

纳米荧光素酶的表达、纯化及性质鉴定*

侯家鹏, 丁 瀨**

(复旦大学 生命科学学院, 上海 200438)

摘要: 由荧光素酶 (luciferase) 催化的一大类发光反应被统称为生物发光 (bioluminescence), 该反应具有背景低、灵敏度高、线性范围广等特点, 是高灵敏检测的发展方向之一。课题组在近期的研究中全基因合成了一种纳米荧光素酶 (nano luciferase), 研究清楚了其理化性质的基础上, 将其作为一种新型的生物发光检测工具。将荧光素酶基因克隆至原核高表达载体上, 通过自动诱导系统进行了表达。通过 Ni-NTA 亲和层析纯化和分子筛将重组纳米荧光素酶进行纯化, 其产量可稳定达到每升菌 25.3 mg, 纯度超过 98%; 通过酶活实验鉴定了纳米荧光素酶的活性, 在 $1.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-7}$ mg/mL 的范围内, 该酶均具有良好的线性反应, 其线性检测下限低至 1.0×10^{-7} mg/mL (约 5 pmol)。纳米荧光素酶具有灵敏度高、数据重复性好、操作简便、稳定性高、易于保存等多重优点, 可利用其作为基础平台, 开发具有应用前景的超灵敏新型生物发光探针。

关键词: 纳米荧光蛋白; 原核表达; 纯化

中图分类号: Q 617 文献标志码: A 文章编号: 1004-390X (2017) 02-0191-06

Expression, Purification and Characterization of Nano Luciferase in *Escherichia coli*

HOU Jiapeng, DING Yu

(School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China)

Abstract: A large group of luminescence reactions catalyzed by luciferase are called bioluminescence. Since bioluminescence has been characterized as low background, high sensitivity and wide linear dynamic range. It is applied widely in sensitive molecular biology detection. In this research, we have synthesized a novel luciferase (nano luciferase) by whole gene synthesis, to make it a novel bioluminescent detection tool. Nano luciferase was cloned into a prokaryotic expression vector and expressed in an auto-induced system. Recombinant nano luciferase was purified by Ni-NTA affinity chromatography and size exclusive chromatography. The typical yield of recombinant nano luciferase was 25.3 mg from a liter culture medium with purity above 98%. Then, we tested the activity of recombinant nano luciferase, from 1.0×10^{-4} mg/mL to 1.0×10^{-7} mg/mL, nano luciferase has good linear response, the detection limit was as low as 1.0×10^{-7} mg/mL (around 5 pmol). The assay based on nano luciferase is ultrasensitive, good repeatable and easy operated. It would be applied as a basic tool to develop new sensitive bioluminescent probes with promising novel applications.

Keywords: nano luciferase (NLuc); prokaryotic expression; purification

收稿日期: 2017-01-24 修回日期: 2017-02-26 网络出版时间: 2017-03-31 0:00:39

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (31470764)。

作者简介: 侯家鹏 (1991—), 男, 山东泰安人, 硕士研究生, 主要从事功能蛋白质克隆、表达与纯化研究。
E-mail: houjiapeng11@163.com

** 通信作者 Corresponding author: 丁瀨 (1978—), 男, 山东枣庄人, 博士, 副教授, 主要从事结构生物学研究。
E-mail: yuding@fudan.edu.cn

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.s.20170331.0000.001.html>

荧光素酶是生物体内催化荧光素发光的酶的总称,一般来源于自然界能够发光的生物体内。根据其来源可分为海肾荧光素酶 (Renilla luciferase, RL)、细菌荧光素酶 (bacterial luciferase, BL)、萤火虫荧光素酶 (firefly luciferase, FL) 等多种类型。自 1954 年,人们对荧光素酶进行了长期的研究,不仅解析了其结构,还研究透彻了其发光原理,使之作为生物标记得到了广泛的应用^[1-3]。由于其具有高灵敏性与特异性,操作简单、反应迅速等优点,目前已经应用于快速检测、基因分析等科学研究。

然而,传统的荧光素酶在使用过程中还有很多不足之处,如荧光强度易受 pH、离子浓度、温度等因素影响、依赖 ATP 等^[4-6],妨碍了其更多用途。近年来,一种新型纳米荧光素酶 (nano luciferase, NLuc) 的出现很好地弥补了传统荧光素酶身上的缺点。NLuc 最初来源于一种深海磷虾,从 1978 年至今,通过对其不断地改造,终于优化得到一种比野生型效率高 250 万倍的微型荧光素酶^[7-9],使之便于实验室研究。与传统荧光素酶相比, NLuc 有分子量小、不需要 ATP、发光效率高、在各个 pH、温度下理化性质均比较稳定等优点。目前,这种新型荧光素酶已经成为一种极具使用价值的荧光标记物,得到广泛使用^[10-12],未来可利用 NLuc 荧光素酶作为基础,开发更具有应用前景的超灵敏新型生物发光探针,但对其进行大规模表达纯化条件的优化却鲜有报道。本研究利用原核表达系统大量制备具有生物活性的纳米荧光素酶蛋白,为今后将该酶作为生物发光示踪剂研究其他蛋白奠定基础。

1 材料与方法

1.1 原核表达载体的构建

参考 NCBI 中的数据 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KM359770>) 全基因合成了 NLuc 的 DNA 序列,通过 PCR 方法在目的片段两端加上 BamH I 和 Xho I 酶切位点并使用凝胶电泳的方法回收纯化片段。然后我们对 PCR 产物与 pT₇N₁₀ 载体做 BamH I/Xho I 双酶切处理,再用 T4 连接酶连接,连接产物转化至 DH5 α 感受态,最终获得了可用于原核表达的 pT₇-His₁₀-NLuc 质粒,经测序显示克隆成功。利用本实验室改造的 pT₇N₁₀ 载体可以在目的蛋白氨基端增加 10 个连续的组氨酸标签,便于后续进行 Ni-NTA 纯化。

1.2 His₁₀-NLuc 蛋白的诱导表达

我们选择自动诱导方法对目标蛋白进行诱导表达,主要基于以下原理:pT₇N₁₀ 质粒上含有一个乳糖操纵子,而自动诱导培养基中同时含有葡萄糖和乳糖成分:当葡萄糖成分还存在时,乳糖启动子及其后面的目的蛋白一般不表达或少量表达,大肠杆菌大量扩增;而当培养基中的葡萄糖全部被消耗掉,只剩乳糖时,乳糖启动子开始转录并表达目的蛋白。经过多次条件摸索与优化,我们选择在 20 °C 培养 20 h 的条件,本实验中的目的蛋白表达量最高。

pT₇-His₁₀-NLuc 质粒经测序检验正确后,转化至 BL21 (DE3) 菌中,过夜培养。第 2 天挑取单菌落加入到小试管中扩增,菌液浑浊后取 2 mL 转入 1 L 含 0.1 mg/mL 氨苄的 LB 自动诱导培养基^[13] 大规模诱导表达。37 °C 培养至 OD₆₀₀ 为 0.6 ~ 0.8 后,将温度调整到 20 °C 培养 20 h,之后以 6 000 r/min 的转速离心 15 min 收菌, -80 °C 冻存。

1.3 重组 His₁₀-NLuc 的纯化

将表达菌在 1 000 bar 的高压下破碎,随后以 18 000 r/min 的转速离心 1 h,收集上清。先通过 5 mL 的 Ni-NTA 亲和层析柱进行粗纯化,用含 1 mol/L NaCl 的缓冲液洗涤后,用含咪唑的缓冲液梯度洗脱,并监测 UV 280 nm 吸光值,收集出峰位置的洗脱液。将收集的洗脱液进行超滤浓缩,上样至 Superose 6 Increase 10/300 GL 高分辨率分子筛进行再纯化,最终产物通常保存在含 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.5, 5% 甘油的缓冲液中 (质谱实验则保存在相应缓冲液内)。

而由于有多聚组氨酸标签存在的影响,用 Ni-NTA 柱纯化后的重组蛋白的分子量比单独的 NLuc 高 2 ku 左右。所以,为了得到单独的 NLuc 蛋白进行后续试验,使用实验室纯化的 TEV 酶处理纯化蛋白,切掉 His 标签,再将酶切产物反挂 Ni-NTA 层析柱得到无标签的 NLuc 酶蛋白。

1.4 蛋白质性质的鉴定

为了消除杂蛋白影响,也为了满足后续酶活、质谱等实验对纯度、缓冲液的要求,我们尝试进行了多种纯化方案,并最终选择采用酶切后通过超滤浓缩然后上样至分子筛的方法进行进一步的纯化。

随后我们根据 Pierce 公司的操作手册用 BCA 法测定蛋白质浓度,按照《分子克隆实验手册 (第三版)》进行 SDS-PAGE 电泳,验证每一步收集的纯化蛋白,计算产率产量。同时,将 Ni-NTA 柱纯化蛋白

取少量样上至分子筛进行层析实验, 更换缓冲液为 5 mmol/L 乙酸铵溶液, 在 Bruker Ultraflex TOF/TOF MS (Bruker, Bremen) 质谱仪线性模式 (linear mode) 进行基质辅助激光解吸离子化飞行质谱实验 (MALDI-TOF) 以确定目的蛋白分子量。

1.5 NLuc 的活性检测

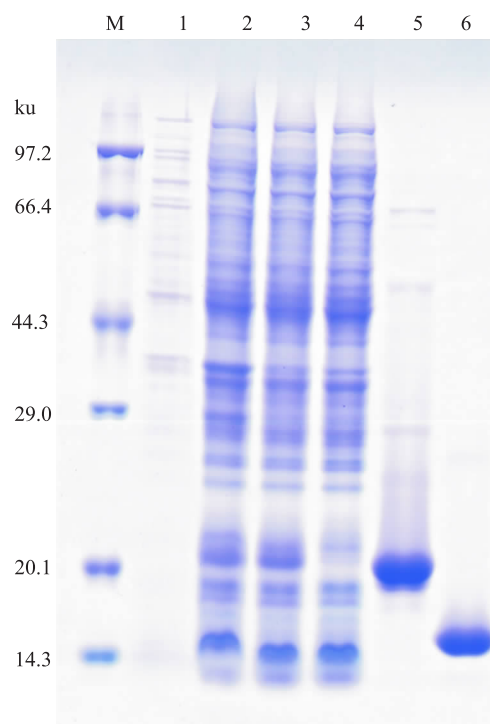
采用 Promega 公司的 Nano-Glo Luciferase Assay 试剂盒 (#N1110) 中的方法进行 NLuc 蛋白的分光光度法酶活测定。用 PBS 梯度稀释待测蛋白, 然后加入到 96 孔白板 (Costar #3922, Corning 公司), 每孔 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。之后弃蛋白溶液, 用 10 mg/mL 的 BSA 在 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 封闭 96 孔板未结合位点。封闭结束后弃掉 BSA, 用 TBST (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 140 mmol/L NaCl, 0.05% Tween-20) 清洗 3 次, 每次 200 μ L, 随后每孔加入 50 μ L 荧光底物静置 3 min, 用 Bio Tek 公司的 Cytation3 细胞成像多功能检测系统测定荧光强度, 据此计算 NLuc 酶活, 确定线性检测范围。

2 结果与分析

2.1 重组 His₁₀-NLuc 蛋白的表达与纯化

我们使用原核表达方法表达重组蛋白。在此方法下, 经过 Ni-NTA 初步纯化后可以从 1 L 大肠杆菌培养液得到原核表达的重组 NLuc 蛋白 33.6 mg (表 1), 纯度在 90% 以上。但是由于有标签的存在, 重组 NLuc 蛋白会比原始分子量大 2 ku 左右。SDS-PAGE 电泳结果显示含标签 (21 ku) 与切掉标签后的蛋白分子量 (19 ku) 分子量有明显差异, 而切掉 His 标签的 NLuc 蛋白在 SDS-PAGE 胶上迁

移距离 (相当于 16 ku) 较其理论分子量 (19 ku) 偏远 (图 1)。我们猜测可能是由于结合了 SDS 后蛋白构象变化而导致偏移距离改变, 但还需要进一步确认。



注: M. 分子量标签; 1. 诱导前全菌; 2. 诱导后全菌; 3. 诱导后上清; 4. Ni-NTA亲和层析上样流过液; 5. 300 mmol/L咪唑洗脱液; 6. 分子筛浓缩结果 (切除His标签后)。

Note: M. Molecular weight marker; 1. Whole cell lysate before induction; 2. Whole cell lysate after induction; 3. Supernatant; 4. Flow through of Ni-NTA chromatography; 5. Eluent sample with 300 mmol/L imidazole; 6. Eluate of size exclusive chromatography (after His tag removed).

图 1 SDS-PAGE检测重组NLuc的表达与Ni-NTA层析纯化
Fig. 1 Verification of the expression and Ni-NTA purification of NLuc by SDS-PAGE

表 1 以 1 L *E. coli* 菌液表达和纯化重组 His₁₀-NLuc 蛋白

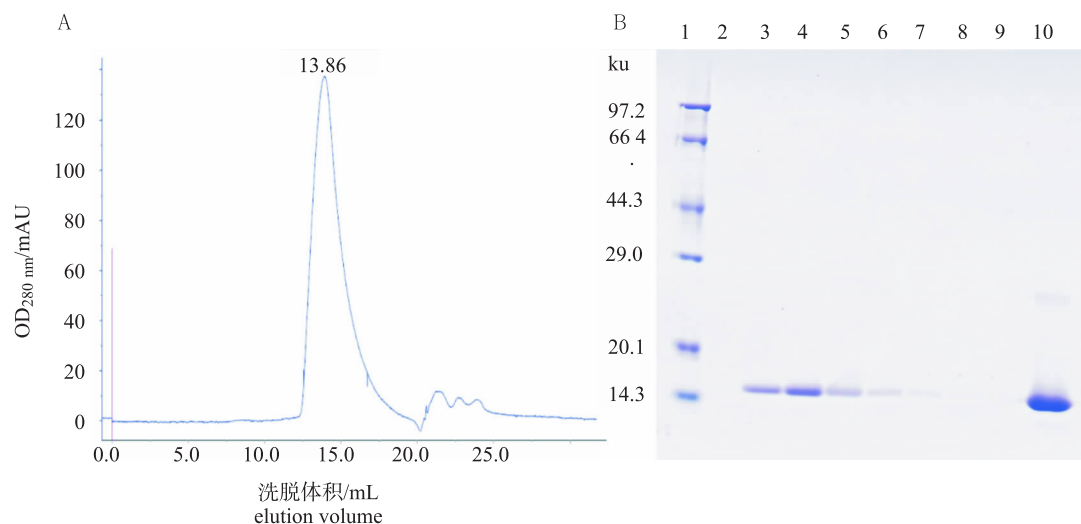
Tab. 1 Purification of recombinant His₁₀-NLuc from 1 L cultured *E. coli* cells

项目 item	总蛋白量/mg total protein	纯度/% purity	体积/mL volume	质量浓度/ (mg · mL ⁻¹) concentration	产量/ng yield	回收率/% recovery rate
supernatant	3 644	1.2	40	91.1	43.7	100
Ni-NTA	36.0	93.4	30	1.2	33.6	76.9
Superose 6	25.6	98.9	16	1.6	25.3	57.9

2.2 NLuc 蛋白的鉴定

在对 NLuc 进行进一步性质检测之前, 我们使用高分辨率的分子筛对镍柱粗纯化产物进行处理。通过 Ni-NTA 亲和层析方法进行了初步富集, 随后将标签切掉得到目标蛋白 (图 1), 结果显示: 初纯化的

蛋白纯度已经可以达到 90% 以上。分子筛结果如图 2A 所示: NLuc 蛋白以单峰状态存在, 在低分子量处有少量杂质。将分子筛主峰样品进行 SDS-PAGE 电泳 (图 2B), 进一步纯化后的 NLuc 纯度较高, 且已更换到分子筛所用缓冲液之中以方便后续试验。



注:NLuc洗脱的主峰中心为13.86 mL; B. 1. 分子量标签; 2. Superose 6洗脱第8管样品; 3. 第9管; 4. 第10管; 5. 第11管; 6. 第12管; 7. 第13管; 8. 第14管; 9. 第15管; 10. 上样至分子筛前的NLuc。
Note: The center of the NLuc elution peak was 13.86 mL; B. 1. Molecular weight marker; 2-9. Elution of the Superose 6 column from 8 to 15; 10. NLuc sample before loaded on the Superose 6 column.

图2 Superose 6分子筛纯化NLuc蛋白

Fig. 2 Purification of NLuc by Superose 6 size exclusive chromatography and SDS-PAGE

通过分子筛进一步纯化后, 我们使用质谱方法确定重组 NLuc 的分子量, 图 3 显示: 分子筛纯化的产物几乎全部为表观分子量一致的目的蛋白。由于 SDS-PAGE 结果 (16 ku) 与蛋白理论分子量 (19 ku) 存在差异, 为精确测定其分子量, 我们对纯化的蛋白进行了质谱鉴定。根据氨基酸序列理论计算, NLuc 分子量为 19 134.9 u, 而质谱峰值为 19 116.926 u, 两者非常接近, 证明其胶上迁移距离偏远与其结合 SDS 后构象有关, 而非蛋白质非全长表达或降解。

2.3 NLuc 蛋白酶活检测

为了构建基于 NLuc 的生物发光检测体系,

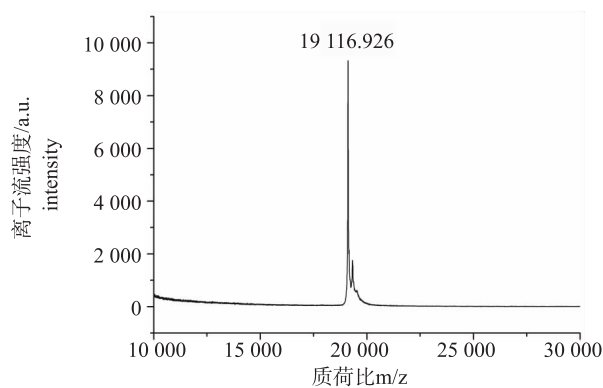


图3 NLuc MALDI-TOF质谱检测NLuc分子量与聚合状态

Fig. 3 Verification of the molecular weight and oligomeric state of NLuc by MALDI-TOF

我们需要明确 NLuc 的线性范围与检测下限。所以, 我们使用 Promega 公司的 Nano-Glo Luciferase Assay 试剂盒对酶切后的 NLuc 蛋白进行了酶活测定, 并绘制 NLuc 的酶活曲线 (图 4)。结果显示: 使用 furimazine 作为底物进行酶活检测时, 纯化的重组 NLuc 蛋白检测的线性范围至少为 $1.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-7}$ mg/mL (因比 1.0×10^{-4} mg/mL 更高的蛋白质量浓度对于微量检测无实际意义, 未检测), 线性拟合后 R^2 为 0.993 1。所以重组 NLuc 的分子量为 19.1 ku, 其线性检测下限 1.0×10^{-7} mg/mL 相当于 5.2 pmol/L, 具有很好的应用前景。

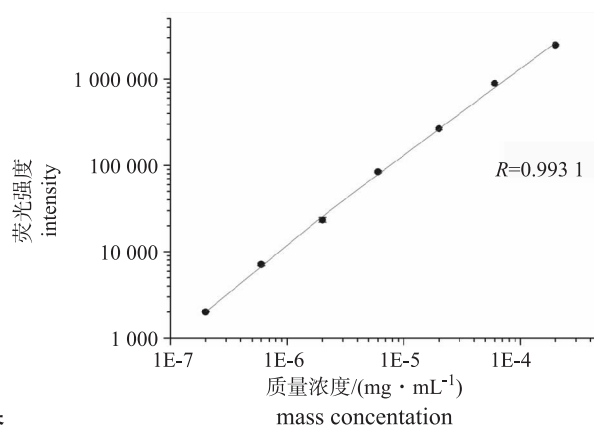


图4 NLuc荧光素酶活性的鉴定

Fig. 4 Verification of the luciferase activity of NLuc

3 讨论

3.1 重组 NLuc 蛋白的表达纯化

本研究在比较了传统 IPTG 诱导和自动诱导两种方法后, 发现自动诱导表达的纯化蛋白表达量更高, 且操作更加简便, 所以选择自动诱导系统表达 His₁₀-NLuc 蛋白, 而反应时间与温度都是通过不断优化后确定, 使得蛋白表达的质量与纯度都有所保证。

在我们的实验中, 首先在荧光素酶原始蛋白的 N 端上加上 1 个 His 标签形成重组蛋白, 之后通过亲和层析的方法从菌液中利用特异性标签将目标蛋白纯化出来, 后续再通过诸如离子交换柱、分子筛等方法进行精纯化。多聚组氨酸、MBP、GST 等都是常见的层析纯化标签, 由于多聚组氨酸的分子量较小, 空间位阻较小不影响荧光素酶的空间构象, NLuc 据文献报道可溶性尚可, 所以我们最终选择相对简单的多聚组氨酸作为纯化标签。我们尝试用不同浓度的咪唑缓冲液洗脱目标蛋白, 随着咪唑浓度的升高, 非特异性吸附的杂蛋白不断被冲出, 最终用 300 mmol/L 的咪唑缓冲液洗脱得到了较为纯净的目的蛋白。

而之后尝试用阴/阳离子交换柱对产物进行纯化, 但效果均不明显, 且由于原始纯化产物纯度已经较高, 所以在切掉多聚组氨酸标签后, 我们直接选择用分子筛去除盐类与其他分子量差异较大的杂质即可。经两步纯化后的 NLuc 在合适的缓冲液中可长期保存在 4 °C 环境下维持蛋白活性。

3.2 NLuc 蛋白的荧光素酶活性测定

我们通过比较 NLuc 与传统的萤火虫/海肾荧光蛋白发现, NLuc 单分子的检测下限远低于其他类似的检测系统, 发光效率更高。因为更灵敏的发光效率也可以有效降低背景噪音, 对仪器与环境的要求更低, 而由于 NLuc 仅有 19 ku, 是目前分子量最小的荧光素酶蛋白, 且其稳定性相当高, 所以作为标记蛋白进行蛋白改造时就有更广泛的应用前景。

3.3 NLuc 荧光素酶的应用前景

传统荧光素酶 (如海肾荧光素酶、萤火虫荧光素酶) 自发现以来在蛋白检测的领域结合已有的传统荧光素酶已经有了较多的应用, 比如使用生物发光共振能量转移 (BRET) 检测蛋白相互作用^[14], 作为标记物进行生物体内的荧光示踪

实验^[15-16]等, 但分子量较大的荧光素酶会限制该方法的使用, 比如不宜形成融合蛋白、容易诱发生物体免疫反应等。而我们所研究的纳米荧光素酶由于其分子量小, 发光效率高等优势, 将比传统荧光素酶获得更广泛的应用。

目前, 该荧光素酶已经有人尝试在诸多领域中使用, 如白血病治疗以及药物筛选^[17], G 蛋白偶联受体的相关研究^[18], 胃饥饿素及其配体的相关实验^[19]等。而在我们后续的实验中, 已经成功地将 NLuc 连接到其他抗体蛋白的氨基端或羧基端形成融合蛋白, 然后用同样的检测系统设计荧光素酶实验, 对其他目标蛋白进行体内、体外的定量分析。比如用抗 α -synuclein 的纳米抗体携带荧光素酶来研究 α -synuclein 的聚集水平与浓度, 从而对帕金森症的早期诊断提供建议; 或使用融合了 NLuc 及 PDL1 抗体的重组蛋白来建立灵敏的 PDL1 检测系统, 以对肿瘤患者的术后康复水平进行评估^[20]等。

我们也筛选出了几种重组 NLuc 的结晶条件, 并在上海光源 BL17U1 衍射线站收集了衍射数据, 解析了 NLuc 蛋白的晶体结构。我们希望进一步根据其结构改进 NLuc, 继续提高其发光能力和稳定性, 使之可以在更多的科研领域发挥作用, 但 TOMABECHI 等^[21]已在近期报道了 NLuc 的晶体结构, 与我们得到的结果一致, 因此在本研究中未对 NLuc 的晶体结构进行深入讨论。

[参考文献]

- [1] MCELROY W D, GREEN A A. Enzymatic properties of bacterial luciferase [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1955, 56 (1): 240.
- [2] FRIEDLAND J, HASTINGS J W. Nonidentical subunits of bacterial luciferase: their isolation and recombination to form active enzyme [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1967, 58 (6): 2336.
- [3] OW D W, JR D E W, HELINSKI D R, et al. Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants [J]. Science, 1986, 234 (4778): 856.
- [4] HERBST R, GAST K, SECKLER R. Folding of firefly (*Photinus pyralis*) luciferase: aggregation and reactivation of unfolding intermediates [J]. Biochemistry, 1998, 37 (18): 6586.

- [5] OBA Y, SATO M, OHTA Y, et al. Identification of paralogous genes of firefly luciferase in the Japanese firefly, *Luciola cruciata* [J]. *Gene*, 2006, 368: 53.
- [6] LEGOCKI R P, LEGOCKI M, BALDWIN T O, et al. Bioluminescence in soybean root nodules: demonstration of a general approach to assay gene expression *in vivo* by using bacterial luciferase [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1986, 83 (23): 9080.
- [7] SHIMOMURA O, MASUGI T, JOHNSON F H, et al. Properties and reaction mechanism of the bioluminescence system of the deep-sea shrimp *Oplophorus gracilorostri* [J]. *Biochemistry*, 1978, 17 (6): 994.
- [8] INOUE S, WATANABE K, NAKAMURA H, et al. Secretional luciferase of the luminous shrimp *Oplophorus gracilirostris*: cDNA cloning of a novel imidazopyrazinone luciferase (1) [J]. *FEBS Letters*, 2000, 481 (1): 19.
- [9] HALL M P, UNCH J, BINKOWSKI B F, et al. Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate [J]. *ACS Chemical Biology*, 2012, 7 (11): 1848.
- [10] SONG G, JIANG Q, XU T, et al. A convenient luminescence assay of ferroportin internalization to study its interaction with hepcidin [J]. *FEBS Journal*, 2013, 280 (8): 1773.
- [11] ZHANG L, SONG G, XU T, et al. A novel ultrasensitive bioluminescent receptor-binding assay of INSL3 through chemical conjugation with nanoluciferase [J]. *Biochimie*, 2013, 95 (12): 2454.
- [12] MACHLEIDT T, WOODROOFE C C, SCHWINN M K, et al. NanoBRET – A novel BRET platform for the analysis of protein-protein interactions [J]. *ACS Chemical Biology*, 2015, 10 (8): 1797.
- [13] STUDIER F W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures [J]. *Protein Expression and Purification*, 2005, 41 (1): 207.
- [14] ALAM R, KARAM L M, DOANE T L, et al. Near infrared bioluminescence resonance energy transfer from firefly luciferase-quantum dot bionanoconjugates [J]. *Nanotechnology*, 2014, 25 (49): 495606.
- [15] DMELLO S, SALEM A K, HONG L, et al. Characterization and evaluation of the efficacy of cationic complex mediated plasmid DNA delivery in human embryonic palatal mesenchyme cells [J]. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2016, 10 (11): 927.
- [16] YOUNG N A, BRUSS M S, GARDNER M, et al. Oral administration of nano-emulsion curcumin in mice suppresses inflammatory-induced NFkappaB signaling and macrophage migration [J]. *PloS One*, 2014, 9 (11): e111559.
- [17] HE S X, SONG G, SHI J P, et al. Nanoluciferase as a novel quantitative protein fusion tag: application for overexpression and bioluminescent receptor-binding assays of human leukemia inhibitory factor [J]. *Biochimie*, 2014, 106: 140.
- [18] LIU Y, SONG G, SHAO X X, et al. Quantitative measurement of cell membrane receptor internalization by the nanoluciferase reporter: using the G protein-coupled receptor RXFP3 as a model [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2015, 1848 (2): 688.
- [19] LIU Y, SHAO X X, ZHANG L, et al. Novel bioluminescent receptor-binding assays for peptide hormones: using ghrelin as a model [J]. *Amino Acids*, 2015, 47 (10): 2237.
- [20] ZHENG Z, BU Z, LIU X, et al. Level of circulating PD-L1 expression in patients with advanced gastric cancer and its clinical implications [J]. *Chinese Journal of Cancer Research*, 2014, 26 (1): 104.
- [21] TOMABECHI Y, HOSOYA T, EHARA H, et al. Crystal structure of nanoKAZ: the mutated 19 kDa component of *Oplophorus* luciferase catalyzing the bioluminescent reaction with coelenterazine [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 470 (1): 88.