

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 725**

51 Int. Cl.:

G01N 33/579 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2010 PCT/JP2010/054568**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.09.2010 WO10107068**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2010 E 10753559 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2410337**

54 Título: **Método para medir β -glucano, y proteína de unión a β -glucano para su uso en el método**

30 Prioridad:

17.03.2009 JP 2009063780

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.02.2018

73 Titular/es:

**WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.
(100.0%)
1-2, Doshomachi 3-chome Chuo-ku Osaka-shi
Osaka 540-8605, JP**

72 Inventor/es:

YONEDA AKITO

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 655 725 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para medir β -glucano, y proteína de unión a β -glucano para su uso en el método

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un nuevo método para medir β -glucano (en lo sucesivo en el presente documento, abreviado como " β G") usando una nueva proteína de unión a β -glucano y un kit para realizar el método.

Técnica antecedente

10 En las enfermedades micóticas, hay una superficial que se desarrolla sobre la piel y una profundamente arraigada que se desarrolla en el órgano interno, el sistema sanguíneo y el sistema linfático. La enfermedad micótica profundamente arraigada es un tipo de enfermedad infecciosa oportunista con la que los pacientes que pierden su poder de resistencia (estado de inmunodeficiencia) se ven afectados, y conduce a afecciones patológicas extremadamente graves. Un ejemplo representativo de microorganismo causal de la enfermedad micótica profundamente arraigada incluye especies de *Candida* y *Aspergillus*, y dado que el β G está presente comúnmente en las paredes celulares de ambas especies, es útil para determinar el nivel en sangre del β G. En el diagnóstico clínico, la determinación del nivel de β -glucano en plasma o suero se usa para el diagnóstico precoz de una infección fúngica, la determinación del efecto terapéutico y el pronóstico.

15 El β G tiene una estructura de unidad de glucosa repetida unida por un enlace β (1 \rightarrow 3) como una cadena principal, y en algunos casos, tiene una estructura ramificada con un enlace (1 \rightarrow 6) o un enlace (1 \rightarrow 4), y tiene un alto peso molecular de aproximadamente varios miles a millones (a este respecto, sin embargo, la distribución es amplia). Además, el β G tiene una propiedad de unión con el dominio de unión a β G de la subunidad α del factor G que está presente en el extracto de hemocito (lisado de amebocito) del cangrejo herradura.

20 El análisis estructural de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura *Tachypleus* se completa, y su secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos se han descrito en la base de datos NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (Centro Nacional de Información Biotecnológica). Además, también se ha logrado la expresión de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura *Tachypleus* mediante la técnica de ingeniería genética (Bibliografía de patente 3).

25 El factor G es un precursor de serina proteasas, y se activa mediante la unión con β G para iniciar una cascada de proteasas de la serie del factor G. Y el factor G activado activa la enzima de procoagulación en la enzima de coagulación, y finalmente esto da como resultado la formación de gel. En consecuencia, en el campo de la ciencia médica, farmacéutica y microbiológica, los métodos de detección de β G se han desarrollado utilizando esta propiedad del extracto de hemocito de cangrejo herradura.

30 En cuanto al ejemplo representativo del método de detección de β G empleado principalmente en este momento, la prueba de gelificación y el método cinético turbidimétrico mediante el uso de la reacción de gelificación que surge de una solución que contiene extracto de hemocito de cangrejo herradura y β G, así como el método de sustrato sintético del criterio de valoración, el método de sustrato sintético cinético, y similares, están incluidos.

35 Por ejemplo, la determinación de β G mediante el método cinético turbidimétrico se realiza como se indica a continuación. Es decir, un reactivo que contiene extracto de hemocito de cangrejo herradura se mezcla con una muestra que contiene β G, y la mezcla mencionada anteriormente se irradia con luz. Posteriormente, utilizando un instrumento de medición apropiado (por ejemplo, espectrofotómetro, lector de microplacas, etc.), se mide la duración del cambio óptico, tal como cambio en la transmitancia, cambio en la absorbancia, variación en una relación de luz transmitida R_t , variación en el valor logarítmico de la relación de luz transmitida R_t , y similares, requeridos para llegar a un valor predeterminado (tiempo de gelificación, T_g) después del inicio de la irradiación con luz para la mezcla mencionada anteriormente. La concentración de β G en la muestra se determina ajustando el tiempo mencionado anteriormente obtenido con respecto a una curva estándar que indica la relación entre el tiempo de gelificación y la concentración de β G que se ha producido por adelantado usando soluciones de β G de concentraciones conocidas.

40 Los métodos de medición que usan extracto de hemocito de cangrejo herradura como se menciona anteriormente, son un método que permite realizar la medición de una pequeña cantidad de β G en la sangre con alta sensibilidad. Sin embargo, estos métodos, por otro lado, tienen problemas tales como que (1) los resultados de la medición tienden a variar dependiendo del probador porque el método se realiza manualmente; (2) debido a la medición específica del β G en la sangre, es necesario llevar a cabo la inactivación de endotoxinas en la sangre o hacer que los reactivos de ensayo sean insensibles a las endotoxinas; (3) para inactivar los factores interferentes en la sangre que interfieren con la reacción en cascada del cangrejo herradura, es necesario realizar un tratamiento previo de la muestra de ensayo; (4) la medición requiere un tiempo de medición largo (aproximadamente 90 minutos); (5) dado que se utiliza extracto de hemocito de cangrejo herradura, es decir, se usa un material natural (sustancia de origen natural), existe preocupación por el agotamiento de los recursos; (6) dado que se usa extracto de hemocito de cangrejo herradura, es decir, se usa material natural, cuesta mantener la calidad del material estable, etc.

Y así, para resolver los problemas descritos anteriormente en los métodos de medición que utilizan la cascada de proteasas, se han desarrollado algunos nuevos métodos de medición adicionales.

5 Por ejemplo, hay un método en el que una proteína que consiste únicamente en el dominio de unión a β G de la subunidad α del factor G se prepara mediante tecnología de ingeniería genética y se marca de forma fluorescente, y usando una molécula de la proteína recombinante marcada de forma fluorescente en lugar de usar extracto de hemocito de cangrejo herradura que es un material natural, se mide el β G mediante la técnica de polarización de fluorescencia (Bibliografía de patente 1). Sin embargo, la sensibilidad de detección de este método es de aproximadamente varios ng/ml al más alto del valor reducido de paquimano (un tipo de β G), y es insuficiente para aplicar el método a los ensayos de laboratorio clínico.

10 Además, se ha indicado un método de medición basado en la técnica Biacore que usa un chip sensor (Bibliografía no perteneciente a patente 1), un método para medir β G usando una proteína de unión a β G que tiene una propiedad de unirse específicamente a β G y una propiedad de inhibir la activación del factor G de cangrejo herradura, y un anticuerpo contra la proteína de unión a β G que está marcado con una sustancia marcadora (Bibliografía de patente 2). Se describe en la Bibliografía de patente 2 que la proteína de unión a β G puede producirse mediante tecnología de ingeniería genética.

15 Aunque el método que usa un chip sensor mide principalmente la afinidad entre la proteína de unión a β G y β G, dado que la medición es cualitativa y la operación es engorrosa, sigue habiendo un problema al aplicar este método al campo de las pruebas de laboratorio.

20 Además, dado que la proteína de unión a β G utilizada en el método que usa proteína de unión a β G que tiene la propiedad de inhibir la activación del factor G de cangrejo herradura y un anticuerpo contra la proteína de unión a β G que está marcado con una sustancia marcadora es un producto natural, existe el problema de que puede haber una gran diferencia. Además, aún no se ha estudiado si este método puede aplicarse al campo de las pruebas de laboratorio. Además, este método tiene un problema de sensibilidad.

25 Aún adicionalmente, también se conoce una invención que se refiere a "Un kit para detectar hongos, que comprende un dominio o una pluralidad de dominios derivados de un dominio Z1 y/o un dominio Z2 de una subunidad α del factor G Xln para cangrejo herradura, cuyo residuo de cisteína se reemplaza por otro aminoácido, y que comprende una proteína recombinante capaz de unirse a β -1, 3-glucano" (Bibliografía de patente 4).

30 Este método es un método para detectar hongos poniendo en contacto un tipo de proteína recombinante que tiene la propiedad descrita anteriormente con una muestra que comprende hongos. Sin embargo, no se ha estudiado un método para medir β G usando la proteína mencionada anteriormente (incluyendo el método sándwich).

Usando dos moléculas de Dectina 1 que se conoce como un receptor de β G, también se conoce un método para medir β G mediante ELISA, y similares (Bibliografía no perteneciente a patente 2). Sin embargo, este método tampoco ha alcanzado el nivel de sensibilidad requerido para las pruebas de laboratorio.

35 Además, entre las bacterias tales como la bacteria celulolítica de *Fibrobacter succinogenes*, se conoce una que posee proteína de unión a celulosa. Una región en la proteína de unión a celulosa donde la proteína se une a la celulosa se denomina dominio de unión a celulosa (CBD). El CBD se clasifica además en varias subfamilias (CBD I a X) según la característica de una secuencia de aminoácidos (Advances in Microbial Physiology, vol.37, pág. 1-81, 1995). En los CBD, hay unos que tienen un dominio de tipo xilanasa Z que tiene la propiedad de unirse a β G. Sin embargo, no necesariamente todos los CBD tienen el dominio tipo xilanasa Z. Además, la celulosa, que es una diana de unión por CBD es (1 \rightarrow 4)- β -D-glucano, sin embargo, el β G en plasma, que es un objeto de medición en ensayos clínicos, es (1 \rightarrow 3)- β -D-glucano. Por lo tanto, no se ha aclarado si el CBD puede utilizarse para medir β G en el campo de las pruebas clínicas, incluso si el que tiene el dominio tipo xilanasa Z está presente en el CBD.

40 Como se ha descrito anteriormente, todos estos métodos tenían diversos problemas cuando se pretendía que β G se midiera específicamente, y particularmente, para utilizar el método para pruebas clínicas.

45 **Lista de referencias**

BIBLIOGRAFÍA DE PATENTES

Bibliografía de patente 1: JP-A-2003-155298;

Bibliografía de patente 2: JP-B-3793573;

Bibliografía de patente 3: JP-B-3781771;

50 Bibliografía de patente 4: JP-A-2009-47588.

BIBLIOGRAFÍA NO PERTENECIENTE A PATENTES

Bibliografía no perteneciente a patente 1: Takaki Y. et al., J. Biol. Chem., 2002, vol. 277, pág.14281-14287;

Bibliografía no perteneciente a patente 2: Graham L. M. et. al., J. Immunol. Methods, 2006, vol. 314(1-2), pág.164-169.

Resumen de la invención

PROBLEMA A RESOLVER POR LA INVENCION

5 La presente invención se realizó en vista de la situación descrita anteriormente, y un objeto de la presente invención es proporcionar un método para medir β G que tiene una sensibilidad y especificidad equivalentes al reactivo convencional con la utilización de la cascada de proteasa, y ha resuelto los diversos problemas descritos anteriormente.

MEDIOS PARA RESOLVER EL PROBLEMA

10 La presente invención se realiza con el fin de resolver los problemas descritos anteriormente, y comprende las siguientes constituciones.

(1) Un método para medir β -glucano (en lo sucesivo en el presente documento, abreviado como " β G"), que comprende:

15 (i) poner en contacto una muestra con una proteína 1 que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, o SEQ ID NO: 20, o una secuencia de aminoácidos que es un 95 % o más homóloga con la secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, o SEQ ID NO: 20, y que tiene una activación de unión a β -glucano (en lo sucesivo en el presente documento, abreviado como "proteína de unión a β G 1"), y también una proteína 2 que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, o SEQ ID NO: 20, o una secuencia de aminoácidos que es un 95 % o más homóloga con la secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, o SEQ ID NO: 20, y que tiene una actividad de unión a β -glucano (en lo sucesivo en el presente documento, abreviado como "proteína de unión a β G 2"), para formar un complejo de la proteína de unión a β G 1, β G en la muestra y la proteína de unión a β G 2;

(ii) medir la cantidad del complejo mencionado anteriormente; y

(iii) determinar la concentración de β G en la muestra en función de la cantidad del complejo obtenido.

20 (2) Un kit para medir β -glucano que comprende los siguientes como constituyentes. Un kit para medir β -glucano que comprende los siguientes como constituyentes:

25 (i) un reactivo que contiene una proteína de unión a β G 1 que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, o SEQ ID NO: 20, o una secuencia de aminoácidos que es un 95 % o más homóloga con la secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, o SEQ ID NO: 20, y que tiene una actividad de unión a β -glucano, y

30 (ii) un reactivo que contiene una proteína de unión a β G 2 marcada con una sustancia de marcado que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, o SEQ ID NO: 20, o una secuencia de aminoácidos que tiene un 95 % o más de homología con la secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, o SEQ ID NO: 20, y que tiene una actividad de unión a β -glucano, en donde

(A) la proteína de unión a β G 1 y la proteína de unión a β G 2 tienen una secuencia de aminoácidos diferente, respectivamente,

35 (B) la proteína de unión a β G 1 está inmovilizada en un vehículo insoluble, y

la proteína de unión a β G 2 no está inmovilizada en un vehículo insoluble,

(C) la proteína de unión a β G 1 no está marcada, y

la proteína de unión a β G 2 se marca con una sustancia marcadora, o

(D) la proteína de unión a β G 1 está inmovilizada en un vehículo insoluble y está sin marcar, y

40 la proteína de unión a β G 2 está marcada con una secuencia de marcado.

(3) Una proteína que tiene una actividad de unión a β -glucano seleccionada de los siguientes puntos (i) o (ii);

(i) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ, o una secuencia de aminoácidos que tiene 95 % o más de homología con la secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, o

(ii) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:14 o la SEQ ID NO:20.

(4) Una molécula de ácido nucleico

(i) que comprende una secuencia de nucleótidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9; o una secuencia de nucleótidos que tiene un 95 % o más de homología con la secuencia de nucleótidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9,

(ii) que consiste en una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO:13 o la SEQ ID NO:19, o

(iii) que codifica una proteína descrita en el punto (3) anterior.

(5) Una construcción recombinante que incorpora en la misma la molécula de ácido nucleico descrita en el punto (4) anterior.

(6) Un transformante o un transductor, que se transforma o se transduce por la construcción recombinante descrita en el punto (5) anterior.

(7) Un proceso para producir una proteína descrita en el punto (3) anterior, caracterizado por que el transformante o el transductor del punto (6) descrito anteriormente se cultiva, y la proteína se separa del cultivo resultante.

El presente inventor consideró, en el transcurso del extenso estudio con el fin de resolver los problemas descritos anteriormente, que, tomando nota del dominio de unión a β G que estaba presente en la subunidad α del factor G de cangrejo herradura, y que era un dímero, podría ser posible medir el β G usando el fragmento de la subunidad α que comprende esta estructura de dominio. Además, el presente inventor también consideró que dicho fragmento de subunidad α podría obtenerse como un producto recombinante (proteína recombinante) mediante técnica de ingeniería genética, y estudiarse más a fondo, y como consecuencia, se estableció un sistema de medición de β G basado en el método sándwich que usa el fragmento de la subunidad α mencionada anteriormente. Es decir, se encontró que un fragmento adecuado para la medición de β G está presente en los fragmentos de la subunidad α con una secuencia de aminoácidos particular y que tiene al menos una estructura monomérica del dominio de unión a β G, y, además, se estableció un sistema de medición de β G basado en el método sándwich usando dos moléculas de estos fragmentos de la subunidad α , y así se completó la presente invención.

Efecto de la invención

La presente invención se dirige a proporcionar un método para medir β G usando dos moléculas de proteína de unión a β G que tiene una secuencia de aminoácidos específica y un reactivo y un kit para su uso en la medición, así como una proteína de unión a β G recombinante, que posee una secuencia de aminoácidos específica y un método de producción de la misma. De acuerdo con el método para medir β G de la presente invención, β G puede medirse con alta sensibilidad aún con especificidad en comparación con los métodos convencionales. Además, incluso si se trata de un caso en el que se mide β G en una muestra que contiene proteasa, no es necesario realizar el pretratamiento para desactivar la proteasa en la muestra con antelación. Además, debido a su alta sensibilidad, el método puede producir tal efecto que puede emplearse también para pruebas de laboratorio.

Además, dado que no es necesario usar material natural si el método de medición de la presente invención se realiza usando proteína recombinante de la presente invención, no hay diferencia de lote del reactivo a utilizar, y se realizará el efecto de que la medición específica de β G se puede realizar de forma estable en la sensibilidad de medición alta.

Aún adicionalmente, el método de medición de la presente invención puede aplicarse no solo a procedimientos manuales, sino también a la medición que emplea analizadores automáticos.

Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] La Figura 1 muestra un diagrama esquemático de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) y fragmentos de la misma. El panel superior de la Figura 1 muestra el diagrama esquemático de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*). El panel inferior de la Figura 1 muestra el diagrama esquemático de los fragmentos derivados de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*), y las posiciones del aminoácido N-terminal y C-terminal de cada fragmento en la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*), respectivamente.

5 [Figura 2] La Figura 2 muestra un diagrama esquemático de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Tachypleus tridentatus*) y fragmentos de la misma. El panel superior de la Figura 2 muestra el diagrama esquemático de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Tachypleus tridentatus*). El panel inferior de la Figura 2 muestra el diagrama esquemático de los fragmentos derivados de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Tachypleus tridentatus*), y las posiciones del aminoácido N-terminal y C-terminal de cada fragmento en la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Tachypleus tridentatus*), respectivamente.

10 [Figura 3] La Figura 3 muestra los resultados de la expresión proteica del fragmento a (233-649 aa) derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* obtenida en el Ejemplo 1. (a) muestra los resultados de la transferencia Western, (b) muestra los resultados de la tinción con plata del gel después de SDS-PAGE, respectivamente. Además, en la Figura 3 (a) y la Figura 3 (b), se usaron el carril (1) y el carril (2) que muestran los resultados de los marcadores de peso molecular de proteína y el fragmento a purificado por afinidad a como muestra, respectivamente.

15 [Figura 4] La Figura 4 es una curva estándar obtenida en el Ejemplo 5, que muestra la relación entre la concentración de lentinano (valor reducido) en una muestra y la absorbancia a 450 nm de la muestra. Las barras de error indican el valor de 2 DE.

[Figura 5] La Figura 5 muestra los resultados de la medición de la actividad de peroxidasa en cada concentración del fragmento a derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* y el fragmento b derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*, obtenidos en el Ejemplo 6.

20 [Figura 6] La Figura 6 muestra los resultados de la medición en presencia o ausencia de un agente quelante de metal para determinar la actividad de peroxidasa del fragmento a derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*, obtenidos en el Ejemplo 7.

[Figura 7] La Figura 7 muestra el diseño del chip capilar usado en el Ejemplo 8.

25 [Figura 8] La Figura 8 muestra una curva estándar obtenida en el Ejemplo 6, que muestra la relación entre la concentración de lentinano (valor reducido) en una muestra y el valor de integración de tiempo de la intensidad de fluorescencia del complejo. Las barras de error indican el valor de 2 DE.

[Figura 9] La Figura 9 muestra una correlación entre las concentraciones de β G obtenidas mediante el método sándwich de la presente invención y las concentraciones de β G obtenidas mediante el método de medición convencional que emplea extracto de hemocito de cangrejo herradura, que se obtuvo en el Ejemplo 10.

30 [Figura 10] La Figura 10 muestra una relación entre la concentración de lentinano (valor reducido) en una muestra y la intensidad de luminiscencia (cps: recuento por segundo), que se obtuvo en el Ejemplo 11. Las barras de error indican el valor de 1 DE.

Realizaciones para realizar la invención

35 El β G implicado en la presente invención no está particularmente limitado, siempre que sea un polisacárido que comprenda β G como constituyente. Por ejemplo, se incluyen los que tienen la propiedad de desencadenar una reacción enzimática del extracto de hemocito de cangrejo herradura. Específicamente, por ejemplo, se incluyen polisacáridos naturales obtenidos de la pared celular, y similares, de diversas bacterias (por ejemplo, el género *Alcaligenes*, *Agrobacterium*, y similares), levadura (por ejemplo, el género *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Rhodotorula*, y similares), hongos (genus *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Trichophyton*, *Sporothrix*, *Phialophora*, y similares), hongos del rayo (género *Actinomyces*, *Nocardia*, y similares), y champiñones (por ejemplo, *Lentinula edodes*, *Schizophyllum commune*, *Trametes versicolor*, y similares), más específicamente, por ejemplo, curdlan, paquimano, esclerotano, lentinano, esquizofilano, coriolano, y similares, o un glucano de almacenamiento de algas (por ejemplo, algas pardas, euglena, diatomeas, y similares), y aún específicamente, por ejemplo, laminarano, paramilo y similares.

45 La "Proteína 1 que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, o SEQ ID NO: 20, o una secuencia de aminoácidos que tiene 95 % o más de homología con la secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, o SEQ ID NO: 20, y que tiene una actividad de unión a β -glucano" (proteína de unión a β G 1) y la "proteína 2 que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, o SEQ ID NO: 20, o una secuencia de aminoácidos que tiene 95 % o más de homología con la secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, o SEQ ID NO: 20, y que tiene una actividad de unión a β -glucano" (proteína de unión a β G 2) pueden ser iguales a o diferentes entre sí, y estas pueden ser una proteína sintética.

55 Además, la "proteína de unión a β G 1" y la "proteína de unión a β G 2" a veces se ponen juntas y se describen como "proteína de unión a β G implicada en la presente invención" o simplemente "proteína de unión a β G", en lo sucesivo.

La "proteína de unión a β G 1" y la "proteína de unión a β G 2" son las únicas derivadas de la subunidad α del factor G del hemocito de cangrejo herradura.

La secuencia de aminoácidos de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) se aclaró por el presente inventor. Comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 constituida por aproximadamente 649 aminoácidos, y codificada por una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, y existe un dominio de tipo β -1,3-glucanasa en el lado N-terminal, dominio dimérico de tipo xilanasa Z (XlnZ) que se presume que es el dominio de unión a β G en el lado C-terminal, y un dominio de tipo xilanasa A en el centro de la secuencia. En el dominio de tipo xilanasa A, hay dos repeticiones del motivo QQWS (Gln-Gln-Trp-Ser) que son un motivo estructural.

Además, basándose en el conocimiento de la secuencia de aminoácidos de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) obtenida por el presente inventor, se diseñaron cuatro tipos de fragmentos de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*), cada uno de los cuales comprende el dominio de tipo xilanasa Z (XlnZ) que se supone que es un dominio de unión a β G en la estructura. Es decir, estos son:

* fragmento a de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) (en lo sucesivo, indicado a veces simplemente como "fragmento a");

* fragmento b de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) (en lo sucesivo, indicado a veces simplemente como "fragmento b");

* fragmento c de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) (en lo sucesivo, indicado a veces simplemente como "fragmento c"); y

* fragmento d de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) (en lo sucesivo, indicado a veces simplemente como "fragmento d").

El diagrama esquemático de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) que se aclaró por el presente inventor se muestra en el panel superior de la Figura 1. Además, el diagrama esquemático de los fragmentos derivados de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*), y las posiciones del aminoácido N-terminal y C-terminal de cada fragmento en la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) se muestran colectivamente en el panel inferior de la Figura 1.

La estructura, etc. de cada fragmento, se explica a continuación.

El fragmento a consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 que se codifica por una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3. Corresponde a la parte de la secuencia de aminoácidos del 233 al 649 de N-terminal de la secuencia de aminoácidos de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) mostrada en la SEQ ID NO: 2. Tiene un dominio tipo xilanasa A (existen dos motivos QQWS) y un dominio dimérico tipo xilanasa Z (XlnZ).

El fragmento b consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 que se codifica por una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5. Corresponde a la parte de la secuencia de aminoácidos del 387 al 649 de N-terminal de la secuencia de aminoácidos de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) mostrada en la SEQ ID NO: 2. Tiene un dominio dimérico de tipo xilanasa Z (XlnZ).

El fragmento c consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 8 que se codifica por una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7. Corresponde a la parte de la secuencia de aminoácidos del 524 al 649 de N-terminal de la secuencia de aminoácidos de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) mostrada en la SEQ ID NO: 2. Tiene un dominio de tipo xilanasa Z en el lado C-terminal del dominio dimérico de tipo xilanasa Z (XlnZ).

El fragmento d consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 10 que se codifica por una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 9. Corresponde a la parte de la secuencia de aminoácidos del 233 al 515 de N-terminal de la secuencia de aminoácidos de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) mostrada en la SEQ ID NO: 2. Tiene un dominio de tipo xilanasa A (existen dos motivos QQWS) y un dominio de tipo xilanasa Z en el lado N-terminal del dominio dimérico de tipo xilanasa Z (XlnZ).

Por otro lado, se completa el análisis estructural de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Tachypleus tridentatus*) y la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos se describen en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Comprende un péptido señal que consiste en 19 aminoácidos y una secuencia de aminoácidos que consiste en 673 aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO: 12 y que se codifica por una secuencia de nucleótidos mostrada en el presente documento por la SEQ ID NO: 11. Existe un dominio de tipo β -1,3-glucanasa en el lado N-terminal, dominio dimérico de tipo xilanasa Z (XlnZ) que se presume que es el dominio de unión a β G en el lado C-terminal, y un dominio de tipo xilanasa A en el centro de la secuencia. En el dominio de tipo xilanasa A, hay una repetición de tres veces del motivo QQWS (Gln-Gln-Trp-Ser) que son un motivo

estructural. Además, el ADN que codifica el polipéptido de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Tachypleus tridentatus*) se describe en el documento JP-B-3781771 (Bibliografía de patente 3). El polipéptido mencionado anteriormente consiste en 654 aminoácidos, y carece de la parte del péptido señal de la secuencia de aminoácidos descrita en la base de datos NCBI.

5 Además, el presente inventor diseñó cuatro tipos del fragmento de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Tachypleus tridentatus*), cada uno de los cuales comprende el dominio de tipo xilanasas Z (XlnZ) que se supone que es un dominio de unión a β G en la estructura de la misma manera que en el diseño de los fragmentos de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*). Es decir, estos son:

10 * fragmento e de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Tachypleus tridentatus*) (en lo sucesivo, indicado a veces simplemente como "fragmento e");

* fragmento f de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Tachypleus tridentatus*) (en lo sucesivo, indicado a veces simplemente como "fragmento f");

* fragmento g de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Tachypleus tridentatus*) (en lo sucesivo, indicado a veces simplemente como "fragmento g");

15 * fragmento h de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Tachypleus tridentatus*) (en lo sucesivo, indicado a veces simplemente como "fragmento h").

20 El diagrama esquemático de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Tachypleus tridentatus*) se muestra en el panel superior de la Figura 2. Además, el diagrama esquemático de los fragmentos derivados de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Tachypleus tridentatus*), y las posiciones de aminoácido N-terminal y C-terminal de cada fragmento en la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Tachypleus tridentatus*) se muestran en conjunto en el panel inferior de la Figura 2. Entre estos, el fragmento e y el fragmento h están diseñados por primera vez por el presente inventor. Por el contrario, el fragmento f y el fragmento g se conocen bien, y existe un caso, por ejemplo, en el que la medición de β G se realizó usándolos marcados con sustancia marcadora. Sin embargo, no se conoce la medición de β G mediante el método sándwich usando dos moléculas de estos fragmentos o dos moléculas de este fragmento y otro fragmento.

25 La estructura, y similares de cada fragmento, se explica a continuación.

30 El fragmento e consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 14 que se codifica por una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 13. Corresponde a la parte de la secuencia de aminoácidos del 268 al 673 de N-terminal de la secuencia de aminoácidos de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Tachypleus tridentatus*) mostrada en la SEQ ID NO: 12. Tiene un dominio de tipo xilanasas A (existen tres motivos QQWS) y un dominio dimérico de tipo xilanasas Z (XlnZ).

35 El fragmento f consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 16 que se codifica por una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 15. Corresponde a la parte de la secuencia de aminoácidos del 410 al 673 de N-terminal de la secuencia de aminoácidos de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Tachypleus tridentatus*) mostrada en la SEQ ID NO: 12. Tiene un dominio dimérico de tipo xilanasas Z (XlnZ).

40 El fragmento g consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 18 que se codifica por una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 17. Corresponde a la parte de la secuencia de aminoácidos del 548 al 673 de N-terminal de la secuencia de aminoácidos de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Tachypleus tridentatus*) que se muestra en la SEQ ID NO: 12. Tiene un dominio de tipo xilanasas Z en el lado C-terminal del dominio dimérico de tipo xilanasas Z (XlnZ).

45 El fragmento h consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 20 que se codifica por una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 19. Corresponde a la parte de la secuencia de aminoácidos del 268 al 547 de N-terminal de la secuencia de aminoácidos de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Tachypleus tridentatus*) mostrada en la SEQ ID NO: 12. Tiene un dominio de tipo xilanasas A (existen tres motivos QQWS) y un dominio de tipo xilanasas Z en el lado N-terminal del dominio dimérico de tipo xilanasas Z (XlnZ).

La SEQ ID NO de la secuencia de aminoácidos y la SEQ ID NO de la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) y los fragmentos de la misma, así como de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Tachypleus tridentatus*) y los fragmentos de la misma, se muestran conjuntamente en la siguiente Tabla 1.

50

[Tabla 1]

SEQ ID NO de la secuencia de nucleótidos	SEQ ID NO de la secuencia de aminoácidos	Tipo de fragmento de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura
1	2	Subunidad α del factor G de <i>Limulus polyphemus</i>
3	4	Fragmento a derivado de la subunidad α del factor G de <i>Limulus polyphemus</i>
5	6	Fragmento b derivado de la subunidad α del factor G de <i>Limulus polyphemus</i>
7	8	Fragmento c derivado de la subunidad α del factor G de <i>Limulus polyphemus</i>
9	10	Fragmento d derivado de la subunidad α del factor G de <i>Limulus polyphemus</i>
11	12	Subunidad α del factor G de <i>Tachypleus tridentatus</i>
13	14	Fragmento e derivado de la subunidad α del factor G de <i>Tachypleus tridentatus</i>
15	16	Fragmento f derivado de la subunidad α del factor G de <i>Tachypleus tridentatus</i>
17	18	Fragmento g derivado de la subunidad α del factor G de <i>Tachypleus tridentatus</i>
19	20	Fragmento h derivado de la subunidad α del factor G de <i>Tachypleus tridentatus</i>

5 La "proteína que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, o SEQ ID NO: 20, y que tiene la actividad de unión a β -glucano" que se usa en el método de medición de la presente invención es, corresponde a, la subunidad α G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) o los fragmentos respectivos de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Tachypleus tridentatus*).

10 Además, la "secuencia de aminoácidos que tiene un 95 % o más de homología con la secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, o SEQ ID NO: 20" usada en el método de medición de la presente invención

15 es, por ejemplo, una proteína en la que de 1 a 5 (preferiblemente, de 1 a 3) aminoácidos se reemplazan o se eliminan en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, o SEQ ID NO: 20, o de 1 a 5 (preferiblemente, de 1 a 3) aminoácidos se insertan o se añaden a la secuencia de aminoácidos mencionados anteriormente, y que tiene la actividad de unión a β -glucano. La posición que da la sustitución, delección, inserción, adición y similares a la secuencia de aminoácidos que constituye la proteína mencionada anteriormente es opcional siempre que la afinidad de la proteína por β G no se vea afectada por la misma.

20 Además, la sustitución, delección, inserción y adición pueden tener lugar en múltiples puntos de una única secuencia de aminoácidos, siempre que la afinidad de la proteína mencionada anteriormente por β G no se vea afectada por la misma.

25 Los ejemplos preferidos de la proteína de unión a β G 1 y la proteína de unión a β G 2 que se usarán para el método de medición de la presente invención incluyen el fragmento a, el fragmento b, el fragmento c, el fragmento d, el fragmento e, el fragmento f, el fragmento g, y el fragmento h implicados en la presente invención. Considerando la facilidad de adquisición del producto recombinante, el fragmento a, el fragmento b, el fragmento e y el fragmento f son particularmente preferibles.

Además, en el caso en el que una proteína de unión a β G implicada en la presente invención se marca con una sustancia marcadora y la proteína de unión a β G marcada se usa para la medición de β G, la siguiente proteína de unión a β G es más preferible. Es decir, es mejor que la proteína de unión β G tenga una longitud suficiente (el número de aminoácidos) entre el sitio de la sustancia marcadora que se une y el sitio de unión a β G en la proteína

de unión a β G, de manera que la unión de la proteína de unión a β G a β G no se vea interferida por la sustancia marcadora. Además, cuando la proteína de unión a β G se usa para el método sándwich, la distancia más larga (mayor cantidad de aminoácidos) también puede proporcionar una mayor sensibilidad de medición. Teniendo en cuenta el punto anterior, en cuanto a la proteína de unión a β G implicada en la presente invención, son preferibles el fragmento a, el fragmento b, el fragmento e y el fragmento f, y el fragmento a o el fragmento b son particularmente preferibles.

Además, aunque la proteína de unión a β G usada para el método de medición de β G descrito anteriormente de la presente invención no tiene un dominio tipo β -glucanasa de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura, el uso de esta proteína de unión a β G para el método de medición de β G proporciona las siguientes ventajas.

Es decir, como se ha descrito anteriormente, dado que el extracto de hemocito de cangrejo herradura es un producto natural, incluso si el extracto de hemocito de cangrejo herradura, o el factor G, la subunidad α del factor G o el aislado similar de los mismos está destinado a usarse para la medición de β G, la diferencia de lote tiende a aparecer. Además, como es un producto natural, no se puede negar que existe un riesgo de suministro inestable en el futuro. Por lo tanto, si se obtiene el producto recombinante que posee actividad de unión al β G, tal problema también puede resolverse.

Y así, los presentes inventores han estudiado extensamente cómo obtener una proteína recombinante que posea actividad de unión al β G. Como resultado, aunque la razón no se ha aclarado, una proteína de unión a β G que carece del dominio tipo glucanasa de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura puede expresarse de manera eficaz, particularmente cuando la proteína se expresa usando *E. coli* como huésped.

Como se describirá más adelante, la proteína de unión a β G que se usará para el método de medición de β G de la presente invención puede, por supuesto, expresarse también cuando se usa célula de mamífero, célula de insecto, o similar como célula huésped. Sin embargo, por ejemplo, cuando se usa levadura como célula huésped, será necesario un proceso adicional para eliminar la proteína de unión a β G de origen de levadura de la proteína expresada, porque la célula de levadura tiene proteína de unión a β G endógenamente. Además, cuando se usa una célula de insecto como huésped, existe el problema de que la proteína expresada secretada puede estar contaminada con albúmina sérica bovina contenida en el medio con el que se cultivan las células de insecto.

Sin embargo, dado que la célula de *E. coli* no tiene β G, no hay riesgo de que la proteína expresada por *E. coli* esté contaminada con β G endógeno. Además, como se sabe bien, *E. coli* tiene dichas ventajas en comparación con otras células, ya que es fácil de manipular; es fácil de propagar; la tasa de crecimiento es rápida; el coste de manipulación es barato; y no se requiere una instalación de cultivo especial. Por lo tanto, si se usa *E. coli* como huésped, existe la ventaja de que la proteína recombinante puede fabricarse de manera rápida, estable y a bajo coste.

Por lo tanto, la proteína de unión a β G implicada en la presente solicitud que carece del dominio tipo glucanasa de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura también es excelente ya que puede expresarse cuando se usa *E. coli* como huésped.

El método para medir β G de la presente invención se logra mediante los siguientes procedimientos:

(1) una muestra se hace reaccionar con la proteína de unión a β G 1 y la proteína de unión a β G 2 para formar un complejo de la proteína de unión a β G 1, β G en una muestra y la proteína de unión a β G 2;

(2) se mide la cantidad del complejo anteriormente mencionado; y

(3) la concentración de β G en la muestra se determina basándose en la cantidad del complejo obtenido.

El principio del método de medición implicado en la presente invención es la denominada técnica sándwich en la que la medición se realiza usando la proteína de unión a β G 1 y la proteína de unión a β G 2.

Por ejemplo, es la técnica sándwich realizada en el método de inmunocromatografía habitual, un método de látex, y un método de inmunoensayo enzimático (método EIA), y es el método que usa la proteína de unión a β G 1 y la proteína de unión a β G 2 en lugar del anticuerpo o el antígeno. Además, la aplicación a Micro-TAS (sistemas de análisis Micro-Total: μ -TAS) también es posible.

El complejo formado puede medirse mediante un método heterogéneo en el que la separación de BF se realiza usando un vehículo insoluble o similar, o mediante un método homogéneo en el que no se realiza la separación de BF.

En lo sucesivo, se describirán ejemplos de realización de la presente invención. Debe observarse que después de las operaciones respectivas, se puede realizar una operación para eliminar la sustancia no deseada (lavado o similar), si es necesario.

I-1. Método que usa proteína de unión a β G libre (1):

(i) una muestra se pone en contacto con la proteína de unión a β G 1 libre (no inmovilizada en un vehículo insoluble) y la proteína de unión a β G 2 libre (no inmovilizada en un vehículo insoluble), para formar un complejo de la proteína de unión a β G 1, β G en la muestra y la proteína de unión a β G 2;

(ii) se mide la cantidad del complejo mencionado anteriormente; y

5 (iii) la concentración de β G en la muestra se determina basándose en la cantidad del complejo obtenido.

I-2. Método que usa proteína de unión a β G libre (2):

(i) una muestra se pone en contacto con la proteína de unión a β G 1 libre (no inmovilizada en un vehículo insoluble) para formar un complejo 1 de β G en la muestra y la proteína de unión a β G 1; después

10 (ii) el complejo 1 mencionado anteriormente se pone en contacto con la proteína de unión a β G 2 libre (no inmovilizada en un vehículo insoluble) para formar un complejo 2 de la proteína de unión a β G 1, β G en la muestra y la proteína de unión a β G 2; después

(iii) se mide la cantidad del complejo 2 mencionado anteriormente; y

(iv) la concentración de β G en la muestra se determina basándose en la cantidad del complejo 2 obtenido mencionado anteriormente.

15 II-1. Método que usa una proteína de unión a β G 1 inmovilizada en un vehículo insoluble y una proteína de unión a β G 2 no marcada libre (1):

(i) una muestra se pone en contacto con una proteína de unión a β G 1 inmovilizada en un vehículo insoluble y una proteína de unión a β G 2 no marcada libre, para formar un complejo de la proteína de unión a β G 1 inmovilizada en un vehículo insoluble, β G en la muestra y la proteína de unión a β G 2 no marcada;

20 (ii) se mide la cantidad del complejo mencionado anteriormente; y

(iii) la concentración de β G en la muestra se determina basándose en la cantidad del complejo obtenido mencionado anteriormente.

II-2. Método que usa una proteína de unión a β G 1 inmovilizada en un vehículo insoluble y una proteína de unión a β G 2 no marcada libre (2):

25 (i) una muestra se pone en contacto con una proteína de unión a β G 1 inmovilizada en un vehículo insoluble para formar un complejo 1 de la proteína de unión a β G 1 inmovilizada en un vehículo insoluble y β G en la muestra; después

(ii) el complejo 1 mencionado anteriormente se pone en contacto con una proteína de unión a β G 2 no marcada libre, para formar un complejo 2 del complejo 1 y la proteína de unión a β G 2 no marcada; después

30 (iii) se mide la cantidad del complejo 2 mencionado anteriormente; y

(iv) la concentración de β G en la muestra se determina basándose en la cantidad del complejo 2 mencionado anteriormente.

III-1. Método que usa una proteína de unión a β G 1 libre y una proteína de unión a β G 2 libre marcada con una sustancia marcadora (1):

35 (i) una muestra se pone en contacto con una proteína de unión a β G 1 libre y una proteína de unión a β G 2 libre marcada con una sustancia marcadora, para formar un complejo de la proteína de unión a β G 1, β G en la muestra y la proteína de unión a β G 2 marcada;

(iii) se mide la cantidad de la sustancia marcadora en el complejo mencionado anteriormente; y

40 (iv) la concentración de β G en la muestra se determina basándose en la cantidad de la sustancia marcadora obtenida.

III-2. Método que usa una proteína de unión a β G 1 libre y una proteína de unión a β G 2 libre marcada con una sustancia marcadora (2):

(i) una muestra se pone en contacto con una proteína de unión a β G 1 libre para formar un complejo 1 del β G en la muestra y la proteína de unión a β G 1; después

45 (ii) el complejo 1 mencionado anteriormente se pone en contacto con una proteína de unión a β G 2 libre marcada con una sustancia marcadora, para formar un complejo 2 del complejo 1 y la proteína de unión a β G 2 marcada; después

(iii) se mide la cantidad de la sustancia marcadora en el complejo 2 mencionado anteriormente; y

(iv) la concentración de β G en la muestra se determina basándose en la cantidad de la sustancia marcadora obtenida.

5 IV-1. Método que usa una proteína de unión a β G 1 inmovilizada en un vehículo insoluble y una proteína de unión a β G libre marcada con una sustancia marcadora (1):

(i) una muestra se pone en contacto con una proteína de unión a β G 1 inmovilizada en un vehículo insoluble y una proteína de unión a β G libre marcada con una sustancia marcadora, para formar un complejo de la proteína de unión a β G 1 inmovilizada en un vehículo insoluble, β G en la muestra y la proteína de unión a β G 2 marcada;

(iii) se mide la cantidad de la sustancia marcadora en el complejo mencionado anteriormente; y

10 (iv) la concentración de β G en la muestra se determina basándose en la cantidad de la sustancia marcadora obtenida.

IV-2. Método que usa una proteína de unión a β G 1 inmovilizada en un vehículo insoluble y una proteína de unión a β G libre marcada con una sustancia marcadora (2):

15 (i) una muestra se pone en contacto con una proteína de unión a β G 1 inmovilizada en un vehículo insoluble para formar un complejo 1 de la proteína de unión a β G 1 inmovilizada en el vehículo insoluble y el β G en la muestra; después

(ii) el complejo 1 mencionado anteriormente se pone en contacto con una proteína de unión a β G 2 libre marcada con una sustancia marcadora, para formar un complejo 2 del complejo 1 y la proteína de unión a β G 2 marcada; después

20 (iii) se mide la cantidad de la sustancia marcadora en el complejo 2 mencionado anteriormente; y

(iv) la concentración de β G en la muestra se determina basándose en la cantidad de la sustancia marcadora obtenida.

V-1. Método que usa una proteína de unión a β G 1 libre marcada con una sustancia marcadora, y una proteína de unión a β G 2 libre marcada con una sustancia marcadora (1):

25 (i) una muestra se pone en contacto con una proteína de unión a β G 1 marcada con una sustancia marcadora y una proteína de unión a β G 2 libre marcada con una sustancia marcadora para formar un complejo de la proteína de unión a β G 1, el β G en la muestra y la proteína de unión a β G 2 marcada;

(iii) se mide la cantidad de la sustancia marcadora en el complejo mencionado anteriormente; y

30 (iv) la concentración de β G en la muestra se determina basándose en la cantidad de la sustancia marcadora obtenida.

V-2. Método que usa una proteína de unión a β G 1 libre marcada con una sustancia marcadora, y una proteína de unión a β G 2 libre marcada con una sustancia marcadora (2):

(i) una muestra se pone en contacto con una proteína de unión a β G 1 libre marcada con una sustancia marcadora, para formar un complejo 1 del β G en la muestra y la proteína de unión a β G 1 marcada; después

35 (ii) el complejo 1 mencionado anteriormente se pone en contacto con una proteína de unión a β G 2 libre marcada con una sustancia marcadora, para formar un complejo 2 del complejo 1 y la proteína de unión a β G 2 marcada; después

(iii) se mide la cantidad de la sustancia marcadora en el complejo 2 mencionado anteriormente; y

40 (iv) la concentración de β G en la muestra se determina basándose en la cantidad de la sustancia marcadora obtenida.

VI-1. Método que usa una proteína de unión a β G 1 inmovilizada en un vehículo insoluble tal como una partícula de látex y una proteína de unión a β G 2 inmovilizada en un vehículo insoluble tal como una partícula de látex (1):

45 (i) una muestra se pone en contacto con una proteína de unión a β G 1 inmovilizada en un vehículo insoluble tal como una partícula de látex y una proteína de unión a β G 2 inmovilizada en un vehículo insoluble tal como una partícula de látex, para formar un complejo de la proteína de unión a β G 1 inmovilizada en un vehículo insoluble tal como una partícula de látex, el β G en la muestra y la proteína de unión a β G 2 inmovilizada en un vehículo insoluble tal como una partícula de látex;

(iii) se mide la cantidad del complejo mencionado anteriormente; y

(iv) la concentración de β G en la muestra se determina basándose en la cantidad del complejo obtenido mencionado anteriormente.

VI-2. Método que usa una proteína de unión a β G 1 inmovilizada en un vehículo insoluble tal como una partícula de látex y una proteína de unión a β G 2 inmovilizada en un vehículo insoluble tal como una partícula de látex (2):

5 (i) una muestra se pone en contacto con una proteína de unión a β G 1 inmovilizada en un vehículo insoluble tal como una partícula de látex, para formar un complejo 1 de la proteína de unión a β G 1 inmovilizada en un vehículo insoluble tal como una partícula de látex y el β G en la muestra; después

10 (ii) el complejo 1 mencionado anteriormente se pone en contacto con una proteína de unión a β G 2 inmovilizada en un vehículo insoluble tal como una partícula de látex, para formar un complejo 2 del complejo 1 y la proteína de unión a β G 2 inmovilizada en un vehículo insoluble tal como una partícula de látex; después

(iii) se mide la cantidad del complejo 2 mencionado anteriormente; y

(iv) la concentración de β G en la muestra se determina basándose en la cantidad del complejo obtenido mencionado anteriormente.

15 Además, también se incluye un método en el que la cantidad del β G en una muestra se mide usando un anticuerpo contra la proteína de unión a β G 1 o la proteína de unión a β G 2 y la proteína de unión a β G 1 y la proteína de unión a β G 2, formando un complejo del anticuerpo mencionado anteriormente y la proteína de unión a β G 1 y la proteína de unión a β G 2 y el β G en la muestra, y midiendo la cantidad del complejo mencionado anteriormente. El anticuerpo que se utilizará para este método puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal, sin embargo, debe ser uno que no interfiera en la formación del complejo de la proteína de unión a β G 1, la proteína de unión a β G 2 y el β G en la muestra. Además, la medición de β G también se puede realizar mediante un único sistema de medición usando varios tipos de los anticuerpos mencionados anteriormente. Además, como se ha descrito anteriormente, no hace falta decir que la proteína de unión a β G 1 y la proteína de unión a β G 2 se pueden inmovilizar en un vehículo insoluble, o se pueden marcar con una sustancia marcadora.

20 Además, la combinación de la proteína de unión a β G 1 y la proteína de unión a β G 2 usada para el método de medición de la presente invención pueden ser las mismas o diferentes entre sí.

25 Es decir, la proteína de unión a β G 1 y la proteína de unión a β G 2 en una combinación pueden ser de un tipo cada una, o pueden ser de múltiples tipos cada una. Además, un tipo o múltiples tipos de la proteína de unión a β G 1 y un tipo o múltiples tipos de la proteína de unión a β G 2 a usar pueden ser iguales o diferentes entre sí. La combinación más preferible incluye una combinación en la que la proteína de unión a β G 1 es el fragmento a o el fragmento b y la proteína de unión a β G 2 es el fragmento a o el fragmento b.

30 Además, por ejemplo, en el caso en el que se usan la proteína de unión a β G 1 que está unida a un vehículo insoluble y la proteína de unión a β G 2 libre (marcada), una combinación preferible (una proteína de unión a β G 1 inmovilizada en un vehículo insoluble-proteína de unión a β G 2 libre) incluye (fragmento a - fragmento a), (fragmento a - fragmento f), (fragmento b - fragmento a), (fragmento b - fragmento d), (fragmento b - fragmento f), (fragmento e - fragmento f) y (fragmento f - fragmento f).

35 Una combinación más preferible incluye (fragmento a - fragmento a), (fragmento a - fragmento b), (fragmento b - fragmento a), y (fragmento b - fragmento b); y una combinación preferible adicional incluye (fragmento a - fragmento a) y (fragmento b - fragmento a). Una combinación particularmente preferible incluye (fragmento b - fragmento a).

40 A continuación, un método para separar el complejo 1 o el complejo 2 obtenido de la proteína de unión a β G 1 y/o la proteína de unión a β G 2 que no formaba un complejo incluye los métodos de análisis de separación bien conocidos *per se* y usados comúnmente.

Por ejemplo, en cuanto a un método de separación en el caso en el que se realiza la medición que usa la proteína de unión a β G implicada en la presente invención que está inmovilizada en un vehículo insoluble, se incluye un método para la separación mediante la técnica de separación B/F.

45 Además, un método para la separación en el caso en el que la medición se realiza usando una proteína de unión a β G 1 libre (marcada) y/o una proteína de unión a β G 2 libre (marcada) que no están inmovilizadas en un vehículo insoluble incluye, por ejemplo, cromatografía, cromatografía líquida de alto rendimiento, electroforesis, electroforesis capilar, electroforesis en chip capilar, y un método que usa un analizador inmunológico automatizado tal como, por ejemplo, LiBASys (fabricado por Shimadzu Corp.). Las condiciones específicas de los mismos pueden establecerse de manera que el complejo 1 o el complejo 2 obtenidos puedan separarse de una proteína de unión a β G 1 (marcada) libre y/o una proteína de unión a β G 2 libre (marcada) que no forma el complejo, y otras condiciones pueden ser según los métodos bien conocidos *per se*. Por ejemplo, cuando la separación se realiza usando HPLC, la operación puede realizarse según el método descrito en Anal. Chem. 65, 5, 613-616 (1993) o JP-A-9-301995; y en el caso en el que se usa la electroforesis capilar, puede realizarse según el método descrito en J. Chromatogr. 593, 253-258 (1992); Anal. Chem. 64, 1926-1932 (1992); y el documento WO2007/027495. Además, por ejemplo, cuando

se usa LiBASys como un analizador inmunológico automatizado, la operación se realiza según el método descrito en Journal of Analytical Bio-Science, 22 N.º 4 303-308 (1999).

5 En cuanto al vehículo insoluble que se usa para inmovilizar la proteína de unión a β G implicada en la presente invención en el método para medir el β G de la presente invención, se puede usar cualquier vehículo siempre que se use, por ejemplo, en los métodos de medición inmunológicos convencionales, y, por ejemplo, se incluyen polímeros altamente sintéticos tales como, por ejemplo, un poliestireno, un polipropileno, un ácido poliacrílico, un ácido polimetacrílico, una poliacrilamida, un metacrilato de poliglicidilo, un cloruro de polivinilo, un polietileno, un policlorocarbonato, una resina de silicona, y un caucho de silicona, sustancias inorgánicas tales como, por ejemplo, un vidrio poroso, un vidrio esmerilado, cerámica, una alúmina, un gel de sílice, un carbón activado, y un óxido de metal. Además, estos vehículos insolubles se pueden usar en una amplia variedad de formas tales como una placa de microtitulación, una perla, un tubo, una bandeja dedicada con muchos tubos moldeados integralmente, una pieza en forma de disco, y particulados (partículas de látex). Entre ellos, son preferibles una microplaca y una perla desde los puntos de vista, tales como facilidad de lavado y operatividad en el momento del procesamiento de muchas muestras al mismo tiempo.

15 El método para inmovilizar la proteína de unión a β G implicada en la presente invención en un vehículo no está particularmente limitado, siempre que la proteína de unión a β G pueda inmovilizarse en un vehículo insoluble. Se incluyen todos los métodos de inmovilización usualmente usados en este campo y bien conocidos *per se*, por ejemplo, un método de acoplamiento químico (método de inmovilización por enlace covalente), un método por adsorción física, y similares.

20 Un ejemplo preferible incluye, por ejemplo, un método para obtener un vehículo insoluble (fase sólida) unido con la proteína de unión a β G poniendo en contacto un vehículo insoluble con una solución que contiene la proteína de unión a β G implicada en la presente invención en un intervalo de 0,1 μ g/ml a 20 mg/ml, y preferiblemente 1 μ g/ml a 5 mg/ml, y haciendo reaccionar a una temperatura apropiada durante un tiempo predeterminado.

25 En cuanto a un disolvente que se utilizará para preparar una solución de la proteína de unión a β G, puede ser uno que no tenga una propiedad de interferir en la adsorción o la unión de la proteína de unión a β G implicada en la presente invención a un vehículo insoluble, por ejemplo, son preferibles agua purificada, solución de tampón fosfato, solución de tampón Tris, solución de tampón Good, solución de tampón de glicina, solución de tampón borato, solución de tampón MOPS que tiene una acción tamponante a aproximadamente pH neutro, por ejemplo, de pH 5,0 a pH 10,0, preferiblemente de pH 6,5 a pH 8,5, y similares. Además, la concentración de agente tamponante en estas soluciones de tampón se selecciona apropiadamente del intervalo de habitualmente 10 mM a 500 mM, y preferiblemente de 10 mM a 300 mM. Además, esta solución puede comprender, por ejemplo, azúcares, sales tales como NaCl, agente de superficie activa, conservantes, y similares, siempre que la cantidad de la misma no interfiera con la adsorción o la unión de la proteína de unión a β G implicada en la presente invención con un vehículo insoluble.

35 Se debe observar que es deseable realizar un tratamiento de bloqueo normalmente realizado en este campo, es decir, un tratamiento sumergiendo el vehículo insoluble que está unido con la proteína de unión a β G implicada en la presente invención obtenida como se ha descrito anteriormente en una solución que contiene una proteína no relacionada con la proteína de unión a β G, tal como, por ejemplo, una albúmina sérica humana, una albúmina sérica bovino, una proteína de leche tal como leche desnatada, una albúmina de huevo, un agente bloqueante comercialmente disponible (por ejemplo, Blockace (producido por Dainippon Sumitomo Pharma Co. Ltd.)), y similares, desde el punto de vista de evitar la reacción inespecífica durante la medición.

45 Además, la "proteína de unión a β G inmovilizada en un vehículo insoluble" que se ha descrito anteriormente puede inmovilizarse directamente en un vehículo insoluble, o puede inmovilizarse en un vehículo insoluble a través de un anticuerpo de proteína de unión anti- β G que se inmoviliza en un vehículo insoluble. El anticuerpo de la proteína de unión anti- β G que se utilizará para ello puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. Además, un ejemplo específico del vehículo insoluble en el que se inmoviliza el anticuerpo de la proteína de unión anti- β G incluye el mismo vehículo insoluble que el utilizado para la inmovilización de la proteína de unión a β G descrita anteriormente. Para inmovilizar el anticuerpo de proteína de unión anti- β G, la inmovilización se puede realizar según el método descrito anteriormente para inmovilizar la proteína de unión a β G en un vehículo insoluble.

50 Se ha de apreciar que también es posible inmovilizar la proteína de unión a β G en un vehículo insoluble usando una reacción de unión muy firme como la reacción de avidina-biotina comúnmente utilizada en este campo.

55 La sustancia marcadora a usar para marcar la proteína de unión a β G en la presente invención incluye todas las sustancias marcadoras utilizadas habitualmente en este campo, por ejemplo, las enzimas utilizadas en los métodos de inmunoensayo habituales, tal como peroxidasa, microperoxidasa, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucosa oxidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, acetilcolinesterasa, deshidrogenasa málica, y luciferasa, isótopos radiactivos como los utilizados en el radioinmunoensayo (RIA), por ejemplo, ^{99m}Tc , ^{131}I , ^{125}I , ^{14}C , ^3H , ^{32}P y ^{35}S , sustancias fluorescentes utilizadas en el fluoroinmunoensayo (FIA), por ejemplo, fluoresceína, dansilo, fluorescamina, cumarina, naftilamina, isotiocianato de fluoresceína (FITC), rodamina, isotiocianato de rodamina X, sulforodamina 101, lucifer amarillo, acridina, isotiocianato de acridina, riboflavina, o derivados de los mismos,

sustancias luminiscentes tal como luciferina, isoluminol, luminol y un bis (2,4,6-trifluorofenil) oxalato, una sustancia que tiene absorción en la región ultravioleta, tal como fenol, naftol, antraceno, o los derivados de los mismos, una sustancia que tiene una propiedad como agente marcador de espín representado por el compuesto que tiene un grupo oxilo, por ejemplo, 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxilo, 3-amino-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina-1-oxilo y 2,6-di-t-butil- α -(3,5-di-t-butil-4-oxo-2,5-ciclohexadieno-1-ililideno)-p-tiloiloxilo.

Por otra parte, además de la sustancia marcadora mencionada anteriormente, por ejemplo, el colorante de la serie HiLyte, tal como HiLyte Fluor 647, HiLyte Fluor 488, HiLyte Fluor 555, HiLyte Fluor 680, y HiLyte Fluor 750 (cada uno de ellos son nombres comerciales de HiLyte Bioscience, Inc.), colorante de la serie Alexa tal como Alexa Fluor Dye 350, Alexa Fluor Dye 430, Alexa Fluor Dye 488, Alexa Fluor Dye 532, Alexa Fluor Dye 546, Alexa Fluor Dye 555, Alexa Fluor Dye 568, Alexa Fluor Dye 594, Alexa Fluor Dye 633, Alexa Fluor Dye 647, Alexa Fluor Dye 660, Alexa Fluor Dye 680, Alexa Fluor Dye 700, y Alexa Fluor Dye 750 (cada uno de ellos son nombres comerciales de Molecular Probes, Inc.), colorante de la serie CyDye tal como Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, y Cy7 (cada uno de ellos son nombres comerciales de Amersham Biosciences Corp.), y por ejemplo, el colorante tal como Coomassie Brilliant Blue R250, y también puede usarse naranja de metilo.

Además, para unir la sustancia marcadora descrita anteriormente (marcado) a la proteína de unión a β G, por ejemplo, el método de marcado bien conocido per se que se usa comúnmente en el método de inmunoensayo (EIA, RIA, FIA) bien conocido per se (por ejemplo, el método descrito en "Course on Experimental Medical Chemistry", vol. 8, supervisado por Yuichi Yamamura, 1ª edición, Nakayama Shoten, 1971; "Illustrative Description of Fluorescent Antibody", Akira Kawaol, 1ª edición, Soft Science Inc., 1983; "Enzyme Immunoassay", Eiji Ishikawa, Tadashi Kawai, Kiyoshi Muroi ed, 2ª edición, Igaku Shoin Ltd., 1982; "Molecular Cloning A Laboratory Manual Second Edition", J. Sambrook, E. F. Frisch, T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press), o puede realizarse apropiadamente un procedimiento convencional que utiliza la reacción de avidina (estreptavidina) y biotina, o similares.

Además, la proteína de unión a β G se puede marcar mediante un método en el que una sustancia marcadora se une a la proteína de unión a β G a través de uno o varios aminoácidos, o uno o varios aminoácidos y enlazadores. La proteína de unión a β G que está unida a la sustancia marcadora a través de un aminoácido o aminoácido y un enlazador hace que la distancia entre el sitio de unión a β G y la sustancia marcadora en la proteína de unión a β G sea más larga. Por esta razón, dado que la posibilidad de interferir en la unión de un β G en una muestra al sitio de unión a β G por la sustancia marcadora se vuelve baja, este método de marcado es más preferible. Para obtener la proteína de unión a β G unida con un aminoácido, el aminoácido puede unirse al N-terminal de β G implicado en la presente invención mediante el procedimiento convencional. Además, la proteína de unión a β G que estaba unida con el aminoácido también puede obtenerse realizando la PCR usando el cebador F que se añade con una secuencia de nucleótidos que codifica el aminoácido mencionado anteriormente en el N-terminal, el producto de PCR obtenido se incorpora en un ADN del vector de expresión adecuado y seguido de la obtención de un transformante por los procedimientos de rutina, entonces se expresa la proteína de unión a β G de la presente invención.

Además, dado que diversos tipos de kit para unir (etiquetar) la sustancia marcadora como se ha descrito anteriormente a la proteína también están disponibles en el mercado, el etiquetado puede realizarse utilizándolos según el manual de instrucciones adjunto al kit.

Además, la "proteína de unión a β G marcada que está marcada con una sustancia marcadora" descrita anteriormente puede ser la que está marcada indirectamente uniendo un anticuerpo de proteína de unión anti- β G marcado que está marcado con una sustancia marcadora. El anticuerpo de la proteína de unión anti- β G que se utilizará para ello puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. Además, un ejemplo específico de la sustancia marcadora para marcar el anticuerpo de proteína de unión anti- β G y un método para medir el marcador mencionado anteriormente, son como se menciona en la descripción con respecto a la proteína de unión a β G marcada. Además, para marcar el anticuerpo de proteína de unión anti- β G con la sustancia de marcado mencionada anteriormente, el marcado se puede realizar según el método descrito anteriormente para marcar la proteína de unión a β G con una sustancia marcadora.

Además, también se puede usar una cadena de ácido nucleico como sustancia marcadora.

Una cadena de ácido nucleico es un polinucleótido, que comprende un residuo de nucleótido como una unidad básica constituida por una base de purina o una base de pirimidina, un resto de azúcar de pentosa y ácido fosfórico, y este ácido fosfórico conecta cada nucleótido a través de un enlace diéster entre carbono 3' del resto de azúcar de un nucleótido y carbono 5' del resto de azúcar de otro nucleótido y polimerizado, y por ejemplo, se incluyen ARN cuya porción de azúcar es ribosa y/o ADN cuya porción de azúcar es desoxirribosa. Además, la cadena de ácido nucleico mencionada anteriormente puede ser una que consiste en única cadena, cadena doble o más de cadena de múltiples ácidos nucleicos.

La longitud de la cadena de ácido nucleico a usar puede ser la que puede alcanzar el objetivo de la presente invención, y normalmente es de 1 pb a 1000 kpb, preferiblemente de 5 pb a 100 kpb, y más preferiblemente de 10 pb a 50 kpb.

Se debe observar que la cadena de ácido nucleico usada en la presente invención se puede modificar opcionalmente mediante una sustancia apropiada, dentro de un rango en el que se puede lograr el propósito de la presente invención.

5 El método para unir la proteína de unión a β G implicada en la presente invención a la cadena de ácido nucleico incluye, por ejemplo, un método conocido descrito en el documento JP-B-4214779.

Por ejemplo, los respectivos grupos funcionales poseídos por la proteína de unión a β G implicada en la presente invención y una cadena de ácido nucleico se pueden unir directamente o a través de un enlazador [por ejemplo, N-(ϵ -maleimidacaproiloxi) succinimida (EMCS), 4-(p-maleimidofenil)butirato de sulfosuccinimidilo (Sulfo-SMPB), 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (Sulfo-SMCC), y similares], y similares.

10 Además, después de introducir un grupo funcional reactivo en una cadena de ácido nucleico por adelantado, la proteína de unión a β G implicada en la presente invención y la cadena de ácido nucleico en la que se introduce un grupo funcional reactivo pueden unirse entre sí según el método descrito en el documento JP-B-4214779. El método para introducir un grupo funcional reactivo en la cadena de ácido nucleico incluye el método bien conocido per se.

15 Además, en cuanto al método para unir la proteína de unión a β G implicada en la presente invención a la cadena de ácido nucleico, el grupo funcional reactivo se puede introducir en el extremo 5' del ácido nucleico, por ejemplo, mediante un método para obtener la cadena de ácido nucleico como un producto de PCR donde un grupo funcional reactivo se introduce en el terminal 5' realizando la PCR usando un cebador de PCR donde un grupo funcional reactivo se introduce en el terminal 5' ("Molecular Cloning A Laboratory Manual Second Edition", J. Sambrook, E. F. Frisch, T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, etc.).

20 Además, la "proteína de unión a β G marcada descrita que está marcada con una sustancia marcadora" descrita anteriormente puede ser la que se une a una cadena de ácido nucleico marcada con la sustancia marcadora. Un ácido nucleico a usar para ello y un método para unir el ácido nucleico a la proteína de unión a β G es como se ha descrito anteriormente.

25 El método para unir ácido nucleico a una sustancia marcadora incluye, por ejemplo, un método descrito en el documento JP-B-4214779.

Debe observarse que la solución que contiene la proteína de unión a β G que está marcada con una sustancia marcadora (proteína de unión a β G marcada) puede comprender una que se usa habitualmente como estabilizante en este campo, por ejemplo, un azúcar, una proteína, un agente tensioactivo y similares a una concentración dentro de un intervalo que se usa habitualmente en este campo.

30 Además, un método para medir una cantidad de marcado en el complejo producido como resultado de la práctica del método de medición de la presente invención puede variar dependiendo de los tipos de sustancias de marcado utilizadas, sin embargo, el método puede realizarse según los procedimientos prescritos, cada uno correspondiente a una propiedad poseída por la sustancia marcadora que puede detectarse mediante algún tipo de método. Por ejemplo, en el caso en el que la sustancia marcadora sea enzima, la medición puede realizarse según el método de inmunoensayo convencional, por ejemplo, el método descrito en "Enzyme Immunoassay Method" (PROTEIN, NUCLEIC ACID AND ENZYME, Separate vol. No. 31, Tsunehiro Kitagawa, Toshio Nanbara, Akio Tsuji, y Eiji Ishikawa ed., págs. 51 - 63, Kyoritsu Shuppan Co., Ltd., 1987), y en el caso en el que la sustancia marcadora sea una sustancia radioactiva, la medición puede realizarse, por ejemplo, según un procedimiento de rutina que se realiza actualmente en RIA, y utilizando la selección apropiadamente y usando un aparato de medición tal como un contador GM de inmersión, un contador de centelleo líquido, un contador de centelleo de tipo pocillo, y un contador de centelleo líquido, un contador de rutina para HPLC, dependiendo del tipo y la intensidad de la radiación generada por la sustancia radiactiva (véase, por ejemplo, "Course on Experimental Medical Chemistry", vol. 8, Yuichi Yamamura editorial supervision, 1ª edición, Nakayama Shoten, 1971). Además, en el caso en el que la sustancia marcadora sea una sustancia fluorescente, la medición puede llevarse a cabo según el procedimiento de rutina realizado en FIA usando un aparato de medición tal como un espectrofotómetro de fluorescencia, por ejemplo, según el método descrito en "Illustrative Description of Fluorescent Antibody", Akira Kawaoi, 1ª edición, Soft Science Inc., 1983; y en el caso en el que la sustancia marcadora sea una sustancia luminiscente, la medición puede realizarse según el procedimiento de rutina usando un aparato de medición tal como un contador fotográfico, por ejemplo, según el método descrito en "Enzyme Immunoassay Method" (PROTEIN, NUCLEIC ACID AND ENZYME, Separate vol. N.º 31, Tsunehiro Kitagawa, Toshio Nanbara, Akio Tsuji, y Eiji Ishikawa ed., págs. 252 - 263, Kyoritsu Shuppan Co., Ltd., 1987). Además, en el caso en el que la sustancia marcadora sea una sustancia que tiene absorción en la región ultravioleta, la medición puede llevarse a cabo mediante un procedimiento de rutina usando un aparato de medición tal como un espectrofotómetro; y en el caso de que la sustancia marcadora tenga un carácter de espín, la medición puede llevarse a cabo mediante el procedimiento de rutina utilizando un equipo de resonancia de espín electrónico, por ejemplo, según un método descrito en "Enzyme Immunoassay Method" (PROTEIN, NUCLEIC ACID AND ENZYME, Separate vol. N.º 31, Tsunehiro Kitagawa, Toshio Nanbara, Akio Tsuji, y Eiji Ishikawa ed., págs. 264 - 271, Kyoritsu Shuppan Co., Ltd., 1987).

55

Más específicamente, por ejemplo, en el caso en el que la sustancia marcadora sea una enzima, se incluyen los métodos bien conocidos per se como un método en el que la sustancia marcadora se hace reaccionar con un reactivo colorante para conducir a una reacción cromogénica, y la intensidad del color generado como resultado se mide por un espectrofotómetro, o similar.

5 El reactivo colorante utilizado para tal fin incluye los reactivos colorantes habitualmente utilizados en este campo, por ejemplo, tetrametilbenzidina (TMB), o-fenilendiamina, o-nitrofenil- β -D-galactósido, 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), N-etil-N-sulfopropil-m-anisidina (ADPS) y fosfato de p-nitrofenilo, etc. Además, las concentraciones de estos reactivos colorantes a utilizar se pueden ajustar de forma apropiada a partir del intervalo de concentración usualmente usado en este campo.

10 Además, para terminar la reacción cromogénica, puede utilizarse el método para terminar la reacción usualmente realizada en este campo, por ejemplo, la adición de un inhibidor enzimático tal como ácido sulfúrico 1 N a 6 N, o un agente de terminación de la reacción unido al kit para la solución de reacción.

15 Además, un método para medir β G usando proteína de unión a β G no etiquetada incluye, por ejemplo, un método de medición que utiliza una propiedad derivada de un complejo obtenido, específicamente, un método para medir la actividad enzimática tal como actividad de proteasa o un grado de deflexión fluorescente poseída por un complejo en sí mismo como absorbancia, o un sistema de inmunoensayo homogéneo tal como resonancia de plasmón superficial, y similares.

20 Además, el vehículo, tal como partículas de látex a usar para el método en el que se usan la proteína de unión a β G 1 inmovilizada en un vehículo insoluble, tal como partículas de látex, y la proteína de unión a β G 2 inmovilizada en un vehículo insoluble, tal como partículas de látex, incluye, por ejemplo, el que se usa en el método de inmunoensayo, por ejemplo, el que se prepara usando un conjunto de molécula tal como liposoma, y micela de polímero; un compuesto de polímero sintético tal como poliestireno, ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico, poliacrilamida, metacrilato de poliglicidilo, polipropileno, cloruro de polivinilo, polietileno, policlorocarbonato, resina de silicona, y caucho de silicona; sustancia inorgánica tal como vidrio poroso, vidrio esmerilado, alúmina, gel de sílice, carbón activado y óxido de metal; y similares como material. Además, entre ellos, la partícula de látex es particularmente preferible desde el punto de vista de que es fácil realizar el tratamiento químico de la superficie del vehículo dependiendo del propósito y la reacción no específica no ocurre fácilmente, porque es un vehículo artificial. Aunque un material del mismo no está particularmente limitado, se incluyen como preferibles partículas de látex a base de estireno tales como partículas de látex de poliestireno y partículas de látex a base de ácido acrílico y similares.

30 La forma del mismo incluye el que tiene una forma de perla, micropartícula y partícula de látex. Además, el tamaño de partícula no está particularmente limitado, sin embargo, es preferible el que tiene un tamaño medio de partícula de usualmente 0,05 μ m a 0,5 μ m, y preferiblemente de 0,1 μ m a 0,4 μ m.

35 El método para soportar la proteína de unión a β G implicada en la presente invención por el vehículo descrito anteriormente no está particularmente limitado, siempre que la proteína de unión a β G se ponga en contacto con el vehículo. El método de soporte incluye el bien conocido en sí mismo y usualmente usado en este campo (por ejemplo, el denominado método de adsorción física) como un ejemplo representativo.

40 Además, en el caso en el que se usa el vehículo comercialmente disponible, la proteína de unión a β G implicada en la presente invención puede ser soportada por el vehículo según el método de soporte recomendado por el manual de instrucciones adjunto.

45 En el método que usa proteína de unión a β G 1 inmovilizada en un vehículo insoluble tal como partícula de látex, y proteína de unión a β G 2 inmovilizada en un vehículo insoluble tal como una partícula de látex, un método para medir la cantidad de complejo formado por la proteína de unión a β G 1 inmovilizada en un vehículo insoluble tal como la partícula de látex, β G en una muestra y la proteína de unión a β G 2 inmovilizada en un vehículo insoluble tal como partículas de látex, incluye métodos rutinarios tales como, por ejemplo, el llamado método turbidimétrico donde determinación del componente objetivo se realiza midiendo el cambio en la turbidez provocado por la generación del complejo mencionado anteriormente, la denominada nefelometría, donde la determinación del componente objetivo se realiza midiendo el cambio de la intensidad de la luz dispersada, y el método de agregación del látex, etc.

50 Para obtener la concentración de β G en una muestra mediante los métodos descritos anteriormente, se prepara una curva estándar que muestra la relación entre la concentración de β G y el cambio de turbidez o intensidad de luz dispersa obtenido de antemano realizando la misma operación usando las muestras de concentraciones de β G conocidas, y ajustando el valor de medición a la curva estándar, se puede determinar la concentración de β G en una muestra.

55 En el método para medir β G de la presente invención, las concentraciones de proteína de unión a β G 1 y proteína de unión a β G 2 implicadas en la presente invención en cada reacción varían dependiendo de qué tan amplio alcance se mide para β G, o en el método de medición específico.

Por ejemplo, en el caso en el que se mide 0,1 pg a 1 µg de βG y se realiza la medición utilizando dos moléculas de proteína de unión βG libre, las cantidades de la proteína de unión a βG 1 libre y la proteína de unión a βG 2 libre a usar son en cada una de 0,1 ng a 0,1 mg, respectivamente.

5 En el caso en el que la medición se realiza usando una proteína de unión a βG 1 inmovilizada en un vehículo insoluble y la proteína de unión a βG 2 marcada, y por un método de quimioluminiscencia o un método cromogénico, la de la proteína de unión a βG 1 inmovilizada en un vehículo insoluble a usar es de aproximadamente 0,1 ng a 0,1 mg, y la cantidad de la proteína de unión a βG 2 marcada a usar es de aproximadamente 0,1 ng a 0,1 mg.

10 Además, por ejemplo, en el caso en el que se mide de 0,1 pg a 1 µg de βG y se realiza la medición usando dos moléculas de la proteína de unión a βG inmovilizada en un vehículo insoluble, la cantidad de la proteína de unión a βG 1 y la proteína de unión a βG 2 a usar es cada una de aproximadamente 0,1 ng a 0,1 mg, respectivamente.

Cuando se hace reaccionar una muestra que contiene βG y la proteína de unión a βG libre, la cantidad de la proteína de unión a βG implicada en la presente invención que se va a usar es normalmente de 1 µl a 1000 µl (que contiene de 0,1 ng a 0,1 mg como proteína de unión a βG), preferiblemente de 2 µl a 500 µl, con respecto a la muestra que contiene βG de 1 µl a 1000 µl, preferiblemente de 10 µl a 100 µl (que contiene de 0,1 pg a 1 µg de βG).

15 Además, la temperatura durante la reacción es de 25 °C a 40 °C, y preferiblemente de 30 °C a 37 °C, y el tiempo de reacción es usualmente de 10 segundos a 30 horas, preferiblemente de 5 minutos a 20 horas, y más preferiblemente es de 30 minutos a 10 horas.

La proteína de unión a βG 1 y la proteína de unión a βG 2 pueden hacerse reaccionar con una muestra simultánea o secuencialmente.

20 Como ejemplo específico del método para medir la concentración de βG de la presente invención, un método para medir la concentración de βG en una muestra derivada de un cuerpo biológico usando peróxidos (POD) como sustancia marcadora, y una proteína de unión a βG 1 inmovilizada en un vehículo insoluble y una proteína de unión a βG 2 marcada con POD se explica como se indica a continuación.

25 Es decir, 50 µl de muestra que contiene βG (está contenido de 0,1 pg a 1 µg de βG) se pone en contacto con una fase sólida donde la proteína de unión a βG 1 implicada en la presente invención está inmovilizada en un vehículo insoluble (que contiene de 0,1 ng a 0,1 mg de proteína de unión a βG 1), y se hace reaccionar de 4 °C a 40 °C durante 3 minutos a 20 horas para formar un complejo del βG y la proteína de unión a βG 1 (denominado como complejo 1) en el vehículo insoluble. Posteriormente, el complejo 1 se hace reaccionar con 50 µl a 100 µl de una solución (que contiene de 0,1 ng a 0,1 mg de proteína de unión a βG 2) que contiene proteína de unión a βG 2 marcada con POD implicada en la presente invención de 4 °C a 40 °C durante 3 minutos a 16 horas para formar un complejo de proteína de unión a βG 1 inmovilizada-βG-proteína de unión a βG marcada (denominado como complejo 2) en el vehículo insoluble. A continuación, después de añadir, por ejemplo, una solución de TMB de una concentración apropiada, el complejo 2 se hace reaccionar durante un tiempo predeterminado. Después de eso, la reacción se termina añadiendo una solución de terminación de reacción, tal como ácido fosfórico 1 M. Se mide la absorbancia a 450 nm. La concentración de βG en la muestra puede determinarse ajustando el valor de medición obtenido con respecto a una curva estándar que se obtiene de antemano realizando la misma operación para las muestras de concentraciones conocidas de βG usando los mismos reactivos, y muestra una relación entre el valor de medición y la concentración de βG.

40 Cuando se detecta βG realizando la electroforesis en chip capilar, la detección puede realizarse mediante un instrumento tal como un detector de refracción diferencial, detector de fluorescencia, y un detector UV, y el detector UV y el detector de fluorescencia son preferibles entre ellos, y el detector de fluorescencia es más preferible.

45 En el caso en el que se realiza el método para medir βG de la presente invención, por ejemplo, separando por electroforesis con chip capilar y midiendo mediante el detector de fluorescencia, la medición se puede realizar como se indica a continuación. La proteína de unión a βG 1 y la proteína de unión a βG 2 que se van a usar pueden marcarse con una sustancia marcadora.

50 Es decir, se mezclan de 1 µl a 50 µl de muestra de βG con una solución de reactivo de 20 a 50 µl que contiene, usualmente de 0,001 µM a 10 µM, y preferiblemente de 0,01 µM a 1 µM de la proteína de unión a βG 1 implicada en la presente invención, y usualmente de 0,01 µM a 10 µM, y preferiblemente de 0,01 µM a 1 µM de la proteína de unión a βG 2 implicada en la presente invención, y se hace reaccionar con calentamiento de 25 °C a 40 °C durante 5 minutos a 30 minutos, y preferiblemente durante 10 segundos a 15 minutos. Después de eso, la solución obtenida se separa por un método de separación apropiado, por ejemplo, mediante electroforesis en chip capilar, y se mide, por ejemplo, mediante un detector de fluorescencia y similares. La concentración de βG en la muestra puede determinarse ajustando el valor de medición obtenido con respecto a una curva estándar que se obtiene de antemano usando soluciones de concentraciones de βG conocidas, y muestra una relación entre la concentración de βG y el valor de medición mencionado anteriormente.

55 Se debe observar que la medición de βG también se puede realizar usando, por ejemplo, la proteína de unión a βG 1 que está marcada con el tetrafluorofenil éster Alexa Fluor-488 o similar y, por ejemplo, la proteína de unión a βG 2

que está marcada con succinimidil éster Alexa Fluor-647 o similar, y realizando la denominada espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCCS) ya conocida.

5 La muestra implicada en la presente invención incluye una muestra clínica tal como, por ejemplo, sangre, suero, plasma, orina, linfa, líquido cefalorraquídeo, derrame pleural y fluido de ascitis; fármaco medicinal; dispositivo médico; alimento; y similares, sin embargo, la muestra no está limitada a los mismos.

10 Un ejemplo específico de solución de tampón para disolver la proteína de unión a β G que se usará en el método de medición de la presente invención incluye todas las soluciones de tampón usualmente usadas para el método de medición usando la reacción antígeno-anticuerpo tal como una solución de tampón Tris, una solución de tampón fosfato, una solución de tampón veronal, una solución de tampón borato, una solución de tampón de Good, y similares, y su pH no está particularmente limitado, siempre que esté en un intervalo en el que la reacción de la proteína de la presente invención β G árido no se inhiba, pero usualmente es preferible un intervalo de pH de 5 a pH 9.

15 Se debe observar que la presente invención se puede utilizar suficientemente no solo en el funcionamiento manual sino también en un sistema de medición que utiliza un analizador automatizado, y puede realizar la medición de manera fácil y rápida. Además, cuando se realiza la medición en funcionamiento manual o usando un analizador automatizado, puede seleccionarse y usarse la combinación de reactivos y similares no está particularmente limitada, y la mejor combinación de reactivos y similares según una circunstancia y un modelo de analizador automatizado a aplicar, o teniendo en cuenta otros factores.

20 El reactivo para medir β G incluye "un reactivo para medir β G que contiene una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 95 % o más de homología con la secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, o SEQ ID NO: 20, y que tiene la actividad de unión a β -glucano". La proteína de unión a β G puede inmovilizarse en un vehículo insoluble. Además, la proteína de unión a β G puede marcarse con una sustancia marcadora. Los aspectos preferidos y similares del vehículo insoluble y la sustancia marcadora son como se han descrito anteriormente.

25 Además, el vehículo insoluble descrito anteriormente en el que se inmoviliza la proteína de unión a β G puede ser cualquiera de los vehículos insolubles en los que solo se inmoviliza un tipo de proteína de unión a β G o el vehículo insoluble en que se han inmovilizado varios tipos de proteínas de unión a β G.

La concentración de la proteína de unión a β G contenida en el reactivo es usualmente de 0,1 ng/ml a 100 mg/ml, y preferiblemente de 1 ng/ml a 10 mg/ml.

30 Además, en el reactivo, otros reactivos apropiados habitualmente utilizados en este campo, tales como un agente tamponante y una sal de metal alcalinotérreo, pueden estar contenidos adicionalmente, y estos reactivos se pueden seleccionar apropiadamente de los usados en las llamadas reacciones bioquímicas y similares y usarse. Específicamente, el agente tamponante descrito anteriormente incluye una solución de tampón usualmente usada en este campo tal como una solución de tampón Trishidroxilaminometán, una solución de tampón fosfato, una solución de tampón de borato, una solución de tampón de Good, y similares, y la concentración del agente tamponante mencionado anteriormente en el reactivo puede variar algo dependiendo del reactivo que se use, pero

35 habitualmente es de 5 mM a 500 mM, y preferiblemente de 20 mM a 200 mM. Debe observarse que la proteína de unión a β G implicada en la presente invención puede ser un material liofilizado.

El kit para medir β G de la presente invención incluye uno que consiste en lo siguiente como un constituyente:

40 (1) un reactivo que comprende la proteína 1 que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica o sustancialmente idéntica a una secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, o SEQ ID NO: 20, y que tiene la actividad de unión a β -glucano (proteína de unión a β G 1), y

45 (2) un reactivo que comprende la proteína 2 que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica o sustancialmente idéntica a una secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, o SEQ ID NO: 20, y que tiene la actividad de unión a β -glucano (proteína de unión a β G 2).

La proteína de unión a β G puede soportarse por un vehículo insoluble. Además, la proteína de unión a β G puede marcarse con una sustancia marcadora.

50 El aspecto preferible y el ejemplo específico de los constituyentes son como se han descrito anteriormente.

Además, la proteína de unión a β G 1 y la proteína de unión a β G 2 que constituyen el punto (1) y (2) anteriores del kit mencionado anteriormente, respectivamente, pueden ser cada una, una de un tipo o una de dos o más tipos. Además, la proteína de unión a β G 1 que constituye (1) y la proteína de unión a β G 2 que constituye (2) pueden ser iguales o diferentes entre sí.

55

Además, el kit para medir β G de la presente invención puede añadirse, si es necesario, con un reactivo usualmente usado en este campo, tal como alcoholes de azúcar como manitol y sorbitol, sacarinas como sacarosa y trehalosa, polisacáridos como dextrano, proteínas como albúmina de suero bovino, agentes estabilizantes tales como agente tensioactivo, y pueden establecerse concentraciones de los mismos y similares dentro del intervalo usualmente usado en este campo. Además, en el reactivo que contiene la proteína de unión a β G de la presente invención, puede usarse agente tamponante, sal de metal alcalinotérreo, y similares que se describen en la sección del reactivo de la presente invención, y puede usarse una concentración de los mismos y similares como se puede usar dentro del mismo rango que se ha descrito anteriormente. Además, el kit puede comprender β G estándar para preparar una curva patrón en combinación. En cuanto al β G estándar mencionado anteriormente, se puede usar cualquier preparación estándar disponible comercialmente de β G fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd. o el fabricado según el método descrito en JP-B-3652738. Además, estos reactivos en el kit de reactivos pueden ser un material liofilizado

La proteína de unión a β G de la presente invención es la subunidad α del factor G que es capaz de unirse a β G en el componente de hemocito de cangrejo herradura y un fragmento derivado de la subunidad α mencionada anteriormente y, por lo tanto, una proteína que tiene la actividad de unión a β -glucano.

Por ejemplo, una proteína que es la subunidad α del factor G del componente de hemocito de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) y un fragmento de la misma, y tiene la actividad de unión a β -glucano, y una proteína que es la subunidad α del factor G del componente de hemocito de cangrejo herradura (*Tachypleus tridentatus*) y un fragmento de la misma, y tiene la actividad de unión a β -glucano.

Un ejemplo de dicha proteína de unión a β G de la presente invención incluye "una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica o sustancialmente idéntica a una secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, o SEQ ID NO: 20, y que tiene la actividad de unión a β -glucano".

En la proteína de unión a β G de la presente invención, "una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, o SEQ ID NO: 20, y que tiene actividad de unión a β G" corresponde a cada fragmento de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*), o cada fragmento de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Tachypleus tridentatus*), que se ha explicado en el "método para medir β G" descrito anteriormente.

Además, una "secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a una secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, o SEQ ID NO: 20" incluye una secuencia de aminoácidos que tiene aproximadamente un 70 % o más, preferiblemente aproximadamente un 80 % o más, más preferiblemente aproximadamente un 90 % o más, adicionalmente preferiblemente aproximadamente un 95 % o más de homología con una secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, o SEQ ID NO: 20.

Además, "una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a una secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, o SEQ ID NO: 20" incluye, por ejemplo, una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a una secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, o SEQ ID NO: 20, y que tiene actividad de unión a β G.

Más específicamente, por ejemplo, es una proteína o similar, que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, o SEQ ID NO: 20, en la que de 1 a 5 (preferiblemente, de 1 a 3) aminoácidos se reemplazan o se eliminan, o de 1 a 5 (preferiblemente, de 1 a 3) aminoácidos se insertan o se añaden, y que tiene actividad de unión a β G.

El reemplazo, eliminación, inserción y adición pueden tener lugar en dos o más sitios en una secuencia de aminoácidos, siempre que la actividad de unión a β G de esta proteína no se pierda.

La proteína de unión a β G de la presente invención se puede producir mediante un proceso de producción química general según la secuencia de aminoácidos. La proteína de unión a β G de la presente invención se puede obtener mediante un método de síntesis química convencional tal como, por ejemplo, el método de fluorenilmetiloxycarbonilo (método de Fmoc) y el método de t-butiloxycarbonilo (método de tBoc). Además, también se puede obtener mediante síntesis química usando un sintetizador peptídico disponible comercialmente.

Además, la proteína de unión a β G de la presente invención también se puede obtener mediante el método bien conocido que usa tecnología de recombinación génica, donde una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de unión a β G de la presente invención se incorpora en un vector de expresión apropiado tal como plásmido y fago; la célula huésped se transforma (o se transduce) usando este vector de expresión recombinante; la célula huésped obtenida se cultiva para secretar la proteína de unión a β G de la presente invención intracelular o extracelularmente.

La molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de unión a β G de la presente invención es "una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos idéntica o sustancialmente idéntica a una secuencia de nucleótidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, o SEQ ID NO: 19.

5 "Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos idéntica a una secuencia de nucleótidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, o SEQ ID NO: 19" que codifica la proteína de unión a β G de la presente invención, incluye "una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de nucleótidos idéntica a una secuencia de nucleótidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 13" y "una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos entera idéntica a una secuencia de nucleótidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, o SEQ ID NO: 19".

10 "Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica a una secuencia de nucleótidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, o SEQ ID NO: 19" incluye una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, o SEQ ID NO: 19, en la que 1 a varios nucleótidos se eliminan parcialmente, se añaden, se reemplazan o se insertan. La delección, adición, reemplazo o inserción puede tener lugar en un sitio o dos o más sitios de una molécula de ácido nucleico simultáneamente.

15 Además, la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de unión a β G de la presente invención también incluye "una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica o sustancialmente idéntica a una secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO:2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, o SEQ ID NO: 20, y que tiene actividad de unión a β G (la proteína de unión a β G de la presente invención)". Un ejemplo específico de "la proteína de unión a β G de la presente invención" mencionado aquí es como se ha descrito en la explicación anterior en "la proteína de unión a β G implicada en la presente invención".

20 La molécula de ácido nucleico puede ser ADN o ARN.

Un ejemplo de un método para preparar la proteína de unión a β G implicada en la presente invención (incluyendo la proteína de unión a β G de la presente invención) por un método genético se explica a continuación.

25 1. Preparación del vector recombinante para la expresión

(1) Preparación de ADNc

30 Se extrae el ARN total del hemocito de cangrejos herradura (*Limulus polyphemus*) por un método convencional, y se obtiene ARNm purificado utilizando un método convencional, tal como, por ejemplo, extracción con una cadena poli (A) poseída por el ARNm. Usando el ARNm purificado obtenido como plantilla, el ADNc se sintetiza mediante un procedimiento de rutina de reacción de transcripción inversa. Este ADNc se usa como plantilla en el caso de la siguiente PCR como una biblioteca de ADNc que contiene el gen de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura.

(2) Preparación del vector de expresión recombinante que incorpora una secuencia de nucleótidos para la proteína de unión a β G implicada en la presente invención

35 1) Preparación del vector de expresión recombinante que incorpora una secuencia que comprende el gen de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura

40 Por ejemplo, por procedimientos rutinarios, un fragmento de ADN objetivo de la secuencia que comprende el gen de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (por ejemplo, SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 11) se amplifica por un método de amplificación de ácido nucleico tal como PCR usando un cebador inverso (cebador R) diseñado a partir de una posición arbitraria seleccionada de la región 3'-terminal de la secuencia de nucleótidos de ADNc (SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO:11) que codifica la subunidad α del factor G del cangrejo herradura, y un cebador directo (cebador F) diseñado a partir de una posición arbitraria de la región 5'-terminal al codón de inicio de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 11, y que usa una biblioteca de ADNc que comprende el gen de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (la biblioteca de ADNc que se ha descrito anteriormente, y similares) como plantilla. El producto de PCR obtenido se incorpora en un ADN vectorial apropiado para la expresión según un procedimiento rutinario para obtener un vector de expresión recombinante.

45 Si surge la necesidad, la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN integrado en el vector de expresión recombinante se analiza para confirmar que la secuencia que comprende el gen objetivo de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura se ha incorporado con seguridad.

50 2) Preparación del vector de expresión recombinante que incorpora una secuencia que comprende un gen para un

fragmento derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (1)

En primer lugar, por ejemplo, por procedimientos rutinarios, un fragmento de ADN de la secuencia que comprende el gen de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (por ejemplo, SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 11) se amplifica por un método de amplificación de ácido nucleico tal como PCR usando un cebador R diseñado a partir de una posición arbitraria seleccionada de la región 3'-terminal de la secuencia de nucleótidos de ADNc (SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 11) que codifica la subunidad α del factor G del cangrejo herradura, y un cebador F diseñado a partir de una posición arbitraria de la región 5'-terminal al codón de inicio de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 11, y una biblioteca de ADNc que comprende el gen de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (ADNc y similares) como plantilla. El producto de PCR obtenido se incorpora en un ADN vectorial apropiado para la expresión según un procedimiento rutinario para obtener un vector recombinante.

Un vector que se usará aquí incluye, por ejemplo, un vector de clonación, tal como el vector de clonación TA. El procedimiento es sencillo y fácil si se usa un vector de clonación disponible comercialmente. Por ejemplo, se usan ampliamente pGEM-T Easy (producido por Progema Corp.) y similares.

Si es necesario, se analiza la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN integrado en el vector recombinante, para confirmar que la secuencia que comprende un gen derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura se ha incorporado con seguridad.

Posteriormente, un fragmento de ADN de la secuencia que comprende un gen para un fragmento de la subunidad α del factor G del cangrejo herradura objetivo (por ejemplo, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 13, SEC ID NO: 15, SEC ID NO: 17, SEC ID NO: 19) o una secuencia que contiene el gen para el fragmento de la misma, se amplifica por un método de amplificación de ácido nucleico tal como PCR usando un cebador R diseñado a partir de una posición arbitraria seleccionada de la región 3'-terminal de la secuencia de nucleótidos de ADNc (SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 13, SEC ID NO: 15, SEC ID NO: 17, SEC ID NO: 19) que codifica un fragmento derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura, el cebador F diseñado a partir de una posición arbitraria de la región 5'-terminal al codón de inicio de la misma secuencia, y una biblioteca de ADNc que comprende el fragmento derivado del gen de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (ADNc, incorporando el vector recombinante obtenido anteriormente una secuencia que comprende el gen de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura, y similares) como plantilla. El producto de PCR obtenido se incorpora en un ADN de vector apropiado para la expresión según un procedimiento de rutina para obtener un vector de expresión recombinante que incorpora una secuencia que comprende el gen objetivo para un fragmento derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura.

Si es necesario, se analiza la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN integrado en el vector de expresión recombinante, para confirmar si una secuencia que comprende el gen objetivo para un fragmento derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura se ha incorporado con seguridad.

3) Preparación del vector de expresión recombinante que incorpora una secuencia que comprende un gen para un fragmento derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (2)

Por ejemplo, por un procedimiento rutinario, un fragmento de ADN de la secuencia que comprende un gen objetivo para un fragmento derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 13, SEC ID NO: 15, SEC ID NO: 17, SEC ID NO: 19) se amplifica por un método de amplificación de ácido nucleico tal como PCR usando un cebador R diseñado a partir de una posición arbitraria seleccionada de la región 3'-terminal de la secuencia de nucleótidos de ADNc (SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 13, SEC ID NO: 15, SEC ID NO: 17, SEC ID NO: 19) que codifica un fragmento derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura, el cebador F diseñado a partir de una posición arbitraria de la región 5'-terminal al codón de inicio de la misma secuencia, y una biblioteca de ADNc que comprende un gen para un fragmento derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (ADNc, y similares) como plantilla. El producto de PCR obtenido se incorpora en un ADN de vector apropiado para la expresión según un procedimiento de rutina para obtener un vector de expresión recombinante que incorpora una secuencia que comprende el gen objetivo para un fragmento derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura.

Si es necesario, se analiza la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN integrado en el vector de expresión recombinante, para confirmar si una secuencia que comprende el gen objetivo para un fragmento o una secuencia que contiene el fragmento de la misma derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura se ha incorporado con seguridad.

Se ha de apreciar que el fragmento de ADN que se incorpora en un vector recombinante para expresión (que incluye una secuencia de nucleótidos para la subunidad α del factor G de cangrejo herradura o fragmento de la misma) se puede usar tal cual, para un propósito dado, o se puede usar después de la digestión con la enzima de restricción o después de la adición de un enlazador, etc., si se desea.

El vector de expresión que se usará en el método de los puntos 1) a 3) anteriores no está particularmente limitado, siempre que exprese la proteína de unión a β G implicada en la presente invención en diversas especies de células huésped procariontas y/o eucariotas, y tenga la función de producir estas proteínas. Por ejemplo, se incluyen el vector plasmídico, vector de fagos y vector vírico.

5 Específicamente, por ejemplo, se incluyen vectores plasmídicos tales como vector pTrcHis2, vector pcDNA3.1/myc-His (producido por Invitrogen Corp.), pUC119 (producido por TAKARA SHUZO Co., Ltd.), pBR322 (producido por TAKARA SHUZO Co., Ltd.), pBluescript II KS+ (producido por Stratagene Corp.), Pqe-tri (producido por Qiagen Corp.), pET, pGEM-3Z, pGEX, y pMAL, vectores bacteriófagos tales como λ ENBL3 (producido por Stratagene Corp.), y λ DASHII (producido por Funakoshi Co., Ltd.), vectores cósmidos tales como ADN Charomid (producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), y Lorist6 (producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

10 Adicionalmente, además de los plásmidos derivados de *E. coli* (por ejemplo, pTrc99A, pKK223, pET3a), se incluyen plásmidos derivados de *Bacillus subtilis* (por ejemplo, pUB110, pTP5, pC194), plásmidos derivados de levadura (por ejemplo, pSH19, pSH15), bacteriófago tal como fago λ , virus animales tales como retrovirus, virus vaccinia, y baculovirus, pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNAI/Neo, p3xFLAG-CMV-14, pCAT3, pcDNA3.1, pCMV, y similares.

15 Se ha de apreciar que, para facilitar la detección y purificación, la proteína objetivo de unión a β G implicada en la presente invención (subunidad α del factor G de cangrejo herradura o un fragmento de la misma) se puede expresar como una proteína de fusión con otro péptido marcador o proteína. El péptido marcador a fusionar incluye la etiqueta FLAG, la etiqueta 3xFLAG, la etiqueta His (etiqueta His, por ejemplo, etiqueta 6xHis) y similares; y la proteína incluye β -galactosidasa (β -Gal), proteína verde fluorescente (GFP), proteína de unión a maltosa (MBP) y similares.

20 En la práctica, la proteína de unión a β G implicada en la presente invención se expresa como una proteína de fusión con estos péptidos o proteínas, realizando la subclonación del producto de PCR como resultado de la reacción de PCR usando un cebador diseñado para tener una secuencia que codifique el péptido marcador como se ha descrito anteriormente en la parte frontal o posterior de un marco de lectura abierto; o insertando un enlazador que tiene una secuencia que codifica el péptido marcador entre el gen mencionado anteriormente y un vector de expresión; o usando un vector de expresión que comprende una secuencia que codifica el péptido marcador o la proteína de antemano. Por ejemplo, usando el vector pTrcHis 2 (producido por Invitrogen Corp.) que incorpora el gen de etiqueta His como vector de expresión, y si una secuencia que comprende un gen para la proteína de unión a β G se ha incorporado en la dirección aguas arriba del gen de etiqueta His, expresión del gen de la proteína de unión a β G en la región aguas arriba también puede confirmarse confirmando la expresión de esta etiqueta His.

25 La construcción recombinante de la presente invención significa un recombinante en el que se incorpora la molécula de ácido nucleico de la presente invención como se ha descrito anteriormente, y se incluye un vector recombinante para la expresión en la que se incorpora el gen de proteína de unión a β G implicada en la presente invención. El ejemplo específico es el mismo que el descrito anteriormente.

35 2. Preparación del transformante

El transformante (transductante) de la presente invención se puede preparar realizando la transformación (transducción) de una célula huésped apropiada usando el vector recombinante obtenido para la expresión.

40 Una célula huésped que se utilizará para este fin incluye, por ejemplo, microorganismos [bacterias (por ejemplo, especies de *Escherichia* y especies de *Bacillus*), levaduras (por ejemplo, especies de *Saccharomyces*, etc.), células animales, células de insectos, etc.]. Además, también se puede realizar el sistema de expresión libre de células y el sistema de células vegetales que se usan usualmente en este campo.

45 Específicamente, para especies *Escherichia*, se incluyen coli bacillus (*Escherichia coli*, por ejemplo, BL21, BL21 (DE3), K-12, DH1, DH5, DH5 α , M15, HB101, C600, XL-1 Blue, JM109, JM105, JM127, XL1-Blue, VCS257, TOP10, y similares). Para especies *Bacillus*, se incluyen *B. subtilis*, *B. brevis*, *B. borstelensis*, y similares. También se incluyen cepas de levadura, tales como *S. cerevisiae*, *Scizo. pombe*, *A. nidulans*, *Pichia pastoria*, y similares, o bacterias *Aspergillus* filamentous tal como *Aspergillus nidulans*. En cuanto a una célula animal, se incluyen células de mono COS-7, Vero, célula de ovario de hámster chino CHO, linfocito L de ratón, célula Hela humana, célula FL y similares. En cuanto a la célula de insecto, se incluyen BmN4, Sf9 y similares, pero no se limitan particularmente a las mismas.

50 Además de esto, también se puede usar la célula competente que tiene una eficacia de transducción más alta para el ADN de plásmido o fago. Por ejemplo, se incluyen célula competente de *E. coli* DH5 α , célula competente de *E. coli* JM109 (producidas por TAKARABIO Inc.), y similares.

La transformación (o transducción) de la célula huésped por el vector de expresión puede realizarse usando el método hasta ahora conocido.

55 Por ejemplo, en el caso en el que la célula huésped es una bacteria (por ejemplo, en el caso de *E. coli*), la transformación (o transducción) de la célula huésped puede realizarse mediante un procedimiento de rutina tal como, por ejemplo, el método de Cohen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1972), 9, 2110), el método de

protoplasto (Mol. Gen. Genet. (1979) 168, 111), el método competente (J. Mol. Biol. (1971), 56, 209), o el método de M. Morrison (Methods in Enzymology, 68, 326-331, 1979). Además, cuando se usa una célula competente comercialmente disponible, la transformación (o transducción) de la célula huésped puede realizarse según el protocolo adjunto al producto.

5 Aquí, se obtiene un método para confirmar si el transformante que se transforma mediante "un vector recombinante para expresión que incorpora un fragmento que comprende una secuencia genómica que codifica la proteína de unión a β G objetivo" que incluye, por ejemplo, un método en el que mediante la utilización de un gen para determinar la resistencia a fármacos poseída preliminarmente por el vector de expresión que se usa para obtener el vector recombinante, la resistencia del fármaco del transductor se verifica y se confirma. Por ejemplo, cuando se utiliza el vector pTrcHis2 como un vector de expresión, el vector mencionado anteriormente tiene un gen para la resistencia a la ampicilina (*amp^r*). Y así, este método es aquel en el que el transformante obtenido se cultiva en un medio añadido con ampicilina, y se confirma que el transformante cultivado (cepa resistente a ampicilina) es un transformante que se transforma mediante un vector recombinante para expresión que incorpora una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a β G objetivo.

10 Para asegurarse de que el transformante (transductante) obtenido produzca la proteína objetivo de unión a β G implicada en la presente invención (en lo sucesivo, denominada a veces "proteína recombinante de unión a β G") (se expresa el gen de la proteína de unión a β G), por ejemplo, además de un procedimiento rutinario de hibridación tal como hibridación Southern e hibridación de colonias usando una sonda, existe, por ejemplo, un método como se describe a continuación.

15 En el caso en que la proteína recombinante de unión a β G no se excreta en una solución de cultivo del transformante, por ejemplo, cuando se expresa como una proteína de tipo transmembrana, el transformante obtenido se trata mediante un procedimiento de rutina para homogeneizar o lisar la célula (por ejemplo, tratamiento supersónico, tratamiento con homogeneizador o similar, tratamiento con agente de lisado de membranas tal como un agente tensioactivo apropiado, y similares), para obtener el lisado del mismo. Y, para el lisado (si es necesario, después de realizar una purificación adicional de proteína), por ejemplo, se realiza un método de medición inmunológica usual (método de transferencia de Western blot, método de transferencia de Western, y similares) usando anticuerpo peptídico anti-etiqueta, y seleccionando el transductante que se confirma que expresa el péptido marcador en el sobrenadante del cultivo, puede obtenerse el transformante que expresa la proteína de unión a β G recombinante objetivo.

20 Además, cuando un fragmento recombinante derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura se excreta en la solución de cultivo (sobrenadante de cultivo) del transductor anteriormente mencionado, se realiza un método de medición inmunológico usual para la solución de cultivo (sobrenadante de cultivo) por el mismo procedimiento que se realizó para el lisado descrito anteriormente, y el transformante que expresa la proteína de unión a β G recombinante objetivo se puede seleccionar y obtener por el mismo procedimiento.

35 3. Expresión de la proteína de unión a β G

La proteína de unión a β G implicada en la presente invención se puede obtener cultivando el transformante que se transforma mediante vector plasmídico para la expresión que incorpora una secuencia que comprende el gen para proteína de unión a β G obtenida por el modo descrito anteriormente en un medio nutriente, y permitiendo que el transformante produzca la proteína recombinante de unión a β G.

40 El medio nutriente preferiblemente contiene una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno inorgánico o una fuente de nitrógeno orgánico, que se requieren para el crecimiento de la célula huésped (transformante). La fuente de carbono incluye, por ejemplo, glucosa, dextrano, almidón soluble, sacarosa y similares; la fuente de nitrógeno inorgánico o la fuente de nitrógeno orgánico incluye, por ejemplo, sales de amonio, sales de nitrato, aminoácido, aguas madre de maceración de maíz, peptona, caseína, extracto de carne, torta de soja, solución de extracción de patata, y similares. Además, a petición, pueden estar contenidos otros nutrientes (por ejemplo, cloruro de calcio, dihidrogenofosfato de sodio y cloruro de magnesio), vitaminas, antibióticos, factor de crecimiento y similares. En cuanto al pH del medio, es deseable un intervalo de aproximadamente pH 5 a pH 8.

45 El cultivo se realiza mediante el método conocido en esta industria. Las condiciones culturales tales como, por ejemplo, la temperatura, el pH del medio, y el tiempo de fermentación se seleccionan de manera que se pueda obtener el título más alto de la proteína de unión a β G implicada en la presente invención.

50 Cuando se cultiva un transformante (transductante) en el que el huésped del transformante es *E. coli*, el cultivo puede realizarse en las condiciones de un procedimiento de rutina para cultivar *E. coli* en un medio usualmente utilizado, sin embargo, como el medio que se utilizará para el cultivo, el medio líquido es adecuado.

55 El medio a usar cuando se cultiva un transformante en el que el huésped es *E. coli*, puede ser el medio usualmente utilizado cuando se cultiva *E. coli*. Por ejemplo, se incluyen medio sintético, tal como D-MEM y RPMI, medio LB, medio 2xYT, caldo Terrific, medio M9 (Miller, Journal of Experiments in Molecular Genetics, 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1972), y similares. El cultivo puede realizarse usualmente de 14 °C a 42 °C, y

preferiblemente de 28 °C a 39 °C, durante aproximadamente 3 horas a 24 horas con aireación y agitación, si es necesario. Además, según surge la necesidad, puede añadirse un fármaco tal como isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG), ácido 3 β -indolilacrílico.

4. Recuperación de la proteína recombinante de unión a β G

5 La proteína de unión a β G implicada en la presente invención puede obtenerse a partir del cultivo obtenido como se ha descrito anteriormente por el siguiente procedimiento.

Es decir, en el caso en el que la proteína de unión a β G implicada en la presente invención está presente en el periplasma o el citoplasma del transformante cultivado, el cultivo se somete a un procedimiento de rutina tal como separación por filtración o centrifugación para recoger el cuerpo o células bacterianas, y el cuerpo o las células bacterianas se suspenden en una solución de tampón apropiada, y después de homogeneizar la pared celular y/o la membrana celular de la célula y similares mediante el método, tal como, por ejemplo, tratamiento con agente tensoactivo, tratamiento supersónico, tratamiento con lisozima, congelación y descongelación, se obtiene una solución de extracción en bruto que contiene la proteína de unión a β G implicada en la presente invención por el método tal como separación por centrifugación o filtración. Y, a partir de la solución de extracción en bruto mencionada anteriormente, la proteína de unión a β G implicada en la presente invención se purifica y se aísla según un procedimiento común usado para purificar y aislar una proteína natural o una proteína sintética para que no se mezcle con β G.

El método para aislar y purificar la proteína de unión a β G incluye, por ejemplo, un método que usa solubilidad, tal como el método de precipitación con disolución salina; un método que usa una diferencia de peso molecular tal como diálisis, ultrafiltración, filtración en gel, electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida; un método que usa carga eléctrica tal como cromatografía de intercambio iónico; un método que usa afinidad específica tal como cromatografía de afinidad, un método que usa diferencia en hidrofobicidad tal como cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa; y un método que usa diferencia en el punto isoeléctrico tal como electroforesis de enfoque isoeléctrico.

Por ejemplo, cuando se usa un vector de expresión tal como el vector pTrcHis2 que comprende preliminarmente una secuencia que codifica un péptido marcador tal como el péptido marcador de la etiqueta His, la proteína recombinante de unión a β G tiene una etiqueta His. Por lo tanto, sometiendo una solución que contiene la proteína de unión a β G recombinante a cromatografía de afinidad usando un material de relleno de columna que contiene ión níquel, tal como Ni-NTA (níquel-ácido nitrilotriacético), la proteína de unión a β G recombinante objetivo puede refinarse.

Además, una solución que contiene la proteína de unión a β G recombinante purificada mediante el método descrito anteriormente puede someterse adicionalmente a cromatografía de afinidad usando un material de relleno de columna unido con la proteína de unión a β implicada en la presente invención. Especialmente, cuando la célula huésped utilizada para la expresión de la proteína recombinante de unión a β G es un organismo eucariota, tal como una levadura, el β G producido por el huésped también puede estar contenido en el producto de la célula huésped. Por lo tanto, para eliminar el β G derivado de la célula huésped y para obtener la proteína de unión a β G recombinante objetivo, es preferible añadir este proceso de cromatografía de afinidad al proceso de purificación descrito anteriormente.

La existencia de la proteína de unión a β G implicada en la presente invención que se aísla y se purifica de esta manera puede medirse y determinarse, por ejemplo, por ELISA y similares, usando anticuerpo anti-His.

En lo sucesivo, la presente invención se explicará con más detalle haciendo referencia a los siguientes Ejemplos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

(1) Recuperación de ARN

45 Usando un reactivo para extraer ARN, ISOGEN (producido por Nippon Gene Co., Ltd.), y según un protocolo adjunto al producto, se recuperó el ARN total del hemocito de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) como se indica a continuación.

Primero, se añadieron 640 mg de hemocito de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) (cultivado en Estados Unidos) en un tubo en el que se colocaron 7 ml de ISOGEN previamente, y se homogeneizó el hemocito usando el homogeneizador POLYTRON (fabricado por Kinematica AG).

50 Después de incubar el homogeneizado de hemocitos obtenido a temperatura ambiente durante 5 minutos, se añadieron al mismo 1,4 ml de cloroformo, y se agitó durante 15 segundos, y se incubó adicionalmente a temperatura ambiente durante 3 minutos. Después de esto, se realizó la separación por centrifugación del homogeneizado a 12000G a 4 °C durante 15 minutos, luego la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se añadieron 3,5 ml de

isopropanol y se agitó, seguido de incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente, la separación por centrifugación del homogeneizado se realizó a 4 °C y 12000G durante 10 minutos, y se obtuvo un precipitado. El precipitado obtenido se lavó con 7 ml de etanol al 70 %, y luego se secó, y se obtuvo el precipitado de ARN. El precipitado de ARN obtenido se disolvió en 800 µl de agua estéril. Se midió la absorbancia de la solución de ARN obtenida y se determinó la cantidad de ARN total obtenido. Se obtuvieron 779 µg de ARN total a partir de 640 mg del hemocito de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*).

(2) Purificación ARNm

Usando Oligotex™-dT30<Super> (producido por TAKARABIO Inc.), se purificó ARNm mediante el siguiente método.

Primero, a 250 µl de una solución acuosa de ARN total (aproximadamente 243 µg como ARN total) obtenida en el punto (1) anterior, se le añadieron 250 µl de una solución de tampón (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, SDS al 0,1 %, pH 7,5), y se añadieron 500 µl más de Oligotex™-dT30, y después la mezcla se hizo reaccionar por incubación a 65 °C durante 5 minutos. La solución de reacción se dejó en hielo durante 3 minutos. Posteriormente, a la solución de reacción se le añadieron 0,1 ml de NaCl 5 M y se incubó a 37 °C durante 10 minutos. Después de eso, la solución de reacción se sometió a separación por centrifugación a 15000 rpm durante 3 minutos para eliminar la solución de sobrenadante, y el sedimento se disolvió en 450 µl de TE (tampón Tris-EDTA, pH 8,0). Después de incubar la solución de sedimentos a 65 °C durante 5 minutos, la solución se dejó en hielo durante 3 minutos. Después de eso, la solución de sedimentos se centrifugó a 20000 G durante 3 minutos; y se recuperó una porción de 400 µl de sobrenadante. Después de que el sobrenadante se trató mediante el proceso habitual de precipitación con etanol, el precipitado obtenido se disolvió en 10 µl de TE para obtener una solución de ARNm purificada.

(3) Producción y clonación por PCR de ADNc

1) ADNc

Usando el ARNm purificado obtenido en el punto (2) anterior como plantilla, se realizó una reacción de transcripción inversa habitual usando Oligo (dT)₁₂₋₁₈ (producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y Reverscript II (producido por Nippon Gene Co., Ltd.) para sintetizar ADNc.

2) PCR

No se ha determinado la secuencia genómica que codifica la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*. Por lo tanto, considerando que los cebadores que amplifican la secuencia genómica que codifica la subunidad α del factor G de *Tachypleus tridentatus* se diseñaron a partir de la secuencia de nucleótidos que codifica la subunidad α del factor G de *Tachypleus tridentatus*, y si la PCR se realizó usando este cebador, la secuencia de nucleótidos que codifica la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* podría amplificarse, la idea se puso en práctica como se describe a continuación.

En primer lugar, sobre la base de la secuencia genómica de la subunidad α del factor G de *Tachypleus tridentatus* (mostrada en la SEQ ID NO: 11) descrita en la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information), la secuencia de cebador descrita a continuación se diseñó y se sintetizó por Sigma-Aldrich Corp. en consignación.

Secuencia de cebador:

cebador F1: 5'-gcaatgttggtgttc-3' (SEQ ID NO: 21)

cebador R1: 5'-gaagaacaacagctgttgacc-3' (SEQ ID NO: 22)

El cebador F1 entre los cebadores descritos anteriormente corresponde a una secuencia de 16 nucleótidos que comprende 3 nucleótidos (gca: la parte de la secuencia que se considera que codifica la secuencia señal) en el lado 5' del codón de inicio y una secuencia del codón de inicio posterior con respecto al 13º nucleótido del lado 3' del genoma que codifica la subunidad α del factor G de *Tachypleus tridentatus* descrita en la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information). Además, el cebador R1 codifica varios aminoácidos en el lado C-terminal de la subunidad α del factor G de *Tachypleus tridentatus* descrita anteriormente.

El análisis por PCR se realizó usando este par de cebadores y usando el ADNc obtenido en el punto (3)-1) anterior como plantilla, en las condiciones de reacción descritas a continuación. Después del calentamiento a 98 °C durante 2 minutos, la reacción se repitió en 30 ciclos de un ciclo de reacción compuesto por calentamiento a 95 °C durante 15 segundos, 50 °C durante 30 segundos y 68 °C durante 2 minutos y en cada ciclo, y finalmente, la reacción se realizó a 68 °C durante 5 minutos.

Condiciones de reacción de la PCR:

agua estéril: 12 µl;

ADNc: 2 µl;

cebador F1: 1 µl;

cebador R1: 1 µl;

dNTP 0,2 mM (mezcla de dATP, dGTP, dCTP, y dTTP) (producido por Nippon Gene Co., Ltd.): 2 µl;

Tampón de amplificación 2xTOPOTAQ con MgCl₂ 6 mM (producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.): 20 µl;

5 ADN polimerasa TOPOTAQ (producida por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.): 2 µl.

El producto de PCR obtenido se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1 % que contenía 1 µg/ml de bromuro de etidio, y se cortó una porción de gel de aproximadamente 1,2 Kbp de banda. El producto de PCR se purificó a partir del corte de gel utilizando el kit de extracción de gel QIAquick (producido por Qiagen GmbH).

(4) Preparación del vector recombinante y determinación de la secuencia de nucleótidos

10 Después de mezclar 0,1 µg de pGEM-T Easy (producido por Promega Corp.) con aproximadamente 5 µg del producto de PCR obtenido en el punto (3)-2) anterior y 5 µl de solución del kit de ligación de ADN Ver.2, I (producido por TAKARABIO Inc.), se hizo un volumen total a 10 µl con agua destilada estéril. Posteriormente, la reacción de ligación se realizó a 16 °C durante 1 hora para obtener el vector recombinante. En el vector recombinante obtenido, se insertó la misma secuencia de nucleótidos que el ADNc obtenido en el punto (3)-1) anterior, es decir, la secuencia de nucleótidos que codifica la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*. Por lo tanto, el vector recombinante obtenido se denominó "factor G α de *Limulus polyphemus*/pGEM-T".

15 Utilizando 200 ng del vector recombinante obtenido factor G α de *Limulus polyphemus*/pGEM-T como plantilla, y utilizando el mismo par de cebadores que se utilizó en el punto (3)-2) anterior, la reacción de secuenciación se realizó usando el kit DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing (producido por GE Healthcare Bio-Science AB) según el método proporcionado en un manual suministrado.

20 (5) Búsqueda de homología de la secuencia de nucleótidos

La decodificación de la secuencia de nucleótidos del producto de reacción de secuenciación obtenido [que tiene la misma secuencia de nucleótidos que el ADNc obtenido en el punto (3)-1) anterior] se realizó usando BaseStation (Bio-Rad Laboratories, Inc.). La secuencia de nucleótidos que codifica la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* obtenida mediante decodificación se muestra en SEQ ID NO: 1, y la secuencia de aminoácidos que se deduce de la secuencia de nucleótidos y está codificada por esta secuencia de nucleótidos, se muestra en SEQ ID NO: 2, respectivamente.

25 Posteriormente, usando la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information), se realizó la búsqueda de homología (BLAST) en la secuencia de nucleótidos del producto de PCR insertado en el vector. Como resultado, quedó claro que la secuencia de nucleótidos del producto de PCR insertado en el vector, es decir, la secuencia de nucleótidos del ADNc, mostró una alta homología con la secuencia genómica conocida de la subunidad α del factor G de *Tachypleus tridentatus*, sin embargo, fueron diferentes entre sí. Es decir, la homología entre la secuencia genómica conocida de la subunidad α del factor G de *Tachypleus tridentatus* y la secuencia genómica correspondiente a la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* (se excluyeron el péptido señal y la secuencia parcial del lado N-terminal, y el codón de parada) fue del 85,6 %. Además, a partir de la comparación de las secuencias de aminoácidos deducidas de las respectivas secuencias de nucleótidos, la homología de ambas secuencias fue del 79,5 %.

30 Además, sobre la base de la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) que se deduce de la secuencia de nucleótidos obtenida de ADNc y codificada por esta secuencia de nucleótidos, se analizó en detalle la estructura de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*. En consecuencia, quedó claro que en la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*, existía un dominio de tipo β-1,3-glucanasa en el lado N-terminal, un dominio de tipo xilanasasa dímera Z (XlnZ) que se suponía que era un dominio de unión a βG. en el lado C-terminal, y un dominio de tipo xilanasasa A (XlnA) en el centro. Los puntos de diferencia de la secuencia de aminoácidos conocida de la subunidad α del factor G de *Tachypleus tridentatus* fueron: (i) una secuencia enlazadora entre las secuencias diméricas del dominio de unión a βG presente en el lado C-terminal era completamente diferente; (ii) el motivo QQES que era un motivo estructural presente en el dominio tipo xilanasasa A en el centro de la secuencia se repitió 3 veces en la subunidad α del factor G de *Tachypleus tridentatus*, mientras que en la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* se repitió dos veces.

35 Basándose en los resultados analíticos descritos anteriormente, se compararon la secuencia de nucleótidos, la secuencia de aminoácidos y las estructuras de proteínas entre la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* y la subunidad α del factor G de *Tachypleus tridentatus*. Los resultados se muestran colectivamente en la Tabla 2 a continuación.

50

[Tabla 2]

		Subunidad α del factor G	
		<i>Limulus polyphemus</i>	<i>Tachypleus tridentatus</i>
Número de aminoácido		649	654
Número de aminoácido en la estructura de hueco		5	
Masa molecular deducida	Longitud completa	72,5 KDa	73,9 KDa
	Dominio de tipo XInZ (dímero)	28,6 KDa	29,2 KDa
Punto isoeléctrico deducido	Longitud completa	5,20	5,94
	Dominio de tipo XInZ (dímero)	8,57	6,19
Homología entre <i>Limulus polyphemus</i> y <i>Tachypleus tridentatus</i>	Longitud completa	Secuencia de aminoácidos: 79,5 % (secuencia de nucleótidos: 85,6 %)	
	Dominio de tipo XInZ (dímero)	Secuencia de aminoácidos: 83,3 % (secuencia de nucleótidos: 85,9 %)	
	Dominio de tipo XInZ	Secuencia de aminoácidos: 78,8 % (secuencia de nucleótidos: 87,4 %)	
	Dominio de tipo glucanasa	Secuencia de aminoácidos: 77,2 % (secuencia de nucleótidos: 85,1 %)	
Motivo QQWS		Repetición dos veces	Repetición tres veces

Además, el diagrama esquemático de la estructura de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* predicho a partir del análisis mencionado anteriormente se muestra en la Figura 1, y se muestra un diagrama esquemático de la estructura conocida de la subunidad α del factor G de *Tachypleus tridentatus* en la Figura 2, respectivamente.

(6) Preparación del vector de expresión

En primer lugar, se realizó un análisis por PCR usando el vector recombinante factor G α de *Limulus polyphemus*/pGEM-T obtenido en el punto (4) anterior como plantilla. En cuanto al cebador, se usaron las secuencias de cebador descritas a continuación que se diseñaron a partir de la secuencia de nucleótidos aclarada en el punto (5) anterior (SEQ ID NO: 1) y se sintetizaron mediante un método de síntesis de rutina de Sigma-Aldrich Corp. Mediante el análisis por PCR usando estos cebadores, puede amplificarse una secuencia de nucleótidos del 696 al 1947 del 5'-terminal en la secuencia de nucleótidos aclarada en el punto (5) anterior y mostrada en la SEQ ID NO: 1 que codifica la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*, es decir, una secuencia de nucleótidos que codifica "una secuencia de aminoácidos desde 233 (asparagina) hasta 649 (valina) en la secuencia de aminoácidos de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* mostrada en la SEQ ID NO: 1".

Secuencia de cebador:

cebador F2: 5'-aatacaccttctcctgttgacg-3' (SEQ ID NO: 23);

cebador R2: 5'-ctggattaagattacaaggtt-3' (SEQ ID NO: 24).

Se ha de apreciar que el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de 233 a 649 de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* se denominó "fragmento a derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*". Es decir, el "fragmento a derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*" tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4. Además, la secuencia de aminoácidos del fragmento a mencionado anteriormente se codifica por la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3.

Se muestra un diagrama esquemático del fragmento a derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* en el dibujo inferior de la Figura 1 de manera que pueda compararse con el diagrama esquemático de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*. Es decir, el fragmento a derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* posee el dominio de tipo xilanasa A (existiendo dos motivos QQWS en el mismo) y un

dominio dimérico de tipo xilanasa Z (XlnZ) que se supone que es el dominio de unión a β G de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*.

5 La PCR se realizó en las condiciones de reacción descritas a continuación. Después del calentamiento a 98 °C durante 2 minutos, se repitió 30 veces un calentamiento secuencial a 95 °C durante 15 segundos, a 63 °C durante 30 segundos y a 68 °C durante 1 minuto, y finalmente se calentó a 68 °C durante 5 minutos.

Condiciones de reacción de la PCR:

agua estéril: 12 μ l;

Factor G α de *Limulus polyphemus*/pGEM-T: 2 μ l;

cebador F2: 1 μ l;

10 cebador R2: 1 μ l;

dNTP 0,2 mM (mezcla de dATP, dGTP, dCTP, y dTTP) (producido por Nippon Gene Co., Ltd.): 2 μ l;

Tampón de amplificación 2xTOPOTAQ con MgCl₂ 6 mM (producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.): 20 μ l;

ADN polimerasa TOPOTAQ (producida por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.): 2 μ l.

15 El producto de PCR obtenido se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1 % que contenía 1 μ g/ml de bromuro de etidio, y se cortó una porción de gel de aproximadamente 1,3 Kbp de banda. El producto de PCR se purificó a partir del corte de gel utilizando el kit de extracción de gel QIAquick (producido por Qiagen GmbH).

20 Posteriormente, se mezclaron una porción de 1 μ l del vector pTrcHis2 (producido por Invitrogen Corp.) y 4 μ l del producto de PCR obtenido, y el volumen total se ajustó a 5 μ l con agua estéril. Posteriormente, la reacción de ligación se realizó por incubación a 25 °C durante 5 minutos para preparar un vector recombinante. Usando este vector recombinante, la línea de células competentes DH5 α derivada de la cepa K de *E. coli* (producida por Nippon Gene Co., Ltd.) se transformó por un procedimiento de rutina. Este transformante se cultivó en un medio de agar LB que contenía ampicilina (producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 100 μ g/ml) a 37 °C durante 1 día, y se dejó que crecieran colonias.

25 Del transformante de cada colonia, se extrajo ADN, respectivamente, mediante un procedimiento de rutina, y la secuencia de nucleótidos se confirmó usando BaseStation (producido por Bio-Rad Laboratories, Inc.). Y, el transformante que tenía una secuencia de nucleótidos como un marco de lectura que codificaba una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 se denominó "fragmento α derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* (233-649 aa)/DH5 α ".

(7) Expresión del fragmento α derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* (233-649 aa)

30 El transformante del fragmento α derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* (233-649 aa)/DH5 α seleccionado en el punto (6) anterior se cultivó durante una noche. La solución de cultivo (5 ml) se inoculó en 1 l de medio LB que contenía 100 mg/l de ampicilina, y se cultivó a 37 °C durante 4 horas. En el momento en que la DO_{600 nm} del caldo de cultivo alcanzó 0,8, se añadió una concentración final 1 mM de isopropil- β -tiogalactopiranosido (IPTG) (producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) al medio de cultivo, y se cultivó adicionalmente con agitación a 20 °C durante 48 horas.

35 Después del cultivo, la solución de cultivo se sometió a separación por centrifugación, y el precipitado resultante (cuerpo bacteriano) se recogió. Después de lavar el precipitado con agua destilada (producida por Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.), el cuerpo bacteriano se homogeneizó por onda ultrasónica, después se sometió a separación por centrifugación (5000g x 10 minutos) para obtener una fracción de sobrenadante.

40 La proteína expresada tiene seis de His que se obtienen del vector pTrcHis2 que se une en el lado C-terminal. Y así, usando Ni-agarosa (producida por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), la proteína se purificó a partir de la fracción de sobrenadante obtenida como se ha descrito anteriormente realizando la purificación por afinidad con Ni-agarosa según el método descrito en el manual suministrado.

45 (8) Confirmación de la expresión del fragmento α derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* (233-649 aa)

50 En primer lugar, después de que la proteína expresada purificada en el punto (7) anterior (fragmento α recombinante derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*) se sometiera a SDS-PAGE usando gel de poliacrilamida (producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), la proteína se transfirió a la membrana de PVDF usando iBlot (producido por Invitrogen Corp.). Después de someter la membrana de PVDF a un proceso de bloqueo con Blockace al 1 %, la membrana se hizo reaccionar con anticuerpo anti-His marcado con peroxidasa (producido por GE Healthcare Bio-Science AB) a temperatura ambiente durante 1 hora. La membrana de PVDF después de la

reacción se lavó 3 veces con PBS-T (que contenía monolaurato de polioxietilen (20) sorbitán al 0,05 %) (producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), después se dejó emitir luz usando ECLplus (producido por GE Healthcare Bio -Science AB), que se mostró en una película de rayos X (producida por GE Healthcare Bio-Science AB).

5 Por separado, el gel después de SDS-PAGE se tiñó usando un kit de tinción de plata (producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) según el método proporcionado en el manual suministrado.

Los resultados se muestran en la Figura 3(a) y (b). La Figura 3 (a) muestra los resultados de la transferencia Western, y la Figura 3 (b) muestra los resultados de la tinción con plata del gel después de la SDS-PAGE, respectivamente.

10 Además, en la Figura 3 (a), el carril (1) es un resultado cuando se usó el marcador de peso molecular Dr. Western (producido por Oriental Yeast Co., Ltd.) como muestra, y carril (2) es un resultado cuando se utilizó el fragmento a purificado por afinidad como muestra.

En la Figura 3 (b), el carril (1) es un resultado cuando se usó el marcador de peso molecular de proteína Precisión Plus Protein Standards (producido por Bio-Rad Laboratories, Inc.) como muestra, y el carril (2) es un resultado cuando el fragmento a purificado por afinidad se usó como muestra.

15 Como es evidente a partir de los resultados mostrados en la Figura 3 (a), se pudo detectar una banda que mostraba la proteína expresada que reaccionó con el anticuerpo anti-His marcado con peroxidasa (indicado por la flecha).

20 Además, el peso molecular del fragmento a derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* supuesto a partir de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 es de aproximadamente 48 kDa. Como queda claro a partir de los resultados mostrados en la Figura 3 (b), el tamaño de la proteína de la banda (Figura 3 (a)) identificado por SDS-PAGE, y en reacción con el anticuerpo anti-His marcado con peroxidasa es de aproximadamente 48 kDa, y la banda se confirmó en la misma posición que el peso molecular del fragmento a derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*.

25 Por lo tanto, se confirmó que el fragmento a derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* (233-649 aa) podría expresarse mediante el método descrito anteriormente, y podría obtenerse un fragmento a recombinante derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*.

Ejemplo 2: Medición de β G por diversas proteínas de unión a β G

(1) Preparación de diversas proteínas de unión a β G

1) Fragmento a derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*)

30 Se usó el fragmento a recombinante derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* obtenido en el Ejemplo 1.

2) Preparación de la proteína de reconocimiento β (1-479 aa) derivada de gusano de seda

35 En la Figura 3 de Ochiai M. et al., J. Biol. Chem., vol. 275, N.º 7, pág. 4995-5002 (2000), se ha descrito la secuencia de aminoácidos de la proteína de reconocimiento de β -1,3-glucano derivada de gusano de seda, y la secuencia de nucleótidos del gen que la codifica. La proteína mencionada anteriormente es una proteína que consiste en 479 aminoácidos, que está codificada por una secuencia de nucleótidos de 1575 pb. Según el método descrito en la bibliografía descrita anteriormente y un método dado en el Ejemplo 1 descrito anteriormente, se obtuvo una proteína de reconocimiento de β -1,3-glucano derivada de gusano de seda descrita en la Figura 3 de la bibliografía descrita anteriormente (en lo sucesivo en el presente documento, denominada como "proteína de reconocimiento de β G (1-479 aa) derivada de gusano de seda" en la presente descripción).

40 Es decir, ARNm se purificó de un extracto obtenido a partir de hemocito de larva de gusano de seda, y el ADNc se obtuvo por una reacción de transcripción inversa. Usando el ADNc obtenido como plantilla, y usando 5'-taccgagcaccaccg-3' (SEQ ID NO: 39) como cebador F y 5'-gttaaagttttgcaata-3' (SEQ ID NO: 40) como cebador R, la PCR se realizó en las condiciones descritas en la bibliografía mencionada anteriormente. El producto de PCR obtenido se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1 % en presencia de 1 μ g/ml de bromuro de etidio, y se cortó una porción de gel de la banda de aproximadamente 1,5 kbp. El producto de PCR se purificó a partir de la porción de gel usando el kit de extracción de gel QIAquick.

45 Posteriormente, se realizaron la preparación del vector de expresión usando el mismo vector de expresión (vector pTrcHis2) que en el Ejemplo 1 (6), y la transformación de la línea de células competentes DH5 α derivada de la cepa K de *E. coli*. Después, por el mismo método que en el Ejemplo 1 (7), el transformante se cultivó y se expresó la "proteína de reconocimiento de β G (1-479 aa) derivada de gusano de seda". Después del cultivo, la proteína se purificó de la solución de cultivo mediante el mismo método que en el Ejemplo 1 (7).

3) Preparación de la proteína de unión de reconocimiento de β G (1-454 aa) derivada de gusano de seda

Se han descrito una secuencia de aminoácidos de proteína de unión a bacterias Gram negativas derivada de gusano de seda y una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína en la Figura 3 de Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol. 93, pág. 7888-7893 (1996). La proteína mencionada anteriormente es la que consiste en 467 aminoácidos y está codificada por una secuencia de nucleótidos de 2257 pb. Dado que se describe en la bibliografía descrita anteriormente que la estructura de la proteína mencionada anteriormente "comprende un dominio de tipo glucanasa y tiene un parecido con el dominio α del factor G", se supone que esta proteína tiene una propiedad para unirse con β G.

Y así, según el método descrito en la bibliografía descrita anteriormente y un método dado en el Ejemplo 1 descrito anteriormente, se obtuvo la proteína de unión a bacterias Gram-negativas derivada de gusanos de seda descrita en la Figura 3 de Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.93, pág.7888-7893 (1996) (en lo sucesivo en el presente documento, denominada "proteína de unión al reconocimiento de β G (1-454 aa) derivada de gusano de seda" en la presente descripción).

Es decir, ARNm se purificó de un extracto obtenido a partir de hemocito de larva de gusano de seda, y el ADNc se obtuvo por una reacción de transcripción inversa. Usando el ADNc obtenido como plantilla, y usando 5'-atatcgtacgctcaaatgcc-3' (SEQ ID NO: 41) como cebador F y 5'-ctttgtcaaagttatcgcctta-3' (SEQ ID NO: 42) como cebador R, la PCR se realizó en las condiciones descritas en la bibliografía mencionada anteriormente. El producto de PCR obtenido se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1 % en presencia de 1 μ g/ml de bromuro de etidio, y se cortó una porción de gel de la banda de aproximadamente 1,5 kbp. El producto de PCR se purificó a partir de la porción de gel usando el kit de extracción de gel QIAquick.

Posteriormente, se realizaron la preparación del vector de expresión usando el mismo vector de expresión (vector pTrcHis2) que en el Ejemplo 1 (6), y la transformación de la línea de células competentes DH5 α derivada de la cepa K de *E. coli*. Después, por el mismo método que en el Ejemplo 1 (7), el transformante se cultivó y se expresó la "proteína de unión al reconocimiento de β G (1-454 aa) derivada de gusano de seda". Después del cultivo, la proteína se purificó de la solución de cultivo mediante el mismo método que en el Ejemplo 1 (7).

4) Preparación de la proteína de reconocimiento β G (181-471 aa) derivada de polilla india de la harina

En la hemolinfa de la polilla india de la harina (*Plodia interpunctella*), existe la proteína de reconocimiento de β G (proteína de reconocimiento de β -1,3-glucano). En Fabrick J. A., et al., Insect Biochem. Mol. Biol., vol. 33, pág. 579-594, 2003, se ha descrito una secuencia de aminoácidos de la proteína y una secuencia de nucleótidos de la proteína. Consiste en 471 aminoácidos y tiene parte de tipo glucanasa (dominio de tipo glucanasa) en el lado C-terminal (Fabrick J. A., et al., J. Biol. Chem., vol. 279, N.º 25, pág.26605-26611, 2004, Figura 1).

Y así, según el método descrito en Fabrick J. A., et al., Insect Biochem. Mol. Biol., vol. 33, pág.579-594, 2003 y un método dado en el Ejemplo 1 descrito anteriormente, se obtuvo la proteína del dominio de tipo glucanasa de la proteína de reconocimiento de β G que consiste en una secuencia de aminoácidos de 181 a 471 en el lado C-terminal de esta polilla india de la harina (en lo sucesivo en el presente documento, denominada como "proteína de reconocimiento de β G (181-471 aa) derivada de la polilla india de la harina" en la presente descripción).

Es decir, el ARNm se purificó de un extracto obtenido a partir de hemocito de polilla india de la harina, y el ADNc se obtuvo por una reacción de transcripción inversa. Usando el ADNc obtenido como plantilla, y usando 5'-gagggtcaagtttctgaag-3' (SEQ ID NO: 43) como cebador F y 5'-gtcagagtctatgctgctg-3' (SEQ ID NO: 44) como cebador R, la PCR se realizó en las condiciones descritas en la bibliografía mencionada anteriormente. El producto de PCR obtenido se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1 % en presencia de 1 μ g/ml de bromuro de etidio, y se cortó una porción de gel de la banda de aproximadamente 1,5 kbp. El producto de PCR se purificó a partir de la porción de gel usando el kit de extracción de gel QIAquick.

Posteriormente, se realizaron la preparación del vector de expresión usando el mismo vector de expresión (vector pTrcHis2) que en el Ejemplo 1-(6), y la transformación de la línea de células competentes DH5 α derivada de la cepa K de *E. coli*. Después, por el mismo método que en el Ejemplo 1 (7), el transformante se cultivó y se expresó la "proteína de reconocimiento de β G (181-471 aa) derivada de polilla india de la harina". Después del cultivo, la proteína se purificó de la solución de cultivo mediante el mismo método que se ha descrito en el Ejemplo 1 (7).

5) Preparación de otra proteína de unión a β G

Además, se usaron las siguientes como proteína de unión a β G.

* Dectina 1 derivada de ratón (producida por R&D Systems, Inc.);

* Anticuerpo anti-(1, 3) β G de ratón (producido por Biosupplies Australia Pty Ltd.).

(2) Marcado con peroxidasa de la proteína de unión a β G

Usando el kit de marcado con peroxidasa-NH₂ (producido por Dojindo Laboratories Co., Ltd.), y según el método dado en el manual suministrado con el kit, cada proteína de unión a β G preparada en el punto (1) descrito

anteriormente se marcó con peroxidasa.

(3) Medición sándwich

1) Preparación de microplaca inmovilizada en proteína de unión a βG para ELISA

5 Las proteínas de unión a βG preparadas en el punto (1) anterior se ajustaron cada una para dar 5 μg/ml con una solución de tampón MOPS 50 mM (pH 7,0), y cada alícuota de 50 μl se puso en cada pocillo de una microplaca para ELISA (producida por Nunk), y permaneciendo en reposo a 10 °C durante 16 horas, cada proteína de unión a βG se inmovilizó debido a la microplaca mencionada anteriormente (aproximadamente 250 ng/pocillo como proteína de unión a βG).

10 Posteriormente, como una operación de bloqueo para reducir la adsorción no específica, se dispensó un alícuota de 0,2 ml de solución de Blockace al 1 % (producido por Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) disuelta en solución salina tamponada con fosfato 50 mM (pH 7,0) en cada pocillo, y después de permanecer en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora, se realizó el lavado de cada pocillo.

2) Preparación de proteína de unión a βG marcada con peroxidasa

15 Cada proteína de unión a βG marcada con peroxidasa obtenida en el punto (2) anterior se diluyó 8000 veces con una solución de Blockace al 1 % disuelta en una solución salina tamponada con fosfato 50 mM (pH 7,0).

3) Preparación de la muestra

Se preparó la "preparación estándar de β-glucano" de ensayo de β-glucano de Wako (producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) para dar 1000 pg/ml en el valor reducido de lentinano con una solución de Blockace al 1 % disuelta en una solución salina tamponada con fosfato 50 mM (pH 7,0). Se usó como una muestra.

20 4) Medición

25 Una muestra de 50 μl (50 pg en el valor reducido de lentinano) preparada en el punto 3) anterior se añadió a cada pocillo de la microplaca inmovilizada con proteína de unión a βG para ELISA preparada en el punto 1) anterior, y se hizo reaccionar a 37 °C durante 1 hora. Posteriormente, cada pocillo se lavó 3 veces con PBS-T (producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Se dispersaron 50 μl de la proteína de unión a βG marcada con peroxidasa (2 μg/ml) preparada en el punto 2) anterior en cada pocillo, y se hicieron reaccionar a 37 °C durante 1 hora. Después de lavar cada pocillo 3 veces con PBS-T y una vez con agua destilada, se añadieron 50 μl de solución de TMB (3, 3', 5, 5'-tetrametilbencidina) (producida por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) a cada pocillo, y se hizo reaccionar a 25 °C durante 30 minutos. Después, se añadieron 50 μl de solución de terminación de reacción (solución 1 M de ácido fosfórico) a cada pocillo para terminar la reacción. La absorbancia a 450 nm se midió usando V_{máx} (producido por Molecular Devices Inc.).

30 Ha de apreciarse que la medición se realizó de una manera similar usando una muestra de 0 pg/ml en el valor reducido de lentinano para su uso como un valor en blanco.

(4) Resultados

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.

[Tabla 3]

DO450 nm (x 1000)

		Proteína marcada con peroxidasa					
		i	ii	iii	iv	v	vi
Proteína inmovilizada en una placa	i	41	7	70	51	43	38
	ii	38	15	77	61	38	32
	iii	36	6	412	24	10	39
	iv	20	11	8	18	17	28
	v	18	7	42	31	15	31
	vi	31	8	38	4	21	42

Ha de apreciarse que el valor numérico indicado en la Tabla 3 es un valor que se obtiene restando el valor en blanco de la absorbancia obtenida a 450 nm y multiplicado por 1000.

Además, en la Tabla 3, cada símbolo es un resultado cuando se usa la siguiente muestra.

i: Proteína de reconocimiento de β G derivada de gusano de seda;

5 ii: Proteína de unión a reconocimiento de β G derivada de gusano de seda;

iii: Fragmento a derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*);

iv: Proteína de reconocimiento de β G derivada de polilla india de la harina;

v: Dectina 1 derivada de ratón;

vi: Anticuerpo anti-(1, 3) β G de ratón.

10 Es decir, en la Tabla 3 anterior, por ejemplo, cuando el valor es "412" para "proteína inmovilizada en la placa: iii" y "proteína marcada con peroxidasa: iii", significa que la reacción que se ha descrito anteriormente se realizó usando "microplaca para ELISA inmovilizado con fragmento a derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*)" y "fragmento a marcado con peroxidasa derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*)", y el valor del valor de medición de la absorbancia obtenida a 450 nm multiplicado por 1000 fue "412".

A continuación, se muestran en la siguiente Tabla 4 las relaciones S/N obtenidas dividiendo cada valor de medición de la absorbancia obtenida por el valor en blanco.

[Tabla 4]

S/N

		Proteína marcada con peroxidasa					
		i	ii	iii	iv	v	vi
Proteína inmovilizada en una placa	i	1,4	1,2	1,1	1,2	1,4	1,1
	ii	1,3	1,3	1,1	1,2	1,2	1,1
	iii	1,3	1,1	3,5	1,2	1,3	1,2
	iv	1,2	1,2	1,1	1,1	1,2	1,1
	v	1,1	1,1	1,3	1,2	1,2	1,1
	vi	1,3	1,2	1,3	1,1	1,3	1,2

20 Además, los resultados de la evaluación obtenida basándose en los resultados de la Tabla 3 y la Tabla 4 se muestran en la siguiente Tabla 5.

[Tabla 5]

Evaluación

		Proteína marcada con peroxidasa					
		i	ii	iii	iv	v	vi
Proteína inmovilizada en una placa	i	x	x	Δ	Δ	x	x
	ii	x	x	Δ	Δ	x	x
	iii	x	x	⊙	x	x	x
	iv	x	x	x	x	x	x
	v	x	x	x	x	x	x
	vi	x	x	x	x	x	x

En la Tabla 5, cada símbolo tiene el siguiente significado.

⊙: DO450 nm (x 1000) es 200 o más, y S/N es 3,0 o más;

5 ○: DO450 nm (x 1000) es 100 o más, y S/N es 1,5 o más;

Δ: DO450 nm (x 1000) es 50-99, o S/N es 1,0 o más;

X: DO450 nm (x 1000) es 0-49, o S/N es 1,0 o más.

10 Ha de apreciarse que en la Tabla 5, el método de medición usando tanto la placa (v) que está inmovilizada con Dectina I de ratón como Dectina I de ratón marcada con peroxidasa (v) es un método de medición por el método sándwich usando 2 moléculas de Dectina I que se describe en la Bibliografía no perteneciente a patente 1.

Por otro lado, en la Tabla 5, el método para medir βG usando la proteína de unión a βG implicada en la presente invención es un método que usa tanto placa (iii) que está inmovilizada con el fragmento a derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) como con el fragmento a derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*).

15 Como resulta evidente a partir de los resultados de la Tabla 5, la combinación en la que el valor en la Tabla 3 es 100 o más y la relación S/N en la Tabla 4 es 1,5 o más era un sistema de medición usando la placa (iii) que está inmovilizada con el fragmento a derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) y el fragmento a derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*).

20 Mediante el método que usaba 2 moléculas de Dectina, que es el sistema de medición de sándwich ya conocido (el método que usa tanto una placa inmovilizada con Dectina como con Dectina marcada con peroxidasa), no pudo obtenerse un resultado favorable.

A partir de los resultados mencionados anteriormente, se mostró que un sistema de medición sándwich que usaba el fragmento a (iii) derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) que es una proteína de unión a βG implicada en la presente invención, era útil para medir el βG.

25 Ejemplo 3: Medición sándwich usando un fragmento derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) (1)

(1) Designación de un fragmento derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*)

30 Basándose en la secuencia de aminoácidos de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) (SEQ ID NO: 2) obtenida en el Ejemplo 1 (5), se diseñaron los siguientes 4 tipos de fragmentos derivados de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*). Ha de apreciarse que el diagrama esquemático de cada fragmento se muestra colectivamente en la Figura 1, de manera que puede compararse con el diagrama esquemático de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*).

35 1) Fragmento a derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*): El fragmento a obtenido en el Ejemplo 1. Consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 que se codifica

por una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3. Corresponde a una secuencia de aminoácidos de la parte del 233 al 649 de N-terminal de la secuencia de aminoácidos de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) mostrada en la SEQ ID NO: 2. Tiene un dominio tipo xilanasas A (existen dos motivos QQWS) y un dominio dimérico tipo xilanasas Z (XlnZ).

5 2) Fragmento b derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*): Consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 que se codifica por una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5. Corresponde a una secuencia de aminoácidos de la parte del 387 al 649 de N-terminal de la secuencia de aminoácidos de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) mostrada en la SEQ ID NO: 2. Tiene un dominio dimérico de tipo xilanasas Z (XlnZ).

10 3) Fragmento c derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*): Consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 8 que se codifica por una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7. Corresponde a una secuencia de aminoácidos de la parte del 524 al 649 de N-terminal de la secuencia de aminoácidos de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) mostrada en la SEQ ID NO: 2. Tiene un dominio de tipo xilanasas Z en el lado C-terminal del dominio dimérico de tipo xilanasas Z (XlnZ) poseído por la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*.

15 4) Fragmento d derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*): Consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 10 que se codifica por una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 9. Corresponde a una secuencia de aminoácidos de la parte del 233 al 515 de N-terminal de la secuencia de aminoácidos de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) mostrada en la SEQ ID NO: 2. Tiene un dominio de tipo xilanasas A (existen dos motivos QQWS) y un dominio de tipo xilanasas Z en el lado N-terminal del dominio dimérico de tipo xilanasas Z (XlnZ) poseído por la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*.

(2) Designación de un fragmento derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Tachypleus tridentatus*)

25 Basándose en la secuencia de nucleótidos de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Tachypleus tridentatus*) (SEQ ID NO: 11) descrita en la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information), se diseñaron los siguientes 4 tipos de fragmentos derivados de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Tachypleus tridentatus*). Ha de apreciarse que el diagrama esquemático de cada fragmento se muestra colectivamente en la Figura 2, de manera que puede compararse con el diagrama esquemático de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Tachypleus tridentatus*).

30 1) Fragmento e derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Tachypleus tridentatus*): Consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 14 que se codifica por una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 13. Corresponde a una secuencia de aminoácidos de la parte del 299 al 673 de N-terminal de la secuencia de aminoácidos de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Tachypleus tridentatus*) mostrada en la SEQ ID NO: 12. Tiene un dominio de tipo xilanasas A (existen tres motivos QQWS) y un dominio dimérico de tipo xilanasas Z (XlnZ).

35 2) Fragmento f derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Tachypleus tridentatus*): Consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 16 que se codifica por una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 15. Corresponde a una secuencia de aminoácidos de la parte del 410 al 673 de N-terminal de la secuencia de aminoácidos de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Tachypleus tridentatus*) mostrada en la SEQ ID NO: 12. Tiene un dominio dimérico de tipo xilanasas Z (XlnZ).

40 3) Fragmento g derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Tachypleus tridentatus*): Consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 18 que se codifica por una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 17. Corresponde a una secuencia de aminoácidos de la parte del 548 al 673 de N-terminal de la secuencia de aminoácidos de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Tachypleus tridentatus*) mostrada en la SEQ ID NO: 12. Tiene un dominio de tipo xilanasas Z en el lado C-terminal del dominio dimérico de tipo xilanasas Z (XlnZ) poseído por la subunidad α del factor G de *Tachypleus tridentatus*.

45 4) Fragmento h derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Tachypleus tridentatus*): Consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 20 que se codifica por una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 19. Corresponde a una secuencia de aminoácidos de la parte del 299 al 547 de N-terminal de la secuencia de aminoácidos de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Tachypleus tridentatus*) mostrada en la SEQ ID NO: 12. Tiene un dominio de tipo xilanasas A (existen tres motivos QQWS) y un dominio de tipo xilanasas Z en el lado N-terminal del dominio dimérico de tipo xilanasas Z (XlnZ).

(3) Expresión del fragmento derivado del fragmento de origen de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura

55 De cada secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de fragmentos respectivos diseñados en los puntos (1) y (2) anteriores, se diseñaron cebadores de PCR que amplifican una secuencia de nucleótidos que

codifica cada fragmento.

La SEQ ID NO de la secuencia de aminoácidos de cada fragmento, la SEQ ID NO de la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos, y la secuencia de nucleótidos y su SEQ ID NO del par de cebadores usados para clonar las secuencias de nucleótidos respectivas se resumen en la siguiente Tabla 6.

5

[Tabla 6]

Fragmento			Cebador usado			
Nombre	Secuencia de nucleótidos	Secuencia de aminoácidos	cebador F	SEQ ID NO:	cebador R	SEQ ID NO:
a	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO: 4	5'-aatacaccttctcctgttgacg-3'	23	5'-ctggattaagattacaaaggtt-3'	24
b	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO: 6	5'-tctaaattgattcaggcag-3'	25	5'-ctggattaagattacaaaggtt-3'	26
c	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO: 8	5'-tctagagtaattcaggcagaaag-3'	27	5'-ctggattaagattacaaaggtt-3'	28
d	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO: 10	5'-aatacaccttctcctgttgacg-3'	29	5'-aatattacaaaagatccagtcag-3'	30
e	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14	5'-ggttactattttgtcctcagcag-3'	31	5'-ggaatatcaattggattagaattacaaaagtg-3'	32
f	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16	5'-tctaaattaattcaggcag-3'	33	5'-ggaatatcaattggattagaattacaaaagtg-3'	34
g	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	5'-tctaaattaattcaggcag-3'	35	5'-ggaatatcaattggattagaattacaaaagtg-3'	36
h	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	5'-ggttactattttgtcctcagcag-3'	37	5'-aattgaaatcaagggcgctgtaat-3'	38

Cada cebador que tiene la secuencia de nucleótidos descrita en la Tabla 6 se sintetizó por Sigma-Aldrich Corp. en consignación. Posteriormente, la PCR se realizó por el mismo método que en el Ejemplo 1 (6), excepto por el uso del cebador mencionado anteriormente, usando el vector recombinante factor G α de *Limulus polyphemus*/pGEM-T como plantilla. El producto de PCR obtenido se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1 % en presencia de 1 μ g/ml de bromuro de etidio, y se cortó una porción de gel de la banda de aproximadamente 1,5 kbp. El producto de PCR se purificó a partir de la porción de gel usando el kit de extracción de gel QIAquick.

10

Posteriormente, se realizaron la preparación del vector de expresión usando el mismo vector de expresión (vector pTrcHis2) que en el Ejemplo 1 (6), y la transformación de la línea de células competentes DH5 α derivada de la cepa K de *E. coli*. Después, por el mismo método que en el Ejemplo 1 (7), el transformante se cultivó y se expresó cada fragmento. Después del cultivo, la proteína se purificó de la solución de cultivo mediante el mismo método que en el Ejemplo 1 (7). La producción en masa de cada fragmento se realizó mediante el método descrito anteriormente.

15

(4) Marcado con peroxidasa del fragmento derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura

Usando el kit de marcado con peroxidasa-SH (producido por Dojindo Laboratories Co., Ltd.), y según el método dado en el manual adjunto al kit, cada fragmento derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) y la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Tachypleus tridentatus*) se marcaron con peroxidasa.

20

(5) Medición sándwich

1) Preparación de cada microplaca inmovilizada con el fragmento de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura para ELISA

25

Cada microplaca inmovilizada con el fragmento de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura *Limulus polyphemus* para ELISA y cada microplaca inmovilizada con el fragmento de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura *Tachypleus tridentatus* para ELISA se preparó por el mismo método que en el Ejemplo 2 (3)1), excepto que se usó cada fragmento derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) y la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Tachypleus tridentatus*) como proteína de unión a β G.

2) Preparación de proteína de unión a β G marcada con peroxidasa

Cada fragmento marcado con peroxidasa derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) y cada fragmento marcado con peroxidasa derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (*Tachypleus tridentatus*) se diluyó 8000 veces con una solución de Blockace al 1 % disuelta en una solución salina tamponada con fosfato 50 mM (pH 7,0).

3) Preparación de la muestra

La muestra se preparó mediante el mismo método usando los mismos reactivos que en el Ejemplo 2 (3) 3).

4) Medición

Se añadieron 50 μ l de muestra (50 pg en el valor reducido de lentinano) preparada en el punto 3) anterior a cada pocillo de la microplaca preparada en el punto 1) anterior. En lo sucesivo, se midió la absorbancia a 450 nm usando $V_{m\acute{a}x}$ (producido por Molecular Devices Inc.) mediante el mismo método que en el Ejemplo 2(3)4).

Ha de apreciarse que se realizó una medición similar usando una muestra de 0 pg/ml en el valor reducido de lentinano para su uso como un valor en blanco.

(6) Resultados

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7.

[Tabla 7]

DO450 nm (x 1000)

		Proteína marcada con peroxidasa							
		a	b	c	d	e	f	g	h
Proteína inmovilizada en una placa	a	353	8	32	411	211	376	58	168
	b	270	3	132	258	167	430	61	27
	c	114	8	24	260	154	217	29	153
	d	NT	NT	NT	340	NT	NT	NT	53
	e	290	NT	164	197	257	355	NT	237
	f	300	9	50	77	237	429	63	201
	g	114	12	38	329	62	118	54	226
	h	NT	NT	NT	305	NT	NT	NT	39

NT: no ensayado

Ha de apreciarse que el valor numérico indicado en la Tabla 7 es un valor que se obtiene restando el valor en blanco de la absorbancia obtenida a DO 450 nm, y multiplicado por 1000.

Además, en la Tabla 7, cada símbolo es un resultado cuando se usan los siguientes fragmentos derivados de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura.

a: fragmento a derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*;

b: fragmento b derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*;

c: fragmento c derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*;

d: fragmento d derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*;

ES 2 655 725 T3

e: fragmento e derivado de la subunidad α del factor G de *Tachypleus tridentatus*;

f: fragmento f derivado de la subunidad α del factor G de *Tachypleus tridentatus*;

g: fragmento g derivado de la subunidad α del factor G de *Tachypleus tridentatus*;

h: fragmento h derivado de la subunidad α del factor G de *Tachypleus tridentatus*.

5 La lectura de los datos en la Tabla 7 es la misma que en el caso de la Tabla 3.

A continuación, el valor de la relación S/N obtenida dividiendo cada valor de medición obtenido de absorbancia por valor en blanco se muestra en la siguiente Tabla 8.

[Tabla 8]

S/N

		Proteína marcada con peroxidasa							
		a	b	c	d	e	f	g	h
	a	4,8	1,2	1,2	2,0	1,6	3,8	1,4	1,5
	b	3,1	1,1	1,5	3,2	1,8	4,5	1,1	1,9
	c	1,6	1,4	1,5	2,3	1,8	3,2	1,2	1,7
Proteína inmovilizada en una placa	d	NT	NT	NT	1,9	NT	NT	NT	1,6
	e	3,6	NT	1,6	1,6	2,1	3,0	NT	1,5
	f	3,3	1,4	1,6	1,1	2,0	4,0	1,3	2,1
	g	1,6	1,5	1,6	1,8	1,6	1,6	1,4	2,3
	h	NT	NT	NT	1,6	NT	NT	NT	1,4

NT: no ensayado

10 Además, los resultados de la evaluación realizada basándose en los resultados de la Tabla 7 y la Tabla 8 se muestran en la siguiente Tabla 9.

[Tabla 9]

Evaluación

		Proteína marcada con peroxidasa							
		a	b	c	d	e	f	g	h
	a	⊙	x	x	○	○	⊙	○	○
	b	⊙	x	○	⊙	○	⊙	Δ	x
	c	○	x	x	○	○	○	x	○
Proteína inmovilizada en una placa	d	NT	NT	NT	○	NT	NT	NT	Δ
	e	⊙	NT	○	○	○	⊙	NT	○
	f	⊙	x	Δ	Δ	○	⊙	○	○
	g	○	x	x	○	Δ	○	Δ	○
	h	NT	NT	NT	○	NT	NT	NT	x

Además, cada símbolo en la Tabla 9 tiene el siguiente significado.

⊙: DO450 nm (x 1000) es 200 o más, y S/N es 3,0 o más;

○: DO450 nm (x 1000) es 100 o más, y S/N es 1,5 o más;

Δ: DO450 nm (x 1000) es 50-99, o S/N es 1,0 o más;

5 X: DO450 nm (x 1000) es 0-49, o S/N es 1,0 o más;

NT: no ensayado.

10 Como resulta evidente a partir de los resultados de la Tabla 9, cuando la combinación de fragmento inmovilizado en una placa con fragmento marcado con peroxidasa (fragmento inmovilizado en una placa con fragmento marcado con peroxidasa) se clasifica por el origen del cangrejo herradura a partir del cual se derivan dichos fragmentos, resulta que la medición del βG puede realizarse incluso cuando la medición se realiza usando cualquier combinación de (*Limulus polyphemus* - *Limulus polyphemus*), (*Limulus polyphemus* - *Tachypleus tridentatus*), (*Tachypleus tridentatus* - *Limulus polyphemus*), y (*Tachypleus tridentatus* - *Tachypleus tridentatus*).

15 Además, como resulta evidente a partir de los resultados de la Tabla 9, en el caso en el que βG se mide por el método del presente Ejemplo, la combinación de (fragmento inmovilizado en una placa - fragmento marcado con peroxidasa) fue (fragmento a - fragmento a), (fragmento a - fragmento f), (fragmento b - fragmento a), (fragmento b - fragmento d), (fragmento b - fragmento f), (fragmento e - fragmento f), y (fragmento f - fragmento f).

20 Además, entre el fragmento usado para la medición, el fragmento a de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*, el fragmento b de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*, el fragmento e de la subunidad α del factor G de *Tachypleus tridentatus* y el fragmento f de la subunidad α del factor G de *Tachypleus tridentatus* tienen dos secuencias repetidas (dímero) del dominio de tipo xilanasas Z.

Por otro lado, cada uno del fragmento c de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*, el fragmento d de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*, el fragmento g de la subunidad α del factor G de *Tachypleus tridentatus* y el fragmento h de la subunidad α del factor G de *Tachypleus tridentatus* tienen un dominio de tipo xilanasas Z (monómero).

25 Y así, cuando la combinación del fragmento inmovilizado en una placa con el fragmento marcado con peroxidasa que se usan para la medición (fragmento inmovilizado en una placa - fragmento marcado con peroxidasa) se clasifica por la estructura del dominio de tipo xilanasas Z, resulta que la medición del βG puede realizarse incluso cuando la medición se realiza usando cualquier combinación de (dímero - dímero), (dímero - monómero), (monómero - dímero), y (monómero - monómero).

30 Además, a partir de estos resultados, también se sugiere que la medición sea posible si se ajustan las condiciones, incluso para algunas combinaciones de las que no se obtienen buenos resultados en las condiciones de medición de este Ejemplo.

35 A partir de los resultados mencionados anteriormente, resulta que la medición de βG puede realizarse si el sistema de medición sándwich se pone en práctica usando una placa inmovilizada con proteína de unión a βG 1 implicada en la presente invención y una proteína de unión a βG 2 implicada en la presente invención que está marcada con una sustancia marcadora, independientemente del cangrejo herradura original a partir del cual se obtiene el fragmento que va a usarse para la medición y la estructura del dominio de tipo xilanasas Z del fragmento que se utilizará para la medición.

40 Ejemplo 4: Medición sándwich usando un fragmento derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (2)

(1) Preparación del fragmento derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura

1) Preparación del fragmento b derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* y el fragmento g derivado de la subunidad α del factor G de *Tachypleus tridentatus*

45 El fragmento b derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* y el fragmento g derivado de la subunidad α del factor G de *Tachypleus tridentatus* se expresaron y se purificaron realizando el mismo que en el Ejemplo 3 (3), excepto que se usó BL21 deficiente en proteasa y derivado de la cepa B (DE3) como *E. coli* para la transformación.

2) Preparación del fragmento g/Cys derivado de la subunidad α del factor G de *Tachypleus tridentatus*

50 Se diseñó el fragmento g/Cys derivado de la subunidad α del factor G de *Tachypleus tridentatus* en el que se introduce un residuo de cisteína en N-terminal de fragmento g (547 aa - 673 aa) derivado de la subunidad α del

factor G de *Tachypleus tridentatus*. Posteriormente, el fragmento g/Cys derivado de la subunidad α del factor G de *Tachypleus tridentatus* se expresó y se purificó realizando el mismo método que en el Ejemplo 3 (3), excepto que se usó un cebador que tenía una secuencia de nucleótidos (5'-tggtctaaattaattcaggcag-3') descrita en la SEQ ID NO: 45 como cebador F, y un cebador que tenía una secuencia de nucleótidos descrita en la SEQ ID NO: 36 como cebador R (el cebador F y el cebador R se sintetizaron por Sigma-Aldrich Corp. en consigna).

(2) Medición sándwich

1) Microplaca inmovilizada en proteína de unión a β G para ELISA

Se usó la misma que se preparó en el Ejemplo 3 (5) 1).

2) Preparación del fragmento de expresión marcado con peroxidasa

10 Usando el kit de marcado con peroxidasa-SH, se marcó cada fragmento obtenido en el punto (1) anterior con peroxidasa según el método dado en el manual adjunto.

3) Muestra:

La muestra se preparó mediante el mismo método usando los mismos reactivos que en el Ejemplo 2 (3)3).

4) Medición

15 Se añadieron 50 μ l de muestra (50 pg en el valor reducido de lentinano) preparada en el punto 3) anterior a cada pocillo de la microplaca preparada en el punto (2) 1) anterior. En lo sucesivo, se midió la absorbancia a 450 nm usando $V_{\text{máx}}$ (producido por Molecular Devices Inc.) mediante el mismo método que en el Ejemplo 2 (3) 4).

Ha de apreciarse que se realizó una medición similar usando una muestra de 0 pg/ml en el valor reducido de lentinano para su uso como un valor en blanco.

20 (3) Resultados

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 10 y la Tabla 11.

25 La Tabla 10 muestra los resultados en el caso en el que se usa un fragmento b marcado con peroxidasa derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* o un fragmento g marcado con peroxidasa derivado de la subunidad α del factor G de *Tachypleus tridentatus* que se obtuvieron en el punto (1) 1) anterior, como un fragmento marcado con peroxidasa.

[Tabla 10]

Secuencia		Fragmento marcado con peroxidasa	
		Fragmento b	Fragmento g
Fragmento inmovilizado en una placa	a	o	x
	b	o	x
	c	o	x
	d	N.T	N.T
	e	o	o
	f	o	x
	g	o	o
	h	N.T	N.T

N.T: no ensayado

30 Además, la Tabla 11 muestra los resultados en el caso en el que se usa un fragmento g marcado con peroxidasa/Cys derivado de la subunidad α del factor G de *Tachypleus tridentatus* como un fragmento marcado con peroxidasa.

[Tabla 11]

Secuencia	Fragmento marcado con peroxidasa (Fragmento g/Cys)	
Fragmento inmovilizado en una placa	a	○
	b	○
	c	○
	d	x
	e	x
	f	x
	g	x
	h	○

En comparación con los resultados de la Tabla 10 y 11 con los resultados de la Tabla 9 obtenidos en el Ejemplo 3, cuando el fragmento b derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* obtenida en el punto (1) 1) anterior se usa como un fragmento marcado con peroxidasa, la medición de β G puede realizarse con suficiente sensibilidad incluso en los casos de (fragmento a - fragmento b), (fragmento b - fragmento b), (fragmento c - fragmento b), (fragmento f - fragmento b), y (fragmento g - fragmento b), aunque la medición de β G no puede realizarse por la combinación de (fragmento inmovilizado en una placa - fragmento marcado con peroxidasa) en el Ejemplo 3.

Además, cuando el fragmento g derivado de la subunidad α del factor G de *Tachypleus tridentatus* obtenido en el punto (1) 1) descrito anteriormente se usa como un fragmento marcado con peroxidasa, la medición de β G pudo realizarse con suficiente sensibilidad, aunque la sensibilidad fue insuficiente por (fragmento g - fragmento g) en el Ejemplo 3.

Además, en el caso del Ejemplo 3, por una combinación de (fragmento c - fragmento g) como la combinación de (fragmento inmovilizado en una placa - fragmento marcado con peroxidasa), β G no pudo medirse, y, además, por una combinación de (fragmento b - fragmento g), β G no pudo medirse con la suficiente sensibilidad. Sin embargo, cuando el fragmento g/Cys derivado de la subunidad α del factor G de *Tachypleus tridentatus* obtenido en el punto (1) 2) anterior se usó como fragmento marcado con peroxidasa, por la combinación de (fragmento c - fragmento g/Cys) y (fragmento b - fragmento g/Cys), β G pudo medirse con suficiente sensibilidad.

Como una razón para eso, se puede considerar lo siguiente. Es decir, en el Ejemplo 3, la peroxidasa está unida a dos restos Cys en el dominio de unión a β G de la subunidad α del factor G. Sin embargo, cuando el fragmento marcado y la muestra se hacen reaccionar para medir β G, se considera que la peroxidasa unida al fragmento interfiere en la unión entre el fragmento y β G. Y así, en el presente Ejemplo, el residuo Cys se introdujo en el extremo N-terminal del fragmento y la peroxidasa se unió al mismo. De este modo, la peroxidasa se no llegó a interferir en la unión entre el fragmento y β G, y se considera que la medición de β G es posible con suficiente sensibilidad.

Como se ha mencionado anteriormente, resultó que tres tipos de fragmentos marcados con peroxidasa usados en el presente Ejemplo podían reaccionar también incluso en la combinación mediante la cual la reacción no se produjo en el Ejemplo 3.

Ejemplo 5: Medición sándwich usando un fragmento derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (3)

(1) Preparación del fragmento a/Cys derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*

Se diseñó el fragmento a/Cys derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* en el que se introdujo un residuo de cisteína en el extremo N-terminal del fragmento a derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*. Posteriormente, el fragmento a/Cys derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* se expresó y purificó realizando el mismo método que en el Ejemplo 1 (6) a (8), excepto que se usó un cebador que tenía una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 46 (5'-tgtctggattaagattacaaagg-3') como cebador F, y un cebador que tenía una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 24 como cebador R (el cebador F y el cebador R se sintetizaron por Sigma-Aldrich Corp. en consigna).

(2) Marcado con peroxidasa del fragmento a/Cys derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*

Utilizando el kit de marcado con peroxidasa-SH, y según el método dado en el manual adjunto al kit, el fragmento a

recombinante/Cys derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* obtenido en el punto (1) anterior se marcó con peroxidasa.

Este producto marcado se diluyó 8000 veces con una solución de Blockace al 1 % disuelta en una solución salina tamponada con fosfato 50 mM que contenía caseína (pH 7,5) y se usó para la medición.

5 (3) Preparación de la muestra

Se diluyó "estándar de β -glucano" unido a la prueba de β -glucano Wako que es un kit para la medición de β G (producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) con albúmina sérica al 0,5 % disuelta en PBS 50 mM (pH 7,5) para dar 1000 pg/ml en el valor reducido de lentinano (descrito en las instrucciones adjuntas en el "estándar de β G": 35 pg del valor indicado corresponden a 1 ng de lentinano). Y se diluyó adicionalmente con albúmina sérica al 0,5 % disuelta en solución salina tamponada con fosfato 50 mM para dar 0, 20, 50, 100, 250, 400 y 500 pg/ml en el valor reducido de lentinano. Se usaron como muestra.

10

(4) Preparación de una microplaca para ELISA inmovilizada con fragmento b derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*

El fragmento b recombinante derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* obtenido en el Ejemplo 3 se ajustó con una solución de tampón MOPS 50 mM (pH 7,0) a 5 μ g/ml, y se dispensó una alícuota de 50 μ l en cada pocillo de la microplaca para ELISA, y permaneciendo en reposo a 10 °C durante 16 horas, el fragmento b derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* se inmovilizó en la microplaca mencionada anteriormente.

15

Posteriormente, como tratamiento de bloqueo para disminuir la adsorción no específica, se añadieron a cada pocillo 0,2 ml de albúmina sérica al 0,5 % disuelta en una solución salina tamponada con fosfato 50 mM (pH 7,0); después de permanecer en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora, cada pocillo se lavó.

20

(5) Medición sándwich

Se añadieron 50 μ l de muestra que tenía cada concentración de lentinano preparada en el punto (3) anterior a cada pocillo de la microplaca preparada en el punto (4) anterior, y se hizo reaccionar a 37 °C durante 1 hora. Posteriormente, cada pocillo se lavó 3 veces con PBS-T (producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). A cada pocillo se le añadieron 50 μ l de fragmento a marcado con peroxidasa derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* preparado en el punto (1) anterior, y se hizo reaccionar a 37 °C durante 1 hora. Cada pocillo se lavó 3 veces con PBS-T, luego una vez con agua destilada. Posteriormente, se añadieron 50 μ l de una solución de TMB (producida por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) a cada pocillo, y se hizo reaccionar a 25 °C durante 30 minutos. Después, se añadieron 50 μ l de solución de terminación de reacción del kit (solución 1 M de ácido fosfórico) a cada pocillo para terminar la reacción. La absorbancia a 450 nm se midió usando V_{\max} (producido por Molecular Devices Inc.).

25

30

En base al valor de medición obtenido, se preparó una curva estándar trazando la absorbancia a 450 nm (DO450 nm, eje y) contra la concentración de lentinano en la muestra (valor reducido, pg/ml, eje x).

35

(6) Resultados

La curva estándar obtenida se muestra en la Figura 4. En la Figura 4, la barra de error muestra un valor de 2 DE.

Además, la fórmula de la línea de regresión y el coeficiente de correlación que se calcularon mediante el método de mínimos cuadrados a partir de los valores de medición son como se indican a continuación.

$$y = 0,0013x + 0,1342$$

40

$$R^2 = 0,9989$$

Como resulta evidente a partir de la Figura 4, resulta que cuando la medición de β G se realiza usando la proteína de unión a β G implicada en la presente invención, se puede obtener una curva estándar favorable en la que la absorbancia es proporcional a la concentración de β G (0 a 500 pg/ml en el valor reducido de lentinano) en una muestra, y puede usarse para la determinación de β G. En particular, se confirmó que la concentración de lentinano podría detectarse significativamente a 20 pg/ml del límite inferior. Ha de apreciarse que, los 20 pg/ml de la concentración de lentinano corresponden a 0,7 pg/ml de glucano en sangre (valor de corte: 11 pg/ml o menos) cuando la medición se realiza por la prueba de β -glucano Wako que es un kit para la medición de β G.

45

Ejemplo 6: Confirmación de la actividad de tipo peroxidasa del fragmento derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura

50

(1) Proteína de unión a β G

Se usaron el fragmento a recombinante derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura obtenido en

el Ejemplo 1, y el fragmento b recombinante derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura obtenido en el Ejemplo 3.

Ha de apreciarse que, como se ha descrito anteriormente, el fragmento a derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* tiene una secuencia de aminoácidos del aminoácido 233 a 649 de N-terminal de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*, y el fragmento b derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* tiene una secuencia de aminoácidos del aminoácido 387 a 649 de N-terminal de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*. Es decir, el fragmento b derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* carece de la secuencia de aminoácidos del aminoácido 233 a 386 de N-terminal de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* en comparación con el fragmento a derivado de la subunidad α del factor G *Limulus polyphemus*.

(2) Medición de la actividad peroxidasa

La proteína de unión a β G del punto (1) descrito anteriormente se preparó para dar 0, 3, 4, 5, 6, y 7 μ g/ml con una solución de tampón MOPS 50 mM (pH 7,0), y se pusieron 50 μ l en cada pocillo de la microplaca para ELISA. Permaneciendo en reposo a 10 °C durante 16 horas, cada proteína de unión a β G se inmovilizó en la microplaca.

Posteriormente, como una operación de bloqueo para reducir la adsorción inespecífica, se dispensaron alícuotas de 0,2 ml de una solución de Blockace al 1 % o albúmina sérica al 0,1 % disuelta en una solución salina tamponada con fosfato 50 mM (pH 7,0) en cada pocillo, y después de permanecer en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora, cada pocillo se lavó.

Posteriormente, se añadieron 50 μ l de una solución de TMB (producida por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) a cada pocillo, y se hizo reaccionar a 25 °C durante 30 minutos. Después, se añadieron 50 μ l de solución de terminación de reacción (solución 1 M de ácido fosfórico) a cada pocillo para terminar la reacción. La absorbancia a 450 nm se midió usando V_{máx} (producido por Molecular Devices Inc.).

Ha de apreciarse que usando una muestra de solamente albúmina sérica al 0,1 % en lugar de proteína de unión a β G, se realizó una medición similar para su uso como un valor en blanco.

(3) Resultados

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5. En la Figura 5, cada barra muestra un resultado obtenido cuando se usaron las siguientes proteínas de unión a β G.

	Fragmento a derivado de la subunidad α del factor G de <i>Limulus polyphemus</i>
	Fragmento b derivado de la subunidad α del factor G de <i>Limulus polyphemus</i>

Como es evidente a partir de la Figura 5, el fragmento b derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* no mostró actividad de peroxidasa dentro del intervalo de concentración de 0, 3, 4, 5, 6 y 7 μ g/ml. Por otro lado, en cuanto al fragmento a derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*, la actividad de la peroxidasa dependiente de la concentración del fragmento se confirmó dentro del intervalo de concentración de 0, 3, 4, 5, 6 y 7 μ g/ml.

A partir de los resultados mencionados anteriormente, se considera que la secuencia de aminoácidos de 233 a 386 de N-terminal del fragmento derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* es esencial para tener actividad de peroxidasa.

Ejemplo 7: Participación del ión metálico en la actividad de la peroxidasa del fragmento a derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*

(1) Medición de la actividad peroxidasa

En una solución de 10 μ g/ml (solución de tampón MOPS 50 mM (pH 7,0)) del fragmento a recombinante derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*, se mezcló etilendiaminotetraacetato disódico (EDTA) o NaN₃ para dar una concentración final de 70 mM o al 0,05 %, respectivamente, y la mezcla se incubó a 25 °C durante 1 hora. Como referencia, se preparó una solución de 10 μ g/ml de fragmento a derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* que no contiene estos agentes quelantes de metales.

Posteriormente, cada solución después de la incubación se preparó para dar 5 μ g/ml de solución del fragmento a derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* con una solución de tampón MOPS 50 mM (pH 7,0), y se puso una alícuota de 50 μ l en cada pocillo de la microplaca para ELISA, y se inmovilizó permaneciendo en reposo a 10 °C durante 12 horas a 20 horas. Como una operación de bloqueo para reducir la adsorción inespecífica, se dispensaron alícuotas de 0,2 ml de una solución de Blockace al 1 % o albúmina sérica al 0,1 % disuelta en una

solución salina tamponada con fosfato 50 mM (pH 7,0) en cada pocillo, y después de permanecer en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora, cada pocillo se lavó.

5 Se añadió una alícuota de 50 μ l de una solución de TMB (producida por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) a cada pocillo, y se hizo reaccionar a 25 °C durante 30 minutos. Luego, se añadieron 50 μ l de solución de terminación de reacción (solución 1 M de ácido fosfórico) a cada pocillo, y se midió la absorbancia a 450 nm de longitud de onda usando Vmáx (producido por Molecular Devices Inc.).

(2) Resultados

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6.

10 Como se desprende de la Figura 6, en cuanto al fragmento a derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*, se confirmó que se había perdido la actividad de la peroxidasa del fragmento a derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* cuando existía EDTA o NaN_3 , que era un agente quelante de metales. En consecuencia, es concebible que, para que el factor G de *Limulus polyphemus* ejerza actividad de peroxidasa, puede estar implicado el ión metálico.

15 Ejemplo 8: Medición sándwich usando un fragmento derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (4)

(1) Preparación del fragmento a/Cys derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*

20 Se diseñó el fragmento a/Cys derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* en el que se introdujo un residuo de cisteína en el extremo N-terminal del fragmento a derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*. Posteriormente, el fragmento a/Cys derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* se expresó y purificó realizando el mismo método que en el Ejemplo 1 (6) a (8), excepto que se usó un cebador que tenía una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 46 (5'-tgtctggattaagattacaaagg-3') como cebador F, y un cebador que tenía una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 24 como cebador R (el cebador F y el cebador R se sintetizaron por Sigma-Aldrich Corp. en consigna).

(2) Marcado de ADN del fragmento a derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*

(i) Preparación de fragmento de ADN de 250 pb para marcado

30 El cebador 1 (5'-gcctagcaaaactcgaagatt-3', SEQ ID NO: 47) y el cebador 2 en el que se había introducido el enlazador C6 amino (producido por Sigma-Aldrich Corporation) en 5'-terminal de antemano (secuencia de nucleótidos: 5'-atctatgactgtacgccaatgtccctag-3', SEQ ID NO: 48) se sintetizaron por Sigma-Aldrich Corp. en consignación. Usando este par de cebadores y usando ADN λ (producido por Nippon Gene Co., Ltd.) como plantilla, se realizó la PCR, y se preparó el ADN de 250 pb que tenía un enlazador C6 amino en el otro extremo. Este producto de PCR se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico DEAE y precipitación con isopropanol, y se obtuvo el fragmento de ADN de 250 pb para marcado.

(ii) Unión del fragmento de ADN de 250 pb al fragmento a derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*

35 Después de hacer reaccionar el grupo NH_2 del enlazador C6 amino introducido en el fragmento de ADN con el enlazador N-(ϵ -maleimidocaproiloxi) succinimida éster (EMCS) (producido por Thermo Fisher Scientific Inc.) mediante el método dado en la dirección unida a EMCS, el enlazador de EMCS sin reaccionar se eliminó por tratamiento de filtración de gel, y se obtuvo el fragmento de ADN unido con el enlazador EMCS. Este fragmento de ADN unido a un enlazador EMCS y el fragmento a del punto (1) anterior se hicieron reaccionar mediante el método dado en la dirección adjunta a EMCS. El producto de reacción obtenido se purificó por cromatografía de intercambio iónico DEAE y cromatografía de filtración en gel, y se obtuvo el fragmento a marcado con ADN derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*.

(3) Marcado por fluorescencia del fragmento a/Cys derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*

45 Usando HiLyte Fluor 647 C2 maleimida (producida por AnaSpec Inc.) y según el método descrito en el manual adjunto, el fragmento a/Cys obtenido en el punto (1) anterior se marcó por fluorescencia con HiLyte Fluor 647.

(4) Preparación de la muestra de β G

50 Se disolvió "estándar de β -glucano" unido a la prueba de β -glucano Wako que es un kit para la medición de β G (producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) en la solución de disolución de estándar de β -glucano unida al kit para preparar una solución estándar (solución madre). Además, la solución madre se diluyó con la solución de disolución del estándar de β -glucano unida al kit para proporcionar 0, 25, 50, 100, 200, 400, y 800 pg/ml en el valor reducido de lentinano. Se usaron como muestra.

(5) Medición sándwich por electroforesis capilar

1) Chip capilar

Se preparó un chip capilar que tenía un diseño mostrado en la Figura 7 como se indica a continuación según el método descrito en "Micro Chemical. Chip Technology and Applications", págs.185-217 [Takehiko Kitamori, et al., publicado en 2004 (Maruzen Co., Ltd.)].

Es decir, se formó una película fotorresistente en una placa de cuarzo revestida de Si. Esta película fotorresistente se expuso a través de una máscara con un diseño (disposición) capilar que se muestra en la Figura 7, y se desarrolló. Después de eliminar el Si de la parte donde se eliminó la fotoprotección mediante revelado por deposición catódica, se realizó un canal capilar (túbulo) sobre la placa de cuarzo realizando un grabado en húmedo usando una solución de ácido fluorhídrico. Después de eliminar el fotoprotector y la película de Si que queda en la placa de cuarzo, la placa de cuarzo mencionada anteriormente y una placa de cubierta que tiene orificios para introducir o descargar diversos reactivos en/desde diversos pocillos se pegaron entre sí mediante un método de conexión HF para preparar el chip capilar.

Debe observarse que en la Figura 7, L1 y L2 indican pocillos para introducir el tampón principal; R1 indica el pocillo para introducir un tampón final; S indica un pocillo para la introducción de muestra para electroforesis; y W1 y W2 indican pocillos para drenaje, respectivamente. Además, en la Figura, la distancia entre L1 a R1 es de 6,3 cm, y de L1 a L2 es de 2,8 cm.

2) Muestra para electroforesis

Usando un fragmento a marcado con ADN/Cys derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* obtenido en el punto (2) anterior y el fragmento a marcado por fluorescencia/Cys derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* obtenido en el punto (3) anterior, se preparó la solución de reactivo para la reacción de la siguiente composición.

Fragmento a marcado con ADN 25 nM/Cys derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*;

Fragmento a marcado por fluorescencia 6 nM/Cys derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*;

BisTris 150 mM;

cloruro de magnesio 100 mM;

pDMA22 (poli(N,N-dimetilacrilamida)) al 0,56 %;

glicerol al 3,33 %;

Tween20 al 0,056 %;

BSA al 0,01 %;

heparina de litio al 1 %.

El pH se ajustó a 7,0.

45 μ l de esta solución de reactivo para una reacción y 5 μ l de muestra de β G preparada en el punto (4) anterior se mezclaron a temperatura ambiente durante 1 minuto, y así, el β G en la muestra y el fragmento a marcado con ADN/Cys derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* y el fragmento a marcado por fluorescencia/Cys derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* se hicieron reaccionar para su uso como una muestra para electroforesis.

3) Reactivos para electroforesis

a) Tampón final: HEPES 125 mM que contenía Tris base 75 mM, pDMA 22 al 0,5 %, Glicerol al 3 %, Tween 20 al 0,05 %, y BSA al 0,01 %;

b) Tampón principal: Tris-HCl 75 mM (pH 8,0) que contiene NaCl 50 mM, pDMA22 al 0,5 %, Glicerol al 3 %, Tween20 al 0,05 %, BSA al 0,01 %, y Heparina Li al 1 %.

4) Introducción de muestra para electroforesis y solución de reactivo

En la figura 7, se añadieron por goteo 10 μ l de muestra para electroforesis obtenida en el punto 2 anterior en el pocillo S (un pocillo para introducir una muestra para electroforesis), 10 μ l de tampón final en el pocillo R1 (un pocillo para introducir solución de reactivo), 10 μ l de tampón principal en el pocillo L1 y el pocillo L2, respectivamente; después, la muestra para electroforesis y el tampón principal se introdujeron en el canal aplicando -5 psi entre el pocillo W1 (un pocillo para drenaje) y el pocillo W2 (un pocillo para drenaje) durante 100 segundos.

5) Concentración/separación/detección

Se aplicó una tensión de 2500 V entre el pocillo R1 - el pocillo L1 en la Figura 7, y se realizó la electroforesis en la dirección R1 → L1 a 30 °C, mientras que la muestra se condensó. Controlando la tensión entre el pocillo L1 - pocillo L2, se verificó el paso sobre el punto de unión del canal L2 y el canal principal. En el momento del paso, aplicando una tensión de 1500 V entre el pocillo L2 y el pocillo L1 durante 120 segundos, se realizó la electroforesis en la dirección del pocillo L2 → pocillo L1, el fragmento α marcado por fluorescencia sin reaccionar/Cys derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* en la muestra mencionada anteriormente, y un complejo formado por β G en la muestra, el producto marcado con ADN del fragmento α /Cys derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* y el fragmento α -Cys marcado por fluorescencia derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* se separaron, y se detectó la cantidad del complejo mencionado anteriormente.

Ha de apreciarse que la detección se realizó midiendo la intensidad de fluorescencia con el tiempo mediante excitación láser a 650 nm usando un microscopio de fluorescencia (BX-50, producido por KS Olympus Co., Ltd.) en una sección capilar separada en 2 cm desde el punto de unión de L2 hacia L1.

Basándose en los resultados, se preparó una curva estándar, que se realizó representando un valor integrado en el tiempo de la intensidad de fluorescencia del complejo mencionado anteriormente (un valor que se obtuvo al controlar la intensidad de fluorescencia e integrar la intensidad del pico correspondiente para el tiempo, eje y) frente a una concentración de lentinano en la muestra (un valor reducido, pg/ml, eje x).

(6) Resultados

La curva estándar obtenida se muestra en la Figura 8. En la Figura 8, la barra de error muestra 2 DE.

Además, la fórmula de la línea de regresión y el coeficiente de correlación que se calcularon mediante el método de mínimos cuadrados a partir de los valores de medición son como se indican a continuación.

$$y = 0,0370x + 5,1$$

$$R^2 = 0,9999$$

Como resulta evidente a partir de la Figura 8, resulta que cuando la medición de β G se realiza usando la proteína de unión a β G implicada en la presente invención, se puede obtener una curva estándar favorable que es proporcional a la concentración de β G (0 a 800 pg/ml en el valor reducido de lentinano) en una muestra y se puede usar para la medición de β G. Particularmente, se confirmó que la concentración podría detectarse significativamente hasta el límite inferior de 50 pg/ml en la concentración de lentinano. Ha de apreciarse que, los 50 pg/ml en la concentración de lentinano corresponden a 1,75 pg/ml de glucano en sangre (valor de corte: 11 pg/ml) cuando la medición se realiza usando la prueba de β -glucano Wako que es un kit para la medición de β G.

Ejemplo 9: Medición sándwich usando un fragmento derivado de la subunidad α del factor G de cangrejo herradura (5)

(1) Fragmento α /Cys derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*

Se usó el fragmento α /Cys recombinante derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* obtenido en el Ejemplo 8.

(2) Marcado con peroxidasa del fragmento α /Cys derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*

Utilizando el kit de marcado con peroxidasa-SH, y según el método dado en el manual adjunto al kit, el fragmento α recombinante/Cys derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* del punto (1) anterior se marcó con peroxidasa.

Este producto marcado se diluyó 8000 veces con una solución de Blockace al 1 % disuelta en una solución salina tamponada con fosfato 50 mM que contenía caseína (pH 7,5) y se usó para la medición.

(3) Preparación de la muestra en plasma

El plasma humano se diluyó 10 veces con PBS 50 mM (pH 7,5, que contenía albúmina sérica al 0,5 %), y la mitad de la solución se sometió a tratamiento térmico en un baño de agua caliente a 70 °C durante 10 minutos (pretratamiento). El plasma pretratado y el plasma que no se pretrató se usaron como una muestra de plasma, respectivamente.

(4) Preparación de una microplaca para ELISA inmovilizada con fragmento α derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*

El fragmento α recombinante derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* obtenido en el Ejemplo

1 se ajustó con una solución de tampón MOPS 50 mM (pH 7,0) a 5 µg/ml, y se dispensó una alícuota de 50 µl en cada pocillo de la microplaca para ELISA, y permaneciendo en reposo a 10 °C durante 16 horas, el fragmento a derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* se inmovilizó en la microplaca mencionada anteriormente.

5 Posteriormente, como tratamiento de bloqueo para disminuir la adsorción no específica, se añadieron a cada pocillo 0,2 ml de albúmina sérica al 0,5 % disuelta en una solución salina tamponada con fosfato 50 mM (pH 7,0); después de permanecer en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora, cada pocillo se lavó.

(5) Medición sándwich

10 Se añadieron 50 µl de muestra en plasma preparada en el punto (3) anterior a cada pocillo de la microplaca preparada en el punto (4) anterior, y se hizo reaccionar a 37 °C durante 1 hora. Posteriormente, cada pocillo se lavó 3 veces con PBS-T (producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). A cada pocillo se le añadieron 50 µl de fragmento a marcado con peroxidasa derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* preparado en el punto (1) anterior, y se hizo reaccionar a 37 °C durante 1 hora. Cada pocillo se lavó 3 veces con PBS-T, luego una vez con agua destilada. Posteriormente, se añadieron 50 µl de una solución de TMB (producida por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) a cada pocillo, y se hizo reaccionar a 25 °C durante 30 minutos. Después, se añadieron 50 µl de solución de terminación de reacción del kit (solución 1 M de ácido fosfórico) a cada pocillo para terminar la reacción. La absorbancia a 450 nm se midió usando $V_{\text{máx}}$ (producido por Molecular Devices Inc.).

Aparte de esto, como para el estándar de β -glucano, se realizó una medición similar usando muestras preparadas por el método del Ejemplo 5 (3), se preparó una curva estándar.

20 Ajustando el valor de absorbancia obtenido con el uso de la muestra en plasma con respecto a la curva estándar mencionada anteriormente, se calculó la cantidad de β G en la muestra en plasma.

25 Se debe observar que se realizó una prueba de recuperación de adición mediante un procedimiento de rutina para confirmar el rendimiento del método de medición de la presente invención. Es decir, usando una muestra en plasma que es un plasma negativo para β G añadido con una cierta cantidad de β G, se realizó la medición de β G mediante el método del presente Ejemplo. Como resultado, la tasa de recuperación de adición fue del 72,8 % al 93,9 %, mostrando una buena tasa de recuperación.

Además, se confirmó que el método de medición de β G mediante el método del presente Ejemplo no se vio influenciado por la heparina contenida en el plasma.

(6) Resultados

30 Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 12.

Ejemplo comparativo 1.

(1) Muestra en plasma

Se usó la muestra en plasma pretratada en el Ejemplo 9.

(2) Medición de la concentración de β G

35 Utilizando la prueba de β -glucano Wako disponible comercialmente que es un kit para la medición β G (producida por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), se midió la concentración de β G de la muestra en plasma del punto (1) anterior según el método de operación descrito en un documento adjunto al kit mencionado anteriormente, y según un procedimiento común de método cinético turbidimétrico, el β G se midió como se indica a continuación.

40 Es decir, se añadieron 200 µl de muestra en plasma pretratada al reactivo Limulus del kit (producto liofilizado: que contiene extracto de hemocito de Limulus (AL)). Después de agitar durante varios segundos usando el mezclador vorticial, se midió el tiempo necesario para que la intensidad de luz transmitida a través de la solución mixta mencionada anteriormente disminuya en un 5 % desde el inicio de la medición (en lo sucesivo en el presente documento, abreviado como Tg) bajo calentamiento a 37 °C usando el Toxinometer MT- 5500 (producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Aparte de esto, se realizó la misma medición usando agua destilada y una solución de β G de concentración conocida, y se preparó una curva estándar que muestra una relación entre la concentración de β G y la Tg. La concentración de β G en la muestra se calculó basándose en esta curva estándar.

(3) Resultados

Los resultados obtenidos se muestran conjuntamente en la Tabla 12.

[Tabla 12]

Concentración de β G (pg/ml)

	Ejemplo 9		Ejemplo comparativo 1
	Pretratado	No pretratado	Pretratado
Muestra en plasma 1	Por debajo del límite de detección	Por debajo del límite de detección	Por debajo del límite de detección
Muestra en plasma 2	Por debajo del límite de detección	Por debajo del límite de detección	Por debajo del límite de detección
Muestra en plasma 3	126,1	129,6	174,5
Muestra en plasma 4	288,1	287,6	300,1

5

El método convencional para medir β G usando extracto de hemocito de cangrejo herradura es un método que usa cascada de proteasa, sin embargo, la cascada se inhibe por proteasas contenidas en una muestra de sangre. Por lo tanto, para medir el β G mediante el método convencional usando extracto de hemocito de cangrejo herradura, es indispensable un pretratamiento en el que la enzima en la muestra de sangre se desactive de antemano por tratamiento térmico de la muestra de sangre.

10

En el Ejemplo 9, la concentración de β G en las muestras de plasma pretratadas y no pretratadas se midió mediante el método de ELISA tipo sándwich de la presente invención. Como resultado, como resulta evidente a partir de la Tabla 12, las concentraciones de β G medidas usando la muestra de plasma que no se pretrató, se aproximaron a las concentraciones de β G medidas usando la muestra en plasma pretratada. Además, los valores también fueron cercanos a las concentraciones de β G obtenidas midiendo las concentraciones de β G en la muestra en plasma pretratada mediante el método de medición convencional usando extracto de hemocito de cangrejo herradura (Ejemplo comparativo 1). Del hecho mencionado anteriormente, resulta que, si se realiza el método para medir β G de la presente invención, se puede medir β G sin volver a tratar una muestra. Además, los resultados anteriores sugieren que el método para medir el β G de la presente invención puede ser un nuevo sistema de detección para detectar β G en una muestra clínica.

15

Ejemplo 10: Correlación del valor de β G en plasma entre el método de medición sándwich de la presente invención y el método de medición convencional que utiliza extracto de hemocito de cangrejo herradura

20

(1) Medición sándwich de la presente invención

1) Fragmento a marcado con peroxidasa/Cys derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*

Se usó el fragmento a marcado con peroxidasa/Cys derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* preparado en el Ejemplo 9.

25

2) Preparación de una microplaca para ELISA inmovilizada con fragmento a derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*

Se usó la microplaca para ELISA inmovilizada con el fragmento a derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* preparado en el Ejemplo 9.

3) Preparación de la muestra en plasma

30

El plasma humano (N = 50) en el que se había confirmado la concentración de β G como por debajo de un valor de corte por la medición usando una prueba de β -glucano Wako disponible en el mercado (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y pretratada por el mismo método que en el Ejemplo 9 se usó como una muestra en plasma.

4) Medición sándwich

Usando el mismo equipo que el utilizado en el Ejemplo 9, y realizando la medición en las mismas condiciones de medición, se calculó la concentración de β G en una muestra en plasma.

35

(2) Medición utilizando extracto de hemocito de cangrejo herradura (método cinético turbidimétrico)

La concentración de β G en una muestra en plasma se calculó de la misma manera que en el Ejemplo comparativo 1,

excepto que se usó la misma muestra que se usó en el punto (1) 3) anterior como muestra en plasma.

(3) Resultados

Un diagrama de correlación entre la concentración de β G obtenida por el método de medición sándwich de la presente invención (el método para medir β G de la presente invención) y la concentración de β G obtenida usando un kit comercialmente disponible del método de medición convencional usando extracto de hemocito de cangrejo herradura (el método de medición convencional) se muestran en la Figura 9.

La fórmula de la línea de regresión y el coeficiente de correlación que se obtuvieron realizando el análisis de regresión para los resultados de la Figura 9 son como se indican a continuación.

$$y = 0,506x + 6,248;$$

$$R = 0,933.$$

Como resulta evidente a partir de los resultados mencionados anteriormente, resulta que las concentraciones de β G obtenidas por el método para medir β G de la presente invención muestran una buena correlación con las concentraciones de β G obtenidas por el método de medición convencional usando extracto de hemocito de cangrejo herradura. Los resultados anteriores sugieren que el método para medir el β G de la presente invención puede ser un nuevo sistema de detección para detectar β G en una muestra clínica.

Ejemplo 11: Medición sándwich usando el fragmento derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* (6)

(1) Fragmento a marcado con peroxidasa/Cys derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*

Se usó el fragmento a marcado con peroxidasa/Cys derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* preparado en el Ejemplo 9.

(2) Una microplaca para ELISA inmovilizada con fragmento b derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus*

Se usó la microplaca para ELISA inmovilizada con el fragmento b derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* preparado en el Ejemplo 5 (4).

(3) Preparación de la muestra de β G

Se disolvió "estándar de β -glucano" unido a la prueba de β -glucano Wako que era un kit para la medición de β G (producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) en la solución de disolución de estándar de β -glucano unida al kit para preparar una solución estándar (solución madre). Además, la solución madre se diluyó con la solución de disolución del estándar de β -glucano unida al kit para proporcionar 0, 1, 5, 10, 17, 50, y 100 pg en el valor reducido de lentinano. Se usaron como muestra.

(4) Medición sándwich

Se añadieron 50 μ l de muestra preparada en el punto (3) anterior a cada pocillo de la microplaca del punto (2) anterior, y se hizo reaccionar a 37 °C durante 1 hora. Posteriormente, cada pocillo se lavó 3 veces con PBS-T (producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). A cada pocillo se le añadieron 50 μ l de fragmento a marcado con peroxidasa/Cys derivado de la subunidad α del factor G de *Limulus polyphemus* del punto (1) anterior, y se hizo reaccionar a 37 °C durante 1 hora. Cada pocillo se lavó 3 veces con PBS-T, luego una vez con agua destilada. Posteriormente, se añadió sustrato Super Signal ELISA Feta Maximum Sensitivity Substrate (producido por Thermo Fisher Scientific Inc.), y se hizo reaccionar según las instrucciones de uso adjuntas al kit.

Se midió la cantidad de luminiscencia (cps, recuentos por segundo) usando Ultra Evolution (fabricado por TECAN Group Ltd.).

(5) Resultados

Los resultados se muestran en la Figura 10. En la Figura 10, la barra de error muestra un valor de 1 DE.

Como resulta evidente a partir de la Figura 10, se confirmó que cuando la medición de β G se realizó midiendo la fluorescencia usando la proteína de unión a β G implicada en la presente invención, el β G podría detectarse significativamente hasta el límite inferior de 1 pg/ml en concentración de lentinano.

Además, el valor de corte de glucano en sangre es de 11 pg/ml cuando la medición se realiza mediante la prueba de β -glucano Wako, que es un kit disponible comercialmente para la medición β G. Se sabe que 1 pg de lentinano es equivalente a 0,035 pg de glucano. En el presente ejemplo, resultó que el límite inferior de concentración de lentinano detectable era de 1 pg/ml, e incluso si se tenía en cuenta la velocidad de dilución de la muestra, se puede

medir una concentración inferior al valor de corte del kit comercial para la medición de β G, es decir, β G puede medirse con una sensibilidad extremadamente alta.

5 Se considera que, de manera similar al caso del Ejemplo 4, realizando el marcado con peroxidasa del fragmento a en el que se introduce Cys, se genera una distancia entre la peroxidasa unida al fragmento a y el sitio de unión a β G en el fragmento a, y, por lo tanto, la peroxidasa no lleva a interferir en la unión del fragmento y β G, y la medición de β G se puede realizar con suficiente sensibilidad.

Aplicabilidad industrial

10 El método para medir β G de la presente invención puede utilizar una proteína de unión a β G recombinante y no necesita usar materiales naturales. Por lo tanto, el método no tiene mucha diferencia causada por el reactivo, y ejerce un efecto de que se puede realizar una medición específica de β G con una sensibilidad de medición constante y, sin embargo, alta.

Descripción de los símbolos

L1, L2: pocillo para conducir la introducción de tampón;

R1: pocillo para seguir la introducción del tampón;

15 S: pocillo para introducir una muestra para electroforesis;

W1, W2: pocillo para drenaje.

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Wako Pure Chemical Industries, Ltd.	
5	<120> Método para medir beta-glucano	
	<130> F1810WAKOPAT	
	<150> JP2009-063780	
10	<151> 17-2009	
	<160> 48	
	<170> PatentIn versión 3.3	
15	<210> 1	
	<211> 1947	
	<212> ADN	
20	<213> Limulus sp.	
	<220>	
	<221> CDS	
25	<222> (1)..(1947)	
	<400> 1	
	agc cag gaa cca aaa tgg aag ctc gtc tgg tgc gat gaa ttt acc aat	48
	Ser Gln Glu Pro Lys Trp Lys Leu Val Trp Ser Asp Glu Phe Thr Asn	
	1 5 10 15	
	gga atc agt tca gat tgg gaa ttc gaa acg ggc aat ggc ccc aac ggt	96
	Gly Ile Ser Ser Asp Trp Glu Phe Glu Thr Gly Asn Gly Pro Asn Gly	
	20 25 30	
	tgg ggc aat aac gaa ctg caa tat tat cgt cgt gaa aat acc cga gtt	144
	Trp Gly Asn Asn Glu Leu Gln Tyr Arg Arg Glu Asn Thr Arg Val	
	35 40 45	
	gag ggc ggg aaa tta ata att aca gct aaa gaa gaa gat tat gag ggt	192
	Glu Gly Gly Lys Leu Ile Ile Thr Ala Lys Glu Glu Asp Tyr Glu Gly	
	50 55 60	
	ttc agg tac act tct gcc aag ctg aaa acc cag ttc aat aaa cct tgg	240
	Phe Arg Tyr Thr Ser Ala Lys Leu Lys Thr Gln Phe Asn Lys Pro Trp	
	65 70 75 80	
	aaa gat ggt aaa att gaa gcc aga atg tgc att cca tca ttt cgg ggg	288
	Lys Asp Gly Lys Ile Glu Ala Arg Met Ser Ile Pro Ser Phe Arg Gly	
	85 90 95	
	gtc tgg gtg gcg ttc tgg atg tta gga gac atc acc gat act gat agc	336
	Val Trp Val Ala Phe Trp Met Leu Gly Asp Ile Thr Asp Thr Asp Ser	
	100 105 110	
	tgg ccc tct tcc ggt gaa att gac ttt gag gaa cat ata aat acc aac	384
	Trp Pro Ser Ser Gly Glu Ile Asp Phe Glu Glu His Ile Asn Thr Asn	
	115 120 125	
	aat gaa gtt aga gga act att cac tgg tct act tct gat gac gct gat	432
	Asn Glu Val Arg Gly Thr Ile His Trp Ser Thr Ser Asp Asp Ala Asp	

ES 2 655 725 T3

130	135	140	
aca ctt cat ggc aga gga acc aat act gac tat cac att tat tct gta Thr Leu His Gly Arg Gly Thr Asn Thr Asp Tyr His Ile Tyr Ser Val 145 150 155 160			480
gag tgg aat tct tcc gtt att aga tgg ttt gtt gat gga aat cag tac Glu Trp Asn Ser Ser Val Ile Arg Trp Phe Val Asp Gly Asn Gln Tyr 165 170 175			528
ttt gat gtg aat att cag aga gga gca act gga aca aac gca ttt cat Phe Asp Val Asn Ile Gln Arg Gly Ala Thr Gly Thr Asn Ala Phe His 180 185 190			576
aat aac gtt ttc gtt att tta aac atg gct att ggt gga aac tgg cca Asn Asn Val Phe Val Ile Leu Asn Met Ala Ile Gly Gly Asn Trp Pro 195 200 205			624
gga ttc aat gtt gct gat gag gct ttc cct gct aac atg tat gta gat Gly Phe Asn Val Ala Asp Glu Ala Phe Pro Ala Asn Met Tyr Val Asp 210 215 220			672
tat gtc cgt gta tat cag gat gcc aat aca cct tct cct gtt gac gtt Tyr Val Arg Val Tyr Gln Asp Ala Asn Thr Pro Ser Pro Val Asp Val 225 230 235 240			720
act cat tta tct ggt tac tat ttt ctt caa aat agg cac agt gaa ctg Thr His Leu Ser Gly Tyr Tyr Phe Leu Gln Asn Arg His Ser Glu Leu 245 250 255			768
tat ctt gat gtc agt ggt tcc agt aac gaa gat gga gca ttt cta caa Tyr Leu Asp Val Ser Gly Ser Ser Asn Glu Asp Gly Ala Phe Leu Gln 260 265 270			816
caa tgg cct tat agc ggt aat gct aac caa cag ttt gat ttt gta cat Gln Trp Pro Tyr Ser Gly Asn Ala Asn Gln Gln Phe Asp Phe Val His 275 280 285			864
ctc gga aat aag gtt tat aaa att atc aat aaa aat agt gga aaa tct Leu Gly Asn Lys Val Tyr Lys Ile Ile Asn Lys Asn Ser Gly Lys Ser 290 295 300			912
ctg gat gtt tac gag tta ggg act gat aat ggt gtc aga atc caa cag Leu Asp Val Tyr Glu Leu Gly Thr Asp Asn Gly Val Arg Ile Gln Gln 305 310 315 320			960
tgg tcg tat gga ggg ggc tac aat cag cag ttt att gta caa gat gtt Trp Ser Tyr Gly Gly Gly Tyr Asn Gln Gln Phe Ile Val Gln Asp Val 325 330 335			1008
gga gat ggt tat tat aag ata ttt gca cgc agc act gga aag tta gtg Gly Asp Gly Tyr Tyr Lys Ile Phe Ala Arg Ser Thr Gly Lys Leu Val 340 345 350			1056
gaa gta gca gat ttg aat aaa gac cca gga gga aag ata caa caa tgg Glu Val Ala Asp Leu Asn Lys Asp Pro Gly Gly Lys Ile Gln Gln Trp 355 360 365			1104
tct gat gat ggc caa tta tcc gga cag tgg aaa ctt att cga aat aaa Ser Asp Asp Gly Gln Leu Ser Gly Gln Trp Lys Leu Ile Arg Asn Lys			1152

ES 2 655 725 T3

370	375	380	
gct aat tct aaa ttg att cag gca gaa agt tat ttt gct agt tca aaa			1200
Ala Asn Ser Lys Leu Ile Gln Ala Glu Ser Tyr Phe Ala Ser Ser Lys			
385	390	395	400
gta caa ttg gaa gat acc tcg gat gta gga ggc ggg aag aat gtc aag			1248
Val Gln Leu Glu Asp Thr Ser Asp Val Gly Gly Gly Lys Asn Val Lys			
	405	410	415
tgt gat aat gaa gga gcc tgg atg gct tac aag gat atc aat ttc cca			1296
Cys Asp Asn Glu Gly Ala Trp Met Ala Tyr Lys Asp Ile Asn Phe Pro			
	420	425	430
agt tca ggt act tat caa gta gag tac aga gtg gca agt gaa cgt gca			1344
Ser Ser Gly Thr Tyr Gln Val Glu Tyr Arg Val Ala Ser Glu Arg Ala			
	435	440	445
gga gga atg ttg tct ctg gat ttg aat gca ggt tct ata gtg ctt ggc			1392
Gly Gly Met Leu Ser Leu Asp Leu Asn Ala Gly Ser Ile Val Leu Gly			
	450	455	460
atg ctg aat gtt cct tca act gga gga ttg cag aag tgg acc acc att			1440
Met Leu Asn Val Pro Ser Thr Gly Gly Leu Gln Lys Trp Thr Thr Ile			
	465	470	480
tcc cac aca gtg aat gta agt tca ggt acg tac aac ttg ggg atc agt			1488
Ser His Thr Val Asn Val Ser Ser Gly Thr Tyr Asn Leu Gly Ile Ser			
	485	490	495
gtt caa cga ccc ggg tgg aat atc aac tgg att aat att aca aaa gta			1536
Val Gln Arg Pro Gly Trp Asn Ile Asn Trp Ile Asn Ile Thr Lys Val			
	500	505	510
tcc agt cag ttg aaa tct att cca agt act aat tct aga gta att cag			1584
Ser Ser Gln Leu Lys Ser Ile Pro Ser Thr Asn Ser Arg Val Ile Gln			
	515	520	525
gca gaa agt tat ttc gat agt tca aaa gta caa ttg gaa gac acc tcg			1632
Ala Glu Ser Tyr Phe Asp Ser Ser Lys Val Gln Leu Glu Asp Thr Ser			
	530	535	540
gat gtt gga ggc ggg aag aat gtt aag tgt gat act aaa gga gcc tgg			1680
Asp Val Gly Gly Gly Lys Asn Val Lys Cys Asp Thr Lys Gly Ala Trp			
	545	550	555
atg gcc tac aag gat atc aat ttt ccc agt tca ggt agt tat caa ata			1728
Met Ala Tyr Lys Asp Ile Asn Phe Pro Ser Ser Gly Ser Tyr Gln Ile			
	565	570	575
gag tac aga gtg gca agt gaa cgt gca gga gga aag ttg tct ctc gat			1776
Glu Tyr Arg Val Ala Ser Glu Arg Ala Gly Gly Lys Leu Ser Leu Asp			
	580	585	590
ttg aat gca ggt tct ata gtg ctt gga atg ctg gat gtt cct tca act			1824
Leu Asn Ala Gly Ser Ile Val Leu Gly Met Leu Asp Val Pro Ser Thr			
	595	600	605
ggg gga tgg cag aag tgg acc acc att tcc cat aca gta aag gtg gat			1872
Gly Gly Trp Gln Lys Trp Thr Thr Ile Ser His Thr Val Lys Val Asp			
610	615	620	
tca ggt act tat aac ttg ggg atc tac gtt caa caa ccc ggg tgg aat			1920
Ser Gly Thr Tyr Asn Leu Gly Ile Tyr Val Gln Gln Pro Gly Trp Asn			
	625	630	635
atc aac tgg att aag att aca aag gtt			1947
Ile Asn Trp Ile Lys Ile Thr Lys Val			
	645		

ES 2 655 725 T3

<210> 2
 <211> 649
 <212> PRT
 <213> Limulus sp.

5

<400> 2
 Ser Gln Glu Pro Lys Trp Lys Leu Val Trp Ser Asp Glu Phe Thr Asn
 1 5 10 15

 Gly Ile Ser Ser Asp Trp Glu Phe Glu Thr Gly Asn Gly Pro Asn Gly
 20 25 30

 Trp Gly Asn Asn Glu Leu Gln Tyr Tyr Arg Arg Glu Asn Thr Arg Val
 35 40 45

 Glu Gly Gly Lys Leu Ile Ile Thr Ala Lys Glu Glu Asp Tyr Glu Gly
 50 55 60

 Phe Arg Tyr Thr Ser Ala Lys Leu Lys Thr Gln Phe Asn Lys Pro Trp
 65 70 75 80

 Lys Asp Gly Lys Ile Glu Ala Arg Met Ser Ile Pro Ser Phe Arg Gly
 85 90 95

 Val Trp Val Ala Phe Trp Met Leu Gly Asp Ile Thr Asp Thr Asp Ser
 100 105 110

 Trp Pro Ser Ser Gly Glu Ile Asp Phe Glu Glu His Ile Asn Thr Asn
 115 120 125

 Asn Glu Val Arg Gly Thr Ile His Trp Ser Thr Ser Asp Asp Ala Asp
 130 135 140

 Thr Leu His Gly Arg Gly Thr Asn Thr Asp Tyr His Ile Tyr Ser Val
 145 150 155 160

 Glu Trp Asn Ser Ser Val Ile Arg Trp Phe Val Asp Gly Asn Gln Tyr
 165 170 175

ES 2 655 725 T3

Phe Asp Val Asn Ile Gln Arg Gly Ala Thr Gly Thr Asn Ala Phe His
 180 185 190
 Asn Asn Val Phe Val Ile Leu Asn Met Ala Ile Gly Gly Asn Trp Pro
 195 200 205
 Gly Phe Asn Val Ala Asp Glu Ala Phe Pro Ala Asn Met Tyr Val Asp
 210 215 220
 Tyr Val Arg Val Tyr Gln Asp Ala Asn Thr Pro Ser Pro Val Asp Val
 225 230 235 240
 Thr His Leu Ser Gly Tyr Tyr Phe Leu Gln Asn Arg His Ser Glu Leu
 245 250 255
 Tyr Leu Asp Val Ser Gly Ser Ser Asn Glu Asp Gly Ala Phe Leu Gln
 260 265 270
 Gln Trp Pro Tyr Ser Gly Asn Ala Asn Gln Gln Phe Asp Phe Val His
 275 280 285
 Leu Gly Asn Lys Val Tyr Lys Ile Ile Asn Lys Asn Ser Gly Lys Ser
 290 295 300
 Leu Asp Val Tyr Glu Leu Gly Thr Asp Asn Gly Val Arg Ile Gln Gln
 305 310 315 320
 Trp Ser Tyr Gly Gly Gly Tyr Asn Gln Gln Phe Ile Val Gln Asp Val
 325 330 335
 Gly Asp Gly Tyr Tyr Lys Ile Phe Ala Arg Ser Thr Gly Lys Leu Val
 340 345 350
 Glu Val Ala Asp Leu Asn Lys Asp Pro Gly Gly Lys Ile Gln Gln Trp
 355 360 365
 Ser Asp Asp Gly Gln Leu Ser Gly Gln Trp Lys Leu Ile Arg Asn Lys
 370 375 380
 Ala Asn Ser Lys Leu Ile Gln Ala Glu Ser Tyr Phe Ala Ser Ser Lys
 385 390 395 400
 Val Gln Leu Glu Asp Thr Ser Asp Val Gly Gly Gly Lys Asn Val Lys
 405 410 415

ES 2 655 725 T3

Cys Asp Asn Glu Gly Ala Trp Met Ala Tyr Lys Asp Ile Asn Phe Pro
 420 425 430

Ser Ser Gly Thr Tyr Gln Val Glu Tyr Arg Val Ala Ser Glu Arg Ala
 435 440 445

Gly Gly Met Leu Ser Leu Asp Leu Asn Ala Gly Ser Ile Val Leu Gly
 450 455 460

Met Leu Asn Val Pro Ser Thr Gly Gly Leu Gln Lys Trp Thr Thr Ile
 465 470 475 480

Ser His Thr Val Asn Val Ser Ser Gly Thr Tyr Asn Leu Gly Ile Ser
 485 490 495

Val Gln Arg Pro Gly Trp Asn Ile Asn Trp Ile Asn Ile Thr Lys Val
 500 505 510

Ser Ser Gln Leu Lys Ser Ile Pro Ser Thr Asn Ser Arg Val Ile Gln
 515 520 525

Ala Glu Ser Tyr Phe Asp Ser Ser Lys Val Gln Leu Glu Asp Thr Ser
 530 535 540

Asp Val Gly Gly Gly Lys Asn Val Lys Cys Asp Thr Lys Gly Ala Trp
 545 550 555 560

Met Ala Tyr Lys Asp Ile Asn Phe Pro Ser Ser Gly Ser Tyr Gln Ile
 565 570 575

Glu Tyr Arg Val Ala Ser Glu Arg Ala Gly Gly Lys Leu Ser Leu Asp
 580 585 590

Leu Asn Ala Gly Ser Ile Val Leu Gly Met Leu Asp Val Pro Ser Thr
 595 600 605

Gly Gly Trp Gln Lys Trp Thr Thr Ile Ser His Thr Val Lys Val Asp
 610 615 620

Ser Gly Thr Tyr Asn Leu Gly Ile Tyr Val Gln Gln Pro Gly Trp Asn
 625 630 635 640

Ile Asn Trp Ile Lys Ile Thr Lys Val
 645

<210> 3
 <211> 1251
 <212> ADN
 <213> Limulus sp.

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1251)

10

<400> 3

ES 2 655 725 T3

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

ES 2 655 725 T3

gct tac aag gat atc aat ttc cca agt tca ggt act tat caa gta gag	624
Ala Tyr Lys Asp Ile Asn Phe Pro Ser Ser Gly Thr Tyr Gln Val Glu	
195 200 205	
tac aga gtg gca agt gaa cgt gca gga gga atg ttg tct ctg gat ttg	672
Tyr Arg Val Ala Ser Glu Arg Ala Gly Gly Met Leu Ser Leu Asp Leu	
210 215 220	
aat gca ggt tct ata gtg ctt ggc atg ctg aat gtt cct tca act gga	720
Asn Ala Gly Ser Ile Val Leu Gly Met Leu Asn Val Pro Ser Thr Gly	
225 230 235 240	
gga ttg cag aag tgg acc acc att tcc cac aca gtg aat gta agt tca	768
Gly Leu Gln Lys Trp Thr Thr Ile Ser His Thr Val Asn Val Ser Ser	
245 250 255	
ggt acg tac aac ttg ggg atc agt gtt caa cga ccc ggg tgg aat atc	816
Gly Thr Tyr Asn Leu Gly Ile Ser Val Gln Arg Pro Gly Trp Asn Ile	
260 265 270	
aac tgg att aat att aca aaa gta tcc agt cag ttg aaa tct att cca	864
Asn Trp Ile Asn Ile Thr Lys Val Ser Ser Gln Leu Lys Ser Ile Pro	
275 280 285	
agt act aat tct aga gta att cag gca gaa agt tat ttc gat agt tca	912
Ser Thr Asn Ser Arg Val Ile Gln Ala Glu Ser Tyr Phe Asp Ser Ser	
290 295 300	
aaa gta caa ttg gaa gac acc tcg gat gtt gga ggc ggg aag aat gtt	960
Lys Val Gln Leu Glu Asp Thr Ser Asp Val Gly Gly Gly Lys Asn Val	
305 310 315 320	
aag tgt gat act aaa gga gcc tgg atg gcc tac aag gat atc aat ttt	1008
Lys Cys Asp Thr Lys Gly Ala Trp Met Ala Tyr Lys Asp Ile Asn Phe	
325 330 335	
ccc agt tca ggt agt tat caa ata gag tac aga gtg gca agt gaa cgt	1056
Pro Ser Ser Gly Ser Tyr Gln Ile Glu Tyr Arg Val Ala Ser Glu Arg	
340 345 350	
gca gga gga aag ttg tct ctc gat ttg aat gca ggt tct ata gtg ctt	1104
Ala Gly Gly Lys Leu Ser Leu Asp Leu Asn Ala Gly Ser Ile Val Leu	
355 360 365	
gga atg ctg gat gtt cct tca act ggg gga tgg cag aag tgg acc acc	1152
Gly Met Leu Asp Val Pro Ser Thr Gly Gly Trp Gln Lys Trp Thr Thr	
370 375 380	
att tcc cat aca gta aag gtg gat tca ggt act tat aac ttg ggg atc	1200
Ile Ser His Thr Val Lys Val Asp Ser Gly Thr Tyr Asn Leu Gly Ile	
385 390 395 400	
tac gtt caa caa ccc ggg tgg aat atc aac tgg att aag att aca aag	1248
Tyr Val Gln Gln Pro Gly Trp Asn Ile Asn Trp Ile Lys Ile Thr Lys	
405 410 415	
ggt	1251
Val	

<210> 4
 <211> 417
 <212> PRT
 <213> Limulus sp.

<400> 4

ES 2 655 725 T3

Asn Thr Pro Ser Pro Val Asp Val Thr His Leu Ser Gly Tyr Tyr Phe
 1 5 10 15
 Leu Gln Asn Arg His Ser Glu Leu Tyr Leu Asp Val Ser Gly Ser Ser
 20 25 30
 Asn Glu Asp Gly Ala Phe Leu Gln Gln Trp Pro Tyr Ser Gly Asn Ala
 35 40 45
 Asn Gln Gln Phe Asp Phe Val His Leu Gly Asn Lys Val Tyr Lys Ile
 50 55 60
 Ile Asn Lys Asn Ser Gly Lys Ser Leu Asp Val Tyr Glu Leu Gly Thr
 65 70 75 80
 Asp Asn Gly Val Arg Ile Gln Gln Trp Ser Tyr Gly Gly Gly Tyr Asn
 85 90 95
 Gln Gln Phe Ile Val Gln Asp Val Gly Asp Gly Tyr Tyr Lys Ile Phe
 100 105 110
 Ala Arg Ser Thr Gly Lys Leu Val Glu Val Ala Asp Leu Asn Lys Asp
 115 120 125
 Pro Gly Gly Lys Ile Gln Gln Trp Ser Asp Asp Gly Gln Leu Ser Gly
 130 135 140
 Gln Trp Lys Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Ser Lys Leu Ile Gln Ala
 145 150 155 160
 Glu Ser Tyr Phe Ala Ser Ser Lys Val Gln Leu Glu Asp Thr Ser Asp
 165 170 175
 Val Gly Gly Gly Lys Asn Val Lys Cys Asp Asn Glu Gly Ala Trp Met
 180 185 190
 Ala Tyr Lys Asp Ile Asn Phe Pro Ser Ser Gly Thr Tyr Gln Val Glu
 195 200 205

ES 2 655 725 T3

Tyr Arg Val Ala Ser Glu Arg Ala Gly Gly Met Leu Ser Leu Asp Leu
 210 215 220

Asn Ala Gly Ser Ile Val Leu Gly Met Leu Asn Val Pro Ser Thr Gly
 225 230 235 240

Gly Leu Gln Lys Trp Thr Thr Ile Ser His Thr Val Asn Val Ser Ser
 245 250 255

Gly Thr Tyr Asn Leu Gly Ile Ser Val Gln Arg Pro Gly Trp Asn Ile
 260 265 270

Asn Trp Ile Asn Ile Thr Lys Val Ser Ser Gln Leu Lys Ser Ile Pro
 275 280 285

Ser Thr Asn Ser Arg Val Ile Gln Ala Glu Ser Tyr Phe Asp Ser Ser
 290 295 300

Lys Val Gln Leu Glu Asp Thr Ser Asp Val Gly Gly Gly Lys Asn Val
 305 310 315 320

Lys Cys Asp Thr Lys Gly Ala Trp Met Ala Tyr Lys Asp Ile Asn Phe
 325 330 335

Pro Ser Ser Gly Ser Tyr Gln Ile Glu Tyr Arg Val Ala Ser Glu Arg
 340 345 350

Ala Gly Gly Lys Leu Ser Leu Asp Leu Asn Ala Gly Ser Ile Val Leu
 355 360 365

Gly Met Leu Asp Val Pro Ser Thr Gly Gly Trp Gln Lys Trp Thr Thr
 370 375 380

Ile Ser His Thr Val Lys Val Asp Ser Gly Thr Tyr Asn Leu Gly Ile
 385 390 395 400

Tyr Val Gln Gln Pro Gly Trp Asn Ile Asn Trp Ile Lys Ile Thr Lys
 405 410 415

Val

<210> 5
 <211> 789
 <212> ADN
 <213> Limulus sp.

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(789)

10

<400> 5

ES 2 655 725 T3

tct aaa ttg att cag gca gaa agt tat ttt gct agt tca aaa gta caa	48
Ser Lys Leu Ile Gln Ala Glu Ser Tyr Phe Ala Ser Ser Lys Val Gln	
1 5 10 15	
ttg gaa gat acc tcg gat gta gga ggc ggg aag aat gtc aag tgt gat	96
Leu Glu Asp Thr Ser Asp Val Gly Gly Lys Asn Val Lys Cys Asp	
20 25 30	
aat gaa gga gcc tgg atg gct tac aag gat atc aat ttc cca agt tca	144
Asn Glu Gly Ala Trp Met Ala Tyr Lys Asp Ile Asn Phe Pro Ser Ser	
35 40 45	
ggt act tat caa gta gag tac aga gtg gca agt gaa cgt gca gga gga	192
Gly Thr Tyr Gln Val Glu Tyr Arg Val Ala Ser Glu Arg Ala Gly Gly	
50 55 60	
atg ttg tct ctg gat ttg aat gca ggt tct ata gtg ctt ggc atg ctg	240
Met Leu Ser Leu Asp Leu Asn Ala Gly Ser Ile Val Leu Gly Met Leu	
65 70 75 80	
aat gtt cct tca act gga gga ttg cag aag tgg acc acc att tcc cac	288
Asn Val Pro Ser Thr Gly Gly Leu Gln Lys Trp Thr Thr Ile Ser His	
85 90 95	
aca gtg aat gta agt tca ggt acg tac aac ttg ggg atc agt gtt caa	336
Thr Val Asn Val Ser Ser Gly Thr Tyr Asn Leu Gly Ile Ser Val Gln	
100 105 110	
cga ccc ggg tgg aat atc aac tgg att aat att aca aaa gta tcc agt	384
Arg Pro Gly Trp Asn Ile Asn Trp Ile Asn Ile Thr Lys Val Ser Ser	
115 120 125	
cag ttg aaa tct att cca agt act aat tct aga gta att cag gca gaa	432
Gln Leu Lys Ser Ile Pro Ser Thr Asn Ser Arg Val Ile Gln Ala Glu	
130 135 140	
agt tat ttc gat agt tca aaa gta caa ttg gaa gac acc tcg gat gtt	480
Ser Tyr Phe Asp Ser Ser Lys Val Gln Leu Glu Asp Thr Ser Asp Val	
145 150 155 160	
gga ggc ggg aag aat gtt aag tgt gat act aaa gga gcc tgg atg gcc	528
Gly Gly Gly Lys Asn Val Lys Cys Asp Thr Lys Gly Ala Trp Met Ala	
165 170 175	
tac aag gat atc aat ttt ccc agt tca ggt agt tat caa ata gag tac	576
Tyr Lys Asp Ile Asn Phe Pro Ser Ser Gly Ser Tyr Gln Ile Glu Tyr	
180 185 190	
aga gtg gca agt gaa cgt gca gga gga aag ttg tct ctc gat ttg aat	624
Arg Val Ala Ser Glu Arg Ala Gly Gly Lys Leu Ser Leu Asp Leu Asn	
195 200 205	
gca ggt tct ata gtg ctt gga atg ctg gat gtt oct tca act ggg gga	672
Ala Gly Ser Ile Val Leu Gly Met Leu Asp Val Pro Ser Thr Gly Gly	
210 215 220	
tgg cag aag tgg acc acc att tcc cat aca gta aag gtg gat tca ggt	720
Trp Gln Lys Trp Thr Thr Ile Ser His Thr Val Lys Val Asp Ser Gly	
225 230 235 240	
act tat aac ttg ggg atc tac gtt caa caa ccc ggg tgg aat atc aac	768
Thr Tyr Asn Leu Gly Ile Tyr Val Gln Gln Pro Gly Trp Asn Ile Asn	
245 250 255	
tgg att aag att aca aag gtt	789
Trp Ile Lys Ile Thr Lys Val	
260	

ES 2 655 725 T3

<210> 6
 <211> 263
 <212> PRT
 <213> Limulus sp.

5

<400> 6
 Ser Lys Leu Ile Gln Ala Glu Ser Tyr Phe Ala Ser Ser Lys Val Gln
 1 5 10 15

 Leu Glu Asp Thr Ser Asp Val Gly Gly Gly Lys Asn Val Lys Cys Asp
 20 25 30

 Asn Glu Gly Ala Trp Met Ala Tyr Lys Asp Ile Asn Phe Pro Ser Ser
 35 40 45

 Gly Thr Tyr Gln Val Glu Tyr Arg Val Ala Ser Glu Arg Ala Gly Gly
 50 55 60

 Met Leu Ser Leu Asp Leu Asn Ala Gly Ser Ile Val Leu Gly Met Leu
 65 70 75 80

 Asn Val Pro Ser Thr Gly Gly Leu Gln Lys Trp Thr Thr Ile Ser His
 85 90 95

 Thr Val Asn Val Ser Ser Gly Thr Tyr Asn Leu Gly Ile Ser Val Gln
 100 105 110

 Arg Pro Gly Trp Asn Ile Asn Trp Ile Asn Ile Thr Lys Val Ser Ser
 115 120 125

 Gln Leu Lys Ser Ile Pro Ser Thr Asn Ser Arg Val Ile Gln Ala Glu
 130 135 140

ES 2 655 725 T3

Ser Tyr Phe Asp Ser Ser Lys Val Gln Leu Glu Asp Thr Ser Asp Val
145 150 155 160

Gly Gly Gly Lys Asn Val Lys Cys Asp Thr Lys Gly Ala Trp Met Ala
165 170 175

Tyr Lys Asp Ile Asn Phe Pro Ser Ser Gly Ser Tyr Gln Ile Glu Tyr
180 185 190

Arg Val Ala Ser Glu Arg Ala Gly Gly Lys Leu Ser Leu Asp Leu Asn
195 200 205

Ala Gly Ser Ile Val Leu Gly Met Leu Asp Val Pro Ser Thr Gly Gly
210 215 220

Trp Gln Lys Trp Thr Thr Ile Ser His Thr Val Lys Val Asp Ser Gly
225 230 235 240

Thr Tyr Asn Leu Gly Ile Tyr Val Gln Gln Pro Gly Trp Asn Ile Asn
245 250 255

Trp Ile Lys Ile Thr Lys Val
260

<210> 7
<211> 378
5 <212> ADN
<213> Limulus sp.

<220>
10 <221> CDS
<222> (1)..(378)

<400> 7
tct aga gta att cag gca gaa agt tat ttc gat agt tca aaa gta caa 48
Ser Arg Val Ile Gln Ala Glu Ser Tyr Phe Asp Ser Ser Lys Val Gln
1 5 10 15

ttg gaa gac acc tcg gat gtt gga ggc ggg aag aat gtt aag tgt gat 96
Leu Glu Asp Thr Ser Asp Val Gly Gly Gly Lys Asn Val Lys Cys Asp
20 25 30

act aaa gga gcc tgg atg gcc tac aag gat atc aat ttt ccc agt tca 144
Thr Lys Gly Ala Trp Met Ala Tyr Lys Asp Ile Asn Phe Pro Ser Ser
35 40 45

ggg agt tat caa ata gag tac aga gtg gca agt gaa cgt gca gga gga 192
Gly Ser Tyr Gln Ile Glu Tyr Arg Val Ala Ser Glu Arg Ala Gly Gly
50 55 60

aag ttg tct ctc gat ttg aat gca ggt tct ata gtg ctt gga atg ctg 240

ES 2 655 725 T3

Lys Leu Ser Leu Asp Leu Asn Ala Gly Ser Ile Val Leu Gly Met Leu
65 70 75 80

gat gtt cct tca act ggg gga tgg cag aag tgg acc acc att tcc cat 288
Asp Val Pro Ser Thr Gly Gly Trp Gln Lys Trp Thr Thr Ile Ser His
85 90 95

aca gta aag gtg gat tca ggt act tat aac ttg ggg atc tac gtt caa 336
Thr Val Lys Val Asp Ser Gly Thr Tyr Asn Leu Gly Ile Tyr Val Gln
100 105 110

caa ccc ggg tgg aat atc aac tgg att aag att aca aag gtt 378
Gln Pro Gly Trp Asn Ile Asn Trp Ile Lys Ile Thr Lys Val
115 120 125

<210> 8
<211> 126
5 <212> PRT
<213> Limulus sp.

<400> 8
Ser Arg Val Ile Gln Ala Glu Ser Tyr Phe Asp Ser Ser Lys Val Gln
1 5 10 15

Leu Glu Asp Thr Ser Asp Val Gly Gly Gly Lys Asn Val Lys Cys Asp
20 25 30

Thr Lys Gly Ala Trp Met Ala Tyr Lys Asp Ile Asn Phe Pro Ser Ser
35 40 45

Gly Ser Tyr Gln Ile Glu Tyr Arg Val Ala Ser Glu Arg Ala Gly Gly
50 55 60

Lys Leu Ser Leu Asp Leu Asn Ala Gly Ser Ile Val Leu Gly Met Leu
65 70 75 80

Asp Val Pro Ser Thr Gly Gly Trp Gln Lys Trp Thr Thr Ile Ser His
85 90 95

Thr Val Lys Val Asp Ser Gly Thr Tyr Asn Leu Gly Ile Tyr Val Gln
100 105 110

Gln Pro Gly Trp Asn Ile Asn Trp Ile Lys Ile Thr Lys Val
115 120 125

10 <210> 9
<211> 849
<212> ADN
<213> Limulus sp.

15 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(849)

20 <400> 9

ES 2 655 725 T3

aat	aca	cct	tct	cct	gtt	gac	gtt	act	cat	tta	tct	ggt	tac	tat	ttt	48
Asn	Thr	Pro	Ser	Pro	Val	Asp	Val	Thr	His	Leu	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Phe	
1				5					10					15		
ctt	caa	aat	agg	cac	agt	gaa	ctg	tat	ctt	gat	gtc	agt	ggt	tcc	agt	96
Leu	Gln	Asn	Arg	His	Ser	Glu	Leu	Tyr	Leu	Asp	Val	Ser	Gly	Ser	Ser	
			20					25					30			
aac	gaa	gat	gga	gca	ttt	cta	caa	caa	tgg	cct	tat	agc	ggt	aat	gct	144
Asn	Glu	Asp	Gly	Ala	Phe	Leu	Gln	Gln	Trp	Pro	Tyr	Ser	Gly	Asn	Ala	
		35					40					45				
aac	caa	cag	ttt	gat	ttt	gta	cat	ctc	gga	aat	aag	ggt	tat	aaa	att	192
Asn	Gln	Gln	Phe	Asp	Phe	Val	His	Leu	Gly	Asn	Lys	Val	Tyr	Lys	Ile	
	50					55					60					
atc	aat	aaa	aat	agt	gga	aaa	tct	ctg	gat	ggt	tac	gag	tta	ggg	act	240
Ile	Asn	Lys	Asn	Ser	Gly	Lys	Ser	Leu	Asp	Val	Tyr	Glu	Leu	Gly	Thr	
65					70				75					80		
gat	aat	ggt	gtc	aga	atc	caa	cag	tgg	tcg	tat	gga	ggg	ggc	tac	aat	288
Asp	Asn	Gly	Val	Arg	Ile	Gln	Gln	Trp	Ser	Tyr	Gly	Gly	Gly	Tyr	Asn	
				85				90						95		
cag	cag	ttt	att	gta	caa	gat	gtt	gga	gat	ggt	tat	tat	aag	ata	ttt	336
Gln	Gln	Phe	Ile	Val	Gln	Asp	Val	Gly	Asp	Gly	Tyr	Tyr	Lys	Ile	Phe	
			100					105						110		
gca	cgc	agc	act	gga	aag	tta	gtg	gaa	gta	gca	gat	ttg	aat	aaa	gac	384
Ala	Arg	Ser	Thr	Gly	Lys	Leu	Val	Glu	Val	Ala	Asp	Leu	Asn	Lys	Asp	
		115					120					125				
cca	gga	gga	aag	ata	caa	caa	tgg	tct	gat	gat	ggc	caa	tta	tcc	gga	432
Pro	Gly	Gly	Lys	Ile	Gln	Gln	Trp	Ser	Asp	Asp	Gly	Gln	Leu	Ser	Gly	
	130					135					140					
cag	tgg	aaa	ctt	att	cga	aat	aaa	gct	aat	tct	aaa	ttg	att	cag	gca	480
Gln	Trp	Lys	Leu	Ile	Arg	Asn	Lys	Ala	Asn	Ser	Lys	Leu	Ile	Gln	Ala	
145					150					155				160		
gaa	agt	tat	ttt	gct	agt	tca	aaa	gta	caa	ttg	gaa	gat	acc	tcg	gat	528
Glu	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ser	Ser	Lys	Val	Gln	Leu	Glu	Asp	Thr	Ser	Asp	
				165				170						175		
gta	gga	ggc	ggg	aag	aat	gtc	aag	tgt	gat	aat	gaa	gga	gcc	tgg	atg	576
Val	Gly	Gly	Gly	Lys	Asn	Val	Lys	Cys	Asp	Asn	Glu	Gly	Ala	Trp	Met	
			180					185					190			
gct	tac	aag	gat	atc	aat	ttc	cca	agt	tca	ggt	act	tat	caa	gta	gag	624
Ala	Tyr	Lys	Asp	Ile	Asn	Phe	Pro	Ser	Ser	Gly	Thr	Tyr	Gln	Val	Glu	
		195					200						205			
tac	aga	gtg	gca	agt	gaa	cgt	gca	gga	gga	atg	ttg	tct	ctg	gat	ttg	672
Tyr	Arg	Val	Ala	Ser	Glu	Arg	Ala	Gly	Gly	Met	Leu	Ser	Leu	Asp	Leu	

ES 2 655 725 T3

210	215	220	
aat gca ggt tct ata gtg ctt ggc atg ctg aat gtt cct tca act gga			720
Asn Ala Gly Ser Ile Val Leu Gly Met Leu Asn Val Pro Ser Thr Gly			
225	230	235	240
gga ttg cag aag tgg acc acc att tcc cac aca gtg aat gta agt tca			768
Gly Leu Gln Lys Trp Thr Thr Ile Ser His Thr Val Asn Val Ser Ser			
	245	250	255
ggt acg tac aac ttg ggg atc agt gtt caa cga ccc ggg tgg aat atc			816
Gly Thr Tyr Asn Leu Gly Ile Ser Val Gln Arg Pro Gly Trp Asn Ile			
	260	265	270
aac tgg att aat att aca aaa gta tcc agt cag			849
Asn Trp Ile Asn Ile Thr Lys Val Ser Ser Gln			
	275	280	
<210> 10			
<211> 283			
<212> PRT			
<213> Limulus sp.			
<400> 10			
Asn Thr Pro Ser Pro Val Asp Val Thr His Leu Ser Gly Tyr Tyr Phe			
1	5	10	15
Leu Gln Asn Arg His Ser Glu Leu Tyr Leu Asp Val Ser Gly Ser Ser			
	20	25	30
Asn Glu Asp Gly Ala Phe Leu Gln Gln Trp Pro Tyr Ser Gly Asn Ala			
	35	40	45
Asn Gln Gln Phe Asp Phe Val His Leu Gly Asn Lys Val Tyr Lys Ile			
	50	55	60
Ile Asn Lys Asn Ser Gly Lys Ser Leu Asp Val Tyr Glu Leu Gly Thr			
	65	70	75
Asp Asn Gly Val Arg Ile Gln Gln Trp Ser Tyr Gly Gly Gly Tyr Asn			
	85	90	95
Gln Gln Phe Ile Val Gln Asp Val Gly Asp Gly Tyr Tyr Lys Ile Phe			
	100	105	110
Ala Arg Ser Thr Gly Lys Leu Val Glu Val Ala Asp Leu Asn Lys Asp			
	115	120	125
Pro Gly Gly Lys Ile Gln Gln Trp Ser Asp Asp Gly Gln Leu Ser Gly			
	130	135	140

5

10

ES 2 655 725 T3

Gln Trp Lys Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Ser Lys Leu Ile Gln Ala
145 150 155 160

Glu Ser Tyr Phe Ala Ser Ser Lys Val Gln Leu Glu Asp Thr Ser Asp
165 170 175

Val Gly Gly Gly Lys Asn Val Lys Cys Asp Asn Glu Gly Ala Trp Met
180 185 190

Ala Tyr Lys Asp Ile Asn Phe Pro Ser Ser Gly Thr Tyr Gln Val Glu
195 200 205

Tyr Arg Val Ala Ser Glu Arg Ala Gly Gly Met Leu Ser Leu Asp Leu
210 215 220

Asn Ala Gly Ser Ile Val Leu Gly Met Leu Asn Val Pro Ser Thr Gly
225 230 235 240

Gly Leu Gln Lys Trp Thr Thr Ile Ser His Thr Val Asn Val Ser Ser
245 250 255

Gly Thr Tyr Asn Leu Gly Ile Ser Val Gln Arg Pro Gly Trp Asn Ile
260 265 270

Asn Trp Ile Asn Ile Thr Lys Val Ser Ser Gln
275 280

<210> 11
<211> 2022
5 <212> ADN
<213> Tachyporus sp.

<220>
10 <221> CDS
<222> (1)..(2022)

<400> 11
atg ttg gtg ttg ctg tgt tgt gtt gtt ttg cat gtt ggt gtt gca aga 48
Met Leu Val Leu Leu Cys Cys Val Val Leu His Val Gly Val Ala Arg
1 5 10 15

att tgc tgt agc cac gaa cca aag tgg cag ctc gtc tgg tcg gat gaa 96
Ile Cys Cys Ser His Glu Pro Lys Trp Gln Leu Val Trp Ser Asp Glu
20 25 30

ttt acc aat gga ata agt tct gat tgg gaa ttt gaa atg ggc aat ggc 144
Phe Thr Asn Gly Ile Ser Ser Asp Trp Glu Phe Glu Met Gly Asn Gly
35 40 45

ES 2 655 725 T3

ctc aat ggt tgg ggt aat aac gaa ctg caa tat tat cgt cgt gaa aat	192
Leu Asn Gly Trp Gly Asn Asn Glu Leu Gln Tyr Tyr Arg Arg Glu Asn	
50 55 60	
gcc caa gtt gag gga ggg aaa ctg gta att act gct aaa aga gaa gac	240
Ala Gln Val Glu Gly Gly Lys Leu Val Ile Thr Ala Lys Arg Glu Asp	
65 70 75 80	
tat gat ggc ttc aaa tac act tct gct agg ctg aaa acc cag ttt gat	288
Tyr Asp Gly Phe Lys Tyr Thr Ser Ala Arg Leu Lys Thr Gln Phe Asp	
85 90 95	
aaa tct tgg aag tat ggt aaa att gaa gcc aaa atg gcg att cca tca	336
Lys Ser Trp Lys Tyr Gly Lys Ile Glu Ala Lys Met Ala Ile Pro Ser	
100 105 110	
ttt cgg gga gtc tgg gtg atg ttc tgg atg tca gga gac aac act aat	384
Phe Arg Gly Val Trp Val Met Phe Trp Met Ser Gly Asp Asn Thr Asn	
115 120 125	
tat gtt aga tgg cca tct tct ggt gaa att gac ttt att gaa cat aga	432
Tyr Val Arg Trp Pro Ser Ser Gly Glu Ile Asp Phe Ile Glu His Arg	
130 135 140	
aac act aac aat gaa aaa gtc aga gga act att cac tgg tcc act cct	480
Asn Thr Asn Asn Glu Lys Val Arg Gly Thr Ile His Trp Ser Thr Pro	
145 150 155 160	
gac ggt gct cat gcg cat cat aac aga gaa agt aat aca aat ggg att	528
Asp Gly Ala His Ala His His Asn Arg Glu Ser Asn Thr Asn Gly Ile	
165 170 175	
gat tat cac att tat tct gta gag tgg aat tct tcc att gtt aaa tgg	576
Asp Tyr His Ile Tyr Ser Val Glu Trp Asn Ser Ser Ile Val Lys Trp	
180 185 190	
ttt gtt aat gga aat caa tac ttt gaa gtg aaa att cag gga gga gta	624
Phe Val Asn Gly Asn Gln Tyr Phe Glu Val Lys Ile Gln Gly Gly Val	
195 200 205	
aat ggg aaa agt gca ttt cgt aac aaa gtt ttc gtt att tta aac atg	672
Asn Gly Lys Ser Ala Phe Arg Asn Lys Val Phe Val Ile Leu Asn Met	
210 215 220	
gcg att ggt gga aac tgg cca gga ttc gat gtt gct gac gag gct ttc	720
Ala Ile Gly Gly Asn Trp Pro Gly Phe Asp Val Ala Asp Glu Ala Phe	
225 230 235 240	
cct gct aaa atg tac att gat tat gtc cgt gta tac cag gat gcc agt	768
Pro Ala Lys Met Tyr Ile Asp Tyr Val Arg Val Tyr Gln Asp Ala Ser	
245 250 255	
aca tct tct cct gtt ggg gat acc tct tta gat ggt tac tat ttt gtc	816
Thr Ser Ser Pro Val Gly Asp Thr Ser Leu Asp Gly Tyr Tyr Phe Val	
260 265 270	
caa aac agg cac agt gaa ttg tat ctt gat gtc act gat gcc agt aac	864
Gln Asn Arg His Ser Glu Leu Tyr Leu Asp Val Thr Asp Ala Ser Asn	
275 280 285	

ES 2 655 725 T3

gaa gat gga gca ttt ctg caa caa tgg tct tat agt ggt aat gag aac	912
Glu Asp Gly Ala Phe Leu Gln Gln Trp Ser Tyr Ser Gly Asn Glu Asn	
290 295 300	
caa cag ttt gat ttt gag cat ctc gaa aat aat gtt tat aaa att act	960
Gln Gln Phe Asp Phe Glu His Leu Glu Asn Asn Val Tyr Lys Ile Thr	
305 310 315 320	
aat aaa aaa agt gga aaa tct ttg gat gtt tat aat ttt ggg act gag	1008
Asn Lys Lys Ser Gly Lys Ser Leu Asp Val Tyr Asn Phe Gly Thr Glu	
325 330 335	
aat ggt gtt aga atc caa cag tgg tca tat gga ggg gct cgc aat cag	1056
Asn Gly Val Arg Ile Gln Gln Trp Ser Tyr Gly Gly Ala Arg Asn Gln	
340 345 350	
cag ttt act gta caa agt gtt ggt gat ggt tat tat aag att att cca	1104
Gln Phe Thr Val Gln Ser Val Gly Asp Gly Tyr Tyr Lys Ile Ile Pro	
355 360 365	
cgc ggc agt gga aag tta gtg gaa gta gca gat ttt agt aaa gat gca	1152
Arg Gly Ser Gly Lys Leu Val Glu Val Ala Asp Phe Ser Lys Asp Ala	
370 375 380	
gga ggg aag ata caa caa tgg tct gat aac aac caa tta tct gga cag	1200
Gly Gly Lys Ile Gln Gln Trp Ser Asp Asn Asn Gln Leu Ser Gly Gln	
385 390 395 400	
tgg aaa ctt att aaa agt aaa agt tat tct aaa tta att cag gca gaa	1248
Trp Lys Leu Ile Lys Ser Lys Ser Tyr Ser Lys Leu Ile Gln Ala Glu	
405 410 415	
agt tat ttt gat tcc tca aaa gta caa ttg gaa gat acc tca gat gta	1296
Ser Tyr Phe Asp Ser Ser Lys Val Gln Leu Glu Asp Thr Ser Asp Val	
420 425 430	
gga ggt ggg aag aat gtt aaa tgt gat aat gaa gga gcc tgg atg gct	1344
Gly Gly Gly Lys Asn Val Lys Cys Asp Asn Glu Gly Ala Trp Met Ala	
435 440 445	
tat aag gat att gat ttc ccc agt tca ggt aat tat cga ata gaa tac	1392
Tyr Lys Asp Ile Asp Phe Pro Ser Ser Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Tyr	
450 455 460	
aga gta gca agt gaa cgt gca gga gga aag ctg tct ctg gat ttg aat	1440
Arg Val Ala Ser Glu Arg Ala Gly Gly Lys Leu Ser Leu Asp Leu Asn	
465 470 475 480	
gca ggc tct ata gtt ctt ggc atg ctg gat gtt cct tca aca gga gga	1488
Ala Gly Ser Ile Val Leu Gly Met Leu Asp Val Pro Ser Thr Gly Gly	
485 490 495	
tgg cag aag tgg acc acc att tcc cat aca gtg aat gtg gat tca ggt	1536
Trp Gln Lys Trp Thr Thr Ile Ser His Thr Val Asn Val Asp Ser Gly	
500 505 510	
aca tat aac ttg ggg atc tat gtt caa cga gcc agc tgg aat atc aac	1584
Thr Tyr Asn Leu Gly Ile Tyr Val Gln Arg Ala Ser Trp Asn Ile Asn	
515 520 525	

ES 2 655 725 T3

tgg ata aag att aca aaa ata cct gaa cag tca aat ttg aat caa ggg	1632
Trp Ile Lys Ile Thr Lys Ile Pro Glu Gln Ser Asn Leu Asn Gln Gly	
530 535 540	
cgf cgt aat tct aaa tta att cag gca gaa agt tat ttt agt tac tca	1680
Arg Arg Asn Ser Lys Leu Ile Gln Ala Glu Ser Tyr Phe Ser Tyr Ser	
545 550 555 560	
gaa gta caa ctg gaa gat acc tta gat gta gga ggt gga aag aat gtt	1728
Glu Val Gln Leu Glu Asp Thr Leu Asp Val Gly Gly Gly Lys Asn Val	
565 570 575	
aaa tgt gat aaa gaa ggg gcc tgg atg gct tac aag gat att gat ttc	1776
Lys Cys Asp Lys Glu Gly Ala Trp Met Ala Tyr Lys Asp Ile Asp Phe	
580 585 590	
ccc agt tca gga agt tat cga gta gaa tac aga gtg gca agt gaa cgt	1824
Pro Ser Ser Gly Ser Tyr Arg Val Glu Tyr Arg Val Ala Ser Glu Arg	
595 600 605	
gca gga gga aag ctg tcc cta gat ttg aat gca ggc tct ata gtg ctt	1872
Ala Gly Gly Lys Leu Ser Leu Asp Leu Asn Ala Gly Ser Ile Val Leu	
610 615 620	
ggc atg ctg gat att cct tca aca gga gga ttg cag aag tgg acc acc	1920
Gly Met Leu Asp Ile Pro Ser Thr Gly Gly Leu Gln Lys Trp Thr Thr	
625 630 635 640	
att tct cat ata gtg aat gtg gat tta ggt aca tat aac ttg gga att	1968
Ile Ser His Ile Val Asn Val Asp Leu Gly Thr Tyr Asn Leu Gly Ile	
645 650 655	
tat gtt caa aaa gcc agt tgg aat atc aat tgg att aga att aca aaa	2016
Tyr Val Gln Lys Ala Ser Trp Asn Ile Asn Trp Ile Arg Ile Thr Lys	
660 665 670	
gtg tag	2022
Val	

<210> 12
 <211> 673
 <212> PRT
 <213> Tachyporus sp.

5

<400> 12
 Met Leu Val Leu Leu Cys Cys Val Val Leu His Val Gly Val Ala Arg
 1 5 10 15

Ile Cys Cys Ser His Glu Pro Lys Trp Gln Leu Val Trp Ser Asp Glu
 20 25 30

Phe Thr Asn Gly Ile Ser Ser Asp Trp Glu Phe Glu Met Gly Asn Gly
 35 40 45

10

ES 2 655 725 T3

Leu Asn Gly Trp Gly Asn Asn Glu Leu Gln Tyr Tyr Arg Arg Glu Asn
 50 55 60

Ala Gln Val Glu Gly Gly Lys Leu Val Ile Thr Ala Lys Arg Glu Asp
 65 70 75 80

Tyr Asp Gly Phe Lys Tyr Thr Ser Ala Arg Leu Lys Thr Gln Phe Asp
 85 90 95

Lys Ser Trp Lys Tyr Gly Lys Ile Glu Ala Lys Met Ala Ile Pro Ser
 100 105 110

Phe Arg Gly Val Trp Val Met Phe Trp Met Ser Gly Asp Asn Thr Asn
 115 120 125

Tyr Val Arg Trp Pro Ser Ser Gly Glu Ile Asp Phe Ile Glu His Arg
 130 135 140

Asn Thr Asn Asn Glu Lys Val Arg Gly Thr Ile His Trp Ser Thr Pro
 145 150 155 160

Asp Gly Ala His Ala His His Asn Arg Glu Ser Asn Thr Asn Gly Ile
 165 170 175

Asp Tyr His Ile Tyr Ser Val Glu Trp Asn Ser Ser Ile Val Lys Trp
 180 185 190

Phe Val Asn Gly Asn Gln Tyr Phe Glu Val Lys Ile Gln Gly Gly Val
 195 200 205

Asn Gly Lys Ser Ala Phe Arg Asn Lys Val Phe Val Ile Leu Asn Met
 210 215 220

Ala Ile Gly Gly Asn Trp Pro Gly Phe Asp Val Ala Asp Glu Ala Phe
 225 230 235 240

Pro Ala Lys Met Tyr Ile Asp Tyr Val Arg Val Tyr Gln Asp Ala Ser
 245 250 255

Thr Ser Ser Pro Val Gly Asp Thr Ser Leu Asp Gly Tyr Tyr Phe Val
 260 265 270

Gln Asn Arg His Ser Glu Leu Tyr Leu Asp Val Thr Asp Ala Ser Asn
 275 280 285

ES 2 655 725 T3

Glu Asp Gly Ala Phe Leu Gln Gln Trp Ser Tyr Ser Gly Asn Glu Asn
 290 295 300

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

Asn Lys Lys Ser Gly Lys Ser Leu Asp Val Tyr Asn Phe Gly Thr Glu
 325 330 335

Asn Gly Val Arg Ile Gln Gln Trp Ser Tyr Gly Gly Ala Arg Asn Gln
 340 345 350

Gln Phe Thr Val Gln Ser Val Gly Asp Gly Tyr Tyr Lys Ile Ile Pro
 355 360 365

Arg Gly Ser Gly Lys Leu Val Glu Val Ala Asp Phe Ser Lys Asp Ala
 370 375 380

Gly Gly Lys Ile Gln Gln Trp Ser Asp Asn Asn Gln Leu Ser Gly Gln
 385 390 395 400

Trp Lys Leu Ile Lys Ser Lys Ser Tyr Ser Lys Leu Ile Gln Ala Glu
 405 410 415

Ser Tyr Phe Asp Ser Ser Lys Val Gln Leu Glu Asp Thr Ser Asp Val
 420 425 430

Gly Gly Gly Lys Asn Val Lys Cys Asp Asn Glu Gly Ala Trp Met Ala
 435 440 445

Tyr Lys Asp Ile Asp Phe Pro Ser Ser Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Tyr
 450 455 460

Arg Val Ala Ser Glu Arg Ala Gly Gly Lys Leu Ser Leu Asp Leu Asn
 465 470 475 480

Ala Gly Ser Ile Val Leu Gly Met Leu Asp Val Pro Ser Thr Gly Gly
 485 490 495

Trp Gln Lys Trp Thr Thr Ile Ser His Thr Val Asn Val Asp Ser Gly
 500 505 510

Thr Tyr Asn Leu Gly Ile Tyr Val Gln Arg Ala Ser Trp Asn Ile Asn
 515 520 525

ES 2 655 725 T3

Trp Ile Lys Ile Thr Lys Ile Pro Glu Gln Ser Asn Leu Asn Gln Gly
530 535 540

Arg Arg Asn Ser Lys Leu Ile Gln Ala Glu Ser Tyr Phe Ser Tyr Ser
545 550 555 560

Glu Val Gln Leu Glu Asp Thr Leu Asp Val Gly Gly Gly Lys Asn Val
565 570 575

Lys Cys Asp Lys Glu Gly Ala Trp Met Ala Tyr Lys Asp Ile Asp Phe
580 585 590

Pro Ser Ser Gly Ser Tyr Arg Val Glu Tyr Arg Val Ala Ser Glu Arg
595 600 605

Ala Gly Gly Lys Leu Ser Leu Asp Leu Asn Ala Gly Ser Ile Val Leu
610 615 620

Gly Met Leu Asp Ile Pro Ser Thr Gly Gly Leu Gln Lys Trp Thr Thr
625 630 635 640

Ile Ser His Ile Val Asn Val Asp Leu Gly Thr Tyr Asn Leu Gly Ile
645 650 655

Tyr Val Gln Lys Ala Ser Trp Asn Ile Asn Trp Ile Arg Ile Thr Lys
660 665 670

Val

<210> 13
<211> 1218
5 <212> ADN
<213> Tachyporus sp.

<220>
10 <221> CDS
<222> (1)..(1218)

<400> 13
ggt tac tat ttt gtc caa aac agg cac agt gaa ttg tat ctt gat gtc 48
Gly Tyr Tyr Phe Val Gln Asn Arg His Ser Glu Leu Tyr Leu Asp Val
1 5 10 15

act gat gcc agt aac gaa gat gga gca ttt ctg caa caa tgg tct tat 96
Thr Asp Ala Ser Asn Glu Asp Gly Ala Phe Leu Gln Gln Trp Ser Tyr
20 25 30

ES 2 655 725 T3

agt ggt aat gag aac caa cag ttt gat ttt gag cat ctc gaa aat aat	144
Ser Gly Asn Glu Asn Gln Gln Phe Asp Phe Glu His Leu Glu Asn Asn	
35 40 45	
ggt tat aaa att act aat aaa aaa agt gga aaa tct ttg gat gtt tat	192
Val Tyr Lys Ile Thr Asn Lys Lys Ser Gly Lys Ser Leu Asp Val Tyr	
50 55 60	
aat ttt ggg act gag aat ggt gtt aga atc caa cag tgg tca tat gga	240
Asn Phe Gly Thr Glu Asn Gly Val Arg Ile Gln Gln Trp Ser Tyr Gly	
65 70 75 80	
ggg gct cgc aat cag cag ttt act gta caa agt gtt ggt gat ggt tat	288
Gly Ala Arg Asn Gln Gln Phe Thr Val Gln Ser Val Gly Asp Gly Tyr	
85 90 95	
tat aag att att cca cgc ggc agt gga aag tta gtg gaa gta gca gat	336
Tyr Lys Ile Ile Pro Arg Gly Ser Gly Lys Leu Val Glu Val Ala Asp	
100 105 110	
ttt agt aaa gat gca gga ggg aag ata caa caa tgg tct gat aac aac	384
Phe Ser Lys Asp Ala Gly Gly Lys Ile Gln Gln Trp Ser Asp Asn Asn	
115 120 125	
caa tta tct gga cag tgg aaa ctt att aaa agt aaa agt tat tct aaa	432
Gln Leu Ser Gly Gln Trp Lys Leu Ile Lys Ser Lys Ser Tyr Ser Lys	
130 135 140	
tta att cag gca gaa agt tat ttt gat tcc tca aaa gta caa ttg gaa	480
Leu Ile Gln Ala Glu Ser Tyr Phe Asp Ser Ser Lys Val Gln Leu Glu	
145 150 155 160	
gat acc tca gat gta gga ggt ggg aag aat gtt aaa tgt gat aat gaa	528
Asp Thr Ser Asp Val Gly Gly Gly Lys Asn Val Lys Cys Asp Asn Glu	
165 170 175	
gga gcc tgg atg gct tat aag gat att gat ttc ccc agt tca ggt aat	576
Gly Ala Trp Met Ala Tyr Lys Asp Ile Asp Phe Pro Ser Ser Gly Asn	
180 185 190	
tat cga ata gaa tac aga gta gca agt gaa cgt gca gga gga aag ctg	624
Tyr Arg Ile Glu Tyr Arg Val Ala Ser Glu Arg Ala Gly Gly Lys Leu	
195 200 205	
tct ctg gat ttg aat gca ggc tct ata gtt ctt ggc atg ctg gat gtt	672
Ser Leu Asp Leu Asn Ala Gly Ser Ile Val Leu Gly Met Leu Asp Val	
210 215 220	
cct tca aca gga gga tgg cag aag tgg acc acc att tcc cat aca gtg	720
Pro Ser Thr Gly Gly Trp Gln Lys Trp Thr Thr Ile Ser His Thr Val	
225 230 235 240	
aat gtg gat tca ggt aca tat aac ttg ggg atc tat gtt caa cga gcc	768
Asn Val Asp Ser Gly Thr Tyr Asn Leu Gly Ile Tyr Val Gln Arg Ala	
245 250 255	
agc tgg aat atc aac tgg ata aag att aca aaa ata cct gaa cag tca	816
Ser Trp Asn Ile Asn Trp Ile Lys Ile Thr Lys Ile Pro Glu Gln Ser	
260 265 270	

ES 2 655 725 T3

aat ttg aat caa ggg cgt cgt aat tct aaa tta att cag gca gaa agt 864
 Asn Leu Asn Gln Gly Arg Arg Asn Ser Lys Leu Ile Gln Ala Glu Ser
 275 280 285
 tat ttt agt tac tca gaa gta caa ctg gaa gat acc tta gat gta gga 912
 Tyr Phe Ser Tyr Ser Glu Val Gln Leu Glu Asp Thr Leu Asp Val Gly
 290 295 300
 ggt gga aag aat gtt aaa tgt gat aaa gaa ggg gcc tgg atg gct tac 960
 Gly Gly Lys Asn Val Lys Cys Asp Lys Glu Gly Ala Trp Met Ala Tyr
 305 310 315 320
 aag gat att gat ttc ccc agt tca gga agt tat cga gta gaa tac aga 1008
 Lys Asp Ile Asp Phe Pro Ser Ser Gly Ser Tyr Arg Val Glu Tyr Arg
 325 330 335
 gtg gca agt gaa cgt gca gga gga aag ctg tcc cta gat ttg aat gca 1056
 Val Ala Ser Glu Arg Ala Gly Gly Lys Leu Ser Leu Asp Leu Asn Ala
 340 345 350
 ggc tct ata gtg ctt ggc atg ctg gat att cct tca aca gga gga ttg 1104
 Gly Ser Ile Val Leu Gly Met Leu Asp Ile Pro Ser Thr Gly Gly Leu
 355 360 365
 cag aag tgg acc acc att tct cat ata gtg aat gtg gat tta ggt aca 1152
 Gln Lys Trp Thr Thr Ile Ser His Ile Val Asn Val Asp Leu Gly Thr
 370 375 380
 tat aac ttg gga att tat gtt caa aaa gcc agt tgg aat atc aat tgg 1200
 Tyr Asn Leu Gly Ile Tyr Val Gln Lys Ala Ser Trp Asn Ile Asn Trp
 385 390 395 400
 att aga att aca aaa gtg 1218
 Ile Arg Ile Thr Lys Val
 405

<210> 14
 <211> 406
 <212> PRT
 <213> Tachyporus sp.

5

<400> 14
 Gly Tyr Tyr Phe Val Gln Asn Arg His Ser Glu Leu Tyr Leu Asp Val
 1 5 10 15

Thr Asp Ala Ser Asn Glu Asp Gly Ala Phe Leu Gln Gln Trp Ser Tyr
 20 25 30

Ser Gly Asn Glu Asn Gln Gln Phe Asp Phe Glu His Leu Glu Asn Asn
 35 40 45

Val Tyr Lys Ile Thr Asn Lys Lys Ser Gly Lys Ser Leu Asp Val Tyr
 50 55 60

10

ES 2 655 725 T3

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

ES 2 655 725 T3

Gly Gly Lys Asn Val Lys Cys Asp Lys Glu Gly Ala Trp Met Ala Tyr
305 310 315 320

Lys Asp Ile Asp Phe Pro Ser Ser Gly Ser Tyr Arg Val Glu Tyr Arg
325 330 335

Val Ala Ser Glu Arg Ala Gly Gly Lys Leu Ser Leu Asp Leu Asn Ala
340 345 350

Gly Ser Ile Val Leu Gly Met Leu Asp Ile Pro Ser Thr Gly Gly Leu
355 360 365

Gln Lys Trp Thr Thr Ile Ser His Ile Val Asn Val Asp Leu Gly Thr
370 375 380

Tyr Asn Leu Gly Ile Tyr Val Gln Lys Ala Ser Trp Asn Ile Asn Trp
385 390 395 400

Ile Arg Ile Thr Lys Val
405

5 <210> 15
<211> 792
<212> ADN
<213> Tachyporus sp.

10 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(792)

<400> 15
tct aaa tta att cag gca gaa agt tat ttt gat tcc tca aaa gta caa 48
Ser Lys Leu Ile Gln Ala Glu Ser Tyr Phe Asp Ser Ser Lys Val Gln
1 5 10 15

ttg gaa gat acc tca gat gta gga ggt ggg aag aat gtt aaa tgt gat 96
Leu Glu Asp Thr Ser Asp Val Gly Gly Gly Lys Asn Val Lys Cys Asp
20 25 30

aat gaa gga gcc tgg atg gct tat aag gat att gat ttc ccc agt tca 144
Asn Glu Gly Ala Trp Met Ala Tyr Lys Asp Ile Asp Phe Pro Ser Ser
35 40 45

ggg aat tat cga ata gaa tac aga gta gca agt gaa cgt gca gga gga 192
Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Tyr Arg Val Ala Ser Glu Arg Ala Gly Gly
50 55 60

aag ctg tct ctg gat ttg aat gca ggc tct ata gtt ctt ggc atg ctg 240
Lys Leu Ser Leu Asp Leu Asn Ala Gly Ser Ile Val Leu Gly Met Leu
65 70 75 80

gat gtt cct tca aca gga gga tgg cag aag tgg acc acc att tcc cat 288

ES 2 655 725 T3

Asp	Val	Pro	Ser	Thr	Gly	Gly	Trp	Gln	Lys	Trp	Thr	Thr	Ile	Ser	His	
				85					90					95		
aca	gtg	aat	gtg	gat	tca	ggt	aca	tat	aac	ttg	ggg	atc	tat	ggt	caa	336
Thr	Val	Asn	Val	Asp	Ser	Gly	Thr	Tyr	Asn	Leu	Gly	Ile	Tyr	Val	Gln	
			100					105					110			
cga	gcc	agc	tgg	aat	atc	aac	tgg	ata	aag	att	aca	aaa	ata	cct	gaa	384
Arg	Ala	Ser	Trp	Asn	Ile	Asn	Trp	Ile	Lys	Ile	Thr	Lys	Ile	Pro	Glu	
		115					120					125				
cag	tca	aat	ttg	aat	caa	ggg	cgt	cgt	aat	tct	aaa	tta	att	cag	gca	432
Gln	Ser	Asn	Leu	Asn	Gln	Gly	Arg	Arg	Asn	Ser	Lys	Leu	Ile	Gln	Ala	
	130					135					140					
gaa	agt	tat	ttt	agt	tac	tca	gaa	gta	caa	ctg	gaa	gat	acc	tta	gat	480
Glu	Ser	Tyr	Phe	Ser	Tyr	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Glu	Asp	Thr	Leu	Asp	
145					150					155					160	
gta	gga	ggt	gga	aag	aat	ggt	aaa	tgt	gat	aaa	gaa	ggg	gcc	tgg	atg	528
Val	Gly	Gly	Gly	Lys	Asn	Val	Lys	Cys	Asp	Lys	Glu	Gly	Ala	Trp	Met	
				165					170					175		
gct	tac	aag	gat	att	gat	ttc	ccc	agt	tca	gga	agt	tat	cga	gta	gaa	576
Ala	Tyr	Lys	Asp	Ile	Asp	Phe	Pro	Ser	Ser	Gly	Ser	Tyr	Arg	Val	Glu	
			180					185					190			
tac	aga	gtg	gca	agt	gaa	cgt	gca	gga	gga	aag	ctg	tcc	cta	gat	ttg	624
Tyr	Arg	Val	Ala	Ser	Glu	Arg	Ala	Gly	Gly	Lys	Leu	Ser	Leu	Asp	Leu	
		195					200					205				
aat	gca	ggc	tct	ata	gtg	ctt	ggc	atg	ctg	gat	att	cct	tca	aca	gga	672
Asn	Ala	Gly	Ser	Ile	Val	Leu	Gly	Met	Leu	Asp	Ile	Pro	Ser	Thr	Gly	
	210					215					220					
gga	ttg	cag	aag	tgg	acc	acc	att	tct	cat	ata	gtg	aat	gtg	gat	tta	720
Gly	Leu	Gln	Lys	Trp	Thr	Thr	Ile	Ser	His	Ile	Val	Asn	Val	Asp	Leu	
225					230					235					240	
ggt	aca	tat	aac	ttg	gga	att	tat	ggt	caa	aaa	gcc	agt	tgg	aat	atc	768
Gly	Thr	Tyr	Asn	Leu	Gly	Ile	Tyr	Val	Gln	Lys	Ala	Ser	Trp	Asn	Ile	
				245					250					255		
aat	tgg	att	aga	att	aca	aaa	gtg									792
Asn	Trp	Ile	Arg	Ile	Thr	Lys	Val									
				260												

<210> 16
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> Tachyporus sp.

5

<400> 16
 Ser Lys Leu Ile Gln Ala Glu Ser Tyr Phe Asp Ser Ser Lys Val Gln
 1 5 10 15

Leu Glu Asp Thr Ser Asp Val Gly Gly Gly Lys Asn Val Lys Cys Asp

10

ES 2 655 725 T3

<222> (1)..(378)

<400> 17

tct aaa tta att cag gca gaa agt tat ttt agt tac tca gaa gta caa 48
 Ser Lys Leu Ile Gln Ala Glu Ser Tyr Phe Ser Tyr Ser Glu Val Gln
 1 5 10 15

ctg gaa gat acc tta gat gta gga ggt gga aag aat gtt aaa tgt gat 96
 Leu Glu Asp Thr Leu Asp Val Gly Gly Gly Lys Asn Val Lys Cys Asp
 20 25 30

aaa gaa ggg gcc tgg atg gct tac aag gat att gat ttc ccc agt tca 144
 Lys Glu Gly Ala Trp Met Ala Tyr Lys Asp Ile Asp Phe Pro Ser Ser
 35 40 45

gga agt tat cga gta gaa tac aga gtg gca agt gaa cgt gca gga gga 192
 Gly Ser Tyr Arg Val Glu Tyr Arg Val Ala Ser Glu Arg Ala Gly Gly
 50 55 60

aag ctg tcc cta gat ttg aat gca ggc tct ata gtg ctt ggc atg ctg 240
 Lys Leu Ser Leu Asp Leu Asn Ala Gly Ser Ile Val Leu Gly Met Leu
 65 70 75 80

gat att cct tca aca gga gga ttg cag aag tgg acc acc att tct cat 288
 Asp Ile Pro Ser Thr Gly Gly Leu Gln Lys Trp Thr Thr Ile Ser His
 85 90 95

ata gtg aat gtg gat tta ggt aca tat aac ttg gga att tat gtt caa 336
 Ile Val Asn Val Asp Leu Gly Thr Tyr Asn Leu Gly Ile Tyr Val Gln
 100 105 110

aaa gcc agt tgg aat atc aat tgg att aga att aca aaa gtg 378
 Lys Ala Ser Trp Asn Ile Asn Trp Ile Arg Ile Thr Lys Val
 115 120 125

5

<210> 18

<211> 126

<212> PRT

<213> Tachyporus sp.

10

<400> 18

Ser Lys Leu Ile Gln Ala Glu Ser Tyr Phe Ser Tyr Ser Glu Val Gln
 1 5 10 15

Leu Glu Asp Thr Leu Asp Val Gly Gly Gly Lys Asn Val Lys Cys Asp
 20 25 30

ES 2 655 725 T3

Lys Glu Gly Ala Trp Met Ala Tyr Lys Asp Ile Asp Phe Pro Ser Ser
 35 40 45

Gly Ser Tyr Arg Val Glu Tyr Arg Val Ala Ser Glu Arg Ala Gly Gly
 50 55 60

Lys Leu Ser Leu Asp Leu Asn Ala Gly Ser Ile Val Leu Gly Met Leu
 65 70 75 80

Asp Ile Pro Ser Thr Gly Gly Leu Gln Lys Trp Thr Thr Ile Ser His
 85 90 95

Ile Val Asn Val Asp Leu Gly Thr Tyr Asn Leu Gly Ile Tyr Val Gln
 100 105 110

Lys Ala Ser Trp Asn Ile Asn Trp Ile Arg Ile Thr Lys Val
 115 120 125

<210> 19
 <211> 840
 <212> ADN
 <213> Tachyporus sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(840)

<400> 19
 ggt tac tat ttt gtc caa aac agg cac agt gaa ttg tat ctt gat gtc 48
 Gly Tyr Tyr Phe Val Gln Asn Arg His Ser Glu Leu Tyr Leu Asp Val
 1 5 10 15

act gat gcc agt aac gaa gat gga gca ttt ctg caa caa tgg tct tat 96
 Thr Asp Ala Ser Asn Glu Asp Gly Ala Phe Leu Gln Gln Trp Ser Tyr
 20 25 30

agt ggt aat gag aac caa cag ttt gat ttt gag cat ctc gaa aat aat 144
 Ser Gly Asn Glu Asn Gln Gln Phe Asp Phe Glu His Leu Glu Asn Asn
 35 40 45

ggt tat aaa att act aat aaa aaa agt gga aaa tct ttg gat gtt tat 192
 Val Tyr Lys Ile Thr Asn Lys Lys Ser Gly Lys Ser Leu Asp Val Tyr
 50 55 60

aat ttt ggg act gag aat ggt gtt aga atc caa cag tgg tca tat gga 240
 Asn Phe Gly Thr Glu Asn Gly Val Arg Ile Gln Gln Trp Ser Tyr Gly
 65 70 75 80

ggg gct cgc aat cag cag ttt act gta caa agt gtt ggt gat ggt tat 288
 Gly Ala Arg Asn Gln Gln Phe Thr Val Gln Ser Val Gly Asp Gly Tyr
 85 90 95

ES 2 655 725 T3

tat aag att att cca cgc ggc agt gga aag tta gtg gaa gta gca gat 336
Tyr Lys Ile Ile Pro Arg Gly Ser Gly Lys Leu Val Glu Val Ala Asp
100 105 110

ttt agt aaa gat gca gga ggg aag ata caa caa tgg tct gat aac aac 384
Phe Ser Lys Asp Ala Gly Gly Lys Ile Gln Gln Trp Ser Asp Asn Asn
115 120 125

caa tta tct gga cag tgg aaa ctt att aaa agt aaa agt tat tct aaa 432
Gln Leu Ser Gly Gln Trp Lys Leu Ile Lys Ser Lys Ser Tyr Ser Lys
130 135 140

tta att cag gca gaa agt tat ttt gat tcc tca aaa gta caa ttg gaa 480
Leu Ile Gln Ala Glu Ser Tyr Phe Asp Ser Ser Lys Val Gln Leu Glu
145 150 155 160

gat acc tca gat gta gga ggt ggg aag aat gtt aaa tgt gat aat gaa 528
Asp Thr Ser Asp Val Gly Gly Gly Lys Asn Val Lys Cys Asp Asn Glu
165 170 175

gga gcc tgg atg gct tat aag gat att gat ttc ccc agt tca ggt aat 576
Gly Ala Trp Met Ala Tyr Lys Asp Ile Asp Phe Pro Ser Ser Gly Asn
180 185 190

tat cga ata gaa tac aga gta gca agt gaa cgt gca gga gga aag ctg 624
Tyr Arg Ile Glu Tyr Arg Val Ala Ser Glu Arg Ala Gly Gly Lys Leu
195 200 205

tct ctg gat ttg aat gca ggc tct ata gtt ctt ggc atg ctg gat gtt 672
Ser Leu Asp Leu Asn Ala Gly Ser Ile Val Leu Gly Met Leu Asp Val
210 215 220

cct tca aca gga gga tgg cag aag tgg acc acc att tcc cat aca gtg 720
Pro Ser Thr Gly Gly Trp Gln Lys Trp Thr Thr Ile Ser His Thr Val
225 230 235 240

aat gtg gat tca ggt aca tat aac ttg ggg atc tat gtt caa cga gcc 768
Asn Val Asp Ser Gly Thr Tyr Asn Leu Gly Ile Tyr Val Gln Arg Ala
245 250 255

agc tgg aat atc aac tgg ata aag att aca aaa ata cct gaa cag tca 816
Ser Trp Asn Ile Asn Trp Ile Lys Ile Thr Lys Ile Pro Glu Gln Ser
260 265 270

aat ttg aat caa ggg cgt cgt aat 840
Asn Leu Asn Gln Gly Arg Arg Asn
275 280

<210> 20
<211> 280
5 <212> PRT
<213> Tachyporus sp.

<400> 20
10 Gly Tyr Tyr Phe Val Gln Asn Arg His Ser Glu Leu Tyr Leu Asp Val
1 5 10 15

ES 2 655 725 T3

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

5 <210> 21
 <211> 16

<212> ADN
 <213> Artificial

 5 <220>
 <223> cebador oligonucleótido

 <400> 21
 gcaatgttg tttgc 16

 10 <210> 22
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> cebador oligonucleótido

 <400> 22
 gaagaacaa cagctgtga cc 22
 20
 <210> 23
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> cebador oligonucleótido

 <400> 23
 aatacacctt ctctgtga cg 22
 30
 <210> 24
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> cebador oligonucleótido

 <400> 24
 ctggattaag attacaaagg tt 22
 40
 <210> 25
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45
 <220>
 <223> cebador oligonucleótido

 <400> 25
 tctaaattga ttcaggcag 19
 50
 <210> 26
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> cebador oligonucleótido

 <400> 26
 ctggattaag attacaaagg tt 22
 60
 <210> 27
 <211> 23

<212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> cebador oligonucleótido

<400> 27
 tctagagtaa ttcaggcaga aag 23

10 <210> 28
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> cebador oligonucleótido

<400> 28
 ctggattaag attacaaagg tt 22

20 <210> 29
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> cebador oligonucleótido

<400> 29
 aatacacctt ctctgttga cg 22

30 <210> 30
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> cebador oligonucleótido

<400> 30
 aatattacaa aagtatccag tcag 24

40 <210> 31
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> cebador oligonucleótido

<400> 31
 ggtactatt ttgtcaaaa cagg 24

50 <210> 32
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> cebador oligonucleótido

<400> 32
 ggaatatcaa ttgattaga attacaaaag tg 32

60 <210> 33
 <211> 19

65

<212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> cebador oligonucleótido

<400> 33
 tctaaattaa ttcaggcag 19

10 <210> 34
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> cebador oligonucleótido

20 <400> 34
 ggaatatcaa ttgattaga attacaaaag tg 32

25 <210> 35
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> cebador oligonucleótido

<400> 35
 tctaaattaa ttcaggcag 19

35 <210> 36
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> cebador oligonucleótido

<400> 36
 ggaatatcaa ttgattaga attacaaaag tg 32

45 <210> 37
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> cebador oligonucleótido

<400> 37
 ggtactatt ttgtcaaaa cagg 24

55 <210> 38
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> cebador oligonucleótido

<400> 38
 aattgaatc aaggcgctcg taat 24

65 <210> 39
 <211> 15

<212> ADN
 <213> Artificial

 5 <220>
 <223> cebador oligonucleótido

 <400> 39
 tacgaggcac caccg 15

 10 <210> 40
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> cebador oligonucleótido

 <400> 40
 gttaaagttt ttgcaata 18
 20
 <210> 41
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> cebador oligonucleótido

 <400> 41
 atatcgtacg ctcaaatgcc 20
 30
 <210> 42
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> cebador oligonucleótido

 <400> 42
 ctttgtcaaa gttatcgct ta 22
 40
 <210> 43
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45
 <220>
 <223> cebador oligonucleótido

 <400> 43
 gaggtcaagt ttctgaag 19
 50
 <210> 44
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> cebador oligonucleótido

 <400> 44
 gtcagagtct atgcgctg 18
 60
 <210> 45
 <211> 22
 65

ES 2 655 725 T3

<212> ADN
<213> Artificial

5 <220>
<223> cebador oligonucleótido

<400> 45
tgttctaaat taattcaggc ag 22

10 <210> 46
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> cebador oligonucleótido

20 <400> 46
tgtctggatt aagattacaagg 23

25 <210> 47
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> cebador oligonucleótido

35 <400> 47
gcctagcaaa ctcggaagat t 21

40 <210> 48
<211> 28
<212> ADN
<213> Artificial

45 <220>
<223> cebador oligonucleótido

50 <400> 48
atctatgact gtacccaat gtcctag 28

55

REIVINDICACIONES

1. Un método para medir β -glucano (en lo sucesivo en el presente documento, abreviado como " β G"), que comprende:

5 (1) poner en contacto una muestra con una proteína 1 que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, o SEQ ID NO: 20, o una secuencia de aminoácidos que es un 95 % o más homóloga con la secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, o SEQ ID NO: 20, y que tiene una activación de unión a β -glucano (en lo sucesivo en el presente documento, abreviado como "proteína de unión a β G 1"), y
 10 también una proteína 2 que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, o SEQ ID NO: 20, o una secuencia de aminoácidos que es un 95 % o más homóloga con la secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, o SEQ ID NO: 20, y que tiene una actividad de unión a β -glucano (en lo sucesivo en el presente documento, abreviado como "proteína de unión a β G 2"), para formar un complejo de la proteína de unión a β G 1, β G en la muestra y la proteína de unión a β G 2;

(2) medir la cantidad del complejo mencionado anteriormente; y

(3) determinar la concentración de β G en la muestra en función de la cantidad del complejo obtenido.

2. El método de medición según la reivindicación 1, en donde

20 (i) la proteína de unión a β G 1 está inmovilizada en un vehículo insoluble.

(ii) la proteína de unión a β G 2 se marca con una sustancia marcadora; o

(iii) la proteína de unión a β G 1 y la proteína de unión a β G 2 se usan sin inmovilizarse en un vehículo insoluble, preferiblemente después de la formación del complejo, el complejo mencionado anteriormente se separa de la proteína de unión a β G libre 1 y de la proteína de unión a β G libre 2 por electroforesis capilar.

25 3. El método de medición según la reivindicación 1, en donde la medición comprende:

(1) poner en contacto una muestra con la proteína de unión a β G 1 para formar un complejo 1 de β G en la muestra y la proteína de unión a β G 1;

(2) poner en contacto el complejo 1 mencionado anteriormente con la proteína de unión a β G 2 para formar un complejo 2 de la proteína de unión a β G 1, β G en la muestra y la proteína de unión a β G 2;

30 (3) medir la cantidad del complejo 2 mencionado anteriormente; y

(4) determinar la concentración de β G en la muestra basándose en la cantidad del complejo 2 obtenido que se ha mencionado anteriormente.

4. El método de medición según la reivindicación 1, en donde la medición comprende:

35 (1) poner en contacto una muestra con la proteína de unión a β G 1 que está inmovilizada en un vehículo insoluble, para formar un complejo 1 de β G en la muestra y la proteína de unión a β G 1 inmovilizada en el vehículo insoluble;

(2) poner en contacto el complejo 1 mencionado anteriormente con la proteína de unión a β G 2, para formar un complejo 2 del complejo 1 y la proteína de unión a β G 2; después

(3) medir la cantidad del complejo 2 mencionado anteriormente; y

40 (4) determinar la concentración de β G en la muestra basándose en la cantidad del complejo 2 obtenido que se ha mencionado anteriormente.

5. El método de medición según la reivindicación 1, en donde la medición comprende:

45 (1) poner en contacto una muestra con la proteína de unión a β G 1 que está inmovilizada en un vehículo insoluble, para formar un complejo 1 de β G en la muestra y la proteína de unión a β G 1 inmovilizada en el vehículo insoluble;

(2) poner en contacto el complejo 1 mencionado anteriormente con la proteína de unión a β G 2 que está marcada con una sustancia de marcado, para formar un complejo 2 del complejo 1 y la proteína de unión a β G 2 marcada;

(3) medir la cantidad de la sustancia de marcado en el complejo 2 mencionado anteriormente; y

(4) determinar la concentración de β G en la muestra basándose en la cantidad obtenida de la sustancia de marcado.

6. El método según la reivindicación 1 a 5,

5 en donde una combinación de la proteína de unión a β G 1 y la proteína de unión a β G 2 se selecciona de los siguientes puntos (1) a (21),

(1) la proteína de unión a β G 1 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4, y la proteína de unión a β G 2 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4;

10 (2) la proteína de unión a β G 1 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4, y la proteína de unión a β G 2 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 16;

15 (3) la proteína de unión a β G 1 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6, y la proteína de unión a β G 2 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4;

(4) la proteína de unión a β G 1 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6, la proteína de unión a β G 2 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 10;

20 (5) la proteína de unión a β G 1 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6, y la proteína de unión a β G 2 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 16;

(6) la proteína de unión a β G 1 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 14, y la proteína de unión a β G 2 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 16;

25 (7) la proteína de unión a β G 1 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 16, y la proteína de unión a β G 2 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 16;

30 (8) la proteína de unión a β G 1 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4, y la proteína de unión a β G 2 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6;

(9) la proteína de unión a β G 1 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6, y la proteína de unión a β G 2 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6;

35 (10) la proteína de unión a β G 1 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 8, y la proteína de unión a β G 2 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6;

(11) la proteína de unión a β G 1 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 16, y la proteína de unión a β G 2 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6;

40 (12) la proteína de unión a β G 1 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 18, y la proteína de unión a β G 2 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6;

45 (13) la proteína de unión a β G 1 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 18, y la proteína de unión a β G 2 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 18;

(14) la proteína de unión a β G 1 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 8, y la proteína de unión a β G 2 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 18;

50 (15) la proteína de unión a β G 1 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6, y la proteína de unión a β G 2 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 18;

(16) la proteína de unión a β G 1 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 14, y la proteína de unión a β G 2 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4;

5 (17) la proteína de unión a β G 1 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 16, y la proteína de unión a β G 2 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4;

(18) la proteína de unión a β G 1 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 14, y la proteína de unión a β G 2 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6;

10 (19) la proteína de unión a β G 1 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 14, y la proteína de unión a β G 2 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 18;

15 (20) la proteína de unión a β G 1 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4, y la proteína de unión a β G 2 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 18; o

(21) la proteína de unión a β G 1 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 20, y la proteína de unión a β G 2 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 18.

7. Un kit para la medición de β -glucano que comprende los siguientes como constituyentes:

20 (1) un reactivo que contiene una proteína de unión a β G 1 que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, o SEQ ID NO: 20, o una secuencia de aminoácidos que es un 95 % o más homóloga con la secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, o SEQ ID NO: 20, y que tiene una actividad de unión a β -glucano, y

25 (2) un reactivo que contiene una proteína de unión a β G 2 que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, o SEQ ID NO: 20, o una secuencia de aminoácidos que es un 95 % o más homóloga con la secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, o SEQ ID NO: 20, y que tiene una actividad de unión a β -glucano,

30 en donde

(A) la proteína de unión a β G 1 y la proteína de unión a β G 2 tienen una secuencia de aminoácidos diferente, respectivamente,

35 (B) la proteína de unión a β G 1 está inmovilizada en un vehículo insoluble, y la proteína de unión a β G 2 no está inmovilizada en un vehículo insoluble,

(C) la proteína de unión a β G 1 está sin marcar, y la proteína de unión a β G 2 está marcada con una sustancia de marcado, o

40 (D) la proteína de unión a β G 1 está inmovilizada en un vehículo insoluble y está sin marcar, y la proteína de unión a β G 2 está marcada con una sustancia de marcado.

8. El kit según la reivindicación 7, en donde

(i) la proteína de unión a β G 1 está inmovilizada en un vehículo insoluble; o

(ii) la proteína de unión a β G 2 está marcada con una sustancia de marcado.

9. El kit según la reivindicación 7 u 8,

45 en donde una combinación de la proteína de unión a β G 1 y la proteína de unión a β G 2 se selecciona de los siguientes puntos (1) a (21),

(1) la proteína de unión a β G 1 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4, y la proteína de unión a β G 2 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4;

ID NO: 14, y la proteína de unión a β G 2 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 18;

5 (20) la proteína de unión a β G 1 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4, y la proteína de unión a β G 2 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 18; o

(21) la proteína de unión a β G 1 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 20, y la proteína de unión a β G 2 es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 18.

10. Una proteína que tiene una actividad de unión a β -glucano seleccionada de los siguientes puntos (i) o (ii);

10 (i) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ, o una secuencia de aminoácidos que es un 95 % o más homóloga con la secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, o

15 (ii) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:14 o la SEQ ID NO:20.

11. La proteína según la reivindicación 10, en donde la proteína comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un 95 % o más de homología con la secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10.

12. Una molécula de ácido nucleico

20 (i) que comprende una secuencia de nucleótidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9; o una secuencia de nucleótidos que es un 95 % o más homóloga con la secuencia de nucleótidos mostrada en una cualquiera de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9,

(ii) que consiste en una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO:13 o la SEQ ID NO:19, o

25 (iii) que codifica una proteína según la reivindicación 10.

13. La molécula de ácido nucleico según la reivindicación 12, en donde la molécula de ácido nucleico es ADN.

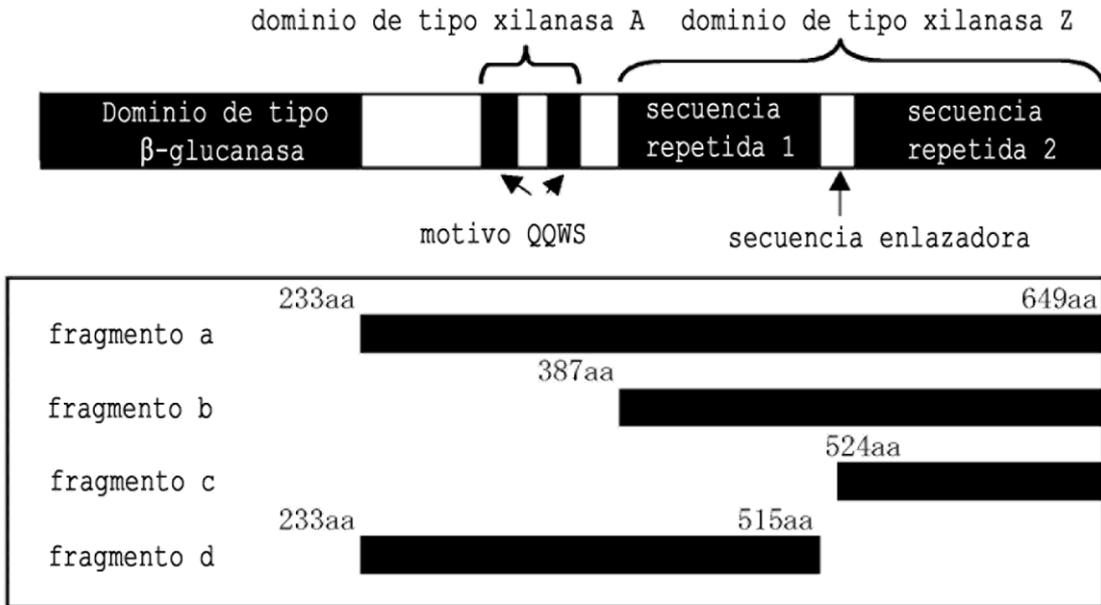
14. Una construcción recombinante que incorpora en la misma la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 12.

30 15. Un transformante o un transductor, que se transforma o se transduce mediante la construcción recombinante según la reivindicación 14.

16. Un proceso para producir una proteína según la reivindicación 10, caracterizado por que el transformante o el transductor según la reivindicación 15 se cultiva y la proteína se separa del cultivo resultante.

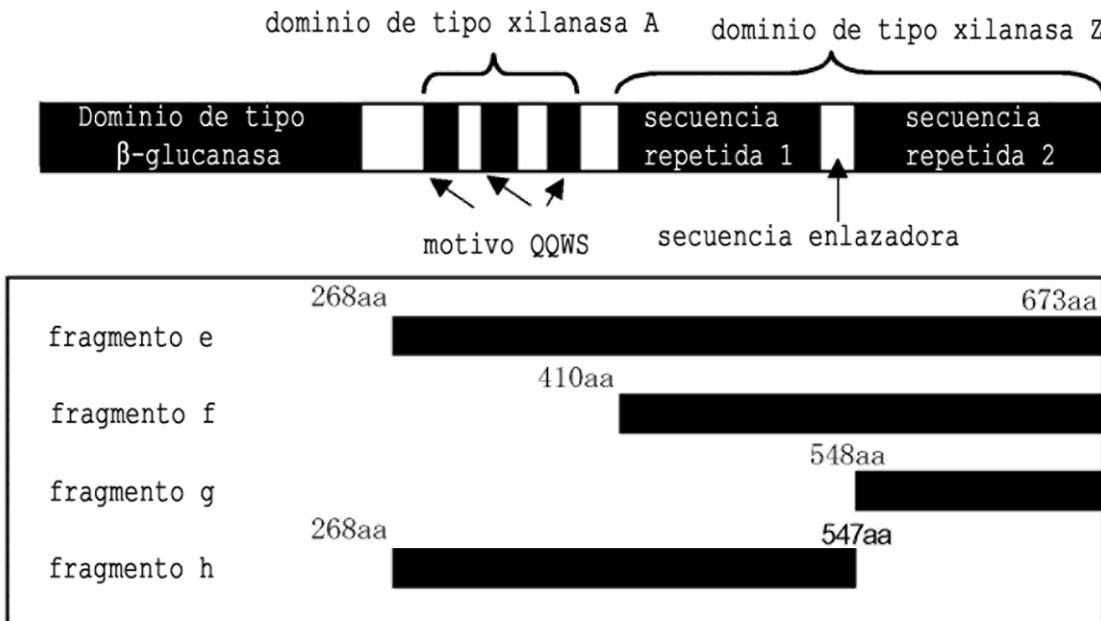
[Fig. 1]

Subunidad del factor G de cangrejo de herradura (*Limulus polyhemus*)

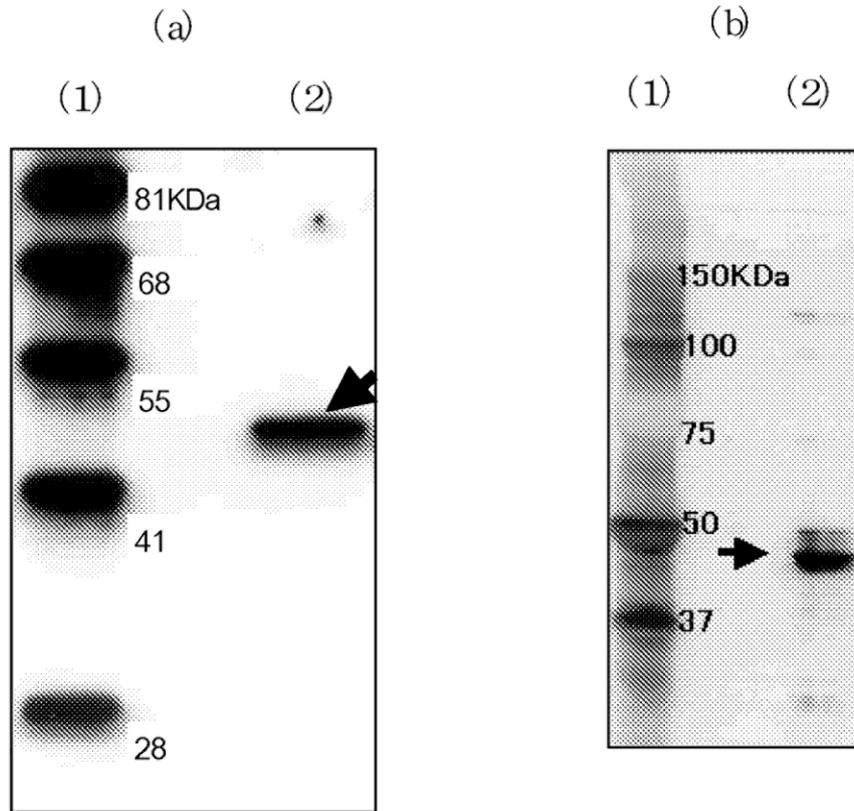


[Fig. 2]

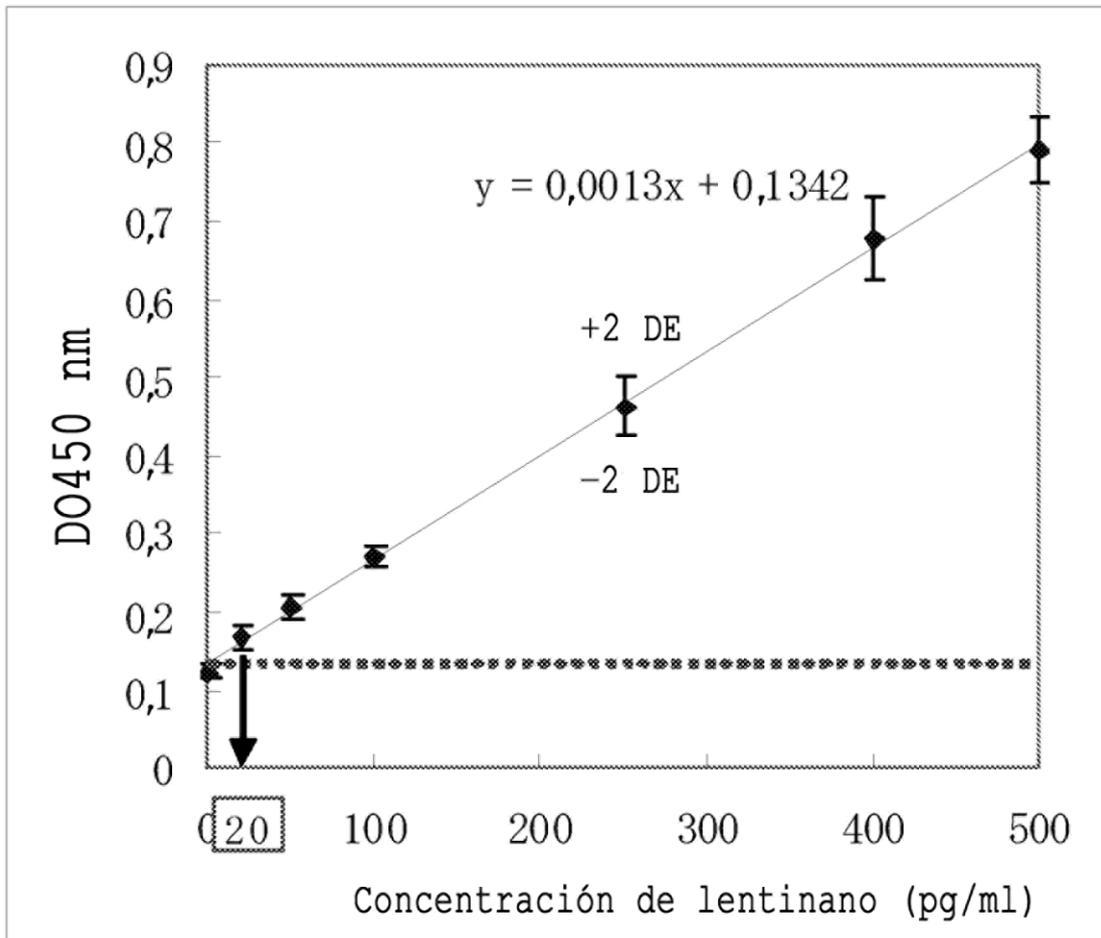
Subunidad del factor G de cangrejo de herradura (*Tachypleus tridentatus*)



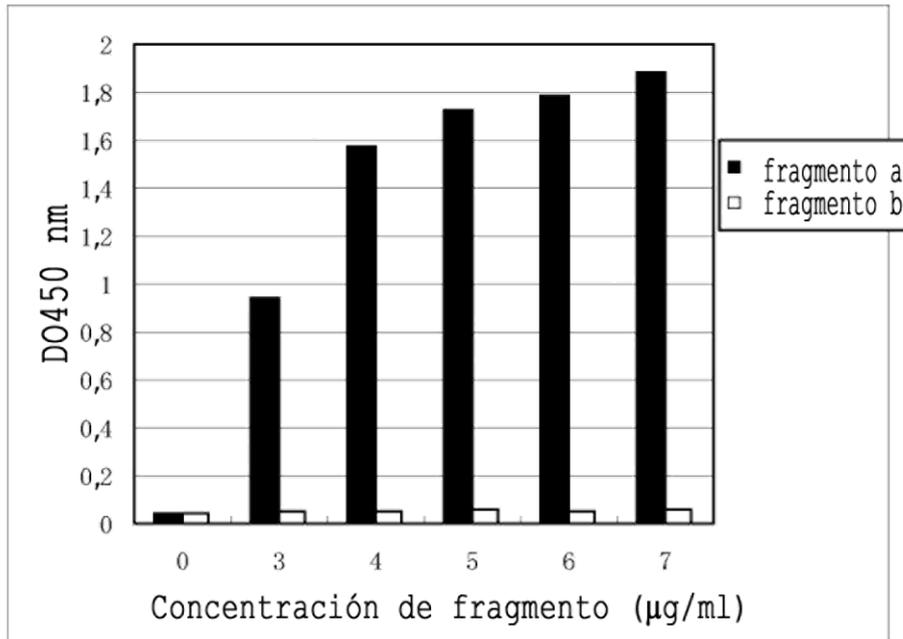
[Fig.3]



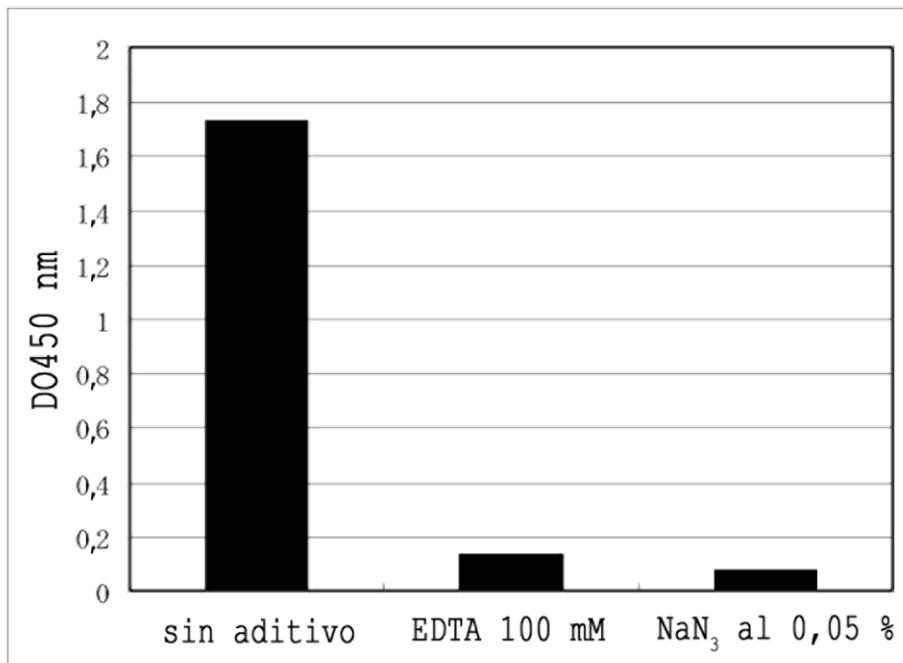
[Fig.4]



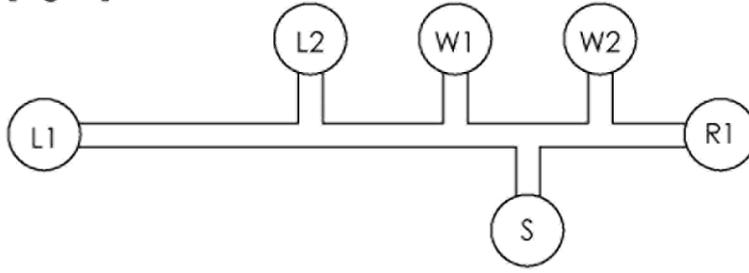
[Fig. 5]



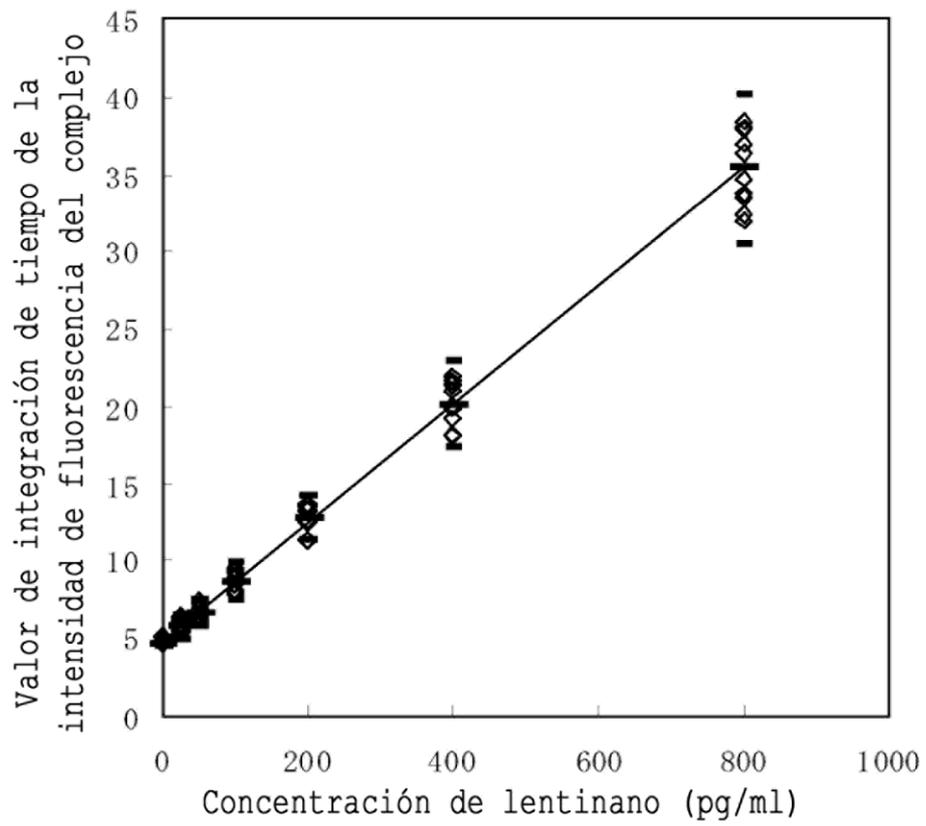
[Fig. 6]



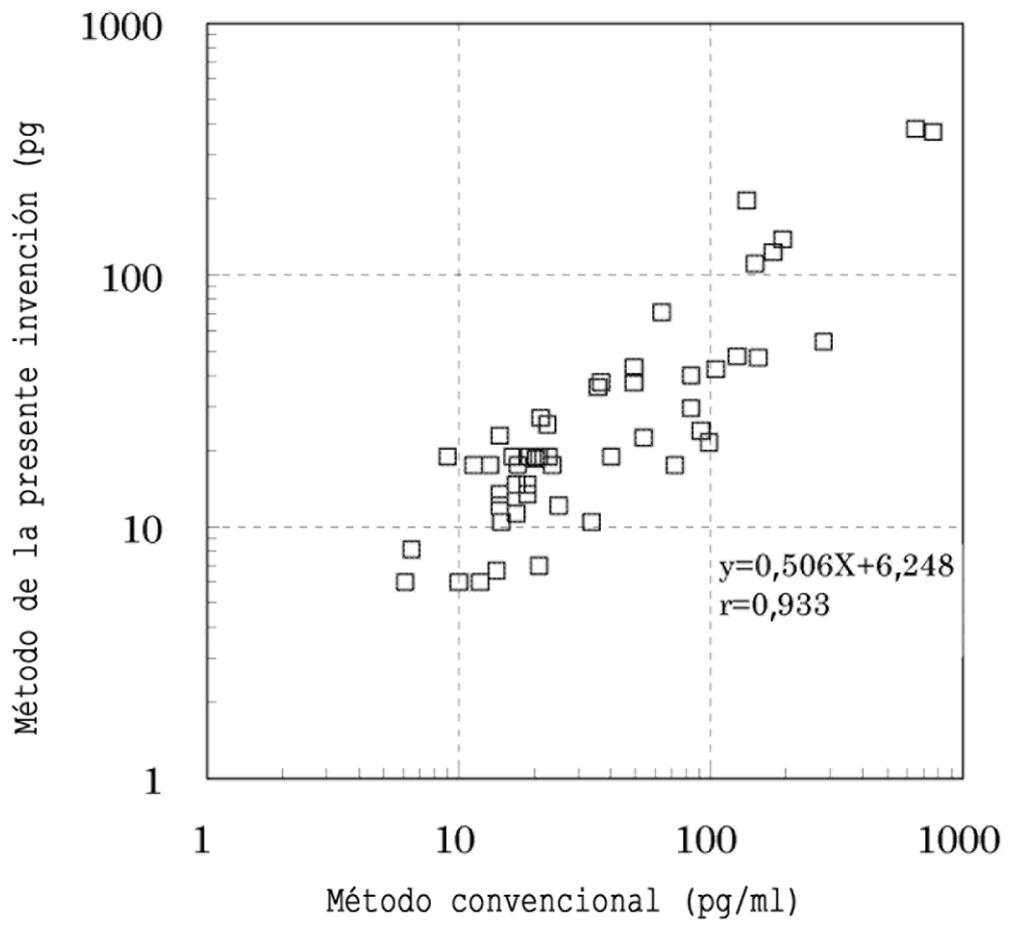
[Fig. 7]



[Fig. 8]



[Fig. 9]



[Fig. 10]

