(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 108395484 A
(43)申请公布日 2018.08.14

(21)申请号 201810215698.7

(22)申请日 2018.03.15

(71)申请人 华东理工大学
地址 200237 上海市徐汇区梅陇路130号

(72)发明人 杨弋 赵玉政 李写 邹叶君 张长程

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100
代理人 陶启长

(51)Int.Cl.
C07K 19/00(2006.01)
G01N 21/64(2006.01)

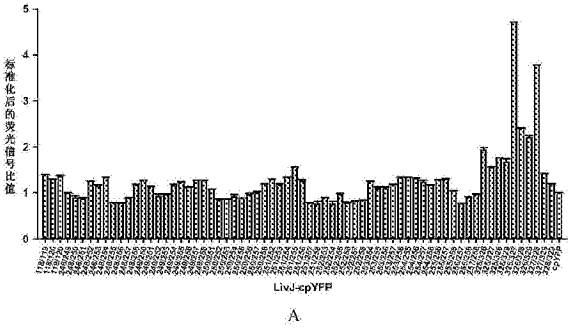
权利要求书2页 说明书23页
序列表56页 附图8页

(54)发明名称

支链氨基酸荧光探针及其应用

(57)摘要

本发明提供一种荧光探针，包含a)响应多肽，和b)光学活性多肽，其中所述光学活性多肽插入所述响应多肽。本发明还提供编码本发明任何实施方式所述的荧光探针的核酸序列或其互补序列。本发明还提供包含与表达控制序列操作性连接的本发明所述的核酸序列或其互补序列的表达载体。本发明还提供包含本发明所述的表达载体的细胞。本发明还提供制备本发明所述的荧光探针的方法，包括：提供包含表达本发明所述的荧光探针的载体的细胞，在所述细胞表达的条件下培养所述细胞，和分离所述荧光探针。本发明还提供本发明所述的荧光探针或本发明所述方法制备的荧光探针在检测支链氨基酸中的应用。在一个实施方式中，所述支链氨基酸选自亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸。所述检测可以在体内、体外、亚细胞或原位水平进行。本发明还提供一种试剂盒，包含本发明所述的荧光探针或本发明所述方法制备的荧光探针。



A

CN 108395484 A

1.一种荧光探针,包含

a)响应亮氨酸的多肽,和

b)光学活性多肽,

其中所述光学活性多肽插入所述响应亮氨酸的多肽。

2.如权利要求1所述的荧光探针,其中所述响应亮氨酸的多肽还响应其他支链氨基酸,例如异亮氨酸或缬氨酸,或者所述光学活性多肽为荧光蛋白或其功能片段或变体。

3.如上述权利要求中任一项所述的荧光探针,其还包含所述响应亮氨酸的多肽和所述光学活性多肽之间的一个或多个接头。

4.如上述权利要求中任一项所述的荧光探针,其还包含定位序列。

5.如上述权利要求中任一项所述的荧光探针,其中所述响应亮氨酸的多肽选自支链氨基酸结合蛋白或其功能片段,和亮氨酸结合蛋白或其功能片段。

6.如上述权利要求中任一项所述的荧光探针,其中所述响应亮氨酸的多肽是支链氨基酸结合蛋白或其功能片段,优选具有SEQ ID NO:1所示的序列或其功能片段,或与其有85%序列相同性的序列。

7.如上述权利要求中任一项所述的荧光探针,其中所述响应亮氨酸的多肽是亮氨酸结合蛋白或其功能片段,优选具有SEQ ID NO:2所示的序列或其功能片段,或与其有85%序列相同性的序列。

8.如权利要求6-7所述的荧光探针,其中所述光学活性多肽位于所述响应亮氨酸的多肽的残基118-120,残基248-258或残基325-331之间,编号对应于所述支链氨基酸结合蛋白的全长或所述亮氨酸结合蛋白的全长。

9.如权利要求6-7所述的荧光探针,其中所述光学活性多肽置换所述响应亮氨酸的多肽的残基118-120,残基248-258或残基325-331之间的一个或多个氨基酸,编号对应于所述支链氨基酸结合蛋白的全长或所述亮氨酸结合蛋白的全长。

10.如权利要求6所述的荧光探针,其中所述光学活性多肽位于所述响应亮氨酸的多肽的残基325-329之间,编号对应于所述支链氨基酸结合蛋白的全长。

11.如权利要求6所述的荧光探针,其中所述光学活性多肽置换所述响应亮氨酸的多肽的残基325-329之间的一个或多个氨基酸,编号对应于所述支链氨基酸结合蛋白的全长。

12.如权利要求7所述的荧光探针,其中所述光学活性多肽位于所述响应亮氨酸的多肽的残基327-331之间,编号对应于所述亮氨酸结合蛋白的全长。

13.如权利要求7所述的荧光探针,其中所述光学活性多肽置换所述响应亮氨酸的多肽的残基327-331之间的一个或多个氨基酸,编号对应于所述亮氨酸结合蛋白的全长。

14.如上述权利要求中任一项所述的荧光探针,其中所述荧光蛋白选自绿色荧光蛋白、蓝色荧光蛋白、青色荧光蛋白、橘黄色荧光蛋白、苹果红荧光蛋白、红色荧光蛋白。

15.如上述权利要求中任一项所述的荧光探针,其中所述荧光蛋白具有SEQ ID NO:3-13所示的序列。

16.编码上述权利要求中任一项所述的荧光探针的核酸序列或其互补序列。

17.包含与表达控制序列操作性连接的上述权利要求中任一项所述的核酸序列的表达载体。

18.包含权利要求17所述的表达载体的细胞。

19.制备如权利要求1所述的荧光探针的方法，包括：提供包含表达如权利要求1-15中任一项所述的荧光探针的载体的细胞，在所述细胞表达的条件下培养所述细胞，和分离所述荧光探针。

20.检测亮氨酸的方法，包括：使如权利要求1-15中任一项所述的荧光探针或如权利要求19所述方法制备的荧光探针与样品接触，和检测光学活性多肽的变化。

21.检测支链氨基酸的方法，包括：使如权利要求1-15中任一项所述的荧光探针或如权利要求19所述方法制备的荧光探针与样品接触，和检测光学活性多肽的变化，其中所述支链氨基酸例如选自亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸。

22.如权利要求1-15中任一项所述的荧光探针或如权利要求19所述方法制备的荧光探针在检测样品中的亮氨酸中的用途。

23.如权利要求1-15中任一项所述的荧光探针或如权利要求19所述方法制备的荧光探针在检测样品中的支链氨基酸中的用途，所述支链氨基酸例如选自亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸。

24.一种试剂盒，其包含权利要求1-15中任一项所述的荧光探针或权利要求19所述方法制备的荧光探针。

支链氨基酸荧光探针及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及荧光蛋白，更具体地涉及用于检测支链氨基酸的荧光探针及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 支链氨基酸(BCAA)包括亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸，其作为有效的营养信号分子用于调节蛋白质合成速率。这三种支链氨基酸属于人类必需的九种氨基酸，占肌肉蛋白质中必需氨基酸的35％，以及哺乳动物所需的氨基酸的40％。它们在免疫、脑功能和其他生理方面具有重要意义(P.C.Calder,2006;B.Skeie et al.,1990)。所有三种支链氨基酸都是淋巴细胞生长和增殖所必需的(K.Tajiri and Y.Shimizu,2013)。支链氨基酸可能会影响脑蛋白的合成和能量的产生，并参与不同神经递质的合成(J.D.Fernstrom,2005)。

[0003] 亮氨酸是支链氨基酸中最重要的氨基酸(Buse and Reid,1975;Buse et al.,1979;Li and Jefferson,1978;Anthony et al.,2000)，它可以通过胰岛素依赖和独立途径刺激mRNA翻译启动，从而刺激肌肉蛋白合成(Norton和Layman,2006)。亮氨酸能够在一定程度上跨越血脑屏障(Smith et al.,1987)，与其他氨基酸相比更容易吸收(Grill et al.,1992)。亮氨酸在代谢中起到独特的调节作用，包括蛋白质合成的翻译控制(Kimball and Jefferson,2001)和血糖调节(Layman and Baum,2004)。有研究表明支链氨基酸含量的异常通常与一些重大代谢性疾病相关，包括糖尿病(Hu,F.B et al.,2001;Wang,T.J et al.,2011;Mapstone,M et al.,2014)、肥胖(Goffredo et al.,2017)、衰老(D'Antona et al.,2010)、癌症(Tarlungeanu,D.C et al.,2 016;Mayers,J.R.et al.,2014;Tonjes,M et al.,2013)等。

[0004] 正是由于支链氨基酸尤其是亮氨酸具有上述重要的作用，因此其含量的检测也尤为重要。常用检测方法是质谱法(Pontoni,G et al.,2014,1996)，色谱法(Tateda N等，Analytical sciences:the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry 2001,17(6):775-778;Wadud S等，Journal of chromatography B,Analytical technologies in the biomedical and life sciences 2002,767(2):369-374)，毛细管电泳法(Li X-t等，Chem Res Chin Univ 2013,29(3):434-438;Meng J等，The Analyst 2010,135(7):1592-1599)，紫外可见光分光光度法(Hortala MA等，J Am Chem Soc 2003,125(1):20-21;Pu F等，Anal Chem 2010,82(19):8211-8216;Du J等，Chemical communications(Cambridge,England)2013,49(47):5399-5401;Engeser M等，Chemical Communications 1999,(13):1191-1192)。但是，这些检测方法存在很大的技术缺陷，需要细胞破碎、样品处理耗时、分离提取纯化困难等，使得无法在原位进行高通量定量分析，一定程度上制约了支链氨基酸相关研究领域的发展。

[0005] 因此，本领域亟需发展一种高特异性的支链氨基酸检测技术，特别是一种适合生理水平和亚细胞水平的原位、实时、动态、高通量和高时空分辨率的检测方法。

[0006] 本领域还通过荧光光谱测定法(Engeser M等，Chemical Communications 1999,

(13):1191-1192)测定支链氨基酸,通过与Ni(II)四氮杂大环复合物共价连接的萘片段的荧光发射强度的变化来测量,但是所述Ni(II)四氮杂大环复合物需要经历温度相关的自旋互换平衡。该方法依然无法达到上述监测要求。

[0007] 而相对于传统的小分子染料检测技术以及迅速发展的量子点检测技术,荧光蛋白检测技术在大多数的活体细胞成像方面具有独一无二的压倒性优势,它能够通过遗传导入细胞、组织乃至整个器官,因此荧光蛋白能够作为一个全细胞标记物或基因启动激活的指示器。

[0008] 绿色荧光蛋白最初是从维多利亚多管发光水母(Aequorea victoria)中提取,野生型的AvGFP由238个氨基酸构成,分子量约为26kD。当前的研究确认,天然GFP蛋白中第65～67位的三个氨基酸Ser-Tyr-Gly能够自发形成一个荧光生色基团:对-羟基苯亚甲基咪唑啉酮(p-hydroxybenzylideneimidazolinone),是其主要的发光位置。野生型AvGFP的光谱特征十分复杂,其荧光激发的主峰在395nm处,而在475nm处另有一个附峰,后者荧光强度约为前者的1/3。在标准的溶液条件下,395nm处的激发可产生508nm处的发射,而475nm处的激发产生的最大发射波长位于503nm(Heim,R.等,Proc Natl Acad Sci U S A.1994,V.91(26),pp.12501-12504)。

[0009] 随着对GFP蛋白突变的研究日渐深入,利用分子生物学技术,目前已经发展了多种表现突出的GFP衍生物,通过在野生型GFP基础上进行不同的单点突变或者组合,可获得诸如增强型GFP(S65T,F64L)、YFP(T203Y)、CFP(Y66W)等。而借助对GFP蛋白序列的重新排列,将原第145-238位氨基酸部分作为新蛋白的N端,原第1-144位氨基酸作为新蛋白的C端,两片段间通过一小段具有柔性的短肽链连接,形成一个对空间变化敏感的环状排列荧光蛋白(circular permutation fluorescent protein),在此基础上对原蛋白T203Y进行的点突变就形成了环状排列的黄色荧光蛋白cpYFP(Nagai,T.等,Proc Natl Acad Sci U S A.2001,V.98(6),pp.3197-3202)。

[0010] 由于对荧光蛋白研究日益深入,相关的一些基于荧光的分析检测技术也获得了进一步的发展。例如当前常用的荧光共振能量转移(FRET)技术,该技术主要原理是当两个荧光发色基团在足够靠近时,当供体分子吸收一定频率的光子后被激发到更高的电子能态,在该电子回到基态前,通过偶极子相互作用,实现了能量向邻近的受体分子转移(即发生能量共振转移)。FRET是一种非辐射能量跃迁,通过分子间的电偶极相互作用,将供体激发态能量转移到受体激发态的过程,使供体荧光强度降低,而受体可以发射更强于本身的特征荧光(敏化荧光),也可以不发荧光(荧光猝灭)。当前对绿色荧光蛋白的进一步研究发现,衍生自绿色荧光蛋白突变体的青色荧光蛋白(CFP)和黄色荧光蛋白(YFP)是一对表现出色的供体/受体对。CFP的发射光谱与YFP的吸收光谱有相当的重叠,当它们足够接近时,用CFP的吸收波长激发,CFP的发色基团将会把能量高效率地共振转移至YFP的发色基团上,所以CFP的发射荧光将减弱或消失,主要发射将是YFP的荧光。两个发色基团之间的能量转换效率与它们之间的空间距离的6次方成反比,对空间位置的改变非常灵敏。因此现有研究报道利用基因工程重组手段将期望研究的蛋白基因两端分别与CFP与YFP融合表达出一个全新的融合蛋白,该蛋白与其专一性的靶标分子的结合所产生的空间变化即通过荧光的变化所直观地显现。

[0011] 因此,本文所用的荧光蛋白序列可以来自于维多利亚多管发光水母(Aequorea

victoria)的荧光蛋白及其衍生物,包括但不局限于这些突变体:黄色荧光蛋白(YFP)、绿色荧光蛋白(GFP)、青色荧光蛋白(CFP)等的序列,其中优选黄色荧光蛋白YFP的序列,更优选环状排列的黄色荧光蛋白cpYFP的序列。

[0012] 支链氨基酸和亮氨酸结合蛋白都来源于大肠杆菌(Escherichia coli),或来源于沙门氏菌和支链氨基酸、亮氨酸结合蛋白有90%以上同源性的支链氨基酸和亮氨酸结合蛋白,含有周质结合蛋白所具有的典型的两个α/β球状结构域通过铰链连接的结构,可以结合支链氨基酸和亮氨酸。

[0013] 发明人发现,荧光蛋白与将支链氨基酸结合蛋白或亮氨酸结合蛋白融合后的荧光探针,可以将支链氨基酸结合蛋白或亮氨酸结合蛋白与支链氨基酸或亮氨酸的结合实时且直观的显示出来。

[0014] 不应认为对本文所述参考文献的引用或讨论意味着承认这些参考文献是本发明的现有技术。

发明内容

[0015] 本发明的目的在于提供一种在细胞内外实时定位、高通量、定量检测支链氨基酸或亮氨酸的支链氨基酸荧光探针或亮氨酸荧光探针。

[0016] 本发明提供一种荧光探针,包含a)响应亮氨酸的多肽,和b)光学活性多肽,其中所述光学活性多肽插入所述响应亮氨酸的多肽。在一个实施方式中,响应亮氨酸的多肽还响应其他支链氨基酸,例如异亮氨酸或缬氨酸。

[0017] 在一个实施方式中,光学活性多肽是荧光蛋白或其功能片段或变体。在一个实施方式中,荧光蛋白选自绿色荧光蛋白、蓝色荧光蛋白、青色荧光蛋白、橘黄色荧光蛋白、苹果红荧光蛋白、红色荧光蛋白。在一个实施方式中,荧光蛋白具有SEQ ID NO:3-13所示的序列。

[0018] 在一个实施方式中,本发明所述荧光探针还包含响应亮氨酸的多肽和光学活性多肽之间的一个或多个接头。在一个实施方式中,本发明所述荧光探针不包含接头。本发明所述接头可以是任何氨基酸序列,优选长度不超过4个氨基酸。

[0019] 在一个实施方式中,本发明所述荧光探针还包含定位序列。用于将探针定位到例如细胞的特定细胞器。

[0020] 在一个实施方式中,本发明所述响应亮氨酸的多肽选自支链氨基酸结合蛋白或其功能片段,和亮氨酸结合蛋白或其功能片段。

[0021] 在一个实施方式中,本发明所述响应亮氨酸的多肽是支链氨基酸结合蛋白或其功能片段,优选具有SEQ ID NO:1所示的序列或其功能片段,或与其有85%序列相同性的序列。

[0022] 在一个实施方式中,本发明所述响应亮氨酸的多肽是亮氨酸结合蛋白或其功能片段,优选具有SEQ ID NO:2所示的序列或其功能片段,或与其有85%序列相同性的序列。

[0023] 本发明所述光学活性多肽可以位于响应亮氨酸的多肽的任何位置。在一个实施方式中,本发明所述光学活性多肽位于响应亮氨酸的多肽的残基118-120,残基248-258或残基325-331之间,编号对应于支链氨基酸结合蛋白的全长或亮氨酸结合蛋白的全长。在一个实施方式中,光学活性多肽置换响应亮氨酸的多肽的残基118-120,残基248-258或残基

325-331之间的一个或多个氨基酸，编号对应于支链氨基酸结合蛋白的全长或亮氨酸结合蛋白的全长。

[0024] 在一个实施方式中，光学活性多肽插入支链氨基酸结合蛋白的下述位点：118/119，118/120，119/120，248/249，248/250，248/251，248/252，248/253，248/254，248/255，248/256，248/257，248/258，249/250，249/251，249/252，249/253，249/254，249/255，249/256，249/257，249/258，250/251，250/252，250/253，250/254，250/255，250/256，250/257，250/258，251/252，251/253，251/254，251/255，251/256，251/257，251/258，252/253，252/254，252/255，252/256，252/257，252/258，253/254，253/255，253/256，253/257，253/258，254/255，254/256，254/257，254/258，255/256，255/257，255/258，256/257，256/258，257/258，325/326，325/327，325/328，325/329，326/327，326/328，326/329，327/328，327/329或328/329。

[0025] 在一个实施方式中，光学活性多肽插入亮氨酸结合蛋白的下述位点：118/119，118/120，119/120，248/249，248/250，248/251，248/252，248/253，248/254，248/255，248/256，248/257，248/258，249/250，249/251，249/252，249/253，249/254，249/255，249/256，249/257，249/258，250/251，250/252，250/253，250/254，250/255，250/256，250/257，250/258，251/252，251/253，251/254，251/255，251/256，251/257，251/258，252/253，252/254，252/255，252/256，252/257，252/258，253/254，253/255，253/256，253/257，253/258，254/255，254/256，254/257，254/258，255/256，255/257，255/258，256/257，256/258，257/258，327/328，327/329，327/330，327/331，328/329，328/330，328/331，329/330，329/331或330/331。

[0026] 在一个实施方式中，光学活性多肽位于响应亮氨酸的多肽的残基325-329之间，编号对应于支链氨基酸结合蛋白的全长。在一个实施方式中，光学活性多肽置换响应亮氨酸的多肽的残基325-329之间的一个或多个氨基酸，编号对应于支链氨基酸结合蛋白的全长。优选地，光学活性多肽位于支链氨基酸结合蛋白或其功能片段的残基326/327或327/328之间。

[0027] 在一个实施方式中，光学活性多肽位于响应亮氨酸的多肽的残基327-331之间，编号对应于所述亮氨酸结合蛋白的全长。在一个实施方式中，光学活性多肽置换响应亮氨酸的多肽的残基327-331之间的一个或多个氨基酸，编号对应于亮氨酸结合蛋白的全长。优选地，光学活性多肽位于亮氨酸结合蛋白或其功能片段的残基328/329或329/330之间。

[0028] 在另一方面，本发明提供一种荧光探针，包含a)响应支链氨基酸的多肽，和b)光学活性多肽，其中所述光学活性多肽插入所述响应支链氨基酸的多肽。

[0029] 在一个实施方式中，光学活性多肽是荧光蛋白或其功能片段或变体。在一个实施方式中，荧光蛋白选自绿色荧光蛋白、蓝色荧光蛋白、青色荧光蛋白、橘黄色荧光蛋白、苹果红荧光蛋白、红色荧光蛋白。在一个实施方式中，荧光蛋白具有SEQ ID NO:3-13所示的序列。

[0030] 在一个实施方式中，荧光探针包含响应支链氨基酸的多肽和光学活性多肽之间的一个或多个接头。在一个实施方式中，荧光探针不包含接头。本发明所述接头可以是任何氨基酸序列，优选长度不超过4个氨基酸。

[0031] 在一个实施方式中，荧光探针包含定位序列。用于将探针定位到例如细胞的特定

细胞器。

[0032] 在一个实施方式中，支链氨基酸选自亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸。

[0033] 在一个实施方式中，响应支链氨基酸的多肽选自支链氨基酸结合蛋白或其功能片段，和亮氨酸结合蛋白或其功能片段。

[0034] 在一个实施方式中，响应支链氨基酸的多肽是支链氨基酸结合蛋白或其功能片段，其优选具有SEQ ID NO:1所示的序列或其功能片段，或与其有85％序列相同性的序列。

[0035] 在一个实施方式中，响应支链氨基酸的多肽是亮氨酸结合蛋白或其功能片段，其优选具有SEQ ID NO:2所示的序列或其功能片段，或与其有85％序列相同性的序列。

[0036] 在本发明中，光学活性多肽可以位于响应支链氨基酸的多肽的任何位置。在一个实施方式中，光学活性多肽位于响应支链氨基酸的多肽的残基118-120，残基248-258或残基325-331之间，编号对应于支链氨基酸结合蛋白的全长或亮氨酸结合蛋白的全长。在一个实施方式中，光学活性多肽置换响应支链氨基酸的多肽的残基118-120，残基248-258或残基325-331之间的一个或多个氨基酸，编号对应于支链氨基酸结合蛋白的全长或亮氨酸结合蛋白的全长。

[0037] 在一个实施方式中，本发明所述光学活性多肽插入支链氨基酸结合蛋白的下述位点：118/119，118/120，119/120，248/249，248/250，248/251，248/252，248/253，248/254，248/255，248/256，248/257，248/258，249/250，249/251，249/252，249/253，249/254，249/255，249/256，249/257，249/258，250/251，250/252，250/253，250/254，250/255，250/256，250/257，250/258，251/252，251/253，251/254，251/255，251/256，251/257，251/258，252/253，252/254，252/255，252/256，252/257，252/258，253/254，253/255，253/256，253/257，253/258，254/255，254/256，254/257，254/258，255/256，255/257，255/258，256/257，256/258，257/258，325/326，325/327，325/328，325/329，326/327，326/328，326/329，327/328，327/329或328/329。本文中，如果以“X/Y”形式表示的位点中的两个数字不是连续的数字，则表示光学活性多肽置换该数字之间的氨基酸。例如250/257表示光学活性多肽置换氨基酸序列251-256。

[0038] 在一个实施方式中，本发明所述光学活性多肽插入亮氨酸结合蛋白的下述位点：118/119，118/120，119/120，248/249，248/250，248/251，248/252，248/253，248/254，248/255，248/256，248/257，248/258，249/250，249/251，249/252，249/253，249/254，249/255，249/256，249/257，249/258，250/251，250/252，250/253，250/254，250/255，250/256，250/257，250/258，251/252，251/253，251/254，251/255，251/256，251/257，251/258，252/253，252/254，252/255，252/256，252/257，252/258，253/254，253/255，253/256，253/257，253/258，254/255，254/256，254/257，254/258，255/256，255/257，255/258，256/257，256/258，257/258，327/328，327/329，327/330，327/331，328/329，328/330，328/331，329/330，329/331或330/331。本文中，如果以“X/Y”形式表示的位点中的两个数字不是连续的数字，则表示光学活性多肽置换该数字之间的氨基酸。例如250/257表示光学活性多肽置换氨基酸序列251-256。

[0039] 在一个实施方式中，本发明所述光学活性多肽位于支链氨基酸结合蛋白或其功能片段的残基325-329之间，编号对应于支链氨基酸结合蛋白的全长。优选地，本发明所述光学活性多肽位于支链氨基酸结合蛋白或其功能片段的残基326/327或327/328之间。在一个

实施方式中，本发明所述光学活性多肽置换支链氨基酸结合蛋白或其功能片段的残基325-329之间的一个或多个氨基酸，编号对应于支链氨基酸结合蛋白的全长。

[0040] 在一个实施方式中，本发明所述光学活性多肽位于亮氨酸结合蛋白或其功能片段的残基327-331之间，编号对应于亮氨酸结合蛋白的全长。在一个实施方式中，本发明所述光学活性多肽置换亮氨酸结合蛋白或其功能片段的残基327-331之间的一个或多个氨基酸，编号对应于亮氨酸结合蛋白的全长。优选地，本发明所述光学活性多肽位于亮氨酸结合蛋白或其功能片段的残基328/329或329/330之间。

[0041] 本发明还提供编码本发明所述荧光探针的核酸序列或其互补序列。

[0042] 本发明还提供包含与表达控制序列操作性连接的本发明所述的核酸序列或其互补序列的表达载体，该核酸序列编码本发明所述荧光探针。

[0043] 本发明还提供包含本发明所述表达载体的细胞，该表达载体包含与表达控制序列操作性连接的本发明所述的核酸序列或其互补序列。

[0044] 本发明提供制备本发明所述荧光探针的方法，包括：提供包含表达本发明所述的荧光探针的载体的细胞，在所述细胞表达的条件下培养所述细胞，和分离所述荧光探针。

[0045] 本发明提供检测样品中亮氨酸的方法，包括：使本发明所述的荧光探针或如本发明方法制备的荧光探针与样品接触，和检测光学活性多肽的变化。

[0046] 本发明提供检测样品中支链氨基酸的方法，包括：使本发明所述的荧光探针或本发明方法制备的荧光探针与样品接触，和检测光学活性多肽的变化。在一个实施方式中，支链氨基酸选自亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸。所述检测可以在体内、体外、亚细胞或原位水平进行。

[0047] 本发明提供本发明所述荧光探针或本发明方法制备的荧光探针在检测样品中的亮氨酸中的用途。所述检测可以在体内、体外、亚细胞或原位水平进行。

[0048] 本发明提供本发明所述荧光探针或本发明方法制备的荧光探针在检测样品中的支链氨基酸中的用途。在一个实施方式中，支链氨基酸选自亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸。所述检测可以在体内、体外、亚细胞或原位水平进行。

[0049] 本发明还提供试剂盒，其包含本发明所述荧光探针或本发明方法制备的荧光探针。

[0050] 本发明的有益效果：本发明所述的荧光探针易于成熟，荧光动态变化大，特异性好，并且能够通过基因操作的方法在细胞中表达，可在细胞内外实时定位、高通量、定量检测支链氨基酸和亮氨酸。省去了耗时的处理样品步骤。实验效果表明本申请所提供的支链氨基酸荧光探针和亮氨酸荧光探针对支链氨基酸和亮氨酸的最高响应达到3倍以上，可以在细胞浆、线粒体、细胞核、内质网、细胞外膜、细胞内膜、高尔基体和溶酶体等亚细胞结构中对细胞进行定位检测；并且可以进行高通量的化合物筛选。

附图说明

[0051] 图1为实施例所述的支链氨基酸荧光探针和亮氨酸荧光探针的SDS-PAGE分析图；

[0052] 图2为实施例1所述的黄色荧光蛋白cpYFP在支链氨基酸结合蛋白和亮氨酸结合蛋白不同插入位点形成的支链氨基酸荧光探针和亮氨酸荧光探针对支链氨基酸响应变化图；

[0053] 图3为实施例2所述的蓝色荧光蛋白cpBFP在支链氨基酸结合蛋白和亮氨酸结合蛋

白不同插入位点形成的支链氨基酸荧光探针和亮氨酸荧光探针对支链氨基酸响应变化图；

[0054] 图4为实施例3所述的苹果红荧光蛋白cpmApple在支链氨基酸结合蛋白和亮氨酸结合蛋白不同插入位点形成的支链氨基酸荧光探针和亮氨酸荧光探针对支链氨基酸响应变化图；

[0055] 图5显示实施例4所述的三种荧光蛋白与支链氨基酸荧光探针或亮氨酸荧光探针的N端或者C端连接所形成的融合蛋白对支链氨基酸的响应。如图5所述，融合蛋白相对对照无统计学显著的变化。

[0056] 图6为实施例5所述的支链氨基酸荧光探针和亮氨酸荧光探针的荧光光谱性质图；

[0057] 图7为实施例5所述的支链氨基酸荧光探针对不同浓度支链氨基酸的滴定曲线和实施例5所述的亮氨酸荧光探针对不同浓度的亮氨酸或支链氨基酸的滴定曲线；

[0058] 图8为实施6例所述的支链氨基酸荧光探针在哺乳动物细胞中亚细胞器定位分布图；

[0059] 图9为实施例6所述的支链氨基酸荧光探针在哺乳动物细胞中不同亚细胞器内对支链氨基酸跨膜运输进行动态监测；

[0060] 图10为实施例7所述的在活细胞水平基于支链氨基酸荧光探针进行高通量化合物筛选分析图；

[0061] 图11为实施例8所述的支链氨基酸荧光探针对培养基以及血液中的支链氨基酸定量分析图。

具体实施方式

[0062] I.定义：

[0063] 在给出数值或范围时，本文所用术语“约”指该数值或范围在给定数值或范围的20％以内、10％以内和5％以内。

[0064] 本文所用术语“包含”、“包括”和其等同形式包括“含有”以及“由……组成”的含义，例如“包含”X的组合物可仅由X组成或可含有其它物质，例如X+Y。

[0065] 本文所用术语“支链氨基酸”或“BCAA”是具有带支链(与三个或更多个原子结合的中心碳原子)的脂肪族侧链的氨基酸。在蛋白质氨基酸中，有三种支链氨基酸：亮氨酸，异亮氨酸和缬氨酸。非蛋白源性支链氨基酸包括2-氨基异丁酸。

[0066] 本文所用术语“响应支链氨基酸的多肽”指对支链氨基酸产生响应的多肽。本文所用术语“响应亮氨酸的多肽”指对亮氨酸产生响应的多肽。本文中，二者可统称为“响应多肽”。所述响应包括与响应多肽的相互作用相关的多肽的化学，生物学，电学或生理学参数的任何响应。响应包括小的变化，例如，响应多肽的氨基酸或肽片段的方向的变化以及例如多肽的一级，二级或三级结构的变化，包括例如质子化，电化学势和/或构象的变化。“构象”是分子中包含侧基的分子的一级，二级和三级结构的三维排列；当分子的三维结构发生变化时，构象发生变化。构象变化的实例包括从α-螺旋转变为β-折叠或从β-折叠转变为α-螺旋。可以理解的是，只要荧光蛋白部分的荧光被改变，可检测到的改变不需要是构象改变。

[0067] 本发明所述响应支链氨基酸的多肽或响应亮氨酸的多肽包括但不限于“与支链氨基酸结合的蛋白”、“支链氨基酸结合蛋白”、“与亮氨酸结合的蛋白”和“亮氨酸结合蛋白”。本发明所述示例性支链氨基酸结合蛋白LivJ或亮氨酸结合蛋白LivK来源于大肠杆菌

(Escherichia coli)，或来源于沙门氏菌和支链氨基酸结合蛋白、亮氨酸结合蛋白有90％以上同源性的支链氨基酸结合蛋白或亮氨酸结合蛋白，含有周质结合蛋白所具有的典型的两个α/β球状结构域通过铰链连接的结构，可以结合支链氨基酸或亮氨酸。支链氨基酸结合蛋白或亮氨酸结合蛋白可以感应周质中支链氨基酸和亮氨酸浓度的变化，在支链氨基酸和亮氨酸浓度动态变化的过程中支链氨基酸结合蛋白和亮氨酸结合蛋白的空间构象也会发生很大改变。支链氨基酸结合蛋白和亮氨酸结合蛋白专一性地与生理浓度的支链氨基酸和亮氨酸结合后产生的构象变化引起的荧光蛋白的构象变化，进而导致荧光蛋白的荧光发生改变，并借助不同支链氨基酸和亮氨酸浓度下测定的荧光蛋白的荧光绘制标准曲线，进而检测并分析支链氨基酸和亮氨酸的存在和/或水平。示例性支链氨基酸结合蛋白如SEQ ID NO.1所示，示例性亮氨酸结合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0068] 本文所用术语“融合蛋白”与“荧光融合蛋白”和“重组荧光融合蛋白”同义，指包含第一种多肽或蛋白质或者其片段、类似物或衍生物的氨基酸序列，以及异源多肽或蛋白质(即，不同于第一种多肽或蛋白质或者其片段、类似物或衍生物的第二种多肽或蛋白质或者其片段、类似物或衍生物)的氨基酸序列的多肽或蛋白质。在一个实施方式中，融合蛋白包含与异源蛋白质、多肽或肽融合的荧光蛋白。按照这个实施方式，异源蛋白质、多肽或肽可能是或不是不同类型荧光蛋白。在一个实施方式中，与融合于异源蛋白质、多肽或肽之前的原始多肽或蛋白质的活性相比，融合蛋白保持或提高了活性。在一个具体实施方式中，融合蛋白包含与异源蛋白质、多肽或肽融合的荧光探针，所述异源蛋白质、多肽或肽可以是特异性亚细胞定位信号。

[0069] 本文所用术语“荧光探针”是指与荧光蛋白融合的响应多肽，所述响应多肽可为响应支链氨基酸的多肽或响应亮氨酸的多肽，具体可以是支链氨基酸结合蛋白或亮氨酸结合蛋白。所述荧光探针利用响应多肽与支链氨基酸(例如选自亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸)结合后引起的荧光蛋白的构象变化，进而导致产生或消失的荧光或产生的荧光发生改变，实现对支链氨基酸的存在和/或水平的检测。

[0070] 在本发明的荧光探针中，光学活性多肽(例如荧光蛋白)可操作地插入响应多肽中，所述响应多肽可为响应支链氨基酸的多肽或响应亮氨酸的多肽。基于蛋白质的“光学活性多肽”是含有发光手段的多肽。荧光是光学活性多肽的一种光学性质，其可用作检测本发明的荧光探针或响应多肽的响应性的手段。如本文所用，术语“荧光性质”是指适当激发波长下的摩尔消光系数，荧光量子效率，激发光谱或发射光谱的形状，激发波长最大值和发射波长最大值，激发的比率两个不同波长的振幅，两个不同波长的发射振幅比，激发态寿命或荧光各向异性。

[0071] 活性和无活性状态之间的这些性质中的任何一个的可测量的差异足以用于本发明的荧光蛋白底物在活性测定中的效用。可测量的差异可通过确定任何定量荧光性质的量来确定，例如，特定波长处的荧光量或荧光在发射光谱上的积分。优选地，选择蛋白质底物以具有在未激活和活化的构象状态下容易区分的荧光特性。

[0072] 本文所用术语“荧光团”与“荧光蛋白”同义，指自身发出荧光或在照射下发出荧光的蛋白质。荧光蛋白常常用作检测手段，例如生物技术领域常用的绿色荧光蛋白GFP及由该蛋白突变衍生出的BFP、CFP、YFP、cpYFP等。任何荧光蛋白都可用于本发明，包括由于分子内重排而发荧光的蛋白质或添加促进荧光的辅因子。示例性荧光蛋白的序列如SEQ ID NO:3-

13所示。

[0073] 本文所用术语“GFP”指绿色荧光蛋白，最初是从维多利亚多管发光水母(Aequorea victoria)中提取，野生型的AvGFP由238个氨基酸构成，分子量约为26kD。GFP是由12条β-折叠链形成了独特的桶状结构，其内包裹着生色三肽(Ser65-Tyr66-Gly67)。当在氧气存在下，它会自发形成对-羟基苯亚甲基咪唑啉酮的生色团结构而产生荧光。GFP产生荧光不需要辅因子，而且荧光非常稳定，是一种良好的成像工具。当前的研究确认，天然GFP蛋白中第65～67位的三个氨基酸Ser-Tyr-Gly能够自发形成一个荧光生色基团：对-羟基苯亚甲基咪唑啉酮(p-hydroxybenzylideneimidazolinone)，是其主要的发光位置。野生型AvGFP的光谱特征十分复杂，其荧光激发的主峰在395nm处，而在475nm处另有一个附峰，后者振幅强度约为前者的1/3。在标准的溶液条件下，395nm处的激发可产生508nm处的发射，而475nm处的激发产生的最大发射波长位于503nm。

[0074] 本文所用术语“YFP”指黄色荧光蛋白，该蛋白衍生自绿色荧光蛋白GFP，其氨基酸序列与GFP同源性高达90％以上，YFP相比于GFP关键改变在于第203位氨基酸由苏氨酸突变为酪氨酸(T203Y)。相比于原始的AvGFP，YFP的主激发峰的波长红移至514nm而发射波长则改变为527nm。在此基础上对YFP第65位氨基酸进行定点突变(S65T)可获得荧光增强型黄色荧光蛋白EYFP。

[0075] 本发明荧光蛋白可为黄色荧光蛋白cpYFP，黄色荧光蛋白cpYFP的氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示。在本发明中，所述黄色荧光蛋白cpYFP是将GFP的原始N端和C端通过一段柔性的短肽链连接，在原始GFP近生色团位置制造一个新的N端和C端，将原第145～238位氨基酸部分作为新蛋白的N端，原第1～144位氨基酸作为新蛋白的C端，两片段间通过5～9个具有柔性的短肽链连接获得，形成一个对空间变化敏感的环状排列黄色荧光蛋白cpYFP(circular permutation yellow fluorescent protein)。在本发明中，近生色团位置优选为Y144和N145位氨基酸处；所述具有柔性的短肽链优选为VDGGSGGTG或GGSGG。

[0076] 在本发明中，所述红色荧光蛋白cpmKate最初是从海洋中的珊瑚中提取的，野生的RFP是寡聚体蛋白不利于生物体的融合表达，随后在RFP的基础上进一步衍生出了不同颜色波段的红色荧光蛋白，其中最常用的是mCherry和mKate。

[0077] 在本发明其他实施方式中，所述荧光蛋白还可以为氨基酸序列如SEQ ID NO.6或SEQ ID NO.11所示绿色荧光蛋白、氨基酸序列如SEQ ID NO.4或SEQ ID NO.12所示蓝色荧光蛋白、氨基酸序列如SEQ ID NO.7所示青色荧光蛋白cpTFP、氨基酸序列如SEQ ID NO.8所示橘黄色荧光蛋白、氨基酸序列如SEQ ID NO.5所示苹果红荧光蛋白、氨基酸序列如SEQ ID NO.9或SEQ ID NO.13所示红色荧光蛋白cpmKate和氨基酸序列如SEQ ID NO.10所示红色荧光蛋白mcherry中的一种或多种。

[0078] 在本发明的荧光探针中，荧光蛋白或其功能片段或变体可以位于所述响应多肽的任何位置，所述响应多肽可为响应支链氨基酸的多肽或响应亮氨酸的多肽。具体地，荧光蛋白或其功能片段或变体位于响应多肽的柔性区域，所述的柔性区域是指蛋白质高级结构中存在的一些特定的如环状结构域等结构，这些结构域相比于蛋白质的其他高级结构具有更高的移动性和柔性，并且该区域可以在该蛋白质和配体结合后，空间结构构象发生动态变化。本发明中所述的柔性区域可为支链氨基酸结合蛋白和亮氨酸结合蛋白中的插入位点所在区域，

[0079] 在一个实施方式中，本发明所述荧光蛋白或其功能片段或变体位于所述响应多肽的残基118-120，残基248-258或残基325-331之间，编号对应于所述支链氨基酸结合蛋白的全长或所述亮氨酸结合蛋白的全长。在一个实施方式中，本发明所述荧光蛋白或其功能片段或变体置换所述响应多肽的残基118-120，残基248-258或残基325-331之间的一个或多个氨基酸，编号对应于所述支链氨基酸结合蛋白的全长或所述亮氨酸结合蛋白的全长。在一个实施方式中，本发明所述荧光蛋白或其功能片段或变体插入支链氨基酸结合蛋白的下述位点：118/119，118/120，119/120，248/249，248/250，248/251，248/252，248/253，248/254，248/255，248/256，248/257，248/258，249/250，249/251，249/252，249/253，249/254，249/255，249/256，249/257，249/258，250/251，250/252，250/253，250/254，250/255，250/256，250/257，250/258，251/252，251/253，251/254，251/255，251/256，251/257，251/258，252/253，252/254，252/255，252/256，252/257，252/258，253/254，253/255，253/256，253/257，253/258，254/255，254/256，254/257，254/258，255/256，255/257，255/258，256/257，256/258，257/258，325/326，325/327，325/328，325/329，326/327，326/328，326/329，327/328，327/329或328/329。在一个实施方式中，本发明所述荧光蛋白或其功能片段或变体插入亮氨酸结合蛋白的下述位点：118/119，118/120，119/120，248/249，248/250，248/251，248/252，248/253，248/254，248/255，248/256，248/257，248/258，249/250，249/251，249/252，249/253，249/254，249/255，249/256，249/257，249/258，250/251，250/252，250/253，250/254，250/255，250/256，250/257，250/258，251/252，251/253，251/254，251/255，251/256，251/257，251/258，252/253，252/254，252/255，252/256，252/257，252/258，253/254，253/255，253/256，253/257，253/258，254/255，254/256，254/257，254/258，255/256，255/257，255/258，256/257，256/258，257/258，327/328，327/329，327/330，327/331，328/329，328/330，328/331，329/330，329/331或330/331。在一个实施方式中，本发明所述荧光蛋白或其功能片段或变体位于所述支链氨基酸结合蛋白或其功能片段的残基325-329之间，编号对应于所述支链氨基酸结合蛋白的全长。在一个实施方式中，本发明所述荧光蛋白或其功能片段或变体置换所述支链氨基酸结合蛋白或其功能片段的残基325-329之间的一个或多个氨基酸，编号对应于所述支链氨基酸结合蛋白的全长。优选地，本发明所述荧光蛋白或其功能片段或变体位于所述支链氨基酸结合蛋白或其功能片段的残基326/327或327/328之间。在一个实施方式中，本发明所述荧光蛋白或其功能片段或变体位于所述亮氨酸结合蛋白或其功能片段的残基327-331之间，编号对应于所述亮氨酸结合蛋白的全长。在一个实施方式中，本发明所述荧光蛋白或其功能片段或变体置换所述亮氨酸结合蛋白或其功能片段的残基327-331之间的一个或多个氨基酸，编号对应于所述亮氨酸结合蛋白的全长。优选地，本发明所述荧光蛋白或其功能片段或变体位于所述亮氨酸结合蛋白或其功能片段的残基328/329或329/330之间。

[0080] 例如，黄色荧光蛋白插入SEQ ID NO:1所示的支链氨基酸结合蛋白的325/326，325/327，325/328，325/329，326/327，326/328，326/329，327/328，327/329或328/329之间时，荧光探针的氨基酸序列如SEQ ID NO.14～23所示。例如，黄色荧光蛋白插入SEQ ID NO:2所示的亮氨酸结合蛋白的残基327/328，327/329，327/330，327/331，328/329，328/330，328/331，329/330，329/331或330/331之间时，荧光探针的氨基酸序列如SEQ ID NO.24～33所示。

[0081] 在本发明中，与荧光团融合的响应多肽可以是支链氨基酸结合蛋白或亮氨酸结合蛋白的全长或其片段，优选是支链氨基酸结合蛋白的氨基酸1-345或亮氨酸结合蛋白的氨基酸1-347。

[0082] “接头”指在本发明多肽、蛋白质或核酸中连接两个部分的氨基酸或核酸序列。在本发明多肽或蛋白质中进行连接时，接头的长度不大于6个氨基酸，优选不大于4个氨基酸，更优选是3个氨基酸。在本发明核酸中进行连接时，接头的长度不大于18个核苷酸，优选不大于12个核苷酸，更优选是9个核苷酸。

[0083] 提到某多肽或蛋白时，本发明所用术语“变体”包括具有所述多肽或蛋白相同功能、但序列不同的变体。这些变体包括(但并不限于)：在所述多肽或蛋白的序列中缺失、插入和/或取代一个或多个(通常为1-30个，较佳地1-20个，更佳地1-10个，最佳地1-5个)氨基酸，以及在其C末端和/或N末端添加一个或数个(通常为20个以内，较佳地为10个以内，更佳地为5个以内)氨基酸获得的序列。例如，在本领域中，用性能相近或相似的氨基酸进行取代时，通常不会改变多肽或蛋白的功能。在本领域中，性能相似的氨基酸往往指具有相似侧链的氨基酸家族，在本领域已有明确定义。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电荷的极性侧链的氨基酸(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、具有β-分支侧链的氨基酸(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳香侧链的氨基酸(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。又比如，在C末端和/或N末端添加一个或数个氨基酸通常也不会改变多肽或蛋白的功能。本领域技术人员公知，在基因克隆操作中，常常需要设计合适的酶切位点，这势必在所表达的多肽或蛋白末端引入了一个或多个不相干的残基，而这并不影响目的多肽或蛋白的活性。又如为了构建融合蛋白、促进重组蛋白的表达、获得自动分泌到宿主细胞外的重组蛋白、或利于重组蛋白的纯化，常常需要将一些氨基酸添加至重组蛋白的N-末端、C-末端或该蛋白内的其它合适区域内，例如，包括但不限于，适合的接头肽、信号肽、前导肽、末端延伸、谷胱甘肽S-转移酶(GST)、麦芽糖E结合蛋白、蛋白A、如6His或Flag的标签，或Xa因子或凝血酶或肠激酶的蛋白水解酶位点。多肽或蛋白的变体可包括：同源序列、保守性变体、等位变体、天然突变体、诱导突变体、在高或低的严谨条件下能与所述多肽或蛋白的DNA杂交的DNA所编码的多肽或蛋白、以及利用抗所述多肽或蛋白的抗血清获得的多肽或蛋白。这些变体还可包含与所述多肽或蛋白的序列相同性为至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％、至少约98％、至少约99％或100％的多肽或蛋白。

[0084] 在两种或多种多肽或核酸分子序列中，术语“相同性”或“相同性百分数”指在比较窗口或指定区域上，采用本领域已知方法如序列比较算法，通过手工比对和目测检查来比较和比对最大对应性时，两个或多个序列或子序列相同或其中在指定区域有一定百分数的氨基酸残基或核苷酸相同(例如，60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同)。例如，适合测定序列相同性百分数和序列相似性百分数的优选算法是BLAST和BLAST 2.0算法，分别可参见Altschul等(1977)Nucleic Acids Res.25:3389和Altschul等(1990)J.Mol.Biol.215:403。

[0085] 本文所用术语“功能片段”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持与原始多肽或蛋

白相同的生物学功能或活性的多肽或蛋白。“功能片段”、“衍生物”和“类似物”可以具有与天然存在的蛋白质相同或基本相同的氨基酸序列。“基本上相同”是指氨基酸序列大部分但不完全相同，但保留与其相关的序列的功能活性。通常两个氨基酸序列“基本上相同”或“基本同源”，如果它们至少85％相同的话。也包括具有与天然存在的蛋白质不同的三维结构的片段。本发明的响应多肽的功能片段、衍生物或类似物可以是(i)有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的蛋白，而这样的取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的，或(ii)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的蛋白，或(iii)成熟蛋白与另一个化合物(比如延长蛋白半衰期的化合物，例如聚乙二醇)融合所形成的蛋白，或(iv)附加的氨基酸序列融合到此蛋白序列而形成的蛋白(如前导序列或分泌序列或用来纯化此蛋白的序列或蛋白原序列，或与抗原IgG片段的形成的融合蛋白)。根据本文的教导，这些功能片段、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

[0086] 所述类似物与原始多肽或蛋白的差别可以是氨基酸序列上的差异，也可以是不影响序列的修饰形式上的差异，或者兼而有之。这些蛋白包括天然或诱导的遗传变体。诱导变体可以通过各种技术得到，如通过辐射或暴露于诱变剂而产生随机诱变，还可通过定点诱变法或其他已知分子生物学的技术得到。

[0087] 所述类似物还包括具有不同于天然L-氨基酸的残基(如D-氨基酸)的类似物，以及具有非天然存在的或合成的氨基酸(如β、γ-氨基酸)的类似物。应理解，本发明的响应多肽并不限于上述列举的代表性蛋白、片段、衍生物和类似物。修饰(通常不改变一级结构)形式包括：体内或体外的蛋白的化学衍生形式如乙酰化或羧基化。修饰还包括糖基化，如那些在蛋白的合成和加工中或进一步加工步骤中进行糖基化修饰而产生的蛋白。这种修饰可以通过将蛋白暴露于进行糖基化的酶(如哺乳动物的糖基化酶或去糖基化酶)而完成。修饰形式还包括具有磷酸化氨基酸残基(如磷酸酪氨酸，磷酸丝氨酸，磷酸苏氨酸)的序列。还包括被修饰从而提高了其抗蛋白水解性能或优化了溶解性能的蛋白。

[0088] 本发明所用术语“核酸”可以是DNA形式或RNA形式。DNA形式包括cDNA、基因组DNA或人工合成的DNA。DNA可以是单链的或是双链的。DNA可以是编码链或非编码链。编码成熟蛋白的编码区序列可以与SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15或17所示的编码区序列相同或者是其简并变体。如本文所用，“简并变体”在本发明中是指编码本发明多肽，但与SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15或17所示的编码区序列有差别的核酸序列。

[0089] 提到核酸时，本文所用术语“变体”可以是天然发生的等位变体或非天然发生的变体。这些核苷酸变体包括简并变体、取代变体、缺失变体和插入变体。如本领域所知的，等位变体是一个核酸的替换形式，它可能是一个或多个核苷酸的取代、缺失或插入，但不会从实质上改变其编码的蛋白的功能。本发明核酸可包含与所述核酸序列的序列相同性为至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％、至少约98％、至少约99％或100％的核苷酸序列。

[0090] 如此处所用，术语“在严谨条件下杂交”是用来描述典型的相互间至少60％同源的核苷酸序列仍可相互杂交的杂交和清洗条件。优选的，严谨条件为这样的条件，在此条件下相互间有至少65％、更优的至少70％、且甚至更优选的至少80％或更高同源性的序列一般仍可相互杂交。此严谨条件为本领域普通技术人员所公知。严谨条件的一个优选，非限制性实例为：(1)在较低离子强度和较高温度下的杂交和洗脱，如0.2×SSC，0.1％SDS，0℃；或

(2)杂交时加有变性剂,50%(v/v)甲酰胺,0.1%小牛血清/0.1%Ficoll,42℃等;或(3)仅在两条序列之间的相同性至少在90%以上,更好是95%以上时才发生杂交。并且,可杂交的核酸编码的蛋白与SEQ ID NO:4、5、6、7或8所示的成熟蛋白有相同的生物学功能和活性。

[0091] 本发明还涉及与上述的序列杂交的核酸片段。如本文所用,"核酸片段"的长度至少含15个核苷酸,较好是至少30个核苷酸,更好是至少50个核苷酸,最好是至少100个核苷酸以上。核酸片段可用于核酸的扩增技术(如PCR)。

[0092] 本发明荧光探针或融合蛋白的全长序列或其片段通常可以用PCR扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于PCR扩增法,可根据本发明所公开的有关核苷酸序列,尤其是开放阅读框序列来设计引物,并用市售的cDNA库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的cDNA库作为模板,扩增而得有关序列。当序列较长时,常常需要进行两次或多次PCR扩增,然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。当荧光探针或融合蛋白的全长序列或其片段小于例如2500bp时,可以采用人工合成方法来合成。所述人工合成方法为本领域常规的DNA的人工合成方法,例如通过先合成多个小片段,然后再进行连接可获得全长序列。

[0093] 可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体,再转入细胞,然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离和纯化得到有关多肽或蛋白。

[0094] 此外,还可用人工合成的方法来合成有关序列,尤其是片段长度较短时。通常,通过先合成多个小片段,然后再进行连接可获得序列很长的片段。

[0095] 目前,已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明蛋白(或其片段、衍生物、类似物或变体)的DNA序列。然后可将该DNA序列引入本领域中已知的各种现有的DNA分子(如载体)和细胞中。可通过突变PCR或化学合成等方法将突变引入本发明蛋白序列中。

[0096] 本文所用的术语"表达载体"和"重组载体"可互换使用,指本领域熟知的原核或真核载体,例如细菌质粒、噬菌体、酵母质粒、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒如腺病毒、逆转录病毒或其他载体,这些载体能够在宿主体内复制和稳定,这些重组载体的一个重要特征是通常含有表达控制序列。本文所用术语"表达控制序列"指调控目的基因的转录、翻译和表达的可以与目的基因操作性连接的元件,可以是复制起点、启动子、标记基因或翻译控制元件,包括增强子、操纵子、终止子、核糖体结合位点等,表达控制序列的选择取决于所用的宿主细胞。在本发明中适用的重组载体包括但不限于细菌质粒。在重组表达载体中,"操作性连接"是指目的的核苷酸序列与调节序列以允许核苷酸序列表达的方式连接。本领域的技术人员熟知能用于构建含本发明融合蛋白编码序列和合适的转录/翻译控制信号的表达载体的方法。这些方法包括体外重组DNA技术、DNA合成技术、体内重组技术等。所述的DNA序列可有效连接到表达载体中的适当启动子上,以指导mRNA合成。这些启动子的代表性例子有:大肠杆菌的lac或trp启动子;λ噬菌体PL启动子;真核启动子包括CMV立即早期启动子、HSV胸苷激酶启动子、早期和晚期SV40启动子、反转录病毒的LTR和其他一些已知的可控制基因在原核或真核细胞或其病毒中表达的启动子。表达载体还包括翻译起始用的核糖体结合位点和转录终止子。

[0097] 本领域普通技术人员将理解重组表达载体的设计可取决于如欲转化的宿主细胞的选择、所需的蛋白质表达水平等因素。此外,重组表达载体优选地包含一个或多个选择性标记基因,以提供用于选择转化的宿主细胞的表型性状,如用于真核细胞的二氢叶酸还原

酶、新霉素抗性，或用于大肠杆菌的四环素或氨苄青霉素抗性。

[0098] 在一种实施方式中，将本发明荧光探针或融合蛋白的编码序列经BamHI和HindIII双酶切后与BamHI和HindIII双酶切的pRSETb载体连接，得到大肠杆菌重组表达载体。可以将本发明的表达载体转移到宿主细胞中，以产生包括融合蛋白的蛋白或肽。此种转移过程可用转化或转染等本领域技术人员熟知的常规技术进行。

[0099] 本文在所用术语“宿主细胞”或“细胞”又称为受体细胞，是指能够接收和容纳重组DNA分子的细胞，是重组基因扩增的场所，理想的受体细胞应该满足易于获取和增殖两个条件。本发明的“细胞”可包括原核细胞和真核细胞，具体包括细菌细胞、酵母细胞、昆虫细胞和哺乳动物细胞。

[0100] 本发明的表达载体可用于在原核或真核细胞中表达本发明荧光探针或融合蛋白。从而，本发明涉及已导入本发明表达载体的宿主细胞、优选大肠杆菌。宿主细胞可为任何原核或真核细胞，代表性例子有：大肠杆菌，链霉菌属，鼠伤寒沙门氏菌的细菌细胞，真菌细胞如酵母，植物细胞，果蝇S2或Sf9的昆虫细胞，CHO、COS、293细胞、或Bowes黑素瘤细胞的动物细胞等，其中包括但不限于上述的那些宿主细胞。所述宿主细胞优选各种利于基因产物表达或发酵生产的细胞，此类细胞已为本领域熟知并常用，例如各种大肠杆菌细胞和酵母细胞。在本发明的一个实施方式中，选用大肠杆菌BL21构建表达本发明融合蛋白的宿主细胞。本领域一般技术人员都清楚如何选择适当的载体、启动子、增强子和宿主细胞。

[0101] 本文所用术语“转化”和“转染”、“接合”和“转导”意指本领域内公知的各种将外源核酸(例如，线性DNA或RNA(例如，线性化载体或无载体的单独的基因构建体))或载体形式的核酸(例如，质粒、粘粒、噬菌体、噬粒、噬菌粒、转座子或其它DNA)导入宿主细胞的技术，包括磷酸钙或氯化钙共沉淀、DEAE-甘露聚糖-介导的转染、脂转染、天然感受态、化学介导的转移或电穿孔。当宿主为原核生物如大肠杆菌时，能吸收DNA的感受态细胞可在指数生长期后收获，用$CaCl_2$法处理，所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用$MgCl_2$。如果需要，转化也可用电穿孔的方法进行。当宿主细胞是真核细胞时，可选用如下的DNA转染方法：磷酸钙共沉淀法，常规机械方法如显微注射、电穿孔、脂质体包装等。

[0102] 可以用适合所述宿主细胞表达的常规方法培养获得的转化细胞，表达本发明融合蛋白。根据所用的宿主细胞，培养中所用的培养基可以是各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后，用合适的方法(如温度转换或化学诱导)诱导选择的启动子，将细胞再培养一段时间。

[0103] 在上面的方法中的重组蛋白可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要，可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离或纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但并不限于：常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。优选的采用带His-tag标签的亲和层析法进行。

[0104] 在一个实施方式中，通过包含本发明融合蛋白编码序列的大肠杆菌发酵生产本发明荧光探针或融合蛋白，并通过镍柱亲和层析柱纯化得到了纯形式的本发明荧光探针或融合蛋白。

[0105] 本发明荧光探针或融合蛋白的用途包括但不限于：检测支链氨基酸或亮氨酸、在

生理状态下检测支链氨基酸或亮氨酸、在亚细胞水平检测支链氨基酸或亮氨酸、原位检测支链氨基酸或亮氨酸等。

[0106] 本发明还提供了所述荧光探针荧光探针在支链氨基酸和亮氨酸实时定位、定量检测以及高通量化合物筛选中的应用。在一个实施方式中，所述的支链氨基酸荧光探针和亮氨酸荧光探针优选的与细胞不同部位的信号肽连接，转入到细胞中，通过检测细胞中荧光信号的强弱，进行支链氨基酸和亮氨酸的实时定位；通过支链氨基酸和亮氨酸标准滴加曲线进行相应支链氨基酸和亮氨酸的定量检测。在一个实施方式中，所述的支链氨基酸和亮氨酸标准滴加曲线是根据支链氨基酸荧光探针和亮氨酸荧光探针在不同浓度支链氨基酸和亮氨酸的情况下的荧光信号绘制而成。本发明所述荧光探针直接转入细胞中，在支链氨基酸和亮氨酸实时定位和定量检测过程中不需要耗时的样品处理过程，更加准确。本发明荧光探针在进行高通量化合物筛选时，将不同的化合物添加到细胞培养液中，测定支链氨基酸和亮氨酸含量的变化，从而筛选出对支链氨基酸和亮氨酸含量变化有影响的化合物。通常，本发明中所述应用不涉及疾病的诊断和治疗。

[0107] 在本文中，浓度、含量、百分数和其它数值均可用范围的形式表示。也应理解，使用这种范围形式只是为了方便和简洁，应该被弹性地借读为包括范围上下限所明确提及的数值，还应包括该范围内包括的所有单个数值或子范围，就好像明确提及各个数值和子范围那样。

[0108] 实施例

[0109] 下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。

[0110] 下列实施例中未注明具体条件的实验方法是本领域普通技术人员所熟知的，通常按照常规条件如Sambrook等的《分子克隆：实验室指南》(美国纽约州：冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press)，1989)；简·罗斯凯姆斯等的《分子生物学实验参考手册》，J.萨姆布鲁克，D.W.拉塞尔著，黄培堂等译：《分子克隆实验指南》(第三版，2002年8月，科学出版社出版，北京)；费雷谢尼等的《动物细胞培养：基本技术指南》(第五版)，章静波，徐存拴等译；J.S.博尼费斯农，M.达索等的《精编细胞生物学实验指南》，章静波等译；或按照制造厂商所建议的条件进行。在本文中，除非另外说明，百分比和份数均按重量计算。本领域普通技术人员按照以下实施例，不难根据具体情况略作修改和变换而成功实施本发明，这些修改和变换均落在本申请权利要求的范围内。

[0111] I.实验材料和试剂

[0112] 实施例中所用的基于pRSETb-cpYFP，pRSETb-LivJ，pRSETb-LivK质粒由华东理工大学蛋白质实验室构建，pRSETb质粒载体购自Invitrogen公司。所有用于PCR的引物均由上海捷瑞生物工程技术有限公司合成、纯化和经质谱法鉴定正确。实施例中构建的表达质粒都经过序列测定，序列测定由华大基因公司和杰李测序公司完成。各实施例所用的Taq DNA聚合酶购自东盛生物，pfu DNA聚合酶购自天根生化科技(北京)有限公司，primeSTAR DNA聚合酶购自TaKaRa公司，三种聚合酶购买时都附带赠送对应聚合酶缓冲液和dNTP。BamHI、BglII、HindIII、NdeI、XhoI、EcoRI、SpeI等限制性内切酶、T4连接酶、T4磷酸化酶(T4 PNK)购自Fermentas公司，购买时附带有相对应的缓冲液等。转染试剂Lip2000Kit购于Invitrogen公司。支链氨基酸和亮氨酸等均购自Sigma公司。除非特别声明，无机盐类等化

学试剂均购自sigma-aldrich公司。HEPES盐，氨苄青霉素(Amp)和嘌呤霉素购自Ameresco公司；96孔检测黑板、384孔荧光检测黑板购自Grenier公司。

[0113] 实施例中所用的DNA纯化试剂盒购自BBI公司(加拿大)，普通质粒小抽试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。克隆菌株Mach1购自Invitrogen公司。镍柱亲和层析柱和脱盐柱填料均来自GE healthcare公司。

[0114] 实施例中用到的主要仪器：Biotek Synergy 2多功能酶标仪(美国Bio-Tek公司)，X-15R高速冷冻离心机(美国Beckman公司)，Microfuge22R台式高速冷冻离心机(美国Beckman公司)，PCR扩增仪(德国Biometra公司)，超声破碎仪(宁波新芝公司)，核酸电泳仪(申能博彩公司)，荧光分光光度计(美国Varian公司)，CO_2恒温细胞培养箱(SANYO)，倒置荧光显微镜(日本尼康公司)。

[0115] II.实施例中用到的常规分子生物学方法和细胞实验方法

[0116] (一)聚合酶链式反应(PCR)：

[0117] 1.目的片段扩增PCR：

[0118] 该方法主要用于基因片段扩增和菌落PCR鉴定阳性克隆。所述PCR扩增的反应体系如表1所示，扩增程序如表2所示。

[0119] 表1.PCR扩增反应体系

[0120]

目的片段 PCR 扩增反应体系	
模板序列	0.5-1 μL
正向引物（25 μM）	0.5 μL
反向引物（25 μM）	0.5 μL
10×pfu 缓冲液	5 μL
pfu DNA 聚合酶	0.5 μL
dNTP（10 mM）	1 μL
灭菌超纯水 (ddH_2O)	41.5-42 μL
总体积	50 μL

[0121]

[0122]

PCR 扩增程序		
变性	95 ℃	2-10 min
30 轮循环	94-96 ℃	30 -45 s
	50-65 ℃	30 -45 s
	72 ℃	bp/(600 bp/min)
延伸	72 ℃	10 min

[0123] 表2.PCR扩增程序2.长片段(>2500bp)扩增PCR：

[0124] 本发明中使用的长片段扩增，主要是反向PCR扩增载体，在下述实施例中用于获得定点突变的一种技术。在变异部位设计反向PCR引物，其中一条引物的5’端包含变异的核苷酸序列。扩增后的产物就含有相应的突变位点。长片段扩增PCR反应体系如表3所示，扩增程序如表4或表5所示。

[0125] 表3.长片段(>2500bp)扩增PCR反应体系

[0126]

长片段（>2500 bp）扩增 PCR 反应体系	
模板序列（10 pg-1 ng）	1 μL
正向引物（25 μM）	0.5 μL
反向引物（25 μM）	0.5 μL
5×PrimerSTAR 缓冲液	10 μL
PrimerSTAR DNA 聚合酶	0.5 μL
dNTP（2.5 mM）	4 μL
灭菌超纯水(ddH_2O)	33.5 μL
总体积	50 μL

[0127] 表4.长片段(>2500bp)扩增PCR扩增程序

[0128]

长片段 PCR 扩增程序		
变性	95 °C	5 min
30 轮循环	98 °C	10 s
	50-68 °C	5-15 s
	72 °C	bp/(1000 bp/min)
延伸	72 °C	10 min

[0129] 表5.长片段(>2500bp)扩增PCR扩增程序

[0130]

长片段 PCR 扩增程序		
变性	95 °C	5 min
30 轮循环	98 °C	10 s
	68 °C	bp/(1000 bp/min)
延伸	72 °C	10 min

[0131]

[0132] (二)核酸内切酶酶切反应：

[0133] 对质粒载体进行双酶切的体系如表6所示，其中n代表使体系达到总体积所需要加入的灭菌超纯水μL量。

[0134] 表6质粒载体双酶切体系

[0135]

质粒载体双酶切体系	
质粒载体	20 μL(约 1.5 μg)
10×缓冲液	5 μL
限制性内切酶 1	1-2 μL
限制性内切酶 2	1-2 μL
灭菌超纯水	n μL
总体积	50 μL
反应条件	37 °C，1~7 h

[0136] (三)DNA片段5’端磷酸化反应

[0137] 从微生物中抽提出的质粒或者基因组末端都含有磷酸基团，而PCR产物没有，故需对PCR产物的5’端碱基进行磷酸基团加成反应，只有末端含有磷酸基团DNA分子才能发生连接反应。磷酸化反应体系如表7所示，其中T4 PNK为T4多聚核苷酸激酶的简写，用于对DNA分

子的5’端磷酸基团的加成反应。

[0138] 表7.磷酸化反应体系

磷酸化反应体系	
PCR 产物片段 DNA 序列	5-8 μL
10×T4 连接酶缓冲液	1 μL
T4 PNK	1 μL
灭菌超纯水	0-3 μL
总体积	10 μL
反应条件 37 ℃，30 min~2 h 后 72 ℃ 灭活 20 min	

[0139]

[0140] (四)目的片段和载体的连接反应

[0141] 不同的片段和载体之间的连接方法有所差异，本发明中使用了三种连接方法

[0142] 1.平末端短片段和线性化载体的平末端连接

[0143] 该方法的原理是PCR获得的平末端产物在T4 PNK作用下对DNA片段的5’末端进行磷酸化反应后，与线性化的载体在PEG4000和T4 DNA连接酶的作用下连接获得重组质粒。同源重组连接体系如表8所示。

[0144] 表8.同源重组连接体系

同源重组连接体系	
T4 PNK 处理的 DNA 片段	4 μl
线性化载体片段	4 μl
PEG4000	1 μl
10×T4 连接酶缓冲液	1 μL
T4 DNA 连接酶	1 μL
总计	10 μl
反应条件 22 ℃，30 分钟	

[0145]

[0146] 2.含有粘性末端的DNA片段和含有粘性末端载体片段的连接

[0147] 通过限制性内切酶切割的DNA片段通常会产生突出的粘性末端，因此可以和含有序列互补的粘性末端载体片段连接，形成重组质粒。连接反应体系如表9所示。

[0148] 表9.连接反应体系

连接反应体系	
酶切后的 PCR 产物片段 DNA	1-7 μL
酶切后的质粒	0.5-7 μL
10×T4 连接酶缓冲液	1 μL
T4 DNA 连接酶	1 μL
灭菌超纯水	n μL
总体积	10 μL
反应条件	16 ℃，4~8 h

[0149]

[0150] 注:PCR产物片段与载体双酶切产物的质量比大致在2:1—6:1之间。

[0151] 3.反向PCR引入定点突变后5’端磷酸化的DNA片段产物自身环化的连接反应

[0152] 将5’端磷酸化的DNA片段通过自身环化连接反应将线性化载体的3’端和5’端连接反应得到重组质粒。自身环化连接反应体系如表10所示。

[0153] 表10.自身环化连接反应体系

自身环化连接反应体系	
磷酸化反应体系	10 μL
T4 连接酶（5 U/μL）	0.5 μL
总体积	10.5 μL
反应条件	16 ℃，4~16 h

[0154]

[0155] (五)感受态细胞的制备与转化

[0156] 感受态细胞的制备：

[0157] 1.挑取单菌落(如Mach1)接种于5mL LB培养基中,37℃摇床过夜。

[0158] 2.取0.5-1mL过夜培养的菌液转种到50mL LB培养基中,37℃,220rpm培养3至5h,直到OD600达到0.5。

[0159] 3.冰浴预冷细胞2h。

[0160] 4.4℃,4000rpm离心10min。

[0161] 5.弃上清,用5mL预冷的重悬缓冲液悬浮细胞,待均匀后再加入重悬缓冲液至终体积为50mL。

[0162] 6.冰浴45min。

[0163] 7.4℃,4000rpm离心10min,用5mL冰预冷的储存缓冲液重悬细菌。

[0164] 8.每个EP管中放100μL菌液,-80℃或液氮冻存。

[0165] 重悬缓冲液:CaCl2(100mM)、MgCl2(70mM)、NaAc(40mM)

[0166] 储存缓冲液:0.5mL DMSO、1.9mL 80％甘油、1mL 10×$CaCl_2$(1M)、1mL 10×$MgCl_2$(700mM)、1mL 10×NaAc(400mM)、4.6mL ddH_2O转化：

[0167] 1.取100μl感受态细胞于冰浴上融化。

[0168] 2.加入适当体积的连接产物,轻轻吹打混匀,冰浴30min。通常加入的连接产物的体积少于感受态细胞体积的1/10。

[0169] 3.将菌液放入42℃水浴中热激90s,迅速转移至冰浴中放置5min。

[0170] 4.加入500μl LB,于37℃恒温摇床上200转培养1h。

[0171] 5.将菌液4000rpm离心3min,留200μL上清将菌体吹匀,均匀涂布于含适当抗生素的琼脂平板表面,平板于37℃恒温培养箱内倒置过夜。

[0172] (六)蛋白质的表达,纯化和荧光检测

[0173] 1.将pRSETb为基础的支链氨基酸和亮氨酸探针质粒转化到JM109(DE3)中,倒置培养过夜,从平板上挑取克隆到250mL锥形瓶中,置于37℃摇床,220rpm培养至OD＝0.4～0.8,加入1/1000(v/v)的IPTG(1M),18℃诱导表达24～36h。

[0174] 2.诱导表达完成后,4000rpm,30min离心收菌,加入50mM的磷酸盐缓冲液重悬菌体沉淀,超声破碎至菌体澄清。9600rpm,4℃离心20min。

[0175] 3.离心上清通过自装的镍柱亲和层析柱纯化获得蛋白,镍柱亲和层析后的蛋白再

通过自装的脱盐柱获得溶解在20mM MOPS缓冲液(pH 7.4)或者磷酸盐缓冲液PBS中的蛋白。

[0176] 4.纯化的支链氨基酸和亮氨酸结合蛋白及突变蛋白经过SDS-PAGE鉴定后,使用测定缓冲液(100mM HEPES,100mM NaCl,pH 7.3)或者磷酸盐缓冲液PBS稀释探针成终浓度为5～10μM的蛋白溶液。用测定缓冲液(20mM MOPS,pH 7.4)或者磷酸盐缓冲液PBS将组氨酸配制成终浓度为1M的储液。

[0177] 取100μl 5μM的蛋白溶液,37℃温育5min,分别加入支链氨基酸和亮氨酸混匀后至终浓度为100mM,利用多功能荧光酶标仪测定蛋白在340nm下的光吸收。

[0178] 取100μL 1μM的荧光探针溶液,37℃温育5min,加入支链氨基酸和亮氨酸滴定,测定蛋白的485nm荧光激发后528nm发射的荧光强度。对样品的荧光激发、发射测定利用多功能荧光酶标仪完成。

[0179] 取100μl 1μM的荧光探针溶液,37℃温育5min,加入支链氨基酸和亮氨酸,测定探针蛋白的吸收光谱和荧光光谱。对样品的吸收光谱和荧光光谱的测定是通过分光光度计和荧光分光光度计完成。

[0180] (七)哺乳动物细胞荧光检测

[0181] 1.将pCDNA3.1+为基础的支链氨基酸和亮氨酸探针质粒通过转染试剂Lipofectamine2000(Invitrogen)转染到HeLa中,置于37℃,5%CO_2的细胞培养箱中培养。待外源基因充分表达24～36h后进行荧光检测。

[0182] 2.诱导表达完成后,将贴壁的HeLa细胞,用PBS冲洗三次,置于HBSS溶液中分别进行荧光显微镜和酶标仪检测。

[0183] 实施例1

[0184] pRSETb-LivJ和pRSETb-LivK质粒的构建

[0185] 通过PCR扩增大肠杆菌基因中的LivJ、LivK基因,LivJ的PCR产物凝胶电泳后回收后用BamHI和HindIII酶切;LivK的PCR产物凝胶电泳后回收后用EcoRI和HindIII酶切同时对pRSETb载体进行相应的双酶切。用T4 DNA ligase连接后,连接产物转化MachI,转化的MachI涂布于LB平板(氨苄青霉素100ug/mL),置于37℃培养过夜。将生长MachI转化子进行质粒抽提后,进行PCR鉴定。阳性质粒经过测序正确后进行后续的质粒构建。

[0186] pRSETb-LivJ-cpYFP,pRSETb-LivK-cpYFP荧光探针不同插入位点的质粒构建和检测

[0187] 本实施例中,我们以pRSETb-LivJ为基础质粒根据LivJ晶体结构选择了118/119,118/120,119/120,248/249,248/250,248/251,248/252,248/253,248/254,248/255,248/256,248/257,248/258,249/250,249/251,249/252,249/253,249/254,249/255,249/256,249/257,249/258,250/251,250/252,250/253,250/254,250/255,250/256,250/257,250/258,251/252,251/253,251/254,251/255,251/256,251/257,251/258,252/253,252/254,252/255,252/256,252/257,252/258,253/254,253/255,253/256,253/257,253/258,254/255,254/256,254/257,254/258,255/256,255/257,255/258,256/257,256/258,257/258,325/326,325/327,325/328,325/329,326/327,326/328,326/329,327/328,327/329,328/329位点。其中检测对支链氨酸响应超过3倍的有326/327,327/328位(如图2所示)。

[0188] 以pRSETb-LivK为基础质粒根据LivK晶体结构选择了118/119,118/120,119/120,248/249,248/250,248/251,248/252,248/253,248/254,248/255,248/256,248/257,248/

258,249/250,249/251,249/252,249/253,249/254,249/255,249/256,249/257,249/258,250/251,250/252,250/253,250/254,250/255,250/256,250/257,250/258,251/252,251/253,251/254,251/255,251/256,251/257,251/258,252/253,252/254,252/255,252/256,252/257,252/258,253/254,253/255,253/256,253/257,253/258,254/255,254/256,254/257,254/258,255/256,255/257,255/258,256/257,256/258,257/258,327/328,327/329,327/330,327/331,328/329,328/330,328/331,329/330,329/331,330/331位点。其中检测对亮链氨酸响应超过1.5倍的有328/329,329/330位(如图2所示)。

[0189] 利用PCR产生cpYFP的DNA片段,对该DNA片段使用5'末端的加磷操作后灭活,同时通过反向PCR扩增产生含有不同断裂位点的pRSETb-LivJ和pRSETb-LivK线性化载体,将线性化的pRSETb-LivJ和pRSETb-LivK与5'末端磷酸化的cpYFP片段在PEG4000和T4 DNA ligase的作用下连接产生重组质粒,将这些平板在Kodak多功能活体成像系统,挑取在FITC通道激发下有黄色荧光的克隆,由北京六合华大基因科技股份有限公司上海分公司完成测序。

[0190] 经过测序正确后,将重组质粒转化到JM109(DE3)中诱导表达,并纯化蛋白质,通过SDS-PAGE电泳大小在67KDa。该大小符合pRSETb-LivJ-cpYFP和pRSETb-LivK-cpYFP表达出的含His-tag纯化标签的LivJ-cpYFP和LivK-cpYFP融合蛋白质的大小。结果如图1所示。

[0191] 将纯化的LivJ-cpYFP和LivK-cpYFP融合蛋白质进行支链氨基酸和亮氨酸响应筛选,将含有10mM支链氨基酸和亮氨酸的融合荧光蛋白质的检测信号除以无支链氨基酸和亮氨酸的融合荧光蛋白质的检测信号。

[0192] 结果如图2所示,检测结果显示支链氨基酸荧光探针对支链氨酸响应超过3倍的有326/327,327/328,326/327和327/328位的420nm激发528nm发射处荧光强度随着支链氨基酸浓度升高而降低,326/327和327/328位的485nm激发528nm发射处荧光强度随着支链氨基酸浓度升高而升高。亮氨酸荧光探针对亮氨酸响应超过1.5倍的有328/329,329/330,328/329和329/330位的420nm激发528nm发射处荧光强度随着支链氨基酸浓度升高而降低;328/329和329/330位的485nm激发528nm发射处荧光强度随着支链氨基酸浓度升高而升高。

[0193] 实施例2

[0194] 基于cpBFP的支链氨基酸荧光探针的设计构建和检测

[0195] 按照实施例1中的方法将cpYFP替换为蓝色荧光蛋白cpBFP,融合到支链氨基酸结合蛋白和亮氨酸结合蛋白中分别构建支链氨基酸蓝色荧光蛋白荧光探针和亮氨酸蓝色荧光蛋白荧光探针。结果如图3所示,荧光检测结果显示支链氨基酸荧光探针对支链氨基酸响应超过3倍的有326/327、327/328;亮氨酸荧光探针对亮氨酸响应超过1.5倍的有328/329、329/330。

[0196] 实施例3

[0197] 基于cpmApple的支链氨基酸荧光探针的设计构建和检测

[0198] 按照实施例1中的方法将cpYFP替换为苹果红荧光蛋白cpmApple,融合到支链氨基酸结合蛋白和亮氨酸结合蛋白中分别构建支链氨基酸红色荧光蛋白荧光探针和亮氨酸红色荧光蛋白荧光探针,结果如图4所示,荧光检测结果显示支链氨基酸荧光探针对支链氨基酸响应超过3倍的有326/327,327/328;亮氨酸荧光探针对亮氨酸响应超过1.5倍的有328/329、329/330。

[0199] 实施例1～3的结果说明支链氨基酸结合蛋白的linker区325-329适合融合cpFP荧光蛋白获得对支链氨基酸响应的融合荧光蛋白支链氨基酸探针;亮氨酸结合蛋白的linker区327-331适合融合cpFP荧光蛋白获得对亮氨酸响应的融合荧光蛋白探针。

[0200] 实施例4

[0201] 荧光蛋白和支链氨基酸结合蛋白的简单直接融合无法产生支链氨基酸荧光探针

[0202] 将荧光蛋白cpYFP直接融合到LivK或LivJ蛋白的N端或者C端构建支链氨基酸荧光探针,然后将cpYFP替换为蓝色荧光蛋白cpBFP和苹果红荧光蛋白cpmApple,分别构建支链氨基酸蓝色荧光蛋白荧光探针和红色荧光蛋白荧光探针。结果如图5所示,与对照相比,荧光检测结果显示上述支链氨基酸荧光探针对支链氨基酸的响应没有变化。

[0203] 实施例5

[0204] LivJ-cpYFP和LivK-cpYFP荧光探针性质检测

[0205] 将纯化的LivJ-cpYFP和LivK-cpYFP分别进行0mM和5mM亮氨酸处理10min后,使用荧光分光光度计进行荧光谱的检测。对激发谱的测定:固定发射在530nm处,进行350～515nm区间的激发谱检测;对发射谱的测定,固定激发在490nm处,进行505～600nm区间的发射谱进行检测。LivJ-cpYFP和LivK-cpYFP荧光探针的光谱曲线如图6A和6B所示,以上结果说明LivJ-cpYFP、LivK-cpYFP荧光蛋白的荧光光谱性质与cpYFP荧光蛋白荧光光谱性质类似(Nagai,T.等,Proc Natl Acad Sci USA.2001,V.98(6),pp.3197-3202)。

[0206] 选取其中的对支链氨基酸检测范围在0.1μM～1mM的探针F LivJ sensor A(LivJ-cpYFP 326/327)和F LivJ sensor B(LivJ-cpYFP 327/328)以及F LivK sensor A(Livk-cpYFP 328/329)和F LivK sensor B(Livk-cpYFP 329/330)进行浓度梯度(0～1mM)的三种支链氨基酸检测。分别对纯化的LivJ-cpYFP和LivK-cpYFP进行处理10min后,检测420nm激发528nm发射处荧光强度和485nm激发528nm发射处荧光强度比值的变化,结果如图7所示。这样可以针对样品中支链氨基酸或者亮氨酸含量或者水平,选择更加合适的支链氨基酸或亮氨酸进行定量检测。

[0207] 实施例6

[0208] FLivJ sensor A荧光探针在不同亚细胞器的定位和亚细胞器内荧光探针性质检测

[0209] 本实施例中,我们使用不同的定位信号肽与FLivJ sensor A进行融合,将F LivJ sensor A支链氨基酸荧光蛋白探针定位到不同的细胞器中。

[0210] 将融合不同定位信号肽的FLivJ sensor A基因的质粒转染HeLa细胞36hours后,使用PBS冲洗之后,置于HBSS溶液中使用倒置荧光显微镜进行FITC通道下进行荧光检测。我们发现FLivJ sensor A通过与不同的特异定位信号肽融合能够定位到包括细胞浆,细胞核,细胞内膜,细胞内膜,线粒体,吞噬体,溶酶体,高尔基体。结果如图8所示,不同的亚细胞结构中都显示有荧光,并且荧光的分布和强度各不相同。

[0211] 将融合不同定位信号肽胞浆和线粒体的FLivJ sensor A基因的质粒转染HeLa细胞36hours后,使用PBS冲洗之后,置于HBSS溶液中检测40min时间段内420nm激发528nm发射处荧光强度和485nm激发528nm发射处荧光强度比值的变化,结果如图9,显示随着支链氨基酸的消耗,ratio 485/420逐渐降低,然后添加BCAAs,继续检测43min,添加支链氨基酸的样品ratio 485/420逐渐增加,而对照组ratio 485/420继续降低直至不变。

[0212] 实施例7

[0213] 活细胞水平基于支链氨基酸FLivJ sensor A进行高通量化合物筛选

[0214] 本实施例中，我们使用支链氨基酸FLivJ sensor A胞浆表达的HeLa细胞进行了高通量化合物筛选。

[0215] 将经过转染FLivJ sensor A基因的HeLa细胞，使用PBS冲洗之后，置于HBSS溶液中(无支链氨基酸)处理1小时后，使用10μM的化合物进行处理1小时。滴加支链氨基酸。使用酶标仪记录420nm激发528nm发射处荧光强度和485nm激发528nm发射处荧光强度比值变化。以未用任何化合物处理的样品为标准。结果如图10所示，我们发现使用2000种化合物处理的细胞中，绝大部分的化合物对支链氨基酸进入细胞影响极小。有16种化合物能够提高细胞对支链氨基酸的摄取能力，另外有6种化合物能够明显降低细胞对支链氨基酸的摄取。

[0216] 实施例8

[0217] 支链氨基酸荧光探针FLivJ sensor A对不同亚细胞器内支链氨基酸的定量

[0218] 实施例中，我们使用支链氨基酸FLivJ sensor A胞浆表达的HeLa细胞进行半定量。将经过转染FLivJ sensor A基因的HeLa细胞，分成几种情况，一种情况是不作处理，另一种情况是使用PBS冲洗之后，置于HBSS溶液中(无支链氨基酸)处理1hours后，使用1mM的三种支链氨基酸进行处理1hours，或者继续置于HBSS溶液中。使用酶标仪记录420nm激发528nm发射处荧光强度和485nm激发528nm发射处荧光强度比值变化。如图11，我们可以检测支链氨基酸的代谢情况。

[0219] 由以上实施例可知，本发明提供的荧光探针的蛋白分子量相对较小且易于成熟，荧光动态变化大，特异性好，并且能够通过基因操作的方法在细胞中表达，可在细胞内外实时定位、定量检测支链氨基酸；并且能够进行高通量的化合物筛选。

[0220] 其它实施方式

[0221] 本说明书描述了许多实施方式。然而应理解，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

序列表

<110> 华东理工大学

<120> 支链氨基酸荧光探针及其应用

<130> 181768 1CNCN

<160> 33

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 345

<212> PRT

<213> 大肠杆菌(Escherichia coli)

<220>

<223> LivJ

<400> 1

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

195 200 205

Gln Ile Leu Arg Gln Ala Arg Ala Ala Gly Leu Lys Thr Gln Phe Met
210 215 220

Gly Pro Glu Gly Val Ala Asn Val Ser Leu Ser Asn Ile Ala Gly Glu
225 230 235 240

Ser Ala Glu Gly Leu Leu Val Thr Lys Pro Lys Asn Tyr Asp Gln Val
245 250 255

Pro Ala Asn Lys Pro Ile Val Asp Ala Ile Lys Ala Lys Lys Gln Asp
260 265 270

Pro Ser Gly Ala Phe Val Trp Thr Thr Tyr Ala Ala Leu Gln Ser Leu
275 280 285

Gln Ala Gly Leu Asn Gln Ser Asp Asp Pro Ala Glu Ile Ala Lys Tyr
290 295 300

Leu Lys Ala Asn Ser Val Asp Thr Val Met Gly Pro Leu Thr Trp Asp
305 310 315 320

Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe Glu Phe Gly Val Phe Asp Trp His
325 330 335

Ala Asn Gly Thr Ala Thr Asp Ala Lys
340 345

<210> 2

<211> 347

<212> PRT

<213> 大肠杆菌(Escherichia coli)

<220>

<223> LivK

<400> 2

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

Ala Gln Trp Gly Asp Met Glu Phe Asn Gly Ala Arg Gln Ala Ile Lys
20 25 30

Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly Asp Lys Leu Val Gly Val
35 40 45

Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln Ala Val Ala Val Ala Asn
50 55 60

Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val Ile Gly His Leu Cys Ser
65 70 75 80

Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr Glu Asp Glu Gly Ile Leu
85 90 95

Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu Leu Thr Gln Arg Gly Tyr

100 105 110

Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp Ser Ser Gln Gly Pro Thr
115 120 125
Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys Pro Gln Arg Ile Ala Ile
130 135 140
Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly Leu Ala Arg Ser Val Gln
145 150 155 160
Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val Val Phe Phe Asp Gly Ile
165 170 175
Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu Ile Ala Arg Leu Lys Lys
180 185 190
Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly Tyr Tyr Pro Glu Met Gly
195 200 205
Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly Leu Lys Thr Gln Phe Met
210 215 220
Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu Ser Asn Ile Ala Gly Asp
225 230 235 240
Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro Lys Arg Tyr Asp Gln Asp
245 250 255
Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu Lys Ala Asp Lys Lys Asp
260 265 270
Pro Ser Gly Pro Tyr Val Trp Ile Thr Tyr Ala Ala Val Gln Ser Leu
275 280 285
Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp Glu Pro Leu Ala Leu Val
290 295 300
Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr Val Ile Gly Pro Leu Asn
305 310 315 320
Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe Asp Phe Gly Val Phe Gln
325 330 335
Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala Lys
340 345

<210> 3
<211> 247
<212> PRT
<213> 人工合成
<220>
<223> cpYFP
<400> 3
Met Tyr Asn Ser Asp Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn

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

<210> 4
<211> 243
<212> PRT
<213> 人工合成
<220>
<223> cpBFP
<400> 4
Asn Val Tyr Ile Lys Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn

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

<210> 5
<211> 243
<212> PRT
<213> 人工合成
<220>
<223> cpmApple
<400> 5

Met Val Ser Glu Arg Met Tyr Pro Glu Asp Gly Ala Leu Lys Ser Glu
1 5 10 15

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

<210> 6
<211> 241
<212> PRT
<213> 人工合成
<220>
<223> cpGFP
<400> 6

Asn Val Tyr Ile Lys Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn
1 5 10 15
Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Gly Val Gln Leu Ala Tyr

20 25 30

His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro
35 40 45

Asp Asn His Tyr Leu Ser Val Gln Ser Ile Leu Ser Lys Asp Pro Asn
50 55 60

Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly
65 70 75 80

Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Gly Gly Thr Gly Gly Ser
85 90 95

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Gln
100 105 110

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
115 120 125

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
130 135 140

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
145 150 155 160

Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
165 170 175

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Ile Gln Glu
180 185 190

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
195 200 205

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

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
225 230 235 240

Asn

<210> 7

<211> 241

<212> PRT

<213> 人工合成

<220>

<223> cpTFP

<400> 7

Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn
1 5 10 15

Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Gly Val Gln Leu Ala Asp
20 25 30

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

<210> 8
<211> 242
<212> PRT
<213> 人工合成
<220>
<223> cpmOrange
<400> 8

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

35 40 45

Ile Val Asp Ile Lys Leu Asp Ile Val Ser His Asn Glu Asp Tyr Thr
50 55 60

Ile Val Glu Gln Cys Glu Arg Ala Glu Gly Arg His Pro Thr Gly Gly
65 70 75 80

Arg Asp Glu Leu Tyr Lys Gly Gly Thr Gly Gly Ser Leu Val Ser Lys
85 90 95

Gly Glu Glu Asp Asn Met Ala Ile Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe Lys
100 105 110

Val His Met Glu Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Glu Gly
115 120 125

Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Ala Phe Gln Thr Ala Lys Leu Lys
130 135 140

Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro
145 150 155 160

Gln Phe Thr Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Ile Lys His Pro Ala Asp Ile
165 170 175

Pro Asp Tyr Phe Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Arg Trp Glu Arg
180 185 190

Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Ile Ile His Val Asn Gln Asp Ser
195 200 205

Ser Leu Gln Asp Gly Val Phe Ile Tyr Lys Val Lys Leu Arg Gly Thr
210 215 220

Asn Phe Pro Pro Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Met Gly Trp
225 230 235 240

Glu Ala

<210> 9

<211> 250

<212> PRT

<213> 人工合成

<220>

<223>cpmKate

<400> 9

Met Gly Gly Arg Ser Lys Lys Pro Ala Lys Asn Leu Lys Met Pro Gly
1 5 10 15

Val Tyr Tyr Val Asp Arg Arg Leu Glu Arg Ile Lys Glu Ala Asp Lys
20 25 30

Glu Thr Tyr Val Glu Gln His Glu Val Ala Val Ala Arg Tyr Cys Asp
35 40 45

Leu Pro Ser Lys Leu Gly His Lys Leu Asn Gly Gly Thr Gly Gly Ser
50 55 60
Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met His Met Lys
65 70 75 80
Leu Tyr Met Glu Gly Thr Val Asn Asn His His Phe Lys Cys Thr Ser
85 90 95
Glu Gly Glu Gly Lys Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Met Arg Ile Lys
100 105 110
Val Val Glu Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Phe Asp Ile Leu Ala Thr
115 120 125
Ser Phe Met Tyr Gly Ser Lys Thr Phe Ile Asn His Thr Gln Gly Ile
130 135 140
Pro Asp Phe Phe Lys Gln Ser Phe Pro Glu Gly Phe Thr Trp Glu Arg
145 150 155 160
Val Thr Thr Tyr Glu Asp Gly Gly Val Leu Thr Ala Thr Gln Asp Thr
165 170 175
Ser Leu Gln Asp Gly Cys Leu Ile Tyr Asn Val Lys Ile Arg Gly Val
180 185 190
Asn Phe Pro Ser Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Leu Gly Trp
195 200 205
Glu Ala Ser Thr Glu Met Leu Tyr Pro Ala Asp Gly Gly Leu Glu Gly
210 215 220
Arg Ser Asp Met Ala Leu Lys Leu Val Gly Gly Gly His Leu Ile Cys
225 230 235 240
Asn Leu Lys Thr Thr Tyr Arg Ser Lys Lys
245 250

<210> 10
<211> 236
<212> PRT
<213> 人工合成
<220>
<223> mcherry
<400> 10
Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Asp Asn Met Ala Ile Ile Lys Glu Phe
1 5 10 15
Met Arg Phe Lys Val His Met Glu Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe
20 25 30
Glu Ile Glu Gly Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr
35 40 45

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

<210> 11
<211> 238
<212> PRT
<213> 人工合成
<220>
<223> GFP
<400> 11

Met Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Val Leu Val
1 5 10 15
Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly Gln Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu
20 25 30
Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Asn 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 Gln
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 Phe Tyr 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 Met Glu Tyr Asn
130 135 140
Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Gly Asp Lys Pro Lys Asn Gly
145 150 155 160
Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Lys Asp Gly Ser Val
165 170 175
Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro
180 185 190
Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser
195 200 205
Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Ile Leu Leu Glu Phe Val
210 215 220
Thr Ala Ala Arg Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
225 230 235

<210> 12
<211> 239
<212> PRT
<213> 人工合成
<220>
<223> BFP
<400> 12

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

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
85 90 95
Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
100 105 110
Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
115 120 125
Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
130 135 140
Asn Phe Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
145 150 155 160
Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
165 170 175
Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
180 185 190
Pro Val Leu Leu Pro Asp Ser His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
195 200 205
Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
210 215 220
Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
225 230 235

<210> 13
<211> 233
<212> PRT
<213> 人工合成
<220>
<223> mKate
<400> 13

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

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

<210> 14
<211> 590
<212> PRT
<213> 人工合成
<220>
<223> LivJ325/326-cpYFP
<400> 14

Glu Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly Ala Met Ser Gly Pro Val Ala
1 5 10 15
Gln Tyr Gly Asp Gln Glu Phe Thr Gly Ala Glu Gln Ala Val Ala Asp
20 25 30
Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly Asn Lys Leu Gln Ile Val Lys
35 40 45
Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln Ala Val Ala Val Ala Asn Lys
50 55 60
Val Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val Ile Gly His Leu Cys Ser Ser
65 70 75 80
Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met
85 90 95
Ile Thr Pro Ala Ala Thr Ala Pro Glu Leu Thr Ala Arg Gly Tyr Gln
100 105 110

Leu Ile Leu Arg Thr Thr Gly Leu Asp Ser Asp Gln Gly Pro Thr Ala
115 120 125
Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Lys Val Lys Pro Gln Arg Ile Ala Ile Val
130 135 140
His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly Leu Ala Arg Ala Val Gln Asp
145 150 155 160
Gly Leu Lys Lys Gly Asn Ala Asn Val Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr
165 170 175
Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Thr Leu Val Ala Arg Leu Lys Lys Glu
180 185 190
Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly Tyr His Pro Glu Met Gly Gln
195 200 205
Ile Leu Arg Gln Ala Arg Ala Ala Gly Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly
210 215 220
Pro Glu Gly Val Ala Asn Val Ser Leu Ser Asn Ile Ala Gly Glu Ser
225 230 235 240
Ala Glu Gly Leu Leu Val Thr Lys Pro Lys Asn Tyr Asp Gln Val Pro
245 250 255
Ala Asn Lys Pro Ile Val Asp Ala Ile Lys Ala Lys Lys Gln Asp Pro
260 265 270
Ser Gly Ala Phe Val Trp Thr Thr Tyr Ala Ala Leu Gln Ser Leu Gln
275 280 285
Ala Gly Leu Asn Gln Ser Asp Asp Pro Ala Glu Ile Ala Lys Tyr Leu
290 295 300
Lys Ala Asn Ser Val Asp Thr Val Met Gly Pro Leu Thr Trp Asp Glu
305 310 315 320
Lys Gly Asp Leu Lys Tyr Asn Ser Asp Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp
325 330 335
Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Val
340 345 350
Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro
355 360 365
Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Phe
370 375 380
Gln Ser Val Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val
385 390 395 400
Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu
405 410 415
Leu Tyr Asn Val Asp Gly Gly Ser Gly Gly Thr Gly Ser Lys Gly Glu

420 425 430

Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp

435 440 445

Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala

450 455 460

Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Leu Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu

465 470 475 480

Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Gly Tyr Gly Leu Lys

485 490 495

Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys

500 505 510

Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys

515 520 525

Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp

530 535 540

Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Gly Phe Lys Glu Asp

545 550 555 560

Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Gly Phe Glu Phe Gly

565 570 575

Val Phe Asp Trp His Ala Asn Gly Thr Ala Thr Asp Ala Lys

580 585 590

<210> 15

<211> 589

<212> PRT

<213> 人工合成

<220>

<223> LivJ325/327-cpYFP

<400> 15

Glu Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly Ala Met Ser Gly Pro Val Ala

1 5 10 15

Gln Tyr Gly Asp Gln Glu Phe Thr Gly Ala Glu Gln Ala Val Ala Asp

20 25 30

Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly Asn Lys Leu Gln Ile Val Lys

35 40 45

Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln Ala Val Ala Val Ala Asn Lys

50 55 60

Val Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val Ile Gly His Leu Cys Ser Ser

65 70 75 80

Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met

85 90 95

Ile Thr Pro Ala Ala Thr Ala Pro Glu Leu Thr Ala Arg Gly Tyr Gln
100 105 110

Leu Ile Leu Arg Thr Thr Gly Leu Asp Ser Asp Gln Gly Pro Thr Ala
115 120 125

Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Lys Val Lys Pro Gln Arg Ile Ala Ile Val
130 135 140

His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly Leu Ala Arg Ala Val Gln Asp
145 150 155 160

Gly Leu Lys Lys Gly Asn Ala Asn Val Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr
165 170 175

Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Thr Leu Val Ala Arg Leu Lys Lys Glu
180 185 190

Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly Tyr His Pro Glu Met Gly Gln
195 200 205

Ile Leu Arg Gln Ala Arg Ala Ala Gly Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly
210 215 220

Pro Glu Gly Val Ala Asn Val Ser Leu Ser Asn Ile Ala Gly Glu Ser
225 230 235 240

Ala Glu Gly Leu Leu Val Thr Lys Pro Lys Asn Tyr Asp Gln Val Pro
245 250 255

Ala Asn Lys Pro Ile Val Asp Ala Ile Lys Ala Lys Lys Gln Asp Pro
260 265 270

Ser Gly Ala Phe Val Trp Thr Thr Tyr Ala Ala Leu Gln Ser Leu Gln
275 280 285

Ala Gly Leu Asn Gln Ser Asp Asp Pro Ala Glu Ile Ala Lys Tyr Leu
290 295 300

Lys Ala Asn Ser Val Asp Thr Val Met Gly Pro Leu Thr Trp Asp Glu
305 310 315 320

Lys Gly Asp Leu Lys Tyr Asn Ser Asp Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp
325 330 335

Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Val
340 345 350

Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro
355 360 365

Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Phe
370 375 380

Gln Ser Val Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val
385 390 395 400

Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu
405 410 415
Leu Tyr Asn Val Asp Gly Gly Ser Gly Gly Thr Gly Ser Lys Gly Glu
420 425 430
Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp
435 440 445
Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala
450 455 460
Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Leu Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu
465 470 475 480
Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Gly Tyr Gly Leu Lys
485 490 495
Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys
500 505 510
Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys
515 520 525
Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp
530 535 540
Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Gly Phe Lys Glu Asp
545 550 555 560
Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Phe Glu Phe Gly Val
565 570 575
Phe Asp Trp His Ala Asn Gly Thr Ala Thr Asp Ala Lys
580 585

<210> 16
<211> 588
<212> PRT
<213> 人工合成
<220>
<223> LivJ325/328-cpYFP
<400> 16

Glu Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly Ala Met Ser Gly Pro Val Ala
1 5 10 15
Gln Tyr Gly Asp Gln Glu Phe Thr Gly Ala Glu Gln Ala Val Ala Asp
20 25 30
Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly Asn Lys Leu Gln Ile Val Lys
35 40 45
Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln Ala Val Ala Val Ala Asn Lys
50 55 60

Val Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val Ile Gly His Leu Cys Ser Ser
65 70 75 80
Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met
85 90 95
Ile Thr Pro Ala Ala Thr Ala Pro Glu Leu Thr Ala Arg Gly Tyr Gln
100 105 110
Leu Ile Leu Arg Thr Thr Gly Leu Asp Ser Asp Gln Gly Pro Thr Ala
115 120 125
Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Lys Val Lys Pro Gln Arg Ile Ala Ile Val
130 135 140
His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly Leu Ala Arg Ala Val Gln Asp
145 150 155 160
Gly Leu Lys Lys Gly Asn Ala Asn Val Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr
165 170 175
Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Thr Leu Val Ala Arg Leu Lys Lys Glu
180 185 190
Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly Tyr His Pro Glu Met Gly Gln
195 200 205
Ile Leu Arg Gln Ala Arg Ala Ala Gly Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly
210 215 220
Pro Glu Gly Val Ala Asn Val Ser Leu Ser Asn Ile Ala Gly Glu Ser
225 230 235 240
Ala Glu Gly Leu Leu Val Thr Lys Pro Lys Asn Tyr Asp Gln Val Pro
245 250 255
Ala Asn Lys Pro Ile Val Asp Ala Ile Lys Ala Lys Lys Gln Asp Pro
260 265 270
Ser Gly Ala Phe Val Trp Thr Thr Tyr Ala Ala Leu Gln Ser Leu Gln
275 280 285
Ala Gly Leu Asn Gln Ser Asp Asp Pro Ala Glu Ile Ala Lys Tyr Leu
290 295 300
Lys Ala Asn Ser Val Asp Thr Val Met Gly Pro Leu Thr Trp Asp Glu
305 310 315 320
Lys Gly Asp Leu Lys Tyr Asn Ser Asp Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp
325 330 335
Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Val
340 345 350
Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro
355 360 365
Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Phe

370 375 380
Gln Ser Val Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val
385 390 395 400
Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu
405 410 415
Leu Tyr Asn Val Asp Gly Gly Ser Gly Gly Thr Gly Ser Lys Gly Glu
420 425 430
Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp
435 440 445
Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala
450 455 460
Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Leu Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu
465 470 475 480
Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Gly Tyr Gly Leu Lys
485 490 495
Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys
500 505 510
Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys
515 520 525
Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp
530 535 540
Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Gly Phe Lys Glu Asp
545 550 555 560
Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Glu Phe Gly Val Phe
565 570 575
Asp Trp His Ala Asn Gly Thr Ala Thr Asp Ala Lys
580 585

<210> 17
<211> 587
<212> PRT
<213> 人工合成
<220>
<223> LivJ325/329-cpYFP
<400> 17
Glu Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly Ala Met Ser Gly Pro Val Ala
1 5 10 15
Gln Tyr Gly Asp Gln Glu Phe Thr Gly Ala Glu Gln Ala Val Ala Asp
20 25 30
Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly Asn Lys Leu Gln Ile Val Lys

35 40 45

Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln Ala Val Ala Val Ala Asn Lys
50 55 60

Val Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val Ile Gly His Leu Cys Ser Ser
65 70 75 80

Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met
85 90 95

Ile Thr Pro Ala Ala Thr Ala Pro Glu Leu Thr Ala Arg Gly Tyr Gln
100 105 110

Leu Ile Leu Arg Thr Thr Gly Leu Asp Ser Asp Gln Gly Pro Thr Ala
115 120 125

Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Lys Val Lys Pro Gln Arg Ile Ala Ile Val
130 135 140

His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly Leu Ala Arg Ala Val Gln Asp
145 150 155 160

Gly Leu Lys Lys Gly Asn Ala Asn Val Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr
165 170 175

Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Thr Leu Val Ala Arg Leu Lys Lys Glu
180 185 190

Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly Tyr His Pro Glu Met Gly Gln
195 200 205

Ile Leu Arg Gln Ala Arg Ala Ala Gly Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly
210 215 220

Pro Glu Gly Val Ala Asn Val Ser Leu Ser Asn Ile Ala Gly Glu Ser
225 230 235 240

Ala Glu Gly Leu Leu Val Thr Lys Pro Lys Asn Tyr Asp Gln Val Pro
245 250 255

Ala Asn Lys Pro Ile Val Asp Ala Ile Lys Ala Lys Lys Gln Asp Pro
260 265 270

Ser Gly Ala Phe Val Trp Thr Thr Tyr Ala Ala Leu Gln Ser Leu Gln
275 280 285

Ala Gly Leu Asn Gln Ser Asp Asp Pro Ala Glu Ile Ala Lys Tyr Leu
290 295 300

Lys Ala Asn Ser Val Asp Thr Val Met Gly Pro Leu Thr Trp Asp Glu
305 310 315 320

Lys Gly Asp Leu Lys Tyr Asn Ser Asp Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp
325 330 335

Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Val
340 345 350

Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro
355 360 365
Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Phe
370 375 380
Gln Ser Val Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val
385 390 395 400
Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu
405 410 415
Leu Tyr Asn Val Asp Gly Gly Ser Gly Gly Thr Gly Ser Lys Gly Glu
420 425 430
Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp
435 440 445
Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala
450 455 460
Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Leu Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu
465 470 475 480
Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Gly Tyr Gly Leu Lys
485 490 495
Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys
500 505 510
Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys
515 520 525
Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp
530 535 540
Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Gly Phe Lys Glu Asp
545 550 555 560
Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Phe Gly Val Phe Asp
565 570 575
Trp His Ala Asn Gly Thr Ala Thr Asp Ala Lys
580 585

<210> 18
<211> 591
<212> PRT
<213> 人工合成
<220>
<223> LivJ326/327-cpYFP
<400> 18
Met Glu Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly Ala Met Ser Gly Pro Val
1 5 10 15

Ala Gln Tyr Gly Asp Gln Glu Phe Thr Gly Ala Glu Gln Ala Val Ala
20 25 30
Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly Asn Lys Leu Gln Ile Val
35 40 45
Lys Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln Ala Val Ala Val Ala Asn
50 55 60
Lys Val Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val Ile Gly His Leu Cys Ser
65 70 75 80
Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr Glu Asp Glu Gly Ile Leu
85 90 95
Met Ile Thr Pro Ala Ala Thr Ala Pro Glu Leu Thr Ala Arg Gly Tyr
100 105 110
Gln Leu Ile Leu Arg Thr Thr Gly Leu Asp Ser Asp Gln Gly Pro Thr
115 120 125
Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Lys Val Lys Pro Gln Arg Ile Ala Ile
130 135 140
Val His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly Leu Ala Arg Ala Val Gln
145 150 155 160
Asp Gly Leu Lys Lys Gly Asn Ala Asn Val Val Phe Phe Asp Gly Ile
165 170 175
Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Thr Leu Val Ala Arg Leu Lys Lys
180 185 190
Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly Tyr His Pro Glu Met Gly
195 200 205
Gln Ile Leu Arg Gln Ala Arg Ala Ala Gly Leu Lys Thr Gln Phe Met
210 215 220
Gly Pro Glu Gly Val Ala Asn Val Ser Leu Ser Asn Ile Ala Gly Glu
225 230 235 240
Ser Ala Glu Gly Leu Leu Val Thr Lys Pro Lys Asn Tyr Asp Gln Val
245 250 255
Pro Ala Asn Lys Pro Ile Val Asp Ala Ile Lys Ala Lys Lys Gln Asp
260 265 270
Pro Ser Gly Ala Phe Val Trp Thr Thr Tyr Ala Ala Leu Gln Ser Leu
275 280 285
Gln Ala Gly Leu Asn Gln Ser Asp Asp Pro Ala Glu Ile Ala Lys Tyr
290 295 300
Leu Lys Ala Asn Ser Val Asp Thr Val Met Gly Pro Leu Thr Trp Asp
305 310 315 320
Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Tyr Asn Ser Asp Asn Val Tyr Ile Met

325 330 335
Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His
340 345 350
Asn Val Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn
355 360 365
Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu
370 375 380
Ser Phe Gln Ser Val Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His
385 390 395 400
Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met
405 410 415
Asp Glu Leu Tyr Asn Val Asp Gly Gly Ser Gly Gly Thr Gly Ser Lys
420 425 430
Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp
435 440 445
Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly
450 455 460
Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Leu Ile Cys Thr Thr Gly
465 470 475 480
Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Gly Tyr Gly
485 490 495
Leu Lys Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe
500 505 510
Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe
515 520 525
Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu
530 535 540
Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Gly Phe Lys
545 550 555 560
Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Phe Glu Phe
565 570 575
Gly Val Phe Asp Trp His Ala Asn Gly Thr Ala Thr Asp Ala Lys
580 585 590

<210> 19
<211> 589
<212> PRT
<213> 人工合成
<220>
<223> LivJ326/328-cpYFP

<400> 19

Glu Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly Ala Met Ser Gly Pro Val Ala
1 5 10 15
Gln Tyr Gly Asp Gln Glu Phe Thr Gly Ala Glu Gln Ala Val Ala Asp
20 25 30
Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly Asn Lys Leu Gln Ile Val Lys
35 40 45
Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln Ala Val Ala Val Ala Asn Lys
50 55 60
Val Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val Ile Gly His Leu Cys Ser Ser
65 70 75 80
Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met
85 90 95
Ile Thr Pro Ala Ala Thr Ala Pro Glu Leu Thr Ala Arg Gly Tyr Gln
100 105 110
Leu Ile Leu Arg Thr Thr Gly Leu Asp Ser Asp Gln Gly Pro Thr Ala
115 120 125
Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Lys Val Lys Pro Gln Arg Ile Ala Ile Val
130 135 140
His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly Leu Ala Arg Ala Val Gln Asp
145 150 155 160
Gly Leu Lys Lys Gly Asn Ala Asn Val Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr
165 170 175
Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Thr Leu Val Ala Arg Leu Lys Lys Glu
180 185 190
Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly Tyr His Pro Glu Met Gly Gln
195 200 205
Ile Leu Arg Gln Ala Arg Ala Ala Gly Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly
210 215 220
Pro Glu Gly Val Ala Asn Val Ser Leu Ser Asn Ile Ala Gly Glu Ser
225 230 235 240
Ala Glu Gly Leu Leu Val Thr Lys Pro Lys Asn Tyr Asp Gln Val Pro
245 250 255
Ala Asn Lys Pro Ile Val Asp Ala Ile Lys Ala Lys Lys Gln Asp Pro
260 265 270
Ser Gly Ala Phe Val Trp Thr Thr Tyr Ala Ala Leu Gln Ser Leu Gln
275 280 285
Ala Gly Leu Asn Gln Ser Asp Asp Pro Ala Glu Ile Ala Lys Tyr Leu
290 295 300

Lys Ala Asn Ser Val Asp Thr Val Met Gly Pro Leu Thr Trp Asp Glu
305 310 315 320
Lys Gly Asp Leu Lys Gly Tyr Asn Ser Asp Asn Val Tyr Ile Met Ala
325 330 335
Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn
340 345 350
Val Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr
355 360 365
Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser
370 375 380
Phe Gln Ser Val Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met
385 390 395 400
Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp
405 410 415
Glu Leu Tyr Asn Val Asp Gly Gly Ser Gly Gly Thr Gly Ser Lys Gly
420 425 430
Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly
435 440 445
Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp
450 455 460
Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Leu Ile Cys Thr Thr Gly Lys
465 470 475 480
Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Gly Tyr Gly Leu
485 490 495
Lys Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe
500 505 510
Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe
515 520 525
Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly
530 535 540
Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Gly Phe Lys Glu
545 550 555 560
Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Glu Phe Gly Val
565 570 575
Phe Asp Trp His Ala Asn Gly Thr Ala Thr Asp Ala Lys
580 585

<210> 20
<211> 588
<212> PRT

<213> 人工合成

<220>

<223> LivJ326/329-cpYFP

<400> 20

Glu Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly Ala Met Ser Gly Pro Val Ala
1 5 10 15
Gln Tyr Gly Asp Gln Glu Phe Thr Gly Ala Glu Gln Ala Val Ala Asp
20 25 30
Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly Asn Lys Leu Gln Ile Val Lys
35 40 45
Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln Ala Val Ala Val Ala Asn Lys
50 55 60
Val Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val Ile Gly His Leu Cys Ser Ser
65 70 75 80
Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met
85 90 95
Ile Thr Pro Ala Ala Thr Ala Pro Glu Leu Thr Ala Arg Gly Tyr Gln
100 105 110
Leu Ile Leu Arg Thr Thr Gly Leu Asp Ser Asp Gln Gly Pro Thr Ala
115 120 125
Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Lys Val Lys Pro Gln Arg Ile Ala Ile Val
130 135 140
His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly Leu Ala Arg Ala Val Gln Asp
145 150 155 160
Gly Leu Lys Lys Gly Asn Ala Asn Val Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr
165 170 175
Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Thr Leu Val Ala Arg Leu Lys Lys Glu
180 185 190
Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly Tyr His Pro Glu Met Gly Gln
195 200 205
Ile Leu Arg Gln Ala Arg Ala Ala Gly Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly
210 215 220
Pro Glu Gly Val Ala Asn Val Ser Leu Ser Asn Ile Ala Gly Glu Ser
225 230 235 240
Ala Glu Gly Leu Leu Val Thr Lys Pro Lys Asn Tyr Asp Gln Val Pro
245 250 255
Ala Asn Lys Pro Ile Val Asp Ala Ile Lys Ala Lys Lys Gln Asp Pro
260 265 270
Ser Gly Ala Phe Val Trp Thr Thr Tyr Ala Ala Leu Gln Ser Leu Gln

275 280 285

Ala Gly Leu Asn Gln Ser Asp Asp Pro Ala Glu Ile Ala Lys Tyr Leu

290 295 300

Lys Ala Asn Ser Val Asp Thr Val Met Gly Pro Leu Thr Trp Asp Glu

305 310 315 320

Lys Gly Asp Leu Lys Gly Tyr Asn Ser Asp Asn Val Tyr Ile Met Ala

325 330 335

Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn

340 345 350

Val Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr

355 360 365

Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser

370 375 380

Phe Gln Ser Val Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met

385 390 395 400

Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp

405 410 415

Glu Leu Tyr Asn Val Asp Gly Gly Ser Gly Gly Thr Gly Ser Lys Gly

420 425 430

Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly

435 440 445

Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp

450 455 460

Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Leu Ile Cys Thr Thr Gly Lys

465 470 475 480

Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Gly Tyr Gly Leu

485 490 495

Lys Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe

500 505 510

Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe

515 520 525

Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly

530 535 540

Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Gly Phe Lys Glu

545 550 555 560

Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Phe Gly Val Phe

565 570 575

Asp Trp His Ala Asn Gly Thr Ala Thr Asp Ala Lys

580 585

<210> 21
<211> 591
<212> PRT
<213> 人工合成
<220>
<223> LivJ327/328-cpYFP
<400> 21

Met Glu Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly Ala Met Ser Gly Pro Val
1 5 10 15
Ala Gln Tyr Gly Asp Gln Glu Phe Thr Gly Ala Glu Gln Ala Val Ala
20 25 30
Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly Asn Lys Leu Gln Ile Val
35 40 45
Lys Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln Ala Val Ala Val Ala Asn
50 55 60
Lys Val Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val Ile Gly His Leu Cys Ser
65 70 75 80
Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr Glu Asp Glu Gly Ile Leu
85 90 95
Met Ile Thr Pro Ala Ala Thr Ala Pro Glu Leu Thr Ala Arg Gly Tyr
100 105 110
Gln Leu Ile Leu Arg Thr Thr Gly Leu Asp Ser Asp Gln Gly Pro Thr
115 120 125
Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Lys Val Lys Pro Gln Arg Ile Ala Ile
130 135 140
Val His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly Leu Ala Arg Ala Val Gln
145 150 155 160
Asp Gly Leu Lys Lys Gly Asn Ala Asn Val Val Phe Phe Asp Gly Ile
165 170 175
Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Thr Leu Val Ala Arg Leu Lys Lys
180 185 190
Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly Tyr His Pro Glu Met Gly
195 200 205
Gln Ile Leu Arg Gln Ala Arg Ala Ala Gly Leu Lys Thr Gln Phe Met
210 215 220
Gly Pro Glu Gly Val Ala Asn Val Ser Leu Ser Asn Ile Ala Gly Glu
225 230 235 240
Ser Ala Glu Gly Leu Leu Val Thr Lys Pro Lys Asn Tyr Asp Gln Val
245 250 255

Pro Ala Asn Lys Pro Ile Val Asp Ala Ile Lys Ala Lys Lys Gln Asp
260 265 270
Pro Ser Gly Ala Phe Val Trp Thr Thr Tyr Ala Ala Leu Gln Ser Leu
275 280 285
Gln Ala Gly Leu Asn Gln Ser Asp Asp Pro Ala Glu Ile Ala Lys Tyr
290 295 300
Leu Lys Ala Asn Ser Val Asp Thr Val Met Gly Pro Leu Thr Trp Asp
305 310 315 320
Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe Tyr Asn Ser Asp Asn Val Tyr Ile
325 330 335
Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg
340 345 350
His Asn Val Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln
355 360 365
Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr
370 375 380
Leu Ser Phe Gln Ser Val Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp
385 390 395 400
His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly
405 410 415
Met Asp Glu Leu Tyr Asn Val Asp Gly Gly Ser Gly Gly Thr Gly Ser
420 425 430
Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu
435 440 445
Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu
450 455 460
Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Leu Ile Cys Thr Thr
465 470 475 480
Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Gly Tyr
485 490 495
Gly Leu Lys Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp
500 505 510
Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile
515 520 525
Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe
530 535 540
Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Gly Phe
545 550 555 560
Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Glu Phe

565 570 575
Gly Val Phe Asp Trp His Ala Asn Gly Thr Ala Thr Asp Ala Lys
580 585 590

<210> 22
<211> 589
<212> PRT
<213> 人工合成
<220>
<223> LivJ327/329-cpYFP
<400> 22

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

225 230 235 240
Ala Glu Gly Leu Leu Val Thr Lys Pro Lys Asn Tyr Asp Gln Val Pro
245 250 255
Ala Asn Lys Pro Ile Val Asp Ala Ile Lys Ala Lys Lys Gln Asp Pro
260 265 270
Ser Gly Ala Phe Val Trp Thr Thr Tyr Ala Ala Leu Gln Ser Leu Gln
275 280 285
Ala Gly Leu Asn Gln Ser Asp Asp Pro Ala Glu Ile Ala Lys Tyr Leu
290 295 300
Lys Ala Asn Ser Val Asp Thr Val Met Gly Pro Leu Thr Trp Asp Glu
305 310 315 320
Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe Tyr Asn Ser Asp Asn Val Tyr Ile Met
325 330 335
Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His
340 345 350
Asn Val Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn
355 360 365
Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu
370 375 380
Ser Phe Gln Ser Val Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His
385 390 395 400
Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met
405 410 415
Asp Glu Leu Tyr Asn Val Asp Gly Gly Ser Gly Gly Thr Gly Ser Lys
420 425 430
Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp
435 440 445
Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly
450 455 460
Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Leu Ile Cys Thr Thr Gly
465 470 475 480
Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Gly Tyr Gly
485 490 495
Leu Lys Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe
500 505 510
Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe
515 520 525
Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu
530 535 540

Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Gly Phe Lys
545 550 555 560
Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Phe Gly Val
565 570 575
Phe Asp Trp His Ala Asn Gly Thr Ala Thr Asp Ala Lys
580 585

<210> 23
<211> 590
<212> PRT
<213> 人工合成
<220>
<223> LivJ328/329-cpYFP
<400> 23

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

Ile Leu Arg Gln Ala Arg Ala Ala Gly Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly
210 215 220
Pro Glu Gly Val Ala Asn Val Ser Leu Ser Asn Ile Ala Gly Glu Ser
225 230 235 240
Ala Glu Gly Leu Leu Val Thr Lys Pro Lys Asn Tyr Asp Gln Val Pro
245 250 255
Ala Asn Lys Pro Ile Val Asp Ala Ile Lys Ala Lys Lys Gln Asp Pro
260 265 270
Ser Gly Ala Phe Val Trp Thr Thr Tyr Ala Ala Leu Gln Ser Leu Gln
275 280 285
Ala Gly Leu Asn Gln Ser Asp Asp Pro Ala Glu Ile Ala Lys Tyr Leu
290 295 300
Lys Ala Asn Ser Val Asp Thr Val Met Gly Pro Leu Thr Trp Asp Glu
305 310 315 320
Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe Glu Tyr Asn Ser Asp Asn Val Tyr Ile
325 330 335
Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg
340 345 350
His Asn Val Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln
355 360 365
Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr
370 375 380
Leu Ser Phe Gln Ser Val Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp
385 390 395 400
His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly
405 410 415
Met Asp Glu Leu Tyr Asn Val Asp Gly Gly Ser Gly Gly Thr Gly Ser
420 425 430
Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu
435 440 445
Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu
450 455 460
Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Leu Ile Cys Thr Thr
465 470 475 480
Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Gly Tyr
485 490 495
Gly Leu Lys Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp
500 505 510
Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile

515 520 525

Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe
530 535 540

Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Gly Phe
545 550 555 560

Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Phe Gly
565 570 575

Val Phe Asp Trp His Ala Asn Gly Thr Ala Thr Asp Ala Lys
580 585 590

<210> 24

<211> 593

<212> PRT

<213> 人工合成

<220>

<223> LivK 327/328-cpYFP

<400> 24

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

Ala Gln Trp Gly Asp Met Glu Phe Asn Gly Ala Arg Gln Ala Ile Lys
20 25 30

Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly Asp Lys Leu Val Gly Val
35 40 45

Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln Ala Val Ala Val Ala Asn
50 55 60

Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val Ile Gly His Leu Cys Ser
65 70 75 80

Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr Glu Asp Glu Gly Ile Leu
85 90 95

Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu Leu Thr Gln Arg Gly Tyr
100 105 110

Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp Ser Ser Gln Gly Pro Thr
115 120 125

Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys Pro Gln Arg Ile Ala Ile
130 135 140

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

Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val Val Phe Phe Asp Gly Ile
165 170 175

Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu Ile Ala Arg Leu Lys Lys

180 185 190

Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly Tyr Tyr Pro Glu Met Gly

195 200 205

Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly Leu Lys Thr Gln Phe Met

210 215 220

Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu Ser Asn Ile Ala Gly Asp

225 230 235 240

Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro Lys Arg Tyr Asp Gln Asp

245 250 255

Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu Lys Ala Asp Lys Lys Asp

260 265 270

Pro Ser Gly Pro Tyr Val Trp Ile Thr Tyr Ala Ala Val Gln Ser Leu

275 280 285

Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp Glu Pro Leu Ala Leu Val

290 295 300

Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr Val Ile Gly Pro Leu Asn

305 310 315 320

Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Tyr Asn Ser Asp Asn Val Tyr Ile

325 330 335

Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg

340 345 350

His Asn Val Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln

355 360 365

Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr

370 375 380

Leu Ser Phe Gln Ser Val Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp

385 390 395 400

His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly

405 410 415

Met Asp Glu Leu Tyr Asn Val Asp Gly Gly Ser Gly Gly Thr Gly Ser

420 425 430

Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu

435 440 445

Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu

450 455 460

Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Leu Ile Cys Thr Thr

465 470 475 480

Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Gly Tyr

485 490 495

Gly Leu Lys Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp
500 505 510
Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile
515 520 525
Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe
530 535 540
Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Gly Phe
545 550 555 560
Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Gly Phe
565 570 575
Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala
580 585 590
Lys

<210> 25
<211> 592
<212> PRT
<213> 人工合成
<220>
<223> LivK 327/329-cpYFP
<400> 25
Met Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly Ala Met Ser Gly Pro Ile
1 5 10 15
Ala Gln Trp Gly Asp Met Glu Phe Asn Gly Ala Arg Gln Ala Ile Lys
20 25 30
Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly Asp Lys Leu Val Gly Val
35 40 45
Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln Ala Val Ala Val Ala Asn
50 55 60
Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val Ile Gly His Leu Cys Ser
65 70 75 80
Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr Glu Asp Glu Gly Ile Leu
85 90 95
Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu Leu Thr Gln Arg Gly Tyr
100 105 110
Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp Ser Ser Gln Gly Pro Thr
115 120 125
Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys Pro Gln Arg Ile Ala Ile
130 135 140
Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly Leu Ala Arg Ser Val Gln

145 150 155 160
Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val Val Phe Phe Asp Gly Ile
165 170 175
Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu Ile Ala Arg Leu Lys Lys
180 185 190
Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly Tyr Tyr Pro Glu Met Gly
195 200 205
Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly Leu Lys Thr Gln Phe Met
210 215 220
Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu Ser Asn Ile Ala Gly Asp
225 230 235 240
Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro Lys Arg Tyr Asp Gln Asp
245 250 255
Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu Lys Ala Asp Lys Lys Asp
260 265 270
Pro Ser Gly Pro Tyr Val Trp Ile Thr Tyr Ala Ala Val Gln Ser Leu
275 280 285
Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp Glu Pro Leu Ala Leu Val
290 295 300
Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr Val Ile Gly Pro Leu Asn
305 310 315 320
Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Tyr Asn Ser Asp Asn Val Tyr Ile
325 330 335
Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg
340 345 350
His Asn Val Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln
355 360 365
Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr
370 375 380
Leu Ser Phe Gln Ser Val Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp
385 390 395 400
His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly
405 410 415
Met Asp Glu Leu Tyr Asn Val Asp Gly Gly Ser Gly Gly Thr Gly Ser
420 425 430
Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu
435 440 445
Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu
450 455 460

Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Leu Ile Cys Thr Thr
465 470 475 480
Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Gly Tyr
485 490 495
Gly Leu Lys Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp
500 505 510
Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile
515 520 525
Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe
530 535 540
Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Gly Phe
545 550 555 560
Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Phe Asp
565 570 575
Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala Lys
580 585 590

<210> 26
<211> 591
<212> PRT
<213> 人工合成
<220>
<223> LivK 327/330-cpYFP
<400> 26

Met Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly Ala Met Ser Gly Pro Ile
1 5 10 15
Ala Gln Trp Gly Asp Met Glu Phe Asn Gly Ala Arg Gln Ala Ile Lys
20 25 30
Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly Asp Lys Leu Val Gly Val
35 40 45
Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln Ala Val Ala Val Ala Asn
50 55 60
Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val Ile Gly His Leu Cys Ser
65 70 75 80
Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr Glu Asp Glu Gly Ile Leu
85 90 95
Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu Leu Thr Gln Arg Gly Tyr
100 105 110
Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp Ser Ser Gln Gly Pro Thr
115 120 125

Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys Pro Gln Arg Ile Ala Ile
130 135 140
Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly Leu Ala Arg Ser Val Gln
145 150 155 160
Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val Val Phe Phe Asp Gly Ile
165 170 175
Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu Ile Ala Arg Leu Lys Lys
180 185 190
Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly Tyr Tyr Pro Glu Met Gly
195 200 205
Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly Leu Lys Thr Gln Phe Met
210 215 220
Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu Ser Asn Ile Ala Gly Asp
225 230 235 240
Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro Lys Arg Tyr Asp Gln Asp
245 250 255
Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu Lys Ala Asp Lys Lys Asp
260 265 270
Pro Ser Gly Pro Tyr Val Trp Ile Thr Tyr Ala Ala Val Gln Ser Leu
275 280 285
Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp Glu Pro Leu Ala Leu Val
290 295 300
Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr Val Ile Gly Pro Leu Asn
305 310 315 320
Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Tyr Asn Ser Asp Asn Val Tyr Ile
325 330 335
Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg
340 345 350
His Asn Val Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln
355 360 365
Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr
370 375 380
Leu Ser Phe Gln Ser Val Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp
385 390 395 400
His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly
405 410 415
Met Asp Glu Leu Tyr Asn Val Asp Gly Gly Ser Gly Gly Thr Gly Ser
420 425 430
Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu

435 440 445

Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu

450 455 460

Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Leu Ile Cys Thr Thr

465 470 475 480

Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Gly Tyr

485 490 495

Gly Leu Lys Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp

500 505 510

Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile

515 520 525

Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe

530 535 540

Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Gly Phe

545 550 555 560

Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Asp Phe

565 570 575

Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala Lys

580 585 590

<210> 27

<211> 593

<212> PRT

<213> 人工合成

<220>

<223> LivK 327/331-cpYFP

<400> 27

Met Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly Ala Met Ser Gly Pro Ile

1 5 10 15

Ala Gln Trp Gly Asp Met Glu Phe Asn Gly Ala Arg Gln Ala Ile Lys

20 25 30

Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly Asp Lys Leu Val Gly Val

35 40 45

Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln Ala Val Ala Val Ala Asn

50 55 60

Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val Ile Gly His Leu Cys Ser

65 70 75 80

Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr Glu Asp Glu Gly Ile Leu

85 90 95

Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu Leu Thr Gln Arg Gly Tyr

100 105 110

Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp Ser Ser Gln Gly Pro Thr

115 120 125

Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys Pro Gln Arg Ile Ala Ile

130 135 140

Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly Leu Ala Arg Ser Val Gln

145 150 155 160

Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val Val Phe Phe Asp Gly Ile

165 170 175

Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu Ile Ala Arg Leu Lys Lys

180 185 190

Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly Tyr Tyr Pro Glu Met Gly

195 200 205

Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly Leu Lys Thr Gln Phe Met

210 215 220

Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu Ser Asn Ile Ala Gly Asp

225 230 235 240

Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro Lys Arg Tyr Asp Gln Asp

245 250 255

Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu Lys Ala Asp Lys Lys Asp

260 265 270

Pro Ser Gly Pro Tyr Val Trp Ile Thr Tyr Ala Ala Val Gln Ser Leu

275 280 285

Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp Glu Pro Leu Ala Leu Val

290 295 300

Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr Val Ile Gly Pro Leu Asn

305 310 315 320

Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Tyr Asn Ser Asp Asn Val Tyr Ile

325 330 335

Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg

340 345 350

His Asn Val Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln

355 360 365

Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr

370 375 380

Leu Ser Phe Gln Ser Val Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp

385 390 395 400

His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly

405 410 415

Met Asp Glu Leu Tyr Asn Val Asp Gly Gly Ser Gly Gly Thr Gly Ser
420 425 430
Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu
435 440 445
Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu
450 455 460
Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Leu Ile Cys Thr Thr
465 470 475 480
Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Gly Tyr
485 490 495
Gly Leu Lys Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp
500 505 510
Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile
515 520 525
Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe
530 535 540
Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Gly Phe
545 550 555 560
Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Gly Phe
565 570 575
Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala
580 585 590
Lys

<210> 28
<211> 593
<212> PRT
<213> 人工合成
<220>
<223> LivK 328/329-cpYFP
<400> 28

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

65 70 75 80
Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr Glu Asp Glu Gly Ile Leu
85 90 95
Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu Leu Thr Gln Arg Gly Tyr
100 105 110
Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp Ser Ser Gln Gly Pro Thr
115 120 125
Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys Pro Gln Arg Ile Ala Ile
130 135 140
Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly Leu Ala Arg Ser Val Gln
145 150 155 160
Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val Val Phe Phe Asp Gly Ile
165 170 175
Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu Ile Ala Arg Leu Lys Lys
180 185 190
Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly Tyr Tyr Pro Glu Met Gly
195 200 205
Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly Leu Lys Thr Gln Phe Met
210 215 220
Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu Ser Asn Ile Ala Gly Asp
225 230 235 240
Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro Lys Arg Tyr Asp Gln Asp
245 250 255
Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu Lys Ala Asp Lys Lys Asp
260 265 270
Pro Ser Gly Pro Tyr Val Trp Ile Thr Tyr Ala Ala Val Gln Ser Leu
275 280 285
Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp Glu Pro Leu Ala Leu Val
290 295 300
Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr Val Ile Gly Pro Leu Asn
305 310 315 320
Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Tyr Asn Ser Asp Asn Val Tyr
325 330 335
Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile
340 345 350
Arg His Asn Val Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln
355 360 365
Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His
370 375 380

Tyr Leu Ser Phe Gln Ser Val Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg
385 390 395 400
Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu
405 410 415
Gly Met Asp Glu Leu Tyr Asn Val Asp Gly Gly Ser Gly Gly Thr Gly
420 425 430
Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu
435 440 445
Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly
450 455 460
Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Leu Ile Cys Thr
465 470 475 480
Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Gly
485 490 495
Tyr Gly Leu Lys Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His
500 505 510
Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr
515 520 525
Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys
530 535 540
Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Gly
545 550 555 560
Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Phe
565 570 575
Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala
580 585 590
Lys

<210> 29
<211> 593
<212> PRT
<213> 人工合成
<220>
<223> LivK 328/330-cpYFP
<400> 29

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

35 40 45

Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln Ala Val Ala Val Ala Asn

50 55 60

Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val Ile Gly His Leu Cys Ser

65 70 75 80

Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr Glu Asp Glu Gly Ile Leu

85 90 95

Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu Leu Thr Gln Arg Gly Tyr

100 105 110

Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp Ser Ser Gln Gly Pro Thr

115 120 125

Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys Pro Gln Arg Ile Ala Ile

130 135 140

Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly Leu Ala Arg Ser Val Gln

145 150 155 160

Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val Val Phe Phe Asp Gly Ile

165 170 175

Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu Ile Ala Arg Leu Lys Lys

180 185 190

Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly Tyr Tyr Pro Glu Met Gly

195 200 205

Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly Leu Lys Thr Gln Phe Met

210 215 220

Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu Ser Asn Ile Ala Gly Asp

225 230 235 240

Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro Lys Arg Tyr Asp Gln Asp

245 250 255

Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu Lys Ala Asp Lys Lys Asp

260 265 270

Pro Ser Gly Pro Tyr Val Trp Ile Thr Tyr Ala Ala Val Gln Ser Leu

275 280 285

Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp Glu Pro Leu Ala Leu Val

290 295 300

Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr Val Ile Gly Pro Leu Asn

305 310 315 320

Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Tyr Asn Ser Asp Asn Val Tyr

325 330 335

Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile

340 345 350

Arg His Asn Val Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln
355 360 365
Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His
370 375 380
Tyr Leu Ser Phe Gln Ser Val Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg
385 390 395 400
Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu
405 410 415
Gly Met Asp Glu Leu Tyr Asn Val Asp Gly Gly Ser Gly Gly Thr Gly
420 425 430
Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu
435 440 445
Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly
450 455 460
Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Leu Ile Cys Thr
465 470 475 480
Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Gly
485 490 495
Tyr Gly Leu Lys Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His
500 505 510
Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr
515 520 525
Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys
530 535 540
Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Gly
545 550 555 560
Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Phe
565 570 575
Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala
580 585 590
Lys

<210> 30
<211> 593
<212> PRT
<213> 人工合成
<220>
<223> LivK 328/331-cpYFP
<400> 30
Met Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly Ala Met Ser Gly Pro Ile

1 5 10 15
Ala Gln Trp Gly Asp Met Glu Phe Asn Gly Ala Arg Gln Ala Ile Lys
20 25 30
Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly Asp Lys Leu Val Gly Val
35 40 45
Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln Ala Val Ala Val Ala Asn
50 55 60
Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val Ile Gly His Leu Cys Ser
65 70 75 80
Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr Glu Asp Glu Gly Ile Leu
85 90 95
Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu Leu Thr Gln Arg Gly Tyr
100 105 110
Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp Ser Ser Gln Gly Pro Thr
115 120 125
Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys Pro Gln Arg Ile Ala Ile
130 135 140
Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly Leu Ala Arg Ser Val Gln
145 150 155 160
Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val Val Phe Phe Asp Gly Ile
165 170 175
Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu Ile Ala Arg Leu Lys Lys
180 185 190
Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly Tyr Tyr Pro Glu Met Gly
195 200 205
Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly Leu Lys Thr Gln Phe Met
210 215 220
Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu Ser Asn Ile Ala Gly Asp
225 230 235 240
Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro Lys Arg Tyr Asp Gln Asp
245 250 255
Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu Lys Ala Asp Lys Lys Asp
260 265 270
Pro Ser Gly Pro Tyr Val Trp Ile Thr Tyr Ala Ala Val Gln Ser Leu
275 280 285
Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp Glu Pro Leu Ala Leu Val
290 295 300
Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr Val Ile Gly Pro Leu Asn
305 310 315 320

Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Tyr Asn Ser Asp Asn Val Tyr
325 330 335
Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile
340 345 350
Arg His Asn Val Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln
355 360 365
Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His
370 375 380
Tyr Leu Ser Phe Gln Ser Val Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg
385 390 395 400
Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu
405 410 415
Gly Met Asp Glu Leu Tyr Asn Val Asp Gly Gly Ser Gly Gly Thr Gly
420 425 430
Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu
435 440 445
Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly
450 455 460
Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Leu Ile Cys Thr
465 470 475 480
Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Gly
485 490 495
Tyr Gly Leu Lys Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His
500 505 510
Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr
515 520 525
Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys
530 535 540
Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Gly
545 550 555 560
Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Phe
565 570 575
Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala
580 585 590
Lys

<210> 31

<211> 593

<212> PRT

<213> 人工合成

<220>

<223> LivK 329/330-cpYFP

<400> 31

Met Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly Ala Met Ser Gly Pro Ile
1 5 10 15
Ala Gln Trp Gly Asp Met Glu Phe Asn Gly Ala Arg Gln Ala Ile Lys
20 25 30
Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly Asp Lys Leu Val Gly Val
35 40 45
Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln Ala Val Ala Val Ala Asn
50 55 60
Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val Ile Gly His Leu Cys Ser
65 70 75 80
Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr Glu Asp Glu Gly Ile Leu
85 90 95
Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu Leu Thr Gln Arg Gly Tyr
100 105 110
Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp Ser Ser Gln Gly Pro Thr
115 120 125
Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys Pro Gln Arg Ile Ala Ile
130 135 140
Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly Leu Ala Arg Ser Val Gln
145 150 155 160
Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val Val Phe Phe Asp Gly Ile
165 170 175
Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu Ile Ala Arg Leu Lys Lys
180 185 190
Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly Tyr Tyr Pro Glu Met Gly
195 200 205
Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly Leu Lys Thr Gln Phe Met
210 215 220
Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu Ser Asn Ile Ala Gly Asp
225 230 235 240
Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro Lys Arg Tyr Asp Gln Asp
245 250 255
Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu Lys Ala Asp Lys Lys Asp
260 265 270
Pro Ser Gly Pro Tyr Val Trp Ile Thr Tyr Ala Ala Val Gln Ser Leu
275 280 285

Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp Glu Pro Leu Ala Leu Val
290 295 300
Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr Val Ile Gly Pro Leu Asn
305 310 315 320
Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe Tyr Asn Ser Asp Asn Val
325 330 335
Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys
340 345 350
Ile Arg His Asn Val Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr
355 360 365
Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn
370 375 380
His Tyr Leu Ser Phe Gln Ser Val Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys
385 390 395 400
Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr
405 410 415
Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Asn Val Asp Gly Gly Ser Gly Gly Thr
420 425 430
Gly Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val
435 440 445
Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu
450 455 460
Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Leu Ile Cys
465 470 475 480
Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu
485 490 495
Gly Tyr Gly Leu Lys Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln
500 505 510
His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg
515 520 525
Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val
530 535 540
Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile
545 550 555 560
Gly Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn
565 570 575
Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala
580 585 590
Lys

<210> 32
<211> 593
<212> PRT
<213> 人工合成
<220>
<223> LivK 329/331-cpYFP
<400> 32

Met Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly Ala Met Ser Gly Pro Ile
1 5 10 15
Ala Gln Trp Gly Asp Met Glu Phe Asn Gly Ala Arg Gln Ala Ile Lys
20 25 30
Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly Asp Lys Leu Val Gly Val
35 40 45
Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln Ala Val Ala Val Ala Asn
50 55 60
Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val Ile Gly His Leu Cys Ser
65 70 75 80
Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr Glu Asp Glu Gly Ile Leu
85 90 95
Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu Leu Thr Gln Arg Gly Tyr
100 105 110
Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp Ser Ser Gln Gly Pro Thr
115 120 125
Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys Pro Gln Arg Ile Ala Ile
130 135 140
Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly Leu Ala Arg Ser Val Gln
145 150 155 160
Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val Val Phe Phe Asp Gly Ile
165 170 175
Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu Ile Ala Arg Leu Lys Lys
180 185 190
Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly Tyr Tyr Pro Glu Met Gly
195 200 205
Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly Leu Lys Thr Gln Phe Met
210 215 220
Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu Ser Asn Ile Ala Gly Asp
225 230 235 240
Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro Lys Arg Tyr Asp Gln Asp
245 250 255

Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu Lys Ala Asp Lys Lys Asp
260 265 270
Pro Ser Gly Pro Tyr Val Trp Ile Thr Tyr Ala Ala Val Gln Ser Leu
275 280 285
Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp Glu Pro Leu Ala Leu Val
290 295 300
Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr Val Ile Gly Pro Leu Asn
305 310 315 320
Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe Tyr Asn Ser Asp Asn Val
325 330 335
Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys
340 345 350
Ile Arg His Asn Val Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr
355 360 365
Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn
370 375 380
His Tyr Leu Ser Phe Gln Ser Val Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys
385 390 395 400
Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr
405 410 415
Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Asn Val Asp Gly Gly Ser Gly Gly Thr
420 425 430
Gly Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val
435 440 445
Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu
450 455 460
Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Leu Ile Cys
465 470 475 480
Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu
485 490 495
Gly Tyr Gly Leu Lys Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln
500 505 510
His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg
515 520 525
Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val
530 535 540
Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile
545 550 555 560
Gly Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn

565 570 575

Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala

580 585 590

Lys

<210> 33

<211> 593

<212> PRT

<213> 人工合成

<220>

<223> LivK 330/331-cpYFP

<400> 33

Met Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly Ala Met Ser Gly Pro Ile

1 5 10 15

Ala Gln Trp Gly Asp Met Glu Phe Asn Gly Ala Arg Gln Ala Ile Lys

20 25 30

Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly Asp Lys Leu Val Gly Val

35 40 45

Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln Ala Val Ala Val Ala Asn

50 55 60

Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val Ile Gly His Leu Cys Ser

65 70 75 80

Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr Glu Asp Glu Gly Ile Leu

85 90 95

Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu Leu Thr Gln Arg Gly Tyr

100 105 110

Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp Ser Ser Gln Gly Pro Thr

115 120 125

Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys Pro Gln Arg Ile Ala Ile

130 135 140

Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly Leu Ala Arg Ser Val Gln

145 150 155 160

Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val Val Phe Phe Asp Gly Ile

165 170 175

Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu Ile Ala Arg Leu Lys Lys

180 185 190

Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly Tyr Tyr Pro Glu Met Gly

195 200 205

Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly Leu Lys Thr Gln Phe Met

210 215 220

Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu Ser Asn Ile Ala Gly Asp
225 230 235 240
Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro Lys Arg Tyr Asp Gln Asp
245 250 255
Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu Lys Ala Asp Lys Lys Asp
260 265 270
Pro Ser Gly Pro Tyr Val Trp Ile Thr Tyr Ala Ala Val Gln Ser Leu
275 280 285
Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp Glu Pro Leu Ala Leu Val
290 295 300
Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr Val Ile Gly Pro Leu Asn
305 310 315 320
Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe Asp Tyr Asn Ser Asp Asn
325 330 335
Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe
340 345 350
Lys Ile Arg His Asn Val Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His
355 360 365
Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp
370 375 380
Asn His Tyr Leu Ser Phe Gln Ser Val Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu
385 390 395 400
Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile
405 410 415
Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Asn Val Asp Gly Gly Ser Gly Gly
420 425 430
Thr Gly Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
435 440 445
Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
450 455 460
Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Leu Ile
465 470 475 480
Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
485 490 495
Leu Gly Tyr Gly Leu Lys Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
500 505 510
Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
515 520 525
Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu

530 535 540

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly

545 550 555 560

Ile Gly Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr

565 570 575

Asn Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala

580 585 590

Lys

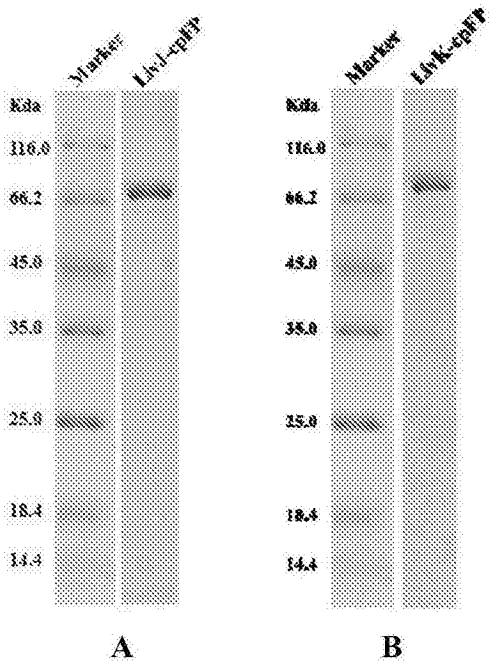

Marker
LivJ-cpYFP
KDa
116.0
66.2
45.0
35.0
25.0
18.4
14.4
A
Marker
LivK-cpYFP
KDa
116.0
66.2
45.0
35.0
25.0
18.4
14.4
B

图1

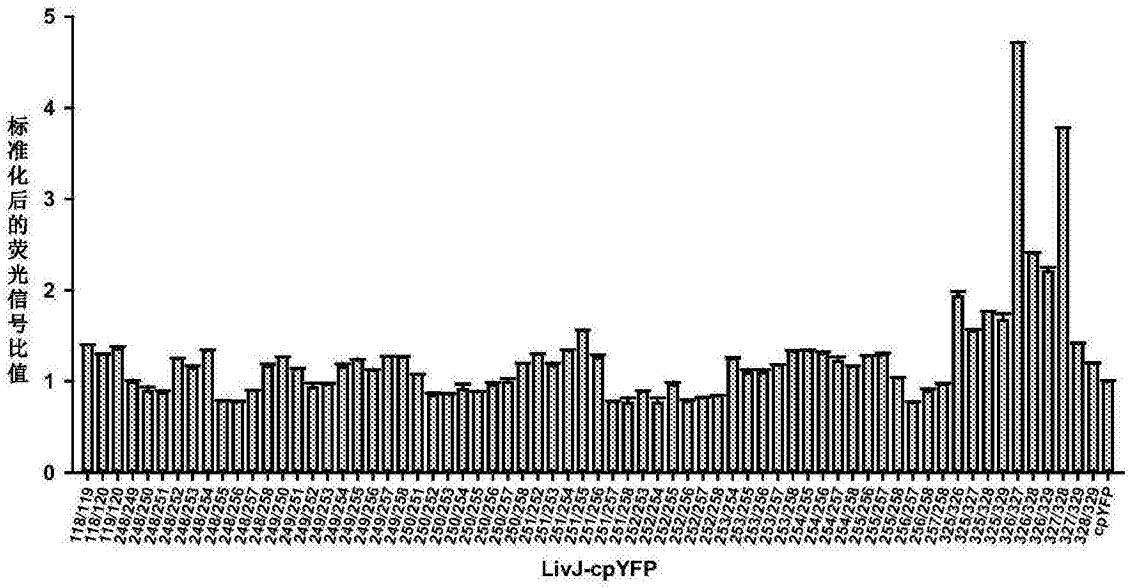
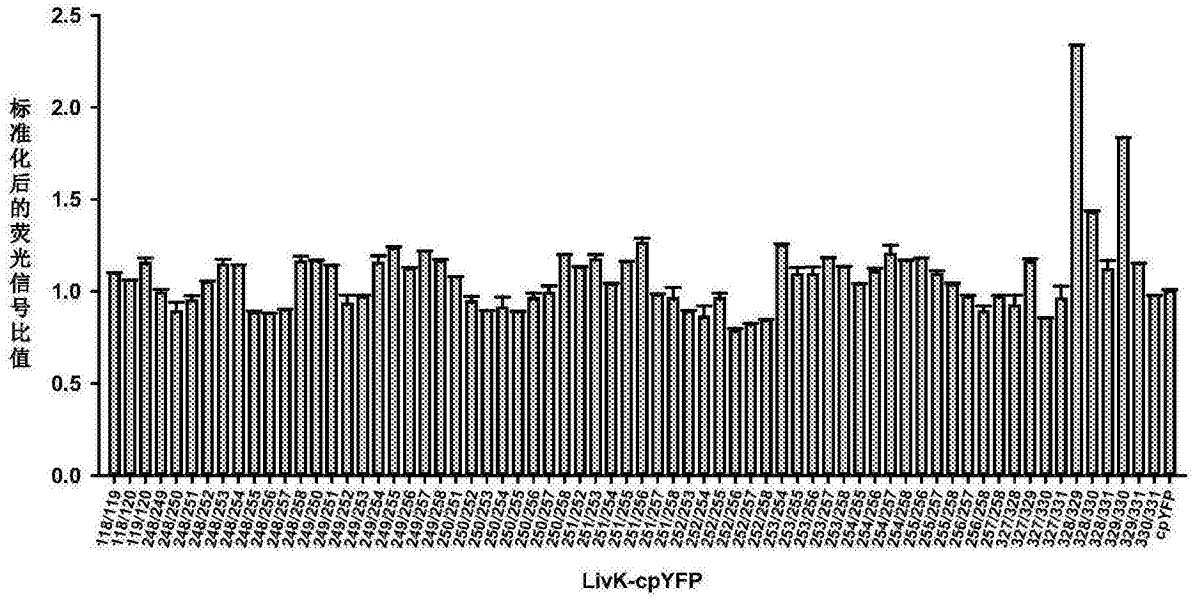
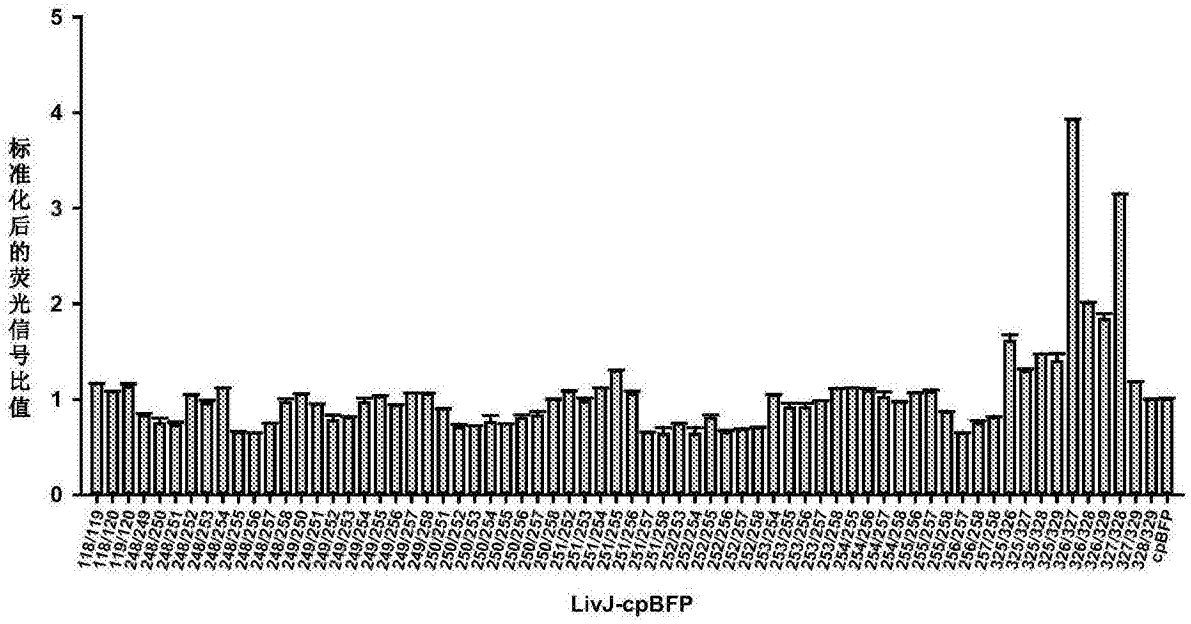

标准化后的荧光信号比值
0
1
2
3
4
5
LivJ-cpYFP
cpYFP
A

图2A

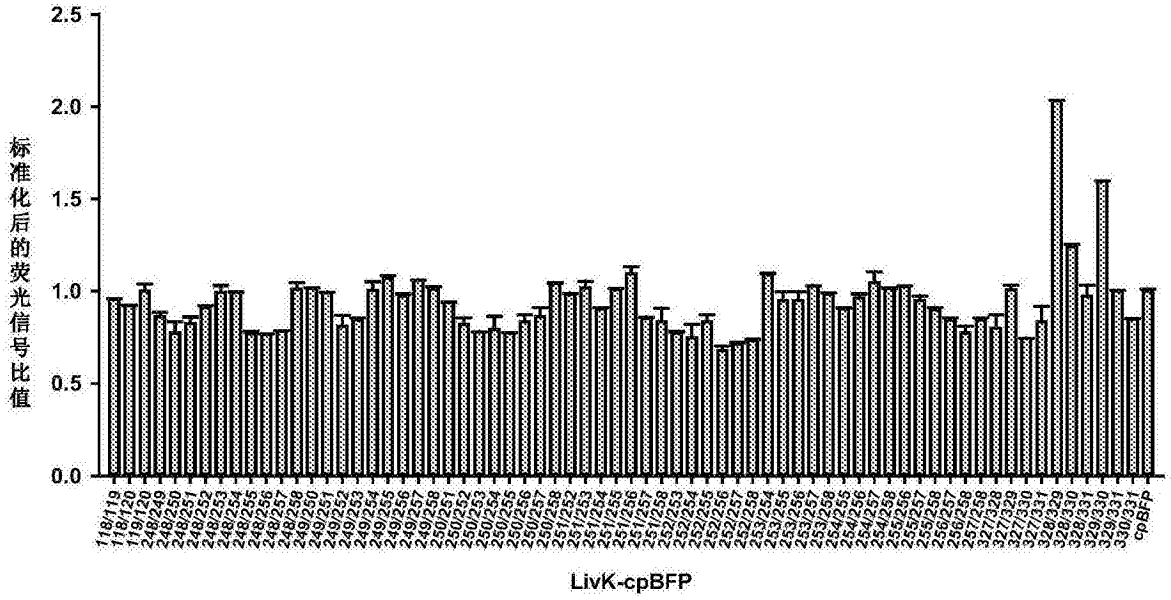

标准化后的荧光信号比值
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
118/119
118/120
119/120
248/249
248/250
248/251
248/252
248/253
248/254
248/255
248/256
248/257
248/258
249/250
249/251
249/252
249/253
249/254
249/255
249/256
249/257
249/258
250/251
250/252
250/253
250/254
250/255
250/256
250/257
250/258
251/252
251/253
251/254
251/255
251/256
251/257
251/258
252/253
252/254
252/255
252/256
252/257
252/258
253/254
253/255
253/256
253/257
253/258
254/255
254/256
254/257
254/258
255/256
255/257
255/258
256/257
256/258
257/258
327/328
327/329
327/330
327/331
328/329
328/330
328/331
329/330
329/331
330/331
cpYFP
LivK-cpYFP

B

图2B

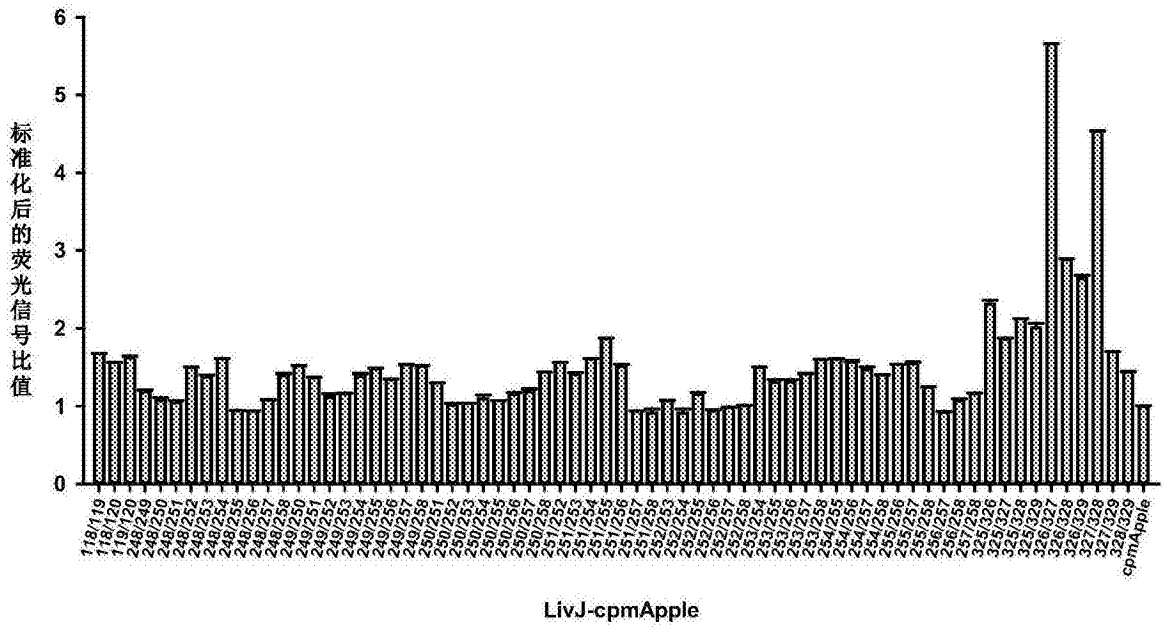


A

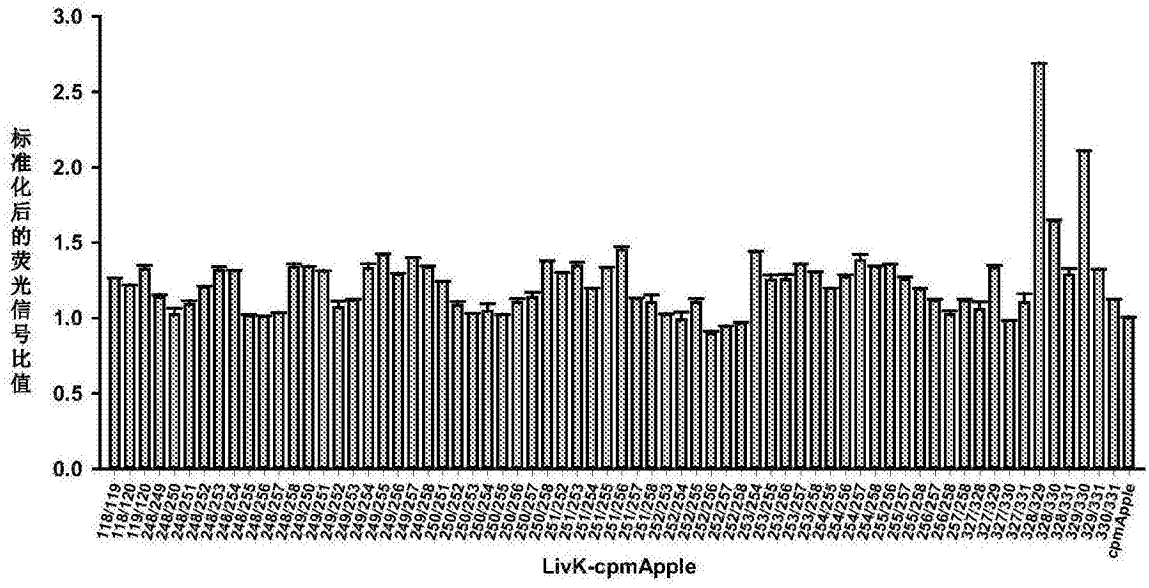


B

图3



A



B

图4

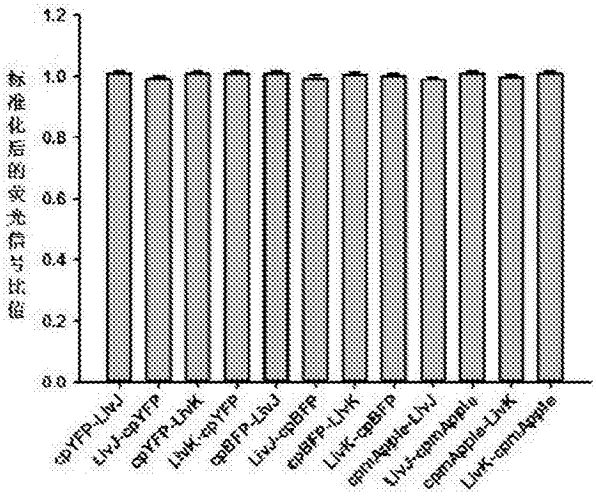
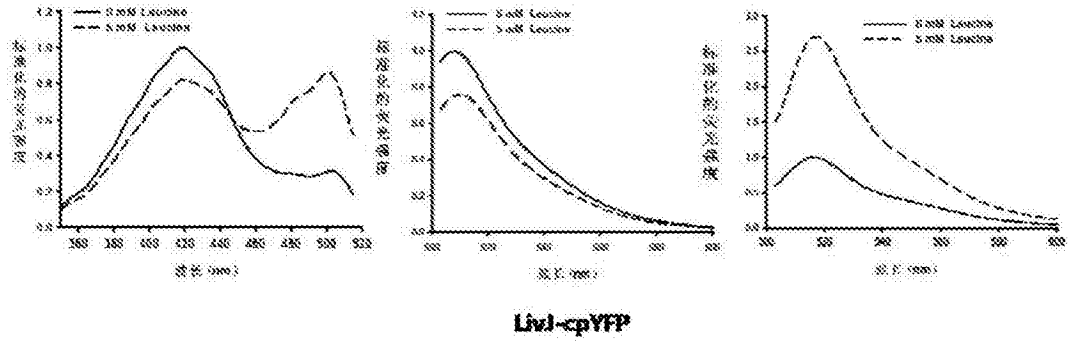
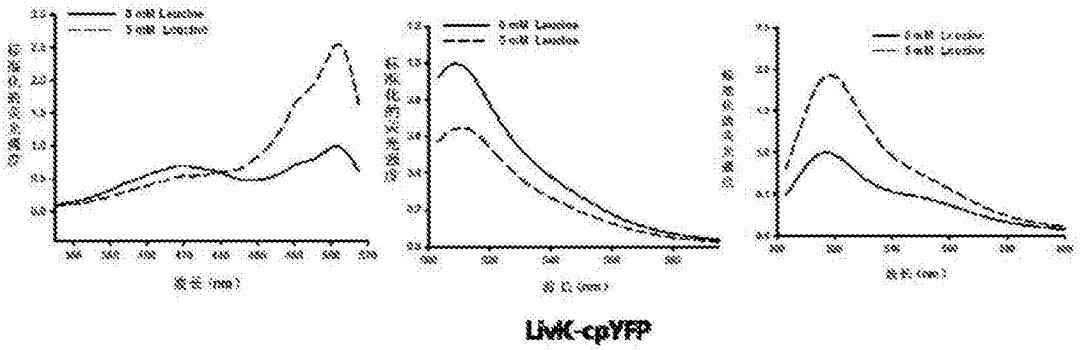

1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
cpYFP-LivJ
LivJ-cpYFP
cpYFP-LivK
LivK-cpYFP
cpBFP-LivJ
LivJ-cpBFP
cpBFP-LivK
LivK-cpBFP
cpmApple-LivJ
LivJ-cpmApple
cpmApple-LivK
LivK-cpmApple

图5


LivJ-cpYFP

A


LivK-cpYFP

B

图6

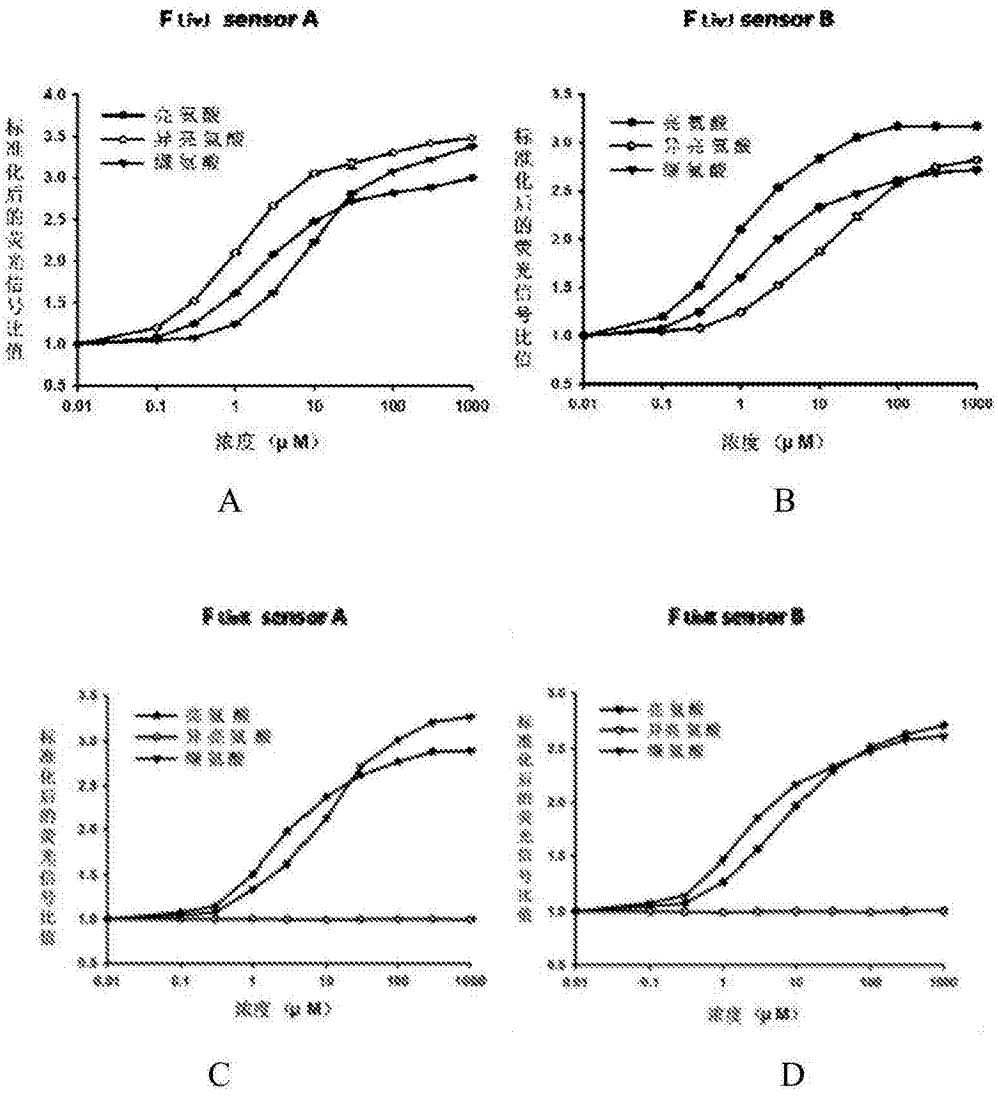


图7

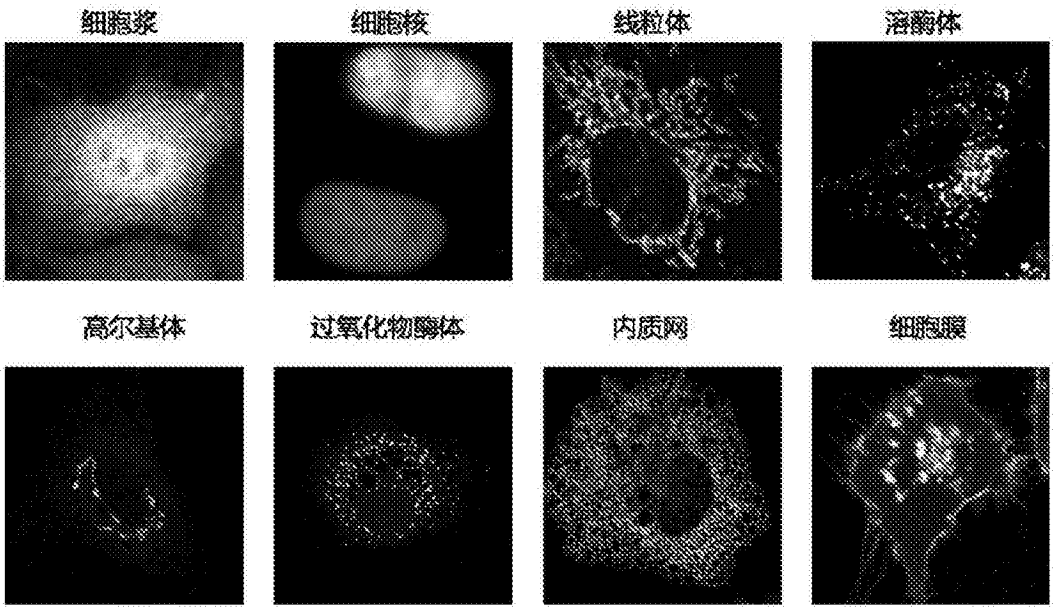

细胞浆
细胞核
线粒体
溶酶体
高尔基体
过氧化物酶体
内质网
细胞膜

图8

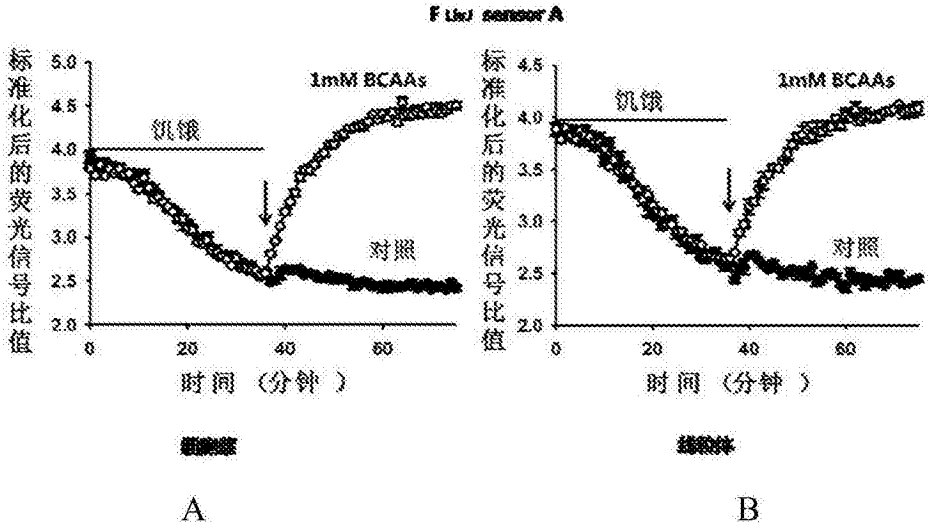

标准化后的荧光信号比值
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
0
20
40
60
时间（分钟）
饥饿
1mM BCAAs
对照
A
B

图9

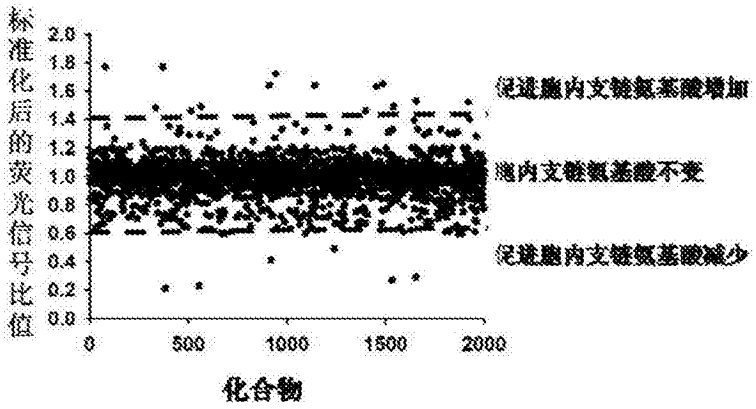

标准化后的荧光信号比值
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
500
1000
1500
2000
化合物
促进胞内支链氨基酸增加
胞内支链氨基酸不变
促进胞内支链氨基酸减少

图10

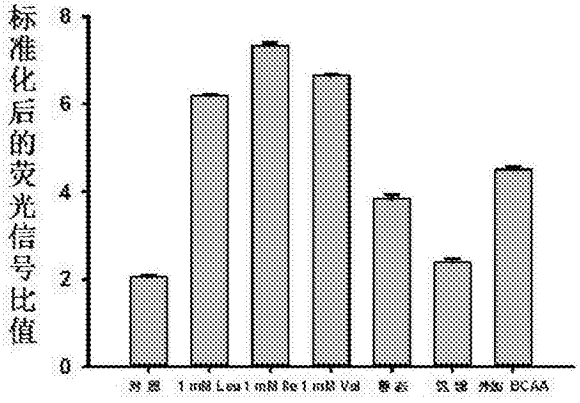

标准化后的荧光信号比值
8
6
4
2
0

图11