



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104004723 A

(43) 申请公布日 2014. 08. 27

(21) 申请号 201310056306. 4

(22) 申请日 2013. 02. 22

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 王江云 李发慧 李家松 龚为民
江欢欢

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 陈晓娜

(51) Int. Cl.

C12N 9/10(2006. 01)

C12N 1/21(2006. 01)

C12N 9/12(2006. 01)

C12P 21/00(2006. 01)

G01N 24/08(2006. 01)

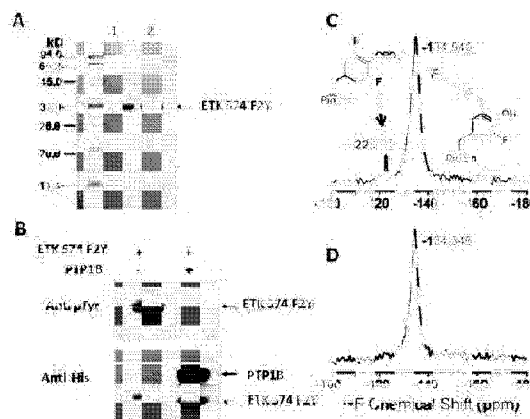
权利要求书2页 说明书11页
序列表8页 附图6页

(54) 发明名称

3, 5- 二氟代酪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。本发明还提供一种 3, 5- 二氟代酪氨酸翻译系统, 其包含: (i) 3, 5- 二氟代酪氨酸; (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 3, 5- 二氟代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。



1. 一种正交氨酰基-tRNA 合成酶,其含有的氨基酸序列选自由 SEQID 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 3,5- 二氟代酪氨酸翻译系统,所述系统包含:

(i) 3,5- 二氟代酪氨酸;

(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: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 3,5- 二氟代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,所述选择密码子是琥珀密码子,并且所述翻译系统还包含编码所述正交氨酰基-tRNA 合成酶的核苷酸序列。

4. 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。

5. 如权利要求 4 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。

6. 一种产生在至少一个所选位置定点特异性插入 3,5- 二氟代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 3,5- 二氟代酪氨酸翻译系统,该系统包含:

(i) 3,5- 二氟代酪氨酸;

(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: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 3,5- 二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 3,5- 二氟代酪氨酸,在所述目标蛋白质的翻译期间,3,5- 二氟代酪氨酸氨酰化的正交 tRNA 识别编码所述目标蛋白质的 mRNA 上的选择密码子以及 3,5- 二氟代酪氨酸,从而介导 3,5- 二氟代酪氨酸定点特异性插入所述选择密码子对应的氨基酸位置,产生在所选位置含 3,5- 二氟代酪氨酸的所述目标蛋白质。

7. 如权利要求 6 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。

8. 生产含有 3,5- 二氟代酪氨酸的原核蛋白酪氨酸激酶突变体的方法,其利用权利要求 6 所述的方法,其中所用的编码原核蛋白酪氨酸激酶突变体的核酸序列在选定的位置包含所述正交 tRNA 特异性识别的选择密码子,在激酶的翻译期间,3,5- 二氟代酪氨酸定点插入到所述选择密码子对应的氨基酸位置,从而产生在选定位置含有 3,5- 二氟代酪氨酸的原核蛋白酪氨酸激酶突变体。

9. 由权利要求 8 所述的方法获得的含有 3,5- 二氟代酪氨酸的原核蛋白酪氨酸激酶突变体,其氨基酸序列为 SEQ ID NO :8。

10. 一种鉴定目标蛋白的酪氨酸磷酸化位点的方法,所述方法包括利用权利要求 6 的方法将所述目标蛋白中推定进行磷酸化的酪氨酸取代为 3,5- 二氟代酪氨酸,由此得到含有 3,5- 二氟代酪氨酸的目标蛋白突变体,利用该目标蛋白突变体作为氟代指示剂,通过 ^{19}F -NMR 技术来检测 3,5- 二氟代酪氨酸的磷酸化,从而鉴定所述酪氨酸位点是否是酪氨酸磷酸化位点。

3,5- 二氟代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 3,5- 二氟代酪氨酸(简称为 F2Y) 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 3,5- 二氟代酪氨酸定点特异性插入目标蛋白质的 3,5- 二氟代酪氨酸翻译系统,和利用所述翻译系统在目标蛋白质中定点特异性插入 3,5- 二氟代酪氨酸的方法。本发明还涉及用这套翻译系统和这种方法产生的含有 3,5- 二氟代酪氨酸的突变蛋白质,例如,插入 3,5- 二氟代酪氨酸的原核蛋白酪氨酸激酶突变体,以及插入 3,5- 二氟代酪氨酸的突变蛋白质的应用。

背景技术

[0002] 蛋白质磷酸化对于许多生物现象的引发是很必要的,包括细胞生长、增殖、泛素(ubiquitin) 介导的蛋白降解等过程。特别是酪氨酸磷酸化,作为细胞信号转导和酶活性调控的一种主要方式,通常通过引发蛋白质之间的相互作用,进而介导生长因子、荷尔蒙和细胞因子等对细胞膜上受体的信号调控。然而,酪氨酸磷酸化在细胞的所有磷酸化修饰中所占的比例却非常低。大概 10% 的细胞蛋白会受到磷酸化共价修饰,但每 100 次蛋白的磷酸化修饰中仅有 1 次酪氨酸基团的修饰。与大部分细胞中的丝氨酸和苏氨酸磷酸化水平相比,酪氨酸磷酸化的水平估计要低 2000 倍。正是由于细胞中酪氨酸磷酸化的水平相当低,才能保证细胞在内外信号的刺激下,作出灵敏的反应,所以研究酪氨酸的磷酸化对于细胞信号的调控和许多重要生物现象的研究具有极为重要的意义,而对发生酪氨酸磷酸化的蛋白质的识别及磷酸化位点的鉴定对揭示细胞过程的调控和药物的作用位点起到非常重要的作用。

[0003] ^{19}F -NMR 技术由于其化学位移范围大、不易出现峰重叠及灵敏度高等优点,自上个世纪 50 年代出现以来,在分析光学异构体、生命科学等研究中有其特殊意义。在体内核磁共振技术中, ^{19}F -NMR 与其他方法相比,在不损伤样品的条件下,就可进行实时定量监测。近 30 年,引入氟代指示剂进行体内 ^{19}F -NMR 的研究,含氟生物活性物质以及含氟材料的研究受到很大的重视, ^{19}F -NMR 技术及其应用发展起来。从近 10 年的情况来看,含氟生物活性物质的研究以及在医药、农药和具有优异性能的含氟材料的研究应用受到很大的重视,这是近期 ^{19}F -NMR 研究发展的一个主要特点。

[0004] 根据先前的报道,含有 3,5- 二氟代酪氨酸的肽段作为蛋白酪氨酸激酶的底物,其表现出了与相应的含有酪氨酸的肽段作为底物类似的效率,并且不会显著影响蛋白酪氨酸磷酸酶的催化活性。因此本研究旨在通过遗传密码扩展,用非天然氨基酸 3,5- 二氟代酪氨酸替代酪氨酸,使其作为氟代指示剂,从而可以通过 ^{19}F -NMR 技术来检测及量化酪氨酸磷酸化水平。同时,本研究现已开发了在原核和真核生物中将各种非天然氨基酸体内位点特异

性地定点插入蛋白质的通用方法。这些方法依赖于正交蛋白质翻译组分,所述组分识别合适的选择密码子(selector codon)从而能在体内多肽翻译期间将所需的非天然氨基酸插入限定位置。这些方法利用识别选择密码子的正交 tRNA(O-tRNA),而相应的特异性正交氨酰基-tRNA 合成酶(O-RS)用非天然氨基酸加载该 O-tRNA。这些组分不与宿主生物体内的任何内源性 tRNA、氨酰基-tRNA 合成酶(RS)、氨基酸或密码子交叉反应(即,它必须是正交的)。利用这种正交 tRNA-RS 配对可能遗传编码大量结构各异的非天然氨基酸。

[0005] 本领域普遍知道利用适合于制备含一个或多个非天然氨基酸的蛋白质的正交翻译系统,例如产生正交翻译系统的通用方法。例如,参见国际公布号 WO 2002/086075,其发明名称为“METHODS AND COMPOSITION FOR THE PRODUCTION OF ORTHOGONAL tRNA-AMINOACYL-tRNA SYNTHETASE PAIRS”;WO 2002/085923,其发明名称为“IN VIVO INCORPORATION OF UNNATURAL AMINO ACIDS”;WO 2004/094593,其发明名称为“EXPANDING THE EUKARYOTIC GENETIC CODE”。定点特异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, Methods36(3):227-238(2005);Xie 和 Schultz, Curr.Opinion in Chemical Biology9(6):548-554(2005);Wang 等, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 35: 225-249(2006)。

发明内容

[0006] 1、技术问题

[0007] 本发明提供一种氨酰基-tRNA 合成酶突变体,其为一种正交氨酰基-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 3,5-二氟代酪氨酸(简称为 F2Y)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 F2Y。这是本发明人首次发现的,同时,本发明人还解析了它的高分辨率晶体结构,相应地,在本发明中将其命名为正交 3,5-二氟代酪氨酸氨酰基-tRNA 合成酶(F2YRS)。

[0008] 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 3,5-二氟代酪氨酸定点特异性插入目标蛋白质的 3,5-二氟代酪氨酸翻译系统,和利用所述翻译系统在目标蛋白质中定点特异性插入 3,5-二氟代酪氨酸的方法。本发明还涉及用这种翻译系统和这种方法产生的含有 3,5-二氟代酪氨酸的突变蛋白质及其应用。

[0009] 因此,本发明的目的在于提供利用正交 tRNA、正交氨酰基-tRNA 合成酶的配对将 3,5-二氟代酪氨酸定点特异性插入蛋白质的 3,5-二氟代酪氨酸翻译系统,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 3,5-二氟代酪氨酸的方法。

[0010] 本发明还提供利用本发明的 3,5-二氟代酪氨酸翻译系统产生的含有至少一个 3,5-二氟代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 3,5-二氟代酪氨酸定点特异性插入目的蛋白中,所述目的蛋白包括,但不限于,原核蛋白酪氨酸激酶 Etk。通过本发明的方法得到的包含 3,5-二氟代酪氨酸的原核蛋白酪氨酸激酶突变体蛋

白可以作为氟代指示剂,从而通过¹⁹F-NMR技术来检测及量化酪氨酸磷酸化水平。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蛋白酪氨酸激酶之外的多种蛋白中定点特异性插入3,5-二氟代酪氨酸,并不局限于该蛋白。2、技术方案

[0011] 本发明人经过筛选,获得一种正交氨酰基-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3,5-二氟代酪氨酸氨酰基-tRNA合成酶(F2YRS)。同时,本发明人还解析了它的高分辨率晶体结构。并且,本发明人利用所述正交氨酰基-tRNA合成酶,研发了3,5-二氟代酪氨酸翻译系统。

[0012] 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3,5-二氟代酪氨酸氨酰基-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。

[0013] 并且,编码本发明的正交3,5-二氟代酪氨酸氨酰基-tRNA合成酶(F2YRS)的核苷酸序列也包括在本发明的范围内。优选地,所述编码核苷酸序列为SEQ ID NO:3所示。

[0014] 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3,5-二氟代酪氨酸定点特异性插入到多肽链中的3,5-二氟代酪氨酸翻译系统。所述3,5-二氟代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3,5-二氟代酪氨酸的大量蛋白质。

[0015] 在一些方面中,本发明提供3,5-二氟代酪氨酸翻译系统。所述翻译系统包含:

[0016] (a) 非天然氨基酸,即3,5-二氟代酪氨酸,

[0017] (b) 本发明的正交氨酰-tRNA合成酶(O-RS),和

[0018] (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3,5-二氟代酪氨酸),优先氨酰化所述O-tRNA。

[0019] 优选地,本发明的3,5-二氟代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3,5-二氟代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。

[0020] 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。

[0021] 在本发明的优选方面中,本发明提供一种3,5-二氟代酪氨酸翻译系统,所述系统包含:

[0022] (i) 3,5-二氟代酪氨酸；

[0023] (ii) 本发明的正交氨酰基-tRNA 合成酶；

[0024] (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 3,5-二氟代酪氨酸优先氨酰化所述正交 tRNA；和

[0025] (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。

[0026] 优选地, 所述 3,5-二氟代酪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。

[0027] 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。

[0028] 在一些方面中, 本发明的 3,5-二氟代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。

[0029] 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。

[0030] 本发明还提供产生在至少一个所选位置定点特异性插入 3,5-二氟代酪氨酸的突变蛋白质的方法。所述方法利用上述 3,5-二氟代酪氨酸翻译系统。所述方法通常包括下述步骤：

[0031] (a) 提供含有以下组分的 3,5-二氟代酪氨酸翻译系统的步骤：

[0032] (i) 非天然氨基酸, 即 3,5-二氟代酪氨酸；

[0033] (ii) 本发明的正交氨酰基-tRNA 合成酶 (O-RS)；

[0034] (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 3,5-二氟代酪氨酸优先氨酰化所述 O-tRNA；和

[0035] (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)；

[0036] (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 3,5-二氟代酪氨酸, 在所述目标蛋白质的翻译过程中, 3,5-二氟代酪氨酸氨酰化的正交 RNA 识别编码所述目标蛋白质的 mRNA 上的选择密码子以及 3,5-二氟代酪氨酸, 从而介导 3,5-二氟代酪氨酸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 3,5-二氟代酪氨酸的突变蛋白质。

[0037] 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。

[0038] 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。

[0039] 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。

[0040] 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 3,5-二氟代酪氨酸)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。

[0041] 还可在宿主细胞内实施产生含有 3,5-二氟代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 3,5-二氟代酪氨酸翻译系统(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 3,5-二氟代酪氨酸等)培养该宿主细胞可导致在所述目标蛋白质中定点特异性插入 3,5-二氟代酪氨酸。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)。

[0042] 本发明还提供生产含有 3,5-二氟代酪氨酸的酪氨酸激酶突变体的方法,其利用上述产生在至少一个所选位置定点特异性插入 3,5-二氟代酪氨酸的突变蛋白质的方法,其中所用的编码原核蛋白酪氨酸激酶突变体的核酸序列在选定的位置包含所述正交 tRNA

特异性识别的选择密码子,在酪氨酸激酶的翻译期间,3,5-二氟代酪氨酸定点插入到所述选择密码子对应的氨基酸位置,从而产生在选定位置含有3,5-二氟代酪氨酸的酪氨酸激酶突变体。

[0043] 优选地,本发明还提供生产含有3,5-二氟代酪氨酸的原核蛋白酪氨酸激酶突变体的方法,所述方法利用上述3,5-二氟代酪氨酸翻译系统进行,所述方法通常包括下述步骤:

[0044] (a) 提供含有以下组分的3,5-二氟代酪氨酸翻译系统的步骤:

[0045] (i) 3,5-二氟代酪氨酸;

[0046] (ii) 正交氨酰基-tRNA合成酶(O-RS);

[0047] (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3,5-二氟代酪氨酸优先氨酰化所述O-tRNA;和

[0048] (iv) 编码所述原核蛋白酪氨酸激酶的核酸,例如,但不限于,SEQ ID NO:7,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);

[0049] (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3,5-二氟代酪氨酸,在所述目标蛋白质(即原核蛋白酪氨酸激酶)的翻译过程中,3,5-二氟代酪氨酸氨酰化的正交RNA识别编码酪氨酸激酶的mRNA上的选择密码子以及3,5-二氟代酪氨酸,从而介导3,5-二氟代酪氨酸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)。

[0050] 本发明还提供利用本发明的3,5-二氟代酪氨酸翻译系统产生的作为氟代指示剂的含有3,5-二氟代酪氨酸的原核蛋白酪氨酸激酶突变体,在野生型原核蛋白酪氨酸激酶的574位引入3,5-二氟代酪氨酸,所述酪氨酸激酶突变体的氨基酸序列为SEQ ID NO:8。所述激酶突变体与野生型酪氨酸激酶一样在适宜条件下可以进行活性中心酪氨酸的自磷酸化,从而激活自身的蛋白激酶活性。

[0051] 本发明还提供一种新颖的鉴定目标蛋白的酪氨酸磷酸化位点的方法,所述方法包括利用本发明的3,5-二氟代酪氨酸翻译系统将所述目标蛋白中推定进行磷酸化的酪氨酸取代为3,5-二氟代酪氨酸,由此得到含有3,5-二氟代酪氨酸的目标蛋白突变体,利用该目标蛋白突变体作为氟代指示剂,通过¹⁹F-NMR技术来检测3,5-二氟代酪氨酸的磷酸化,从而鉴定所述酪氨酸位点是否是酪氨酸磷酸化位点。

[0052] 例如,已知原核蛋白酪氨酸激酶具有较低程度的自身磷酸化能力,目前尚没有合适的技术能够检测并且量化其自身磷酸化水平。但是,利用本发明的3,5-二氟代酪氨酸翻译系统将原核蛋白酪氨酸激酶活性中心574位酪氨酸残基替换为3,5-二氟代酪氨酸,得到含有3,5-二氟代酪氨酸的原核蛋白酪氨酸激酶突变体,再通过¹⁹F-NMR技术来检测并且量化该原核蛋白酪氨酸激酶突变体的自身酪氨酸磷酸化水平。该原核蛋白酪氨酸激酶突变体的酪氨酸磷酸化水平在一定程度上可以代表野生型原核蛋白酪氨酸激酶的自身磷酸化水平。此外,这个检测结果也证明原核蛋白酪氨酸激酶活性中心574位酪氨酸是其自身酪氨酸磷酸化位点。

[0053] 因此,本发明提供下述:

[0054] 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。

[0055] 2. 一种 3,5- 二氟代酪氨酸翻译系统,所述系统包含:

[0056] (i) 3,5- 二氟代酪氨酸;

[0057] (ii) 第 1 项所述的正交氨酰基 -tRNA 合成酶;

[0058] (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 3,5- 二氟代酪氨酸优先氨酰化所述正交 tRNA ;和

[0059] (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。

[0060] 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,并且所述翻译系统还包含编码所述正交氨酰基 -tRNA 合成酶的核苷酸序列。

[0061] 4. 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。

[0062] 5. 如第 4 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。

[0063] 6. 一种产生在至少一个所选位置定点特异性插入 3,5- 二氟代酪氨酸的突变蛋白质的方法,所述方法包括下述步骤:

[0064] (a) 提供第 2 项所述的 3,5- 二氟代酪氨酸翻译系统,该系统包含:

[0065] (i) 3,5- 二氟代酪氨酸;

[0066] (ii) 第 1 项所述的正交氨酰基 -tRNA 合成酶;

[0067] (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 3,5- 二氟代酪氨酸优先氨酰化所述正交 tRNA ;和

[0068] (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

[0069] (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 3,5- 二氟代酪氨酸,在所述目标蛋白质的翻译期间,3,5- 二氟代酪氨酸氨酰化的正交 tRNA 识别编码所述目标蛋白质的 mRNA 上的选择密码子以及 3,5- 二氟代酪氨酸,从而介导 3,5- 二氟代酪氨酸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 3,5- 二氟代酪氨酸的所述目标蛋白质。

[0070] 7. 如第 6 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。

[0071] 8. 生产含有 3,5- 二氟代酪氨酸的原核蛋白酪氨酸激酶突变体的方法,其利用第 6 项所述的方法,其中所用的编码原核蛋白酪氨酸激酶突变体的核酸序列在选定的位置包含所述正交 tRNA 特异性识别的选择密码子,在激酶的翻译期间,3,5- 二氟代酪氨酸定点插入到所述选择密码子对应的氨基酸位置,从而产生在选定位置含有 3,5- 二氟代酪氨酸的原核蛋白酪氨酸激酶突变体。

[0072] 9. 由第 8 项所述的方法获得的含有 3,5- 二氟代酪氨酸的原核蛋白酪氨酸激酶突

变体,其氨基酸序列为 SEQ ID NO :8。

[0073] 10. 一种鉴定目标蛋白的酪氨酸磷酸化位点的方法,所述方法包括利用第 6 项的方法将所述目标蛋白中推定进行磷酸化的酪氨酸取代为 3,5- 二氟代酪氨酸,由此得到含有 3,5- 二氟代酪氨酸的目标蛋白突变体,利用该目标蛋白突变体作为氟代指示剂,通过 ^{19}F -NMR 技术来检测 3,5- 二氟代酪氨酸的磷酸化,从而鉴定所述酪氨酸位点是否是酪氨酸磷酸化位点。

[0074] 11. 编码第 1 项的正交氨酰基 -tRNA 合成酶的核苷酸序列。

[0075] 13. 如第 11 项所述的核苷酸序列,其为 SEQ ID NO :3。

[0076] 3、有益效果

[0077] 本研究通过筛选得到了一种正交氨酰基 -tRNA 合成酶,并且,在此基础上研发了 3,5- 二氟代酪氨酸翻译系统。通过该系统可以在目标蛋白——例如,原核蛋白酪氨酸激酶 Etk 中定点特异性插入 3,5- 二氟代酪氨酸,产生 574 位含有 3,5- 二氟代酪氨酸的酪氨酸激酶突变体,将其作为氟代指示剂,从而可以通过 ^{19}F -NMR 技术来检测及量化酪氨酸磷酸化水平。

[0078] 我们这种探测酪氨酸磷酸化水平的新方法与传统方法相比有许多的优势。首先,可以直接检测及量化目标蛋白质某一特定位点的酪氨酸磷酸化水平。其次,样品可以随时冻存,接着再进行 ^{19}F NMR 光谱分析,这样,可以最大限度地缩短样品的制备时间,以便更精确地定量蛋白质样品的磷酸化水平。第三,由于 ^{19}F 的高灵敏度,相对于环境的化学位移各向异性以及 ^{19}F - ^{19}F 直接耦合的缺乏,单位点整合 ^{19}F 结合 NMR 分析可以更有效地用来阐明蛋白的动态特性。最后, NMR 研究可能有助于揭示真核和原核蛋白酪氨酸激酶活性状态和非活性状态的运动特性,以及这些状态之间的动态交换。这些独特的优势使我们能够获得直接证据来证明并且量化原核蛋白酪氨酸激酶 Etk 活性中心磷酸化水平,而这在以前是无法实现的。并且,这种监测酪氨酸激酶激活及活性的方法灵敏度高,选择性强,可以为酪氨酸激酶 / 底物蛋白相互作用的新型抑制剂筛选提供有效的途径。

附图说明

[0079] 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:

[0080] 图 1 是本发明的正交 3,5- 二氟代酪氨酸氨酰基 -tRNA 合成酶 (F2YRS) 的晶体结构图;

[0081] 图 2 :图 2A 是体外氨酰化作用的酸性尿素聚丙烯酰胺凝胶电泳图,图 2B 是 F2Y- 绿色荧光蛋白的 SDS-PAGE 电泳图,图 2C 和图 2D 是 F2Y- 绿色荧光蛋白的质谱图;

[0082] 图 3 是 3,5- 二氟代酪氨酸 (F2Y) (下图) 和 o- 磷酸 -3,5- 二氟代酪氨酸 (pF2Y) (上图) 的 ^{19}F -NMR 谱图;

[0083] 图 4 :图 4A 是野生型原核蛋白酪氨酸激酶 (Etk,泳道 1) 和 Etk-574-F2Y (泳道 2) 的 SDS-PAGE 电泳图,图 4B 是 Etk-574-F2Y 和酪氨酸磷酸酶 PTP1B 的 Western 检测图 (上图是 pTyr 抗体,下图是 His 抗体),图 4C 是 Etk-574-F2Y 磷酸化的 ^{19}F -NMR 谱图,图 4D 是 Etk-574-F2Y 脱磷酸化的 ^{19}F -NMR 谱图;

[0084] 图 5 是正交 tRNA、野生型酪氨酸 tRNA 合成酶、本发明的正交氨酰基 -tRNA 合成酶、绿色荧光蛋白突变体、原核蛋白酪氨酸激酶突变体和蛋白酪氨酸磷酸酶的序列。

具体实施方式

[0085] 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。

[0086] 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。

[0087] 实施例 1 : α -磷酸-3,5-二氟代酪氨酸 (pF2Y) 的化学合成

[0088] 取 100mM 三氯氧磷、100mM 3,5-二氟代酪氨酸 (购自上海吉尔生化公司) 和 500mM 氢氧化钠,溶解至 5mL,然后室温搅拌 1h。收集水相,通过 HPLC 分离纯化得到白色粉末,产率 10%。(YMC AA12S052503WT column, 12ml/min flow rate, from 10% to 90% CH₃CN, 0.1% TFA (w/v) in water, over the course of 30 min). MS: m/z : 298 [M+H]⁺; ¹H-NMR (600MHz, D₂O) : 7.03 (d, 2H) 4.01 (dd, 1H) 3.21 (m, 2H)。

[0089] 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。

[0090] 实施例 2 :进化 F2Y 特异性氨酰基-tRNA 合成酶

[0091] 为了在基因中位点特异性插入 F2Y,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}^Y)/酪氨酰 tRNA 合成酶 (MjYRS, 野生型,其氨基酸序列为 SEQ ID NO : 2) 对。MjYRS 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 MjYRS 基因上挑选 6 个位点 (Y32, 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, Y114, 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)。

[0092] 通过正负筛选来进化特异性识别 F2Y 的氨酰基-tRNA 合成酶。正筛选质粒包含 MjtRNA_{CUA}^Y, 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}^Y,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 (GML 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 GML 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 GML 培养基中加入 500ml 3% 琼脂粉, 1mM F2Y, 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。

[0093] 最后一轮正筛选挑 384 个克隆, 分别点板在含有 1mM F2Y、氯霉素 60, 80, 120, 160 μ g/mL 的 GML 固体培养基上, 及不包含 F2Y、但包含氯霉素 0, 20, 40, 60 μ g/mL 的 GML 固体培养基。挑选在在 1mM F2Y 160 μ g/mL 氯霉素的培养基上生长, 而在 0mM F2Y, 浓度大于 20 μ g/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 3, 5-二氟代酪氨酸效率最高, 测序表明, 克隆所包含的氨酰基-tRNA 合成酶突变体 (F2YRS) 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:4 所示, 其中突变位点为 Tyr32Arg, Leu65Tyr, His70Gly, Phe108Asn, Gln109Cys, Asp158Asn 和 Leu162Ser。

[0094] 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 3, 5-二氟代酪氨酸氨酰基-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。

[0095] 同时, 本发明人还解析了 F2YRS 的晶体结构 (图 1), 为 F2YRS 特异性整合 F2Y 提供了结构基础。

[0096] 实施例 3: 体外氨酰化作用分析

[0097] 为了验证 F2YRS 在目标蛋白中整合 F2Y 的高效性和保真度, 我们进行了体外氨酰化作用分析。取 50mM 氯化钠, 20mM 氯化镁, 4mM 二硫苏糖醇, 2mM ATP, 10 μ M Tyr tRNA, 3 μ M F2YRS 和 2mM 酪氨酸或者 F2Y, 溶解于 20mM, pH8.0 的 Tris 缓冲液中, 37°C 孵育 1h。反应液进行 24h 酸性尿素聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 结果如图 2A 所示, F2YRS 只能整合 F2Y, 而无法整合酪氨酸。

[0098] 实施例 4: 表达 F2Y-绿色荧光蛋白及质谱鉴定

[0099] 将正交 tRNA (SEQ ID NO:1) 和筛选出来的编码 F2YRS 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, 编码绿色荧光蛋白的核苷酸序列 (151TAG) (SEQ ID NO:5) 构建到 pET 载体 (购自美国 scripps 研究所 Peter G. Schultz 实验室) 上, 然后共转化到 DH10B 细胞 (购自全式金公司) 中。挑取单个克隆在 37°C 培养到 OD₆₀₀ 约等于 1.2 时, 向 LB 培养基中加入 1mM IPTG, 0.02% 阿拉伯糖 (购自 sigma 公司) 及 0.5mM F2Y 培养细胞, 对照不加入 F2Y。8 小时之后, 收菌, Ni-NTA 纯化蛋白, 并用 SDS-PAGE 电泳分析 (图 2B)。

[0100] 我们发现, 只有在存在 F2Y 的培养基中才能纯化出全长的绿色荧光蛋白, 这说明筛选出来的 F2YRS 可以特异性的识别 F2Y。在 LB 培养基中 F2Y-绿色荧光蛋白的产率为 60mg/L, 而野生型绿色荧光蛋白的产率为 100mg/L。为了检测 F2Y 仅仅插入到绿色荧光蛋白的 151 位琥珀突变位点, 我们对 151-F2Y-绿色蛋白进行了 ESI-TOF 质谱检测, 检测结果分子量为 27746Da (图 2C, D), 与计算的分子量 27746Da 吻合。

[0101] 实施例 5: 表达 F2Y-原核蛋白酪氨酸激酶突变体及酪氨酸磷酸化检测

[0102] 我们选取原核蛋白酪氨酸激酶 Etk 的 C 末端胞浆区片段 (451 位-726 位, 核苷酸

序列如 SEQ ID NO :7 所示),用基因工程方法构建了 Etk 突变体,其中 574 位突变为 TAG 终止密码子,然后用实施例 4 中的相同方法在 Etk 突变体的 574 位定点特异性插入 F2Y,表达产生突变蛋白 Etk-574-F2Y(氨基酸序列如 SEQ ID NO :8 所示),产率为 12.5mg/L,而野生型 Etk 的产率为 20mg/L(图 4A)。

[0103] 为了验证 Etk 活性中心的 574 位酪氨酸能否进行自磷酸化,我们取突变蛋白 Etk-574-F2Y,于 pH8.5 的缓冲液(含有:20mM Tris,20mM NaCl,2mM ATP 和 5mM MgCl₂)中 25°C 孵育 30min。作为对照,我们往突变蛋白 Etk-574-F2Y 中加入 0.125mg/mL 蛋白酪氨酸磷酸酶 PTP1B(通过常规分子生物学方法克隆表达而得到,或者也可以商购获得,氨基酸序列如 SEQ ID NO :9 所示)进行脱磷酸化,然后于 pH8.5 的缓冲液(含有:20mM Tris,20mM NaCl 和 1mM EDTA)中 25°C 孵育 30min。孵育结束后,分别取少量混合液进行 Western 验证,剩余样品立刻冻干后进行 ¹⁹F-NMR 分析。同时,我们取 F2Y 和实施例 1 中新合成的 pF2Y 进行 ¹⁹F-NMR 分析,作为验证 F2Y 是否磷酸化的对照。结果如图 3 和图 4C, D 所示, F2Y 的 ¹⁹F 化学位移为 -133.1ppm,而 pF2Y 为 -126.7ppm(图 3)。图 4C 和 D 显示,仅含有 Etk-574-F2Y 的混合液分别在 -122.3ppm 和 -134.5ppm 处都出现了信号峰,而加入 PTP1B 的混合液,仅在 -134.5ppm 处出现信号峰,说明 Etk-574-F2Y 的 574 位二氟代酪氨酸在缓冲液中发生了自磷酸化,这一结论与 western 的检测结果完全一致(图 4B)。同时,通过信号强度对比分析发现,仅有 3.8%的二氟代酪氨酸发生了磷酸化,这与先前报道中所称的原核蛋白酪氨酸激酶活性中心的磷酸化水平很低也是一致的。

[0104] 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书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]

IB130284序列表.txt

序列表

<110> 中国科学院生物物理研究所

<120> 3,5-二氟代酪氨酸翻译系统及其应用

<130> IB130284

<160> 9

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 77

<212> DNA

<213> 正交tRNA

<400> 1
 tggtcggeg ggccggattt gaaccagcgc catgggatt tagagtccgc cgttctgccc 60
 tgctgaacta ccgccg 77

<210> 2

<211> 312

<212> PRT

<213> 野生型酪氨酰tRNA合成酶 (MjYRS), 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 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
 Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
 85 90 95

[0002]

IB130284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 Glu 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 (F2YRS) 的核苷酸序列

<400> 3

atggacgaat ttgaaatgat aaagagaaac acatctgaaa ttatcagega ggaagagtta 60
 agagaggttt taaaaaaga igaaaaatct gctcgatag gttttgaacc aagtggtaaa 120
 atacatttag ggcattatct ccaataaaa aagatgatig atttacaana tgcctgattt 180
 gatataatta tatatttggc igatttaggc gcctatttaa accagaaagg agagttggat 240
 gagattagaa aaataggaga ttataacaaa aaagtttttg aagcaatggg gttaaaggca 300

[0003]

TB130284序列表.txt

aaatagttt atggaagtga aaattgtctt gataaggatt atacctgaa tgcctataga 360
 ttggcittaa aaactacctt aaaaagagca agaaggagta tggaacttat agcaagagag 420
 gatgaaaate caaaggttgc tgaagttatc tatccaataa tgcaggttaa taatattcat 480
 tatagtggcg ttgatgttgc agttggaggg atggagcaga gaaaaataca catgtagca 540
 agggagcttt taccaaaaaa ggttgtttgt attcacaacc ctgtcttaac gggtttgat 600
 ggagaaggaa agatgagttc ttcaaaaggg aattttatag ctgttgatga cctccagaa 660
 gagattaggg ctaagataaa gaaagcatac tgcccagctg gagttgttga aggaaatcca 720
 ataattggaga tagctaaata ctcccttgaa taccctttaa ccataaaaag gccagaaaaa 780
 tttggtggag atttgacagt taatagctat gaggagttag agagtttatt taaaaataag 840
 gaattgcatc caatggattt aaaaatgct gtagctgaag aacttataaa gattttagag 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 (F2YRS)

<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 Arg
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

Tyr 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 Asn Cys 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]

IB130284序列表.txt

Tyr Ser 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 Gln Pro Ile Arg Lys
 290 295 300

Arg Leu
 305

<210> 5

<211> 741

<212> DNA

<213> 含有151位F2Y的绿色荧光蛋白突变体的核苷酸序列

<400> 5
 atgagtaaag gagaagaact ttctactgga gttgtcccaa ttcttgttga attagatggt 60
 gatgttaatg ggcacaaatt ttctgtcagt ggagagggtg aagtgatgc aacatacggg 120
 aaacttacce ttaaatttat itgcactact ggaaaactac cigttccatg gccaaacatt 180
 gtcactactt tctcttatgg tgttcaatgc ttttcccggt atccggatca catgaaacgg 240
 catgactttt tcaagagtgc catgcccga ggttatgtac aggaacgcac tatatctttc 300
 aaagatgacg ggaactacaa gacgcgtgct gaagtcaagt ttgaaggtga tacccttgtt 360
 aatcgtatcg agttaaagg tattgatitt aaagaagatg gaaacattct cggacacaaa 420
 ctcgaataca actataactc acacaatgta tagatcacgg cagacaaaca aaagaatgga 480
 atcaaagcta acttcaaat tcgccacaac attgaagatg gatccgttca actagcagac 540
 cattatcaac aaaatactcc aattggcgat ggccctgtcc ttttaccaga eaaccattac 600
 cigtcgacac aatctgccct itcgaaagat cccaacgaaa agcgtgacca catgttccct 660
 cttgagtttg taactgtctg igggattaca catggcatgg atgagctota caaactcgag 720
 caccaccacc accaccactg a 741

[0005]

IB130284序列表.txt

<210> 6

<211> 246

<212> PRT

<213> 含有151位F2Y的绿色荧光蛋白突变体, 其中*表示引入的3, 5-二氟代酪氨酸

<400> 6

Met Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val
1 5 10 15Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu
20 25 30Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys
35 40 45Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe
50 55 60Ser Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Arg
65 70 75 80His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg
85 90 95Thr Ile Ser Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val
100 105 110Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile
115 120 125Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn
130 135 140Tyr Asn Ser His Asn Val * Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly
145 150 155 160Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val
165 170 175Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro
180 185 190Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser
195 200 205Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val
210 215 220Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Leu Glu
225 230 235 240His His His His His His
245

[0006]

IBI30284序列表.txt

<210> 7

<211> 894

<212> DNA

<213> 含有574位F2Y的原核蛋白酪氨酸激酶突变体 (Etk-574-F2Y) 的核苷酸序列

<400> 7

```

atgggcagea gccatcatca tcatcateac agcagcggec tgggtgecgcg cggcagccat    60
atgcgtggtg tagaagcccc ggaacaactg gaagagcagc gcatecagegt tlatgccaat    120
atcccaatgt ccgagtggtc ggataaacgc acccgtctgc gtaagaaaaa tttattttct    180
aatcageage gccatcgtac taaaaatata cccttctcgg cgggtggataa cccggcggat    240
tcctgtgtgg aagccgtacg tgcgctacga accagtctgc atttcgctat gatggagacg    300
gagaataaca ttcigatgat caccggtgcg acgccagaca gtgglaaaac gtttgtcagt    360
teaactctgg cagcggatgat cgcaccagtc gatcaaaaag tgttatttat tgatgccgac    420
ttacgcctgg gttagtcgca taacctgttt accgtgagta atgaacatgg cttgtcggaa    480
tatctggcag gtaaagatga gctcaacaaa gtgatccage attttggcaa aggaggcttt    540
gatgtgatta ctgcgggtca ggtgccacct aaccctctc aactgctgat gcgcgatcgg    600
atgcgtcaat tactggaatg ggccaacgac cattacgate tggtgattgt cgatacgcgcg    660
ccgatgetgg cggfagatga tgcgcgggtc gtggggcggt cigtttggcac cagcctctctg    720
gttgcgcgtt ttggcctttaa caccgcaaaa gaggtgagtt tgtcaatgca gegtctggaa    780
caggcaggeg tcaatattaa aggcgctata ctcaatggtg tgattaaacg cggcagcaac    840
gcttacagtt acggctataa ctattacggt tatagttact ccgagaaaga gtaa          894

```

<210> 8

<211> 297

<212> PRT

<213> 含有574位F2Y的原核蛋白酪氨酸激酶突变体 (Etk-574-F2Y) ,
其中*表示引入的3,5-二氟代酪氨酸

<400> 8

```

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

```

[0007]

TB130284序列表.txt

Ser Ala Val Glu Ala Val Arg Ala Leu Arg Thr Ser Leu His Phe Ala
 85 90 95
 Met Met Glu Thr Glu Asn Asn Ile Leu Met Ile Thr Gly Ala Thr Pro
 100 105 110
 Asp Ser Gly Lys Thr Phe Val Ser Ser Thr Leu Ala Ala Val Ile Ala
 115 120 125
 Gln Ser Asp Gln Lys Val Leu Phe Ile Asp Ala Asp Leu Arg Arg Gly
 130 135 140
 * Ser His Asn Leu Phe Thr Val Ser Asn Glu His Gly Leu Ser Glu
 145 150 155 160
 Tyr Leu Ala Gly Lys Asp Glu Leu Asn Lys Val Ile Gln His Phe Gly
 165 170 175
 Lys Gly Gly Phe Asp Val Ile Thr Arg Gly Gln Val Pro Pro Asn Pro
 180 185 190
 Ser Glu Leu Leu Met Arg Asp Arg Met Arg Gln Leu Leu Glu Trp Ala
 195 200 205
 Asn Asp His Tyr Asp Leu Val Ile Val Asp Thr Pro Pro Met Leu Ala
 210 215 220
 Val Ser Asp Ala Ala Val Val Gly Arg Ser Val Gly Thr Ser Leu Leu
 225 230 235 240
 Val Ala Arg Phe Gly Leu Asn Thr Ala Lys Glu Val Ser Leu Ser Met
 245 250 255
 Gln Arg Leu Glu Gln Ala Gly Val Asn Ile Lys Gly Ala Ile Leu Asn
 260 265 270
 Gly Val Ile Lys Arg Ala Ser Thr Ala Tyr Ser Tyr Gly Tyr Asn Tyr
 275 280 285
 Tyr Gly Tyr Ser Tyr Ser Glu Lys Glu
 290 295
 <210> 9
 <211> 333
 <212> PRT
 <213> 蛋白酪氨酸磷酸酶PTP1B
 <400> 9
 Met Glu Met Glu Lys Glu Phe Glu Gln Ile Asp Lys Ser Gly Ser Trp
 1 5 10 15
 Ala Ala Ile Tyr Arg Asp Ile Arg His Glu Ala Ser Asp Phe Pro Cys
 20 25 30

[0008]

TB130284序列表.txt

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

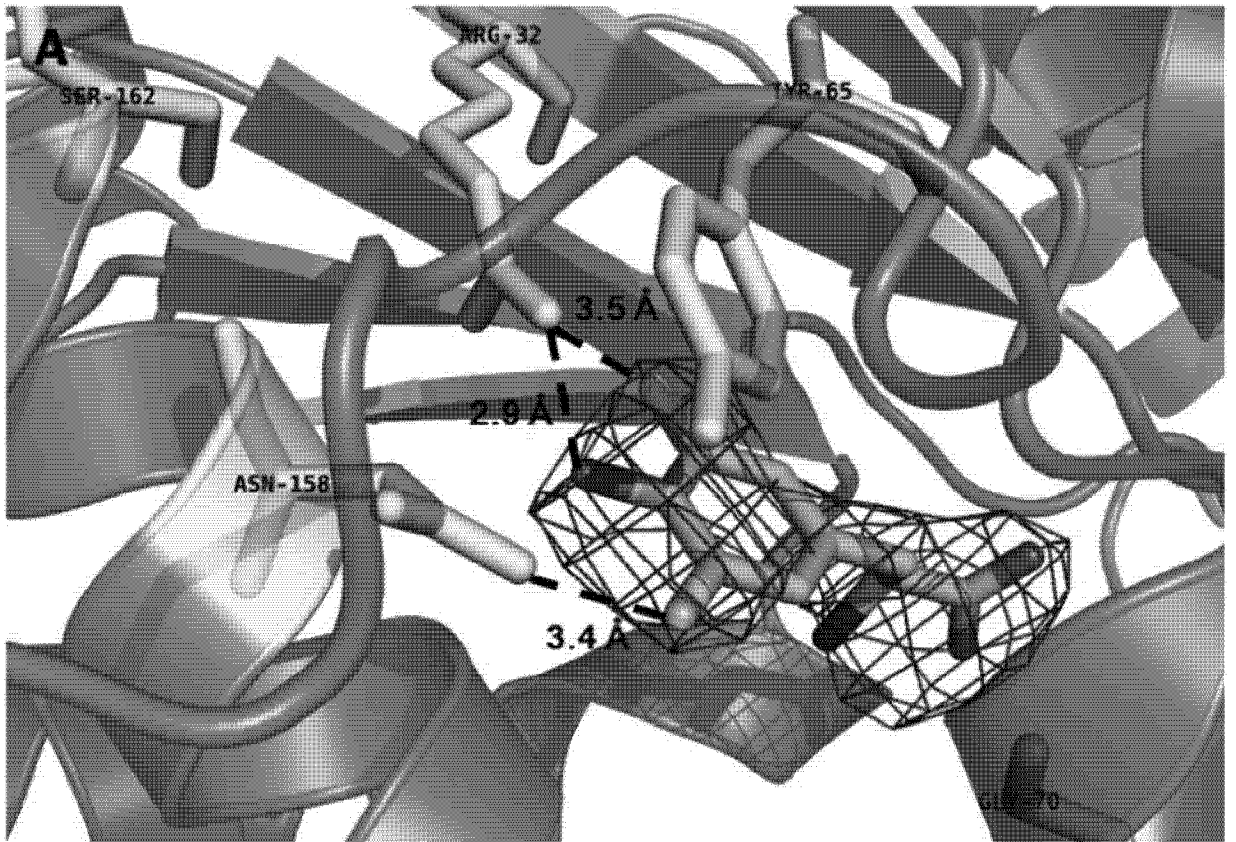


图 1

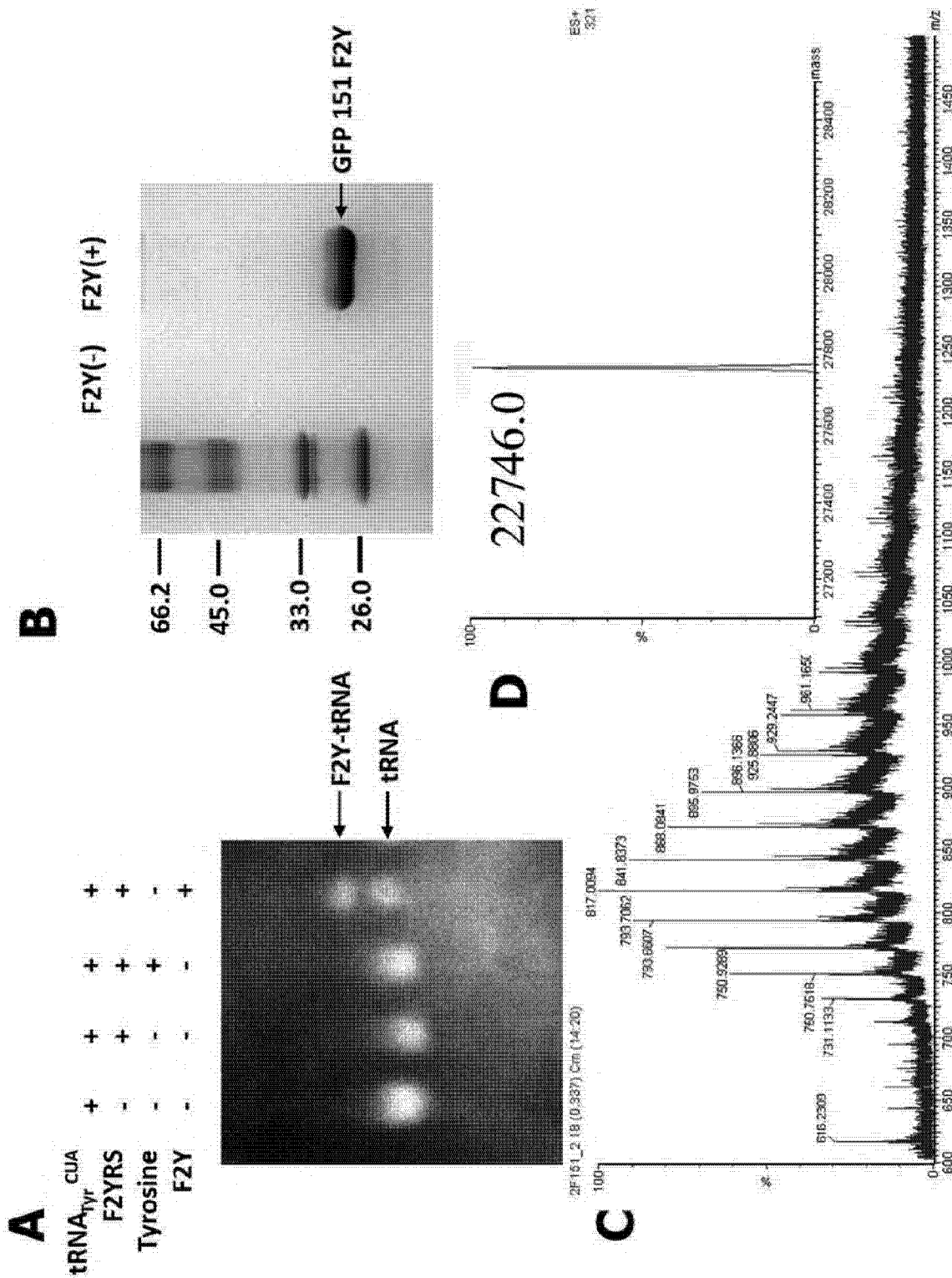


图 2

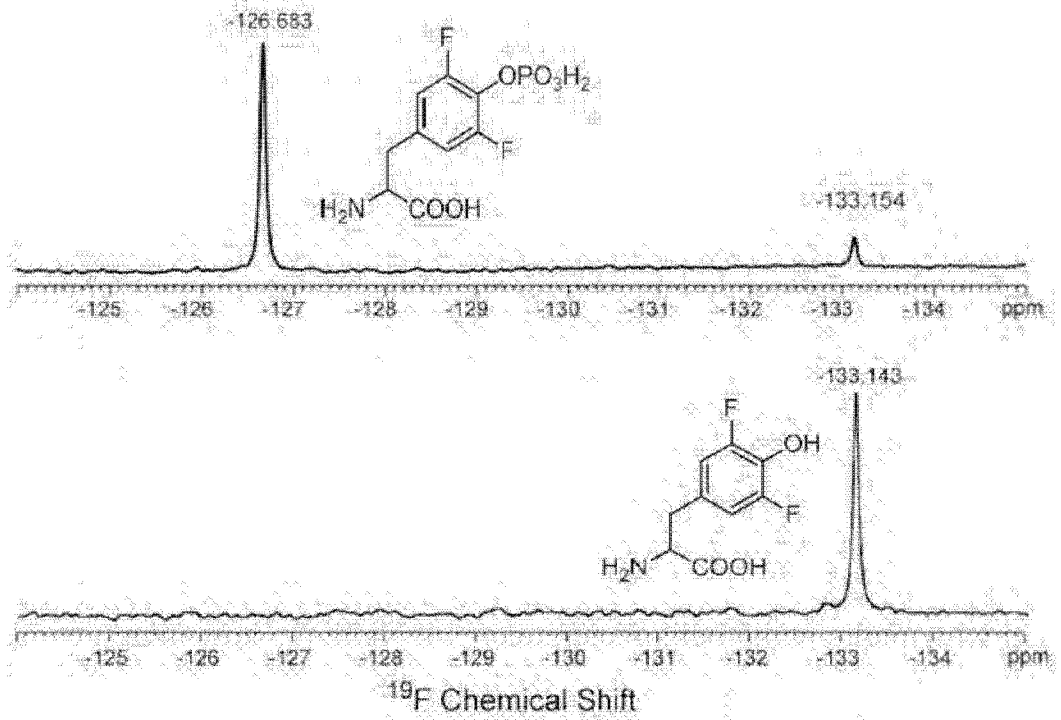


图 3

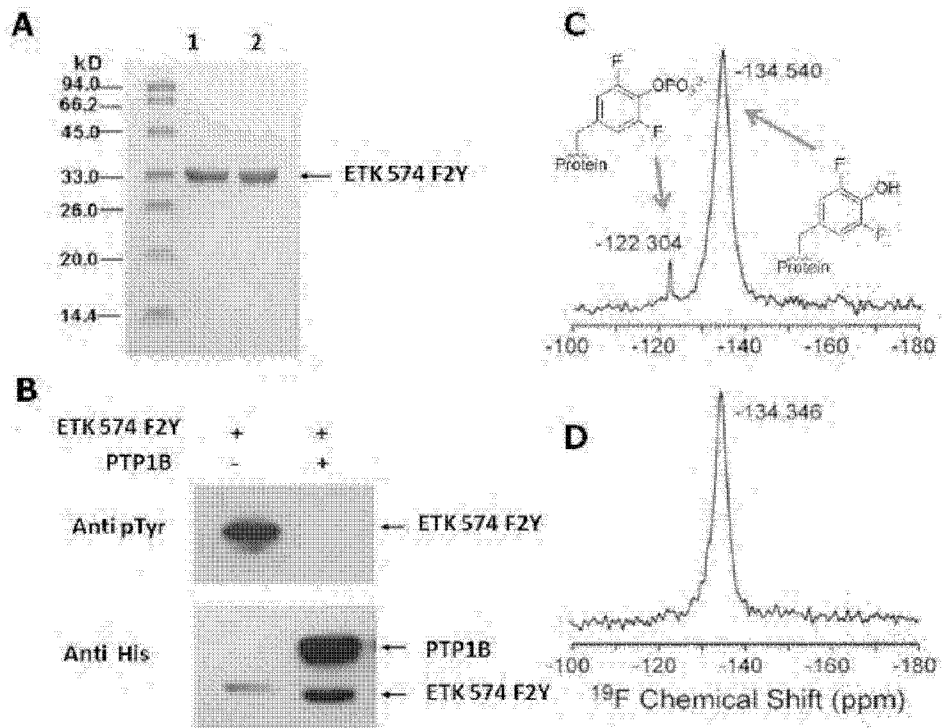


图 4

名称	核苷酸/氨基酸序列
正交 tRNA	<p><u>SEQ ID NO: 1</u></p> <p>tggtcggcgggcgcgattgaaccagcgccatgcggttagagtcgcecggttctgccctgtgaactaccgcccgg</p>
野生型酪氨酰 tRNA 合成酶 (MjYRS), 来源于詹氏甲烷球菌	<p><u>氨基酸序列 (SEQ ID NO: 2):</u></p> <p>MDEFEMIKRNTSEIISEEELREVLK KDEKSAYIGFEPGKIHL GHY LQIKKMIDLQNAGFDIILLADLHAYLNQK GELDEIRKI GDYNKKVFEAMGLKAKYVY GSEFQLDKDYTLNVYRLALK TTLKRARRSMELIAREDENPKVAEVIYPIMQVNDIHYLGVD VAVGGMEQRKIHMLARELLPKKVVCIHNPVLTGLDGE GKM SSSKGNFIAVDDSP EIRAKIKKAYCPAGVVEGNPIMEIAKYF LEYPLTIKRPEKFGGDLTVNSYEELSLFKNKELHPMDL KNA VAEELIKILEPIRKRLHHHHHH</p>
本发明的正交氨酰基-tRNA 合成酶 (F2YRS)	<p><u>核苷酸序列 (SEQ ID NO: 3):</u></p> <p>ATGGACGAATTGAAATGATAAAGAGAAAACACATCTGAAATTATCA GCGAGGAAGAGTTAAGAGAGGTTTTAAAAAAGATGAAAAATCT GCTCGGATAGGTTTTGAACCAAGTGGTAAAATACATTTAGGGCATT ATCTCAAATAAAAAAGATGATTGATTTACAAAATGCTGGATTTGAT ATAATTATATATTTGGCTGATTTAGGCGCCTATTTAAACCAGAAAGG AGAGTTGGATGAGATTAGAAAAATAGGAGATTATAACAAAAAAGT TTTTGAAGCAATGGGGTTAAAGGCAAAATATGTTTATGGAAGTGAA AATTGTCTTGATAAGGATTATACACTGAATGTCTATAGATTGGCTTT AAAACTACCTTAAAAAGAGCAAGAAGGAGTATGGAACCTTATAGC AAGAGAGGATGAAAATCCAAAGGTTGCTGAAGTTATCTATCCAATA ATGCAGGTTAATAATATTCATTATAGTGGCGTTGATGTTGCAGTTGG AGGGATGGAGCAGAGAAAAATACACATGTTAGCAAGGGAGCTTTT ACCAAAAAAGGTTGTTGTATTCAACACCTGTCTTAAACGGGTTTG GATGGAGAAGGAAAAGATGAGTTCTTCAAAGGGAATTTTATAGCT GTTGATGACTCTCCAGAAGAGATTAGGGCTAAGATAAAGAAAGCA TACTGCCAGCTGGAGTTGTTGAAGGAAATCCAATAATGGAGATA GCTAAATACTTCTTGAATATCCTTTAACCATAAAAAGGCCAGAAA AATTTGGTGGAGATTTGACAGTTAATAGCTATGAGGAGTTAGAGAG TTTATTTAAAAATAAGGAATTGCATCCAATGGATTTAAAAAATGCTG TAGCTGAAGAACTTATAAAGATTTTAGAGCCAATTAGAAAGAGATT ATAA</p> <p><u>氨基酸序列 (SEQ ID NO: 4):</u></p> <p>MDEFEMIKRNTSEIISEEELREVLK KDEKSARIGFEPGKIHL GHY LQIKKMIDLQNAGFDIIILADLGAYLNQK GELDEIRKI GDYNKKVFEAMGLKAKYVY GSENCCLKDYTLNVYRLALK TTLKRARRSMELIAREDENPKVAEVIYPIMQVNNIHYSGVD VAVGGMEQRKIHMLARELLPKKVVCIHNPVLTGLDGE GKM SSSKGNFIAVDDSP EIRAKIKKAYCPAGVVEGNPIMEIAKYF LEYPLTIKRPEKFGGDLTVNSYEELSLFKNKELHPMDL KNA VAEELIKILEPIRKRL</p>
含有 151 位 F2Y 的绿色荧光蛋白突变体	<p><u>核苷酸序列 (SEQ ID NO: 5):</u></p> <p>ATGAGTAAAGGAGAAGA AACTTTTCACTGGAGTTGTCCCA ATTCTTGTTGAATTAGATGGT GATGTTAATGGGCACAAATT TTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGG AAA ACTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAA ACTAC CTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTCTCTTATGGT GTTCAATGCTTTTCCCGTTATCCGGATCACATGAAACGGCA TGACTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAG</p>

	<p>GAACGCACTATATCTTTCAAAGATGACGGGA ACTACAAGA CGCGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAA TCGTATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGA AACATTCTCGGACACAAACTCGAATACA ACTATAACTCAC ACAATGTATAGATCACGGCAGACAAACAAAAGAATGGAA TCAAAGCTAACTTCAA AATTCGCCACAACATTGAAGATGG ATCCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCA ATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCAGACAACCATTACC TGTCGACACAATCTGCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAA AGCGTGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTA ACTGCTGC TGGGATTACACATGGCATGGATGAGCTCTACAAACTCGAG CACCACCACCACCACC ACTGA</p> <p>氨基酸序列 (SEQ ID NO: 6), 其中*表示引入的 3,5-二氟代酪氨酸:</p> <p>MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEDATYG KLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFSYGVQCFSRYPDHMKRH DFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGNYKTRA EVKFEGLTLVNR IELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNV*ITADKQKNGIKAN FKIRHNIEDGSVQLADHYQONTPIGDGPVLLPDNHYLSTQS ALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITHGMDELYKLEHHHHH H</p>
<p>含有 574 位 F2Y 的原核蛋白酪氨 酸激酶突变体 (Etk-574-F2Y)</p>	<p>核苷酸序列 (SEQ ID NO: 7):</p> <p>ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGC CGCGCGGCAGCCATATGCGTGGTGTAGAAGCCCCGGAACA ACTGG AAGAGCACGGCATCAGCGTTTATGCCACTATCCCAATGTCCGAGTG GCTGGATAAACGCACCCGTCGCGTAAGAAAAATTTATTTCTAAT CAGCAGCGCCATCGTACTAAAAATATCCCCTCCTGGCGGTGGATA ACCCGGCGGATTCTGTGTGGAAGCCGTACGTGCGCTACGAACCA GTCTGCATTTTCGCTATGATGGAGACGGAGAATAACATTCTGATGAT CACCGGTGCGACGCCAGACAGTGGTAAAACGTTTGTCA GTTCAAC TCTGGCAGCGGTGATCGCCCAGTCCGATCAAAAAGTGTTATTTATT GATGCCGACTTACGCCGTGGTTAGTCGCATAACCTGTTTACCGTGA GTAATGAACATGGCTTGTCCGAATATCTGGCAGGTAAAGATGAGCT CAACAAAGTGATCCAGCATT TTTGGCAAAGGAGGCTTTGATGTGATT ACTCGCGGTCAGGTGCCACCTAACCCGTCTGAACTGCTGATGCGC GATCGGATGCGTCAATTACTGGAATGGGCGAACGACCATTACGATC TGGTGATTGTCGATACGCCCGCGATGCTGGCGGTGAGTGATGCCGC GGTCTGGGGCGTTCTGTTGGCACCAGCCTGCTGGTTGCGCGTTT TGGCTTGAACACCGCCAAAGAGGGTGAGTTTGTCAATGCAGCGTCT GGAACAGGCAGGCGTCAATATTAAGGCGCTATCCTCAATGGTGT GATTAAACGCGCCAGCACCGCTTACAGTTACGGCTATAACTATTAC GGTTATAGTTACTCCGAGAAAGAGTAA</p> <p>氨基酸序列 (SEQ ID NO:8), 其中*表示引入的 3,5-二氟代酪氨酸:</p> <p>MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMRGVEAPEQLEEHGISVYATI PMSEWLDKRTRLRKKNLFSNQQRHRTKNIPFLAVDNPADSA VEAVRALRTSLHFAMMETENNILMITGATPDSGKTFVSSTLA AVIAQSDQKVL FIDADLRG*SHNLFTVSNEHGLSEYLAGK DELNKVIQHFGKGGFDVITRGQVPPNPSELLMRDRMRQLE WANDHYDLVIVDTPPMLAVSDAAVVG RSVGTSLLVARFGLN TAKEVSLSMQRLEQAGVNIKGAILNGVIKRASTAYSYGNY YGYSYSEKE</p>

蛋白酪氨酸磷酸酶 PTP1B	<u>氨基酸序列 (SEQ ID NO:9):</u> MEMEKEFEQIDKSGSWAAIYRDIRHEASDFPCRVAKLPKNK NRNRYRDVSPFDHSRIKLHQEDNDYINASLIKMEEAQRSYIL TQGPLPNTCGHFWEMVWEQKSRGVVMLNRVMEKGSKLC AQYWPQKEEKEMIFEDTNLKLTLISEDIKSYTYRQLELENL TTQETREILHFHYTTWPDFGVPEPASFLNFLFKVRESGSLSP EHGPVVVHCSAGIGRSGTFCLADTCLLLMDKRKDPSSVDIK KVLLEMRFKRMGLIQTADQLRESYLAVIEGAKFIMGDSSVQ ISGRSFPTRTWSPHPSISPHLPGHPNESWSPTIRSLVLEHHHH HH
----------------	--

图 5