

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200380101748.0

[51] Int. Cl.
C07K 14/435 (2006.01)
G01N 33/533 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007年5月23日

[11] 授权公告号 CN 1317299C

[22] 申请日 2003.10.21
[21] 申请号 200380101748.0
[30] 优先权
 [32] 2002.10.21 [33] EP [31] 02023452.2
[86] 国际申请 PCT/EP2003/011626 2003.10.21
[87] 国际公布 WO2004/035620 英 2004.4.29
[85] 进入国家阶段日期 2005.4.20
[73] 专利权人 阿克萨姆有限公司
 地址 意大利米兰
[72] 发明人 M·福蒂 S·洛默尔
[56] 参考文献

" Obelin from the bioluminescent marine hydrodroid Obeliageniculata: Cloning, expression, and comparison of some properties with those of other Ca²⁺ + - regulated photoproteins MARKOVA SVETLANA V ET A, BIOCHEMISTR, Vol. 41 No. 7 2002

Recombinant obelin: Cloning and expression of cDNA, purification, and characterization as a calcium indicator ILLARIONOV BORIS A ET A, METHODS IN ENZYMOLOG, Vol. 305 2000

审查员 杨振宇

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
 代理人 黄革生 隗永良

权利要求书 2 页 说明书 19 页 附图 5 页

[54] 发明名称

生物发光提高的发光蛋白质

[57] 摘要

所公开的为发光活性提高的发光蛋白质，其在用于检测和测量胞内钙的基于细胞的分析法中作为钙指示物的用途。

1. 嵌合发光蛋白质，其通过将奥贝林蛋白质所包含的位于第一个和第二个钙结合位点之间的区域用发光蛋白质 Clytin 中的相应区域替代而获得。
2. 根据权利要求1的嵌合发光蛋白质，其中所选发光蛋白质中的所述相应区域在分别的序列比对中除了至少1个氨基酸残基外与奥贝林序列匹配。
3. 根据权利要求2的嵌合发光蛋白质，其中所选发光蛋白质中的所述相应区域在分别的序列比对中除了至少5个氨基酸残基外与奥贝林序列匹配。
4. 根据权利要求3的嵌合发光蛋白质，其中所选发光蛋白质中的所述相应区域在分别的序列比对中除了至少10个氨基酸残基外与奥贝林序列匹配。
5. 根据权利要求1的嵌合发光蛋白质，其中所述的区域为奥贝林蛋白质序列的42到122位残基。
6. 根据权利要求5的嵌合发光蛋白质，其中所述的区域为从奥贝林蛋白质序列的50位残基延伸至94位残基。
7. 根据权利要求6的嵌合发光蛋白质，其中奥贝林蛋白质的50到94位残基用 Clytin 序列从53位残基延伸到97位残基的片段替代。
8. 根据权利要求7的嵌合发光蛋白质，其具有 SEQ ID NO. 3 的氨基酸序列。
9. 根据权利要求1的嵌合发光蛋白质，其还包含在奥贝林序列55、66、67、73、74、75、78、83、84、87、89和94位进行一个或多个氨基酸替代。
10. 融合蛋白质，其含有权利要求1-9的发光蛋白质。
11. 连接产物，其由根据权利要求1-6的发光蛋白质和用于分析、诊断或治疗用途的分子之间连接形成。

12. 经分离核酸分子，其编码根据权利要求 1-9 的嵌合发光蛋白质。

13. 根据权利要求 12 的编码权利要求 8 所述蛋白质的经分离核酸分子，其具有选自 SEQ ID NO. 4 和 SEQ ID NO. 5 的序列。

14. 根据权利要求 1-9 的嵌合发光蛋白质的用途，其与萤光素底物组合用于检测钙离子。

15. 根据权利要求 14 的用途，其中所述的萤光素底物为腔肠素。

16. 根据权利要求 14-15 的用途，用于定量测定钙离子。

17. 根据权利要求 14-15 的用途，用于测定胞内钙浓度。

18. 宿主细胞，其具有根据权利要求 12-13 的核酸分子。

19. 权利要求 18 的细胞宿主，其选自细菌、酵母、真菌、植物、昆虫和动物细胞。

20. 产生发光蛋白质的方法，其包括在适于发光蛋白质表达的条件下培养权利要求 18-19 的宿主细胞和收获表达的蛋白质。

21. 筛选生物活性分子的方法，其包括将根据权利要求 18-19 的细胞宿主暴露于一定量的所述分子并检测胞内钙浓度的任何变化。

22. 根据权利要求 21 的方法，其中宿主细胞用异源 G 蛋白偶联受体或离子通道转染。

23. 根据权利要求 11 的连接产物在竞争性固相免疫测定法中的用途，用于测定生物样品中所述分子的量。

24. 生物发光共振能量转移 (BRET) 系统，其包含荧光蛋白和权利要求 8 的发光蛋白质。

生物发光提高的发光蛋白质

本发明提供了发光活性提高的嵌合发光蛋白质，提供了其在报告基因系统中作为钙指示物的用途以及在用于检测和测定胞内钙的基于细胞的测定法中作为钙指示物的用途。

发明背景

生物发光是活的生物体通过多种化学发光发应系统发射可见光的能力。生物发光反应需要三种主要的成分：萤光素、萤光素酶和分子氧。然而在一些反应中也需要包括阳离子（ Ca^{++} 和 Mg^{++} ）和辅因子（ATP、NAD(P)H）的其他成分。萤光素酶为催化底物萤光素氧化并产生不稳定中间体的酶。光在不稳定中间体衰变成基态产生氧化萤光素时发射。虽然存在多种不同的无关萤光素类型，但是来自至少七个门的许多物种使用相同的萤光素，即已知的腔肠素（coelenterazine），其含有由三个氨基酸（2个酪氨酸和1个苯丙氨酸）形成的环。萤光素/萤光素酶系统可在一些动物（如水母）中以稳定的“发光蛋白质”形式提取，其在结合钙时能发光。发光蛋白质与萤光素酶不同，因为前者为萤光素酶和萤光素的稳定氧化中间复合体。发光蛋白质在许多海洋腔肠动物中存在并允许这些生物为包括繁殖、摄食和防御在内的多种目的发光（1）。虽然细菌能连续发光，但发光在许多其他生物中以闪光的形式出现，一般地持续时间为0.1-1秒。这需要酶促反应的迅速开/关且存在适当螯合并易于快速动员的反应物。在腔肠动物中闪光由钙的进入引起。发光蛋白质的钙结合位点与钙调素同源。发光蛋白质在钙存在的条件下通过分子内反应发出可见光。虽然有许多发光生物，但目前只有七种发光蛋白质得到分离，即 Thalassicolin(2,3)、水母发光蛋白(4-6)、Mitrocromin(与 Halistaurin 为同物异名词)(7,8)、Clytin(与

Phialidin 为同物异名词)(8,9)、奥贝林 (Obelin) (2,6,10,11)、Mnemiopsin (12,13) 和 Berovin (12,13)。这些蛋白全部为脱辅基蛋白质、咪唑吡嗪发色团 (腔肠素) 和氧的复合体。其结构高度保守, 尤其在包含三个钙结合位点 (EF 手型结构) 的区域。这些 EF 手型结构为钙结合蛋白家族的特点。发光蛋白质一旦和与 EF 手型袋紧密结合的钙反应就会发光。反应为单次周转事件并造成 CO_2 的释放和在蓝光区域发光 ($\lambda_{\text{max}}=470\text{nm}$)。术语“发光蛋白质”等同于与萤光素结合的多肽, 其能发光, 而“脱辅基发光蛋白质”用于表示不具萤光素的蛋白质。

研究最多的发光蛋白质为从维多利亚多管水母 (*Aequorea victoria*) 分离的水母发光蛋白 (14) 和从双叉蕨枝螅 (*Obelia longissima*) 分离的奥贝林 (15)。当与 Ca^{++} 结合时, 水母发光蛋白经历将其转换成加氧酶 (萤光素酶) 的构象变化, 然后通过结合的分子氧催化腔肠素的氧化。蓝色荧光蛋白由不与脱辅基发光蛋白质共价连接的 coelenteramide 组成, 其为腔肠素的氧化产物。发光蛋白质可通过将脱辅基发光蛋白质与腔肠素、分子氧、EDTA 和 2-巯基乙醇或二硫苏糖醇孵育而重新产生。既然腔肠素为发光蛋白质水母发光蛋白、Mitrocomin、Clytin 和奥贝林使用的共同发光底物, 那么这四种发光蛋白质中的发光反应可能是相同的 (16)。最近获得的水母发光蛋白和奥贝林的一级结构和晶体学数据带来了有关其功能的其他信息。来源于螅体双叉蕨枝螅的天然奥贝林为含有非共价连接的发色团腔肠素的、具有分子量约为 20kDa 的由 195 个氨基酸残基 (aa) 组成的单链蛋白质。对 Clytin 一级结构的分析表明其含有 189 个氨基酸残基并属于发光蛋白质家族。然而水螅 Ca^{++} 结合发光蛋白质与其他的 Ca^{++} 结合蛋白质如钙调素和肌钙蛋白 C 不同, 前者具有相对高含量的半胱氨酸、组氨酸、色氨酸、脯氨酸和酪氨酸残基。

对奥贝林结构和功能的研究在 Bondar VS 等, *Biochemistry* (2001), 66(9): 1014-8, Vysotski ES 等, (2003), 42 (20): 6013-24 和 Deng L. 等, *FEBS Lett.* (2001), 506 (3): 281-5 中报道。后两者尤其描述了 W92F 奥贝林突变体的生物发光和发射性质。

发光蛋白质广泛用于报告基因技术中来监测与信号转导和基因表达相关的细胞事件。

对细胞事件和其调节的研究需要灵敏的、非侵害性的分析方法。发光蛋白质和通常的生物发光为极好的报告系统，因为其与荧光系统相比实质上不具有背景。

已经在哺乳动物细胞中表达了发光蛋白质以监测对不同刺激反应的钙变化。胞内钙浓度可通过向表达发光蛋白质的哺乳动物细胞中加入腔肠素辅因子并探测光子发射来测定，其中所述光子发射为胞内钙浓度的指示物。

发明详述

现在发现将奥贝林蛋白质（脱辅基奥贝林）所包含的、位于前两个钙结合位点之间的区域用选自 Clytin、水母发光蛋白、Thalassicolin、Mitocromin、Mnemiopsoin 和 Berovin 的发光蛋白质中的相应区域进行替代的嵌合，可获得生物发光提高的新发光蛋白质。

如在此使用的，奥贝林可指从包括双叉蕈枝螅水母和曲膝蕈枝螅（*Obelia geniculata*）在内的不同种类蕈枝螅中分离的任一发光蛋白质（17）。奥贝林核苷酸和氨基酸序列参考分别列于 SEQ ID NO.1 和 2 中。Clytin、Mitocromin 和水母发光蛋白的氨基酸序列和核苷酸序列参考存于 GenBank 登录号 Q08121、P39047、AAA27720 和分别地 L13247、L31623、L29571，而 Thalassicolin、Mnemiopsis 和 Berovin 的序列在参考文献 2、3、12 和 13 中描述。

正如在此使用的，“相应的区域或片段”是指在所选择发光蛋白质中的任一这样的氨基酸序列，其在分别的序列比对中除了至少 1 个、优选地除了至少 5 个、更优选地除了至少 10 个氨基酸残基外与奥贝林序列匹配，并在相关蛋白质（奥贝林和所选发光蛋白质）中不保守，在涉及奥贝林序列时，所述的区域或片段优选地跨越 42 - 112 位残基，更优选地跨越 50 - 95 位残基。

根据本发明优选的实施方案，嵌合蛋白质可通过用 Clytin 序列从 53

到 97 位残基的片段替代奥贝林氨基酸序列的 50 到 94 位残基来获得。这样获得的命名为“Photin”的发光蛋白质具有 SEQ ID NO.3 的氨基酸序列。

本发明的嵌合蛋白质可进一步通过一个或多个氨基酸残基的删除、添加或替代来修饰，条件是使发光蛋白质涉及发光和钙反应性的活性特征得以维持或提高。在涉及奥贝林序列时，尤其优选的为在 55、66、67、73、74、75、78、83、84、87、89 和 94 位替代。

体外研究表明，Photin 产生对钙刺激产生强烈的生物发光，一般其高于在天然发光蛋白质中观察到的生物发光。

为制备嵌合发光蛋白质，可使用常规的基因工程制备具有奥贝林和所选的非奥贝林发光蛋白质的部分编码序列的重组 DNA 构建体，将得到的嵌合产物插入载体，在适当的宿主中表达，然后分离和纯化。例如编码奥贝林和不同发光蛋白质的 cDNA 可通过 PCR 扩增或用合成寡核苷酸在体外构建，产物可利用适当的限制酶切位点重组，其中所述酶切位点为天然存在或人工引入寡核苷酸中用于 PCR 或体外构建。除了重组构建体之外，表达载体还可含有启动子、核糖体结合位点、起始密码子、终止密码子或转录增强子的共有位点。载体还可包含用于分离含有 DNA 构建体的宿主细胞的选择标记。适当的载体例如酵母或细菌质粒、噬菌体、病毒、逆转录病毒或 DNA。携带重组构建体的载体可通过常规技术导入宿主。宿主细胞可为原核的或真核的，如细菌、酵母或哺乳动物细胞。用于发光蛋白质表达/生产的优选宿主为哺乳动物细胞，包括上皮或淋巴母细胞来源的细胞，如 Hek-293、CHO-K1、HepG2 和 HL-60。这些细胞可在细胞质中(18)、通过向发光蛋白质添加线粒体靶向序列而在线粒体中、或者在任何其他细胞器中(19-21)表达脱辅基发光蛋白质。作为选择，也可使用非哺乳动物细胞例如细菌或真菌。一旦选择了宿主细胞类型，基因构建体可通过磷酸钙沉淀、电穿孔或其他常规技术引入。转染之后在适当的培养基中培养细胞并筛选合适的活性。本发明的发光蛋白质可用常规的方法分离和纯化，例如提取、沉淀、层析、亲和层析、电泳。

可通过重叠延伸 PCR 在嵌合产物中引入点突变。

为产生 Photin, 奥贝林基因的 Nde I /Mun I 片段用对应于 Clytin 编码序列 156 到 291 位核苷酸的 135 个核苷酸片段替换。

另一方面, 本发明涉及编码在此公布的嵌合蛋白质的核酸分子。DNA 编码序列可利用遗传密码的简并性修饰, 例如改变密码子选择以提高在异源系统中的表达。

在本发明优选的实施方案中, 编码蛋白质 Photin 的 DNA 序列选自 SEQ ID NO.4 和 5。

在存在腔肠素的无细胞麦胚翻译系统中进行体外转录和翻译实验以检验嵌合产物是否具有功能。在这些实验中, 活性发光蛋白质的形成通过检测翻译混合物中加入钙离子之后的发光来记录。在存在 ^{35}S -甲硫氨酸的情况下进行翻译反应, 以使测量的发光与产生的蛋白质数量相关。通过测量掺入三氯乙酸不溶级分的 ^{35}S -甲硫氨酸确定新合成多肽的数量。这些实验结果证明 Photin 在对钙离子刺激反应产生生物发光的灵敏性和效力。

本发明的另一个实施方案中, 在此提供的嵌合蛋白质可作为钙指示物使用, 尤其是用于测量胞内钙浓度。在典型的分析中, 向表达发光蛋白质的哺乳动物细胞中加入辅因子例如腔肠素并用本领域已知的方法记录光的发射, 例如使用商业购买的发光计。

可使用同时表达发光蛋白质和参与胞内钙动员的受体的细胞检测候选分子在受体调节方面的影响。本发明的嵌合发光蛋白质可用于多种基于细胞的功能鉴定法中, 其利用测量胞内钙评估蛋白质活性, 所述蛋白质尤其是 G-蛋白偶联受体 (GPCRs) 和质膜例子通道。虽然 GPCRs 和离子通道刺激之后大量且迅速地胞内钙浓度的增加可通过多种报告分子如钙敏感性荧光染料检测, 但优选使用生物发光的发光蛋白质 (22) 是因为其与荧光染料相比实质上不具有背景; 此外, 用发光蛋白质测量钙除了产生迅速的信号外还产生具有广泛检测敏感性范围的高信噪比 (22,23)。基于细胞的功能鉴定法一般包括在同时表达 GPCRs 或离子通道和发光蛋白质的细胞培养物中加入适当的激动剂, 然后通过测量发光蛋白质活性确定任何钙浓度的改变, 例如由从胞外位点迅速流入或从胞内库中释放引起的钙增加

(18)。

使用同时表达 Photin 和参与胞内钙浓度调节的受体的细胞提供了筛选对胞内钙释放有影响的化合物的有效系统。使用根据本发明的发光蛋白质也可设计高通量筛选鉴定法作为报告系统。系统的敏感性和其高信噪比允许使用小的鉴定体积。

在另一个实施方案中，根据本发明的发光蛋白质与分析、诊断或治疗目的分子连接，并将连接产物用于竞争性固相免疫测定以确定生物样品中的分子数量。例如，发光蛋白质可与激素蛋白质化学连接并用于使用激素特异性抗体确定激素唾液水平 (24) 的固相免疫测定中。还在另一实施方案中，根据本发明的发光蛋白质和不同的 (多) 肽的融合产物用如在 US6087476 中 (其在此引用作为参考) 公布的已知基因工程技术产生并用于免疫诊断或图象加工，其中所述不同的 (多) 肽为例如激素、抗原性肽、轻链或重链免疫球蛋白、亲和素、链亲和素或蛋白 A。

下列实施例详细描述了本发明。

附图简述

图 1. 新合成的发光蛋白质的钙诱导生物发光。发光蛋白质在存在腔肠素的麦胚无细胞体系中翻译。所有翻译混合物等分试样于 30℃ 黑暗条件下孵育 2 小时。反应中加入 50mM CaCl_2 并记录发光 10 秒。

图 2. 存在腔肠素条件下的发光蛋白质 DNA 翻译，通过稀释反应混合物测量发光。AQ: 水母发光蛋白，PH: Photin，OB: 奥贝林。

图 3. (A) PhotinDNA 转染的 CHO-K1 细胞表达的内源 ATP 受体刺激下 ATP 剂量依赖性发光。细胞转染、收获和 Photin 表达如实施例 1 所述进行。细胞用两个不同浓度的 ATP 处理。(B) 使用奥贝林 DNA 转染的 CHO-K1 细胞作为阳性对照。发光以 RLU (相对光度单位) 形式表达。

图 4. 用内皮素 A 受体和 Photin 两者转染的 CHO-K1 细胞中 Photin 活性的剂量依赖性曲线。受体通过注射浓度为 100 和 500 nM 的内皮素活化。

图 5. 由表达发光蛋白质 Photin 和大鼠辣椒素受体 1 (vanilloid receptor 1 (VR1)) 的细胞获得的剂量依赖性曲线。特异的激动剂辣椒素以 10 和 50 μM 的浓度使用。

实施例

1. 发光蛋白质 DNA 的体外转录/翻译

发光蛋白质的翻译根据提供商的通用说明在麦胚无细胞体系 (TNT 试剂盒, Promega) 中进行。每一个体外转录/翻译反应混合物中使用约 2 μg DNA。翻译体积 (50 μl) 包括 25 μl 麦胚提取物、2 μl 反应缓冲液、不含甲硫氨酸的氨基酸混合物、RNA 酶抑制剂和腔肠素 (40 μM)、T7 聚合酶。混合物还含有 ^{35}S -甲硫氨酸 (比活性 1000Ci/mmol)。 ^{35}S -甲硫氨酸用于确定体外合成的发光蛋白质的数量。为此, 每个翻译混合物样品中的 5 μl 在冰上用 TCA 沉淀 30 分钟, 过滤, 用冷的 5% TCA、甲醇洗, 干燥并置于计数管中。

表 1 显示了无细胞体系中产生的 Photin 和奥贝林数量。

表 I

进入发光蛋白质翻译产物中的放射性标记

加入的 DNA	奥贝林 (1 μg)	Photin (1 μg)	水母发光蛋白 (1 μg)
翻译 90 分钟后 的 ^{35}S 计数 (cpm)	8169	8290	13049

2. 发光蛋白质分析

取 5 和 10 μl 翻译混合物直接与固定于发光计 (Berthold) 的 96 孔板中的 95-90 μl PBS 溶液混合。在孔中注入 50 μl 溶液 (50mM CaCl_2) 以引发发光蛋白质发光并记录发光 10 秒钟。

图 1 显示了 Photin、奥贝林和水母发光蛋白 DNA 体外翻译的结果。图 2 显示了通过稀释体外翻译反应中的发光蛋白质获得的发光测量结果。

表 II 显示了不同数量 Photin 和奥贝林 DNA 在翻译过程中获得的发光数据与 TCA 计数的比较 (测量的发光与新合成的发光蛋白质数量成比例)。

表 II
放射性标记的发光蛋白质含量及其在翻译混合物中的发光

DNA (ng)	奥贝林		Photin	
	TCA 计数 (cpm/ μ l)	发光 (RLU/ μ l)	TCA 计数 (cpm/ μ l)	发光 (RLU/ μ l)
250	2722	358944	2927	990308
125	2396	271952	2094	858046
63	1030	139241	807	339348
31	579	41970	502	88326
16	265	13482	196	30617

3. 基于细胞的功能鉴定法的实施例

3.1 通过转染 CHO-K1 细胞获得 Photin 表达克隆 (材料和方法)。转染后两天细胞用胰酶消化并稀释 10 或 100 倍。一旦细胞生长为充分分开的集落, 将集落转移到新板上并在其对不同浓度 ATP 功能性反应 (发光信号) 的基础上选择, 已知 ATP 能刺激 CHO 内源受体并使胞质 Ca^{++} 浓度升高。每一个实验的最后, 细胞通过灌流含有 TritonX-100 和 $CaCl_2$ 的溶液裂解。活性的发光蛋白质通过将细胞与稀释于含 2mM 钙的 PBS 中的 10 μ M 腔肠素在 5% CO_2 气体中 37 $^{\circ}C$ 黑暗条件下孵育 3 小时再生。为测量发光, 细胞在钙存在条件下裂解并记录发出的光。发光计整合前 10 秒发出的光子数量并在屏幕上显示。空质粒转染的细胞或未转染的细胞 (数据未显示) 不能增加光子发射。注入 10、50、100 μ M ATP 以检测钙浓度的变化并确定钙反应动力学。图 3(A) 显示了获得的曲线。使用表达发光蛋白质奥贝林的细胞系作为阳性对照, 见图 3(B)。

3.2 建立表达内皮素 A 受体和 Photin 的 CHO 细胞系。在激动剂的刺

激下,此受体诱导胞内钙浓度的增加,其通过 Photin 发光测量。细胞在 96 孔板中于含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM/F12 培养基中培养成单层。实验当天去除培养基,细胞在含 10 μ M 腔肠素的 PBS 中解育至少 3 小时。内皮素肽在 PBS 中稀释成 100 和 500nM 浓度。每孔中加入约 50 μ l 内皮素并测量反应。立即记录发射的光 30 秒。图 4 报告了对内皮素的剂量依赖性反应。

3.3 表达脱辅基 Photin 和大鼠 VR1 辣椒素受体 - 钙可透性离子通道 - 的 CHO 细胞在组织培养瓶中生长到 80-95% 汇合并通过胰酶消化收获。用生长培养基将细胞悬浮成在 96 孔板中的 10,000 个细胞/孔并于 5% CO₂ 湿润培养箱中 37 $^{\circ}$ C 解育过夜。为进行发光实验,细胞中加入 10 μ M 腔肠素在 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 条件下 3 小时。通过在每孔中加入 10 和 50 μ M 辣椒素刺激钙反应。使用 Labsystem Luminoskan Ascent 追踪闪光动力学,其在每一单孔中注入反应物并记录光的发射。辣椒素的加入在 30 秒内引起迅速且短暂的发光信号,在约 10 秒内出现峰水平(图 5)。

材料和方法

试剂

限制性内切酶购于 New England Biolabs 并根据提供者的说明书使用。RNA 酶抑制剂和用于体外转录和翻译的 TNT 试剂盒来自 Promega (Madison, WI)。Pfu Turbo 聚合酶、PCR 试剂和大肠杆菌(*E. coli*)XL-1 Blue 和 BL21 菌株感受态细胞为 Stratagene (La Jolla, CA)生产。寡核苷酸购于 Primm (Milan)。腔肠素为 Prolume Ltd. (Pittsburg, PA)生产。所有其他化学品为合格来源并为试剂级别或更高级别。

用于奥贝林 DNA 序列一步合成的装配 PCR

PCR 装配需要 4 个步骤:寡聚物合成、基因装配、基因扩增和克隆。我们合成了长度为 40nt 的 30 个寡聚物,其合起来编码奥贝林基因序列的两条链。互补寡聚物重叠 20 nt。在 20 μ l Geneamp XL PCR 混合液(Perkin Elmer)中稀释 250 倍之前,从 30 个寡聚物溶液中的每一个取出的等体积混合成终浓度约为 250 μ M 的混合寡聚物。扩增过程通过三个阶段进行。第一步用混合的寡聚物如下进行: 40 $^{\circ}$ C 2 分钟,然后加入聚合酶, 72 $^{\circ}$ C 10

秒, 然后 40 个循环 (94℃15 秒, 40℃30 秒和 72℃10 秒)。反应混合物用新制 PCR 和聚合酶混合液稀释 3 倍。第二阶段为: 25 个循环 (94℃15 秒, 40℃30 秒, 72℃45 秒)。反应再次用完全 PCR 混合液稀释 3 倍。第三阶段的条件为: 20 个循环 (94℃15 秒, 40℃30 秒, 72℃70 秒)。反应产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 特异片段克隆到 pcrBlunt 载体中用于进一步的克隆步骤。此质粒称为 pcr-OB。PCR 反应的保真性通过双脱氧测序确认。

嵌合蛋白质的构建

根据 Clytin 基因序列设计 4 对寡聚物。选择 EF-手型结构 I 和 EF-手型结构 II 之间的区域进行基因嵌合。以下为寡核苷酸引物:

Clyt-4

5'-AATTCTTTCCATCCATCAACAAAAGCTGGGAATTCGACTTCTTT
AC CATAATCCATACCAATC-3'

Clyt-3

5'-AAAGATTGGTATGGATTATGGTAAAGAAGTCGAATTCCTCAGCT
TT TGTTGATGGATGGAAAG-3'

Clyt-2

5'-TTTTTGAAGAAAGCTTCGACAGCATCCTGGTGACGTTTGGTCT
GTT CTGGTGTTGCTCCAAGTTTGGCGCA-3'

Clyt-1

5'-TATGCGCCAAACTTGGAGCAACACCAGAACAGACCAAACGTC
AC CAGGATGCTGTCGAAGCTTTCTTCAA-3'

退火寡聚物克隆到 pcr-OB 载体上的 *Nde I/Mun I* 单一位点中。含有嵌合基因产物的质粒称为 pcr-Photin。Photin DNA 进一步亚克隆到含有 T7 启动子的 pcDNA3 载体中。

基于 PCR 的密码子选择的改变

使用重叠延伸 PCR 技术产生奥贝林突变体。设计 6 对引物, 其带有 10 个不同点突变, 能产生 10 个不同的密码子选择改变。PCR 反应如下进行, 以扩增用于重叠延伸的 DNA 片段: pfu 聚合酶 2.5 单位、DNA 模板

50ng、每一种 dNTP 250 μ M、每一种引物 50 pmol, 总体积 100 μ l. 使用的循环参数为: 前 10 个循环 94 $^{\circ}$ C 1 分钟、45 $^{\circ}$ C 1 分钟、72 $^{\circ}$ C 1 分钟 30 秒, 然后退火温度为 50 $^{\circ}$ C 进行 20 个循环。位点特异的突变通过 Primm (Milan) 进行的 DNA 测序确认。所有的分子方法使用标准方案进行。

CHO 细胞培养

所有细胞在标准湿润条件 37 $^{\circ}$ C 和 5% CO₂ 下培养。CHO 细胞保持在 DMEM/F12 + FBS 10% + Pen/Strep + G418 0.5 mg/ml + 丙酮酸 1.6 mM + NaHCO₃ 0.2% 中, 所有试剂为 Life Technologies 生产。这些细胞在板上生长到 70% -80% 汇合时进行 DNA 转染。

参考文献

1. Kendall, J. M. 和 Badminton, M. N. (1998). 维多利亚多管水母生物发光进入激动人心的新时代, *Trends Biotechnology*. 16 (5): 216-24.
2. Campbell, A.K. , Hallet, R.A. , Daw, M.E. , Ryall, R.C. , Hart 和 Herring P.J. (1981). 发光蛋白质奥贝林在测量细胞中游离 Ca⁺⁺ 的应用, 在 *Bioluminescence and Chemiluminescence, basic Chemistry and Analytical applications* (M. A. deLuca 和 W. D. McElroy 编辑)一书中的 601-607 页. Academy Press, New York.
3. Herring, P.J. (1979) 放射虫 *Thalassicola* sp. 生物发光的某些特征, *Mar. Biol.* 53,213-216.
4. Shimomura, O., Johnson F.H. 和 Saiga, Y (1962) 发光水螅水母多管水母属的发光蛋白质即水母发光蛋白的提取、纯化和性质, *J. Cell. Comp. Physiol.* 59,223-239.
5. Shimomura, O., Johnson F.H. 和 Saiga, Y (1963) 生物发光蛋白质水母发光蛋白的其他数据, *J. Cell. Comp. Physiol.* 62,1-8.
6. Morin, J.G. 和 Hastings J.W. (1971) 群体水螅和其他腔肠动物生物发光的生物化学, *J. Cell. Physiol.* 77,305-311.
7. Shimomura, O., Johnson, F.H. 和 Saiga, Y. (1963) 水螅水母

Halistaura 的生物发光蛋白质 halistaurin 的提取和性质, J. Cell. Physiol. 62,9-15.

8. Shimomura,O., 和 Shimomura, A. (1985)Halistaurin、phialidin 和修饰形式的水母发光蛋白在生物系统中作为 Ca^{++} 指示物, Biochem. J. 228,745-749.

9. Levine, L.D., 和 Ward, W.W. (1982)生物发光水母 *Phialidium gregarium* 中的发光蛋白质“phialidin”和光谱单一绿色荧光蛋白的分离和性质研究, Comp. Biochem. Physiol.72B, 77-85.

10. Morin, J.G. 和 Hastings (1971) 生物发光系统中的能量转移, J. Cell. Physiol. 77,313-318.

11. Campbell, A.K. (1974)水螅体曲膝藪枝螅的钙激活蛋白质奥贝林的提取、部分纯化和性质, Biochem. J. 143,411-418.

12. Ward, W. W. 和 Selinger (1974)栉水母动物 *Mnemiopsis sp.* 和 *Bern ovata* 的钙激活发光蛋白质的提取和纯化, Biochemistry 13,1491-1499.

13. Ward, W. W. 和 Seliger H.H. (1974)栉水母动物 *Mnemiopsis sp.* 和 *Bern ovata* 的钙激活发光蛋白质 mnemiopsin 和 berovin 的性质, Biochemistry 13,1500-1510.

14. Johnson, F.H. 和 Shimomura,O. (1978) 水母生物发光简介, 尤其涉及到发光蛋白质水母发光蛋白, Methods Enzymol. 57,271-291.

15. Illarionov BA, Bondar VS, Illarionova VA, Vysotski ES. 编码双叉藪枝螅水母钙激活发光蛋白质奥贝林的 cDNA 序列, Gene. 1995 14; 153 (2): 273-4.

16. Blinks, J.R. , Weir, W.G. , Hess, P. 和 Prendergast, F.G. (1982).活细胞中 Ca^{++} 浓度的测量, Prog. Biophys. Mol. Biol. 40, 1-114.

17. Markova SV, Vysotski ES, Blinks JR, Burakova LP, Wang BC, Lee J., (2002) 生物发光海洋水螅体曲膝藪枝螅的奥贝林: 克隆、表达及与其他 Ca^{2+} 调节发光蛋白质一些性质的比较, Biochemistry. 2002 Feb 19; 41 (7): 2227-36.

18. Button D, Brownstein M. (1993) 表达水母发光蛋白的哺乳动物细胞系用于报告 Ca^{++} 的动员, *Cell Calcium*. Oct; 14 (9):663-71.
19. Mattheakis, L. 和 Ohler, L. D. (2002) 展望: 细胞中的钙成像用于药物发现, *Drug Discovery Today S*, 15-19.
20. Stables J, Green A, Marshall F, Fraser N, Knight E, Sautel M, Milligan G, Lee M., Rees S. (1997). 潜在的任何 G 蛋白偶联受体激动剂活性的生物发光分析, (1997) *Anal Biochem* 1; 252(1) : 115-26.
21. Brini M. , Pinton P. , Pozzan T. , Rizzuto R. (1999). 关注重组水母发光蛋白: 监测活细胞多种细胞器中 Ca^{++} 的工具, *Microsc. Res. Tech.* 46,380-389.
22. Creton R. , Kreiling J. A. , Jaffe LF. (1999) 带有化学发光的钙成像, *Microsc. Res. Tech.* 46,390-397.
23. Shimomura, O. 等(1993) 重组半合成水母发光蛋白和重组连接荧光素的水母发光蛋白的发光性质用于测量细胞钙, *Cell Calcium* 14,373-378.
24. Mirasoli, M.等 (2002) 使用重组水母发光蛋白作为标记物进行皮质醇的生物发光免疫测定, *Analytical Biochemistry* 306,204-211.

<110> 阿克萨姆有限公司

<120> 生物发光提高的发光蛋白质

<130> 1191EUR

<160> 9

<170> PatentIn 版本 3.1

<210> 1

<211> 662

<212> DNA

<213> 双叉藪枝螳 (*Obelia longissima*)

<400> 1

```

acgatcgaac caacaactc agctcacagc tactgaacaa ctcttgttgt gtacaatcaa      60
aatgtcttca aaatacgcag ttaaactcaa gactgacttt gataatccac gatggatcaa      120
aagacacaag cacatgtttg atttcctcga catcaatgga aatggaaaaa tcaccctcga      180
tgaaattgtg tccaaggcat ctgatgacat atgtgccaaag ctggaagcca caccagaaca      240
aacaaaacgc catcaagttt gtgttgaagc tttctttaga ggatgtggaa tggaatatgg      300
taaagaaatt gccttcccac aattcctcga tggatggaaa caattggcga cttcagaact      360
caagaaatgg gcaagaaacg aacctactct cattcgtgaa tggggagatg ctgtctttga      420
tattttcgac aaagatggaa gtgttacaat cactttggac gaatggaaag cttatggaaa      480
aatctctggt atctctccat cacaagaaga ttgtgaagcg acatttcgac attgcgattt      540
ggacaacagt ggtgaccttg atgttgacga gatgacaaga caacatcttg gattctggta      600
cactttggac ccagaagctg atggtctcta tggcaacgga gttccctaag ctttttttcg      660
aa                                                                                   662

```

<210> 2

<211> 195

<212> PRT

<213> 双叉蕨枝螳

<400> 2

Met Ser Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asp Phe Asp Asn Pro
 1 5 10 15

Arg Trp Ile Lys Arg His Lys His Met Phe Asp Phe Leu Asp Ile Asn
 20 25 30

Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys Ala Ser Asp
 35 40 45

Asp Ile Cys Ala Lys Leu Glu Ala Thr Pro Glu Gln Thr Lys Arg His
 50 55 60

Gln Val Cys Val Glu Ala Phe Phe Arg Gly Cys Gly Met Glu Tyr Gly
 65 70 75 80

Lys Glu Ile Ala Phe Pro Gln Phe Leu Asp Gly Trp Lys Gln Leu Ala
 85 90 95

Thr Ser Glu Leu Lys Lys Trp Ala Arg Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg
 100 105 110

Glu Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp Gly Ser Gly
 115 120 125

Thr Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Lys Ile Ser Gly Ile
 130 135 140

Ser Pro Ser Gln Glu Asp Cys Glu Ala Thr Phe Arg His Cys Asp Leu
 145 150 155 160

Asp Asn Ser Gly Asp Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Leu
 165 170 175

Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Glu Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Asn
 180 185 190

Gly Val Pro
 195

<210> 3

<211> 195

<212> PRT

<213> 嵌合蛋白

<400> 3

Met Ser Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asp Phe Asp Asn Pro
 1 5 10 15

Arg Trp Ile Lys Arg His Lys His Met Phe Asp Phe Leu Asp Ile Asn
 20 25 30

Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys Ala Ser Asp
 35 40 45

Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Thr Lys Arg His
 50 55 60

Gln Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Ile Gly Met Asp Tyr Gly
 65 70 75 80

Lys Glu Val Glu Phe Pro Ala Phe Val Asp Gly Trp Lys Glu Leu Ala
 85 90 95

Thr Ser Glu Leu Lys Lys Trp Ala Arg Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg
 100 105 110

Glu Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp Gly Ser Gly
 115 120 125

Thr Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Lys Ile Ser Gly Ile
 130 135 140

Ser Pro Ser Gln Glu Asp Cys Glu Ala Thr Phe Arg His Cys Asp Leu
 145 150 155 160

Asp Asn Ser Gly Asp Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Leu
 165 170 175

Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Glu Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Asn
 180 185 190

Gly Val Pro
 195

<210> 4

<211> 600

<212> DNA

<213> 嵌合基因

<400> 4

ggatccgccg ccattgtcttc aaaatagca gttaaactca agactgactt tgataatcca 60

cgatggatca aaagacacaa gcacatgttt gatttcctcg acatcaatgg aatggaaaa 120

atcacctcg atgaaattgt gtccaaggca tctgatgaca tatgcccga acttgagca 180

acaccagaac agaccaaagc tcaccaggat gctgtcgaag ctttcttcaa aaagattggt 240

atggattatg gtaaagaagt cgaattccca gcttttgttg atggatggaa agaattggcg 300

acttcagaac tcaagaaatg ggcaagaaac gaacctactc tcattcgtga atggggagat 360
gctgtctttg atattttcga caaagatgga agtggtagaa tcactttgga cgaatggaaa 420
gcttatggaa aaatctctgg tatctctcca tcacaagaag attgtgaagc gacatttcga 480
cattgcgatt tggacaacag tggtagacctt gatgtagacg agatgacaag acaacatctt 540
ggattctggt acactttgga cccagaagct gatggtctct atggcaacgg agttccctaa 600

<210> 5
<211> 607
<212> DNA
<213> 嵌合基因

<400> 5
ggatccgccg ccattgtcttc aaaatacga gttaaactca agactgactt tgataatcca 60
cgatggatca aaagacacaa gcacatgttt gatttcctcg acatcaatgg aatggaaaa 120
atcacctcgc atgaaattgt gtccaaggca tctgatgaca tctgcgcaa actgggagca 180
acaccagaac agaccaaacg gcaccaggat gctgtcgaag ctttcttcaa aaagattggt 240
atggattatg gtaaagaagt cgaattccca gcttttggtg atggatggaa agaattggcg 300
acttcagaac tcaagaaatg ggcaagaaac gaacctactc tcattcgtga atggggagat 360
gctgtctttg atattttcga caaagatgga agtggtagaa tcactttgga cgaatggaaa 420
gcttatggaa aaatctctgg tatctctcca tcacaagaag attgtgaagc gacatttcga 480
cattgcgatc tggacaacag tggtagacctg gatgtagacg agatgacaag acaacatctt 540
ggattctggt acactttgga cccagaagct gatggcctct atggcaacgg agttccctaa 600
gaattcc 607

<210> 6
<211> 70
<212> DNA

<213> 寡核苷酸引物

<400> 6

tatgcgccaa acttgagca acaccagaac agaccaaagc tcaccaggat gctgtcgaag 60

ctttcttcaa 70

<210> 7

<211> 71

<212> DNA

<213> 寡核苷酸引物

<400> 7

tttttgaaga aagcttcgac agcatcctgg tgacgtttgg tctgttctgg tgttgctcca 60

agtttggcgc a 71

<210> 8

<211> 62

<212> DNA

<213> 寡核苷酸引物

<400> 8

aaagattggt atggattatg gtaaagaagt cgaattccca gcttttgttg atggatggaa 60

ag 62

<210> 9

<211> 63

<212> DNA

<213> 寡核苷酸引物

<400> 9

aattctttcc atccatcaac aaaagctggg aattcgactt cttaccata atccatacca 60

atc 63

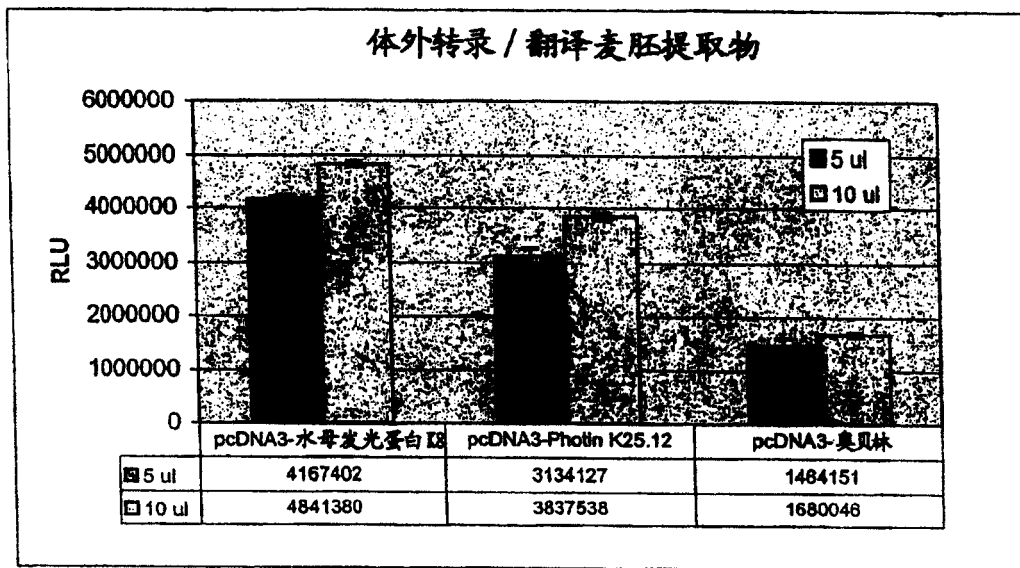


图1

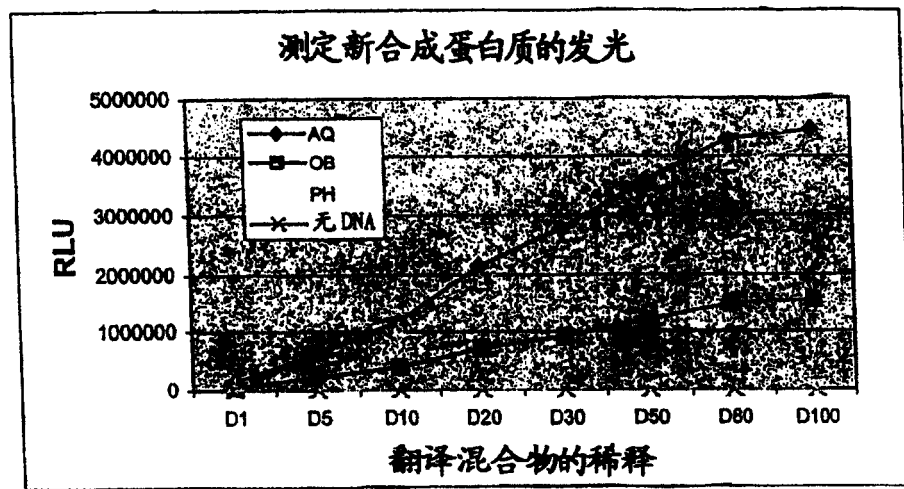


图2

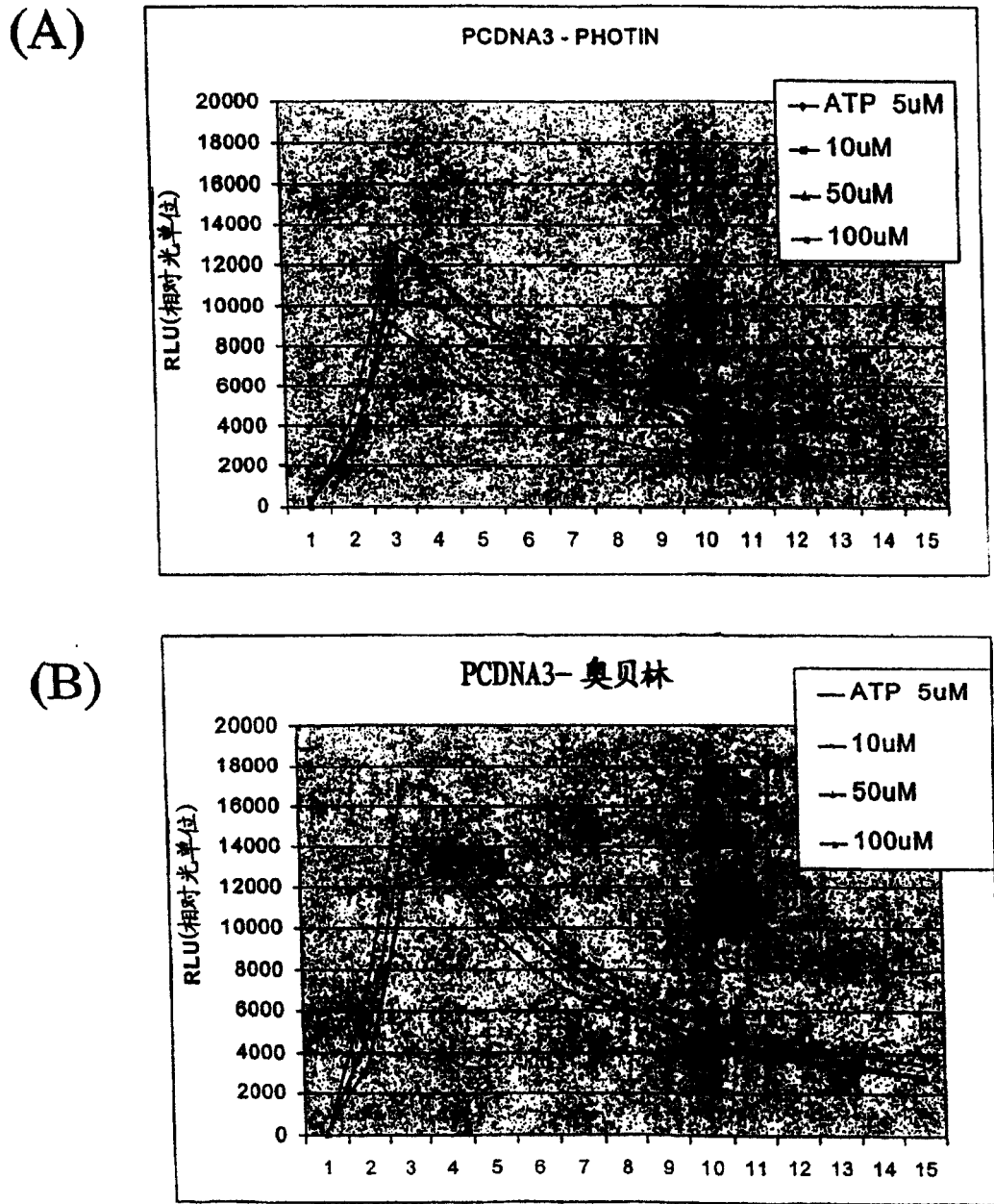


图 3

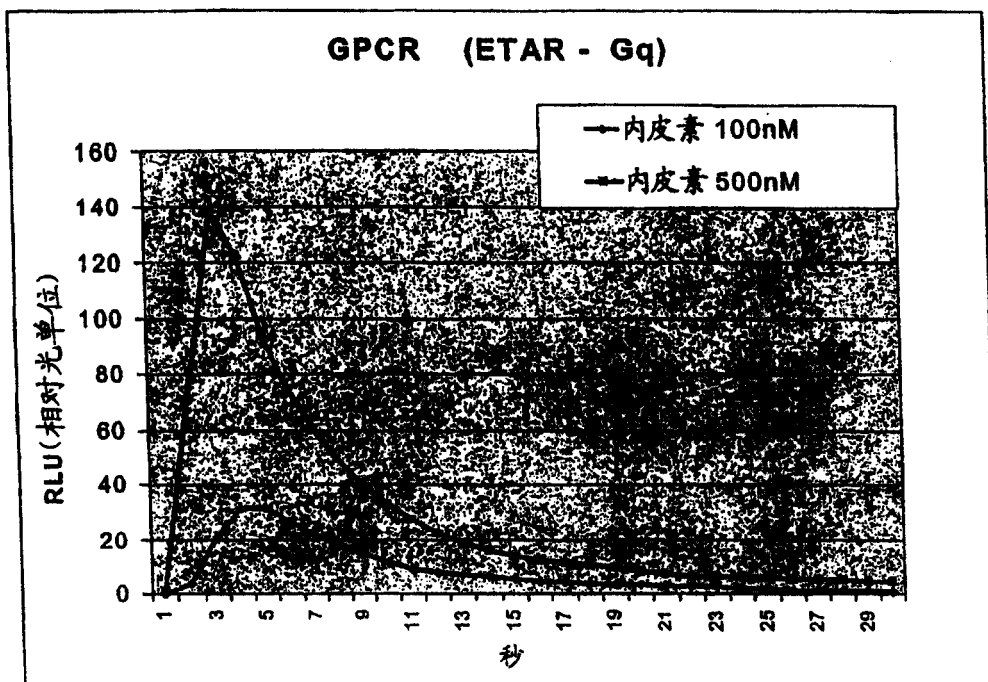


图 4

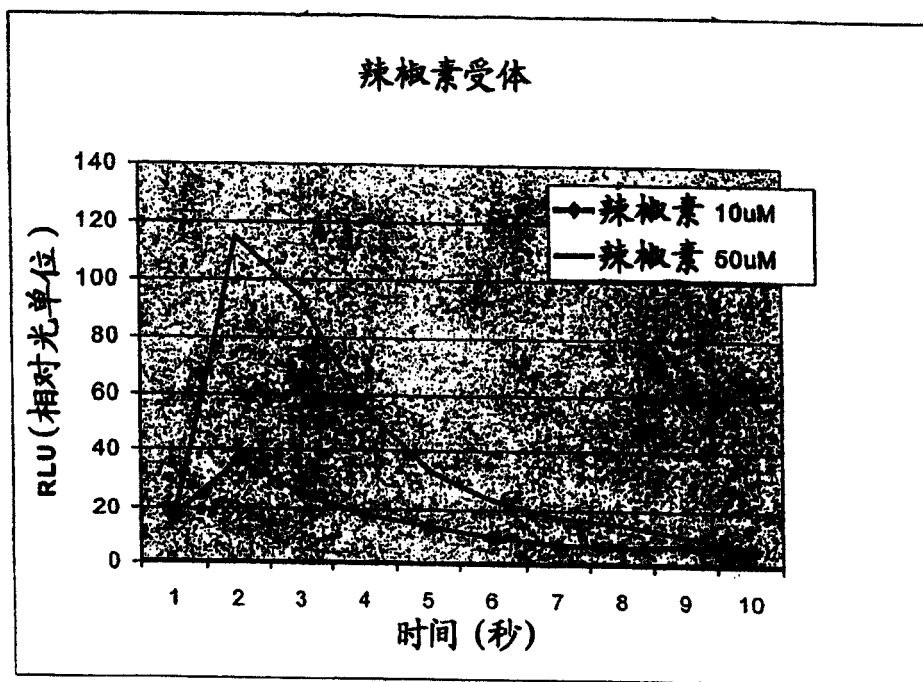


图 5

专利名称(译)	生物发光提高的发光蛋白质		
公开(公告)号	CN1317299C	公开(公告)日	2007-05-23
申请号	CN200380101748.0	申请日	2003-10-21
[标]发明人	M福蒂 S洛默尔		
发明人	M·福蒂 S·洛默尔		
IPC分类号	C07K14/435 G01N33/533 C07K19/00 G01N33/542		
CPC分类号	G01N2500/10 C07K2319/00 C07K14/43595 G01N33/542		
优先权	2002023452 2002-10-21 EP		
其他公开文献	CN1705680A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

所公开的为发光活性提高的发光蛋白质，其在用于检测和测量胞内钙的基于细胞的分析法中作为钙指示物的用途。

METHODS IN ENZYMOLOG, Vol. 305 2000

审查员 杨振宇

74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 隗永良

权利要求书2页 说明书19页 附图5页
