



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106432457 A

(43)申请公布日 2017. 02. 22

(21)申请号 201610799888.9

G01N 33/579(2006.01)

(22)申请日 2012.02.28

(30)优先权数据

61/447556 2011.02.28 US

(62)分案原申请数据

201280010708.4 2012.02.28

(71)申请人 生化学工业株式会社

地址 日本东京都

(72)发明人 水村光 相泽真纪 小田俊男

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 黄希贵

(51)Int. Cl.

G07K 14/435(2006.01)

G07K 5/10(2006.01)

权利要求书1页 说明书17页

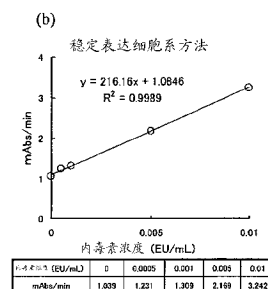
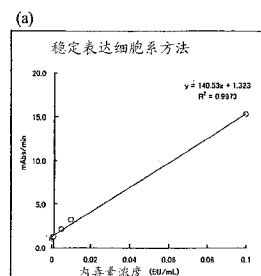
序列表20页 附图6页

(54)发明名称

用于测量内毒素的试剂

(57)摘要

提供了一种用于快速地且高灵敏度地测量内毒素的方法。使用包含下面的蛋白(1)至(3)的内毒素测量剂测量内毒素,所述蛋白质中的每一种是通过使用昆虫细胞作为宿主进行表达可得到的重组蛋白:(1)源自东方鲎的因子C,该因子C在C-端处不具有His-标签序列;(2)鲎的因子B;和(3)鲎的前凝固酶。



1. 因子C,其是通过使用昆虫细胞作为宿主进行表达可得到的重组蛋白,且是由SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列组成的蛋白。

2. 一种内毒素测量剂,包含权利要求1的因子C。

3. 一种制备权利要求1的因子C或权利要求2的测量剂的方法,该方法包括如下步骤(A)–(C):

(A) 将编码因子C的DNA掺入病毒DNA的步骤,该因子C由SEQIDNO:2所示的氨基酸序列组成;

(B) 用其中掺入了所述DNA的病毒感染昆虫细胞的步骤;和

(C) 使被所述病毒感染的昆虫细胞表达由所述DNA编码的蛋白的步骤。

4. 一种制备权利要求1的因子C或权利要求2的测量剂的方法,该方法包括如下步骤(A)–(C):

(A) 将编码因子C的DNA掺入载体的步骤,该因子C由SEQIDNO:2所示的氨基酸序列组成;

(B) 将其中掺入了所述DNA的载体引入昆虫细胞中以使所述DNA掺入昆虫细胞的染色体中的步骤;和

(C) 使其中掺入了所述每种DNA的昆虫细胞表达由所述DNA编码的蛋白的步骤。

5. 权利要求3或4的方法,其中编码因子C的所述DNA是包含SEQ ID NO:1的核苷酸序列的DNA。

6. 一种在测试样品中测量内毒素的方法,该方法包括将权利要求1的因子C或权利要求2的测量剂和测试样品混合的步骤,以及测量级联反应的进展的步骤。

7. 权利要求6的方法,包括将用于检测级联反应的进展的底物加入反应系统中的步骤。

8. 权利要求7的方法,该方法还包括基于所述底物的反应计算测试样品中内毒素水平的步骤。

9. 一种表达因子C的昆虫细胞,该因子C由SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列组成。

10. 一种昆虫细胞,包含编码因子C的DNA,该因子C由SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列组成。

11. 权利要求10的昆虫细胞,该DNA包含权利要求1所示的核苷酸序列。

用于测量内毒素的试剂

[0001] 本申请是国际申请日为2012年2月28日、国家申请号为201280010708.4(国际申请号为PCT/JP2012/055728)、发明名称为“用于测量内毒素的试剂”的申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及内毒素测量剂、用于生产所述测量剂的方法、和用于测量样品中的内毒素的方法。

背景技术

[0003] 内毒素是存在于革兰氏阴性细菌的细胞壁外膜上的脂多糖,且已知是强致热原。此外,已知的是,即使少量的内毒素也会造成归因于细菌感染的不同疾病状态,诸如由巨噬细胞活化引起的炎症性细胞因子的释放和内毒素性休克的诱导以及发热。因此,药物(诸如注射用药)、水、医疗设备等中的内毒素的检测是重要的。此外,内毒素被认为是革兰氏阴性细菌感染中的休克的主要原因,因此,通过测量血液中的内毒素,可以判断感染和/或药物作用是否存在。

[0004] 此外,已知的是,革兰氏阴性细菌对美洲鲎(*Limulus polyphemus*) 的感染会造成血管内凝固,并且该现象已经被用于检测内毒素。

[0005] 也就是说,已知使用鲎的血细胞提取物(鲎变形细胞裂解物;在下文中也被称作“裂解物”)测量内毒素的方法(例如,非专利文献1)。该方法被称作“鲎试验”,且使用存在于所述裂解物中的不同蛋白质的级联反应,该反应通过使内毒素与所述裂解物接触而发生。所述级联反应的示意图显示在图1中。

[0006] 在使内毒素与裂解物接触后,存在于裂解物中的因子C被活化,以产生活化型因子C。该活化型因子C会活化存在于裂解物中的因子B,以产生活化型因子B。该活化型因子B然后活化存在于裂解物中的前凝固酶,以产生凝固酶。

[0007] 该凝固酶会水解存在于裂解物中的凝固蛋白原分子的特定部分。由此产生凝固蛋白凝胶,以造成裂解物的凝固。因而,通过测量裂解物的凝固反应,可以测量内毒素。

[0008] 此外,通过使凝固酶与合成底物反应以造成显色反应,也可以测量内毒素。例如,凝固酶会与合成底物叔丁氧羰基-亮氨酸基-甘氨酸基-精氨酸基-pNA (Boc-Leu-Gly-Arg-pNA) 反应以水解它的酰胺键,并由此释放pNA。因而,通过最初在反应系统中包括合成底物,可以通过测量着色物质(pNA)的吸光度(405 nm) 来定量内毒素。

[0009] 此外,已知的是,使用从日本鲎裂解物纯化出的因子C、因子B和前凝固酶,可以重构级联反应系统(非专利文献2)。

[0010] 此外,已知这样的情况,其中使用源自东南亚鲎圆尾鲎(*Carcinoscorpius rotundicauda*)的重组因子C、以及源自日本鲎东方鲎(*Tachypleus tridentatus*)的重组因子B和重组前凝固酶来重构级联反应系统(专利文献1)。

[0011] 此外,已知用于检测内毒素的系统,其使用源自东南亚鲎圆尾鲎的重组因子C和可与活化型因子C反应以释放荧光物质的底物(专利文献2)。该系统可作为内毒素检测系统商

购得到(商品名:PyroGene (注册商标);Lonza)。

[0012] 但是,为了使用裂解物或从其制备的天然存在的因子C、因子B和前凝固酶,必须捕获鲨并从中收集血液。因此,考虑到生物资源的保护等,难以无限地供给这些组分。因此,已经需要容易地且快速地以低成本生产用于检测内毒素的试剂的技术。

[0013] 此外,在使用重组因子C、重组因子B和重组前凝固酶的情况下,任意上述情况需要1小时或更久来进行测量,并且尚未实现在0.001 EU/mL量级的检测灵敏度。因此,已经需要快速地且高灵敏度地测量内毒素的技术。

[0014] 现有技术文件

专利文献

[专利文献1] WO 2008/004674

[专利文献2] US 6,849,426 B

非专利文献。

[0015] [非专利文献1] Iwanaga S., Curr Opin Immunol. 1993 Feb; 5(1): 74-82。

[非专利文献2] Nakamura T. 等人, J Biochem. 1986 Mar; 99(3): 847-57。

发明内容

[0016] 本发明目的在于,提供用于快速地且高灵敏度地测量内毒素的方法。本发明目的还在于,提供要在所述方法中使用的内毒素测量剂和用于生产所述试剂的方法。

[0017] 本发明的发明人发现,通过使用源自日本鲨东方鲨并使用昆虫细胞作为宿主进行表达的重组因子C(不含His-标签)、重组因子B和重组前凝固酶,可以快速地且高灵敏度地测量内毒素,由此完成了本发明。

[0018] 也就是说,本发明如下。

[1]

一种内毒素测量剂,其包含下面的蛋白(1)至(3),所述蛋白中的每一种是通过使用昆虫细胞作为宿主进行表达可得到的重组蛋白:

- (1) 源自东方鲨的因子C,该因子C在C-端处不具有His-标签序列;
- (2) 鲨的因子B;和
- (3) 鲨的前凝固酶。

[2]

根据[1]所述的测量剂,其中所述因子B和所述前凝固酶源自东方鲨。

[3]

根据[1]或[2]所述的测量剂,其中所述因子C是下面的蛋白(A)或(B);所述因子B是下面的蛋白(C)或(D);且所述前凝固酶是下面的蛋白(E)或(F):

- (A) 蛋白,其包含在SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列;
- (B) 蛋白,其包含在SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列,但是其包括一个或几个氨基酸残基的置换、缺失、插入或添加,所述蛋白具有因子C活性;
- (C) 蛋白,其包含在SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列;
- (D) 蛋白,其包含在SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列,但是其包括一个或几个氨基酸残基的置换、缺失、插入或添加,所述蛋白具有因子B活性;

(E) 蛋白,其包含在SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列;

(F) 蛋白,其包含在SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列,但是其包括一个或几个氨基酸残基的置换、缺失、插入或添加,所述蛋白具有前凝固酶活性。

[4]

一种用于生产根据[1]至[3]中的任一项所述的测量剂的方法,所述方法包括下面的步骤(A)至(C):

(A) 将下面DNA (1)至(3)中的每一种掺入病毒DNA中的步骤:

(1) DNA,其编码源自东方鲀的因子C,该因子C在C-端处不具有His-标签序列;

(2) DNA,其编码鲀的因子B;和

(3) DNA,其编码鲀的前凝固酶;

(B) 用其中掺入了所述每种DNA的病毒感染昆虫细胞的步骤;和

(C) 使被所述每种病毒感染的昆虫细胞表达由所述每种DNA编码的蛋白的步骤。

[5]

一种用于生产根据[1]至[3]中的任一项所述的测量剂的方法,所述方法包括下面的步骤(A)至(C):

(A) 将下面DNA (1)至(3)中的每一种掺入载体中的步骤:

(1) DNA,其编码源自东方鲀的因子C,该因子C在C-端处不具有His-标签序列;

(2) DNA,其编码鲀的因子B;和

(3) DNA,其编码鲀的前凝固酶;

(B) 将其中掺入了所述每种DNA的载体引入昆虫细胞中以使所述每种DNA掺入昆虫细胞的染色体中的步骤;和

(C) 使其中掺入了所述每种DNA的昆虫细胞表达由所述每种DNA编码的蛋白的步骤。

[6]

根据[4]或[5]所述的方法,其中所述编码因子C的DNA是下面的DNA (A)或(B);所述编码因子B的DNA是下面的DNA (C)或(D);且所述编码前凝固酶的DNA是下面的DNA (E)或(F):

(A) DNA,其包含在SEQ ID NO:1中所示的核苷酸序列;

(B) DNA,其在严谨条件下与SEQ ID NO:1所示核苷酸序列的全长或一部分的互补序列杂交,且编码具有因子C活性的蛋白。

(C) DNA,其包含在SEQ ID NO:3或8中所示的核苷酸序列;

(D) DNA,其在严谨条件下与SEQ ID NO:3或8所示核苷酸序列的全长或一部分的互补序列杂交,且编码具有因子B活性的蛋白。

(E) DNA,其包含在SEQ ID NO:5或9中所示的核苷酸序列;

(F) DNA,其在严谨条件下与SEQ ID NO:5或9所示核苷酸序列的全长或一部分的互补序列杂交,且编码具有前凝固酶活性的蛋白。

[7]

一种用于测量试验样品中的内毒素的方法,所述方法包括:使根据[1]至[3]中的任一项所述的测量剂与试验样品混合的步骤,和测量级联反应的进展的步骤。

[8]

根据[7]所述的方法,所述方法包括:将用于检测级联反应的进展的底物加入反应系统

中的步骤。

[9]

根据[8]所述的方法,所述方法另外包括:基于所述底物的反应计算试验样品中的内毒素水平的步骤。

[0019] 通过本发明,可以快速地且高灵敏度地测量内毒素。例如,在本发明的一个实施方案中,仅测量30分钟便可以实现0.0005 EU/mL量级的检测灵敏度。此外,在本发明中,表达的重组因子C、重组因子B和重组前凝固酶可以不经纯化就使用,并且因此,可以简单地且快速地以低成本生产包含这些重组蛋白的内毒素测量剂。

附图说明

[0020]

[图1] 图1的简图显示了萤试验中的级联反应系统。

[图2] 图2的简图显示了载体pIZ/V5-His的结构和每个基因的插入位置。在上部的箭头指示了基因的插入位置。

[图3] 图3的照片显示了各个因子C的表达水平。

[图4] 图4的简图显示了各个因子C的活性。

[图5] 图5的照片显示了通过病毒方法表达的因子C的稳定性。

[图6] 图6的照片显示了通过稳定表达细胞方法表达的因子C的稳定性。

[图7] 图7的简图显示了中空纤维膜过滤处理对通过病毒方法表达的因子的反应性的影响。

[图8] 图8的简图显示了含有通过病毒方法表达的因子的内毒素测量剂的反应性。

[图9] 图9的简图显示了含有通过稳定表达细胞系方法表达的因子的内毒素测量剂的反应性。(a) 在0-0.1 EU/mL的内毒素浓度时的反应性。(b) 在0-0.01EU/mL的内毒素浓度时的反应性。

[图10] 图10的照片显示了纯化的重组因子C和纯化的天然存在的因子C的纯度和浓度。

[图11] 图11的校正曲线显示了带强度和BSA的量之间的关联。

[图12] 图12的简图显示了纯化的重组因子C和纯化的天然存在的因子C的活性。

具体实施方式

[0021] 在本发明中,下述的一系列反应可以被称作“级联反应”:其中内毒素活化因子C以产生活化型因子C;所述活化型因子C活化因子B以产生活化型因子B;和所述活化型因子B活化前凝固酶以产生凝固酶。

[0022] [1]本发明的内毒素测量剂

本发明的内毒素测量剂包含因子C、因子B和前凝固酶。在本发明的内毒素测量剂中包含的因子C、因子B和前凝固酶在下文中可以分别被称作“本发明的因子C”、“本发明的因子B”和“本发明的前凝固酶”。此外,因子C、因子B和前凝固酶可以共同地称作“因子”。

[0023] 本发明的因子C、本发明的因子B和本发明的前凝固酶全部是通过使用昆虫细胞作为宿主进行表达可得到的重组蛋白。

[0024] 本发明的因子C是源自日本鲎东方鲎的因子C。本发明的因子C的特征在于,它不具有在C-端处连接的His-标签。此外,本发明的因子C优选地在C-端处不具有V5-标签。此外,本发明的因子C更优选地不具有在C-端处连接的任何肽。此外,本发明的因子C特别优选地不具有在任一端处连接的任何肽。东方鲎的因子C的氨基酸序列显示在SEQ ID NO:2中。编码东方鲎的因子C的基因的核苷酸序列显示在SEQ ID NO:1中。

[0025] 本发明的因子C可以是具有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的蛋白的变体,只要所述变体具有因子C活性。

[0026] “因子C活性”是指,因子C在有内毒素存在下变成活化型因子C以活化因子B的活性。例如,可以如下证实本发明的因子C“具有因子C活性”的事实:使用与合适的因子B和合适的前凝固酶相组合的本发明的因子C,并在有内毒素存在下检测级联反应的进展。更具体地,SEQ ID NO:4的蛋白可以用作合适的因子B,SEQ ID NO:6的蛋白可以用作合适的前凝固酶。使用下面提及的底物进行检测,可以测量级联反应的进展。

[0027] 本发明的因子C可以是这样的蛋白:其包含在SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列,但是其包括一个或几个氨基酸残基的置换、缺失、插入或添加,只要所述因子C具有因子C活性。术语“一个或几个”的含义随所述氨基酸残基在蛋白的三维结构中的位置和所述氨基酸残基的类型而变化,并且,更具体地,该术语优选是指1-20、更优选1-10、更优选1-5、特别优选1-3。上述的一个或几个氨基酸的置换、缺失、插入或添加是维持蛋白的正常功能的保守突变。保守突变的代表性例子是保守置换。所述保守置换是例如这样的突变:其中,如果置换位点是芳族氨基酸,那么置换在Phe、Trp和Tyr之间相互发生;如果置换位点是疏水氨基酸,那么置换在Leu、Ile和Val之间相互发生;如果置换位点是极性氨基酸,那么置换在Gln和Asn之间相互发生;如果置换位点是碱性氨基酸,那么置换在Lys、Arg和His之间相互发生;如果置换位点是酸性氨基酸,那么置换在Asp和Glu之间相互发生;如果置换位点是具有羟基的氨基酸,那么置换在Ser和Thr之间相互发生。被视作保守置换的置换的例子具体地包括:Ser或Thr对Ala的置换,Gln、His或Lys对Arg的置换,Glu、Gln、Lys、His或Asp对Asn的置换,Asn、Glu或Gln对Asp的置换,Ser或Ala对Cys的置换,Asn、Glu、Lys、His、Asp或Arg对Gln的置换,Gly、Asn、Gln、Lys或Asp对Glu的置换,Pro对Gly的置换,Asn、Lys、Gln、Arg或Tyr对His的置换,Leu、Met、Val或Phe对Ile的置换,Ile、Met、Val或Phe对Leu的置换,Asn、Glu、Gln、His或Arg对Lys的置换,Ile、Leu、Val或Phe对Met的置换,Trp、Tyr、Met、Ile或Leu对Phe的置换,Thr或Ala对Ser的置换,Ser或Ala对Thr的置换,Phe或Tyr对Trp的置换,His、Phe或Trp对Tyr,和Met、Ile或Leu对Val的置换。此外,上述的置换、缺失、插入、添加、倒位等还可以包括天然存在的突变,所述突变归因于衍生出所述基因的鲎的个体、品种或物种的差异。

[0028] 此外,本发明的因子C可以是这样的蛋白:其与如上所述的因子C的全长氨基酸序列(例如,SEQ ID NO:2所示的全长氨基酸序列)具有不小于80%、优选不小于90%、更优选不小于95%、更优选不小于97%、特别优选不小于99% 的同源性或同一性,并且具有因子C活性。

[0029] 编码本发明的因子C的基因没有特别限制,只要所述基因编码如上所述的本发明的因子C。编码本发明的因子C的基因可以是基于已知基因序列制备的探针,例如,这样的DNA:其在严谨条件下与SEQ ID NO:1所示核苷酸序列的全长或一部分的互补序列杂交,且编码具有因子C活性的蛋白。术语“严谨条件”在本文中是指这样的条件:在该条件下,形成所谓的特异性的杂交物,但是不形成非特异性的杂交物。所述条件的例子包括这样的条件:

在该条件下,高度同源的DNA彼此杂交,例如,具有不小于80% 同源性、优选不小于90% 同源性、更优选不小于95% 同源性、更优选不小于97% 同源性、特别优选不小于99% 同源性的DNA彼此杂交,而其同源性低于上述值的DNA不会彼此杂交;以及这样的条件:在该条件下,在与60℃、1×SSC和0.1% SDS(优选60℃、0.1×SSC和0.1% SDS,更优选68℃、0.1×SSC和0.1% SDS,它们是在DNA杂交中的标准洗涤条件)相对应的盐浓度和温度,进行洗涤1次,更优选2次或3次。

[0030] 此外,可以改变编码本发明的因子C的基因中的密码子组合,从而为在昆虫细胞中的表达而优化所述基因。所述优化可以如下进行,例如,使用通常可得到的协议服务。编码本发明的因子C的基因可以是DNA变体,其密码子组合为在昆虫细胞中的表达进行了优化。

[0031] 上面关于基因和蛋白的变体的描述类似地适用于本发明的因子B和前凝固酶,并适用于编码它们的基因。

[0032] 本发明的因子B是源自鲎的因子B。此外,本发明的前凝固酶是源自鲎的前凝固酶。鲎的例子包括日本鲎东方鲎、美洲鲎美洲鲎、东南亚鲎圆尾鲎和东南亚鲎马来鲎(*Tachypleus gigas*)。在这些鲎中,上述因子优选地源自日本鲎东方鲎。

[0033] 东方鲎的因子B和前凝固酶的氨基酸序列分别显示在SEQ ID NO:4和6中。编码东方鲎的因子B和前凝固酶的基因的核苷酸序列分别显示在SEQ ID NO:3和5中。

[0034] 本发明的因子B可以是上述任一种鲎的因子B的变体,例如,具有SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的蛋白的变体,只要本发明的因子B具有因子B活性。此外,编码本发明的因子B的基因没有特别限制,只要所述基因编码如上所述的本发明的因子B。上面关于因子C的描述在细节上做必要的修正后也适用于基因和蛋白的变体。

[0035] “因子B活性”是指,因子B在活化型因子C存在下变成活化型因子B以将前凝固酶变成它的活性形式凝固酶的活性。例如,可以如下证实本发明的因子B“具有因子B活性”的事实:使用与合适的因子C和合适的前凝固酶相组合的本发明的因子B,并在内毒素存在下检测级联反应的进展。更具体地,SEQ ID NO:2的蛋白可以用作合适的因子C,SEQ ID NO:6的蛋白可以用作合适的前凝固酶。使用下面提及的底物进行检测,可以测量级联反应的进展。

[0036] 本发明的前凝固酶可以是上述任一种鲎的前凝固酶的变体,例如,具有SEQ ID NO:6所示氨基酸序列的蛋白的变体,只要本发明的前凝固酶具有前凝固酶活性。此外,编码本发明的前凝固酶的基因没有特别限制,只要所述基因编码如上所述的本发明的前凝固酶。上面关于因子C的描述在细节上做必要的修正后也适用于基因和蛋白的变体。

[0037] “前凝固酶活性”是指,前凝固酶在活化型因子B存在下变成凝固酶以与下面提及的用于检测的底物反应的活性。“与用于检测的底物反应的活性”是指,例如,与凝固蛋白原反应以造成凝固的活性,和与Boc-Leu-Gly-Arg-pNA反应以释放pNA的活性。例如,可以如下证实本发明的前凝固酶“具有前凝固酶活性”的事实:使用与合适的因子C和合适的因子B相组合的本发明的凝固酶,并在内毒素存在下检测级联反应的进展。更具体地,SEQ ID NO:2的蛋白可以用作合适的因子C,SEQ ID NO:4的蛋白可以用作合适的因子B。使用下面提及的底物进行检测,可以测量级联反应的进展。

[0038] 可以向本发明的因子B和/或本发明的前凝固酶添加任意肽等,只要所述因子分别具有因子B活性和前凝固酶活性。这样的肽的例子包括标签序列诸如His-标签和V5-标签。与本发明的因子C类似地,要使用的本发明的因子B和/或本发明的前凝固酶可以属于下述

的任一种：其中在C-端没有添加His-标签的那些，其中在C-端没有添加V5-标签的那些，其中在C-端根本没有添加肽的那些，和其中在任一端根本没有添加肽的那些。

[0039] 此外，可以改变编码本发明的因子B的基因和/或编码本发明的前凝固酶的基因中的密码子组合，从而为在昆虫细胞中的表达而优化所述基因。编码SEQ ID NO:4的因子B且具有为在昆虫细胞中的表达而优化的密码子组合的DNA的例子包括SEQ ID NO:8的DNA。编码SEQ ID NO:6的前凝固酶且具有为在昆虫细胞中的表达而优化的密码子组合的DNA的例子包括SEQ ID NO:9的DNA。每一个编码本发明的因子B的基因和/或编码本发明的前凝固酶的基因可以是DNA变体，其密码子组合为在昆虫细胞中的表达进行了优化。

[0040] 本发明的内毒素测量剂可以由本发明的因子C、本发明的因子B和本发明的前凝固酶组成。

[0041] 本发明的内毒素测量剂可以包含用于检测级联反应的进展的底物。在本发明中，这样的底物可以被称作“用于检测的底物”。

[0042] 用于检测的底物的例子包括凝固蛋白原。由于凝固蛋白原与凝固酶的接触，发生凝固从而产生凝固蛋白。通过测量反应溶液的浊度，可以测定凝固反应的进程。可以从蜚血细胞提取物(裂解物)回收凝固蛋白原。并且，因为已经公开了编码凝固蛋白原的基因的核苷酸序列(Miyata, 等人, PROTEIN, NUCLEIC ACID AND ENZYME, 增刊, 第29期, 第30-43页(1986)), 可以根据常规方法通过基因工程生产凝固蛋白原。

[0043] 还可以使用合成底物作为用于检测的底物。所述合成底物没有特别限制，只要所述底物具有适合用于检测的性质，诸如使凝固酶的催化反应造成显色或发荧光的性质。合成底物的例子包括由通式X-Y-Z (其中X代表保护基，Y代表肽，且Z代表经由酰胺键与Y结合的染料)代表的底物。在内毒素存在于反应系统中的情况下，凝固酶(其作为级联反应的结果而产生)的催化反应会切割Y和Z之间的酰胺键，以释放染料Z，从而导致显色或发荧光。保护基X没有特别限制，可以适当地使用肽的已知保护基。这样的保护基的例子包括叔丁氧羰基和苯甲酰基。染料Z没有特别限制，且可以是在可见光下可检测的染料或荧光染料。染料Z的例子包括pNA (对-硝基苯胺)、MCA (7-甲氧基香豆素-4-乙酸)、DNP (2,4-二硝基苯胺)和丹磺酰基染料。肽Y的例子包括Leu-Gly-Arg (LGR)、Ile-Glu-Gly-Arg (IEGR) (SEQ ID NO:12)和Val-Pro-Arg (VPR)。通过根据染料的性质选择的方法，可以测量释放的染料Z。

[0044] 此外，本发明的内毒素测量剂还可以包含除了因子和用于检测的底物以外的组分，只要所述试剂可以用于测量内毒素。这样的组分没有特别限制，且可以考虑因子和用于检测的底物的储存性、操作容易度以及稳定性来选择。本发明的内毒素测量剂可以包含，例如，pH-缓冲剂和/或盐。pH-缓冲剂的例子包括HEPES缓冲剂、MES缓冲剂、Tris缓冲剂和GTA宽范围缓冲剂。在本发明的内毒素测量剂中还可以包含诸如醇、酯、酮和酰胺等有机溶剂。

[0045] 本发明的内毒素测量剂可以配制成任意形式，包括例如，固体形式、液体形式和凝胶形式。就制剂而言，可以使用通常用作制剂载体诸如媒介物、粘合剂、崩解剂、润滑剂、稳定剂、矫味剂、稀释剂、表面活性剂和溶剂的添加剂。本发明的内毒素测量剂可以原样用于测量内毒素，或者在水、生理盐水、缓冲液等中进行稀释、分散或溶解。不言而喻，通过这样的稀释、分散或溶解得到的生成制剂也在本发明的内毒素测量剂的范围内。

[0046] 在本发明的内毒素测量剂中，所述因子和所述其它组分可以作为混合物存在，或者可以分开存在。例如，所述因子可以以要配制的任意比例混合，或者可以分开配制。

[0047] 在本发明的内毒素测量剂中的所述因子和所述其它组分的浓度没有特别限制,且优选地经过调节,使得当测量内毒素时,所述浓度是在下面提及的优选范围内。在本发明的内毒素测量剂(以在与试验样品接触之前制备的溶液的方式)中的每种因子的浓度是,例如,优选20-100 $\mu\text{g/mL}$ 、更优选40-80 $\mu\text{g/mL}$ 、特别优选约60 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0048] 本发明的内毒素测量剂可以作为内毒素测量试剂盒来提供。内毒素测量试剂盒没有特别限制,只要所述试剂盒含有本发明的内毒素测量剂。

[0049] (2) 用于生产本发明的内毒素测量剂的方法

通过使用昆虫细胞作为宿主进行表达,可以生产在本发明的内毒素测量剂中包含的因子。

[0050] 所述昆虫细胞没有特别限制,只要所述细胞可以表达所述因子,并且可以适当地使用通常用于表达异源蛋白的细胞。这样的昆虫细胞的例子包括Sf9、Sf21、SF+和High-Five。所述昆虫细胞优选地是Sf9。

[0051] 用于培养昆虫细胞的培养条件没有特别限制,只要在所述条件下可以培养昆虫细胞,并且如果必要的话,可以在适当地修改后使用通常用于培养昆虫细胞的培养条件。例如,可以使用通常用于培养昆虫细胞的培养基作为培养基。这样的培养基的例子包括商购可得的用于昆虫细胞的无血清培养基。更具体地,可以适当地使用Sf900 II培养基(Invitrogen)等。例如,可以在27°C至28°C在摇动下进行培养。

[0052] 使用昆虫细胞作为宿主来表达因子的方法没有特别限制,只要通过该方法可以表达所述因子,并且可以适当地使用通常用于表达异源蛋白的方法。例如,通过用其中掺入了编码所述因子的基因的病毒感染昆虫细胞,可以表达每种因子(病毒方法)。可替换地,通过将其中掺入了编码所述因子的基因的载体引入昆虫细胞中,由此将所述基因掺入宿主染色体中,可以表达每种因子(稳定表达细胞系方法)。

[0053] <病毒方法>

要在病毒方法中使用的病毒没有特别限制,只要该病毒可以感染昆虫细胞,并且由此可以表达所述因子,并且可以适当地使用通常用于在昆虫细胞中表达蛋白的病毒。这样的病毒的例子包括杆状病毒。所述杆状病毒优选地是核多角体病毒属(NPV)。NPV的例子包括AcNPV(苜蓿银纹夜蛾NPV)和BmNPV(家蚕NPV)。NPV优选地是AcNPV。

[0054] 通过常规方法,例如,通过使用转移载体的同源重组,可以将核酸引入病毒中。转移载体的例子包括pPSC8(Protein Sciences)、pFastBac(Invitrogen)和pVL1393(PharMingen)。转移载体优选地是pPSC8。

[0055] 通过常规方法用其中掺入了编码每种因子的基因的病毒感染昆虫细胞,可以得到携带所述病毒并表达所述因子的昆虫细胞。

[0056] <稳定表达细胞系方法>

通过将编码每种因子的基因掺入昆虫细胞的染色体中,可以得到稳定表达细胞系,其稳定地表达所述因子。稳定表达细胞系的构建方法没有特别限制,并且可以通过常规方法进行构建。例如,根据手册使用pIZ/V5-His载体(Invitrogen),可以构建稳定表达细胞系。

[0057] 在任何情况下,构建表达细胞,使得表达的因子C具有没有连接His标签的C-端。此外,在没有添加任何肽(其不限于在因子C的C-端处的His-标签)而表达每种因子的情况下,可以构建表达细胞,使得不添加肽。

[0058] 在任何情况下,所述因子可以由单一类型的表达细胞一起表达,或者可以为每种因子构建表达细胞以分别表达各种因子。

[0059] 通过测量因子的活性,可以证实每种因子是否被表达。通过测量从编码因子的基因转录的mRNA的量,或者通过使用抗体通过蛋白质印迹法而检测因子,也可以证实每种因子是否被表达。

[0060] 每种表达的因子可以作为含有因子的溶液回收,以用作本发明的内毒素测量剂的组分。含有因子的溶液可以是,例如,培养液、培养物上清液、或细胞提取物、或其混合物。每种因子可以在纯化后或不经纯化地使用。在本发明中,即使不经因子纯化而原样使用含有每种表达的因子的细胞培养物上清液,也可以提供具有足够高性能的内毒素测量剂。在要纯化每种因子的情况下,可以通过例如用于蛋白纯化的已知方法进行纯化。这样的方法的例子包括硫酸铵沉淀、凝胶过滤色谱法、离子交换色谱法、疏水相互作用色谱法和羟磷灰石色谱法。在将诸如His-标签等标签与每种因子连接的情况下,使用针对所述标签的亲合力,通过亲和色谱法也可以纯化所述因子。

[0061] 在通过病毒方法生产每种因子的情况下,优选地消除病毒。消除病毒的方法没有特别限制,并且可以通过常规方法进行消除。例如,通过具有500 kDa孔径的中空纤维过滤膜,可以消除病毒。

[0062] (3) 本发明的测量内毒素的方法

通过将本发明的内毒素测量剂与试验样品混合,在试验样品含有内毒素的情况下,发生级联反应。通过测量级联反应的进展,可以测量试验样品中的内毒素。也就是说,本发明提供了一种用于测量试验样品中的内毒素的方法,所述方法包括:将本发明的内毒素测量剂与试验样品混合的步骤,和测量级联反应的进展的步骤(在下文中被称作“第一实施方案”)。

[0063] 在所述第一实施方案中,从将本发明的内毒素测量剂与试验样品混合的步骤开始,在本发明的内毒素测量剂中含有的每种因子可以已经被包含在反应系统中,或者可以顺序地加入反应系统中。

[0064] 例如,将本发明的内毒素测量剂与试验样品混合的步骤可以包括下述步骤(A)至(C):

- (A) 将本发明的因子C加入反应系统中的步骤;
- (B) 将本发明的因子B加入反应系统中的步骤;和
- (C) 将本发明的前凝固酶加入反应系统中的步骤。

[0065] 步骤(A)至(C)可以分开地、部分同时地或完全同时地进行。步骤(A)至(C)可以以任意次序进行。例如,步骤(A)之后进行步骤(B),然后进行步骤(C)。

[0066] 在所述第一实施方案中,通过将用于检测的底物加入反应系统中,然后测量底物的反应(着色、凝固等),可以测量级联反应的进展。从将本发明的内毒素测量剂与试验样品混合的步骤开始,用于检测的底物可以已经被包含在反应系统中,或者可以在进展过程中或在该步骤结束以后加入反应系统中。当然,所述第一实施方案包括这样的情况:其中采用预先含有用于检测的底物的本发明的内毒素测量剂。

[0067] 只要在试验物含有内毒素的情况下发生级联反应,本发明的因子B和前凝固酶本身可以不必与试验样品接触。也就是说,本发明的用于测量内毒素的方法的另一个实施方

案(在下文中被称作“第二实施方案”)是,用于测量试验物中的内毒素的方法,该方法包括下面的步骤(A)至(D)。

- (A) 将本发明的因子C与试验样品混合的步骤;
- (B) 在步骤A中混合因子C以后,将本发明的因子B与因子C混合的步骤;
- (C) 在步骤B中混合因子B以后,将本发明的前凝固酶与因子B混合的步骤;和
- (D) 测量级联反应的进展的步骤。

[0068] 在所述第二实施方案中,步骤(A)至(D)可以分开地、部分同时地或完全同时地进行。例如,在开始步骤A之后,可以在进展过程中或在该步骤结束以后将因子B和/或前凝固酶加入反应系统中。可替换地,在开始步骤B之后,可以在进展过程中或在该步骤结束以后将前凝固酶加入反应系统中。可替换地,从步骤A开始时,所有3种因子可以都被包含在反应系统中。可替换地,例如,可以回收在步骤A中的接触以后的因子C用于步骤B,且可以回收在步骤B中的接触以后的因子B用于步骤C。

[0069] 在所述第二实施方案中,通过将用于检测的底物加入反应系统中,然后测量底物的反应(着色、凝固等),可以测量级联反应的进展。从步骤A开始,用于检测的底物可以被包含在反应系统中,或者可以在进展过程中或在每个步骤结束以后加入反应系统中。

[0070] 本发明的测量内毒素的方法可以包含其它任意步骤,只要在试验样品含有内毒素的情况下会发生级联反应即可。例如,本发明的测量内毒素的方法可以包括:将用于检测的底物加入反应系统中的步骤,或将由级联反应产生的凝固酶与用于检测的底物混合的步骤。此外,例如,本发明的测量内毒素的方法可以包括:基于用于检测的底物的反应,计算试验样品中的内毒素水平的步骤。

[0071] 在本发明的测量内毒素的方法中,所述反应优选地在水性溶剂诸如水或缓冲液中进行。

[0072] 在本发明的测量内毒素的方法中,反应溶液中的每种因子的浓度没有特别限制,只要在试验样品中含有内毒素的情况下会发生级联反应即可,并且可以根据因子的性质和/或类似因素适当地设定。例如,以终浓度的方式,每种因子的浓度通常是10-50 $\mu\text{g/mL}$ 、优选20-40 $\mu\text{g/mL}$ 、更优选约30 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0073] 在本发明的测量内毒素的方法中,反应溶液中的用于检测的底物的浓度没有特别限制,只要在试验样品中含有内毒素的情况下会发生级联反应即可,并且可以根据用于检测的底物的性质和/或类似因素适当地设定。例如,在用于检测的底物是合成底物的情况下,以终浓度的方式,用于检测的底物的浓度通常是0.001 mM-100 mM、优选0.01 mM-10 mM。

[0074] 在任何实施方案中,反应系统可以含有除了内毒素测量剂(在第一实施方案中)或因子(在第二实施方案中)、用于检测的底物和试验样品以外的一种或多种任意组分,只要在试验样品中含有内毒素的情况下会发生级联反应即可。例如,反应系统可以含有pH-缓冲剂和/或盐。pH-缓冲剂的例子包括HEPES缓冲剂、MES缓冲剂、Tris缓冲剂和GTA宽范围缓冲剂。在反应系统中还可以包含诸如醇、酯、酮和酰胺等有机溶剂。

[0075] 反应溶液的pH没有特别限制,只要在试验样品中含有内毒素的情况下会发生级联反应即可,且可以根据每种因子的性质适当地设定。例如,反应溶液的pH通常是5-10、优选7-8.5。

[0076] 反应温度没有特别限制,只要在试验样品中含有内毒素的情况下会发生级联反应即可,且可以根据每种因子的性质适当地设定。反应温度通常是,例如,10℃至80℃、优选20℃至50℃。例如,反应温度可以是室温。

[0077] 反应时间没有特别限制,且可以根据诸如每种因子的性质和反应温度等条件适当地设定。反应时间通常是,例如,5分钟至1小时、优选15分钟至45分钟。例如,反应时间可以是30分钟。

[0078] 在任何实施方案中,在反应过程中,可以向反应系统中额外地单独地或以任意组合加入试验样品、因子和其它组分。这些组分可以一次性加入,或者分多次加入,或者可以连续加入。从反应开始至反应结束可以采用恒定条件,或者可以在反应过程中改变条件。

[0079] 通过测量用于检测的底物的反应(着色、凝固等),可以测量由内毒素的存在引起的级联反应的进展,并因此可以测量试验物中的内毒素。通过依赖于采用的用于检测的底物的方法,可以测量用于检测的底物的反应(着色、凝固等)。

[0080] 在定量测量内毒素的情况下,可以使用已知其浓度的内毒素标准样品来得到内毒素水平和用于检测的底物的反应程度(着色、凝固等的程度)之间的关联数据,并且,基于关联数据,可以定量在试验样品中存在的内毒素。关联数据可以是,例如,校正曲线。定量可以通过动力学方法或通过终点法来进行。

[0081] 要进行内毒素测量的试验样品没有特别限制,其例子包括医用水、药物、输注溶液、血液制品、医疗设备、医疗仪器、化妆品、食品和饮料、环境样品(例如,空气、河水和土壤)、生物组分(例如,血液、体液和组织)、天然存在的蛋白、重组蛋白、核酸和碳水化合物。通过在反应系统中混合、分散或溶解试验样品原样或试验样品的提取物或洗涤溶液,可以对试验样品进行内毒素测量。

实施例

[0082] 现在将通过实施例更具体地描述本发明。但是,这些仅仅是本发明的实施例,并且本发明的范围不限于这些。

[0083] 实施例1: 本发明的内毒素测量剂的生产

(1-1) 使用病毒的方法(在下文中被称作“病毒方法”)

在本实施例中,使用其中掺入了编码每种因子C、因子B和前凝固酶的基因的重组杆状病毒在昆虫细胞中表达所述因子,并由此生产内毒素测量剂。

[0084] (1-1-1) 重组杆状病毒的制备

使用通常可得到的协议服务(TAKARA BIO INC.),完全合成了SEQ ID NO:7的DNA,作为编码His-标签连接的因子C的DNA(His-标签连接的因子C基因)。His-标签连接的因子C是在SEQ ID NO:2中显示的日本鲎的因子C,其中6×His-标签连接至C-端。将所述DNA插入在转移载体pPSC8 (Protein Sciences)的限制性酶*Nru*I和*Sma*I的识别位点之间,以得到用于重组的载体。使用用于重组的载体,将His-标签连接的因子C基因掺入杆状病毒AcNPV中,以制备重组杆状病毒。

[0085] 此外,使用引物FC-N-Pst (SEQ ID NO:10)和引物FC-notag-R-Bam (SEQ ID NO:11)并使用上述的编码His-标签连接的因子C的DNA作为模板,进行PCR以制备编码因子C的DNA,其中编码在3'-末端处的His-标签序列的核苷酸序列被除去(不含His-标签的因子C基

因)。该DNA编码在SEQ ID NO:2中显示的日本鲎因子C,其中在C-端处没有连接His标签。对于不含His-标签的因子C基因,也通过如上所述的相同方法制备重组杆状病毒。

[0086] 使用通常可得到的协议服务(TAKARA BIO INC.),完全合成了SEQ ID NO:8的DNA,作为编码因子B的DNA(因子B基因)。该DNA编码在SEQ ID NO:4中显示的日本鲎因子B(不含His-标签),并且它的密码子组合为在昆虫细胞中的表达进行了优化。对于因子B基因,也通过如上所述的相同方法制备重组杆状病毒。但是,在pPSC8载体中的插入位置是在限制性酶PstI和KpnI的识别位点之间。

[0087] 使用通常可得到的协议服务(TAKARA BIO INC.),完全合成了SEQ ID NO:9的DNA,作为编码前凝固酶的DNA(前凝固酶基因)。该DNA编码在SEQ ID NO:6中显示的日本鲎前凝固酶(不含His-标签),并且它的密码子组合为在昆虫细胞中的表达进行了优化。对于前凝固酶基因,也通过如上所述的相同方法制备重组杆状病毒。但是,在pPSC8载体中的插入位置是在限制性酶XbaI和BglIII的识别位点之间。

[0088] (1-1-2)用重组杆状病毒感染昆虫细胞(Sf9细胞)

以 1.5×10^6 细胞/mL,将Sf9细胞(Novagen)接种在培养基中,并将在其中引入了编码His-标签连接的因子C的DNA的重组杆状病毒加入培养基中,以用所述病毒感染所述细胞。使用补充了抗生素(抗生素-抗真菌剂($\times 100$);Invitrogen)(终浓度, $\times 1$)的Sf900 II培养基(Invitrogen)(1 L),作为Sf9细胞的培养基。将病毒的感染复数(MOI)设定为1.0。此后,将得到的细胞在摇动下在28℃培养48小时。

[0089] 类似地,用在其中引入了编码不含His-标签的因子C的DNA的病毒感染Sf9细胞。

[0090] 此外,还用下述每种病毒感染Sf9细胞:向其中引入了编码因子B的DNA的病毒,和向其中引入了编码前凝固酶的DNA的病毒。在这些情况下,将MOI设定为0.5,培养时间为72小时。

[0091] (1-1-3)表达的重组蛋白的溶液的回收

将上述培养以后得到的每种培养液在4℃在 $3000 \times g$ 离心30分钟以得到上清液,然后将上清液在-80℃保存。

[0092] (1-1-4)从重组蛋白溶液除去杂质和病毒

将已经如上所述冷冻保存的每种上清液融化,并应用于具有0.1 μm 孔径的滤器(Cup Filter (Millipore))。在抽吸下进行过滤,并回收已经穿滤器的溶液。将每种回收的上清液应用于具有500 kDa孔径的中空纤维过滤膜(聚醚砜中空纤维膜; Spectrum Labs),并使用Kros Flow TFF泵过滤系统(Spectrum Labs)过滤。回收已经穿过膜的每种溶液。

[0093] (1-1-5)试剂的制备

在4℃,将560 mL在上面(1-1-4)得到的每种溶液(其中含有因子C、因子B或前凝固酶)、134 mL蒸馏水、126 mL 6.66 mM的合成底物(Boc-Leu-Gly-Arg-pNA)的水溶液(终浓度,0.3 mM)和560 mL 15%的葡聚糖水溶液(终浓度,3%)混合到一起。将该混合物以5 mL体积等分分进管形瓶中并冷冻干燥,以得到内毒素测量剂1。

[0094] (1-2)使用质粒的方法(在下文中也被称作“稳定表达细胞系方法”)

在本实施例中,将编码每种因子C、因子B和前凝固酶的基因掺入昆虫细胞的染色体中以构建稳定表达细胞系,然后表达每种因子,由此生产内毒素测量剂。

[0095] (1-2-1)稳定表达细胞系的制备和培养

使用pIZ载体试剂盒 (Invitrogen), 将在上述的病毒方法中使用的每种不含His-标签的因子C基因, 因子B基因 (SEQ ID NO:8) 和前凝固酶基因 (SEQ ID NO:9) 引入Sf9细胞 (Invitrogen) 中。

[0096] 更具体地, 首先将每种DNA掺入在试剂盒所含的载体pIZ/V5-His的EcoRV和MluI识别位点之间, 并将得到的每种载体与试剂盒所含的Cellfectin混合, 随后将所述载体引入Sf9细胞中。DNA在pIZ/V5-His中的掺入位置等显示在图2中。在图2的顶部所示的厚箭头指示的区域中, 掺入了每种DNA。使用补充了抗生素 (抗生素-抗真菌剂 ($\times 100$); Invitrogen) (终浓度, $\times 1$) 和Zeocin抗生素 (Invitrogen) (终浓度, 50 $\mu\text{g/mL}$) 的Sf900 III培养基 (Invitrogen) 作为Sf9细胞的培养基。在培养基中将如此得到的细胞系 (其中引入了每种DNA) 的密度调至 6×10^5 细胞/mL (1L), 并将所述细胞在摇动下在28°C培养96小时。

[0097] 应当指出, 尽管在pIZ/V5-His中含有His标签序列, 所有上述的DNA具有终止密码子, 从而在没有添加His-标签的情况下表达所有因子C、因子B和前凝固酶。

[0098] (1-2-2) 重组蛋白溶液的回收、杂质的除去和试剂的制备

以与关于病毒方法的“(1-1-3) 表达的重组蛋白的溶液的回收”、“(1-1-4) 从重组蛋白溶液除去杂质和病毒”和“(1-1-5) 试剂的制备”中所述的相同方式, 处理在上述培养以后得到的每种培养液。但是, 没有进行“(1-1-4) 从重组蛋白溶液除去杂质和病毒”中的使用中空纤维过滤膜的过滤过程。将如此得到的测量剂作为内毒素测量剂2提供。

[0099] 实施例2: 表达的蛋白质的性能等

(2-1) 因子C的表达水平的对比

在通过病毒方法和稳定表达细胞系方法得到的不含His-标签的因子C和通过病毒方法得到的His-标签连接的因子C之间, 对比了表达水平。

[0100] 如下评价了表达水平: 取0.5、1.5、5或15 μL 与在实施例1中过滤以后且在制备试剂之前的溶液相对应的溶液, 并对取样的溶液进行在有SDS存在下的5-20% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (在非还原条件下), 然后使用抗-因子C抗体 (2C12, 得自Shun-ichiro Kawabata教授, Department of Biology, Graduate School of Sciences, Kyushu University) 进行蛋白质印迹法。

[0101] 结果显示在图3中。结果指示, 不含His-标签的因子C的表达水平低于His-标签连接的因子C的表达水平。此外, 使用光密度计测量了图3中的蛋白质印迹上的带的强度, 并且, 基于测得的强度的相对值, 计算用于得到相等因子C浓度的每种溶液的体积比。通过病毒方法得到的不含His-标签因子C的体积比为50, 通过稳定表达细胞系方法得到的不含His-标签因子C的体积比为17, 通过病毒方法得到的His-标签连接的因子C的体积比为7。

[0102] (2-2) 因子C的活性的对比

使用等量的因子C, 研究了每种因子C溶液的前凝固酶活化能力。

[0103] 更具体地, 将每种通过病毒方法得到的His-标签连接的因子C溶液 (0.7 μL 或5 μL)、通过病毒方法得到的不含His-标签的因子C溶液 (5 μL) 和通过稳定表达细胞系方法得到的不含His-标签的因子C溶液 (1.7 μL) 放入96-孔板的孔中。此后, 向每个孔中加入含有因子B的溶液 (5 μL) 和含有前凝固酶的溶液 (5 μL) (在实施例1的病毒方法中在(1-1-4)中穿过0.1 μm 滤器过滤以后得到)、以及Boc-Leu-Gly-Arg-pNA (终浓度, 0.3 mM)、Tris-HCl (pH 8.0) (终浓度, 100 mM) 和50 μL 内毒素 (产品名“USP-参比标准内毒素” (USP-

Reference Standard Endotoxin, (USP-RSE); 可商购得自Seikagaku Biobusiness Corporation) (样品浓度:0、0.05或0.5 EU/mL),使得孔中的总体积变为100 μ L,并混合到一起,随后在37℃温育3小时,在这期间,随着时间测量在405 nm的吸光度。使用蒸馏水作为阴性对照。吸光度的增加速率(吸光度变化速率)反映了前凝固酶活化能力。术语“EU”是指“内毒素单位”,它是代表内毒素的量的单位(这也适用于下文中)。

[0104] 结果显示在图4中。在图4中,“DW”是指蒸馏水;“病毒+ His标签(x1)”是指通过病毒方法得到的His-标签连接的因子C溶液(0.7 μ L);“病毒+ His标签(x7)”是指相同的溶液(5 μ L);“病毒且无标签(x1)”是指通过病毒方法得到的不含His-标签因子C溶液;和“稳定的Sf9且无标签(x1)”是指通过稳定表达细胞系方法得到的不含His-标签因子C溶液。

[0105] 结果,在含有等量的因子C的His-标签连接的因子C溶液(0.7 μ L)中,并且甚至在含有约7倍量的因子C的溶液(5 μ L)中,没有观察到或几乎没有观察到前凝固酶的活化。另一方面,不含His-标签的因子C表现出显著的前凝固酶活化能力,不论它是通过病毒方法得到还是通过稳定表达细胞系方法得到。

[0106] 上述结果表明,与在添加His-标签序列的情况下表达的重组因子C分子相比,在没有添加His-标签序列的情况下表达的重组因子C分子具有强得多的前凝固酶活化能力。此外,表明了每种表达的蛋白质可以以在培养物上清液中含有的蛋白质的状态不经纯化地使用。

[0107] (2-3)表达的因子C的稳定性的对比

(2-3-1)通过病毒方法表达的因子C的稳定性

在实施例1的病毒方法中在(1-1-2)中在摇动下在28℃培养病毒感染的细胞的步骤中,在培养48小时、72小时和96小时以后回收上清液,并对每种回收的上清液进行在有SDS存在下的5-20%聚丙烯酰胺凝胶电泳(在非还原条件下),然后使用抗-因子C抗体(2C12,其与上面使用的相同)通过蛋白质印迹法评价因子C的剩余量。此外,以相同的方式对通过在病毒感染24小时后向培养液中加入蛋白酶抑制剂(终浓度为0.5 μ g/mL的亮抑酶肽+ 终浓度为0.7 μ g/mL的抑胃酶肽A)得到的上清液分别进行取样和分析。

[0108] 结果显示在图5中。结果表明,通过病毒方法表达的因子C在培养期间随着时间而分解。此外,表明了加入蛋白酶抑制剂的情况下,也发生某种程度的因子C的分解。

[0109] (2-3-2)通过稳定表达细胞系方法表达的因子C的稳定性

类似地,在实施例1的稳定表达细胞系方法中在(1-2-1)中在摇动下在28℃培养稳定表达细胞系的步骤中,在培养72小时、96小时、120小时、144小时和168小时以后回收上清液,并对每种回收的上清液进行在有SDS存在下的5-20%聚丙烯酰胺凝胶电泳(在非还原条件下),然后使用抗-因子C抗体(2C12,其与上面使用的相同)通过蛋白质印迹法评价因子C的剩余量。此外,还将通过病毒方法培养48小时以后得到的上清液上样。

[0110] 结果显示在图6中。结果,在没有蛋白酶抑制剂存在下,即使在培养168小时以后,通过稳定表达细胞系方法表达的因子C也没有分解。由此表明,稳定表达细胞系方法的应用可以防止因子C的分解。

[0111] (2-4)关于中空纤维膜过滤处理是否必要的研究

研究了在病毒方法中在(1-1-4)中的中空纤维过滤膜处理是否是必要的。使用在(1-1-4)中穿过中空纤维膜过滤之前取样的每种溶液和在(1-1-4)中穿过中空纤维膜过滤之后取

样的每种溶液(3批),通过加入内毒素(USP-RSE)至0或0.05 EU/mL的终浓度,以与上面(2-2)相同的方式测量了吸光度的增加速率(吸光度变化速率)。

[0112] 结果显示在图7中。在图7中,“未过滤的溶液”是指没有过滤的保留在中空纤维膜筒中的溶液。在使用穿过中空纤维膜过滤后取样的每种溶液的情况下,当内毒素的浓度为0 EU/mL时,前凝固酶的活化度较低(换言之,在内毒素测量后的空白值较低),也就是说,得到了优良结果。相反,表明了在使用穿过中空纤维膜过滤之前取样的每种溶液(“过滤前”或“未过滤的溶液”)的情况下,即使在0 EU/mL内毒素的情况下,前凝固酶的活化程度也较高,这会导致在内毒素测量后的高空白值。

[0113] 相反,通过稳定表达细胞系方法,即使没有这样的穿过中空纤维过滤膜的过滤过程,在0 EU/mL内毒素的情况下前凝固酶的活化程度(在内毒素测量后的空白值)保持较低(图4)。

[0114] 这些结果表明,尽管在使用病毒方法的情况下,穿过中空纤维过滤膜的过滤是不可避免的,但是在使用稳定表达细胞系方法的情况下,这样的过滤不是必需的。

[0115] 实施例3: 使用本发明的内毒素测量剂测量内毒素

(3-1) 使用内毒素测量剂1的测量

向内毒素测量剂1(冷冻干燥产品)中,加入3.3 mL 100 mM Tris缓冲液(pH 8.0),以溶解该试剂。在该溶液中,含有因子C、因子B和前凝固酶的每种培养物上清液的蛋白浓度为约60 $\mu\text{g/mL}$ 。

在96-孔微孔滴定板的每个孔中,加入50 μL 浓度为0、0.001、0.01或0.1 EU/mL的内毒素溶液的等分试样,并将50 μL 通过溶解所述试剂制备的内毒素测量剂溶液加入每个孔中,随后混合得到的混合物。然后将混合物在37 $^{\circ}\text{C}$ 温育30分钟,并根据反应速率方法测量内毒素浓度,其中在温育过程中随时间测量在405 nm的吸光度。在该反应溶液中,含有因子C、因子B和前凝固酶的每种培养物上清液的蛋白浓度为约30 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0116] 结果显示在图8中。结果表明,在使用通过病毒方法表达的因子的情况下,吸光度变化速率随着内毒素浓度增加而在0.001-0.10 EU/mL范围内线性地增加。

[0117] (3-2) 使用内毒素测量剂2的测量

向内毒素测量剂2(冷冻干燥产品)中,加入3.3 mL 100 mM Hepes缓冲液(pH 7.6),以溶解该试剂。在该溶液中,含有因子C、因子B和前凝固酶的每种培养物上清液的蛋白浓度为约60 $\mu\text{g/mL}$ 。

在96-孔微孔滴定板的每个孔中,加入50 μL 浓度为0、0.0005、0.001、0.005、0.01或0.1 EU/mL的内毒素溶液的等分试样,并将50 μL 通过溶解所述试剂制备的内毒素测量剂溶液加入每个孔中,随后混合得到的混合物。然后将混合物在37 $^{\circ}\text{C}$ 温育30分钟,并根据反应速率方法测量内毒素浓度,其中在温育过程中随时间测量在405 nm的吸光度。在该反应溶液中,含有因子C、因子B和前凝固酶的每种培养物上清液的蛋白浓度为约30 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0118] 结果显示在图9中。结果表明,在使用通过稳定表达细胞方法表达的因子的情况下,吸光度变化速率随着内毒素浓度增加而在0.0005-0.1 EU/mL范围内线性地增加。

[0119] 基于上述结果,利用任一种内毒素测量剂,在30分钟内可实现0.001 EU/mL浓度的内毒素的定量。此外,利用内毒素测量剂2,能够在30分钟内测量0.0005 EU/mL浓度的内毒素。因而,表明了与常规方法(其测量需要不小于1小时,且尚未实现0.001 EU/mL的检测灵

敏度)相比,本发明的内毒素测量剂能够更快速地且灵敏地定量内毒素。此外,表明了在任何一种情况下,表达的因子可以不经纯化而原样用于测量剂中。

[0120] 实施例4: 重组因子C蛋白和天然存在的因子C蛋白之间的活性差异

(4-1) 重组因子C蛋白和天然存在的因子C蛋白的纯化

通过使2 mg抗-因子C抗体(2C12,其与上面使用的相同)与1ml琼脂糖柱(GE Healthcare)共价连接,制备了2个因子-C抗体柱。根据在所附的说明书中描述的方法,进行所述制备。向76 mL含有通过稳定表达细胞方法制备的重组因子C蛋白(其通过与上面“(1-2-2) 重组蛋白的回收”中所述相同的方法制备)的培养物上清液中,加入等量的20 mM Tris-HCl缓冲液(pH 8.0)(其含有2 M氯化钠和2 mM EDTA)以稀释所述培养物上清液,随后将得到的稀释液应用于因子-C抗体柱之一。类似地,向76 mL鲎血细胞提取物中,加入等量的20 mM Tris-HCl缓冲液(pH 8.0)(其含有2 M氯化钠和2 mM EDTA)以稀释所述提取物,随后将得到的稀释液应用于因子-C抗体柱中的另一个。顺序地用20 mL各自含有200 mM或450 mM氯化钠的20 mM Tris-HCl缓冲液(pH 8.0)洗涤2个柱,然后用50 mM甘氨酸缓冲液(pH 2.5)进行洗脱。在预先放入了0.025 mL 1M氨丁三醇碱(Sigma)的1.5 mL试管中,收集1 mL每个洗脱的级分,以使洗脱的溶液的pH恢复至中性。

[0121] (4-2)纯化的重组的和天然存在的因子C蛋白之间的浓度对比

对纯化的重组的和天然存在的因子C蛋白的洗脱级分进行在有SDS存在下的5-20% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离(在非还原条件下)。在该过程中,已知浓度的纯化的牛血清白蛋白(=BSA)作为浓度参照物样品也在相同的凝胶上进行分离(图10)。用光密度计定量在考马斯亮蓝染色的凝胶上的BSA带的强度,并相对于BSA蛋白的浓度绘图,以制备校正曲线(图11)。基于纯化的因子C蛋白的带强度和校正曲线,估测出纯化的因子C蛋白的浓度。结果表明,关于纯化的样品,天然存在的因子C蛋白的浓度是重组因子C蛋白的浓度的约4倍。

[0122] (4-3)纯化的重组的和天然存在的因子C蛋白之间的活性对比

使用纯化的重组的和天然存在的因子C蛋白,进行了活性对比。在该对比中,基于(4-2)的结果,在纯化的因子C之间平衡蛋白浓度。在96-孔微孔滴定板的每个孔中,加入50 μ L浓度为0、0.05、0.1或0.5 EU/mL的内毒素溶液的等分试样。将试剂和培养物上清液加入每个孔中,使得反应溶液中含有50 mM Tris缓冲液(pH 8.0)、0.2 μ g/mL的纯化的因子C蛋白、30 μ g/mL的含有重组因子B和重组前凝固酶的每种培养物上清液的蛋白、和0.3 mM的合成底物Boc-Leu-Gly-Arg-pNA,通过加入注射用水将所述反应溶液的总体积调至100 μ L。将反应溶液在37°C温育30分钟,并根据反应速率方法进行分析,其中在温育过程中随时间测量在405 nm的吸光度。

[0123] 结果表明,纯化的重组因子C蛋白的活性是纯化的天然存在的因子C蛋白的活性的约2倍(图12)。上述结果提示,重组因子C具有比天然存在的因子C更高的比活性。

[0124] 工业适用性

通过本发明,可以快速地且高灵敏度地测量内毒素。此外,通过本发明,可以简单地且快速地以低成本生产内毒素测量剂。因此,本发明可以非常有效地用于内毒素的检测。

[0125] 序列表的描述

SEQ ID NO:1	日本鲎的因子C基因的DNA序列
SEQ ID NO:2	日本鲎的因子C的氨基酸序列

SEQ ID NO:3	日本鲎的因子B基因的DNA序列
SEQ ID NO:4	日本鲎的因子B的氨基酸序列
SEQ ID NO:5	日本鲎的前凝固酶基因的DNA序列
SEQ ID NO:6	日本鲎的前凝固酶的氨基酸序列
SEQ ID NO:7	His-标签连接的因子C基因的DNA序列
SEQ ID NO:8	其密码子为在昆虫细胞中的表达进行了优化的因子B基因的DNA 序列
SEQ ID NO:9	其密码子为在昆虫细胞中的表达进行了优化的前凝固酶基因的 DNA序列
SEQ ID NO:10	用于制备不含His-标签的因子C基因的引物
SEQ ID NO:11	用于制备不含His-标签的因子C基因的引物
SEQ ID NO:12	肽序列

aag aat gga ggt atc tgt gac cag agg aca gga gct tgt acc tgt cgt	384
Lys Asn Gly Gly Ile Cys Asp Gln Arg Thr Gly Ala Cys Thr Cys Arg	
115 120 125	
gac aga tat gaa gga gcg cac tgt gaa att ctc aaa ggt tgt cct ctt	432
Asp Arg Tyr Glu Gly Ala His Cys Glu Ile Leu Lys Gly Cys Pro Leu	
130 135 140	
ctt cca tcg gat tct caa gtt cag gaa gtc aga aac cca cca gat aat	480
Leu Pro Ser Asp Ser Gln Val Gln Glu Val Arg Asn Pro Pro Asp Asn	
145 150 155 160	
ccc caa act att gac tac agc tgt tca cca ggg ttc aag ctt aaa ggc	528
Pro Gln Thr Ile Asp Tyr Ser Cys Ser Pro Gly Phe Lys Leu Lys Gly	
165 170 175	
gtg gca cga att agc tgt ctc cca aat gga cag tgg agt agc ttt cca	576
Val Ala Arg Ile Ser Cys Leu Pro Asn Gly Gln Trp Ser Ser Phe Pro	
180 185 190	
ccc aaa tgt att cga gaa tgt gcc aag gtt tca tct cca gaa cac ggg	624
Pro Lys Cys Ile Arg Glu Cys Ala Lys Val Ser Ser Pro Glu His Gly	
195 200 205	
aaa gtg aat gct cct agt ggc aat atg ata gaa ggg gct act tta cgg	672
Lys Val Asn Ala Pro Ser Gly Asn Met Ile Glu Gly Ala Thr Leu Arg	
210 215 220	
ttc tca tgt gat agt ccc tac tac ttg att ggt caa gaa aca tta acc	720
Phe Ser Cys Asp Ser Pro Tyr Tyr Leu Ile Gly Gln Glu Thr Leu Thr	
225 230 235 240	
tgc cag ggt aat ggt cag tgg agt gga caa ata cca caa tgt aag aag	768
Cys Gln Gly Asn Gly Gln Trp Ser Gly Gln Ile Pro Gln Cys Lys Lys	
245 250 255	
ttg gtc ttc tgt cct gac ctt gat cct gta aac cat gct gaa cac cag	816
Leu Val Phe Cys Pro Asp Leu Asp Pro Val Asn His Ala Glu His Gln	
260 265 270	
gtt aaa att ggt gtg gaa caa aaa tat ggt cag ttt cct caa ggc act	864
Val Lys Ile Gly Val Glu Gln Lys Tyr Gly Gln Phe Pro Gln Gly Thr	
275 280 285	
gaa gtg acc tat acg tgt tcg ggt aac tac ttc ttg atg ggt ttt aac	912
Glu Val Thr Tyr Thr Cys Ser Gly Asn Tyr Phe Leu Met Gly Phe Asn	
290 295 300	
acc tta aaa tgt aac cct gat ggg tcc tgg tca gga tca cag cca tcc	960
Thr Leu Lys Cys Asn Pro Asp Gly Ser Trp Ser Gly Ser Gln Pro Ser	
305 310 315 320	

tgt gtt aaa gtg gca gac aga gag gtc gac tgt gac agt aaa gct gta	1008
Cys Val Lys Val Ala Asp Arg Glu Val Asp Cys Asp Ser Lys Ala Val	
325 330 335	
gac ttc ttg gat gat gtt ggt gaa cct gtc agg atc cac tgt cct gct	1056
Asp Phe Leu Asp Asp Val Gly Glu Pro Val Arg Ile His Cys Pro Ala	
340 345 350	
ggc tgt tct ttg aca gct ggt act gtg tgg ggt aca gcc ata tac cac	1104
Gly Cys Ser Leu Thr Ala Gly Thr Val Trp Gly Thr Ala Ile Tyr His	
355 360 365	
gaa ctt tcc tca gtg tgt cgt gca gcc atc cat gct ggc aag ctt cca	1152
Glu Leu Ser Ser Val Cys Arg Ala Ala Ile His Ala Gly Lys Leu Pro	
370 375 380	
aac tct gga ggg gcg gtg cat gta gtg aac aat ggc ccc tac tcg gac	1200
Asn Ser Gly Gly Ala Val His Val Val Asn Asn Gly Pro Tyr Ser Asp	
385 390 395 400	
ttt ctg ggt agt gac ctg aat ggg ata aaa tcg gaa gag ttg aag tct	1248
Phe Leu Gly Ser Asp Leu Asn Gly Ile Lys Ser Glu Glu Leu Lys Ser	
405 410 415	
ctt gcc cgc agt ttt cga ttt gat tat gtc agt tca tcc aca gca ggt	1296
Leu Ala Arg Ser Phe Arg Phe Asp Tyr Val Ser Ser Ser Thr Ala Gly	
420 425 430	
aga tca gga tgt cct gat gga tgg ttt gag gta gaa gag aac tgt gtg	1344
Arg Ser Gly Cys Pro Asp Gly Trp Phe Glu Val Glu Glu Asn Cys Val	
435 440 445	
tac gtt aca tca aaa cag aga gcc tgg gaa aga gct caa ggt gtg tgt	1392
Tyr Val Thr Ser Lys Gln Arg Ala Trp Glu Arg Ala Gln Gly Val Cys	
450 455 460	
acc aat atg gct gct cgt ctt gct gtg cta gac aaa gat cta att ccg	1440
Thr Asn Met Ala Ala Arg Leu Ala Val Leu Asp Lys Asp Leu Ile Pro	
465 470 475 480	
agt tcc ttg act gag act cta cga ggg aaa ggg tta aca acc aca tgg	1488
Ser Ser Leu Thr Glu Thr Leu Arg Gly Lys Gly Leu Thr Thr Thr Trp	
485 490 495	
ata gga ttg cac aga cta gat gct gag aag ccc ttt gtt tgg gag cta	1536
Ile Gly Leu His Arg Leu Asp Ala Glu Lys Pro Phe Val Trp Glu Leu	
500 505 510	
atg gat cgt agt aat gtg gtt ctg aat gat aac cta aca ttc tgg gcc	1584
Met Asp Arg Ser Asn Val Val Leu Asn Asp Asn Leu Thr Phe Trp Ala	
515 520 525	

tct ggc gaa cct gga aat gaa act aac tgt gta tat ctg gac atc cga	1632
Ser Gly Glu Pro Gly Asn Glu Thr Asn Cys Val Tyr Leu Asp Ile Arg	
530 535 540	
gat cag ctg cag cct gtg tgg aaa acc aag tca tgt ttt cag ccc tca	1680
Asp Gln Leu Gln Pro Val Trp Lys Thr Lys Ser Cys Phe Gln Pro Ser	
545 550 555 560	
agc ttt gct tgc atg atg gat ttg tca gac aga aat aaa gcc aaa tgc	1728
Ser Phe Ala Cys Met Met Asp Leu Ser Asp Arg Asn Lys Ala Lys Cys	
565 570 575	
gat gac cct gga cca ctg gaa aat gga cac gcc aca ctt cat gga caa	1776
Asp Asp Pro Gly Pro Leu Glu Asn Gly His Ala Thr Leu His Gly Gln	
580 585 590	
agt att gat ggg ttc tat gct ggt tct tct ata agg tac agc tgt gag	1824
Ser Ile Asp Gly Phe Tyr Ala Gly Ser Ser Ile Arg Tyr Ser Cys Glu	
595 600 605	
gtt ctc cac tac ctc agt gga act gag acc gta act tgt aca aca aat	1872
Val Leu His Tyr Leu Ser Gly Thr Glu Thr Val Thr Cys Thr Thr Asn	
610 615 620	
ggc aca tgg agt gct cct aaa cct cga tgt atc aaa gtc atc acc tgc	1920
Gly Thr Trp Ser Ala Pro Lys Pro Arg Cys Ile Lys Val Ile Thr Cys	
625 630 635 640	
caa aac cct cct gta cca tca tat ggt tct gtg gaa atc aaa ccc cca	1968
Gln Asn Pro Pro Val Pro Ser Tyr Gly Ser Val Glu Ile Lys Pro Pro	
645 650 655	
agt cgg aca aac tcg atc agt cgt gtt ggg tca cct ttc ttg agg ttg	2016
Ser Arg Thr Asn Ser Ile Ser Arg Val Gly Ser Pro Phe Leu Arg Leu	
660 665 670	
cca cgg tta ccc ctc cca tta gcc aga gca gcc aaa cct cct cca aaa	2064
Pro Arg Leu Pro Leu Pro Leu Ala Arg Ala Ala Lys Pro Pro Pro Lys	
675 680 685	
cct aga tcc tca caa ccc tct act gtg gac ttg gct tct aaa gtt aaa	2112
Pro Arg Ser Ser Gln Pro Ser Thr Val Asp Leu Ala Ser Lys Val Lys	
690 695 700	
cta cct gaa ggt cat tac cgg gta ggg tct cga gcc att tac acg tgc	2160
Leu Pro Glu Gly His Tyr Arg Val Gly Ser Arg Ala Ile Tyr Thr Cys	
705 710 715 720	
gag tcg aga tac tac gaa cta ctt gga tct caa ggc aga aga tgt gac	2208
Glu Ser Arg Tyr Tyr Glu Leu Leu Gly Ser Gln Gly Arg Arg Cys Asp	
725 730 735	

tct aat gga aac tgg agt ggt cgg ccc gct agc tgt att cca gtt tgt	2256
Ser Asn Gly Asn Trp Ser Gly Arg Pro Ala Ser Cys Ile Pro Val Cys	
740 745 750	
gga cgg tca gac tct cct cgt tct cct ttc atc tgg aat ggg aat tct	2304
Gly Arg Ser Asp Ser Pro Arg Ser Pro Phe Ile Trp Asn Gly Asn Ser	
755 760 765	
aca gaa ata ggt cag tgg ccg tgg cag gca gga atc tct cga tgg ctt	2352
Thr Glu Ile Gly Gln Trp Pro Trp Gln Ala Gly Ile Ser Arg Trp Leu	
770 775 780	
gca gac cac aat atg tgg ttt ctc cag tgt gga gga tcc cta ttg aat	2400
Ala Asp His Asn Met Trp Phe Leu Gln Cys Gly Gly Ser Leu Leu Asn	
785 790 795 800	
gag aaa tgg atc gtc act get gcc cac tgt gtc acc tac tct gct act	2448
Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Thr Tyr Ser Ala Thr	
805 810 815	
gct gag ata att gat ccc agt cag ttt aaa atc tat ctg ggc aag tac	2496
Ala Glu Ile Ile Asp Pro Ser Gln Phe Lys Ile Tyr Leu Gly Lys Tyr	
820 825 830	
tac cgt gat gac agt aga gac gat gac tac gta caa gta aga gag gct	2544
Tyr Arg Asp Asp Ser Arg Asp Asp Asp Tyr Val Gln Val Arg Glu Ala	
835 840 845	
ctc gag atc cac gta aat cct aac tac gac ccc ggc aat ctc aac ttt	2592
Leu Glu Ile His Val Asn Pro Asn Tyr Asp Pro Gly Asn Leu Asn Phe	
850 855 860	
gac ata gcc cta att caa ctg aaa act cct gtt act ttg aca aca cga	2640
Asp Ile Ala Leu Ile Gln Leu Lys Thr Pro Val Thr Leu Thr Thr Arg	
865 870 875 880	
gtc caa cca atc tgt ctg cct act gac atc aca aca aga gaa cac ttg	2688
Val Gln Pro Ile Cys Leu Pro Thr Asp Ile Thr Thr Arg Glu His Leu	
885 890 895	
aag gag gga aca tta gca gtg gtg aca ggt tgg ggt ttg aat gaa aac	2736
Lys Glu Gly Thr Leu Ala Val Val Thr Gly Trp Gly Leu Asn Glu Asn	
900 905 910	
aac aca tat tca gag atg att caa caa gct gtg cta cct gtt gtt gca	2784
Asn Thr Tyr Ser Glu Met Ile Gln Gln Ala Val Leu Pro Val Val Ala	
915 920 925	
gca agc acc tgt gaa gag ggg tac aag gaa gca gac tta cca ctg aca	2832
Ala Ser Thr Cys Glu Glu Gly Tyr Lys Glu Ala Asp Leu Pro Leu Thr	
930 935 940	

gta aca gag aac atg ttc tgt gca ggt tac aag aag gga cgt tat gat	2880
Val Thr Glu Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Lys Gly Arg Tyr Asp	
945 950 955 960	
gcc tgc agt ggg gac agt gga gga cca tta gtg ttt gct gat gat tcc	2928
Ala Cys Ser Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Phe Ala Asp Asp Ser	
965 970 975	
cgt acc gaa agg cgg tgg gtc ttg gaa ggg att gtc agc tgg ggc agt	2976
Arg Thr Glu Arg Arg Trp Val Leu Glu Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser	
980 985 990	
ccc agt gga tgt ggc aag gct aac cag tat ggg ggc ttc act aaa gtt	3024
Pro Ser Gly Cys Gly Lys Ala Asn Gln Tyr Gly Gly Phe Thr Lys Val	
995 1000 1005	
aac gtt ttt cta tca tgg att agg cag ttc att tga	3060
Asn Val Phe Leu Ser Trp Ile Arg Gln Phe Ile	
1010 1015	
<210> 2	
<211> 1019	
<212> PRT	
<213> 东方鲨	
<400> 2	
Met Val Leu Ala Ser Phe Leu Val Ser Gly Leu Val Leu Gly Ile Leu	
1 5 10 15	
Ala Gln Gln Met Arg Pro Val Gln Ser Arg Gly Val Asp Leu Gly Leu	
20 25 30	
Cys Asp Glu Thr Arg Phe Glu Cys Lys Cys Gly Asp Pro Gly Tyr Val	
35 40 45	
Phe Asn Val Pro Met Lys Gln Cys Thr Tyr Phe Tyr Arg Trp Arg Pro	
50 55 60	
Tyr Cys Lys Pro Cys Asp Asp Leu Glu Ala Lys Asp Ile Cys Pro Lys	
65 70 75 80	
Tyr Lys Arg Cys Gln Glu Cys Lys Ala Gly Leu Asp Ser Cys Val Thr	
85 90 95	
Cys Pro Pro Asn Lys Tyr Gly Thr Trp Cys Ser Gly Glu Cys Gln Cys	
100 105 110	
Lys Asn Gly Gly Ile Cys Asp Gln Arg Thr Gly Ala Cys Thr Cys Arg	
115 120 125	
Asp Arg Tyr Glu Gly Ala His Cys Glu Ile Leu Lys Gly Cys Pro Leu	
130 135 140	
Leu Pro Ser Asp Ser Gln Val Gln Glu Val Arg Asn Pro Pro Asp Asn	

145	150	155	160
Pro Gln Thr Ile Asp Tyr Ser Cys Ser Pro Gly Phe Lys Leu Lys Gly			
	165	170	175
Val Ala Arg Ile Ser Cys Leu Pro Asn Gly Gln Trp Ser Ser Phe Pro			
	180	185	190
Pro Lys Cys Ile Arg Glu Cys Ala Lys Val Ser Ser Pro Glu His Gly			
	195	200	205
Lys Val Asn Ala Pro Ser Gly Asn Met Ile Glu Gly Ala Thr Leu Arg			
	210	215	220
Phe Ser Cys Asp Ser Pro Tyr Tyr Leu Ile Gly Gln Glu Thr Leu Thr			
225	230	235	240
Cys Gln Gly Asn Gly Gln Trp Ser Gly Gln Ile Pro Gln Cys Lys Lys			
	245	250	255
Leu Val Phe Cys Pro Asp Leu Asp Pro Val Asn His Ala Glu His Gln			
	260	265	270
Val Lys Ile Gly Val Glu Gln Lys Tyr Gly Gln Phe Pro Gln Gly Thr			
	275	280	285
Glu Val Thr Tyr Thr Cys Ser Gly Asn Tyr Phe Leu Met Gly Phe Asn			
	290	295	300
Thr Leu Lys Cys Asn Pro Asp Gly Ser Trp Ser Gly Ser Gln Pro Ser			
305	310	315	320
Cys Val Lys Val Ala Asp Arg Glu Val Asp Cys Asp Ser Lys Ala Val			
	325	330	335
Asp Phe Leu Asp Asp Val Gly Glu Pro Val Arg Ile His Cys Pro Ala			
	340	345	350
Gly Cys Ser Leu Thr Ala Gly Thr Val Trp Gly Thr Ala Ile Tyr His			
	355	360	365
Glu Leu Ser Ser Val Cys Arg Ala Ala Ile His Ala Gly Lys Leu Pro			
	370	375	380
Asn Ser Gly Gly Ala Val His Val Val Asn Asn Gly Pro Tyr Ser Asp			
385	390	395	400
Phe Leu Gly Ser Asp Leu Asn Gly Ile Lys Ser Glu Glu Leu Lys Ser			
	405	410	415
Leu Ala Arg Ser Phe Arg Phe Asp Tyr Val Ser Ser Ser Thr Ala Gly			
	420	425	430
Arg Ser Gly Cys Pro Asp Gly Trp Phe Glu Val Glu Glu Asn Cys Val			
	435	440	445
Tyr Val Thr Ser Lys Gln Arg Ala Trp Glu Arg Ala Gln Gly Val Cys			
	450	455	460

Thr Asn Met Ala Ala Arg Leu Ala Val Leu Asp Lys Asp Leu Ile Pro			
465	470	475	480
Ser Ser Leu Thr Glu Thr Leu Arg Gly Lys Gly Leu Thr Thr Thr Trp			
	485	490	495
Ile Gly Leu His Arg Leu Asp Ala Glu Lys Pro Phe Val Trp Glu Leu			
	500	505	510
Met Asp Arg Ser Asn Val Val Leu Asn Asp Asn Leu Thr Phe Trp Ala			
	515	520	525
Ser Gly Glu Pro Gly Asn Glu Thr Asn Cys Val Tyr Leu Asp Ile Arg			
	530	535	540
Asp Gln Leu Gln Pro Val Trp Lys Thr Lys Ser Cys Phe Gln Pro Ser			
545	550	555	560
Ser Phe Ala Cys Met Met Asp Leu Ser Asp Arg Asn Lys Ala Lys Cys			
	565	570	575
Asp Asp Pro Gly Pro Leu Glu Asn Gly His Ala Thr Leu His Gly Gln			
	580	585	590
Ser Ile Asp Gly Phe Tyr Ala Gly Ser Ser Ile Arg Tyr Ser Cys Glu			
	595	600	605
Val Leu His Tyr Leu Ser Gly Thr Glu Thr Val Thr Cys Thr Thr Asn			
	610	615	620
Gly Thr Trp Ser Ala Pro Lys Pro Arg Cys Ile Lys Val Ile Thr Cys			
625	630	635	640
Gln Asn Pro Pro Val Pro Ser Tyr Gly Ser Val Glu Ile Lys Pro Pro			
	645	650	655
Ser Arg Thr Asn Ser Ile Ser Arg Val Gly Ser Pro Phe Leu Arg Leu			
	660	665	670
Pro Arg Leu Pro Leu Pro Leu Ala Arg Ala Ala Lys Pro Pro Pro Lys			
	675	680	685
Pro Arg Ser Ser Gln Pro Ser Thr Val Asp Leu Ala Ser Lys Val Lys			
	690	695	700
Leu Pro Glu Gly His Tyr Arg Val Gly Ser Arg Ala Ile Tyr Thr Cys			
705	710	715	720
Glu Ser Arg Tyr Tyr Glu Leu Leu Gly Ser Gln Gly Arg Arg Cys Asp			
	725	730	735
Ser Asn Gly Asn Trp Ser Gly Arg Pro Ala Ser Cys Ile Pro Val Cys			
	740	745	750
Gly Arg Ser Asp Ser Pro Arg Ser Pro Phe Ile Trp Asn Gly Asn Ser			
	755	760	765
Thr Glu Ile Gly Gln Trp Pro Trp Gln Ala Gly Ile Ser Arg Trp Leu			

770	775	780
Ala Asp His Asn Met Trp Phe Leu Gln Cys Gly Gly Ser Leu Leu Asn		
785	790	795
Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Thr Tyr Ser Ala Thr		
805	810	815
Ala Glu Ile Ile Asp Pro Ser Gln Phe Lys Ile Tyr Leu Gly Lys Tyr		
820	825	830
Tyr Arg Asp Asp Ser Arg Asp Asp Asp Tyr Val Gln Val Arg Glu Ala		
835	840	845
Leu Glu Ile His Val Asn Pro Asn Tyr Asp Pro Gly Asn Leu Asn Phe		
850	855	860
Asp Ile Ala Leu Ile Gln Leu Lys Thr Pro Val Thr Leu Thr Thr Arg		
865	870	875
Val Gln Pro Ile Cys Leu Pro Thr Asp Ile Thr Thr Arg Glu His Leu		
885	890	895
Lys Glu Gly Thr Leu Ala Val Val Thr Gly Trp Gly Leu Asn Glu Asn		
900	905	910
Asn Thr Tyr Ser Glu Met Ile Gln Gln Ala Val Leu Pro Val Val Ala		
915	920	925
Ala Ser Thr Cys Glu Glu Gly Tyr Lys Glu Ala Asp Leu Pro Leu Thr		
930	935	940
Val Thr Glu Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Lys Gly Arg Tyr Asp		
945	950	955
Ala Cys Ser Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Phe Ala Asp Asp Ser		
965	970	975
Arg Thr Glu Arg Arg Trp Val Leu Glu Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser		
980	985	990
Pro Ser Gly Cys Gly Lys Ala Asn Gln Tyr Gly Gly Phe Thr Lys Val		
995	1000	1005
Asn Val Phe Leu Ser Trp Ile Arg Gln Phe Ile		
1010	1015	
<210> 3		
<211> 1203		
<212> DNA		
<213> 东方鲀		
<220>		
<221> CDS		
<222> (1) .. (1203)		
<223>		

<400> 3	
atg acg tgg ata tgt gtg ata acg ttg ttt gct ctg gct tct gct acg	48
Met Thr Trp Ile Cys Val Ile Thr Leu Phe Ala Leu Ala Ser Ala Thr	
1 5 10 15	
ttg ggt aac aaa gtt agt aga gtg ggg gtc ctc ttc ccc aag aca cgg	96
Leu Gly Asn Lys Val Ser Arg Val Gly Val Leu Phe Pro Lys Thr Arg	
20 25 30	
aac gac aat gag tgt aca gca aga ggg gga ttg aaa gga tcc tgc aaa	144
Asn Asp Asn Glu Cys Thr Ala Arg Gly Gly Leu Lys Gly Ser Cys Lys	
35 40 45	
tcc ctc ata gac tgt cct agt gtc ttg gct acg ttg aag gac agt ttt	192
Ser Leu Ile Asp Cys Pro Ser Val Leu Ala Thr Leu Lys Asp Ser Phe	
50 55 60	
cct gtc gtt tgc tct tgg aat ggt cga ttt cag cct att gtc tgc tgt	240
Pro Val Val Cys Ser Trp Asn Gly Arg Phe Gln Pro Ile Val Cys Cys	
65 70 75 80	
cct gat gca ata gca cca cca cct gta acc aca aca gct gta act gta	288
Pro Asp Ala Ile Ala Pro Pro Pro Val Thr Thr Thr Ala Val Thr Val	
85 90 95	
ata tct aca aaa gaa cca aag ctt cca aga tta cat ata tca ggt tgt	336
Ile Ser Thr Lys Glu Pro Lys Leu Pro Arg Leu His Ile Ser Gly Cys	
100 105 110	
gga aaa aga aaa gtc aaa ata gat att aca act gtt gga cgc tct gga	384
Gly Lys Arg Lys Val Lys Ile Asp Ile Thr Thr Val Gly Arg Ser Gly	
115 120 125	
tca cca ata ctt cct ccg ata tct act cct caa aat tca aca ggt ggg	432
Ser Pro Ile Leu Pro Pro Ile Ser Thr Pro Gln Asn Ser Thr Gly Gly	
130 135 140	
aga gga att att gct gga ggc gta gaa gcc aaa att ggc gcg tgg cct	480
Arg Gly Ile Ile Ala Gly Gly Val Glu Ala Lys Ile Gly Ala Trp Pro	
145 150 155 160	
tgg atg gca gct gtt ttt gtg aaa aac ttt ggc att ggc aga ttc cac	528
Trp Met Ala Ala Val Phe Val Lys Asn Phe Gly Ile Gly Arg Phe His	
165 170 175	
tgt gct ggt agc ata atc agt aac aag tac att ttg tca gct gcc cac	576
Cys Ala Gly Ser Ile Ile Ser Asn Lys Tyr Ile Leu Ser Ala Ala His	
180 185 190	
gcc ttc ctt atc gga ggt cga aag ttg acc cca act cgc tta gct gtc	624
Ala Phe Leu Ile Gly Gly Arg Lys Leu Thr Pro Thr Arg Leu Ala Val	

195	200	205	
cgt gtg gga ggc cac tac ata aag agg ggt caa gag tat cca gtg aaa			672
Arg Val Gly Gly His Tyr Ile Lys Arg Gly Gln Glu Tyr Pro Val Lys			
210	215	220	
gac gtg att atc cat cct cat tat gta gaa aag gag aac tac aat gat			720
Asp Val Ile Ile His Pro His Tyr Val Glu Lys Glu Asn Tyr Asn Asp			
225	230	235	240
ata gcc ata atc gag tta aaa gag gaa ctg aac ttt acg gac ttg gtc			768
Ile Ala Ile Ile Glu Leu Lys Glu Glu Leu Asn Phe Thr Asp Leu Val			
245	250	255	
aat cct ata tgt ctc cct gat cca gag aca gta acg gat cca tta aaa			816
Asn Pro Ile Cys Leu Pro Asp Pro Glu Thr Val Thr Asp Pro Leu Lys			
260	265	270	
gac aga att gtg act gca gcg gga tgg ggc gat ctg gat ttc tcc ggt			864
Asp Arg Ile Val Thr Ala Ala Gly Trp Gly Asp Leu Asp Phe Ser Gly			
275	280	285	
cca cgg agc caa gtt cta cgt gag gta agc atc cca gtt gtt cca gtt			912
Pro Arg Ser Gln Val Leu Arg Glu Val Ser Ile Pro Val Val Pro Val			
290	295	300	
gat aaa tgt gat caa gcc tat gag aaa ctc aac acc cct tca cta aaa			960
Asp Lys Cys Asp Gln Ala Tyr Glu Lys Leu Asn Thr Pro Ser Leu Lys			
305	310	315	320
aat ggg ata acg aat aac ttc ctt tgc gct gga ttg gaa gaa gga ggg			1008
Asn Gly Ile Thr Asn Asn Phe Leu Cys Ala Gly Leu Glu Glu Gly Gly			
325	330	335	
aaa gac gct tgc caa ggc gat tct ggt gga ccg ttg atg cta gtg aac			1056
Lys Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Leu Val Asn			
340	345	350	
aac act agg tgg ata gta gta gga gtt gtg tcg ttc ggg cac aag tgt			1104
Asn Thr Arg Trp Ile Val Val Gly Val Val Ser Phe Gly His Lys Cys			
355	360	365	
gcc gag gaa gga tat cct ggt gtg tac tcg cgc gta gcg agt tac cta			1152
Ala Glu Glu Gly Tyr Pro Gly Val Tyr Ser Arg Val Ala Ser Tyr Leu			
370	375	380	
gac tgg atc gcg aaa gtt acg aac tcg tta gat cat gcc gtc act aac			1200
Asp Trp Ile Ala Lys Val Thr Asn Ser Leu Asp His Ala Val Thr Asn			
385	390	395	400
taa			1203
<210> 4			

<211> 400
 <212> PRT
 <213> 东方鲀
 <400> 4
 Met Thr Trp Ile Cys Val Ile Thr Leu Phe Ala Leu Ala Ser Ala Thr
 1 5 10 15
 Leu Gly Asn Lys Val Ser Arg Val Gly Val Leu Phe Pro Lys Thr Arg
 20 25 30
 Asn Asp Asn Glu Cys Thr Ala Arg Gly Gly Leu Lys Gly Ser Cys Lys
 35 40 45
 Ser Leu Ile Asp Cys Pro Ser Val Leu Ala Thr Leu Lys Asp Ser Phe
 50 55 60
 Pro Val Val Cys Ser Trp Asn Gly Arg Phe Gln Pro Ile Val Cys Cys
 65 70 75 80
 Pro Asp Ala Ile Ala Pro Pro Pro Val Thr Thr Thr Ala Val Thr Val
 85 90 95
 Ile Ser Thr Lys Glu Pro Lys Leu Pro Arg Leu His Ile Ser Gly Cys
 100 105 110
 Gly Lys Arg Lys Val Lys Ile Asp Ile Thr Thr Val Gly Arg Ser Gly
 115 120 125
 Ser Pro Ile Leu Pro Pro Ile Ser Thr Pro Gln Asn Ser Thr Gly Gly
 130 135 140
 Arg Gly Ile Ile Ala Gly Gly Val Glu Ala Lys Ile Gly Ala Trp Pro
 145 150 155 160
 Trp Met Ala Ala Val Phe Val Lys Asn Phe Gly Ile Gly Arg Phe His
 165 170 175
 Cys Ala Gly Ser Ile Ile Ser Asn Lys Tyr Ile Leu Ser Ala Ala His
 180 185 190
 Ala Phe Leu Ile Gly Gly Arg Lys Leu Thr Pro Thr Arg Leu Ala Val
 195 200 205
 Arg Val Gly Gly His Tyr Ile Lys Arg Gly Gln Glu Tyr Pro Val Lys
 210 215 220
 Asp Val Ile Ile His Pro His Tyr Val Glu Lys Glu Asn Tyr Asn Asp
 225 230 235 240
 Ile Ala Ile Ile Glu Leu Lys Glu Glu Leu Asn Phe Thr Asp Leu Val
 245 250 255
 Asn Pro Ile Cys Leu Pro Asp Pro Glu Thr Val Thr Asp Pro Leu Lys
 260 265 270
 Asp Arg Ile Val Thr Ala Ala Gly Trp Gly Asp Leu Asp Phe Ser Gly

275	280	285	
Pro Arg Ser Gln Val Leu Arg Glu Val Ser Ile Pro Val Val Pro Val			
290	295	300	
Asp Lys Cys Asp Gln Ala Tyr Glu Lys Leu Asn Thr Pro Ser Leu Lys			
305	310	315	320
Asn Gly Ile Thr Asn Asn Phe Leu Cys Ala Gly Leu Glu Glu Gly Gly			
325	330	335	
Lys Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Leu Val Asn			
340	345	350	
Asn Thr Arg Trp Ile Val Val Gly Val Val Ser Phe Gly His Lys Cys			
355	360	365	
Ala Glu Glu Gly Tyr Pro Gly Val Tyr Ser Arg Val Ala Ser Tyr Leu			
370	375	380	
Asp Trp Ile Ala Lys Val Thr Asn Ser Leu Asp His Ala Val Thr Asn			
385	390	395	400
<210> 5			
<211> 1128			
<212> DNA			
<213> 东方鲎			
<220>			
<221> CDS			
<222> (1) .. (1128)			
<223>			
<400> 5			
atg ttg gtg aat aac gtg ttt tca cta ctg tgt ttc cca ctc ttg atg			48
Met Leu Val Asn Asn Val Phe Ser Leu Leu Cys Phe Pro Leu Leu Met			
1 5 10 15			
tct gtg gtt aga tgc agt act ctc agc aga cag cgt aga cag ttt gtt			96
Ser Val Val Arg Cys Ser Thr Leu Ser Arg Gln Arg Arg Gln Phe Val			
20 25 30			
ttc cct gac gag gaa gaa ctt tgc tca aac cga ttt act gaa gaa gga			144
Phe Pro Asp Glu Glu Glu Leu Cys Ser Asn Arg Phe Thr Glu Glu Gly			
35 40 45			
aca tgc aaa aat gtc ttg gat tgt aga ata ctt tta caa aaa aat gat			192
Thr Cys Lys Asn Val Leu Asp Cys Arg Ile Leu Leu Gln Lys Asn Asp			
50 55 60			
tat aat tta ctc aaa gaa tca ata tgc ggc ttt gaa ggc ata aca ccc			240
Tyr Asn Leu Leu Lys Glu Ser Ile Cys Gly Phe Glu Gly Ile Thr Pro			
65 70 75 80			

aaa gtt tgt tgt ccg aaa tca agc cat gta att tca agt aca cag gca	288
Lys Val Cys Cys Pro Lys Ser Ser His Val Ile Ser Ser Thr Gln Ala	
85 90 95	
cct cca gaa acc act acg act gaa cgc cca cca aaa cag ata cca ccc	336
Pro Pro Glu Thr Thr Thr Thr Glu Arg Pro Pro Lys Gln Ile Pro Pro	
100 105 110	
aat ctt cat gaa gtg tgt gga att cac aat act aca act acc agg att	384
Asn Leu His Glu Val Cys Gly Ile His Asn Thr Thr Thr Thr Arg Ile	
115 120 125	
att gga ggt cgg gaa gca cct att gga gcc tgg ccg tgg atg act gct	432
Ile Gly Gly Arg Glu Ala Pro Ile Gly Ala Trp Pro Trp Met Thr Ala	
130 135 140	
gtc tac ata aaa caa gga gga atc aga agt gtt cag tgt ggt ggc gca	480
Val Tyr Ile Lys Gln Gly Gly Ile Arg Ser Val Gln Cys Gly Gly Ala	
145 150 155 160	
ctt gtc act aac agg cac gtg att aca gct tcg cac tgt gtt gta aac	528
Leu Val Thr Asn Arg His Val Ile Thr Ala Ser His Cys Val Val Asn	
165 170 175	
agt gca gga aca gat gtg atg cca gct gat gta ttc tcg gtt cgt ctg	576
Ser Ala Gly Thr Asp Val Met Pro Ala Asp Val Phe Ser Val Arg Leu	
180 185 190	
ggt gaa cac aat tta tac agt acc gat gac gat tcg aat cca ata gat	624
Gly Glu His Asn Leu Tyr Ser Thr Asp Asp Asp Ser Asn Pro Ile Asp	
195 200 205	
ttt gca gtt acg tcg gtg aaa cat cac gaa cac ttt gta ctc gcg acg	672
Phe Ala Val Thr Ser Val Lys His His Glu His Phe Val Leu Ala Thr	
210 215 220	
tat ttg aat gac atc gca att cta acg tta aat gac aca gtt acg ttt	720
Tyr Leu Asn Asp Ile Ala Ile Leu Thr Leu Asn Asp Thr Val Thr Phe	
225 230 235 240	
aca gac aga att cga ccc att tgt cta cct tat cgt aag ttg aga tac	768
Thr Asp Arg Ile Arg Pro Ile Cys Leu Pro Tyr Arg Lys Leu Arg Tyr	
245 250 255	
gat gat cta gca atg aga aaa ccg ttt atc act gga tgg gga aca aca	816
Asp Asp Leu Ala Met Arg Lys Pro Phe Ile Thr Gly Trp Gly Thr Thr	
260 265 270	
gca ttt aac ggc cca tct agt gca gtg ttg aga gaa gta cag tta cca	864
Ala Phe Asn Gly Pro Ser Ser Ala Val Leu Arg Glu Val Gln Leu Pro	
275 280 285	

ata tgg gaa cac gag gcc tgt aga cag gcc tac gag aag gat tta aat	912
Ile Trp Glu His Glu Ala Cys Arg Gln Ala Tyr Glu Lys Asp Leu Asn	
290 295 300	
att aca aac gtg tat atg tgt gct ggc ttt gca gat ggc ggg aag gat	960
Ile Thr Asn Val Tyr Met Cys Ala Gly Phe Ala Asp Gly Gly Lys Asp	
305 310 315 320	
gct tgc cag ggt gat tct gga ggt cca atg atg ttg cct gtt aaa acc	1008
Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Met Met Leu Pro Val Lys Thr	
325 330 335	
gga gag ttt tat ctc att gga att gtg tct ttc gga aag aaa tgc gca	1056
Gly Glu Phe Tyr Leu Ile Gly Ile Val Ser Phe Gly Lys Lys Cys Ala	
340 345 350	
ttg cct gga ttt cct ggg gtt tac aca aaa gtg aca gag ttt tta gat	1104
Leu Pro Gly Phe Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr Glu Phe Leu Asp	
355 360 365	
tgg att gca gaa cat atg gtg tag	1128
Trp Ile Ala Glu His Met Val	
370 375	
<210> 6	
<211> 375	
<212> PRT	
<213> 东方鲷	
<400> 6	
Met Leu Val Asn Asn Val Phe Ser Leu Leu Cys Phe Pro Leu Leu Met	
1 5 10 15	
Ser Val Val Arg Cys Ser Thr Leu Ser Arg Gln Arg Arg Gln Phe Val	
20 25 30	
Phe Pro Asp Glu Glu Glu Leu Cys Ser Asn Arg Phe Thr Glu Glu Gly	
35 40 45	
Thr Cys Lys Asn Val Leu Asp Cys Arg Ile Leu Leu Gln Lys Asn Asp	
50 55 60	
Tyr Asn Leu Leu Lys Glu Ser Ile Cys Gly Phe Glu Gly Ile Thr Pro	
65 70 75 80	
Lys Val Cys Cys Pro Lys Ser Ser His Val Ile Ser Ser Thr Gln Ala	
85 90 95	
Pro Pro Glu Thr Thr Thr Thr Glu Arg Pro Pro Lys Gln Ile Pro Pro	
100 105 110	
Asn Leu His Glu Val Cys Gly Ile His Asn Thr Thr Thr Thr Arg Ile	
115 120 125	

Ile Gly Gly Arg Glu Ala Pro Ile Gly Ala Trp Pro Trp Met Thr Ala	
130	140
Val Tyr Ile Lys Gln Gly Gly Ile Arg Ser Val Gln Cys Gly Gly Ala	
145	155
Leu Val Thr Asn Arg His Val Ile Thr Ala Ser His Cys Val Val Asn	
165	175
Ser Ala Gly Thr Asp Val Met Pro Ala Asp Val Phe Ser Val Arg Leu	
180	190
Gly Glu His Asn Leu Tyr Ser Thr Asp Asp Asp Ser Asn Pro Ile Asp	
195	205
Phe Ala Val Thr Ser Val Lys His His Glu His Phe Val Leu Ala Thr	
210	220
Tyr Leu Asn Asp Ile Ala Ile Leu Thr Leu Asn Asp Thr Val Thr Phe	
225	240
Thr Asp Arg Ile Arg Pro Ile Cys Leu Pro Tyr Arg Lys Leu Arg Tyr	
245	255
Asp Asp Leu Ala Met Arg Lys Pro Phe Ile Thr Gly Trp Gly Thr Thr	
260	270
Ala Phe Asn Gly Pro Ser Ser Ala Val Leu Arg Glu Val Gln Leu Pro	
275	285
Ile Trp Glu His Glu Ala Cys Arg Gln Ala Tyr Glu Lys Asp Leu Asn	
290	300
Ile Thr Asn Val Tyr Met Cys Ala Gly Phe Ala Asp Gly Gly Lys Asp	
305	320
Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Met Met Leu Pro Val Lys Thr	
325	335
Gly Glu Phe Tyr Leu Ile Gly Ile Val Ser Phe Gly Lys Lys Cys Ala	
340	350
Leu Pro Gly Phe Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr Glu Phe Leu Asp	
355	365
Trp Ile Ala Glu His Met Val	
370	375

<210> 7

<211> 3078

<212> DNA

<213> 东方鲀

<400> 7

atgggtcttag cgtcgttttt ggtgtctggt ttagttctag ggatactagc ccaacaaatg 60

cgtccagttc agtccagagg agtagatctg ggcttgtgtg atgaaacgag gttcgagtgt 120

aagtgtggag	atccaggcta	tgtgttcaac	gtccctatga	aacaatgcac	gtactttctat	180
cgatggaggc	cttattgtaa	accatgtgat	gacctggagg	ctaaggacat	ttgtccaaag	240
tacaaacgat	gtcaagagtg	taaggctgg	cttgatagtt	gtgttacttg	tccacctaac	300
aaatatggta	cttgggtgtag	cgggtgaatgt	caatgtaaga	atggagggtat	ctgtgaccag	360
aggacaggag	cttgtacctg	tcgtgacaga	tatgaaggag	cgcactgtga	aattctcaaa	420
ggttgtcctc	ttcttccatc	ggattctcaa	gttcaggaag	tcagaaaccc	accagataat	480
ccccaacta	ttgactacag	ctgttcacca	gggttcaagc	ttaaaggcgt	ggcacgaatt	540
agctgtctcc	caaatggaca	gtggagtagc	tttccacca	aatgtattcg	agaatgtgcc	600
aaggtttcat	ctccagaaca	cgggaaagt	aatgctccta	gtggcaatat	gatagaaggg	660
gctactttac	ggttctcatg	tgatagtccc	tactacttga	ttgggtcaaga	aacattaacc	720
tgccagggtg	atgggtcagt	gagtggacaa	ataccacaat	gtaagaagtt	ggtcttctgt	780
cctgaccttg	atcctgtaaa	ccatgctgaa	caccagggtta	aaattgggtgt	ggaacaaaaa	840
tatggtcagt	ttcctcaagg	cactgaagt	acctatacgt	gttcgggtaa	ctacttcttg	900
atgggtttta	acaccttaaa	atgtaaccct	gatgggtcct	ggtcaggatc	acagccatcc	960
tgtgttaaag	tggcagacag	agaggtcgac	tgtgacagta	aagctgtaga	cttcttggat	1020
gatgttgggtg	aacctgtcag	gatccactgt	cctgctggct	gttctttgac	agctgggtact	1080
gtgtggggta	cagccatata	ccacgaactt	tcctcagtgt	gtcgtgcagc	catccatgct	1140
ggcaagcttc	caaactctgg	aggggcggtg	catgtagtga	acaatggccc	ctactcggac	1200
tttctgggta	gtgacctgaa	tgggataaaa	tcggaagagt	tgaagtctct	tgccccgagt	1260
tttcgatttg	attatgtcag	ttcatccaca	gcaggtagat	caggatgtcc	tgatggatgg	1320
tttgaggtag	aagagaactg	tgtgtacgtt	acatcaaaac	agagagcctg	ggaaagagct	1380
caagggtgtgt	gtaccaatat	ggctgctcgt	cttgctgtgc	tagacaaaga	tctaattccg	1440
agttccttga	ctgagactct	acgagggaaa	gggttaacaa	ccacatggat	aggattgcac	1500
agactagatg	ctgagaagcc	ctttgtttgg	gagctaattgg	atcgtagtaa	tgtggttctg	1560
aatgataacc	taacattctg	ggcctctggc	gaacctggaa	atgaaactaa	ctgtgtatat	1620
ctggacatcc	gagatcagct	gcagcctgtg	tggaaaacca	agtcatgttt	tcagccctca	1680
agcttttgctt	gcatgatgga	ttgttcagac	agaaataaag	ccaaatgcga	tgaccctgga	1740
ccactggaaa	atggacacgc	cacacttcat	ggacaaagta	ttgatgggtt	ctatgctggt	1800
tcttctataa	ggtacagctg	tgaggttctc	cactacctca	gtggaactga	gaccgtaact	1860
tgtacaacaa	atggcacatg	gagtgtcctt	aaacctcgat	gtatcaaagt	catcacctgc	1920
caaaaccctc	ctgtaccatc	atatggtttct	gtggaaatca	aacccccaaag	tcggacaaac	1980
tcgatcagtc	gtgttgggtc	acctttcttg	aggttgccac	ggttaccctt	cccattagcc	2040
agagcagcca	aacctcctcc	aaaacctaga	tcttcacaac	cctctactgt	ggacttggct	2100
tctaaagtta	aactacctga	aggtcattac	cgggtaggg	ctcgagccat	ttacacgtgc	2160
gagtcgagat	actacgaact	acttggtctt	caaggcagaa	gatgtgactc	taatggaaac	2220
tggagtgggtc	ggcccgttag	ctgtattcca	gtttgtggac	ggtcagactc	tctctgttct	2280
cccttcatct	ggaatgggaa	ttctacagaa	ataggtcagt	ggccgtggca	ggcaggaatc	2340
tctcgatggc	ttgcagacca	caatatgtgg	tttctccagt	gtggaggatc	cctattgaa	2400
gagaaatgga	tcgtcactgc	tgcccactgt	gtcacctact	ctgctactgc	tgagataatt	2460

gatcccagtc agtttaaaat ctatctgggc aagtactacc gtgatgacag tagagacgat	2520
gactacgtac aagtaagaga ggctctcgag atccacgtaa atcctaacta cgacccccggc	2580
aatctcaact ttgacatagc cctaattcaa ctgaaaactc ctgttacttt gacaacacga	2640
gtccaaccaa tctgtctgcc tactgacatc acaacaagag aacacttgaa ggagggaaca	2700
ttagcagtggtg tgacagggtg gggtttgaat gaaaacaaca catattcaga gatgattcaa	2760
caagctgtgc tacctgttgt tgcagcaagc acctgtgaag aggggtacaa ggaagcagac	2820
ttaccactga cagtaacaga gaacatgttc tgtgcagggtt acaagaaggg acgttatgat	2880
gcctgcagtg gggacagtggtg aggaccatta gtgtttgctg atgattcccc taccgaaagg	2940
cggtgggtct tggaagggat tgtcagctgg ggcagtccca gtggatgtgg caaggctaac	3000
cagtatgggg gcttcaactaa agttaacgtt tttctatcat ggattaggca gttcattcat	3060
catcaccatc accattga	3078
<210> 8	
<211> 1203	
<212> DNA	
<213> 东方鲀	
<400> 8	
atgacctgga tctgcgtgat caccctgttc gctctggctt ccgctaccct gggcaacaag	60
gtgtcccgtg tgggtgtcct gttccccaag acccgtaacg acaacgagtg caccgctcgt	120
gggtggtctga agggctcctg caagtccctg atcgactgcc cctccgtgct ggctaccctg	180
aaggactcct tccccgtcgt gtgctcctgg aacggtcgtt tccagcccat cgtgtgctgc	240
cccgcgcta tcgtccccc cctgtgacc accaccgtg tgaccgtgat ctccaccaag	300
gagcccaagc tgccccgtct gcacatctcc ggttgcggca agcgcaaggt caagatcgac	360
atcaccaccg tgggccgttc cggttccccc atcctgcccc ccatctccac cccccagaac	420
tccactgggtg gtcgtggtat catcgctggc ggtgtcgagg ctaagatcgg tgcttggccc	480
tggatggctg ctgtgttcgt gaagaacttc ggtatcggtc gcttccactg cgctggttcc	540
atcatctcca acaagtacat cctgtccgct gctcacgctt tcctcatcgg tggtcgcaag	600
ctgaccccca cccgtctggc tgtgcgtgtg ggtggtcact acatcaagcg tggccaggag	660
taccccgta aggacgtgat catccacccc cactacgtgg agaaggagaa ctacaacgac	720
atcgccatca tcgagctgaa ggaggagctg aacttcaccg acctggtcaa ccccatctgc	780
ctgcccgcacc ccgagactgt gaccgacct ctgaaggacc gtatcgtgac cgctgctggc	840
tggggcgacc tggacttctc cgggtccccgt tcccagggtc tgcgtgaggt gtccatcccc	900
gtggtgcccc tggacaagtg cgaccaggt tacgagaagc tgaacacccc ctccctgaag	960
aacggtatta ccaacaactt cctctgcgcc ggactcgagg aggggtggca ggacgcttgc	1020
cagggcgact ccggtggtcc cctgatgtg gtcaacaaca cccgttggat cgctgtgggt	1080
gtcgtgtcct tcggtcacia gtgcgtgag gagggttacc ccggcgtcta ctcccgtgtg	1140
gcttcctacc tggactggat cgctaaggtc accaactccc tggaccacgc tgtcaccaac	1200
taa	1203
<210> 9	
<211> 1128	

<212> DNA

<213> 东方鲀

<400> 9

atgctgggtca acaacgtgtt ctccctgctg tgcttcccc tgctgatgtc cgtcgtgcgt	60
tgctccaccc tgtcccgta gcgtcgtcag ttctgtgtcc ccgacgaaga ggagctgtgc	120
tccaaccgtt tcaccgagga gggcacttgc aagaacgtgc tggactgccg tatcctgctg	180
cagaagaacg actacaacct cctgaaggag tccatctgcg gtttcgaggg tatcactccc	240
aaggtctgct gcccgaagtc ctcccacgtg atctccagca cccaggctcc ccccgagact	300
accaccaccg agcgtccccc caagcagatc cccccaacc tccacgaggt ctgcggtatc	360
cacaacacca ccaccaccg tatcatcggt ggtcgcgagg ctcccatcgg tgcttggccc	420
tggatgaccg ctgtgtacat caagcagggt ggtatccgtt ccgtgcagtg cggaggtgct	480
ctggtcacca accgtcacgt gatcacgct tccactgcg tggteaactc cgtggcacc	540
gacgtgatgc ccgtgacgt gttctctgtg cgtctgggag agcacaacct gtactccacc	600
gacgacgact ccaaccccat cgacttcgtg gtgacctcc tgaagacca cgagcacttc	660
gtgctggcta cctacctgaa cgacatcgt atctgaact tgaacgacac cgtgaccttc	720
accgaccgta tccgtcccat ctgcctgccc taccgcaagc tgcgttacga cgacctggt	780
atgcgcaagc ccttcatcac cggtcggggc accaccgctt tcaacggtcc ctctccgct	840
gtgctgcgtg aggtgcagct gcccatctgg gagcacgagg cttgccgtca ggcttacgag	900
aaggacctga acatcaccaa cgtgtacatg tgcgttggtt tcgctgacgg tggcaaggac	960
gcttgccagg gcgactccgg tggccccatg atgtgcccc tcaagaccgg cgagttctac	1020
ctgatcggtg tcgtgtcctt cggaagaag tgcgtctgc ccggtttccc cggtgtctac	1080
accaaggtca ccgagttcct cgactggatc gccgagcaca tgggtgtaa	1128

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物FC-N-Pst

<400> 10

caactgcaga tggctcttagc gtcgtttttt	30
-----------------------------------	----

<210> 11

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物FC-无标签-R-Bam

<400> 11

caggatcctc aaatgaactg cctaattccat gat	33
---------------------------------------	----

<210> 12

<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<400> 12
Ile Glu Gly Arg
1

含有内毒素的试验样品

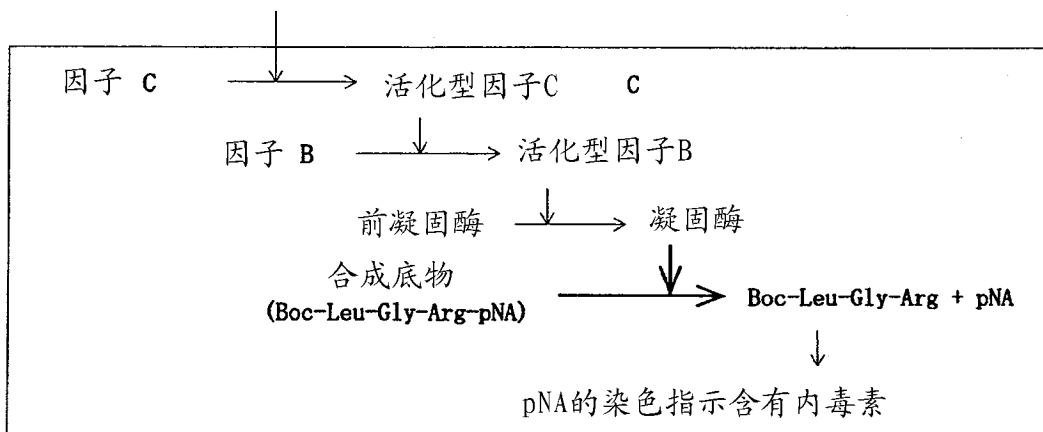


图 1

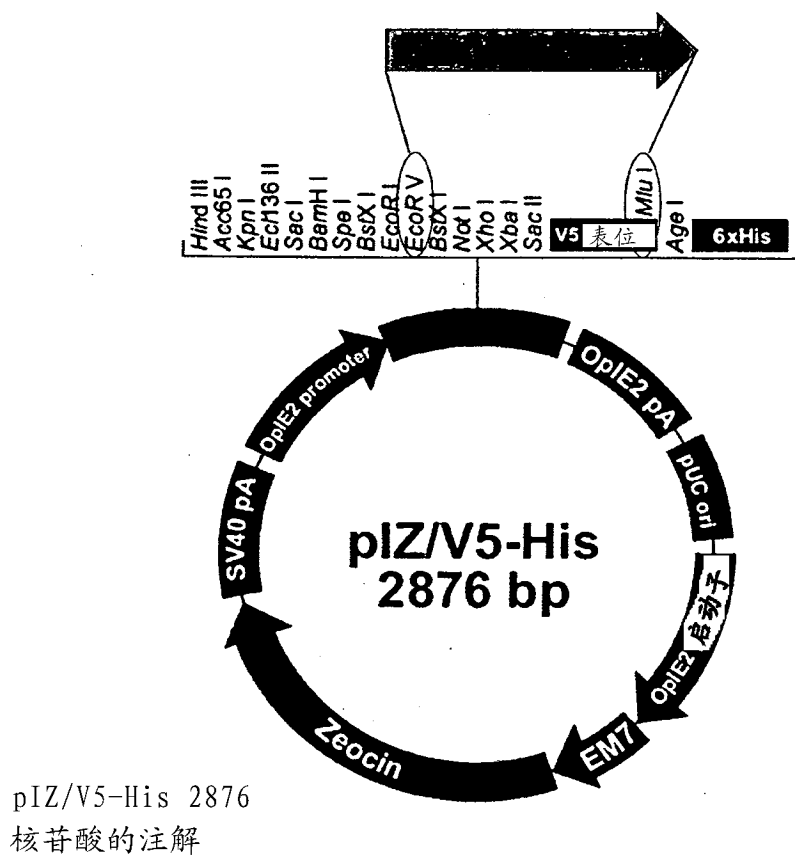


图 2

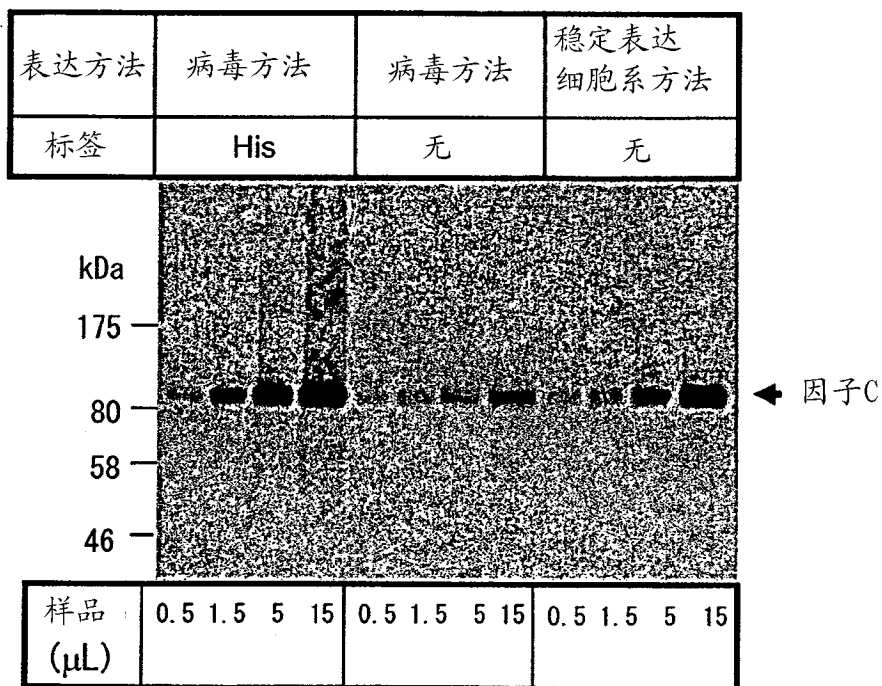


图 3

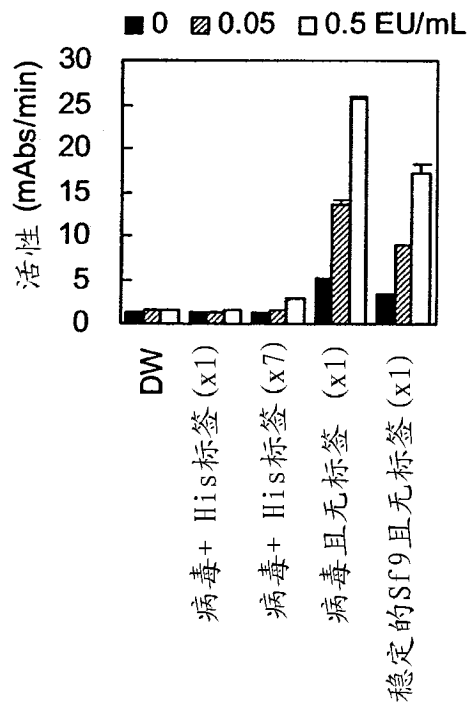


图 4

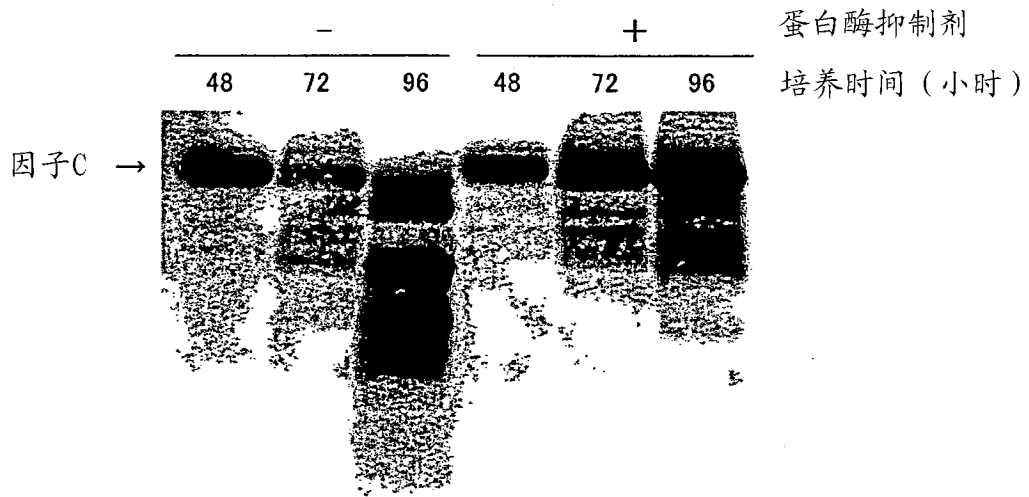


图 5

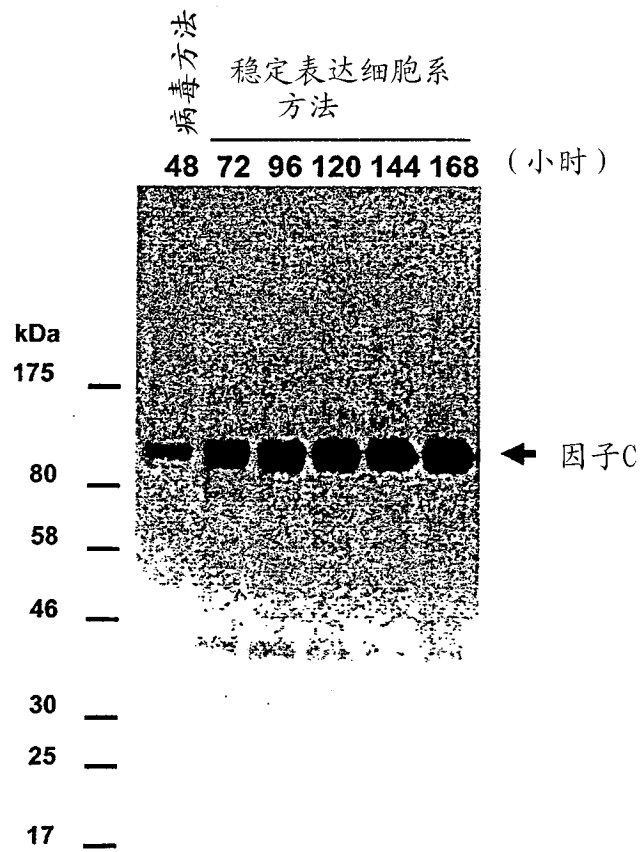


图 6

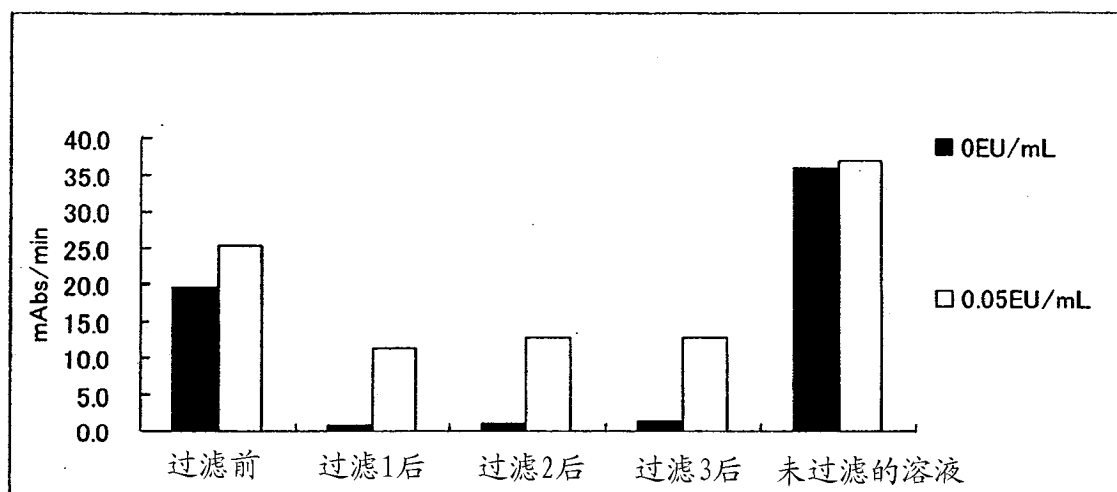


图 7

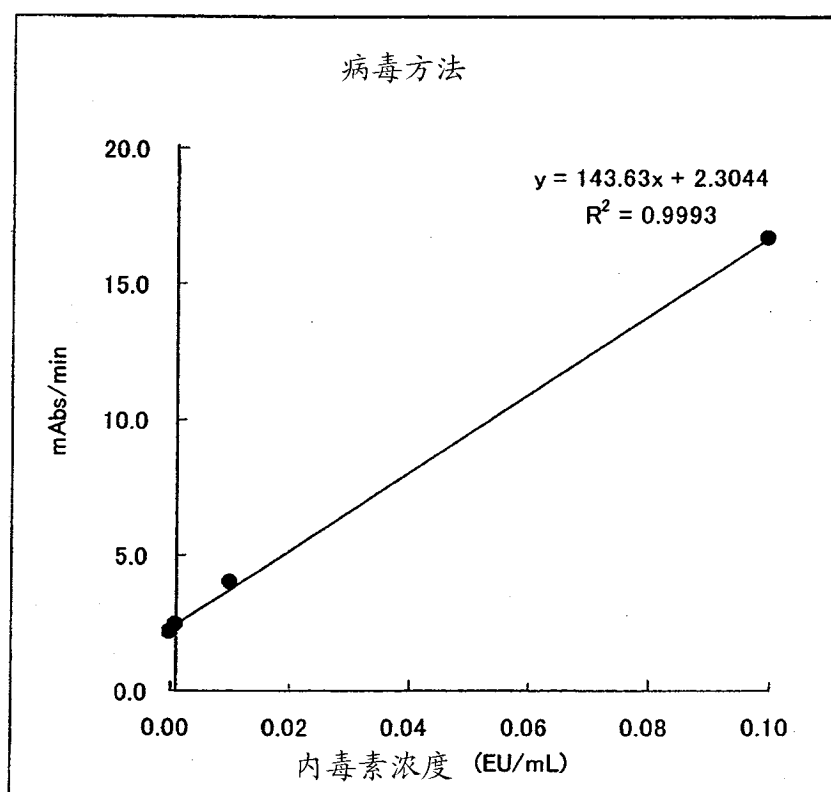


图 8

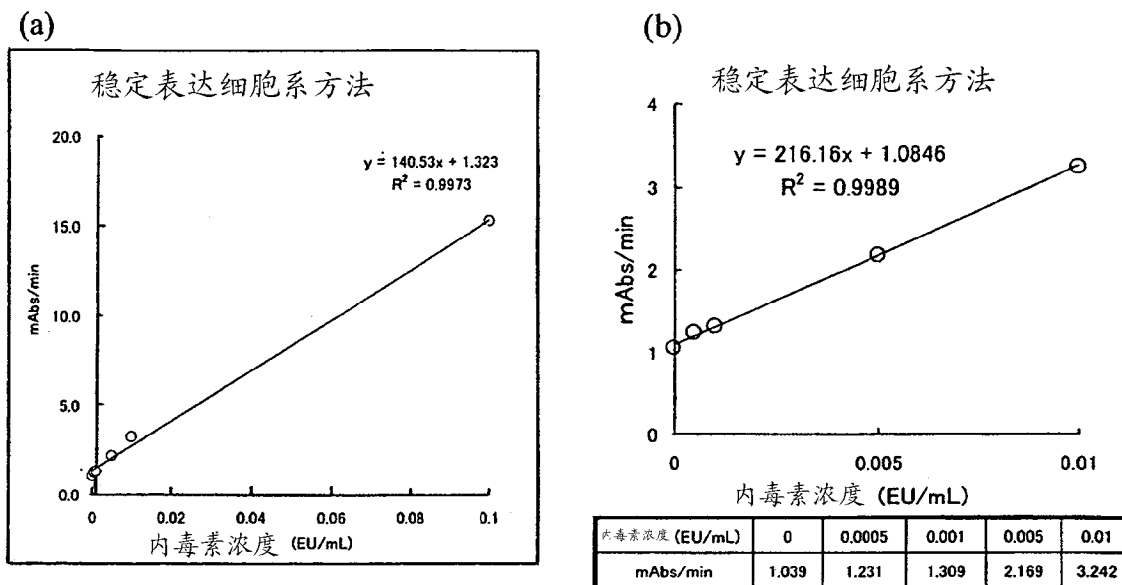


图 9

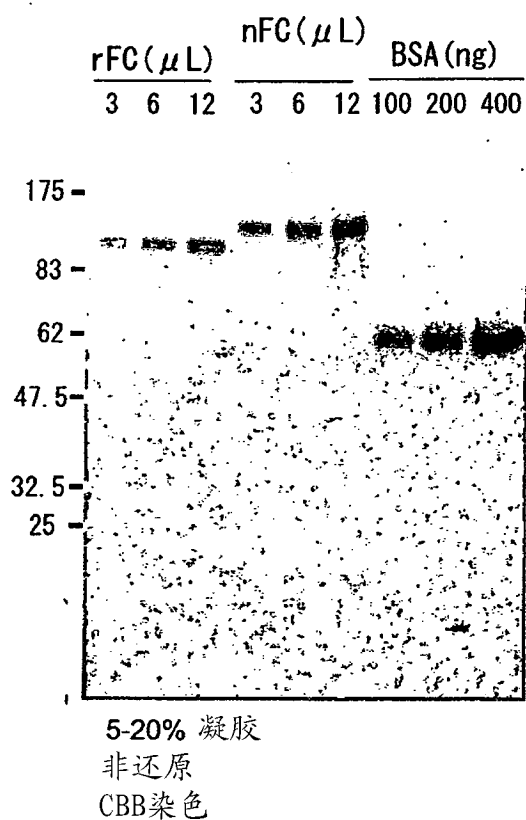


图 10

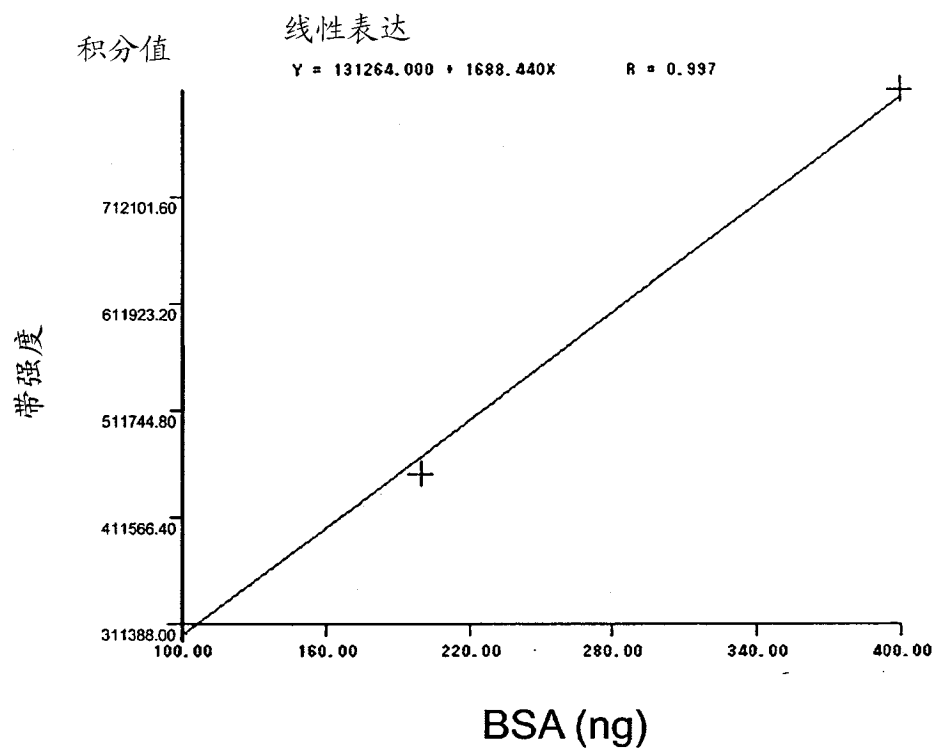


图 11

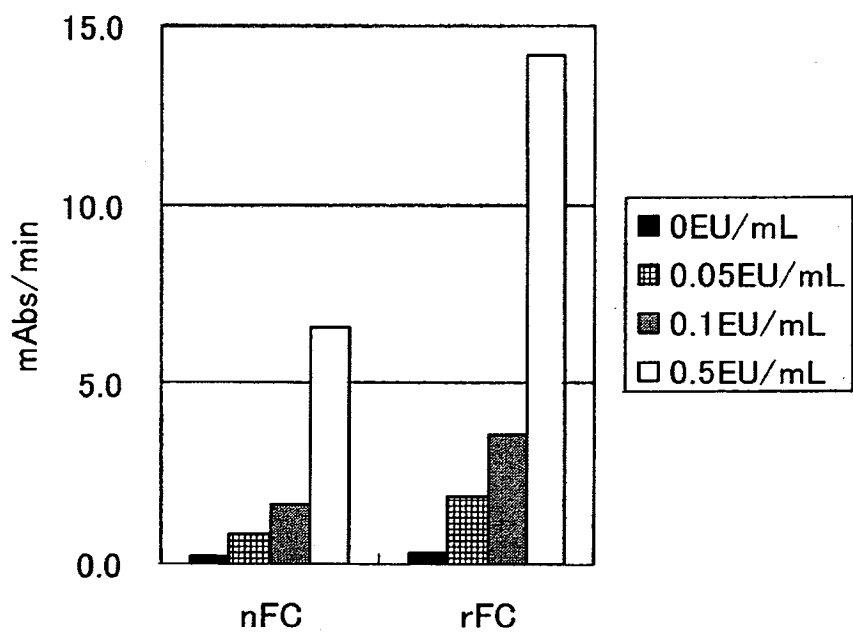


图 12