(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 102925427 A
(43)申请公布日 2013.02.13

(21)申请号 201110225152.8
(22)申请日 2011.08.08
(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 孙云 潘延超
(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 15/00(2006.01)
C12N 1/21(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)
C12N 15/70(2006.01)
C12N 15/85(2006.01)
G01N 33/68(2006.01)
A61K 49/00(2006.01)
C12Q 1/02(2006.01)
C12R 1/01(2006.01)
C12R 1/19(2006.01)

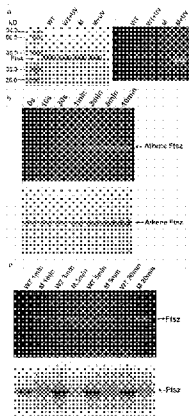
权利要求书 1 页 说明书 9 页
序列表 9 页 附图 5 页

(54)发明名称

丙烯酰赖氨酸翻译系统及其应用

(57)摘要

本发明提供利用正交 tRNA、正交丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶和它们的配对将丙烯酰赖氨酸掺入目标蛋白质的丙烯酰赖氨酸翻译系统，和利用所述翻译系统在目标蛋白质中定点特异掺入丙烯酰赖氨酸的方法。所述丙烯酰赖氨酸翻译系统包含：(i)丙烯酰赖氨酸；(ii)正交丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶；(iii)正交 tRNA，其中所述正交丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶用所述丙烯酰赖氨酸优先氨酰化所述正交 tRNA；和(iv)编码目标蛋白质的核酸，其中所述核酸含有所述正交 tRNA 特异性识别的至少一个选择密码子。本发明还涉及掺入丙烯酰赖氨酸的突变蛋白质的应用。



CN 102925427 A

1. 一种丙烯酰赖氨酸翻译系统，所述系统包含：

(i) 丙烯酰赖氨酸；

(ii) 正交丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶，其含有的氨基酸序列选自由 SEQ ID NO:2 所示氨基酸和它们的保守性变体构成的组；

(iii) 正交 tRNA，其包含 SEQ ID NO:1 所示的多核苷酸序列；其中所述正交丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶用所述丙烯酰赖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。

2. 如权利要求 1 所述的翻译系统，其特征在于，所述正交 tRNA 是琥珀抑制型 tRNA，并且所述选择密码子是琥珀密码子。

3. 如权利要求 1 所述的翻译系统，其还包含编码正交丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶的核苷酸序列。

4. 一种宿主细胞，其包含所述正交 tRNA 序列和编码所述正交丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶的核苷酸序列。

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，或哺乳动物细胞，优选大肠杆菌细胞和中国仓鼠卵巢细胞。

6. 一种产生在至少一个所选位置定点特异性掺入丙烯酰赖氨酸的突变蛋白质的遗传方法，所述方法包括下述步骤：

(a) 提供权利要求 1 所述的丙烯酰赖氨酸翻译系统，该系统包含：

(i) 丙烯酰赖氨酸；

(ii) 正交丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶，其含有的氨基酸序列选自由 SEQ ID NO:2 所示氨基酸和它们的保守性变体构成的组；

(iii) 正交 tRNA，其包含 SEQ ID NO:1 所示的多核苷酸序列；其中所述正交丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶用所述丙烯酰赖氨酸优先氨酰化所述正交 tRNA；和

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

(b) 将编码所述目标蛋白质的核酸转化到权利要求 4 所述的宿主细胞中，在所述蛋白质的翻译期间，丙烯酰赖氨酸氨酰化的正交 tRNA 对所述选择密码子起反应而将培养基中的丙烯酰赖氨酸掺入所述目标蛋白质的所述所选位置，从而产生在所选位置含丙烯酰赖氨酸的所述突变目标蛋白质。

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. 由权利要求 6 所述的方法获得的含有至少一个丙烯酰赖氨酸的突变蛋白质。

9. 由权利要求 6 所述的方法获得的含有至少一个丙烯酰赖氨酸的突变蛋白质的应用，所述突变蛋白质中的丙烯酰赖氨酸在光引发下通过与含有四唑官能团的化合物特异反应，从而交联化学活性荧光基团，用于在体内或体外有效地标记蛋白，或用于活体细胞成像。

10. 权利要求 9 所述的应用，其用于真细菌细胞、或哺乳动物细胞的活体细胞成像。

丙烯酰赖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，本发明提供丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶突变体，其含有的氨基酸序列选自由SEQ ID NO:2所示氨基酸和它们的保守性变体构成的组。本发明还涉及一种丙烯酰赖氨酸 (Acryllysine，或 AcrK) 翻译系统。更具体地，本发明涉及利用正交 tRNA、正交丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶和它们的配对将丙烯酰赖氨酸掺入目标蛋白质的丙烯酰赖氨酸翻译系统，和利用所述翻译系统在目标蛋白质中定点特异掺入丙烯酰赖氨酸的遗传方法。本发明还涉及用这种翻译系统和这种遗传方法产生的含有丙烯酰赖氨酸的突变蛋白质，以及含有丙烯酰赖氨酸的突变蛋白质的应用。

背景技术

[0002] 蛋白质是细胞功能的主要执行者。许多重要的生命过程，如多亚单位蛋白质复合体形成、细胞内信号转导、基因转录、蛋白质转运、蛋白质修饰和降解等，都依赖于蛋白质之间相互作用。所以，研究蛋白质的结构、功能及其相互作用是理解细胞生命过程中各种内在机制的关键。蛋白荧光标记技术已经被广泛应用于蛋白质功能的可视化研究中。荧光蛋白常被用来研究蛋白质在生物体内的表达和定位，但由于它本身体积比较大，往往会影响目标蛋白的生物活性。特异性的小分子荧光探针以其体积小、膜透性好、背景噪音低以及制备方便的优点成为蛋白质研究的一个有力工具 (陈磊，姚祝军，生命科学，2008，20(1) : 3-12)。但是，如何将具有各种不同功能的荧光分子引入到特定的蛋白是限制其应用的瓶颈。因此，发展一种高效的蛋白标记技术对生命科学的研究有着重要的意义。

[0003] 为此，生物正交化学提供了令人兴奋的研究生物体中生物分子动力学及功能的新策略 (Prescher J.A.，Bertozzi C.R. Nat. Chem. Biol.，2005，1 :13-21 ；van Swieten P.F.，Leeuwenburgh M.A.，Kessler B.M.，Overkleeft H.S. Org. Biomol. Chem.，2005，3 :20-27 ；Barglow K.T.，Cravatt B.F. Nat. Methods，2007，4 :822-827)。与以配体为基础的方法相比，生物正交化学则需要能与目标生物分子特异性共价结合的探针分子。因此这种方法具有以下独特的优势 :(1) 能应用到各种各样的生物体分子中，包括蛋白、核酸、碳水化合物和脂质体。(2) 用途广泛，探针分子的选择取决于研究人员的想象力。(3) 具有高扩展性，适合活细胞中单个目标生物分子功能注释以及一类生物分子的全基因功能分析。由于这些特征，生物正交化学被成功的运用到可视化蛋白表达，跟踪蛋白定位，测定蛋白活性，鉴定蛋白相互作用和生物体系中蛋白转换等功能研究。

[0004] 在化学和生物学复杂的分子系统研究中，需要高度选择性修饰分子的方法。特别是在大生物分子中，由于分子链长和结构复杂，不可避免的产生非特异性标记和副反应。通过生物正交化学的方法选择性的修饰蛋白为研究活体内蛋白功能提供了强有力的工具，这种方法目前的一个主要瓶颈是缺少可以位点特异性插入蛋白的生物正交反应基团。另外，生物正交反应广泛应用于解决生物体中复杂和动态的生物问题上则应具备以下三种必要特性 :(1) 真正的生物正交性 ；(2) 快反应速率 ；(3) 快速的可诱导性 (LIM Reyna K.V.，LIN Q. Science china，2010，53(1) :61-70)。优良的生物正交性和快反应速率的重要性在这个

领域中已经得到认可，但可诱导性的重要性还没有被广泛理解。

[0005] 与其他生物正交反应相比，点击化学由于其具有高选择性、水兼容性和高产率的特点使其在细胞生物学研究中具有巨大的应用前景 (Y.Clovis J.S.，EckellA.，HuisgenR.，Sustmann R.Chem.Ber.，1967，100：60-70)。光点击化学是由纽约大学的 Lin Q. 教授提出来的概念，其的主要优点是不需要 Cu(I) 催化，而是通过光诱导引发反应。这类生物正交反应提供了一种用于研究生物时空分辨和可控引发的化学工具。由于四唑类化合物在紫外光照射下能够释放氮气而原位生成腈亚胺偶极子，该偶极子与烯发生瞬间环合生成吡唑啉环加成产物 (Wang Y.，Rivera Vera C.I.，Lin Q.Org.Lett.，2007，9：4155-4158；Wang Y.，Hu W.J.，Song W.，Lim R.K.V.，Lin Q.Org.Lett.，2008，10：3725-3728)，因此这类反应能够实现时空可控引发。值得注意的是这种环加成反应具有以下特点：(1) 与传统的利用半胱氨酸和氮端氨基或碳端羧基的反应活性引入标记分子的蛋白标记方法相比，基因编码含有烯烃官能团的氨基酸具有位点特异性。(2) 四唑类化合物在光照条件下只与烯烃反应，具有反应特异性，能够实现蛋白的特异标记。(3) 能够在多种溶剂中发生反应，具有良好的溶剂兼容性；能够特定的与烯烃反应，而不与醛基，氰基等活性基团反应，具有官能团耐受性；立体选择性和高收率 (90％以上)。(4) 反应快速，腈亚胺偶极子的生成速率为 $k_1 = 0.14s^{-1}$，环合产物的二级反应速率为 $11.0M^{-1}s^{-1}$。而且吡唑啉环加成产物是有荧光的，这样我们就能用荧光分析来证明特定的环加成产物的生成 (Song，W.，Wang，Y.，Qu，J.，Madden，M.M.，Lin，Q.Angew.Chem.Int.Ed.，2008，47：2832-2835)。随着新型荧光分子探针的出现和成像方法的改进，光学成像的分辨率得到极大的改进，超分辨和活细胞荧光成像成为目前生物单分子研究的热点。2006 年底，庄晓薇实验组开发出来一种打破分辨率极限的 STORM 超高分辨荧光成像采技术 (Rust M.J.，Bates M.，Zhuang X.Nat.Methods，2006，3：793-795)。他们发现，不同的波长可以控制化学荧光分子 Cy5 在荧光激发态和暗态之间切换。当 Cy3 和 Cy5 交联成分子对时，具备了特定的激发光转换荧光分子发射波长的特性。将 Cy3 和 Cy5 分子对交联到特异的蛋白质抗体上，就可以用抗体来标记细胞的内源蛋白。应用特定波长的激光来激活探针，然后应用另一个波长激光来观察、精确定位以及漂白荧光分子，此过程循环上百次后就可以得到最后的内源蛋白的高分辨率影像。2007 年，他们进一步改进 STORM 技术，发展了不同颜色的变色荧光分子对，可以同时记录两种甚至多种蛋白质的空间相对定位，从而阐明笼形蛋白 clathrin（网格蛋白）形成的内吞小泡与细胞骨架蛋白之间的精确空间位置关系，两种颜色的分辨率都可以达到 20 ～ 30nm(Bates M.，Huang B.，Dempsey G.T.，et al.Science，2007，317：1749-1753)。因此，我们希望通过扩展基因密码的方法在蛋白的特异性位点掺入含有烯烃官能团的氨基酸，利用烯烃与连有染料分子的四唑化合物在一定波长紫外光照射下发生环加成反应来交联荧光分子，从而建立位点特异性标记蛋白和超高分辨荧光成像的一种新方法，为将来的深入研究创造条件。

[0006] 为了能在蛋白的特异性位点掺入含有烯烃官能团的氨基酸，本领域需要能将非天然丙烯酰赖氨酸掺入蛋白质的新方案。现已开发了在原核和真核生物中将各种非天然氨基酸体内位点特异性地掺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掺入限定位置。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 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 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。

[0007] 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,其名为“METHODS AND COMPOSITION FOR THE PRODUCTION OF ORTHOGONAL tRNA-AMINOACYL-tRNA SYNTHETASE PAIRS”;WO 2002/085923,其名为“IN VIVO INCORPORATION OF UNNATURAL AMINO ACIDS”;WO 2004/094593,其名为“EXPANDING THE EUKARYOTIC GENETIC CODE”。掺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

[0008] 1、技术问题

[0009] 本发明提供丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶突变体,其含有的氨基酸序列选自由 SEQ ID NO :2 所示氨基酸和它们的保守性变体构成的组。本发明涉及利用正交 tRNA、正交丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶和它们的配对将丙烯酰赖氨酸 (AcrK) 掺入目标蛋白质的丙烯酰赖氨酸翻译系统,和利用所述翻译系统在目标蛋白质中定点特异性掺入丙烯酰赖氨酸的遗传方法。本发明还涉及用这种翻译系统和这种遗传方法产生的含有丙烯酰赖氨酸的突变蛋白质及其应用。

[0010] 因此,本发明的目的在于提供利用正交 tRNA、正交丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶和它们的配对将丙烯酰赖氨酸掺入蛋白质的丙烯酰赖氨酸翻译系统,并且提供利用该翻译系统在目标蛋白质中掺入丙烯酰赖氨酸的方法。

[0011] 本发明还提供利用本发明的丙烯酰赖氨酸翻译系统产生的含有至少一个丙烯酰赖氨酸的突变蛋白质。在本发明的优选方面中,本发明人利用这种方法将丙烯酰赖氨酸分别定点特异掺入绿色荧光蛋白 (GFP) 和 Ftsz 蛋白 (filamentation temperature sensitive Z ring,Peter L.Graumann,Annu.Rev.Microbiol.,2007,61 :589-618) 中,通过与四唑类化合物发生光点击反应生成具有荧光的化合物进而实现荧光标记。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绿色荧光蛋白 (GFP) 和 Ftsz 蛋白之外的多种蛋白中定点特异掺入丙烯酰赖氨酸,并不局限于这两种蛋白。

[0012] 在另一个方面中,本发明提供利用本发明的丙烯酰赖氨酸翻译系统获得的在至少一个所选位置定点特异掺入丙烯酰赖氨酸的突变蛋白质的应用,所述突变蛋白质中的丙烯酰赖氨酸在光引发下通过与含有四唑官能团的化合物特异反应,从而交联化学活性荧光基团,用于在体内或体外有效地标记蛋白,或用于活体细胞成像,例如,用于真细菌细胞、或哺乳动物细胞的活体细胞成像。

[0013] 2、技术方案

[0014] 本发明提供在体内 (例如在宿主细胞内) 对选择密码子 (selector codon) 如琥珀终止密码子 (TAG) 起反应而将非天然氨基酸丙烯酰赖氨酸掺入延伸中的多肽链的丙烯

酰赖氨酸翻译系统。所述丙烯酰赖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 tRNA 合成酶 (O-RS) 配对。即，宿主细胞内源性氨酰 tRNA 合成酶不会用氨基酸（天然的或非天然的）加载 O-tRNA。类似地，本发明提供的 O-RS 不以显著水平或者某些情况下不以可检测水平地用氨基酸（天然的或非天然的）加载内源性 tRNA。利用所述翻译系统能够产生含有在翻译过程中掺入丙烯酰赖氨酸的大量蛋白质。

[0015] 在一些方面中，本发明提供丙烯酰赖氨酸翻译系统。所述翻译系统包含 :(a) 非天然氨基酸，即丙烯酰赖氨酸，(b) 正交丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶 (O-RS)，其含有的氨基酸序列选自由 SEQ ID NO :2 所示氨基酸和它们的保守性变体构成的组和 (c) 正交 tRNA(O-tRNA)，其包含 SEQ ID NO :1 所示的多核苷酸序列，其中所述正交丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶用所述非天然氨基酸（即丙烯酰赖氨酸），优先氨酰化所述 O-tRNA。

[0016] 优选地，本发明的丙烯酰赖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，本发明的丙烯酰赖氨酸翻译系统还包含编码所述正交丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶的核苷酸序列。

[0017] 在本发明的优选方面中，本发明提供一种丙烯酰赖氨酸翻译系统，所述系统包含 :

[0018] (i) 丙烯酰赖氨酸 ;

[0019] (ii) 正交丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶，其含有的氨基酸序列选自由 SEQ ID NO :2 所示氨基酸和它们的保守性变体构成的组 ;

[0020] (iii) 正交 tRNA，其包含 SEQ ID NO :1 所示的多核苷酸序列 ;其中所述正交丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶用所述丙烯酰赖氨酸优先氨酰化所述正交 tRNA ;和

[0021] (iv) 编码目标蛋白质的核酸，其中所述核酸含有所述正交 tRNA 特异性识别的至少一个选择密码子。

[0022] 优选地，所述丙烯酰赖氨酸翻译系统还包含编码所述正交丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶的核苷酸序列。

[0023] 该翻译系统中的各种组分可以衍生自各种物种来源，例如，该翻译系统中的各组分衍生自巴氏甲烷八叠球菌 (Methanosarcina barkeri)。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赖氨酸 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，用于该系统的正交丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶 (O-RS) 包含 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列，优选地，所述正交丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶 (O-RS) 的氨基酸序列如 SEQ ID NO :2 所示。

[0024] 在一些方面中，本发明的丙烯酰赖氨酸翻译系统还包含编码目标蛋白质的核酸，其中所述核酸具有由正交 tRNA(O-tRNA) 特异性识别的至少一个选择密码子。在优选方面中，所述正交 tRNA 是琥珀抑制型 tRNA，并且所述选择密码子是琥珀密码子。

[0025] 在一些方面中，本发明提供包含正交 tRNA 序列和编码正交丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶的核苷酸序列的宿主细胞。所用的宿主细胞不作具体限定，只要 O-RS 和 O-tRNA 在它们的宿主细胞环境中保留它们的正交性即可。例如，所述宿主细胞可以是真细菌细胞，也可以是哺乳动物细胞，优选大肠杆菌细胞和中国仓鼠卵巢细胞。如实施例所述，可以将包

含正交 tRNA 序列的重组载体和包含编码正交丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶的核苷酸序列的重组载体共转化到宿主细胞中，而获得包含正交 tRNA 序列和编码正交丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶的核苷酸序列的宿主细胞。

[0026] 本发明还提供产生在至少一个所选位置定点特异性掺入丙烯酰赖氨酸的突变蛋白质的遗传方法。所述方法利用上述丙烯酰赖氨酸翻译系统进行。所述方法通常始于提供含有以下组分的丙烯酰赖氨酸翻译系统的步骤：(i) 非天然氨基酸，即丙烯酰赖氨酸；(ii) 正交丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶 (O-RS)，其含有的氨基酸序列选自由 SEQ ID NO：2 所示氨基酸和它们的保守性变体构成的组；(iii) 正交 tRNA(O-tRNA)，其包含 SEQ IDNO：1 所示的多核苷酸序列，其中所述正交丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶用所述非天然氨基酸（即丙烯酰赖氨酸）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 O-tRNA 特异性识别的至少一个选择密码子（任选地为琥珀密码子）；然后将编码所述目标蛋白质的核酸转化到包含正交 tRNA 序列和编码正交丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶的核苷酸序列的宿主细胞中，在所述蛋白质的翻译过程中，丙烯酰赖氨酸氨酰化的 O-tRNA 对所述选择密码子起反应而将培养基中的丙烯酰赖氨酸掺入所述目标蛋白质的所选位置，从而产生在所选位置含有丙烯酰赖氨酸的突变蛋白质。其中包含正交 tRNA 序列和编码正交丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶的核苷酸序列的宿主细胞可以通过将包含正交 tRNA 序列的重组载体和包含编码正交丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶的核苷酸序列的重组载体共转化到所选的宿主细胞中而获得。本领域技术人员应该理解，这可以通过常规分子克隆技术和筛选技术实现。

[0027] 在所述方法的一些实施方式中，提供翻译系统的步骤包括通过定点诱变使野生型氨酰 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（即丙烯酰赖氨酸）优先氨酰化所述 O-tRNA 的氨酰 tRNA 合成酶突变体（即，本发明所用的正交丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶）。在一些实施方式中，提供翻译系统的步骤还包括提供 O-tRNA 的序列，O-tRNA 为古菌来源的反密码子突变为与琥珀密码互补的赖氨酸 tRNA，例如，所述 O-tRNA 是琥珀抑制型 tRNA，或者 O-tRNA 包含 SEQ ID NO：1 所示的多核苷酸序列。在这些方法中，提供翻译系统的步骤还包括提供含有所述翻译系统所用的琥珀选择密码子的编码目标蛋白质的核酸。

[0028] 还可在宿主细胞内实施产生含有丙烯酰赖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丙烯酰赖氨酸翻译系统（即，包含编码正交丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶 (O-RS) 的核苷酸序列、正交 tRNA(O-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，在培养基中添加适宜浓度的丙烯酰赖氨酸等）培养该宿主细胞可导致在所述目标蛋白质中定点特异性掺入丙烯酰赖氨酸。在一些实施方式中，提供步骤包括提供真细菌宿主细胞和哺乳动物细胞，例如，大肠杆菌和中国仓鼠卵巢细胞。

[0029] 本发明还提供蛋白荧光标记的遗传方法，所述方法利用上述丙烯酰赖氨酸翻译系统进行。这些方法通常始于提供含有以下组分的丙烯酰赖氨酸翻译系统的步骤：(i) 丙烯酰赖氨酸；(ii) 正交丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶 (O-RS)，其含有的氨基酸序列选自由 SEQ ID NO：2 所示氨基酸和它们的保守性变体构成的组；(iii) 正交 tRNA(O-tRNA)，其包含 SEQ ID NO：1 所示的多核苷酸序列，其中所述正交丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶用所述丙

烯酰赖氨酸优先氨酰化所述正交 tRNA ;和 (iv) 编码所述荧光蛋白质的核酸,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 (任选地为琥珀密码子) ;然后在所述蛋白质的翻译过程中,丙烯酰赖氨酸氨酰化的正交 tRNA 对所述选择密码子起反应而将培养基中的所述丙烯酰赖氨酸掺入所述蛋白的所选位置,之后通过与含四唑官能团的化合物在一定波长紫外光照射下发生环加成反应,生成具有荧光的吡唑化合物以实现位点特异性标记蛋白和超高分辨荧光成像。

[0030] 因此,本发明还提供利用本发明的丙烯酰赖氨酸翻译系统获得的包含至少一个丙烯酰赖氨酸的突变蛋白质的应用,所述突变蛋白质中的丙烯酰赖氨酸在光引发下通过与含有四唑官能团的化合物特异反应,从而交联化学活性荧光基团,用于在体内或体外有效地标记蛋白,或用于活体细胞成像。所述活体细胞选自真细菌细胞,或哺乳动物细胞,优选大肠杆菌细胞和中国仓鼠卵巢细胞。

[0031] 3、有益效果

[0032] 通过生物正交化学的方法选择性的修饰蛋白,可以实现蛋白位点特异性插入生物正交反应基团。应用琥珀密码子在细胞中编码含有烯烃活性官能团的氨基酸 (丙烯酰赖氨酸),实现在特定位点掺入该非天然氨基酸的蛋白质的高效表达,进而在光引发下通过与含有四唑官能团的化合物特异反应,从而交联化学活性荧光基团。并且丙烯酰赖氨酸与四唑类化合物的光点击反应速率很快,365nm 紫外线照射下,只需几分钟,就可以在体内或者体外有效地标记蛋白,从而实现蛋白特异位点荧光标记。

[0033] 另外,采用遗传突变掺入丙烯酰赖氨酸以及光点击反应技术,还适合活体细胞成像,无需基因融合绿色荧光蛋白 (GFP)。因为该方法比较简单,仅需要突变一个氨基酸,同时附加使用一个分子量 338Da 的四唑类化合物 T3 即可在干扰背景最低的情况下实现活体细胞中的蛋白质成像。该成像技术对于标记那些可以组装成分子量较大的复合体的蛋白,如细胞骨架或鞭毛尤其有意义。因为引入 GFP 融合或其他大的标签可能干扰标记蛋白的装配和功能。

附图说明

[0034] 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,

[0035] 其中 :

[0036] 图 1 是丙烯酰赖氨酸的合成 ;

[0037] 图 2 是四唑类化合物 T1 及 T3 的合成 ;

[0038] 图 3 是文中所述蛋白的核苷酸 / 氨基酸序列 ;

[0039] 图 4 :a 图是 AcrK- 绿色荧光蛋白 (GFP) 的 SDS-PAGE 电泳图,b 图 (上) 是质谱图解卷积处理图,b 图 (下) 是电喷雾质谱图 ;

[0040] 图 5 :a 图是野生型 Ftsz 蛋白及 Ftsz-3-AcrK 蛋白和 T3 进行光点击反应后的 SDS-PAGE 及琼脂糖凝胶电泳图,b 图是野生型 Ftsz 蛋白及 Ftsz-3-AcrK 蛋白和 T3 进行不同时间 (0-10 分钟) 光点击反应后的 SDS-PAGE 及琼脂糖凝胶电泳图,c 图是产生野生型 Ftsz 蛋白及 Ftsz-3-AcrK 蛋白的大肠杆菌细胞和 T3 进行不同时间 (0-20 分钟) 光点击反应后,细胞裂解液的 SDS-PAGE 及琼脂糖凝胶电泳图 ;

[0041] 图 6 是大肠杆菌细胞荧光成像 :左图是通过 DAPI 通道观察图片,右图是通过 DIC

通道观察图片；

[0042] 图7是CHO细胞荧光成像：左图是通过GFP通道观察图片，右图是通过DIC通道观察图片。

具体实施方式

[0043] 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。

[0044] 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。

[0045] 实施例1：化学合成

[0046] 1、丙烯酰赖氨酸(AcrK)的合成(图1)：向装有磁力搅拌和温度计的250mL圆底三口瓶中加入化合物N-α-Boc-赖氨酸(2.46g,10.0mmol,购自上海吉尔生化公司)及无水碳酸钠(2.12g,20.0mmol)，再加入100mL乙酸乙酯和水的混合溶剂(乙酸乙酯：水(v/v)＝1：1)，冰浴搅拌下缓慢加入1.1个当量丙烯酰氯(购自TCI公司)的乙酸乙酯溶液。反应过夜，用冰醋酸调pH至3，乙酸乙酯萃取，旋蒸后冰浴下加入100mL乙酸乙酯的氯化氢溶液，搅拌过夜，有大量白色固体析出，过滤，固体用乙酸乙酯洗涤数次，干燥后得目标化合物丙烯酰赖氨酸(1.44g,7.2mmol)，收率72%。^{1}H NMR(600MHz, D_2O) δ ＝1.38-1.47(m,2H), 1.55-1.59(m,2H), 1.89-1.97(m,2H), 3.26(dd, J_1 ＝6.94Hz, J_2 ＝13.73,2H), 4.03(dd, J_1 ＝6.21Hz, J_2 ＝12.47Hz,2H), 5.71(d, J ＝10.30Hz,1H), 6.12-6.24(m,2H)。ESI-MS：m/z 201.1$[M+H]^+$。

[0047] 2、四唑类化合物T1的合成(图2)：根据文献方法(Ito, S.；Tanaka, Y.；Kakehi, A.；Kondo, K. Bull. Chem. Soc. Jpn., 1976, 49：1920-1923)，将4-甲酸-苯甲酸甲酯(1.64g, 10.0mmol，购自Alfa Aesar公司)溶于100mL无水乙醇中，加入和等当量的苯磺酰肼(1.72g,10.0mmol，购自百灵威公司)，使反应在室温下搅拌过夜，有大量白色固体析出。过滤，收集固体干燥后得2.92g，收率92%，不需进一步提纯而直接用于下一步反应。

[0048] 将对甲氧基苯胺(615mg,5.0mmol，购自百灵威公司)溶于无水乙醇：水(1：1, 10mL)中，冰浴冷却后加入浓盐酸(1.0mL)搅拌10min后，缓慢滴加$NaNO_2$(363mg,5.25mmol)的5mL水溶液。冰浴下继续搅拌1h后，将其滴加到上述合成的Schiff碱(1.59g,5.0mmol)的20mL吡啶溶液中。TLC跟踪反应进程，反应结束后，加入等体积的水后有大量固体析出，过滤，用乙醚和乙酸乙酯的混合溶剂(1：1)洗涤后得到浅粉色固体，收率为52%。^{1}H NMR(600MHz, $CDCl_3$) δ ＝3.98(s,3H), 4.05(s,3H), 7.15(d, J ＝8.1Hz,2H), 8.18(d, J ＝8.1Hz,2H), 8.27(d, J ＝7.6Hz,2H), 8.39(d, J ＝7.6Hz,2H)；^{13}C NMR(150MHz, $CDCl_3$) δ ＝52.25,55.64,114.72,121.40,126.85,130.15,130.31,131.37,131.70,160.68,164.07, 166.46。

[0049] 3、四唑类化合物T3的合成(图2)：将合成的化合物T1(310mg,1.0mmol)悬浮于乙二胺(购自北京市兴沣化工厂)中，加热至80℃过夜。减压浓缩，用甲醇：二氯甲烷(v/v)＝1：9体系过柱(100目硅胶柱(购自蓝弋公司))，纯化后得浅黄色固体200mg，收率为60%。^{1}H NMR(600MHz, DMSO-d_6) δ ＝3.04(s,2H), 3.60-3.57(m,2H), 3.88(s,3H), 7.24(d, J ＝13.2Hz,2H), 7.95(br s,2H), 8.09-8.11(m,4H), 8.28(d, J ＝12.0Hz,2H),

8.84(t, J_1 = 7.8Hz, J_2 = 16.2Hz, 1H) ; ^{13}C NMR(150MHz, DMSO-d_6) δ = 37.23, 38.58, 55.70, 115.11, 121.69, 126.42, 128.36, 129.08, 129.52, 135.91, 160.48, 163.63, 166.20 ; ESI-MS : m/z 339.1 $[M+H]^+$。

[0050] 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。

[0051] 实施例 2 ：表达 AcrK- 绿色荧光蛋白 (GFP) 及质谱鉴定

[0052] 为了在基因中位点特异性掺入丙烯酰赖氨酸 (AcrK)，需要在所用的 E.coli 宿主细胞中引入丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶 /tRNA 正交对，这个正交对来源于巴氏甲烷八叠球菌 (Methanosarcina barkeri) 琥珀抑制 tRNA(Mb $tRNA_{CUA}^{Pyl}$)/ 氨酰 tRNA 合成酶 (Mb PylRS) 对。将正交 tRNA(SEQ ID NO :1) 和丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶突变体 (SEQ ID NO :2)(Heinz Neumann, Sew Y Peak-Chew, Jason W Chin, Genetically encoding Ne-acetyllysine in recombinant proteins, Nature chemical biology, 4, 4, 2008 ; Neumann H, Hancock SM, Buning R, et al, Mol Cell, 2009 Oct9 ; 36(1) :153-63) 分别构建到 pEVOL 载体 (美国 scripps 研究所 Peter G. Schultz 实验室惠赠) 上，然后共转化到包含有 pEt22b-GFP-151TAG(SEQID NO :4)(pEt22b 购自 novagen 公司) 的 DH10B 细胞 (购自全式金公司) 中。挑取单个克隆在 37℃培养到 OD_{600} 约等于 0.5 时，向 LB 培养基中加入 1mM 丙烯酰赖氨酸 (AcrK)，1mM IPTG(购自 sigma 公司) 及 0.2％阿拉伯糖 (购自 sigma 公司) 培养细胞，对照不加入 AcrK。6-8 小时之后，收菌，Ni-NTA(购自南京金斯瑞公司) 纯化蛋白，并用 SDS-PAGE 电泳分析 (图 4a)。

[0053] 我们发现，只有在存在丙烯酰赖氨酸 (AcrK) 的培养基中才能纯化出全长的绿色荧光蛋白，这说明丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶突变体可以特异性的识别 AcrK。在 LB 培养基中，AcrK- 绿色荧光蛋白的产率为 10mg/L，而野生型绿色荧光蛋白的产率为 50mg/L。为了检测 AcrK 仅仅掺入到绿色荧光蛋白的 151 位琥珀突变位点，我们对 AcrK- 绿色荧光蛋白进行了 ESI-TOF 质谱检测，检测结果分子量为 27728Da(图 4b)，与计算的分子量 27728Da 吻合，说明该丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶突变体可以有效地将丙烯酰赖氨酸掺入到目标蛋白的琥珀突变位点。

[0054] 实施例 3 ：表达 AcrK-Ftsz 并进行体内外光点击反应

[0055] 将野生型 Ftsz(SEQ ID NO :6，来源于大肠杆菌 BL21) 构建在 pEt22b 载体 (购自 novagen 公司) 上，同时将正交 tRNA(SEQ ID NO :1) 和丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶突变体的核苷酸序列 (SEQ ID NO :3) 分别构建到 pEVOL 载体 (美国 scripps 研究所 Peter G. Schultz 实验室惠赠) 上。通过 PCR 方法，在 Ftsz 3 位引入 TAG(SEQ ID NO :8，Ftsz-3TAG，其中第 3 位氨基酸为丙烯酰赖氨酸，用 @ 表示)。共转化 pEVOL-tRNA(即，包含正交 tRNA 序列 (SEQ ID NO :1) 的重组载体)，pEVOL-AcrKRS(即，包含丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶突变体核苷酸序列 (SEQ ID NO :3) 的重组载体) 及 pEt22b-Ftsz-3TAG 到 BL21(DE3) 细胞 (购自全式金公司) 中，表达纯化条件同 Ftsz-3-AcrK。结果显示，只有在存在 AcrK 的培养基中才能纯化出全长的 Ftsz-3-AcrK 蛋白，产率为 5mg/L，而野生型 Ftsz 蛋白的产率为 50mg/L。

[0056] 取 10μM 纯化的野生型 Ftsz 蛋白及 Ftsz-3-AcrK 蛋白分别与 100μM 四唑类化合物 T3 在 PBS 缓冲液中孵育，然后用 365nm 手提紫外灯照射 5 分钟，同时以未照射紫外灯的作为对照。将反应后的混合物加入琼脂糖凝胶的加样槽内，通电进行电泳。待电泳结束后，取

出凝胶，在紫外灯下观察是否有荧光。观察结果表明，只有 Ftsz-3-AcrK 蛋白和 T3 混合物在经紫外灯照射后能形成荧光产物（图 5a），也就是说，T3 只能和 AcrK 进行光点击反应，而不能与其它天然氨基酸发生反应。为了验证该反应的速率，取如上所述 Ftsz-3-AcrK 蛋白和 T3 混合物，用 365nm 手提紫外灯分别照射不同时间 (0-10 分钟）后，通过凝胶电泳观察荧光。如图 5b 所示，紫外灯仅照射 10 秒后，就能形成肉眼可观察到荧光的环加成产物，并且随着照射时间的延长，荧光强度也逐渐增加，直至照射 5 分钟时，光点击反应基本结束。

[0057] 为了进一步证明该点击反应在活体细胞内的有效性和选择性，我们培养出分别能产生野生型 Ftsz 蛋白及 Ftsz-3-AcrK 蛋白的大肠杆菌细胞（利用常规分子克隆技术进行，分别构建野生型 Ftsz 蛋白及 Ftsz-3-AcrK 蛋白的表达载体，然后转化到大肠杆菌细胞中进行表达），并将其与 100μM T3 在 PBS 缓冲液中 37℃孵育 30 分钟，然后用 365nm 手提紫外灯分别照射不同时间 (0-20 分钟）后，裂解细胞，通过凝胶电泳和 SDS-PAGE 观察分析细胞裂解液。如图 5c 所示，产生野生型 Ftsz 蛋白的大肠杆菌细胞不能与 T3 产生光点击反应，而产生 Ftsz-3-AcrK 蛋白的大肠杆菌细胞和 T3 仅需 365nm 紫外灯照射 1 分钟，就可以形成荧光产物。

[0058] 同时，我们验证了光点击反应在活体细胞荧光成像方面的应用。我们培养出分别能产生野生型 Ftsz 蛋白及 Ftsz-3-AcrK 蛋白的大肠杆菌细胞，将其与 100μM T3 在 PBS 缓冲液中 37℃孵育 30 分钟，然后用 365nm 手提紫外灯分别照射 5 分钟后，于奥林巴斯 LSCMFV500 聚焦显微镜（日本，奥林巴斯）下通过 DAPI 通道观察荧光信号。从如图 6 所示，只有产生 Ftsz-3-AcrK 蛋白的细胞产生荧光信号，而产生野生型 Ftsz 蛋白的大肠杆菌细胞则无荧光信号。

[0059] 实施例 4 :表达 EGFP-AcrK 并进行哺乳动物细胞荧光成像

[0060] 既然细菌和哺乳动物细胞中均存在氨酰 tRNA 合成酶 /tRNA 正交对，我们接下来验证了正交 tRNA/ 正交丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶 ($MbtRNA_{CUA}^{Pyl}$/Mb AcrKRS) 是否可以将 AcrK 遗传掺入到哺乳动物细胞蛋白中。我们把 $tRNA_{CUA}^{Pyl}$(SEQ ID NO :1) 和 AcrKRS 基因 (SEQ ID NO :3) 分别克隆到 pCMV-NBK-1 载体（美国 scripps 研究所 Peter G. Schultz 实验室惠赠）上，分别获得重组构建体 pCMV-tRNA 和 pCMV-AcrKRS，由 CMV 启动子控制 AcrKRS 的表达，U6 控制 Mb $tRNA_{CUA}^{Pyl}$ 的转录。同时按照常规分子克隆方法构建 pSwan-EGFP 质粒 (pSwan 质粒由美国 scripps 研究所 Peter G.Schultz 实验室惠赠），并在 EGFP 的 37 位引入 TAG 突变。在 35-mm 玻底皿（购自杭州生友公司）上用 10％ FBS DMEM/F12 培养基（购自茂健联星公司）培养 CHO 细胞（中国仓鼠卵巢细胞，购自中国协和医科大学基础医学院），待其生长至 50-60％时，用 Lipofectamine 2000 试剂（购自 Invitrogen 公司）将质粒 pCMV-tRNA、pCMV-AcrKRS 和 pSwan-EGFP37TAG 共转染到 CHO 细胞中，在加入 1mM 丙烯酰赖氨酸 (AcrK) 的情况下培养细胞 48 小时，并以未加 AcrK 的作为对照。发现只有加入 AcrK 的细胞可以观察到荧光信号，而没有 AcrK 的情况下无荧光信号（图 7），表明 AcrK 成功地通过 Mb $tRNA_{CUA}^{Pyl}$/Mb AcrKRS 正交对掺入到哺乳动物细胞的遗传密码子编码的蛋白序列中。

[0061] 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]

IB114372序列表

序列表

<110> 中国科学院生物物理所

<120> 内烯酰赖氨酸翻译系统及其应用

<130> IB114372

<160> 9

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 72

<212> DNA

<213> 人工合成的

<400> 1
gggaacctga tcatgtagat cgaatggact ctaaatccgt tcagccgggt tagattcccg 60

gggtttccgc ca 72

<210> 2

<211> 419

<212> PRT

<213> 人工合成的

<400> 2

Met Asp Lys Lys Pro Leu Asp Val Leu Ile Ser Ala Thr Gly Leu Trp
1 5 10 15

Met Ser Arg Thr Gly Thr Leu His Lys Ile Lys His His Glu Val Ser
20 25 30

Arg Ser Lys Ile Tyr Ile Glu Met Ala Cys Gly Asp His Leu Val Val
35 40 45

Asn Asn Ser Arg Ser Cys Arg Thr Ala Arg Ala Phe Arg His His Lys
50 55 60

Tyr Arg Lys Thr Cys Lys Arg Cys Arg Val Ser Gly Glu Asp Ile Asn
65 70 75 80

Asn Phe Leu Thr Arg Ser Thr Glu Ser Lys Asn Ser Val Lys Val Arg
85 90 95

[0002]

IB114372序列表

Val Val Ser Ala Pro Lys Val Lys Lys Ala Met Pro Lys Ser Val Ser
100 105 110

Arg Ala Pro Lys Pro Leu Glu Asn Ser Val Ser Ala Lys Ala Ser Thr
115 120 125

Asn Thr Ser Arg Ser Val Pro Ser Pro Ala Lys Ser Thr Pro Asn Ser
130 135 140

Ser Val Pro Ala Ser Ala Pro Ala Pro Ser Leu Thr Arg Ser Gln Leu
145 150 155 160

Asp Arg Val Glu Ala Leu Leu Ser Pro Glu Asp Lys Ile Ser Leu Asn
165 170 175

Met Ala Lys Pro Phe Arg Glu Leu Glu Pro Glu Leu Val Thr Arg Arg
180 185 190

Lys Asn Asp Phe Gln Arg Leu Tyr Thr Asn Asp Arg Glu Asp Tyr Leu
195 200 205

Gly Lys Leu Glu Arg Asp Ile Thr Lys Phe Phe Val Asp Arg Gly Phe
210 215 220

Leu Glu Ile Lys Ser Pro Ile Leu Ile Pro Ala Glu Tyr Val Glu Arg
225 230 235 240

Met Gly Ile Asn Asn Asp Thr Glu Leu Ser Lys Gln Ile Phe Arg Val
245 250 255

Asp Lys Asn Leu Cys Leu Arg Pro Met Met Ala Pro Thr Ile Phe Asn
260 265 270

Tyr Ala Arg Lys Leu Asp Arg Ile Leu Pro Gly Pro Ile Lys Ile Phe
275 280 285

Glu Val Gly Pro Cys Tyr Arg Lys Glu Ser Asp Gly Lys Glu His Leu
290 295 300

Glu Glu Phe Thr Met Val Asn Phe Phe Gln Met Gly Ser Gly Cys Thr
305 310 315 320

Arg Glu Asn Leu Glu Ala Leu Ile Lys Glu Phe Leu Asp Tyr Leu Glu
325 330 335

Ile Asp Phe Glu Ile Val Gly Asp Ser Cys Met Val Tyr Gly Asp Thr
340 345 350

Leu Asp Ile Met His Gly Asp Leu Glu Leu Ser Ser Ala Val Val Gly
355 360 365

Pro Val Ser Leu Asp Arg Glu Trp Gly Ile Asp Lys Pro Trp Ile Gly
370 375 380

Ala Gly Phe Gly Leu Glu Arg Leu Leu Lys Val Met His Gly Phe Lys
385 390 395 400

[0003]

IB114372序列表

Asn Ile Lys Arg Ala Ser Arg Ser Glu Ser Tyr Tyr Asn Gly Ile Ser
405 410 415

Thr Asn Leu

<210> 3

<211> 1260

<212> DNA

<213> 人工合成的

<400> 3

atggataaaa aaccgctgga tgtgctgatt agcgcgaccg gcctgtggat gagccgtacc 60

ggcaccctgc ataaaatcaa acatcatgaa gtgagccgca gcaaaatcta tattgaaatg 120

gcgtgcggcg atcatctggt ggtgaacaac agccgtagct gccgtaccgc gcgtgcgttt 180

cgtcatcata aataccgcaa aacctgcaaa cgttgccgtg tgagcggtga agatatcaac 240

aactttctga cccgtagcac cgaaagcaaa aacagcgtga aagtgcgtgt ggtgagcgcg 300

ccgaaagtga aaaaagcgat gccgaaaagc gtgagccgtg cgccgaaacc gctggaaaat 360

agcgtgagcg cgaaagcgag caccaacacc agccgtagcg ttccgagccc ggcgaaaagc 420

accccgaaca gcagcgttcc ggcgtctgcg ccggcaccga gcctgacccg cagccagctg 480

gatcgtgtgg aagcgctgct gtctccggaa gataaaatta gcctgaacat ggcgaaaccg 540

tttcgtgaac tggaaccgga actggtgacc cgtcgtaaaa acgattttca gcgcctgtat 600

accaacgatc gtgaagatta tctgggcaaa ctggaacgtg atatcaccaa atttttgtg 660

gatcgcggct ttctggaaat taaaagcccg attctgattc cggcggaata tgtggaacgt 720

atgggcatta acaacgacac cgaactgagc aaacaaattt tccgcgtgga taaaaacctg 780

tgcctgcgtc cgatgatggc cccgaccatt tttaactatg ctcgtaaact ggatcgtatt 840

ctgccgggtc cgatcaaaat ttttgaagtg ggcccgtgct atcgcaaaga aagcgatggc 900

aaagaacacc tggaagaatt caccatggtt aacttttttc aaatgggcag cggctgcacc 960

cgtgaaaacc tggaagcgct gatcaaagaa ttcctggatt atctggaaat cgacttcgaa 1020

attgtgggcg atagctgcat ggtgtatggc gataccctgg atattatgca tggcgatctg 1080

gaactgagca gcgcggtggt gggtccggtt agcctggatc gtgaatgggg cattgataaa 1140

ccgtggattg gcgcgggttt tggcctggaa cgtctgctga aagtgatgca tggcttcaaa 1200

aacattaaac gtgcgagccg tagcgaaagc tactataacg gcattagcac gaacctgtaa 1260

<210> 4

<211> 245

<212> PRT

<213> 人工合成的

<400> 4

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

[0004]

IB114372序列表

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

Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys
35 40 45

Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe
50 55 60

Ser Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Arg
65 70 75 80

His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg
85 90 95

Thr Ile Ser Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val
100 105 110

Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile
115 120 125

Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn
130 135 140

Tyr Asn Ser His Asn Val Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile
145 150 155 160

Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln
165 170 175

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

Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys
195 200 205

Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr
210 215 220

Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Leu Glu His
225 230 235 240

His His His His His
245

<210> 5

<211> 741

<212> DNA

<213> 人工合成的

<400> 5
atgagtaaag gagaagaact tttcactgga gttgtcccaa ttcttgttga attagatggt 60

gatgttaatg ggcacaaatt ttctgtcagt ggagagggtg aaggtgatgc aacatacgga 120

[0005]

IB114372序列表

aaacttaccc ttaaatttat ttgcactact ggaaaactac ctgttccatg gccaacactt 180

gtcactactt tctcttatgg tgttcaatgc ttttcccgtt atccggatca catgaaacgg 240

catgactttt tcaagagtgc catgcccgaa ggttatgtac aggaacgcac tatatctttc 300

aaagatgacg ggaactacaa gacgcgtgct gaagtcaagt ttgaaggtga tacccttgtt 360

aatcgtatcg agttaaaagg tattgatttt aaagaagatg gaaacattct cggacacaaa 420

ctcgaataca actataactc acacaatgta tagatcacgg cagacaaaca aaagaatgga 480

atcaaagcta acttcaaaat tcgccacaac attgaagatg gatccgttca actagcagac 540

cattatcaac aaaatactcc aattggcgat ggccctgtcc ttttaccaga caaccattac 600

ctgtcgacac aatctgccct ttcgaaagat cccaacgaaa agcgtgacca catggtcctt 660

cttgagtttg taactgctgc tgggattaca catggcatgg atgagctcta caaactcgag 720

caccaccacc accaccactg a 741

<210> 6

<211> 391

<212> PRT

<213> 人工合成的

<400> 6

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

Gly Val Gly Gly Gly Gly Gly Asn Ala Val Glu His Met Val Arg Glu
20 25 30

Arg Ile Glu Gly Val Glu Phe Phe Ala Val Asn Thr Asp Ala Gln Ala
35 40 45

Leu Arg Lys Thr Ala Val Gly Gln Thr Ile Gln Ile Gly Ser Gly Ile
50 55 60

Thr Lys Gly Leu Gly Ala Gly Ala Asn Pro Glu Val Gly Arg Asn Ala
65 70 75 80

Ala Asp Glu Asp Arg Asp Ala Leu Arg Ala Ala Leu Glu Gly Ala Asp
85 90 95

Met Val Phe Ile Ala Ala Gly Met Gly Gly Gly Thr Gly Thr Gly Ala
100 105 110

Ala Pro Val Val Ala Glu Val Ala Lys Asp Leu Gly Ile Leu Thr Val
115 120 125

Ala Val Val Thr Lys Pro Phe Asn Phe Glu Gly Lys Lys Arg Met Ala
130 135 140

Phe Ala Glu Gln Gly Ile Thr Glu Leu Ser Lys His Val Asp Ser Leu
145 150 155 160

[0006]

IB114372序列表

Ile Thr Ile Pro Asn Asp Lys Leu Leu Lys Val Leu Gly Arg Gly Ile
165 170 175

Ser Leu Leu Asp Ala Phe Gly Ala Ala Asn Asp Val Leu Lys Gly Ala
180 185 190

Val Gln Gly Ile Ala Glu Leu Ile Thr Arg Pro Gly Leu Met Asn Val
195 200 205

Asp Phe Ala Asp Val Arg Thr Val Met Ser Glu Met Gly Tyr Ala Met
210 215 220

Met Gly Ser Gly Val Ala Ser Gly Glu Asp Arg Ala Glu Glu Ala Ala
225 230 235 240

Glu Met Ala Ile Ser Ser Pro Leu Leu Glu Asp Ile Asp Leu Ser Gly
245 250 255

Ala Arg Gly Val Leu Val Asn Ile Thr Ala Gly Phe Asp Leu Arg Leu
260 265 270

Asp Glu Phe Glu Thr Val Gly Asn Thr Ile Arg Ala Phe Ala Ser Asp
275 280 285

Asn Ala Thr Val Val Ile Gly Thr Ser Leu Asp Pro Asp Met Asn Asp
290 295 300

Glu Leu Arg Val Thr Val Val Ala Thr Gly Ile Gly Met Asp Lys Arg
305 310 315 320

Pro Glu Ile Thr Leu Val Thr Asn Lys Gln Val Gln Gln Pro Val Met
325 330 335

Asp Arg Tyr Gln Gln His Gly Met Ala Pro Leu Thr Gln Glu Gln Lys
340 345 350

Pro Val Ala Lys Val Val Asn Asp Asn Ala Pro Gln Thr Ala Lys Glu
355 360 365

Pro Asp Tyr Leu Asp Ile Pro Ala Phe Leu Arg Lys Gln Ala Asp Leu
370 375 380

Glu His His His His His His
385 390

<210> 7

<211> 1176

<212> DNA

<213> 人工合成的

<400> 7
atgtttgaac caatggaact taccaatgac gcggtgatta aagtcatcgg cgtcggcggc 60

ggcggcggta atgctgttga acacatggtg cgcgagcgca ttgaaggtgt tgaattcttc 120

gcggtaaata ccgatgcaca agcgctgcgt aaaacagcgg ttggacagac gattcaaatc 180

[0007]

IB114372序列表

ggtagcggta tcaccaaagg actgggcgct ggcgctaatc cagaagttgg ccgcaatgcg 240

gctgatgagg atcgcgatgc attgcgtgcg gcgctggaag gtgcagacat ggtctttatt 300

gctgcgggta tgggtggtgg taccggtaca ggtgcagcac cagtcgtcgc tgaagtggca 360

aaagatttgg gtatcctgac cgttgctgtc gtcactaagc ctttcaactt tgaaggcaag 420

aagcgtatgg cattcgcgga gcaggggatc actgaactgt ccaagcatgt ggactctctg 480

atcactatcc cgaacgacaa actgctgaaa gttctgggcc gcggtatctc cctgctggat 540

gcgtttggcg cagcgaacga tgtactgaaa ggcgctgtgc aaggtatcgc tgaactgatt 600

actcgtccgg gtttgatgaa cgtggacttt gcagacgtac gcaccgtaat gtctgagatg 660

ggctacgcaa tgatgggttc tggcgtggcg agcggtgaag accgtgcgga agaagctgct 720

gaaatggcta tctcttctcc gctgctggaa gatatcgacc tgtctggcgc gcgcggcgtg 780

ctggttaaca tcacggcggg cttcgacctg cgtctggatg agttcgaaac ggtaggtaac 840

accatccgtg catttgcttc cgacaacgcg actgtggtta tcggtacttc tcttgacccg 900

gatatgaatg acgagctgcg cgtaaccgtt gttgcgacag gtatcggcat ggacaaacgt 960

cctgaaatca ctctggtgac caataagcag gttcagcagc cagtgatgga tcgctaccag 1020

cagcatggga tggctccgct gacccaggag cagaagccgg ttgctaaagt cgtgaatgac 1080

aatgcgccgc aaactgcgaa agagccggat tatctggata tcccagcatt cctgcgtaag 1140

caagctgatc tcgagcacca ccaccaccac cactga 1176

<210> 8

<211> 391

<212> PRT

<213> 人工合成的,其中第3位氨基酸为丙烯酰赖氨酸，用@表示

<400> 8

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

Gly Val Gly Gly Gly Gly Gly Asn Ala Val Glu His Met Val Arg Glu
20 25 30

Arg Ile Glu Gly Val Glu Phe Phe Ala Val Asn Thr Asp Ala Gln Ala
35 40 45

Leu Arg Lys Thr Ala Val Gly Gln Thr Ile Gln Ile Gly Ser Gly Ile
50 55 60

Thr Lys Gly Leu Gly Ala Gly Ala Asn Pro Glu Val Gly Arg Asn Ala
65 70 75 80

Ala Asp Glu Asp Arg Asp Ala Leu Arg Ala Ala Leu Glu Gly Ala Asp
85 90 95

Met Val Phe Ile Ala Ala Gly Met Gly Gly Gly Thr Gly Thr Gly Ala
100 105 110

[0008]

IB114372序列表

Ala Pro Val Val Ala Glu Val Ala Lys Asp Leu Gly Ile Leu Thr Val
115 120 125

Ala Val Val Thr Lys Pro Phe Asn Phe Glu Gly Lys Lys Arg Met Ala
130 135 140

Phe Ala Glu Gln Gly Ile Thr Glu Leu Ser Lys His Val Asp Ser Leu
145 150 155 160

Ile Thr Ile Pro Asn Asp Lys Leu Leu Lys Val Leu Gly Arg Gly Ile
165 170 175

Ser Leu Leu Asp Ala Phe Gly Ala Ala Asn Asp Val Leu Lys Gly Ala
180 185 190

Val Gln Gly Ile Ala Glu Leu Ile Thr Arg Pro Gly Leu Met Asn Val
195 200 205

Asp Phe Ala Asp Val Arg Thr Val Met Ser Glu Met Gly Tyr Ala Met
210 215 220

Met Gly Ser Gly Val Ala Ser Gly Glu Asp Arg Ala Glu Glu Ala Ala
225 230 235 240

Glu Met Ala Ile Ser Ser Pro Leu Leu Glu Asp Ile Asp Leu Ser Gly
245 250 255

Ala Arg Gly Val Leu Val Asn Ile Thr Ala Gly Phe Asp Leu Arg Leu
260 265 270

Asp Glu Phe Glu Thr Val Gly Asn Thr Ile Arg Ala Phe Ala Ser Asp
275 280 285

Asn Ala Thr Val Val Ile Gly Thr Ser Leu Asp Pro Asp Met Asn Asp
290 295 300

Glu Leu Arg Val Thr Val Val Ala Thr Gly Ile Gly Met Asp Lys Arg
305 310 315 320

Pro Glu Ile Thr Leu Val Thr Asn Lys Gln Val Gln Gln Pro Val Met
325 330 335

Asp Arg Tyr Gln Gln His Gly Met Ala Pro Leu Thr Gln Glu Gln Lys
340 345 350

Pro Val Ala Lys Val Val Asn Asp Asn Ala Pro Gln Thr Ala Lys Glu
355 360 365

Pro Asp Tyr Leu Asp Ile Pro Ala Phe Leu Arg Lys Gln Ala Asp Leu
370 375 380

Glu His His His His His His
385 390

<210> 9

<211> 1176

[0009]

IB114372序列表

<212> DNA

<213> 人工合成的

<400> 9

atgttttagc caatggaact taccaatgac gcggtgatta aagtcatcgg cgtcggcggc 60

ggcggcggta atgctgttga acacatggtg cgcgagcgca ttgaaggtgt tgaattcttc 120

gcggtaaata ccgatgcaca agcgctgcgt aaaacagcgg ttggacagac gattcaaatc 180

ggtagcggta tcaccaaagg actgggcgct ggcgctaatc cagaagttgg ccgcaatgcg 240

gctgatgagg atcgcgatgc attgcgtgcg gcgctggaag gtgcagacat ggtctttatt 300

gctgcgggta tgggtggtgg taccggtaca ggtgcagcac cagtcgtcgc tgaagtggca 360

aaagatttgg gtatcctgac cgttgctgtc gtcactaagc ctttcaactt tgaaggcaag 420

aagcgtatgg cattcgcgga gcaggggatc actgaactgt ccaagcatgt ggactctctg 480

atcactatcc cgaacgacaa actgctgaaa gttctgggcc gcggtatctc cctgctggat 540

gcgtttggcg cagcgaacga tgtactgaaa ggcgctgtgc aaggtatcgc tgaactgatt 600

actcgtccgg gtttgatgaa cgtggacttt gcagacgtac gcaccgtaat gtctgagatg 660

ggctacgcaa tgatgggttc tggcgtggcg agcggtgaag accgtgcgga agaagctgct 720

gaaatggcta tctcttctcc gctgctggaa gatatcgacc tgtctggcgc gcgcggcgtg 780

ctggttaaca tcacggcggg cttcgacctg cgtctggatg agttcgaaac ggtaggtaac 840

accatccgtg catttgcttc cgacaacgcg actgtggtta tcggtacttc tcttgacccg 900

gatatgaatg acgagctgcg cgtaaccgtt gttgcgacag gtatcggcat ggacaaacgt 960

cctgaaatca ctctggtgac caataagcag gttcagcagc cagtgatgga tcgctaccag 1020

cagcatggga tggctccgct gacccaggag cagaagccgg ttgctaaagt cgtgaatgac 1080

aatgcgccgc aaactgcgaa agagccggat tatctggata tcccagcatt cctgcgtaag 1140

caagctgatc tcgagcacca ccaccaccac cactga 1176

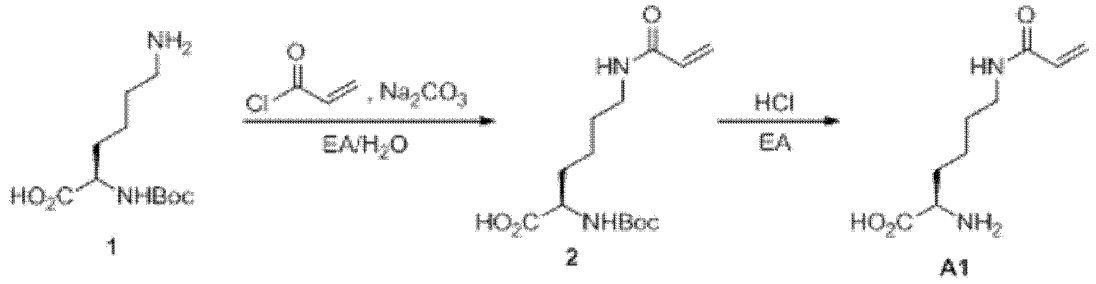


图 1

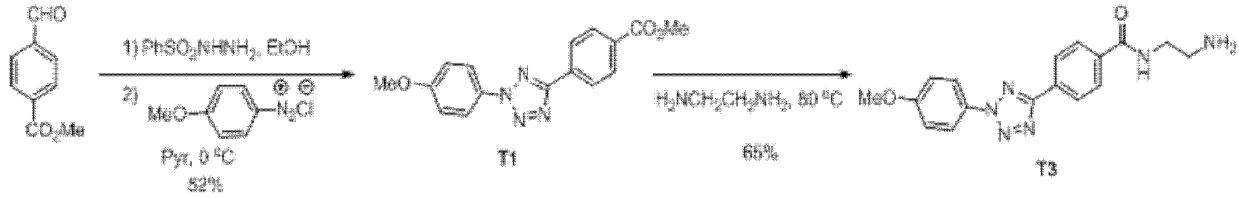


图 2

名称	核苷酸/氨基酸序列
Mb $tRNA_{CUA}^{Pyl}$（本发明所用的正交 tRNA）	SEQ ID NO: 1 GGGAACCTGATCATGTAGATCGAATGGACTCTAAATCCGTTCAGCCGGGTTAGATTCCCG GGGTTTCCGCCA
AcrKRS（丙烯酰赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶）	氨基酸序列（SEQ ID NO: 2）： MDKKPLDVLISATGLWMSRTGTLHKIKHHEVSRSKIYIEMACGDHLVVNNSRSCRTARAFRH HKYRKTCKRCRVSGEDINNFLTRSTESKNSVKVRVVSAPKVKKAMPKSVSRAPKPLENSVS AKASTNTSRSVPSPAKSTPNSSVPASAPAPSLTRSQLDRVEALLSPEDKISLNMAKPFRELEPEL VTRRKNDFQRLYTNDREDYLGKLERDITKFFVDRGFLEIKSPILIPAEYVERMGINNDTELSK QIFRVDKNLCLRPMMAPTIFNYARKLDRILPGPIKIFEVGPCYRKESDGKEHLEEFTMVNFFQ MGSGCTRENLEALIKEFLDYLEIDFEIVGDSCMVYGDTLDIMHGDLELSSAVVGPVSLDREW GIDKPWIGAGFGLERLLKVMHGFKNIKRASRSESYYNGISTNL 核苷酸序列（SEQ ID NO: 3）： ATGGATAAAAAACCGCTGGATGTGCTGATTAGCGCGACCGGCCTGTGGATGAGCCGTACC GGCACCCTGCATAAAATCAAACATCATGAAGTGAGCCGCAGCAAAATCTATATTGAAATG GCGTGCGGCGATCATCTGGTGGTGAACAACAGCCGTAGCTGCCGTACCGCGCGTGCGTTT CGTCATCATAAATACCGCAAAACCTGCAAACGTTGCCGTGTGAGCGGTGAAGATATCAAC AACTTTCTGACCCGTAGCACCGAAAGCAAAAACAGCGTGAAAGTGCGTGTGGTGAGCG CGCCGAAAGTGAAAAAAGCGATGCCGAAAAGCGTGAGCCGTGCGCCGAAACCGCTGGA AAATAGCGTGAGCGCGAAAGCGAGCACCAACACCAGCCGTAGCGTTCCGAGCCCGGCG AAAAGCACCCCGAACAGCAGCGTTCCGGCGTCTGCGCCGGCACCGAGCCTGACCCGCA GCCAGCTGGATCGTGTGGAAGCGCTGCTGTCTCCGGAAGATAAAATTAGCCTGAACATGG CGAAACCGTTTCGTGAACTGGAACCGGAACTGGTGACCCGTCGTAAAAACGATTTTCAG CGCCTGTATACCAACGATCGTGAAGATTATCTGGGCAAACTGGAACGTGATATCACCAAA TTTTTTGTGGATCGCGGCTTTCTGGAAATTAAAAGCCCGATTCTGATTCCGGCGGAATATG TGGAACGTATGGGCATTAACAACGACACCGAACTGAGCAAACAAATTTTCCGCGTGGAT AAAAACCTGTGCCTGCGTCCGATGATGGCCCCGACCATTTTTAACTATGCTCGTAAACTG GATCGTATTCTGCCGGGTCCGATCAAAATTTTTGAAGTGGGCCCGTGCTATCGCAAAGAA AGCGATGGCAAAGAACACCTGGAAGAATTCACCATGGTTAACTTTTTTCAAATGGGCAG CGGCTGCACCCGTGAAAACCTGGAAGCGCTGATCAAAGAATTCCTGGATTATCTGGAAAT CGACTTCGAAATTGTGGGCGATAGCTGCATGGTGTATGGCGATACCCTGGATATTATGCAT GGCGATCTGGAACTGAGCAGCGCGGTGGTGGGTCCGGTTAGCCTGGATCGTGAATGGGG CATTGATAAACCGTGGATTGGCGCGGGTTTTGGCCTGGAACGTCTGCTGAAAGTGATGCA TGGCTTCAAAAACATTAAACGTGCGAGCCGTAGCGAAAGCTACTATAACGGCATTAGCAC GAACCTGTAA

GFP-151TAG（在 GFP 蛋白的 151 位引入 TAG 密码子）	氨基酸序列（SEQ ID NO: 4）： MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVT TFSYGVQCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRI ELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNV@ITADKQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQLADHYQQ NTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITHGMDELYKLEHHHHHH H
	核苷酸序列（SEQ ID NO: 5）： ATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTTGAATTAGATGGT GATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGA AAACTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACTACCTGTTCCATGGCCAACACTTG TCACTACTTTCTCTTATGGTGTTCAATGCTTTTCCCGTTATCCGGATCACATGAAACGGCAT GACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAACGCACTATATCTTTCAAA GATGACGGGAACTACAAGACGCGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAAT CGTATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAAACATTCTCGGACACAAACTC GAATACAACTATAACTCACACAATGTATAGATCACGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATC AAAGCTAACTTCAAAATTCGCCACAACATTGAAGATGGATCCGTTCAACTAGCAGACCAT TATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCAGACAACCATTACCTGT CGACACAATCTGCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGCGTGACCACATGGTCCTTCTTG AGTTTGTAACTGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAGCTCTACAAACTCGAGCACC ACCACCACCACCACTGA
野生型 Ftsz（来源于大肠杆菌 BL21）	氨基酸序列（SEQ ID NO: 6）： MFEPMELTNDAVIKVIGVGGGGGNAVEHMVRERIEGVEFFAVNTDAQALRKTAVGQTIQIGS GITKGLGAGANPEVGRNAADEDRDALRAALEGADMVFIAAGMGGGTGTGAAPVVAEVAK DLGILTVAVVTKPFNFEGKKRMAFAEQGITELSKHVDSLITIPNDKLLKVLGRGISLLDAFGA ANDVLKGAVQGIAELITRPGLMNVDFADVRTVMSEMGYAMMGSGVASGEDRAEEAAEMAI SSPLLEDIDLSGARGVLVNITAGFDLRLDEFETVGNTIRAFASDNATVVIGTSLDPDMNDELR VTVVATGIGMDKRPEITLVTNKQVQQPVMDRYQQHGMAPLTQEQKPVAKVVNDNAPQTAK EPDYLDIPAFLRKQADLEHHHHHH
	核苷酸序列（SEQ ID NO: 7）： ATGTTTGAACCAATGGAACTTACCAATGACGCGGTGATTAAAGTCATCGGCGTCGGCGGC GGCGGCGGTAATGCTGTTGAACACATGGTGCGCGAGCGCATTGAAGGTGTTGAATTCTTC GCGGTAAATACCGATGCACAAGCGCTGCGTAAAACAGCGGTTGGACAGACGATTCAAAT CGGTAGCGGTATCACCAAAGGACTGGGCGCTGGCGCTAATCCAGAAGTTGGCCGCAATG CGGCTGATGAGGATCGCGATGCATTGCGTGCGGCGCTGGAAGGTGCAGACATGGTCTTTA TTGCTGCGGGTATGGGTGGTGGTACCGGTACAGGTGCAGCACCAGTCGTCGCTGAAGTG GCAAAAGATTTGGGTATCCTGACCGTTGCTGTCGTCACTAAGCCTTTCAACTTTGAAGGC AAGAAGCGTATGGCATTCGCGGAGCAGGGGATCACTGAACTGTCCAAGCATGTGGACTC TCTGATCACTATCCCGAACGACAAACTGCTGAAAGTTCTGGGCCGCGGTATCTCCCTGCT GGATGCGTTTGGCGCAGCGAACGATGTACTGAAAGGCGCTGTGCAAGGTATCGCTGAAC TGATTACTCGTCCGGGTTTGATGAACGTGGACTTTGCAGACGTACGCACCGTAATGTCTG AGATGGGCTACGCAATGATGGGTTCTGGCGTGGCGAGCGGTGAAGACCGTGCGGAAGAA GCTGCTGAAATGGCTATCTCTTCTCCGCTGCTGGAAGATATCGACCTGTCTGGCGCGCGC GGCGTGCTGGTTAACATCACGGCGGGCTTCGACCTGCGTCTGGATGAGTTCGAAACGGT AGGTAACACCATCCGTGCATTTGCTTCCGACAACGCGACTGTGGTTATCGGTACTTCTCTT GACCCGGATATGAATGACGAGCTGCGCGTAACCGTTGTTGCGACAGGTATCGGCATGGAC AAACGTCCTGAAATCACTCTGGTGACCAATAAGCAGGTTCAGCAGCCAGTGATGGATCG CTACCAGCAGCATGGGATGGCTCCGCTGACCCAGGAGCAGAAGCCGGTTGCTAAAGTCG TGAATGACAATGCGCCGCAAACTGCGAAAGAGCCGGATTATCTGGATATCCCAGCATTCC TGCGTAAGCAAGCTGATCTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA
Ftsz-3TAG（在野生型 Ftsz 的 3 位引入 TAG 密码子）	氨基酸序列（SEQ ID NO: 8）：（注：第 3 位氨基酸是丙烯酰赖氨酸，用@表示） MF@PMELTNDAVIKVIGVGGGGGNAVEHMVRERIEGVEFFAVNTDAQALRKTAVGQTIQIGS GITKGLGAGANPEVGRNAADEDRDALRAALEGADMVFIAAGMGGGTGTGAAPVVAEVAK DLGILTVAVVTKPFNFEGKKRMAFAEQGITELSKHVDSLITIPNDKLLKVLGRGISLLDAFGA ANDVLKGAVQGIAELITRPGLMNVDFADVRTVMSEMGYAMMGSGVASGEDRAEEAAEMAI SSPLLEDIDLSGARGVLVNITAGFDLRLDEFETVGNTIRAFASDNATVVIGTSLDPDMNDELR VTVVATGIGMDKRPEITLVTNKQVQQPVMDRYQQHGMAPLTQEQKPVAKVVNDNAPQTAK EPDYLDIPAFLRKQADLEHHHHHH
	核苷酸序列（SEQ ID NO: 9）： ATGTTTTAGCCAATGGAACTTACCAATGACGCGGTGATTAAAGTCATCGGCGTCGGCGGC GGCGGCGGTAATGCTGTTGAACACATGGTGCGCGAGCGCATTGAAGGTGTTGAATTCTTC GCGGTAAATACCGATGCACAAGCGCTGCGTAAAACAGCGGTTGGACAGACGATTCAAAT CGGTAGCGGTATCACCAAAGGACTGGGCGCTGGCGCTAATCCAGAAGTTGGCCGCAATG CGGCTGATGAGGATCGCGATGCATTGCGTGCGGCGCTGGAAGGTGCAGACATGGTCTTTA TTGCTGCGGGTATGGGTGGTGGTACCGGTACAGGTGCAGCACCAGTCGTCGCTGAAGTG GCAAAAGATTTGGGTATCCTGACCGTTGCTGTCGTCACTAAGCCTTTCAACTTTGAAGGC AAGAAGCGTATGGCATTCGCGGAGCAGGGGATCACTGAACTGTCCAAGCATGTGGACTC TCTGATCACTATCCCGAACGACAAACTGCTGAAAGTTCTGGGCCGCGGTATCTCCCTGCT

	GGATGCGTTTGGCGCAGCGAACGATGTACTGAAAGGCGCTGTGCAAGGTATCGCTGAAC TGATTACTCGTCCGGGTTTGATGAACGTGGACTTTGCAGACGTACGCACCGTAATGTCTG AGATGGGCTACGCAATGATGGGTTCTGGCGTGGCGAGCGGTGAAGACCGTGCGGAAGAA GCTGCTGAAATGGCTATCTCTTCTCCGCTGCTGGAAGATATCGACCTGTCTGGCGCGCGC GGCGTGCTGGTTAACATCACGGCGGGCTTCGACCTGCGTCTGGATGAGTTCGAAACGGT AGGTAACACCATCCGTGCATTTGCTTCCGACAACGCGACTGTGGTTATCGGTACTTCTCTT GACCCGGATATGAATGACGAGCTGCGCGTAACCGTTGTTGCGACAGGTATCGGCATGGAC AAACGTCCTGAAATCACTCTGGTGACCAATAAGCAGGTTCAGCAGCCAGTGATGGATCG CTACCAGCAGCATGGGATGGCTCCGCTGACCCAGGAGCAGAAGCCGGTTGCTAAAGTCG TGAATGACAATGCGCCGCAAACTGCGAAAGAGCCGGATTATCTGGATATCCCAGCATTCC TGCGTAAGCAAGCTGATCTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA

图 3

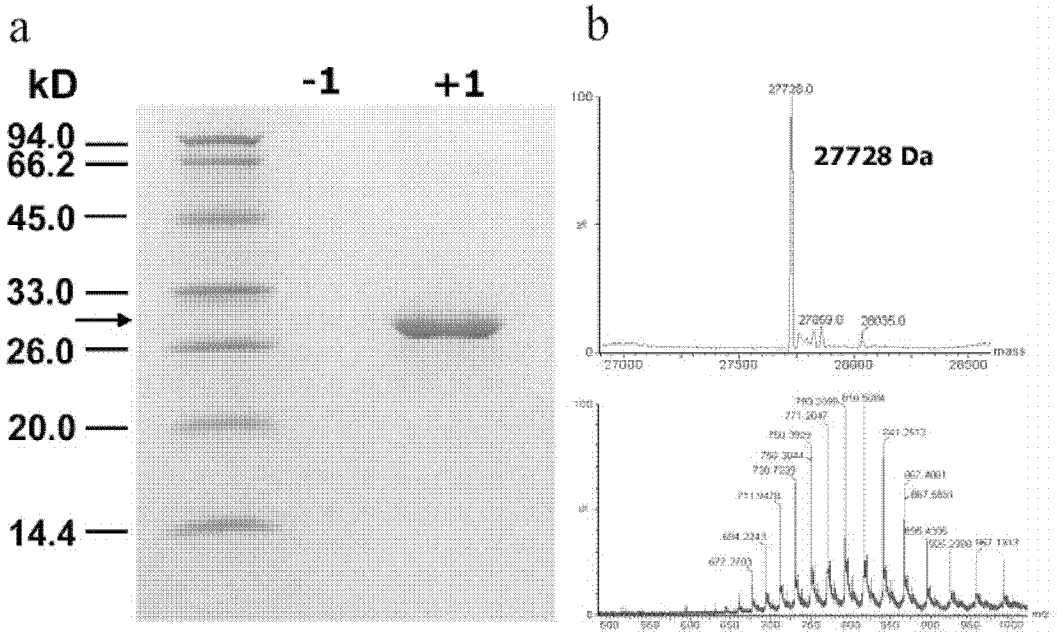


图 4

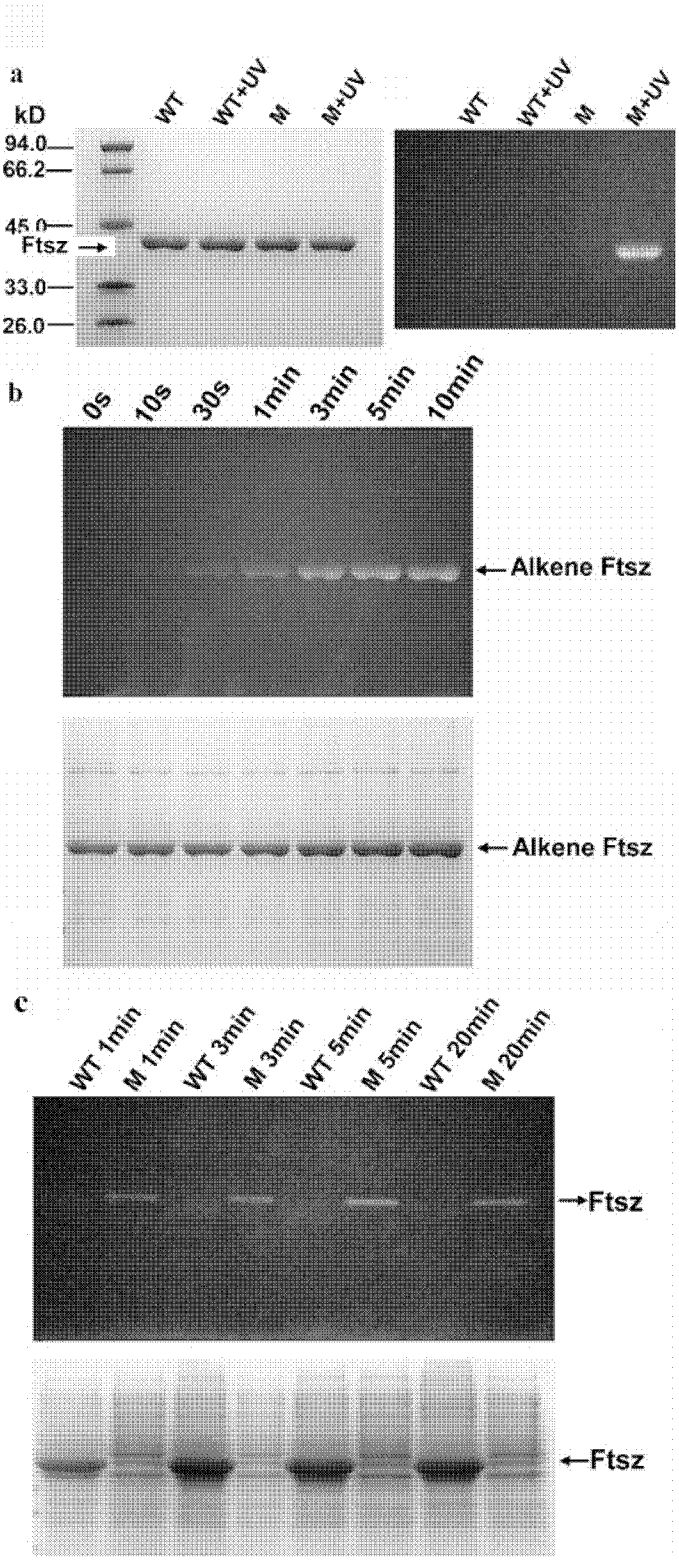

a
kD
WT
WT+UV
M
M+UV
94.0
66.2
45.0
Ftsz
33.0
26.0
b
0s
10s
30s
1min
3min
5min
10min
Alkene Ftsz
Alkene Ftsz
c
WT 1min
M 1min
WT 3min
M 3min
WT 5min
M 5min
WT 20min
M 20min
Ftsz
Ftsz

图 5

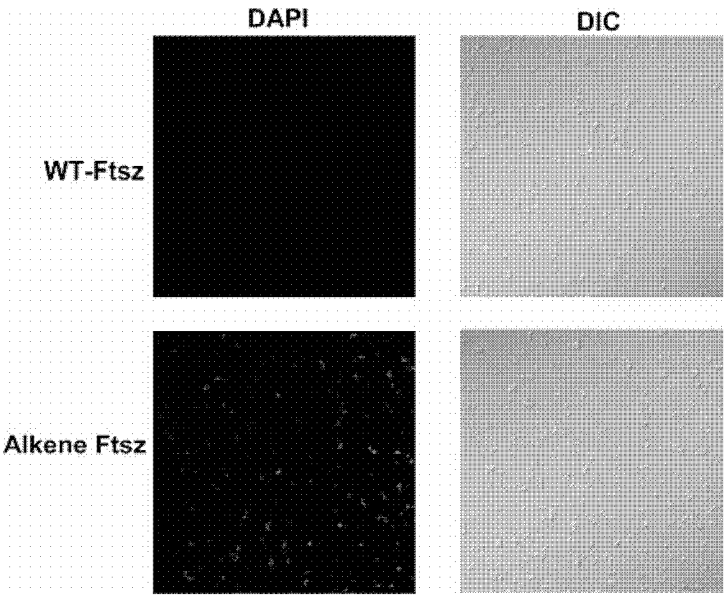


图 6

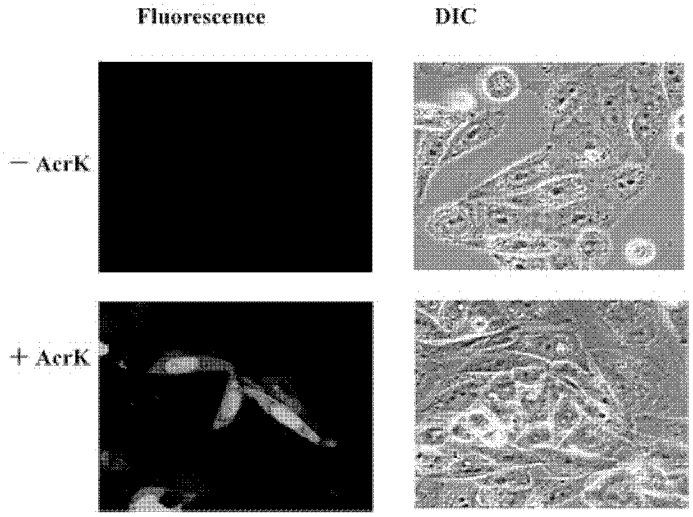


图 7