



(21) 申請案號：107129633

(22) 申請日：中華民國 107 (2018) 年 08 月 24 日

(51) Int. Cl. :

C12Q1/34 (2006.01)

C12Q1/37 (2006.01)

C12Q1/42 (2006.01)

C12Q1/44 (2006.01)

C12N9/14 (2006.01)

A23J3/00 (2006.01)

(30) 優先權：2017/08/24 澳大利亞

2017903420

(71) 申請人：全民科學與工業研究機構 (澳大利亞) COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION (AU)

澳大利亞

(72) 發明人：凱倫 凱琳 CARON, KARINE (CA)；卓威爾 史蒂芬 查爾斯 TROWELL, STEPHEN CHARLES (AU)

(74) 代理人：閻啟泰；林景郁

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：31 項 圖式數：10 共 139 頁

(54) 名稱

偵測水解的感應器

SENSOR FOR DETECTING HYDROLYSIS

(57) 摘要

本發明係關於偵測樣品中之諸如磷酸酶、醣苷酶、酯酶、外肽酶及脂肪酶之水解酶之感應器及方法。詳言之，本發明係關於偵測食物、飲料及臨床樣品中之水解酶之感應器及方法。該等感應器及方法可用以測定該樣品中存在之水解酶之量。

The present invention relates to sensors and methods for detecting hydrolases, such as phosphatases, glycosidases, esterases, exopeptidases and lipases, in a sample. In particular, the present invention relates to sensors and methods for detecting hydrolases in food, beverages and in clinical samples. The sensors and methods may be used to determine the amount of hydrolase present in the sample.

指定代表圖：

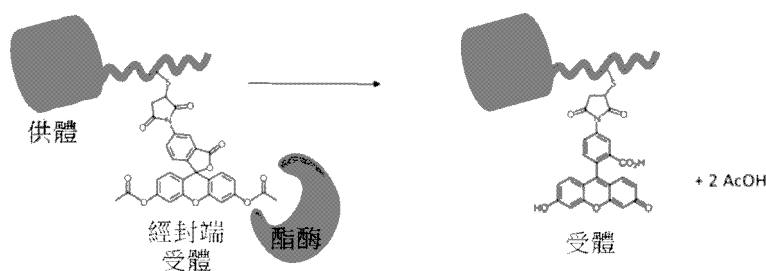
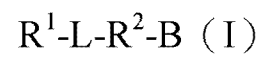


圖1

特徵化學式：



【發明說明書】

【中文發明名稱】 偵測水解的感應器

【英文發明名稱】 SENSOR FOR DETECTING HYDROLYSIS

【技術領域】

【0001】 本發明係關於偵測樣品中之諸如磷酸酶、醣苷酶、酯酶、外肽酶及脂肪酶之水解酶之感應器及方法。詳言之，本發明係關於偵測食物、飲料及臨床樣品中之水解酶之感應器及方法。該等感應器及方法可用以測定該樣品中存在之水解酶之量。

【先前技術】

【0002】 水解酶為一類見於所有生命領域中之酶。其作用不同，例如水解酶參與生物質降解、防禦、致病及正常細胞功能。測定水解酶活性之分析通常用於食物、臨床及診斷環境中。此等分析通常依賴於分光光度、電流分析、比色或螢光偵測。然而，對提供替代更傳統分析形式之簡單、靈敏及/或具成本效益之分析的需求日益增長。亦存在對適用於高通量篩檢之可再現分析之需求。尤其受關注的是可用於偵測及量測諸如磷酸酶、醣苷酶、酯酶、外肽酶及脂肪酶之多種水解酶之含量之感應器及分析。

【發明內容】

【0003】 本發明人已確認可用於偵測樣品中之水解酶的感應器分子。本發明人亦已確認偵測樣品中之水解酶之方法。

【0004】 在一個態樣中，提供一種偵測水解酶之感應器分子，該感應器分子具有選自以下之通式：

R^1 -L- R^2 -B (I) , 或

B- R^2 -L- R^1 (II)

其中

R^1 為生物發光蛋白質；

L為連接元件；

R^2 為非蛋白質受體域；及

B為封端基團，

其中結合至B之 R^2 包含可水解鍵且可水解鍵藉由水解酶之水解產生生物發光共振能量轉移 (BRET) 之變化。

【0005】 在一具體實例中，非蛋白質受體域為非蛋白質螢光受體域。

【0006】 在一些具體實例中，封端基團使呈非螢光態之受體域穩定。在一些具體實例中，封端基團使呈低螢光態之受體域穩定。

【0007】 在一些具體實例中，B包含含磷酸酯部分、含糖部分、含胺基酸部分、核苷酸、核苷、酯或醚。

【0008】 在一些具體實例中，連接元件包含烷基鏈、乙二醇、醚、聚醚、聚醯胺、聚酯、肽、多肽、胺基酸或聚核苷酸。在一些具體實例中，連接元件包含多肽。在一些具體實例中， R^1 -L或L- R^1 為單個多肽。在一些具體實例中，連接元件包含半胱胺酸殘基及/或離胺酸殘基。在一些具體實例中， R^2 經由半胱胺酸殘基連接至連接元件。

【0009】 在一些具體實例中， R^2 選自阿萊克薩螢光染料 (Alexa Fluor dye)、氟硼二吡咯染料 (Bodipy dye)、Cy染料、螢光素、丹醯基 (dansyl)、繖形酮、螢光微球體、發光微球體、螢光奈米結晶、馬力納藍 (Marina Blue)、喀斯開藍 (Cascade Blue)、喀斯開黃 (Cascade Yellow)、太平洋藍 (Pacific Blue)、俄勒岡綠 (Oregon Green)、四甲基玫瑰紅、玫瑰

紅、香豆素、BODIPY、試鹵靈 (resorufin)、德克薩斯紅 (Texas Red)、稀土元素螯合物或其等之任何組合或衍生物。

【0010】 在一些具體實例中，生物發光蛋白質 R^1 選自螢光素酶、 β -半乳糖苷酶、內醯胺酶、辣根過氧化酶、鹼性磷酸酶、 β -葡萄糖醛酸酶或 β -葡糖苷酶。在一些具體實例中， R^1 為螢光素酶，其包括海腎螢光素酶、螢火蟲螢光素酶、腔腸動物螢光素酶、北美螢光蟲 (North American glow worm) 螢光素酶、叩頭蟲螢光素酶、軌道蠕蟲 (railroad worm) 螢光素酶、細菌螢光素酶、長腹水蚤 (*Gaussia*) 螢光素酶、水母發光蛋白 (Aequorin)、葷蚊 (*Arachnocampa*) 螢光素酶或其等之任一者之生物學活性變異體或片段、或兩者或更多者之嵌合體。

【0011】 在一些具體實例中，生物發光蛋白質 R^1 能夠修飾受質。在一些具體實例中，受質為蟲螢光素、鈣、腔腸素 (coelenterazine) 或腔腸素之衍生物或類似物。

【0012】 在一些具體實例中，水解酶為酯酶、脂肪酶、蛋白酶、磷酸酶、核酸酶、糖苷酶、DNA糖基化酶及酸酐水解酶。在一些具體實例中，水解酶為酯酶。在一些具體實例中，水解酶為磷酸酶。在一些具體實例中，水解酶為脂肪酶。

【0013】 在一些具體實例中， R^1 包含 $RLuc8$ ， L 為包括半胱胺酸殘基之多肽，且結合至 B 之 R^2 為螢光素二乙酸酯。在此具體實例中，結合至 B 之 R^2 經由順丁烯二醯胺鍵聯基團連接至半胱胺酸， L 包含28個胺基酸且 $L-R^1$ 為單個多肽。此感應器可用作酯酶感應器。

【0014】 在一些具體實例中，在水解酶存在及/或不存在下 R^1 及 R^2 之間隔及相對方向在福斯特距離 (Förster distance) 之 $\pm 50\%$ 內。在一些具體實例中， R^1 及 R^2 之福斯特距離為至少4.0 nm。在一些具體實例中， R^1 及 R^2 之福斯特距離

為至少5.6 nm。在一些具體實例中， R^1 及 R^2 之福斯特距離在約4.0 nm與約10 nm之間。在一些具體實例中， R^1 及 R^2 之福斯特距離在約5.6 nm與約10 nm之間。

【0015】 在另一態樣中，提供一種偵測樣品中之水解酶之方法，該方法包含

- i) 使樣品與本文所定義之感應器分子接觸；及
- ii) 偵測BRET比率變化，其中BRET比率變化與樣品中水解酶之存在相對應。

【0016】 在又一態樣中，提供一種偵測樣品中之水解酶之方法，該方法包含：

i) 使樣品與具有結構B- R^2 之經封端非蛋白質受體域接觸以形成經處理樣品；

ii) 使經處理樣品與式 R^1 -L或L- R^1 之化合物在使 R^2 連接至L之條件下接觸；及

iii) 偵測BRET比率變化，其中BRET比率變化與樣品中水解酶之存在及式 R^1 -L- R^2 或 R^2 -L- R^1 之化合物之形成相對應，

且其中

R^1 為生物發光蛋白質；

L為連接元件；

R^2 為非蛋白質受體域；及

B為封端基團且結合至B之 R^2 包含可水解鍵。

【0017】 在一具體實例中，非蛋白質受體域 R^2 為非蛋白質螢光受體域。

【0018】 在一些具體實例中， R^2 包含半胱胺酸特異性親電子體或胺特異性親電子體。在一些具體實例中，L包含半胱胺酸及/或離胺酸殘基。

【0019】 在一些具體實例中，本文所定義之方法進一步包含測定樣品中

之水解酶之濃度及/或活性。在一些具體實例中，在微流控裝置上執行本文所定義之方法。

【0020】 在一些具體實例中，樣品選自由以下組成之群：空氣、液體、生物材料及土壤。在一些具體實例中，樣品可為任何適合的生物材料，諸如（但不限於）乳汁、血液、血清、痰液、黏液、膿液、尿液、汗液、糞便、淚液或腹膜液。在一些具體實例中，樣品包含選自由以下組成之群的生物材料：乳汁、血液、血清、痰液、黏液、膿液及腹膜液。在一些具體實例中，樣品可為藉由在水溶液中及使用液相洗滌、浸泡、研磨或浸漬固態農作物、食物或其他物質獲得之懸浮液或萃取物。液相可藉由沈澱、過濾或離心澄清。

【0021】 在又一態樣中，提供一種變異型生物發光蛋白質，其在與對應天然產生之蛋白質相比時少包含至少一個半胱胺酸殘基。在一些具體實例中，變異型生物發光蛋白質在與RLuc（SEQ ID NO: 49）之胺基酸編號24、73及/或124對應之位置缺乏半胱胺酸殘基。在一些具體實例中，變異型生物發光蛋白質在與RLuc之胺基酸編號24對應之位置缺乏半胱胺酸殘基。在一些具體實例中，變異型生物發光蛋白質在與RLuc之胺基酸編號73對應之位置缺乏半胱胺酸殘基。在一些具體實例中，變異型生物發光蛋白質在與RLuc之胺基酸編號124對應之位置缺乏半胱胺酸殘基。在一些具體實例中，變異型生物發光蛋白質在與RLuc8之胺基酸編號24及/或73對應之位置缺乏半胱胺酸殘基。在一些具體實例中，變異型生物發光蛋白質在與RLuc8（SEQ ID NO: 50）之位置24或位置73對應之位置缺乏半胱胺酸殘基。在一些具體實例中，變異型生物發光蛋白質在與RLuc8（SEQ ID NO: 50）之位置24及位置73對應之位置缺乏半胱胺酸殘基。在一些具體實例中，變異型生物發光蛋白質在與RLuc2（SEQ ID NO: 51）之胺基酸編號24、73及/或124對應之位置缺乏半胱胺酸殘基。

【0022】 在又一態樣中，提供一種編碼本文所定義之變異型生物發光蛋

白質之聚核苷酸。

【0023】 在一些具體實例中，提供一種包含編碼本文所定義之變異型生物發光蛋白質之聚核苷酸之載體。

【0024】 在一些具體實例中，提供一種包含本文所定義之聚核苷酸及/或載體之宿主細胞。

【0025】 在一些具體實例中，提供一種產生變異型生物發光蛋白質之方法，該方法包含在允許編碼蛋白質之聚核苷酸表現之條件下培養本文所定義之宿主細胞或本文所定義之載體，及回收表現之蛋白質。

【0026】 在一些具體實例中，提供一種如本文所定義之感應器分子，其中R¹為如本文所定義之變異型生物發光蛋白質。

【0027】 除非另外特定陳述，否則本文中之任何具體實例在加以必要修飾後應用於任何其他具體實例。

【0028】 本發明之範圍不限於本文所述之特定具體實例，該等特定具體實例僅欲出於範例之目的。如本文所描述，功能等效之產物、組成物及方法明確處於本發明之範圍內。

【0029】 在本說明書通篇中，除非另外特定陳述或上下文另外需要，否則提及單個步驟、物質之組成物、步驟之群或物質組成物之群應視為涵蓋彼等步驟、物質組成物、步驟之群或物質組成物之群之一者及複數（亦即一或多者）。

【0030】 下文中藉由以下非限制性實施例及參照附圖來描述本發明。

【圖式簡單說明】

【0031】

圖1 - 如本文所定義之偵測水解酶之說明性感應器分子。在所說明之具體實

例中，生物發光蛋白質R¹藉由連接元件L連接至非蛋白質受體域R，其螢光藉由乙酸酯封端基團B調節。在所說明之具體實例中，封端基團B藉由酯酶移除，由此恢復非蛋白質受體域之螢光且使得BRET發生。

圖2 - 使用諸如順丁烯二醯亞胺、丙烯醯胺及苯基羰基丙烯醯胺之邁克爾受體之半胱氨酸特異性標記策略之實例。

圖3 - 使標記條件最佳化以使內部RLuc8標記最少。在4°C下將5 μm R¹-L（具有連接元件之RLuc8）與4當量螢光素-5-順丁烯二醯亞胺（20 μm）於50 mM MES緩衝液（pH 5.0）中一起培育，且在添加螢光素-5-順丁烯二醯亞胺之前及在添加螢光素-5-順丁烯二醯亞胺之後6、15、30及60分鐘使用BRET監測反應。（A）wt-RLuc8（SEQ ID NO: 1）；（B）RLuc8Cys1（SEQ ID NO: 2）。

圖4 - （A）說明性感應器分子（RLuc8Cys2-螢光素-二乙酸酯）（實線）及在37°C下與酯酶（0.8 U）一起培育30分鐘後之感應器分子之生物發光共振能量轉移（BRET）之比較。（B）說明性感應器分子（實線）及未封端感應器分子（RLuc8Cys2-螢光素）之BRET之比較。

圖5 - pH 7.0、7.5及8.0之RLuc8Cys1-FM結合物（於50 mM HEPES、50 mM NaCl中之1 μm結合物）之BRET比率之比較（平均值± S.D.，n=3）。

圖6 - （A）在RLuc8之N端肽連接元件上在位置1（R¹與R²之間的1個胺基酸，SEQ ID NO: 2）、2（R¹與R²之間的11個胺基酸，SEQ ID NO: 3）或3（R¹與R²之間的21個胺基酸，SEQ ID NO: 4）中之一者處引入單個半胱氨酸殘基；（B）1 μm感應器分子之BRET比率（平均值± S.D.，n=6）。

圖7 - （A）用螢光素-順丁烯二醯亞胺標記之RLuc8Cys1、RLuc8Cys2、RLuc8Cys3、RLuc8Cys4、RLuc8Cys5及MBP(K239C)RLuc8之BRET之比較（平均值± S.D.，n=3）。（B）用螢光素-順丁烯二醯亞胺（FM）或玫瑰紅紅C2順丁烯二醯亞胺（RM）標記之RLuc8Cys1、RLuc8Cys2、RLuc8Cys3、

RLuc8Cys4、RLuc8Cys5及MBP(K239C)RLuc8之BRET之比較（平均值± S.D.，n=3）。（C）用螢光素-順丁烯二醯亞胺標記之RLuc8Cys1、RLuc8Cys2、RLuc8Cys3、RLuc8Cys4、RLuc8Cys5及MBP(K239C)RLuc8之BRET²之比較（平均值± S.D.，n=3）。

圖8 - 在pH 7.0及25°C下使用說明性感應器分子RLuc8Cys4-螢光素-二乙酸酯、RLuc8Cys3-螢光素-二乙酸酯及RLuc8Cys2-螢光素-二乙酸酯偵測及量測酯酶活性。

圖9 - 在30°C（A）、25°C（B）或20°C（C）下使用說明性感應器分子（RLuc8Cys4-螢光素-二乙酸酯）偵測及量測酯酶活性。

圖10 - 根據本發明之具體實例之偵測水解酶之方法。（A）在此具體實例中，小分子受體在與水解酶接觸之前共價連接至BRET供體。（B）在此具體實例中，小分子受體R²在共價連接至BRET供體之前用水解酶預活化以用於偵測。

序列表註釋

- 【0032】 SEQ ID NO: 1 - wt-RLuc8（包含RLuc8及N端連接元件）。
- 【0033】 SEQ ID NO: 2 - RLuc8Cys1（包含RLuc8及N端連接元件）。
- 【0034】 SEQ ID NO: 3 - RLuc8Cys2（包含RLuc8及N端連接元件）。
- 【0035】 SEQ ID NO: 4 - RLuc8Cys3（包含RLuc8及N端連接元件）。
- 【0036】 SEQ ID NO: 5至7 - 連接元件序列。
- 【0037】 SEQ ID NO: 8 - wt-RLuc8(C24X)。
- 【0038】 SEQ ID NO: 9 - wt-RLuc8(C73Z)。
- 【0039】 SEQ ID NO: 10 - wt-RLuc8(C24X.C73Z)。
- 【0040】 SEQ ID NO: 11 - 編碼wt-RLuc8之核苷酸序列。

- 【0041】 SEQ ID NO: 12 - 編碼RLuc8Cys1之核苷酸序列。
- 【0042】 SEQ ID NO: 13 - 編碼RLuc8Cys2之核苷酸序列。
- 【0043】 SEQ ID NO: 14 - 編碼RLuc8Cys3之核苷酸序列。
- 【0044】 SEQ ID NO: 15至20 - 引子序列。
- 【0045】 SEQ ID NO: 21至22 - mTG之高親和力受質。
- 【0046】 SEQ ID NO: 23 - 分選酶識別序列。
- 【0047】 SEQ ID NO: 24至30 - 間隔子序列。
- 【0048】 SEQ ID NO: 31 - mTG之高親和力受質。
- 【0049】 SEQ ID NO: 32 - RLuc8Cys4（包含RLuc8及N端連接元件）。
- 【0050】 SEQ ID NO: 33 - RLuc8Cys5（包含RLuc8及N端連接元件）。
- 【0051】 SEQ ID NO: 34 - MBP(K239C)RLuc8（包含包含MBP(K239C)及RLuc8之N端連接元件）。
- 【0052】 SEQ ID NO: 35 - 編碼RLuc8Cys4之核苷酸序列。
- 【0053】 SEQ ID NO: 36 - 編碼RLuc8Cys5之核苷酸序列。
- 【0054】 SEQ ID NO: 37 - 編碼MBP(K239C)RLuc8之核苷酸序列。
- 【0055】 SEQ ID NO: 38至43 - 引子序列。
- 【0056】 SEQ ID NO: 44至48 - 含有半胱胺酸殘基之連接元件。
- 【0057】 SEQ ID NO: 49 - RLuc之胺基酸序列。
- 【0058】 SEQ ID NO: 50 - RLuc8之胺基酸序列。
- 【0059】 SEQ ID NO: 51 - RLuc2之胺基酸序列。

【實施方式】

通用技術及定義

- 【0060】 除非另外特定定義，否則本文所用之所有技術及科學術語將視

為具有與一般熟習此項技術者通常理解（例如在細胞培養、基於BRET之感應器技術、生物結合技術、蛋白質化學、生物化學及其類似技術中）相同的含義。

【0061】 除非另外指明，否則在本發明中所利用之重組蛋白質、細胞培養及免疫技術為熟習此項技術者所熟知之標準程序。此類技術描述及解釋於諸如以下之來源的文獻通篇中：J. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley and Sons (1984)、J. Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989)、T.A. Brown (編者), *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*, 第1及2卷, IRL Press (1991)、D.M. Glover及B.D. Hames (編者), *DNA Cloning: A Practical Approach*, 第1-4卷, IRL Press (1995及1996)、及F.M. Ausubel等人(編者), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, 包括直至目前之所有更新)、Ed Harlow及David Lane (編者) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988)、及J.E. Coligan等人(編者) *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (包括直至目前之所有更新)。

【0062】 術語「及/或 (and/or)」，例如「X及/或Y (X and/or Y)」應理解為意謂「X及Y」或「X或Y」且應用於為兩種含義或任一含義提供明確支持。

【0063】 如本文所用，除非相反陳述，否則術語約 (about) 係指指定值之 $\pm 10\%$ 、更佳 $\pm 5\%$ 、甚至更佳 $\pm 1\%$ 。

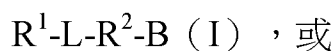
【0064】 在本說明書通篇中，詞語「包含(comprise)」或諸如「包含(comprises)」或「包含(comprising)」之變化形式應理解為暗示包括所陳述之要素、整數或步驟、或要素、整數或步驟之群，但不排除任何其他要素、整數或

步驟、或要素、整數或步驟之群。

感應器

【0065】 在本說明書通篇中，「感應器 (sensor)」及「感應器分子 (sensor molecule)」可互換使用。

【0066】 在一個態樣中，本發明提供一種偵測水解酶之感應器分子，該感應器分子具有選自以下之通式：



其中

R^1 為生物發光蛋白質；

L為連接元件；

R^2 為非蛋白質受體域；及

B為封端基團，

其中結合至B之 R^2 包含可水解鍵且可水解鍵藉由水解酶之水解產生生物發光共振能量轉移 (BRET) 之變化。

【0067】 在一些具體實例中， R^1-L 或 $L-R^1$ 為單個多肽。在一些具體實例中， R^1-L 為胺基酸之連續鏈段。在其他具體實例中， $L-R^1$ 為胺基酸之連續鏈段。舉例而言，生物發光蛋白質 (R^1) 及連接元件為胺基酸之單個鏈段，諸如 (但不限於) 共價連接至連接元件之N端的生物發光蛋白質或共價連接至連接元件之C端的生物發光蛋白質。共價連接為肽鍵。舉例而言， R^1-L 或 $L-R^1$ 為單個多肽，其包含選自SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 32及SEQ ID NO: 33之多肽序列。在一些具體實例中，單個多肽亦可包含與SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO:

4、SEQ ID NO: 32及SEQ ID NO: 33中之任何一或多者具有至少30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之多肽序列。

【0068】 在另一具體實例中，亦提供一種包含編碼如本文所定義之R¹-L或L-R¹之聚核苷酸序列的核酸。在一些具體實例中，核酸為分離之核酸。舉例而言，在一個具體實例中，核酸分子包含編碼選自由以下組成之群的多肽序列之序列：SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 32及SEQ ID NO: 33。在一些具體實例中，核酸分子包含編碼與SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 32及SEQ ID NO: 33中之任何一或多者具有至少30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之多肽序列的序列。在一個具體實例中，核酸分子包含編碼選自由SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3及SEQ ID NO: 4組成之群的多肽序列或與SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3及SEQ ID NO: 4中之任何一或多者具有至少30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之多肽序列的序列。除編碼本發明之感測器（或其一部分）之序列以外，核酸分子可含有其他序列，諸如引子位點、轉錄因子結合位點、載體插入位點及抵抗核分解降解之序列（例如聚腺苷尾）。核酸分子可為DNA或RNA且可包含合成核苷酸，其限制條件為聚核苷酸仍能夠轉譯以合成本發明之蛋白質。

【0069】 在一些具體實例中，核酸形成載體之一部分，諸如質體。除上文所述之核酸序列以外，質體包含其他要素，諸如原核複製起點（例如大腸桿菌OR1複製起點）、自發複製序列、著絲點序列；能夠表現宿主細胞中之核酸且可操作地連接至核酸之啟動子序列、位於核酸序列下游之終止子序列、抗生

素抗性基因及/或分泌信號序列。包含自發複製序列之載體亦為酵母人工染色體。在一些替代具體實例中，載體為病毒，諸如噬菌體，且除本發明之核酸序列以外包含用於噬菌體複製之核酸序列，諸如結構蛋白、啟動子、轉錄活化因子及其類似物。

【0070】 本發明之核酸或載體可用以轉染或轉型宿主細胞以合成本發明之感應器或目標序列。適合的宿主細胞包含原核細胞，諸如大腸桿菌，及真核細胞，諸如酵母細胞、或哺乳動物或植物細胞系。宿主細胞使用此項技術中已知之技術進行轉染或轉型，諸如電穿孔；磷酸鈣基方法；基因槍技術或使用病毒載體。

【0071】 在轉染/轉型之後，本發明之核酸或載體視需要轉錄及轉譯。在一些具體實例中，合成之蛋白質藉助於其自細胞分泌（由於例如載體中存在分泌信號）或藉由溶解宿主細胞及自其純化蛋白質自宿主細胞來萃取。

【0072】 在一些具體實例中，感應器（或其一部分，例如 R^1 -L或L- R^1 ）以無細胞組成物提供。如本文所用，術語「無細胞組成物」係指含有極少（若存在）完整細胞且包含感應器之分離之組成物。無細胞組成物之實例包含含有分離、純化及/或重組感應器分子（諸如蛋白質）之細胞（諸如酵母細胞）萃取物及組成物。用於自細胞製備無細胞組成物之方法在此項技術中熟知。

封端基團

【0073】 在本發明之感應器中，「B」指封端基團且結合至 R^2 之B包含可水解鍵。B能夠調節 R^2 之螢光特性以使得可水解鍵完整時結合至B之 R^2 的螢光特性不同於可水解鍵已裂解時結合至B之 R^2 的螢光特性。在一些具體實例中，封端基團B使呈低螢光態A之受體域 R^2 穩定。藉由水解酶裂解 R^2 -B或B- R^2 之可水解鍵將受體域 R^2 之螢光態變至螢光態 A^* 。螢光態A及螢光態 A^* 不同以使得可水解

鍵之裂解產生BRET變化。在一些具體實例中，選擇B以使得結合至B之 R^2 具有相對於無B之 R^2 的信號降低之信號。

【0074】 在一些具體實例中，封端基團B改變 R^2 之吸收光譜以使得螢光態A與螢光態 A^* 之間添加受質後藉由 R^2 發射之光的強度不同，且可水解鍵之裂解產生BRET變化。舉例而言，藉由水解酶裂解可水解鍵可增加藉由 R^2 發射之光的強度。此舉可在受體域為中止劑時發生，且封端基團改變受體域之螢光特性以使得其不再充當中止劑。可水解鍵之裂解使得受體域恢復為中止劑且使得BRET減少。或者，藉由水解酶裂解可水解鍵可減小藉由 R^2 發射之光的強度。在一些具體實例中，封端基團B使呈低螢光態之受體域 R^2 穩定。在一些具體實例中，封端基團B使呈非螢光態之受體域 R^2 穩定。在藉由水解酶裂解可水解鍵之後， R^2 不再呈低或非螢光態。因此，藉由水解酶裂解可水解鍵產生可偵測及/或定量之BRET變化。

【0075】 如本文所用，「低螢光態」係指可區分於高螢光態之螢光態。舉例而言，與不結合至B時之 R^2 相比，低螢光態可為至少少20%之螢光、至少少30%之螢光、至少少40%之螢光、至少少50%之螢光、至少少60%之螢光、至少少70%之螢光、至少少80%之螢光、至少少90%之螢光、至少少95%之螢光、至少少98%之螢光或至少少99%之螢光。在一些具體實例中，與不結合至B時之 R^2 相比，低螢光態為至少少90%之螢光、至少少95%之螢光、至少少98%之螢光或至少少99%之螢光。在一些具體實例中，與不結合至B時之 R^2 相比，低螢光態為少20%與99%、30%與99%、40%與99%、50%與99%、60%與99%、70%與99%、80%與99%或90%與99%之間的螢光。在一些具體實例中，與不結合至B時之 R^2 相比，低螢光態為少80%與99%之間的螢光、少85%與97%之間的螢光或少90%與95%之間的螢光。

【0076】 如本文所用，「非螢光態 (non-fluorescent state)」係指本底噪

音水準100倍、本底噪音水準50倍、本底噪音水準20倍、本底噪音水準10倍或本底噪音水準5倍之螢光態。舉例而言，呈「非螢光」態之螢光團可展現接近基線之激發及發射。如熟習此項技術者所瞭解，「非螢光態」及「低螢光態」並不彼此排斥。

【0077】 呈低螢光或非螢光態之經封端螢光團亦可稱為掩蔽或潛在螢光團。

【0078】 在一些具體實例中，封端基團B改變 R^2 之吸收光譜以使得螢光態A與螢光態 A^* 之間之吸收光譜之峰波長不同，且可水解鍵之裂解產生變化。舉例而言，在一些具體實例中，封端基團B改變 R^2 之吸收光譜以使得 R^2 在激發時發射極少或不發射光。在此等具體實例中， R^1 與 R^2 之間可存在能量轉移，但 R^2 充當中止劑直至可水解鍵裂解。換言之，在用於 R^1 之受質存在下，由於 R^2 -B之作用未裂解感應器為暗的。一旦可水解鍵藉由水解酶裂解， R^2 即不再充當中止劑且在激發時發光。因此，在添加用於 R^1 之受質時，可偵測及/或定量自 R^2 之螢光發射之增加（及對應BRET變化）。在其他具體實例中，封端基團B改變 R^2 之吸收光譜以使得不或大體上不與 R^1 之發射光譜重疊且在 R^1 與 R^2 之間無或大體上無能量轉移。在藉由水解酶裂解可水解鍵之後， R^2 之螢光態改變以使得 R^2 之吸收光譜與 R^1 之發射光譜重疊（至少部分）且在 R^1 與 R^2 之間存在能量轉移。因此，在添加用於 R^1 之受質時，可偵測及/或定量自 R^2 之螢光發射之增加（及對應BRET變化）。

【0079】 在一些具體實例中，封端基團B改變 R^2 之發射光譜以使得螢光態A與螢光態 A^* 之間的發射光譜不同，且可水解鍵之裂解產生變化。舉例而言，藉由水解酶裂解可水解鍵可增加藉由 R^2 發射之光的強度。或者，藉由水解酶裂解可水解鍵可減小藉由 R^2 發射之光的強度。在一些具體實例中，封端基團B使呈低螢光態或非螢光態之受體域 R^2 穩定。在藉由水解酶裂解可水解鍵之

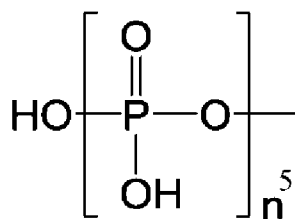
後， R^2 不再呈低螢光態或非螢光態。因此，藉由水解酶裂解可水解鍵產生可偵測及/或定量之BRET變化。

【0080】 在替代具體實例中，本發明之封端基團B可充當中止劑且藉由接受由於BRET對之活性所發射之能量而不將該能量作為光能再發射以減小藉由BRET對 R^1 及 R^2 發射之光的強度。在此等具體實例中， R^1 與 R^2 及 R^2 與B之間可存在能量轉移，但B充當中止劑直至可水解鍵裂解。換言之，在用於 R^1 之受質存在下，由於B之作用感應器為暗的。一旦可水解鍵藉由水解酶裂解，即移除B且BRET對在激發時發光。因此，在添加用於 R^1 之受質時，可偵測及/或定量BRET變化。

【0081】 B可為熟習此項技術者已知的任何適合封端基團，且可由熟習此項技術者根據所關注之水解酶來選擇。適合封端基團為能夠調節 R^2 之螢光特性的基團。B或結合至 R^2 之B包含用於水解酶之受質。舉例而言，在一些具體實例中，B包含可水解鍵。在一些具體實例中，B經由可水解鍵連接至 R^2 。

【0082】 在本發明之上下文中，B包含含磷酸酯部分、含糖部分、含胺基酸部分、含醯胺部分、核苷酸、核苷、酯或醚。在一些具體實例中，B包含含磷酸酯部分、含糖部分或酯。在一些具體實例中，B包含含磷酸酯部分或酯。在一些具體實例中，B包含酯。如熟習此項技術者所瞭解，封端基團B可歸類為以上中之一或多者。舉例而言，核苷酸為含磷酸酯部分與核苷酸。

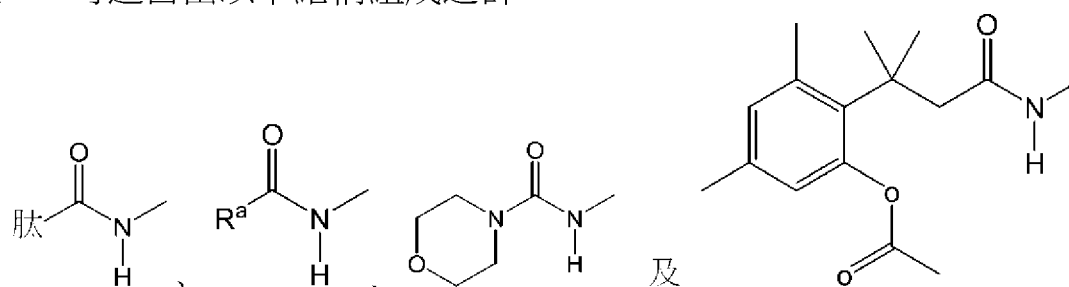
【0083】 在一些具體實例中，B可包含含磷酸酯部分。在一些具體實例中，B包含包含一或多個共價鍵結磷酸酯基之磷酸酯部分。舉例而言，B包含具有以下結構之磷酸酯部分：



其中 n 為1與4之間的整數。在一組具體實例中， B 為 $H_2PO_4^-$ 。作為實施例， B 包含磷酸酯鍵或藉由磷酸酯鍵連接至 R 。在此等具體實例中，感應器可形成用於磷酸酶之受質。

【0084】 在替代具體實例中， B 包含含胺基酸部分。舉例而言，在一些具體實例中， B 包含 $(X_{aa})_n$ ，其中 X_{aa} 為胺基酸且 n 為1至10、2至9、3至7、4至6或5之整數。在一些具體實例中， B 包含蛋白酶之裂解位點，例如 B 至少含有蛋白酶之較佳P1-P1'胺基酸（Schechter及Berger, 1967；Schechter及Berger, 1968）。在此等具體實例中，感應器可形成用於蛋白酶之受質。

【0085】 在其他具體實例中， B 包含醯胺鍵或經由醯胺鍵連接至 R 。舉例而言， B 可選自由以下結構組成之群：



其中 R^a 包含 $(X_{aa})_n$ ，其中 X_{aa} 為胺基酸且 n 為1至10、2至9、3至7、4至6或5之整數。在此等具體實例中，感應器可形成用於作用於非肽C-N鍵之蛋白酶或水解酶之受質。

【0086】 在一些具體實例中， B 可包含含糖部分。在一實施例中， B 包含糖苷鍵或藉由糖苷鍵連接至 R 。如本文所用，糖苷鍵為使碳水化合物（糖）分子連接至可為或可不為另一碳水化合物之另一基團之共價鍵。在一些具體實例中，糖苷鍵為O-糖苷鍵、S-糖苷鍵或N-糖苷鍵。舉例而言， B 包含葡萄糖部分、半乳糖部分或果糖部分。在此等具體實例中，感應器可形成用於諸如 α -糖苷酶或 β -糖苷酶之糖苷酶之受質。

【0087】 在一些具體實例中， B 包含核苷。核苷包含含氮鹼基及5-碳糖。在一些具體實例中，5-碳糖為核糖。在一些具體實例中，5-碳糖為脫氧核糖。

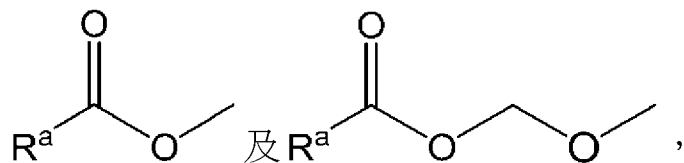
在一些具體實例中，含氮鹼基選自由以下組成之群：腺嘌呤（A）、尿嘧啶（U）、鳥嘌呤（G）、胸腺嘧啶（T）及胞嘧啶（C）。在一些具體實例中，核苷選自由以下組成之群：胞苷、尿苷、腺苷、鳥苷、胸苷及肌苷。在一些具體實例中，核苷選自由以下組成之群：脫氧胞苷、脫氧尿苷、去氧腺苷、脫氧鳥苷、去氧胸苷及去氧肌苷。在此等具體實例中，感應器可形成用於核苷水解酶之受質。

【0088】 在一些具體實例中，B包含核苷酸。如本文所用，核苷酸廣義定義且包含至少一個磷酸酯基、含氮鹼基及5-碳糖。在一些具體實例中，5-碳糖為核糖。在一些具體實例中，5-碳糖為脫氧核糖。在一些具體實例中，含氮鹼基選自由以下組成之群：腺嘌呤（A）、尿嘧啶（U）、鳥嘌呤（G）、胸腺嘧啶（T）及胞嘧啶（C）。舉例而言，在一些具體實例中，核苷酸為核苷及至少一個磷酸酯基，例如（但不限於）核苷單磷酸酯、核苷二磷酸酯及核苷三磷酸酯。在一些具體實例中，B包含線性核苷酸，諸如ATP、GTP、CTP及UTP。在一些具體實例中，B包含環狀核苷酸，諸如環狀單磷酸鳥苷（cGMP）及環狀單磷酸腺苷（cAMP）。在一些具體實例中，B選自由以下組成之群：輔酶A、黃素腺嘌呤二核苷酸（FAD）、黃素單核苷酸（FMN）、菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸（NAD）及菸醯胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（NADP⁺）。在此等具體實例中，感應器可形成用於N-糖基水解酶或核苷酸水解酶之受質。

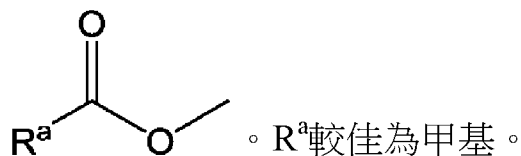
【0089】 在一些具體實例中，B包含寡核苷酸。舉例而言，B可包含 $(X_{NT})_n$ ，其中 X_{NT} 為核苷酸且 n 為1至10、2至9、3至7、4至6或5之整數。在一些中， X_{NT} 包含選自由以下組成之群的含氮鹼基：腺嘌呤（A）、尿嘧啶（U）、鳥嘌呤（G）、胸腺嘧啶（T）及胞嘧啶（C）。在此等具體實例中，感應器可形成用於核酸酶或DNA糖基化酶之受質。

【0090】 在一些具體實例中，B包含酯。在一些具體實例中，B選自由以

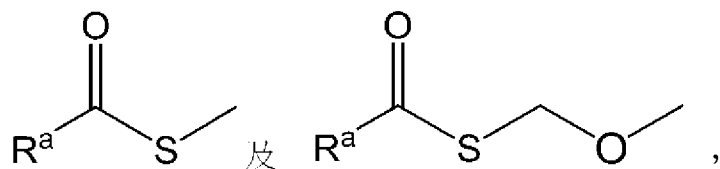
下結構組成之群：



其中 R^a 為視情況經多個鹵素原子中之一者取代之 C_{1-30} 直鏈或分支鏈烷基、 C_{3-8} 環烷基或環烯基、 C_{3-8} 雜環基或芳基。在一些具體實例中， R^a 為視情況經多個鹵素原子中之一者取代之 C_{1-4} 直鏈或分支鏈烷基。在一些具體實例中， R^a 為甲基、乙基、丁基、丙基、丁基或第三丁基。在一些具體實例中， R^a 為甲基。在此等具體實例中，感應器可形成用於酯酶之受質。在一些較佳具體實例中，B包含一或多個具有以下結構之基團，其中 R^a 如本文所定義：

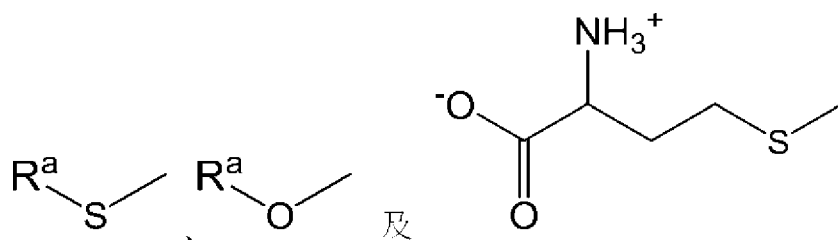


【0091】 在一些具體實例中，B包含硫酯。在一些具體實例中，B選自由以下結構組成之群：



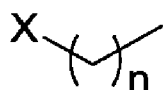
其中 R^a 為視情況經多個鹵素原子中之一者取代之 C_{1-30} 直鏈或分支鏈烷基、 C_{3-8} 環烷基或環烯基、 C_{3-8} 雜環基或芳基。在一些具體實例中， R^a 為視情況經多個鹵素原子中之一者取代之 C_{1-4} 直鏈或分支鏈烷基。在一些具體實例中， R^a 為甲基、乙基、丁基、丙基、丁基或第三丁基。在此等具體實例中，感應器可形成用於硫酯酶之受質。

【0092】 在一些具體實例中，B包含醚或硫醚。在一些具體實例中，B選自由以下結構組成之群：



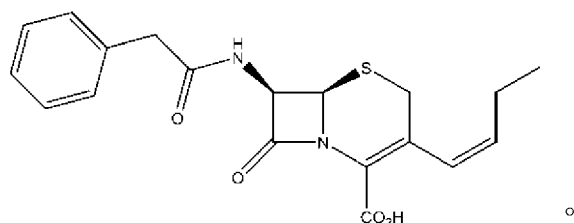
其中 R^a 為視情況經多個鹵素原子中之一者取代之 C_{1-30} 直鏈或分支鏈烷基、 C_{3-8} 環烷基或環烯基、 C_{3-8} 雜環基或芳基。在一些具體實例中， R^a 為視情況經多個鹵素原子中之一者取代之 C_{1-4} 直鏈或分支鏈烷基。在一些具體實例中， R^a 為甲基、乙基、丁基、丙基、丁基或第三丁基。在此等具體實例中，感應器可形成用於脫烷基酶之受質。

【0093】 在一些具體實例中，B包含鹵素或鹵烷基。在一些具體實例中，B為



其中n為1至8之整數且X為鹵素。在一些具體實例中，X選自由以下組成之群：Cl、Br、F及I。在此等具體實例中，感應器可形成用於脫鹵素酶之受質。

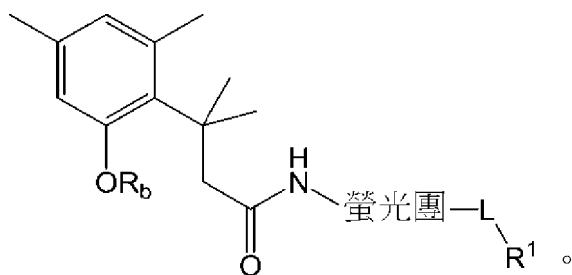
【0094】 在一些具體實例中，B包 β -內醯胺。在一些具體實例中，包含 β -內醯胺抗生素，諸如青黴素、頭孢菌素、頭黴素或碳青黴烯類。在一些具體實例中，B包含選自由青黴素及頭孢菌素組成之群的 β -內醯胺抗生素。舉例而言，在一些具體實例中，B包含以下結構：



在此等具體實例中，感應器可形成用於 β -內醯胺酶之受質。

【0095】 在一些具體實例中，B包含「三甲基鎖 (trimethyl lock)」。如本文所用「三甲基鎖」為鄰羥基肉桂酸衍生物。在此等具體實例中，結合至 R^2 之B通常稱為「潛在螢光團 (latent fluorophore)」，「掩蔽螢光團 (masked

fluorophore) 」或「前螢光團 (pro-fluorophore) 」且呈低螢光態或非螢光態。具有三甲基鎖之感應器之實例具有以下結構：



其中螢光團為可連接至三甲基鎖之任何適合螢光團，且其中 OR_b 包含可藉由所關注之水解酶水解以使酚系氧未掩蔽之可水解鍵。舉例而言， R_b 可為醯基、磷醯基、硫醯基或糖基。在一個實施例中， R_b 為乙醯基。視螢光團而定感應器可包括超過一個「三甲基鎖」。一旦酚系氧未掩蔽，則三個甲基之間的不利空間相互作用引起快速內酯化，釋放結合至 $L-R^1$ 之螢光團及增加BRET比率。適合螢光團包含（但不限於）玫瑰紅110、7-胺基-4-甲基香豆素及甲苯紫。在此實施例中，感應器可形成用於酯酶之受質。在另一實施例中， OR_b 為 OPO_3H_2 基團且感應器可形成用於磷酸酶之受質。基於三甲基鎖之實例潛在螢光團提供於Chandran等人, 2005, Levine及Raines, 2012; Lavis等人, 2006a及Lavis等人, 2006b中。不希望受理論所束縛，認為可水解鍵與螢光團之間包括三甲基嵌段可改良可水解鍵與水解酶之可接近性。

【0096】 在一些具體實例中，B包含自分解型連接子。自分解型連接子可位於螢光團與可水解鍵之間，從而可改良可水解鍵與水解酶之可接近性。如本文所用，「自分解型連接子」為兩個分子物種（在此情況下為螢光團及可水解鍵）之間的可逆共價連接。在可水解鍵裂解之前，螢光團呈低螢光或非螢光態。共價連接體之自分解藉由由水解酶裂解可水解鍵觸發，從而釋放呈高螢光態之螢光團。因此，藉由水解酶裂解可水解鍵增加BRET比率。適合自分解型螢光探針描述於Ządło-Dobrowolska等人, 2016中。

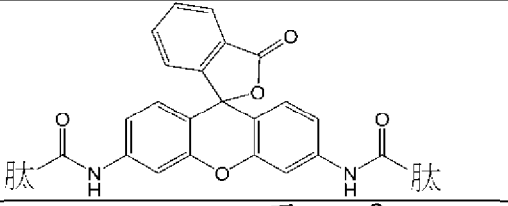
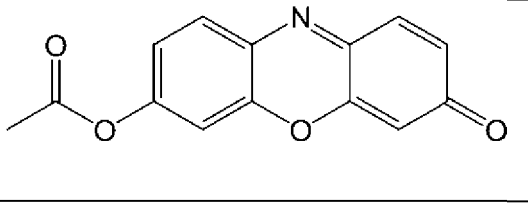
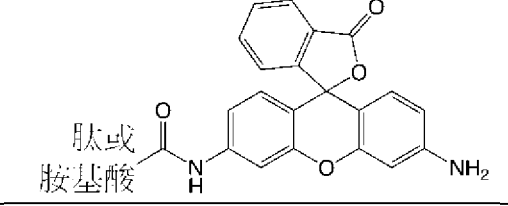
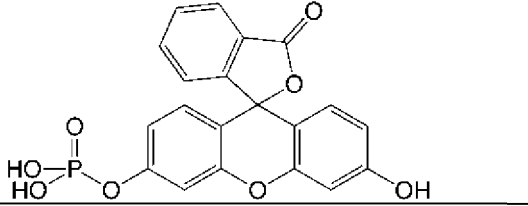
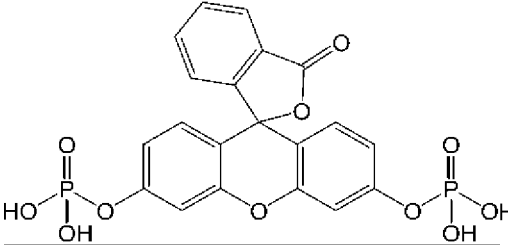
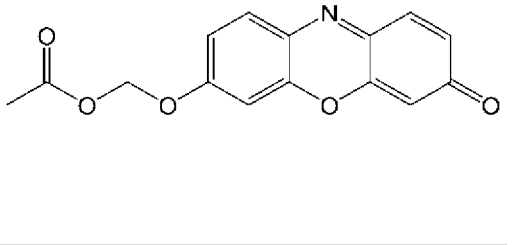
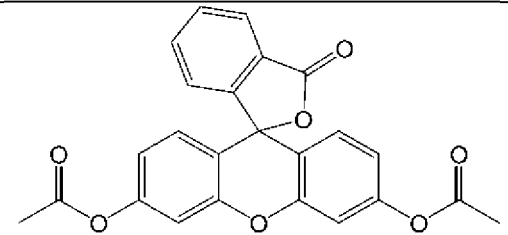
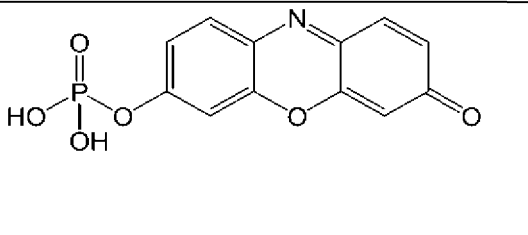
可水解鍵

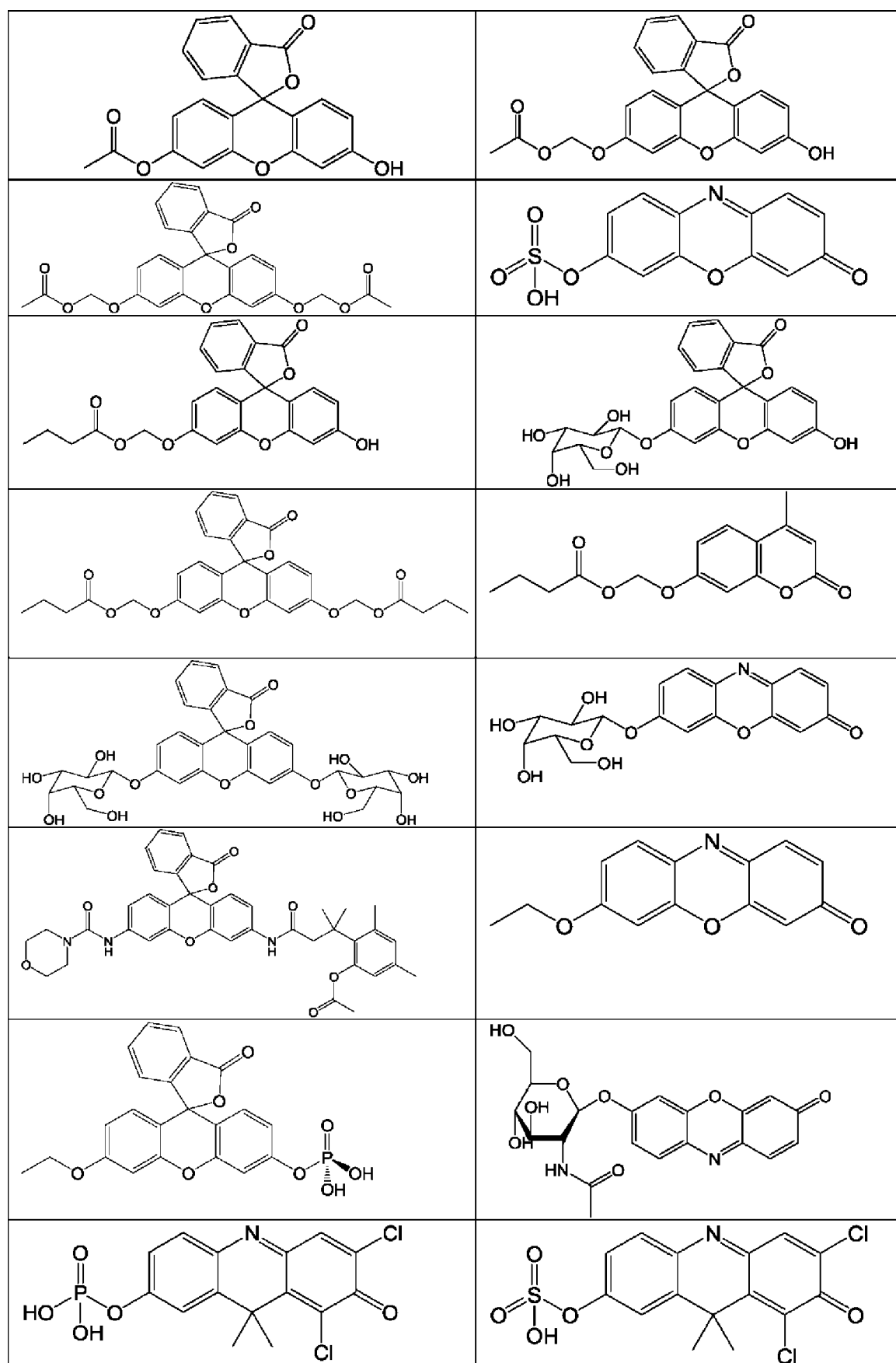
【0097】 本發明之感應器包含可水解鍵。如本文所用，「可水解鍵」為可藉由水解酶斷裂之共價鍵。換言之，可水解鍵為用於水解酶之受質。可水解鍵之裂解改變 R^2 之螢光特性從而產生BRET變化。B或結合至 R^2 之B包含可水解鍵。在一些具體實例中，B包含可水解鍵。在其他具體實例中，B藉由可水解鍵結合至 R^2 。

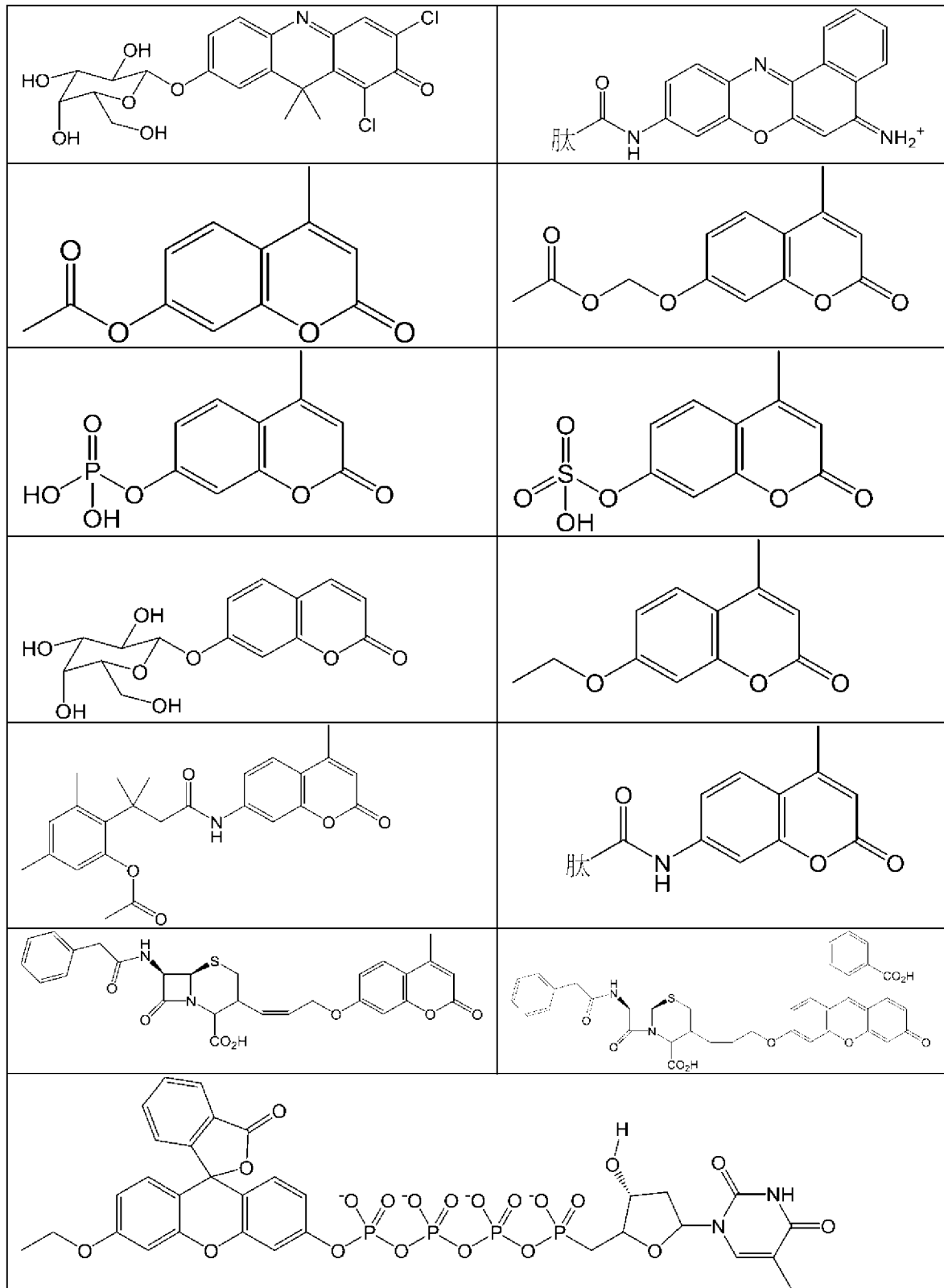
【0098】 本發明提供任何適合可水解鍵在本發明之感應器中之用途。在一些實施例中，可水解鍵選自由以下組成之群：酯鍵、醯胺（或肽）鍵、醚鍵、硫醚鍵、糖苷鍵、硫酸酯鍵、磷酸酯鍵、碳-氮鍵、酸酐鍵、碳-碳鍵、鹵基鍵、磷-氮鍵、硫-氮鍵、碳-磷鍵、硫-硫鍵及碳-硫鍵。在一些具體實例中，可水解鍵選自由以下組成之群：酯鍵、醯胺（或肽）鍵、醚鍵、硫醚鍵、糖苷鍵、硫酸酯鍵、磷酸酯鍵及碳-氮鍵。在較佳具體實例中，可水解鍵為酯鍵。

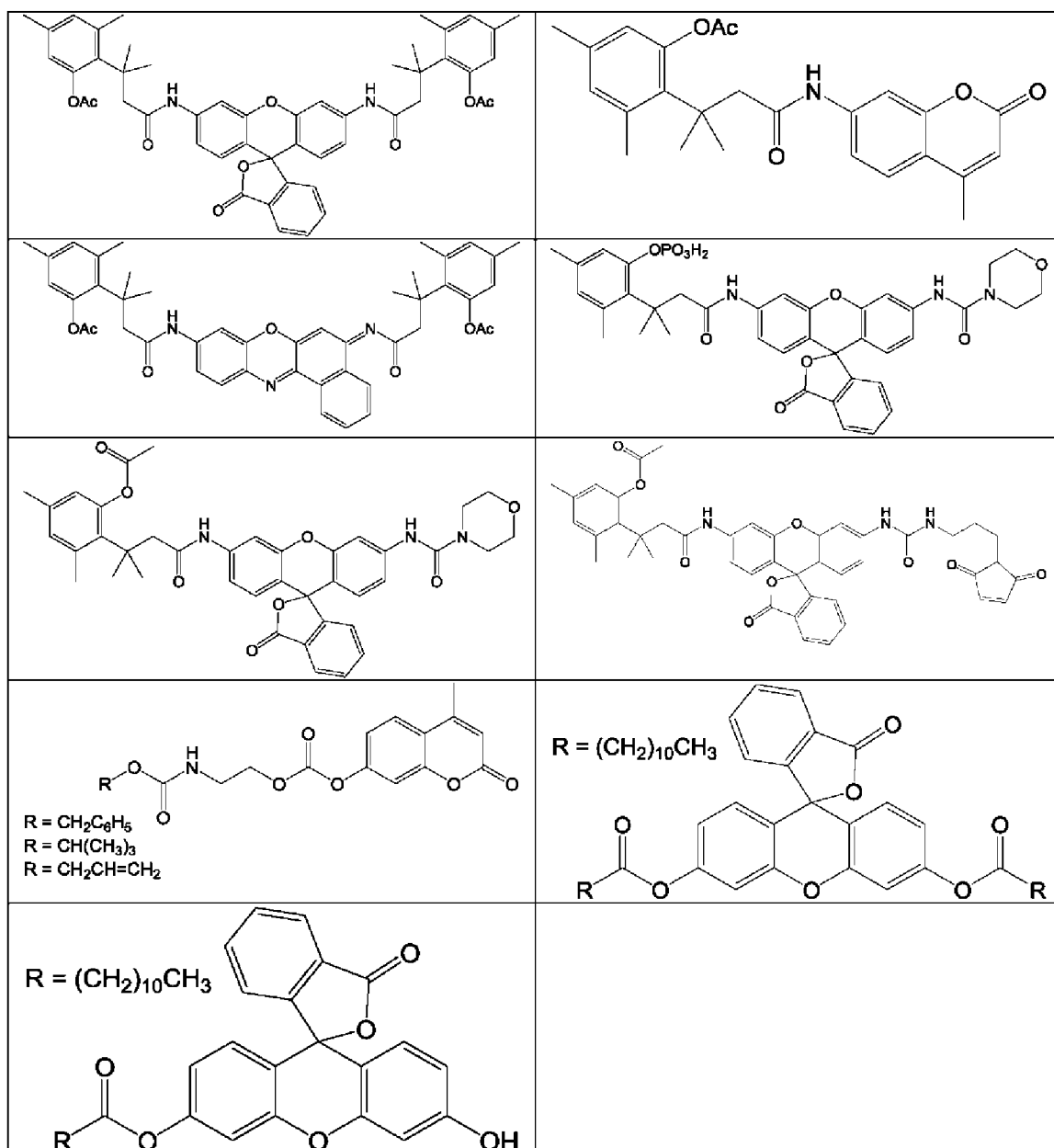
【0099】 在本發明之具體實例中， R^2 -B/B- R_2 包含可水解鍵且形成用於所關注之水解酶之受質。 R^2 -B/B- R^2 之適合非限制性實施例列於表1中。

表1：結合至B之R²的非限制性實施例







【0100】 在較佳具體實例中， $\text{R}^2\text{-B/B-R}_2$ 包含螢光素乙酸酯或螢光素二乙酸酯。

【0101】 以上化合物獲自商業供應商，可根據此項技術中已知之方法合成或可根據公佈之方法合成。

連接元件

【0102】 本發明之感應器包含連接元件L。連接元件為使 R^1 連接至 R^2 之分子部分。在一些具體實例中，連接元件（或其一部分）為 R^1 之整體部分（例

如， R^1 之N或C端或 R^1 中之天然產生之半胱胺酸或離胺酸殘基，以使得 R^2 經由天然產生之半胱胺酸或離胺酸之側鏈直接結合至 R^1 ）。在一些具體實例中，連接元件（或其一部分）為 R^2 之整體部分（例如， R^2 中之胺或硫醇基，以使得 R^1 經由胺或硫醇基或分選酶識別序列直接結合至 R^2 ）。在一些具體實例中，連接元件為使 R^1 連接至 R^2 之獨立化學實體。

【0103】 適合連接元件包括（但不限於）多肽、聚核苷酸、聚伸烷二醇、聚伸烷二醇鏈之至少一個氧經氮取代之聚伸烷二醇、多元胺（Herve等人, 2008）、肽核酸（peptide nucleic acid, PNA（Egholm等人, 2005）、鎖定核酸（locked nucleic acid, LNA）（Singh等人, 1998）、三唑、哌啶、脒、噻唑啉、芳環系統、烷烴、烯烴、炔烴、環狀烷烴、環烯烴、醯胺、硫代醯胺、醚及胺。在一些具體實例中，連接元件包含以下或選自由以下組成之群：烷基鏈、乙二醇、聚二醇、醚、聚醚、聚醯胺、聚酯、胺基酸、肽、多肽或聚核苷酸。在一些具體實例中，連接元件為肽或多肽。在一些具體實例中，連接元件為聚乙二醇或聚丙二醇。

【0104】 連接元件之長度視所選連接元件以及所選 R^1 - R^2 對而定。舉例而言，連接元件之長度視所選 R^1 - R^2 對之工作距離範圍而定。在一些具體實例中，可改變連接元件之長度以改變或控制BRET比率變化。

【0105】 在一些具體實例中，連接元件可包含聚伸烷二醇。適合聚伸烷基二醇包含聚乙二醇（polyethylene glycol, PEG）及甲氧基聚乙二醇（methoxypolyethylene glycol, mPEG）。PEG為乙二醇之聚合物，且視取代而定可具有化學式 $C_{2n+2}H_{4n+6}O_{n+2}$ 。舉例而言，連接元件包含具有多達約40個乙二醇部分之PEG。在一些具體實例中，連接元件包含具有多達約30個乙二醇部分之PEG連接子。在一些具體實例中，連接元件包含具有多達約20個乙二醇部分之PEG連接子。在一些具體實例中，連接元件包含具有多達約10個乙二醇部分

之PEG連接子。在一些具體實例中，連接元件包含具有多達約8個乙二醇部分之PEG連接子。在一些具體實例中，連接元件包含具有多達約6個乙二醇部分之PEG連接子。其他適用聚仲烷基二醇為聚丙烯乙二醇、聚丁烯乙二醇、PEG-縮水甘油醚及PEG-氧基羰基咪唑。

【0106】 在替代具體實例中，連接元件包含寡核苷酸。寡核苷酸可包含核苷鹼基或修飾之核苷鹼基或兩者。連接元件可具有多達約50個核苷鹼基及/或修飾之核苷鹼基。在一個具體實例中，連接元件可具有多達約40個核苷鹼基及/或修飾之核苷鹼基。在另一具體實例中，連接元件包含多達約30個核苷鹼基及/或修飾之核苷鹼基。在另一具體實例中連接元件包含多達約20個核苷鹼基及/或修飾之核苷鹼基。在另一具體實例中，連接元件包含多達約10個核苷鹼基及/或修飾之核苷鹼基。在另一具體實例中，連接元件包含多達約5個核苷鹼基及/或修飾之核苷鹼基。

【0107】 在較佳具體實例中，連接元件包含多肽。肽、寡肽及多肽在本文中可互換使用以指兩個或更多個胺基酸之聚合物。通常，寡肽用於含有2與10個之間的胺基酸之鏈，且術語多肽用於含有大於10個胺基酸之鏈。肽可包含天然或非天然產生之胺基酸或其組合。肽或多肽可包含修飾之胺基酸。在一個具體實例中，連接元件可具有多達約50個胺基酸殘基。在一個具體實例中，連接元件可具有多達約40個胺基酸殘基。在另一具體實例中，連接元件包含多達約37個胺基酸殘基。在另一具體實例中，連接元件包含多達約31個胺基酸殘基。在另一具體實例中，連接元件包含多達約30個胺基酸殘基。在另一具體實例中，連接元件包含多達約28個胺基酸殘基。在另一具體實例中，連接元件包含多達約23個胺基酸殘基。在另一具體實例中，連接元件包含多達約21個胺基酸殘基。在另一具體實例中，連接元件包含多達約20個胺基酸殘基。在另一具體實例中，連接元件包含多達約13個胺基酸殘基。在另一具體實例中，連接元

件包含多達約11個胺基酸殘基。在另一具體實例中，連接元件包含多達約10個胺基酸殘基。在另一具體實例中，連接元件包含多達約5個胺基酸殘基。在另一具體實例中，連接元件包含多達約3個胺基酸殘基。在另一具體實例中，連接元件包含1個胺基酸。在另一具體實例中，連接元件包含約1與30個之間的胺基酸、約5與25個之間的胺基酸、約7與23個之間的胺基酸、約10與20個之間的胺基酸或約13與18個之間的胺基酸。在另一具體實例中，連接元件包含約1與30個之間的胺基酸、約10與30個之間的胺基酸、約20與30個之間的胺基酸、約25與30個之間的胺基酸或約28個胺基酸。在較佳具體實例中，連接元件包含約25至30個胺基酸或約28個胺基酸。在一些具體實例中，連接元件包含自由半胱胺酸或自由離胺酸。如本文所用，「自由」在界定胺基酸時指未修飾之側鏈，例如分別具有-SH基團或-NH₂/-NH₃⁺基團之未修飾之側鏈。在一些具體實例中，連接元件為R¹之N端的肽序列。在一些具體實例中，連接元件為R¹之C端的肽序列。

【0108】 在一些具體實例中，連接元件為包含序列C之肽。在一些具體實例中，連接元件為包含序列CDDKDRWGSEF (SEQ ID NO: 5) 之肽。在一些具體實例中，連接元件為包含序列CQQMGRDLYDDDDKDRWGSEF (SEQ ID NO: 6) 之肽。在一些具體實例中，連接元件為包含序列MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDRWGSEF (SEQ ID NO: 7) 之肽。在一些具體實例中，序列中之至少一個胺基酸經半胱胺酸置換。舉例而言SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6或SEQ ID NO: 7中之胺基酸中之至少一者經半胱胺酸置換。在一些具體實例中，連接元件包含或由SEQ ID NO: 44、SEQ ID NO: 45、SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO: 47及SEQ ID NO: 48中之任一者中提供之序列組成。

【0109】 在一些具體實例中，連接元件包含用於微生物轉麩醯胺酸酶之

高親和力Gln受質 (Oteng-Pabi等人, 2014)。舉例而言，連接元件包含具有選自由WALQRPH (SEQ ID NO: 21) 及WELQRPY (SEQ ID NO: 22) 組成之群的序列之肽。在一些具體實例中，連接元件包含分選酶識別序列 (Theile等人, 2013)。舉例而言，連接元件包含具有序列LPXT之肽，其中X為任何胺基酸 (SEQ ID NO: 23)。如熟習此項技術者所瞭解，分選酶介導之反應可用以標記R¹之N端。在一些具體實例中，連接元件進一步包含間隔子序列。在一些具體實例中，間隔子序列包含一或多個甘胺酸、絲胺酸及/或蘇胺酸殘基。舉例而言，在一些具體實例中，間隔子序列包含選自以下之胺基酸序列：GSSGGS (SEQ ID NO: 24), GGSGGS (SEQ ID NO: 25)、GGTGGG (SEQ ID NO: 26)、GGGGGT (SEQ ID NO: 27)、LQGGTGGG (SEQ ID NO: 28)、FEGGTGGG (SEQ ID NO: 29) 及GGSGGSL (SEQ ID NO: 30)。

【0110】 連接元件可具有低於約5 kD、低於約4.5 kD、低於約4.0 kD、低於約3.5 kD、低於約3 kD或低於約2.5 kD，且可低於約2 kD之物質。連接元件可具有約1 kDa與5 kD之間的物質、約2 kDa與5 kD之間的物質及約3 kDa與5 kD之間的物質。

【0111】 在一些具體實例中，連接元件包含反應性部分。反應性部分可藉助於任何化學反應與R¹及/或R²中之化學基團反應，以形成本文所述之感應器分子。可使用任何適合的反應性部分。在一些具體實例中，反應性部分選自由以下組成之群：硫氫基反應性部分、胺反應性部分及羰基反應性部分。在一些具體實例中，反應性部分為與硫氫基反應性部分、胺反應性部分及/或羰基反應性部分反應之基團。舉例而言，反應性部分可包括自由半胱胺酸殘基、自由離胺酸殘基或羰基。

【0112】 舉例而言，在一些具體實例中，連接元件具有硫氫基反應性部分，其可與R¹及/或R²中之自由半胱胺酸 (例如天然產生之半胱胺酸或藉由突變

引入之半胱胺酸)反應以在其間形成共價鍵聯。在其他具體實例中，連接元件具有胺反應性部分，其可與 R^1 及/或 R^2 中之離胺酸殘基(例如天然產生之離胺酸或藉由突變引入之離胺酸)反應以在其間形成共價鍵聯。在其他具體實例中，連接元件具有羰基反應性部分，其可與 R^1 及/或 R^2 中之羰基反應以在其間形成共價鍵聯。在另一具體實例中，連接元件具有自由半胱胺酸或自由離胺酸，其可與 R^2 及/或 R^1 中之硫氫基反應性部分反應以在其間形成共價鍵聯。在另一具體實例中，連接元件具有自由離胺酸，其可與 R^2 及/或 R^1 中之胺反應性部分反應以在其間形成共價鍵聯。在另一具體實例中，連接元件具有羰基，其可與 R^2 及/或 R^1 中之羰基反應性部分反應以在其間形成共價鍵聯。

【0113】 硫氫基反應性部分包括硫醇、三氟甲磺酸酯、三氟乙磺酸酯、氮丙啶、環氧乙烷、S-吡啶基、順丁烯二醯亞胺基苯甲醯基磺基丁二醯亞胺酯或順丁烯二醯亞胺部分。較佳硫氫基反應性部分包括順丁烯二醯亞胺、丙烯醯胺、苯基羰基丙烯醯胺及碘乙醯胺。胺反應性部分包括活性酯(包括(但不限於)丁二醯亞胺基酯、磺基丁二醯亞胺基酯、四氟苯基酯及磺基二氯酚酯)、異硫氰酸酯、二氯三嗪、芳基鹵化物、醯基疊氮化物及磺醯氯。關於此等胺反應性部分，活性酯為較佳試劑，因為其產生穩定甲醯胺鍵(參見例如Banks及Paquette, 1995)。羰基反應性部分包括一級胺，諸如醯肼及烷氧胺。含羰基部分包括醛(RCHO)及酮(RCOR')。在一些實施例中，醛藉由連接元件中之糖基之過碘酸鹽氧化產生。

【0114】 在一個實施例中，當連接元件包含PEG(或NPEG)時，其亦可包含一或多個反應性部分，諸如親電子或親核基團(例如參見WO 2007/140282)，其可用以使PEG連接子連接至 R^1 及/或 R^2 。在一些具體實例中，連接元件衍生自PEG-二酸或NPEG-二酸。在此等具體實例中，使PEG-二酸或NPEG-二酸連接元件之羧基經由醯胺鍵連接至 R^1 之末端殘基之末端胺基。

PEG-二酸或NPEG-二酸連接元件之其他羧基經由醯胺鍵連接至 R^2 。

【0115】 在一個實施例中，當連接元件包含肽時，其亦可包含半胱胺酸殘基及/或離胺酸殘基。在較佳具體實例中，連接元件包含半胱胺酸。

【0116】 熟習此項技術者將瞭解，連接子之長度可影響生物發光蛋白質與受體域之間的BRET。因此，連接子之較佳長度可視用於感應器中之生物發光蛋白質及受體域而改變。

非蛋白質受體域 (R^2)

【0117】 R^2 可為任何適合的非蛋白質受體域。如本文所用，「受體域 (acceptor domain)」為能夠接受由於生物發光蛋白質 R^1 (如本文所述) 之活性所發射之能量的任何分子。在一些具體實例中，非蛋白質受體域可為螢光受體域或中止劑。如本文所用，術語「螢光受體域 (fluorescent acceptor domain)」 (在本文中亦稱為「螢光受體分子 (fluorescent acceptor molecule)」) 係指可接受由於生物發光蛋白質 R^1 之活性所發射之能量且將其作為光能再發射之任何化合物。如本文所用，術語「中止劑 (quencher)」係指可接受由於生物發光蛋白質 R^1 之活性所發射之能量而不將其作為光能再發射之任何化合物。非螢光受體可為中止劑。

【0118】 存在許多可用於本發明中之受體域。適合受體域為非蛋白質且包括有機分子，以使得在較佳具體實例中， R^2 為有機受體域。在較佳具體實例中，受體域不為量子點。

【0119】 在一些具體實例中， R 為非蛋白質螢光受體域。可使用任何適合的非蛋白質螢光受體域。在一些具體實例中， R^2 選自由以下組成之群：阿萊克薩螢光染料、氟硼二吡咯染料、Cy染料、螢光素、丹醯基、繖形酮、馬力納藍、喀斯開藍、喀斯開黃、太平洋藍、俄勒岡綠、四甲基玫瑰紅、玫瑰紅、香

豆素、硼-二吡咯亞甲基 (BODIPY)、試鹵靈、德克薩斯紅、稀土元素螯合物或其等之任何組合或衍生物。衍生物之實例包括 (但不限於) 胺反應性衍生物、醛/酮反應性衍生物、胞嘧啶反應性或硫氫基反應性衍生物。

【0120】 在一些具體實例中，R為螢光素或其衍生物。適合衍生物包括 (但不限於) 胺反應性螢光素衍生物、螢光素異硫氰酸酯 (fluorescein isothiocyanate, FITC)、NHS-螢光素、NHS-LC-螢光素、硫氫基反應性螢光素衍生物、5- (及6) -碘乙醯胺基-螢光素、螢光素-5-順丁烯二醯亞胺、螢光素-6-順丁烯二醯亞胺、SAMSA-螢光素、醛/酮及胞嘧啶反應性螢光素衍生物、螢光素-5-硫胺脲及5-(((2-(甲醯肼)甲基)硫基)乙醯基)-胺基螢光素。在一些具體實例中，R²為螢光素-5-順丁烯二醯亞胺衍生物。在一些具體實例中，R為螢光素-6-順丁烯二醯亞胺衍生物。在較佳具體實例中，B-R²或R²-B為螢光素-二乙酸酯-6-順丁烯二醯亞胺。在較佳具體實例中，B-R²或R²-B為螢光素-二乙酸酯-5-順丁烯二醯亞胺。

【0121】 在一些具體實例中，R²為玫瑰紅或其衍生物。適合衍生物包括 (但不限於) 胺反應性玫瑰紅衍生物、四甲基玫瑰紅-5- (及6) -異硫氰酸酯、NHS-玫瑰紅、Lissamine™玫瑰紅B磺醯氯磺醯氯Lissamine™玫瑰紅B磺醯肼、硫氫基反應性玫瑰紅衍生物、四甲基玫瑰紅-5- (及6) -碘乙醯胺、醛/酮及胞嘧啶反應性玫瑰紅衍生物、德克薩斯紅肼及德克薩斯紅磺醯氯。在一些具體實例中，R²為磺醯玫瑰紅B、C₂順丁烯二醯亞胺衍生物 (亦稱為 (RhodamineRed™ C2-順丁烯二醯亞胺或2-(6-(二乙基胺基)-3-(二乙亞胺基) -3H-二苯并吡喃-9-基)-5-(N-(2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙基)胺磺醯基)苯磺酸酯)。

【0122】 在一些具體實例中，R²為香豆素或其衍生物。適合衍生物包括 (但不限於) 胺反應性香豆素衍生物、AMCA、AMCA-NHS、AMCA-磺基-NHS、硫氫基反應性香豆素衍生物、AMCA-HPDP、DCIA、醛及酮反應性

coumarin衍生物及AMCA-醯肼。

【0123】 在一些具體實例中， R^2 為硼-二吡咯亞甲基（BODIPY）或其衍生物。適合衍生物包括（但不限於）胺反應性硼-二吡咯亞甲基染料、BODIPY FL C_3 -SE、BODIPY 530/550 C_3 、BODIPY 530/550 C_3 -SE、BODIPY 530/550 C_3 -醯肼、BODIPY 493/503 C_3 -醯肼、BODIPY FL C_3 -醯肼、硫氫基反應性硼-二吡咯亞甲基染料、BODIPY FL 1A、BOPDIY 530/550 1A、Br-BOPDIY 493/503及醛及酮反應性硼-二吡咯亞甲基染料。

【0124】 在一些具體實例中， R^2 為Cy（花青）染料或其衍生物。適合衍生物包括（但不限於）胺反應性花青染料、硫醇反應性花青染料及羰基反應性花青染料。

【0125】 在一些具體實例中， R^2 為中止劑。可使用任何適合中止劑。在一些具體實例中， R^2 選自由以下組成之群：DABCYL [4-((4-(二甲胺基苯基)偶氮基)苯甲酸)、DABSYL（二甲胺基偶氮磺酸）、金屬奈米粒子（諸如金及銀）、黑洞中止劑（black hole quencher, BHQ）、QSY染料及QXL中止劑。在一些具體實例中， R^2 選自由以下組成之群：DABCYL [4-((4-(二甲胺基)苯基)偶氮基)苯甲酸)、DABSYL（二甲胺基偶氮磺酸）、黑洞中止劑（BHQ）、QSY染料及QXL中止劑。

【0126】 在一些具體實例中， R^2 可經由 R^1 中天然產生之反應性部分、連接元件L中天然產生之反應性部分、藉由將偶合基團添加至連接元件L中及/或藉由 R^2 中存在之偶合基團連接至連接元件L以形成感應器。舉例而言，在一些具體實例中，連接元件包含半胱胺酸以使得 R^2 可經由半胱胺酸之含硫醇側鏈連接至連接元件L。在一些具體實例中，連接元件包含離胺酸以使得 R^2 可經由離胺酸之含胺側鏈連接至連接元件L。在一些具體實例中，連接元件L包含非天然胺基酸，以使得 R^2 可經由非天然胺基酸之側鏈連接至連接元件L。在一些具體

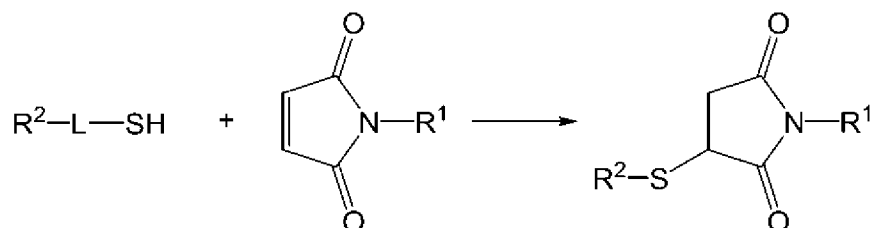
實例中，連接元件L包含糖基，以使得 R^2 可經由醯肼反化學物質或烷氧基胺反應化學物質連接至連接元件L。

【0127】 例示性偶合基團在下文中加以描述，且將此類偶合基團併入至連接元件L中以連接至 R^2 或 R^1 或併入至 R^2 或 R^1 中以連接至連接元件L之方法為熟習此項技術者所已知。舉例而言，適合偶合基團及相關技術描述且闡述於Greg T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques* (第三版), Academic Press (2013)中。在本發明之化合物包含經保護官能性部分或經保護偶合基團之情況下，保護基之移除藉由此項技術中已知之方法進行。如本文上下文中所用，術語「連接 (attaching)」指在鍵聯基團L與 R^1 及/或在L與 R^2 之間形成共價鍵。

【0128】 適合偶合基團包括（但不限於）半胱胺酸特異性親電子體及/或胺特異性親電子體。在一些具體實例中，且 R^1 、 R^2 及連接元件中之一或多者包含半胱胺酸特異性親電子體。可使用熟習此項技術者已知之任何半胱胺酸特異性親電子體。舉例而言，半胱胺酸特異性親電子體包括（但不限於）順丁烯二醯亞胺、烷基鹵化物、芳基鹵化物、 α -鹵羰基（例如碘乙醯胺）、吡啶基二硫化物、丙烯醯胺及苯基羰基丙烯醯胺。其他硫醇特異性偶合基團包括（但不限於）鹵乙醯基及烷基鹵衍生物、氮丙啶、丙烯醯基衍生物、芳化劑、硫醇-二硫化物交換試劑、乙烯磺衍生物、金屬硫醇配位鍵、天然化學連接、甲硫胺酸及半胱胺酸之順鉑修飾。

【0129】 在一些具體實例中，半胱胺酸特異性親電子體為圖2中所示之邁克爾受體，諸如順丁烯二醯亞胺、丙烯醯胺、苯基羰基丙烯醯胺。在一些具體實例中， R^1 可直接結合至邁克爾受體或經由鍵聯化學物質間接結合至邁克爾受體。適合鍵聯化學物質之實例包括（但不限於）視情況經1至4個獨立地選自由以下組成之群的取代基取代之包含0至4個主鏈（亦即非取代基）雜原子之 C_{1-10} 伸烷基直鏈或分支鏈： C_{1-6} 烷基直鏈或分支鏈、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $=O$ 、鹵素、三鹵

甲基、 C_{1-6} 烷氧基、 $-OH$ 、 $-CH_2OH$ 及 $-C(O)NH_2$ 。在較佳具體實例中，半胱胺酸特異性親電子體為根據反應方案連接之順丁烯二醯亞胺：



其中 R^2-L-SH 包含自由硫醇，呈自由硫醇或在經保護硫醇脫除保護基之後。

【0130】 可使用熟習此項技術者已知之任何胺特異性親電子體。舉例而言，胺特異性親電子體包括（但不限於）活化酯、磺醯氯及異硫氰酸酯。其他胺特異性偶合基團包括（但不限於）異氰酸酯、醯基疊氮化物、N-羥基丁二醯亞胺（N-hydroxysuccinimide, NHS）酯、甲苯磺酸酯、醛及乙二醛（glyoxal）、環氧化物及環氧乙烷、碳酸酯、芳化劑、醯亞胺酯、碳二醯亞胺、酸酐、氟苯酯、羥甲基磷衍生物及胺之胍基化。

【0131】 較佳胺特異性親電子體包括亞胺酯及NHS酯。NHS酯在與一級或二級胺反應時產生穩定產物。偶合在生理學pH下有效，且NHS-酯交聯劑在溶液中比其醯亞胺酯對應物更穩定。一級胺為NHS-酯之主要標靶。存在於蛋白質之N端上之可獲得的 α -胺基可與NHS-酯反應以形成醯胺。離胺酸之 ϵ -胺基與NHS-酯顯著反應。在NHS-酯交聯劑與一級胺反應時形成共價醯胺鍵，從而釋放N-羥基丁二醯亞胺羥基丁二醯亞胺。

【0132】 其他適合技術可用以使 R^2 連接至L。舉例而言，碳二醯亞胺可用以使羧基與一級胺或醯肼偶合，從而使得形成醯胺或脲鍵。碳二醯亞胺與其他偶合劑之不同之處在於，在偶合之碳化二亞胺與分子之間不形成交叉橋鍵；相反地，在可獲得的羧基與可獲得的胺基之間形成肽鍵。視可獲得性而定，可靶向蛋白質之羧基末端，以及麩胺酸及天冬胺酸側鏈。在另一實施例中，在氰基硼氫化鈉存在下使用醛還原烷基化可用以使 R^2 連接至L。

【0133】 在一些具體實例中， R^2 可經由酶介導之標記連接至L。適合穩酶包括（但不限於）分選酶及轉麩醯胺酸酶。分選酶可影響蛋白質之位點特異性N端標記（Theile等人, 2013）。轉麩醯胺酸酶影響麩醯胺酸特異性殘基之位點特異性標記（Oteng-Pabi等人, 2014）。舉例而言，對於分選酶介導之N端標記， R^2 包含有包含具有序列LPXTZ之肽的偶合基團，其中X為任何胺基酸且Z為甘胺酸或丙胺酸（SEQ ID NO: 31）。

【0134】 其他技術包括（但不限於）天然化學連接、狄爾斯-阿德試劑對（Diels-Alder reagent pairs）、肼-醛試劑對、胺氧基-醛試劑對、點擊化學及施陶丁格連接（Staudinger ligation）。此等技術更詳細地描述於Greg T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques* (第三版), Academic Press (2013)中。

【0135】 儘管偶合基團在本文中已根據官能基特異性定義，但熟習此項技術者將意識到，此等偶合基團具有與除預期官能基外之官能基反應之可能。舉例而言，儘管N-羥基丁二醯亞胺酯在本文中定義為胺特異性偶合基團，但其亦可與半胱胺酸、組胺酸、絲胺酸、蘇胺酸及酪胺酸側鏈基團反應。類似地，儘管順丁烯二醯亞胺在本文中定義為半胱胺酸特異性親電子體，但其亦可在適當條件下與胺反應。

生物發光蛋白質（ R^1 ）

【0136】 生物發光為一種化學發光形式。化學發光為熱量發射限制之能量發射（發光），作為化學反應之結果。當能量由以化學方式誘發之有機染料之激發態衰減至基態時，發生化學發光發射。化學發光發射之持續時間及強度主要視反應溶液中化學試劑之存在程度而定。非酶促化學發光為催化劑存在下有機染料與氧化劑之間的化學反應之結果。生物發光視通常稱為生物發光蛋白質之酶之活性而定。如本文所用，術語「生物發光蛋白質（bioluminescent

protein) 」指能夠作用於適合受質以產生發光之任何蛋白。

【0137】 在此項技術中應瞭解，生物發光蛋白質為使受質轉化為活化產物之酶，該活化產物接著在其弛豫時釋放能量。活化產物（受質上由生物發光蛋白質之活性產生）為轉移至受體分子中之生物發光蛋白質產生之發光的來源。

【0138】 例示性生物發光蛋白質描述於下文中（參見例如表2）。發光系統已知且已自許多發光生物體分離，該等發光生物體包括細菌、原生動物、腔腸動物、軟體動物、魚、馬陸、蒼蠅、真菌、蠕蟲、甲殼動物及甲蟲，尤其螢叩甲屬（genus *Pyrophorus*）之叩頭蟲及條背螢屬（*Photinus*）、女巫螢屬（*Photuris*）及熠螢屬（*Luciola*）之螢火蟲。展示生物發光之另外生物體列舉於WO 00/024878、WO 99/049019及Viviani (2002)中。

【0139】 在本發明之感應器中，R¹可為任何適合生物發光蛋白質。一個極熟知實例為稱為螢光素酶之蛋白質類別，其催化產生能量之化學反應，其中特異性生物化學物質，一種蟲螢光素（天然產生之螢光團）經具有螢光素酶活性之酶氧化(Hastings, 1996)。多種多樣生物體，即原核與真核生物體，包括細菌、海藻、真菌、昆蟲、魚及其他海洋形式之物種，可以此方式發射光能，且各具有化學上不同於其他生物體之特異性螢光素酶活性及蟲螢光素。蟲螢光素/螢光素酶系統之形式、化學物質及功能極不同。具有螢光素酶活性之生物發光蛋白質因此獲自多種來源或藉由多種手段獲得。具有螢光素酶活性之生物發光蛋白質之實例可見於US 5,229,285、5,219,737、5,843,746、5,196,524及5,670,356中。兩種最廣泛使用之螢光素酶為：(i) 海腎螢光素酶（來自海洋海腎（*R. reniformis*）），一種35 kDa蛋白質，其使用腔腸素作為受質且在480 nm發光（Lorenz等人, 1991）；及(ii) 螢火蟲螢光素酶（來自條背螢（*Photinuspyralis*）），一種61 kDa蛋白質，其使用蟲螢光素作為受質且在560

nm發光（de Wet等人, 1987）。

【0140】 將長腹水蚤螢光素酶（來自海洋橈腳類動物（*Gaussia princeps*））用於生物化學分析中（Verhaegen等人, 2002）。長腹水蚤螢光素酶為20 kDa蛋白質，其以快速反應氧化腔腸素從而在470 nm產生亮光發射。

【0141】 適用於本發明之螢光素酶亦自蕈蚊屬（*Anachnocampa sp*）表徵（WO 2007/019634）。此等酶類之大小約59 kDa且為催化發射光譜在光譜之藍色部分內之發光反應之ATP依賴性螢光素酶。

【0142】 天然產生之生物發光蛋白質之生物學活性變異體或片段可容易藉由熟習此項技術者產生。適用於本發明之此類變異體之三個實例為RLuc2（Loening等人, 2006）、RLuc8（Loening等人, 2006）及RLuc8.6-535（Loening等人, 2007），其各為海腎螢光素酶之變異體。相對於RLuc，RLuc8含有突變A55T、C124A、S130A、K136R、A143M、M185V、M253L及S287L。相對於RLuc，RLuc2含有突變M185V及Q235A。另一實例為NanoLuc™（Hall等人, 2012）。在另一較佳具體實例中，BRET化學發光供體之序列經選擇以具有比併入有天然海腎螢光素酶感應器之感應器分子更大的熱穩定性。RLuc2或RLuc8為適合選擇之適宜實例，因此其展現比併入有天然海腎螢光素酶序列之感應器高 ≥ 5 倍或 ≥ 10 倍之亮度。此類增強之亮度因為其允許將試劑更經濟地用於任何既定時間解析度而具有顯著益處。生物發光蛋白質之非限制性實例提供於表2中。

表2：例示性生物發光蛋白質。

物種	名稱	生物體	MW kDa × 10 ⁻³	發射 (nm)	受質之實例
昆蟲	FFluc	海腎 (北美螢光蟲)	約 61	560	D-(-)-2-(6'-羥基苯并噻唑基)-D ² -噻唑啉-4-甲酸，HBTCA (C ₁₁ H ₈ N ₂ O ₃ S ₂) (蟲螢光素)
昆蟲	FF'luc	源氏螢火蟲 (<i>Luciola cruciata</i>) (日本螢火蟲)		560-590 (許多突變體)	蟲螢光素
昆蟲		光熒甲蟲 (Phengodid beetle) (軌道蠕蟲)			
昆蟲		蕈蚊屬			蟲螢光素
昆蟲		雪白奧菲利亞蟲 (<i>Orphelia fultoni</i>) (北美螢光蟲)			
昆蟲	Cluc	牙買加螢叩甲 (<i>Pyrophorus plagiophthalmus</i>) (叩頭蟲)		546、 560、 578 及 593	蟲螢光素
水母	發光蛋白質	多管水母 (<i>Aequorea</i>)	44.9	460-470	腔腸素
海腎	RLuc	海洋海腎	36	480	腔腸素
海腎 (經修飾)	RLuc8	海洋海腎 (經修飾)	36	487 (峰值)	腔腸素/深藍 C
海腎 (經修飾)	RLuc2	海洋海腎 (經修飾 M185V/Q235A)	36	480	腔腸素
海腎 (經修飾)	RLuc8.6-535	海洋海腎 (經修飾)	36	535	腔腸素
海腎	Rmluc	馬勒海腎 (<i>Renilla mullerei</i>)	36.1	約 480	腔腸素
海腎		硬皮海腎 (<i>Renilla kollikeri</i>)			
甲殼動物 (蝦)	Vluc	希氏彎喉海螢 (<i>Vargula hilgendorffii</i>)	約 62	約 460	腔腸素
甲殼動物	CLuc	海螢 (<i>Cypridina</i>) (海螢火蟲)	75	465	腔腸素/海螢 蟲螢光素
腰鞭毛蟲 (Dinofagellate) (海)		多邊膝溝藻 (<i>Gonyaulax polyedra</i>)	130	約 475	四吡咯

洋藻)					
軟體動物		澳洲瓢蟲 (<i>Latia</i>) (淡水帽貝)	170	500	甲酸烯醇、砒、醛
水螅蟲		藪枝螅 (<i>Obelia biscuspidata</i>)	約 20	約 470	腔腸素
蝦		刺蝦 (<i>Oplophorus gracilorostris</i>)	31	462	腔腸素
蝦		刺蝦 (NanoLuc)	19	約 460	福 瑪 津 (Furimazine)
其他	Ptluc	海筆 (<i>Ptilosarcus</i>)		約 490	腔腸素
	Gluc	長腹水蚤 (<i>Gaussia</i>)	約 20	約 475	腔腸素
	Plluc	乳 點 水 蚤 (<i>Pleuromamma</i>)	22.6	約 475	腔腸素

【0143】 或者，可用於本發明中之非螢光素酶生物發光蛋白質為可對適合的基材起作用以產生發光信號之任何酶。此類酶之特定實例為 β -半乳糖苷酶、內醯胺酶、辣根過氧化酶、鹼性磷酸酶、 β -葡萄糖醛酸酶及 β -葡糖苷酶。用於此等酶之合成發光受質在此項技術中已熟知且可購自諸如Tropix公司 (Bedford, MA, USA) 之公司。

【0144】 適用於本發明之過氧化酶之實例藉由Hushpulier等人 (2007) 描述。

【0145】 在一些具體實例中， R^1 可包括 (但不限於) 螢光素酶、 β -半乳糖苷酶、內醯胺酶、辣根過氧化酶、鹼性磷酸酶、 β -葡萄糖醛酸酶及 β -葡糖苷酶或其生物學活性片段或變異體。

【0146】 在較佳具體實例中，生物發光蛋白質為螢光素酶。在一些具體實例中， R^1 為選自由以下組成之群的螢光素酶：海腎螢光素酶、螢火蟲螢光素酶、腔腸動物螢光素酶、北美螢光蟲螢光素酶、叩頭蟲螢光素酶、軌道蠕蟲螢光素酶、細菌螢光素酶、長腹水蚤螢光素酶、水母發光蛋白、蕈蚊螢光素酶或其等之任一者之生物學活性變異體或片段、或兩者或更多者之嵌合體。在一些具體實例中， R^1 包含RLuc (SEQ ID NO: 49) 或其生物學活性片段或變異體。在一些具體實例中， R^1 包含RLuc8 (SEQ ID NO: 50) 或其生物學活性片段或變

異體。在一些具體實例中，R¹包含RLuc2 (SEQ ID NO: 51) 或其生物學活性片段或變異體。在一些具體實例中，R¹具有與SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 50及SEQ ID NO: 51中之任何一或多者中提供之序列至少30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列。在一些具體實例中，R¹具有與SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3；SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 32及SEQ ID NO: 33中之任何一或多者中提供之序列至少30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列。

【0147】 如本文所用，「生物學活性片段 (biologically active fragment)」為如本文所述之多肽之維持全長多肽之所定義活性之一部分。舉例而言，在全長多肽為生物發光蛋白質之具體實例中，「生物學活性片段」維持至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%之全長生物發光蛋白質之活性，其中活性為多肽將受質轉化為活化產物之能力之量度，該活化產物接著在其弛豫時釋放能量。

【0148】 生物學活性片段與天然產生及/或所定義之多肽通常至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%一致。如本文所用，「生物學活性變異體 (biologically active variant)」為如本文所述之多肽之維持天然多肽之所定義活性之一部分。生物學活性變異體與天然產生及/或所定義之多肽通常至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少

75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%一致。如本文所用，「生物學活性變異體」包括融合蛋白。融合蛋白包含融合至蛋白質、多肽或肽之生物發光蛋白質（或其片段或變異體）。蛋白質、多肽或肽可為標籤，例如溶解度標籤或純化標籤。融合蛋白可視情況包含允許自蛋白質、多肽或肽裂解生物發光蛋白質（或其片段或變異體）之胺基酸序列。

【0149】 在一些具體實例中，R¹為生物發光蛋白質之生物學活性變異體，其在與對應天然產生之蛋白質相比時少包含至少一個半胱胺酸殘基。舉例而言，生物學活性變異體與對應天然產生之蛋白質相比時可少包含至少一個半胱胺酸殘基、少至少兩個半胱胺酸殘基或少至少三個半胱胺酸殘基。半胱胺酸殘基可經天然或非天然產生之胺基酸置換。在一些具體實例中，半胱胺酸經絲胺酸、纈胺酸、丙胺酸、蘇胺酸或硒半胱胺酸置換。在一些具體實例中，變異型生物發光蛋白質在與RLuc（SEQ ID NO: 49）之胺基酸位置24對應之位置、在與胺基酸位置73對應之位置或在與胺基酸位置124對應之位置缺乏半胱胺酸殘基。在一些具體實例中，變異型生物發光蛋白質在與RLuc（SEQ ID NO: 49）之胺基酸位置24及73對應之位置、在與胺基酸位置24及124對應之位置或在與對應之位置缺乏半胱胺酸殘基胺基酸位置73及124。在一些具體實例中，變異型生物發光蛋白質在與RLuc（SEQ ID NO: 49）之胺基酸位置24、73及124對應之位置缺乏半胱胺酸殘基。在一些具體實例中，變異型生物發光蛋白質在與RLuc8（SEQ ID NO: 50）之胺基酸位置24對應之位置缺乏半胱胺酸殘基。在一些具體實例中，變異型生物發光蛋白質在與RLuc8（SEQ ID NO: 50）之胺基酸位置73對應之位置缺乏半胱胺酸殘基。在一些具體實例中，變異型生物發光蛋白質在與RLuc8之胺基酸位置24及73對應之位置缺乏半胱胺酸殘基。在一些具體實例中，變異型生物發光蛋白質包含選自由以下組成之群的多肽序列：SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9及SEQ ID NO: 10。如本文所用，片語「在與胺基

酸位置對應之位置」或其變化形式指該胺基酸與周圍胺基酸相比之相對位置。就此而言在一些具體實例中，本發明之多肽可具有缺失型或取代型突變，其在相對於例如SEQ ID NO: 49比對時改變胺基酸之相對定位。

【0150】 在一些具體實例中， R^1 為生物發光蛋白質之生物學活性變異體，其在對應天然產生之蛋白質在相同序列位置不包含半胱胺酸殘基時包含至少一個半胱胺酸殘基。在一些具體實例中， R^1 為生物發光蛋白質之生物學活性變異體，其在對應天然產生之蛋白質不包含暴露之半胱胺酸殘基時包含至少一個暴露之半胱胺酸殘基。如本文所用，「暴露之半胱胺酸 (exposed cysteine)」為接近於或位於蛋白質之表面上以使得半胱胺酸之側鏈可用於與L或 R^2 反應以形成本文所述之感應器分子的半胱胺酸。經由胺基酸變化為半胱胺酸或經由提供暴露之半胱胺酸殘基獲得之經突變半胱胺酸殘基可充當或形成本文中所定義之感應器中之連接元件之一部分。舉例而言，經突變半胱胺酸之側鏈可與 R^2 中之硫醇反應性基團反應以形成如本文所定義之感應器。在一些具體實例中， R^1 為包含至少一個半胱胺酸殘基之生物發光蛋白質之生物學活性變異體，當對應天然產生之蛋白質在相同序列位置不包含半胱胺酸殘基時，及少包含至少一個半胱胺酸殘基之生物發光蛋白質之生物學活性變異體，當對應天然產生之蛋白質在相同序列位置包含半胱胺酸殘基時。

【0151】 在一較佳具體實例中，使用具有小分子量之生物發光蛋白質以防止或減小歸因於位阻之對水解酶與感應器之間的相互作用之抑制。生物發光蛋白質較佳包含單個多肽鏈。生物發光蛋白質較佳亦不形成寡聚物或聚集體。生物發光蛋白質海腎螢光素酶、長腹水蚤螢光素酶及螢火蟲螢光素酶滿足所有或大多數此等準則。

【0152】 在一些具體實例中，生物發光蛋白質能夠修飾受質。如本文所用，術語「受質 (substrate)」指可與化學發光供體結合使用以產生或吸收發

光之任何分子。受質之選擇可影響由化學發光供體產生之光之波長及強度。在一些具體實例中，生物發光蛋白質具有選自以下之受質：蟲螢光素、鈣、腔腸素、腔腸素之衍生物或類似物或蟲螢光素之衍生物或類似物。在較佳具體實例中，受質為蟲螢光素、鈣、腔腸素或腔腸素之衍生物或類似物。

【0153】 腔腸素為廣泛已知之受質，其出現於刺胞動物、橈足動物、毛顎動物、櫛水母、十足蝦、觀星蝦、散線蟲類動物及一些魚分類中（Greer及Szalay, 2002）。對於海腎螢光素酶，例如可使用產生418與547 nm之間的光發射之腔腸素類似物/衍生物（Inouye等人, 1997，Loening等人, 2007）。已描述腔腸素類似物/衍生物（400A，深藍C）用海腎螢光素酶來發射400 nm之光（WO 01/46691）。腔腸素類似物/衍生物之其他實例為EnduRen、普拉姆紫（Prolume purple）、普拉姆紫II、普拉姆紫III、ViviRen及福瑪津。腔腸素類似物/衍生物之其他實例包括（但不限於）WO/2014/036482及US20140302539中所揭示之化合物。

【0154】 如本文所用，術語「蟲螢光素（luciferin）」廣義定義且指一類見於能夠生物發光之生物體中之發光生物學顏料以及合成類似物或功能等效化學物質，其在螢光素酶存在下氧化以產生氧化蟲螢光素及呈光形式之能量。首先自條背螢分離D-蟲螢光素或2-(6-羥基苯并噻唑基-2-基)-2-噻唑啉-4-甲酸。此後，各種化學形式不同之蟲螢光素已自各種不同生物體，主要自海洋（例如魚及魷魚）發現並研究，然而，許多已確認在陸生生物體中，例如蠕蟲、甲蟲及各種其他昆蟲（Day等人, 2004；Viviani, 2002）。如本文所用，蟲螢光素亦包括蟲螢光素之衍生物或類似物。

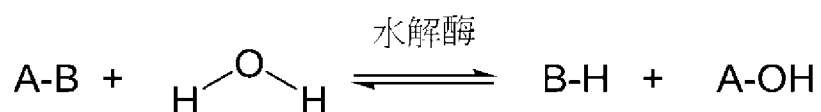
【0155】 除諸如環狀烷胺基蟲螢光素（CycLuc1）之整個合成蟲螢光素以外，存在至少五種通用類型之生物學演變之蟲螢光素，其各自在化學上不同且藉由採用各種不同輔因子之化學上及結構上不同之螢光素酶催化。首先為螢

火蟲蟲螢光素，螢火蟲螢光素酶之受質，其需要用於催化之ATP（EC 1.13.12.7）。其次為亦見於一些魷魚及魚中之細菌蟲螢光素，其由長鏈醛及還原之核黃素磷酸酯組成。細菌螢光素酶具FMNH-依賴性。第三為甲藻蟲螢光素，一種見於甲藻中之四吡咯葉綠素衍生物（海洋浮游生物），負責夜間海洋磷光之生物體。甲藻螢光素酶催化甲藻蟲螢光素之氧化且由三個相同及催化活性之域組成。第四為咪唑并吡啞海螢螢光素，其見於某些介形蟲及深海魚（例如光蟾魚（*Porichthys*））中。最後為腔腸素（咪唑吡啞），水母發光蛋白質之發光器，見於散線蟲類動物、櫛水母、刺胞動物、魷魚、橈足動物、毛顎動物、魚及蝦中。

【0156】 在一些具體實例中，生物發光蛋白質需要輔助因子。輔助因子之實例包括（但不一定限於）ATP、鎂、氧、FMNH₂、鈣或其任何兩者或更多者之組合。

水解酶

【0157】 水解酶為催化水解反應之酶。水解為藉由添加水使化學鍵裂解。將氫添加至斷裂化學鍵之一側且將羥基添加至斷裂化學鍵之另一側。舉例而言：



如本文所用，術語「水解酶」指能夠催化水解反應之任何蛋白質。水解酶歸類為酶之EC編號（酶委員會編號）等級中之EC 3。其可基於其水解之化學鍵進一步歸類為子類。在一些具體實例中，水解酶可為EC編號選自以下由EC 3.1；EC 3.2；EC 3.3；EC 3.4；EC 3.5；EC 3.6；EC 3.7；EC 3.8；EC 3.9；EC 3.10；EC 3.11及EC 3.13組成之群的多肽或前述中任一者之片段或變異體。

【0158】 藉由以上EC編號所界定之多肽之詳述如具有增刊1（1993）、
第 46 頁，共 82 頁(發明說明書)

增刊2 (1994)、增刊3 (1995)、增刊4 (1997) 及增刊5 (分別在Tipton 1994; Barrett 1995; Barrett 1995; Barrett 1997及命名委員會1999中) 之酶命名法1992 [Academic Press, San Diego, California, ISBN 0-12227164-5 (精裝), 0-12-227165-3 (平裝)] 中所述。詳述亦尤其獲自國際生物化學及分子生物學聯盟之命名委員會 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/>) 及ExPASy (<http://enzyme.expasy.org/EC/3.-.->)。

【0159】 相關多肽之胺基酸序列可容易藉由熟習此項技術者獲得。舉例而言，序列可經由ExPASy <http://enzyme.expasy.org/EC/3.-.->獲得。

【0160】 例示性水解酶包括 (但不限於) 對酯鍵起作用之水解酶、對醚鍵起作用之水解酶、對肽鍵起作用之水解酶、對除肽鍵外之碳-氮鍵起作用之水解酶、對酸酐起作用之水解酶、對碳-碳鍵起作用之水解酶、對鹵鍵起作用之水解酶、對磷-氮鍵起作用之水解酶、對硫-氮鍵起作用之水解酶、對碳-磷鍵起作用之水解酶、對碳-硫鍵起作用之水解酶、對硫-硫鍵起作用之水解酶及糖基化酶。在一些實施例中，對酯鍵起作用之水解酶包括羧酸酯酶、芳基酯酶、乙醯基酯酶、乙醯膽鹼酯酶、膽鹼酯酶、硫酸酯酶 (諸如乙醯基-CoA水解酶、麩胱甘肽巯醇酯酶)、磷酸酶 (鹼性磷酸酶)、硫酸酯水解酶及脂肪酶。在一些實施例中，對肽鍵起作用之水解酶包括絲胺酸及半胱胺酸蛋白酶、羧基及胺基肽酶、金屬肽酶、二肽酶、二肽基-肽酶及三肽基-肽酶。在一些實施例中，對除肽鍵外之碳-氮鍵起作用之水解酶包括靶向線性醯胺或環狀醯胺之醯胺酶。在一些具體實例中，水解酶為 β -內醯胺酶。在一些實施例中，水解酶為醣苷酶，諸如 α -醣苷酶或 β -醣苷酶。醣苷酶水解N-、O-及S-糖基化合物且包括 (但不限於) 澱粉酶、麥芽糖酶、蔗糖酶、乳糖酶及半乳糖苷酶。在一些實施例中，水解酶為核苷水解酶，諸如嘌呤核苷酶或嘧啶核苷酶。在一些實施例中，水解酶為核苷酸水解酶，諸如GTP酶。在一些實施例中，水解酶為核酸外切酶、核酸

內切酶或DNA糖基化酶。在一些實施例中，水解酶為脫烷基酶。在一些實施例中，水解酶為脫鹵素酶。

【0161】 在一些具體實例中，水解酶選自由以下組成之群：膽鹼酯酶、酯酶、脂肪酶、蛋白酶、磷酸酶、核酸酶、糖苷酶、DNA糖基化酶及酸酐水解酶。在一些實施例中，水解酶選自由以下組成之群：膽鹼酯酶、脂肪酶、蛋白酶及磷酸酶。在一些具體實例中，水解酶為酯酶。適合水解酶之一個實例為豬肝臟酯酶。在一些具體實例中，水解酶為磷酸酶。

R^1 及 R^2

【0162】 許多 R^1 及 R^2 組合可用於本發明之感應器中。熟習此項技術者將能夠選擇允許有效能量轉移之 R^1 及 R^2 對。在較佳具體實例中， R^1 及 R^2 之間隔及相對方向在距離福斯特距離之 $\pm 50\%$ 內。如本文所用，術語「 R^1 及 R^2 之間隔及相對方向在福斯特距離之 $\pm 50\%$ 內」指可在 R_0 之 $\pm 50\%$ 範圍內進行之穩定態RET量測（Förster 1948；Förster 1960）。此片語涵蓋10-90%範圍內之由化學發光供體域至受體域之發光能量轉移效率。在一些具體實例中，化學發光供體域及受體域之福斯特距離為至少4 nm，為至少4.5 nm，為至少5.0 nm，為至少5.6 nm或為至少6 nm。在一些具體實例中，化學發光供體域及受體域之福斯特距離在約4 nm與約10 nm之間，在約4.5 nm與約10 nm之間，在約5.0 nm與約10 nm之間，在約5.6 nm與約10 nm之間或在約6 nm與約10 nm之間。

【0163】 測定適合對中應考慮之準則為受體分子（ R^2 ）與生物發光蛋白質（ R^1 ）相比之相對發射/螢光光譜。在一些具體實例中，生物發光蛋白質之發射光譜應與受體分子之吸收光譜重疊以使得來自供體光發射之光能之波長在兩個分子相對於彼此呈適當接近度及取向時能夠激發受體分子且因此促進受體分子螢光。為研究可能的成對，製備含有所選生物發光蛋白質及受體域而無封端

基團B之融合物（舉例而言）且進行測試（參見實施例）。

【0164】 亦應證實供體及受體分子不會彼此虛假締合。

【0165】 供體發射可藉由對受質進行修飾來操作。在海腎螢光素酶之情況下，受質為腔腸素。改變供體發射背後之基本原理為改良供體發射與受體發射之間的解析度。原始BRET系統使用海腎螢光素酶作為供體，使用EYFP（或Topaz）作為受體且使用腔腸素h衍生物作為受質。此等組分在BRET分析中組合時生物發光蛋白質產生475-480 nm範圍之光且受體分子產生525-530 nm範圍之光，從而得到45-55 nm之光譜解析度。

【0166】 海腎螢光素酶產生大體上重疊GFP發射之寬發射峰，其又有助於減小系統之信噪比。一個用於本發明之BRET系統具有coel400a作為海腎螢光素酶受質且在供體與受體發射波長之間提供寬光譜解析度（約105 nm）。

【0167】 各種腔腸素衍生物在此項技術中已知，包括coel400a，從而由於海腎螢光素酶活性而產生各種波長之光（不同於由野生型腔腸素產生之光）。熟習此項技術者將瞭解，因為供體之光發射峰已改變，所以需要選擇吸收此波長之光的受體分子，且因此允許有效能量轉移。供體之光發射與受體之光吸收峰之間的光譜重疊為一種尤其用於有效能量轉移之條件。

【0168】 其他生物發光蛋白質及受體分子對之實例提供於表3中。

表3：例示性BRET生物發光蛋白質 (R¹) 及受體分子 (R²) 對。

生物發光蛋白質 (R ¹)	受質	受質波長 (峰值)	受體分子 (R ²)	受體波長 (Ex/Em)
RLuc2 RLuc8	天然腔腸素	470 nm	螢光素	495/519 nm
RLuc2 RLuc8	天然腔腸素	470 nm	吡啶黃	470/550 nm
RLuc2 RLuc8	天然腔腸素	470 nm	尼羅紅 (Nile red)	485/525 nm
RLuc2 RLuc8	天然腔腸素	470 nm	紅 613	480/613 nm
RLuc2 RLuc8	天然腔腸素	470 nm	TruRed	490/695 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	腔腸素 <i>h</i>	470 nm	螢光素	490/525nm
RLuc RLuc2 RLuc8	腔腸素 <i>h</i>	470 nm	吡啶黃	470/550 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	腔腸素 <i>h</i>	470 nm	尼羅紅	485/525 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	腔腸素 <i>h</i>	470 nm	紅 613	480/613 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	腔腸素 <i>h</i>	470 nm	TruRed	490/695 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	腔腸素 400a	400 nm	Quin-2	365/490 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	腔腸素 400a	400 nm	太平洋藍	403/551 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	腔腸素 400	400 nm	丹磺醯氯	380/475 nm
Firefly luciferase	蟲螢光素	560 nm	花青 Cy3	575/605 nm
Firefly luciferase	蟲螢光素	560 nm	德克薩斯紅	590/615 nm
FFLuc PpyRE8 PpyRE10	蟲螢光素	560 nm	AF680	679/702 nm
FFLuc PpyRE8 PpyRE10	蟲螢光素	560 nm	AF750	749/775 nm
NanoLuc	福瑪津	460 nm	螢光素	495/519 nm

NanoLuc	福瑪津	460 nm	吡啶黃	470/550 nm
NanoLuc	福瑪津	460 nm	尼羅紅	485/525 nm
NanoLuc	福瑪津	460 nm	紅 613	480/613 nm
NanoLuc	福瑪津	460 nm	TruRed	490/695 nm
NanoLuc	福瑪津	460 nm	俄勒岡綠	496/516 nm
NanoLuc	福瑪津	460 nm	diAcFAM	494/526 nm
NanoLuc	福瑪津	460 nm	阿萊克薩螢光 488	494/517 nm
NanoLuc	福瑪津	460 nm	TMR	555/585 nm
NanoLuc	福瑪津	460 nm	Halotag NCT	595/635 nm
NanoLuc	福瑪津	460 nm	HalotagBRET 618	525/618 nm
NanoLuc	天然腔腸素	460 nm	螢光素	495/519 nm
NanoLuc	天然腔腸素	460 nm	吡啶黃	470/550 nm
NanoLuc	天然腔腸素	460 nm	尼羅紅	485/525 nm
NanoLuc	天然腔腸素	460 nm	紅 613	480/613 nm
NanoLuc	天然腔腸素	460 nm	TruRed	490/695 nm
NanoLuc	天然腔腸素	460 nm	俄勒岡綠	496/516 nm
NanoLuc	天然腔腸素	460 nm	diAcFAM	494/526 nm
NanoLuc	天然腔腸素	460 nm	阿萊克薩螢光 488	494/517 nm
NanoLuc	天然腔腸素	460 nm	TMR	555/585 nm
NanoLuc	天然腔腸素	460 nm	Halotag NCT	595/635 nm
NanoLuc	天然腔腸素	460 nm	HalotagBRET 618	525/618 nm
NanoLuc	腔腸素 <i>h</i>	460 nm	螢光素	495/519 nm
NanoLuc	腔腸素 <i>h</i>	460 nm	吡啶黃	470/550 nm
NanoLuc	腔腸素 <i>h</i>	460 nm	尼羅紅	485/525 nm
NanoLuc	腔腸素 <i>h</i>	460 nm	紅 613	480/613 nm
NanoLuc	腔腸素 <i>h</i>	460 nm	TruRed	490/695 nm
NanoLuc	腔腸素 <i>h</i>	460 nm	俄勒岡綠	496/516 nm
NanoLuc	腔腸素 <i>h</i>	460 nm	diAcFAM	494/526 nm
NanoLuc	腔腸素 <i>h</i>	460 nm	阿萊克薩螢光 488	494/517 nm
NanoLuc	腔腸素 <i>h</i>	460 nm	TMR	555/585 nm
NanoLuc	腔腸素 <i>h</i>	460 nm	Halotag NCT	595/635 nm
NanoLuc	腔腸素 <i>h</i>	460 nm	HalotagBRET 618	525/618 nm
RLuc	普拉姆紫受質	405 nm	Quin-2	365/490 nm

RLuc2 RLuc8				
RLuc RLuc2 RLuc8	普拉姆紫受質	405 nm	太平洋藍	403/551 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	普拉姆紫受質	405 nm	丹磺醯氯	380/475 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	普拉姆紫受質 II	400 nm	Quin-2	365/490 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	普拉姆紫受質 II	400 nm	太平洋藍	403/551 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	普拉姆紫受質 II	400 nm	丹磺醯氯	380/475 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	普拉姆紫受質 III	410 nm	Quin-2	365/490 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	普拉姆紫受質 III	410 nm	太平洋藍	403/551 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	普拉姆紫受質 III	410 nm	丹磺醯氯	380/475 nm

生物發光共振能量轉移 (BRET)

【0169】 如本文所用，「BRET」或「生物發光共振能量轉移 (bioluminescent resonance energy transfer)」為生物發光蛋白質供體與受體分子之間基於能量之非放射性轉移之接近度分析。「生物發光共振能量轉移」及「BRET」可互換使用。

【0170】 藉由水解酶裂解本文所述之感應器之可水解鍵產生BRET比率變化。生物發光蛋白質與受體分子之間發生之能量轉移呈現為計算比率，使用選擇特定波長之濾光器（一個用於受體分子發射且另一個用於生物發光蛋白質發射）量測之發射（參見等式1）。

$$E_a/E_d = \text{BRET比率} \quad (1)$$

其中 E_a 定義為受體分子發射強度（使用適用於受體發射之特定濾光器選擇發射

光)且 E_d 定義為生物發光蛋白質發射強度(使用適用於生物發光蛋白質發射之特定濾光器選擇發射光)。

【0171】 熟習此項技術者應容易理解，濾光器可為鑑別適用於BRET之波長的任何類型之濾波器。舉例而言，根據本發明使用之濾光器可為干涉濾波器、長通濾波器、短通濾波器等。傳遞通過濾波器之波長之強度(通常以每秒之計數(CPS)或相對發光單元(RLU)計)可使用固態微型光電倍增器(micro-photomultiplier, 微型-PMT)、光電倍增管(photo-multiplier tube, PMT)、光電二極體(包括喀斯開光電二極體)、光電二極體陣列或敏感照相機(諸如電荷耦合裝置(charge coupled device, CCD)相機)定量。隨後使用量化之信號計算BRET比率且表示能量轉移效率。BRET比率隨受體發射之強度增加而增加。

【0172】 一般而言，測定受體發射強度相對於供體發射強度之比率(參見等式1)，其為以反映能量轉移效率之任意單位表示之數值。該比率隨能量轉移效率之增加而增加(參見Xu等人, 1999)。

【0173】 能量轉移效率亦可使用供體發射強度相對於受體發射強度之反向比率表示(參見等式2)。在此情況下，比率隨能量轉移效率之增加而減小。在執行此計算之前，針對受質之本底光及自動發光之存在校正發射強度。此校正一般藉由自含有受質但無本發明之生物發光蛋白質、受體分子、感應器或多肽之對照樣品減去在適當波長下量測之發射強度來進行。

$$E_d/E_a = \text{BRET比率} \quad (2)$$

其中 E_a 及 E_d 如上文所定義。

【0174】 生物發光蛋白質及受體分子發射之光強度亦可使用諸如分光螢光計、電荷耦合裝置(CCD)照相機或二極體陣列偵測器之基於單色器之儀器來定量。使用分光螢光計，執行發射掃描以使得在添加受質後偵測生物發光蛋

白質與受體分子發射峰。峰下面積或 λ_{\max} 下或藉由相對於最大強度之任何任意強度百分比所定義之波長下之強度可用以表示相對光強度，且可用以計算比率，如上文所概述。任何能夠量測來自相同樣品之生物發光蛋白質及受體分子之光之儀器均可用以監測本發明之BRET系統。

【0175】 在一替代具體實例中，單獨受體分子發射即適用於BRET之有效偵測及/或定量。在此情況下，能量轉移效率僅使用受體發射強度表示。熟習此項技術者將顯而易見，為量測能量轉移，吾人可在不進行任何比率計算下使用受體發射強度。此情況是由於理想地受體分子僅當其吸收自生物發光蛋白質轉移之光時才發射光。在此情況下，僅需要一個濾光器。

【0176】 在相關具體實例中，單獨生物發光蛋白質發射即適用於BRET之有效偵測及/或定量。在此情況下，能量轉移效率僅使用生物發光蛋白質發射強度來計算。熟習此項技術者將顯而易見，為量測能量轉移，吾人可在不進行任何比率計算下使用供體發射強度。此情況是由於當受體分子吸收自生物發光蛋白質轉移之光時，可偵測發射自生物發光蛋白質對應減小。在此情況下，僅需要一個濾光器。

【0177】 在一替代具體實例中，能量轉移效率使用僅需要一個用於量測之濾光器之比率量測來表示。在此情況下，供體或受體之光強度使用適當濾光器測定且樣品之另一量測在不使用任何濾波器下進行（開放光譜之強度）。在此後一量測中，定量總光輸出（對於所有波長）。接著使用等式3或4進行比率計算。對於等式3，僅需要用於受體之濾光器。對於等式4，僅需要用於供體之濾光器。

$$E_a/E_o - E_a = \text{BRET比率或} = E_o - E_a/E_a \quad (3)$$

$$E_o - E_d/E_d = \text{BRET比率或} = E_d/E_o - E_d \quad (4)$$

其中 E_a 及 E_d 如上文所定義且 E_o 定義為組合之所有波長的發射強度（開放光

譜)。

【0178】 熟習此項技術者應顯而易見，其他方程可自方程1至4導出。舉例而言，一種此類推導涉及針對在生物發光蛋白質及/或受體分子之發射波長下存在之本底光進行校正。

【0179】 在執行BRET分析中，可自各孔使用BRETCount測定光發射。BRETCount儀器為改良之TopCount，其中TopCount為Packard Instrument (Meriden, CT) 出售之微量滴定盤閃爍及發光計數器。不同於利用兩個重合光電倍增管 (photomultiplier tube, PMT) 以消除本底雜訊之經典計數器，TopCount採用單個PMT技術及用於減小雜訊之時差式脈衝計數來在標準不透明微量滴定盤中計數。使用不透明微量滴定盤可將光學串擾減至可忽略的水準。TopCount以多種形式出現，包括分別同時讀取1、2、6及12種樣品之1、2、6及12個偵測器 (PMT)。除BRETCount之外，其他市售儀器能夠執行BRET：Victor 2 (Wallac, Finland (Perkin Elmer Life Sciences)) 及 Fusion (Packard Instrument, Meriden)。BRET可使用可偵測至少受體分子發射及較佳兩個波長 (對於受體分子及生物發光蛋白質) 或更多個波長之讀取器來進行。

【0180】 如熟習此項技術者所瞭解，BRET需要感應器包含化學發光供體域 (在此情況下為生物發光蛋白質) 及受體域。在一些具體實例中，當可水解鍵藉由水解酶裂解時化學發光供體域相對於受體域之空間位置及/或偶極取向發生改變從而產生BRET比率變化。如本文所用，術語「空間位置 (spatial location)」指供體相對於受體分子之三維定位，其由於蛋白酶裂解感應器分子而變化，以使得供體域不再經由目標序列連接至受體域。如本文所用，術語「偶極取向 (dipole orientation)」指與供體及/或受體分子相關且相對其在三維空間中之取向的偶極矩之三維空間中之方向。偶極矩為分子上電荷變化之結果。

【0181】 在一些具體實例中，藉由水解酶裂解可水解鍵產生螢光受體域 R^{2z} 吸收及/或發射光譜之變化。舉例而言，在一些具體實例中，可水解鍵之裂解為藉由水解酶裂解，產生螢光受體域之最大激發（Ex）及/或發射（Em）波長變化。此等變化可致使BRET比率改變。

【0182】 藉由水解酶裂解可水解鍵產生BRET比率變化，例如藉由水解酶裂解可水解鍵可致使BRET比率發生最大觀察BRET比率之約2%至約100%之間的變化。如本文所用，「最大觀察BRET比率（the maximum observed BRET ratio）」為對於 R^1-L-R^2 或 R^2-L-R^1 所觀察之BRET比率（亦即對於在B不存在下經由視情況存在之連接元件連接於 R^1 之 R^2 ）。在一些具體實例中，BRET比率變化在最大觀察BRET比率之約5%至約95%、約15%至約50%或約15%至約40%之間。在一些具體實例中，藉由水解酶裂解可水解鍵產生最大觀察BRET比率之 $\geq 2\%$ 之BRET比率變化。在一些具體實例中，藉由水解酶裂解可水解鍵產生最大觀察BRET比率之 $\geq 5\%$ 、 $\geq 10\%$ 、 $\geq 20\%$ 、 $\geq 30\%$ 、 $\geq 40\%$ 、 $\geq 50\%$ 、 $\geq 60\%$ 、 $\geq 70\%$ 、 $\geq 80\%$ 、 $\geq 90\%$ 或 $\geq 95\%$ 之BRET比率變化。15%或更大子BRET比率變化增加水解酶偵測之信雜比。由此產生任何既定取樣時間之優良偵測限及水解酶濃度之更精確量測。或者，在固定偵測限下，BRET比率之變化更大促使信號整合時間更短且因此偵測更快速。

【0183】 在一些具體實例中，藉由水解酶裂解可水解鍵可致使BRET比率發生大於約2倍、大於約3倍、大於約4倍、大於約5倍、大於約10倍、大於約20倍、大於約30倍、大於約40倍、大於約50倍、大於約60倍、大於約70倍、大於約80倍、大於約90倍或大於約100倍之變化。在一些具體實例中，BRET比率變化在約1倍至約60倍之間、在約2倍至約50倍之間、在約3倍至約40倍之間或在約4倍至約30倍之間。

【0184】 如本文所用，「斯托克位移（Stokes shift）」為同一電子躍遷

之吸收及發射光譜之最大譜帶位置之間的波長差。較佳地，受體域具有大斯托克位移。需要大斯托克位移，因為吸收及發射光譜之最大譜帶位置之間的差值大使其更易於自發射之信號消除反射之激發輻射。在一些具體實例中，受體域之斯托克位移大於約50 nm。在一些具體實例中，受體域之斯托克位移在約50 nm與約350 nm之間，在約50 nm與約150 nm之間。在一些具體實例中，受體域之斯托克位移大於約90 nm，例如100 nm、110 nm、120 nm、130 nm、140 nm或150 nm。

組成物及套組

【0185】 本發明之感應器可包括於用於偵測水解酶之組成物中。在一些具體實例中，本文所述之感應器可包括於用於偵測酯酶之組成物中。舉例而言，在一些具體實例中，本文所述之感應器可包括於用於偵測膽鹼酯酶或脂肪酶之組成物中。在其他具體實例中，本文所述之感應器可包括於用於偵測磷酸酶之組成物中。舉例而言，在一些具體實例中，本文所述之感應器可包括於用於偵測鹼性磷酸酶之組成物中。在其他具體實例中，本文所述之感應器可包括於用於偵測糖苷酶之組成物中。舉例而言，在一些具體實例中，本文所述之感應器可包括於用於偵測乳糖酶、葡糖苷酶、半乳糖苷酶或麥芽糖酶之組成物中。在另一具體實例中，本文所述之感應器可包括於用於偵測蛋白酶之組成物中。舉例而言，在一些具體實例中，本文所述之感應器可包括於用於偵測凋亡蛋白酶（caspase）之組成物中。在另一具體實例中，本文所述之感應器可包括於用於偵測核酸酶或DNA/RNA水解酶之組成物中。舉例而言，在一些具體實例中，本文所述之感應器可包括於用於偵測核糖核酸酶或核酸內切酶之組成物中。在另一具體實例中，本文所述之感應器可包括於用於偵測β-內醯胺酶之組成物中。

【0186】 在一些具體實例中，提供一種包含根據本發明之感應器及可接受之載劑的組成物。如本文所用，術語「可接受之載劑（**acceptable carrier**）」包括與本發明之方法及用途相容之任何及所有固體或溶劑（諸如磷酸鹽緩衝鹽水緩衝液、水、生理食鹽水）、分散介質、塗料及其類似物。可接受之載劑必須在與組成物之其他成分相容且不抑制或損害所測試水解酶之意義上為『可接受的』。一般而言，適合的可接受之載劑在此項技術中已知且基於最終應用選擇。

【0187】 本發明之感應器可包括於用於偵測水解酶之套組中。在一些具體實例中，提供一種包含根據本發明之感應器及使用說明書之套組。在一個實施例中，該套組包含根據本發明之感應器、使用說明書及適用於感應器之生物發光蛋白質之受質。

方法及用途

【0188】 如熟習此項技術者所瞭解，本發明之感應器可用以偵測樣品中水解酶之存在或不存在，且若存在，亦可用以測定水解酶之活性（圖10）。因此，在一個態樣中，提供一種偵測樣品中之水解酶之方法，該方法包含（i）使樣品與本發明之感應器分子接觸；及（ii）偵測BRET比率變化，其中BRET比率變化與樣品中水解酶之存在相對應（參見例如圖10A）。舉例而言，在一些具體實例中，提供一種偵測樣品中之酯酶之方法，該方法包含（i）使樣品與本發明之感應器分子接觸；及（ii）偵測BRET比率變化，其中BRET比率變化與樣品中酯酶之存在相對應。如熟習此項技術者所理解，步驟（i）中之「接觸（**contacting**）」在適用於藉由水解酶水解感應器之條件下發生。在一些具體實例中，該方法包含使在步驟（ii）之後形成之組成物與生物發光蛋白質受質及視情況存在之輔助因子接觸，之後。

【0189】 在替代具體實例中，提供一種偵測樣品中之水解酶之方法，該方法包含 (i) 使樣品與具有結構 $B-R^2$ 之經封端非蛋白質受體域接觸以形成經處理樣品；(ii) 使經處理樣品與式 R^1-L 或 $L-R^1$ 之化合物在使 R^2 連接至 L 之條件下接觸；及(iii) 偵測BRET比率變化，其中BRET比率變化與樣品中水解酶之存在及式 R^1-L-R^2 或 R^2-L-R^1 之化合物之形成相對應，且其中 R^1 為生物發光蛋白質； L 為連接元件； R^2 為非蛋白質受體域；且 B 為包含可水解鍵之封端基團（參見例如圖10B）。 R^1 、 L 、 R^2 及 B 均如前文所定義。在一些具體實例中，該方法進一步包含在步驟(iii)之前使在步驟(ii)之後形成之組成物與生物發光蛋白質受質及視情況存在之輔助因子接觸。舉例而言，在一些具體實例中，提供一種偵測樣品中之酯酶之方法，該方法包含(i)使樣品與具有結構 $B-R^2$ 之經封端非蛋白質受體域接觸以形成經處理樣品；(ii)使經處理樣品與式 R^1-L 或 $L-R^1$ 之化合物在使 R^2 連接至 L 之條件下接觸；及(iii)偵測BRET比率變化，其中BRET比率變化與樣品中水解酶之存在及式 R^1-L-R^2 或 R^2-L-R^1 之化合物之形成相對應，且其中 R^1 為生物發光蛋白質； L 為連接元件； R^2 為非蛋白質受體域；且 B 為封端基團且結合至 B 之 R^2 包含可水解鍵。 R^1 、 L 、 R^2 及 B 均如前文所定義。此等具體實例之優勢為封端基團（及因此可水解鍵）可容易改變以產生視情況具有對於不同應用達最佳化之不同顏色輸出之響應於一系列水解酶之BRET感應器。當實際應用需要時（例如用於特異性酶之感應器之位阻、酶反應性螢光標籤之不穩定性及其類似因素），此等具體實例亦可為適用的。如藉由熟習此項技術者所理解，使樣品與具有結構 $B-R^2$ 之經封端非蛋白質受體域接觸以形成經處理樣品在適用於藉由水解酶水解可水解鍵之條件下發生。

【0190】 如熟習此項技術者所瞭解，本發明之感應器亦可用於定量樣品中存在之水解酶之量。舉例而言，在一些具體實例中，該方法進一步包含測定樣品中水解酶之濃度及/或活性。

【0191】 如熟習此項技術者所意識到，本發明之感應器亦可為多工感應器。在此系統中，提供兩個或更多個藉由不同水解酶裂解之不同感應器分子。舉例而言，本發明之感應器可與藉由牛纖維蛋白溶酶（參見例如WO 2013/155553）裂解之感應器及/或藉由假單胞菌屬（*Pseudomonas spp.*）蛋白酶裂解之感應器多工複用。在一些具體實例中，各不同感應器分子可包括不同供體及/或受體分子，以使得其不同波長發射以使得能夠偵測及定量不同標靶化合物。在一些具體實例中，各不同感應器分子可具有相同供體及/或受體分子。在一些具體實例中，使用單個流體偵測腔室。在替代具體實例中，可使用多通道偵測裝置。

【0192】 可對適用於偵測BRET比率變化之任何系統執行本發明之方法。如熟習此項技術者所瞭解，本發明之方法可以分批（例如使用盤讀取器之分批形式）或流動形式執行。舉例而言，本發明之方法可以微定量盤式形式使用配備有適當濾波器之微定量盤式讀取器執行。亦可在微流控裝置上執行本發明之方法，諸如WO 2013/155553中所述。在微流控裝置（CYBERTONGUE裝置）上執行基於BRET之分析的實施例提供於PCT/AU2018/050824中。

【0193】 如熟習此項技術者所瞭解，本發明之感應器、組成物及套組亦可用於量測水解酶之活性及/或測定水解酶之濃度。本發明之感應器、組成物及套組亦可用於偵測、量測及/或測定水解酶之活化因子或抑制因子之濃度。

【0194】 本文中所述之感應器及組成物可用於監測食物、飲料、動物健康狀況及人類健康狀況診斷領域中之水解酶活性、食物、化學物質、生物化學物質及生物藥劑製造及加工中之程序控制及監測生物修復。在一個實施例中，本文中所述之感應器及組成物可用於偵測神經毒劑。在此實施例中，感應器可為用於膽鹼酯酶之受質。在另一實施例中，本文中所述之感應器及組成物可用於經由偵測乳汁中之鹼性磷酸酶活性來早期診斷奶牛中之乳腺炎。在此實施例

中，感應器可為用於鹼性磷酸酶之受質。在另一實施例中，本文中所述之感應器及組成物可用於經由偵測乳汁樣品中之磷酸酶活性來評定乳汁巴氏殺菌之效用。在此實施例中，感應器可為用於鹼性磷酸酶之受質。在另一實施例中，本文中所述之感應器及組成物可用於量測脂肪酶活性水準，諸如用於胰臟病變之早期診斷的血液中之脂肪酶活性水準。在此實施例中，感應器可為用於酯酶（例如脂肪酶）之受質。

樣品

【0195】 如上文所述，本發明之感應器可用以偵測樣品中之水解酶之存在或不存在。感應器亦可用於定量樣品中之水解酶量及/或活性。「樣品」可為可含有水解酶之任何物質或組成物。通常，樣品為已知或懷疑包含水解酶之任何物質。在一些具體實例中，樣品可為空氣、液體、生物材料、獸醫學樣品、臨床樣品、土壤、植物樣品或其萃取物。在一些具體實例中，樣品選自由以下組成之群：空氣、液體、生物材料及土壤或其萃取物。樣品亦可為儀器。

【0196】 在一些實施例中，樣品包含生物材料。如本文所用，「生物材料」廣義定義且包括整個或部分得自生物體之任何物質。生物材料包括（但不限於）體液、細胞、軟組織（諸如結締組織及非結締組織）及硬組織（諸如骨骼及軟骨）。在一些具體實例中，體液為血液、血清、痰液、黏液、膿液、腹膜液、尿液、淚液、糞便、汗液或其他體液。在一些具體實例中，此類物質可自活生物體收穫或收集且接著經歷進一步加工及/或化學處理。在一具體實例中，感應器不用以偵測活細胞內之水解酶。生物材料包括植物物質、動物物質、細菌物質及其類似物或其萃取物。

【0197】 在一些具體實例中，樣品包含臨床樣品。臨床樣品包括（但不限於）血液、血清、痰液、黏液、膿液、淚液、糞便、汗液、腹膜液及其他體

液。

【0198】 在一些實施例中，樣品包含乳製品。如本文所用，術語「乳製品 (dairy product)」包括乳汁及部分或全部得自乳汁之產品。乳汁可獲自任何哺乳動物，例如牛、綿羊、山羊、馬、駱駝、水牛、人類及其類似物。乳製品包括（但不限於）原料乳、低脂乳、脫脂乳、巴氏殺菌乳、UHT乳、乳糖改質之UHT乳、強化UHT乳、調味UHT乳及此等產品之組合以及UHT嬰兒乳、乾酪、酸乳、乳清、乳酪、乳膏：奶粉、嬰兒乳粉及黃油及其類似物。在一些實施例中，樣品為乳汁或稀釋乳汁。乳製品亦可為乳製品之包含或懷疑包含所關注碳水化合物之萃取物，諸如部分純化之部分。

【0199】 在一些具體實例中，樣品選自由以下組成之群土壤或其萃取物、來自醫學設備之樣品（例如拭子、沖洗液及其類似物）、來自機械設備之樣品（例如拭子、沖洗液及其類似物）、來自食物加工設備之樣品（例如拭子、沖洗液及其類似物）及其類似物。在一些具體實例中，食物加工設備包含（但不限於）運輸罐車、儲存槽、加工機械設備、管線、管道、連接器、閥門及其類似物。樣品可得自機械設備（例如拭子、沖洗液或其類似物）。機械設備包括懷疑或已知具有所關注水解酶及/或表現所關注水解酶之細菌的任何機械設備，例如參與乳製品之生產、儲存及加工之任何機械設備。在一些具體實例中，機械設備包含（但不限於）緩衝液及儲存倉、焊接接合部、緩衝槽出口、傳送帶、超濾膜、閥門、空氣分離器、槽罐卡車、槽罐卡車儲槽、儲槽、墊圈、連接管道及其類似物。樣品亦可得自醫學設備，例如樣品可為來自醫學設備之拭子或沖洗液，包括（但不限於）導管、靜脈內管線、呼吸機、傷口塗劑、隱形眼鏡、滲析設備、醫學裝置及其類似物。

【0200】 樣品可直接獲自環境或來源，或在執行本發明之方法之前可藉由適合程序萃取及/或至少部分純化，

【0201】 在一些具體實例中，樣品為水性液體。舉例而言，樣品包括（但不限於）乳汁、果汁、其他飲料及體液（包括血液及血清）。

【0202】 在一些具體實例中，樣品可為藉由在水溶液中及使用液相作為樣品洗滌、浸泡、研磨或浸漬固態農作物、食物或其他物質獲得之懸浮液或萃取物。液相樣品可藉由例如沈澱、過濾或離心之任何適合技術澄清。

【0203】 在一些具體實例中，樣品可藉由使空氣或其他氣相樣品鼓泡穿過水相或經由空氣或其他氣相或以其他方式噴塗水相獲得，從而使分子自空氣或其他氣相樣品轉移至水相中。所得水相接著將用作用於分析之樣品。

實施例

實施例1 - 構築感應器分子

【0204】 設計用於量測酯酶活性之感應器分子。感應器包含經由N端肽連接元件共價連接至具有乙酸酯作為封端基團之合成螢光探針螢光素的RLuc8。乙酸酯封端基團使非螢光態之螢光素穩定直至酯鍵藉由酯酶裂解。因此，在藉由酯酶移除乙酸酯基且活化螢光素受體之後，僅觀察到供者至小分子螢光團之BRET。

材料及方法

生產wt-RLuc8及RLuc8Cys變異體1、2及3

【0205】 在例示感應器中，RLuc8經由N端肽連接元件連接至合成螢光團（圖1）。為特異性標記連接元件，將單個Cys殘基引入至肽連接子內。儘管兩個Cys殘基對於RLuc8為內源性的，但將Cys殘基引入至連接元件中使得與螢光受體域及/或水解酶反應之可用性增加。

【0206】 pRSET RLuc8 PCR編碼前面具有SEQ ID NO: 7所示序列之N端

連接元件的RLuc8 (SEQ ID NO:1)。藉由PCR使用pRSET RLuc8作為模板且用適當引子在N端肽連接元件之各個位置引入單個半胱胺酸殘基 (表4)。pRSET-RLuc8之突變誘發根據公佈之程序進行 (Zheng等人, 2004)。編碼RLuc8Cys1、2及3之質體 (SEQ ID NO: 12-14) 藉由DNA定序鑑別及證實。

表4：用於製備pRSET RLuc8 Cys突變體之寡核苷酸。

突變體	取向*	寡 5'-3'序列	Cys之位置**
RLuc8Cys1	F	ATGGGGATCCGAATGCATGGCTTCCAAGG (SEQ ID NO: 15)	1 aa
	R	CCTTGAAGCCATGCATTTCGGATCCCCAT (SEQ ID NO: 16)	
RLuc8Cys2	F	GGATCTGTACGACTGCGACGATAAGGATCG (SEQ ID NO: 17)	11 aa
	R	CGATCCTTATCGTCGCAGTCGTACAGATCC (SEQ ID NO: 18)	
RLuc8Cys3	F	CTAGCATGACTGGTTGCCAGCAAATGGGTC (SEQ ID NO: 19)	21 aa
	R	GACCCATTTGCTGGCAACCAGTCATGCTAG (SEQ ID NO: 20)	

*F為正向引子；R為反向引子。

**RLuc8之N端殘基與引入之胱胺酸之間的胺基酸數量。

【0207】 野生型 (wt) RLuc8及半胱胺酸變異體RLuc8Cys1、2及3表現於大腸桿菌BL21(DE3) (New England BioLabs) 中。隔夜培養物在37°C、200 rpm下生長自含有100 µg/mL安比西林及2%葡萄糖之LB (每公升10 g胰蛋白胍、5 g酵母提取物、5 g NaCl (pH 7.4)) 中之單個群落。使用隔夜培養物接種250 mL LB (100 µg/mL安比西林) 達至0.05之OD₆₀₀且培養物在37°C、200 rpm下培育4.5小時。蛋白質表現藉由將溫度降至22°C及在200 rpm下培育隔夜來誘導。細胞藉由在接種之後離心 (5000 x g, 10 min, 4°C) 24小時來收穫。移除上清

液且用PBS洗滌細胞集結粒，之後再懸浮於50 mM NaPi、0.3 M NaCl (7.0) 中。細胞使用均質機 (Microfluidics M-110P) 在 $P = 20\,000$ psi下破碎且藉由離心 ($15\,000 \times g$, 15 min, 4°C) 分離可溶性部分。His₆標記之蛋白質根據製造商之說明書使用鈷親和層析 (TALON®超流金屬親和力樹脂 (Takara Clontech, Australia)) 分離。在用150 mM咪唑溶液溶離之後，用MES緩衝液 (50 mM MES、300 mM NaCl、0.1 mM EDTA (pH 6.0)) 使用透析單元 (GE Healthcare, Vivaspin 6, 10 kDa MWCO) 透析蛋白質。500 μL 純化蛋白質之等分試樣於液氮中急凍且儲存於 -80°C 。蛋白質濃度藉由在280 nm下吸收來測定。

用螢光素類似物標記RLuc8半胱氨酸變異體

【0208】 將於50 mM MES (pH 5.0) 中之wt-RLuc8或RLuc8Cys 1、2及3變異體 (5 μM) 與4倍莫耳過量 (20 μM) 之螢光素類似物 (來自於DMSO中之1 mM儲備液) 一起培育，且在 4°C 下輕輕振盪混合物指定時間 (6至60分鐘)。在培育時間結束時，反應混合物為藉由離心 (10 kDa MWCO, $13000 \times g$, 13 min, 4°C) 或去鹽管柱 (HiTrap™去鹽, GE Healthcare) 交換以移除過量標記藥劑之緩衝液。在標記之後即刻記錄如下所述之生物發光光譜。

BRET分析

【0209】 BRET分析在96孔盤 (Perkin-Elmer, Australia) 中進行，最終體積100 μL 。將1 μM 純化之蛋白質用於所有BRET分析，最終體積100 μL ，其中視需要用PBS或MES稀釋蛋白質。

【0210】 對於BRET量測，將5 μL 於EtOH中之腔腸素400a添加至蛋白質感應器溶液 (最終[腔腸素400a]=16.7 μM) 且即刻記錄光譜掃描。用Spectramax M2盤讀取光譜螢光計 (Molecular Devices) 記錄光譜掃描。使用發光掃描模式

在380與600 nm之間，在20 nm時間間隔下記錄生物發光掃描。

數據分析

【0211】 BRET比率計算為最大受體發射強度（520 nm）與最大供體發射強度（420 nm）之比率。

結果

【0212】 酯酶感應器藉由用可水解螢光素二乙酸酯-5-順丁烯二醯亞胺標記RLuc8Cys2之N端肽連接子來製備。使標記條件最佳化以使RLuc8之N端肽連接子之標記效率達最大，同時使螢光素衍生物之乙酸酯基之化學水解降至最低。在酶促分析之前使標籤之化學水解降至最低降低感應器之本底螢光且增加酶偵測之敏感性。

【0213】 為確定最佳標記條件，使用螢光素-5-順丁烯二醯亞胺在不同培育時間下標記wt-RLuc8及RLuc8Cys變異體。藉由過濾移除過量標記藥劑且記錄生物發光光譜。將所量測之BRET比率用作wt-RLuc8（圖3A）及RLuc8Cys1（圖3B）之隨時間推移之標記效率之指示。如圖3中所呈現，對於所有測試之培育時間，用螢光素標記RLuc8Cys1產生大致6.5之BRET比率（圖3B），指示在6分鐘內標記達到完成。對於本發明感應器，較佳標記時間為6 min。

【0214】 儘管量測到wt-RLuc8標記之BRET比率極不佳（圖3A），但在6與60分鐘之間的標記時間觀察到BRET比率微小增加。由此指示，儘管側鏈Cys之定量標記在幾分鐘內實現，但延長培育時間可增加內源性Cys殘基之標記。

【0215】 如圖4A中所呈現，用螢光素二乙酸酯5-順丁烯二醯亞胺標記RLuc8Cys2得到0.11之極低BRET比率（實線）。由『經封端』小分子受體觀察到低BRET水準指示最佳化標記，且純化條件適合於產生具有極少本底螢光之

酯酶BRET感應器。

【0216】 BRET比率之pH依賴性呈現於圖5中。在pH 7.0下BRET比率最高。

實施例2 - 連接子長度

【0217】 為評定連接元件之長度對例示感應器分子之BRET之作用，將半胱氨酸殘基引入至RLuc8之N端連接元件之自N端1個胺基酸、11個胺基酸及21個胺基酸中（表4；圖6A）。根據實施例1中所述之最佳化方案用螢光素-5-順丁烯二醯亞胺標記RLuc8Cys變異體（亦即RLuc8Cys1、2及3）且如實施例2中所述量測BRET比率（圖6B）。如圖6B中所示，BRET比率隨RLuc8與螢光素之間的胺基酸數量增加而減小。關於三個所測試感應器，選擇RLuc8Cys2感應器用於進一步研究，因為其提供接近最大的BRET比率，但認為要用更長連接元件以改良可水解鍵之可接近性。

實施例3 - 使用RLuc8Cys2感應器量測酯酶活性

【0218】 為判定RLuc8Cys2是否可用以偵測及量測酯酶之活性，使感應器與豬肝臟酯酶（PLE；8 U/mL）反應以水解乙酸酯基且釋放螢光受體。簡言之，在37°C下，將1 μ M用MES（pH 5.0）以最終體積100 μ L稀釋之RLuc8Cys2與PLE（0.8 U）一起培育10分鐘。在培育時間結束時，將5 μ L於EtOH中之腔腸素400a添加至蛋白質感應器溶液（最終[腔腸素400a] = 16.7 μ M），且如實施例2中所述即刻記錄光譜掃描。

【0219】 如圖4A中所呈現，用PLE處理酯酶感應器產生部分未封端受體，從而使BRET比率由0.11增至0.47，增加4.4倍（圖4，點線）。值得注意的是，儘管在所用水解條件下觀察到4.4倍BRET增加，可獲得6.6之最大BRET比

率（圖4B，點線），從而表示高達60倍之可能動態範圍。

實施例4 - 選殖、表現及純化感應器分子

材料及方法

選殖RLuc8Cys變異體4及5及MBP(K239C)RLuc8

【0220】 藉由PCR使用pRSET RLuc8作為模板且用適當引子將單個Cys殘基引入至肽連接子內位置2及11處（亦即緊接在His₆標籤之後）（表5）。pRSET-RLuc8之突變誘發根據公佈之程序進行（Zheng等人, 2004）。編碼RLuc8Cys4及5之質體（SEQ ID NO: 35及36）藉由DNA定序鑑別及證實。

【0221】 為研究供體與受體域之間的較大距離之作用，將麥芽糖結合蛋白選殖至pRSET RLuc8（編碼N端組胺酸標籤與RLuc8之序列之間）中從而形成pRSET MBP RLuc8。使預計位於MBP之表面上的離胺酸殘基（K289）突變成半胱胺酸以用螢光受體域標記。藉由PCR使用pRSET MBP RLuc8作為模板且用適當引子進行突變誘發（表5）（Zheng等人, 2004）。編碼MBP(K289C)RLuc8之質體（SEQ ID NO: 34）藉由DNA定序鑑別及證實。

【0222】 所有構築體在有N端六組胺酸標籤下表現。

表現及純化RLuc8感應器

【0223】 野生型（wt）RLuc8、半胱胺酸變異體、RLuc8Cys1、2、3、4及5及MBP(K239C)RLuc8表現於大腸桿菌BL21(DE3)（New England BioLabs）中。隔夜培養物在37°C、200 rpm下生長於含有100 µg/mL安比西林及2%葡萄糖之LB（每公升10 g胰蛋白胍、5 g酵母提取物、5 g NaCl（pH 7.0））中之單個群落。使用隔夜培養物接種250 mL LB（100 µg/mL安比西林）達至0.05之OD₆₀₀且培養物在37°C、200 rpm下培育4.5小時。蛋白質表現藉由將溫度降至22°C及

在200 rpm下培育隔夜來誘導。藉由離心(4000 x g, 10 min, 4°C)收穫細胞。移除上清液且用PBS洗滌細胞集結粒，之後再懸浮於50 mM NaPi、0.1 M NaCl (7.0) 中。細胞使用均質機 (Microfluidics M-110P) 在P = 20 000 psi下破碎且藉由離心 (15 000 x g, 15 min, 4°C) 分離可溶性部分。His₆標記之蛋白質根據製造商之說明書使用鈷親和層析 (TALON®超流金屬親和力樹脂 (Takara Clontech, Australia)) 分離。在用150 mM咪唑、50 mM NaPi、0.1 M NaCl (pH 7.4) 溶離之後，用MES緩衝液 (50 mM MES、50 mM NaCl (pH 7.5)) 使用透析單元 (Novagen, D-Tube™ Dialyzer Mega, MWCO 6-8 kDa) 透析蛋白質。純化之蛋白質於液氮中急凍且儲存於-80°C。蛋白質濃度使用布拉福方法 (Bradford methodology) (Sigma Aldrich方案) 來測定。

表5：用於製備pRSET RLuc8 Cys突變體之寡核苷酸。

突變體	取向*	寡 5'-3'序列	Cys 之位置**
RLuc8Cys4	F	TCATCATCATCATCATTGCATGGCTAGCATGAC (SEQ ID NO: 38)	28 aa
	R	GTCATGCTAGCCATGCAATGATGATGATGATGA (SEQ ID NO: 39)	
RLuc8Cys5	F	AAGGAGATATACATATGTGCGGTTCTCATCATCAT (SEQ ID NO: 40)	37 aa
	R	ATGATGATGAGAACCGCACATATGTATATCTCCTT (SEQ ID NO: 41)	
MBP(K239C)	F	TGGTCCAACATCGACTGCAGCAAAGTGAATTATGG (SEQ ID NO: 42)	距 RLuc8 之中心約 7.1 nm***
	R	AACATCGACACCAGCTGCGTGAATTATGGTGTAAC (SEQ ID NO: 43)	

*F為正向引子；R為反向引子。

**RLuc8之N端殘基與引入之半胱胺酸之間的胺基酸數量。

***位置239處之半胱胺酸殘基與RLuc8之中心之間的距離使用獲自Qiagen之CLC序列圖8及MBP之晶體結構來估計 (PDB ID: 1ANF; Quioco等人, 1997)。

RLuc8變異體之生物結合

【0224】 在25°C下將於8:2之MES:HEPES (pH 5.5) (50 mM MES、50 mM NaCl (pH 3.6) ; 50 mM HEPES、50 mM NaCl (pH 7.5)) 中之RLuc8或RLuc8變異體 (10 μM) 與10當量 (100 μM) 螢光素-5-順丁烯二醯亞胺 (FM; Sapphire Bioscience)、磺醯玫瑰紅B、C₂-順丁烯二醯亞胺 (RM; Serateh Biotech, USA) 或螢光素-二乙酸酯-6-順丁烯二醯亞胺 (FD; Sapphire Bioscience) (來自於DMSO中之10-20 mM儲備液) 一起培育5至60分鐘。在培育時間結束時, RLuc8生物結合物經HiTrap™去鹽管柱 (GE Healthcare) 純化以移除過量標記藥劑。將MES (pH 5.0) (50 mM MES、50 mM NaCl (pH 5.0)) 用作溶離緩衝液。RLuc8生物結合物於液氮中急凍且儲存於-80°C。

RLuc8生物結合物定量

【0225】 將5 μL於緩衝液 (50 mM MES、50 mM NaCl (pH 5.0)) 中之BSA標準物 (0、0.1、0.3、0.6、1.0、1.4 mg/mL)或RLuc8生物結合物分配於透明96孔盤之個別孔中, 一式三份。將250 μL室溫布拉福試劑 (Sigma Aldrich) 添加至各孔中且輕輕混合盤30秒。在室溫下培育反應混合物10分鐘且量測595 nm之吸收 (A₅₉₅)。標準物曲線藉由樣品之A₅₉₅對BSA標準濃度繪圖來構建。RLuc8生物結合物濃度藉由比較淨A₅₉₅數值相對於標準曲線來測定。

RLuc8生物結合物之SDS-PAGE

【0226】 將RLuc8生物結合物 (5 μg) 及NuPage LDS樣品緩衝液4x (ThermoFisher) 混合且在98°C下培育樣品5分鐘。將蛋白質樣品負載於NuPage bis-tris凝膠 (ThermoFisher) 上且在200 V下運作40 min。用gelDoc (5毫秒暴

露) 記錄螢光凝膠且用考馬斯金魚草 (Coomassie BullDog) 染色劑染色。

BRET分析

【0227】 BRET分析在96孔盤 (Perkin-Elmer, Australia) 中進行, 最終體積100 μ L。將1 μ M純化之蛋白質用於所有BRET分析, 最終體積100 μ L, 其中蛋白質用8:2之HEPES:MES (pH 7.5) (50 mM HEPES、50 mM NaCl (pH 7.8) ; 50 mM MES、50 mM NaCl (pH 5.0)) 稀釋。

【0228】 對於BRET量測, 將1 μ L於EtOH中之腔腸素400a添加至反應混合物 (最終[腔腸素400a]=17 μ M), 振盪1毫秒且即刻記錄光譜掃描。用Spectramax M3盤讀取光譜螢光計 (Molecular Devices) 記錄光譜掃描。對於基於螢光素之感應器, 使用發光掃描模式在360與600 nm之間, 在20 nm時間間隔下記錄生物發光掃描。對於基於玫瑰紅之感應器, 使用發光掃描模式在360與700 nm之間, 在20 nm時間間隔下記錄生物發光掃描。

數據分析

【0229】 BRET比率計算為最大受體發射強度 (520 nm (螢光素) 或600 nm (玫瑰紅)) 與最大供體發射強度 (420 nm) 之比率。

結果

【0230】 為進一步評定連接元件長度對例示感應器分子之BRET之作用, 將半胱胺酸殘基引入至位置2 (RLuc8Cys5; SEQ ID NO: 33) 及位置11 (RLuc8Cys4; SEQ ID NO: 32) 之N端連接元件中。亦產生MBP(K239C)RLuc8融合物以評定供體與受體域之間的較大間隙之影響 (表5)。RLuc8Cys變異體用螢光素-5-順丁烯二醯亞胺 (FM) 或磺醯玫瑰紅B C2-順丁烯二醯亞胺

(RM) 標記，且量測FM (圖7A) 及RM變異體 (圖7B) 之BRET光譜。亦計算FM及RM變異體之BRET比率 (圖7C)。如圖7中所示，BRET比率隨供體與受體之間的胺基酸數量增加而減小。亦如圖7中所示，FM變異體之BRET比率更大且選擇此等變異體用於進一步研究。然而，RM變異體之BRET比率指示玫瑰紅將適用於本申請案之感應器。

實施例5 - 量測酯酶活性

材料及方法

【0231】 在白色96孔盤中，在各個溫度下將1 μM RLuc8Cys(變異體)-螢光素二乙酸酯感應器 (RLuc8Cys-FD)) 與2.9 U豬肝臟酯酶 (PLE) (Sigma-Aldrich E3019號) 一起培育10、20、40或60分鐘 (表6)。最終反應混合物含有20% 40 mM MES、50 mM NaCl (pH 5.0) 及80%表6中所述之緩衝液。

【0232】 在培育時間結束時，添加1 μL 於EtOH中之腔腸素400a (最終[腔腸素400a] = 17 μM) 且如實施例4中所述即刻記錄光譜掃描。為評定感應器之化學水解，在PLE不存在下執行相同分析。針對感應器之化學水解校正資料。pH 7.0、pH 7.5及pH 8.0下之實驗僅進行20分鐘。經20、40及60分鐘監測pH 6.0及pH 6.5下之實驗。

表6. 用於使用RLuc8Cys-FD之酯酶分析之緩衝液

溫度	pH	緩衝液
30°C	6.0	50 mM MES、50 mM NaCl (pH 6.3)
	6.5	50 mM MES、50 mM NaCl (pH 6.8)
	7.0	50 mM HEPES、50 mM NaCl (pH 7.3)
	7.5	50 mM HEPES、50 mM NaCl (pH 7.8)
	8.0	50 mM HEPES、50 mM NaCl (pH 8.3)
25°C	6.5	50 mM MES、50 mM NaCl (pH 6.8)
	7.0	50 mM HEPES、50 mM NaCl (pH 7.3)
20°C	7.0	50 mM HEPES、50 mM NaCl (pH 7.3)

結果

【0233】 初始實驗表徵RLuc8Cys2-螢光素-二乙酸酯感應器、RLuc8Cys3-螢光素-二乙酸酯感應器及RLuc8Cys4-螢光素-二乙酸酯感應器在20°C及pH 7.0下偵測及量測酯酶PLE活性之能力。如圖8中所示，RLuc8Cys4-螢光素-二乙酸酯感應器之BRET比率增加百分比最大。不希望受理論所束縛，認為在RLuc8Cys4-螢光素-二乙酸酯感應器中更可獲得酯鍵聯。因此，選擇RLuc8Cys4-螢光素-二乙酸酯感應器用於進一步研究。

【0234】 為進一步表徵RLuc8Cys4-螢光素-二乙酸酯感應器偵測及量測酯酶活性之能力，使感應器與PLE在各個pH及溫度下反應。如圖9中所呈現，在pH 6.5、7.0及7.5下用PLE處理RLuc8Cys4-螢光素-二乙酸酯感應器產生部分未封端之受體，從而增加BRET比率。在pH 6.0下，與PLE之已知pH依賴性一致，PLE之活性不可偵測。在pH 8.0下，PLE之活性不可偵測，因為感應器之化學水解速率高於酯酶活動之速率。不希望受理論所束縛，認為隨時間推移之BRET比率之增加%的線性不足亦為感應器水解化學水解之結果。相對於化學水解（本底水解）之速率，隨時間推移酯酶亦可失去活性。

實施例6 - 量測磷酸酶活性以用於評定乳汁巴氏殺菌之效用

【0235】 磷酸酶（EC 3.1.3.x）為催化磷酸單酯水解之水解酶之子類。磷酸酶在自然界中幾乎隨處可見涉及核酸轉化、蛋白質之轉譯後修飾及生物能量學及次級代謝之許多反應。磷酸酶活性或磷酸酶活性之抑制因子之作用宜可使用本發明中所定義之感應器來量測。舉例而言，鹼性磷酸酶（EC 3.1.3.1）為廣泛分佈之磷酸酶且通常量測其活性用作一系列醫學及其他診斷性目的之代理。舉例而言，量測殘餘鹼性磷酸酶活性可用以評定原料乳巴氏殺菌之效用（Kay, 1935；Hoy and Neave, 1937；Rankin等人, 2010），因為使天然存在於原料乳中

之鹼性磷酸酶活性失活所需之溫度-時間特徵曲線比使乳汁中可存在之主要病原體失活所需略更嚴格。因此，可應用本文所述之類型之磷酸酯封端之感應器（參見例如表1）以藉由量測在處理之後或處理之前及之後鹼性磷酸酶殘餘含量測定巴氏殺菌之效用。

材料及方法

【0236】 BRET分析將在96孔盤中進行，最終體積100 μL 。在白色96孔盤（Opti-plate™-96, PerkinElmer）中，用SpectraMax M3盤讀取光譜螢光計（Molecular Devices）以發光模式（20 nm增加）記錄光譜掃描。

【0237】 1 μM 本文中所述之感應器分子，諸如如下感應器分子，其中 R^1 包含RLuc8，L包含28個包含半胱胺酸殘基之胺基酸多肽，結合至B之 R^2 為螢光素磷酸酯或螢光素二磷酸酯（如表1所示）且結合至B之 R^2 經由順丁烯二醯亞胺鍵聯基團連接至28個胺基酸多肽上之半胱胺酸殘基。使用諸如100 mM TrisHCl、68 mM NaCl（pH 8.0）之適合緩衝液將感應器稀釋至所需濃度，且將45 μL 此製劑與50 μL 乳汁混合。任何適合乳汁均可用於分析中，例如作為對照之原料牛乳或巴氏殺菌乳，其可另外未改變或已改變脂肪及/或蛋白質及/或乳糖含量，或實際上經歷另外熱處理或添加（諸如調味劑或顏料）。將乳汁及感應器之混合物在20-30°C下培育1與120分鐘之間，通常5至10分鐘之間的時段。在培育時間結束時，將添加5 μL 於EtOH中之腔腸素400a（至最終腔腸素400a濃度為17 μM ）從而使反應物達至最終體積100 μL ，且即刻記錄光譜掃描。BRET比率將計算為峰值螢光受體發射強度與峰值供體發射強度（對於RLuc通常處於420 nm）之比率。或者，可在諸如Clariostar盤讀取器（BMG Labtech）之具有帶通或其他光譜濾波器之儀器中量測供體及受體發射之強度，且BRET比率計算為RLuc發射強度與螢光受體發射強度之比率。此分析亦可在微流控裝置上執

行，諸如WO 2013/155553及PCT/AU2018/050824中所描述。

數據分析及結果之解釋

【0238】 巴氏殺菌之效用藉由與通常使用已知量之鹼性磷酸酶及/或未巴氏殺菌原料乳樣品（其具有高含量之鹼性磷酸酶）及真實巴氏殺菌或甚至UHT乳汁樣品（其具有極低或不可偵測含量之鹼性磷酸酶）觀察到之BRET比率變化相比來評定。成功巴氏殺菌將具有低或不可偵測含量之鹼性磷酸酶。因此，當乳汁成功巴氏殺菌時，將觀察到與低BRET比率對應之高水準之RLuc供體發射強度及低水準之螢光受體部分發射強度。在巴氏殺菌乳巴氏殺菌不成功或由未巴氏殺菌乳汁污染之情況下，將觀察到與提高或高BRET比率對應之較低水準之供體峰值發射強度及較高水準之受體峰值發射強度。BRET比率之甚至高於陰性對照樣品之適度升高認為是關注的問題，從而指示成巴氏殺菌未完或由非巴氏殺菌乳污染。

實施例7 - 量測磷酸酶活性以用於診斷臨床前或臨床乳腺炎。

【0239】 奶牛中之臨床前及臨床乳腺炎與乳汁中之鹼性磷酸酶（EC3.1.3.1）升高相關，且此可位於來自一或多個有炎症之乳區（quarter）之乳汁中（Bogin及Ziv, 1973）。研究指示量測荷斯坦奶牛（Holstein cow）乳汁中之鹼性磷酸酶對用以診斷個別奶牛中之亞臨床乳腺炎具有足夠敏感性及特異性（Babaei等人, 2007）。因此，可使用本文所述類型之磷酸酯封端感應器（參見例如表1）測定個別奶牛或奶牛之特定乳區經歷臨床前乳腺炎或乳腺炎之可能性。

材料及方法

【0240】 BRET分析將在96孔盤中進行，最終體積100 μL 。在白色96孔盤（Opti-plate™-96, PerkinElmer）中，用SpectraMax M3盤讀取光譜螢光計（Molecular Devices）以發光模式（20 nm增加）記錄光譜掃描。

【0241】 1 μM 本文中所定義之感應器分子，諸如如下感應器分子，其中 R^1 包含RLuc8，L包含28個包含半胱胺酸殘基之胺基酸多肽，且結合至B之 R^2 為螢光素磷酸酯或螢光素二磷酸酯（如表1所示）且結合至B之 R^2 經由順丁烯二醯亞胺鍵聯基團連接至28個胺基酸多肽上之半胱胺酸殘基。使用諸如100 mM TrisHCl、68 mM NaCl（pH 8.0）之適合緩衝液將感應器稀釋至所需濃度。將45 μL 感應器與50 μL 未改變之原料牛乳混合。可自乳房之各乳區個別收集樣品，或者可將來自兩個或更多個乳區之樣品組合。在20-30°C下培育具有感應器之乳汁1與120分鐘之間，通常5至10分鐘之間。在培育時間結束時，添加5 μL 於乙醇中之腔腸素400a（至最終腔腸素400a濃度為17 μM ）且即刻記錄光譜掃描。BRET比率將計算為峰值螢光受體發射強度與峰值供體發射強度（對於RLuc通常處於420 nm）之比率。或者，可在諸如Clariostar盤讀取器（BMG Labtech）之具有帶通或其他光譜濾波器之儀器中量測供體及受體發射之強度，且BRET比率計算為RLuc發射強度與螢光受體發射強度之比率。此分析亦可在微流控裝置上執行，諸如WO 2013/155553及PCT/AU2018/050824中所描述。

數據分析及結果之解釋

【0242】 乳腺炎或亞臨床乳腺炎之可能性藉由比較使用測試樣品（例如來自懷疑患有乳腺炎之奶牛）執行分析時獲得之BRET比率與使用來自相同畜群之健康動物之原料乳樣品或來自相同動物之先前乳汁收集執行分析時獲得之BRET比率，或理想地藉由比較各奶牛之各乳區中所量測之鹼性磷酸酶活性之先前記錄來評定。此途徑在使用通常收集且分析來自個別乳區之乳汁之現代自

動化擠奶系統時可行。

【0243】 提高含量之鹼性磷酸酶將產生較低水準之供體峰值發射強度及較高水準之受體峰值發射強度（與如本文所定義之提高或高的BRET比率對應）。可使用諸如高於先前自該奶牛或該乳區觀察到之平均水準大於或等於1至3個標準差之鹼性磷酸酶活性升高之統計學閾值以確定何時BRET比率升高認為是關注的問題及/或引發跟蹤。

實施例8 - 量測酯酶活性

【0244】 脂肪酶（EC 3.1.1.x）為水解形成於醇與長鏈脂肪酸培養基之間的酯之酯酶子類。脂肪酶在自然界中隨處可見且發現許多重要工業及其他用途。因此，重要的是量測多種情形下之脂肪酶活性，包括臨床診斷及作為工業加工中品質控制之一部分，及在商業含有脂肪酶之產品調配期間（Stoytcheva 等人, 2012）。脂肪酶活性之量測可使用本文中所定義之感應器實現，其中B為例如長鏈脂肪酸之培養基或經由醯酯鍵連接至螢光團之醯基或二醯基丙三醇。

材料及方法

【0245】 BRET分析將在96孔盤中進行，最終體積100 μ L。在白色96孔盤（Opti-plate™-96, PerkinElmer）中，用SpectraMax M3盤讀取光譜螢光計（Molecular Devices）以發光模式（20 nm增加）記錄光譜掃描。

【0246】 如本文所定義之感應器分子，諸如如下感應器分子，其中R¹包含RLuc8，L包含28個包含半胱胺酸殘基之胺基酸多肽，且結合至B之R²為螢光素月桂酸酯或螢光素二月桂酸酯且結合至B之R²經由順丁烯二醯亞胺鍵聯基團連接至28個胺基酸多肽上之半胱胺酸殘基，將使用適合的緩衝液（例如50-100 mM NaCl、40-100 mM Tris-HCl（pH 8.0）、0.0125-0.05%（v/v）Zwittergent或

Triton X-100或等效微胞形成清潔劑及2-4% (w/v) 無脂肪酸牛血清蛋白稀釋至2與5 μM 之間的最終濃度 (基於Basu等人, 2011) 。將45 μL 此製劑與50 μL 含脂肪酶樣品混合, 且在20-30°C下培育1與120分鐘之間, 通常5至10分鐘之間的時間。在培育時間結束時, 添加5 μL 於EtOH中之腔腸素400a (至最終腔腸素400a濃度為17 μM) 且即刻記錄光譜掃描。BRET比率將計算為峰值螢光受體發射強度與峰值供體發射強度 (對於RLuc通常處於420 nm) 之比率。或者, 可在諸如Clariostar盤讀取器 (BMG Labtech) 之具有帶通或其他光譜濾波器之儀器中量測供體及受體發射之強度, 且BRET比率計算為RLuc發射強度與螢光受體發射強度之比率。或者, 可在諸如Clariostar盤讀取器 (BMG Labtech) 之具有帶通或其他光譜濾波器之儀器中量測供體及受體發射之強度, 且BRET比率計算為RLuc發射強度與螢光受體發射強度之比率。此分析亦可在微流控裝置上執行, 諸如WO 2013/155553及PCT/AU2018/050824中所描述。

【0247】 在執行分析前, 含脂肪酶樣品可用特異性脂肪酶抑制因子預培育, 例如選自Iglesias等人, 2016提及之彼等抑制因子, 因為脂肪酶分析之特異性僅針對一或多種所關注之脂肪酶來調節。

【0248】 該分析將由可能的含脂肪酶樣品來執行, 包括 (但不限於) 含有所關注脂肪酶之臨床樣品或其他類型之生物樣品或工業樣品。

數據分析及結果之解釋

【0249】 在特異性脂肪酶抑制因子存在或不存在下特定脂肪酶之相對活性可藉由比較感應器修飾程度且由此之BRET比率變化與在相同條件下藉由已知量之標準脂肪酶產生之BRET比率變化來評定。在類似條件下, 較高水準之脂肪酶活性將產生較低水準之供體峰值發射強度及較高水準之受體峰值發射強度 (與如本文所定義之提高或高的BRET比率對應) 。

實施例9 - 計算酯酶、磷酸酶或脂肪酶活性。

【0250】 酯酶、磷酸酶或脂肪酶活性可自如由本文中所定義之感應器量測之BRET比率變化來計算。酶活性宜可以相對術語，在此情況下以指定時間內之BRET比率變化表示。比較標準分析條件下樣品之間及/或樣品與標準物之間及/或樣品與陽性及陰性對照之間BRET比率變化速率（例如1分鐘時段內之BRET比率之數值變化）將適用於酯酶、磷酸酶及脂肪酶或本文中所定義之其他水解酶感應器之大多數實際應用。

【0251】 若需要以絕對值估計結果（亦即每分鐘轉化之受質之微莫耳數），則基於本文中所定義之感應器之BRET可藉由比較由未知樣品產生之BRET比率之變化率與由相同酯酶、磷酸酶、脂肪酶或其他水解酶之純化製劑產生之BRET比率之變化率來校準，其比活性在相同或類似條件下藉由另一手段測定。酶之許多此類純化製劑可購自多個供應商，諸如Merck。或者，受質之轉化速率可在平行分析中藉由自後一反應忽略腔腸素且實際上使用吸收光譜法量測未封端螢光團之濃度升高速率來估計。在諸如螢光素乙酸酯、螢光素磷酸酯或螢光素月桂酸酯之經封端螢光素基團之情況下，吾人將使用既定波長及分析pH下之公佈之螢光素莫耳吸收率（例如如Sjoback等人, 1995所揭示）減去任何本底吸收以校準相同分析條件下BRET比率之變化率，呈每分鐘轉化之感應器之莫耳數形式。校準一旦執行，即可應用於在不同時間但在相似或相同條件下獲取之量測。

【0252】 若需要根據比活性（亦即每毫克蛋白質每分鐘轉化之受質之微莫耳數）來表示酶活性，則亦需要使用任何一般可接受之方法來估計樣品中蛋白質之濃度，諸如280 nm之吸收、布拉福蛋白質分析、勞立蛋白質分析（Lowry protein assay）、雙金雞納酸蛋白質分析或熟習此項技術者已知之此等

方法之公佈及或市售替代方案或變化形式中之任一者。

【0253】 若需要表示樣品中存在之酶之量（不根據活性而是以質量），則有可使用所關注之酶之純製劑的典型或量測比活性來計算此量。舉例而言，若使用以上途徑，則特定含酯酶樣品支持已測定為每分鐘轉化之受質等於0.005微莫耳的分析中BRET比率之變化率，且已知純酯酶之比活性為每毫克蛋白質每分鐘轉化之受質為100微莫耳，接著在使用任何體積之樣品下存在之酯酶之量將計算為 $0.005/100 = 0.00005 \text{ mg}$ 或50 ng。

【0254】 若需要將此結果表示為莫耳數，則吾人將應用所關注之酶之公佈之分子量。舉例而言，在豬肝臟羧酸酯酶（ $M = 163,000 \pm 15,000$ ；Horgan等人, 1969）且使用來自以上之任意實施例數值之情況下，存在之酯酶之莫耳量將估計為大致 $50\text{ng}/163,000\text{gM}^{-1} \approx 0.3$ 飛莫耳。

【0255】 本申請案主張2017年8月24日申請之澳大利亞申請案第2017903420號之優先權，其全部內容以引用的方式併入本文中。

【0256】 熟習此項技術者應瞭解，可對如特定具體實例中所示之本發明進行大量變化及/或修改，而不背離如廣泛地描述之本發明之精神或範疇。因此，將本發明之具體實例在各方面視為說明性且非限制性的。

【0257】 本文中所論述及/或參考之所有公開案均以全文引用的方式併入本文中。

【0258】 對於本說明書中所包括之文件、行為、材料、裝置、物品及其類似物之任何論述僅出於為本發明提供背景之目的。其不應視為承認任何或所有此等事項形成先前技術基礎之一部分或因為其存在於本申請案各技術方案之優先權日之前而成為本發明相關領域中的公共常識。

參考文獻

- Babaei等人 (2007) *Vet. Res. Commun.* **31**: 419-425。
- Banks及Paquette (1995) *Bioconjugate Chem.* **6**:447-458。
- Basu等人 (2011) *J. Lipid Res.* **52**:826-832。
- Bogin及Ziv (1973) *Cornell Veterinarian* **63**: 666-676。
- Chandran等人 (2005) *J. Am. Chem. Soc.* **127**:1652-1653。
- Day等人 (2004) *Luminescence* **19**:8-20。
- de Wet等人 (1987) *Mol. Cell. Biol.* **7**:725-737。
- Egholm等人 (2005) *Nature* **365**:566-568。
- Förster (1948) *Ann. Physik.* **2**:55-75。
- Förster (1960) *Rad. Res.*增刊**2**:326-339。
- Greer及Szalay (2002) *Luminescence* **17**:43-74。
- Hall等人 (2012) *ACS Chem. Biol.* **7**:1848-57。
- Hastings (1996) *Gene* **173**:5-11。
- Herve等人 (2008) *AAPS J.* **10**:455-472。
- Horgan等人 (1969) *Biochemistry* **8**: 2006-2013。
- Hoy及Neave FK (1937) *The Lancet* **230**:595-598。
- Iglesias等人 (2016) *J. Lipid Res.* **57**:131-141。
- Kay (1935) *The Lancet* **225**:1516-1518。
- Lavis等人 (2006a) *Chembiochem.* **7**:1151-1154。
- Lavis等人 (2006b) *ACS Chemical Biology* **1**:252-260。
- Levine及Raines (2012) *Chem. Sci.* **3**:2412-2420。
- Loening等人 (2006) *Protein Eng. Des. Sel.* **19**:391-400。
- Loening等人 (2007) *Nature Methods* **4**:641-643。

- Lorenz等人 (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4438-4442 ◦
- Martins (2015) *Braz. J Microbiol.* 46:207-217 ◦
- Oteng-Pabi等人 (2014) *Chem. Commun. (Camb)*. 50:6604-6606 ◦
- Quioco等人 (1997) *Structure* 5:997-1015 ◦
- Rankin等人 (2010) *J. Dairy Sci.* 93: 5538-5551 ◦
- Schechter及Berger (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27:157-162 ◦
- Schechter及Berger (1968) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 32:898-902
- Singh等人 (1998) *Chem. Commun.* 455-456 ◦
- Sjoback等人 (1995) *Spectrochim. Acta. A, Mol. Biomol. Spectrosc.* 51: L7-L21 ◦
- Stoytcheva等人 (2012) *Curr. Anal. Chem.* 8:400-407 ◦
- Theile等人 (2013) *Nat. Protoc.* 8:1800-1807 ◦
- Verhaegen等人 (2002) *Anal. Chem.* 74:4378-4385
- Viviani (2002) *Cell. Mol. Life Sci.* 59:1833-1850 ◦
- Xu等人 (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:151-156 ◦
- Żądło-Dobrowolska等人, (2016) *Org. Biomol. Chem.* 14:9146-9150 ◦
- Zheng等人 (2004) *Nucl. Acids Res.* 32:e115 ◦

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 全民科學與工業研究機構

<120> 偵測水解的感應器

<130> 524960PCT

<150> AU2017903420

<151> 2017-08-24

<160> 51

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 349

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> wt-RLuc8

<400> 1

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr
1 5 10 15

Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp
 20 25 30

Arg Trp Gly Ser Glu Phe Met Ala Ser Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln
 35 40 45

Arg Lys Arg Met Ile Thr Gly Pro Gln Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln
 50 55 60

Met Asn Val Leu Asp Ser Phe Ile Asn Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His
65 70 75 80

Ala Glu Asn Ala Val Ile Phe Leu His Gly Asn Ala Thr Ser Ser Tyr
 85 90 95

201923088

Leu Trp Arg His Val Val Pro His Ile Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile
100 105 110

Ile Pro Asp Leu Ile Gly Met Gly Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly
115 120 125

Ser Tyr Arg Leu Leu Asp His Tyr Lys Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu
130 135 140

Leu Leu Asn Leu Pro Lys Lys Ile Ile Phe Val Gly His Asp Trp Gly
145 150 155 160

Ala Ala Leu Ala Phe His Tyr Ala Tyr Glu His Gln Asp Arg Ile Lys
165 170 175

Ala Ile Val His Met Glu Ser Val Val Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp
180 185 190

Glu Trp Pro Asp Ile Glu Glu Asp Ile Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu
195 200 205

Gly Glu Lys Met Val Leu Glu Asn Asn Phe Phe Val Glu Thr Val Leu
210 215 220

Pro Ser Lys Ile Met Arg Lys Leu Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr
225 230 235 240

Leu Glu Pro Phe Lys Glu Lys Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser
245 250 255

Trp Pro Arg Glu Ile Pro Leu Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val
260 265 270

Gln Ile Val Arg Asn Tyr Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu
275 280 285

Pro Lys Leu Phe Ile Glu Ser Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile
290 295 300

201923088

Val Glu Gly Ala Lys Lys Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys
305 310 315 320

Gly Leu His Phe Leu Gln Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr
325 330 335

Ile Lys Ser Phe Val Glu Arg Val Leu Lys Asn Glu Gln
340 345

<210> 2

<211> 349

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> RLuc8Cys1

<400> 2

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr
1 5 10 15

Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp
20 25 30

Arg Trp Gly Ser Glu Cys Met Ala Ser Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln
35 40 45

Arg Lys Arg Met Ile Thr Gly Pro Gln Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln
50 55 60

Met Asn Val Leu Asp Ser Phe Ile Asn Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His
65 70 75 80

Ala Glu Asn Ala Val Ile Phe Leu His Gly Asn Ala Thr Ser Ser Tyr
85 90 95

Leu Trp Arg His Val Val Pro His Ile Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile
100 105 110

Ile Pro Asp Leu Ile Gly Met Gly Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly
 115 120 125

Ser Tyr Arg Leu Leu Asp His Tyr Lys Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu
 130 135 140

Leu Leu Asn Leu Pro Lys Lys Ile Ile Phe Val Gly His Asp Trp Gly
 145 150 155 160

Ala Ala Leu Ala Phe His Tyr Ala Tyr Glu His Gln Asp Arg Ile Lys
 165 170 175

Ala Ile Val His Met Glu Ser Val Val Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp
 180 185 190

Glu Trp Pro Asp Ile Glu Glu Asp Ile Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu
 195 200 205

Gly Glu Lys Met Val Leu Glu Asn Asn Phe Phe Val Glu Thr Val Leu
 210 215 220

Pro Ser Lys Ile Met Arg Lys Leu Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr
 225 230 235 240

Leu Glu Pro Phe Lys Glu Lys Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser
 245 250 255

Trp Pro Arg Glu Ile Pro Leu Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val
 260 265 270

Gln Ile Val Arg Asn Tyr Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu
 275 280 285

Pro Lys Leu Phe Ile Glu Ser Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile
 290 295 300

201923088

Val Glu Gly Ala Lys Lys Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys
305 310 315 320

Gly Leu His Phe Leu Gln Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr
325 330 335

Ile Lys Ser Phe Val Glu Arg Val Leu Lys Asn Glu Gln
340 345

<210> 3

<211> 349

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> RLuc8Cys2

<400> 3

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr
1 5 10 15

Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Cys Asp Asp Lys Asp
20 25 30

Arg Trp Gly Ser Glu Phe Met Ala Ser Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln
35 40 45

Arg Lys Arg Met Ile Thr Gly Pro Gln Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln
50 55 60

Met Asn Val Leu Asp Ser Phe Ile Asn Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His
65 70 75 80

Ala Glu Asn Ala Val Ile Phe Leu His Gly Asn Ala Thr Ser Ser Tyr
85 90 95

Leu Trp Arg His Val Val Pro His Ile Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile
100 105 110

Ile Pro Asp Leu Ile Gly Met Gly Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly
 115 120 125

Ser Tyr Arg Leu Leu Asp His Tyr Lys Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu
 130 135 140

Leu Leu Asn Leu Pro Lys Lys Ile Ile Phe Val Gly His Asp Trp Gly
 145 150 155 160

Ala Ala Leu Ala Phe His Tyr Ala Tyr Glu His Gln Asp Arg Ile Lys
 165 170 175

Ala Ile Val His Met Glu Ser Val Val Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp
 180 185 190

Glu Trp Pro Asp Ile Glu Glu Asp Ile Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu
 195 200 205

Gly Glu Lys Met Val Leu Glu Asn Asn Phe Phe Val Glu Thr Val Leu
 210 215 220

Pro Ser Lys Ile Met Arg Lys Leu Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr
 225 230 235 240

Leu Glu Pro Phe Lys Glu Lys Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser
 245 250 255

Trp Pro Arg Glu Ile Pro Leu Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val
 260 265 270

Gln Ile Val Arg Asn Tyr Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu
 275 280 285

Pro Lys Leu Phe Ile Glu Ser Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile
 290 295 300

Val Glu Gly Ala Lys Lys Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys
 305 310 315 320

Gly Leu His Phe Leu Gln Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr
 325 330 335

Ile Lys Ser Phe Val Glu Arg Val Leu Lys Asn Glu Gln
 340 345

<210> 4

<211> 349

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> RLuc8Cys3

<400> 4

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr
 1 5 10 15

Gly Cys Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp
 20 25 30

Arg Trp Gly Ser Glu Phe Met Ala Ser Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln
 35 40 45

Arg Lys Arg Met Ile Thr Gly Pro Gln Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln
 50 55 60

Met Asn Val Leu Asp Ser Phe Ile Asn Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His
 65 70 75 80

Ala Glu Asn Ala Val Ile Phe Leu His Gly Asn Ala Thr Ser Ser Tyr
 85 90 95

Leu Trp Arg His Val Val Pro His Ile Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile
 100 105 110

Ile Pro Asp Leu Ile Gly Met Gly Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly
 115 120 125

Ser Tyr Arg Leu Leu Asp His Tyr Lys Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu
130 135 140

Leu Leu Asn Leu Pro Lys Lys Ile Ile Phe Val Gly His Asp Trp Gly
145 150 155 160

Ala Ala Leu Ala Phe His Tyr Ala Tyr Glu His Gln Asp Arg Ile Lys
165 170 175

Ala Ile Val His Met Glu Ser Val Val Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp
180 185 190

Glu Trp Pro Asp Ile Glu Glu Asp Ile Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu
195 200 205

Gly Glu Lys Met Val Leu Glu Asn Asn Phe Phe Val Glu Thr Val Leu
210 215 220

Pro Ser Lys Ile Met Arg Lys Leu Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr
225 230 235 240

Leu Glu Pro Phe Lys Glu Lys Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser
245 250 255

Trp Pro Arg Glu Ile Pro Leu Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val
260 265 270

Gln Ile Val Arg Asn Tyr Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu
275 280 285

Pro Lys Leu Phe Ile Glu Ser Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile
290 295 300

Val Glu Gly Ala Lys Lys Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys
305 310 315 320

201923088

Gly Leu His Phe Leu Gln Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr
325 330 335

Ile Lys Ser Phe Val Glu Arg Val Leu Lys Asn Glu Gln
340 345

<210> 5
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接元件

<400> 5

Cys Asp Asp Lys Asp Arg Trp Gly Ser Glu Phe
1 5 10

<210> 6
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接元件

<400> 6

Cys Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp Arg
1 5 10 15

Trp Gly Ser Glu Phe
20

<210> 7
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接元件

<400> 7

201923088

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr
1 5 10 15

Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp
20 25 30

Arg Trp Gly Ser Glu Phe
35

<210> 8

<211> 311

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> wt-RLuc8(C24X)

<220>

<221> X

<222> (24)..(24)

<223> X為除半胱氨酸外之任何胺基酸。

<400> 8

Met Ala Ser Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg Met Ile Thr
1 5 10 15

Gly Pro Gln Trp Trp Ala Arg Xaa Lys Gln Met Asn Val Leu Asp Ser
20 25 30

Phe Ile Asn Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn Ala Val Ile
35 40 45

Phe Leu His Gly Asn Ala Thr Ser Ser Tyr Leu Trp Arg His Val Val
50 55 60

Pro His Ile Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp Leu Ile Gly
65 70 75 80

Met Gly Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg Leu Leu Asp
85 90 95

His Tyr Lys Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn Leu Pro Lys
100 105 110

Lys Ile Ile Phe Val Gly His Asp Trp Gly Ala Ala Leu Ala Phe His
115 120 125

Tyr Ala Tyr Glu His Gln Asp Arg Ile Lys Ala Ile Val His Met Glu
130 135 140

Ser Val Val Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile Glu
145 150 155 160

Glu Asp Ile Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu
165 170 175

Glu Asn Asn Phe Phe Val Glu Thr Val Leu Pro Ser Lys Ile Met Arg
180 185 190

Lys Leu Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu
195 200 205

Lys Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro
210 215 220

Leu Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr
225 230 235 240

Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Leu Phe Ile Glu
245 250 255

Ser Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys
260 265 270

Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Leu Gln
275 280 285

201923088

Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu
290 295 300

Arg Val Leu Lys Asn Glu Gln
305 310

<210> 9
<211> 311
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> wt-RLuc8(C73Z)

<220>
<221> Z
<222> (73)..(73)
<223> Z為除半胱氨酸外之任何胺基酸。

<400> 9

Met Ala Ser Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg Met Ile Thr
1 5 10 15

Gly Pro Gln Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val Leu Asp Ser
20 25 30

Phe Ile Asn Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn Ala Val Ile
35 40 45

Phe Leu His Gly Asn Ala Thr Ser Ser Tyr Leu Trp Arg His Val Val
50 55 60

Pro His Ile Glu Pro Val Ala Arg Glx Ile Ile Pro Asp Leu Ile Gly
65 70 75 80

Met Gly Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg Leu Leu Asp
85 90 95

His Tyr Lys Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn Leu Pro Lys
100 105 110

Lys Ile Ile Phe Val Gly His Asp Trp Gly Ala Ala Leu Ala Phe His
115 120 125

Tyr Ala Tyr Glu His Gln Asp Arg Ile Lys Ala Ile Val His Met Glu
130 135 140

Ser Val Val Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile Glu
145 150 155 160

Glu Asp Ile Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu
165 170 175

Glu Asn Asn Phe Phe Val Glu Thr Val Leu Pro Ser Lys Ile Met Arg
180 185 190

Lys Leu Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu
195 200 205

Lys Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro
210 215 220

Leu Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr
225 230 235 240

Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Leu Phe Ile Glu
245 250 255

Ser Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys
260 265 270

Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Leu Gln
275 280 285

Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu
290 295 300

201923088

Arg Val Leu Lys Asn Glu Gln
305 310

<210> 10
<211> 311
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> wt-RLuc8(C24X.C73Z)

<220>
<221> X
<222> (24)..(24)
<223> X為除半胱氨酸外之任何胺基酸。

<220>
<221> Z
<222> (73)..(73)
<223> Z為除半胱氨酸外之任何胺基酸。

<400> 10

Met Ala Ser Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg Met Ile Thr
1 5 10 15

Gly Pro Gln Trp Trp Ala Arg Xaa Lys Gln Met Asn Val Leu Asp Ser
20 25 30

Phe Ile Asn Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn Ala Val Ile
35 40 45

Phe Leu His Gly Asn Ala Thr Ser Ser Tyr Leu Trp Arg His Val Val
50 55 60

Pro His Ile Glu Pro Val Ala Arg Glx Ile Ile Pro Asp Leu Ile Gly
65 70 75 80

Met Gly Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg Leu Leu Asp
85 90 95

His Tyr Lys Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn Leu Pro Lys

100

105

110

Lys Ile Ile Phe Val Gly His Asp Trp Gly Ala Ala Leu Ala Phe His
 115 120 125

Tyr Ala Tyr Glu His Gln Asp Arg Ile Lys Ala Ile Val His Met Glu
 130 135 140

Ser Val Val Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile Glu
 145 150 155 160

Glu Asp Ile Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu
 165 170 175

Glu Asn Asn Phe Phe Val Glu Thr Val Leu Pro Ser Lys Ile Met Arg
 180 185 190

Lys Leu Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu
 195 200 205

Lys Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro
 210 215 220

Leu Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr
 225 230 235 240

Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Leu Phe Ile Glu
 245 250 255

Ser Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys
 260 265 270

Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Leu Gln
 275 280 285

Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu
 290 295 300

Arg Val Leu Lys Asn Glu Gln

305 310

<210> 11

<211> 1050

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 編碼wt-RLuc8之核苷酸序列

<400> 11

atgCGGGgtt ctcatcatca tcatcatcat ggtatggcta gcatgactgg tggacagcaa 60

atgggtcggg atctgtacga cgatgacgat aaggatcgat ggggatccga attcatggct 120

tccaaggtgt acgaccccga gcaacgcaaa cgcgatgatca ctgggcctca gtggtgggct 180

cgctgcaagc aaatgaacgt gctggactcc ttcatcaact actatgattc cgagaagcac 240

gccgagaacg ccgtgatfff tctgcatggt aacgctacct ccagctacct gtggaggcac 300

gtcgtgcctc acatcgagcc cgtggctaga tgcacatcc ctgatctgat cggaatgggt 360

aagtcggca agagcgggaa tggctcatat cgctctctgg atcactaaa gtacctcacc 420

gcttggttcg agctgctgaa ccttccaaag aaaatcatct ttgtgggcca cgactggggg 480

gctgctctgg cctttcacta cgcctacgag caccaagaca ggatcaaggc catcgtccat 540

atggagagtg tcgtggacgt gatcgagtcc tgggacgagt ggcctgacat cgaggaggat 600

atcgcctga tcaagagcga agagggcgag aaaatggcgc ttgagaataa cttcttcgtc 660

gagaccgtgc tccaagcaa gatcatgagg aaactggagc ctgaggagt cgtgcctac 720

ctggagccat tcaaggagaa gggcgagggt agacggccta cctctctctg gcctcgcgag 780

atccctctcg ttaaggaggg caagcccagc gtcgtccaga ttgtccgcaa ctacaacgcc 840

taccttcggg ccagcgacga tctgcctaag ctgttcatcg agtccgacc tgggttcttt 900

tccaacgcta ttgtcgaggg agctaagaag ttccctaaca ccgagttcgt gaaggtgaag 960

ggcctccact tcctccagga ggacgtcca gatgaaatgg gtaagtacat caagagcttc 1020

gtggagcgcg tgctgaagaa cgagcagtaa 1050

<210> 12
 <211> 1050
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> 編碼RLuc8Cys1之核苷酸序列

<400> 12

```

atgcgggggtt ctcatcatca tcatcatcat ggtatggcta gcatgactgg tggacagcaa      60
atgggtcggg atctgtacga cgatgacgat aaggatcgat ggggatccga atgcatggct      120
tccaaggtgt acgaccccga gcaacgcaaa cgcatgatca ctgggcctca gtggtgggct      180
cgctgcaagc aatgaacgt gctggactcc tcatcaact actatgattc cgagaagcac      240
gccgagaacg ccgtgatfff tctgcatggt aacgctacct ccagctacct gtggaggcac      300
gtcgtgcctc acatcgagcc cgtggctaga tgcacatcc ctgatctgat cggaatgggt      360
aagtcggca agagcgggaa tggctcatat cgctcctgg atcactaaa gtacctacc      420
gcttggttcg agctgctgaa ctttccaaag aaaatcatct ttgtgggcca cgactggggg      480
gctgctctgg ctttcaacta cgcctacgag caccaagaca ggatcaaggc catcgtccat      540
atggagagtg tcgtggacgt gatcgagtcc tgggacgagt ggcctgacat cgaggaggat      600
atgccctga tcaagagcga agagggcgag aaaatggtgc ttgagaataa cttcttcgtc      660
gagaccgtgc tccaagcaa gatcatgcgg aaactggagc ctgaggagt t cgctgcctac      720
ctggagccat tcaaggagaa gggcgagggt agacggccta ccctctctg gcctcgcgag      780
atccctctcg ttaaggagg caagcccgcac gtcgtccaga ttgtccgaa ctacaacgcc      840
taccttcggg ccagcgacga tctgcctaag ctgttcatcg agtccgacce tgggttcttt      900
tccaacgcta ttgtcgaggg agctaagaag ttccctaaca ccgagttcgt gaaggtgaag      960
ggcctccact tcctccagga ggacgtcca galgaaatgg gtaagtacat caagagcttc     1020
gtggagcgcg tgctgaagaa cgagcagtaa                                         1050

```

<210> 13
 <211> 1050
 <212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 編碼RLuc8Cys2之核苷酸序列

<400> 13

```

atgCGGGgtt ctcatcatca tcatcatcat ggtatggcta gcatgactgg tggacagcaa      60
atgggtcggg atctgtacga ctgcgacgat aaggatcgat ggggatccga attcatggct      120
tccaaggtgt acgaccccga gcaacgcaaa cgcatgatca ctgggcctca gtggtgggct      180
cgctgcaagc aaatgaacgt gctggactcc ttcatcaact actatgattc cgagaagcac      240
gccgagaacg ccgtgatfff tctgcatggt aacgctacct ccagctacct gtggaggcac      300
gtcgtgcctc acatcgagcc cgtggctaga tgcacatcc ctgatctgat cggaatgggt      360
aagtccggca agagcgggaa tggctcatat cgctcctgg atcactaaa gtacctacc      420
gcttggttcg agctgctgaa ccttccaaag aaaatcatct ttgtgggcca cgactggggg      480
gctgctctgg cctttacta cgcctacgag caccaagaca ggatcaaggc catcgtccat      540
atggagagtg tcgtggacgt gatcgagtcc tgggacgagt ggcctgacat cgaggaggat      600
atcgccttga tcaagagcga agagggcgag aaaatggtgc ttgagaataa cttcttcgtc      660
gagaccgtgc tccaagcaa gatcatgagg aaactggagc ctgaggagt tgcctgctac      720
ctggagccat tcaaggagaa gggcgagggt agacggccta ccctctctg gcctcgcgag      780
atccctctcg ttaaggagg caagcccgac gtcgtccaga ttgtccgaa ctacaacgcc      840
taccttcggg ccagcgacga tctgcctaag ctgttcatcg agtccgacc tgggttcttt      900
tccaacgcta ttgtcgaggg agctaagaag ttccctaaca ccgagttcgt gaaggtgaag      960
ggcctccact tcctccagga ggacgtcca gatgaaatgg gtaagtacat caagagcttc     1020
gtggagcgcg tgctgaagaa cgagcagtaa                                         1050

```

<210> 14

<211> 1050

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 編碼RLuc8Cys3之核苷酸序列

<400> 14
 atgCGGGgtt ctcatcatca tcatcatcat ggtatggcta gcatgactgg ttgccagcaa 60
 atgggtcggg atctgtacga cgatgacgat aaggatcgat ggggatccga attcatggct 120
 tccaagggtg acgaccccga gcaacgcaaa cgcatgatca ctgggcctca gtggtgggct 180
 cgctgcaagc aatgaacgt gctggactcc tcatcaact actatgattc cgagaagcac 240
 gccgagaacg ccgtgatfff tctgcatggg aacgctacct ccagctacct gtggaggcac 300
 gtcgtgcctc acatcgagcc cgtggctaga tgcacatcc ctgatctgat cggaatgggt 360
 aagtcggca agagcgggaa tggctcatat cgctcctgg atcactaaa gtacctacc 420
 gcttggttcg agctgctgaa ccttccaaag aaaatcatct ttgtggcca cgactggggg 480
 gctgctctgg cctttacta cgcctacgag caccaagaca ggatcaaggc catcgtccat 540
 atggagagtg tcgtggacgt gatcgagtcc tgggacgagt ggcctgacat cgaggaggat 600
 atcgcctga tcaagagcga agagggcgag aaaatggtgc ttgagaataa cttcttcgtc 660
 gagaccgtgc tccaagcaa gatcatgagg aactggagc ctgaggagt cgtgcctac 720
 ctggagccat tcaaggagaa gggcgagggt agacggccta cctctctctg gcctcgcgag 780
 atccctctcg ttaagggagg caagcccgac gtcgtccaga ttgtccgaa ctacaacgcc 840
 taccttcggg ccagcgacga tctgcctaag ctgttcatcg agtccgacc tgggttcttt 900
 tccaacgcta ttgtcgaggg agctaagaag ttccctaaca ccgagttcgt gaaggagaag 960
 ggctccact tcctccagga ggacgtcca gatgaaatgg gtaagtacat caagagcttc 1020
 gtggagcgcg tgctgaagaa cgagcagtaa 1050

<210> 15
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> RLuc8Cys1-F

<400> 15
 atggggatcc gaatgcatgg cttccaagg 29

<210> 16

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> RLuc8Cys1-R

<400> 16

ccttggagc catgcattcg gatcccat

29

<210> 17

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> RLuc8Cys2-F

<400> 17

ggatctgtac gactgcgacg ataaggatcg

30

<210> 18

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> RLuc8Cys2-R

<400> 18

cgatccttat cgtcgcagtc gtacagatcc

30

<210> 19

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> RLuc8Cys3-F

<400> 19

ctagcatgac tggttgccag caaatgggtc

30

<210> 20

<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> RLuc8Cys3-R

<400> 20
gaccatttg ctggcaacca gtcattgctag

30

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mTG之高親和力受質

<400> 21

Trp Ala Leu Gln Arg Pro His
1 5

<210> 22
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mTG之高親和力受質

<400> 22

Trp Glu Leu Gln Arg Pro Tyr
1 5

<210> 23
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 分選酶識別序列

<220>
<221> X

201923088

<222> (3)..(3)

<223> X為任何胺基酸

<400> 23

Leu Pro Xaa Thr

1

<210> 24

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 間隔子序列

<400> 24

Gly Ser Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 25

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 間隔子序列

<400> 25

Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 26

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 間隔子序列

<400> 26

Gly Gly Thr Gly Gly Gly

1 5

201923088

<210> 27
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 間隔子序列

<400> 27

Gly Gly Gly Gly Gly Thr
1 5

<210> 28
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 間隔子序列

<400> 28

Leu Gln Gly Gly Thr Gly Gly Gly
1 5

<210> 29
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 間隔子序列

<400> 29

Phe Glu Gly Gly Thr Gly Gly Gly
1 5

<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 間隔子序列

<400> 30

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Leu
1 5

<210> 31

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mTG之高親和力受質

<220>

<221> X

<222> (3)..(3)

<223> X爲任何胺基酸

<220>

<221> Z

<222> (5)..(5)

<223> Z爲Gly或Ala

<400> 31

Leu Pro Xaa Thr Glx
1 5

<210> 32

<211> 349

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> RLuc8Cys4

<400> 32

Met Arg Gly Ser His His His His His His Cys Met Ala Ser Met Thr
1 5 10 15

Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp
20 25 30

Arg Trp Gly Ser Glu Phe Met Ala Ser Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln
 35 40 45

Arg Lys Arg Met Ile Thr Gly Pro Gln Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln
 50 55 60

Met Asn Val Leu Asp Ser Phe Ile Asn Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His
 65 70 75 80

Ala Glu Asn Ala Val Ile Phe Leu His Gly Asn Ala Thr Ser Ser Tyr
 85 90 95

Leu Trp Arg His Val Val Pro His Ile Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile
 100 105 110

Ile Pro Asp Leu Ile Gly Met Gly Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly
 115 120 125

Ser Tyr Arg Leu Leu Asp His Tyr Lys Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu
 130 135 140

Leu Leu Asn Leu Pro Lys Lys Ile Ile Phe Val Gly His Asp Trp Gly
 145 150 155 160

Ala Ala Leu Ala Phe His Tyr Ala Tyr Glu His Gln Asp Arg Ile Lys
 165 170 175

Ala Ile Val His Met Glu Ser Val Val Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp
 180 185 190

Glu Trp Pro Asp Ile Glu Glu Asp Ile Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu
 195 200 205

Gly Glu Lys Met Val Leu Glu Asn Asn Phe Phe Val Glu Thr Val Leu
 210 215 220

Pro Ser Lys Ile Met Arg Lys Leu Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr
 225 230 235 240

Leu Glu Pro Phe Lys Glu Lys Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser
 245 250 255

Trp Pro Arg Glu Ile Pro Leu Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val
 260 265 270

Gln Ile Val Arg Asn Tyr Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu
 275 280 285

Pro Lys Leu Phe Ile Glu Ser Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile
 290 295 300

Val Glu Gly Ala Lys Lys Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys
 305 310 315 320

Gly Leu His Phe Leu Gln Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr
 325 330 335

Ile Lys Ser Phe Val Glu Arg Val Leu Lys Asn Glu Gln
 340 345

<210> 33

<211> 349

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> RLuc8Cys5

<400> 33

Met Cys Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr
 1 5 10 15

Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp
 20 25 30

Arg Trp Gly Ser Glu Phe Met Ala Ser Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln
 35 40 45

Arg Lys Arg Met Ile Thr Gly Pro Gln Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln
 50 55 60

Met Asn Val Leu Asp Ser Phe Ile Asn Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His
 65 70 75 80

Ala Glu Asn Ala Val Ile Phe Leu His Gly Asn Ala Thr Ser Ser Tyr
 85 90 95

Leu Trp Arg His Val Val Pro His Ile Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile
 100 105 110

Ile Pro Asp Leu Ile Gly Met Gly Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly
 115 120 125

Ser Tyr Arg Leu Leu Asp His Tyr Lys Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu
 130 135 140

Leu Leu Asn Leu Pro Lys Lys Ile Ile Phe Val Gly His Asp Trp Gly
 145 150 155 160

Ala Ala Leu Ala Phe His Tyr Ala Tyr Glu His Gln Asp Arg Ile Lys
 165 170 175

Ala Ile Val His Met Glu Ser Val Val Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp
 180 185 190

Glu Trp Pro Asp Ile Glu Glu Asp Ile Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu
 195 200 205

Gly Glu Lys Met Val Leu Glu Asn Asn Phe Phe Val Glu Thr Val Leu
 210 215 220

Pro Ser Lys Ile Met Arg Lys Leu Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr
 225 230 235 240

201923088

Leu Glu Pro Phe Lys Glu Lys Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser
245 250 255

Trp Pro Arg Glu Ile Pro Leu Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val
260 265 270

Gln Ile Val Arg Asn Tyr Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu
275 280 285

Pro Lys Leu Phe Ile Glu Ser Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile
290 295 300

Val Glu Gly Ala Lys Lys Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys
305 310 315 320

Gly Leu His Phe Leu Gln Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr
325 330 335

Ile Lys Ser Phe Val Glu Arg Val Leu Lys Asn Glu Gln
340 345

<210> 34

<211> 724

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> MBP(K239C)RLuc8

<400> 34

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr
1 5 10 15

Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp
20 25 30

Arg Trp Gly Ser Glu Phe Met Lys Ile Glu Glu Gly Lys Leu Val Ile
35 40 45

Trp Ile Asn Gly Asp Lys Gly Tyr Asn Gly Leu Ala Glu Val Gly Lys
 50 55 60

Lys Phe Glu Lys Asp Thr Gly Ile Lys Val Thr Val Glu His Pro Asp
 65 70 75 80

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

Asp Ile Ile Phe Trp Ala His Asp Arg Phe Gly Gly Tyr Ala Gln Ser
 100 105 110

Gly Leu Leu Ala Glu Ile Thr Pro Asp Lys Ala Phe Gln Asp Lys Leu
 115 120 125

Tyr Pro Phe Thr Trp Asp Ala Val Arg Tyr Asn Gly Lys Leu Ile Ala
 130 135 140

Tyr Pro Ile Ala Val Glu Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Asn Lys Asp Leu
 145 150 155 160

Leu Pro Asn Pro Pro Lys Thr Trp Glu Glu Ile Pro Ala Leu Asp Lys
 165 170 175

Glu Leu Lys Ala Lys Gly Lys Ser Ala Leu Met Phe Asn Leu Gln Glu
 180 185 190

Pro Tyr Phe Thr Trp Pro Leu Ile Ala Ala Asp Gly Gly Tyr Ala Phe
 195 200 205

Lys Tyr Glu Asn Gly Lys Tyr Asp Ile Lys Asp Val Gly Val Asp Asn
 210 215 220

Ala Gly Ala Lys Ala Gly Leu Thr Phe Leu Val Asp Leu Ile Lys Asn
 225 230 235 240

Lys His Met Asn Ala Asp Thr Asp Tyr Ser Ile Ala Glu Ala Ala Phe
 245 250 255

Asn Lys Gly Glu Thr Ala Met Thr Ile Asn Gly Pro Trp Ala Trp Ser
 260 265 270

Asn Ile Asp Thr Ser Cys Val Asn Tyr Gly Val Thr Val Leu Pro Thr
 275 280 285

Phe Lys Gly Gln Pro Ser Lys Pro Phe Val Gly Val Leu Ser Ala Gly
 290 295 300

Ile Asn Ala Ala Ser Pro Asn Lys Glu Leu Ala Lys Glu Phe Leu Glu
 305 310 315 320

Asn Tyr Leu Leu Thr Asp Glu Gly Leu Glu Ala Val Asn Lys Asp Lys
 325 330 335

Pro Leu Gly Ala Val Ala Leu Lys Ser Tyr Glu Glu Glu Leu Val Lys
 340 345 350

Asp Pro Arg Ile Ala Ala Thr Met Glu Asn Ala Gln Lys Gly Glu Ile
 355 360 365

Met Pro Asn Ile Pro Gln Met Ser Ala Phe Trp Tyr Ala Val Arg Thr
 370 375 380

Ala Val Ile Asn Ala Ala Ser Gly Arg Gln Thr Val Asp Glu Ala Leu
 385 390 395 400

Lys Asp Ala Gln Thr Gly Gly Gly Thr Gly Gly Phe Glu Met Ala Ser
 405 410 415

Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg Met Ile Thr Gly Pro Gln
 420 425 430

Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val Leu Asp Ser Phe Ile Asn
 435 440 445

Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn Ala Val Ile Phe Leu His
 450 455 460

Gly Asn Ala Thr Ser Ser Tyr Leu Trp Arg His Val Val Pro His Ile
 465 470 475 480

Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp Leu Ile Gly Met Gly Lys
 485 490 495

Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg Leu Leu Asp His Tyr Lys
 500 505 510

Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn Leu Pro Lys Lys Ile Ile
 515 520 525

Phe Val Gly His Asp Trp Gly Ala Ala Leu Ala Phe His Tyr Ala Tyr
 530 535 540

Glu His Gln Asp Arg Ile Lys Ala Ile Val His Met Glu Ser Val Val
 545 550 555 560

Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile Glu Glu Asp Ile
 565 570 575

Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu Glu Asn Asn
 580 585 590

Phe Phe Val Glu Thr Val Leu Pro Ser Lys Ile Met Arg Lys Leu Glu
 595 600 605

Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu Lys Gly Glu
 610 615 620

Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro Leu Val Lys
 625 630 635 640

Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr Asn Ala Tyr
 645 650 655

Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Leu Phe Ile Glu Ser Asp Pro
 660 665 670

Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys Phe Pro Asn
 675 680 685

Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Leu Gln Glu Asp Ala
 690 695 700

Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu Arg Val Leu
 705 710 715 720

Lys Asn Glu Gln

<210> 35

<211> 1050

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 編碼RLuc8Cys4之核苷酸序列

<400> 35

atgcgggggtt ctcatcatca tcatcatcat tgcattggcta gcatgactgg tggacagcaa 60

atgggtcggg atctgtacga cgatgacgat aaggatcgat ggggatccga attcatggct 120

tccaaggtgt acgaccccga gcaacgcaaa cgcattgatca ctgggcctca gtggtgggct 180

cgctgcaagc aatgaacgt gctggactcc tcatcaact actatgattc cgagaagcac 240

gccgagaacg ccgtgatattt tctgcatggt aacgctacct ccagctacct gtggaggcac 300

gtcgtgcctc acatcgagcc cgtggctaga tgcattcatcc ctgatctgat cggaatgggt 360

aagtcggca agagcgggaa tggctcatat cgctcctgg atcactaaa gtacctcacc 420

gcttggttcg agctgctgaa ccttccaaag aaaatcatct ttgtgggcca cgactggggg 480

gctgctctgg cctttcacta cgcctacgag caccaagaca ggatcaaggc catcgtccat 540

atggagagtg tcgtggacgt gatcgagtcc tgggacgagt ggctgacat cgaggaggat 600

atcgccctga tcaagagcga agagggcgag aaaatggtgc ttgagaataa cttcttcgtc 660
 gagaccgtgc tccaagcaa gatcatgctg aactgggagc ctgaggagt ctgctgcctac 720
 ctggagccat tcaaggagaa gggcgagggt agacggccta cctctcctg gcctcgcgag 780
 atccctctcg ttaagggagg caagcccagc gtcgtccaga ttgtccgcaa ctacaacgcc 840
 taccttcggg ccagcgacga tctgcctaag ctgttcatcg agtccgacc tgggttcttt 900
 tccaacgcta ttgtcgaggg agctaagaag ttcctaaca ccgagtctgt gaaggtgaag 960
 ggctccact tctccagga ggacgtcca gatgaaatgg gtaagtacat caagagcttc 1020
 gtggagcgcg tgctgaagaa cgagcagtaa 1050

<210> 36

<211> 1050

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 編碼RLuc8Cys5之核苷酸序列

<400> 36

atgtgcggtt ctcatcatca tcatcatcat ggtatggcta gcatgactgg tggacagcaa 60
 atgggtcggg atctgtacga cgatgacgat aaggatcgat ggggatccga attcatggct 120
 tccaagggtg acgaccccga gcaacgcaaa cgcgatgatca ctgggcctca gtgggtgggct 180
 cgctgcaagc aatgaacgt gctggactcc tcatcaact actatgattc cgagaagcac 240
 gccgagaacg ccgtgatfff tctgcatggt aacgctacct ccagctacct gtggaggcac 300
 gtcgtgcctc acatcgagcc cgtggctaga tgcacatcc ctgatctgat cggaatgggt 360
 aagtcggca agagcgggaa tggctcatat cgctcctgg atcactaaa gtacctcacc 420
 gcttggttcg agctgctgaa cttccaaag aaaatcatct ttgtgggcca cgactggggg 480
 gctgctctgg ctttcaacta cgcctacgag caccaagaca ggatcaaggc catcgtccat 540
 atggagagtg tcgtggacgt gatcgagtcc tgggacgagt ggctgacat cgaggaggat 600
 atcgccctga tcaagagcga agagggcgag aaaatggtgc ttgagaataa cttcttcgtc 660
 gagaccgtgc tccaagcaa gatcatgctg aactgggagc ctgaggagt ctgctgcctac 720

ctggagccat tcaaggagaa gggcgagggt agacggccta ccctctcctg gcctcgcgag 780
atccctctcg ttaagggagg caagcccgac gtcgtccaga ttgtccgcaa ctacaacgcc 840
taccttcggg ccagcgacga tctgcctaag ctgttcatcg agtccgacc tgggttcttt 900
tccaacgcta ttgtcgaggg agctaagaag ticcctaaca ccgagtctgt gaaggatgaag 960
ggcctccact tctccagga ggacgtcca gatgaaatgg gtaagtacat caagagcttc 1020
gtggagcgcg tgctgaagaa cgagcagtaa 1050

<210> 37

<211> 2175

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 編碼MBP(K239C)RLuc8之核苷酸序列

<400> 37

atgcgggggt ctcatcatca tcatcatcat ggtatggcta gcatgactgg tggacagcaa 60
atgggtcggg atctgtacga cgatgacgat aaggatcgat ggggatccga attcatgaaa 120
atcgaagaag gtaaaactggg aatctggatt aacggcgata aaggctataa cggctctcgct 180
gaagtcggta agaaattcga gaaagatacc ggaattaaag tcaccgttga gcatccggat 240
aaactggaag agaaattccc acaggttgcg gcaactggcg atggccctga cattaatttc 300
tgggcacacg accgctttgg tggctacgct caatctggcc tgttggctga aatcaccccg 360
gacaaaagcgt tccaggacaa gctgtatccg ttacctggg atgccgtacg ttacaacggc 420
aagctgattg cttaccgat cgctgttgaa gcgttatcgc tgatttataa caaagatctg 480
ctgccgaacc cgccaaaaac ctgggaagag atcccggcgc tggataaaga actgaaagcg 540
aaagtaaga gcgcgctgat gttcaacctg caagaacctg acttacctg gccgctgatt 600
gctgctgacg ggggttatgc gttcaagtat gaaaacggca agtacgacat taaagacgtg 660
ggcgtggata acgctggcgc gaaagcgggt ctgaccttcc tggttgacct gattaanaac 720
aaacacatga atgcagacac cgattactcc atcgcagaag ctgcctttaa taaaggcgaa 780
acagcgatga ccatcaacgg cccgtgggca tggccaaca tcgacaccag ctgcgtgaat 840

tatggtgtaa cggctactgcc gaccttcaag ggtcaacat ccaaaccgtt cgttggcgtg 900
 ctgagcgcag gtattaacgc cgccagtccg aacaaagagc tggcaaaaga gttcctcgaa 960
 aactatctgc tgactgatga aggtctggaa gcggttaata aagacaaacc gctgggtgcc 1020
 gtagcgctga agtcttacga ggaagagttg gtgaaagatc cgcgtattgc cgccactatg 1080
 gaaaacgccc agaaagggtga aatcatgccg aacatcccgc agatgtccgc tttctggtat 1140
 gccgtgctga ctgcggtgat caacgccgcc agcggctcgc agactgtcga tgaagccctg 1200
 aaagacgcgc agactggcgg cggtaccggt ggattcgaaa tggcttccaa ggtgtacgac 1260
 cccgagcaac gcaaacgcat gatcactggg cctcagtggg gggctcgtg caagcaaatg 1320
 aacgtgctgg actccttcat caactactat gattccgaga agcacgccga gaacccctg 1380
 atttttctgc atggiaacgc tacctccagc tacctgtgga ggcacgtcgt gcctcacatc 1440
 gagcccgtgg ctagatgcat catccctgat ctgatcggaa tgggtaagtc cggcaagagc 1500
 gggaatggct cataatgcct cctggatcac tacaagtacc tcaccgcttg gttcgagctg 1560
 ctgaaccttc caaagaaaat catctttgtg ggccacgact ggggggctgc tctggccttt 1620
 cactacgcct acgagcacca agacaggatc aaggccatcg tccatatgga gagtgtcgtg 1680
 gacgtgatcg agtcttggga cgagtggcct gacatcgagg aggatatcgc cctgatcaag 1740
 agcgaagagg gcgagaaaat ggtgcttgag aataacttct tcgtcgagac cgtgctccca 1800
 agcaagatca tgcggaaact ggagcctgag gagttcgctg cctacctgga gccattcaag 1860
 gagaagggcg aggttagacg gcctaccctc tcttggcctc gcgagatccc tctcgttaag 1920
 ggaggcaagc ccgacgtcgt ccagattgtc cgcaactaca acgcctacct tcgggccagc 1980
 gacgatctgc ctaagctgtt catcgagtcc gacctgggt tcttttccaa cgctattgtc 2040
 gagggagcta agaagtccc taacaccgag ttcgtgaagg tgaaggcct ccacttctc 2100
 caggaggacg ctccagatga aatgggtaag tacatcaaga gcttcgtgga gcgcgtcgtg 2160
 aagaacgagc agtaa 2175

<210> 38

<211> 33

201923088

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> RLuc8Cys4-F

<400> 38

tcatcatcat catcattgca tggctagcat gac

33

<210> 39

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> RLuc8Cys4-R

<400> 39

gtcatgctag ccatgcaatg atgatgatga tga

33

<210> 40

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> RLuc8Cys5-F

<400> 40

aaggagatat acatatgtgc ggttctcadc atcat

35

<210> 41

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> RLuc8Cys5-R

<400> 41

atgatgatga gaaccgcaca tatgtatadc tcctt

35

<210> 42

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> MBP(K239C)-F

<400> 42

tggtccaaca tcgactgcag caaagtgaat tatgg

35

<210> 43

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> MBP(K239C)-R

<400> 43

aacatcgaca ccagctgcgt gaattatggg gtaac

35

<210> 44

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 含有半胱氨酸殘基之連接元件

<400> 44

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr
1 5 10 15

Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp
20 25 30

Arg Trp Gly Ser Glu Cys
35

<210> 45

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 含有半胱氨酸殘基之連接元件

201923088

<400> 45

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr
1 5 10 15

Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Cys Asp Asp Lys Asp
20 25 30

Arg Trp Gly Ser Glu Phe
35

<210> 46

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 含有半胱氨酸殘基之連接元件

<400> 46

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr
1 5 10 15

Gly Cys Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp
20 25 30

Arg Trp Gly Ser Glu Phe
35

<210> 47

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 含有半胱氨酸殘基之連接元件

<400> 47

Met Arg Gly Ser His His His His His His Cys Met Ala Ser Met Thr
1 5 10 15

201923088

Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp
20 25 30

Arg Trp Gly Ser Glu Phe
35

<210> 48

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 含有半胱氨酸殘基之連接元件

<400> 48

Met Cys Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr
1 5 10 15

Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp
20 25 30

Arg Trp Gly Ser Glu Phe
35

<210> 49

<211> 311

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> RLuc

<400> 49

Met Ala Ser Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg Met Ile Thr
1 5 10 15

Gly Pro Gln Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val Leu Asp Ser
20 25 30

Phe Ile Asn Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn Ala Val Ile
35 40 45

Phe Leu His Gly Asn Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Trp Arg His Val Val
 50 55 60

Pro His Ile Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp Leu Ile Gly
 65 70 75 80

Met Gly Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg Leu Leu Asp
 85 90 95

His Tyr Lys Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn Leu Pro Lys
 100 105 110

Lys Ile Ile Phe Val Gly His Asp Trp Gly Ala Cys Leu Ala Phe His
 115 120 125

Tyr Ser Tyr Glu His Gln Asp Lys Ile Lys Ala Ile Val His Ala Glu
 130 135 140

Ser Val Val Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile Glu
 145 150 155 160

Glu Asp Ile Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu
 165 170 175

Glu Asn Asn Phe Phe Val Glu Thr Met Leu Pro Ser Lys Ile Met Arg
 180 185 190

Lys Leu Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu
 195 200 205

Lys Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro
 210 215 220

Leu Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr
 225 230 235 240

201923088

Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met Phe Ile Glu
245 250 255

Ser Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys
260 265 270

Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Ser Gln
275 280 285

Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu
290 295 300

Arg Val Leu Lys Asn Glu Gln
305 310

<210> 50

<211> 311

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> RLuc8

<400> 50

Met Ala Ser Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg Met Ile Thr
1 5 10 15

Gly Pro Gln Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val Leu Asp Ser
20 25 30

Phe Ile Asn Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn Ala Val Ile
35 40 45

Phe Leu His Gly Asn Ala Thr Ser Ser Tyr Leu Trp Arg His Val Val
50 55 60

Pro His Ile Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp Leu Ile Gly
65 70 75 80

Met Gly Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg Leu Leu Asp
 85 90 95

His Tyr Lys Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn Leu Pro Lys
 100 105 110

Lys Ile Ile Phe Val Gly His Asp Trp Gly Ala Ala Leu Ala Phe His
 115 120 125

Tyr Ala Tyr Glu His Gln Asp Arg Ile Lys Ala Ile Val His Met Glu
 130 135 140

Ser Val Val Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile Glu
 145 150 155 160

Glu Asp Ile Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu
 165 170 175

Glu Asn Asn Phe Phe Val Glu Thr Val Leu Pro Ser Lys Ile Met Arg
 180 185 190

Lys Leu Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu
 195 200 205

Lys Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro
 210 215 220

Leu Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr
 225 230 235 240

Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Leu Phe Ile Glu
 245 250 255

Ser Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys
 260 265 270

Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Leu Gln
 275 280 285

Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu
 290 295 300

Arg Val Leu Lys Asn Glu Gln
 305 310

<210> 51

<211> 311

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> RLuc2

<400> 51

Met Ala Ser Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg Met Ile Thr
 1 5 10 15

Gly Pro Gln Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val Leu Asp Ser
 20 25 30

Phe Ile Asn Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn Ala Val Ile
 35 40 45

Phe Leu His Gly Asn Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Trp Arg His Val Val
 50 55 60

Pro His Ile Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp Leu Ile Gly
 65 70 75 80

Met Gly Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg Leu Leu Asp
 85 90 95

His Tyr Lys Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn Leu Pro Lys
 100 105 110

Lys Ile Ile Phe Val Gly His Asp Trp Gly Ala Cys Leu Ala Phe His
 115 120 125

Tyr Ser Tyr Glu His Gln Asp Lys Ile Lys Ala Ile Val His Ala Glu
130 135 140

Ser Val Val Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile Glu
145 150 155 160

Glu Asp Ile Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu
165 170 175

Glu Asn Asn Phe Phe Val Glu Thr Val Leu Pro Ser Lys Ile Met Arg
180 185 190

Lys Leu Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu
195 200 205

Lys Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro
210 215 220

Leu Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Ala Ile Val Arg Asn Tyr
225 230 235 240

Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met Phe Ile Glu
245 250 255

Ser Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys
260 265 270

Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Ser Gln
275 280 285

Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu
290 295 300

Arg Val Leu Lys Asn Glu Gln
305 310



201923088

【發明摘要】**【中文發明名稱】** 偵測水解的感應器**【英文發明名稱】** SENSOR FOR DETECTING HYDROLYSIS**【中文】**

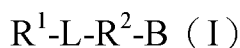
本發明係關於偵測樣品中之諸如磷酸酶、醣苷酶、酯酶、外肽酶及脂肪酶之水解酶之感應器及方法。詳言之，本發明係關於偵測食物、飲料及臨床樣品中之水解酶之感應器及方法。該等感應器及方法可用以測定該樣品中存在之水解酶之量。

【英文】

The present invention relates to sensors and methods for detecting hydrolases, such as phosphatases, glycosidases, esterases, exopeptidases and lipases, in a sample. In particular, the present invention relates to sensors and methods for detecting hydrolases in food, beverages and in clinical samples. The sensors and methods may be used to determine the amount of hydrolase present in the sample.

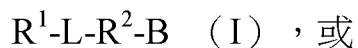
【指定代表圖】 圖1**【代表圖之符號簡單說明】**

無

【特徵化學式】

【發明申請專利範圍】

【第1項】一種用於偵測水解酶之感應器分子，該感應器分子具有選自以下之通式：



其中

R^1 為生物發光蛋白質；

L為連接元件；

R^2 為非蛋白質受體域；及

B為封端基團，

其中結合至B之 R^2 包含可水解鍵且該可水解鍵藉由該水解酶之水解產生生物發光共振能量轉移（BRET）之變化。

【第2項】如請求項1所述之感應器分子，其中該封端基團使呈低螢光態或非螢光態之受體域穩定。

【第3項】如請求項1或請求項2所述之感應器分子，其中該封端基團包含含磷酸酯部分、含糖部分、含胺基酸部分、核苷酸、核苷、酯或醚。

【第4項】如請求項1至3中任一項所述之感應器分子，其中該連接元件包含烷基鏈、乙二醇、醚、聚醚、聚醯胺、聚酯、肽、多肽、胺基酸或聚核苷酸。

【第5項】如請求項4所述之感應器分子，其中該連接元件包含多肽。

【第6項】如請求項5所述之感應器分子，其中 R^1-L 或 $L-R^1$ 為單個多肽。

【第7項】如請求項5或請求項6所述之感應器分子，其中該連接元件包含半胱胺酸殘基及/或離胺酸殘基。

【第8項】如請求項7所述之感應器分子，其中 R^2 經由該半胱胺酸殘基連接

至該連接元件。

【第9項】如請求項1至8中任一項所述之感應器分子，其中 R^2 選自阿萊克薩螢光染料（Alexa Fluor dye）、氟硼二吡咯染料（Bodipy dye）、Cy染料、螢光素、丹醯基（dansyl）、繖形酮、螢光微球體、發光微球體、螢光奈米結晶、馬力納藍（Marina Blue）、喀斯開藍（Cascade Blue）、喀斯開黃（Cascade Yellow）、太平洋藍（Pacific Blue）、俄勒岡綠（Oregon Green）、四甲基玫瑰紅、玫瑰紅、香豆素、BODIPY、試鹵靈（resorufin）、德克薩斯紅（Texas Red）、稀土元素螯合物或其等之任何組合或衍生物。

【第10項】如請求項1至9中任一項所述之感應器分子，其中 R^1 選自螢光素酶、 β -半乳糖苷酶、內醯胺酶、辣根過氧化酶、鹼性磷酸酶、 β -葡萄糖醛酸酶或 β -葡糖苷酶。

【第11項】如請求項10所述之感應器分子，其中該螢光素酶為海腎螢光素酶、螢火蟲螢光素酶、腔腸動物螢光素酶、北美螢光蟲（North American glow worm）螢光素酶、叩頭蟲螢光素酶、軌道蠕蟲（railroad worm）螢光素酶、細菌螢光素酶、長腹水蚤（*Gaussia*）螢光素酶、水母發光蛋白（Aequorin）、葷蚊（*Arachnocampa*）螢光素酶或其等之任一者之生物學活性變異體或片段、或兩者或更多者之嵌合體。

【第12項】如請求項1至11中任一項所述之感應器分子，其中該水解酶為酯酶、脂肪酶、蛋白酶、磷酸酶、核酸酶、醣苷酶、DNA糖基化酶及酸酐水解酶。

【第13項】如請求項1至12中任一項所述之感應器分子，其中在水解酶存在及/或不存在下 R^1 及 R^2 之間隔及相對方向在福斯特距離（Förster distance）之 $\pm 50\%$ 內。

【第14項】如請求項13所述之感應器分子，其中 R^1 及 R^2 之福斯特距離為至

少4.0 nm。

【第15項】如請求項14所述之感應器分子，其中 R^1 及 R^2 之福斯特距離在約4.0 nm與約10 nm之間。

【第16項】一種偵測樣品中之水解酶之方法，該方法包含

- i) 使樣品與如請求項1至15及請求項31中任一項所述之感應器分子接觸；及
- ii) 偵測BRET比率變化，其中該BRET比率變化與該樣品中水解酶之存在相對應。

【第17項】一種偵測樣品中之水解酶之方法，該方法包含：

- i) 使樣品與具有結構 $B-R^2$ 之經封端非蛋白質受體域接觸以形成經處理樣品；
- ii) 使該經處理樣品與式 R^1-L 或 $L-R^1$ 之化合物在使 R^2 連接至 L 之條件下接觸；及
- iii) 偵測BRET比率變化，其中該BRET比率變化與該樣品中水解酶之存在及式 R^1-L-R^2 或 R^2-L-R^1 之化合物之形成相對應，且其中

R^1 為生物發光蛋白質；

L 為連接元件；

R^2 為非蛋白質受體域；及

B 為封端基團且結合至 B 之 R^2 包含可水解鍵。

【第18項】如請求項17所述之方法，其中 R^2 包含半胱胺酸特異性親電子體或胺特異性親電子體。

【第19項】如請求項17或請求項18所述之方法，其中 L 包含半胱胺酸及/或離胺酸殘基。

【第20項】如請求項18至21中任一項所述之方法，其進一步包含測定該樣品中該水解酶之濃度及/或該樣品中該水解酶之活性。

【第21項】如請求項18至22中任一項所述之方法，其在微流控裝置上執行。

【第22項】如請求項16至21中任一項所述之方法，其中該樣品為空氣、液體、生物材料或土壤中之任一者。

【第23項】如請求項22所述之方法，其中該樣品包含選自由以下組成之群的生物材料：乳汁、血液、血清、痰液、黏液、膿液及腹膜液。

【第24項】一種變異型生物發光蛋白質，其在與對應天然產生之蛋白質相比時少包含至少一個半胱胺酸殘基。

【第25項】如請求項24所述之變異型生物發光蛋白質，其在與RLuc8 (SEQ ID NO: 50) 之位置24或位置73對應之位置缺乏半胱胺酸殘基。

【第26項】如請求項24所述之變異型生物發光蛋白質，其在與RLuc8 (SEQ ID NO: 50) 之胺基酸位置24及位置73對應之位置缺乏半胱胺酸殘基。

【第27項】一種聚核苷酸，其編碼如請求項24至26中任一項所述之變異型生物發光蛋白質。

【第28項】一種載體，其包含如請求項27之聚核苷酸。

【第29項】一種宿主細胞，其包含如請求項27所述之聚核苷酸及/或如請求項28所述之載體。

【第30項】一種產生變異型生物發光蛋白質之方法，該方法包含在允許編碼該蛋白質之聚核苷酸表現之條件下培養如請求項29所述之宿主細胞或如請求項28所述之載體，及回收表現之蛋白質。

【第31項】如請求項1至15中任一項所述之感應器分子，其中該R¹為如請求項24至26中任一項所述之變異型生物發光蛋白質。

【發明圖式】

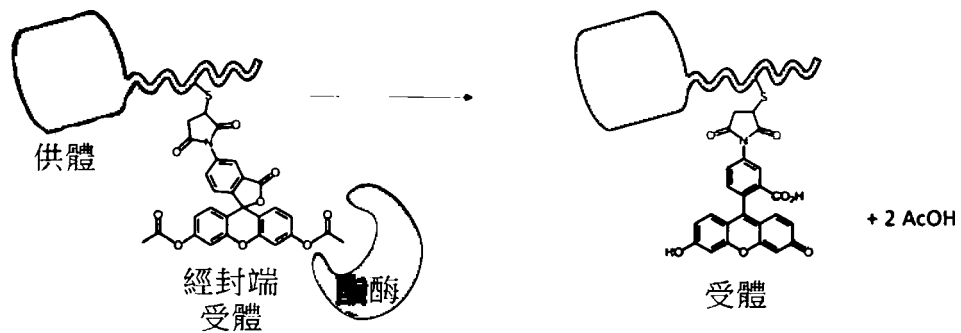


圖1

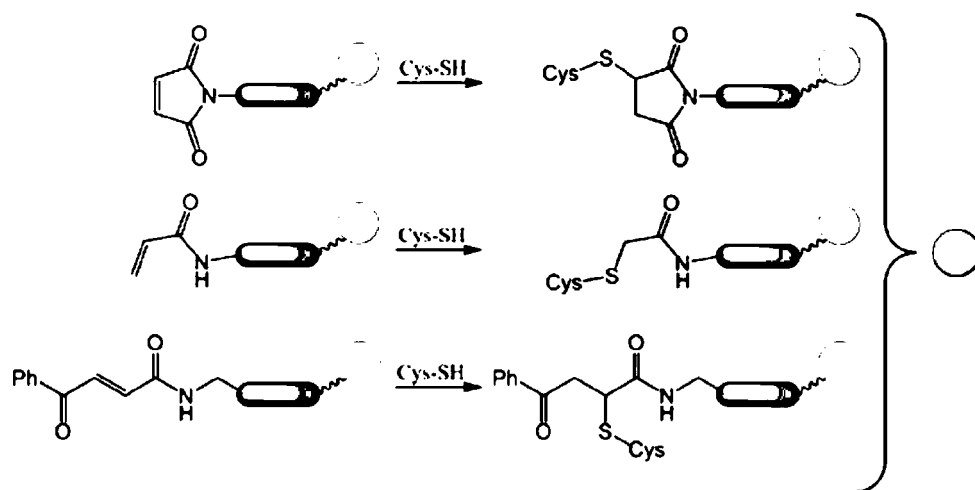


圖2

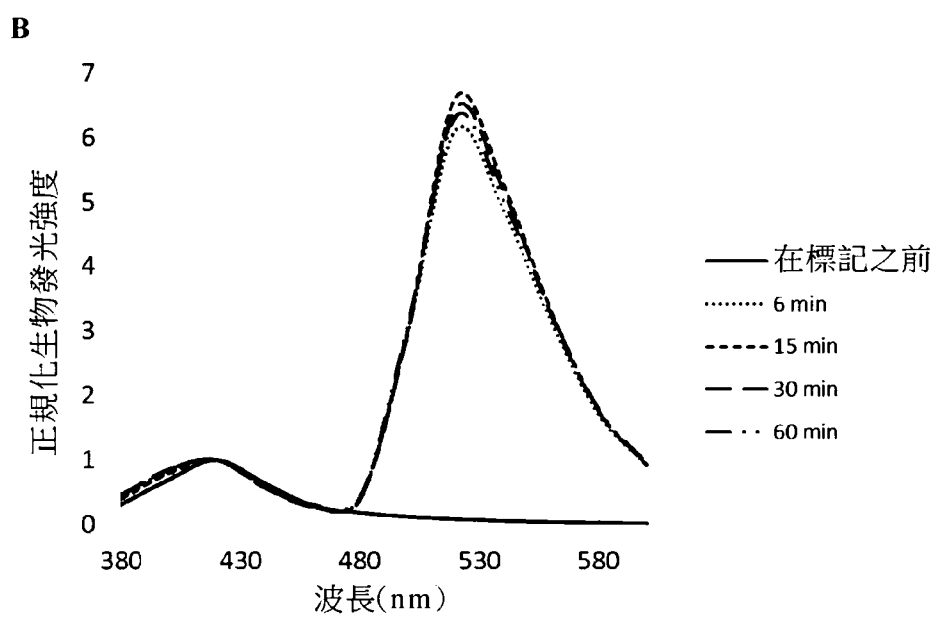
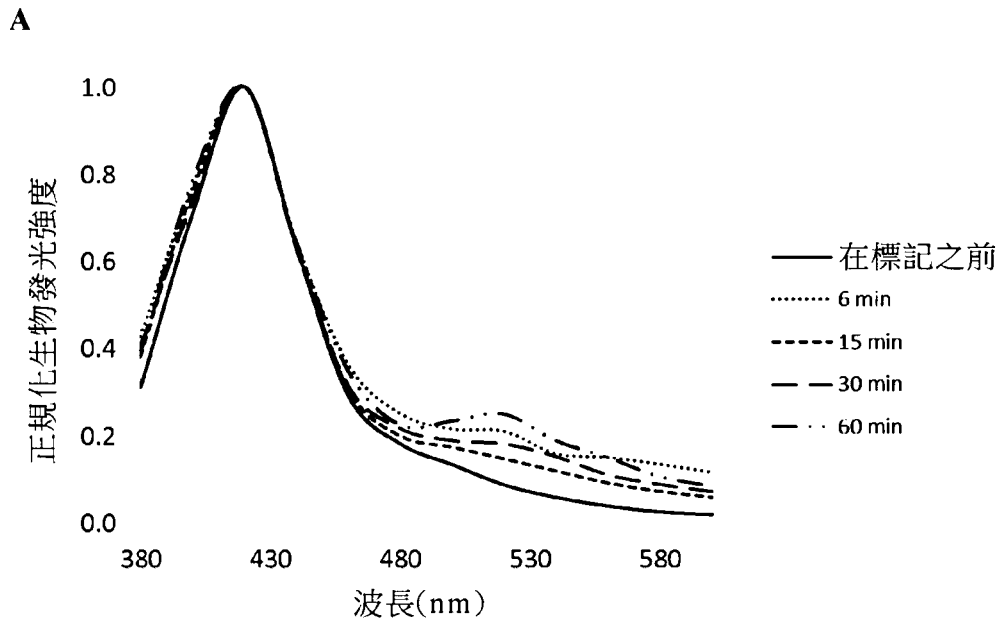


圖3

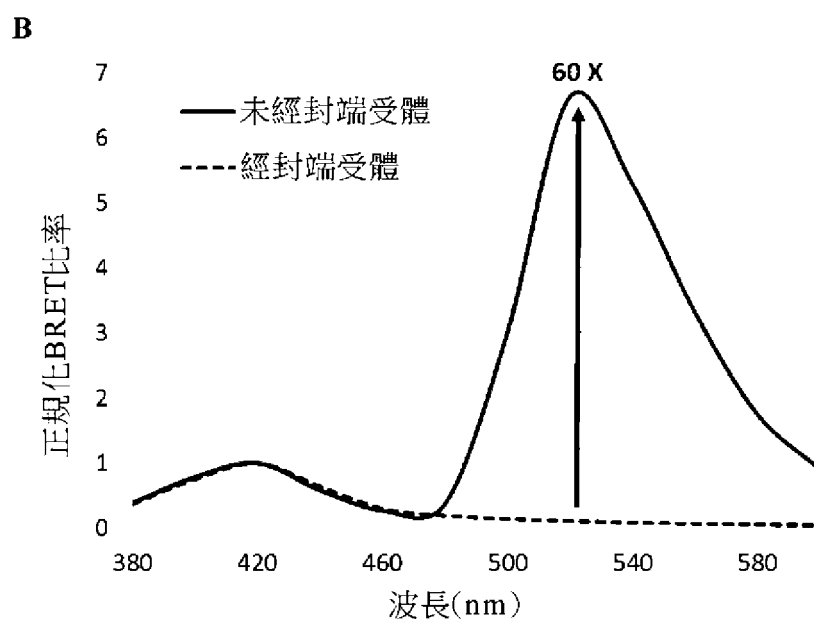
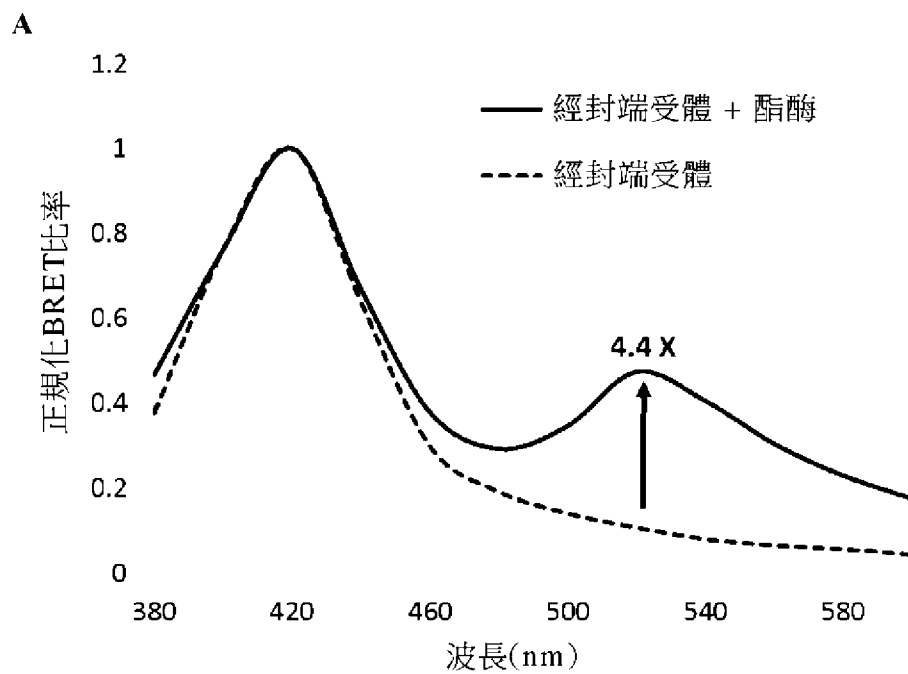


圖4

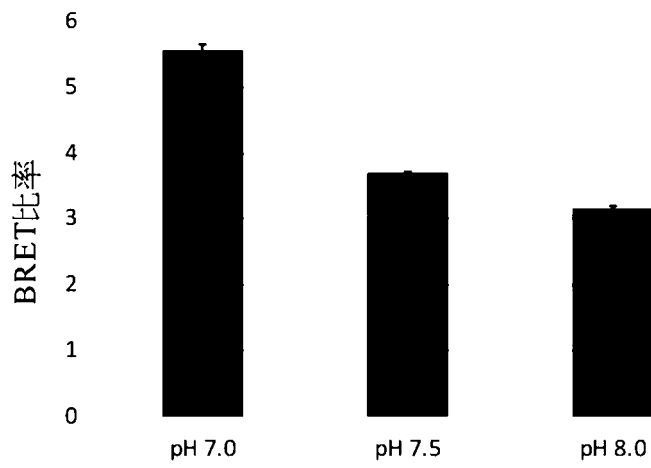
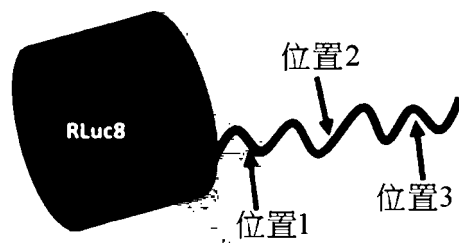


圖5

A



B

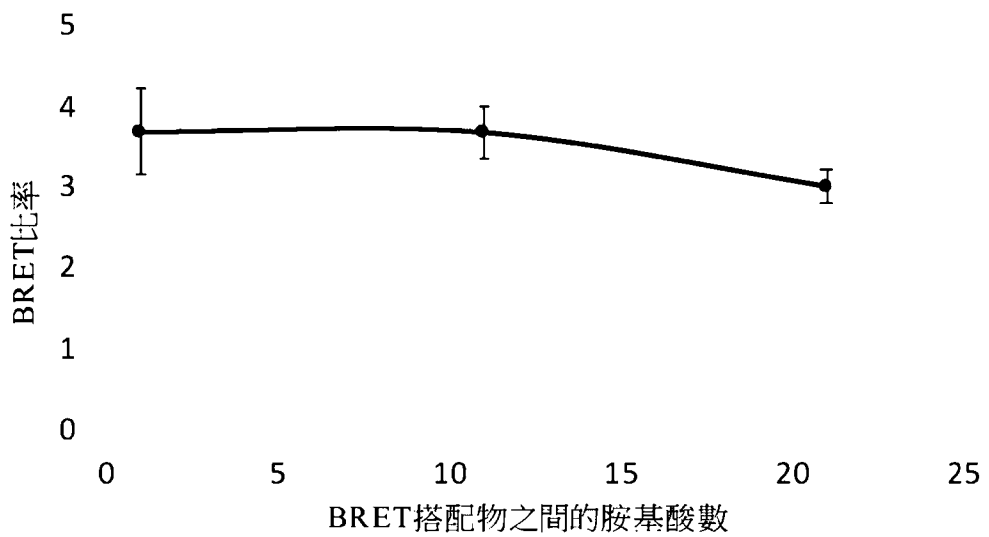


圖6

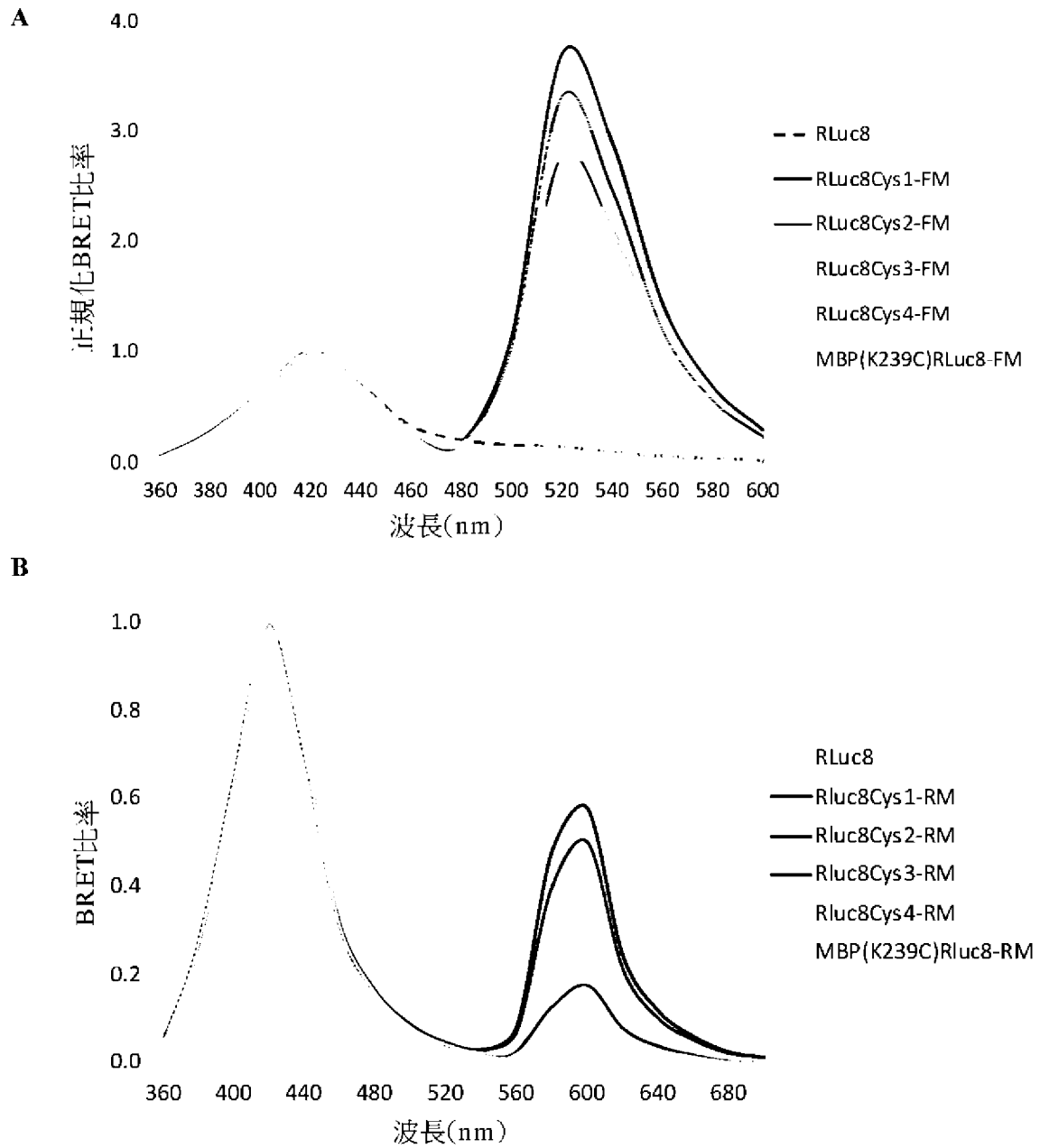


圖7

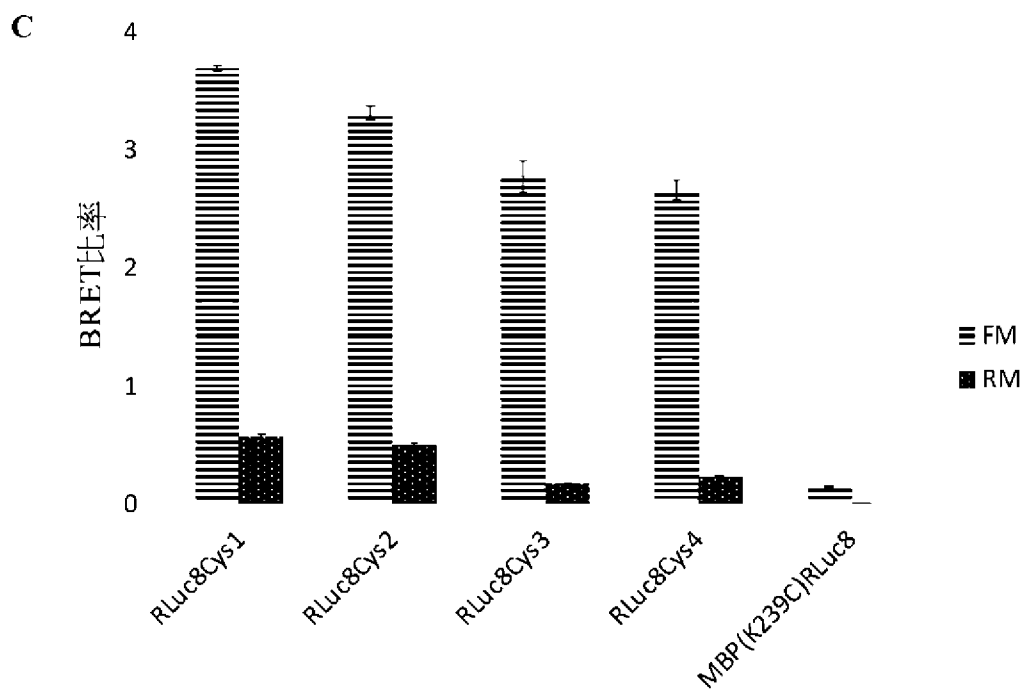


圖7(續)

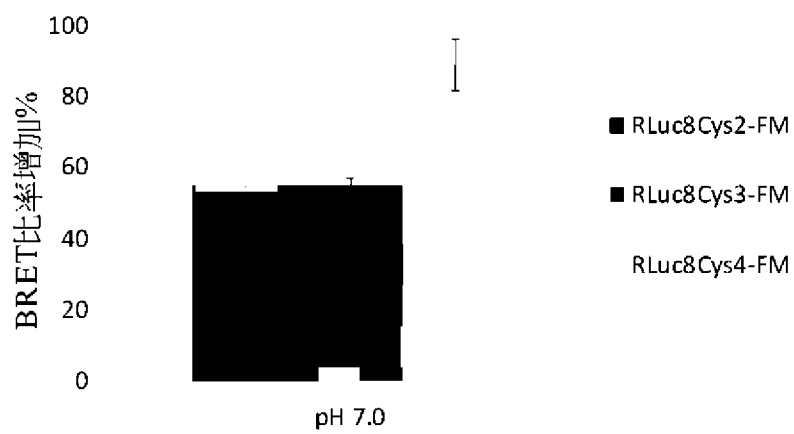


圖8

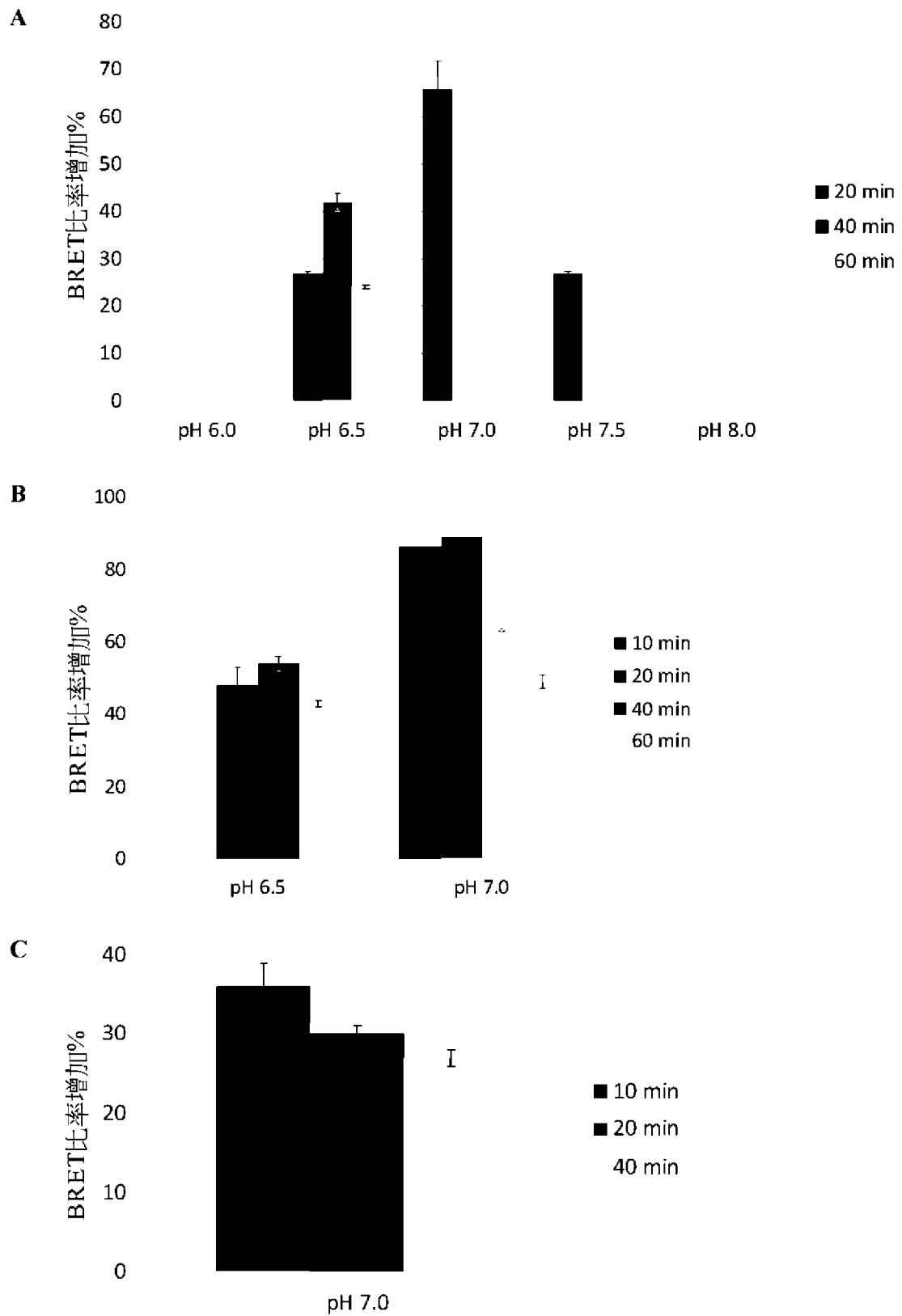


圖9

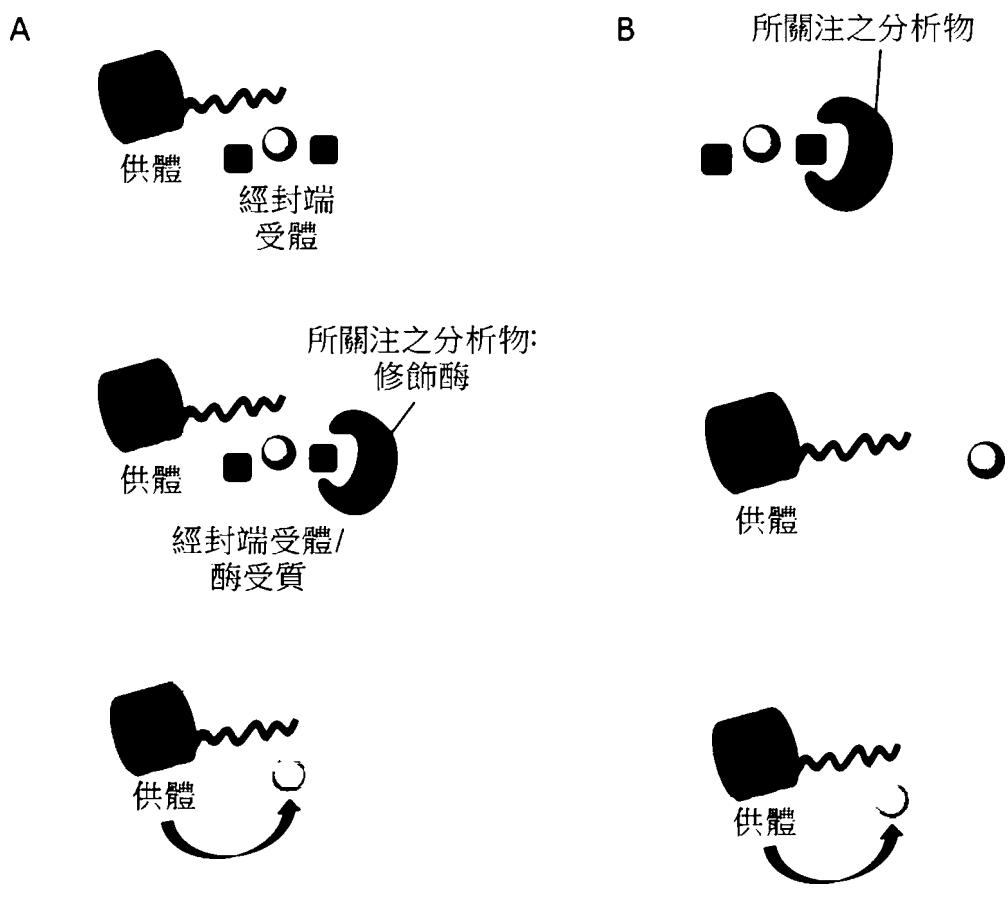


圖10