



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103571804 A

(43) 申请公布日 2014.02.12

(21) 申请号 201210285659.7

C12P 21/02(2006.01)

(22) 申请日 2012.08.10

C07K 14/00(2006.01)

C07D 231/12(2006.01)

(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 刘晓红 李家松 董建树

胡诚 龚为民 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 15/11(2006.01)

C12P 21/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书10页

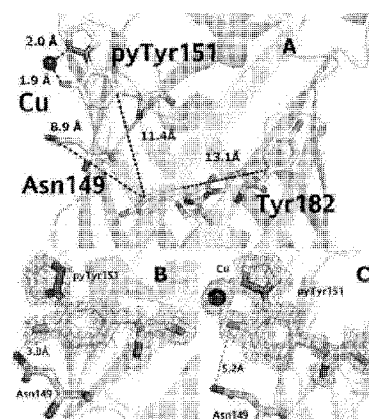
序列表9页 附图11页

(54) 发明名称

3-吡唑基酪氨酸翻译系统及其应用

(57) 摘要

3-吡唑基酪氨酸翻译系统及其应用。本发明涉及氨酰基-tRNA合成酶突变体,其含有的氨基酸序列选自自由 SEQ ID NO:3 所示氨基酸和它们的保守性变体构成的组。本发明提供利用正交 tRNA、正交氨酰基-tRNA合成酶的配对将 3-吡唑基酪氨酸(pyTyr) 定点特异插入目标蛋白质的 3-吡唑基酪氨酸翻译系统,和利用所述翻译系统在目标蛋白质中定点特异插入 3-吡唑基酪氨酸的方法。所述 3-吡唑基酪氨酸翻译系统包含:(i) 3-吡唑基酪氨酸;(ii) 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-吡唑基酪氨酸优先酰化所述正交 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:3 所示氨基酸和它们的保守性变体构成的组。
2. 一种 3-吡唑基酪氨酸翻译系统,所述系统包含:
 - (i) 3-吡唑基酪氨酸;
 - (ii) 权利要求 1 所述的正交氨酰基-tRNA 合成酶;和
 - (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-吡唑基酪氨酸优先氨酰化所述正交 tRNA。
3. 如权利要求 2 所述的翻译系统,其还包含 (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。
4. 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,并且所述选择密码子是琥珀密码子,并且其还包含编码正交氨酰基-tRNA 合成酶的核苷酸序列。
5. 一种宿主细胞,其包含所述正交 tRNA 序列和编码所述正交氨酰基-tRNA 合成酶的核苷酸序列,并且该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插入 3-吡唑基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 3 所述的 3-吡唑基酪氨酸翻译系统,该系统包含:
 - (i) 3-吡唑基酪氨酸;
 - (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-吡唑基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转化到适当的宿主细胞中,然后将编码所述目标蛋白质的核酸转化到所得到的宿主细胞中,在培养基中加入 3-吡唑基酪氨酸,在所述蛋白质的翻译期间,3-吡唑基酪氨酸氨酰化的正交 tRNA 对所述选择密码子起反应而将培养基中的 3-吡唑基酪氨酸定点特异插入所述目标蛋白质的所述所选位置,从而产生在所选位置含 3-吡唑基酪氨酸的所述目标蛋白质。
7. 生产含有 3-吡唑基酪氨酸的绿色荧光蛋白突变体的方法,其利用权利要求 6 所述的方法,其中所用的编码绿色荧光蛋白突变体的核酸序列分别为 SEQ ID NO:8,10,12,在野生型绿色荧光蛋白的 149 位,151 位和 182 位分别引入 3-吡唑基酪氨酸,所述绿色荧光蛋白突变体的氨基酸序列分别为 SEQ ID NO:7,9,11。
8. 由权利要求 7 所述的方法获得的含有 3-吡唑基酪氨酸的绿色荧光蛋白突变体,其氨基酸序列选自 SEQ ID NO:7,9 或 11。
9. 由权利要求 8 获得的绿色荧光蛋白突变体及其螯合铜离子后形成的复合物的高分辨率晶体结构,其中所述绿色荧光蛋白突变体的核酸序列为 SEQ ID NO:8,10,12,氨基酸序列分别为 SEQ ID NO:7,9,11。
10. 一种高效的 3-吡唑基酪氨酸 (pyTyr) 的合成方法,其包括下述两个步骤:
 - 第一步:在 50ml 圆底烧瓶中加入 2.46g 3-碘代酪氨酸,溶于 20ml 10% NaOH 水溶液

中,另取 1.92g t-Boc 酸酐溶于 20ml THF 中后,将其滴加于 3-碘代酪氨酸 NaOH 溶液中,室温下搅拌过夜,停止反应后,加入适量的盐酸,调节 pH 值至 6.5-7.0 之间,然后用乙酸乙酯萃取,收集乙酸乙酯相进行旋蒸,可得到 2.94g 的 Boc-L-3-碘代酪氨酸;

第二步:取一干净的 50ml 三口瓶,加入 0.34g 吡啶,1.92g 无水 Cs_2CO_3 ,0.019g CuI, 2.03g Boc-L-3-碘代酪氨酸和 8ml 无水 DMF,在氮气保护的条件下,搅拌并于 180°C 回流 18 小时,冷却后,旋干 DMF,用无水乙醇溶解并抽滤沉淀,取滤液加浓盐酸至沉淀完全,然后再进行抽滤,旋干滤液,用乙酸乙酯和蒸馏水进行萃取,收集水相,用制备型 HPLC 进行分离纯化。

3-吡唑基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由 SEQ ID NO:3 所示氨基酸和它们的保守性变体构成的组。本发明还涉及一种 3-吡唑基酪氨酸((S)-2-氨基-3-(4-羟基-3-(1H-吡唑-1-基)苯基)丙酸,简称为 pyTyr)的高效合成方法及包含其的翻译系统。更具体地,本发明涉及利用正交 tRNA、正交氨酰基-tRNA合成酶和它们的配对将 3-吡唑基酪氨酸定点特异插入目标蛋白质的 3-吡唑基酪氨酸翻译系统,和利用所述翻译系统在目标蛋白质中定点特异插入 3-吡唑基酪氨酸的方法。本发明还涉及用这种翻译系统和这种方法产生的含有 3-吡唑基酪氨酸的突变蛋白质,例如,含有 3-吡唑基酪氨酸的绿色荧光蛋白突变体,以及含有 3-吡唑基酪氨酸的绿色荧光蛋白突变体的应用。

背景技术

[0002] 电子传递 (Electron Transfer, ET) 涉及体内许多重要的生化过程,包括光合作用和细胞色素 P450 介导的氧化作用等。尽管目前人们在了解生物大分子如核酸及蛋白质的电子传递机制方面取得了巨大进步,但是对蛋白质的电子传递实验仍依赖于在蛋白质本身含有的残基如组氨酸或半胱氨酸上连接探针来进行,因此该方法仅能用于研究小的可溶性蛋白,这也就大大地限制了其应用。光诱导电子传递 (photo-induced electron transfer, PET) 导致的荧光淬灭是一种用来探索生物大分子中的电子传递机理及酶分子构象动力学等的有利工具,但由于受到目前技术的限制,缺乏新技术手段仍是将光电子转移应用于生物功能研究中的一个瓶颈。研究者通常利用色氨酸和酪氨酸等天然氨基酸作为电子供体,荧光基团作为电子受体,因此也只能限制于研究相对简单的生物学系统。

[0003] 我们通过在蛋白中遗传整合金属螯合非天然氨基酸 (UAAs) 来克服上述限制因素。相比于在蛋白电子传递过程研究中作为电子供体的多种天然氨基酸以及多巴、3-氨基酪氨酸或者二氟代酪氨酸等非天然氨基酸,3-吡唑基酪氨酸-Cu(II) 可以作为电子受体,这种独特的性质使得我们可以研究复杂生物学系统中的电子传递过程,而这是先前的电子传递研究方法所不能达到的。尽管已有报道含有可以结合金属基团(如联吡啶,羟基喹啉等)的非天然氨基酸可以被基因编码至目标蛋白中,但是对于它们在蛋白中发挥电子传递功能的应用至今却没有描述,而且,以上非天然氨基酸应用的最大瓶颈问题来自于其合成的复杂性,目前能够整合至蛋白中的以上非天然氨基酸的合成至少需要五个步骤才能得到产率较低的消旋混合物,而且整个合成过程涉及到重金属催化,致癌溶剂,强酸强碱以及多重纯化步骤。本发明中,我们开发了一种高效合成金属螯合非天然氨基酸-3-吡唑基酪氨酸(pyTyr)的方法,该方法仅需两步就可以获得较高产率(50%)的 pyTyr,并且不需要经过后续复杂的过柱纯化步骤即可被遗传整合到蛋白质中。

[0004] 水母绿色荧光蛋白(Aequorea victoria green fluorescent protein, GFP)目前被广泛应用于研究生物分子定位和相互作用中,但是在水母中该蛋白的生物功能及机制至今仍在探索研究中。近期,有研究表明 GFP 可以作为光诱导电子供体,因此在生物体内

可能通过感光进而发挥体内电子传递的功能。然而,由于缺乏在目标蛋白的特定位置点中加入电子受体的有效方法,导致人们无法深入了解生物体内 GFP 的电子传递机制。本发明拟通过在 GFP 中定点特异插入 pyTyr,使其通过整合铜离子 Cu(II) 形成 pyTyr-Cu(II) 复合物,而 pyTyr-Cu(II) 可以作为电子受体,与作为电子供体的 GFP 发色基团产生光诱导电子传递,该研究将为 GFP 的电子传递机制提供研究基础。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。

[0005] 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. Opinion in Chemical Biology 9(6) :548-554(2005); Wang 等, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 35 :225-249(2006)。

发明内容

[0006] 1、技术问题

[0007] 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 :3 所示氨基酸和它们的保守性变体构成的组。这种氨酰基-tRNA 合成酶突变体能够用 3-吡啶基酪氨酸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 3-吡啶基酪氨酸。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-吡啶基酪氨酸氨酰基-tRNA 合成酶(pyTyrRS)。

[0008] 本发明涉及利用正交 tRNA、正交氨酰基-tRNA 合成酶的配对将 3-吡啶基酪氨酸定点特异插入目标蛋白质的 3-吡啶基酪氨酸翻译系统,和利用所述翻译系统在目标蛋白质中定点特异插入 3-吡啶基酪氨酸的方法。本发明还涉及用这种翻译系统和这种方法产生的含有 3-吡啶基酪氨酸的突变蛋白质及其应用。

[0009] 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-吡啶基酪氨酸定点特异插入蛋白质的 3-吡啶基酪氨酸翻译系统,并且提供该翻译系统在目标蛋白质中定点特异插入 3-吡啶基酪氨酸的方法。

[0010] 本发明还提供利用本发明的 3-吡啶基酪氨酸翻译系统产生的含有至少一个 3-吡啶基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-吡啶基酪氨酸

氨酸定点特异插入目的蛋白中,所述目的蛋白包括,但不限于,绿色荧光蛋白(GFP)。通过本发明的方法得到的包含 3-吡唑基酪氨酸的突变绿色荧光蛋白通过螯合铜离子,可以作为电子受体,与作为电子供体的 GFP 发色基团产生光诱导电子传递。同时,本发明还通过解析了 GFP-151pyTyr 和 GFP-151pyTyr-Cu(II) 的高分辨率晶体结构为 pyTyr 螯合铜离子及 GFP 发色基团和 pyTyr-Cu(II) 之间产生的光诱导电子传递提供了结构研究基础。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绿色荧光蛋白之外的多种蛋白中定点特异插入 3-吡唑基酪氨酸,并不局限于绿色荧光蛋白。

[0011] 最后,本发明还有一个目的是提供一种高效的 3-吡唑基酪氨酸(pyTyr)的合成方法,该方法仅需两步就可以获得较高产率的 pyTyr,并且不需要经过后续复杂的过柱纯化步骤。

[0012] 2、技术方案

[0013] 本发明人经过筛选,首次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 :3 所示氨基酸和它们的保守性变体构成的组。并且,本发明人利用所述正交氨酰基-tRNA 合成酶,研发了 3-吡唑基酪氨酸翻译系统。

[0014] 具体来说,本发明提供在体内(例如在宿主细胞内)对选择密码子(selector codon)如琥珀终止密码子(TAG)起反应而将非天然氨基酸 3-吡唑基酪氨酸定点特异插入延伸中的多肽链的 3-吡唑基酪氨酸翻译系统。所述 3-吡唑基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 合成酶不会用氨基酸(天然的或非天然的)加载 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用氨基酸(天然的或非天然的)加载内源性 tRNA。利用所述翻译系统能够产生含有在翻译过程中定点特异插入 3-吡唑基酪氨酸的大量蛋白质。

[0015] 在一些方面中,本发明提供 3-吡唑基酪氨酸翻译系统,所述翻译系统包含:(a)非天然氨基酸,即 3-吡唑基酪氨酸,(b)正交氨酰基-tRNA 合成酶(O-RS),和(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-吡唑基酪氨酸),优先氨酰化所述 O-tRNA。

[0016] 优选地,本发明的 3-吡唑基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-吡唑基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。

[0017] 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 ID NO :3 所示氨基酸和它们的保守性变体构成的组。

[0018] 在本发明的优选方面中,本发明提供一种 3-吡唑基酪氨酸翻译系统,所述系统包含:

[0019] (i) 3-吡唑基酪氨酸;

[0020] (ii) 正交氨酰基-tRNA 合成酶;

[0021] (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-吡唑基酪氨酸优先氨酰化所述正交 tRNA;和

[0022] (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。

[0023] 优选地,所述 3-吡唑基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] 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 (O-RS) 可以包含 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列及该序列的保守变体。

[0025] 在一些方面中,本发明的 3-吡唑基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。

[0026] 在一些方面中,本发明提供包含正交 tRNA 序列和编码正交氨酰基-tRNA 合成酶的核苷酸序列的宿主细胞。所用的宿主细胞不作具体限定,只要 O-RS 和 O-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,如大肠杆菌。如实施例所述,可以将包含正交 tRNA 序列的重组载体和包含编码正交 3-吡唑基酪氨酸氨酰 tRNA 合成酶的核苷酸序列的重组载体共转化到宿主细胞中,而获得包含正交 tRNA 序列和编码正交 3-吡唑基酪氨酸氨酰 tRNA 合成酶的核苷酸序列的宿主细胞。所述包含正交 tRNA 序列和编码本发明的正交 3-吡唑基酪氨酸氨酰 tRNA 合成酶的核苷酸序列的宿主细胞构成本发明的另一个方面。

[0027] 本发明还提供产生在至少一个所选位置定点特异插入 3-吡唑基酪氨酸的突变蛋白质的方法。所述方法利用上述 3-吡唑基酪氨酸翻译系统实现。所述方法通常始于提供含有以下组分的 3-吡唑基酪氨酸翻译系统的步骤:(i) 非天然氨基酸,即 3-吡唑基酪氨酸;(ii) 正交氨酰基-tRNA 合成酶 (O-RS);(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 用所述非天然氨基酸(即 3-吡唑基酪氨酸)优先氨酰化所述 O-tRNA;和(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);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转化到适当的宿主细胞中,然后将编码所述目标蛋白质的核酸转化到包含正交 tRNA 序列和编码正交氨酰基-tRNA 合成酶的核苷酸序列的宿主细胞中,在培养基中加入 3-吡唑基酪氨酸,在所述蛋白质的翻译过程中,3-吡唑基酪氨酸氨酰化的 O-tRNA 对所述选择密码子起反应而将培养基中的 3-吡唑基酪氨酸定点特异插入所述目标蛋白质的所选位置,从而产生在所选位置含有 3-吡唑基酪氨酸的突变蛋白质。其中包含正交 tRNA 序列和编码正交 3-吡唑基酪氨酸氨酰 tRNA 合成酶的核苷酸序列的宿主细胞可以通过将包含正交 tRNA 序列的重组载体和包含编码正交 3-吡唑基酪氨酸氨酰 tRNA 合成酶的核苷酸序列的重组载体共转化到所选的宿主细胞中而获得。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。

[0028] 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-吡唑基

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。

[0029] 还可在宿主细胞内实施产生含有 3-吡唑基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-吡唑基酪氨酸翻译系统(即, 包含编码 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-吡唑基酪氨酸等)培养该宿主细胞可导致在所述目标蛋白质中定点特异插入 3-吡唑基酪氨酸。在一些实施方式中, 提供步骤包括提供真菌宿主细胞(例如, 大肠杆菌)。

[0030] 本发明还提供生产含有 3-吡唑基酪氨酸的绿色荧光蛋白突变体的方法, 所述方法利用上述 3-吡唑基酪氨酸翻译系统, 其中所用的编码绿色荧光蛋白突变体的核酸序列可以为, 但不限于, SEQ ID NO:8, 10, 12, 例如, 在野生型绿色荧光蛋白的 149 位, 151 位和 182 位分别引入 3-吡唑基酪氨酸, 相应地, 利用本发明的突变方法所得绿色荧光蛋白突变体的氨基酸序列为 SEQ ID NO:7, 9, 11。这些方法通常始于提供含有以下组分的 3-吡唑基酪氨酸翻译系统的步骤:(i) 3-吡唑基酪氨酸;(ii) 正交氨酰基-tRNA 合成酶(0-RS); (iii) 正交 tRNA(0-tRNA), 其包含 SEQ ID NO:1 所示的多核苷酸序列, 其中所述 0-RS 用所述 3-吡唑基酪氨酸优先氨酰化所述 0-tRNA; 和 (iv) 编码所述绿色荧光蛋白的核酸, 例如, 但不限于, SEQ ID NO:8, 10, 12, 其中所述核酸含有所述 0-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); 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转化到适当的宿主细胞中, 然后将编码所述目标蛋白质的核酸转化到所得到的宿主细胞中, 在培养基中加入 3-吡唑基酪氨酸, 在所述蛋白质的翻译过程中, 3-吡唑基酪氨酸氨酰化的 0-tRNA 对所述选择密码子起反应而将培养基中的所述 3-吡唑基酪氨酸定点特异插入所述绿色荧光蛋白的所选位置, 之后通过整合铜离子来研究 GFP 的光诱导电子传递。

[0031] 本发明还提供利用本发明的 3-吡唑基酪氨酸翻译系统产生的含有 3-吡唑基酪氨酸的绿色荧光蛋白突变体, 所述绿色荧光蛋白突变体的氨基酸序列为 SEQ ID NO:7, 9, 11, 在野生型绿色荧光蛋白的 149 位, 151 位和 182 位分别引入 3-吡唑基酪氨酸, 所述绿色荧光蛋白突变体通过整合铜离子产生光诱导电子传递。

[0032] 最后, 本发明还提供一种高效的 3-吡唑基酪氨酸(pyTyr) 的合成方法, 所述方法包括下列两个步骤: 第一步: 在 50ml 圆底烧瓶中加入 2.46g 3-碘代酪氨酸, 溶于 20ml 10% NaOH 水溶液中, 另取 1.92g t-Boc 酸酐溶于 20ml THF 中后, 将其滴加于 3-碘代酪氨酸 NaOH 溶液中, 室温下搅拌过夜, 停止反应后, 加入适量的盐酸, 调节 pH 值至 6.5-7.0 之间, 然后用乙酸乙酯萃取, 收集乙酸乙酯相进行旋蒸, 可得到 2.94g 的 Boc-L-3-碘代酪氨酸;

[0033] 第二步: 取一干净的 50ml 三口瓶, 加入 0.34g 吡唑, 1.92g 无水 Cs_2CO_3 , 0.019g CuI(作为催化剂), 2.03g Boc-L-3-碘代酪氨酸和 8ml 无水 DMF。在氮气保护的条件下, 搅

拌并于 180℃回流 18 小时,冷却后,旋干 DMF,用无水乙醇溶解并抽滤沉淀,取滤液加浓盐酸至沉淀完全,然后再进行抽滤,旋干滤液,用乙酸乙酯和蒸馏水进行萃取,收集水相,用制备型 HPLC 进行分离纯化。

[0034] 本领域技术人员应该理解,上述制备方法中各反应物的用量仅是举例说明的目的,本领域技术人员根据所需终产物量等因素,可以适当成比例放大或减少各反应物用量,这也在本发明的范围之内。

[0035] 3、有益效果

[0036] 蛋白质分子设计的目的之一是揭示一些通过研究天然蛋白所无法获得的生物原理,而这些新的原理可能会有潜在的生物化学与生物物理的应用前景。然而,近观一些天然存在的金属蛋白,我们发现自然界利用金属或其配合物的种类十分有限。而且能与这些金属或其配合物形成配位作用的氨基酸种类也十分有限,自然界存在的 20 种天然氨基酸中能形成配位作用的不到一半。对于天然配位性氨基酸的局限性,人们正试图通过在蛋白的设计与构建的过程中引入非天然氨基酸来加以克服。这些非天然氨基酸与天然氨基酸在结构上有着类似性,但其结构与性质更多样化。

[0037] 通过生物正交化学的方法选择性的修饰蛋白,可以实现蛋白位点特异性插入非天然氨基酸。应用琥珀密码子在细胞中编码 3-吡啶基酪氨酸,实现在绿色荧光蛋白中特定位点插入该非天然氨基酸,使其螯合铜离子 Cu(II) 形成 pyTyr-Cu(II) 复合物,而 pyTyr-Cu(II) 可以作为电子受体,与作为电子供体的 GFP 发色基团产生光诱导电子传递。同时,本发明还通过解析了 GFP-151pyTyr 和 GFP-151pyTyr-Cu(II) 的高分辨率晶体结构为 pyTyr 螯合铜离子及 GFP 发色基团和 pyTyr-Cu(II) 之间产生的光诱导电子传递提供了结构研究基础。同时,本发明涉及的高效合成 3-吡啶基酪氨酸(pyTyr)的方法,大大简化了合成步骤,避免了合成过程中所涉及到的重金属催化,致癌溶剂及强酸强碱,并且不需要经过后续复杂的过柱纯化步骤就能得到较高产率的目标产物。

附图说明

[0038] 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:

[0039] 图 1 是 (S)-2-氨基-3-(4-羟基-3-(1H-吡啶-1-基)苯基)丙酸(简称为 pyTyr)的化学合成;

[0040] 图 2 是 pyTyr 的核磁图谱,上图是氢谱图,下图是碳谱图;

[0041] 图 3 是正交 tRNA,氨酰基-tRNA 合成酶,肌红蛋白及绿色荧光蛋白系列突变体序列;

[0042] 图 4 是 SDS-PAGE 电泳图及质谱图:A 是 pyTyr-Mb(4TAG) 的 SDS-PAGE 电泳图,B 是 pyTyr-GFP(151TAG) 的 SDS-PAGE 电泳图;C 是 pyTyr-Mb(4TAG) 的质谱图;

[0043] 图 5 是 wt GFP, GFP-149pyTyr 和 GFP-151pyTyr 的荧光光谱图;

[0044] 图 6 是 wt GFP, GFP-149pyTyr, GFP-151pyTyr 和 GFP-182pyTyr 中加入不同浓度 Cu(II) 离子后的荧光强度图;

[0045] 图 7 是亚铁氰化钾导致的 GFP-149pyTyr-Cu(II) 荧光强度恢复;

[0046] 图 8 是荧光淬灭强度与温度的关系图;

[0047] 图 9 是 pyTyr-Cu(II) 的吸收光谱和 GFP 的荧光光谱图;

- [0048] 图 10 是 GFP-149pyTyr-Cu(II) 光激发后加入 BCS 的吸收光谱图；
- [0049] 图 11 是 GFP 系列突变体整合铜离子后的荧光寿命曲线图；
- [0050] 图 12 是 GFP 发光基团和 pyTyr 残基间距离值与光诱导电子传递速率 k_{ET} 值的线性关系图；
- [0051] 图 13 是高分辨率晶体结构图和电子密度图：A 是 GFP-151pyTyr-Cu(II) 的晶体结构图；B 是 GFP-151pyTyr 的电子密度图；C 是 GFP-151pyTyr-Cu(II) 的电子密度图。

具体实施方式

[0052] 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。

[0053] 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。

[0054] 实施例 1：pyTyr 的化学合成（参见图 1 和图 2）

[0055] 在 50ml 圆底烧瓶中加入 3-碘代酪氨酸 (2.46g, 8mmol, 购自上海吉尔生化公司)，溶于 20ml 10% NaOH 水溶液中，另取 t-Boc 酸酐 (1.92g, 8.8mmol, 购自北京中胜华腾有限公司) 溶于 20ml THF 中后，将其滴加于 3-碘代酪氨酸 NaOH 溶液中，室温下搅拌过夜。停止反应后，加入适量的盐酸，调节 pH 值至 6.5-7.0 之间，然后用乙酸乙酯萃取，收集乙酸乙酯相进行旋蒸，可得到 2.94g 的 Boc-L-3-碘代酪氨酸。

[0056] 取一干净的 50ml 三口瓶，加入吡啶 (0.34g, 5mmol, 购自 Sigma 公司)，无水 Cs_2CO_3 (1.92g, 10mmol, 购自天津 Alfa Aesar 公司)，CuI (0.019g, 0.1mmol, 作为催化剂)，Boc-L-3-碘代酪氨酸 (2.03g, 5mmol) 和 8ml 无水 DMF (购自北京百灵威公司)。在氮气保护的条件下，搅拌并于 180°C 回流 18 小时。冷却后，旋干 DMF，用无水乙醇溶解并抽滤沉淀，取滤液加浓盐酸至沉淀完全，然后再进行抽滤，旋干滤液，用乙酸乙酯和蒸馏水进行萃取，收集水相，用制备型 HPLC 进行分离纯化（分离柱 YMC AA12S052503WT，购自慧德易公司，流速 12ml/min）。收率 50%。MS :m/z :248 [M+H]⁺；¹H-NMR (600MHz, DMSO-d₆ (CD3SOCD3)) : δ 10-11.6 (s-b, 1H), 8.44 (t, 2H), 8.38 (s, 1H), 7.8 (s, 1H), 7.7 (s, 1H), 7.14 (dd, 1H), 6.6 (s, 1H), 4.27 (dd, 1H, -CH), 3.19 (m, 2H, -CH₂)。 ¹³C NMR (600MHz, DMSO-d₆) δ 35, 54, 107, 118, 124, 126, 127, 129, 132, 139, 147, 172ppm。

[0057] 以上合成反应所需化学试剂如无特别说明，均购自北京化工厂，纯度均为分析纯以上级别。

[0058] 实施例 2：进化 pyTyr 特异性氨酰基-tRNA 合成酶

[0059] 为了在基因中位点特异性插入 pyTyr，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 (MjtRNA_{CUA}^{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)。

[0060] 通过正负筛选来进化特异性识别 pyTyr 的氨酰基-tRNA 合成酶 (参见 Liu, X. H. ; Yu, Y. ;Hu, C. ;Zhang, W. ;Lu, Y. ;Wang, J. Y, Significant Increase of Oxidase Activity through the Genetic Incorporation of a Tyrosine-Histidine Cross-Link in a Myoglobin Model of Heme-Copper Oxidase. *Angewandte Chemie-International Edition* 2012, 51(18), 4312-4316.)。正筛选质粒包含 MjtRNA_{CUA}^{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 T7 RNA 聚合酶, 四环素抗性基因。负筛选质粒包含 MjtRNA_{CUA}^{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 (GMMML 极限培养基的配方: M9 盐 / 甘油: 764g Na₂HPO₄ · 7H₂O 或者 30g Na₂HPO₄, 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 GMMML 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 GMMML 培养基中加入 500ml 3% 琼脂粉, 0.5mM pyTyr, 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。

[0061] 最后一轮正筛选挑 384 个克隆, 分别点板在含有 0.5mM pyTyr、氯霉素 60, 80, 100, 120mg/L 的 GMMML 固体培养基上, 及不包含 pyTyr、但包含氯霉素 0, 20, 40, 60mg/L 的 GMMML 固体培养基。挑选在在 0.5mM pyTyr 120mg/L 氯霉素的培养基上生长, 而在 0mM pyTyr 40mg/L 氯霉素培养基中不生长的克隆进行进一步验证。挑出 3 个克隆, 其中克隆 1 的 3-吡唑基酪氨酸插入效率最高, 测序表明, 克隆 1 所包含的氨酰基-tRNA 合成酶突变体 (pyTyrRS) 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:3 所示, 其中突变位点为 Tyr32Asp, Leu65Thr, His70Gly 和 Asp158Ala。

[0062] 实施例 3: 表达 pyTyr-肌红蛋白, pyTyr-绿色荧光蛋白及质谱鉴定

[0063] 将正交 tRNA (SEQ ID NO:1) 和筛选出来的 pyTyrRS (SEQ ID NO:3) 分别构建到 pEVOL 载体 (购自美国 scripps 研究所 Peter G. Schultz 实验室) 上, 然后共转化到包含有 pbad-肌红蛋白 (4TAG) 或 pET-绿色荧光蛋白 (151TAG) 表达质粒 (该质粒购自美国 Scripps 研究所 Peter G. Schultz 实验室) (其中肌红蛋白的核苷酸序列为 SEQ ID NO:5, 绿色荧光蛋白的核苷酸序列为 SEQ ID NO:10) 的 DH10B 细胞 (购自全式金公司) 中。挑取单个克隆在 37°C 培养到 OD₆₀₀ 约等于 1.1 时, 向 LB 培养基中加入 0.5mM pyTyr, 1mM IPTG 及 0.2% 阿拉伯糖 (购自 Sigma 公司) 培养细胞, 对照不加入 pyTyr。6-8 小时之后, 收菌, Ni-NTA 纯化蛋白, 并用 SDS-PAGE 电泳分析 (图 4A, 图 4B)。

[0064] 我们发现,只有在存在 pyTyr 的培养基中才能纯化出全长的肌红蛋白和绿色荧光蛋白,这说明筛选出来的 pyTyrRS 可以特异性的识别 pyTyr。在 LB 培养基中 pyTyr- 肌红蛋白的产率为 10mg/L,而野生型肌红蛋白的产率为 50mg/L;pyTyr- 绿色荧光蛋白的产率为 20mg/L,而野生型绿色荧光蛋白的产率为 100mg/L。为了检测 pyTyr 仅仅插入到肌红蛋白的 4 位琥珀突变位点,我们对 pyTyr- 肌红蛋白进行了 ESI-TOF 质谱检测,检测结果分子量为 18496Da(图 4C),与计算的分子量 18496Da 吻合。

[0065] 实施例 4:表达 pyTyr- 绿色荧光蛋白突变体进行光诱导电子传递研究

[0066] 我们用基因工程方法构建了绿色荧光蛋白系列突变体(核苷酸序列如 SEQ ID NO: 8,10,12 所示),其中 149 位,151 位和 182 位分别突变为 TAG 终止密码子,然后用实施例 3 中的相同方法在 GFP 的突变位点特异插入 pyTyr,表达产生突变蛋白 GFP-149pyTyr, GFP-151pyTyr 和 GFP-182pyTyr(氨基酸序列如 SEQ ID NO:7,9,11 所示)。

[0067] 由于本发明主要通过测量荧光淬灭和荧光寿命的方法来研究 GFP 的光诱导电子传递,因此首先需验证 GFP 突变后有没有对蛋白自身的荧光强度产生影响,所以我们测量了 $1\mu\text{M}$ wt GFP(核苷酸序列为 SEQ ID NO:6), GFP-149pyTyr 和 GFP-151pyTyr 在 60mM Tris-HCl(pH 7.0) 缓冲液中的发射光谱,结果显示 GFP 系列突变体与其野生型的发射光谱相似,说明 GFP 中引入非天然氨基酸后没有影响蛋白的发光团形成及其荧光量子产率(图 5)。然后,我们往 $5\mu\text{M}$ wt GFP, GFP-149pyTyr, GFP-151pyTyr 和 GFP-182pyTyr 中加入不同浓度的 Cu(II) 离子,测量其荧光强度,结果如图 6 所示,加入 $5\mu\text{M}$ 的 Cu(II) 离子可以导致 GFP-149pyTyr, GFP-151pyTyr 和 GFP-182pyTyr 的荧光强度分别淬灭 85%, 50% 和 25%, 而 wt GFP 仅仅淬灭了不到 5%, 证明 GFP 中插入 pyTyr 后可以有效地整合铜离子,且蛋白荧光可以被 Cu(II) 不同程度的淬灭。接着,我们又往 GFP-149pyTyr-Cu(II) 中分别加入多种对 Cu(II) 离子具有不同亲和力的铜离子螯合剂:甲硫氨酸、乙二胺、组氨酸、44'-联吡啶和 N-(2-羟乙基)亚氨基二乙酸,通过测量 GFP-149pyTyr-Cu(II) 的荧光强度,再结合 Scatchard 分析法计算发现 GFP-149pyTyr 对 Cu(II) 具有高度亲和力,其 K_D 值为 0.9nM。然后,我们用还原滴定法往 $5\mu\text{M}$ GFP-149pyTyr-Cu(II) 中加入 50mM 还原剂亚铁氰化钾,发现其可以完全恢复 GFP-149pyTyr-Cu(II) 的荧光强度(图 7),根据能斯特方程设计实验并计算得出 GFP-149pyTyr-Cu(II) 的还原电位为 168mV,这与 $\text{Cu}^{2+} + \text{e}^- \rightarrow \text{Cu}^+$ 中产生的 153mV 电位值很接近。以上这些结果都充分地证明 GFP-149pyTyr 对 Cu(II) 的高度亲和力。

[0068] 由于 GFP 在不同位置含有结合金属离子的非天然氨基酸 pyTyr,其荧光强度可以被 Cu(II) 离子不同程度的淬灭,为了验证这种淬灭机制,我们还检测了荧光淬灭强度和温度的关系,发现淬灭强度随着温度的增加而降低(图 8),说明该淬灭现象并非动态荧光淬灭;如图 9 所示, pyTyr-Cu(II) 的吸收光谱和 GFP 的荧光光谱没有重叠,因此由 FRET 引起的淬灭机制也可能得到排除;为了进一步验证以上的荧光淬灭机制为 PET 机制,我们选用一种 Cu(I) 特异性螯合剂 -bathocuproine disulfonate(浴酮灵二磺酸二钠盐,BCS) 来验证 GFP-149pyTyr-Cu(II) 中的光诱导电子传递现象,因为当 GFP-149pyTyr 螯合 Cu(II) 并且经过光激活后,如果能够在 GFP 和 Cu(II) 之间形成电子传递,势必会产生 Cu(I),而 BCS 和 Cu(I) 特异性结合形成的复合物在 483nm 处具有较强吸收(摩尔消光系数为 $12,500\text{M}^{-1}$)。测量结果如图 10 所示,当 $2\mu\text{M}$ GFP-149pyTyr, $5\mu\text{M}$ Cu(II) 和 $10\mu\text{M}$ BCS 的混合液经过 405nm 激光激发后,其在 483nm 处的吸光值迅速升高,并且在 10 分钟后达到最高值。计算发

现,该过程中产生了 $4.1 \mu\text{M Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2$ 产物。即 1 当量的蛋白通过光诱导转移可以产生两个当量的电子转移,这些结果与之前报道的 GFP 能通过光诱导产生 2 个电子氧化的结果一致。该实验证实了 GFP 发色基团和 pyTyr-Cu(II) 之间确实产生了光诱导电子传递现象。

[0069] 通过测量荧光寿命进一步研究 GFP 发色基团和 pyTyr-Cu(II) 之间的光诱导电子传递速率。如图 11 所示,加入 Cu(II) 后,pyTyr-GFP 不同突变体的荧光寿命均不同程度的减短,其中 GFP-149pyTyr 的荧光寿命从 3.4ns 降低至 0.7ns,根据公式: $k_{\text{ET}} = \tau_1^{-1}(\text{加入 Cu(II)}) - \tau_2^{-1}(\text{不加 Cu(II)})$ 可以得到 GFP-149pyTyr-Cu(II) 的光诱导电子传递速率 k_{ET} 为 $1.13 \times 10^9 \text{s}^{-1}$;同理计算出 GFP-151pyTyr-Cu(II) 和 GFP-182pyTyr-Cu(II) 的 k_{ET} 分别为 0.37×10^9 和 $0.08 \times 10^9 \text{s}^{-1}$ (表 1)。相比于 GFP-149pyTyr-Cu(II), GFP-151pyTyr-Cu(II) 和 GFP-182pyTyr-Cu(II) 电子传递速率有所降低,我们推测很有可能是因为 GFP 发色团与 pyTyr 残基之间的距离增大而导致的,因此我们根据 GFP-151pyTyr-Cu(II) 高分辨率晶体结构(如实施例 5 所述)计算出 GFP 发色基团与 pyTyr151 残基之间的距离为 11.4 Å,而 GFP 发色基团与 pyTyr149 和 pyTyr182 之间的距离则通过测量 GFP-151pyTyr-Cu(II) 晶体结构中其与 Asn149 和 Tyr182 之间的距离得到。结果如图 12 所示, GFP 发色基团和 pyTyr-Cu(II) 之间的光诱导电子传递速率随着它们之间距离的增加而减慢。由于 GFP 二级结构主要为 β 桶组成的,实验证明该种类型结构相对于 α 螺旋更有利于 GFP 中的电子传递发生。通过计算发现 GFP-151pyTyr-Cu(II) 的距离衰减因子 β 值为 0.7,该值小于在通常蛋白中的距离衰减因子,因此推测在该 GFP 蛋白中的电子传递有可能还存在跳跃模式,使电子传递更加有效的进行。需要值得关注的是, GFP-151pyTyr-Cu(II) 的电子传递速度约 10-100 倍低于光系统(II)的主要电子传递反应,但高于目前为止的光系统(II)模拟系统。

[0070] 表 1. GFP 系列突变体的荧光寿命值及电子传递速率 k_{ET} 值。

	Mutant	τ_1 , ns without Cu(II)	τ_2 , ns with Cu(II)	distance (Å)	$k_{\text{ET}} (\text{s}^{-1})$
[0071]	149pyTyr	3.4	0.7	8.9	1.13×10^9
	151pyTyr	3.4	1.5	11.4	0.37×10^9
	182pyTyr	3.5	2.7	13.1	0.08×10^9

[0072] 实施例 5 :GFP-151pyTyr 和 GFP-151pyTyr-Cu(II) 高分辨率晶体结构的解析

[0073] 为了进一步了解 GFP-pyTyr 整合铜离子的机制,我们解析了 GFP-151pyTyr 和 GFP-151pyTyr-Cu(II) 的高分辨率晶体结构,如图 13 所示,将 GFP 的 Tyr151 替换为 pyTyr 后,pyTyr 形成了一种扭曲的构象,它的吡啶环和苯环形成了 30 度的夹角(图 13B);随后将 GFP-151pyTyr 晶体浸泡在 25mM CuCl_2 溶液中后,再解析其结构,发现 Cu(II) 离子特异性地结合到了 pyTyr 上,与 pyTyr 苯环上的氧原子和吡啶环上的氮原子配位,形成了共平面结构(图 13C)。

[0074] 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,在不背离由后附的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]

序列表

IB125261序列表

<110> 中国科学院生物物理研究所

<120> 3-吡唑基酪氨酸翻译系统及其应用

<130> IB125261

<160> 12

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 77

<212> DNA

<213> 正交tRNA

<400> 1

tggtcggcg ggcggattt gaaccagcgc catcgggatt tagagtccgc cgttctgccc 60

tgctgaacta ccgccgg 77

<210> 2

<211> 306

<212> PRT

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

<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]

IB125261序列表

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
 305

<210> 3

<211> 306

<212> PRT

<213> 正交氨基酸-tRNA合成酶 (pyTyrRS)

<400> 3

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 Asp
 20 25 30

[0003]

IB125261序列表

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
 Thr 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
 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
 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> 4

<211> 921

[0004]

IB125261序列表

<212> DNA

<213> 正交氨酰基-tRNA合成酶 (pyTyrRS) 的核苷酸序列

<400> 4

```

atggacgaat ttgaaatgat aaagagaaac acatctgaaa ttatcagcga ggaagagtta    60
agagaggttt taaaaaaaga tgaaaaatct gctgatatag gttttgaacc aagtggtaaa    120
atacatttag ggcattatct ccaataaaaa aagatgattg atttacaaaa tgettgattt    180
gafataatta taactttggc tgatttaggc gcctatttaa accagaaagg agagttggat    240
gagattagaa aaataggaga ttataacaaa aaagtttttg aagcaatggg gttaaaggca    300
aaatatgttt atggaagtga attccagctt gataaggatt atacactgaa tctctataga    360
ttggctttaa aaactacctt aaaaagagca agaaggagta tggaacttat agcaagagag    420
gafgaaaaate caaaggttgc tgaagttatc tatccaataa tgcaggttaa tgcgattcat    480
tatcttggcg ttgatgttgc agttggaggg atggagcaga gaaaaataca catgttagca    540
agggagcttt taccaaaaaa gtttgtttgt attcacaacc ctgtcttaac gggtttggat    600
ggagaaggaa agatgagttc ttcaaaaggg aattttatag ctgttgatga ctctccagaa    660
gagattaggg ctaagataaa gaaagcatac tgcccagctg gagttgttga aggaaatcca    720
ataatggaga tagetaaata ettccttgaa tatccittaa ccataaaaaag gccagaaaaa    780
ttfsgtggag atttgacagt taatagctat gaggagttag agagtttatt taaaaataag    840
gaattgcate caatggattt aaaaaatget gtagctgaag aacttataaa gattttagag    900
ceaattagaa agagattata a                                921

```

<210> 5

<211> 492

<212> DNA

<213> 肌红蛋白突变体 (Mb-4TAG) 的核苷酸序列

<400> 5

```

atggttctgt aggaaggatga atggcagctg gtictgcatg ttgggctaa agttgaagct    60
gacgtcctgt gtcattgtca ggacatcttg attcagctgt tcaaatetca tccgaaact    120
ctggaaaaat tcatcgtttt caaacatctg aaaactgaag ctgaaatgaa agctttctgaa    180
gacttgaaaa aacatgggtg taccgtgta actgccctag gtgctatcct taagaaaaaa    240
ggcatcatg aagctgagct caaaccgctt gcacaatcgc atgctactaa acataagatc    300
ccgatcaaat acctggaatt catctctgaa gcgatcctcc atgttctgca tcttagacat    360
ccaggtgact tcggtctga cgctcagggt gctatgaaca aagctctcga getgttccgt    420
aaagatatcg ctgctaagta caaagaactg ggttaccagg gtggctcggg acatcatcac    480
caccaccatt ga                                492

```

<210> 6

<211> 741

<212> DNA

[0005]

IB125261序列表

<213> 野生型绿色荧光蛋白 (GFP) 的核苷酸序列

<400> 6
atgagtaaag gagaagaact ttteactgga gttgtccea tctttgttga attagatggt 60
gatgttaatg ggcacaaatt tctfgtcagt ggagagggtg aaggatgatc aacatacggg 120
aaacttacc c ttaaattfat ttgcactact ggaaaactac ctgttccatg gccaacactt 180
gtcactactt tctettatgg ttttcaatgc ttttcccggt atccggatca catgaaacgg 240
catgactttt tcaagagtgc catgcccga ggttatgtac aggaacgcac tatatctttc 300
aaagatgacg ggaactacaa gacgcgtgct gaagtcagt ttgaaggatg tacccttgtt 360
aatcgtatcg agttaaaggg tattgatttt aaagaagatg gaaacattct cggacacaaa 420
ctcgaataca actataactc acacaatgta tacatcacgg cagacaaaca aaagaatgga 480
atcaaaagct acttcaaaat tgcaccacac attgaagatg gatecgttca actageagac 540
cattataaac aaaatactcc aattggcgat ggccctgtcc ttttaccaga caaccattac 600
ctgtcgacac aatctgcctt ttgaaagat cccaacgaaa agecgtgacca catggtcctt 660
cttgagtftg taactgtctg tgggattaca catgcatgg atgagetcta caaacctegag 720
caccaccacc accaccactg a 741

<210> 7

<211> 246

<212> PRT

<213> 含有3-吡唑基酪氨酸的绿色荧光蛋白突变体 (GFP-I49pyTyr),
其中*表示引入的3-吡唑基酪氨酸

<400> 7

Met	Ser	Lys	Gly	Glu	Glu	Leu	Phe	Thr	Gly	Val	Val	Pro	Ile	Leu	Val
1			5					10						15	
Glu	Leu	Asp	Gly	Asp	Val	Asn	Gly	His	Lys	Phe	Ser	Val	Ser	Gly	Glu
		20					25						30		
Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Thr	Tyr	Gly	Lys	Leu	Thr	Leu	Lys	Phe	Ile	Cys
		35				40					45				
Thr	Thr	Gly	Lys	Leu	Pro	Val	Pro	Trp	Pro	Thr	Leu	Val	Thr	Thr	Phe
		50			55						60				
Ser	Tyr	Gly	Val	Gln	Cys	Phe	Ser	Arg	Tyr	Pro	Asp	His	Met	Lys	Arg
65				70					75					80	
His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser	Ala	Met	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu	Arg
			85					90						95	
Thr	Ile	Ser	Phe	Lys	Asp	Asp	Gly	Asn	Tyr	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu	Val
			100				105							110	
Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	Val	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly	Ile
		115				120								125	

[0006]

IB125261序列表

Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn
 130 135 140
 Tyr Asn Ser His * Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly
 145 150 155 160
 Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val
 165 170 175
 Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro
 180 185 190
 Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser
 195 200 205
 Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val
 210 215 220
 Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Leu Glu
 225 230 235 240
 His His His His His His
 245

<210> 8

<211> 741

<212> DNA

<213> 含有3-吡唑基酪氨酸的绿色荧光蛋白突变体(GFP-149pyTyr)的核苷酸序列

<400> 8
 atgagtaaag gagaagaact ttactctgga gttgtcccaa ttcttgttga attagatggt 60
 gatgtaaatg ggcacaaatt ttctgtcagt ggagagggtg aaggatgatc aacatacggg 120
 aaacttaccc ttaaatttat ttgcactact ggaaaactac ctgttccatg gccaacactt 180
 gtcactactt tctettatgg tgttcaatgc ttttcccggt atccggatca catgaaacgg 240
 catgactttt tcaagagtgc catgcccgaa ggttatgtac aggaacgeac tatactttc 300
 aaagatgacg ggaactacaa gacgcgtgct gaagtcaagt ttgaaggatg tacccttgtt 360
 aatcgtatcg agttaaaggg tattgatttt aaagaagatg gaaacattct cggacacaaa 420
 ctcgaataca actataactc aactaggtg tacatcacgg cagacaaaca aaagaatgga 480
 atcaaaageta actteaaaat tcgcacaaac attgaagatg gatecgttca actagcagac 540
 cattatcaac aaaatactcc aatlgcgat ggccctgtcc ttctaccaga caaccattac 600
 ctgtcgacac aatctgccct ttcgaaagat cccaacgaaa agegtgacca catggtcctt 660
 cttgagtttg taactgetgc tgggattaca catggcatgg atgagcteta caaactcgag 720
 caccaccacc accaccactg a 741

<210> 9

<211> 246

<212> PRT

[0007]

IB125261序列表

<213> 含有3-吡唑基酪氨酸的绿色荧光蛋白突变体 (GFP-151pyTyr) ,
其中*表示引入的3-吡唑基酪氨酸

<400> 9

Met Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val
1 5 10 15

Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu
20 25 30

Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys
35 40 45

Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe
50 55 60

Ser Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Arg
65 70 75 80

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

Thr Ile Ser Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val
100 105 110

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

Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn
130 135 140

Tyr Asn Ser His Asn Val * Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly
145 150 155 160

Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val
165 170 175

Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro
180 185 190

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

Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val
210 215 220

Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Leu Glu
225 230 235 240

His His His His His His
245

<210> 10

<211> 741

[0008]

IB125261序列表

<212> DNA

<213> 含有3-吡唑基酪氨酸的绿色荧光蛋白突变体 (GFP-151pyTyr) 的核苷酸序列

<400> 10

```

atgagtaaag gagaagaact tticactgga gttgteccaa ttctgttga attagatggt      60
gatgttaatg ggcacaaatt ttctgtcagt ggagagggtg aaggtgatgc aacatacgg      120
aaacttacce ttaaatttat ttgcactact ggaaaaactac ctgttccatg gccaacactt      180
gtcactactt tctcttatgg tgttcaatgc ttttcccgtt atccggatca catgaaacgg      240
catgaactttt tcaagagtgc catgcccgaagggttatgtac aggaacgcac tatatctttc      300
aaagatgacg ggaactacaa gacgcgtgct gaagtcaagt ttgaaggatg taaccttgtt      360
aatcgtatcg agttaaagg tattgatittt aaagaagatg gaaacattct cggacacaaa      420
ctcgaataca actataacte acacaatgta tagatcacgg cagacaaaca aaagaatgga      480
atcaaageta acttcaaaat tcgccacaac attgaagatg gatecgttca actagecagac      540
cattatcaac aaaatactcc aattggcgat ggccctgtcc tttfaccaga caaccattac      600
ctgtcgacac aatctgccct ttcgaaagat cccaacgaaa agcgtgacca catggtcctt      660
cttgagtttg taactgetgc tgggattaca catggcatgg atgagctcta caaactegag      720
caccaccacc accaccactg a.                                             741

```

<210> 11

<211> 246

<212> PRT

<213> 含有3-吡唑基酪氨酸的绿色荧光蛋白突变体 (GFP-182pyTyr), 其中*表示引入的3-吡唑基酪氨酸

<400> 11

```

Met Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val
1           5           10           15

Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu
20           25           30

Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys
35           40           45

Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe
50           55           60

Ser Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Arg
65           70           75           80

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

Thr Ile Ser Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val
100          105          110

Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile

```

[0009]

		IB125261序列表													
		115				120				125					
Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	Ile	Leu	Gly	His	Lys	Leu	Glu	Tyr	Asn
	130					135					140				
Tyr	Asn	Ser	His	Asn	Val	Tyr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn	Gly
145				150						155					160
Ile	Lys	Ala	Asn	Phe	Lys	Ile	Arg	His	Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser	Val
			165						170					175	
Gln	Leu	Ala	Asp	His	*	Gln	Gln	Asn	Thr	Pro	Ile	Gly	Asp	Gly	Pro
			180					185					190		
Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Asn	His	Tyr	Leu	Ser	Thr	Gln	Ser	Ala	Leu	Ser
	195						200					205			
Lys	Asp	Pro	Asn	Glu	Lys	Arg	Asp	His	Met	Val	Leu	Leu	Glu	Phe	Val
	210					215					220				
Thr	Ala	Ala	Gly	Ile	Thr	His	Gly	Met	Asp	Glu	Leu	Tyr	Lys	Leu	Glu
225					230					235					240
His	His	His	His	His	His										
					245										
<210>	12														
<211>	741														
<212>	DNA														
<213>	含有3-吡唑基酪氨酸的绿色荧光蛋白突变体 (GFP-182pyTyr) 的核苷酸序列														
<400>	12														
		atgagtaaag	gagaagaact	tttcaactgga	gttgtcccaa	ttcttgttga	attagatggt								60
		gatgttaatg	ggcacaatt	ttctgtcagt	ggagagggtg	aaggatgac	aacatacga								120
		aaacttacec	ttaaatttat	ttgcaactact	ggaaaactac	ctgttccatg	gccaactatt								180
		gtcactactt	tctcttatgg	tgttcaatgc	ttttcccggt	atccggatec	catgaaacgg								240
		catgaactttt	tcaagagtgc	catgcccga	ggttatgtac	aggaacgcac	tatatcttc								300
		aaagatgacg	ggaactacaa	gacgcgtgct	gaagtcaagt	ttgaaggatga	tacccttgtt								360
		aatcgtatcg	agttaaaagg	tattgatctt	aaagaagatg	gaaacattct	cggacacaaa								420
		ctcgaataca	actataactc	acacaatgta	tacatcaegg	cagacaaaac	aaagaatgga								480
		atcaaaagct	acttcaaaat	tcgccacaac	attgaagatg	gatccgttca	actagcagac								540
		cattagcaac	aaaatactcc	aattggegat	ggeccgtgtec	ttttaccaga	caaccattac								600
		ctgtcgacac	aatctgcect	ttcgaagaat	cccaacgaaa	agcgtgacca	catggtcctt								660
		cttgagtttg	taactgctgc	tgggattaca	catggcatgg	atgagctcta	caactcgag								720
		caccaccacc	accaccactg	a											741

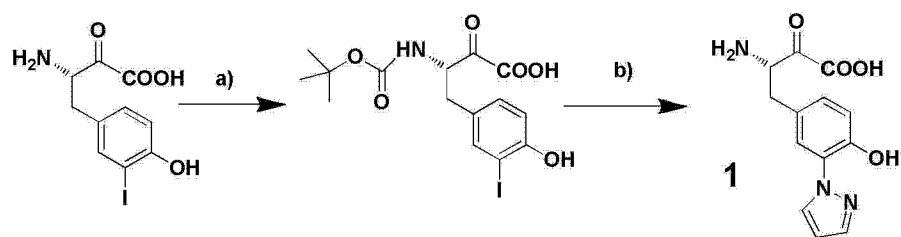


图 1

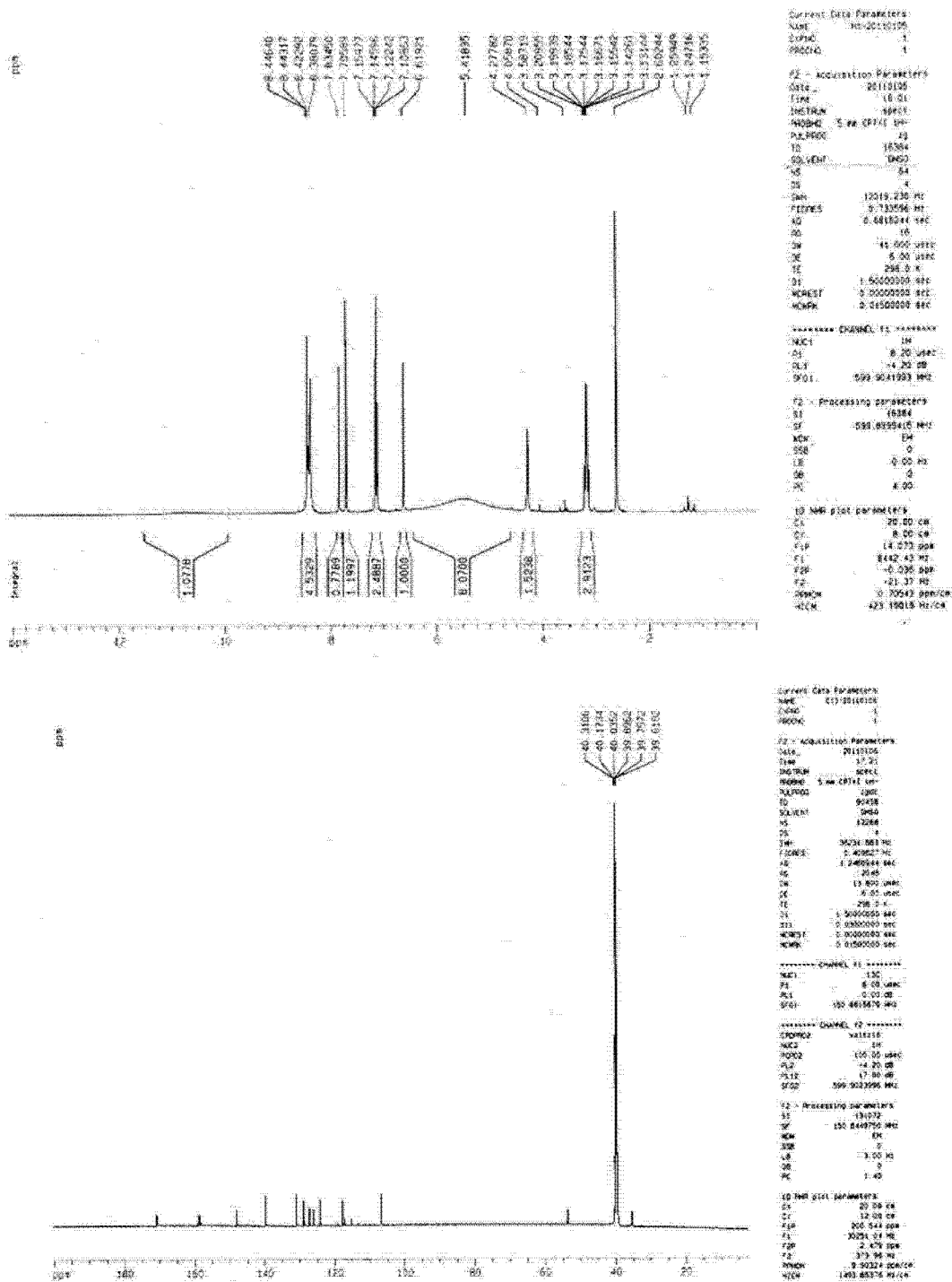


图 2

名称	核苷酸/氨基酸序列
正交 tRNA	<p><u>SEQ ID NO: 1</u> tggtcggcgccggcggattgaaccagcgccatgccgattagagtcggcgttctgcctgc tgaactaccgcccgg</p>
野生型酪氨酰 tRNA 合成酶 (MjTyrRS), 来源于詹氏甲烷 球菌	<p><u>SEQ ID NO: 2</u> MDEFEMIKRNTSEIISEEELREVLKKDEKSAYIGFEPGKIHL GHYLQIKKMIDLQNAGFDIILLADLHAYLNQKGELDEIRKI GDYNKKVFEAMGLKAKYVYGSEFQLDKDYTLNVYRLALK TTLKRARRSMELIAREDENPKVAEVIYPIMQVNDIHYLGVD VAVGGMEQRKIHMLARELLPKKVVCIHNPVLTGLDGEGKM SSSKGNFIAVDDSPPEIRAKIKKAYCPAGVVEGNPIMEIAKYF LEYPLTIKRPEKFGGDLTVNSYEELESFLKKNELHPMDLKNA VAEELIKILEPIRKRL</p>
正交氨酰基 -tRNA 合成酶 (pyTyrRS)	<p><u>氨基酸序列 (SEQ ID NO: 3):</u> MDEFEMIKRNTSEIISEEELREVLKKDEKSADIGFEPGKIHL GHYLQIKKMIDLQNAGFDIITLADLGAYLNQKGELDEIRKI GDYNKKVFEAMGLKAKYVYGSEFQLDKDYTLNVYRLALK TTLKRARRSMELIAREDENPKVAEVIYPIMQVNAIHYLGVD VAVGGMEQRKIHMLARELLPKKVVCIHNPVLTGLDGEGKM SSSKGNFIAVDDSPPEIRAKIKKAYCPAGVVEGNPIMEIAKYF LEYPLTIKRPEKFGGDLTVNSYEELESFLKKNELHPMDLKNA VAEELIKILEPIRKRL</p>
	<p><u>核苷酸序列 (SEQ ID NO: 4):</u> ATGGACGAATTTGAAATGATAAAGAGAAACACATCTGAAA TTATCAGCGAGGAAGAGTTAAGAGAGGTTTTAAAAAAG ATGAAAATCTGCTGATATAGGTTTTGAACCAAGTGGTAA AATACATTTAGGGCATTATCTCCAAATAAAAAAGATGATTG ATTTACAAAATGCTGGATTTGATATAATTATAACTTTGGCTG ATTTAGGCGCCTATTTAAACCAGAAAGGAGAGTTGGATGA GATTAGAAAAATAGGAGATTATAACAAAAAAGTTTTTGAA GCAATGGGGTTAAAGGCAAAATATGTTTATGGAAGTGAAT TCCAGCTTGATAAGGATTATACACTGAATGTCTATAGATTG GCTTTAAAACTACCTTAAAAAGAGCAAGAAGGAGTATG GAACTTATAGCAAGAGAGGATGAAAATCCAAGGTTGCT GAAGTTATCTATCCAATAATGCAGGTTAATGCGATTCATTAT CTTGGCGTTGATGTTGCAGTTGGAGGGATGGAGCAGAGA AAAATACACATGTTAGCAAGGGAGCTTTTACCAAAAAAG GTTGTTGTATTACAAACCCTGTCTTAACGGGTTTGGATG GAGAAGGAAAGATGAGTTCCTTCAAAGGGAATTTTATAG CTGTTGATGACTCTCCAGAAGAGATTAGGGCTAAGATAAA GAAAGCATACTGCCAGCTGGAGTTGTTGAAGGAAATCC AATAATGGAGATAGCTAAATACTTCCTTGAATATCCTTTAA CCATAAAAAGGCCAGAAAAATTTGGTGGAGATTTGACAG TTAATAGCTATGAGGAGTTAGAGAGTTTATTTAAAAATAAG GAATTGCATCCAATGGATTTAAAAAATGCTGTAGCTGAAG AACTTATAAAGATTTAGAGCCAATTAGAAAGAGATTATA A</p>
肌红蛋白突变体 (Mb-4TAG) 的 核苷酸序列	<p><u>SEQ ID NO: 5</u> atggtctgtaggaaggtgaatggcagctggttctgcatggtgggctaaagttgaagctgacgt cgctggtcatggtcaggacatctgattcgactgtcaaatctcatccgaaactctggaaaatt</p>

	<p>cgatcgtttcaaacatctgaaaactgaagctgaaatgaaagcttctgaagatctgaaaaacatg gtgttaccgtgttaactgccctaggtgctatccttaagaaaaagggcatcatgaagctgagctc aaaccgcttgacaatcgcatgctactaaacataagatcccgatcaaatacctggaattcatctc tgaagcgatcatccatgttctgcattctagacatccaggtgacttcgggtgctgacgctcagggtg ctatgaacaaagctctcgagctgttccgtaaagatctgctgctaagtacaaagaactgggttac caggggtggctcgggacatcatcaccatcaccattga</p>
野生型绿色荧光蛋白(GFP)的核苷酸序列	<p><u>SEQ ID NO:6</u> ATGAGTAAAGGAGAAGA ACTTTTCACTGGAGTTGTCCCA ATTCTTGTTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATT TTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGG AAA ACTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAA ACTAC CTGTTCCATGGCCAACTTTGTCACTACTTTTCTTATGGT GTTCAATGCTTTTCCCGTTATCCGGATCACATGAAACGGCA TGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAG GAACGCACTATATCTTTCAAAGATGACGGGAACTACAAGA CGCGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAA TCGTATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGA AACATTCTCGGACACAACTCGAATACA ACTATAACTCAC ACAATGTATACATCACGGCAGACAAACAAAAGAATGGAA TCAAAGCTAACTTCAA AATTCGCCACAACATTGAAGATGG ATCCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCA ATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCAGACAACCATTACC TGTCGACACAATCTGCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAA AGCGTGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAACTGCTGC TGGGATTACACATGGCATGGATGAGCTCTACAACTCGAG CACCACCACCACC ACTGA</p>
含有 3-吡唑基酪氨酸的绿色荧光蛋白突变体 (GFP-149pyTyr)	<p><u>氨基酸序列 (SEQ ID NO: 7)</u>, 其中*表示引入的 3-吡唑基酪氨酸 MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYG KLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFSYGVQCFSRYPDHMKRH DFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNR IELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSH*VYITADKQKNGIKAN FKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYSTQS ALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITHGMDELYKLEHHHHH H</p> <p><u>核苷酸序列 (SEQ ID NO:8):</u> ATGAGTAAAGGAGAAGA ACTTTTCACTGGAGTTGTCCCA ATTCTTGTTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATT TTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGG AAA ACTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAA ACTAC CTGTTCCATGGCCAACTTTGTCACTACTTTTCTTATGGT GTTCAATGCTTTTCCCGTTATCCGGATCACATGAAACGGCA TGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAG GAACGCACTATATCTTTCAAAGATGACGGGAACTACAAGA CGCGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAA TCGTATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGA AACATTCTCGGACACAACTCGAATACA ACTATAACTCAC ACTAGGTATACATCACGGCAGACAAACAAAAGAATGGAA TCAAAGCTAACTTCAA AATTCGCCACAACATTGAAGATGG ATCCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCA</p>

	<p>ATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCAGACAACCATTACC TGTCGACACAATCTGCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAA AGCGTGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAACTGCTGC TGGGATTACACATGGCATGGATGAGCTCTACAACTCGAG CACCACCACCACCACACTGA</p>
含有 3-吡唑基酪氨酸的绿色荧光蛋白突变体 (GFP-151pyTyr)	<p>氨基酸序列 (SEQ ID NO: 9), 其中*表示引入的 3-吡唑基酪氨酸</p> <p>MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYG KLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFSYGVQCFSRYPDHMKRH DFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNR IELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNV*ITADKQKNGIKAN FKIRHNIEDGSVQLADHYQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQS ALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITHGMDELYKLEHHHHH H</p>
	<p>核苷酸序列 (SEQ ID NO:10):</p> <p>ATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCACTGGAGTTGTCCCA ATTCTTGTTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATT TTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGG AAAAGCTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACACTAC CTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTCTCTTATGGT GTTCAATGCTTTTCCCGTTATCCGGATCACATGAAACGGCA TGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAG GAACGCACTATATCTTTCAAAGATGACGGGAAGCTACAAGA CGCGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAA TCGTATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGA AACATTCTCGGACACAACTCGAATACAACATAACTCAC ACAATGTATAGATCACGGCAGACAAACAAAAGAATGGAA TCAAAGCTAACTTCAAATTCGCCACAACATTGAAGATGG ATCCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCA ATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCAGACAACCATTACC TGTCGACACAATCTGCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAA AGCGTGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAACTGCTGC TGGGATTACACATGGCATGGATGAGCTCTACAACTCGAG CACCACCACCACCACACTGA</p>
含有 3-吡唑基酪氨酸的绿色荧光蛋白突变体 (GFP-182pyTyr)	<p>氨基酸序列 (SEQ ID NO: 11), 其中*表示引入的 3-吡唑基酪氨酸</p> <p>MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYG KLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFSYGVQCFSRYPDHMKRH DFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNR IELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYITADKQKNGIKA NFKIRHNIEDGSVQLADH*QNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQS ALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITHGMDELYKLEHHHHH H</p>
	<p>核苷酸序列 (SEQ ID NO:12):</p> <p>ATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCACTGGAGTTGTCCCA ATTCTTGTTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATT TTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGG AAAAGCTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACACTAC CTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTCTCTTATGGT GTTCAATGCTTTTCCCGTTATCCGGATCACATGAAACGGCA</p>

```

TGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAG
GAACGCACTATATCTTTCAAAGATGACGGGA ACTACAAGA
CGCGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAA
TCGTATCGAGTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGA
AACATTCTCGGACACAACTCGAATACA ACTATAACTCAC
ACAATGTATACATCACGGCAGACAAACAAAAGAATGGAA
TCAAAGCTAACTTCAA AATTCGCCACAACATTGAAGATGG
ATCCGTTCAACTAGCAGACCATTAGCAACAAAATACTCCA
ATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCAGACAACCATTACC
TGTCGACACAATCTGCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAA
AGCGTGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTA ACTGCTGC
TGGGATTACACATGGCATGGATGAGCTCTACAAACTCGAG
CACCACCACCACCACACTGA

```

图 3

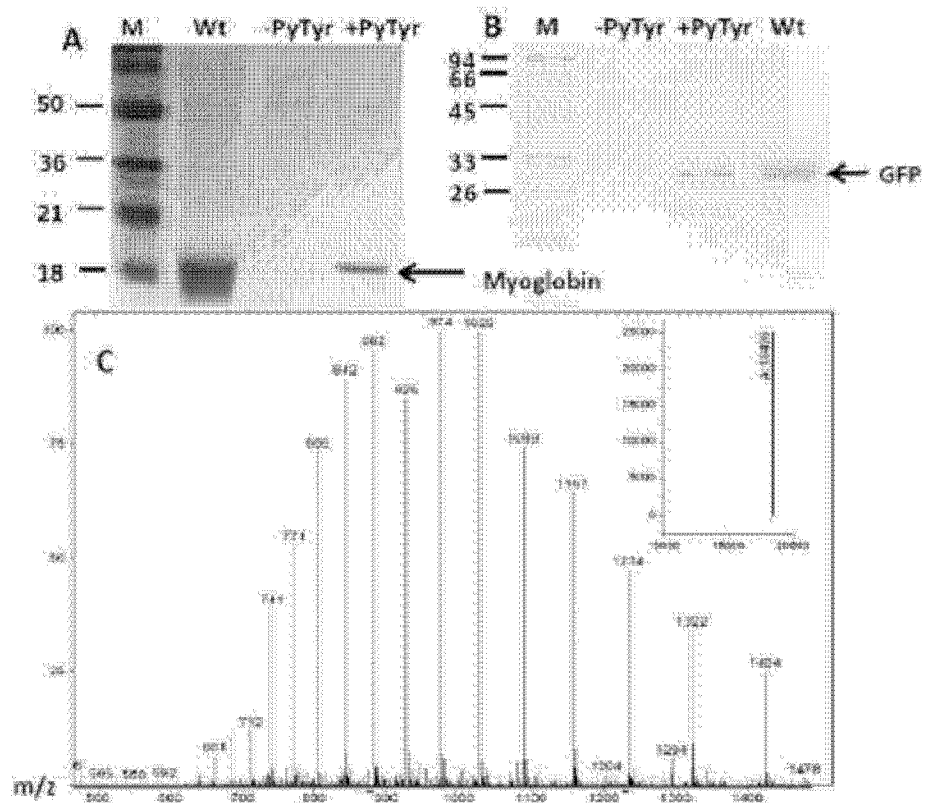


图 4

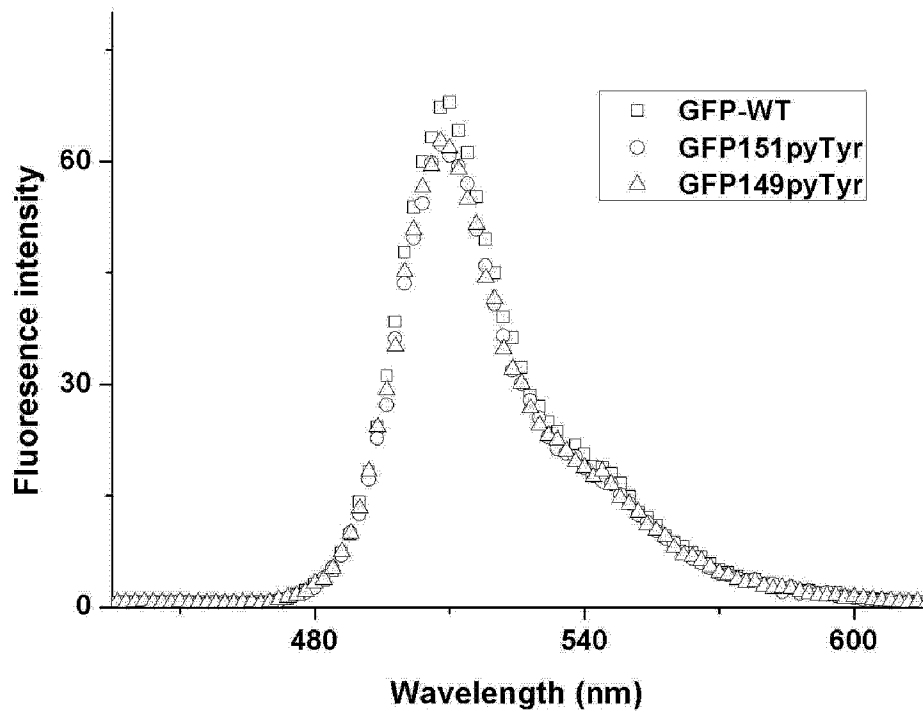


图 5

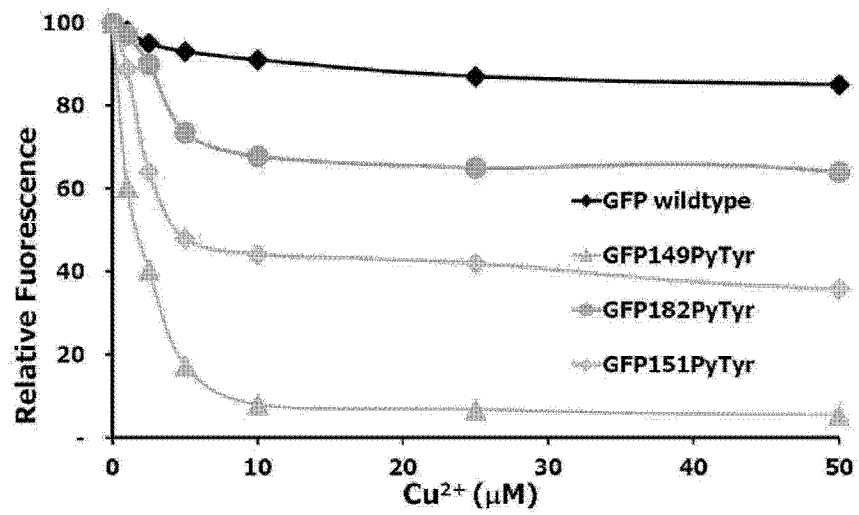


图 6

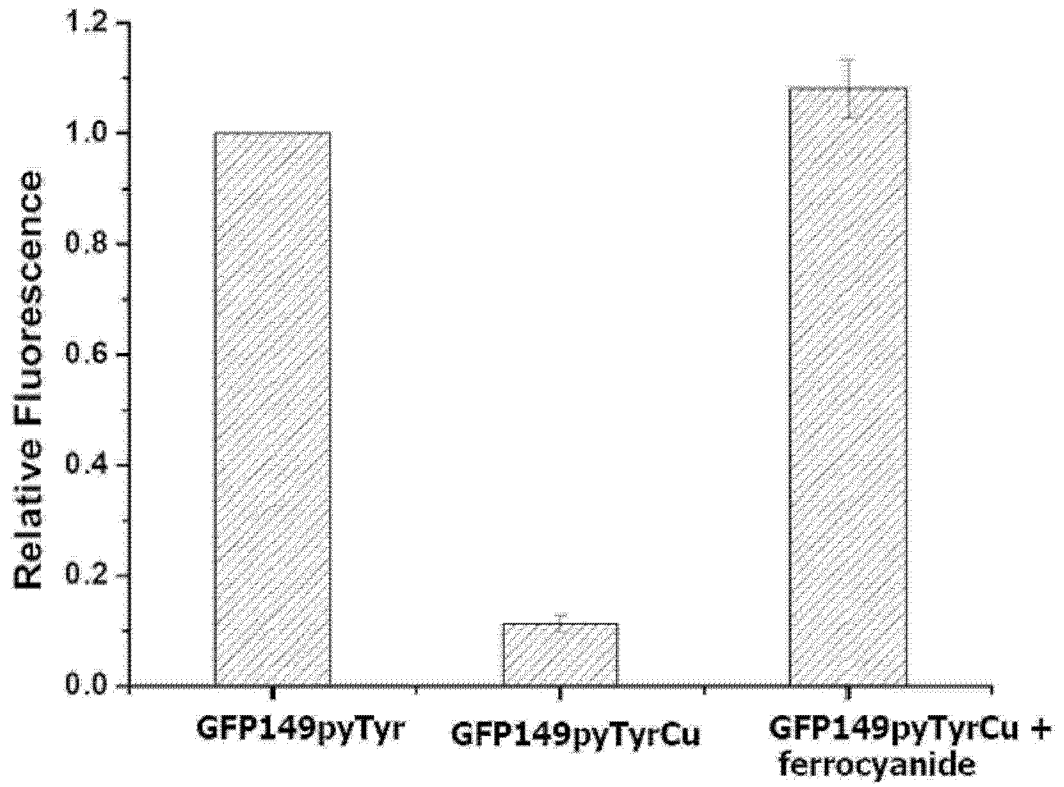


图 7

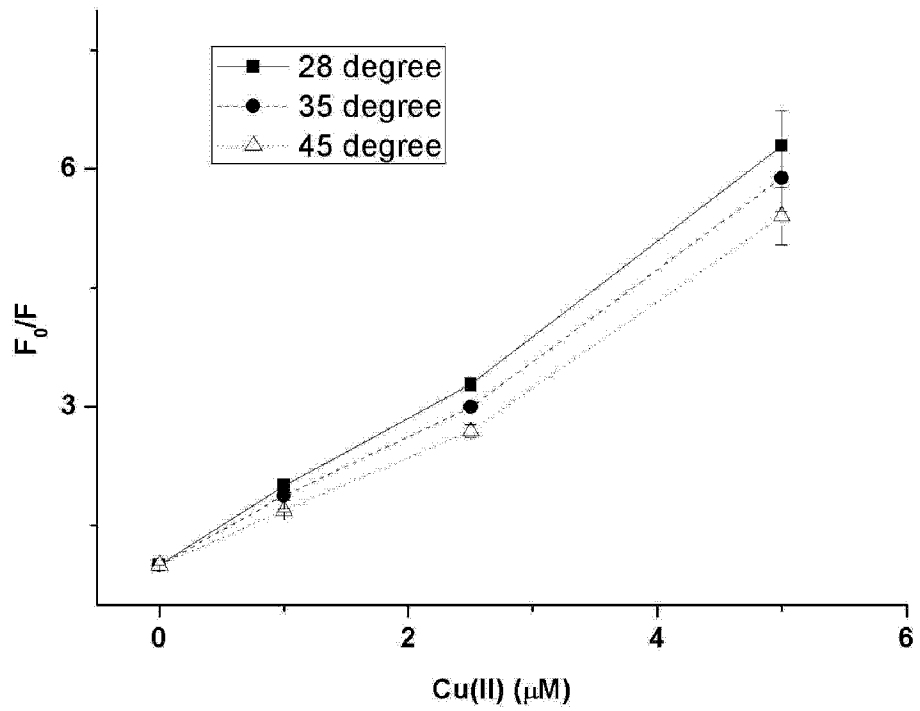


图 8

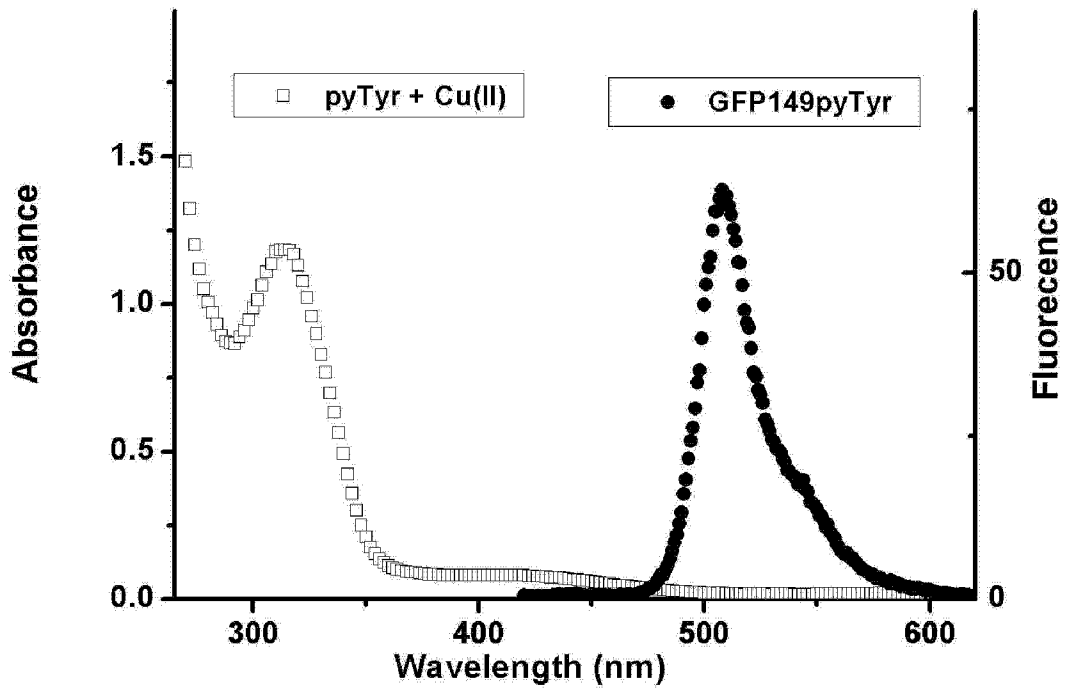


图 9

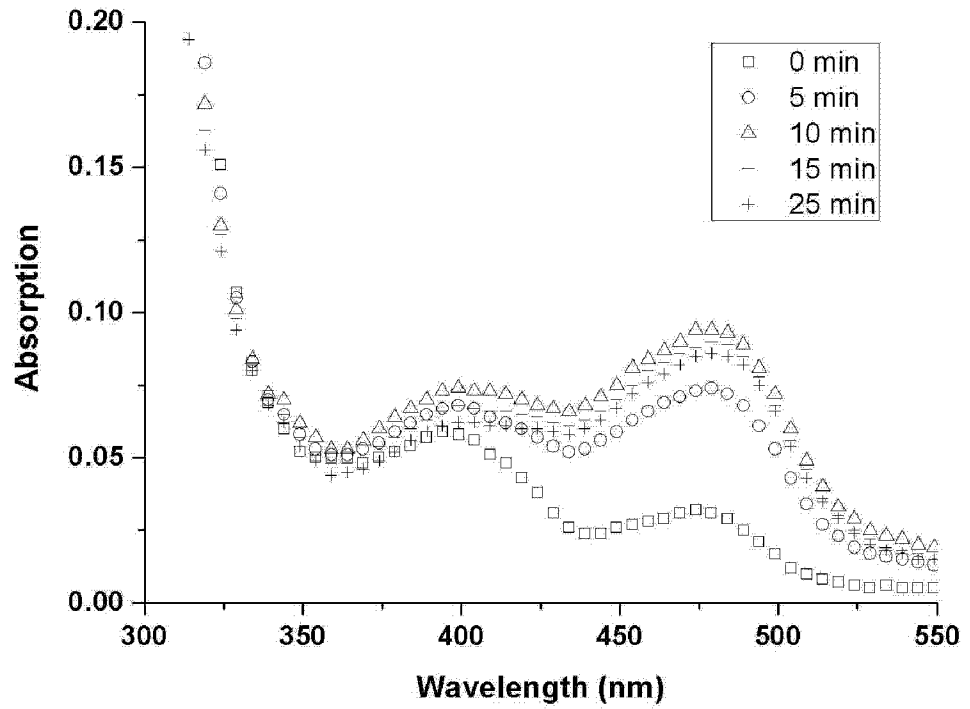


图 10

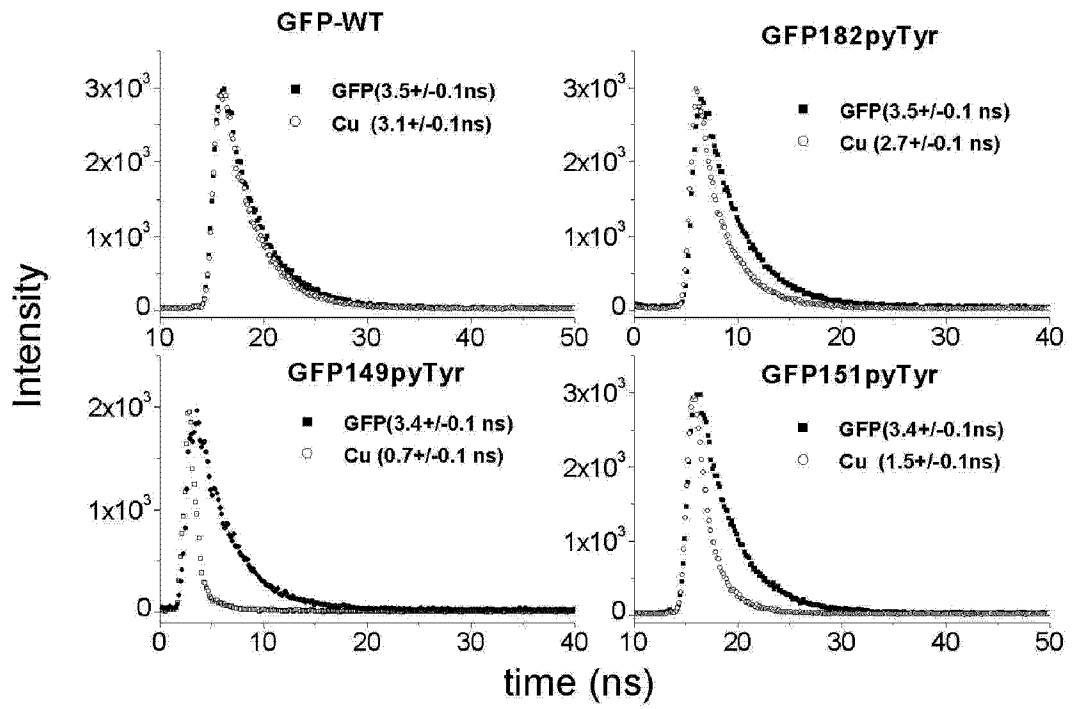


图 11

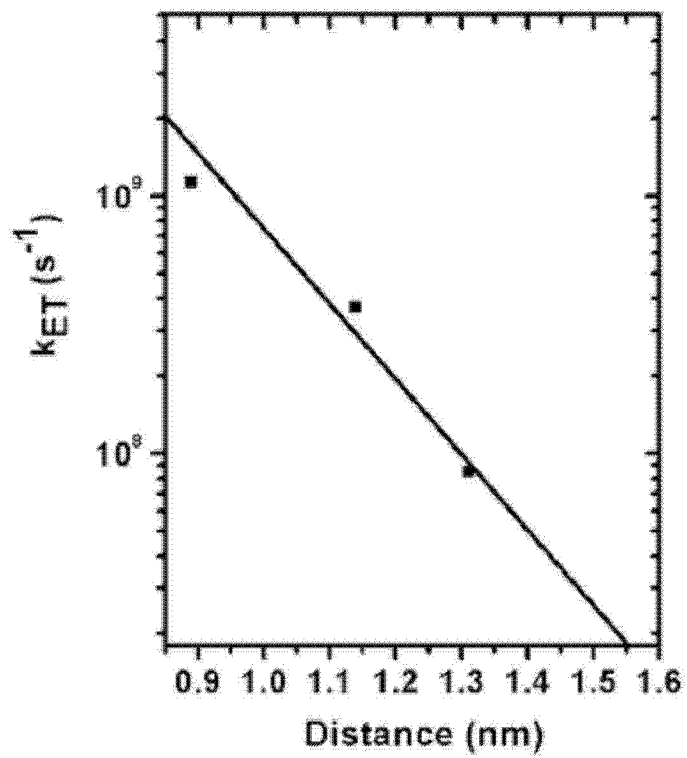


图 12

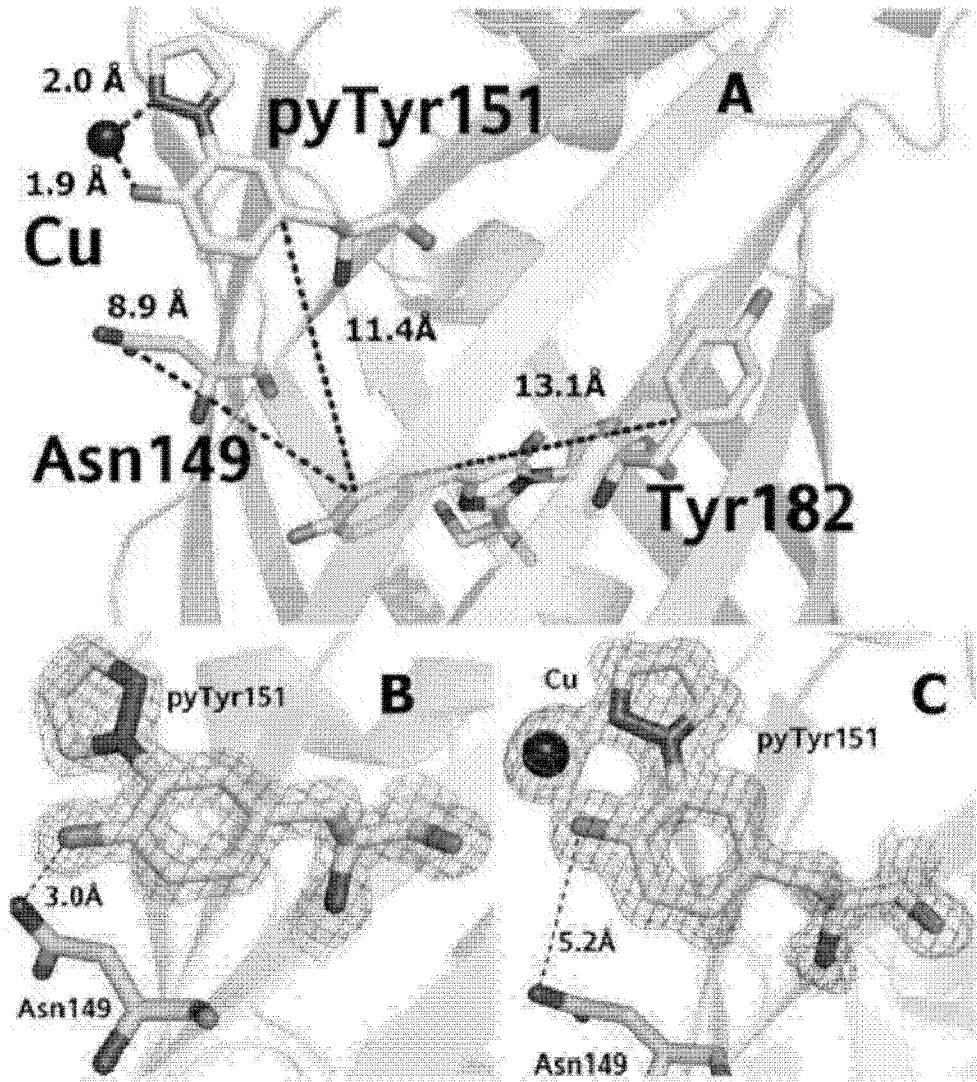


图 13