

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 726 530**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01)  
**C12N 5/071** (2010.01)  
**C07K 14/435** (2006.01)  
**C12N 9/02** (2006.01)  
**C12N 9/52** (2006.01)  
**C12N 15/09** (2006.01)  
**C12N 9/50** (2006.01)  
**G01N 33/569** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2012 PCT/JP2012/001814**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **20.09.2012 WO12124338**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2012 E 12758377 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 2687847**

54 Título: **Sonda para analizar tejido biológico y método para utilizar la misma**

30 Prioridad:

**16.03.2011 JP 2011058080**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.10.2019**

73 Titular/es:

**TOHOKU UNIVERSITY (50.0%)**  
**1-1 Katahira 2-chome Aoba-ku Sendai-shi**  
**Miyagi 980-8577, JP y**  
**MEIJI SEIKA PHARMA CO., LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**YAMAGATA, YOUHEI;**  
**GOTO, MASAFUMI y**  
**WATANABE, KIMIKO**

74 Agente/Representante:

**MARTÍN BADAJOZ, Irene**

ES 2 726 530 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

Sonda para analizar tejido biológico y método para utilizar la misma

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método para obtener células o poblaciones de células que tienen una alta actividad biológica con alto rendimiento de un tejido biológico mediante aislamiento enzimático, y a sondas para el método.

10

**Técnica anterior**

El aislamiento enzimático de células y agrupaciones de células a partir de tejido biológico es útil para diversos propósitos incluyendo trasplante de las células y establecimiento de cepas celulares y en una amplia variedad de usos en los campos de terapia, diagnóstico y examen. Sin embargo, para disociar un tejido biológico y aislar células o agregados de células que constituyen el tejido, es necesario separar las células o los agregados celulares hasta un nivel deseado y aislarlos del tejido celular. Al separar las células y agrupaciones de células de un tejido biológico, la matriz intercelular se degrada mediante una mezcla de proteasas tales como colagenasa.

15

20

Un tejido biológico está constituido por células y la matriz intercelular. La matriz intercelular, que es una sustancia para anclar las células, incluye materiales estructurales y materiales no estructurales. Los primeros incluyen fibras tales como una fibra colágena, una fibra elástica y una fibra reticular; mientras que los últimos incluyen las denominadas sustancias de base formadas por materiales de sol o gel tales como una glicoproteína y proteoglicano, para rellenar el espacio entre las fibras. Un ejemplo típico de la matriz intercelular es una proteína denominada colágeno, que ocupa aproximadamente 1/3 del peso de las proteínas totales en un organismo vivo. El colágeno tiene una estructura fibrosa, que se denomina formalmente fibra de colágeno.

25

Los tejidos se clasifican a grandes rasgos en cuatro categorías: el tejido epitelial, el tejido de soporte, el tejido muscular y el tejido nervioso. El tejido epitelial es el tejido que cubre la superficie del cuerpo, en el que las células se disponen densamente sin matriz intercelular entre ellas. El tejido de soporte, que funciona para el soporte de órganos, células y similares, incluye el tejido conjuntivo, el tejido de cartílago, el tejido óseo, la sangre y la linfa. El tejido muscular es una integración de células diferenciadas para el propósito de movimiento de contracción, en el que la matriz intercelular ocupa una razón extremadamente baja.

30

35

El tejido muscular está constituido por células musculares, tejido conjuntivo, vasos sanguíneos y nervios; sin embargo, está formado principalmente por fibras musculares. El tejido nervioso está constituido principalmente por el endoneuro y el perineuro, que contienen cada uno una gran cantidad de matriz intercelular (colágeno). El tejido conjuntivo, que es una clase de tejido de soporte, está constituido por tejido adiposo y tejido conjuntivo fibroso (constituido por fibras de colágeno y fibras elásticas) y se divide a grandes rasgos en tejido conjuntivo hidrófobo y tejido conjuntivo denso. El tejido conjuntivo hidrófobo es tejido conjuntivo fibroso que tiene fibras de colágeno dispuestas irregularmente en el mismo y distribuidas en el tejido subcutáneo, tejido mucoso, nervios, membrana externa de vasos sanguíneos y tejido interlobular.

40

El contenido de colágeno en la matriz intercelular varía dependiendo de la especie, la edad, el sexo, el tejido y el entorno en que se vive. Sin embargo, aún no se ha dilucidado suficientemente qué tipo de colágeno está incluido en qué tejido y en qué estado de la matriz y en qué cantidad. La característica del colágeno reside en que los aminoácidos que constituyen una cadena peptídica de una proteína tienen una estructura primaria en la que aparece repetidamente glicina cada tercer residuo como "glicina-aminoácido X-aminoácido Y". Se ha notificado que hay aproximadamente más de 30 tipos de proteínas de colágeno en el cuerpo humano. El colágeno presente más abundantemente en el cuerpo es colágeno tipo I fibroso. El colágeno tipo IV no fibroso también está contenido abundantemente y conectado mutuamente por medio de un enlace disulfuro intermolecular, que contribuye a la formación de un tejido reticular (documento no de patente 1). Se notifica que el colágeno tipo IV está presente entre los islotes pancreáticos y el tejido endocrino (documentos no de patente 2 y 3).

45

50

Puede ser teóricamente posible determinar la presencia de un tipo predeterminado de colágeno en una matriz diana mediante inmunotinción usando anticuerpos contra tipos de colágenos individuales. Sin embargo, están presentes muchos tipos de colágenos en una amplia variedad de tipos de animales multicelulares. Por tanto, es difícil producir anticuerpos contra colágenos. Esto hecho supone un obstáculo y hace difícil realizar la determinación de colágeno mediante inmunotinción.

55

60

Las enzimas que degradan el tejido, es decir, diversos tipos de colagenasas en bruto derivadas de *Clostridium histolyticum*, contienen no solo dos tipos de colagenasas sino también diversos tipos de proteasas (que tienen actividad de degradación de colágeno y actividad de degradación de proteínas no específicas) y componentes distintos de proteasas (por ejemplo, fosfolipasa). En virtud de la colagenasa en bruto, se separan enzimáticamente células y poblaciones de células de un tejido biológico.

65

En la separación enzimática de células individuales o poblaciones de células de un tejido biológico, se notifica que dos tipos de colagenasas (ColG y ColH) tienen papeles importantes en el logro del rendimiento y el mantenimiento de la actividad biológica de las células y poblaciones de células que van a separarse, y por tanto la razón cuantitativa de las mismas tiene un efecto significativo sobre el rendimiento y la actividad (documento no de patente 4). Además, en la separación de islotes pancreáticos del tejido pancreático, se usan dos tipos de colagenasas producidas por *Clostridium histolyticum* (documento no de patente 5, documentos de patente 1 y 2). Los presentes inventores han encontrado hasta ahora que pueden separarse islotes pancreáticos con alta calidad optimizando la razón cuantitativa de los dos tipos de colagenasas.

Se ha notificado que diferentes colagenasas tienen dominios de unión a colágeno mutuamente diferentes (documento no de patente 6). Hasta el presente, se han preparado diversas proteínas de fusión formadas por una proteína funcional y un dominio de unión a colágeno para sistemas de direccionamiento y administración (DDS). Los ejemplos de los mismos incluyen un factor de crecimiento celular que puede unirse a colágeno (documento no de patente 7) preparado uniendo bFGF o EGF a un dominio de unión a colágeno de una colagenasa derivada de *Clostridium histolyticum*; una proteína de fusión formada por decapeptido de unión a colágeno derivado de factor de von Willebrand y TGF- $\beta$  (documentos no de patente 8 y 9); y un agente de suministro de factor de crecimiento celular de liberación sostenida (documento de patente 3) preparado uniendo un péptido funcional a un dominio de unión a colágeno de fibronectina. Tal como se describió anteriormente, se han preparado proteínas de fusión con un dominio de unión a colágeno para la selección como diana y visualización de tejidos; sin embargo, nunca se han usado para el análisis y la separación de un tejido biológico.

Con el fin de aislar un tejido específico y células sin dañarlas, es necesario degradar la matriz intercelular presente alrededor del tejido y las células. Sin embargo, no resulta fácil degradar la matriz intercelular sola sin degradar y dañar la superficie de las células deseadas. Particularmente, en el caso de un órgano humano, la degradabilidad proteolítica varía dependiendo de, por ejemplo, la edad, el sexo, el hábito y los antecedentes patológicos. Por tanto, el aislamiento tiene que realizarse empíricamente determinando el tipo de enzima y el tiempo de reacción de la misma.

A los pacientes diabéticos se les aplica una terapia (trasplante de islotes pancreáticos) para trasplantar islotes pancreáticos aislados del páncreas. Para el trasplante de islotes pancreáticos, es esencial separar grupos de células denominados islotes pancreáticos presentes en el tejido pancreático. El tejido pancreático debe degradarse sin producir ningún daño en los islotes pancreáticos para separarlos. Sin embargo, el estado de la matriz intercelular varía significativamente dependiendo del tipo de animal, el sitio del tejido, la edad o el sexo de un organismo individual y entorno de crecimiento. Particularmente, las propiedades físicas del colágeno cambian significativamente dependiendo de la edad. No obstante, para tejidos pancreáticos en estado diferente, se aplica una razón cuantitativa predeterminada de enzimas según un protocolo (excepto porque se cambia el tiempo de degradación solo) y se realiza un tratamiento enzimático al tiempo que se comprueba visualmente el grado de degradación del páncreas. Por este motivo, la cantidad y calidad de los islotes pancreáticos así obtenidos varían dependiendo de la institución médica, los profesionales médicos y el estado del páncreas diana.

Si el tipo y la cantidad de proteasa que va a usarse pueden determinarse de manera precisa y fácil a partir de la composición de proteínas de la matriz extracelular u órgano que va a degradarse, pueden aislarse células diana y similares al tiempo que se mantiene una alta actividad.

**Lista de menciones**

Documentos de patente

Documento de patente 1: WO96/00283

Documento de patente 2: WO98/24889

Documento de patente 3: WO02/014505

Documentos no de patente

Documento no de patente 1: Inoue *et al.*, J Cell Biol, 97, 1524-1537 (1983)

Documento no de patente 2: SJ Hughes, P McShane, Transplant Proceedings, 37, 3444-34445 (2005)

Documento no de patente 3: SJ Hughes, A Clark, P McShane, Transplantation, 81(3) 423-426 (2006)

Documento no de patente 4: D Brandhorst *et al.*, Transplantation Proceedings, 37(8), 3450-3451 (2005)

Documento no de patente 5: E Linetsky *et al.*, Diabetes, 46, 1120-1123 (1997)

Documento no de patente 6: K Watanabe, Appl Microbiol Biotechnol, 63, 520-526 (2004)

Documento no de patente 7: N Nishi, O Matsushita, K Yuube, H Miyataka, A Okabe, F Wada, Proc Natl Acad Sci USA.; 95(12):7018-7023 (1998)

5

Documento no de patente 8: Tuan *et al.*, Connective Tissue Research, 34(1), 1-9 (1996)

Documento no de patente 9: Han *et al.*, Protein Expression and Purification 11, 169-178 (1997)

10 Krahn *et al.*, Analytical Biochemistry 350 (2006), 177-185 se refiere a "proteínas de unión a colágeno marcadas fluorescentemente que permiten la visualización específica de colágeno en tejidos y cultivo de células vivas".

### Sumario de la invención

15 Problema técnico

Un objeto de la presente invención es proporcionar un medio para separar rápida y eficazmente células y poblaciones de células que tienen una alta actividad biológica de un tejido biológico; más específicamente, para obtener células diana y poblaciones de células con alto rendimiento sin disminuir la actividad fisiológica de sustancias fisiológicamente activas en un tejido biológico, células o/y órganos.

20

### Solución al problema

Los inventores prepararon sondas para analizar componentes biológicos usando proteínas de fusión de dominios de unión a sustrato (dominios de unión a componentes biológicos) que tienen dos tipos de enzimas, y proteínas de visualización. Los inventores encontraron que pueden separarse más eficazmente células diana y poblaciones de células al tiempo que se mantiene una alta actividad biológica analizando las cantidades de unión de sondas y prediciendo la acción de la enzima en un tejido biológico, determinando de ese modo, por ejemplo, una razón cuantitativa óptima de enzimas y tiempo de acción.

25

30

En resumen, la presente invención se refiere a un método para analizar un tejido biológico, que incluye aplicar dos o más sondas que contienen respectivamente un dominio de unión a sustrato de una proteasa a través del cual dos o más proteínas se unen a un componente biológico específico, a un tejido biológico aislado y analizar las cantidades de unión de las sondas al tejido biológico, en el que las sondas se marcan con una molécula de visualización.

35

Las sondas que van a usarse en la presente invención están diseñadas para visualizarse mediante una técnica de obtención de imágenes de moléculas conocida en la técnica. Más específicamente, las sondas se marcan con moléculas de visualización tales como una molécula fluorescente, una molécula luminiscente, un núcleo positrónico y un radioisótopo.

40

Los ejemplos de las moléculas de visualización incluyen moléculas fluorescentes tales como GFP, EGFP, YFP, BFP, CFP, DsRED, tdTomato y RFP, y moléculas luminiscentes tales como una proteína luciferasa, pero no se limitan a estas. La proteína luciferasa tiene preferiblemente una longitud de onda pico y una intensidad luminiscente diferentes de las de una luciferasa de tipo natural presente en la naturaleza.

45

Una molécula fluorescente y una molécula luminiscente pueden usarse solas. Alternativamente, una molécula fluorescente (proteína receptora de energía) puede usarse en combinación con una molécula autoluminiscente (proteína generadora de energía) tal como luciferasa. En este caso, ambas moléculas están unidas preferiblemente entre sí con un ligador apropiado interpuesto entre ellas.

50

Como dominio de unión a componentes biológicos que va a usarse en una sonda, pueden mencionarse un dominio de unión de una proteasa o un dominio de unión a colágeno de una proteína *in vivo* tal como fibronectina. Los ejemplos específicos del primero incluyen un dominio de unión a colágeno que tiene la colagenasa derivada de *Clostridium*, tal como dominios de unión a colágeno de colagenasa G y colagenasa H derivadas de *Clostridium histolyticum*.

55

Obsérvese que el dominio de unión a colágeno que va a usarse en una sonda puede ser una parte del dominio (secuencia parcial) siempre que puedan lograrse el objeto y efecto de la presente invención. Una parte del dominio de unión a colágeno de este tipo se incluye en el término de "dominio de unión a colágeno".

60

Las secuencias de aminoácidos de dominios de unión a colágeno de colagenasa G y colagenasa H derivadas de *Clostridium histolyticum*, que son ejemplos específicos del dominio de unión a sustrato que va a usarse en la presente invención, se describen en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

65 Cuando la molécula de visualización es una proteína, puede fusionarse un dominio de unión a componentes biológicos con la molécula de visualización (proteína) y usarse como proteína de fusión.

En una sonda, la secuencia de un dominio de unión a componentes biológicos se repite de 1 a 100 veces, y preferiblemente de 1 a 20 veces.

5 En el método de análisis de la presente invención, dos o más sondas pueden aplicarse por separado o simultáneamente a un tejido biológico. Además, las cantidades de unión de sondas individuales pueden medirse por separado o simultáneamente. Preferiblemente, dos o más sondas se marcan con moléculas de visualización diferentes y se aplican simultáneamente, y las cantidades de unión de las mismas se miden simultáneamente.

10 La presente divulgación también proporciona un método para separar células o poblaciones de células de un tejido biológico mediante el método de análisis de la presente invención. El método de separación de la presente invención se caracteriza por el análisis de un tejido biológico mediante el método de análisis anterior, la determinación de la razón cuantitativa de enzimas (enzimas a partir de las cuales se derivan los dominios de unión a sustrato contenidos en las sondas) basándose en los resultados del análisis y la aplicación de las enzimas en la razón cuantitativa al  
15 tejido biológico, separando de ese modo células diana o poblaciones de células.

La presente invención proporciona además un conjunto de sondas para analizar un tejido biológico, constituido por las dos o más sondas mencionadas anteriormente, y un kit de separación de tejidos biológicos que contiene, por ejemplo, el conjunto de sondas y enzimas.

20 Efectos ventajosos de la invención

Cada una de las sondas que van a usarse en la presente invención contiene un dominio de unión a componentes biológicos. Se une específicamente a sitios de unión de una enzima predeterminada en un tejido biológico y emite fluorescencia o luminiscencia. Basándose en la observación de fluorescencia o luminiscencia emitida a partir de cada una de las sondas correspondientes a la enzima predeterminada, puede analizarse la afinidad de la enzima por un tejido biológico y las acciones de la enzima. Para describirlo más específicamente, se incuban sondas junto con una pequeña cantidad de trozos congelados de un tejido diana para teñirlos. Los estados de unión de las sondas se analizan basándose en el tono de color e intensidad fluorescente en los trozos de tejido. Basándose en el análisis, pueden obtenerse informáticamente la razón cuantitativa y tiempo de acción de las enzimas adecuadas para la degradación.

Más específicamente, según la presente invención, el tipo y la cantidad de proteasa que va a usarse puede determinarse de manera precisa y fácil basándose en las propiedades de unión de sondas a la matriz extracelular o de la proteína de un tejido que va a separarse. De esta manera, pueden aislarse células diana y poblaciones de células de manera rápida y fácil de un tejido biológico al tiempo que se mantiene una alta actividad. Por ejemplo, en el caso del trasplante de islotes pancreáticos, puede realizarse un tratamiento enzimático según el estado del tejido pancreático diana, y puede establecerse la indexación del estado de un tejido pancreático para lograr la separación de islotes pancreáticos de alta calidad de manera constante en una gran cantidad.

40 **Breve descripción de los dibujos**

[Figura 1] La figura 1 muestra las constituciones de (A) CBD de ColG y (B) CBD de ColH.

45 [Figura 2] La figura 2 muestra una vista esquemática de la secuencia de tdTomato CBD de ColH.

[Figura 3] La figura 3 muestra la SDS-PAGE de la fracción de elución de Ni-NTA.

50 [Figura 4] La figura 4 muestra la SDS-PAGE de fracción de elución de cromatografía de intercambio aniónico.

[Figura 5] La figura 5 muestra los espectros fluorescentes y de excitación de tdTomato CBD de ColH.

[Figura 6] La figura 6 muestra vistas esquemáticas de los cebadores usados para la amplificación de un gen de luciferasa y un gen de CBD.

55 [Figura 7] La figura 7 muestra plásmidos de expresión de proteína de fusión de dominio de unión a colágeno-luciferasa.

[Figura 8] La figura 8 muestra la detección de la expresión de la proteína de sonda (SDS-PAGE).

60 [Figura 9] La figura 9 muestra la detección de luminiscencia de luciferasa (espectro luminiscente y un cambio de intensidad de luz a 550 nm con el tiempo).

[Figura 10] La figura 10 muestra la SDS-PAGE de la fracción de elución de columna de agarosa Ni-NTA (M: marcador proteico, S: PGV\_CBD de ColH en bruto, FT: fracción no retenida, de 50 a 500 mM: fracción de elución de imidazol a concentraciones individuales (la primera fracción de elución de imidazol 200 mM se usó como disolución

enzimática purificada)).

[Figura 11] La figura 11 muestra un experimento de confirmación para la unión a un trozo de tejido pancreático.

5 [Figura 12] La figura 12 muestra los resultados del análisis de componentes de un trozo de páncreas porcino mediante sonda de EGFP-CBD de ColG.

[Figura 13] La figura 13 muestra la razón de brillo fluorescente de GFP CBD de ColG y tdTomato CBD de ColH en un trozo de tejido de rata (H/G: razón de brillo fluorescente de tdTomato CBD de ColH en relación con GFP CBD de ColG, W: rata Wister-Furth, L: rata Lewis, SD: rata SD).

10 [Figura 14] La figura 14 muestra el efecto de la diferencia en la razón de composición de colagenasas G y H sobre la cantidad y calidad de los islotes pancreáticos (A: rendimiento, B: ATP/ADN, C: prueba de tolerancia a hidratos de carbono *in vitro*, D: insulina/ADN).

15 **Descripción de realizaciones**

1. Método de análisis para tejido biológico

20 En la presente invención, se usan dos o más sondas que contienen respectivamente dominios de unión a componentes biológicos a través de los cuales se unen dos o más proteínas a un componente biológico predeterminado para analizar las cantidades de unión (afinidad) de un tejido biológico a las sondas. Los resultados se aplican a la degradación del tejido biológico y el aislamiento de células y poblaciones de células.

25 En el presente documento, las “dos o más proteínas que se unen a un componente biológico específico predeterminado” se refieren a proteínas de la matriz intercelular tales como fibronectina e integrina, y a enzimas tales como una proteasa. Estas proteínas tienen cada una un sitio (dominio) que se une específicamente al ligando y sustrato correspondiente. El sitio se describirá como “un dominio de unión a componente biológico” en la memoria descriptiva.

30 En el aislamiento de células y poblaciones de células de un tejido biológico, en la mayoría de los casos, se usan habitualmente una pluralidad de enzimas. Sin embargo, la acción de cada enzima (sensibilidad de un tejido) varía significativamente dependiendo del sitio y estado del tejido biológico al que va a aplicarse la enzima. Por tanto, para separar rápida y eficazmente células diana y poblaciones de células al tiempo que se mantiene una alta actividad biológica, se determinan deseablemente de antemano el consumo óptimo, razón de uso, tiempo de acción de la enzima y otros. Las sondas de la presente invención permiten una fácil determinación del consumo óptimo, razón de uso y tiempo de acción de la enzima de este tipo.

35 El “tejido biológico” diana que va a usarse en la presente invención no está particularmente limitado, e incluye una amplia variedad de tejidos de animales multicelulares (por ejemplo, mamíferos, aves, reptiles y peces) tales como hígado, páncreas, riñón, tejido de regazo del diente, hígado, páncreas, piel, cartílago, hueso y tejido nervioso. Además, no solo se incluyen tejidos aislados de un organismo vivo sino que también se incluyen tejidos construidos artificialmente, tales como tejido de células ES y un tejido de células de fibroblastos que sirve como material para células iPS.

40 La presente invención emplea “dos o más sondas” que contienen respectivamente dominios de unión a componentes biológicos (por ejemplo, diferentes sitios de unión a enzima-sustrato) a través de los cuales dos o más proteínas se unen a un componente biológico predeterminado. Los dominios de unión a componentes biológicos que van a usarse en las sondas se seleccionan apropiadamente dependiendo del propósito del análisis.

45 Por ejemplo, en el análisis de un tejido biológico antes de la digestión enzimática (degradación) del tejido biológico y la separación de células y poblaciones de células, se usan sondas que comprenden un dominio de unión a sustrato de la proteasa que va a usarse para tal digestión enzimática y separación de células.

50 Los ejemplos de la proteasa que va a usarse en la degradación de un tejido incluyen colagenasa, tripsina, quimotripsina, dispasa, elastasa, papaína, pronasa, termolisina, subtilisina, bromelaína, fitina y termitasa. Los ejemplos de colagenasa incluyen particularmente colagenasa G y colagenasa H derivadas de *Clostridium histolyticum*, colagenasa derivada de *Actinomyces* y colagenasa derivada de *Clostridium perfringens*. La mayoría de las estructuras primarias de los sitios de unión a sustrato de estas enzimas ya se han analizado. Usando la información estructural, los expertos en la técnica pueden diseñar una sonda.

55 La sonda unida a un tejido biológico se visualiza mediante una técnica de obtención de imágenes moleculares conocida en la técnica. Debido a la visualización, la cantidad de unión de la sonda puede determinarse fácilmente sin dañar el tejido. La sonda se marca mediante una molécula de visualización apropiada tal como una molécula fluorescente, una molécula luminiscente y un radioisótopo tal como un núcleo positrónico. En la siguiente sección se describirá más específicamente cómo diseñar una sonda.

Dos o más sondas pueden aplicarse por separado o simultáneamente a un tejido biológico. Además, las cantidades de unión de las sondas pueden medirse por separado o simultáneamente. Sin embargo, en vista de una medición rápida y simple, es preferible que dos o más sondas se marquen con diferentes moléculas de visualización y se apliquen simultáneamente a un tejido biológico, y que las cantidades de unión de las mismas se midan simultáneamente.

En la presente invención, las dos o más sondas mencionadas anteriormente se aplican un tejido biológico aislado, y las cantidades de unión (afinidad) de las sondas al tejido biológico se analizan. Los resultados se aplican a la degradación de un tejido biológico y al aislamiento de células y poblaciones de células. Para describir más específicamente, mediante el análisis se obtiene la razón de cantidad de unión de dos o más sondas a un tejido biológico. Basándose en la razón de cantidad de unión, se determina la razón cuantitativa óptima de enzimas que van a usarse para la degradación del tejido biológico y el aislamiento de células y poblaciones de células. La razón de unión de las sondas tiene una correlación con la razón cuantitativa de enzimas. Cuanto mayor es la razón de unión, mayor es la razón cuantitativa óptima de enzimas. Sin embargo, puesto que las enzimas difieren mutuamente en el número de unidades, título (unidad de eficacia/mg), temperatura óptima, pH óptimo y tiempo de acción, la razón cuantitativa de las enzimas que van a usarse se determina finalmente considerando de manera exhaustiva estos factores y la razón de unión de sondas. Si la razón de unión de sondas puede obtenerse mediante la presente invención, los expertos en la técnica pueden determinar una razón cuantitativa óptima de este tipo.

## 2. Conjunto de sondas para el análisis de tejido biológico

El conjunto de sondas de la presente invención está constituido por dos o más sondas. Cada una de las sondas contiene un dominio de unión a componentes biológicos diferente (uno de los dominios de unión a componentes biológicos de dos o más proteínas que se unen a un componente biológico predeterminado) y una molécula de visualización seleccionada de una molécula fluorescente, una molécula luminiscente y un radioisótopo incluyendo un núclido positrónico.

El dominio de unión a sustrato de una enzima se selecciona apropiadamente según el propósito del análisis. En el análisis de un tejido biológico antes de la digestión enzimática (degradación) de un tejido biológico y la separación de células y poblaciones de células, se usan sondas que comprenden un dominio de unión a sustrato de una proteasa usada en tal digestión enzimática y separación de células.

Los ejemplos de una proteasa de este tipo incluyen colagenasa, tripsina, quimotripsina, dispasa, elastasa, papaína, pronasa, termolisina, subtilisina, bromelaína, fitina y termitasa. Los ejemplos de colagenasa incluyen particularmente colagenasa G y colagenasa H derivadas de *Clostridium histolyticum* y colagenasa derivada de *Actinomyces* y colagenasa derivada de *Clostridium perfringens*. La mayoría de las estructuras primarias de los sitios de unión al sustrato de estas enzimas ya se han analizado. Usando la información estructural, los expertos en la técnica pueden diseñar sondas. Como ejemplos, las secuencias de aminoácidos de colagenasa G y colagenasa H derivadas de *Clostridium histolyticum* se describen en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, respectivamente.

Es preferible que una sonda contenga de 1 a 100 repeticiones, particularmente de 1 a 20 repeticiones de un dominio de unión a sustrato (por ejemplo, dominio de unión a colágeno) o una parte del mismo.

Como molécula de visualización, pueden usarse una molécula fluorescente, una molécula luminiscente y un núclido positrónico que van a usarse en la técnica de obtención de imágenes de moléculas.

Como molécula fluorescente, puede usarse para la visualización una proteína fluorescente tal como GFP, EGFP, YFP, BFP, CFP, DsRED, tdTomato y RFP o un marcador fluorescente tal como Alexa350, dimetilaminocumarina, 5/6-carboxi-fluoresceína, Alexa488, ATTO488, DY-505, 5/6-carboxifluoresceína, Alexa488, Alexa532, Alexa546, Alexa555, ATTO488, ATTO532, tetrametilrodamina, Cy3, DY-505, DY-547, Alexa635, Alexa647, ATTO600, ATTO655, DY-632, Cy5, DY-647, Cy5.5.

Como molécula luminiscente, puede usarse una enzima luminiscente tal como luciferasa. Como luciferasa, puede mencionarse luciferasa derivada de diversos organismos luminiscentes tales como *Cypridina*, *Hoplophoridae*, insectos luminiscentes (por ejemplo, luciérnaga, *Pityobiinae*), gusanos luminiscentes, *Latia*, *pus shiitake*, *Aequorea victoria* (aecuorina). Se usa preferiblemente una luciferasa modificada que tiene una longitud de onda pico e intensidad luminiscente diferentes de una luciferasa de tipo natural.

Una proteína fluorescente tal como GFP requiere una fuente de luz externa para emitir fluorescencia; sin embargo, la luciferasa oxida la luciferina para emitir luz por sí misma. También se desarrolla una técnica de emisión de luz a partir de GFP sin una fuente de luz externa uniendo la luciferasa a GFP, y por tanto puede aplicarse una técnica de este tipo (documentos WO2004/22600, WO2004/052934).

Distintas a estas, se conocen muchas técnicas con respecto a la visualización de una proteína (documento WO01/46694, publicación nacional de solicitud de patente internacional n.º 2006-518209, publicación nacional de

solicitud de patente internacional n.º 2005-525111, patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2008-283959). Pueden usarse estas técnicas conocidas.

5 Como radioisótopo, puede usarse un núcleo positrónico empleado en obtención de imágenes usando PET. Los ejemplos del núcleo positrónico incluyen  $^{15}\text{O}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$  y  $^{82}\text{Rb}$ . Puede usarse una etiqueta convencional conocida en la técnica y frecuentemente usada en una sonda de PET.

10 Si se usa una molécula de proteína como molécula de visualización, puede fusionarse un dominio de unión a componentes biológicos (dominio de unión a colágeno) con la molécula de visualización para constituir una proteína de fusión. Se conoce en la técnica un método para producir una proteína de fusión (tal como se describió anteriormente, N Nishi, *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA.; 95(12):7018-7023 (1998), Tuan *et al.*, Connective Tissue Research, 34(1), 1-9 (1996), Han *et al.*, Protein Expression and Purification 11, 169-178). Por tanto, los expertos en la técnica pueden producir fácilmente una proteína de fusión según estas técnicas convencionales.

15 3. Método para separar células o poblaciones de células de tejido biológico

La presente divulgación también proporciona un método para separar eficazmente células o poblaciones de células deseadas de un tejido biológico, analizando el tejido biológico mediante el uso del método de análisis mencionado anteriormente y determinando la razón cuantitativa y el tiempo de acción de enzimas que van a usarse, basándose en los resultados del análisis.

20 Puesto que la afinidad del tejido por una enzima se sugiere mediante la cantidad de unión de la sonda, la razón cuantitativa y el tiempo de acción de enzimas según el propósito pueden predecirse basándose en la afinidad de cada una de las enzimas.

25 4. Kit de separación de tejido biológico

La presente divulgación también proporciona un kit que va a usarse en el método mencionado anteriormente para separar células o poblaciones de células de un tejido biológico.

30 El kit de la presente divulgación consiste en uno o dos o más elementos seleccionados de reactivos y herramientas usados en el método para separar un tejido biológico de la presente divulgación, tal como el conjunto de sondas de la presente invención, una enzima usada en la separación de un tejido biológico y que tiene un dominio de unión a sustrato usado como elemento de constitución de una sonda, y un tampón, como elementos constitutivos.

### 35 Ejemplos

Ahora, la presente invención se describirá más específicamente por medio de ejemplos a continuación; sin embargo, la presente invención no se limita a estos ejemplos.

40 [Ejemplo 1] Preparación de sonda mediante el uso de EGFP

[Preparación de sonda de EGFP-CBD de ColG]

45 (1) Método para construir EGFP-CBD de ColG

En primer lugar, se describirá la preparación de una sonda (EGFP-CBD de ColG) para colagenasa G derivada de *Clostridium histolyticum* marcada con EGFP.

50 En primer lugar, basándose en la secuencia de FLAG, se sintetizaron dos ADN de oligonucleótido: 5'-TCGACGATTATAAAGATGATGATGATAAAT-3' (SEQ ID NO: 3) y 5'-CTAGATTTATCATCATCATCTTTATAATCG-3' (SEQ ID NO: 4). Cada uno de los ADN de oligonucleótido se disolvió en TE para obtener una concentración de 100  $\mu\text{M}$ . Luego, se mezclaron 10  $\mu\text{l}$  de ADN de oligonucleótido, 3  $\mu\text{l}$  de tampón de polinucleótido cinasa de T4 10 x (fabricado por Nippon Gene), 0,3  $\mu\text{l}$  de ATP 0,1 M, 2  $\mu\text{l}$  de polinucleótido cinasa de T4 (20 U, Nippon Gene) y 14,7  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  y se mantuvo a 37 °C durante una hora. Se tomó una alícuota (10  $\mu\text{l}$ ) de cada una de las disoluciones de reacción y se mezclaron las alícuotas. Se mantuvo la mezcla de disolución a 100 °C durante 5 minutos y se enfrió directamente de manera gradual hasta temperatura ambiente. Se designó esto como disolución 1 de inserto.

60 A 10  $\mu\text{l}$  de pCold2 (TAKARA Bio), se le añadieron 10  $\mu\text{l}$  de tampón Tango 10 x (fabricado por Fermentas), 1  $\mu\text{l}$  de Sall (Fermentas), 1  $\mu\text{l}$  de Xbal (Fermentas) y 28  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ , y se llevó a cabo una reacción a 37 °C durante 5 horas. Tras la finalización de la reacción, a la disolución de reacción se le añadieron 150  $\mu\text{l}$  de TE; además se le añadieron 250  $\mu\text{l}$  de una disolución fenólica/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó suficientemente. Después de eso, se centrifugó la mezcla a temperatura ambiente durante 5 minutos y a 16 000 g, y se recogió el sobrenadante. Al sobrenadante recogido se le añadieron 20  $\mu\text{l}$  de una disolución de acetato de sodio 3 M, y se le añadieron 450  $\mu\text{l}$  de etanol frío. Se permitió que la mezcla reposara todavía sobre hielo durante 5 minutos, y luego se centrifugó a

16 000 g y a 4 °C durante 5 minutos para recoger una precipitación.

Se lavó la precipitación con etanol frío al 70 %, y luego se disolvió en 40 µl de H<sub>2</sub>O. Para esto, se añadieron 5 µl de tampón BAP 10 x (fabricado por TOYOBO CO. LTD.) y 5 µl de fosfatasa alcalina bacteriana (TOYOBO). Se llevó a cabo la reacción a 65 °C durante una hora. La cantidad total de la disolución de reacción se sometió a electroforesis en agarosa al 0,8 %. Tras la finalización de la electroforesis, se realizó tinción con una disolución de bromuro de etidio. Tras comprobarse la posición de una banda, se cortó el gel de agarosa. Se realizó la recuperación del gel de agarosa mediante el uso del kit de purificación de gel/PCR fabricado por Viogene. Se realizó la elución con 40 µl de EB según el protocolo adjunto.

El eluido así obtenido se designó como disolución 1 de vector. Se mezclaron disolución 1 de vector (9 µl), 1 µl de disolución 1 de inserto y 10 µl de disolución de conveniencia de ligación (Nippon gene) y se mantuvieron a 16 °C durante 30 minutos. Se transformó *Escherichia coli* DH5α con esta disolución. Se inoculó la *Escherichia coli* así transformada en 2 ml de medio LB esterilizado mediante un autoclave y que contenía ampicilina, que se esterilizó mediante un filtro esterilizado de 0,22 µm para obtener una concentración final de 100 µg/ml, se cultivó a 37 °C durante la noche y luego se centrifugó a 10 000 g durante un minuto para recoger células bacterianas. A partir de las células bacterianas así recogidas, se recuperaron plásmidos mediante el uso del kit de extracción de ADN de plásmido Mini Plus fabricado por Viogene. Se realizó la elución con 100 µl de EB. A 10 µl de una alícuota tomada del eluido, se le añadieron 2 µl de tampón Tango 10 x, 1 µl de XbaI y 7 µl de H<sub>2</sub>O y se mantuvieron a 37 °C durante 3 horas. Se sometió la disolución de reacción a electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %, y se cortó una única banda que surgió en las proximidades de 4 kpb. Se realizó la recuperación mediante el uso del kit de purificación de gel/PCR fabricado por Viogene. Se realizó la elución con 50 µl de EB. A 10 µl del eluido, se le añadieron 10 µl de disolución de conveniencia de ligación y se mantuvieron a 16 °C durante 30 minutos.

Usando la disolución, se transformó de nuevo *Escherichia coli* DH5α. Se inoculó la *Escherichia coli* así transformada en 2 ml de medio LB esterilizado mediante un autoclave y que contenía ampicilina, que se esterilizó mediante un filtro esterilizado de 0,22 µm para obtener una concentración final de 100 µg/ml, se cultivó a 37 °C durante la noche y luego se centrifugó a 10 000 g durante un minuto para recoger células bacterianas. A partir de las células bacterianas así recogidas, se recuperaron plásmidos mediante el uso del kit de extracción de ADN de plásmido Mini Plus fabricado por Viogene. Se realizó la elución con 100 µl de EB. A 10 µl de una alícuota tomada del eluido, se le añadieron 3 µl de tampón K 10 x (TAKARA Bio), 1 µl de BamHI (TAKARA Bio), 1 µl de EcoRI (TAKARA Bio) y 15 µl de H<sub>2</sub>O y se hicieron reaccionar a 37 °C durante la noche. Tras la finalización de la reacción, se realizó la extracción con una cantidad igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. A la capa superior obtenida, se le añadieron 3 µl de acetato de sodio 3 M, y se le añadieron 70 µl de etanol frío. Se permitió que la mezcla reposara todavía sobre hielo durante 5 minutos, y luego se centrifugó a 16 000 g y a 4 °C durante 5 minutos para recoger una precipitación. Se lavó la precipitación con etanol frío al 70 %, y luego se disolvió en 40 µl de H<sub>2</sub>O. A esto, se le añadieron 5 µl de tampón BAP 10 x (TOYOBO) y 5 µl de fosfatasa alcalina bacteriana (TOYOBO). Se realizó una reacción a 65 °C durante una hora. La cantidad total de la disolución de reacción se sometió a electroforesis en agarosa al 0,8 % con tampón TAE, y se realizó tinción con una disolución de bromuro de etidio. Tras comprobarse la posición de una banda, se cortó el gel de agarosa. Se realizó la recuperación del gel de agarosa mediante el uso del kit de purificación de gel/PCR fabricado por Viogene. Se realizó la elución con 30 µl de EB según el protocolo adjunto. Se designó el eluido resultante como disolución 2 de vector.

Mientras tanto, se mezclaron 0,5 µl de 5'-AAAGAACGGATCCACAACAACACCTATAACTAAAG-3' 100 µM (cebador 1: SEQ ID NO: 5), y 0,5 µl de 5'-AAGCAGAGATGAATTCTTTATTACCCTTAACATAG-3' 100 µM (cebador 2: SEQ ID NO: 6), 1 µl de un plásmido que ya se había clonado y contenía la longitud completa de un gen que codifica colagenasa G de *Clostridium histolyticum*, 8 µl de mezcla de dNTP (TAKARA Bio), 1,0 µl de PrimeStar HS (TAKARA Bio), 20 µl de betaína 5 M y 49 µl de H<sub>2</sub>O, y se realizó la reacción que consistía en 98 °C, 2 min (la primera etapa), 98 °C, 10 s (la segunda etapa), 55 °C, 5 s (la tercera etapa) y 72 °C y 90 s (la cuarta etapa), y se repitió de manera continua el procedimiento de la segunda etapa a la cuarta etapa 35 veces.

Se purificaron los fragmentos de PCR resultantes mediante el uso del kit de purificación de gel/PCR fabricado por Viogene. Se realizó la elución con 50 µl de EB. A la alícuota (10 µl) del eluido resultante, se le añadieron 3 µl de tampón K 10 x (TAKARA Bio), 1 µl de BamHI (TAKARA Bio), 1 µl de EcoRI (TAKARA Bio) y 15 µl de H<sub>2</sub>O, y se realizó una reacción a 37 °C durante la noche. La cantidad total de la disolución de reacción se sometió a electroforesis en agarosa al 0,8 % con tampón TAE, y se tiñó con una disolución de bromuro de etidio. Tras comprobarse la posición de una banda, se cortó el gel de agarosa. Se realizó la recuperación del gel de agarosa mediante el uso del kit de purificación de gel/PCR fabricado por Viogene. Se realizó la elución con 30 µl de EB según el protocolo adjunto. Se designó el eluido como disolución 2 de inserto.

A 5 µl de disolución 2 de vector y 5 µl de disolución 2 de inserto, se le añadieron 10 µl de disolución de conveniencia de ligación. Se realizó la reacción a 16 °C durante 30 minutos. Tras la finalización de la reacción, usando la disolución de ligación, se transformó *Escherichia coli* DH5α. Se inoculó la cepa transformada resultante en 2 ml de medio LB esterilizado mediante un autoclave y que contenía ampicilina, que se esterilizó mediante un filtro

esterilizado de 0,22  $\mu\text{m}$  para obtener una concentración final de 100  $\mu\text{g/ml}$ , se cultivó a 37 °C durante la noche y luego se centrifugó a 10 000 g durante un minuto para recoger células bacterianas. A partir de las células bacterianas así recogidas, se recuperaron plásmidos mediante el uso del kit de extracción de ADN de plásmido Mini Plus fabricado por Viogene. Se realizó la elución con 100  $\mu\text{l}$  de EB. A 10  $\mu\text{l}$  de una alícuota tomada del eluido, se le añadieron 3  $\mu\text{l}$  de tampón Tango 10 x, 1  $\mu\text{l}$  de Sacl (Fermentas), 1  $\mu\text{l}$  de KpnI (Fermentas) y 15  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O y se hicieron reaccionar a 37 °C durante la noche. Tras la finalización de la reacción, se realizó la extracción con una cantidad igual de disolución fenólica/cloroformo/alcohol isoamílico. A la capa superior, se le añadieron 3  $\mu\text{l}$  de acetato de sodio 3 M y 70  $\mu\text{l}$  de etanol frío. Se permitió que la mezcla reposara todavía sobre hielo durante 5 minutos, y luego se centrifugó a 16 000 g y a 4 °C durante 5 minutos para recoger una precipitación. Se lavó la precipitación con etanol frío al 70 %, y luego se disolvió en 40  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O. A esto, se le añadieron 5  $\mu\text{l}$  de tampón BAP 10 x (TOYOBO) y 5  $\mu\text{l}$  de fosfatasa alcalina bacteriana (TOYOBO). Se hizo reaccionar la disolución de reacción a 65 °C durante una hora. La cantidad total de la disolución de reacción se sometió a electroforesis en agarosa al 0,8 % con tampón TAE, y se realizó tinción con una disolución de bromuro de etidio. Tras comprobarse la posición de una banda, se cortó el gel de agarosa. Se realizó la recuperación del gel de agarosa mediante el uso del kit de purificación de gel/PCR fabricado por Viogene. Se realizó la elución con 30  $\mu\text{l}$  de EB según el protocolo adjunto. Se designó el eluido como disolución 3 de vector.

Se usó el gen que codifica EGFP como molde. Se usaron 5'-CGAAGGTGAGCTCATGGTGAGCAAGGGCG-3' (cebador 3: SEQ ID NO: 7) y 3'-AGACTGCGGTACCGATCGATCTGAGTCCG-3' (cebador 4: SEQ ID NO: 8) como cebadores. Entonces, se mezclaron 20  $\mu\text{l}$  de tampón PrimeStar 5 x (TAKARA Bio), 1,0  $\mu\text{l}$  de pET-EGFP, 0,5  $\mu\text{l}$  de cebador 3 100  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{l}$  de cebador 4 100  $\mu\text{M}$ , 8,0  $\mu\text{l}$  de mezcla de dNTP, 1,0  $\mu\text{l}$  de PrimeStarHS, 20  $\mu\text{l}$  de betaína 5 M y 49  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O, y se sometieron a la reacción que consistía en 98 °C, 2 min (la primera etapa), 98 °C, 10 s (la segunda etapa), 55 °C, 5 s (la tercera etapa) y 72 °C y 90 s (la cuarta etapa), y se repitió de manera continua el procedimiento de la segunda etapa a la cuarta etapa 35 veces.

Se purificaron los fragmentos de PCR resultantes mediante el uso del kit de purificación de gel/PCR fabricado por Viogene. Se realizó la elución con 50  $\mu\text{l}$  de EB. A la alícuota (10  $\mu\text{l}$ ) del eluido resultante, se le añadieron 3  $\mu\text{l}$  de tampón Tango, 1  $\mu\text{l}$  de Sacl (Fermentas), 1  $\mu\text{l}$  de KpnI (Fermentas) y 15  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O, y se realizó una reacción a 37 °C durante la noche. La cantidad total de la disolución de reacción se sometió a electroforesis en agarosa al 0,8 % con tampón TAE y se tiñó con una disolución de bromuro de etidio. Tras comprobarse la posición de una banda, se cortó el gel de agarosa. Se realizó la recuperación del gel de agarosa mediante el uso del kit de purificación de gel/PCR fabricado por Viogene. Se realizó la elución con 30  $\mu\text{l}$  de EB según el protocolo adjunto. Se designó el eluido como disolución 3 de inserto.

A 5  $\mu\text{l}$  de disolución 3 de vector y 5  $\mu\text{l}$  de disolución 3 de inserto, se le añadieron 10  $\mu\text{l}$  de disolución de conveniencia de ligación. Se realizó la reacción a 16 °C durante 30 minutos. Tras la finalización de la reacción, usando la disolución de ligación, se transformó *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Se inoculó la cepa transformada resultante en 2 ml de medio LB esterilizado mediante un autoclave y que contenía ampicilina, que se esterilizó mediante un filtro esterilizado de 0,22  $\mu\text{m}$  para obtener una concentración final de 100  $\mu\text{g/ml}$ , se cultivó a 37 °C durante la noche y luego se centrifugó a 10 000 g durante un minuto para recoger células bacterianas. A partir de las células bacterianas así recogidas, se recuperaron plásmidos mediante el uso del kit de extracción de ADN de plásmido Mini Plus fabricado por Viogene. Se realizó la elución con 100  $\mu\text{l}$  de EB. Usando el eluido resultante, se transformó la cepa de *Escherichia coli* BLR (fabricada por Novagen). La cepa transformada resultante se designó como cepa de *E. coli* BLR/pCold2-EGFP-CBD de ColG.

## (2) Purificación de EGFP-CBD de ColG

### Cultivo

Se inoculó la cepa de *Escherichia coli* BLR transformada con pCold2-EGFP-CBD de ColG en 2 ml de medio LB esterilizado mediante un autoclave y que contenía ampicilina, que se esterilizó mediante un filtro esterilizado de 0,22  $\mu\text{m}$  para obtener una concentración final de 100  $\mu\text{g/ml}$ , y se cultivó mientras se agitaba a 37 °C durante la noche. Se designó esto como disolución de precultivo. Se inoculó la disolución de precultivo en el mismo medio (170 ml) preparado en 500 ml de volumen de un matraz cónico equipado con un deflector, de modo que fuese una cantidad de 1/1000. Se realizó el cultivo en agitación a 37 °C hasta que la DO<sub>660</sub> alcanzó de aproximadamente 0,6 a 1,0. A esto, se le añadió IPTG esterilizado mediante un filtro esterilizado de 0,22  $\mu\text{m}$  para obtener una concentración final de 1 mM. Se cultivó la mezcla resultante mientras se agitaba a 15 °C durante 24 horas.

### Recuperación

Tras la finalización del cultivo, se recogieron células bacterianas mediante centrifuga a 10 000 g durante 5 minutos, se suspendieron en un tampón fosfato 50 mM (pH 8,0) (la misma cantidad que la disolución de cultivo) que contenía NaCl 0,3 M, y se recogieron de nuevo mediante centrifuga a 10 000 g durante 5 minutos. Se repitió adicionalmente la misma operación dos veces para lavar las células bacterianas. Se suspendieron las células bacterianas lavadas

en 25 ml del tampón, y luego se trituraron mediante un homogeneizador ultrasónico a una potencia de 200 W durante un minuto en hielo. Tras la finalización de la trituración, se centrifugaron las células bacterianas a 10 000 g durante 10 minutos a 4 °C, y se recogió el sobrenadante.

## 5 Purificación

El sobrenadante obtenido de manera centrífuga a partir de las células bacterianas trituradas se sometió a cromatografía en columna de Cosmosil His-accept (diámetro: 2,5 × 10 cm). Tras lavarse la columna suficientemente con tampón fosfato 50 mM (pH 8,0) que contenía NaCl 0,3 M, se aplicó un tampón fosfato 50 mM (pH 8,0) que contenía imidazol 10 mM y NaCl 0,3 M a la columna en una cantidad equivalente a la de la columna. Posteriormente, se aplicaron el mismo tampón que anteriormente excepto porque estaba contenido imidazol 20 mM, el mismo tampón que anteriormente excepto porque estaba contenido imidazol 30 mM, el mismo tampón que anteriormente excepto porque estaba contenido imidazol 40 mM, el mismo tampón que anteriormente excepto porque estaba contenido imidazol 50 mM, el mismo tampón que anteriormente excepto porque estaba contenido imidazol 100 mM y el mismo tampón que anteriormente excepto porque estaba contenido imidazol 500 mM, y se eluyó la proteína adsorbida. Se comprobaron fracciones de elución individuales mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia usando un anticuerpo anti-His6 (Santa Cruz). Como resultado, se confirmó que estaba contenida una proteína deseada en la fracción de elución de imidazol 20-30 mM. Se designó esta proteína como proteína EGFP-CBD de ColG. CBD de ColG se muestra en la figura 1 (A), y la secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos de EGFP-CBD de ColG se muestran respectivamente en SEQ ID NO: 9 y 10 de la lista de secuencias.

[Ejemplo 2] Preparación de sondas mediante el uso de DsRed

[Preparación de sondas de DsRed-CBD de ColH]

### 25 (1) Método para construir DsRed-CBD de ColH

A continuación, se describirá la preparación de una sonda (DsRed-CBD de ColH) para colagenasa H derivada de *Clostridium histolyticum* marcada con DsRed.

30 Basándose en la secuencia de Cmyc, se sintetizaron dos ADN de oligonucleótido: 5'-TCGACGAACAGAACTGATTAGCGAAGAAGATCTGT-3' (SEQ ID NO: 11) y 5'-CTAGACAGATCTTCTTCGCTAATCAGTTTCTGTTTCG-3' (SEQ ID NO: 12). Cada uno de los ADN de oligonucleótido se disolvió en TE para obtener una concentración de 100 µM. Entonces, se mezclaron 10 µl de ADN de oligonucleótido, 3 µl de tampón de polinucleótido cinasa de T4 10 x (Nippon Gene), 0,3 µl de ATP 0,1 M, 2 µl de polinucleótido cinasa de T4 (20U, Nippon Gene) y 14,7 µl de H<sub>2</sub>O, y se mantuvieron a 37 °C durante una hora. Se tomó una alícuota de 10 µl de cada una de las disoluciones de reacción, y se mezclaron las alícuotas. Se mantuvo la mezcla de disolución a 100 °C durante 5 minutos y se enfrió directamente de manera gradual hasta temperatura ambiente. Se designó esto como disolución 4 de inserto.

40 A 10 µl de pCold2 (TAKARA Bio), se le añadieron 10 µl de tampón Tango 10 x (fabricado por Fermentas), 1 µl de Sall (Fermentas), 1 µl de Xbal (Fermentas) y 28 µl de H<sub>2</sub>O, y se llevó a cabo una reacción a 37 °C durante 5 horas. Tras la finalización de la reacción, a la disolución de reacción se le añadieron 150 µl de TE; además, se le añadieron 250 µl de una disolución fenólica/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), y se agitó suficientemente. Después de eso, se centrifugó la mezcla a temperatura ambiente durante 5 minutos a 16 000 g, y se recogió el sobrenadante. Al sobrenadante así recogido se le añadieron 20 µl de una disolución de acetato de sodio 3 M, y se le añadieron 450 µl de etanol frío. Se permitió que la mezcla reposara todavía sobre hielo durante 5 minutos, y luego se centrifugó a 16 000 g y a 4 °C durante 5 minutos para recoger una precipitación.

50 Se lavó la precipitación con etanol frío al 70 %, y luego se disolvió en 40 µl de H<sub>2</sub>O. A esto, se le añadieron 5 µl de tampón BAP 10 x (fabricado por TOYOBO CO. LTD.) y 5 µl de fosfatasa alcalina bacteriana (TOYOBO). Se realizó una reacción a 65 °C durante una hora. La cantidad total de la disolución de reacción se sometió a electroforesis en agarosa al 0,8 %. Tras la finalización de la electroforesis, se realizó tinción con una disolución de bromuro de etidio. Tras comprobarse la posición de una banda, se cortó el gel de agarosa. Se realizó la recuperación del gel de agarosa mediante el uso del kit de purificación de gel/PCR fabricado por Viogene. Se realizó la elución con 40 µl de EB según el protocolo adjunto. El eluido así obtenido se designó como disolución 4 de vector. Se mezclaron disolución 4 de vector (9 µl), 1 µl de disolución 4 de inserto y 10 µl de disolución de conveniencia de ligación (Nippon gene) y se mantuvieron a 16 °C durante 30 minutos.

60 Usando esta disolución, se transformó *Escherichia coli* DH5α. Se inoculó la *Escherichia coli* así transformada en 2 ml de medio LB esterilizado mediante un autoclave y que contenía ampicilina, que se esterilizó mediante un filtro esterilizado de 0,22 µm para obtener una concentración final de 100 µg/ml, se cultivó a 37 °C durante la noche y luego se centrifugó a 10 000 g durante un minuto para recoger células bacterianas. A partir de las células bacterianas así recogidas, se recuperaron plásmidos mediante el uso del kit de extracción de ADN de plásmido Mini Plus fabricado por Viogene. Se realizó la elución con 100 µl de EB. A 10 µl de una alícuota tomada del eluido, se le

65

añadieron 2 µl de tampón Tango 10 x, 1 µl de XbaI y 7 µl de H<sub>2</sub>O y se mantuvieron a 37 °C durante 3 horas. Se sometió la disolución de reacción a electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %, y se cortó una única banda que surgió en las proximidades de 4 kpb. Se realizó la recuperación mediante el uso del kit de purificación de gel/PCR fabricado por Viogene. Se realizó la elución con 50 µl de EB. A 10 µl del eluido, se le añadieron 10 µl de disolución de conveniencia de ligación y se mantuvo a 16 °C durante 30 minutos. Usando la disolución, se transformó de nuevo *Escherichia coli* DH5α. Se inoculó la *Escherichia coli* así transformada en 2 ml de medio LB esterilizado mediante un autoclave y que contenía ampicilina, que se esterilizó mediante un filtro esterilizado de 0,22 µm para obtener una concentración final de 100 µg/ml, se cultivó a 37 °C durante la noche y luego se centrifugó a 10 000 g durante un minuto para recoger células bacterianas. A partir de las células bacterianas así recogidas, se recuperaron plásmidos mediante el uso del kit de extracción de ADN de plásmido Mini Plus fabricado por Viogene. Se realizó la elución con 100 µl de EB. A 10 µl de una alícuota tomada del eluido, se le añadieron 3 µl de tampón K 10 x (TAKARA Bio), 1 µl de BamHI (TAKARA Bio), 1 µl de EcoRI (TAKARA Bio) y 15 µl de H<sub>2</sub>O y se hicieron reaccionar a 37 °C durante la noche. Tras la finalización de la reacción, se realizó la extracción con una cantidad igual de fenol/cloroform/alcohol isoamílico. A la capa superior obtenida, se le añadieron 3 µl de acetato de sodio 3 M y se le añadieron 70 ml de etanol frío. Se permitió que la mezcla reposara todavía sobre hielo durante 5 minutos, y luego se centrifugó a 16 000 g y a 4 °C durante 5 minutos para recoger una precipitación. Se lavó la precipitación con etanol frío al 70 %, y luego se disolvió en 40 µl de H<sub>2</sub>O. A esto, se le añadieron 5 µl de tampón BAP 10 x (TOYOBO) y 5 µl de fosfatasa alcalina bacteriana (TOYOBO). Se realizó la reacción a 65 °C durante una hora. La cantidad total de la disolución de reacción se sometió a electroforesis en agarosa al 0,8 % con tampón TAE, y se realizó tinción con una disolución de bromuro de etidio. Tras comprobarse la posición de una banda, se cortó el gel de agarosa. Se realizó la recuperación del gel de agarosa mediante el uso del kit de purificación de gel/PCR fabricado por Viogene. Se realizó la elución con 30 µl de EB según el protocolo adjunto. Se designó el eluido resultante como disolución 5 de vector.

Mientras tanto, se mezclaron 0,5 µl de 5'-GAATCTTCAGGATCCACTACTACTGCAGAAATAAAG-3' 100 µM (cebador 5: SEQ ID NO: 13) y 0,5 µl de 5'-AAGCAGAGATGAATTCTTCTACTGAACCTTCTATATTAATTC-3' 100 µM (cebador 6: SEQ ID NO: 14), 1 µl de un plásmido, pCold2-ColH-His, que ya se había clonado y contenía la longitud completa de un gen que codifica colagenasa H de *Clostridium histolyticum*, 8 µl de mezcla de dNTP (TAKARA Bio), 1,0 µl de PrimeStar HS (TAKARA Bio), 20 µl de betaína 5 M y 49 µl de H<sub>2</sub>O, y se realizó la reacción que consistía en 98 °C, 2 min (la primera etapa), 98 °C, 10 s (la segunda etapa), 55 °C, 5 s (la tercera etapa) y 72 °C y 90 s (la cuarta etapa), y se repitió de manera continua el procedimiento de la segunda etapa a la cuarta etapa 35 veces.

Se purificaron los fragmentos de PCR resultantes mediante el uso del kit de purificación de gel/PCR fabricado por Viogene. Se realizó la elución con 50 µl de EB. A la alícuota (10 µl) del eluido resultante, se le añadieron 3 µl de tampón K 10 x (TAKARA Bio), 1 µl de BamHI (TAKARA Bio), 1 µl de EcoRI (TAKARA Bio) y 15 µl de H<sub>2</sub>O, y se realizó una reacción a 37 °C durante la noche. La cantidad total de la disolución de reacción se sometió a electroforesis en agarosa al 0,8 % con tampón TAE, y se tiñó con una disolución de bromuro de etidio. Tras comprobarse la posición de una banda, se cortó el gel de agarosa. Se realizó la recuperación del gel de agarosa mediante el uso del kit de purificación de gel/PCR fabricado por Viogene. Se realizó la elución con 30 µl de EB según el protocolo adjunto. Se designó el eluido como disolución 5 de inserto.

A 5 µl de disolución 5 de vector y 5 µl de disolución 5 de inserto, se le añadieron 10 µl de disolución de conveniencia de ligación. Se realizó la reacción a 16 °C durante 30 minutos. Tras la finalización de la reacción, se transformó *Escherichia coli* DH5α mediante el uso de la disolución de ligación. Se inoculó la cepa transformada resultante en 2 ml de medio LB esterilizado mediante un autoclave y que contenía ampicilina, que se esterilizó mediante un filtro esterilizado de 0,22 µm para obtener una concentración final de 100 µg/ml, se cultivó a 37 °C durante la noche y luego se centrifugó a 10 000 g durante un minuto para recoger células bacterianas. A partir de las células bacterianas así recogidas, se recuperaron plásmidos mediante el uso del kit de extracción de ADN de plásmido Mini Plus fabricado por Viogene. Se realizó la elución con 100 µl de EB. A 10 µl de una alícuota tomada de esto, se le añadieron 3 µl de tampón Tango 10 x, 1 µl de SacI (Fermentas), 1 µl de KpnI (Fermentas) y 15 µl de H<sub>2</sub>O y se hicieron reaccionar a 37 °C durante la noche. Tras la finalización de la reacción, se realizó la extracción con una cantidad igual de disolución fenólica/cloroformo/alcohol isoamílico. A la capa superior obtenida, se le añadieron 3 µl de acetato de sodio 3 M, y se le añadieron 70 µl de etanol frío. Se permitió que la mezcla reposara todavía sobre hielo durante 5 minutos, y luego se centrifugó a 16 000 g y a 4 °C durante 5 minutos para recoger una precipitación. Se lavó la precipitación con etanol frío al 70 %, y luego se disolvió en 40 µl de H<sub>2</sub>O. A esto, se le añadieron 5 µl de tampón BAP 10 x (fabricado por TOYOBO CO., LTD.) y 5 µl de fosfatasa alcalina bacteriana (TOYOBO). Se realizó la reacción a 65 °C durante una hora. La cantidad total de la disolución de reacción se sometió a electroforesis en agarosa al 0,8 % con tampón TAE, y se realizó tinción con una disolución de bromuro de etidio. Tras comprobarse la posición de una banda, se cortó el gel de agarosa. Se realizó la recuperación del gel de agarosa mediante el uso del kit de purificación de gel/PCR fabricado por Viogene. Se realizó la elución con 30 µl de EB según el protocolo adjunto. Se designó el eluido como disolución 6 de vector.

Como molde, se usó pDsRed-monomer (fabricado por Clontech). Se usaron 5'-GTACCGGTCGAGCTCATGGACAACACCGAGG-3' (cebador 7: SEQ ID NO: 15) y 3'-

GTCGCGGCCGGTACCCTGGGAGCCGGAGTGGC-3' (cebador 8: SEQ ID NO: 16) como cebadores. Entonces, se mezclaron 20  $\mu$ l de tampón PrimeStar 5 x (TAKARA Bio), 1,0  $\mu$ l de pDsRed-monomer (fabricado por Clontech), 0,5  $\mu$ l de cebador 7 100  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ l de cebador 8 100  $\mu$ M, 8,0  $\mu$ l de mezcla de dNTP, 1,0  $\mu$ l de PrimeStar HS, 20  $\mu$ l de betaína 5 M y 49  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O, y se sometieron a la reacción que consistía en 98 °C, 2 min (la primera etapa), 98 °C, 10 s (la segunda etapa), 55 °C, 5 s (la tercera etapa) y 72 °C y 90 s (la cuarta etapa) y se repitió de manera continua el procedimiento de la segunda etapa a la cuarta etapa 35 veces.

Se purificaron los fragmentos de PCR resultantes mediante el uso del kit de purificación de gel/PCR fabricado por Viogene. Se realizó la elución con 50  $\mu$ l de EB. A la alícuota (10  $\mu$ l) del eluido resultante, se le añadieron 3  $\mu$ l de tampón Tango, 1  $\mu$ l de Sacl (Fermentas), 1  $\mu$ l de KpnI (Fermentas) y 15  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O, y se realizó una reacción a 37 °C durante la noche. La cantidad total de la disolución de reacción se sometió a electroforesis en agarosa al 0,8 % con tampón TAE, y se tiñó con una disolución de bromuro de etidio. Tras comprobarse la posición de una banda, se cortó el gel de agarosa. Se realizó la recuperación del gel de agarosa mediante el uso del kit de purificación de gel/PCR fabricado por Viogene. Se realizó la elución con 30  $\mu$ l de EB según el protocolo adjunto. Se designó el eluido como disolución 6 de inserto.

A 5  $\mu$ l de disolución 6 de vector y 5  $\mu$ l de disolución 6 de inserto, se le añadieron 10  $\mu$ l de disolución de conveniencia de ligación. Se realizó la reacción a 16 °C durante 30 minutos. Tras la finalización de la reacción, se transformó *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  mediante el uso de la disolución de ligación. Se inoculó la cepa transformada resultante en 2 ml de medio LB esterilizado mediante un autoclave y que contenía ampicilina, que se esterilizó mediante un filtro esterilizado de 0,22  $\mu$ m para obtener una concentración final de 100  $\mu$ g/ml, se cultivó a 37 °C durante la noche y luego se centrifugó a 10 000 g durante un minuto para recoger células bacterianas. A partir de las células bacterianas así recogidas, se recuperaron plásmidos mediante el uso del kit de extracción de ADN de plásmido Mini Plus fabricado por Viogene. Se realizó la elución con 100  $\mu$ l de EB. Usando el eluido resultante, se transformó la cepa de *Escherichia coli* BLR (DE3) pLys (fabricada por Novagen). La cepa transformada resultante se designó como cepa de *E. coli* BLR/pCold2-DsRed-CBD de ColH.

## (2) Purificación de DsRed-CBD de ColH

### Cultivo

Se inoculó la cepa de *Escherichia coli* BLR transformada con pCold2-DsRed-CBD de ColH en 2 ml de medio LB esterilizado mediante un autoclave y que contenía ampicilina, que se esterilizó mediante un filtro esterilizado de 0,25  $\mu$ m para obtener una concentración final de 100  $\mu$ g/ml, y se cultivó mientras se agitaba a 37 °C durante la noche. Se designó esto como disolución de precultivo. Se inoculó la disolución de precultivo en el mismo medio (170 ml) preparado en 500 ml de volumen de un matraz cónico equipado con un deflector para que fuese una cantidad de 1/1000. Se realizó el cultivo en agitación a 37 °C hasta que la DO<sub>660</sub> alcanzó de aproximadamente 0,6 a 1,0. A esto, se le añadió IPTG esterilizado mediante un filtro esterilizado de 0,25  $\mu$ m para obtener una concentración final de 1 mM. Se cultivó la mezcla resultante mientras se agitaba a 15 °C durante 24 horas.

### Recuperación

Tras la finalización del cultivo, se recogieron células bacterianas mediante centrifuga a 10 000 g durante 5 minutos, se suspendieron en un tampón fosfato 50 mM (pH 8,0) (la misma cantidad que la disolución de cultivo) que contenía NaCl 0,3 M, y se recogieron de nuevo mediante centrifuga a 10 000 g durante 5 minutos. Se repitió la misma operación adicionalmente dos veces para lavar las células bacterianas. Se suspendieron las células bacterianas lavadas en 25 ml del tampón, y luego se trituraron mediante un homogeneizador ultrasónico a una potencia de 200 W durante un minuto en hielo. Tras la finalización de la trituración, se centrifugaron las células bacterianas a 10 000 g durante 10 minutos a 4 °C, y se recogió el sobrenadante.

### Purificación

El sobrenadante obtenido de manera centrifuga a partir de las células bacterianas trituradas se sometió a cromatografía en columna de Cosmosil His-accept (diámetro: 2,5  $\times$  10 cm). Tras lavarse la columna suficientemente con tampón fosfato 50 mM (pH 8,0) que contenía NaCl 0,3 M, se aplicó un tampón fosfato 50 mM (pH 8,0) que contenía imidazol 10 mM y NaCl 0,3 M a la columna en una cantidad equivalente a la de la columna. Posteriormente, se aplicaron el mismo tampón que anteriormente excepto porque estaba contenido imidazol 20 mM, el mismo tampón que anteriormente excepto porque estaba contenido imidazol 30 mM, el mismo tampón que anteriormente excepto porque estaba contenido imidazol 40 mM, el mismo tampón que anteriormente excepto porque estaba contenido imidazol 50 mM, el mismo tampón que anteriormente excepto porque estaba contenido imidazol 100 mM y el mismo tampón que anteriormente excepto porque estaba contenido imidazol 500 mM, y se eluyó la proteína adsorbida. Se comprobaron fracciones de elución individuales mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia usando un anticuerpo anti-His6 (Santa Cruz). Como resultado, se confirmó que estaba contenida una proteína deseada en la fracción de elución de imidazol 20-30 mM. Se designó esta proteína como proteína DsRed-CBD de ColH. CBD de ColH se muestra en la figura 1 (B), y la secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos de DsRed-CBD de

ColH se muestran respectivamente en SEQ ID NO: 17 y 18 de la lista de secuencias.

[Ejemplo 3] Preparación de sondas mediante el uso de tdTomato

5 (1) Preparación de ADN de tdTomato CBD de ColH e inserción en el vector de expresión pColdII

Como molde, se usó ADN del gen de tdTomato, el vector ptdTomato (Clontech). En la PCR para la amplificación del ADN, como cebador N-terminal, se usó una secuencia de 34 bases (TomatoF) que contenía un sitio de reconocimiento de Nde I situado en el sentido de 5' de tdTomato. Como cebador C-terminal, se usó una secuencia complementaria a 34 pb (TomatoR) que tenía un sitio de reconocimiento de BamHI en lugar de un codón de terminación situado en el sentido de 3' de tdTomato. Las secuencias de cebadores individuales se muestran en negrita.

15 Secuencia de cebador:

TomatoF: 5'-CCGGTCGCCcatATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGG-3' (SEQ ID NO: 19)

TomatoR: 5'-AGAGTCGCGCGGATCCCTTGTACAGCTCGTCCA-3' (SEQ ID NO: 20)

20 Posteriormente, se trató pCold II que tenía un inserto de ADN de DsRed-CBD de ColH con enzimas de restricción, BamH I y Xba I, para obtener un fragmento de ADN de CBD de Col H de aproximadamente 1000 pb.

Se trató ADN de tdTomato de aproximadamente 1500 pb preparado mediante PCR con Nde I y BamHI y se insertó junto con ADN de CBD de ColH en el vector de expresión pCold II tratado con Nde I, Xba I. Se realizaron análisis de datos de secuencias y PCR de colonias para confirmar que se construye un plásmido tal como se diseñó. Obsérvese que el análisis de la secuencia de ADN se pidió a Operon Biotechnologies. Cuando se insertó ADN de tdTomato CBD de ColH en pCold II, se expresó como una proteína que tenía una secuencia de etiqueta de His en el extremo N-terminal (figura 2). Los residuos del tdTomato CBD de ColH diseñado incluyendo estas secuencias de aminoácidos se convierten en 726 (cantidad de moléculas 82 k).

30 (2) Preparación de bacterias de expresión e inducción de la expresión de proteínas

Se transformó *Escherichia coli* BLR con el plásmido de expresión de tdTomato CBD de ColH construido en el método mencionado anteriormente. Se usó un método de choque térmico general para la transformación. La *Escherichia coli* BLR transformada se propagó sobre una placa de LB que contenía ampicilina (Amp) 100 µg/ml y se cultivó a 37 °C durante la noche. Se subcultivaron las colonias que crecieron sobre un medio líquido LB/Amp y se incubaron a 37 °C hasta que la DO<sub>600</sub> alcanzó 0,5-0,7. Se enfrió la disolución de cultivo sobre hielo durante 30 minutos, y luego se añadió isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) para obtener una concentración de 0,1 mM. Se continuó el cultivo a 15 °C durante 24 horas para inducir la expresión de una proteína.

40 Después de 24 horas, se centrifugó la disolución de cultivo de *Escherichia coli* para recoger las células bacterianas. Se lavaron las células bacterianas con solución salina tamponada con fosfato (PBS) dos veces y se suspendieron de nuevo en PBS. A esto, se le añadió fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF) para obtener una concentración de 0,1 mM. Se trituraron las células bacterianas mediante una onda ultrasónica mientras se enfriaban en hielo. La disolución resultante de células bacterianas trituradas se centrifugó a 12 000 rpm durante 20 minutos para separar una precipitación y un sobrenadante. Se realizó un análisis de SDS-PAGE para confirmar que una proteína deseada se expresa en una fracción soluble. A la disolución cultivada de *Escherichia coli*, se le añadió dimetilsulfóxido (DMSO) hasta el 8 % y se almacenó a -80 °C en un congelador. Se usó esto como reserva de células bacterianas congeladas para expresar tdTomato CBD de ColH.

50 (3) Purificación de tdTomato CBD de ColH

A la columna de Ni-NTA agarosa (φ2 cm × 5,0 cm, volumen de columna de 15 ml, empresa: QIAGEN) equilibrada con un tampón NaCl 300 mM/fosfato de sodio 50 mM (pH 8,0), se le aplicó una disolución preparada diluyendo la fracción soluble de células bacterianas trituradas tres veces con un tampón de equilibración. Después de que la fracción no retenida no adsorbida al portador se eliminara por lavado con el tampón de equilibración, se realizó la elución con tampones que contenían imidazol 50 mM, 200 mM y 500 mM. Cada una de las fracciones eluidas por los tampones diferentes en la concentración de imidazol se sometió a SDS-PAGE para confirmar que el tdTomato CBD de ColH se eluyó en una fracción de elución de imidazol 200 mM (figura 3). La fracción se recuperó y se dializó frente a Tris-HCl 50 mM (pH 8,0).

65 Después del diálisis, se aplicó la disolución resultante a una columna de intercambio aniónico (HiTrap DEAE FF, C.V. = 1 ml, GE Healthcare), y se realizó la elución con el gradiente de concentración de NaCl lineal 0-400 mM. Se recuperó una fracción en la que se confirmó la presencia de tdTomato CBD de ColH mediante SDS-PAGE de las fracciones de elución (figura 4) y se concentró mediante ultrafiltración usando Amicon 30k (fabricado por Millipore) hasta 5 mg/ml. Se usó esto como tdTomato CBD de ColH purificado.

## (4) Medición del espectro fluorescente.

Se notifica que tdTomato tiene la misma longitud de onda de excitación (554 nm) y longitud de onda fluorescente (581 nm) que las de DsRed. El espectro de excitación y fluorescente de la disolución de enzima purificada de tdTomato CBD de ColH se midió mediante un espectrofluorómetro F-2500 (Hitachi High-Technologies Corporation) (figura 5). A partir del espectro, se confirmó que ni un desplazamiento de la longitud de onda fluorescente ni extinción se producen al expresarse como una proteína de fusión con CBD. Además, se confirmó que se emite una fluorescencia más intensa en comparación con la que usa DsRed.

## [Ejemplo 4] Preparación de una sonda usando luciferasa

[Método para preparar PGV\_CBD de Col G y PGV-CBD de Col H (sondas de proteína de fusión de dominio de unión a colágeno-luciferasa)]

## (1) Método para construir PGV\_CBD de Col G

## 1) Preparación de ADN de proteína de fusión de dominio de unión a colágeno-luciferasa

## Inserción en el vector de expresión pCold I

Como plantilla de ADN de un gen de luciferasa, se usó la secuencia de una región codificante de luciferasa (PGV) de un vector de control PicaGene (PGV\_control). En la PCR para la amplificación de ADN, como cebador N-terminal, se usó una secuencia de 27 bases (PGVctrl\_Nterm) que tenía un sitio de reconocimiento de Nde I (CATATG) situado en el sentido de 5' de PGV. Como cebador C-terminal, se utilizó una secuencia de 30 pb (PGV\_CF\_r) complementaria a un sitio de reconocimiento de BamHI (GGATCC) situada en el sentido de 3' de PGV en lugar de un codón de terminación.

Para los dominios de unión a colágeno (CBD) de colagenasas (Col) G y H, se usó un plásmido que tenía el ADN de longitud completa de Col G y H insertado en pCold III como ADN molde. En la PCR para la amplificación de ADN, se usó un ADN de 35 bases (ColG\_Nterm, ColH\_Nterm) que tenía un sitio de reconocimiento de BamH I añadido al extremo N-terminal de CBD como cebador N-terminal. Como cebador C-terminal, se usaron respectivamente una secuencia (ColG\_CtermStrep\_comp) en la que se añadieron secuencialmente una secuencia de aminoácidos etiquetada con Strep y un sitio de reconocimiento de Xba I (TCTAGA) en este orden a CBD de Col G, y un ADN complementario de 49 bases para la secuencia (ColH\_CtermFLAG\_comp) en la que la secuencia de aminoácidos etiquetada con FLAG y un sitio de reconocimiento de Xba I se añadieron secuencialmente en este orden a CBD de Col H (figura 6).

Se trató ADN de PGV de aproximadamente 1700 pb preparado por PCR con Nde I y BamHI, y se trató ADN de CBD de aproximadamente 1000 pb con BamH y Xba I, y se insertó en un vector de expresión, pCold I que se había tratado con Nde I y Xba I (figura 7).

Se realizaron análisis de datos de secuencias y PCR de colonias para confirmar que el plásmido se construyó tal como se diseñó. Obsérvese que el análisis de la secuencia de ADN se pidió a Operon Biotechnologies. Si el ADN se insertó en pCold I, se expresó como una proteína que tenía una etiqueta de His en el extremo N-terminal y una secuencia de reconocimiento para el factor Xa. El tamaño de la proteína de fusión diseñada incluyendo estas secuencias de aminoácidos se convierte en 911 residuos (cantidad de moléculas: 101 k) en el caso de PGV CBD de Col G y 883 residuos (cantidad de molécula: 98 k) en el caso de PGV CBD de Col H.

## 2) Preparación de bacterias de expresión e inducción de la expresión de proteínas.

Se transformó *Escherichia coli* Rosetta 2 (DE3) con el plásmido de expresión en el que se insertaron PGV y ADN de CBD de Col G o CBD de Col H. Se usó un método de choque térmico general para la transformación. Se indujo la expresión de una proteína de fusión de dominio de unión a colágeno-luciferasa mediante la cepa transformada.

La *Escherichia coli* Rosetta 2 transformada se propagó sobre una placa de LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina (Amp) y 34 µg/ml de cloranfenicol (Cm) y se cultivó a 37 °C durante la noche. Las colonias cultivadas se subcultivaron sobre un medio líquido de LB/Amp/Cm y se incubaron a 37 °C hasta que la DO<sub>600</sub> alcanzó 0,5-0,7. La disolución de cultivo se enfrió en hielo durante 30 minutos y luego se añadió isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) para obtener una concentración de 0,1 mM. El cultivo se continuó a 15 °C durante 48 horas para inducir la expresión de una proteína.

Después de 48 horas, se centrifugó la disolución de cultivo de *Escherichia coli* para recoger células bacterianas. Se lavaron las células bacterianas con solución salina tamponada con fosfato (PBS) dos veces y se suspendieron de nuevo en PBS. A esto, se le añadió fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF) para obtener una concentración de 0,1 mM. Después de eso, se trituraron las células bacterianas mediante una onda ultrasónica en condiciones: la

potencia máxima, pulso de intervalo de 2 segundos y durante 15 minutos. Se centrifugó la disolución resultante de células bacterianas trituradas a 12 000 rpm durante 20 minutos para separar una precipitación y un sobrenadante. Se realizó análisis de SDS-PAGE para confirmar la expresión de una proteína. Como resultado de SDS-PAGE, se detectaron bandas de proteínas que tenían tamaños presumiblemente correspondientes a PGV\_CBD de Col G (101 k) y PGV\_CBD de Col H (98 k) (figura 8). Estas bandas también se detectaron mediante transferencia de tipo Western usando un anticuerpo anti-etiqueta de His. A la solución cultivada de *Escherichia coli* en la que se confirmó que se expresaba una proteína deseada, se añadió dimetilsulfóxido (DMSO) hasta el 8 % y se almacenó a -80 °C en un congelador. Se usó esto como reserva de células bacterianas congeladas de PGV\_CBD de Col G o PGV\_CBD de Col H.

### 3) Determinación de la actividad luciferasa.

En el sobrenadante obtenido después de que se trituraran las células bacterianas de la cepa transformada, se confirmó la presencia de una proteína que tenía actividad luciferasa. La luciferasa usada en la presente invención tiene un espectro luminiscente que tiene un valor máximo a 550 nm. Después de mezclar Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) con el producto en bruto, se añadió una disolución de sustrato (reactivo de ensayo de luciferasa Tripluc, TOYOBO CO., LTD.). Inmediatamente después, se midió la luminiscencia a 550 nm con el paso del tiempo. La luminiscencia de la luciferasa alcanzó el máximo inmediatamente después de añadir una disolución de sustrato, y luego disminuyó. La medición se continuó hasta que la luminiscencia disminuyó y aparentemente alcanzó casi una meseta. Después de eso, se midió el espectro luminiscente (figura 9). También cuando se expresó una proteína de fusión con CBD, se mostró la misma luminiscencia que la de PGV individual. En el producto en bruto obtenido inmediatamente después de la trituración, se observó una luminiscencia intensa a 550 nm. En el caso del producto en bruto almacenado en un congelador a -80 °C, se confirmó que la luminiscencia disminuyó gradualmente y que la inactivación se suprimió más en comparación con los productos en bruto almacenados a 4 °C y -20 °C.

### (2) Método de purificación

A una columna de Ni-NTA agarosa (diámetro: 2,0 cm × 5,0 cm, volumen de columna 15 ml, QIAGEN) equilibrada con un tampón de NaCl 300 mM/fosfato de sodio 50 mM (pH 8,0), se le aplicó una disolución que se preparó diluyendo el producto en bruto (obtenido después de que se trituraran las células bacterianas) 10 veces con un tampón de equilibración. Después de que la fracción no retenida no adsorbida al portador se eliminara por lavado con el tampón de equilibración, se realizó la elución con tampones que contenían 50 mM, 200 mM y 500 mM de imidazol. Cada una de las fracciones eluidas mediante los tampones diferentes en la concentración de imidazol se verificó mediante SDS-PAGE. Se determinó una fracción de elución de imidazol 200 mM como una fracción que contenía PGV\_CBD de ColG o PGV\_CBD de ColH purificado (figura 10).

### [Ejemplo 5] Determinación de la unión al tejido pancreático

Se mezclaron trozos de tejido pancreático porcino suspendidos en 100 µl de Tris-HCl 50 mM/CaCl<sub>2</sub> 5 mM (pH 7,5) con una disolución enzimática purificada (100 µl) y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos, y luego se centrifugaron para separar una precipitación y un sobrenadante (sob. 1). La precipitación resultante se suspendió en un tampón de ácido acético 50 mM (pH 5,0) y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos, y luego se centrifugó para separar una precipitación y un sobrenadante (sob. 2). La precipitación y el sobrenadante resultantes se sometieron a SDS-PAGE para verificar la unión del tejido pancreático a tdTomato CBD de ColH (figura 11).

Como resultados de SDS-PAGE, se observó una banda de tdTomato CBD de ColH en la precipitación. A partir de esto, se confirmó la unión al tejido pancreático. Se encontró que el tdTomato CBD de ColH unido al tejido pancreático se fraccionó en una precipitación y el tdTomato CBD de ColH no unido se fraccionó en el sob. 1. Además, dado que no se detectó ninguna banda en el sob. 2, se encontró que el tdTomato CBD de ColH aún se une a una fibra de colágeno en condiciones de pH ácido.

### [Ejemplo 6] Método para analizar un componente de tejido biológico usando una sonda

#### [Método para medir un componente biológico]

Se describirá un método para medir un componente biológico de la presente invención.

#### (1) Método para medir un componente biológico mediante EGFP-CBD de ColG y DsRED-ColH

De un cerdo muerto por exanguinación, se extirpó el páncreas y se cortó en trozos de 5 mm<sup>2</sup>. Cada trozo de páncreas se incrustó en el compuesto OCT (fabricado por Sakura Finetek Co., Ltd.) y se congeló mediante nitrógeno líquido. Posteriormente, se cortó el trozo de páncreas en trozos delgados de 8 µm de espesor con un instrumento Cryostat CM 3050S (fabricado por Leica). Cada uno de los trozos delgados se unió sobre portaobjetos (fabricados por Matsunami Glass Ind., Ltd.). El portaobjetos preparado se empapó en una disolución de formalina (fabricada por WAKO), cuya concentración se controló para que fuera del 10 % con una disolución de tampón fosfato (PBS (-)) que no contenía ni ión de calcio ni ión de magnesio, y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, y luego se

secó durante 30 minutos. En una cubeta de vidrio, se vertió PBS (-) y el portaobjetos se incubó en la cubeta durante 5 minutos a temperatura ambiente. El portaobjetos preparado se almacenó en una caja de humedad de manera que el portaobjetos no se secase. El portaobjetos preparado se empapó en una solución de EGFP-CBD de ColG (200  $\mu$ l) y se incubó a 37 °C durante una hora. Tras la finalización de la incubación, se realizó el lavado con PBS (-) durante 5 minutos. El portaobjetos preparado se lavó con PBS (-) en una botella de lavado y se cubrió con VECTORSHELD (fabricado por Vector). Posteriormente, el portaobjetos preparado se observó mediante un microscopio de fluorescencia BIOLEVO BZ 9000 (fabricado por KEYENCE CORPORATION), y se fotografió una imagen.

(2) Resultados de la medición

Los resultados se muestran en la figura 12. En comparación con un control negativo, en la muestra de tejido teñida mediante EGFP-CBD de ColG, la región donde está presente el tejido se tiñó satisfactoriamente.

[Ejemplo 7] Método para medir un trozo de tejido

(1) Método de observación

Un portaobjetos preparado sobre el que se fijó el trozo de tejido pancreático de la rata y almacenado a -80 °C se empapó en  $\text{CaCl}_2$  5 mM/TBS a temperatura ambiente durante 10 minutos y se lavó con Milli-Q. Para bloquear una unión no específica, se añadieron gota a gota 100  $\mu$ l de mioglobina (Myb) al 2 % al portaobjetos preparado, que luego se preincubó a 37 °C durante 30 minutos y luego se lavó con Milli-Q. Se mezclaron cada una de las disoluciones de proteína (control de GFP, GFP CDB de ColG, control de tdTomato, tdTomato CBD de ColH) (40  $\mu$ l) y Myb al 2 % (40  $\mu$ l). Luego, cada una de las mezclas se añadió gota a gota sobre los trozos de tejido y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Las concentraciones de las soluciones de proteínas se controlaron de la siguiente manera: control de GFP: 10 mg/ml, GFP CBD de ColG: 10 mg/ml, control de tdTomato: 5 mg/ml, tdTomato CBD de ColH: 5 mg/ml.

El portaobjetos preparado se empapó en  $\text{CaCl}_2$  5 mM/TBS a temperatura ambiente durante 10 minutos y se lavó con Milli-Q. Después de repetir este procedimiento dos veces, se observó el portaobjetos preparado mediante un microscopio de fluorescencia BIOREVO BZ-9000 (fabricado por KEYENCE CORPORATION) con un aumento de 200 x. Se seleccionaron adecuadamente varias regiones y se fotografiaron las imágenes con un tiempo de exposición de 0,5 segundos.

Usando la función de medición del software adjunto al microscopio, se preparó un histograma del brillo de toda la fotografía. En control de GFP y GFP CBD de ColG, se seleccionó el brillo de fluorescencia verde solo, mientras que en control de tdTomato y tdTomato CBD de ColH, se seleccionó el brillo de fluorescencia roja solo.

A partir del histograma, se calcularon y organizaron las diferencias del valor de brillo promedio (brillo promedio delta) entre el control de GFP y el GFP CBD de ColG, y entre el control de tdTomato y el tdTomato CDB de ColH para cada linaje. A medida que aumenta el valor de brillo promedio delta así calculado, el número de enlaces entre el CDB y el tejido aumenta, lo que indica que la intensidad fluorescente difiere significativamente del control. Como resultado de que los valores de brillo promedio delta se compararon entre sí, la unión de CBD de ColG y CBD de ColH al tejido pancreático difiere dependiendo del linaje y la edad en la semana.

(2) Método para separar el islote pancreático de rata

Basándose en la "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (revisada en 1996)" publicada por los Institutos Nacionales de la Salud de los Estados Unidos, se llevaron a cabo experimentos con animales. Se usaron ratas Lewis macho (Slc, Japón) que tenían un peso corporal de 239-268 g, ratas SD macho (Slc, Japón) que tenían un peso corporal de 255-301 g y ratas Wistar-Furth macho (Slc, Japón) que tenían un peso corporal de 197-231 g.

Se establecieron grupos experimentales sin cambiar la cantidad de termolisina (0,322 mg) que servía como proteasa neutra de la siguiente manera: un grupo que proporciona un producto de alta pureza de tipo recombinante: Col G (5,46 mg) y Col H (2,02 mg) en una razón de cantidad de enzima patrón de (razón H/G) de 3,7; un grupo de 10 veces (Col G (4,96 mg), Col H (18,34 mg), termolisina (0,322 mg), (razón H/G = 3,70)); un grupo de 1/10 veces (Col G (5,51 mg), Col H (0,20 mg), termolisina (0,322 mg), (razón H/G = 0,04)); un grupo de ausencia completa de Col G y un grupo de ausencia completa de Col H. Antes de extirpar el páncreas, se inyectaron combinaciones de enzimas disueltas en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) fría a través del conducto colédoco para expandir los tejidos pancreáticos. Después de añadir 10 ml de HBSS, se colocó el páncreas en un baño caliente a 37 °C o menos durante 14 minutos para digerirlo. Posteriormente, se llevó a cabo una centrifugación en gradiente de concentración utilizando Histopaque-1119 (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, EE. UU.) y Lymphoprep™ (NycomedPharma AS, Oslo, Noruega) para tomar una capa que contenía islotes pancreáticos. El tejido obtenido por la operación de separación de islotes pancreáticos se tiñó con difeniltiocarbazona (Wako, Osaka, Japón) para distinguir los islotes pancreáticos del tejido distinto de los islotes pancreáticos, tal como una glándula exocrina y un conducto de excreción. Cada rendimiento se midió directamente bajo observación microscópica. El rendimiento de los islotes pancreáticos separados se indicó en cuanto a equivalente de islotes (IEQ) (1 IEQ corresponde al tamaño

ES 2 726 530 T3

de un islote pancreático de 150 µm de diámetro. Esto está definido por la norma internacional).

(3) Resultados experimentales

- 5 1) Resultados de medición del brillo fluorescente de GFP CBD de ColG y tdTomato CBD de ColH en trozos de tejido de ratas

El brillo fluorescente de dos sondas, es decir, ColG y ColH en ratas y la razón de ellas se muestran en la figura 13 y en la tabla 1.

10

[Tabla 1]

Rata	Sondas	Brillo fluorescente				
			Muestra <sup>①</sup>	Muestra <sup>②</sup>	Muestra <sup>③</sup>	Muestra <sup>④</sup>
Wister	G	Compartimiento <sup>①</sup>	74	109	78	-
		Compartimiento <sup>②</sup>	89	114	87	-
		Compartimiento <sup>③</sup>	80	127	73	-
		Compartimiento <sup>④</sup>	-	105	73	-
		Valor promedio	81	109	78	-
	H	Compartimiento <sup>①</sup>	76	125	65	-
		Compartimiento <sup>②</sup>	70	118	71	-
		Compartimiento <sup>③</sup>	68	101	80	-
		Compartimiento <sup>④</sup>	-	105	64	-
		Valor promedio	71	108	70	-
H/G		0,881	0,991	0,897	-	
Lewis	G	Compartimiento <sup>①</sup>	79	88	95	70
		Compartimiento <sup>②</sup>	84	97	106	77
		Compartimiento <sup>③</sup>	80	79	125	71
		Compartimiento <sup>④</sup>	-	90	104	82
		Valor promedio	81	89	108	75
	H	Compartimiento <sup>①</sup>	62	66	106	57
		Compartimiento <sup>②</sup>	60	64	93	58
		Compartimiento <sup>③</sup>	61	57	91	60
		Compartimiento <sup>④</sup>	-	67	76	74
		Valor promedio	61	64	87	58
H/G		0,753	0,719	0,806	0,773	
SD	G	Compartimiento <sup>①</sup>	85	115	84	-
		Compartimiento <sup>②</sup>	83	109	72	-
		Compartimiento <sup>③</sup>	87	121	72	-
		Compartimiento <sup>④</sup>	-	135	78	-
		Valor promedio	85	120	77	-
	H	Compartimiento <sup>①</sup>	68	77	56	-
		Compartimiento <sup>②</sup>	71	106	55	-
		Compartimiento <sup>③</sup>	69	113	46	-
		Compartimiento <sup>④</sup>	-	85	61	-
		Valor promedio	69	101	55	-
H/G		0,816	0,842	0,714	-	

## 2) Resultados de la separación de islotes pancreáticos en ratas

5 En el caso de que la razón de brillo fluorescente de dos sondas, ColG y ColH, es decir, un valor H/G sea de 0,85 o más, la razón de cantidad de adición de ColH a ColG, es decir, la razón ColH/G, debe ser un valor óptimo. Sin embargo, en el caso de que el valor H/G sea de 0,8 o menos, la razón ColH/G no tiene un efecto significativo. Se encontró que si no se añade ColG, el rendimiento de un islote pancreático no se ve afectado significativamente. Se realizó una prueba de separación de islotes pancreáticos cambiando la razón de contenido de ColH y ColG que va a usarse para la separación de los islotes pancreáticos en ratas de acuerdo con el valor numérico mencionado anteriormente. Se midió el rendimiento de los islotes pancreáticos en esta prueba. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

[Tabla 2]

En el caso de ColH/ColG = 2/10 (valor estándar)			
Rendimiento del islote pancreático (IEQ)	Lewis	SD	Wistar
	2772	2836	3050
	3040	3104	2224
	3806	2516	2927
Valor promedio	3206	2819	2734
En el caso de ColH/ColG = 1/10			
Rendimiento del islote pancreático (IEQ)	Lewis	SD	Wistar
	2049	1855	1306
	2827	2669	1174
	2710	2311	1997
	2748	2220	1493
	2752	1747	
	3404	3541	
Valor promedio	2748	2368	1493
Valor de p	0,21	0,27	0,009
% de rendimiento	85,7	84,0	54,6
En el caso de ColH/ColG = 10/1			
Rendimiento del islote pancreático (IEQ)	Lewis	SD	Wistar
	3416	1711	2015
	2282	2517	2134
	2707	2652	2796
	3338	2821	3233
	3188	2804	2269
	3488	4653	
Valor promedio	3070	2860	2489
Valor de p	0,71	0,95	0,52
% de rendimiento	95,8	101,5	91,0
En el caso de ColH/ColG = 10/0			
Rendimiento del islote pancreático (IEQ)	Lewis	SD	Wistar
	1671	1443	1364
	1807	2350	2764
Valor promedio	1739	1897	2064
Valor de p	0,04	0,11	0,36

% de rendimiento	54,2	67,3	75,5
------------------	------	------	------

Tal como se muestra en la tabla 2, incluso en ausencia completa de Col G, fue posible la separación de los islotes pancreáticos en todos los linajes de ratas. En cambio, en ausencia completa de Col H, el páncreas no se digirió en absoluto en todos los linajes de ratas. A continuación, se encontró que la razón Col H/G tiene un efecto sobre los resultados de la separación de islotes pancreáticos. En el caso en el que la razón H/G se fijó en 1/10, el rendimiento de los islotes pancreáticos separados disminuye significativamente solo en el grupo de Wistar (54,6 % de la razón de referencia,  $p = 0,009$ ). Además, también en ausencia completa de Col G, se obtuvo un rendimiento suficiente de islotes pancreáticos separados en el orden de Wistar (75,5 %), SD (67,3 %) y Lewis (54,2 %). La expresión de un sustrato que requiere Col H tenía una tendencia de Wistar > SD > Lewis.

Tal como se describió anteriormente, se demostró que si la razón de cantidad de uso óptima de ColH y ColG se calculaba para optimizar las cantidades de uso de ColG y ColH, pueden separarse islotes pancreáticos con un alto rendimiento.

[Ejemplo de referencia] Efecto de la razón de colagenasa (ColH/ColG) sobre la separación de islotes pancreáticos

Se realizó la separación de los islotes pancreáticos cambiando la razón de colagenasa (ColH/ColG) de dos colagenasas usadas en la separación de los islotes pancreáticos de ratas a 0, 0,05, 0,1, 0,2 y 0,4. Como resultado, en el ATP/ADN, la prueba de tolerancia a hidratos de carbono *in vitro* y el experimento de insulina/ADN (que muestran rendimiento y calidad), se confirmó que pueden separarse islotes pancreáticos de alta calidad con un alto rendimiento en el intervalo de razón de colagenasa de desde 0,1 hasta 0,2.

Los resultados se muestran en la figura 14. La figura 14A muestra el rendimiento. La figura 14B muestra el ATP/ADN, que es un valor corregido de la carga de energía (ATP) por el tamaño (ADN) del islote pancreático. La prueba de tolerancia a hidratos de carbono *in vitro* de la figura 14C muestra la capacidad de secreción de insulina de los islotes pancreáticos en respuesta a la glucosa, y representa una acción adicional de los islotes pancreáticos. La insulina/ADN que se muestra en la Figura 14D es un valor corregido de la cantidad de insulina por el tamaño (ADN) del islote pancreático. Si un reactivo o similar es tóxico para los islotes pancreáticos, a menudo se produce la desgranulación de los islotes pancreáticos. Por tanto, esto se posiciona como un tipo de prueba de toxicidad para los islotes pancreáticos.

Se ha notificado que como la enzima para separar islotes pancreáticos, son adecuadas dos tipos de colagenasas (ColG y ColH) producidas por *Clostridium histolyticum* y una metaloproteasa neutra (Diabetes: 46: 1120: 1997). Los resultados anteriores enseñan que la razón de combinación de dos tipos de colagenasas (ColG y ColH) es un factor importante para determinar el rendimiento y la calidad de la separación de islotes pancreáticos.

La razón de combinación óptima de colagenasas varía dependiendo del animal distinto de una rata tal como un cerdo y un ser humano, incluso si los individuos pertenecen a la misma especie, y por tanto es un factor que disminuye la tasa de éxito en el aislamiento de islotes pancreáticos. Por tanto, si la razón de combinación óptima de colagenasas que va a usarse se determina usando las sondas de la presente invención antes de separar los islotes pancreáticos, es posible calcular las cantidades de uso de colagenasas que han de emplearse y llevar a cabo la separación de islotes pancreáticos en una razón de combinación óptima, con el resultado de que pueden obtenerse islotes pancreáticos de alta calidad con un alto rendimiento.

#### 45 **Aplicabilidad industrial**

Según la presente invención, es posible determinar de manera precisa y fácil el tipo y la cantidad de proteasa que ha de usarse a partir de la composición proteica de la matriz extracelular u órgano que va a separarse, y aislar células deseadas y similares mientras se mantiene una alta actividad. Por tanto, la presente invención es útil en una amplia variedad de usos en el campo de la terapia, el diagnóstico y el examen, incluyendo el trasplante de órganos, tal como el trasplante de islotes pancreáticos, la medicina regenerativa mediante trasplante celular y el establecimiento de cepas celulares.

Texto libre de lista de secuencias

55 SEQ ID NO: 3: ADN de oligonucleótido

SEQ ID NO: 4: ADN de oligonucleótido

60 SEQ ID NO: 5: cebador directo para CBD de ColG (cebador 1)

SEQ ID NO: 6: cebador inverso para CBD de ColG (cebador 2)

SEQ ID NO: 7: cebador directo para EGFP (cebador 3)

- SEQ ID NO: 8: cebador inverso para EGFP (cebador 4)
- 5 SEQ ID NO: 9: EGFP-CBD de ColG
- SEQ ID NO: 10: EGFP-CBD de ColG
- SEQ ID NO: 11: ADN de oligonucleótido
- 10 SEQ ID NO: 12: ADN de oligonucleótido
- SEQ ID NO: 13: cebador directo para CBD de ColH (cebador 5)
- SEQ ID NO: 14: cebador inverso para CBD de ColH (cebador 6)
- 15 SEQ ID NO: 15: cebador directo para DsRed (cebador 7)
- SEQ ID NO: 16: cebador inverso para DsRed (cebador 8)
- 20 SEQ ID NO: 17: DsRed-CBD de ColH
- SEQ ID NO: 18: DsRed-CBD de ColH
- SEQ ID NO: 19: cebador directo para la amplificación del gen de tdTomato (TomatoF)
- 25 SEQ ID NO: 20: cebador inverso para amplificación del gen de tdTomato (TomatoR)

**Lista de secuencias**

- 30 <110> Tohoku University
- <120> Sonda analítica para tejido corporal y su uso
- <130> PTU-9008WO
- 35 <150> JP2011-058080
- <151> 16-03-2011
- <160> 20
- 40 <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- <211> 236
- 45 <212> PRT
- <213> *Clostridium histolyticum*
- <400> 1

ES 2 726 530 T3

Thr Thr Thr Pro Ile Thr Lys Glu Met Glu Pro Asn Asp Asp Ile Lys  
1 5 10 15

Glu Ala Asn Gly Pro Ile Val Glu Gly Val Thr Val Lys Gly Asp Leu  
20 25 30

Asn Gly Ser Asp Asp Ala Asp Thr Phe Tyr Phe Asp Val Lys Glu Asp  
35 40 45

Gly Asp Val Thr Ile Glu Leu Pro Tyr Ser Gly Ser Ser Asn Phe Thr  
50 55 60

Trp Leu Val Tyr Lys Glu Gly Asp Asp Gln Asn His Ile Ala Ser Gly  
65 70 75 80

Ile Asp Lys Asn Asn Ser Lys Val Gly Thr Phe Lys Ser Thr Lys Gly  
85 90 95

Arg His Tyr Val Phe Ile Tyr Lys His Asp Ser Ala Ser Asn Ile Ser  
100 105 110

Tyr Ser Leu Asn Ile Lys Gly Leu Gly Asn Glu Lys Leu Lys Glu Lys  
115 120 125

Glu Asn Asn Asp Ser Ser Asp Lys Ala Thr Val Ile Pro Asn Phe Asn  
130 135 140

Thr Thr Met Gln Gly Ser Leu Leu Gly Asp Asp Ser Arg Asp Tyr Tyr  
145 150 155 160

Ser Phe Glu Val Lys Glu Glu Gly Glu Val Asn Ile Glu Leu Asp Lys  
165 170 175

Lys Asp Glu Phe Gly Val Thr Trp Thr Leu His Pro Glu Ser Asn Ile  
180 185 190

Asn Asp Arg Ile Thr Tyr Gly Gln Val Asp Gly Asn Lys Val Ser Asn  
195 200 205

Lys Val Lys Leu Arg Pro Gly Lys Tyr Tyr Leu Leu Val Tyr Lys Tyr  
210 215 220

Ser Gly Ser Gly Asn Tyr Glu Leu Arg Val Asn Lys  
225 230 235

<210> 2  
<211> 219  
<212> PRT

5

ES 2 726 530 T3

<213> *Clostridium histolyticum*

<400> 2

Thr Thr Thr Ala Glu Ile Lys Asp Leu Ser Glu Asn Lys Leu Pro Val  
1 5 10 15

Ile Tyr Met His Val Pro Lys Ser Gly Ala Leu Asn Gln Lys Val Val  
20 25 30

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

Gln Trp Asp Phe Gly Asp Gly Ser Asp Phe Ser Ser Glu Gln Asn Pro  
50 55 60

Ser His Val Tyr Thr Lys Lys Gly Glu Tyr Thr Val Thr Leu Arg Val  
65 70 75 80

Met Asp Ser Ser Gly Gln Met Ser Glu Lys Thr Met Lys Ile Lys Ile  
85 90 95

Thr Asp Pro Val Tyr Pro Ile Gly Thr Glu Lys Glu Pro Asn Asn Ser  
100 105 110

Lys Glu Thr Ala Ser Gly Pro Ile Val Pro Gly Ile Pro Val Ser Gly  
115 120 125

Thr Ile Glu Asn Thr Ser Asp Gln Asp Tyr Phe Tyr Phe Asp Val Ile  
130 135 140

Thr Pro Gly Glu Val Lys Ile Asp Ile Asn Lys Leu Gly Tyr Gly Gly  
145 150 155 160

Ala Thr Trp Val Val Tyr Asp Glu Asn Asn Asn Ala Val Ser Tyr Ala  
165 170 175

Thr Asp Asp Gly Gln Asn Leu Ser Gly Lys Phe Lys Ala Asp Lys Pro  
180 185 190

Gly Arg Tyr Tyr Ile His Leu Tyr Met Phe Asn Gly Ser Tyr Met Pro  
195 200 205

Tyr Arg Ile Asn Ile Glu Gly Ser Val Gly Arg  
210 215

5

<210> 3

<211> 30

<212> ADN

10 <213> Artificial

# ES 2 726 530 T3

	<220>	
	<223> ADN de oligonucleótido	
5	<400> 3 tcgacgatta taaagatgat gatgataaat	30
	<210> 4 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial	
10		
	<220>	
	<223> ADN de oligonucleótido	
15	<400> 4 ctagatttat catcatcatc ttataatcg	30
	<210> 5 <211> 35 <212> ADN <213> Artificial	
20		
	<220>	
	<223> cebador directo para CBD de ColG (cebador 1)	
25	<400> 5 aaagaacgga tccacaaca cacctataac taaag	35
	<210> 6 <211> 38 <212> ADN <213> Artificial	
30		
	<220>	
	<223> cebador inverso para CBD de ColG (cebador 2)	
35	<400> 6 aagcagagat gaattcttta ttaccctta actcatag	38
40	<210> 7 <211> 29 <212> ADN <213> Artificial	
45		
	<220>	
	<223> cebador directo para EGFP (cebador 3)	
50	<400> 7 cgaaggtgag ctcatggtga gcaagggcg	29
	<210> 8 <211> 29 <212> ADN <213> Artificial	
55		
	<220>	
	<223> cebador inverso para EGFP (cebador 4)	
60	<400> 8 agactgcggt accgatcgat ctgagtccg	29
	<210> 9 <211> 1555 <212> ADN <213> Artificial	
65		

## ES 2 726 530 T3

- <220>  
<223> EGFP-CBD de ColG
- 5 <220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(1545)  
<223>
- 10 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(15)  
<223> Secuencia de TEE
- 15 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (16)..(33)  
<223> Etiqueta de His
- 20 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (43)..(777)  
<223> Secuencia de EGFP
- 25 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (796)..(1503)  
<223> Secuencia CBD de ColG
- 30 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1522)..(1545)  
<223> Secuencia Flag
- 35 <400> 9

ES 2 726 530 T3

atg aat cat aaa gtg cat cat cat cat cat cat atg gag ctc atg gtg	48
Met Asn His Lys Val His His His His His His Met Glu Leu Met Val	
1 5 10 15	
agc aag ggc gag gag ctg ttc acc ggg gtg gtg ccc atc ctg gtc gag	96
Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu	
20 25 30	
ctg gac ggc gac gta aac ggc cac aag ttc agc gtg tcc ggc gag ggc	144
Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly	
35 40 45	
gag ggc gat gcc acc tac ggc aag ctg acc ctg aag ttc atc tgc acc	192
Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr	
50 55 60	
acc ggc aag ctg ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc gtg acc acc ctg acc	240
Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr	
65 70 75 80	
tac ggc gtg cag tgc ttc agc cgc tac ccc gac cac atg aag cag cac	288
Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His	
85 90 95	
gac ttc ttc aag tcc gcc atg ccc gaa ggc tac gtc cag gag cgc acc	336
Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr	
100 105 110	
atc ttc ttc aag gac gac ggc aac tac aag acc cgc gcc gag gtg aag	384
Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys	
115 120 125	
ttc gag ggc gac acc ctg gtg aac cgc atc gag ctg aag ggc atc gac	432
Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp	
130 135 140	
ttc aag gag gac ggc aac atc ctg ggg cac aag ctg gag tac aac tac	480
Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr	
145 150 155 160	
aac agc cac aac gtc tat atc atg gcc gac aag cag aag aac ggc atc	528
Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile	
165 170 175	
aag gtg aac ttc aag atc cgc cac aac atc gag gac ggc agc gtg cag	576
Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln	
180 185 190	
ctc gcc gac cac tac cag cag aac acc ccc atc ggc gac ggc ccc gtg	624
Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val	
195 200 205	
ctg ctg ccc gac aac cac tac ctg agc acc cag tcc gcc ctg agc aaa	672
Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys	

ES 2 726 530 T3

210	215	220	
gac ccc aac gag aag cgc gat cac atg gtc ctg ctg gag ttc gtg acc Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr 225 230 235 240			720
gcc gcc ggg atc act ctc ggc atg gac gag ctg tac aag tcc gga ctc Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Ser Gly Leu 245 250 255			768
aga tcg atc ggt acc ctc gag gga tcc aca aca aca cct ata act aaa Arg Ser Ile Gly Thr Leu Glu Gly Ser Thr Thr Thr Pro Ile Thr Lys 260 265 270			816
gaa atg gaa cct aat gat gat ata aaa gag gct aat ggt cca ata gtt Glu Met Glu Pro Asn Asp Asp Ile Lys Glu Ala Asn Gly Pro Ile Val 275 280 285			864
gaa ggt gtt act gta aaa ggt gat tta aat ggt tct gat gat gct gat Glu Gly Val Thr Val Lys Gly Asp Leu Asn Gly Ser Asp Asp Ala Asp 290 295 300			912
acc ttc tat ttt gat gta aaa gaa gat ggt gat gtt aca att gaa ctt Thr Phe Tyr Phe Asp Val Lys Glu Asp Gly Asp Val Thr Ile Glu Leu 305 310 315 320			960
cct tat tca ggg tca tct aat ttc aca tgg tta gtt tat aaa gag gga Pro Tyr Ser Gly Ser Ser Asn Phe Thr Trp Leu Val Tyr Lys Glu Gly 325 330 335			1008
gac gat caa aac cat att gca agt ggt ata gat aag aat aac tca aaa Asp Asp Gln Asn His Ile Ala Ser Gly Ile Asp Lys Asn Asn Ser Lys 340 345 350			1056
gtt gga aca ttt aaa tct aca aaa gga aga cat tat gtg ttt ata tat Val Gly Thr Phe Lys Ser Thr Lys Gly Arg His Tyr Val Phe Ile Tyr 355 360 365			1104
aaa cac gat tct gct tca aat ata tcc tat tct tta aac ata aaa gga Lys His Asp Ser Ala Ser Asn Ile Ser Tyr Ser Leu Asn Ile Lys Gly 370 375 380			1152
tta ggt aac gag aaa ttg aag gaa aaa gaa aat aat gat tct tct gat Leu Gly Asn Glu Lys Leu Lys Glu Lys Glu Asn Asn Asp Ser Ser Asp 385 390 395 400			1200
aaa gct aca gtt ata cca aat ttc aat acc act atg caa ggt tca ctt Lys Ala Thr Val Ile Pro Asn Phe Asn Thr Thr Met Gln Gly Ser Leu 405 410 415			1248
tta ggt gat gat tca aga gat tat tat tct ttt gag gtt aag gaa gaa Leu Gly Asp Asp Ser Arg Asp Tyr Tyr Ser Phe Glu Val Lys Glu Glu 420 425 430			1296
ggc gaa gtt aat ata gaa cta gat aaa aag gat gaa ttt ggt gta aca Gly Glu Val Asn Ile Glu Leu Asp Lys Lys Asp Glu Phe Gly Val Thr 435 440 445			1344
tgg aca cta cat cca gag tca aat att aat gac aga ata act tac gga Trp Thr Leu His Pro Glu Ser Asn Ile Asn Asp Arg Ile Thr Tyr Gly 450 455 460			1392
caa gtt gat ggt aat aag gta tct aat aaa gtt aaa tta aga cca gga			1440

ES 2 726 530 T3

Gln Val Asp Gly Asn Lys Val Ser Asn Lys Val Lys Leu Arg Pro Gly  
 465 470 475 480

aaa tat tat cta ctt gtt tat aaa tac tca gga tca gga aac tat gag 1488  
 Lys Tyr Tyr Leu Leu Val Tyr Lys Tyr Ser Gly Ser Gly Asn Tyr Glu  
 485 490 495

tta agg gta aat aaa gaa ttc aag ctt gtc gac gat tat aaa gat gat 1536  
 Leu Arg Val Asn Lys Glu Phe Lys Leu Val Asp Asp Tyr Lys Asp Asp  
 500 505 510

gat gat aaa tct aga tag 1555  
 Asp Asp Lys Ser Arg

515

<210> 10  
 <211> 517[YY1]  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> EGFP-CBD de ColG  
 10

<400> 10  
 Met Asn His Lys Val His His His His His His Met Glu Leu Met Val  
 1 5 10 15

Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu  
 20 25 30

Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly  
 35 40 45

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

Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr  
 65 70 75 80

Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His  
 85 90 95

Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr  
 100 105 110

Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys  
 115 120 125

Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp  
 130 135 140

ES 2 726 530 T3

Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr  
 145 150 155 160

Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile  
 165 170 175

Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln  
 180 185 190

Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val  
 195 200 205

Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys  
 210 215 220

Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr  
 225 230 235 240

Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Ser Gly Leu  
 245 250 255

Arg Ser Ile Gly Thr Leu Glu Gly Ser Thr Thr Thr Pro Ile Thr Lys  
 260 265 270

Glu Met Glu Pro Asn Asp Asp Ile Lys Glu Ala Asn Gly Pro Ile Val  
 275 280 285

Glu Gly Val Thr Val Lys Gly Asp Leu Asn Gly Ser Asp Asp Ala Asp  
 290 295 300

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

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

Asp Asp Gln Asn His Ile Ala Ser Gly Ile Asp Lys Asn Asn Ser Lys  
 340 345 350

Val Gly Thr Phe Lys Ser Thr Lys Gly Arg His Tyr Val Phe Ile Tyr  
 355 360 365

Lys His Asp Ser Ala Ser Asn Ile Ser Tyr Ser Leu Asn Ile Lys Gly  
 370 375 380

Leu Gly Asn Glu Lys Leu Lys Glu Lys Glu Asn Asn Asp Ser Ser Asp  
 385 390 395 400

ES 2 726 530 T3

Lys Ala Thr Val Ile Pro Asn Phe Asn Thr Thr Met Gln Gly Ser Leu  
 405 410 415

Leu Gly Asp Asp Ser Arg Asp Tyr Tyr Ser Phe Glu Val Lys Glu Glu  
 420 425 430

Gly Glu Val Asn Ile Glu Leu Asp Lys Lys Asp Glu Phe Gly Val Thr  
 435 440 445

Trp Thr Leu His Pro Glu Ser Asn Ile Asn Asp Arg Ile Thr Tyr Gly  
 450 455 460

Gln Val Asp Gly Asn Lys Val Ser Asn Lys Val Lys Leu Arg Pro Gly  
 465 470 475 480

Lys Tyr Tyr Leu Leu Val Tyr Lys Tyr Ser Gly Ser Gly Asn Tyr Glu  
 485 490 495

Leu Arg Val Asn Lys Glu Phe Lys Leu Val Asp Asp Tyr Lys Asp Asp  
 500 505 510

Asp Asp Lys Ser Arg  
 515

- 5 <210> 11
- <211> 36
- <212> ADN
- <213> Artificial
  
- 10 <220>
- <223> ADN de oligonucleótido
  
- <400> 11
- tcgacgaaca gaaactgatt agcgaagaag atctgt 36
  
- 15 <210> 12
- <211> 36
- <212> ADN
- <213> Artificial
  
- 20 <220>
- <223> ADN de oligonucleótido
  
- <400> 12
- ctagacagat ctctctgct aatcagtttc tgttcg 36
  
- 25 <210> 13
- <211> 36
- <212> ADN
- <213> Artificial
  
- 30 <220>
- <223> cebador directo para CBD de ColH cebador 5)
  
- <400> 13
- gaatctcag gatccactac tactgcagaa ataaag 36
- 35

# ES 2 726 530 T3

	<210> 14	
	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> cebador inverso para CBD de ColH (cebador 6)	
	<400> 14	
10	aagcagagat gaattctctt cctactgaac cttctatatt aattc	45
	<210> 15	
	<211> 31	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo para DsRED (cebador 7)	
20	<400> 15	
	gtaccggtcg agctcatgga caacaccgag g	31
	<210> 16	
	<211> 32	
25	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo para DsRED (cebador 8)	
30	<400> 16	
	gtcgcggccg gtaccctggg agccggagtg gc	32
	<210> 17	
35	<211> 1449	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
40	<223> DsRed-CBD de ColH	
	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (1)..(1449)	
45	<223>	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(15)	
50	<223> Secuencia de TEE	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (16)..(33)	
55	<223> Etiqueta de His	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (43)..(717)	
60	<223> Secuencia DsRed	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (736)..(1392)	
65	<223> Secuencia CBD de ColH	

ES 2 726 530 T3

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1411)..(1440)  
 <223> Secuencia C-myc

5

<400> 17  
 atg aat cat aaa gtg cat cat cat cat cat cat atg gag ctc atg gac 48  
 Met Asn His Lys Val His His His His His His Met Glu Leu Met Asp  
 1 5 10 15  
  
 aac acc gag gac gtc atc aag gag ttc atg cag ttc aag gtg cgc atg 96  
 Asn Thr Glu Asp Val Ile Lys Glu Phe Met Gln Phe Lys Val Arg Met  
 20 25 30  
  
 gag ggc tcc gtg aac ggc cac tac ttc gag atc gag ggc gag ggc gag 144  
 Glu Gly Ser Val Asn Gly His Tyr Phe Glu Ile Glu Gly Glu Gly Glu  
 35 40 45  
  
 ggc aag ccc tac gag ggc acc cag acc gcc aag ctg cag gtg acc aag 192  
 Gly Lys Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ala Lys Leu Gln Val Thr Lys  
 50 55 60  
  
 ggc ggc ccc ctg ccc ttc gcc tgg gac atc ctg tcc ccc cag ttc cag 240  
 Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Gln Phe Gln  
 65 70 75 80  
  
 gcc ggc tcc aag gcc tac gtg aag cac ccc gcc gac atc ccc gac tac 288  
 Ala Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His Pro Ala Asp Ile Pro Asp Tyr  
 85 90 95  
  
 atg aag ctg tcc ttc ccc gag ggc ttc acc tgg gag cgc tcc atg aac 336  
 Met Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Thr Trp Glu Arg Ser Met Asn  
 100 105 110  
  
 ttc gag gac ggc ggc gtg gtg gag gtg cag cag gac tcc tcc ctg cag 384  
 Phe Glu Asp Gly Gly Val Val Glu Val Gln Gln Asp Ser Ser Leu Gln  
 115 120 125  
  
 gac ggc acc ttc atc tac aag gtg aag ttc aag ggc gtg aac ttc ccc 432  
 Asp Gly Thr Phe Ile Tyr Lys Val Lys Phe Lys Gly Val Asn Phe Pro  
 130 135 140  
  
 gcc gac ggc ccc gta atg cag aag aag act gcc ggc tgg gag ccc tcc 480  
 Ala Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Ala Gly Trp Glu Pro Ser  
 145 150 155 160

ES 2 726 530 T3

acc gag aag ctg tac ccc cag gac ggc gtg ctg aag ggc gag atc tcc	528
Thr Glu Lys Leu Tyr Pro Gln Asp Gly Val Leu Lys Gly Glu Ile Ser	
165 170 175	
cac gcc ctg aag ctg aag gac ggc ggc cac tac acc tgc gac ttc aag	576
His Ala Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr Thr Cys Asp Phe Lys	
180 185 190	
acc gtg tac aag gcc aag aag ccc gtg cag ctg ccc ggc aac cac tac	624
Thr Val Tyr Lys Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu Pro Gly Asn His Tyr	
195 200 205	
gtg gac tcc aag ctg gac atc acc aac cac aac gag gac tac acc gtg	672
Val Asp Ser Lys Leu Asp Ile Thr Asn His Asn Glu Asp Tyr Thr Val	
210 215 220	
gtg gag cag tac gag cac gcc gag gcc cgc cac tcc ggc tcc cag ggt	720
Val Glu Gln Tyr Glu His Ala Glu Ala Arg His Ser Gly Ser Gln Gly	
225 230 235 240	
acc ctc gag gga tcc act act act gca gaa ata aag gat ctt tca gaa	768
Thr Leu Glu Gly Ser Thr Thr Thr Ala Glu Ile Lys Asp Leu Ser Glu	
245 250 255	
aat aaa ctt cca gtt ata tat atg cat gta cct aaa tcc gga gcc tta	816
Asn Lys Leu Pro Val Ile Tyr Met His Val Pro Lys Ser Gly Ala Leu	
260 265 270	
aat caa aaa gtt gtt ttc tat gga aaa gga aca tat gac cca gat gga	864
Asn Gln Lys Val Val Phe Tyr Gly Lys Gly Thr Tyr Asp Pro Asp Gly	
275 280 285	
tct atc gca gga tat caa tgg gac ttt ggt gat gga agt gat ttt agc	912
Ser Ile Ala Gly Tyr Gln Trp Asp Phe Gly Asp Gly Ser Asp Phe Ser	
290 295 300	
agt gaa caa aac cca agc cat gta tat act aaa aaa ggt gaa tat act	960
Ser Glu Gln Asn Pro Ser His Val Tyr Thr Lys Lys Gly Glu Tyr Thr	
305 310 315 320	
gta aca tta aga gta atg gat agt agt gga caa atg agt gaa aaa act	1008
Val Thr Leu Arg Val Met Asp Ser Ser Gly Gln Met Ser Glu Lys Thr	
325 330 335	
atg aag att aag att aca gat ccg gta tat cca ata ggc act gaa aaa	1056
Met Lys Ile Lys Ile Thr Asp Pro Val Tyr Pro Ile Gly Thr Glu Lys	
340 345 350	
gaa cca aat aac agt aaa gaa act gca agt ggt cca ata gta cca ggt	1104
Glu Pro Asn Asn Ser Lys Glu Thr Ala Ser Gly Pro Ile Val Pro Gly	
355 360 365	
ata cct gtt agt gga acc ata gaa aat aca agt gat caa gat tat ttc	1152
Ile Pro Val Ser Gly Thr Ile Glu Asn Thr Ser Asp Gln Asp Tyr Phe	
370 375 380	
tat ttt gat gtt ata aca cca gga gaa gta aaa ata gat ata aat aaa	1200
Tyr Phe Asp Val Ile Thr Pro Gly Glu Val Lys Ile Asp Ile Asn Lys	
385 390 395 400	
tta ggg tac gga gga gct act tgg gta gta tat gat gaa aat aat aat	1248
Leu Gly Tyr Gly Glu Ala Thr Trp Val Val Tyr Asp Glu Asn Asn Asn	
405 410 415	

ES 2 726 530 T3

gca gta tct tat gcc act gat gat ggg caa aat tta agt gga aag ttt 1296  
 Ala Val Ser Tyr Ala Thr Asp Asp Gly Gln Asn Leu Ser Gly Lys Phe  
 420 425 430

aag gca gat aaa cca ggt aga tat tac atc cat ctt tac atg ttt aat 1344  
 Lys Ala Asp Lys Pro Gly Arg Tyr Tyr Ile His Leu Tyr Met Phe Asn  
 435 440 445

ggt agt tat atg cca tat aga att aat ata gaa ggt tca gta gga aga 1392  
 Gly Ser Tyr Met Pro Tyr Arg Ile Asn Ile Glu Gly Ser Val Gly Arg  
 450 455 460

gaa ttc aag ctt gtc gac gaa cag aaa ctg att agc gaa gaa gat ctg 1440  
 Glu Phe Lys Leu Val Asp Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu  
 465 470 475 480

tct aga tag 1449  
 Ser Arg

<210> 18  
 <211> 482  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> DsRed-CBD de ColH

10

<400> 18  
 Met Asn His Lys Val His His His His His His Met Glu Leu Met Asp  
 1 5 10 15

Asn Thr Glu Asp Val Ile Lys Glu Phe Met Gln Phe Lys Val Arg Met  
 20 25 30

Glu Gly Ser Val Asn Gly His Tyr Phe Glu Ile Glu Gly Glu Gly Glu  
 35 40 45

Gly Lys Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ala Lys Leu Gln Val Thr Lys  
 50 55 60

Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Gln Phe Gln  
 65 70 75 80

Ala Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His Pro Ala Asp Ile Pro Asp Tyr  
 85 90 95

Met Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Thr Trp Glu Arg Ser Met Asn  
 100 105 110

Phe Glu Asp Gly Gly Val Val Glu Val Gln Gln Asp Ser Ser Leu Gln  
 115 120 125

ES 2 726 530 T3

Asp Gly Thr Phe Ile Tyr Lys Val Lys Phe Lys Gly Val Asn Phe Pro  
 130 135 140  
 Ala Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Ala Gly Trp Glu Pro Ser  
 145 150 155 160  
 Thr Glu Lys Leu Tyr Pro Gln Asp Gly Val Leu Lys Gly Glu Ile Ser  
 165 170 175  
 His Ala Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr Thr Cys Asp Phe Lys  
 180 185 190  
 Thr Val Tyr Lys Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu Pro Gly Asn His Tyr  
 195 200 205  
 Val Asp Ser Lys Leu Asp Ile Thr Asn His Asn Glu Asp Tyr Thr Val  
 210 215 220  
 Val Glu Gln Tyr Glu His Ala Glu Ala Arg His Ser Gly Ser Gln Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Glu Gly Ser Thr Thr Thr Ala Glu Ile Lys Asp Leu Ser Glu  
 245 250 255  
 Asn Lys Leu Pro Val Ile Tyr Met His Val Pro Lys Ser Gly Ala Leu  
 260 265 270  
 Asn Gln Lys Val Val Phe Tyr Gly Lys Gly Thr Tyr Asp Pro Asp Gly  
 275 280 285  
 Ser Ile Ala Gly Tyr Gln Trp Asp Phe Gly Asp Gly Ser Asp Phe Ser  
 290 295 300  
 Ser Glu Gln Asn Pro Ser His Val Tyr Thr Lys Lys Gly Glu Tyr Thr  
 305 310 315 320  
 Val Thr Leu Arg Val Met Asp Ser Ser Gly Gln Met Ser Glu Lys Thr  
 325 330 335  
 Met Lys Ile Lys Ile Thr Asp Pro Val Tyr Pro Ile Gly Thr Glu Lys  
 340 345 350  
 Glu Pro Asn Asn Ser Lys Glu Thr Ala Ser Gly Pro Ile Val Pro Gly  
 355 360 365  
 Ile Pro Val Ser Gly Thr Ile Glu Asn Thr Ser Asp Gln Asp Tyr Phe  
 370 375 380

ES 2 726 530 T3

Tyr Phe Asp Val Ile Thr Pro Gly Glu Val Lys Ile Asp Ile Asn Lys  
385 390 395 400

Leu Gly Tyr Gly Gly Ala Thr Trp Val Val Tyr Asp Glu Asn Asn Asn  
405 410 415

Ala Val Ser Tyr Ala Thr Asp Asp Gly Gln Asn Leu Ser Gly Lys Phe  
420 425 430

Lys Ala Asp Lys Pro Gly Arg Tyr Tyr Ile His Leu Tyr Met Phe Asn  
435 440 445

Gly Ser Tyr Met Pro Tyr Arg Ile Asn Ile Glu Gly Ser Val Gly Arg  
450 455 460

Glu Phe Lys Leu Val Asp Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu  
465 470 475 480

Ser Arg

<210> 19  
<211> 34  
5 <212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> cebador directo para amplificar el gen de tdTomato (TomatoF)

10 <400> 19  
ccggtcgccc atatggtgag caagggcgag gagg

34

15 <210> 20  
<211> 34  
<212> ADN  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> cebador inverso para amplificar el gen de tdTomato (TomatoR)

<400> 20  
agagtcgagg cggatccctt gtacagctcg tcca

34

**REIVINDICACIONES**

1. Método para analizar un tejido biológico, que comprende aplicar dos o más sondas respectivamente, conteniendo cada una un dominio de unión a sustrato de una proteasa a través del cual dicha proteasa se une a proteínas de la matriz intercelular de un componente biológico predeterminado, a un tejido biológico aislado y analizar las cantidades de unión de las sondas al tejido biológico;
 

5 en el que las sondas se marcan con una molécula de visualización.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que cada una de las sondas se marca con una molécula de visualización seleccionada de moléculas fluorescentes, moléculas luminiscentes y radioisótopos incluyendo un núclido positrónico, y preferiblemente, en el que la molécula de visualización es una proteína luciferasa y/o una molécula fluorescente seleccionada del grupo que consiste en GFP, EGFP, YFP, BFP, CFP, DsRED, tdTomato y RFP.
- 15 3. Método según la reivindicación 2, en el que cada uno de los dominios de unión a sustrato y la molécula de visualización forman una proteína de fusión.
- 20 4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que cada uno de los dominios de unión a sustrato comprende un dominio de unión a colágeno de una proteasa.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende: aplicar las dos o más sondas por separado o simultáneamente a un tejido biológico, y medir las cantidades de unión de las sondas por separado o simultáneamente.
- 25 6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende: aplicar las dos o más sondas simultáneamente a un tejido biológico, y medir las cantidades de unión de las sondas simultáneamente.
- 30 7. Método para separar células o poblaciones de células de un tejido biológico, que comprende: analizar el tejido biológico mediante el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, determinar una razón cuantitativa de proteasas basándose en los resultados del análisis y aplicar las proteasas en la razón cuantitativa al tejido biológico para separar las células o las poblaciones de células.
- 35 8. Conjunto de sondas adecuado para análisis de un tejido biológico, que comprende dos o más sondas respectivamente, conteniendo cada una un dominio de unión a sustrato de una proteasa a través del cual dicha proteasa se une a proteínas de la matriz intercelular de un componente biológico predeterminado, en el que las sondas se marcan con moléculas de visualización mutuamente diferentes seleccionadas de moléculas fluorescentes, moléculas luminiscentes y radioisótopos incluyendo un núclido positrónico.
- 40 9. Conjunto de sondas según la reivindicación 8, en el que las moléculas de visualización son una(s) proteína(s) luciferasa y/o una(s) molécula(s) fluorescente(s) seleccionada(s) del grupo que consiste en GFP, EGFP, YFP, BFP, CFP, DsRED, tdTomato y RFP, y preferiblemente, en el que la proteína luciferasa tiene una longitud de onda pico e intensidad luminiscente diferentes de una luciferasa de tipo natural.
- 45 10. Conjunto de sondas según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, en el que cada uno de los dominios de unión a sustrato y cada una de las moléculas de visualización forman una proteína de fusión.
- 50 11. Conjunto de sondas según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que los dominios de unión a sustrato son dominios de unión a colágeno de una proteasa.
- 55 12. Conjunto de sondas según la reivindicación 11, en el que los dominios de unión a colágeno son dominios de unión a colágeno de colagenasa seleccionados de colagenasas derivadas del género *Clostridium*.
13. Conjunto de sondas según la reivindicación 12, en el que los dominios de unión a colágeno son dominios de unión a colágeno de colagenasa G y colagenasa H derivadas de *Clostridium histolyticum*.
- 60 14. Conjunto de sondas según la reivindicación 13, en el que cada uno de los dominios de unión a colágeno comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1, una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 o secuencias parciales de las mismas.

FIG.1

(A) CBD de ColG

3618 3628 3638 3648 3658 3668 3678 3688 3698 3708 3718 3728  
 g t g c a a c a g c t a c a g a a g c t t t a c t a t a g a a t a a g a c a g a a t a c a a c a c c t a t a a c t a a g a a t g g a a c t a a t g a t a t a a a g a g g c t a t g g t c c a t a g t t g a a g  
 T T T P I T K E H E P H D D I K E A H G P I V E G

3738 3748 3758 3768 3778 3788 3798 3808 3818 3828 3838 3848  
 g t g t t a c t g t a a a a g g t a t t t a a t g g t t c t g a t g a t c t a c t t c t a t t t t g a t g t a a a a g a g a t g g t g a t g t t a c a a t t g a a c t t c c t t a t t c a g g g t a t c t a a t t t c a a t  
 V T V K Q D L H G S D D A D T F Y F D V K E D D D V T I E L P V S G S S H F T W

3858 3868 3878 3888 3898 3908 3918 3928 3938 3948 3958 3968  
 g g t t a g t t t a t a a a g a g g a g a c a t c a a a c a t a t t t g c a a g t g g t a t a g a t a a g a t a a c t a a a a g t t g g a a c t t t a a a t c t a a a a a g a a g a a t t a t g t g t t a t a t a a a c  
 L V Y K E Q D D Q H H I A S G I D K H N S K V Q T F K S T K G R H V V F I V K H

3978 3988 3998 4008 4018 4028 4038 4048 4058 4068 4078 4088  
 a e g a t t c t g c t t c a a a t a t a t c c t a t t c t t t a a a c a t a a a a g g a t t a g g t a a c g a g a a t t g a a g a a a a a a a a a t a a t g a t t c t t g a t a a a g c t a c a g t t a t a c c a a t t t c a a t a  
 D S A S H I S Y S L N I K Q L G N E K L K E K E N N D S S D K A T V I P N F N T

4098 4108 4118 4128 4138 4148 4158 4168 4178 4188 4198 4208  
 c c a c t a t g c a a g g t t c a c t t t t a g g t g a t g a t t c a a g a t t a t t a t c t t t t g a g g t t a a g a a a a g a a g g c a a g t t a a t a t a g a a c t a g a t a a a a a g a t g a a t t g g t g t a a c a t g g a  
 T M Q Q S L L Q D D S A D V Y S F E V K E E Q E V N I E L D K K D E F Q V T W T

4218 4228 4238 4248 4258 4268 4278 4288 4298 4308 4318 4328  
 c a c t a c a t c a a g a g t c a a t t a t t a g a c a g a t a c t t a c g a c a a g t g a t g t a a a a g g t a t c t a a a a g t t a a t t a a g a c c a g a a a t a t t a t c t a c t t g t t t a t a a t a c t  
 L H P E S H I H D R I T Y Q Q V D G H K V S H K V K L R P Q K Y Y L L V Y K Y S

4338 4348 4358  
 c a g a t c a g a a c t a t g a g t t a a g g t a a a t a a a  
 O S Q H Y E L R V H K

(B) CBD de ColH

18 28 38 48 58 68 78 88 98 108 118 128  
 a c t a c t a c t g a a g a a t a a a g g a t c t t t t a g a a a a t a a a c t t c c a g t t a t a t a t a t g c a t g t a a c t a a a t c a g g a c c t t a a a t c a a a a a g t t g t t t t c t a t g g a a a a g g a a c a t a t g a c  
 T T T R E I K D L S E N K L P V I Y H H V P K S Q A L H Q K V V F V G K O T V D

138 148 158 168 178 188 198 208 218 228 238 248  
 c c a g a t g g a t c t a t c a c a g g a t a t c a a t g g g a c t t t g g t g a t g g a a g t g a t t t t a g c a g t g a a c a a a a c c a a g a a t g t a t a t a c t a a a a a a g g t g a a t a t a c t g t a a c a t t a a g a t a  
 P D G S I R G Y Q H D F Q D G S D F S S E Q M P S H V Y T K K G E Y T V T L R V

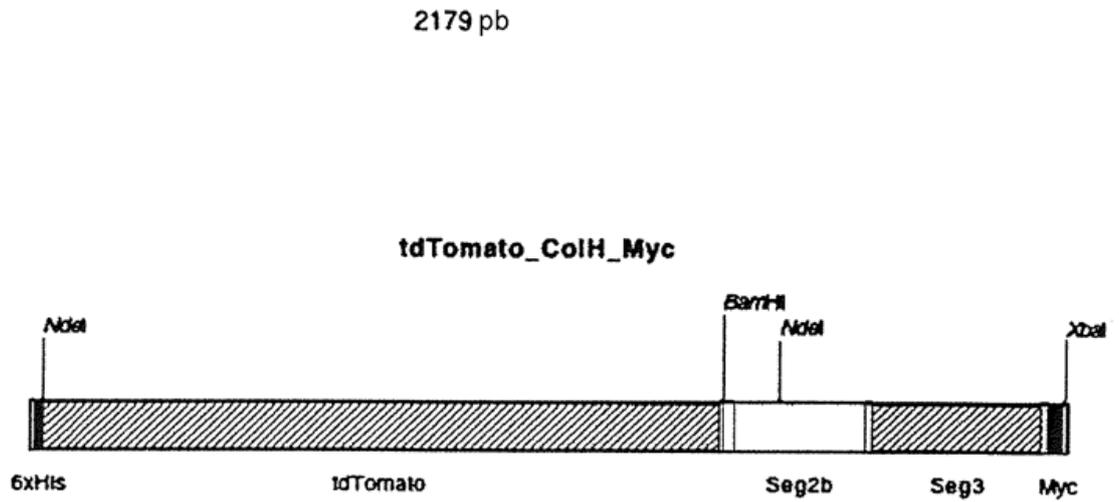
258 268 278 288 298 308 318 328 338 348 358 368  
 a t g g a t a g t a g t g g a a a a t g a g t g a a a a a c t a t g a a g t t a a g a t t a c a g a t c c a g t a t a t a c a a t a g g a c t g a a a a a g a a c a a a t a a c a g t a a a g a a c t g a a g t g t c c a a t a  
 H D S S Q Q H S E K T H K I K I T D P V Y P I G T E K E P H N S K E T A S O P I

378 388 398 408 418 428 438 448 458 468 478 488  
 g t a c c a g g t a t a c c t g t t a g t g g a a c a t a g a a a t a c a a g t g a t a a g a t t a t t c t a t t t t g a t g t t a t a c a c c a g g a g a a g t a a a a t a g a t a t a a a t a a a t t a g g g t a c g g a g a  
 V P O I P V S G T I E N T S Q Q D Y F V F D V I T P Q E V K I D I N K L O Y G G

498 508 518 528 538 548 558 568 578 588 598 608  
 g c t a c t t g g g t a g t a t a t g a t g a a a t a a t a t g c a g t a t c t t a t g c a c t g a t g a t g g c a a a t t t a a g t g g a a g t t t a a g g a g a t a a a c a g g t a g a t a t t a c a t c c a t c t t t a c  
 A T W V V Y D E N H N A V S Y A T D D Q N L S Q K F K A D K P G R Y V I H L V

618 628 638 648 658  
 a t g t t a a t g g t a g t a t a t g c a t a t a g a a t t a a t a t a g a a g g t t c a g t a g g a a g a  
 N F H G S Y M P Y R I N I E O S V O R

FIG.2



Nombre del plásmido: tdTomato\_ColH\_Myc  
Tamaño del plásmido: 2179 pb  
Construido por: K.Nakagawa  
Fecha de construcción: 29-07-2011  
Comentario y referencia: CBD de ColH: Seg2b, Seg3  
PM: 82157.07

FIG.3

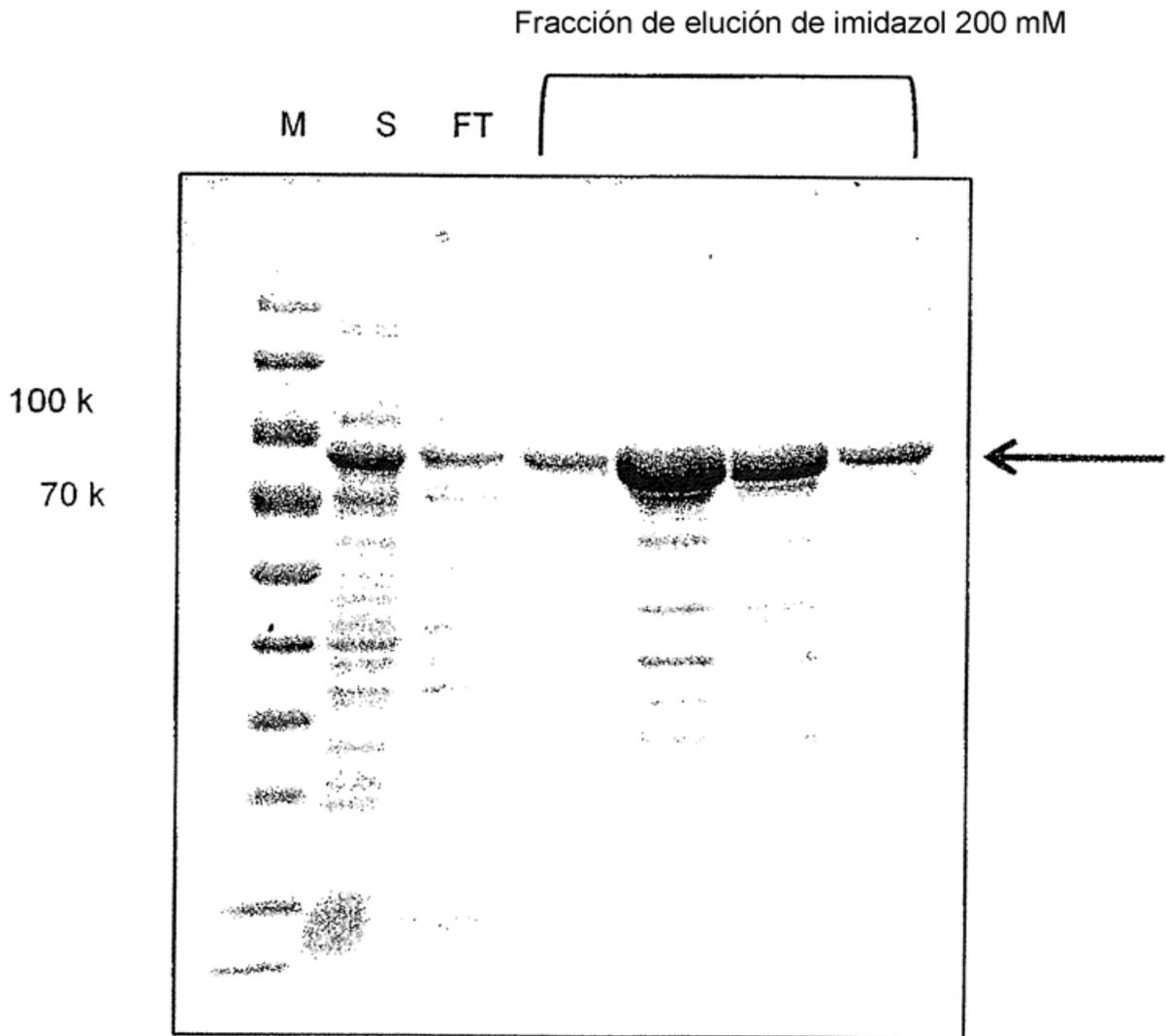


FIG.4

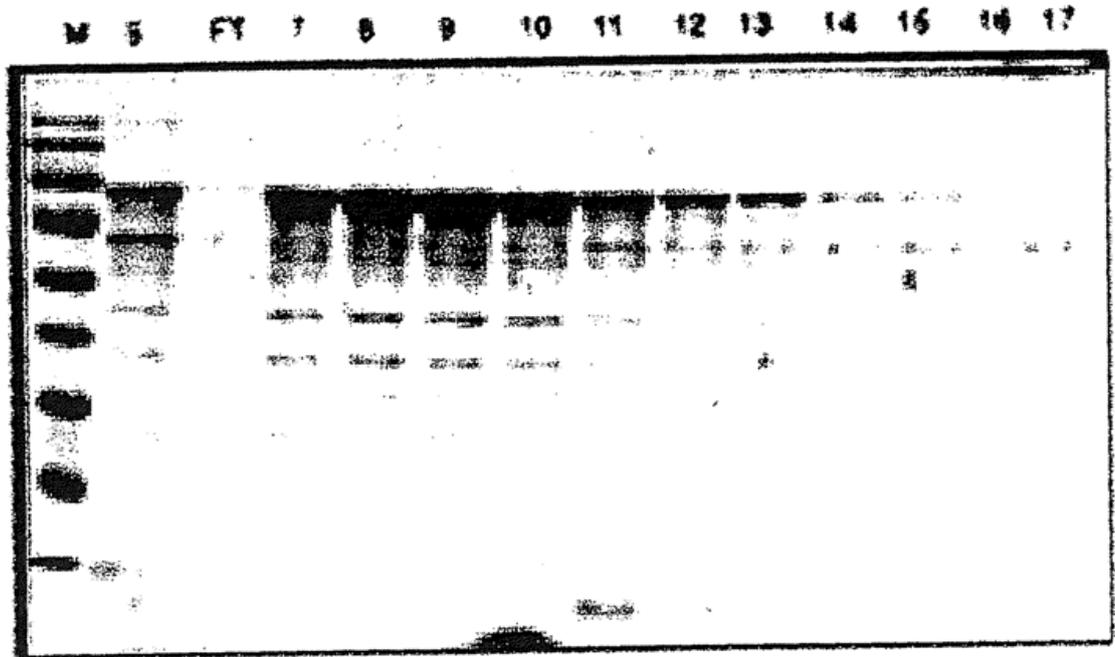


FIG.5

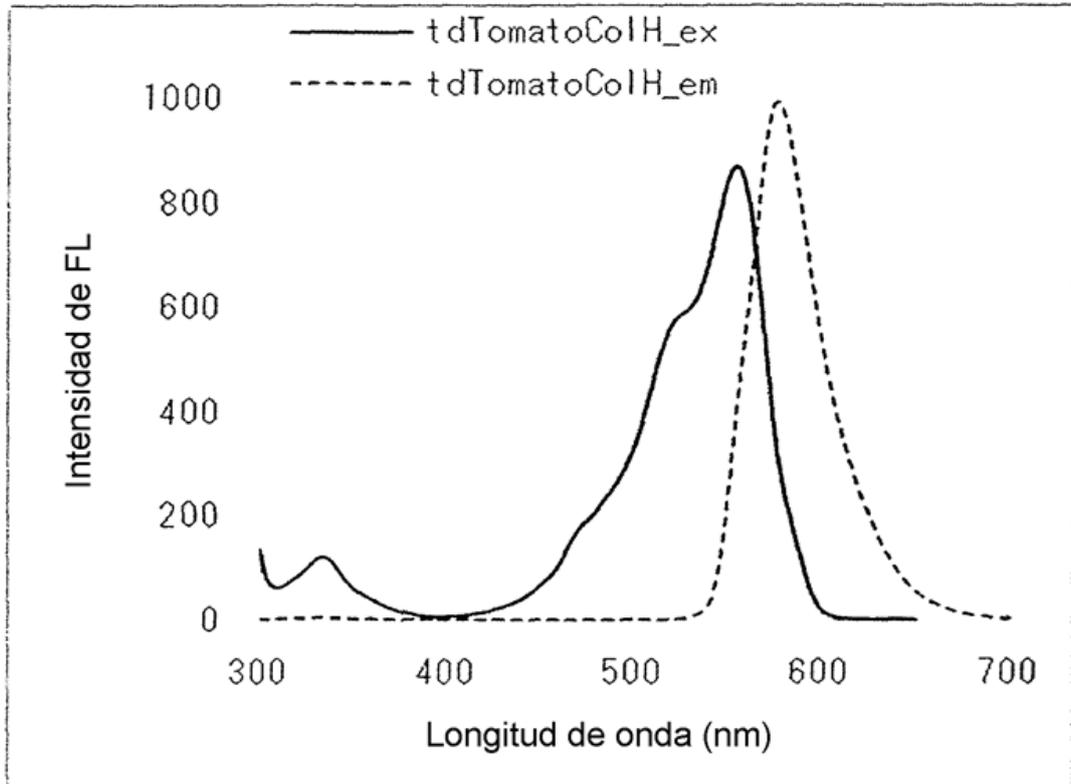


FIG.6

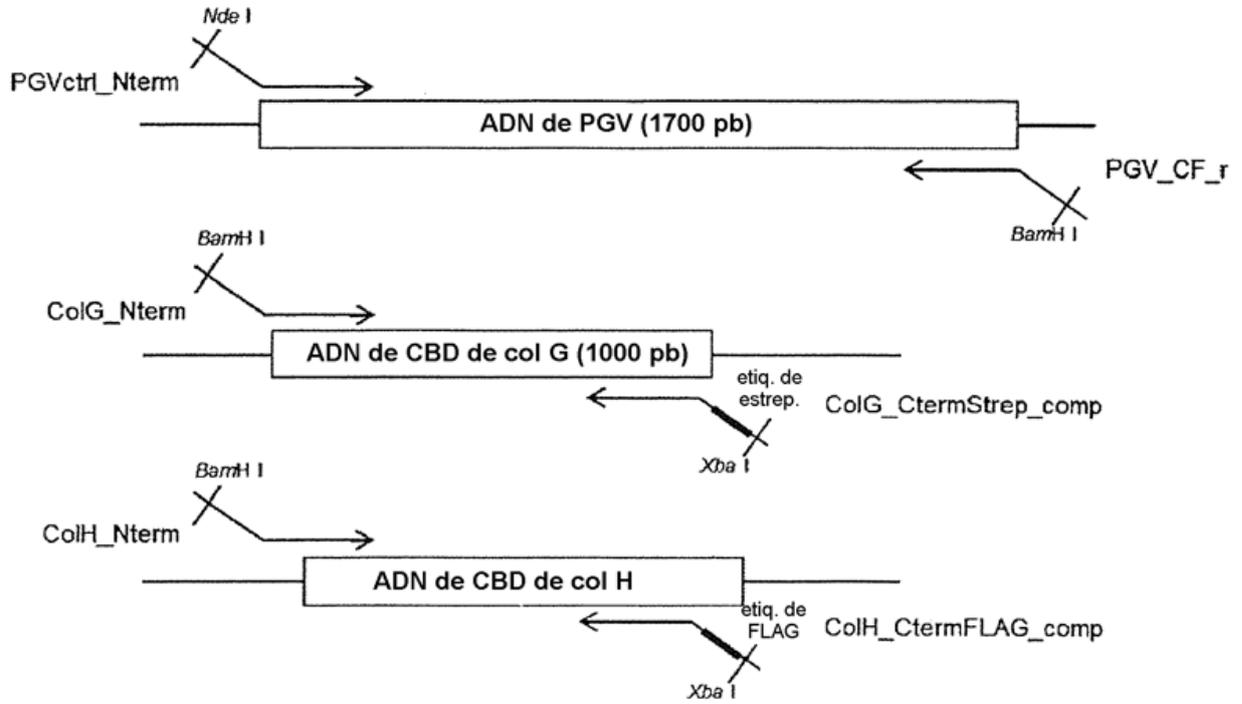


FIG.7

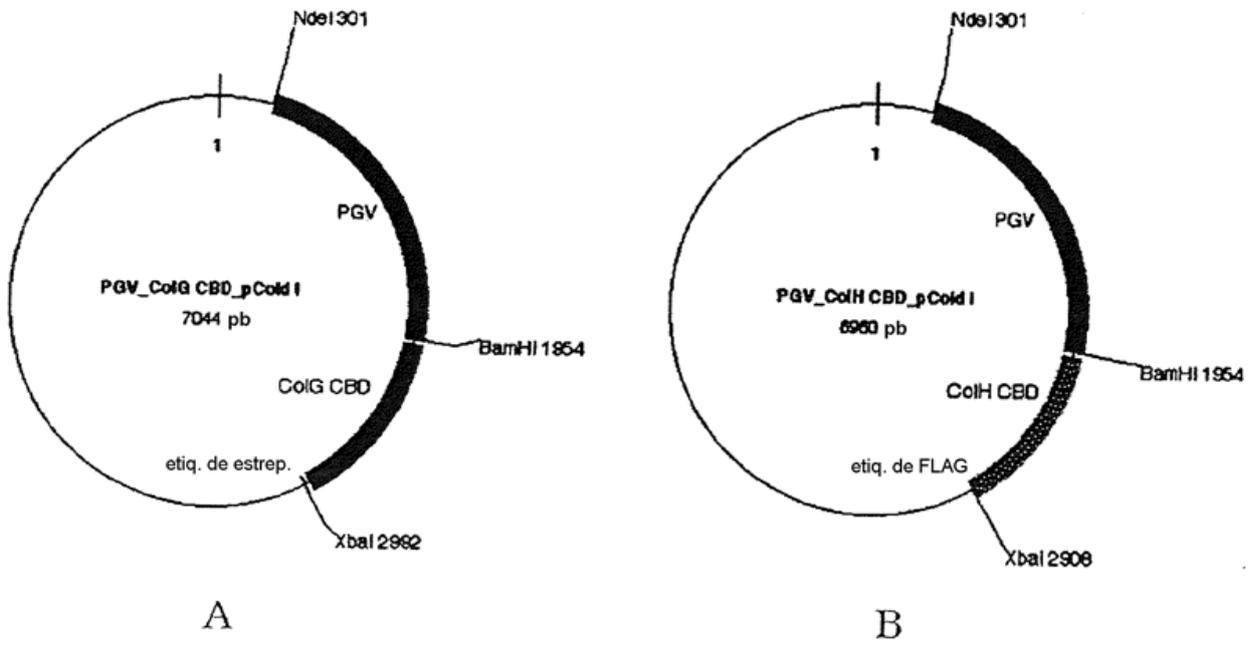


FIG.8

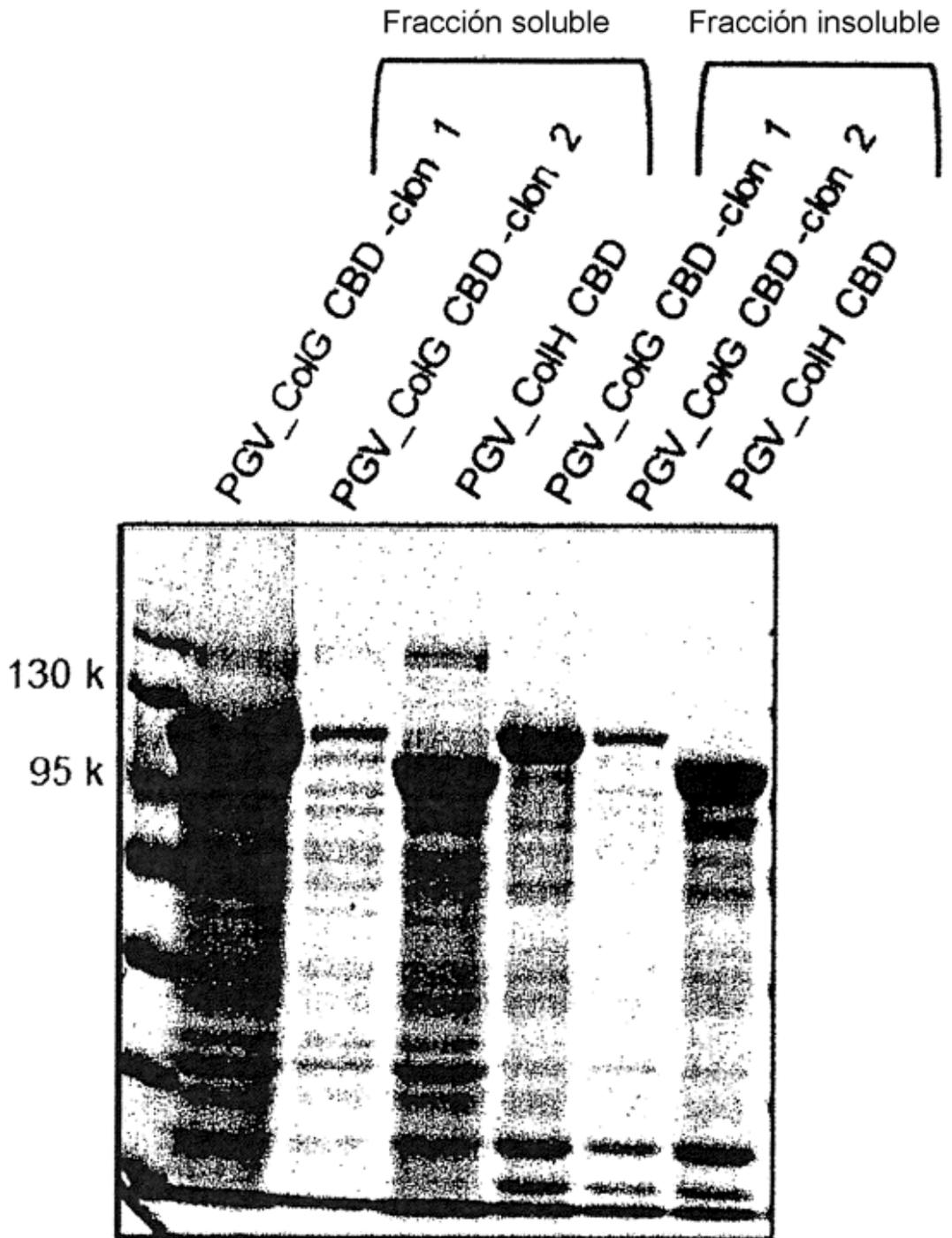


FIG.9

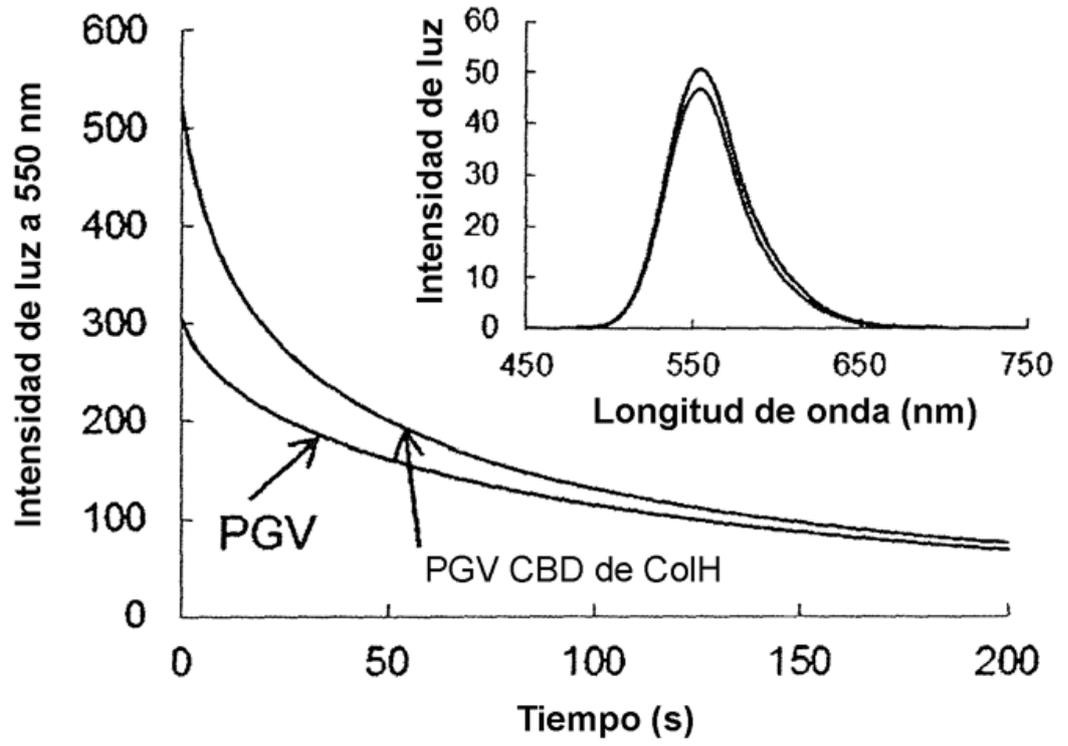


FIG.10

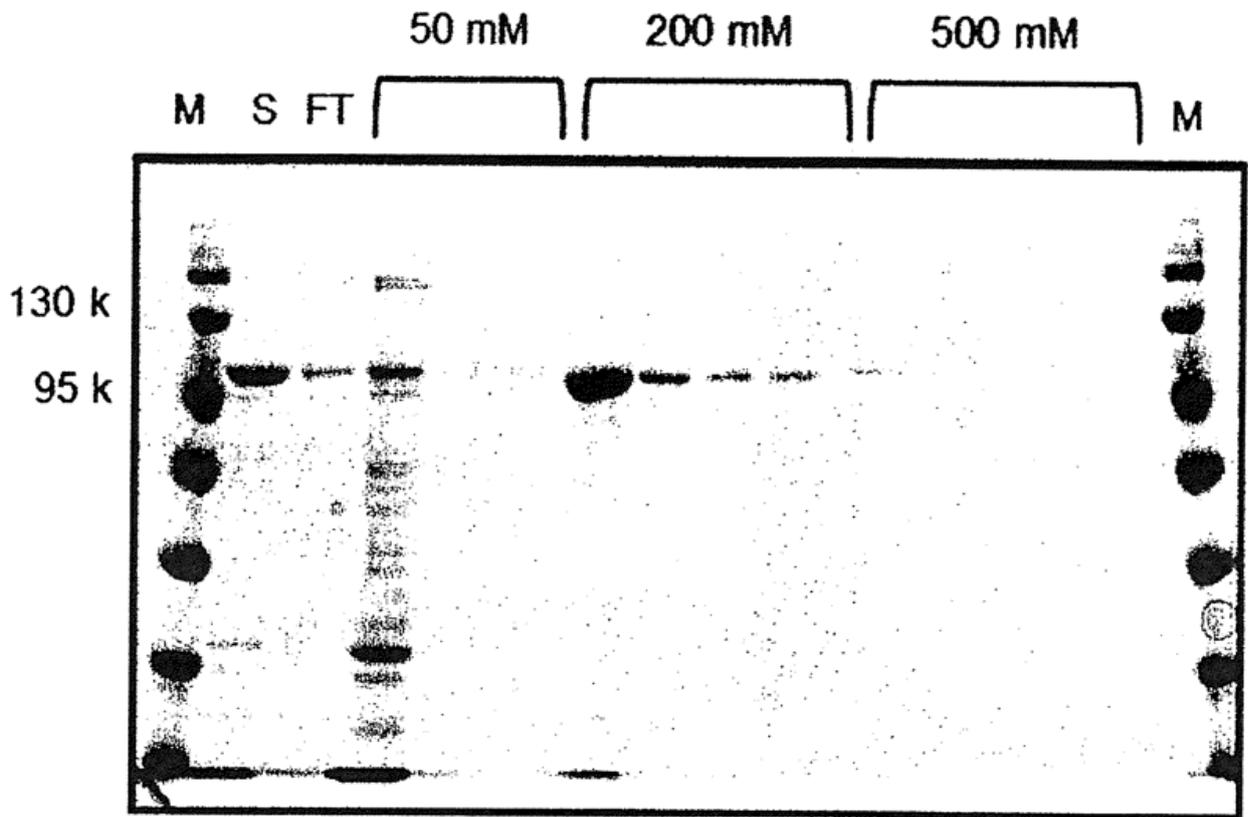


FIG.11

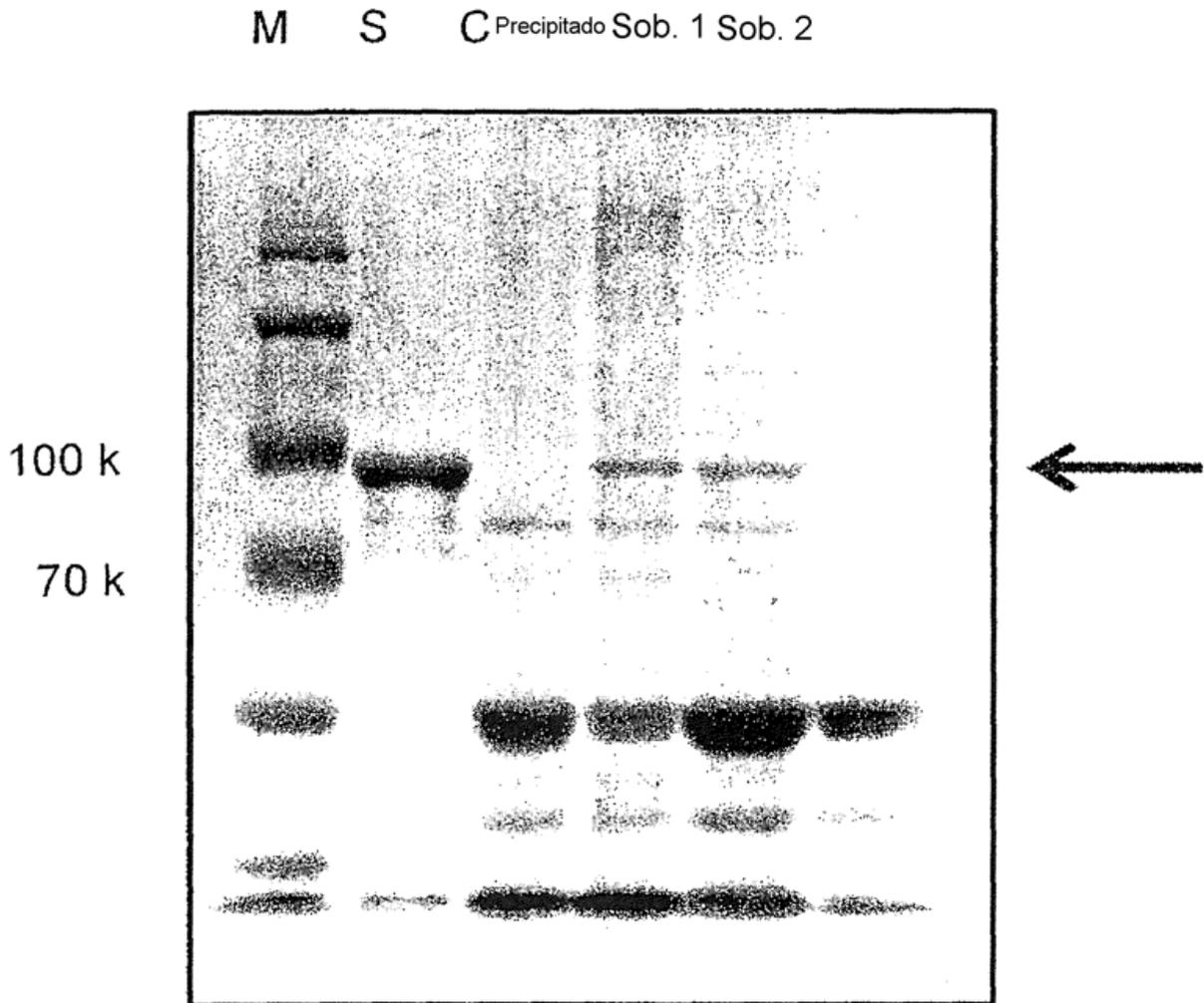
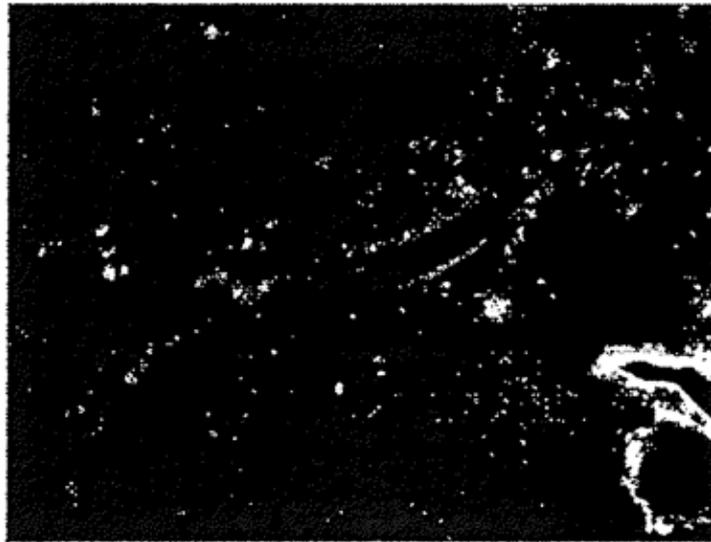
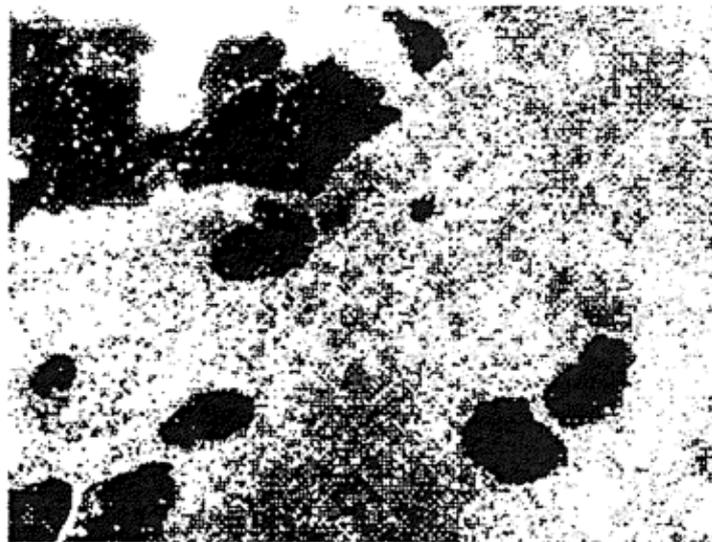


FIG.12



A (Control negativo: PBS solo)



B (EGFP-CBD de ColG Tiempo de exposición a la luz 1/4,5 s)

FIG.13

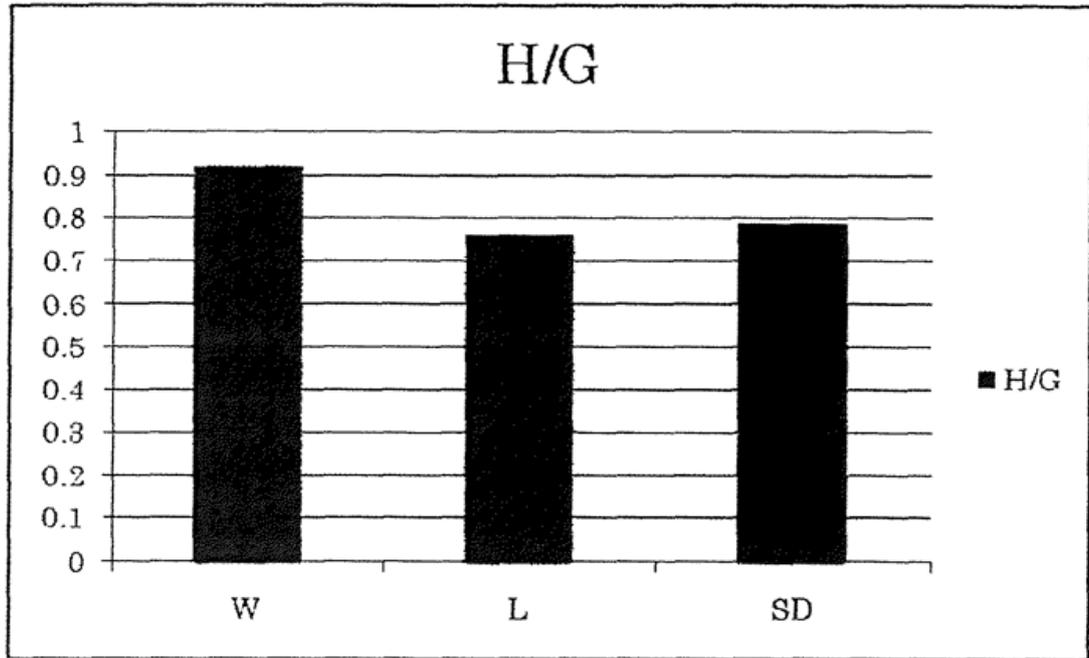


FIG.14

