

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105420203 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 23

(21) 申请号 201410444233. 0

(22) 申请日 2014. 09. 03

(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 姜丽 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 9/00(2006. 01)

C12N 1/21(2006. 01)

C12P 21/00(2006. 01)

G07K 14/415(2006. 01)

权利要求书2页 说明书12页
序列表9页 附图9页

(54) 发明名称

酪氨酸类似物翻译系统和基因编码的蛋白质
光致电子转移荧光传感器蛋白家族

(57) 摘要

本发明涉及蛋白质光致电子转移荧光传感器蛋白家族 iLovU, 其包括五种突变体蛋白, 其分别通过在野生型黄素蛋白 iLov 486 位氨基酸位点特异性插入 3- 氯代酪氨酸、3, 5- 二氯代酪氨酸、3, 5- 二氟代酪氨酸、2, 3, 5- 三氟代酪氨酸或 2, 3, 5, 6- 四氟代酪氨酸 (这五种酪氨酸类似物作为光致电子转移探针) 而得到。本发明还涉及两种氨酰基 -tRNA 合成酶突变体, 其含有的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO :11 或 13 所示。这两种氨酰基 -tRNA 合成酶突变体能够分别在翻译的氨基酸序列中插入 3, 5- 二氯代酪氨酸或 2, 3, 5, 6- 四氟代酪氨酸。

1. SEQ ID NO:11 所示的正交氨酰基-tRNA 合成酶, 其用 3,5-二氯代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 3,5-二氯代酪氨酸。

2. 一种表达包含至少一个 3,5-二氯代酪氨酸的突变蛋白的 3,5-二氯代酪氨酸翻译系统, 所述系统包含:

(i) 3,5-二氯代酪氨酸;

(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:9 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 3,5-二氯代酪氨酸优先氨酰化所述正交 tRNA; 和

(iv) 编码目标蛋白的核酸, 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. SEQ ID NO:13 所示的正交氨酰基-tRNA 合成酶, 其用 2,3,5,6-四氟代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 2,3,5,6-四氟代酪氨酸。

4. 一种表达包含至少一个 2,3,5,6-四氟代酪氨酸的突变蛋白的 2,3,5,6-四氟代酪氨酸翻译系统, 所述系统包含:

(i) 2,3,5,6-四氟代酪氨酸;

(ii) 权利要求 3 所述的正交氨酰基-tRNA 合成酶;

(iii) 正交 tRNA, 其包含 SEQ ID NO:9 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 2,3,5,6-四氟代酪氨酸优先氨酰化所述正交 tRNA; 和

(iv) 编码目标蛋白的核酸, 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。

5. 如权利要求 2 或 4 所述的翻译系统, 其特征在于, 所述正交 tRNA 是琥珀抑制型 tRNA, 所述选择密码子是琥珀密码子。

6. 如权利要求 2 或 4 所述的翻译系统, 其中所述翻译系统还包含编码正交氨酰基-tRNA 合成酶的核苷酸序列。

7. 一种宿主细胞, 其包含编码权利要求 1 或 3 所述的正交氨酰基-tRNA 合成酶的核苷酸序列和相对应的正交 tRNA 序列, 其中所述宿主细胞是真细菌细胞, 优选大肠杆菌细胞。

8. 一种产生在至少一个所选位置定点特异插入 3,5-二氯代酪氨酸的突变蛋白的方法, 所述方法包括下述步骤:

(a) 提供权利要求 2 所述的 3,5-二氯代酪氨酸翻译系统, 该系统包含:

(i) 3,5-二氯代酪氨酸;

(ii) 权利要求 1 所述的正交氨酰基-tRNA 合成酶;

(iii) 正交 tRNA, 其为 SEQ ID NO:9 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 3,5-二氯代酪氨酸优先氨酰化所述正交 tRNA; 和

(iv) 编码所述目标蛋白的核酸, 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的核酸转化到权利要求 7 所述的宿主细胞中, 在所述蛋白的翻译期间, 3,5-二氯代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 3,5-二氯代酪氨酸定点特异插入所述目标蛋白的所述所选位置, 从而产生在所选位置含 3,5-二氯代酪氨酸的所述目标蛋白。

9. 一种产生在至少一个所选位置定点特异插入 2,3,5,6- 四氟代酪氨酸的突变蛋白的方法,所述方法包括下述步骤:

(a) 提供权利要求 4 所述的 2,3,5,6- 四氟代酪氨酸翻译系统,该系统包含:

(i) 2,3,5,6- 四氟代酪氨酸;

(ii) 权利要求 3 所述的正交氨酰基 -tRNA 合成酶;

(iii) 正交 tRNA,其为 SEQ ID NO:9 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 2,3,5,6- 四氟代酪氨酸优先氨酰化所述正交 tRNA;和

(iv) 编码所述目标蛋白的核酸,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的核酸转化到权利要求 7 所述的宿主细胞中,在所述蛋白的翻译期间,2,3,5,6- 四氟代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 2,3,5,6- 四氟代酪氨酸定点特异插入所述目标蛋白的所述所选位置,从而产生在所选位置含 2,3,5,6- 四氟代酪氨酸的所述目标蛋白。

10. 蛋白质光致电子转移荧光传感器蛋白家族 iLovU,其包括五种突变体蛋白,所述突变体蛋白分别通过在野生型黄素蛋白 iLov 486 位氨基酸位点特异性插入 3- 氯代酪氨酸、3,5- 二氯代酪氨酸、3,5- 二氟代酪氨酸、2,3,5- 三氟代酪氨酸或 2,3,5,6- 四氟代酪氨酸而得到,其中在野生型黄素蛋白 iLov 486 位氨基酸位点特异性插入 3,5- 二氟代酪氨酸得到的突变体蛋白通过权利要求 8 的方法制备,在野生型黄素蛋白 iLov 486 位氨基酸位点特异性插入 2,3,5,6- 四氟代酪氨酸的突变体蛋白通过权利要求 9 的方法制备。

酪氨酸类似物翻译系统和基因编码的蛋白质光致电子转移 荧光传感器蛋白家族

技术领域

[0001] 本发明属于生物化学领域。具体地,本发明提供两种酪氨酸类似物翻译系统和基因编码的蛋白质光致电子转移荧光传感器蛋白家族 iLovU。更具体地,本发明通过基因编码的方法在黄素蛋白 iLov 中定点特异性插入五种酪氨酸类似物:3-氯代酪氨酸(C1Y)、3,5-二氯代酪氨酸(C12Y)、3,5-二氟代酪氨酸(F2Y)、2,3,5-三氟代酪氨酸(F3Y)、2,3,5,6-四氟代酪氨酸(F4Y)(该五种酪氨酸类似物简称为C1nY/FnY)作为光致电子转移探针,得到的突变蛋白即为光致电子转移荧光传感器。本发明还涉及两种氨酰基-tRNA合成酶突变体,其氨基酸序列分别如SEQ ID NO:11和13所示。这种氨酰基-tRNA合成酶突变体能够用3,5-二氯代酪氨酸/2,3,5,6-四氟代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3,5-二氯代酪氨酸/2,3,5,6-四氟代酪氨酸。

背景技术

[0002] 基因编码和荧光蛋白(fluorescent protein,简称FP)传感器是生物学研究中的重要技术手段。在过去的几十年中,人们已经开发出多种荧光蛋白传感器,用于监测金属离子,pH值,第二信使和翻译后修饰(PTM),这对于解开它们在体内信号转导网络中的作用是至关重要的。这些荧光蛋白传感器通常依赖于荧光共振能量转移(FRET)或者绿色荧光蛋白GFP荧光团酚基的质子化/去质子化来发挥作用。尽管它们现在已被广泛应用,但是在分析物结合前后,这些荧光蛋白传感器的荧光强度变化通常都在两倍以内。相比之下,光致电子转移(photo-induced electron transfer,简称PET)机制开始越来越广泛地被引用到荧光传感器设计中来,最重要的原因在于分析物结合前后,荧光蛋白传感器可以展现出显著的荧光强度变化(通常可以增强10至100倍)。

[0003] 蛋白质光致电子转移荧光传感器蛋白的设计通常使用荧光发光体-连接体-接受体的分子结构形式。在配体结合之前,传感器处于关闭状态,光激发致使受体和荧光基团之间产生电子转移,削弱光能,最终导致荧光淬灭。而当配体结合之后,传感器转变为开启状态,受体分子由于配体的结合可以显著增加HOMO能量,阻断光致电子转移,从而使荧光基团发射光子,产生荧光。基于这种原理,科学家在光致电子转移荧光传感器的设计中通常选择一些相对简单的分析物来进行传感器的开启,如 H^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pd^{2+} , Hg^{2+} ,F和神经元电压等。这些传感器现已广泛应用于临床,细胞生物学研究以及环境监测中。

[0004] 为了开发基因编码的蛋白质光致电子转移传感器蛋白,我们首先需要在蛋白中遗传整合非天然氨基酸(UAAs)。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的通用方法。这些方法依赖于正交蛋白翻译组分,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] 本发明提供基因编码的蛋白质光致电子转移荧光传感器蛋白。通过基因编码的方法在黄素蛋白 iLov 中定点特异性插入五种酪氨酸类似物:3-氯代酪氨酸(C1Y)、3,5-二氯代酪氨酸(C12Y)、3,5-二氟代酪氨酸(F2Y)、2,3,5-三氟代酪氨酸(F3Y)、2,3,5,6-四氟代酪氨酸(F4Y)(该五种酪氨酸类似物简称为 ClnY/FnY)作为光致电子转移探针,得到的突变蛋白即为蛋白质光致电子转移荧光传感器蛋白。

[0007] 本发明还提供两种氨酰基-tRNA 合成酶突变体,其氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 11 和 13 所示。这种氨酰基-tRNA 合成酶突变体能够用 3,5-二氯代酪氨酸/2,3,5,6-四氟代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 3,5-二氯代酪氨酸/2,3,5,6-四氟代酪氨酸。这是本发明人首次发现的。

[0008] 因此,本发明的目的在于利用正交 tRNA、正交氨酰基-tRNA 合成酶的配对将五种酪氨酸类似物定点特异插入 iLov 蛋白中,得到蛋白质光致电子转移荧光传感器蛋白。

[0009] 蛋白质光致电子转移传感器设计的重点主要是在合适的荧光蛋白上定点特异性插入环境敏感型光致电子转移探针。首先,我们选择遗传编码五种酪氨酸类似物:3-氯代酪氨酸(C1Y)、3,5-二氯代酪氨酸(C12Y)、3,5-二氟代酪氨酸(F2Y)、2,3,5-三氟代酪氨酸(F3Y)、2,3,5,6-四氟代酪氨酸(F4Y)(该五种酪氨酸类似物简称为 ClnY/FnY)作为光致电子转移探针,具体原因如下:第一、已有实验证明,酪氨酸阴离子和发光体之间的光致电子转移速率比电中性酪氨酸快百倍。而酪氨酸的 pKa 为 10.2,该值与生理条件的 pH 值相差较大,因此我们设想,在生理条件下可以用酚基团被取代的酪氨酸类似物来作为最理想的环境敏感型光致电子转移探针。第二、静电场可以严重影响酪氨酸残基的 pKa 值,因此,带电基团的结合或者神经信号触发的外部静电场变化都能显著干扰非天然氨基酸受体的 pKa,最终导致荧光强度的剧烈变化。利用这种特性,我们可以设计出受电荷分析物(例如,ATP、第二信使、核酸)或者活细胞质膜电场调控的蛋白质传感器。第三、酪氨酸的翻译后修饰,如磷酸化,硫酸化和糖基化对于信号转导是至关重要的,而酪氨酸或者酪氨酸类似物酚侧链上氧原子的化学修饰可以显著调节它的光致电子转移供体特性,因此我们可以进一步设计酪氨酸磷酸化,硫酸化或者糖基化的荧光传感器。这些传感器将是测量酪氨酸激酶,酪氨酸磷酸酶,硫酸酯酶和糖基化酶活性的重要工具。

[0010] 除了光致电子转移探针,我们还需要选择一种合适的荧光蛋白,其激发态荧光基团可以有效地接受非天然氨基酸 ClnY/FnY 传递的电子。目前研究中常用的荧光蛋白共有四种,分别是:依赖红外荧光蛋白 1.4(IF 1.4) 的胆绿素;依赖 UnaG 的胆红素;包含 4-(对-羟基苯亚甲基)-5-咪唑啉酮(HBI) 发光基团的绿色荧光蛋白(GFP) 以及依赖黄素的 iLov。之前我们已经证实了绿色荧光蛋白 GFP 在其激发状态时是一个很好的电子供体,但是,203 位酪氨酸残基与 HBI 之间的电子传递仅能产生荧光红移,并不能导致荧光淬灭,证明了当 ClnY/FnY 作为电子供体时,光激发的 HBI 并不能作为一个很好的电子受体。同样的,在胆绿素和胆红素中,至少有一个酪氨酸残基与 IF 1.4 和 UnaG 之间存在范德华力,说明光激发的胆绿素和胆红素也不能成为很好的电子受体。相比之下,以前曾有研究证明,一个距离黄素 4.5 Å 的酪氨酸残基可以有效地淬灭黄素荧光。值得注意的是,在荧光黄素蛋白 iLov 中,距离黄素辅因子 7 Å 的距离范围内并没有酪氨酸或者色氨酸侧链。因此,我们选择在 iLov 的特定位点上遗传编码 ClnY/FNY 来构建蛋白质光致电子转移传感器。

[0011] 当光致电子转移传感器的探针和蛋白载体都确定好之后,我们需要进行蛋白质传感器的基因编码。本发明中选用的五种光致电子转移探针:3-氯代酪氨酸、3,5-二氯代酪氨酸、3,5-二氟代酪氨酸、2,3,5-三氟代酪氨酸和 2,3,5,6-四氟代酪氨酸,其中 3-氯代酪氨酸和 3,5-二氟代酪氨酸已有成熟的翻译系统和基因编码方法(参见本申请人的专利申请:申请号 201110205760.2,发明名称“3-氯代酪氨酸翻译系统及其应用”和申请号 201310056306.4,发明名称“3,5-二氟代酪氨酸翻译系统及其应用”),而 2,3,5-三氟代酪氨酸的遗传编码也曾被报道。但是,3,5-二氯代酪氨酸和 2,3,5,6-四氟代酪氨酸的正交氨酰基-tRNA 合成酶是本发明人经过筛选首次获得的,其氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:11 和 13 所示。并且,本发明人利用所述正交氨酰基-tRNA 合成酶,参照专利:3-氯代酪氨酸翻译系统及其应用和 3,5-二氟代酪氨酸翻译系统及其应用,以类似的方法研发了 3,5-二氯代酪氨酸/2,3,5,6-四氟代酪氨酸翻译系统。

[0012] 本发明提供利用本发明的 3,5-二氯代酪氨酸/2,3,5,6-四氟代酪氨酸翻译系统以及先前开发的非天然氨基酸翻译系统产生的含有五种酪氨酸类似物的 iLov 蛋白突变体,所述 iLov 蛋白突变体的氨基酸序列为 SEQ ID NO:3,在野生型 iLov 蛋白的 486 位分别引入五种酪氨酸类似物,所述 iLov 蛋白突变体可以作为良好的蛋白质光致电子转移荧光传感器。

[0013] 总的来说,本发明提供下述技术方案:

[0014] 1. SEQ ID NO:11 所示的正交氨酰基-tRNA 合成酶,其用 3,5-二氯代酪氨酸优先氨酰化与之配对的正义 tRNA,从而在翻译的氨基酸序列中插入 3,5-二氯代酪氨酸。

[0015] 2. 一种表达包含至少一个 3,5-二氯代酪氨酸的突变蛋白的 3,5-二氯代酪氨酸翻译系统,所述系统包含:

[0016] (i) 3,5-二氯代酪氨酸;

[0017] (ii) 第 1 项所述的正交氨酰基-tRNA 合成酶;

[0018] (iii) 正义 tRNA,其包含 SEQ ID NO:9 所示的多核苷酸序列;其中所述正义氨酰基-tRNA 合成酶用所述 3,5-二氯代酪氨酸优先氨酰化所述正义 tRNA;和

[0019] (iv) 编码目标蛋白的核酸,其中所述核酸含有所述正义 tRNA 特异性识别的至少一个选择密码子。

[0020] 3. SEQ ID NO:13所示的正交氨酰基-tRNA合成酶,其用2,3,5,6-四氟代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2,3,5,6-四氟代酪氨酸。

[0021] 4. 一种表达包含至少一个2,3,5,6-四氟代酪氨酸的突变蛋白的2,3,5,6-四氟代酪氨酸翻译系统,所述系统包含:

[0022] (i) 2,3,5,6-四氟代酪氨酸;

[0023] (ii) 第3项所述的正交氨酰基-tRNA合成酶;

[0024] (iii) 正交tRNA,其包含SEQ ID NO:9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2,3,5,6-四氟代酪氨酸优先氨酰化所述正交tRNA;和

[0025] (iv) 编码目标蛋白的核酸,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。

[0026] 5. 第2或4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,所述选择密码子是琥珀密码子。

[0027] 6. 第2或4项所述的翻译系统,其中所述翻译系统还包含编码正交氨酰基-tRNA合成酶的核苷酸序列。

[0028] 7. 一种宿主细胞,其包含编码第1或3项所述的正交氨酰基-tRNA合成酶的核苷酸序列和相对应的正交tRNA序列,其中所述宿主细胞是真细菌细胞,优选大肠杆菌细胞。

[0029] 8. 一种产生在至少一个所选位置定点特异插入3,5-二氯代酪氨酸的突变蛋白的方法,所述方法包括下述步骤:

[0030] (a) 提供第2项所述的3,5-二氯代酪氨酸翻译系统,该系统包含:

[0031] (i) 3,5-二氯代酪氨酸;

[0032] (ii) 第1项所述的正交氨酰基-tRNA合成酶;

[0033] (iii) 正交tRNA,其为SEQ ID NO:9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3,5-二氯代酪氨酸优先氨酰化所述正交tRNA;和

[0034] (iv) 编码所述目标蛋白的核酸,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

[0035] (b) 将编码所述目标蛋白的核酸转化到第7项所述的宿主细胞中,在所述蛋白的翻译期间,3,5-二氯代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3,5-二氯代酪氨酸定点特异插入所述目标蛋白的所述所选位置,从而产生在所选位置含3,5-二氯代酪氨酸的所述目标蛋白。

[0036] 9. 一种产生在至少一个所选位置定点特异插入2,3,5,6-四氟代酪氨酸的突变蛋白的方法,所述方法包括下述步骤:

[0037] (a) 提供第4项所述的2,3,5,6-四氟代酪氨酸翻译系统,该系统包含:

[0038] (i) 2,3,5,6-四氟代酪氨酸;

[0039] (ii) 第3项所述的正交氨酰基-tRNA合成酶;

[0040] (iii) 正交tRNA,其为SEQ ID NO:9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2,3,5,6-四氟代酪氨酸优先氨酰化所述正交tRNA;和

[0041] (iv) 编码所述目标蛋白的核酸,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

[0042] (b) 将编码所述目标蛋白的核酸转化到第7项所述的宿主细胞中,在所述蛋白的

翻译期间,2,3,5,6- 四氟代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 2,3,5,6- 四氟代酪氨酸定点特异插入所述目标蛋白的所述所选位置,从而产生在所选位置含 2,3,5,6- 四氟代酪氨酸的所述目标蛋白。

[0043] 10. 蛋白质光致电子转移荧光传感器蛋白家族 iLovU,其包括五种突变体蛋白,所述突变体蛋白分别通过在野生型黄素蛋白 iLov 486 位氨基酸位点特异性插入 3- 氯代酪氨酸、3,5- 二氯代酪氨酸、3,5- 二氟代酪氨酸、2,3,5- 三氟代酪氨酸或 2,3,5,6- 四氟代酪氨酸而得到,其中在野生型黄素蛋白 iLov 486 位氨基酸位点特异性插入 3,5- 二氟代酪氨酸得到的突变体蛋白通过第 8 项的方法制备,在野生型黄素蛋白 iLov 486 位氨基酸位点特异性插入 2,3,5,6- 四氟代酪氨酸的突变体蛋白通过第 9 项的方法制备。

[0044] 11. 根据权利要求 2 或 4 所述的翻译系统,其中所述正交 tRNA 如 SEQ ID NO :9 所示。

[0045] 12. 根据权利要求 8 或 9 所述的方法,其中所述正交 tRNA 如 SEQ ID NO :9 所示。

[0046] 本领域技术人员应该理解,在具体的实施方案中,依据所用的宿主,用于表达的核苷酸序列可以相应地进行密码子优化,从而提高其表达效率。重组表达载体的构建、转化或转染等均可通过常规分子克隆技术实现。

[0047] 本发明的有益技术效果:

[0048] 目前,开发基因编码的光致电子转移传感器可以显著扩大现有传感器的技术范围,主要原因如下:1、可以通过荧光活化细胞分选 (FACS) 以及其他高通量细胞分选方法进行受体位点微调和快速筛选,这样就能够依据不同的目标物设计出具有最适亲和力的光致电子转移传感器;2、蛋白具有较大的配体结合表面,利用这种特性可以开发适用于复杂大分子的光致电子转移传感器;3、通过细胞特异性启动子或细胞器靶向肽的基因融合,基因编码光致电子转移传感器能够针对性地应用于特定器官,细胞和细胞器;4、蛋白可以在活细胞内直接翻译,因此将不再需要传统传感器所必须的定位和洗涤步骤。

[0049] 为了实现上述目标,本发明遗传整合了五种酪氨酸类似物作为环境敏感型光致电子转移探针(图 1、图 2),分别为:3- 氯代酪氨酸 (C1Y)、3,5- 二氯代酪氨酸 (C12Y)、3,5- 二氟代酪氨酸 (F2Y)、2,3,5- 三氟代酪氨酸 (F3Y)、2,3,5,6- 四氟代酪氨酸 (F4Y)(该五种酪氨酸类似物简称为 C1nY/FnY)。本发明人将以上五种酪氨酸类似物定点特异性插入到改良型荧光蛋白 iLov(拟南芥向光素 2 中荧光特异优化域,Lov 代表光,氧和电压域)中。本发明中选用的上述五种非天然氨基酸 FnY 和 C1nY 分别具有不同的 pKa 值,其范围为 5.6-8.3(图 1),该范围显著低于酪氨酸的 pKa 值 10.2。因此,在生理条件下(pH 为 4.5-8),我们遗传编码的非天然氨基酸可以去质子化,而其他天然酪氨酸残基则不受影响。实验结果发现,在阴离子状态下,非天然氨基酸的酚基团将电子传递给黄素(FMN*)的速率是电中性非天然氨基酸或天然酪氨酸的上百倍,而当 pH 值降低到这些非天然氨基酸 pKa 值以下时,会导致荧光强度增强 20 倍以上。相较于以前报告中的荧光蛋白 pH 传感器,我们开发的传感器在酸化时具有更强的荧光增强能力,范围更广的 pKa 值,并能够匹配多种细胞器,例如溶酶体(pH 约为 4.8),次级内体(pH 约为 5.0),初级内体(pH 约为 6.0)以及线粒体(pH 约为 8.0)。更重要的是,我们开发的 iLovU 传感器展现出高效的酸控特性,使其非常适用于研究细胞内吞作用。运用这些传感器,我们可以在酸性介质中或巨噬细胞吞噬后监测大肠杆菌的细胞质酸化动力学。

[0050] 非天然氨基酸的基因密码子扩展技术还可以显著提高我们通过单分子电子转移探测蛋白构象动力学的的能力。先前已有报道通过酪氨酸和黄素之间的光致电子转移来探测黄素蛋白构象变化,而酪氨酸本身并不是一个很好的电子供体,除此之外,光致电子转移的发生还需要酪氨酸和黄素之间的距离小于 4.5 \AA 。相比之下,本申请开发的传感器中,3,5-二氯代酪氨酸和黄素之间可以产生高效的光致电子转移并导致荧光淬灭,而它们的距离却高达 9.6 \AA 。另外,当 ClnY/FnY 作为电子转移反应中的单电子氧化还原辅因子时,这种非天然氨基酸的遗传编码技术还可以为具有氧化还原活性的金属酶的设计提供解决思路。

附图说明

[0051] 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:

[0052] 图 1 是 3-氯代酪氨酸 (ClY)、3,5-二氯代酪氨酸 (Cl2Y)、3,5-二氟代酪氨酸 (F2Y)、2,3,5-三氟代酪氨酸 (F3Y) 和 2,3,5,6-四氟代酪氨酸 (F4Y) 的结构式和 pKa 值;

[0053] 图 2 是蛋白质光致电子转移荧光传感器的设计原理图;

[0054] 图 3 是蛋白质光致电子转移荧光传感器,正交 tRNA,氨酰基-tRNA 合成酶, iLov 蛋白系列突变体序列;

[0055] 图 4 是 Cl2Y-iLov(486TAG) 蛋白的 SDS-PAGE 电泳图;

[0056] 图 5 是 F4Y-iLov(486TAG) 蛋白的 SDS-PAGE 电泳图;

[0057] 图 6 是质谱图,图 6A 是 Cl2Y-iLov(486TAG) 蛋白的质谱图,图 6B 是 F4Y-iLov(486TAG) 蛋白的质谱图;

[0058] 图 7 是晶体结构图,图 7A 是 3,5-二氯代酪氨酸氨酰基-tRNA 合成酶高分辨率晶体结构图,图 7B 是 3,5-二氯代酪氨酸氨酰基-tRNA 合成酶和野生型酪氨酸氨酰基-tRNA 合成酶的活性位点叠加图;

[0059] 图 8 是紫外吸收光谱图,图 8A 是 iLov 蛋白在不同 pH 条件下的紫外吸收光谱图,图 8B 是 iLovU2 蛋白(即 iLov-486-Cl2Y)在不同 pH 条件下的紫外吸收光谱图;

[0060] 图 9 是 iLov 和 iLovU2 蛋白的发射光谱图,从横坐标向上依次为 iLovU2pH = 9(a), iLovU2pH = 5(b) 和 iLov pH = 5(c);

[0061] 图 10 是 iLovU2 蛋白的晶体结构图;

[0062] 图 11 是 iLovU 系列突变体的荧光强度曲线图;

[0063] 图 12A 是 iLovU2 蛋白在 pH = 5 条件下的荧光衰减图谱,图 12B 是 iLovU2 蛋白在 pH = 9 条件下的荧光衰减图谱,图 12C 是 iLovU2 蛋白在 pH 为 5 和 9 条件下的荧光衰减时间,图 12D 是 Cl2Y-iLov 蛋白的荧光衰减曲线,图 12E 是 Y-iLov 蛋白的荧光衰减曲线,图 12F 是 $\log k_{ET}$ 对距离的图表;

[0064] 图 13A 是过度表达 iLovU3(iLov-486Cl2Y388R) 的大肠杆菌 BL21(DE3) 细胞的荧光成像,图 13B 是过度表达 iLovU3 的大肠杆菌 MG1655 菌株的荧光强度;

[0065] 图 14 是大肠杆菌细胞吞噬作用的荧光成像,图 14A 是表达 iLov 的大肠杆菌细胞吞噬作用的荧光成像,图 14B 是表达 iLovU3 的大肠杆菌细胞吞噬作用的荧光成像。

[0066] 序列表说明

[0067]

- SEQ ID NO: 1 野生型黄素蛋白 iLov 的核苷酸序列
- SEQ ID NO: 2 野生型黄素蛋白 iLov 的氨基酸序列
- SEQ ID NO: 3 iLovU 传感器家族的氨基酸序列, 其中 X 表示引入的五种非天然氨基酸 3-氯代酪氨酸 (ClY)、3,5-二氯代酪氨酸 (Cl₂Y)、3,5-二氟代酪氨酸 (F₂Y)、2,3,5-三氟代酪氨酸 (F₃Y) 或者 2,3,5,6-四氟代酪氨酸 (F₄Y)
- SEQ ID NO: 4 iLovU 传感器家族的核苷酸序列
- SEQ ID NO: 5 iLovU2 的氨基酸序列, 其中 X 表示引入的 3,5-二氯代酪氨酸 (Cl₂Y)
- SEQ ID NO: 6 iLovU2 的核苷酸序列
- SEQ ID NO: 7 iLovU3 的氨基酸序列, 其中 X 表示引入的 3,5-二氯代酪氨酸 (Cl₂Y)
- SEQ ID NO: 8 iLovU3 的核苷酸序列
- SEQ ID NO: 9 正交 tRNA
- SEQ ID NO: 10 野生型酪氨酰 tRNA 合成酶 (MjTyrRS), 来源于詹氏甲烷球菌
- SEQ ID NO: 11 正交氨酰基-tRNA 合成酶 (Cl₂Y RS) 的氨基酸序列
- SEQ ID NO: 12 正交氨酰基-tRNA 合成酶 (Cl₂Y RS) 的核苷酸序列

[0068]

- SEQ ID NO: 13 正交氨酰基-tRNA 合成酶 (F₄Y RS) 的氨基酸序列
- SEQ ID NO: 14 正交氨酰基-tRNA 合成酶 (F₄Y RS) 的核苷酸序列

具体实施方式

[0069] 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。

[0070] 实施例 1: 进化 3,5-二氯代酪氨酸 / 2,3,5,6-四氟代酪氨酸特异性氨酰基-tRNA 合成酶

[0071] 为了在基因中位点特异性插入 3,5-二氯代酪氨酸 / 2,3,5,6-四氟代酪氨酸 (简称 Cl₂Y/F₄Y), 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: 10) 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)。

[0072] 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 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 (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, 1mM C12Y/F4Y, 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 DN10B 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 0.5mM C12Y/F4Y、氯霉素 60, 80, 100, 120mg/L 的 GMMML 固体培养基上, 及不包含 C12Y/F4Y、但包含氯霉素 0, 20, 40, 60mg/L 的 GMMML 固体培养基。挑选在 0.5mM C12Y/F4Y 100mg/L 氯霉素的培养基上生长, 而在 0mM C12Y/F4Y 20mg/L 氯霉素培养基中不生长的克隆进行进一步验证。挑选得到 2 个克隆, 其中克隆 1 插入 3,5-二氯代酪氨酸 C12Y 效率最高, 我们将其命名为 C12YRS; 克隆 2 插入 2,3,5,6-四氟代酪氨酸 F4Y 效率最高, 我们将其命名为 F4YRS。测序表明, 克隆 1 所包含的氨酰基-tRNA 合成酶突变体 (C12YRS) 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:11 所示, 其中突变位点为 Y32L, L65I, H70G, F108I, Q109L, Y114G, D158S, L162M; 克隆 2 所包含的氨酰基-tRNA 合成酶突变体 (F4YRS) 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:13 所示, 其中突变位点为 Y32A, L65H, H70G, F108T, Q109R, D158G, L162H。

[0074] 实施例 2: 表达 C12Y/F4Y-iLov 蛋白及质谱鉴定

[0075] 将正交 tRNA (SEQ ID NO:9) 和筛选出来的 C12YRS 或 F4YRS (SEQ ID NO:11 或 13) 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 pET-iLov (486TAG) 表达质粒 (该质粒购自美国 Scripps 研究所 Peter

G. Schultz 实验室) (其中 iLov 的核苷酸序列为 SEQ ID NO :2) 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 1.1 时, 向 LB 培养基中加入 1mM C12Y 或 F4Y, 1mM IPTG 及 0.2% 阿拉伯糖 (购自 Sigma 公司) 培养细胞, 对照不加入 C12Y 或 F4Y。6-8 小时之后, 收菌, Ni-NTA 纯化蛋白, 并用 SDS-PAGE 电泳分析 (图 4, 图 5)。

[0076] 我们发现, 只有在存在 C12Y 或 F4Y 的培养基中才能纯化出全长的 iLov 蛋白, 这说明筛选出来的 C12YRS 可以特异性的识别 C12Y, F4YRS 可以特异性的识别 F4Y。在 LB 培养基中 C12Y/F4Y-iLov 蛋白的产率为 15-21mg/L, 而野生型 iLov 蛋白的产率为 30mg/L。为了检测 C12Y/F4Y 仅仅插入到 iLov 蛋白的 486 位琥珀突变位点, 我们对 C12Y/F4Y-iLov 蛋白进行了 ESI-MS 质谱检测, 检测结果分子量分别为 13947Da 和 13952 (图 6), 均与计算分子量吻合。

[0077] 实施例 3 :3,5-二氯代酪氨酸氨酰基-tRNA 合成酶高分辨率晶体结构的解析

[0078] 为了进一步了解 3,5-二氯代酪氨酸氨酰基-tRNA 合成酶 C12YRS 选择性识别 C12Y 的结构基础, 我们解析了 C12YRS 结合 C12Y 的高分辨率晶体结构。如图 7 所示, 32 位酪氨酸突变为亮氨酸, 65 位亮氨酸突变为异亮氨酸, 108 位苯丙氨酸突变为异亮氨酸, 109 位谷氨酰胺突变为亮氨酸, 162 位亮氨酸突变为甲硫氨酸。这五个残基共同形成一个新的疏水口袋, 以稳定二氯苯酚侧链。有趣的是, 114 位酪氨酸和 70 位组氨酸均突变为甘氨酸, 它们在活性位点中创造出更大的空间来容纳 C12Y 残基。相比于野生型 TyrRS 结构, C12Y 围绕 $C\alpha$ 原子旋转了 10 度, 但是多肽骨架结构变化不大。重要的是, 158 位天冬氨酸突变为丝氨酸, 从而与 C12Y 形成一个氢键。由于 C12Y 酚基团的 pKa 为 6.4, C12Y 很可能是以阴离子状态存在, 因此在野生型 TyrRS 中, 阴离子状态的 C12Y 无法与带负电荷的 158 位天冬氨酸结合 (图 7B)。

[0079] 实施例 4 :基因编码的蛋白质光致电子转移传感器 iLovU 的特征

[0080] 我们用基因工程方法构建了蛋白质光致电子转移传感器 iLov-486-C12Y (核苷酸序列如 SEQ ID NO :6 所示), 其中 486 位突变为 TAG 终止密码子, 然后用实施例 3 中的相同方法在 iLov 的突变位点特异插入 3,5-二氯代酪氨酸 (C12Y), 表达产生突变蛋白 iLov-486-C12Y (氨基酸序列如 SEQ ID NO :5 所示, 简称为 iLovU2)。

[0081] iLov 和 iLovU2 蛋白的紫外光谱均展现出了黄素蛋白的特性 (图 8), 它们的最大吸收波长分别为 365nm, 450nm 和 475nm。当 pH 从 9.0 降至 5.0 后, iLov 和 iLovU2 蛋白在可见光区域的紫外光谱以及 iLov 蛋白的荧光强度均没有发生显著变化, 而 iLovU2 蛋白的荧光强度却增加了 20 倍 (图 9)。

[0082] 为了研究 iLovU2 的荧光猝灭机制, 我们解析了 iLovU2 在 pH 分别为 6.5, 7.0, 7.5 和 9.0 条件下的晶体结构 (图 10)。通过分析 iLov 蛋白的晶体结构, 我们认为在 486 位插入非天然氨基酸 C12Y 不会影响 iLov 蛋白的整体结构。此外, iLovU2 在 pH 为 6.5 和 9.0 条件下的晶体结构几乎是重叠的, 这表明 pH 下降引起的传感器开关并不是蛋白构象改变的结果。

[0083] 接下来, 我们通过监测电中性酚基团转变为阴离子酚基团时的红移 (275nm-305nm) 来检测 C12Y 的 pKa 值。将测量结果代入 Hi11 方程, 计算出 C12Y 的 pKa 值为 6.3。值得注意的是, 虽然 iLov 和 iLovU2 的紫外光谱图在可见光区几乎是相同的, 但是当 pH 从 4 升高到 9 时, 在 iLovU2 紫外光谱图的 305nm 位置出现了一个新的峰 (图 8), 而

iLov 蛋白的紫外光谱图却没有这个新的峰,因此我们认为该峰是 486 位的 C12Y 产生的。我们将这个数据代入 Hi11 方程,计算出 486 位 C12Y 的 pKa 值也为 6.3。根据图 11 结果计算可知,iLovU2 荧光蛋白的 pKa 值同样为 6.3。iLovU2 和 486 位 C12Y 具有相同的 pKa 值,说明 iLovU2 的荧光通过 486 位 C12Y 的质子化状态进行调控的。而 486 位 C12Y 距离黄素荧光基团较远,无法通过范德华力来干扰黄素的荧光特性。另外,C12Y 的吸收光谱与 iLov 的发射光谱没有重叠,因此也可以排除荧光能量共振转移导致荧光淬灭的可能。

[0084] 由于 pH 传感器只能用于精确测量接近其 pKa 值的 pH 值,我们进一步设计了具有不同 pKa 值的荧光蛋白突变体,用于匹配多种细胞器,例如溶酶体 (pH 约为 4.8),次级内体 (pH 约为 5.0),初级内体 (pH 约为 6.0) 以及线粒体 (pH 约为 8.0)。往 iLov 荧光蛋白的 486 位点插入不同的非天然氨基酸,可以改变 iLovU 传感器的 pKa 值,获得的传感器 pKa 范围为 5.3 至 9.2(图 11)。接着,我们测试了 486 位非天然氨基酸临近位点的突变能否调控 iLovU 传感器的荧光特性? 结果如图 11 所示,往 388 位引入一个带正电荷的精氨酸残基可以使 iLovU2 传感器的 pKa 值从 6.3 降低至 5.9,往 388 和 393 位同时引入两个正电荷的精氨酸残基可以使 iLovU2 传感器的 pKa 值进一步降低至 5.7。同样地,往另一传感器 iLov-486F4Y 中引入 388 位精氨酸可以使 pKa 值从 6.1 降低至 5.3。先前已有研究表明,带电荷的氨基酸产生的本地静电场可以显著扰乱酪氨酸残基的 pKa。本实验中,由于引入 388 和 393 位精氨酸能够稳定带负电荷的 486 位非天然氨基酸,而阴离子非天然氨基酸是一种有效的光致电子转移猝灭剂,因此 388 和 393 位精氨酸突变体可以显著降低 iLovU 荧光传感器的 pKa 值。

[0085] 为了进一步验证 iLovU 荧光传感器的光致电子转移特性,我们通过酪氨酰自由基捕获方法检测 C12Y 自由基来证明 iLovU2 传感器中的 C12Y 和黄素之间是否产生了光致电子转移。我们发现,在 pH 9 的缓冲液中加入 2mM 半胱氨酸,100mM 5,5'-二甲基-1-吡咯啉-N-氧化物 (DMP0) 和 10 μ M iLovU2 蛋白,然后用 405nm 激光笔进行光照射,最后通过液相色谱-质谱联用仪来检测到大量 DMP0-cys 加成化合物 ($M+H^+ = 234$ Da)。相比之下,当在相同的条件下对 10 μ M iLov 蛋白进行光照射后,没有检测到任何 DMP0-cys 加成化合物生成。这些结果表明,在光照射下,产生的 C12Y 自由基可以和半胱氨酸快速反应,得到含硫自由基,该含硫自由基又可以和 DMP0 相互反应,最终形成 DMP0-cys 加成化合物。综上所述,所有的研究结果足以表明,iLovU2 的荧光猝灭是由 C12Y 阴离子和黄素之间的光致电子转移导致的。

[0086] 我们接着通过荧光寿命的方法来分析 C12Y 和黄素间光致电子转移的 pH 和距离依赖性。iLovU2 在 pH 5 和 9 时呈单指数荧光衰减,而当 pH 从 5 上升至 9 时,iLovU2 的荧光寿命从 5.0ns 急剧下降至 0.2ns(图 12,表 1),通过计算可以得到其光致电子转移速率 k_{ET} 为 $4.8 \times 10^9 s^{-1}$ 。我们同时还测量了 iLov-486Tyr 突变体中 486 位酪氨酸和黄素之间的光致电子转移速率,并且发现该速率较 iLovU2 降低了上百倍,仅为 $3.5 \times 10^7 s^{-1}$ 。该结果与以前的报道相吻合,当酪氨酸和黄素之间的距离足够近时,可以通过光致电子转移淬灭荧光黄素。我们还发现,iLov-393C12Y,iLov-391C12Y 和 iLov-488C12Y 的电子传递速率均低于 iLovU2,分别为 3.8×10^8 , $1.1 \times 10^8 s^{-1}$ 和 $0.58 \times 10^8 s^{-1}$ 。从 iLovU2 的晶体结构图中可以得知,486 位 C12Y 和黄素荧光基团之间的距离为 7.7 Å,而 393 位,391 位和 488 位 C12Y 和黄素荧光基团之间的距离可以通过测量突变前相应位点和黄素荧光基团之间的距离来分别进行估算。分析结果可知,即使 C12Y 和黄素荧光基团间的距离高达 9.6 Å,它们仍可以发生

光致电子转移。总的来说,这些结果表明,C12Y 和黄素荧光基团间仅需不到 1 纳秒的时间,就可以发生光致电子转移,并且,电子转移速率随着 C12Y 和黄素荧光基团间距离的增加而呈指数下降(图 12,表 1)。

[0087] 表 1. iLov 系列突变体的荧光寿命值及电子传递速率 k_{ET} 值。

[0088]

iLOV Mutants	τ_{fs} (ns)	distance (Å)	k_{ET} (s^{-1})
WT	5.0		
486C12Y	0.2	7.7	4.8×10^8
393C12Y	1.7	8.4	3.8×10^8
391C12Y	3.3	9.0	1.1×10^8
488C12Y	4.0	9.6	5.8×10^7
489Y	0.9	3.5	3.2×10^8
485Y	3.9	5.2	6.4×10^7
486Y	4.4	7.7	3.5×10^7

[0089] 实施例 5 :光致电子转移传感器 iLovU 的应用

[0090] 细菌,尤其是肠致病性大肠杆菌,主要依靠耐酸性系统在酸性环境中生存。为了预防和治疗肠道致病细菌感染,发展一种酸控荧光传感器来研究细菌的耐酸性机制就变得尤其重要。目前已有一些小分子 pH 传感器,但是这些指示剂在细胞中的定位能力很差。此前也曾报道过一些 pH 敏感型荧光蛋白传感器,但是它们仅具有有限的动态范围。为了更好地研究细菌的耐酸性和内吞作用机制,研发具有较强荧光增强能力和光漂白抗性的酸控荧光蛋白传感器是非常可取的。

[0091] 我们用基因工程方法构建了荧光传感器 iLov-486C12Y388R(核苷酸序列如 SEQ ID NO :8 所示),即将 iLovU2 的 388 位突变为精氨酸,表达产生突变蛋白 iLov-486C12Y388R(氨基酸序列如 SEQ ID NO :7 所示,简称为 iLovU3),其 pKa 值为 5.9。

[0092] 我们之所以选择 iLovU3 进行体内 pH 传感实验,主要因为其 pKa 值低于 iLovU2,因此在中性 pH 条件下具有更少的背景荧光。在 pH 分别为 7 和 5 的条件下,我们将过度表达 iLovU3 的大肠杆菌 BL21 (DE3) 细胞经过 488nm 荧光激发,在共聚焦荧光显微镜的 FITC 通道下进行荧光成像。结果如图 13 所示,当 pH 为 7 时,细胞仅展示出很弱的荧光,而当 pH 降低至 5 时,细胞荧光强度开始持续增强,并在 5 分钟后达到最大。这些结果表明,当大肠杆菌缺乏耐酸性 (AR) 系统时,即使在弱酸性条件下,细胞质 pH 也会迅速下降。

[0093] 接着,我们使用耐酸性大肠杆菌 MG1655 菌株进行进一步研究。我们将浓度为 1×10^9 cells/ml,过度表达 iLovU3 的 MG1655 菌株分别加入 pH 为 7,5 或者 2.5 的缓冲液中,同时加入谷氨酰胺和 6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸 (DLN),孵育 90 分钟,并以未加入谷氨酰胺和 DLN 的细胞作为对照。孵育结束后,使用多功能酶标仪在 450nm 激发,495nm 发射的条件下检测细胞荧光强度。我们发现,当 pH 为从 7 降至 5 后,细胞荧光强度大约增强了 50% (图 13),而当 pH 进一步下降至 2.5 后,细胞荧光强度增强了 5.5 倍。结果表明,在极酸条件下,抗性菌株即使长时间孵育,其细胞质仍然可以酸化。最近,有研究表明谷氨酰胺在细菌耐酸性机制中发挥着重要作用。当胞质 pH 降低到 6 以下时,谷氨酰胺酶 YbaS 被激活以水解谷氨酰胺生成谷氨酸和氨。在酸性条件下,氨被质子化形成铵,从而降低质子浓度,帮助细胞产生抗酸性。如图 13 所示,当细胞中加入 5mM 谷氨酰胺后,细胞荧光强度显著降低,表明谷氨酰胺确实可以帮助耐酸性大肠杆菌菌株在酸性环境中实现胞质 pH 平衡。谷氨酰胺类似物 6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸 (DLN) 为谷氨酰胺酶抑制剂,当细胞中加入 5mM DLN

后,细胞荧光强度又开始增强,说明谷氨酰胺虽然可以在酸性条件下防止胞质酸化来保护细菌,DLN 却能够抵制谷氨酰胺的这种保护作用。本实验结果还说明我们研发的酸控 iLovU 传感器可以直接用于细胞荧光成像,不再需要传统传感器所必须的定位、连接和洗涤步骤,因此有利于新酶或者细菌耐酸性通道的发现,以及耐酸性通道小分子抑制剂的筛选。

[0094] 最后,我们通过 iLovU3 跟踪观察巨噬细胞吞噬细菌的过程。首先从雌性小鼠中制备出新鲜的巨噬细胞,然后将过量表达 iLov 或者 iLovU3 的 BL21 (DE3) 大肠杆菌与巨噬细胞混合,37 度孵育 90 分钟。接下来,我们用荧光显微镜直接观察过量表达 iLov 或 iLovU3 蛋白的大肠杆菌的荧光信号。如图 14 所示,在巨噬细胞吞噬前后,表达 iLov 蛋白的大肠杆菌均可观察到荧光信号,而表达 iLovU3 蛋白的大肠杆菌只有被巨噬细胞吞噬后才能观察到荧光信号(图 14)。结果证明,iLovU3 蛋白的荧光信号可以被 C12Y 和黄素荧光基团间产生的光致电子转移所淬灭,而巨噬体中的酸性环境可以有效地开启 iLovU3 蛋白的荧光信号,从而使吞噬作用过程变得直观可视。由于胞质酸化是巨噬细胞的主要杀伤机制,我们的新方法可以为进一步确定细胞吞噬和吞噬体成熟的关键因素提供有力工具。

[0095] 实施例 6 :包含氟代酪氨酸的蛋白质光致电子转移荧光传感器蛋白 iLov 的实验数据

[0096] 我们用基因工程方法构建了荧光传感器 iLov-486 位点分别突变为单氯酪氨酸、二氯酪氨酸、二氟酪氨酸、三氟酪氨酸及四氟酪氨酸的系列突变体,荧光检测发现在不同的 pH 条件下以上突变体具有不同的荧光强度,通过计算可知其 pKa 值分别为 9.2、6.3、7.6、5 和 6.1(图 11)。

[0097] 以上结果表明,包含氟代酪氨酸的系列突变体均可作为光致电子转移荧光传感器,同时,范围较广的 pKa 值能够使其匹配多种细胞器。

[0098] 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

<110> 中国科学院生物物理研究所

<120> 酪氨酸类似物翻译系统和基因编码的蛋白质光致电子转移荧光传感器蛋白家族

<130> IB147674

<160> 14

<170> PatentIn version 3.1.

<210> 1

<211> 336

<212> DNA

<213> 野生型黄素蛋白iLov的核苷酸序列

```

<400> 1
atggaaaaaa acctegttat caccgaccgg cgtctgcggg acaaccegat catcttgcg      60
tetgacggtt tctcggaact gaccgaatac tctctggaag aaatcctggg tctaacggg      120
cgtttctgc agggctcgga aaccgaccag ggcaccgttc agaaaaaccg tgcacggatc      180
cgtgaccagc gigaaccac cgttcagctg aicaactaea ccaaatctgg taaaaaatc      240
tggaacctgc tgcacctga gccggitcgt gaccagaaag gigaactga gtacttcac      300
ggtgttcagc tggacggttc tgaccagtt ctgcag      336
    
```

<210> 2

<211> 112

<212> PRT

<213> 野生型黄素蛋白iLov的氨基酸序列

<400> 2

```

Met Glu Lys Asn Phe Val Ile Thr Asp Pro Arg Leu Pro Asp Asn Pro
1           5           10           15

Ile Ile Phe Ala Ser Asp Gly Phe Leu Glu Leu Thr Glu Tyr Ser Arg
20           25           30

Glu Glu Ile Leu Gly Arg Asn Ala Arg Phe Leu Glu Gly Pro Glu Thr
35           40           45

Asp Gln Ala Thr Val Gln Lys Ile Arg Asp Ala Ile Arg Asp Gln Arg
50           55           60
    
```

[0002]

Glu Thr Thr Val Gln Leu Ile Asn Tyr Thr Lys Ser Gly Lys Lys Phe
65 70 75 80

Trp Asn Leu Leu His Leu Gln Pro Val Arg Asp Gln Lys Gly Glu Leu
85 90 95

Gln Tyr Phe Ile Gly Val Gln Leu Asp Gly Ser Asp His Val Leu Glu
100 105 110

<210> 3

<211> 113

<212> PRT

<213> iLovU传感器家族的氨基酸序列, 其中X表示引入的五种非天然氨基酸
3-氯代酪氨酸 (C1Y)、3,5-二氯代酪氨酸 (C12Y)、
3,5-二氯代酪氨酸 (F2Y)、2,3,5-三氯代酪氨酸 (F3Y) 或者
2,3,5,6-四氯代酪氨酸 (F4Y)

<400> 3

Met Glu Lys Asn Phe Val Ile Thr Asp Pro Arg Leu Pro Asp Asu Pro
1 5 10 15

Ile Ile Phe Ala Ser Asp Gly Phe Leu Glu Leu Thr Glu Tyr Ser Arg
20 25 30

Glu Glu Ile Leu Gly Arg Asn Ala Arg Phe Leu Gln Gly Pro Glu Thr
35 40 45

Asp Glu Ala Thr Val Gln Lys Ile Arg Asp Ala Ile Arg Asp Gln Arg
50 55 60

Glu Thr Thr Val Gln Leu Ile Asn Tyr Thr Lys Ser Gly Lys Lys Phe
65 70 75 80

Trp Asn Leu Leu His Leu Gln Pro Val Arg Asp Gln Lys Gly Glu Leu
85 90 95

Gln Tyr Phe X Ile Gly Val Gln Leu Asp Gly Ser Asp His Val Leu
100 105 110

Glu

<210> 4

<211> 336

<212> DNA

<213> iLovU传感器家族的核苷酸序列

<400> 4

atggaaaaaa acttcgttat caccgaccgg cgtctgcggg acaaccgat catcttcggc 60

tcgacgggtt tectggaact gaccgnatcc tctctggaag aaatctggg tcgtaaccgg 120

cgtttctctc agggiccgga aaccgaccag gcgaccgttc agaaaatcgg tgaccgcatc 180

[0003]

cgtgaccage gtgaaacsac cgttcagctg atcaactaca ccaaatctgg taaaaattc 240
 tggaaactgc tgcacctgca gccggttcgt gaccagaag gigaactgca gtacttcatg 300
 ggtgttcage tggacggttc tgaccaagtt ctcgag 336

<210> 5

<211> 113

<212> PRT

<213> iLov2的氨基酸序列, 其中X表示引入的3,5-二氯代酪氨酸 (Cl2Y)

<400> 5

Met Glu Lys Asn Phe Val Ile Thr Asp Pro Arg Leu Pro Asp Asn Pro
1 5 10 15

Ile Ile Phe Ala Ser Asp Gly Phe Leu Glu Leu Thr Glu Tyr Ser Arg
20 25 30

Glu Glu Ile Leu Gly Arg Asn Ala Arg Phe Leu Gln Gly Pro Glu Thr
35 40 45

Asp Glu Ala Thr Val Glu Lys Ile Arg Asp Ala Ile Arg Asp Glu Arg
50 55 60

Glu Thr Thr Val Glu Leu Ile Asn Tyr Thr Lys Ser Gly Lys Lys Phe
65 70 75 80

Trp Asn Leu Leu His Leu Gln Pro Val Arg Asp Gln Lys Gly Glu Leu
85 90 95

Gln Tyr Phe X Ile Gly Val Gln Leu Asp Gly Ser Asp His Val Leu
100 105 110

Glu

<210> 6

<211> 336

<212> DNA

<213> iLov2的核苷酸序列

<400> 6

atggaaaaa acttcggtat caccgaaccg cgtcigccgg acaaaccgat catcttcgeg 60

tcigaagggt tcctggaact gaacgaatac tctcgtgaag aatctctggg tcgtaaccgg 120

cgttctctgc agggctccga aaccgaaccg ggcaccgttc agaaaatcgg tgaccggatc 180

cgtgaccage gtgaaaccac cgttcagctg atcaactaca ccaaatctgg taaaaaattc 240

tggaaactgc tgcacctgca gccggttcgt gaccagaag gigaactgca gtacttcatg 300

ggtgttcage tggacggttc tgaccaagtt ctcgag 336

<210> 7

[0004]

<211> 113

<212> PRT

<213> iLovU3的氨基酸序列，其中X表示引入的3,5-二氯代酪氨酸（Cl2Y）

<400> 7

Met Arg Lys Asn Phe Val Ile Thr Asp Pro Arg Leu Pro Asp Asn Pro
1 5 10 15

Ile Ile Phe Ala Ser Asp Gly Phe Leu Glu Leu Thr Gln Tyr Ser Arg
20 25 30

Glu Gln Ile Leu Gly Arg Asn Ala Arg Phe Leu Gln Gly Pro Glu Thr
35 40 45

Asp Glu Ala Thr Val Glu Lys Ile Arg Asp Ala Ile Arg Asp Gln Arg
50 55 60

Glu Thr Thr Val Glu Leu Ile Asn Tyr Thr Lys Ser Gly Lys Lys Phe
65 70 75 80

Trp Asn Leu Leu His Leu Gln Pro Val Arg Asp Glu Lys Gly Gln Leu
85 90 95

Glu Tyr Phe X Ile Gly Val Gln Leu Asp Gly Ser Asp His Val Leu
100 105 110

Glu

<210> 8

<211> 336

<212> DNA

<213> iLovU3的核苷酸序列

<400> 8

atgaggaanaa acctegttaa caccgaccgg cgtctgccgg acnaccggat catcttccg 60

tctgacggit tcttggaaet gaccgaaiac tcctgtgaag aaatcttggg tegttaacgg 120

cgtttctctgc agggctccga aaccgaccag ggcaccgttc agaaaatccg tgacgggatc 180

cgtgaccage gigaanaccac cgttcagctg atcaactaca ccaaatctgg taanaaatc 240

tggaacctgc tgcacctgca gccggttctg gaccagaaag gtaactgca gtaactctg 300

gggttccage tggacggttc tgaccacgtt ctccag 336

<210> 9

<211> 77

<212> DNA

<213> 正义tRNA

[0005]

<400> 9
 tggterggcg ggcgggatit gaaccagegc catgeggait tagagtccgc cgttctgccc 60
 tgctgaacta ccgcggg 77

<210> 10

<211> 306

<212> PRT

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

<400> 10

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 Glu
 35 40 45

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

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Glu 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 Glu 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 Glu Val Asn Asp Ile His
 145 150 155 160

Tyr Leu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Glu 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

[0006]

	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> 12

<211> 921

<212> DNA

<213> 正交氨基-tRNA合成酶 (CI2Y RS) 的核苷酸序列

<400> 12

```

atggacgaat ttgaatgat aaagagaaac acatctgaaa ttatcagcga ggaagagtta      60
agagagggtt taaaaaaga tgaanaafct gcctctgatag gttttgaacc aagtggtaaa      120
atacatttag ggcattatct ccaaataaaa nagatgattg atttcaaaa tctctgattt      180
gatataatta taattttggc tcatcttagt gccatctaa accagaagg agagtggat      240
gagattagaa aaataggaga ttatacaaaa aaagtttttg aagcaatggg gttaaaggca      300
aaataatgtt atggaagtga aattctctct gataaggatg gtacactgaa tctctataga      360
ttgctcttaa aaactacctt aaaaagagca agaaggagta tggnaattat agcaagagag      420
gatgasaate caaaggttgc tgaagttaac taccacaata tgcaggctaa tctctatcat      480
tataagggeg ttgatgttgc agtiggaggg atggagcaga gaaaaataca catgttagca      540
agggagcttt taccacaaaa gtttctttgt atccacaaac ctgtcttaac gggtttggat      600
ggagaaggaa agatgagttc ttcaaaaggg aattttatag ctgttgatga ctctccagaa      660
gagattaggc ctaagataaa gaagacatac tcccagctg gagttgttga aggaantcca      720
ataatggaga tagctaaata ctctctttaa taaccttaa ccataaaaag gccagaaaaa      780
    
```

[0008]

tttggtggag attigacagi taatagctat gaggagtiag agagtiati taaaaataag 840
 gaatigcacc caatggatti aaaaaatget gtagctgaag acattataaa gatttiagag 900
 ccaattagaa agagatiata a 921

<210> 13

<211> 306

<212> PRT

<213> 正交氨基-tRNA合成酶 (F4Y RS) 的氨基酸序列

<400> 13

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 Ala
 20 25 30

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

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

His Leu Ala Asp Leu Gly Ala Tyr Leu Asn Glu 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 Thr Arg 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 Glu Val Asn Gly Ile His
 145 150 155 160

Tyr His Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Glu 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

[0009]

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> 14

<211> 921

<212> DNA

<213> 正交氨基酰-tRNA合成酶 (F4Y RS) 的核苷酸序列

<400> 14

```

atggacgaat tggaaatgat aaagagaac acatcigaaa ttatcagcga ggaagagtt 60
agagagggtt taaaaaaga tgaaaaatct gctgctatag gttitgaacc aagtggtaaa 120
atacatttag gccattatct ccaataaaa nagatgattg atttacaasa tgetggattt 180
gatataattt tacatttggc tgatttaggc gccattttaa accagaangg agagittgat 240
gagattagaa aataggaga ttatacaaaa aaagtitttg angcaatggg gttaaaggca 300
aaataatggt atggaagtga aacgcgtctt gataaggatt atacactgaa tgtctataga 360
ttgcttttaa aaactaectt aaaaagagca agaaggagta tggaaertat agcaagagag 420
gatgaaaatc caaaggttgc tgaagttatc tatecaataa tgeaggttaa tggatttcat 480
tatcatggcg ttgatgtgc agtiggaggg atggagcaga gaaaaataca caigttagca 540
agggagcttt taccaaaaaa ggtigtitgt attcaaac ccgtcttaac gggtttggat 600
ggagaaggaa agatgagttc ttcaaaaggg aattttatag ctgttgaiga ctctccagaa 660
gagattaggg ctaagataaa gaaagcaaac tcccagctg gatttgtiga aggaaatcca 720
afaatggaga tagctaaata cticctttaa taicctttaa ccataaaaag gccagaaaaa 780
tttggtgag attgacagt taafagctat gaggagttag agagtttatt taaaaatag 840
gaatgcate caatgattt aaaaaatgct gtatctgaag aacttataaa gatittagag 900
ccanttagaa agagattata a 921
    
```

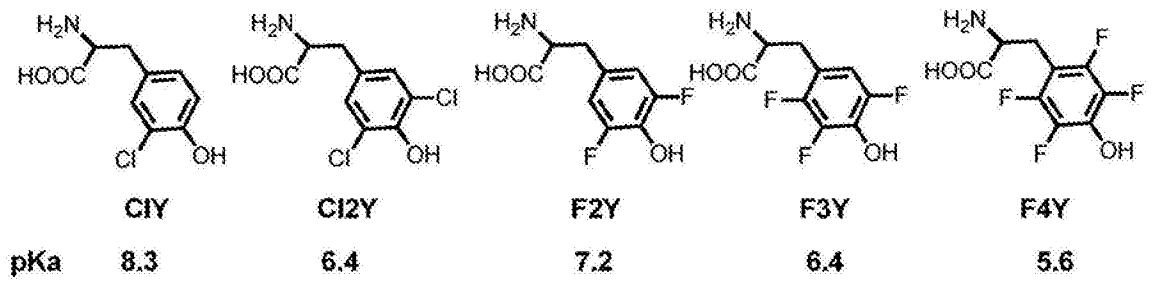



图 1

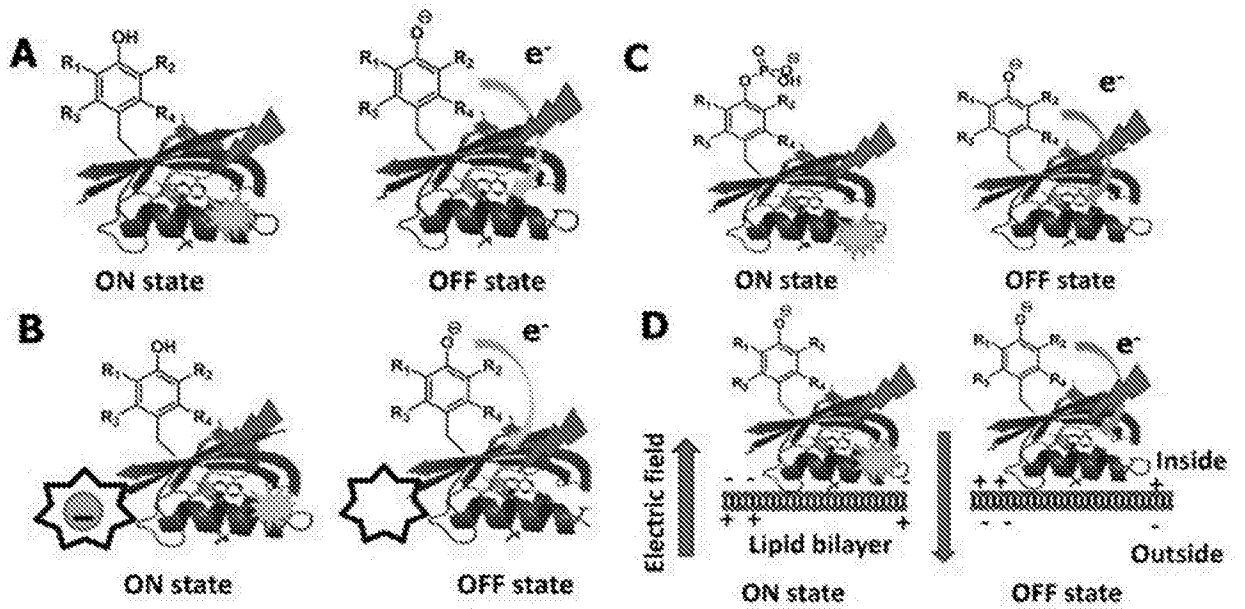


图 2

名称	核苷酸/氨基酸序列
野生型黄素蛋白 iLov	核苷酸序列 (SEQ ID NO: 1): ATGGAAAAAACTTCGTTATCACCGACCCGCGTCTGCCGGACAAC CCGATCATCTTCGCGTCTGACGGTTTCCTGGAAGTACCGAATACT CTCGTGAAGAAATCCTGGGTCGTAACGCGCGTTCCTGCAGGGTC CGGAAACCGACCAGGCGACCGTTCAGAAAATCCGTGACGCGATCC GTGACCAGCGTGAAACCACCGTTCAGCTGATCAACTACACCAAAT CTGGTAAAAAATTCGGAACCTGCTGCACCTGCAGCCGGTTCGTG ACCAGAAAGGTGAACTGCAGTACTTCATCGGTGTTTCAGCTGGACC GTTCTGACCACGTTCTCGAG
	氨基酸序列 (SEQ ID NO: 2): MEKNFVITDPRLPDNPIFASDGFLELTEYSREEILGRNARFLQGPETD QATVQKIRDAIRDQRETTVQLINYTKSGKKFWNLLHLQPVRDQKGE LQYFIGVQLDGS DHVLE
iLovU 传感器家族	氨基酸序列 (SEQ ID NO: 3), 其中 X 表示引入的五种非天然氨基酸 3-氯代酪氨酸 (ClY)、3,5-二氯代酪氨酸 (Cl ₂ Y)、3,5-二氯代酪氨酸 (F ₂ Y)、2,3,5-三氯代酪氨酸 (F ₃ Y) 或者 2,3,5,6-四氯代酪氨酸 (F ₄ Y): MEKNFVITDPRLPDNPIFASDGFLELTEYSREEILGRNARFLQGPETD QATVQKIRDAIRDQRETTVQLINYTKSGKKFWNLLHLQPVRDQKGE LQYFXIGVQLDGS DHVLE
	核苷酸序列 (SEQ ID NO: 4): ATGGAAAAAACTTCGTTATCACCGACCCGCGTCTGCCGGACAAC CCGATCATCTTCGCGTCTGACGGTTTCCTGGAAGTACCGAATACT CTCGTGAAGAAATCCTGGGTCGTAACGCGCGTTCCTGCAGGGTC CGGAAACCGACCAGGCGACCGTTCAGAAAATCCGTGACGCGATCC GTGACCAGCGTGAAACCACCGTTCAGCTGATCAACTACACCAAAT CTGGTAAAAAATTCGGAACCTGCTGCACCTGCAGCCGGTTCGTG ACCAGAAAGGTGAACTGCAGTACTTCATGGGTGTTTCAGCTGGACC GTTCTGACCACGTTCTCGAG
iLovU2	氨基酸序列 (SEQ ID NO: 5), 其中 X 表示引入的 3,5-二氯代酪氨酸 (Cl ₂ Y): MEKNFVITDPRLPDNPIFASDGFLELTEYSREEILGRNARFLQGPETD QATVQKIRDAIRDQRETTVQLINYTKSGKKFWNLLHLQPVRDQKGE LQYFXIGVQLDGS DHVLE
	核苷酸序列 (SEQ ID NO: 6): ATGGAAAAAACTTCGTTATCACCGACCCGCGTCTGCCGGACAAC CCGATCATCTTCGCGTCTGACGGTTTCCTGGAAGTACCGAATACT CTCGTGAAGAAATCCTGGGTCGTAACGCGCGTTCCTGCAGGGTC CGGAAACCGACCAGGCGACCGTTCAGAAAATCCGTGACGCGATCC GTGACCAGCGTGAAACCACCGTTCAGCTGATCAACTACACCAAAT CTGGTAAAAAATTCGGAACCTGCTGCACCTGCAGCCGGTTCGTG ACCAGAAAGGTGAACTGCAGTACTTCATGGGTGTTTCAGCTGGACC GTTCTGACCACGTTCTCGAG
iLovU3	氨基酸序列 (SEQ ID NO: 7), 其中 X 表示引入的 3,5-二氯代酪氨酸 (Cl ₂ Y): MRKNFVITDPRLPDNPIFASDGFLELTEYSREEILGRNARFLQGPETD QATVQKIRDAIRDQRETTVQLINYTKSGKKFWNLLHLQPVRDQKGE LQYFXIGVQLDGS DHVLE
	核苷酸序列 (SEQ ID NO: 8): ATGAGAAAAAACTTCGTTATCACCGACCCGCGTCTGCCGGACAAC CCGATCATCTTCGCGTCTGACGGTTTCCTGGAAGTACCGAATACT CTCGTGAAGAAATCCTGGGTCGTAACGCGCGTTCCTGCAGGGTC

	CGGAAACCGACCAGGCGACCGTTCAGAAAATCCGTGACGCGATCC GTGACCAGCGTGAAACCACCGTTCAGCTGATCAACTACACCAAAT CTGGTAAAAAATTCTGGAACCTGCTGCACCTGCAGCCGGTTCGTG ACCAGAAAGGTGAACTGCAGTACTTCATGGGTGTTTCAGCTGGACG GTTCTGACCACGTTCTCGAG
正交 tRNA	SEQ ID NO: 9 tggtcggcgccggccgattgaaccagcgcccaigcggatftagagtcggcgtctgcccetgetgaactacc gcccc
野生型酪氨酰 tRNA 合成酶 (MjTyrRS), 来源于詹氏甲烷 球菌	SEQ ID NO: 10 MDEFEMIKRNTSEIHSEEELREVLKKDEKSAYIGFEPSPGKIHLGHYLQI KKMIDLQNA GFDIIHLLADLHAYLNQKGELDEIRKIGDYNKKVFEAM GLKAKYVYGSEFQLDKDYTLNVYRLALKTTLKRARRSMELIAREDE NPKVAEVIYPIMQVNDIHYLGVDVAVGGMEQRKIHMLARELLPKKV VCIHNPVLTGLDGEKMSSSKGNFIAVDDSPPEIRAKIKKAYCPAGVV EGNPIMEIAKYFLEYPLTIKRPEKFGGDLTVNSYEELESLEFKNKELHP MDLKNAVAEELIKILEPIRKRL
正交氨酰基 -tRNA 合成酶 (C12YRS)	氨基酸序列 (SEQ ID NO: 11): MDEFEMIKRNTSEIHSEEELREVLKKDEKSALIGFEPSPGKIHLGHYLQI KKMIDLQNA GFDIIHLLADLGAYLNQKGELDEIRKIGDYNKKVFEAMG LKAKYVYGSEFLLDKDGTNLNVYRLALKTTLKRARRSMELIAREDENP KVAEVIYPIMQVNSIHYMGVDVAVGGMEQRKIHMLARELLPKKVVC IHNVPVLTGLDGEKMSSSKGNFIAVDDSPPEIRAKIKKAYCPAGVVEG NPIMEIAKYFLEYPLTIKRPEKFGGDLTVNSYEELESLEFKNKELHPMD LKNVAEELIKILEPIRKRL
	核苷酸序列 (SEQ ID NO: 12): ATGGACGAATTTGAAATGATAAAGAGAAACACATCTGAAATTATCA GCGAGGAAGAGTTAAGAGAGGTTTTAAAAAAGATGAAAAATCT GCTCTGATAGGTTTGAACCAAGTGGTAAAATACATTTAGGGCATT ATCTCCAAATAAAAAAGATGATTGATTACAAAATGCTGGATTGAT ATAAATAAATTTGGCTGATTTAGGTGCCTATTTAAACCAGAAAAGG AGAGTTGGATGAGATTAGAAAAATAGGAGATTATAACAAAAAAGT TTTGAAGCAATGGGGTTAAAGGCAAAATATGTTTATGGAAGTGAA AAAACACTACCTTAAAAAGAGCAAGAAGGAGTATGGAACCTTATAGC AAGAGAGGATGAAAATCCAAAGGTTGCTGAAAGTTATCTATCCAATA ATGCAGGTAAATTCATTCATTATAATGGGCGTTGATGTTGCAAGTTGG AGGGATGGAGCAGAGAAAAATACACATGTTAGCAAGGGAGCTTTT ACCAAAAAAGGTTGTTTGTATTACAAACCCTGTCTTAACGGGTTTG GATGGAGAAGGAAAGATGAGTTCTTCAAAGGGAATTTTATAGCT GTTGATGACTCTCCAGAAGAGATTAGGGCTAAGATAAAGAAAGCA TACTGCCACGCTGGAGTTGTTGAAGGAAATCCAATAATGGAGATA GCTAAATACTTCTTGAATATCCTTTAACCATAAAAAGGCCAGAAA AATTTGGTGGAGATTTGACAGTTAATAGCTATGAGGAGTTAGAGAG TTTATTTAAAAATAAGGAATTCATCCAATGGATTTAAAAAATGCTG TAGCTGAAGAACTTATAAAGATTTTAGAGCCAATTAGAAAAGAGATT ATAA
正交氨酰基 -tRNA 合成酶 (F4YRS)	氨基酸序列 (SEQ ID NO: 13): MDEFEMIKRNTSEIHSEEELREVLKKDEKSAAYIGFEPSPGKIHLGHYLQI KKMIDLQNA GFDIIHLLADLGAYLNQKGELDEIRKIGDYNKKVFEAM GLKAKYVYGSETRLDKDYTLNVYRLALKTTLKRARRSMELIAREDE NPKVAEVIYPIMQVNGIHYHGVDVAVGGMEQRKIHMLARELLPKKV VCIHNPVLTGLDGEKMSSSKGNFIAVDDSPPEIRAKIKKAYCPAGVV EGNPIMEIAKYFLEYPLTIKRPEKFGGDLTVNSYEELESLEFKNKELHP MDLKNAVAEELIKILEPIRKRL
	核苷酸序列 (SEQ ID NO: 14): ATGGACGAATTTGAAATGATAAAGAGAAACACATCTGAAATTATCA

```

GCGAGGAAGAGTTAAGAGAGGTTTAAAAAAGATGAAAAATCT
GCTGCTATAGGTTTTGAACCAAGTGGTAAAATACATTTAGGGCATT
TCTCCAAATAAAAAAGATGATTGATTACAAAATGCTGGATTTGATA
TAATTATACATTTGGCTGATTTAGGCGCCTATTTAAACCAGAAAAGGA
GAGTTGGATGAGATTAGAAAAATAGGAGATTATAACAAAAAAGTT
TTTGAAGCAATGGGGTTAAAGGCAAAAATATGTTTATGGAAGTGAA
ACGCGTCTTGATAAGGATTATACACTGAATGCTATAGATTGGCTTT
AAAAACTACCTTAAAAAGAGCAAGAAGGAGTATGGAACCTTATAGC
AAGAGAGGATGAAAATCCAAAGGTTGCTGAAGTTATCTATCCAATA
ATGCAGGTTAATGGTATTCATTATCATGGCGTTGATGTTGCAGTTGG
AGGGATGGAGCAGAGAAAAATACACATGTTAGCAAGGGAGCTTTT
ACAAAAAAGGTTGTTTGTATTACACAACCCTGCTTAAACGGGTTTG
GATGGAGAAGGAAAGATGAGTTCCTCAAAGGGAATTTTATAGCT
GTTGATGACTCTCCAGAAGAGATTAGGGCTAAGATAAAGAAAGCA
TACTGCCCAGCTGGAGTTGTTGAAGGAAATCCAATAATGGAGATA
GCTAAATACTTCCTTGAATATCCTTTAACCATAAAAAGGCCAGAAA
AATTTGGTGGAGATTTGACAGTTAATAGCTATGAGGACTTAGAGAG
TTTATTTAAAAATAAGGAATTGCATCCAATGGATTTAAAAAATGCTG
TAGCTGAAGAACTTATAAAGATTTTAGAGCCAATTAGAAAAGAGATT
ATAA
    
```

图 3

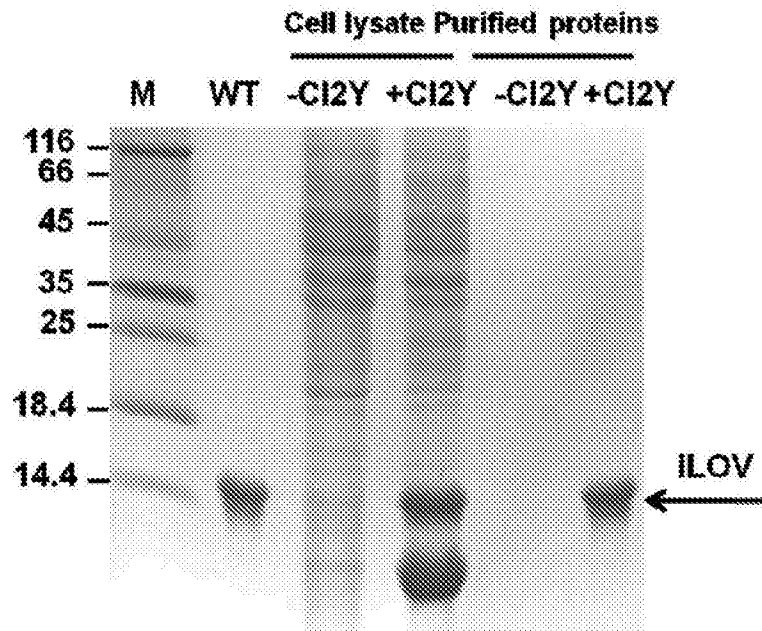


图 4

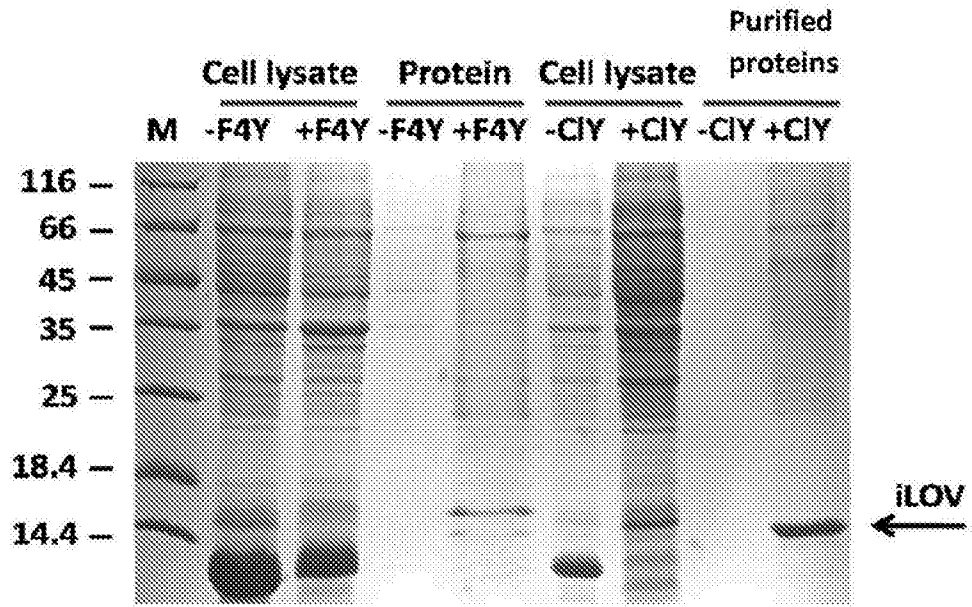


图 5

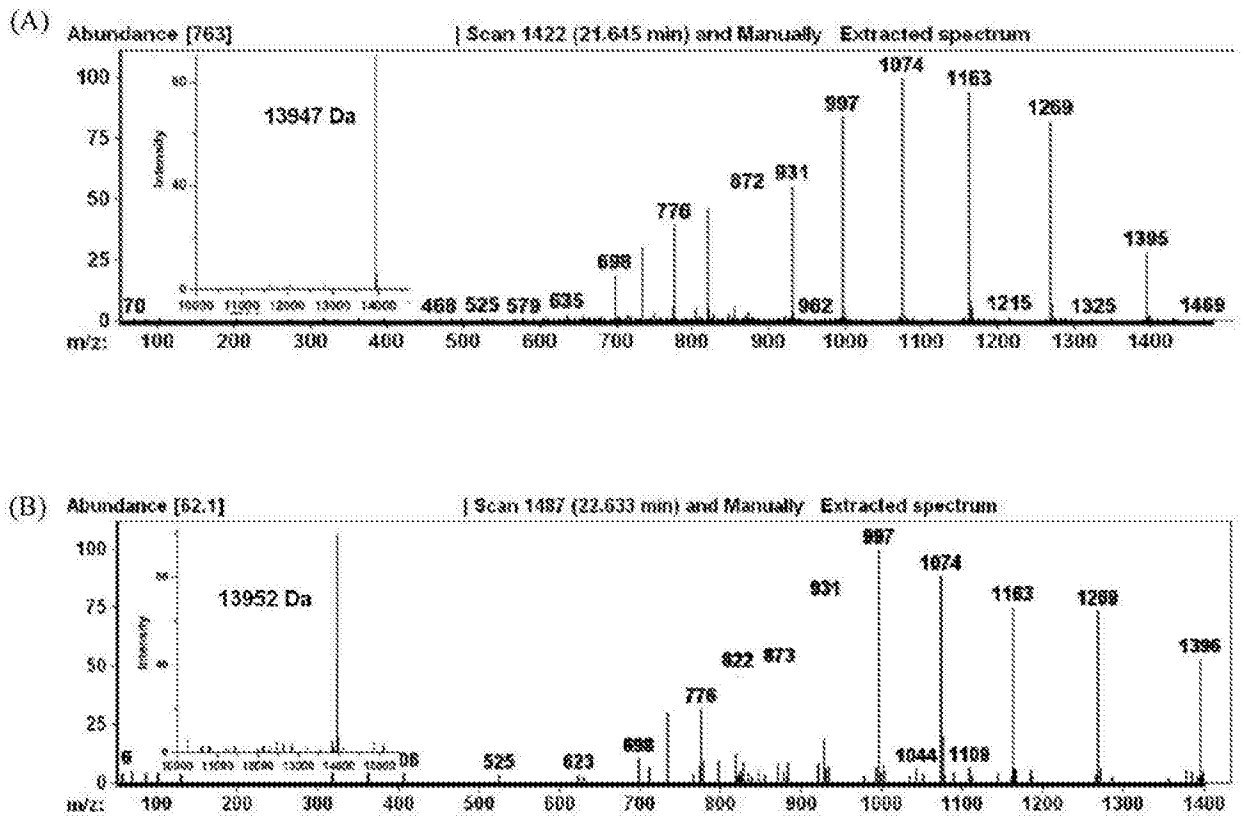


图 6

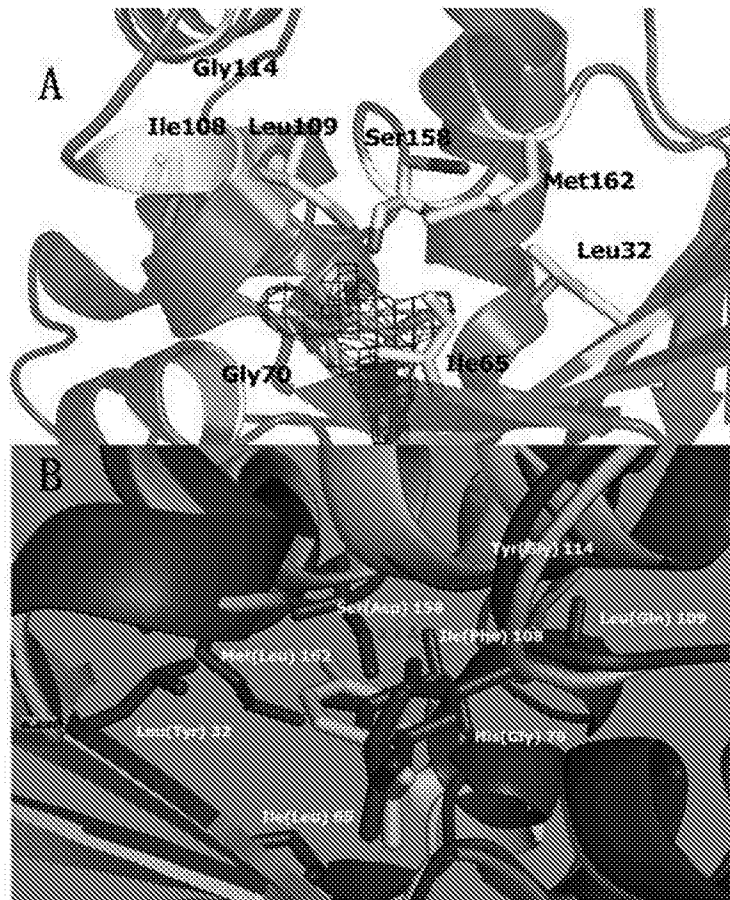


图 7

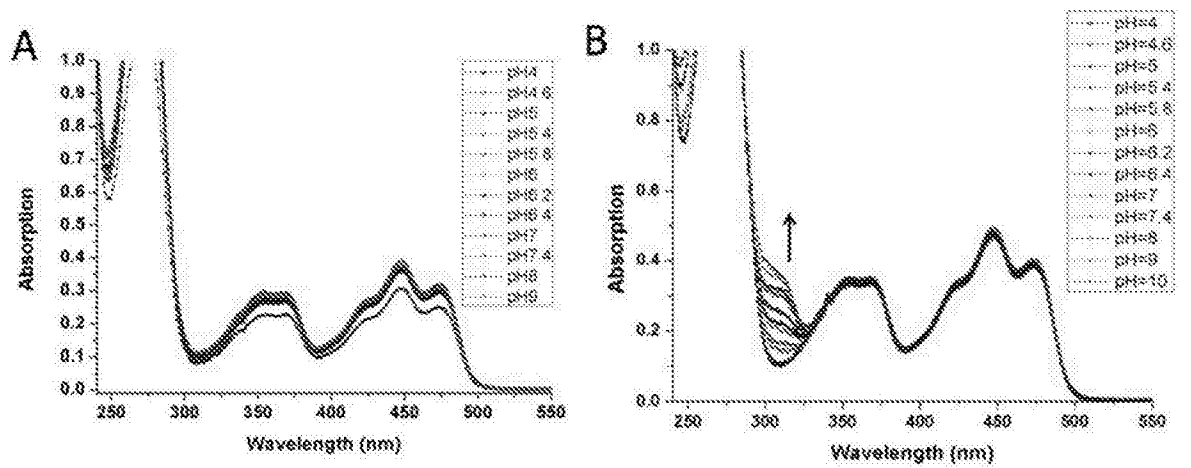


图 8

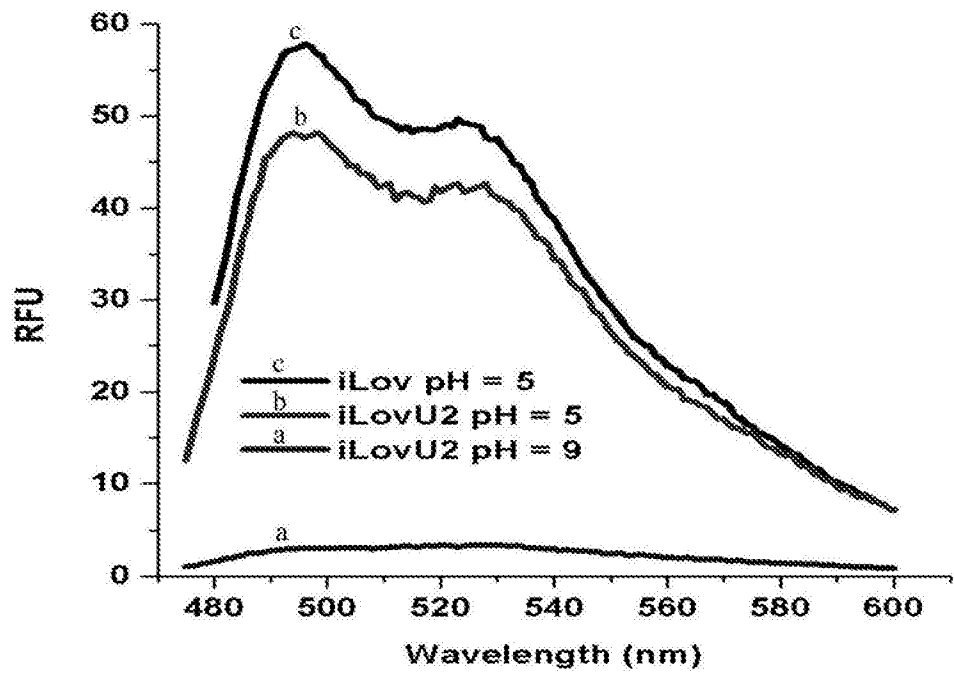


图 9

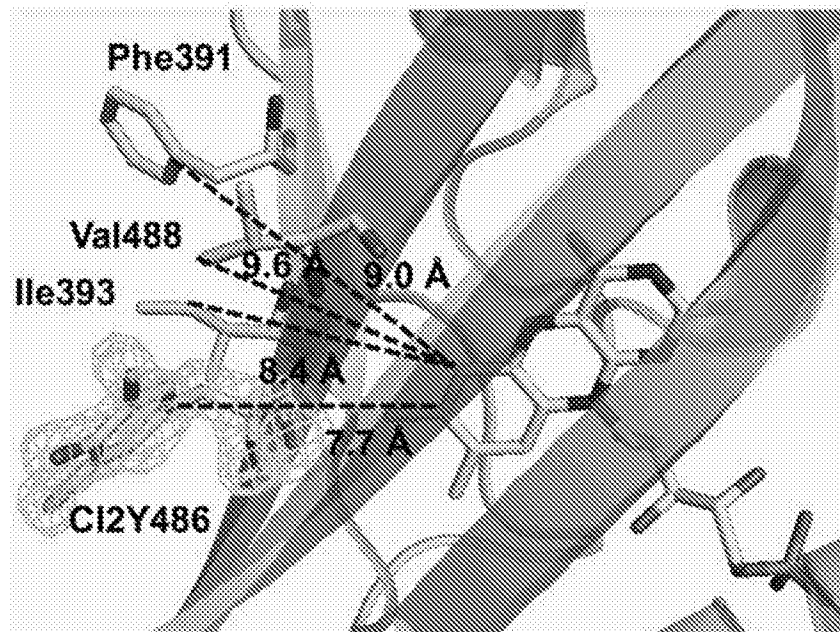


图 10

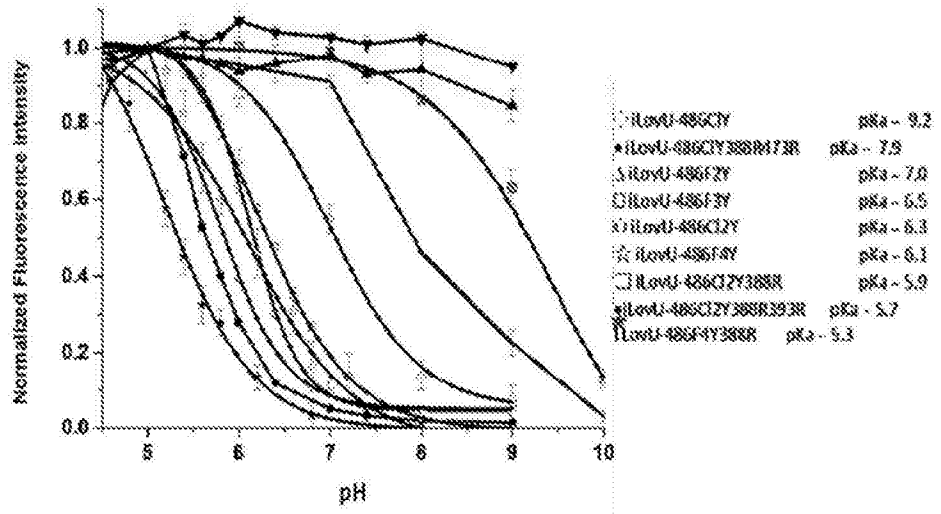


图 11

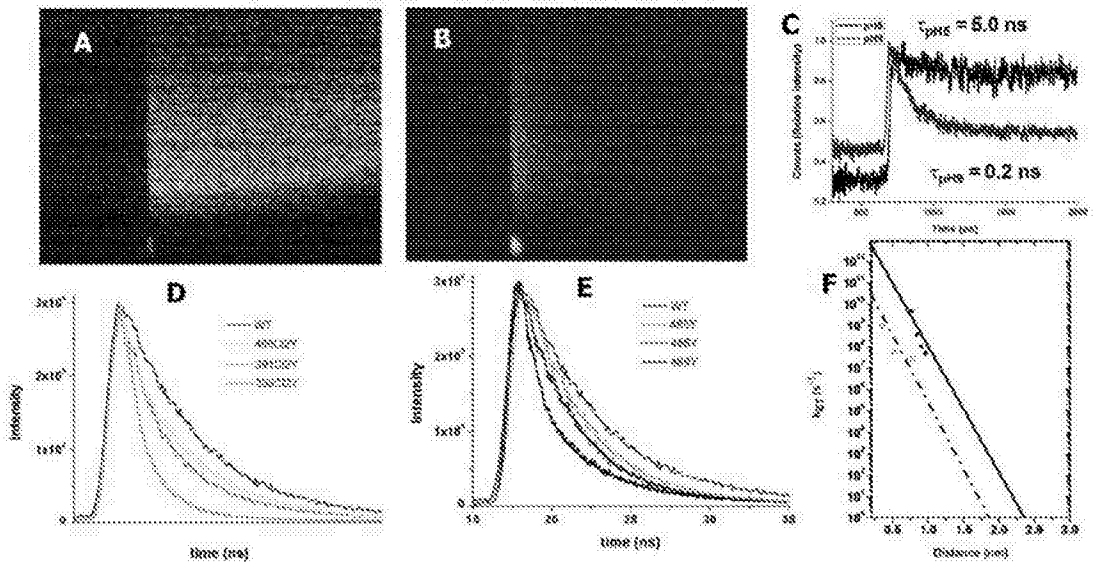


图 12

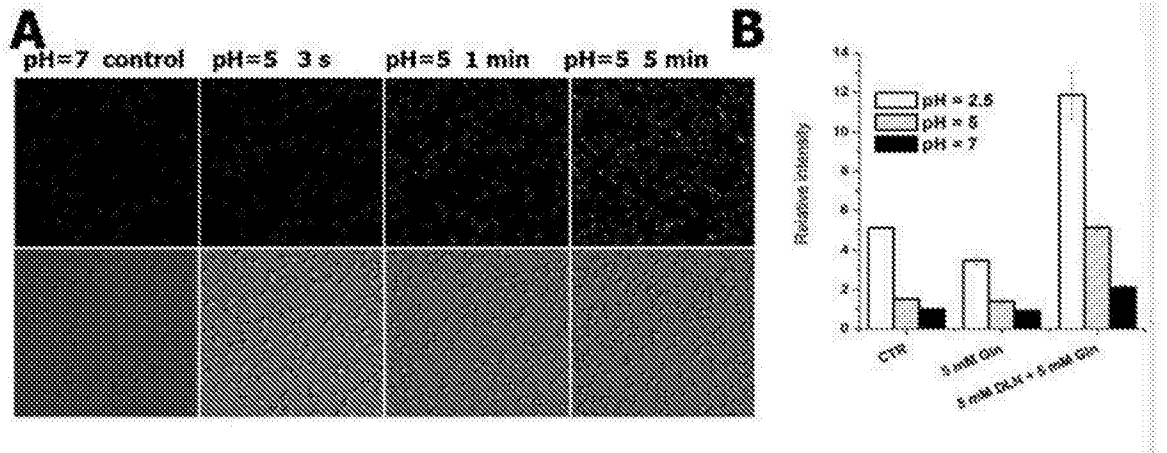


图 13

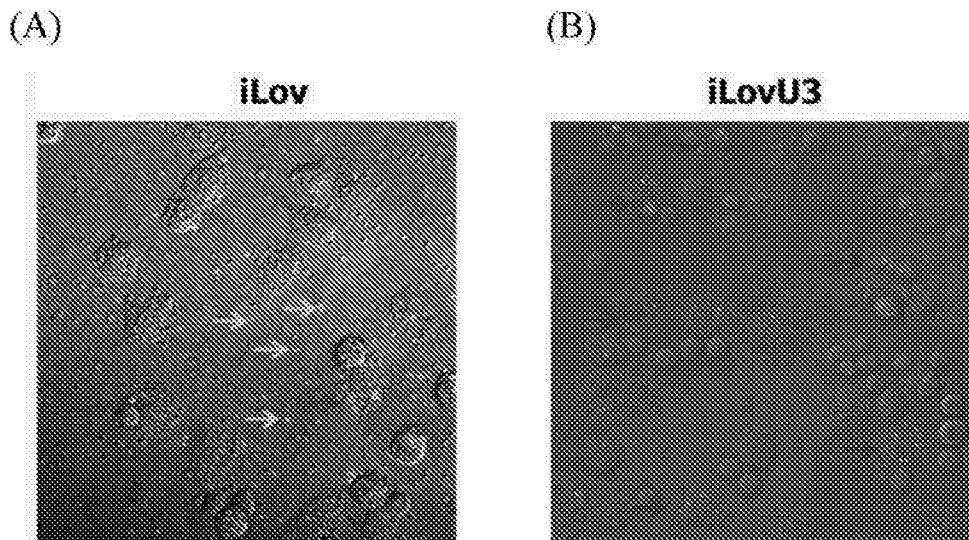


图 14