



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109071609 A

(43)申请公布日 2018.12.21

(21)申请号 201780025441.9

(22)申请日 2017.03.24

(30)优先权数据

62/312,772 2016.03.24 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.10.24

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/024051 2017.03.24

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/165788 EN 2017.09.28

(71)申请人 马凯特大学

地址 美国威斯康辛州

(72)发明人 柳异 杨品芬

(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219

代理人 杨青 穆德骏

(51)Int.Cl.

G07K 14/00(2006.01)

G07K 14/415(2006.01)

G07K 17/14(2006.01)

G07K 19/00(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

权利要求书2页 说明书25页

序列表14页 附图15页

(54)发明名称

定量鞭毛荧光标志物和标准品

(57)摘要

本文公开了荧光标志物,其包含沿着所述荧光标志物的长度有规律地散布的已知数目的荧光标记的蛋白质拷贝。所述荧光标志物可用于在荧光显微术中定量荧光标记的样品。

1. 一种荧光标志物,其包含由结构蛋白(SP)的多个拷贝形成的管状或圆柱状生物结构,所述生物结构包含沿着所述生物结构的长度有规律地散布的荧光标记的蛋白质(FP)的多个拷贝。

2. 权利要求1的荧光标志物,其每96nm的所述生物结构长度包含2个FP。

3. 权利要求1或2的荧光标志物,其中所述结构蛋白以螺旋构型组装。

4. 前述权利要求任一项的荧光标志物,其中所述结构蛋白包含微管蛋白。

5. 权利要求4的荧光标志物,其中所述微管蛋白是 α -微管蛋白(SEQ ID NO:6或其变体)、 β -微管蛋白(SEQ ID NO:7或其变体)或作为异二聚体的 α -微管蛋白与 β -微管蛋白的组合。

6. 前述权利要求任一项的荧光标志物,其中所述生物结构是微管或二联微管。

7. 前述权利要求任一项的荧光标志物,其中所述生物结构是蛋白质微管或蛋白质二联微管。

8. 前述权利要求任一项的荧光标志物,其中所述生物结构是包含A-微管和B-微管的二联微管。

9. 前述权利要求任一项的荧光标志物,其中所述荧光标记的蛋白质是融合蛋白,所述融合蛋白包含与荧光蛋白的氨基酸序列相融合的与微管结合的径向辐条蛋白(RSP)的氨基酸序列。

10. 权利要求9的荧光标志物,其中所述荧光蛋白的氨基酸序列被融合到所述RSP的氨基酸序列的C-端。

11. 权利要求9或10的荧光标志物,其中所述荧光蛋白是绿色荧光蛋白(GFP)、mNeonGreen蛋白(NG)或其荧光变体。

12. 权利要求9-11任一项的荧光标志物,其中所述RSP是组装在微管结构中的径向辐条蛋白3(RSP3)或其变体。

13. 权利要求12的荧光标志物,其中所述RSP3包含SEQ ID NO:1或其变体的氨基酸序列,所述变体与SEQ ID NO:1具有至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性。

14. 权利要求9-13任一项的荧光标志物,其中所述荧光蛋白包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3或其变体的氨基酸序列,所述变体与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3具有至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性。

15. 权利要求9-12任一项的荧光标志物,其中所述融合蛋白包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5或其变体的氨基酸序列,所述变体与SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5具有至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性。

16. 前述权利要求任一项的荧光标志物,其中所述荧光标记的蛋白质是融合蛋白,所述融合蛋白包含与结合到荧光标记物的衔接蛋白的氨基酸序列相融合的径向辐条蛋白(RSP)的氨基酸序列。

17. 前述权利要求任一项的荧光标志物,其中所述生物结构是包含所述管状或圆柱状生物结构的多个拷贝的轴丝。

18. 权利要求17的荧光标志物,其中所述生物结构是包含9+2结构的轴丝。

19. 前述权利要求任一项的荧光标志物,其中所述生物结构是包含轴丝的鞭毛。

20. 权利要求19的荧光标志物,其中所述轴丝包含所述管状或圆柱状生物结构的多个拷贝。

21. 一种固体基底,其包含固定到所述固体基底的、前述权利要求任一项的荧光标志物。

22. 权利要求21的固体基底,其中所述固体基底是载玻片。

23. 一种用于执行荧光显微术的方法,所述方法包括在执行荧光显微术时检测来自权利要求1-20任一项的荧光标志物或来自权利要求21或22的固体基底的荧光,所述固体基底包含固定到所述固体基底的荧光标志物。

24. 一种用于执行荧光显微术的方法,所述方法包括向基底施加权利要求1-20任一项的荧光标志物,并在执行荧光显微术时检测来自所述荧光标志物的荧光。

25. 权利要求24的方法,其中所述固体基底是载玻片。

26. 权利要求24或25的方法,其还包括向同一基底或不同基底施加荧光样品,并在执行荧光显微术时检测来自所述样品的荧光。

27. 权利要求26的方法,其中所述标志物的荧光标记物与所述样品的荧光标记物相同。

28. 权利要求26的方法,其中所述标志物的荧光标记物与所述样品的荧光标记物不同。

29. 一种融合蛋白,其包含与荧光蛋白的氨基酸序列相融合的与微管结合的径向辐条蛋白(RSP)的氨基酸序列。

30. 权利要求29的融合蛋白,其中所述荧光蛋白的氨基酸序列被融合到所述RSP的氨基酸序列的C-端。

31. 权利要求29或30的融合蛋白,其中所述荧光蛋白是绿色荧光蛋白(GFP)、mNeonGreen蛋白(NG)或其荧光变体。

32. 权利要求29-31任一项的融合蛋白,其中所述RSP是组装在微管结构中的径向辐条蛋白3(RSP3)或其变体。

33. 权利要求32的融合蛋白,其中所述RSP3包含SEQ ID NO:1或其变体的氨基酸序列,所述变体与SEQ ID NO:1具有至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性。

34. 权利要求29-33任一项的融合蛋白,其中所述荧光蛋白包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5或其变体的氨基酸序列,所述变体与SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5具有至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性。

35. 权利要求29-34任一项的融合蛋白,其中所述融合蛋白包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

36. 一种融合蛋白,其包含与结合到荧光标记物的衔接蛋白的氨基酸序列相融合的径向辐条蛋白(RSP)的氨基酸序列。

37. 一种多核苷酸,其编码权利要求29-36任一项的融合蛋白的氨基酸序列。

38. 一种表达载体,其包含可操作连接到启动子的权利要求37的多核苷酸。

39. 一种分离的细胞,其包含权利要求38的表达载体。

40. 权利要求39的分离的细胞,其中所述分离的细胞是原核细胞。

定量鞭毛荧光标志物和标准品

[0001] 与相关专利申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2016年3月24日提交的美国临时申请号62/312,772在35U.S.C. §119(e)下的优先权利益,所述美国临时申请的内容通过引用以整体并入本文。

背景技术

[0003] 本发明涉及可以在荧光显微术中有用的荧光标志物和标准品。具体来说,本发明涉及可以在荧光显微术中有用的荧光标记的鞭毛。

[0004] 在各种不同的生物学方法中,生物分子标志物是有价值的工具。例如,DNA或蛋白质标志物对于在凝胶电泳这种生物医学科学中的常用操作中估算相应分子的尺寸和丰度来说,是不可缺少的。不幸的是,在执行荧光显微术这种在研究和诊断中使用的非常常见的方法时,没有等效的标志物可用于容易地估算目标分子的数目。

[0005] 在这里,我们公开了可以在荧光显微术中用作生物分子标志物的荧光鞭毛。所述荧光鞭毛通常包括以已知的周期性存在于所述荧光鞭毛中的重组荧光蛋白,换句话说,每单位长度的鞭毛具有已知数目的重组荧光蛋白。因此,在荧光鞭毛中,所述重组荧光蛋白具有已知的化学计量,使得可以测量来自于所述鞭毛的荧光并且可以容易地确定每个重组荧光蛋白的相对荧光。通过将所述荧光鞭毛的荧光与荧光标记的样品分子的荧光进行比较,可以相当容易地定量荧光标记的样品分子的数目。因此,所公开的荧光鞭毛在荧光测定法中可用作标志物标准品。

发明内容

[0006] 本文公开了荧光标志物。所公开的荧光标志物可以在荧光显微术中使用,以便定量荧光标记的样品或以其他方式评估荧光标记的样品。

[0007] 所公开的荧光标志物通常包含管状或圆柱状生物结构,其维度使所述荧光标志物适合用于荧光显微术。所述荧光标志物的生物结构可以包括但不限于蛋白质微管或包含蛋白质微管的宏观结构,如二联微管、轴丝或鞭毛(例如真核鞭毛)。

[0008] 所公开的荧光标志物的生物结构通常由至少一种结构蛋白(SP)的多个拷贝形成。例如,所述结构蛋白的多个拷贝可以彼此非共价地结合或组装,以形成所述生物结构,所述生物结构可具有螺旋构象。形成所述生物结构的适合的结构蛋白可以包括微管蛋白例如 α -微管蛋白、 β -微管蛋白或其组合例如异二聚体。

[0009] 所述荧光标志物的生物结构包含荧光标记的蛋白质(FP)的多个拷贝。所述荧光蛋白沿着所述生物结构的长度有规律地散布,因此可以说所述荧光蛋白在所述生物结构中表现出周期性。由于所述荧光蛋白沿着所述生物结构的长度有规律地散布,因此所述生物结构具有每单位长度的所述生物结构已知化学计量的荧光蛋白,并且通过测量所述生物结构的长度,可以估算所述结构中存在的荧光蛋白的数目。此外,可以测量所述荧光标志物的荧光强度并且可以计算每个荧光蛋白的强度。

[0010] 所述荧光标记的蛋白质可以包含融合蛋白、由融合蛋白构成或基本上由融合蛋白

构成,所述融合蛋白包含荧光蛋白部分和与所述生物结构结合或在所述生物结构中组装所述融合蛋白的部分。所述融合蛋白的与所述生物结构结合或在所述生物结构中组装所述融合蛋白的部分,可以被称为所述融合蛋白的锚部分,其中该锚部分将所述荧光蛋白部分锚定到所述生物结构。所述荧光蛋白部分被直接地或通过肽连接物融合到所述锚部分,并且所述荧光蛋白部分可以被融合到所述锚部分的C-端、N-端或任何位置。

[0011] 用于所述生物结构的融合蛋白,例如作为所述融合蛋白的锚部分的适合的蛋白质或其变体,可以包括与微管结合的径向辐条(RS)蛋白或其变体,例如在所述生物结构是微管或包含微管和二联微管的宏观结构例如轴丝或鞭毛的情况下。适合的RS蛋白可以包括径向辐条蛋白3(RSP3)。用于所述生物结构的融合蛋白,例如作为所述融合蛋白的荧光蛋白部分的适合的蛋白质或其变体,可以包括但不限于绿色荧光蛋白(GFP)、增强绿色荧光蛋白(EGFP)、mNeonGreen蛋白(NG)、增强蓝色荧光蛋白(EBFP)、mCherry荧光蛋白、tdTomato荧光蛋白、增强蓝绿色荧光蛋白(ECFP)、Midoriishi-Cyan1蛋白、AmCyan1蛋白、Azami-Green蛋白、mAzami-Green1蛋白、ZsGreen1、增强黄色荧光蛋白(EYFP)、Venus蛋白、ZsYellow蛋白、Kusabira-Orange1蛋白和mKusabira-Orange1蛋白。正如指明的,本文中公开的融合蛋白可以包含与荧光蛋白或其变体的氨基酸序列相融合的鞭毛的径向辐条蛋白(RSP)或其变体的氨基酸序列。

[0012] 代替荧光蛋白部分,所公开的融合蛋白可以包含融合到衔接蛋白或衔接蛋白的一部分(即“衔接部分”)的锚部分,其中所述融合蛋白的衔接部分结合到荧光团标记物。适合的衔接蛋白可以包括生物素化的多肽,其结合到可包括非蛋白质荧光团标记物的链亲合素偶联的荧光团标记物。因此,所公开的荧光标记的融合蛋白可包含融合到生物素化的衔接多肽的锚部分,所述生物素化的衔接多肽结合到链亲合素偶联的荧光团标记物。

[0013] 本文中还想想了编码本文中公开的融合蛋白的氨基酸序列的多核苷酸。所述多核苷酸可被可操作连接到启动子,例如在表达载体内。还想想了分离的细胞,其包含表达所述融合蛋白的表达载体。可以培养所述分离的细胞以便生产所述融合蛋白和/或包含所述融合蛋白的生物结构,例如在本文中公开的荧光标志物包含所述生物结构的情况下。

[0014] 所公开的荧光标志物可以任选地被固定在固体基底例如可以在荧光显微术中使用的显微镜载玻片上。因此,本文中还想想了用于执行荧光显微术的方法。所述方法利用本文中公开的荧光标志物,并且可以包括在执行荧光显微术时检测来自于所述荧光标志物或来自于其上固定有所述荧光标志物的固体基底的荧光,和/或对所述荧光标志物进行成像的步骤。

[0015] 在所公开的用于执行荧光显微术的方法中,可以将所公开的荧光标志物施加到固体基底例如显微镜载玻片。随后,可以在执行荧光显微术之前将荧光标记的样品施加到所述载玻片。然后可以检测来自于所述荧光标志物的荧光和/或可以将所述荧光标志物成像。然后,同时或不同时地,可以在执行荧光显微术时检测来自于所述荧光标记的样品的荧光和/或可以将所述荧光标记的样品成像。在所述用于执行荧光显微术的方法中,所述标志物的荧光标记物可以与所述样品的荧光标记物相同或不同。所述荧光标志物可以与所述荧光标记的样品分开成像,和/或所述荧光标志物可以与所述荧光标记的样品一起成像。

附图说明

[0016] 图1. 衣藻(*Chlamydomonas*)鞭毛中的9+2轴丝。(A、B)轴丝的横截面和纵断面。径向辐条(白色箭头)被锚定到9个外部双联管中的每一个,并且呈现为每96nm一对。(C)每个径向辐条含有两个RSP3,其C-端靠近辐条头部区域。96nm重复单元的数字演示源自于具有RSP3(左,EM数据库ID,5845;Oda等,2014)和具有RSP3-链亲合素(右,EM数据库ID,5847)的鞭毛的低温电子断层扫描图。箭头,链亲合素标签。标尺条,100nm。

[0017] 图2.RSP3-NG鞭毛比RSP3-GFP鞭毛更亮。(A)鞭毛中RSP3-FP丰度的蛋白质印迹分析。鞭毛样品从野生型(WT)、pf14(RSP3突变体)和表达RSP3-NG或RSP3-GFP转基因的pf14细胞收获。探测所述印迹的RSP3和IC78,外部动力蛋白臂亚基作为载样对照。(B)RSP3-NG(左)和RSP3-GFP(右)转基因细胞的活细胞荧光显微术。箭头,鞭毛。(C)在不带有(上图)和带有背景减除的图像中RSP3-NG和RSP3-GFP鞭毛的荧光强度比较。在显微术之前将细胞混合在一起。测量代表性区域(箭头)的强度并跨过所指示的区域将其作图为强度分布图。标尺条,10 μ m。

[0018] 图3.具有RSP3-NG的鞭毛的荧光强度的定量。(A)各个RSP3-NG鞭毛具有相近的强度。使用imageJ程序横跨中间区(上图)测量每个鞭毛。相对强度被作图于图中(下图,左)。最高强度的平均值被呈现在柱状图(下图,右)中。(B)交叠区的强度接近于非交叠区的两倍。测量了横跨交叠(箭头,上图)区和附近的非交叠区的范围。将峰值强度(左下图)和平均值(右下图)作图于柱状图中。灰色,交叠区;蓝色,非交叠区。标尺条,10 μ m。

[0019] 图4.具有RSP3-NG的外部双联管的荧光强度。(A)附着于聚L-赖氨酸包被的载玻片的展开的RSP3-NG鞭毛。展开通过来自于轻柔地前后移动盖玻片的剪切力引起(上图)。将一部分展开的鞭毛(带框区域)放大(下图)。测量用彩色线标注的3个区域。红色,3个子纤维;橙色,2个子纤维;蓝色,完整区域(中图)。测量相对强度并将其呈现为分布图(下图)。(B)通过未附连的RSP3-NG鞭毛的剪切产生的荧光粒子(上图)。将部分展开的鞭毛和片段化粒子(带框区域)放大(中图)。测量3个区域处的相对强度并作图(下图)。蓝色箭头,完整区域;红色箭头,展开的子纤维;绿色箭头,小粒子。标尺条,5 μ m。

[0020] 图5.在甲醇固定后NG保留荧光,尽管强度降低。(A)使用或不使用甲醇处理的RSP3-NG鞭毛。将固定在聚L-赖氨酸包被的载玻片上的RSP3-NG鞭毛首先用-20 $^{\circ}$ C的甲醇固定。在恢复水分并添加未固定的鞭毛后获取荧光图像(上图)。测量区域的相对强度(中图)和平均值(下图)。蓝色,未固定的;红色,固定的;箭头和灰色,固定的鞭毛中的交叠区。(B)表达EB1-NG的WT细胞。将固定在聚L-赖氨酸包被的载玻片上的细胞首先用甲醇固定。在恢复水分并添加活细胞后获取荧光图像(左图)。在固定的细胞中EB1-NG彗星具有相似的带斑点头部(橙色箭头),不论曝光时间是1秒还是10秒。相反,由于生长中的微管的延长,活细胞中的彗星(蓝色箭头)在10秒曝光后显得更长。测量所述标记的彗星的相对强度(右图)。标尺条,10 μ m。

[0021] 图6.将RSP3-NG鞭毛用作荧光强度标准品。(A、B)RSP3-NG鞭毛与鞭毛顶端处的EB1-NG和细胞体中的EB1-NG彗星的比较。将表达RSP3-NG或EB1-NG的细胞粘附到载玻片以在相同的焦平面处成像鞭毛中的荧光(A)。为了测量细胞体中的彗星,在图像获取之前将EB1-NG细胞与分离的RSP3-NG鞭毛混合(B)。相应的强度测量值作图于右图中。蓝色,RSP3-NG;红色EB1-NG。(C、D)分离的RSP3-NG鞭毛与表达靶向线粒体的COX4-GFP或胞质溶胶中的Sis1-GFP的酵母菌株的比较。COX4-GFP装饰线粒体管(C中的绿色和红色箭头)。荧光强度分

布显示出对于一个细胞来说Cox4-GFP的强度与RSP3-NG鞭毛的强度相近,对于另一个细胞来说更强超过2X。一部分Sis1-GFP富集在斑点中(D中的红色圆圈)。将斑点(红色圆圈)的平均强度(总强度/所选区域的面积)与10个RSP3-NG鞭毛的2- μ m区段(蓝色矩形)的平均强度进行比较。峰值强度的平均值作图于柱状图中。

[0022] 图7. 荧光鞭毛的多样化。目前的荧光鞭毛来自于表达RSP3-GFP或RSP3-NeonGreen的藻类菌株。对于多样化来说,一种方式是切换到不同颜色的荧光蛋白例如mCherry或tdTomato,或切换到SNAP标签蛋白,其可以通过化学反应偶联到荧光化合物例如Alexa 488。目前的DNA构建物被设计用于容易地切换蛋白标签。SNAP标签允许客户制作他们自己的标准品。或者,荧光载体RSP3可以被切换到不同的鞭毛蛋白。这将允许我们产生更亮或具有至少2个的鞭毛。

[0023] 详细描述

[0024] 本文中公开的主题内容使用如下文和整个本申请中阐述的几个定义来描述。

[0025] 除非另有注明,否则本文中使用的术语应该按照相关领域普通技术人员的惯常用法来理解。除了下文中提供的术语定义之外,应该理解,当在说明书、实施方式和权利要求书中使用时,取决于使用指称的上下文,没有具体数目的指称可以意味着一个或多个。例如,术语“鞭毛”应该被解释为意味着“一个或多个鞭毛”。

[0026] 当在本文中使用时,“约”、“大约”、“实质上”和“显著地”将被本领域普通技术人员所理解,并且将在一定程度上根据使用它们的上下文而变化。如果对于本领域普通技术人员来说,这些术语的使用在使用它们的上下文中不清楚,则“约”和“大约”将意味着所述特定术语的加或减 $\leq 10\%$,并且“实质上”和“显著地”将意味着所述特定术语的加或减 $> 10\%$ 。

[0027] 当在本文中使用时,术语“包括”具有与术语“包含”相同的意义。术语“包含”应该被解释为是“开放性”过渡术语,其允许在权利要求中叙述的那些组分之外还包含其他组分。术语“由……构成”应该被解释为是“封闭性”过渡术语,其不允许包含在权利要求中叙述的组分之外的其他组分。术语“本质上由……构成”应该被解释为是部分封闭的,并仅允许包含不根本性改变所要求保护的主体内容的本质的其他组分。

[0028] 当在本文中使用时,术语“蛋白质”、“多肽”和“肽”是指包含通过酰胺键连接的氨基酸残基的聚合物的生物分子。术语“氨基酸残基”包括但不限于在由丙氨酸(Ala或A)、半胱氨酸(Cys或C)、天冬氨酸(Asp或D)、谷氨酸(Glu或E)、苯丙氨酸(Phe或F)、甘氨酸(Gly或G)、组氨酸(His或H)、异亮氨酸(Ile或I)、赖氨酸(Lys或K)、亮氨酸(Leu或L)、甲硫氨酸(Met或M)、天冬酰胺(Asn或N)、脯氨酸(Pro或P)、谷氨酰胺(Gln或Q)、精氨酸(Arg或R)、丝氨酸(Ser或S)、苏氨酸(Thr或T)、缬氨酸(Val或V)、色氨酸(Trp或W)和酪氨酸(Tyr或Y)残基构成的组中所包含的氨基酸残基。术语“氨基酸残基”也可以包括在由高半胱氨酸、2-氨基己二酸、N-乙基天冬酰胺、3-氨基己二酸、羟赖氨酸、 β -丙氨酸、 β -氨基-丙酸、别羟赖氨酸、2-氨基丁酸、3-羟脯氨酸、4-氨基丁酸、4-羟脯氨酸、哌啶酸、6-氨基己酸、异锁链素、2-氨基庚酸、别异亮氨酸、2-氨基异丁酸、N-甲基甘氨酸、肌氨酸、3-氨基异丁酸、N-甲基异亮氨酸、2-氨基庚二酸、6-N-甲基赖氨酸、2,4-二氨基丁酸、N-甲基缬氨酸、锁链素、正缬氨酸、2,2'-二氨基庚二酸、正亮氨酸、2,3-二氨基丙酸、鸟氨酸和N-乙基甘氨酸构成的组中所包含的氨基酸残基。通常,肽的酰胺键从一个氨基酸的骨架的氨基和另一个氨基酸的骨架的羧基形成。

[0029] 当在本文中使用时,“蛋白质”或“多肽”被定义为与“肽”相比相对长的氨基酸聚合

物。蛋白质或多肽通常具有超过50、60、70、80、90或100个氨基酸的氨基酸长度，而“肽”被定义为长度通常为50、40、30、20个或更少氨基酸的短的氨基酸聚合物 (Garrett&Grisham,《生物化学》(Biochemistry),第二版,1999,Brooks/Cole,110)。

[0030] 本文中考虑的蛋白质、多肽或肽可以被进一步修饰以包含非氨基酸组成部分。修饰可以包括但不限于酰化(例如O-酰化(酯)、N-酰化(酰胺)、S-酰化(硫酯))、乙酰化(例如在蛋白质的N-端处或在赖氨酸残基处添加乙酰基)、甲酰化、脂化(例如附连硫辛酸——一种C8官能团)、肉豆蔻酰化(例如附连肉豆蔻酸——一种C14饱和酸)、棕榈酰化(例如附连棕榈酸——一种C16饱和酸)、烷基化(例如在赖氨酸或精氨酸残基处添加烷基例如甲基)、异戊二烯化或戊二烯化(例如添加类异戊二烯基团例如法尼醇或香叶基香叶醇)、C-端处的酰胺化、糖基化(例如向天冬酰胺、羟赖氨酸、丝氨酸或苏氨酸添加糖基,产生糖蛋白)。不同于被视为糖类的非酶促附连的糖化、多唾液酸化(例如添加多唾液酸)、糖基磷脂酰肌醇化(例如糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚形成)、羟基化、碘化(例如甲状腺激素的碘化)和磷酸化(例如通常向丝氨酸、酪氨酸、苏氨酸或组氨酸添加磷酸基团)。

[0031] 本文中还可能考虑了所公开的蛋白质、多肽和肽的变体。当在本文中使用时,“变体”是指具有与参比蛋白质、多肽或肽分子不同的氨基酸序列的蛋白质、多肽或肽分子。相对于参比蛋白质、多肽或肽,变体可以具有氨基酸残基的一个或多个插入、缺失或替换。变体可包括参比蛋白质、多肽或肽的片段。例如,参比蛋白质、多肽或肽可包含SEQ ID NO:1-7的氨基酸序列的任一项、由所述氨基酸序列构成或基本上由所述氨基酸序列构成。相对于被呈现为SEQ ID NO:1的RSP3全长多肽,RSP3变体分子具有至少一个氨基酸残基的一个或多个插入、缺失或替换。

[0032] “缺失”是指氨基酸的变化,其导致相对于参比蛋白质、多肽或肽缺少一个或多个氨基酸残基。相对于参比蛋白质、多肽或肽,缺失移除至少1、2、3、4、5、10、20、50、100、200或更多个氨基酸残基。缺失可以包括内部缺失或末端缺失(例如参比多肽的N-端截短、C-端截短或两者)。

[0033] “片段”是氨基酸序列的一部分,其在序列上与参比序列一致,但长度更短。片段可包含多达所述参比序列的整个长度减去至少一个氨基酸残基。例如,片段可分别包含参比多肽的5至1000个毗连氨基酸残基。在某些实施方式中,片段可包含参比多肽的至少5、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、150、250或500个毗连氨基酸残基。片段可优先地选自分子的某些区域。术语“至少片段”涵盖了全长多肽。片段可包括相对于全长(即相对于SEQ ID NO:1-7的任一者)的N-端截短、C-端截短或两者。RSP3的片段可包含RSP3的毗连氨基酸序列或基本上由RSP3的毗连氨基酸序列构成。

[0034] 短语“插入”和“添加”是指引起一个或多个氨基酸残基的添加的氨基酸序列变化。插入或添加可以是指1、2、3、4、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200或更多个氨基酸残基。

[0035] 本文中还可能考虑了融合蛋白。“融合蛋白”是指通过至少一个本文中所公开的第一蛋白与本文中所公开的第二异源蛋白或其变体(例如GFP或NG)的至少一个分子的融合而形成的蛋白。所述异源蛋白可以被融合在所述第一蛋白的N-端、C-端或两端。融合蛋白包含所述第一蛋白的至少片段或变体和所述第二异源蛋白的至少片段或变体,它们优选地通过基因融合彼此结合(即所述融合蛋白通过其中编码所述第一蛋白的全部或一部分的多核苷酸与

编码所述第二异源蛋白的全部或一部分的多核苷酸同框连接的核酸的翻译而产生)。所述第一蛋白和第二异源蛋白一旦成为所述融合蛋白的部分之后,可以各自在本文中被称为所述融合蛋白的“部分”、“区”或“组成部分”(例如“蛋白质部分”,其可包括RSP3或其变体,或“第二异源蛋白部分”,其可包括荧光蛋白或其变体)。

[0036] “同源性”是指两个或更多个多肽序列之间的序列相似性或可互换地序列同一性。同源性、序列相似性和序列同一性百分比可以使用本领域和本文中描述的方法来确定。

[0037] 短语“同一性百分比”和“同一性%”当应用于多肽序列时,是指使用标准化算法比对的至少两个多肽序列之间的残基匹配百分率。多肽序列比对的方法是公知的。一些比对方法将保守氨基酸替换考虑在内。这些在上文更详细解释的保守替换通常在替换位点处保留电荷和疏水性,从而保留所述多肽的结构(以及因此功能)。对于氨基酸序列来说,同一性百分比可以如本领域中所理解的来确定。(参见例如美国专利号7,396,664,其通过引用以整体并入本文)。一系列常用且可免费获得的序列比较算法由国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)(NCBI)局部序列比对检索基本工具(Basic Local Alignment Search Tool)(BLAST)提供(Altschul,S.F.等,(1990) *J.Mol.Biol.*215:403-410),其可以从若干来源获得,包括NCBI,Bethesda,Md.的网站。所述BLAST软件套装包括各种不同的序列分析程序,包括用于将已知氨基酸序列与来自于各种不同数据库的其他氨基酸序列进行比对的“blastp”。

[0038] 同一性百分比可以在整个确定的多肽序列、例如由特定SEQ ID编号所确定的序列的长度内测量,或者可以在较短长度内测量,例如在从较大的确定的多肽序列获取的片段,例如至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少70或至少150个毗连残基的片段的长度内。这些长度仅仅是示例性的,并且应该理解,由本文在表、图或序列列表中示出的序列所支持的任何片段长度,都可用于描述可以在其内测量同一性百分比的长度。

[0039] 特定多肽序列的“变体”,可以被定义为使用可以在国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)的网站处获得的“BLAST 2Sequences”工具的blastp,在多肽序列之一的一定长度内与所述特定多肽序列具有至少50%序列同一性的多肽序列。(参见Tatiana A.Tatusova,Thomas L.Madden(1999),“BLAST 2Sequences——一种用于比较蛋白质和核苷酸序列的新工具”(BLAST 2Sequences—a new tool for comparing protein and nucleotide sequences),*FEMS Microbiol Lett.*174:247-250)。这样的一对多肽可在所述多肽之一的某个确定长度内显示出例如至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%或更高的序列同一性。“变体”可具有与参比多肽基本上相同的功能活性。例如,变体可表现出与PEDF相关的或更多生物活性。本文中考虑了“基本上分离的或纯化的”核酸或氨基酸序列。术语“基本上分离的或纯化的”是指从其天然环境移除的核酸或氨基酸序列,并且至少不含60%、优选地至少不含75%、更优选地至少不含90%、甚至更优选地至少不含95%的在天然情况下与其相伴的其他组分。

[0040] 本文中考虑的氨基酸序列或蛋白质、多肽和肽可包括相对于参比氨基酸序列的保守氨基酸替换。例如,变体、突变体或衍生肽可包括相对于参比分子的保守氨基酸替换。“保守氨基酸替换”是那些将氨基酸替换成不同氨基酸的替换,其中所述替换预计对所述参比多肽的性质干扰极小。换句话说,保守氨基酸替换基本上保留所述参比多肽的结构和功能。

下表提供了本文中考虑的示例性保守氨基酸替换的列表：

原始残基	保守替换
Ala	Gly, Ser
Arg	His, Lys
Asn	Asp, Glu, His
Asp	Asn, Glu
Cys	Ala, Ser
Gln	Asn, Glu, His
Glu	Asp, Glu, His
Gly	Ala
[0041] His	Asn, Arg, Glu, Lys
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Glu, Lys
Met	Leu, Ile
Phe	His, Met, Leu, Trp, Tyr
Ser	Cys, Thr
Thr	Ser, Val
Trp	Phe, Tyr
Tyr	His, Phe, Trp
Val	Ile, Leu, Thr

[0042] 保守氨基酸替换通常维持 (a) 多肽骨架在所述替换区域中的结构, 例如作为 β 折叠或 α 螺旋构象, (b) 分子在所述替换位点处的电荷或疏水性, 和/或 (c) 侧链的体积。

[0043] 所公开的蛋白质、多肽、肽或其变体可具有参比多肽表现出的一种或多种功能或生物活性(例如由RSP3表现出的一种或多种功能或生物活性)。例如, 变体蛋白例如片段可表现出与参比蛋白例如RSP3、GFP或NG相关的一种或多种生物活性。RSP3的变体可表现出与RSP3相关的一种或多种生物活性, 包括但不限于二聚化和与微管和轴丝的结合。

[0044] 本文中公开了多核苷酸, 例如编码本文中公开的多肽或蛋白质的多核苷酸序列(例如编码具有SEQ ID NO:1-7任一者的氨基酸序列的多肽的DNA, 或编码与SEQ ID NO:1-7任一者具有至少约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列的多肽变体的DNA)。

[0045] 术语“多核苷酸”、“多核苷酸序列”、“核酸”和“核酸序列”是指核苷酸、寡核苷酸、多核苷酸(所述术语可以互换使用)或其任何片段。这些短语也指称基因组、天然或合成来源的DNA或RNA(其可是单链或双链的, 并且可代表有义链或反义链)。

[0046] 对于多核苷酸序列而言, 术语“同一性百分比”和“同一性%”是指使用标准化算法比对的至少两个多核苷酸序列之间的残基匹配百分率。这种算法可以以标准化和可重复的方式在待比较的序列中插入间隙, 以便优化两个序列之间的比对, 并因此实现所述两个序列的更加有意义的比较。对于核酸序列来说, 同一性百分比可以如本领域中所理解的来确定。(参见例如美国专利号7,396,664, 其通过引用以整体并入本文)。一系列常用且可免费获得的序列比较算法由国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)(NCBI)局部序列比对检索基本工具(Basic Local Alignment Search Tool)(BLAST)提供, 其可以从若干来源获得, 包括NCBI, Bethesda, Md. 的网站。所述BLAST软件套装包括各种不同的序列分析程序, 包括用于将已知多核苷酸序列与来自于各种不同数据库的其他多核苷酸序列进行比对的“blastn”。也可以使用被称为“BLAST 2Sequences”的工具, 其被用于两个核苷酸序列的直接成对比较。“BLAST 2Sequences”可以在NCBI网站处进

入并交互式使用。“BLAST 2Sequences”工具可用于blastn和blastp(上文讨论的)两者。

[0047] 对于多核苷酸序列来说,同一性百分比可以在整个确定的多核苷酸序列、例如由特定SEQ ID编号所确定的序列的长度内测量,或者可以在较短长度内测量,例如在从较大的确定的序列获取的片段的长度内。这些长度仅仅是示例性的,并且应该理解,由本文在表、图或序列表中示出的序列所支持的任何片段长度,都可用于描述可以在其内测量同一性百分比的长度。

[0048] 对于多核苷酸序列来说,“变体”、“突变体”或“衍生物”可以被定义为使用可以在国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)的网站处获得的“BLAST 2Sequences”工具的blastn,在核酸序列之一的一定长度内与所述特定核酸序列具有至少50%序列同一性的核酸序列。(参见Tatiana A.Tatusova,Thomas L.Madden(1999),“BLAST 2Sequences——一种用于比较蛋白质和核苷酸序列的新工具”(BLAST 2Sequences—a new tool for comparing protein and nucleotide sequences),FEMS Microbiol Lett.174:247-250)。这样的一对核酸可在某个确定长度内显示出例如至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%或更高的序列同一性。

[0049] 然而,未显示出高度同一性的核酸序列可能编码相似的氨基酸序列,这是由遗传密码的简并性造成的,其中多种密码子可编码单一氨基酸。应该理解,可以使用这种简并性来制造核酸序列变化,以产生全部都基本上编码同一蛋白质的多种核酸序列。例如,本文中考虑的多核苷酸序列可编码蛋白质,并且可以被密码子优化用于在特定宿主中表达。在本领域中,已为大量宿主生物体包括人、小鼠、大鼠、猪、大肠杆菌、植物和其他宿主细胞准备了密码子使用频率表。

[0050] “重组核酸”是非天然存在的序列,或具有通过两个或更多个原本分开的序列区段的人工合并而制造的序列。这种人工合并通常通过化学合成或更通常地通过分离的核酸区段的人工操作,例如通过本领域中已知的基因工程技术来实现。术语重组体包括单单通过一部分核酸的添加、替换或缺失而改变的核酸。通常,重组核酸可以包括可操作连接到启动子序列的核酸序列。这种重组核酸可以是载体的一部分,所述载体被用于例如转化细胞。

[0051] 本文中公开的核酸可以是“基本上分离或纯化的”。术语“基本上分离或纯化的”是指从其天然环境取出的核酸,并且至少不含60%、优选地至少不含75%、更优选地至少不含90%、甚至更优选地至少不含95%的在天然情况下与其相伴的其他组分。

[0052] “转化”或“转染”描述了用于将外源核酸(例如DNA或RNA)引入到受体细胞中的过程。转化或转染可以按照本领域中公知的各种不同方法,在天然或人工条件下进行,并且可以依赖于用于将外来核酸序列插入到原核或真核宿主细胞中的任何已知方法。用于转化或转染的方法在待转化的宿主细胞类型的基础上选择,并且可以包括但不限于噬菌体或病毒感染或非病毒递送。核酸的非病毒递送的方法包括脂转染、核转染、显微注射、电穿孔、热冲击、粒子轰击、基因枪、病毒体、脂质体、免疫脂质体、聚阳离子或脂类;核酸缀合物、裸DNA、人造毒粒和药剂增强的DNA摄入。脂转染被描述在例如美国专利号5,049,386、4,946,787和4,897,355中,并且脂转染试剂可以商购(例如Transfectam.TM.和Lipofectin.TM.)。适用

于多核苷酸的高效受体识别脂转染的阳离子和中性脂类包括Felgner、WO 91/17424、WO 91/16024的脂类。可以递送到细胞(例如体外或离体给药)或靶组织(例如体内给药)。术语“转化的细胞”或“转染的细胞”包括稳定地转化或转染的细胞,其中插入的DNA能够作为自主复制的质粒或作为宿主染色体的一部分复制,以及瞬时转化或转染的细胞,其在有限的时间段内表达插入的DNA或RNA。

[0053] 本文中考虑的多核苷酸序列可存在于表达载体中。例如,所述载体可包含:(a) 编码蛋白质的ORF的多核苷酸;(b) 表达指导靶DNA序列的RNA介导的结合、缺刻和/或切割的RNA的多核苷酸;和(a)与(b)两者。存在于所述载体中的多核苷酸可以被可操作连接到原核或真核启动子。“可操作连接”是指将第一核酸序列放置成与第二核酸序列具有功能关系的情况。例如,如果启动子影响编码序列的转录或表达,则所述启动子被可操作连接到所述编码序列。可操作连接的DNA序列可以近邻或毗邻,并且在需要将两个蛋白质编码区连接的情况下,在同一阅读框中。本文中考虑的载体可包含可操作连接到编码蛋白质的多核苷酸的异源启动子(例如真核或原核启动子)。“异源启动子”是指对于待表达的蛋白质或RNA来说不是本源或内源启动子的启动子。

[0054] 当在本文中使用时,“表达”是指用于从DNA模板转录多核苷酸(例如转录成mRNA或其他RNA转录本)的过程和/或用于随后将转录的mRNA翻译成肽、多肽或蛋白质的过程。转录本和编码的多肽可以被合称为“基因产物”。如果所述多核苷酸源自于基因组DNA,则表达可包括真核细胞中mRNA的剪接。

[0055] 术语“载体”是指可用于将核酸(例如DNA)引入到宿主生物体或宿主组织中的一些手段。存在各种不同类型的载体,包括质粒载体、噬菌体载体、粘粒载体、细菌载体和病毒载体。当在本文中使用时,“载体”可以是指已被工程化改造以表达异源多肽(例如本文中公开的融合蛋白)的重组核酸。所述重组核酸通常包括用于表达所述异源多肽的顺式作用元件。

[0056] 用于在真核细胞中表达的任何常规载体,可用于将DNA直接引入到对象中。含有来自于真核病毒的调控元件的表达载体,可用于真核表达载体中(例如含有SV40、CMV或反转录病毒的启动子或增强子的载体)。示例性载体包括在诸如SV40早期启动子、SV40晚期启动子、金属硫蛋白启动子、人细胞肥大病毒启动子、鼠乳腺肿瘤病毒启动子和劳斯肉瘤病毒启动子的启动子的指导之下表达蛋白质的那些载体。本文中考虑的表达载体可以包括调节异源蛋白(例如本文中公开的融合蛋白)的表的真核或原核控制序列。原核表达控制序列可以包括组成型或诱导型启动子(例如T3、T7、Lac、trp或phoA)、核糖体结合位点或转录终止子。

[0057] 本文中考虑的载体可以被引入到原核生物中并在其中繁殖,所述原核生物可用于扩增待引入到真核细胞中的载体的拷贝,或者在待引入到真核细胞中的载体的生产中用作中间载体(例如扩增作为病毒载体包装系统的一部分的质粒)。原核生物可用于扩增载体的拷贝并表达一种或多种核酸,以例如提供用于递送到宿主细胞或宿主生物体的一种或多种蛋白质的来源。蛋白质在原核生物中的表达可以使用带有载体的大肠埃希氏杆菌来进行,所述载体含有指导蛋白质或包含蛋白质或其片段的融合蛋白的表的组成型或诱导型启动子。融合载体向其中编码的蛋白质、例如向所述重组蛋白的氨基端添加多个氨基酸。这些融合载体可用于一种或多种目的,例如:(i) 提高重组蛋白的表达;(ii) 提高重组蛋白的溶解性;(iii) 通过在亲和纯化中起到配体的作用(例如His标签)来协助所述重组蛋白的纯

化；(iv) 标记所述重组蛋白以备识别（例如绿色荧光蛋白 (GFP) 或可以被经标记的抗体识别的抗原（例如HA））；(v) 促进所述重组蛋白定位到细胞的特定区域（例如在所述蛋白质被融合（例如在其N-端或C-端）到核定位信号 (NLS) 的情况下，所述核定位信号可包括SV40的NLS、核质蛋白、C-myc、hnRNP A1的M9结构域或合成的NLS）。中性和酸性氨基酸在NLS中的重要性已被研究（参见Makkerh等，(1996), Curr Biol 6(8):1025-1027）。通常，在融合表达载体中，在融合组成部分与重组蛋白的结合部引入蛋白水解切割位点，以便能够在所述融合蛋白纯化后将重组蛋白与所述融合组成部分分开。这些酶和它们的同源识别序列包括因子Xa、凝血酶和肠激酶。

[0058] 说明性实施方式

[0059] 下面的实施方式是说明性的，并且不应被解释为限制所要求保护的发明的范围。

[0060] 本文公开了荧光标志物。所公开的荧光标志物可用于荧光显微术，以便定量荧光标记的样品或以其他方式评估荧光标记的样品。

[0061] 所公开的荧光标志物通常包含管状或圆柱状生物结构。通常，所述荧光标志物的生物结构具有使所述荧光标志物适合用于荧光显微术的维度。在某些实施方式中，所述生物结构具有小于约任一下述值的长度：2mm, 1mm, 0.5mm, 0.2mm, 0.1mm, 0.05mm, 0.02mm, 0.01mm, 0.005mm, 0.002mm或更小；和/或所述生物结构具有大于约下述值的长度：0.001mm, 0.002mm, 0.005mm, 0.01mm, 0.02mm, 0.05mm, 0.1mm, 0.2mm, 0.5mm或1mm；或者所述生物结构可以具有在由任何这些值中的两个所限定的范围之内的长度。所述荧光标志物的生物结构通常具有明显大于其直径 (D) 的长度 (L)，例如其中比率L/D通常大于约下述值：5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500, 1000或更大，或者所述比率L/D在由这些值中的任两个所限定的范围之内。所述标志物的生物结构通常具有小于约下述值的直径：1000nm, 500nm, 400nm, 300nm, 200nm, 100nm, 50nm, 40nm, 30nm, 20nm, 10nm；和/或所述生物结构具有大于约0.5nm、1nm、5nm或更大的直径；或者所述生物结构可以具有在由这些值中的任两个所限定的范围之内的长度，例如在20-30nm之间或100-400nm之间的长度。

[0062] 在某些实施方式中，所述生物结构是微管或包含微管的宏观结构，如二联微管、轴丝或鞭毛，例如真核鞭毛。在所公开的荧光标志物中，微管的维度可以变化，但通常所公开的标志物的微管具有小于约任一下述值的外径：100nm, 50nm, 40nm, 30nm, 20nm或10nm；和/或所述微管具有大于约任一下述值的外径：1nm, 5nm, 10nm, 20nm, 30nm, 40nm或50nm；或者所述微管具有在由这些值中的任两个所限定的范围之内的外径，例如20-30nm或大约24nm的外径。在所公开的荧光标志物，所述微管通常具有大于约下述值的长度：0.001mm, 0.002mm, 0.005mm, 0.01mm, 0.02mm, 0.05mm, 0.1mm, 0.2mm, 0.5mm或1mm；和/或所述微管可以具有小于约2mm、1mm、0.5mm、0.2mm、0.1mm、0.05mm、0.02mm、0.01mm、0.005mm或0.002mm的长度；或者所述微管可以具有在由任何这些值中的两个所限定的范围之内的长度。

[0063] 在某些实施方式中，所述生物结构是本领域中已知的包含A-微管和B-微管的二联微管。在所公开的荧光标志物中，二联微管的维度可以变化，但通常所公开的标志物的二联微管具有小于约任一下述值的平均有效外径：100nm, 50nm, 40nm, 30nm, 20nm或10nm；和/或所述微管具有大于约任一下述值的外径：1nm, 5nm, 10nm, 20nm, 30nm, 40nm或50nm；或者所述二联微管具有在由这些值中的任两个所限定的范围之内的平均有效外径，例如20-30nm或大约24nm。在所公开的荧光标志物中，所述二联微管通常具有大于约下述值的长度：

0.001mm,0.002mm,0.005mm,0.01mm,0.02mm,0.05mm,0.1mm,0.2mm,0.5mm或1mm;和/或所述二联微管可以具有小于约2mm、1mm、0.5mm、0.2mm、0.1mm、0.05mm、0.02mm、0.01mm、0.005mm或0.002mm的长度;或者所述微管可以具有在由任何这些值中的两个所限定的范围之内的长度。

[0064] 在某些实施方式中,所述生物结构是轴丝或包含轴丝的鞭毛(例如被质膜包围的轴丝)。正如本领域中已知的,轴丝包括微管和二联微管的9+2排列。在所公开的荧光标志物中,轴丝或鞭毛的维度可以变化,但通常轴丝或鞭毛具有大于约任一下述值的直径:100nm,150nm,200nm,250nm,300nm,350nm,400nm,450nm或500nm;和/或所述轴丝或鞭毛具有小于约任一下述值的直径:500nm,450nm,400nm,350nm,300nm,250nm,200nm,150nm或100nm;或所述轴丝或鞭毛具有在由这些值中的任两个所限定的范围之内的直径,例如在100-400nm之间或约250nm的直径。在所公开的荧光标志物中,所述轴丝或鞭毛通常具有大于约下述值的长度:0.001mm,0.002mm,0.005mm,0.01mm,0.02mm,0.05mm,0.1mm,0.2mm,0.5mm或1mm;和/或所述轴丝或鞭毛可以具有小于约2mm、1mm、0.5mm、0.2mm、0.1mm、0.05mm、0.02mm、0.01mm、0.005mm或0.002mm的长度;或者所述轴丝或鞭毛可以具有在由任何这些值中的两个所限定的范围之内的长度。

[0065] 所公开的荧光标志物的生物结构通常由至少一种结构蛋白(SP)的多个拷贝形成。例如,所述结构蛋白的多个拷贝可以彼此非共价地结合或组装,以形成所述生物结构。在某些实施方式中,所述结构蛋白的多个拷贝以螺旋构象组装(例如所述螺旋的每一轮具有所述结构蛋白的13个拷贝)。适合的结构蛋白可以包括微管蛋白例如 α -微管蛋白、 β -微管蛋白或其组合例如异二聚体。所述结构蛋白可以组装以形成微管或二联微管。因此,所述生物结构可以包含微管或二联微管或包含一个或多个微管或二联微管的宏观结构,例如具有微管和二联微管的9+2构型的轴丝或包含所述轴丝的鞭毛(例如被质膜包围的轴丝)。

[0066] 所述荧光标志物的生物结构包含荧光标记的蛋白质(FP)的多个拷贝。所述荧光蛋白沿着所述生物结构的长度有规律地散布,因此,所述荧光蛋白可以被称为在所述生物结构中表现出周期性。例如,所述生物结构可以包含选自下述值的任何数目的荧光蛋白、由所述数目的荧光蛋白构成或基本上由所述数目的荧光蛋白构成:每单位长度的所述生物结构(例如每~100nm长度的所述生物结构,每96nm) 2,4,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24,26,28,30,32,34,36,38,40,42,44,46,48,50,52,54,56,58,60,62,64,66,68,70,72,74,76,78,80,82,84,86,88,90,92,94,96,98,100,102,104,106,108,110,112,114,116,118,120,122,124,126,128,130,132,134,136,138,140,142,144,146,148,150,152,154,156,158,160,162,164,166,168,170,172,174,176,178,180,182,184,186,188,190,192,194,196,198或200个荧光蛋白;或者所述生物结构可以包含每单位长度的所述生物结构在由这些值中的任两个所限定的范围之内的任何数目的荧光蛋白、由所述数目的荧光蛋白构成或基本上由所述数目的荧光蛋白构成。例如,在某些实施方式中,所述生物结构可以具有每96nm长度的所述生物结构~2个荧光蛋白(例如在所述生物结构是微管的情况下),或者所述生物结构可以具有每96nm长度的所述生物结构~4个荧光蛋白(例如在所述生物结构是二联微管的情况下),或者所述生物结构可以具有每96nm长度的所述生物结构~36个荧光蛋白(例如在所述生物结构是轴丝的情况下)。由于所述荧光蛋白沿着所述生物结构的长度有规律地散布,因此所述生物结构具有每单位长度的所述生物结构已知化学计量的荧光蛋白,并

且通过测量所述生物结构的长度,可以估算所述结构中存在的荧光蛋白的数目。

[0067] 所述荧光标记的蛋白质可以包含下述融合蛋白、由下述融合蛋白构成或基本上由下述融合蛋白构成,所述融合蛋白包含荧光蛋白部分以及结合所述生物结构或组装在所述生物结构中的部分。所述融合蛋白的结合所述生物结构或组装在所述生物结构中的部分可以被称为所述融合蛋白的锚部分,其中该锚部分将所述荧光蛋白部分锚定到所述生物结构。所述荧光蛋白部分可以融合到所述锚部分的N-端、C-端或任何位置,但通常所述荧光蛋白部分直接地或通过小于约10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸的氨基酸连接物融合在所述锚部分的C-端处。

[0068] 用于所述生物结构的融合蛋白,例如作为所述融合蛋白的锚部分的适合的蛋白质或其变体可以包括但不限于沿着微管、二联微管或轴丝的长度有规律地散布的任何蛋白质。在某些实施方式中,所述生物结构包括与微管或其变体结合的径向辐条蛋白(RS)的融合蛋白,例如,在所述生物结构是微管或包含微管和二联微管的宏观结构例如轴丝或鞭毛的情况下。适合的RS蛋白可以包括径向辐条蛋白3。莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)的RSP3的氨基酸序列被提供为SEQ ID NO:1。因此,适合用于所述融合蛋白的蛋白质可以包括SEQ ID NO:1或其变体的氨基酸序列,所述变体表现出至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性,其中优选地所述蛋白质或变体结合所述生物结构或组装在所述生物结构中。

[0069] 其他适用于所述荧光标志物的蛋白质可以包括鞭毛相关蛋白例如鞭毛相关蛋白20(FAP20)(例如,莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)的FAP20的序列被提供为SEQ ID NO:8)。例如,FAP20是可行的鞭毛蛋白载体(Yanagisawa等,2014),并且可能比RSP3丰度更高。FAP20可用于产生融合蛋白例如FAP20-NG和FAP20-mCherry(例如在如下文的实施例部分中所描述的衣藻的菌株中)。可能FAP20-NG鞭毛比RSP3-NG鞭毛更亮,因为在鞭毛中FAP20比RSP3丰度更高。FAP20-mCherry也可以提供红色荧光标准品。生物体(例如衣藻)的FAP20-mCherry菌株可以与RSP3-NG菌株杂交,以产生双突变体。所述用RSP3-NG和FAP20-mCherry两者双重标记的鞭毛将充当用于双标记样品的标准品。另一种产品是RSP3-SNAP标签鞭毛,其可以如下所述被转变成RSP3-SNAP标签-鸟嘌呤-Alexa 488鞭毛(例如在所述融合蛋白包括接头部分的情况下)。其他适合的载体包括但不限于径向辐条的亚基(Oda等,2014)、动力蛋白马达(Hom等,2012)、中心对器(Teves等,2016)和轴丝中的微管相关复合体(例如King和Patel-King,2015;Norrander等,2000)。在其他具纤毛的生物体例如四膜虫(*Tetrahymena*)和草履虫(*Paramecium*)中可以复制相似的策略。

[0070] 用于所述生物结构的融合蛋白,例如作为所述融合蛋白的荧光蛋白部分的适合的蛋白质或其变体,可以包括但不限于绿色荧光蛋白(GFP)、增强绿色荧光蛋白(EGFP)、mNeonGreen蛋白(NG)、增强蓝色荧光蛋白(EBFP)、mCherry荧光蛋白、tdTomato荧光蛋白、增强蓝绿色荧光蛋白(ECFP)、Midoriishi-Cyan1蛋白、AmCyan1蛋白、Azami-Green蛋白、mAzami-Green1蛋白、ZsGreen1、增强黄色荧光蛋白(EYFP)、Venus蛋白、ZsYellow蛋白、Kusabira-Orange1蛋白和mKusabira-Orange1蛋白。(参见Suzuki等,“用于荧光显微术的荧光标记技术的最新进展”(Recent Advanced in Fluorescent Labeling Techniques for Fluorescence Microscopy),*Acta Histochem. Cytochem.* 40(5):131-137,2007,其内容通过引用以整体并入本文)。GFP的氨基酸序列被提供为SEQ ID NO:2,NG的氨基酸序列被提供

为SEQ ID NO:3。因此,适合用于所述融合蛋白的蛋白质可以包括SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3或其变体的氨基酸序列,所述变体表现出至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性,其中优选地所述蛋白质或变体结合所述生物结构或组装在所述生物结构中。

[0071] 示例性的融合蛋白可以包括下述融合蛋白,所述融合蛋白包含已融合在荧光蛋白例如GFP、NG或其变体的氨基酸序列的C-端处的RSP3(例如莱茵衣藻的RSP3或其变体)的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述融合蛋白包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5或其变体的氨基酸序列,所述变体与SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5具有至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性。

[0072] 正如指明的,本文中公开的融合蛋白可以包含融合到荧光蛋白或其变体的氨基酸序列的与微管结合的径向辐条蛋白(RSP)或其变体的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述荧光蛋白的氨基酸序列被融合到所述RSP的氨基酸序列的C-端。适合的RSP可以包括但不限于径向辐条蛋白3(RSP3)。适合的荧光蛋白可以包括但不限于GFP、EGFP、NG、EBFP、ECFP、Midoriishi-Cyan1蛋白、AmCyan1蛋白、Azami-Green蛋白、mAzami-Green1蛋白、ZsGreen1、EYFP、Venus蛋白、ZsYellow蛋白、Kusabira-Orangel蛋白和mKusabira-Orangel蛋白。

[0073] 在某些实施方式中,所公开的融合蛋白可以包含与微管结合的径向辐条蛋白(RSP)或其变体的氨基酸序列,所述径向辐条蛋白(RSP)或其变体被融合到用于结合作为荧光标记物的荧光团的衔接蛋白(或衔接蛋白的一部分(即“衔接部分”))的氨基酸序列,所述荧光团可以包括非蛋白质荧光团而不是荧光蛋白。例如,所公开的融合蛋白可以包含融合到衔接部分的锚部分,其中所述融合蛋白的衔接部分结合到荧光团标记物。适合的衔接蛋白可以包括结合到链亲合素偶联的荧光团标记物的生物素化的多肽,所述荧光团标记物可以包括非蛋白质荧光团标记物。因此,所公开的荧光标记的融合蛋白可以包含融合到生物素化的衔接多肽的锚部分,所述衔接多肽结合到链亲合素偶联的荧光团标记物。衔接蛋白的实例可以包括但不限于生物素化的多肽例如AviTag或生物素羧基载体蛋白(BCCP)和SNAP标签(可以从New England BioLabs获得)。所述融合蛋白的15-a.a.的AviTag或9-kD的BCCP部分可以使用BirA酶在体内或体外生物素化。可以将纯化的融合蛋白或包含所述融合蛋白的纯化的生物结构(例如生物素化的鞭毛)与链亲合素偶联的发荧光化合物在体外温浴。所述SNAP标签是DNA修复蛋白O⁶-烷基鸟嘌呤-DNA烷基转移酶的20kDa的突变体,其特异性且快速地与荧光团的苯甲基鸟嘌呤(BG)衍生物反应,导致所述SNAP标签被所述BG荧光团不可逆地共价标记(参见图7)。

[0074] 因此,在所述融合蛋白的某些实施方式中,所述荧光蛋白部分被衔接蛋白部分替换,所述衔接蛋白部分共价或非共价地结合作为荧光标记物的荧光团。适合的荧光团可以包括但不限于1,5IAEDANS、1,8-ANS、4-甲基伞形酮、5-羧基-2,7-二氯荧光素、5-羧基荧光素(5-FAM)、5-羧基四甲基罗丹明(5-TAMRA)、5-FAM(5-羧基荧光素)、5-HAT(羟色胺)、5-羟色胺(HAT)、5-ROX(羧基-X-罗丹明)、5-TAMRA(5-羧基四甲基罗丹明)、6-羧基罗丹明6G、6-CR 6G、6-JOE、7-氨基-4-甲基香豆素、7-氨基放线菌素D(7-AAD)、7-羟基-4-甲基香豆素、9-氨基-6-氯-2-甲氧基吡啶、ABQ、酸性品红、ACMA(9-氨基-6-氯-2-甲氧基吡啶)、吡啶橙、吡啶红、吡啶黄、Acridine、Acridine Feulgen SITSA、Alexa Fluor 350TM、Alexa Fluor 430TM、Alexa Fluor 488TM、Alexa Fluor 532TM、Alexa Fluor 546TM、Alexa Fluor 568TM、

Alexa Fluor 594TM、Alexa Fluor 633TM、Alexa Fluor 647TM、Alexa Fluor 660TM、Alexa Fluor 680TM、茜素络合指示剂、茜素红、别藻蓝素 (APC)、AMC、AMCA-S、AMCA (氨基甲基香豆素)、AMCA-X、氨基放线菌素D、氨基香豆素、氨基甲基香豆素 (AMCA)、苯胺蓝、硬脂酸葱基酯、APC (别藻蓝素)、APC-Cy7、APTS、阿斯屈拉松亮红4G、阿斯屈拉松橙R、阿斯屈拉松红6B、阿斯屈拉松黄7GLL、阿的平、ATTO-TAGTMCBQCA、ATTO-TAGTMFQ、金胺、Aurophosphine G、Aurophosphine、BAO 9 (双氨基苯基噁二唑)、硫酸黄连素、 β -内酰胺酶、Bimane、双苯甲酰胺、双苯甲酰亚胺 (Hoechst)、Blancophor FFG、Blancophor SV、BOBOTM-1、BOBOTM-3、Bodipy 492/515、Bodipy 493/503、Bodipy 500/510、Bodipy 505/515、Bodipy 530/550、Bodipy 542/563、Bodipy 558/568、Bodipy 564/570、Bodipy 576/589、Bodipy 581/591、Bodipy 630/650-X、Bodipy 650/665-X、Bodipy 665/676、Bodipy FL、Bodipy FL ATP、Bodipy FL-神经酰胺、Bodipy R6G SE、Bodipy TMR、Bodipy TMR-X 偶联物、Bodipy TMR-X、SE、Bodipy TR、Bodipy TR ATP、Bodipy TR-X SE、BO-PROTM-1、BO-PROTM-3、Brilliant Sulphoflavin FF、钙黄绿素、钙黄绿素蓝、Calcium CrimsonTM、钙绿、钙橙、Calcofluor White、羧基-X-罗丹明 (5-ROX)、Cascade BlueTM、Cascade Yellow、儿茶酚胺、CCF2 (GeneBlazer)、CFDA、叶绿素、色霉素A、CL-NERF (比率染料, pH)、CMFDA、腔肠素f、腔肠素fcp、腔肠素h、腔肠素hcp、腔肠素ip、腔肠素n、腔肠素O、香豆素鬼笔环肽、C-藻蓝蛋白、CPM 甲基香豆素、CTC、CTC 甲贲、Cy2TM、Cy3.1 8、Cy3.5TM、Cy3TM、Cy5.1 8、Cy5.5TM、Cy5TM、Cy7TM、环AMP Fluorosensor (FiCRhR)、Dabcyl、丹磺酰、丹磺酰胺、丹磺酰尸胺、丹磺酰氯、丹磺酰DHPE、丹磺酰氟、DAPI、Dapoxyl、Dapoxyl 2、Dapoxyl 3、DCFDA、DCFH (二氯二氢荧光素二乙酸酯)、DDAO、DHR (二氢罗丹明123)、二-4-ANEPPS、二-8-ANEPPS (非比率)、DiA (4-二-16-ASP)、二氯二氢荧光素二乙酸酯 (DCFH)、DiD-亲脂性示踪剂、DiD (DiIC18 (5))、DIDS、二氢罗丹明123 (DHR)、DiI (DiIC18 (3))、二硝基苯酚、DiO (DiOC18 (3))、DiR、DiR (DiIC18 (7))、DNP、多巴胺、DsRed、DTAF、DY-630-NHS、DY-635-NHS、ELF 97、曙红、赤藓红、赤藓红ITC、溴化乙锭、乙锭同二聚体-1 (EthD-1)、Euchrysin、EukoLight、氯化铯 (III)、快蓝 (Fast Blue)、FDA、Feulgen (副蔷薇苯胺)、FITC、Flazo 橙、Fluo-3、Fluo-4、荧光素 (FITC)、荧光素二乙酸酯、Fluoro-Emerald、Fluoro-Gold (羟基司替巴脒)、Fluoro-Ruby、FluorX、FM 1-43TM、FM 4-46、Fura RedTM、Fura RedTM/Fluo-3、Fura-2、Fura-2/BCECF、Genacryl 亮红B、Genacryl 亮黄10GF、Genacryl 粉3G、Genacryl 黄5GF、GeneBlazer (CCF2)、Gloxalic Acid、粒状蓝、血卟啉、Hoechst 33258、Hoechst 33342、Hoechst 34580、HPTS、羟基香豆素、羟基司替巴脒 (FluoroGold)、羟色胺、Indo-1、吡啶二碳菁 (DiD)、吡啶三碳菁 (DiR)、Intrawhite Cf、JC-1、J0-J0-1、J0-PRO-1、Laurodan、LDS 751 (DNA)、LDS 751 (RNA)、Leucophor PAF、Leucophor SF、Leucophor WS、丽丝胺罗丹明、丽丝胺罗丹明B、钙黄绿素/乙锭同二聚体、LOLO-1、LO-PRO-1、萤黄、Lyso 示踪剂蓝、Lyso 示踪剂蓝-白、Lyso 示踪剂绿、Lyso 示踪剂红、Lyso 示踪剂黄、LysoSensor 蓝、LysoSensor 绿、LysoSensor 黄/蓝、Mag 绿、Magdala 红 (根皮红B)、Mag-Fura 红、Mag-Fura-2、Mag-Fura-5、Mag-Indo-1、镁绿、镁橙、孔雀石绿、海蓝、Maxilon 亮黄素10GFF、Maxilon 亮黄素8GFF、部花青、甲氧基香豆素、Mitotracker 绿FM、Mitotracker 橙、Mitotracker 红、辉煌霉素、Monobromobimane、Monobromobimane (mBBr-GSH)、Monochlorobimane、MPS (甲基绿派若宁芪)、NBD、NBD 胺、尼罗红、硝基苯并噁二唑 (nitrobenzoxadidole)、去甲肾上腺素、核固红、核黄、Nylosan Brilliant Iavin E8G、俄

勒冈绿、俄勒冈绿488-X、俄勒冈绿TM、俄勒冈绿TM488、俄勒冈绿TM500、俄勒冈绿TM514、太平洋蓝、副蔷薇苯胺 (Feulgen)、PBF1、PE-Cy5、PE-Cy7、PerCP、PerCP-Cy5.5、PE-德克萨斯红 [红613]、根皮红B (Magdala红)、Phorwite AR、Phorwite BKL、Phorwite Rev、Phorwite RPA、Phosphine 3R、藻红蛋白B[PE]、藻红蛋白R[PE]、PKH26 (Sigma)、PKH67、PMIA、Pontochrome Blue Black、POPO-1、POPO-3、PO-PRO-1、PO-PRO-3、樱草灵、Procion黄、碘化丙啶 (PI)、PyMP0、茈、派若宁、派若宁B、Pyroza1亮黄素7GF、QSY 7、喹吖因氮芥、红613[PE-德克萨斯红]、试卤灵、RH 414、Rhod-2、罗丹明、罗丹明110、罗丹明123、罗丹明5GLD、罗丹明6G、罗丹明B、罗丹明B 200、罗丹明B extra、罗丹明BB、罗丹明BG、罗丹明绿色、罗丹明Phallicidine、罗丹明鬼笔环肽、罗丹明红、罗丹明WT、玫瑰红、R-藻蓝蛋白、R-藻红蛋白 (PE)、SBFI、血清素、Sevron亮红2B、Sevron亮红4G、Sevron亮红B、Sevron橙、Sevron黄L、SITS (异硫代磺酸芪)、SNAFL钙黄绿素、SNAFL-1、SNAFL-2、SNARF钙黄绿素、SNARF1、钠绿、SpectrumAqua、Spectrum绿、Spectrum橙、Spectrum红、SPQ (6-甲氧基-N-(3-磺基丙基) 喹啉鎓)、芪、磺基罗丹明B can C、磺基罗丹明G Extra、SYTO 11、SYTO 12、SYTO 13、SYTO 14、SYTO 15、SYTO 16、SYTO 17、SYTO 18、SYTO 20、SYTO 21、SYTO 22、SYTO 23、SYTO 24、SYTO 25、SYTO 40、SYTO 41、SYTO 42、SYTO 43、SYTO 44、SYTO 45、SYTO 59、SYTO 60、SYTO 61、SYTO 62、SYTO 63、SYTO 64、SYTO 80、SYTO 81、SYTO 82、SYTO 83、SYTO 84、SYTO 85、SYTOX蓝、SYTOX绿、SYTOX橙、四环素、四甲基罗丹明 (TRITC)、德克萨斯红TM、德克萨斯红-XTM偶联物、硫代二碳菁 (DiSC3)、噻嗪红R、噻嗪橙、硫代黄素5、硫代黄素S、硫代黄素TCN、Thiolyte、Thiozole橙、Tinopol CBS (Calcofluor白)、TMR、TO-PRO-1、TO-PRO-3、TO-PRO-5、TOTO-1、TOTO-3、TriColor (PE-Cy5)、TRITC四甲基罗丹明异硫氰酸酯、真蓝 (True Blue)、真红 (TruRed)、Ultralite、荧光素钠B、Uvitex SFC、WW 781、X-罗丹明、XRITC、二甲酚橙、Y66F、Y66H、Y66W、YO-PRO-1、YO-PRO-3、YOYO-1和YOYO-3。

[0075] 本文中还可能考虑了编码本文中公开的融合蛋白的氨基酸序列的多核苷酸。所述多核苷酸可以被可操作地连接到启动子，例如在表达载体内。

[0076] 本文还可能考虑了包含表达所述融合蛋白的表达载体的分离的细胞，例如转化或转染的细胞。可以培养所述分离的细胞以生产所述融合蛋白和/或包含所述融合蛋白的生物结构例如微管、轴丝和/或鞭毛，例如在本文中公开的荧光标志物包含所述生物结构的情况下。用于制备和分离和/或纯化鞭毛的方法在本领域中是已知的。(参见Craig等，“衣藻鞭毛的分离”(Isolation of Chlamydomonas Flagella), Curr. Prot. Cell Biol. 2013 June; 03: Unit-3.41.9., 其内容通过引用以整体并入本文)。如本文中所公开制备的分离的荧光鞭毛可以被进一步加工以分离所述轴丝和/或微管。

[0077] 所公开的荧光标志物任选地可以被固定在固体基底例如显微镜载玻片上。其上固定有所述荧光标志物的载玻片可以在荧光显微术中用于分析和成像荧光标记的样品。

[0078] 本文中还可能考虑了用于执行荧光显微术的方法。所述方法利用本文中公开的荧光标志物，并且可以包括在执行荧光显微术时检测来自于所述荧光标志物或来自于其上固定有所述荧光标志物的固体基底的荧光和/或将所述荧光标志物成像的步骤。在所述方法的某些实施方式中，可以将所述荧光标志物施加到固体基底例如显微镜载玻片，并随后将荧光标记的样品施加到所述载玻片，然后执行荧光显微术。然后在执行荧光显微术时检测来自于所述荧光标志物的荧光和/或将所述荧光标志物成像，然后同时或不同时地，检测来自于

所述荧光标记的样品的荧光和/或将所述荧光标记的样品成像。

[0079] 或者,可以将所述荧光标志物预先提供在固体基底例如固定所述荧光标志物的显微镜载玻片上,使得用户不必将所述荧光标志物施加到所述固体基底,然后用户将所述荧光标记的样品施加到所述固体基底。然后在执行荧光显微术时检测来自于所述荧光标志物的荧光和/或将所述荧光标志物成像,然后同时或不同时地,检测来自于所述荧光标记的样品的荧光和/或将所述荧光标记的样品成像。

[0080] 在用于执行荧光显微术的所述方法中,所述标志物的荧光标记物可以与所述样品的荧光标记物相同或不同。所述荧光标志物可以与所述荧光标记的样品分开地或一起成像。

实施例

[0081] 下面的实施例仅仅是说明性的,并且不限制所要求保护的主体内容的范围。

[0082] 用于荧光显微术的鞭毛标志物

[0083] 摘要

[0084] 尽管在定量分析中的兴趣剧增,但使用荧光显微术估算分子的数目仍然是繁琐的。在这里,我们报道了与用于电泳的蛋白质或DNA标志物等效的生物荧光强度标准品的产生。我们利用了明确的蛋白质即衣藻的鞭毛中的RSP3和新的荧光蛋白mNeonGreen (NG),后者具有与增强绿色荧光蛋白 (EGFP) 相似的激发和发射光谱,但是更亮并且可开关。RSP3是径向辐条复合物中的同二聚体,所述复合物以精确的32-64nm周期性组装成轴丝中的9个微管双联管中的每一个。每96nm具有平均36个NG分子,衣藻RSP3-NG转基因菌株的鞭毛均匀地发光。在甲醇固定后强度降低60%,所述甲醇固定也有利地减小叶绿素来源的自发荧光。在交叠区处强度几乎加倍,并且在展开的双联管和片段化的双联管粒子处强度按比例分配。所述作为强度标准品的用途,通过将衣藻中具有NG融合蛋白的RSP3-NG鞭毛与酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中具有GFP融合蛋白的鞭毛进行比较得以证实。具有不同荧光标签和轴丝载体蛋白的荧光鞭毛,将简化定量荧光成像。

[0085] 简介

[0086] 用于生物医学科学的荧光显微术已有长足的进步。荧光团已扩展到具有适合于各种不同应用的独特光谱性质的大量各种各样的化学化合物和荧光蛋白。使用各种不同的巧妙工具、数字软件和新的显微镜和图像处理的发明,现在可以在诊断和研究中使用荧光,这在十年前是不可想象的。

[0087] 尽管取得了巨大进展,但单纯地基于荧光图像的强度来推导分子的数目仍然是繁琐的。荧光强度受到激发光强度和光谱的影响,后者又受到灯的使用年限和状况影响。此外,强烈的激发光将使荧光团饱和,并且重要的是可能漂白荧光团。通过在图像获取期间增益并通过随后进行被设计用于最大化灵敏度和图像质量的图像处理,可以进一步操控亮度、对比度和线性范围。因此,荧光图像的定量分析通常用相对术语表示或需要复杂的仪器和计算。

[0088] 一种解决方案是理想情况下在成像期间包含标准品,其类似于在电泳中广泛使用的在迁移距离的基础上揭示未知分子的大小并在用染料染色后的强度的基础上揭示未知分子的丰度的蛋白质标志物或DNA梯。尽管对于不同应用来说存在范围从量子点到DNA-

origami的各种不同的荧光标准品 (Michalet等,2005;Schmied等,2012,2014),但我们推论,真核细胞的活动的鞭毛可以被容易地转变成强度、规模和生物相容性适合的、待包含在平均生物样品的成像中的荧光标准品。

[0089] 活动鞭毛或同义的纤毛,有节奏地击打以扫过周围的流体。多种多样的真核细胞将所述运动用于关键行为例如交配、食物收集和避开有害环境。尽管运动有区别,但大多数纤毛和鞭毛搭载9个微管双联管环绕着中央的两个单微管的9+2轴丝。两种类型的微管与具有独特功能的各种不同分子复合体相关。表征最明确的是轴丝动力蛋白和在整个鞭毛的长度内周期性地精确位置处锚定到9个外部双联管中的每一个的径向辐条。动力蛋白马达向邻近的双联管突出以驱动双联管间滑动,其被转变成有节奏的击打。径向辐条指向中心对以进一步控制动力蛋白驱动的运动。这些复合体反复地驱动邻近结构,使轴丝能够作为纳米机器以高频率有节奏地击打。我们利用双鞭毛藻类衣藻来产生具有荧光轴丝的鞭毛,在所述轴丝中荧光蛋白被化学计量已知的定义明确的径向辐条蛋白携带。因此,在鞭毛的整个长度上,已知量的荧光蛋白以相近的丰度分布在精确位置处。我们还使用了3个实例来证明它们作为强度标准品用于荧光图像的定量分析的用途。

[0090] 结果

[0091] 具有RSP3作为荧光团载体的荧光鞭毛的产生。除了微管蛋白之外,轴丝在大量分子复合体中包含超过400种不同蛋白质,其在96nm的重复段内周期性地变化。理论上,许多轴丝蛋白质可以携带荧光团而不影响它们的功能。对于本原理论证性研究来说,我们使用径向辐条(RS)复合体中已明确表征的RSP3作为荧光蛋白载体,因为RS和RSP3的化学计量已知。在电子显微术(EM)下,RS显得像Y形复合体,用它的柄锚定到外部双联管,而它的增大的头部向中心对器伸出(Huang等,1981;Pigino等,2011;图1A)。RS与中心对的物理相互作用协调外部双联管上动力蛋白马达的活化,并且对于有节奏的击打来说是关键的。在衣藻中,沿着每个外部双联管的长度每96nm存在两个相隔32nm放置的RS(图1B)。这对应于具有9个外部双联管的鞭毛每96nm具有18个RS。

[0092] RSP3作为跨过RS的同二聚体存在,其作为支架用于对接其他径向辐条亚基(Wirschell等,2008;Sivadas等,2012;Oda等,2014)。衣藻的RSP3突变体pf14产生缺少RS的不能动的鞭毛(Huang等,1981;Diener等,1993)。所述缺陷可以通过转化原始的或带有标签的RSP3基因组DNA来恢复(Williams等,1989;Gupta等,2012;Oda等,2014)。RSP3缺失突变体的分析和带标签的RSP3菌株的低温电子断层扫描术(图1C)将C-端尾部定位为朝向辐条头部(Sivadas等,2012;Oda等,2014)。因此,具有完全挽救的带有荧光蛋白(FP)标签的RSP3的转基因pf14菌株的鞭毛应该每96nm含有36个RSP3以及因此36个FP。

[0093] 为此目的,我们制作了RSP3基因组构建物,将编码增强绿色荧光蛋白(GFP)或mNeonGreen(NG)的DNA片段插入到终止密码子之前。GFP被附连到几种轴丝蛋白质(Bower等,2013;Yanagisawa等,2014)并且NG被附连到EB1,所述EB1是一种优先性结合到生长中的微管的尖端并富集在鞭毛尖端处的蛋白质(Pederson等,2003;Harris等,2015)。选择NG是出于3个原因。它明亮——比EGFP明亮2.7X倍,这得自于高2.07X的消光系数和高1.33X倍的量子产率(Shaner等,2013)。事实上,它的亮度与大多数现有的FP相当,如果不是更高的话。此外,在宽视野照明下,它的光稳定性与GFP相当。最后,NG具有与GFP相似的激发和发射光谱。

[0094] 具有RSP3-GFP和RSP3-NG的鞭毛的比较。将含有RSP3-FP基因组构建物和巴龙霉素抗性基因的质粒转化到不能动的RSP3突变体pf14中。一旦引入到细胞内后,所述质粒将随机插入到基因组中。一部分插入事件引起巴龙霉素抗性基因和基因组构建物的表达。大约30%的抗生素抗性克隆是能动的。选择完全挽救的克隆——所有细胞像野生型(WT)一样泳动。鞭毛的蛋白质印迹显示RSP3-GFP和RSP3-NG与WT中的RSP3具有相似丰度(图2A)。阴性对照是pf14。载样对照是IC78,其是在所有4个菌株中都正常的外部动力蛋白臂的亚基。

[0095] 对于荧光显微术来说,我们利用藻类的趋光反应。藻类细胞将朝向或远离显微镜的光源泳动,并因此遇到载玻片或盖玻片。这导致鞭毛粘附于玻璃表面并变得静止,而主要来自于叶绿素的强烈自体荧光的细胞体偏离焦点。静止的鞭毛使用典型的宽视野落射荧光显微镜和40X物镜来成像。除非另有陈述,否则所有图像以相似的方式获取。RSP3-NG和RSP3-GFP两者显得在除了末端之外的整个鞭毛中均匀分布,而在所述末端处外部双联管逐渐变细(图2B)。当在一起成像时,明显RSP3-GFP鞭毛更加暗淡,使用1秒曝光时几乎不可与自体荧光区分开(图2C,上图)。在背景减除后它们变得更加明显(下图)。使用ImageJ Plot Profile来测量跨过鞭毛的荧光强度(图2C,右图)。峰值显示RSP3-NG鞭毛比RSP3-GFP鞭毛亮大约4X。余下的研究聚焦于RSP3-NG鞭毛,因为它们的强度水平更接近于使用EGFP的大多数研究。

[0096] RSP3-NG鞭毛的表征。从所述转基因细胞切下RSP3-NG鞭毛用于进一步表征。大多数分离的鞭毛长为10-12 μm ,由于不平坦的焦平面造成荧光强度有一定变化(图3A,顶部图)。沿着每个鞭毛制作曲线图,以确定焦点对准的最亮的区域。对于所有鞭毛来说,将跨越所述最亮区域的曲线图汇编在一起(底部图)。峰值的平均值和标准偏差示出在柱状图中(右图)。

[0097] 为了测试RSP3-NG分子的强度水平是否与分子数目成线性,我们比较了两个鞭毛的交叠区和附近的非交叠区的强度(图3B,顶部图)。两个区域的峰值强度(左下图)和平均值(右下图)表明,正如预期,所述两个鞭毛区域处的强度比单一鞭毛区域亮大约2X。

[0098] 由于RSP3-GFP鞭毛暗淡但可见,因此我们合理地推测分开的RSP3-NG外部双联管子纤维可能是可见的。通常,将外部双联管在含有用于溶解鞭毛膜的去污剂、被动力蛋白马达消耗以驱动双联管间滑动的ATP和用于切断机械束缚包括RS的蛋白酶的缓冲液中展开。为了维持完整的RS,我们通过手动地来回移动盖玻片向固定到聚L-赖氨酸的鞭毛施加剪切力。在荧光显微术下,许多鞭毛被展开(图4A)——9个外部双联管的束分成2个或更多个子纤维。使用100X透镜获取的放大图像(图4A,中图)的分析显示,荧光仍然沿着子纤维均匀分布。荧光强度的测量显示,子纤维被展开得越多,单个子纤维的强度越低(底部图)。对于未附连的鞭毛来说,所述展开不太广泛(图4B,顶部图)。但在100X物镜下并使用增强的对比,我们发现某些外部双联管断裂成粒子(图4B,中图)。单个粒子相对于完整区域接近九分之一的强度(图4B,底部图)表明,它们可能由单个外部双联管构成,或许是96-nm的重复单元。因此,具有RSP3-NG的鞭毛或外部双联管显得与NG分子的丰度几乎成正比。

[0099] 甲醇固定后的NG荧光

[0100] 尽管FP对于活细胞成像有价值,但有时需要将它们在固定的细胞中可视化。快速甲醇固定通常用于保存组织中的动态微管,并且对于植物和衣藻来说,用于萃取造成强烈自体荧光的色素。然而,在甲醇固定后,GFP通常变得不可见,并代之以通过免疫荧光进行可

视化。为了了解甲醇对NG的影响,将带有RSP3-NG鞭毛的载玻片在 -20°C 的甲醇中浸泡20min。在脱水和恢复水分后,向载玻片添加新鲜的RSP3-NG鞭毛,然后成像(图5A,顶部图)。分析固定的鞭毛(红点)和未固定的鞭毛(蓝点)的曲线图(左中图)。峰值的平均值(右中图)表明甲醇固定将NG荧光强度降低 $\sim 60\%$ 。相似地,固定的鞭毛的交叠区(白色箭头和灰色条)的亮度约为非交叠区(红色条)的两倍。

[0101] 我们进一步试验了用甲醇固定的表达EB1-NG的衣藻转基因野生型菌株(Harris等,2016)。生长中的微管的偏好性的正末端结合赋予荧光EB1以典型的彗星图案。将固定化到聚L-赖氨酸包被的载玻片的EB1-NG细胞首先在甲醇中固定。在恢复水分后,将活细胞添加到所述载玻片中并获取图像。尽管在甲醇固定的细胞中EB1-NG彗星(图5B左图中的橙色箭头)的强度比活细胞中(蓝色箭头)更暗淡,但自体荧光也显著降低(图5B)。曲线图(右图)显示,甲醇处理不显著影响信号/背景比率。在10秒曝光后彗星是可见的(顶部图),并在随后的1秒曝光后仍然可见(底部图),显示出不论是否甲醇固定,NG在这种激发光强度下的稳定性。正如预期,在具有不同曝光量的两张图像中,固定的细胞中的彗星图案显得一致,而活细胞中移动的彗星头部的长度在1秒曝光的图像中显得如报道那样为 $\sim 500\text{nm}$ (Seetapun等,2012),并且在10秒图像中更长(蓝色箭头)。因此,NG和RSP3-NG鞭毛是用于涉及甲醇固定的实验的可行工具。

[0102] RSP3-NG鞭毛应用于不同分子和不同生物体。考虑到RSP3-NG数目与荧光强度的线性关系,我们合理地推论,不论细胞区室和细胞类型如何,推演荧光分子数目都是可行的。我们首先将RSP3-NG鞭毛与EB1-NG细胞进行比较。除了细胞体中的EB1-NG彗星之外,EB1-NG也富集在鞭毛尖端处,在那里微管正末端经历持续不断的周转(turnover),即使在鞭毛达到完全长度之后(Pederson等,2003;Harris等,2016;Marshall和Rosenbaum,2001)。光漂白后的荧光恢复(FRAP)分析表明所述尖端群体含有不动的EB1-NG和可能负责正末端处微管蛋白周转的高度动态的群体两者(Harris等,2016)。为了评估鞭毛尖端处EB1-NG的量,我们将RSP3-NG细胞和EB1-NG细胞一起成像,将附着到玻璃表面的鞭毛聚焦在同一焦平面处(图6A)。EB1-NG尖端长度约为 500nm 。曲线图表明EB1-NG尖端的强度与RSP3-NG鞭毛的强度相近或更加暗淡。为了分析细胞体中的EB1-NG彗星,将所述细胞与分离的鞭毛共同成像。在相似焦平面处对彗星和鞭毛的分析显示,在各个微管的正末端处彗星头部的前端(图6B,红色箭头)与RSP3-NG鞭毛同样亮,如果不是更亮的话。我们推断对应于5.2个各自含有36个RSP3-NG分子的 96-nm 重复单元的 500-nm 的彗星头部,可含有大约187个EB1-NG或93个EB1-NG二聚体,其被召集到单个生长中的微管的尖端。考虑到存在相近丰度的不带标签的EB1(Harris等,2016),最亮的 500nm 彗星头部应该具有187个EB1二聚体,包括带标签和不带标签的EB1,假定C-端标签不实质性影响正末端追踪。这种在室温下在绿藻中的测量值与在 37°C 下测量的上皮细胞中 $1\text{-}\mu\text{m}$ 微管正末端具有270个EB二聚体相一致(Seetapun等,2012)。在一个微管的尖端处和在含有源于9个外部二联微管和2个单微管的20个微管的全长鞭毛的尖端处相近的EB1-NG强度,显示出尽管在全长鞭毛的尖端处存在持续不断的微管蛋白周转,但速率为细胞体中生长的微管的正末端处的速率的 $\sim 1/20$ 。

[0103] 我们也将RSP3-NG鞭毛与两个转基因酿酒酵母菌株进行了比较。一个菌株表达附连到细胞色素c氧化酶亚基4(COX4)的前21个氨基酸的GFP(Jensen等,2000)。细胞色素c复合物与线粒体中内膜的基质表面结合。阐明酵母中线粒体的网状网络的COX4-GFP,是筛选

在裂殖、融合和形状方面不同的酵母线粒体突变体的有力工具。在各个酵母细胞之间COX4-GFP水平不同(Jensen等,2000)。在低丰度细胞中的峰值强度(图6C,右)与RSP3-NG鞭毛的峰值强度相近。考虑到GFP的亮度比NG弱2.7X,每96-nm长的线粒体管预期含有~97(2.7X 36)个COX4-GFP分子。这个估算略低于实际数目,因为管状线粒体的平均直径为300-400nm,大于轴丝的~220-nm的直径(Westermann,2008)。在左边的细胞中COX4-GFP的丰度高2倍。

[0104] 另一个酵母菌株表达带有GFP标签的Sis1,所述Sis1是HSP70的一种HSP40辅助伴侣蛋白(chaperon)。它参与错误折叠的多肽向不溶性蛋白质沉积物(IPOD)区室的运输,作为细胞用于控制蛋白质聚集体的策略的一部分(Kaganovich等,2008;Specht等,2011;Nillegoda等,2015)。富集在非膜结合的IPOD中的Sis1-GFP分子表现为直径比鞭毛更大的斑点(图6D)。基于在材料和方法中概括的公式,每个斑点在许可温度30°C下平均含有~2,000个Sis1-GFP分子,大约占一个酵母细胞中估算的20,500个Sis1分子的1/10(Ghaemmaghami等,2003)。

[0105] 扩展鞭毛标准品的种类以用于多样化应用。到目前为止,我们只产生了具有RSP3-GFP或RSP3-NG的荧光鞭毛,并使用单细胞对它们进行试验。两种鞭毛发出绿光,尽管具有不同强度。为了挖掘涵盖各种不同应用的巨大市场,必需利用具有不同性质、颜色和应用的广范围的发荧光工具使鞭毛标准品多样化。2A)一种方法是将NeonGreen更换成两种主要类型的标签(图3)。现有的DNA构建物被设计成易于标签互换。一种是其他颜色的荧光蛋白例如mCherry或tdTomato,它们处在红光范围。由于荧光蛋白必须由细胞表达,因此通常被用于活细胞成像中。另一个选项是通用的SNAP标签蛋白,其自身不发光,但可以通过化学反应连接到发光的可商购化合物,如图3中所示。与限于活细胞的荧光蛋白相反,发荧光化合物已被化学偶联到各种不同的探针如抗体,所述抗体将被锁接在通常在被固定的样品中的目标分子上(免疫荧光)。SNAP标签鞭毛适合于这种应用。此外,顾客可以购买SNAP标签鞭毛的一个等分试样,然后将它们与特定荧光化合物温浴以适合于他们的特定需求。通过对一致的发荧光分子进行比较,更容易计算分子数目。在荧光显微术中免疫荧光是最常用的方法,特别是在诊断中。与免疫荧光相容的试剂将具有巨大市场。2B)将RSP3更换成不同的鞭毛蛋白。如果它的周期性更频繁,则荧光强度将会提高。尤其是,一旦产生表达一种荧光融合蛋白的菌株,我们就可以将它们交叉以回收产生多色鞭毛的第二代,其中一种蛋白质携带NeonGreen,另一种蛋白质携带mCherry或SNAP标签。这种双标签标准品适用于多色荧光显微术。2C)将所述荧光纳米机器分解成9个纤维或96-nm粒子定量。与完整鞭毛相反,以32-64nm的交替周期性带有两个NeonGreen分子的单个纤维或粒子,可以作为分子标尺用于超高分辨率显微术和单分子分析,后者的受欢迎程度由于最近的诺贝尔奖而爆炸性增长。尽管用于此目的的基于DNA的分子标尺已经存在,我们将探索鞭毛标尺是否具有独特的优势,例如生产成本。2D)探索所述荧光标准品在3D成像中的应用。到目前为止,我们仅仅使用了小的单细胞来试验鞭毛标准品。我们可能需要改良应用以用于通常需要不同类型显微镜的具有宽的焦平面范围的大样品,例如蠕虫或斑马鱼。焦平面对荧光强度具有实质性影响。我们将使用我们部门中的共聚焦显微镜,使用表达GFP的蠕虫来试验所述标准品,并且如果认为有必要,调整定量措施。2E)开发与商业化相容的包装策略。我们希望了解包装我们的产品以方便客户并最大化稳定性的最佳方式。目前,我们已试验了液体形式。我们正在试验固定化到玻璃载玻片的固定的鞭毛。这可能简化在诊断领域中的日常使用。

[0106] 讨论

[0107] 本研究利用9+2轴丝和衣藻RSP3突变体中确定的RS周期性和RSP3化学计量来产生具有确定数目的荧光RSP3的鞭毛。通过以各种不同方式成像RSP3-NG鞭毛,本研究显示了荧光鞭毛作为强度标准品的用途和限制。

[0108] 交叠区相比于非交叠区~2X的强度(图3)以及轴丝子纤维和粒子的按比例分配的强度,指示了从单个外部双联管到具有RSP3-NG的鞭毛的接近20X的线性范围。由于NG与GFP的光谱和稳定性相似,因此将所述两种荧光团的不同亮度考虑在内,RSP3-NG可以作为标准品用于GFP融合蛋白。

[0109] 然而,几种因素可能使所述估算偏离。例如,尽管据报道NG与EGFP相比亮度为2.7X,但RSP3-NG鞭毛比RSP3-GFP亮4X。一种可能的解释是通常在衣藻中使用的GFP序列与常用版本的序列不一致。或者载体蛋白可能影响FP强度,这或者是由于附近的三级分子环境,或者仅仅是由于载体蛋白的尺寸。已显示,分子尺寸反向影响GFP强度。尚不清楚附连到~30-kD EB1的NG是否比~60-kD RSP3中的NG更亮。

[0110] 在图像获取期间使用的参数是重要的。一个参数是焦平面。考虑到荧光显微术的宽视野的焦平面约为200nm,接近鞭毛的直径,因此偏离焦区的强度显著降低(图3A)。另一个参数是增益程度。我们避免使用增益来以线性范围为代价增强图像对比度。另一个参数是激发光强度。GFP鞭毛的快速光漂白是已报道的顾虑。这是由强的激发光补偿弱的GFP信号造成的。这对于亮度更高的NG来说不那么令人担忧。可以建议通过在光路中放置中性滤光片来使用最低激发光,以更长的曝光时间为交换。这种做法减少光漂白以及光毒性。正如图5B中所示,10-sec的曝光不妨碍随后的1sec图像获取。一旦获取到图像,图像的进一步调整将不影响曲线图分析。

[0111] 亮度使NG适用于需要甲醇固定的样品。与甲醇使FP变性,致使荧光不可见这一常见误解相反,本研究显示~40%的RSP3-NG亮度得以保留。这不仅仅发生于NG或RSP3。可以使用CCD相机获取在甲醇固定后鞭毛尖端处的EB1-NG,尽管所述强度非常低(未示出)。在快速移动或具有强烈自体荧光的物体的成像中,甲醇固定是值得考虑的。在衣藻中,尽管甲醇在降低自体荧光中的效果不能补偿NG强度的降低,但所述处理提供了自体荧光减少的EB1-NG彗星强度的独立评估、更高对比度的图像以及对长曝光时间图像获取构成挑战的移动细胞的固定化。

[0112] 三个实例展示了来自于估算分子丰度的新见解。已充分确定,鞭毛尖端处的微管正末端经历持续不断的周转,即使是在具有封住所述正末端的结构的全长微管中。通过比较鞭毛尖端处和彗星中的EB1-NG丰度,可以清楚看出在鞭毛尖端处EB1正追踪以及因此微管蛋白周转率相对慢。由于EB1-NG的朝向尖端的扩散速率在~10 μ m/sec的范围下,因此所述缓慢的周转不是由EB1的供应有限造成的,而更可能是由于变小的GTP-微管蛋白的运输(Craft等,2015)或所述帽结构可能在全长鞭毛中阻碍微管蛋白周转。使用RSP3-NG荧光鞭毛作为标准品,估算未知分子的数目只需要成像定量软件。类似的维度使得使用荧光鞭毛作为标准品进行线粒体中荧光蛋白的估算相当直接。尽管COX4-GFP已被用作标志物来揭示突变体中线粒体动力学的变化,但现在可以估算在各种条件下表达的线粒体蛋白质的数目。同样地,使用鞭毛标准品,可以更准确地估算Sis1和其他伴侣蛋白和错误折叠的蛋白质的丰度变化,所述蛋白质在不同温度下并且在不同突变体中,在亚细胞区室处运输。

[0113] 本研究使用RSP3-NG鞭毛和宽视野落射荧光显微术来演示鞭毛荧光强度标志物的原理。它可能适用于获取3D图像的共聚焦或反卷积分光显微术。建立在精确的周期性之上的鞭毛标志物,可以用具有不同周期性的载体蛋白和具有不同性质的标签蛋白进一步修饰。RSP3-NG的展开的外部双联管的用途仍有待探索。交替的32nm和64nm周期性或双联管粒子的荧光可以潜在地用于超高分辨率或单分子分析。考虑到从转基因衣藻收获大量鞭毛的容易性,将荧光鞭毛强度标准品应用于日常荧光图像获取将是相当经济的。

[0114] 参考文献

[0115] Bower,R.,Tritschler,D.,Vanderwaal,K.,Perrone,C.A.,Mueller,J.,Fox,L.,Sale,W.S.和Porter,M.E. (2013),N-DRC形成保守的生物化学复合物,其在运动轴丝中维持外部双联管对齐并限制微管滑动(The N-DRC forms a conserved biochemical complex that maintains outer doublet alignment and limits microtubule sliding in motile axonemes),*Mol Biol Cell* 24,1134-1152.

[0116] Craft,J.M.,Harris,J.A.,Hyman,S.,Kner,P.和Lehtreck,K.F. (2015),在纤毛生长期间微管蛋白被IFT的运输受纤毛自主机制上调(Tubulin transport by IFT is upregulated during ciliary growth by a cilium-autonomous mechanism),*J Cell Biol* 208,223-237.

[0117] Craige,B.,Brown,J.M.和Witman,G.B. (2013),衣藻鞭毛的分离(Isolation of *Chlamydomonas* flagella),*Curr Protoc Cell Biol* Chapter 3,Unit 3 41 41-49.

[0118] Diener,D.R.,Ang,L.H.和Rosenbaum,J.L. (1993),衣藻中鞭毛径向辐条蛋白的组装:径向辐条蛋白3的轴丝结合结构域的鉴定(Assembly of flagellar radial spoke proteins in *Chlamydomonas*:identification of the axoneme binding domain of radial spoke protein 3),*J Cell Biol* 123,183-190.

[0119] Ghaemmaghami,S.,Huh,W.K.,Bower,K.,Howson,R.W.,Belle,A.,Dephoure,N.,O'Shea,E.K.和Weissman,J.S. (2003),酵母中蛋白质表达的全局分析(Global analysis of protein expression in yeast),*Nature* 425,737-741.

[0120] Gupta,A.,Diener,D.R.,Sivadas,P.,Rosenbaum,J.L.和Yang,P. (2012),通用分子复合物组分LC8促进鞭毛组装的几个不同步骤(The versatile molecular complex component LC8promotes several distinct steps of flagellar assembly),*J Cell Biol* 198,115-126.

[0121] Harris,J.A.,Liu,Y.,Yang,P.,Kner,P.和Lehtreck,K.F. (2016),单粒子成像揭示出在衣藻鞭毛中EB1的鞭毛内运输不依赖性运输和积累(Single-particle imaging reveals intraflagellar transport-independent transport and accumulation of EB1in *Chlamydomonas* flagella),*Mol Biol Cell* 27,295-307.

[0122] Hom,E.F.,Witman,G.B.,Harris,E.H.,Dutcher,S.K.,Kamiya,R.,Mitchell,D.R.,Pazour,G.J.,Porter,M.E.,Sale,W.S.,Wirschell,M.,Yagi,T.和King,S.M. (2012),纤毛动力蛋白的统一分类学(A unified taxonomy for ciliary dyneins),*Cytoskeleton (Hoboken)* 68,555-565.

[0123] Huang,B.,Piperno,G.,Ramanis,Z.和Luck,D.J. (1981),衣藻鞭毛的径向辐条:组装和功能的遗传分析(Radial spokes of *Chlamydomonas* flagella:genetic analysis

of assembly and function), *J Cell Biol* 88,80-88.

[0124] Jensen, R.E., Hobbs, A.E., Cervený, K.L. 和 Sesaki, H. (2000), 酵母线粒体动力学: 融合、分裂、分离和形状 (Yeast mitochondrial dynamics: fusion, division, segregation, and shape), *Microsc Res Tech* 51,573-583.

[0125] Kaganovich, D., Kopito, R. 和 Frydman, J. (2008), 错误折叠的蛋白质在两种不同品质的控制区室之间的分配 (Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments), *Nature* 454,1088-1095.

[0126] King, S.M. 和 Patel-King, R.S. (2015), 寡聚外部动力蛋白臂组装因子CCDC103被紧密整合在纤毛轴丝内并表现出与微管的周期性结合 (The oligomeric outer dynein arm assembly factor CCDC103 is tightly integrated within the ciliary axoneme and exhibits periodic binding to microtubules), *J Biol Chem* 290,7388-7401.

[0127] Marshall, W.F. 和 Rosenbaum, J.L. (2001), 鞭毛内运输平衡外部二联微管的连续周转: 对鞭毛长度控制的意义 (Intraflagellar transport balances continuous turnover of outer doublet microtubules: implications for flagellar length control), *J Cell Biol* 155,405-414.

[0128] Michalet, X., Pinaud, F.F., Bentolila, L.A., Tsay, J.M., Doose, S., Li, J.J., Sundaresan, G., Wu, A.M., Gambhir, S.S. 和 Weiss, S. (2005), 用于活细胞、体内成像和诊断的量子点 (Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics), *Science* 307,538-544.

[0129] Nillegoda, N.B. 和 Bukau, B. (2015), 后生动物的基于Hsp70的蛋白质分解酶: 出现和机制 (Metazoan Hsp70-based protein disaggregases: emergence and mechanisms), *Front Mol Biosci* 2,57.

[0130] Norrander, J.M., deCathelineau, A.M., Brown, J.A., Porter, M.E. 和 Linck, R.W. (2000), 在衣藻中Rib43a蛋白与鞭毛微管的特化原丝带的形成相关 (The Rib43a protein is associated with forming the specialized protofilament ribbons of flagellar microtubules in *Chlamydomonas*), *Mol Biol Cell* 11,201-215.

[0131] Oda, T., Yanagisawa, H., Yagi, T. 和 Kikkawa, M. (2014), 中心器与径向辐条之间的机械信号传导控制轴丝动力蛋白活性 (Mechanosignaling between central apparatus and radial spokes controls axonemal dynein activity), *J Cell Biol* 204,807-819.

[0132] Pedersen, L.B., Geimer, S., Sloboda, R.D. 和 Rosenbaum, J.L. (2003), 在莱茵衣藻中微管正末端追踪蛋白EB1定位于鞭毛尖端和基体 (The Microtubule plus end-tracking protein EB1 is localized to the flagellar tip and basal bodies in *Chlamydomonas reinhardtii*), *Curr Biol* 13,1969-1974.

[0133] Pigino, G., Bui, K.H., Maheshwari, A., Lupetti, P., Diener, D. 和 Ishikawa, T. (2011), 纤毛和鞭毛中的径向辐条的冷冻电子断层扫描术 (Cryo-electron tomography of radial spokes in cilia and flagella), *J Cell Biol* 195,673-687.

[0134] Schmied, J.J., Raab, M., Forthmann, C., Pibiri, E., Wunsch, B., Dammeyer, T. 和 Tinnefeld, P. (2012), 用于定量荧光显微术的基于DNA origami的标准品 (DNA origami-based standards for quantitative fluorescence microscopy), *Nat Protoc* 9,1367-

1391.

[0135] Schmied, J.J., Raab, M., Forthmann, C., Pibiri, E., Wunsch, B., Dammeyer, T. 和 Tinnefeld, P. (2014), 用于定量荧光显微术的基于DNA origami的标准品 (DNA origami-based standards for quantitative fluorescence microscopy), *Nat Protoc* 9, 1367-1391.

[0136] Seetapun, D., Castle, B.T., McIntyre, A.J., Tran, P.T. 和 Odde, D.J. (2012), 在体内估算微管GTP帽的尺寸 (Estimating the microtubule GTP cap size in vivo), *Curr Biol* 22, 1681-1687.

[0137] Shaner, N.C., Lambert, G.G., Chamma, A., Ni, Y., Cranfill, P.J., Baird, M.A., Sell, B.R., Allen, J.R., Day, R.N., Israelsson, M., Davidson, M.W. 和 Wang, J. (2013), 源自文昌鱼的明亮的单体绿色荧光蛋白 (A bright monomeric green fluorescent protein derived from *Branchiostoma lanceolatum*), *Nat Methods* 10, 407-409.

[0138] Sivadas, P., Dienes, J.M., St Maurice, M., Meek, W.D. 和 Yang, P. (2012), 具有两个两亲性螺旋的鞭毛A-激酶锚定蛋白在径向辐条复合物中形成结构支架 (A flagellar A-kinase anchoring protein with two amphipathic helices forms a structural scaffold in the radial spoke complex), *J Cell Biol* 199, 639-651.

[0139] Specht, S., Miller, S.B., Mogk, A. 和 Bukau, B. (2011), 在酿酒酵母中蛋白质聚集体整合在沉积位点中需要Hsp42 (Hsp42 is required for sequestration of protein aggregates into deposition sites in *Saccharomyces cerevisiae*), *J Cell Biol* 195, 617-629.

[0140] Teves, M.E., Nagarkatti-Gude, D.R., Zhang, Z. 和 Strauss, J.F., 3rd. (2016), 哺乳动物的轴丝中心对复合体蛋白: 由基因敲除表型所揭示的更宽泛的作用 (Mammalian axoneme central pair complex proteins: Broader roles revealed by gene knockout phenotypes), *Cytoskeleton (Hoboken)* 73, 3-22.

[0141] Vasudevan, K.K., Song, K., Alford, L.M., Sale, W.S., Dymek, E.E., Smith, E.F., Hennessey, T., Joachimiak, E., Urbanska, P., Wloga, D., Dentler, W., Nicastro, D. 和 Gaertig, J. (2015), FAP206是用于纤毛径向辐条2和动力蛋白c的微管对接接头 (FAP206 is a microtubule-docking adapter for ciliary radial spoke 2 and dynein c), *Mol Biol Cell* 26, 696-710.

[0142] Westermann, B. (2008), 线粒体融合和裂殖的分子机器 (Molecular machinery of mitochondrial fusion and fission), *J Biol Chem* 283, 13501-13505.

[0143] Williams, B.D., Velleca, M.A., Curry, A.M. 和 Rosenbaum, J.L. (1989), 编码径向辐条蛋白3的衣藻基因分子克隆和序列分析: 鞭毛突变pf-14是赭石等位基因 (Molecular cloning and sequence analysis of the *Chlamydomonas* gene coding for radial spoke protein 3: flagellar mutation pf-14 is an ochre allele), *J Cell Biol* 109, 235-245.

[0144] Wirschell, M., Zhao, F., Yang, C., Yang, P., Diener, D., Gaillard, A., Rosenbaum, J.L. 和 Sale, W.S. (2008), 建造径向辐条: 鞭毛径向辐条蛋白3 (RSP3) 是二聚体 (Building a radial spoke: flagellar radial spoke protein 3 (RSP3) is a dimer), *Cell Motil*

Cytoskeleton 65,238-248.

[0145] Yanagisawa,H.A.,Mathis,G.,Oda,T.,Hirono,M.,Richey,E.A.,Ishikawa,H.,Marshall,W.F.,Kikkawa,M.和Qin,H. (2014),在衣藻中FAP20是二联微管的内部联结蛋白,对于鞭毛的平面不对称波形和稳定性两者来说是必不可少的(FAP20 is an inner junction protein of doublet microtubules essential for both the planar asymmetrical waveform and stability of flagella in Chlamydomonas),Mol Biol Cell 25,1472-1483.

[0146] 在上面的描述中,本领域技术人员可以容易地明显看出,可以对本文中公开的发明做出不同替换和修改而不背离本发明的范围和精神。本文中示例性描述的发明可以在不存在本文中具体公开的任一或多个要素、任一或多个限制的情况下适合地实践。所使用的术语和表示法被用作描述性而非限制性术语,并且在这些术语和表示法的使用中不打算排除所示出或描述的特征或其部分的任何等效物,而是应该认识到在本发明的范围内,各种不同的修改是可能的。因此,应该理解,尽管本发明已通过特定实施方式和任选的特征进行说明,但本文中公开的概念的修改和/或改变可以被本领域技术人员付诸实施,并且这些修改和改变被认为是在本发明的范围之内。

[0147] 在本文中对大量参考文献进行引用。所引用的参考文献通过引用以整体并入本文。在本说明书中术语的定义与引用的参考文献中所述术语的定义之间存在不一致之处的情况下,应该基于本说明书中的定义来解释所述术语。

序列表

<110> 马凯特大学

柳异

杨品芬

<120> 定量鞭毛荧光标志物和标准品

<130> 5528-00128

<150> US 62/312,772

<151> 2016-03-24

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 516

<212> PRT

<213> Chlamydomonas reinhardtii

<400> 1

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

180	185	190
Phe Glu Gln Ile Arg Asn Ala Glu Leu Val Ala Thr Gln Arg Met Glu		
195	200	205
Ala Ala Glu Arg Arg Lys Leu Glu Glu Lys Glu Arg Arg Met Gln Gln		
210	215	220
Glu Arg Glu Arg Val Glu Arg Glu Arg Val Val Arg Gln Lys Val Ala		
225	230	235
Ala Ser Ala Phe Ala Arg Gly Tyr Leu Ser Gly Ile Val Asn Thr Val		
245	250	255
Phe Asp Arg Leu Val Ser Ser Gly Tyr Ile Tyr Asp Pro Val Met Arg		
260	265	270
Glu Val Glu Thr Ala Phe Met Pro Trp Leu Lys Glu Gln Ala Ile Gly		
275	280	285
Tyr Leu Ala Arg Gly Val Val Ala Arg Arg Val Val Asp Lys Leu Val		
290	295	300
Glu Asp Ala Ala Ala Ala Leu Ala Ala Asn Arg Ser Thr Leu Ala Asp		
305	310	315
Lys Ala Ala Ser Thr Ala Ala Thr Val Asp Ala Trp Ala Glu Arg Gln		
325	330	335
Ala Lys Met Glu Ala Glu Leu Gln Gly Lys Glu Leu Glu Ala Val Arg		
340	345	350
Arg Arg Pro Thr Phe Val Leu Arg Glu Leu Lys Pro Ala Val Ala Ser		
355	360	365
Ala Asp Ala Val Glu Ala Ala Ala Ala Glu Leu Thr Ala Gln Ala Glu		
370	375	380
Glu Ala Ala Asn Ala Lys Trp Glu Ala Asp Lys Ala Glu Ala Ala Glu		
385	390	395
Lys Ala Arg Ala Glu Ala Glu Ala Ala Ala Glu Glu Gln Lys Ala Leu		
405	410	415
Leu Glu Glu Leu Ala Ala Thr Ala Ala Ala Glu Ala Glu Glu Arg Gly		
420	425	430
Glu Glu Pro Pro Ala Glu Pro Pro Ser Leu Pro Asp Gly Val Glu Pro		
435	440	445
Val Asp Val Glu Ala Glu Val Ala Lys Ala Val Glu Ala Val Pro Lys		
450	455	460
Pro Pro Val Lys Glu Val Thr Asp Ile Asp Ile Leu Ser Tyr Met Met		
465	470	475
Asp Lys Gly Ala Ile Thr Lys Asp Ala Ile Ile Gln Ala Leu Ala Val		
485	490	495

His Ala Leu Gly Asp Lys Ala Tyr Thr Asn His Pro Ala Phe Ala Glu
 500 505 510
 Ala Glu Gly Ala
 515
 <210> 2
 <211> 244
 <212> PRT
 <213> *Aequorea victoria*
 <400> 2
 Met Ala Ser Leu Ala Asp Pro Pro Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly
 1 5 10 15
 Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys
 20 25 30
 Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu
 35 40 45
 Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro
 50 55 60
 Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr
 65 70 75 80
 Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu
 85 90 95
 Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr
 100 105 110
 Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg
 115 120 125
 Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly
 130 135 140
 His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala
 145 150 155 160
 Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn
 165 170 175
 Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr
 180 185 190
 Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser
 195 200 205
 Ile Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met
 210 215 220
 Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp
 225 230 235 240

<213> Artificial

<220>

<223> Fusion protein of Chlamydomonas reinhardtii RSP3 and Aequorea victoria GFP

<400> 4

```

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

```

Glu Val Glu Thr Ala Phe Met Pro Trp Leu Lys Glu Gln Ala Ile Gly
 275 280 285
 Tyr Leu Ala Arg Gly Val Val Ala Arg Arg Val Val Asp Lys Leu Val
 290 295 300
 Glu Asp Ala Ala Ala Ala Leu Ala Ala Asn Arg Ser Thr Leu Ala Asp
 305 310 315 320
 Lys Ala Ala Ser Thr Ala Ala Thr Val Asp Ala Trp Ala Glu Arg Gln
 325 330 335
 Ala Lys Met Glu Ala Glu Leu Gln Gly Lys Glu Leu Glu Ala Val Arg
 340 345 350
 Arg Arg Pro Thr Phe Val Leu Arg Glu Leu Lys Pro Ala Val Ala Ser
 355 360 365
 Ala Asp Ala Val Glu Ala Ala Ala Ala Glu Leu Thr Ala Gln Ala Glu
 370 375 380
 Glu Ala Ala Asn Ala Lys Trp Glu Ala Asp Lys Ala Glu Ala Ala Glu
 385 390 395 400
 Lys Ala Arg Ala Glu Ala Glu Ala Ala Ala Glu Glu Gln Lys Ala Leu
 405 410 415
 Leu Glu Glu Leu Ala Ala Thr Ala Ala Ala Glu Ala Glu Glu Arg Gly
 420 425 430
 Glu Glu Pro Pro Ala Glu Pro Pro Ser Leu Pro Asp Gly Val Glu Pro
 435 440 445
 Val Asp Val Glu Ala Glu Val Ala Lys Ala Val Glu Ala Val Pro Lys
 450 455 460
 Pro Pro Val Lys Glu Val Thr Asp Ile Asp Ile Leu Ser Tyr Met Met
 465 470 475 480
 Asp Lys Gly Ala Ile Thr Lys Asp Ala Ile Ile Gln Ala Leu Ala Val
 485 490 495
 His Ala Leu Gly Asp Lys Ala Tyr Thr Asn His Pro Ala Leu Glu Met
 500 505 510
 Ala Ser Leu Ala Asp Pro Pro Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val
 515 520 525
 Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe
 530 535 540
 Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr
 545 550 555 560
 Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr
 565 570 575
 Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro

580	585	590
Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly		
595	600	605
Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys		
610	615	620
Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile		
625	630	635
Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His		
645	650	655
Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp		
660	665	670
Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile		
675	680	685
Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro		
690	695	700
Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Ile		
705	710	715
Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val		
725	730	735
Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu		
740	745	750
Leu Tyr Lys		
755		
<210> 5		
<211> 747		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Fusion protein of Chlamydomonas reinhardtii RSP3 and		
Branchiostoma lanceolatum mNeonGreen Protein		
<400> 5		
Met Val Gln Ala Lys Ala Gln Gln Gln Leu Tyr Thr His Ala Ala Glu		
1	5	10
Pro Lys Ala Val Gln Gln Arg Arg Ala Lys Tyr Arg Glu Asp Glu Thr		
20	25	30
Thr Gln Thr Leu Pro Thr Ala Asn Ile Met Phe Asp Arg Arg Val Val		
35	40	45
Arg Gly Asn Thr Tyr Ala Ala Arg Ile Leu Pro Ala Asp Ala Thr Gln		
50	55	60

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

370	375	380
Glu Ala Ala Asn Ala Lys Trp	Glu Ala Asp Lys Ala Glu Ala Ala Glu	
385	390	395
Lys Ala Arg Ala Glu Ala Glu Ala Ala Ala Glu Glu Gln Lys Ala Leu		400
	405	410
Leu Glu Glu Leu Ala Ala Thr Ala Ala Ala Glu Ala Glu Glu Arg Gly		415
	420	425
Glu Glu Pro Pro Ala Glu Pro Pro Ser Leu Pro Asp Gly Val Glu Pro		430
	435	440
Val Asp Val Glu Ala Glu Val Ala Lys Ala Val Glu Ala Val Pro Lys		445
	450	455
Pro Pro Val Lys Glu Val Thr Asp Ile Asp Ile Leu Ser Tyr Met Met		460
465	470	475
Asp Lys Gly Ala Ile Thr Lys Asp Ala Ile Ile Gln Ala Leu Ala Val		480
	485	490
His Ala Leu Gly Asp Lys Ala Tyr Thr Asn His Pro Ala Leu Glu Leu		495
	500	505
Val Gln Leu Val His Ala His His Val Gly Glu Arg Leu Leu Pro Leu		510
	515	520
Leu Glu Val Gln Leu Arg Leu Ala Val Leu Gln Leu Gly Leu Ala Glu		525
	530	535
His Val His Arg Leu Val Leu Gln Val Val Arg Gly His Gly Leu Arg		540
545	550	555
Glu Arg Val Arg Gly Ala Gly Gly Arg Ala Val Ala Leu Ala Val Ala		560
	565	570
Arg Gly Val Arg Pro Leu Glu Arg Ala Asp Asp Gly Leu Val Val Gly		575
	580	585
Val Gly Leu Leu Gly Ala Ala Pro Val Arg Gly Arg Gln Arg Val Gly		590
	595	600
His His Arg Ala Val Arg Gly Glu Ala Gly Ala Leu His Leu Gly Leu		605
	610	615
Ala Leu Asp Val Ala Ala Leu Val Arg Val Ala Val Val His Gly Gln		620
625	630	635
Gly Gly Ala Val Leu Glu Leu His Gly Ala Val His Leu Val Ala Arg		640
	645	650
Ala Val His His Arg Gly Leu Glu Arg Ala His Ala Val Arg Val Gly		655
	660	665
Gln Val Leu Val Glu Ala Val Ala Asp Val Arg His Gln Asn Pro Gly		670
	675	680
		685

Ala Glu Leu Gln Val Ala Leu Arg Gly Leu Gln Val Gln Leu Leu Val
690 695 700

Ala Val Val Gly Val Ala Gly Ala Leu Ala His His Val Glu Val His
705 710 715 720

Ala Val Asp Ala Ala Glu Asp Val Gln Leu Val Arg Arg Gly Gln Ala
725 730 735

Arg His Val Val Leu Leu Ala Leu Gly His His
740 745

<210> 6
<211> 451
<212> PRT
<213> *Chamydomonas reinhardtii*
<400> 6

Met Arg Glu Val Ile Ser Ile His Ile Gly Gln Ala Gly Ile Gln Val
1 5 10 15

Gly Asn Ala Cys Trp Glu Leu Tyr Cys Leu Glu His Gly Ile Gln Pro
20 25 30

Asp Gly Gln Met Pro Ser Asp Lys Thr Ile Gly Gly Gly Asp Asp Ala
35 40 45

Phe Asn Thr Phe Phe Ser Glu Thr Gly Ala Gly Lys His Val Pro Arg
50 55 60

Cys Ile Phe Leu Asp Leu Glu Pro Thr Val Val Asp Glu Val Arg Thr
65 70 75 80

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

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

Glu Ile Val Asp Leu Ala Leu Asp Arg Ile Arg Lys Leu Ala Asp Asn
115 120 125

Cys Thr Gly Leu Gln Gly Phe Leu Val Phe Asn Ala Val Gly Gly Gly
130 135 140

Thr Gly Ser Gly Leu Gly Ser Leu Leu Leu Glu Arg Leu Ser Val Asp
145 150 155 160

Tyr Gly Lys Lys Ser Lys Leu Gly Phe Thr Val Tyr Pro Ser Pro Gln
165 170 175

Val Ser Thr Ala Val Val Glu Pro Tyr Asn Ser Val Leu Ser Thr His
180 185 190

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

Ile Tyr Asp Ile Cys Arg Arg Ser Leu Asp Ile Glu Arg Pro Thr Tyr
 210 215 220
 Thr Asn Leu Asn Arg Leu Ile Ala Gln Val Ile Ser Ser Leu Thr Ala
 225 230 235 240
 Ser Leu Arg Phe Asp Gly Ala Leu Asn Val Asp Ile Thr Glu Phe Gln
 245 250 255
 Thr Asn Leu Val Pro Tyr Pro Arg Ile His Phe Met Leu Ser Ser Tyr
 260 265 270
 Ala Pro Ile Ile Ser Ala Glu Lys Ala Tyr His Glu Gln Leu Ser Val
 275 280 285
 Ala Glu Ile Thr Asn Ala Ala Phe Glu Pro Ala Ser Met Met Val Lys
 290 295 300
 Cys Asp Pro Arg His Gly Lys Tyr Met Ala Cys Cys Leu Met Tyr Arg
 305 310 315 320
 Gly Asp Val Val Pro Lys Asp Val Asn Ala Ser Val Ala Thr Ile Lys
 325 330 335
 Thr Lys Arg Thr Ile Gln Phe Val Asp Trp Cys Pro Thr Gly Phe Lys
 340 345 350
 Cys Gly Ile Asn Tyr Gln Pro Pro Thr Val Val Pro Gly Gly Asp Leu
 355 360 365
 Ala Lys Val Gln Arg Ala Val Cys Met Ile Ser Asn Ser Thr Ala Ile
 370 375 380
 Gly Glu Ile Phe Ser Arg Leu Asp His Lys Phe Asp Leu Met Tyr Ala
 385 390 395 400
 Lys Arg Ala Phe Val His Trp Tyr Val Gly Glu Gly Met Glu Glu Gly
 405 410 415
 Glu Phe Ser Glu Ala Arg Glu Asp Leu Ala Ala Leu Glu Lys Asp Phe
 420 425 430
 Glu Glu Val Gly Ala Glu Ser Ala Glu Gly Ala Gly Glu Gly Glu Gly
 435 440 445
 Glu Glu Tyr
 450
 <210> 7
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> *Chamydomonas reinhardtii*
 <400> 7
 Met Arg Glu Ile Val His Ile Gln Gly Gly Gln Cys Gly Asn Gln Ile
 1 5 10 15

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

	325		330		335
Asn Ser Ser Tyr Phe Val Glu Trp Ile Pro Asn Asn Val Lys Ser Ser					
	340		345		350
Val Cys Asp Ile Pro Pro Lys Gly Leu Lys Met Ser Ala Thr Phe Ile					
	355		360		365
Gly Asn Ser Thr Ala Ile Gln Glu Met Phe Lys Arg Val Ser Glu Gln					
	370		375		380
Phe Thr Ala Met Phe Arg Arg Lys Ala Phe Leu His Trp Tyr Thr Gly					
385		390		395	400
Glu Gly Met Asp Glu Met Glu Phe Thr Glu Ala Glu Ser Asn Met Asn					
	405		410		415
Asp Leu Val Ser Glu Tyr Gln Gln Tyr Gln Asp Ala Ser Ala Glu Glu					
	420		425		430
Glu Gly Glu Phe Glu Gly Glu Glu Glu Glu Ala					
	435		440		
<210> 8					
<211> 190					
<212> PRT					
<213> Chlamydomonas reinhardtii					
<400> 8					
Met Phe Lys Asn Ala Phe Gln Ser Gly Phe Leu Ser Val Leu Tyr Ser					
1	5		10		15
Ile Gly Ser Lys Pro Leu Glu Ile Trp Asp Lys Gln Val Ser Asn Gly					
	20		25		30
His Ile Lys Arg Ile Thr Asp Ala Asp Ile Gln Ser Ser Val Leu Glu					
	35		40		45
Ile Met Gly Gln Asn Val Ser Thr Thr Tyr Ile Thr Cys Pro Ala Asp					
	50		55		60
Pro Asn Lys Thr Leu Gly Ile Lys Leu Pro Phe Leu Val Leu Ile Ile					
65		70		75	80
Lys Asn Leu Asn Lys Tyr Phe Ser Phe Glu Val Gln Val Leu Asp Asp					
	85		90		95
Lys Asn Val Arg Arg Arg Phe Arg Ala Ser Asn Tyr Gln Ser Thr Thr					
	100		105		110
Arg Val Lys Pro Phe Ile Cys Thr Met Pro Met Arg Leu Asp Ser Gly					
	115		120		125
Trp Asn Gln Ile Gln Phe Asn Leu Ser Asp Phe Thr Arg Arg Ala Tyr					
	130		135		140
Gly Thr Asn Tyr Ile Glu Thr Leu Arg Val Gln Val His Ala Asn Cys					

145	150	155	160
Arg Ile Arg Arg Ile Tyr Phe Ser Asp Arg Leu Tyr Ser Glu Glu Glu			
	165	170	175
Leu Pro Ala Glu Phe Lys Leu Phe Leu Pro Ile Gln Lys Ser			
	180	185	190

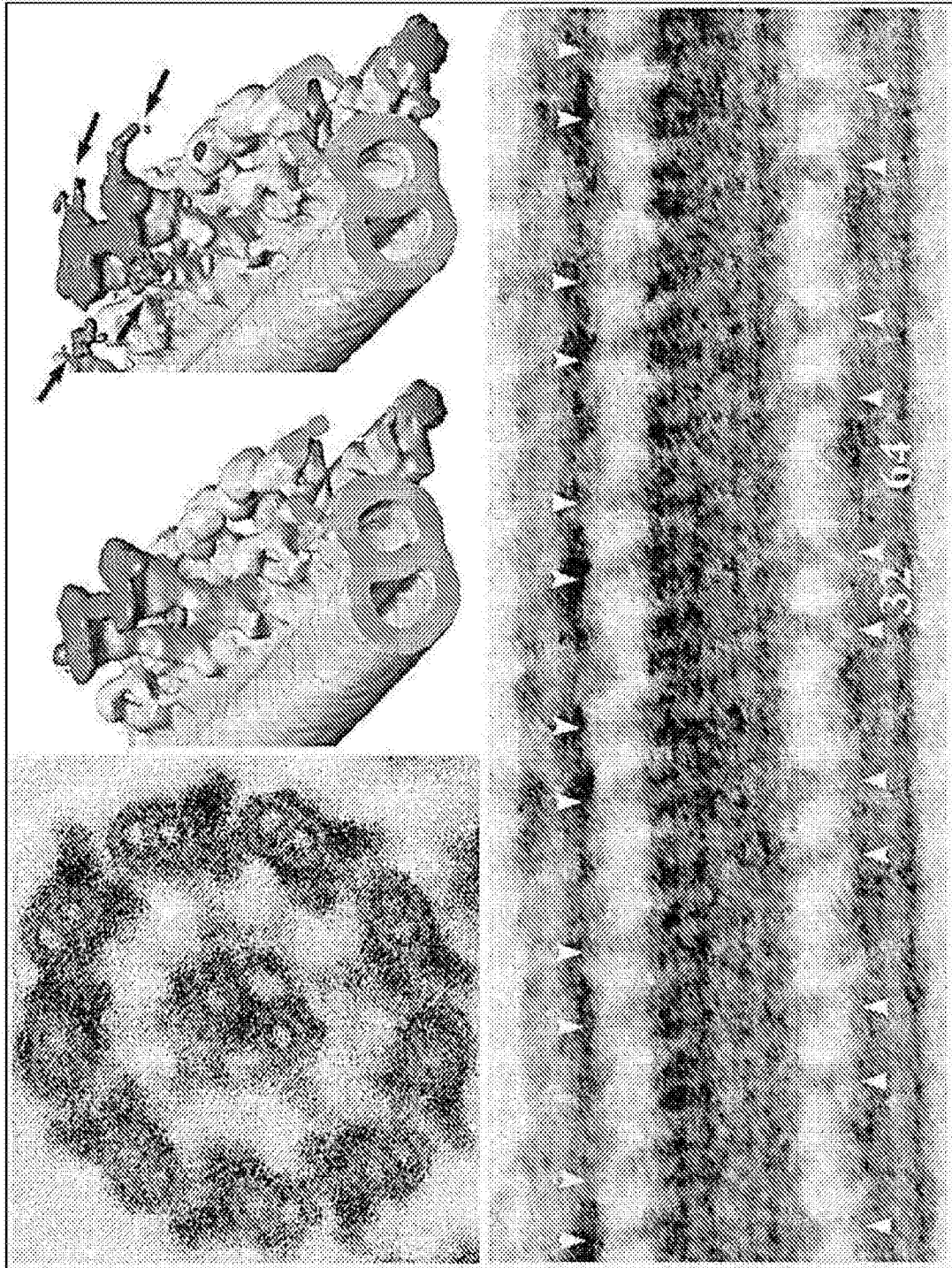


图1

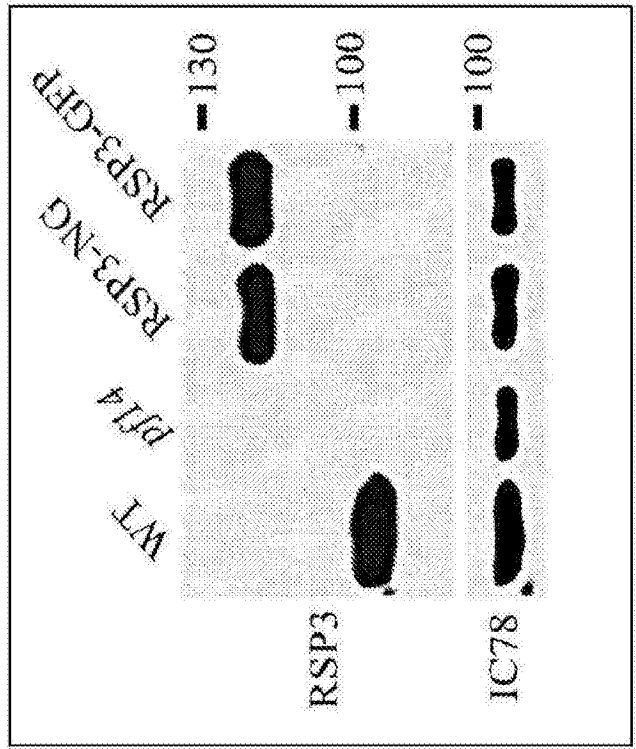


图2A

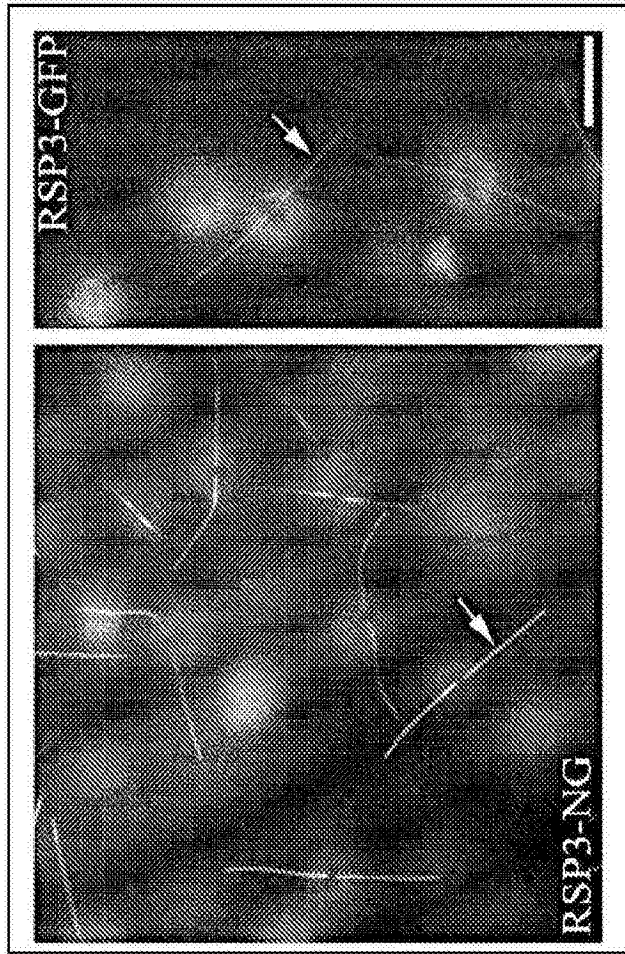


图 2B

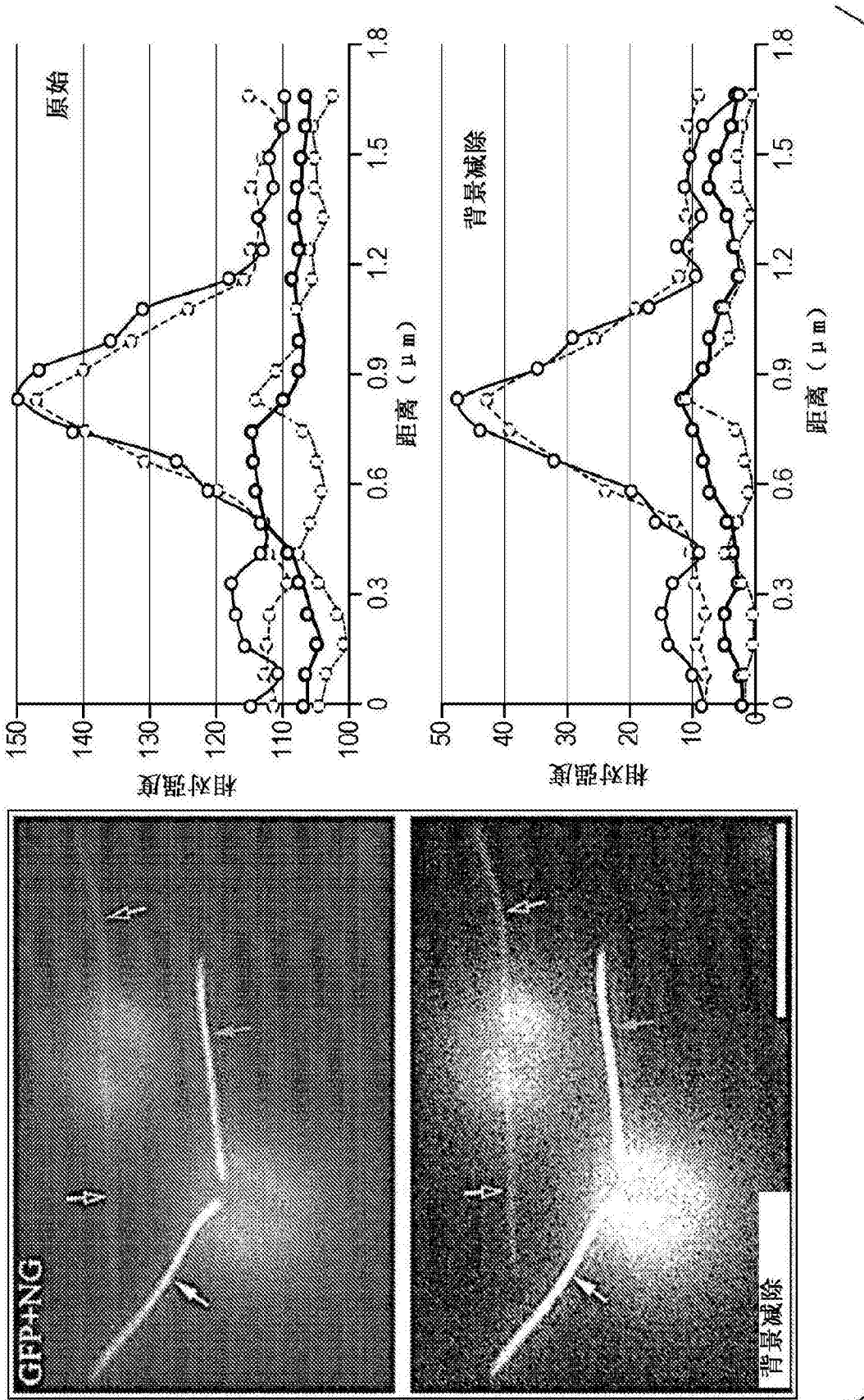


图2C

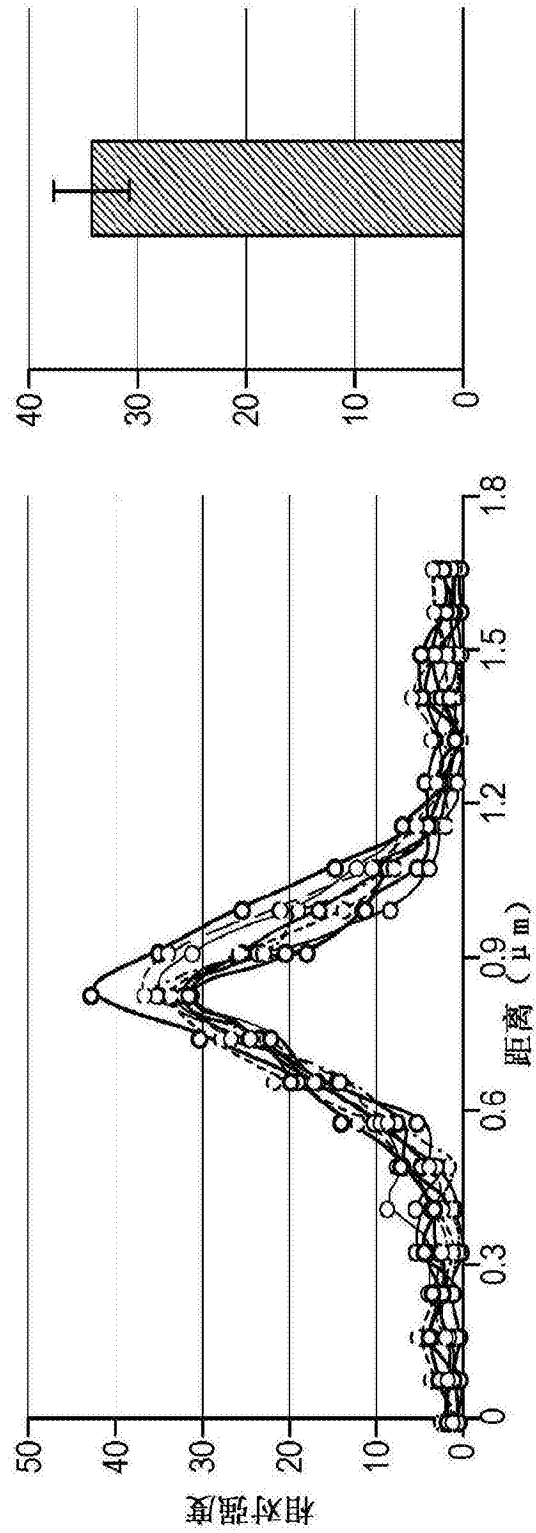
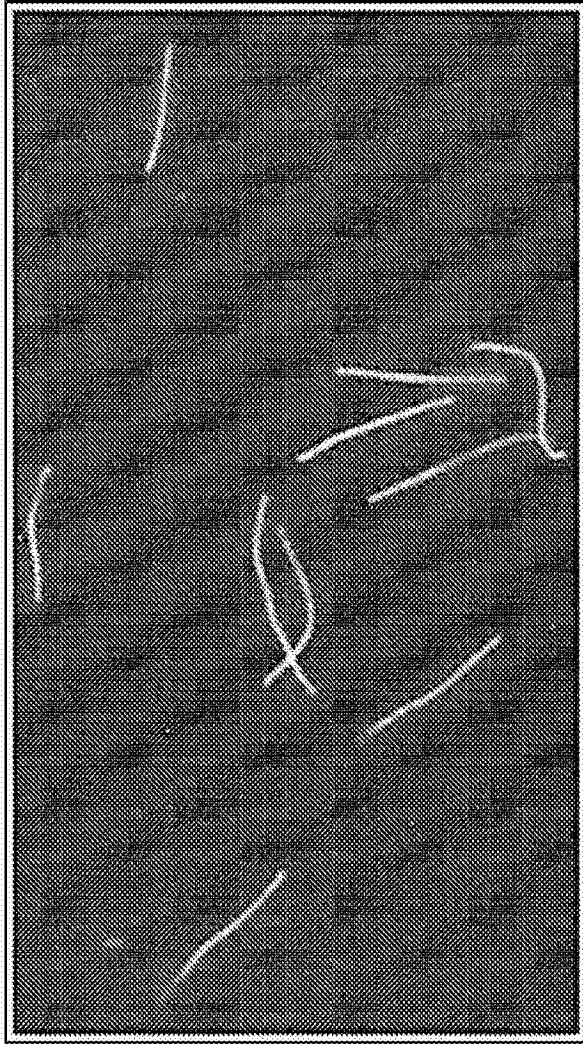


图3A

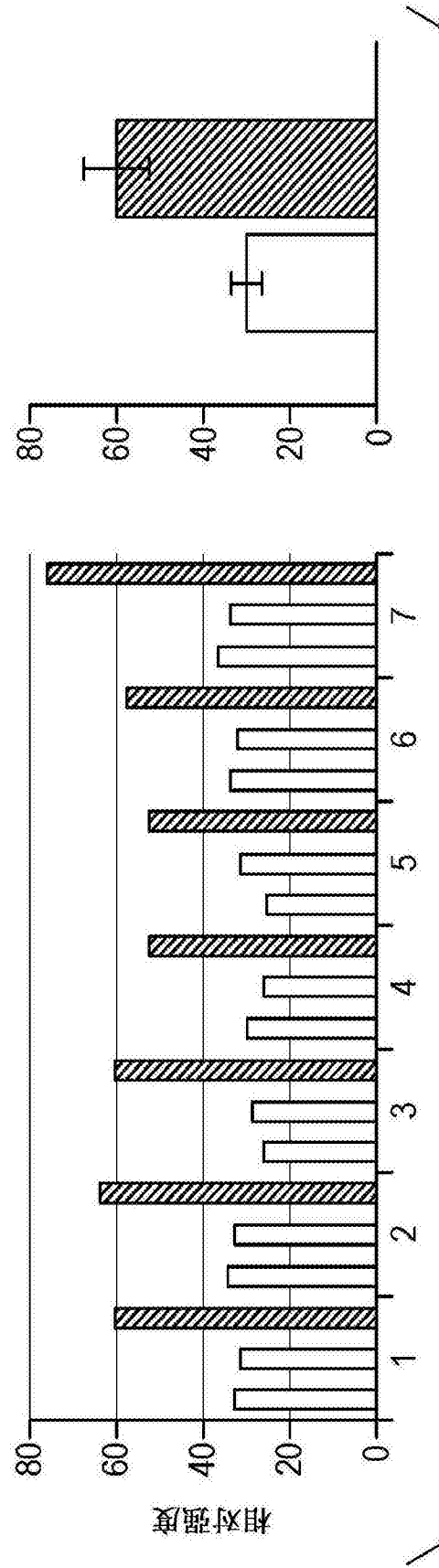
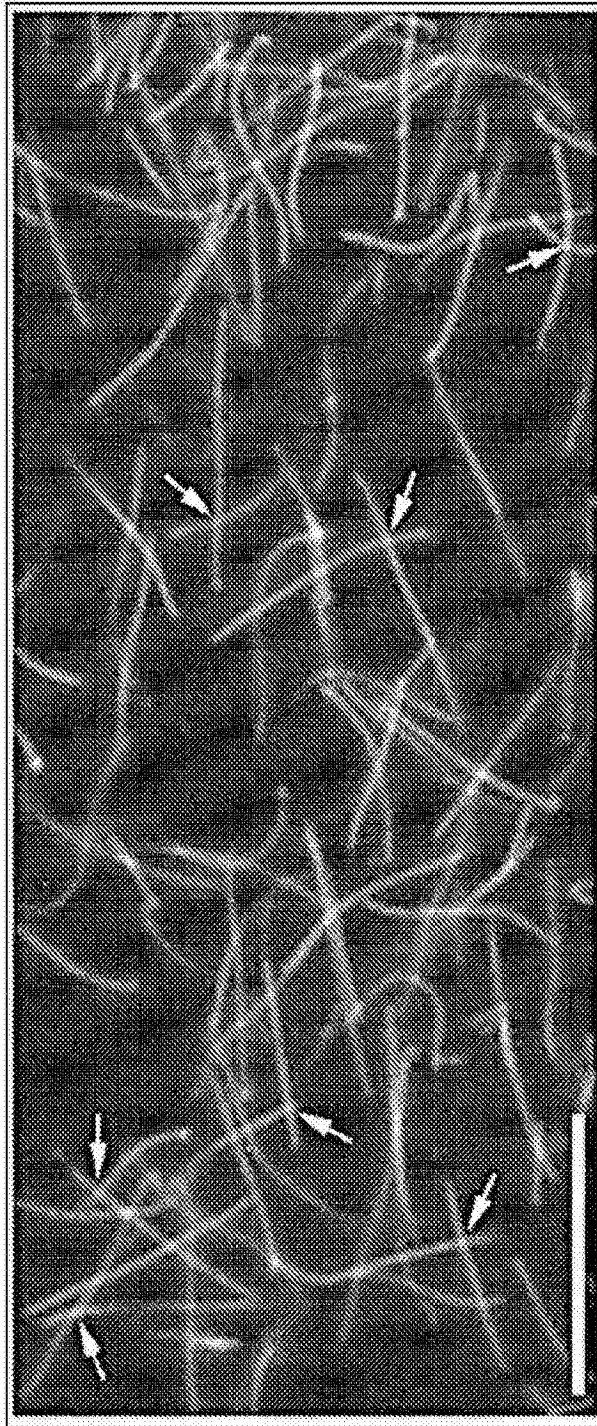


图3B

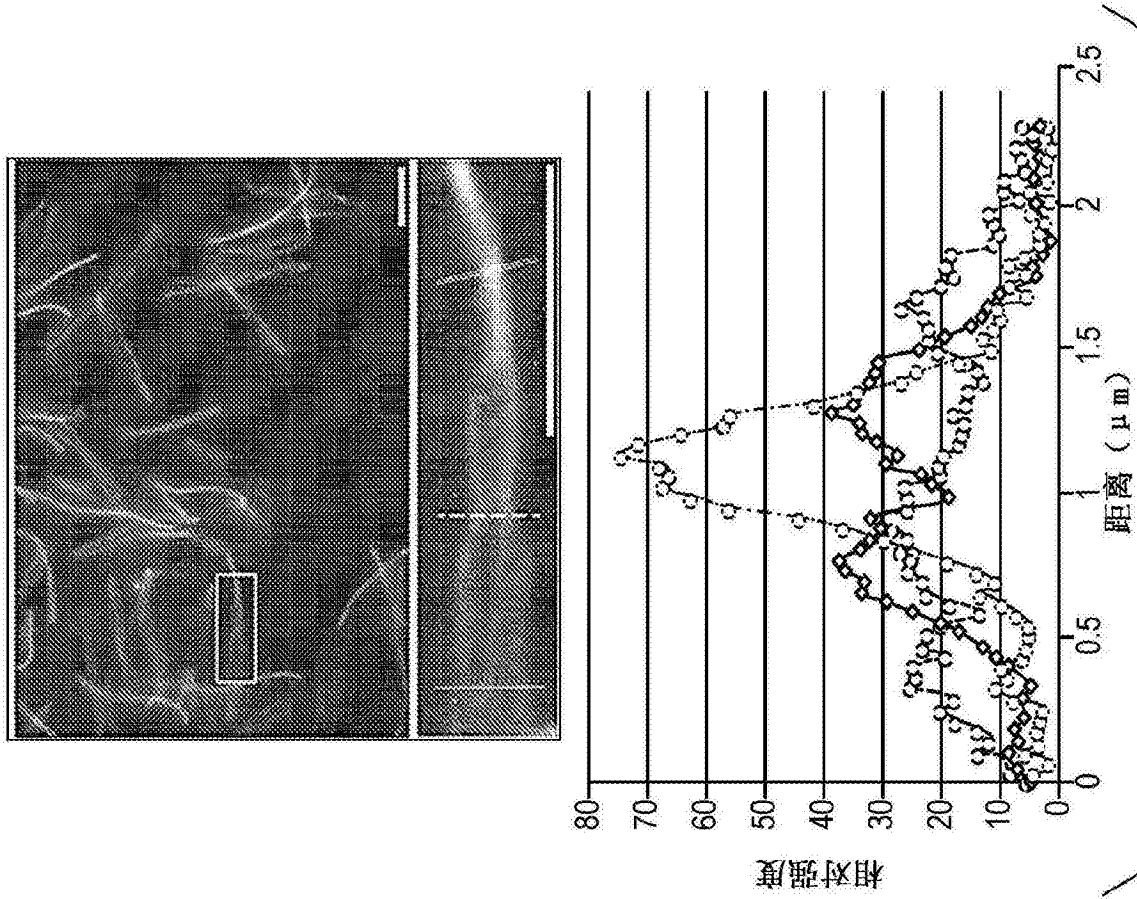


图4A

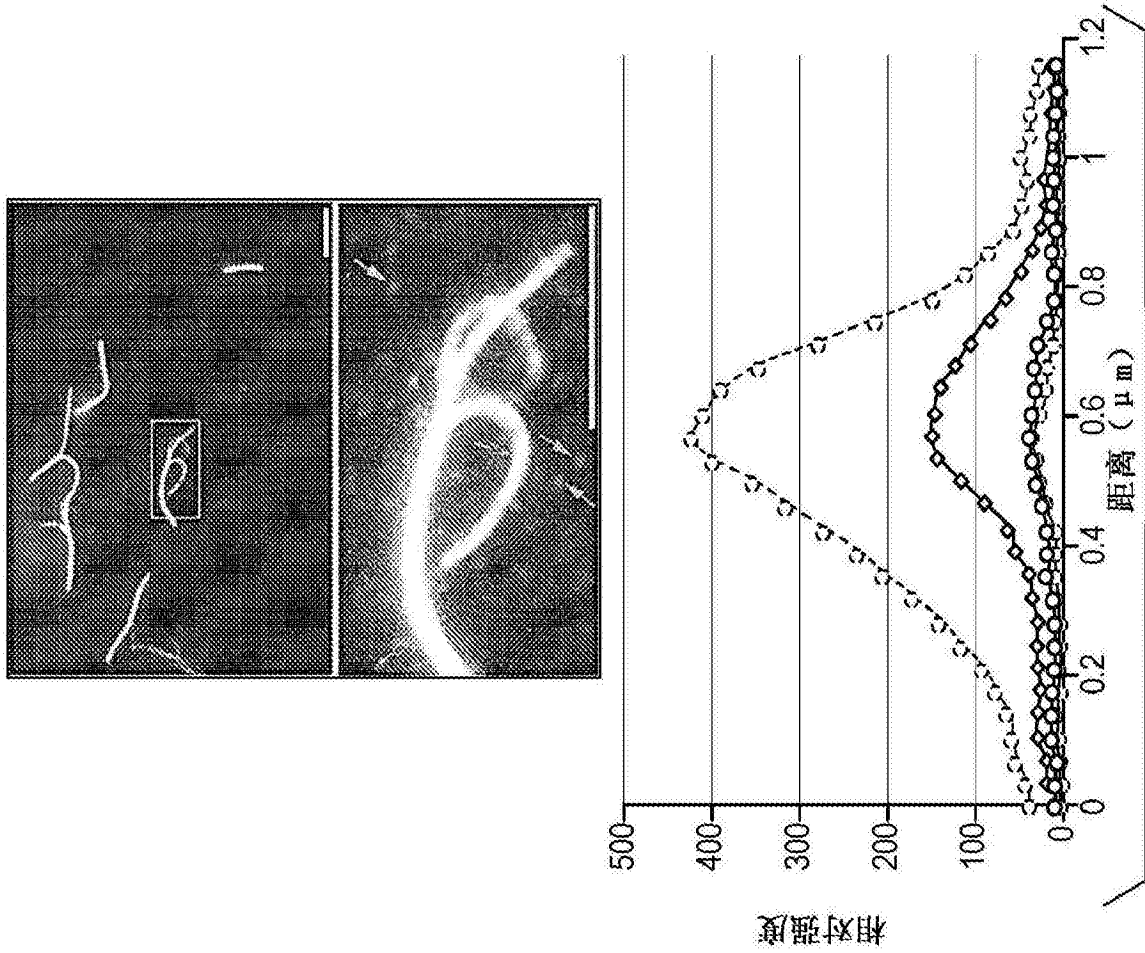


图4B

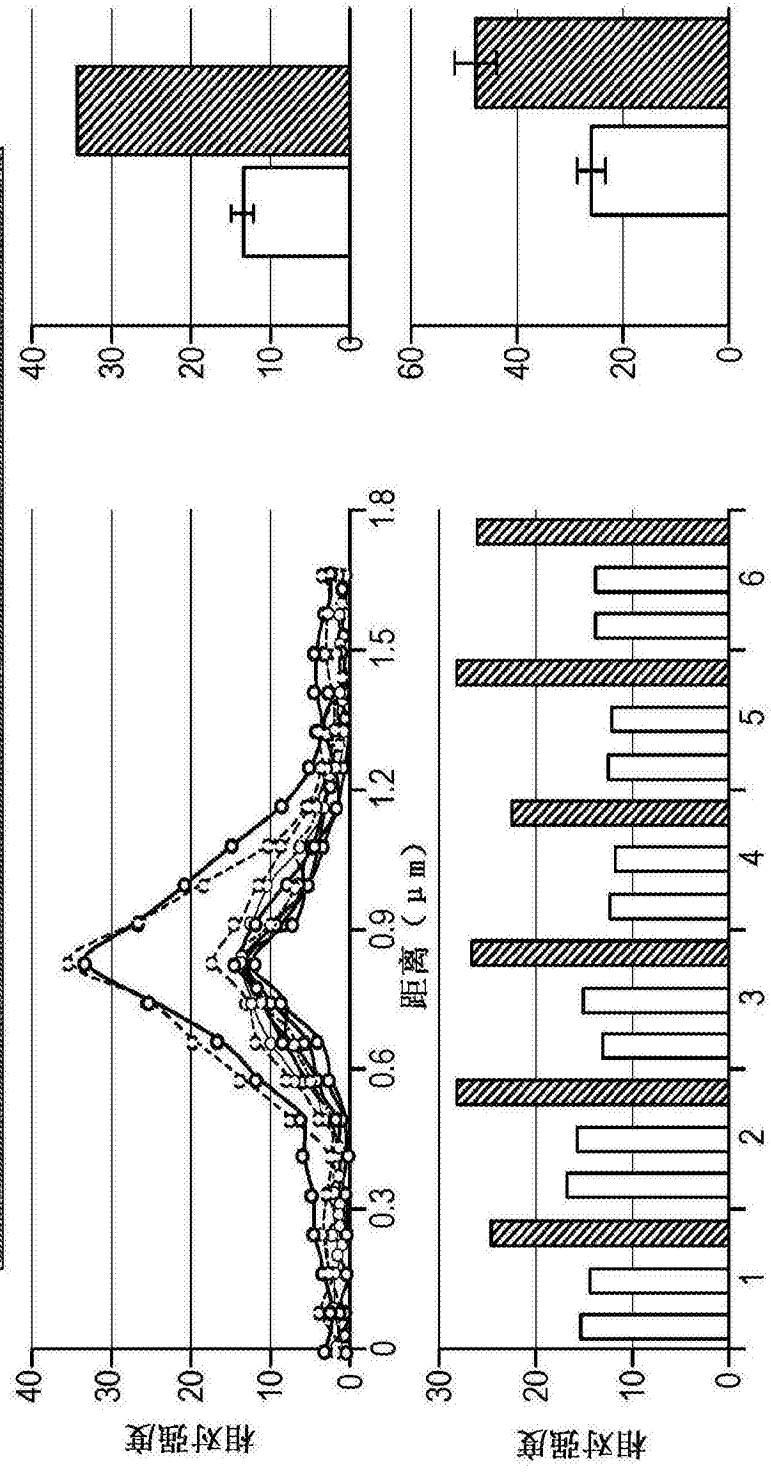
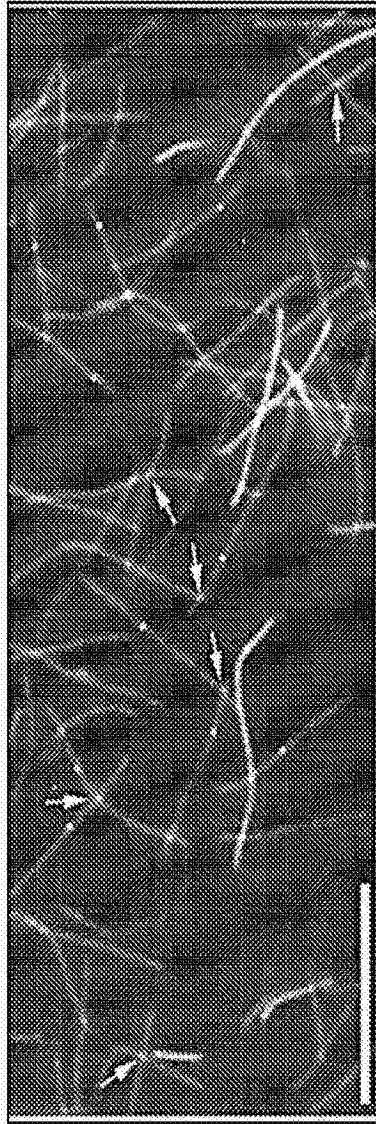


图5A

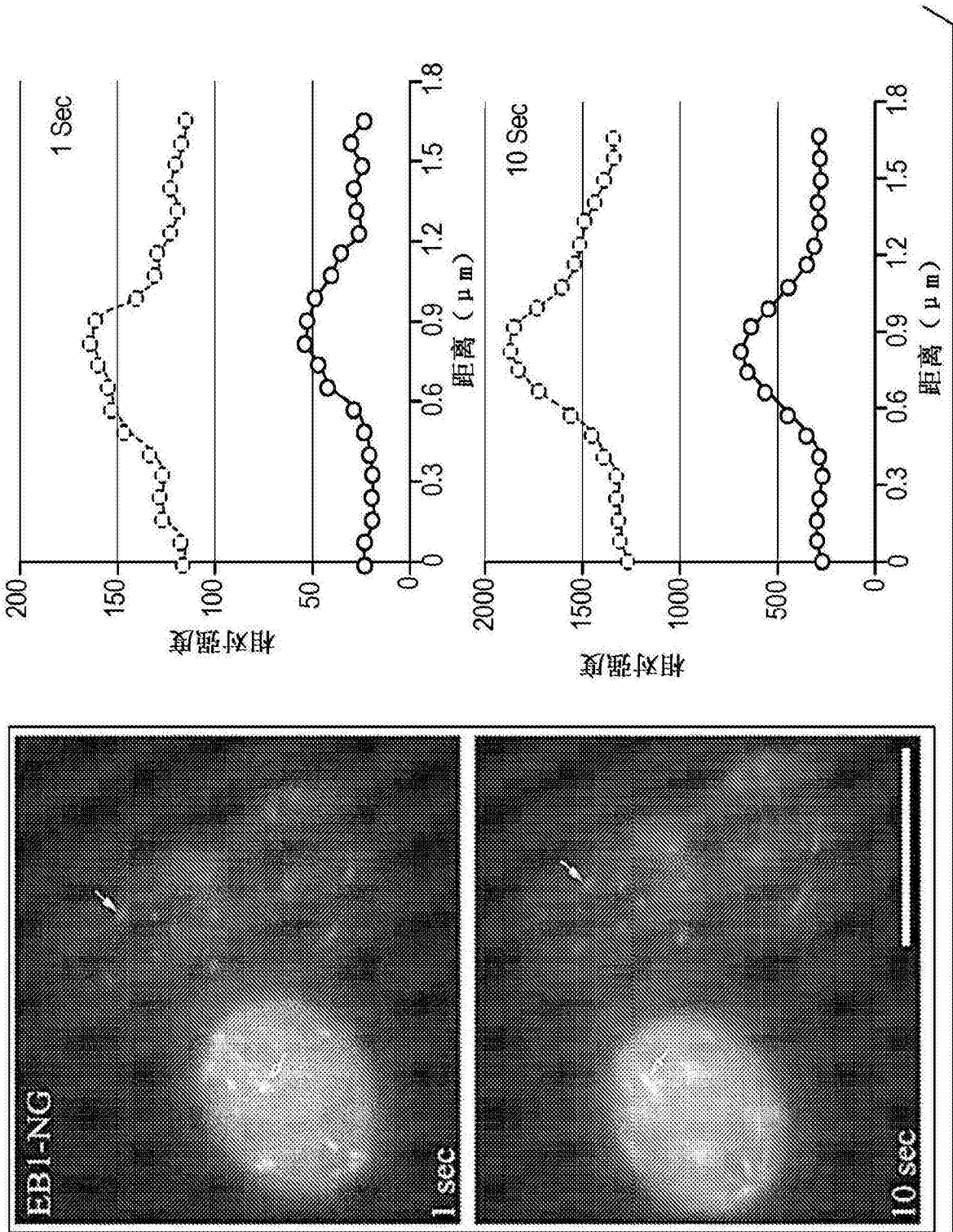


图5B

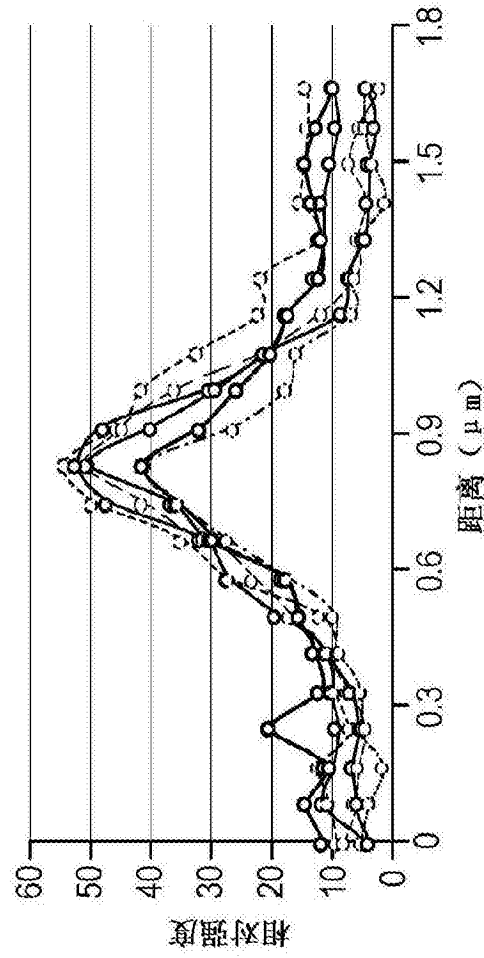
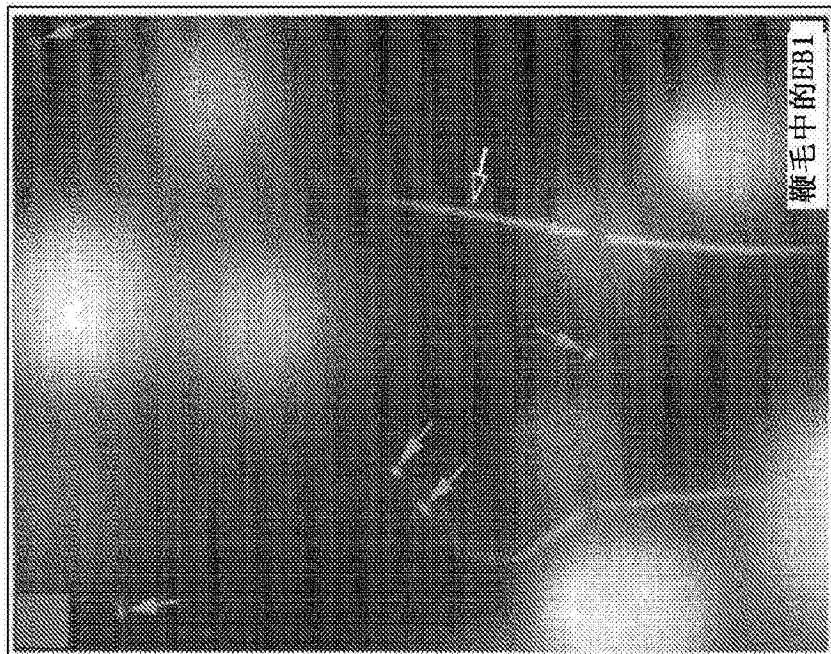


图6A

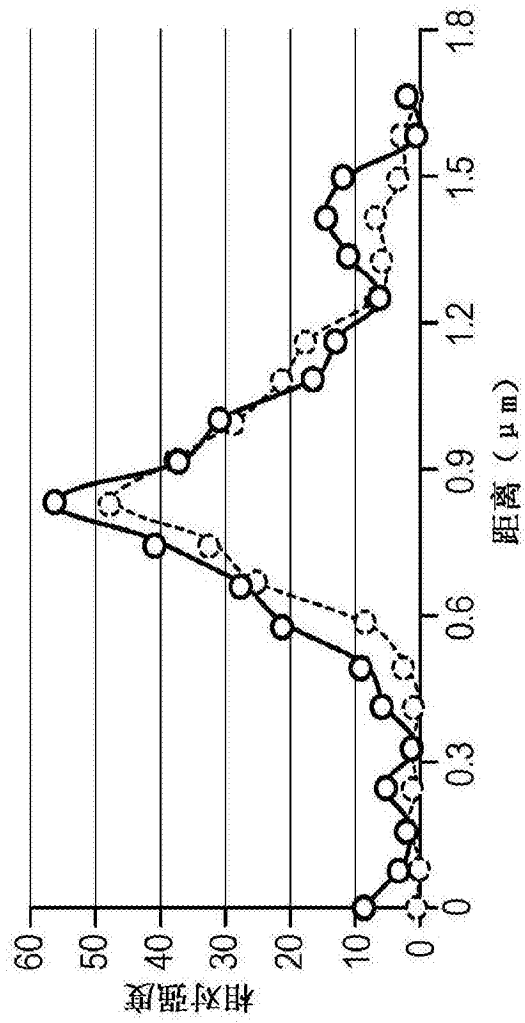
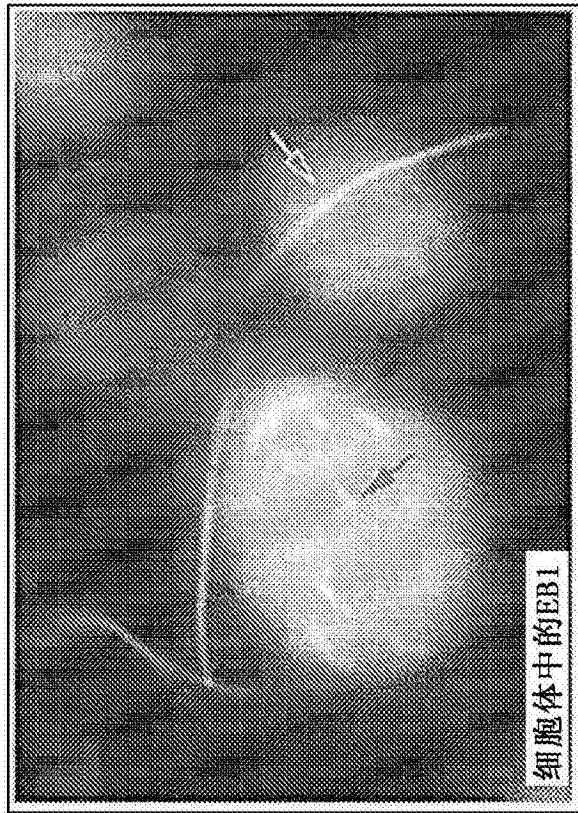


图6B

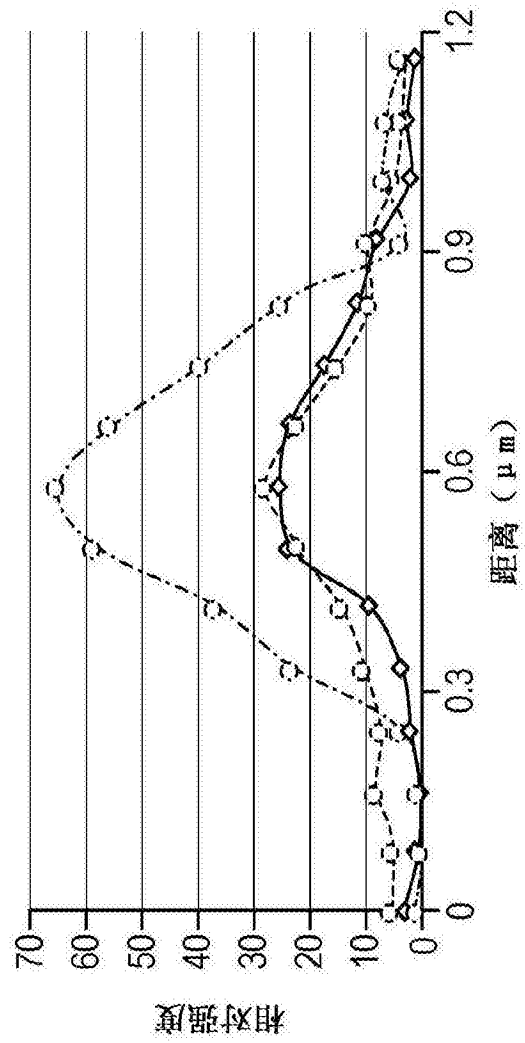
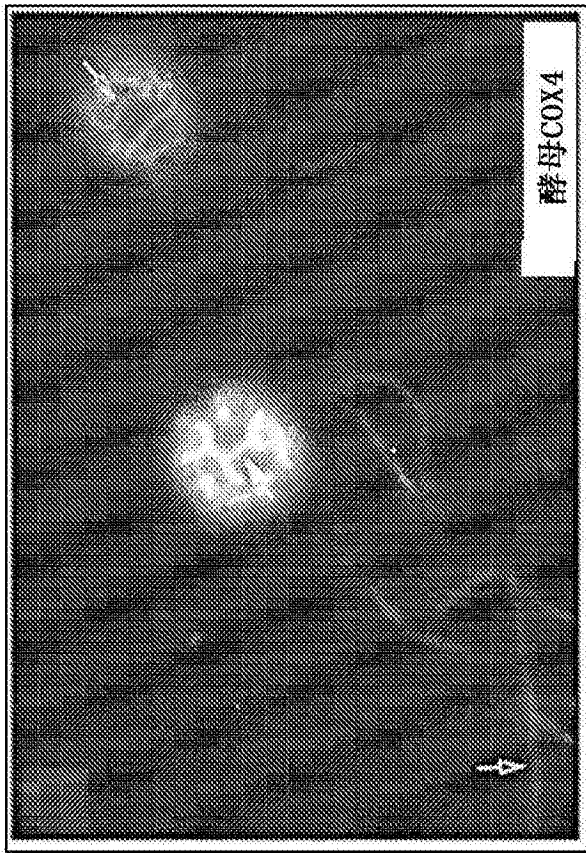


图6C

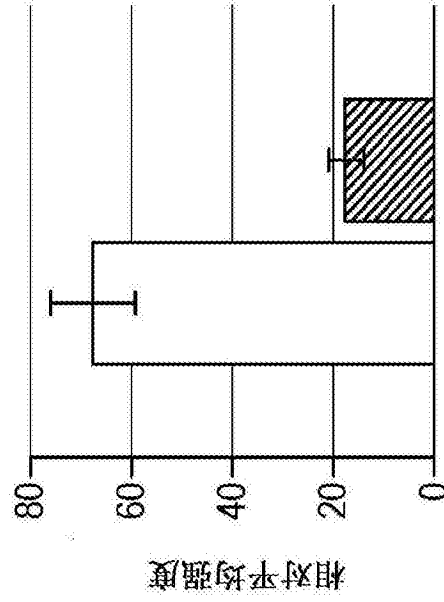
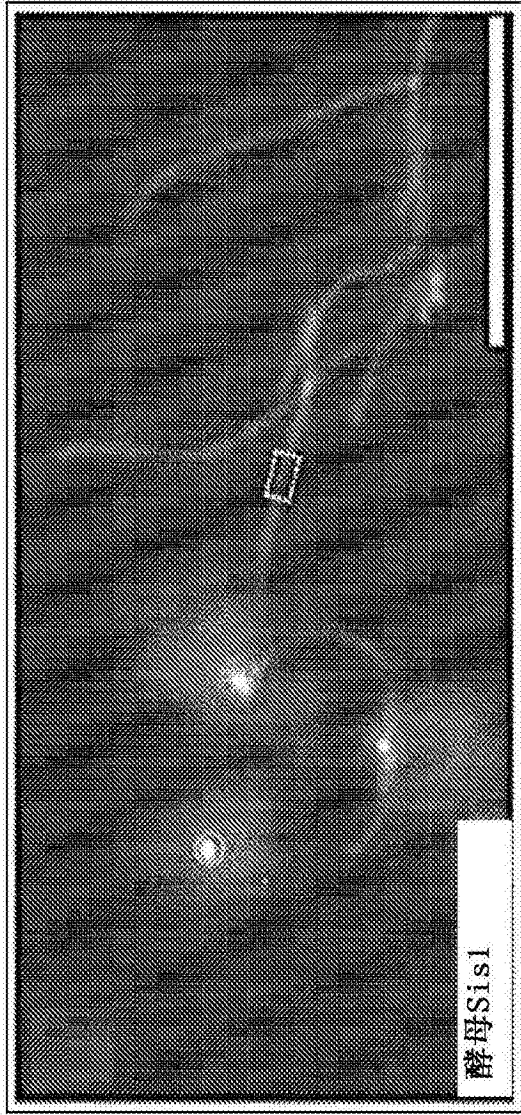


图6D

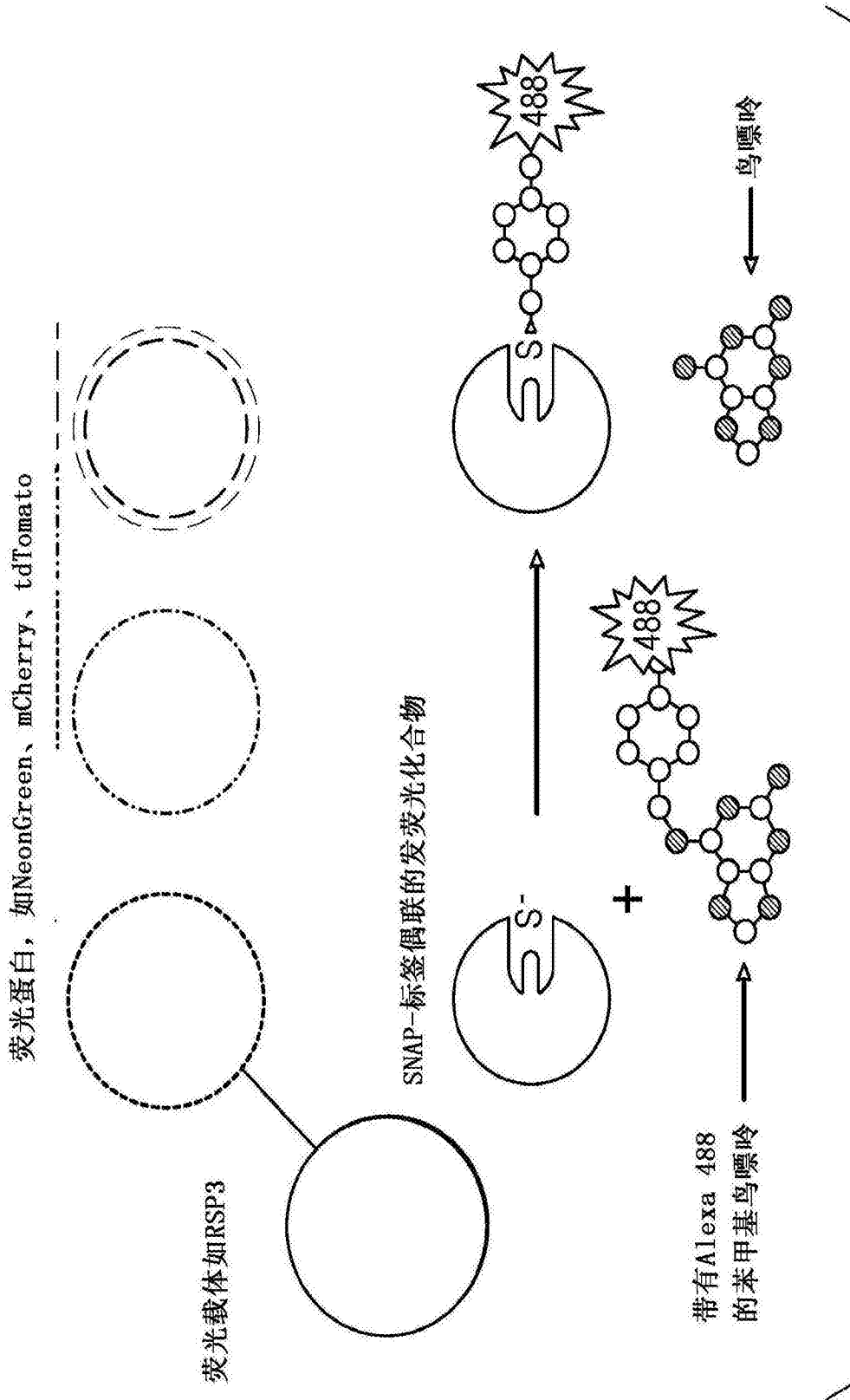


图7