



(21) 申请号 201780082959.6
(22) 申请日 2017.11.13
(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110494569 A

(43) 申请公布日 2019.11.22

(30) 优先权数据
2016904639 2016.11.14 AU
2017900161 2017.01.19 AU

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.07.10

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/AU2017/051237 2017.11.13

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/085895 EN 2018.05.17

(73) 专利权人 联邦科学技术研究组织
地址 澳大利亚澳大利亚首都领地

(72) 发明人 H·戴克斯 S·C·特罗威尔

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002
专利代理师 左路 区斌

(51) Int.Cl.
C12Q 1/37 (2006.01)
C12N 13/00 (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)
G01N 21/76 (2006.01)

(56) 对比文件
AU 2015243093 A1, 2015.11.05
A. Mateos等. Proteolysis of milk proteins by AprX, an extracellular protease identified in Pseudomonas LBSA1 isolated from bulk raw milk, and implications for the stability of UHT milk”.《International Dairy Journal》.2015, Jensen et al.. “The function of the milk-clotting enzymes bovine and camel chymosin studied by a fluorescence resonance energy transfer assay”.《Journal of Dairy Science》.2015,第98卷(第5期),

审查员 娄菲

权利要求书2页 说明书60页
序列表47页 附图17页

(54) 发明名称
蛋白酶传感器分子

(57) 摘要
本发明涉及用于检测样品中的细菌蛋白酶的传感器和方法。具体地,本发明涉及用于检测样品中的假单胞菌属某些种蛋白酶活性的传感器和方法。所述传感器和方法可以用于检测或预测乳制品的腐败。本发明还涉及制备用于蛋白酶测定的样品的方法。

1. 一种荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*) AprX蛋白酶传感器分子,其包含:靶序列,其包含选自SFMKKNQNTIEI (SEQ ID NO: 45)和LQGSFMKKNQNTIEIGSFE (SEQ ID NO: 72)以及它们的组合的氨基酸序列;以及共价附接到所述靶序列的化学发光供体结构域和受体结构域,其中通过荧光假单胞菌AprX蛋白酶切割所述靶序列产生共振能量转移的可检测的变化。

2. 如权利要求1所述的荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*) AprX蛋白酶传感器分子,其中所述靶序列进一步包含SKMXXPP (SEQ ID NO: 40),其中X是任何氨基酸。

3. 如权利要求1所述的荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*) AprX蛋白酶传感器分子,其中一个结构域共价附接到所述靶序列的N-末端,并且另一个结构域共价附接到所述靶序列的C-末端。

4. 如权利要求1所述的荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*) AprX蛋白酶传感器分子,其中所述受体结构域是绿色荧光蛋白 (GFP)、Venus、mOrange,或者它们中任一者的生物活性变体或片段;所述化学发光供体结构域是荧光素酶或者生物活性变体或片段;并且所述靶序列包含SFMKKNQNTIEI (SEQ ID NO: 45)。

5. 如权利要求1所述的荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*) AprX蛋白酶传感器分子,其中所述受体结构域是GFP²;所述化学发光供体结构域是海肾荧光素酶2、海肾荧光素酶8或海肾荧光素酶8.6-535;和所述靶序列包含SFMKKNQNTIEI (SEQ ID NO:45)。

6. 如权利要求1所述的荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*) AprX蛋白酶传感器分子,其中所述受体结构域是绿色荧光蛋白 (GFP)、Venus、mOrange,或者它们中任一者的生物活性变体或片段;所述化学发光供体结构域是荧光素酶或生物活性变体或片段;和所述靶序列包含LQGSFMKKNQNTIEIGSFE (SEQ ID NO:72)。

7. 如权利要求1所述的荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*) AprX蛋白酶传感器分子,其中所述受体结构域是GFP²;所述化学发光供体结构域是海肾荧光素酶2、海肾荧光素酶8或海肾荧光素酶8.6-535;和所述靶序列包含LQGSFMKKNQNTIEIGSFE (SEQ ID NO:72)。

8. 如权利要求1所述的荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*) AprX蛋白酶传感器分子,所述荧光假单胞菌AprX蛋白酶传感器分子i) 对于荧光假单胞菌AprX蛋白酶的 EC_{50} 介于0.1 nM与100 nM之间,并且/或者ii) 对荧光假单胞菌AprX蛋白酶的灵敏度是对牛纤溶酶的灵敏度的至少20倍。

9. 一种编码如权利要求1至8中任一项所述的荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*) AprX蛋白酶传感器分子或其靶序列的经分离的核酸,或一种包含编码如权利要求1至8中任一项所述的荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*) AprX蛋白酶传感器分子或其靶序列的核酸的载体。

10. 如权利要求1至8中任一项所述的荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*) AprX蛋白酶传感器分子用于以下的用途,i) 检测样品中的荧光假单胞菌AprX蛋白酶,或ii) 检测乳制品的腐败。

11. 如权利要求1至8中任一项所述的荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*) AprX蛋白酶传感器分子在制备用于检测样品中的荧光假单胞菌AprX蛋白酶的组合物或试剂盒中的用途,其中所述样品与所述传感器接触后共振能量转移的变化对应于所述样品中存在荧光假单胞菌AprX蛋白酶。

12. 一种检测乳制品腐败的方法,所述方法包括i) 使样品与如权利要求1至8中任一

项所述的荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*) AprX蛋白酶传感器分子接触;以及ii) 检测所述荧光假单胞菌AprX蛋白酶传感器分子的变化,其中所述变化指示所述乳制品腐败、已经开始腐败或有可能腐败。

13. 如权利要求11所述的用途,所述用途 i) 检测至少100 pm的荧光假单胞菌AprX蛋白酶,并且/或者ii) 在短于1小时内进行。

14. 如权利要求12所述的方法,所述方法i) 检测至少100 pm的荧光假单胞菌AprX蛋白酶,并且/或者ii) 在短于1小时内进行。

15. 一种组合物,其包含如权利要求1至8中任一项所述的荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*) AprX蛋白酶传感器分子、以及一种或多种可接受的载体。

16. 一种确定乳制品中的荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*) AprX蛋白酶浓度的方法,所述方法包括(i) 处理所述乳制品的样品,所述处理包括在与酪蛋白结合蛋白酶竞争的化合物存在下对包含与酪蛋白胶束缔合的荧光假单胞菌AprX蛋白酶的组合物进行超声处理;(ii) 测量经处理的乳制品中的荧光假单胞菌AprX蛋白酶活性,其中测量荧光假单胞菌AprX蛋白酶活性包括将经处理的乳制品与根据权利要求1-8中任一项所述的荧光假单胞菌AprX蛋白酶传感器分子混合;并测量可检测的变化;以及(iii) 基于所述荧光假单胞菌AprX蛋白酶活性确定所述乳制品的荧光假单胞菌AprX蛋白酶浓度。

17. 如权利要求16所述的方法,其中以下特征中的一个或多个适用i) 所述组合物是包含与酪蛋白结合的蛋白酶的乳制品或其提取物的样品,ii) 所述蛋白酶至少部分地导致乳腐败,iii) 所述化合物是氨基己酸,iv) 所述组合物包含钙螯合剂,v) 所述超声处理进行15分钟或更短时间,以及vi) 所述超声处理在低于约50°C的温度下进行。

蛋白酶传感器分子

发明领域

[0001] 本发明涉及用于检测样品中的细菌蛋白酶的传感器和方法。具体地,本发明涉及用于检测样品中的假单胞菌属某些种(*Pseudomonas* spp.)蛋白酶活性的传感器和方法。所述传感器和方法可以用于检测或预测乳制品的腐败。

[0002] 发明背景

[0003] 乳容易快速腐败。腐败可以作为内在因素(例如天然存在于乳中的酶(诸如纤溶酶))和外在水素(诸如由乳中存在的微生物产生的酶)这两类因素的结果而发生。存在于适当储存的冷藏乳中的最常见和最丰富的腐败微生物是假单胞菌属某些种,其被归类为嗜冷生物并且在寒冷条件下具有选择优势。嗜冷细菌能够在低储存温度(例如4°C)下相对快速地繁殖。当假单胞菌属培养物的种群密度超过约 10^6 cfu/ml时,细菌生长伴随着酶(包括蛋白酶)的产生以及向周围培养基中的分泌。这些蛋白酶具有侵袭性并且相对热稳定。它们能够降解乳蛋白质(诸如酪蛋白),这可能导致全脂UHT乳和脱脂UHT乳在储存期间粘度、凝胶化和苦味增加,从而导致货架期损失。虽然诸如巴氏灭菌和超高温(UHT)处理的技术可以帮助防止腐败并延长乳的货架期,但一些细菌酶对热处理有抗性。如果在热处理前细菌产生了足够多的酶,则UHT乳即便在被处理之后也可能腐败。在这些酶中,蛋白酶特别重要,因为它们在以极低浓度存在时就可以导致乳腐败。此外,乳中的蛋白酶还可能对一系列其他乳制品的产量、质量和/或货架期产生不利影响,所述其他乳制品包括经调味、改良和强化的乳、乳粉和由乳制成的粉状产品,包括婴儿配方食品、奶酪和超长期巴氏灭菌乳。

[0004] 已经使用一系列方法来测量乳制品诸如乳中的细菌蛋白酶。用于检测乳样品中的细菌蛋白酶的最常用方法(诸如异硫氰酸荧光素(FITC)酪蛋白蛋白酶测定)需要大量的操作。这些方法要么不够灵敏以检测到可能导致UHT乳在生产后的6至9个月之间腐败的极低水平的蛋白酶,要么根本不能检测到这些蛋白酶(Button等人,(2011))。此外,这些方法通常很慢,在大约几天到几周内才提供结果。因此,虽然这些方法可以用于事后确定产品失效的原因,但它们在实时管理乳制品的生产、加工和分配方面几乎毫无用处。

[0005] 已经报道过两种将乳中的假单胞菌属某些种蛋白酶与纤溶酶区分开的方法,即HPLC和竞争ELISA测定法(Datta和Deeth,2001;Dupont等人,2007;Martins,2015)。这两种方法都需要数小时至数天的延时温育,在此期间蛋白酶耗尽内源性 κ -酪蛋白,从而将特异性肽释放到上清液中。基于HPLC的方法使用示差酸沉淀,之后进行反相分离,以鉴定特征性 κ -酪蛋白衍生肽(Datta和Deeth,2001)。ELISA方法依赖于对Pfl_u蛋白酶的完整Met₁₀₅-Phe₁₀₆靶标有特异性的单克隆抗体来测量样品中残留的完整卡帕-酪蛋白(κ -酪蛋白)(Dupont等人,2007)。该测定法中的未消化 κ -酪蛋白与ELISA板壁上的固定量的纯化 κ -酪蛋白竞争。这些方法不适用于在乳腐败前测量假单胞菌属某些种蛋白酶活性。

[0006] 因此,需要可以用于检测样品中的细菌蛋白酶的传感器和方法,特别是可以快速和/或以增加的灵敏度进行的方法。还需要区分由于内在因素(诸如纤溶酶)和外在水素(诸如细菌蛋白酶)引起的腐败的方法。

发明内容

[0007] 本发明的发明人已经确定了可以用于检测样品中的细菌蛋白酶的传感器。本发明的发明人还已经确定了使用这些传感器来检测样品中存在细菌蛋白酶的改进方法。发明人还已经确定了使用这些传感器检测乳制品腐败的改进方法。

[0008] 在一个方面,提供了一种假单胞菌属某些种蛋白酶传感器分子,其包含具有选自KQ、SF、FM、KK、KN、NQ、NT、EI、QQ及其组合的至少一个假单胞菌属某些种蛋白酶切割位点的靶序列,并且包含下列特征中的一种或多种:

[0009] (i) 所述靶序列的长度小于约50个氨基酸;

[0010] (ii) 可检测标记;和/或

[0011] (iii) 两个或更多个所述蛋白酶切割位点;

[0012] 其中通过假单胞菌属某些种蛋白酶切割所述靶序列产生可检测的变化。

[0013] 在一些实施方案中,提供了一种假单胞菌属某些种蛋白酶传感器分子,其包含具有选自KQ、SF、FM、KK、KN、NQ、NT、EI及其组合的至少一个假单胞菌属某些种蛋白酶切割位点的靶序列,并且包含下列特征中的一种或多种:

[0014] (i) 所述靶序列的长度小于约50个氨基酸;

[0015] (ii) 可检测标记;和/或

[0016] (iii) 两个或更多个所述蛋白酶切割位点;

[0017] 其中通过假单胞菌属某些种蛋白酶切割所述靶序列产生可检测的变化。

[0018] 在一些实施方案中,所述靶序列包含两个或更多个所述蛋白酶切割位点。在一些实施方案中,所述靶序列包含三个、四个、五个、六个或七个蛋白酶切割位点。

[0019] 在一些实施方案中,所述靶序列包含选自KQ、SFM (SEQ ID NO:37)、KKNQ (SEQ ID NO:24)、NT和EI及其组合的假单胞菌属某些种蛋白酶切割位点。在一些实施方案中,所述靶序列至少包含SFM (SEQ ID NO:37) 和/或KKNQ (SEQ ID NO:24)。在另外的实施方案中,所述靶序列包含SKMXXPP (SEQ ID NO:40),其中X是任何氨基酸。在一些实施方案中,所述靶序列包含选自以下的氨基酸序列:SFMKKNQNT EI (SEQ ID NO:45);SFMNQNT EI (SEQ ID NO:57);和LSFMAIP (SEQ ID NO:70)。在另外的实施方案中,所述靶序列包含选自以下的氨基酸序列:LQGSFMKKNQNT EIGSFE (SEQ ID NO:72);LQGSFMNQNT EIGSFE (SEQ ID NO:73);LQGSLSFMAIPGSFE (SEQ ID NO:74) 和LQGSKQKQKQKGSFE (SEQ ID NO:112)。其他实例包括LQGSPPLKQPPPGSFE (SEQ ID NO:113)、LQGSPPLQQPQPGSFE (SEQ ID NO:114) 和LQGGSGGSLKQGGSGGSFE (SEQ ID NO:115)。

[0020] 在一些实施方案中,所述靶序列包含在N-末端和/或C-末端处附接到可检测标记的氨基酸接头。在一些实施方案中,所述接头包含一个或多个甘氨酸残基、丝氨酸残基和/或脯氨酸残基。例如,在一些实施方案中,所述接头包含选自以下的氨基酸序列:LQG (SEQ ID NO:95);GSFE (SEQ ID NO:96);GSSGGS (SEQ ID NO:97);GSPPL (SEQ ID NO:98);PPPGS (SEQ ID NO:99)、GGSGGS (SEQ ID NO:100)、GGSGGSL (SEQ ID NO:101) 和PPVKQPPP (SEQ ID NO:44)。

[0021] 通过假单胞菌属某些种蛋白酶切割所述靶序列导致可检测的变化。在一些实施方案中,可检测的变化是共振能量转移、声学、电化学电位、荧光、化学发光、磷光、吸光度、抗体结合、BRET比率、FRET效率或质量的变化。在一些实施方案中,通过假单胞菌属某些种蛋

白酶切割所述靶序列导致共振能量转移 (RET) 的可检测的变化。

[0022] 在一些优选的实施方案中,所述传感器分子包含可检测标记。优选地,可检测标记选自发色团、纳米粒子、量子点、紫精(viologen)及其组合。

[0023] 在一些实施方案中,可检测标记是发色团。在优选的实施方案中,发色团选自荧光团、发光团、有机染料、无机染料、磷光团(phosphophore)、光吸收纳米粒子、它们的组合,以及它们的金属化络合物。

[0024] 在一些实施方案中,可检测标记包含两种或更多种组分。例如,可检测标记可以包含两种组分。在一些实施方案中,可检测标记包含:i) 共价附接到靶序列的化学发光供体结构域和受体结构域,或ii) 荧光团结构域和受体结构域。在一些实施方案中,一个结构域共价附接到靶序列的N-末端,并且另一个结构域共价附接到靶序列的C-末端。例如,化学发光供体结构域可以共价附接到靶序列的N-末端,受体结构域可以共价附接到靶序列的C-末端。作为替代,受体结构域可以共价附接到靶序列的N-末端,化学发光供体结构域可以共价附接到靶序列的C-末端。

[0025] 在一些优选的实施方案中,可检测标记包含共价附接到靶序列的化学发光供体结构域和受体结构域。在一些实施方案中,当通过假单胞菌属某些种蛋白酶切割靶序列时,化学发光供体结构域相对于受体结构域的空间位置和/或偶极取向改变。化学发光供体结构域相对于受体结构域的空间位置和/或偶极取向改变可以产生可检测的变化。

[0026] 在一些实施方案中,通过假单胞菌属某些种蛋白酶切割所述靶序列导致BRET比率的变化。在一些实施方案中,BRET比率的变化介于观察到的最大BRET比率的约2%至约95%之间。在一些实施方案中,BRET比率的变化介于观察到的最大BRET比率的约5%至约90%之间。

[0027] 在一些实施方案中,化学发光供体结构域是生物发光蛋白。在一些实施方案中,生物发光蛋白选自荧光素酶、 β -半乳糖苷酶、内酰胺酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -葡萄糖苷酸酶或 β -葡萄糖苷酶。

[0028] 在一些实施方案中,生物发光蛋白是荧光素酶。在一些实施方案中,荧光素酶选自海肾(Renilla)荧光素酶、萤火虫荧光素酶、腔肠动物荧光素酶、北美蓝光萤荧光素酶、叩头虫荧光素酶、苹果蝇蛆荧光素酶、细菌荧光素酶、长腹水蚤(Gaussia)荧光素酶、水母发光蛋白、葶蚊属(Arachnocampa)荧光素酶,或者它们中任一者的生物活性变体或片段,或者它们中的两者或更多者的嵌合体。

[0029] 在一些实施方案中,生物发光蛋白具有选自荧光素、钙、腔肠素、腔肠素的衍生物或类似物、或者荧光素的衍生物或类似物的底物。

[0030] 在一些实施方案中,生物发光蛋白需要辅因子。例如,辅因子可以是ATP、镁、氧、FMNH₂、钙,或它们中的任何两者或更多者的组合。

[0031] 在一些实施方案中,受体结构域是荧光受体结构域。在一些实施方案中,荧光受体结构域是蛋白质。在一些实施方案中,荧光受体结构域选自绿色荧光蛋白(GFP)、GFP的蓝色荧光变体(BFP)、GFP的青色荧光变体(CFP)、GFP的黄色荧光变体(YFP)、增强型GFP(EGFP)、增强型CFP(ECFP)、增强型YFP(EYFP)、GFPS65T、Emerald、Venus、mOrange、Topaz、GFPuv、去稳定化EGFP(dEGFP)、去稳定化ECFP(dECFP)、去稳定化EYFP(dEYFP)、HcRed、t-HcRed、DsRed、DsRed2、t-二聚体2、t-二聚体2(12)、mRFP1、pocilloporin、海肾GFP、Monster GFP、

paGFP、Kaede蛋白、tdTomato、mCherry、TagRFP、TurBoFB和藻胆蛋白,以及它们中任一者的生物活性变体或片段。

[0032] 作为替代,荧光受体结构域是非蛋白质。在一些实施方案中,所述荧光受体结构域选自Alexa Fluor染料、Bodipy染料、Cy染料、荧光素、丹磺酰、伞形酮、荧光微球、发光微球、荧光纳米晶体、海蓝(Marina Blue)、级联蓝(Cascade Blue)、级联黄(Cascade Yellow)、太平洋蓝(Pacific Blue)、俄勒冈绿(Oregon Green)、四甲基罗丹明、罗丹明、得克萨斯红(Texas Red)和稀土元素螯合物,以及它们的任何组合或衍生物。

[0033] 在一些实施方案中,受体结构域选自绿色荧光蛋白(GFP)、Venus和mOrange,以及它们中任一者的生物活性变体或片段;化学发光供体结构域是荧光素酶或者生物活性变体或片段;并且靶序列包含SFMKKNQNTI(SEQ ID NO:45)、SFMNQNTI(SEQ ID NO:57)或LSFMAIP(SEQ ID NO:70)。

[0034] 在一些实施方案中,i)受体结构域是GFP²,化学发光供体结构域是海肾荧光素酶,并且靶序列包含SFMKKNQNTI(SEQ ID NO:45),ii)受体结构域是GFP²,化学发光供体结构域是海肾荧光素酶2,并且靶序列包含SFMKKNQNTI(SEQ ID NO:45),iii)受体结构域是GFP²,化学发光供体结构域是海肾荧光素酶8,并且靶序列包含SFMKKNQNTI(SEQ ID NO:45),或iv)受体结构域是mOrange,化学发光供体结构域是海肾荧光素酶8.6-535,并且靶序列包含SFMKKNQNTI(SEQ ID NO:45)。

[0035] 在一些实施方案中,i)受体结构域是GFP²,化学发光供体结构域是海肾荧光素酶,并且靶序列包含SFMNQNTI(SEQ ID NO:57),ii)受体结构域是GFP²,化学发光供体结构域是海肾荧光素酶2,并且靶序列包含SFMNQNTI(SEQ ID NO:57),iii)受体结构域是GFP²,化学发光供体结构域是海肾荧光素酶8,并且靶序列包含SFMNQNTI(SEQ ID NO:57),或iv)受体结构域是mOrange,化学发光供体结构域是海肾荧光素酶8.6-535,并且靶序列包含SFMNQNTI(SEQ ID NO:57)。

[0036] 在一些实施方案中,i)受体结构域是GFP²,化学发光供体结构域是海肾荧光素酶,并且靶序列包含LSFMAIP(SEQ ID NO:70),ii)受体结构域是GFP²,化学发光供体结构域是海肾荧光素酶2,并且靶序列包含LSFMAIP(SEQ ID NO:70),iii)受体结构域是GFP²,化学发光供体结构域是海肾荧光素酶8,并且靶序列包含LSFMAIP(SEQ ID NO:70),或iv)受体结构域是mOrange,化学发光供体结构域是海肾荧光素酶8.6-535,并且靶序列包含LSFMAIP(SEQ ID NO:70)。

[0037] 如技术人员所理解的,传感器的EC₅₀和灵敏度可以根据所使用的检测方法而变化。在一个实施方案中,使用如实施例2和10中所定义的方法来检测传感器切割。在该实施方案中,在一个实例中,所述传感器对于假单胞菌属某些种蛋白酶的EC₅₀介于0.1nM与10nM之间,并且/或者所述传感器对假单胞菌属某些种蛋白酶的灵敏度是对牛纤溶酶的灵敏度的至少100倍。在一个另选实施方案中,使用诸如实施例12中所定义的方法来检测传感器切割。在该实施方案中,在一个实例中,所述传感器对于假单胞菌属某些种蛋白酶的EC₅₀介于0.1nM与100nM之间,并且/或者所述传感器对假单胞菌属某些种蛋白酶的灵敏度是对牛纤溶酶的灵敏度的至少20倍。

[0038] 在一些实施方案中,假单胞菌属某些种是荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、莓实假单胞菌(*Pseudomonas fragi*)、隆德假单胞菌(*Pseudomonas*

ludensis)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、LBSA1假单胞菌或致金色假单胞菌(*Pseudomonas aureofaciens*)。

[0039] 在一些实施方案中,传感器是连续的一段氨基酸。

[0040] 在另一个方面,本发明提供了一种分离的核酸,其编码如本文所述的传感器或其靶序列。

[0041] 在又一个方面,本发明还提供了一种载体,其包含编码如本文所述传感器或其靶序列的分离的核酸。

[0042] 在又一个方面,本发明还提供了一种宿主细胞,所述宿主细胞包含:包含编码如本文所述传感器或其靶序列的核酸的载体,或者编码如本文所述传感器或其靶序列的核酸,其中在所述细胞中所述核酸可操作地连接至能够表达所述传感器或其靶序列的启动子。

[0043] 在又一个方面,本发明还提供了如本文所述的传感器用于检测样品中的假单胞菌属某些种蛋白酶的用途。

[0044] 在又一个方面,本发明还提供了如本文所述的传感器用于检测乳制品腐败的用途。

[0045] 在又一个方面,本发明还提供了如本文所述的传感器用于检测假单胞菌属某些种感染的用途。

[0046] 在又一个方面,本发明还提供了一种检测样品中的假单胞菌属某些种蛋白酶的方法,所述方法包括

[0047] i) 使样品与如本文所述的传感器接触;以及

[0048] ii) 检测传感器的变化,其中所述变化对应于样品中存在假单胞菌属某些种蛋白酶。

[0049] 在一些实施方案中,所述样品选自乳制品或其提取物、土壤或其提取物、临床样品或其提取物、来自医疗设备的样品、来自食品加工设备的样品,以及植物材料或其提取物。在一些实施方案中,临床样品包括但不限于血液、血清、痰液、粘液、脓液、腹膜液和其他体液。在一些实施方案中,医疗设备包括但不限于导管、静脉注射管、呼吸机、透析设备等。在一些实施方案中,食品加工设备包括但不限于运输罐车、储料罐、加工机械、管线、连接器、阀门等。

[0050] 在又一个方面,本发明还提供了一种检测乳制品腐败的方法,所述方法包括:

[0051] i) 使样品与如本文所述的传感器接触;以及

[0052] ii) 检测传感器的变化,其中所述变化指示乳制品腐败、已经开始腐败或有可能腐败。

[0053] 在一些实施方案中,所述乳制品选自原料乳、低脂乳、脱脂乳、巴氏灭菌乳、UHT乳、乳糖改性UHT乳、强化UHT乳、调味UHT乳和这些产品的组合,以及UHT婴儿配方食品、奶酪、酸乳、乳清、酪乳、奶油、乳粉、粉状婴儿配方食品和黄油。

[0054] 在一些实施方案中,可检测的变化是共振能量转移、声学、电化学电位、荧光、磷光、吸光度、抗体结合、BRET比率、FRET效率或质量的变化。

[0055] 在一些实施方案中,所述传感器包含化学发光供体结构域,并且所述方法还包括提供所述化学发光供体结构域的底物。在一些实施方案中,所述底物是荧光素、钙、腔肠素、腔肠素的衍生物或类似物、或者荧光素的衍生物或类似物。

[0056] 在一些实施方案中,所述方法还包括提供化学发光供体结构域的辅因子。在一些实施方案中,辅因子是ATP、镁、氧、FMNH₂、钙,或它们中的任何两者或更多者的组合。

[0057] 在一些实施方案中,所述方法能够检测至少10pM的假单胞菌属某些种蛋白酶。在一些实施方案中,所述方法能够检测至少1pM的假单胞菌属某些种蛋白酶。在另一个实施方案中,所述方法能够检测至少100pM的假单胞菌属某些种蛋白酶。

[0058] 在一些实施方案中,所述方法在短于1小时、短于30分钟或短于15分钟内进行。

[0059] 在另一个方面,本发明提供了一种组合物,其包含如本文所述的传感器和一种或多种可接受的载体。

[0060] 在另一个方面,本发明提供了一种试剂盒,其包含如本文所述的传感器。

[0061] 本发明的发明人已经发现,在与酪蛋白结合蛋白酶竞争的化合物存在下对所述组合物进行超声处理减小了样品制备所需的时间量。使用所述方法制备的样品可以用于本申请的方法和/或用途。

[0062] 因此,在另一个方面,本发明还提供了一种从酪蛋白胶束解离蛋白酶的方法,所述方法包括在与酪蛋白结合蛋白酶竞争的化合物存在下对包含与酪蛋白胶束缔合的蛋白酶的组合物进行超声处理。

[0063] 在一些实施方案中,本发明还提供了一种从酪蛋白胶束解离蛋白酶的方法,所述方法包括在与酪蛋白结合蛋白酶竞争的化合物和钙螯合剂存在下对包含与酪蛋白胶束缔合的蛋白酶的组合物进行超声处理。

[0064] 在一些实施方案中,包含与酪蛋白胶束缔合的蛋白酶的组合物是包含与酪蛋白结合的蛋白酶的乳制品或其提取物的样品。

[0065] 优选地,所述蛋白酶至少部分地导致乳腐败。在一些实施方案中,所述蛋白酶是纤溶酶。在一些实施方案中,所述蛋白酶是细菌蛋白酶。在一些实施方案中,所述细菌蛋白酶是由假单胞菌属某些种产生的。在一些实施方案中,假单胞菌属某些种是荧光假单胞菌、莓实假单胞菌、隆德假单胞菌、恶臭假单胞菌、LBSA1假单胞菌或致金色假单胞菌。

[0066] 在一些实施方案中,与酪蛋白结合蛋白酶竞争的化合物是赖氨酸的衍生物或类似物。在优选的实施方案中,赖氨酸的衍生物或类似物是氨基己酸。

[0067] 在一些实施方案中,钙螯合剂选自六偏磷酸钠、磷酸氢二钠、柠檬酸三钠、植酸钠、乙二胺四乙酸和乙二醇-双(β-氨基乙基醚)-N,N',N'-四乙酸。在优选的实施方案中,钙螯合剂是柠檬酸三钠。

[0068] 在一些实施方案中,超声处理进行15分钟或更短时间、10分钟或更短时间、5分钟或更短时间,或者2分钟或更短时间。在一些实施方案中,超声处理以介于约10μm与约300μm之间或约15μm与约300μm之间,优选地介于约15μm与约25μm之间的超声处理装置位移振幅进行。

[0069] 在一些实施方案中,超声处理用直径介于约11mm至约2mm之间的探头进行。

[0070] 在一些实施方案中,超声处理以介于约10kHz与约60kHz之间、优选地介于约28kHz与约40kHz之间的频率进行。

[0071] 在一些实施方案中,超声处理以小于约55瓦特、优选地小于约25瓦特并且最优选地介于约5瓦特与约8瓦特之间的功率进行。在一些实施方案中,当样品体积小于约1ml时,超声处理以小于约1瓦特的声功率水平进行。

[0072] 在一些实施方案中,超声处理在低于约50°C、优选地低于约40°C并且最优选地低于约30°C的温度下进行。

[0073] 在又一个方面,本发明提供了一种确定乳制品中的蛋白酶浓度的方法,所述方法包括

[0074] (i) 使用本文所述的超声处理方法处理乳制品的样品;

[0075] (ii) 测量经处理的乳制品中的蛋白酶活性;以及

[0076] (iii) 基于所述蛋白酶活性确定所述乳制品的蛋白酶浓度。

[0077] 在一些实施方案中,所述乳制品选自原料乳、低脂乳、脱脂乳、巴氏灭菌乳、UHT乳、乳糖改性UHT乳、强化UHT乳、调味UHT乳、UHT婴儿配方食品、奶酪、酸乳、乳清、酪乳、奶油、乳粉、粉状婴儿配方食品和黄油及其组合,和/或它们中一种或多种的包含与酪蛋白结合的蛋白酶的提取物。

[0078] 在一些实施方案中,步骤(ii)包括将经处理的乳制品与包含具有至少一个蛋白酶切割位点的靶序列和任选的可检测标记的传感器分子混合,其中通过所述蛋白酶切割所述靶序列产生可检测的变化;以及测量所述可检测的变化。

[0079] 在一个实施方案中,传感器分子是本发明的传感器分子。

[0080] 在一些实施方案中,传感器分子是如本文所述的假单胞菌属某些种蛋白酶传感器分子。在一些实施方案中,传感器分子包含可检测标记,并且所述可检测标记包含共价附接到靶序列的化学发光供体结构域和受体结构域。

[0081] 在一些实施方案中,蛋白酶具有选自SF、FM、NQ、NT、EI、QQ或KZ的切割位点,其中Z是Q、N、K、Y、V或E及其组合。

[0082] 在一些实施方案中,蛋白酶具有选自SF、FM、NQ、NT、EI或KZ的切割位点,其中Z是Q、N、K、Y、V或E及其组合。

[0083] 除非另外明确规定,否则本文的任何实施方案都应当被视为加以必要的变更应用于任何其他实施方案。

[0084] 本发明不限于本文所述具体实施方案的范围,这些具体实施方案仅旨在用于举例说明的目的。如本文所述,功能等同的产品、组合物和方法显然在本发明的范围之内。

[0085] 在本说明书通篇中,除非另外明确规定或上下文另有要求,否则提及单个步骤、物质组合物、步骤组或物质组合物组应当被视为涵盖一个(种)和多个(种)(即,一个(种)或多个(种))那些步骤、物质组合物、步骤组或物质组合物组。

[0086] 下文通过以下非限制性实施例并参考附图描述本发明。

附图说明

[0087] 图1-根据一个实施方案的用于检测细菌蛋白酶活性的BRET²传感器。所述传感器包含Phe-Met切割位点。

[0088] 图2-根据本公开实施方案的对原料乳的预处理。(A)使用Honda Z041超声波切割机对1.5mL样品进行0s、30s、1min和2min的超声处理,所述超声波切割机经过改造,探头顶端直径为4mm,频率=40kHz,振幅=16μm,功耗=5W;(B)使用Honda Z041超声波切割机对1.5mL样品进行0s、30s、1min和2min的超声处理,所述超声波切割机经过改造,探头顶端直径为4mm,频率=40kHz,振幅=19μm,功耗=8W。超声处理后,将所有样品以约12,000g离心2

分钟,以便确定超声处理步骤将样品均质化的有效程度。

[0089] 图3-在与荧光假单胞菌菌株65(泳道2)或对照(泳道1)一起温育的脱脂乳制备的粗提取物的SDS-PAGE。

[0090] 图4-在与各种浓度的人纤溶酶和牛纤溶酶一起温育纤溶酶传感器10分钟后,所述传感器的BRET²响应。

[0091] 图5-在与0、1、10和100nM的人纤溶酶、牛纤溶酶和粗制细菌蛋白酶一起温育纤溶酶传感器10分钟后,所述传感器的BRET²响应。

[0092] 图6-在28℃下温育10分钟后,使用纤溶酶传感器校准原料乳中的细菌蛋白酶。

[0093] 图7-在50%全脂UHT乳中将Pfl1u传感器1与各种浓度的牛纤溶酶和粗制细菌蛋白酶一起温育10分钟后,所述传感器的BRET²响应。

[0094] 图8-在50%全脂UHT乳中将Pfl1u传感器1与各种浓度的人纤溶酶和粗制细菌蛋白酶一起温育10分钟后,所述传感器的BRET²响应。

[0095] 图9-在50%全脂UHT乳中将Pfl1u传感器2与各种浓度的人纤溶酶和粗制细菌蛋白酶一起温育10分钟后,所述传感器的BRET²响应。

[0096] 图10-在50%全脂UHT乳中将Pfl1u传感器3与各种浓度的人纤溶酶和粗制细菌蛋白酶一起温育10分钟后,所述传感器的BRET²响应。

[0097] 图11-在Rauh等人(2014)的预处理方案之后,使用添加到经热处理的原料乳中的人纤溶酶校准BRET²纤溶酶传感器。

[0098] 图12-在Rauh等人(2014)的预处理方案之后,使用添加到经热处理的原料乳样品中的人纤溶酶校准D-Val-Leu-Lys-4-硝基酰苯胺二盐酸盐。

[0099] 图13-在两步预处理方案之后,使用添加到经热处理的原料乳样品中的人纤溶酶校准BRET²纤溶酶传感器。

[0100] 图14-在两步预处理方案之后,使用添加到经热处理的原料乳样品中的人纤溶酶校准D-Val-Leu-Lys-4-硝基酰苯胺二盐酸盐。

[0101] 图15-在一步预处理方案之后,使用添加到经热处理的原料乳样品中的人纤溶酶校准BRET²纤溶酶传感器。

[0102] 图16-在一步预处理方案之后,使用添加到经热处理的原料乳样品中的人纤溶酶校准D-Val-Leu-Lys-4-硝基酰苯胺二盐酸盐。

[0103] 图17-在使用低功率超声处理进行的一步预处理方案之后,使用添加到经热处理的原料乳样品中的人纤溶酶校准BRET²纤溶酶传感器。

[0104] 图18-在使用低功率超声处理进行的一步预处理方案之后,使用Pfl1u1传感器校准原料乳中的细菌蛋白酶。

[0105] 图19-在使用低功率超声处理进行的一步预处理方案之后,使用Pfl1u生物传感器在原料乳样品中测得的细菌蛋白酶水平。样品1至20是独立的原料乳样品。

[0106] 图20-在28℃下温育10分钟后,在未进行预处理的情况下,使用Pfl1u1传感器校准原料乳中的细菌蛋白酶。

[0107] 图21-在28℃下温育2小时后,在未进行预处理的情况下,使用Pfl1u1传感器校准原料乳中的细菌蛋白酶。

[0108] 图22-在28℃下温育2小时后,在使用低功率超声处理进行一步预处理方案的情况

下,使用Pfl1u1传感器校准原料乳中的细菌蛋白酶。

[0109] 图23-用与荧光假单胞菌菌株117(泳道2)或对照(泳道1)一起温育的脱脂乳制备的粗提取物的SDS-PAGE。

[0110] 图24-在缓冲液和UHT乳中将Pfl1u1传感器与0nM(对照)或1nM来自荧光假单胞菌菌株65和117的粗制细菌蛋白酶一起温育10分钟后,所述传感器的BRET²响应。

[0111] 图25-在28°C下温育2小时后,使用Pfl1u1传感器校准原料乳中的粗制细菌蛋白酶荧光假单胞菌菌株117。

[0112] 图26-在缓冲液中将Pfl1u-H传感器系列与0nM(对照)或1nM来自荧光假单胞菌菌株65的粗制细菌蛋白酶一起温育10分钟后,所述传感器的BRET²响应。

[0113] 图27-在缓冲液中将Pfl1u-H1传感器与加标有0nM(对照)或1nM来自荧光假单胞菌菌株65的粗制细菌蛋白酶或1nM牛纤溶酶的UHT乳一起温育10分钟后,所述传感器的BRET²响应。

[0114] 图28-在缓冲液中将Pfl1u-H2传感器与加标有0nM(对照)或1nM来自荧光假单胞菌菌株65的粗制细菌蛋白酶或1nM牛纤溶酶的UHT乳一起温育10分钟后,所述传感器的BRET²响应。

[0115] 图29-在缓冲液中将Pfl1u-H3传感器与加标有0nM(对照)或1nM来自荧光假单胞菌菌株65的粗制细菌蛋白酶或1nM牛纤溶酶的UHT乳一起温育10分钟后,所述传感器的BRET²响应。

[0116] 图30-在缓冲液中将Pfl1u-H4传感器与加标有0nM(对照)或1nM来自荧光假单胞菌菌株65的粗制细菌蛋白酶或1nM牛纤溶酶的UHT乳一起温育10分钟后,所述传感器的BRET²响应。

[0117] 图31-在50%原料乳中将Pfl1u-H1传感器与各种浓度的牛纤溶酶和粗制细菌蛋白酶一起温育10分钟后,所述传感器的BRET²响应。

[0118] 图32-用与荧光假单胞菌一起温育的脱脂乳制备的粗提取物的SDS-PAGE。标志物(泳道1)、菌株65-1(泳道2)、65-2(泳道3)、117(泳道4)、100ng BSA(泳道5)、200ng BSA(泳道6)、400ng BSA(泳道7)、600ng BSA(泳道8)、800ng BSA(泳道9)和1000ng BSA(泳道10)。

[0119] 图33-通过使用Image Quant TL的光密度分析测定的SDS-PAGE凝胶上的不同BSA浓度(ng)的条带的计算体积。

[0120] 图34-在50%全脂UHT乳中将Pfl1u传感器1与各种浓度的牛纤溶酶和粗制细菌蛋白酶一起温育10分钟后,所述传感器的BRET²响应。通过与BSA标准比较来确定细菌蛋白酶。

[0121] 序列表注释

[0122] SEQ ID NO:1-94和112-115-蛋白酶传感器分子的靶序列。

[0123] SEQ ID NO:95-101-接头序列。

[0124] SEQ ID NO:102-编码GFP²-Pfl1u1-RLuc2的核苷酸序列。

[0125] SEQ ID NO:103-编码GFP²-Pfl1u2-RLuc2的核苷酸序列。

[0126] SEQ ID NO:104-编码GFP²-Pfl1u3-RLuc2的核苷酸序列。

[0127] SEQ ID NO:105-GFP²-Pfl1u1-RLuc2融合蛋白。

[0128] SEQ ID NO:106-GFP²-Pfl1u2-RLuc2融合蛋白。

[0129] SEQ ID NO:107-GFP²-Pfl1u3-RLuc2融合蛋白。

- [0130] SEQ ID NO:108-编码GFP²-plas1-RLuc2的核苷酸序列。
- [0131] SEQ ID NO:109-GFP²-plas1-RLuc2融合蛋白。
- [0132] SEQ ID NO:110-纤溶酶靶序列。
- [0133] SEQ ID NO:111-Plas1靶序列。
- [0134] SEQ ID NO:116-编码GFP²-Pflu-H1-RLuc2的核苷酸序列。
- [0135] SEQ ID NO:117-编码GFP²-Pflu-H2-RLuc2的核苷酸序列。
- [0136] SEQ ID NO:118-编码GFP²-Pflu-H3-RLuc2的核苷酸序列。
- [0137] SEQ ID NO:119-编码GFP²-Pflu-H4-RLuc2的核苷酸序列。
- [0138] SEQ ID NO:120-GFP²-Pflu-H1-RLuc2融合蛋白。
- [0139] SEQ ID NO:121-GFP²-Pflu-H2-RLuc2融合蛋白。
- [0140] SEQ ID NO:122-GFP²-Pflu-H3-RLuc2融合蛋白。
- [0141] SEQ ID NO:123-GFP²-Pflu-H4-RLuc2融合蛋白。

具体实施方式

[0142] 一般技术和定义

[0143] 除非另外明确定义,否则本文使用的所有技术术语和科学术语都应当被视为具有与本领域(例如,蛋白质化学、蛋白酶生物学、乳品科学、乳品技术和生物化学等领域)普通技术人员通常理解的含义相同的含义。

[0144] 除非另外指明,否则本发明中利用的重组蛋白技术、细胞培养技术和免疫学技术都是本领域技术人员熟知的标准程序。这些技术在以下来源的文献中的各处描述和解释:诸如J.Perbal,A Practical Guide to Molecular Cloning,John Wiley和Sons(1984);J.Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbour Laboratory Press(1989);T.A.Brown(编辑),Essential Molecular Biology:A Practical Approach,第1卷和第2卷,IRL Press(1991);D.M.Glover和B.D.Hames(编辑),DNA Cloning:A Practical Approach,第1至4卷,IRL Press(1995年和1996年);和F.M.Ausubel等人(编辑),Current Protocols in Molecular Biology,Greenlee Pub.Associates and Wiley-Interscience(1988年,包括到目前为止的所有更新);Ed Harlow和David Lane(编辑)Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbour Laboratory,(1988);以及J.E.Coligan等人(编辑),Current Protocols in Immunology,John Wiley&Sons(包括到目前为止的所有更新)。

[0145] 术语“和/或”,例如“X和/或Y”应当理解为表示“X和Y”或者“X或Y”,并且应当被视为对这两种含义或对任一种含义提供明确的支持。

[0146] 除非上下文另外提出,否则提及单数形式的术语(诸如传感器和底物)也清楚地表示复数。例如,逻辑上许多单个传感器分子而非单个分子将流过该装置或包含在孔内。

[0147] 除非有相反的规定,否则如本文所用的术语“约”是指指定值的+/-10%、更优选地+/-5%、甚至更优选地+/-1%。

[0148] 在整篇本说明书中,词语“包括”或变型形式诸如“包含”或“具有”将被理解为意味着包含所指出的要素、整数或步骤,或者要素组、整数组或步骤组,但并不排除任何其他的要素、整数或步骤,或者要素组、整数组或步骤组。

[0149] 传感器

[0150] 在说明书通篇中,“传感器”、“细菌蛋白酶传感器”和“传感器分子”可互换使用。

[0151] 在一个方面,本申请提供了一种假单胞菌属某些种蛋白酶传感器分子,其包含具有选自KQ、SF、FM、KK、KN、NQ、NT、EI及其组合的至少一个假单胞菌属某些种蛋白酶切割位点的靶序列,并且包含下列特征中的一种或多种:(i)所述靶序列的长度小于约50个氨基酸;(ii)可检测标记;和/或(iii)两个或更多个所述蛋白酶切割位点;其中通过假单胞菌属某些种蛋白酶切割所述靶序列产生可检测的变化。

[0152] 在一些实施方案中,假单胞菌属某些种是荧光假单胞菌、莓实假单胞菌、隆德假单胞菌、恶臭假单胞菌、LBSA1假单胞菌或致金色假单胞菌。优选地,所述假单胞菌属某些种是荧光假单胞菌。

[0153] 在一些实施方案中,所述假单胞菌属某些种蛋白酶是细胞外蛋白酶。优选地,所述蛋白酶相对热稳定。如本文所用,“相对热稳定”意味着该蛋白酶在热处理到95°C并维持至少8分钟后或者在热处理到140°C并维持3秒或在提供类似的时间/温度曲线下面积的热处理方案之后,保持其初始活性的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%或80%。优选地,所述蛋白酶在热处理到95°C并维持至少8分钟后或者在热处理到140°C并维持3秒或在提供类似的时间/温度曲线下面积的热处理方案之后,保持其初始活性的至少20%。在一些实施方案中,所述蛋白酶是碱性金属蛋白酶。在一些实施方案中,所述蛋白酶属于蛋白酶的沙雷菌蛋白酶(serralysin)家族。在一些实施方案中,所述蛋白酶是AprX蛋白酶。在一些实施方案中,所述蛋白酶与荧光假单胞菌n^o114 (NCBI GenPept ID BAA28268)的AprX至少具有50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%的序列同一性或100%的序列同一性。

[0154] 在一些实施方案中,传感器是连续的一段氨基酸。例如,靶序列和可检测标记是单段氨基酸,诸如但不限于共价附接到靶序列的N-末端的化学发光供体蛋白质结构域和共价附接到靶序列的C-末端的受体蛋白质结构域,或者共价附接到靶序列的N-末端的受体蛋白质结构域和共价附接到靶序列的C-末端的化学发光供体蛋白质结构域,或者共价附接到靶序列的N-末端的荧光团蛋白质结构域和共价附接到靶序列C-末端的受体蛋白质结构域,或者共价附接到靶序列的N-末端的受体蛋白质结构域和共价附接到靶序列的C-末端的荧光团蛋白质结构域。

[0155] 在一些实施方案中,还提供了一种分离的核酸,其包含编码如本文所定义的传感器或靶序列的多核苷酸序列。例如,在一个实施方案中,所述核酸分子包含编码SEQ. ID NO.81、SEQ. ID NO.82或SEQ. ID NO.83的多肽序列的序列。除了编码本发明的传感器的序列之外,所述核酸分子还可以含有其他序列,诸如引物位点、转录因子结合位点、载体插入位点和抵抗溶核降解的序列(例如,聚腺苷尾)。所述核酸分子可以是DNA或RNA,并且可以包括合成核苷酸,前提是该多核苷酸仍然能够被翻译以合成本发明的蛋白质。

[0156] 在一些实施方案中,所述核酸形成载体(诸如质粒)的一部分。除了上述的核酸序列之外,质粒还包含其他元件,诸如原核生物复制起点(例如,大肠杆菌(E.coli)OR1复制起点)、自主复制序列、着丝粒序列;能够在宿主细胞中表达所述核酸并且可操作地连接到所述核酸的启动子序列、位于所述核酸序列下游的终止子序列、抗生素抗性基因和/或分泌信号序列。包含自主复制序列的载体也是酵母人工染色体。在一些替代性实施方案中,载体是病毒,诸如噬菌体,并且除了包含本发明的核酸序列之外,还包含用于复制噬菌体的核酸序

列,诸如结构蛋白、启动子、转录激活子等。

[0157] 本发明的核酸或载体可以用于转染或转化宿主细胞,以便合成本发明的传感器或靶序列。合适的宿主细胞包括原核生物细胞(诸如大肠杆菌)和真核生物细胞(诸如酵母细胞),或者哺乳动物或植物细胞系。使用本领域已知的技术来转染或转化宿主细胞,这些技术诸如:电穿孔;磷酸钙基方法;生物弹道技术或使用病毒载体。

[0158] 在转染/转化之后,必要时转录本发明的核酸或载体,并加以翻译。在一些实施方案中,合成的蛋白质是从宿主细胞中提取的,方式为:凭借由于例如载体中存在分泌信号而从所述细胞分泌,或者通过裂解所述宿主细胞和纯化来自所述宿主细胞的蛋白质。

[0159] 在一些实施方案中,所述传感器作为无细胞组合物提供。如本文所用,术语“无细胞组合物”是指含有少量(如果有的话)完整细胞并且包含传感器的分离组合物。无细胞组合物的实例包括含有分离的和/或重组的传感器分子(诸如蛋白质)的细胞(诸如酵母细胞)提取物和组合物。用于由细胞制备无细胞组合物的方法是本领域熟知的。

[0160] 靶序列

[0161] 本申请的传感器包含具有至少一个假单胞菌属某些种蛋白酶切割位点的靶序列。假单胞菌属某些种蛋白酶切割位点至少是被假单胞菌属某些种蛋白酶切割的二肽序列。典型地,二肽序列中的第一个氨基酸称为P1残基,第二个氨基酸则称为P1'残基。蛋白酶切割P1残基与P1'残基之间的肽键。如本领域技术人员将理解的,蛋白酶切割位点周围的残基可以有助于蛋白酶识别该切割位点、特异性和切割效率。

[0162] 在一些实施方案中,蛋白酶切割位点选自KQ、SF、FM、KK、KN、NQ、NT、EI、QQ及其组合。在一些实施方案中,蛋白酶切割位点选自KQ、SF、FM、KK、KN、NQ、NT、EI及其组合。在一些实施方案中,蛋白酶切割位点选自SF、FM、KK、KN、NQ、NT、EI、QQ及其组合。在一些实施方案中,蛋白酶切割位点选自SF、FM、KK、KN、NQ、NT、EI及其组合。在一些实施方案中,蛋白酶切割位点是KQ。在一些实施方案中,蛋白酶切割位点是SF。在一些实施方案中,蛋白酶切割位点是FM。在一些实施方案中,蛋白酶切割位点是KK。在一些实施方案中,蛋白酶切割位点是KN。在一些实施方案中,蛋白酶切割位点是NQ。在一些实施方案中,蛋白酶切割位点是NT。在一些实施方案中,蛋白酶切割位点是EI。在一些实施方案中,蛋白酶切割位点是QQ。

[0163] 在一些实施方案中,所述靶序列包含至少两个蛋白酶切割位点。在一些实施方案中,所述靶序列包含至少三个、至少四个、至少五个、至少六个或至少七个蛋白酶切割位点。在一些实施方案中,所述靶序列包含两个、三个、四个、五个、六个或七个蛋白酶切割位点。蛋白酶切割位点可以包含相同切割位点的多个重复序列,例如 $(KQ)_n$ 、 $(FM)_n$ 、 $(KK)_n$ 、 $(KN)_n$ 、 $(NQ)_n$ 、 $(NT)_n$ 、 $(EI)_n$ 、 $(QQ)_n$ 及其组合,其中n是等于或大于2的整数,例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、40、50或更大的数。蛋白酶切割位点可以以任何顺序包含在靶序列中。例如,靶序列包含KQKQ (SEQ ID NO:1)、KQSF (SEQ ID NO:2)、KQFM (SEQ ID NO:3)、KQKK (SEQ ID NO:4)、KQKN (SEQ ID NO:5)、KQNN (SEQ ID NO:6)、KQNT (SEQ ID NO:7)、KQEI (SEQ ID NO:8)、KQQQ (SEQ ID NO:75)、SFSF (SEQ ID NO:9)、SFFM (SEQ ID NO:10)、SFKK (SEQ ID NO:11)、SFKN (SEQ ID NO:12)、SFNQ (SEQ ID NO:13)、SFNT (SEQ ID NO:14)、SFEI (SEQ ID NO:15)、SFQQ (SEQ ID NO:76)、FMFM (SEQ ID NO:16)、FMKK (SEQ ID NO:17)、FMKN (SEQ ID NO:18)、FMNQ (SEQ ID NO:19)、FMNT (SEQ ID NO:20)、FMEI (SEQ ID NO:21)、FMQQ (SEQ ID NO:77)、KKKK (SEQ ID NO:22)、KKKN (SEQ ID NO:23)、KKNQ (SEQ ID NO:24)、

KKNT (SEQ ID NO:25)、KKEI (SEQ ID NO:26)、KKQQ (SEQ ID NO:78)、KNKN (SEQ ID NO:27)、KNNQ (SEQ ID NO:28)、KNNT (SEQ ID NO:29)、KNEI (SEQ ID NO:30)、KNQQ (SEQ ID NO:79)、KNFM (SEQ ID NO:31)、KNKK (SEQ ID NO:32)、NQNQ (SEQ ID NO:33)、NQQQ (SEQ ID NO:80)、NTNT (SEQ ID NO:34)、NTEI (SEQ ID NO:35)、NTQQ (SEQ ID NO:81)、EIEI (SEQ ID NO:36)、EIQQ (SEQ ID NO:82)、QQQQ (SEQ ID NO:83)、QQKQ (SEQ ID NO:84)、QQSF (SEQ ID NO:85)、QQFM (SEQ ID NO:86)、QQKK (SEQ ID NO:87)、QQKN (SEQ ID NO:88)、QQNQ (SEQ ID NO:89)、QQNT (SEQ ID NO:90)、QQEI (SEQ ID NO:91)、KQQ (SEQ ID NO:92),以及它们的任意组合。

[0164] 在一些实施方案中,所述靶序列包含KQ、SFM (SEQ ID NO:37)、KKNQ (SEQ ID NO:24)、NT、KQQ (SEQ ID NO:92)和EI及其组合。在一些实施方案中,所述靶序列至少包含SFM (SEQ ID NO:37)和/或KKNQ (SEQ ID NO:24)。例如,靶序列可以包含SFMKKNQ (SEQ ID NO:38)或KKNQSFM (SEQ ID NO:39)或这两者。

[0165] 在一些实施方案中,所述靶序列包含SKMXXPP (SEQ ID NO:40),其中X是任何氨基酸。在一些实施方案中,所述靶序列包含PPXXSKMXXPP (SEQ ID NO:41)、PPXXSKMXXPP (SEQ ID NO:42)或PPXXSKMXXPP (SEQ ID NO:43),其中X是任何氨基酸。

[0166] 在一些实施方案中,所述靶序列包含PPVKQPPP (SEQ ID NO:44)。

[0167] 在一些实施方案中,所述靶序列不包含可以被牛纤溶酶切割的二肽序列。已经公开了牛纤溶酶切割KZ之间的肽键,其中Z是选自K、Y、V或E的氨基酸。因此,在一些实施方案中,所述靶序列不包含KK、KY、KV和KE。优选地,蛋白酶切割位点选自KQ、SF、FM、KN、NQ、NT、EI及其组合。在一些实施方案中,蛋白酶切割位点选自SF、FM、KN、NQ、NT、EI及其组合。

[0168] 在一些实施方案中,所述靶序列包含SFMKKNQNT (SEQ ID NO:45)、SFMNTKKNQEI (SEQ ID NO:46)、SFMNQNT (SEQ ID NO:47)、SFMNQKKNQEI (SEQ ID NO:48)、SFMNQNTKKEI (SEQ ID NO:49)、SFMNQNT (SEQ ID NO:50)、KKNQSFMNT (SEQ ID NO:51)、KKNQNTSFMEI (SEQ ID NO:52)、KKNQNT (SEQ ID NO:53)、KKSFMNQNT (SEQ ID NO:54)、KKNQSFMEINT (SEQ ID NO:55)、KKNQNT (SEQ ID NO:56)、SFMNQNT (SEQ ID NO:57)、NQSFMEINT (SEQ ID NO:58)、NQNTSFMEI (SEQ ID NO:59)、NQNT (SEQ ID NO:60)、SFMNTNQEI (SEQ ID NO:61)、SFMNT (SEQ ID NO:62)、SFMNQ (SEQ ID NO:63)、NQSFMEINT (SEQ ID NO:64)、NQNTSFMEINT (SEQ ID NO:65)、SFMEINT (SEQ ID NO:66)、EISFMNTNQ (SEQ ID NO:67)、EINTSFMNQ (SEQ ID NO:68)、EINTNQSFM (SEQ ID NO:69)、LSFMAIP (SEQ ID NO:70)或LFMSFAIP (SEQ ID NO:71)。优选地,靶序列包含SFMKKNQNT (SEQ ID NO:45)、SFMNQNT (SEQ ID NO:57)或LSFMAIP (SEQ ID NO:70)。

[0169] 在一些实施方案中,所述靶序列包含LQGSFMKKNQNT (SEQ ID NO:72)、LQGSFMNQNT (SEQ ID NO:73)、LQGSLSFMAIP (SEQ ID NO:74)或LQGSKQKQKQKQGSFE (SEQ ID NO:112)。其他实例包括LQGSPLKQPPPGSFE (SEQ ID NO:113)、LQGSPLQPPQGSFE (SEQ ID NO:114)和LQGSGLKQGGSGGSFE (SEQ ID NO:115)。

[0170] 在一些实施方案中,所述靶序列包含GSPPLQPPPGS (SEQ ID NO:93)或GGSGSLKQGGSGGS (SEQ ID NO:94)。

[0171] 靶序列包含不形成可检测标记的一部分的氨基酸或由所述氨基酸组成。因此,靶序列可以包含附接到可检测标记的氨基酸接头。在一些实施方案中,所述接头可以位于靶序列的N-末端和/或C-末端处。在一些实施方案中,所述接头包含一个或多个甘氨酸残基、

丝氨酸残基和/或脯氨酸残基。例如,在一些实施方案中,所述接头包含选自LQG (SEQ ID NO:95)、GSFE (SEQ ID NO:96)、GSSGGS (SEQ ID NO:97)、GSPPL (SEQ ID NO:98)、PPPGS (SEQ ID NO:99)、GGS GGS (SEQ ID NO:100)、GGS GGS L (SEQ ID NO:101)和PPVKQPPP (SEQ ID NO:44)的氨基酸序列。该接头序列可以位于靶序列的N-末端处、靶序列的C-末端处或这两个位置处。当接头位于靶序列的N-末端和C-末端这两处时,接头序列可以相同或不同。不希望受理论束缚,所述接头可以用于以下目的中的一个或多个:(i)帮助确保蛋白酶切割位点处于优选的切割构象;(ii)改善蛋白酶切割位点的可及性;(iii)增加可检测的变化的大小(例如,在可检测标记是BRET对的情况下,所述接头序列可以起到增大BRET比率的作用);(iv)有助于蛋白酶识别靶序列;以及/或者(v)有助于所述传感器(和/或靶序列)对假单胞菌属某些种蛋白酶的特异性高于对牛纤溶酶的特异性。另外,不希望受理论束缚,靶序列中的脯氨酸残基可能有助于所述传感器对假单胞菌属某些种蛋白酶的特异性高于对牛纤溶酶的特异性。

[0172] 在一些实施方案中,所述接头包含可以用于纯化或用于附接可检测标记的一个氨基酸或一系列氨基酸。例如,所述接头可以包含组氨酸标签,用于纯化或与可检测标记一起进行自组装。在另一个实例中,接头可以包含反应性基团(例如半胱氨酸),以便添加可检测标记。

[0173] 在优选的实施方案中,所述靶序列的氨基酸少于约50个。例如,靶序列包含介于约2个与约50个之间的氨基酸。在一些实施方案中,所述靶序列包含2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个氨基酸。可以改变靶序列的(氨基酸)长度,以增大传感器的灵敏度。

[0174] 一个或多个可检测标记

[0175] 优选地,所述传感器包含可检测标记。如本文所用,术语“标记”是指通过共价键合或非共价相互作用与靶序列直接或间接地特异性缔合的化合物或组合物。在优选的实施方案中,标记通过共价键合(例如肽、硫醚或酯键)附接到靶标。本领域技术人员将意识到可以用于将标记共价附接到靶序列的技术。通常能够产生可目测检测或可通过仪器装置检测的信号的任何物质都可以用作可检测标记。

[0176] 标记可以是可直接检测的,例如,标记可以是荧光或磷光分子(例如,FITC、罗丹明、镧系元素磷光体),或可间接检测的,例如通过酶活性(例如,辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、荧光素酶、碱性磷酸酶)。可以通过本领域已知的多种方式实现标记的掺入,例如,通过使用两种分子(诸如酶及其底物(例如,ATP酶和ATP)、链霉亲和素与生物素、或者抗原或表位与抗体之间的高结合亲和力。以举例说明的方式,其他方式包括在聚合酶介导的引物延伸反应中使用放射性标记的或生物素化的核苷酸,或者经由重组表达或合成方式进行表位标注。标记可以经由各种长度的间隔臂或接头直接或间接地附接。可检测标记可以是蛋白质或非蛋白质。例如,具有靶序列和任何接头(如果存在)的可检测标记可以形成连续的一段氨基酸。

[0177] 在优选的实施方案中,可检测标记包含两种或更多种组分。这两种或更多种组分可以相同或不同。例如,这两种或更多种组分可以是相同的发色团,或者这两种或更多种组分可以是:i)共价附接到靶序列的化学发光供体结构域和受体结构域,或ii)荧光团结构域

和受体结构域。

[0178] 在一些实施方案中,所述传感器对于假单胞菌属某些种蛋白酶具有介于约0.01nM与约100nM之间、或约0.1nM与约10nM之间、或约0.2nM与约5nM之间的 EC_{50} 。在一些实施方案中,所述传感器对于假单胞菌属某些种蛋白酶具有介于约0.4nM与约3nM之间的 EC_{50} ,例如, EC_{50} 可以为约0.1、0.2、1.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9或3.0nM。

[0179] 还需要区分由于内在因素(诸如纤溶酶)和外在因素(诸如细菌蛋白酶)引起的腐败的传感器。在一些实施方案中,本发明的传感器对假单胞菌属某些种蛋白酶的灵敏度是对纤溶酶的灵敏度的至少5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、100倍、150倍、200倍、250倍、300倍、350倍或400倍。优选地,所述传感器对假单胞菌属某些种蛋白酶的灵敏度是对纤溶酶的灵敏度的至少100倍、150倍、200倍、250倍、300倍、350倍或400倍。在该上下文中,传感器对假单胞菌属某些种蛋白酶相比于对纤溶酶的灵敏度这样计算:取得由纤溶酶校准曲线计算的 EC_{50} 的比率,将其除以由细菌蛋白酶校准曲线计算的 EC_{50} 。

[0180] 在一些实施方案中,可检测标记选自发色团、纳米粒子、量子点、紫精及其组合。

[0181] 在一些实施方案中,可检测的变化是共振能量转移、声学、电化学电位、荧光、化学发光、磷光、吸光度、抗体结合、BRET比率、FRET效率或质量的变化。在一些实施方案中,通过假单胞菌属某些种蛋白酶切割所述靶序列导致共振能量转移(RET)的可检测的变化。

[0182] 发色团

[0183] 在一些实施方案中,可检测标记包含发色团。在说明书通篇中,发色团和发光团可互换使用。如本文所用,发色团被广义地定义为任何光活性化合物并且包括任何有色或无色的光吸收物质和任何发荧光的物质。任何合适的发色团都可以用于本申请的传感器中。合适的发色团包括但不限于任何有机或无机染料、荧光团、磷光团、光吸收纳米粒子、它们的组合,或者它们的金属化络合物。因此,在一些实施方案中,发色团选自有机染料、无机染料、磷光团、光吸收纳米粒子、它们的组合,以及它们的金属化络合物。

[0184] 在一些实施方案中,有机染料选自香豆素、茈、花菁、苯、N-甲基吡啶、赤藓红B、N-乙酰基-L-色氨酸酰胺、2,5-二苯基噻唑、红荧烯和N-(3-磺丙基)吡啶鎓。优选的香豆素的实例包括7-氨基香豆素、7-二烷基氨基香豆素和香豆素153。优选的苯的实例包括1,4-双(5-苯基噻唑-2-基)苯和1,4-二苯基苯。优选的花菁的实例包括氧杂菁、噻菁、吡啶菁、部花菁和羰花菁。其他示例性花菁包括ECL Plus、ECF、C3-氧杂菁、C3-噻菁染料(EtOH)、C3-噻菁染料(PrOH)、C5-吡啶菁、C5-氧杂菁、C5-噻菁、C7-吡啶菁、C7-氧杂菁、CypHer5、染料-33、Cy7、Cy5、Cy5.5、Cy3Cy5ET、Cy3B、Cy3、Cy3.5、Cy2、CBQCA₅NIR1、NIR2、NIR3、NIR4、NIR820、SNIR1、SNIR2、SNIR4、部花菁540、碘化频哪酮醇、1,1-二乙基-4,4-羰花菁碘化物、全染色染料(Stains All)、染料-1041或染料-304。

[0185] 在一些实施方案中,无机染料选自金属化和非金属化卟啉、酞菁、二氢卟吩(例如,叶绿素A和B)和金属化发色团。优选的卟啉选自四羧基-苯基-卟啉(TCPP)和Zn-TCPP。优选的金属化发色团选自钆多吡啶络合物、钕多吡啶络合物、铈多吡啶络合物、铈(III)的3-(1-甲基苯并咪唑-2-基)-7-(二乙氨基)-香豆素络合物,以及3-(苯并噻唑-2-基)-7-(二乙氨基)-香豆素与铈(III)的络合物。

[0186] 在一些实施方案中,可检测标记是选自磷光染料、荧光素、罗丹明(例如,罗丹明B、

罗丹明6G) 和蒽 (例如, 9-氰基蒽、9,10-二苯基蒽、1-氯-9,10-双(苯基乙炔基)蒽) 的荧光团/磷光团。

[0187] 在一些实施方案中,光吸收纳米粒子包含金、银、铂或钯。

[0188] 在一些实施方案中,磷光团是磷光染料。在一些实施方案中,磷光团是一种或多种金属(诸如钪、钇、铈、镧、铈、钕、钐、铕、钆、铜、铁、铬、钨、锌等)的金属络合物。该金属络合物可以含有一种或多种配体,其有助于该络合物在水性或非水性环境中的溶解性。例如,配体的一些合适的实例包括但不限于吡啶、吡嗪、异烟酰胺、咪唑、联吡啶、三联吡啶、菲咯啉、二吡啶并吩嗪、卟啉、卟吩以及它们的衍生物。此类配体可以例如被以下各项取代:烷基、经取代的烷基、芳基、经取代的芳基、芳烷基、经取代的芳烷基、羧酸根、甲醛、甲酰胺、氰基、氨基、羟基、亚氨基、羟基羰基、氨基羰基、脒、胍基、酰脲、含硫基团、含磷基团和N-羧基-琥珀酰亚胺的羧酸酯。

[0189] 本领域技术人员将意识到使用发色团作为可检测标记的蛋白酶测定。

[0190] 纳米粒子

[0191] 在一些实施方案中，可检测标记包含纳米粒子。如本文所用，术语“纳米粒子”是指可以任选地被金属或非金属纳米层壳包围的金属纳米晶体粒子。合适的纳米粒子的直径为约1nm至约100nm。在一些实施方案中，所述直径优选地为约10nm至约50nm，更优选地为约5nm至约20nm。这些纳米粒子可以包含任何类型的金属（包括元素金属）或金属合金。在一些实施方案中，这些金属或金属合金纳米粒子包含选自金(Au)、银(Ag)、铜(Cu)、镍(Ni)、钯(Pd)、铂(Pt)、钴(Co)、铑(Rh)、铱(Ir)、铁(Fe)、钌(Ru)、锇(Os)、锰(Mn)、镱(Re)、钪(Sc)、钛(Ti)、钒(V)、铬(Cr)、锌(Zn)、钇(Y)、锆(Zr)、铌(Nb)、钼(Mo)、锝(Tc)、镉(Cd)、镧(La)、铈(Lu)、铪(Hf)、钽(Ta)、钨(W)、铀(U)、镥(Lr)、铷(Rb)、铯(Cs)、钡(Ba)、镉(Cd)、镧(La)、铈(Ce)、铕(Eu)、铈(Ce)、铋(Bi)、钫(Fr)、钍(Th)、铀(U)、镎(Np)、钚(Pu)、镅(Am)、锔(Cm)、锿(Er)、镱(Yb)、镱(Lu)、铪(Hf)、钽(Ta)、钨(W)、铀(U)、镎(Np)、钚(Pu)、镅(Am)、锔(Cm)、锿(Er)、镱(Yb)、镱(Lu)的金属，前述物质的氧化物（例如， FeO 、 Fe_3O_4 、 Fe_2O_3 、 Fe_xO_y （非化学计量的氧化铁）、 CuO 、 NiO 、 Ag_2O 、 Mn_2O_3 ）、氢氧化物、硫化物、硒化物和碲化物及其组合。

[0192] 在一些实施方案中,这些核/壳纳米粒子包含金属或金属合金核和金属壳。在优选的实施方案中,核选自Au、Ag、Cu、Co、Fe和Pt。在优选的实施方案中,提到的壳选自Au、Ag、Cu、Co、Fe、Pt、它们的金属氧化物及其组合。在一些实施方案中,这些金属核/壳组合选自Fe/Au、Fe/Fe₃O₄和Au/Fe₂O₃。所述纳米粒子的核的直径优选地为约1nm至约25nm,更优选地为约3nm至约5nm。所述核/壳纳米粒子的金属壳的厚度优选地为约0.5nm至约10nm,更优选地为约0.5nm至约2nm。

[0193] 在一些实施方案中,纳米粒子可以被稳定化。如本文所用,“稳定化”意味着使用配体壳或单层来涂覆、保护纳米粒子,或赋予纳米粒子一些特性。例如,配体壳或单层可以用于保护纳米粒子免受生物腐蚀。在另一个实例中,配体壳或单层可以用于使纳米粒子可或多或少地溶于溶剂诸如水中。该单层可以由相同配体中的几种(即,同型配体)或不同配体的混合物组成。本领域技术人员将意识到可以用于将配体附接到纳米粒子表面以形成配体壳的技术。例如,纳米粒子可以在含有配体的溶液中混合,以促进对纳米粒子的涂覆。在另一个实例中,可以通过将纳米粒子暴露于配体和/或涂覆材料的气相,使得配体和/或涂覆材料附接到纳米粒子或与纳米粒子结合,来用配体和/或涂覆材料涂覆纳米粒子。在一些实施方案中,配体和/或涂覆材料通过共价键合而附接到纳米粒子。这些配体包含被纳米粒子

的金属表面吸引的官能团。在一些实施方案中,这些配体包含至少一种选自下列的基团:硫醇、醇、硝基化合物、膦、氧化膦、间苯二酚芳烃(resorcinarenes)、硒化物、次膦酸、膦酸、磺酸、磺酸根、羧酸、二硫化物、过氧化物、胺、腈、异腈、硫腈(thionitile)、氧腈、氧硅烷、烷烃、烯烃、炔烃、芳族化合物和硒基部分。形成单层所需的配体数量将取决于纳米粒子的大小。

[0194] 在优选的实施方案中,稳定化的纳米粒子包含围绕纳米粒子核的有机单层。可以使用本领域技术人员已知的任何有机单层。例如,合适的有机单层可以选自烷烃硫醇盐单层、氨基烷基硫醇盐单层、烷基硫代硫酸盐单层和有机酚(例如,多巴胺及其衍生物)。在一些实施方案中,有机单层的厚度小于约10nm,优选地小于约5nm。

[0195] 优选的稳定化纳米粒子选自三辛基氧化膦稳定化的纳米粒子、胺稳定化的纳米粒子、羧酸稳定化的纳米粒子、膦稳定化的纳米粒子、硫醇稳定化的纳米粒子、氨基烷基硫醇稳定化的纳米粒子和有机酚稳定化的纳米粒子。

[0196] 作为非限制性实例,可检测标记包含金纳米粒子。Guarise等人(2006)中讨论了金纳米粒子在蛋白酶测定中的应用。

[0197] 量子点

[0198] 在一些实施方案中,可检测标记包含量子点。在说明书通篇中,量子点和纳米晶体可互换使用。如本文所用,“量子点”是由元素周期表的II-VI族或III-V族元素的原子组成的半导体(例如,CdSe、CdTe和InP)。材料相同但尺寸不同的量子点可以发出不同颜色的光。它们的亮度归因于能级由于电子在所有三个空间维度中受到限制而发生量子化。在体半导体中,电子-空穴对被束缚在玻尔激子半径内,这是每种类型半导体的特征。量子点小于玻尔激子半径,这导致出现离散能级。半导体的价带与导带之间的带隙 ΔE 是纳米晶体的大小和形状的函数。与传统的有机荧光团相比,量子点具有略低的发光量子产额,但具有大得多的吸收截面和极低的光漂白率。量子点的摩尔消光系数为约 10^5 - $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$,是染料的10至100倍大。如本文所用,“量子产额”是指原始能量供给的最终发射的量度。

[0199] 可以使用适合于该目的的任何量子点。在一些实施方案中,可以通过合成壳来操纵量子点的光学特性。典型地,壳是稳定壳。此类量子点称为核-壳量子点,包括但不限于CdSe/ZnS、InP/ZnS、InP/CdSe。核/壳量子点在其带隙较低的核周围具有带隙较高的壳,核发射的光完全不被壳吸收。壳使来自核的表面非辐射发射钝化,从而增强光致发光量子产额并防止自然降解。I型量子点(诸如,CdSe/ZnS)的壳具有比核能量更高的导带和能量更低的价带,导致电子和空穴都被限制在核中。II型量子点(诸如CdTe/CdSe和CdSe/ZnTe)的壳的导带和价带在能量上比核的导带和价带都低或都高。因此,电子和空穴的运动被限制在一个维度上。激子在核-壳界面处的辐射性复合引起II型发射。II型量子点在带边缘附近表现为间接半导体,因而具有进入红色和近红外的吸收尾部。也可以使用合金化半导体量子点(CdSeTe),但优选的是I型和II型。合金组成和内部结构可以变化,从而允许在不改变粒子大小的情况下调节光学特性。

[0200] 在一些实施方案中,量子点选自CdSe/ZnS核/壳量子点、CdTe/CdSe核/壳量子点、CdSe/ZnTe核/壳量子点和合金化半导体量子点(例如,CdSeTe)。

[0201] 如果需要不同的颜色发射来产生多个传感器(多路复用检测),这可以通过改变量子点核的大小来实现,从而产生不同的发射波长。量子点可以如上文关于纳米粒子所讨论

的那样稳定化或不稳定。用于稳定量子点的优选配体是间苯二酚芳烃。

[0202] 作为非限制性实例,在可检测标记基于共振能量转移(RET)的情况下,可以使用量子点。关于量子点在蛋白酶测定中的用途的综述,参见Kim和Kim(2012)。

[0203] 紫精

[0204] 在一些实施方案中,可检测标记包含紫精。如本文所用,“紫精”是有机氧化还原化合物。优选的紫精能够在氧化和还原时多次可逆地改变颜色。在一些实施方案中,紫精是甲基紫精、丙基紫精磷酸盐或氨基丙基紫精。在一些实施方案中,紫精可以用作猝灭剂,因为它们能够猝灭发色团(诸如卟啉)的激发态。

[0205] 共振能量转移

[0206] 在一些实施方案中,可检测标记基于共振能量转移(RET),诸如Förster共振能量转移,并且包括但不限于生物发光共振能量转移(“BRET”)和荧光共振能量转移(“FRET”)。

[0207] 如本文所用,“BRET”是基于生物发光蛋白供体与受体分子之间的非放射性能量转移的邻近测定法。“生物发光共振能量转移”和“BRET”可互换使用。

[0208] 如本文所用,“FRET”是基于两个发色团之间或发色团与猝灭剂之间的非放射性能量转移的邻近测定法。“FRET”和“荧光共振能量转移”可互换使用。

[0209] 在一些实施方案中,可检测标记包含:i)共价附接到靶序列的化学发光供体结构域和受体结构域,或ii)供体结构域和受体结构域。在ii)的一些实施方案中,供体结构域是荧光团供体并且/或者受体结构域是猝灭剂结构域。在一些实施方案中,一个结构域共价附接到靶序列的N-末端,并且另一个结构域共价附接到靶序列的C-末端。在优选的实施方案中,可检测标记包含共价附接到靶序列的化学发光供体结构域和受体结构域。图1中提供了实例。

[0210] A.化学发光供体结构域

[0211] 化学发光是由于化学反应产生的热量发射(发光)有限的能量发射。术语“化学发光”在本文中用于涵盖依赖于酶的活性的生物发光。非酶化学发光是存在下有机染料与氧化剂之间的化学反应的结果。化学发光发射是由化学诱导的有机染料激发态的能量衰减到基态而产生的。化学发光发射的持续时间和强度主要取决于反应溶液中存在的化学试剂的程度。

[0212] 在优选的实施方案中,化学发光供体结构域是生物发光蛋白。如本文所用,术语“生物发光蛋白”是指能够作用于合适的底物以产生发光的任何蛋白质。

[0213] 在本领域中应当理解,生物发光蛋白是一种酶,其将底物转变为激活产物,所述激活产物随后在弛豫时释放能量。激活产物(由生物发光蛋白对底物的活性产生)是生物发光蛋白产生的发光的来源,所述发光被转移到受体分子。

[0214] 有许多不同的生物发光蛋白可以用于本发明(参见例如表1)。从许多发光生物体中分离出来的已知发光系统包括细菌、原生动物、腔肠动物、软体动物、鱼类、多足类、苍蝇、真菌、蠕虫、甲壳类动物和甲虫,特别是发光叩头虫属(Pyrophorus)的叩头虫,以及Photinus属、Photuris属和熠萤属(Luciola)的萤火虫。显示生物发光的另外的生物体列于WO 00/024878、WO 99/049019和Viviani(2002)中。

[0215] 任何合适的生物发光蛋白都可以用于本申请的传感器中。一个众所周知的实例是被称为荧光素酶的这类蛋白质,它们催化产生能量的化学反应,其中特定的生物化学物质

荧光素(一种天然存在的荧光团)被具有荧光素酶活性的酶氧化(Hastings,1996)。种类繁多的生物体(原核生物和真核生物这两类)包括细菌、藻类、真菌、昆虫、鱼类和其他海洋形态的物种能够以这种方式发出光能,并且各自都具有特定的荧光素酶活性和化学性质不同于其他生物体。荧光素/荧光素酶系统在形式、化学和功能方面非常多样化。因此,具有荧光素酶活性的生物发光蛋白可以从多种来源或通过多种方式获得。具有荧光素酶活性的生物发光蛋白的实例可以在US 5,229,285、5,219,737、5,843,746、5,196,524和5,670,356中找到。最广泛使用的两种荧光素酶是:(i)海肾荧光素酶(来自海肾(*R. reniformis*)),35kDa蛋白质,其使用腔肠素作为底物并发射480nm的光(Lorenz等人,1991);和(ii)萤火虫荧光素酶(来自北美萤火虫(*Photinus pyralis*)),61kDa蛋白质,其使用荧光素作为底物并发射560nm的光(de Wet等人,1987)。

[0216] 长腹水蚤荧光素酶(来自海洋桡脚类动物(*Gaussia princeps*))已经用于生物化学测定法(Verhaegen等人,2002)。长腹水蚤荧光素酶是20kDa蛋白质,其在快速反应中氧化腔肠素,导致470nm处的亮光发射。

[0217] 可用于本发明的荧光素酶还已经被表征为来自*Anachnocampa*属物种(WO 2007/019634)。这些酶的大小为约59kDa,并且是ATP依赖性的荧光素酶,催化具有在光谱的蓝色部分内的发射光谱的发光反应。

[0218] 本领域技术人员可以轻易地制备天然存在的生物发光蛋白的生物活性变体或片段。可用于本发明的此类变体的三个实例是Rluc2(Loening等人,2006年)、Rluc8(Loening等人,2006年)和Rluc8.6-535(Loening等人,2007年),它们各自为海肾荧光素酶的变体。在另一个优选的实施方案中,选择BRET化学发光供体的序列以获得比掺入了天然的海肾荧光素酶传感器的传感器分子更大的热稳定性。Rluc2或Rluc8是合适选择的适宜实例,因此表现出的发光度是掺有天然海肾荧光素酶序列的传感器的 ≥ 5 倍或 ≥ 10 倍。这种增强的发光度具有显著益处,因为对于任何给定时间分辨率,它允许更经济地使用试剂。

[0219] 表1. 示例性生物发光蛋白。

[0220]

物种	名称	生物体	MW kDa x 10 ⁻³	发射 (nm)	底物的实例
昆虫	FFluc	<i>Photinus pyralis</i> (北美萤火虫)	~61	560	D-(-)-2-(6'- 羟基苯并噻 唑基)-D ² -噻 唑啉-4-羧 酸, HBTTCa (C ₁₁ H ₈ N ₂ O ₃ S ₂) (荧光素)
昆虫	FF'luc	源氏萤(<i>Luciola cruciata</i>) (日本萤火虫)		560-5 90 (许多 突变 体)	荧光素
昆虫		鞘翅目光萤科 (Phengodid)甲虫 (苹果蝇蛆)			
昆虫		蕈蚊属物种			荧光素
昆虫		<i>Orphelia fultoni</i> (北美蓝光萤)			
昆虫	Clluc	<i>Pyrophorus plagiophthalmu s</i> (叩头虫)		546、 560、 578 和 593	荧光素
海蜇	水母 发光 蛋白	多管水母属 (<i>Aequorea</i>)	44.9	460-4 70	腔肠素
海三色堇	Rluc	海肾(<i>Renilla reniformis</i>)	36	480	腔肠素

[0221]

海三色堇(经修饰)	Rluc8	海肾(经修饰)	36	487(峰)	腔肠素/Deep Blue C
海三色堇(经修饰)	Rluc2	海肾(经修饰的 M185V/Q235A)	36	480	腔肠素
海三色堇(经修饰)	RLuc8 .6-535	海肾(经修饰)	36	535	腔肠素
海三色堇	Rmluc	海洋微藻 (<i>Renilla mullerei</i>)	36.1	~480	腔肠素
海三色堇		<i>Renilla kollikeri</i>			
甲壳纲 (Crustacea) (虾)	Vluc	希氏弯喉海萤 (<i>Vargula hilgendorffii</i>)	~62	~460	腔肠素
甲壳纲	CLuc	海萤属 (<i>Cypridina</i>) (海萤)	75	465	腔肠素/海萤 荧光素
腰鞭毛虫 (Dinofagellate) (海藻)		多边膝沟藻 (<i>Gonyaulax polyedra</i>)	130	~475	四吡咯
软体动物		<i>Latia</i> (淡水帽贝)	170	500	烯醇甲酸盐、萜烯、 醛
水螅		蕨枝螅(<i>Obelia bicuspidata</i>)	~20	~470	腔肠素
虾		细角刺虾 (<i>Oplophorus gracilorostris</i>)	31	462	腔肠素
虾		细角刺虾 (NanoLuc)	19	~460	复立玛津 (Furimazine)
其他	Ptluc	<i>Ptilosarcus</i>		~490	腔肠素
	Gluc	长腹水蚤	~20	~475	腔肠素
	Plluc	乳点水蚤属 (<i>Pleuromamma</i>)	22.6	~475	腔肠素

[0222] 可以在本发明中采用的替代性非荧光素酶生物发光蛋白是可以作用于合适的底物以产生发光信号的任何酶。此类酶的具体实例是 β -半乳糖苷酶、内酰胺酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -葡萄糖醛酸酶和 β -葡萄糖苷酶。这些酶的合成发光底物在本领域中是熟知的,并且可从诸如Tropix Inc. (Bedford, MA, USA) 等公司商购获得。

[0223] Hushpulian等人描述了可用于本发明的过氧化物酶的实例(2007)。

[0224] 在一些实施方案中,生物发光蛋白是荧光素酶、 β -半乳糖苷酶、内酰胺酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -葡萄糖苷酸酶或 β -葡萄糖苷酶。在一些实施方案中,生物发光蛋白是荧光素酶。合适的荧光素酶包括但不限于海肾荧光素酶、萤火虫荧光素酶(例如PpyRE8、PpyRE10)、腔肠动物荧光素酶、北美蓝光萤荧光素酶、叩头虫荧光素酶、苹果蝇蛆荧光素酶、细菌荧光素酶、长腹水蚤荧光素酶、水母发光蛋白、蕈蚊荧光素酶,或者它们中任一者的生物活性变体或片段,或者它们中的两者或更多者的嵌合体。

[0225] 如本文所用,“生物活性片段”是如本文所述多肽的维持该全长多肽的限定活性的一部分。如本文所用,“生物活性变体”是与天然存在的分子和/或限定分子有一个或多个氨基酸不同,但维持限定活性(诸如上文针对生物活性片段所限定的活性)的分子。生物活性变体与天然存在的分子和/或限定分子典型地具有至少50%、更优选至少80%、更优选至少90%、更优选至少95%、更优选至少97%、并且甚至更优选至少99%同一性。

[0226] 在一个优选的实施方案中,具有小分子量的生物发光蛋白用于防止由于空间位阻而出现的对相互作用的抑制。该生物发光蛋白优选地由单条多肽链组成。另外,所述生物发光蛋白优选地不形成寡聚物或聚集体。生物发光蛋白海肾荧光素酶、长腹水蚤荧光素酶和萤火虫荧光素酶满足这些准则中的全部或大多数。

[0227] 如本文所用,术语“底物”是指可以连同化学发光供体一起用于产生或吸收发光的任何分子。对底物的选择可以影响由化学发光供体产生的光的波长和强度。在一些实施方案中,生物发光蛋白具有选自荧光素、钙、腔肠素、腔肠素的衍生物或类似物、或者荧光素的衍生物或类似物的底物。

[0228] 一种广泛已知的底物是腔肠素,其存在于刺胞动物门(cnidarian)、桡脚亚纲动物(copepod)、毛颚动物门(chaetognath)、栉水母门动物(ctenophore)、十足类虾、糠虾、放射虫和一些鱼类中(Greer和Szalay,2002)。对于例如海肾荧光素酶,可使用在418nm与547nm之间产生光发射的腔肠素类似物/衍生物(Inouye等人,1997;Loening等人,2007)。已经描述了在使用海肾荧光素酶时,在400nm处发射光的腔肠素类似物/衍生物(400A,DeepBlueC)(WO 01/46691)。腔肠素类似物/衍生物的其他实例是EnduRen、Prolume purple、Prolume purple II、Prolume purple III、ViviRen和复立玛津。腔肠素类似物/衍生物的其他实例包括但不限于PCT/US2013057660和US20140302539中所公开的化合物。

[0229] 如本文所用,术语“荧光素”被广义地定义为并且是指在能够生物发光的生物体中发现的一类发光生物色素,以及合成类似物或功能上等同的化学物质,其在荧光素酶存在下被氧化产生氧化荧光素和光形式的能量。首先从萤火虫*Photinus pyralis*中分离出D-荧光素或2-(6-羟基苯并噻唑-2-基)-2-噻唑啉-4-羧酸。从那时起,各种化学性质不同形式的荧光素已经从各种不同的生物体中发现并加以研究,它们主要来自海洋,例如鱼和鱿鱼,但许多已经在陆栖生物体(例如,蠕虫、甲虫和其他各种昆虫)中鉴定出来(Day等人2004; Viviani,2002)。如本文所用,荧光素还包括荧光素的衍生物或类似物。

[0230] 除完全合成的荧光素(诸如环状烷基氨基荧光素(CycLuc1))之外,还存在至少五种一般类型的在生物学上进化的荧光素,它们各自在化学性质上不同并且由采用范围广泛的不同辅因子的在化学性质和结构上不同的荧光素酶催化。第一种是作为需要ATP来达成催化的萤火虫荧光素酶(EC 1.13.12.7)的底物的萤火荧光素。第二种是也见于一些鱿鱼和鱼中的由长链醛和还原型磷酸核黄素组成的细菌荧光素。细菌荧光素酶是FMN依赖性的。第三种是作为见于沟鞭藻纲(Dinoflagellate)(海洋浮游生物)中的四吡咯叶绿素衍生物的沟鞭藻纲荧光素,所述沟鞭藻纲是造成夜间海洋磷光的生物体。沟鞭藻纲荧光素酶催化沟鞭藻纲荧光素氧化,并且由三个相同且具有催化活性的结构域组成。第四种是见于某些介形亚纲动物(ostracod)和深海鱼(例如,光蟾鱼属(Porichthys))中的咪唑并吡嗪介形荧光素。最后一种,是作为蛋白质水母发光蛋白的光发射体的见于放射虫、栉水母门动物、刺胞动物门、鱿鱼、桡脚亚纲动物、毛颚动物门、鱼和虾中的腔肠素(咪唑吡嗪)。

[0231] 在一些实施方案中,生物发光蛋白需要辅因子。辅因子的实例包括但不必限于ATP、镁、氧、FMNH₂、钙,或它们中的任何两者或更多者的组合。

[0232] B.受体结构域

[0233] 如本文所用,“受体结构域”是能够接受由于化学发光供体结构域的活性而发射的能量的任何分子。在一些实施方案中,受体结构域(在本文中也称为“受体分子”)是荧光受体结构域。如本文所用,术语“荧光受体结构域”(在本文中也称为“荧光受体分子”)是指能够接受由于化学发光供体的活性而发射的能量,然后将其作为光能量再发射的任何化合物。

[0234] 本发明中可以采用许多不同的受体结构域。合适的受体结构域可以是蛋白质或非蛋白质类。

[0235] 在一些实施方案中,荧光受体结构域是蛋白质。实例包括但不限于绿色荧光蛋白(GFP)、GFP的蓝色荧光变体(BFP)、GFP的青色荧光变体(CFP)、GFP的黄色荧光变体(YFP)、增强型GFP(EGFP)、增强型CFP(ECFP)、增强型YFP(EYFP)、GFPS65T、Emerald、Venus、mOrange、Topaz、GFPuv、去稳定化EGFP(dEGFP)、去稳定化ECFP(dECFP)、去稳定化EYFP(dEYFP)、HcRed、t-HcRed、DsRed、DsRed2、t-二聚体2、t-二聚体2(12)、mRFP1、pocilloporin、海肾GFP、Monster GFP、paGFP、TdTomato、mCherry、Kaede蛋白、TagRFP、TurBoFB或藻胆蛋白,或者它们中任一者的生物活性变体或片段。

[0236] 在一些实施方案中,荧光受体结构域是非蛋白质。不是蛋白质的受体分子的实例包括但不限于Alexa Fluor染料(例如,AF680、AF750)、Bodipy染料、Cy染料、荧光素、丹磺酰、伞形酮、荧光微球、发光微球、荧光纳米晶体、海蓝、级联蓝、级联黄、太平洋蓝、俄勒冈绿、四甲基罗丹明、罗丹明、得克萨斯红、稀土元素螯合物,或者它们的任何组合或衍生物。

[0237] 一个极其熟知的实例是包括来自水母维多利亚水母(*Aequorea victoria*)的绿色荧光蛋白和由应用分子生物学(例如诱变和嵌合蛋白技术)产生的众多其他变体(GFP)的一组荧光团(Tsien,1998)。GFP基于它们的发色团的独特组分加以分类,各类别具有不同的激发波长和发射波长:类别1,中性酚和阴离子酚盐的野生型混合物;类别2,酚盐阴离子;类别3,中性酚;类别4,具有堆叠的s-电子体系的酚盐阴离子;类别5,吡啶;类别6,咪唑;类别7,苯基。

[0238] 已发生突变的天然存在的受体分子(变体)也可以用于本发明。适用于BRET的工程化系统的一个实例是海肾荧光素酶和GFP的增强型黄色突变体(EYFP)配对,在不存在一种或多种介导蛋白质(在该情况下是G蛋白偶联受体)时,所述配对不单独地以显著程度直接彼此相互作用(Xu等人,1999)。

[0239] 在另一个实施方案中,受体结构域是荧光纳米晶体。纳米晶体或“量子点”作为荧光标记具有超过有机分子的若干优势,包括对光降解具有抗性、亮度提高、无毒性并且具有使得能够同时监测若干过程的尺寸依赖性狭窄发射光谱。另外,纳米晶体的吸收光谱通常很宽,从而使得所有尺寸、因此所有颜色能够用单一激发波长激发。该特性意味着它们适用于多路复用。纳米晶体在紫外线范围和可见光范围中的波长处也具有非常大的摩尔消光系数。因此,在相同的激发通量下,它们能够吸收是有机染料的10至50倍的光子。

[0240] 荧光纳米晶体可以以多种方式附接或“生物缀合”于蛋白质(诸如本申请的传感器或靶序列)。例如,可以用来自二氢硫辛酸(DHLA)或两亲性聚合物的羧酸根基团使“量子点”

的表面帽带负电。可以直接或经由由带正电的亮氨酸拉链肽融合于重组蛋白所组成的桥使蛋白质静电缀合于DHLA-纳米晶体。后者以针对预定靶标的特异性结合一抗。作为替代,用常规的碳二亚胺化学使抗体、链霉亲和素或其他蛋白质共价偶联于纳米晶体的聚丙烯酸酯帽。

[0241] 存在用于产生包括硒化镉、硫化镉、砷化镉和磷化镉在内的纳米晶体的胶体方法。这些量子点可以以10至50个原子的直径在量子点体积内含有少至100至100,000个原子。一些量子点是一种材料包埋在带隙较大的另一种材料中的小区域。这些量子点可以是所谓的核-壳结构,例如,其中CdSe在核中且ZnS在壳中,或来自称为有机改性硅酸盐(ormosil)的特殊二氧化硅形式。点越大,其荧光光谱越红(能量越低)。相反,较小的点发射较蓝(能量较高)的光。显色与量子点的能级直接相关。定量地说,决定荧光化光的能量(因而颜色)的带隙能量与量子点大小的平方成反比。较大量子点具有更紧密间隔的更多能级。这允许量子点吸收含有较小能量的光子,即较接近光谱的红端的那些光子。

[0242] 如前所述,纳米晶体可以被有机分子和/或大分子涂覆。这些涂层可以用于改变纳米晶体的特性。例如,这些涂层可以改善纳米晶体在水性溶剂中的溶解度。

[0243] Kim和Kim(2012)综述了纳米晶体或量子点在FRET和BRET中的应用。

[0244] 在一个另选实施方案中,受体分子是荧光微球。这些荧光微球典型地由聚合物制得,并且含有被掺入到聚合物基质中的荧光分子(例如荧光素GFP或YFP),所述聚合物基质可以缀合于多种试剂。荧光微球可以在内部或表面上标记。内部标记产生荧光发射光谱通常狭窄的极其明亮和稳定的粒子。通过内部标记,表面基团仍然可用于使配体(例如,蛋白质)缀合于珠粒的表面。内部标记的珠粒广泛用于成像应用中,因为它们显示对光致漂白的较大抗性。

[0245] 羧酸盐改性的荧光微球适于使用诸如1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDAC)等水溶性碳二亚胺试剂来共价偶联蛋白质。硫酸盐荧光微球是相对疏水的,将被动且接近不可逆地吸附几乎任何蛋白质。醛-硫酸盐荧光微球是已经被改性以添加表面醛基团、且与蛋白质反应的硫酸盐微球。

[0246] 在另一个实施方案中,受体分子是发光微球。这些发光微球典型地由含有被掺入到聚合物基质中的发光分子(例如铈或铕的络合物)的聚合物制得,所述聚合物基质可以缀合于多种试剂。

[0247] 可用于本发明的非荧光受体结构域的实例包括猝灭剂,诸如DABCYL[4-((4-(二甲基氨基)苯基)偶氮)苯甲酸]、DABSYL(二甲基氨基偶氮磺酸)、金属纳米粒子(诸如金和银)、黑洞猝灭剂(BHQ)和QXL猝灭剂。

[0248] C. 化学发光供体结构域和受体结构域对

[0249] 任何数量的供体-受体组合可以用于本发明的传感器中。本领域技术人员将能够选择允许进行有效能量转移的供体和受体对。在优选的实施方案中,化学发光供体结构域和受体结构域在不存在假单胞菌属某些种蛋白酶的情况下的间隔和相对取向在 $\pm 50\%$ Förster距离内。如本文所用,术语“在存在和/或不存在分析物的情况下,化学发光供体结构域和受体结构域的间隔和相对取向在 $\pm 50\%$ Förster距离内”是指可以在 $\pm 50\%R_0$ 的范围内进行的稳态RET测量。该短语涵盖从化学发光供体结构域向受体结构域的发光能量转移的效率在10%至90%范围内。在一些实施方案中,化学发光供体结构域和受体结构域的

Förster距离为至少4nm。在一个实施方案中,化学发光供体结构域和受体结构域的**Förster**距离介于约4nm与约10nm之间,或者介于约6nm与约10nm之间。

[0250] 在确定合适的配对时应当考虑的准则是受体分子相较于供体的发射/荧光光谱的相对发射/荧光光谱。供体的发射光谱应当与受体分子的吸收光谱重叠,使得来自供体发光发射的光能量处于能够激发受体分子的波长下,由此当这两个分子关于彼此处于适当的邻近度和取向时促进受体分子荧光。例如,已经证明,基于可观察的发射光谱峰,海肾荧光素酶/EGFP配对不如海肾荧光素酶/EYFP配对(Xu, 1999; Wang等人, 1997)。为了研究潜在配对,制备含有所选择生物发光蛋白和受体分子的蛋白融合物(举例来说),并且在适当底物的存在下加以测试。

[0251] 还应当确认的是供体和受体分子不乱真地彼此缔合。这可以通过例如区分生物发光蛋白和受体分子在相同细胞中的共表达且接着监测荧光光谱以便确定是否发生BRET来实现。这可以例如使用Xu等人, (1999)的方法来实现。如果观察到少许BRET或未观察到BRET,那么所选择的生物发光蛋白和受体分子形成了合适的BRET对。

[0252] 供体发射可以通过对底物的修饰来操纵。就海肾荧光素酶而言,底物是腔肠素。在改变供体发射背后的基本原理在于提高供体发射与受体发射之间的分辨率。原始BRET系统使用海肾荧光素酶作为供体,EYFP(或Topaz)作为受体,以及腔肠素h衍生物作为底物。这些组分当在BRET测定中组合时产生在475nm至480nm范围内(对于生物发光蛋白)以及在525nm至530nm范围内(对于受体分子)的光,从而产生光谱分辨率45nm至55nm。

[0253] 不幸的是,海肾荧光素酶产生大致上与GFP发射重叠的宽发射峰,这进而促进降低系统的信噪比。用于本发明的一种BRET系统使用coel400a作为海肾荧光素酶底物,并且提供供体发射波长与受体发射波长之间的广泛光谱分辨率(约105nm)。使用coel400a时,海肾荧光素酶产生介于390nm与400nm之间的光,制备吸收该范围内的光并且在505nm至508nm下再发射光的GFP衍生物(GFP₂)。由于海肾荧光素酶发射与GFP发射之间的光谱分辨率的这种增加,所以该BRET系统提供了用以监测将靶序列切割为细菌蛋白酶的出色生物学工具。然而,较小的斯托克斯位移(Stokes shift)BRET系统也将允许灵敏地测量蛋白酶活性。

[0254] 本领域中已知由于海肾荧光素酶活性而在各种波长下产生光(不同于由野生型腔肠素产生的光)的各种腔肠素衍生物,包括coel400a。本领域技术人员将会知道,因为供体的光发射峰已经改变,所以必须选择将在该波长下吸收光、从而允许有效能量转移的受体分子。这可以例如通过改变第4类GFP以使其变为第3类或第1类GFP来进行。在供体的光发射与受体的光吸收峰之间的光谱重叠尤其是一种用于达成有效能量转移的条件。已知第3类和第1类GFP会在400nm下吸收光并且在505nm与511nm之间再发射。这导致供体发射与受体发射之间的波长差异为约111nm。

[0255] 另外的生物发光蛋白和受体分子对的实例在表2中提供。

[0256] 表2. 示例性的BRET生物发光蛋白和受体分子对。

[0257]

<u>BDP</u>	<u>底物</u>	<u>底物波长 (峰)</u>	<u>荧光受体分子</u>	<u>受体波长 (Ex/Em)</u>
Rluc2 Rluc8	天然腔肠素	470 nm	Venus	515/528 nm
Rluc2 Rluc8	天然腔肠素	470 nm	mOrange	548/562 nm
Rluc2 Rluc8	天然 腔肠素	470 nm	EYFP/Topaz	514/527 nm
Rluc2 Rluc8	天然 腔肠素	470 nm	mCitrine	516/529 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	天然 腔肠素	470 nm	YPet	517/530 nm
Rluc2 Rluc8	天然 腔肠素	470 nm	荧光素	495/519 nm
Rluc2 Rluc8	天然 腔肠素	470 nm	吖啶黄	470/550 nm
Rluc2 Rluc8	天然 腔肠素	470 nm	尼罗红	485/525 nm
Rluc2	天然	470 nm	R-藻红蛋白	480/578 nm

[0258]

BDP	底物	底物波长 (峰)	荧光受体分子	受体波长 (Ex/Em)
Rluc8	腔肠素			
Rluc2 Rluc8	天然 腔肠素	470 nm	Red 613	480/613 nm
Rluc2 Rluc8	天然 腔肠素	470 nm	TruRed	490/695 nm
RLuc8.6-5. 35	天然 腔肠素	535 nm	mOrange	548/562 nm
RLuc8.6-5. 35	腔肠素 <i>h</i>	535 nm	TagRFP	555/584 nm
RLuc8.6-5. 35	腔肠素 <i>h</i>	535 nm	TurboRFP	588/635 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	腔肠素 <i>v</i>	515 nm	mOrange	548/562 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	腔肠素 <i>v</i>	515 nm	TagRFP	555/584 nm
RLuc8.6-5. 35	腔肠素 <i>v</i>	570 nm	TurboRFP	588/635 nm
Rluc2 Rluc8	腔肠素 <i>h</i>	470 nm	Venus	515/528 nm
Rluc2 Rluc8	腔肠素 <i>h</i>	470 nm	mOrange	548/528 nm
Rluc2 Rluc8	腔肠素 <i>h</i>	470 nm	EYFP/Topaz	514/527 nm
Rluc2 Rluc8	腔肠素 <i>h</i>	470 nm	mCitrine	516/529 nm
Rluc2 Rluc8	天然 腔肠素	470 nm	YPet	517/530 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	腔肠素 <i>h</i>	470 nm	荧光素	490/525 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	腔肠素 <i>h</i>	470 nm	吖啶黄	470/550 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	腔肠素 <i>h</i>	470 nm	尼罗红	485/525 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	腔肠素 <i>h</i>	470 nm	R-藻红蛋白	480/578 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	腔肠素 <i>h</i>	470 nm	Red 613	480/613 nm
Rluc Rluc2	腔肠素 <i>h</i>	470 nm	TruRed	490/695 nm

[0259]

BDP	底物	底物波长 (峰)	荧光受体分子	受体波长 (Ex/Em)
Rluc8				
RLuc8.6-5.35	腔肠素 <i>h</i>	535 nm	mOrange	548/562 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	腔肠素 400a	400 nm	GFP2	396/508 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	腔肠素 400a	400 nm	GFP10	400/510 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	腔肠素 400a	400 nm	野生型 GFP	396 (475)/508 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	腔肠素 400a	400 nm	TagBFP	402/457 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	腔肠素 400a	400 nm	Cerulean/mCFP	433/475 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	腔肠素 400a	400 nm	ECFP/CyPet	434/477 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	腔肠素 400a	400 nm	Y66W	436/485 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	腔肠素 400a	400 nm	dKeima-Red	440/616 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	腔肠素 400a	400 nm	mKeima-Red	440/620 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	腔肠素 400a	400 nm	Quin-2	365/490 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	腔肠素 400a	400 nm	太平洋蓝	403/551 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	腔肠素 400	400 nm	丹磺酰氯 (Dansylchloride)	380/475 nm
萤火虫荧光素酶	荧光素	560 nm	花菁 Cy3	575/605 nm
萤火虫荧光素酶	荧光素	560 nm	得克萨斯红	590/615 nm
萤火虫荧光素酶	荧光素	560 nm	TurboRed	553/574 nm
萤火虫荧光素酶	荧光素	560 nm	tdTomato	554/581 nm

[0260]

BDP	底物	底物波长 (峰)	荧光受体分子	受体波长 (Ex/Em)
光素酶				
萤火虫荧光素酶	荧光素	560 nm	TagRFP	555/584 nm
萤火虫荧光素酶	荧光素	560 nm	DsRed	557/592 nm
萤火虫荧光素酶	荧光素	560 nm	mRFP1	584/607 nm
萤火虫荧光素酶	荧光素	560 nm	mCherry	587/610 nm
甲虫绿色荧光素酶	荧光素	560 nm	tdTomato	554/581 nm
FFLuc PpyRE8 PpyRE10	荧光素	560 nm	AF680	679/702 nm
FFLuc PpyRE8 PpyRE10	荧光素	560 nm	AF750	749/775 nm
NanoLuc	复立玛津	460 nm	Venus	515/528 nm
NanoLuc	复立玛津	460 nm	mOrange	548/562 nm
NanoLuc	复立玛津	460 nm	EYFP/Topaz	514/527 nm
NanoLuc	复立玛津	460 nm	mCitrine	516/529 nm
NanoLuc	复立玛津	460 nm	YPet	517/530 nm
NanoLuc	复立玛津	460 nm	荧光素	495/519 nm
NanoLuc	复立玛津	460 nm	吖啶黄	470/550 nm
NanoLuc	复立玛津	460 nm	尼罗红	485/525 nm
NanoLuc	复立玛津	460 nm	R-藻红蛋白	480/487 nm
NanoLuc	复立玛津	460 nm	Red 613	480/613 nm
NanoLuc	复立玛津	460 nm	TruRed	490/695 nm
NanoLuc	复立玛津	460 nm	俄勒冈绿	496/516 nm
NanoLuc	复立玛津	460 nm	diAcFAM	494/526 nm
NanoLuc	复立玛津	460 nm	AlexFluor488	494/517 nm
NanoLuc	复立玛津	460 nm	TMR	555/585 nm
NanoLuc	复立玛津	460 nm	Halotag NCT	595/635 nm
NanoLuc	复立玛津	460 nm	HalotagBRET 618	525/618 nm
NanoLuc	天然 腔肠素	460 nm	Venus	515/528 nm
NanoLuc	天然 腔肠素	460 nm	mOrange	548/562 nm
NanoLuc	天然 腔肠素	460 nm	EYFP/Topaz	514/527 nm
NanoLuc	天然 腔肠素	460 nm	mCitrine	516/529 nm

[0261]

BDP	底物	底物波长 (峰)	荧光受体分子	受体波长 (Ex/Em)
NanoLuc	天然 腔肠素	460 nm	YPet	517/530 nm
NanoLuc	天然 腔肠素	460 nm	荧光素	495/519 nm
NanoLuc	天然 腔肠素	460 nm	吖啶黄	470/550 nm
NanoLuc	天然 腔肠素	460 nm	尼罗红	485/525 nm
NanoLuc	天然 腔肠素	460 nm	R-藻红蛋白	480/487 nm
NanoLuc	天然 腔肠素	460 nm	Red 613	480/613 nm
NanoLuc	天然 腔肠素	460 nm	TruRed	490/695 nm
NanoLuc	天然 腔肠素	460 nm	俄勒冈绿	496/516 nm
NanoLuc	天然 腔肠素	460 nm	diAcFAM	494/526 nm
NanoLuc	天然 腔肠素	460 nm	AlexFluor488	494/517 nm
NanoLuc	天然 腔肠素	460 nm	TMR	555/585 nm
NanoLuc	天然 腔肠素	460 nm	Halotag NCT	595/635 nm
NanoLuc	天然 腔肠素	460 nm	HalotagBRET 618	525/618
NanoLuc	天然 腔肠素	460 nm	俄勒冈绿	496/516 nm
NanoLuc	天然 腔肠素	460 nm	diAcFAM	494/526 nm
NanoLuc	天然 腔肠素	460 nm	AlexFluor488	494/517 nm
NanoLuc	天然 腔肠素	460 nm	TMR	555/585 nm
NanoLuc	天然 腔肠素	460 nm	Halotag NCT	595/635 nm
NanoLuc	天然 腔肠素	460 nm	HalotagBRET 618	525/618
NanoLuc	腔肠素 <i>h</i>	460 nm	Venus	515/528 nm
NanoLuc	腔肠素 <i>h</i>	460 nm	mOrange	548/562 nm
NanoLuc	腔肠素 <i>h</i>	460 nm	EYFP/Topaz	514/527 nm
NanoLuc	腔肠素 <i>h</i>	460 nm	mCitrine	516/529 nm

[0262]

BDP	底物	底物波长 (峰)	荧光受体分子	受体波长 (Ex/Em)
NanoLuc	腔肠素 <i>h</i>	460 nm	YPet	517/530 nm
NanoLuc	腔肠素 <i>h</i>	460 nm	荧光素	495/519 nm
NanoLuc	腔肠素 <i>h</i>	460 nm	吖啶黄	470/550 nm
NanoLuc	腔肠素 <i>h</i>	460 nm	尼罗红	485/525 nm
NanoLuc	腔肠素 <i>h</i>	460 nm	R-藻红蛋白	480/487 nm
NanoLuc	腔肠素 <i>h</i>	460 nm	Red 613	480/613 nm
NanoLuc	腔肠素 <i>h</i>	460 nm	TruRed	490/695 nm
NanoLuc	腔肠素 <i>h</i>	460 nm	俄勒冈绿	496/516 nm
NanoLuc	腔肠素 <i>h</i>	460 nm	diAcFAM	494/526 nm
NanoLuc	腔肠素 <i>h</i>	460 nm	AlexFluor488	494/517 nm
NanoLuc	腔肠素 <i>h</i>	460 nm	TMR	555/585 nm
NanoLuc	腔肠素 <i>h</i>	460 nm	Halotag NCT	595/635 nm
NanoLuc	腔肠素 <i>h</i>	460 nm	HalotagBRET 618	525/618
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple 底物	405 nm	GFP2	396/508 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple 底物	405 nm	GFP10	400/510 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple 底物	405 nm	野生型 GFP	396 (475)/508 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple 底物	405 nm	TagBFP	402/457 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple 底物	405 nm	Cerulean/mCFP	433/475 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple 底物	405 nm	ECFP/CyPet	434/477 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple 底物	405 nm	Y66W	436/485 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple 底物	405 nm	dKeima-Red	440/616 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple 底物	405 nm	mKeima-Red	440/620 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple 底物	405 nm	Quin-2	365/490 nm
Rluc Rluc2	Prolume Purple 底物	405 nm	太平洋蓝	403/551 nm

[0263]

BDP	底物	底物波长 (峰)	荧光受体分子	受体波长 (Ex/Em)
Rluc8				
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple 底物	405 nm	丹磺酰氯	380/475 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple 底物 II	400 nm	GFP2	396/508 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple 底物 II	400 nm	GFP10	400/510 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple 底物 II	400 nm	野生型 GFP	396 (475)/508 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple 底物 II	400 nm	TagBFP	402/457 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple 底物 II	400 nm	Cerulean/mCFP	433/475 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple 底物 II	400 nm	ECFP/CyPet	434/477 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple 底物 II	400 nm	Y66W	436/485 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple 底物 II	400 nm	dKeima-Red	440/616 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple 底物 II	400 nm	mKeima-Red	440/620 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple 底物 II	400 nm	Quin-2	365/490 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple 底物 II	400 nm	太平洋蓝	403/551 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple 底物 II	400 nm	丹磺酰氯	380/475 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple 底物 III	410 nm	GFP2	396/508 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple 底物 III	410 nm	GFP10	400/510 nm
Rluc	Prolume Purple	410 nm	野生型 GFP	396

[0264]

BDP	底物	底物波长 (峰)	荧光受体分子	受体波长 (Ex/Em)
Rluc2 Rluc8	底物 III			(475)/508 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple 底物 III	410 nm	TagBFP	402/457 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple 底物 III	410 nm	Cerulean/mCFP	433/475 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple 底物 III	410 nm	ECFP/CyPet	434/477 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple 底物 III	410 nm	Y66W	436/485 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple 底物 III	410 nm	dKeima-Red	440/616 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple 底物 III	410 nm	mKeima-Red	440/620 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple 底物 III	410 nm	Quin-2	365/490 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple 底物 III	410 nm	太平洋蓝	403/551 nm
Rluc Rluc2 Rluc8	Prolume Purple 底物 III	410 nm	丹磺酰氯	380/475 nm

[0265] D. 荧光团结构域和受体结构域

[0266] 在一些实施方案中,可检测标记包含荧光团供体结构域和受体结构域。如本文所用,术语“供体”意味着当用特定波长的光照射时发光的分子。如本文所用,术语“受体”是指能够从供体吸收能量并在供体激发时吸收能量的分子。供体和受体都可以吸收光能,但只需要供体发射光能,即,供体可以是荧光的,而受体可以是非荧光的。如果受体不发射光能,则称其为猝灭剂或猝灭剂结构域。可用于本发明的受体通常在适用于激发供体的波长下具有相当低的吸收。在优选的实施方案中,可检测标记包含荧光供体和猝灭剂结构域。

[0267] 任何适当选择的发色团可以用作供体和/或受体,前提是供体的发射光谱与受体的激发光谱重叠。如本文所用,关于受体的吸收光谱和供体的发射光谱的术语“重叠”,是指部分或完全共用的吸收光谱和发射光谱。因此,在这种重叠光谱中,供体发射光谱范围的高端高于受体吸收光谱范围的低端。

[0268] 适合用作供体和/或受体的荧光团的非限制性实例包括但不限于荧光素、罗丹明、4-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑(NBD);级联蓝、4,4-二氟-5,7-二苯基-4-硼-3a,4a-二氮杂-s-引达省-3-丙酸;4,4-二氟-5,p-甲氧基苯基-4-硼-3a,4a-二氮杂-s-引达省-3-丙酸;4,4-二氟-5-苯乙烯基-4-硼-3a,4a-二氮杂-s-引达省-丙酸;6-羧基-X-罗丹明、N,N,N',N'-

四甲基-6-羧基罗丹明;碘代乙酰基定向探针,诸如5-(((2-碘代乙酰基)氨基)乙基)氨基)萘-1-磺酸(IAEDANS,可与AEDANS互换使用);5-羧基荧光素;6-羧基荧光素;6-(荧光素-5-甲酰胺)己酸;异硫氰酸荧光素(FITC);四甲基罗丹明异硫氰酸酯(TRITC);得克萨斯红(TR);伊红;藻胆蛋白;花菁染料;香豆素;R-藻红蛋白;别藻蓝蛋白(APC);R-藻红蛋白(R-PE)缀合物;Alexa Fluor染料;量子点染料;马来酰亚胺定向探针,诸如4-二甲基氨基偶氮苯-4'-马来酰亚胺(DABmal)和荧光素-5-马来酰亚胺(Fmal);或它们的组合(例如,串联缀合物)。

[0269] 其他非限制性实例包括核苷酸类似物,诸如ATP-、ADP-或AMP-类似物(参见例如, Bagshaw, 2001)。在某些实施方案中,这些核苷酸类似物是荧光性的。举例来说,荧光核苷酸类似物的实例包括2'-(或-3')-0-(三硝基苯基)腺苷5'-三磷酸(TNP-ATP)、2'-(或-3')-0-(三硝基苯基)腺苷5'-二磷酸(TNP-ADP)、e-ATP、e-氮杂-ATP、FTP、2AP-TP、ant-ATP、Mant-ATP、DEDA-ATP、FEDA-ATP、REDA-ATP和Cys3-EDA-ATP。

[0270] 其他非限制性实例包括蛋白质,诸如绿色荧光蛋白(GFP)、GFP的蓝色荧光变体(BFP)、GFP的青色荧光变体(CFP)、GFP的黄色荧光变体(YFP)、增强型GFP(EGFP)、增强型CFP(ECFP)、增强型YFP(EYFP)、GFPS65T、Emerald、Venus、mOrange、Topaz、GFPuv、去稳定化EGFP(dEGFP)、去稳定化ECFP(dECFP)、去稳定化EYFP(dEYFP)、HcRed、t-HcRed、DsRed、DsRed2、t-二聚体2、t-二聚体2(12)、mRFP1、pocilloporin、海肾GFP、Monster GFP、paGFP、TdTomato、mCherry、Kaede蛋白、TagRFP、TurBoFB或藻胆蛋白,或者它们中任一者的生物活性变体或片段。

[0271] 在一些实施方案中,供体荧光团结构域可以是如上所定义的纳米晶体或量子点。

[0272] 在一些实施方案中,受体结构域可以是猝灭剂。如本文所用,术语“猝灭”是指由猝灭剂结构域通过能量转移(不管机制如何)引起的荧光供体的荧光降低。因此,在猝灭剂存在下照射荧光供体导致发射信号强度低于预期,或甚至完全不存在。任何适当选择的分子都可以用作猝灭剂,前提是它降低被用作荧光团供体结构域的荧光团的荧光强度。猝灭剂的实例包括但不限于Deep Dark猝灭剂DDQ-I、DABCYL、Eclipse® Dark猝灭剂、Iowa Black® FQ、BHQ-1、QSY-7、BHQ-2、DDQ-II、Iowa Black® RQ、QSY-21、Black Hole Quencher® BHQ-3和金纳米粒子。

[0273] 任何数量的供体-受体组合可以用于本发明的传感器中。本领域技术人员将能够选择允许进行有效能量转移的供体和受体对,例如参见Bryce等人(2016)和Sapsford等人(2006)。

[0274] 可检测的变化

[0275] 通过蛋白酶(例如假单胞菌属某些种蛋白酶)切割本发明的传感器产生可检测的变化。如本领域技术人员将意识到的,本发明的传感器也可以被其他蛋白酶切割,前提是所述传感器含有被另一种蛋白酶识别和切割的切割位点。

[0276] 如本领域技术人员将理解的,如本文所用的“可检测的变化”是传感器中的任何可测量的变化。例如,可检测的变化可以是传感器的物理或化学特性的变化。在一些实施方案中,可检测的变化是声学、电化学电位、荧光、化学发光、磷光、吸光度、抗体结合、BRET比率、FRET效率或质量的变化。在一些实施方案中,可检测的变化是荧光、化学发光、磷光、吸光

度、抗体结合或质量的变化。本发明的一个优点是,传感器可以适于适合可用的检测技术。可以使用本领域技术人员已知的任何技术来测量可检测的变化。

[0277] 在一个优选的实施方案中,可检测的变化是BRET比率的变化。使用BRET作为实例,在一个实施方案中,在生物发光蛋白与受体分子之间发生的能量转移呈现为根据使用选择特定波长的光学滤光器(一个用于受体分子发射,并且另一个用于生物发光蛋白发射)测量的发射计算的比率(参见公式1)。

[0278] $E_a/E_d = \text{BRET比率}$ (1)

[0279] 其中 E_a 被定义为受体分子发射强度(使用适于受体发射的特定滤光器来选择发射光), E_d 被定义为生物发光蛋白发射强度(使用适于生物发光蛋白发射的特定滤光器来选择发射光)。

[0280] 本领域技术人员应当易于理解,光学滤光器可以是允许进行适用于BRET的波长判别的任何类型的滤光器。例如,根据本发明使用的光学滤光器可以是干涉滤光器、长通滤光器、短通滤光器等。穿过滤光器的波长的强度(通常以每秒计数(CPS)或相对发光单位(RLU)计)可以使用固态微型光电倍增管(micro-PMT)、光电倍增管(PMT)、光电二极管(包括级联光电二极管)、光电二极管阵列或灵敏性照相机(诸如电荷耦合装置(CCD)照相机)进行定量。定量的信号随后用于计算BRET比率,并且表示能量转移效率。BRET比率随受体发射的强度增加而增加。

[0281] 一般来讲,测定受体发射强度与供体发射强度的比率(参见公式1),该比率是用任意单位表示的反映能量转移效率的数值。该比率随能量转移效率增加而增加(参见Xu等人,1999)。

[0282] 能量转移效率也可以使用供体发射强度与受体发射强度的反比来表示(参见公式2)。在这种情况下,比率随能量转移效率增加而降低。在进行该计算之前,针对背景光和底物自身发光的存在情况来校正发射强度。该校正通常是通过从含有底物但不含本发明的生物发光蛋白、受体分子或多肽的对照样品中减去在适当波长下测量的发射强度来进行的。

[0283] $E_d/E_a = \text{BRET比率}$ (2)

[0284] 其中 E_a 和 E_d 如上所定义。

[0285] 生物发光蛋白和受体分子发射的光强度也可以使用基于单色器的仪器,诸如分光荧光计、电荷耦合装置(CCD)照相机或二极管阵列检测器来定量。使用分光荧光计进行发射扫描,使得在添加底物后,生物发光蛋白发射峰与受体分子发射峰这两者均被检测。峰下面积或者 $\lambda_{\text{最大}}$ 或由相对于最大强度的任何任意强度百分比限定的波长下的强度可以用于表示相对光强度,并且可以用于计算如上所概述的比率。能够测量来自相同样品的生物发光蛋白和受体分子的光的任何仪器都可以用于监测本发明的BRET系统。

[0286] 在一个替代性实施方案中,单独的受体分子发射适用于对BRET进行有效检测和/或定量。在这种情况下,仅使用受体发射强度来表示能量转移效率。对于本领域技术人员来说显而易见的是,为了测量能量转移,可以使用受体发射强度而不进行任何比率计算。这是由于以下事实:在理想情况下,受体分子只有在吸收从生物发光蛋白转移的光时才会发射光。在这种情况下,只需要一个滤光器。

[0287] 在一个相关实施方案中,单独的生物发光蛋白发射适用于对BRET进行有效检测和/或定量。在这种情况下,仅使用生物发光蛋白发射强度来计算能量转移效率。对于本领域

域技术人员来说显而易见的是,为了测量能量转移,可以使用供体发射强度而无需进行任何比率计算。这是由于以下事实:当受体分子吸收从生物发光蛋白转移的光时,来自该生物发光蛋白的可检测发射存在对应的降低。在这种情况下,只需要一个滤光器。

[0288] 在一个替代性实施方案中,使用仅需要一个光学滤光器来进行测量的比率式测量结果来表示能量转移效率。在这种情况下,供体或受体的光强度是使用适当的光学滤光器测定的,并且对样品的另一种测量是不使用任何滤光器进行的(开放光谱(open spectrum)的强度)。在该后一种测量中,对总光输出(对于所有波长)进行定量。接着使用公式3或公式4进行比率计算。对于公式3,仅需要用于受体的光学滤光器。对于公式4,仅需要用于供体的光学滤光器。

[0289] $E_a/E_o - E_a = \text{BRET比率或} = E_o - E_a/E_a$ (3)

[0290] $E_o - E_d/E_d = \text{BRET比率或} = E_d/E_o - E_d$ (4)

[0291] 其中 E_a 和 E_d 如上所定义, E_o 被定义为组合的所有波长(开放光谱)的发射强度。

[0292] 对于本领域技术人员来说应当显而易见的是,可以由公式1至4导出另外的公式。例如,一个这样的导出式涉及相对于在生物发光蛋白和/或受体分子的发射波长下存在的背景光进行校正。

[0293] 在进行BRET测定时,可以使用BRETCount测定来自每个孔的光发射。BRETCount仪器是一种改进的TopCount,其中TopCount是由Packard Instrument (Meriden,CT)销售的微量滴定板闪烁和发光计数器。不同于利用两个重合光电倍增管(PMT)来消除背景噪声的经典计数器,TopCount采用单PMT技术和时间分辨的脉冲计数来降低噪声,以允许在不透明微量滴定板中计数。使用不透明的微量滴定板可以将光学串扰降低至可忽略水平。TopCount呈各种格式,包括分别允许同时读取1、2、6或12个样品的1、2、6和12个检测器(PMT)。除BRETCount之外,其他可商购获得的仪器也能够进行BRET:Victor 2 (Wallac, Finland (Perkin Elmer Life Sciences))和Fusion(Packard Instrument,Meriden)。可以使用可至少检测受体分子发射和优选两个波长(针对受体分子和生物发光蛋白)或更多个波长的读取器来进行BRET。

[0294] 如本领域技术人员将理解的,BRET要求传感器包含相对于受体结构域具有化学发光供体结构域的可检测标记。在这些实施方案中,当通过假单胞菌属某些种蛋白酶切割靶序列时,化学发光供体结构域相对于受体结构域的空间位置和/或偶极取向改变,导致BRET比率的变化。

[0295] 如本文所用,术语“空间位置”是指供体相对于受体分子的三维定位,其由于蛋白酶切割传感器分子而变化,使得供体结构域不再经由靶序列与受体结构域连接。

[0296] 如本文所用,术语“偶极取向”是指与供体和/或受体分子关于它们在三维空间中的取向相关联的偶极矩在三维空间中的方向。偶极矩是在分子上的电荷变化的结果。

[0297] 通过假单胞菌属某些种蛋白酶切割靶序列导致BRET比率的变化,例如,通过假单胞菌属某些种蛋白酶切割靶序列可以导致BRET比率在观察到的最大BRET比率的约2%至约95%之间变化。在一些实施方案中,BRET比率的变化介于观察到的最大BRET比率的约5%至约90%之间、约15%至约50%之间、或约15%至约40%之间。在一些实施方案中,通过假单胞菌属某些种蛋白酶切割所述靶序列导致BRET比率的变化,是观察到的最大BRET比率的 $\geq 2\%$ 。在一些实施方案中,通过假单胞菌属某些种蛋白酶切割所述靶序列导致BRET比率的变

化,是观察到的最大BRET比率的 $\geq 5\%$ 、 $\geq 10\%$ 、 $\geq 20\%$ 、 $\geq 30\%$ 、 $\geq 35\%$ 。BRET比率的变化为15%或更大增加了蛋白酶检测的信噪比。这导致任何给定取样时间的检测限都优异,并且对更精确地编码蛋白酶的浓度水平。作为替代,在固定的检测限下,BRET比率的较大变化促使信号积分时间较短,因此检测更快速。

[0298] 如本文所用,“斯托克斯位移”是相同电子跃迁的吸收光谱和发射光谱的带最大值的位置之间的波长差异。优选地,受体结构域具有大的斯托克斯位移。大的斯托克斯位移是期望的,因为吸收光谱和发射光谱的带最大值的位置之间的较大差异使得更容易消除来自发射信号的反射激发辐射。

[0299] 在一些实施方案中,受体结构域具有大于约50nm的斯托克斯位移。在一些实施方案中,受体结构域具有介于约50nm与约350nm之间、介于约50nm与约150nm之间的斯托克斯位移。在一些实施方案中,受体结构域具有大于约90nm,例如100nm、110nm、120nm、130nm、140nm或150nm的斯托克斯位移。

[0300] BRET具有超过基于荧光的技术的若干优势,因为它不需要用外部光源激发供体。BRET不遭受供体部分的自身荧光、光散射、光致漂白和/或光致异构化,或者对细胞的光致损伤。在BRET测定中不存在外部光源导致背景极低,因此检测灵敏度增加。例如,就监测凝血酶催化的蛋白水解切割而言,BRET的灵敏度是FRET的50倍(Dacres等人,2009)。

[0301] 在一些实施方案中,可检测的变化是FRET效率的变化,例如,通过假单胞菌属某些种蛋白酶切割靶序列导致FRET效率的变化。如本文所用,FRET是基于从一个荧光团(供体)到受体的非放射性能量转移的邻近测定法。受体可以是通常发出不同颜色荧光的另一种荧光团。受体也可以是不发光的猝灭剂。根据Förster公式(Förster (1948)和Förster (1960)),FRET效率取决于五个参数:(i)第二荧光团的吸收光谱与第一荧光团的发射光谱之间的重叠,(ii)供体的发射偶极与受体的吸收偶极之间的相对取向,(iii)荧光团之间的距离,(iv)供体的量子产额和(v)受体的消光系数。

[0302] 典型地,供体和受体附接到形成本发明传感器的靶序列的N-末端和C-末端。当供体和受体与完整的靶序列结合时,在供体粒子激发时观察到来自受体的发射。一旦蛋白酶切割所述靶序列,供体与受体之间的能量转移就被破坏。当供体和受体都是荧光团时,切割改变了供体与受体荧光发射的比率。当供体是荧光团并且受体是猝灭剂时,切割增加荧光强度。这是因为在切割传感器时,供体与受体之间的距离大大增加。

[0303] 在一些实施方案中,可检测的变化是磷光的变化,例如,通过假单胞菌属某些种蛋白酶切割靶序列导致磷光的变化。可以使用本领域技术人员已知的技术测量磷光的变化。如本文所用,“磷光”是其中物质所吸收的能量以光的形式相对缓慢地释放的过程。

[0304] 在一些实施方案中,可检测的变化是时间分辨荧光的变化。可以使用本领域技术人员已知的技术测量荧光的变化。

[0305] 在一些实施方案中,可检测的变化是吸光度的变化,例如,通过假单胞菌属某些种蛋白酶切割靶序列导致吸光度的变化。在一些实施方案中,所述传感器包含发色团(诸如对硝基苯胺)。通过假单胞菌属某些种蛋白酶切割靶序列将改变发色团的化学环境,并导致吸光度的变化,其中吸光度的变化可以使用分光光度计测量。在一些实施方案中,所述传感器的靶序列在N-末端或C-末端处用发色团、优选高 ϵ 发色团标记,并且未标记的末端附接到固体支撑物(例如,珠粒或表面)。通过假单胞菌属某些种蛋白酶切割靶序列将发色团与固体

支撑物分离,从而将发色团释放到反应介质中。释放到介质中的发色团的量可以使用本领域技术人员已知的技术来确定。在另一个实施方案中,所述传感器包含酶(例如,碱性磷酸酶/辣根过氧化物酶等),其可以使用产色底物或化学发光底物产生吸光度的变化。所述传感器还附接到固体基质(例如,珠粒或表面)。通过假单胞菌属某些种蛋白酶切割靶序列会将产生颜色或光的部分释放到反应介质中,这可以使用酶测定法,利用本领域技术人员已知的技术来检测。

[0306] 在一些实施方案中,可检测的变化是抗体结合的变化,例如,通过假单胞菌属某些种蛋白酶切割靶序列释放可以使用抗体检测的表位。在一些实施方案中,传感器包含表位(例如,myc、Flag、六聚组氨酸等)。任选地,传感器附接到固体支撑物。通过假单胞菌属某些种蛋白酶切割靶序列将表位释放到反应介质中,这可以使用本领域技术人员已知的方法来检测。还可以使用相关抗体(例如,抗myc、抗6XHis标签或抗FLAG)和本领域技术人员已知的方法来检测未释放的表位。

[0307] 在一些实施方案中,可检测的变化是质量的变化。如本领域技术人员将理解的,通过假单胞菌属某些种蛋白酶切割靶序列改变了传感器的质量。可以使用本领域技术人员已知的任何合适的技术来检测质量的变化,所述技术例如任何微量称量技术,诸如表面等离子共振 (SPR) 或石英晶体微量天平 (QCM)。在一些实施方案中,所述传感器可以经由本领域技术人员已知的任何技术(例如,硫醇键)固定在SPR芯片或QCM上。就SPR而言,通过假单胞菌属某些种蛋白酶切割靶序列导致局部折射率的变化,从而导致可以测量的SPR变化。就QCM而言,通过假单胞菌属某些种蛋白酶切割靶序列改变谐振器的质量,并且可以在QCM的谐振频率中检测到变化。在一些实施方案中,所述传感器包含大分子、珠粒等,使得当靶序列被切割时,质量的变化更大。

[0308] 组合物、方法和用途

[0309] 本发明的传感器可以包含在组合物中以用于检测细菌蛋白酶。在一些实施方案中,提供了一种组合物,其包含根据本发明的传感器和可接受的载体。如本文所用,术语“可接受的载体”包括可与本发明的方法和用途相容的任何和所有固体或溶剂(诸如磷酸盐缓冲盐水缓冲液、水、盐水)分散介质、包衣剂等。在可与组合物的其他成分相容并且不抑制或损害所测试的蛋白酶的意义上,可接受的载体必须是“可接受的”。一般来讲,合适的可接受的载体是本领域已知的,并且基于最终用途应用来选择。

[0310] 如技术人员将会理解的,本申请的传感器可以用于检测样品中是否存在假单胞菌属某些种蛋白酶,如果存在,也可以用于测定假单胞菌属某些种蛋白酶的活性。因此,在一些实施方案中,提供了检测样品中的假单胞菌属某些种蛋白酶的方法,所述方法包括:i)使样品与本发明的传感器接触;以及ii)检测传感器的变化,其中所述变化对应于样品中存在假单胞菌属某些种蛋白酶。

[0311] 传感器可以用于对来自假单胞菌属某些种和乳制品中的其他细菌的 κ -酪蛋白水解蛋白酶进行检测和定量,以预测其货架期和质量,并且优化被设计来减轻、延迟或消除细菌蛋白酶驱使的腐败的管理和加工处理。

[0312] 如本文所用,关于乳制品和其他食物产品的术语“腐败”,是用于描述产品的质地、颜色、气味和/或风味劣化至不再引起食欲或适合供人食用的程度的术语。就由诸如假单胞菌属某些种等微生物引起的腐败而言,腐败通常涉及微生物或其酶对蛋白质(诸如酪蛋白

和乳清)、碳水化合物和脂肪的降解。本发明的发明人已经观察到,在37°C下,细菌蛋白酶在以大于1pM的浓度存在时可以导致乳腐败。在这种情况下,腐败表现为乳的相分离(产生“凝乳和乳清”的外观)。

[0313] 如本文所用,术语“乳制品”包括乳和部分或完全由乳衍生的产品。乳可以从任何哺乳动物获得,其中哺乳动物例如牛、绵羊、山羊、马、骆驼、水牛、人等。乳制品包括但不限于原料乳、低脂乳、脱脂乳、巴氏灭菌乳、UHT乳、乳糖改性UHT乳、强化UHT乳、调味UHT乳和这些产品的组合,以及UHT婴儿配方食品、奶酪、酸乳、乳清、酪乳、奶油、乳粉、粉状婴儿配方食品和黄油等。在一些实施方案中,提供了一种检测乳制品腐败的方法,所述方法包括:i)使样品与本发明的传感器接触;以及ii)检测所述传感器的变化,其中所述变化指示乳制品腐败、已经开始腐败或有可能腐败。在该实例中,靶序列包含可以被至少部分地导致乳腐败的假单胞菌属某些种细菌蛋白酶切割的切割位点。该产品还可以是包含或疑似包含蛋白酶的乳制品的提取物,诸如部分纯化的部分。

[0314] 本发明的传感器还可以用于检测或估计包含假单胞菌属某些种的生物膜。例如,本发明的传感器可以用于检测或估计可能存在于乳加工厂和设备的难以触及或难以到达的部分中的包含假单胞菌属某些种的生物膜。在另一个实例中,本发明的传感器还可以用于检测或估计食品和/或饮料加工厂和设备的难以触及或难以到达的部分中的生物膜。在另一个实例中,本发明的传感器还可以用于检测或估计医疗设备和装置中的生物膜。能够不必拆卸设备等的情况下检测或估计包含假单胞菌属某些种的生物膜,将有助于安排和评估日常的“在线清洁(clean in place)”,并且有助于以“离线清洁(clean out of place)”程序为目标。

[0315] 本发明的传感器还可以用于检测假单胞菌属某些种感染。至少一种严重的导管感染爆发与荧光假单胞菌有关。其他假单胞菌是重要的条件致病菌。使用这些传感器检测感染可以帮助临床情况下的感染管理和治疗。

[0316] 如技术人员将意识到的,本发明的传感器也可以被多路复用。在该系统中,提供了被不同蛋白酶切割的两个或更多个不同的传感器分子。例如,本发明的传感器可以与被牛纤溶酶切割的传感器一起多路复用(参见例如,PCT/AU2013/000378)。在一些实施方案中,每个不同的传感器分子可以包括不同的供体和/或受体分子,使得它们以不同的波长发射,从而能够对不同的目标化合物进行检测和定量。在一些实施方案中,每种不同的传感器分子可以是相同的供体和/或受体分子。在一些实施方案中,使用单个流体检测室。在一些实施方案中,可以使用多通道检测装置。

[0317] “样品”可以是任何有可能含有假单胞菌属某些种和/或假单胞菌属某些种蛋白酶的物质或组合物。典型地,样品是已知或疑似包含细菌和/或蛋白酶的任何物质。样品的实例包括液体、生物材料和仪器。在一些实施方案中,所述样品选自乳制品或其提取物、土壤或其提取物、临床样品或其提取物、来自医疗设备的样品(例如拭子、冲洗液等)、来自机械的样品(例如拭子、冲洗液等)、来自食品加工设备的样品(例如拭子、冲洗液等)、植物材料或其提取物等。在一些实施方案中,临床样品包括但不限于血液、血清、痰液、粘液、脓液、腹膜液和其他体液。在一些实施方案中,食品加工设备包括但不限于运输罐车、储料罐、加工机械、管线、管道、连接器、阀门等。该样品可以来自机械(例如拭子、冲洗液等)。机械包括疑似或已知含有细菌和/或蛋白酶的任何机械,例如涉及乳制品的生产、储存和加工的任何机

械。在一些实施方案中,机械包括但不限于缓冲和储料筒仓、焊接接头、缓冲罐出口、运输机皮带、超滤膜、阀门、空气分离器、油罐卡车、油罐卡车储罐、储罐、阀门、垫圈、连接管等。样品也可以来自医疗设备,例如,样品可以是来自医疗设备的拭子或冲洗液,其中医疗设备包括但不限于导管、静脉注射管、呼吸机、伤口敷料、接触镜片、透析设备、医疗装置等。

[0318] 乳制品可以是但不限于原料乳、低脂乳、脱脂乳、巴氏灭菌乳、UHT乳、乳糖改性UHT乳、强化UHT乳、调味UHT乳和这些产品的组合,以及UHT婴儿配方食品、奶酪、酸乳、乳清、酪乳、奶油、乳粉、粉状婴儿配方食品和黄油等。样品可以直接从环境或来源获得,或者可以在执行本发明的方法之前通过合适的程序提取和/或至少部分纯化。

[0319] 在一些实施方案中,样品是水性液体。例如,样品包括但不限于乳、果汁、其他饮料和体液(包括血清)。

[0320] 可以在适用于测量可检测的变化的任何系统上执行本发明的方法。

[0321] 如本领域技术人员将会理解的,本发明的方法可以按批量格式(例如使用板读取仪的批量格式)或流式格式执行。例如,本发明的方法可以使用配备有适当过滤器的微孔板读取仪以微孔板格式进行。本发明的方法也可以在微流体装置(诸如PCT/AU2013/000378中所述)上执行。

[0322] 与先前描述的方法相比,本发明可以用于直接的选择性测定法,以测量乳中皮摩尔水平的假单胞菌属某些种蛋白酶。例如,在一些实施方案中,可以检测到至少1pM的假单胞菌属某些种蛋白酶。在一些实施方案中,可以检测到至少5pM的假单胞菌属某些种蛋白酶。在一些实施方案中,可以检测到至少10pM的假单胞菌属某些种蛋白酶。在一些实施方案中,可以检测到至少20pM的假单胞菌属某些种蛋白酶。在一些实施方案中,可以检测到至少30pM的假单胞菌属某些种蛋白酶。在一些实施方案中,可以检测到至少40pM的假单胞菌属某些种蛋白酶。在一些实施方案中,可以检测到至少50pM的假单胞菌属某些种蛋白酶。在一些实施方案中,可以检测到至少60pM的假单胞菌属某些种蛋白酶。在一些实施方案中,可以检测到至少70pM的假单胞菌属某些种蛋白酶。在一些实施方案中,可以检测到至少80pM的假单胞菌属某些种蛋白酶。在一些实施方案中,可以检测到至少90pM的假单胞菌属某些种蛋白酶。在一些实施方案中,可以检测到至少100pM的假单胞菌属某些种蛋白酶。在一些实施方案中,可以检测到至少150pM的假单胞菌属某些种蛋白酶。

[0323] 之前报道的用于检测乳中的细菌蛋白酶的方法需要极长的温育时间(长达14天或更长时间)(Button等人,2011年)。相比之下,本发明的方法能够在短于3小时、2小时、短于1小时、短于30分钟或短于15分钟内进行。在一些实施方案中,本发明的方法能够在短于2小时内进行。在一些实施方案中,本发明的方法能够在短于1小时内进行。在一些实施方案中,本发明的方法能够在短于30分钟内进行。优选地,本发明的方法能够在短于15分钟内获得所需的灵敏度。

[0324] 本申请的方法和传感器对细菌蛋白酶可以比对牛纤溶酶更灵敏。在一个实施方案中,本发明对细菌蛋白酶的选择性是对牛纤溶酶的选择性的至少5倍、或至少10倍、或5倍至1,000倍、或5倍至100倍、或5倍至50倍、或5倍至20倍,或者在某些情况下高达100至1,000倍。

[0325] 样品制备

[0326] 蛋白酶(诸如纤溶酶、其酶原纤溶酶原)和细菌蛋白酶可以与乳制品中的酪蛋白胶

束和乳脂肪球缔合。这可能使得难以测量这些样品中存在的蛋白酶的量。不希望受理论束缚,认为作为这些蛋白酶的天然底物的酪蛋白可以充当针对蛋白酶测定中所使用的底物的竞争性抑制剂。已经描述了用于测量乳制品中的蛋白酶量的各种方法(例如,对于纤溶酶,参见Saint-Denis等人,(2001)和Rauh等人,(2014))。通过这些测定法测量的蛋白酶量可以根据制备样品用于测定法的方式而变化。需要从酪蛋白胶束解离蛋白酶并且可以用于制备用于蛋白酶测定的样品的改进方法。

[0327] 本发明的发明人已经发现了一种用于从酪蛋白胶束解离蛋白酶的改进方法。在一个方面,本发明提供了一种从酪蛋白胶束解离蛋白酶的方法,所述方法包括在与酪蛋白结合蛋白酶竞争的化合物存在下对包含与酪蛋白胶束缔合的蛋白酶的组合物进行超声处理。在一些实施方案中,提供了一种从酪蛋白胶束解离蛋白酶的方法,所述方法包括在与酪蛋白结合蛋白酶竞争的化合物和钙螯合剂存在下对包含与酪蛋白胶束缔合的蛋白酶的组合物进行超声处理。这些改进方法增加了游离蛋白酶的量并且可以用于制备用于蛋白酶测定的样品,诸如使用上文所述的蛋白酶传感器分子的那些。如本文所用,术语“游离蛋白酶”是指从酪蛋白胶束解离的蛋白酶。

[0328] 在一些实施方案中,所述组合物是乳制品的样品。所述组合物还可以是乳制品的提取物,诸如部分纯化的部分。

[0329] 与酪蛋白结合蛋白酶竞争的化合物可以是本领域技术人员已知的任何合适的化合物。在一些实施方案中,所述化合物是赖氨酸的衍生物或类似物。合适的赖氨酸衍生物或类似物包括但不限于氨基己酸、反式-4-氨基甲基环己烷羧酸、反式-4-氨基-乙基环己烷羧酸,以及它们的酯。氨基己酸也称为 ϵ -氨基己酸、 ϵ -Ahx或6-氨基己酸。氨基己酸及其酯的实例包括氨基己酸、烷基酯(诸如 ϵ -氨基己酸己酯)和芳烷基酯(诸如 ϵ -氨基己酸苄酯)。反式-4-氨基甲基环己烷羧酸及其酯的实例包括反式-4-氨基-甲基环己烷羧酸、芳烷基酯(诸如反式-氨基甲基环己烷羧酸苄酯)和芳基酯(诸如反式-氨基甲基环己烷羧酸苯酯和反式-氨基甲基环己烷羧酸4-(2-羧乙基)苯酯)。用于本发明的反式-4-氨基乙基环己烷羧酸及其酯的实例包括反式-4-氨基-乙基环己烷羧酸、芳烷基酯(诸如反式-氨基乙基环己烷羧酸苄酯)和芳基酯(诸如反式-氨基乙基环己烷羧酸苯酯和反式-氨基乙基环己烷羧酸4-(2-羧乙基)苯酯)。在优选的实施方案中,赖氨酸的衍生物或类似物是 ϵ -氨基己酸(也称为EACA)。

[0330] 与酪蛋白结合蛋白酶竞争的化合物的存在量足以增加游离蛋白酶的量。在一些实施方案中,所述组合物包含约0.1mM至约20mM的所述化合物、约0.3mM至约10mM的所述化合物、约0.5mM至约5mM的所述化合物、约0.6mM至约4mM的所述化合物,或约0.7mM至约2mM的所述化合物。例如,所述组合物可以含有约0.7mM、约0.8mM、约0.9mM、约1mM、约1.1mM、约1.2mM、约1.3mM、约1.4mM、约1.5mM、约1.6mM、约1.7mM、约1.8mM、约1.9mM或约2.0mM的所述化合物。在优选的实施方案中,所述组合物包含0.8mM、约0.9mM、约1mM、约1.1mM或约1.2mM的所述化合物。在更优选的实施方案中,所述组合物包含约1mM的所述化合物。

[0331] 所述组合物可以包含钙螯合剂。可以使用本领域技术人员已知的任何合适的钙螯合剂。不希望受理论束缚,认为钙螯合剂减少游离钙离子和胶体磷酸钙的量,从而导致酪蛋白胶束至少部分解离。在一些实施方案中,钙螯合剂选自柠檬酸盐离子、磷酸盐离子、焦磷酸盐离子、聚磷酸盐离子和聚羧酸盐,以及它们的盐。在一些实施方案中,钙螯合剂选自六偏磷酸钠、磷酸氢二钠、柠檬酸三钠、植酸钠、乙二胺四乙酸和乙二醇-双(β -氨基乙基醚)-

N,N,N',N'-四乙酸。钙螯合剂的浓度可以根据待螯合金属离子的预计量和/或所用钙螯合剂的类型而变化。在一些实施方案中,钙螯合剂的浓度介于约0.01M与约0.5M之间、或约0.05M与约0.4M之间、或约0.05M与约0.1M之间。在一些实施方案中,钙螯合剂是柠檬酸盐离子或其盐。在一些实施方案中,钙螯合剂是柠檬酸三钠。在一些实施方案中,柠檬酸三钠的浓度介于约0.01M与约0.5M之间、或约0.05M与约0.4M之间、或约0.05M与约0.1M之间。

[0332] 在一些实施方案中,本领域技术人员可以基于所用的钙螯合剂来选择所述组合物的pH。pH可以影响螯合剂的稳定性和有效性。在一些实施方案中,所述组合物的pH大于6.0。在一些实施方案中,pH大于7.0。在一些实施方案中,pH介于约8.0与约10.0之间、约8.3与9.5之间、约8.5与约9.3之间、约8.7与约9.1之间、约8.8与约9.0之间,或为约8.9。可以向所述组合物中添加缓冲液以维持pH。可以使用任何合适的缓冲液。

[0333] 所述组合物还可以包含可接受的载体和/或添加剂。一般来讲,合适的可接受的载体和/或添加剂是本领域已知的,并且基于最终用途应用来选择。例如,在一些实施方案中,所述组合物包含氯化钠。在一些实施方案中,氯化钠的浓度介于约0.01M与约0.3M之间、或约0.025M与约0.25M之间、或约0.04M与约0.1M之间,或为约0.05M。在一些实施方案中,氯化钠的浓度为0.05M氯化钠。

[0334] 在优选的实施方案中,所述蛋白酶至少部分地导致乳腐败。在一些实施方案中,所述蛋白酶相对热稳定。在一些实施方案中,所述蛋白酶是纤溶酶或其酶原(即纤溶酶原)。在一些实施方案中,所述蛋白酶是纤溶酶。在一些实施方案中,所述方法还包括使用本领域技术人员已知的方法将纤溶酶原转变为纤溶酶。在一些实施方案中,所述蛋白酶是细菌蛋白酶。在一些实施方案中,所述细菌蛋白酶是由假单胞菌属某些种产生的。在一些实施方案中,假单胞菌属某些种是荧光假单胞菌、莓实假单胞菌、隆德假单胞菌、恶臭假单胞菌、LBSA1假单胞菌或致金色假单胞菌。在一些实施方案中,所述蛋白酶是细菌细胞外蛋白酶。在一些实施方案中,所述细菌细胞外蛋白酶是碱性金属蛋白酶。在一些实施方案中,所述蛋白酶属于蛋白酶的沙雷菌蛋白酶家族。在一些实施方案中,所述蛋白酶是AprX蛋白酶。在一些实施方案中,所述蛋白酶与荧光假单胞菌n^o114 (NCBI GenPept ID BAA28268)的AprX至少具有50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%的序列同一性或100%的序列同一性。

[0335] 本发明方法的优点之一是其比本领域中所述的其他方法执行得更快。例如,Rauh等人(2014)中描述的方法需要温育两次,每次15分钟。认为第一次温育使酪蛋白胶束解离。认为第二次温育使蛋白酶从酪蛋白解离。本发明的发明人已经发现,本文所述的方法减小了样品制备所需的时间量。在一些实施方案中,超声处理进行15分钟或更短时间、10分钟或更短时间、5分钟或更短时间,或者2分钟或更短时间。优选地,超声处理进行5分钟或更短时间。更优选地,超声处理进行2分钟或更短时间。如本文所用,“或更短时间”需要超声处理至少1秒。

[0336] 在一些实施方案中,超声处理是连续的。在替代性的实施方案中,超声处理是脉冲式的。

[0337] 可以使用本领域技术人员已知的任何合适的超声波仪或均化器。合适的超声波仪或均化器包括但不限于Honda Electronics Sonac-200控制器、改进的Honda Z041超声波切割机、在线超声微反应器(诸如Heilscher GDmini2)、Misonix超声波仪3000或Q55超声波仪。在一些实施方案中,超声处理可以用声波注射器(诸如Sono Tek的SonicSyringeTM系统)

进行。

[0338] 优选地,超声波仪可以用于超声处理10mL或更少、5mL或更少、2.5mL或更少、1.25mL或更少、或者0.1mL或更少的样品体积。在一些实施方案中,超声波仪可以用于超声处理约2.5mL的样品体积。在一些实施方案中,超声波仪可以用于超声处理约1.25mL的样品体积。在一些实施方案中,超声波仪可以用于超声处理约0.1mL的样品体积。

[0339] 在一些实施方案中,超声波仪的探头顶端直径为20mm或更小、15mm或更小、11mm或更小、9mm或更小、7mm或更小、5mm或更小、4mm或更小、3mm或更小、或者2mm或更小。在一些实施方案中,超声处理可以用配备有合适的4mm顶端直径探头的微型超声波仪工具(诸如Honda Electronics Z041或Z0-40W超声波切割机)进行。在又一个实施方案中,超声波仪是在线超声微反应器,诸如配备有11mm顶端直径探头的Heilscher GDmini2(或该设备的低功率版本)。

[0340] 可以使用任何合适的超声处理装置位移振幅。在一些实施方案中,超声处理以介于约15 μ m与300 μ m之间、或介于约40 μ m与300 μ m之间、或介于约120 μ m与300 μ m之间的超声处理装置位移振幅进行。在一些实施方案中,超声处理以介于约15 μ m与300 μ m之间、介于约15 μ m与120 μ m之间、或介于约15 μ m与25 μ m之间的超声处理装置位移振幅进行。在一些实施方案中,超声处理以约40 μ m的超声处理装置位移振幅进行。

[0341] 可以使用任何合适的频率。在一些实施方案中,超声处理以介于约10kHz与约60kHz之间的频率(例如约10kHz、约20kHz、约30kHz、约40kHz、约50kHz或约60kHz)进行。在一些实施方案中,超声处理以介于约15kHz与约30kHz之间的频率进行。在一些实施方案中,超声处理以介于约28kHz与约40kHz之间的频率进行。

[0342] 可以使用任何合适的功耗。在一些实施方案中,超声处理以小于约55瓦、小于约50瓦、小于约45瓦、小于约40瓦、小于约35瓦、小于约30瓦、小于约25瓦、小于约20瓦或小于约15瓦的功耗进行,在优选的实施方案中,超声处理以小于约25瓦的功率进行。

[0343] 在一些实施方案中,对约0.05mL至约10mL、0.08mL至2mL或0.1mL至约2.5mL的样品体积进行超声处理。例如,对约0.1mL、约0.2mL、约0.3mL、约0.4mL、约0.5mL、约0.6mL、约0.7mL、约0.8mL、约0.9mL、约1.0mL、约1.1mL、约1.2mL、约1.3mL、约1.4mL、约1.5mL、约1.6mL、约1.7mL、约1.8mL、约1.9mL、约2.0mL、约2.1mL、约2.2mL、约2.3mL、约2.4mL或约2.5mL的样品体积进行超声处理。在一些实施方案中,对约0.1mL的样品体积进行超声处理。在一些实施方案中,对约1.25mL的样品体积进行超声处理。在一些实施方案中,对约2.5mL的样品体积进行超声处理。

[0344] 如本领域技术人员将会理解的,超声处理参数(包括上面提到的那些)可以根据样品体积、超声波仪、超声波仪探头、顶端深度、样品器皿等而变化。本领域技术人员将能够选择使乳均质化所需的超声处理参数,使得在超声处理之后,以约12,000xg离心2分钟不形成单独的层(图2)。优选地,选择超声处理参数,以便在使乳均质化所需的最小时间量内提供低功率超声处理,使得在超声处理之后,以约12,000xg离心2分钟不形成单独的层。

[0345] 例如,在一些实施方案中,超声波仪是探头顶端直径为11mm的Honda Electronics Sonac-200控制器,样品体积为2.5mL(2mL原料乳,添加0.5mL EACA缓冲液),样品处于内径为23mm的玻璃小瓶中,以下列参数超声处理约2分钟:频率=28kHz,振幅=17 μ m至21 μ m,功耗:25W。

[0346] 在其他实施方案中,超声波仪是Honda Z041超声波切割机,其经过改造,探头顶端直径为4mm,样品体积为2.5mL (2mL原料乳,添加0.5mL EACA缓冲液),样品处于内径为23mm的玻璃小瓶中,以下列参数超声处理约2至6分钟:频率=40kHz;振幅=16 μ m至19 μ m,功耗:5W至8W。

[0347] 在还有其他实施方案中,超声波仪是Honda Z041超声波切割机,其经过改造,探头顶端直径为4mm,样品体积为约1.25mL (1mL原料乳,添加0.25mL EACA缓冲液),样品处于内径为约10mm的1.5mL至2mL塑料Eppendorf管中,以下列参数超声处理约1至6分钟:频率=40kHz;振幅=16 μ m至19 μ m,功耗:5W至8W。

[0348] 在另一个实施方案中,超声波仪是Honda Z041超声波切割机,其经过改造,探头顶端直径为4mm,样品体积为约0.150mL (0.120mL原料乳,添加0.030mL EACA缓冲液),样品处于内径为6mm的96孔板的0.3mL孔中,以下列参数超声处理约1至2分钟:频率=35kHz;振幅=10 μ m,声功率水平为0.25W。

[0349] 如本领域技术人员将理解的,超声处理是在不引起蛋白酶变性和/或失活的温度下进行的。在一些实施方案中,超声处理在低于约50°C、优选地低于40°C并且最优选地低于30°C的温度下进行。例如,可以在超声处理期间将样品置于冰上或冰浴中温育。在超声处理时,样品可以维持(例如通过冷藏或其他合适的技术)在10°C或低于10°C、10°C或低于10°C、或者4°C或低于4°C。

[0350] 如上所述,从酪蛋白胶束解离蛋白酶的方法可以用于制备进行蛋白酶测定的样品。所述方法还可以用于制备乳制品的样品以进行蛋白酶测定,并且用于确定乳制品中的蛋白酶浓度。因此,在另一个方面,提供了一种确定乳制品中的蛋白酶浓度的方法,所述方法包括

[0351] (i) 使用本文所述的方法处理所述乳制品的样品;

[0352] (ii) 测量经处理的乳制品中的蛋白酶活性;以及

[0353] (iii) 基于所述蛋白酶活性确定所述乳制品的蛋白酶浓度。在一些实施方案中,所述乳制品的样品还可以是乳制品的提取物,诸如部分纯化的部分。在一些实施方案中,所述乳制品选自原料乳、低脂乳、脱脂乳、巴氏灭菌乳、UHT乳、乳糖改性UHT乳、强化UHT乳、调味UHT乳、UHT婴儿配方食品、奶酪、酸乳、乳清、酪乳、奶油、乳粉、粉状婴儿配方食品和黄油及其组合,和/或它们中一种或多种的包含与酪蛋白结合的蛋白酶的提取物。

[0354] 在一些实施方案中,步骤(ii)包括将经处理的乳制品与包含具有至少一个蛋白酶切割位点和任意的可检测标记的靶序列的传感器分子混合,其中通过所述蛋白酶切割所述靶序列产生可检测的变化;以及测量所述可检测的变化。

[0355] 在一些实施方案中,传感器分子是本发明的传感器分子。在一些实施方案中,传感器分子是如本文所述的假单胞菌属某些种蛋白酶传感器分子。在一些实施方案中,传感器分子具有选自SEQ ID NO:105、106和107的多肽序列。在一些实施方案中,传感器分子是PCT/AU2013/000378中所定义的传感器分子。在一些实施方案中,传感器分子具有多肽序列SEQ ID NO:109。在一些实施方案中,传感器被纤溶酶切割(参见例如PCT/AU2013/000378)。在一些实施方案中,传感器被细菌蛋白酶(例如,如本文所定义的假单胞菌属某些种蛋白酶)切割。

[0356] 在一些实施方案中,传感器分子包含可检测标记,并且所述可检测标记包含共价

附接到靶序列的化学发光供体结构域和受体结构域。在一些实施方案中,受体结构域如本文所定义。在一些实施方案中,化学发光供体结构域如本文所定义。

[0357] 传感器分子包含具有至少一个蛋白酶切割位点的靶序列。在一些实施方案中,蛋白酶切割位点选自SF、FM、NQ、NT、EI、QQ和KZ,其中Z是Q、N、K、Y、V或E及其组合。在一些实施方案中,蛋白酶切割位点选自SF、FM、NQ、NT、EI和KZ,其中Z是Q、N、K、Y、V或E及其组合。在一些实施方案中,蛋白酶切割位点选自SF、FM、NQ、NT、EI、KK、KQ和KN及其组合。在一些实施方案中,蛋白酶切割位点选自KK、KY、KV和KE及其组合。

[0358] 在一些实施方案中,所述靶序列包含纤溶酶切割位点。在一些实施方案中,所述靶序列包含氨基酸序列KZ,其中Z是K、Y、V或E。在一些实施方案中,所述靶序列包含氨基酸序列LQXXXXKZKLQ (SEQ ID NO:110,其中Z是K、Y、V或E,并且X是任何氨基酸。在一些实施方案中,所述靶序列包含LQGSKKYKVKEGSLQ (SEQ ID NO:111)。

[0359] 在一些实施方案中,所述靶序列包含细菌蛋白酶切割位点。在一些实施方案中,所述靶序列包含假单胞菌属某些种切割位点。在一些实施方案中,所述靶序列包含SEQ ID NO:1-94。

[0360] 实施例

[0361] 以下实施例阐述了根据本发明的优选传感器和方法。然而应当理解,这些实施例是以举例说明的方式提供的,其中没有任何内容应当视为对本发明总范围的限制。

[0362] 实施例1

[0363] 构建传感器

[0364] 由GenScript (USA) 合成编码BRET²-纤溶酶传感器和BRET²-细菌蛋白酶Pflu传感器1、2和3的DNA构建体。所述传感器包括作为化学发光供体的Rluc2和作为受体的绿色荧光蛋白 (GFP²) 的变体。使用EcoRI和XhoI限制性位点将这些构建体克隆到pRSET载体 (BioLabs, Australia) 中,以制备编码蛋白酶传感器的pRSET-Pflu载体。编码所述蛋白酶传感器的多核苷酸序列以SEQ ID NO:102-104示出。这些蛋白酶传感器的多肽序列以SEQ ID NO:105-107示出。编码纤溶酶传感器的多核苷酸序列以SEQ ID NO:108示出。纤溶酶传感器的多肽序列以SEQ ID NO:109示出。

[0365] 用编码蛋白酶传感器的pRSET-Pflu载体转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株BL21 (DE3) (Novagen) 的细胞。这些传感器在大肠杆菌菌株BL21 (DE3) (Novagen) 中表达。在37°C, 200rpm下,由含有100μg/mL氨苄青霉素和2%葡萄糖的LB (10g胰蛋白胨、5g酵母提取物、5g NaCl (pH 7.4) 中的单菌落来生长过夜培养物。将含有100μg/mL氨苄青霉素的250mL LB接种至OD₆₀₀为0.1,然后在37°C (200rpm) 下温育4.5小时,之后在22°C (200rpm) 下温育过夜,来诱导表达。接种后24小时收获细胞。

[0366] 通过在4335x g (4°C) 下离心15分钟并重悬于平衡缓冲液 (57.7mM Na₂HPO₄、42.3mM NaH₂PO₄、300mM NaCl, pH 7.0) 中,收获细胞。使细胞悬浮液在约等于21,000psi的压力下通过均化器 (Microfluidics M-100P (Newton, Massachusetts, USA)), 并通过在15,000x g (4°C) 下离心15分钟来分离可溶性蛋白质级分。根据制造商的说明,使用钴亲和层析 (TALON® Superflow金属亲和树脂 (Takara Clontech, Australia)) 来纯化蛋白质。用150mM咪唑洗脱纯化的蛋白质之后,使用纤维素透析膜 (截留分子量为12,000 (Sigma)) 针对纤溶酶裂解缓冲液 (50mM Tris (pH 8)、10mM NaCl和25mM赖氨酸) 透析样品。将500μL纯化蛋

白质的等分试样置于干冰上速冻并储存在 -80°C 下。

[0367] 实施例2

[0368] 材料和方法

[0369] 粗制细菌蛋白酶

[0370] 将荧光假单胞菌(菌株65)的分离株涂铺在OXOID琼脂平板上,并在 28°C 下温育2天。用来自平板的三个菌落接种100mL无菌营养肉汤(NB),并在 28°C 下温育48小时。取10mL培养物以 $6000\times g$ 离心10分钟。弃去上清液,并将细胞沉淀物重悬于1mL无菌等渗盐水溶液($0.85\% \text{ w/v}$)中,并添加到99mL脱脂UHT乳(COLES Australian脱脂乳,99%无脂肪)中。在 4°C 下,伴随以150rpm环形搅拌将培养物温育8天。通过向99mL脱脂UHT乳中添加1mL $0.85\% \text{ w/v}$ 盐水并在相同条件下温育8天来制备对照培养物。此后,将培养物在 4°C 下以 $3,000\times g$ 离心10分钟。将上清液收集,在 $0.22\mu\text{m}$ 过滤器上过滤灭菌,并用作粗制蛋白酶的来源。将其等分为多个1mL等分试样,并储存在 -80°C 下。

[0371] 对由接种荧光假单胞菌的脱脂乳制备的粗提取物的SDS-PAGE(图3)分析证明,46kDa与58kDa之间存在与50kDa的分子质量一致的显性条带,所述分子质量表征了由乳中多种不同的荧光假单胞菌菌株产生的一类锌依赖性金属蛋白酶(AprX蛋白酶)(Dacres等人,2014年;Button等人,2011年)。通过对SDS-PAGE凝胶上的染色条带的光密度分析,估计荧光假单胞菌菌株65所分泌的蛋白酶的浓度为 $0.34\mu\text{M}$ 。

[0372] 蛋白酶测定

[0373] 蛋白酶测定在96孔板中以 $100\mu\text{L}$ 的最终体积进行。在 28°C 下,将纯化的纤溶酶传感器(10nM)与不同量的粗制细菌蛋白酶或纤溶酶(人或牛,Sigma)一起在裂解缓冲液(50mM Tris-HCl,50mM NaCl,25mM赖氨酸,pH 8)中温育10分钟、或者在添加 $50\mu\text{L}$ 全脂或脱脂UHT乳(Coles)的情况下温育10分钟。通过测定1pM与10nM之间的蛋白酶浓度而产生校准图。在温育10分钟后测量BRET²信号。对于BRET²测量,在10分钟的温育期后添加 $5\mu\text{L}$ Clz400a底物($100\mu\text{M}$)。

[0374] 使用POLARstar OPTIMA微孔板读取仪(BMG LabTech,Australia),采用BRET²发射滤光片套件进行同时双发射BRET测量,其中所述发射滤光片套件包括RLuc2/Clz400a发射滤光片(410nm,带通80nm)和GFP²发射滤光片(515nm,带通30nm)。使用0.5秒的积分时间。

[0375] 数据分析

[0376] 在使用微孔板光谱仪的情况下,BRET比率被计算为在500nm和470nm下测量的生物发光发射的比率。通过将GFP²强度(平均0至5s)除以RLuc2强度(平均0至5s)来计算BRET比率。使用用于Windows的Graphpad Prism 7中的归一化函数对BRET比率进行归一化,相对于Log[蛋白酶]值绘图并且用Log[激动剂]对归一化响应-可变斜率模型拟合。

[0377] 结果

[0378] 针对全脂UHT乳中的纤溶酶传感器为牛纤溶酶和人纤溶酶(图4)或细菌蛋白酶构建校准曲线。纤溶酶传感器对于人纤溶酶的 EC_{50} 为 5.6nM ,并且对于牛纤溶酶的 EC_{50} 为 108nM (表3)。将纤溶酶传感器对人纤溶酶、牛纤溶酶和细菌蛋白酶的响应进行比较的初步研究(图5)推断,对于全脂UHT乳中的细菌蛋白酶的 EC_{50} 为约 50nM 。

[0379] 除此之外,在原料乳中用细菌蛋白酶校准纤溶酶传感器(图6)。纤溶酶传感器对于原料乳中的细菌蛋白酶的 EC_{50} 为 1.4nM (表3)。

[0380] 实施例3

[0381] 本申请的传感器可以用于检测样品(诸如乳制品)中的假单胞菌属某些种蛋白酶。如实施例1中所述制备Pf1u传感器1、2和3。如实施例2中所述制备粗制细菌蛋白酶。使用10nM纯化传感器如实施例2中所述进行蛋白酶测定。

[0382] 结果

[0383] 针对全脂UHT乳中的Pf1u传感器1、2和3,为细菌蛋白酶、牛纤溶酶和/或人纤溶酶构建校准曲线。所述校准曲线在图7(Pf1u传感器1)、图8(Pf1u传感器1)、图9(Pf1u传感器2)和图10(Pf1u传感器3)中示出。

[0384] Pf1u传感器1对于细菌蛋白酶的 EC_{50} 为0.7nM,并且对于牛纤溶酶的 EC_{50} 为169nM,并且对于人纤溶酶的 EC_{50} 为124nM(表3)。因此,Pf1u传感器1对细菌蛋白酶的灵敏度是对人纤溶酶的灵敏度的174倍,并且对细菌蛋白酶的灵敏度是对牛纤溶酶的灵敏度的238倍。传感器的灵敏度通过将由使用纤溶酶产生的校准曲线计算的 EC_{50} 除以由使用细菌蛋白酶产生的校准曲线计算的 EC_{50} 来确定。

[0385] Pf1u传感器2对于细菌蛋白酶级分的 EC_{50} 为2.6nM,并且对于人纤溶酶的 EC_{50} 为926nM(表3)。未测试牛纤溶酶。因此,Pf1u传感器2对细菌蛋白酶的灵敏度是对人纤溶酶的灵敏度的约353倍。

[0386] Pf1u传感器3对于细菌蛋白酶的 EC_{50} 为2.3nM,并且对于人纤溶酶的 EC_{50} 为1280nM(表3)。未测试牛纤溶酶。因此,Pf1u传感器3对细菌蛋白酶的灵敏度是对纤溶酶的灵敏度的约563倍。

[0387] 结论

[0388] 通过改变传感器中的靶序列,细菌蛋白酶传感器对细菌蛋白酶的灵敏度给出0.1nM至90nM细菌蛋白酶的组线性范围,并且可以测量32nM至537nM范围内的牛纤溶酶水平和0.7nM至3680nM范围内的人纤溶酶水平。已使用比色测量法测量了原料乳中在1nM至5nM浓度范围内的纤溶酶浓度(Benslimane等人,2009年),并且已使用ELISA测定法测量了在0.6nM至22nM范围内的纤溶酶浓度(Dupont等人,1997年)。这些数据证明,根据本发明的传感器被细菌蛋白酶切割,对细菌蛋白酶具有选择性,并且在很大程度上或相对来说对乳中生理水平的纤溶酶无响应。

[0389] 实施例4

[0390] 材料和方法

[0391] 原料乳样品

[0392] 从澳大利亚乳品加工商处获得六个原料乳样品。加工商指出,从其获得这些样品的乳牛被认为是高品质的生产者,能够始终如一地产生货架期长的鲜乳。

[0393] Rauh等人(2014)的预处理方案

[0394] 对原料乳样品进行超声处理(Misonix超声波仪3000;样品脉冲开启,0.5秒;脉冲关闭,2.5秒;功率5.5),持续12分钟。对原料乳样品进行超声处理,以产生均匀的分散体。超声处理后,使用Rauh等人(2014)描述的预处理方法预处理乳样品。简言之,将1mL超声处理的原料乳与250 μ L 0.4M柠檬酸三钠缓冲液(pH 8.9)混合,并在室温下伴随振荡温育15分钟以解离酪蛋白胶束。将用柠檬酸盐处理过的乳与含有8mM ϵ -氨基己酸(EACA)和0.4M NaCl的0.1M Tris缓冲液(pH 8)混合(1:1),并在室温下伴随振荡再温育15分钟。

[0395] 表3.在加标有粗制蛋白酶的50%全脂乳中计算的 EC_{50} 和线性范围。线性范围被定义为介于BRET²响应的10%与90%之间的范围。细菌蛋白酶传感器Pflu 1、Pflu 2Pflu 3、Pflu-H3和纤溶酶传感器的选择性因子(细菌蛋白酶:纤溶酶)。N.D.=未测定,*表示在原料乳样品中计算的值,¹表示对来自菌株117的细菌蛋白酶的响应,所有其他响应均是对来自菌株65的细菌蛋白酶的响应。

[0396]

靶序列	传感器	人纤溶酶		牛纤溶酶		细菌蛋白酶		对细菌蛋白酶的选择性 超过对人纤溶酶的选择性(倍数)	对细菌蛋白酶的选择性 超过对牛纤溶酶的选择性(倍数)
		EC_{50} (nM)	线性范围 (nM)	EC_{50} (nM)	线性范围 (nM)	EC_{50} (nM)	线性范围 (nM)		
LQSKKYYKVKEGSL Q (SEQ ID NO: 110)	纤溶酶	5.6	0.7 - 43	108	32 - 367	约 50 1.4*	10 - 90 0.2 - 9*	0.1	2
LQSFMKKNQNT E (SEQ ID NO: 73)	Pflu 1	124	10 - 1401	169	53 - 537	0.7 0.14* 0.2* ¹	0.1 - 4 0.01 - 1.25* 0.02* ¹ - 3.16* ¹	174	238
LQSFMNQNT E (SEQ ID NO: 74)	Pflu 2	926	233 - 3680	n.d.	n.d.	2.6	0.6 - 12	353	N.D.
LQSLSFMAIPGSFE (SEQ ID NO: 74)	Pflu 3	1280	452 - 3622	n.d.	n.d.	2.3	0.5 - 11	563	N.D.
LQSKKQKQKQGS FE (SEQ ID NO: 112)	Pflu-H3	n.d.	n.d.	174*	28 - 1079*	0.5*	.03 - 6.8*	N.D.*	376*

[0397] 使用BRET²纤溶酶传感器的校准曲线

[0398] 为了产生校准曲线,将经预处理的乳样品的等分试样加热至90°C并维持30秒,以使任何内源性纤溶酶失活。通过向50μL加热的乳样品中添加10μL纤溶酶溶液来将加热的预

处理样品用人纤溶酶(Sigma)加标。添加的纤溶酶的最终浓度介于0.001nM与500nM之间。将5 μ L BRET²纤溶酶传感器(10nM)和30 μ L纤溶酶裂解缓冲液添加到经加标的样品中,并通过吸移将样品充分混合。将样品在28 $^{\circ}$ C下温育10分钟。温育后,向孔中添加5 μ L Clz400a底物(100 μ M),并如上所述记录BRET比率。

[0399] 使用BRET²纤溶酶传感器测定内源性纤溶酶浓度

[0400] 为了确定原料乳样品中存在的纤溶酶的量,将50 μ L经预处理的原料乳样品在微孔板孔中与5 μ L BRET²纤溶酶传感器(10nM)和40 μ L纤溶酶切割缓冲液混合。将混合物在28 $^{\circ}$ C下温育10分钟。温育后,向孔中添加5 μ L Clz400a底物(100 μ M),并记录BRET比率。将由校准曲线计算的浓度乘以稀释因数2.5。

[0401] 使用比色底物进行验证

[0402] 使用Rauh等人(2014)的方法来验证基于BRET²纤溶酶传感器的测量结果,所述方法使用D-Val-Leu-Lys-4-硝基酰苯胺二盐酸盐(V0882,Sigma Aldrich)作为比色底物。

[0403] 通过将1.81mL 0.1M Tris HCl(pH 8.0)添加到5mg底物中,制备D-Val-Leu-Lys-4-硝基酰苯胺二盐酸盐的5mM储备溶液。

[0404] 通过将50 μ L经处理的原料乳与5 μ L含人纤溶酶的纤溶酶切割缓冲液和45 μ L比色底物混合,并在37 $^{\circ}$ C下温育2小时,来产生校准曲线。添加的纤溶酶的最终浓度介于0nM与15nM之间。使用板读取仪(Spectra Max M2,Molecular Devices,USA)每2分钟在405nm和490nm下测量吸光度。从405nm下的吸光度中减去490nm下的吸光度,并将其相对于时间绘图。计算添加的每种纤溶酶浓度在20分钟与120分钟之间的吸光度(410nm至490nm)变化率。

[0405] 使用商业测定法测定内源性纤溶酶的浓度。将50 μ L经预处理的原料乳与5 μ L纤溶酶切割缓冲液(10nM)和45 μ L比色底物混合,并在37 $^{\circ}$ C下温育2小时。使用板读取仪(Spectra Max M2,Molecular Devices,USA)每2分钟在405nm和490nm下测量吸光度。从405nm下的吸光度中减去490nm下的吸光度,并将其相对于时间绘图。计算每个样品在20分钟与120分钟之间的吸光度(410nm至490nm)变化率。将由校准曲线计算的浓度乘以稀释因数2.5。

[0406] 结果

[0407] BRET²纤溶酶传感器

[0408] 最初尝试在无预处理步骤的情况下确定原料乳中的纤溶酶浓度没有成功。

[0409] 针对遵循Rauh等人(2014)的预处理方案制备并加标有人纤溶酶的样品,构建了BRET²纤溶酶传感器的校准曲线(图11)。EC₅₀为19.48nM。在预处理的原料乳样品中测量的内源性纤溶酶浓度在2.1nM至4.4nM范围内(表4),其中有三个样品中未能检测到内源性纤溶酶浓度。

[0410] 比色底物

[0411] 针对遵循Rauh等人(2014)的预处理方案并加标有人纤溶酶的原料乳样品,构建了比色底物D-Val-Leu-Lys-4-硝基酰苯胺二盐酸盐的校准曲线(图12)。在原始的Rauh预处理方案之后,在原料乳样品中测量的内源性纤溶酶浓度在2.1nM至2.9nM范围内(表4)。

[0412] 实施例5

[0413] 材料和方法

[0414] 两步预处理方案

[0415] 通过将EACA和NaCl添加到柠檬酸三钠缓冲液中并将两个15分钟的温育步骤合并,

修改了实施例4中所述的预处理方案。简言之,将1mL超声处理的原料乳与含有5mM EACA和0.25M NaCl的250 μ L柠檬酸三钠缓冲液(pH 8.9)混合。然后将样品在室温下温育15分钟。

[0416] 表4.在Rauh等人(2014)的预处理方案之后,原料乳样品中的游离内源性纤溶酶的测量结果。当使用BRET²纤溶酶传感器时将经预处理的样品温育10分钟,或者将经预处理的样品与比色底物(D-Val-Leu-Lys-4-硝基酰苯胺二盐酸盐)一起温育120分钟。ND=未检出。

样品 ID	[游离内源性纤溶酶] (nM)	
	BRET ² 纤溶酶传感器	比色底物
1	ND	2.3
2	ND	2.6
3	ND	2.7
4	2.1	2.6
5	2.4	2.1
6	4.4	2.9

[0417] 校准曲线

[0419] 如实施例4中所述确定BRET²纤溶酶传感器和比色底物的校准曲线。

[0420] 测定内源性纤溶酶浓度

[0421] 如实施例4中所述测定原料乳样品中存在的纤溶酶的量。如实施例4中所述,使用比色底物D-Val-Leu-Lys-4-硝基酰苯胺二盐酸盐验证原料乳样品中存在的纤溶酶的量。

[0422] 结果

[0423] BRET²纤溶酶传感器

[0424] 使用加标有人纤溶酶并遵循两步预处理方案的原料乳样品,为BRET²纤溶酶传感器构建校准曲线。 EC_{50} 为16.04nM(图13)。在原料乳样品中测量的内源性纤溶酶浓度在5.8nM至9.0nM范围内(表5)。

[0425] 比色底物

[0426] 使用通过两步预处理方案处理并加标有人纤溶酶的原料乳样品,为比色底物构建校准曲线(图14)。在两步预处理方案之后,在原料乳样品中测量的内源性纤溶酶浓度在9.7nm至10.9nM范围内(表5)。

[0427] 表5:使用BRET²纤溶酶传感器和比色底物D-Val-Leu-Lys-4-硝基酰苯胺二盐酸盐测量两步预处理后的原料乳样品中的游离内源性纤溶酶的测量结果(平均值 $\pm$ SD,n=3)。当使用BRET²纤溶酶传感器时将经预处理的样品温育10分钟,或者将经预处理的样品与比色底物(D-Val-Leu-Lys-4-硝基酰苯胺二盐酸盐)一起温育120分钟。

样品 ID	[游离内源性纤溶酶] (nM)	
	BRET ² 纤溶酶传感器	比色底物
1	6.8 $\pm$ 1.4	9.7 $\pm$ 1.1
2	5.8 $\pm$ 1.5	10.0 $\pm$ 0.8
3	8.2 $\pm$ 1.1	10.9 $\pm$ 2.4
4	6.4 $\pm$ 1.7	10.4 $\pm$ 0.6
5	8.5 $\pm$ 0.7	9.7 $\pm$ 0
6	9.0 $\pm$ 1.1	10.4 $\pm$ 0.6

[0428] 实施例6

[0430] 材料和方法

[0431] 一步预处理方案

[0432] 通过组合超声处理步骤和温育步骤来修改实施例5中所述的预处理方案,以促进游离纤溶酶释放。简言之,将1mL原料乳与250 μ L 0.4M柠檬酸三钠缓冲液(pH 8.9,含有5mM EACA和0.25M NaCl)混合,并对样品进行超声处理(Misonix超声波仪3000;样品脉冲开启,0.5秒;脉冲关闭,2.5秒;功率5.5),持续12分钟。

[0433] 校准曲线

[0434] 如实施例4中所述确定BRET²纤溶酶传感器和比色底物的校准曲线。

[0435] 测定内源性纤溶酶浓度

[0436] 如实施例4中所述测定原料乳样品中存在的纤溶酶的量。如实施例4中所述,使用比色底物D-Val-Leu-Lys-4-硝基酰苯胺二盐酸盐验证原料乳样品中存在的纤溶酶的量。

[0437] 结果

[0438] BRET²纤溶酶传感器

[0439] 针对在一步预处理方案后加标有人纤溶酶的原料乳样品,构建BRET²纤溶酶传感器的校准曲线。校准曲线在图15中示出。 EC_{50} 为24.2nM,并且在1.6nM(90%)纤溶酶与128nM(10%)纤溶酶之间观察到线性响应。

[0440] 在原料乳样品中测量的内源性纤溶酶浓度在20.9nM至23.1nM范围内(表6)。在乳样品中测得的最低纤溶酶浓度为18.2nM(BRET²响应为77.1%),并且最高纤溶酶浓度为25.7nM(BRET²响应为66.7%),这两者均适当地处于该测定法的线性范围内。

[0441] 比色底物

[0442] 针对在一步预处理方案后加标有人纤溶酶的原料乳样品,构建比色底物D-Val-Leu-Lys-4-硝基酰苯胺二盐酸盐的校准曲线。校准曲线在图16中示出。

[0443] 该比色测定的 EC_{50} 为11.06nM,其线性响应介于5.70nM(10%)与13.70nM(90%)之间。这比使用BRET²纤溶酶传感器校准结果观察到的范围窄得多。

[0444] 在原料乳样品中测量的内源性纤溶酶浓度在17.2nM至18.0nM范围内(表6)。

[0445] 表6:使用BRET²纤溶酶传感器和比色底物D-Val-Leu-Lys-4-硝基酰苯胺二盐酸盐测量一步预处理后的原料乳样品中的游离内源性纤溶酶的测量结果(平均值 $\pm$ SD,n=3)。当使用BRET²纤溶酶传感器时将经预处理的样品温育10分钟,或者将经预处理的样品与比色底物(D-Val-Leu-Lys-4-硝基酰苯胺二盐酸盐)一起温育120分钟。

[0446]

样品 ID	[游离内源性纤溶酶] (nM)	
	BRET ² 纤溶酶传感器	比色底物
1	20.9 ± 3.7	17.2 ± 0.9
2	23.6 ± 0.7	17.2 ± 0.5
3	21.2 ± 1.7	18.0 ± 0.6
4	22.6 ± 3.2	17.6 ± 0.2
5	22.8 ± 2.0	17.2 ± 0.7
6	22.3 ± 1.6	17.6 ± 0.9

[0447] 实施例7

[0448] 材料和方法

[0449] 利用低功率超声处理的一步预处理方案

[0450] 用可以连续使用的低功率超声波仪(Q55超声波仪,Daintree Scientific)替换超

声波仪 (Misonix超声波仪3000), 来进一步修改实施例6中所述的预处理方案。简言之, 将1mL原料乳与250 μ L 0.4M柠檬酸三钠缓冲液 (pH 8.9, 含有5mM EACA和0.25M NaCl) 混合。将样品在冰上连续超声处理 (Q55超声波仪, 振幅设定为40) 2分钟。

[0451] 校准曲线

[0452] 如实施例4中所述确定校准曲线。

[0453] 测定内源性纤溶酶浓度

[0454] 如实施例4中所述测定原料乳样品中存在的纤溶酶的量。

[0455] 结果

[0456] 针对在利用低功率超声处理的一步预处理方案后加标有人纤溶酶的原料乳样品, 构建BRET²纤溶酶传感器的校准曲线。校准曲线在图17中示出。计算的EC₅₀为29.3nM, 并且响应在5.5nM(90%) 与107nM(10%) 之间呈线性。

[0457] 在利用低功率超声处理的一步预处理后, 在原料乳样品中测量的内源性纤溶酶浓度在12.0nM至17.2nM范围内, 且针对六个样品, BRET²响应在介于87.1%与91.4%之间的范围内(表7)。

[0458] 讨论

[0459] 来自实施例4至7的数据显示, 将超声处理并入到预处理方案中对该测定法的灵敏度和在乳样品中测得的游离内源性纤溶酶的量有显著的积极作用(表8)。例如, 与Rauh等人(2014)的预处理方法相比, 使用一步预处理方案将游离内源性纤溶酶的水平提高了5至10倍。使用比色底物测定法验证了这一点。对于BRET测定和比色测定这两者, 当使用一步方案替代两步预处理时, 在原料乳中测得的游离内源性纤溶酶水平是2至3倍高。与Rauh等人(2014)的预处理方法相比, 并入低功率超声处理使原料乳中测得的内源性游离纤溶酶水平增加4至6倍, 同时将总测定时间从原始方法的50分钟测定时间减少到低功率超声处理预处理的12分钟测定时间。数据显示, 在EACA存在下对样品进行超声处理显著提高了内源性纤溶酶从酪蛋白解离的效率。

[0460] 表7: 使用BRET²纤溶酶传感器以低功率超声处理进行一步预处理后, 原料乳样品中的游离内源性纤溶酶的测量结果(平均值 $\pm$ SD, n=3)。

[0461]

样品ID	[游离内源性纤溶酶] (nM)
1	12.0 $\pm$ 0.6
2	12.5 $\pm$ 1.9
3	17.3 $\pm$ 0.4
4	17.2 $\pm$ 2.3
5	16.8 $\pm$ 0.9
6	15.6 $\pm$ 1.5

[0462] 表8. 比较在原始的Rauh预处理方案、两步预处理、一步预处理和采用低功率超声处理的一步预处理(一步快速预处理)之后, 六个“高品质”原料乳样品中测得的游离内源性纤溶酶浓度范围(nM)。总测定时间包括均质化时间(两步和一步预处理为12分钟, 并且一步快速预处理为2分钟)、预处理温育时间和10分钟温育测定时间。

[0463]	预处理方案			
	Rauh 等人, (2014)	两步	一步	一步快速
测得的纤溶酶(nM)	2.1 – 4.4	5.8 – 9.0	20.9 – 22.6	12 – 17.2
总测定时间(分钟)	50	32	22	12

[0464] 实施例8

[0465] 材料和方法

[0466] 这里使用Pfl1u1传感器测量原料乳中的细菌蛋白酶。如实施例7中所述制备经预处理的原料乳样品,不同的是将样品超声处理4分钟。

[0467] 校准曲线

[0468] 为了产生校准曲线,将经预处理的原料乳样品的等分试样加热至55℃持续1小时,之后加热至90℃并维持30秒,以使任何内源性细菌蛋白酶和内源性纤溶酶失活。通过向50μL加热的乳样品中添加10μL细菌蛋白酶,将加热的经预处理的样品用不同量的粗制细菌蛋白酶级分加标(参见实施例2的制备)。添加的细菌蛋白酶的最终浓度介于1pM与10nM之间。将5μL BRET²Pfl1u1传感器(10nM)和30μL纤溶酶裂解缓冲液添加到加标样品中,并通过吸移将样品充分混合。将样品在28℃下温育10分钟。温育后,向孔中添加5μL Clz400a底物(100μM),并如上所述记录BRET比率。

[0469] 测定细菌蛋白酶浓度

[0470] 为了确定原料乳样品中存在的细菌蛋白酶的量,将50μL经预处理的原料乳样品在微孔板孔中与5μL Pfl1u1传感器(10nM)和40μL纤溶酶切割缓冲液混合。将混合物在28℃下温育2小时。温育后,向孔中添加5μL Clz400a底物(100μM),并记录BRET比率。将由校准曲线计算的浓度乘以稀释因数2.5。

[0471] 结果

[0472] 为预处理后的原料乳样品和Pfl1u1传感器构建校准曲线。校准曲线在图18中示出。EC₅₀为0.4nM,并且响应在48.2pM(90%)与2.6nM(10%)之间呈线性。在一步快速预处理方案后的原料乳样品中测得的细菌蛋白酶水平主要以亚皮摩尔浓度存在,等于或低于我们当前一代CYBERTONGUE®细菌蛋白酶传感器的检测限(目前估计该检测限≥1pM)。除了两个原料乳样品之外的所有样品都没有可检测的细菌蛋白酶(图19)。在可以测量内源性细菌蛋白酶的样品中,浓度在1.4pM至3.4pM范围内(图19)。

[0473] 实施例9

[0474] 材料和方法

[0475] 这里使用Pfl1u1传感器测量没有对原料乳样品进行任何预处理的原料乳中的细菌蛋白酶。

[0476] 校准曲线

[0477] 为了产生校准曲线,将经预处理的原料乳样品的等分试样加热至55℃持续1小时,以使任何内源性细菌蛋白酶失活。通过向50μL加热的乳样品中添加10μL细菌蛋白酶,将加热的经预处理的样品用不同量的粗制细菌蛋白酶级分加标(参见实施例2的制备操作)。添加的细菌蛋白酶的最终浓度介于1pM与10nM之间。将5μL BRET²Pfl1u1传感器(10nM)和30μL纤溶酶裂解缓冲液添加到加标的样品中,并通过吸移将样品充分混合。在进行和没有进行预处理(利用低功率超声处理的一步预处理方案)的情况下,将样品在28℃下温育10分钟或2

小时。温育后,向孔中添加5 μ L Clz400a底物(100 μ M),并如上所述记录BRET比率。

[0478] 结果

[0479] 看起来,所述细菌蛋白酶传感器在将所述传感器与细菌蛋白酶一起温育10分钟之后没有对原料乳进行任何预处理的情况下,相比于在已经在2小时的温育时间后预处理(使用利用低功率超声处理4分钟的一步预处理方案)的原料乳中校准的相同传感器,对细菌蛋白酶具有相似的响应和灵敏度(图20至图22,表9)。

[0480] 在2小时温育时间后,在没有进行预处理的情况下实现了细菌蛋白酶的最低检测(3.94pM)。这证明了较长的温育时间导致较低的检测限。据预测,更进一步增加温育时间将使得能够检测到甚至更低(亚pM)的细菌蛋白酶浓度。将结果与纤溶酶传感器对原料乳中的细菌蛋白酶的响应进行比较(图6和表3),在原料乳中温育10分钟的情况下,Pf1u1传感器对细菌蛋白酶的灵敏度是纤溶酶传感器的10倍。

[0481] 表9. 在进行或不进行利用低功率超声处理4分钟的一步预处理方案的情况下温育了不同时间的加标有粗制蛋白酶的50%原料乳中计算的EC₅₀和线性范围。线性范围被定义为介于BRET²响应的10%与90%之间的范围。

[0482]

	测定条件			
	没有预处理		预处理	
	温育时间			
	10 min	2 h	10 min	2 h
线性范围(pM)	15.74 - 1256	3.94 - 290	48.2 - 2580	14.80 - 670
EC ₅₀ (pM)	140	33.9	353	100

[0483] 实施例10

[0484] 为了确定Pf1u 1传感器是否可以响应多于一种荧光假单胞菌菌株,本发明人从荧光假单胞菌菌株117产生了细菌蛋白酶的粗提取物。

[0485] 材料和方法

[0486] 使用实施例2中所述的方法,由用荧光假单胞菌菌株117接种的脱脂乳制备粗提取物。

[0487] 对由接种荧光假单胞菌(株系117)的脱脂乳制备的粗提取物的SDS-PAGE(图23)分析证明,46kDa与58kDa之间存在与50KDa的分子质量一致的显性条带,所述分子质量表征了由乳中多种不同的荧光假单胞菌菌株产生的一类锌依赖性金属蛋白酶(AprX蛋白酶)(Dacres等人,2014年;Button等人,2011年),包括菌株65(图3)。通过对染色条带进行光密度分析,并且当与标志物46KDa(彩色蛋白标准品,Broad Range#P7712S批号:0021410,BioLaban) SDS-PAGE凝胶比较时,估计荧光假单胞菌菌株117分泌的蛋白酶的浓度为0.32 μ M。

[0488] 检测来自荧光假单胞菌(菌株117)的细菌蛋白酶

[0489] 将切割缓冲液和UHT乳用由菌株65或117产生的1nM细菌蛋白酶加标,并且将响应与不添加任何细菌蛋白酶的对照进行比较。如实施例2中所述制备粗制细菌蛋白酶。使用10nM纯化传感器如实施例2中所述进行蛋白酶测定。

[0490] 结果

[0491] 由荧光假单胞菌菌株65和117产生的细菌蛋白酶在缓冲液中的10分钟温育时间内

完全切割Pfl_u1传感器(图24),导致BRET比率下降95%。当在加标有1nM细菌蛋白酶的UHT乳中进行该测定时,使用菌株65细菌蛋白酶造成BRET比率下降80.6%,与之相比,使用来自菌株117的细菌蛋白酶造成BRET比率下降71.2%。这证明Pfl_u 1传感器能够响应由不同的荧光假单胞菌菌株产生的细菌蛋白酶。

[0492] 实施例11

[0493] Pfl_u 1-3传感器系列包含由具有中心F-M切割位点(图1)的接头序列分开的BRET组分,以便掺入在κ-酪蛋白中发现的切割位点和多肽序列。第二组蛋白酶传感器被设计用于针对所有酪蛋白中发现的所有切割位点掺入P4至P4`位置中发现的最主要的氨基酸(Pfl_u H1-4)。

[0494] 材料和方法

[0495] 构建新型细菌蛋白酶传感器

[0496] 由GenScript(USA)合成编码BRET²-细菌蛋白酶Pfl_u传感器H1、H2、H3和H4的DNA构建体。传感器包括作为化学发光供体的Rluc2和作为被接头分离的受体的绿色荧光蛋白(GFP²)的变体(表10)。将构建体克隆到pRSET载体(BioLabs,Australia)中,以制备编码蛋白酶传感器的pRSET-Pfl_u H载体。编码蛋白酶传感器的多核苷酸序列以SEQ ID NO:116至119示出。蛋白酶传感器的多肽序列以SEQ ID NO:120至123示出。使用实施例1中所述的方法产生纯化的传感器。

[0497] 校准曲线和蛋白酶测定

[0498] 用于新型细菌蛋白酶传感器(Pfl_u-H1-H4)的校准曲线和蛋白酶测定的方法在实施例2中描述。

[0499] 表10.分离H1至H4传感器中的BRET组分的接头序列。

细菌蛋白酶传感器	接头序列
Pfl _u -H1	LQGSPLKQPPPGSFE (SEQ ID NO:113)
Pfl _u -H2	LQGSPLQQPQPGSFE (SEQ ID NO:114)
Pfl _u -H3	LQGSKQKQKQKGSFE (SEQ ID NO:112)
Pfl _u -H4	LQGGSGSLKQQGGSGGSFE (SEQ ID NO:115)

[0501] 结果

[0502] 所有四种新型细菌蛋白酶传感器(Pfl_u H1-H4)在缓冲液中都对1nM细菌蛋白酶发生显著响应($P=0.05$) (图26)。传感器的相对灵敏度 $H3>H4>H1>H2$,其响应分别为89.7%、64.5%、49.5%和31.9%。这证明,Pfl_u H3传感器对细菌蛋白酶的响应最敏感,对1nM细菌蛋白酶的响应相比于Pfl_u H4传感器、Pfl_u H1传感器和Pfl_u H2传感器的相应响应高39%、82%和182%。

[0503] 为了评估Pfl_uH1-H4传感器对细菌蛋白酶相比于对乳中的纤溶酶的选择性,我们比较了Pfl_uH1-H4传感器对加标有1nM纤溶酶或细菌蛋白酶的UHT乳的响应(图27至图30,表11)。

[0504] 表11.Pfl_u-H1-H4传感器系列对来自荧光假单胞菌菌株65的1nM粗制细菌蛋白酶或UHT乳中的1nM牛纤溶酶的BRET²响应(%)。选择性被计算为细菌蛋白酶响应与纤溶酶响应的比率。

传感器	纤溶酶响应(%)	细菌蛋白酶响应(%)	选择性
-----	----------	------------	-----

Pfl _u -H1	4.9	6.7	1.3
Pfl _u -H2	7.9	6.6	0.8
Pfl _u -H3	0.9	36.3	40.3
Pfl _u -H4	6.3	17.1	2.7

[0506] Pfl_u-H3传感器对检测UHT乳中的细菌蛋白酶的选择性最高,高于对UHT乳中的纤溶酶的选择性,且选择性因子为40。其次是Pfl_u-H4传感器,它对细菌蛋白酶的选择性是对纤溶酶的选择性的2.7倍。Pfl_u-H1对细菌蛋白酶的选择性是对纤溶酶的选择性的1.3倍。Pfl_u-H2对细菌蛋白酶的选择性最小,对纤溶酶的选择性较高,且选择性因子为0.8。

[0507] 由于Pfl_u-H3对于检测乳中的细菌蛋白酶的选择性和灵敏度最高,因此使用该传感器在原料乳中进行进一步分析。绘制细菌蛋白酶(菌株65)和牛纤溶酶的校准曲线,如图31所示。Pfl_u-H3传感器对于细菌蛋白酶的EC₅₀为0.5nM,并且对于牛纤溶酶的EC₅₀为173.9nM(表3)。因此,Pfl_u-H3传感器对原料乳中的细菌蛋白酶的灵敏度是对牛纤溶酶的灵敏度的约376倍。

[0508] 实施例12

[0509] 在实施例2和10中,使用光密度测定法估计细菌蛋白酶浓度,并比较SDS-PAGE上的细菌蛋白酶条带与标志物条带的46kDa条带的相对密度(彩色蛋白标准品,Broad Range#P7712S批号:0021410,BioLaban)。本发明人通过比较细菌蛋白酶与已知浓度BSA的相对密度,研究了用于确定细菌蛋白酶浓度的不同方法。

[0510] 材料和方法

[0511] 使用实施例2和10中所述的方法,由用荧光假单胞菌菌株65和117接种的脱脂乳制备粗提取物。对菌株65(65-1和65-2)和菌株117的两种提取物以及不同浓度的BSA进行SDS-PAGE分析(图32)。菌株65-1是用于本文所有实施例的提取物,其使用了来自菌株65的细菌蛋白酶。菌株117是实施例10中所使用的提取物。Novex#LC5625SeeBlue预染标准品是使用的商业标志物。使用Image Quant TL(GE Healthcare)和从BSA校准曲线估计的细菌蛋白酶浓度进行对SDS-PAGE上的蛋白质的光密度分析(图33)。使用GraphPad Prism(版本7),通过拟合线性回归分析来绘制校准图。

[0512] 结果

[0513] BSA校准图的最佳拟合线被确定为 $y = 107235 + 79.66x$, $R^2 = .9679$ (图32)。提取物65-1、65-2和117的细菌蛋白酶浓度分别被测定为3.94 μ M、2.37 μ M和3.37 μ M。先前用于测定实施例2和10中相同批次的菌株65-1和菌株117的浓度的方法将浓度分别估计为0.34 μ M和0.32 μ M。使用当前的浓度测定方法,导致对于菌株65(65-1),细菌蛋白酶的浓度为11.6倍,而对于菌株117为10.5倍。作为这种方法对Pfl_u1传感器灵敏度的影响的一个实例,使用校正因子11.6来校正用于绘制图7的所有细菌蛋白酶浓度,得到EC₅₀为8.2nM并且线性范围为1.4nM至45nM(图34和表12),比表3中所呈现的那些高11.6。将细菌蛋白酶浓度的校正因子应用于最初在表3中呈现的关于细菌蛋白酶测量结果的所有值(表12)。

[0514] 使用这种方法估计细菌蛋白酶浓度有降低细菌蛋白酶传感器对细菌蛋白酶的选择性(高于对人或牛纤溶酶的选择性)的影响。例如,对于Pfl_u1传感器,对细菌蛋白酶的最低选择性(高于对人纤溶酶的选择性)从174降至15,而使用Pfl_u3传感器时,与最初的选择性因子563相比,最高选择性为48.5。将该校正因子应用于纤溶酶传感器对细菌蛋白酶的响

应增大了纤溶酶传感器检测纤溶酶的选择性因子(高于对细菌蛋白酶的选择性因子)(表12)。

[0515] 在使用BSA作为测量UHT乳中的细菌蛋白酶浓度的标准品的情况下,具有不同靶序列的所有传感器给出的组合线性范围是1.5nM至1044nM,与之相比,使用较早的浓度测定方法,UHT乳中的细菌蛋白酶为0.1nM至90nM。在原料乳中,细菌蛋白酶测量结果的组合线性范围在0.2nM至110nM范围内(表12),与之相比,两种不同的浓度测定方法在0.01nM至9nM范围内(表3)。

[0516] 如果针对通过实施例8中所使用的BSA方法测定的细菌蛋白酶浓度校正校准曲线以确定原料乳中的内源性细菌蛋白酶水平,则使用后测量的浓度此时在16.2pM至39.4pM范围内(图19)。

[0517] 表12.在加标有粗制蛋白酶的50%全脂乳中计算的 EC_{50} 和线性范围。线性范围被定义为介于BRET²响应的10%与90%之间的范围。细菌蛋白酶传感器Pfl_u 1、Pfl_u 2Pfl_u 3、Pfl_u-H3和纤溶酶传感器的选择性因子(细菌蛋白酶:纤溶酶)。通过与BSA标准比较来确定细菌蛋白酶。N.D.=未测定,*表示在原料乳样品中计算的值,¹表示对来自菌株117的细菌蛋白酶的响应,所有其他响应均是对来自菌株65的细菌蛋白酶的响应。

[0518]

靶序列	传感器	[人纤溶酶] (nM)		[牛纤溶酶] (nM)		[细菌蛋白酶] (nM)		对细菌蛋白酶的选择 性高于对人纤溶酶的 选择性(倍数)	对细菌蛋白酶的选择 性高于对牛纤溶酶的 选择性(倍数)
		<i>EC</i> ₅₀	线性范围	<i>EC</i> ₅₀	线性范围	<i>EC</i> ₅₀	线性范围		
LQGSKKYKVKEGSL Q (SEQ ID NO: 110)	纤溶酶	5.6	0.7 – 43	108	32 – 367	约 580 16.2*	116 – 1044 2.4 – 110*	0.2	
LQGSFMKKNQNTEI GSFE (SEQ ID NO: 72)	Pflu 1	124	10 – 1401	169	53 – 537	8.2 1.63* 2.6* ¹	1.5 – 45 0.2 – 14.5* 0.2 – 33.2* ¹	20	
LQGSFMNQNTEIGS FE (SEQ ID NO: 73)	Pflu 2	926	233 – 3680	n.d.	n.d.	30.4	6.7 – 13.8	N.D.	
LQGSLSFMAIPGSFE (SEQ ID NO: 74)	Pflu 3	1280	452 – 3622	n.d.	n.d.	26.4	5.5 – 125.8	N.D.	
LQGSKKQKQKQKQ SFE (SEQ ID NO: 112)	Pflu-H3	n.d.	n.d.	174*	28 – 1079*	5.4*	0.4 – 78.9*	32	

[0519] 本领域技术人员将会理解,在不脱离本公开的广泛的一般范围的情况下,可以对上述实施方案作出多种变化和/或修改。因此,本发明的实施方案在所有方面都被认为是说

明性的而非限制性的。

[0520] 本申请要求2016年11月14日提交的AU 2016904639和2017年1月19日提交的AU 2017900161的优先权,这两篇专利的全部内容均通过引用并入本文。

[0521] 本文讨论和/或引用的所有出版物均全文并入本文。

[0522] 已包括在本说明书中的关于文献、动作、材料、装置、物品等的任何讨论仅仅是用于提供本发明的上下文的目的。这不应被视为是承认,这些内容中的任何部分或其全部构成现有技术基础的组成部分,或者已是与本发明有关的领域中的公知常识,如同它在本申请的每一项权利要求的优先权日之前就存在一样。

[0523] 参考文献

[0524] Bagshaw(2001)J.of Cell Science 114:459-460

[0525] Benslimane et al.(2009)Journal of Dairy Research 57:423-435.

[0526] Bryce et al.(2016)Sensors 16:1488.

[0527] Button et al.(2011)Journal of Food Quality 34:229-235.

[0528] Dacres et al.(2009)Biosensors and Bioelectronics 24:1164-1170.

[0529] Dacres et al.(2014)Poster presentation.Biosensors 2014,May 27-30th 2014,Melbourne.

[0530] Datta and Deeth(2001)Trans.Instit.Chem.Eng(Part C) .79:197-210

[0531] Day et al.(2004)Luminescence 19:8-20.

[0532] de Wet et al.(1987)Mol.Cell.Biol.2987:725-737.

[0533] Dupont et al.(1997)Journal of Dairy Research.64:77-86.

[0534] Dupont et al.(2007)Journal of Agriculture and Food Chemistry.55:6857-6862.

[0535] Forster(1948)Ann.Physik.2:55

[0536] Forster(1960)Rad.Res.Suppl.,2:326,

[0537] Greer and Szalay(2002)Luminescence 17:43-74.

[0538] Guarise et al.(2006)PNAS,103:3978-3982.

[0539] Hastings(1996)Gene 173:5-11.

[0540] Hushpulier et al.(2007)Biol.Chem.388:373-380.

[0541] Inouye and Shimomura(1997)Biochem Biophys Res Commun.233:349-353.

[0542] Kim and Kim(2012)Theranostics,2:127-138.

[0543] Loening et al.(2006)Protein Eng.Des.Sel.19:391-400.

[0544] Loening et al.(2007)Nature Methods 4:641-643.

[0545] Lorenz et al.(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:4438-4442.

[0546] Martins(2015)Brazilian Journal of Microbiology,<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-838246120130859>.

[0547] Rauh et al.(2014)Int.Dairy J.38:74-80.

[0548] Saint-Denis et al.(2001)J.Dairy Res.68:437-449.

[0549] Sapsford et al.(2006)Angew.Chemie.Int.Ed.45:4562-4588.

[0550] Tsien(1998)Ann.Rev.Biochem.63:509-544.

- [0551] Verhaegen et al. (2002) Anal. Chem. 74:4378-4385
- [0552] Viviani (2002) Cell. Mol. Life Sci. 59:1833-1850.
- [0553] Wang et al. (1997) in Bioluminescence and Chemiluminescence: Molecular Reporting with Photohs, eds. Hastings et al (Wiley, New York), pp.419-422.
- [0554] Xu et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96:151-156.
- [0555] Zhang and Lv (2014) J Food Sci Technol. 51:1185-119.

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 联邦科学技术研究组织
- [0003] <120> 蛋白酶传感器分子
- [0004] <130> 526697
- [0005] <150> 2016904639
- [0006] <151> 2016-11-14
- [0007] <150> 2017900161
- [0008] <151> 2017-01-19
- [0009] <160> 123
- [0010] <170> PatentIn 3.5版
- [0011] <210> 1
- [0012] <211> 4
- [0013] <212> PRT
- [0014] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0015] <220>
- [0016] <223> 蛋白酶传感器分子
- [0017] <400> 1
- [0018] Lys Gln Lys Gln
- [0019] 1
- [0020] <210> 2
- [0021] <211> 4
- [0022] <212> PRT
- [0023] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0024] <220>
- [0025] <223> 蛋白酶传感器分子
- [0026] <400> 2
- [0027] Lys Gln Ser Phe
- [0028] 1
- [0029] <210> 3
- [0030] <211> 4
- [0031] <212> PRT
- [0032] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0033] <220>
- [0034] <223> 蛋白酶传感器分子
- [0035] <400> 3
- [0036] Lys Gln Phe Met
- [0037] 1
- [0038] <210> 4
- [0039] <211> 4
- [0040] <212> PRT
- [0041] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0042]	<220>
[0043]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0044]	<400> 4
[0045]	Lys Gln Lys Lys
[0046]	1
[0047]	<210> 5
[0048]	<211> 4
[0049]	<212> PRT
[0050]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0051]	<220>
[0052]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0053]	<400> 5
[0054]	Lys Gln Lys Asn
[0055]	1
[0056]	<210> 6
[0057]	<211> 4
[0058]	<212> PRT
[0059]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0060]	<220>
[0061]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0062]	<400> 6
[0063]	Lys Gln Asn Gln
[0064]	1
[0065]	<210> 7
[0066]	<211> 4
[0067]	<212> PRT
[0068]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0069]	<220>
[0070]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0071]	<400> 7
[0072]	Lys Gln Asn Thr
[0073]	1
[0074]	<210> 8
[0075]	<211> 4
[0076]	<212> PRT
[0077]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0078]	<220>
[0079]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0080]	<400> 8
[0081]	Lys Gln Glu Ile
[0082]	1
[0083]	<210> 9

[0084]	<211> 4
[0085]	<212> PRT
[0086]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0087]	<220>
[0088]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0089]	<400> 9
[0090]	Ser Phe Ser Phe
[0091]	1
[0092]	<210> 10
[0093]	<211> 4
[0094]	<212> PRT
[0095]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0096]	<220>
[0097]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0098]	<400> 10
[0099]	Ser Phe Phe Met
[0100]	1
[0101]	<210> 11
[0102]	<211> 4
[0103]	<212> PRT
[0104]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0105]	<220>
[0106]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0107]	<400> 11
[0108]	Ser Phe Lys Lys
[0109]	1
[0110]	<210> 12
[0111]	<211> 4
[0112]	<212> PRT
[0113]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0114]	<220>
[0115]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0116]	<400> 12
[0117]	Ser Phe Lys Asn
[0118]	1
[0119]	<210> 13
[0120]	<211> 4
[0121]	<212> PRT
[0122]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0123]	<220>
[0124]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0125]	<400> 13

[0126] Ser Phe Asn Gln
[0127] 1
[0128] <210> 14
[0129] <211> 4
[0130] <212> PRT
[0131] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0132] <220>
[0133] <223> 蛋白酶传感器分子
[0134] <400> 14
[0135] Ser Phe Asn Thr
[0136] 1
[0137] <210> 15
[0138] <211> 4
[0139] <212> PRT
[0140] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0141] <220>
[0142] <223> 蛋白酶传感器分子
[0143] <400> 15
[0144] Ser Phe Glu Ile
[0145] 1
[0146] <210> 16
[0147] <211> 4
[0148] <212> PRT
[0149] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0150] <220>
[0151] <223> 蛋白酶传感器分子
[0152] <400> 16
[0153] Phe Met Phe Met
[0154] 1
[0155] <210> 17
[0156] <211> 4
[0157] <212> PRT
[0158] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0159] <220>
[0160] <223> 蛋白酶传感器分子
[0161] <400> 17
[0162] Phe Met Lys Lys
[0163] 1
[0164] <210> 18
[0165] <211> 4
[0166] <212> PRT
[0167] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0168] <220>
[0169] <223> 蛋白酶传感器分子
[0170] <400> 18
[0171] Phe Met Lys Asn
[0172] 1
[0173] <210> 19
[0174] <211> 4
[0175] <212> PRT
[0176] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0177] <220>
[0178] <223> 蛋白酶传感器分子
[0179] <400> 19
[0180] Phe Met Asn Gln
[0181] 1
[0182] <210> 20
[0183] <211> 4
[0184] <212> PRT
[0185] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0186] <220>
[0187] <223> 蛋白酶传感器分子
[0188] <400> 20
[0189] Phe Met Asn Thr
[0190] 1
[0191] <210> 21
[0192] <211> 4
[0193] <212> PRT
[0194] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0195] <220>
[0196] <223> 蛋白酶传感器分子
[0197] <400> 21
[0198] Phe Met Glu Ile
[0199] 1
[0200] <210> 22
[0201] <211> 4
[0202] <212> PRT
[0203] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0204] <220>
[0205] <223> 蛋白酶传感器分子
[0206] <400> 22
[0207] Lys Lys Lys Lys
[0208] 1
[0209] <210> 23

[0210]	<211> 4
[0211]	<212> PRT
[0212]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0213]	<220>
[0214]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0215]	<400> 23
[0216]	Lys Lys Lys Asn
[0217]	1
[0218]	<210> 24
[0219]	<211> 4
[0220]	<212> PRT
[0221]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0222]	<220>
[0223]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0224]	<400> 24
[0225]	Lys Lys Asn Gln
[0226]	1
[0227]	<210> 25
[0228]	<211> 4
[0229]	<212> PRT
[0230]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0231]	<220>
[0232]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0233]	<400> 25
[0234]	Lys Lys Asn Thr
[0235]	1
[0236]	<210> 26
[0237]	<211> 4
[0238]	<212> PRT
[0239]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0240]	<220>
[0241]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0242]	<400> 26
[0243]	Lys Lys Glu Ile
[0244]	1
[0245]	<210> 27
[0246]	<211> 4
[0247]	<212> PRT
[0248]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0249]	<220>
[0250]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0251]	<400> 27

[0252] Lys Asn Lys Asn
[0253] 1
[0254] <210> 28
[0255] <211> 4
[0256] <212> PRT
[0257] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0258] <220>
[0259] <223> 蛋白酶传感器分子
[0260] <400> 28
[0261] Lys Asn Asn Gln
[0262] 1
[0263] <210> 29
[0264] <211> 4
[0265] <212> PRT
[0266] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0267] <220>
[0268] <223> 蛋白酶传感器分子
[0269] <400> 29
[0270] Lys Asn Asn Thr
[0271] 1
[0272] <210> 30
[0273] <211> 4
[0274] <212> PRT
[0275] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0276] <220>
[0277] <223> 蛋白酶传感器分子
[0278] <400> 30
[0279] Lys Asn Glu Ile
[0280] 1
[0281] <210> 31
[0282] <211> 4
[0283] <212> PRT
[0284] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0285] <220>
[0286] <223> 蛋白酶传感器分子
[0287] <400> 31
[0288] Lys Asn Phe Met
[0289] 1
[0290] <210> 32
[0291] <211> 4
[0292] <212> PRT
[0293] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0294]	<220>
[0295]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0296]	<400> 32
[0297]	Lys Asn Lys Lys
[0298]	1
[0299]	<210> 33
[0300]	<211> 4
[0301]	<212> PRT
[0302]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0303]	<220>
[0304]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0305]	<400> 33
[0306]	Asn Gln Asn Gln
[0307]	1
[0308]	<210> 34
[0309]	<211> 4
[0310]	<212> PRT
[0311]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0312]	<220>
[0313]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0314]	<400> 34
[0315]	Asn Thr Asn Thr
[0316]	1
[0317]	<210> 35
[0318]	<211> 4
[0319]	<212> PRT
[0320]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0321]	<220>
[0322]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0323]	<400> 35
[0324]	Asn Thr Glu Ile
[0325]	1
[0326]	<210> 36
[0327]	<211> 4
[0328]	<212> PRT
[0329]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0330]	<220>
[0331]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0332]	<400> 36
[0333]	Glu Ile Glu Ile
[0334]	1
[0335]	<210> 37

[0336] <211> 3
[0337] <212> PRT
[0338] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0339] <220>
[0340] <223> 蛋白酶传感器分子
[0341] <400> 37
[0342] Ser Phe Met
[0343] 1
[0344] <210> 38
[0345] <211> 7
[0346] <212> PRT
[0347] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0348] <220>
[0349] <223> 蛋白酶传感器分子
[0350] <400> 38
[0351] Ser Phe Met Lys Lys Asn Gln
[0352] 1 5
[0353] <210> 39
[0354] <211> 7
[0355] <212> PRT
[0356] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0357] <220>
[0358] <223> 蛋白酶传感器分子
[0359] <400> 39
[0360] Lys Lys Asn Gln Ser Phe Met
[0361] 1 5
[0362] <210> 40
[0363] <211> 7
[0364] <212> PRT
[0365] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0366] <220>
[0367] <223> 蛋白酶传感器分子
[0368] <220>
[0369] <221> X
[0370] <222> (4) .. (5)
[0371] <223> X可以是任何氨基酸
[0372] <400> 40
[0373] Ser Lys Met Xaa Xaa Pro Pro
[0374] 1 5
[0375] <210> 41
[0376] <211> 12
[0377] <212> PRT

- [0378] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0379] <220>
- [0380] <223> 蛋白酶传感器分子
- [0381] <220>
- [0382] <221> X
- [0383] <222> (3) .. (5)
- [0384] <223> X可以是任何氨基酸
- [0385] <220>
- [0386] <221> X
- [0387] <222> (9) .. (10)
- [0388] <223> X可以是任何氨基酸
- [0389] <400> 41
- [0390] Pro Pro Xaa Xaa Xaa Ser Lys Met Xaa Xaa Pro Pro
- [0391] 1 5 10
- [0392] <210> 42
- [0393] <211> 11
- [0394] <212> PRT
- [0395] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0396] <220>
- [0397] <223> 蛋白酶传感器分子
- [0398] <220>
- [0399] <221> X
- [0400] <222> (3) .. (4)
- [0401] <223> X可以是任何氨基酸
- [0402] <220>
- [0403] <221> X
- [0404] <222> (8) .. (9)
- [0405] <223> X可以是任何氨基酸
- [0406] <400> 42
- [0407] Pro Pro Xaa Xaa Ser Lys Met Xaa Xaa Pro Pro
- [0408] 1 5 10
- [0409] <210> 43
- [0410] <211> 10
- [0411] <212> PRT
- [0412] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0413] <220>
- [0414] <223> 蛋白酶传感器分子
- [0415] <220>
- [0416] <221> X
- [0417] <222> (3) .. (3)
- [0418] <223> X可以是任何氨基酸
- [0419] <220>

[0420]	<221> X
[0421]	<222> (7) .. (8)
[0422]	<223> X可以是任何氨基酸
[0423]	<400> 43
[0424]	Pro Pro Xaa Ser Lys Met Xaa Xaa Pro Pro
[0425]	1 5 10
[0426]	<210> 44
[0427]	<211> 8
[0428]	<212> PRT
[0429]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0430]	<220>
[0431]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0432]	<400> 44
[0433]	Pro Pro Val Lys Gln Pro Pro Pro
[0434]	1 5
[0435]	<210> 45
[0436]	<211> 11
[0437]	<212> PRT
[0438]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0439]	<220>
[0440]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0441]	<400> 45
[0442]	Ser Phe Met Lys Lys Asn Gln Asn Thr Glu Ile
[0443]	1 5 10
[0444]	<210> 46
[0445]	<211> 11
[0446]	<212> PRT
[0447]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0448]	<220>
[0449]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0450]	<400> 46
[0451]	Ser Phe Met Asn Thr Lys Lys Asn Gln Glu Ile
[0452]	1 5 10
[0453]	<210> 47
[0454]	<211> 11
[0455]	<212> PRT
[0456]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0457]	<220>
[0458]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0459]	<400> 47
[0460]	Ser Phe Met Gln Asn Thr Glu Ile Lys Lys Asn
[0461]	1 5 10

[0462]	<210>	48	
[0463]	<211>	11	
[0464]	<212>	PRT	
[0465]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0466]	<220>		
[0467]	<223>	蛋白酶传感器分子	
[0468]	<400>	48	
[0469]		Ser Phe Met Asn Gln Lys Lys Asn Thr Glu Ile	
[0470]	1	5	10
[0471]	<210>	49	
[0472]	<211>	11	
[0473]	<212>	PRT	
[0474]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0475]	<220>		
[0476]	<223>	蛋白酶传感器分子	
[0477]	<400>	49	
[0478]		Ser Phe Met Asn Gln Asn Thr Lys Lys Glu Ile	
[0479]	1	5	10
[0480]	<210>	50	
[0481]	<211>	11	
[0482]	<212>	PRT	
[0483]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0484]	<220>		
[0485]	<223>	蛋白酶传感器分子	
[0486]	<400>	50	
[0487]		Ser Phe Met Asn Gln Asn Thr Glu Ile Lys Lys	
[0488]	1	5	10
[0489]	<210>	51	
[0490]	<211>	11	
[0491]	<212>	PRT	
[0492]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0493]	<220>		
[0494]	<223>	蛋白酶传感器分子	
[0495]	<400>	51	
[0496]		Lys Lys Asn Gln Ser Phe Met Asn Thr Glu Ile	
[0497]	1	5	10
[0498]	<210>	52	
[0499]	<211>	11	
[0500]	<212>	PRT	
[0501]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0502]	<220>		
[0503]	<223>	蛋白酶传感器分子	

[0504]	<400> 52
[0505]	Lys Lys Asn Gln Asn Thr Ser Phe Met Glu Ile
[0506]	1 5 10
[0507]	<210> 53
[0508]	<211> 11
[0509]	<212> PRT
[0510]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0511]	<220>
[0512]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0513]	<400> 53
[0514]	Lys Lys Asn Gln Asn Thr Glu Ile Ser Phe Met
[0515]	1 5 10
[0516]	<210> 54
[0517]	<211> 11
[0518]	<212> PRT
[0519]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0520]	<220>
[0521]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0522]	<400> 54
[0523]	Lys Lys Ser Phe Met Asn Gln Asn Thr Glu Ile
[0524]	1 5 10
[0525]	<210> 55
[0526]	<211> 11
[0527]	<212> PRT
[0528]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0529]	<220>
[0530]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0531]	<400> 55
[0532]	Lys Lys Asn Gln Ser Phe Met Glu Ile Asn Thr
[0533]	1 5 10
[0534]	<210> 56
[0535]	<211> 11
[0536]	<212> PRT
[0537]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0538]	<220>
[0539]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0540]	<400> 56
[0541]	Lys Lys Asn Gln Glu Ile Ser Phe Met Asn Thr
[0542]	1 5 10
[0543]	<210> 57
[0544]	<211> 9
[0545]	<212> PRT

[0546] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0547] <220>
[0548] <223> 蛋白酶传感器分子
[0549] <400> 57
[0550] Ser Phe Met Asn Gln Asn Thr Glu Ile
[0551] 1 5
[0552] <210> 58
[0553] <211> 9
[0554] <212> PRT
[0555] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0556] <220>
[0557] <223> 蛋白酶传感器分子
[0558] <400> 58
[0559] Asn Gln Ser Phe Met Asn Thr Glu Ile
[0560] 1 5
[0561] <210> 59
[0562] <211> 9
[0563] <212> PRT
[0564] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0565] <220>
[0566] <223> 蛋白酶传感器分子
[0567] <400> 59
[0568] Asn Gln Asn Thr Ser Phe Met Glu Ile
[0569] 1 5
[0570] <210> 60
[0571] <211> 9
[0572] <212> PRT
[0573] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0574] <220>
[0575] <223> 蛋白酶传感器分子
[0576] <400> 60
[0577] Asn Gln Asn Thr Glu Ile Ser Phe Met
[0578] 1 5
[0579] <210> 61
[0580] <211> 9
[0581] <212> PRT
[0582] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0583] <220>
[0584] <223> 蛋白酶传感器分子
[0585] <400> 61
[0586] Ser Phe Met Asn Thr Asn Gln Glu Ile
[0587] 1 5

[0588] <210> 62
[0589] <211> 9
[0590] <212> PRT
[0591] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0592] <220>
[0593] <223> 蛋白酶传感器分子
[0594] <400> 62
[0595] Ser Phe Met Asn Thr Glu Ile Asn Gln
[0596] 1 5
[0597] <210> 63
[0598] <211> 9
[0599] <212> PRT
[0600] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0601] <220>
[0602] <223> 蛋白酶传感器分子
[0603] <400> 63
[0604] Ser Phe Met Asn Gln Glu Ile Asn Thr
[0605] 1 5
[0606] <210> 64
[0607] <211> 9
[0608] <212> PRT
[0609] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0610] <220>
[0611] <223> 蛋白酶传感器分子
[0612] <400> 64
[0613] Asn Gln Ser Phe Met Glu Ile Asn Thr
[0614] 1 5
[0615] <210> 65
[0616] <211> 9
[0617] <212> PRT
[0618] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0619] <220>
[0620] <223> 蛋白酶传感器分子
[0621] <400> 65
[0622] Asn Gln Glu Ile Ser Phe Met Asn Thr
[0623] 1 5
[0624] <210> 66
[0625] <211> 9
[0626] <212> PRT
[0627] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0628] <220>
[0629] <223> 蛋白酶传感器分子

[0630]	<400> 66
[0631]	Ser Phe Met Glu Ile Asn Gln Asn Thr
[0632]	1 5
[0633]	<210> 67
[0634]	<211> 9
[0635]	<212> PRT
[0636]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0637]	<220>
[0638]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0639]	<400> 67
[0640]	Glu Ile Ser Phe Met Asn Thr Asn Gln
[0641]	1 5
[0642]	<210> 68
[0643]	<211> 9
[0644]	<212> PRT
[0645]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0646]	<220>
[0647]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0648]	<400> 68
[0649]	Glu Ile Asn Thr Ser Phe Met Asn Gln
[0650]	1 5
[0651]	<210> 69
[0652]	<211> 9
[0653]	<212> PRT
[0654]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0655]	<220>
[0656]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0657]	<400> 69
[0658]	Glu Ile Asn Thr Asn Gln Ser Phe Met
[0659]	1 5
[0660]	<210> 70
[0661]	<211> 7
[0662]	<212> PRT
[0663]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0664]	<220>
[0665]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0666]	<400> 70
[0667]	Leu Ser Phe Met Ala Ile Pro
[0668]	1 5
[0669]	<210> 71
[0670]	<211> 8
[0671]	<212> PRT

[0672]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)																
[0673]	<220>																	
[0674]	<223>	蛋白酶传感器分子																
[0675]	<400>	71																
[0676]		Leu	Phe	Met	Ser	Phe	Ala	Ile	Pro									
[0677]		1				5												
[0678]	<210>	72																
[0679]	<211>	18																
[0680]	<212>	PRT																
[0681]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)																
[0682]	<220>																	
[0683]	<223>	蛋白酶传感器分子																
[0684]	<400>	72																
[0685]		Leu	Gln	Gly	Ser	Phe	Met	Lys	Lys	Asn	Gln	Asn	Thr	Glu	Ile	Gly	Ser	
[0686]		1				5					10					15		
[0687]		Phe	Glu															
[0688]	<210>	73																
[0689]	<211>	16																
[0690]	<212>	PRT																
[0691]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)																
[0692]	<220>																	
[0693]	<223>	蛋白酶传感器分子																
[0694]	<400>	73																
[0695]		Leu	Gln	Gly	Ser	Phe	Met	Asn	Gln	Asn	Thr	Glu	Ile	Gly	Ser	Phe	Glu	
[0696]		1				5					10					15		
[0697]	<210>	74																
[0698]	<211>	15																
[0699]	<212>	PRT																
[0700]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)																
[0701]	<220>																	
[0702]	<223>	蛋白酶传感器分子																
[0703]	<400>	74																
[0704]		Leu	Gln	Gly	Ser	Leu	Ser	Phe	Met	Ala	Ile	Pro	Gly	Ser	Phe	Glu		
[0705]		1				5					10					15		
[0706]	<210>	75																
[0707]	<211>	4																
[0708]	<212>	PRT																
[0709]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)																
[0710]	<220>																	
[0711]	<223>	蛋白酶传感器分子																
[0712]	<400>	75																
[0713]		Lys	Gln	Gln	Gln													

[0714] 1
[0715] <210> 76
[0716] <211> 4
[0717] <212> PRT
[0718] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0719] <220>
[0720] <223> 蛋白酶传感器分子
[0721] <400> 76
[0722] Ser Phe Gln Gln
[0723] 1
[0724] <210> 77
[0725] <211> 4
[0726] <212> PRT
[0727] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0728] <220>
[0729] <223> 蛋白酶传感器分子
[0730] <400> 77
[0731] Phe Met Gln Gln
[0732] 1
[0733] <210> 78
[0734] <211> 4
[0735] <212> PRT
[0736] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0737] <220>
[0738] <223> 蛋白酶传感器分子
[0739] <400> 78
[0740] Lys Lys Gln Gln
[0741] 1
[0742] <210> 79
[0743] <211> 4
[0744] <212> PRT
[0745] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0746] <220>
[0747] <223> 蛋白酶传感器分子
[0748] <400> 79
[0749] Lys Asn Gln Gln
[0750] 1
[0751] <210> 80
[0752] <211> 4
[0753] <212> PRT
[0754] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0755] <220>

[0756] <223> 蛋白酶传感器分子
[0757] <400> 80
[0758] Asn Gln Gln Gln
[0759] 1
[0760] <210> 81
[0761] <211> 4
[0762] <212> PRT
[0763] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0764] <220>
[0765] <223> 蛋白酶传感器分子
[0766] <400> 81
[0767] Asn Thr Gln Gln
[0768] 1
[0769] <210> 82
[0770] <211> 4
[0771] <212> PRT
[0772] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0773] <220>
[0774] <223> 蛋白酶传感器分子
[0775] <400> 82
[0776] Glu Ile Gln Gln
[0777] 1
[0778] <210> 83
[0779] <211> 4
[0780] <212> PRT
[0781] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0782] <220>
[0783] <223> 蛋白酶传感器分子
[0784] <400> 83
[0785] Gln Gln Gln Gln
[0786] 1
[0787] <210> 84
[0788] <211> 4
[0789] <212> PRT
[0790] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0791] <220>
[0792] <223> 蛋白酶传感器分子
[0793] <400> 84
[0794] Gln Gln Lys Gln
[0795] 1
[0796] <210> 85
[0797] <211> 4

[0798] <212> PRT
[0799] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0800] <220>
[0801] <223> 蛋白酶传感器分子
[0802] <400> 85
[0803] Gln Gln Ser Phe
[0804] 1
[0805] <210> 86
[0806] <211> 4
[0807] <212> PRT
[0808] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0809] <220>
[0810] <223> 蛋白酶传感器分子
[0811] <400> 86
[0812] Gln Gln Phe Met
[0813] 1
[0814] <210> 87
[0815] <211> 4
[0816] <212> PRT
[0817] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0818] <220>
[0819] <223> 蛋白酶传感器分子
[0820] <400> 87
[0821] Gln Gln Lys Lys
[0822] 1
[0823] <210> 88
[0824] <211> 4
[0825] <212> PRT
[0826] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0827] <220>
[0828] <223> 蛋白酶传感器分子
[0829] <400> 88
[0830] Gln Gln Lys Asn
[0831] 1
[0832] <210> 89
[0833] <211> 4
[0834] <212> PRT
[0835] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0836] <220>
[0837] <223> 蛋白酶传感器分子
[0838] <400> 89
[0839] Gln Gln Asn Gln

[0840]	1
[0841]	<210> 90
[0842]	<211> 4
[0843]	<212> PRT
[0844]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0845]	<220>
[0846]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0847]	<400> 90
[0848]	Gln Gln Asn Thr
[0849]	1
[0850]	<210> 91
[0851]	<211> 4
[0852]	<212> PRT
[0853]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0854]	<220>
[0855]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0856]	<400> 91
[0857]	Gln Gln Glu Ile
[0858]	1
[0859]	<210> 92
[0860]	<211> 3
[0861]	<212> PRT
[0862]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0863]	<220>
[0864]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0865]	<400> 92
[0866]	Lys Gln Gln
[0867]	1
[0868]	<210> 93
[0869]	<211> 12
[0870]	<212> PRT
[0871]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0872]	<220>
[0873]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0874]	<400> 93
[0875]	Gly Ser Pro Pro Leu Gln Gln Pro Pro Pro Gly Ser
[0876]	1 5 10
[0877]	<210> 94
[0878]	<211> 16
[0879]	<212> PRT
[0880]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0881]	<220>

[0882]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0883]	<400> 94
[0884]	Gly Gly Ser Gly Gly Ser Leu Lys Gln Gln Gly Gly Ser Gly Gly Ser
[0885]	1 5 10 15
[0886]	<210> 95
[0887]	<211> 3
[0888]	<212> PRT
[0889]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0890]	<220>
[0891]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0892]	<400> 95
[0893]	Leu Gln Gly
[0894]	1
[0895]	<210> 96
[0896]	<211> 4
[0897]	<212> PRT
[0898]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0899]	<220>
[0900]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0901]	<400> 96
[0902]	Gly Ser Phe Glu
[0903]	1
[0904]	<210> 97
[0905]	<211> 6
[0906]	<212> PRT
[0907]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0908]	<220>
[0909]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0910]	<400> 97
[0911]	Gly Ser Ser Gly Gly Ser
[0912]	1 5
[0913]	<210> 98
[0914]	<211> 5
[0915]	<212> PRT
[0916]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0917]	<220>
[0918]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0919]	<400> 98
[0920]	Gly Ser Pro Pro Leu
[0921]	1 5
[0922]	<210> 99
[0923]	<211> 5

[0924]	<212> PRT
[0925]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0926]	<220>
[0927]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0928]	<400> 99
[0929]	Pro Pro Pro Gly Ser
[0930]	1 5
[0931]	<210> 100
[0932]	<211> 6
[0933]	<212> PRT
[0934]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0935]	<220>
[0936]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0937]	<400> 100
[0938]	Gly Gly Ser Gly Gly Ser
[0939]	1 5
[0940]	<210> 101
[0941]	<211> 7
[0942]	<212> PRT
[0943]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0944]	<220>
[0945]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0946]	<400> 101
[0947]	Gly Gly Ser Gly Gly Ser Leu
[0948]	1 5
[0949]	<210> 102
[0950]	<211> 1713
[0951]	<212> DNA
[0952]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0953]	<220>
[0954]	<223> 蛋白酶传感器分子
[0955]	<400> 102
[0956]	gaattcatgg tgagcaaggg cgaggagctg ttcaccgggg tggtgcccat cctggtcgag 60
[0957]	ctggacggcg acgtaaacgg ccacaagttc agcgtgtccg gcgagggcga gggcgatgcc 120
[0958]	acctacggca agctgaccct gaagttcatc tgcaccaccg gcaagctgcc cgtgccctgg 180
[0959]	cccaccctcg tgaccaccct gagctacggc gtgcagtgtc tcagccgcta ccccgaccac 240
[0960]	atgaagcagc acgacttctt caagtccgcc atgcccgaag gctacgtcca ggagcgcacc 300
[0961]	atctttctca aggacgacgg caactacaag acccgcgccg aggtgaagtt cgagggcgac 360
[0962]	accctgggtga accgcatcga gctgaagggc atcgacttca aggaggacgg caacatcctg 420
[0963]	gggcacaagc tggagtacaa ctacaacagc cacaacgtct atatcatggc cgacaagcag 480
[0964]	aagaacggca tcaagtgaa cttcaagatc cgccacaaca tcgaggacgg cagcgtgcag 540
[0965]	ctcgccgacc actaccagca gaacaccccc atcggcgacg gccccgtgct gctgccccgac 600

[0966]	aaccactacc tgagcaccca gtccgccctg agcaaagacc ccaacgagaa gcgcgatcac	660
[0967]	atggtcctgc tggagtctgt gaccgccgcc gggatcactc tcggcatgga cgagctgtac	720
[0968]	aagctgcagg gttcctttat gaaccagaac actgaaatcg gaagcttcga aatggcttcc	780
[0969]	aaggtgtacg accccgagca acgcaaacgc atgatcactg ggcctcagtg gtgggctcgc	840
[0970]	tgcaagcaaa tgaacgtgct ggactccttc atcaactact atgattccga gaagcacgcc	900
[0971]	gagaacgccg tgatttttct gcatggtaac gctgcctcca gctacctgtg gaggcacgtc	960
[0972]	gtgcctcaca tcgagcccgt ggctagatgc atcatccctg atctgatcgg aatgggtaag	1020
[0973]	tccgcaaga gcgggaatgg ctcatatcgc ctcttgatc actacaagta cctcaccgt	1080
[0974]	tggttcgagc tgctgaacct tccaaagaaa atcatctttg tgggccacga ctggggggct	1140
[0975]	gctctggcct ttactactc ctacgagcac caagacaaga tcaaggccat cgtccatgct	1200
[0976]	gagagtgtcg tggacgtgat cgagtcctgg gacgagtggc ctgacatcga ggaggatata	1260
[0977]	gccctgatca agagcgaaga gggcgagaaa atgggtgctg agaataactt ctctctcgag	1320
[0978]	accgtgctcc caagcaagat catgcggaaa ctggagcctg aggagtctgc tgcctacctg	1380
[0979]	gagccattca aggagaaggc cgaggtaga cggcctaccc tctctggcc tcgcgagatc	1440
[0980]	cctctcgtaa agggaggcaa gcccagcgtc gtccagattg tccgcaacta caacgcctac	1500
[0981]	cttcgggcca gcgacgatct gcctaagatg ttcatcgagt ccgaccctgg gttcttttcc	1560
[0982]	aacgtatttg tcgagggagc taagaagttc cctaacaccg agttcgtgaa ggtgaagggc	1620
[0983]	ctccacttca gccaggagga cgctccagat gaaatgggta agtacatcaa gagcttcgtg	1680
[0984]	gagcgcgtgc tgaagaacga gcagtaactc gag	1713
[0985]	<210>	103
[0986]	<211>	1713
[0987]	<212>	DNA
[0988]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0989]	<220>	
[0990]	<223>	蛋白酶传感器分子
[0991]	<400>	103
[0992]	gaattcatgg tgagcaaggc cgaggagctg ttcaccgggg tggtgcccac cctggctcag	60
[0993]	ctggacggcg acgtaaacgg ccacaagtgc agcgtgtccg gcgaggcgga gggcgatgcc	120
[0994]	acctacggca agctgacct gaagttcatc tgcaccaccg gcaagctgcc cgtgccctgg	180
[0995]	cccaccctcg tgaccacct gagctacggc gtgcagtget tcagccgcta ccccgaccac	240
[0996]	atgaagcagc acgacttctt caagtcgcc atgcccgaag gctacgtcca ggagcgcacc	300
[0997]	atcttcttca aggacgacgg caactacaag acccgcgccg aggtgaagtt cgaggcgac	360
[0998]	acctgggtga accgcatcga gctgaagggc atcgacttca aggaggacgg caacatcctg	420
[0999]	gggcacaagc tggagtacaa ctacaacagc cacaacgtct atatcatggc cgacaagcag	480
[1000]	aagaacggca tcaagtgaa cttcaagatc cgccacaaca tcgaggacgg cagcgtgcag	540
[1001]	ctcgccgacc actaccagca gaacaccccc atcggcgacg gccccgtgct gctgcccgc	600
[1002]	aaccactacc tgagcaccca gtccgccctg agcaaagacc ccaacgagaa gcgcgatcac	660
[1003]	atggtcctgc tggagtctgt gaccgccgcc gggatcactc tcggcatgga cgagctgtac	720
[1004]	aagctgcagg gttcctttat gaaccagaac actgaaatcg gaagcttcga aatggcttcc	780
[1005]	aaggtgtacg accccgagca acgcaaacgc atgatcactg ggcctcagtg gtgggctcgc	840
[1006]	tgcaagcaaa tgaacgtgct ggactccttc atcaactact atgattccga gaagcacgcc	900
[1007]	gagaacgccg tgatttttct gcatggtaac gctgcctcca gctacctgtg gaggcacgtc	960

[1008]	gtgcctcaca tcgagcccggt ggctagatgc atcatccctg atctgatcgg aatgggtaag	1020
[1009]	tccggcaaga gcggaatgg ctcatatcgc ctctggatc actacaagta cctcaccgct	1080
[1010]	tggttcgagc tgctgaacct tccaaagaaa atcatctttg tgggccacga ctggggggct	1140
[1011]	gctctggcct ttcactactc ctacgagcac caagacaaga tcaaggccat cgtccatgct	1200
[1012]	gagagtgtcg tggacgtgat cgagtcctgg gacgagtggc ctgacatcga ggaggatc	1260
[1013]	gccctgatca agagcgaaga gggcgagaaa atgggtgctt agaataactt cttcgtcgag	1320
[1014]	accgtgctcc caagcaagat catgcgaaa ctggagcctg aggagtctgc tgcctacctg	1380
[1015]	gagccattca aggagaagg cgaggttaga cggcctaccc tctcctggcc tcgcgagatc	1440
[1016]	cctctcgta aggaggcaa gcccgcgtc gtccagattg tccgcaacta caacgcctac	1500
[1017]	cttcgggcca gcgacatct gcctaagatg ttcacgagt ccgaccctgg gttcttttcc	1560
[1018]	aacgtattg tcgaggagc taagaagttc ctaacaccg agttcgtgaa ggtgaagggc	1620
[1019]	ctccacttca gccaggagga cgctccagat gaaatgggta agtacatcaa gagcttcgtg	1680
[1020]	gagcgcgtgc tgaagaacga gcagtaactc gag	1713
[1021]	<210>	104
[1022]	<211>	1710
[1023]	<212>	DNA
[1024]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[1025]	<220>	
[1026]	<223>	蛋白酶传感器分子
[1027]	<400>	104
[1028]	gaattcatgg tgagcaagg cgaggagctg ttcaccgggg tggtgccc	60
[1029]	ctggacggcg acgtaaacgg ccacaagttc agcgtgtccg gcgagggcga gggcgatgcc	120
[1030]	acctacggca agctgaccct gaagttcatc tgcaccaccg gcaagctgcc cgtgccctgg	180
[1031]	cccaccctcg tgaccaccct gagctacggc gtgcagtgtc tcagccgcta ccccgaccac	240
[1032]	atgaagcagc acgacttctt caagtccgcc atgcccgaag gctacgtcca ggagcgcacc	300
[1033]	atcttcttca aggacgacgg caactacaag acccgcgccg aggtgaagtt cgagggcgac	360
[1034]	accctgggtga accgcatcga gctgaagggc atcgacttca aggaggacgg caacatcctg	420
[1035]	gggcacaagc tggagtacaa ctacaacagc cacaacgtct atatcatggc cgacaagcag	480
[1036]	aagaacggca tcaagtgaa cttcaagatc cgccacaaca tcgaggacgg cagcgtgcag	540
[1037]	ctcgccgacc actaccagca gaacaccccc atcggcgacg gccccgtgct gctgcccgac	600
[1038]	aaccactacc tgagcaccca gtccgcccctg agcaaagacc ccaacgagaa gcgcgatcac	660
[1039]	atggtcctgc tggagtctgt gaccgcccgc gggatcactc tcggcatgga cgagctgtac	720
[1040]	aagctgcagg gctctttaag ctttatggcc atccctgggt ccttcgaaat ggcttccaag	780
[1041]	gtgtacgacc ccgagcaacg caaacgcatt atcactgggc ctacgtggtg ggctcgtgct	840
[1042]	aagcaaatga acgtgctgga ctcttctatc aactactatg attccgagaa gcacgccgag	900
[1043]	aacgccgtga tttttctgca tggtaacgct gcctccagct acctgtggag gcacgtcgtg	960
[1044]	cctcacatcg agcccgtggc tagatgcac atccctgac tgatcggaat gggtaagtcc	1020
[1045]	ggcaagagcg ggaatggctc atatcgctc ctggatcaact acaagtacct caccgcttgg	1080
[1046]	ttcagctgct tgaaccttcc aaagaaaatc atctttgtgg gccacgactg gggggctgct	1140
[1047]	ctggcctttc actactccta cgagcaccaa gacaagatca aggccatcgt ccatgctgag	1200
[1048]	agtgtcgtgg acgtgatcga gtccctgggac gactggcctg acatcgagga ggatatcgcc	1260
[1049]	ctgatcaaga gcgaagagg cgagaaaatg gtgcttgaga ataacttctt cgtcgagacc	1320

[1050]	gtgctcccaa gcaagatcat gcggaaactg gagcctgagg agttcgctgc ctacctggag	1380
[1051]	ccattcaagg agaagggcga ggtagacgg cctaccctct cctggcctcg cgagatccct	1440
[1052]	ctcgtaagg gaggcaagcc cgacgtcgtc cagattgtcc gcaactacaa cgcctacctt	1500
[1053]	cgggccagcg acgatctgcc taagatgttc atcgagtccg accctgggtt cttttccaac	1560
[1054]	gctattgtcg agggagctaa gaagttccct aacaccgagt tcgtgaaggt gaagggcctc	1620
[1055]	cacttcagcc aggaggacgc tccagatgaa atgggtaagt acatcaagag cttcgtggag	1680
[1056]	cgcgtgctga agaacgagca gtaactcgag	1710
[1057]	<210>	105
[1058]	<211>	568
[1059]	<212>	PRT
[1060]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[1061]	<220>	
[1062]	<223>	蛋白酶传感器分子
[1063]	<400>	105
[1064]	Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu	
[1065]	1 5 10 15	
[1066]	Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly	
[1067]	20 25 30	
[1068]	Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile	
[1069]	35 40 45	
[1070]	Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr	
[1071]	50 55 60	
[1072]	Leu Ser Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys	
[1073]	65 70 75 80	
[1074]	Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu	
[1075]	85 90 95	
[1076]	Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu	
[1077]	100 105 110	
[1078]	Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly	
[1079]	115 120 125	
[1080]	Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr	
[1081]	130 135 140	
[1082]	Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn	
[1083]	145 150 155 160	
[1084]	Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser	
[1085]	165 170 175	
[1086]	Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly	
[1087]	180 185 190	
[1088]	Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu	
[1089]	195 200 205	
[1090]	Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe	
[1091]	210 215 220	

[1092]	Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Leu
[1093]	225 230 235 240
[1094]	Gln Gly Ser Phe Met Lys Lys Asn Gln Asn Thr Glu Ile Gly Ser Phe
[1095]	245 250 255
[1096]	Glu Met Ala Ser Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg Met Ile
[1097]	260 265 270
[1098]	Thr Gly Pro Gln Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val Leu Asp
[1099]	275 280 285
[1100]	Ser Phe Ile Asn Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn Ala Val
[1101]	290 295 300
[1102]	Ile Phe Leu His Gly Asn Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Trp Arg His Val
[1103]	305 310 315 320
[1104]	Val Pro His Ile Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp Leu Ile
[1105]	325 330 335
[1106]	Gly Met Gly Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg Leu Leu
[1107]	340 345 350
[1108]	Asp His Tyr Lys Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn Leu Pro
[1109]	355 360 365
[1110]	Lys Lys Ile Ile Phe Val Gly His Asp Trp Gly Ala Ala Leu Ala Phe
[1111]	370 375 380
[1112]	His Tyr Ser Tyr Glu His Gln Asp Lys Ile Lys Ala Ile Val His Ala
[1113]	385 390 395 400
[1114]	Glu Ser Val Val Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile
[1115]	405 410 415
[1116]	Glu Glu Asp Ile Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val
[1117]	420 425 430
[1118]	Leu Glu Asn Asn Phe Phe Val Glu Thr Val Leu Pro Ser Lys Ile Met
[1119]	435 440 445
[1120]	Arg Lys Leu Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys
[1121]	450 455 460
[1122]	Glu Lys Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile
[1123]	465 470 475 480
[1124]	Pro Leu Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn
[1125]	485 490 495
[1126]	Tyr Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met Phe Ile
[1127]	500 505 510
[1128]	Glu Ser Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys
[1129]	515 520 525
[1130]	Lys Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Ser
[1131]	530 535 540
[1132]	Gln Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val
[1133]	545 550 555 560

[1134]	Glu Arg Val Leu Lys Asn Glu Gln
[1135]	565
[1136]	<210> 106
[1137]	<211> 566
[1138]	<212> PRT
[1139]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1140]	<220>
[1141]	<223> 蛋白酶传感器分子
[1142]	<400> 106
[1143]	Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
[1144]	1 5 10 15
[1145]	Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
[1146]	20 25 30
[1147]	Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
[1148]	35 40 45
[1149]	Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
[1150]	50 55 60
[1151]	Leu Ser Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
[1152]	65 70 75 80
[1153]	Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
[1154]	85 90 95
[1155]	Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
[1156]	100 105 110
[1157]	Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
[1158]	115 120 125
[1159]	Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
[1160]	130 135 140
[1161]	Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
[1162]	145 150 155 160
[1163]	Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
[1164]	165 170 175
[1165]	Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
[1166]	180 185 190
[1167]	Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
[1168]	195 200 205
[1169]	Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
[1170]	210 215 220
[1171]	Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Leu
[1172]	225 230 235 240
[1173]	Gln Gly Ser Phe Met Asn Gln Asn Thr Glu Ile Gly Ser Phe Glu Met
[1174]	245 250 255
[1175]	Ala Ser Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg Met Ile Thr Gly

[1176]	260	265	270
[1177]	Pro Gln Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val Leu Asp Ser Phe		
[1178]	275	280	285
[1179]	Ile Asn Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn Ala Val Ile Phe		
[1180]	290	295	300
[1181]	Leu His Gly Asn Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Trp Arg His Val Val Pro		
[1182]	305	310	315
[1183]	His Ile Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp Leu Ile Gly Met		
[1184]	325	330	335
[1185]	Gly Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg Leu Leu Asp His		
[1186]	340	345	350
[1187]	Tyr Lys Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn Leu Pro Lys Lys		
[1188]	355	360	365
[1189]	Ile Ile Phe Val Gly His Asp Trp Gly Ala Ala Leu Ala Phe His Tyr		
[1190]	370	375	380
[1191]	Ser Tyr Glu His Gln Asp Lys Ile Lys Ala Ile Val His Ala Glu Ser		
[1192]	385	390	395
[1193]	Val Val Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile Glu Glu		
[1194]	405	410	415
[1195]	Asp Ile Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu Glu		
[1196]	420	425	430
[1197]	Asn Asn Phe Phe Val Glu Thr Val Leu Pro Ser Lys Ile Met Arg Lys		
[1198]	435	440	445
[1199]	Leu Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu Lys		
[1200]	450	455	460
[1201]	Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro Leu		
[1202]	465	470	475
[1203]	Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr Asn		
[1204]	485	490	495
[1205]	Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met Phe Ile Glu Ser		
[1206]	500	505	510
[1207]	Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys Phe		
[1208]	515	520	525
[1209]	Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Ser Gln Glu		
[1210]	530	535	540
[1211]	Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu Arg		
[1212]	545	550	555
[1213]	Val Leu Lys Asn Glu Gln		
[1214]	565		
[1215]	<210> 107		
[1216]	<211> 565		
[1217]	<212> PRT		

[1218]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)															
[1219]	<220>															
[1220]	<223> 蛋白酶传感器分子															
[1221]	<400> 107															
[1222]	Met	Val	Ser	Lys	Gly	Glu	Glu	Leu	Phe	Thr	Gly	Val	Val	Pro	Ile	Leu
[1223]	1				5					10					15	
[1224]	Val	Glu	Leu	Asp	Gly	Asp	Val	Asn	Gly	His	Lys	Phe	Ser	Val	Ser	Gly
[1225]					20					25					30	
[1226]	Glu	Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Thr	Tyr	Gly	Lys	Leu	Thr	Leu	Lys	Phe	Ile
[1227]					35					40					45	
[1228]	Cys	Thr	Thr	Gly	Lys	Leu	Pro	Val	Pro	Trp	Pro	Thr	Leu	Val	Thr	Thr
[1229]					50					55					60	
[1230]	Leu	Ser	Tyr	Gly	Val	Gln	Cys	Phe	Ser	Arg	Tyr	Pro	Asp	His	Met	Lys
[1231]	65					70					75					80
[1232]	Gln	His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser	Ala	Met	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu
[1233]						85					90					95
[1234]	Arg	Thr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp	Asp	Gly	Asn	Tyr	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu
[1235]						100					105					110
[1236]	Val	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	Val	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly
[1237]						115					120					125
[1238]	Ile	Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	Ile	Leu	Gly	His	Lys	Leu	Glu	Tyr
[1239]					130						135					140
[1240]	Asn	Tyr	Asn	Ser	His	Asn	Val	Tyr	Ile	Met	Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn
[1241]	145					150					155					160
[1242]	Gly	Ile	Lys	Val	Asn	Phe	Lys	Ile	Arg	His	Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser
[1243]						165					170					175
[1244]	Val	Gln	Leu	Ala	Asp	His	Tyr	Gln	Gln	Asn	Thr	Pro	Ile	Gly	Asp	Gly
[1245]						180					185					190
[1246]	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Asn	His	Tyr	Leu	Ser	Thr	Gln	Ser	Ala	Leu
[1247]						195					200					205
[1248]	Ser	Lys	Asp	Pro	Asn	Glu	Lys	Arg	Asp	His	Met	Val	Leu	Leu	Glu	Phe
[1249]						210					215					220
[1250]	Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Ile	Thr	Leu	Gly	Met	Asp	Glu	Leu	Tyr	Lys	Leu
[1251]						225					230					240
[1252]	Gln	Gly	Ser	Leu	Ser	Phe	Met	Ala	Ile	Pro	Gly	Ser	Phe	Glu	Met	Ala
[1253]						245					250					255
[1254]	Ser	Lys	Val	Tyr	Asp	Pro	Glu	Gln	Arg	Lys	Arg	Met	Ile	Thr	Gly	Pro
[1255]						260					265					270
[1256]	Gln	Trp	Trp	Ala	Arg	Cys	Lys	Gln	Met	Asn	Val	Leu	Asp	Ser	Phe	Ile
[1257]						275					280					285
[1258]	Asn	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Glu	Lys	His	Ala	Glu	Asn	Ala	Val	Ile	Phe	Leu
[1259]						290					295					300

[1260]	His Gly Asn Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Trp Arg His Val Val Pro His		
[1261]	305	310	315 320
[1262]	Ile Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp Leu Ile Gly Met Gly		
[1263]	325	330	335
[1264]	Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg Leu Leu Asp His Tyr		
[1265]	340	345	350
[1266]	Lys Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn Leu Pro Lys Lys Ile		
[1267]	355	360	365
[1268]	Ile Phe Val Gly His Asp Trp Gly Ala Ala Leu Ala Phe His Tyr Ser		
[1269]	370	375	380
[1270]	Tyr Glu His Gln Asp Lys Ile Lys Ala Ile Val His Ala Glu Ser Val		
[1271]	385	390	395 400
[1272]	Val Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile Glu Glu Asp		
[1273]	405	410	415
[1274]	Ile Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu Glu Asn		
[1275]	420	425	430
[1276]	Asn Phe Phe Val Glu Thr Val Leu Pro Ser Lys Ile Met Arg Lys Leu		
[1277]	435	440	445
[1278]	Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu Lys Gly		
[1279]	450	455	460
[1280]	Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro Leu Val		
[1281]	465	470	475 480
[1282]	Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr Asn Ala		
[1283]	485	490	495
[1284]	Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met Phe Ile Glu Ser Asp		
[1285]	500	505	510
[1286]	Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys Phe Pro		
[1287]	515	520	525
[1288]	Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Ser Gln Glu Asp		
[1289]	530	535	540
[1290]	Ala Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu Arg Val		
[1291]	545	550	555 560
[1292]	Leu Lys Asn Glu Gln		
[1293]	565		
[1294]	<210> 108		
[1295]	<211> 1710		
[1296]	<212> DNA		
[1297]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[1298]	<220>		
[1299]	<223> 蛋白酶传感器分子		
[1300]	<400> 108		
[1301]	gaattcatgg tgagcaaggg cgaggagctg ttcaccgggg tggtgcccat cctggtcgag 60		

[1302]	ctggacggcg acgtaaacgg ccacaagttc agcgtgtccg gcgagggcga gggcgatgcc	120
[1303]	acctacggca agctgaccct gaagttcatc tgcaccaccg gcaagctgcc cgtgccctgg	180
[1304]	cccaccctcg tgaccaccct gagctacggc gtgcagtgtc tcagccgcta ccccgaccac	240
[1305]	atgaagcagc acgacttctt caagtccgcc atgcccgaag gctacgtcca ggagcgcacc	300
[1306]	atcttcttca aggacgacgg caactacaag acccgcgccg aggtgaagtt cgagggcgac	360
[1307]	accctgggtga accgcatcga gctgaagggc atcgacttca aggaggacgg caacatcctg	420
[1308]	gggcacaagc tggagtacaa ctacaacagc cacaacgtct atatcatggc cgacaagcag	480
[1309]	aagaacggca tcaagtgaa cttcaagatc cgccacaaca tcgaggacgg cagcgtgcag	540
[1310]	ctcgccgacc actaccagca gaacaccccc atcggcgacg gccccgtgtc gctgcccgc	600
[1311]	aaccactacc tgagcaccca gtccgcccctg agcaaagacc ccaacgagaa gcgcgatcac	660
[1312]	atggtcctgc tggagtctgt gaccgcccgc gggatcactc tcggcatgga cgagctgtac	720
[1313]	aagctgcagg gttccaaaaa gtataaagtt aaggaaggat cacttcagat ggcttccaag	780
[1314]	gtgtacgacc ccgagcaacg caaacgcatt atcactgggc ctacgtgtgt ggctcgtgc	840
[1315]	aagcaaatac acgtgctgga ctccttcatt aactactatg attccgagaa gcacgccgag	900
[1316]	aacgccgtga tttttctgca tggtaacgct gcctccagct acctgtggag gcacgtcgtg	960
[1317]	cctcacatcg agccccgtgc tagatgcatt atccctgatt tgatcggaat gggtaagtcc	1020
[1318]	ggcaagagcg ggaatggctc atatcgctc ctggatcact acaagtacct caccgcttgg	1080
[1319]	ttcgagctgc tgaaccttcc aaagaaaatc atctttgtgg gccacgactg gggggctgct	1140
[1320]	ctggcctttc actactccta cgagcaccaa gacaagatca aggccatcgt ccatgctgag	1200
[1321]	agtgtcgtgg acgtgatcga gtctgtggac gagggtcctg acatcgagga ggatatgcc	1260
[1322]	ctgatcaaga gcgaagaggg cgagaaaatg gtgcttgaga ataacttctt cgtcgagacc	1320
[1323]	gtgctcccaa gcaagatcat gcggaactg gagcctgagg agttcgtgc ctacctggag	1380
[1324]	ccattcaagg agaaggcgga ggttagacgg cctaccctct cctggcctcg cgagatccct	1440
[1325]	ctcgtaaggg gaggcaagcc cgacgtcgtc cagattgtcc gcaactacaa cgcctacctt	1500
[1326]	cgggccagcg acgatctgcc taagatgttc atcgagtcg accctgggtt cttttccaac	1560
[1327]	gctattgtcg agggagctaa gaagttccct aacaccgagt tcgtgaaggt gaagggcctc	1620
[1328]	cacttcagcc aggaggacgc tccagatgaa atgggtaagt acatcaagag cttcgtggag	1680
[1329]	cgcgtgctga agaacgagca gtaactcgag	1710
[1330]	<210>	109
[1331]	<211>	565
[1332]	<212>	PRT
[1333]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[1334]	<220>	
[1335]	<223>	蛋白酶传感器分子
[1336]	<400>	109
[1337]	Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu	
[1338]	1 5 10 15	
[1339]	Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly	
[1340]	20 25 30	
[1341]	Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile	
[1342]	35 40 45	
[1343]	Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr	

[1344]	50	55	60
[1345]	Leu Ser Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys		
[1346]	65	70	75
[1347]	Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu		
[1348]	85	90	95
[1349]	Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu		
[1350]	100	105	110
[1351]	Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly		
[1352]	115	120	125
[1353]	Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr		
[1354]	130	135	140
[1355]	Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn		
[1356]	145	150	155
[1357]	Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser		
[1358]	165	170	175
[1359]	Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly		
[1360]	180	185	190
[1361]	Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu		
[1362]	195	200	205
[1363]	Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe		
[1364]	210	215	220
[1365]	Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Leu		
[1366]	225	230	235
[1367]	Gln Gly Ser Lys Lys Tyr Lys Val Lys Glu Gly Ser Leu Gln Met Ala		
[1368]	245	250	255
[1369]	Ser Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg Met Ile Thr Gly Pro		
[1370]	260	265	270
[1371]	Gln Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val Leu Asp Ser Phe Ile		
[1372]	275	280	285
[1373]	Asn Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn Ala Val Ile Phe Leu		
[1374]	290	295	300
[1375]	His Gly Asn Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Trp Arg His Val Val Pro His		
[1376]	305	310	315
[1377]	Ile Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp Leu Ile Gly Met Gly		
[1378]	325	330	335
[1379]	Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg Leu Leu Asp His Tyr		
[1380]	340	345	350
[1381]	Lys Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn Leu Pro Lys Lys Ile		
[1382]	355	360	365
[1383]	Ile Phe Val Gly His Asp Trp Gly Ala Ala Leu Ala Phe His Tyr Ser		
[1384]	370	375	380
[1385]	Tyr Glu His Gln Asp Lys Ile Lys Ala Ile Val His Ala Glu Ser Val		

[1386]	385	390	395	400
[1387]	Val Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile Glu Glu Asp			
[1388]		405	410	415
[1389]	Ile Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu Glu Asn			
[1390]		420	425	430
[1391]	Asn Phe Phe Val Glu Thr Val Leu Pro Ser Lys Ile Met Arg Lys Leu			
[1392]		435	440	445
[1393]	Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu Lys Gly			
[1394]		450	455	460
[1395]	Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro Leu Val			
[1396]		465	470	475
[1397]	Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr Asn Ala			
[1398]		485	490	495
[1399]	Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met Phe Ile Glu Ser Asp			
[1400]		500	505	510
[1401]	Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys Phe Pro			
[1402]		515	520	525
[1403]	Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Ser Gln Glu Asp			
[1404]		530	535	540
[1405]	Ala Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu Arg Val			
[1406]		545	550	555
[1407]	Leu Lys Asn Glu Gln			560
[1408]		565		
[1409]	<210> 110			
[1410]	<211> 11			
[1411]	<212> PRT			
[1412]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[1413]	<220>			
[1414]	<223> 蛋白酶传感器分子			
[1415]	<220>			
[1416]	<221> X			
[1417]	<222> (3) .. (6)			
[1418]	<223> X可以是任何氨基酸			
[1419]	<220>			
[1420]	<221> Z			
[1421]	<222> (8) .. (8)			
[1422]	<223> Z是赖氨酸、酪氨酸、缬氨酸或谷氨酸			
[1423]	<400> 110			
[1424]	Leu Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Glx Lys Leu Gln			
[1425]	1	5	10	
[1426]	<210> 111			
[1427]	<211> 15			

98

[1470]	1	5	10	15
[1471]	Gly Ser Phe Glu			
[1472]	20			
[1473]	<210> 116			
[1474]	<211> 1701			
[1475]	<212> DNA			
[1476]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[1477]	<220>			
[1478]	<223> 编码GFP2-Pflu-H1-RLuc2的核苷酸序列			
[1479]	<400> 116			
[1480]	atggtgagca	agggcgagga	gctgttcacc	ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60
[1481]	ggcgacgtaa	acggccacaa	gttcagcgtg	tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120
[1482]	ggcaagctga	ccctgaagtt	catctgcacc	accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 180
[1483]	ctcgtgacca	ccctgagcta	cggcgtgcag	tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag 240
[1484]	cagcacgact	tcttcaagtc	cgccatgccc	gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300
[1485]	ttcaaggacg	acggcaacta	caagaccgcg	gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360
[1486]	gtgaaccgca	tcgagctgaa	gggcatcgac	ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420
[1487]	aagctggagt	acaactacaa	cagccacaac	gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480
[1488]	ggcatcaagg	tgaacttcaa	gatccgccac	aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540
[1489]	gaccactacc	agcagaacac	ccccatcggc	gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600
[1490]	tacctgagca	cccagtcgcg	cctgagcaaa	gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc 660
[1491]	ctgctggagt	tcgtgaccgc	cgccgggata	actctcggca tggacgagct gtacaagctg 720
[1492]	cagggaagtc	caccgttgaa	acaaccccc	cctggctcct tcgaaatggc ttccaaggtg 780
[1493]	tacgaccccg	agcaacgcaa	acgcatgata	actgggcctc agtggtgggc tcgctgcaag 840
[1494]	caaatgaacg	tgctggactc	cttcatcaac	tactatgatt ccgagaagca cgccgagaac 900
[1495]	gccgtgattt	ttctgcatgg	taacgtgcc	tccagctacc tgtggaggca cgctcgtcct 960
[1496]	cacatcgagc	ccgtggctag	atgcatcacc	cctgatctga tcggaatggg taagtccggc 1020
[1497]	aagagcggga	atggctcata	tcgcctcctg	gatcactaca agtacctcac cgcttggttc 1080
[1498]	gagctgctga	accttccaaa	gaaaatcacc	tttgtgggcc acgactgggg ggctgctctg 1140
[1499]	gcctttcact	actcctacga	gcaccaagac	aagatcaagg ccatcgtcca tgctgagagt 1200
[1500]	gtcgtggacg	tgatcgagtc	ctgggacgag	tggcctgaca tcgaggagga tatcgccctg 1260
[1501]	atcaagagcg	aagaggcgca	gaaaatggtg	cttgagaata acttcttcgt cgagaccgtg 1320
[1502]	ctcccaagca	agatcatgcg	gaaactggag	cctgaggagt tcgctgccta cctggagcca 1380
[1503]	ttcaaggaga	agggcgaggt	tagacggcct	accctctcct ggctcgcga gatecctctc 1440
[1504]	gttaagggag	gcaagcccga	cgctcgtccg	attgtccgca actacaacgc ctaccttcgg 1500
[1505]	gccagcgacg	atctgcctaa	gatgttcacc	gagtcgcacc ctgggttctt ttccaacgct 1560
[1506]	attgtcgagg	gagctaagaa	gttccctaac	accgagttcg tgaaggtaga gggcctccac 1620
[1507]	ttcagccagg	aggacgtcc	agatgaaatg	ggtaagtaca tcaagagctt cgtggagcgc 1680
[1508]	gtgctgaaga	acgagcagta	a	1701
[1509]	<210> 117			
[1510]	<211> 1707			
[1511]	<212> DNA			

- [1512] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1513] <220>
- [1514] <223> 编码GFP2-Pflu-H2-RLuc2的核苷酸序列
- [1515] <400> 117
- [1516] atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60
- [1517] ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120
- [1518] ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 180
- [1519] ctctgtagca ccctgagcta cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag 240
- [1520] cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300
- [1521] ttcaaggacg acggcaacta caagaccgcg gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360
- [1522] gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420
- [1523] aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480
- [1524] ggcatacagg tgaactcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540
- [1525] gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600
- [1526] tacctgagca ccagtcgcg cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc 660
- [1527] ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggacg actctcgga tggacgagct gtacaagctg 720
- [1528] cagggatctc cacccttaca acaaccgcaa ccgggtagct tcgaaatggc ttccaaggtg 780
- [1529] tacgaccccg agcaacgcaa acgcatgacg actgggcctc agtggtgggc tcgctgcaag 840
- [1530] caaatgaacg tgctggactc cttcatcaac tactatgatt ccgagaagca cgccgagaac 900
- [1531] gccgtgattt ttctgcatgg taacgtgcc tccagctacc tgtggaggca cgctcgtgct 960
- [1532] cacatcgagc ccgtggctag atgcatcacc cctgatctga tcggaatggg taagtccggc 1020
- [1533] aagagcggga atggctcata tcgcctcctg gatcactaca agtacctcac cgcttggttc 1080
- [1534] gagctgctga accttccaaa gaaaatcatc tttgtgggcc acgactgggg ggctgctctg 1140
- [1535] gcctttcact actcctacga gcaccaagac aagatcaagg ccatcgtcca tgctgagagt 1200
- [1536] gtcgtggacg tgatcgagtc ctgggacgag tggcctgaca tcgaggagga tategccctg 1260
- [1537] atcaagagcg aagagggcga gaaaatggtg cttgagaata acttcttcgt cgagaccgtg 1320
- [1538] ctccaagca agatcatgag gaaactggag cctgaggagt tcgctgccta cctggagcca 1380
- [1539] ttcaaggaga agggcgaggt tagacggcct accctctcct ggcctcgca gatccctctc 1440
- [1540] gttaaggag gcaagcccga cgctgtccag attgtccgca actacaacgc ctaccttcgg 1500
- [1541] gccagcgacg atctgcctaa gatgttcacg gagtccgacc ctgggttctt ttccaacgct 1560
- [1542] attgtcgagg gagtaagaa gttccctaac accgagttcg tgaagtgaa gggcctccac 1620
- [1543] ttcagccagg aggacgctcc agatgaaatg ggtaagtaca tcaagagctt cgtggagcgc 1680
- [1544] gtgctgaaga acgagcagta actcgag 1707
- [1545] <210> 118
- [1546] <211> 1707
- [1547] <212> DNA
- [1548] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1549] <220>
- [1550] <223> 编码GFP2-Pflu-H3-RLuc2的核苷酸序列
- [1551] <400> 118
- [1552] atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60
- [1553] ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120

[1554]	ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc	180
[1555]	ctcgtgacca ccctgagcta cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag	240
[1556]	cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc	300
[1557]	ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg	360
[1558]	gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac	420
[1559]	aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac	480
[1560]	ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc	540
[1561]	gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac	600
[1562]	tacctgagca cccagtccgc cctgagcaaa gacccaacg agaagcgcga tcacatggtc	660
[1563]	ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggcatc actctcgga tggacgagct gtacaagctg	720
[1564]	caggggtcta aacaaaaaca gaagcaaaag caaggatcat tcgaaatggc ttccaaggtg	780
[1565]	tacgaccccg agcaacgcaa acgcatgac actgggcctc agtggtgggc tcgctgcaag	840
[1566]	caaatgaacg tgctggactc cttcatcaac tactatgatt ccgagaagca cgccgagaac	900
[1567]	gccgtgattt ttctgcatgg taacgtgcc tccagctacc tgtggaggca cgctcgtcct	960
[1568]	cacatcgagc ccgtggctag atgcatcatc cctgatctga tcggaatggg taagtccggc	1020
[1569]	aagagcggga atggctcata tcgcctcctg gatcactaca agtacctcac cgcttggttc	1080
[1570]	gagctgctga accttccaaa gaaaatcatc tttgtgggcc acgactgggg ggctgctctg	1140
[1571]	gcctttcact actcctacga gcaccaagac aagatcaagg ccatcgtcca tgctgagagt	1200
[1572]	gtcgtggacg tgatcgagtc ctgggacgag tggcctgaca tcgaggagga tatcgccctg	1260
[1573]	atcaagagcg aagaggcgga gaaaatggtg cttgagaata acttcttcgt cgagaccgtg	1320
[1574]	ctcccaagca agatcatgag gaaactggag cctgaggagt tcgctgccta cctggagcca	1380
[1575]	ttcaaggaga agggcgaggt tagacggcct accctctcct ggcctcgcga gatccctctc	1440
[1576]	gttaaggag gcaagcccga cgctcgtccag attgtccga actacaacgc ctaccttcgg	1500
[1577]	gccagcgacg atctgcctaa gatgttcac gagtccgacc ctgggttctt ttccaacgct	1560
[1578]	attgtcgagg gagctaagaa gttccctaac accgagttcg tgaaggtgaa gggcctccac	1620
[1579]	ttcagccagg aggacgtcc agatgaaatg ggtaagtaca tcaagagctt cgtggagcgc	1680
[1580]	gtgctgaaga acgagcagta actcgag	1707
[1581]	<210>	119
[1582]	<211>	1713
[1583]	<212>	DNA
[1584]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[1585]	<220>	
[1586]	<223>	编码GFP2-Pflu-H4-RLuc2的核苷酸序列
[1587]	<400>	119
[1588]	atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac	60
[1589]	ggcgacgtaa acggccacaa gttagcgtg tccggcgagg gcgaggcgga tgccacctac	120
[1590]	ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc	180
[1591]	ctcgtgacca ccctgagcta cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag	240
[1592]	cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc	300
[1593]	ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg	360
[1594]	gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac	420
[1595]	aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac	480

[1596]	ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc	540
[1597]	gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac	600
[1598]	tacctgagca cccagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc	660
[1599]	ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaagctg	720
[1600]	caggggggaa gcggtggtag ttgaaacag cagggcggat caggagggtc tttcgaaatg	780
[1601]	gcttccaagg tgtacgaccc cgagcaacgc aaacgcatga tctactgggc tcagtggtag	840
[1602]	gctcgtgca agcaaatgaa cgtgctggac tccttcatca actactatga ttccgagaag	900
[1603]	cacgccgaga acgccgtgat ttttctgcat ggtaacgtg cctccagcta cctgtggagg	960
[1604]	cacgtcgtgc ctcacatcga gcccgtggct agatgcatca tccctgatct gatcggaatg	1020
[1605]	ggtaagtccg gcaagagcgg gaatggctca tatcgctcc tggatcacta caagtacctc	1080
[1606]	accgcttggc tcgagctgct gaaccttcca aagaaaatca tctttgtggg ccacgactgg	1140
[1607]	ggggtgctc tggccttcca ctactctac gagcaccaag acaagatcaa ggccatcgtc	1200
[1608]	catgctgaga gtgtcgtgga cgtgatcgag tcctgggacg agtggcctga catcgaggag	1260
[1609]	gatatcgccc tgatcaagag cgaagagggc gagaaaatgg tgcttgagaa taacttcttc	1320
[1610]	gtcgagaccg tgctcccaag caagatcatg cggaaactgg agcctgagga gttcgtgcc	1380
[1611]	tacctggagc cattcaagga gaaggcgag gttagacggc ctaccctctc ctggcctcgc	1440
[1612]	gagatccctc tcgttaaggg aggcaagccc gacgtcgtcc agattgtccg caactacaac	1500
[1613]	gcctaccttc gggccagcga cgatctgcct aagatgttca tcgagtccga ccctgggttc	1560
[1614]	ttttccaacg ctattgtcga gggagctaag aagttcccta acaccgagtt cgtgaagggtg	1620
[1615]	aagggcctcc acttcagcca ggaggacgt ccagatgaaa tgggtaagta catcaagagc	1680
[1616]	ttcgtggagc gcgtgctgaa gaacgagcag taa	1713
[1617]	<210>	120
[1618]	<211>	566
[1619]	<212>	PRT
[1620]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[1621]	<220>	
[1622]	<223>	GFP2-Pflu-H1-RLuc2融合蛋白
[1623]	<400>	120
[1624]	Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu	
[1625]	1 5 10 15	
[1626]	Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly	
[1627]	20 25 30	
[1628]	Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile	
[1629]	35 40 45	
[1630]	Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr	
[1631]	50 55 60	
[1632]	Leu Ser Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys	
[1633]	65 70 75 80	
[1634]	Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu	
[1635]	85 90 95	
[1636]	Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu	
[1637]	100 105 110	

[1638]	Val	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	Val	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly
[1639]				115				120					125			
[1640]	Ile	Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	Ile	Leu	Gly	His	Lys	Leu	Glu	Tyr
[1641]			130					135					140			
[1642]	Asn	Tyr	Asn	Ser	His	Asn	Val	Tyr	Ile	Met	Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn
[1643]	145					150					155					160
[1644]	Gly	Ile	Lys	Val	Asn	Phe	Lys	Ile	Arg	His	Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser
[1645]					165					170					175	
[1646]	Val	Gln	Leu	Ala	Asp	His	Tyr	Gln	Gln	Asn	Thr	Pro	Ile	Gly	Asp	Gly
[1647]					180					185					190	
[1648]	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Asn	His	Tyr	Leu	Ser	Thr	Gln	Ser	Ala	Leu
[1649]					195					200					205	
[1650]	Ser	Lys	Asp	Pro	Asn	Glu	Lys	Arg	Asp	His	Met	Val	Leu	Leu	Glu	Phe
[1651]			210					215					220			
[1652]	Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Ile	Thr	Leu	Gly	Met	Asp	Glu	Leu	Tyr	Lys	Leu
[1653]	225					230					235					240
[1654]	Gln	Gly	Ser	Pro	Pro	Leu	Lys	Gln	Pro	Pro	Pro	Gly	Ser	Phe	Glu	Met
[1655]					245					250					255	
[1656]	Ala	Ser	Lys	Val	Tyr	Asp	Pro	Glu	Gln	Arg	Lys	Arg	Met	Ile	Thr	Gly
[1657]					260					265					270	
[1658]	Pro	Gln	Trp	Trp	Ala	Arg	Cys	Lys	Gln	Met	Asn	Val	Leu	Asp	Ser	Phe
[1659]					275					280					285	
[1660]	Ile	Asn	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Glu	Lys	His	Ala	Glu	Asn	Ala	Val	Ile	Phe
[1661]					290					295					300	
[1662]	Leu	His	Gly	Asn	Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Trp	Arg	His	Val	Val	Pro
[1663]	305					310						315				320
[1664]	His	Ile	Glu	Pro	Val	Ala	Arg	Cys	Ile	Ile	Pro	Asp	Leu	Ile	Gly	Met
[1665]					325						330				335	
[1666]	Gly	Lys	Ser	Gly	Lys	Ser	Gly	Asn	Gly	Ser	Tyr	Arg	Leu	Leu	Asp	His
[1667]					340						345				350	
[1668]	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Thr	Ala	Trp	Phe	Glu	Leu	Leu	Asn	Leu	Pro	Lys	Lys
[1669]					355					360					365	
[1670]	Ile	Ile	Phe	Val	Gly	His	Asp	Trp	Gly	Ala	Ala	Leu	Ala	Phe	His	Tyr
[1671]					370					375					380	
[1672]	Ser	Tyr	Glu	His	Gln	Asp	Lys	Ile	Lys	Ala	Ile	Val	His	Ala	Glu	Ser
[1673]	385						390					395				400
[1674]	Val	Val	Asp	Val	Ile	Glu	Ser	Trp	Asp	Glu	Trp	Pro	Asp	Ile	Glu	Glu
[1675]					405						410				415	
[1676]	Asp	Ile	Ala	Leu	Ile	Lys	Ser	Glu	Glu	Gly	Glu	Lys	Met	Val	Leu	Glu
[1677]					420						425				430	
[1678]	Asn	Asn	Phe	Phe	Val	Glu	Thr	Val	Leu	Pro	Ser	Lys	Ile	Met	Arg	Lys
[1679]					435					440					445	

[1680]	Leu Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu Lys
[1681]	450 455 460
[1682]	Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro Leu
[1683]	465 470 475 480
[1684]	Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr Asn
[1685]	485 490 495
[1686]	Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met Phe Ile Glu Ser
[1687]	500 505 510
[1688]	Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys Phe
[1689]	515 520 525
[1690]	Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Ser Gln Glu
[1691]	530 535 540
[1692]	Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu Arg
[1693]	545 550 555 560
[1694]	Val Leu Lys Asn Glu Gln
[1695]	565
[1696]	<210> 121
[1697]	<211> 567
[1698]	<212> PRT
[1699]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1700]	<220>
[1701]	<223> GFP2-Pflu-H2-RLuc2融合蛋白
[1702]	<400> 121
[1703]	Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
[1704]	1 5 10 15
[1705]	Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
[1706]	20 25 30
[1707]	Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
[1708]	35 40 45
[1709]	Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
[1710]	50 55 60
[1711]	Leu Ser Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
[1712]	65 70 75 80
[1713]	Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
[1714]	85 90 95
[1715]	Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
[1716]	100 105 110
[1717]	Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
[1718]	115 120 125
[1719]	Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
[1720]	130 135 140
[1721]	Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn

[1722]	145	150	155	160
[1723]	Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser			
[1724]		165	170	175
[1725]	Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly			
[1726]		180	185	190
[1727]	Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu			
[1728]		195	200	205
[1729]	Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe			
[1730]		210	215	220
[1731]	Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Leu			
[1732]		225	230	235
[1733]	Gln Gly Ser Pro Pro Leu Gln Gln Pro Gln Pro Gly Ser Phe Glu Met			
[1734]		245	250	255
[1735]	Ala Ser Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg Met Ile Thr Gly			
[1736]		260	265	270
[1737]	Pro Gln Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val Leu Asp Ser Phe			
[1738]		275	280	285
[1739]	Ile Asn Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn Ala Val Ile Phe			
[1740]		290	295	300
[1741]	Leu His Gly Asn Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Trp Arg His Val Val Pro			
[1742]		305	310	315
[1743]	His Ile Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp Leu Ile Gly Met			
[1744]		325	330	335
[1745]	Gly Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg Leu Leu Asp His			
[1746]		340	345	350
[1747]	Tyr Lys Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn Leu Pro Lys Lys			
[1748]		355	360	365
[1749]	Ile Ile Phe Val Gly His Asp Trp Gly Ala Ala Leu Ala Phe His Tyr			
[1750]		370	375	380
[1751]	Ser Tyr Glu His Gln Asp Lys Ile Lys Ala Ile Val His Ala Glu Ser			
[1752]		385	390	395
[1753]	Val Val Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile Glu Glu			
[1754]		405	410	415
[1755]	Asp Ile Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu Glu			
[1756]		420	425	430
[1757]	Asn Asn Phe Phe Val Glu Thr Val Leu Pro Ser Lys Ile Met Arg Lys			
[1758]		435	440	445
[1759]	Leu Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu Lys			
[1760]		450	455	460
[1761]	Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro Leu			
[1762]		465	470	475
[1763]	Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr Asn			

[1764]	485	490	495
[1765]	Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met Phe Ile Glu Ser		
[1766]	500	505	510
[1767]	Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys Phe		
[1768]	515	520	525
[1769]	Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Ser Gln Glu		
[1770]	530	535	540
[1771]	Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu Arg		
[1772]	545	550	555
[1773]	Val Leu Lys Asn Glu Gln Glu		560
[1774]	565		
[1775]	<210> 122		
[1776]	<211> 566		
[1777]	<212> PRT		
[1778]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[1779]	<220>		
[1780]	<223> GFP2-Pflu-H3-RLuc2融合蛋白		
[1781]	<400> 122		
[1782]	Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu		
[1783]	1	5	10
[1784]	Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly		15
[1785]	20	25	30
[1786]	Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile		
[1787]	35	40	45
[1788]	Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr		
[1789]	50	55	60
[1790]	Leu Ser Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys		
[1791]	65	70	75
[1792]	Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu		80
[1793]	85	90	95
[1794]	Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu		
[1795]	100	105	110
[1796]	Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly		
[1797]	115	120	125
[1798]	Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr		
[1799]	130	135	140
[1800]	Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn		
[1801]	145	150	155
[1802]	Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser		160
[1803]	165	170	175
[1804]	Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly		
[1805]	180	185	190

[1806]	Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu		
[1807]	195	200	205
[1808]	Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe		
[1809]	210	215	220
[1810]	Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Leu		
[1811]	225	230	235
[1812]	Gln Gly Ser Lys Gln Lys Gln Lys Gln Lys Gln Gly Ser Phe Glu Met		
[1813]	245	250	255
[1814]	Ala Ser Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg Met Ile Thr Gly		
[1815]	260	265	270
[1816]	Pro Gln Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val Leu Asp Ser Phe		
[1817]	275	280	285
[1818]	Ile Asn Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn Ala Val Ile Phe		
[1819]	290	295	300
[1820]	Leu His Gly Asn Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Trp Arg His Val Val Pro		
[1821]	305	310	315
[1822]	His Ile Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp Leu Ile Gly Met		
[1823]	325	330	335
[1824]	Gly Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg Leu Leu Asp His		
[1825]	340	345	350
[1826]	Tyr Lys Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn Leu Pro Lys Lys		
[1827]	355	360	365
[1828]	Ile Ile Phe Val Gly His Asp Trp Gly Ala Ala Leu Ala Phe His Tyr		
[1829]	370	375	380
[1830]	Ser Tyr Glu His Gln Asp Lys Ile Lys Ala Ile Val His Ala Glu Ser		
[1831]	385	390	395
[1832]	Val Val Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile Glu Glu		
[1833]	405	410	415
[1834]	Asp Ile Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu Glu		
[1835]	420	425	430
[1836]	Asn Asn Phe Phe Val Glu Thr Val Leu Pro Ser Lys Ile Met Arg Lys		
[1837]	435	440	445
[1838]	Leu Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu Lys		
[1839]	450	455	460
[1840]	Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro Leu		
[1841]	465	470	475
[1842]	Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr Asn		
[1843]	485	490	495
[1844]	Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met Phe Ile Glu Ser		
[1845]	500	505	510
[1846]	Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys Phe		
[1847]	515	520	525

[1848]	Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Ser Gln Glu
[1849]	530 535 540
[1850]	Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu Arg
[1851]	545 550 555 560
[1852]	Val Leu Lys Asn Glu Gln
[1853]	565
[1854]	<210> 123
[1855]	<211> 570
[1856]	<212> PRT
[1857]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1858]	<220>
[1859]	<223> GFP2-Pflu-H4-RLuc2融合蛋白
[1860]	<400> 123
[1861]	Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
[1862]	1 5 10 15
[1863]	Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
[1864]	20 25 30
[1865]	Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
[1866]	35 40 45
[1867]	Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
[1868]	50 55 60
[1869]	Leu Ser Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
[1870]	65 70 75 80
[1871]	Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
[1872]	85 90 95
[1873]	Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
[1874]	100 105 110
[1875]	Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
[1876]	115 120 125
[1877]	Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
[1878]	130 135 140
[1879]	Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
[1880]	145 150 155 160
[1881]	Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
[1882]	165 170 175
[1883]	Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
[1884]	180 185 190
[1885]	Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
[1886]	195 200 205
[1887]	Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
[1888]	210 215 220
[1889]	Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Leu

[1890]	225	230	235	240
[1891]	Gln Gly Gly Ser Gly Gly Ser Leu Lys Gln Gln Gly Gly Ser Gly Gly			
[1892]		245	250	255
[1893]	Ser Phe Glu Met Ala Ser Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg			
[1894]		260	265	270
[1895]	Met Ile Thr Gly Pro Gln Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val			
[1896]		275	280	285
[1897]	Leu Asp Ser Phe Ile Asn Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn			
[1898]		290	295	300
[1899]	Ala Val Ile Phe Leu His Gly Asn Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Trp Arg			
[1900]	305	310	315	320
[1901]	His Val Val Pro His Ile Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp			
[1902]		325	330	335
[1903]	Leu Ile Gly Met Gly Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg			
[1904]		340	345	350
[1905]	Leu Leu Asp His Tyr Lys Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn			
[1906]		355	360	365
[1907]	Leu Pro Lys Lys Ile Ile Phe Val Gly His Asp Trp Gly Ala Ala Leu			
[1908]		370	375	380
[1909]	Ala Phe His Tyr Ser Tyr Glu His Gln Asp Lys Ile Lys Ala Ile Val			
[1910]	385	390	395	400
[1911]	His Ala Glu Ser Val Val Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro			
[1912]		405	410	415
[1913]	Asp Ile Glu Glu Asp Ile Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys			
[1914]		420	425	430
[1915]	Met Val Leu Glu Asn Asn Phe Phe Val Glu Thr Val Leu Pro Ser Lys			
[1916]		435	440	445
[1917]	Ile Met Arg Lys Leu Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro			
[1918]		450	455	460
[1919]	Phe Lys Glu Lys Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg			
[1920]	465	470	475	480
[1921]	Glu Ile Pro Leu Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val			
[1922]		485	490	495
[1923]	Arg Asn Tyr Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met			
[1924]		500	505	510
[1925]	Phe Ile Glu Ser Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly			
[1926]		515	520	525
[1927]	Ala Lys Lys Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His			
[1928]		530	535	540
[1929]	Phe Ser Gln Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser			
[1930]	545	550	555	560
[1931]	Phe Val Glu Arg Val Leu Lys Asn Glu Gln			

[1932]	565	570
--------	-----	-----

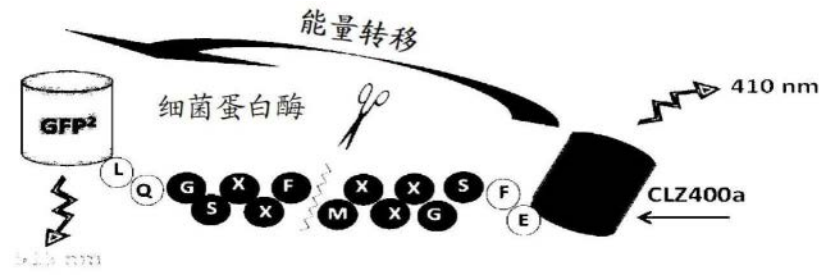


图1

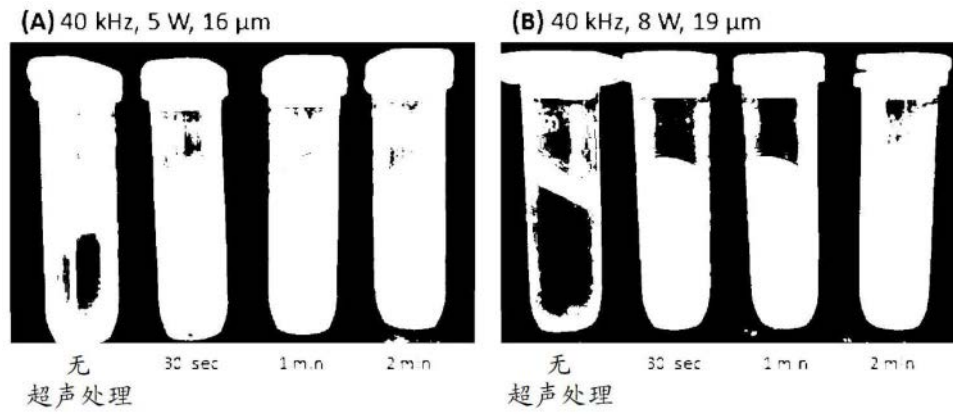


图2

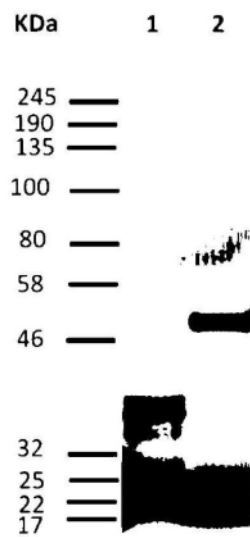


图3

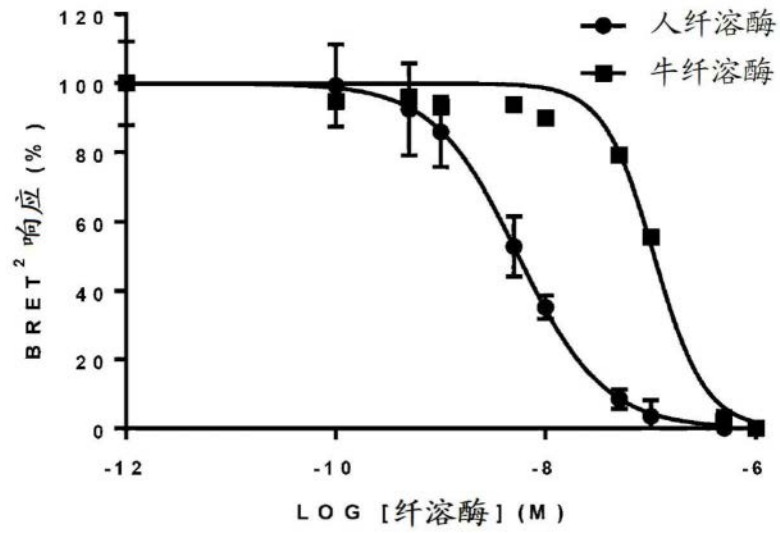


图4

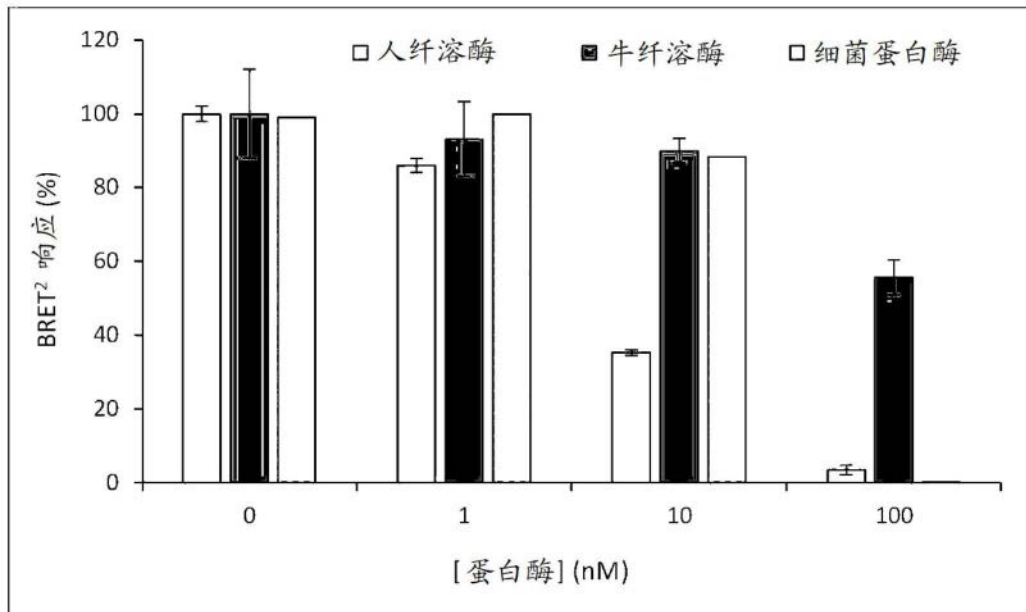


图5

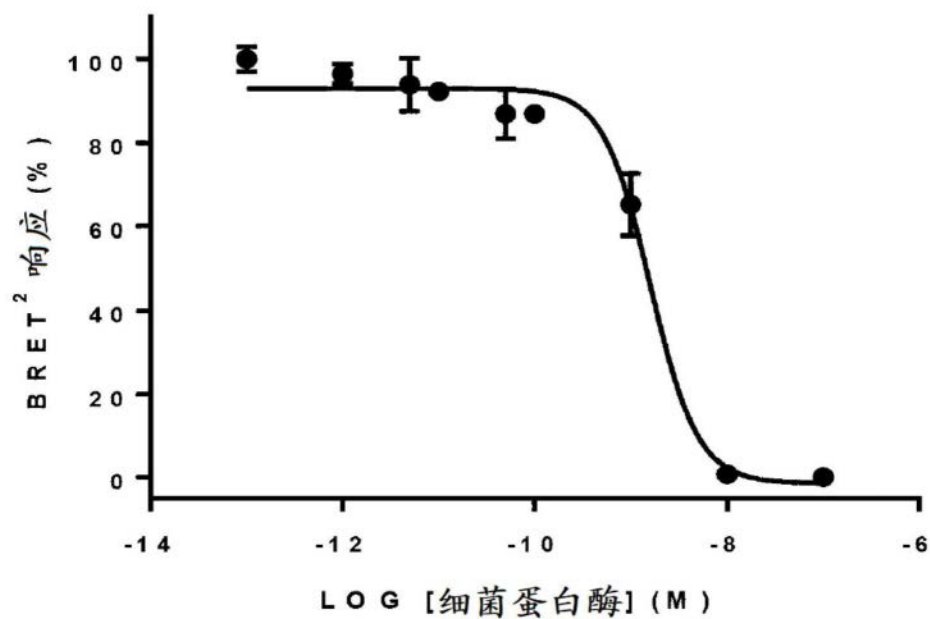


图6

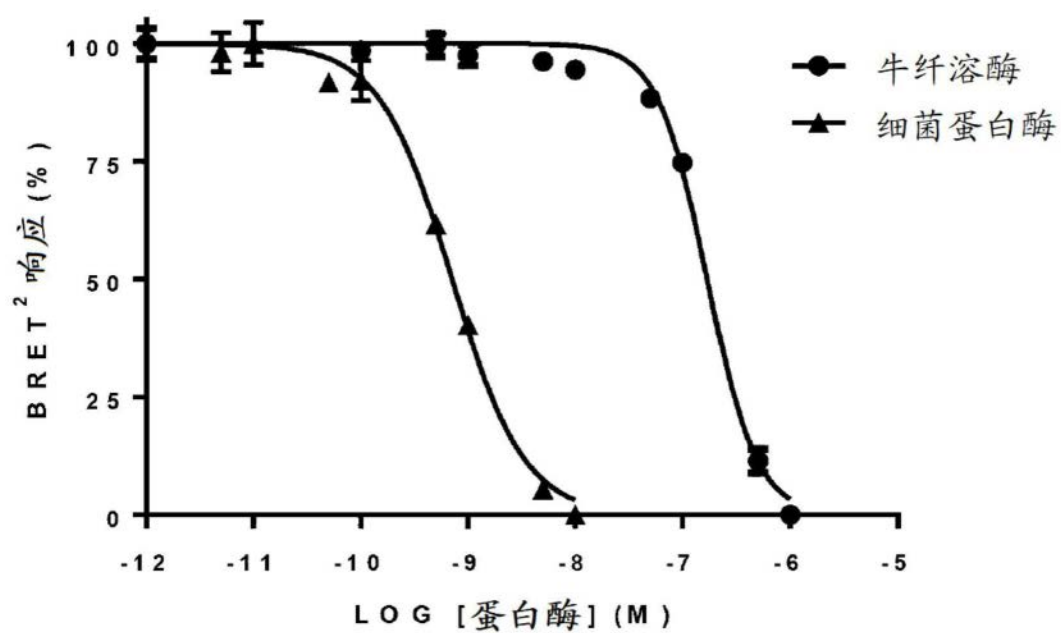


图7

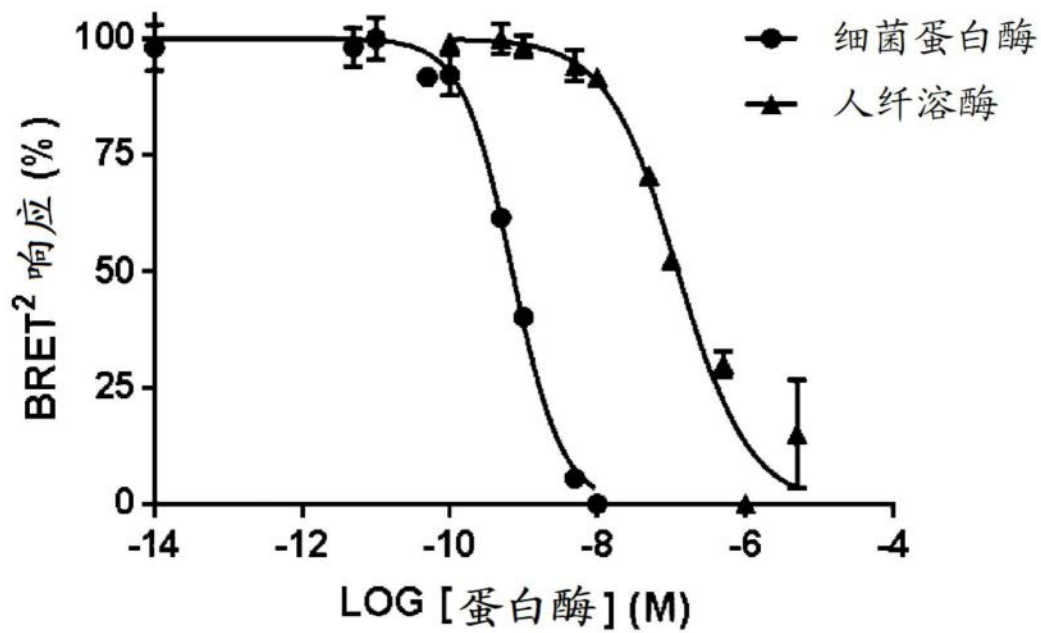


图8

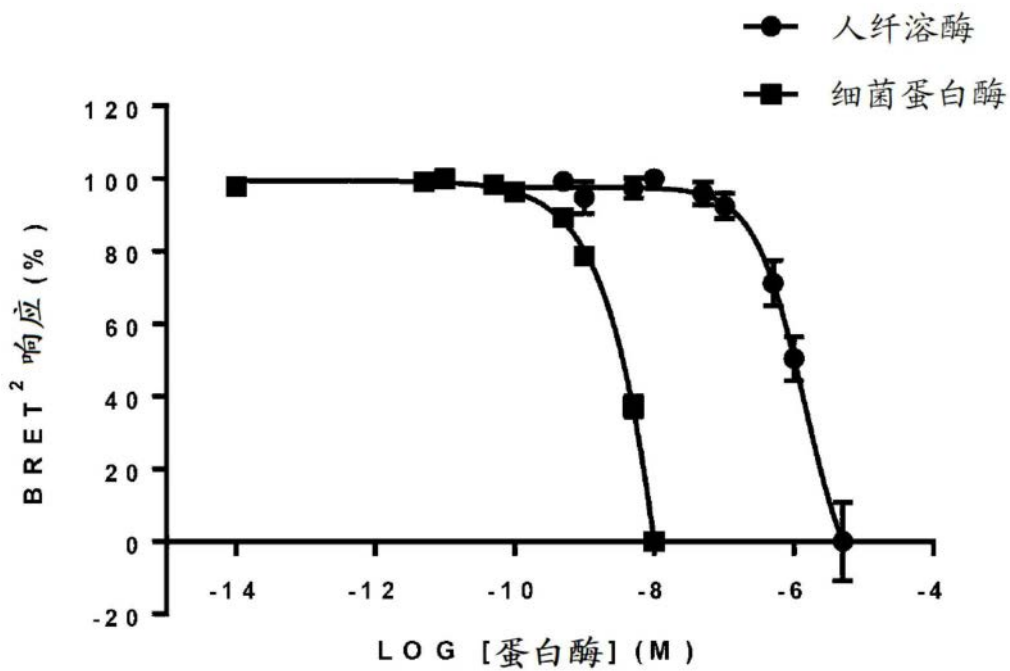


图9

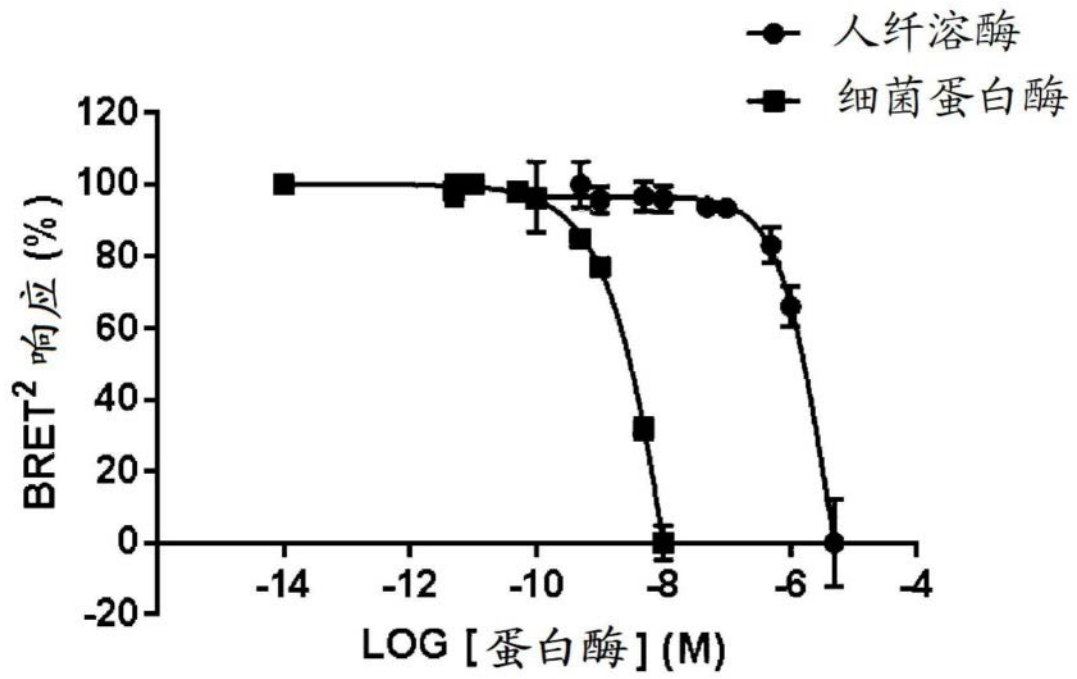


图10

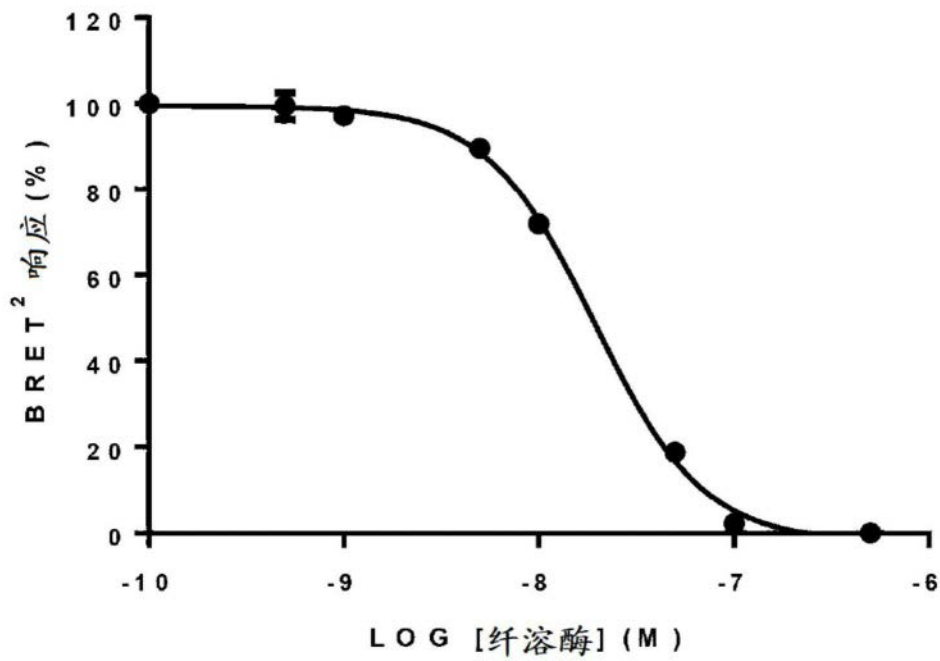


图11

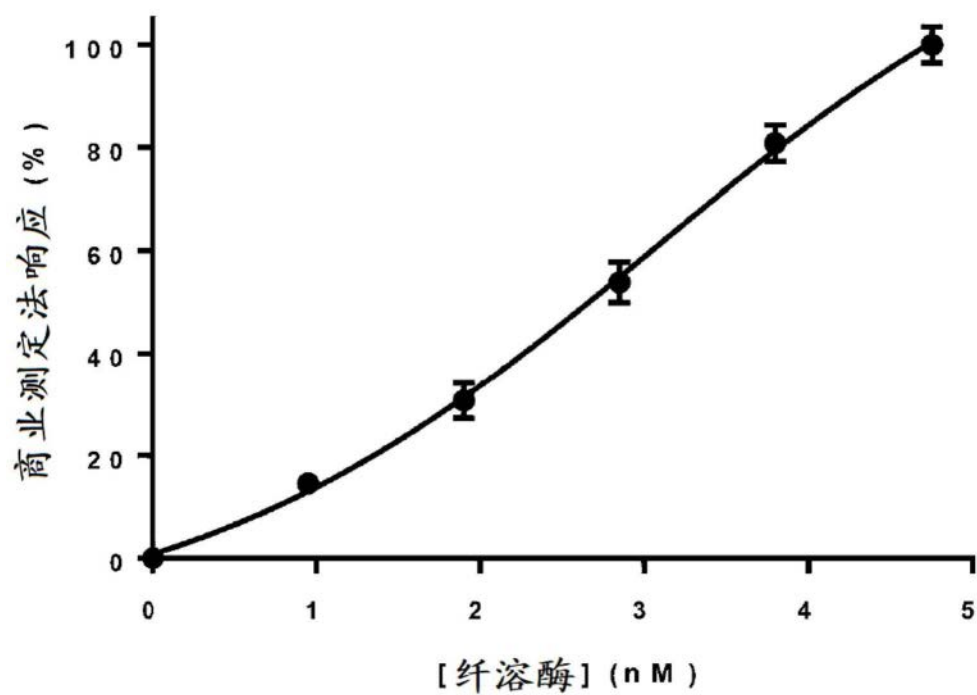


图12

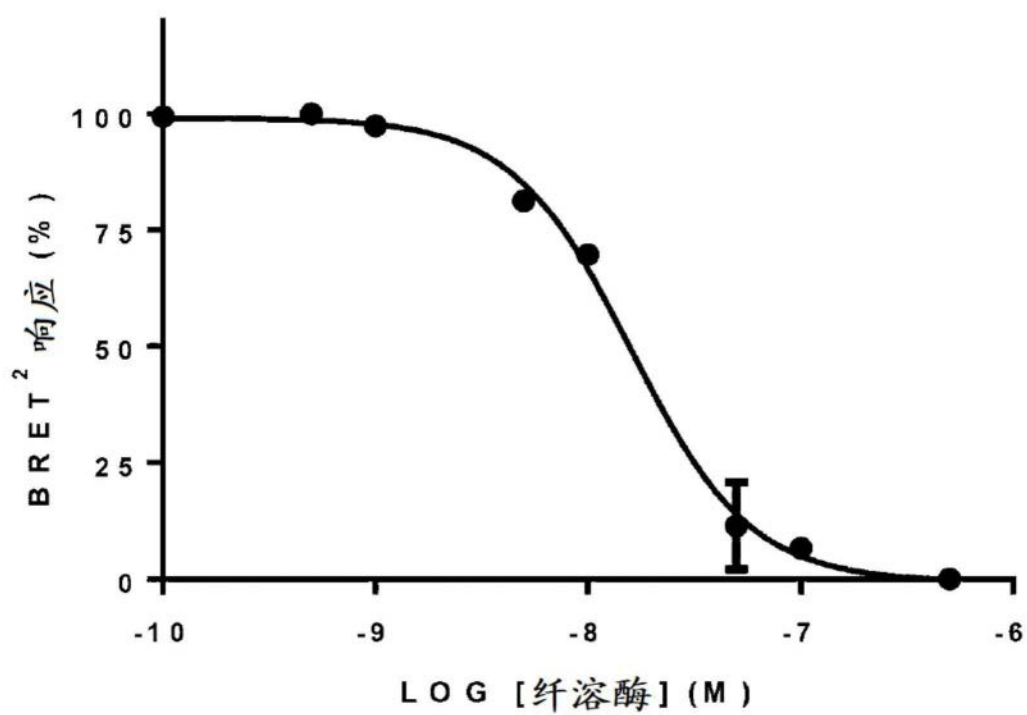


图13

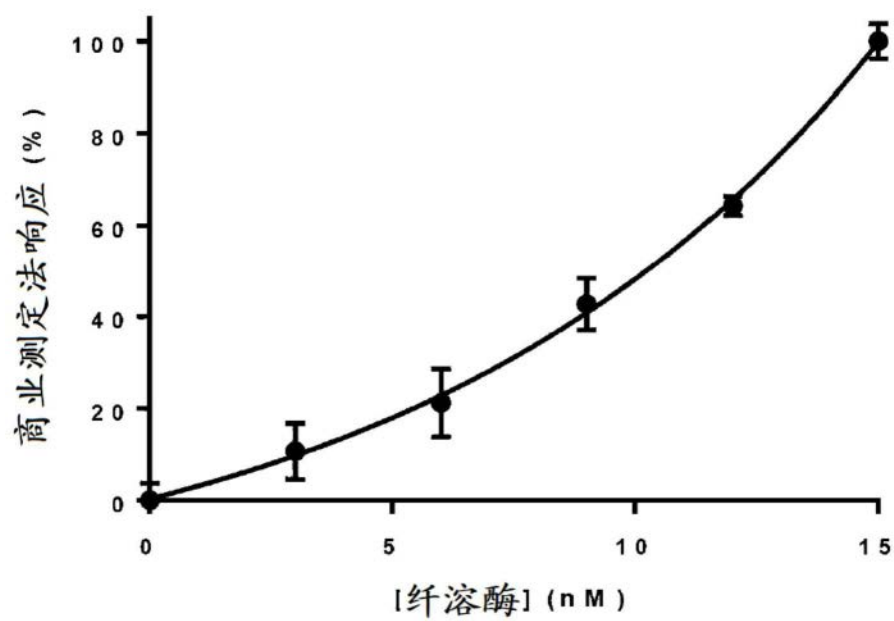


图14

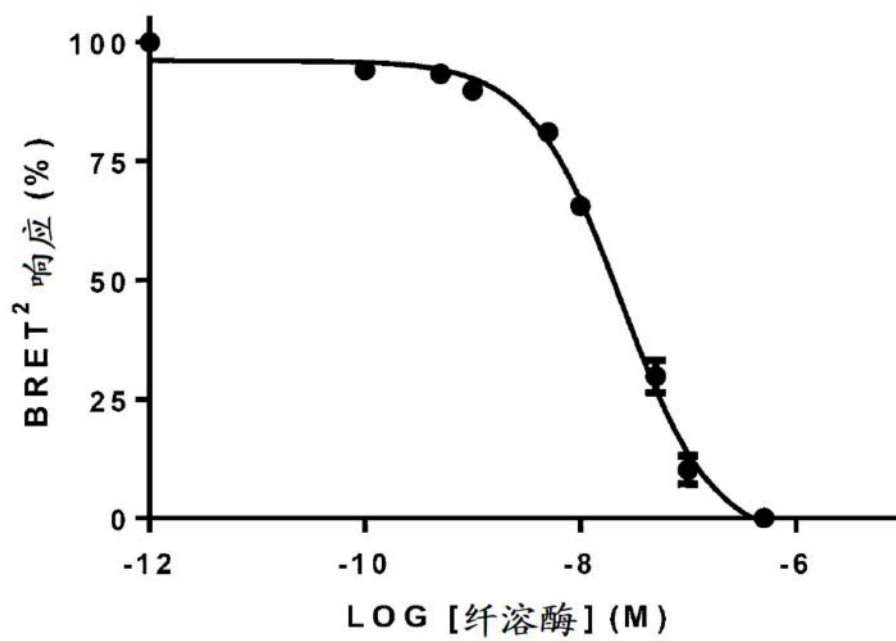


图15

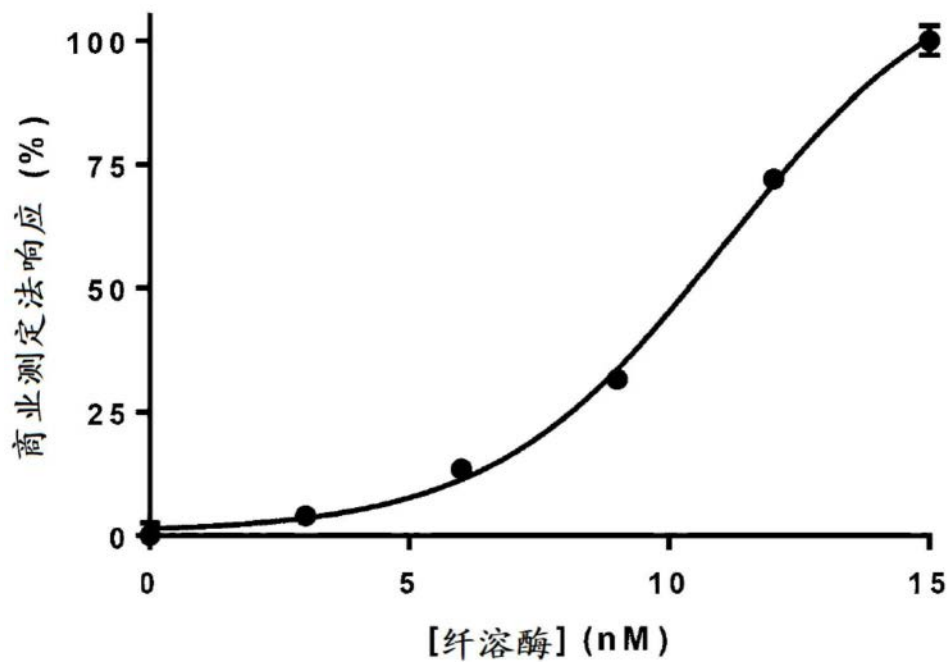


图16

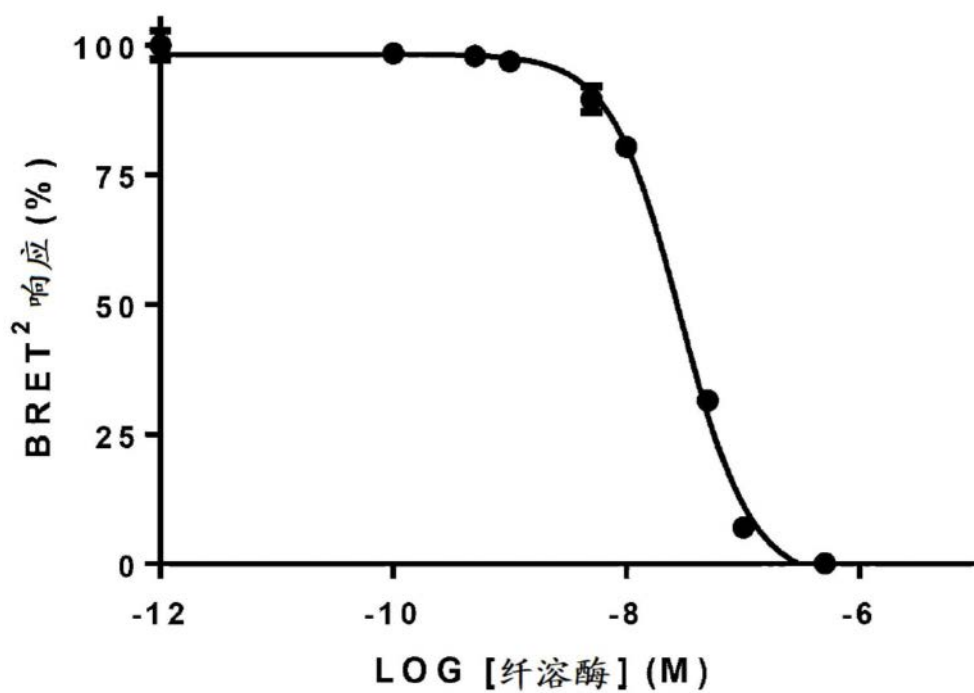


图17

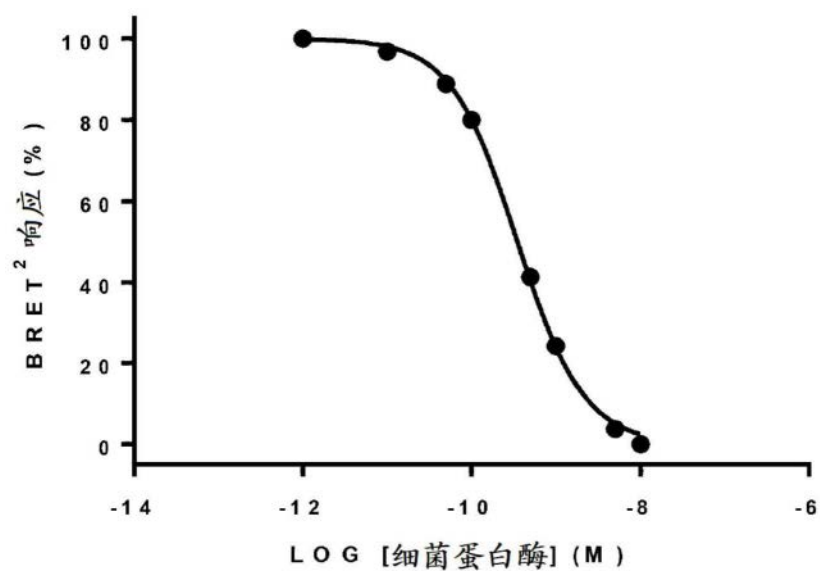


图18

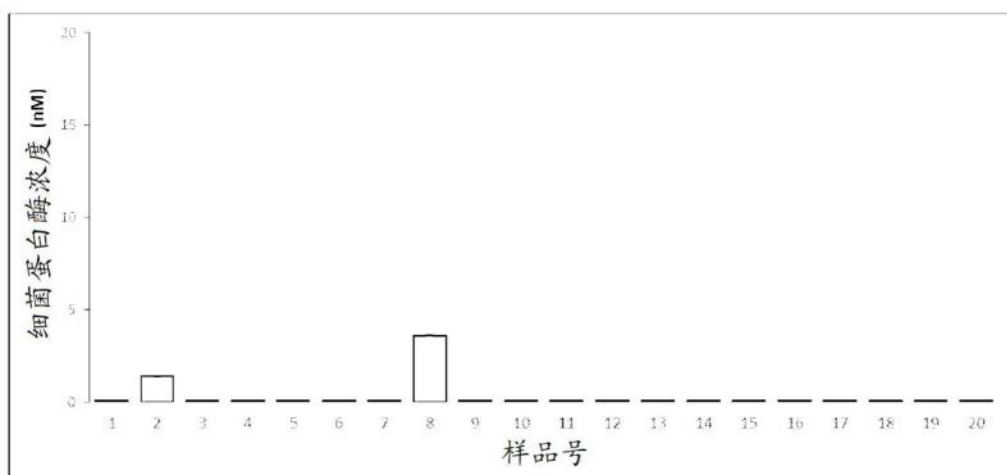


图19

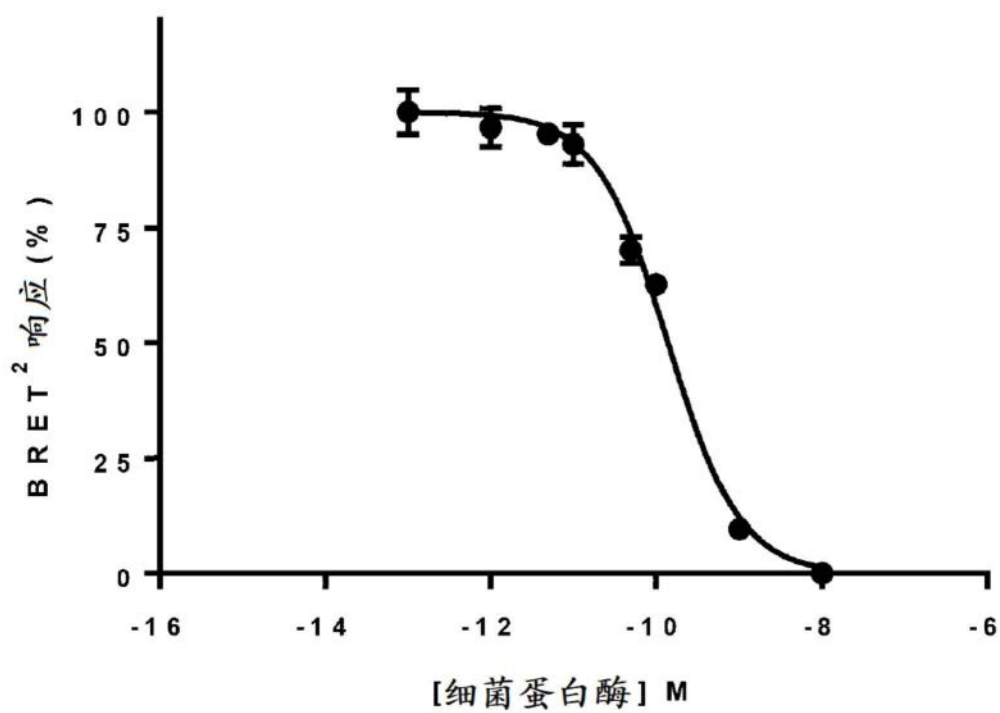


图20

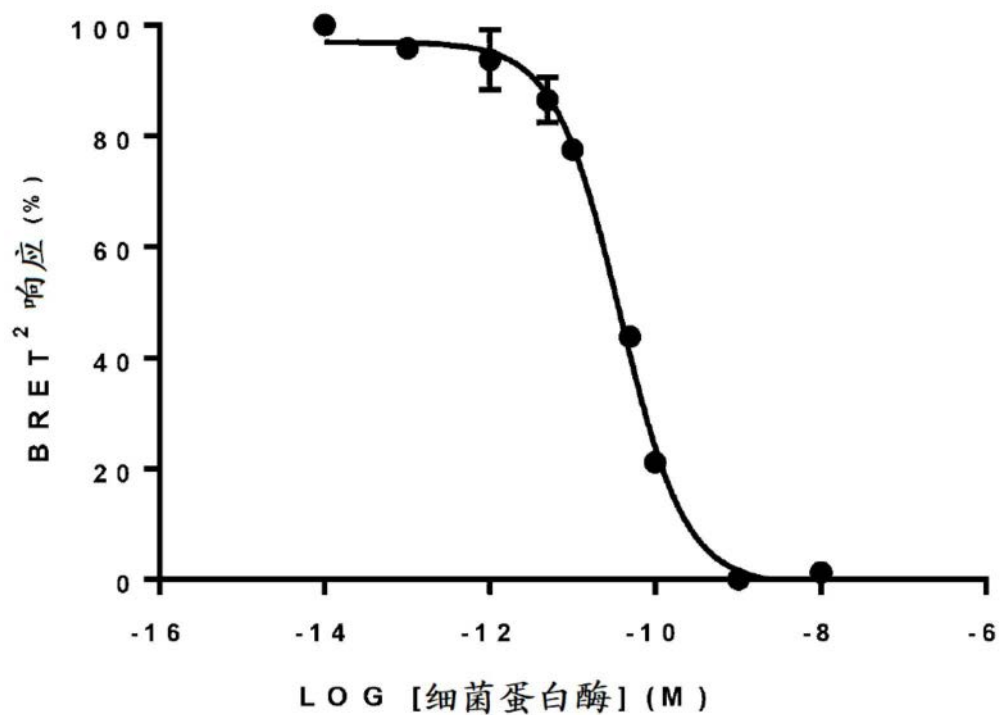


图21

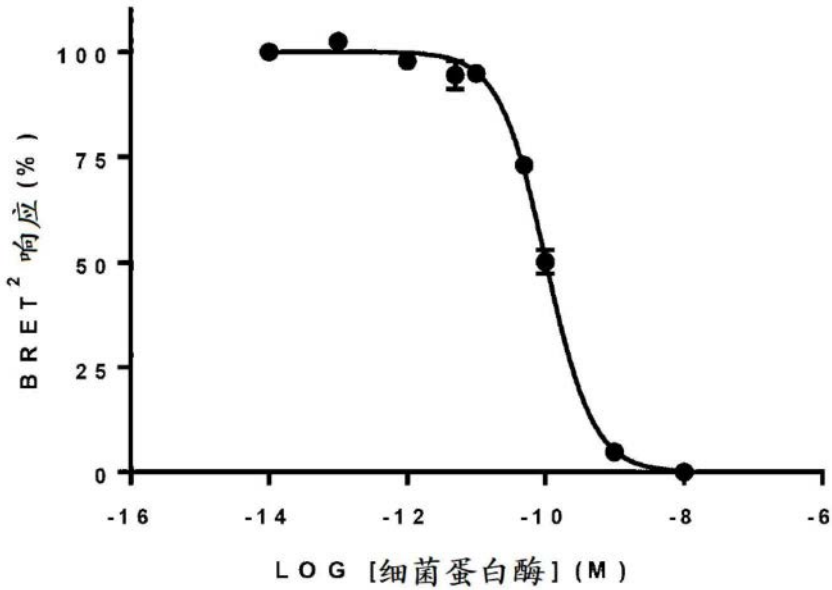


图22

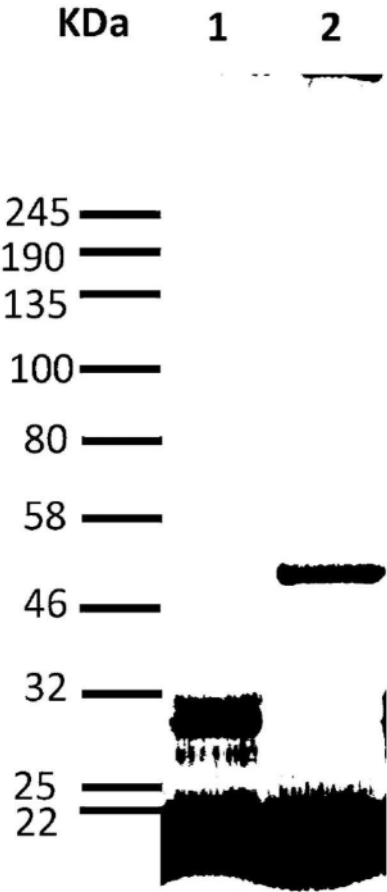


图23

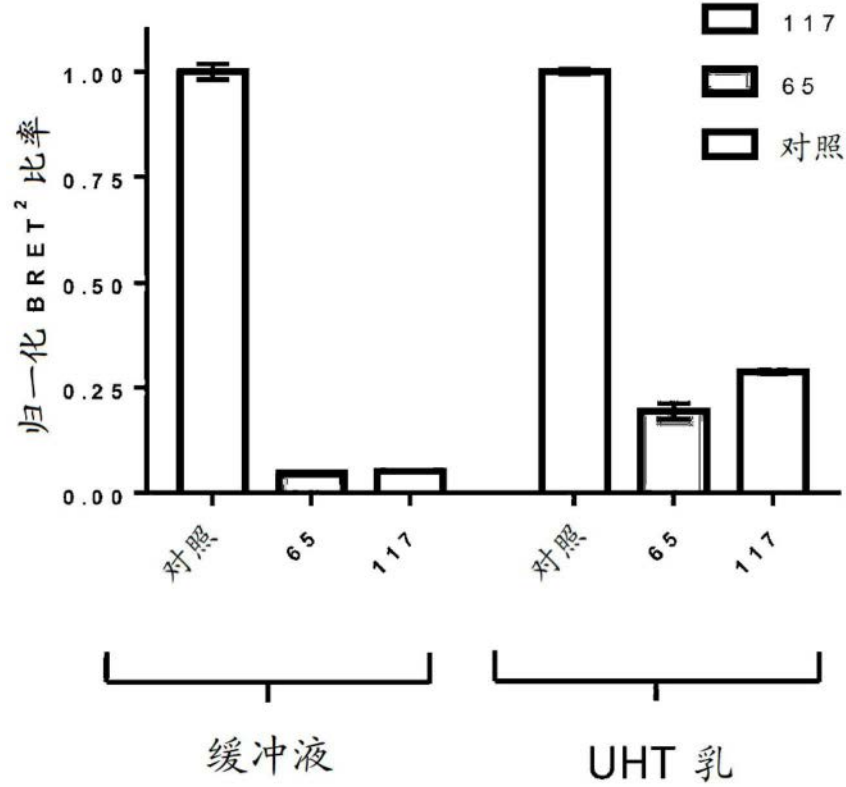


图24

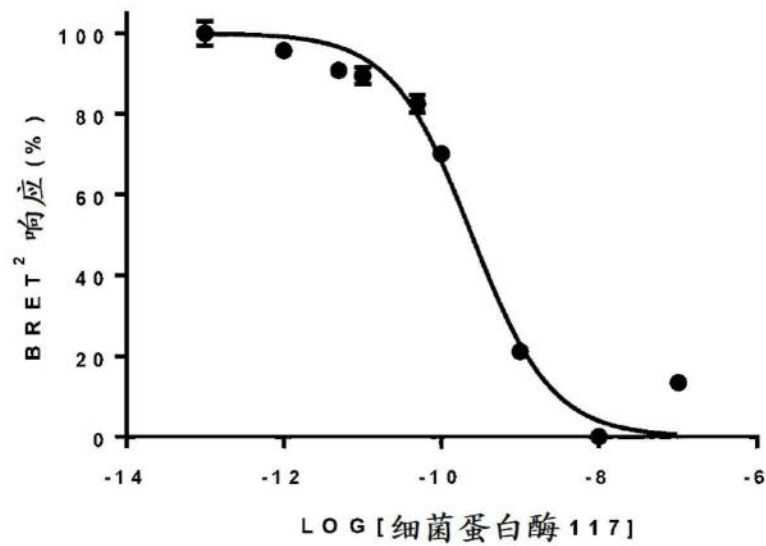


图25

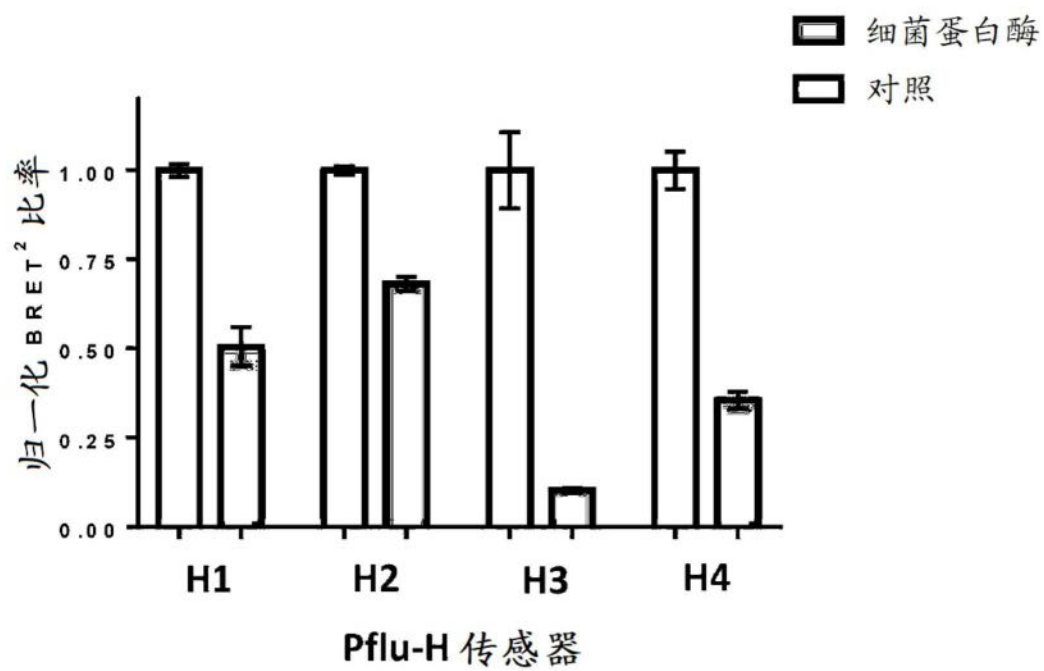


图26

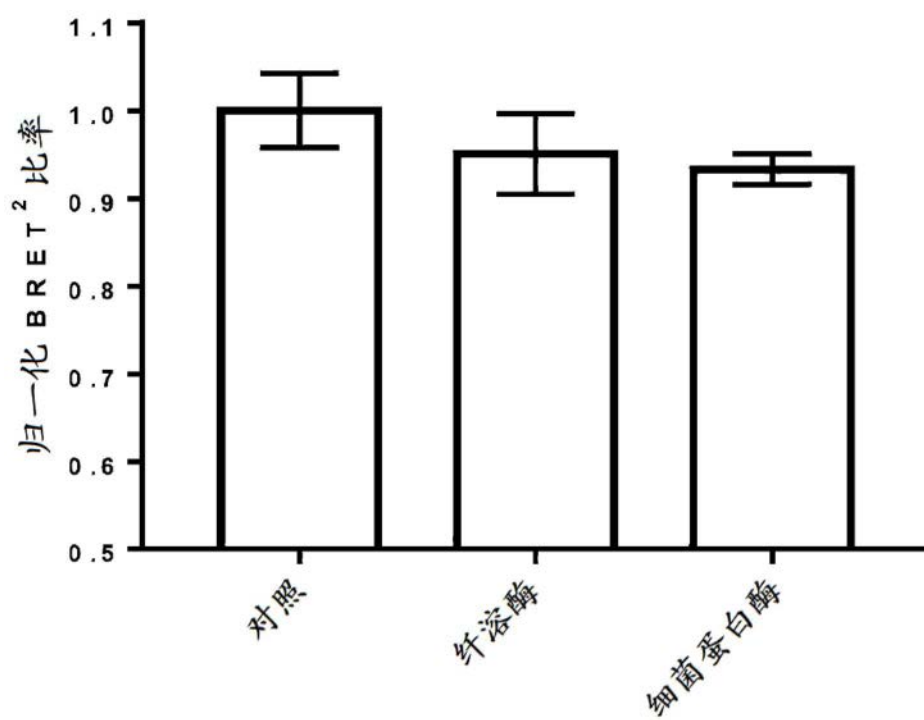


图27

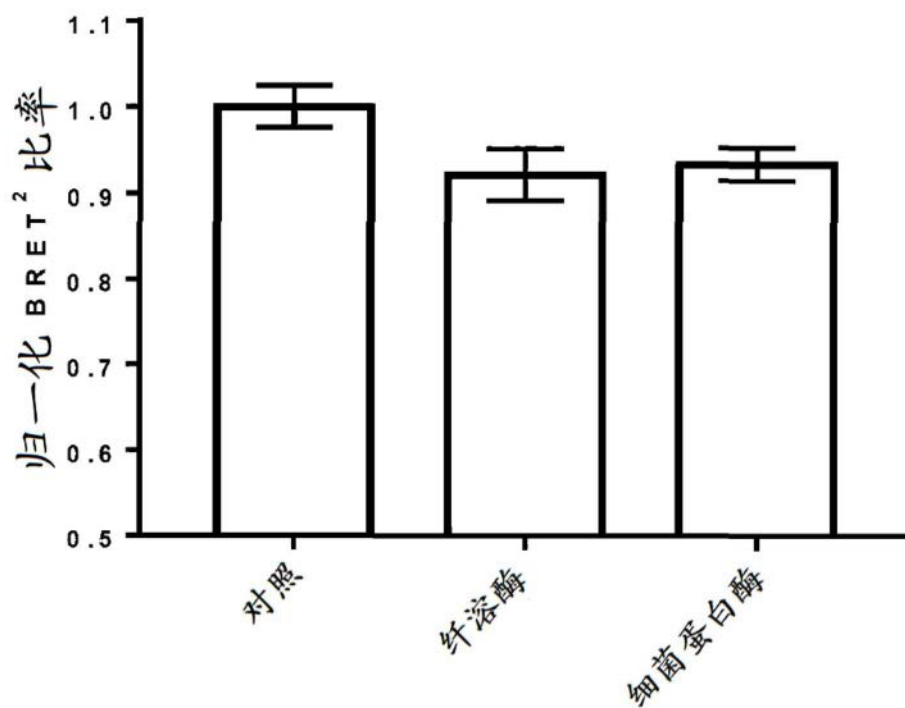


图28

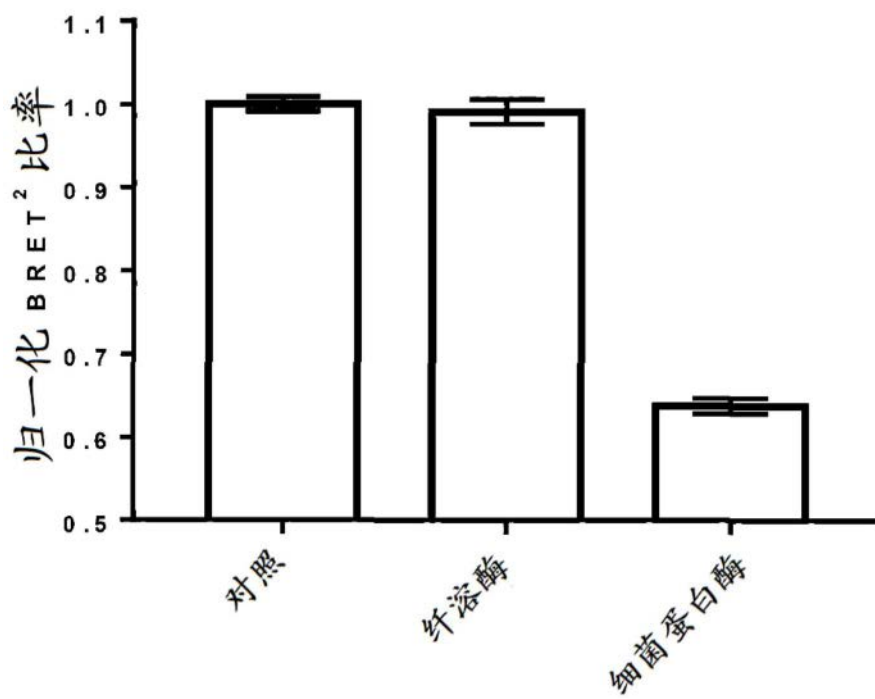


图29

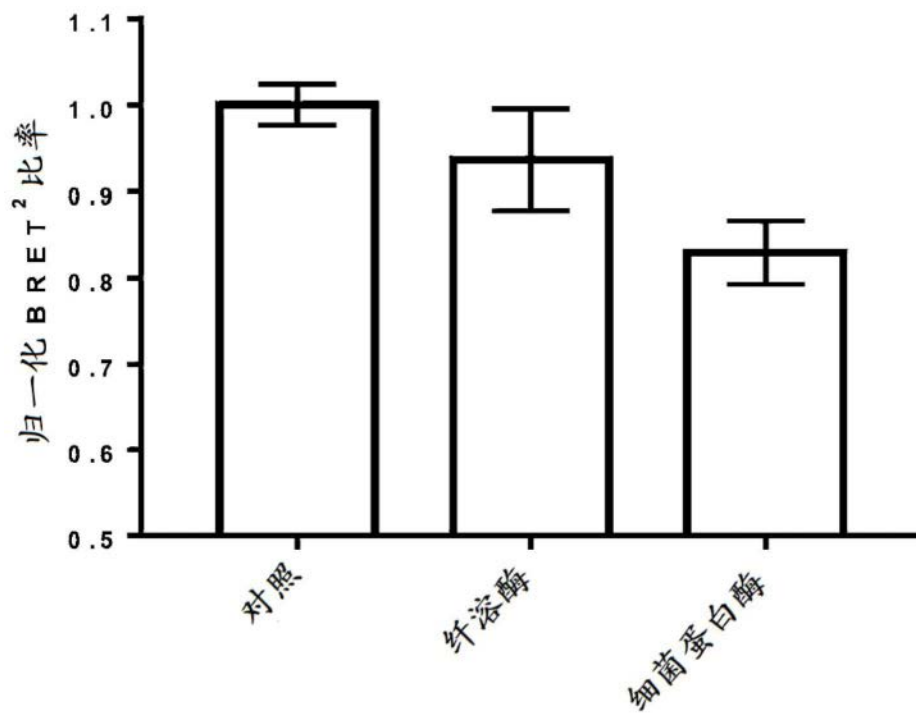


图30

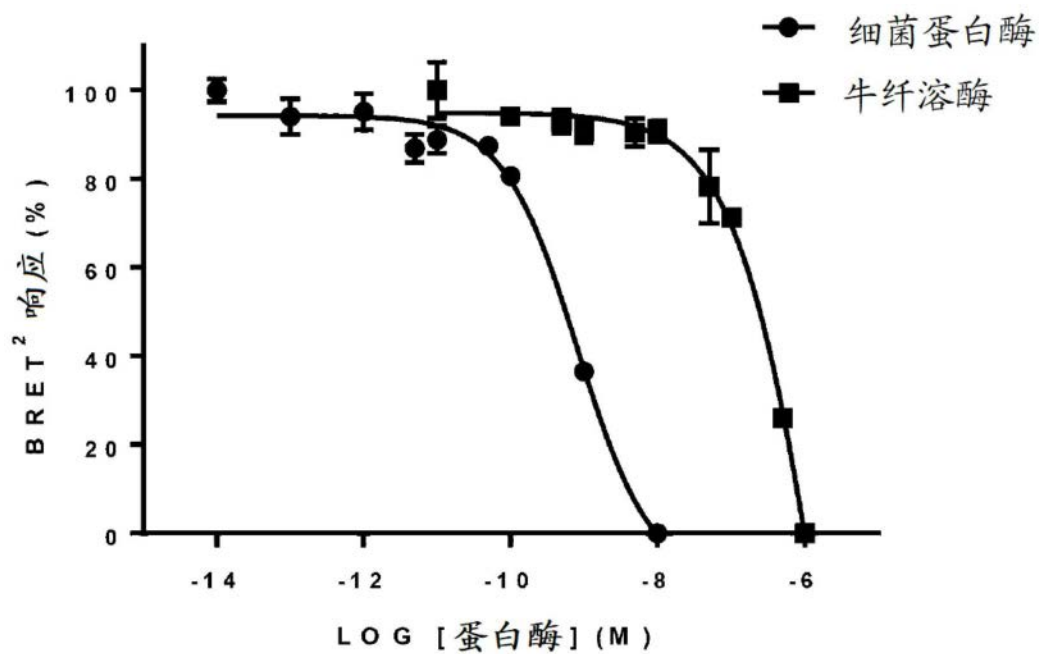


图31

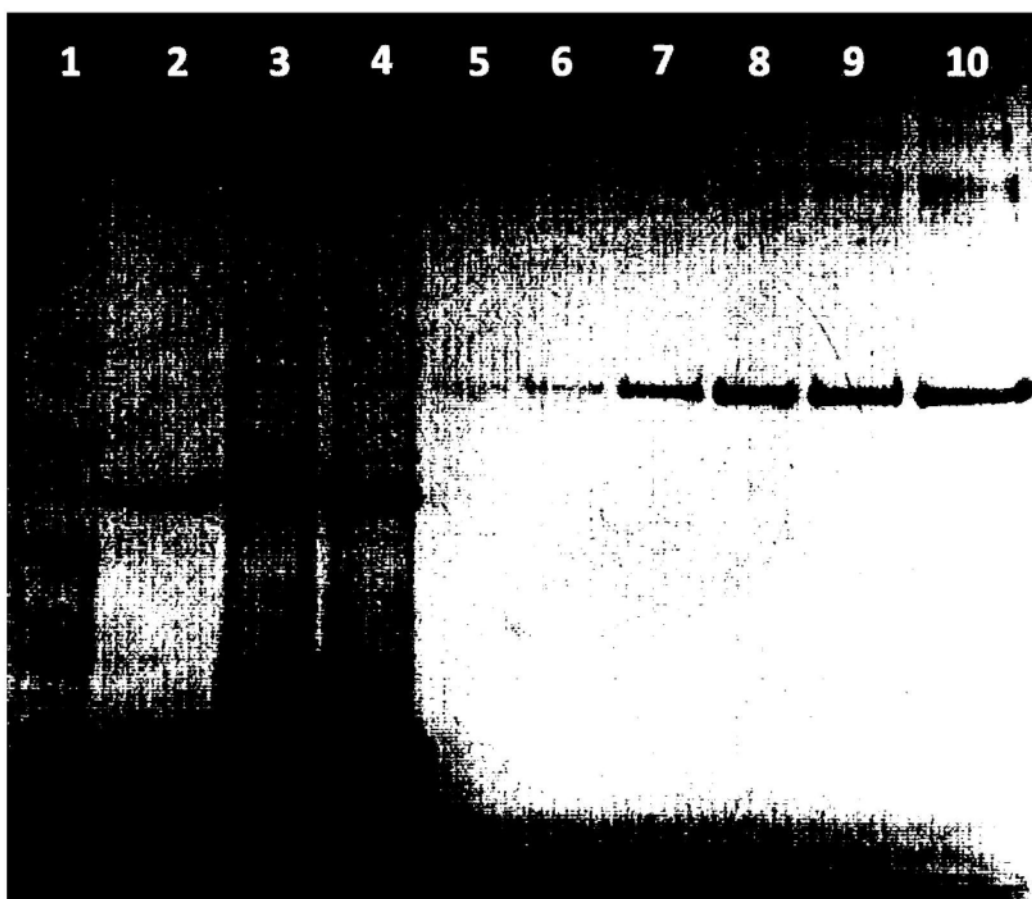


图32

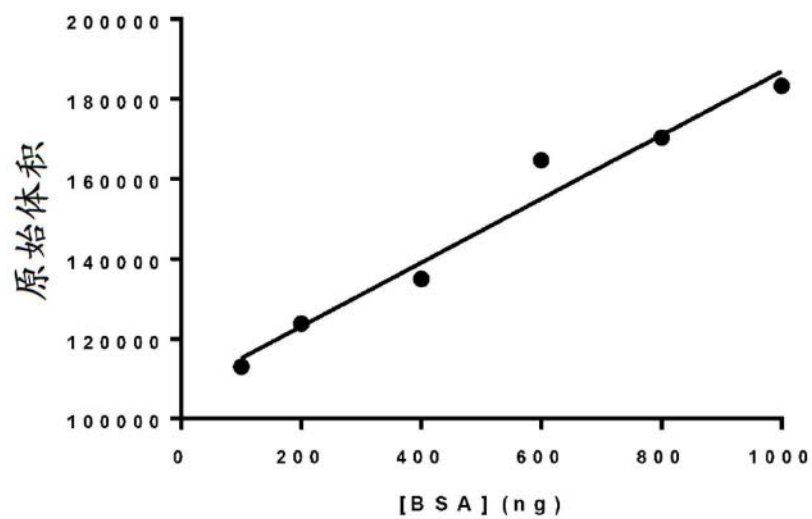


图33

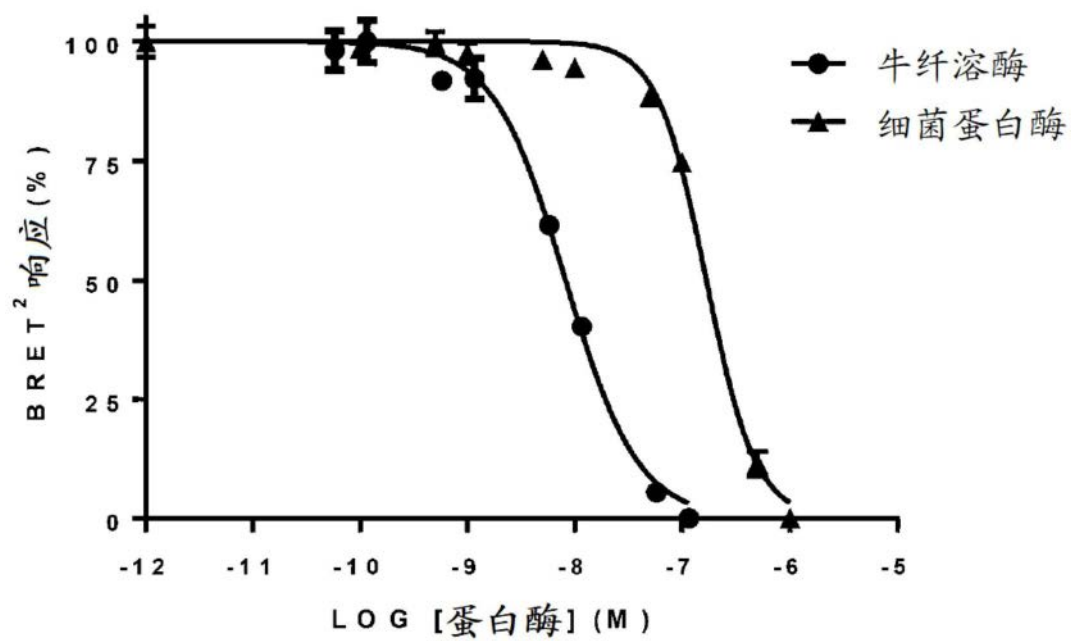


图34