



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103635589 B

(45)授权公告日 2016.10.12

(21)申请号 201280011699.0

(22)申请日 2012.03.02

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103635589 A

(43)申请公布日 2014.03.12

(30)优先权数据

2011-048101 2011.03.04 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.09.04

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2012/055386 2012.03.02

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/121144 JA 2012.09.13

(73)专利权人 富山县

地址 日本富山县

专利权人 味之素株式会社

(72)发明人 浅野泰久 龟谷将史 尾仲宏康

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 刘彬

(51)Int.Cl.

C12Q 1/26(2006.01)

C12M 1/40(2006.01)

C12N 9/06(2006.01)

C12N 15/09(2006.01)

(56)对比文件

JP 特开平6-70798 A,1994.03.15,

JP 特开2001-69974 A,2001.03.21,说明书  
51-53段,图9-10.

August,P.R.,et al.Q9S3V1.《GENBANK》

.2011,

Onaka,H.,et al.Q83WG4.《GENBANK》.2006,

审查员 刘东吉

权利要求书2页 说明书16页

序列表10页 附图5页

(54)发明名称

生物体试样中的L-色氨酸分析方法以及用  
于该方法的试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种包括将样品、L-色氨酸氧化酶和水混合的步骤、将所得反应液在氧的存在下放置指定时间的步骤、测定放置后的反应液中存在的因所述酶的作用而产生的反应产物的步骤的L-色氨酸的定量方法。所述L-色氨酸氧化酶具有指定氨基酸序列,且具有在氧和水的存在下,作用于L-色氨酸而生成过氧化氢和氨的氧化酶活性,对L-苯丙氨酸的氧化酶活性是对L-色氨酸的氧化酶活性的0~3%的范围,对L-色氨酸和L-苯丙氨酸以外的组成蛋白质的氨基酸不具有氧化酶活性。本发明还公开了包含上述L-色氨酸氧化酶的L-色氨酸的定量用试剂盒和使用上述L-色氨酸氧化酶的酶传感器。本发明的方法、试剂盒和酶传感器使用了L-色氨酸特异性酶,因此

即使在其他氨基酸共存下也能对L-色氨酸进行  
定量。

1. 一种分析样品中的L-色氨酸的方法,所述方法包括  
步骤(A):将样品、L-色氨酸氧化酶以及水混合,  
步骤(B):将通过所述混合而得到的反应液在氧的存在下放置指定时间,  
步骤(C):对放置后的反应液中存在的因所述酶的作用而产生的反应产物中的至少一种的存在进行确认,或对所述反应产物中的至少一种的量进行测定;  
其中,在所述L-色氨酸氧化酶中  
(a1)其为下述(1)中的氨基酸序列,且  
(a2)具有在氧和水的存在下作用于L-色氨酸而生成过氧化氢和氨的氧化酶活性,对L-苯丙氨酸的氧化酶活性是对L-色氨酸的氧化酶活性的0~3%,对除L-色氨酸和L-苯丙氨酸以外的组成蛋白质的氨基酸不具有氧化酶活性;  
(1)序列表的SEQ ID NO:1或2所述的氨基酸序列。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述(a1)中的L-色氨酸氧化酶对L-苯丙氨酸的氧化酶活性是对L-色氨酸的氧化酶活性的0~1%。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中,在步骤(A)中用于与样品混合的所述L-色氨酸氧化酶在L-色氨酸氧化酶的稳定剂的存在下保存。
4. 根据权利要求3所述的方法,其中,所述稳定剂是选自甘油、蔗糖、山梨糖醇和海藻糖中的至少1种。
5. 根据权利要求1~4中任一项所述的方法,其中,所述步骤(C)中进行确认或测定的反应产物是过氧化氢。
6. L-色氨酸氧化酶用于制备一种用于包含L-苯丙氨酸的样品中的L-色氨酸分析的试剂盒的用途,所述试剂盒包含以下试剂:(K1)L-色氨酸氧化酶,在所述L-色氨酸氧化酶中,  
(a1)其为下述(1)中的氨基酸序列,且  
(a2)具有在氧和水的存在下作用于L-色氨酸而生成过氧化氢和氨的氧化酶活性,对L-苯丙氨酸的氧化酶活性是对L-色氨酸的氧化酶活性的0~3%,对除L-色氨酸和L-苯丙氨酸以外的组成蛋白质的氨基酸不具有氧化酶活性;  
(1)序列表的SEQ ID NO:1或2所述的氨基酸序列。
7. 根据权利要求6所述的用途,其中,所述(a1)中的(K1)L-色氨酸氧化酶对L-苯丙氨酸的氧化酶活性是对L-色氨酸的氧化酶活性的0~1%。
8. 根据权利要求6所述的用途,其中,所述(K1)L-色氨酸氧化酶是与(K1)L-色氨酸氧化酶的稳定剂的混合物。
9. 根据权利要求8所述的用途,其中,所述稳定剂是选自甘油、蔗糖、山梨糖醇和海藻糖中的至少1种。
10. 根据权利要求6~9中任一项所述的用途,其还包含(K2)反应用缓冲液、(K3)过氧化氢检测用试剂、(K4)氨检测试剂和(K5)吡啶丙酮酸检测试剂中的至少一种。
11. L-色氨酸氧化酶用于制备一种用于包含L-苯丙氨酸的样品中的L-色氨酸分析的组合作用的用途,所述组合物包含L-色氨酸氧化酶,其中,在所述L-色氨酸氧化酶中  
(a1)其为下述(1)中的氨基酸序列,且  
(a2)具有在氧和水的存在下作用于L-色氨酸而生成过氧化氢和氨的氧化酶活性,对L-苯丙氨酸的氧化酶活性是对L-色氨酸的氧化酶活性的0~3%,对除L-色氨酸和L-苯丙氨酸

以外的组成蛋白质的氨基酸不具有氧化酶活性；

(1)序列表的SEQ ID NO:1或2所述的氨基酸序列。

12.根据权利要求11所述的用途,其中,所述(a1)中的L-色氨酸氧化酶对L-苯丙氨酸的氧化酶活性是对L-色氨酸的氧化酶活性的0~1%。

13.根据权利要求11或12所述的用途,其中,含有L-色氨酸氧化酶的稳定剂。

14.根据权利要求13所述的用途,其中,所述稳定剂是选自甘油、蔗糖、山梨糖醇和海藻糖中的至少1种。

15.一种使用L-色氨酸氧化酶的用于L-色氨酸的检测或定量的酶传感器,其中,所述检测用电极是过氧化氢检测用电极,且在所述L-色氨酸氧化酶中,

(a1)其为下述(1)中的氨基酸序列,且

(a2)具有在氧和水的存在下作用于L-色氨酸而生成过氧化氢和氨的氧化酶活性,对L-苯丙氨酸的氧化酶活性是对L-色氨酸的氧化酶活性的0~3%,对除L-色氨酸和L-苯丙氨酸以外的组成蛋白质的氨基酸不具有氧化酶活性;

(1)序列表的SEQ ID NO:1或2所述的氨基酸序列。

16.根据权利要求15所述的酶传感器,其中,所述(a1)中的L-色氨酸氧化酶对L-苯丙氨酸的氧化酶活性是对L-色氨酸的氧化酶活性的0~1%。

17.根据权利要求15所述的酶传感器,其中,所述L-色氨酸氧化酶与L-色氨酸氧化酶的稳定剂一起使用。

18.根据权利要求17所述的酶传感器,其中,所述稳定剂是选自甘油、蔗糖、山梨糖醇和海藻糖中的至少1种。

19.根据权利要求15~18中任一项所述的酶传感器,其中,过氧化氢检测用电极是酶式过氧化氢电极或隔膜式过氧化氢电极。

## 生物体试样中的L-色氨酸分析方法以及用于该方法的试剂盒

[0001] 相关申请的相互引用

[0002] 本申请要求2011年3月4日申请的日本特愿2011-48101号的优先权,其全部内容在此援引作为特别公开。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及使用L-色氨酸氧化酶的L-色氨酸分析方法以及用于其的试剂盒,其中,所述L-色氨酸氧化酶适合于将生物体试样中的L-色氨酸转化为可定量的产物、通过该产物的检测或定量来测定L-色氨酸的含量。

### 背景技术

[0004] 以血中为代表的生物体试样中的氨基酸浓度的定量是各种疾病检测的标志物,其定量方法的开发是医疗立场上强烈需求的。氨基酸浓度的酶定量方法与仪器分析相比具有迅速、简便等特点,是一种适合于在实际的医疗现场进行各种疾病检测的方法。

[0005] 作为对L-色氨酸进行酶学定量的传统技术,已知有使用(i)L-色氨酸单加氧酶(非专利文献A、非专利文献B)、和(ii)L-氨基酸氧化酶的方法(专利文献A)。

[0006] 专利文献A:日本特开2001-069974号公报

[0007] 非专利文献A:Emanuele, J. J., Heasley, C. J., and Fitzpatrick, P. F. (1995) Arch Biochem Biophys 316, 241-248

[0008] 非专利文献B:Simonian, A. L., Rainina, E. I., Fitzpatrick, P. F., and Wild, J. R. (1997) Biosens Bioelectron 12, 363-371

[0009] 非专利文献C:Balibar, C. J., and Walsh, C. T. (2006) Biochemistry 45, 15444-15457

[0010] 非专利文献D:Onaka, H., Taniguchi, S., Igarashi, Y., and Furumai, T. (2002) J Antibiot 55, 1063-1071

[0011] 非专利文献E:Tonismagi, K., Samel, M., Trummal, K., Ronnholm, G., Siigur, J., Kalkkinen, N., and Siigur, E. (2006) Toxicon 48, 227-237  
非专利文献F:Tan, N. H., and Saifuddin, M. N. (1991) Int J Biochem 23, 323-327

[0012] 非专利文献G:Yang, H., Johnson, P. M., Ko, K. C., Kamio, M., Germann, M. W., Derby, C. D., and Tai, P. C. (2005) J Exp Biol 208, 3609-3622

[0013] 非专利文献H:Ehara, T., Kitajima, S., Kanzawa, N., Tamiya, T., and Tsuchiya, T. (2002) FEBS Lett 531, 509-512

[0014] 非专利文献I:Geueke, B., and Hummel, W. (2002) Enzyme Microb Technol 31, 77-87

[0015] 非专利文献J:Tong, H., Chen, W., Shi, W., Qi, F., and Dong, X. (2008) J Bacteriol 190, 4716-4721

[0016] 非专利文献K:Onaka, H., Taniguchi, S., Ikeda, H., Igarashi, Y., and Furumai, T.

(2003)J Antibiot56,950-956

## 发明内容

[0017] 在上述的使用(i)L-色氨酸单加氧酶的方法中,有必要检测伴随L-色氨酸氧化的氧减少量。因此,需要原理上复杂的装置(非专利文献B)。此外,上述L-色氨酸单加氧酶在对L-色氨酸的活性设为100%时,对L-苯丙氨酸显示出83%、对L-甲硫氨酸显示出42%的高相对活性(非专利文献A)。因而,使用该酶的方法不适合进行简便、廉价且L-色氨酸特异性高的检测。

[0018] 对于上述的使用(ii)L-氨基酸氧化酶的方法,公知的L-氨基酸氧化酶一般而言底物特异性低,L-色氨酸以外的多种L-氨基酸也可作为反应底物。因此,尚不知晓在杂质存在下利用L-氨基酸氧化酶进行L-色氨酸特异性检测的例子。例如,作为L-氨基酸氧化酶,已知蛇毒中的多种酶。但是,上述酶均对广泛的氨基酸种类具有活性(非专利文献E、F)。此外,软体动物、细菌来源的L-氨基酸氧化酶也有报告。但是,这些也均已知底物特异性宽泛(非专利文献G、H、I、J),使用这些酶对L-色氨酸进行定量在原理上是不可能的。

[0019] 作为对L-色氨酸的底物特异性较高的酶,报告了担子菌*Coprinus* sp.来源的L-氨基酸氧化酶(专利文献A)。但,上述酶对L-苯丙氨酸等其他种类的氨基酸也显示7%左右的反应性。因而,依然不适合于杂质多的生物体试样的测定。此外,上述酶对L-色氨酸的 $K_m$ 值为 $650\mu\text{M}$ ,为了对血中中仅以数十 $\mu\text{M}$ 数量级的浓度存在的L-色氨酸准确进行定量,底物亲和性低也成为问题。实际上,目前为止尚不知有使用L-氨基酸加氧酶对试样中的L-色氨酸进行定量的例子。而且,上述酶未经基因鉴定,担子菌的长期(约1个月)培养和复杂的纯化过程对其制造而言是必要的。基于以上理由,利用上述酶的生物体试样中的L-色氨酸定量、以及需要大量的酶的实用化是困难的。

[0020] 因此,本发明的目的在于,探索即使在共存有其他氨基酸的生物体试样中,也能够用于L-色氨酸特异性定量的新酶,提供使用该酶的、L-色氨酸的新的分析方法。

[0021] 而且,本发明的目的还在于提供可在实施上述酶的分析方法时利用的测定用试剂盒。而且,本发明的目的还在于提供可在上述酶的分析方法中利用的酶传感器。

[0022] 本发明人从细菌的双喹啉类抗生素生物合成途径中的基因中发现了L-色氨酸底物特异性高的L-色氨酸氧化酶。通过使该酶与生物体试样中所含的L-色氨酸反应,可以生成可检测的化合物,而且,发现该酶不受生物体试样中混合存在的其他氨基酸的影响,能够进行L-色氨酸特异性定量,从而完成了本发明。

[0023] 本发明如下。

[0024] [1].一种分析样品中的L-色氨酸的方法,所述方法包括

[0025] 步骤(A):将样品、L-色氨酸氧化酶以及水混合,

[0026] 步骤(B):将通过所述混合而得到的反应液在氧的存在下放置指定时间,

[0027] 步骤(C):对放置后的反应液中存在的因所述酶的作用而产生的反应产物中的至少一种的存在进行确认,或对所述反应产物中的至少一种的量进行测定;

[0028] 其中,在所述L-色氨酸氧化酶中

[0029] (a1)具有下述(1)~(3)中的任一个的氨基酸序列,且

[0030] (a2)具有在氧和水的存在下作用于L-色氨酸而生成过氧化氢和氨的氧化酶活性,

对L-苯丙氨酸的氧化酶活性是对L-色氨酸的氧化酶活性的0~3%,对除L-色氨酸和L-苯丙氨酸以外的组成蛋白质的氨基酸不具有氧化酶活性;

[0031] (1)序列表的SEQ ID NO:1或2所述的氨基酸序列;

[0032] (2)在序列表的SEQ ID NO:1或2所述的氨基酸序列中具有1~50个氨基酸的缺失、取代和/或添加的氨基酸序列;或

[0033] (3)与序列表的SEQ ID NO:1或2所述的氨基酸序列具有90%以上的同一性的氨基酸序列。

[0034] [2].根据[1]所述的方法,其中,所述L-色氨酸氧化酶的(a1)中的对L-苯丙氨酸的氧化酶活性是对L-色氨酸的氧化酶活性的0~1%。

[0035] [3].[1]或[2]所述的方法,其中,在步骤(A)中用于与样品混合的所述L-色氨酸氧化酶在所述酶的稳定剂的存在下保存。

[0036] [4].根据[3]所述的方法,其中,所述稳定剂是选自甘油、蔗糖、山梨糖醇和海藻糖中的至少1种。

[0037] [5].[1]~[4]中任一项所述的方法,其中,所述步骤(C)中进行确认或测定的反应产物是过氧化氢。

[0038] [6].包含以下试剂的用于L-色氨酸分析的试剂盒:(K1)L-色氨酸氧化酶,所述L-色氨酸氧化酶

[0039] (a1)具有下述(1)~(3)中的任一个的氨基酸序列,且

[0040] (a2)具有在氧和水的存在下作用于L-色氨酸而生成过氧化氢和氨的氧化酶活性,对L-苯丙氨酸的氧化酶活性是对L-色氨酸的氧化酶活性的0~3%,对除L-色氨酸和L-苯丙氨酸以外的组成蛋白质的氨基酸不具有氧化酶活性;

[0041] (1)序列表的SEQ ID NO:1或2所述的氨基酸序列;

[0042] (2)在序列表的SEQ ID NO:1或2所述的氨基酸序列中具有1~50个氨基酸的缺失、取代和/或添加的氨基酸序列;或

[0043] (3)与序列表的SEQ ID NO:1或2所述的氨基酸序列具有90%以上的同一性的氨基酸序列。

[0044] [7].[6]所述的试剂盒,其中,所述(K1)L-色氨酸氧化酶的(a1)中的对L-苯丙氨酸的氧化酶活性是对L-色氨酸的氧化酶活性的0~1%。

[0045] [8].[6]或[7]所述的试剂盒,其中,所述(K1)L-色氨酸氧化酶是与所述酶的稳定剂的混合物。

[0046] [9].根据[8]所述的试剂盒,其中,所述稳定剂是选自甘油、蔗糖、山梨糖醇和海藻糖中的至少1种。

[0047] [10].根据[6]~[9]中任一项所述的试剂盒,其还包含(K2)反应用缓冲液、(K3)过氧化氢检测用试剂、(K4)氨检测试剂和(K5)吡啶丙酮酸检测试剂中的至少一种。

[0048] [11].一种含L-色氨酸氧化酶的用于L-色氨酸分析的组合物,其中,在所述L-色氨酸氧化酶中

[0049] (a1)具有下述(1)~(3)中的任一个的氨基酸序列,且

[0050] (a2)具有在氧和水的存在下作用于L-色氨酸而生成过氧化氢和氨的氧化酶活性,对L-苯丙氨酸的氧化酶活性是对L-色氨酸的氧化酶活性的0~3%,对除L-色氨酸和L-苯丙

氨酸以外的组成蛋白质的氨基酸不具有氧化酶活性；

[0051] (1)序列表的SEQ ID NO:1或2所述的氨基酸序列；

[0052] (2)在序列表的SEQ ID NO:1或2所述的氨基酸序列中具有1~50个氨基酸的缺失、取代和/或添加的氨基酸序列；或

[0053] (3)与序列表的SEQ ID NO:1或2所述的氨基酸序列具有90%以上的同一性的氨基酸序列。

[0054] [12].根据[11]所述的组合物,其中,所述L-色氨酸氧化酶的(a1)中的对L-苯丙氨酸的氧化酶活性是对L-色氨酸的氧化酶活性的0~1%。

[0055] [13].根据[11]或[12]所述的组合物,其中,含有所述酶的稳定剂。

[0056] [14].根据[13]所述的组合物,其中,所述稳定剂是选自甘油、蔗糖、山梨糖醇和海藻糖中的至少1种。

[0057] [15].一种使用L-色氨酸氧化酶的用于L-色氨酸的检测或定量的酶传感器,其中,所述检测用电极是过氧化氢检测用电极,且所述L-色氨酸氧化酶

[0058] (a1)具有下述(1)~(3)中的任一个的氨基酸序列,且

[0059] (a2)具有在氧和水的存在下作用于L-色氨酸而生成过氧化氢和氨的氧化酶活性,对L-苯丙氨酸的氧化酶活性是对L-色氨酸的氧化酶活性的0~3%,对除L-色氨酸和L-苯丙氨酸以外的组成蛋白质的氨基酸不具有氧化酶活性；

[0060] (1)序列表的SEQ ID NO:1或2所述的氨基酸序列；

[0061] (2)在序列表的SEQ ID NO:1或2所述的氨基酸序列中具有1~50个氨基酸的缺失、取代和/或添加的氨基酸序列；或

[0062] (3)与序列表的SEQ ID NO:1或2所述的氨基酸序列具有90%以上的同一性的氨基酸序列。

[0063] [16].根据[15]所述的酶传感器,其中,所述L-色氨酸氧化酶的(a1)中的对L-苯丙氨酸的氧化酶活性是对L-色氨酸的氧化酶活性的0~1%。

[0064] [17].根据[15]或[16]所述的酶传感器,其中,所述L-色氨酸氧化酶与所述酶的稳定剂一起使用。

[0065] [18].根据[17]所述的酶传感器,其中,所述稳定剂是选自甘油、蔗糖、山梨糖醇和海藻糖中的至少1种。

[0066] [19.]根据[15]~[18]中任一项所述的酶传感器,其中,过氧化氢检测用电极是酶式过氧化氢电极或隔膜式过氧化氢电极。

## 发明内容

[0067] 根据本发明,通过使用对L-色氨酸特异性的色氨酸氧化酶,即使在包含其他氨基酸等许多杂质的试样中,也能够L-色氨酸特异地进行迅速、简便的检测。特别是,对于血浆、血清或尿这样的生物体试样,本发明是有效的,通过与过氧化物酶等酶偶联,不仅能够采用生色法、荧光法对L-色氨酸进行定量,还能够提供电极型酶传感器。

## 附图说明

[0068] [图1]显示各L-色氨酸浓度中的Sta0的活性。

[0069] [图2]显示Sta0引起的L-色氨酸标准曲线制作样品的吸光度的时间性变化。

[0070] [图3]显示利用使用Sta0的样品制作的L-色氨酸标准曲线。

[0071] [图4]显示VioA引起的L-色氨酸标准曲线制作样品的吸光度的时间性变化。

[0072] [图5]显示利用使用VioA的样品制作的L-色氨酸标准曲线。

[0073] [图6]显示利用仪器分析或L-色氨酸氧化酶进行的人血浆试样中L-色氨酸定量结果。

[0074] [图7]显示各种甘油浓度存在下的Sta0残存活性的时间性变化。

[0075] [图8]显示各种甘油浓度存在下的VioA残存活性的时间性变化。

[0076] [图9]显示10%甘油存在下或不存在下的、4℃或-80℃过夜保存VioA后的残存活性。

[0077] 发明的具体实施方式

[0078] <L-色氨酸的分析方法>

[0079] 本发明的L-色氨酸的分析方法包括：将样品和L-色氨酸氧化酶和水混合的步骤(A)；将通过所述混合而得到的反应液在氧的存在下放置指定时间的步骤(B)；确认放置后的反应液中存在的因所述酶的作用而产生的反应产物中的至少一种的存在、或者测定所述反应产物中的至少一种的量的步骤(C)；其是通过这些步骤来确认样品中的L-色氨酸的存在、或对其进行定量的方法。

[0080] 在本发明的方法中，作为样品使用的生物体试样是具有包含L-色氨酸的可能性的试样即可，可以是任何生物体试样。生物体试样可以根据通过使L-色氨酸氧化酶作用于生物体试样、对哪个产物进行确认或定量，来对生物体试样中的L-色氨酸进行确认或对其浓度进行测定，来适宜地选择。例如，在利用生色剂、荧光剂对上述产物进行确认或定量的情况下，优选无色的水溶液，作为例子可以列举出血清和血浆等。

[0081] 本发明中使用的所述L-色氨酸氧化酶

[0082] (a1)具有下述(1)~(3)中的任一个的氨基酸序列，且(a2)具有在氧和水的存在下，作用于L-色氨酸而生成过氧化氢和氨的氧化酶活性，且对L-苯丙氨酸的氧化酶活性是对L-色氨酸的氧化酶活性的0~3%的范围，对L-色氨酸和L-苯丙氨酸以外的组成蛋白质的氨基酸不具有氧化酶活性。

[0083] (1)序列表的SEQ ID NO:1或2所述的氨基酸序列；

[0084] (2)在序列表的SEQ ID NO:1或2所述的氨基酸序列中，具有1~50个氨基酸的缺失、取代和/或添加的氨基酸序列；或

[0085] (3)与序列表的SEQ ID NO:1或2所述的氨基酸序列具有90%以上的同一性的氨基酸序列

[0086] (1)具有序列表的SEQ ID NO:1所述的氨基酸序列，且(a2)具有在氧和水的存在下，作用于L-色氨酸而生成过氧化氢和氨的氧化酶活性，对L-苯丙氨酸的氧化酶活性是对L-色氨酸的氧化酶活性的0~3%的范围，对L-色氨酸和L-苯丙氨酸以外的组成蛋白质的氨基酸不具有氧化酶活性的酶是VioA，其是紫色色杆菌(*Chromobacterium violaceum*)来源的酶。VioA是作为催化紫色色杆菌生产的抗生素紫色杆菌素的生物合成途径的一部分的酶被鉴定出来的，该酶被报告具有L-色氨酸氧化活性(非专利文献C)。但是，本酶的以底物特异性为代表的酶学的性质目前尚未开展研究，因而，VioA是具有在氧和水的存在下作用于



L-色氨酸而生成过氧化氢和氨的氧化酶活性,对L-苯丙氨酸的氧化酶活性是对L-色氨酸的氧化酶活性的0~3%的范围,且对L-色氨酸和L-苯丙氨酸以外的氨基酸不具有氧化酶活性的酶这一事实,是在本发明中首次明确的。而且,对于将VioA用于L-色氨酸的定量,目前尚无报告。

[0087] (1)具有序列的SEQ ID NO:2所述的氨基酸序列,且(a2)具有在氧和水的存在下,作用于L-色氨酸而生成过氧化氢和氨的氧化酶活性,对L-苯丙氨酸的氧化酶活性是对L-色氨酸的氧化酶活性的0~3%的范围,对L-色氨酸和L-苯丙氨酸以外的组成蛋白质的氨基酸不具有氧化酶活性的酶是作为链霉菌属种(*Streptomyces* sp.)TA-A0724来源的酶的Sta0。关于Sta0,该酶的基因是在该菌所生产的抗生素星形孢菌素(staurosporine)的生物合成基因簇中被发现的(非专利文献D)。本基因与上述VioA的基因不具有显著同源性,此外,对基因产物未进行过生化解析,其基因产物的性质是未知的。因而,Sta0是具有在氧和水的存在下作用于L-色氨酸而生成过氧化氢和氨的氧化酶活性,对L-苯丙氨酸的氧化酶活性是对L-色氨酸的氧化酶活性的0~3%的范围,对L-色氨酸和L-苯丙氨酸以外的氨基酸不具有氧化酶活性的酶这一事实,是在本发明中首次明确的。

[0088] 而且,在本说明书中,“对L-苯丙氨酸的氧化酶活性是对L-色氨酸的氧化酶活性的0~3%”中的“对L-苯丙氨酸的氧化酶活性”和“对L-色氨酸的氧化酶活性”是指:在实施例中的“4.L-色氨酸氧化酶对氨基酸的底物特异性”的试验方法中,分别使用L-苯丙氨酸和L-色氨酸作为组成蛋白质的氨基酸的情况下得到的相对活性。上述“4.L-色氨酸氧化酶对氨基酸的底物特异性”的试验方法中得到的活性值的检测限均为0.5%。此外,本发明中使用的L-色氨酸氧化酶从提高分析精度的观点来看,优选对L-苯丙氨酸的氧化酶活性为对L-色氨酸的氧化酶活性的0~2%的范围,更优选0~1.5%的范围,更优选0~1%的范围。

[0089] 而且,“对L-色氨酸和L-苯丙氨酸以外的氨基酸不具有氧化酶活性”中的“对L-色氨酸和L-苯丙氨酸以外的氨基酸的氧化酶活性”是指:在实施例中的“4.L-色氨酸氧化酶对氨基酸的底物特异性”的试验方法中,作为组成蛋白质的氨基酸分别使用L-色氨酸和L-苯丙氨酸以外的氨基酸的情况下所得的相对活性。而且,“不具有氧化酶活性”是指相对活性为1%以下,优选不显示超过检测限(0.5%)的相对活性。

[0090] 而且,具有作用于L-色氨酸而生成过氧化氢和氨的氧化酶活性、对L-苯丙氨酸的氧化酶活性是对L-色氨酸的氧化酶活性的0~3%、对L-色氨酸和L-苯丙氨酸以外的组成蛋白质的氨基酸不具有氧化酶活性,这些分别可以采用实施例所述的分析方法(定量方法)来确认。此外,组成蛋白质的氨基酸是指:L-酪氨酸、L-丙氨酸、L-半胱氨酸、L-天冬氨酸、L-谷氨酸、L-甘氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-赖氨酸、L-亮氨酸、L-甲硫氨酸、L-天冬酰胺、L-脯氨酸、L-谷氨酰胺、L-精氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-缬氨酸、L-。

[0091] 本说明书中提及的“具有1~50个的氨基酸的缺失、取代和/或添加的氨基酸序列”中的“1~50个”的范围是指:具有缺失等的蛋白质是具有在氧和水的存在下作用于L-色氨酸而生成过氧化氢和氨的氧化酶活性,对L-苯丙氨酸的氧化酶活性是对L-色氨酸的氧化酶活性的0~3%的范围,对L-色氨酸和L-苯丙氨酸以外的氨基酸不具有氧化酶活性的酶。所述“1~50个”的范围从是具有所述氧化酶活性的蛋白质的比例高的观点来看,可以是例如,1~40个、优选1~30个、更优选1~20个、更优选1~10个、更优选1~7个、更优选1~5个、特别优选1~3个左右。

[0092] 本说明书中提及的“与序列表的SEQ ID NO:1或2所述的氨基酸序列具有90%以上的同一性的氨基酸序列”中的同一性是指:具有所述氨基酸序列的同一性的蛋白质是具有在氧和水的存在下作用于L-色氨酸而生成过氧化氢和氨的氧化酶活性,对L-苯丙氨酸的氧化酶活性是对L-色氨酸的氧化酶活性的0~3%的范围,对L-色氨酸和L-苯丙氨酸以外的氨基酸不具有氧化酶活性的酶即可,没有特殊限制。所述氨基酸序列的同一性是90%以上即可,没有特殊限制,优选95%以上、更优选96%以上、更优选97%以上、更优选98%、特别优选99%以上。

[0093] 本发明中使用的L-色氨酸氧化酶不限于是由特定的种生产的,其是指:伴随特异地对L-色氨酸的氨基的氧化脱氨基化,生产过氧化氢。

[0094] 而且,本发明中使用的L-色氨酸氧化酶具有同样的活性即可,包括从自然界分离出的生物来源的,也包括将编码本酶的基因以大肠杆菌、其他生物作为宿主进行表达而得到的酶或蛋白质。

[0095] 此外,作为利用异种表达的生产方法,可以列举出例如,由从具有同样的活性的生物物种抽提的基因组DNA对该基因进行PCR扩增,将其插入pET或pUC等中构建质粒载体,然后转化BL21、JM109等宿主菌株,再进行培养的方法。也可以适宜采用这些以外的公知的方法。

[0096] 对于本发明中使用的L-色氨酸氧化酶的取得方法没有特殊限制,可以是化学合成的蛋白质,也可以是采用基因重组技术制作的重组蛋白质。在制作重组蛋白质的情况下,如后述地取得编码该蛋白质的基因(DNA)。通过将该DNA导入适当的表达系统,可以产生上述的L-色氨酸氧化酶。

[0097] 上述L-色氨酸氧化酶可以通过下述上述生产方法来制备,所述生产方法包括:将编码L-色氨酸氧化酶的基因搭载在载体上,利用该载体转化宿主细胞后,培养转化的宿主细胞,在培养物中蓄积编码所述基因的蛋白质,收集蓄积的蛋白质。

[0098] 对编码上述L-色氨酸氧化酶的基因的取得方法没有特殊限制。编码本发明的L-色氨酸氧化酶的基因例如可以基于SEQ ID NO:1或者2所述的氨基酸序列或SEQ ID NO:3或者4所记载的碱基序列的信息,采用化学合成、基因工程方法或突然诱变等本领域技术人员已知的任意方法来制作。

[0099] 可以通过采用例如,对于具有序列表的SEQ ID NO:3或4所述的碱基序列的DNA,使之与作为突变原的药物接触作用的方法、照射紫外线的方法、基因工程的方法等来进行。作为基因工程方法之一的定点诱变是一种能够针对特定的位置导入特定的突变的方法,因而是有用的,可以采用公知方法来进行。

[0100] 基于本说明书中的序列表的SEQ ID NO:1或者2所记载的氨基酸序列或SEQ ID NO:3或者4所示的碱基序列的信息,制备适当的探针、引物,通过使用它们对紫色色杆菌(*Chromobacterium violaceum*)NBRC12614或链霉菌属种(*Streptomyces* sp.)TA-A0724的基因组文库进行筛选,能够分离出本发明的基因。基因组文库可以从紫色色杆菌(*Chromobacterium violaceum*)NBRC12614或链霉菌属种(*Streptomyces* sp.)TA-A0724采用常规方法来制作。

[0101] 还可以采用PCR法取得编码本发明的L-色氨酸氧化酶的基因。使用上述紫色色杆菌(*Chromobacterium violaceum*)NBRC12614或链霉菌属种(*Streptomyces* sp.)TA-A0724

的基因组文库作为模板,使用设计成可扩增SEQ ID NO:3或者4所记载的碱基序列的1对引物,进行PCR.PCR的反应条件可以适宜设定,可以列举出例如下述条件等:将由94℃30秒(变性)、55℃30秒~1分钟(退火)、72℃2分钟(延伸)组成的反应步骤作为1个循环,例如进行30个循环后,72℃反应7分钟。然后,可以将扩增得到的DNA片段克隆至可在大肠杆菌(*E.coli*)等宿主中扩增的适合的载体中。

[0102] 上述的探针或引物的制备、基因组文库的构建、基因组文库的筛选、以及目的基因的克隆等操作可以按照本领域技术人员已知的方法适宜进行。

[0103] 上述L-色氨酸氧化酶的基因可以插入到适当的载体中来使用。对本发明中使用的载体的种类没有特殊限制,例如,可以是可自主复制的载体(例如质粒等),或者可以是导入到宿主细胞中时能够整合到宿主细胞的基因组中、并与被整合的染色体一起复制的载体。优选载体是表达载体。在表达载体中,上述基因与转录所必需的元件(例如启动子等)可操作连接。启动子是在宿主细胞中显示转录活性的DNA序列,可以根据宿主的种类适宜选择。

[0104] 作为可在细菌细胞中工作的启动子,可以列举出:嗜热脂肪土芽孢杆菌麦芽糖淀粉酶基因(*Geobacillus stearothermophilus maltogenic amylase gene*)、地衣芽孢杆菌 $\alpha$ 淀粉酶基因(*Bacillus licheniformis alpha-amylase gene*)、解淀粉芽孢杆菌BAN淀粉酶基因(*Bacillus amyloliquefaciens BAN amylase gene*)、枯草芽孢杆菌碱性蛋白酶基因(*Bacillus subtilis alkaline protease gene*)或短小芽孢杆菌木糖苷酶基因(*Bacillus pumilus xylosidase gene*)的启动子、或Lambda噬菌体的 $P_R$ 或者 $P_L$ 启动子、大肠杆菌(*E.coli*)的lac、trp或者tac启动子等。

[0105] 作为可以在哺乳动物细胞中工作的启动子的例子,有SV40启动子、MT-1(金属硫蛋白基因)启动子、或腺病毒2主后期启动子等。作为可以在昆虫细胞中工作的启动子的例子,多角体蛋白启动子、P10启动子、*Autographa californica polyhedrosis*碱性蛋白启动子、棒状病毒即时型早期基因1启动子、或棒状病毒39K延迟型早期基因启动子等。作为可以在酵母宿主细胞中工作的启动子的例子,可以列举出酵母解糖系基因来源的启动子、醇脱氢酶基因启动子、TPI1启动子、ADH2-4c启动子等。作为可以在丝状真菌细胞中工作的启动子的例子,有ADH3启动子或tpiA启动子等。

[0106] 此外,上述L-色氨酸氧化酶的基因可以视需要与适合的终止子可操作连接。含L-色氨酸氧化酶的基因的重组载体还可以具有Poly A信号(例如SV40或腺病毒5E1b区域来源的)、转录增强子序列(例如SV40增强子)等元件。含L-色氨酸氧化酶的基因的重组载体还可以具备使得该载体能够在宿主细胞内复制的DNA序列,作为一例,可以列举出SV40复制起点(宿主细胞为哺乳类细胞时)。

[0107] 含L-色氨酸氧化酶的基因的重组载体还可以含有选择标志物。作为选择标志物,可以列举出例如,二氢叶酸还原酶(DHFR)或粟酒裂殖酵母TPI基因等这样的宿主细胞内缺乏其补体的基因,或者例如氨苄西林、卡那霉素、四环素、氯霉素、新霉素或者潮霉素这样的药物抗性基因。将L-色氨酸氧化酶的基因、启动子、和视需要的终止子和/或分泌信号序列分别连接,再将其插入适合的载体的方法是本领域技术人员周知的。

[0108] 通过将含L-色氨酸氧化酶的基因的重组载体导入适当的宿主,可以制作转化体。被导入含L-色氨酸氧化酶的基因的重组载体的宿主细胞表达L-色氨酸氧化酶的基因即可,可以是任意细胞,可以列举出细菌、酵母、真菌和高等真核细胞等。

[0109] 作为细菌细胞的例子,可以列举出芽孢杆菌或streptomyces等革兰氏阳性菌或大肠杆菌(E.coli)等革兰氏阴性菌。这些细菌的转化可以采用原生质体法、或按公知的方法使用感受态细胞来进行。作为哺乳类细胞的例子,可以列举出HEK293细胞、HeLa细胞、COS细胞、BHK细胞、CHL细胞或CHO细胞等。转化哺乳类细胞、并在该细胞中表达导入的DNA序列的方法也是公知的,可以采用例如,电穿孔法、磷酸钙法、脂质体法等。

[0110] 作为酵母细胞的例子,可以列举出属于酵母或裂殖酵母的细胞,可以列举出例如,酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)或克鲁维酵母(Saccharomyces kluyveri)等。作为对酵母宿主导入重组载体的方法,可以列举出例如,电穿孔法、球状体法、醋酸锂法等。

[0111] 作为其他真菌细胞的例子,是丝状真菌,例如属于曲霉、脉孢菌、镰孢菌、或木霉菌的细胞。在使用丝状真菌作为宿主细胞的情况下,可以通过将DNA构建物整合至宿主染色体得到重组宿主细胞。来进行转化。DNA构建物对宿主染色体的整合可以采用公知方法、如同源重组或非同源重组来进行。

[0112] 在使用昆虫细胞作为宿主的的情况下,可以采用公知的方法将重组基因导入载体和棒状病毒共导入昆虫细胞,在昆虫细胞培养上清中得到重组病毒后,在用重组病毒感染昆虫细胞,从而表达蛋白质。

[0113] 作为棒状病毒,可以使用例如,作为感染夜蛾科昆虫的病毒的首蓆银纹夜蛾核型多角体病毒(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)等。

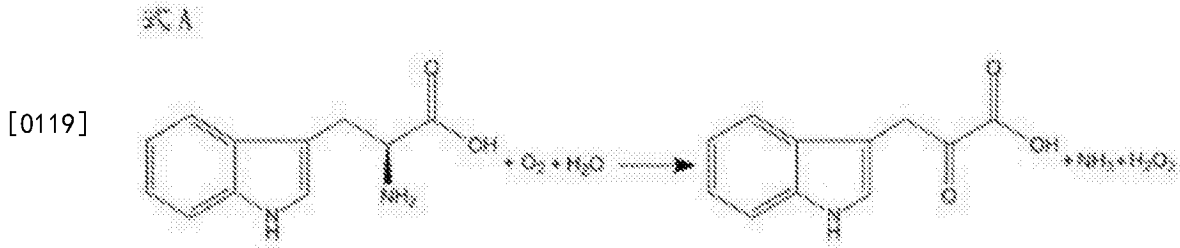
[0114] 作为昆虫细胞,可以使用作为草地贪夜蛾(Spodoptera frugiperda)的卵巢细胞的Sf9、Sf21(棒状病毒表达载体,实验室操作手册,W.H.Freeman and Company,(New York)、(1992))、作为甘蓝尺蠖(Trichoplusia ni)的卵巢细胞的HiFive(Invitrogen公司制造)等。

[0115] 作为用于制备重组病毒的、针对昆虫细胞的重组基因导入载体以及上述棒状病毒的共导入方法,可以列举出例如,磷酸钙法或脂质体法等。

[0116] 将上述的转化体在导入的基因可表达的条件下在适合的营养培养基中进行培养。为了从转化体的培养物分离纯化出本发明中使用的L-色氨酸氧化酶,可以采用通常的蛋白质分离、纯化方法。例如,在本发明中使用的L-色氨酸氧化酶以溶解于细胞内的状态表达的情况下,培养结束后,将细胞通过离心分离回收,悬浮于水系缓冲液后,利用超声波破碎机破碎细胞,得到无细胞抽提液。从将该无细胞抽提液离心分离而得到的上清中,单独或组合使用通常的蛋白质分离纯化方法,即溶剂抽提法、利用硫酸铵等进行的盐析法、脱盐法、利用有机溶剂进行的沉淀法、使用二乙基氨基乙基(DEAE)琼脂糖等树脂的阴离子交换色谱法、使用S-Sepharose FF(Pharmacia公司制造)等树脂的阳离子交换色谱法、使用丁基琼脂糖、苯基琼脂糖等树脂的疏水性色谱法、使用分子筛的凝胶过滤法、亲和色谱法、色谱聚焦法、等电点电泳等电泳法等方法,可以以纯化标准品的形式得到本发明的L-色氨酸氧化酶。

[0117] 利用L-色氨酸氧化酶进行的L-色氨酸的氧化反应如以下的反应式A所示。

[0118] [化学式1]



[0120] 本发明中使用的L-色氨酸氧化酶是指：催化上述式A所示的反应的酶，因而，对其来源、氨基酸序列的差异不做限定。

[0121] 步骤(A)

[0122] 步骤(A)中的L-色氨酸氧化酶的混合量为10mU/ml(1分钟消耗色氨酸1 $\mu$ mol的活性为1U)以上是适当的，水的混合量可以根据样品中的Trp浓度或反应体系中的总质量适宜确定，例如，可以为反应体系中的总质量的5~95%的范围，作为摩尔比，相对于1摩尔的Trp，可以存在例如1摩尔以上的水。在酶反应在水溶液中进行的情况下，反应体系中存在过量的水。L-色氨酸氧化酶的混合量的上限没有特殊，从实用上来看，可以是例如100mU/ml以下。但是，L-色氨酸氧化酶的混合量和水混合量并非限定在该范围，可以适宜调整。

[0123] 而且，除了包含L-色氨酸氧化酶和水之外，优选可以包含显示认为是L-色氨酸氧化酶的最适pH的缓冲液。在使用缓冲液的情况下，水也可以以缓冲液的形式供给。而且，还可以进一步包含L-色氨酸氧化酶的稳定剂。L-色氨酸氧化酶的稳定剂可以是例如，选自甘油、蔗糖、山梨糖醇和海藻糖中的至少1种。

[0124] 步骤(B)

[0125] 步骤(B)中，将通过所述混合而得到的反应液在氧的存在下放置指定时间。

[0126] 在利用L-色氨酸氧化酶的L-色氨酸氧化反应中，如反应式A所示，作为产物，与作为L-色氨酸脱氨基化产物的吲哚-3-丙酮酸一起得到氨(NH<sub>3</sub>)和过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)。通过将上述反应在例如与空气接触的状态下实施，上述氧以反应液中的溶存氧的形式供给。通常没有必要出于供给反应液中的氧的目的而强制地对反应液供给空气等含氧气体。酶反应必要的氧量是微量的，凭借溶存氧即可充分实现。用于酶的放置时间例如也会与使用的酶量有关，可以是例如10分钟~1小时的范围。但是，并非限定在该范围，可以适宜调整。

[0127] 步骤(C)中，对放置后的反应液中存在的因所述酶的作用而产生的反应产物中的至少一种的存在进行确认，或者对反应产物中的至少一种的量进行测定。

[0128] 在用于存在确认或定量的产物是过氧化氢的情况下，可以通过例如使用过氧化物酶反应进行测定的方法等公知的方法，进行过氧化氢的存在确认或定量。在使用过氧化物酶反应来进行测定的情况下，可使用的过氧化物酶是可用于过氧化氢的存在确认或定量的酶即可，可以列举出例如辣根来源过氧化物酶。此外，如果是所使用的过氧化物酶的底物，则可能作为生色剂使用，在使用辣根来源过氧化物酶的情况下，可以列举出4-氨基安替比林：酚等。用于使用辣根来源过氧化物酶进行过氧化氢的存在确认或定量的反应如下所示。

[0129] [化学式2]

[0130]  $2\text{H}_2\text{O}_2 + 4\text{-氨基安替比林} + \text{酚} \longrightarrow \text{醌亚胺} + 4\text{H}_2\text{O}$

[0131] 4-氨基安替比林等生色剂、荧光剂可以根据所使用的过氧化物酶的种类适宜选

择。

[0132] 作为L-色氨酸氧化酶反应的产物的过氧化氢还可以利用使用过氧化氢电极的电流检测型传感器来进行测定。通过该测定,过氧化氢的存在确认和定量均是可行的。可以列举出下述传感器,所述传感器中作为过氧化氢电极使用了例如下述电极,所述电极的碳糊料中含有将过氧化物酶和牛血清白蛋白一起用戊二醛固定化的膜和二茂铁。

[0133] 在用于存在确认或定量的产物是氨的情况下,可以使用氨检测试剂来进行测定。作为氨检测试剂,可以列举出例如基于酚和次氯酸的组合的吲哚酚法。具体地,通过将样品与酚-硝普酸盐溶液和高氯酸溶液混合来进行生色,可以进行存在确认,而且,通过对该生色测定635nm的吸光度,可以进行氨定量。

[0134] 在用于存在确认或定量的产物是作为L-色氨酸的脱氨基化产物的吲哚丙酮酸的情况下,可以使用2-氧代酸还原酶进行吲哚丙酮酸的存在确认或定量。

[0135] <L-色氨酸的分析用试剂盒>

[0136] 本发明包含含有以下试剂的L-色氨酸分析用试剂盒。

[0137] (K1)L-色氨酸氧化酶

[0138] 上述L-色氨酸氧化酶与上述L-色氨酸的定量方法中说明的L-色氨酸氧化酶相同。L-色氨酸的分析包括L-色氨酸的存在确认和定量。

[0139] 上述L-色氨酸氧化酶也可以是该L-色氨酸氧化酶与稳定剂的混合物。稳定剂可以是选自甘油、蔗糖、山梨糖醇和海藻糖中的至少1种。稳定剂为甘油,则对酶的稳定化效果好,因而优选。

[0140] 本发明的试剂盒可以还包含(K2)反应用缓冲液、(K3)过氧化氢检测用试剂、(K4)氨检测试剂和(K5)吲哚丙酮酸检测试剂中的至少一种。

[0141] (K2)反应用缓冲液用于将反应液中保持在适于定量等反应的pH。后述的实施例所示的L-色氨酸氧化酶的最适pH是8~9的范围,因而希望是具有该范围的pH的缓冲液。

[0142] (K3)过氧化氢检测用试剂在例如利用生色或荧光进行过氧化氢的检测的情况下使用。作为过氧化氢检测用试剂,例如可以是过氧化物酶与能够作为其底物的生色剂的组合。具体地,可以列举出辣根过氧化物酶与2-氨基安替比林-酚的组合。

[0143] 作为(K4)氨检测试剂,可以列举出例如,利用酚与次氯酸的组合的吲哚酚法。

[0144] 作为(K5)吲哚丙酮酸检测试剂,可以使用例如2-氧代酸还原酶。

[0145] <L-色氨酸的分析用组合物>

[0146] 本发明还包括包含L-色氨酸氧化酶的L-色氨酸分析用组合物。该组合物中所含的L-色氨酸氧化酶与上述L-色氨酸的定量方法中说明的L-色氨酸氧化酶相同。L-色氨酸的分析包括L-色氨酸的存在确认和定量。本发明的分析用组合物中除了包含上述L-色氨酸之外,还可以包含例如所述酶的稳定剂、缓冲液或缓冲剂等。

[0147] 该L-色氨酸氧化酶的稳定剂可以是选自甘油、蔗糖、山梨糖醇和海藻糖中的至少1种。稳定剂是甘油,则对酶的稳定化效果好,因而优选。

[0148] 酶与稳定剂的混合比例如是,相对于酶100重量份,包含10~70重量份的稳定剂,这从能够长期稳定保存酶的观点来看是优选的。稳定剂的量优选相对酶100重量份,在20~60重量份的范围,更优选在30~50重量份的范围。<酶传感器>

[0149] 本发明包括使用L-色氨酸氧化酶的L-色氨酸的检测或定量用酶传感器。用于该酶

传感器的L-色氨酸氧化酶与所述L-色氨酸的定量方法中说明的L-色氨酸氧化酶相同。

[0150] 所述检测用电极是过氧化氢检测用电极。过氧化氢检测用电极可以是酶式过氧化氢电极或隔膜式过氧化氢电极。通过L-色氨酸氧化酶与L-色氨酸反应生成过氧化氢,因此能用过氧化氢检测用电极对该过氧化氢进行检测。作为酶式过氧化氢电极,可以列举出下述传感器,所述传感器中作为过氧化氢电极使用了例如下述电极,所述电极的碳糊料中含有将过氧化物酶和牛血清白蛋白一起用戊二醛固定化的膜和二茂铁。

[0151] 从更高精度地进行L-色氨酸的检测或定量的观点来看,所述L-色氨酸氧化酶优选配置在检测用电极的表面或检测用电极的近傍,在配置于检测用电极的表面的情况下,可以固定化或不固定化在检测用电极的表面。通过固定化在检测用电极的表面,具有能够重复使用本发明的传感器的优点。而且,所述L-色氨酸氧化酶还可以与所述酶的稳定剂一起配置在检测用电极的表面或检测用电极的近傍。所述稳定剂是选自甘油、蔗糖、山梨糖醇和海藻糖中的至少1种。

## 实施例

[0152] 以下列举出实施例对本发明进行具体说明,但本发明不受这些实施例的限定。

[0153] 1.L-色氨酸氧化酶的制备例

[0154] 制备紫色色杆菌(*Chromobacterium violaceum*)NBRC12614基因组DNA,以此为模板,使用基于碱基序列数据库上的各菌的序列(AF172851.1)设计的SEQ ID NO:5和6的引物进行PCR,扩增出了L-色氨酸氧化酶基因vioA。将该扩增产物插入pET-28a,得到了vioA表达用质粒。此外,把将含链霉菌属种(*Streptomyces* sp.)TA-A0724的基因组片段的粘粒pTYMCsta(非专利文献D)用StuI处理而得到的片段插入用HincII处理的载体pTYM19(非专利文献K),亚克隆了L-色氨酸氧化酶基因sta0。使用Stratagene公司制造QuikChange site-directed mutagenesis kit与SEQ ID NO:7~10的引物,对上述亚克隆质粒的序列进行了修饰。从该质粒通过NdeI和HindIII处理切出sta0基因,插入用同限制酶处理的pET-26b,得到了sta0表达用质粒。而且,进行了引物设计,使得各酶的N末端或C末端添加了His-tag。用各表达用质粒转化大肠杆菌BL21(DE3)株,得到了VioA或Sta0异种表达株。引物的碱基序列如下。

[0155] VioA-F:ATTCTAGACATATGAAGCATTCTTCCGATATCTG(SEQ ID NO:5)

[0156] VioA-R:AATAAGCTTCGCGGCGATGCGCTG(SEQ ID NO:6)

[0157] Sta0-N-sense:TACTGGAGGAAACATATGACGGCACCC(SEQ ID NO:7)

[0158] Sta0-N-anti:CAAGGGTGCCGTCATATGTTTCTCCA(SEQ ID NO:8)

[0159] Sta0-C-sense:GACCGGTCGGCGAAGCTTTCTTCGACCTG(SEQ ID NO:9)

[0160] Sta0-C-anti:GCAGGTCAAGAAAGCTTCGCCGACCGGT(SEQ ID NO:10)

[0161] 将各异种表达株采用37℃的振荡培养进行培养,直至OD<sub>600</sub>为0.6~0.8,添加终浓度0.5mM的IPTG来实施表达诱导。表达诱导后的培养于16℃进行16小时,在可溶性级分中得到了目的酶。此外,对于Sta0,共表达Takara公司制造的伴侣质粒pG-KJE8,则产量进一步提高。

[0162] 将各表达株破碎液上清加载于GE health care公司制造的Ni Sepharose柱,用20mM Tris-HCl,50mM咪唑(pH8.0)溶液洗涤后,通过用20mM Tris-HCl,500mM咪唑(pH8.0)

溶液进行洗脱,对目的酶进行了纯化、回收。测定了这些酶的碱基序列,如SEQ ID NO:3和4所示。而且,酶的氨基酸序列如SEQ ID NO:1和2所示。

[0163] 2.L-色氨酸氧化酶的活性测定条件例

[0164] 制备含有20mM Tris-盐酸缓冲液(pH8.0)、5mM L-色氨酸、1mM酚、1mM4-氨基安替比林、15U/ml辣根来源过氧化物酶、和任意量的L-色氨酸氧化酶酶液的反应液,测定30℃、505nm处的吸光度变化。醌亚胺色素的摩尔吸光系数是 $6.4\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。1分钟生成 $1\mu\text{mol}$ 的过氧化氢的活性定义为1U。本方法的检测限为0.5%。

[0165] 3.活性的pH依赖性

[0166] 使用磷酸钾缓冲液(pH6.5,7.0,7.5,8.0,8.5)和Tris-盐酸缓冲液(pH8.0,8.5,9.0)作为缓冲液,进行了使用各缓冲液时的Sta0的活性测定。制备含有20mM的上述的任何缓冲液、5mM L-色氨酸、1mM酚、1mM4-氨基安替比林、15U/ml辣根来源过氧化物酶、和Sta0酶液的反应液,测定了30℃、505nm处的吸光度变化。其结果显示,Sta0的酶活性在pH8.0~9.0最大。而且,VioA的最适pH在非专利文献C中报告为9.25。

[0167] 4.L-色氨酸氧化酶对氨基酸的底物特异性

[0168] 制备含有20mM Tris-盐酸缓冲液(pH8.0)、1mM酚、1mM4-氨基安替比林、15U/ml辣根来源过氧化物酶、0.2~20mU/ml L-色氨酸氧化酶与0.5mM的氨基酸(20种蛋白构成氨基酸中的任何1种)的反应液,测定了30℃、505nm的吸光度变化。根据所得测定值计算出对各氨基酸的相对活性,结果如表1。本方法的检测限为0.5%。

[0169] Sta0对L-色氨酸以外的氨基酸不显示反应性(相对活性在检测限以下),仅对L-苯丙氨酸检测到了L-色氨酸的0.5%~1%这样的极低的相对活性。此外,对于VioA,未检测到针对L-色氨酸以外的氨基酸的反应性(相对活性在检测限以下)。如以上,Sta0与VioA中的任何一个均显示具有对L-色氨酸的极高的底物特异性。

[0170] 5.L-色氨酸氧化酶的对L-色氨酸的Km值

[0171] 制备含有20mM Tris-盐酸缓冲液(pH8.0)、1mM酚、1mM4-氨基安替比林、15U/ml辣根来源过氧化物酶、0.5mU/ml L-色氨酸氧化酶与0,6.3,13,25,50,100,500 $\mu\text{M}$ 的L-色氨酸的反应液,测定了30℃、505nm处的吸光度变化。

[0172] 由各L-色氨酸浓度计算出的Sta0的活性如图1所示。由该结果计算出Sta0对L-色氨酸的Km值为19 $\mu\text{M}$ 。此外,对于VioA的Km值,有报告称其为30 $\mu\text{M}$ (非专利文献C)。这些值与鬼伞属种Coprinus sp.来源的L-氨基酸氧化酶的值(650 $\mu\text{M}$ )相比是极低的,此外,与对一般用于氨基酸定量用的酶的底物的Km值相比,也是同等以下的低值。这表明,Sta0和VioA即使在L-色氨酸浓度低的样品中作为定量用酶也具有良好性质。

[0173] [表1]

[0174] 表1Sta0、VioA以及背景技术中使用的酶对各种氨基酸的相对活性和Km值



[0175]

		StaO	VioA	鬼伞来源的 L-氨基酸氧化酶(专利文献 A)
相对活性	L-色氨酸	100%	100%	100%
	L-苯丙氨酸	1% <sup>*2</sup>	无活性 <sup>*3</sup>	7%
	L-酪氨酸	无活性	无活性	3%
	其他氨基酸 <sup>*1</sup>	无活性	无活性	无活性或无报告
对 L-色氨酸的 Km 值		19um	30um	650um
亚基的分子量		55.6kDa	46.7kDa	68kDa

[0176] \*1:L-丙氨酸、L-半胱氨酸、L-天冬氨酸、L-谷氨酸、L-甘氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-赖氨酸、L-亮氨酸、L-甲硫氨酸、L-天冬酰胺、L-脯氨酸、L-谷氨酰胺、L-精氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-缬氨酸

[0177] \*2:对L-苯丙氨酸的相对活性是3次测定的平均值,该测定的检测限为0.5%,定量限为1.5%。

[0178] \*3:“无活性”是指检测限以下,检测限为0.5%。

[0179] 6.L-色氨酸的标准曲线的制作

[0180] 制备含有40mM Tris-盐酸缓冲液(pH8.0)、2mM酚、2mM4-氨基安替比林、30U/ml辣根来源过氧化物酶、20mU/ml L-色氨酸氧化酶酶液的反应液。作为标准试样,混合与其等量的0,20,40,60,80,100μM的L-色氨酸水溶液。30℃进行反应,测定30℃、505nm处的吸光度的时间性变化,监测了反应的进行。

[0181] 如上述制作的样品的测定结果如图2~5所示。即使在使用Sta0,VioA中的任何一个的情况下,最迟在反应开始20分钟以后可见L-色氨酸浓度与吸光度之间的良好的直线关系,这表明在本反应体系中可制作标准曲线。此外,特别是对于Sta0样品,即使在使反应时间过长的情况下,也仍然显示吸光度上升基本上停止的变化。该性质可以说是即使反应时间有偏差也不易出现误差的、适合于作为定量用酶的性质。

[0182] 7.人血浆样品中的L-色氨酸定量

[0183] 7-1.人血浆试样的前处理

[0184] 人血浆试样从Kohjin Bio购买,使用了在-20℃保存得3个样品。分别在即将使用前解冻,直接或者利用Microcon YM-10超滤进行除蛋白处理后,用于下述的L-色氨酸定量。

[0185] 7-2.利用仪器分析进行人血浆试样中L-色氨酸的定量

[0186] 作为酶法定量的比较对象,采用使用了超高速氨基酸分析系统的预柱衍生生物法进行了定量。将如前述地进行了除蛋白质处理后的人血浆试样用于超高速氨基酸分析系统Waters UPLC Amino Acid Analysis Solution system。样品的衍生生物化、分析操作等按照上述系统的说明书的规程进行。将0,20,40,60,80,100μM的L-色氨酸水溶液作为标准试样来制作标准曲线,进行了血浆试样中L-色氨酸的定量。

[0187] 7-3.利用L-色氨酸氧化酶进行人血浆试样中L-色氨酸的定量

[0188] 制备了含40mM Tris-盐酸缓冲液(pH8.0)、2mM酚、2mM4-氨基安替比林、30U/ml辣根来源过氧化物酶、20mU/ml L-色氨酸氧化酶酶液的反应液。混合与其等量的0,20,40,60,80,100μM的L-色氨酸水溶液、或除蛋白处理前后的人血浆试样。30℃进行反应,30分钟后测定了505nm处的吸光度。由L-色氨酸水溶液样品的测定值制作标准曲线,进行了血浆试样中

L-色氨酸的定量。

[0189] 7-4. 利用仪器分析或L-色氨酸氧化酶进行的人血浆试样的定量结果的比较

[0190] 上述的测定结果如图6所示。在使用了Sta0, VioA中的任何酶的定量体系也能够得到与仪器分析的测定值相近的值。因此, 这说明使用L-色氨酸氧化酶的定量方法即使在人血浆试样中也是有效的。

[0191] 在一般的酶法生物体试样分析中, 如不预先进行除蛋白质处理则会损害定量性的例子很多。该情况下, 作为生物体试样的前处理, 除蛋白处理是必要的。另一方面, 使用Sta0, VioA中的任何一个, 即使是对于未经除蛋白质处理的试样, 也未见对定量性的影响。因此, 在使用上述酶的定量方法中, 试样的前处理是不需要的, 可知作为酶法也是一种特别简便且准确的定量方法。

[0192] 8. 稳定性

[0193] 在Sta0, VioA纯化酶液中添加终浓度0~50%(v/v)的甘油。将各酶液于4℃保存, 随时间取样, 进行了活性测定。各种甘油浓度存在下的Sta0或VioA的残存活性的时间性变化如图7和图8所示。对于Sta0, 其在仅包含缓冲液的溶液中是不稳定的, 但在添加30%以上的甘油的条件显示出高稳定性。VioA即使未添加甘油也是比较稳定的, 但若添加10%以上的甘油, 则其稳定性提高。

[0194] 在VioA纯化酶液中添加终浓度0或10%(v/v)的甘油。将各酶液在4℃或-80℃保存过夜后, 进行了活性测定。10%甘油存在下或非存在下的VioA酶液的残存活性如图9所示。VioA在冻融时可见失活, 但通过添加10%甘油, 这样的失活消失。

[0195] 以上显示, 对于Sta0添加30%甘油, 对于VioA不添加(冻融时添加10%)甘油即可作为稳定的酶液使用。

[0196] 9. 反应温度依赖性

[0197] 进行了反应温度20, 30, 40, 50, 60℃下的Sta0, VioA的活性测定。使用了组成为20mM Tris-盐酸缓冲液(pH8.0)、1mM L-色氨酸、1mM酚、1mM4-氨基安替比林、15U/ml辣根来源过氧化物酶和L-色氨酸氧化酶酶液的活性测定反应液。上述反应液中, 将除过氧化物酶与L-色氨酸氧化酶酶液以外的混合起来, 在上述各种温度下进行10分钟的温育。保持上述反应液的温度, 添加过氧化物酶与L-色氨酸氧化酶酶液开始反应, 迅速测定505nm的吸光度变化。由测定结果计算出的各温度的Sta0, VioA的相对活性值如表2所示。对于两种酶, 均可见随反应温度上升活性上升。而且, 对于Sta0为60℃以上, 对于VioA为50℃以上, 高温引起的失活的影响变得显著, 准确的活性测定变困难。

[0198] [表2]

[0199] 表2以20℃的活性为100时的各反应温度的相对活性

[0200]

	Sta0	VioA
20℃	100	100
30℃	156	197
40℃	268	327
50℃	427	327
60℃	480*	-#

[0201] \*:推测该值受到了热失活的大影响

[0202] #:因急剧的热失活而无法测定

[0203] 10. 热稳定性

[0204] 将含20%甘油的Sta0酶液、以及含10%甘油的VioA酶液于30,40,50,60,70℃热处理1小时后,进行了活性测定。热处理后的各酶液的残存活性如表3所示。任何酶通过40℃以上的热处理均可见显著的热失活,50℃以上的热处理中残存活性为检测限以下。

[0205] [表3]

[0206] 表3以热处理前的活性为100时的各反应温度的热处理后的相对活性

[0207]

	Sta0	VioA
30℃	73	95
40℃	1	7
≥ 50℃	<1	<1

[0208] 工业实用性

[0209] L-色氨酸是必需氨基酸,已知的地方病糙皮病即使其在极端不足的情况下,显示出烟酸欠乏症状。此外,有报道指出,在过量摄取的情况下,可能成为嗜酸性白血球增加、肌肉痛综合征的原因。因此,L-色氨酸的定量可以考虑在食品分析、医药品或营养补品(supplement)的品质管理、过量症或欠乏症时的血液检查以及酶传感器中加以利用。此外,其在代谢途径上是烟酸、NAD等生物体内具有重要机能的物质的原材料,因此,即使在利用氨基酸谱的疾病诊断“氨基指标”中,也能够作为构成各种疾病的生物标志物的数值之一加以活用。出于这些理由,对于食品、生物体试样等进行L-色氨酸量的测定在产业上、医学上均被认为是重要的技术,现状是只有必须使用以高效液相色谱为代表的非常昂贵的仪器和试剂的方法实现了实用化。因此,本发明可能以L-色氨酸定量用试剂盒、酶传感器等形态实现商品化,可以作为廉价且简便的L-色氨酸定量方法而产业化。

<110> 富山县(Toyama Prefecture)

<120> 生物体试样中的L-色氨酸分析方法以及用于该方法的试剂盒

<130> 125045H

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 418

<212> PRT

<213> 紫色色杆菌

<400> 1

Met Lys His Ser Ser Asp Ile Cys Ile Val Gly Ala Gly Ile Ser Gly  
1                    5                    10                    15

[0001]

Leu Thr Cys Ala Ser His Leu Leu Asp Ser Pro Ala Cys Arg Gly Leu  
                  20                    25                    30

Ser Leu Arg Ile Phe Asp Met Gln Gln Glu Ala Gly Gly Arg Ile Arg  
                  35                    40                    45

Ser Lys Met Leu Asp Gly Lys Ala Ser Ile Glu Leu Gly Ala Gly Arg  
                  50                    55                    60

Tyr Ser Pro Gln Leu His Pro His Phe Gln Ser Ala Met Gln His Tyr  
65                    70                    75                    80

Ser Gln Lys Ser Glu Val Tyr Pro Phe Thr Gln Leu Lys Phe Lys Ser  
                  85                    90                    95

His Val Gln Gln Lys Leu Lys Arg Ala Met Asn Glu Leu Ser Pro Arg

	100		105		110
Leu Lys Glu His Gly Lys Glu Ser Phe Leu Gln Phe Val Ser Arg Tyr					
	115		120		125
Gln Gly His Asp Ser Ala Val Gly Met Ile Arg Ser Met Gly Tyr Asp					
	130		135		140
Ala Leu Phe Leu Pro Asp Ile Ser Ala Glu Met Ala Tyr Asp Ile Val					
	145		150		155
Gly Lys His Pro Glu Ile Gln Ser Val Thr Asp Asn Asp Ala Asn Gln					
	165		170		175
Trp Phe Ala Ala Glu Thr Gly Phe Ala Gly Leu Ile Gln Gly Ile Lys					
	180		185		190
[0002]					
Ala Lys Val Lys Ala Ala Gly Ala Arg Phe Ser Leu Gly Tyr Arg Leu					
	195		200		205
Leu Ser Val Arg Thr Asp Gly Asp Gly Tyr Leu Leu Gln Leu Ala Gly					
	210		215		220
Asp Asp Gly Trp Lys Leu Glu His Arg Thr Arg His Leu Ile Leu Ala					
	225		230		235
Ile Pro Pro Ser Ala Met Ala Gly Leu Asn Val Asp Phe Pro Glu Ala					
	245		250		255
Trp Ser Gly Ala Arg Tyr Gly Ser Leu Pro Leu Phe Lys Gly Phe Leu					
	260		265		270
Thr Tyr Gly Glu Pro Trp Trp Leu Asp Tyr Lys Leu Asp Asp Gln Val					

	275		280		285										
Leu	Ile	Val	Asp	Asn	Pro	Leu	Arg	Lys	Ile	Tyr	Phe	Lys	Gly	Asp	Lys
	290					295						300			
Tyr	Leu	Phe	Phe	Tyr	Thr	Asp	Ser	Glu	Met	Ala	Asn	Tyr	Trp	Arg	Gly
305				310						315					320
Cys	Val	Ala	Glu	Gly	Glu	Asp	Gly	Tyr	Leu	Glu	Gln	Ile	Arg	Thr	His
			325						330						335
Leu	Ala	Ser	Ala	Leu	Gly	Ile	Ala	Arg	Glu	Arg	Ile	Pro	Gln	Pro	Leu
			340					345							350
Ala	His	Val	His	Lys	Tyr	Trp	Ala	His	Gly	Val	Glu	Phe	Cys	Arg	Asp
		355						360							365

[0003]

Ser	Asp	Ile	Asp	His	Pro	Ser	Ala	Leu	Ser	His	Arg	Asp	Ser	Gly	Ile
	370							375							380
Ile	Ala	Cys	Ser	Asp	Ala	Tyr	Thr	Glu	His	Cys	Gly	Trp	Met	Glu	Gly
385					390					395					400
Gly	Leu	Leu	Ser	Ala	Arg	Glu	Ala	Ser	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Arg	Ile
				405						410					415

Ala Ala

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 504

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 链霉菌属种 TP-A0274

&lt;400&gt; 2

Met Thr Ala Pro Leu Gln Asp Ser Asp Gly Pro Asp Asp Ala Ile Gly  
 1                    5                    10                    15

Gly Pro Lys Gln Val Thr Val Ile Gly Ala Gly Ile Ala Gly Leu Val  
                   20                    25                    30

Thr Ala Tyr Glu Leu Glu Arg Leu Gly His His Val Gln Ile Ile Glu  
                   35                    40                    45

Gly Ser Asp Asp Ile Gly Gly Arg Ile His Thr His Arg Phe Ser Gly  
                   50                    55                    60

Ala Gly Gly Pro Gly Pro Phe Ala Glu Met Gly Ala Met Arg Ile Pro  
 65                    70                    75                    80

[0004] Ala Gly His Arg Leu Thr Met His Tyr Ile Ala Glu Leu Gly Leu Gln  
                   85                    90                    95

Asn Gln Val Arg Glu Phe Arg Thr Leu Phe Ser Asp Asp Ala Ala Tyr  
                   100                    105                    110

Leu Pro Ser Ser Ala Gly Tyr Leu Arg Val Arg Glu Ala His Asp Thr  
                   115                    120                    125

Leu Val Asp Glu Phe Ala Thr Gly Leu Pro Ser Ala His Tyr Arg Gln  
                   130                    135                    140

Asp Thr Leu Leu Phe Gly Ala Trp Leu Asp Ala Ser Ile Arg Ala Ile  
 145                    150                    155                    160

Ala Pro Arg Gln Phe Tyr Asp Gly Leu His Asn Asp Ile Gly Val Glu  
                   165                    170                    175

Leu Leu Asn Leu Val Asp Asp Ile Asp Leu Thr Pro Tyr Arg Cys Gly  
 180 185 190

Thr Ala Arg Asn Arg Ile Asp Leu His Ala Leu Phe Ala Asp His Pro  
 195 200 205

Arg Val Arg Ala Ser Cys Pro Pro Arg Leu Glu Arg Phe Leu Asp Asp  
 210 215 220

Val Leu Asp Glu Thr Ser Ser Ser Ile Val Arg Leu Lys Asp Gly Met  
 225 230 235 240

Asp Glu Leu Pro Arg Arg Leu Ala Ser Arg Ile Arg Gly Lys Ile Ser  
 245 250 255

[0005]

Leu Gly Gln Glu Val Thr Gly Ile Asp Val His Asp Asp Thr Val Thr  
 260 265 270

Leu Thr Val Arg Gln Gly Leu Arg Thr Val Thr Arg Thr Cys Asp Tyr  
 275 280 285

Val Val Cys Thr Ile Pro Phe Thr Val Leu Arg Thr Leu Arg Leu Thr  
 290 295 300

Gly Phe Asp Gln Asp Lys Leu Asp Ile Val His Glu Thr Lys Tyr Trp  
 305 310 315 320

Pro Ala Thr Lys Ile Ala Phe His Cys Arg Glu Pro Phe Trp Glu Lys  
 325 330 335

Asp Gly Ile Ser Gly Gly Ala Ser Phe Thr Gly Gly His Val Arg Gln  
 340 345 350



Thr Tyr Tyr Pro Pro Ala Glu Gly Asp Pro Ala Leu Gly Ala Val Leu  
 355 360 365

Leu Ala Ser Tyr Thr Ile Gly Pro Asp Ala Glu Ala Leu Ala Arg Met  
 370 375 380

Asp Glu Ala Glu Arg Asp Ala Leu Val Ala Lys Glu Leu Ser Val Met  
 385 390 395 400

His Pro Glu Leu Arg Arg Pro Gly Met Val Leu Ala Val Ala Gly Arg  
 405 410 415

Asp Trp Gly Ala Arg Arg Trp Ser Arg Gly Ala Ala Thr Val Arg Trp  
 420 425 430

[0006] Gly Gln Glu Ala Ala Leu Arg Glu Ala Glu Arg Arg Glu Cys Ala Arg  
 435 440 445

Pro Gln Lys Gly Leu Phe Phe Ala Gly Glu His Cys Ser Ser Lys Pro  
 450 455 460

Ala Trp Ile Glu Gly Ala Ile Glu Ser Ala Ile Asp Ala Ala His Glu  
 465 470 475 480

Ile Glu Trp Tyr Glu Pro Arg Ala Ser Arg Val Phe Ala Ala Ser Arg  
 485 490 495

Leu Ser Arg Ser Asp Arg Ser Ala  
 500

<210> 3

<211> 1257

<212> DNA

	<213> 紫色色杆菌	
	<400> 3	
	atgaagcatt cttccgatat ctgcattgtc ggcgccggca tcagcggcct gacctgcgcc	60
	agccatctgc tegattogcc cgcttgccgc ggctgtcgc tgcgcattct cgacatgcag	120
	caggaggcgg gcggccgcac ccgctcgaag atgctggatg gcaaggcttc gatagagctg	180
	ggcgcggggc gatactcccc gcagctgcac ccgcatttcc agagcgcgat gcageattac	240
	agccagaaga gcgaggtgta tccgctcacc cagttgaaat tcaagagcca tgtccagcag	300
	aagctgaagc gggcgatgaa cgagttgtcg ccagcctga aagagcatgg caaggaatcc	360
	ttctccagt tegtccagcc ctaccagggc catgacagcg cggtagggcat gatccgctcc	420
	atgggctacg acgcctgttt cctgccccac atctcgccg agatggccta cgacatcgtc	480
	ggcaagcacc cggaaatcca gacgctgacc gataacgacg ccaaccagtg gttcgcggcg	540
[0007]	gaaacgggct ttgcccgcct gatccagggc atcaaggcca agtcaaggc tgccggcgcg	600
	cgcttcagcc tgggttaccg gctgctgtcg gtgaggacgg acggcgacgg ctacctgctg	660
	caactggccg gcgacgacgg ctggaagctg gaacaccgga cccgccacct gatcctggcc	720
	atccctccgt cggcgatggc cgggctcaat gtgcacttcc ccgagcgtg gacggcgcg	780
	cgctacggct cgtgcccgt gttcaagggt ttctcacct acggcgagcc ctggtggctg	840
	gactacaagc tggacgacca ggtgctgacg gtgcacaacc cgtgcgcaa gatctacttc	900
	aaggcgaca agtacctgtt ctctacacc gacagcgaga tggccaatta ctggcgcggc	960
	tgctggccg aaggcgagga cggctacctg gacagatcc gcacctctt ggccagcgcg	1020
	ctggcctcgc cccgcgagcg ccttccccag cccctcgccc atgtgcacaa gtattggcg	1080
	catggcgtgg agttctgcgg cgacagcgat atcgaccatc cgtccgcgct cagccaccgc	1140
	gacagcggca tcategcctg ttgggaagcc tacaccgagc actgcggctg gatggagggc	1200
	ggctgctca gcgcccgga agccagcctt ctgctgctgc agcgcctgc cgcgta	1257

	<210> 4	
	<211> 1515	
	<212> DNA	
	<213> 链霉菌属种 TP-A0274	
	<400> 4	
	gtgacggca ccttgcagga cagtgcagg cggacgacg ccatcgggtg accgaagcag	60
	gtcacctca tggcgccgg tategccggc ctggtgacgg cctatgaact ggaacgcctc	120
	ggacatcacg tgcagatcat cgaaggcagt gacgacatag gcggccgcat teacaccac	180
	cgtttctccg gtgcccgttg gcccgcccg ttccgagaga tgggggceat ggggatcccc	240
	gccggacacc ggttgacct gcactacate gccgaactcg gaetgcagaa ccaggtaagg	300
	gaattccgga cgctgttctc cgacgacgc ccctatctgc cgagttccgc cggatatctc	360
	cggtgtgcgc aggcgcacga cacgctggtc gacgaattcg ccaccggact gccgagcgcg	420
[0008]	cactaccgcc aggacacct gttgttcggt gcctggctgg atgccagcat ccgggccatc	480
	gccccacgcc agttctacga cggactgca aagacatcg gtgtcgaact getgaatctc	540
	gtggacgaca tcgatctgac gccctatcgc tgcggcaccg cccgcaacag gatcgatctg	600
	cacgccctgt tcgccacca tccccgtgia cgggcgtcct gccaccaccg gctcgaacgc	660
	ttctctgacg acgtgctgga cgagaccagc tccagcatcg tgcggctcaa ggaocgcatg	720
	gacgaactgc cccgccgct cgcctcccgt atccggggga agatctccct gggccaggag	780
	gtcacggca tcgacgtgca cgacgacacc gtgaccctga ccgtccgaca gggcctcagg	840
	acggteacca gaacgtgca ctacgtggtg tgcaccatcc cgttcacggt cctgaggacg	900
	ttgggctca ccggcttcca ccaggacaag ctcgacatcg tccagagac caagtaactg	960
	ccggcgacga agatcgcctt ccaactgccg gagcccttct gggagaagga cggcatcagc	1020
	gggggcgcct cctcaccgg cggccatgtc cggcagacct actaccgcc cggcgagggc	1080

gaccccgccc tcggcgcggt cctcctcgcc agctacacca tcggccecga egccgaggcc 1140  
 ctggcccgga tggacgagge cgagcgcgac gccctcgtgg ccaaggaact cagcgtgatg 1200  
 caccccgagt tgcgcaggcc eggcattggtc ctccagtcg cgggcccggga ctggggcgcc 1260  
 egccgatggt cccggggcgc gccaccgtc cgtggggcc aggaggccgc cctccgggag 1320  
 gccgagcgcc gtgagtgcgc acgaccgcag aaggcctgt tcttcgccg cgagcactgc 1380  
 tcgtccaagc oggcctggat cgagggggcc atcgagtccg cgatcgacgc cgcgcacgag 1440  
 atcgagtggt acgagccgcg gccaccgcgc gtcttcgccg cctccgcct cagccgctcg 1500  
 gaccggtcgg cgtga 1515

<210> 5  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

[0009]

<220>  
 <223> VioA-F 引物

<400> 5  
 attctagaca tatgaagcat tcttcgata tctg 34

<210> 6  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> VioA-R 引物

<400> 6  
 aataagcttc gcggcgatgc getg 24

<210> 7  
 <211> 27  
 <212> DNA

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Sta0-N-sense 引物	
	<400> 7	
	tactggagga aacatatgac ggcaccc	27
	<210> 8	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Sta0-N-anti 引物	
	<400> 8	
	caagggtgcc gtcatatgtt tcctcca	27
[0010]	<210> 9	
	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Sta0-C-sense 引物	
	<400> 9	
	gaccggtcgg cgaagctttc ttcgacctg	29
	<210> 10	
	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Sta0-C-anti 引物	
	<400> 10	
	gcaggtcgaa gaaagcttcg ccgaccggt	29

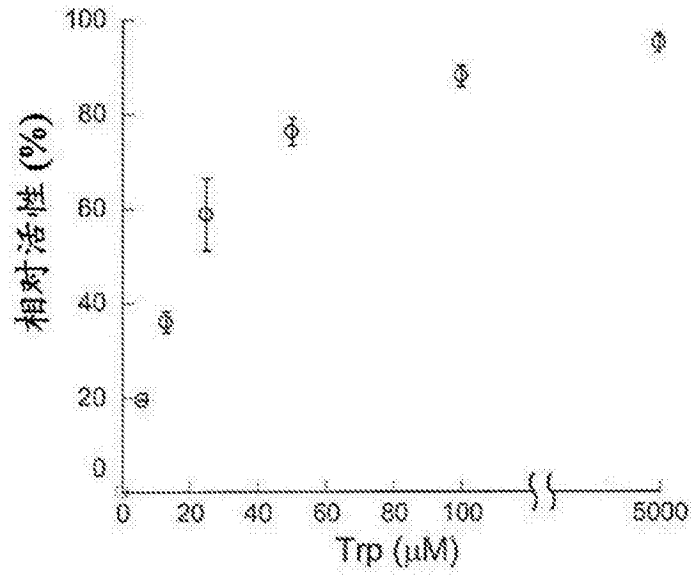


图1

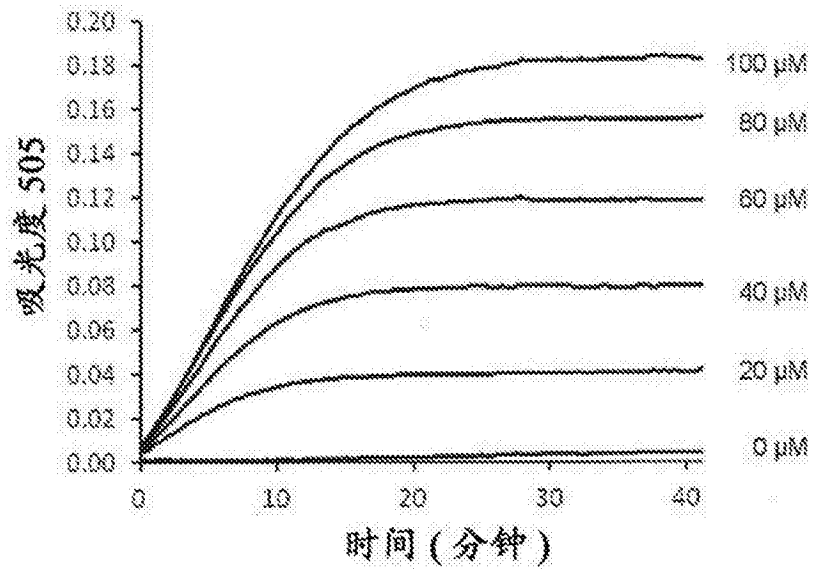


图2

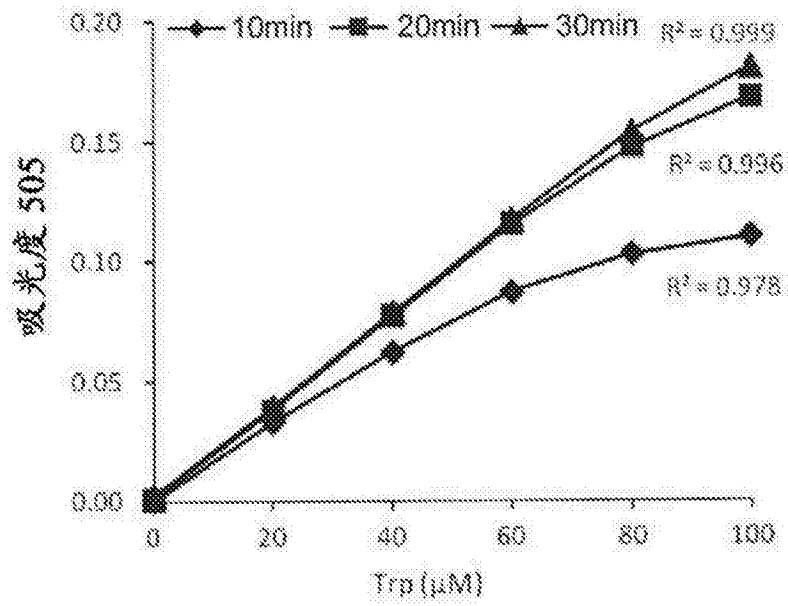


图3

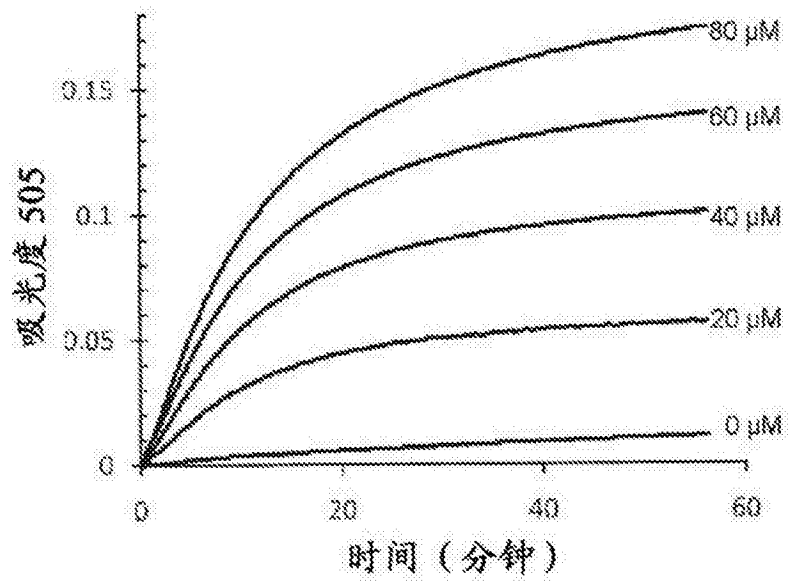


图4

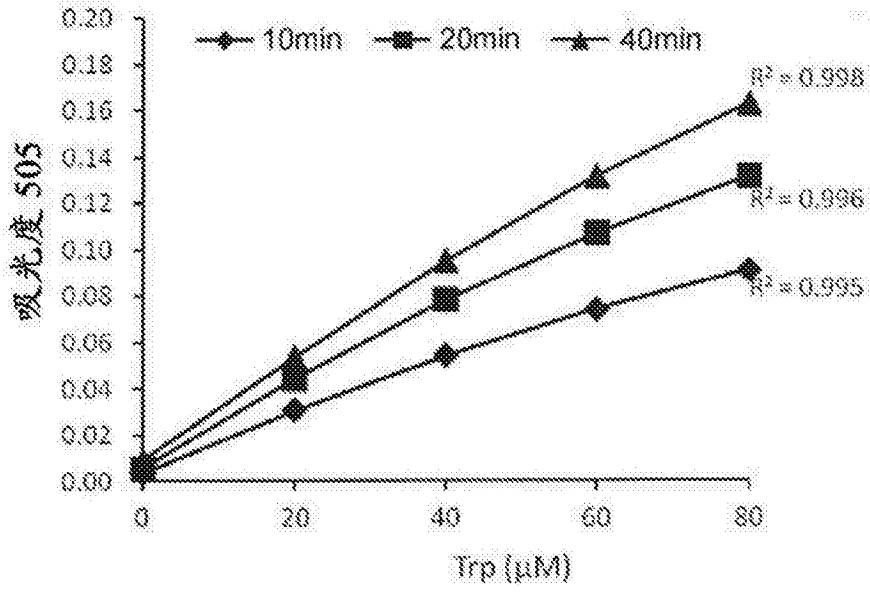


图5

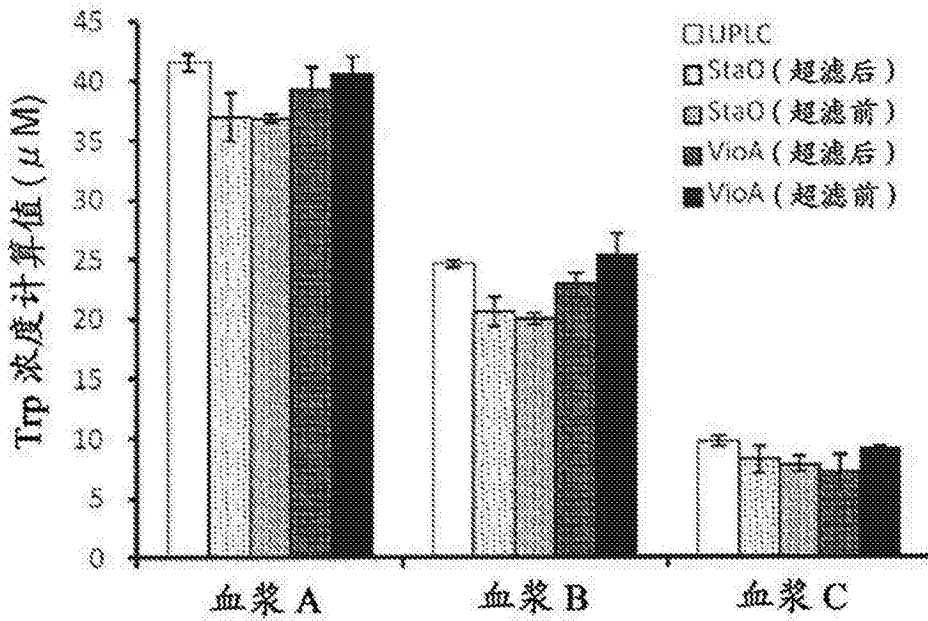


图6



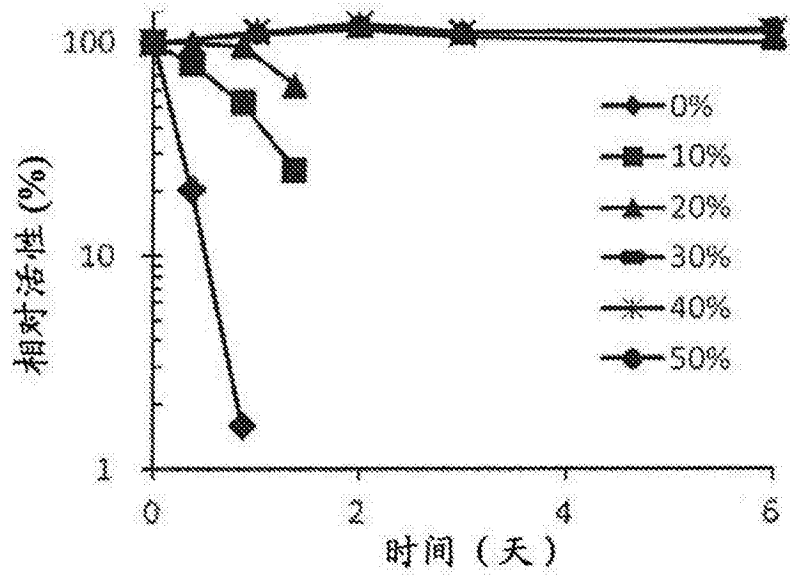


图7

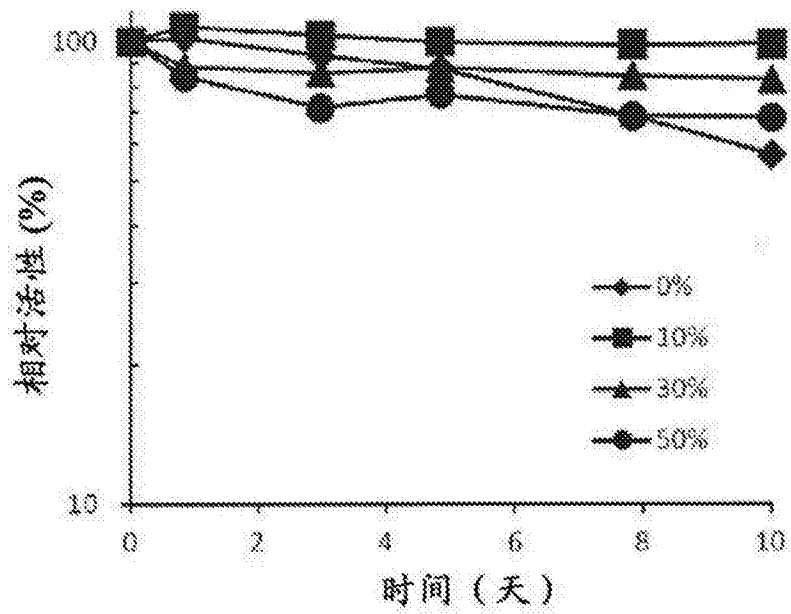


图8

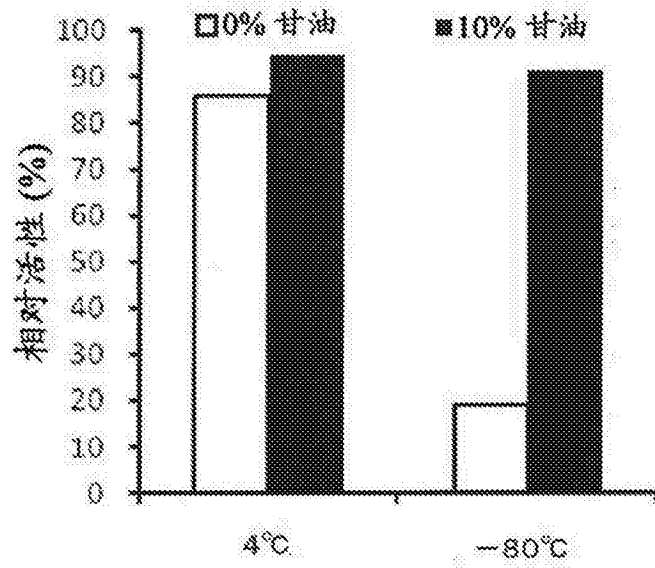


图9