

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/12

C07K 14/435 C07K 16/18

C12N 5/10 C12N 15/62

G01N 33/53



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02804249.2

[43] 公开日 2004 年 11 月 24 日

[11] 公开号 CN 1549859A

[22] 申请日 2002.1.29 [21] 申请号 02804249.2

[30] 优先权

[32] 2001. 1.29 [33] US [31] 60/264,932

[86] 国际申请 PCT/US2002/002500 2002.1.29

[87] 国际公布 WO2002/060941 英 2002.8.8

[85] 进入国家阶段日期 2003.7.29

[71] 申请人 抗癌公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 赵 明 徐明旭 姜 平 杨 萌

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南

权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 12 页

[54] 发明名称 改进的荧光蛋白

[57] 摘要

揭示了具有高荧光性和低毒性的荧光蛋白的改进形式。 MVSKQILKNTGLQEIMSFKNLEGVVNNH-VFTMEGCGKGNILFGNQLVQIRVTKGA-PLPFAFDILSPAFQYGNRTFTKYPEDISD-FFIQSFPAGFVYERTLRYEDGCLVEIRS-DINLIEEMFVYRVEYKGRNFPNDGPMKK-TITGLQPSFEVVYMNDGVLVGQVIL-VYRLNSGKFYSCHMRTLKSKGVVKDF-PEYHFIQHRLEKTYVEDGGFVEQHETA-IAQLTSLGKPLGSLHEWV

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种含有图 1A 的 A/C 蛋白质的氨基酸序列的荧光蛋白或一种与所述 A/C 蛋白质有至少 90%同源性的荧光蛋白。
- 5 2. 如权利要求 1 所示的荧光蛋白, 其特征在于, 它与图 1A 的 A/C 蛋白质有至少 95%的同源性。
3. 如权利要求 2 所示的荧光蛋白, 其特征在于, 它与图 1A 的 A/C 蛋白质至少有 99%的同源性。
4. 如权利要求 1 所示的荧光蛋白, 其特征在于, 它含有图 1A 的 A/C 蛋白质的
10 氨基酸序列。
5. 如权利要求 1 所示的荧光蛋白, 其特征在于, 第 66-68 位中至少 1 个氨基酸被不同的氨基酸取代。
6. 如权利要求 5 所示的荧光蛋白, 其特征在于, 所述第 66 位的氨基酸被取代。
7. 一种核酸分子, 其特征在于, 所述氨基酸分子含有编码权利要求 1 的荧光蛋
15 白的核苷酸序列。
8. 一种核酸分子, 其特征在于, 所述氨基酸分子含有编码权利要求 4 的荧光蛋白的核苷酸序列。
9. 如权利要求 8 所示的核酸分子, 其特征在于, 它含有图 1B 所列的核苷酸序列, 并任选地含有 1 或多个如图 2A、2B 或 2C 所示的核苷酸取代基。
- 20 10. 一种重组表达系统, 其特征在于, 它含有编码权利要求 1 的荧光蛋白的核苷酸序列, 所述序列可操作地结合到控制序列以便表达。
11. 一种重组宿主细胞, 其特征在于, 它包括权利要求 10 的表达系统。
12. 一种制造荧光蛋白的方法, 其特征在于, 所述方法包括培养权利要求 11 的细胞, 其中所述核酸序列被表达以制造所述荧光蛋白, 以及任选地回收所述荧
25 光蛋白。
13. 与权利要求 1 的荧光蛋白发生特异性免疫反应的抗体。
14. 一种包含与寻靶部分结合的权利要求 1 的蛋白质的共轭物。
15. 如权利要求 14 所述的共轭物, 其特征在于, 所述寻靶部分是抗体或受体的配体。
- 30 16. 如权利要求 10 所述的表达系统, 其特征在于, 所述编码荧光蛋白的核苷酸序列与编码其它蛋白质的核苷酸序列融合。
17. 监控蛋白质产生的方法, 其特征在于, 所述方法包括

提供一表达系统，所述表达系统包括编码所述蛋白质的第一核苷酸序列，所述蛋白质与编码权利要求 1 的荧光蛋白的第二核苷酸序列融合；

将所述表达系统置于可监测表达的环境中；并且

评估荧光的产生，由此荧光的产生说明了所述蛋白质的表达。

- 5 18. 一种评价启动子活性的方法，其特征在于，所述方法包括但不限于提供含有启动子的核酸，所述启动子可操作地连接到编码权利要求 1 的荧光蛋白的核苷酸序列；

将所述核酸置于可评估所述启动子活性的环境中；

监测荧光的出现和量；

- 10 其中所述荧光的出现和量说明了所述启动子的活性。

19. 一种标记组织的方法，其特征在于，所述方法包括使所述组织与权利要求 14 的共轭物接触，其中所述寻靶部分是所述组织特异的。

20. 一种评估肿瘤的位置和进展及其转移的方法，其特征在于，所述方法包括修饰所述肿瘤以表达权利要求 1 的荧光蛋白，并观察荧光的位置。

- 15 21. 一种改进的进行免疫测定的方法，其特征在于，所述免疫测定包括将分析物或其类似物捕获在夹层结构上，所述夹层结构包含与固体支持物结合的所述分析物的第一特异性结合伴侣和带有标记的第二特异性结合伴侣，其中所述改进包括将权利要求 1 的荧光蛋白用作标记。

改进的荧光蛋白

相关申请的交叉引用

- 5 根据 U. S. C. §119(e) 的规定, 本申请要求提交于 2001 年 11 月 29 日的临时申请 60/264, 932 的优先权。在此将该申请全文并入以供参考。

技术领域

- 本发明涉及新型“绿色荧光蛋白”及其应用。特别地, 本发明涉及特殊的 GFP
10 及其变体, 这种变体是明亮且无毒的。

技术背景

- 绿色荧光蛋白 (GFP) 最初由 Chalfie 分离自 *Aequorea Victoria*, 美国专利 5, 491, 084。Ward 和 Chalfie 在 PCT 公布 W0 95/21191 中报道对其氨基酸序列作了
15 了修饰以增加其亮度。如美国专利 5, 625, 048 和 5, 777, 079 所揭示, Tsien 提供了这种蛋白质经过改进的形式, 它具有不同的光谱特征并可提供各种不同颜色的荧光。此外, 对编码这些蛋白质的核苷酸序列做了修饰以使其序列与人类细胞相容。此外, 公布于 1999 年 9 月 30 日 PCT 公布 W0 99/49019 提供了一些与绿色荧光蛋白有关的序列信息, 这些绿色荧光蛋白由分离自 *Renilla* 和 *Ptilocarpus* 的
20 基因表达。Gurskaya, N. G. 等, *BMC Biochem*(2002) 2:5 描述了一种突变体, 这种突变体改变了来自珊瑚的荧光蛋白的发射光谱。

- 上述文件证实了蛋白质氨基酸序列中的变化, 这种蛋白质在波长短于可提供一定颜色选择和强度范围的荧光波长的照射激发下产生荧光, 在此将这些文件全文并入以供参考。荧光蛋白在科学研究和新项目制造 (如玩具) 中都有广泛应用。
25 由于对荧光的唯一要求是用适当波长照射, 并且由于荧光是肉眼可见的, 这些蛋白质被证明是方便的标记并有令人鼓舞的意想不到的应用。

已经发现荧光蛋白其它的变体有改进的亮度并具有低毒性。这些蛋白质还可被修饰以得到各种颜色的荧光并改变其强度。

发明概述

30 发明涉及组合物和使用荧光蛋白的方法, 所述荧光蛋白与图 1B 所示的核苷酸序列编码的蛋白质同源。与已知的荧光蛋白相比, 示例性的 GFP 包括保守性取代

基和一些可使其在 N-末端部分酸性减弱但在 C-末端部分酸性增强的取代基。本发明涉及与一组变体有关的组合物和方法，所述变体在接近序列一半的 N-末端酸性减弱同时在接近序列一半的 C-末端酸性增强。本发明的蛋白质是无毒的，含有它们的细胞可存活至少 4 周-3, 4 或 6 个月。

5 因此，一方面，本发明涉及变体蛋白质本身并涉及使用这些变体的方法。另一方面，本发明涉及编码所述变体的重组物质和用这些物质制造所述变体的方法，以及关于这些重组物质本身的其它应用。

附图简述

10 图 1A 显示了推出的在这里称为 A/C 的本发明变体的氨基酸序列。图 1B 显示了假定分离自 *R. reniformis* 的核酸的核苷酸序列，所述核酸编码图 1A 的氨基酸序列。

图 2A、2B 和 2C 显示了基于图 1B 的核苷酸序列的核苷酸序列，它经过修饰以分别与酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)
15 和长双歧杆菌 (*Bifidobacterium bongum*) 优选使用的密码子一致。

图 3 显示了标示为 A/C 的本发明变体的氨基酸序列与绿色荧光蛋白的氨基酸序列的比较，所述绿色荧光蛋白克隆自 *R. mulleri*。

图 4A 和 4B 显示了用来在各种肿瘤细胞系中制造所述变体的逆转录病毒载体的示意图。所述载体被用来包装细胞，所得病毒粒子被用来感染肿瘤细胞系。

20 图 5A-5C 显示了包装细胞系 PT67、黑色素瘤细胞系 B16F0 和前列腺癌细胞系 PC3 中表达的荧光蛋白的图象。

图 6A-6D 显示了生长自肺癌细胞系 H460、前列腺癌细胞系 PC3、胰腺癌细胞系 CAPAN-1 和结肠癌细胞系 PKO 的肿瘤的图象。

图 7A 和 7B 显示了编码来自珊瑚的荧光蛋白第 289-964 位的核苷酸序列。

25

具体实施方案

提供了改进的“绿色荧光蛋白”(GFP)和编码它们的重组物质。这样可使用明亮、无毒的标记以监测基因表达、标记各种细胞以及监测如 PCT 公布 W0 98/49336 所述的转移的过程，在此将其并入有关参考。所述本发明改进的荧光蛋白提供了
30 更敏感的评估这些现象的方法，且对细胞和整个生物无毒。因此，本发明的蛋白质在许多领域都有用，这些领域已知使用上述 GFP 已知形式的方法。一般 GFP 的制造和重组材料的使用以及所述 GFP 本身是此领域熟知的，有许多描述这种荧光

蛋白先前已知形式的文献。

图 1A 所示的氨基酸序列的蛋白质，这里称为 A/C，发射绿色荧光并有上述亮度和无毒特性。然而，如此领域已知，这些“绿色”荧光蛋白可被修饰，这样它们可发出各种颜色的可见光谱的荧光。因此，通过适当修饰图 1A 所列蛋白质的氨基酸序列，也可得到红色、黄色、蓝色或其它颜色的荧光。此外，通过使所述氨基酸序列做出小的改变所述荧光的亮度可调节。这些修饰的本性描述在有益的描述在，例如，美国专利 5,777,079 中，在此将其并入以供参考。如上所述，对在 A/C 序列第 66 位发现的丝氨酸残基的修饰可被丙氨酸、亮氨酸、半胱氨酸、缬氨酸、异亮氨酸或苏氨酸替代以得到具有红色移位光谱 (shifted spectra) 的蛋白质，与未经修饰的 A/C 相比，这种光谱通常比较明亮。其它可影响亮度或荧光波长的修饰包括在第 67 位发生的那些。所述发色团似乎几种在 A/C 蛋白质第 66-68 位，它相应于'079 专利所述 *Aequorea* 野生型 GFP 蛋白质第 65-67 位。因此，第 66-68 位的突变对于蛋白质性质的改进特别重要。

因此，本发明包括在第 66-68 位中任一位尤其是在第 66 位上具有取代基的突变体

其它对分子中 1-4 个氨基酸的修饰也是允许的；很小数量这种类型的突变不足以将 A/C 的氨基酸序列转变为任何已知的“绿色荧光蛋白”的氨基酸序列，且对所述分子的性质有极小的影响。因此，本发明的蛋白质包括与图 1A 所示的氨基酸序列至少有 90%同源，优选有 95%同源，最优选有 99%同源的荧光蛋白。特别优选的是具有图 1A 所示氨基酸序列的荧光蛋白及其变体，所示变体在第 66-68 位，最好在第 66 位至少有一个氨基酸取代。同样优选的是上述那些来自珊瑚的蛋白质的经过修饰的类似物，如 Gurskaya 所示，已在上面引用。

编码本发明荧光蛋白变体的核苷酸序列可被各种细胞表达。适合由重组系统制造蛋白质的表达系统现在通常是真核细胞、原核细胞，如酵母和真菌、高等植物、动物细胞(包括脊椎动物细胞、哺乳动物细胞，尤其是人类细胞)，和各种细胞系。合适的表达系统和载体取决于宿主的本性和所需应用。除了提供合适的表达系统，所示核苷酸序列可被修饰以将其转变为所需宿主优选使用的密码子。因此，图 1B 所示的核苷酸序列可含有一个或多个图 2A、2B 和 2C 所示的修饰以在指出的宿主中表达，这些宿主分别是酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和长双歧杆菌 (*Bifidobacterium bongum*)。因此，为在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中表达的序列可包含 1-230 个沉默碱基改变；为在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中表达的序列可包含 1-94

个沉默碱基改变；为在长双歧杆菌 (*Bifidobacterium bongum*) 中表达的序列可包含 1-21 个碱基改变。所有中间数目的碱基改变也包括在本发明的范围内。

本发明的荧光蛋白和编码它们的重组物质可用于广泛应用，如上面提到的 PCT 公布 WO 99/49019 中详细列出的那些，在此将其并入以供参考。所述公布描述了
5 许多应用，包括分析、研究、诊断和商业应用。

因此，制造本发明荧光蛋白的目的可以是获得所示蛋白质本身以用于各种组合物和加工物品。这些荧光蛋白可用于各种项目，如玩具、玩偶、牌类游戏、油漆、织物、气球、化妆品和食物或任何其它设计可发光的物品或组合物。可制造所述蛋白质自身以掺入这些物品和组合物。本发明的荧光蛋白也可和其它可发出
10 荧光或发光的物质如萤光素酶结合。’019 公布描述了一些组合物，其中其它发光生物物质与荧光蛋白一起结合在同一组合物中，这样除了被外部照射有效激发，照射波长由发光组合物物质在原位产生。

绿色荧光蛋白更重要的应用在于其作为研究工具的价值。在一个实施方案中，本发明的荧光蛋白可融合或结合到导向植物或动物靶组织的抗体中。例如，可用
15 它来标记动物中的肿瘤然后通过使荧光标记与肿瘤结合来追踪转移。本发明荧光蛋白可作为能以组织或细胞为目标的部分的共轭物被制备。典型的寻靶部分是组织或细胞上所呈现物质的特异性结合伴侣。典型的寻靶部分是抗体和受体的配体。

或者，含有绿色荧光蛋白的融合蛋白产品可用来监测结合蛋白的表达。此外，
20 如例如 Yang, M. 等, *Cancer Res.* (1998) 58:4217-4221 和 Yang, M. 等, *Cancer Res.* (1999) 59:731-736 所述，以及如 Hoffman, R. M., *Cancer & Metastasis Reviews* (1999) 17:271-277 所会综述，荧光蛋白可在肿瘤中产生并被用来监测转移。

本发明的荧光蛋白还可被用来在免疫测定等实验中标记试剂。在一个实施例中，采用了夹层结构(sandwich)测定，其中分析物的一个特异性结合伴侣是固定
25 分析物的捕获部分，第二特异性结合伴侣被用来标记固定的分析物。本发明的荧光蛋白可直接被用作标记结合伴侣或第二结合伴侣上的标记，如用作第二抗体携带的标记以与直接结合分析物的第一抗体结合。

通过使编码蛋白质的核酸序列与编码本发明荧光蛋白的核苷酸序列融合也可监测蛋白质的表达。然后可通过监测所制造的融合蛋白产生的荧光来监测感兴趣的蛋白质的表达。或者，可通过使编码本发明荧光蛋白的核苷酸序列与启动子或
30 其它控制序列可操作连接来监测启动子或其它控制序列影响表达的能力。再者，通过制造荧光蛋白产生了荧光，由此说明表达控制是可操作的。

上述应用仅仅是例举说明。通常，发明的荧光蛋白可用于任何使用荧光标记的应用，包括测定修饰，如荧光偏振和荧光序列测定。本发明的荧光蛋白的其它优点在于它可原位产生，因此它们的存在或不存在或量可被用作表达的指标并在细胞内提供内部荧光源。因此，可用本发明的荧光蛋白追踪肿瘤转移的过程、细菌或病毒感染或是植物或动物内任何类型细胞的移动。

以下实施例仅是为了阐述而不是限制本发明。

实施例 1

改进的荧光蛋白的表达

从 Stratagene(圣地亚哥,加利福尼亚州)获得了名为 *R. reniformis* GFP 的编码具有如图 1A 中 A/C 所示的氨基酸序列的荧光蛋白的核酸分子。编码所述蛋白质的核苷酸序列被鉴定并显示在图 1B 中。

通过沉默碱基取代所述核苷酸序列被按照图 2A-2C 所述任选地修饰以最优优化其在各种宿主生物中的表达。

与所述荧光蛋白的氨基酸序列显示在图 3A 中，与其相比的是申请人认为与其最相关的此领域的荧光蛋白。所述 A/C 蛋白质与分离自 *R. mulleri* 的核苷酸序列编码的蛋白质的氨基酸序列有将近 86% 的同一性。标出了这些蛋白质的发色团部分，A/C 的第 66-68 位和 *R. mulleri* 的第 65-67 位。

图 1B 的核苷酸序列被插入 3'LTR 启动子控制的逆转录病毒载体(图 4A)。在该载体中，来自图 4B 所示的 pFB(Stratagene)，显示了多个克隆位点。所得载体，称为 pFB-Rmv GFP，被用来修饰 PT-67 包装细胞。所述包装细胞被培养，由于 GFP 蛋白的产生从而产生了明亮的绿色信号。参见图 5A。高强度可保持 10 天以上，这说明 GFP 是无毒的。

实施例 2

制备表达 A/C 荧光蛋白的细胞系

用在 PT-67 包装细胞系中制备的被包装的病毒粒子感染许多肿瘤细胞系，所述细胞系有：乳腺癌细胞系 MX-1；前列腺癌细胞系 MDA-PCA2B 和 PC3；胰腺癌细胞系 CAPAN-1；结肠癌细胞系 PK0；肉瘤细胞系 MES-SA/DX5；肺癌细胞系 H460、Lewis 肺和 A549 以及黑色素瘤系 B16F0。列出了其中的一些。这些细胞系发出的荧光列在图 5B(B16F0)和 5C(PC3)中。所述荧光可保持数周。

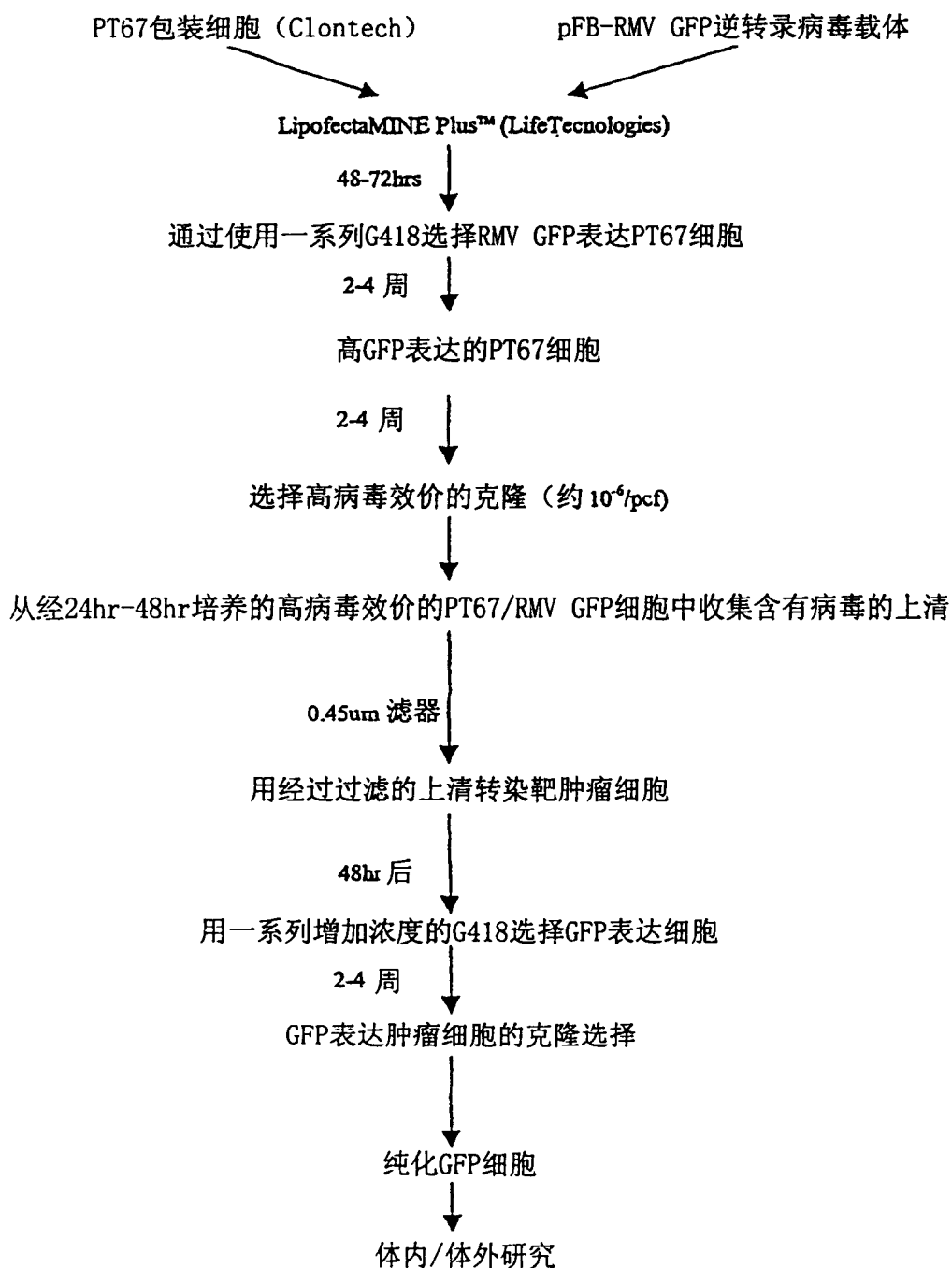
实施例 3

肿瘤标记

肿瘤是通过皮下注射无免疫应答的小鼠由转化的细胞系生长成的，并通过监测荧光观察肿瘤的发展情况。说明性的结果显示在图 6A-6D 中。

5

通过使用 pFB-RMV GFP 表达载体制造 GFP 细胞系



MVSKQILKNTGLQEIMSFKVNLEGVVNNHVFTMEGCGKGNILFGNQ
LVQIRVTKGAPLPFAFDILSPAFQYGNRTFTKYPEDISDFFIQSFPA GF
VYERTLR YEDGGLVEIRSDINLIEEMFVYRVEYKGRNFPNDGPV MK
KTITGLQPSFEVVMNDGVLVGQVILVYRLNSGKFYSCHMR TLMKS
KGVVKDFPEYHFHQHRLKTYVEDGGFVEQHETAIAQLTSLGKPLGS
LHEWV

图 1A

ATGGTGAGCJAGCAGATCCTGAAGAACAACCGGCTGCAGGAGATCATGAGCTTCAAGGTGAACCTGGAGGGCGGTGG
TGAACAACCAACGTTTCAACCATGGAGGGCTGCGGCAAGGCAACATCCTGTTGGCAACCAAGCTGGTGCAATCCG
CGTGACCAAGGGCGCCCCCTGCCCCCTTGGCCTTCGACATCCTGAGCCCCGCCCTTCCAGTACGGCAACCGCACCTTC
ACCAAGTACCCCGAGGACATCAGCGACTTCTTCATCCAGAGTTCCCCCGCGGCTTCGTGTACGAGCGCACCTGC
GCTACGAGGACGGCGGCTGGTGGAGATCCGACGCGACATCACTGATCGAGGAGATGTTCTGTGTACCGCGTGGGA
GTACAAGGGCCCAACTTCCCCAACGACGGCCCCCGTGTATGAAGAAGACCATCACCGGCTGCAGCCCCAGCTTCGAG
GTGGTGATACATGAACGACGGCGTGTGGGGCCAGGTGATCTGGTGTACCGCTGAACAGCGGCAAGTTCTACA
GCTGCCACATGCGCACCTTGATGAAGAGCAAGGGCGTGTGAAGGACTTCCCCGAGTACCACTTCATCCAGCACCG
CCTGGAGAAGACCTAGTGGAGGACGGCGGCTTCGTGGAGCAGACGAGACCGCCATCGCCCCAGCTGACCGACCTG
GGCAAGCCCCCTGGGCAGCCTGCACGAGTGGGTGTAA

图 1B

酿酒酵母 (*Sacchromyces cerevisiae*) 的最优化

ATG GTT TCT AAA CAA ATT TTG AAA AAT ACT GGT TTG
CAA GAA ATT ATG TCT TTT AAA GTT AAT TTG GAA GGT
GTT GTT AAT AAT CAT GTT TTT ACT ATG GAA GGT TGT
GGT AAA GGT AAT ATT TTG TTT GGT AAT CAA TTG GTT
CAA ATT AGA GTT ACT AAA GGT GCT CCA TTG CCA TTT
GCT TTT GAT ATT TTG TCT CCA GCT TTT CAA TAT GGT AAT
AGA ACT TTT ACT AAA TAT CCA GAA GAT ATT TCT GAT
TTT TTT ATT CAA TCT TTT CCA GCT GGT TTT GTT TAT GAA
AGA ACT TTG AGA TAT GAA GAT GGT GGT TTG GTT GAA
ATT AGA TCT GAT ATT AAT TTG ATT GAA GAA ATG TTT
GTT TAT AGA GTT GAA TAT AAA GGT AGA AAT TTT CCA
AAT GAT GGT CCA GTT ATG AAA AAA ACT ATT ACT GGT
TTG CAA CCA TCT TTT GAA GTT GTT TAT ATG AAT GAT
GGT GTT TTG GTT GGT CAA GTT ATT TTG GTT TAT AGA
TTG AAT TCT GGT AAA TTT TAT TCT TGT CAT ATG AGA
ACT TTG ATG AAA TCT AAA GGT GTT GTT AAA GAT TTT
CCA GAA TAT CAT TTT ATT CAA CAT AGA TTG GAA AAA
ACT TAT GTT GAA GAT GGT GGT TTT GTT GAA CAA CAT
GAA ACT GCT ATT GCT CAA TTG ACT TCT TTG GGT AAA
CCA TTG GGT TCT TTG CAT GAA TGG GTT TAA

相对于酿酒酵母 (*Sacchromyces cerevisiae*) 优选使用的密码子共有230个沉默变化

图 2A

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的最优化

ATG GTG AGC AAA CAG ATT CTG AAA AAC ACC GGC CTG
 CAG GAA ATT ATG AGC TTT AAA GTG AAC CTG GAA GGC
 GTG GTG AAC AAC CAT GTG TTT ACC ATG GAA GGC TGC
 GGC AAA GGC AAC ATT CTG TTT GGC AAC CAG CTG GTG
 CAG ATT CGC GTG ACC AAA GGC GCG CCC CTG CCC TTT
 GCG TTT GAT ATT CTG AGC CCC GCG TTT CAG TAT GGC
 AAC CGC ACC TTT ACC AAA TAT CCC GAA GAT ATT AGC
 GAT TTT TTT ATT CAG AGC TTT CCC GCG GGC TTT GTG TAT
 GAA CGC ACC CTG CGC TAT GAA GAT GGC GGC CTG GTG
 GAA ATT CGC AGC GAT ATT AAC CTG ATT GAA GAA ATG
 TTT GTG TAT CGC GTG GAA TAT AAA GGC CGC AAC TTT
 CCC AAC GAT GGC CCC GTG ATG AAA AAA ACC ATT ACC
 GGC CTG CAG CCC AGC TTT GAA GTG GTG TAT ATG AAC
 GAT GGC GTG CTG GTG GGC CAG GTG ATT CTG GTG TAT
 CGC CTG AAC AGC GGC AAA TTT TAT AGC TGC CAT ATG
 CGC ACC CTG ATG AAA AGC AAA GGC GTG GTG AAA GAT
 TTT CCC GAA TAT CAT TTT ATT CAG CAT CGC CTG GAA
 AAA ACC TAT GTG GAA GAT GGC GGC TTT GTG GAA CAG
 CAT GAA ACC GCG ATT GCG CAG CTG ACC AGC CTG GGC
 AAA CCC CTG GGC AGC CTG CAT GAA TGG GTG TAA

相对于大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 优选使用的密码子共有94个沉默变化

图 2B

长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*) 的最优化

ATG GTG TCC AAG CAG ATC CTG AAG AAC ACC GGC CTG
 CAG GAG ATC ATG TCC TTC AAG GTG AAC CTG GAG GGC
 GTG GTG AAC AAC CAC GTG TTC ACC ATG GAG GGC TGC
 GGC AAG GGC AAC ATC CTG TTC GGC AAC CAG CTG GTG
 CAG ATC CGC GTG ACC AAG GGC GCC CCG CTG CCG TTC
 GCC TTC GAC ATC CTG TCC CCG GCC TTC CAG TAC GGC
 AAC CGC ACC TTC ACC AAG TAC CCG GAG GAC ATC TCC
 GAC TTC TTC ATC CAG TCC TTC CCG GCC GGC TTC GTG
 TAC GAG CGC ACC CTG CGC TAC GAG GAC GGC GGC CTG
 GTG GAG ATC CGC TCC GAC ATC AAC CTG ATC GAG GAG
 ATG TTC GTG TAC CGC GTG GAG TAC AAG GGC CGC AAC
 TTC CCG AAC GAC GGC CCG GTG ATG AAG AAG ACC ATC
 ACC GGC CTG CAG CCG TCC TTC GAG GTG GTG TAC ATG
 AAC GAC GGC GTG CTG GTG GGC CAG GTG ATC CTG GTG
 TAC CGC CTG AAC TCC GGC AAG TTC TAC TCC TGC CAC
 ATG CGC ACC CTG ATG AAG TCC AAG GGC GTG GTG AAG
 GAC TTC CCG GAG TAC CAC TTC ATC CAG CAC CGC CTG
 GAG AAG ACC TAC GTG GAG GAC GGC GGC TTC GTG GAG
 CAG CAC GAG ACC GCC ATC GCC CAG CTG ACC TCC CTG
 GGC AAG CCG CTG GGC TCC CTG CAC GAG TGG GTG TAA

相对于大肠杆菌 (*Bifidobacterium longum*) 优选使用的密码子共有21个沉默变化

图 20

A/C, Mulleri,	1 Z^M VSKQILKNTGLQEIIMSEKVNLEGVVNNHVFTMEGCCGKNILFGNQLVQIRVTKGAPLPFA 1 MSKQILKNTGLQEIIMSEKVNLEGVVNNHVFTMEGCCGKNILFGNQLVQIRVTKGAPLPFA ***** ** * *****
A/C, Mulleri,	62 FDILSPAFQYGNRTFTKYPEDISDFFIQSFPAGFVYERTLRYEDGGLVEIRSDINLIEEM 61 FBIVSPAFQYGNRTFTKYPENDISDYFIQSFPAGFMYERTLRYGDGGLVEIRSDINLIEDK * * *****
A/C, Mulleri,	122 FVYRVEYKGRNFPNDGPNKKITITGLQPSFEVWYNDGVINGQVILVYRLNSGKFYSCHM 121 FVYRVEYKESNFPDDGPNQKTIILGIEPSFGAMYNNGVINVGEVILVYKLSGKYYSCHM ***** ** * *****
A/C, Mulleri,	182 RTLMKSGVWKDFPEYHFIQHRLEKTYVEDGGFVEQHEHETATAQLTSLGKPLGSLHEWV 181 KTLMKSGVWKEFPYSYHFIHRLEKTYVEDGGFVEQHEHETATAQLTSLGKPLGSLHEWV ***** ** * *****



3

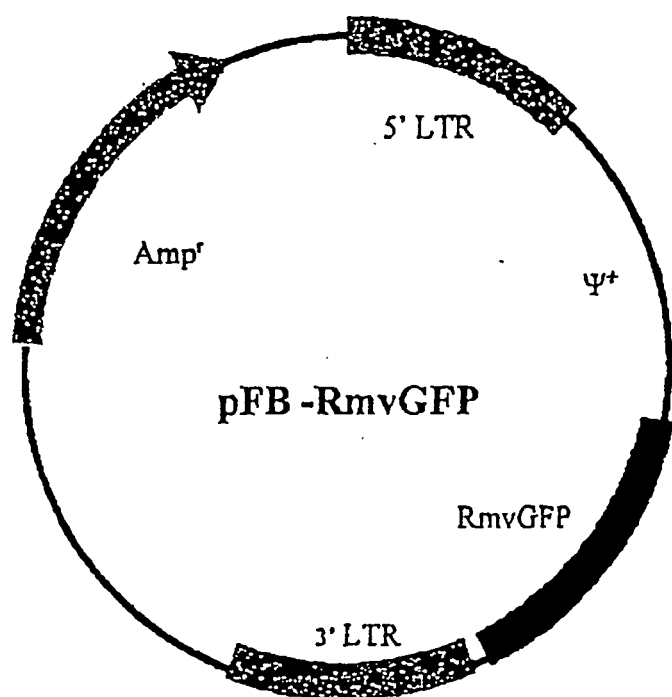
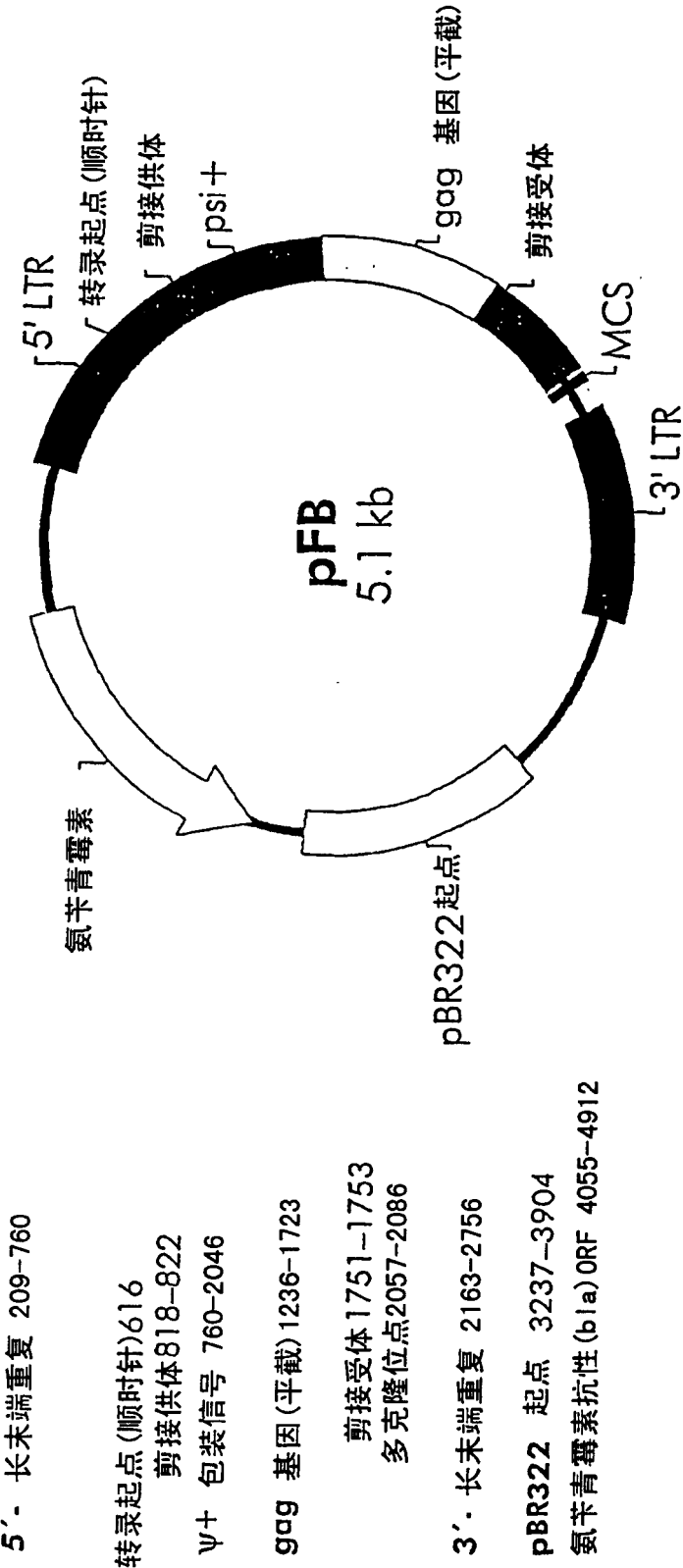


图 4A



pFB 多克隆位点区域
(2057-2086的序列)

SalI

EcoRI

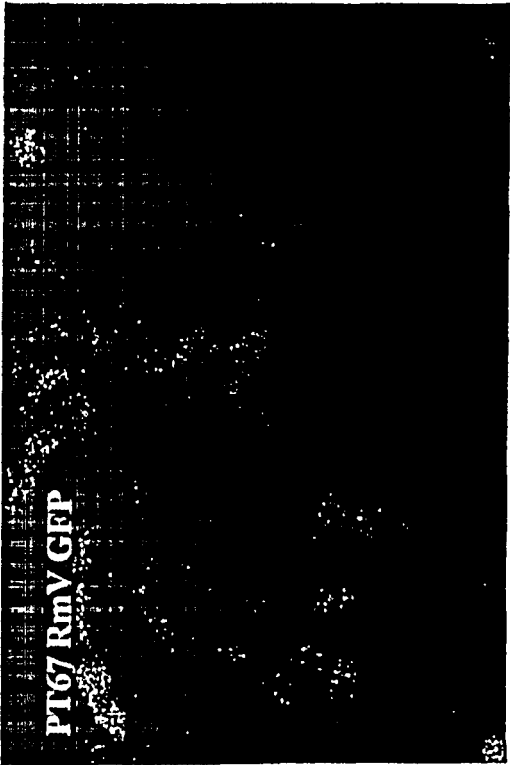
BamHI

XhoI

NotI

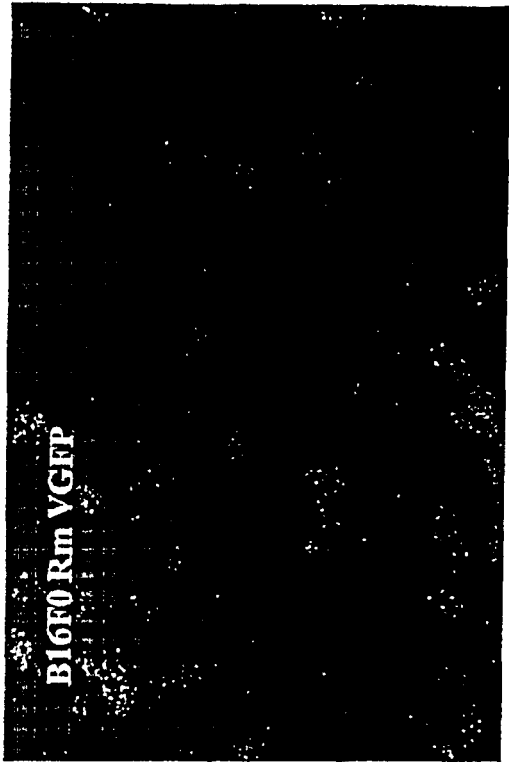
GTCGACGAATTTCGGATCCTCGAGCGGCCGC

图 4B



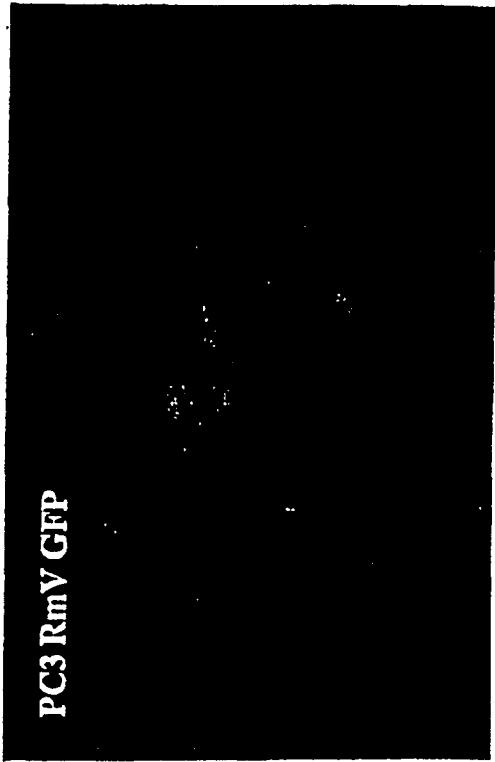
图

5A



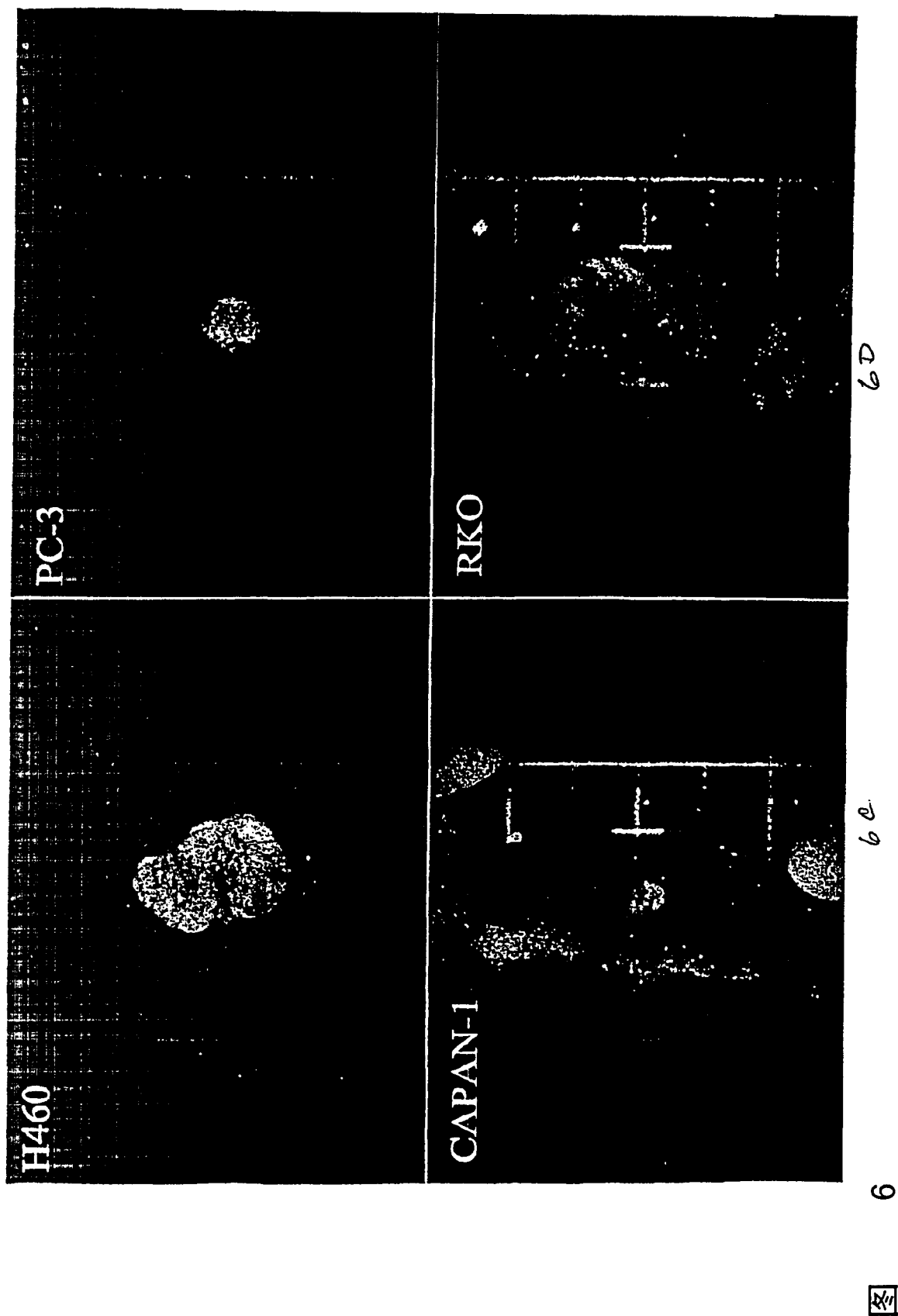
图

5B



图

5C



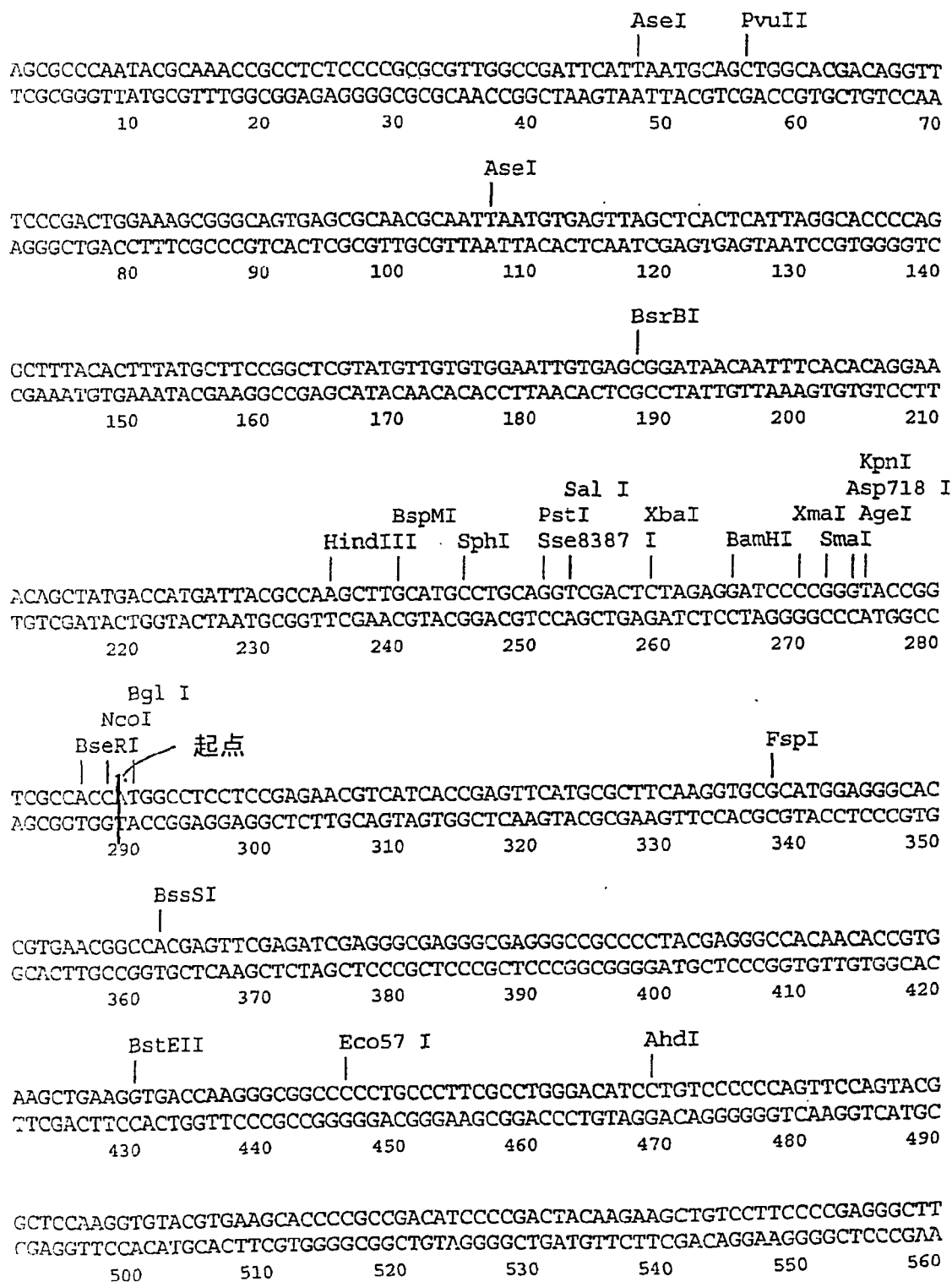


图 7A

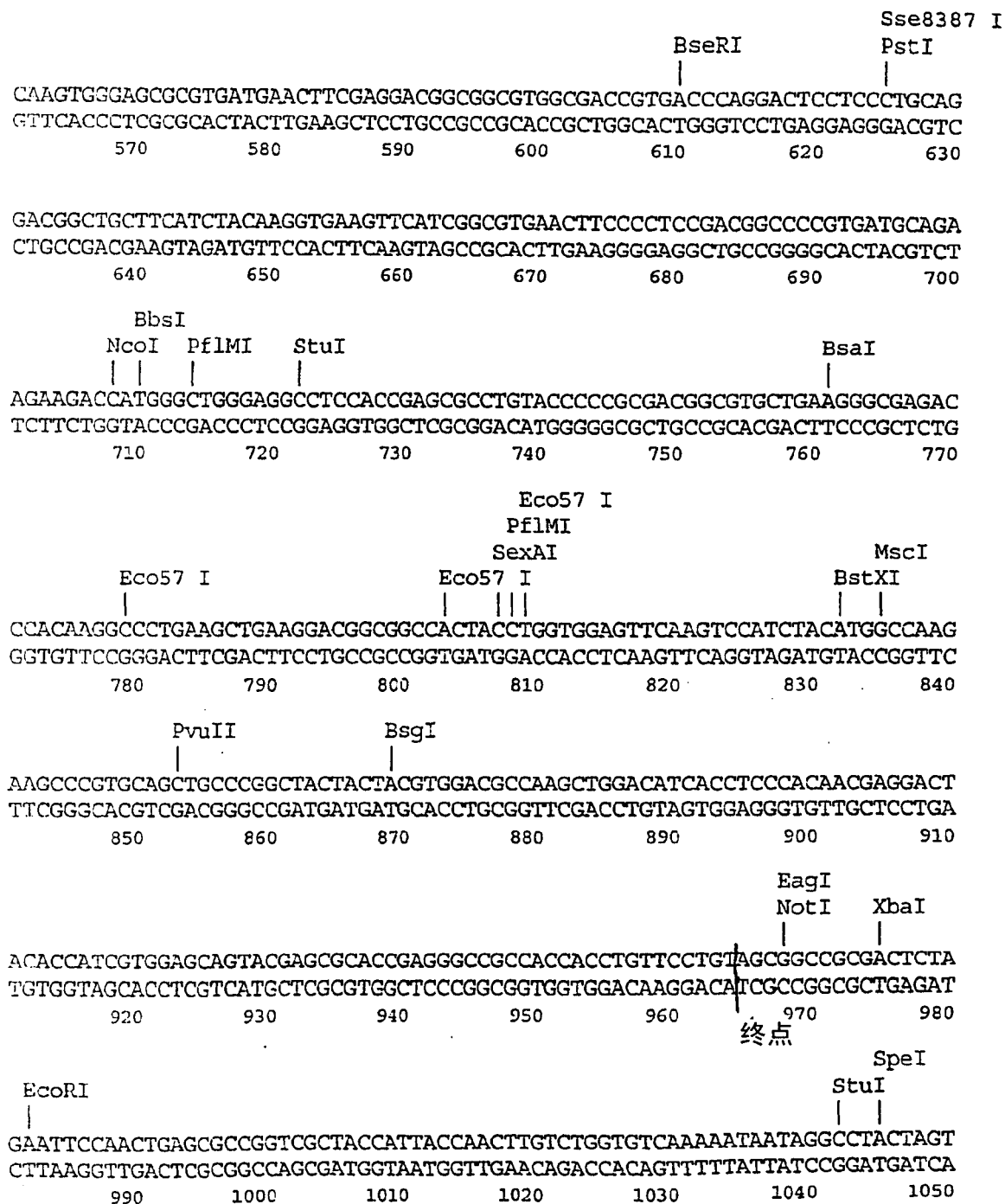


图 7B

专利名称(译)	改进的荧光蛋白		
公开(公告)号	CN1549859A	公开(公告)日	2004-11-24
申请号	CN02804249.2	申请日	2002-01-29
[标]申请(专利权)人(译)	抗癌公司		
申请(专利权)人(译)	抗癌公司		
当前申请(专利权)人(译)	抗癌公司		
[标]发明人	赵明 徐明旭 姜平 杨萌		
发明人	赵明 徐明旭 姜平 杨萌		
IPC分类号	A61K49/00 C07K14/435 C12N15/12 C07K16/18 C12N5/10 C12N15/62 G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/43595 A61K49/0047		
优先权	60/264932 2001-01-29 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

揭示了具有高荧光性和低毒性的荧光蛋白的改进形式。

MVSKQILKNTGLQEIMSFKNLEGVVNNHVFTMEGCGKGNILFGNQL
VQIRVTKGAPLPFAFDILSPAFQYGNRTFTKYPEDISDFFIQSFPAGFV
YERTLRYEDGGLVEIRSDINLIEEMFVYRVEYKGRNFPNDGPVMKKTI
TGLQPSFEVVMNDGVLVGQVILVYRLNSGKFYSCHMRTLKSKGV
VKDFPEYHFIQHRLEKTYVEDGGFVEQHETAIAQLTSLGKPLGSLHE
WV