

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl.⁴

C12N 15/00

C12N 1/00



[12]发明专利申请公开说明书

[11]CN 85 1 09740 A

[43]公开日 1987年2月4日

[21]申请号 85 1 09740

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
代理部

[22]申请日 85.12.30

代理人 辛敏忠 顾柏棣

[30]优先权

(32)84.12.31 (33)美国 (31)687,903

(32)85.2.15 (33)美国 (31)702,308

[71]申请人 佐治亚州大学研究基金会

地址 美国佐治亚州30620阿森斯

[72]发明人 米顿·约瑟夫·科米尔

[54]发明名称 能表达脱辅基水母发光蛋白(Apoaequorin)的重组DNA载体

[57]摘要

一个为脱辅基水母发光蛋白编码的基因以及含该基因的重组载体。

242/87101907/02

北京市期刊登记证第1405号

CN 85 1 09740 A

权 利 要 求 书

1. -种以下式表示的同质肽

蛋- 苏- 丝- 谷- 谷酰- 酪- 丝- 缬- 赖- 亮- 苏- 脯- 天冬- 苯丙
- 天冬- 天冬酰- 脯- 赖- 色- 异亮- 甘- 精- 组- 赖- 组- 蛋- 苯丙-
天冬酰- 苯丙- 亮- 天冬- 缬- 天冬酰- 组- 天冬酰- 甘- 精- 异亮- 丝
- 亮- 天冬- 谷- 蛋- 缬- 酪- 赖- 丙- 丝- 天冬- 异亮- 缬- 异亮- 天冬酰
- 天冬酰- 亮- 甘- 丙- 苏- 脯- 谷- 谷酰- 丙- 赖- 精- 组- 赖- 天冬- 丙
- 缬- 谷- 丙- 苯丙- 苟丙- 甘- 丙- 甘- 蛋- 赖- 酪- 甘- 缬- 谷
- 苏- 谷- 色- 脯- 谷- 酪- 异亮- 谷- 甘- 色- 赖- 精- 亮- 丙- 丝-
谷- 谷- 亮- 赖- 精- 酪- 丝- 赖- 天冬酰- 谷酰- 异亮- 苏- 亮- 异亮
- 精- 亮- 色- 甘- 天冬- 丙- 亮- 苟丙- 天冬- 异亮- 异亮- 天冬- 赖
- 天冬- 谷酰- 天冬酰- 甘- 丙- 异亮- 丝- 亮- 天冬- 谷- 色- 赖- 丙
- 酪- 苏- 赖- 丝- 丙- 甘- 异亮- 异亮- 谷酰- 丝- 丝- 谷- 天冬- 半
胱- 谷- 谷- 苏- 苟丙- 精- 缬- 半胱- 天冬- 异亮- 天冬- 谷- 丝- 甘
- 谷酰- 亮- 天冬- 缬- 天冬- 谷- 蛋- 苏- 精- 谷酰- 组- 亮- 甘- 苟丙-
色- 酪- 苏- 蛋- 天冬- 脯- 丙- 半胱- 谷- 赖- 亮- 酪- 甘- 甘-
丙- 缬- 脯- 。

2. -种分离出的DNA分子，其特征在于它包括一个为权利要求1 所述肽编码的核昔酸顺序。

3. 根据权利要求2 所述分子，其特征在于它们的核昔酸顺序是：

ATG	ACC	AGC	GAA	CAA	TAC	TCA	GAC
AAG	CTT	ACA	CCA	GAC	TTC	GAC	AAC
CCA	AAA	TGG	ATT	GGA	CGA	CAC	AAG
CAC	ATG	TTT	AAT	TTT	CTT	GAT	GTC
AAC	CAC	AAT	GGA	AGG	ATC	TCT	CTT

GAC GAG ATG GTC TAC AAG GCG TCC
GAT ATT GTT ATA AAC AAT CTT GGA
GCA ACA CCT GAA CAA GCC AAA CGT
CAC AAA GAT GCT GTA GAA GCC TTC
TTC GGA GGA GCT GGA ATG AAA TAT
GGT GTA GAA ACT GAA TGG CCT GAA
TAC ATC GAA GGA TGG AAA AGA CTG
GCT TCC GAG GAA TTG AAA AGG TAT
TCA AAA AAC CAA ATC ACA CTT ATT
CGT TTA TGG GGT GAT GCA TTG TTC
GAT ATC ATT GAC AAA GAC CAA AAT
GGA GCT ATT TCA CTG GAT GAA TGG
AAA GCA TAC ACC AAA TCT GCT GGC
ATC ATC CAA TCG TCA GAA GAT TGC
GAG GAA ACA TTC AGA GTG TGC GAT
ATT GAT GAA AGT GGA CAG CTC GAT
GTT GAT GAG ATG ACA AGA CAA CAT
TTA GGA TTT TGG TAC ACC ATG GAT
CCT GCT TGC GAA AAG CTC TAC GGT
GGA GCT GTC CCC.

4. 根据权利要求3 所述分子，其特征在于其3'端5'都还包括一个不表达的片段，分子的核苷酸顺序是：

CTT TGC ACC AAA ACA CCA CAT CAA
ATC TCC AGT TGA TAA ACT AAA TCG
TCC CAA CGG CAA CAG GCC AAC ATG
ACC AGC GAA CAA TAC TCA GTC AAG

CTT ACA CCA GAC TTC GAC AAC CCA
AAA TGG ATT GGA CGA CAC AAG CAC
ATG TTT AAT TTT CTT GAT GTC AAC
CAC AAT GGA AGG ATC TCT CTT GAC
GAG ATG GTC TAC AAG GCG TCC GAT
ATT GTT ATA AAC AAT CTT GGA GCA
ACA CCT GAA CAA GCC AAA CGT CAC
AAA GAT GCT GTA GCC TTC TTC GGA
GGA GCT GGA ATG AAA TAT GGT GTA
GAA ACT GAA TGG CCT GAA TAC ATC
GAA GGA TGG AAA AGA CTG GCT TCC
GAG GAA TTG AAA AGG TAT TCA AAA
AAC CAA ATC ACA CTT ATT CGT TTA
TGG GGT GAT GCA TTG TTC GAT ATC
ATT GAC AAA GAC CAA AAT GGA GCT
ATT TCA CTG GAT GAA TGG AAA GCA
TAC ACC AAA TCT GCT GGC ATC ATC
CAA TCG TCA GAA GAT TGC GAG GAA
ACA TTC AGA GTG TGC GAT ATT GAT
GAA AGT GGA CAG CTC GAT GTT GAT
GAG ATG ACA AGA CAA CAT TTA GGA
TTT TGG TAC ACC ATG GAT CCT GCT
TGC GAA AAG CTC TAC GGT GGA GCT
GTC CCC TAA GAA ACT CTG CGC .

5.根据权利要求3 所述分子，其特征在于它是一个单链DNA分子。

6.根据权利要求3 所述分子，其特征在于它是一个形成双链的DNA

分子。

7. 一种重组DNA载体，其特征在于重组载体可以在一个微生物中复制，它并包括一个为权利要求1的肽编码的核苷酸顺序。

8. 根据权利要求7所述重组DNA载体，其特征在于它包括下列核苷酸顺序：

ATG ACC AGC GAA CAA TAC TCA GAC
AAG CTT ACA CCA GAC TTC GAC AACCC
CA AAA TGG ATT GGA CGA CAC AAG
CAC ATG TTT AAT TTT CTT GAT GTC
AAC CAC AAT GGA AGG ATC TCT CTT
GAC GAG ATG GTC TAC AAG GCG TCC
GAT ATT GTT ATA AAC AAT CTT GGA
GCA ACA CCT GAA CAA GCC AAA CGT
CAC AAA GAT GCT GTA GAA GCC TTC
TTC GGA GGA GCT GGA ATG AAA TAT
GGT GTA GAA ACT GAA TGG CCT GAA
TAC ATC GAA GGA TGG AAA AGA CTG
GCT TCC GAG GAA TTG AAA AGG TAT
TCA AAA AAC CAA ATC ACA CTT ATT
CGT TTA TGG GGT GAT GCA TTG TTC
GAT ATC ATT GAC AAA GAC CAA AAT
GGA GCT ATT TCA CTG GAT GAA TGG
AAA GCA TAC ACC AAA TCT GCT GGC
ATC CAA TCG TCA GAA GAT TGC GAG
GAA ACA TTC AGA GTG TGC GAT ATT
GAT GAA AGT GGA CAG CTC GAT GTT

GAT GAG ATG ACA AGA CAA CAT TTA
GGA TTT TGG TAC ACC ATG GAT CCT
GCT TGC GAA AAG CTC TAC GGT GGA
GCT GTC CCC.

9. 根据权利要求7所述重组DNA载体，其特征在于其中为权利要求1的肽编码的顺序上游有一个乳糖启动子。

10. 一个用遗传工程技术得到的微生物，其特征在于它含有权利要求7所述的重组DNA载体。

11. 权利要求10所述微生物，其特征在于它所含的重组DNA载体包括下式的核苷酸顺序：

ATG ACC AGC GAA CAA TAC TCA GTC
AAG CTT ACA CCA GAC TTC GAC AAC
CCA AAA TGG ATT GGA CGA CAC AAG
CAC ATG TTT AAT TTT CTT GAT GTC
AAC CAC AAT GGA AGG ATC TCT CTT
GAC GAG ATG GTC TAC AAG GCG TCC
GAT ATT GTT ATA AAC AAT CTT GGA
GCA ACA CCT GAA CAA GCC AAA CGT
CAC AAA GAT GCT GTA GAA GCC TTC
TTC GGA GGA GCT GGA ATG AAA TAT
GGT GTA GAA ACT GAA TGG CCT GAA
TAC ATC GAA GGA TGG AAA AGA CTG
GCT TCC GAG GAA TTG AAA AGG TAT
TCA AAA AAC CAA ATC ACA CTT ATT
CGT TTA TGG GGT GAT GCA TTG TTC
GAT ATC ATT GAC AAA GAC CAA AAT

GGA GCT ATT TCA CTG GAT GAA TGG
AAA GCA TAC AAA TCT GCT GGC ATC
ATC CAA TCG TCA GAA GAT TGC GAG
GAA ACA TTC AGA GTG TGC GAT ATT
GAT GAA AGT GGA CAG CTC GAT GTT
GAT GAG ATG ACA AGA CAA CAT TTA
GGA TTT TGG TAC ACC ATG GAT CCT
GCT TGC GAA AAG CTC TAC GGT GGA
GCT GTC CCC.

说 明 书

能表达脱辅基水母发光蛋白(*Apoaequorin*)的重组 DNA载体

蛋白(*Apoaequorin*)的重组 DNA载体

本发明涉及遗传工程领域，特别是把脱辅基水母发光蛋白基因插入到重组DNA载体中以在受体微生物菌株中生产脱辅基水母发光蛋白的技术。本申请是1984年12月31日美国专利申请号687903一案的部分继续申请。

脱辅基水母发光蛋白是一种单肽链蛋白质，它可以从发光水母(*Aequorea Victoria*)中分离得到。该蛋白含一个与其非共价结合的腔肠动物荧光素分子，结合后称其为水母发光蛋白(*aequorin*)。在有钙离子存在时，水母发光蛋白被氧化，并发出可见光。发光后即可把水母发光蛋白的蛋白部分与荧光素分离并纯化出来，然后又可用天然或合成的荧光素与该蛋白部分重新装配。把钙离子加到重新形成的水母发光蛋白将再次导致发光。因而，这种脱辅基水母发光蛋白可在许多化学和生化试验中被用作标记物。

天然的脱辅基水母发光蛋白不是单一化合物而是几种分子大小不同物质的混合物。把上千个水母(*Aequorea*)得到的纯天然水母发光蛋白在所用各种缓冲液均含有0.1mM EDTA的非变性条件下，在碱性缓冲液中电泳，然后将电泳后凝胶(0.5cm×10cm)浸在0.1 M Ca Cl₂中，发现至少有6个可见的兰色荧光带。这个观查结果与J. R步布林克(J. R. Blinks)和G. C. 哈瑞(G. C. Harres)得到的结果一致(刊载在Fed. Proc. 1975年34期474页)。他们在把同样萃取物用等电聚焦电泳分离时观察到12条荧光带。Blinks 和 Harres之所以观查到更多种不同大小分子的电泳带是由于等电聚焦电泳比普通电泳有更高的分辨率。但得到的任何一个带都不是一种纯的肽。

然而，很难从水母或其它天然原料中生产足够量的水母发光蛋白或脱辅基水母发光蛋白以满足生物荧光试验的所需量。因此，急需生产足够量的商业用脱辅基水母发光蛋白的一种改进方法。

最近发展的技术使人们可以利用迅速而大量生产的微生物合成商业上有用的蛋白和肽，不管它们的天然来源如何，这些技术使人们可以使用遗传学上合适的微生物合成正常情况下在其它机体中创造的蛋白质和肽。该技术是应用一切生物中存在的遗传物质DNA和其合成的蛋白质的关系，也就是说蛋白质中氨基酸顺序反映了DNA的核苷酸的顺序。蛋白质有常见的二十种氨基酸，每种氨基酸都特异地与一种与多种三核苷酸顺序相关联。这种关系构成了遗传密码。所有生物的遗传密码都是相同或相似的。由于很好地了解到这种关系，核苷酸顺序反映着每种蛋白或肽的氨基酸顺序。因而，原则上说任何生物都可把相同核苷酸顺序翻译成相同氨基酸顺序。

表1

遗传密码

苯丙氨酸(Phe)	T T K	组氨酸 (His)	C A K
亮氨酸 (Leu)	X T Y	谷氨酰胺 (Gln)	C A T
异亮氨酸 (Ile)	A T M	谷氨酰胺 (Asn)	A A K
蛋氨酸 (Met)	A T G	赖氨酸 (Lys)	A A J
缬氨酸 (Val)	G T L	天冬氨酸 (Asp)	G A K
丝氨酸 (Ser)	Q R S	谷氨酸 (Glu)	G A J
脯氨酸 (Pro)	C C L	半胱氨酸 (Cys)	T G K
苏氨酸 (Thr)	A C L	色氨酸 (Try)	T G G
丙氨酸 (Ala)	G C L	精氨酸 (Arg)	W G Z
酪氨酸 (Tyr)	T A K	甘氨酸 (Gly)	G G L
终止信号	T A J		

终止信号 T G A

注：每个三联字母表示DNA从左端5'到右端3'的三个核苷酸。字母代表组成核苷酸顺序的嘌呤和嘧啶碱。

A=腺嘌呤 G=鸟嘌呤 C=胞嘧啶

J=腺嘌呤或鸟嘌呤 K=胸腺嘧啶或胞嘧啶 L=腺嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶或鸟嘌呤 M=腺嘌呤、胞嘧啶或胸腺嘧啶 T=胸腺嘧啶 X 表示如果Y是腺嘌呤或鸟嘌呤，

则X就是胸腺嘧啶或胞嘧啶

如果Y是胞嘧啶或胸腺嘧啶

则X就是胞嘧啶

Y表示如果X是胞嘧啶，则Y就是腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶或胸腺嘧啶。

如果X是胸腺嘧啶，则Y是腺嘌呤或鸟嘌呤。

W表示如果Z是胸腺嘧啶和胞嘧啶，则W是胞嘧啶或腺嘌呤；

如果Z是胞嘧啶或胸腺嘧啶，则W是胞嘧啶。

Z表示如果W是鸟嘌呤，则Z是腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶或胸腺嘧啶；

如果W是腺嘌呤，则Z是腺嘌呤或鸟嘌呤。

Q R表示如果S是腺嘌呤，鸟嘌呤，胞嘧啶或胸腺嘧啶则QR是胸腺嘧啶一胞嘧啶；

如果S是胸腺嘧啶或胞嘧啶，则QR是腺嘌呤，鸟嘌呤。

S表示如果QR是胸腺嘧啶一胞嘧啶，则S是腺嘌呤，鸟嘌呤，胞嘧啶或胸腺嘧啶。

如果QR是腺嘌呤一鸟嘌呤，则S是胸腺嘧啶或胞嘧啶。

表1 称为密码的三联核苷酸表示生物体内遗传物质DNA的三个核苷酸。蛋白质合成时这些密码的表达需要形成中间产物—信息RNA(mRNA)，下面将进一步论述，mRNA具有与表1 DNA密码一样的顺序，只是尿嘧啶代替了胸腺嘧啶的位置。从现有技术中已经知道方向相反

的互补的DNA核苷酸顺序也与表1的密码一致。遗传密码一个为人所知的重要特点是它的冗余性，即构成蛋白质的大多数氨基酸都具有一个以上的三联密码。因此，一个特定氨基酸可有几个不同核苷酸顺序为其编码。为同一氨基酸编码的不同核苷酸顺序功能是一致的，只是在一些菌株（或品系）中比在另一些菌株（或品系中）转译这些顺序更有效些。偶而在特定核苷酸顺序中也能发现一些甲基化的嘌呤或嘧啶。而这些甲基化并不影响编码关系。

综如上所述，应用能合成新蛋白质的微生物的方法一般包括三个步骤，（1）分离和纯化（或化学合成）特定基因或称含为所需要蛋白氨基酸顺序编码的核苷酸顺序。（2）将分离到的核苷酸顺序与适当的载体即噬菌体或质粒DNA重组，和（3）把载体转移到适当的微生物并选择出含所需遗传信息的受体微生物菌株。

商业上应用上述方法的主要困难是第一步，即分离和提纯所需特定的遗传信息。DNA是以很高分子量的核苷酸链形式存在于所有活细胞中。一个细胞可含10,000个以上为10,000个以上特定量蛋白氨基酸顺序编码的结构基因。每个基因具有成千上万个核苷酸的顺序。大多情况下由四个不同核苷酸构成。它们是腺嘌呤（A），鸟嘌呤（G），胞嘧啶（C）和胸腺嘧啶（T），包含特定蛋白结构基因的长顺序在主要化学组分和物理性质方面是非常相似的。用常规的物理和化学制备方法是不能将这种顺序与其它顺序分离开的。

先有技术为完成上述步骤（1）用两种通常的方法。第一方法有时称之为散弹枪技术，即将抗体DNA酶解成很多比所需核苷酸顺序较长的片段。上述的步骤（1）的方法基本上是过时的。它是不予先纯化特定顺序，将酶解的很多DNA片段立即与所需载体重组。粗分级分离步骤可以有选择地加入，微生物遗传学的选择技术是基于从所有可能的遗传组合中，选择含所需遗传信息的菌株，散弹枪方法有两个缺点。但重要的是这个方法把成

千上万个未知基因转移到受体微生物，因而在试验过程会产生许多具有未知基因组合物的新菌株。用这种方法制造出对科研人员和环境都是意外的菌株。第二个缺点是它对生产所需菌株并不是很有效的，它还取决于所用选择的技术是否是以补偿第一步分级分离的不足，因而，克服这些缺点的方法是存在的，即可应用以后选择的步骤。

第二个常用方法基于细胞中总遗传信息很小，而且某些信息在某些特定时间才能表达。特别是高等生物中分化的组织只能合成它所能制造蛋白的很少一部分。在特定情况下，这些细胞可能优选合成一种蛋白。从而可以用合适的细胞通过分离其相应信息 RNA 来分离为所研究蛋白编码的核苷酸顺序。信息 RNA 是在把 DNA 核苷酸顺序信息转移到一种蛋白质氨基酸顺序的过程中起作用。这过程的第一步称之为转录。即把为特定蛋白编码的 DNA 转录成 RNA。RNA 是与 DNA 相似的多聚核苷酸，只是核糖代替了 DNA 的脱氧核糖，尿嘧啶代替了胸腺嘧啶。RNA 中的碱基也符合存在于 DNA 互补链间的碱基配对原则，即 A 互补于 U(T)，G 互补于 C。一个 DNA 核苷酸顺序的 RNA 转录本与复制它的 DNA 的顺序互补。这样的 RNA 称之为信息 RNA (mRNA)，因为它作为细胞遗传系和它的蛋白合成体系的中间产物。一般来说，特定时间细胞中仅仅出现该时间正活跃合成着的蛋白质的相应 mRNA。因而分化了的细胞主要含相当这种蛋白的各种 RNA。这时，可以利用这个特点来分离和纯化为该蛋白编码的核苷酸顺序。

上述方法的主要缺点是它仅能用于特殊的情况下，即细胞主要地合成单一蛋白。而商业上有兴趣的蛋白质恰恰不是在此特殊情况下。所需的蛋白可能是当时某组织或某些抗体的细胞产生的上百种不同蛋白之一。然而由于通常在细胞中出现的各种 RNA 仅代表存在于 DNA 中总顺序的一部分，这样它就已经提供了一个初始纯化步骤，所以这种 mRNA 分离技术还是有用的。

在最新发展中，美国专利4,363,877 提供一种方法，即使所需 mRNA 占总 mRNA 2% 时也可以分离出其核苷酸顺序。该方法进一步与已知的分级分离 mRNA 方法结合可作为在总体 RNA 中分离和纯的含量较低的某种 mRNA 的初始方法。该方法一般可用于从任何机体来提取 mRNA。因而它提供了最终生产有用数量的商业或科研上有兴趣的蛋白。

该方法的优点是利用 mRNA 和 DNA 的一些结构特点，用一定的酶促反应。这些先有技术中已知的反应及结构特点将进一步在本专利中详述。所用的符号和缩写列在下表。

表2 DNA—脱氧核糖核酸	A—腺嘌呤
RNA—核糖核酸	T—胸腺嘌呤
CDNA—互补DNA	G—鸟嘌呤
(以 mRNA 为模板酶促合成)	C—胞嘧啶
mRNA—信息RNA	U—尿嘧啶
dATP—脱氧腺苷三磷酸	Tris —三羟甲基甲胺缓冲液
dGTP—脱氧鸟苷三磷酸	EDTA—乙二胺四乙酸
dCTP—脱氧胞苷三磷酸	ATP—腺苷三磷酸
TCA—三氯乙酸	
dTTP—脱氧胸腺苷三磷酸	

DNA 的构型是以碱基配对的多核苷酸双链。一条链与其互补链呈对映关系。

如果两个链分开了就有可能从合适的前身单体合成一条新的互补链。从一端开始加上的单核苷酸的顺序与作为它互补链合成模板的原来的多核苷酸链顺序是互补的。与特定 DNA 序列相对应的 mRNA 合成也遵循这一原则。因而在转录区一个特定 mRNA 分子也与为它作模板的 DNA 的一个链互补并与它相对的 DNA 链顺序相同。活细胞内酶的机制在于允许含为某特定蛋白编码的核苷酸顺序的特定 DNA 选择性地转录。所以

分离含有为某特定蛋白氨基酸顺序编码的核苷酸顺序的 mRNA 就等于分离了基因本身的 DNA 顺序。如果 mRNA 逆转录成与它互补的 DNA (cDNA), 则准确的 DNA 顺序即可重建，并通过合适技术插入到另一种抗体的遗传物质中，某一特定顺序的这两种互补形式即可互相转换，机能上也互相对等。

DNA 和 RNA 的核苷酸亚单位通过磷酸二酯键在一个核苷酸中糖的 5' 位置与另一个相邻核苷酸的 3' 位置相连。这种连接多次重复就产生了有极性的线状的多核苷酸，即一端与另一端不同。 3' 端可能有一游离的 3' 一羟基或该羟基可能被一个磷酸盐或一个更复杂的结构取代， 5' 端也如此。在真核生物，也就是具有轮廓分明的核及能进行有丝分裂的生物，功能 mRNA 合成通常包括在其 3' 末端附加多聚腺苷酸。从而可以把信息 RNA 与真核生物的其它种 RNA 通过纤维素柱层析分离出来，因为多聚腺苷酸能附在纤维素层上。（见 Aviv, H 和 Leder, P. 刊载在美国科学院学报 1972 年 69 期， 1408 页， Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A ）其它与多聚腺苷酸配对亲和的层析材料有寡脱氧胸腺苷酸 (oligo..dt) ，多聚尿苷酸 (Polyu) 或多聚胸腺苷酸 (Polyt) 和多聚尿苷酸的结合物如： Polyu - Sepharose 等均是可用的。

逆转录酶在有 RNA 模板，可能具有 3' 端羟基的互补寡核苷酸或多聚核苷酸的引物，四种脱氧核苷三磷酸 (dATP, dGTP 和 dTTP) 存在下催化合成与 RNA 模板链互补的 DNA 。反应起始于最近 mRNA 3' 端寡脱氧核苷酸的非共价结合，接着根据碱基配对原则与 mRNA 配对的一个个脱氧核苷酸加到生长链的 3' 末端。所得产物分子为发卡结构，其中原来 RNA 通过氢键与末端折叠回来的部分 DNA 互补链配对。 DNA 与 RNA 彼此不是共价结合的。用一个 DNA 单链作模板逆转录酶也可能催化一个相似的反应，这时产物为具有一个单链环的双链 DNA 发卡， DNA 彼此在末端相连。（见 1972 年 69 期 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.

A 69 期1408页 Auiv. H 和 Leder. P 的文章及1976年 Cell 第7 期279 页 Efstratcadis. A. Kafatos. F. C, Maxam. A. M 和 Maniatis. T 的文章)。

限制性内切酶能水解DNA中的磷酸二酯键，从而在DNA链中打开一个缺口。如果DNA是呈闭环形式，环就会转变成线性结构。限制性内切酶的主要特色在于它只在特定核苷酸顺序的某一点上起水解作用。这样的顺序称之为限制性内切酶的限制点。从不同来源分离出内切酶，其特性取决于它限制点的核苷酸顺序。当它作用在双链DNA上时，一些限制性内切酶在两条链的同一点上水解磷酸二酯键，产生一个平整末端。而另一些则分别在两个链上相隔几个核苷酸位置上催化水解，在每个酶切分子的末端产生游离的单链区。这样在两链上产生的单链末端是互补的，因而是粘性的，可用来再结合水解了的DNA。由于任何易于被这种酶切的DNA都必须含有同样的识别点，产生同样的粘性末端，从而可能用限制性内切酶处理异质的DNA顺序，产生同样粘性末端，从而彼此互补配对连接。(见1976年 Crit. Rev. Biochem 第4 期123 页 Roberts, R. J 文章)。

人们已观察到，某一特定由切酶的限制点是相对稀少而又不均匀分布的。在某特定DNA片段内是否有一特定限制点存在，是通过试验测定的。然而从含不同限制点特性的不同来源分离出大量的多种限制酶，所以一个有上千个核苷酸的特定片段可能含一个或更多的限制点。

上述的情况可参见 Watson, J. D 的“基因分子生物学”第三版(1976 年); Davidson, J. N. 的“核酸生物化学”第八版，该书于1976年由 Adams, R. L. P., Burdon, R. H., Campbell, A. M 和 Smellie, R. M. S 修订，由 New York, Academic Press 出版；及 Hayes, W. 的“细菌和病毒的遗传学，基础遗传学和分子生物学的研究”第二版，1968 年由 Blackwell Scientific Pub, Oxford 出版。

本发明的一个目的是提供一种能产生足够量的脱辅基水母发光蛋白的

微生物。

本发明再一个目的是提供一个能插入到微生物中并表达脱辅基水母发光蛋白的重组DNA载体。

本发明还有一个目的是提供一个特定结构的DNA片段。用人工合成或天然来源分离该DNA片段，将其用来生产所需重组DNA载体。

本发明又一个目的是在试验室中人工合成或通过微生物生产一种肽，它将模拟天然脱辅基水母发光蛋白的活性。

本发明的这些与其它目的在后文中显而易见，并已通过提供选自下列各式所示化合物(1)的一个同质肽而实现。

(a) 该肽第一个分子式

V K L T P D F N N P K W I G R H K H M F N F L D V
N H N G K I S L D E M V Y K A S D I V I N N L G A
T P E Q A K R H K D A V E A F F G G A G M K Y G V
E T D W P A Y I E G W K K L A T D E L E K Y A K N
Q I T L I R I W G D A L F D I I D K D Q N G A I T
L S E W K A Y T K S A G I I Q T S E E C E E T F R
V C D I D E S G Q L D V D E M T Q Q H L G F W Y T
M D P A C E K L Y G G A V P- Coo H

其中A是丙氨酸，C是半胱氨酸，D是天冬氨酸，E是谷氨酸，F是苯丙氨酸，G是甘氨酸，H是组氨酸，I是异亮氨酸，K是赖氨酸，L是亮氨酸，M是蛋氨酸，N是天冬酰胺，P是脯氨酸，Q是谷氨酰胺，R是精氨酸，S是丝氨酸，T是苏氨酸，V是缬氨酸，W是色氨酸而Y是酪氨酸。

(b) 该肽第二分子式

其中上述第一分子式的₁₁P被S取代，₁₂N被D取代，₁₃K被R取代，₁₄D被E取代，₁₅A被E取代，₁₆K被R取代，₁₇D被C或E取代，₁₈K被R取代，₁₉A被

S_{101} 取代， Q_{102} 被E取代， I_{107} 被P取代， I_{107} 被L取代， I_{116} 被V取代， S_{127} 被D取代， S_{125} 被A取代， T_{141} 被S取代，或E被D取代。数字为第一个分子式从氨基末端起氨基酸的位置。

(c) 该肽第三分子式

从上述第一分子式或第二分子式所示肽的氨基端或羧基端删去1 ~ 15个氨基酸或在两个末端同时删去1 ~ 15个氨基酸。

(d) 该肽第四分子式

从上述第一或第二分子式所示肽的氨基端或羧基端按顺序附加1 ~ 10个氨基酸或在两个末端同时加上1 ~ 10个氨基酸。和

(2) 上述(a)(b)(c)的盐，上述肽能与腔肠动物荧光素结合并在钙离子存在时发光。

DNA分子，重组DNA载体和含下列核苷酸顺序的被修饰的微生物：

G T L A A J X T Y A C L [C C L 或 Q R S] G A K T T
K [A A K 或 G A K] A A K C C L [A A J 或 W G Z] T G G
A T M G G L W G Z C A K A A J C A K A T G T T K
A A K T T K X T Y G A K G T L A A K C A K A A K
G G L A A J A T M Q R S X T Y G A K G A J A T G
G T L T A K A A J G C L Q R S G A K A T M G T L
A T M A A K A A K X T Y G G L G C L A C L C C L
G A J C A J G C L A A J W G Z C A K A A J G A K
G C L G T L G A J G C L T T K T T K G G L G G L
G C L G G L A T G A A J T A K G G L G T L G A J
[G A K 或 G A J] T G G C C L [G C L 或 G A L] T A K
A T M G A J G G L T G G A A J [A A J 或 W G Z]
X T Y G C L A C L [G A K , G A J 或 T G K] G A J X T Y
G A J [A A J 或 W G Z] T A K [G C L 或 Q R S] A A J A A K

[CA J或GA J] [ATM或CCL] ACL XTY ATM

WGZ [ATM或XTY] TGG GGL GAK GCL
XTY TTK GAK ATM [ATM或GTL] GAK
AAJ GAK CAJ AAK GGL GCL ATM ACL
XTY [QRS或GAK] GAJ TGG AAJ GCL
TAK ACL AAJ [QRS或GCL] GCL GGL
ATM ATM CAJ [ACL或QRS] QRS GAJ
[GAJ或GAK] TGK GAJ GAJ ACL TTK
WGZ GTL TGK GAK ATM GAK GAJ QRS
GGL CAJ XTY GAK GTL GAK GAJ ATG
ACL WGZ CAJ CAK XTY GGL TTK TGG
TAK ACL ATG GAK CCL GCL TGK GAJ
AAJ XTY TAK GGL GGL GGL GCL GTL
CCL

其中 A是脱氧腺苷基

G是脱氧鸟苷基

C是脱氧胞苷基

T是脱氧胸苷基

J是A或G， K是T或C， L是A， T， C或G； M是A， C或T；
如果Y是A或G则X是T或C；如果Y是C或T则X是C；如果X是C则
Y是A， G， C或T，如果X是T则Y是A或G；如果Z是G或A则W是
C或A，如果Z是C或T则W是C，如果W是C则Z是A， G， C或T，
如果W是A则Z是A或G；如果S是A， G， C或T则QR是TC，如果
S是T或C则QR是AG；如果QR是TC则S是A， G， C或T，如果

QR是AG则S是T或C；上面核苷酸顺序的小写数字为水母发光蛋白中氨基酸的位置。上面提及的核苷酸顺序都是提供用遗传工程技术生产肽的重要依据。

说明书后附的图表表示实施例中得到的结果，它图解了本发明但不构成对其限制。

图1 表示用从水母分离($\text{Poly}(\text{A}^+)$)RNA体外转译蛋白的放射自显影分析图谱。第一道不含($\text{Poly}(\text{A}^+)$)RNA，第三道含有 $\text{Poly}(\text{A})$ RNA，用在第二道和第四道的分别从上两个反应中得到的抗水母发光蛋白的免疫沉淀蛋白。右边为作为对照的蛋白质分子量标准带，内含磷酸酯酶b, BSA, 卵清蛋白, 碳酸酐酶, SBT, 和溶菌酶。也指出了天然水母发光蛋白的位置。

图2(a)是从发光水母(*Aequorea Victoria*)分离出一个基因的限制酶解图，该基因含为水母发光蛋白编码的DNA顺序，而图2(b)是把图2(a)的片段从乳糖启动子下游插入一个质粒，该片段的酶解图。

图3 是 PAEQ1 萃取液依赖钙离子光蛋白活性在不同时间对氧依赖曲线，所用反应条件是(a) 在曲线1 和2 中，取0.5 毫升有活性萃取液，加 β -巯基乙醇使其浓度为2mM, 再加腔肠动物荧光素使其浓度为0.1mM, 置于4 °C反应。根据适当的时间间隔每次取5 微升混合试液测其光蛋白活性。(b) 在曲线2, 用充Ar 气泡降低溶解了的氧的水平，然后根据给定的时间将混合试液暴露在氧气中，(e)在曲线之中，表示用天然的脱辅基水母发光蛋白代替PAEQ1 萃取液。

图4 是 PAEQ1 萃取液得到的依赖钙离子光蛋白活性部分凝胶过滤曲线。从PAEQ1 萃取液部分纯化的具脱辅基水母发光蛋白活性部分如图3 所示产生了依赖钙离子的光蛋白活性。然后将这部分光蛋白(50 微升)置于一个G-75-40超细柱(30.7 毫升床体积) · 柱用10mMEDTA, 15mMTris, PH7.5, 100mMKCl 缓冲液平衡。标示了洗脱出的各部分位

置与分子量的关系。

本发明第一次在微生物中用重组DNA载体表达出脱辅基水母发光蛋白，并第一次确定了它的氨基酸顺序，从而提供了得到同质脱辅基水母发光蛋白的方法。用这个信息，可以得到很多种能提供适当量同质水母发光蛋白的重组DNA载体。可用标准的重组DNA技术生产一系列重组DNA载体。也可把该技术作为一实例生产表达脱辅基水母发光蛋白的转化体，该蛋白氨基酸顺序示在表3。

表 3

脱辅基水母发光蛋白的氨基酸顺序

(S) (O) (R)

V K L T P D F N N P K W I G R H K H M F N F C D N

1 10 20

N H N G K I S L D E M V Y K A S D I V I N N L G A

30 40 50

T P E Q A K R H K D A V E A F F G G A G M K Y G V

60 (C) 70

(E) (E) (R) (E) (R) (S)

E T D W P A Y I E G W K K L A T D E L E K Y A K N

(E)(P) (I) (V) 100

Q I T L I R I W G D A L F D I I D K D Q N G A I T

110 120

(D) (A) (S) (D)

L S E W K A Y T K S A G I I Q T S E E C E E T F R

130 140 150

V C D I D E S G Q L D V D E M T R Q H L G F W Y T

160 170

M D P A C E K L Y G G A V P- COOH

上面是用一个字母表示一个氨基酸的字码来表示脱辅基水母发光蛋白的氨基酸顺序。括号字母表示有微小变化的位置。这些有取代氨基酸的肽都具有水母发光蛋白的活性。

- | | | |
|--------|---------|---------|
| A. 丙氨酸 | C. 半胱氨酸 | D. 天冬氨酸 |
| E. 谷氨酸 | F. 苯丙氨酸 | G. 甘氨酸 |
| H. 组氨酸 | I. 异亮氨酸 | K. 赖氨酸 |
| L. 亮氨酸 | M. 蛋氨酸 | N. 天冬酰胺 |
| P. 脯氨酸 | Q. 谷氨酰胺 | R. 精氨酸 |
| S. 丝氨酸 | T. 苏氨酸 | V. 缬氨酸 |
| W. 色氨酸 | Y. 酪氨酸 | |

由于肽中氨基酸顺序和为它编码的DNA顺序有确定的对应关系，所以为脱辅基水母发光蛋白（及后面提及的任何修饰了的肽）编码的DNA或RNA分子可以很容易地从其氨基酸顺序衍算出来。表4 表示其核苷酸顺序。

表4

表示脱辅基水母发光蛋白DNA一个链的核苷酸顺序。氨基酸编号和相应DNA顺序始于蛋白氨基端。DNA顺序也对应mRNA顺序，只是在mRNA中U代替了DNA的T

5

缬	赖	亮	苏	脯	(或丝)	天冬
G T L	A A J	X T Y	A C L	C C L	(或 Q R S)	G A K
苯丙	天冬酰(或天冬)		天冬酰	脯	赖(或精)	
T T K	AAK(或GAK)		AAK	C C L	AAJ(或W G Z)	
色	异亮	甘	精	组	赖	
T G G	A T M	G G L	W G Z	C A K	A A J	

15

组	蛋	苯丙	天冬酰	苯丙	亮	天冬
CAK	ATG	TTK	AAK	TTK	X TY	GAK
²⁵ 缬	天冬酰	组	天冬酰	甘	³⁰ 赖	异亮
GTL	AAK	CAK	AAK	GGL	AAJ	ATM
丝	亮	天冬	³⁵ 谷	蛋	缬	酪
QRS	X TY	GAK	GAJ	ATG	GTL	TAK
赖	丙	丝	天冬	异亮	缬	异亮
AAJ	GLL	QRS	GAK	ATM	GTL	ATM
50						
天冬酰	天冬酰	亮	甘	丙	苏	脯
AAK	AAK	X TY	GGL	GCL	ACL	CCL
55						
谷	谷酰	丙	赖	精	组	赖
GAJ	GAJ	GCL	AAJ	WGZ	CAK	AAJ
60						
天冬	丙	缬	谷	丙	苯丙	苯丙
GAK	GCL	GTL	GAJ	GCL	TTK	TTK
甘	甘	丙	甘	蛋	赖	酪
GGL	GGL	GCL	GGL	ATG	AAJ	TAK
甘	缬	谷	苏	[天冬或谷] 酪		脯
GGL	GTL	GAJ	ACL	[GAK 或 GAJ] TGG	TGG	CCL
65						
[丙或谷] 酪	异亮	谷	甘	色	赖	
[GCL 或 GAJ] TAK	ATM	GAJ	GGL	TGG	AAJ	
85						

[赖或精] 亮 丙 苏 [天冬, 谷或半胱] 谷 亮
[AAJ或WGZ] XTY GCL ACL GAK GAJ或TGK] GAT XTY

95

谷 [赖或精] 酪 [丙或丝] 赖 天冬酰 [谷酰或谷]
GAJ [AAJ或WGZ] TAK [GCL或QRST] AAJ AAK [CAJ 或 GAJ]

[异亮或脯] 苏 亮 异亮 精 [异亮或亮] 酪
[ATM或CCL] ACL XTY ATM WGZ [ATM或XTY] TGG

甘 ¹¹⁰ 天冬 丙 亮 苯丙 天冬 异亮
GGL GAK GCL XTY TTK GAK ATM

[异亮或缬] 天冬 赖 天冬 谷酰 天谷酰
[ATM或GTL] GAK AAT GAK CAJ AAK

甘 丙 异亮 苏 亮 [丝或天冬] 谷
GGL GCL ATM ACL XTY [QRS或GAK] GAT

苏 ¹³⁰ 赖 丙 酪 苏 赖 [丝或丙]
TGG AAJ GCL TAK ACL AAJ [QRS或GCL]

丙 甘 异亮 异亮 谷酰 ¹⁴⁰ [苏或丝] 丝
GCL GGL ATM ATM CAJ [ACL或QRS] QRS

谷 ¹⁴⁵ [谷或天冬] 半胱 谷 谷 苏 苯丙
GAJ [GGL或GAK] TGK GAT GAT ACL TTK

精 缬 半胱 天冬 异亮 天冬 谷
WGZ GTL TGK GAK ATM GAK GAT

丝 甘 甘 亮 天冬 缬 天冬
QRS GGL GGL XTY GAK GTL GAK

谷 蛋 苏 精 谷酰 组 亮
GAJ ATG ACL WGZ CAJ CAK XTY

甘 苯丙 色 酪 苏 蛋 天冬
GGL TTK TGG TAK ACL ATG GAK

脯 丙 半胱 谷 赖 亮 酪
CCL GCL TGK GAJ AAJ XTY TAK

甘 甘 丙 缬 脯-COOH
GGL GGL GCL GTL CCL

因为该基因的DNA顺序已完全确定，就可能用化学合成的方法制造一个完整的基因，然后用已知的重组DNA技术将其插入到许多可用的DNA载体中。因此，可用在本专利申请时公众可得到的任何试剂，质柱和微生物来实施本发明。

例如，可采用已作为商用广告的生化系统380 A型DNA合成器(Biosystems Model 380 A，载于遗传工程信息，1984年11~12月，第3页，Genetic Engineering News, November/ December 1984, P3)容易地合成100个以上核苷酸顺序。然后利用本申请后面叙述的技术剪接这寡核苷酸以制造任何我们这里叙述过的核苷酸顺序。

进而，自动设备也可用于直接合成我们前述的肽。上面谈到的遗传工程信息也发表了商用自动肽合成器，广告报道它配对效率为99%以上。这种设备提供了很容易生产本发明肽的方法，或是直接合成或先合成一些片段再用已知技术连接它们。

除表3所示的特定肽的氨基酸顺序外，在这些顺序基础上有较小变化的肽也将具有脱辅基水母发光蛋白的生物活性。例如，从两端的某一段减去15个氨基酸或同时从两边各减去15个氨基酸后肽并没失去与荧光素和钙的结合能力。另外也可在两端分别或同时加上10个氨基酸。因为与荧光素和与钙的结合点位于中部的氨基酸。所以使上述删减或增补成为可能。例如，荧光素结合点好像在第40~100氨基酸中。由于两端顺序对生物活性相对不重要。因此所加氨基酸不重要，它们可以是这里提及的任何氨基酸。

试验证明在氨基端附加的氨基酸对生物荧光性没任何效应。较好的肽是两端分别或同时删掉10个或10以下氨基的化合物，最好是删掉5个或5个以下，或两端分别或同时附加7个或7个以下氨基的化合物，最好是附加4个或4个以下氨基酸。

由于分子中部关系着其生物活性，所以氨基酸取代就比较严格了。然而表3和表4所示的一些位置的微小变化不影响其机能，其中所示取代方式的任何组合都代表一个功能分子。两个表中，表3的主要链及表4每个位置第一个氨基酸都代表该点最通用和优选的氨基酸或核苷酸顺序。

本领域的专业人员会意识到虽然这些肽和DNA分子有些小变化，但仍被视为与上面详述的肽与DNA分子是等同的。例如，有理由认为用一个异亮氨酸或缬氨酸取代亮氨酸，用一个谷氨酸取代天冬氨酸，用一个丝氨酸取代一个苏氨酸或用另一个结构相关氨基酸取代都不会导致分子生物活性的改变，特别是该取代不发生在结合点时更是如此。为确定其结构变化是否导致功能变化，可简单地将其与荧光素共同孵育，再与钙离子接触。这个方法的例子将在后面详述。如果发光则说明取代是不重要的，其分子与表3肽等同。分子内有一个以上部分被取代时，可用同样方式简单地测定。

可简单地测定表1的密码表中为这些肽编肽的DNA，而且可视为与表4的DNA顺序等同。事实上，由于DNA中三联码与肽中氨基酸有一一对应关系，因而本申请讨论的肽中的任何氨基酸取代或其它变化也都适用于相应的DNA顺序或重组载体及含该顺序的转化微生物。

除表4所列特定核苷酸外，本发明的DNA(或相应RNA)分子还可以在前或在后有附加核苷酸。例如，poly(A)可以是加到3'末端的短顺序(例如：少于20个核苷酸)，可加在两端以得到一个对应限制内切酶切点的末端顺序，终止信号可跟着肽顺序以结束转录等等。此外，也可产

生在基因上游含一个启动区或其它控制区的DNA分子。所有含本发明顺序的DNA分子至少都将用于一个目的，因为每个DNA分子起码都可作为本说明后面将叙述的一类寡核苷酸探针。

本发明头一次可制备出同质肽，既可用直接合成方法也可用这里叙述的克隆基因方法得到。“同质”的意思是所研究物质所有分子的一级结构（即氨基酸或核苷酸顺序）基本上都是一样的。所谓“基本”上是指至少重量上为95%，较好为99%，最好为99.8%。同质肽或DNA得到的各肽和DNA重量差不超过5%，较好不超过1%，最好不超过0.2%，这样才可被认为是有一特定结构的同质肽（或核酸）。而混合物其分子的一级结构不同，分子量也不同（例如：天然脱辅基水母发光蛋白）。这里用的术语“分离物”是指与其它肽，DNA或RNA中逐一分开的纯肽，DNA或RNA。而且是存在在一种溶剂，缓冲液中或存在在含常规离子或其它组分的生化溶剂或缓冲液中。分离物即不包括呈天然状态的天然材料，也不包括分散到一些组分（例如：丙烯酰胺凝胶中既不以纯物质也不以溶液得到的天然材料。术语“纯的”在此指与上述“基本上”一样的数字标准。这是用的“被取代”或“取代”不一定涉及任何取代反应，而只是指不同肽分子式中的同一位置出现不同的取代氨基酸（例如，丝氨酸在5位上取代脯氨酸。）

当上述肽以不同pH下的水溶液存在时就自然会产生相应的盐。所有具生物活性的这些肽的盐都被认为在本发明范围之内。包括碱金属，碱土金属和其它金属的羧酸盐，胺基的酸加成盐（如盐酸）和在分子内氨基与胺基间反应形成两性离子。

本发明特别基于表3和表4中列出的可能的氨基酸和选择编码，选择组合制造出稍有变化的肽或核酸都被视为在发明之中。

在本发明优先的实施例中，从发光水母得到的遗传信息mRNA，将它用于建立DNA基因种组体，再反过来用于生产本发明的肽。

虽然可以用总体水母体细胞萃取液，但优选的是水母发光器官的细胞萃取液。典型方法是将水母或某些部分切能小薄片，捣碎，制成一个初始粗细胞悬液。再将其用超声波处理以破碎细胞膜从而得到粗细胞萃取液。可用已知一些生化技术（如蛋白选择沉淀）来初步纯化萃取液。再将萃取液或部分纯化的含 RNA 萃取液进一步处理以分离出 RNA。例如在一个 1×3.5 英寸硝酸纤维离心管中可将粗液置于 5 毫升含 5.7 M CsCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA 混合液的液垫上。用 SW27 转头（Beckman Instruments Corp 制造），于 27,000 rpm 转速，15°C 离心 16 小时。离心后，将液体倾出，将底部 1/2 厘米处含 RNA 沉淀离心管部分用刀片切下，将 RNA 沉淀转到一个烧瓶中，溶在 20 毫升含 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 5% 肌氨酸盐和 5% 酚的混合液中。然后将溶液的 NaCl 浓度调至 0.1 M，加 40 ml 酚：氯仿 = 1 : 1 的混合液，摇动萃取。将悬液中醋酸钠调至 0.2 M, pH 5.5, 用乙醇将 RNA 从水相沉淀出来，离心收集。任何从细胞来源分离 RNA 的方法均可代替此方法。

诸如 poly (A⁺) RNA, 粗制或部分纯化的信息 RNA 等顺序与分子大小不同的各种形式均可应用。选择分离 RNA 的方法取决于它是否能在分离出 mRNA 异质群体中富集所需的 mRNA。任何这样子纯化的方法都可用于制备本发明的基团，只要该方法不导致 mRNA 被酶解。

可用从细胞中萃取后再分级分离的常规方法从予纯化到富集所需的 mRNA 顺序。任何不导致 RNA 降解的技术均可应用。在蔗糖梯度中沉降分离及凝胶电泳分离均可应用。

从来源细胞萃取 mRNA 时必须要在防止 mRNA 降解的条件下。特别要避免核酸酶，因为它能有力地水解 RNA 核苷酸顺序。在细胞萃取过程抑制核酸酶的合适办法是在破碎细胞时。用 4 M 硫氰胍和 1 M 疏基乙醇。此外，低温和 pH 接近 5.0, 等条件也都降低核酸酶对 RNA 降解。

一般来说，制备的_m RNA基本上不受蛋白质DNA，多聚糖和脂类的污染。标准纯化方法在先有技术中已知。这样提取出的RNA中有_m RNA及其RNA。分离真核生物_m RNA通常方法是oligo-dT纤维柱层析法或其它可替代寡核苷酸的柱料诸如：poly-U-Sephadex柱层析。由于真核细胞中_m RNA的3'端有多聚腺苷酸(poly A⁺)，柱料可与其形成氢键。

下一步是生成与分离的_m RNA异质顺序互补的DNA。虽然原则上讲任何能忠实形成_m RNA模板互补的DNA的酶均可应用，但这个反应所需的酶最好是逆转录酶。该反应在先有技术中已知，用_m RNA作为模板，含四种脱氧核苷三磷酸dATP, dGTP, dCTP和dTTP的混合液作为DNA链的前身物。通常再加一种放射性同位素如：在α位置P³²标记的脱氧核苷三磷酸的探测反应过程和提供一个层析，电泳分离步骤后回收标记物和用来估计回收量。（见Efstratiakis, A, 等人Supra）

由于与_m RNA模板有关的个别转录本起始和终止点有变化，用逆转录酶产生的c DNA转录本在5'和3'端的顺序有些差异。5'端的变化是由于用于起始合成的oligo-d引子沿着_m RNA的多腺苷区可能结合在不同的点上。c DNA转录本合成开始于poly-(A)的不定点，而且根据其oligo-d引子的起始结合点会转录不同长度的poly-A。可以用一个除含oligo-d外还含RNA顺序本身的一或两个核苷酸的引子，这引子将有其优选的和确定的转录反应起始结合点。

c DNA转录本3'端的不确定性是由于影响逆转录酶反应的诸因素及可能的RNA模板的部分降解。如果逆转录条件不利于合成长链DNA，又阻遏小的DNA链的合成，那么分离最大限度长的特定c DNA转录变得容易了。对鸟类成髓细胞白血病病毒逆转录酶优选的反应条件在美国专利4,363,877中的实施例中已报道。大量产生高真度长链DNA的反应条件诸如：反应温度，盐浓度，酶用量，引子与模板的比例，反应时间等均因

个别反应而异。

选择合适的温度和盐浓度，有利于oligo-dT引子与RNA模板的poly(A)部分特异性配对。在合适条件下，引子可附着在RNA模板的poly(A)区，而不会附在其它短的富A顺序上导致非特异起始转录。温度与盐溶液对反应影响是相互独立的，高温低盐浓度碱基特异配对的稳定性。为防止非特异起始及最低限度的降解，反应时间越短越好。反应时间与温度有关，低温则需要较长的反应时间。42℃下反应以1分钟到10分钟都是稳定的。引子克分子浓度需为RNA模板的50~500倍，而酶也要以相似的倍数。过量的酶和引子可加强起始反应和cDNA链的增长，从而在各个孵育时间内有效地产生长链的cDNA。

在很多情况下，还可用从mRNA转录来的单链cDNA顺序来进一步纯化cDNA。然而，如下面讨论的，有时所需的限制酶只能作用于双链DNA。因此，就要用上述制备的cDNA为模板，用类似逆转录酶的DNA合成酶和能水解单链DNA的核酸酶来合成双链DNA。用这种方式制备双链DNA已在先有技术中叙述了。（见ullrich,A. Shine J chirgwin, J., Pictet, R., Tischer, E., Rutter, W. J. 和Goodmok, H. m, 在 Science 196期1313页(1977年)），如果需要的话，可以用美国专利4,363,877叙述的方法进一步纯化cDNA。在这个方法中，用一或两种限制内切酶处理通过异质mRNA顺序转录制备的异质cDNA。对内切酶选择取决于预先测定cDNA中酶识别切点。使用的酶需要在cDNA上有两个切上，如果切点确定了，使用这一种酶就足够了。所需顺序在两点间被切下，消除由于切点距所需顺序远近而造成的不同大小片段，创造一个分子群，称其为片段。它既含所需顺序，长短又相同。如果切点不同，就需要用两种酶以制造所需同样长的片段。

必须根据经验选择那些能产生为所需蛋白全部或部分编码的最优长度核苷酸顺序片段的内切酶。如果已知所需蛋白的氨基酸顺序，就可能把用

内切酶切的匀一长度的核苷酸片段与它编码的氨基酸根据适用于所有生物的遗传密码进行比较。基于部分顺序就可以相当准确的识别蛋白（或肽），因而某一特定蛋白完整的氨基酸顺序，就可用限制酶制造出均一长度的多聚核苷酸用作鉴定在适当体外蛋白合成体系所需蛋白合成的探针。此外，可用亲合层析纯化 mRNA。还有一些其它适用本发明的技术可以推荐给本领域的专业人员。

一些限制酶是否适用取决于其作用对象是单链还是双链 c DNA。优选的是那些作用在 mRNA 逆转录酶反应产物的单链 DNA 上的限制酶。现在已知能作用于单链 DNA 上的限制酶是有限的。目前已知 Hae III, Hha I 和 Hin(f) I 是适用的。此外 Mbo II 也可作用单链 DNA。进一步研究发现还有一些其它作用于单链 DNA 的酶可以选用。特异地用于双链 DNA 的限制酶也可以用，但必须增加一个产生双链的反应，这过程会增加失去较长顺序和由于不完全回收失去其它顺序的机会，因此这些酶不是优选的。用双链 c DNA 的另一缺点是随后的顺序分析将更繁重而复杂。为此，单链 c DNA 是优选的，而双链 DNA 也是可行的。事实上，本发明开始也是用双链 DNA 实施的。

为限制酶内切处理制备的 c DNA 可以放射标记，从而以后分离步骤中都可探测出来。一种优越的技术是在四种脱氧核苷三磷酸前身物之一的 α 位置上加上 P^{32} 的放射标记。当放射性前身物比它非放射形式浓度相对高时，就可达到最高活性。然而任何脱氧核苷三磷酸总浓度都必须高于 $30 \mu M$ ，从而可最大限度加长逆转录反应中 c DNA 链。见

(Efstratiadis, A. Maniatis, T. Kafatos, F. C., Jeffrey, A., 和 Vournakis, J. N. 在 Cell 第四期 367 页上文章, 1975 年)。为测定 c DNA 的核苷酸顺序，在多核苷酸激酶的催化剂反应中把 5' 端常规地用 P 标记。(见 Maxam, A. M. 和 Gilbert, W., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 74 期 560 页 1977)

通过一种或两种限制酶把DNA切成片段，再用根据片段长短分离的技术可把不含识别点的非均一顺序彼此分离。这些技术包括电泳，沉降和超速离心。由于凝胶电泳可以得到分离不同多核苷酸的最好分辨率而被优选。此外，该方法很容易大量回收分离材料。常用的凝胶电泳方法在Dingman, C. W. 和 Peacock, A. C. 在 Biochemistry 7 期, 659页(1968)及 Maniatis, T., Jefferey, A. 和 Van de Sande, H., 在 Biochemistry 14 期, 3787页(1975)文章中叙述。

在用限制内切酶处理前，从大多数来源得到的c DNA转录本部是不同长度的混合物。选择合适的限制或几种酶组合酶切c DNA，含所需顺序的多聚核苷酸链将在各个切点被切割，得到长度均一的一系列片段。凝胶电泳后，将观察到一个清楚的带。根据在其它顺序上有无限制切点，可能产生另一些带，它们与所需顺序长度不同。因此，限制内切酶作用结果，电泳后凝胶上将出现一个或多个不连续的带，剩余的c DNA还是非均一的。当所需c DNA顺序包括多种主要聚核苷酸，电泳后大部分c DNA呈不连续带。

尽管限制酶切两个不同顺序时好象不能得到基本上相似长度的片段，还是需要一种测定特定长度片段纯度的方法。电泳带的顺序分析可用于测定带中含10% 或高于10% 杂质的材料。测定低水平杂质的方法基于与起始分离方法同样的原则。方法要求所需核苷酸顺序含一个没用在起始分离的限制内切酶识别点。用能作用于所需顺序内部限制内切酶处理从凝胶电泳带洗脱的多聚核苷酸材料，大多情况下将导致顺序切成不一样长度的两个亚片段。这两个亚片段在电泳过的凝胶上将在对应其长度的位置上形成两个不连续的带。它们总长度应等于酶解前多聚核苷酸的长度。原来带中对限制酶不敏感的杂质可望迁移到原来的位置。含一或多个该酶识别点的杂质可能得到两个或多个亚片段。由于识别点的分布基本上是随机的，从杂质得到与所需片段酶切后一样大小的亚片段的可能性是很小的。用定量测

定每带中放射性活性的量或其它适当方法来测定具放射性标记多聚核苷酸的任何带中存在的材料量。可以用代表所需顺序的亚单位量与材料总量比较值来定量测定所需顺序片段的纯度。

紧跟着上述提取和分离所需基因进一步要重建新的DNA顺序。催化DNA片段端对端接合的连接酶就是用于此目的。所需顺序亚片段的凝胶电泳带可分别洗脱。并在有DNA连接酶存在下结合。(见Sgaramella, V., Van de Sande, J. H., 和 Khorana, H. G. 在 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67期, 1468页, 1970 年的文章)。如果顺序之间不是以平整末端连接的。可用从大肠杆菌 (*E.coli*) 得到的连接酶(见Modrich, P 和 Lehman, I. R., J. Biol. Chem., 245 期3626页, 1970 年的文章)。

从限制内切酶处理产生的亚片段中得到的原DNA顺序重建的效率将通过用防止不合适顺序的重建而大大加强。在限制内切酶切割同质c DNA前通过用一种能除去c DNA 5' 端磷酸根的试剂处理所需顺序的同样长度的c DNA 片段来防止不合适顺序的重建。优选的试剂是碱性磷酸酯酶。5' 端磷酸根是重建酶切亚单位所用DNA连接酶随后连接作用的必要结构单元。因此没有5' 端磷酸根的末端就不能共价连接)。DNA亚单位只能在含有限制内切酶产生的一个5' 端磷酸根的末端连接。大多数c DNA 转录本是在上述条件下, 它起始于从含m RNA 模板5' 端的m RNA 产生的具有由限制酶切割得到片段的同样模板。以这种方式, 上述方法不仅可得到与所需蛋白有关的特定核苷酸顺序, 而且还可得到为感兴趣蛋白编码的整个核苷酸顺序。化学合成的双链的含一个限制酶识别顺序寡核苷酸连接子可能附着在提取的c DNA 的末端, 有利于而后从载体DNA除去基因部分。(见 Scheller, R. H., 等人, Science 196期, 177 页 (总页数2977))。用适当限制酶处理载体DNA 可使它从连续环状转换为线状。用碱性磷酸酯酶处理形成的末端以除去5'- 端磷酸根从而

在没有加入一个脱辅基水母发光蛋白DNA片段时载体DNA就不可能在DNA连接酶反应中重新形成一个连续环。将具有附着的寡核苷酸连接子的c DNA与处理过的载体DNA混合，在DNA连接酶参于下相连接，形成一个具有包含c DNA的重组载体DNA连接环。用质粒作载体时，通常形成闭环以转化细菌。这里说的转化是指一个微生物把细胞外DNA结合到它自己的基因组中。在适当条件下闭环形式的质粒DNA质粒进行复制，复制品在细胞分裂时进入细胞。结果，即建立起一个含有质粒及携带它们的遗传决定子的新细胞系。以此方式通过质粒转化时，质粒复制可使质粒基因在细胞系中保持下来。如果质粒DNA是闭环形式则这种复制以高频率发生；如果它呈线状，不复制或很少复制；一旦重组质粒形成，一种合适微生物的转化就可顺利进行。从而就可以容易地用先有技术已知的适当的选择技术分离出含脱辅基水母发光蛋白基因的新微生物菌株。

简言之，先从水母中得到遗传信息，将其转变为c DNA，将c DNA插入一个载体，用其转化宿主微生物，再表达出脱辅基水母发光蛋白，步骤如下：

1. 从水母中分离poly(A) RNA。
2. 用逆转录酶体外合成单链c DNA，再制造双链c DNA。
3. 用S核酸酶水解单链区。
4. 用凝胶过滤分级分离形成双链的c DNA。
5. 用末端转移酶和d CTP给c DNA加尾端。
6. 用Pst I水解质粒p BR322，然后用末端转移酶和d GTP给其线性DNA加尾端。
7. 将带有d C尾端的c DNA片段和d G尾端的p BR322退火。
8. 转化大肠杆菌SK1592菌株，选出有四环素抗性的菌落。
9. 筛选氯苄青霉素敏感的转化体。 $tet^R amp^S$ （具四环素抗性，对氯苄青霉素敏感的菌落都含有重组质粒。）将其贮存在-80 °C。

10. 用发射性同位素标记寡核苷酸混合物探针(用从测定出的氨基酸顺序推算出的核苷酸顺序)。

11. 把水母发光蛋白c DNA文库的各成员置于硝酸纤维滤纸上，溶解所需菌落并将其DNA固定在滤纸上。

12. 将用 p^{32} 标记的寡核苷酸混合物置于硝酸纤维滤纸上进行分子杂交。从而 p^{32} 探针将与含水母发光蛋白c DNA顺序大肠杆菌重组体的质粒DNA杂交。

13. 洗掉滤纸上多余的 p^{32} 探针。

14. 将X射线底片放在滤纸上曝光。

15. 从水母发光蛋白c DNA库中鉴定的重组体制备质粒DNA。

16. 将 p^{32} 标记的寡核苷酸与质粒DNA杂交(用Southern Blot)以证实其具有杂交部分。

17. 通过下列步骤表明重组体含水母发光蛋白DNA顺序：制备含EDNA缓冲液的萃取液，PH7.2，加入其顺序表达的脱辅基水母发光蛋白，腔肠荧光素和 β -巯基乙醇，将它们孵育在4℃下过夜。加钙离子后发出兰色闪光。

虽然上面分步叙述，结合遗传工程先有技术知识及上述内容将容易地分离所需基因和将其用在重组DNA载体中。其它会得到同样结果的方法已为人所知并可用于制备本发明的重组DNA。

还可通过在转化宿主中引进多个脱辅基水母发光蛋白的拷贝；选择宿主中繁殖的已知载体可以加强脱辅基水母发光蛋白的表达，从而从外源插入的DNA(诸如puc8，ptac12或PIN-III-I-ompA1,2或3,产生大量蛋白。还可通过任何其它已知方法加强肽的表达。

各种情况下当DNA顺序保持其功能地插入到载体中去都将表达脱辅基水母发光蛋白，所谓“保持其功能地插入”如在先有技术中我们懂得，是指以合适的读码和方向插入。尽管需要时可通过产生杂种蛋白后再切割

修饰它，但典型方法，还是。将一个脱辅基水母发光蛋白基因从启动子的下游插入，然后跟一个终止码。根据本发明实施，除了可用上述一般程序制备重组 DNA 分子，再转化单细胞生物，其它已知技术在其基础上的修饰都可用于实施本发明。特别是近来遗传工程技术迅猛的发展。许多美国专利发明了新的质粒，遗传工程新菌株和本发明实施所用的遗传工程新方法。例如：美国专利 4,273,875 揭示了一种质粒及分离它的方法。美国专利 4,304,863 揭示一个通过建立一个杂交质粒，用它转化宿主细菌的遗传工程技术制造一种新菌株的方法。美国专利 4,419,450 揭示了一种重组 DNA 克隆载体的有用质粒。美国专利 4,362,867 揭示了重组 c DNA 的方法和用于克隆的核苷酸杂交方法。美国专利 4,403,036 揭示了用于制造含有 DNA 片段多拷贝的质粒遗传工程试剂。美国专利 4,363,877 揭示了重组 DNA 转移载体。美国专利 4,356,270 揭示了克隆重组 DNA 的载体。该专利对遗传工程领域的生手非常有用，因为它明确了许多用于遗传工程的术语及所用的基本方法。美国专利 4,336,336 揭示了一个融合基因和制造它的方法。美国专利 4,349,629 揭示了质粒载体及其生产和使用。美国专利 4,332,901 揭示了用于重组 DNA 的克隆用载体。虽然这些专利并未直接涉及本发明范围的基因产品，但描述的程序可容易被本领域专业人员修饰后用于本发明。

所有这些专利及其它专利，以及本说明书引用的其它出版物都指出了与本发明有关的本领域专业人员的水平，这一切都包括在参考文献中。

本发明的重要意义在于它可无限制地提供脱辅基水母 发光蛋白，以用于荧光免疫试验或其它的水母发光蛋白作指示剂的其它试验。于 1983 年 10 月 13 日呈交的 N.541,405 号申请指示了用脱辅基水母发光蛋白作生物荧光试验的方法，它已被转让，见参考文献。把分离出的脱辅基水母发光蛋白 c DNA 转移到其它表达载体将产生改善脱辅基水母发光蛋白肽在大肠杆菌中表达或在其它宿主中表达它的重组 DNA。用脱辅基水母发光蛋

自c DNA或含它的一个片段作为杂交探针在其它生物荧光腔肠动物及其它诸如软体动物(Mollusca), 鱼纲(Pisces)和甲壳纲动物等易于克隆的生物中有与其结构相关的基因。这些基因包括为属于珊瑚纲的 *Renilla*, *Stylatula* *Ptilosarcus*, *Cavernularia* 和 *Acanthoptilum* 的荧光素酶编码基因及水螅纲多管水母属和栉水母动物纲的 *Mnemiopsis* 和瓜水母属中发光蛋白编码的基因。

特别是希望基于上述原理和不同核苷酸顺序用核苷酸探针从这些和有关生物提取表达发光蛋白的基因。这些探针比整个顺序短但又不应少于10个核苷酸，优选的为14个以上。较长的核苷酸直至整个顺序也是有用的。RNA及DNA探针均可用。

以可探测方式标记探针(例如：用 P^{32} , H^3 , 生物素或抗生物素蛋白，将其与从含有一基因的生物提取的重链DNA或RNA孵育。将单链和双链(已杂交的)DNA或DNA/ RNA杂交分子分离(典型方法是用硝酸纤维纸)，然后用标记探测杂交分子。用寡核苷酸的适用杂交技术已为人所知。

虽然常用的可探测标记的探针能被容易地鉴别，未标记的寡核苷酸也是有用的。不管是标记探针的前身物还是提供直接探测双链DNA(或DNA/ RNA杂交分子)方法所用的前身物也都是有用的。因此，“寡核苷酸探针”这个术语是指标记的和未标记的两种形式。

特别优选的是从本发明肽的第40~110氨基酸编码区得到的寡核苷酸，因为这些是包括结合到荧光素的氨基酸。

表5列出很多发现有生物发光蛋白和与具有这些发光蛋白的结合的腔肠动物荧光素的生物。本发明叙述的核苷酸将用作从这些生物分离发光蛋白的探针。

表5:腔肠动物型荧光素的分布

1. 腔肠动物：

A. 珊瑚纲: *Renilla*^a(三个种), *Stylatula*, *Ptilosarcus Cavernularia*, *Acanthoptiolam*。

B. 水螅纲: 多管水母属(*Aequorea*^b) 数枝螅属(*obelia*)

2. 栉水母动物:

Mnemiopsis, 瓜水母属(*Beroe*)

3. 软体动物:

荧鸟贼属(*Watasenia*^a)

4. 鱼纲:

Neoscopelus microchir^a, *Diaphus*

5. 甲壳纲

A. 十足类(Decapods)

Acanthephyra eximia, *Acantheohyria purpurea*, 刺虾属(*oplophorus spinosus*), 异腕虾属(*Heterocarpus*, *grimaldii*), *Heterocarpus laevigatus*^a, *Systellaspis cristata*, *systellaspis debilis*,

B. 糜虾目(Mysidacea)

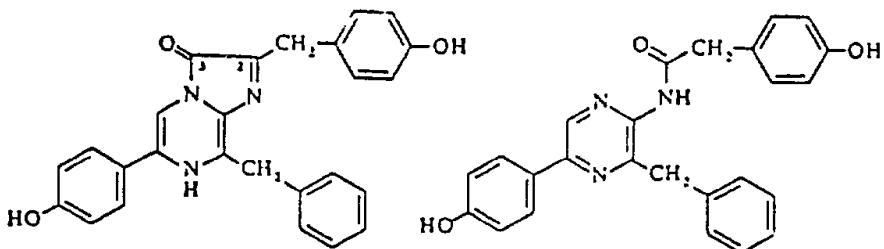
糠虾属(*Gnathophausia ingens*)

a. 基于在萃取荧光中化学和物理资料其结构相当(I)。其它基于荧光素—荧光素酶交叉反应及其动力学和生物荧光谱的比较。

b. 其荧光素相当(I)的附加证据是从基于分离的如(II)的发光物质得到的化学和物理资料。

分子式

分子式



腔肠动物荧光素(Ⅰ)

腔肠动物荧光素(Ⅱ)

我们已一般地叙述了本发明，通过下面的例子可更容易地理解本发明，它们只是为进一步说明本发明，并不能限制它。

例1. 天然水母发光蛋白的纯化

根据 Blinks 等人的方法纯化水母发光蛋白(见 Blinks, J. R. P H Mattingly, B. R. Jewell, M. Van Leeuwen, G. C. Harrer 和 D. G. Allen 在 Methods Enzymol. 1978年57期, 292-328 页的文章)，只是在第二次凝胶过滤时不用 Sephadex G-75(超细型)。纯化水母发光蛋白具体步骤如下：

1. 在 Friday Harbor, Washington 收集水母，切下围口组织(含光细胞)。
2. 通过在 EDTA 缓冲液低渗溶胞作用从光细胞中萃取蛋白。
3. 将光细胞萃取液用 0 ~ 75% 硫酸铵盐析分离。
4. 将硫酸铵沉淀离心，在从 Friday Harbor, Washington 运输期间要贮存在 -70 °C。
5. 用 Sephadex G-50(精细型) 凝胶过滤。
6. 用具有合适 PH 的 QAE Sephadex 柱进行离子交换层析，然后以盐梯度洗脱。
7. 用 Sephadex G-75(超细型) 凝胶过滤。
8. 用有合适 PH 的 DEAE- Sephadex 离子交换柱层析，然后以盐梯度洗脱。
9. 将纯化的水母发光蛋白(在 EDTA 中)冷冻干燥，并贮存在 -80 °C 中。

第1-4步是在 Friday Harbor 进行，除了收集水母和切下围口组织外，所有其它步骤都在0 °C ~ 4 °C下进行。从第4步得到最终产品置于250毫升离心瓶中并贮存在干冰中。材料也是以这种形式运输的。

水母发光蛋白的纯化和制作绿色荧光蛋白(GFP)第5~9在Athens, Georgia完成的。各步均在0 ~ 4 °C下进行。各步骤间隙将含水母发光蛋白的样品贮存在-80 °C下。不管蛋白的浓度如何，看来它对冷冻和融化都是稳定的。

步骤5中用于凝胶过滤的 Sephadex G-50(精细型)柱大小为5.8厘米×97厘米，体积为2563毫升。过柱的缓冲液含10mM EDTA(用二钠盐制备EDTA缓冲液)，速度为75毫升/小时。绿色荧光蛋白和水母发光蛋白同时洗脱，将收集到65-75%的水母发光蛋白活性部分用于随后的纯化。其它部分也收集并贮存，为以后纯化备用。这步得到的水母发光蛋白活性为50%到80%，通常为65%到75%。柱能容纳大约1000毫克柱料(Bradford)，置于75毫升体积中。一般柱体积都小于75毫升。

步骤6所用QAE Sephadex 离子交换柱直径为5厘米。这步用15克干燥的 Sephadex，层析过程柱床体积根据离子强度和缓冲液成分而变化。

一般来说，将6到10个经过G-50凝胶过滤的材料合起来进行这个柱层析。得到产品的活性增加了，这个步骤完全是按照Blinks等人(1978年)的方法进行的。将样品装柱后，用合适PH的缓冲液(含5mM醋酸钠，5mM EDTA，PH为4.75)。然后用线性氯化钠梯度缓冲液(含10mM EDTA，PH5.50，总体积500毫升)洗脱水母发光蛋白。将绿色荧光蛋白用Tris配制成10mM悬液，将PH提高到8.0，贮存于-80 °C，直到进一步纯化。将其过滤(用Amicon YM-10膜)浓缩，为下一步用。这时水母发光蛋白的产率为80%。

步骤7：在 Sephadex G-75(超细型)柱上凝胶过滤。柱的大小为：2.8

$cm \times 150cm$, 924 毫升。过滤的缓冲液含 10mM EDTA, pH 5.5, 速度为每小时 10 毫升。水母发光蛋白产率为 60~80%。

步骤8: 在 DEAE-Sephadex 柱进行离子交换层析。将第7步得到的水母发光蛋白直接进柱, 条件与 QAE-Sephadex 柱一样。产率为 75~80%。对大多数水母发光蛋白制备, 这一步不是必要的。用 12% SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定第一步得到的材料通常是纯的。

步骤9: 如果有 EDTA 存在, 水母发光蛋白在蛋白冷冻干燥时可保持 95% 的活性。如果没有 EDTA, 其活性在 0~95% 之间(见 Blinics 等人 1978 年文章)。

例2：用于测定水母发光蛋白顺序的方法

用 Edman Degradation (Edman 和 Begg, 1967 年) 自动降解装置分析其氨基酸顺序。对相对大量的蛋白和肽(10 毫微摩尔或更多), 可用 Model 890 Beckman 氨基酸顺序分析仪(于 1980 年由 Duke 大学 Bhowm 等人介绍的最新式的分析仪, 加 Polybren, 用 0.55M Quadrol 程序测定。根据 1978 年 Klapper 等人的方法用适合于二甲基烯丙胺缓冲液加 Polybrene 的程序测定用 Quadrol 方法时被从杯中冲出去的两个小肽 M 和 M'。用逆相高效液相色谱在 Hunkapiller 和 Hood 1978 年所述的 Dupont Zorbay ODS 柱可分析氨基酸的苯异硫脲基醋酸衍生物(PTH)。对 2~10 毫微摩尔的肽可用适合于 0.1 Quadrol(见 1975 年 Brane 等人文章)和 Polybrene 的程序在 Model 890c Beckman 顺序分析上测定其顺序。Ericson 等人在 1977 年叙述了用逆相高效液相色谱测定 PTH- 氨基酸。当肽量小于 1.5 毫微摩尔时可用华盛顿大学的 Hunkapiller 等人 1983 年制定的方法用 Biosystems Model 470 A 气相顺序分析仪测定。Hunkapiller 和 Hood 在 1983 年还叙述了用 IBM Cyano 柱测定从气相仪得来的 PTH 氨基酸。

参考文献

Edman P. 和 Begg, G. Fur. J. Biochem 1967 年1期80-91页。

Brown A. G. Cornelius, T. V. Mole. J. E. Lynn. J. D., Tidwell W. A 和 Bennett, J. C. Anal. Biochem 1980 年10 2期35~38页。 Tarr G. E., Beechner J. F, Bell, M 和 McKea n, D. J. Anal. Biochem, 1978年, 84期, 622-627 页。

Klapper D. G., Wilde, C. E., III 和 Capra. J. D. Anal. Biochem. 1978 年85期126 ~131 页。

Hunkapiller, M. W. 和 Hood, L. E. Biochemistry 1978 年17期2124~2133页。

Brauer, A. W., Margolies, M. N. 和 Haber, E. Biochemistry 1975年13期3029~3035页。

Ericsson, L. H. Wade, R. D., Gagnon, J., McDonald, R. R. 和 Walsh, K. A 在 Solid phase Methods in Protein Sequence Analysis (Previero, A. 和 Cole Hi-Previero, M. A. eds.) 137~142 页, Elsevier/北荷兰, 阿姆斯特丹州(1977 年)。

Hunkapiller, M. W., Hewick, R. M., Dreyer, W. J. 和 Hood, L. E. Methods Enzymol 91期399 ~413 页(1983 年)。

Hunkapiller, M. W., 和 Hood, L. E. Methods Enzymol 91 期, 486 ~493 页(1983 年)。

例3 为同质水母发光蛋白编码的c DNA的克隆和表达

限制性内切酶是从 Bethesda Research Laboratory. New England Bio Labs 和 International Biotechnologies, Inc. 购买的, 并根据供应者叙述的条件使用, RNasin 和逆转录酶是分别从 Biotech 和 Life Science 公司得到的。末端转移确是从 PL Biochemicals 公司购买的。腔肠动物荧光素是根据 Hori, K. Anderson, J. M., W

ard, W. W Cormier, M. J. 等人的方法合成的(见1975年 Biochemistry 14期, 2371~2376页; K. charbonneau, H. Hat, R. C., 和 Cormier, M. J. 在 Proc. Nat'l. Acad. Sci. U S A 1977年74期, 4285~4287页; Inouye, S., Sug iura, H., Kakoi, H., Has izuma, K., Goto, T 和 Iio, H., chem.lett . 1975年141 ~144 页。并以冷冻干燥粉末形式贮存到使用。

分离DNA和体外翻译:

从华盛顿州 Friday Harbor 的华盛顿大学海洋生物实验室收集水母 (*Aequorea Victoria*)。从其四周切下圆口环并立即冷冰在干冰/甲醇浴中。将其保存在-70 °C下直到需要。

用 Kim 等人的方法分离 RNA(见 Kim, Y- J, Shuman, J., Sette, K 和 Przybyla, A., 在 J. Cell. Biol. 96期393-400 页上文章, 1983年)。用上述技术制备 Poly(A) RNA(Aviv, H, 和 Leder, P, 在 PNAS 67期1408-1412 页的文章, 1972 年)。

将1 μg Poly(A⁺) RNA和20 μg Poly(A⁻): RNA用家兔网织细胞体外翻译系统转译(见 Pelham, H. R. B 和 Jackson, R. J., 在 Eur. J. Biochem. 1976年247 页; Merrick, W. C., 在 Methods In Enz. 101(c)卷, 606-615 页的文章1983)。用微球菌核酸酶(micrococal nuclease)除去溶胞物中的内源 RNA。每个62 μl 的转译混合物加38 μci的 ³⁵S- 蛋氨酸, 于25 °C下孵育90分钟。然后取出2 μl 进行电泳分析。加入2 μl 抗水母光蛋白抗体和 *Staph aureus* 细胞加入到50 μl 的每个转译混合液免疫沉淀水母发光蛋白。经过几次洗涤, 在有 SDS 参于下加热分解抗体- 脱辅基水母发光蛋白复合物。用13% SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分析转译产物。为鉴别蛋白用 Coomassie R-250染色凝胶, 再将其浸在 PPO- DMSO溶液中。最后在-70 °C进行荧光显影。

重组DNA:

用Wickens 等人方法从总体水母poly(A⁺)RNA合成双链c DNA (见Wickens, M. P., Buell, G. N. 和 Schimke, R. T., 在 J. Biol. chem. 253 期2483-2495 页的文章, 1978年)。把双链c DNA加一个多聚脱氧胞苷尾端后, 将其与在Pst I 切点加聚脱氧鸟苷尾端的质粒PBR322 一起退火(见Villa-Komaroff, L., Efstradiadis, A., Broome, S., Lomedico, P., Trzard, R., Naber, S. P. chick, W. L., 和 Gilbert, 在PNAS75期, 3727-3731 页的文章, 1978年)然后将该重组质粒用于转化大肠杆菌突变系SK1592, 选择出抗四环素但对氨苄青霉素敏感的菌落, 将其转移到微滴定盘并在-70 °C下冷冻。

用一合成的寡核苷酸混合物从水母c DNA文库中选出水母发光蛋白c DNA。该核苷酸混合物是从哥伦比亚大学Charles cantor和Carlos Argarana 处得到的。用聚丙烯酰胺电泳纯化它们(见Maniatis, T. 和 Efstratidis, A., 在Meth. in Enz. 65期, 299-305 页的文章, 1980年), 然后用多核苷酸激酶和r-p³²-ATP对17个多核苷酸寡聚物放射性标记(见Maxam, A. M. 和 Gilbert, W., 在Meth. in Enz 65 期 499-559 页的文章, 1980年)。再用DEAE-纤维素离子交换树脂层析以除去没进入多核苷酸的P³²。

以下列方式筛选水母c DNA文库: 将冷冻的大肠杆菌重组体转移到铺在Luria琼脂培养皿上的硝酸纤维滤纸(7×11cm)。让其在37 °C下生长12小时, 溶菌, 然后根据Taub 和 Thompson 方法用Whatman541 滤纸将DNA固定。(见Taub, F. 和 Thompson, E. B. 在Anal. Biochem. 126 期222-230 页的文章, 1982年)。将滤纸风干, 再在真空条件下烘烤2 小时。

用1 × SSC液将滤纸浸湿, 然后每张滤纸在3ml 的予杂交溶液(内含10×NET, 0.1 % SDS, 3 × Denhardt's)中, 于55 °C下浸泡12-20 小时。然后将溶液从杂交袋中倾出, 换上1ml 的杂交溶液(内含

$10 \times \text{NET}$, 0.1% SDS, 3 \times Denhardt's, 含 $1 \times 10^6 \text{ cpm}$ ^{32}P 标记的 17 个多核苷酸寡聚物)。在 37°C 下杂交 24 小时, 然后用 $10 \times \text{SSC}$ 溶液在 4°C 每次洗 10 分钟, 共洗 4 次。将滤纸风干, 用塑料膜包好。在 -70°C 下用 Dupont Cronex 强化屏将 Kodak XAR-5 胶片放在滤纸上曝光。

培养和提取大肠杆菌的程序:

将含 PAEQ1-PAEQ6 的大肠杆菌 SK1592 菌株于 37°C 下置于 25 ml 的 Luria 肉汤中生长一夜。将细胞离心, 将沉淀物重悬在 5ml 含 10% 蔗糖, 50 mM Tris, PH8 的缓冲液中。加 7.2 μl 0.1 M 苯甲基磺酰基氟化物, 312 μl 的 0.2 M EDTA, 10 mg 的溶胞酶和 10 μl 10 mg/ml 的核酸酶 A 使细胞溶解。放置冰中 45 分钟, 将其用 $43,500 \times g$ 转速离心一小时。留下上清液。

纯化和测定水母发光蛋白:

用 Blinks 等人的方法采取和纯化水母发光蛋白。(见 Blinks, J. R., Wier, W. G., Hess, P. 和 Predergast, F. G., 在 Prog. Biophys., Molec., Biol., 40 期, 1-114 页的文章 1982 年)。通过下述方法测定水母发光蛋白活性: 将 5 μl 样品注入 0.5ml 含 0.1 M 的 CaCl_2 , 0.1 M Tris, PH8 的混合液, 立即测定其光强度和总光子量。试验是用 Anderson 等人设计的光度计及绝对光子所得的校正标准。(见 Anserson, J. M., Faini, G. J. 和 Wampler, J. E., 在 Methods in Enz 57 期, 529-559 页的文章 1978 年) 及 Charbonneau, H 和 Cormier, M. J. 在 J. Biol. Chem. 254 期 769-780 页的文章 1979 年)。

pAEQ I 萃取液中具活性的脱辅基水母发光蛋白的部分纯化:

为部分纯化表达的脱辅基水母发光蛋白, 将 23ml 的 PAEQ1 萃取液过一个 42ml 床体积的 Whatman DE-22 柱, 该柱用含 1 mM EDTA, 1.5 mM Tris, PH7.5 缓冲液平衡。用 800ml NaCl 梯度(0-1M) 洗柱, 有活性的脱辅基水母发光蛋白在 0.3 M NaCl 处被洗脱。将洗脱峰的各

个小份汇集，在含0.5 M KCl, 10mM EDTA和15mM Tris, PH7.5的缓冲液中透析，以备作图3的试验时应用。

水母 Poly(A⁺)RNA的体外翻译：

每克冰冻水母组织可分离出大约1.6 μg Poly(A⁺)RNA。水母Poly(A⁺)RNA体外翻译结果示在图1。翻译产物与水母发光蛋白抗体反应示在第4道。免疫沉淀的S计数占参与翻译可被酸沉淀的计数的0.3%意味着水母发光蛋白RNA约占总体Poly(A⁺)RNA的0.3%。这与已知水母发光蛋白约占水母围口环粗提取液中蛋白的0.5%是一致的。没有水母RNA(2道)或含水母Poly(A⁻)RNA时(资料未标出)进行的体外翻译未得到的发生免疫沉淀的蛋白。

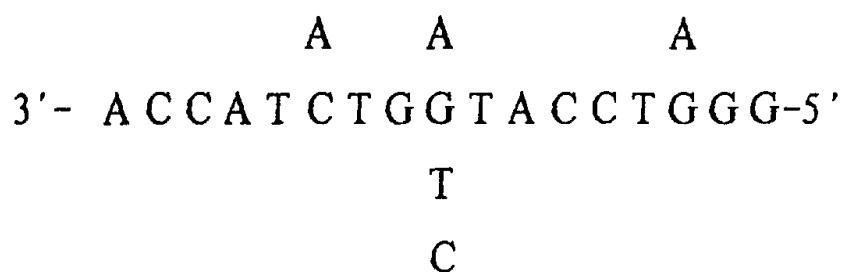
用水母发光蛋白抗体免疫沉淀的最初转译产物用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析，分子量约为23,400道尔顿(见4道)，比从水母分离出的天然发光蛋白稍大些(天然物分子量22,800道尔顿，示在图1)。这个资料和图4所示的都表明在初级转译产物中存在一个大约七个氨基酸的前顺序。

如果研究原来的放射自显影谱会发现Poly(A⁺)RNA转译得到的免疫沉淀的蛋白是以二联体甚至三联体形式迁移。这个结果可以两种方式解释。首先，在发光水母(*Aequorea Victoria*)中可能存在脱辅基水母发光蛋白的多基因，因此它们相对的蛋白质由于其前顺序的长度不同而有不同的分子量。水母发光蛋白的同功酶可能意味着存在这种多基因。(见Blink, J. R. 和 Harrer, G. C., Fed. Proc. 34期, 474页的文章, 1975年)。其次，在Friday Harbor收集的水母可能包括几个水母种。

鉴定水母cDNAs：

所用的水母cDNA文库包含具有450对以上碱基插入体的6000个重组体。随机筛选的25个重组体中，没有一个是具有少于500个碱基对插入体的重组体。其中的两个具有大于3,000对碱基的插入体。

用下列混合的合成寡核苷酸探针来筛选水母 cDNA 文库：



通过检测脱辅基水母发光蛋白完整氨基酸顺序来测定这些寡核苷酸的 DNA 序。这些寡核苷酸是与为水母发光蛋白 C₁ 端区的肽：色- 酪- 苏- 蛋- 天冬- 脯 178 编码的 mRNA 互补的。用 P³² 为 17- 多核苷酸标记，用上述方法与水母 cDNA 文库的质粒 DNA 杂交。

鉴定六个转化体，以确定哪个转化体所含质粒具有与合成寡核苷酸杂交的插入体。含最大 Pst I 插入体，p AEQ1 质粒的限制酶图示在图 2，如果用 BamH1 酶解 p AEQ1 则不与合成的寡核苷酸杂交。根据对 17- 多核苷酸 DNA 序的测定，杂交探针不含 BamH1 识别顺序 (GG ATCC)。所以，p AEQ1 中 BamH1 切点可用于鉴定脱辅基水母发光蛋白编码顺序的 3'- 端区。通过下述的在大肠杆菌中表达表明重组质粒 p AEQ1 确实含有脱辅基水母发光蛋白 cDNA。

脱辅基水母发光蛋白在大肠杆菌中表达：

为测定这六个转化体是否表达具有生物活性的脱辅基水母发光蛋白，用上述方法制备这六种萃取液及宿主菌株。向 0.5 毫升的每种萃取液加入 β- 羟基乙醇使其浓度为 2mM，加腔肠动物萤光素，使其浓度为 0.1mM，然后把混合液置于 4 °C 下孵育 20 小时。再根据上述方法用其作依赖钙离子的光蛋白活性试验。只是在重组的 p AEQ1 萃取液中观察到依赖钙离子的萤光。而在其它任何转化体萃取液及原宿主萃取液中均未发生萤光。在 p AEQ1-6 中插入体的交叉杂交意味着它们含有同质 DNA 序。然而，如果 p AEQ2-6 中的 cDNA 插入体长度不足或在质粒中的方向不合适，则它的萃取液中没有预期的脱辅基水母发光蛋白活性。

p A E Q1 萃取液光蛋白活性的动力学与天然混合脱辅基水母发光蛋白相似，（见图3）。萃取液中显示光蛋白活性的条件与所用对照的脱辅基水母发光蛋白一样，如图3 所示，它们都需要溶解的 O₂。此外，无论从反应混合液中除去 β -巯基乙醇还是除去腔肠动物荧光素都不显示依赖钙离子的光蛋白活性。把活性成份注入没有钙离子的缓冲液中也不发荧光。然而加入钙离子就会发荧光。

为进一步鉴定含p A E Q1 转化体的萃取液中的活性成份，将含这种重组质粒转化体的萃取液如上述方法通过 DE-22 柱层析。在0.3 M 盐浓度下洗脱出的脱辅基水母发光蛋白活性与对照的脱辅基水母发光蛋白相似。然后将含活性部分加入腔肠动物荧光素， β -巯基乙醇和氧气生成如图3 所示光蛋白活性。然后将其凝胶过滤。如图4 所示，从柱洗脱出的p A E Q1 萃取液的部分纯化成分的分子量为20,600，作为对照的天然水母发光蛋白分子量为19,600，在体外翻译试验时也观察到相似的结果（见图1）。从图4 的资料也可以得出结论：在有电荷情况下，荧光素与p A E Q1 萃取液中活性成份紧密结合。

图4 汇集的发光蛋白加入钙离子时产生荧光。发生荧光动力学是与依赖钙离子的水母发光反应的动力学相似的。如下面图6 所示其它的重组质粒出现在转化体中时没有表达出发光蛋白。

上述资料表明插入到p A E Q 1的 cDNA 代表了为脱辅基发光蛋白编码的全长 cDNA。资料也表明这种 cDNA 在 PAEQ 1 中表达，蛋白产物的生物学特性与天然的水母发光蛋白没有区别。表达水平大约为全部可溶性蛋白的0.01%。

表6. 脱辅基水母发光蛋白 cDNA 克隆萃取液中脱辅基水母发光蛋白的充：

克隆	萃取液中高峰光强度(h/sec)
----	--------------------

	含钙离子	不含钙离子
p A EQ1	5×10	0
p A EQ2	0	0
p A EQ3	0	0
p A EQ4	0	0
p A EQ5	0	0
p A EQ6	0	0
SK1592	0	0

在0.5ml 的每种萃取液中加入巯基乙醇。使其浓度达到2mM；加腔肠物荧光素，使其浓度为0.015mM。将混合液在4 °C下孵育20小时。取出5 μl 将其注入0.5ml 的0.1mM钙离子，测定其高峰光强度。

例4：用诱导性乳糖启动子增强脱辅基水母发光蛋白在大肠杆菌中的表达：

在含p A EQ1 的大肠杆菌菌株中脱辅基水母发光蛋白以较低水平表达。为增强其表达水平，可将p A EQ1 中的脱辅基水母发光蛋白基因亚克隆到另一个质粒（PUC9）中去，由于它的位置与诱导性乳糖启动子有关，从而增强了脱辅基水母发光蛋白基因的转录。

从p A EQ1 中分离出0.75千对碱基的P St1段，将其克隆到PUC9唯一的P St1切点。得到了p A EQ7 和p A EQ8 两个不同质粒。如图2(6)所示，p A EQ在所需方向含有一个P St1插入体。而p A EQ却在相反方向插入该片段。

将含p A EQ₇ 和p A EQ₈ 的大肠杆菌菌株（宿主：JM105）置于20ml含氨基苄青霉素（50 μg/ml）Luria肉汤培养液中于37°C下生长，

当光密度 OD₅₅₀ 达0.6 时，用该100mM 母液稀释成1mM。取出5ml 样品，取液时培养液继续在摇床中摇动。1 小时和2 小时后再每次分别取5ml 。每次取出样品后立即将样品细胞离心并冷冻在-20 °C下直至需要。

将6 个样品用于测定脱辅基水母发光蛋白活性。将细胞沉淀重悬在1 毫升含 50mM Tris, PH8 , 10% 蔗糖, 25 μg/ml 溶胞酶和20 μg/ml 核糖酶A的缓冲液中使大肠杆菌细胞第一步溶解。置于冰中45分钟后，以43, 500 ×g 速度将其离心1 小时。留下上清液。然后将其加入腔肠动物荧光素和巯基乙醇(250 μl 萃取液中加入3 μl 5 % 巯基乙醇水溶液, 3 μl 的腔肠动物荧光素)，孵育过夜。为测定孵育后混合液的水母发光蛋白活性，向5ml 样品中注入 5 μl 含0.1 M Ca Cl₂ , 0.1 M Tris , PH 8 , 的缓冲液，然后立即测定高峰光强度和光子数。再用 Bradford 试验(试剂为 Bio- Rad 出品)测定蛋白。

表7 所示结果是从六种含p A EQ7 和p A EQ8 菌株萃取液，一种对照大肠杆菌株(SK1592)萃取液和另一含p A EQ1 菌株萃取液得到的。

表7: 在含p A EQ1 , p A EQ7 和p A EQ8 的大肠杆菌菌株中脱辅基水母发光蛋白的荧光素的表达水平

用 IPTG 质粒	诱导后时间 (小时)	脱辅基水母发 光蛋白比活性 (光子数/mg)	Aeqaorin 占可溶性蛋白的% 假设充电效应 为 1%	Aeqaorin 占可溶性蛋白的% 假设充电效应 为 20%
p A EQ7	0	<0.02	-	0
	1	<0.04	-	0
	2	<0.02	-	0
p A EQ8	0	<0.668	0.042 (11)	0.002 (10)

1	17.1	1.07(268)	0.05(263)
2	38.4	2.40(600)	0.12(600)
p A E Q1	-	0.061	0.0002
SK1592菌株	-	0	0

* 括号中的数字表示在 p A E Q₁ 萃取液观察到活性的倍数。

萃取液中脱辅基水母发光蛋白活性取决于荧光素的充电效应。无法计算粗萃取液中的充电效应。用水母中提取的脱辅基水母发光蛋白观察到的充电效应不高于20%，可能稍低于含重组DNA的大肠杆菌萃取液中的充电效应。因而要计算两个值，即充电效应为1%或20%时占可溶性蛋白的百分数。

与p A E Q₁ 相比，p A E Q₈ 在诱导后两小时表达明显地高于 p A E Q₁(600 倍)。无论在p A E Q 或p P A E Q₈ 中，当水母发光蛋白基因处于相反的方向时都不能被诱导表达发光蛋白，

这资料表明，与脱辅基水母发光蛋白 cDNA核苷酸顺序的3'端靠近诱导的启动子时，其表达水平明显地增强。

例5: 鉴定特定脱辅基水母发光蛋白基因的结构：

用基因核苷酸顺序分析标准技术测定如图2 所示 P St I- P St I 片段的结构及证实质粒p A E Q₁，p A E Q₁ 和p A E Q₈ 中存在这个片段。在3'端上游有69个未翻译的核苷酸。与例1 所述提取的天然脱辅基7个附加的氨基酸残基。例1 所述天然脱辅基水母发光蛋白在N-末端以缬氨酸开始，而且在提取过程7个残基被蛋白酶切掉了。C-末端有一个脯氨酸编码，然后紧跟着终止码及12个附加核苷酸。这表明：提取的 cDNA是长度完整的。整个双键DNA及氨基酸顺序如下：

CTT	TGC	ACC	AAA	ACA	CCA	CAT	CAA
GAA	ACG	TGG	TTT	TGT	GGT	GTA	GTT

ATC TCC AGT TGA TAA ACT AAA TCG
TAG AGG TCA ACT ATT TGA TTT AGC
TCC CAA CGG CAA
AGG GTT GCC GTT

1

-22

CAG	GCC	AAC	ATG	ACC	AGC	GAA	CAA
GTC	CGG	TTG	TAC	TGG	TCG	CTT	GTT
酪	丝	缬	赖	亮	苏	脯	天冬
TAC	TCA	GTC	AAG	CTT	ACA	CCA	GAC
ATG	AGT	CAG	TTC	GAA	TGT	GGT	CTG
苯丙	天冬	天冬酰	脯				
TTC	GAC	AAC	CCA				
AAG	CTG	TTG	GGT				

61

-2

赖	色	异亮	甘	精	组	赖	组
AAA	TGG	ATT	GGA	CGA	CAC	AAG	CAC
TTT	ACC	TAA	CCT	GCT	GTG	TTC	GTG
蛋	苯丙	天冬酰	苯丙	丙	天冬	缬	天冬酰
ATG	TTT	AAT	TTT	CTT	GAT	GTC	AAC
TAC	AAA	TTA	AAA	GAA	CTA	CAG	TTG
组	天冬酰	甘	精				
CAC	AAT	GGA	AGG				
GTG	TTA	CCT	TCC				

121

18

异亮	丝	亮	天冬	谷	蛋	缬	酪
ATC	TCT	CTT	GAC	GAG	ATG	GTC	TAC
TAG	AGA	GAA	CTG	CTC	TAC	CAG	ATG
赖	丙	丝	天冬	异亮	缬	异亮	天冬酰
AAG	GCG	TCC	GAT	ATT	GTT	ATA	AAC
TTC	CGC	AGG	CTA	TAA	CAA	TAT	TTG
天冬酰	亮	甘	丙				
AAC	CTT	GGA	GCA				
TTA	GAA	CCT	CGT				

181

38

苏	脯	谷	谷酰	丙	赖	精	组
ACA	CCT	GAA	CAA	GCC	AAA	CGT	CAC
TGT	GGA	CTT	GTT	CGG	TTT	GCA	GTG
赖	天冬	丙	缬	谷	丙	苯丙	苯丙
AAA	GAT	GCT	GTA	GAA	GCC	TTC	TTC
TTT	CTA	CGA	CAG	CTT	CGG	AAG	AAG
甘	甘	丙	甘				
GGA	GGA	GCT	GGA				
CCT	CCT	CGA	CCT				

241

58

蛋	赖	酪	甘	缬	谷	苏	谷
ATG	AAA	TAT	GGT	GTA	GAA	ACT	GAA
TAC	TTT	ATA	CCA	CAT	CTT	TGA	CTT

色	脯	谷	酪	异亮	谷	甘	色
TGG	CCT	GAA	TAC	ATC	GAA	GGA	TGG
ACC	GGA	CTT	ATG	TAG	CTT	CCT	ACC
赖	精	亮	丙				
AAA	AGA	CTG	GCT				
TTT	TCT	GAC	CGA				

301

78

丝	谷	谷	亮	赖	精	酪	丝
TCC	GAG	GAA	TTG	AAA	AGG	TAT	TCA
AGG	CTC	CTT	AAC	TTT	TCC	ATA	AGT
赖	天冬酰	谷酰	异亮	苏	亮	异亮	精
AAA	AAC	CAA	ATC	ACA	CTT	ATT	CGT
TTT	TTG	GTT	TAG	TGT	GAA	GAA	GCA
亮	色	甘	天冬				
TTA	TGG	GGT	GAT				
AAT	ACC	CCA	CTA				

361

98

丙	亮	苯丙	天冬	异亮	异亮	天冬	赖
GCA	TTG	TTC	GAT	ATC	ATT	GAC	AAA
CGT	AAC	AAG	CTA	TAG	TAA	CTG	TTT
天冬	谷酰	天冬酰	甘	丙	异亮	丝	亮
GAC	CAA	AAT	GGA	GCT	ATT	TCA	CTG
CTG	GTT	TTA	CCT	CGA	TAA	AGT	GAC

天冬 谷 色 赖

GAT GAA TGG AAA

CTA CTT ACC TTT

421

118

丙 酪 苏 赖 丝 丙 甘 异亮

GCA TAC ACC AAA TCT GCT GGC ATC

CGT ATG TGG TTT AGA CGA CCG TAG

异亮 谷酰 丝 丝 谷 天冬 半胱 谷

ATC CAA TCG TCA GAA GAT TGC GAG

TAG GTT AGC AGT CTT CTA ACG CTC

谷 苏 苯丙 精

GAA ACA TTC AGA

CTT TGT AAG TCT

481

138

缬 半胱 天冬 异亮 天冬 谷 丝 甘

GTG TGC GAT ATT GAT GAA AGT GGA

CAC ACG CTA TAA CTA CTT TCA CCT

谷酰 亮 天冬 缬 天冬 谷 蛋 苏

CAG CTC GAT GTT GAT GAG ATG ACA

GTC GAG CTA CAA CTA CTC TAC TGT

精 谷酰 组 亮

AGA CAA CAT TTA

TCT GTT GTA AAT

541

158

甘	苯丙	色	酪	苏	蛋	天冬	脯
GGA	TTT	TGG	TAC	ACC	ATG	GAT	CCT
CCT	AAA	ACC	ATG	TGG	TAC	CTA	GGA
丙	半胱	谷	赖	亮	酪	甘	甘
GCT	TGC	GAA	AAG	CTC	TAC	GGT	GGA
CGA	ACG	CTT	TTC	GAG	ATG	CCA	CCT
丙	缬	脯					

GCT GTC CCC TAA

CGA CAG GGG ATT

601

178

GAA ACT CTG CGC

CTT TGA GAC GCG

661

198

测得的顺序表明选择表3 中所示任何一个稍有变化的氨基酸顺序都可以生产有活性的脱辅基水母发光蛋白，因为它们都含有主要氨基酸顺序，只是在不同位置稍有变化。

所以，为上述稍有变化的肽编码的不同基因都是具生物活性的分子。

上述与其它肽，DNA分子，重组载体等有关的讨论均基于本申请揭

示的一般的DNA顺序及在它基础上作稍小修饰的顺序(因而都具脱辅基水母发光蛋白的生物活性)。它与例中所述特定的顺序一样是可用的。例子揭示了一个肽，一个为该肽编码的DNA序列及含该DNA的两个切点间的整个DNA顺序。为该肽编码的DNA顺序(特别是包含一个末端终止码的)，作为与整个DNA顺序分开的实体，也可被考虑为从其分离出来的。本发明还包括在这段编码区有微小修饰的序列。还包括由它们单链形式形成的双链DNA，或由它们转录的RNA。

本发明不限于例中所述任何特定载体和宿主细菌。例中所举不过是优选的实施方案。本领域普通技术人员可很容易地用不同来源的细菌和质粒。例如：大肠杆菌JM105和质粒PUC和PBR322(从New Jersey 8854, 800 Centenial Avenue P. L Biochemicals. Inc. 公司——一个制药分公司买到的)。在该公司其编号分别为27-1550-01, 27-4918-01和27-1750-01，进而，这些实施本发明的微生物和质粒也可从美国典型样板培养物中心(ATCC, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, 20852)得到，它们贮存号分别是：大肠杆菌SK1592为ATCC No. 35106；大肠杆菌JM105为ATCL No. 53029；质粒PUC9为ATCC No. 37252，质粒PBR322为ATCC No. 31344。

本发明已叙述完毕，在不离开本发明构思和范围内本领域的普通技术人员可作很多改变与修饰均是显而易见的。

说 明 书 附 图

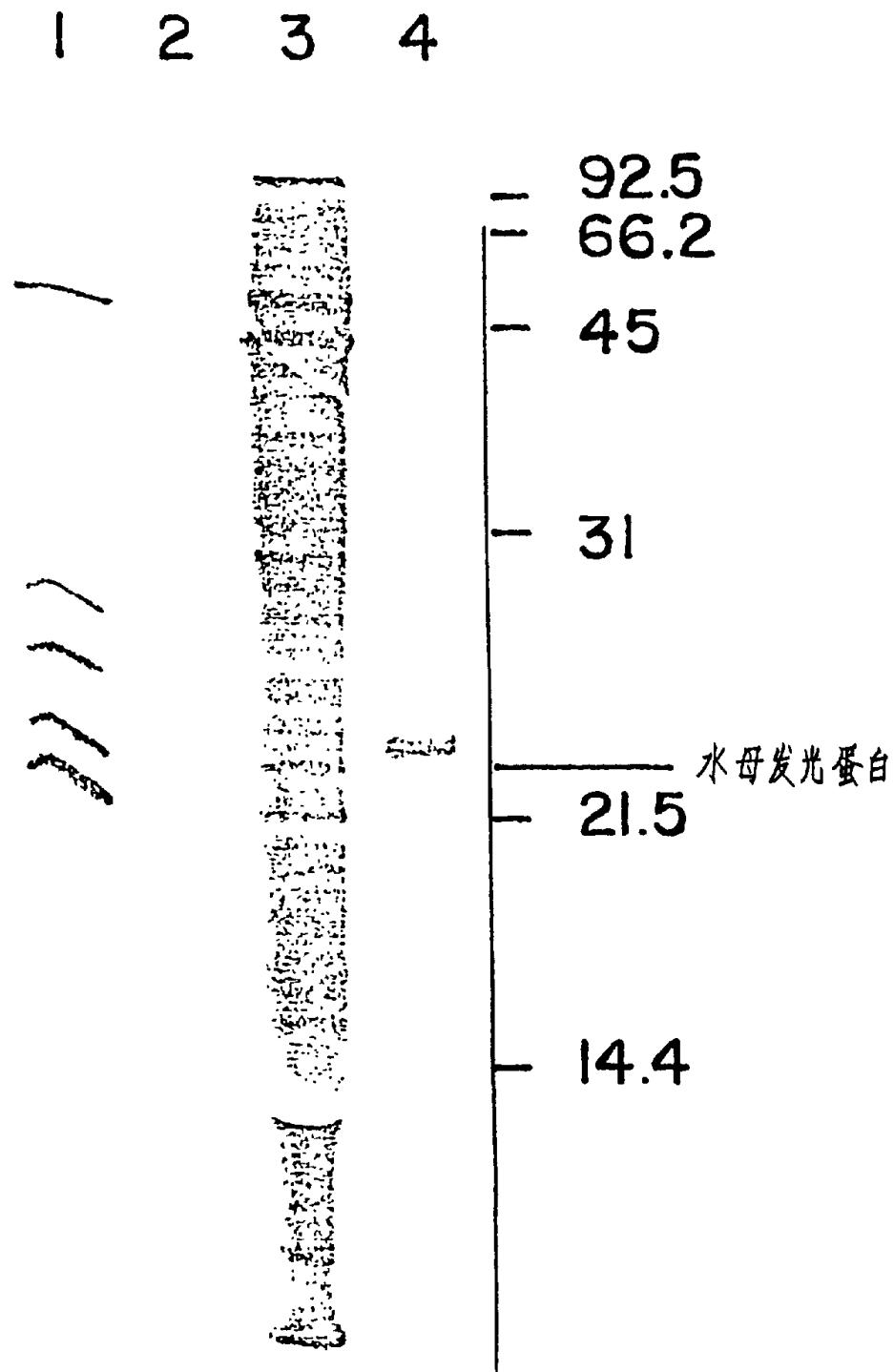
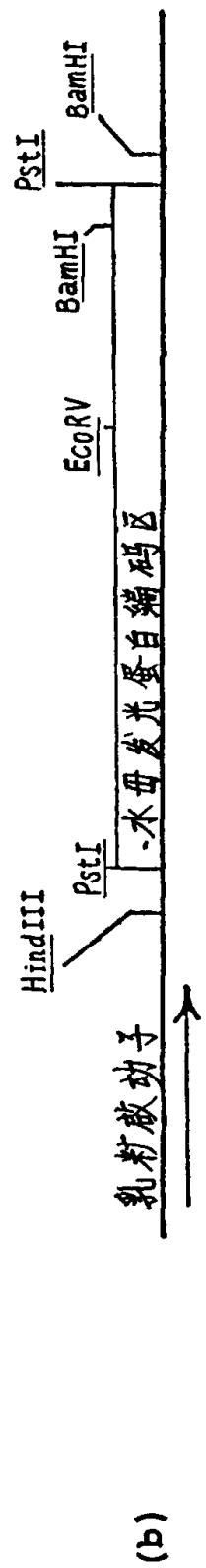
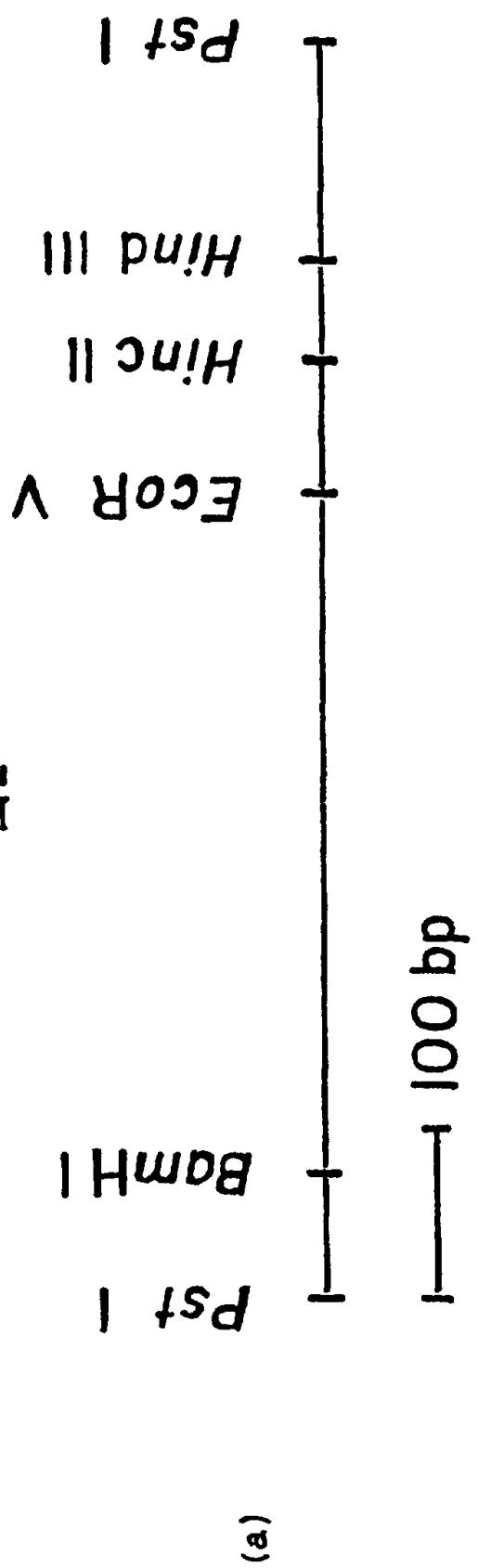


图 1

图2



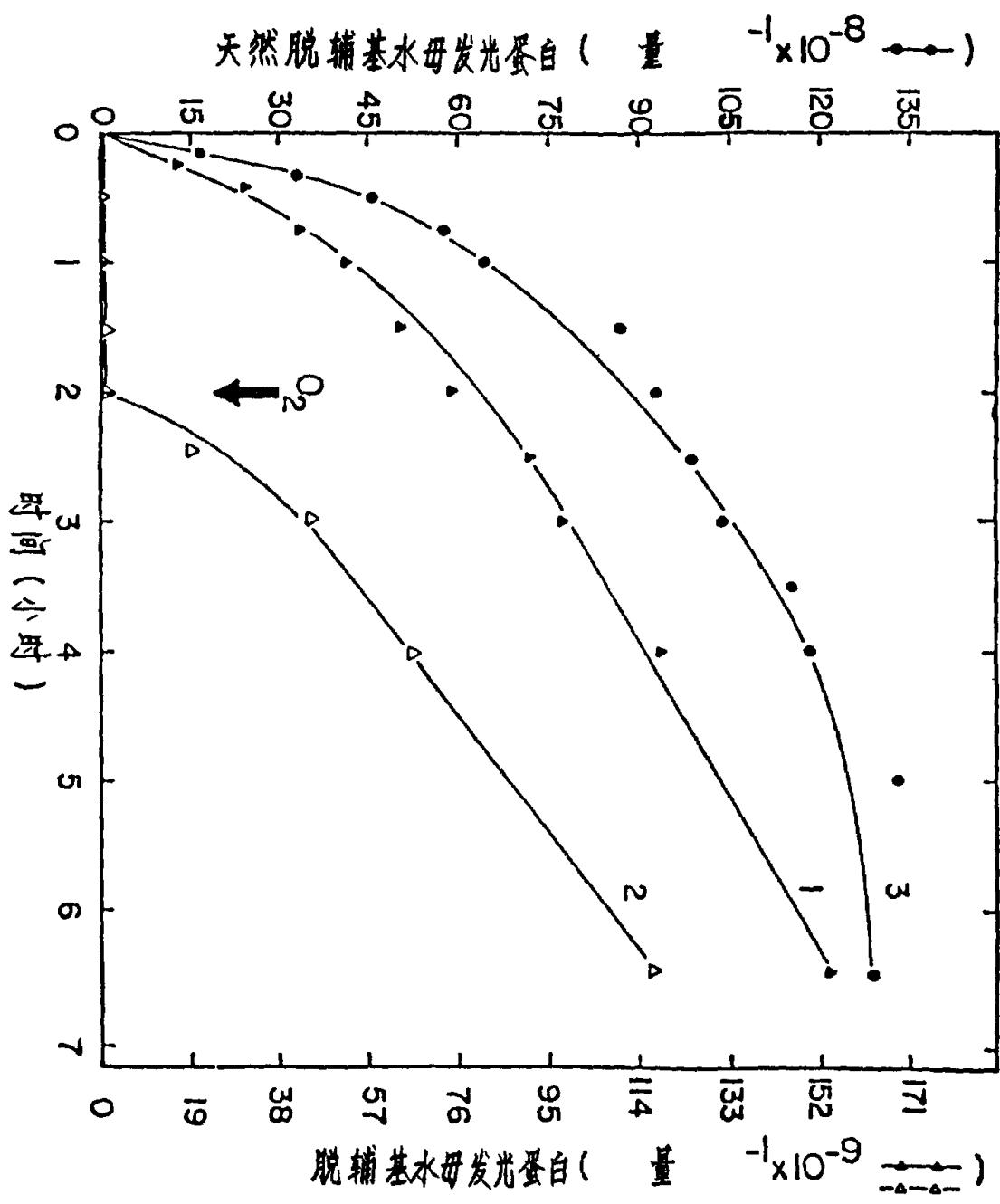


图3

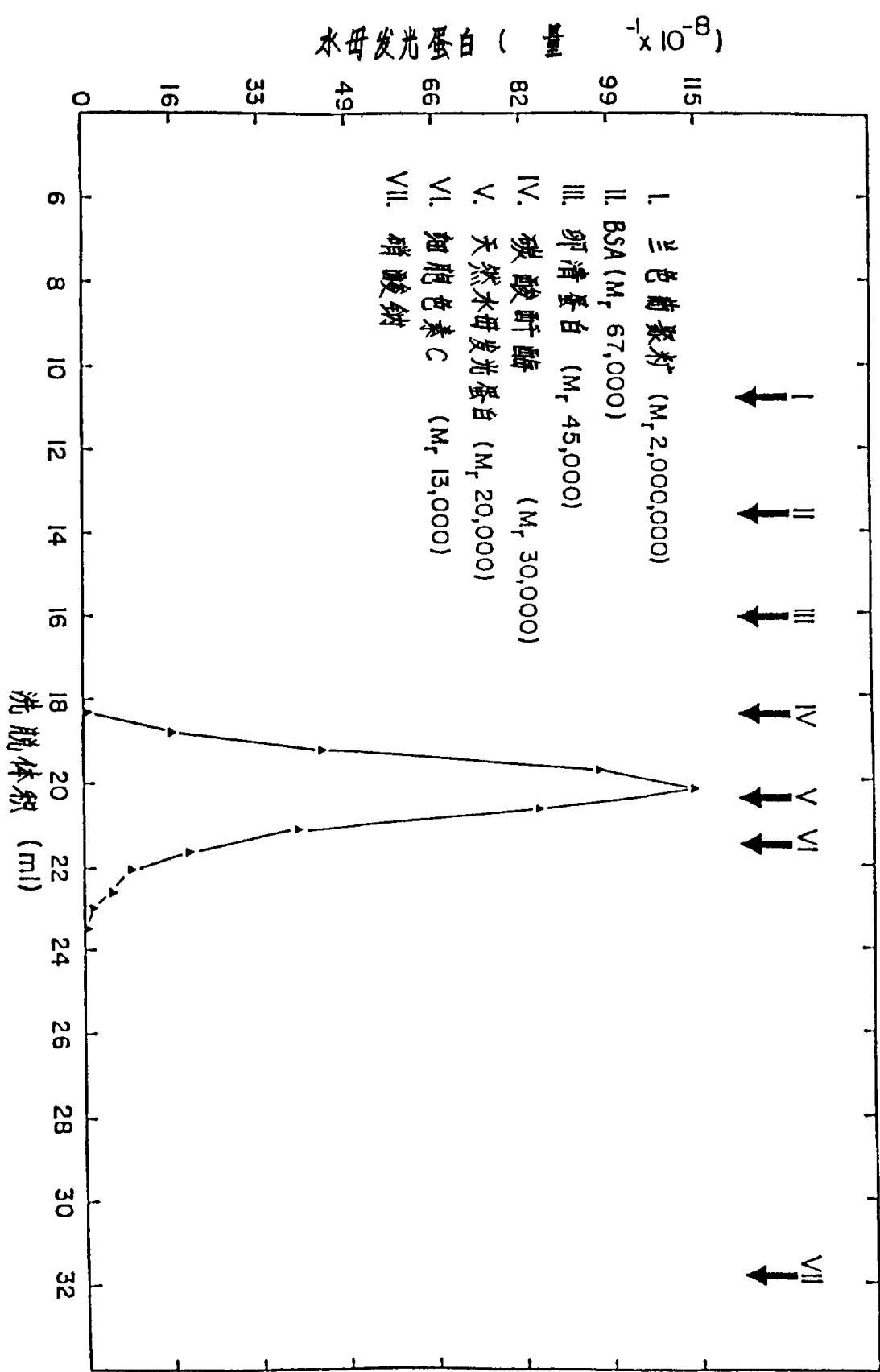


图4