



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103215235 A

(43) 申请公布日 2013. 07. 24

(21) 申请号 201210015550. 1

C12R 1/19(2006. 01)

(22) 申请日 2012. 01. 18

(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 胡诚 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 王旭

(51) Int. Cl.

C12N 9/00(2006. 01)

C12P 21/02(2006. 01)

C12N 1/21(2006. 01)

C07K 14/805(2006. 01)

权利要求书1页 说明书10页

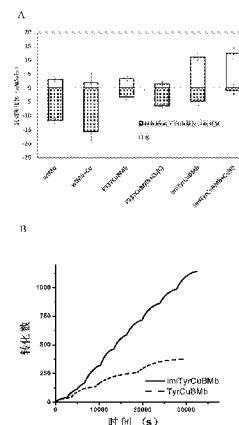
序列表5页 附图6页

(54) 发明名称

3- 咪唑基酪氨酸翻译系统及其应用

(57) 摘要

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 SEQ ID NO:2 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 合成酶和它们的配对将 3- 咪唑基酪氨酸 (imiTyr) 定点特异插入目标蛋白质的 3- 咪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- 咪唑基酪氨酸的方法。所述 3- 咪唑基酪氨酸翻译系统包含:(i) 3- 咪唑基酪氨酸;(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- 咪唑基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。本发明还涉及通过在肌红蛋白(Myoglobin, Mb) 中定点特异插入 3- 咪唑基酪氨酸使其具有氧化酶活性的方法及其应用。



1. 正交氨酰基-tRNA 合成酶,其含有的氨基酸序列选自 SEQ ID NO:2 所示氨基酸和它们的保守性变体构成的组。
2. 一种 3-咪唑基酪氨酸翻译系统,所述系统包含:
 - (i) 3-咪唑基酪氨酸;
 - (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-咪唑基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,并且所述选择密码子是琥珀密码子。
4. 如权利要求 2 所述的翻译系统,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。
6. 如权利要求 5 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。
7. 一种产生在至少一个所选位置定点特异插入 3-咪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 2 所述的 3-咪唑基酪氨酸翻译系统,该系统包含:
 - (i) 3-咪唑基酪氨酸;
 - (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-咪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) 将编码所述目标蛋白质的核酸转化到权利要求 5 所述的宿主细胞中,在所述蛋白质的翻译期间,3-咪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-咪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-咪唑基酪氨酸的所述目标蛋白质。
8. 如权利要求 7 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。
9. 生产含有 3-咪唑基酪氨酸的肌红蛋白突变体的方法,其利用权利要求 7 所述的方法,其中所用的编码肌红蛋白突变体的核酸序列为 SEQ ID NO:7,在野生型肌红蛋白的 33 位引入 3-咪唑基酪氨酸,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。
10. 由权利要求 9 所述的方法获得的含有 3-咪唑基酪氨酸的肌红蛋白突变体,所述肌红蛋白突变体的氨基酸序列为 SEQ ID NO:6,在野生型肌红蛋白的 33 位引入 3-咪唑基酪氨酸,同时将 29 位亮氨酸突变为组氨酸,所述肌红蛋白突变体在适宜的条件下产生氧化酶活性。

3-咪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自由SEQ ID NO:2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-咪唑基酪氨酸((S)-2-氨基-3-(4-羟基-3-(1H-咪唑-1-基)苯基)丙酸,简称为imiTyr)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-咪唑基酪氨酸定点特异插入目标蛋白质的3-咪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-咪唑基酪氨酸的方法。本发明还涉及用这种翻译系统和这种方法产生的含有3-咪唑基酪氨酸的突变蛋白质,例如,含有3-咪唑基酪氨酸的肌红蛋白突变体,以及含有3-咪唑基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)。血红素蛋白(Hemoproteins)就是其中一大类含有原卟啉IX(血红素,heme)作为辅基的金属蛋白,在生命体系中执行着重要的生物功能,如氧载体功能(血红蛋白Hb和肌红蛋白Mb),电子传递功能(细胞色素b5,cyt b5和细胞色素c,cyt c等),生物催化功能(细胞色素P450,cyt P450 细胞色素c过氧化物酶,CcP等),以及生物传感功能(CO传感器CooA和NO传感器sGC等)。虽然血红素蛋白具有迥然相异的生物功能,它们却拥有几乎相似的血红素辅基,和类似的蛋白质多肽链包裹血红素的蛋白分子组成方式。相同的heme辅基如何被不同的蛋白分子所利用,来执行不同的生物功能,一直是化学生物学和蛋白质化学研究领域所关注的重点。国内外众多的科研工作者进行了长期而广泛的研究,试图来解答这一问题,并通过对这一问题的解答来认识蛋白的结构-性质-反应-功能(structure-property-reactivity-function,SPRF)之间所蕴含的精妙关系。

[0003] 血红素-铜氧化酶(HCOs)是既有血红素又有铜的双重结合中心蛋白,是一大类广泛存在于真核线粒体及细菌呼吸链上的末端氧化酶。这类蛋白可以接受来自底物的四个电子,并传递到一个氧气分子上,将氧气最终转化为两个水分子,而在此过程中不会产生活性氧(ROS)。其中血红素结合中心可与轴向的一个组氨酸配位,而铜结合中心(CuB)可与邻近的三个组氨酸配位,两个中心中的铜离子与铁离子距离约5Å。目前科学家们主要通过结构生物学,酶学,光谱,x-射线和拟生态模型等方法来对HCO的结构及功能进行研究,并且已经取得了巨大的突破,但是仍然存在一些重要的结构和机理方面的相关问题需要进一步探讨。例如,CuB在结合并激活氧气方面究竟起着什么作用?在血红素-铜结合中心,氧气浓度的降低如何伴随质子的传递或摄取?高分辨率的X-射线结构揭示了HCO的翻译后修饰使酪氨酸C6和相邻的组氨酸Nε2形成了共价交联,并且在细菌和哺乳动物中,该Tyr-His的共价交联结构都是保守的,证实其一定具有重要功能,但是目前关于该结构的确切功能还无人知晓。

[0004] 为了进一步了解CuB和Tyr-His共价交联在HCO中的功能,有人通过在酵母细胞

色素c氧化酶和抹香鲸肌红蛋白中引入铜中心来模拟HCO蛋白。其中肌红蛋白(Myoglobin, Mb)由153个氨基酸和一个血红素辅基组成,具有分子量小、稳定性高、易通过基因工程和蛋白质工程获得高纯度蛋白等特点,长期以来一直倍受研究者的亲睐,广泛作为蛋白质分子的模型用来研究蛋白质特别是血红素蛋白结构和功能关系。Mb的生物功能是储存和运输氧分子,是典型的氧载体蛋白。其分子中含有一个高自旋五配位的辅基heme,第五个轴向配体为His93,而第六个轴向存在一个空穴,可以可逆地结合O₂分子。同时,空穴周围两个保守的氨基酸残基His64和Val68可以稳定O₂分子的存在。目前,人们已经逐步认识到,血红素蛋白生物功能的差异,主要取决于血红素活性中心结构上的差异,包括血红素中心铁的配位状况、血红素结合腔的微环境,以及血红素与蛋白肽链之间的作用方式等等。对于这些天然存在的血红素蛋白分子间结构及功能上的差异,并非是不可逾越的鸿沟。随着基因工程与蛋白质工程的日益发展,现在,人们可以理性地进行蛋白分子的设计与构建,通过对血红素蛋白的活性中心结构作适当修饰与调整,从而实现不同血红素蛋白生物功能间的相互转换,如氧载体与电子传递蛋白间的相互转换、氧载体与生物催化剂间的相互转换、电子传递蛋白与生物催化剂间的相互转换,以及不同类型血红素蛋白之间的相互转换等等。

[0005] 在血红素蛋白分子中引入其它的金属离子结合位点,是血红素蛋白结构及功能转换研究领域中的一个亮点。通过将Mb与血红素-铜氧化酶的活性中心结构作仔细的比较,将Mb活性中心空穴内的氨基酸Leu29以及Phe43突变成His,加之空穴内原本存在的远端配体His64,在所得到的突变体Mb L29H/F43H分子中,其活性中心就存在3个His,它们可以结合一个Cu²⁺离子(称为CuBMB)。已有研究者经过实验证实,这一突变体由于缺乏质子和一个电子的传递途径而在O₂结合还原过程中会使heme降解,从而也从侧面反应出血红素-铜氧化酶HCO中Tyr-His的共价交联的重要性。3-咪唑基酪氨酸具有Tyr-His共价交联的特性基团,即咪唑基和酪氨酸3位碳的共价连接。为了进一步研究这些蛋白质的结构和功能,本领域还需要能将该非天然3-咪唑基酪氨酸定点特异性地插入蛋白质的新方案。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。

[0006] 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

[0007] 1、技术问题

[0008] 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 : 2 所示氨基酸和它们的保守性变体构成的组。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-咪唑基酪氨酸定点特异插入目标蛋白质的 3-咪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-咪唑基酪氨酸的方法。本发明还涉及用这种翻译系统和这种方法产生的含有 3-咪唑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 合成酶和它们的配对将 3-咪唑基酪氨酸定点特异插入蛋白质的 3-咪唑基酪氨酸翻译系统,并且提供该翻译系统在目标蛋白质中定点特异插入 3-咪唑基酪氨酸的方法。

[0010] 本发明还提供利用本发明的 3-咪唑基酪氨酸翻译系统产生的含有至少一个 3-咪唑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-咪唑基酪氨酸定点特异插入肌红蛋白(Myoglobin)中,该蛋白通过引入铜离子结合中心,可产生氧化酶活性。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插入 3-咪唑基酪氨酸,并不局限于该蛋白。

[0011] 2、技术方案

[0012] 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由 SEQ ID NO :2 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-咪唑基酪氨酸翻译系统。

[0013] 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-咪唑基酪氨酸定点特异插入延伸中的多肽链的 3-咪唑基酪氨酸翻译系统。所述 3-咪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-咪唑基酪氨酸的大量蛋白质。

[0014] 在一些方面中,本发明提供 3-咪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-咪唑基酪氨酸,(b) 正交氨酰-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-tRNA 合成酶用所述非天然氨基酸(即 3-咪唑基酪氨酸),优先氨酰化所述 O-tRNA。

[0015] 优选地,本发明的 3-咪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-咪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。

[0016] 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由 SEQ ID NO :2 所示氨基酸和它们的保守性

变体构成的组。

[0017] 在本发明的优选方面中,本发明提供一种 3-咪唑基酪氨酸翻译系统,所述系统包含:

[0018] (i) 3-咪唑基酪氨酸;

[0019] (ii) 正交氨酰基-tRNA 合成酶;

[0020] (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-咪唑基酪氨酸优先氨酰化所述正交 tRNA;和

[0021] (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。

[0022] 优选地,所述 3-咪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。

[0023] 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:2 所示的氨基酸序列及该序列的保守变体。

[0024] 在一些方面中,本发明的 3-咪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。

[0025] 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-咪唑基酪氨酸氨酰 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-咪唑基酪氨酸氨酰 tRNA 合成酶的核苷酸序列的宿主细胞。

[0026] 本发明还提供产生在至少一个所选位置定点特异插入 3-咪唑基酪氨酸的突变蛋白质的方法。所述方法利用上述 3-咪唑基酪氨酸翻译系统。所述方法通常始于提供含有以下组分的 3-咪唑基酪氨酸翻译系统的步骤:(i) 非天然氨基酸,即 3-咪唑基酪氨酸;(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-咪唑基酪氨酸)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);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,在所述蛋白质的翻译过程中,3-咪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-咪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-咪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-咪唑基酪氨酸氨酰 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-咪唑基酪氨酸氨酰 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,这可以通过常规分子克隆技术和筛选技术实现。

[0027] 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-咪唑基酪氨酸)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。

[0028] 还可在宿主细胞内实施产生含有 3-咪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-咪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-咪唑基酪氨酸等)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-咪唑基酪氨酸。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)。

[0029] 本发明还提供使生产含有 3-咪唑基酪氨酸的肌红蛋白突变体从而使肌红蛋白产生氧化酶活性的方法,所述方法利用上述 3-咪唑基酪氨酸翻译系统,其中所用的编码肌红蛋白突变体的核酸序列为 SEQ ID NO:7,在野生型肌红蛋白的 33 位引入 3-咪唑基酪氨酸,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。这些方法通常始于提供含有以下组分的 3-咪唑基酪氨酸翻译系统的步骤:(i) 3-咪唑基酪氨酸;(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-咪唑基酪氨酸优先氨酰化所述 0-tRNA;和(iv) 编码所述肌红蛋白的核酸,例如,但不限于,SEQ ID NO:7,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);然后在所述蛋白质的翻译过程中,3-咪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-咪唑基酪氨酸定点特异插入所述肌红蛋白的所选位置,之后通过引入铜离子结合中心产生氧化酶活性。

[0030] 本发明还提供利用本发明的 3-咪唑基酪氨酸翻译系统产生的具有氧化酶活性的含有 3-咪唑基酪氨酸的肌红蛋白突变体,所述肌红蛋白突变体的氨基酸序列为 SEQ ID NO:6,在野生型肌红蛋白的 33 位引入 3-咪唑基酪氨酸,同时将 29 位亮氨酸突变为组氨酸,所述肌红蛋白突变体在适宜的条件下产生氧化酶活性。

[0031] 综上所述,本发明提供下述:

[0032] 1. 正交氨酰基-tRNA 合成酶,其含有的氨基酸序列选自 SEQ ID NO:2 所示氨基酸和它们的保守性变体构成的组。

[0033] 2. 一种 3-咪唑基酪氨酸翻译系统,所述系统包含:

[0034] (i) 3-咪唑基酪氨酸;

[0035] (ii) 第 1 项所述的正交氨酰基-tRNA 合成酶;

[0036] (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-咪唑基酪氨酸优先氨酰化所述正交 tRNA ;和

[0037] (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。

[0038] 3. 如第 2 项所述的翻译系统,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。

[0039] 4. 如第 2 项所述的翻译系统,其还包含编码正交氨酰基-tRNA 合成酶的核苷酸序列。

[0040] 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。

[0041] 6. 如第 5 项所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是真细菌细胞,优选大肠杆菌细胞。

[0042] 7. 一种产生在至少一个所选位置定点特异插入 3-咪唑基酪氨酸的突变蛋白质的方法,所述方法包括下述步骤:

[0043] (a) 提供权利要求 2 所述的 3-咪唑基酪氨酸翻译系统,该系统包含:

[0044] (i) 3-咪唑基酪氨酸;

[0045] (ii) 第 1 项所述的正交氨酰基-tRNA 合成酶;

[0046] (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-咪唑基酪氨酸优先氨酰化所述正交 tRNA ;和

[0047] (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

[0048] (b) 将编码所述目标蛋白质的核酸转化到权利要求 5 所述的宿主细胞中,在所述蛋白质的翻译期间,3-咪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-咪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-咪唑基酪氨酸的所述目标蛋白质。

[0049] 8. 如第 7 项所述的方法,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。

[0050] 9. 生产含有 3-咪唑基酪氨酸的肌红蛋白突变体的方法,其利用权利要求 7 所述的方法,其中所用的编码肌红蛋白突变体的核酸序列为 SEQ ID NO:7,在野生型肌红蛋白的 33 位引入 3-咪唑基酪氨酸,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。

[0051] 10. 由第 9 项所述的方法获得的含有 3-咪唑基酪氨酸的肌红蛋白突变体,所述肌红蛋白突变体的氨基酸序列为 SEQ ID NO:6,在野生型肌红蛋白的 33 位引入 3-咪唑基酪氨酸,同时将 29 位亮氨酸突变为组氨酸,所述肌红蛋白突变体在适宜的条件下产生氧化酶活性。

[0052] 3、有益效果

[0053] 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。

[0054] 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-咪唑基酪氨酸,实现在肌红蛋白中特定位点插入该非天然氨基酸,用于模拟 HCO 蛋白中的 Tyr-His 共价交联结构;同时应用分子生物学方法将邻近的 29 位亮氨酸突变成组氨酸,使其和 3-咪唑基酪氨酸,远端的 64 位组氨酸共同形成铜离子结合中心。当该突变蛋白与铜离子结合后,可将氧气转化为水分子,且不会产生活性氧 (ROS)。另外,本文还首次用直接证据证实了 Tyr-His 共价交联结构对 HCO 的氧化酶催化活性起着至关重要的作用。

附图说明

[0055] 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:

[0056] 图 1 是 (S)-2-氨基-3-(4-羟基-3-(1H-咪唑-1-基)苯基)丙酸(简称为 imiTyr)的化学合成;

[0057] 图 2 是 imiTyr 的核磁图谱;

[0058] 图 3 是正交 tRNA,氨酰基-tRNA 合成酶及 Mb 序列;

[0059] 图 4 是 imiTyr-肌红蛋白的 SDS-PAGE 电泳图:A 是 imiTyr-Mb(4TAG)的 SDS-PAGE 电泳图,B 是 imiTyrCuBMb 的 SDS-PAGE 电泳图;

[0060] 图 5 是 imiTyr-Mb(4TAG)的质谱图;

[0061] 图 6 是 imiTyrCuBMb 的质谱图;

[0062] 图 7 是 Mb 的紫外-可见光谱图:A 是野生型 Mb 的紫外-可见光谱图,B 是 imiTyrCuBMb 的紫外-可见光谱图;

[0063] 图 8 是 imiTyrCuBMb 中滴定加入 Cu^{2+} 的紫外-可见光谱图;

[0064] 图 9 是:A 是 Mb 及其突变体消耗 O_2 产生水和 ROS 的能力,B 是 imiTyrCuBMb 和 F33YCuBMb 循环消耗 O_2 的能力。

具体实施方式

[0065] 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。

[0066] 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。

[0067] 实施例 1:imiTyr 的化学合成(图 1,图 2)

[0068] 在 50ml 三颈瓶中加入咪唑(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),Boc-L-3-iodotyrosine(中文名 Boc-L-3-碘代酪氨酸)(2.03g,5mmol,购自上海吉尔生化公司)和 8ml 无水 DMF(购自北京百灵威公司)。在氮气保护的条件下,搅拌并回流 18 小时。冷却后,用乙酸乙酯和蒸馏水进行萃取,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):

δ 11.20 (s, 1H), 9.32 (s, 1H), 8.46 (s, 2H), 7.99 (s, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.33 (d, 1H), 7.2 (d, 1H), 3.53 (dd, 1H), 3.19 (m, 2H)。

[0069] 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,均为分析纯以上级别。

[0070] 实施例 2:进化 imiTyr 特异性氨酰基-tRNA 合成酶

[0071] 为了在基因中位点特异性插入 imiTyr,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:5) 对。*MjTyrRS* 突变库构建在卡那霉素抗性 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)。

[0072] 通过正负筛选来进化特异性识别 imiTyr 的氨酰基-tRNA 合成酶。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 T7RNA 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 (GMML 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 GMML 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 GMML 培养基中加入 500ml 3% 琼脂粉, 1mM imiTyr, 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。

[0073] 最后一轮正筛选挑 384 个克隆, 分别点板在含有 1mM imiTyr、氯霉素 60, 80, 100, 120mg/L 的 GMML 固体培养基上, 及不包含 imiTyr、但包含氯霉素 0, 20, 40, 60mg/L 的 GMML 固体培养基。挑选在在 1mM imiTyr 120mg/L 氯霉素的培养基上生长, 而在 0mM imiTyr 40mg/L 氯霉素培养基中不生长的克隆进行进一步验证。挑出 9 个克隆, 其中克隆 1 的 3-咪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 (imiTyrRS) 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:2 所示, 其中突变位点为 Tyr32Glu, Leu65Ser, His67Gly, Asp158Tyr 和 Leu162Asn。

[0074] 实施例 3:表达 imiTyr- 肌红蛋白及质谱鉴定

[0075] 将正交 tRNA (SEQ ID NO:1) 和筛选出来的 imiTyrRS (SEQ ID NO:2) 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) (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:4) 的 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 imiTyr (购自上海吉尔生化公司), 及 0.2% 阿拉伯糖 (购自 sigma 公司) 培养细胞, 对照不加入 imiTyr。6-8 小时之后, 收菌, Ni-NTA 纯化蛋白, 并用 SDS-PAGE 电泳分析 (图 4A)。

[0076] 我们发现, 只有在存在 imiTyr 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 imiTyrRS 可以特异性的识别 imiTyr。在 LB 培养基中 imiTyr- 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 imiTyr 仅仅插入到肌红蛋白的 4 位琥珀突变位点, 我们对 imiTyr- 肌红蛋白进行了 ESI-TOF 质谱检测, 检测结果分子量为 18497Da (图 5), 与计算的分子量 18496Da 吻合。

[0077] 实施例 4:表达 imiTyr- 肌红蛋白突变体作为 HCO 功能模型

[0078] 为了使肌红蛋白可以模拟 HCO 的功能, 经过活性中心结构的对比, 我们用基因工程方法构建了肌红蛋白双突变体 (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 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 位定点特异插入 imiTyr, 表达产生 imiTyrCuBmb 突变蛋白 (氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示), 并用 SDS-PAGE 电泳和 ESI-TOF 质谱进行验证 (图 4B, 图 6)。

[0079] 为了验证 Mb 突变后有没有对蛋白自身构象产生影响, 我们测量了 imiTyrCuBmb 在 pH 7.4 条件下的紫外-可见光谱 (图 7), 发现其与野生型 Mb 相似, 在 408nm 处具有强吸收峰 Soret 带。当用过量的连二亚硫酸钠 (俗称保险粉) 将三价铁-imiTyrCuBmb 还原成脱氧-imiTyrCuBmb 后, 测量它的紫外-可见光谱, 发现其在 430nm 和 562nm 处分别具有 Soret 带和可见吸收带, 这与脱氧-wtMb 也是完全一致的。以上结果表明突变体 imiTyrCuBmb 中引入非天然氨基酸后没有引起蛋白的构象变化。

[0080] 由于蛋白突变并引入非天然氨基酸后, 其 29 位组氨酸, 33 位 3-咪唑基酪氨酸和远端的 64 位组氨酸可共同形成铜离子结合位点。我们在 pH 7.4 条件下往 imiTyrCuBmb 中滴定加入不同浓度的 Cu^{2+} , 测定紫外-可见光谱 (图 8)。结果表明, Soret 带随着 Cu^{2+} 浓度的变化不断降低, 并最终稳定, 这意味着 imiTyrCuBmb 中成功地引入了一个铜离子结合位点, 根据双倒数图和 Hill 图对测量结果进行分析表明, 其 K_D 值为 1.6 μ M。

[0081] 由于 HCO 的功能主要是催化 O_2 形成水而不释放活性氧 (ROS), 因此我们用氧电极 (Oxygraph Clark-type oxygen electrode, Hansatech Instruments) 在 25°C, pH 7.4 的 20mM Tris 缓冲液中测量了 imiTyrCuBmb (6 μ M) 催化 O_2 还原的能力, 用 1000 当量的维生素 C (6mM) 作为还原剂, 100 当量的 TMPD (N,N,N',N'-四甲基对苯二胺二盐酸盐, 0.6mM, 购自北京百灵威公司) 作为电子传递中间体。同时, 为了验证 imiTyrCuBmb 是否能催化 O_2 形成活性氧 (ROS), 我们选用过氧化氢酶 (catalase, 7.3U/ μ L, 购自 sigma 公司) 和超氧化物歧化酶 (SOD, 0.5U/ μ L, 购自 sigma 公司) 来分别监测 H_2O_2 和过氧化物的形成。如果 O_2 的消耗是由于形成了 ROS 而非形成水, 那么随着过氧化氢酶和 SOD 的加入, O_2 还原率会逐渐减慢, 因为这两种酶可以将 H_2O_2 和过氧化物分解, 重新形成 O_2 。测量结果如图 9A 所示: 1、无论是

否加入 Cu^{2+} ($6 \mu\text{M}$ CuSO_4), 野生型 Mb 都可消耗大部分 O_2 并形成 ROS ;2、在等量 Cu^{2+} 存在的条件下, imiTyrCuBMb 可催化 O_2 形成水, 仅产生低于 6% 的 H_2O_2 ;3、若不加入 Cu^{2+} , imiTyrCuBMb 会将 30% 的 O_2 转化成 ROS。该结果表明, Cu_b 在催化过程中起着重要的作用。

[0082] 除了 Cu_b , 我们推测 Tyr-His 共价交联也具有重要的作用。为了证实这一推论, 我们构建了突变体 Leu29His/Phe33Tyr/Phe43His (F33YCuBMb), 其中, 29 位, 43 位和 64 位 His 可以形成一个铜离子结合位点, 而 33Tyr 和 43His 在 Mb 上的位点及结构与 imiTyrCuBMb 中 33 位 imiTyr 的咪唑基团及酚基团类似, 只是没有形成共价交联。相比 imiTyrCuBMb, F33YCuB-Mb 将 50% 的 O_2 转化成了 ROS (图 9A), 证实了 Tyr-His 共价交联在选择催化 O_2 形成水的过程中也有着至关重要的作用。

[0083] 为了测试 imiTyrCuBMb 在循环条件下催化还原 O_2 的能力, 我们加入 $6 \mu\text{M}$ imiTyrCuBMb, $6 \mu\text{M}$ CuSO_4 , $800 \mu\text{M}$ O_2 , 0.6mM TMPD 和 6mM 维生素 C, 用氧电极监测 O_2 的消耗情况。当 O_2 消耗完全, 随后接着加入 $800 \mu\text{M}$ O_2 , 继续用氧电极监测。如此重复 1000 个循环后, 发现 O_2 的消耗速率几乎没有减弱, 表明 imiTyrCuBMb 的催化功能丝毫没有衰退。相比之下, F33YCuBMb 在相同条件下只能进行 400 个循环 (图 9B)。该结果进一步证实了 Tyr-His 共价交联在选择催化 O_2 形成水过程中的重要作用。

[0084] 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]

序列表

IB120071序列表

<110> 中国科学院生物物理所

<120> 3-咪唑基酪氨酸翻译系统及其应用

<130> IB120071

<160> 7

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 77

<212> DNA

<213> 正交tRNA

<400> 1

tggtcggeg ggccggattt gaaccagegc catgaggatt tagagtccgc cgttctgccc 60

tgctgaacta ccgccgg 77

<210> 2

<211> 282

<212> PRT

<213> 正交氨基-tRNA合成酶 (imiTyrRS)

<400> 2

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

[0002]

IB120071序列表

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

<210> 3

<211> 921

<212> DNA

<213> 正交氨酰基-tRNA合成酶 (imiTyrRS) 的核苷酸序列

<400> 3

atggacgaat ttgaaatgat aaagagaaac acatctgaaa ttatcagega ggaagagtta 60
 agagaggttt taataaaaga tgaaaaatct gctgagatag gttttgaacc aagtggtaaa 120
 atacatttag ggcattatct ccaataaaa aagatgattg atttcaaaa tgcctgattt 180
 gataaatta tatctttggc tgatttaggt gcctatttaa accagaaagg agagttggat 240
 gagattagaa aaataggaga ttatacaaaa aaagttttg aagcaatggg gttaaaggca 300
 aaatatgttt atggaagtga attccagctt gataaggatt atactgaa tgtctataga 360
 ttggetttaa aaactacctt aaaaagagca agaaggagta tggaacttat agcaagagag 420
 gatgaaaatc caaaggttgc tgaagttatc tatccaataa tgcaggttaa tacgattcat 480
 tataatggcg ttgatgttgc agttggaggg atggagcaga gaaaaataca catgttagca 540

[0003]

IB120071序列表

aggagcttt taccaaaaaa gttgtttgt attcacaacc ctgtcttaac gggtttgat 600
ggagaaggaa agatgagttc ttcaaaaggg aattttatag ctgttgatga ctctccagaa 660
gagattaggg ctaagataaa gaaagcatac tgcccagctg gagttgttga aggaaatcca 720
ataatggaga tagctaaata ctcccttgaa tatectttaa ccataaaaag gccagaaaaa 780
tttggaggag atttgacagt taatagctat gaggagttag agagtttatt taaaaataag 840
gaattgcatc caatggattt aaaaaatgct gtagctgaag aacttataaa gatttttagag 900
ccaattagaa agagattata a 921

<210> 4

<211> 492

<212> DNA

<213> 野生型肌红蛋白 (Mb)

<400> 4

atggttctgt ctgaaggatga atggcagctg gttctgcatg tttgggctaa agttgaagct 60
gacgtcgtg gtcattggtca ggacatcttg attcgactgt tcaaatctca tccgaaact 120
ctggaataat tcgacgcttt caaacatctg aaaactgaag ctgaaatgaa agcttctgaa 180
gatctgaaaa aacatgggtg taccgtgta actgcctag gtgctatect taagaaaaa 240
gggcatcatg aagctgagct caaacctgct gcacaatcgc atgctactaa acataagatc 300
ccgatcaaat acctggaatt catctctgaa gggatcatcc atgttctgca ttctagacat 360
ccaggtgact tcggtgctga cgctcagggt gctatgaaca aagctctega getgttccgt 420
aaagatatcg ctgctaagta caaagaactg ggttaccagg gtggctcggg acatcatcac 480
catcaccatt ga 492

<210> 5

<211> 312

<212> PRT

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

<400> 5

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

[0004]

IB120071序列表

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 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> 6
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> 含有3-咪唑基酪氨酸的肌红蛋白突变体 (imiTyrCuBmb),
 其中*表示引入的3-咪唑基酪氨酸, 第1位的甲硫氨酸 (M)
 为在大肠杆菌中表达引入的起始氨基酸

<400> 6

[0005]

IB120071序列表

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 His His His
 145 150 155 160

His His His

<210> 7

<211> 492

<212> DNA

<213> 含有3-咪唑基酪氨酸的肌红蛋白突变体 (imiTyrCuBmb) 的核苷酸序列

<400> 7

atggttctgt ctgaaggatga atggcagctg gttctgcatg tttgggctaa agttgaagct 60
 gaegtgcctg gtcattggtea ggacatccac attegactgt agaaatctca tccggaaaact 120
 ctgaaaaaat tcgatcgttt caaacatctg aaaactgaag ctgaaatgaa agcttctgaa 180
 gatctgaaaa aacatgggtg taccgtgtta actgccttag gtgctatcct taagaaaaaa 240
 gggcatcatg aagctgagct caaacctgct gcacaatcgc atgctactaa acataagatc 300
 ccgatcaaat acctggaatt catctctgaa gcgatcatcc atgttctgca ttctagacat 360
 ccaggtgact tcggtgctga cgctcagggt gctatgaaca aagctctcga gctgttccgt 420
 aaagatatcg ctgctaagta caaagaactg ggttaccagg gtggctcggg acatcatcac 480
 catcaccatt ga 492

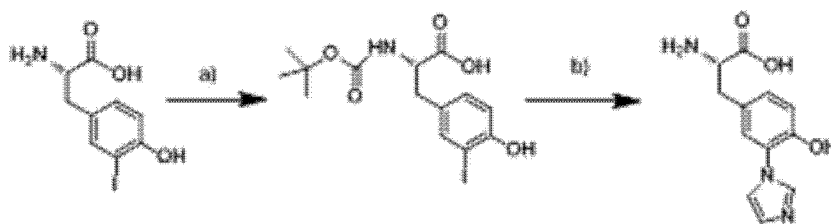


图 1

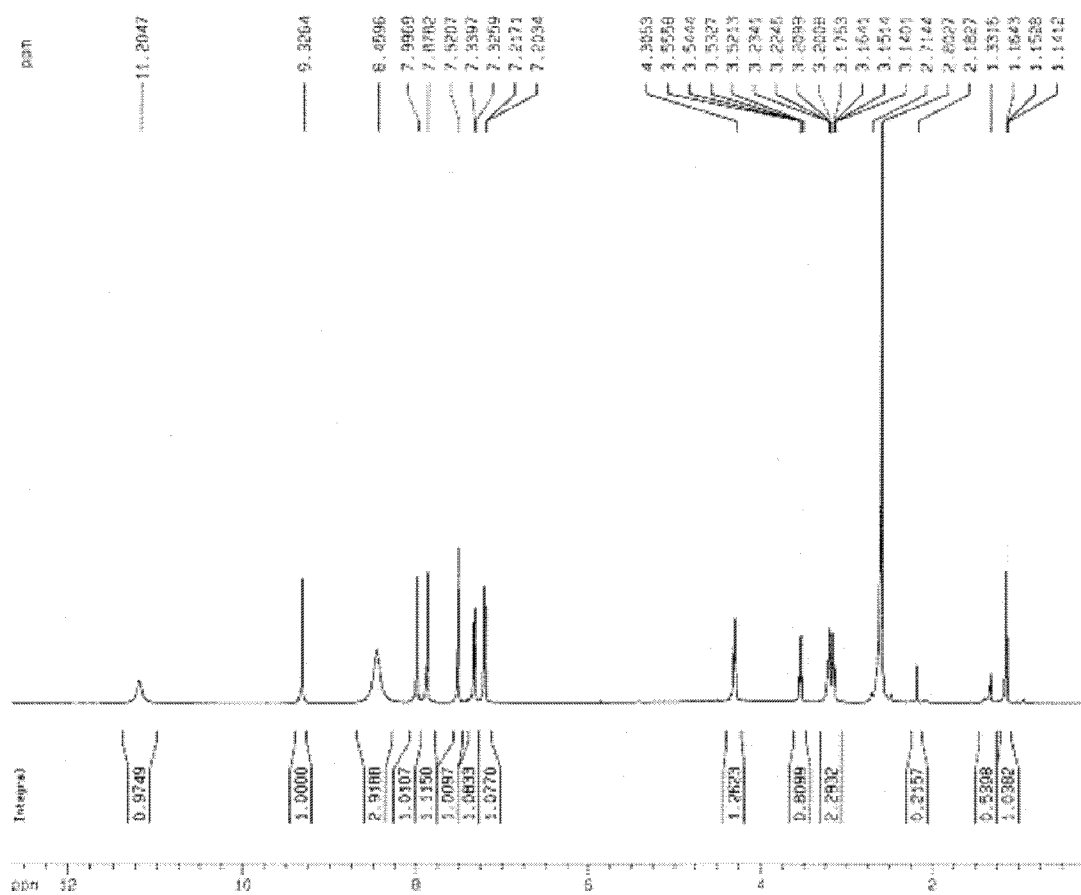


图 2

名称	核苷酸/氨基酸序列
正交 tRNA	SEQ ID NO: 1 tggtccggcggccgattgaaccagcgcgatcggatttagatccgccgtctgcctgctgaactaccgccg
正交氨酰基-tRNA 合成酶 (imiTyrRS)	氨基酸序列 (SEQ ID NO: 2): KKDEKSAEIGFEPGKIHLGHYLQIKKMIDLQNAAGFDIIISLADLGAYLNQKGELDEIRKIGDY NKKVFEAMGLKAKYVYGSEFQLDKDYTLNVYRLALKTTLKRARRSMELIAREDENPKVAE VIYPIMQVNTIHYNGVDVAVGGMEQRKIHMLARELLPKKVVCIHNPVLTGLDGEGKMSSSK GNFIAVDDSPPEIRAKIKKAYCPAGVVEGNPIMEIAKYFLEYPLTIKRPEKFGGDLTVNSYEEL ESLFKNKELHPMDLKNVAEELIKILEPIRKRL
	核苷酸序列 (SEQ ID NO: 3): ATGGACGAATTTGAAATGATAAAGAGAAACACATCTGAAATTATCAGCGAGgaaGAGTTAa GAGAGGTTTTAAAAAAGATGAAAAATCTGCTGAGATAGGTTTTGAACCAAGTGGTAAA ATACATTTAGGGCATTATCTCCAAATAAAAAAGATGATGATTTACAAAATGCTGGATTTGA TATAATTATATCTTTGGCTGATTTAGGTGCTTAAACCAGAAAGGAGATTGGATGAG ATTAGAAAAATAGGAGATTATAACAAAAAGTTTTTGAAGCAATGGGGTTAAAGGCAAAA TATGTTTATGGAAGTGAATTCCAGCTTGATAAGGATTACACTGAAATGCTATAGATTGGC TTAAAAACTACCTTAAAAAGAGCAAGAAGGAGTATGGAACCTATAGCAAGAGAGGATG AAAATCCAAAAGTTGCTGAAGTTATCTATCC.AATAATGCAGGTTAATACGATTCATTATAa GGCGTTGATGTTGCAGTTGGAGGGATGGAGCAGAAAAATACACATGTTAGCAAGGGA GCTTTTACCAAAAAGGTTGTTTGTATTCCAAACCTGTCTTAACGGGTTTTGGATGGAGA AGGAAAGATGAGTTCTTAAAAAGGGAATTTTATAGCTGTTGATGACTCTCCAGAAGAGAT TAGGGCTAAGATAAAGAAAGCATACTGCCAGCTGGAGTTGTTGAAGGAAATCCAATAAT GGAGATAGCTAAATACTTCTTGAATATCCTTTAACATAAAAAAGGCCAGAAAAATTTGGT GGAGATTGACAGTTAATAGCTATGAGGAGTTAGAGAGTTTATTTAAAAATAAGGAATTGC ATCCAATGgATTTAAAAAATGCTGTAGCTGAAGAACTTATAAAGATTTTAGAGCCAATTAG AAAGAGATTATAA
野生型肌红蛋白 (Mb) 的核苷酸序列	SEQ ID NO: 4 atggttctgtcgaaggtgaatggcagctggttctgcatgttgggctaagttgaagctgacgtcgtgctgcatggtcaggacatctgattcgact gtcaaatctcatccgaaactctggaaaaattcgatgttcaaacatctgaaactgaaactgaaatgaaagctctgaagatctgaaaaacatg gtgtaccgtgttaactgccctaggtgctatccttaagaaaaaggcatcatgaagctgagctcaaacctgtgcaaatcgatgctactaaaca taagatccgatcaaataccctggaattcatctgaagcagatcctcatgttctgactctagacatccaggtgacttcgggtgctgacgctcagggtg ctatgaacaaagctctcagctgttccgtaaaagatcgtctgatacaaaagaactgggttaccagggtgctcgggacatcatcaccatcacc attga
野生型酪氨酰 tRNA 合成酶 (MjTyrRS), 来源于詹氏甲烷球菌	SEQ ID NO: 5 MDEFEMIKRNTSEIIEEELREVLKKDEKSAAYIGFEPGKIHLGHYLQIKKMIDLQNAAGFDIIIL LADLHAYLNQKGELDEIRKIGDYNNKKVFEAMGLKAKYVYGSEFQLDKDYTLNVYRLALKT TLKRARRSMELIAREDENPKVAEVIYPIMQVNDIHYLGVDVAVGGMEQRKIHMLARELLPK KVVCIHNPVLTGLDGEGKMSSSKGNFIAVDDSPPEIRAKIKKAYCPAGVVEGNPIMEIAKYFL EYPLTIKRPEKFGGDLTVNSYEELSLFKNK ELHPMDLKNVAEELIKILEPIRKRL LHHHHHH
含有 3-咪唑基酪氨酸的肌红蛋白突变体 (imiTyrCuBMb)	氨基酸序列 (SEQ ID NO: 6), 其中*表示引入的 3-咪唑基酪氨酸, 第 1 位的甲硫氨酸 (M) 为在大肠杆菌中表达引入的起始氨基酸: MVLSEGEWQLVHLVWAKVEADVAGHGQDIHRL*KSHPETLEKDFRKHKLKTEAEMKASE DLKKHGVTVLALGAILKKKGHHEAELKPLAQSHATKHKIPKYLEFISEAIIHVLHSRHPGDF GADAQGANAKALELFRKDIAAKYKELGYQGGSGHHHHHH
	核苷酸序列 (SEQ ID NO: 7): atggttctgtcgaaggtgaatggcagctggttctgcatgttgggctaagttgaagctgacgtcgtgctgcatggtcaggacatccattcgact gtgaaatctcatccgaaactctggaaaaattcgatgttcaaacatctgaaactgaaactgaaatgaaagctctgaagatctgaaaaacat gggttaccgtgttaactgccctaggtgctatccttaagaaaaaggcatcatgaagctgagctcaaacctgtgcaaatcgatgctactaaac ataagatccgatcaaatcctggaattcatctgaagcagatcctcatgttctgactctagacatccaggtgacttcgggtgctgacgctcagggt gctatgaacaaagctctcagctgttccgtaaaagatcgtctgatacaaaagaactgggttaccagggtgctcgggacatcatcaccatcac cattga

图 3

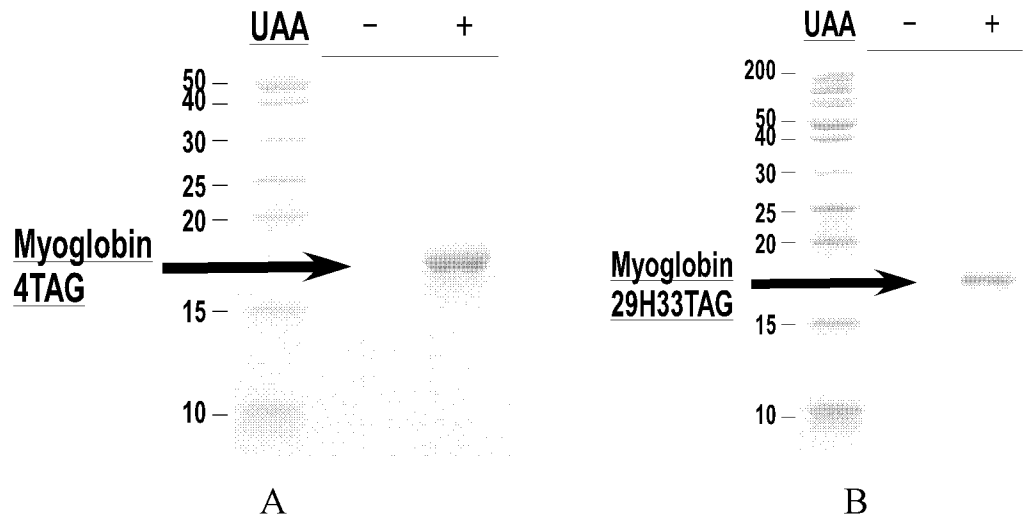


图 4

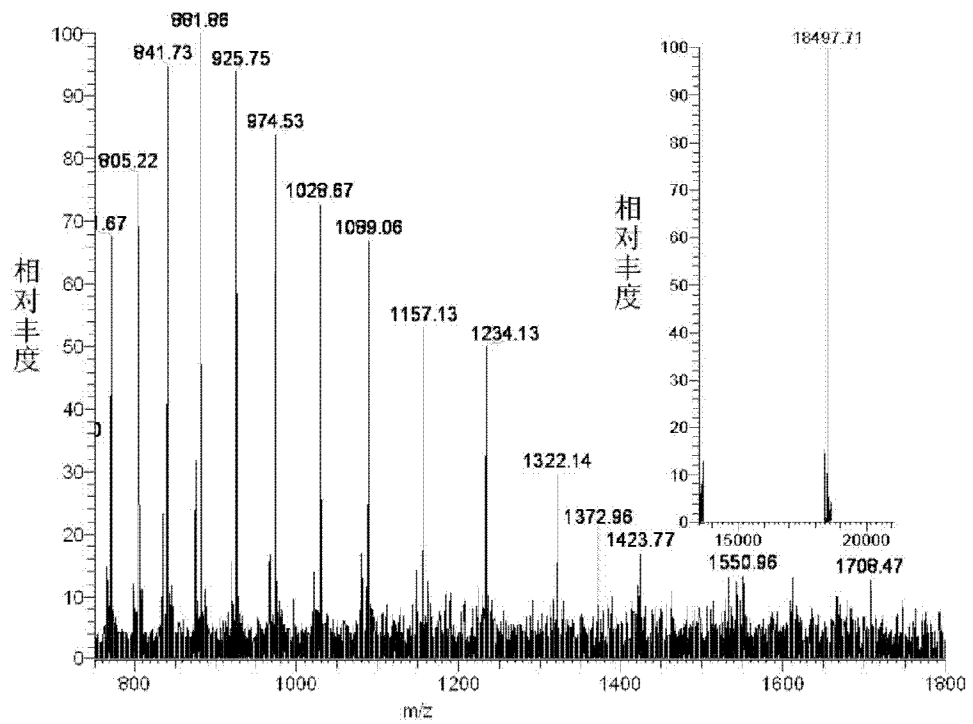


图 5

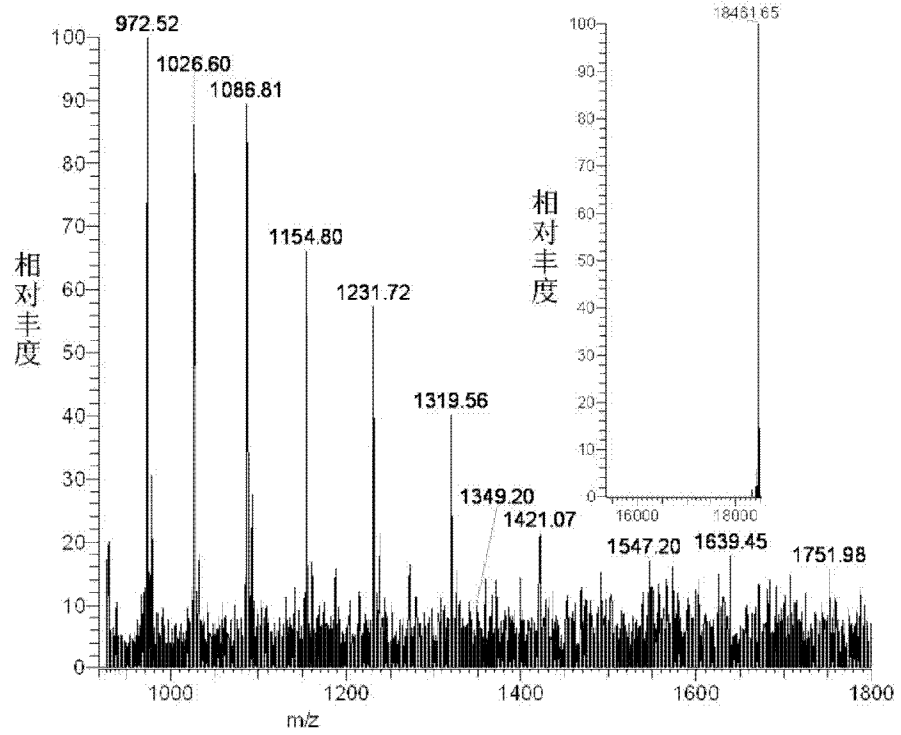


图 6

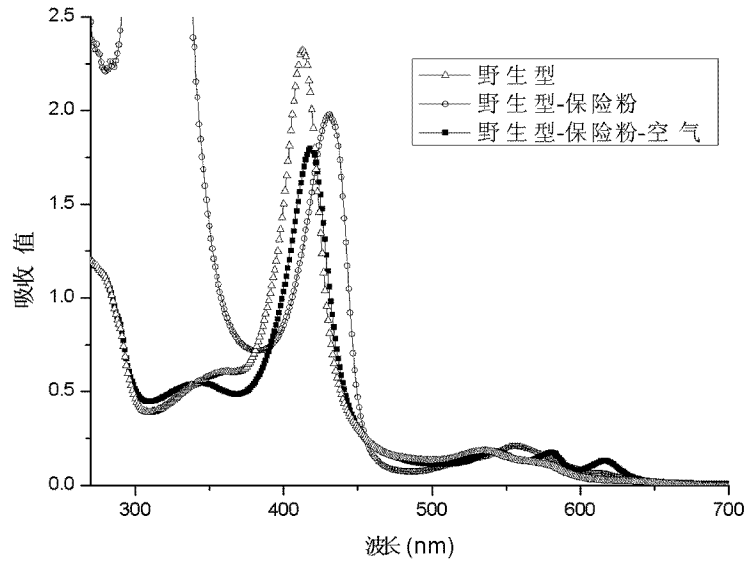


图 7A

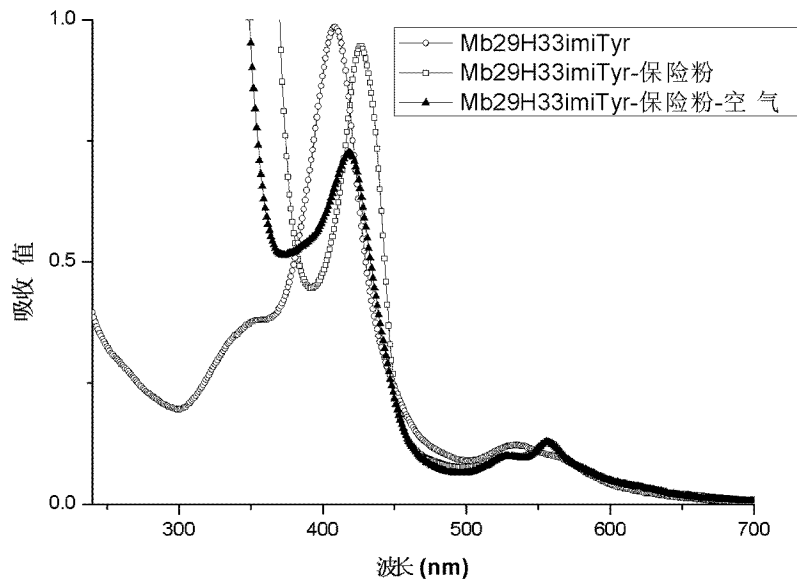


图 7B

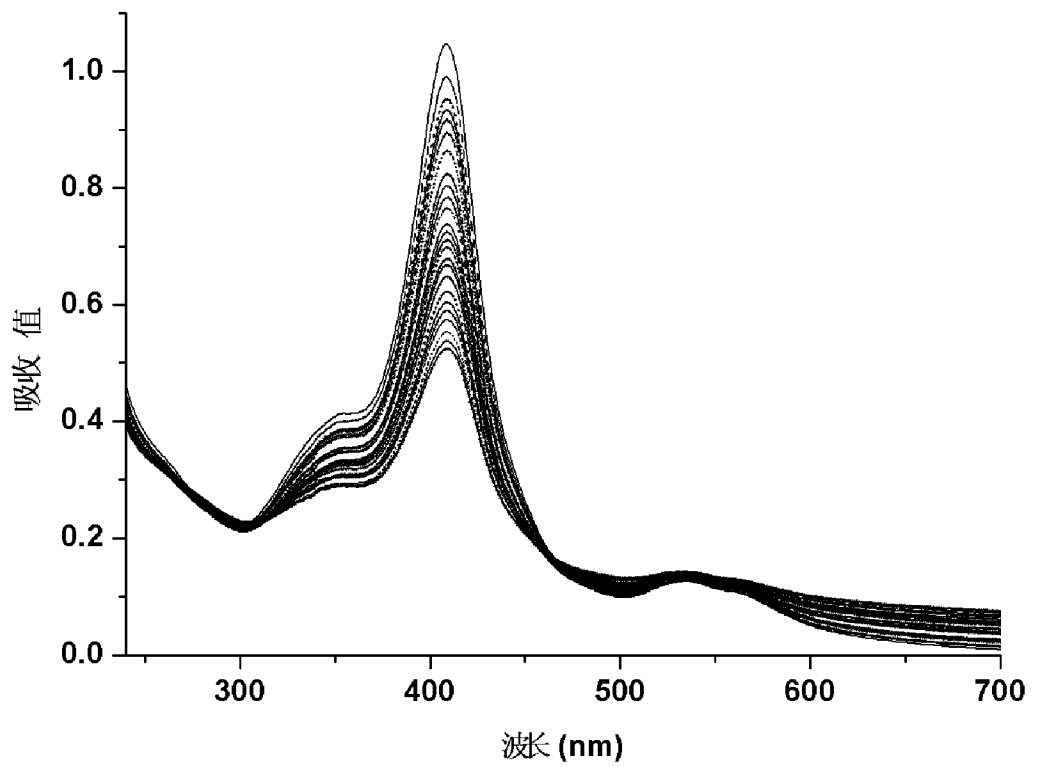


图 8

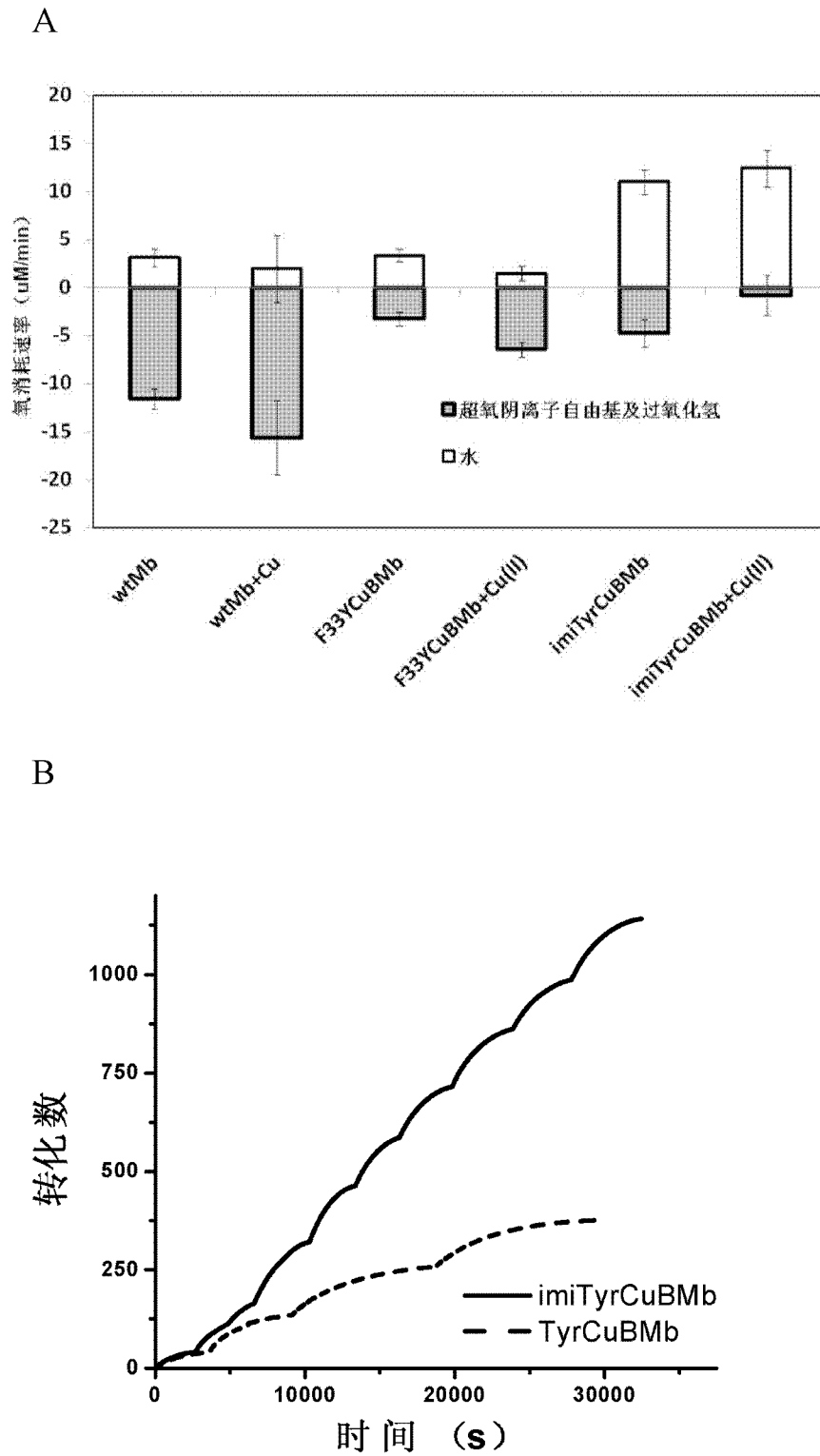


图 9