

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480033782.3

[51] Int. Cl.

C07K 14/435 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

[43] 公开日 2006年12月20日

[11] 公开号 CN 1882608A

[22] 申请日 2004.9.3

[21] 申请号 200480033782.3

[30] 优先权

[32] 2003.9.16 [33] DE [31] 10342670.1

[86] 国际申请 PCT/EP2004/009843 2004.9.3

[87] 国际公布 WO2005/035559 德 2005.4.21

[85] 进入国家阶段日期 2006.5.16

[71] 申请人 拜耳医药保健股份公司

地址 德国莱沃库森

[72] 发明人 S·戈尔茨 S·马科瓦

L·布拉科瓦 L·弗兰克

E·维索特斯基

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 温宏艳 黄可峻

权利要求书3页 说明书26页 序列表4页
附图9页

[54] 发明名称

分离的发光蛋白 mtClytin 及其用途

[57] 摘要

本发明涉及发光蛋白 mtClytin, 其核苷酸和氨基酸序列, 以及发光蛋白 mtClytin 的活性和用途。

1. 核酸分子，其选自组成如下的一组：

a) 编码包含 SEQ ID NO:2 所公开的氨基酸序列的多肽的核酸分子；

b) 包含 SEQ ID NO:1 所示序列的核酸分子；

c) 其互补链在严格条件下与 a) 或 b) 中的核酸分子杂交且编码表现发光蛋白的生物学功能的多肽的核酸分子；

d) 由于遗传密码的简并性而与 c) 中所述核酸分子不同的核酸分子；

e) 表现出与 SEQ ID NO:1 至少 95% 的序列同源性且编码具有发光蛋白的生物学功能的多肽的核酸分子；和

f) 表现出与 SEQ ID NO:1 至少 65% 的序列同源性且编码具有发光蛋白的生物学功能的多肽的核酸分子。

2. 核酸分子，其选自组成如下的一组：

a) 编码包含 SEQ ID NO:3 所公开的氨基酸序列的多肽的核酸分子；

b) 包含 SEQ ID NO:4 所示序列的核酸分子；

c) 其互补链在严格条件下与 a) 或 b) 中的核酸分子杂交且编码表现信号肽或前导肽的生物学功能的肽的核酸分子；

d) 由于遗传密码的简并性而与 c) 中所述核酸分子不同的核酸分子；

e) 表现出与 SEQ ID NO:4 至少 90% 的序列同源性且编码表现信号肽或前导肽的生物学功能的肽的核酸分子；和

f) 表现出与 SEQ ID NO:4 至少 60% 的序列同源性且编码表现信号肽或前导肽的生物学功能的肽的核酸分子。

3. 核酸分子，其选自组成如下的一组：

a) 编码包含 SEQ ID NO:6 所公开的氨基酸序列的多肽的核酸分子；

b) 包含 SEQ ID NO:5 所示序列的核酸分子；

c) 其互补链在严格条件下与 a) 或 b) 中的核酸分子杂交且编码表现发光蛋白的生物学功能的多肽的核酸分子；

d) 由于遗传密码的简并性而与 c) 中所述核酸分子不同的核酸分子。

子;

e)表现出与 SEQ ID NO:5 至少 95%的序列同源性且编码具有发光蛋白的生物学功能的多肽的核酸分子; 和

f)表现出与 SEQ ID NO:5 至少 80%的序列同源性且编码具有发光蛋白的生物学功能的多肽的核酸分子。

4. 一种如权利要求 1、2 或 3 所述的核酸, 其包含编码序列 5'端的功能启动子。

5. 一种重组体 DNA 或 RNA 载体, 其包含如权利要求 4 所述的核酸。

6. 一种生物体, 其包含如权利要求 5 中所述的载体。

7. 一种具有大于 10 个连续核苷酸的寡核苷酸, 其与如权利要求 1、2 或 3 中所述的核酸分子的构成序列相同或互补。

8. 一种多肽, 其用如权利要求 1、2 或 3 中所述的核酸序列编码。

9. 一种表达如权利要求 8 中所述多肽的方法, 其在细菌、病毒系统、酵母细胞、或真核细胞或体外表达系统中。

10. 一种纯化/分离如权利要求 8 中所述发光蛋白多肽的方法。

11. 一种肽, 其具有大于 5 个连续氨基酸, 其被针对抗发光蛋白 mtClytin 的抗体免疫识别。

12. 一种肽, 其具有大于 5 个连续氨基酸, 其被针对抗发光蛋白 clytin-2 的抗体免疫识别。

13. 一种肽, 具有大于 5 个连续氨基酸, 其被针对 SEQ ID NO:3 所示信号肽或前导肽的抗体免疫识别。

14. 如权利要求 1-5 所述的核酸作为标记基因或报道基因的用途。

15. 如权利要求 8 所述的发光蛋白作为标记物或报道分子的用途。

16. 包含 SEQ ID NO:4 所示序列的核酸作为信号序列或前导序列的用途。

17. 包含 SEQ ID NO:3 所示序列的肽作为信号肽或前导肽的用途。

18. 如权利要求 16 或 17 所述的用途, 用于将与信号肽或前导肽融合的蛋白转运至细胞器中。

19. 如权利要求 18 所述的用途, 其中细胞器是线粒体或内质网

(ER)。

20. 如权利要求 8 所述的多肽作为报道蛋白在寻找药理学活性化合物中的用途。

21. 如权利要求 1-3 所述的核酸作为报道基因在寻找药理学活性化合物中的用途。

分离的发光蛋白 mtClytin 及其用途

技术领域

本发明涉及发光蛋白 mtClytin，其核苷酸和氨基酸序列以及发光蛋白 mtClytin 的活性和用途。

背景技术

发光蛋白

活生物体产生光的现象被称作生物发光。它是细胞中生化反应的结果，所述反应以光量子的形式发出化学能（化学发光的方法被称作冷发射）。以该方式产生的光是单色的，因为它的发出与离散电子传递相关，其可通过次级发光染料（例如 Aequora 属的发光水母中的荧光蛋白）易位进入较长波长的光谱区。

生物发光具有生物学功能的多样性：在 200 至 1000 m（Mesopelagial）之间的海洋中层带，大约 90% 的活生物体发冷光。此时，发光信号被用于吸引配偶，欺骗和作为诱饵。萤火虫（Glowworms）以及萤火虫（fireflies）也使用光信号寻找配偶。另一方面，细菌、真菌和单细胞藻类发光的意义不明。其被假定用于协调大种群中的众多单独个体或表示生物钟的类型。

许多腔肠动物具有生物发光性（Morin 等，1974）。这些生物发出蓝色或绿色光。水母发光蛋白（源自 *Aequoria victoria*（Shimomura 等，1969）且于 1962 年被鉴别出的首个产生光的蛋白）作为分离的蛋白发出蓝光，而并非如经 *Aequoria victoria* 表象观察到的绿光。随后从该 *Aequoria victoria* 中分离出绿色荧光蛋白（GFP），其（作为被水母发光蛋白活化的结果）使水母在表型上呈现绿色（Johnson 等，1962；Hastings 等，1969；Inouye 等，1994）。同样已被鉴定和描述的其它发光蛋白可以为 clytin（Inouye 等，1993）、mitrocomin（Fagan 等，1993）和 obelin（Illarionov 等，1995）。

表 1: 某些发光蛋白概述。表中给出了名称, 已从中分离出该蛋白的生物体, 和数据库登录的识别号 (Acc.No.)。

名称	生物体	识别号
Obelin	曲膝藪枝螳 (<i>Obelia geniculata</i>)	AAI86372
Clytin	<i>Clytia gregaria</i>	CAA49754
水母发光蛋白	大型多管水母 (<i>Aequorea macrodactyla</i>)	AAK02061
水母发光蛋白	细小多管水母 (<i>Aequorea parva</i>)	AAK02060
Mitrocomin	<i>Mitrocoma cellularia</i>	AAA29298
Pholasin	<i>Pholas dactylus</i>	AAM18085
?	南鱿 (<i>Symplectoteuthis oualaniensis</i>)	AX305029

表 2: 某些发光蛋白概述。表中给出了已从中分离出该蛋白的生物体, 发光蛋白的名称和专利或申请文选。

生物体	荧光蛋白	专利/申请
曲膝藪枝螳	Obelin	WO03006497
<i>Clytia gregaria</i>	Clytin	WO03006497
<i>Aequoria victoria</i>	水母发光蛋白	WO200168824 US-0908909 US 6,152,358 JP-0176125
<i>Pholas dactylus</i>	Pholasin	WO0028025 GB-0024357

生物发光现被应用于各种各样的技术方法中, 例如作为环境保护的生物指示剂、在生物化学中用于敏感性检测蛋白或定量特定化合物, 或被称作“报道分子”而用于研究细胞中的基因调节。

发光蛋白不仅在其核苷酸序列和氨基酸序列还在其生物化学性质和物理性质上存在差异。

已经证明, 发光蛋白的物理性质和生物化学性质可通过改变这些蛋白的氨基酸序列而进行改变。诱变的发光蛋白的实例在文献中已有

描述(US 6,495,355; US 5,541,309; US 5,093,240; Shimomura 等, 1986)。

上述发光蛋白通过氧化性腔肠素(coelenterazine)产生光(Haddock 等, 2001; Jones 等, 1999)。

报道系统

一般而言, 采用简单的生物化学方法或组织化学方法即可轻易检测基因产物的基因被称作报道基因或指示基因。报道基因至少可分为2个类型。

1. 抗性基因。该术语用于这样的基因, 其在细胞上的表达提供了对抗生素或在如果缺乏抗性基因时存在于生长培养基中即导致细胞死亡的其他物质的抗性。

2. 报道基因。报道基因的产物作为融合指示物或非融合指示物而被用于基因操作中。最常见的报道基因包括 β -半乳糖苷酶(Alam 等, 1990)、碱性磷酸酶(Yang 等, 1997; Cullen 等, 1992), 和荧光素酶以及其它发光蛋白(Shinomura, 1985; Phillips GN, 1997; Snowdowne 等, 1984)。

在可见的光谱范围内发射光子(该发射通过激发的发射体分子的方式产生) 被称作发光。这种情况与荧光相反, 其能量并非由外在较短波长的辐射形式所提供。

化学发光和生物发光之间存在差异。当激发电子返回基态时, 导致激发分子自身发冷光的化学反应被称作化学发光。如果该反应由酶催化, 则该现象被称作生物发光。反应中涉及的酶通常被称作荧光素酶。

物种 *Clytia gregaria* 的分类

刺胞动物门→薄水母目→钟螵水母科→*Clytia gregaria*

物种 *Clytia gregaria* 属于刺胞动物门, 具体地说是水母(Medusae)。生物发光表型和荧光表型已于1998年被分别报道(Ward 等, 1998)。

分离 cDNA

为了研究物种 *Clytia gregaria* 的生物发光活性, 从白海(Biological Station Kartesh, Russia) 中获取样品并贮存于液氮中。为了构建 *Clytia gregaria* 的 cDNA 文库, 使用来自 Novagen (USA) 的 “Straight A” 分离法分离 poly (a) +RNA。

实施 RT-PCR 来制备 cDNA。为此，根据以下程序，将 1 μ g RNA 与逆转录酶（Superscript Gold II）一起孵育：

PCR	1.	30	秒	95°C
	2.	6	分钟	68°C
	3.	10	秒	95°C
	4.	6	分钟	68°C

步骤3然后步骤4进行17个循环

将反应产物与蛋白酶 k 孵育，37°C 下培养 30 分钟，以便使聚合酶失活，然后用乙醇沉淀 cDNA。使用 Clontech (USA) “SMART cDNA 文库构建试剂盒” 依照厂商说明书构建 cDNA 表达文库。将 cDNA 克隆至表达载体 pTriplEx2 (Clontech; USA)。通过电穿孔法将表达载体转化至细菌 E.coli XL1-blue。

将细菌铺于固体 LB 营养培养基上，37°C 培养 24 小时。然后进行影印培养，使用硝化纤维滤纸将细菌转移至另一固体营养培养基平板。影印培养板依次于 37°C 培养 24 小时，然后将生长的菌落移至 LB 液体培养基。加入 IPTG (终浓度，0.1 mM) 后，细菌于振荡器上 37°C 培养 4 小时。经离心获得细菌，然后于 0°C，0.5 ml 的破裂缓冲液 (5 mM EDTA, 20 mM Tris-HCL, pH 9.0) 中重悬细菌团块。然后通过超声波处理破裂细菌。

在加入发光基因 (终浓度，10E-07 M) 后，溶解产物于 4°C 培养 3 小时。然后在加入氯化钙 (终浓度，20 mM) 后用光度计测量生物发光。

鉴定发光蛋白。发光蛋白被命名为 mtClytin。以下详细描述发光蛋白 mtClytin。

MtClytin

发光蛋白 mtClytin 在氨基酸水平上表现出与源自 *Clytia gregaria* 的 Clytin 最高的同源性，其同一性为 87%，而其与源自 *Obelia geniculata* 的 Obelin 的同一性为 77% (参见实施例 8; 图 8)。对于 Clytin, 87% 的同源性出现于蛋白的 C 末端，其中整个蛋白上分布有多个可识别的氨基酸置换。在核苷酸水平上，同一性小于 30% (参见实

施例 7; 图 7)。使用 BLAST 法进行序列比较 (Altschul 等, 1997)。

发光蛋白 Clytin-2 在氨基酸水平上表现出与源自 *Clytia gregaria* 的 Clytin 最高的同源性。然而, 该序列在氨基酸序列上存在多处差异, 实施例 11 (图 9) 中描述了这些差异。这些差别可导致物理化学, 生物化学和生物发光特性的改变。发光蛋白 Clytin-2 不具有信号肽 (如实施例 10 中所示)。

发光蛋白 mtClytin 具有可导致发光蛋白转移至线粒体中的信号肽。采用计算机程序 MITOPROT (Claros 等, 1996) 鉴别该信号肽 (如实施例 10 所示)。SEQ ID NO:3 中给出经 MITOPROT 确定的信号肽。发光蛋白 mtClytin 是首个已鉴别出用于易位至粒体中的天然信号肽的发光蛋白。

本发明还涉及 mtClytin 的功能等同物。功能等同物是那些具有可比拟理化性质并与 SEQ ID NO:2 有至少 70%同源性的蛋白。优选至少 80%或 90%同源性。特别优选至少 95%的同源性。

本发明还涉及 mtClytin 信号肽的功能等同物。功能等同物是那些具有可比拟理化性质并与 SEQ ID NO:3 有至少 70%同源性的蛋白或肽。优选至少 80%或 90%同源性。特别优选至少 95%的同源性。

发光蛋白 mtClytin 适于用作细胞系统 (尤其是受体、离子通道、转运载体、转录因子) 或诱导系统的报道基因。

MtClytin 信号肽还适于与报道基因融合, 以使用作细胞系统 (尤其是受体、离子通道、转运载体、转录因子) 或诱导系统的融合报道基因。

发光蛋白 mtClytin 还适于用作通过标记, 鉴别和特征化细胞器 (尤其是线粒体) 的报道基因。

mtClytin 信号肽还适于与肽或蛋白融合以易位至细胞器 (尤其是线粒体) 中。

发光蛋白 mtClytin 还适于用作测定细胞器 (尤其是线粒体) 内部和外部参数, 尤其是钙浓度的报道基因。

mtClytin 信号肽还适于作为融合肽用作测定细胞器 (尤其是线粒体) 内部和外部参数, 尤其是钙浓度的报道基因。

发光蛋白 mtClytin 还适于用作细菌性和真核生物性系统, 尤其是哺乳动物细胞、细菌、酵母、杆状病毒和植物中的报道基因。

发光蛋白 mtClytin 适于用作联合生物发光或化学发光系统，尤其是使用荧光素酶、氧合酶或磷酸酶系统的细胞系统的报道基因。

mtClytin 信号肽还适于作为融合肽用作联合生物发光或化学发光系统，尤其是使用荧光素酶、氧合酶或磷酸酶系统的细胞系统的报道基因。

发光蛋白 mtClytin 适于作为融合蛋白特别用于受体、离子通道、转运载体、转录因子、蛋白水解酶、激酶、磷酸二酯酶、水解酶、肽酶、转移酶、膜蛋白和糖蛋白。

mtClytin 信号肽还适于作为融合肽作为融合蛋白尤其是用于受体、离子通道、转运载体、转录因子、蛋白水解酶、激酶、磷酸二酯酶、水解酶、肽酶、转移酶、膜蛋白和糖蛋白。

发光蛋白 mtClytin 适于被，尤其是抗体、生物素、或磁性或可磁化的载体固定。

发光蛋白 mtClytin 适于作为蛋白用于能量传递系统，尤其是 FRET（荧光共振能量转移）、BRET（生物发光共振能量转移）、FET（场效应晶体管）、FP（荧光偏振）和 HTRF（均相时间分辨荧光分析）系统。

发光蛋白 mtClytin 适于标记底物或配体，尤其是蛋白酶、激酶或转移酶。

发光蛋白 mtClytin 适于在细菌系统中（尤其是对于滴度测定）作为生物化学系统，特别对于蛋白水解酶和激酶的底物进行表达。

发光蛋白 mtClytin 适于用作，尤其是偶联至抗体、偶联至酶、偶联至受体或偶联至离子通道和其他蛋白的标记物。

mtClytin 信号肽还适于作为融合肽用作尤其是偶联至抗体、偶联至酶、偶联至受体或偶联至离子通道和其他蛋白的标记物。

发光蛋白 mtClytin 适于用作寻求药理学活性化合物，尤其在 HTS（高通量筛选）中的报道基因。

mtClytin 信号肽还适于用作寻求药理学活性化合物，尤其在 HTS（高通量筛选）中的报道基因。

发光蛋白 mtClytin 适于用作检测系统，尤其是 ELISA（酶联免疫吸附测定法）、免疫组织化学、Western 印迹法或共聚焦显微镜法的组件。

发光蛋白 mtClytin 适于用作分析相互作用，尤其是蛋白-蛋白相互作用、DNA-蛋白相互作用、DNA-RNA 相互作用、RNA-RNA 相互作用或 RNA-蛋白相互作用（DNA：脱氧核糖核酸；RNA：核糖核酸）的标记物。

发光蛋白 mtClytin 适于用作在转基因生物，尤其是小鼠、大鼠、仓鼠和其它哺乳动物，灵长类动物、鱼、虫或植物中表达的标记物或融合蛋白。

mtClytin 信号肽还适于作为融合肽而用作在转基因生物，尤其在小鼠、大鼠、仓鼠和其他哺乳动物，灵长类动物、鱼、虫或植物中表达的标记物或融合蛋白。

发光蛋白 mtClytin 适于用作分析胚胎发育的标记物或融合蛋白。

发光蛋白 mtClytin 适于通过偶联介质，尤其通过生物素、通过 NHS（N-羟基磺基丁二酰亚胺）或通过 CN-Br 的方式用作标记物。

发光蛋白 mtClytin 适于用作与核酸，尤其是 DNA 或 RNA 偶联的报道分子。

发光蛋白 mtClytin 适于用作与蛋白或肽偶联的报道分子。

mtClytin 信号肽还适于作为融合肽而用作与蛋白或肽偶联的报道分子。

发光蛋白 mtClytin 适于用作测量细胞内或细胞外钙浓度的报道分子。

发光蛋白 mtClytin 适用于特征化细胞系统中信号级联反应。

与核酸或肽偶联的发光蛋白 mtClytin 适于用作探针，尤其是对于 Northern 印迹、Southern 印迹、Western 印迹、ELISA、核酸序列测定、蛋白分析或芯片分析。

发光蛋白 mtClytin 适用于标记药理学制剂，尤其是传染因子、抗体或“小分子”。

发光蛋白 mtClytin 适用于地质学研究，尤其是对于海洋，地下水和河流。

发光蛋白 mtClytin 适于在表达系统中，尤其是在体外翻译系统、细菌系统、酵母系统、杆状病毒系统、病毒系统和真核生物系统中表达。

mtClytin 信号肽还适于作为融合肽而在表达系统中，尤其是在体

外翻译系统、细菌系统，酵母系统，杆状病毒系统，病毒系统和真核生物系统中表达。

发光蛋白 mtClytin 适于在外科手术方面，尤其是在侵入性、非侵入性和最低限度侵入性介入方面中使组织或细胞可视化。

发光蛋白 mtClytin 还适于标记肿瘤组织和其它表型改变的组织，尤其是在组织学研究和外科介入方面。

本发明还涉及发光蛋白 mtClytin，尤其是以野生型蛋白、融合蛋白和诱变化蛋白的纯化。

本发明还涉及 mtClytin 信号肽，尤其是以野生型蛋白、融合蛋白和诱变化蛋白的纯化。

本发明还涉及发光蛋白 mtClytin 在化妆品领域，尤其是沐浴添加剂、洗剂、肥皂、身体染色剂、牙膏和粉底中的用途。

本发明还涉及发光蛋白 mtClytin 在染色，尤其是食品染色、沐浴添加剂、墨水、纺织品和塑料制品中的用途。

本发明还涉及发光蛋白 mtClytin 在纸染色，尤其是贺卡、纸制品、壁纸和手工艺制品中的用途。

本发明还涉及发光蛋白 mtClytin 在液体染色，尤其是水枪、喷泉、饮料和冰中的用途。

本发明还涉及发光蛋白 mtClytin 在生产玩具，尤其是手指染料和化妆品中的用途。

本发明涉及编码 SEQ ID NO:2 所示多肽的核酸分子。

本发明涉及编码 SEQ ID NO:3 所示多肽的核酸分子。

本发明涉及编码 SEQ ID NO:6 所示多肽的核酸分子。

本发明涉及具有 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的多肽。

本发明涉及具有 SEQ ID NO:3 所示氨基酸序列的多肽。

本发明涉及具有 SEQ ID NO:6 所示氨基酸序列的多肽。

本发明还涉及核酸分子，其选自组成如下的一组：

a) 编码包含 SEQ ID NO:2 所公开的氨基酸序列的多肽的核酸分子；

b) 包含 SEQ ID NO:1 所示序列的核酸分子；

c) 其互补链在严格条件下与 a) 或 b) 中的核酸分子杂交且编码表现发光蛋白生物学功能的多肽的核酸分子；

核酸分子的严格条件下杂交可在，例如，包含 $0.2 \times \text{SSC}$ ($1 \times$ 标准盐水-枸橼酸盐= 150 mM NaCl , 15 mM 枸橼酸钠) 的水溶液中于 68°C 进行 (Sambrook 等, 1989)。

d) 由于遗传密码的简并性而与 c) 中所述核酸分子不同的核酸分子;

e) 表现出与 SEQ ID NO:1 至少 95% 的序列同源性且其蛋白产物表现出发光蛋白生物学功能的核酸分子; 和

f) 表现出与 SEQ ID NO:1 至少 65% 的序列同源性且其蛋白产物表现出发光蛋白生物学功能的核酸分子。

本发明还涉及表现出与 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:5 至少 95%、90%、85%、80%、75%、70%、65% 或 60% 的序列同源性且编码具有发光蛋白质质的多肽的核酸分子。

本发明还涉及表现出与 SEQ ID NO:4 至少 95%、90%、85%、80%、75%、70%、65% 或 60% 的序列同源性且编码具有信号肽或前导肽性质的多肽的核酸分子。

本发明涉及上述的核酸分子，其中序列包含发光蛋白编码序列 5' 端的或前导或信号序列编码序列 5' 端的功能启动子。

本发明还涉及如上述的核酸分子，其构成重组体 DNA 或 RNA 载体。

本发明涉及包含上述载体的生物体。

本发明涉及具有大于 10 个连续核苷酸的寡核苷酸，所述寡核苷酸与 mtClytin 分子或根据本发明的其它分子的 DNA 或 RNA 序列相同或互补。

本发明涉及由上述核苷酸序列编码的发光蛋白。

本发明涉及在细菌、真核细胞或体外表达系统中表达根据本发明的发光蛋白多肽的方法。

本发明还涉及纯化/分离根据本发明的发光蛋白多肽的方法。

本发明涉及具有大于 5 个连续氨基酸且其被针对根据本发明的发光蛋白的抗体免疫识别的肽。

本发明涉及根据本发明的发光蛋白编码核酸作为标记基因或报道基因，尤其是针对寻找药理学活性化合物和诊断剂的用途。

本发明涉及根据本发明的发光蛋白或根据本发明的发光蛋白编码

核酸作为标记物或报道分子或作为标记基因或报道基因的用途。

本发明涉及发光蛋白 mtClytin (SEQ ID NO:2), 或编码发光蛋白 mtClytin 的核酸作为标记物或报道分子, 或作为标记基因或报道基因, 尤其是针对寻找药理学活性化合物和诊断剂的用途。

本发明涉及 SEQ ID NO:1 所示核酸作为标记基因或报道基因, 尤其是针对寻找药理学活性化合物和诊断剂的用途。

本发明涉及 SEQ ID NO:6 所示肽和其相应核酸序列 SEQ ID NO:5 作为标记基因或报道基因, 尤其是针对寻找药理学活性化合物和诊断剂的用途。

本发明还涉及识别根据本发明的多肽的多克隆抗体或单克隆抗体。

本发明还涉及识别发光蛋白 mtClytin (SEQ ID NO:2) 或发光蛋白 Clytin-2 (SEQ ID NO:6) 的单克隆抗体或多克隆抗体。

本发明还涉及识别发光蛋白 mtClytin 的信号肽 (SEQ ID NO:3) 的单克隆抗体或多克隆抗体。

本发明还涉及核酸分子, 其选自组成如下的一组:

a) 编码包含 SEQ ID NO:3 所公开的氨基酸序列的多肽的核酸分子;

b) 包含 SEQ ID NO:4 所示序列的核酸分子;

c) 其互补链在严格条件下与 a) 或 b) 中的核酸分子杂交且编码表现信号肽或前导肽的生物学功能的肽的核酸分子;

d) 由于遗传密码的简并性而与 c) 中所述核酸分子不同的核酸分子;

e) 表现出与 SEQ ID NO:4 至少 95% 的序列同源性且编码具有信号肽或前导肽的生物学功能的肽的核酸分子; 和

f) 表现出与 SEQ ID NO:4 至少 65% 的序列同源性且编码具有信号肽或前导肽的生物学功能的肽的核酸分子。

本发明还涉及核酸分子, 其选自组成如下的一组:

a) 编码包含 SEQ ID NO:6 所公开的氨基酸序列的多肽的核酸分子;

b) 包含 SEQ ID NO:5 所公开的序列的核酸分子;

c) 其互补链在严格条件下与 a) 或 b) 中的核酸分子杂交且编码

表现出发光蛋白的生物学功能的多肽的核酸分子;

d) 由于遗传密码的简并性而与 c) 中所述核酸分子不同的核酸分子;

e) 表现出与 SEQ ID NO:5 至少 95% 的序列同源性且编码具有发光蛋白的生物学功能的多肽的核酸分子; 和

f) 表现出与 SEQ ID NO:5 至少 80% 的序列同源性且编码具有发光蛋白的生物学功能的多肽的核酸分子。

本发明还涉及如前面段落所述的核酸, 其包含编码序列 5' 端的功能启动子。

本发明包括包含如上述的核酸的重组体 DNA 或 RNA 载体。

本发明还涉及包含如上述的载体的生物体。

本发明还涉及具有大于 10 个连续核苷酸的寡核苷酸, 所述寡核苷酸与上述核酸分子的组成序列相同或互补。

本发明还涉及由如上所述的核酸序列编码的多肽。

本发明还涉及在细菌、病毒细胞、酵母或真核生物细胞中或在体外表达系统中表达上述多肽的方法。

本发明还涉及纯化/分离根据本发明的多肽的方法。

本发明还涉及具有大于 5 个连续氨基酸的肽, 所述肽被针对发光蛋白 mtClytin 的抗体免疫识别。

本发明还涉及具有大于 5 个连续氨基酸的肽, 所述肽被针对发光蛋白 Clytin-2 的抗体免疫识别。

本发明还涉及具有大于 5 个连续氨基酸的肽, 所述肽被针对 SEQ ID NO:3 所公开的信号肽或前导肽的抗体免疫识别。

本发明还涉及具有大于 5 个连续氨基酸的肽, 所述肽被针对 SEQ ID NO:6 (Clytin-2) 所示发光蛋白的抗体免疫识别。

本发明涉及根据本发明的核酸作为标记基因或报道基因的用途。

本发明还涉及根据本发明的发光蛋白作为标记物或报道分子的用途。

本发明还涉及包含 SEQ ID NO:4 所示序列或与 SEQ ID NO:4 具有 60%、65%、70%、75%、80%、85% 或 90%, 优选 95% 序列同一性的序列的核酸作为信号序列或前导序列的用途。

本发明还涉及包含 SEQ ID NO:3 所示序列或与 SEQ ID NO:3 具有

60%、65%、70%、75%、80%、85%或90%，优选95%序列同一性的序列的肽作为信号肽或前导肽的用途。

本发明还涉及如以上两个段落中所述的用途，用于将与信号肽或前导肽融合的蛋白转运至细胞器中。

本发明还涉及如以上段落中所述的用途，其中细胞器是线粒体。

本发明还涉及如以上段落中所述的用途，其中细胞器是内质网(ER)。

本发明还涉及 SEQ ID NO:4 所示核酸序列作为信号序列或前导序列的用途。

本发明还涉及 SEQ ID NO:3 所示的肽，其包含所述序列；作为信号肽或前导肽的用途。

本发明还涉及如以上两个段落中所述的用途，用于将与信号肽或前导肽融合的蛋白转运至细胞器中。

本发明还涉及如以上段落中所述的用途，其中细胞器是线粒体。

本发明还涉及如以上段落中所述的用途，其中细胞器是内质网(ER)。

本发明还涉及根据本发明的多肽作为报道蛋白在寻找药理学活性化合物中的用途。

最后，本发明还涉及根据本发明的核酸作为报道基因在寻找药理学活性化合物中的用途。

本发明发光蛋白的表达

在将基因导入适宜的宿主细胞后，能使被克隆至表达载体的外源基因转录和翻译的分子生成被称为表达。表达载体包括在原核生物细胞或真核生物细胞中表达基因所需的控制信号。

一般而言，表达载体可以通过两种不同的方式构建。在被称为转录融合的方式中，由克隆的外源基因所编码的蛋白被合成为真正的生物学活性蛋白。为此目的，表达载体携带所有表达所需的5'和3'控制信号。

在被称为翻译融合的方式中，由克隆的外源基因所编码的蛋白与易于检测的另一蛋白一起作为杂合蛋白而被表达。表达所需的5'和3'控制信号(包括起始密码子和，或者，编码所要形成的杂合蛋白的N端区域的序列的一部分)是载体的起始点。其它插入的蛋白部分不仅

在许多情况下稳定由克隆的外源基因所编码的蛋白使其免于被细胞蛋白酶切断，其还可被用于检测和分离产生的杂合蛋白。表达可以瞬时或稳定地发生。适宜的宿主生物体是细菌、酵母、病毒或真核生物系统。

本发明的发光蛋白的纯化

蛋白（在其同样已被过表达后）的分离通常被称作蛋白纯化。很多已建立的方法和工艺可用于纯化蛋白。

固体/液体分离是与蛋白分离相关的基本操作。在下列时候需要该工艺步骤，当从培养基分离细胞时，在破裂细胞和除去细胞碎片后澄清粗提物时，和沉淀后分离沉淀物的时，等等。其通过离心和过滤方式进行实施。

为获得细胞内的蛋白，必须破坏细胞壁或使其具有可透过性。为此目的，根据规模和生物体，使用高压匀浆器或搅拌球磨机或玻璃珠砂磨机。在实验室规模上，尤其要使用机械性细胞整合和超声波处理。

在细胞外蛋白的情况和细胞内蛋白的情况下（细胞破碎之后），使用盐（尤其是硫酸铵）或有机溶剂（醇、丙酮）的各种沉淀法均为浓缩蛋白的快速且有效的方法。纯化细胞内蛋白时，需要除去可溶性核酸（例如，用硫酸链霉素或硫酸鱼精蛋白沉淀）。分离细胞外蛋白时，通常在加入沉淀剂前加入载体（例如淀粉、硅藻土）以获得较易处理的沉淀物。

很多层析法和分配法（吸收层析法和离子交换层析法，凝胶过滤法，亲和层析法和电泳）可用于高度纯化。柱层析也被用于工业规模。亲和层析（使高达数百每步骤的纯化因子成为可能）对实验室规模尤其重要。

细胞外蛋白在相对稀的溶液中获得。如同细胞外蛋白一样，它们在进一步使用前必须浓缩。除已提到的方法外，超滤法同样已被证明在工业规模上有价值。

蛋白所伴随的无机盐在具体应用时通常是不需要的。可以通过，特别是通过凝胶过滤，渗析和渗滤将其除去。

很多蛋白以干制剂进行使用。真空干燥、冷冻干燥和喷雾干燥是重要的干燥法。

核苷酸序列和氨基酸序列

发光蛋白 mtClytin 由以下核苷酸序列 (SEQ ID NO:1) 编码:

5`-
gacagataaaaaattcactccttagattatthtagtgaataagagaaaaaaggataaagaaatcaag
atgcaaagggtttacaaatcgtcttctttccatgctcggctttacgtgcaagatcaagattgcaacgc
acggcaaattttcacaccagcactactcttggtacagattcaaaatacgcggtcaaactcgatcct
gattttgcaaattcaaaatggatcaacagadacaaatthtagtcaactttttggacataaaacggt
aaggggaaaaatcacattagatgaaatcgtctccaaagcttcagacgacatttgctgctaaactggat
gcaacaccagaacagaccaaacgtcaccaggatgctggtgaagcctttttcaagaaaatgggcatg
gattatggtaaagaagttgcatccccaagaatttattaagggatgggaagagttggccgaacacgac
ttggaactctggtctcaaaacaaaagtacattgatccgtgaatggggagatgctgthttcgacatt
ttcgacaaaagacgcaagtggctcaatcagtttagacgaatggaaggcttacggacgaatctctgga
atctgtccatcagacgaagacgctgagaagacgthtcaaacatttgatthggacaacagtgggcaa
cttgatgthgatgagatgaccaggcaacatthaggctctcgttacacattggatccaactctgat
ggtctthtatggcaattttgttccctaagaagcgttcagthtaaaaacgctaaacattgthcagthgt
aaaattatattcattttcatttcgtaaaattagthattataaatttgthataaaattgthataccat
gthtagactaaataagactcggcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa -3`.

其产生以下氨基酸序列 (SEQ ID NO:2) :

MQRFTNRLLSMSALRARSRLQRTANFHTSILLATDSKYAVKLDPDFANPKWINRHKFMFN
FLDINGK GKITLDEIVSKASDDICAKLDATPEQTKRHQDAVEAFFKKMGMDYGKEVAFPE
FIKGWEELAEHDLLELWSQNKSTLIREWGDAVFDIFDKDASGSISLDEWKA YGRISGICPSDE
DAEKTFKHCDLNSGKLDVDEMTRQHLGFWYTLDPSTDGLYGNFVP

推定的发光蛋白 mtClytin 信号肽具有以下序列 (SEQ ID NO:3) :

MQRFTNRLLSMSALRA

并具有以下核酸序列:

5`- atgcaaagggtttacaaatcgtcttctttccatgctcggctttacgtgca -3` (SEQ ID NO 4)

发光蛋白 Clytin-2 由以下核酸序列 (SEQ ID NO:5) 编码:

5`-

GATCTCAGCTCAACTTGCAATAAGTATCAGATCAAATTTTGCAACTCAAAGCAAATCA
TCAACTTCATCATAATGACTGACACTGCTTCAAAATACGCTGTCAAAGCAAGACCAA
CTTTGAAGATCCAAAATGGGTCAACAGACACAAATTTATGTTCAACTTTTTGGACATT
AACGGCAACGGAAAAATCACTTTGGATGAAATTGTCTCCAAGCTTCGGATGACATTT
GCGCCAAACTTGGAGCTACACCAGCTCAAACCCAACGTCATCAGGAAGCTGTTGAAGC
TTTCTTCAAGAAGATTGGTTTGGATTATGGCAAAGAAGTCGAATTCCCAGCTTTCGTTA
ACGGATGGAAAGAACTGGCCAAACATGACTTGAAACTTTGGTCCCAAAACAAGAAAT
CTTTGATCCGCAATTGGGGAGAAGCTGTATTTCGACATTTTCGACAAGGACGGAAGTGG
CTCAATCAGTTTGGACGAATGGAAAACATACGGAGGAATCTCTGGAATCTGTCCATCA
GACGAAGACGCTGAAAAGACCTTCAAACATTGCGATTTGGACAACAGTGGCAAACCTT
GATGTTGACGAGATGACCAGACAACATTTGGGATTCTGGTACACCTTGGACCCTAACG
CTGATGGTCTTTATGGCAACTTTGTCCTTAAAACTTTTTTTGCTGTAAATTCTTTACG
GGTTATTTTTTTCATAATTGTCATTTGATTTTAACTTTGTTTCGGAAAATGAAAAATATT
CTTTATTCAGAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA - 3`

其产生以下氨基酸序列 (SEQ ID NO:6) :

MTDTASKYAVKLTNFKWVNRHKFMFNFLDINGNGKITLDEIVSKASDDICAKLGAT
PAQTQRHQEAVEAFFKKIGLDYGKEVEFPFVNGWKELAKHDLKLWSQNKSLIRNWGE
AVFDIFDKDGSISLDEWKTYGGISGICPSDEDAEKTFFKHCDLNSGKLDVDEMTRQHLG
FWYTLDPNADGLYGNFVP

这些序列再现于序列表中。

附图简述

图 1: 图 1 表示载体 pTriplex2-mtClytin 的质粒图谱。

图 2: 图 2 表示载体 pcDNA3-mtClytin 的质粒图谱。

图 3: 图 3 表示 mtClytin 的细菌表达的结果和细菌表达后 mtClytin 的生物发光活性。(Y=RLU: 相对光单位; X=稀释度; 黑色柱=mtClytin; 灰色柱=对照裂解物)。

图 4: 图 4 表示 mtClytin 真核生物表达的结果和在 CHO 细胞中表达后 mtClytin 的生物发光活性。(Y=RLU: 相对光单位; X=ATP (以 mol/l 的对数表示))。

图 5: 图 5 表示 mtClytin 生物发光的动力学分析。(Y=RLU: 相对光单位; X=时间[秒])。

图 6: 图 6 表示 Obelin 生物发光的动力学分析。(Y=RLU: 相对光单位; X=时间[秒])。

图 7: 图 7 表示 Clytin 和 mtClytin 在氨基酸水平上的比对。

图 8: 图 8 表示 Clytin 和 mtClytin 在核酸水平上的比对。

图 9: 图 9 表示 Clytin, mtClytin 和 Clytin-2 在氨基酸水平上的比对。

具体实施方式

实施例

实施例 1

采用 Clontech 公司的质粒 pTriplEx2 作为载体用于制备下述的构建体。载体的衍生物被称为 pTriplEx2-mtClytin。载体 pTriplEx2-mtClytin 被用于在细菌系统中表达 mtClytin。

图 1 表示载体 pTriplEx2-mtClytin 的质粒图谱。

实施例 2

采用 Clontech 公司的质粒 pcDNA3.1 (+) 作为载体用于制备下述的构建体。载体的衍生物被称作 pcDNA3-mtClytin。载体 pcDNA3-mtClytin 被用于在真核生物系统中表达 mtClytin。

图 2 表示载体 pcDNA3-mtClytin 的质粒图谱。

实施例 3

细菌性表达

通过用表达质粒 pTriplEx2-mtClytin 和 pTriplEx2 转化细菌在 E.coli 菌株 BL21 (DE3) 中进行细菌性表达。转化的细菌在 LB 培养基中于 37°C 培养 3 小时, 然后通过加入 IPTG 至终浓度 1 mM, 诱导表达 4 小时。通过离心分离采集诱导的细菌, 在 50 mM Tris/HCl (pH 9.0) +5 mM EDTA 中重悬并经超声裂解。随后, 裂解产物以 13 000 rpm (16 000 ref) 离心 15 分钟, 然后除去上清液。上清液 (用 Tris/HCl pH 9.0 稀释 1:5, 1:10, 1:20 和 1:50) 与发光基团 (于 Tris/HCl pH 9.0 中的 10E-07 M 发光基团) 在黑暗中孵育 3 小时。在加入 5 mM 氯化钙后立即用光度计测量生物发光。测量积分时间 (integration time) 是 40 秒。

图 3 表示细菌中 mtClytin 生物发光的检测结果。

实施例 4

真核生物性表达

通过在瞬时实验中用表达质粒 pcDNA3-mtClytin 和 pcDNA3.1(+) 转染细胞, 在 CHO 细胞中进行构成性真核生物性表达。为此, 将 10000 个细胞/孔 (DMEM-F12 培养基中) 铺于 96 孔微量平板上, 然后将平板于 37℃ 培养过夜。使用 Fugene 6 试剂盒 (Roche) 按照厂商说明书实施转染。转染的细胞在 DMEM-F12 培养基中于 37℃ 培养过夜。然后除去培养基, 并用 50 μ l 的发光基团 (PBS 中 10E-07M 发光基团) 代替。细胞于 37℃ 培养 3 小时, 然后加入 ATP (三磷酸腺苷) 至终浓度 1 μ M。在加入后立即开始用光度计测量。总测量时间是 60 秒, 积分时间是 1 秒。

图 4 表示 CHO 细胞中 mtClytin 生物发光的检测结果。

实施例 5

BLAST

mtClytin 在氨基酸水平上的 BLAST 分析结果:

```
>emb|CAD87655.1|      无名蛋白产品      [Clytia gregaria], 长度
= 198, 评分 = 368 bits (945), Expect = e-101, 同一性 =
171/195 (87%), Positives = 182/195 (92%)
```

```
>sp|Q08121|CLYT_CLYGR Clytin 前体 (Phialidin), pir||S28860
clytin - hydromedusa (Clytia gregarium), emb|CAA49754.1| clytin
[Clytia gregaria], gb|AAA28293.1| apoclytin, 长度 = 198, 评分 =
368 bits (945), Expect = e-101, 同一性 = 171/195 (87%),
Positives = 182/195 (92%)
```

```
>emb|CAD87658.1|      无名蛋白产品      [ 合成构建体 ],
长度 = 198, 评分 = 367 bits (943), Expect = e-101, 同一性
= 170/195 (87%), Positives = 182/195 (93%)
```

```
>sp|Q27709|OBL_OBELO Obelin 前体 (OBL), pdb|1EL4|A 链 A,
钙调节的发光蛋白Obelin的结构 , 由 Sulfur
Sas 测定 , gb|AAA67708.1| 无名蛋白产品 , 长度 =
```

195, 评分 = 327 bits (837), Expect = 1e-88, 同一性 = 150/193 (77%), Positives = 170/193 (87%)

>emb|CAD87674.1| 无名蛋白产品 [合成构建体],
长度 = 195, 评分 = 326 bits (835), Expect = 2e-88, 同一性
= 149/193 (77%), Positives = 170/193 (87%)

>emb|CAD87672.1| 无名蛋白产品 [合成构建体],
长度 = 195, 评分 = 325 bits (834), Expect = 3e-88, 同一性
= 149/193 (77%), positives = 170/193 (87%)

>emb|CAD87673.1| 无名蛋白产品 [合成构建体],
长度 = 195, 评分 = 325 bits (833), Expect = 4e-88, 同一性
= 149/193 (77%), Positives = 170/193 (87%)

>pdb|1JF0|A 链 A, 来自 Geniculata 的 Obelin 的晶体
结构, 在 1.82 A 分辨率, gb|AAL86372.1|AF394688_1
apocobelin [Obelia geniculata], 长度 = 195, 评分 = 325
bits (833), Expect = 4e-88, 同一性 = 149/193 (77%), Positives
= 168/193 (86%)

实施例 6

BLAST

mtClytin 在核酸水平上的 BLAST 分析结果:

>emb|AX702125.1| 序列 23, 来自专利 WO03006497, 长度 = 597,
评分 = 669 bits (348), Expect = 0.0, 同一性 = 504/582 (86%)

>emb|AX702119.1| 序列 17, 来自专利 WO03006497, 长度 = 597;
评分 = 669 bits (348), Expect = 0.0, 同一性 = 504/582 (86%)

>emb|X70221.1|CGCLYTIN C.gregaria mRNA for clytin, 长度 = 747,
评分 = 669 bits (348), Expect = 0.0, 同一性 = 504/582 (86%)

>gb|L13247.1|CY1APOCLYT Clytia gregarium apoclytin mRNA, complete
cds, 长度 = 747, 评分 = 669 bits (348), Expect = 0.0,
同一性 = 504/582 (86%)

>emb|AX702187.1| 序列 85, 来自专利 WO03006497, 长度 = 597,
评分 = 664 bits (345), Expect = 0.0, 同一性 = 503/582 (86%)

```

>emb|AX702185.1| 序列 83 , 来自专利 W003006497, 长度 = 597,
评分 = 664 bits (345), Expect = 0.0, 同一性 = 503/582 (86%)

>emb|AX702183.1| 序列 81 , 来自专利 W003006497, 长度 = 597,
评分 = 664 bits (345), Expect = 0.0, 同一性 = 503/582 (86%)

>emb|AX702181.1| 序列 79 , 来自专利 W003006497, 长度 = 597,
评分 = 664 bits (345), Expect = 0.0, 同一性 = 503/582 (86%)

>emb|AX702179.1| 序列 77 , 来自专利 W003006497, 长度 = 597,
评分 = 664 bits (345), Expect = 0.0, 同一性 = 503/582 (86%)

>emb|AX702131.1| 序列 29 , 来自专利 W003006497, 长度 = 597,
评分 = 664 bits (345), Expect = 0.0, 同一性 = 503/582 (86%)

>emb|AX702129.1| 序列 27 , 来自专利 W003006497, 长度 = 597,
评分 = 664 bits (345), Expect = 0.0, 同一性 = 503/582 (86%)

```

实施例 7

图 7 表示 mtClytin 与 Clytin (Clytia gregaria) 在核酸水平上的比对。

实施例 8

图 8 表示 mtClytin 与 Clytin (Clytia gregaria) 在氨基酸水平上的比对。

实施例 9

mtClytin 的动力学分析

对于 mtClytin 生物发光的动力学分析, 采用 pcDNA3-mtClytin 或 pcDNA-Obelin 或 pcDNA3(无任何整合的 cDNA) 瞬时转染 CHO 细胞。转染和检测如实施例 4 中所述。以 1 秒的积分时间, 读数时间为 60 秒。

图 5 和图 6 表示 mtClytin 和 Obelin 的动力学分析结果。

实施例 10

MITOPROT 分析

使用计算机程序 MITOPROT 分析 mtClytin 信号肽 (Claros 等, 1996)。分析以下发光蛋白: Obelin(Q27709)、水母发光蛋白(P07164)、Clytin(Q08121) 和 mtClytin (SEQ ID NO:2)。

分析结果:Obelin:

序列名称: OBELIN

输入序列长度: 195 aa

计算参数的值

query序列的净电荷 : -11
 分析区 : 11
 引导肽中碱性残基的数目 : 3
 引导肽中酸性残基的数目 : 0
 裂解位点 : 未测到
 裂解序列 : -

所用的疏水尺度

	GES	KD	GVH1	ECS
H17 :	-0.624	0.259	-0.308	0.295
MesoH :	-1.573	-0.241	-0.642	0.060
MuHd_075 :	14.019	3.641	4.408	1.523
MuHd_095 :	7.994	7.898	3.285	1.838
MuHd_100 :	13.734	9.836	5.597	2.742
MuHd_105 :	21.195	11.755	7.339	4.117
Hmax_075 :	-9.450	-2.800	-4.008	1.132
Hmax_095 :	-0.963	1.837	-1.971	1.103
Hmax_100 :	0.400	1.300	-1.942	2.240
Hmax_105 :	10.617	6.067	0.733	3.127

概率

输出到线粒体的: 0.1479

水母发光蛋白:

序列名称: AEQUORIN

输入序列长度: 196 aa

计算参数的值

query序列的净电荷 : -13
 分析区 : 3
 引导肽中碱性残基的数目 : 0
 引导肽中酸性残基的数目 : 0
 裂解位点 : 未测到

裂解序列 : -

所用的疏水尺度

	GES	KD	GVH1	ECS
H17	0.006	0.794	-0.263	0.368
MesoH	-1.673	-0.382	-0.703	0.048
MuHd_075	24.326	4.153	5.947	2.450
MuHd_095	12.638	7.213	4.218	1.796
MuHd_100	13.748	8.827	4.477	2.427
MuHd_105	16.581	11.426	5.056	3.453
Hmax_075	0.438	0.233	-2.490	1.692
Hmax_095	0.525	-1.400	-2.394	0.674
Hmax_100	-0.100	-1.200	-2.292	1.550
Hmax_105	0.500	-0.000	-2.164	1.540

概率

输出到线粒体 : 0.0148

Clytin :

序列名称: CLYTIN

输入序列长度: 198 .aa

计算参数的值

query序列的净电荷 : -9
 分析区 : 32
 引导肽中碱性残基的数目 : 6
 引导肽中酸性残基的数目 : 2
 裂解位点 : 未测到
 裂解序列 : -

所用的疏水尺度

	GES	KD	GVH1	ECS
H17	-0.429	0.341	-0.313	0.313
MesoH	-1.778	-0.307	-0.718	0.053
MuHd_075	32.928	17.509	7.351	5.708
MuHd_095	30.874	20.344	9.074	5.834
MuHd_100	36.596	22.666	10.051	6.762
MuHd_105	39.174	19.336	10.379	7.609
Hmax_075	4.900	7.087	-1.223	3.684
Hmax_095	13.600	10.100	1.251	4.390

Hmax_100	:	14.000	12.600	1.601	5.060
Hmax_105	:	6.650	13.067	-0.468	3.920

概率

输出到线粒体 : 0.2047

Clytin-2:

序列名称: CLYTIN-2

输入序列长度: 198 aa

计算参数的值

query序列的净电荷	:	-7
分析区	:	16
引导肽中碱性残基的数目	:	3
引导肽中酸性残基的数目	:	1
裂解位点	:	未测到
裂解序列	:	-

所用疏水尺度

	GES	KD	GVH1	ECS
H17	: -0.288	0.341	-0.213	0.313
MesoH	: -1.519	-0.206	-0.681	0.081
MuHd_075	: 32.594	15.092	8.192	4.075
MuHd_095	: 36.090	19.707	8.836	6.716
MuHd_100	: 38.617	20.269	9.682	6.851
MuHd_105	: 30.267	16.082	8.229	5.470
Hmax_075	: 6.533	6.417	-0.793	2.508
Hmax_095	: 13.600	10.100	1.251	4.390
Hmax_100	: 13.600	10.100	1.251	4.390
Hmax_105	: 13.417	10.150	1.612	3.862

概率

输出到线粒体 : 0.3974

mtClytin:

序列名称: mtClytin

输入序列长度: 228 aa

计算参数的值

query序列的净电荷	:	-8
分析区	:	34

引导肽中碱性残基的数目 : 6
 引导肽中酸性残基的数目 : 0
 裂解位点 : 17
 裂解序列 : MQRFTNRLLSMSALRA

所用疏水尺度

	GES	KD	GVH1	ECS
H17	-0.135	0.453	-0.343	0.309
MesoH	-1.623	-0.215	-0.701	0.073
MuHd_075	33.394	19.322	8.634	7.593
MuHd_095	34.726	19.634	8.110	8.861
MuHd_100	32.825	16.596	7.376	7.520
MuHd_105	28.005	19.893	7.410	7.865
Hmax_075	16.683	17.733	2.851	5.763
Hmax_095	13.125	13.388	2.299	4.314
Hmax_100	8.300	11.500	1.845	3.830
Hmax_105	1.700	9.500	-1.171	2.390

概率

输出到线粒体 : 0.9974

被分析的肽易位至线粒体的概率以接近 1 的计算因数增加。

Obelin、水母发光蛋白、Clytin、Clytin-2 和 mtClytin 的蛋白序列的分析表明仅 mtClytin 具有可以转运至线粒体的蛋白特征。

实施例 11

图 9 显示 mtClytin, Clytin (Clytia gregaria) 和 Clytin-type2 在氨基酸水平上比对。

文献/专利

US 6,495,355
 US 5,541,309
 US 5,093,240
 US-0908909
 US 6,152,358
 JP-0176125

GB-0024357

WO03006497

WO200168824

Alam J, Cook JL. Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal Biochem.* 1990 Aug 1;188(2):245-54

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997); Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs; *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402

Chiesa A, Rapizzi E, Tosello V, Pinton P, de Virgilio M, Fogarty KE, Rizzuto R. Recombinant aequorin and green fluorescent protein as valuable tools in the study of cell signalling. *Biochem J.* 2001 Apr 1;355(Pt 1):1-12.

Claros, M.G., Vincens, P. (1996); Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur. J. Biochem* 241, 779-786.

Cullen Bryan R., Malim Michael H., Secreted placental alkaline phosphatase as a eukaryotic reporter gene. *Methods in Enzymology.* 216:362ff

Fagan TF, Ohmiya Y, Blinks JR, Inouye S, Tsuji FI. Cloning, expression and sequence analysis of cDNA for the Ca(2+)-binding photoprotein, mitrocomin. *FEBS Lett.* 1993 Nov 1;333(3):301-5

Hastings, J.W. and Morin, J.G. (1969) Comparative biochemistry of calcium-activated photoproteins from the ctenophore, *Mnemiopsis* and the coelenterates *Aequorea*, *Obelia*, and *Pelagia*. *Biol. Bull.* 137, 402.

Haddock SH, Rivers TJ, Robison BH. Can coelenterates make coelenterazine? Dietary requirement for luciferin in cnidarian bioluminescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Sep 25;98(20):11148-51

Inouye S, Tsuji FI. (1994) *Aequorea* green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett* 1994 Mar 21;341(2-3):277-80

Inouye S, Tsuji FI. Cloning and sequence analysis of cDNA for the Ca(2+)-activated photoprotein, clytin. *FEBS Lett.* 1993 Jan 11;315(3):343-6.

Ilarionov BA, Bondar VS, Ilarionova VA, Vysotski ES. Sequence of the cDNA encoding the Ca(2+)-activated photoprotein obelin from the hydroid polyp *Obelia longissima*. *Gene*. 1995 Feb 14;153(2):273-4.

Jones K, Hibbert F, Keenan M. Glowing jellyfish, luminescence and a molecule called coelenterazine. *Trends Biotechnol* 1999 Dec;17(12):477-81

Johnson, F.H., Shimomura, O., Saiga, Y., Gershman, L.C., Reynolds, G.T., and Waters, J.R. (1962) Quantum efficiency of *Cypridina* luminescence, with a note on that of *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 60, 85-103.

Morin, J.G. and Hastings, J.W. (1971) Biochemistry of the bioluminescence of colonial hydroids and other coelenterates. *J. Cell. Physiol.* 77, 305-311.

Phillips GN, Structure and dynamics of green fluorescent protein. *Curr Opin Struct Biol.* 1997 Dec;7(6):821-7

Sambrook, J., Fritsch, E. Maniatis, T. 1989, Molecular cloning. A laboratory manual Vol 1-3, Cold Spring Harbor, New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press

Shimomura O, Johnson FH. Properties of the bioluminescent protein aequorin. *Biochemistry.* 1969 Oct;8(10):3991-7

Shimomura O, Bioluminescence in the sea: photoprotein systems. *Symp Soc Exp Biol.* 1985;39:351-72

Shimomura O. Isolation and properties of various molecular forms of aequorin. *Biochem J.* 1986 Mar 1;234(2):271-7.

Snowdowne KW, Borle AB. Measurement of cytosolic free calcium in mammalian cells with aequorin. *Am J Physiol.* 1984 Nov;247(5 Pt 1):C396-408.

Ward, W.W. (1998) Biochemical and physical properties of green fluorescent protein. In: *Green Fluorescent Protein: Properties, Applications, and Protocols* (Chalfie, M. and Kain, S., eds) pp. 45-70. Wiley-Liss, Inc.

Yang Te-Tuan, Sinai Parisa, Kitts Paul A. Kain Seven R., Quantification of gene expression with a secreted alkaline phosphatase reporter system. *Biotechnology*. 1997 23(6) 1110ff

<110> Bayer AG, BHC

<120> 分离的发光蛋白mtClytin, 及其用途

<130> Le. A 36 839

<160> 6

<170> 专利版本3.1

<210> 1

<211> 912

<212> DNA

<213> *Clytia gregaria*

<400> 1

```

gacagataaa aaattcactc cttagattat ttagtgaata agagaaaaaa aggataagaa      60
atcaagatgc aaaggtttac aaatcgtctt ctttccatgt cggctttacg tgcaagatca     120
agattgcaac gcacggcaaa ttttcacacc agcatactct tggctacaga ttcaaaatac     180
goggtcaaac tcgatcctga ttttgcaaat ccaaaatgga tcaacagaca caaatttatg     240
ttcaactttt tggacataaa cggtaagggg aaaatcacat tagatgaaat cgtctccaaa     300
gettccagag acatttgtgc taaactggat gcaacaccag aacagaccaa acgtcaccag     360
gatgctgttg aagocctttt caagaaaatg ggcattggatt atggtaaaga agttgcattc     420
ccagaattta ttaagggatg ggaagagttg gccgaacacg acttggaact ctggtctcaa     480
aacaaaagta cattgatccg tgaatgggga gatgctgttt tcgacatttt cgacaaagac     540
gcaagtggct caatcagttt agacgaatgg aaggcttacg gacgaatctc tggaatctgt     600
ccatcagacg aagacgctga gaagacgttc aacatttgtg .atctggacaa cagtggcaaa     660
cttgatgttg atgagatgac caggcaacat ttaggcttct ggtacacatt ggatccaact     720
tctgatggtc tttatggcaa ttttgtccc taagaagcgt tcagttaaaa acgctaanca     780
ttgttcagtt gtaaaattat attcattttc atttcgtaaa attagtattt ataaatttgt     840
atcataaatt gtatccatgt tgtagactaa ataagactcg gcaaaaaaaa aaaaaaanaa     900
aaaaaaaaaa aa                                                                912

```

<210> 2

<211> 228

<212> PRT

<213> *Clytia gregaria*

<400> 2
 Met Gln Arg Phe Thr Asn Arg Leu Leu Ser Met Ser Ala Leu Arg Ala
 1 5 10 15
 Arg Ser Arg Leu Gln Arg Thr Ala Asn Phe His Thr Ser Ile Leu Leu
 20 25 30
 Ala Thr Asp Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Asp Pro Asp Phe Ala Asn
 35 40 45
 Pro Lys Trp Ile Asn Arg His Lys Phe Met Phe Asn Phe Leu Asp Ile
 50 55 60
 Asn Gly Lys Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys Ala Ser
 65 70 75 80
 Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Asp Ala Thr Pro Glu Gln Thr Lys Arg
 85 90 95
 His Gln Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Met Gly Met Asp Tyr
 100 105 110
 Gly Lys Glu Val Ala Phe Pro Glu Phe Ile Lys Gly Trp Glu Glu Leu
 115 120 125
 Ala Glu His Asp Leu Glu Leu Trp Ser Gln Asn Lys Ser Thr Leu Ile
 130 135 140
 Arg Glu Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp Ala Ser
 145 150 155 160
 Gly Ser Ile Ser Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Arg Ile Ser Gly
 165 170 175
 Ile Cys Pro Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Phe Lys His Cys Asp
 180 185 190
 Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His
 195 200 205
 Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Thr Ser Asp Gly Leu Tyr Gly
 210 215 220
 Asn Phe Val Pro
 225 .

<210> 3
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Clytia gregaria*

<400> 3
 Met Gln Arg Phe Thr Asn Arg Leu Leu Ser Met Ser Ala Leu Arg Ala
 1 5 10 15

<210> 4
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> *Clytia gregaria*

<400> 4
 atgcaaaggt ttacaaatcg tcttctttcc atgtcggett tacgtgca 48

<210> 5
 <211> 791
 <212> DNA
 <213> *Clytia gregaria*

<400> 5
 gatctcagct caacttgcaa taagtatcag atcaaatttt gcaactcaaa gcaaatcatc 60
 aacttcatca taatgactga cactgcttca aaatacagctg tcaaaactcaa gaccaacttt 120
 gaagatccaa aatgggtcaa cagacacaaa tttatgttca actttttgga cattaacggc 180
 aacggaaaaa tcactttgga tgaattgtc tccaaagctt cggatgacat ttgcgccaaa 240
 cttggagcta caccagctca aacccaacgt catcaggaag ctggtgaagc tttcttcaag 300
 aagattgggt tggattatgg caaagaagtc gaattcccag ctttctgtaa cggatggaaa 360
 gaactggcca aacatgactt gaaactttg tccaaaaaca agaaatcttt gatccgcaat 420
 tggggagaag ctgtattoga cttttctgac aaggacggaa gtggctcaat cagtttggac 480
 gaatggaaaa catacggagg aatctctgga atctgtccat cagaogaaga cgtgaaaaag 540
 accttcaaac attgcgattt ggacaacagt ggcaaaccttg atggtgacga gatgaccaga 600
 caacatttgg gattctggta caccttggac cctaacgctg atggtcttta tggcaacttt 660
 gtcocttaa aacttttttt gctgtaaatt ctttaacgggt tttttttta taattgtcat 720
 ttgattttta ctttgtttcg gaaaatgaaa aatattcttt attcagaaaa aaaaaaaaaa 780
 aaaaaaaaaa a 791

<210> 6
 <211> 198
 <212> PRT
 <213> *Clytia gregaria*

<400> 6
 Met Thr Asp Thr Ala Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asn Phe
 1 5 10 15
 Glu Asp Pro Lys Trp Val Asn Arg His Lys Phe Met Phe Asn Phe Leu
 20 25 30
 Asp Ile Asn Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys
 35 40 45
 Ala Ser Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Ala Gln Thr
 50 55 60
 Gln Arg His Gln Glu Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Ile Gly Leu
 65 70 75 80

Asp Tyr Gly Lys Glu Val Glu Phe Pro Ala Phe Val Asn Gly Trp Lys
 85 90 95
 Glu Leu Ala Lys His Asp Leu Lys Leu Trp Ser Gln Asn Lys Lys Ser
 100 105 110
 Leu Ile Arg Asn Trp Gly Glu Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp
 115 120 125
 Gly Ser Gly Ser Ile Ser Leu Asp Glu Trp Lys Thr Tyr Gly Gly Ile
 130 135 140
 Ser Gly Ile Cys Pro Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Phe Lys His
 145 150 155 160
 Cys Asp Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg
 165 170 175
 Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Asn Ala Asp Gly Leu
 180 185 190
 Tyr Gly Asn Phe Val Pro
 195

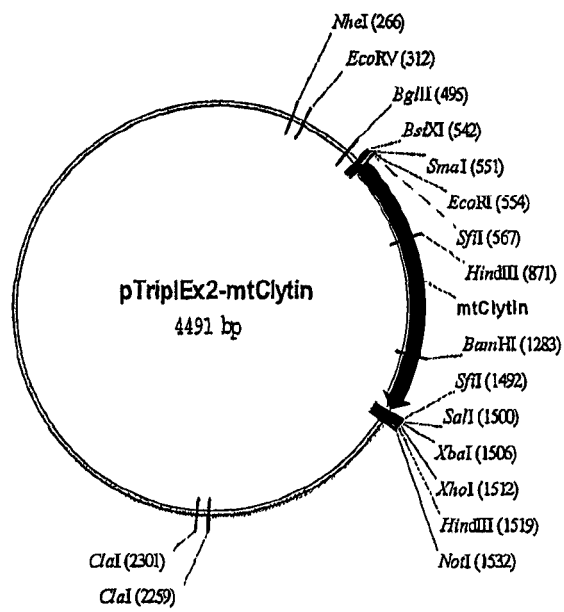


图 1

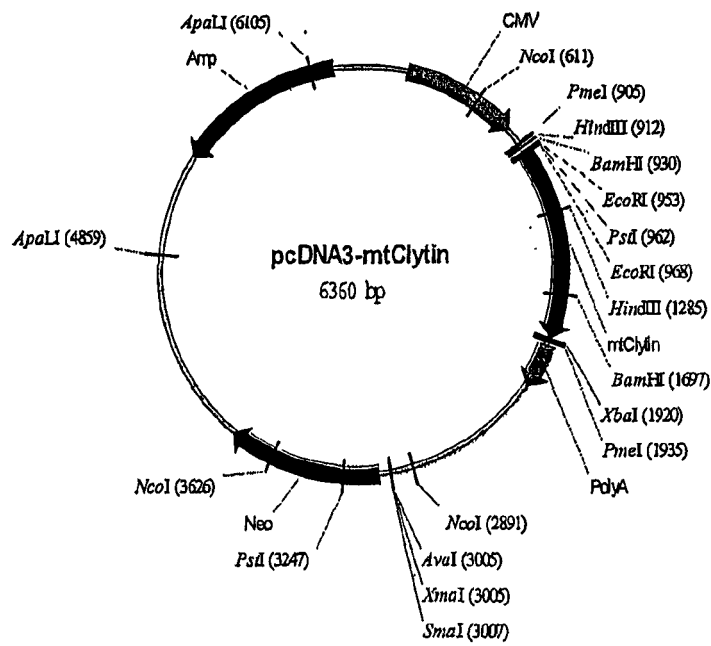


图 2

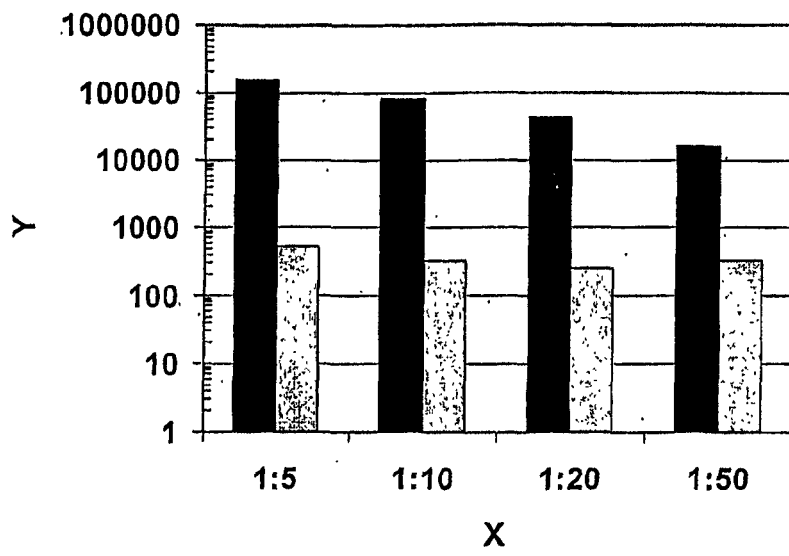


图 3

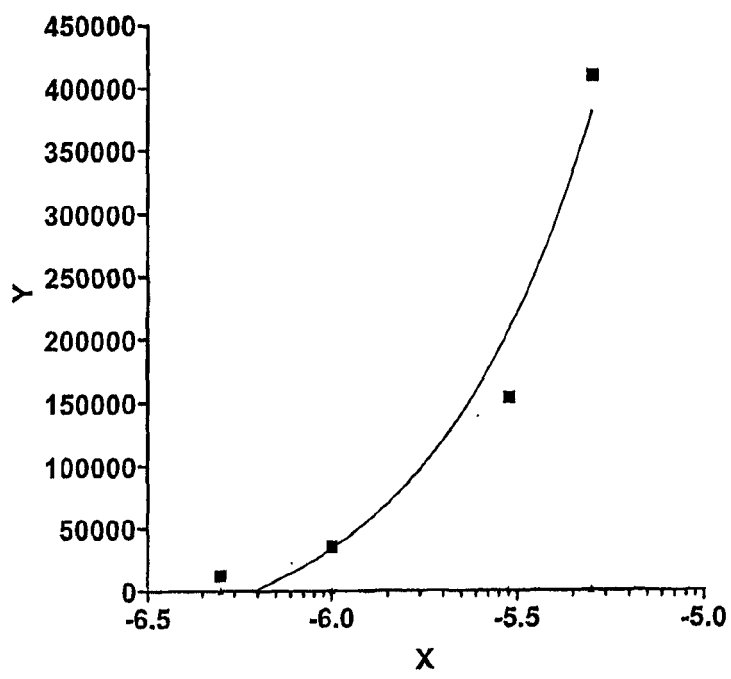


图 4

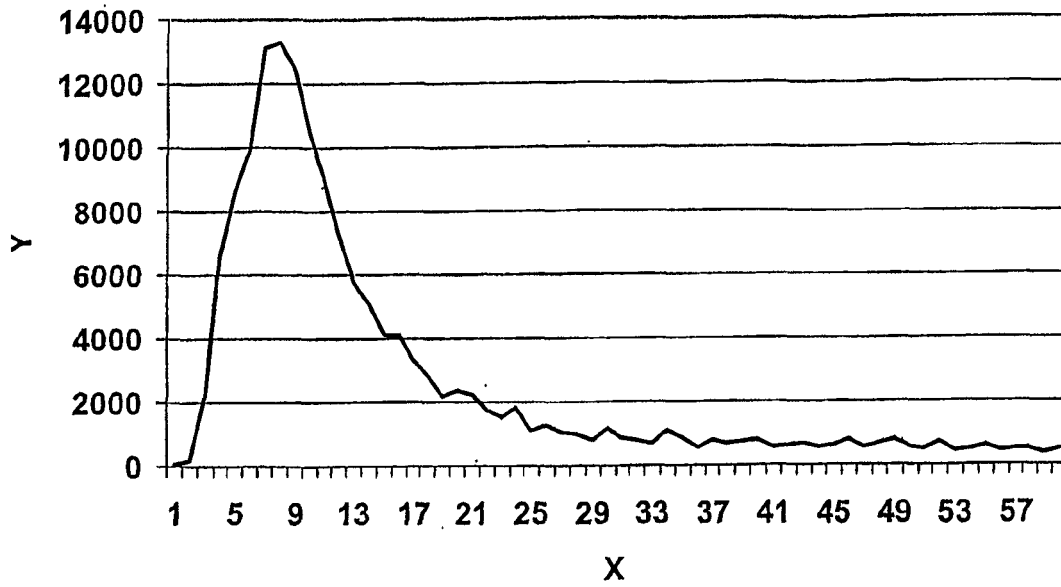


图 5

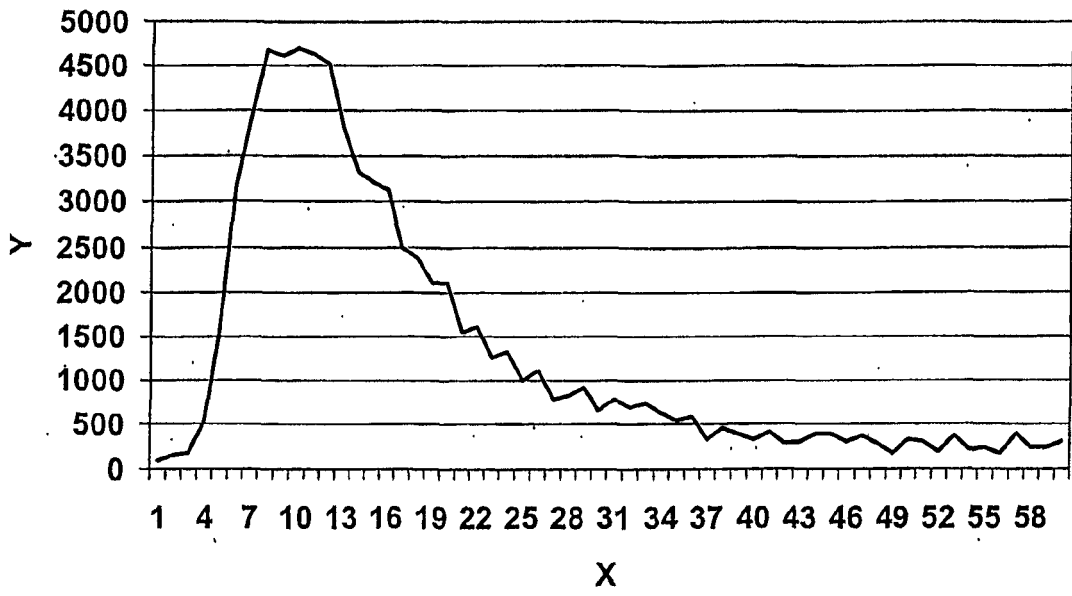


图 6

1		50
Clytin
mtClytin	GACAGATAAA AAATTCACTC CTTAGATTAT TTAGTGAATA AGAGAAAAAA	
	51	100
Clytin
mtClytin	AGGATAAGAA ATCAAGATGC AAAGGTTTAC AAATCGTCTT CTTTCCATGT	
	101	150
ClytinATCA ACTTTTGCAA CTCAAAGCAA ATTTCAAAC	
mtClytin	CGGCTTTACG TGCAAGATCA AGATT.GCAA CGCACGGCAA ATTTTCACAC	
	151	200
Clytin	TTCAACATGG CTGAC.ACTG CATCAAATA CGCCGTCAA CTCAGACCCA	
mtClytin	CAGCATACTC TTGGCTACAG ATTCAAATA CGCGGTCAA CTCGATCCTG	
	201	250
Clytin	ACTTCGACAA CCCAAATGG GTCAACAGAC ACAAATTTAT GTTCAACTTT	
mtClytin	ATTTTGCAA TCCAAATGG ATCAACAGAC ACAAATTTAT GTTCAACTTT	
	251	300
Clytin	TTGGACATTA ACGGCGACGG AAAAATCACT TTGGATGAAA TCGTCTCCAA	
mtClytin	TTGGACATAA ACGGTAAGGG GAAAATCACA TTAGATGAAA TCGTCTCCAA	
	301	350
Clytin	AGCTTCGGAT GACATTTGCG CCAAACCTGG AGCAACACCA GAACAGACCA	
mtClytin	AGCTTCAGAC GACATTTGTG CTAAACTGGA TGCAACACCA GAACAGACCA	
	351	400
Clytin	AACGTCACCA GGATGCTGTC GAAGCTTTCT TCAAAAAGAT TGGTATGGAT	
mtClytin	AACGTCACCA GGATGCTGTT GAAGCCTTTT TCAAGAAAAT GGCATGGAT	
	401	450
Clytin	TATGGTAAAG AAGTCGAATT CCCAGCTTTT GTTGATGGAT GGAAAGAACT	
mtClytin	TATGGTAAAG AAGTTGCATT CCCAGAATTT ATTAAGGGAT GGAAGAGTT	
	451	500
Clytin	GGCCAATTAT GACTTGAAAC TTTGGTCTCA AAACAAGAA TCTTTGATCC	
mtClytin	GGCCGAACAC GACTTGGAAC TCTGGTCTCA AAACAAAAGT ACATTGATCC	
	501	550
Clytin	GCGACTGGGG AGAAGCTGTT TTCGACATT TTGACAAAGA CGGAAGTGGC	
mtClytin	GTGAATGGGG AGATGCTGTT TTCGACATT TCGACAAAGA CGCAAGTGGC	
	551	600
Clytin	TCAATCAGTT TGGACGAATG GAAGGCTTAT GGACGAATCT CTGGAATCTG	

图 7

```

mtClytin  TCAATCAGTT TAGACGAATG GAAGGCTTAC GGACGAATCT CTGGAATCTG
          601                                     650
Clytin    CTCATCAGAC GAAGACGCCG AAAAGACCTT CAAACATTGC GATTTGGACA
mtClytin  TCCATCAGAC GAAGACGCTG AGAAGACGTT CAAACATTGT GATTTGGACA
          651                                     700
Clytin    ACAGTGGCAA ACTTGATGTT GATGAGATGA CCAGACAACA TTTGGGATTC
mtClytin  ACAGTGGCAA ACTTGATGTT GATGAGATGA CCAGGCAACA TTTAGGCTTC
          701                                     750
Clytin    TGGTACACCT TGGACCCCAA CGCTGATGGT CTTTACGGCA ATTTTGTTC
mtClytin  TGGTACACAT TGGATCCAAC TTCTGATGGT CTTTATGGCA ATTTTGTTC
          751                                     800
Clytin    TTAAACATCG ...AAACAAA AGCCCAAAG AAGTTTTGGA AGAATTATTT
mtClytin  CTAAGAAGCG TTCAGTAAA AACGCTAAC ATTGTTCAGT TGTAATAATTA
          801                                     850
Clytin    GATAC..TAT CATTG.... ..TTACTATT TCGTAACATG CT..ATATTT
mtClytin  TATTCATTTT CATTTCGTAA AATTAGTATT TATAAATTTG TATCATAAAT
          851                                     900
Clytin    TGTAAC.ATG CTATATT.TA AATAATTTT. ....
mtClytin  TGTATCCATG TTGTAGACTA AATAAGACTC GGCAAAAAAA AAAAAAAA
          901                                     913
Clytin    .....
mtClytin  AAAAAAAAA AAA

```

```

1                               50
mtClytin  MQRFTNRLLS MSALRARSRL QRTANFHTSI LLATDSKYAV KLDPDFANPK
Clytin    ..... MADTASKYAV KLRPNFDNPK

51                               100
mtClytin  WINRHKFMFN FLDINGGKI TLDEIVSKAS DDICAKLDAT PEQTKRHQDA
Clytin    WVNHRHKFMFN FLDINGGKI TLDEIVSKAS DDICAKLGAT PEQTKRHQDA

101                              150
Clytin    VEAFKQGMG DYKKEVAFPE FIGWEELAE HDLELWSQNK STLIREWGDA
Clytin    VEAFKQGMG DYKKEVEFPA FVDGWKELAN YDLKLWSQNK KSLIRDWGEA

151                              200
Clytin    VFDIFDKDAS GSISLDEWKA YGRISGICPS DEDAECTFKH CDLDNSGKLD
Clytin    VFDIFDKDGS GSISLDEWKA YGRISGICSS DEDAECTFKH CDLDNSGKLD

201                              228
mtClytin  VDEMTRQHLG FWYTLDPDSD GLYGNFVP
Clytin    VDEMTRQHLG FWYTLDPNAD GLYGNFVP

```

图 8

```

1                               50
mtClytin  MQRFTNRLLS MSALRARSRL QRTANFHTSI LLATDSKYAV KLDPDFANPK
Clytin-2  ..... MDTASKYAV KLKTNFEDPK
Clytin    ..... MADTASKYAV KLRPNFDNPK

51                               100
mtClytin  WINRHKFMFN FLDINGGKI TLDEIVSKAS DDICAKLDAT PEQTKRHQDA
Clytin-2  WVNHRHKFMFN FLDINGGKI TLDEIVSKAS DDICAKLGAT PAQTQRHQEA
Clytin    WVNHRHKFMFN FLDINGGKI TLDEIVSKAS DDICAKLGAT PEQTKRHQDA

101                              150
mtClytin  VEAFKQGMG DYKKEVAFPE FIGWEELAE HDLELWSQNK STLIREWGDA
Clytin-2  VEAFKQIGL DYKKEVEFPA FVNGWKELAK HDLKLWSQNK KSLIRNWGEA
Clytin    VEAFKQGMG DYKKEVEFPA FVDGWKELAN YDLKLWSQNK KSLIRDWGEA

151                              200
mtClytin  VFDIFDKDAS GSISLDEWKA YGRISGICPS DEDAECTFKH CDLDNSGKLD
Clytin-2  VFDIFDKDGS GSISLDEWKT YGGISGICPS DEDAECTFKH CDLDNSGKLD
Clytin    VFDIFDKDGS GSISLDEWKA YGRISGICSS DEDAECTFKH CDLDNSGKLD

201                              228
mtClytin  VDEMTRQHLG FWYTLDPDSD GLYGNFVP
Clytin-2  VDEMTRQHLG FWYTLDPNAD GLYGNFVP
Clytin    VDEMTRQHLG FWYTLDPNAD GLYGNFVP

```

图 9

专利名称(译)	分离的发光蛋白mtClytin及其用途		
公开(公告)号	CN1882608A	公开(公告)日	2006-12-20
申请号	CN200480033782.3	申请日	2004-09-03
[标]申请(专利权)人(译)	拜尔健康护理有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	拜耳医药保健股份公司		
当前申请(专利权)人(译)	拜耳医药保健股份公司		
[标]发明人	S·戈尔茨 S·马科瓦 L·布拉科瓦 L·弗兰克 E·维索特斯基		
发明人	S·戈尔茨 S·马科瓦 L·布拉科瓦 L·弗兰克 E·维索特斯基		
IPC分类号	C07K14/435 C12N5/10 C12N15/12 C12Q1/68 G01N33/50 G01N33/533		
CPC分类号	C07K14/43595		
优先权	10342670 2003-09-16 DE		
其他公开文献	CN1882608B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及发光蛋白mtClytin，其核苷酸和氨基酸序列，以及发光蛋白mtClytin的活性和用途。

