



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104059891 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 24

(21) 申请号 201310093794. 6

C12N 9/88 (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 03. 22

C12N 15/60 (2006. 01)

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所

C12P 17/12 (2006. 01)

地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

C12R 1/19 (2006. 01)

(72) 发明人 王江云 刘晓红 李家松 胡诚

周庆 张维 胡美荣 周娟作

江欢欢

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 王旭

(51) Int. Cl.

C12N 9/00 (2006. 01)

C12P 21/02 (2006. 01)

C12N 1/21 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书14页

序列表12页 附图8页

(54) 发明名称

8- 羟基喹啉丙氨酸翻译系统及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种氨酰基-tRNA 合成酶突变体,其含有的氨基酸序列选自 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列和 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列的保守性变体组成的组,所述保守性变体具有与 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列相同的酶活性。本发明还提供一种翻译系统,其包含:(i)8- 羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物;(ii) 本发明的正交氨酰基-tRNA 合成酶;(iii) 正交 tRNA,其中所述正交氨酰基-tRNA 合成酶用所述 8- 羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物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。最后,本发明提供一种能够催化 8- 羟基喹啉生成 8- 羟基喹啉丙氨酸的酪氨酸酯裂解酶突变体,其含有的氨基酸序列由 SEQ ID NO :5 所示。

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

2. 一种翻译系统,所述系统包含:

(i) 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物;

(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 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物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,

其中所述 8-羟基喹啉丙氨酸的结构类似物选自 8-羟基喹啉丙氨酸的盐或酯、对羟基苯基丙氨酸或对羟基苯基丙氨酸的盐或酯。

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

4. 如权利要求 2 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。

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

6. 一种产生在至少一个所选位置定点特异性插入 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物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 所述的翻译系统,该系统包含:

(i) 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物;

(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 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物优先氨酰化所述正交 tRNA;和

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

(b) 将所述正交 tRNA 序列和编码所述正交氨酰基-tRNA 合成酶的核苷酸序列以及编码所述目标蛋白质的核酸序列克隆并转化到适当的宿主细胞中,在培养基中加入 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物,在所述目标蛋白质的翻译期间,8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物氨酰化的正交 tRNA 识别编码所述目标蛋白质的 mRNA 上的选择密码子以及 8-羟基喹啉丙氨酸,从而介导 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物定点特异性插入所述选择密码子对应的氨基酸位置,从而产生在所选位置含 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物的所述目标蛋白质,

其中所述 8-羟基喹啉丙氨酸的结构类似物选自 8-羟基喹啉丙氨酸的盐或酯、对羟基苯基丙氨酸或对羟基苯基丙氨酸的盐或酯。

7. 一种通过遗传编码包含 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物的突变蛋白质来拓展蛋白功能的方法,所述方法包括:利用权利要求 6 所述的方法生产包含 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物的突变蛋白质,所产生的突变蛋白质具有螯合金属离子的能力,并且能够作

为特异性金属离子传感器。

8. 一种酪氨酸酚裂解酶突变体,所述酪氨酸酚裂解酶突变体催化 8-羟基喹啉生成 8-羟基喹啉丙氨酸,其氨基酸序列为:

(1) SEQ ID NO :5 所示的氨基酸序列,或

(2) 将 SEQ ID NO :5 所示的氨基酸序列经过一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加且具有与 SEQ ID NO :5 所示的氨基酸序列相同的催化 8-羟基喹啉生成 8-羟基喹啉丙氨酸的酶活性的由 SEQ ID NO :5 所示的氨基酸序列衍生的氨基酸序列。

9. 编码权利要求 8 的酪氨酸酚裂解酶突变体的核苷酸序列。

10. 一种制备 8-羟基喹啉丙氨酸的方法,所述方法包括用权利要求 8 的酪氨酸酚裂解酶突变体催化 8-羟基喹啉,生成所述的 8-羟基喹啉丙氨酸。

8- 羟基喹啉丙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,本发明提供一种氨酰基-tRNA 合成酶突变体,其作为一种正交氨酰基-tRNA 合成酶,其含有的氨基酸序列选自 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列和 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列的保守性变体组成的组,所述保守性变体具有与 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列相同的酶活性。本发明还涉及一种 2-氨基-3-(8-羟基喹啉-5-基)丙酸(简称 8-羟基喹啉丙氨酸,简称为 HqAla)翻译系统。更具体地,本发明涉及利用正交 tRNA、正交氨酰基-tRNA 合成酶的配对将 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物定点特异性插入目标蛋白质的翻译系统,和利用所述翻译系统在目标蛋白质中定点特异性插入 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物的方法。本发明还涉及一种酪氨酸酚裂解酶突变体,其含有的氨基酸序列由 SEQ ID NO:5 所示,所述酪氨酸酚裂解酶突变体催化 8-羟基喹啉生成 8-羟基喹啉丙氨酸。最后,本发明还提供一种通过遗传编码包含能够整合金属离子的非天然氨基酸的突变蛋白质来拓展蛋白功能的方法。

背景技术

[0002] 遗传编码整合金属离子的非天然氨基酸是一种研究蛋白质传感器设计,金属酶工程以及蛋白核磁共振的有力工具,但是,受限于非天然氨基酸合成的复杂性,使得该方法不能被生物学家广泛地应用。本发明通过定向进化酪氨酸酚裂解酶,使其能够高效地催化一种新型非天然氨基酸-8-羟基喹啉丙氨酸的生物合成,该非天然氨基酸可以与多种过渡金属离子形成稳定复合物。酪氨酸酚裂解酶(Tyrosine phenol lyase, TPL),又名 β -酪氨酸酶,以磷酸吡哆醛(pyridoxal-phosphate, PLP)为辅酶。1987年, Kazakov 等发现 TPL 分子由 4 个相同的分子量约为 50kDa 的亚基组成,每个亚基四聚体与 4 分子磷酸吡哆醛(PLP)结合在一起。TPL 可以催化 L-酪氨酸发生 β -消去反应生成苯酚、丙酮酸和氨。由于这个反应是可逆的,将 8-羟基喹啉代替苯酚后,可由 8-羟基喹啉、丙酮酸钠和氯化铵可在 TPL 催化下生成 8-羟基喹啉丙氨酸。

[0003] 遗传编码 8-羟基喹啉丙氨酸还需要一种在目标蛋白中定点特异插入非天然氨基酸的方法,本研究现已开发了在原核和真核生物中将各种非天然氨基酸体内位点特异性地定点插入蛋白质的通用方法。这些方法依赖于正交蛋白质翻译组分,所述组分识别合适的选择密码子(selector codon)从而能在体内多肽翻译期间将所需的非天然氨基酸插入限定位置。这些方法利用识别选择密码子的正交 tRNA(O-tRNA),而相应的特异性正交氨酰基-tRNA 合成酶(O-RS)用非天然氨基酸加载该 O-tRNA。这些组分不与宿主生物体内的任何内源性 tRNA、氨酰基-tRNA 合成酶(RS)、氨基酸或密码子交叉反应(即,它必须是正交的)。利用这种正交 tRNA-RS 配对可能遗传编码大量结构各异的非天然氨基酸。

[0004] 本领域普遍知道利用适合于制备含一个或多个非天然氨基酸的蛋白质的正交翻译系统,例如产生正交翻译系统的通用方法。例如,参见国际公布号 WO 2002/086075,其发明名称为“METHODS AND COMPOSITION FOR THE PRODUCTION OF ORTHOGONAL tRNA-AMINOACYL-tRNA SYNTHETASE PAIRS”;WO 2002/085923,其发明名称为“IN VIVO

INCORPORATION OF UNNATURAL AMINO ACIDS”;WO 2004/094593,其发明名称为“EXPANDING THE EUKARYOTIC GENETIC CODE”。定点特异性插入非天然氨基酸的正交翻译系统及它们的产生和使用方法的其他讨论还可参见 Wang 和 Schultz, Chem. Commun. (Camb) 1: 1-11(2002);Wang 和 Schultz, Angewandte Chemie Int. Ed. 44(1):34-66(2005); Xie 和 Schultz, Methods 36(3):227-238(2005);Xie 和 Schultz, Curr. Opinion in Chemical Biology 9(6):548-554(2005);Wang 等, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 35: 225-249(2006)。虽然目前本领域已有一套完善的系统可以定点特异性插入多种非天然氨基酸,但是由于 8-羟基喹啉丙氨酸自身结构的特点,目前仍无报道可以成功地在蛋白中插入 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物。同时,目前报道中成功插入的其他非天然氨基酸均与 8-羟基喹啉丙氨酸结构差异较大,导致本领域技术人员根本不会想到使用相同的系统去整合 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物。另外,正交氨酰基-tRNA 合成酶的筛选工作量非常大,需要通过 3 轮正负筛选,即总共 6 轮筛选,才从突变库(包含上百万甚至上千万个克隆)中筛选得到本发明中所述的正交氨酰基-tRNA 合成酶。同时由于筛选过程中经常会出现假阳性克隆,我们需要通过进一步的试验依次去验证它们插入非天然氨基酸的能力,无形中又增加了许多工作量。因此,本发明的内容具有重要的意义,也是首次在蛋白中成功地定点特异插入 8-羟基喹啉丙氨酸,所产生的突变蛋白质不仅具有整合金属离子的能力,并且能够作为特异性金属离子传感器。

发明内容

[0005] 1、技术问题

[0006] 本发明提供一种氨酰基-tRNA 合成酶突变体,其为一种正交氨酰基-tRNA 合成酶,其含有的氨基酸序列选自 SEQ ID NO:4 所示氨基酸和 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列的保守性变体组成的组,所述保守性变体具有与 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列相同的酶活性。这种氨酰基-tRNA 合成酶突变体能够用 8-羟基喹啉丙氨酸(简称为 HqA1a)或其结构类似物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 HqA1a 或其结构类似物。这是本发明人首次发现的,相应地,在本发明中将其命名为正交 8-羟基喹啉丙氨酸氨酰基-tRNA 合成酶(HqA1aRS)。

[0007] 在整个本发明的说明书中,术语“8-羟基喹啉丙氨酸的结构类似物”是指选自 8-羟基喹啉丙氨酸的盐或酯、对羟基苯基丙氨酸或对羟基苯基丙氨酸的盐或酯的化合物。本发明还提供一种酪氨酸酚裂解酶(Tyrosine phenol lyase,简称为 TPL)突变体,所述酪氨酸酚裂解酶突变体可以高效地催化 8-羟基喹啉生成 8-羟基喹啉丙氨酸,其氨基酸序列为:

[0008] (1)SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列,或

[0009] (2)将 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列经过一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加且具有与 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列相同的催化 8-羟基喹啉生成 8-羟基喹啉丙氨酸的酶活性的由 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列衍生的氨基酸序列。

[0010] 此外,本领域技术人员应该理解,在本发明中,术语“能够催化 8-羟基喹啉生成 8-羟基喹啉丙氨酸的酪氨酸酚裂解酶突变体”不仅包括 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列,还包括 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列的功能片段或功能衍生物,即,所述功能片段保留催

化 8- 羟基喹啉生成 8- 羟基喹啉丙氨酸的酶活性,所述功能衍生物是指将 SEQ ID NO :5 所示的氨基酸序列经过一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加且具有与 SEQ ID NO :5 所示的氨基酸序列相同的催化 8- 羟基喹啉生成 8- 羟基喹啉丙氨酸的酶活性的由 SEQ ID NO :5 所示的氨基酸序列衍生的氨基酸序列。

[0011] 这种能够催化 8- 羟基喹啉生成 8- 羟基喹啉丙氨酸的酪氨酸酚裂解酶突变体是本发明人首次发现的。

[0012] 在上述发现的基础上,本发明提供一种利用正交 tRNA、正交氨酰基 -tRNA 合成酶的配对将 8- 羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物定点特异性插入目标蛋白质的翻译系统,和利用所述翻译系统在目标蛋白质中定点特异性插入 8- 羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物的方法。本发明还涉及用这种翻译系统和这种方法产生的含有 8- 羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物的突变蛋白质及其应用。

[0013] 因此,本发明的目的在于提供利用正交 tRNA、正交氨酰基 -tRNA 合成酶的配对将 8- 羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物定点特异性插入蛋白质的翻译系统,并且提供利用该翻译系统在目标蛋白质中定点特异性插入 8- 羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物的方法。

[0014] 本发明还提供利用本发明的翻译系统产生的含有至少一个 8- 羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物的突变蛋白质。在本发明的优选方面中,本发明人利用这种方法将 8- 羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物定点特异性插入目的蛋白中,所述目的蛋白包括,但不限于,荧光蛋白 (Fluorescent Proteins, 简称为 FP)。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荧光蛋白之外的多种蛋白中定点特异性插入 8- 羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物,并不局限于该蛋白。

[0015] 最后,本发明还提供一种通过遗传编码包含能够螯合金属离子的非天然氨基酸的突变蛋白质来拓展蛋白功能的方法,所述非天然氨基酸能螯合多种金属离子,本发明中优选在蛋白的氨基酸序列中引入 8- 羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物。

[0016] 2、技术方案

[0017] 本发明人经过筛选,获得一种正交氨酰基 -tRNA 合成酶,其为一种正交氨酰基 -tRNA 合成酶,其含有的氨基酸序列选自由 SEQ ID NO :4 所示氨基酸序列和 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列的保守性变体组成的组,所述保守性变体具有与 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列相同的酶活性,在本发明中将其命名为正交 8- 羟基喹啉丙氨酸氨酰基 -tRNA 合成酶 (HqAlaRS)。并且,本发明人利用所述正交氨酰基 -tRNA 合成酶,研发了一种在蛋白的氨基酸序列中引入 8- 羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物的翻译系统,该翻译系统在本文中简称为 8- 羟基喹啉丙氨酸翻译系统 (有时也简称为“本发明的翻译系统”)。

[0018] 本领域技术人员应该理解,在本发明中,除了 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列之外,术语“本发明的正交氨酰基 -tRNA 合成酶”或“正交 8- 羟基喹啉丙氨酸氨酰基 -tRNA 合成酶”还包括 SEQ ID NO :4 所示氨基酸序列的保守性变体,只要所述保守性变体具有与 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列相同的酶活性即可;并且还包含将 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列经过一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加且具有与 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列相同的酶活性的由 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列衍生的氨基酸序列。

[0019] 具体来说,本发明提供在体内 (例如在宿主细胞内) 识别选择密码子 (selector codon) 如琥珀终止密码子 (TAG) 从而将非天然氨基酸 8- 羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物

定点特异性插入到多肽链中的 8- 羟基喹啉丙氨酸翻译系统。所述 8- 羟基喹啉丙氨酸翻译系统包含不与宿主细胞翻译机制相互作用的正交 -tRNA (O-tRNA) 和正交氨酰基 -tRNA 合成酶 (O-RS) 配对。即, 宿主细胞内源性氨酰基 -tRNA 合成酶不会识别 O-tRNA。类似地, 本发明提供的 O-RS 不以显著水平或者某些情况下不以可检测水平地识别内源性 tRNA。利用所述翻译系统能够产生在翻译过程中定点特异性插入 8- 羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物的大量蛋白质。

[0020] 在一些方面中, 本发明提供 8- 羟基喹啉丙氨酸翻译系统。所述翻译系统包含:

[0021] (a) 8- 羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物,

[0022] (b) 本发明的正交氨酰基 -tRNA 合成酶 (O-RS), 和

[0023] (c) 正交 tRNA (O-tRNA), 其包含 SEQ ID NO :1 所示的多核苷酸序列, 其中所述正交氨酰基 -tRNA 合成酶用 8- 羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物优先氨酰化所述 O-tRNA。

[0024] 其中, 术语“8- 羟基喹啉丙氨酸的结构类似物”是指选自 8- 羟基喹啉丙氨酸的盐或酯、对羟基苯基丙氨酸或对羟基苯基丙氨酸的盐或酯的化合物。

[0025] 优选地, 本发明的 8- 羟基喹啉丙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 8- 羟基喹啉丙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。

[0026] 所述系统中所用的正交氨酰基 -tRNA 合成酶 (O-RS) 即为本发明人首次发现的氨酰基 tRNA 合成酶突变体, 其含有的氨基酸序列选自 SEQ ID NO :4 所示氨基酸序列和 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列的保守性变体组成的组, 所述保守性变体具有与 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列相同的酶活性。

[0027] 本发明还涉及编码所述正交氨酰基 -tRNA 合成酶 (O-RS) 的核苷酸序列。在一个优选的方面中, 所述核苷酸序列为 SEQ ID NO :3。

[0028] 在本发明的优选方面中, 本发明提供一种 8- 羟基喹啉丙氨酸翻译系统, 所述系统包含:

[0029] (i) 8- 羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物;

[0030] (ii) 本发明的正交氨酰基 -tRNA 合成酶;

[0031] (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 8- 羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物优先氨酰化所述正交 tRNA; 和

[0032] (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。

[0033] 其中, 术语“8- 羟基喹啉丙氨酸的结构类似物”是指选自 8- 羟基喹啉丙氨酸的盐或酯、对羟基苯基丙氨酸或对羟基苯基丙氨酸的盐或酯的化合物。

[0034] 优选地, 所述 8- 羟基喹啉丙氨酸翻译系统还包含编码本发明的正交氨酰基 -tRNA 合成酶的核苷酸序列。在一个优选的实施方案中, 所述编码本发明的正交氨酰基 -tRNA 合成酶的核苷酸序列为 SEQ ID NO :3 所示。

[0035] 该翻译系统中的各种组分可以衍生自各种物种来源, 例如, 该翻译系统中的各组分衍生自詹氏甲烷球菌 (*Methanococcus jannaschii*)。例如, 正交 tRNA (O-tRNA) 为古菌来源的反密码子突变为与琥珀密码互补的酪氨酸 tRNA。在一些实施方式中, O-tRNA 是琥珀抑

制型 tRNA。在一些实施方式中，O-tRNA 包含 SEQ ID NO:1 所示的多核苷酸序列，优选地，O-tRNA 的序列如 SEQ ID NO:1 所示。在一个实施方式中，用于该系统的正交氨酰基-tRNA 合成酶可以包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列及该序列的保守变体。在优选的实施方案中，用于该系统的正交氨酰基-tRNA 合成酶的氨基酸序列为 SEQ ID NO:4 所示。

[0036] 在一些方面中，本发明的 8-羟基喹啉丙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。

[0037] 在一些方面中，本发明提供包含编码本发明的正交氨酰基-tRNA 合成酶的核苷酸序列和相对应的正交 tRNA 序列的宿主细胞。所用的宿主细胞不作具体限定，只要正交氨酰基-tRNA 合成酶和正交 tRNA 在它们的宿主细胞环境中保留它们的正交性即可。例如，所述宿主细胞可以是真细菌细胞，优选大肠杆菌。

[0038] 本发明还提供产生在至少一个所选位置定点特异性插入 8-羟基喹啉丙氨酸的突变蛋白质的方法。所述方法利用上述 8-羟基喹啉丙氨酸翻译系统。所述方法通常包括下述步骤：

[0039] (a) 提供含有以下组分的 8-羟基喹啉丙氨酸翻译系统的步骤：

[0040] (i) 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物；

[0041] (ii) 本发明的正交氨酰基-tRNA 合成酶 (O-RS)；

[0042] (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 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物优先氨酰化所述 O-tRNA；和

[0043] (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）；

[0044] (b) 将所述正交 tRNA 序列和编码所述正交氨酰基-tRNA 合成酶的核苷酸序列以及编码所述目标蛋白质的核酸序列克隆并转化到适当的宿主细胞中，在培养基中加入 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物，在所述目标蛋白质的翻译过程中，8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物氨酰化的正交 RNA 识别编码所述目标蛋白质的 mRNA 上的选择密码子以及 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物，从而介导 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物定点特异性插入所述选择密码子对应的氨基酸位置，从而产生在所选位置含有 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物的突变蛋白质。

[0045] 其中，术语“8-羟基喹啉丙氨酸的结构类似物”是指选自 8-羟基喹啉丙氨酸的盐或酯、对羟基苯基丙氨酸或对羟基苯基丙氨酸的盐或酯的化合物。

[0046] 本领域技术人员应该理解，适当的重组载体的构建和宿主细胞的筛选可以通过常规分子克隆技术和筛选技术实现。

[0047] 本领域技术人员应该理解，在步骤 (b) 中，将所述正交 tRNA 序列和编码所述正交氨酰基-tRNA 合成酶的核苷酸序列以及编码所述目标蛋白质的核酸序列克隆并转化到适当的宿主细胞中可以通过多种方式进行，例如，将所述正交 tRNA 序列、编码所述正交氨酰基-tRNA 合成酶的核苷酸序列以及编码所述目标蛋白质的核酸序列分别可操作性地连接到适当的载体中，再以任意次序或三者共同转化到适当的宿主细胞中；或者，也可以将所述正交 tRNA 序列和编码所述正交氨酰基-tRNA 合成酶的核苷酸序列可操作性地连接到一个适当的载体中（两种序列之间有或无适当的接头连接），将编码所述目标蛋白质的核酸序

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

[0048] 另外,本领域技术人员还应该理解,为了避免宿主细胞对外源重组载体的“踢除”效应,往往选择用带有不同抗生素标记的载体来构建需要共同转化到同一宿主细胞中的核酸序列片段。对于适当的载体的选择、重组载体的构建、宿主细胞的转化或转染等等,都是本领域的常规技术,例如,可以参见美国冷泉港实验室出版的分子克隆手册。

[0049] 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 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物)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。

[0050] 还可在宿主细胞内实施产生含有 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物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 8-羟基喹啉丙氨酸翻译系统(即,包含编码本发明的 0-RS 的核苷酸序列、0-tRNA 序列和含有至少一个选择密码子的编码目标蛋白质的核酸),而在适宜的培养条件下(例如,在培养基中添加 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物等)培养该宿主细胞可导致在所述目标蛋白质中定点特异性插入 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物。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)。

[0051] 本发明还提供生产含有 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物的荧光蛋白突变体的方法,其利用上述产生在至少一个所选位置定点特异性插入 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物的突变蛋白质的方法,其中所用的编码荧光蛋白突变体的核酸序列在适当的位置包含所述正交 tRNA 特异性识别的选择密码子,在荧光蛋白的翻译期间,8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物定点插入到所述选择密码子对应的氨基酸位置,从而产生含有 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物的荧光蛋白突变体。

[0052] 优选地,本发明还提供生产含有 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物的绿色荧光蛋白突变体的方法,所述方法利用上述 8-羟基喹啉丙氨酸翻译系统进行,所述方法通常包括下述步骤:

[0053] (a) 提供含有以下组分的 8-羟基喹啉丙氨酸翻译系统的步骤:

[0054] (i) 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物；

[0055] (ii) 正交氨酰基-tRNA 合成酶 (O-RS)；

[0056] (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 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物优先氨酰化所述 O-tRNA; 和

[0057] (iv) 编码所述绿色荧光蛋白的核酸, 例如, 但不限于, SEQ ID NO:6, 其中所述核酸含有所述 O-tRNA 特异性识别的至少一个选择密码子 (任选地为琥珀密码子);

[0058] (b) 将所述正交 tRNA 序列和编码所述正交氨酰基-tRNA 合成酶的核苷酸序列以及编码所述目标蛋白质的核酸序列克隆并转化到适当的宿主细胞中, 在培养基中加入 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物, 在所述目标蛋白质 (即绿色荧光蛋白) 的翻译过程中, 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物氨酰化的正交 RNA 识别编码绿色荧光蛋白的 mRNA 上的选择密码子以及 8-羟基喹啉丙氨酸, 从而介导 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物定点插入所述目标蛋白质的特定位置 (即, 所述选择密码子对应的氨基酸位置)。

[0059] 其中, 术语“8-羟基喹啉丙氨酸的结构类似物”是指选自 8-羟基喹啉丙氨酸的盐或酯、对羟基苯基丙氨酸或对羟基苯基丙氨酸的盐或酯的化合物。

[0060] 本发明还提供利用本发明的 8-羟基喹啉丙氨酸翻译系统产生的含有 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物的荧光蛋白突变体, 所述荧光蛋白突变体的氨基酸序列为 SEQ ID NO:7。

[0061] 另外, 本发明人进一步研究了在氨基酸序列中引入了 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物的蛋白突变体的应用, 研究结果发现, 超容易折叠绿色荧光蛋白突变体 sfGFP-151-HqA1a 具有很强的铜离子结合能力, 对铜离子的亲和力为 0.1 fM, 可以用于螯合去除铜离子; 并且 sfGFP-66-HqA1a 还在 N 末端和 C 末端分别加入一段六肽的接头 GGTGGS 后形成的突变蛋白 cpsfGFP-66-HqA1a 可以作为特异性锌离子传感器。

[0062] 本发明还涉及一种通过遗传编码包含 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物的突变蛋白质来拓展蛋白功能的方法, 所述方法包括: 利用本发明所述的 8-羟基喹啉丙氨酸翻译系统或所述的产生在至少一个所选位置定点特异性插入 8-羟基喹啉丙氨酸的突变蛋白质的方法来生产包含 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物的突变蛋白质, 所产生的突变蛋白质具有螯合金属离子的能力, 并且能够作为特异性金属离子传感器。

[0063] 最后, 本发明人经过筛选, 还获得了一种能够催化 8-羟基喹啉生成 8-羟基喹啉丙氨酸的酪氨酸酚裂解酶 (简称为 TPL) 突变体, 其氨基酸序列为:

[0064] (1) SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列, 或

[0065] (2) 将 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列经过一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加且具有与 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列相同的催化 8-羟基喹啉生成 8-羟基喹啉丙氨酸的酶活性的由 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列衍生的氨基酸序列。

[0066] 优选地, 所述酪氨酸酚裂解酶突变体的氨基酸序列为 SEQ ID NO:5。分子模型表明, 与野生型酪氨酸酚裂解酶 (氨基酸序列为 SEQ ID NO:11) 相比较, 该突变体的 288 位和 448 位氨基酸分别突变为丝氨酸和半胱氨酸后显著地扩大了酶口袋, 使酶和底物可以更好地作用, 从而高效地催化 8-羟基喹啉生成 8-羟基喹啉丙氨酸。酶催化反应液经过 HPLC 纯化后产率可达到 40%, 最终获得较高产量的 8-羟基喹啉丙氨酸。

[0067] 此外, 本领域技术人员应该理解, 在本发明中, 术语“能够催化 8-羟基喹啉生成

8-羟基喹啉丙氨酸的酪氨酸酚裂解酶突变体”不仅包括 SEQ ID NO :5 所示的氨基酸序列,还包括 SEQ ID NO :5 所示的氨基酸序列的功能片段或功能衍生物,即,所述功能片段保留催化 8-羟基喹啉生成 8-羟基喹啉丙氨酸的酶活性,所述功能衍生物是指将 SEQ ID NO :5 所示的氨基酸序列经过一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加且具有与 SEQ ID NO :5 所示的氨基酸序列相同的催化 8-羟基喹啉生成 8-羟基喹啉丙氨酸的酶活性的由 SEQ ID NO :5 所示的氨基酸序列衍生的氨基酸序列。

[0068] 本发明还涉及编码所述酪氨酸酚裂解酶突变体的核苷酸序列。

[0069] 本发明还涉及一种制备 8-羟基喹啉丙氨酸的方法,所述方法包括用上述酪氨酸酚裂解酶突变体催化 8-羟基喹啉,生成所述的 8-羟基喹啉丙氨酸。

[0070] 综上所述,本发明提供下述:

[0071] 1. 一种正交氨酰基-tRNA 合成酶,其含有的氨基酸序列选自自由 SEQ ID NO :4 所示氨基酸序列和 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列的保守性变体组成的组,所述保守性变体具有与 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列相同的酶活性。

[0072] 2. 一种翻译系统,所述系统包含:

[0073] (i) 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物;

[0074] (ii) 第 1 项所述的正交氨酰基-tRNA 合成酶;

[0075] (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 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物优先氨酰化所述正交 tRNA;和

[0076] (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,

[0077] 其中所述 8-羟基喹啉丙氨酸的结构类似物选自 8-羟基喹啉丙氨酸的盐或酯、对羟基苯基丙氨酸或对羟基苯基丙氨酸的盐或酯。

[0078] 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,所述选择密码子是琥珀密码子。

[0079] 4. 如第 2 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。

[0080] 5. 一种宿主细胞,其包含编码第 1 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。

[0081] 6. 一种产生在至少一个所选位置定点特异性插入 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物的突变蛋白质的方法,所述方法包括下述步骤:

[0082] (a) 提供第 2 项所述的翻译系统,该系统包含:

[0083] (i) 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物;

[0084] (ii) 第 1 项所述的正交氨酰基-tRNA 合成酶;

[0085] (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 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物优先氨酰化所述正交 tRNA;和

[0086] (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

[0087] (b) 将所述正交 tRNA 序列和编码所述正交氨酰基-tRNA 合成酶的核苷酸序列以及编码所述目标蛋白质的核酸序列克隆并转化到适当的宿主细胞中,在培养基中加入 8-羟

基喹啉丙氨酸或其结构类似物,在所述目标蛋白质的翻译期间,8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物氨酰化的正交 tRNA 识别编码所述目标蛋白质的 mRNA 上的选择密码子以及 8-羟基喹啉丙氨酸,从而介导 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物定点特异性插入所述选择密码子对应的氨基酸位置,从而产生在所选位置含 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物的所述目标蛋白质,

[0088] 其中所述 8-羟基喹啉丙氨酸的结构类似物选自 8-羟基喹啉丙氨酸的盐或酯、对羟基苯基丙氨酸或对羟基苯基丙氨酸的盐或酯。

[0089] 7. 一种通过遗传编码包含 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物的突变蛋白质来拓展蛋白功能的方法,所述方法包括:利用第 6 项所述的方法生产包含 8-羟基喹啉丙氨酸或其结构类似物的突变蛋白质,所产生的突变蛋白质具有螯合金属离子的能力,并且能够作为特异性金属离子传感器。

[0090] 8. 一种酪氨酸酚裂解酶突变体,所述酪氨酸酚裂解酶突变体催化 8-羟基喹啉生成 8-羟基喹啉丙氨酸,其氨基酸序列为:

[0091] (1) SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列,或

[0092] (2) 将 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列经过一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加且具有与 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列相同的催化 8-羟基喹啉生成 8-羟基喹啉丙氨酸的酶活性的由 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列衍生的氨基酸序列。

[0093] 9. 编码第 8 项的酪氨酸酚裂解酶突变体的核苷酸序列。

[0094] 10. 一种制备 8-羟基喹啉丙氨酸的方法,所述方法包括用第 8 项的酪氨酸酚裂解酶突变体催化 8-羟基喹啉,生成所述的 8-羟基喹啉丙氨酸。

[0095] 3、有益效果

[0096] 本发明旨在通过遗传编码螯合金属离子的非天然氨基酸来拓展蛋白功能,其中螯合金属离子的非天然氨基酸优选为 8-羟基喹啉丙氨酸,目标蛋白优选为荧光蛋白。通过在超容易折叠绿色荧光蛋白 sfGFP,超容易折叠黄色荧光蛋白 sfYFP,光转换单体橙色荧光蛋白 PsmOrange 和深红色荧光蛋白 eqFP650 中定点特异地插入 8-羟基喹啉丙氨酸后,这几种突变蛋白的激发/发射波长均出现了不同程度的移动,发射波长均红移 30nm 左右,尤其是 eqFP650 突变体,激发和发射波长分别为 622 和 680nm,这是迄今为止报道的类似绿色荧光蛋白中远红外区的最大发射波长。这些蛋白突变体均能作为体内成像研究的标记物,增加探测的灵敏度,进行深层组织成像或者作为荧光能量共振转移传感器。同时,本发明中的 sfGFP-151-HqA1a 突变体(即,将野生型绿色荧光蛋白 sfGFP 第 151 位的氨基酸突变为 8-羟基喹啉丙氨酸(HqA1a))相比于 GFP-151-pyTyr(即,将野生型绿色荧光蛋白 GFP 第 151 位的氨基酸突变为吡唑酪氨酸(pyTyr),参见申请号为 201210285659.7,发明名称为“3-吡唑基酪氨酸翻译系统及其应用”的专利申请)拥有更强的铜离子结合能力,其对铜离子的亲和力是 GFP-151-pyTyr 的九百万倍,证明 8-羟基喹啉丙氨酸比 3-吡唑酪氨酸更适宜做光诱导电子传递探针从而研究蛋白中的电子传递。通过进一步的遗传进化,突变体 cpsfGFP-66-HqA1a 还可以作为锌离子传感器,而锌离子在细胞中发挥着至关重要的作用,敏感特异的锌离子感应器使得我们能够更深入地研究各种调控机理,如酶催化反应,细胞代谢,基因表达和神经传递等。

[0097] 另外,由于野生型酪氨酸酚裂解酶无法催化生成 8-羟基喹啉丙氨酸,我们通过进

化酪氨酸酚裂解酶 (TPL),使其可以直接催化 8- 羟基喹啉生成 8- 羟基喹啉丙氨酸,得到一种酪氨酸酚裂解酶突变体,其氨基酸序列为 SEQ ID NO :5,使用该酪氨酸酚裂解酶突变体只需一步反应就可以达到 40%的产率,最终能够较容易地获得大量定点插入 8- 羟基喹啉丙氨酸的突变蛋白质。与传统的化学法合成相比,该种微生物酶法生物合成非天然氨基酸具有工艺简单、产量稳定等优点,同时,避免了化学合成过程中所涉及到的重金属催化,致癌溶剂及强酸强碱,并且不需要经过后续复杂的过柱纯化步骤就能够得到大量的目标产物。

附图说明

- [0098] 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:
- [0099] 图 1 是 TPL 突变体 (SEQ ID NO :5) 催化合成 8- 羟基喹啉丙氨酸的反应式;
- [0100] 图 2 是薄层层析法筛选 TPL 突变体;
- [0101] 图 3 是 HqA1a 的 HPLC 纯化图谱;
- [0102] 图 4 是 HqA1a 的质谱图;
- [0103] 图 5 是正交 tRNA、野生型酪氨酰 tRNA 合成酶、本发明的正交氨酰基 -tRNA 合成酶、酪氨酸酚裂解酶 (TPL) 突变体、荧光蛋白突变体的序列;
- [0104] 图 6 是 sfGFP-66-HqA1a 的 SDS-PAGE 电泳图;
- [0105] 图 7 是 sfGFP-66-HqA1a 的质谱图;
- [0106] 图 8 是 sfGFP-66-HqA1a 的高分辨率晶体结构图;
- [0107] 图 9: 图 9A 是 sfGFP-66-HqA1a, sfYFP-66-HqA1a, PsmOrange-72-HqA1a 和 eqFP650-67-HqA1a 的吸收和发射光谱图;图 9B 是野生型 sfGFP, sfYFP, PsmOrange, eqFP650 和突变体 sfGFP-66-HqA1a, sfYFP-66-HqA1a, PsmOrange-72-HqA1a 和 eqFP650-67-HqA1a 的发色团化学结构示意图;
- [0108] 图 10:图 10A 是 1 μ M cpsfGFP-66-HqA1a 加入不同金属离子后的荧光强度;图 10B 是表达 cpsfGFP-66-HqA1a 的大肠杆菌细胞分别在加入锌离子前 (左上图是共聚焦荧光图,右上图是可见光图) 和加入锌离子后 (左下图是共聚焦荧光图,右下图是可见光图) 的荧光成像图;图 10C 是 sfGFP-66-HqA1a 的结构图;图 10D 是 cpsfGFP-66-HqA1a 的结构图。

具体实施方式

[0109] 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。

[0110] 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。

[0111] 实施例 1:8- 羟基喹啉丙氨酸 (HqA1a) 的生物催化合成 (图 1- 图 4)

[0112] 本发明采用生物酶催化的方法,利用从弗氏柠檬酸细菌 (ATCC8090,购自美国典型培养物保藏中心 (ATCC)) 中克隆出的酪氨酸酚裂解酶 (TPL) 催化 8- 羟基喹啉合成 8- 羟基喹啉丙氨酸,催化反应式见图 1。

[0113] 但是实验结果表明,野生型酪氨酸酚裂解酶 (TPL,氨基酸序列为 SEQID NO :11) 无法催化生成 8- 羟基喹啉丙氨酸。因此,本发明人分析了 TPL 的晶体结构图,挑选出 448 位苯丙氨酸、36 位苯丙氨酸和 288 位甲硫氨酸,引入 NNK 突变 (N = A+T+C+G ;K = T+G),构建

成 pEt-TPL 突变库来进行 TPL 的定向进化。从突变库挑选出 1024 个单克隆,用 96 孔板培养过夜后,加入溶菌酶裂解细胞,然后加入 8-羟基喹啉、氯化铵和丙酮酸钠,37℃ 孵育 4h,用茚三酮薄层色谱法检测氨基酸的形成。结果表明(图 2),其中一个克隆成功地催化形成了 8-羟基喹啉丙氨酸。测序结果显示,该酪氨酸裂解酶突变体的氨基酸序列为 SEQ ID NO:5,与野生型 TPL(氨基酸序列为 SEQ ID NO:11)相比,该突变体的 288 位由甲硫氨酸突变成了丝氨酸,448 位由苯丙氨酸突变成了半胱氨酸。使用该酪氨酸裂解酶突变体只需一步反应就可以达到 40% 的产率,最终能够较容易地获得大量定点插入 8-羟基喹啉丙氨酸的突变蛋白质。

[0114] 我们将筛选得到的 TPL 突变体进行放大培养,然后收菌,离心,超声破碎,采用镍柱纯化,得到突变蛋白酶。取 30mM 乙酸铵、20mM 8-羟基喹啉(购自北京百灵威公司)、60mM 丙酮酸钠、5mM 巯基乙醇、50 μ M 磷酸吡哆醛和 10mg 突变蛋白酶,定容至 1L, pH8.0,然后室温避光搅拌 7 天。收集水相,通过 HPLC 分离纯化得到白色粉末(图 3),产率 40%。产物经过质谱检测,发现其分子量为 235Da(图 4),与理论分子量 235Da 吻合。

[0115] 以上合成反应所需化学试剂如无特别说明,均购自 Sigma 公司,均为分析纯以上级别。

[0116] 另外,本领域技术人员应该理解,在本发明中,术语“能够催化 8-羟基喹啉生成 8-羟基喹啉丙氨酸的酪氨酸裂解酶突变体”不仅包括 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列,还包括 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列的功能片段或功能衍生物,即,所述功能片段保留催化 8-羟基喹啉生成 8-羟基喹啉丙氨酸的酶活性,所述功能衍生物是将 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列经过一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加且具有与 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列相同的催化 8-羟基喹啉生成 8-羟基喹啉丙氨酸的酶活性的由 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列衍生的氨基酸序列。

[0117] 实施例 2:进化 HqA1a 特异性氨酰基-tRNA 合成酶

[0118] 为了在基因中位点特异性插入 HqA1a,需要在所用的 E. coli 宿主细胞中引入氨酰基-tRNA 合成酶/tRNA 正交对,这个正交对来源于詹氏甲烷球菌(Methanococcus jannaschii)琥珀抑制酪氨酰 tRNA(MjtRNA_{CUA}^{Tyr})/酪氨酰 tRNA 合成酶(MjTyrRS,野生型,其氨基酸序列为 SEQ ID NO:2)对。MjTyrRS 突变库构建在卡纳霉素抗性 pBK 质粒(购自美国 scripps 研究所 Peter G. Schultz 实验室)中,位于该质粒上 E. coli 谷氨酰胺合成酶的启动子和终止子之间。所使用的合成酶突变库为 pBk-lib-jw1 库,该突变库的构建方法为:在 MjTyrRS 基因上挑选 6 个位点(Tyr32,Leu65,Phe108,Gln109,Asp158,和 Leu162)引入 NNK 突变(N = A+T+C+G;K = T+G),另外 6 个位点(Ile63,Ala67,His70,Tyr114,Ile159,Val164)或随机突变为 Gly 或保持不变(参见 Xie, J.;Liu, W. S.;Schultz, P. G. Angew. Chem., Int. Ed. 2007, 46, 9239-9242;Wang, JY.;Zhang W.;Song WJ;et al. J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 14812-14818)。

[0119] 通过正负筛选来进化特异性识别 HqA1a 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,以及氨苄青霉素抗性基因。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, pH7.0; 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 HqA1a, 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。

[0120] 最后一轮正筛选挑 384 个克隆, 分别点板在含有 1mM HqA1a、氯霉素 60, 80, 100, 120mg/L 的 GMML 固体培养基上, 及不包含 HqA1a、但包含氯霉素 0, 20, 40, 60mg/L 的 GMML 固体培养基。挑选在 1mM HqA1a 100mg/L 氯霉素的培养基上生长, 而在 0mM F2Y, 浓度大于 20 μg/mL 氯霉素培养基中不生长的克隆进行进一步验证。最终挑出 1 个克隆, 插入 8-羟基喹啉丙氨酸效率最高, 测序表明, 克隆所包含的氨酰基-tRNA 合成酶突变体 (HqA1aRS) 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:4 所示, 其中突变位点为 Y32H, 153V, L65H, H70G, F108R, Q109V, D158N, L162D 和 V164G。

[0121] 本领域技术人员应该理解, 在本发明中, 除了 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列之外, 术语“正交氨酰基-tRNA 合成酶”或“正交 8-羟基喹啉丙氨酸氨酰基-tRNA 合成酶”还包括 SEQ ID NO:4 所示氨基酸序列的保守性变体, 只要所述保守性变体具有与 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列相同的酶活性即可; 并且还包括将 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列经过一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加且具有与 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列相同的酶活性的由 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列衍生的氨基酸序列。

[0122] 实施例 3: 表达 HqA1a-绿色荧光蛋白及质谱鉴定

[0123] 将正交 tRNA (SEQ ID NO:1) 和筛选出来的编码 HqA1aRS 的核苷酸序列 (SEQ ID NO:3) 构建到 pEVOL 载体 (购自美国 scripps 研究所 Peter G. Schultz 实验室) 上, 编码超容易折叠绿色荧光蛋白的核苷酸序列 (66TAG) (SEQ ID NO:6) 构建到 pET22b 载体 (购自 Novagen 公司) 上, 然后共转化到大肠杆菌 BL21 感受态细胞 (购自全式金公司) 中。挑取单个克隆在至含有 50 μg/mL 氨苄霉素和 30 μg/mL 氯霉素的 5ml LB 培养基中, 37°C 培养 12 小时。然后将 1ml 以上培养液在含有以上抗生素的 100ml LB 培养基中扩大培养, 到 OD₆₀₀ 约等于 1.1 时, 向 LB 培养基中加入 1mM HqA1a, 1mM IPTG 及 0.2% 阿拉伯糖 (购自 sigma 公司) 培养细胞, 对照不加入 HqA1a。12 小时之后, 收菌, Ni-NTA 纯化蛋白, 并用 SDS-PAGE 电泳分析 (图 6)。

[0124] 我们发现, 只有在存在 HqA1a 的培养基中才能纯化出全长的超折叠绿色荧光蛋白, 这说明筛选出来的 HqA1aRS 可以特异性的识别 HqA1a。在 LB 培养基中 HqA1a-超折叠绿色荧光蛋白的产率为 20mg/L, 而野生型蛋白的产率为 100mg/L。为了检测 HqA1a 仅仅插入到超折叠绿色荧光蛋白的 66 位琥珀突变位点, 我们对 sfGFP-66-HqA1a 进行了 ESI-TOF 质谱检测, 检测结果分子量为 27342Da (图 7), 与计算的分子量 27342Da 吻合。

[0125] 突变蛋白质 sfGFP-66-HqA1a 的激发和发射波长分别为 537 和 544nm, 相比野生型 sfGFP 产生了约 30nm 的红移, 我们解析了 sfGFP-66-HqA1a 的晶体结构 (图 8), 发现 HqA1a 参与了 sfGFP 蛋白中发色团的形成, 且 HqA1a 的喹啉环和发色团中的咪唑啉酮环基本共平面, 这为突变蛋白质的红移现象提供了结构基础。

[0126] 实施例 4: 表达 HqA1a- 荧光蛋白突变体进行激发 / 发射光谱研究

[0127] 我们用基因工程方法构建了超容易折叠黄色荧光蛋白 sfYFP (SEQ ID NO :8), 光转换单体橙色荧光蛋白 PsmOrange (SEQ ID NO :9) 和深红色荧光蛋白 eqFP650 (SEQ ID NO :10) 突变体, 然后用实施例 3 中的相同方法在荧光蛋白突变体的特定定点特异性插入 HqA1a, 表达产生突变蛋白 sfYFP-66-HqA1a, PsmOrange-72-HqA1a 和 eqFP650-67-HqA1a, 然后分别测量了这些突变蛋白的激发 / 发射光谱, 结果如图 9 所示, 定点特异地插入 8- 羟基喹啉丙氨酸后导致这几种突变蛋白的发射波长均红移 30nm 左右, 尤其是 eqFP650 突变体, 激发和发射波长分别为 622 和 680nm, 这是迄今为止报道的类绿色荧光蛋白中远红外区的最大发射波长。

[0128] 实施例 5: 表达 HqA1a- 绿色荧光蛋白进行铜离子亲和力测定

[0129] 我们用与实施例 3 相同的方法表达产生了突变蛋白 sfGFP-151-HqA1a 并测定了其铜离子结合能力。在 60mM Tris-HCl, pH7.0 缓冲液中加入 $1 \mu\text{M}$ sfGFP-151-HqA1a 和 $1 \mu\text{M}$ Cu(II), 对照不加入 Cu(II), 然后进行荧光强度测定。结果显示加入 $1 \mu\text{M}$ Cu(II) 可导致 65% 的荧光淬灭, 表明 8- 羟基喹啉丙氨酸和 3- 吡唑酪氨酸 (参见申请号为 201210285659.7, 发明名称为“3- 吡唑基酪氨酸翻译系统及其应用”的专利申请) 结合铜离子后均可作为电子受体, 与作为电子供体的 GFP 发色基团产生光诱导电子传递从而导致荧光淬灭。但是 sfGFP-151-HqA1a 拥有更强的铜离子结合能力, 其对铜离子的亲和力为 0.1fM, 是 GFP-151-pyTyr 的九百万倍。

[0130] 实施例 6: 表达 HqA1a- 绿色荧光蛋白突变体作为锌离子传感器

[0131] 为了验证 sfGFP 定点插入 HqA1a 后是否可以作为锌离子传感器, 我们在 60mM Tris-HCl, pH7.0 缓冲液中加入 $2 \mu\text{M}$ sfGFP-66-HqA1a 和 $100 \mu\text{M}$ 氯化锌, 但是没有检测到任何荧光信号变化。于是, 我们将 sfGFP-66-HqA1a 进行进一步的改造, 在蛋白的 N 末端和 C 末端分别加入一段六肽的接头 GGTGGS, 形成突变蛋白 cpsfGFP-66-HqA1a (图 10C, 图 10D), 然后再加入氯化锌, 发现荧光信号增强了 7.2 倍。接着, 我们检测了 cpsfGFP-66-HqA1a 结合其他金属离子的能力, 往突变蛋白中分别加入 $100 \mu\text{M}$ 的 Cu(II), Fe(II), Co(II) 和 Ni(II) 等多种金属离子, 结果如图 10A 所示, 除了锌离子, 其他金属离子均没有显著增加突变蛋白的荧光强度, 证明 cpsfGFP-66-HqA1a 可以作为特异性锌离子传感器。

[0132] 为了检测 cpsfGFP-66-HqA1a 在活细胞内是否也可以作为锌离子传感器, 我们将 cpsfGFP-66-HqA1a 和 pEOV-HqA1aRS 质粒共转化到大肠杆菌细胞内, 在含有 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄霉素和 $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素的培养基中, 37°C 培养到 OD_{600} 约等于 1.1 时, 向 LB 培养基中加入 0.5mM HqA1a, 1mM IPTG 及 0.2% 阿拉伯糖, 继续培养 12 小时之后, 收菌, 加入 $100 \mu\text{M}$ Zn(II), 同时以不加入 Zn(II) 的菌液作为对照, 在荧光显微镜下观察, 发现没有加入 Zn(II) 的细胞荧光强度很弱, 而加入 Zn(II) 后, 荧光强度显著增强 (图 10B), 证明 cpsfGFP-66-HqA1a 在活细胞内也可有效地结合锌离子。

[0133] 应该理解, 尽管参考其示例性的实施方案, 已经对本发明进行具体地显示和描述,

但是本领域的普通技术人员应该理解,在不背离由权利要求所定义的本发明的精神和范围
的条件下,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

IB130369序列表.txt

<110> 中国科学院生物物理研究所

<120> 8-羟基喹啉丙氨酸翻译系统及其应用

<130> IB130369

<160> 11

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 77

<212> DNA

<213> 正交tRNA

<400> 1

tggtcggcg ggccggattt gaaccagcgc catcgggatt tagagtccgc cgttctgccc 60

tgctgaacta ccgccgg 77

<210> 2

<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> 2

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

[0002]

IB130369序列表.txt

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Leu His His His His His His
 305 310

<210> 3

<211> 921

<212> DNA

<213> 本发明的正交氨酰基-tRNA合成酶 (HqAIaRS)

<400> 3

atggacgaat ttgaaatgat aaagagaaac acatctgaaa ttatcagega ggaagagtta 60

agagagggtt taaaaaaaga tgaaaaatct getcatatag gttttgaacc aagtggtaaa 120

atacacttag ggcattatct ccaataaaa aagatggttg atttacaana tgctggattt 180

gatataatta tacatttggc tgatttaggt gccattttaa accagaaagg agagttggat 240

gagattagaa aaataggaga ttatacaaaa aaagtttttg aagcaatggg gttaaaggca 300

[0003]

IB130369序列表.txt

aaatatgttt atggaagtga acgtgttctt gataaggatt atacactgaa tgtctataga 360
 ttggctttaa aaactacctt aaaaagagca agaaggagta tggaacttat agcaagagag 420
 gatgaaaate caaaggttgc tgaagttatc tatccaataa tgcaggttaa taatattcat 480
 tatgatggcg gtgatgttgc agttggaggg atggagcaga gaaaaataca catgttagca 540
 agggagcttt taccaaaaaa ggttgtttgt attcacaacc ctgtcttaac gggtttggat 600
 ggagaaggaa agatgagtic ttcaaaaggg aattttatag ctgttgatga cctccagaa 660
 gagattaggg ctaagataaa gaaagcatac tgcccagctg gagttgttga aggaaatcca 720
 ataatggaga tagctaaata ctctcttgaa tctcttttaa ccataaaaag gccagaaaaa 780
 tttggtggag atttgacagt taatagctat gaggagttag agagtttatt taaaaataag 840
 gaattgcate caatggattt aaaaaatgct gtagetgaag aacttataaa gatttttagag 900
 ccaattagaa agagattata a 921

<210> 4

<211> 306

<212> PRT

<213> 本发明的正交氨酰基-tRNA合成酶 (HqA1aRS)

<400> 4

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

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala His
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 Val Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

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

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

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Arg Val 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 Asn Ile His
145 150 155 160

[0004]

IB130369序列表.txt

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Leu
 305

<210> 5

<211> 456

<212> PRT

<213> 酪氨酸酯裂解酶(TPL)突变体

<400> 5

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

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

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

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

Met Met Gly Asp Glu Ala Tyr Ala Gly Ser Glu Asn Phe Tyr His Leu
 65 70 75 80

Glu Arg Thr Val Gln Glu Leu Phe Gly Phe Lys His Ile Val Pro Thr
 85 90 95

[0005]

IB130369序列表.txt

His Gln Gly Arg Gly Ala Glu Asn Leu Leu Ser Gln Leu Ala Ile Lys
100 105 110

Pro Gly Gln Tyr Val Ala Gly Asn Met Tyr Phe Thr Thr Thr Arg Tyr
115 120 125

His Gln Glu Lys Asn Gly Ala Val Phe Val Asp Ile Val Arg Asp Glu
130 135 140

Ala His Asp Ala Gly Leu Asn Ile Ala Phe Lys Gly Asp Ile Asp Leu
145 150 155 160

Lys Lys Leu Gln Lys Leu Ile Asp Glu Lys Gly Ala Glu Asn Ile Ala
165 170 175

Tyr Ile Cys Leu Ala Val Thr Val Asn Leu Ala Gly Gly Gln Pro Val
180 185 190

Ser Met Ala Asn Met Arg Ala Val Arg Glu Leu Thr Glu Ala His Gly
195 200 205

Ile Lys Val Phe Tyr Asp Ala Thr Arg Cys Val Glu Asn Ala Tyr Phe
210 215 220

Ile Lys Glu Gln Glu Gln Gly Phe Glu Asn Lys Ser Ile Ala Glu Ile
225 230 235 240

Val His Glu Met Phe Ser Tyr Ala Asp Gly Cys Thr Met Ser Gly Lys
245 250 255

Lys Asp Cys Leu Val Asn Ile Gly Gly Phe Leu Cys Met Asn Asp Asp
260 265 270

Glu Met Phe Ser Ser Ala Lys Glu Leu Val Val Val Tyr Glu Gly Ser
275 280 285

Pro Ser Tyr Gly Gly Leu Ala Gly Arg Asp Met Glu Ala Met Ala Ile
290 295 300

Gly Leu Arg Glu Ala Met Gln Tyr Glu Tyr Ile Glu His Arg Val Lys
305 310 315 320

Gln Val Arg Tyr Leu Gly Asp Lys Leu Lys Ala Ala Gly Val Pro Ile
325 330 335

Val Glu Pro Val Gly Gly His Ala Val Phe Leu Asp Ala Arg Arg Phe
340 345 350

Cys Glu His Leu Thr Gln Asp Glu Phe Pro Ala Gln Ser Leu Ala Ala
355 360 365

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

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

[0006]

IB130369序列表.txt

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

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

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

Phe Thr Ala Arg Phe Asp Tyr Ile
 450 455

<210> 6

<211> 726

<212> DNA

<213> 含有66位8-羟基喹啉丙氨酸的绿色荧光蛋白突变体 (sfGFP-66- HqAla)

<400> 6

```

atgtccaagg gcgaagagct ettcaccgga gttgttccaa tectcgtaga actggacggt      60
gatgttaacg gccacaaatt ttctgtgegt ggtgagggcg aaggtgaecg taccaacggc      120
aaactgactc tgaaatttat ctgcaccacc ggcaaaactgc cggttccgtg gccgacctg      180
gtaactacc tcacttaggg tgtccagtgc ttctctcgtt accccgacca catgaaacgt      240
cactgacttc tcaaaagegc tatgcgggag ggttacgttc aggaacgtac gattagcttc      300
aaggatgaeg gtacetacaa aactcgtgeg gaagttaaat tegagggaga caccctggtg      360
aaccgtatcg aactgaaagg tattgacttc aaggaggatg gcaatatact gggtcacaag      420
ctggagtata acttcaatag ccacaacgtg tacatcactg ctgataaaca gaaaacgggt      480
atcaaggeta acttcaaaat tegccacaac gtagaagacg gctccgttca gctggtgac      540
cactaccagc agaacacccc gateggegac ggtccagtac tgctgcctga caaccactat      600
ctgtccacgc agtccgttct gctaaagac ccgaacgaga aacgegatac catggttctg      660
ctggaattcg ttactgctgc tggcatcact cacggtatgg acgaaetega gcaccaccac      720
caccac                                             726
  
```

<210> 7

<211> 243

<212> PRT

<213> 含有66位8-羟基喹啉丙氨酸的绿色荧光蛋白突变体 (sfGFP-66- HqAla),
 其中*表示引入的8-羟基喹啉丙氨酸,

<400> 7

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

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

Gly Glu Gly Asp Ala Thr Asn Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys

[0007]

IB130369序列表.txt

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

His His

- <210> 11
- <211> 456
- <212> PRT
- <213> 野生型酪氨酸酯裂解酶

<400> 11

Met Asn Tyr Pro Ala Glu Pro Phe Arg Ile Lys Ser Val Glu Thr Val 1 5 10 15		
Ser Met Ile Pro Arg Asp Glu Arg Leu Lys Lys Met Gln Glu Ala Gly 20 25 30		
Tyr Asn Thr Phe Leu Leu Asn Ser Lys Asp Ile Tyr Ile Asp Leu Leu		

[0011]

IB130369序列表.txt

	35	40	45
	Thr Asp Ser Gly Thr Asn Ala Met Ser Asp Lys Gln Trp Ala Gly Met 50	55	60
	Met Met Gly Asp Glu Ala Tyr Ala Gly Ser Glu Asn Phe Tyr His Leu 65	70	75 80
	Glu Arg Thr Val Gln Glu Leu Phe Gly Phe Lys His Ile Val Pro Thr 85	90	95
	His Gln Gly Arg Gly Ala Glu Asn Leu Leu Ser Gln Leu Ala Ile Lys 100	105	110
	Pro Gly Gln Tyr Val Ala Gly Asn Met Tyr Phe Thr Thr Thr Arg Tyr 115	120	125
	His Gln Glu Lys Asn Gly Ala Val Phe Val Asp Ile Val Arg Asp Glu 130	135	140
	Ala His Asp Ala Gly Leu Asn Ile Ala Phe Lys Gly Asp Ile Asp Leu 145	150	155 160
	Lys Lys Leu Gln Lys Leu Ile Asp Glu Lys Gly Ala Glu Asn Ile Ala 165	170	175
	Tyr Ile Cys Leu Ala Val Thr Val Asn Leu Ala Gly Gly Gln Pro Val 180	185	190
	Ser Met Ala Asn Met Arg Ala Val Arg Glu Leu Thr Glu Ala His Gly 195	200	205
	Ile Lys Val Phe Tyr Asp Ala Thr Arg Cys Val Glu Asn Ala Tyr Phe 210	215	220
	Ile Lys Glu Gln Glu Gln Gly Phe Glu Asn Lys Ser Ile Ala Glu Ile 225	230	235 240
	Val His Glu Met Phe Ser Tyr Ala Asp Gly Cys Thr Met Ser Gly Lys 245	250	255
	Lys Asp Cys Leu Val Asn Ile Gly Gly Phe Leu Cys Met Asn Asp Asp 260	265	270
	Glu Met Phe Ser Ser Ala Lys Glu Leu Val Val Val Tyr Glu Gly Met 275	280	285
	Pro Ser Tyr Gly Gly Leu Ala Gly Arg Asp Met Glu Ala Met Ala Ile 290	295	300
	Gly Leu Arg Glu Ala Met Gln Tyr Glu Tyr Ile Glu His Arg Val Lys 305	310	315 320
	Gln Val Arg Tyr Leu Gly Asp Lys Leu Lys Ala Ala Gly Val Pro Ile 325	330	335
	Val Glu Pro Val Gly Gly His Ala Val Phe Leu Asp Ala Arg Arg Phe		

[0012]

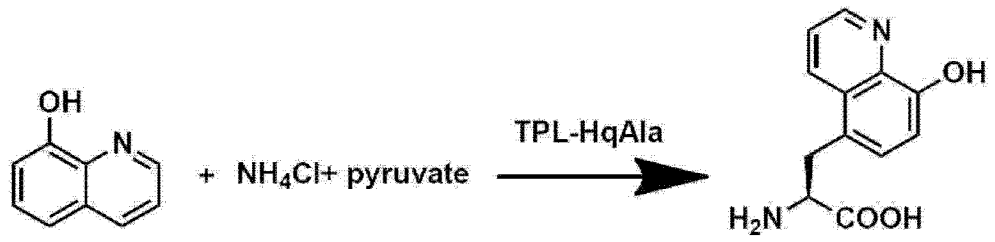


图 1

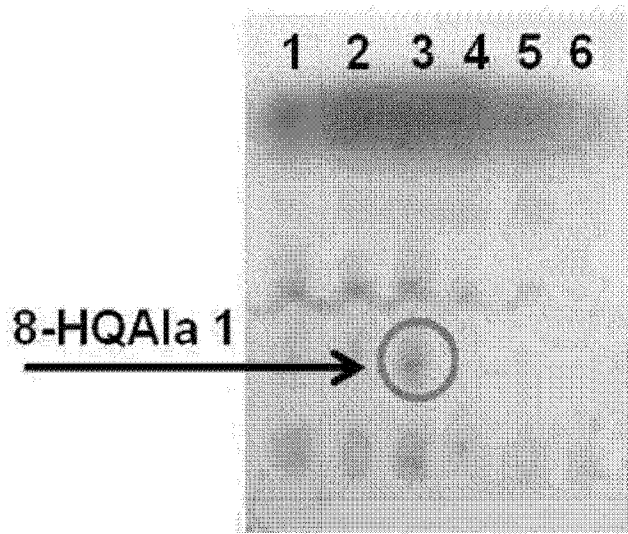


图 2

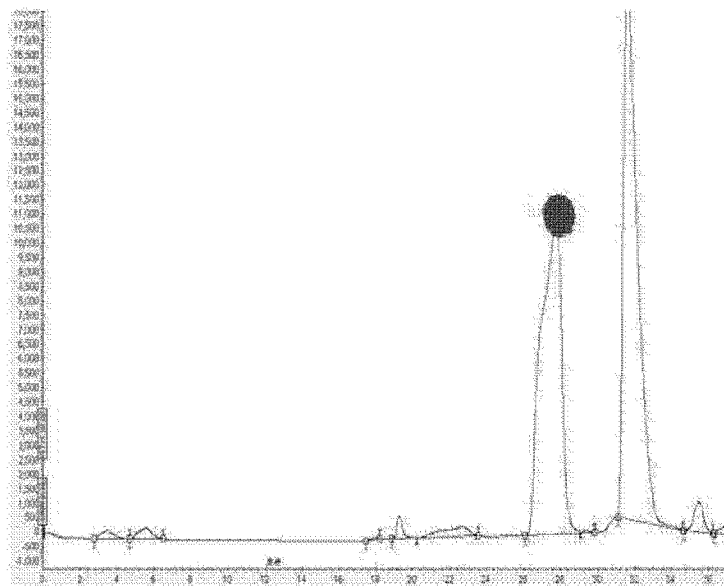


图 3

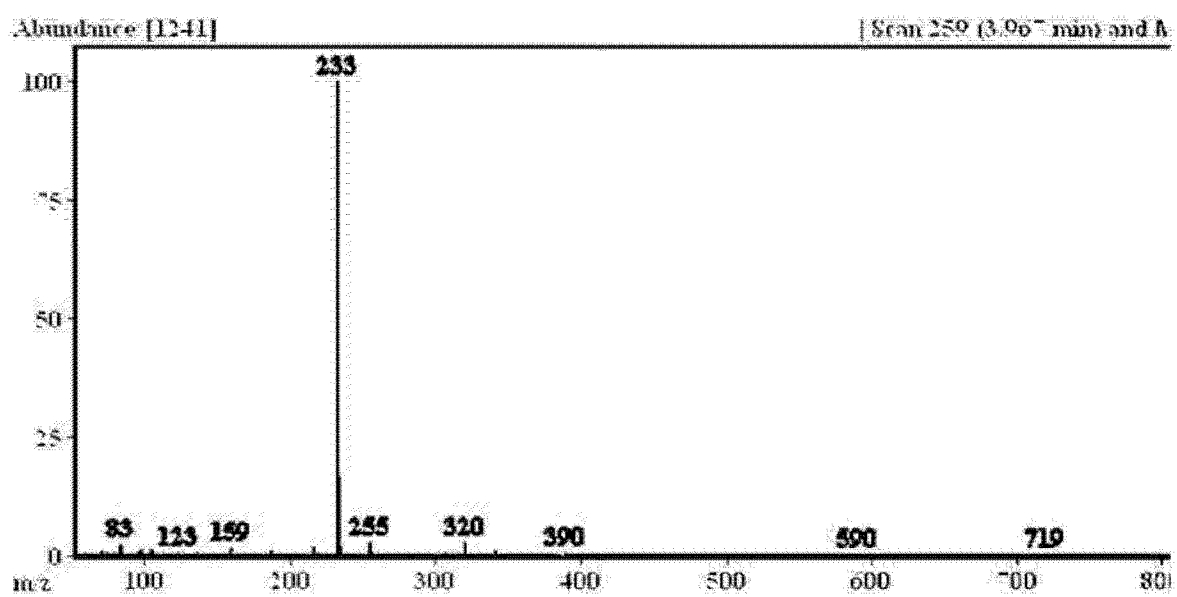


图 4

名称	核苷酸/氨基酸序列
正交 tRNA	SEQ ID NO: 1 tggtcgcgccggccggatttgaaccagcgccatgaggatttagagtcgcccgttctgcctgctgaactaccgcccgg
野生型酪氨酰 tRNA 合成酶 (MjTyrRS), 来源于詹氏甲烷球菌	氨基酸序列 (SEQ ID NO: 2): MDEFEMIKRNTSEIIEEELREVLKKDEKSAYIGFEPGKIHLGHYLQIKKIDLQNAAGFDIILLADLHAYLNQKGELDEIRKIGDYNNKKVFEAMGLKAKYVYGSEFQLDKDYTLNVYRLALKTTLKRARRSMELIAREDE NPKVAEVIYPIMQVNDIHYLGVDVAVGGMEQRKIHMLARELLPKKV VCIHNPVLTGLDGEGKMSSSKGNFIAVDDSPPEIRAKIKKAYCPAGVV EGNPIMEIAKYFLEYPLTIKRPEKFGDLTVNSYEELESFLKNEKELHP MDLKNVAEELIKILEPIRKRLHHHHHH
本发明的正交氨酰基-tRNA 合成酶 (HqAlaRS)	核苷酸序列 (SEQ ID NO: 3): ATGGACGAATTTGAAATGATAAAGAGAAAACACATCTGAAATTATCA GCGAGGAAGAGTTAAGAGAGGTTTTAAAAAAGATGAAAAATCT GCTCATATAGTTTTGAACCAAGTGGTAAAATACACTTAGGGCATT ATCTCCAAATAAAAAAGATGGTTGATTTACAAAATGCTGGATTTGA TATAATTATACATTTGGCTGATTTAGGTGCCTATTTAAACCAGAAAAG GAGAGTTGGATGAGATTAGAAAAATAGGAGATTATAACAAAAAAG TTTTTGAAGCAATGGGGTTAAAGGCAAAATATGTTTATGGAAGTGA ACGTGTCTTGATAAGGATTATACACTGAATGTCTATAGATTGGCTT TAAAACTACCTTAAAAAGAGCAAGAAGGAGTATGGAACCTTATAG CAAGAGAGGATGAAAATCCAAAGGTTGCTGAAGTTATCTATCCAAT AATGCAGGTTAATAATATTCATTATGATGGCGGTGATGTTGCAGTTG GAGGGATGGAGCAGAGAAAAATACACATGTTAGCAAGGGAGCTTT TACCAAAAAAGGTTGTTTGTATTCACAACCCTGTCTTAACGGGTTT GGATGGAGAAGGAAAGATGAGTTCTTCAAAGGGAATTTTATAGC TGTGATGACTCTCCAGAAGAGATTAGGGCTAAGATAAAGAAAGC ATACTGCCAGCTGGAGTTGTTGAAGGAAATCCAATAATGGAGATA GCTAAATACTTCCTTGAATATCCTTTAACCATAAAAAGGCCAGAAA AATTTGGTGGAGATTTGACAGTTAATAGCTATGAGGAGTTAGAGAG

	<p>TTTATTTAAAAATAAGGAATTGCATCCAATGGATTTAAAAAATGCTG TAGCTGAAGAACTTATAAAGATTTAGAGCCAATTAGAAAGAGATT ATAA</p> <p>氨基酸序列 (SEQ ID NO:4): MDEFEMIKRNTSEIIEEELREVLLKDEKSAHIGFEPSPGKIHLGHYLQI KKMVDLQNAGFDIIIHLADLGAYLNQKGELEIRKIGDYNKKVFEA MGLKAKYVYGSERVLDKDYTLNVYRLALKTTLKRARRSMELIARE DENPKVAEVIYPIMQVNNIHYDGGDVAVGGMEQRKIHLARELLPK KVVCIHNPVLTGLDGEGKMSSSKGNFIAVDDSPPEIRAKIKKAYCPAG VVEGNPIMEIAKYFLEYPLTIKRPEKFGGDLTVNSYEELESFLKNKEL HPMDLKNVAEELIKILEPIRKRL</p>
酪氨酸酯裂解酶 (TPL)突变体	<p>氨基酸序列 (SEQ ID NO: 5): MNYPAEPFRIKSVETVSMIPRDERLKKMQEAGYNTFLLNSKDIYIDL TDSGTNAMSDKQWAGMMMGDEAYAGSENFYHLERTVQELFGFKHI VPTHQGRGAENLLSQLAIKPGQYVAGNMYFTTTRYHQEKNGAVFVD IVRDEAHDAGLNIAFKGDIDLKQLKLIIDEKGAENIAYICLAVTVNLA GGQPVS MANMRVRELTEAHGKVFYDATRCVENAYFIKEQEQQFE NKSIAEIVHEMFSYADGCTMSGKKDCLVNI GGFLCMNDDEMFS ELVVVYEGSPSYGGLAGRMEAMAIGLREAMQY EYIEHRVKQVRYL GDKLKAAGVPIVEPVGGHAFVLDARRFCEHLTQDEFPAQSLAASIYV ETGVRSMERGIISAGRNNVTGEHHRPKLETVRLTIPRRVYTYAHMDV VADGIIKLYQHKEDIRGLKFIYEPKQLRCFTARFDYI</p>
含有 66 位 8-羟基喹 啉丙氨酸的绿色荧 光蛋白突变体 (sfGFP-66- HqAla)	<p>核苷酸序列 (SEQ ID NO: 6): ATGTC CAAGGGCGAAGAGCTCTTCAACCGGAGTTGTTCCAATCCTC GTAGAACTGGACGGTGATGTTAACGGCCACAAATTTTCTGTGCGT GGTGAGGGCGAAGGTGACGCTACCAACGGCAA ACTGACTCTGAA ATTTATCTGCACCACCGGCAA ACTGCCGGTTCCTGCGCCGACCTG GTA ACTACCCTCACTTAGGGTGTCCAGTCTCTCCTGTTACCCCG ACCACATGAAACGTCACGACTTCTTCAA AAGCGTATGCCGGAGG GTTACGTT CAGGAACGTACGATTAGCTTCAAGGATGACGGTACCTA CAAAACTCGTGCGGAAGTTAAATTCGAGGGAGACACCCTGGTGAA CCGTATCGAACTGAAAGGTATTGACTTCAAGGAGGATGGCAATATC CTGGGT CACAAGCTgGAGTATAACTTCAATAGCCACAACGTGTACA TCACTGCIGATAAACAGAAAAACGGTATCAAGGCTAACTTCAAAT TCGCCACAACGTAGAAAGACGGCTCCGTT CAGCTGGCTGACCACTA CCAGCAGAACACCCCGATCGGCGACGGTCCAGTACTGCTGCCTGA CAACCACTATCTGTCCACGCAGTCCGTTCTGTCTAAAGACCCGAAC GAGAAACGCGATCAGATGGTCTGCTGGAATTCGTTACTGCIGCTG GCATCACTCACGGTATGGACGAACTCGAGCACCACCACCACCAC</p> <p>氨基酸序列 (SEQ ID NO: 7), 其中*表示引入的 8-羟基喹啉丙氨酸, 第 1 位的甲硫氨酸为在大肠杆菌中表达而引入的起始氨基酸: MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATNGKLT LKFI CTTGKLPVPWPTLVTTLT*GVQCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYV QERTISFKDDGTYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKL EYNFN SHNVYITADKQKNGIKANFKIRHNVEDG SVQLADHYQQNTP IGDGPVLLPDNH YLSTQSVLSKDPNEKRDH MVLLFVTAAGITHGMD ELEHHHHHHH</p>
黄色荧光蛋白 sfYFP	<p>氨基酸序列 (SEQ ID NO: 8): MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATIGKLT LKFI TTGKLPVPWPTLVTTLTGYGLQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQ ERTISFKDDGKYKTRAVVKFEGDTLVNRIELKGTDFKEDGNILGHKL EYNFN SHNVYITADKQKNGIKANFTVRHNVEDG SVQLADHYQQNTP IGDGPVLLPDNH YLSYQTVLSKDPNEKRDH MVLLFVTAAGITLGM DELYKLEHHHHHHH</p>
橙色荧光蛋白	<p>氨基酸序列 (SEQ ID NO: 9):</p>

PsmOrange	MVSKGEENNMAIIKEFMRFKVRMEGTVNGHEFEIEGEGEGRPYEGF QTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPLFTYGSKAYVKHPADIPDYFKLSFPE GFKWERVMNYEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKMRGTNFPDGP VMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIRMRLKLDGGHYTSEVK TTYKAKKSVQLPGAYIVGIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGRHSTGG MDELYKLEHHHHHH
深红色荧光蛋白 eqFP650	氨基酸序列 (SEQ ID NO: 10): MGEDSELISENMHMKLYMEGTVNGHHFKCTSEGEGKPYEGTQTAKI KVVEGGPLPFAFDILATSFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWER ITTYEDGGVLTATQDTSLQNGCLIYNVKINGVNFPNSGPVMQKKTG WEASTEMLYPADSGLRGHSQMALKLVGGGYLHCSLKTTRYRKKPAK NLKMPGFYFVDRKLERIKEADKETYVEQHEMAVARYCDLPSKLGHS LEHHHHHH
野生型酪氨酸酚裂 解酶	氨基酸序列 (SEQ ID NO: 11): MNYPAEPFRIKSVETVSMIPRDERLKKMQEAGYNTFLLNSKDIYIDL TDSGTNAMSDKQWAGMMMGDEAYAGSENFYHLERTVQELFGFKHI VPTHQGRGAENLLSQLAIKPGQYVAGNMYFTTTRYHQEKNGAVFVD IVRDEAHDAGLNIAFKGDIDLKKLQKLIDEKGAENIAYICLAVTVNLA GGQPVS MANMRVRELTEAHGIKVFYDATRCVENAYFIKEQEQGFE NKSIAEIVHEMFSYADGCTMSGKKDCLVNIGGFLCMNDDEMFS ELVVVYEGMPSYGGLAGRDMEAMAIGLREAMQY EYIEHRVKQVRY LGDKLKAAGVPIVEPVGGHAVFLDARRFCEHLTQDEFFPAQSLAASIY VETGVRSMERGIISAGRNNVTGEHHRPKLETVRLTIPRRVYTYAHMD VVADGIIKLYQHKEDIRGLKFIYEPKQLRFFRTARFDYI

图 5

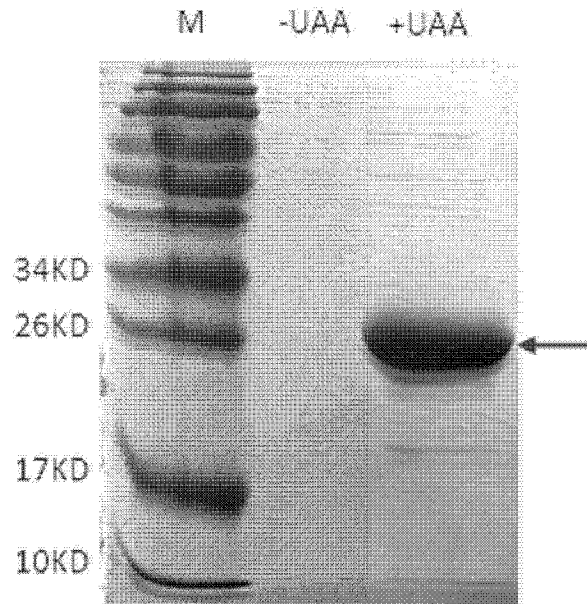


图 6

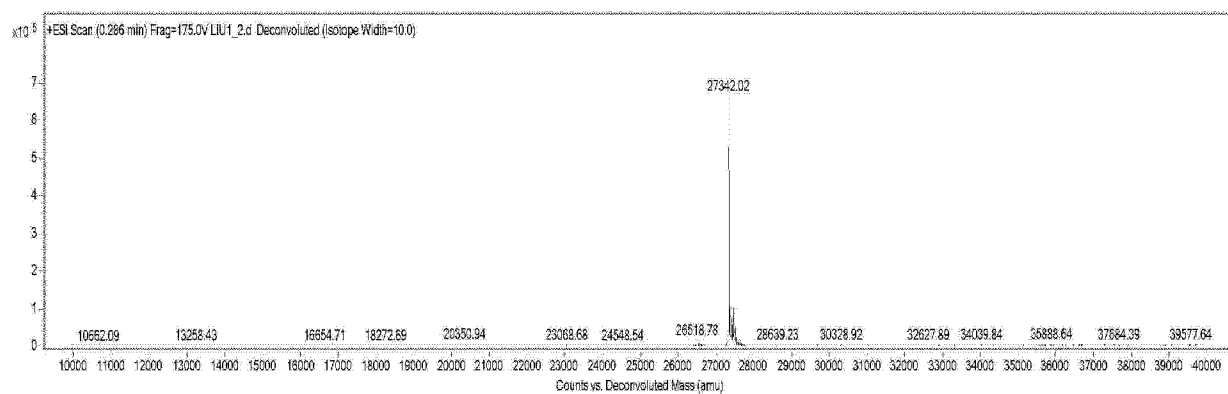


图 7

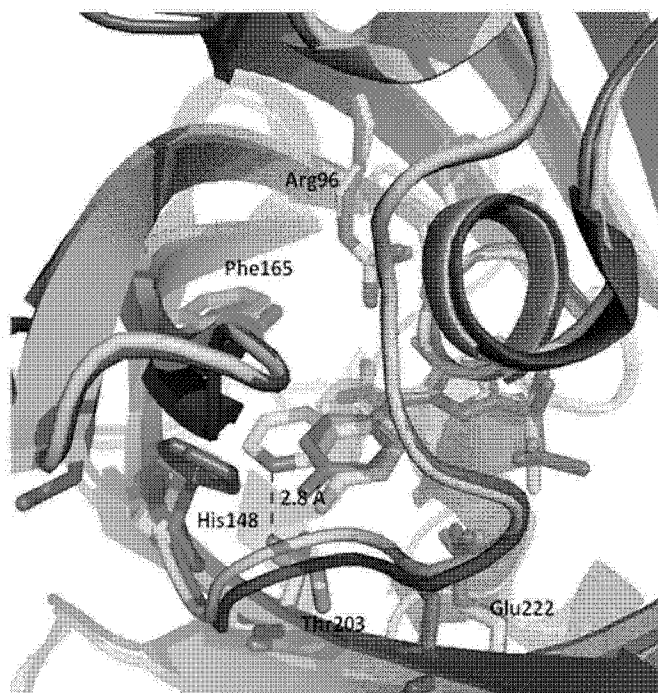
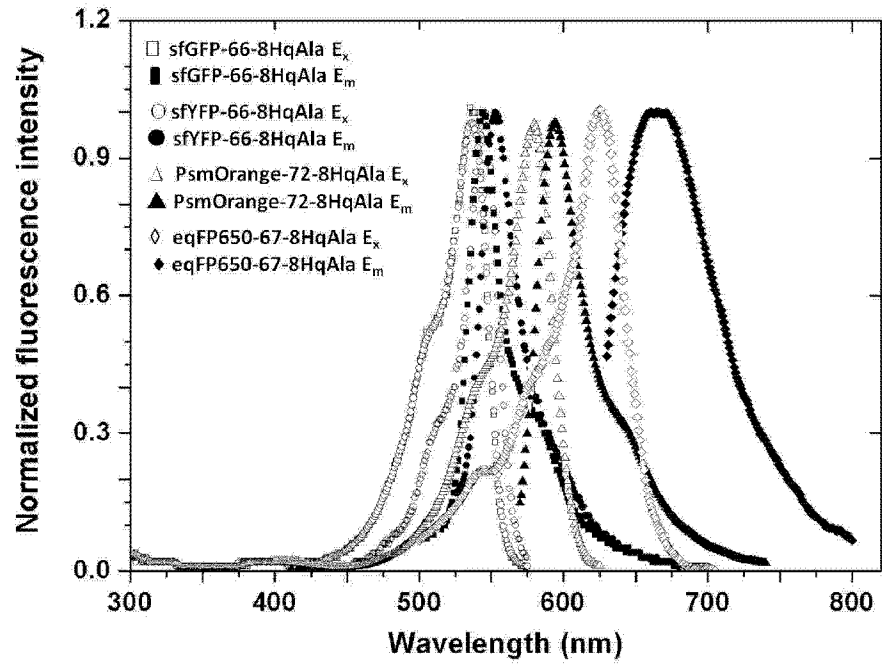


图 8

A



B

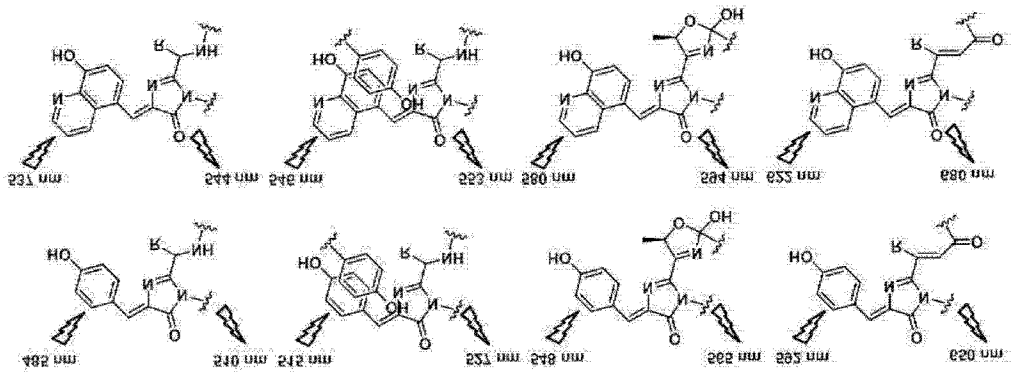


图 9

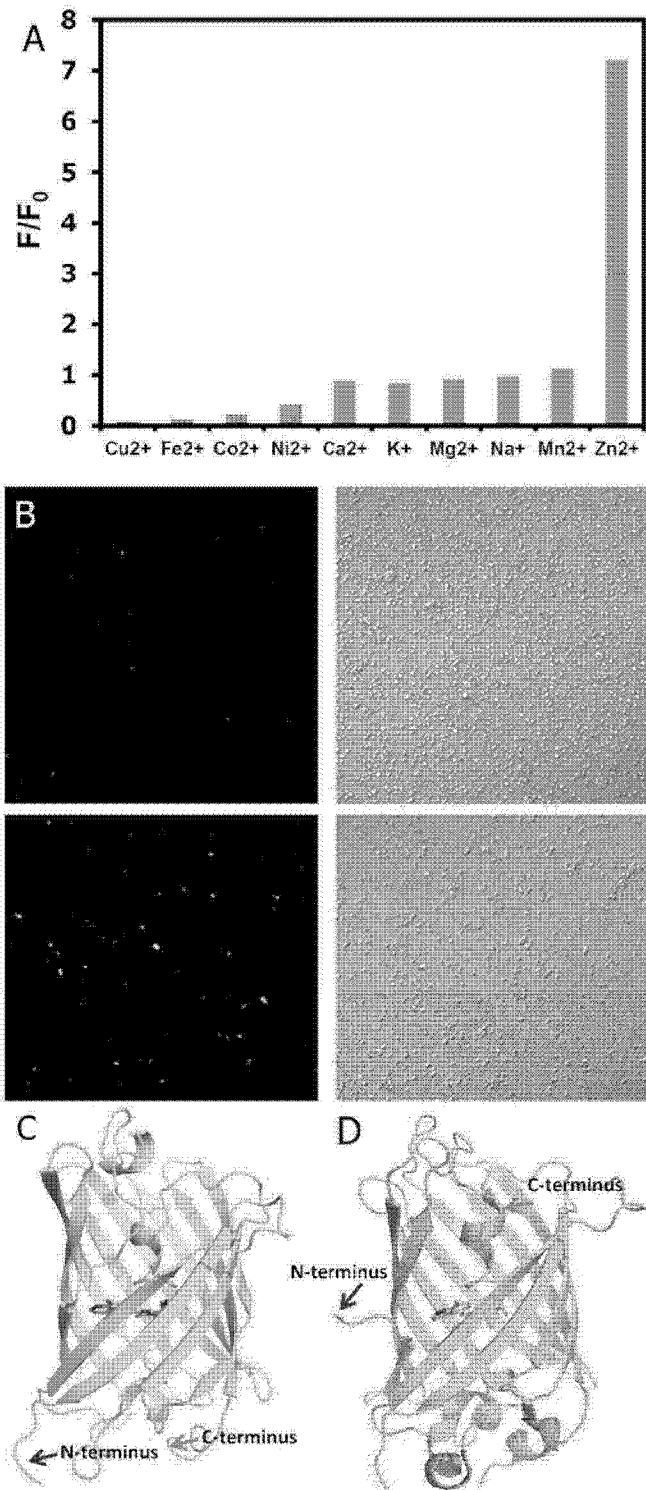


图 10