殺蚊蛋白 (Mosquitocidal Toxin 3) 基因、Cry蛋白 (Cry family proteins) 基因、Cyt蛋白 (Cyt family proteins) 基因、CLP蛋白 (Cyclic lipopeptide protein) 基因或其之任意組合。

【0018】 依據本發明之微生物製劑，於一更佳實施方式中，該蚊蟲毒殺蛋白係第二型殺蚊蛋白 (Mosquitocidal Toxin 2) 基因，其中，當該蚊蟲毒殺蛋白係截短修飾後的第二型殺蚊蛋白 (truncated Mosquitocidal Toxin 2) 基因時，其效果更佳。

【0019】 依據本發明之微生物製劑，於一較佳實施方式中，該胞膜結合蛋白基因依據細菌載體不同而有不同之選擇，如於大腸桿菌 (*E. coli*) 上，則該胞膜結合蛋白基因可選擇AIDA蛋白基因或OmpA蛋白基因；若於枯草桿菌 (*B. subtilis*) 之上，則該胞膜結合蛋白可選擇YhcR蛋白基因。

【0020】 本發明之微生物製劑於控制蚊媒傳染疾病之用途，其係利用投以適量之本發明於水中，由於蚊子的幼蟲-孑孓係生長於水中，尤其係不流動的水，故將適量之本發明之微生物製劑投於水中，則孑孓於進食的同時，就會將本發明之微生物製劑攝入，經其腸道酵素分解該多肽鏈之後，蚊蟲毒殺蛋白隨之釋放，進而達到殺蚊以控制蚊媒傳染疾病之目的。

【圖式簡單說明】

【0021】 圖1為本發明之實施態樣圖。

【0022】 圖2為本發明用於大腸桿菌 (*E. coli*) 表現系統試驗之融合蚊蟲毒殺蛋白基因的重組基因組，KM4重組基因為本發明之重組基因實驗組1；KM6重組基因為不含有多肽鏈基因（以GGGSG取代之）的實驗組2；KM3重組基因為不含多肽鏈基因及胞膜蛋白基因的對照組。

【0023】 圖3為本發明用於大腸桿菌 (*E. coli*) 表現系統試驗之融合蚊蟲毒殺蛋白的重組蛋白表現結果，左圖為SDS-PAGE的結果，右圖為以鼠源抗GST tag的一級抗體進行西方墨點法的結果。

【0024】 圖4為本發明於大腸桿菌 (*E. coli*) 表現系統中對於埃及斑紋幼蟲之毒殺性結果，圖A為KM4及KM6進入幼蟲體內的實施態樣圖，圖B為KM4及KM6的毒殺試驗結果。

【0025】 圖5為本發明用於枯草桿菌 (*B. subtilis*) 表現試驗之融合蚊蟲毒殺蛋白的枯草桿菌表現系統重組基因。

【0026】 圖6為本發明用於枯草桿菌 (*B. subtilis*) 表現試驗之融合蚊蟲毒殺蛋白的枯草桿菌表現系統重組蛋白表現結果。

【實施方式】

【0027】 本發明提供一種控制蚊媒傳染疾病傳播之微生物製劑，包括一細菌載體、一多肽鏈、以及一蚊蟲毒殺蛋白，其中，該細菌載體、該多肽鏈及該蚊蟲毒殺蛋白係依據不同目的不同物種而加以變更，例如本發明之最佳實施方式係利用一環境微生物來控制登革熱之傳播，而登革熱係由蚊蟲傳播，其幼蟲係生長於水中的孑孓；又，枯草桿菌 (*B. subtilis*) 係常用於調整水質之環境益生菌，故，該環境益生菌選用枯草桿菌 (*B. subtilis*)，該多肽鏈選用一段具有可被蚊蟲腸道酵素消化之切位之胺基酸序列，該蚊蟲毒殺蛋白選用殺蚊蛋白。

【0028】 如圖1所示，本發明旨在建立一種控制登革熱傳播之微生物製劑10，其包括一細菌載體101、一可被子孑腸道酵素消化之多肽鏈103、以及一蚊蟲毒殺蛋白104，其中，該蚊蟲毒殺蛋白104係藉由該多肽鏈103表現於該細菌載體101之胞膜結合蛋白102上。當孑孓20自環境中進食的同時，就會將本發明之微生物製劑一併攝入，經孑孓的腸道酵素201分解該多肽鏈103之後，該蚊蟲毒殺蛋白104隨之釋放而達到殺蚊以控制登革熱傳播之目的。

【0029】 依據本發明之微生物製劑，其實施方式如下：

【0030】 1. 建構大腸桿菌 (*E. coli*) 表現系統之融合蚊蟲毒殺蛋白重組基因的表現質體

【0031】 本發明首先建構可於大腸桿菌 (*E. coli*) 中表現之融合蚊蟲毒殺蛋白基因的表現質體，包含一重組基因及一表現質體，以利實驗室試驗。

【0032】 本發明之該重組基因的蚊蟲毒殺蛋白基因係選用截短修飾

後的來自於31-2型球形芽孢桿菌的第二型殺蚊蛋白（truncated Mosquitocidal Toxin 2; tMTX2）基因，並將該重組基因克隆（clone）至pET42b表現質體內。請參照圖2，本發明植入之重組基因，其5'端接入GST tag基因、3'端接入AIDA胞膜蛋白基因，並於tMTX2基因及AIDA基因之間設計一段用以表現包含SEQ ID NO.1之多肽鏈（GGG-KRWY-GGG）的基因，該多肽鏈基因具有可被蚊蟲腸道消化的類胰蛋白酶（trypsin like protease）切位之胺基酸序列之基因及兩端用以穩定該多肽鏈之短肽基因，稱之為KM4重組基因（實驗組1），同時並另外設計了不含有該多肽鏈基因（以GGGSG取代GGG-KRWY-GGG）的KM6重組基因（實驗組2）、及不含該多肽鏈基因及胞膜蛋白基因的KM3重組基因（對照組）。

【0033】 2. 大腸桿菌 (*E. coli*) 表現系統之融合蚊蟲毒殺蛋白的重組蛋白表現

【0034】 將KM3、KM4及KM6重組基因的融合蚊蟲毒殺蛋白表現質體分別轉型（Transform）入BL21 (DE3)型大腸桿菌（*E. coli*）表現載體中，以LB培養液培養至細菌濃度吸光值達OD600nm約為0.4時，開始加入0.1mM的異丙基-β-D-硫代半乳糖苷（Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside; IPTG）誘導（induction）培養，進行蛋白質表現，生產出KM3、KM4及KM6重組蛋白。因為KM3、KM4及KM6的蛋白質大小不同，因此在誘導時分別為KM3誘導0.5小時、KM4誘導3小時及KM6誘導1小時，以求蛋白表現量一致。其後，以SDS-PAGE及西方墨點法進行蛋白質驗證，如圖3所示，左圖為SDS-PAGE的結果，右圖為以鼠源抗GST tag的一級抗體進行西方墨點法的結果。結果顯示，KM4（SEQ ID NO.3）及KM6（SEQ ID NO.4）的表現蛋

白大小分別為預期的108 kDa（千道爾吞），而KM3（SEQ ID NO.2）的表現蛋白大小為預期的58 kDa。

【0035】 3. tMTX2-AIDA表現之BL21 (DE3)型大腸桿菌 (E. coli) 對於埃及斑紋幼蟲之毒殺性測試

【0036】 經蛋白表現確認之後，KM4及KM6分別用於埃及斑紋幼蟲之毒殺性測試，其中，如圖4A所示，KM4具有本發明之該多肽鏈，其tMTX2可被蚊蟲腸道酵素切割分離，KM6之tMTX2則不可被蚊蟲腸道酵素切割分離。

【0037】 如圖4b所示，KM4組及KM6組以不同濃度（ 10^5 cells/ml – 10^8 cells/ml）與埃及斑紋幼蟲培養60個小時（n=5，獨立且重複3次試驗）後，測量其死亡率，並以未轉型的BL21 (DE3)型大腸桿菌（*E. coli*）（同樣在濃度為OD600nm約為0.4時，以IPTG誘導培養3小時）當作對照組。結果顯示，相較於控制組，KM4與KM6具有明顯的毒殺效果，且KM4的毒殺效果相較於KM6來得更快更有效，且其造成子孓死亡的半數致死劑量（LC50）大約落在 10^5 cells/ml – 10^6 cells/ml左右，該結果證明本策略在大腸桿菌（*E. coli*）的系統上是成功的。

【0038】 4. 建構枯草桿菌 (B. subtilis) 表現系統之融合蚊蟲毒殺蛋白重組基因的表現質體

【0039】 經大腸桿菌（*E. coli*）表現系統證明本發明是成功的之後，本發明進一步實施於環境益生菌中，其中所選用的環境益生菌為枯草桿菌（*B. subtilis*）。

【0040】 本發明之重組基因與大腸桿菌（*E. coli*）表現系統的建構方

式相同，於殺蚊蛋白（tMTX2）及胞膜結合蛋白之間設計一段用以表現包含SEQ ID NO.1之多肽鏈（GGG-KRWY-GGG）的基因，不同點則係在於，本次使用之重組基因於胞膜結合蛋白基因前多接上一段HA tag基因。由於選用枯草桿菌（*B. subtilis*）當作細菌載體，故胞膜結合蛋白基因選用YhcR基因，如圖5所示，本次試驗建構兩種不同的重組基因，分別命名為枯草桿菌表現系統重組基因a及枯草桿菌表現系統重組基因b，其中，枯草桿菌表現系統重組基因a可表現「(tMTX 2) - (GGG-KRWY-GGG) - (HA) - (YhcR)」之蛋白（SEQ ID NO.5），枯草桿菌表現系統重組基因b則係在5'端多加一個GST tag，其可表現「(GST) - (tMTX 2) - (GGG-KRWY-GGG) - (HA) - (YhcR)」之蛋白（SEQ ID NO.6）。二者皆克隆（clone）至pHY300PLK表現質體內。

【0041】 5. 枯草桿菌 (*B. subtilis*) 表現融合蚊蟲毒殺蛋白

【0042】 將枯草桿菌表現系統重組基因a及枯草桿菌表現系統重組基因b的融合蚊蟲毒殺蛋白表現質體分別轉型（Transform）入枯草桿菌（*B. subtilis*）載體中表現，以LB培養液培養至細菌濃度吸光值達OD600nm約為0.6時，開始加入1mM的異丙基-β-D-硫代半乳糖苷（Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside; IPTG）誘導（induction）培養3小時，進行蛋白質表現。其後，以SDS-PAGE及西方墨點法進行蛋白質驗證，本次試驗的兩種不同重組基因，枯草桿菌表現系統重組基因a轉譯出的枯草桿菌表現系統重組蛋白a之全長共56 kDa，枯草桿菌表現系統重組基因b轉譯出的枯草桿菌表現系統重組蛋白b之全長共80 kDa。如圖6所示，以鼠源抗HA tag的一級抗體進行西方墨點法的結果顯示，枯草桿菌表現系統重組蛋白a並未產生預期

的56 kDa蛋白，反而出現許多缺損的蛋白（約36 kDa），而枯草桿菌表現系統重組蛋白b的表現蛋白大小為預期的80 kDa，證明了枯草桿菌表現系統重組蛋白b係相對穩定且被成功表現出來的。

【0043】 由前述結果可以證實，將tMTX2蛋白透過本發明之多肽鏈表現在細菌載體的胞膜結合蛋白上，確實具有良好的殺滅蚊子幼蟲的效率，且本發明也成功將tMTX2蛋白表現在枯草桿菌（*B. subtilis*）上，本發明之微生物製劑可同時應用於水質改善及控制蚊媒傳染疾病的傳播。

【符號說明】

【0044】	10	控制蚊媒傳染疾病傳播之微生物製劑
【0045】	101	細菌載體
【0046】	102	胞膜結合蛋白
【0047】	103	多肽鏈
【0048】	104	蚊蟲毒殺蛋白
【0049】	20	孑孓
【0050】	201	孑孓的腸道酵素

【序列表】

SEQUENCE LISTING

<110> 高雄醫學大學 (Kaohsiung Medical University)

<120> 控制蚊媒傳染疾病傳播之微生物製劑

<130> 3098-KMU-TW

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide

<400> 1

Lys Arg Trp Tyr

1

<210> 2

<211> 523

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> KM3

<400> 2

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 Ala Met Gly Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp

20

25

30

Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu

35

40

45

Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys

50

55

60

Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro

65

70

75

80

Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile

85

90

95

Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu

100

105

110

Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr

109年5月 號 替換頁

115

120

125

Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val

130

135

140

Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg

145

150

155

160

Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn Gly Asp His Val Thr His Pro Asp

165

170

175

Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met

180

185

190

Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu

195

200

205

Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala

210

215

220

Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro

225

230

235

240

Pro Lys Ser Asp Glu Leu Leu Phe Val Asn Gly Ser Ile Tyr Thr Ala

245

250

255

Lys Ala Thr Thr Ile His Glu Asn Asn His Asp Ile Ile Lys Gln Gln

260

265

270

Gly Val Ser Ile Glu Asp Ile Asp Lys Lys Ile Asp Asn Met Ile Ala

275

280

285

Ser Ile Pro Pro Leu Phe Gly Phe Leu Pro Tyr Ser Arg Phe Pro Tyr

109年5月 號 替換頁

290

295

300

Ile Phe Gly Glu Ser Val Asp Val Ser Gly Ile Asn Ile Glu Asn Thr

305

310

315

320

Asn Val Thr Ser Val Val Pro Leu Phe Ile Gly Ser Asn Thr Phe Glu

325

330

335

Asn Thr Thr Asp Arg Thr Met Thr Phe Asn Thr Val Ser Phe Ser Lys

340

345

350

Ser Ile Thr Asp Ser Thr Thr Thr Gln Thr Leu Asn Gly Phe Lys Thr

355

360

365

Ala Phe Glu Ala Ser Gly Lys Val Gly Ile Pro Leu Val Ala Glu Gly

370

375

380

Gln Ile Lys Thr Thr Leu Glu Tyr Asn Phe Ser His Thr Asn Ser Asn
 385 390 395 400

Thr Lys Ser Val Thr Thr Thr Tyr Thr Val Pro Pro Gln Pro Ile Pro
 405 410 415

Val Pro Pro His Thr Lys Thr Arg Thr Asp Val Tyr Leu Asn Gln Val
 420 425 430

Ser Ile Ser Gly Asn Val Glu Ile Tyr Ala Asp Ala Ile Thr Gly Ile
 435 440 445

Lys Ala Glu Ser Ser Gly Thr Val Ile Ser Ile Gly Asp Gly Leu Asn
 450 455 460

Leu Ala Ser Asn Thr Tyr Gly Leu Ile Arg Ser Pro Gln Asp Pro Asp

109年5月 號 替換頁

465

470

475

480

Arg Val Arg Ala Ile Gly Ser Gly Lys Phe Asn Leu Ile His Gly Ala

485

490

495

Asp Phe Thr Ala Ile Thr Tyr Asp Ile Thr Ser Gly Glu Ala Ser Ala

500

505

510

Arg Ile Ile Asp Val Lys Glu Ile Ser Phe Lys

515

520

<210> 3

<211> 983

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> KM4

<400> 3

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ala

1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Gly Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp

20 25 30

Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu

35 40 45

Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys

50 55 60

Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro

65 70 75 80

109年5月 號 替換頁

Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile
 85 90 95

Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu
 100 105 110

Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr
 115 120 125

Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val
 130 135 140

Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg
 145 150 155 160

Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn Gly Asp His Val Thr His Pro Asp

165

170

175

Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met

180

185

190

Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu

195

200

205

Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala

210

215

220

Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro

225

230

235

240

Pro Lys Ser Asp Glu Leu Leu Phe Val Asn Gly Ser Ile Tyr Thr Ala

245

250

255

109年5月 號 替換頁

Lys Ala Thr Thr Ile His Glu Asn Asn His Asp Ile Ile Lys Gln Gln
 260 265 270

Gly Val Ser Ile Glu Asp Ile Asp Lys Lys Ile Asp Asn Met Ile Ala
 275 280 285

Ser Ile Pro Pro Leu Phe Gly Phe Leu Pro Tyr Ser Arg Phe Pro Tyr
 290 295 300

Ile Phe Gly Glu Ser Val Asp Val Ser Gly Ile Asn Ile Glu Asn Thr
 305 310 315 320

Asn Val Thr Ser Val Val Pro Leu Phe Ile Gly Ser Asn Thr Phe Glu
 325 330 335

Asn Thr Thr Asp Arg Thr Met Thr Phe Asn Thr Val Ser Phe Ser Lys

340

345

350

Ser Ile Thr Asp Ser Thr Thr Thr Gln Thr Leu Asn Gly Phe Lys Thr

355

360

365

Ala Phe Glu Ala Ser Gly Lys Val Gly Ile Pro Leu Val Ala Glu Gly

370

375

380

Gln Ile Lys Thr Thr Leu Glu Tyr Asn Phe Ser His Thr Asn Ser Asn

385

390

395

400

Thr Lys Ser Val Thr Thr Thr Tyr Thr Val Pro Pro Gln Pro Ile Pro

405

410

415

Val Pro Pro His Thr Lys Thr Arg Thr Asp Val Tyr Leu Asn Gln Val

420

425

430

109年5月 號 替換頁

Ser Ile Ser Gly Asn Val Glu Ile Tyr Ala Asp Ala Ile Thr Gly Ile
435 440 445

Lys Ala Glu Ser Ser Gly Thr Val Ile Ser Ile Gly Asp Gly Leu Asn
450 455 460

Leu Ala Ser Asn Thr Tyr Gly Leu Ile Arg Ser Pro Gln Asp Pro Asp
465 470 475 480

Arg Val Arg Ala Ile Gly Ser Gly Lys Phe Asn Leu Ile His Gly Ala
485 490 495

Asp Phe Thr Ala Ile Thr Tyr Asp Ile Thr Ser Gly Glu Ala Ser Ala
500 505 510

Arg Ile Ile Asp Val Lys Glu Ile Ser Phe Lys Gly Gly Gly Lys Arg

515

520

525

Trp Tyr Gly Gly Gly Val Asp Thr Arg Asp Pro Thr Lys Glu Ser Ala

530

535

540

Gly Asn Thr Leu Thr Val Ser Asn Tyr Thr Gly Thr Pro Gly Ser Val

545

550

555

560

Ile Ser Leu Gly Gly Val Leu Glu Gly Asp Asn Ser Leu Thr Asp Arg

565

570

575

Leu Val Val Lys Gly Asn Thr Ser Gly Gln Ser Asp Ile Val Tyr Val

580

585

590

Asn Glu Asp Gly Ser Gly Gly Gln Thr Arg Asp Gly Ile Asn Ile Ile

595

600

605

109年5月 號 替換頁

Ser Val Glu Gly Asn Ser Asp Ala Glu Phe Ser Leu Lys Asn Arg Val
 610 615 620

Val Ala Gly Ala Tyr Asp Tyr Thr Leu Gln Lys Gly Asn Glu Ser Gly
 625 630 635 640

Thr Asp Asn Lys Gly Trp Tyr Leu Thr Ser His Leu Pro Thr Ser Asp
 645 650 655

Thr Arg Gln Tyr Arg Pro Glu Asn Gly Ser Tyr Ala Thr Asn Met Ala
 660 665 670

Leu Ala Asn Ser Leu Phe Leu Met Asp Leu Asn Glu Arg Lys Gln Phe
 675 680 685

Arg Ala Met Ser Asp Asn Thr Gln Pro Glu Ser Ala Ser Val Trp Met

690

695

700

Lys Ile Thr Gly Gly Arg Ser Ser Gly Lys Leu Asn Asp Gly Gln Asn

705

710

715

720

Lys Thr Thr Thr Asn Gln Phe Ile Asn Gln Leu Gly Gly Asp Ile Tyr

725

730

735

Lys Phe His Ala Glu Gln Leu Gly Asp Phe Thr Leu Gly Ile Met Gly

740

745

750

Gly Tyr Ala Asn Ala Lys Gly Lys Thr Ile Asn Tyr Thr Ser Asn Lys

755

760

765

Ala Ala Arg Asn Thr Leu Asp Gly Tyr Ser Val Gly Val Tyr Gly Thr

770

775

780

109年5月 號 替換頁

Trp Tyr Gln Asn Gly Glu Asn Ala Thr Gly Leu Phe Ala Glu Thr Trp
 785 790 795 800

Met Gln Tyr Asn Trp Phe Asn Ala Ser Val Lys Gly Asp Gly Leu Glu
 805 810 815

Glu Glu Lys Tyr Asn Leu Asn Gly Leu Thr Ala Ser Ala Gly Gly Gly
 820 825 830

Tyr Asn Leu Asn Val His Thr Trp Thr Ser Pro Glu Gly Ile Thr Gly
 835 840 845

Glu Phe Trp Leu Gln Pro His Leu Gln Ala Val Trp Met Gly Val Thr
 850 855 860

Pro Asp Thr His Gln Glu Asp Asn Gly Thr Val Val Gln Gly Ala Gly

Val Ala Tyr Gln Ala Gly Gly His Gly Ser Asn Ala Ile Ser Gly Ala
 965 970 975

Leu Gly Ile Lys Tyr Ser Phe
 980

<210> 4

<211> 983

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> KM6

<400> 4

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 Ala Met Gly Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp

20

25

30

Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu

35

40

45

Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys

50

55

60

Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro

65

70

75

80

Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile

85

90

95

Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu

109年5月 號 替換頁

100

105

110

Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr

115

120

125

Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val

130

135

140

Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg

145

150

155

160

Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn Gly Asp His Val Thr His Pro Asp

165

170

175

Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met

180

185

190

Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu

195

200

205

Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala

210

215

220

Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro

225

230

235

240

Pro Lys Ser Asp Glu Leu Gly Gly Leu Glu Leu Phe Val Asn Gly Ser

245

250

255

Ile Tyr Thr Ala Lys Ala Thr Thr Ile His Glu Asn Asn His Asp Ile

260

265

270

Ile Lys Gln Gln Gly Val Ser Ile Glu Asp Ile Asp Lys Lys Ile Asp

109年5月 號 替換頁

275

280

285

Asn Met Ile Ala Ser Ile Pro Pro Leu Phe Gly Phe Leu Pro Tyr Ser

290

295

300

Arg Phe Pro Tyr Ile Phe Gly Glu Ser Val Asp Val Ser Gly Ile Asn

305

310

315

320

Ile Glu Asn Thr Asn Val Thr Ser Val Val Pro Leu Phe Ile Gly Ser

325

330

335

Asn Thr Phe Glu Asn Thr Thr Asp Arg Thr Met Thr Phe Asn Thr Val

340

345

350

Ser Phe Ser Lys Ser Ile Thr Asp Ser Thr Thr Thr Gln Thr Leu Asn

355

360

365

Gly Phe Lys Thr Ala Phe Glu Ala Ser Gly Lys Val Gly Ile Pro Leu

370

375

380

Val Ala Glu Gly Gln Ile Lys Thr Thr Leu Glu Tyr Asn Phe Ser His

385

390

395

400

Thr Asn Ser Asn Thr Lys Ser Val Thr Thr Thr Tyr Thr Val Pro Pro

405

410

415

Gln Pro Ile Pro Val Pro Pro His Thr Lys Thr Arg Thr Asp Val Tyr

420

425

430

Leu Asn Gln Val Ser Ile Ser Gly Asn Val Glu Ile Tyr Ala Asp Ala

435

440

445

Ile Thr Gly Ile Lys Ala Glu Ser Ser Gly Thr Val Ile Ser Ile Gly

109年5月 號 替換頁

450

455

460

Asp Gly Leu Asn Leu Ala Ser Asn Thr Tyr Gly Leu Ile Arg Ser Pro

465

470

475

480

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

485

490

495

Ile His Gly Ala Asp Phe Thr Ala Ile Thr Tyr Asp Ile Thr Ser Gly

500

505

510

Glu Ala Ser Ala Arg Ile Ile Asp Val Lys Glu Ile Ser Phe Lys Gly

515

520

525

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

530

535

540

Gly Asn Thr Leu Thr Val Ser Asn Tyr Thr Gly Thr Pro Gly Ser Val
 545 550 555 560

Ile Ser Leu Gly Gly Val Leu Glu Gly Asp Asn Ser Leu Thr Asp Arg
 565 570 575

Leu Val Val Lys Gly Asn Thr Ser Gly Gln Ser Asp Ile Val Tyr Val
 580 585 590

Asn Glu Asp Gly Ser Gly Gly Gln Thr Arg Asp Gly Ile Asn Ile Ile
 595 600 605

Ser Val Glu Gly Asn Ser Asp Ala Glu Phe Ser Leu Lys Asn Arg Val
 610 615 620

Val Ala Gly Ala Tyr Asp Tyr Thr Leu Gln Lys Gly Asn Glu Ser Gly

Lys Thr Thr Thr Asn Gln Phe Ile Asn Gln Leu Gly Gly Asp Ile Tyr

725

730

735

Lys Phe His Ala Glu Gln Leu Gly Asp Phe Thr Leu Gly Ile Met Gly

740

745

750

Gly Tyr Ala Asn Ala Lys Gly Lys Thr Ile Asn Tyr Thr Ser Asn Lys

755

760

765

Ala Ala Arg Asn Thr Leu Asp Gly Tyr Ser Val Gly Val Tyr Gly Thr

770

775

780

Trp Tyr Gln Asn Gly Glu Asn Ala Thr Gly Leu Phe Ala Glu Thr Trp

785

790

795

800

Met Gln Tyr Asn Trp Phe Asn Ala Ser Val Lys Gly Asp Gly Leu Glu

109年5月 號 替換頁

805

810

815

Glu Glu Lys Tyr Asn Leu Asn Gly Leu Thr Ala Ser Ala Gly Gly Gly

820

825

830

Tyr Asn Leu Asn Val His Thr Trp Thr Ser Pro Glu Gly Ile Thr Gly

835

840

845

Glu Phe Trp Leu Gln Pro His Leu Gln Ala Val Trp Met Gly Val Thr

850

855

860

Pro Asp Thr His Gln Glu Asp Asn Gly Thr Val Val Gln Gly Ala Gly

865

870

875

880

Lys Asn Asn Ile Gln Thr Lys Ala Gly Ile Arg Ala Ser Trp Lys Val

885

890

895

Lys Ser Thr Leu Asp Lys Asp Thr Gly Arg Glu Phe Arg Pro Tyr Ile

900

905

910

Glu Ala Asn Trp Ile His Asn Thr His Glu Phe Gly Val Lys Met Ser

915

920

925

Asp Asp Ser Gln Leu Leu Ser Gly Ser Arg Asn Gln Gly Glu Ile Lys

930

935

940

Thr Gly Ile Glu Gly Val Ile Thr Gln Asn Leu Ser Val Asn Gly Gly

945

950

955

960

Val Ala Tyr Gln Ala Gly Gly His Gly Ser Asn Ala Ile Ser Gly Ala

965

970

975

Leu Gly Ile Lys Tyr Ser Phe

980

<210> 5

<211> 508

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 枯草桿菌表現系統重組蛋白a

<400> 5

Met Leu Ser Val Glu Met Ile Ser Arg Gln Asn Arg Cys His Tyr Val

1

5

10

15

Tyr Lys Gly Gly Asn Met Met Arg Arg Ile Leu His Ile Val Leu Ile

20

25

30

Thr Ala Leu Met Phe Leu Asn Val Met Tyr Thr Phe Glu Ala Val Lys

35

40

45

Ala Ala Ser Leu Phe Val Asn Gly Ser Ile Tyr Thr Ala Lys Ala Thr

50

55

60

Thr Ile His Glu Asn Asn His Asp Ser Ile Lys Gln Gln Gly Val Ser

65

70

75

80

Ile Glu Asp Ile Asp Lys Lys Ile Asp Asn Met Ile Ala Ser Ile Pro

85

90

95

Pro Leu Phe Gly Phe Leu Ser Tyr Ser Arg Phe Pro Tyr Ile Phe Gly

100

105

110

Glu Ser Val Asp Val Ser Gly Ile Asn Ile Glu Asn Thr Asn Val Thr

115

120

125

109年5月 號 替換頁

Ser Val Val Pro Leu Phe Ile Gly Ser Asn Thr Phe Glu Asn Thr Thr
 130 135 140

Asp Arg Thr Met Thr Phe Asn Thr Val Ser Phe Ser Lys Ser Ile Thr
 145 150 155 160

Asp Ser Thr Thr Thr Gln Thr Leu Asn Gly Phe Lys Thr Ala Phe Glu
 165 170 175

Ala Ser Gly Lys Val Gly Ile Pro Leu Val Ala Glu Gly Gln Ile Lys
 180 185 190

Thr Thr Leu Glu Tyr Asn Phe Ser His Thr Asn Ser Asn Thr Lys Ser
 195 200 205

Val Thr Thr Thr Tyr Thr Val Pro Pro Gln Pro Ile Pro Val Pro Pro

210

215

220

His Thr Lys Thr Arg Thr Asp Val Tyr Leu Asn Gln Val Ser Ile Ser

225

230

235

240

Gly Asn Val Glu Ile Tyr Ala Asp Ala Ile Thr Gly Ile Lys Ala Glu

245

250

255

Ser Ser Gly Lys Val Ile Ser Ile Gly Asp Gly Leu Asn Leu Ala Ser

260

265

270

Asn Thr Tyr Gly Leu Ile Arg Ser Pro Gln Asp Pro Asp Arg Val Arg

275

280

285

Ala Ile Gly Ser Gly Lys Phe Asn Leu Ile His Gly Ala Asp Phe Thr

290

295

300

109年5月 號 替換頁

Ala Ile Thr Tyr Asp Ile Thr Ser Gly Glu Thr Ser Ala Arg Ile Ile
 305 310 315 320

Asp Val Lys Glu Ile Ser Phe Lys Gly Gly Gly Lys Arg Trp Tyr Gly
 325 330 335

Gly Gly Val Asp Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Leu Asp Leu
 340 345 350

Glu Ala Thr Val Glu Tyr Val Lys Ser Phe Asp Glu Pro Ile Ala Tyr
 355 360 365

Thr Lys Glu Gly Arg Ile Lys Leu Ala Glu Ala Ser Asp Ile Glu Asp
 370 375 380

Pro Val Thr Glu Asp Pro Ile Thr Glu Glu Pro Gly Asp Asp Pro Gly

Tyr Asn Phe Met Val Ile Gly Ala Ala Val Thr Leu Ser Gly Thr Tyr
 485 490 495

Leu Tyr Val Arg Arg Lys Arg Ser Ala Ser Arg Thr
 500 505

<210> 6

<211> 730

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 枯草桿菌表現系統重組蛋白b

<400> 6

Met Leu Ser Val Glu Met Ile Ser Arg Gln Asn Arg Cys His Tyr Val
 1 5 10 15

Tyr Lys Gly Gly Asn Met Met Arg Arg Ile Leu His Ile Val Leu Ile

20

25

30

Thr Ala Leu Met Phe Leu Asn Val Met Tyr Thr Phe Glu Ala Val Lys

35

40

45

Ala Ala Ser Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu

50

55

60

Val Gln Pro Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu

65

70

75

80

Glu His Leu Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys

85

90

95

Phe Glu Leu Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly

109年5月 號 替換頁

100

105

110

Asp Val Lys Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp

115

120

125

Lys His Asn Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser

130

135

140

Met Leu Glu Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile

145

150

155

160

Ala Tyr Ser Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys

165

170

175

Leu Pro Glu Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr

180

185

190

Tyr Leu Asn Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp
 195 200 205

Ala Leu Asp Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe
 210 215 220

Pro Lys Leu Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile
 225 230 235 240

Asp Lys Tyr Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly
 245 250 255

Trp Gln Ala Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp Ala
 260 265 270

Ser Leu Phe Val Asn Gly Ser Ile Tyr Thr Ala Lys Ala Thr Thr Ile

109年5月 號 替換頁

275

280

285

His Glu Asn Asn His Asp Ser Ile Lys Gln Gln Gly Val Ser Ile Glu

290

295

300

Asp Ile Asp Lys Lys Ile Asp Asn Met Ile Ala Ser Ile Pro Pro Leu

305

310

315

320

Phe Gly Phe Leu Ser Tyr Ser Arg Phe Pro Tyr Ile Phe Gly Glu Ser

325

330

335

Val Asp Val Ser Gly Ile Asn Ile Glu Asn Thr Asn Val Thr Ser Val

340

345

350

Val Pro Leu Phe Ile Gly Ser Asn Thr Phe Glu Asn Thr Thr Asp Arg

355

360

365

Thr Met Thr Phe Asn Thr Val Ser Phe Ser Lys Ser Ile Thr Asp Ser
 370 375 380

Thr Thr Thr Gln Thr Leu Asn Gly Phe Lys Thr Ala Phe Glu Ala Ser
 385 390 395 400

Gly Lys Val Gly Ile Pro Leu Val Ala Glu Gly Gln Ile Lys Thr Thr
 405 410 415

Leu Glu Tyr Asn Phe Ser His Thr Asn Ser Asn Thr Lys Ser Val Thr
 420 425 430

Thr Thr Tyr Thr Val Pro Pro Gln Pro Ile Pro Val Pro Pro His Thr
 435 440 445

Lys Thr Arg Thr Asp Val Tyr Leu Asn Gln Val Ser Ile Ser Gly Asn

109年5月 號 替換頁

450

455

460

Val Glu Ile Tyr Ala Asp Ala Ile Thr Gly Ile Lys Ala Glu Ser Ser

465

470

475

480

Gly Lys Val Ile Ser Ile Gly Asp Gly Leu Asn Leu Ala Ser Asn Thr

485

490

495

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

500

505

510

Gly Ser Gly Lys Phe Asn Leu Ile His Gly Ala Asp Phe Thr Ala Ile

515

520

525

Thr Tyr Asp Ile Thr Ser Gly Glu Thr Ser Ala Arg Ile Ile Asp Val

530

535

540

Lys Glu Ile Ser Phe Lys Gly Gly Gly Lys Arg Trp Tyr Gly Gly Gly

545

550

555

560

Val Asp Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Leu Asp Leu Glu Ala

565

570

575

Thr Val Glu Tyr Val Lys Ser Phe Asp Glu Pro Ile Ala Tyr Thr Lys

580

585

590

Glu Gly Arg Ile Lys Leu Ala Glu Ala Ser Asp Ile Glu Asp Pro Val

595

600

605

Thr Glu Asp Pro Ile Thr Glu Glu Pro Gly Asp Asp Pro Gly Thr Glu

610

615

620

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

109年5月 號 替換頁

625

630

635

640

Lys Glu Thr Pro Gly Thr Ala Pro Val His Gln Leu Pro Pro Ser Ala

645

650

655

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

660

665

670

Thr Ala Asn Ser Ile Ser Thr Leu Pro Leu Gln Thr Glu Thr Ala Glu

675

680

685

Ser Gly Ser Asp His Gln Leu Pro Asp Thr Ser Ala Gly Tyr Tyr Asn

690

695

700

Phe Met Val Ile Gly Ala Ala Val Thr Leu Ser Gly Thr Tyr Leu Tyr

705

710

715

720

Val Arg Arg Lys Arg Ser Ala Ser Arg Thr

725

730

申請案號：107131752

110年3月29日 替換頁

申請專利範圍

1. 一種供蚊子幼蟲腸道酵素分解之多肽鏈，其係由一段SEQ ID NO.1胺基酸序列以及兩端用以穩定該胺基酸序列之短肽所組成，其中該兩端用以穩定該胺基酸序列之短肽係GGG。
2. 一種控制蚊媒傳染疾病傳播之微生物製劑，包括：
 - 一細菌載體，其細胞膜上具有至少一胞膜結合蛋白，且該細菌載體不是蘇雲金芽孢桿菌 (*Bacillus thuringiensis*)；
 - 一供蚊子幼蟲腸道分解之多肽鏈，其係由一段SEQ ID NO.1胺基酸序列以及兩端用以穩定該胺基酸序列之短肽所組成，且該兩端用以穩定該胺基酸序列之短肽係GGG，其中該多肽鏈係一端接合於該細菌載體之細胞膜的該至少一胞膜結合蛋白上，以供蚊子幼蟲腸道酵素分解；以及
 - 一蚊蟲毒殺蛋白，其係藉由接合於該多肽鏈不同於該至少一胞膜結合蛋白的另一端而表現於該細菌載體之上。
3. 如請求項2所述之微生物製劑，其中，該細菌載體係為一環境益生菌。
4. 如請求項3所述之微生物製劑，其中，該環境益生菌包括芽孢桿菌屬 (*Bacillus*) 的細菌、光合細菌及硝化細菌。
5. 如請求項2所述之微生物製劑，其中，該蚊蟲毒殺蛋白係包括第一型殺蚊蛋白 (Mosquitocidal Toxin 1)、第二型殺蚊蛋白 (Mosquitocidal Toxin 2)、第三型殺蚊蛋白 (Mosquitocidal Toxin 3)、Cry蛋白 (Cry family proteins)、Cyt蛋白 (Cyt family proteins)、CLP蛋白 (Cyclic lipopeptide protein) 或其之任意組合。

申請案號：107131752

110年3月29日 替換頁

6. 如請求項2所述之微生物製劑，其中，該蚊蟲毒殺蛋白係第二型殺蚊蛋白（Mosquitocidal Toxin 2）。
7. 如請求項2所述之微生物製劑，其中，該蚊蟲毒殺蛋白係截短修飾後的第二型殺蚊蛋白（truncated Mosquitocidal Toxin 2）。
8. 如請求項2所述之微生物製劑，其中該細菌載體係選自大腸桿菌或枯草桿菌，且當該細菌載體係大腸桿菌時，則該至少一胞膜結合蛋白係AIDA蛋白；當該細菌載體係枯草桿菌時，則該至少一胞膜結合蛋白係YhcR蛋白。
9. 一種重組基因，包括：
 - 一胞膜結合蛋白基因，轉譯成如請求項2所述之該細菌載體之細胞膜上的該至少一胞膜結合蛋白，且該細菌載體不是蘇雲金芽孢桿菌（*Bacillus thuringiensis*）；
 - 一多肽鏈基因，轉譯成如請求項2所述之多肽鏈；以及
 - 一蚊蟲毒殺蛋白的基因，轉譯成如請求項2所述之蚊蟲毒殺蛋白；其中，該多肽鏈基因係設置於該至少一胞膜結合蛋白基因及該殺蚊蛋白基因之間。
10. 如請求項9所述之重組基因，其中，該蚊蟲毒殺蛋白基因係包括第一型殺蚊蛋白（Mosquitocidal Toxin 1）基因、第二型殺蚊蛋白（Mosquitocidal Toxin 2）基因、第三型殺蚊蛋白（Mosquitocidal Toxin 3）基因、Cry蛋白（Cry family proteins）基因、Cyt蛋白（Cyt family proteins）基因、CLP蛋白（Cyclic lipopeptide protein）基因或其之任意組合。

申請案號：107131752

110年3月29日 替換頁

11. 如請求項9所述之重組基因，其中，該蚊蟲毒殺蛋白基因係第二型殺蚊蛋白（Mosquitocidal Toxin 2）基因。
12. 如請求項9所述之重組基因，其中，該蚊蟲毒殺蛋白基因係截短修飾後的第二型殺蚊蛋白（truncated Mosquitocidal Toxin 2）基因。
13. 如請求項9所述之重組基因，其中該細菌載體係選自大腸桿菌或枯草桿菌，且當該細菌載體係大腸桿菌時，則該至少一胞膜結合蛋白係AIDA蛋白的基因；當該細菌載體係枯草桿菌時，則該至少一胞膜結合蛋白係YhcR蛋白的基因。

圖式

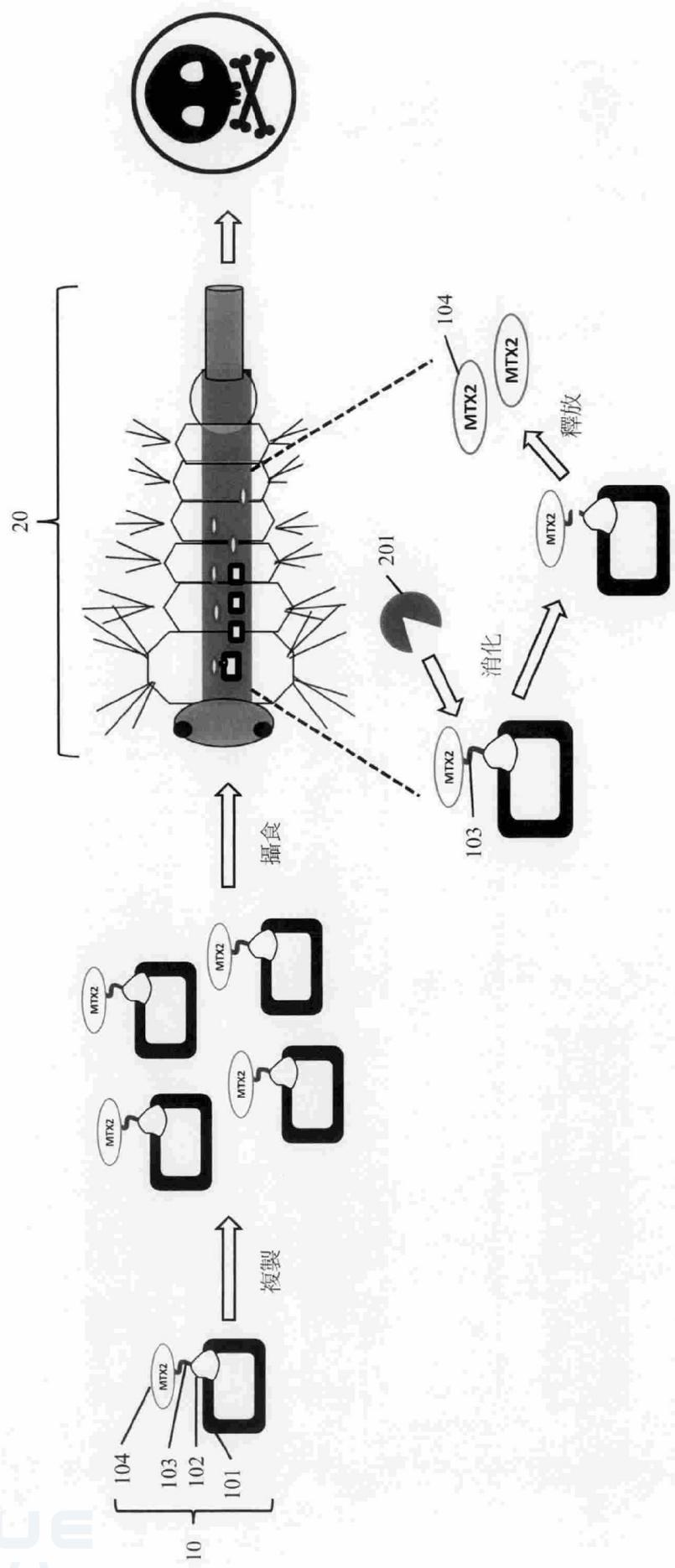


圖 1

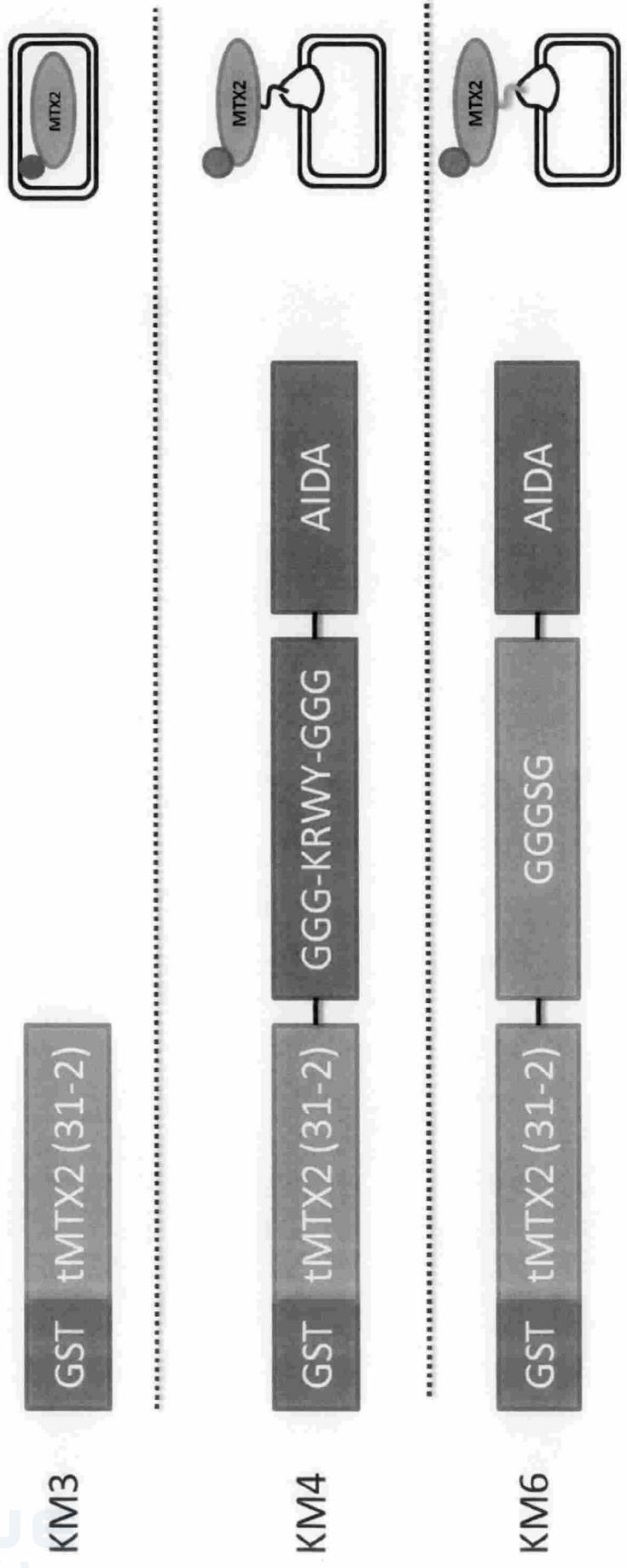


圖 2

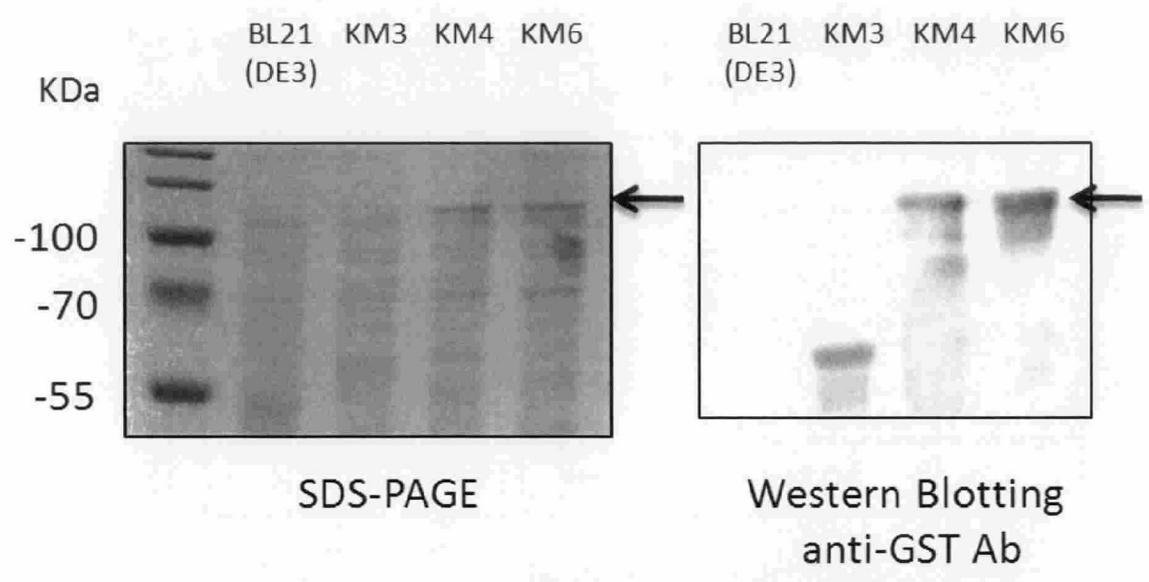


圖 3

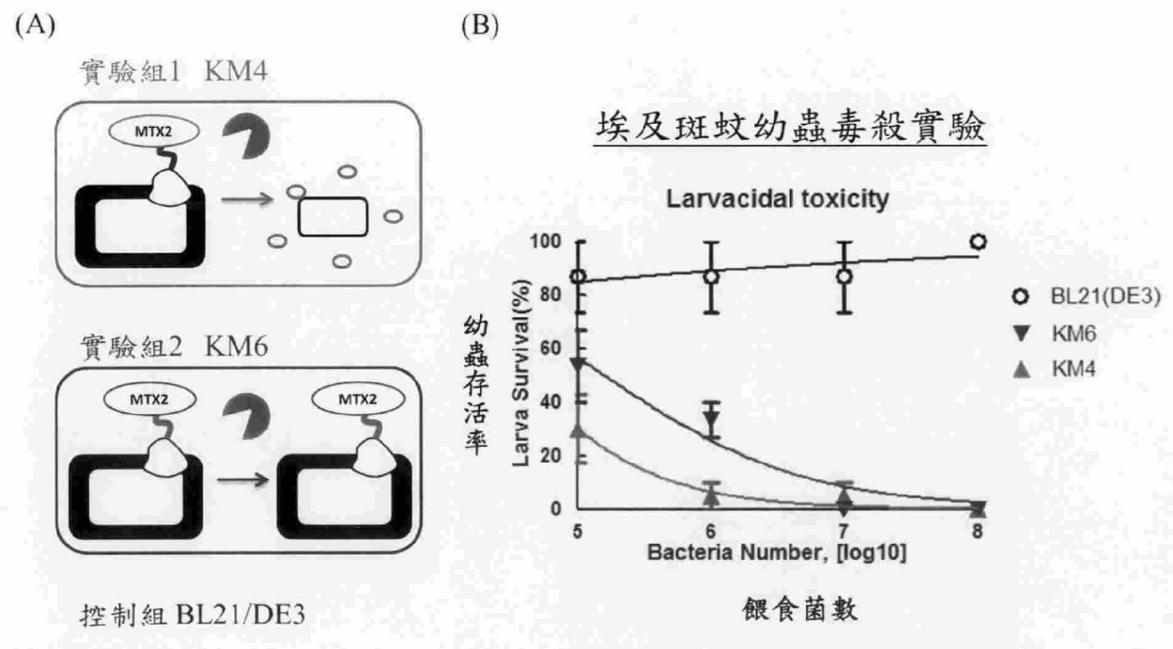
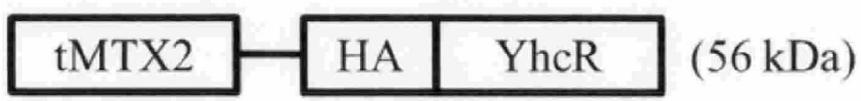


圖 4

枯草桿菌表現系統重組基因 a



枯草桿菌表現系統重組基因 b

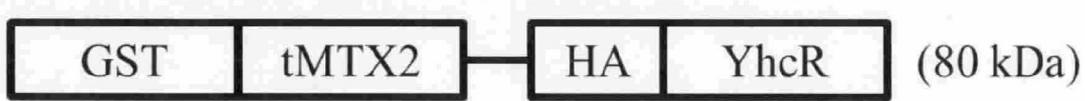


圖 5

枯草桿菌表現系統重組蛋白 a 枯草桿菌表現系統重組蛋白 b

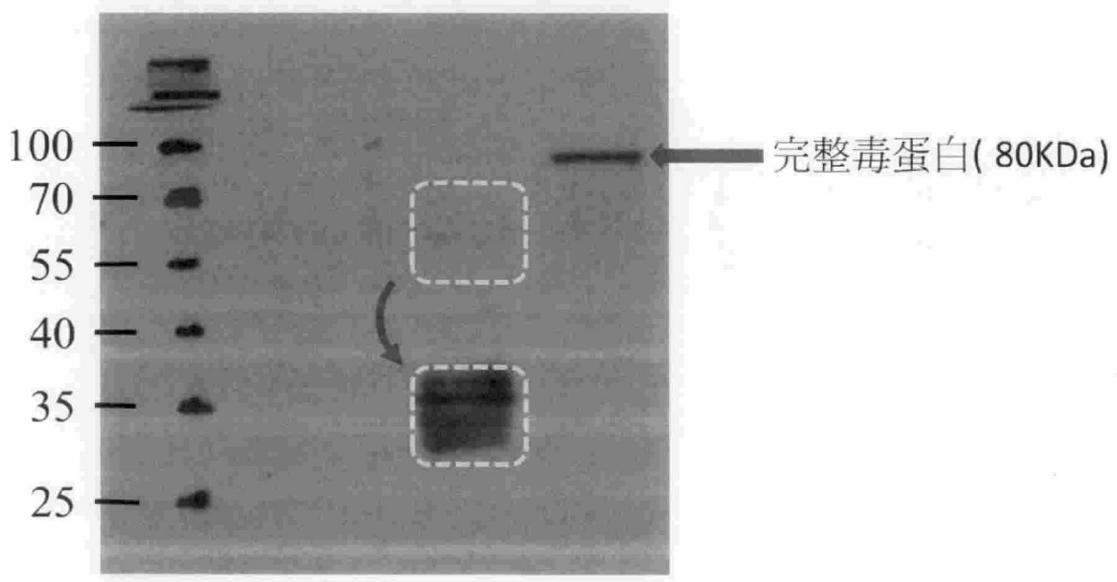


圖 6