



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107075552 A

(43)申请公布日 2017.08.18

(21)申请号 201580060250.7

(22)申请日 2015.11.06

(30)优先权数据

1451332-9 2014.11.07 SE

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.05.05

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2015/075924 2015.11.06

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/071497 EN 2016.05.12

(71)申请人 艾匹瑞斯公司

地址 瑞典索尔纳

(72)发明人 P.阿萨拉普拉姆 A.卢瑟姆

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张文辉

(51)Int.Cl.

C12Q 1/00(2006.01)

C12Q 1/34(2006.01)

权利要求书3页 说明书17页

序列表7页 附图10页

(54)发明名称

利用弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶的分析
和诊断方法

(57)摘要

一种方法,包括以下步骤:提供含有污染性核苷二磷酸和/或核苷三磷酸的样品,例如包括脱氧核糖核苷三磷酸的ATP和/或ATP类似物;用腺苷三磷酸双磷酸酶减少样品中污染性核苷二磷酸和/或核苷三磷酸的量,其中所述腺苷三磷酸双磷酸酶是弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶;对所述样品进行分析,其中所述分析包括如果污染性核苷二磷酸和/或核苷三磷酸在步骤b中没有减少将会受其影响的分析。

1. 一种方法,包括以下步骤:
 - a. 提供含有污染性核苷二磷酸和/或核苷三磷酸的样品,例如包括脱氧核糖核苷三磷酸的ATP和/或ATP类似物;
 - b. 用腺苷三磷酸双磷酸酶减少所述样品中污染性核苷二磷酸和/或核苷三磷酸的量,其中所述腺苷三磷酸双磷酸酶是弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶;并且
 - c. 对所述样品进行分析,其中所述分析包括如果污染性核苷二磷酸和/或核苷三磷酸在步骤b中没有减少将会受其影响的分析。
2. 根据权利要求1所述的方法,是一种用于测定样品中ATP的量的方法,包括以下步骤:
 - a. 通过用腺苷三磷酸双磷酸酶降解来减少所述样品中污染性ATP和/或ATP类似物的量;
 - b. 使所述待测ATP可用于检测;并且
 - c. 测定所述样品中待测ATP的量,其中所述腺苷三磷酸双磷酸酶是弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶。
3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述方法是用于测定样品中存在于第一细胞群中的ATP的量,包括以下步骤:
 - a. 通过用腺苷三磷酸双磷酸酶降解来减少所述样品中污染性ATP和/或ATP类似物的量;
 - b. 使所述待测ATP从所述第一细胞群中释放出来;并且
 - c. 测定所释放的ATP的量;其中步骤(a)中所述腺苷三磷酸双磷酸酶是弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶。
4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述释放步骤(b)包括裂解所述第一细胞群。
5. 根据权利要求3-4中任一项所述的方法,其中所述第一细胞群包括细菌细胞。
6. 根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述样品是来自动物的生物样品。
7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述样品是来自人的生物样品。
8. 根据权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述样品是来自患者的血液样品、血浆样品、血清样品、尿液样品、粪便样品或擦拭物。
9. 根据权利要求2-8中任一项所述的方法,其中所述污染性ATP的至少一小部分存在于第二细胞群中,并且在所述减少步骤(a)前,有从所述第二细胞群选择性释放ATP的步骤。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述第二细胞群产生所述样品的动物的宿主细胞。
11. 根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中所述方法在所述减少步骤后包括加入腺苷三磷酸双磷酸酶抑制剂的步骤。
12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述腺苷三磷酸双磷酸酶抑制剂包括正钒酸盐或 Mg^{2+} 。
13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述正钒酸盐以至少0.1mM的浓度存在。
14. 根据权利要求1-5或11-13中任一项所述的方法,其中所述样品是细胞培养基样品、食品样品、饮料样品、药物样品、污水样品、例如来自表面的擦拭物的环境样品或饮用水样品。
15. 根据权利要求3-14中任一项所述的方法,包括步骤(d),其根据步骤(c)中所测定的

ATP的量计算所述样品中第一细胞群的活细胞的数量或浓度。

16. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法是合成测序过程,所述污染性核苷酸包括在完成测序循环后仍存在的过量dNTP或其类似物,对所述样品进行分析是读取序列。

17. 根据权利要求1或16所述的方法,其中所述方法用于进行焦磷酸测序,包括以下步骤:

a. 进行焦磷酸测序反应,包括加入核苷三磷酸;
b. 通过酶催化反应使步骤(a)中释放的焦磷酸转化为ATP;
c. 测定步骤(b)中形成的ATP的量;
d. 用腺苷三磷酸双磷酸酶降解步骤(a)中未结合的核苷三磷酸和步骤(b)中形成的ATP;

e. 重复步骤a-d至少一次;

其中所述腺苷三磷酸双磷酸酶是弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶。

18. 根据权利要求2-15中任一项所述的方法,其中所述ATP的量的测定是通过生物发光分析法进行。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述ATP的量的测定是通过利用荧光素和荧光素酶的生物发光分析法进行。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中荧光素酶由根据权利要求38-39中任一项所述的组合物提供。

21. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶包括具有与SEQ ID NO:10至少80%序列同一性的氨基酸序列。

22. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶包括根据SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

23. 根据前述项中任一项所述的方法,其中所述弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶由根据项36-37中任一项所述的组合物提供。

24. 一种弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶,包括与SEQ ID NO:4具有至少95%序列同一性的氨基酸序列,并且具有腺苷三磷酸双磷酸酶活性。

25. 根据权利要求24所述的弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶,具有根据SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

26. 一种多核苷酸,编码根据权利要求24或25所述的腺苷三磷酸双磷酸酶。

27. 一种载体,包括根据权利要求26所述的多核苷酸,所述多核苷酸可操作地连接到能够诱导所述多核苷酸表达的启动子。

28. 一种宿主细胞,包括根据权利要求27所述的多核苷酸,所述多核苷酸可操作地连接到能够诱导所述多核苷酸表达的启动子或根据权利要求21所述的载体。

29. 一种生产根据权利要求24或25所述的重组腺苷三磷酸双磷酸酶的方法,包括以下步骤:

a. 在诱导所述多核苷酸表达的条件下培养根据权利要求28所述的宿主细胞;并且
b. 从得到的培养物中回收所产生的重组腺苷三磷酸双磷酸酶。

30. 一种弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶在分析方法中降解污染性核苷三磷酸或核苷二磷酸的用途。

31. 根据权利要求30所述的用途, 其中所述污染性核苷包括污染性ATP和/或ATP类似物, 所述分析方法包括用于测量ATP的分析法。

32. 根据权利要求31所述的用途, 其中所述用于测量ATP的分析法是生物发光分析法。

33. 一种弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶在通过合成分析法、优选地焦磷酸测序分析法进行测序中的用途。

34. 根据权利要求30-33中任一项所述的用途, 其中所述腺苷三磷酸双磷酸酶包括具有与SEQ ID NO:10至少80%序列同一性的氨基酸序列。

35. 根据权利要求30-34中任一项所述的用途, 其中所述腺苷三磷酸双磷酸酶是根据权利要求24-25中任一项所述的腺苷三磷酸双磷酸酶。

36. 一种组合物, 包括弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶和缓冲液, 其pH在6-9范围内, 离子强度为至少300mM。

37. 根据权利要求36所述的组合物, 其中所述离子强度为300-1000mM。

38. 一种组合物, 包括荧光素酶和包含正钒酸盐的腺苷三磷酸双磷酸酶抑制剂。

39. 根据权利要求38所述的组合物, 其中所述正钒酸盐的浓度至少为0.2mM。

利用弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶的分析 and 诊断方法

技术领域

[0001] 本发明涉及污染性核苷酸的分析 and 诊断方法。具体地,本发明涉及测定或定量可能含有污染性核苷酸的样品中的ATP的量,以及用于这种方法的试剂和这种试剂的生产。

背景技术

[0002] 三磷酸腺苷(ATP)是存在于所有活细胞中的分子。由于细胞中ATP的浓度相当恒定,所以测量样品中ATP的含量可以作为确定活细胞数量的替代方法。通过基于荧光素酶/荧光素的敏感生物发光分析法来测量ATP是公知的,例如见美国专利US3745090。荧光素酶(例如来自萤火虫的荧光素酶)是一种微球蛋白,其使用ATP和分子氧催化荧光素的氧化脱羧反应,形成氧化荧光素,氧化荧光素是一种高度不稳定的单级激发化合物,其在回到基态时发光。该反应的发光与反应混合物中的ATP浓度成正比,通过检测发射光的强度,可以连续监测存在的ATP的浓度。

[0003] 在许多情况下,待分析ATP含量的样品含有胞外或存在于污染类型的细胞中的污染性ATP。例如,如果要在任何临床或生物样品中测定细菌的数量,那么样品中宿主细胞所含的任何ATP将对测量产生干扰。在许多应用中,污染性细胞可以选择性裂解并释放ATP,导致所有污染性ATP都是胞外形式,例如见美国专利US4303752或US20110076706。在其它情况下,样品中可能存在ATP类似物而非ATP,也对ATP测量产生干扰。

[0004] 可以用称为腺苷三磷酸双磷酸酶(ATP-二磷酸水解酶、E型ATP酶、ATPD酶、NTDase EC 3.6.1.5)的酶进行水解来减少或消除污染性胞外ATP,或者不想要的ATP或ATP类似物。腺苷三磷酸双磷酸酶常常在有哺乳动物细胞的情况下确定细菌ATP的方法中使用,该方法中,首先选择性裂解哺乳动物细胞,然后用腺苷三磷酸双磷酸酶降解胞外ATP,使细菌ATP不受影响。反应完成后,可以灭活腺苷三磷酸双磷酸酶,使细菌细胞的胞内ATP释放出来,以便通过加入荧光素/荧光素酶来测量细菌ATP。在加入已知量的ATP标准品之前和之后测量发光,作为内部对照。通过将加入ATP标准品之前和之后的光比率乘以所加的标准品的量来计算细菌ATP(以摩尔计)。通常,细菌细胞每个细胞含有约1个阿托摩尔的ATP,从而可以根据所检测的ATP的量估计细菌细胞的数量。本发明的一个目的是提供对这种分析和诊断方法的改进。

[0005] 在本文中,最常用的腺苷三磷酸双磷酸酶是马铃薯腺苷三磷酸双磷酸酶(STA;通常称为马铃薯腺苷三磷酸双磷酸酶,SEQ ID NO:9)。STA存在多种同工型,每种同工型在ATP降解活性方面各有不同。然而,在使用STA时,上述方法中STA的效率受限于降解反应中ADP和不典型ATP类似物的蓄积。这种污染物的蓄积抑制了ATP降解性能,从而使一些污染性ATP保持完整,而这又限制了ATP检测分析的灵敏度,还增加了背景信号。关于STA限制的讨论,见专利W0199402816。

[0006] 此外,DNA测序方法焦磷酸测序的大多数实施例(见例如,国际专利申请PCT/GB1997/002631和PCT/GB1997/003518,或美国专利申请US2013/0045876和US2013/0189717)也依赖于ATP的定量,ATP的定量通常利用荧光素酶/荧光素分析法。每个测序循环

结束时,所有未结合的核苷酸和过量的ATP必须使用例如腺苷三磷酸双磷酸酶来消除。如上所述,目前用于DNA测序应用的腺苷三磷酸双磷酸酶存在以下问题:由于酶的质量(NDP激酶的污染),底物特异性以及批间差异不能实现完全降解,这不仅导致下降峰和非线性峰,也影响长链的DNA测序。本发明的一个目的是更好地消除ATP,其类似物以及其它二磷酸核苷酸或三磷酸核苷酸,以例如实现DNA测序改进。

[0007] 术语释义

[0008] 以下术语和词语在本说明书的上下文中具有如下所定义的含义。

[0009] 词语“包括”或“包含”将以非限制性方式来解释,例如包括或包含;具有作为部分。

[0010] 弗氏志贺菌(*Shigella flexneri*)腺苷三磷酸双磷酸酶(SFA)被定义为具有任何合适纯度的,来自弗氏志贺菌的腺苷三磷酸双磷酸酶。SFA可以通过非重组方法或通过重组DNA技术生产。本文中,重组弗氏志贺菌(*Shigella flexneri*)腺苷三磷酸双磷酸酶缩写为rSFA。天然SFA的序列为SEQ ID NO:10。所定义的SFA的腺苷三磷酸双磷酸酶活性与序列为SEQ ID NO.4或序列为SEQ ID NO:10的SFA基本相似。腺苷三磷酸双磷酸酶活性是指将核苷三磷酸催化水解为核苷二磷酸,并将核苷二磷酸水解成核苷单磷酸的能力。

[0011] 以百分数表示的序列同一性被定义为通过比较窗口中两个最佳比对序列进行比较而测定的值,其中比较窗口中的序列的一部分可以包括与参比序列(其不包括添加或缺失)相比的添加或缺失(即,空位),用于实现两个序列的最佳比对。百分数计算如下:测定位点的数目,在这些位点处相同氨基酸残基同时出现在两个序列中以产生的匹配位点数目,将匹配位点的数除以比较窗口中位点总数,并将所得结果乘以100,以得到序列同一性的百分数。除非另有说明,比较窗口是所涉及的序列的整个长度。在本文中,最佳比对是由美国国家生物技术信息中心(见NCBI手册[互联网]第16章)在线实施的BLASTP算法所产生的比对,输入参数如下:字长=3,矩阵=BLOSUM62,空位成本=11,空位扩展成本=1。

[0012] ATP类似物是指结构和功能上与ATP相似的化合物,其与ATP竞争,与特异地与ATP相互作用的酶结合。在本文中,该术语仅适用于那些作为如上定义的SFA的底物的化合物。优选地,该术语是指那些可以取代ATP作为荧光素酶(如萤火虫荧光素酶)的底物的化合物。在优选的实施例中,该术语包括核苷二磷酸和核苷三磷酸。在更优选的实施例中,该术语是指腺苷二磷酸、脱氧腺苷 α -硫代三磷酸、腺苷四磷酸、脱氧腺苷三磷酸、脱氧腺苷二磷酸、鸟苷三磷酸、鸟苷二磷酸、脱氧鸟苷三磷酸、脱氧鸟苷二磷酸、胸苷三磷酸、脱氧胸苷三磷酸、胸苷二磷酸、脱氧胸苷三磷酸、胞苷二磷酸、脱氧胞苷三磷酸、胞苷三磷酸、脱氧胞苷二磷酸、尿苷二磷酸和尿苷三磷酸。在最优选的实施例中,ATP类似物是指:腺苷二磷酸、脱氧腺苷 α -硫代三磷酸、腺苷四磷酸、脱氧腺苷三磷酸、脱氧腺苷二磷酸、鸟苷三磷酸、鸟苷二磷酸、脱氧鸟苷三磷酸和脱氧鸟苷二磷酸。

发明内容

[0013] 简言之,本发明涉及以下各项。以下各项中所公开的主题应当被视为以与权利要求中所公开的主题相同的方式被公开。

[0014] 1.一种方法,包括以下步骤:

[0015] a.提供含有污染性核苷二磷酸和/或核苷三磷酸(例如包括脱氧核糖核苷三磷酸的ATP和/或ATP类似物)的样品;

[0016] b. 用腺苷三磷酸双磷酸酶减少样品中污染性核苷二磷酸和/或核苷三磷酸的量, 其中所述腺苷三磷酸双磷酸酶是弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶; 并且

[0017] c. 对所述样品进行分析, 其中所述分析包括如果污染性核苷二磷酸和/或核苷三磷酸在步骤b中没有减少, 将会受其影响的分析。

[0018] 2. 根据项1所述的方法, 是一种用于测定样品中ATP的量的方法, 包括以下步骤:

[0019] a. 通过用腺苷三磷酸双磷酸酶降解来减少样品中污染性ATP和/或ATP类似物的量;

[0020] b. 使待测ATP可用于检测; 并且

[0021] c. 测定待测样品中ATP的量,

[0022] 其中所述腺苷三磷酸双磷酸酶是弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶。

[0023] 3. 根据项2所述的方法, 其中所述方法是用于测定样品中存在于第一细胞群中的ATP的量, 包括以下步骤:

[0024] a. 通过用腺苷三磷酸双磷酸酶降解来减少样品中污染性ATP和/或ATP类似物的量;

[0025] b. 使待测ATP从所述第一细胞群中释放出来; 并且

[0026] c. 测定所释放的ATP的量;

[0027] 其步骤(a)中的腺苷三磷酸双磷酸酶是弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶。

[0028] 4. 根据项3所述的方法, 其中所述释放步骤(b)包括裂解所述第一细胞群。

[0029] 5. 根据项3-4中任一项所述的方法, 其中所述第一细胞群包括细菌细胞。

[0030] 6. 根据项1-5中任一项所述的方法, 其中所述样品是来自动物的生物样品。

[0031] 7. 根据项6所述的方法, 其中所述样品是来自人的生物样品。

[0032] 8. 根据项1-7中任一项所述的方法, 其中所述样品是来自患者的血液样品、血浆样品、血清样品、尿液样品、粪便样品或擦拭物。

[0033] 9. 根据项2-8中任一项所述的方法, 其中所述污染性ATP的至少一小部分存在于第二细胞群中, 并且在所述减少步骤(a)前, 有从所述第二细胞群选择性释放ATP的步骤。

[0034] 10. 根据项9所述的方法, 其中所述第二细胞群是产生所述样品的动物的宿主细胞。

[0035] 11. 根据项1-10中任一项所述的方法, 其中所述方法在减少步骤后包括加入腺苷三磷酸双磷酸酶抑制剂的步骤。

[0036] 12. 根据项11所述的方法, 其中所述腺苷三磷酸双磷酸酶抑制剂包括正钒酸盐或 Mg^{2+} , 优选地正钒酸盐。

[0037] 13. 根据项12所述的方法, 其中正钒酸盐存在于样品中的浓度为至少0.1mM, 优选地0.2-25mM, 更优选地0.5-20mM, 或者 Mg^{2+} 存在于样品中的浓度为至少25mM, 优选地30-200mM, 更优选地30-150mM。

[0038] 14. 根据项1-5或11-13中任一项所述的方法, 其中所述样品是细胞培养基样品、食品样品、饮料样品、药物样品、污水样品、环境样品(例如来自表面的擦拭物)或饮用水样品。

[0039] 15. 根据项3-14中任一项所述的方法, 包括根据步骤(c)中测定的ATP的量计算样品中存在于所述第一细胞群的活细胞的数量或浓度的步骤(d)。

[0040] 16. 根据项1所述的方法, 其中所述方法是合成测序过程, 所述污染性核苷酸包括

在完成测序循环后仍存在的过量dNTP或其类似物,对所述样品进行分析是读取序列。

[0041] 17.根据项1或16所述的方法,其中所述方法用于进行焦磷酸测序,包括以下步骤:

[0042] a.进行焦磷酸测序反应,包括加入核苷三磷酸;

[0043] b.通过酶催化反应使步骤(a)中释放的焦磷酸转化为ATP;

[0044] c.测定步骤(b)中形成的ATP的量;

[0045] d.用腺苷三磷酸双磷酸酶降解步骤(a)中未结合的核苷三磷酸和步骤(b)中形成的ATP;

[0046] e.重复步骤a-d至少一次;

[0047] 其中所述腺苷三磷酸双磷酸酶是弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶。

[0048] 18.根据项2-15中任一项所述的方法,其中所述ATP的量的测定是通过生物发光分析法进行。

[0049] 19.根据项18所述的方法,其中所述ATP的量的测定是通过利用荧光素和荧光素酶的生物发光分析法进行。

[0050] 20.根据项19所述的方法,其中荧光素酶由根据项38-39中任一项所述的组合物提供。

[0051] 21.根据前述项中任一项所述的方法,其中所述弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶包括具有与SEQ ID NO:10至少80%、更优选地至少85%、甚至更优选地至少90%、还更优选地至少95%、仍更优选地至少97%、最优选地100%序列同一性的氨基酸序列。

[0052] 22.根据前述项中任一项所述的方法,其中所述弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶包括根据SEQ ID NO:4.的氨基酸序列。

[0053] 23.根据前述项中任一项所述的方法,其中所述弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶由根据项36-37中任一项所述的组合物提供。

[0054] 24.一种弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶,包括具有与SEQ ID NO:4至少95%、优选地至少96%、更优选地至少97%、还更优选地至少98%、仍更优选地至少99序列同一性的氨基酸序列,并且具有腺苷三磷酸双磷酸酶活性。

[0055] 25.根据项24所述的弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶,具有根据SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

[0056] 26.一种多核苷酸,编码根据项24或25所述的腺苷三磷酸双磷酸酶。

[0057] 27.一种载体,包括根据项26所述的多核苷酸,所述多核苷酸可操作地连接到能够诱导所述多核苷酸表达的启动子。

[0058] 28.一种宿主细胞,包括根据项27所述的多核苷酸,所述多核苷酸可操作地连接到能够诱导所述多核苷酸表达的启动子或根据项21所述的载体。

[0059] 29.一种生产根据项24或25所述的重组腺苷三磷酸双磷酸酶的方法,包括以下步骤:

[0060] a.在诱导所述多核苷酸表达的条件下培养根据项28所述的宿主细胞;并且

[0061] b.从所述培养物中回收所产生的重组腺苷三磷酸双磷酸酶。

[0062] 30.一种弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶在分析方法中降解污染性核苷三磷酸或核苷二磷酸的用途。

[0063] 31.根据项30所述的用途,其中所述污染性核苷包括污染性ATP和/或ATP类似物,

所述分析方法包括用于测量ATP的分析法。

[0064] 32. 根据项31所述的用途,其中所述用于测量ATP的分析法是生物发光分析法。

[0065] 33. 一种弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶在通过合成分析法、优选地焦磷酸测序分析法进行测序中的用途。

[0066] 34. 根据项30-33中任一项所述的用途,其中所述腺苷三磷酸双磷酸酶包括具有与SEQ ID NO:10至少80%、更优选地至少85%、甚至更优选地至少90%、还更优选地至少95%、仍更优选地至少97%、最优选地100%序列同一性的氨基酸序列。

[0067] 35. 根据项30-34中任一项所述的用途,其中所述腺苷三磷酸双磷酸酶是根据项24-25中任一项所述的腺苷三磷酸双磷酸酶。

[0068] 36. 一种组合物,包括弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶和缓冲液,其pH在6-9、优选地7-8范围内,离子强度为至少300mM。

[0069] 37. 根据项36所述的组合物,其中所述离子强度为300-1000mM,优选地400-800mM,更优选地500-800mM。

[0070] 38. 一种组合物,包括荧光素酶和包含正钒酸盐的腺苷三磷酸双磷酸酶抑制剂。

[0071] 39. 根据项38所述的组合物,其中所述正钒酸盐的浓度为至少0.2mM,优选地至少1mM,更优选地1-3000mM,最优选地2-200mM。

附图说明

[0072] 图1重组弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶(rSFA)的比色法

[0073] 评价使用钼酸铵和硫酸亚铁铵通过比色法检测过表达的rSFA,以检查定位、质量和效率。检测含有腺苷三磷酸双磷酸酶的大肠杆菌BL21-A1的亚细胞部分,用比色计检测这些部分的光密度(O.D.),以实现定性和/或定量相关性。本发明中,本发明人进行了定性比较,以定位腺苷三磷酸双磷酸酶在所得克隆体的某些亚细胞部分中的表达,比色法分析表明其活性高。

[0074] 图2rSFA酶表达的亚细胞定位

[0075] 在10%SDS-PAGE上分离携带弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶(SFA)基因以及含6-组氨酸的pBL质粒的大肠杆菌BL21-A1表达载体的亚细胞部分,以检查酶的表达。诱导的可溶性样品的部分中rSFA的表达量为25kDa,其用于纯化腺苷三磷酸双磷酸酶。分别是纯化部分和全细胞裂解物的非诱导样品和诱导样品。该实验表明酶位于表达宿主的可溶性部分中。

[0076] 图3rSFA的序列分析

[0077] 通过桑格法(Sanger's method)对携带腺苷三磷酸双磷酸酶基因以及6x组氨酸的rSFA的转化克隆体进行测序。克隆片段含有强毒型SFA的1134个核苷酸的780个同源碱基(图3A)。图3B示出了天然SFA参照序列(SEQ ID NO:10,称为“SFA”)与rSFA(SEQ ID NO:4,称为“rSFA”)之间的相似性。序列仅在N-端和C-端不同。

[0078] 图4重组弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶(rSFA)的活性与马铃薯腺苷三磷酸双磷酸酶(STA)的活性之间的比较

[0079] 检测10倍稀释的酶、rSFA和STA的Tris-EDTA缓冲液,以比较它们的ATP降解效率。从图中可以看出,rSFA在去除ATP方面非常有效,而市购的STA去除ATP的速度较慢。即使反

应60分钟后,STA还不能完全去除ATP,而rSFA在~15分钟内以3.87/分钟的恒定速率去除ATP。用1251型全自动光度计(芬兰图尔库LKB-Wallac公司)检测发光。

[0080] 图5rSFA和STA对ATP和发光的影响

[0081] 加入重组弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶(rSFA;菱形),马铃薯腺苷三磷酸双磷酸酶(STA;方形)和ATP对萤火虫荧光素酶反应的发光的影响。反应混合物由0.2mL ATP试剂SL和0.8mL Tris-EDTA缓冲液(瑞典BioThema AB公司)组成。第一、第三和第四个箭头表示加入ATP,第二个箭头表示加入腺苷三磷酸双磷酸酶。除了加入时,每15秒检测发光。加入10 μ L 10 μ mol/L ATP和10 μ L腺苷三磷酸双磷酸酶。用1251型全自动光度计(芬兰图尔库LKB-Wallac公司)检测发光。

[0082] 图6去除血清中的胞外ATP

[0083] 比较用rSFA去除ATP与用STA去除ATP。在使用100%粗制血清(图6A)和10%稀释血清样品(图6B)的发光分析中,与STA相比,rSFA显示出优异的ATP去除活性。

[0084] 图7比较rSFA的活性与不同市购STA源的活性

[0085] 比较rSFA缓冲液与三种不同的马铃薯腺苷三磷酸双磷酸酶市购产品(称为STA、A6535和A6237)的缓冲液。结果显示rSFA最佳。

[0086] 图8比较10%血清样品中rSFA的活性与不同市购STA源的活性

[0087] 对10%血清样品中rSFA与马铃薯腺苷三磷酸双磷酸酶市购产品(如STA、A6535和A6237)进行比较。结果显示rSFA最佳。

[0088] 图9比较尿液样品中rSFA的活性与不同市购STA源的活性

[0089] 对尿液样品中市购STA与rSFA进行比较,结果显示rSFA最佳。尽管两种酶都表现出相似的初始活性,但是3分钟后STA的作用速率受制,而rSFA继续作用去除ATP。即使在4次连续注入10 μ L 10 μ mol/L ATP后,rSFA每次都表现出在不到3分钟内完全去除ATP的活性,但STA即使在20分钟后也不能消解ATP。

[0090] 图10尿液样品中ATP-类似物对STA和rSFA的影响

[0091] 在尿液样品中检测去除10 μ L 10 μ mol/L的ADP和10 μ L 10 μ mol/L的ATP-ADP混合物。加入ADP或在ATP-ADP混合物中,STA的活性降低,而rSFA的活性不受影响。

[0092] 图11优化缓冲液体系以提高rSFA的活性

[0093] 将相同浓度的rSFA保存在缓冲液1、缓冲液2和缓冲液3中约10个月,再分析ATP去除活性。间歇地检查酶的活性,结果发现与其它两种缓冲液相比,酶与缓冲液3一起使用表现出最佳活性

[0094] 图12rSFA抑制剂的开发

[0095] 在所检测的不同抑制剂中,100mM的MgSO₄和1mM的Na₃VO₄形式的正钒酸盐表现出对rSFA的抑制作用。1mM的正钒酸盐完全抑制rSFA的活性,但完全不影响荧光素酶的活性。50mM的镁也能够完全抑制rSFA的活性,但却降低荧光素酶的活性。

[0096] 图13A-E rSFA对ATP、dATP、dTTP、dGTP和dCTP的活性

[0097] 为了比较STA与rSFA对核苷酸的活性,将ATP、dATP、dTTP、dGTP和dCTP的样品与酶一起培养5分钟或35分钟,通过高效液相色谱法(HPLC)检测所得的产物。在所有例子中,rSFA表现出最佳的核苷酸三磷酸去除活性,特别是有效地去除核苷酸二磷酸,相反STA对去除核苷酸二磷酸无效。

具体实施方式

[0098] 发明人惊喜地发现,弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶(SFA,见专利W01994/012211)在去除污染性或其它不需要的核苷三磷酸和核苷二磷酸方面,特别是ATP和/或其它ATP类似物方面比常用的马铃薯腺苷三磷酸双磷酸酶(STA)更有效。

[0099] 表1显示重组弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶(rSFA)和马铃薯腺苷三磷酸双磷酸酶(STA)之间的比较。所使用的STA的量以单位计略高,1分钟后,STA样品中ATP剩余的量比rSFA低将近2倍。然而,在17分钟时,rSFA处理的样品中的ATP浓度比STA处理的样品低约20倍。在91分钟时,差异更加明显,rSFA处理的样品中ATP浓度比STA处理的样品低约45倍。值得注意的是,即使在培养91分钟后,在17分钟时,STA样品中残余ATP的量比rSFA样品要高。

[0100] 在不受理论约束的情况下,可以假定:降解ATP及其类似物的能力更强是出于以下一种或多种原因:底物亲和力更高,在分析条件下酶稳定性更高,来自反应终产物的抑制作用更少。在所有基于ATP的反应中,污染物或副产物如(ADP、AMP、ATP、dNTP、dNDP、XMP等)的存在或蓄积可能干扰检测分析。

[0101] 市购腺苷三磷酸双磷酸酶制剂通常含有具有对ATP、ADP、xMP(如四磷酸盐或五磷酸盐等)不同相对亲和力的同工酶的混合物。此外,不同供应商提供的腺苷三磷酸双磷酸酶的活性在初始活性方面各有不同,并且相同产品的不同批次可能表现出明显不同的ATP水解活性。这些变化可能是开发用于分析各种生物样品的可靠灵敏的分析方法的重大障碍。

[0102] 在这点上,可以得出结论的是,SFA在去除样品中微量的上述污染性ATP及其类似物(或其它核苷酸)方面更有效,这些污染性ATP及其类似物通常阻碍STA活性和灵敏性。从实际方面,这意味着:在存在或可能存在污染性ATP的情况下测定样品中ATP的量的分析中,当使用SFA作为腺苷三磷酸双磷酸酶时,由于更好地去除大多数ATP-类似物,可以实现更高的灵敏度(见实施例6、7、8和9)。此外,在某些情况下,使用SFA在更短的时间内充分去除污染性ATP,使分析更快。更好地去除dNTP(实施例11)进一步改进使用SFA的合成测序方法。

[0103] 发明人还发现,SFA不仅在反应条件下稳定,而且还允许在冰箱温度下反复冻融和贮存,即使是粗制形式,而且无需添加稳定剂。事实表明,与STA不同,即使在高浓度EDTA中酶仍保持活性,不需要任何二价金属离子来保持其活性。SFA在pH为7.0-7.5时表现出最佳活性,而在pH为5.0-9.5之间时仍保持活性。因此,本发明提供了将SFA用于不同生物样品和宽pH值范围的分析实验的机会。稳定性提供了显著的实用优势,特别是对于有时会进行ATP检测而设备又有限的现场实验室。

[0104] 因此,在第一方面,本发明涉及一种用于减少污染性核苷二磷酸和/或核苷三磷酸的量的方法,包括以下步骤:

[0105] a. 提供含有污染性核苷二磷酸和/或核苷三磷酸(例如包括脱氧核糖核苷三磷酸的ATP和/或ATP类似物)的样品;

[0106] b. 用腺苷三磷酸双磷酸酶减少样品中污染性核苷二磷酸和/或核苷三磷酸的量,其中所述腺苷三磷酸双磷酸酶是弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶;并且

[0107] c. 任选地,对样品进行分析,其中所述分析包括如果污染性核苷二磷酸和/或核苷三磷酸在步骤b中没有减少,将会受其影响的分析。

[0108] 分析可以涉及测定样品中ATP的量或浓度。“将会受影响”是指分析具有以下特性：污染性核苷二磷酸和核苷三磷酸可能潜在地具有干扰作用。该描述并不旨在暗示步骤(b)中减少必然导致完全去除任何和所有干扰。相反，是指干扰不完全减少，包括部分减少，实质上减少，几乎完全减少。

[0109] 污染性核苷三磷酸可以包括脱氧核糖核苷三磷酸(dATP、dTTP、dGTP、dCTP或其类似物)，分析可以是合成测序分析，例如焦磷酸测序反应。

[0110] “减少”是指出于实际目的，量明显减少，使污染性核苷三磷酸或核苷二磷酸不会危及后续步骤中测定的准确性。优选地，减少导致污染性核苷酸基本上去除到以下水平：小于初始量的0.01%，更优选地小于初始量的0.001%，最优选地小于初始量的0.0001%。

[0111] 测定样品中ATP的方法

[0112] 根据第一方面，方法可以是用于确定样品中ATP的量的方法，包括以下步骤：

[0113] a. 通过用腺苷三磷酸双磷酸酶降解来减少样品中污染性ATP和/或ATP类似物的量；

[0114] b. 使待测ATP可用于检测；并且

[0115] c. 测定样品中待测ATP的量，

[0116] 其中所述腺苷三磷酸双磷酸酶是弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶。

[0117] 在ATP测定的上下文中，“减少”是指出于实际目的，量明显减少，使污染性ATP或ATP类似物不危及后续步骤中的测定的准确性。优选地，减少导致污染性ATP或ATP类似物基本上去除到以下水平：小于初始量的0.01%，更优选地小于初始量的0.001%，最优选地小于初始量的0.0001%。

[0118] 使待测ATP可用于检测的步骤(b)可以包括裂解可能含有待测ATP的细胞，例如，通过加热、变性剂、去污剂或其组合。裂解的方式无关紧要，只要所用的方式与步骤(c)中测定所用的技术兼容即可。或者，可以通过在样品中合成ATP来获得ATP，例如，将不同的化学物质通过酶催化转化为ATP。

[0119] 测定存在于细胞中的ATP的量的方法

[0120] 根据第一方面，方法可以是用于测定样品中存在于第一细胞群中的ATP的量的方法，包括以下步骤：

[0121] (a) 通过用腺苷三磷酸双磷酸酶降解来减少样品中污染性ATP和/或ATP类似物的量；

[0122] (b) 使待测ATP从第一细胞群中释放出来；并且

[0123] (c) 测定所释放的ATP的量；

[0124] 其中步骤(a)中的腺苷三磷酸双磷酸酶是弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶。

[0125] “释放”是指使ATP可用于步骤(c)的测定。

[0126] 释放步骤(b)可以包括裂解第一细胞群，例如，通过加热、变性剂、去污剂或其组合。裂解的方式无关紧要，只要所用的方式与步骤(c)中测定所用的技术兼容即可。

[0127] 第一细胞群可以包含细菌细胞。例如，可能需要测定存在于临床样品中的细菌的数量。因此，样品可以是来自动物(例如人、犬、猫、牛、鸟等)的生物样品。优选地，样品来自人。

[0128] 生物样品可以是例如血液样品、血浆样品、血清样品，尿液样品或粪便样品。样品

可以是来自受试者的擦拭物的形式,例如,皮肤或粘膜的擦拭物。

[0129] 根据第一方面,方法可以包括在减少步骤后加入腺苷三磷酸双磷酸酶抑制剂的步骤。所加的腺苷三磷酸双磷酸酶抑制剂可以包含正钒酸盐。在本发明的上下文中,正钒酸盐是有益的,因为它的浓度能够抑制弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶,而不抑制荧光素酶。作为腺苷三磷酸双磷酸酶抑制剂的正钒酸盐可以以至少0.1mM,优选地0.2-25mM,更优选地0.5-20mM,最优选地约1mM的浓度存在于样品中。或者,镁可用作腺苷三磷酸双磷酸酶抑制剂。 Mg^{2+} 可以以至少25mM,优选地30-200mM,更优选地30-150mM的浓度存在于样品中。

[0130] 在本发明的方法中,可能希望在去除污染性核苷酸后抑制腺苷三磷酸双磷酸酶活性,使得样品的后续分析不受腺苷三磷酸双磷酸酶的不利影响。例如,可以在从上述第一细胞群释放ATP之前抑制腺苷三磷酸双磷酸酶,由此通过去除一些腺苷三磷酸双磷酸酶而避免干扰ATP的测定。

[0131] 至少一小部分污染性ATP(或ATP类似物)可以存在于第二细胞群中,减少步骤(a)之前可以有从第二细胞群选择性释放ATP的步骤。在第二细胞群包含动物细胞且第一细胞群包含细菌细胞的情况下,与大多数相关类型的细菌细胞相比,动物细胞通常可在更温和的条件下选择性裂解。例如,如Triton X-100等温和洗涤剂可用于在有细菌细胞的情况下选择性裂解动物细胞。例如见专利US4303752。

[0132] 第二细胞群可以是生物样品来源的动物的宿主细胞。

[0133] 根据第一方面,方法还可以用于非生物样品,例如细胞培养基、食物、饮料、药物、污水、环境样品(例如来自环境表面的擦拭物)、饮用水等等。

[0134] 用于测定样品中存在于第一细胞群的ATP的量的方法还包括步骤(d),其根据步骤(c)中所测定的ATP的量计算样品中第一细胞群的活细胞的数量或浓度。由于细胞中的ATP浓度是相当恒定的,因此可以根据所测定的ATP量估计细胞的数量,例如,通过将读数与从相似类型的细胞所获得的标准曲线进行比较。

[0135] 进行合成测序的方法,例如焦磷酸测序

[0136] 一般而言,任何合成测序过程涉及将已知的脱氧核苷酸(或其类似物)连续加入反应混合物中,其中根据待测序的DNA的序列进行DNA合成。添加之后,确定DNA合成是否实际发生(允许序列测定),随后在下一个循环开始之前去除过量添加的核苷酸。重要的是去除是完全去除,并且没有中间产物(例如脱氧核苷酸二磷酸)蓄积,因为这会干扰随后的测序循环。可以根据本发明有利地利用SFA来去除核苷酸,因为与常用的STA(参见实施例11)相比,它在去除核苷酸(脱氧核苷二磷酸和脱氧核苷三磷酸)方面表现更好。因此,根据第一方面,方法可以是合成测序过程,污染性核苷酸由在完成测序循环后仍存在的过量dNTP或其类似物组成或包括在完成测序循环后仍存在的过量dNTP或其类似物,对样品进行分析是读取序列。

[0137] 焦磷酸测序是合成型测序的成熟DNA测序方法,是基于对DNA合成期间释放出来的焦磷酸(PPi)的检测。简而言之,典型的焦磷酸测序方案的步骤可以概括如下:

[0138] 1.将测序引物与待测序的单链DNA模板杂交,并与以下酶和底物一起培养,酶:DNA聚合酶、ATP硫酸化酶、荧光素酶和腺苷三磷酸双磷酸酶,底物:腺苷-5'-磷酸硫酸酐(APS)和荧光素。

[0139] 2.将四种脱氧核苷三磷酸(dNTP)的第一种添加到反应中。应当注意的是,脱氧腺

苷 α -硫代三磷酸(dATPaS)用来替代天然脱氧腺苷三磷酸(dATP),因为它可以被DNA聚合酶有效利用,但不会被荧光素酶识别。然后,如果DNA聚合酶与模板链中的碱基互补,那么DNA聚合酶催化脱氧核苷酸三磷酸结合到DNA链中。每个结合事件都伴随着与结合的核苷酸的量等摩尔的焦磷酸盐(PPi)的释放。

[0140] 3. ATP硫酸化酶在有腺苷-5'-磷酸硫酸酐的情况下将PPi定量地转化为ATP。所产生的ATP促进荧光素酶介导的荧光素向氧化荧光素的转化,而氧化荧光素产生可见光,可见光的量与ATP的量成正比。在荧光素酶催化的反应中所产生的光用检测器(例如CCD相机)检测。每个光信号与结合的核苷酸的数量成正比。

[0141] 4. 腺苷三磷酸双磷酸酶连续降解所有未结合的dNTPs和过量的ATP。完成降解时,可以添加另一份dNTP以便继续进行下一个测序循环。添加dNTP每次只一次。随着过程的继续,建立互补的DNA链,可以根据示出相对于添加dNTP的时间点随时间的光输出的图来确定核苷酸序列。

[0142] 由于市购的酶在其质量和活性方面有批间差异,所以焦磷酸测序反应的适用性只限于较长的寡核苷酸测序。然而,本发明提供了弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶可以在焦磷酸测序反应中用作腺苷三磷酸双磷酸酶,以提高测序结果,因为它在去除脱氧核苷二磷酸和脱氧核苷三磷酸方面更有效(见实施例11)。

[0143] 因此,本发明提供了第一方面的方法,其是用于进行焦磷酸测序的方法,包括以下步骤:

[0144] a. 进行焦磷酸测序反应,包括加入核苷三磷酸;

[0145] b. 通过酶催化反应使步骤(a)中释放的焦磷酸转化为ATP;

[0146] c. 测定步骤(b)中形成的ATP的量;

[0147] d. 用腺苷三磷酸双磷酸酶降解步骤(a)中未结合的核苷三磷酸和步骤(b)中形成的ATP;

[0148] e. 重复步骤a-d至少一次;

[0149] 其中腺苷三磷酸双磷酸酶是弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶。

[0150] 方法的一般方面

[0151] 在所有上述方法中,可以用生物发光分析法测定ATP。优选地,用利用荧光素和荧光素酶的生物发光分析法测定ATP。可以由根据第八方面的组合物提供荧光素酶,以便能够抑制添加荧光素酶的同时产生的腺苷三磷酸双磷酸酶。

[0152] 上述方法中的弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶包括与根据SEQ ID NO:10的序列具有至少80%,更优选地85%,甚至更优选地90%,还更优选地95%,仍更优选地97%序列同一性的氨基酸序列。重要的是,本发明只包括保留腺苷三磷酸双磷酸酶活性、根据SEQ ID NO:10的天然型弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶的序列变型。最优选地,上述方法中的弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶包括根据SEQ ID NO:4的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成。弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶可以由根据本发明的第七方面的组合物提供。

[0153] 腺苷三磷酸双磷酸酶试剂及其生产

[0154] 在第二方面,本发明涉及弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶,其包括具有与根据SEQ ID NO:4的序列至少95%、更优选地96%、还更优选地97%、仍更优选地98%同一性,甚至更

优选地99%序列同一性的氨基酸序列。重要的是,本发明只包括保留腺苷三磷酸双磷酸酶活性、根据SEQ ID NO:4的弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶的序列变型。更优选地,根据第二方面,弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶由根据SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成。

[0155] 在第三方面,本发明涉及一种编码根据第二方面所述的腺苷三磷酸双磷酸酶的多核苷酸。

[0156] 在第四方面,本发明涉及一种包括根据第三方面所述的多核苷酸的载体,其可操作地连接到能够诱导该多核苷酸表达的启动子,优选地通过阿拉伯糖诱导。

[0157] 在第五方面,本发明涉及一种包括根据第三方面所述的多核苷酸的宿主细胞,其可操作地连接到能够诱导该多核苷酸表达的启动子,或可操作地连接到根据第四方面的载体。

[0158] 在第六方面,本发明涉及一种生产根据第二方面所述的重组腺苷三磷酸双磷酸酶的方法,包括以下步骤:

[0159] 在诱导多核苷酸表达的条件下培养根据第五方面所述的宿主细胞;并且

[0160] 从培养物中回收所产生的重组腺苷三磷酸双磷酸酶。

[0161] 在第七方面,本发明提供一种包括弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶的组合物,其pH在6-9范围内,优选地在7-8范围内,离子强度为至少300mM。优选地,pH为约7.5。缓冲液可以是HEPES缓冲液。离子强度可以为300-1000mM,优选地400-800mM,更优选地500-800mM。缓冲液可包括400-600mM NaCl和20-30mM MgSO₄。如实施例10所示,根据第七方面所述的缓冲液在酶稳定性方面特别有利。

[0162] 在第八方面,本发明提供一种包括荧光素酶和腺苷三磷酸双磷酸酶抑制剂的组合物,该腺苷三磷酸双磷酸酶抑制剂包括正钒酸盐。在本发明的第一方面的上下文中讨论了正钒酸盐的优点。最好在单一组合物中组合使用腺苷三磷酸双磷酸酶抑制剂与荧光素酶,使两者在单个操作中同时加入。正钒酸盐的所选浓度应当保证在组合物加入基于荧光素酶的检测分析中使用的反应混合物后样品中正钒酸盐的最终浓度足以抑制SFA。正钒酸盐的浓度为至少0.2mM,优选地至少1mM,更优选地1-3000mM,最优选地2-200mM。在组合物加入反应混合物后,荧光素酶活性的量应足够用于基于荧光素酶的检测分析。

[0163] SFA腺苷三磷酸双磷酸酶的用途

[0164] 在第九方面,本发明涉及弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶在分析方法中降解污染性核苷酸(核苷酸三磷酸和/或核苷酸二磷酸)的用途。污染性核苷酸可以是ATP和/或ATP类似物,分析方法可以是用于测量ATP的分析方法。用于测量ATP的分析方法可以是生物发光分析法。

[0165] 在第十方面,本发明涉及弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶在DNA测序反应、优选地合成测序反应、最优选地焦磷酸测序方法的用途。

[0166] 根据第九或第十方面,腺苷三磷酸双磷酸酶可以包括具有与根据SEQ ID NO:10的序列至少80%、更优选地85%、甚至更优选地90%、还更优选地95%、仍更优选地97%序列同一性的氨基酸序列。重要的是,本发明只包括保留腺苷三磷酸双磷酸酶活性、根据SEQ ID NO:10的天然型弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶的序列变型。更优选地,根据第九或第十方面所述的腺苷三磷酸双磷酸酶可以是根据第二方面所述的腺苷三磷酸双磷酸酶。

[0167] 本文引用的所有参考文献通过引用并入本文。将本发明分成具有标题和子标题的

多个部分仅仅是为了提高易读性,并非以任何方式进行限制,特别地,这种划分不以任何方式排除或限制不同标题和子标题下的特征彼此之间的组合。

[0168] 以下实施例不应构成对本发明的限制。

[0169] 实施例

[0170] 对于涉及以下实施例的实验细节,读者请见标题为“材料和方法”的单独部分。

[0171] 实施例1:重组弗氏志贺菌的腺苷三磷酸双磷酸酶(SFA)的生产和比色法评估

[0172] 如“材料和方法”部分所述的方法制备和纯化SFA。采用比色分析法检测纯化的酶部分,以确定是否存在细菌源腺苷三磷酸双磷酸酶。从图1可以看出,比色分析法清楚地示出颜色差异,该颜色差异直接对应于腺苷三磷酸双磷酸酶的表达水平,从而揭示其细胞定位。在所有情况下,与空白样品的颜色相比,可以看到非诱导培养物和诱导培养物之间存在明显的颜色差异。

[0173] 从图2可以看出,克隆体的比色分析结果和腺苷三磷酸双磷酸酶表达图谱与它们的定位之间存在明显相关性。酶rSFA以25kDa的量在诱导培养物中,特别是全细胞裂解物和可溶性部分中持续过表达,但不在细胞膜部分中过表达,由此表明其位置,以便进一步纯化步骤。诱导的培养物中酶表达是未诱导的细胞的约10倍,这表明所构建的克隆体的效率。SDS-PAGE还显示腺苷三磷酸双磷酸酶生产的纯度,并且该纯化部分用于本研究的所有实验。

[0174] 实施例2:rSFA和STA之间的序列分析

[0175] 一旦通过凝胶电泳和比色分析法确认蛋白表达,就对rSFA基因产物进行测序以确定核苷酸序列,以便与从NCBI数据库获得的参照序列WP_010921592.1进行比较(图3A)。从图中可以看出,含有腺苷三磷酸双磷酸酶-6x组氨酸(Apyrase-6xHis)的SFA的克隆寡核苷酸片段(rSFA)与表达的序列(pBL21-Apyrase-6xHis)的序列都落入所需范围内(见图3A)。从图3B可以看出,rSFA与参照SFA仅在N-端和C-端不同。

[0176] 实施例3:与STA相比,rSFA在ATP降解方面更有效,并且很稳定

[0177] 测量由萤火虫荧光素酶反应产生的发光的衰减(图4)说明了两种腺苷三磷酸双磷酸酶(rSFA和STA)之间的ATP降解活性。与STA相比,rSFA表现出在~10分钟内明显去除ATP及其类似物。在其它实验中,从图5可以看出,在两种情况下加入ATP时发光增加,而加入腺苷三磷酸双磷酸酶导致发光衰减,这是ATP消耗造成的。在反应期间特意加入额外的ATP表现出类似的ATP消耗趋势。然而,rSFA表现出比市购STA更快的ATP消耗活性。当ATP以及腺苷三磷酸双磷酸酶制剂稀释10倍时,ATP消耗相应地减少。

[0178] 将rSFA样品存放在4℃温度下,然后冷冻并冻融,以检查其稳定性。进行研究观察rSFA是否可以用来制备用于消耗生物样品中的外源ATP的试剂。

[0179] 表1重组弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶与Sigma-Aldrich提供的市购马铃薯腺苷三磷酸双磷酸酶的ATP-降解活性比较

[0180]

腺苷三磷酸双磷酸酶的类型	初始活性(单位/mg 蛋白)	剩余 ATP 活性		
		1 分钟后	17 分钟后	91 分钟后
马铃薯腺苷三磷酸双磷酸酶(STA)	4, 12	1, 1876%	0, 0367%	0, 0228%
重组弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶(rSFA)*	3, 39	2, 6953%	0, 0019%	0, 0005%
重组弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶(rSFA)**	3, 58	2, 1855%	0, 0019%	0, 0004%
*实验前冷冻贮存				
*实验前冷冻贮存				

[0181] 此外,如表1所示,培养时间越长,剩余的ATP越少。这表明,与STA相比,SFA在ATP消耗方面更灵敏、更有效,因为ADP在反应混合物中蓄积并因此阻碍后者的反应效率。

[0182] 实施例4:证明血清中存在胞外ATP及其类似物

[0183] 考虑到上述实验中rSFA的优点,我们检查了它去除血清样品中的胞外ATP的效率。在第一个实验(图6A)中,针对100%粗制血清,rSFA花~17分钟完全水解ATP及其类似物,而STA花了~45分钟。甚至当血清稀释至10%时,此线性度还可再现(图6B)。因此,rSFA在去除生物样品(如血清)中的ATP方面优于STA。

[0184] 表2:血清对粗制血清和稀释血清中ATP消耗速率的影响

[0185]

	无血清 (阴性对照)	未稀释血清 (100%粗制血清)	10% 稀释血清
马铃薯腺苷三磷酸双磷酸酶	3, 52	0, 55355219	2, 42904382
重组腺苷三磷酸双磷酸酶	3, 98	1, 81641444	1, 77443406

[0186] 实施例5:改进的焦磷酸测序方法

[0187] 由于市购的酶在其质量和活性方面存在批间差异,并且不能水解过量的ATP及其

类似物,因此降低了效率并限制焦磷酸测序反应在读取长序列方面的应用性。这可以使用rSFA来解决,因为它与STA相比表现出更高的质量和效率。另见实施例11。

[0188] 实施例6:ATP生物发光分析法表明缓冲液中rSFA的表现优于STA

[0189] 生物发光ATP分析法对马铃薯腺苷三磷酸酶的三种市购产品(称为STA、A6535和A6237)的活性(包括初始活性和终点活性)的时间进程与rSFA进行比较。这些酶用缓冲液稀释,因此不应存在样品干扰,结果代表理想情况。测量来自荧光素酶的光,所需结果是通过腺苷三磷酸双磷酸酶尽可能快速并完全地去除ATP。

[0190] 如图7所示,与其它市购STA源相比,STA变体A6237表现出更好的活性。然而,所有市购STA变体在120秒后饱和,并且此后进一步降低ATP浓度方面变得无效。相反,即使在300秒后rSFA在去除ATP类似物及其副产物方面仍具有活性,并且能够更完全地去除ATP。注意图中的对数刻度,这表明至少提高了10倍。

[0191] 实施例7:ATP生物发光分析法表明10%血清中rSFA的表现优于STA

[0192] 进行类似于实施例8的实验,但分析混合物中使用10%血清,以检测含血清样品(例如血液样品)中rSFA的效用。

[0193] 如图8所示,市购STA变体(STA、A6535和A6237)的活性在6分钟后不再表现出ATP消除作用,但rSFA甚至在30分钟后仍继续裂解ATP-类似物及其副产物。存在胞外ATP可能潜在地抑制STA的活性,而rSFA在去除10%血清中的胞外ATP方面仍保持活性。因此,在血液样品的分析中,rSFA优于STAY。

[0194] 实施例8:ATP生物发光分析法表明尿液中rSFA的表现优于STA

[0195] 考虑到尿液存在污染物导致的复杂性,本发明人在尿液样品中检测STA和rSFA的ATP去除活性60分钟。尽管两种酶都表现出相似的初始活性,但是3分钟后STA的作用速率受制,而rSFA继续作用去除ATP。即使在4次连续注入10 μ l 10 μ mol/L ATP后,rSFA每次都表现出在不到3分钟内完全去除ATP的活性,而STA即使在20分钟后也不能消解ATP(图9)。

[0196] 实施例9:ATP类似物对STA和rSFA活性的影响

[0197] 测试用STA和rSFA水解尿液中的ATP、ADP及其混合物。图10显示,STA的活性仅在ADP浓度为10 μ mol/L时或ADP和ATP的混合物补充到10 μ mol/L浓度时明显降低。相反,与rSFA的活性没有实质性差异。在这两种情况下,ATP-类似物的磷酸盐去除活性明显低于rSFA。

[0198] 实施例10:优化缓冲液体系以提高rSFA的活性

[0199] 选择和优化正确的缓冲液系统是酶稳定性的一个重要方面。本发明人已研发了三种缓冲液系统,以优化rSFA的稳定性。在+4 $^{\circ}$ C下,将相同浓度的rSFA保存在缓冲液1、缓冲液2和缓冲液3中约10个月,再进行生物发光ATP去除分析。测定酶的活性,结果发现与其它两种缓冲液相比,酶与缓冲液3一起使用表现出最佳活性(图11)。

[0200] 实施例11:rSFA对ATP、dATP、dTTP、dGTP和dCTP的活性

[0201] 为了比较STA与rSFA对核苷酸的活性,将ATP、dATP、dTTP、dGTP和dCTP的样品与酶一起培养5分钟或35分钟,通过高效液相色谱法(HPLC)检测所得的产物。

[0202] 作为起点,ATP的色谱分析(图13A)显示:使用STA时,在5分钟内ATP仅部分地裂解为ADP和AMP,35分钟后所有ATP完全转化为ADP和AMP。相反,rSFA在不到5分钟内完全将所有ATP转化为AMP,没有检测到剩余的ADP。

[0203] 图13B显示:与STA培养35分钟后,剩余超过25%的dATP(产物主要是dADP和一些

dAMP), 而rSFA在不到5分钟内将dATP完全转化为dAMP。

[0204] 同样, 使用STA时, 在35分钟内dTTP转化为TDP和TMP, 而rSFA在不到5分钟内将dTTP完全转化为TMP (图13C)。

[0205] 使用dGTP时观察到相似结果 (图13D)。

[0206] 然而, 从图13E可以看出, STA可以在35分钟后仅将一半的dCTP转化为CDP和CMP, 而rSFA在不到5分钟内将dCTP完全转化为CMP。因此, rSFA的dCTP去除效力比STA至少高7倍。

[0207] 上述结果表明, SFA在去除dNTP和dNDP方面优于STA, 这对于合成测序方法 (例如焦磷酸测序) 中的应用特别有意义, 因为dNTP和/或dNDP的蓄积会干扰随后的测序循环。

[0208] 实施例12: rSFA可以由正钒酸盐抑制, 而不干扰荧光素酶活性

[0209] 在一些情况下, 需要使rSFA失活以便测量ATP的胞内浓度。在所检测的不同抑制剂中, 100mM的MgSO₄和1mM的Na₃VO₄形式的正钒酸盐, 其中只有前者影响了荧光素酶的活性 (图12)。正钒酸盐不影响荧光素酶, 同时, 它完全抑制rSFA的活性, 使其非常适合在使用荧光素酶的分析中抑制腺苷三磷酸双磷酸酶。

[0210] 原料和方法

[0211] 弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶的克隆, 测序和生产

[0212] 大肠杆菌GJ1158菌株中携带弗氏志贺菌2a株apy基因的质粒pRSETB (Bhandari and Gowrishankar, 生物学杂志, 1997年7月, 第179 (13) 卷, 4403-6页) 来自印度安娜大学生物技术中心Sankaran。由于GJ1158构建体不稳定, 所以切取天然型apy基因并扩增 (使用apy 3和apy 4引物, 表3), 然后进一步用PCR凝胶纯化试剂盒 (Fermentas) 纯化。使用引物Apyr-6His-BsiWI和Apyr-5-NdeI (表2), 将NdeI和BsiWI的两个限制性内切酶位点引入纯化的DNA模板, 以便用6组氨酸编码区取代天然终止密码子, 并根据制造商提供的说明书 (做微小改动) 在大肠杆菌TOP10 (Invitrogen) 中进行转化。使转化体在琼脂平板上生长, 并通过NheI水解和确认限制性片段在琼脂糖凝胶上的大小来选择阳性pBL-Apyrase-6His克隆体, 随后在斯德哥尔摩的Karolinska研究所的测序设备上序列验证。将pBL-Apyrase-6His构建体的确认序列与弗氏志贺菌2a株腺苷三磷酸双磷酸酶 (GeneBank登录号: U04539) 进行比较, 找出克隆位点的完整性, Apyrase-6His编码序列并用6-His标签替代终止密码子。确认序列后, 将pBL-Apyrase-6His克隆体 (SEQ ID NO: 3) 的质粒转化到大肠杆菌BL21-A1中, 用于蛋白表达。由质粒编码的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示。

[0213] 表3所用的寡核苷酸列表

[0214]

名称	寡核苷酸序列 (5' → 3')	SEQ ID NO
天然型腺苷三磷酸双磷酸酶	CGCGGATCCCTGAAGGCAGAAGGTTTTC	SEQ ID NO: 5

[0215]

引物 1		
天然型腺苷三磷酸双磷酸酶引物 2	CCCAAGCTTTTATGGGGTCAGTTCATT	SEQ ID NO:6
Apyr-6His-BsiWI	GAACATCGTACGTTAGTGGTGATGGTGAT GATGTGGGGTCAGTTCATTGGTAG	SEQ ID NO:7
Apyr-5-NdeI	GATATACATATGAAAACCAAAACTTTC	SEQ ID NO:8

[0216] 纯化弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶的大规模生产

[0217] 使用Ni-NTA磁珠进行初步评估:将约1.3ml的细菌培养物在13,000rpm转速下在300μl提取缓冲液(1mM PMSF,1mg/ml溶菌酶和0.05%Triton X-100,20mM Tris-HCl,pH为8.0)中沉淀,以制备细胞裂解物。30分钟后,加入30μl平衡处理过的Ni-NTA磁珠,同时轻微搅拌以促进His-标记的蛋白与磁珠结合。对含有可溶性蛋白的上清液取样,用300μl的洗涤缓冲液(含300mM NaCl,20mM咪唑,8%甘油和0.2%Triton X-100的10mM KP溶液,pH为7.8)洗涤珠子。用PBS冲洗磁珠10分钟后,用12μl SDS煮沸3分钟以洗脱纯重组蛋白。使用Tris-甘氨酸(25mM Tris-HCl,0.1%w/vSDS,pH为8.3)通过12%SDS-PA凝胶在30mA下进行分离,得到细胞裂解物、可溶性蛋白和纯蛋白组分的蛋白图谱。确认后,规模化生产腺苷三磷酸双磷酸酶,规模化高达2L。

[0218] 通过金属亲和层析进行大规模纯化:将含有pBL-Apyrase-6His的携带apy基因(SFA)的大肠杆菌BL21-A1菌株在2L的LB培养基中培养并在OD 0.7下进行诱导。在生长4小时后通过以4000rpm转速离心收获细胞,盐水洗涤后,通过法式压片机裂解细胞。使用缓冲液(20mM Hepes,500mM NaCl,10%甘油,20mM咪唑,pH为7.5),通过金属亲和层析法(IMAC)(HisTrap FF,瑞典GE医疗公司)对6-组氨酸标记的SFA进行纯化,在用含50mM咪唑的洗涤缓冲液洗涤后,用含350mM咪唑的洗脱缓冲液洗脱酶。缓冲液用含25mM MgSO₄,5%BSA的缓冲液交换,用装有10kDa截留半透膜的超滤装置(Vivaspin Turbo,Sartorius)浓缩蛋白样品。

[0219] 比色法评估腺苷三磷酸双磷酸酶活性

[0220] 通过量热法评估酶活性,量热法参见Sankaran等人(Diagn Microbiol Infect Dis.2009年三月,第63(3)卷,第243-50页),并稍加改动。在有腺苷三磷酸双磷酸酶(测试样品)的情况下,混合等体积的分析试剂(6M焦磷酸钠和40mM EDTA,pH为7.5)和显色试剂(5%w/v酸性钼酸铵和1%w/v硫酸亚铁铵)进行比色反应,产生比色信号,比色信号与存在于测试样品中的酶的浓度成正比。原则上,该分析采用无机焦磷酸盐作为酶的底物,而EDTA作为缓冲剂和金属整合剂以抑制其它污染性磷酸酶和焦磷酸酶的活性。使用酸性钼酸铵在焦磷酸盐存在的情况下测量所释放的磷酸盐,在695nm下用多模式微孔板读数器(SpectraMax®M5,分子设备,美国LLC公司)检测颜色。

[0221] 通过发光实验进行灵敏度测试

[0222] 比色杯总体积为1mL,含有100μl样品以及溶于0.07mol/L Tris-EDTA缓冲液的ATP试剂SL(瑞典BioThema AB公司),注入10μl 10μmol/L的ATP标准品后开始反应。用Lundin及

其同事(分析化学第75版,第611-620页(1976年)和酶学方法第305卷,第346-370页(2000年))提供的方法检测初始腺苷三磷酸双磷酸酶活性。在1分钟内,每10秒钟用1251型全自动光度计(芬兰图尔库LKB-Wallac公司)进行一次生物发光检测。向其中加入10 μ l 10 μ mol/L的ATP以检测背景发光。温度控制设置为25 $^{\circ}$ C,在30或60分钟内用多个比色杯平行测量生物发光,并使用rSFA和STA对不同培养时间后的残留ATP进行比较。用rSFA和STA重复这一过程,并使ATP降解速率作为内部对照来绘制图,以测定两种酶源的ATP降解效率。

[0223] 不同腺苷三磷酸双磷酸酶(ATP-二磷酸水解酶)的生物信息学分析

[0224] 弗氏志贺菌2a株腺苷三磷酸双磷酸酶(GI 532975)的DNA序列(SEQ ID NO:2)以及翻译得到的马铃薯腺苷三磷酸双磷酸酶(翻译得到的马铃薯ATP二磷酸水解酶NM_008XM_004845的基因ID 1025774)(SEQ ID NO:1)的DNA序列来自NCBI核苷酸数据库。使用上述用于同源性搜索、多基因比对和其对蛋白序列的翻译的在线工具分析这些核苷酸。

[0225] 缓冲液体系的优化

[0226] 将等浓度的rSFA在4 $^{\circ}$ C下在缓冲液1(20mM Tris,1mM EDTA,1%BSA,25mM MgSO₄,pH为7.5),缓冲液2(20mM Tris,25mM MgSO₄,2.5%BSA,pH为7.5)和缓冲液3(20mM HEPES,500mM NaCl,25mM MgSO₄,pH为7.5)培养约10个月。如下所述进行生物发光活性分析以检测贮存后rSFA的活性。

[0227] 抑制剂开发

[0228] 检查缓冲液中的rSFA抑制活性后,用尿液验证,其中向10 μ l尿液加入80 μ l的细胞裂解物试剂和10 μ mol/L的ATP。将大约100mM的MgSO₄和1mM的Na₃VO₄加入不同的试管中并培养10分钟,然后使用萤火虫荧光素酶检测发光。

[0229] 生物发光分析

[0230] 使用ATP试剂盒SL(瑞典BioThema AB公司)根据制造商提供的说明书(在缓冲液实验中),或者加入浓缩荧光素酶(在血清/尿实验中),在25 $^{\circ}$ C温度下用1251型光度计(芬兰LKB-Wallac公司)检测萤火虫荧光素酶反应的发光量。最初的荧光素酶反应遵循一级动力学,试剂盒中的ATP试剂SL产生与ATP浓度成正比的光强度。光强度与时间的自然对数的图形呈直线,其中斜率表示反应的速率常数。调节STA、A6535、A6237(Sigma-Aldrich)的起始浓度,使其与rSFA相似。加入0.2 μ mol/L ATP后自动开始BL反应,每10秒钟测量光强度持续10分钟(缓冲液实验)或30分钟(血清和尿液实验),反应体积为0.5mL。

[0231] 核苷/核苷酸的高效液相色谱(HPLC)分析

[0232] 制备dNTP标准制剂,其中所含的酶的最终浓度为0.1mM。将核苷ATP/dATP/dCTP/dGTP/dTTP悬浮在Tris-EDTA缓冲液中,并用流动相(70%乙腈,30%乙酸铵,pH为5.35)稀释10倍。将上述制备的核苷分别与等量的rSFA和STA一起在pH为7.75条件下培养35分钟,并用泵(Jasco PU-2089Plus)将5 μ l的混合物以0.7mL/min的流速注入HPLC检测仪(SeQuant ZIC®-pHILIC柱,默克化工技术公司)。用UV-2075Plus检测器在254nm下检测波峰,并通过等度洗脱实现色谱分离。用Chrompass软件进行分析,其中通过与各自相对应的标准品的保留时间比较来鉴定每个核苷酸/核苷。

序列表

<110> 艾匹瑞斯公司

<120> 利用弗氏志贺菌腺苷三磷酸双磷酸酶的分析 and 诊断方法

<130> NP0155W0

<150> SE 1451332-9

<151> 2014-11-07

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1365

<212> DNA

<213> 马铃薯

<400> 1

```
atgttgaacc aaaatagtca ttttgttttc acaatttttg caatattttt ggttttgccc 60
ctaagtttat tatccaaaaa tgtggatgct caaattccat taagaagaca tttattaagt 120
catgaatcag aacattatgc agtaatatat gatgctggaa gtactggaag tagagtccat 180
gttttttcgat ttgatgaaaa attaggactt cttcctattg gcaacaatat tgagtatttt 240
atggcgacag agccaggttt aagttcatat gcagaagatc caaaggctgc agccaattca 300
cttgagccac ttttagatgg agctgaagga gttgttcctc aagaattgca atctgaaaca 360
cctttagaac ttggggcaac agcaggctct aggatgttaa aaggggatgc agctgaaaaa 420
attctacaag cagtgaagaa tttagtgaag aatcaaagca ctttccatag caaagatcaa 480
tgggtcacta ttcttgatgg aactcaagaa ggctcttata tgtgggctgc aataaattat 540
ttattgggaa atttgggcaa agattataaa agtacaacag caacaattga tcttgggtgt 600
ggttcagtcc aaatggcata tgctatatca aatgaacaat ttgcaaaagc tcctaataat 660
gaggatggag aaccttatgt acaacaaaaa catcttatgt caaaagatta taatctctat 720
gtacatagtt atttaaacta tgggcaatta gcaggctcag ctgagatttt caaggcttca 780
agaaatgaaa gtaatccttg tgctctggaa ggatatgatg ggtattactc atatggagga 840
gtggactaca aagtaaaaagc accaaagaaa ggtagtagtt ggaagagatg caggaggtta 900
actagacatg cacttaaaat aaatgcaaaa tgcaagattg aagaatgcac cttcaatgga 960
gtgtggaatg gtgtgtgttg tgatggacaa aaaaatatte atgcttcate atttttttat 1020
gatattggtg ctcaggtttg cattgttgac accaaatttc catctgctct agcaaagcca 1080
attcaatact taaatgcagc taaagttgct tgccaaacaa atgtggcaga tataaaatcc 1140
atattcccaa aaactcaaga tagaaatate ccatacttat gtatggactt gatatatgag 1200
tacactttgc ttgttgatgg atttggacta aatccacaca aagaaataac agtgatacat 1260
gatgtgcaat acaaaaaacta tctagttgga gcagcatggc cattgggatg tgccattgac 1320
ttggtttctt caactacaaa caaaattaga gttgcatcat cttaa 1365
```

<210> 2

<211> 1134

<212> DNA

<213> 弗氏志贺菌

<400> 2

```

tcacaaatca tcataatcaa gagacaaaac gatacgaaaa aataagataa aaaacatcgt 60
tctttttacca cattatttttc cgtgaatatg aaaaataatg ttattacttt aatataagac 120
tatttttttgt ttttccatca ctctgttcaa atttttccgc atgacttggtg ttttttgtaa 180
tacagctcgt tttttacagc tgaccacaaat catcaattaa ttatgctaag gaaataaatt 240
atgaaaacca aaaacttttct tcttttttgt attgctacaa atatgatttt tatccctca 300
gcaaatgctc tgaaggcaga aggtttttctc actcaacaaa cttcaccaga cagtttgtca 360
atacttccgc cgctccggc agagaattca gtagtatttc aggctgacaa agctcattat 420
gaattcggcc gctcgtcccg ggatgctaatt cgtgtacgtc tcgctagcga agatgcatac 480
tacgagaatt ttggtcttgc attttcagat gcttatggca tggatatttc aagggaaaat 540
accccaatct tatatcagtt gttaacacaa gtactacagg atagccatga ttacgccgtg 600
cgtaacgcca aagaatatta taaaagagtt cgtccattcg ttatttataa agacgcaacc 660
tgtacacctg ataaagatga gaaaatggct atcactggct cttatccctc tggtcattga 720
tcctttgggt gggcagtagc actgatactt gcggagatta atcctcaacg taaagcggaa 780
atacttcgac gtggatatga gtttgagaa agtcgggtca tctgcggtgc gcattggcaa 840
agcgatgtag aggctgggcg tttaatggga gcatcggttg ttgcagtact tcataataca 900
cctgaattta ccaaaagcct tagcgaagcc aaaaaagagt ttgaagaatt aaatactcct 960
accaatgaac tgaccccata aagctggaca gcctgtatca ggctatggag ggcccataga 1020
caaatctacc ctatatgagc ataggaggag tctatgggca caccacgttt taccctgaa 1080
tttaagggat tactggaaag gctgggacat atcctccggc agaagcagaa aaag 1134

```

<210> 3

<211> 780

<212> DNA

<213> 弗氏志贺菌

<400> 3

```

gatatacata tgaaaaccaa aaactttctt cttttttgta ttgctacaaa tatgattttt 60
atcccctcag caaatgctct gaaggcagaa ggttttctca ctcaacaaac ttcaccagac 120
agtttgtcaa tacttccgcc gcctccggca gagaattcag tagtatttca ggctgacaaa 180
gctcattatg aattcggccg ctcgctccgg gatgctaate gtgtacgtct cgctagcgaa 240
gatgcatact acgagaattt tggctcttgc ttttcagatg cttatggcat ggatatttca 300
agggaaaata cccaatctt atatcagttg ttaacacaag tactacagga tagccatgat 360
tacgccgtgc gtaacgcaa agaattattat aaaagagttc gtccattcgt tatttataaa 420
gacgcaacct gtacacctga taaagatgag aaaatggcta tcaactggctc ttatccctct 480
ggctcatgat cctttgggtg ggcagtagca ctgatacttg cggagattaa tctcaacgt 540
aaagcggaaa tacttcgacg tggatatgag tttggagaaa gtcgggtcat ctgcggtgcg 600
cattggcaaa gcgatgtaga ggctgggctg ttaatgggag catcggttgt tgcagtactt 660
cataatacac ctgaatttac caaaagcctt agcgaagcca aaaaagagtt tgaagaatta 720

```

aataactccta ccaatgaact gacccacat catcaccatc accactaacg tacgatgttc 780
<210> 4
<211> 259
<212> PRT
<213> 弗氏志贺菌
<400> 4
Asp Ile His Met Lys Thr Lys Asn Phe Leu Leu Phe Cys Ile Ala Thr
1 5 10 15
Asn Met Ile Phe Ile Pro Ser Ala Asn Ala Leu Lys Ala Glu Gly Phe
20 25 30
Leu Thr Gln Gln Thr Ser Pro Asp Ser Leu Ser Ile Leu Pro Pro Pro
35 40 45
Pro Ala Glu Asn Ser Val Val Phe Gln Ala Asp Lys Ala His Tyr Glu
50 55 60
Phe Gly Arg Ser Leu Arg Asp Ala Asn Arg Val Arg Leu Ala Ser Glu
65 70 75 80
Asp Ala Tyr Tyr Glu Asn Phe Gly Leu Ala Phe Ser Asp Ala Tyr Gly
85 90 95
Met Asp Ile Ser Arg Glu Asn Thr Pro Ile Leu Tyr Gln Leu Leu Thr
100 105 110
Gln Val Leu Gln Asp Ser His Asp Tyr Ala Val Arg Asn Ala Lys Glu
115 120 125
Tyr Tyr Lys Arg Val Arg Pro Phe Val Ile Tyr Lys Asp Ala Thr Cys
130 135 140
Thr Pro Asp Lys Asp Glu Lys Met Ala Ile Thr Gly Ser Tyr Pro Ser
145 150 155 160
Gly His Ala Ser Phe Gly Trp Ala Val Ala Leu Ile Leu Ala Glu Ile
165 170 175
Asn Pro Gln Arg Lys Ala Glu Ile Leu Arg Arg Gly Tyr Glu Phe Gly
180 185 190
Glu Ser Arg Val Ile Cys Gly Ala His Trp Gln Ser Asp Val Glu Ala
195 200 205
Gly Arg Leu Met Gly Ala Ser Val Val Ala Val Leu His Asn Thr Pro
210 215 220
Glu Phe Thr Lys Ser Leu Ser Glu Ala Lys Lys Glu Phe Glu Glu Leu
225 230 235 240
Asn Thr Pro Thr Asn Glu Leu Thr Pro His His His His His His Arg
245 250 255
Thr Met Phe

<210> 5
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 引物
<400> 5
cgcggatccc tgaaggcaga aggttttc 28
<210> 6
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 引物
<400> 6
cccaagcttt tatgggtca gttcatt 27
<210> 7
<211> 53
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 引物
<400> 7
gaacatcgta cgtagtggt gatggtgatg atgtggggtc agttcattgg tag 53
<210> 8
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 引物
<400> 8
gatatacata tgaaaaccaa aaactttc 28
<210> 9
<211> 454
<212> PRT
<213> 马铃薯
<400> 9
Met Leu Asn Gln Asn Ser His Phe Ile Phe Ile Ile Leu Ala Ile Phe
1 5 10 15

Leu Val Leu Pro Leu Ser Leu Leu Ser Lys Asn Val Asn Ala Gln Ile			
20	25	30	
Pro Leu Arg Arg His Leu Leu Ser His Glu Ser Glu His Tyr Ala Val			
35	40	45	
Ile Phe Asp Ala Gly Ser Thr Gly Ser Arg Val His Val Phe Arg Phe			
50	55	60	
Asp Glu Lys Leu Gly Leu Leu Pro Ile Gly Asn Asn Ile Glu Tyr Phe			
65	70	75	80
Met Ala Thr Glu Pro Gly Leu Ser Ser Tyr Ala Glu Asp Pro Lys Ala			
85	90	95	
Ala Ala Asn Ser Leu Glu Pro Leu Leu Asp Gly Ala Glu Gly Val Val			
100	105	110	
Pro Gln Glu Leu Gln Ser Glu Thr Pro Leu Glu Leu Gly Ala Thr Ala			
115	120	125	
Gly Leu Arg Met Leu Lys Gly Asp Ala Ala Glu Lys Ile Leu Gln Ala			
130	135	140	
Val Arg Asn Leu Val Lys Asn Gln Ser Thr Phe His Ser Lys Asp Gln			
145	150	155	160
Trp Val Thr Ile Leu Asp Gly Thr Gln Glu Gly Ser Tyr Met Trp Ala			
165	170	175	
Ala Ile Asn Tyr Leu Leu Gly Asn Leu Gly Lys Asp Tyr Lys Ser Thr			
180	185	190	
Thr Ala Thr Ile Asp Leu Gly Gly Gly Ser Val Gln Met Ala Tyr Ala			
195	200	205	
Ile Ser Asn Glu Gln Phe Ala Lys Ala Pro Gln Asn Glu Asp Gly Glu			
210	215	220	
Pro Tyr Val Gln Gln Lys His Leu Met Ser Lys Asp Tyr Asn Leu Tyr			
225	230	235	240
Val His Ser Tyr Leu Asn Tyr Gly Gln Leu Ala Gly Arg Ala Glu Ile			
245	250	255	
Phe Lys Ala Ser Arg Asn Glu Ser Asn Pro Cys Ala Leu Glu Gly Cys			
260	265	270	
Asp Gly Tyr Tyr Ser Tyr Gly Gly Val Asp Tyr Lys Val Lys Ala Pro			
275	280	285	
Lys Lys Gly Ser Ser Trp Lys Arg Cys Arg Arg Leu Thr Arg His Ala			
290	295	300	
Leu Lys Ile Asn Ala Lys Cys Asn Ile Glu Glu Cys Thr Phe Asn Gly			
305	310	315	320
Val Trp Asn Gly Gly Gly Gly Asp Gly Gln Lys Asn Ile His Ala Ser			

	325		330		335
Ser Phe Phe Tyr Asp Ile Gly Ala Gln Val Gly Ile Val Asp Thr Lys					
	340		345		350
Phe Pro Ser Ala Leu Ala Lys Pro Ile Gln Tyr Leu Asn Ala Ala Lys					
	355		360		365
Val Ala Cys Gln Thr Asn Val Ala Asp Ile Lys Ser Ile Phe Pro Lys					
	370		375		380
Thr Gln Asp Arg Asn Ile Pro Tyr Leu Cys Met Asp Leu Ile Tyr Glu					
385		390		395	400
Tyr Thr Leu Leu Val Asp Gly Phe Gly Leu Asn Pro His Lys Glu Ile					
	405		410		415
Thr Val Ile His Asp Val Gln Tyr Lys Asn Tyr Leu Val Gly Ala Ala					
	420		425		430
Trp Pro Leu Gly Cys Ala Ile Asp Leu Val Ser Ser Thr Thr Asn Lys					
	435		440		445
Ile Arg Val Ala Ser Ser					
450					
<210> 10					
<211> 246					
<212> PRT					
<213> 弗氏志贺菌					
<400> 10					
Met Lys Thr Lys Asn Phe Leu Leu Phe Cys Ile Ala Thr Asn Met Ile					
1	5		10		15
Phe Ile Pro Ser Ala Asn Ala Leu Lys Ala Glu Gly Phe Leu Thr Gln					
	20		25		30
Gln Thr Ser Pro Asp Ser Leu Ser Ile Leu Pro Pro Pro Pro Ala Glu					
	35		40		45
Asn Ser Val Val Phe Gln Ala Asp Lys Ala His Tyr Glu Phe Gly Arg					
50		55		60	
Ser Leu Arg Asp Ala Asn Arg Val Arg Leu Ala Ser Glu Asp Ala Tyr					
65		70		75	80
Tyr Glu Asn Phe Gly Leu Ala Phe Ser Asp Ala Tyr Gly Met Asp Ile					
	85		90		95
Ser Arg Glu Asn Thr Pro Ile Leu Tyr Gln Leu Leu Thr Gln Val Leu					
	100		105		110
Gln Asp Ser His Asp Tyr Ala Val Arg Asn Ala Lys Glu Tyr Tyr Lys					
	115		120		125
Arg Val Arg Pro Phe Val Ile Tyr Lys Asp Ala Thr Cys Thr Pro Asp					

130	135	140
Lys Asp Glu Lys Met Ala Ile Thr Gly Ser Tyr Pro Ser Gly His Ala		
145	150	155
Ser Phe Gly Trp Ala Val Ala Leu Ile Leu Ala Glu Ile Asn Pro Gln		
165	170	175
Arg Lys Ala Glu Ile Leu Arg Arg Gly Tyr Glu Phe Gly Glu Ser Arg		
180	185	190
Val Ile Cys Gly Ala His Trp Gln Ser Asp Val Glu Ala Gly Arg Leu		
195	200	205
Met Gly Ala Ser Val Val Ala Val Leu His Asn Thr Pro Glu Phe Thr		
210	215	220
Lys Ser Leu Ser Glu Ala Lys Lys Glu Phe Glu Glu Leu Asn Thr Pro		
225	230	235
Thr Asn Glu Leu Thr Pro		240
245		

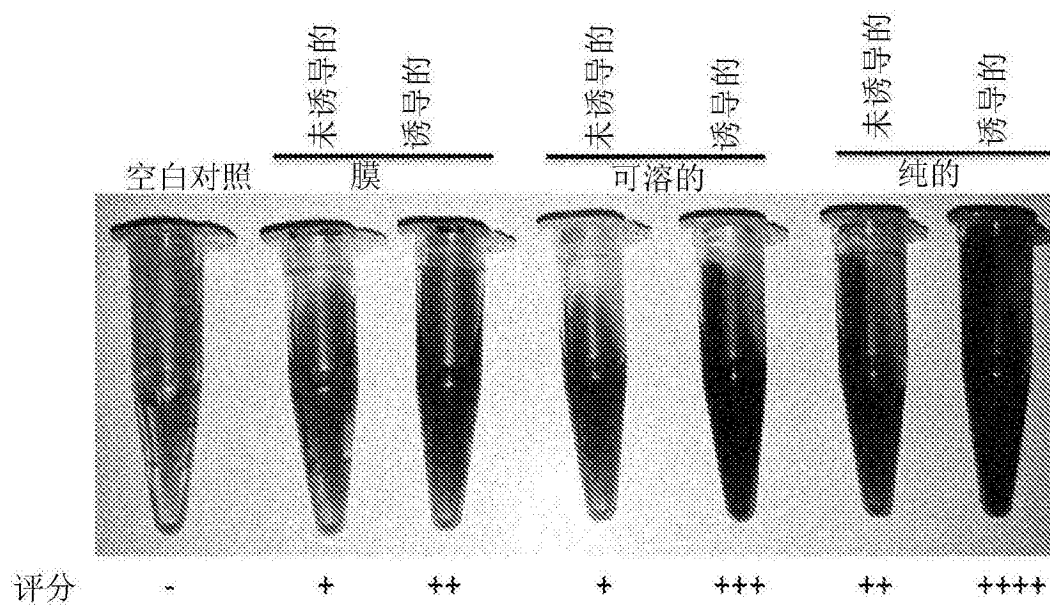


图1

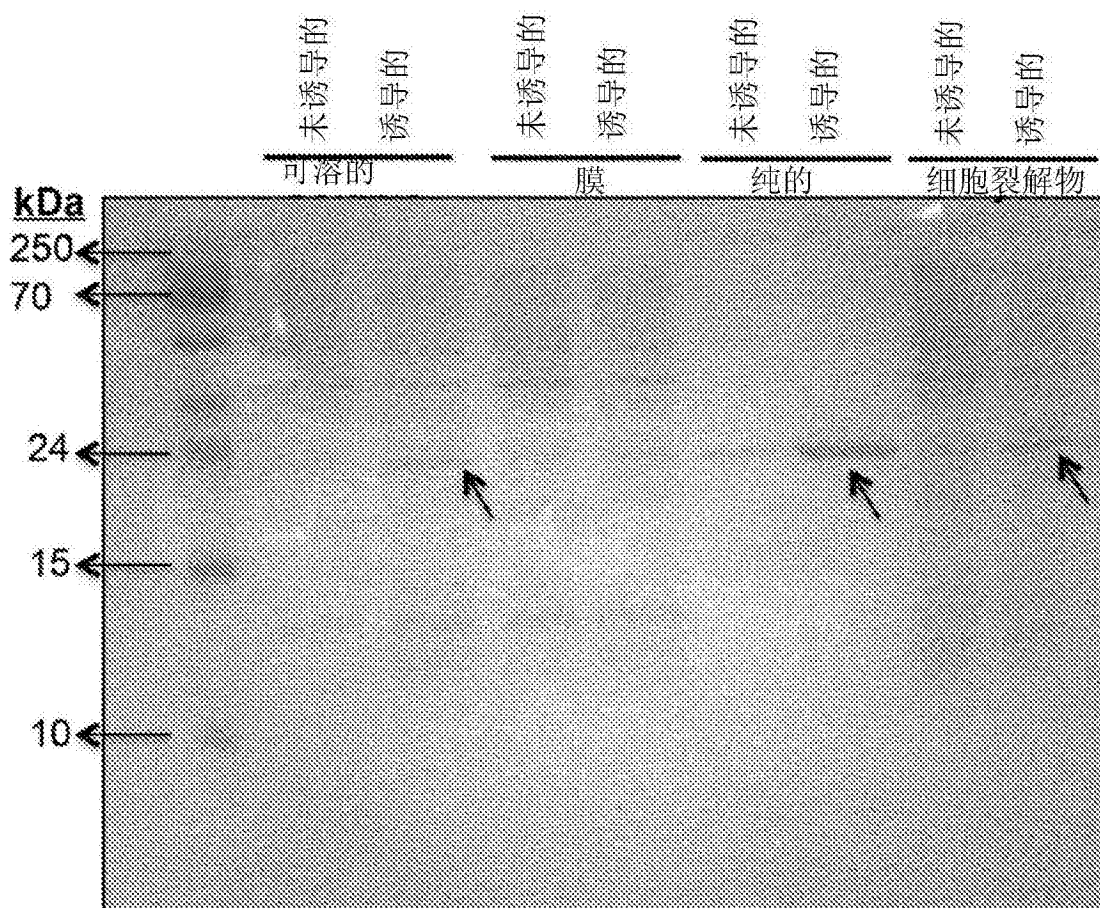


图2

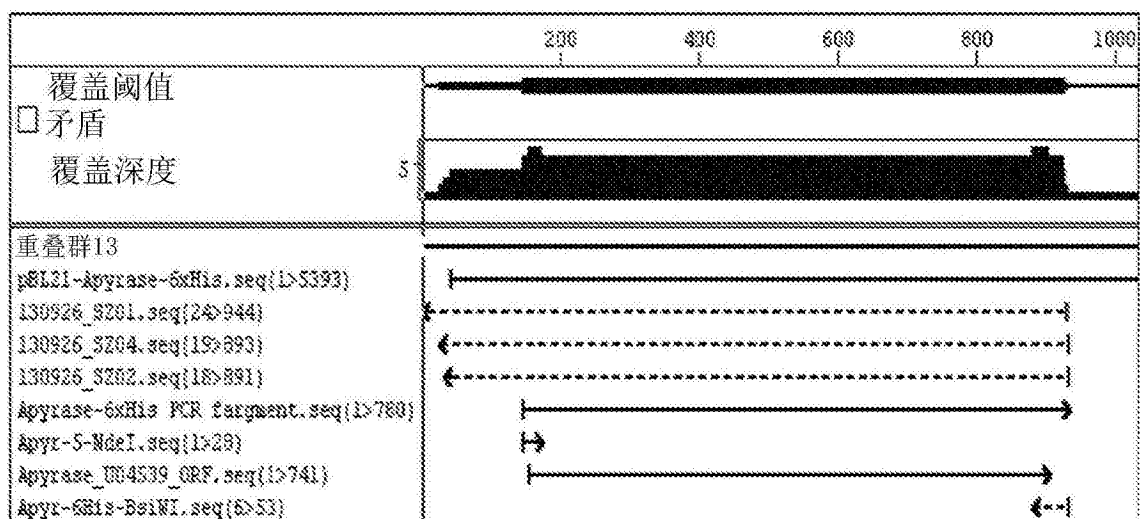


图3A

RSFA	1	DIHMETKNFLLFCIATNMIFIPSANALKAEGFLTQQTSPDLSILPPPPA	50
SFA	1	---MKTENFLLFCIATNMIFIPSANALKAEGFLTQQTSPDLSILPPPPA	47
RSFA	51	ENSVVVFQADKAHYEFGRSLRDANRVRLASEDAYYENFGLAFSDAYGMDIS	100
SFA	48	ENSVVVFQADKAHYEFGRSLRDANRVRLASEDAYYENFGLAFSDAYGMDIS	97
RSFA	101	RENTPILYQLLTQVLQDSHDYAVRNAKEYYKRVPPFVIYKDATCTPDKDE	150
SFA	98	RENTPILYQLLTQVLQDSHDYAVRNAKEYYKRVPPFVIYKDATCTPDKDE	147
RSFA	151	KMAITGSYPSCGNASFGWAVALILAEINPQRKAEILRGYEFGESRVICGA	200
SFA	148	KMAITGSYPSCGNASFGWAVALILAEINPQRKAEILRGYEFGESRVICGA	197
RSFA	201	HWQSDVEAGRIMGASVVAVLHNTPEFTKSLSEAKKEFEEINTPTNELTPH	250
SFA	198	HWQSDVEAGRIMGASVVAVLHNTPEFTKSLSEAKKEFEEINTPTNELTP-	246
RSFA	251	HHHHHRTMF	259
SFA	247	-----	246

图3B

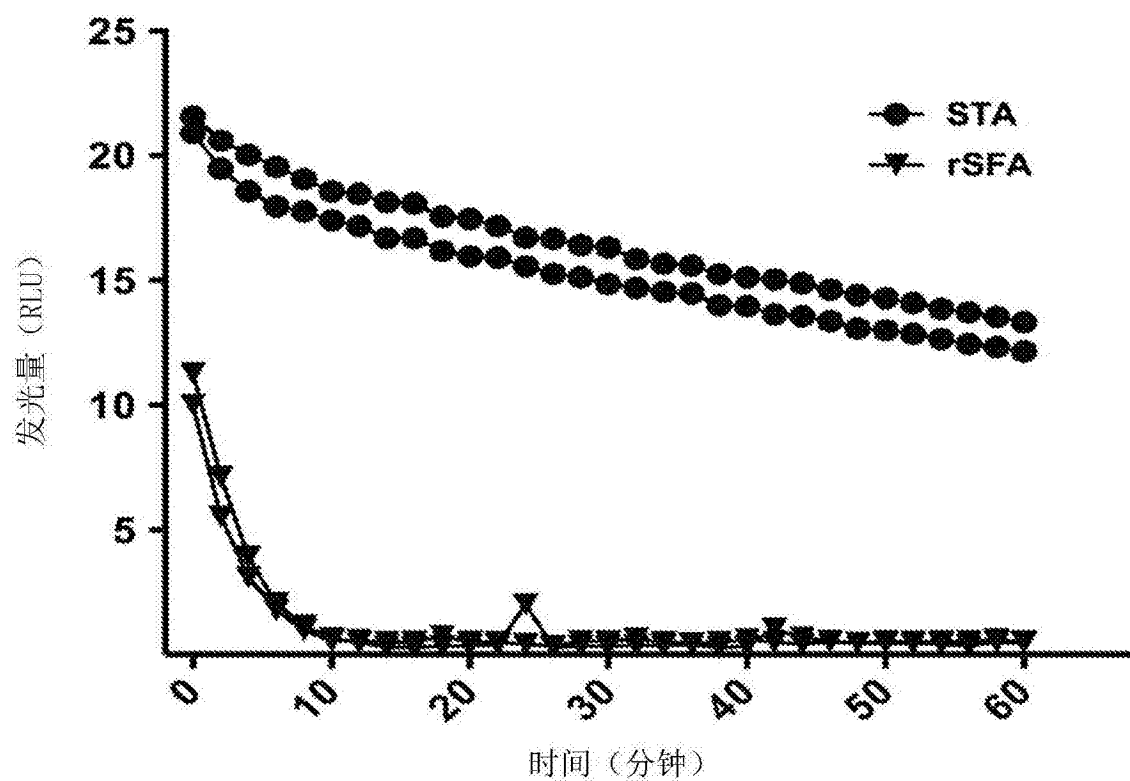


图4

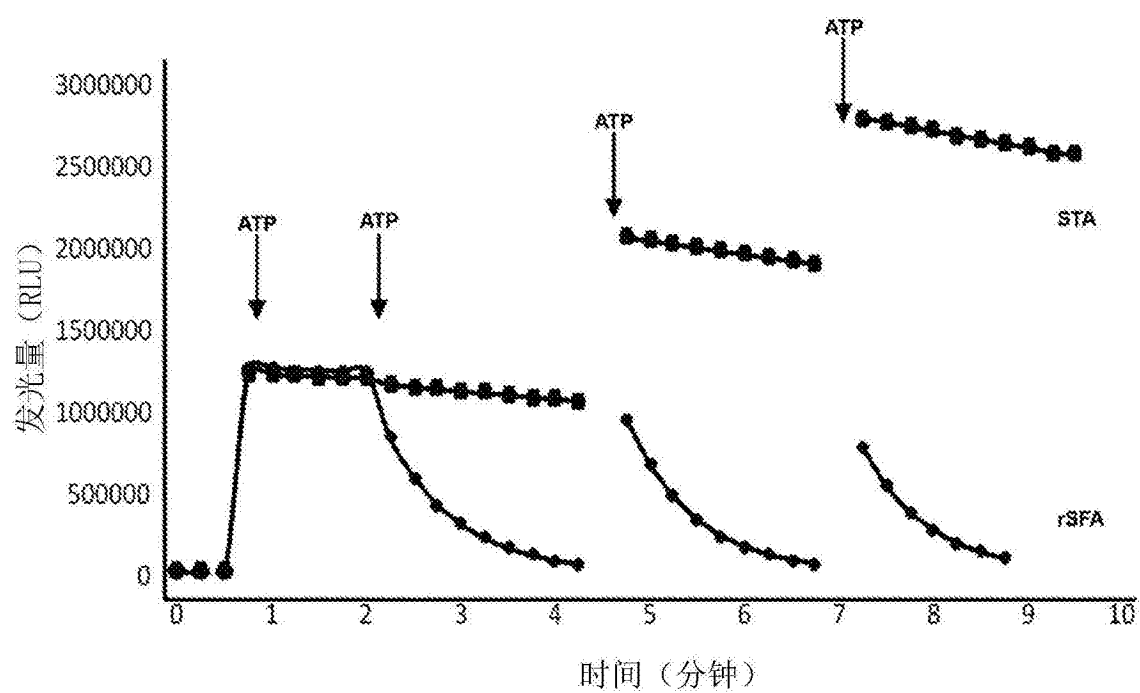


图5

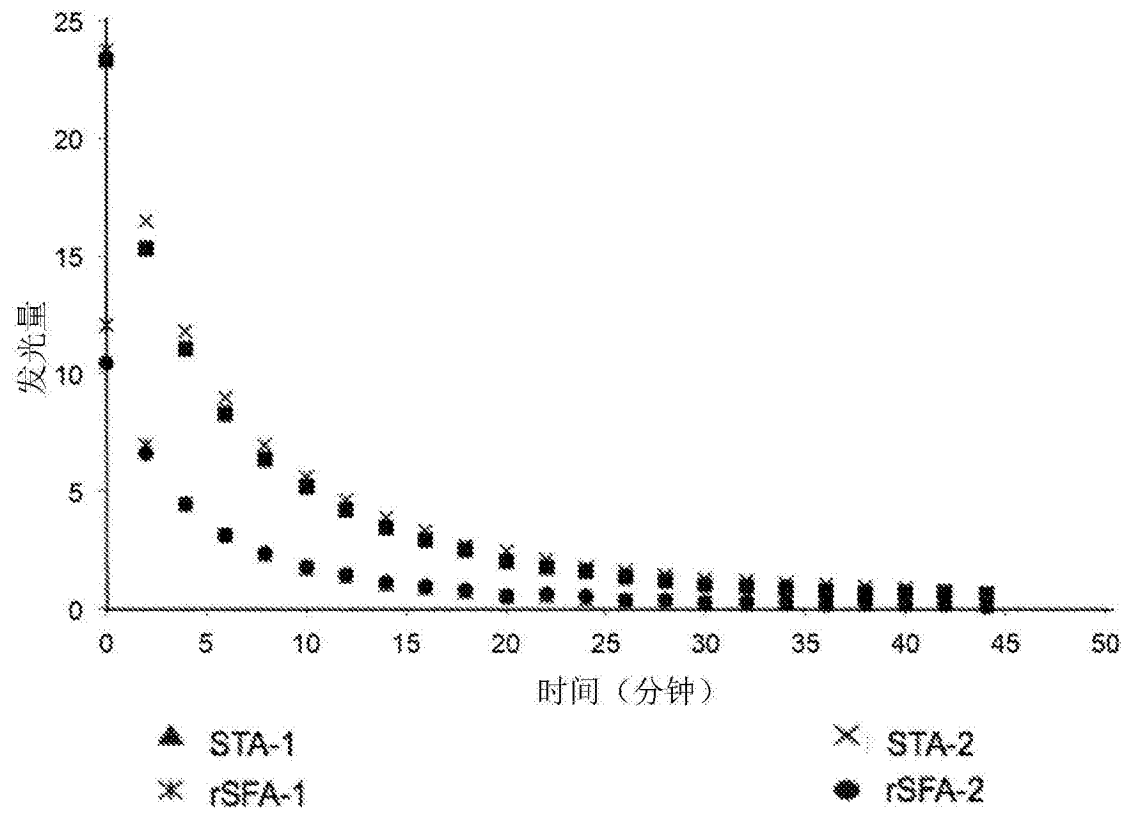


图6A

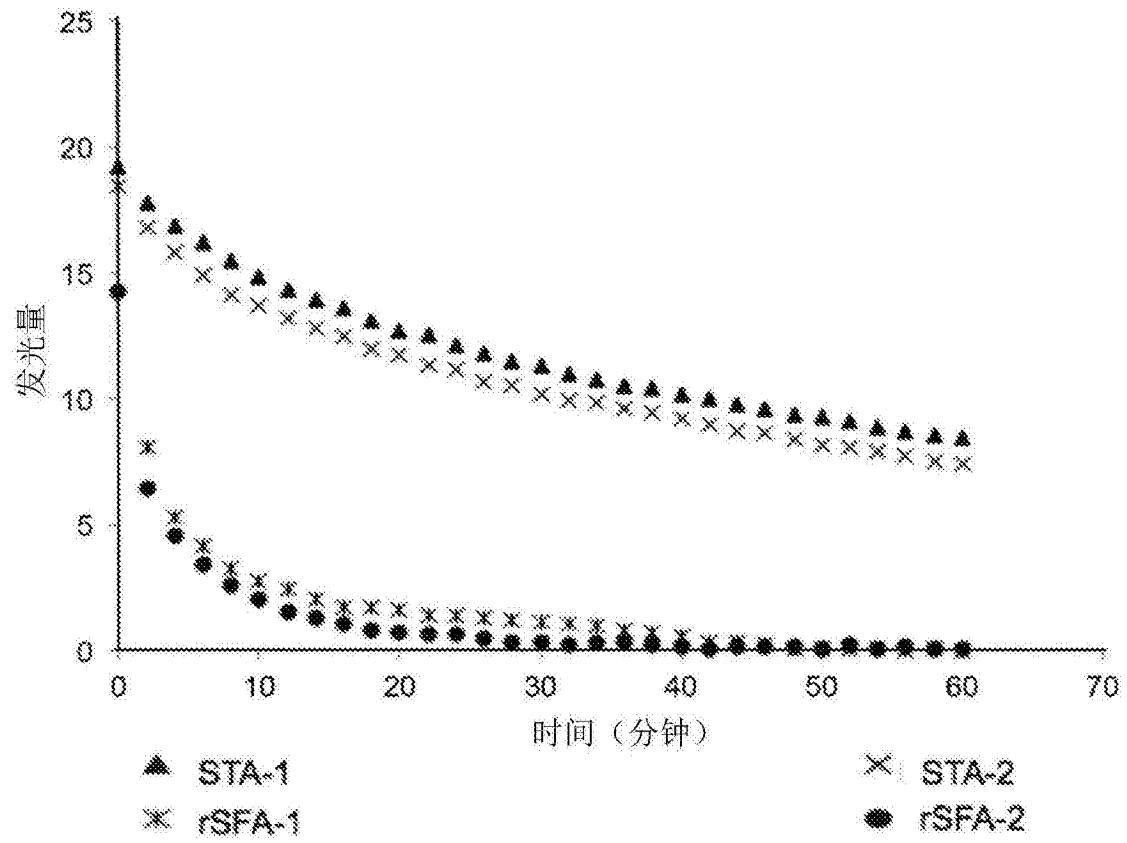


图6B

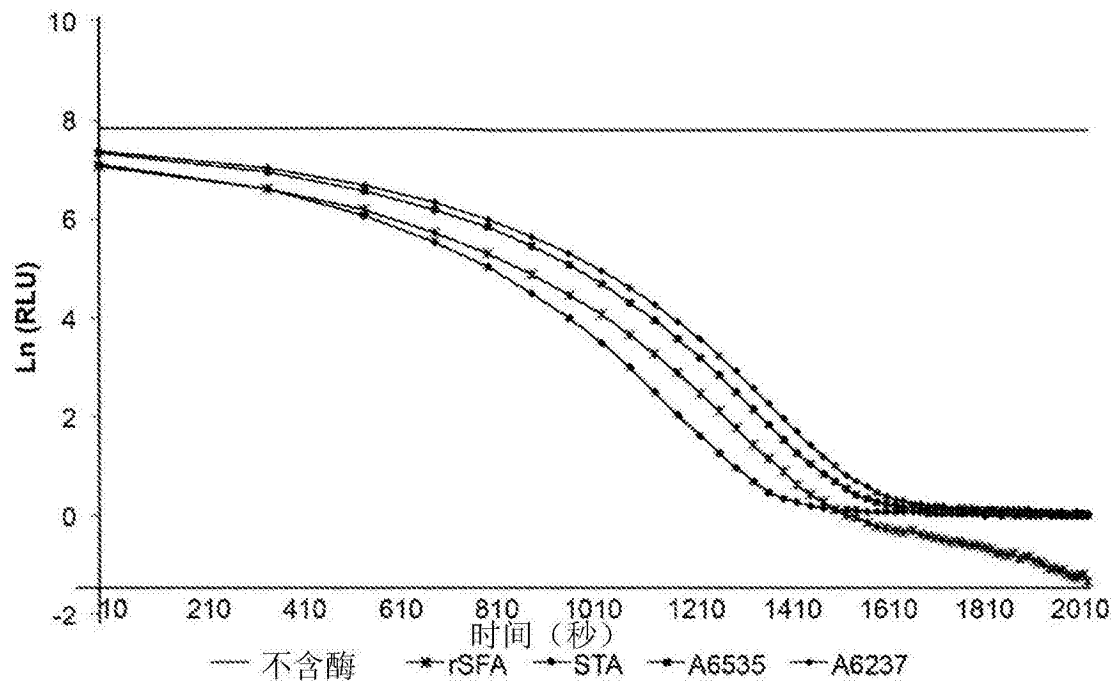


图7

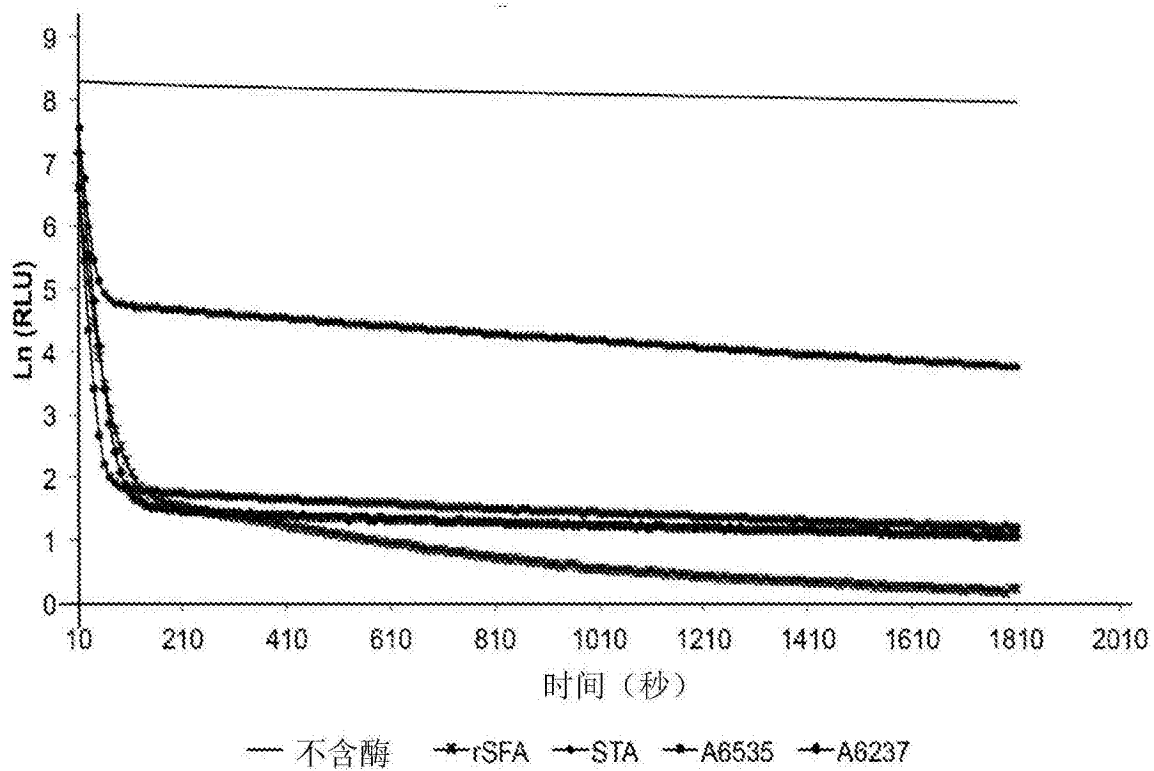


图8

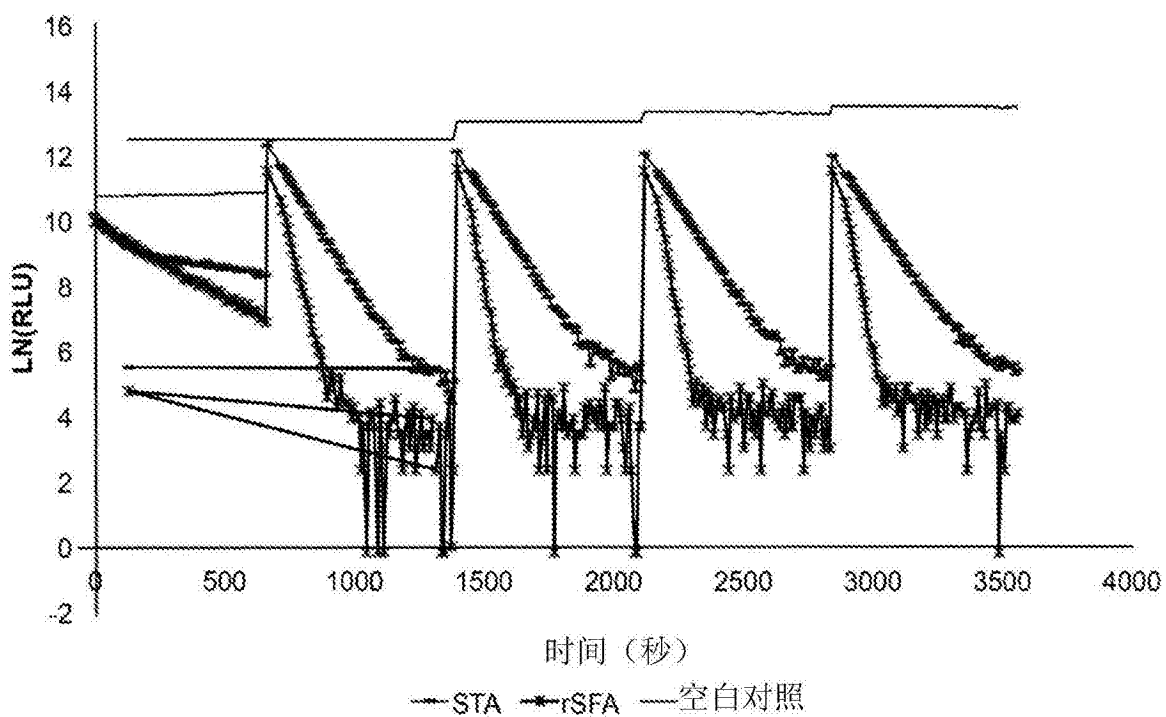


图9

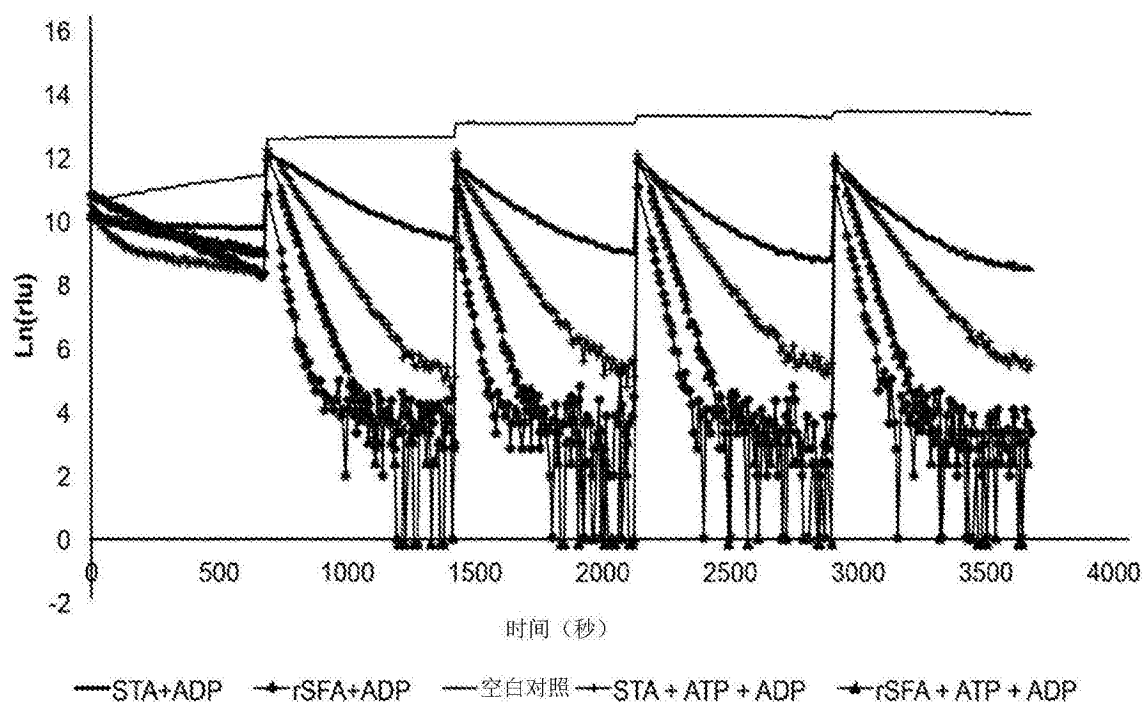


图10

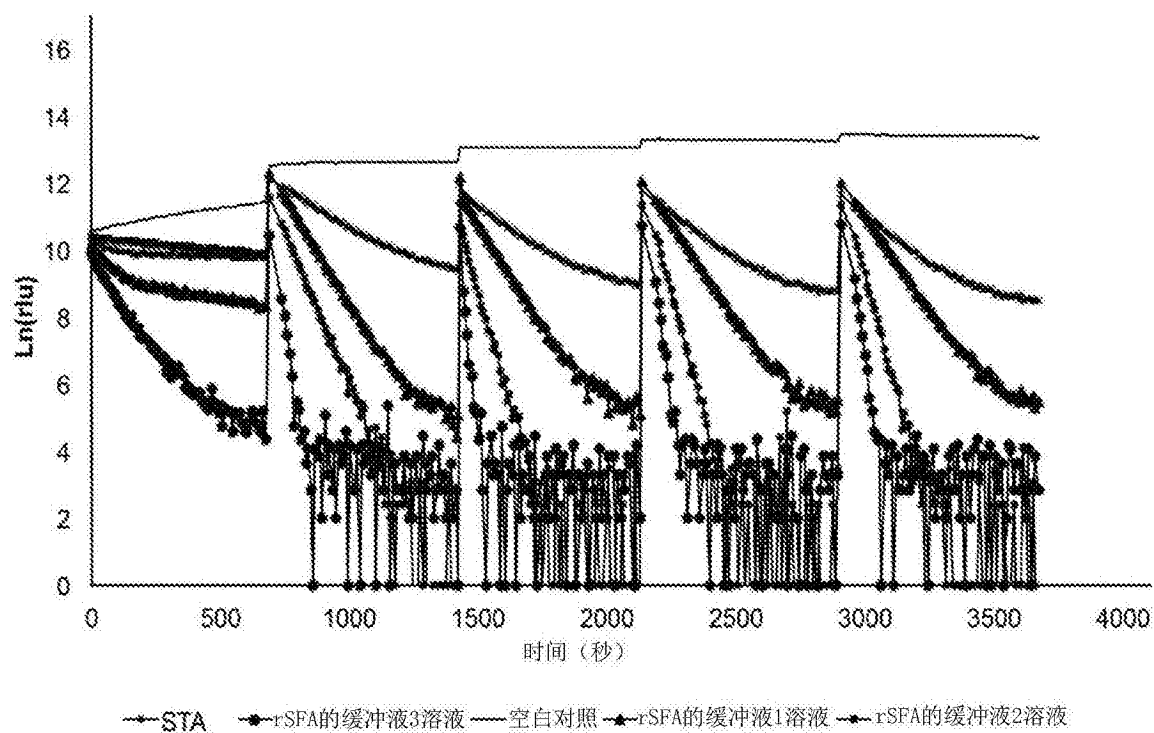


图11

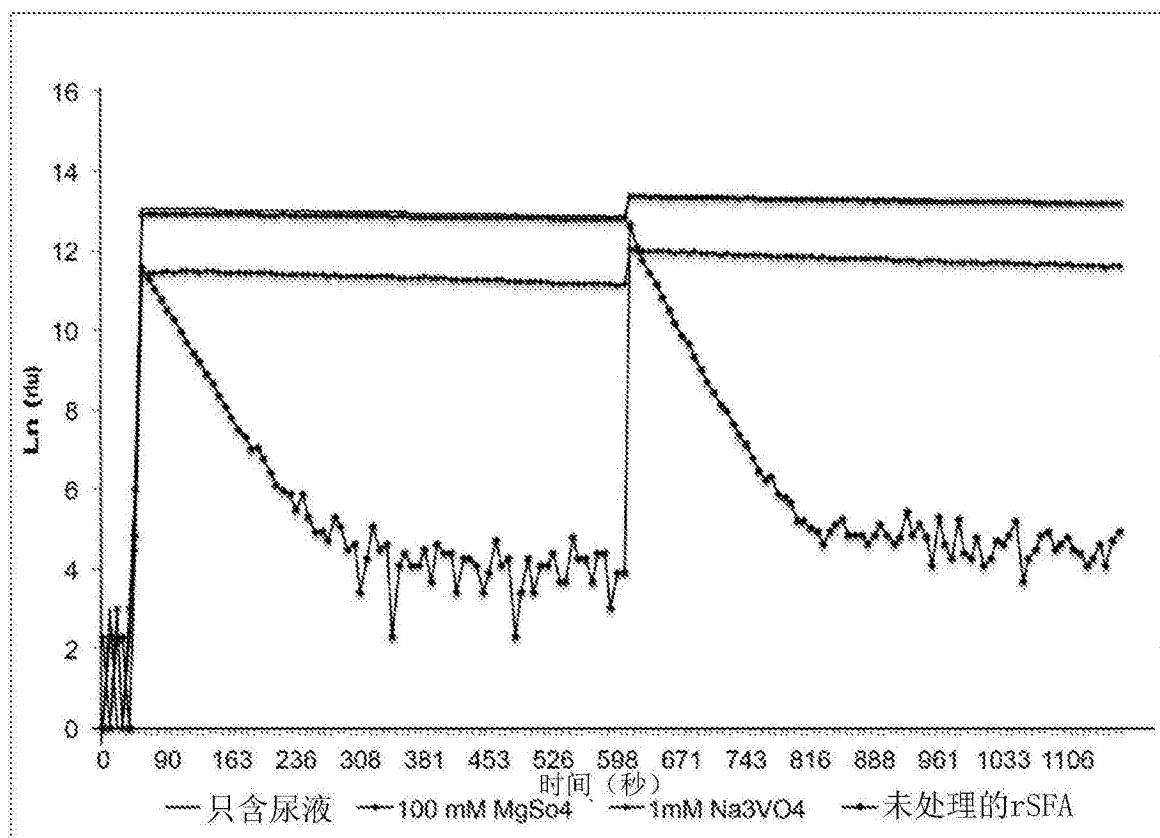


图12

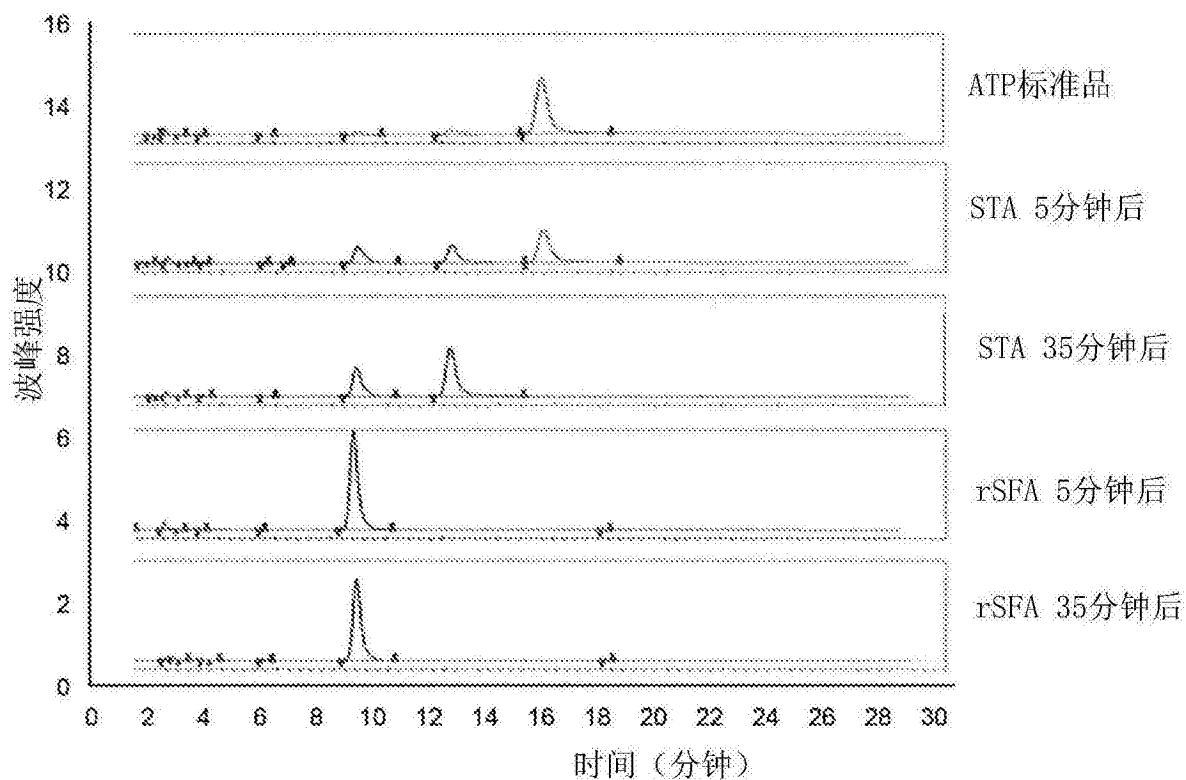


图13A

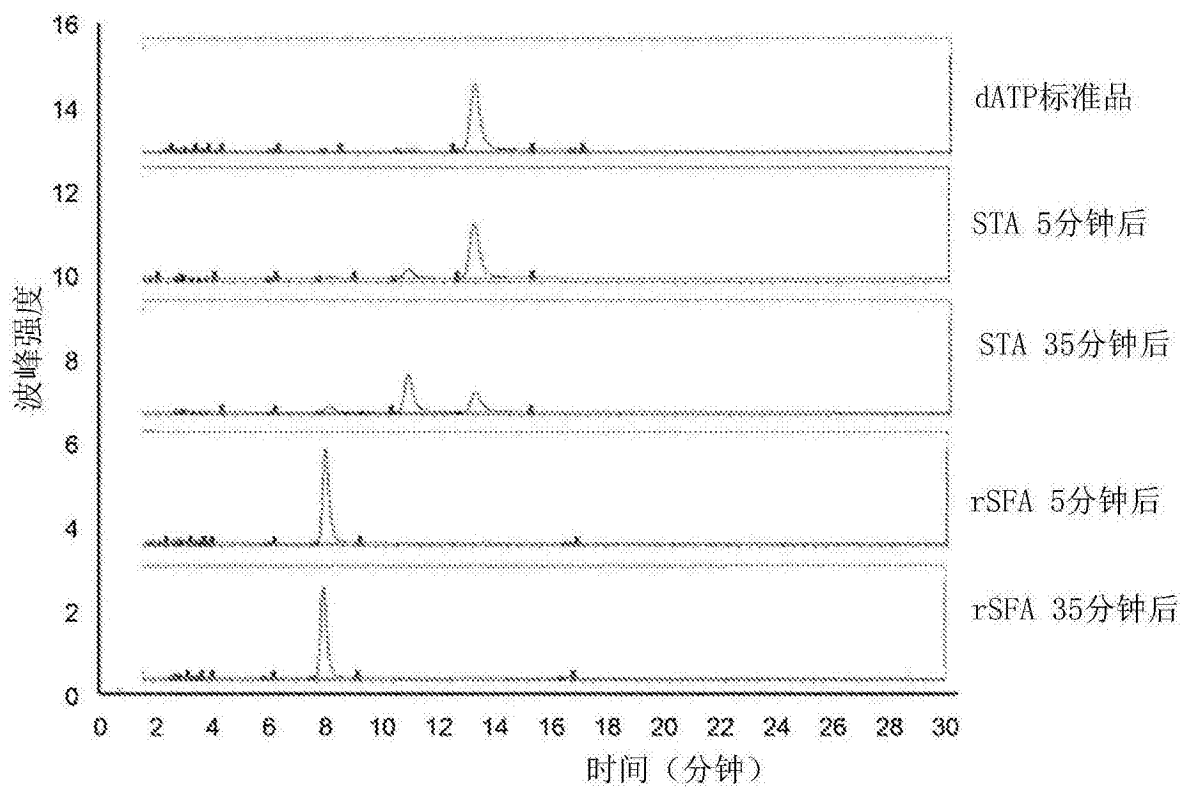


图13B

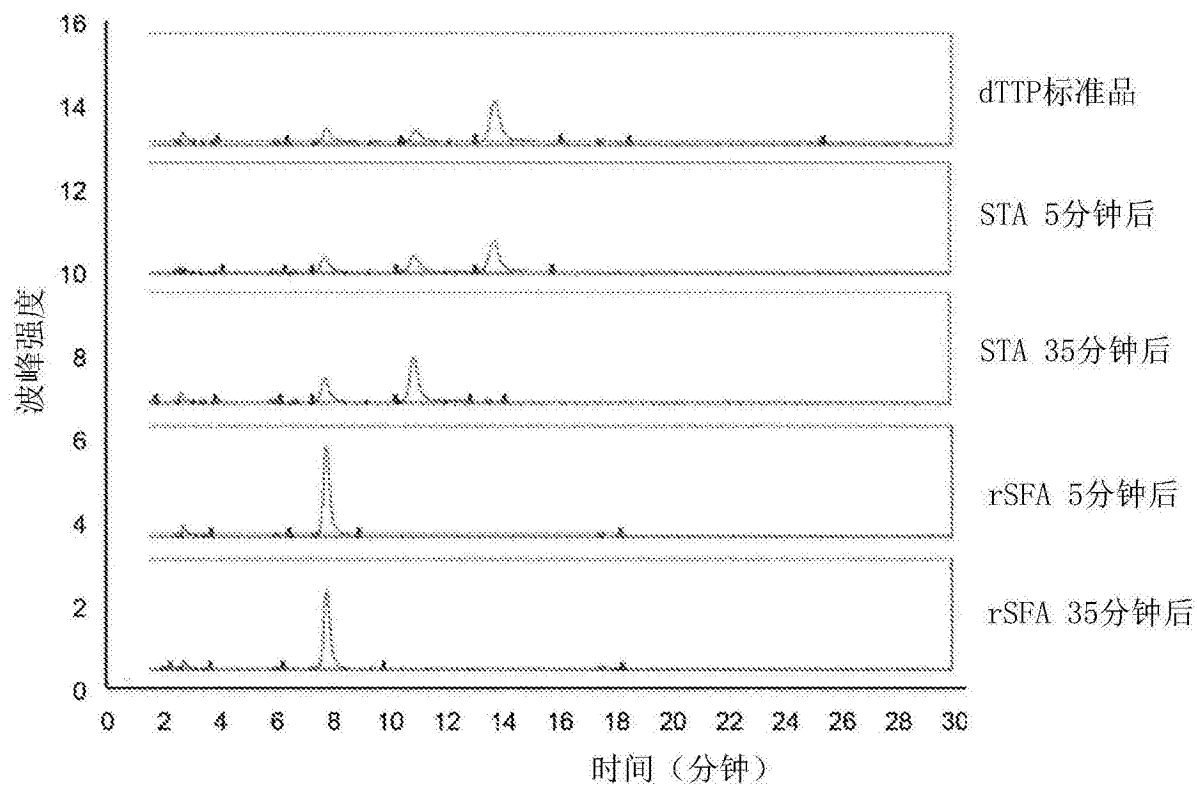


图13C

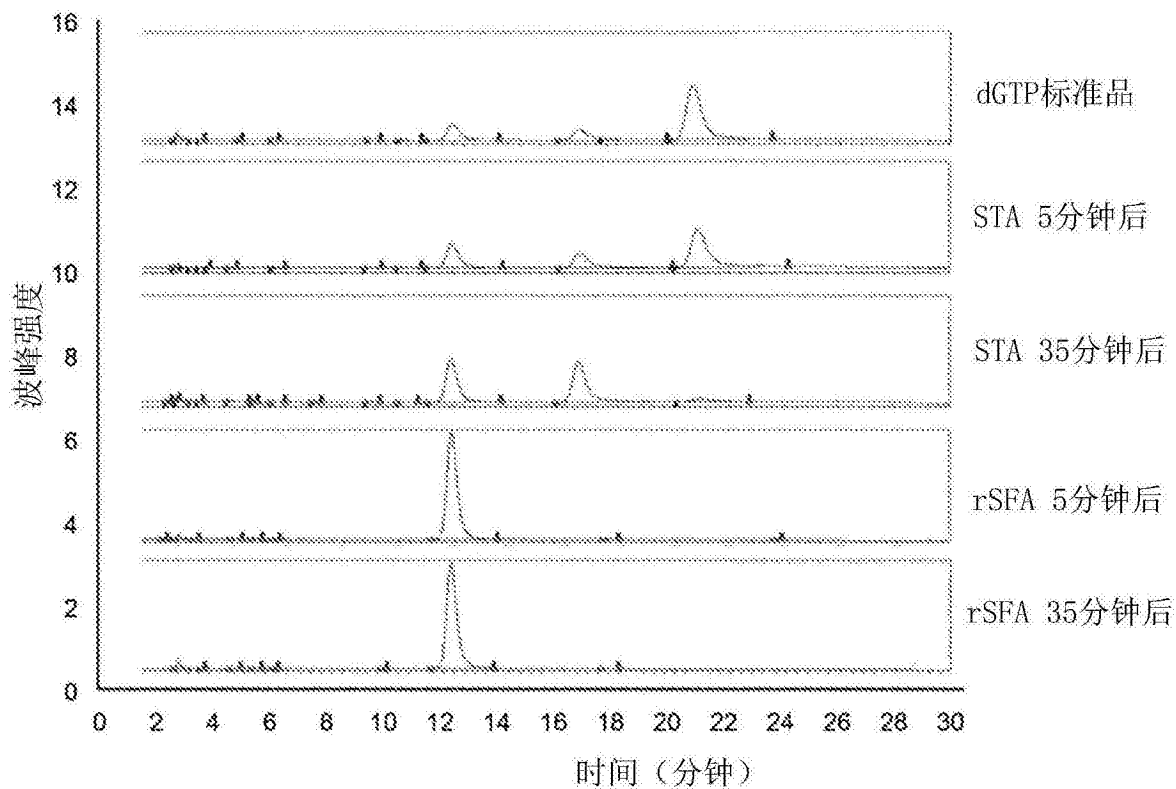


图13D

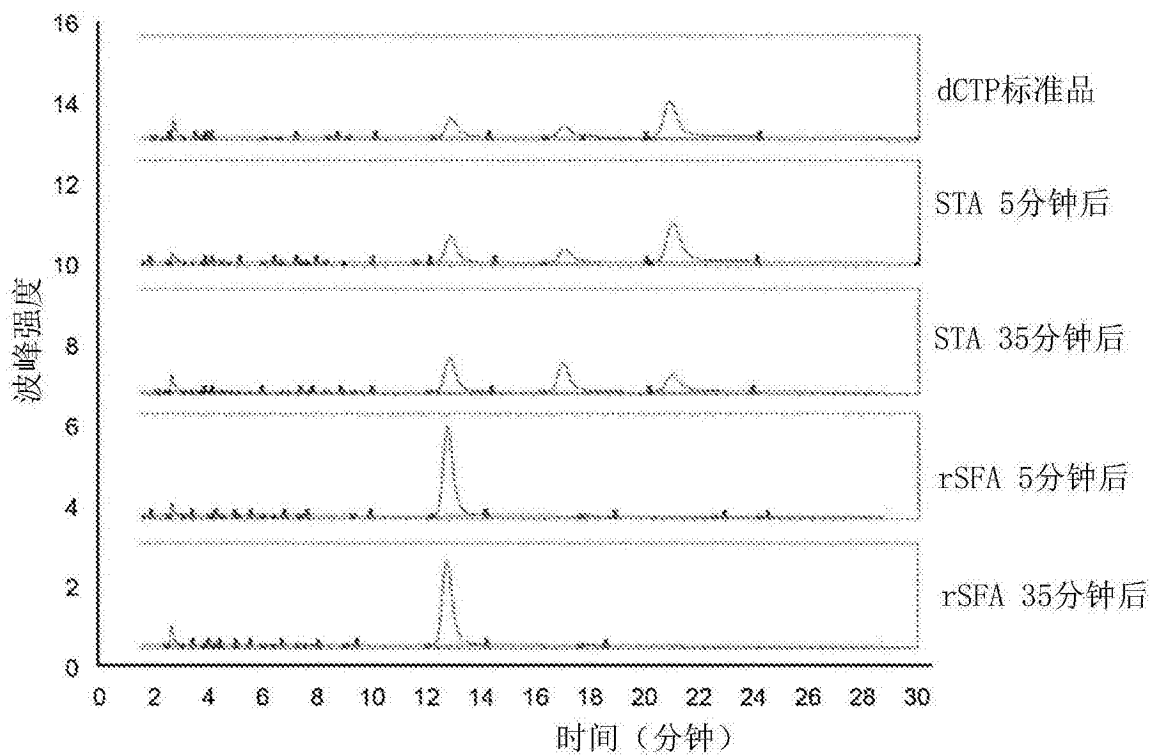


图13E