

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103820410 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 28

(21) 申请号 201210464989. 2

(22) 申请日 2012. 11. 16

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 王江云 周庆 胡美荣 张维
姜丽 柯莎 周娟作 江欢欢

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 陈晓娜

(51) Int. Cl.

C12N 9/10 (2006. 01)

C12N 1/21 (2006. 01)

C12N 9/02 (2006. 01)

C12N 9/88 (2006. 01)

C12P 21/00 (2006. 01)

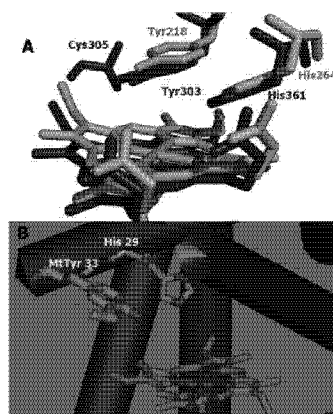
权利要求书2页 说明书10页
序列表8页 附图7页

(54) 发明名称

3- 甲硫酪氨酸翻译系统及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种氨酰基-tRNA 合成酶突变体,其含有的氨基酸序列选自由 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列和 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列的保守性变体组成的组,所述保守性变体具有与 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列相同的酶活性。本发明提供一种 3- 甲硫酪氨酸翻译系统,其包含:(i) 3- 甲硫酪氨酸;(ii) 本发明的正交氨酰基-tRNA 合成酶;(iii) 正交 tRNA,其中所述正交氨酰基-tRNA 合成酶用所述 3- 甲硫酪氨酸优先氨酰化所述正交 tRNA;和 (iv) 编码目标蛋白质的核酸,其中所述核酸含有所述正交 tRNA 特异性识别的至少一个选择密码子。



1. 一种正交氨酰基-tRNA 合成酶,其含有的氨基酸序列选自由 SEQ ID NO :4 所示氨基酸序列和 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列的保守性变体组成的组,所述保守性变体具有与 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列相同的酶活性,所述正交氨酰基-tRNA 合成酶命名为正交 3- 甲硫酪氨酸氨酰基-tRNA 合成酶。

2. 一种 3- 甲硫酪氨酸翻译系统,所述系统包含:

(i) 3- 甲硫酪氨酸;

(ii) 权利要求 1 所述的正交氨酰基-tRNA 合成酶;

(iii) 正交 tRNA,其包含 SEQ ID NO :1 所示的多核苷酸序列;其中所述正交氨酰基-tRNA 合成酶用所述 3- 甲硫酪氨酸优先氨酰化所述正交 tRNA ;和

(iv) 编码目标蛋白质的核酸,其中所述核酸含有所述正交 tRNA 特异性识别的至少一个选择密码子。

3. 如权利要求 2 所述的翻译系统,其特征在于,所述正交 tRNA 是琥珀抑制型 tRNA,所述选择密码子是琥珀密码子,并且所述翻译系统还包含编码正交氨酰基-tRNA 合成酶的核苷酸序列。

4. 一种宿主细胞,其包含编码权利要求 1 所述的正交氨酰基-tRNA 合成酶的核苷酸序列和相对应的正交 tRNA 序列。

5. 如权利要求 4 所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是真细菌细胞,优选大肠杆菌细胞。

6. 一种产生在至少一个所选位置定点特异性插入 3- 甲硫酪氨酸的突变蛋白质的方法,所述方法包括下述步骤:

(a) 提供权利要求 2 所述的 3- 甲硫酪氨酸翻译系统,该系统包含:

(i) 3- 甲硫酪氨酸;

(ii) 权利要求 1 所述的正交氨酰基-tRNA 合成酶;

(iii) 正交 tRNA,其包含 SEQ ID NO :1 所示的多核苷酸序列;其中所述正交氨酰基-tRNA 合成酶用所述 3- 甲硫酪氨酸优先氨酰化所述正交 tRNA ;和

(iv) 编码所述目标蛋白质的核酸,其中所述核酸在所选的位置包含所述正交 tRNA 特异性识别的至少一个选择密码子;和

(b) 将所述正交 tRNA 序列和编码所述正交氨酰基-tRNA 合成酶的核苷酸序列以及编码所述目标蛋白质的核酸序列克隆并转化到适当的宿主细胞中,在培养基中加入 3- 甲硫酪氨酸,在所述目标蛋白质的翻译期间,3- 甲硫酪氨酸氨酰化的正交 tRNA 识别编码所述目标蛋白质的 mRNA 上的选择密码子以及 3- 甲硫酪氨酸,从而介导 3- 甲硫酪氨酸定点特异性插入所述选择密码子对应的氨基酸位置,从而产生在所选位置含 3- 甲硫酪氨酸的所述目标蛋白质。

7. 如权利要求 6 所述的方法,其中所述正交 tRNA 是琥珀抑制型 tRNA,并且所述选择密码子是琥珀密码子。

8. 生产含有 3- 甲硫酪氨酸的肌红蛋白突变体的方法,其利用权利要求 6 所述的方法,其中所用的编码肌红蛋白突变体的核酸序列在适当的位置包含所述正交 tRNA 特异性识别的选择密码子,在肌红蛋白的翻译期间,3- 甲硫酪氨酸定点插入到所述选择密码子对应的氨基酸位置,从而产生含有 3- 甲硫酪氨酸的肌红蛋白突变体。

9. 由权利要求8所述的方法获得的含有3-甲硫酪氨酸的肌红蛋白突变体,其氨基酸序列为 SEQ ID NO :6,所述肌红蛋白突变体具有亚硝酸盐还原酶活性。

10. 一种酪氨酸酚裂解酶突变体,所述酪氨酸酚裂解酶突变体催化2-羟基苯硫醚生成3-甲硫酪氨酸,其氨基酸序列为:

(1) SEQ ID NO :9 所示的氨基酸序列,或

(2) 将 SEQ ID NO :9 所示的氨基酸序列经过一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加且具有与 SEQ ID NO :9 所示的氨基酸序列相同的催化2-羟基苯硫醚生成3-甲硫酪氨酸的酶活性的由 SEQ ID NO :9 所示的氨基酸序列衍生的氨基酸序列。

3- 甲硫酪氨酸翻译系统及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物化学领域。具体地,本发明提供氨酰基-tRNA 合成酶突变体,其含有的氨基酸序列选自 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列和 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列的保守性变体组成的组,所述保守性变体具有与 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列相同的酶活性。本发明还涉及一种 2- 氨基-3-(4- 羟基-3-(甲硫) 苯基) 丙酸 (简称 3- 甲硫酪氨酸,简称为 MtTyr) 翻译系统。更具体地,本发明涉及利用正交 tRNA、正交氨酰基-tRNA 合成酶的配对将 3- 甲硫酪氨酸定点特异性插入目标蛋白质的 3- 甲硫酪氨酸翻译系统,和利用所述翻译系统在目标蛋白质中定点特异性插入 3- 甲硫酪氨酸的方法。本发明还涉及用这套翻译系统和这种方法产生的含有 3- 甲硫酪氨酸的突变蛋白质,例如,插入 3- 甲硫酪氨酸的肌红蛋白突变体,以及插入 3- 甲硫酪氨酸的突变蛋白质的应用。

背景技术

[0002] 蛋白质是所有生命体及其生命活动的主要物质基础。在整个蛋白中,约有三分之一的蛋白都是一些含金属的蛋白,称为金属蛋白 (Metalloprotein) 或金属酶 (Metalloenzyme)。金属酶中普遍存在通过硫醚键结合的 Tyr-Cys 辅助因子,例如:半乳糖氧化酶 (GO), 乙二醛氧化酶,半胱氨酸双加氧酶 (CDO), 亚硫酸盐还原酶 (NirA) 以及 *Thioalkalivibrio nitratreducens* 细胞色素 c 亚硝酸盐还原酶 (TvNiR)。在上述的所有酶中,酪氨酸苯环上的 C3 原子与邻近半胱氨酸的 S 原子均能自发地形成共价键,而不需要任何外源性蛋白质催化。因此,这种 Tyr-Cys 辅助因子的基本功能目前已被多位合成化学家、物理化学家、酶学家和结构生物学家深入研究,并且取得了巨大的突破。尽管如此,关于该辅助因子在酶催化过程中的确切作用至今仍无人知晓,而限制其研究的瓶颈问题是无法通过传统的定点诱变方法来探测这种翻译后修饰的结构。为了克服这种限制,有人合成出模拟 Tyr-Cys 共价交联的化合物来进行研究。结果表明, Tyr-Cys 共价交联基团可以显著降低苯环侧链的 pKa 值和还原电位,因此促进了酶作用底物和 Tyr-Cys 辅助因子之间的质子耦合电子转移,而这对优化酶活性是至关重要的因素。

[0003] 本发明拟通过在肌红蛋白中定点特异性插入 3- 甲硫酪氨酸,使其模拟 *Thioalkalivibrio nitratreducens* 细胞色素 c 亚硝酸盐还原酶 (TvNiR) 活性中心的 Tyr-Cys 辅助因子,该研究将为金属酶中 Tyr-Cys 辅助因子的催化机制提供研究基础。本研究现已开发了在原核和真核生物中将各种非天然氨基酸体内位点特异性地定点插入蛋白质的通用方法。这些方法依赖于正交蛋白质翻译组分,所述组分识别合适的选择密码子 (selector codon) 从而能在体内多肽翻译期间将所需的非天然氨基酸插入限定位置。这些方法利用识别选择密码子的正交 tRNA (O-tRNA), 而相应的特异性正交氨酰基-tRNA 合成酶 (O-RS) 用非天然氨基酸加载该 O-tRNA。这些组分不与宿主生物体内的任何内源性 tRNA、氨酰基-tRNA 合成酶 (RS)、氨基酸或密码子交叉反应 (即,它必须是正交的)。利用这种正交 tRNA-RS 配对可能遗传编码大量结构各异的非天然氨基酸。

[0004] 本领域普遍知道利用适合于制备含一个或多个非天然氨基酸的蛋白质的正交

翻译系统,例如产生正交翻译系统的通用方法。例如,参见国际公布号 WO 2002/086075,其发明名称为“METHODS AND COMPOSITION FOR THE PRODUCTION OF ORTHOGONAL tRNA-AMINOACYL-tRNA SYNTHETASE PAIRS”;WO 2002/085923,其发明名称为“IN VIVO INCORPORATION OF UNNATURAL AMINO ACIDS”;WO 2004/094593,其发明名称为“EXPANDING THE EUKARYOTIC GENETIC CODE”。定点特异性插入非天然氨基酸的正交翻译系统及它们的产生和使用方法的其他讨论还可参见 Wang 和 Schultz, Chem. Commun. (Camb) 1: 1-11(2002); Wang 和 Schultz, Angewandte Chemie Int. Ed. 44(1): 34-66(2005); Xie 和 Schultz, Methods 36(3): 227-238(2005); Xie 和 Schultz, Curr. Opin. in Chemical Biology 9(6): 548-554(2005); Wang 等, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 35: 225-249(2006)。

发明内容

[0005] 1、技术问题

[0006] 本发明提供一种氨酰基-tRNA 合成酶突变体,其含有的氨基酸序列选自 SEQ ID NO:4 所示氨基酸和 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列的保守性变体组成的组,所述保守性变体具有与 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列相同的酶活性。这种氨酰基-tRNA 合成酶突变体能够用 3-甲硫酪氨酸(简称为 MtTyr) 优先氨酰化与之配对的正交 tRNA,从而在翻译的氨基酸序列中插入 MtTyr。这是本发明人首次发现的,相应地,在本发明中将其命名为正交 3-甲硫酪氨酸氨酰基-tRNA 合成酶(MtTyrRS)。

[0007] 本发明还提供一种酪氨酸酚裂解酶(Tyrosine phenol lyase,简称为 TPL) 突变体,所述酪氨酸酚裂解酶突变体可以高效地催化 2-羟基苯硫醚生成 3-甲硫酪氨酸,其氨基酸序列为:

[0008] (1) SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列,或

[0009] (2) 将 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列经过一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加且具有与 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列相同的催化 2-羟基苯硫醚生成 3-甲硫酪氨酸的酶活性的由 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列衍生的氨基酸序列。

[0010] 此外,本领域技术人员应该理解,在本发明中,术语“能够催化 2-羟基苯硫醚生成 3-甲硫酪氨酸的酪氨酸酚裂解酶突变体”不仅包括 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列,还包括 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列的功能片段或功能衍生物,即,所述功能片段保留催化 2-羟基苯硫醚生成 3-甲硫酪氨酸的酶活性,所述功能衍生物是指将 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列经过一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加且具有与 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列相同的催化 2-羟基苯硫醚生成 3-甲硫酪氨酸的酶活性的由 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列衍生的氨基酸序列。

[0011] 这种能够催化 2-羟基苯硫醚生成 3-甲硫酪氨酸的酪氨酸酚裂解酶突变体是本发明人首次发现的。

[0012] 在上述发现的基础上,本发明提供一种利用正交 tRNA、正交氨酰基-tRNA 合成酶的配对将 3-甲硫酪氨酸定点特异性插入目标蛋白质的 3-甲硫酪氨酸翻译系统,和利用所述翻译系统在目标蛋白质中定点特异性插入 3-甲硫酪氨酸的方法。本发明还涉及用这种翻译系统和这种方法产生的含有 3-甲硫酪氨酸的突变蛋白质及其应用。

[0013] 因此,本发明的目的在于提供利用正交 tRNA、正交氨酰基 -tRNA 合成酶的配对将 3- 甲硫酪氨酸定点特异性插入蛋白质的 3- 甲硫酪氨酸翻译系统,并且提供利用该翻译系统在目标蛋白质中定点特异性插入 3- 甲硫酪氨酸的方法。

[0014] 本发明还提供利用本发明的 3- 甲硫酪氨酸翻译系统产生的含有至少一个 3- 甲硫酪氨酸的突变蛋白质。在本发明的优选方面中,本发明人利用这种方法将 3- 甲硫酪氨酸定点特异性插入目的蛋白中,所述目的蛋白包括,但不限于,肌红蛋白 (Myoglobin)。通过本发明的方法得到的包含 3- 甲硫酪氨酸的肌红蛋白突变体蛋白具有亚硝酸盐还原酶活性。然而,本领域技术人员应该理解,本发明的方法也可以用于在肌红蛋白之外的多种蛋白中定点特异性插入 3- 甲硫酪氨酸,并不局限于该蛋白。

[0015] 2、技术方案

[0016] 本发明人经过筛选,获得一种正交氨酰基 -tRNA 合成酶,其含有的氨基酸序列选自 SEQ ID NO :4 所示氨基酸序列和 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列的保守性变体组成的组,所述保守性变体具有与 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列相同的酶活性,在本发明中将其命名为正交 3- 甲硫酪氨酸氨酰基 -tRNA 合成酶 (MtTyrRS)。并且,本发明人利用所述正交氨酰基 -tRNA 合成酶,研发了 3- 甲硫酪氨酸翻译系统。

[0017] 本领域技术人员应该理解,在本发明中,除了 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列之外,术语“本发明的正交氨酰基 -tRNA 合成酶”或“正交 3- 甲硫酪氨酸氨酰基 -tRNA 合成酶”还包括 SEQ ID NO :4 所示氨基酸序列的保守性变体,只要所述保守性变体具有与 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列相同的酶活性即可;并且还包含将 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列经过一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加且具有与 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列相同的酶活性的由 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列衍生的氨基酸序列。

[0018] 具体来说,本发明提供在体内(例如在宿主细胞内)识别选择密码子(selector codon)如琥珀终止密码子(TAG)从而将非天然氨基酸 3- 甲硫酪氨酸定点特异性插入到多肽链中的 3- 甲硫酪氨酸翻译系统。所述 3- 甲硫酪氨酸翻译系统包含不与宿主细胞翻译机制相互作用的正交 -tRNA (O-tRNA) 和正交氨酰基 -tRNA 合成酶 (O-RS) 配对。即,宿主细胞内源性氨酰基 -tRNA 合成酶不会识别 O-tRNA。类似地,本发明提供的 O-RS 不以显著水平或者某些情况下不以可检测水平地识别内源性 tRNA。利用所述翻译系统能够产生在翻译过程中定点特异性插入 3- 甲硫酪氨酸的大量蛋白质。

[0019] 在一些方面中,本发明提供 3- 甲硫酪氨酸翻译系统。所述翻译系统包含:

[0020] (a) 非天然氨基酸,即 3- 甲硫酪氨酸,

[0021] (b) 本发明的正交氨酰基 -tRNA 合成酶 (O-RS), 和

[0022] (c) 正交 tRNA (O-tRNA), 其包含 SEQ ID NO :1 所示的多核苷酸序列,其中所述正交氨酰基 -tRNA 合成酶用所述非天然氨基酸(即 3- 甲硫酪氨酸),优先氨酰化所述 O-tRNA。

[0023] 优选地,本发明的 3- 甲硫酪氨酸翻译系统还包含编码目标蛋白质的核酸,其中所述核酸含有由正交 tRNA (O-tRNA) 特异性识别的至少一个选择密码子,优选地为琥珀密码子。更优选地,本发明的 3- 甲硫酪氨酸翻译系统还包含编码正交氨酰基 -tRNA 合成酶的核苷酸序列。

[0024] 所述系统中所用的正交氨酰基 -tRNA 合成酶 (O-RS) 即为本发明人首次发现的氨酰基 tRNA 合成酶突变体,其含有的氨基酸序列选自 SEQ IDNO :4 所示氨基酸序列和 SEQ

ID NO:4 所示的氨基酸序列的保守性变体组成的组,所述保守性变体具有与 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列相同的酶活性。

[0025] 在本发明的优选方面中,本发明提供一种 3- 甲硫酪氨酸翻译系统,所述系统包含:

[0026] (i) 3- 甲硫酪氨酸;

[0027] (ii) 本发明的正交氨酰基 -tRNA 合成酶;

[0028] (iii) 正交 tRNA,其包含 SEQ ID NO:1 所示的多核苷酸序列;其中所述正交氨酰基 -tRNA 合成酶用所述 3- 甲硫酪氨酸优先氨酰化所述正交 tRNA;和

[0029] (iv) 编码目标蛋白质的核酸,其中所述核酸含有所述正交 tRNA 特异性识别的至少一个选择密码子。

[0030] 优选地,所述 3- 甲硫酪氨酸翻译系统还包含编码本发明的正交氨酰基 -tRNA 合成酶的核苷酸序列。

[0031] 该翻译系统中的各种组分可以衍生自各种物种来源,例如,该翻译系统中的各组分衍生自詹氏甲烷球菌 (*Methanococcus jannaschii*)。例如,正交 tRNA (O-tRNA) 为古菌来源的反密码子突变为与琥珀密码互补的酪氨酸 tRNA。在一些实施方式中,O-tRNA 是琥珀抑制型 tRNA。在一些实施方式中,O-tRNA 包含 SEQ ID NO:1 所示的多核苷酸序列,优选地,O-tRNA 的序列如 SEQ ID NO:1 所示。在一个实施方式中,用于该系统的正交氨酰基 -tRNA 合成酶可以包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列及该序列的保守变体。在优选的实施方案中,用于该系统的正交氨酰基 -tRNA 合成酶的氨基酸序列为 SEQ ID NO:4 所示。

[0032] 在一些方面中,本发明的 3- 甲硫酪氨酸翻译系统还包含编码目标蛋白质的核酸,其中所述核酸具有由正交 tRNA (O-tRNA) 特异性识别的至少一个选择密码子。在优选方面中,所述正交 tRNA 是琥珀抑制型 tRNA,并且所述选择密码子是琥珀密码子。

[0033] 在一些方面中,本发明提供包含编码本发明的正交氨酰基 -tRNA 合成酶的核苷酸序列和相对应的正交 tRNA 序列的宿主细胞。所用的宿主细胞不作具体限定,只要正交氨酰基 -tRNA 合成酶和正交 tRNA 在它们的宿主细胞环境中保留它们的正交性即可。例如,所述宿主细胞可以是真细菌细胞,优选大肠杆菌。

[0034] 本发明还提供产生在至少一个所选位置定点特异性插入 3- 甲硫酪氨酸的突变蛋白质的方法。所述方法利用上述 3- 甲硫酪氨酸翻译系统。所述方法通常包括下述步骤:

[0035] (a) 提供含有以下组分的 3- 甲硫酪氨酸翻译系统的步骤:

[0036] (i) 非天然氨基酸,即 3- 甲硫酪氨酸;

[0037] (ii) 本发明的正交氨酰基 -tRNA 合成酶 (O-RS);

[0038] (iii) 正交 tRNA (O-tRNA),其包含 SEQ ID NO:1 所示的多核苷酸序列,其中所述 O-RS 用 3- 甲硫酪氨酸优先氨酰化所述 O-tRNA;和

[0039] (iv) 编码目标蛋白质的核酸,其中所述核酸含有 O-tRNA 特异性识别的至少一个选择密码子(任选地为琥珀密码子);

[0040] (b) 将所述正交 tRNA 序列和编码所述正交氨酰基 -tRNA 合成酶的核苷酸序列以及编码所述目标蛋白质的核酸序列克隆并转化到适当的宿主细胞中,在培养基中加入 3- 甲硫酪氨酸,在所述木匾蛋白质的翻译过程中,3- 甲硫酪氨酸氨酰化的正交 RNA 识别编码所述目标蛋白质的 mRNA 上的选择密码子以及 3- 甲硫酪氨酸,从而介导 3- 甲硫酪氨酸定点特

异性插入所述选择密码子对应的氨基酸位置,从而产生在所选位置含有 3- 甲硫酪氨酸的突变蛋白质。

[0041] 本领域技术人员应该理解,适当的重组载体的构建和宿主细胞的筛选可以通过常规分子克隆技术和筛选技术实现。

[0042] 本领域技术人员应该理解,在步骤 (b) 中,将所述正交 tRNA 序列和编码所述正交氨酰基 -tRNA 合成酶的核苷酸序列以及编码所述目标蛋白质的核酸序列克隆并转化到适当的宿主细胞中可以通过多种方式进行,例如,将所述正交 tRNA 序列、编码所述正交氨酰基 -tRNA 合成酶的核苷酸序列以及编码所述目标蛋白质的核酸序列分别可操作性地连接到适当的载体中,再以任意次序或三者共同转化到适当的宿主细胞中;或者,也可以将所述正交 tRNA 序列和编码所述正交氨酰基 -tRNA 合成酶的核苷酸序列可操作性地连接到一个适当的载体中(两种序列之间有或无适当的接头连接),将编码所述目标蛋白质的核酸序列可操作性地连接到另一种不同的适当的载体中,然后将构建好的两种重组载体共同转化到适当的宿主细胞中;或者,也可以将所述正交 tRNA 序列和编码所述目标蛋白质的核酸序列可操作性地连接到一个适当的载体中(两种序列之间有或无适当的接头连接),将编码所述正交氨酰基 -tRNA 合成酶的核苷酸序列可操作性地连接到另一种不同的适当的载体中,然后将构建好的两种重组载体共同转化到适当的宿主细胞中。或者,也可以将正交 tRNA 序列和编码所述正交氨酰基 -tRNA 合成酶的核苷酸序列以及编码目标蛋白质的核酸序列以任意适当的顺序可操作性地连接在一起,然后克隆到一个载体上,最后转化到适当的宿主细胞中。上述克隆方案都是可行的,本领域技术人员可以根据实验的需要容易地进行适当的选择。

[0043] 另外,本领域技术人员还应该理解,为了避免宿主细胞对外源重组载体的“踢除”效应,往往选择用带有不同抗生素标记的载体来构建需要共同转化到同一宿主细胞中的核酸序列片段。对于适当的载体的选择、重组载体的构建、宿主细胞的转化或转染等等,都是本领域的常规技术,例如,可以参见美国冷泉港实验室出版的分子克隆手册。

[0044] 在所述方法的一些实施方式中,提供翻译系统的步骤包括通过定点诱变使野生型氨酰基 -tRNA 合成酶的氨基酸结合口袋发生突变,选择用所述非天然氨基酸(即 3- 甲硫酪氨酸)优先氨酰化所述 0-tRNA 的氨酰基 -tRNA 合成酶突变体(即,本发明所用的正交氨酰基 -tRNA 合成酶)。所述选择步骤包括定点诱变后从得到的氨酰基 -tRNA 合成酶分子库进行所述 0-RS 的正选择和负选择(参见下述实施例 2)。在一些实施方式中,提供翻译系统的步骤还包括提供 0-tRNA 的序列,0-tRNA 为古菌来源的反密码子突变为与琥珀密码互补的酪氨酸 tRNA,例如,所述 0-tRNA 是琥珀抑制型 tRNA,或者 0-tRNA 包含 SEQ ID NO:1 所示的多核苷酸序列。在这些方法中,提供翻译系统的步骤还包括提供含有所述翻译系统所用的琥珀选择密码子的编码目标蛋白质的核酸。

[0045] 还可在宿主细胞内实施产生含有 3- 甲硫酪氨酸的突变蛋白质的方法。在这些情况中,提供的宿主细胞包含本发明的 3- 甲硫酪氨酸翻译系统(即,包含编码本发明的 0-RS 的核苷酸序列、0-tRNA 序列和含有至少一个选择密码子的编码目标蛋白质的核酸),而在适宜的培养条件下(例如,在培养基中添加 3- 甲硫酪氨酸等)培养该宿主细胞可导致在所述目标蛋白质中定点特异性插入 3- 甲硫酪氨酸。在一些实施方式中,提供步骤包括提供真细菌宿主细胞(例如,大肠杆菌)。

[0046] 本发明还提供生产含有 3- 甲硫酪氨酸的肌红蛋白突变体的方法,其利用上述产生在至少一个所选位置定点特异性插入 3- 甲硫酪氨酸的突变蛋白质的方法,其中所用的编码肌红蛋白突变体的核酸序列在适当的位置包含所述正交 tRNA 特异性识别的选择密码子,在肌红蛋白的翻译期间,3- 甲硫酪氨酸定点插入到所述选择密码子对应的氨基酸位置,从而产生含有 3- 甲硫酪氨酸的肌红蛋白突变体。

[0047] 优选地,本发明还提供生产含有 3- 甲硫酪氨酸的肌红蛋白突变体的方法,所述方法利用上述 3- 甲硫酪氨酸翻译系统进行,所述方法通常包括下述步骤:

[0048] (a) 提供含有以下组分的 3- 甲硫酪氨酸翻译系统的步骤:

[0049] (i) 3- 甲硫酪氨酸;

[0050] (ii) 正交氨酰基-tRNA 合成酶 (O-RS);

[0051] (iii) 正交 tRNA (O-tRNA),其包含 SEQ ID NO:1 所示的多核苷酸序列,其中所述 O-RS 用所述 3- 甲硫酪氨酸优先氨酰化所述 O-tRNA;和

[0052] (iv) 编码所述肌红蛋白的核酸,例如,但不限于,SEQ ID NO:5,其中所述核酸含有所述 O-tRNA 特异性识别的至少一个选择密码子(任选地为琥珀密码子);

[0053] (b) 将所述正交 tRNA 序列和编码所述正交氨酰基-tRNA 合成酶的核苷酸序列以及编码所述目标蛋白质的核酸序列克隆并转化到适当的宿主细胞中,在培养基中加入 3- 甲硫酪氨酸,在所述目标蛋白质(即肌红蛋白)的翻译过程中,3- 甲硫酪氨酸氨酰化的正交 RNA 识别编码肌红蛋白的 mRNA 上的选择密码子以及 3- 甲硫酪氨酸,从而介导 3- 甲硫酪氨酸定点插入所述目标蛋白质的特定位置(即,所述选择密码子对应的氨基酸位置),之后通过模拟 *Thioalkalivibrio nitratireducens* 细胞色素 c 亚硝酸盐还原酶 (TvNiR) 活性中心的 Tyr-Cys 辅助因子从而增强其酶活性。

[0054] 本发明还提供利用本发明的 3- 甲硫酪氨酸翻译系统产生的具有亚硝酸盐还原酶活性的含有 3- 甲硫酪氨酸的肌红蛋白突变体,在野生型肌红蛋白的 33 位引入 3- 甲硫酪氨酸,同时将 29 位亮氨酸突变为组氨酸,所述肌红蛋白突变体的氨基酸序列为 SEQ ID NO:6。

[0055] 最后,本发明人经过筛选,还获得了一种能够催化 2- 羟基苯硫醚生成 3- 甲硫酪氨酸的酪氨酸酚裂解酶(简称为 TPL) 突变体,其氨基酸序列为:

[0056] (1) SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列,或

[0057] (2) 将 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列经过一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加且具有与 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列相同的催化 2- 羟基苯硫醚生成 3- 甲硫酪氨酸的酶活性的由 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列衍生的氨基酸序列。

[0058] 分子模型表明,与野生型酪氨酸酚裂解酶相比较,该突变体的 36 位氨基酸突变为亮氨酸后显著地扩大了酶口袋,使酶和底物可以更好地作用,从而高效地催化 2- 羟基苯硫醚生成 3- 甲硫酪氨酸。酶催化反应液经过 HPLC 纯化后产率可达到 40%,最终获得较高产量的 3- 甲硫酪氨酸。这也是通过进化 TPL 突变体来扩大其底物范围的首次应用。

[0059] 此外,本领域技术人员应该理解,在本发明中,术语“能够催化 2- 羟基苯硫醚生成 3- 甲硫酪氨酸的酪氨酸酚裂解酶突变体”不仅包括 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列,还包括 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列的功能片段或功能衍生物,即,所述功能片段保留催化 2- 羟基苯硫醚生成 3- 甲硫酪氨酸的酶活性,所述功能衍生物是指将 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列经过一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加且具有与 SEQ ID NO:9 所示的氨基

酸序列相同的催化 2-羟基苯硫醚生成 3-甲硫酪氨酸的酶活性的由 SEQ ID NO :9 所示的氨基酸序列衍生的氨基酸序列。

[0060] 3、有益效果

[0061] 通过在肌红蛋白中定点特异性插入非天然的氨基酸,即 3-甲硫酪氨酸 (MtTyr),我们成功地设计出了一个亚硝酸盐还原酶功能模型 MtTyrMb(即,与野生型肌红蛋白相比,在氨基酸位点 33 位插入 3-甲硫酪氨酸,同时将 29 位亮氨酸突变为组氨酸的肌红蛋白突变体),它可以高效地催化强羟胺还原成铵根离子,并且其酶活性是对照的肌红蛋白突变体 TyrMb(即,与野生型肌红蛋白相比,33 位苯丙氨酸突变为酪氨酸,同时将 29 位亮氨酸突变为组氨酸的肌红蛋白突变体,其可以按照常规分子克隆和突变方法制备)的四倍。该研究首次直接证实了酪氨酸残基上的 3-甲硫取代基可以显著提高酶活性。

[0062] 同时,由于野生型酪氨酸酚裂解酶无法催化生成 3-甲硫酪氨酸,我们通过进化酪氨酸酚裂解酶 (TPL),使其可以直接催化 2-羟基苯硫醚生成 3-甲硫酪氨酸,得到一种酪氨酸酚裂解酶突变体,其氨基酸序列为 SEQ IDNO :9,使用该酪氨酸酚裂解酶突变体只需一步反应就可以达到 40%的产率,最终能够较容易地获得大量定点插入 3-甲硫酪氨酸的突变蛋白质。

[0063] 本发明中通过 TPL 突变体催化合成的 MtTyr,其结构与 GO、CDO、NirA 和 TvNir 活性中心上经过翻译后修饰的 Tyr-Cys 辅助因子高度相似,因此可以作为模型来详细研究这些金属酶的催化机理,同时也具有在合成生物学和工业催化方面的应用潜力。目前,研究半乳糖氧化酶的定向进化并获得利用单糖作为底物的突变体已成为研究热点,而我们发明设计的 3-甲硫酪氨酸翻译系统,再结合合理性及计算设计方法,可能为解决半乳糖氧化酶的定向进化提供有效的途径。

附图说明

[0064] 从下面结合附图的详细描述中,本发明的上述特征和优点将更明显,其中:

[0065] 图 1 是 TPL 突变体 (SEQ ID NO :9) 催化合成 3-甲硫酪氨酸的反应式;

[0066] 图 2:图 2A 是野生型 TPL 活性中心的晶体结构图,图 2B 是薄层层析法筛选 TPL 突变体;

[0067] 图 3 是 MtTyr 的 HPLC 纯化图谱;

[0068] 图 4 是 MtTyr 的质谱图;

[0069] 图 5 是正交 tRNA、野生型酪氨酰 tRNA 合成酶、本发明的正交氨酰基-tRNA 合成酶、肌红蛋白突变体、酪氨酸酚裂解酶 (TPL) 突变体的序列;

[0070] 图 6:图 6A 是 4TAG-Mb(即,4 位插入 3-甲硫酪氨酸的肌红蛋白突变体)和 MtTyrMb 的 SDS-PAGE 电泳图,图 6B 是 4TAG-Mb 的质谱图;

[0071] 图 7:图 7A 是 *Wolinella succinogenes* 细胞色素 c 亚硝酸盐还原酶和 *Thioalkalivibrio nitratireducens* 细胞色素 c 亚硝酸盐还原酶活性中心的晶体对比结构图;图 7B 是 MtTyrMb 的结构模型图;

[0072] 图 8 是肌红蛋白突变体 (MtTyrMb 和 TyrMb) 和野生型肌红蛋白 (wtMb) 催化还原羟胺的反应对比图;

[0073] 图 9 是 MtTyrMb 催化还原羟胺的核磁共振光谱图;

[0074] 图 10 是肌红蛋白突变体 (MtTyrMb 和 TyrMb) 和野生型肌红蛋白 (wtMb) 催化还原羟胺的反应速率图。

具体实施方式

[0075] 以下通过实施例来进一步阐明本发明。但是应该理解,所述实施例只是举例说明的目的,并不意欲限制本发明的范围和精神。

[0076] 本领域技术人员应该理解,除非特别说明,下述实施例中所用的化学试剂均为可通过商业途径购得的分析纯级别的试剂。

[0077] 实施例 1 :MtTyr 的生物催化合成 (图 1- 图 4)

[0078] 本发明采用生物酶催化的方法,利用从弗氏柠檬酸细菌 (ATCC 8090, 购自美国典型培养物保藏中心 (ATCC)) 中克隆出的酪氨酸酚裂解酶 (TPL) 催化 2- 羟基苯硫醚合成 3- 甲硫酪氨酸,催化反应式见图 1。

[0079] 但是实验结果表明,野生型 TPL 无法催化生成 3- 甲硫酪氨酸。因此,本发明人分析了 TPL 的晶体结构图 (图 2A), 挑选出 448 位苯丙氨酸、36 位苯丙氨酸和 288 位甲硫氨酸, 引入 NNK 突变 ($N = A+T+C+G$; $K = T+G$), 构建成 pEt-TPL 突变库来进行 TPL 的定向进化。从突变库挑选出 96 个单克隆, 用 96 孔板培养过夜后, 加入溶菌酶裂解细胞, 然后加入 2- 羟基苯硫醚、氯化铵和丙酮酸钠, 37°C 孵育 4h, 用茚三酮薄层色谱法检测氨基酸的形成。结果表明 (图 2B), 其中一个克隆成功地催化形成了 3- 甲硫酪氨酸。测序结果显示, 该酪氨酸酚裂解酶突变体的氨基酸序列为 SEQ ID NO :9, 该突变体将野生型 TPL 36 位的苯丙氨酸突变成了亮氨酸。使用该酪氨酸酚裂解酶突变体只需一步反应就可以达到 40% 的产率, 最终能够较容易地获得大量定点插入 3- 甲硫酪氨酸的突变蛋白质。

[0080] 我们将筛选得到的 TPL 突变体进行放大培养, 然后收菌, 离心, 超声破碎, 采用镍柱纯化, 得到突变蛋白酶。取 30mM 乙酸铵、10mM 2- 羟基苯硫醚 (购自北京百灵威公司)、60mM 丙酮酸钠、50mM 巯基乙醇、40 μ M 磷酸吡哆醛和 10mg 突变蛋白酶, 定容至 1L, pH 8.0, 然后室温避光搅拌 3 天。收集水相, 通过 HPLC 分离纯化得到白色粉末 (图 3, 图 4), 产率 40%。(YMC AA12S052503WT column, 12ml/min flow rate, from 10% to 90% CH₃CN, 0.1% TFA (w/v) in water, over the course of 30min). MS :m/z :228 [M+H]⁺; ¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆) :2.35 (s, 3H), 3.00 (m, 2H), 4.12 (t, 1H), 6.73 (d, 1H, J = 8.1), 6.83 (dd, J = 8.1, 1.96, 1H), 6.97 (d, 1H), 8.23 (s, 2H), 9.88 (s, 1H)。

[0081] 以上合成反应所需化学试剂如无特别说明, 均购自 Sigma 公司, 均为分析纯以上级别。

[0082] 另外, 本领域技术人员应该理解, 在本发明中, 术语“能够催化 2- 羟基苯硫醚生成 3- 甲硫酪氨酸的酪氨酸酚裂解酶突变体”不仅包括 SEQ ID NO :9 所示的氨基酸序列, 还包括 SEQ ID NO :9 所示的氨基酸序列的功能片段或功能衍生物, 即, 所述功能片段保留催化 2- 羟基苯硫醚生成 3- 甲硫酪氨酸的酶活性, 所述功能衍生物是将 SEQ ID NO :9 所示的氨基酸序列经过一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加且具有与 SEQ ID NO :9 所示的氨基酸序列相同的催化 2- 羟基苯硫醚生成 3- 甲硫酪氨酸的酶活性的由 SEQ ID NO :9 所示的氨基酸序列衍生的氨基酸序列。

[0083] 实施例 2 :进化 MtTyr 特异性氨酰基 -tRNA 合成酶

[0084] 为了在基因中位点特异性插入 MtTyr, 需要在所用的 *E. coli* 宿主细胞中引入氨酰基-tRNA 合成酶/tRNA 正交对, 这个正交对来源于詹氏甲烷球菌 (*Methanococcus jannaschii*) 琥珀抑制酪氨酰 tRNA ($\text{MjtRNA}_{\text{CUA}}^{\text{Tyr}}$)/酪氨酰 tRNA 合成酶 (MjTyrRS, 野生型, 其氨基酸序列为 SEQ ID NO:2) 对。MjTyrRS 突变库构建在卡纳霉素抗性 pBK 质粒 (购自美国 scripps 研究所 Peter G. Schultz 实验室) 中, 位于该质粒上 *E. coli* 谷氨酰胺合成酶的启动子和终止子之间。所使用的合成酶突变库为 pBk-lib-jw1 库, 该突变库的构建方法为: 在 MjTyrRS 基因上挑选 6 个位点 (Tyr32, Leu65, Phe108, Gln109, Asp158, 和 Leu162) 引入 NNK 突变 ($N = A+T+C+G$; $K = T+G$), 另外 6 个位点 (Ile63, Ala67, His70, Tyr114, Ile159, Val164) 或随机突变为 Gly 或保持不变 (参见 Xie, J.; Liu, W. S.; Schultz, P. G. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2007, 46, 9239-9242; Wang, JY.; Zhang W.; Song WJ; et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 14812-14818)。

[0085] 通过正负筛选来进化特异性识别 MtTyr 的氨酰基-tRNA 合成酶。正筛选质粒包含 $\text{MjtRNA}_{\text{CUA}}^{\text{Tyr}}$, TAG 突变的氯霉素乙酰转移酶基因, 启动表达绿色荧光蛋白的琥珀突变的 T7RNA 聚合酶, 四环素抗性基因。负筛选质粒包含 $\text{MjtRNA}_{\text{CUA}}^{\text{Tyr}}$, 在阿拉伯糖操纵子下的琥珀突变芽孢杆菌 RNA 酶基因, 以及氨基青霉素抗性基因。进行 3 轮正负筛选: 包含有正筛选质粒的 *E. coli* DH10B 细胞作为正筛选寄主细胞。细胞电转 pBk-lib-jw1 库, SOC 培养基 (2% (W/V) 胰蛋白胨, 0.5% (W/V) 酵母粉, 0.05% (W/V) NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl₂, 20mM 葡萄糖) 在 37°C 培养 1 小时。之后换用极限培养基 (GML 极限培养基的配方: M9 盐 / 甘油: 764g Na₂HP0₄·7H₂O 或者 30g Na₂HP0₄, 15g KH₂PO₄, 2.5g NaCl, 5g NH₄Cl, 50ml 甘油, 高压灭菌, pH 7.0; 1M MgSO₄: 高压灭菌; 50mM CaCl₂: 高压灭菌; 25mM FeCl₂: 过滤灭菌; 0.3M 亮氨酸: 溶解于 0.3M NaOH 中, 过滤灭菌; 1L 液体 GML 培养基: 200ml M9 盐 / 甘油, 2ml MgSO₄, 2ml CaCl₂, 2ml FeCl₂, 1ml 亮氨酸) 洗两次, 铺板固体极限培养基 (在液体 GML 培养基中加入 500ml 3% 琼脂粉, 1mM MtTyr, 50mg/L 卡那霉素, 60mg/L 氯霉素, 15mg/L 四环素), 37°C 培养 60 小时。收取细胞, 提取质粒 DNA, 电泳分离, 胶回收。然后, 将经过正筛选的 pBK-lib-jw1 转化到包含负筛选质粒的 DH10B 感受态细胞中。SOC 培养基中恢复 1 小时。之后涂板包含 0.2% 阿拉伯糖 (购自 sigma 公司) 的 LB 固体培养基 (每升培养基含 10g 胰蛋白胨, 5g 酵母粉, 10g NaCl)。37°C 培养 8-12 小时。共重复 3 轮。

[0086] 最后一轮正筛选挑 384 个克隆, 分别点板在含有 1mM MtTyr、氯霉素 60, 80, 100, 120mg/L 的 GML 固体培养基上, 及不包含 MtTyr、但包含氯霉素 0, 20, 40, 60mg/L 的 GML 固体培养基。挑选在在 1mM MtTyr 100mg/L 氯霉素的培养基上生长, 而在 0mM MtTyr 20mg/L 氯霉素培养基中不生长的克隆进行进一步验证。最终挑出 1 个克隆, 插入 3- 甲硫酪氨酸效率最高, 测序表明, 克隆所包含的氨酰基-tRNA 合成酶突变体 (MtTyrRS) 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:4 所示, 其中突变位点为 Tyr32Glu, His70Gly, Asp158Ala 和 Leu162Pro。

[0087] 本领域技术人员应该理解, 在本发明中, 除了 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列之外, 术语“正交氨酰基-tRNA 合成酶”或“正交 3- 甲硫酪氨酸氨酰基-tRNA 合成酶”还包括 SEQ ID NO:4 所示氨基酸序列的保守性变体, 只要所述保守性变体具有与 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列相同的酶活性即可; 并且还包括将 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列经过一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加且具有与 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列相同的酶活性的由 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列衍生的氨基酸序列。

[0088] 实施例 3:表达 MtTyr- 肌红蛋白及质谱鉴定

[0089] 将正交 tRNA (SEQ ID NO:1) 和编码肌红蛋白的核苷酸序列 (4TAG 或 33TAG) (SEQ ID NO:5 和 7) 构建到 pBAD 载体 (购自美国 scripps 研究所 Peter G. Schultz 实验室) 上, 筛选出来的编码 MtTyrRS 的核苷酸序列 (SEQ ID NO:3) 构建到 pBK 载体 (购自美国 scripps 研究所 Peter G. Schultz 实验室) 上, 然后共转化到 DH10B 细胞 (购自全式金公司) 中。挑取单个克隆在 37°C 培养到 OD_{600} 约等于 0.5 时, 向 LB 培养基中加入 1mM MtTyr 及 0.2% 阿拉伯糖 (购自 sigma 公司) 培养细胞, 对照不加入 MtTyr。6-8 小时之后, 收菌, Ni-NTA 纯化蛋白, 并用 SDS-PAGE 电泳分析 (图 6A)。

[0090] 我们发现, 只有在存在 MtTyr 的培养基中才能纯化出全长的肌红蛋白, 这说明筛选出来的 MtTyrRS 可以特异性的识别 MtTyr。在 LB 培养基中 MtTyr- 肌红蛋白的产率为 10mg/L, 而野生型肌红蛋白的产率为 50mg/L。为了检测 MtTyr 仅仅插入到肌红蛋白的 4 位琥珀突变位点, 我们对 4-MtTyr- 肌红蛋白进行了 ESI-TOF 质谱检测, 检测结果分子量为 18476.5Da (图 6B), 与计算的分子量 18477.2Da 吻合。

[0091] 实施例 4:表达 MtTyr- 肌红蛋白突变体作为 TvNiR 功能模型

[0092] 我们用基因工程方法构建了肌红蛋白突变体 MtTyrMb (核苷酸序列如 SEQ ID NO:5 所示), 其中 29 位亮氨酸突变为组氨酸, 33 位苯丙氨酸突变为 TAG 终止密码子, 然后用实施例 3 中的相同方法在肌红蛋白突变体的 33 位定点特异性插入 MtTyr, 表达产生 MtTyrMb 突变蛋白 (氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示), 突变的 3- 甲硫酪氨酸和组氨酸残基可以模拟 TvNiR 活性中心上的 303 位酪氨酸残基和 316 位组氨酸残基 (图 7)。作为对照, 我们还构建了突变体 TyrMb (核苷酸序列如 SEQ ID NO:7 所示), 其中 29 位亮氨酸突变为组氨酸, 33 位苯丙氨酸突变为酪氨酸。

[0093] 我们首先通过 ^{15}N 核磁共振光谱测试了 MtTyrMb 还原羟胺的活性。在 500mM, pH 7.0 的磷酸钠缓冲液中加入 50mM $^{15}\text{NH}_2\text{OH}$ (购自剑桥同位素实验室) 和 100mM 连二亚硫酸钠 (俗称保险粉), 核磁共振光谱图没有变化; 接着往上述溶液中加入 5 μM MtTyrMb, 30 分钟后, 发现 $^{15}\text{NH}_2\text{OH}$ 在 90ppm 的吸收峰消失, 而在 21ppm 处产生了一个新的吸收峰, 证明羟胺已被还原成了铵根离子 (图 8, 图 9)。

[0094] 为了进一步检测反应速率, 我们使用 0.5 μM 肌红蛋白突变体反应不同时间后, 加入 50 μM 三羰基氯甘氨酸钌 (tricarbonylchloro(glycinato)ruthenium(II), CORM-3) 终止反应, 然后通过 ^{15}N 核磁共振光谱测量分析 90ppm 和 21ppm 处的化学位移并进行计算, 同时以 20mM ^{15}N - 尿素 (购自剑桥同位素实验室) 作为内标物。结果如图 10 所示, MtTyrMb 可以催化 95% 的羟胺还原成铵根离子, 反应速率为 400 $\mu\text{M}/\text{min}$ ($k_{\text{cat}} = 800\text{min}^{-1}$); TyrMb 催化反应的速率仅为 MtTyrMb 的四分之一, $k_{\text{cat}} = 200\text{min}^{-1}$ 。而 MtTyrMb 和 TyrMb 的 k_m 值却比较近似, 分别为 7mM 和 6mM。

[0095] 应该理解, 尽管参考其示例性的实施方案, 已经对本发明进行具体地显示和描述, 但是本领域的普通技术人员应该理解, 在不背离由权利要求所定义的本发明的精神和范围的前提下, 可以在其中进行各种形式和细节的变化, 可以进行各种实施方案的任意组合。

[0001]

IB127932序列表.txt

序列表

<110> 中国科学院生物物理研究所

<120> 3-甲硫酪氨酸翻译系统及其应用

<130> IB127932

<160> 9

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 77

<212> DNA

<213> 正交tRNA序列

<400> 1

tggtcggcg ggcggattt gaaccagcgc catcgggatt tagagtccgc cgttctgccc 60

tgctgaacta ccgccgg 77

<210> 2

<211> 312

<212> PRT

<213> 来源于詹氏甲烷球菌的野生型酪氨酰tRNA合成酶 (MjTyrRS)

<400> 2

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Tyr
20 25 30Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

[0002]

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys
 100 105 110
 Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125
 Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140
 Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Asp Ile His
 145 150 155 160
 Tyr Leu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165 170 175
 His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180 185 190
 Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
 195 200 205
 Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
 210 215 220
 Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
 225 230 235 240
 Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
 245 250 255
 Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
 260 265 270
 Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285
 Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 290 295 300
 Arg Leu His His His His His His
 305 310

<210> 3

<211> 921

<212> DNA

<213> 本发明的正交氨基酰基-tRNA合成酶 (MtTyrRS) 的核苷酸序列

<400> 3
 atggaagaat ttgaaatgat aaagagaac acatctgaaa ttatcagcga ggaagagtta 60
 agagaggttt taaaaaaga fgaaaaatct gctgaaatag gttttgaacc aagtggtaaa 120
 atacatttag ggcattatct ccaataaaa aagatgattg atttacaana tgcctgattt 180
 gatataatta tattgttggc tgatttaggt gectaittaa accagaaagg agagttggat 240
 gagattagaa aaataggaga ttataacaaa aaagtttttg aagcaatggg gttaaaggca 300

[0003]

aaatatgttt atggaagtga attccagett gataaggatt atacactgaa tgtctataga 360
 ttggcttttaaa aaactacctt aaaaagagca agaaggagta tggaacttat agcaagagag 420
 gatgaaaatc caaaggttgc tgaagttatc tatccaataa tgcaggttaa tgctattcat 480
 tatectggcg ttgatgttgc agttggaggg atggagcaga gaaaaataca catgttagca 540
 agggagcttt taccaaaaaa ggttgtttgt attcacaacc ctgtettaac gggtttgat 600
 ggagaaggaa agatgagtte ttcaaaaggg aattttatag ctgttgatga ctctccagaa 660
 gagattaggg ctaagataaa gaaagcatac tgcccagctg gagttgttga aggaaatcca 720
 ataatggaga tagctaaata ctctcttgaa tatecttttaa ccataaaaag gccagaaaaa 780
 tttggtagag atttgacagt taatagctat gaggagttag agagttttatt taaaaataag 840
 gaattgcatc caatggattt aaaaaatgct gtagctgaag aacttataaa gattttagag 900
 ccaattagaa agagattata a 921

<210> 4

<211> 306

<212> PRT

<213> 本发明的正交氨酰基-tRNA合成酶 (MtTyrRS)

<400> 4

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Glu
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu Gly Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Ala Ile His
145 150 155 160

[0004]

Tyr Pro Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
290 295 300

Arg Leu
305

<210> 5

<211> 471

<212> DNA

<213> 含有3-甲硫酪氨酸的肌红蛋白突变体 (MtTyrMb) 的核苷酸序列

```

<400> 5
atggttctgt ctgaaggiga atggcagctg gttctgcatg tttaggctaa agttgaagct    60
gacgtgctg gtcattgcca ggacatccat attegactgt agaaatccea tceggaaact    120
ctggaaaaat tcgacgtttt caaacatctg aaaactgaag ctgaaatgaa agcttctgaa    180
gatctgaaaa aacatggtgt taccgtgtta actgccctag gtgetatcct taagaaaaaa    240
gggcatcatg aagetgagct caaacgctt gcacaatcge atgetactaa acataagatc    300
ccgatcaaat acctggaatt catctctgaa gcgatcatcc atgttctgca ttctagacat    360
ccaggtgact tcggtgctga cgctcagggt gctatgaaca aagctctcga gctgttcctg    420
aaagatatcg ctgctaagta caaagaactg ggttaccagg gtggctcggg a          471

```

<210> 6

<211> 157

<212> PRT

<213> 含有3-甲硫酪氨酸的肌红蛋白突变体 (MtTyrMb)，其中*表示引入的3-甲硫酪氨酸，第1位的甲硫氨酸为在大肠杆菌中表达而引入的起始氨基酸

[0005]

<400> 6

Met Val Leu Ser Glu Gly Glu Trp Gln Leu Val Leu His Val Trp Ala
1 5 10 15

Lys Val Glu Ala Asp Val Ala Gly His Gly Gln Asp Ile His Ile Arg
20 25 30

Leu * Lys Ser His Pro Glu Thr Leu Glu Lys Phe Asp Arg Phe Lys
35 40 45

His Leu Lys Thr Glu Ala Glu Met Lys Ala Ser Glu Asp Leu Lys Lys
50 55 60

His Gly Val Thr Val Leu Thr Ala Leu Gly Ala Ile Leu Lys Lys Lys
65 70 75 80

Gly His His Glu Ala Glu Leu Lys Pro Leu Ala Gln Ser His Ala Thr
85 90 95

Lys His Lys Ile Pro Ile Lys Tyr Leu Glu Phe Ile Ser Glu Ala Ile
100 105 110

Ile His Val Leu His Ser Arg His Pro Gly Asp Phe Gly Ala Asp Ala
115 120 125

Gln Gly Ala Met Asn Lys Ala Leu Glu Leu Phe Arg Lys Asp Ile Ala
130 135 140

Ala Lys Tyr Lys Glu Leu Gly Tyr Gln Gly Gly Ser Gly
145 150 155

<210> 7

<211> 471

<212> DNA

<213> 含有33位酪氨酸的肌红蛋白突变体 (TyrMb) 的核苷酸序列

<400> 7

atggttctgt ctgaaggatga atggcagctg gttctgcatg tttgggctaa agttgaagct 60
gacgtcgtg gtcattggtca ggacatccat attcgactgt ataaatctca tccggaaact 120
ctggaaaaat tccatcgtttf caaacatctg aaaactgaag ctgaaatgaa agcttctgaa 180
gatctgaaaa aacatggtgt taccgtgtta actgccctag gtctatctct taagaaaaaa 240
gggcatcatg aagctgagct caaacgcctt gcacaategc atgetactaa acataagatc 300
ccgatcaaat acctggaatt caictctgaa cgcacatccc atgttctgca ttctagacat 360
ccaggtgact tccgtgctga cgcctcagggt gctatgaaca aagctctega gctgttccgt 420
aaagatatcg ctgctaagta caaagaactg ggttaccagg gtgctctggg a 471

<210> 8

<211> 157

[0006]

<212> PRT

<213> 含有33位酪氨酸的肌红蛋白突变体 (TyrMb)

<400> 8

Met Val Leu Ser Glu Gly Glu Trp Gln Leu Val Leu His Val Trp Ala
 1 5 10 15

Lys Val Glu Ala Asp Val Ala Gly His Gly Gln Asp Ile His Ile Arg
 20 25 30

Leu Tyr Lys Ser His Pro Glu Thr Leu Glu Lys Phe Asp Arg Phe Lys
 35 40 45

His Leu Lys Thr Glu Ala Glu Met Lys Ala Ser Glu Asp Leu Lys Lys
 50 55 60

His Gly Val Thr Val Leu Thr Ala Leu Gly Ala Ile Leu Lys Lys Lys
 65 70 75 80

Gly His His Glu Ala Glu Leu Lys Pro Leu Ala Gln Ser His Ala Thr
 85 90 95

Lys His Lys Ile Pro Ile Lys Tyr Leu Glu Phe Ile Ser Glu Ala Ile
 100 105 110

Ile His Val Leu His Ser Arg His Pro Gly Asp Phe Gly Ala Asp Ala
 115 120 125

Gln Gly Ala Met Asn Lys Ala Leu Glu Leu Phe Arg Lys Asp Ile Ala
 130 135 140

Ala Lys Tyr Lys Glu Leu Gly Tyr Gln Gly Gly Ser Gly
 145 150 155

<210> 9

<211> 456

<212> PRT

<213> 酪氨酸酚裂解酶(TPL)突变体

<400> 9

Met Asn Tyr Pro Ala Glu Pro Phe Arg Ile Lys Ser Val Glu Thr Val
 1 5 10 15

Ser Met Ile Pro Arg Asp Glu Arg Leu Lys Lys Met Gln Glu Ala Gly
 20 25 30

Tyr Asn Thr Leu Leu Leu Asn Ser Lys Asp Ile Tyr Ile Asp Leu Leu
 35 40 45

Thr Asp Ser Gly Thr Asn Ala Met Ser Asp Lys Gln Trp Ala Gly Met
 50 55 60

[0007]

Met Met Gly Asp Glu Ala Tyr Ala Gly Ser Glu Asn Phe Tyr His Leu
 65 70 75 80
 Glu Arg Thr Val Gln Glu Leu Phe Gly Phe Lys His Ile Val Pro Thr
 85 90
 His Gln Gly Arg Gly Ala Glu Asn Leu Leu Ser Gln Leu Ala Ile Lys
 100 105 110
 Pro Gly Gln Tyr Val Ala Gly Asn Met Tyr Phe Thr Thr Thr Arg Tyr
 115 120 125
 His Gln Glu Lys Asn Gly Ala Val Phe Val Asp Ile Val Arg Asp Glu
 130 135 140
 Ala His Asp Ala Gly Leu Asn Ile Ala Phe Lys Gly Asp Ile Asp Leu
 145 150 155 160
 Lys Lys Leu Gln Lys Leu Ile Asp Glu Lys Gly Ala Glu Asn Ile Ala
 165 170 175
 Tyr Ile Cys Leu Ala Val Thr Val Asn Leu Ala Gly Gly Gln Pro Val
 180 185 190
 Ser Met Ala Asn Met Arg Ala Val Arg Glu Leu Thr Glu Ala His Gly
 195 200 205
 Ile Lys Val Phe Tyr Asp Ala Thr Arg Cys Val Glu Asn Ala Tyr Phe
 210 215 220
 Ile Lys Glu Gln Glu Gln Gly Phe Glu Asn Lys Ser Ile Ala Glu Ile
 225 230 235 240
 Val His Glu Met Phe Ser Tyr Ala Asp Gly Cys Thr Met Ser Gly Lys
 245 250 255
 Lys Asp Cys Leu Val Asn Ile Gly Gly Phe Leu Cys Met Asn Asp Asp
 260 265 270
 Glu Met Phe Ser Ser Ala Lys Glu Leu Val Val Val Tyr Glu Gly Met
 275 280 285
 Pro Ser Tyr Gly Gly Leu Ala Gly Arg Asp Met Glu Ala Met Ala Ile
 290 295 300
 Gly Leu Arg Glu Ala Met Gln Tyr Glu Tyr Ile Glu His Arg Val Lys
 305 310 315 320
 Gln Val Arg Tyr Leu Gly Asp Lys Leu Lys Ala Ala Gly Val Pro Ile
 325 330 335
 Val Glu Pro Val Gly Gly His Ala Val Phe Leu Asp Ala Arg Arg Phe
 340 345 350
 Cys Glu His Leu Thr Gln Asp Glu Phe Pro Ala Gln Ser Leu Ala Ala
 355 360 365

[0008]

Ser Ile Tyr Val Glu Thr Gly Val Arg Ser Met Glu Arg Gly Ile Ile
 370 375 380

Ser Ala Gly Arg Asn Asn Val Thr Gly Glu His His Arg Pro Lys Leu
 385 390 395 400

Glu Thr Val Arg Leu Thr Ile Pro Arg Arg Val Tyr Thr Tyr Ala His
 405 410 415

Met Asp Val Val Ala Asp Gly Ile Ile Lys Leu Tyr Gln His Lys Glu
 420 425 430

Asp Ile Arg Gly Leu Lys Phe Ile Tyr Glu Pro Lys Gln Leu Arg Phe
 435 440 445

Phe Thr Ala Arg Phe Asp Tyr Ile
 450 455

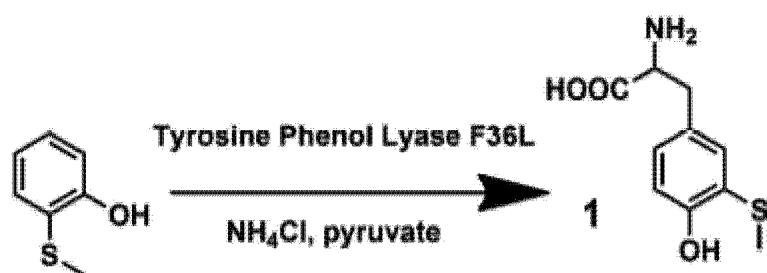


图 1

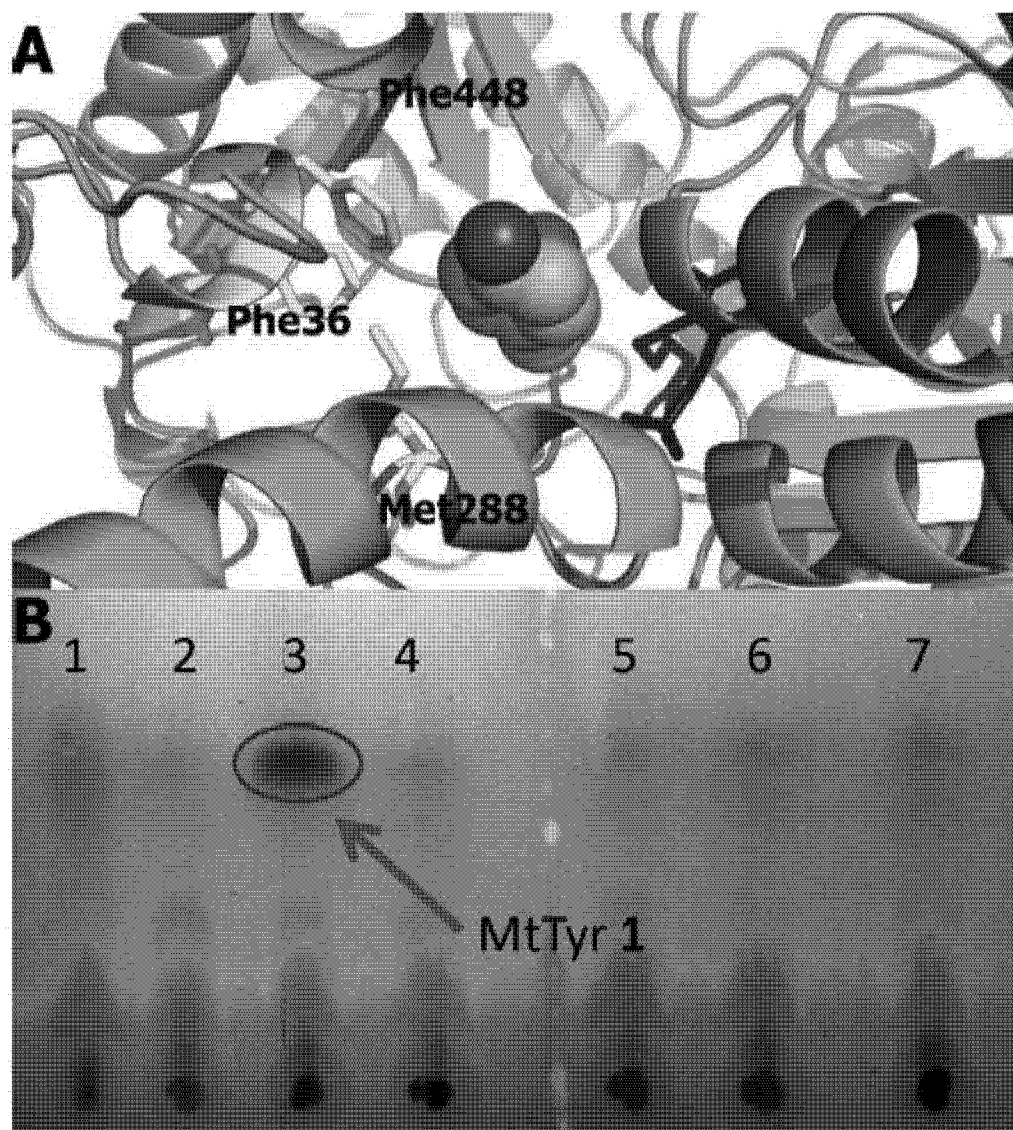


图 2

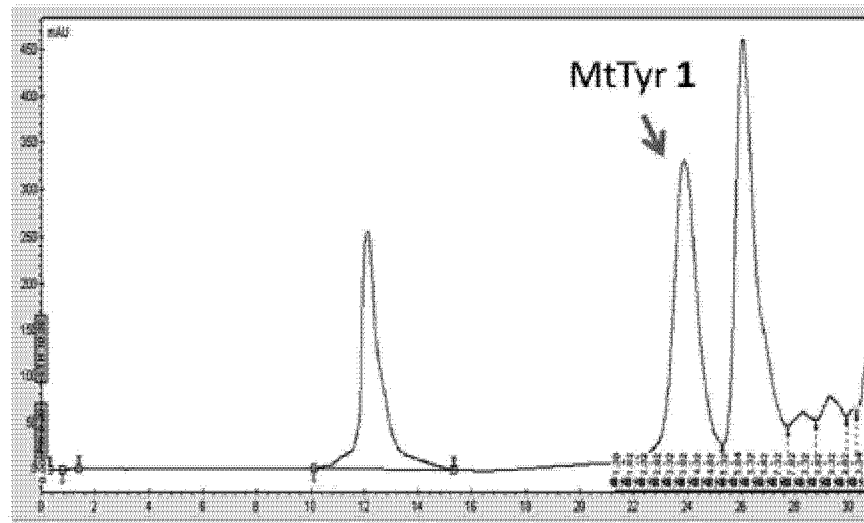


图 3

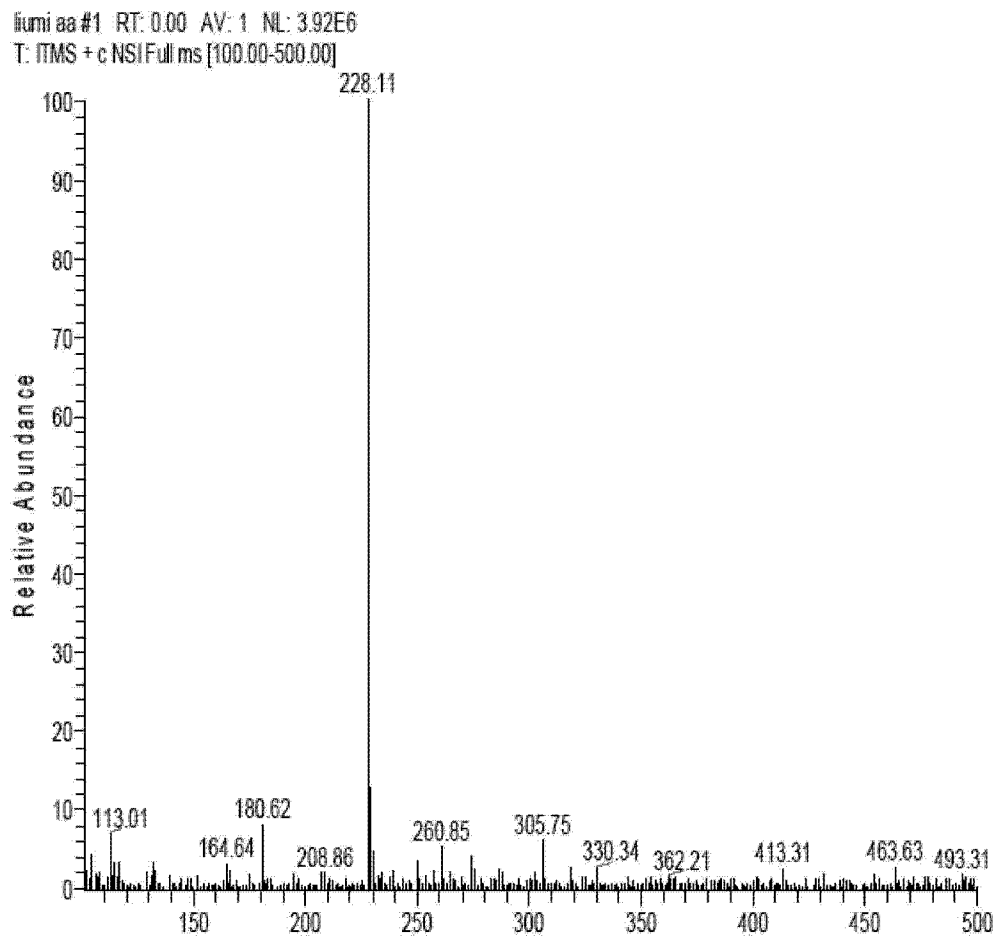


图 4

名称	核苷酸/氨基酸序列
正交 tRNA	<p><u>SEQ ID NO: 1</u> tggtcggcgccggccgattgaaccagcgccatgcgatttagagtcggcgttctgcctgc tgaactaccgcccgg</p>
野生型酪氨酰 tRNA 合成酶 (MjTyrRS), 来源于詹氏甲烷 球菌	<p><u>氨基酸序列 (SEQ ID NO: 2):</u> MDEFEMIKRNTSEIISEEELREVLKKDEKSAYIGFEPGKIHL GHYLQIKKMIDLQNAGFDIILLADLHAYLNQKGELDEIRKI GDYNKKVFEAMGLKAKYVYVGSEFQLDKDYTLNVYRLALK TTLKRARRSMELIAREDENPKVAEVIYPIMQVNDIHYLQVD VAVGGMEQRKIHMLARELLPKKVVCIHNPVLTGLDGEKGM SSSKGNFIAVDDSPPEIRAKIKKAYCPAGVVEGNPIMEIAKYF LEYPLTIKRPEKFGGDLTVNSYEELESFLKKNELHPMDLKNA VAEELIKILEPIRKRLHHHHHH</p>
本发明的正交氨 酰基-tRNA 合成 酶 (MtTyrRS)	<p><u>核苷酸序列 (SEQ ID NO: 3):</u> ATGGACGAATTTGAAATGATAAAGAGAAACACATCTGAAA TTATCAGCGAGGAAGAGTTAAGAGAGGTTTTAAAAAAG ATGAAAAATCTGCTGAAATAGGTTTTGAACCAAGTGGTAA AATACATTTAGGGCATTATCTCAAATAAAAAAGATGATTG ATTTACAAAATGCTGGATTTGATATAATTATATTGTTGGCTG ATTTAGGTGCCTATTTAAACCAGAAAGGAGAGTTGGATGA GATTAGAAAAATAGGAGATTATAACAAAAAAGTTTTTGAA GCAATGGGGTTAAAGGCAAAATATGTTTATGGAAGTGAAT TCCAGCTTGATAAGGATTATACACTGAATGTCTATAGATTG GCTTTAAAACTACCTTAAAAAGAGCAAGAAGGAGTATG GAACTTATAGCAAGAGAGGATGAAAATCCAAAGGTTGCT GAAGTTATCTATCCAATAATGCAGGTTAATGCTATTCATTAT CCTGGCGTTGATGTTGCAGTTGGAGGGATGGAGCAGAGA AAAATACACATGTTAGCAAGGGAGCTTTTACCAAAAAAG GTTGTTTGTATTACAAACCTGTCTTAACGGGTTTGGATG GAGAAGGAAAGATGAGTTCTTCAAAGGGAATTTTATAG CTGTTGATGACTCTCCAGAAGAGATTAGGGCTAAGATAAA GAAAGCATACTGCCAGCTGGAGTTGTTGAAGGAAATCC AATAATGGAGATAGCTAAATACTTCCTTGAATATCCTTTAA CCATAAAAAGGCCAGAAAAATTTGGTGGAGATTTGACAG TTAATAGCTATGAGGAGTTAGAGAGTTTATTTAAAAATAAG GAATTGCATCCAATGGATTTAAAAAATGCTGTAGCTGAAG AACTTATAAAGATTTTAGAGCCAATTAGAAAGAGATTATA A</p> <p><u>氨基酸序列 (SEQ ID NO:4):</u> MDEFEMIKRNTSEIISEEELREVLKKDEKSAEIGFEPGKIHL GHYLQIKKMIDLQNAGFDIILLADLGAYLNQKGELDEIRKI GDYNKKVFEAMGLKAKYVYVGSEFQLDKDYTLNVYRLALK TTLKRARRSMELIAREDENPKVAEVIYPIMQVNAIHYPGVD VAVGGMEQRKIHMLARELLPKKVVCIHNPVLTGLDGEKGM SSSKGNFIAVDDSPPEIRAKIKKAYCPAGVVEGNPIMEIAKYF LEYPLTIKRPEKFGGDLTVNSYEELESFLKKNELHPMDLKNA VAEELIKILEPIRKRL</p>
含有 3-甲硫酪氨 酸的肌红蛋白突	<p><u>核苷酸序列 (SEQ ID NO: 5):</u> ATGGTTCTGTCTGAAGGTGAATGGCAGCTGGTTCTGCATG TTTGGGCTAAAGTTGAAGCTGACGTCGCTGGTCATGGTCA</p>

变体 (MtTyrMb)	<p>GGACATCCATATTCGACTGTAGAAATCTCATCCGGAAACT CTGGAAAAATTCGATCGTTTCAAACATCTGAAAACCTGAAG CTGAAATGAAAGCTTCTGAAGATCTGAAAAACATGGTG TTACCGTGTTAACTGCCCTAGGTGCTATCCTTAAGAAAA AGGGCATCATGAAGCTGAGCTCAAACCGCTTGCACAATC GCATGCTACTAACATAAGATCCCGATCAAATACCTGGAA TTCATCTCTGAAGCGATCATCCATGTTCTGCATTCTAGACA TCCAGGTGACTTCGGTGCTGACGCTCAGGGTGCTATGAAC AAAGCTCTCGAGCTGTTCCGTAAAGATATCGCTGCTAAGT ACAAAGAACTGGGTTACCAGGGTGGCTCGGGA</p> <p><u>氨基酸序列 (SEQ ID NO: 6), 其中*表示引入的 3-甲硫酪氨酸, 第 1 位的甲硫氨酸为在大肠杆菌中表达而引入的起始氨基酸:</u> MVLSEGEWQLVLHVWAKVEADVAGHGQDIHIRL*KSHPET LEKFDRFKHLKTEAEMKASEDLKKHGVTVLTALGAILKKK GHHEAELKPLAQSHATKHKIPIKYLEFISEAIIHVLHSRHPGD FGADAQGAMNKALELFRKDIAAKYKELGYQGGSG</p>
含有 33 位酪氨酸的肌红蛋白突变体 (TyrMb)	<p><u>核苷酸序列 (SEQ ID NO: 7):</u> ATGGTTCTGTCTGAAGGTGAATGGCAGCTGGTCTGCATG TTTGGGCTAAAGTTGAAGCTGACGTCGCTGGTCATGGTCA GGACATCCATATTCGACTGTATAAATCTCATCCGGAAACTC TGGAAAAATTCGATCGTTTCAAACATCTGAAAACCTGAAGC TGAAATGAAAGCTTCTGAAGATCTGAAAAACATGGTGTT ACCGTGTTAACTGCCCTAGGTGCTATCCTTAAGAAAAAAG GGCATCATGAAGCTGAGCTCAAACCGCTTGCACAATCGCA TGCTACTAACATAAGATCCCGATCAAATACCTGGAATTCA TCTCTGAAGCGATCATCCATGTTCTGCATTCTAGACATCCA GGTGACTTCGGTGCTGACGCTCAGGGTGCTATGAACAAA GCTCTCGAGCTGTTCCGTAAAGATATCGCTGCTAAGTACA AAGAACTGGGTTACCAGGGTGGCTCGGGA</p> <p><u>氨基酸序列 (SEQ ID NO: 8):</u> MVLSEGEWQLVLHVWAKVEADVAGHGQDIHIRLYKSHPET LEKFDRFKHLKTEAEMKASEDLKKHGVTVLTALGAILKKK GHHEAELKPLAQSHATKHKIPIKYLEFISEAIIHVLHSRHPGD FGADAQGAMNKALELFRKDIAAKYKELGYQGGSG</p>
酪氨酸酚裂解酶 (TPL)突变体	<p><u>氨基酸序列 (SEQ ID NO: 9):</u> MNYPAEPFRIKSVETVSMIPRDERLKKMQEAGYNTLLLSK DIYIDLLTDSGTNAMS DKQWAGMMMGEAYAGSENFYHLE RTVQELFGFKHIVPTHQGRGAENLLSQLAIKPGQYVAGNMY FTTRYHQEKNGAVFVDIVRDEAHDAGLNIAFKGDIDLKKL QKLIDEKGAENIAYICLAVTVNLAGGQPVS MANMRAVRELT EAHGKVFYDATRCVENAYFIKEQE QGFENK SIAEIVHEMFS YADGCTMSGKKDCLVNIGGFLCMNDDEM FSSAKELVVVYE GMPSYGGLAGRDMEAMAIGLREAMQY EYIEHRVKQVRYL GDKLKAAGVPIVEPVGGHAVFLDARRFCEHLTQDEFPAQSL AASIYVETGVRSMERGIISAGRNNVTGEHHRPKLETVRLTIP RRVYTYAHMDVVADGIIKLYQHKEDIRGLKFIYEPKQLRFFT ARFDYI</p>

图 5

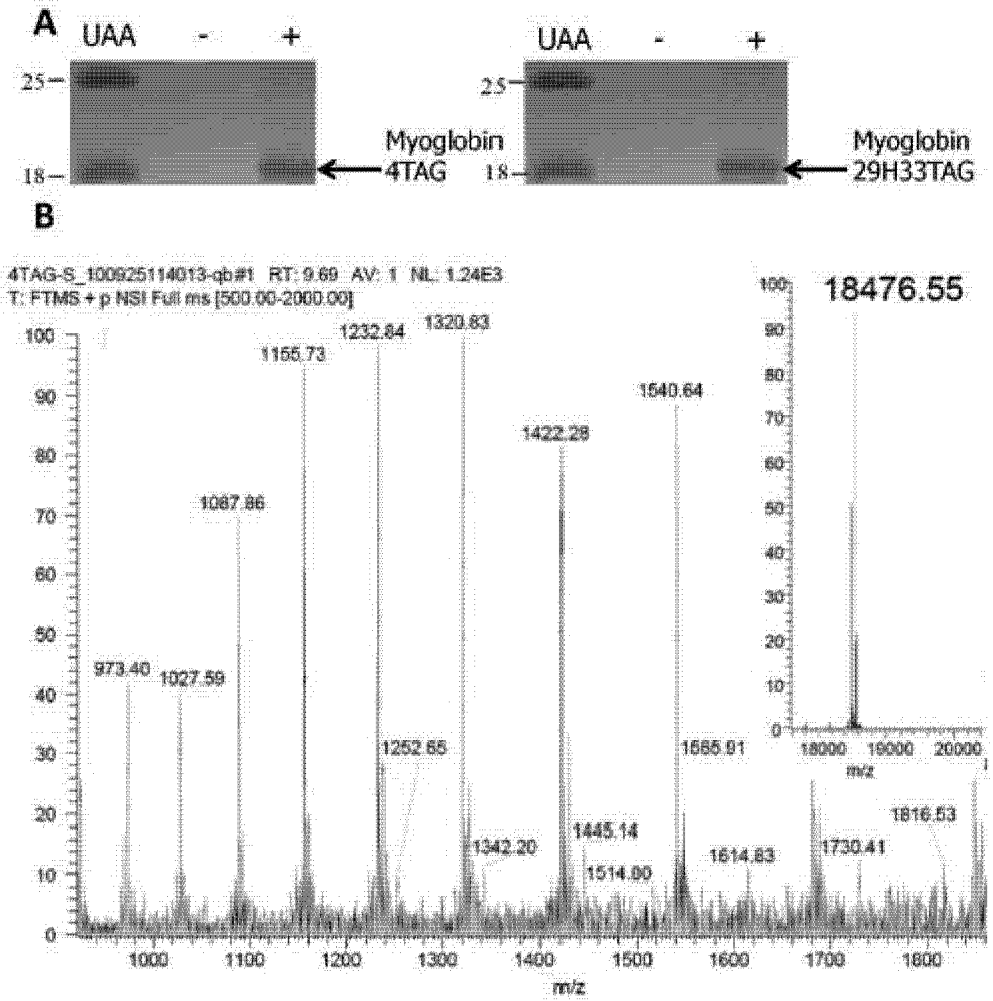


图 6

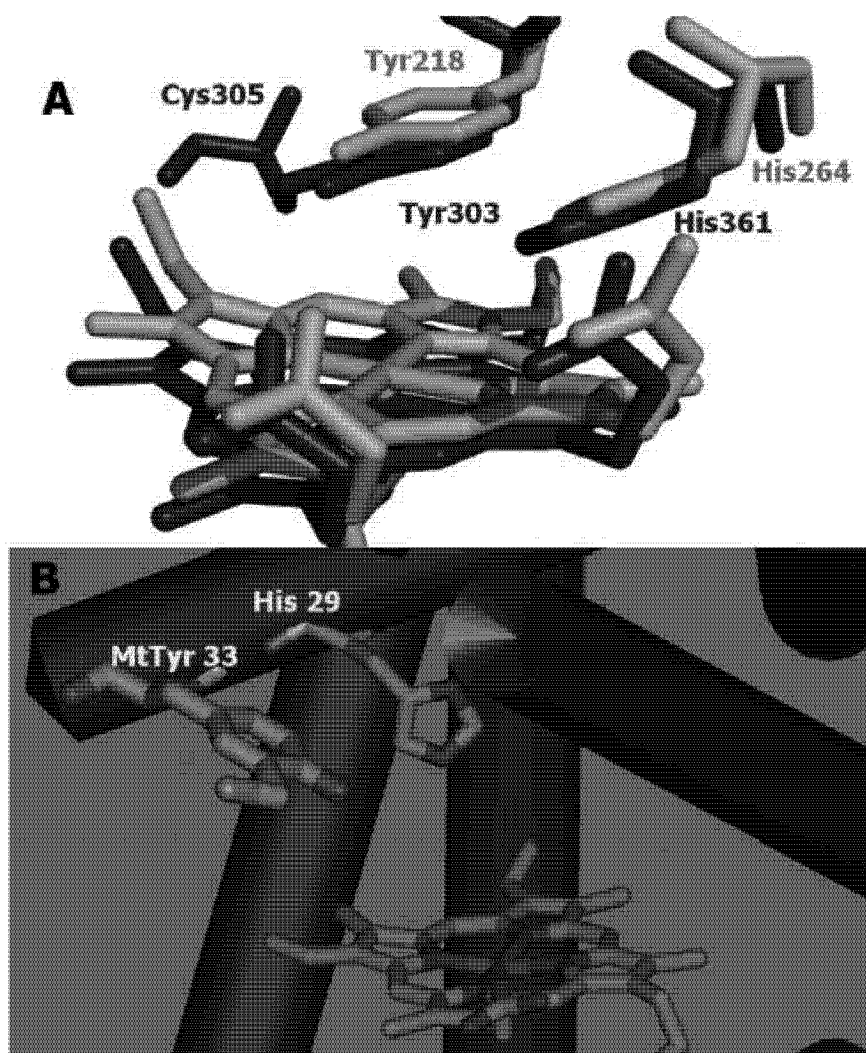


图 7

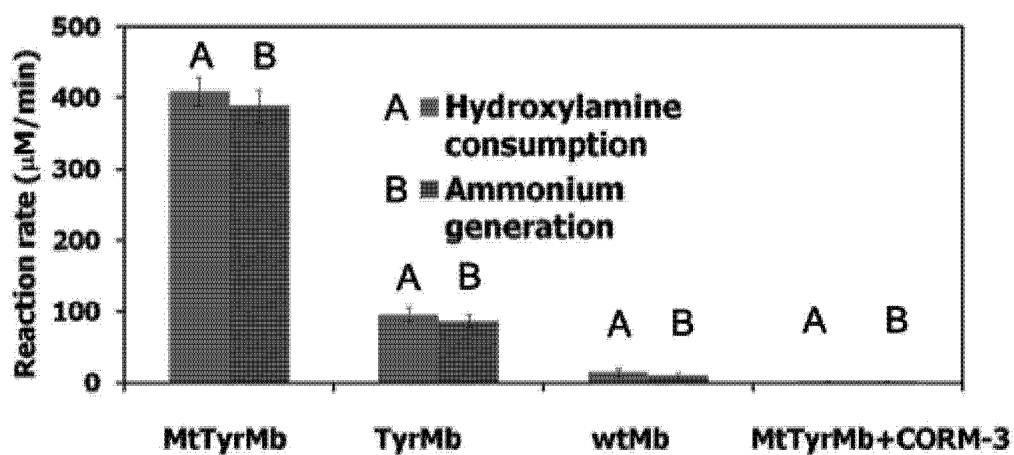


图 8

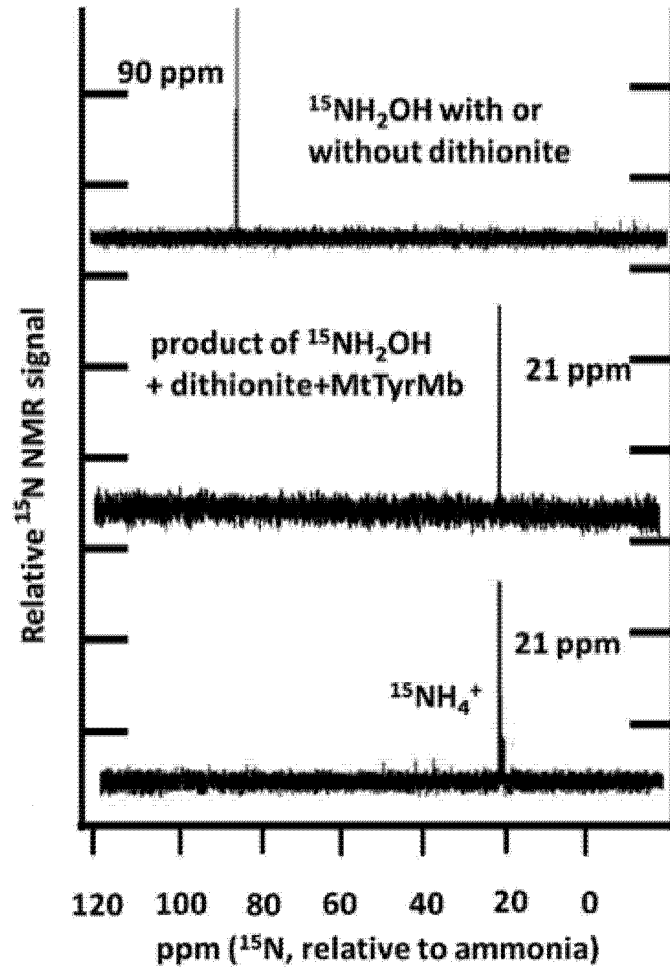


图 9

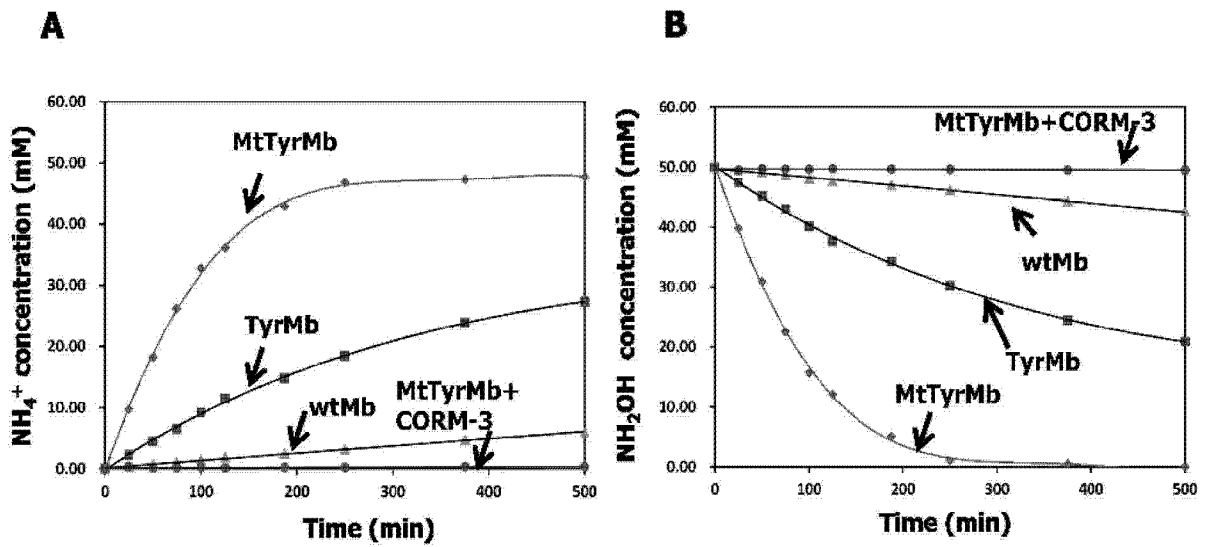


图 10