(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 38 434 T2** 2008.06.05

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 041 151 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 38 434.2**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/JP98/05864**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 961 523.2**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/033997**
(86) PCT-Anmeldetag: **24.12.1998**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **08.07.1999**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **04.10.2000**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **12.09.2007**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **05.06.2008**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 15/53*** (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12Q 1/26 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
36102297 26.12.1997 JP

(84) Benannte Vertragsstaaten:
DE, GB, NL

(73) Patentinhaber:
Kikkoman Corp., Noda, Chiba, JP

(74) Vertreter:
LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(72) Erfinder:
HATTORI, Noriaki Kikkoman Corporation, Noda-shi, Chiba 278-8601, JP; MURAKAMI, Seiji, Noda-shi, Chiba 278-8601, JP

(54) Bezeichnung: **LUZIFERASE UND VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG VON INTRAZELLULÄREM ATP UNTER VERWENDUNG DERSELBEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft eine neue Luciferase mit Resistenz gegen ein Tensid sowie ein Verfahren zum Messen von intrazellulärem ATP unter Verwendung derselben.

Stand der Technik

[0002] Intrazelluläres ATP wird routinemäßig zum Nachweisen der Gegenwart von Zellen in einer Probe oder zur Bestimmung der Zellanzahl auf den Gebieten Lebensmittelhygiene, Biologie, klinischer Untersuchungen, medizinischer Wissenschaft, ultrareinen Wassers und Umweltwissenschaften gemessen. Ein allgemeines Verfahren zum Messen von intrazellulärem ATP umfasst die Schritte des Hinzufügens eines ATP-Extraktionsreagens, das ein Tensid als wirksame Komponente enthält, zu einer zellhältigen Probe, des Extrahierens von intrazellulärem ATP, des Hinzufügens eines lumineszierenden Reagens, das Luciferase enthält, zur Probe sowie des anschließenden Messens der Gesamtmenge an emittiertem Licht.

[0003] Luciferase ist ein Enzym, das in Gegenwart von ATP und Magnesiumionen die Lumineszenzreaktion von Luciferin katalysiert, das ein Substrat ist. Luciferase, die in einem Verfahren zum Messen von intrazellulärem ATP verwendet wird, umfasst jene Arten, die von Glühwürmchen-Spezies, wie z.B. GENJI-Glühwürmchen (Luciola cruciata), HEIKE-Glühwürmchen (Luciola lateralis), dem Nordamerikanischen Glühwürmchen und dem Russischen Glühwürmchen etc., stammen.

[0004] Intrazelluläres ATP kann durch Hinzufügen eines ATP-Extraktionsreagens zu einer zellhältigen Probe und anschließendes Rühren der Probe extrahiert werden.

[0005] Um das Potential des Extraktionsreagens vollständig auszuschöpfen, wird das Reaktionsmittel vorzugsweise so hinzugefügt, dass die Konzentration eines Tensids 0,05% oder mehr des Gemischs aus der Probe und dem Extraktionsreagen beträgt. Ein Zustand, in dem die Konzentration des Tensids 0,05% oder mehr beträgt, inhibiert jedoch die Enzymreaktion während des Vorgangs des Messens der ATP-Konzentration mittels Biolumineszenz beträchtlich. Daher werden die Empfindlichkeit und die Genauigkeit der Messung stark beeinträchtigt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass ein Tensid in solch einer hohen Konzentration die Luciferase-Aktivität verringert.

[0006] Beispielsweise sinkt die Luciferase-Aktivität des Nordamerikanischen Glühwürmchens in Gegenwart von 0,1% Benzalkoniumchlorid auf etwa 20% ab (siehe Tabelle 1).

[0007] Andererseits kann die Inhibierung der Biolumineszenzreaktion mit einer niedrigeren Tensidkonzentration reduziert werden. Dabei wäre jedoch die Extraktionswirksamkeit für ATP ungenügend.

[0008] Ein Verfahren, bei dem Cyclodextrin oder ein Derivat davon verwendet wird, ist ein bekanntes Verfahren zur Unterdrückung der Inhibierung der Biolumineszenzreaktion durch ein Tensid (Offenlegungsschrift der Japanischen Patentanmeldung Nr. 6-504200).

[0009] Unter den Verfahren zur Messung von intrazellulärem ATP, bei denen ATP extrahiert wird, indem eine Probe mit einem Tensid in Kontakt gebracht und anschließend ATP durch ein Luciferin-Luciferase-Biolumineszenzreaktionsverfahren gemessen wird, ist auch ein Verfahren zum Messen von intrazellulärem ATP bekannt, das durch die Anwendung des Biolumineszenz-Reaktionsverfahrens, nachdem die Probe, aus der ATP extrahiert wird, mit Cyclodextrin in Kontakt gebracht wird, charakterisiert ist (Offenlegungsschrift der Japanischen Patentanmeldung Nr. 7-203995).

[0010] Bisher gab es noch keine Versuche, die Inhibierung der Biolumineszenzreaktion aufgrund einer Tensid-Fokussierung auf Luciferase zu unterdrücken.

[0011] Das Ziel der Erfindung ist es, eine neue Luciferase mit einer Anti-Tensid-Resistenz bereitzustellen, deren Aktivität nicht durch die Gegenwart eines Tensids in einer hohen Konzentration beeinträchtigt wird. Das andere Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens, das die Schritte des Extrahierens von intrazellulärem ATP unter Verwendung eines Tensids sowie des Messens von intrazellulärem ATP mittels Biolumineszenzreaktion unter Verwendung einer Luciferase umfasst, welche die Inhibierung der Biolumineszenzreaktion durch ein Tensids senken kann, ohne zu einer Verringerung der Effizienz der Extraktion von intrazellulärem

ATP zu führen.

[0012] Im Kontext dieser Beschreibung wird der Ausdruck „unterdrücken" verwendet, um eine signifikante Verringerung der Inhibierung der Lumineszenz-Reaktion durch ein Tensid sowie die vollständige Eliminierung dieser Inhibierung zu beschreiben.

Offenbarung der Erfindung

[0013] Die vorliegende Erfindung betrifft eine Luciferase mit Anti-Tensid-Resistenz.

[0014] Die Luciferase mit Resistenz gegenüber einem Tensid umfasst eine Luciferase, in der eine Aminosäure an Position 490 des GENJI-Glühwürmchens oder des HEIKE-Glühwürmchens oder eine Aminosäure, die der Aminosäure an Position 490 entspricht, in der Aminosäuresequenz einer Wildtyp-Glühwürmchen-Luciferase durch eine andere Aminosäure als Glutaminsäure, z.B. Lysin, ersetzt ist.

[0015] Weiters umfasst die Luciferase mit Resistenz gegenüber einem Tensid ein Polypeptid, das aus (a) oder (b) besteht:

(a) einem Polypeptid, das aus der in Seq.-ID Nr. 4 dargestellten Aminosäuresequenz besteht,
(b) einem Polypeptid, das Additionen, Deletionen oder Substitutionen einer oder mehrerer Aminosäuren im Polypeptid unter (a) umfasst und eine Luciferase-Aktivität aufweist, die gegenüber einem Tensid resistent ist,

oder ein Polypeptid, das aus (a) oder (b) besteht:

(a) einem Protein, das aus einer in Seq.-ID Nr. 6 dargestellten Aminosäuresequenz besteht,
(b) einem Protein, das Additionen, Deletionen oder Substitutionen einer oder mehrerer Aminosäuren im Polypeptid unter (a) umfasst und eine Luciferase-Aktivität aufweist, die gegenüber einem Tensid resistent ist.

[0016] Weiters betrifft die vorliegende Erfindung ein Luciferase-Gen, das für die Luciferase mit Resistenz gegenüber einem Tensid kodiert.

[0017] Weiters betrifft die vorliegende Erfindung einen rekombinanten Vektor, der das Luciferase-Gen enthält, das für die Luciferase mit Resistenz gegenüber einem Tensid kodiert.

[0018] Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine Transformante, die den rekombinanten Vektor enthält.

[0019] Zusätzlich dazu betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Produktion der Luciferase, umfassend die Schritte des Züchtens der Rekombinante in einem Medium sowie des Sammelns von Luciferase mit Resistenz gegenüber einem Tensid aus dem Kulturprodukt.

[0020] Weiters betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Messen von intrazellulärem ATP, das folgende Schritte umfasst: einen ersten Schritt, bei dem ATP in Gegenwart eines Tensids aus Zellen in einer Probe extrahiert wird; einen zweiten Schritt, bei dem ein lumineszierendes Reagens, das Luciferase enthält, zu der extrahierten ATP-Lösung hinzugefügt wird, um eine Lichtemission hervorzurufen; sowie einen dritten Schritt, bei dem die Lichtemission gemessen wird, und das dadurch gekennzeichnet ist, dass Luciferase mit Resistenz gegenüber einem Tensid eingesetzt wird.

[0021] Diese Beschreibung umfasst auch die Beschreibung und/oder die Zeichnungen, die in der Japanischen Patentanmeldung Nr. H09-361022 enthalten sind.

Kurzbeschreibung der Zeichnungen

[0022] Fig. 1 zeigt ein Produktionsverfahren für die mutierte Luciferase HIK.

[0023] Fig. 2 zeigt die zeitliche Änderung der Lichtemission von natürlicher Luciferase.

[0024] Fig. 3 zeigt einen Resistenzvergleich von mutierter Luciferase gegenüber Benzalkoniumchlorid.

[0025] Fig. 4 zeigt einen Resistenzvergleich von mutierter Luciferase gegenüber Benzetoniumchlorid.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0026] Die vorliegende Erfindung wird nun im Detail beschrieben.

[Luciferase mit Resistenz gegenüber einem Tensid]

[0027] Luciferase mit Resistenz gegenüber einem Tensid gemäß der vorliegenden Erfindung ist, wie nachstehend beschrieben.

[0028] Der Ausdruck „mit Resistenz gegenüber einem Tensid" entspricht einem beliebigen der folgenden Merkmale.

(1) Beim Vergleich mit bekannter Luciferase führt die Luciferase der vorliegenden Erfindung zu einer erhöhten anfänglichen Menge an Licht, das in Gegenwart eines Tensids emittiert wird. Dabei bedeutet der Ausdruck „vergleichen" z.B. in Fällen, in denen die Luciferase der vorliegenden Erfindung durch Einführung einer Mutation in eine Aminosäuresequenz bekannter Luciferase erzeugt wird, das Vergleichen der Lichtemission von Luciferase vor und nach der Einführung der Mutation.

(2) Beim Vergleich mit bekannter Luciferase zeigt die Luciferase der vorliegenden Erfindung in Gegenwart eines Tensids eine leichte Verringerung ihrer Aktivität.

(3) Die Luciferase der vorliegenden Erfindung besitzt in Gegenwart von 0,1% Benzalkoniumchlorid eine Restaktivität von mehr als 85%.

[0029] Im Folgenden wird „Luciferase mit Resistenz gegenüber einem Tensid" als „tensidresistente Luciferase" bezeichnet.

[0030] Der Ausdruck „Aktivität" bezeichnet eine katalytische Aktivität auf die Bioluminesezenzreaktion. Weiters kann ein beliebiges Tensid in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, solange es im Messsystem für intrazelluläres ATP verwendet werden kann. Diese Tenside umfassen anionische Tenside, kationische Tenside, ampholytische Tenside und nichtionische Tenside. Ein spezifisches Reagens ist Benzalkoniumchlorid oder Benzetoniumchlorid, die quartäre Ammoniumsalze als Hauptkomponente enthalten.

[0031] Die Luciferase der vorliegenden Erfindung kann aus Lumineszenzorganen von lumineszierenden Organismen präpariert werden. Die lumineszierenden Organismen umfassen lumineszierende Insekten und lumineszierende Bakterien. Die lumineszierenden Insekten umfassen jene, die zu der Ordnung Cleoptera gehören, wie z.B. jene, die zu der Familie der Glühwürmchen und der Familie Pyrophorus gehören. Spezifische Beispiele umfassen das GENJI-Glühwürmchen, das HEIKE-Glühwürmchen, das Nordamerikanische Glühwürmchen, das Russische Glühwürmchen, Pyrophorus plagiophthalamus, Arachnocampa luminosa und den Eisenbahnwurm. Weiters wird Luciferase der vorliegenden Erfindung durch Klonieren des Luciferase-Gens aus dem lumineszierenden Organismus und Ermöglichen der Expression des Gens unter Verwendung eines geeigneten Vektor-Wirt-Systems erhalten.

[0032] Weiters kann die Luciferase der vorliegenden Erfindung durch Einführen von Mutationen, wie z.B. Additionen, Deletionen und Substitutionen, in eine Aminosäuresequenz einer bekannten Luciferase erhalten werden. Bekannte Verfahren der Gentechnik können angewandt werden, um eine Mutation in eine Aminosäuresequenz einzuführen. Dabei wird zuerst eine Mutation, wie z.B. eine Addition, Deletion oder Substitution, in die Nucleotidsequenz eines Luciferase-Gens, das von dem zuvor genannten lumineszierenden Organismus herrührt, oder ein bekanntes Luciferase-Gen durch gentechnische Verfahren eingeführt, um eine Luciferasegen-Mutante zu erzeugen. Anschließend wird die Genmutante in ein geeignetes Wirt-Vektor-System eingefügt, wodurch ein rekombinanter Mikroorganismus erzeugt wird. Anschließend werden die rekombinanten Mikroorganismen, welche die Luciferase der vorliegenden Erfindung produzieren, durch Screening selektiert. Die selektierten rekombinanten Mikroorganismen werden in einem Medium gezüchtet. Schließlich kann die Luciferase aus dem Kulturprodukt gewonnen werden.

[0033] Im Folgenden wird tensidresistente Luciferase, die durch Einführung einer Mutation in eine Aminosäuresequenz erhalten wird, als „Luciferase-Mutante" bezeichnet.

[0034] Die Luciferase-Mutante ist z.B. Luciferase, in der eine Aminosäure, die der Aminosäure an Position 490 von GENJI-Glühwürmchen-Luciferase oder HEIKE-Glühwürmchen-Luciferase entspricht, in einer Aminosäuresequenz einer Wildtyp-Glühwürmchen-Luciferase durch eine andere Aminosäure als Glutaminsäure ersetzt wird. Die Aminosäure, bei der es sich nicht um Glutaminsäure handelt, ist eine basische Aminosäure. Spezifische Beispiele umfassen Lysin, Arginin und Histidin. Der Ausdruck „eine Aminosäure, die der Amino-

säure an Position 490 von GENJI- oder HEIKE-Glühwürmchen-Luciferase entspricht" beschreibt eine Aminosäure, die der Aminosäure an Position 490 von GENJI- oder HEIKE-Glühwürmchen-Luciferase entspricht, wenn die jeweilige Aminosäuresequenz von Luciferase mit einer Aminosäuresequenz von GENJI- oder HEIKE-Glühwürmchen-Luciferase verglichen wird.

[0035] Weiters ist die Aminosäure an Position 490 der GENJI- oder HEIKE-Glühwürmchen-Luciferase Glutaminsäure. Weiters entspricht „eine Aminosäure, die der Aminosäure an Position 490 von GENJI- oder HEIKE-Glühwürmchen-Luciferase entspricht" bei Luciferase vom Nordamerikanischen Glühwürmchen Glutaminsäure an Position 488.

[0036] Genauer gesagt handelt es sich bei der Luciferase-Mutante um ein Polypeptid, das die in Seq.-ID Nr. 4 oder 6 dargestellte Aminosäuresequenz oder eine Aminosäuresequenz umfasst, in der eine oder mehrere Aminosäuren addiert, deletiert oder substituiert sind.

[Verfahren zur Herstellung von Luciferase-Mutanten durch gentechnische Verfahren]

[0037] Ein Verfahren zur Herstellung von Luciferase-Mutanten durch gentechnische Verfahren wird nachstehend beschrieben.

[0038] Die Luciferase-Mutante wird durch Einführen von Mutationen, wie z.B. Additionen, Deletionen und Substitutionen, in die Nucleotidsequenz bekannter Luciferase sowie Ermöglichen, dass ein geeignetes Vektor-Wirt-System das Gen exprimiert, erzeugt.

[0039] Die bekannten Luciferase-Gene umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf ein Glühwürmchen-Luciferase-Gen, genauer gesagt ein Wildtyp-HEIKE-Glühwürmchen-Luciferase-Gen (Offenlegungsschrift der Japanischen Patentanmeldung Nr. 2-171189) sowie ein thermostabiles HEIKE-Glühwürmchen-Luciferase-Gen (Offenlegungsschrift der Japanischen Patentanmeldung Nr. 5-244942).

i) Ein Verfahren zum Einführen einer Mutation in ein Luciferase-Gen ist z.B. ein Verfahren, in dem ein Gen und ein Mutagen miteinander in Kontakt gebracht werden. Spezifische Beispiele für das Mutagen umfassen Hydroxylamin, salpetrige Säure, schweflige Säure und 5-Bromuracil. Weiters können auch Ultraviolettbestrahlung, Kassettenmutagenese und ortsspezifische Mutagenese unter Anwendung von PCR eingesetzt werden. Es kann durch Annealing chemisch synthetisierter DNA auch ein mutiertes Luciferase-Gen mit einer Mutation an einer gewünschten Position erzeugt werden.

ii) Als nächstes wird das mutierte Luciferase-Gen in eine Vektor-DNA, die z.B. eine Promotor-Sequenz, ein Marker-Gen und einen Replikationsstartpunkt etc. aufweist, insertiert, wodurch ein rekombinantes Plasmid erzeugt wird. Jede Vektor-DNA kann verwendet werden, solange sie in einer Wirtszelle repliziert werden kann. Beispiele für die Vektor-DNA umfassen Plasmid-DNA und Bakteriophagen-DNA. Handelt es sich bei der Wirtszelle um Escherichia coli, so umfassen Beispiele für die Vektor-DNA die Plasmide pUC119 (Takara Shuzo Co., Ltd.), pBluescript SK+ (Stratagene), pMAL-C2 (NEW England Labs), pGEX-5X-1 (Pharmacia), pXa1 (Boehringer) und pMA56 (G. Ammerer, Meth. Enzymol. 101, 109 (1983)).

iii) Anschließend wird eine geeignete Wirtszelle mit dem oben genannten rekombinanten Plasmid transformiert oder transduziert, und es wird ein Screening auf rekombinante Mikroorganismen mit der Fähigkeit, die Luciferase-Mutante zu produzieren, durchgeführt.

[0040] Es können beliebige Wirtszellen verwendet werden, die eukaryotische und prokaryotische Zellen umfassen. Die eukaryotischen Zellen umfassen Tier-, Pflanzen-, Insekten- und Hefe-Zellen. Die prokaryotischen Zellen umfassen Escherichia coli, Bacillus subtilis und Actinomyces. Die Tierzellen umfassen CHO-, COS-, HeLa-zellen, sowie Zellen von Myelom-Zelllinien. Die prokaryotischen Zellen umfassen Mikroorganismen, die zur Gattung Escherichia gehören, wie z.B. Escherichia coli JM101 (ATCC 33876), JM109 (produziert von Takara Shuzo Co., Ltd.), XL1-Blue (produziert von Stratagene) und HB101 (ATCC33694).

[0041] Die Transformation kann in der vorliegenden Erfindung z.B. durch das Verfahren von D.M. Morrison durchgeführt werden (Meth. Enzymol. 68, 326–331 (1979)); die Transduktion kann z.B. durch das Verfahren von B. Hohn durchgeführt werden (Meth. Enzymol. 68, 299–309 (1979)). Verfahren zur Reinigung rekombinanter DNA aus rekombinanten Mikroorganismen umfassen das Verfahren von P. Guerry (J. Bacteriology 116, 1064–1066 (1973)) sowie das Verfahren von D.B. Clewell (J. Bacteriology 10, 667–676 (1972)).

[0042] Die Nucleotidsequenz eines Gens, die in die rekombinante DNA insertiert ist, kann z.B. durch das Maxam-Gilbert-Verfahren (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 560–564 (1977) und das Didesoxy-Verfahren (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463–5467 (1977)) bestimmt werden.

iv) Die Luciferase-Mutante der vorliegenden Erfindung kann durch Züchten der rekombinanten Mikroorganismen, die auf die oben beschriebene Art und Weise erhalten werden, in Medien produziert werden.

[0043] Handelt es sich bei der Wirtszelle um Escherichia coli, so kann rekombinantes E. coli durch Festkulturverfahren, vorzugsweise aber durch Flüssigkulturverfahren gezüchtet werden.

[0044] Ein Kulturmedium der vorliegenden Erfindung enthält eine oder mehrere Stickstoffquellen, wie z.B. Hefeextrakt, Trypton, Pepton, Fleischextrakt, Maisquellwasser oder Exsudat von Sojabohnen oder Weizenkleie, denen ein oder mehrere anorganische Salze, wie z.B. Natriumchlorid, Kaliumphosphat, Dikaliumphosphat, Magnesiumsulfat, Magnesiumchlorid, Eisen(III)-chlorid, Eisen(III)-sulfat oder Mangansulfat, zugesetzt werden. Falls notwendig werden diesem Medium Zucker und Vitamine zugesetzt. Weiters wird der anfängliche pH des Mediums vorzugsweise auf einen pH im Bereich von 7 bis 9 eingestellt. Überdies wird die Kultur bei einer Temperatur im Bereich von 30°C bis 42°C, vorzugsweise bei etwa 37°C, für eine Zeitspanne von 3 bis 24 Stunden, vorzugsweise für 5 bis 8 Stunden, durchgeführt. Bevorzugte Kulturverfahren umfassen die Belüftungs-Rührsuspensionskultur, die Schüttelkultur und die statische Kultur.

[0045] Um Luciferase-Mutanten nach der Beendigung des Züchtens von rekombinantem E. coli aus dem Kulturprodukt zu gewinnen, können Standardverfahren zum Sammeln von Enzymen verwendet werden. Das heißt, das Kulturprodukt wird zentrifugiert, um Zellen zu erhalten. Anschließend werden die Zellen durch Behandlung mit lytischen Enzymen, wie z.B. Lysozym, Ultrabeschallbehandlung oder Vermahlung zerstört. Fusioniertes Protein wird aus der Zelle abgegeben. Anschließend werden unlösliche Substanzen durch Filtration oder Zentrifugation entfernt, so dass eine rohe Enzymlösung erhalten werden kann, welche die Luciferase-Mutante enthält.

[0046] In der vorliegenden Erfindung kann die oben genannte rohe Enzymlösung als authentisches Proteinmaterial verwendet werden, oder alternativ dazu kann sie mittels Standard-Proteinreinigungsverfahren auf höhere Reinheitsgrade weiter gereinigt werden. Diese Verfahren, umfassend Sulfataussalzung, Fällung mit organischem Lösungsmittel, Ionenaustauschchromatographie, Hydrophobchromatographie, Gelfiltrationschromatographie, Adsorptionschromatographie, Affinitätschromatographie und Elektrophorese, können alleine oder in Kombination angewandt werden.

[0047] Die Verwendung von tensidresistenter Luciferase der vorliegenden Erfindung ermöglicht einen Zusatz von Tensid in hohen Konzentrationen im Extraktionsprozess von intrazellulärem ATP.

[Detektion von intrazellulärem ATP gemäß vorliegender Erfindung]

[0048] Die Detektion von intrazellulärem ATP gemäß vorliegender Erfindung wird nachstehend beschrieben.
i) Zuerst wird ATP-Extraktionsreagens, das Tensid als eine wirksame Komponente enthält, zu einer zellhältigen Probe hinzugefügt, um intrazelluläres ATP aus den Zellen zu extrahieren. Der Ausdruck „Zellen" bezieht sich auf Zellen, die von Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen (z.B. Hefen, Schimmel, Pilzen, Bakterien, Actinomyceten, einzelligen Algen, Viren und Protozoen) abstammen.

[0049] Es kann eine beliebige Probe verwendet werden, solange sie die oben erwähnten Zellen enthält. Diese Proben umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf Lebensmittel und Getränke, Pharmazeutika, Kosmetika, Meerwasser, Flusswasser, Brauchwasser, Abwasser, Boden, Urin, Fäkalien, Blut, Sputum, Eiter, sowie das Kulturprodukt der oben genannten Zellen. Eine Probelösung kann auch durch Suspendieren dieser Proben in einem geeigneten Lösungsmittel, wie z.B. destilliertem Wasser, physiologischer Salzlösung, Phosphorsäurepuffer, Tris-Puffer oder Natriumacetatpuffer, hergestellt werden. Enthält eine flüssige Probe Feststoffe, so wird die flüssige Probe in einem geeigneten Lösungsmittel unter Verwendung eines Mischers suspendiert oder homogenisiert, so dass sie auf dieselbe Art und Weise behandelt werden kann wie jene in flüssiger Form.

[0050] Eine Probe einer Filtermembran kann auch durch Filtrieren der oben genannten Probe in flüssiger Form durch eine hydrophile oder hydrophobe Filtermembran bereitet werden. Die hydrophile oder hydrophobe Filtermembran, von der die Zellen eingefangen werden, kann als Probe verwendet werden. In solch einem Fall kann eine hydrophile film- oder blattartige Filtermembran verwendet werden, die aus hydrophilem Polytetrafluorethylen, hydrophilem Polyvinylidenfluorid, hydrophilem Polyamid, Acetylcellulose und Nitrocellulose etc. besteht. Hydrophobe Filtermembranen, die aus PVDF (Polyvinylidenfluorid), PTFE (Polytorafluorethylen) und PE (Polyethylen) etc. bestehen, können verwendet werden.

[0051] Tenside umfassen anionische Tenside, kationische Tenside, ampholytische Tenside und nichtionische

Tenside.

[0052] Anionische Tenside umfassen Natriumdodecylsulfat (SDS), Laurylkaliumsulfat, Natriummonolaurylphosphat und Natriumalkylbenzolsulfonsäure. Kationische Tenside umfassen Benzalkoniumchlorid (BAC), Benzetoniumchlorid (BZC), Cetylpyridiniumchlorid, Cetyltrimethylammoniumbromid und Myristyldimethylbenzylammoniumchlorid. Ampholytische Tenside umfassen Twittergent-Detergens 3-08, 3-10, 3-12, 3-14, 3-16 und Tego. Nichtionische Tenside schließlich umfassen Tween 20, 60 und 80, Span 60 und 80, Triton X-45 und X-100, Polyoxyethylenether und Polyoxyethylenlaurylether.

[0053] Es kann eine beliebige Tensidkonzentration verwendet werden, solange sie die vollständige Expression der Fähigkeit, ATP zu extrahieren, ermöglicht. Eine bevorzugte Konzentration eines Tensids liegt bei 0,05% oder mehr des Gemischs aus Probe und ATP-Extraktionsreagens.

[0054] Eine Probe und ATP-Extraktionsreagens werden miteinander bei Raumtemperatur oder unter Wärmezufuhr kontaktiert.

ii) Nach der ATP-Extraktion wird bioluminesziерendes Reagens zu der Probe hinzugefügt, die tensidresistente Luciferase enthält, um eine Emission hervorzurufen. Anschließend wird die Lichtemission gemessen.

[0055] Stammt die tensidresistente Luciferase von einem Glühwürmchen, so sind die bioluminesziерenden Reagenzien jene, die z.B. die folgenden Komponenten (a) bis (c) enthalten:

(a) tensidresistente Luciferase,
(b) Luciferin,
(c) Magnesiumionen oder andere Metallionen.

[0056] Weiters können zusätzlich zu den oben genannten Komponenten Substanzen hinzugefügt werden, die eine pH-Einstellung oder eine verbesserte Lagerbarkeit ermöglichen. Solche Substanzen umfassen EDTA-2Na, Dithiothreitol, Ammoniumsulfat, Saccharose, 2-Mercaptoethanol, HEPES, Tricin und Tris.

iii) Die Menge an Licht, die bei Zugabe eines bioluminesziерenden Reagens emittiert wird, kann mit einem Lumineszenzmessgerät, wie z.B. einem Lumitester K-100, hergestellt von Kikkoman Corporation, einem Lumineszenz-Leser BLR-201, hergestellt von Aloka Co., Ltd. (einem verbesserten Typus) oder einem Lumat-LB9501, hergestellt von Berthold, gemessen werden. Wird eine Filtermembran, mit der Zellen eingefangen werden, als Probe verwendet, so können die Zellen unter Verwendung einer bioluminesziерenden Bildanalyse-Systemvorrichtung gezählt werden, um Flecken auf der Filtermembran zu fotografieren. Solch eine Vorrichtung ist ARGUS-50/CL (mit Fasertaper: hergestellt von Hamamatsu Photonics K.K.).

[0057] Die vorliegende Erfindung wird nun anhand von Beispielen ausführlich beschrieben. Das technische Gebiet der vorliegenden Erfindung wird durch diese Beispiele jedoch nicht eingeschränkt.

Beispiel 1: Tensidresistenz von von verschiedenen Glühwürmchen-Spezies stammender Naturtyp-Luciferase

(Verfahren zur Präparierung von von verschiedenen Glühwürmchen-Spezies stammender Wildtyp-Luciferase)

[0058] Von GENJI- und HEIKE-Glühwürmchen stammende Luciferase wurde durch die folgenden Verfahren präpariert. 1 mM Ethylendiamin-4-acetat-2-natrium und 2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid wurden zu 25 mM Tris(hydroxy)aminomethan-Salzsäure-Puffer hinzugefügt. Weiters wurde Ammoniumsulfat zu dieser Lösung zugesetzt, um eine Sättigung von 10% zu erreichen. Zu diesem Gemisch wurden bei einem pH von 7,8 Schwanzabschnitte der verschiedenen Glühwürmchen-Spezies hinzugefügt und anschließend unter Verwendung von Hiskotoron (hergestellt von Nichionrikakikaiseisakusho) aufgeschlossen. Die resultierende Lösung wurde bei 12.000 U/min 20 Minuten lang zentrifugiert, um Überstände als Ausgangsmaterialien für die Reinigung zu erhalten. Die Reinigung wurde durch das Verfahren, umfassend das Aussalzen von Ammoniumsulfat, eine Ultrogel-Ac-A34-Säule (produziert von LKB) und eine Hydroxyapatit-HPLC-Säule (hergestellt von TOSHOH, TSK-Gel-HA-100), durchgeführt. Schließlich wurde eine elektrophoretisch homogene Probe erhalten. Zusätzlich dazu ist die vom Nordamerikanischen Glühwürmchen stammende Luciferase ein im Handel erhältliches Produkt (Sigma, L-9506).

(Verfahren zur Bestimmung der Luciferase-Aktivität)

[0059] Eine Luciferase-Probe wurde unter Verwendung von verdünnter Enzymlösung (1 mM EDTA, 1 mM 2-Mercaptoethanol, 1% BSA, 50 mM HEPES (pH 7,5)) gründlich verdünnt. Zu 100 µl dieser Lösung wurden 100 µl Substratlösung (1,4 mM Luciferin, 40 mM ATP, 300 mM $MgSO_4$, 7 H_2O, 50 mM HEPES (pH 7,5)) hinzu-

gefügt.

[0060] Die Lichtemission wurde unter Verwendung eines BLE-201-Lumineszenz-Lesers (hergestellt von Aloka Co., Ltd.) unter den folgenden Bedingungen gemessen.
Messbereich: ×100
Angezeigter numerischer Wert: ×1000
Messtemperatur: 30°C
Messzeit: 20 Sekunden
1 MLU (Millionen Lichteinheiten)/ml ist der Wert der Aktivität, wenn der gemessene Wert unter diesen Bedingungen bei 1000 Counts lag.

(Verfahren zur Bestimmung der Tensidresistenz)

[0061] Enzymproben wurden durch Präparation von von verschiedenen Glühwürmchen-Spezies stammenden Luciferase-Proben unter Verwendung von verdünnter Enzymlösung (1 mM EDTA, 1 mM 2-Mercaptoethanol, 5% Glycerin, 50 mM HEPES (pH 7,5)) erhalten, um eine Konzentration von 0,5 MLU/ml zu erzielen.

[0062] 50 µl 0,4%igs Benzalkoniumchlorid (25 mM Tricin mit einem pH von 7,75) und anschließend 50 µl Enzymprobe wurden zu 100 µl Substratlösung hinzugefügt (4 mM ATP, 0,4 mM Luciferin, 10 mM Magnesiumsulfat, 50 mM HEPES (pH 7,5)). Nachdem die Lösung 5 Sekunden lang gerührt wurde, wurde die Lichtemission jede Sekunde unter Verwendung eines Berthold-Lumat LB-9501 1 Minute lang gemessen.

[0063] Fig. 2 zeigt die Resultate. Auf der vertikalen Achse dieser Figur wurde der relative Verhältnis der Lichtemission unter Verwendung von 25 mM Tricin (pH 7,75) anstelle von 0,4% Benzalkoniumchlorid aufgetragen, wobei die anfängliche Menge an emittiertem Licht mit 100% angenommen wurde.

[0064] Wie sich in diesen Resultaten zeigt, wies die Luciferase des Nordamerikanischen Glühwürmchens eine geringe anfängliche Lichtemission auf, und die Lichtemission nahm rasch ab. Dies wurde durch die geringe Tensidresistenz der Luciferase des Nordamerikanischen Glühwürmchens hervorgerufen. Dies kann zu geringer Empfindlichkeit und Genauigkeit beim Messen solcher Werte führen. Auf der anderen Seite zeigte GENJI-Glühwürmchen-Luciferase eine höhere anfängliche Lichtemission als Luciferase des Nordamerikanischen Glühwürmchens. Somit wurde gezeigt, dass GENJI-Glühwürmchen-Luciferase eine höhere Tensidresistenz als Luciferase des Nordamerikanischen Glühwürmchens aufwies. Weiters wies HEIKE-Glühwürmchen-Luciferase eine höhere anfängliche Lichtemission auf als jene von GENJI-Glühwürmchen-Luciferase, und die Emission nahm langsam ab. Daher besitzt HEIKE-Glühwürmchen-Luciferase eine gute Tensidresistenz, und zwar eine, die höher ist als jene von GENJI-Glühwürmchen-Luciferase. Diese Resultate zeigen, dass das Ausmaß der Tensidresistenz von Luciferase je nach Glühwürmchen-Spezies variiert.

Beispiel 2: Herstellung der Luciferase-Mutanten HLK und HIK

[0065] Es wurden zwei Arten von Luciferase-Mutanten (genannt „HLK" und „HIK") durch die folgenden Verfahren hergestellt.

(Erzeugung eines für die Luciferase-Mutante HLK kodierenden Gens)

[0066] Ein mutiertes Luciferase-Gen wurde unter Verwendung von PCR mittels ortsspezifischer Mutagenese erzeugt. Das in der Offenlegungsschrift der Japanischen Patentanmeldung Nr. 5-244942 beschriebene Plasmid pHLf7-217Leu wurde als Matrize für die PCR-Reaktion verwendet. pHLf7-217Leu war ein rekombinantes Plasmid, das durch Insertion eines thermostabilen HEIKE-Glühwürmchen-Luciferase-Gens in das Plasmid pUC119 hergestellt wurde, wobei in dem Gen ein für Leu kodierendes Gen durch eine Aminosäure, die Ala an Position 217 entspricht, ersetzt wurde. Zusätzlich dazu wurde E. coli JM101, in die das rekombinante Plasmid pHLf7-217Leu eingeführt wurde, E. coli JM101 (pHLf7-217Leu) genannt und wurde am 22. April 1992 als FERM-BP-3840 beim National Institute of Bioscience and Human-Technology (1–3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan) hinterlegt.

[0067] Der Primer für die PCR-Reaktion war ein Oligonucleotid mit derdie in Seq.-ID Nr. 1 oder 2 gezeigten Nucleotidsequenz. Die DNA-Polymerase war eine KOD-Dash-Polymerase (hergestellt von TOYOBO). Ein PCR-Reaktionszyklus (94°C, 30 Sekunden lang, 50°C 2 Sekunden lang und 74°C 3 Minuten lang) wurde in den Beispielen mit Bindung an KOD-Dash-Polymerase, 30 Mal wiederholt. Das PCR-Produkt wurde unter Verwendung von Standardverfahren in das zirkuläre rekombinante Plasmid pHLfLK ligiert.

[0068] Das mutierte Luciferase-Gen, das in pHLfLK enthalten war, wurde sequenziert. Die Reaktion wurde unter Verwendung eines Diprimer-Taq-Sequenzierungssets (hergestellt von Biosystems) durchgeführt. Anschließend wurde eine elektrophoretische Analyse unter Verwendung eines ABI-373A-DNA-Sequenzierers (hergestellt von Applied Biosystems) durchgeführt. Die gesamte Nucleotidsequenz des erhaltenen mutierten Luciferase-Gens wird in Seq.-ID Nr. 3 gezeigt, und die Aminosäuresequenz des Polypeptids, für das dieses Gen kodiert, wird in Seq.-ID Nr. 4 gezeigt. Im mutierten Luciferase-Gen war der Genabschnitt, der an Position 217 von Wildtyp-HEIKE-Glühwürmchen-Luciferase Alanin entsprach, durch ein Gen ersetzt, das für Leucin kodierte, der Genabschnitt, der an Position 490 derselben Glutaminsäure entsprach, war durch ein Gen ersetzt, das für Lysin kodierte. Der E.-coli-Stamm JM109 mit eingeführtem pHLfLK wurde E. coli JM109(pHLfLK) genannt (siehe **Fig. 1**). E. coli JM109(pHLfLK) wurde am 16. Oktober 1997 als FERM-BP-6147 beim National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Japan, hinterlegt.

[0069] Das in Seq.-ID Nr. 4 dargestellte Polypeptid wurde Luciferase-Mutante HLK genannt.

(Herstellung eines für die Luciferase-Mutante HIK kodierenden Gens)

[0070] Ein mutiertes Luciferase-Gen wurde unter Verwendung des Plasmids pHLf7-217Ile, beschrieben in der Offenlegungschrift der Japanischen Patentanmeldung Nr. 5-244942, hergestellt. Das Plasmid pHLf7-217Ile war ein rekombinantes Plasmid, das durch Insertieren eines thermostabilen HEIKE-Glühwürmchen-Luciferase-Gens in das Plasmid pUC119 hergestellt wurde, wobei in dem Gen ein für Ile kodierendes Gen durch eine Aminosäure ersetzt wurde, die an Position 217 Ala entsprach. Der unter Verwendung dieses Plasmids erhaltene Transformanten-Stamm wurde am 22. April 1992 als FERM-BP-3841 beim National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Japan, hinterlegt.

[0071] Es wurde ein Fragment von etwa 560 bp durch Schneiden von pHLfLK mit EcoRV und NarI mittels Agarose-Gelelektrophorese erhalten. Anschließend wurde das Fragment in pHLf7-217Ile insertiert, das mit denselben Restriktionsenzymen behandelt worden war.

[0072] Das resultierende rekombinante Plasmid wurde pHLfIK genannt, und der E.-coli-Stamm JM109 mit eingeführtem Plasmid wurde E.-coli-JM109(pHLfIK) genannt.

[0073] E.-coli-JM109(pHLfIK) wurde am 16. Oktober 1997 als FERM-BP-6146 beim National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Japan, hinterlegt.

[0074] Die gesamte Nucleotidsequenz des mutierten Luciferase-Gens, das in pHLfIK enthalten ist, wird in Seq.-ID Nr. 5 dargestellt, und die Aminosäuresequenz des Polypeptids, für das dieses Gen kodiert, wird in Seq.-ID Nr. 6 dargestellt. Im mutierten Luciferase-Gen war der Genabschnitt, der an Position 217 von Wildtyp-HEIKE-Glühwürmchen-Luciferase Alanin entsprach, durch ein Gen ersetzt, das für Isoleucin kodierte, der Genabschnitt, der an Position 490 derselben Glutaminsäure entsprach, war durch ein Gen ersetzt, das für Lysin kodierte (siehe **Fig. 1**).

[0075] Das in Seq.-ID Nr. 6 dargestellte Polypeptid wurde mutiertes HIK-Glühwürmchen genannt.

Beispiel 3: Herstellung der Luciferase-Mutanten HLK und HIK

[0076] E.-coli-JM109(pHLfLK) und E.-coli-JM109(pHLfIK) wurden auf LB-Medium (1% (Gew./Vol.) Bacto-Trypton, 0,5% (Gew./Vol.) Hefeextrakt, 0,5% (Gew./Vol.) NaCl, Ampicillin (50 µg/ml), 1,4% (Gew./Vol.) Agar) überimpft, das jeweils Ampicillin enthielt, und bei 37°C 18 Stunden lang gezüchtet. Die resultierende Kulturflüssigkeit wurde bei 8000 U/min 10 Minuten lang zentrifugiert. Die präzipitierten Zellen wurden in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer bei einem pH von 7,8 suspendiert (0,1 M Ammoniumsulfat, 1 Mm EDTA) und durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen.

[0077] Als nächstes wurde rohe Enzymlösung durch Zentrifugation bei 12.000 U/min für eine Zeitspanne von 10 Minuten erhalten. Die erhaltene Enzymlösung wurde unter Anwendung der oben genannten Reinigungsverfahren gereinigt, so dass sie zu einer elektrophoretisch homogenen Probe wurde.

Beispiel 4: Tensidresistenz der Luciferase-Mutanten HLK und HIK

(Zeitliche Änderung der Emission)

[0078] Zum Vergleich der Tensidresistenz von Luciferase-Mutanten mit jener von bekannter Luciferase wurde die zeitliche Änderung der Emission durch die zuvor erwähnten Verfahren zur Messung der Tensidresistenz gemessen. Fig. 3 zeigt die unter Verwendung von 0,4% Benzalkoniumchlorid (25 mM Tricin (pH 7,75)) erhaltenen Resultate. Fig. 4 zeigt die unter Verwendung von 0,8% Benzethoniumchlorid (25 mM Tricin (pH 7,75)) erhaltenen Resultate.

[0079] „HEIKE-I-Mutante" ist in dieser Figur thermostabile HEIKE-Glühwürmchen-Luciferase (beschrieben in der Offenlegungsschrift der Japanischen Patentanmeldung Nr. 5-244942), worin an Position 217 von Wildtyp-HEIKE-Glühwürmchen-Luciferase Ile durch Ala ersetzt ist. „HEIKE-L-Mutante" ist thermostabile HEIKE-Glühwürmchen-Luciferase (Offenlegungsschrift der Japanischen Patentanmeldung Nr. 5-244942), in der an Position 217 von Wildtyp-HEIKE-Luciferase Ala durch Leu ersetzt ist. „HIK" ist eine Mutante, in der Glu an Position 490 der HEIKE-I-Mutante durch Lys ersetzt ist, d.h. die in Beispiel 3 hergestellte Luciferase-Mutante HIK. „HLK" ist eine Mutante, in der Glu an Position 490 der HEIKE-L-Mutante durch Lys ersetzt ist, d.h. die in Beispiel 3 hergestellte Luciferase-Mutante HLK.

[0080] Wie in Fig. 3, welche die Resultate für Benzalkoniumchlorid zeigt, zu sehen ist, nahm die Emission von HIK langsamer ab als die der HEIKE-I-Mutante. Ein Vergleich der Mutanten HLK und HEIKE-L zeigt, dass HLK eine etwa um 20% erhöhte anfängliche Lichtemission sowie eine langsamere Abnahme der Lichtemission aufwies.

[0081] Daher führte die Substitution einer Aminosäure an der Position 490 zu einer verbesserten Tensidresistenz der Luciferase.

[0082] Wie in Fig. 4, welche die unter Verwendung von Benzethoniumchlorid erhaltenen Resultate zeigt, dargestellt ist, wies HIK eine langsamere Abnahme der Emission auf als die HEIKE-I-Mutante. Weiters zeigte HLK eine langsamere Abnahme der Lichtemission als die HEIKE-L-Mutante. Daher führte die Substitution einer Aminosäure an Position 490 zu einer verbesserten Tensidresistenz.

(Vergleich der Emissionsrate)

[0083] Der Einfluss der verwendeten Enzymlösung, Substratlösung und von Benzalkoniumchlorid auf die beim Messen der zeitlichen Änderung unter tatsächlichen Emissionsmessbedingungen erhaltenen Messwerte wurde untersucht. Tabelle 1 zeigt die Lichtemission, die unter Verwendung eines Berthold-Lumat LB-9501 unter den Messbedingungen (5 Sekunden Wartezeit, 3 Sekunden Messzeit) erhalten wurde.

[0084] Zusätzlich dazu wurde die Emissionsrate (Restaktivität) durch Dividieren der Lichtemission, die in Gegenwart von 0,4% Benzalkoniumchlorid gemessen wurde, durch einen Kontrollwert berechnet. Dabei war der Kontrollwert die Lichtemission unter Verwendung von 25 mM Tricin bei einem pH von 7,75 anstelle von 0,4% Benzalkoniumchlorid.

Tabelle 1

Luciferase-Typ	Lichtemission (RLU)		Emissionsrate(%)
	ohne Extraktionsreagens	mit Extraktionsreagens	
Nordamerikanisches Glühwürmchen	452563	97790	21,6
GENJI-Glühwürmchen	409406	167805	41,0
HEIKE-Glühwürmchen	425792	324724	76,3
HEIKE-I-Mutante	422269	341039	80,8
HEIKE-L-Mutante	423728	343634	81,1
HIK	386429	345159	89,3
HLK	390289	396764	101,7

[0085] Luciferase vom Nordamerikanischen Glühwürmchen zeigte eine Emissionsrate, die nur bei dem geringen Wert von 21,6% lag, was eine starke Verringerung der Empfindlichkeit anzeigte. Andererseits lagen die Emissionsraten für GENJI- und HEIKE-Glühwürmchen-Luciferase bei 41,0% bzw. 76,3%, was zeigte, dass die Empfindlichkeit dieser Glühwürmchen-Luciferasen weniger betroffen war als jene der Luciferase des Nordamerikanischen Glühwürmchens.

[0086] Die Emissionsrate für die Luciferase-Mutanten HIK und HLK lag bei 89,3% bzw. 101,7%. Diese Raten waren um vieles höher als jene von Wildtyp-HEIKE-Glühwürmchen-Luciferase sowie von thermostabiler HEIKE-Glühwürmchen-Luciferase. Speziell die Emissionsrate von HLK lag bei beinahe 100%. Das heißt, HLK kann dieselbe Lichtemission erbringen, unabhängig von der Gegenwart oder dem Fehlen eines Tensids. Daher ist die Empfindlichkeit von HLK durch die Verwendung eines Tensids vollkommen unbeeinflusst, was eine Messung mit hoher Genauigkeit ermöglicht.

(Vergleich der IC50)

[0087] Benzalkoniumchlorid und verschiedene Luciferasen wurden 10 Minuten lang miteinander vermischt. Anschließend wurde die Benzalkoniumchloridkonzentration (IC50) bestimmt, bei der die Aktivität zu 50% deaktiviert wurde. Gleiche Mengen an Luciferaselösung, die in dieser Konzentration hergestellt wurden, sowie 0,01 bis 0,1% Benzalkoniumchlorid wurden vermischt und anschließend 10 Minuten lang bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden 100 µl Substratlösung zu dem Gemisch hinzugefügt. Sofort nach der Addition wurde die Lichtemission unter Verwendung eines Berthold-Lumats LB-9501 gemessen. Die erhaltenen IC50-Werte waren wie in Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 2: IC_{50} für verschiedene Luciferase-Arten

Luciferase-Typ	IC_{50}(%)
Nordamerikanisches Glühwürmchen	0,014
GENJI-Glühwürmchen	0,016
HEIKE-Glühwürmchen	0,026
HEIKE-I-Mutante	0,028
HEIKE-L-Mutante	0,028
HIK	0,032
HLK	0,035

[0088] Luciferase des Nordamerikanischen Glühwürmchens zeigte die geringste IC_{50} von den drei Wildtyp-Luciferase-Arten. Das heißt, es wurde gezeigt, dass Luciferase vom Nordamerikanischen Glühwürmchen die geringste Resistenz gegenüber einem Tensid aufwies. HEIKE-Glühwürmchen-Luciferase wies die höchste IC_{50} der Wildtyp-Luciferasen auf. HLK und HIK zeigten IC_{50}-Werte, die höher waren, als jene von Wildtyp-HEIKE-Glühwürmchen-Luciferase und thermostabiler HEIKE-Glühwürmchen-Luciferase, was zeigte, dass die Resistenz durch Substitution einer Aminosäure an Position 490 verbessert wurde. Besonders HLK zeigte eine IC_{50}, die höher war als jene von HIK, was zeigte, dass HLK die beste Tensidresistenz besaß.

Beispiel 5: Verfahren zum Messen von intrazellulärem ATP

[0089] Als nächstes wird ein Verfahren zum Messen von intrazellulärem ATP unter Verwendung der tensidresistenten Luciferase der vorliegenden Erfindung beschrieben.

[0090] Ein hierin verwendetes Standardverfahren war das TCA-Extraktionsverfahren, worin intrazelluläres ATP unter Verwendung von Trichloressigsäure (TCA) extrahiert wird und die Menge an extrahiertem ATP unter Verwendung der Luciferin-Luciferase-Lumineszenz-Reaktion gemessen wird. Das TCA-Extraktionsverfahren besitzt eine ausgezeichnete Extraktionswirksamkeit. Weiters wird im TCA-Extraktionsverfahren keine Inhibierung der Lumineszenz-Reaktion durch TCA hervorgerufen, da die Emission gemessen wird, nachdem die TCA-hältige Probe im Verhältnis 1:100 verdünnt wurde. Aufgrund dieser Verdünnung ist das TCA-Extraktionsverfahren jedoch kompliziert und kann eine Verringerung der Messempfindlichkeit hervorrufen.

1. Materialien

(1) Tensid

[0091] Benzalkoniumchlorid (BAC, Japanische Pharmakopöe) wurde verwendet. Das ATP-Extraktionsreagens wurde durch Auflösen dieses Tensids in einer Konzentration von 0,25% in 25 mM Tricin (pH 7,75) hergestellt.

(2) Mikroorganismen

[0092] Es wurden vier Stämme verwendet, Escherichia coli (ATCC 25922), Staphylococcus aureus (ATCC 25923), Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853) und Enterococcus faecalis (ATCC 29212).

(3) Probenvorbereitung

[0093] Nach Standardverfahren wurde eine unverdünnte Probenlösung durch Züchten der vorgeschriebenen Mikroorganismen auf einem Normal-Broth-Medium (hergestellt von Eiken Chemical Co., Ltd.) bei 35°C über Nacht hergestellt. Im Verfahren der vorliegenden Erfindung wurde eine verdünnte Probelösung durch Verdünnen einer unverdünnten Lösung der Kulturflüssigkeit im Verhältnis 1:100 mit sterilem Wasser hergestellt.

(4) Luciferase

[0094] Tensidresistente Luciferase-Arten der vorliegenden Erfindung waren HIK und HLK. Tensidresistente Kontroll-Luciferase-Arten waren bekannte Luciferase-Arten (Luciferase des Nordamerikanischen Glühwürmchens, GENJI-Glühwürmchen-Luciferase, HEIKE-Glühwürmchen-Luciferase, HEIKE-I-Mutante und HEIKE-L-Mutante).

(5) Lumineszierendes Reagens

[0095] Lumineszierendes Reagens wurde durch Zusatz verschiedener Luciferase-Arten zu Lösungen hergestellt, die 0,15 mM Luciferin, 6 mM EDTA, 15 mM Magnesiumacetat, 0,2 mM Dithiothreitol, 0,5% BSA und 25 mM HEPES (pH 7,75) enthielten.

[0096] Die hinzuzufügende Luciferase-Menge wurde so vorbereitet, dass die bei Zusatz von 100 µl 2×10^{-8} M ATP-Standardlösung zu 100 µl des lumineszierenden Reagens erzeugte Lichtemission dieselbe Menge an Lichtemission war wie bei Verwendung eines lumineszierenden, an Luciferase-LU (Kikkoman Corporation) gebundenen Reagens.

2. Verfahren zur Messung von intrazellulärem ATP

(1) Verfahren der vorliegenden Erfindung

[0097] 100 µl ATP-Extraktionsreagens wurden zu 100 µl Probe hinzugefügt. Die Lösung wurde 20 Sekunden lang bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden 100 µl des lumineszierenden Reagens zu dieser Lösung hinzugefügt. Sofort nach der Zugabe wurde die Lichtemission unter Verwendung eines Lumat-LB-9501, hergestellt von Berthold, gemessen.

(2) Standardverfahren

[0098] 100 µl 10-%-Trichloracetatlösung wurden zu 100 µl Probe hinzugefügt, und die Lösung wurde 1 Minute lang stehen gelassen. 9,8 ml 25-mM-Tricin (pH 7,75) wurden zu diesem Extrakt hinzugefügt, und anschließend wurde der Extrakt gut gerührt. 25 mM Tricin (pH 7,75) und 100 µl eines lumineszierenden Reagens, gebunden an CheckLite-LU (hergestellt von Kikkoman Corporation), wurden zu 100 l der Probe hinzugefügt. Sofort nach der Zugabe wurde die Lichtemission unter Verwendung eines von Berthold hergestellten Lumat-LB-9501 gemessen.

3. Resultate

[0099] Die Tabellen 3 und 4 zeigen die Resultate. Das relative Verhältnis der unter Verwendung verschiedener Luciferase-Arten unter Verwendung der lumineszierenden Reagenzien erhaltenen Lichtemissionen ist

ebenfalls in diesen Tabellen angeführt. Dabei wurde die durch das Standardverfahren (TCA-Extraktionsverfahren) erhaltene Lichtemission als 100% definiert.

Tabelle 3: Detektion von intrazellulärem ATP

Messverfahren	E.coli ATCC25922		S.aureus ATCC25923	
	gemessener Wert (RLU)	relatives Verhältnis(%)	gemessener Wert (RLU)	relatives Verhältnis(%)
Standardverfahren (TCA-Extraktionsverfahren)	132794	(100,0)	130220	(100,0)
Nordamerikanisches Glühwürmchen	153	(0,1)	163	(0,1)
GENJI-Glühwürmchen-Luciferase	463	(0,3)	659	(0,5)
HEIKE-Glühwürmchen-Luciferase	76082	(57,3)	74019	(56,8)
HEIKE-I-Mutante	47655	(35,9)	50031	(38,4)
HEIKE-L-Mutante	46217	(34,8)	51243	(39,4)
HIK	97073	(73,1)	76533	(58,8)
HLK	87981	(66,3)	72182	(55,4)

Tabelle 4: Detektion von intrazellulärem ATP

Messverfahren	P.aeruginosa ATCC 27853		E.faecalis ATCC 29212	
	gemessener Wert (RLU)	relatives Verhältnis(%)	gemessener Wert (RLU)	relatives Verhältnis(%)
Standardverfahren (TCA-Extraktionsverfahren)	168141	(100,0)	12427	(100,0)
Nordamerikanisches Glühwürmchen	553	(0,3)	113	(0,1)
GENJI-Glühwürmchen-Luciferase	1503	(0,9)	163	(1,3)
HEIKE-Glühwürmchen-Luciferase	117096	(69,6)	8132	(65,4)
HEIKE-I-Mutante	80455	(47,8)	4586	(36,9)
HEIKE-L-Mutante	81069	(48,2)	4762	(38,3)
HIK	131134	(78,0)	7914	(63,7)
HLK	131815	(78,4)	7998	(64,4)

[0100] Es wurde keine Emission beim lumineszierenden Reagens beobachtet, das Luciferase des Nordamerikanischen Glühwürmchens enthielt. GENJI-Glühwürmchen-Luciferase zeigte eine schwache Emission. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Luciferase selbst durch das Tensid abgetötet wurde. Daher wurde gezeigt, dass das Tensid in hoher Konzentration, wie sie in dieser Untersuchung verwendet wurde, nicht als ATP-Extraktionsreagens für die Luciferase verwendet werden kann.

[0101] Im Gegensatz zu Luciferase des Nordamerikanischen Glühwürmchens und GENJI-Glühwürmchen-Luciferase zeigte HEIKE-Glühwürmchen-Luciferase eine Emission von 60 bis 70% jener im TCA-Extraktionsverfahren. Es wurde gezeigt, dass HEIKE-Glühwürmchen-Luciferase eine höhere Tensidresistenz besaß als jene von Luciferase des Nordamerikanischen Glühwürmchens und von GENJI-Glühwürmchen-Luciferase.

[0102] Lichtemissionen der HEIKE-L-Mutante und der HEIKE-I-Mutante, wobei es sich um thermostabile HEIKE-Glühwürmchen-Luciferase handelt, entsprachen jeweils etwa 40% jener im TCA-Extraktionsverfahren und waren großteils niedriger als jene von Wildtyp-HEIKE-Glühwürmchen-Luciferase.

[0103] Jeder der Lichtemissionswerte von HIK und von HLK, wobei es sich um tensidresistente Luciferase der vorliegenden Erfindung handelt, war jeweils höher als jene von Wildtyp-HEIKE-Glühwürmchen-Luciferase und thermostabiler Luciferase. Weiters entsprach die Lichtemission in diesem Fall 60 bis 80% jener im TCA-Extraktionsverfahren.

[0104] HIK und HLK sind Mutanten, in denen an Position 490 der HEIKE-I- und der HEIKE-L-Mutante Lys durch Glu ersetzt ist. Das heißt, die Einführung der Mutation in die Aminosäure an Position 490 verbesserte die Resistenz gegenüber einem Tensid. Die Empfindlichkeit von HIK und HLK wird sogar in solch einer hohen, in dieser Untersuchung verwendeten Konzentration durch das ATP-Extraktionsreagens weniger beeinträchtigt, was zeigt, dass die Verwendung von HIK und HLK eine sehr genaue Messung ermöglicht.

Gewerbliche Anwendbarkeit

[0105] Die Verwendung einer neuen tensidresistenten Luciferase der vorliegenden Erfindung gemäß zur Messung von intrazellulärem ATP ermöglicht die Detektion ohne Verringerung der Lucifease-Aktivität sogar in Gegenwart eines Tensids in hoher Konzentration.

Sequenzprotokoll freier Text

Seq.-ID Nr. 1: synthetische DNA
Seq.-ID Nr. 2: synthetische DNA

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Kikkoman Corporation

<120> Luciferase und Verfahren zum Testen auf intrazelluläres ATP unter Verwendung derselben

<130> AHB/FP5864723

<140> EP 98961523.2
<141> 1998-12-24

<150> PCT/JP 98/05864
<151> 1998-12-24

<150> JP 361022/1997
<151> 1997-12-26

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 23
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> synthetische DNA

<400> 1
tgttgtactt aagaaaggaa aat 23

<210> 2
<211> 23
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> synthetische DNA

<400> 2

acagctcccg gaagctcacc agc 23

<210> 3

<211> 1644

<212> DNA

<213> Luciola lateralis

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1644)

<400> 3

```
atg gaa aac atg gag aac gat gaa aat att gtg tat ggt cct gaa cca   48
Met Glu Asn Met Glu Asn Asp Glu Asn Ile Val Tyr Gly Pro Glu Pro
  1               5                  10                  15

ttt tac cct att gaa gag gga tct gct gga gca caa ttg cgc aag tat   96
Phe Tyr Pro Ile Glu Glu Gly Ser Ala Gly Ala Gln Leu Arg Lys Tyr
             20                  25                  30

atg gat cga tat gca aaa ctt gga gca att gct ttt act aac gca ctt   144
Met Asp Arg Tyr Ala Lys Leu Gly Ala Ile Ala Phe Thr Asn Ala Leu
         35                  40                  45

acc ggt gtc gat tat acg tac gcc gaa tac tta gaa aaa tca tgc tgt   192
Thr Gly Val Asp Tyr Thr Tyr Ala Glu Tyr Leu Glu Lys Ser Cys Cys
     50                  55                  60

cta gga gag gct tta aag aat tat ggt ttg gtt gtt gat gga aga att   240
Leu Gly Glu Ala Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Val Val Asp Gly Arg Ile
 65                  70                  75                  80

gcg tta tgc agt gaa aac tgt gaa gaa ttc ttt att cct gta tta gcc   288
Ala Leu Cys Ser Glu Asn Cys Glu Glu Phe Phe Ile Pro Val Leu Ala
                 85                  90                  95

ggt tta ttt ata ggt gtc ggt gtg gct cca act aat gag att tac act   336
Gly Leu Phe Ile Gly Val Gly Val Ala Pro Thr Asn Glu Ile Tyr Thr
            100                 105                 110

cta cgt gaa ttg gtt cac agt tta ggc atc tct aag cca aca att gta   384
Leu Arg Glu Leu Val His Ser Leu Gly Ile Ser Lys Pro Thr Ile Val
        115                 120                 125

ttt agt tct aaa aaa gga tta gat aaa gtt ata act gta caa aaa acg   432
Phe Ser Ser Lys Lys Gly Leu Asp Lys Val Ile Thr Val Gln Lys Thr
    130                 135                 140

gta act gct att aaa acc att gtt ata ttg gac agc aaa gtg gat tat   480
Val Thr Ala Ile Lys Thr Ile Val Ile Leu Asp Ser Lys Val Asp Tyr
145                 150                 155                 160
```

```
aga ggt tat caa tcc atg gac aac ttt att aaa aaa aac act cca caa   528
Arg Gly Tyr Gln Ser Met Asp Asn Phe Ile Lys Lys Asn Thr Pro Gln
                165                 170                 175

ggt ttc aaa gga tca agt ttt aaa act gta gaa gtt aac cgc aaa gaa   576
Gly Phe Lys Gly Ser Ser Phe Lys Thr Val Glu Val Asn Arg Lys Glu
            180                 185                 190

caa gtt gct ctt ata atg aac tct tcg ggt tca acc ggt ttg cca aaa   624
Gln Val Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys
        195                 200                 205

ggt gtg caa ctt act cat gaa aat ttg gtc act aga ttt tct cac gct   672
Gly Val Gln Leu Thr His Glu Asn Leu Val Thr Arg Phe Ser His Ala
    210                 215                 220

aga gat cca att tat gga aac caa gtt tca cca ggc acg gct att tta   720
Arg Asp Pro Ile Tyr Gly Asn Gln Val Ser Pro Gly Thr Ala Ile Leu
225                 230                 235                 240

act gta gta cca ttc cat cat ggt ttt ggt atg ttt act act tta ggc   768
Thr Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Gly
                245                 250                 255

tat cta act tgt ggt ttt cgt att gtc atg tta acg aaa ttt gac gaa   816
Tyr Leu Thr Cys Gly Phe Arg Ile Val Met Leu Thr Lys Phe Asp Glu
            260                 265                 270

gag act ttt tta aaa aca ctg caa gat tac aaa tgt tca agc gtt att   864
Glu Thr Phe Leu Lys Thr Leu Gln Asp Tyr Lys Cys Ser Ser Val Ile
        275                 280                 285

ctt gta ccg act ttg ttt gca att ctt aat aga agt gaa tta ctc gat   912
Leu Val Pro Thr Leu Phe Ala Ile Leu Asn Arg Ser Glu Leu Leu Asp
    290                 295                 300

aaa tat gat tta tca aat tta gtt gaa att gca tct ggc gga gca cct   960
Lys Tyr Asp Leu Ser Asn Leu Val Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro
305                 310                 315                 320

tta tct aaa gaa att ggt gaa gct gtt gct aga cgt ttt aat tta ccg
1008
Leu Ser Lys Glu Ile Gly Glu Ala Val Ala Arg Arg Phe Asn Leu Pro
                325                 330                 335

ggt gtt cgt caa ggc tat ggt tta aca gaa aca acc tct gca att att
1056
Gly Val Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Ile
            340                 345                 350

atc aca ccg gaa ggc gat gat aaa cca ggt gct tct ggc aaa gtt gtg
1104
Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Ser Gly Lys Val Val
        355                 360                 365

cca tta ttt aaa gca aaa gtt atc gat ctt gat act aaa aaa act ttg
1152
Pro Leu Phe Lys Ala Lys Val Ile Asp Leu Asp Thr Lys Lys Thr Leu
    370                 375                 380

ggc ccg aac aga cgt gga gaa gtt tgt gta aag ggt cct atg ctt atg
1200
Gly Pro Asn Arg Arg Gly Glu Val Cys Val Lys Gly Pro Met Leu Met
385                 390                 395                 400
```

```
aaa ggt tat gta gat aat cca gaa gca aca aga gaa atc ata gat gaa
1248
Lys Gly Tyr Val Asp Asn Pro Glu Ala Thr Arg Glu Ile Ile Asp Glu
                405                 410                 415

gaa ggt tgg ttg cac aca gga gat att ggg tat tac gat gaa gaa aaa
1296
Glu Gly Trp Leu His Thr Gly Asp Ile Gly Tyr Tyr Asp Glu Glu Lys
            420                 425                 430

cat ttc ttt atc gtg gat cgt ttg aag tct tta atc aaa tac aaa gga
1344
His Phe Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly
        435                 440                 445

tat caa gta cca cct gct gaa tta gaa tct gtt ctt ttg caa cat cca
1392
Tyr Gln Val Pro Pro Ala Glu Leu Glu Ser Val Leu Leu Gln His Pro
    450                 455                 460

aat att ttt gat gcc ggc gtt gct ggc gtt cca gat cct ata gct ggt
1440

Asn Ile Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Val Pro Asp Pro Ile Ala Gly
465                 470                 475                 480

gag ctt ccg gga gct gtt gtt gta ctt aag aaa gga aaa tct atg act
1488
Glu Leu Pro Gly Ala Val Val Val Leu Lys Lys Gly Lys Ser Met Thr
                485                 490                 495

gaa aaa gaa gta atg gat tac gtt gct agt caa gtt tca aat gca aaa
1536
Glu Lys Glu Val Met Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Ser Asn Ala Lys
            500                 505                 510

cgt ttg cgt ggt ggt gtc cgt ttt gtg gac gaa gta cct aaa ggt ctc
1584
Arg Leu Arg Gly Gly Val Arg Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu
        515                 520                 525

act ggt aaa att gac ggt aaa gca att aga gaa ata ctg aag aaa cca
1632
Thr Gly Lys Ile Asp Gly Lys Ala Ile Arg Glu Ile Leu Lys Lys Pro
    530                 535                 540

gtt gct aag atg
1644
Val Ala Lys Met
545
```

<210> 4

<211> 548

<212> PRT

<213> Luciola lateralis

<400> 4

```
Met Glu Asn Met Glu Asn Asp Glu Asn Ile Val Tyr Gly Pro Glu Pro
 1               5                  10                  15

Phe Tyr Pro Ile Glu Glu Gly Ser Ala Gly Ala Gln Leu Arg Lys Tyr
            20                  25                  30

Met Asp Arg Tyr Ala Lys Leu Gly Ala Ile Ala Phe Thr Asn Ala Leu
        35                  40                  45

Thr Gly Val Asp Tyr Thr Tyr Ala Glu Tyr Leu Glu Lys Ser Cys Cys
    50                  55                  60

Leu Gly Glu Ala Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Val Val Asp Gly Arg Ile
65                  70                  75                  80

Ala Leu Cys Ser Glu Asn Cys Glu Glu Phe Phe Ile Pro Val Leu Ala
                85                  90                  95

Gly Leu Phe Ile Gly Val Gly Val Ala Pro Thr Asn Glu Ile Tyr Thr
            100                 105                 110

Leu Arg Glu Leu Val His Ser Leu Gly Ile Ser Lys Pro Thr Ile Val
        115                 120                 125

Phe Ser Ser Lys Lys Gly Leu Asp Lys Val Ile Thr Val Gln Lys Thr
    130                 135                 140

Val Thr Ala Ile Lys Thr Ile Val Ile Leu Asp Ser Lys Val Asp Tyr
145                 150                 155                 160

Arg Gly Tyr Gln Ser Met Asp Asn Phe Ile Lys Lys Asn Thr Pro Gln
                165                 170                 175

Gly Phe Lys Gly Ser Ser Phe Lys Thr Val Glu Val Asn Arg Lys Glu
            180                 185                 190

Gln Val Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys
        195                 200                 205

Gly Val Gln Leu Thr His Glu Asn Leu Val Thr Arg Phe Ser His Ala
    210                 215                 220

Arg Asp Pro Ile Tyr Gly Asn Gln Val Ser Pro Gly Thr Ala Ile Leu
225                 230                 235                 240

Thr Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Gly
                245                 250                 255

Tyr Leu Thr Cys Gly Phe Arg Ile Val Met Leu Thr Lys Phe Asp Glu
            260                 265                 270

Glu Thr Phe Leu Lys Thr Leu Gln Asp Tyr Lys Cys Ser Ser Val Ile
        275                 280                 285

Leu Val Pro Thr Leu Phe Ala Ile Leu Asn Arg Ser Glu Leu Leu Asp
    290                 295                 300
```

```
Lys Tyr Asp Leu Ser Asn Leu Val Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro
305                 310                 315                 320

Leu Ser Lys Glu Ile Gly Glu Ala Val Ala Arg Arg Phe Asn Leu Pro
                325                 330                 335

Gly Val Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Ile
            340                 345                 350

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

Pro Leu Phe Lys Ala Lys Val Ile Asp Leu Asp Thr Lys Lys Thr Leu
    370                 375                 380

Gly Pro Asn Arg Arg Gly Glu Val Cys Val Lys Gly Pro Met Leu Met
385                 390                 395                 400

Lys Gly Tyr Val Asp Asn Pro Glu Ala Thr Arg Glu Ile Ile Asp Glu
                405                 410                 415

Glu Gly Trp Leu His Thr Gly Asp Ile Gly Tyr Tyr Asp Glu Glu Lys
            420                 425                 430

His Phe Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly
        435                 440                 445

Tyr Gln Val Pro Pro Ala Glu Leu Glu Ser Val Leu Leu Gln His Pro
    450                 455                 460

Asn Ile Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Val Pro Asp Pro Ile Ala Gly

465                 470                 475                 480

Glu Leu Pro Gly Ala Val Val Val Leu Lys Lys Gly Lys Ser Met Thr
                485                 490                 495

Glu Lys Glu Val Met Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Ser Asn Ala Lys
            500                 505                 510

Arg Leu Arg Gly Gly Val Arg Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu
        515                 520                 525

Thr Gly Lys Ile Asp Gly Lys Ala Ile Arg Glu Ile Leu Lys Lys Pro
    530                 535                 540

Val Ala Lys Met
545
```

<210> 5

<211> 1644

<212> DNA

<213> Luciola lateralis

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1644)

<400> 5

```
atg gaa aac atg gag aac gat gaa aat att gtg tat ggt cct gaa cca   48
Met Glu Asn Met Glu Asn Asp Glu Asn Ile Val Tyr Gly Pro Glu Pro
  1               5                  10                  15

ttt tac cct att gaa gag gga tct gct gga gca caa ttg cgc aag tat   96
Phe Tyr Pro Ile Glu Glu Gly Ser Ala Gly Ala Gln Leu Arg Lys Tyr
             20                  25                  30

atg gat cga tat gca aaa ctt gga gca att gct ttt act aac gca ctt   144
Met Asp Arg Tyr Ala Lys Leu Gly Ala Ile Ala Phe Thr Asn Ala Leu
         35                  40                  45

acc ggt gtc gat tat acg tac gcc gaa tac tta gaa aaa tca tgc tgt   192
Thr Gly Val Asp Tyr Thr Tyr Ala Glu Tyr Leu Glu Lys Ser Cys Cys
     50                  55                  60

cta gga gag gct tta aag aat tat ggt ttg gtt gtt gat gga aga att   240
Leu Gly Glu Ala Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Val Val Asp Gly Arg Ile
 65                  70                  75                  80

gcg tta tgc agt gaa aac tgt gaa gaa ttc ttt att cct gta tta gcc   288
Ala Leu Cys Ser Glu Asn Cys Glu Glu Phe Phe Ile Pro Val Leu Ala
                 85                  90                  95

ggt tta ttt ata ggt gtc ggt gtg gct cca act aat gag att tac act   336
Gly Leu Phe Ile Gly Val Gly Val Ala Pro Thr Asn Glu Ile Tyr Thr
            100                 105                 110

cta cgt gaa ttg gtt cac agt tta ggc atc tct aag cca aca att gta   384
Leu Arg Glu Leu Val His Ser Leu Gly Ile Ser Lys Pro Thr Ile Val
        115                 120                 125

ttt agt tct aaa aaa gga tta gat aaa gtt ata act gta caa aaa acg   432
Phe Ser Ser Lys Lys Gly Leu Asp Lys Val Ile Thr Val Gln Lys Thr
    130                 135                 140

gta act gct att aaa acc att gtt ata ttg gac agc aaa gtg gat tat   480
Val Thr Ala Ile Lys Thr Ile Val Ile Leu Asp Ser Lys Val Asp Tyr
145                 150                 155                 160

aga ggt tat caa tcc atg gac aac ttt att aaa aaa aac act cca caa   528
Arg Gly Tyr Gln Ser Met Asp Asn Phe Ile Lys Lys Asn Thr Pro Gln
                165                 170                 175

ggt ttc aaa gga tca agt ttt aaa act gta gaa gtt aac cgc aaa gaa   576
Gly Phe Lys Gly Ser Ser Phe Lys Thr Val Glu Val Asn Arg Lys Glu
            180                 185                 190
```

```
caa gtt gct ctt ata atg aac tct tcg ggt tca acc ggt ttg cca aaa   624
Gln Val Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys
        195                 200                 205

ggt gtg caa ctt act cat gaa aat atc gtc act aga ttt tct cac gct   672
Gly Val Gln Leu Thr His Glu Asn Ile Val Thr Arg Phe Ser His Ala
    210                 215                 220

aga gat cca att tat gga aac caa gtt tca cca ggc acg gct att tta   720
Arg Asp Pro Ile Tyr Gly Asn Gln Val Ser Pro Gly Thr Ala Ile Leu
225                 230                 235                 240

act gta gta cca ttc cat cat ggt ttt ggt atg ttt act act tta ggc   768
Thr Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Gly
                245                 250                 255

tat cta act tgt ggt ttt cgt att gtc atg tta acg aaa ttt gac gaa   816
Tyr Leu Thr Cys Gly Phe Arg Ile Val Met Leu Thr Lys Phe Asp Glu
            260                 265                 270

gag act ttt tta aaa aca ctg caa gat tac aaa tgt tca agc gtt att   864
Glu Thr Phe Leu Lys Thr Leu Gln Asp Tyr Lys Cys Ser Ser Val Ile
        275                 280                 285

ctt gta ccg act ttg ttt gca att ctt aat aga agt gaa tta ctc gat   912
Leu Val Pro Thr Leu Phe Ala Ile Leu Asn Arg Ser Glu Leu Leu Asp
    290                 295                 300

aaa tat gat tta tca aat tta gtt gaa att gca tct ggc gga gca cct   960
Lys Tyr Asp Leu Ser Asn Leu Val Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro
305                 310                 315                 320

tta tct aaa gaa att ggt gaa gct gtt gct aga cgt ttt aat tta ccg
1008
Leu Ser Lys Glu Ile Gly Glu Ala Val Ala Arg Arg Phe Asn Leu Pro
                325                 330                 335

ggt gtt cgt caa ggc tat ggt tta aca gaa aca acc tct gca att att
1056
Gly Val Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Ile
            340                 345                 350

atc aca ccg gaa ggc gat gat aaa cca ggt gct tct ggc aaa gtt gtg
1104
Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Ser Gly Lys Val Val
        355                 360                 365

cca tta ttt aaa gca aaa gtt atc gat ctt gat act aaa aaa act ttg
1152
Pro Leu Phe Lys Ala Lys Val Ile Asp Leu Asp Thr Lys Lys Thr Leu
    370                 375                 380

ggc ccg aac aga cgt gga gaa gtt tgt gta aag ggt cct atg ctt atg
1200
Gly Pro Asn Arg Arg Gly Glu Val Cys Val Lys Gly Pro Met Leu Met
385                 390                 395                 400

aaa ggt tat gta gat aat cca gaa gca aca aga gaa atc ata gat gaa
1248
Lys Gly Tyr Val Asp Asn Pro Glu Ala Thr Arg Glu Ile Ile Asp Glu
                405                 410                 415
```

```
gaa ggt tgg ttg cac aca gga gat att ggg tat tac gat gaa gaa aaa
1296
Glu Gly Trp Leu His Thr Gly Asp Ile Gly Tyr Tyr Asp Glu Glu Lys
            420                 425                 430

cat ttc ttt atc gtg gat cgt ttg aag tct tta atc aaa tac aaa gga
1344
His Phe Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly
        435                 440                 445

tat caa gta cca cct gct gaa tta gaa tct gtt ctt ttg caa cat cca
1392
Tyr Gln Val Pro Pro Ala Glu Leu Glu Ser Val Leu Leu Gln His Pro
    450                 455                 460

aat att ttt gat gcc ggc gtt gct ggc gtt cca gat cct ata gct ggt
1440
Asn Ile Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Val Pro Asp Pro Ile Ala Gly
465                 470                 475                 480

gag ctt ccg gga gct gtt gtt gta ctt aag aaa gga aaa tct atg act
1488
Glu Leu Pro Gly Ala Val Val Val Leu Lys Lys Gly Lys Ser Met Thr
                485                 490                 495

gaa aaa gaa gta atg gat tac gtt gct agt caa gtt tca aat gca aaa
1536
Glu Lys Glu Val Met Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Ser Asn Ala Lys
            500                 505                 510

cgt ttg cgt ggt ggt gtc cgt ttt gtg gac gaa gta cct aaa ggt ctc
1584
Arg Leu Arg Gly Gly Val Arg Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu
        515                 520                 525

act ggt aaa att gac ggt aaa gca att aga gaa ata ctg aag aaa cca
1632
Thr Gly Lys Ile Asp Gly Lys Ala Ile Arg Glu Ile Leu Lys Lys Pro
    530                 535                 540

gtt gct aag atg
1644
Val Ala Lys Met
545
```

<210> 6

<211> 548

<212> PRT

<213> Luciola lateralis

<400> 6

```
Met Glu Asn Met Glu Asn Asp Glu Asn Ile Val Tyr Gly Pro Glu Pro
  1               5                  10                  15

Phe Tyr Pro Ile Glu Glu Gly Ser Ala Gly Ala Gln Leu Arg Lys Tyr
            20                  25                  30
```

Met Asp Arg Tyr Ala Lys Leu Gly Ala Ile Ala Phe Thr Asn Ala Leu
35 40 45

Thr Gly Val Asp Tyr Thr Tyr Ala Glu Tyr Leu Glu Lys Ser Cys Cys
50 55 60

Leu Gly Glu Ala Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Val Val Asp Gly Arg Ile
65 70 75 80

Ala Leu Cys Ser Glu Asn Cys Glu Glu Phe Phe Ile Pro Val Leu Ala
85 90 95

Gly Leu Phe Ile Gly Val Gly Val Ala Pro Thr Asn Glu Ile Tyr Thr
100 105 110

Leu Arg Glu Leu Val His Ser Leu Gly Ile Ser Lys Pro Thr Ile Val
115 120 125

Phe Ser Ser Lys Lys Gly Leu Asp Lys Val Ile Thr Val Gln Lys Thr
130 135 140

Val Thr Ala Ile Lys Thr Ile Val Ile Leu Asp Ser Lys Val Asp Tyr
145 150 155 160

Arg Gly Tyr Gln Ser Met Asp Asn Phe Ile Lys Lys Asn Thr Pro Gln
165 170 175

Gly Phe Lys Gly Ser Ser Phe Lys Thr Val Glu Val Asn Arg Lys Glu
180 185 190

Gln Val Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys
195 200 205

Gly Val Gln Leu Thr His Glu Asn Ile Val Thr Arg Phe Ser His Ala
210 215 220

Arg Asp Pro Ile Tyr Gly Asn Gln Val Ser Pro Gly Thr Ala Ile Leu
225 230 235 240

Thr Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Gly
245 250 255

Tyr Leu Thr Cys Gly Phe Arg Ile Val Met Leu Thr Lys Phe Asp Glu
260 265 270

Glu Thr Phe Leu Lys Thr Leu Gln Asp Tyr Lys Cys Ser Ser Val Ile
275 280 285

Leu Val Pro Thr Leu Phe Ala Ile Leu Asn Arg Ser Glu Leu Leu Asp
290 295 300

Lys Tyr Asp Leu Ser Asn Leu Val Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro
305 310 315 320

Leu Ser Lys Glu Ile Gly Glu Ala Val Ala Arg Arg Phe Asn Leu Pro
325 330 335

Gly Val Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Ile
340 345 350

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

```
Pro Leu Phe Lys Ala Lys Val Ile Asp Leu Asp Thr Lys Lys Thr Leu
    370                 375                 380

Gly Pro Asn Arg Arg Gly Glu Val Cys Val Lys Gly Pro Met Leu Met
385                 390                 395                 400

Lys Gly Tyr Val Asp Asn Pro Glu Ala Thr Arg Glu Ile Ile Asp Glu
                405                 410                 415

Glu Gly Trp Leu His Thr Gly Asp Ile Gly Tyr Tyr Asp Glu Glu Lys
            420                 425                 430

His Phe Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly
        435                 440                 445

Tyr Gln Val Pro Pro Ala Glu Leu Glu Ser Val Leu Leu Gln His Pro
    450                 455                 460

Asn Ile Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Val Pro Asp Pro Ile Ala Gly
465                 470                 475                 480

Glu Leu Pro Gly Ala Val Val Val Leu Lys Lys Gly Lys Ser Met Thr
                485                 490                 495

Glu Lys Glu Val Met Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Ser Asn Ala Lys
            500                 505                 510

Arg Leu Arg Gly Gly Val Arg Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu
        515                 520                 525

Thr Gly Lys Ile Asp Gly Lys Ala Ile Arg Glu Ile Leu Lys Lys Pro
    530                 535                 540

Val Ala Lys Met
545
```

Patentansprüche

1. Luciferasemutante, die
(i) aus der Aminosäuresequenz der Luciferase des Heike-Glühwürmchens (Luciola lateralis) vom Wildtyp besteht, in der die Glutaminsäure an Position 490 durch eine andere Aminosäure als Glutaminsäure ersetzt ist;
(ii) aus der Aminosäuresequenz der Luciferase des Heike-Glühwürmchens vom Wildtyp besteht, in der das Alanin an Position 217 durch Isoleucin ersetzt ist und die Glutaminsäure an Position 490 durch eine andere Aminosäure als Glutaminsäure ersetzt ist;
(iii) aus der Aminosäuresequenz der Luciferase des Genji-Glühwürmchens (Luciola cruciata) vom Wildtyp besteht, in der die Glutaminsäure an Position 490 durch eine andere Aminosäure als Glutaminsäure ersetzt ist;
(iv) aus der Aminosäuresequenz der Luciferase des Nordamerikanischen Glühwürmchens vom Wildtyp besteht, in der die Glutaminsäure entsprechend der Glutaminsäure an Position 490 der Heike- und Genji-Glühwürmchen-Luciferase durch eine andere Aminosäure als Glutaminsäure ersetzt ist;
(v) aus der Aminosäuresequenz der Luciferase des Russischen Glühwürmchens vom Wildtyp besteht, in der die Glutaminsäure entsprechend der Glutaminsäure an Position 490 der Heike- und Genji-Glühwürmchen-Luciferase durch eine andere Aminosäure als Glutaminsäure ersetzt ist;
(vi) aus der in Seq.-ID Nr. 4 dargestellten Aminosäuresequenz besteht; oder
(vii) aus der in Seq.-ID Nr. 6 dargestellten Aminosäuresequenz besteht.

2. Luciferase nach Anspruch 1, worin die Aminosäure, bei der es sich nicht um Glutaminsäure handelt, Lysin, Arginin oder Histidin ist.

3. Luciferase nach Anspruch 2, worin die Aminosäure, bei der es sich nicht um Glutaminsäure handelt, Lysin ist.

4. Luciferase-Gen, das für die Luciferase nach einem der Ansprüche 1 bis 3 kodiert.

5. Rekombinanter Vektor, umfassend das Luciferase-Gen nach Anspruch 4.

6. Transformante, umfassend den rekombinanten Vektor nach Anspruch 5.

7. Verfahren zur Herstellung einer Luciferase, wobei das Verfahren das Züchten der Transformante nach Anspruch 6 in einem Medium und das Gewinnen der Luciferase aus der resultierenden Kultur umfasst.

8. Verfahren zur Messung des intrazellulären ATP, umfassend:
einen ersten Schritt, worin ATP in Gegenwart von Tensid aus Zellen in einer Probe extrahiert wird;
einen zweiten Schritt, worin ein lumineszierendes Reagens, enthaltend Luciferase, zu der extrahierten ATP-Lösung hinzugefügt wird, um die Emission von Licht hervorzurufen; sowie
einen dritten Schritt, worin die Menge der Lichtemission gemessen wird,
dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Luciferase um die Luciferase nach einem der Ansprüche 1 bis 3 handelt.

9. Verfahren nach Anspruch 8, worin die Lichtemission durch die Zugabe eines lumineszierenden Reagens in Gegenwart eines Tensids von 0,01% oder mehr hervorgerufen wird.

10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, worin es sich bei dem Tensid um ein beliebiges eines kationischen Tensids, eines anionischen Tensids, eines nicht-ionischen Tensids und eines ampholytischen Tensids handelt.

11. Verfahren zur Steigerung der Tensidresistenz einer Luciferase, wobei das Verfahren die Substitution einer Glutaminsäure der Luciferase, die jener an der Position 490 der Luciferase eines Heike-Glühwürmchens entspricht, durch eine andere Aminosäure als Glutaminsäure umfasst, wobei die Aminosäuresequenz der Luciferase des Heike-Glühwürmchens jene aus Seq.-ID Nr. 4 ohne die A217L- und E490K-Mutationen und jene aus Seq.-ID Nr. 6 ohne die A2171- und E490K-Mutationen ist.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei es sich um ein Verfahren zur Erhöhung der Tensidresistenz einer Glühwürmchen-Luciferase handelt.

13. Verfahren nach Anspruch 12, worin es sich bei der Glühwürmchen-Luciferase um Folgendes handelt: (i) Luciferase des Heike-Glühwürmchens (Luciola lateralis) vom Wildtyp; (ii) Luciferase des Heike-Glühwürmchens vom Wildtyp, in der das Alanin an Position 217 durch Isoleucin ersetzt ist; Luciferase des Genji-Glühwürmchens (Luciola cruciata) vom Wildtyp; Luciferase des Nordamerikanischen Glühwürmchens vom Wildtyp; oder Luciferase des Russischen Glühwürmchens vom Wildtyp.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13, worin die Aminosäure, bei der es sich nicht um Glutaminsäure handelt, Lysin, Arginin oder Histidin ist.

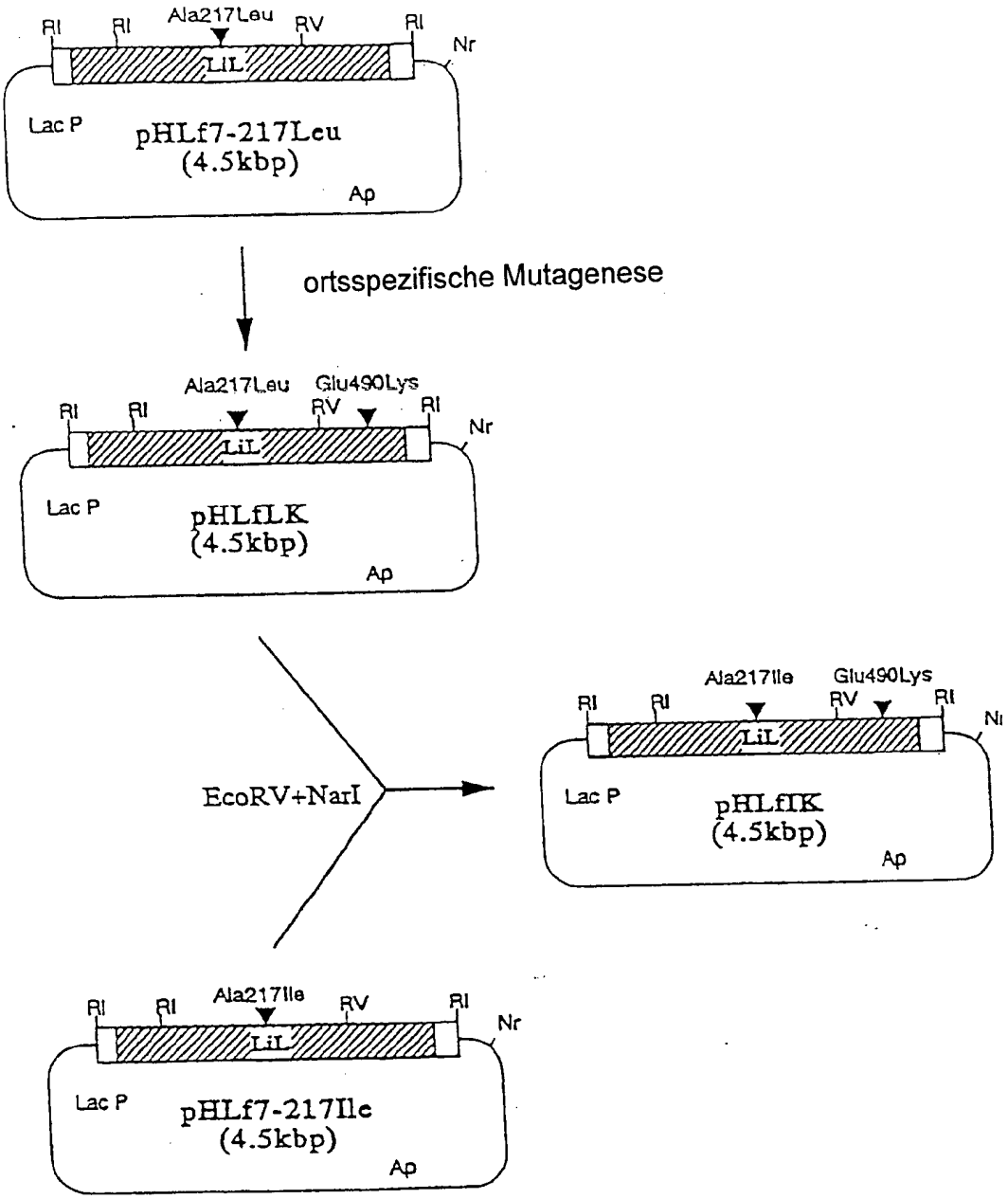
15. Verfahren nach Anspruch 14, worin die Aminosäure, bei der es sich nicht um Glutaminsäure handelt, Lysin ist.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 15, umfassend folgende Schritte:
(a) das Einführen einer Mutation in die Nucleotidsequenz eines Luciferase-Gens durch gentechnologische Verfahren, um eine Luciferase-Genmutante zu erzeugen;
(b) das Inkorporieren der Genmutante in ein geeignetes Wirt-Vektor-System, wodurch ein rekombinanter Mikroorganismus erzeugt wird;
(c) das Auswählen rekombinanter Mikroorganismen mittels Screening, die Luciferase mit erhöhter Tensidresistenz produzieren;
(d) das Züchten der ausgewählten Mikroorganismen; sowie gegebenenfalls
(e) das Sammeln von Luciferase aus dem Kulturprodukt.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

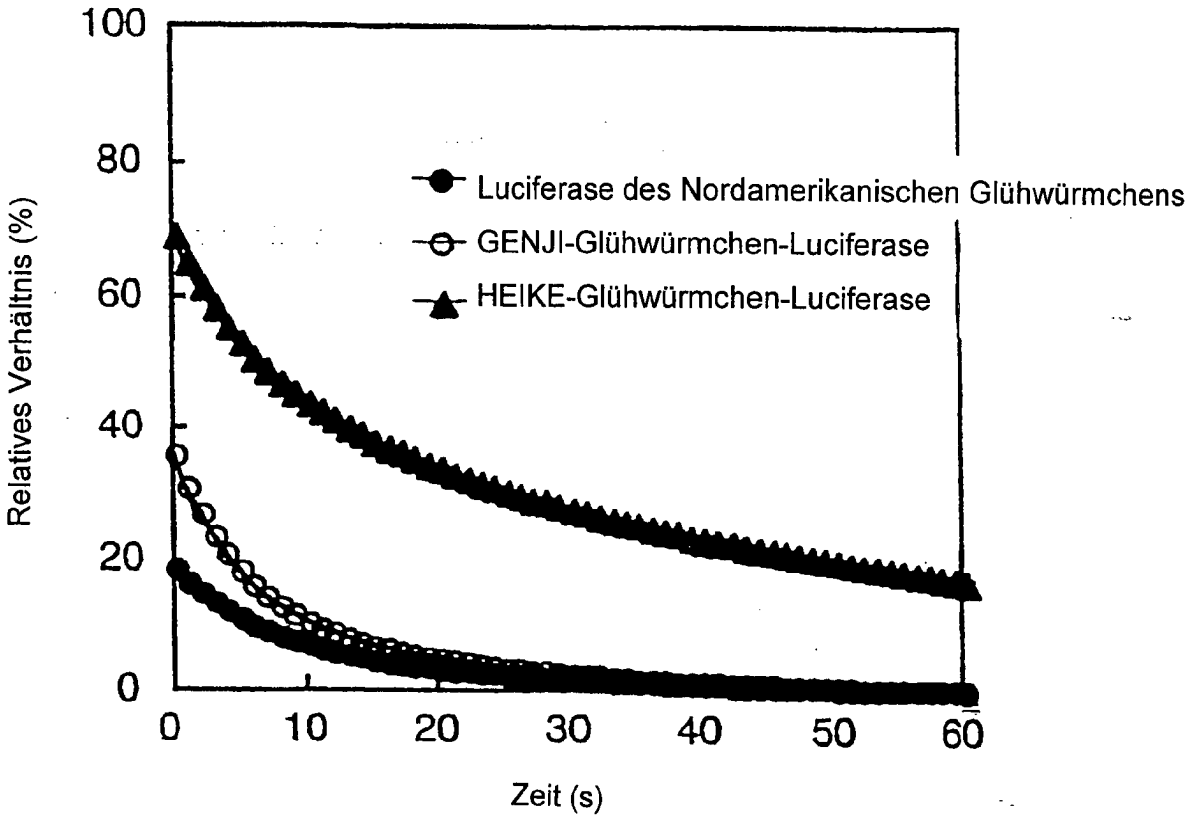
Anhängende Zeichnungen

Figur 1

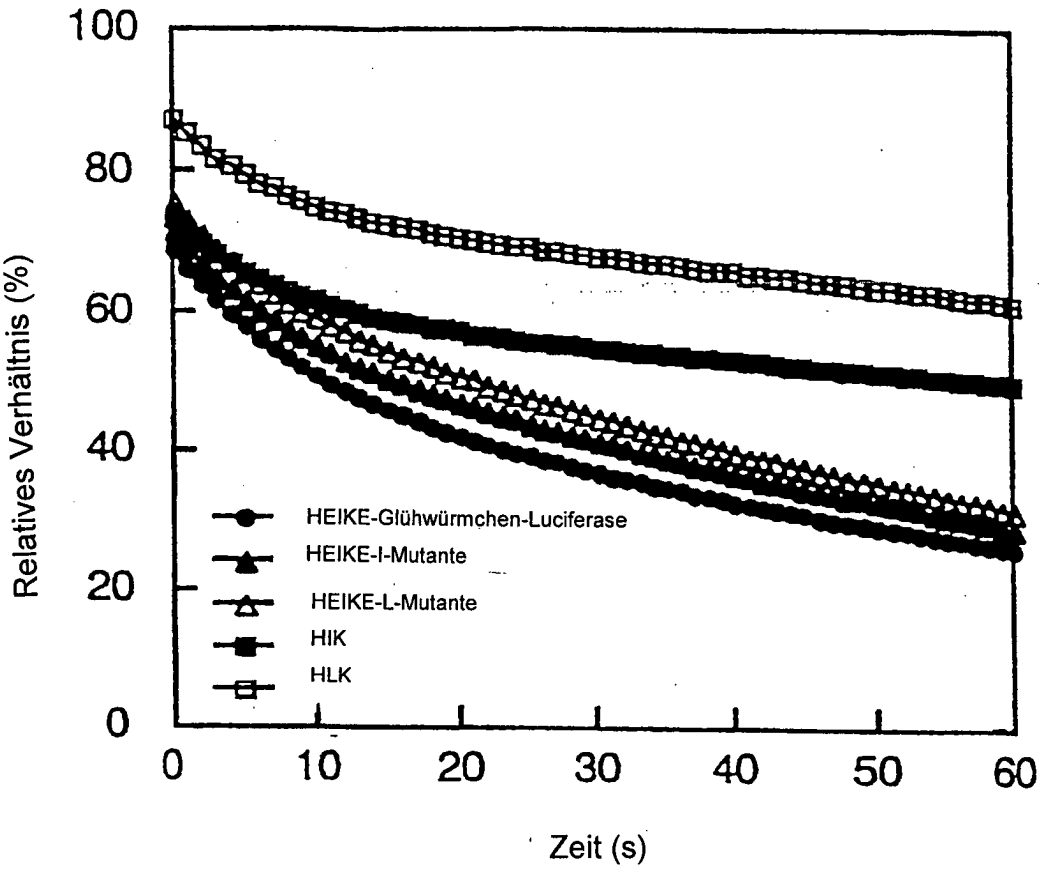


LIL; Luciola-lateralis-Luciferase-cDNA, Ap; β-Lactamase-Gen, LacP; β-Galactosidase-Promotor, RI; EcoRI, RV; EcoRV, Nr; NarI

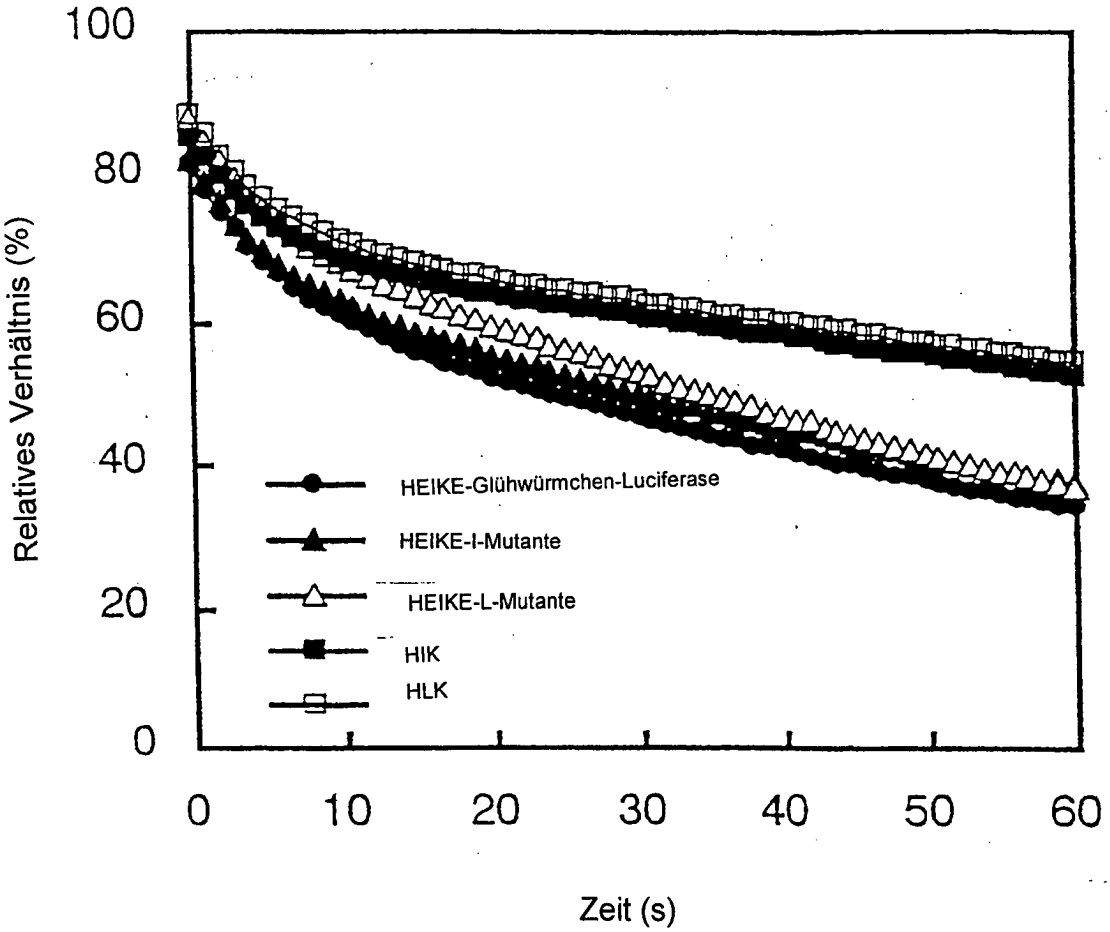
Figur 2


100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
Relatives Verhältnis (%)
Zeit (s)
Luciferase des Nordamerikanischen Glühwürmchens
GENJI-Glühwürmchen-Luciferase
HEIKE-Glühwürmchen-Luciferase

Figur 3


100
80
60
40
20
0
Relatives Verhältnis (%)
0
10
20
30
40
50
60
Zeit (s)
HEIKE-Glühwürmchen-Luciferase
HEIKE-I-Mutante
HEIKE-L-Mutante
HIK
HLK

Figur 4


100
80
60
40
20
0
Relatives Verhältnis (%)
0
10
20
30
40
50
60
Zeit (s)
HEIKE-Glühwürmchen-Luciferase
HEIKE-I-Mutante
HEIKE-L-Mutante
HIK
HLK