



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105985944 A

(43) 申请公布日 2016. 10. 05

(21) 申请号 201510046658. 0

(22) 申请日 2015. 01. 29

(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 李发慧

(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 15/10(2006. 01)

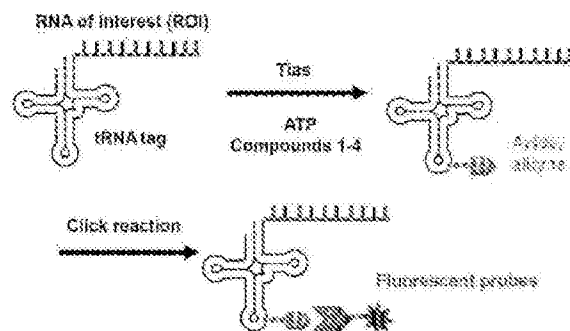
权利要求书2页 说明书10页
序列表4页 附图10页

(54) 发明名称

一种细胞内位点特异性共价标记 RNA 的新方法

(57) 摘要

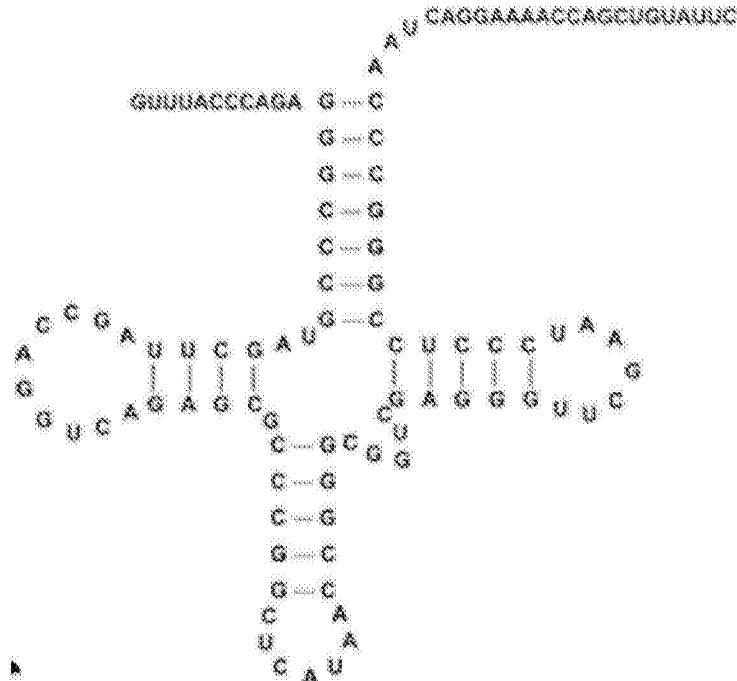
本发明涉及一种在体外或细胞内位点特异性共价标记 RNA 的新方法。该方法通过在体外或细胞内引入 tRNA^{11e2}-agmatidine 合成酶 (简称 Tias, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO :1 所示, 氨基酸序列如 SEQ ID NO :2 所示) 和闪烁古生球菌 tRNA^{11e2} (SEQ ID NO :3) 或其衍生核苷酸序列, 使 Tias 特异识别转录组中 AftRNA^{11e2} 的特定序列, 促使含有叠氮化物或炔基官能团的小分子与含有 tRNA^{11e2} 标签的目标 RNA 之间产生序列及位点特异性结合, 进而通过荧光染料与官能团的化学反应来实现目标 RNA 的特异性标记及成像。本发明还涉及在细胞内位点特异性共价标记靶标 RNA 的试剂盒, 其包含 tRNA^{11e2}-agmatidine 合成酶和 tRNA^{11e2}-3-5。



1. 一种能够在细胞内位点特异性共价标记靶标 RNA 的试剂盒, 所述试剂盒包括:

- (1) tRNA^{11e2}-agmatidine 合成酶, 其氨基酸序列为 SEQ ID NO :2,
- (2) tRNA^{11e2}或其衍生的核苷酸序列, 其中所述 tRNA^{11e2}的核苷酸序列为 SEQ ID NO :3,
- (3) 底物, 所述底物为胍丁胺或胍丁胺类似物,
- (4) 反应缓冲液;
- (5) ATP 储液;
- (6) DTT 储液;
- (7) 荧光染料, 其选自 BCN-FITC、BCN-Cy5 或 Sulfo-Cy5-azide。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒, 其中所述 tRNA^{11e2}衍生的核苷酸序列为 tRNA^{11e2}-3-5, 其核苷酸序列为 SEQ ID NO :5, 其具有下述结构:



3. 根据权利要求 1 所述的试剂盒, 其中所述胍丁胺类似物选自 N-(4-氨基丁基)-2-叠氨基乙酰胺、炔丙胺或丁-3-炔-1-基(4-氨基丁基)氨基甲酸叔丁酯。

4. 根据权利要求 1 所述的试剂盒, 其中所述反应缓冲液为 100mM Tris-HCl, pH 8.0、10mM KCl, 5mM MgCl₂。

5. 根据权利要求 1 所述的试剂盒, 所述试剂盒还包括使 tRNA^{11e2}或其衍生的核苷酸序列与靶标 RNA 融合的试剂。

6. 一种在细胞内位点特异性共价标记靶标 RNA 的方法, 所述方法包括下述步骤:

(1) 将 tRNA^{11e2}或其衍生的核苷酸序列与所述靶标 RNA 偶联形成融合 RNA, 其中所述 tRNA^{11e2}的核苷酸序列为 SEQ ID NO :3;

(2) 在所述细胞中共同表达氨基酸序列为 SEQ ID NO :2 的 tRNA^{11e2}-agmatidine 合成酶和步骤 (1) 得到的融合 RNA, 细胞培养基中含有选自胍丁胺或胍丁胺类似物的化合物;

(3) 裂解细胞, 提取细胞总 RNA, 加入荧光染料混合孵育, 通过琼脂糖凝胶电泳结合荧光成像进行分析, 其中所述荧光染料选自 BCN-FITC、BCN-Cy5 或 Sulfo-Cy5-azide。

7. 一种在细胞内位点特异性共价标记靶标 RNA 的方法, 所述方法包括下述步骤:

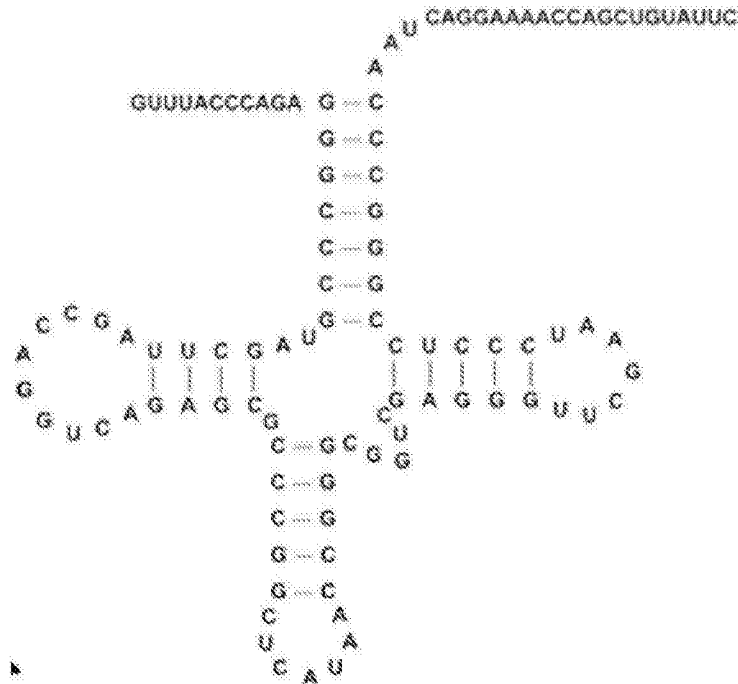
(1) 将 tRNA^{11e2}或其衍生的核苷酸序列与所述靶标 RNA 偶联形成融合 RNA, 其中所述 tRNA^{11e2}的核苷酸序列为 SEQ ID NO :3 ;

(2) 在所述细胞中共同表达氨基酸序列为 SEQ ID NO :2 的 tRNA^{11e2}-agmatidine 合成酶和步骤 (1) 得到的融合 RNA, 细胞培养基中含有选自胍丁胺或胍丁胺类似物的化合物 ;

(3) 向细胞培养物中加入荧光染料和催化荧光反应的催化剂, 进行孵育, 通过激光共聚焦显微镜分析, 其中所述荧光染料选自 BCN-FITC、BCN-Cy5 或 Sulfo-Cy5-azide。

8. 一种在体外位点特异性共价标记靶标 RNA 的方法, 所述方法包括在体外体系中共同孵育下列物质 : Tias, tRNA^{11e2}或其衍生的核苷酸序列与靶标 RNA 的融合核苷酸序列, 小分子探针, 荧光染料和其他辅助材料, 其中所述 tRNA^{11e2}的核苷酸序列为 SEQ ID NO :3, 所述小分子探针为选自胍丁胺或胍丁胺类似物的化合物。

9. 根据权利要求 6-8 中任一项所述的方法, 其中所述 tRNA^{11e2}衍生的核苷酸序列为 tRNA^{11e2}-3-5, 其核苷酸序列为 SEQ ID NO :5, 其具有下述结构 :



10. 根据权利要求 6-8 中任一项所述的方法, 其中所述胍丁胺类似物选自 N-(4-氨基丁基)-2-叠氮基乙酰胺、炔丙胺或丁-3-炔-1-基(4-氨基丁基)氨基甲酸叔丁酯。

一种细胞内位点特异性共价标记 RNA 的新方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物化学领域。具体地,本发明提供一种在体外或细胞内位点特异性共价标记 RNA 的新方法。更具体地,该发明通过在体外或细胞内引入 tRNA^{11e2}-agmatidine 合成酶 (tRNA^{11e2}-agmatidine synthetase,简称 Tias,其核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示,氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示) 和闪烁古生球菌 (Archaeoglobus fulgidus,简称 Af) tRNA^{11e2} (核苷酸序列如 SEQ ID NO:3 所示),使 Tias 特异识别转录组中 Af tRNA^{11e2} 的特定序列,促使含有叠氮化物或炔基官能团的小分子与含有 tRNA^{11e2} 标签的目标 RNA 之间产生序列及位点特异性结合,进而通过荧光染料与官能团的化学反应来实现目标 RNA 的特异性标记及成像。

背景技术

[0002] RNA 是生物体内一种重要的生物大分子,其在蛋白质翻译、基因表达调控等生物学过程中扮演着极其重要的角色。随着科学研究的深入,RNA 的功能越来越多样化,其重要性目前已经可以媲美蛋白质。

[0003] RNA 在细胞内存在明确的亚细胞定位, RNA 的不同亚细胞定位决定着其执行不同生物学功能。因此,开发细胞中 RNA 的特异标记和成像技术对我们精确理解 RNA 的生物学功能具有十分重要的意义。

[0004] 为了揭示 RNA 在细胞中的动态运输、定位和相互作用,科研人员已经开发出许多在哺乳动物细胞中非共价标记 RNA 的新方法,并且取得了一些进展。目前已开发的细胞内 RNA 标记和成像技术极大地促进了 RNA 的功能研究,加深了我们对 RNA 功能的认识。但是已有的细胞内 RNA 标记和成像技术都存在某种程度上的不足,这阻碍了 RNA 功能的广泛研究。因此,发展新的细胞内 RNA 标记和成像技术将会极大提高 RNA 功能研究的水平,这对广大科研工作者来说也是任重而道远的。

[0005] 相比于非共价方法,生物正交化学主要依赖于探针分子的特异性,以及目标生物大分子的共价连接。因此,该方法有以下几种优点:1、探针分子和目标生物大分子具有高度亲和性,因此可通过严格限制洗脱条件来高度纯化目标生物大分子;2、高亲和力使得低丰度的目标生物大分子能够可视化,而这对于非编码 RNA 尤其重要;3、许多含有功能基团(例如:荧光、核磁共振、红外光谱、电子顺磁共振官能团等)的探针分子都可以结合到目标生物大分子上,使得该方法在应用上变得非常灵活。由于这些独特的功能,生物正交化学已被成功地应用于蛋白质和多糖的功能研究,主要用来在哺乳动物细胞中观察它们的表达、定位和相互作用。

[0006] 目前,将翻译/翻译后修饰机制与生物正交化学相结合,已经能够以前所未有的精度和多功能性来标记蛋白质,但是却没有适宜的方法在哺乳动物细胞中对 RNA 进行位点及序列特异性标记。因此,本发明拟寻找合适的翻译后修饰组分,将其与生物正交化学相结合,来开发 RNA 特异标记的新方法。

发明内容

[0007] 1、技术问题

[0008] 为了解决上述问题,本发明的目的在于提供一种在体外或细胞内位点特异性共价标记 RNA 的新方法。

[0009] 本发明提供一种在体外或细胞内位点特异性共价标记 RNA 的新方法。本发明涉及通过在体外或细胞内引入 tRNA^{11e2}-agmatidine 合成酶 (tRNA^{11e2}-agmatidine synthetase, 简称 Tias, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示, 氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示) 和闪烁古生球菌 (Archaeoglobus fulgidus, 简称 Af) tRNA^{11e2} (核苷酸序列如 SEQ ID NO:3 所示), 使 Tias 特异识别转录组中 Af tRNA^{11e2} 的特定序列, 促使含有叠氮化物或炔基官能团的小分子与含有 tRNA^{11e2} 标签的目标 RNA 之间产生序列及位点特异性结合, 进而通过荧光染料与官能团的化学反应来实现目标 RNA 的特异性标记及成像。

[0010] 2、技术方案

[0011] 为了实现 RNA 的特异性标记, 我们首先需要找到一种翻译后修饰机制中的独特组分, 用以进行生物正交化学反应。该组分需要具有两个特征: 第一、它必须是一种 RNA 修饰酶, 能够在转录组中识别特定 RNA 序列中的特定位点; 第二、它必须能够将含有独特功能基团 (例如叠氮化物或炔基官能团) 的小分子转移到 RNA 的特定部位, 随后通过生物正交化学反应进行共价标记, 实现位点特异性结合, 最终进行荧光、核磁共振、电子顺磁共振或者红外光谱测定。

[0012] 为了找到这种可以在哺乳动物细胞中精确标记 RNA 的翻译后修饰组分, 本发明人将目光转向 tRNA 修饰酶。众所周知, tRNA 修饰酶可以催化 100 多种 tRNA 修饰。遗传密码的忠实翻译主要依赖于 tRNA 的化学修饰, 尤其是反密码子环的第 34 位核苷酸。许多作用于该位点的 tRNA 修饰酶被发现仅存在于特定区域, 这意味着它们可能是独立进化的。

[0013] 值得注意的是, 古细菌中 tRNA^{11e2} 的 34 位胞嘧啶经 tRNA^{11e2}-agmatidine 合成酶 (tRNA^{11e2}-agmatidine synthetase, 简称 Tias) 催化可被胍丁胺 (agmatine, 简称 AGM, 本发明中简称为化合物 1) 修饰。根据以前的报道, 在闪烁古生球菌 (Archaeoglobus fulgidus, 简称 Af) 中, Tias 识别 tRNA^{11e2} 需要七个核苷酸, 分别是: G1、G2、C34、U36、A37、C71 和 C72, 而哺乳动物细胞中既没有 Tias, 也没有含有这七种核苷酸位点的 tRNA。因此, 本发明人设想, 如果将 Tias 和古细菌的 tRNA^{11e2} 引入哺乳动物细胞中, 而 Tias 可以将含有叠氮或炔基官能团的小分子探针转移至目标 RNA 上, 也许会实现 RNA 的序列及位点特异性标记。

[0014] 要成功实现 RNA 标记和成像, 除了 tRNA 修饰酶 Tias, 还需要含有功能基团的小分子探针和相应的荧光染料进行生物正交化学反应, 因此, 本发明人购买 / 合成了三种胍丁胺类似物 (结构式参见图 1): N-(4-氨基丁基)-2-叠氮基乙酰胺 (N-(4-aminobutyl)-2-azidoacetamide) (简称 AGN, 本发明中简称为化合物 2)、炔丙胺 (2-Propynylamine, 本发明中简称为化合物 3, 购自阿法埃莎公司)、丁-3-炔-1-基 (4-氨基丁基) 氨基甲酸叔丁酯 (but-3-yn-1-yl (4-aminobutyl) carbamate, 本发明中简称为化合物 4); 以及三种荧光染料: BCN-FITC、Sulfo-Cy5-azide (购自 Lumiprobe 公司)、BCN-Cy5。同时, 购买了古细菌 Archaeoglobus fulgidus (购自 ATCC 公司, 货号 49558), 从其基因组中克隆表达并纯化出 RNA 修饰酶 Tias (核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示, 氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示)。通过设计一系列实验, 在体外共同孵育 Tias, Af tRNA^{11e2} 或其衍生的核苷酸序列与靶标 RNA

的融合核苷酸序列,小分子探针,荧光染料和其他辅助材料,或在细胞内共同表达 Tias 和 Af tRNA^{11e2}或其衍生的核苷酸序列与靶标 RNA 的融合核苷酸序列,并与小分子探针,荧光染料和其他辅助材料共同孵育,最终成功实现了目标 RNA 的特异性标记及荧光成像。其中所述小分子探针可以是,但不限于,选自胍丁胺或胍丁胺类似物的化合物。

[0015] 本发明提供下述实施方案:

[0016] 1. 一种能够在细胞内位点特异性共价标记靶标 RNA 的试剂盒,所述试剂盒包括:

[0017] (1) tRNA^{11e2}-agmatidine 合成酶,其氨基酸序列为 SEQ ID NO :2,

[0018] (2) tRNA^{11e2}或其衍生的核苷酸序列,其中所述 tRNA^{11e2}的核苷酸序列为 SEQ ID NO :3,

[0019] (3) 底物,所述底物为胍丁胺或胍丁胺类似物,

[0020] (4) 反应缓冲液;

[0021] (5) ATP 储液;

[0022] (6) DTT 储液;

[0023] (7) 荧光染料,其选自 BCN-FITC、BCN-Cy5 或 Sulfo-Cy5-azide。

[0024] 2. 根据第 1 项所述的试剂盒,其中所述 tRNA^{11e2}衍生的核苷酸序列为 tRNA^{11e2}-3-5,其核苷酸序列为 SEQ ID NO :5,其具有图 11 所示的结构。

[0025] 3. 根据第 1 项所述的试剂盒,其中所述胍丁胺类似物选自 N-(4-氨基丁基)-2-叠氮基乙酰胺、炔丙胺或丁-3-炔-1-基(4-氨基丁基)氨基甲酸叔丁酯。

[0026] 4. 根据第 1 项所述的试剂盒,其中所述反应缓冲液为 100mM Tris-HCl, pH 8.0、10mM KCl, 5mM MgCl₂。

[0027] 5. 根据第 1 项所述的试剂盒,所述试剂盒还包括使 tRNA^{11e2}或其衍生的核苷酸序列与靶标 RNA 融合的试剂。

[0028] 6. 一种在细胞内位点特异性共价标记靶标 RNA 的方法,所述方法包括下述步骤:

[0029] (1) 将 tRNA^{11e2}或其衍生的核苷酸序列与所述靶标 RNA 偶联形成融合 RNA,其中所述 tRNA^{11e2}的核苷酸序列为 SEQ ID NO :3;

[0030] (2) 在所述细胞中共同表达氨基酸序列为 SEQ ID NO :2 的 tRNA^{11e2}-agmatidine 合成酶和步骤 (1) 得到的融合 RNA,细胞培养基中含有选自胍丁胺或胍丁胺类似物的化合物;

[0031] (3) 裂解细胞,提取细胞总 RNA,加入荧光染料混合孵育,通过琼脂糖凝胶电泳结合荧光成像进行分析,其中所述荧光染料选自 BCN-FITC、BCN-Cy5 或 Sulfo-Cy5-azide。

[0032] 6. 一种在细胞内位点特异性共价标记靶标 RNA 的方法,所述方法包括下述步骤:

[0033] (1) 将 tRNA^{11e2}或其衍生的核苷酸序列与所述靶标 RNA 偶联形成融合 RNA,其中所述 tRNA^{11e2}的核苷酸序列为 SEQ ID NO :3;

[0034] (2) 在所述细胞中共同表达氨基酸序列为 SEQ ID NO :2 的 tRNA^{11e2}-agmatidine 合成酶和步骤 (1) 得到的融合 RNA,细胞培养基中含有选自胍丁胺或胍丁胺类似物的化合物;

[0035] (3) 向细胞培养物中加入荧光染料和催化荧光反应的催化剂,进行孵育,通过激光共聚焦显微镜分析,其中所述荧光染料选自 BCN-FITC、BCN-Cy5 或 Sulfo-Cy5-azide。

[0036] 8. 一种在体外位点特异性共价标记靶标 RNA 的方法,所述方法包括在体外体系中共同孵育下列物质:Tias, tRNA^{11e2}或其衍生的核苷酸序列与靶标 RNA 的融合核苷酸序列,小分子探针,荧光染料和其他辅助材料,其中所述 tRNA^{11e2}的核苷酸序列为 SEQ ID NO :3,所述

小分子探针为选自胍丁胺或胍丁胺类似物的化合物。

[0037] 9. 根据第 6-8 项中任一项所述的方法,其中所述 tRNA^{11e2}衍生的核苷酸序列为 tRNA^{11e2}-3-5,其核苷酸序列为 SEQ ID NO :5,其具有图 11 所示的结构。

[0038] 10. 根据第 6-8 项中任一项所述项所述的方法,其中所述胍丁胺类似物选自 N-(4-氨基丁基)-2-叠氮基乙酰胺、炔丙胺或丁-3-炔-1-基(4-氨基丁基)氨基甲酸叔丁酯。

[0039] 3、有益效果

[0040] 目前,许多现代 RNA 生物学和 RNA 生物技术均涉及通过化学方法在 RNA 分子上位点特异性整合修饰核苷酸,然而,由于整合效率的限制,目标 RNA 分子的长度通常小于 30-50 个核苷酸。我们的新方法主要依赖于 RNA 的转录机制和 RNA 修饰酶 Tias 的序列特异性,因此可以在哺乳动物细胞中的任何目标 RNA 上高度特异性整合生物物理探针。该方法可以应用于体外或哺乳动物细胞内的 RNA 折叠、RNA-蛋白质相互作用、RNA 转运、RNA 修饰研究以及 RNA 纳米材料构建。

[0041] 相比于以前的非共价 RNA 成像方法,例如菠菜适体,绿色荧光发光基团和菠菜适体之间的非共价相互作用仅能在微摩尔范围内具有亲和力;而我们的新方法主要依赖于 Tias 和 Af tRNA^{11e2}的选择性识别(这两者均不存在于哺乳动物细胞中),再通过引入叠氮基或炔基基团,使荧光基团和靶 RNA 之间形成共价键,以实现低丰度 RNA 的荧光成像,因此共价标记新方法具有更高的特异性,亲和性及通用性。更重要的是,我们的新方法通过引入含有不同功能基团的小分子,经点击化学反应(click chemistry reaction)后,可以利用多种方法,例如:荧光、红外光谱、核磁共振或电子顺磁共振等,进行多功能位点特异性 RNA 标记,而不需要改变 Tias 蛋白或 Af tRNA^{11e2}序列。

附图说明

[0042] 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:

[0043] 图 1:左上图是化合物 1 (AGM) 的化学结构式,右上图是化合物 2 (AGN) 的化学结构式,左下图是化合物 3 的化学结构式,右下图是化合物 4 的化学结构式;

[0044] 图 2 是化合物 2 的合成路线;

[0045] 图 3 是化合物 4 的合成路线;

[0046] 图 4 和图 4(续)是 BCN-FITC 的合成路线(由于说明书附图第 2 页没能显示完整的 BCN-FITC 的合成路线,因此,在图 4(续)中继续显示);

[0047] 图 5 是 BCN-Cy5 的合成路线;

[0048] 图 6 是本发明中所用的酶和 RNA 的核苷酸/氨基酸序列;

[0049] 图 7 是 Tias 修饰 RNA 的反应示意图;

[0050] 图 8 :A 图是 RNA 体外修饰的聚丙烯酰胺凝胶电泳图, B 图是 RNA 修饰位点验证的聚丙烯酰胺凝胶电泳图, C 图是非修饰 tRNA^{11e2}核酸片段质谱图, D 图是经化合物 1 修饰的 tRNA^{11e2}核酸片段质谱图, E 图是经化合物 2 修饰的 tRNA^{11e2}核酸片段质谱图, F 图是经化合物 3 修饰的 tRNA^{11e2}核酸片段质谱图;

[0051] 图 9 是 Tias 结合 AGN 的晶体结构图,其中 A 图是整体结构图, B 图是局部结构图;

[0052] 图 10 :A 图是经化合物 2 修饰的 tRNA^{11e2}体外特异性标记及荧光成像图, B 图是经

化合物 3 修饰的 tRNA^{11e2}体外特异性标记及荧光成像图；

[0053] 图 11 是 tRNA^{11e2}-3-5 结构图；

[0054] 图 12 是 tRNA^{11e2}-3-5 体外特异性标记及荧光成像图；

[0055] 图 13 是 tRNA^{11e2}-5S 融合 RNA 特异性标记及荧光成像图；

[0056] 图 14 是 tRNA^{11e2}-5S 融合 RNA 在 U2OS 细胞内特异性标记及荧光成像图,其中上一行是未表达 tRNA^{11e2}-5S 融合 RNA 的 U2OS 细胞的显微成像图,下一行是表达 tRNA^{11e2}-5S 融合 RNA 的 U2OS 细胞的显微成像图(左列是荧光成像图,中列是通过 DAPI 通道显微观察图片,右列是通过 DIC 通道显微观察图片)。

具体实施方式

[0057] 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。

[0058] 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。

[0059] 实施例 1:胍丁胺 (AGM, 化合物 1) 类似物的化学合成

[0060] 1、化合物 2 (N-(4-aminobutyl)-2-azidoacetamide, AGN) 的合成 (图 2):

[0061] 取 656mg BOC-1,4-丁二胺盐酸盐和 1.48g 碳酸钠共同溶于 80mL、1:1(v/v) 的乙酸乙酯和水混合物中,0℃冰浴。1 小时后往反应液中添加 10ml 溶解 702mg 2-溴乙酰基溴的乙酸乙酯溶液,室温搅拌 2 小时。取上层有机相,利用旋转蒸发仪干燥,然后通过硅胶色谱法在硅胶(含体积比例为 1:1 的乙酸乙酯:石油醚)上纯化,得到 320mg 白色中间产物 1:叔丁基(4-(2-溴乙酰胺基)丁基)氨基甲酸酯(Tert-butyl(4-(2-bromoacetamido)butyl)carbamate)。

[0062] 取 230mg 中间产物 1 溶解于 5mL 丙酮中,0℃冰浴。30 分钟后添加 5mL 叠氮化钠(250mg)水溶液,室温搅拌过夜(22 小时)。然后将反应液浓缩,并通过硅胶色谱法在硅胶(含体积比例为 1:1 的乙酸乙酯:石油醚)上纯化,得到 50mg 中间产物 2:叔丁基(4-(2-叠氮乙酰胺基)丁基)氨基甲酸酯(Tert-butyl(4-(2-azidoacetamido)butyl)carbamate)。

[0063] 取 44mg 中间产物 2 重悬于 20ml 盐酸/乙酸乙酯(体积比为 1:1)混合液中,室温搅拌过夜(12 小时),然后旋转蒸发并冷冻干燥,得到 29mg 终产物 N-(4-氨基丁基)-2-叠氮乙酰胺盐酸盐(N-(4-aminobutyl)-2-azidoacetamide hydrochlorate)。

[0064] 2、化合物 4 (but-3-yn-1-yl(4-aminobutyl)carbamate) 的合成 (图 3):

[0065] 取 140mg 3-丁炔-1-醇和 424mg 碳酸钠共同溶于 10mL 四氢呋喃溶液中,0℃冰浴。然后向反应液中加入 198mg 三光气,并于室温下搅拌 12 小时,得到中间产物。取 380mg 中间产物溶于 50mL 乙酸乙酯/水(体积比比为 1:1)溶液中,室温搅拌 12 小时后,分离有机相,通入 HCL 气体。最后收集白色固体,得到终产物。

[0066] 以上合成反应所需化学试剂如无特别说明,均购自北京化工厂或阿法埃莎公司,均为分析纯以上级别。

[0067] 实施例 2:荧光染料的化学合成

[0068] 1、BCN-FITC 的合成 (图 4):

[0069] 取 15.0mL 1,5-环辛二烯和 281mg 二聚醋酸铯混合加入 10mL 二氯甲烷溶液中,然后在 3 小时内逐滴加入 10mL 溶解 15mmol 重氮乙酸乙酯的二氯甲烷溶液,同时温度保持在 0℃。室温条件下反应 15 小时后,反应体系重新置于冰水浴中保持温度在 0℃,再次在 3 小时内加入 10mL 溶解 15mmol 重氮乙酸乙酯的二氯甲烷溶液,继续在室温条件下反应 21 小时。随后通过旋转蒸发除去二氯甲烷,硅胶柱分离(石油醚:乙酸乙酯 = 20 : 1, v/v) 得到 2.52g 中间产物 1:(1R,8S,9r, Z)-ethyl bicycle[6.1.0]non-4-ene-9-carboxylate(endo 产物)和 2.08g 中间产物 2:(1R,8S,9s, Z)-ethyl bicycle[6.1.0]non-4-ene-9-carboxylate(exo 产物)。

[0070] 取 370mg 氢化铝锂溶于 30mL 乙醚,然后置于 0℃ 冰水浴中,并往悬浊液中逐滴加入 30mL 溶解 2.23g 中间产物 1 的乙醚溶液。室温条件下反应 2 小时后冷却到 0℃,随后逐滴加入去离子水直至灰色固体变为白色。再加入 8g 硫酸钠,而后通过过滤除去固体,并用 100mL 乙醚充分洗涤,得到的滤液通过旋转蒸发除去乙醚。在没有进一步纯化的情况下,将得到的 1.55g 醇类化合物溶于 30mL 二氯甲烷并置于冰水浴中,然后逐滴加入 7.3mL 溶解 649 μL 溴的二氯甲烷溶液,直至溶液保持黄色不变。反应体系用 30mL、10% 的硫代硫酸钠溶液淬灭,并用 2×50mL 二氯甲烷萃取。得到的有机相用无水硫酸钠干燥后,再通过减压浓缩除去二氯甲烷,得到 2.80g 二溴代混合物。在没有进一步纯化的情况下,将得到的 2.80g 二溴代混合物全部溶于 30mL 四氢呋喃并置于冰水浴中,然后在 10 分钟内逐滴加入 29.6mL 催化剂 KOtBu。反应体系在 66℃ 回流 2 小时后冷却到室温,用 100mL 饱和氯化铵溶液淬灭,再通过旋转蒸发除去四氢呋喃。得到的溶液用 3×100mL 二氯甲烷萃取,分离出有机层后,用无水硫酸钠干燥,随后通过旋转蒸发除去二氯甲烷,硅胶柱分离(石油醚:乙酸乙酯 = 4 : 1, v/v) 得到 724mg 中间产物 3 白色固体:(1R,8S,9r)-Bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmethanol。

[0071] 取 222mg 中间产物 3 溶于 20mL 二氯甲烷溶液中,加入 299 μL 吡啶和 368mg 对硝基苯基氯甲酸酯,反应体系在室温搅拌 40 分钟后用 35mL 饱和氯化铵溶液淬灭。反应液用 2×50mL 二氯甲烷萃取,分离有机层,然后通过旋转蒸发仪除去二氯甲烷,硅胶柱分离(石油醚:乙酸乙酯 = 5 : 1, v/v) 得到 459mg 中间产物 4 白色固体:(1R,8S,9r)-bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmethyl(4-nitrophenyl)carbonate。

[0072] 将 80 μL 四亚甲基二胺逐滴加入到 4mL 溶解 102mg 异硫氰酸荧光素(简称 FITC, 购自 sigma 公司)的甲醇溶液中,室温搅拌 2 小时。待溶液中有红色沉淀物生成后,过滤沉淀并干燥,得到 100mg 中间产物 5:5-(3-(4-aminobutyl)thioureido)-2-(6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoic acid。

[0073] 取 83mg 中间产物 4 和 100mg 中间产物 5 共同溶于 4mL N,N-二甲基甲酰胺溶液中,加入 111 μL 三乙胺,然后在室温条件下搅拌 3 小时。硅胶柱分离(二氯甲烷:甲醇 = 10 : 1, v/v) 得到 106mg 终产物:5-(3-(4-(((1R,8S,9r)-bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmethoxy)carbonyl)amino)butyl)thioureido)-2-(6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoic acid(简称 BCN-FITC)。

[0074] 2、BCN-Cy5 的合成(图 5):

[0075] 取 15g 4-胍基苯磺酸半水合物和 25.2mL 3-甲基-2-丁酮溶于 45mL 冰醋酸中,然后 110℃ 回流 3 小时。通过旋转蒸发仪除去醋酸,将得到的残余物溶于甲醇,并且在含有氢氧化钾的异丙醇饱和溶液中搅拌,直至溶液变为黄色,最终得到 13.2g 黄色中间产物 1:

Potassium2,3,3-trimethyl-3H-indole-5-sulfonate。

[0076] 取 1.39g 中间产物 1 和 1.42g 3-溴丙胺氢溴酸盐共同悬浮于 10mL 乙腈溶液,然后在封管中保持 80℃回流 24 小时。反应体系通过旋转蒸发进行浓缩后重新悬浮于乙醚中。过滤混合物得到固体,并重新溶于甲醇,再次旋干,然后加入 2.35g 二碳酸二叔丁酯、30mL 无水三氯甲烷和 3.75mL N,N-二异丙基乙胺。混合物慢慢加热到回流温度 55℃后,继续搅拌 4 小时。经过浓缩和硅胶柱分离(二氯甲烷:甲醇=4:1)得到中间产物 2:1-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)propyl)-2,3,3-trimethyl-3H-indol-1-ium-5-sulfonate。

[0077] 向 10mL 含有 1.39g 中间产物 1 的乙腈溶液中加入 0.828mL 碘乙烷,置于一个封管中,然后在 80℃反应 24 小时得到粗产物 1-ethyl-2,3,3-trimethyl-3H-indol-1-ium-5-sulfonate。取 535mg 粗产物和 570mg 盐酸-N-(3-苯氨基-2-丙烯亚基)苯胺溶于 10mL 冰醋酸和 10mL 醋酸酐中,110℃反应 4 小时,得到中间产物 3:1-ethyl-3,3-dimethyl-2-((1E,3E)-4-(N-phenylacetamido)buta-1,3-dien-1-yl)-3H-indol-1-ium-5-sulfonate。

[0078] 取 2.00mmol 中间产物 2、2.00mmol 中间产物 3 和 2.29g 无水醋酸 钠溶于 30mL 乙醇中,然后在 80℃回流 18 小时。经过浓缩和硅胶柱分离(二氯甲烷:甲醇=4:1, v/v)得到 214mg 产物 sodium1-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)propyl)-2-((1E,3E,5Z)-5-(1-ethyl-3,3-dimethyl-5-sulfonatoindolin-2-ylidene)penta-1,3-dien-1-yl)-3,3-dimethyl-3H-indol-1-ium-5-sulfonate。随后将产物溶于 15mL 甲醇和 10mL、37% 盐酸中,60℃反应 6 小时后,得到 Sodium 1-(3-(aminopropyl)-2-((1E,3E,5Z)-5-(1-ethyl-3,3-dimethyl-5-sulfonatoindolin-2-ylidene)penta-1,3-dien-1-yl)-3,3-dimethyl-3H-indol-1-ium-5-sulfonate (简称 Cy5-NH₂·HCl)。

[0079] 取 99mg Cy5-NH₂·HCl 和 51mg (1R,8S,9r)-bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmethyl(4-nitrophenyl)carbonate 溶于 8mL N,N-二甲基甲酰胺,然后加入 86 μL 三乙胺溶液,室温下搅拌 6 小时,得到终产物 Sodium 1-(3-(((1R,8S,9r)-bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmethoxy)carbonyl)amino)propyl)-2-((1E,3E,5Z)-5-(1-ethyl-3,3-dimethyl-5-sulfonatoindolin-2-ylidene)penta-1,3-dien-1-yl)-3,3-dimethyl-3H-indol-1-ium-5-sulfonate (简称 BCN-Cy5)。

[0080] 以上合成反应所需化学试剂如无特别说明,均购自北京化工厂或阿法埃莎公司,均为分析纯以上级别。

[0081] 实施例 3:RNA 修饰酶 Tias 的重组表达

[0082] 本发明人购买了古细菌 *Archaeoglobus fulgidus* (购自 ATCC 公司,登记号 49558),从其基因组中克隆表达并纯化出有活性的 RNA 修饰酶 Tias (核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示,氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示)。

[0083] 具体操作方法为:将 pET22b Af Tias 质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3),挑取单克隆于含氨苄抗生素的 LB 液体培养基中,37℃摇菌过夜;再将菌液按照 1:100 体积比例转接于含氨苄抗生素的 LB 液体培养基中,37℃摇菌至 OD₆₀₀ = 0.6,加入 1mM IPTG,37℃诱导 4 小时,离心收菌,弃培养基后,用含 50mM Tris,500mM NaCl,5%甘油,10mM 咪唑,pH8.0 的溶液重悬,超声波破碎,再用 His 标签纯化柱(购自南京金斯瑞公司)进行纯化,纯化后的蛋白继续用 sephadex G200 (购自 GE 公司)进一步纯化,得到的蛋白即为具有活性的 RNA 修

饰酶 Tias, 将其保存在 100mM Tris-HCl, pH 8.0, 10mM KCl 溶液中。

[0084] 实施例 4 : Af tRNA^{11e2} 的制备

[0085] Af tRNA^{11e2} (SEQ ID NO :3) 的制备用 Promega 公司的 T7 Ribomax Express Large Scale RNA production System (P1320) 试剂盒进行体外转录, 反应体系为 20 μ L, 内含 10 μ L RiboMAXTM Express T7 2X Buffer、3 μ L T7 Af tRNA^{11e2} 转录模板、2 μ L T7 Express Enzyme Mix、3 μ L RNase inhibitor, 置 37 $^{\circ}$ C 水浴锅反应 30 分钟, 再加 1 μ L RQ1 RNase-Free DNase 入反应体系, 置 37 $^{\circ}$ C 水浴锅反应 15 分钟。

[0086] 实施例 5 : RNA 体外修饰及验证

[0087] 在反应缓冲液 (100mM Tris-HCl, pH 8.0、10mM KCl, 5mM MgCl₂) 中加入 8 μ g 实施例 3 纯化的 Tias (SEQ ID NO :2), 20pmol 体外转录的 Af tRNA^{11e2} (SEQ ID NO :3), 1mMATP, 5mM DTT, 最后分别加入 1mM 化合物 1、2、3 或 4。37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时后, 通过醋酸-尿素聚丙烯酰胺凝胶 (acid-urea PAGE gel) 电泳来分离修饰 RNA 和非修饰 RNA。如图 8A 所示, 当 tRNA^{11e2} 被修饰后, 在凝胶中的移动速度会变慢。本发明人很高兴地看到, 三种化合物 1 的类似物: 化合物 2、3 和 4 均能共价修饰 tRNA^{11e2}, 导致其在醋酸-尿素聚丙烯酰胺凝胶中移动速度变慢。但相比之下, 化合物 3 修饰的 tRNA^{11e2} 比化合物 2 修饰的 tRNA^{11e2} 展现出了更高的移动性, 这可能是由于化合物 3 的分子量相对较低的缘故。而化合物 4 修饰后 tRNA^{11e2} 呈现出了两条主带, 表明 tRNA^{11e2} 仅仅被部分修饰, 这也许是因为较大的氨基甲酸酯和炔官能团影响了 Tias 对 RNA 的识别效率而导致了不完全修饰。因此, 本发明人将选择化合物 2 和化合物 3 来进行后续的研究。

[0088] 接下来, 本发明人构建了 tRNA^{11e2}C34U (SEQ ID NO :4) 突变体, 用以验证 Tias 催化的是否是 Af tRNA^{11e2} 第 34 位胞嘧啶的特异性修饰。结果如图 8B 所示, Tias 能够成功催化化合物 1 和 2 共价结合到 tRNA^{11e2} 上, 却不能催化化合物 1/2 与 tRNA^{11e2}C34U 突变体的结合。这一结果充分证明了 Tias 不仅可以催化天然底物化合物 1, 也可以催化非天然的底物类似物特异性结合到 Af tRNA^{11e2} 的第 34 位胞嘧啶上。

[0089] 为了进一步验证化合物 2 和 3 确实能够精确结合 Af tRNA^{11e2} 的 C34, 本发明人使用 RNase T1 对 Af tRNA^{11e2} 进行消化, 然后通过质谱分析含有反密码子环的核酸片段。结果如图 8C 所示, 非修饰的 tRNA^{11e2} 片段分子量为 3184.08Da, 与理论计算分子量 3184.4Da 非常接近。化合物 1 和化合物 3 修饰的 tRNA^{11e2} 片段分子量分别为 3295.29 和 3220.26Da (图 8D 和 F), 也都非常接近理论计算分子量 3295.5 和 3220.3Da。但化合物 2 修饰的 tRNA^{11e2} 片段分子量为 3311.15Da (图 8E), 与理论计算分子量 3337.5Da 相差 26.3Da, 本发明人分析, 其原因可能是因为在质谱的激光照射期间, 核酸片段丢失了两个氮原子, 增加了两个氢原子, 这种情况在以前的质谱检测中也曾经出现过。总之, 我们的结果还是能够说明 Tias 可以催化含有叠氮化物/炔官能团的 AGM (化合物 1) 类似物——化合物 2 和 3 特异性结合 Af tRNA^{11e2} 的 34 位胞嘧啶。

[0090] 实施例 6 : Tias 晶体结构解析

[0091] 为了解开 Tias (SEQ ID NO :2) 识别 AGN (化合物 2) 的分子基础, 本发明人解析了 Tias 结合 AGN 的晶体结构 (图 9)。Asp193 的主链羰基和 Asn194 的侧链分别与 AGN 的叠氮基形成了两个氢键, Arg217 的胍基也与 AGN 的羰基形成了一个氢键, 同时, Val203 的侧链可以通过疏水作用稳定胍丁胺的碳链。根据该晶体结构, 本发明人可以推断, 类似的疏水作用

也能够促进 Tias 对炔丙胺 (2-Propynylamine, 化合物 3) 的识别。

[0092] 实施例 7 :RNA 体外特异性标记及成像

[0093] 本发明人接着测试 Tias 是否可以通过生物正交化学方法来实现 RNA 荧光标记? 本发明人往缓冲液 (20mM Tris, pH 7.4、150mM NaCl) 中混合加入 100 μ M BCN-FITC 和 5pmol 经化合物 2 修饰的 tRNA^{11e2}, 同时以加入未被修饰的 tRNA^{11e2}作为对照, 室温孵育 30 分钟, 经 6.5% 聚丙烯酰胺凝胶 (含 40mM Tris, pH8.0、1mM EDTA, 8M 尿素) 电泳分析后, 进行荧光成像 (488nm 激发, 520nm 发射)。由图 10A 可知, 经化合物 2 修饰的 tRNA^{11e2}可以与 BCN-FITC 进行反应, 产生荧光, 而未经修饰的 tRNA^{11e2}与 BCN-FITC 没有产生任何反应。该结果证明了 BCN-FITC 可以特异性地与修饰后 tRNA^{11e2}的叠氮基团反应。

[0094] 本发明人在 1mM 亚铜离子作催化剂的条件下, 又用同样的试验方法测试了经化合物 3 修饰的 tRNA^{11e2}和 Sulfo-Cy5-azide 的荧光成像反应 (633nm 激发, 670nm 发射), 也得到了相同的反应结果 (图 10B), 即 Sulfo-Cy5-azide 只能与修饰后的 tRNA^{11e2}反应并产生荧光。

[0095] 尽管本发明人已经证明了 Tias 可以催化叠氮化物或炔基官能团位点特异性结合 tRNA^{11e2}, 但本发明人还想知道, 该方法能否用来标记其他目标 RNA? 为了实现这一目标, 本发明人通过体外转录, 合成了含有 3' 和 5' 延伸端的 tRNA^{11e2} (简称为 tRNA^{11e2}-3-5, 结构见图 11, 核苷酸序列如 SEQ ID NO :5 所示)。本发明人将 5pmol tRNA^{11e2}-3-5, 8 μ g Tias, 5mM DTT, 1mM ATP 和 1mM AGN 混合, 同时以不加入 AGN 的混合液作为对照, 37°C 孵育 2 小时。然后去除过量的 AGN, 再加入 100 μ M BCN-FITC, 室温孵育 30 分钟。反应液通过聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分析。如图 12 所示, 只有加入 AGN, BCN-FITC 才能选择性地标记 tRNA^{11e2}-3-5, 这也同时说明了在 tRNA^{11e2}两端分别加上 3' 和 5' 延伸端后, Tias 仍可以催化其与 AGN 的特异结合。

[0096] 实施例 8 :细胞内靶标 RNA 特异性标记及成像

[0097] 由于以上方法均为 RNA 体外标记, 于是本发明人继续开发在哺乳动物细胞内特异标记 RNA 的方法。我们选用 293T 细胞 (购自 ATCC 公司), 将同时带有 tRNA^{11e2}-5S 融合基因和 Tias 基因的 pCMV Myc 5S Tias 质粒转染 293T 细胞, 得到一株可以共同表达 Tias (SEQ ID NO :1) 和 tRNA^{11e2}-5S 融合 RNA (SEQ ID NO :6) 的细胞株, 同时将仅带有 Tias 基因的 pCMV MycTias 质粒转染 293T 细胞, 得到另一株只能表达 Tias 而无法表达融合 RNA 的细胞株。我们将这两种细胞培养于含有 1mM 化合物 2 的 DMEM 培养基中, 随后通过 TRIZOL 洗涤剂来裂解细胞, 提取细胞总 RNA。取 50pmol 细胞总 RNA 与 100 μ M BCN-Cy5 混合孵育 30 分钟后, 通过琼脂糖凝胶电泳结合荧光成像进行分析。结果如图 13 所示, 当细胞中没有 tRNA^{11e2}-5S 融合 RNA 表达时, BCN-Cy5 无法标记 293T 细胞转录组中的任何 RNA, 而细胞中正常表达 tRNA^{11e2}-5S 融合 RNA 时, BCN-Cy5 可以成功标记该目标融合 RNA。

[0098] 为了进一步验证本发明的新方法在哺乳动物细胞中进行 RNA 成像的效果, 本发明人换用 U2OS 细胞 (购自 ATCC 公司, 登记号 :HTB-96) 和化合物 3 重复上述实验。两株 U2OS 细胞中, 一种可以同时表达 Tias 和 tRNA^{11e2}-5S 融合 RNA (SEQ ID NO :6), 另一种只能表达 Tias 而无法表达融合 RNA, 用含有 1mM 化合物 3 的 DMEM 培养基进行培养, 然后将细胞与 Sulfo-Cy5-azide 孵育, 同时加入亚铜离子作为催化剂。利用激光共聚焦显微镜对细胞进行观察。本发明人得到了相同的实验结果: 只有在正常表达融合 RNA 的细胞中, RNA 能够被成

功标记并成像（图 14）。

[0099] 我们用 293T 细胞提取 RNA 进行标记是因为 293T 细胞的转染效率高，导致我们提取的总 RNA 中 tRNA^{11e2}-5S 融合 RNA 的比例高，这便于我们后续的荧光染料标记，因为我们的检测方法是琼脂糖电泳后用荧光扫描仪成像，它的灵敏度相对较低，所以需要相对高丰度的蛋白。同时这种方法可以观察到被标记 RNA 的相对分子量位置，便于我们验证 tRNA^{11e2}-5S 融合 RNA 的标记。

[0100] 而我们用 U2OS 细胞进行细胞成像是因为相对于 293T 细胞，U2OS 细胞贴壁比较牢固，伸展性较大，便于用来进行激光共聚焦成像。但是 U2OS 细胞的转染效率比较低，不过对于激光共聚焦成像来说，只需要少数的阳性细胞就可以观察了，灵敏度较高。

[0101] 上述两个细胞内实验的操作上的区别在于研究目的的不同：在 293T 细胞中观察被标记 RNA 的大小，在 U2OS 细胞中观察被标记 RNA 在细胞内位置的分布，实验目的不同。

[0102] 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条件下，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]

SEQUENCE LISTING

<110> 中国科学院生物物理研究所

<120> 一种细胞内位点特异性共价标记RNA的新方法

<130> IB157103

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1287

<212> DNA

<213> tRNA^{Ala}2-arginine合成酶的核苷酸序列

```

<400> 1
atgagagtct gggigggaat tgaagacaag gacagcagea gagggatgtg caactactat 60
ctggcagtcg ttgcaatgga gagggtagag agggagcttg gaaaggtaat cggattccg 120
agacteataa gatigaatcc gacaattccg tacaaaaacta ggggcaatgg ggcgtttage 180
ttctcgtcag aggttgaiga cgttggggag cttgttgaig ttgtgaaiga ggtataaate 240
gagcatgeaa tgcitgatga tgagaagacg aaccccgggg cegtttttgt tgatgaggag 300
cttgggtaea agcltaaac ctttgcggac aaagccatta aagacgtttt gcagattgat 360
gaggccctct tgcctcctgg gaagtacttc atcccccaat taaggcacia aaagggaaag 420
ggctcctcag gagcccttgc cggcgttggg gggagcttg aagaatttac gttggageta 480
atagcctaca ggtatccaga gagattcggg acggaaaggg agtacgacga ggagagcttt 540
ttcgactgag actacagact ctatccccag accttcgaca aegttgactg gtgcaatgat 600
gttctagctc gcaaccctaa cacaccctgt cgggttcctt acggaatcag gggcgagagt 660
gtcgaggctc tgtacaagcc catggagagc gtaaaaaatg agccccgtga taggagatg 720
atttcgttta ctaaccacgc aaccgacatg cacctatttg gggaggaaga agttcacagg 780
ctggaaaact accgctccta caggttgagg gggagagtta ctttgagacc gtacgacatt 840
gaggggggac acgtcctttt cgagattgac acgaaattcg gcagcgttaa gtgcgcgcgc 900
ttcgagccga cgaagcagtt cagaaacgtg ataaggctgc tcagaaaggg gtagttgttt 960
gaagttlacg gctcgatgaa aaaagacacg ataaaccttg aaaagataca aatcgttgag 1020
ctcgcggaaa ttgggttga gaagaatcca atcigtccga gcgcggggag gagaatggag 1080
tccgcaggaa gagggcaggg attcagatgc aaaaagtgea gaactauggc agatgaaaag 1140
ctaagggaaa aagtggagag ggagcttcag ccagggtttt atgaggttcc gcgcgtctgc 1200
agaaggcacc ttccaagcc gctaateaga atgaacgttg aaggeaggea cttttcaga 1260

```

[0002]

ctcgagcacc accaccacca ccaactga

1287

<210> 2

<211> 428

<212> PRT

<213> tRNAIle2-agnatidine合成酶的氨基酸序列

<400> 2

Met Arg Val Trp Val Gly Ile Asp Asp Thr Asp Ser Ser Arg Gly Met
1 5 10 15Cys Thr Thr Tyr Leu Ala Val Leu Ala Met Glu Arg Val Glu Arg Glu
20 25 30Leu Gly Lys Val Ile Gly Phe Pro Arg Leu Ile Arg Leu Asn Pro Thr
35 40 45Ile Pro Tyr Lys Thr Arg Gly Asn Gly Ala Val Ser Phe Leu Val Glu
50 55 60Val Asp Asp Val Gly Glu Leu Val Asp Val Val Asn Glu Val Ile Ile
65 70 75 80Glu His Ala Met Leu Asp Asp Glu Lys Thr Asn Pro Gly Ala Val Phe
85 90 95Val Asp Glu Glu Leu Ala Val Lys Leu Lys Pro Phe Ala Asp Lys Ala
100 105 110Ile Lys Asp Val Leu Glu Ile Asp Glu Ala Leu Phe Val Ile Gly Lys
115 120 125Tyr Phe Ile Pro His Leu Arg His Lys Lys Gly Arg Gly Leu Ile Gly
130 135 140Ala Leu Ala Ala Val Gly Ala Glu Leu Glu Asp Phe Thr Leu Glu Leu
145 150 155 160Ile Ala Tyr Arg Tyr Pro Glu Arg Phe Gly Thr Glu Arg Glu Tyr Asp
165 170 175Glu Glu Ser Phe Phe Asp Met Asp Tyr Glu Leu Tyr Pro Glu Thr Phe
180 185 190Asp Asn Val Asp Trp Cys Asn Asp Val Val Val Cys Ile Pro Asn Thr
195 200 205Pro Cys Pro Val Leu Tyr Gly Ile Arg Gly Glu Ser Val Glu Ala Leu
210 215 220Tyr Lys Ala Met Glu Ser Val Lys Thr Glu Pro Val Asp Arg Arg Met
225 230 235 240

[0003]

Ile Phe Val Thr Asn His Ala Thr Asp Met His Leu Ile Gly Glu Glu
 245 250 255

Glu Val His Arg Leu Glu Asn Tyr Arg Ser Tyr Arg Leu Arg Gly Arg
 260 265 270

Val Thr Leu Glu Pro Tyr Asp Ile Gln Gly Gly His Val Phe Phe Glu
 275 280 285

Ile Asp Thr Lys Phe Gly Ser Val Lys Cys Ala Ala Phe Glu Pro Thr
 290 295 300

Lys Glu Phe Arg Asn Val Ile Arg Leu Leu Arg Lys Gly Asp Val Val
 305 310 315 320

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

Gln Ile Val Glu Leu Ala Glu Ile Trp Val Glu Lys Asn Pro Ile Cys
 340 345 350

Pro Ser Cys Gly Arg Arg Met Glu Ser Ala Gly Arg Gly Gln Gly Phe
 355 360 365

Arg Cys Lys Lys Cys Arg Thr Lys Ala Asp Glu Lys Leu Arg Glu Lys
 370 375 380

Val Glu Arg Glu Leu Gln Pro Gly Phe Tyr Glu Val Pro Pro Ser Ala
 385 390 395 400

Arg Arg His Leu Ser Lys Pro Leu Ile Arg Met Asn Val Glu Gly Arg
 405 410 415

His Ile Phe Arg Leu Glu His His His His His His
 420 425

<210> 3

<211> 78

<212> DNA

<213> Af. tRNAIle2

<400> 3

gggcccgtag cttagccagg tcagagcgcc cggctcataa ccgggcggtc gagggttcga 60

atccctcgg gccacca 78

<210> 4

<211> 78

<212> DNA

<213> tRNAIle2C34U突变体

<400> 4

gggcccgtag cttagccagg tcagagcgcc cggcttataa ccgggcggtc gagggttcga 60

[0004]

| | |
|------------------------------------------------------------------|-----|
| ateectccgg gccacca | 78 |
| <210> 5 | |
| <211> 108 | |
| <212> DNA | |
| <213> tRNAIle2-3-5 | |
| <400> 5 | |
| gittaccag agggccgta gcttagccag gtcagagcgc ccggtcaca accggcggt | 60 |
| cgagggttcg aatccctccg gcccaatca ggaaaaccag ctgtatc | 108 |
| <210> 6 | |
| <211> 404 | |
| <212> DNA | |
| <213> tRNAIle2-5S融合RNA | |
| <400> 6 | |
| aagctccccc gggtggggg tctggctgc aatccggcgg gaacggcgg gccggctgg | 60 |
| gctcttgggg cagccaggcg cctccttcag cgtctacgga cataccaccg tgaacggcc | 120 |
| cgatctctgc tgatctcgga agctaagcag gctcggcct ggttagtact tggatgggag | 180 |
| accgctggg aataccgggt gctgtagcgg tcgacgggce cgtagcttag ccagtcaga | 240 |
| gcgccggct cataaccggg cggtcgaggg ttcgaatccc tcgggceca ccatggccc | 300 |
| gtagcttagc caggtcagag cgcctggctc ataaccgggc gctcagggt tcgaatcct | 360 |
| ccggcccac catctagagc ggaattcggc ccgcttttaa gctt | 404 |

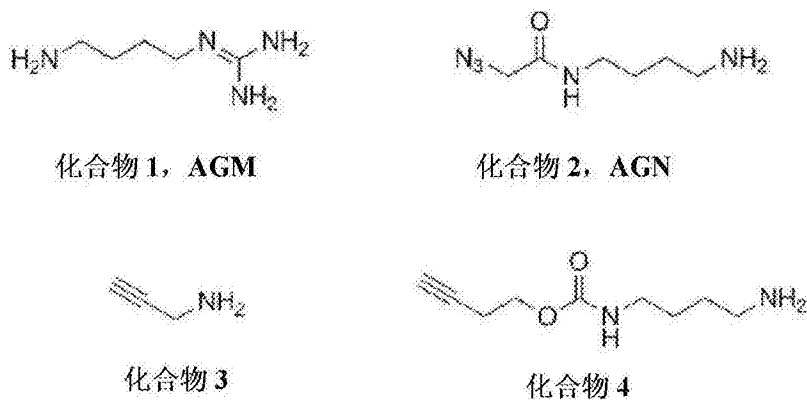


图 1

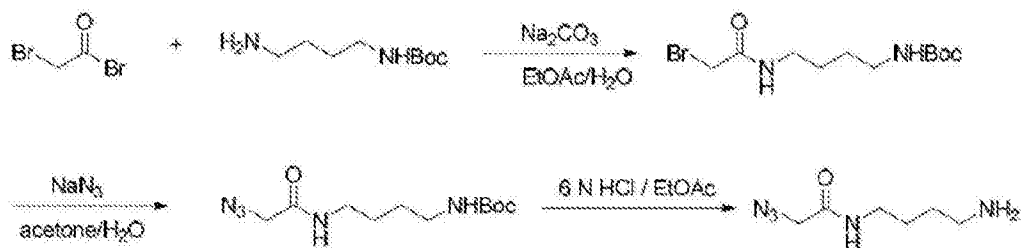


图 2

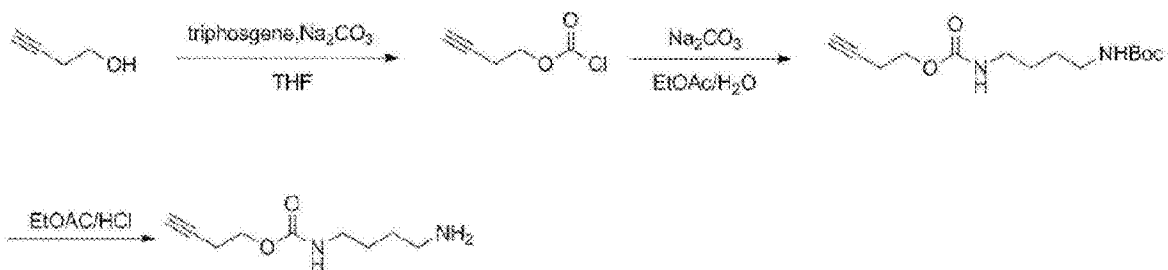


图 3

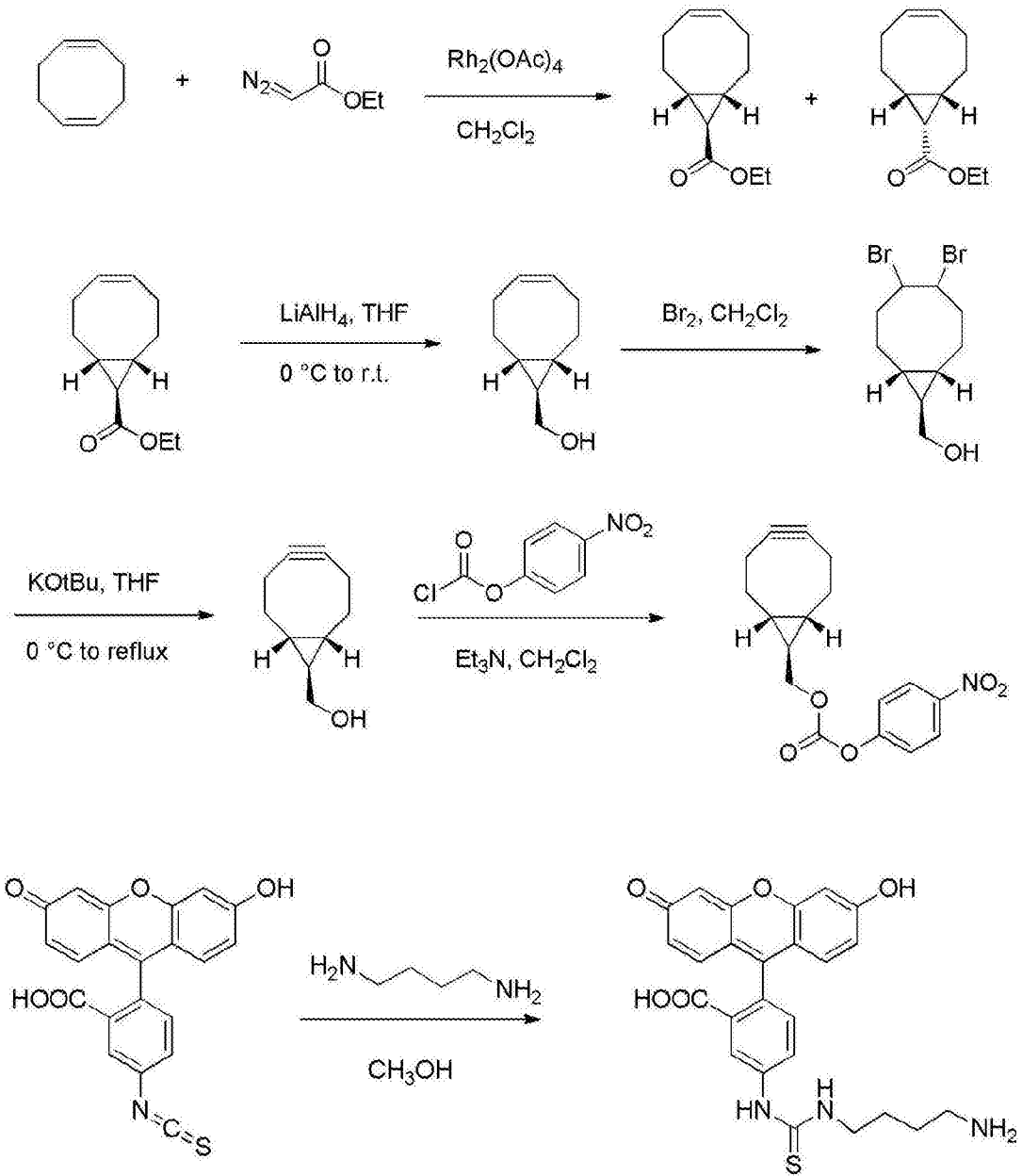


图 4

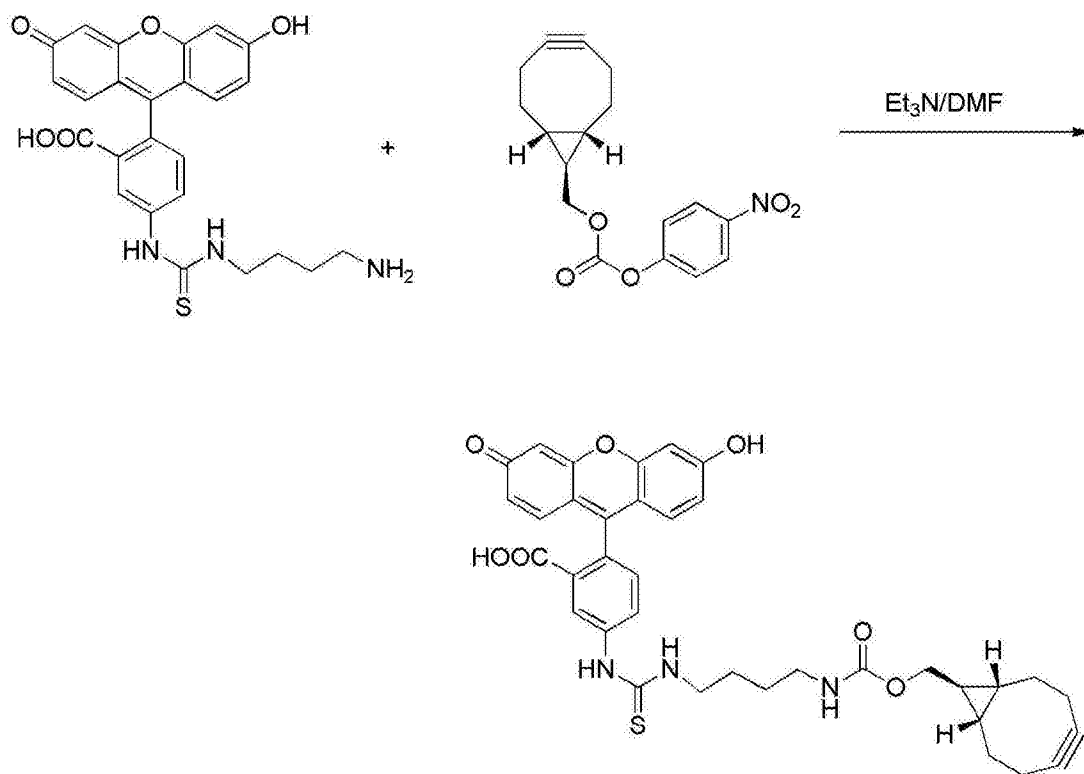


图4(续)

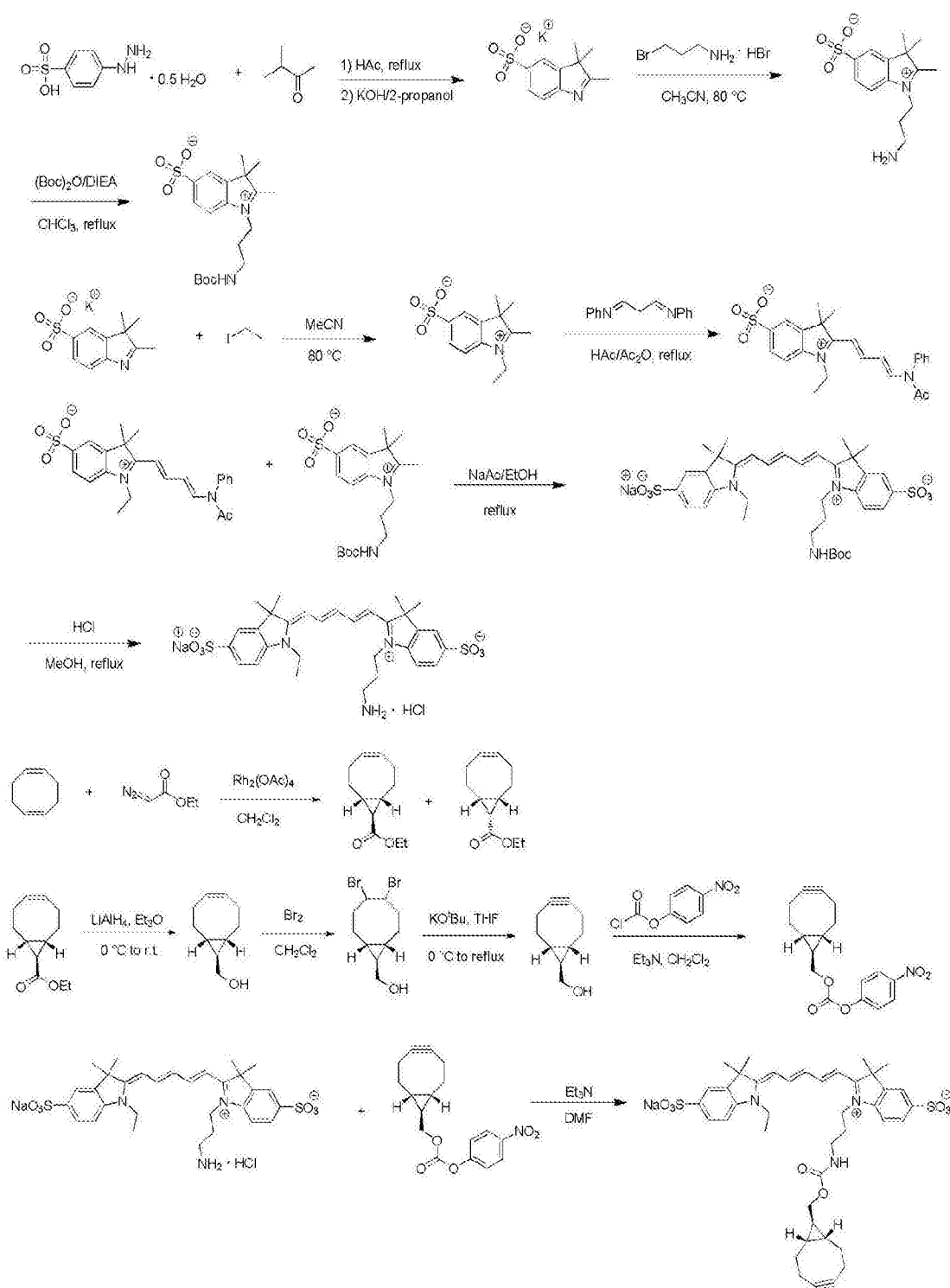


图 5

| 名称 | 核苷酸/氨基酸序列 |
|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| tRNA ^{Ile2} -agmatidine 合成酶 | <u>核苷酸序列 (SEQ ID NO: 1):</u> ATGAGAGTCTGGGTGGGAATTGACGACACGGACAGCAGC AGAGGGATGTGACTACTATCTGGCAGTGCTTGCAATGG AGAGGGTAGAGAGGGAGCTGGGAAAGGTAATCGGATTTC CGAGACTCATAAGATTGAATCCGACAATTCCGTACAAAAC TAGGGGCAATGGGGCTGTTAGCTTTCTCGTCGAGGTTGAT GACGTTGGGGAGCTTGTTGATGTTGTGAATGAGGTTATAA TCGAGCATGCAATGCTTGATGATGAGAAGACGAACCCCG GGGCCGTTTTTGTGATGAGGAGCTTGCGGTCAAGCTTAA ACCCTTTGCGGACAAAGCCATTAAGACGTTTTGACGATT GATGAGGCCCTCTTCGTCATCGGGAAGTACTTCATCCCCC ATTTAAGGCACAAAAGGGAAGGGGTCTCATCGGAGCCC TTGCCGCCGTTGGTTCGGAGCTTGAAGACTTTACGTTGGA GCTAATAGCCTACAGGTATCCAGAGAGATTGCGGACGGAA AGGGAGTACGACGAGGAGAGCTTTTTTCGACATGGACTAC GAGCTCTATCCCAGACCTTCGACAACGTTGACTGGTGCA ATGATGTTGTAGTCTGCATCCCTAACACACCCTGTCCGGT GCTTTACGGAATCAGGGGCGAGAGTGTGAGGCTCTGTA CAAGGCCATGGAGAGCGTAAAACTGAGCCCGTGGATAG GAGAATGATTTTCGTTACTAACCACGCAACCGACATGCAC CTTATTGGGGAGGAAGAAGTTCACAGGCTGGAAAACCTAC CGCTCCTACAGGTTGAGGGGGGAGAGTACTTTGGAGCCG TACGACATTGAGGGGGGGCACGTCTTTTTCGAGATTGACA CGAAATTCGGCAGCGTTAAGTGCGCCCGCCTTCGAGCCGA CGAAGCAGTTCAGAAACGTGATAAGGCTGCTCAGAAAGG GGGATGTTGTTGAAGTTTACGGCTCGATGAAAAAGACA CGATAAACCTTGAAAAGATACAAATCGTTGAGCTCGCGG AAATTTGGGTTGAGAAGAATCCAATCTGTCCGAGCTGCGG GAGGAGAAATGGAGTCCGCAGGAAGAGGGCAGGGATTCA GATGCAAAAAGTGCAGAACTAAGGCAGATGAAAAGCTAA GGGAAAAGTGGAGAGGGAGCTTCAGCCAGGGTTTTATG AGGTTCCGCCGTCTGCCAGAAGGCACCTTTCCAAGCCGC TAATCAGAATGAACGTGGAAGGCAGGCACATTTTCAGAC TCGAGCACCACCACCACCACCCTGA |
| | <u>氨基酸序列 (SEQ ID NO: 2):</u> MRVWVGIDDTSSRGMCTTYLAVLAMERVERELGKVIQFP RLIRLNPTIPYKTRGNGAVSFLVEVDDVGELVDVVNEVIEH AMLDDEKTNPGAVFVDEELAVKLPFADKAIKDVLOIDEAL FVIGKYFIPHLRHKKGRGLIGALAAVGALEDFLELIAYRY PERFGTEREYDEESFFDMDYELYPQTFDNDVWCNDVVVCI NTPCPVLYGIRGESVEALYKAMESVKTEPVDRRMIFVTNHA TDMHLIGEEEVHRLNYSYRLRGRVTLEPYDIEGGHVFFEI DTKFGSVKCAAFEPTKQFRNVIRLLRKGDVVEVYGSMMKKD TINLEKIQIVELAEIWVEKNPICPSCGRRMESAGRQGFRC KCRTKADEKLRKVERELQPGFYEVPPSARRHLSKPLIRMN VEGRHIFRLEHHHHHH |
| Af tRNA ^{Ile2} | <u>核苷酸序列 (SEQ ID NO: 3):</u> GGGCCCGTAGCTTAGCCAGGTCAGAGCGCCCGGCTCATA ACCGGGCGGTCGAGGGTTCGAATCCCTCCGGGCCACCA |

| | |
|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| tRNA ^{Ile2} C34U 突变体 | 核苷酸序列 (SEQ ID NO: 4): GGCCCCGTAGCTTAGCCAGGTCAGAGCGCCCCGGCTTATAA CCGGGCGGTCGAGGGTTCGAATCCCTCCGGGCCACCA |
| tRNA ^{Ile2} -3-5 | 核苷酸序列 (SEQ ID NO: 5): GTTTACCCAGAGGGCCCGTAGCTTAGCCAGGTCAGAGCG CCCGGCTCATAACCGGGCGGTCGAGGGTTCGAATCCCTCC GGGCCCAATCAGGAAAACCAGCTGTATTC |
| tRNA ^{Ile2} -5S 融合 RNA | 核苷酸序列 (SEQ ID NO: 6): AAGCTTCCCCGGGCTGGCGGTGTCGGCTGCAATCCGGCG GGCACGGCCGGGCCGGGCTGGGCTCTTGGGGCAGCCAGG CGCTCCTTCAGCGTCTACGGCCATACCACCCTGAACCGC CCCGATCTCGTCTGATCTCGGAAGCTAAGCAGGGTCGGGC CTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCGG GTGCTGTAGGCGTCGACGGGCCCGTAGCTTAGCCAGGTC AGAGCGCCCGGCTCATAACCGGGCGGTCGAGGGTTCGAA TCCCTCCGGGCCACCATGGGCCCAGCTTAGCCAGGTC AGAGCGCCCGGCTCATAACCGGGCGGTCGAGGGTTCGAA TCCCTCCGGGCCACCATCTAGAGCGGACTTCGGTCCGCT TTAAGCTT |

图 6

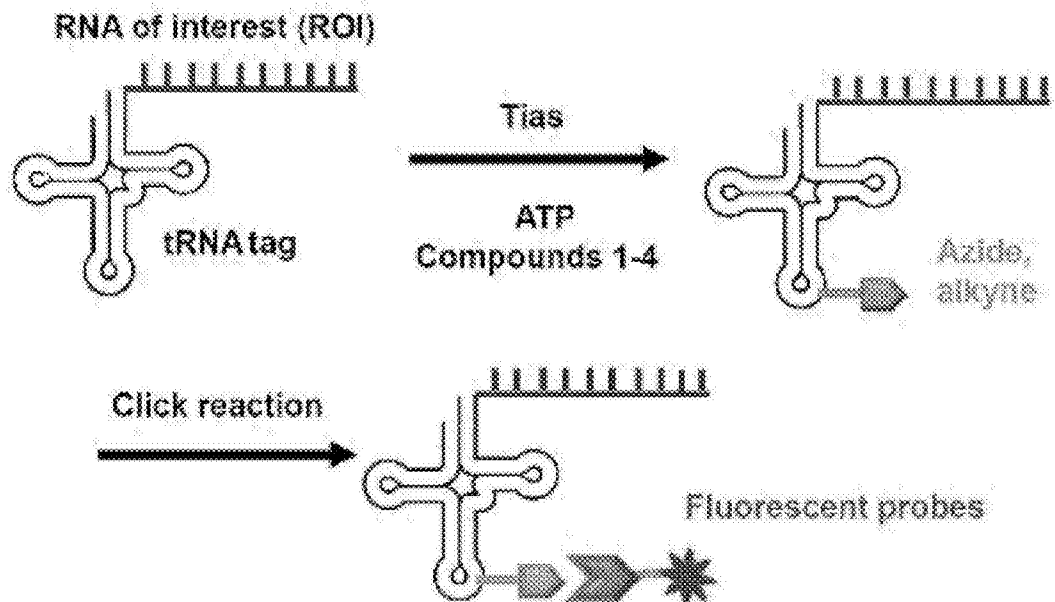


图 7

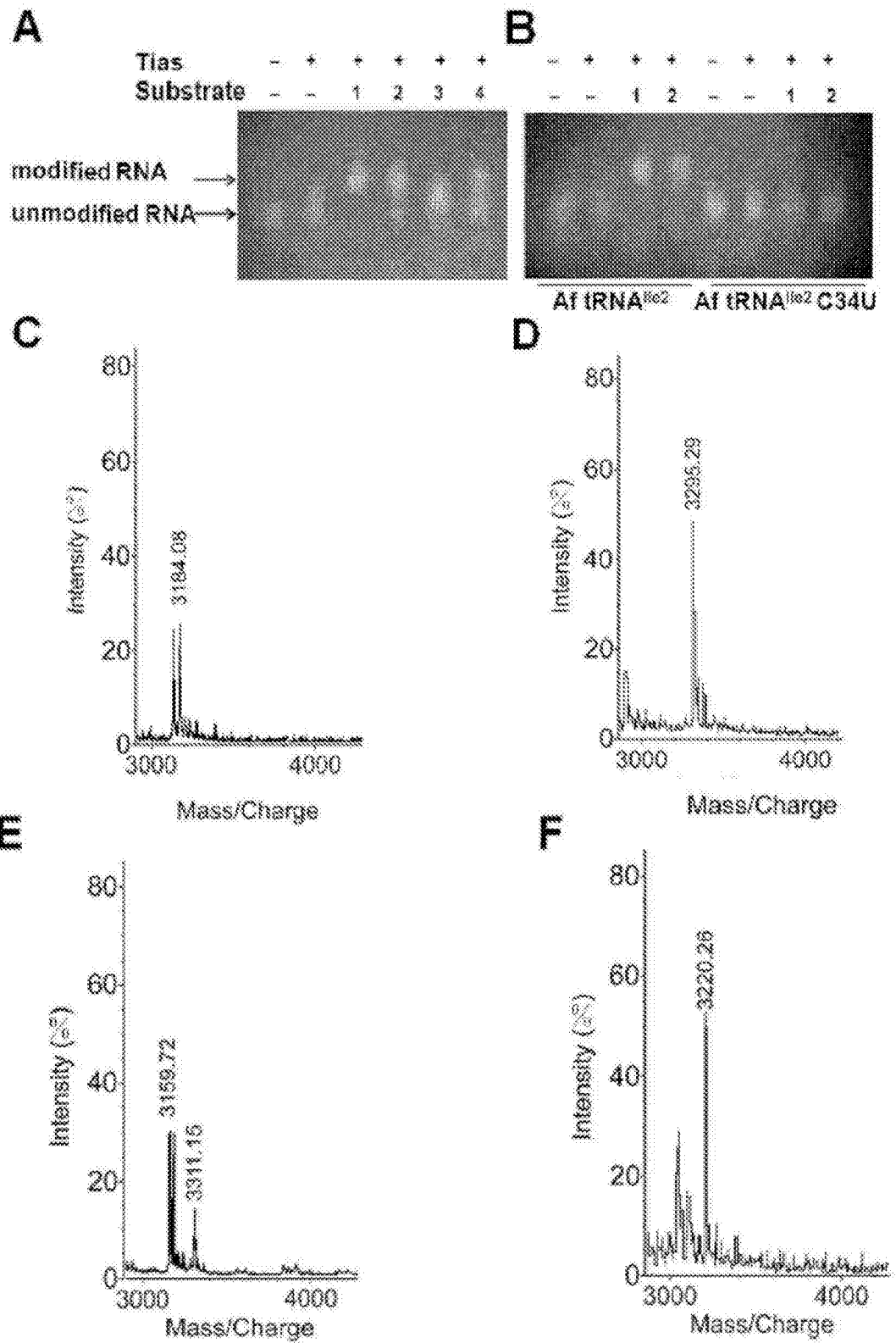


图 8

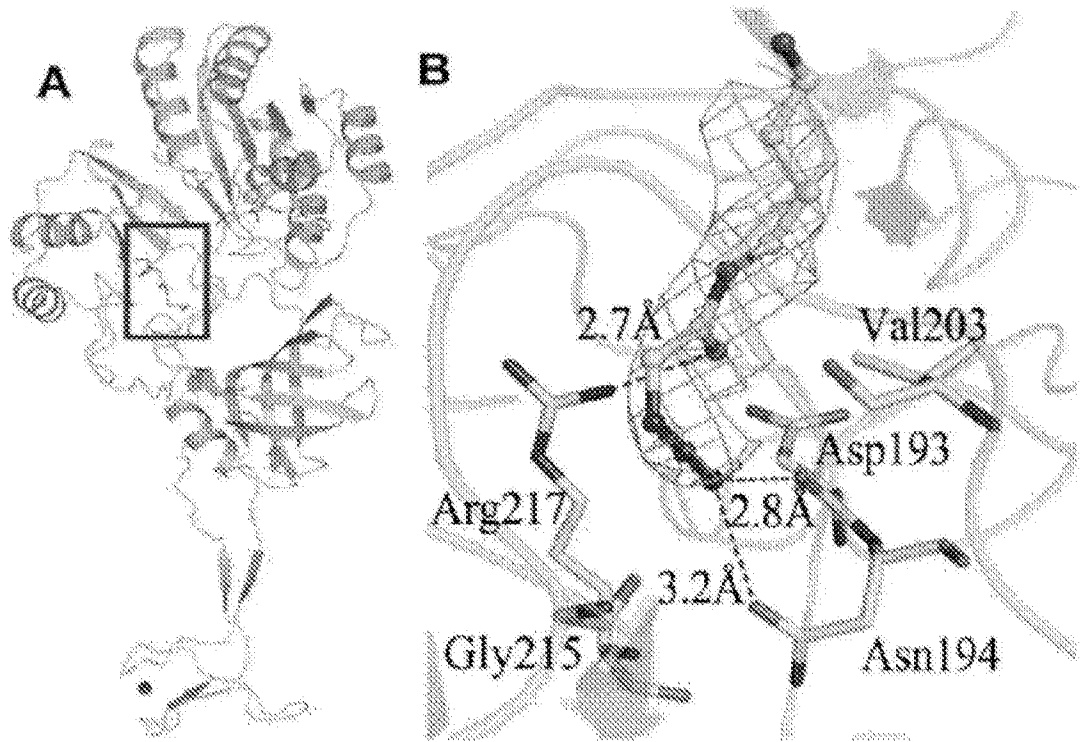


图 9



图 10

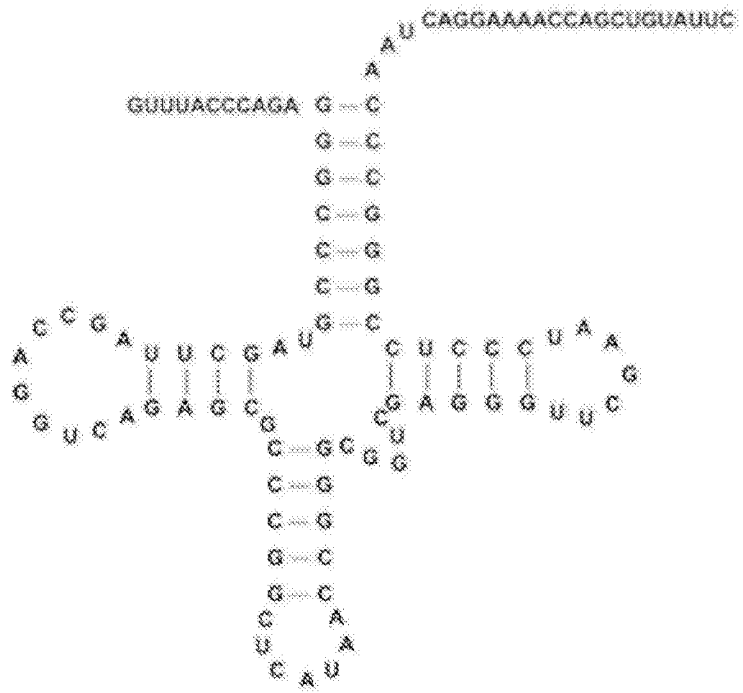


图 11

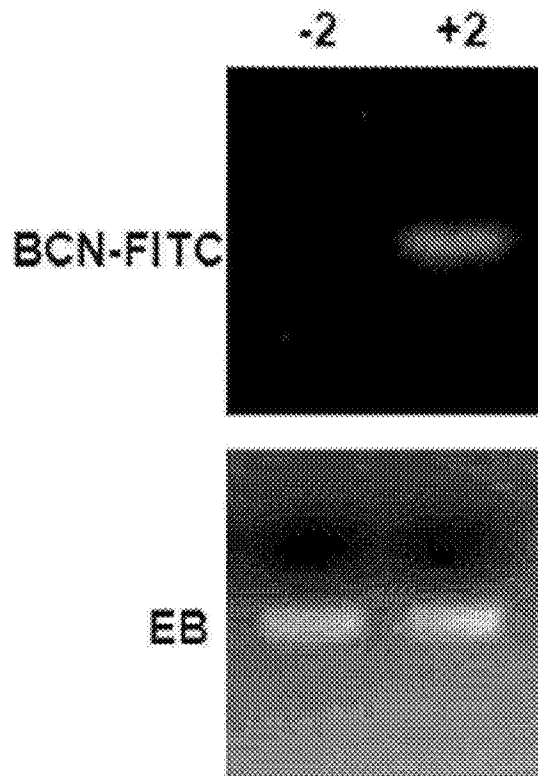


图 12

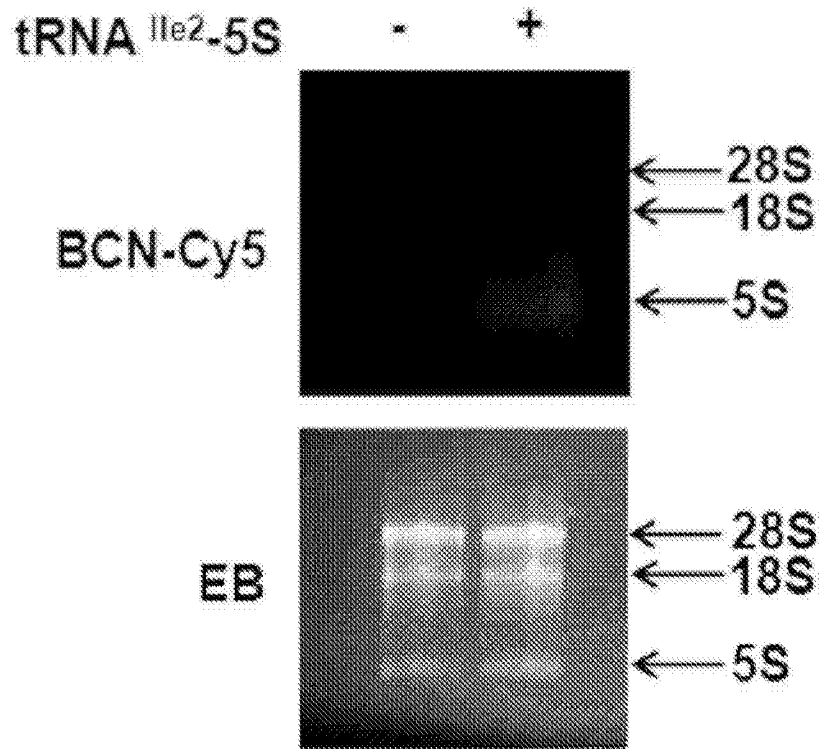


图 13

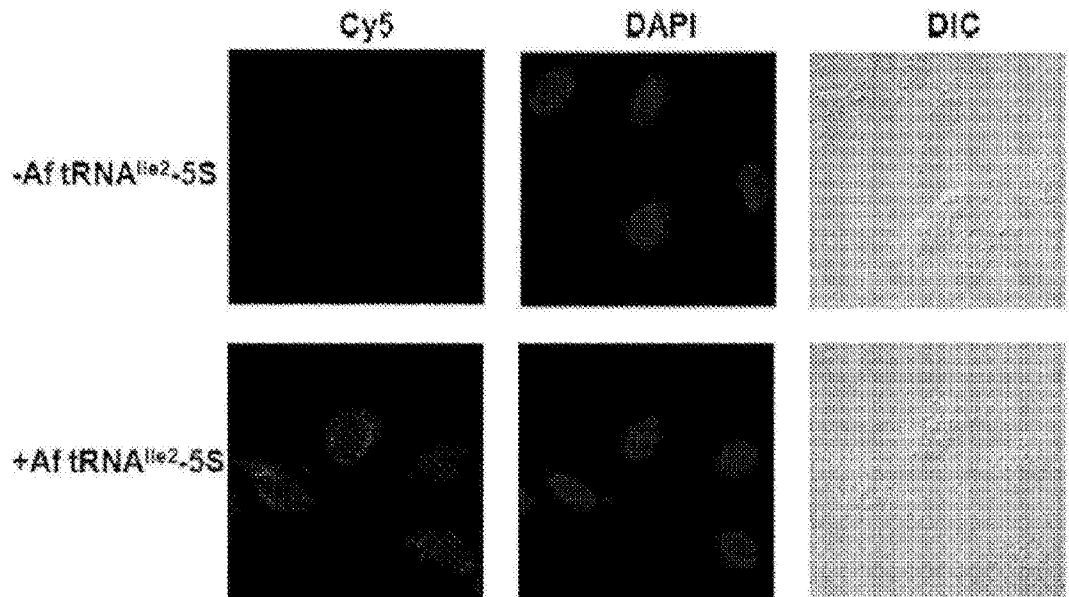


图 14