

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020 年 12 月 3 日 (03.12.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/238433 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 15/52 (2006.01) *C12N 15/70* (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2020/084079
- (22) 国际申请日: 2020 年 4 月 10 日 (10.04.2020)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201910440254.8 2019年5月24日 (24.05.2019) CN
- (71) 申请人: 浙江大学(ZHEJIANG UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路
866号, Zhejiang 310058 (CN)。
- (72) 发明人: 林世贤(LIN, Shixian); 中国浙江省杭州市
西湖区余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。

柳光龙(LIU, Guanglong); 中国浙江省杭州市西湖
区余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。 丁
文龙(DING, Wenlong); 中国浙江省杭州市西湖
区余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。 赵红
霞(ZHAO, Hongxia); 中国浙江省杭州市西湖区
余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。

- (74) 代理人: 杭州浙科专利事务所(普通
合伙)(HANGZHOU ZHEKE PATENT AGENCY
(GENERAL PARTNERSHIP)); 中国浙江省杭州
市拱墅区万达商业中心4幢3单元1019室
沈渊琪, Zhejiang 310015 (CN)。
- (81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS,

(54) Title: CONSTRUCTION OF ORTHOGONAL AMINOACYL-TRNA SYNTHETASE/TRNA SYSTEM BY USING CHIMERIC DESIGN METHOD

(54) 发明名称: 一种利用嵌合设计方法构建正交的氨酰-tRNA合成酶/tRNA体系

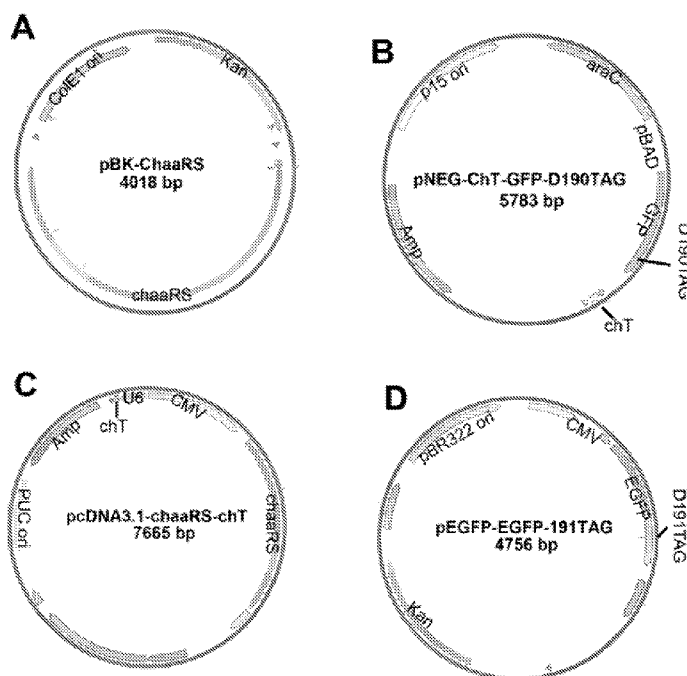


图 1

(57) Abstract: Provided is construction of an orthogonal aminoacyl-tRNA synthetase/tRNA system by using a chimeric design method. The system transplants the universal orthogonality of eukaryotes and prokaryotes of a pyrrolysyl-tRNA synthetase/tRNA system by means of rational chimeric design, includes several chimeric tRNA synthetase/tRNA systems, such as histidine, phenylalanine, alanine and serine systems, and can be applied to prokaryotes and eukaryotes, as well as orthogonal transformation of other aminoacyl-tRNA synthetase/tRNA pairs.



WO 2020/238433 A1



JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:

— 发明人资格 (细则4.17(iv))

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分 (细则5.2(a))。

(57) 摘要: 提供了一种利用嵌合设计方法构建的正交的氨酰-tRNA合成酶/tRNA体系。该体系通过合理的嵌合设计移植了吡咯赖氨酰-tRNA合成酶/tRNA系统的真核生物和原核生物普适正交性, 包括几个嵌合的tRNA合成酶/tRNA体系, 例如组氨酸、苯丙氨酸、丙氨酸和丝氨酸系统, 可应用到原核生物和真核生物中, 以及应用到其他氨酰-tRNA合成酶/tRNA对的正交性改造中。

一种利用嵌合设计方法构建正交的氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 体系

技术领域

本发明属于化学生物学技术领域，具体涉及一种利用嵌合设计方法构建正交的氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 体系。

背景技术

蛋白质是生物体内行使功能的主要物质，由 61 种密码子编码的 20 种氨基酸在核糖体中合成。20 种氨基酸虽然赋予了蛋白质参与各种生理生化活动的特性，但是 20 种氨基酸中只有巯基、羟基等很少的活性基团可以进行化学操控。为了更好的研究蛋白质的生理功能，可以引入其他带有活性基团的非天然氨基酸的遗传密码扩展技术应运而生。遗传密码扩展技术利用正交化的氨酰 tRNA 合成酶/tRNA 系统识别不同功能的非天然氨基酸解码未分配的密码子（终止密码子，4 联密码子等）从而实现非天然氨基酸的定点插入。到现在为止这个系统已经实现了超过 150 种带有不同活性基团的非天然氨基酸的插入，行使不同的功能，如生物示踪和成像，体内蛋白质功能的调控，研究翻译后修饰，蛋白质组学分析以及生物治疗。

在遗传密码子扩增技术中，核心是需要正交化的氨酰 tRNA 合成酶/tRNA，不与细胞内内源的氨酰 tRNA 合成酶和 tRNA 相互识别，不影响细胞内正常生理活动下实现特异性非天然氨基酸的插入。现在为止常用的氨酰 tRNA 和 tRNA 的正交对主要有 4 种，但是只有来源于甲烷古菌 *Methanosarcina mazei* 或 *Methanosarcina barkeri* 的 pyrrolysyl-tRNA 合成酶(PyIRS)/tRNA_{CUA} 正交对可以普适的应用在细菌、真核细胞和个体中。

Pyrrolysyl—tRNA 合成酶(PyIRS)/tRNA_{CUA} 正交系统虽然已经将约 100 种非

天然氨基酸成功的引入到了细菌和真核细胞中，但是它存在着以下几个问题：1，对某些非天然氨基酸的活性很低，从而导致实验成本高，信噪比低；2，这些引入的非天然氨基酸是赖氨酸和苯丙氨酸的衍生物，对于带有其它化学结构的氨基酸引入较为困难。我们虽然可以利用自然存在的其它 20 种氨酰 tRNA 合成酶，通过进化引入新颖的非天然氨基酸。但是这种方式也存在着诸多问题：1，对其它氨酰 tRNA 合成酶/tRNA 系统需要对氨酰 tRNA 合成酶的 anticodon-binding 结构域定向进化，使其可以识别未分配的密码子（终止密码子，稀有密码子以及 4 联密码子）；2，这种系统不具备普适的正交性，来源与细菌的可以用在真核细胞，来源于真核生物的可以利用在细菌中，这就给我们应用增加了诸多限制。

为了克服上述问题，研究者想出了不同的应对方法。为了提高 Pyrrolysyl—tRNA 合成酶 (PylRS)/tRNA_{CUA} 正交系统的活性，Diter Soll 和 David R Liu 构建了 Mm 和 Mb 两个物种嵌合体的 Pyrrolysyl-tRNA 合成酶，并通过 PACE（噬菌体辅助的连续进化）的方法对这个嵌合蛋白进行了改造，提高活性。还有一些研究者从 tRNA 的角度出发，分别对反密码子环、反密码子臂、T 环进行了相应的诱变提高了这个系统的插入非天然氨基酸的效率。对于其它氨酰 tRNA 合成酶/tRNA 系统不普适正交的问题，研究者通过改造大肠杆菌，将大肠杆菌基因组中的 TrpRS/tRNA 替换为酵母中的 TrpRS/tRNA，这样就可以使大肠杆菌 TrpRS/tRNA 系统在改造的这个大肠杆菌菌株和真核生物中正交，方便非天然氨基酸的筛选。以上的解决办法虽然在一定程度上克服了遗传密码子扩展领域存在的问题，但是并没有从根本上解决天然氨基酸氨酰 tRNA 合成酶存在的不广泛正交的问题。

发明内容

针对现有技术存在的问题，本发明的目的在于提出一种利用嵌合设计方法构建正交的氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 体系的技术方案，不限于构建的嵌合组氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 对 (chHisRS/chHisT)、嵌合苯丙氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 对

(chHmPheRS/chHmPheT)、嵌合丝氨酸-tRNA 合成酶/tRNA 对(chSerRS/chSerT)、嵌合丙氨酸-tRNA 合成酶/tRNA 对(chAlaRS/chAlaT)四种系统,所述嵌合组氨酸-tRNA 合成酶的基因序列如 SEQ ID No. 3 所示,所述嵌合苯丙氨酸-tRNA 合成酶的基因序列如 SEQ ID No. 4 所示,所述嵌合丝氨酸-tRNA 合成酶的基因序列如 SEQ ID No. 5 所示,所述嵌合丙氨酸-tRNA 合成酶的基因序列如 SEQ ID No. 6 所示。更为具体的我们不以一个特定的嵌合系统示例,但是所有的嵌合系统的构建都是遵照以下方法。同时在本发明中大肠杆菌表达系统利用 pNEG 和 pBK 载体,动物细胞表达系统利用 pcDNA3.1 载体为示例,但并不限于这三种载体。这三种载体的图谱见图 1。

在所述的一种利用嵌合设计方法构建正交的氨酰 tRNA 合成酶/tRNA/体系,我们提供了具体的方法构建和优化嵌合系统,步骤如下:

S1: 嵌合氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 载体的构建;

S2: 在大肠杆菌中利用 GFP 琥珀抑制效率评价嵌合氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 的活性;

S3: 氨基酸插入的确认,包括 GFP 表达,LC-MS 和 LC-MS/MS 的的鉴定;

S4: 嵌合系统在哺乳动物细胞表达体系琥珀抑制效率测试;

S5: 对效率偏低的嵌合系统,选择嵌合 tRNA 的受体臂,构建突变文库进行筛选。

所述嵌合氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 载体的构建通过以下步骤:

S6: 嵌合 tRNA 载体构建;

S7: 嵌合氨酰-tRNA 合成酶载体构建。

所述嵌合 tRNA 载体构建通过以下步骤:

S8: 嵌合 tRNA 的设计合成;

S9: 报告基因 GFP190TAG-His6 的合成,序列如 SEQ ID No. 1 所示;

S10: 将嵌合 tRNA 和 GFP190TAG-His6 连接到 pNEG 载体, 分别在 glns 和 pBAD 启动子控制下。

所述嵌合氨酰-tRNA 合成酶的构建通过以下步骤:

S11: 嵌合氨酰-tRNA 合成酶中来自吡咯赖氨酰-tRNA 合成酶 tRNA 结合结构域的选择, 氨酰-tRNA 合成酶催化结构域的选择; 分别连接到 pBK 载体。本发明中利用的吡咯赖氨酰-tRNA 合成酶 tRNA 结合结构域的完整序列如 SEQ ID No. 2 所示;

S12: 合成不同的长度和类型的连接肽并装载到嵌合氨酰-tRNA 合成酶中两个部分之间。连接肽种类: GS-rich、helix、P-rich, 序列见表 3-1 所示。

S13: 合成 glns 启动子、pBAD 启动子、oxb20 启动子、trp 启动子插入 pBK 载体上控制嵌合氨酰 tRNA 合成酶的表达, 序列见表 4-1 所示。

同时我们提供一个在大肠杆菌中利用 GFP 琥珀抑制效率评价嵌合氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 的活性的方法, 具体如下:

S14: 携带 GFP190TAG-His6 基因和嵌合 tRNA 的 pNEG 载体和携带的嵌合氨酰-tRNA 合成酶的 pBK 载体共转化转入 DH10B 感受态细胞;

S15: 挑单克隆到液体培养基中, 阿拉伯糖诱导基因表达;

S17: 裂解表达后的细胞;

S18: 测定裂解后细胞上清液 GFP 的荧光, 并计算嵌合系统 GFP 琥珀抑制效率 (图 4)。

对于构建的嵌合氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 体系, 我们还提供了一个鉴定氨基酸正确插入的方法, 具体如下:

S19: S14 中的大肠杆菌大量培养, 阿拉伯糖诱导蛋白质表达;

S20: 收集表达后的大肠杆菌, 超声破碎, 亲和层析纯化;

S21: 纯化蛋白质的 Western-blotting, LC-MS 和 LC-MS/MS 的鉴定。

在大肠杆菌中正交可用的嵌合系统，转入到哺乳动物细胞内效率的分析以及正交性的确认，具体如下：

S22：嵌合氨酰 tRNA 合成酶基因和嵌合 tRNA 基因转入 pcDNA3.1 载体中；

S23：S22 的质粒与 pEGFP-EGFP-191TAG-Histag 共转染 HEK 293T 细胞；

S24：GFP 荧光和 Western-blotting 衡量嵌合系统在哺乳动物细胞中的效率。

对于初始构建中活性和正交性低的嵌合系统，我们提供了一个基于嵌合 tRNA 受体臂区域文库筛选体系，具体如下：

S25：构建嵌合 tRNA 文库，并克隆到 pNEG 载体中；

S26：制备含有嵌合氨酰-tRNA 合成酶质粒的 DH10B 感受态细胞；

S27：将文库电转化到制备好的感受态细胞中，并涂布含有阿拉伯糖的平板；

S28：筛选有荧光的克隆；

S29：嵌合 tRNA 正交性的确认；

S30：嵌合 tRNA 测序。

嵌合系统遗传了吡咯赖氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 系统的灵活性，不仅可以利用密码子 UAG 还可以利用 UAA 和 UGA 密码子实现氨基酸的高效的位点特异性引入，具体如下：

S31：UAA 系统和 UGA 系统载体的构建；

S32：三种系统引入氨基酸的效率比较。

本发明的体系通过合理的嵌合设计移植了吡咯赖氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 系统的真核生物和原核生物普适正交性，包括几个嵌合的 tRNA 合成酶/tRNA 体系，包括但不限于组氨酸、苯丙氨酸、丙氨酸和丝氨酸系统，所述体系不仅具有高效性，而且具有吡咯赖氨酰-tRNA 合成酶/tRNA^{Pyl} 系统的灵活性，可应用到原核生物和真核生物中。所述方法毫无疑问的可以应用到其他氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 对的正交性改造。

附图说明

如图 1 为本发明中用到质粒图谱，图中 A：pBK 质粒图谱，B：pNEG 质粒图谱，C：pcDNA3.1 质粒图谱，D：pEGFP-EGFP-191TAG-Histag 质粒图谱。

如图 2 为嵌合设计方法构建正交的氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 体系原理图，图中 A：吡咯赖氨酰-tRNA 合成酶/tRNA^{Py1} 正交对的结构（左侧）和传统的氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 对结构（右侧），吡咯赖氨酰-tRNA 合成酶的 tRNA 结合结构域与传统的氨酰-tRNA 合成酶的催化结构域融合形成的嵌合氨酰 tRNA 合成酶(chRS)，嵌合的 tRNA(chT)通过将 py1T 受体臂替换为特定的 tRNA 受体臂产生(中间)；B：本研究中氨基酸结构。

如图 3 为嵌合组氨酸 tRNA 的构建及效率测定图，图中 A：具有 G-1 结构的组氨酸 tRNA 和吡咯赖氨酸 tRNA 的三叶草结构；B：chHisT 的嵌合体的三叶草结构由 py1 T 的序列和 his T 的序列组成；C：chHisRS-1 的嵌合体结构由 py1RS NTD(1-149aa)和 hisRS CD(1-326aa)融合组成；D：GFP 荧光强度法检测琥珀抑制效率。

如图 4 为嵌合组氨酰-tRNA 合成酶的构建及相应效率和特异性的测定，A：chHisRS 嵌合体由 py1RS 序列和 hisRS 序列组成，py1RS NTD 突变携带 IPYE 突变；B：用 GFP 报告法分析 chHisRSs 的琥珀抑制效率；C：在 22℃和 30℃下，用 GFP 荧光分析在 2mM Boc-L-赖氨酸的条件下 py1RSs 的琥珀抑制效率，值得一提的是，在 30℃时 py1RS 的活性比在 22℃时高，而在 22℃或 30℃时 chHisRS 的活性相似；D：质谱法确认通过嵌合组氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 在 GFP 的特定位点引入了组氨酸；E：通过 GFP 信号和非变性聚丙烯酰胺凝胶分析不同启动子条件下的 chHisRS 的琥珀抑制效率；F：将组氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 复合物通过 tRNA 为重叠对象与吡咯赖氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 复合体结构叠加。

如图 5 为嵌合组氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 系统在细胞中活性和正交性的测试

图, 图中 A: 通过 western 检测全长 GFP 的表达水平, 测定哺乳动物细胞中琥珀的抑制效率。在本实验中, 两种质粒共转染 HEK 293T 细胞: 一种质粒携带嵌合氨酰 tRNA 合成酶和嵌合 tRNA 基因, 其中 tRNA 分为有末端 CCA 序列和没有, 另一种质粒携带 GFP-190TAG-His₆ 基因。然后通过抗 His₆ 抗体进行 western 分析(A) 或通过荧光显微镜 (B) 对转染的细胞进行分析。未携带嵌合 aaRS 基因的质粒作为阴性对照。C: 用 GFP 报告法分析 chHisRS 在不同 tRNA 条件下琥珀抑制活性。

如图 6 利用嵌合设计构建的其它嵌合系统图, 图中 A: 用 GFP 为报告基因分析产生的嵌合氨酰-tRNA 合成酶对相应嵌合 tRNAs 的琥珀抑制活性。在这个图中, EC 代表大肠杆菌, H 代表人类, H-MT 代表人类线粒体; B: 用 GFP 报告基因分析 chPheRSs 的琥珀抑制活性; C: 质谱法确认通过嵌合苯丙氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 在 GFP 的特定位点引入了苯丙氨酸; D: 用 GFP 报告基因分析 chAlaRSs 的琥珀抑制活性 E: 质谱法确认通过嵌合丙氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 在 GFP 的特定位点引入了丙氨酸。

如图 7 为嵌合丝氨酰 tRNA 的分子进化图, 图中 A: 嵌合体 tRNA 受体臂进化的一般两步法是 tRNA 随机化和 tRNA 选择的结合; B: GFP 报告法分析在 chSerRS 条件下 chSerTs 的琥珀抑制效率 C: 质谱分析丝氨酸的 GFP 保真度。

如图 8 为本发明中 tRNA 的三叶草结构, 图中 A: 本发明中 pylT 和 hisT 的结构, pylT 有 U25C 突变, 提高吡咯烷的效率, hisT 具有 G⁻¹ 的结构; B: Histidyl-tRNA -1 到 -6 的嵌合结构, 包括 pylT 和 hisT; C: Histidyl-tRNA 嵌合结构在 E. coli 和人类中 CUA 反密码子; D: 本发明中其他的 tRNAs 的嵌合结构, chPheT, chAlaT, chAlaT (G-U) 有一个不常用的 G-U 对突变成 AU 对; E: 嵌合丝氨酸 tRNA 从原始的 -1 到筛选后的 -2, -3, 具有高琥珀抑制效率的 ChSerT-2 被命名为 chSerT。

如图 9 为嵌合组氨酸系统, 图中 A: 考马斯亮蓝染色分析纯化的插入组氨酸

的 GFP 蛋白；B：质谱分析确认 GFP 中组氨酸的插入；C：LC-MS/MS 分析确认 GFP 中组氨酸的插入；D：非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 GFP 蛋白组氨酸的插入；E：嵌合组氨酰-tRNA/tRNA 系统在 22°C 或 30°C 条件不同组氨酸浓度的琥珀抑制效率。

如图 10 为嵌合组氨酰-tRNA 合成酶的结构。蛋白复合物通过 tRNA 重叠进行拟合。

如图 11 为嵌合组氨酸 tRNA 合成酶的优化，图中 A：不同长度连接肽的 chHisRS 的概览图；B：GFP 报告法和 native 凝胶荧光分析不同长度的 chHisRS 琥珀抑制活性；C：GFP 报告法分析携带不同类型连接肽的 chHisRS 琥珀抑制活性，在图中，GS 丰富表示含有 Gly 和 Ser 丰富的连接肽，Pro 丰富表示连接肽含有丰富的 Pro，螺旋表示连接肽是螺旋结构。

如图 12 为嵌合组氨酸体系的无义密码抑制效率，分析携带三个终止密码子（ochre, opal 和 amber codon）的 GFP 基因的抑制效率。

如图 13 为嵌合组氨酸系统在哺乳动物细胞中正交性的测试，图中 A&B、在图 5 中显示了完整的 Western 印迹凝胶，主要文本中的区域被虚线框突出，D：GFP 法分析 chHisRS 对内源性 hisTs 琥珀抑制活性。

如图 14 为嵌合苯丙氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 系统，图中 A：GFP 法分析 chPheRSs 的琥珀抑制活性；B：Figure 5B 中完整的 Western 印迹凝胶，Figure 5B 中被虚线框突出；C：考马斯亮蓝染色分析纯化的 GFP 蛋白；D：质谱的原始数据，确认通过嵌合苯丙氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 在 GFP 的特定位点引入了苯丙氨酸；E：在 22°C 或 30°C 下苯丙氨酸嵌合体系的琥珀抑制效率。

如图 15 为嵌合丙氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 系统，图中 A：丙氨酸-tRNA 合成酶（chAlaRS）的结构含有 pylRS 序列和 alaRS 序列，pylRS 的 tRNA 结合结构域携带 IPYE 突变；B：GFP 法分析 chAlaRSs 与 chAlaT(G-U)的琥珀抑制活性；C：GFP 法分析 chAlaRSs 与 chAlaT(A-U)的琥珀抑制活性。D：在 Figure 5D 中显示

了完整的 Western 印迹凝胶，主要文本中的区域被虚线框突出；E：考马斯亮蓝染色分析纯化的 GFP 蛋白；F：G 质谱法确认通过嵌合丙氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 在 GFP 的特定位点引入了丙氨酸的原始数据。

具体实施方式

以下结合具体实施案例对本发明做进一步详细说明，以下实施案例是对本发明的解释，本发明并不局限于以下实施案例。

下面以嵌合组氨酸 tRNA 合成酶/tRNA 系统和嵌合丝氨酸 tRNA 的分子进化为例对本发明进一步说明。

实施例 1：嵌合组氨酸 tRNA 的构建

在本发明中嵌合 tRNA 和报告基因 GFP190TAG-His6 是构建在同一个质粒上，分别在 1pp 启动子和 pBAD 启动子控制。具体的构建方法如下：

(1) 将 GFP190TAG-His6 构建到 pNEG 载体上

GFP190TAG-His6 的序列如 SEQ ID No. 1 所示，设计引物 pNEG-gfp-F 和 pNEG-gfp-R 利用现有的含有这个基因的质粒为模板扩增，同时设计合成 pNEG-gfp-v-F 和 pNEG-gfp-v-R，以之前 pNEG 为模板扩增载体。琼脂糖凝胶回收后利用 Gibson 组装，转化 DH10B 感受态细胞，挑选单克隆测序得到质粒 pNEG-GFP190TAG-His6；

(2) 设计嵌合组氨酸 tRNA 并克隆到 pNEG-GFP190TAG-His6 载体

嵌合组氨酸 tRNA 需要将组氨酸 tRNA 的受体臂区移植到吡咯赖氨酸 tRNA 上，为了获得最优的嵌合组氨酸 tRNA，我们设计了移植组氨酸 tRNA 受体臂区不同区域的嵌合组氨酸 tRNA，分别命名为 chHisT-1, 2, 3, 4, 5 和 6，模型图和详细序列见图 3 和 8。设计相应的引物扩增克隆到前一步构建 pNEG-GFP190TAG-His6 载体上。相应的引物见表 1-1。

表 1-1. 构建嵌合 tRNA 所需引物

Name	Sequence
GFP190TAG-F	TTTAAGAAGGAGATATACATATGGGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTC
GFP190TAG-R	CCGCAAGGAATGGTGCATGCTCAATGGTGATGGTGATGATGGGGCCCC
ChHisT-1-F	ATCCGTTTCAGCCGGGTAGATTCCCGGGGTTTCCCCCACTGCAGATCCTTAGCGAAAGC
ChHisT-1-R	TTAGAGTCCATTTCGATCTACATGATCAGGTTTCCCGAATTCAGCGTTACAAGTATTACAC
ChHisT-2-F	ATCCGTTTCAGCCGGGTAGATTCCCGGGGTTTACCCCACTGCAGATCCTTAGCGAAAGC
ChHisT-2-R	TTAGAGTCCATTTCGATCTACATGATCAGGTTTACCGAATTCAGCGTTACAAGTATTACAC
ChHisT-3-F	ATCCGTTTCAGCCGGGTAGATTCCCGGGGTCCACCCCACTGCAGATCCTTAGCGAAAGC
ChHisT-3-R	TTAGAGTCCATTTCGATCTACATGATCAGGTCCACCGAATTCAGCGTTACAAGTATTACAC
ChHisT-4-F	TTAGAGTCCGTTTCGATCTACATGATCATAGCCACCGAATTCAGCGTTACAAGTATTACAC
ChHisT-4-R	ATCCGTTTCAGCCGGGTAGATTCCCGGTAGCCACCCCACTGCAGATCCTTAGCGAAAGC
ChHisT-5-F	GAATTCAGCGTTACAAGTATTACACA
ChHisT-5-R	GTGGCTATGATCATGTAGATCGAACGG
ChHisT-6-F	AAGAGTCCGTTTCGATCTACATG
ChHisT-6-R	AATCCGTTTCAGCCGGGTAGATTTC

实施例 2：嵌合组氨酰-tRNA 合成酶的构建

嵌合组氨酰-tRNA 合成酶由两部分构成，一部分是吡咯赖氨酰-tRNA 合成酶 tRNA 结合结构域，另一部分是组氨酰-tRNA 合成酶的催化结构域，设计见图 2 和 3C。

嵌合组氨酰-tRNA 合成酶的构建就包括吡咯赖氨酰-tRNA 合成酶 tRNA 结合结构域的选择，组氨酰-tRNA 合成酶催化结构域的选择，以及二者融合方式的选择。

(1) 吡咯赖氨酰-tRNA 合成酶 tRNA 结合结构域的分析以及选择

本发明中需要先克隆吡咯赖氨酰-tRNA 合成酶 tRNA 结合结构域到 pBK 载体上，这个 tRNA 结合结构域又可分为两个亚结构域，N 端 1-149 识别对应 tRNA 的可变区和 T 环，185-240 这段识别对应 tRNA 的 D-stem 区，而且文献报道

V31I, T56P, H62Y, A100E（简称 IPYE）的突变可以提高系统的活性。因此我们选择四种 tRNA 结合结构域部分，分别是 N149、N149+185-240 (N240)、N149-IPYE、N149+185-240-IPYE，设计引物构建到 pBK 载体上(图 4A)。

(2) 组氨酰-tRNA 合成酶催化结构域的选择

接着本发明对组氨酰-tRNA 合成酶的结构进行分析（图 3F、4A 和 10），选择 N 端 326 个氨基酸（1-326）作为嵌合设计的催化结构域部分。

(3) 不同融合方式嵌合组氨酰-tRNA 合成酶的构建

设计引物扩增组氨酰-tRNA 合成酶 1-326，连接到吡咯赖氨酰-tRNA 合成酶 tRNA 结合结构域的 N 端或 C 端，从而构建 chHis-1、2、3、4 和 5，并克隆到 pBK 载体上。相应的引物见表 2-1.

表 2-1. 构建嵌合组氨酰-tRNA 合成酶引物列表

Name	Sequence
Pyl-N149-F	TACGCTTTGAGGAATCCCATATGGATAAGAAGCCGCTGGATG
Pyl-N149-R	GTCAGAGCTGGGGCGCTTGCAGAGGTCGGAACCGGAGAGTTC
Pyl-N205-R	GCCGCCGCTTCCGCCACCCTCGCGTTCCTCAGC
ChHisRS-1-F	GTGGCGGAAGCGGCGGCATGGCAAAAAACATTCAAGC
ChHisRS-1-R	TAGCGTTTGAAACTGCAGTTACGGATTAACGGCCTGTACTAACAATACAAGACGTTC
ChHisRS-3-F	CGCTTTGAGGAATCCCATATGGCAAAAAACATTCAAGCC
ChHisRS-3-R	TTCCGCCGCCGCTTCCGCCACCTATATCGACAACAGGATCGGCT

实施例 3：嵌合组氨酰-tRNA 合成酶连接肽的优化

在嵌合蛋白质的构建中，两个嵌合片段之间的连接肽对嵌合分子的活性至关重要，在本发明中我们对连接肽的长度和连接肽的种类进行了测试（图 11）。

(1) 连接肽长度的优化

设计柔性连接肽的长度（GS-type）0，6，12，18 和 24 个氨基酸，分别命

名为 chHisRS4-2、-3、-4、-5 和-6，相应连接肽的核苷酸序列见表 3-1 所示。同时在 0 个氨基酸连接肽基础上缺失组氨酸-tRNA 合成酶的 N 端 15 个氨基酸，命名为 chHisRS4-1. 设计引物通过 Q5 位点定向突变试剂盒(NEB)构建到载体上，相应的引物见表 3-2。

(2) 不同连接肽种类嵌合组氨酰-tRNA 合成酶的构建

除了柔性连接肽 (GS-type) 以外，在本发明中还选择了脯氨酸丰富的连接肽 (APAPAPAPAPAPAPAPAPAP) 和 α 螺旋类型连接肽 (AEAAAAAACA)，相应的核苷酸序列见表 3-1。设计引物通过 Q5 位点定向突变试剂盒 (NEB) 构建到载体上，相应的引物见表 3-2。

表 3-1. 不同连接肽的核苷酸序列

Name	Sequence
6aa-GS-linker	GGTGGCGGAAGCGGCGGC
12aa-GS-linker	GGTGGCGGAAGCGGCGGCGGCGGTGGGTCTGGTGGC
18aa-GS-linker	GGTGGCGGAAGCGGCGGCGGCGGTGGGTCTGGTGGCGGTGGCGGAAGCGGCGGT
24aa-GS-linker	GGTGGCGGAAGCGGCGGCGGCGGTGGGTCTGGTGGCGGTGGCGGAAGCGGCGGTGGCGGTGGC AGCGGGGT
P-rich-linker	GCCCCGCGCCAGCGCCGGCCCTGCTCCAGCGCCTGCCCCGGCACCCGCCCCC
α -helix-linker	GCCGAAGCGGCTGCAAAAGAGGCCGCTGCAAGGAAGCTGCAGCGAAGGCT

表 3-2. 连接肽构建所用引物

Name	Sequence
12aa-GS-linker-F	TCTGGTGGCATGGCAAAAAACATTCAAGCC
18aa-GS-linker-F	TCTGGTGGCGGTGGCGGAAGCGGCGGTATGGCAAAAAACATTCAAGCC
24aa-GS-linker-R	ACCGCCACCAGACCCACCGCCGCCGCTTCCGCCACCCTCGCGTTCCTCAG
24aa-GS-linker-F	GGCGGAAGCGGCGGTGGCGGTGGCAGCGGGGTATGGCAAAAAACATTCAAGCC
P-rich-linker-R	GAGCAGGGGCCGGCGCTGGCGCGGGGGCCTCGCGTTCCTCAGCGTAGAT
P-rich-linker-F	CAGCGCCTGCCCCGGCACCCGCCCCCATGGCAAAAAACATTCAAGCCA
α -helix-linker-F	GCTGCAAGGAAGCTGCAGCGAAGGCTATGGCAAAAAACATTCAAGCCA
α -helix-linker-R	GGCCTCTTTGCAGCCGCTTCGGCCTCGCGTTCCTCAGCGTAGA

实施例 4：控制嵌合组氨酰-tRNA 合成酶启动子的优化

在大肠杆菌表达体系中，启动子对酶活性有很大的影响。为了获得最优氨基酸插入效率，选择 *glns* 启动子、*pBAD* 启动子、*oxb20* 启动子、*trp* 启动子启动子，启动子的核苷酸序列见表 4-1. 设计引物利用 Gibson 组装插入到 pBK 载体中，从而控制嵌合组氨酰-tRNA 合成酶的表达。相应的引物见表 4-2.

表 4-1. 不同启动子的核苷酸序列

Name	Sequence
pBAD	AAACCAATTGTCCATATTGCATCAGACATTGCCGTCACTGCGTCTTTACTGGCTCTTCTCGCTAA CCAAACCGGTAACCCCGCTTATTAAGCATTCTGTAACAAAGCGGGACCAAAGCCATGACAAA AACGCGTAACAAAAGTGTCTATAATCACGGCAGAAAAGTCCACATTGATTATTTGCACGGCGTC ACACTTTGCTATGCCATAGCATTTTATCCATAAGATTAGCGGATCCTACCTGACGCTTTTTATCGC AACTCTCTACTG
Trp	TTGACAATTAATCATCGAACTAGTTTAAT
Oxb20	GGTGGCGGAAGCGGCGGCGGCGGTGGGTCTGGTGGCGGTGGCGGAAGCGGCGGT
Glns	GATCATA

表 4-2. 构建启动子所需引物

Name	Sequence
pBAD-F	TTTGCTGAGTTGAAGTTATGACAACCTTGACGGCTACAT
pBAD-R	CCAGCGGCTTCTTATCCATGGTTAATTCCTCTGTTAGC
Trp-F	GTGTGGAAGCGGTCGCTTTCATAAGGAGGTCGCAAATGGATAAGAAGCCGCTGGATG
Trp-R	ATTAACTAGTTCGATGATTAATTGTCAACAGCCGAGGATCCTTCAACTCAGCA
Oxb20-F	TCCCGCTTATAAAGCTGTTGTGACCGCTTGCTCTAGCCAGC
Oxb20-R	TATAACGGCGGCCGGGTAATACCGGATAGTCAATATGTTCTG

实施例 5：在大肠杆菌中利用 GFP 琥珀抑制效率评价构建的不同类型嵌合组氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 的活性，获得最优的嵌合组氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 系统

在本实施案例中,将上述实施例中构建的嵌合组氨酰-tRNA 合成酶质粒和嵌合组氨酸 tRNA 质粒共转化进入 DH10B 感受态细胞。转化细胞在 2xYT 培养基中于 37℃振荡培养 1h,涂布到含 50μg/ml 卡那霉素 (kan)、100μg/ml 氨苄青霉素 (AMP) 的 LB 琼脂平板上,37℃培养 12h,同时用携带 GFP-190 (TAG) 和嵌合 tRNA 的 pNEG 质粒单独转化的细胞作阴性对照。分别从每个平板上挑取 3 个点到 2xYT 培养基中,在 37℃条件下,振荡培养到 OD600=0.8,加入终浓度为 0.2%的阿拉伯糖,在 22℃下诱导培养 14h 使蛋白表达。表达结束后,取 1ml 细胞培养物离心,去掉培养基并用 150 μ l BugBuster 蛋白提取试剂 (Millipore) 裂解。裂解结束后,12000rpm 离心 1min,取 100 μ l 上清液至 96 孔培养板中 (COSTAR)。用 Bio Tek Synergy NE02 记录上清的 GFP 信号,并归一化。将测定的数据进行统计学处理,求取平均值和误差。通过以上测试,我们得到了以下几点结论:

- (1) 嵌合组氨酸 tRNA 需要组氨酸 tRNA 受体臂的完整移植 (图 3);
- (2) 吡咯赖氨酰-tRNA 合成酶的 tRNA 结合结构域在嵌合蛋白的 N 端比在 C 端好 (图 4A 和 B);
- (3) 吡咯赖氨酰-tRNA 合成酶的 tRNA 结合结构域越完整,嵌合分子的活性越高,IPYE 突变的引入可以显著的提高嵌合分子活性 (图 4A 和 B);
- (4) 连接肽的种类对活性影响不大,18 个氨基酸的连接肽最好 (图 11B 和 C);
- (5) oxb20 启动子在大肠杆菌表达体系中最好 (图 4E)。

实施例 6: 组氨酸插入到 GFP 蛋白质特定定位点的确认

我们获得嵌合组氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 对,还需要验证其引入氨基酸的准确性,需要纯化蛋白质,通过 LC-MS 和 LC-MS/MS 确认。

在本实施案例中,为了表达和纯化蛋白质,过夜培养的 DH10B 细胞按照

1:100 的接种量接种到 100ml 新鲜 LB 培养基中并添加所需的抗生素，然后生长到 OD₆₀₀ 达到 0.8。添加 L-阿拉伯糖，终浓度为 0.2%，诱导 GFP(22° C, 220 rpm, 14 h) 的表达。诱导结束的细胞在 4°C 4000rpm 离心 5 分钟，所得细胞沉淀用预冷的 NTA-0 缓冲液 (25mM Tris, 250mM NaCl, pH 8.0) 重悬，超声裂解。裂解液 12000rpm 4°C 离心 60 分钟，所得上清液经上样到提前用 NTA-0 缓冲液平衡的镍亲和层析螯合色谱，然后用 6 倍体积含有 50mM 咪唑的 NTA-0 缓冲液洗涤。最终用添加 500 mM 咪唑的 NTA-0 缓冲液洗脱蛋白质。纯化蛋白进行 SDS-PAGE 和 LC-MS 分析。

对于 LC-MS 分析，纯化的蛋白质在配备有电喷雾电离 (ESI) 源和安捷伦 1200HPLC 的 LCQ Deca XP MAX 质谱仪 (Thermo Fisher Science) 上进行分析。在安捷伦 300 SB-C18 柱上 (300×2.1, 150 mm, 5 μm) 进行分离脱盐。流动相 A 设置为含有 0.1% 甲酸的水溶液，流动相 B 含 0.1% 甲酸的乙腈，并设定流量为 0.200 毫升/分钟。使用 XCalibur-Quar 浏览器软件对数据进行分析。在 UniDec 软件 (版本 2.6.8, 牛津大学) 中，使用核心贝叶斯反卷积算法进行质谱反卷积。使用 ExPASy Compute pI/Mw 工具 (https://web.expasy.org/compute_pi/) 预测了蛋白质的理论分子量。

在 LC-MS/MS 分析中，将蛋白条带从凝胶中切下，并用胰蛋白酶隔夜消化。将消化产物上样到结合 Proxeon Easy-nLC II HPLC (Thermo Fisher Science) 和 Proxeon nanospray 源的 Q Exactive Orbitrap (Thermo Fisher) 质谱仪。使用 MASCOT 引擎 (Matrix Science, London, UK; version 2.2) 搜索 MS/MS 光谱，并用 pLabel 软件 (version 2.4, University of Florida Herbarium) 进一步处理。处理结果显示组氨酸插入到了 GFP 的 190 位点，见图 4D 和图 9。

实施例 7: 嵌合丝氨酸 tRNA 的分子进化

通过以上实施例构建的嵌合丝氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 系统活性较低, 接下来对嵌合丝氨酸 tRNA 的受体臂区进行改造, 具体步骤如下:

S25: 构建嵌合 tRNA 文库, 并克隆到 pNEG 载体中;

S26: 制备含有嵌合氨酰-tRNA 合成酶质粒的 DH10B 感受态细胞;

S27: 将文库电转化到制备好的感受态细胞中, 并涂布含有阿拉伯糖的平板;

S28: 筛选有荧光的克隆;

S29: 嵌合 tRNA 正交性的确认;

S30: 嵌合 tRNA 测序;

更为具体的, 为了建立 chSerT 文库, 选择 G2:C71、U3:A70、G4:C69、A5:U68、G6:C67、G7:C66 6 个碱基对, 设计引物 chSerT-lib-F 和 chSerT-lib-R PCR 随机文库片段, 同时设计引物 chSerT-v-F 和 chSerT-v-R 扩增 pNEG 载体, 载体和片段通过胶回收试剂盒回收后 Gibson 组装。将组装好的文库质粒利用电穿孔的方法转化到含有 pBK-oxb20-chSerRS 的 DH10B 感受态细胞中。转化的细胞加入 0.9ml SOC 培养基 37° C 复苏 1h, 然后涂布到含 50 μ g/ml 卡那霉素、100 μ g/ml 氨苄青霉素和 0.2% L-阿拉伯糖的 LB 琼脂平板上。37°C 下培养 12h, 随后在 22°C 下培养 48h 用 Azure Bio. C400 在 Cy2 通道上从平板上挑选出具有荧光的克隆, 接种到 96 孔培养板上。37° C, 220 rpm 下培养 10 小时, 然后用 0.2% 的阿拉伯糖诱导 22 h。用 Bio Tek Synergy NE02 记录 OD600 和 GFP 荧光 (λ_{ex} =490/10 nm, λ_{em} =510/10 nm)。挑取 GFP/OD600 比值最高的细胞接种于 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 2xYT 培养基中, 用质粒小量试剂盒提取质粒。用 BglIII 限制性内切酶消化提取的 DNA, 去除 pBK-oxb20-chSerRS 质粒, 转化到大肠杆菌 DH10B 活性细胞。提取含有 chSerT 变体的 pNEG 质粒, 并测序。筛选到的 tRNA 和相应活性比较见图 7。具体引物如下表。

表 7-1. 嵌合丝氨酸 tRNA 文库构建引物列表

Name	Sequence
chSerT-lib-F	TTCGCTAAGGATCTGCAGTGGCGGNNNNNCCGGGAATCTAACCCG
chSerT-lib-R	ATACTTGTAACGCTGAATTCGGNNNNNTGATCATGTAGATCGAAC
chSerT-v-F	GAATTCAGCGTTACAAGTATTACACAAAGTTTTTTATG
chSerT-v-R	CCACTGCAGATCCTTAGCGAAAGCTAAGGATTTTTTTTAAG

实施例 8：嵌合组氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 系统在哺乳动物细胞琥珀抑制效率分析

(1) 嵌合组氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 哺乳动物表达载体构建

设计引物将扩增嵌合组氨酰-tRNA 合成酶和嵌合组氨酸 tRNA，克隆到 pcDNA3.1 载体上，分别在 CMV 和 U6 启动子控制下空载体图谱见图 1。嵌合组氨酸 tRNA 分别保留受体臂的 CCA 和不保留两种。引物见表 8-1。

(2) 嵌合系统转染 HEK 293T 细胞

用 PEI 试剂将上述构建的质粒与 pEGFP-EGFP190TAG-His₆ 按照 1 : 1(G : G) 的比例共转染到 HEK 293T 细胞中。

(3) 细胞荧光和 WB 分析转染及抑制效率

转染 48h 后先用 GE DV Elite Applied Precision DeltaVision system 进行荧光成像分析，然后再 Western 印迹分析。嵌合组氨酸 tRNA 末端连有 CCA 的效率显著高于没有的（图 5 和 13）。

以上仅为本发明的优选实施例，并非因此 限制本发明的专利范围，凡是利用本发明说明书及附图内容所作的等效结构或等效流程变换，或直接或间接运用在其他相关的技术领域，均同理包括在本发明的专利保护范围内。

权利要求书

1. 一种利用嵌合设计方法构建正交的氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 体系, 其特征在于移植吡咯赖氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 对在真核细胞和原核细胞的广泛正交性。

2. 如权利要求 1 所述的一种利用嵌合设计方法构建正交的氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 体系, 其特征在于正交的嵌合体系包括嵌合组氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 对、嵌合苯丙氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 对、嵌合丝氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 对、嵌合丙氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 对, 但不限于这 4 种嵌合系统, 所述嵌合组氨酰-tRNA 合成酶的基因序列如 SEQ ID No. 3 所示, 所述嵌合苯丙氨酰-tRNA 合成酶的基因序列如 SEQ ID No. 4 所示, 所述嵌合丝氨酰-tRNA 合成酶的基因序列如 SEQ ID No. 5 所示, 所述嵌合丙氨酰-tRNA 合成酶的基因序列的基因序列如 SEQ ID No. 6 所示。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的一种利用嵌合设计方法构建正交的氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 体系, 其特征在于所述正交的氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 体系嵌合通过以下步骤实现:

S1: 嵌合氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 载体的构建;

S2: 在大肠杆菌中利用 GFP 琥珀抑制效率评价嵌合氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 的活性;

S3: 氨基酸插入的确认, 包括 GFP 表达, LC-MS 和 LC-MS/MS 的鉴定;

S4: 嵌合系统在哺乳动物细胞表达体系琥珀抑制效率测试;

S5: 对效率偏低的嵌合系统, 选择嵌合 tRNA 的受体臂, 构建突变文库进行筛选。

4. 如权利要求 3 所述的一种利用嵌合设计方法构建正交的氨酰 tRNA 合成酶/tRNA/体系, 其特征在于所述 S1 中嵌合氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 载体的构建具

体包括：

S6：嵌合 tRNA 载体构建；

S7：嵌合氨酰-tRNA 合成酶载体构建。

5. 如权利要求 4 所述的一种利用嵌合设计方法构建正交的氨酰 tRNA 合成酶/tRNA 体系，其特征在于所述 S6 中嵌合 tRNA 载体构建具体包括：

S8：嵌合 tRNA 的设计合成；

S9：报告基因 GFP190TAG-His6 的合成；

S10：将嵌合 tRNA 和 GFP190TAG-His6 连接到 pNEG 载体，分别在 *glns* 和 *pBAD* 启动子控制下。

6. 如权利要求 4 所述的一种利用嵌合设计方法构建正交的氨酰 tRNA 合成酶/tRNA/体系，其特征在于 S7 中嵌合氨酰-tRNA 合成酶的构建具体包括：

S11：嵌合氨酰-tRNA 合成酶中来自吡咯赖氨酰-tRNA 合成酶 tRNA 结合结构域的选择，氨酰-tRNA 合成酶催化结构域的选择；分别连接到 pBK 载体上；

S12：合成不同的长度和类型的连接肽并装载到嵌合氨酰-tRNA 合成酶中两个部分之间，连接肽种类：GS-rich、helix、P-rich；

S13：合成 *glns* 启动子、*pBAD* 启动子、*oxb20* 启动子、*trp* 启动子插入 pBK 载体上控制嵌合氨酰 tRNA 合成酶的表达。

7. 如权利要求 3 所述的一种利用嵌合设计方法构建正交的氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 体系，其特征在于所述 S2 中在大肠杆菌中利用 GFP 琥珀抑制效率评价嵌合氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 的活性具体包括：

S14：携带 GFP190TAG-His6 基因和嵌合 tRNA 的 pNEG 载体和携带的嵌合氨酰-tRNA 合成酶的 pBK 载体共转化转入 DH10B 感受态细胞；

S15：挑单克隆到液体培养基中，阿拉伯糖诱导基因表达；

S17：裂解表达后的细胞；

S18: 测定裂解后细胞上清液 GFP 的荧光, 并计算嵌合系统 GFP 琥珀抑制效率。

8. 如权利要求 3 所述的一种利用嵌合设计方法构建正交的氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 体系, 其特征在于所述 S3 中氨基酸插入的确认具体包括:

S19: S14 中的大肠杆菌大量培养, 阿拉伯糖诱导蛋白质表达 ;

S20: 收集表达后的大肠杆菌, 超声破碎, 亲和层析纯化;

S21: 纯化蛋白质的 Western-blotting, LC-MS 和 LC-MS/MS 的鉴定。

9. 如权利要求 3 所述的一种利用嵌合设计方法构建正交的氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 体系, 其特征在于 S4 中嵌合系统在哺乳动物细胞内效率测试具体包括:

S22: 嵌合氨酰 tRNA 合成酶基因和嵌合 tRNA 基因转入 pcDNA3.1 载体中;

S23: S22 得到的质粒与 pEGFP-EGFP-191TAG-Histag 共转染 HEK 293T 细胞;

S24: GFP 荧光和 Western-blotting 衡量嵌合系统在哺乳动物细胞中的效率。

10. 如权利要求 3 所述的一种利用嵌合设计方法构建正交的氨酰-tRNA 合成酶/tRNA 体系, 其特征在于 S5 中嵌合 tRNA 受体臂区域文库筛选体系具体包括:

S25: 构建嵌合 tRNA 文库, 并克隆到 pNEG 载体中;

S26: 制备含有嵌合氨酰-tRNA 合成酶质粒的 DH10B 感受态细胞;

S27: 将文库电转化到制备好的感受态细胞中, 并涂布含有阿拉伯糖的平板;

S28: 筛选有荧光的克隆;

S29: 嵌合 tRNA 正交性的确认;

S30: 嵌合 tRNA 测序。

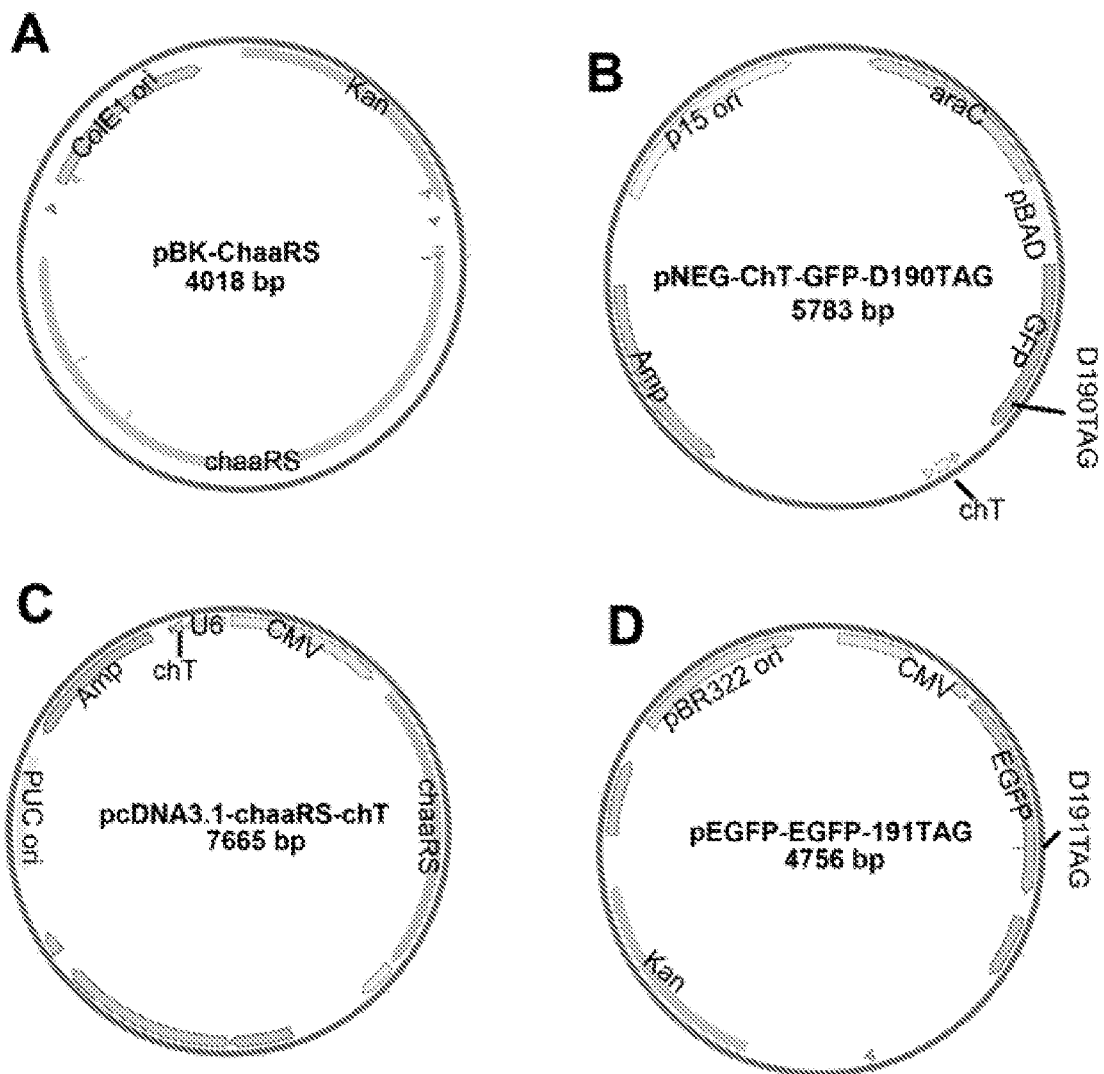


图 1

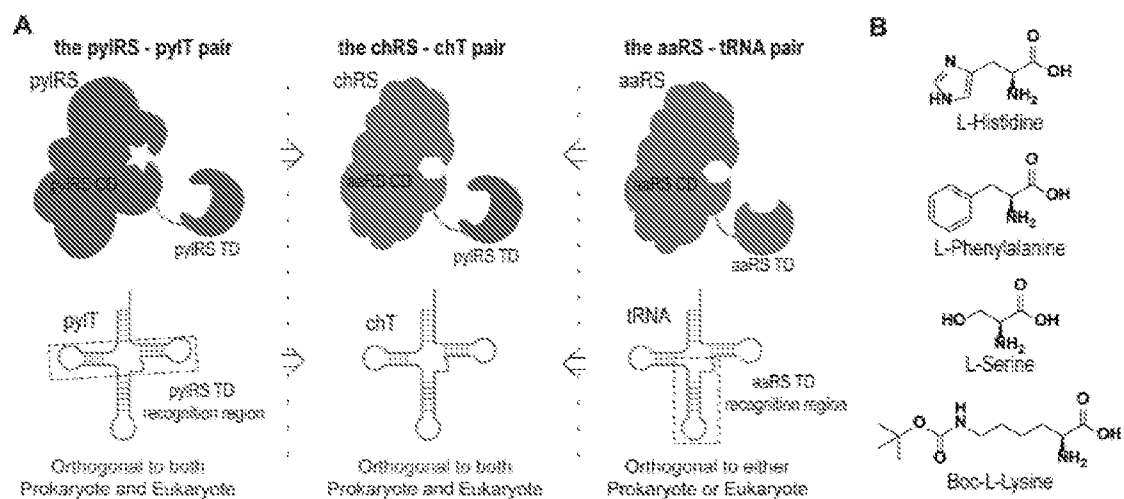


图 2

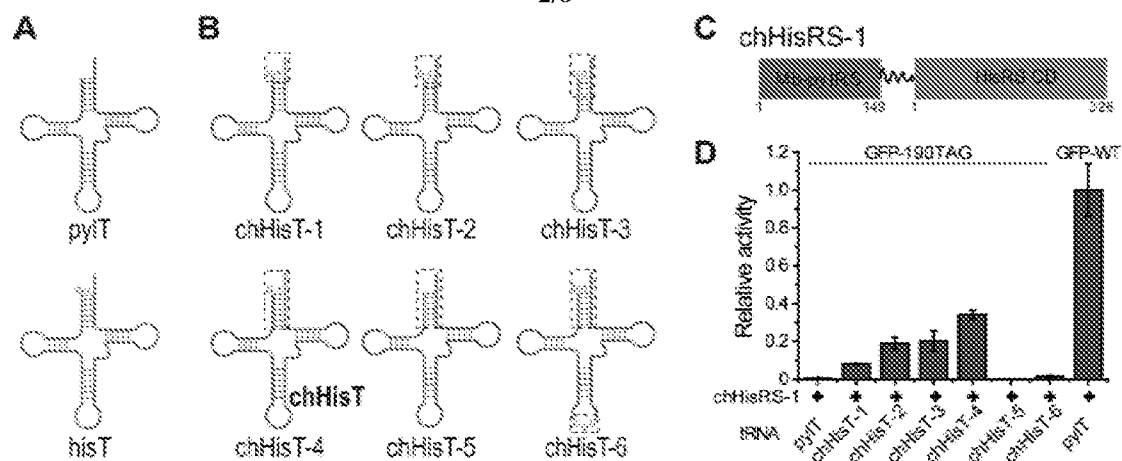


图 3

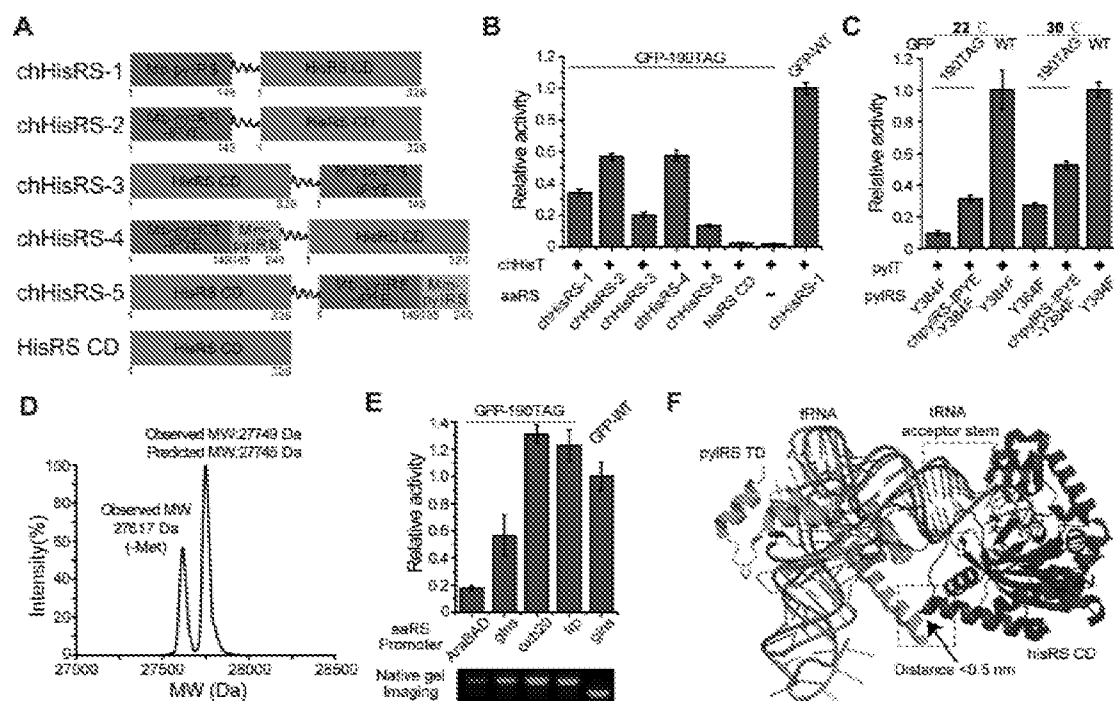


图 4

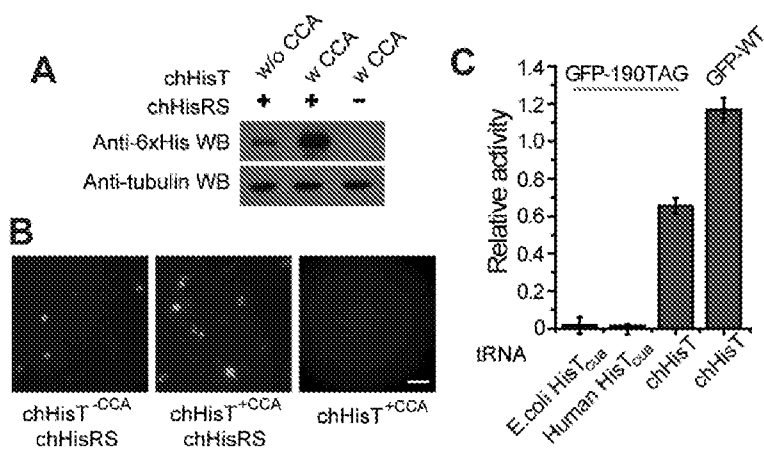


图 5

3/8

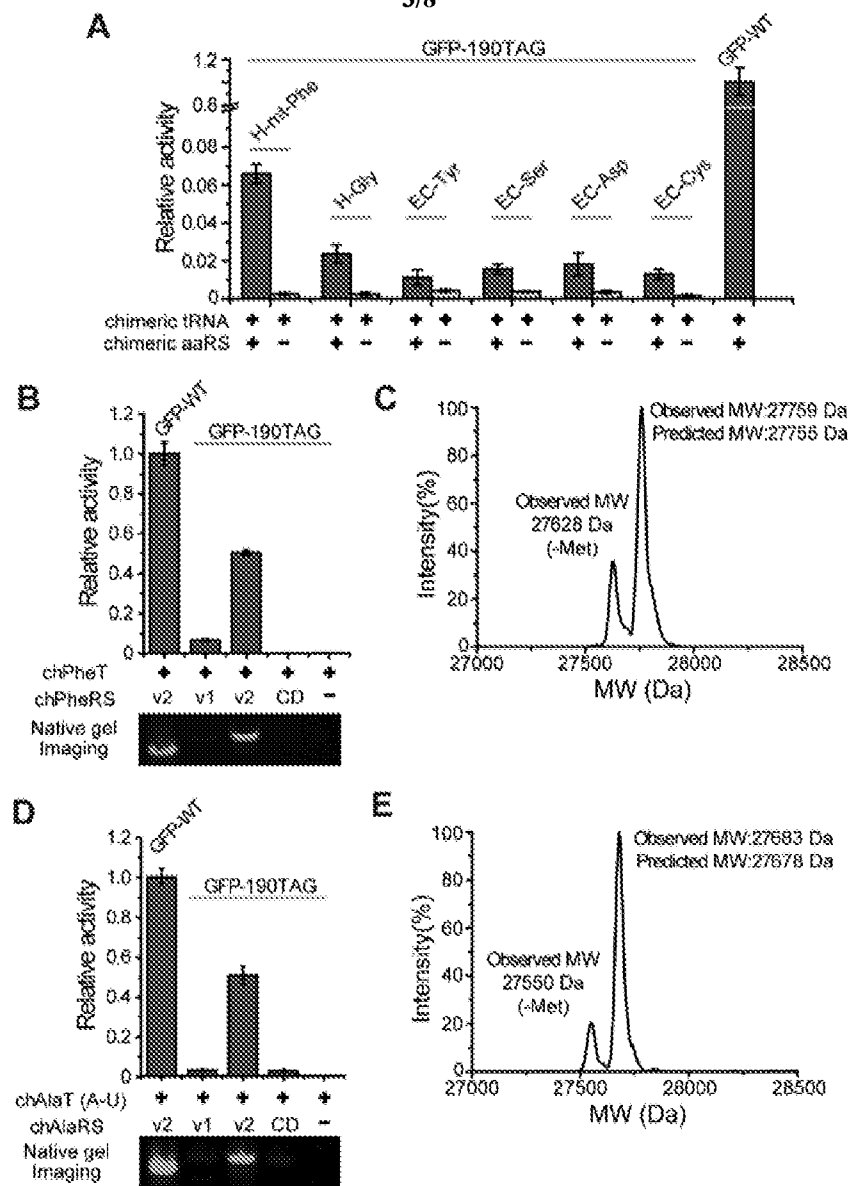


图 6

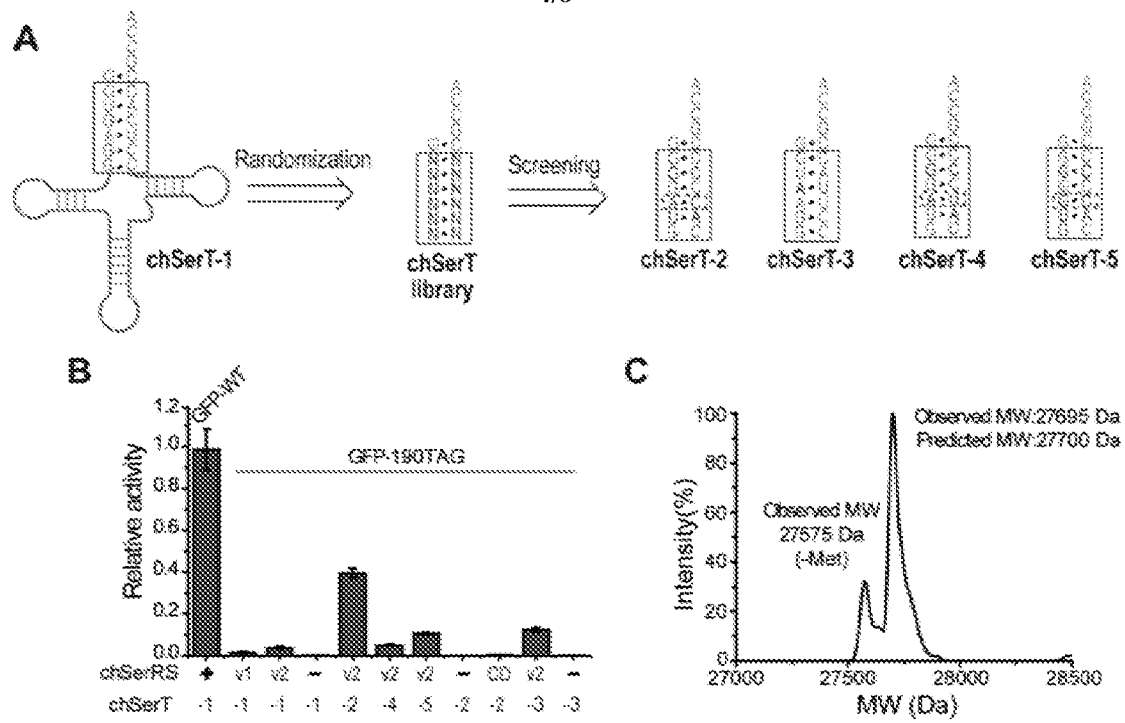


图 7

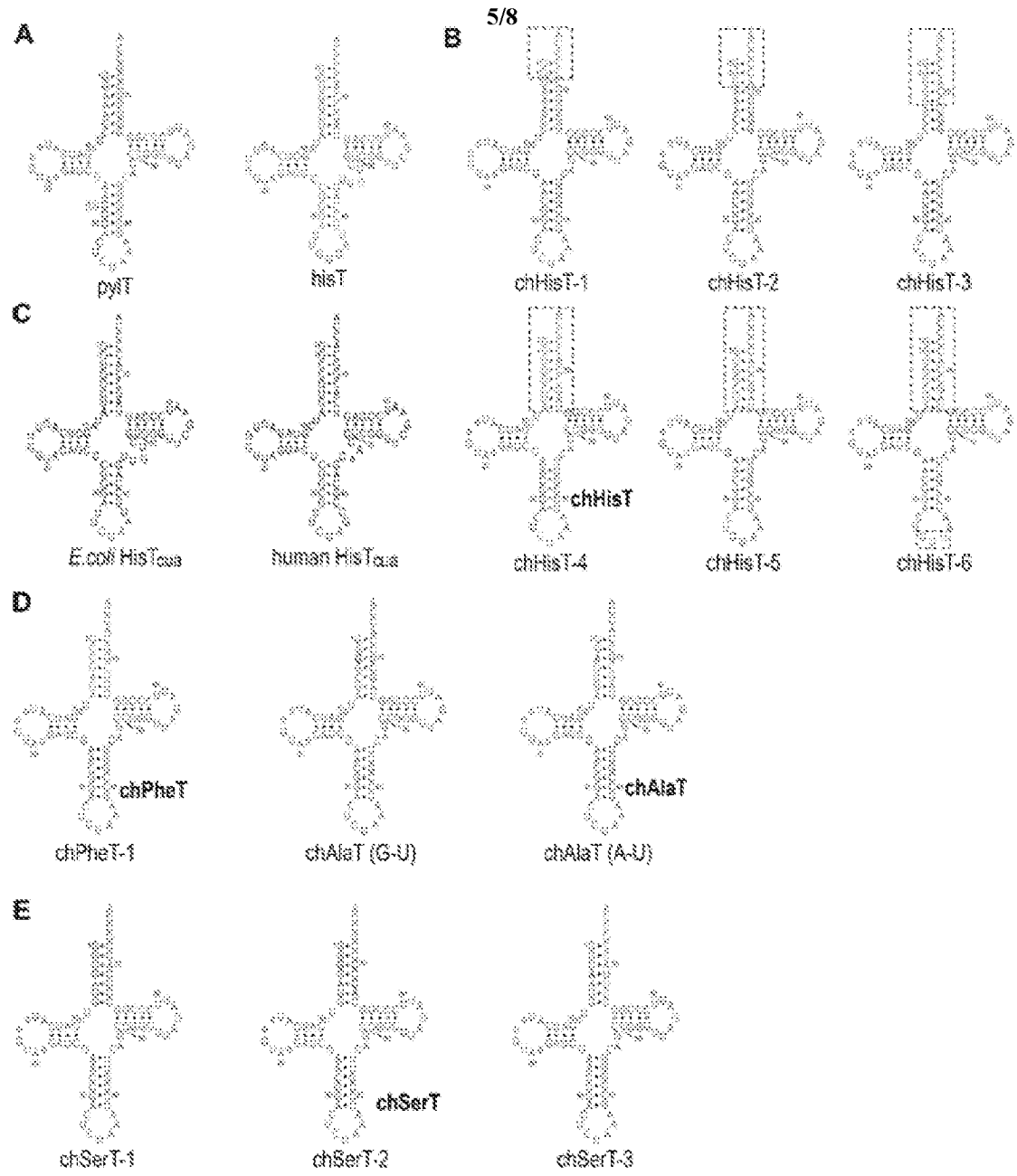


图 8

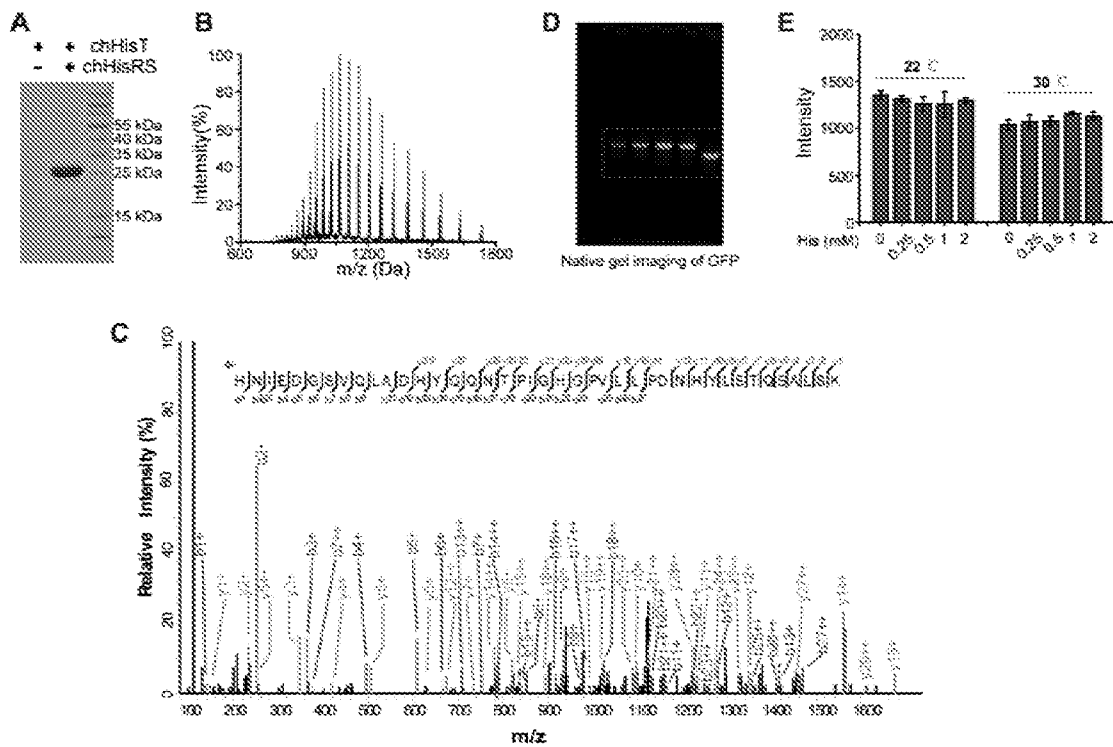


图 9

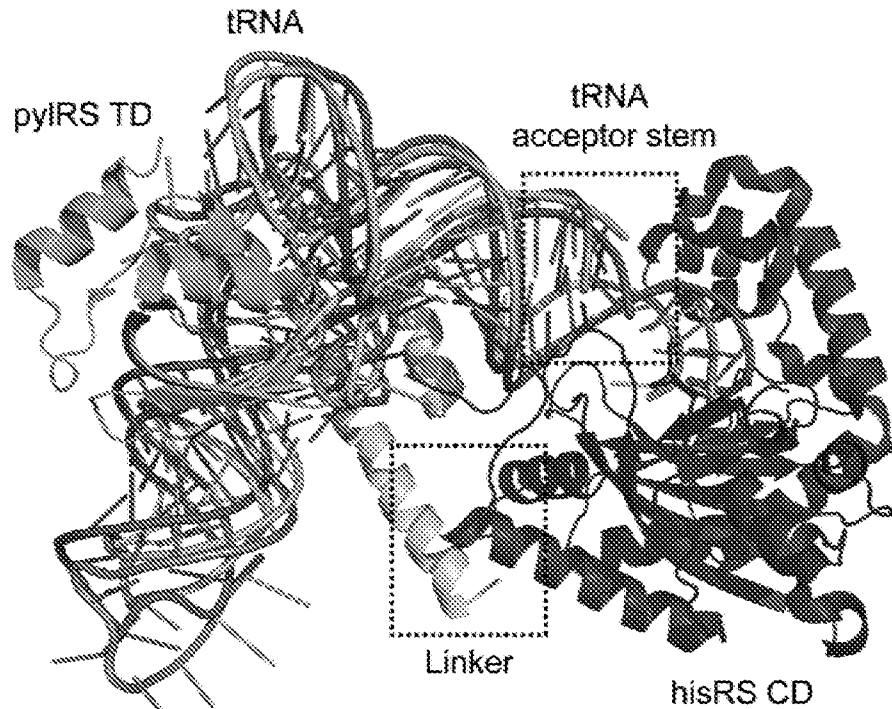


图 10

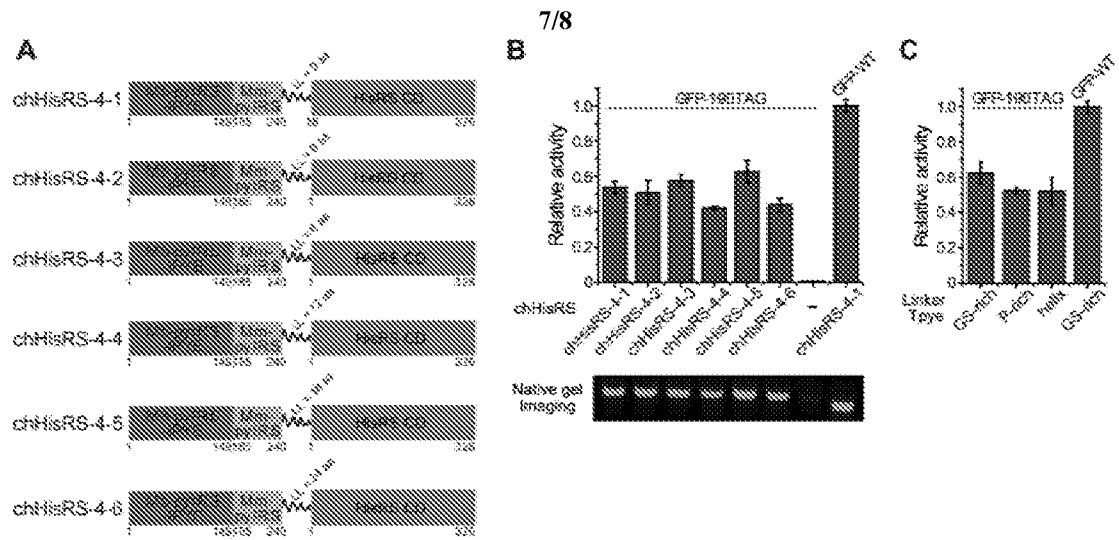


图 11

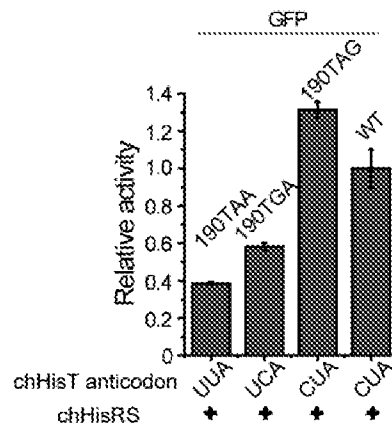


图 12

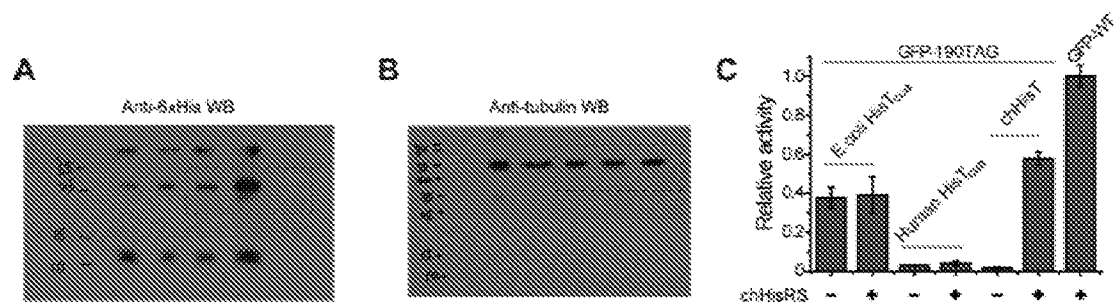


图 13

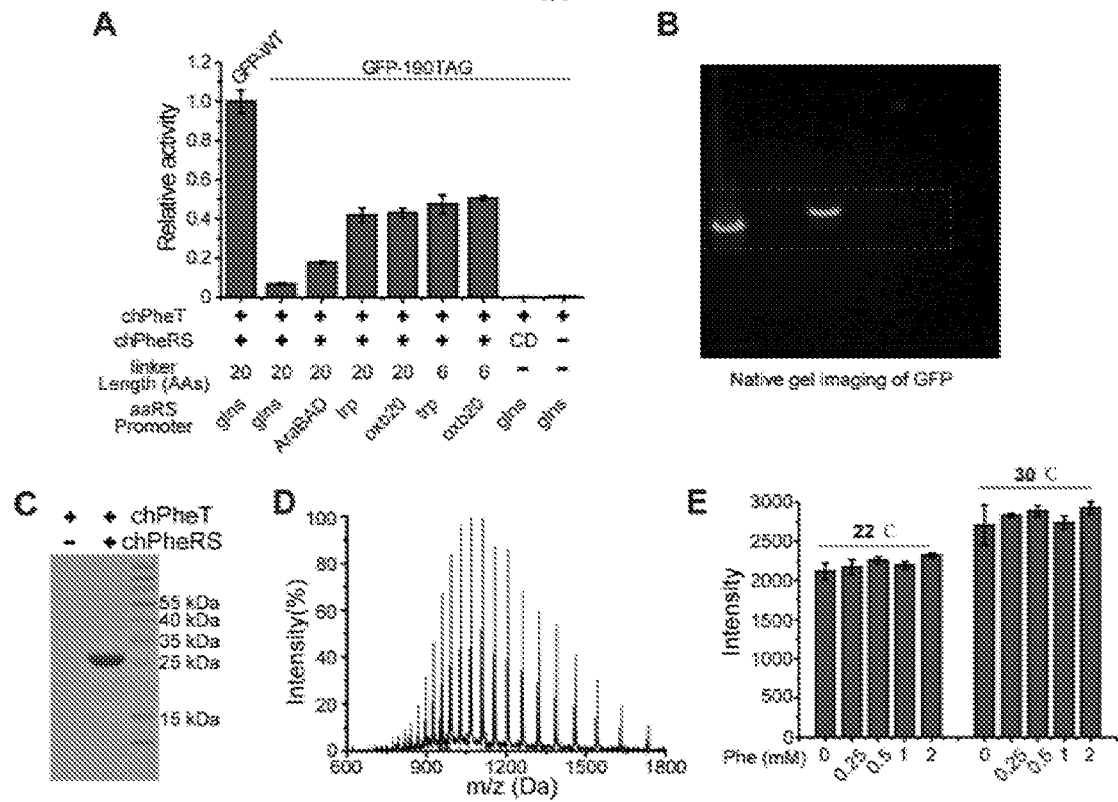


图 14

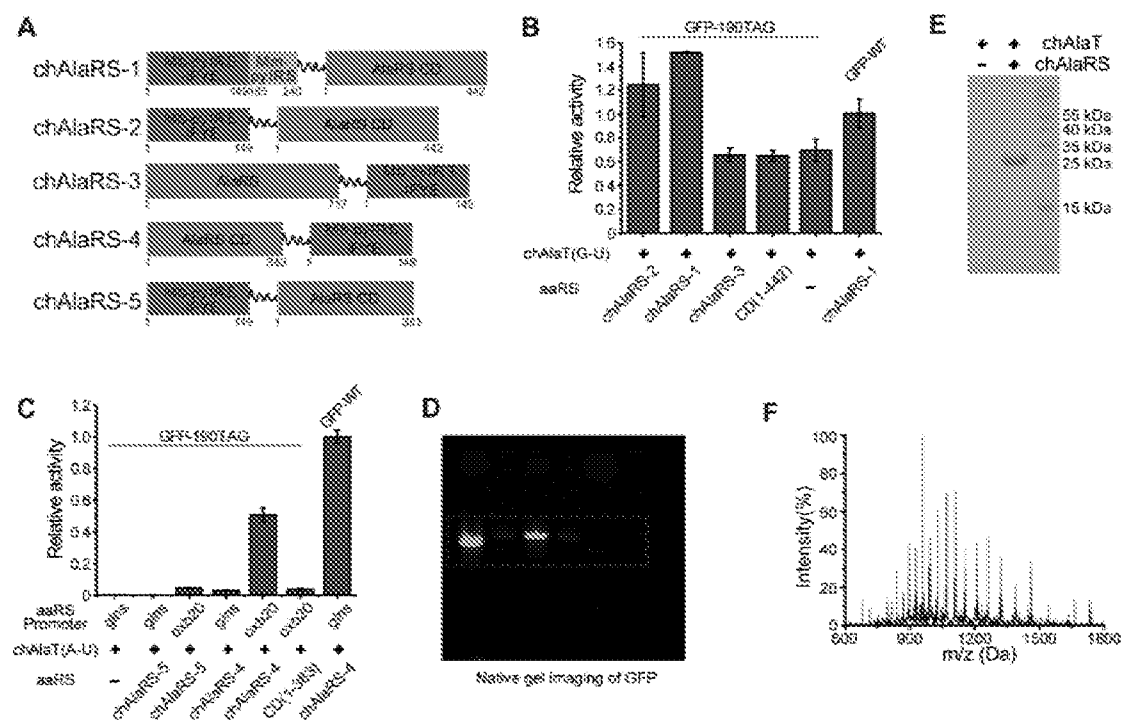


图 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/084079

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/52(2006.01)i; C12N 15/85(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; DWPI; SIPOABS; CPRSABS, CNTXT, WOTXT, USTXT; EPTXT; CNKI; WEB OF SCIENCE; PUBMED; 万方数据库; 浙江大学, 氨酰-tRNA合成酶, 吡咯赖氨酰-tRNA合成酶, 组氨酰-tRNA合成酶, 苯丙氨酰-tRNA合成酶, 丝氨酸-tRNA合成酶, 丙氨酰-tRNA合成酶, 琥珀密码子, 终止密码子, 筛选, 正交, 嵌合, aminoacyl-tRNA synthetase, pyrrolysyl-tRNA synthetase, histidyl-tRNA synthetase, phenylalanyl-tRNA synthetase, alanyl-tRNA synthetase, canonical synthetase, amber, amber codon, terminal codon, screening, orthogonality, orthogonal pairs, chimeric, chimera; GENBANK+EBML+中国专利生物序列检索系统; sequence search for SEQ ID NOs: 3-6.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 110172467 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 27 August 2019 (2019-08-27) see entire document	1-10
X	CN 103215227 A (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 24 July 2013 (2013-07-24) see abstract, claims 1, 66, 103	1,
X	CN 101076598 A (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 21 November 2007 (2007-11-21) see entire document	1,
Y	CN 103215227 A (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 24 July 2013 (2013-07-24) see abstract, claims 1, 66, 103	3-10
Y	MEINEKE B. et al. "Methanomethylophilus alvus Mx1201 Provides Basis for Mutual Orthogonal Pyrrolysyl tRNA/Aminoacyl-tRNA Synthetase Pairs in Mammalian Cells" <i>ACS CHEMICAL BIOLOGY</i> , Vol. 13, No. 11., 16 November 2018 (2018-11-16), ISSN: 1554-8929, pages 3087-3096, see abstract, pages 3091-3094, figure 5, figure 6	3-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07 July 2020

Date of mailing of the international search report

15 July 2020

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/084079**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 107012121 A (PEKING UNIVERSITY) 04 August 2017 (2017-08-04) see entire document	1-10
A	CN 101849002 A (JAPAN AGENCY FOR MARINE-EARTH SCIENCE AND TECHNOLOGY) 29 September 2010 (2010-09-29) see entire document	1-10
A	AMBROGELLY A. et al. "Pyrrolysine is not hardwired for cotranslational insertion at UAG codons" <i>PNAS</i> , Vol. 104, No. 9, 27 February 2007 (2007-02-27), ISSN: 0027-8424, pp. 3141-3146, see entire document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/084079

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	110172467	A	27 August 2019	None			
CN	103215227	A	24 July 2013	US	2012282689	A1	08 November 2012
				CN	101223272	A	16 July 2008
				CN	103215227	B	16 September 2015
				KR	101171397	B1	07 August 2012
				US	7625717	B2	01 December 2009
				CN	101223272	B	03 April 2013
				US	8945926	B2	03 February 2015
				HK	1087432	A1	06 July 2012
				AU	2010257225	B2	13 December 2012
				US	2007166791	A1	19 July 2007
				US	2015240249	A1	27 August 2015
				AU	2004233083	A1	04 November 2004
				US	7794978	B2	14 September 2010
				WO	2004094593	A2	04 November 2004
				US	7608423	B2	27 October 2009
				WO	2004094593	A3	21 December 2007
				EP	1613735	A2	11 January 2006
				US	2012253026	A1	04 October 2012
				AT	542894	T	15 February 2012
				US	8357532	B2	22 January 2013
				US	2011217733	A1	08 September 2011
				US	2005009049	A1	13 January 2005
				EP	1613735	A4	28 January 2009
				US	2008227195	A1	18 September 2008
				US	8173393	B2	08 May 2012
				IL	171128	A	31 July 2013
				CN	103215228	A	24 July 2013
				JP	2014195463	A	16 October 2014
				US	2008176277	A1	24 July 2008
				AU	2010257225	A1	13 January 2011
				JP	2007525943	A	13 September 2007
				US	2007154952	A1	05 July 2007
				CA	2520750	A1	04 November 2004
				US	2010160618	A1	24 June 2010
				US	9580721	B2	28 February 2017
				CN	103289960	A	11 September 2013
				KR	20050119704	A	21 December 2005
				CN	103289960	B	26 April 2017
				JP	5642916	B2	17 December 2014
				EP	1613735	B1	25 January 2012
				US	8114628	B2	14 February 2012
				MX	PA05011127	A	10 March 2006
				US	7618775	B2	17 November 2009
				AU	2004233083	B2	16 September 2010
CN	101076598	A	21 November 2007	PT	1666604	E	19 May 2008
				US	2007042461	A1	22 February 2007
				MX	PA06000242	A	07 April 2006
				EP	1666604	A1	07 June 2006
				US	2010291559	A1	18 November 2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/084079

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
				US	7638297 B2	29 December 2009
				AT	386133 T	15 March 2008
				US	8669073 B2	11 March 2014
				SI	1666604 T1	31 August 2008
				WO	2005019415 A2	03 March 2005
				DE	602004027770 D1	29 July 2010
				AT	471385 T	15 July 2010
				DE	602004011789 T2	12 February 2009
				WO	2005019415 A3	25 January 2007
				BR	PI0412272 A	05 September 2006
				EP	1649004 A4	09 April 2008
				CN	101076598 B	25 July 2012
				AU	2004267359 A1	03 March 2005
				US	2006177900 A1	10 August 2006
				US	8030028 B2	04 October 2011
				JP	2011101656 A	26 May 2011
				CA	2531146 A1	03 March 2005
				EP	1649004 A2	26 April 2006
				JP	5192150 B2	08 May 2013
				EP	1666604 B1	13 February 2008
				DE	602004011789 D1	27 March 2008
				AU	2004267359 B2	09 September 2010
				US	7575895 B2	18 August 2009
				JP	2007529998 A	01 November 2007
				PT	1914314 E	08 September 2010
				SI	EP1666604 T1	31 August 2008
				US	2012129215 A1	24 May 2012
				ES	2301099 T3	16 June 2008
CN	107012121	A	04 August 2017	None		
CN	101849002	A	29 September 2010	EP	2177610 A1	21 April 2010
				WO	2009011258 A1	22 January 2009
				US	2011008832 A1	13 January 2011
				JP	2009017840 A	29 January 2009
				EP	2177610 A4	18 May 2011

A. 主题的分类

C12N 15/52 (2006.01) i; C12N 15/85 (2006.01) i; C12N 15/70 (2006.01) i

按照国际专利分类 (IPC) 或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献 (标明分类系统和分类号)

C12N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库 (数据库的名称, 和使用的检索词 (如使用))

CNABS; DWPI; SIPOABS; CPRSABS, CNTXT, WOTXT, USTXT; EPTXT; CNKI; WEB OF SCIENCE; PUBMED; 万方数据库; 浙江大学, 氨酰-tRNA合成酶, 吡咯赖氨酰-tRNA合成酶, 组氨酰-tRNA合成酶, 苯丙氨酰-tRNA合成酶, 丝氨酸-tRNA合成酶, 丙氨酰-tRNA合成酶, 琥珀密码子, 终止密码子, 筛选, 正交, 嵌合, aminoacyl-tRNA synthetase, pyrrolysyl-tRNA synthetase, histidyl-tRNA synthetase, phenylalanyl-tRNA synthetase, alanyl-tRNA synthetase, canonical synthetase, amber codon, terminal codon, screening, orthogonality, orthogonal pairs, chimeric, chimera; GENBANK+EBML+中国专利生物序列检索系统: 对SEQ ID N0s:3-6的序列检索。

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 110172467 A (浙江大学) 2019年 8月 27日 (2019 - 08 - 27) 参见全文	1-10
X	CN 103215227 A (斯克利普斯研究院) 2013年 7月 24日 (2013 - 07 - 24) 参见摘要, 权利要求1, 66, 103	1
X	CN 101076598 A (斯克利普斯研究院) 2007年 11月 21日 (2007 - 11 - 21) 参见全文	1
Y	CN 103215227 A (斯克利普斯研究院) 2013年 7月 24日 (2013 - 07 - 24) 参见摘要, 权利要求1, 66, 103	3-10
Y	MEINEKE B. 等. "Methanomethylophilus alvus Mx1201 Provides Basis for Mutual Orthogonal Pyrrolysyl tRNA/Aminoacyl-tRNA Synthetase Pairs in Mammalian Cells" ACS CHEMICAL BIOLOGY, 第13卷, 第11期, 2018年 11月 16日 (2018 - 11 - 16), ISSN: 1554-8929, 第3087-3096页, 参见摘要, 第3091-3094页, 图5, 图6	3-10

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2020年 7月 7日

国际检索报告邮寄日期

2020年 7月 15日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局 (ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

李肖渠

电话号码 62411615

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 107012121 A (北京大学) 2017年 8月 4日 (2017 - 08 - 04) 参见全文	1-10
A	CN 101849002 A (独立行政法人海洋研究开发机构) 2010年 9月 29日 (2010 - 09 - 29) 参见全文	1-10
A	AMBROGELLY A. 等. "Pyrrolysine is not hardwired for cotranslational insertion at UAG codons" PNAS, 第104卷, 第9期, 2007年 2月 27日 (2007 - 02 - 27), ISSN: 0027-8424, 第3141-3146页, 参见全文	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/084079

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	110172467	A	2019年 8月 27日	无			
CN	103215227	A	2013年 7月 24日	US	2012282689	A1	2012年 11月 8日
				CN	101223272	A	2008年 7月 16日
				CN	103215227	B	2015年 9月 16日
				KR	101171397	B1	2012年 8月 7日
				US	7625717	B2	2009年 12月 1日
				CN	101223272	B	2013年 4月 3日
				US	8945926	B2	2015年 2月 3日
				HK	1087432	A1	2012年 7月 6日
				AU	2010257225	B2	2012年 12月 13日
				US	2007166791	A1	2007年 7月 19日
				US	2015240249	A1	2015年 8月 27日
				AU	2004233083	A1	2004年 11月 4日
				US	7794978	B2	2010年 9月 14日
				WO	2004094593	A2	2004年 11月 4日
				US	7608423	B2	2009年 10月 27日
				WO	2004094593	A3	2007年 12月 21日
				EP	1613735	A2	2006年 1月 11日
				US	2012253026	A1	2012年 10月 4日
				AT	542894	T	2012年 2月 15日
				US	8357532	B2	2013年 1月 22日
				US	2011217733	A1	2011年 9月 8日
				US	2005009049	A1	2005年 1月 13日
				EP	1613735	A4	2009年 1月 28日
				US	2008227195	A1	2008年 9月 18日
				US	8173393	B2	2012年 5月 8日
				IL	171128	A	2013年 7月 31日
				CN	103215228	A	2013年 7月 24日
				JP	2014195463	A	2014年 10月 16日
				US	2008176277	A1	2008年 7月 24日
				AU	2010257225	A1	2011年 1月 13日
				JP	2007525943	A	2007年 9月 13日
				US	2007154952	A1	2007年 7月 5日
				CA	2520750	A1	2004年 11月 4日
				US	2010160618	A1	2010年 6月 24日
				US	9580721	B2	2017年 2月 28日
				CN	103289960	A	2013年 9月 11日
				KR	20050119704	A	2005年 12月 21日
				CN	103289960	B	2017年 4月 26日
				JP	5642916	B2	2014年 12月 17日
				EP	1613735	B1	2012年 1月 25日
				US	8114628	B2	2012年 2月 14日
				MX	PA05011127	A	2006年 3月 10日
				US	7618775	B2	2009年 11月 17日
				AU	2004233083	B2	2010年 9月 16日
CN	101076598	A	2007年 11月 21日	PT	1666604	E	2008年 5月 19日
				US	2007042461	A1	2007年 2月 22日
				MX	PA06000242	A	2006年 4月 7日
				EP	1666604	A1	2006年 6月 7日
				US	2010291559	A1	2010年 11月 18日

国际申请号

PCT/CN2020/084079

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2015年1月)