



(21) 申请号 202011604223.0

(22) 申请日 2020.12.30

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 114689552 A

(43) 申请公布日 2022.07.01

(73) 专利权人 中国科学院天津工业生物技术研究所

地址 300308 天津市滨海新区空港经济区  
西七道32号

(72) 发明人 王猛 王瑾

(74) 专利代理机构 北京商专永信知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11400

专利代理师 欧阳石文

(51) Int. Cl.

G01N 21/64 (2006.01)

(56) 对比文件

Jin Wang等.Repurposing conformational changes in ANL superfamily enzymes to rapidly generate biosensors for organic and amino acids.Nature Communications.2023,全文.

审查员 马蕊

权利要求书2页 说明书9页  
序列表11页 附图5页

(54) 发明名称

一种小分子荧光传感器及其应用

(57) 摘要

本发明通过利用腺苷结构域和酰基中间载体结构域(PCP)的三维结构与催化机理,开发了具有很强通用性的有机小分子生物荧光传感器的构建方法,并获得一系列小分子荧光传感器,实现含有羧基的有机小分子化合物的快速检测。本发明涉及的小分子荧光传感器的构建方法简便、通用性强。用于检测小分子时具有检测周期短、灵敏度高、特异性强、成本低、应用范围广、易于实现高通量检测等优点。

1. 一种含有羧基的有机小分子荧光传感器的融合基因,其特征在于,将带有随机连接肽的荧光蛋白DNA序列插入到结合特定含有羧基的有机小分子的感应蛋白基因的N端大亚基与C端小亚基相连的铰链处,或者插入到C端小亚基与酰基中间载体结构域相连的连接肽处,或者插入到感应蛋白的C端小亚基后而形成;

所述结合特定含有羧基的小分子的感应蛋白基因是芳香基和酰基-CoA合成酶的DNA序列、非核糖体肽合成酶的腺苷结构域和酰基中间载体结构域的DNA序列,或羧酸还原酶的腺苷结构域和酰基中间载体结构域的DNA序列;所述的带有随机连接肽的荧光蛋白是循环排列荧光蛋白的N末端和C末端分别带有随机长度的连接肽;

所述芳香基和酰基-CoA合成酶的DNA序列编码的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示、非核糖体肽合成酶的腺苷结构域和酰基中间载体结构域的DNA序列编码的氨基酸序列如SEQ ID NO.3或SEQ ID NO.5或SEQ ID NO.7所示,或羧酸还原酶的腺苷结构域和酰基中间载体结构域的DNA序列编码的氨基酸序列如SEQ ID NO.9所示。

2. 如权利要求1所述的融合基因,其特征在于,所述连接肽的长度为20个氨基酸长度以内;所述荧光蛋白是绿色荧光蛋白、黄色荧光蛋白、红色荧光蛋白。

3. 如权利要求2所述的融合基因,其特征在于,所述连接肽的长度为10个氨基酸以内;荧光蛋白DNA编码的氨基酸序列如SEQ ID NO.11所示。

4. 如权利要求2所述的融合基因,其特征在于,所述芳香基和酰基-CoA合成酶的DNA序列如SEQ ID NO.2所示、非核糖体肽合成酶的腺苷结构域和酰基中间载体结构域的DNA序列如SEQ ID NO.4或SEQ ID NO.6或SEQ ID NO.8所示,或羧酸还原酶的腺苷结构域和酰基中间载体结构域的DNA序列SEQ ID NO.10所示;所述荧光蛋白DNA的核苷酸序列如SEQ ID NO.12所示。

5. 如权利要求4所述的融合基因,其特征在于,所述带有随机连接肽的荧光蛋白DNA序列插入到所述结合特定小分子的感应蛋白基因上的位点是在感应蛋白的N端大亚基与C端小亚基相连的铰链处或者C端小亚基与酰基中间载体结构域相连的连接肽处。

6. 如权利要求5所述的融合基因,其特征在于,所述带有随机连接肽的荧光蛋白DNA序列插入到所述结合特定小分子的感应蛋白基因上的位点是在SEQ ID NO.1所示氨基酸序列的第438位亮氨酸与439位异亮氨酸之间、SEQ ID NO.3所示氨基酸序列的第532位丝氨酸与第533位丝氨酸之间、SEQ ID NO.5所示氨基酸序列的第524位脯氨酸与525位谷氨酸之间、SEQ ID NO .5所示氨基酸序列的第524位脯氨酸与组氨酸标签之间、SEQ ID NO .7所示氨基酸序列的第528位脯氨酸与第529位天门冬酰胺之间、或SEQ ID NO .9所示氨基酸序列的第651位丙氨酸与652 位谷氨酸之间。

7. 如权利要求6所述的融合基因,其特征在于,所述融合基因还包括纯化标签编码序列。

8. 含有如权利要求1-7任一项所述的融合基因的表达质粒。

9. 如权利要求8所述的表达质粒,其特征在于,其适合于底盘细胞诱导表达的表达质粒,其出发载体是pET表达系统质粒,或pBAD表达系统质粒。

10. 一种含有羧基的有机小分子荧光传感器,其特征在于,其是由如权利要求1-7任一项所述的融合基因编码的融合蛋白。

11. 含有如权利要求8或9所述的表达质粒的宿主细胞。

12. 如权利要求11所述的宿主细胞,其特征在于,其是细菌。

13. 如权利要求12所述的宿主细胞,其特征在于,其是大肠杆菌。

14. 一种检测有机小分子化合物的方法,其特征在于,将如权利要求10所述的含有羧基的有机小分子荧光传感器溶于缓冲溶液中,加入ATP、 $MgCl_2$ 以及待测的含有羧基的有机小分子化合物的样品构成反应体系,随后测定荧光强度。

15. 如权利要求14所述的方法,其特征在于,所述缓冲液是100 mM Tris, pH7.5;所述反应体系中各物质终浓度分别为ATP 0.5-2 mM, $MgCl_2$  1.0-3.0 mM,含有羧基的有机小分子化合物0.05  $\mu$ M-5 mM,所述含有羧基的有机小分子荧光传感器0.5-4  $\mu$ M。

16. 如权利要求15所述的方法,其特征在于,所述含有羧基的有机小分子是苯丙氨酸、酪氨酸、脯氨酸、异亮氨酸、(2S,3S)-甲基天冬氨酸、6-氯-L-色氨酸、苯甲酸、香豆酸、肉桂酸。

17. 如权利要求16所述的方法,其特征在于,所述含有羧基的有机小分子荧光传感器通过基因重组表达的方式获得。

18. 如权利要求16所述的方法,其特征在于,还包括所述含有羧基的有机小分子荧光传感器荧光强度与待测有机小分子浓度之间的标准曲线的制作环节。

## 一种小分子荧光传感器及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种生物传感器,具体涉及一种小分子荧光传感器及其在检测小分子化合物中的应用。

### 背景技术

[0002] 小分子是指分子量小于900道尔顿的有机化合物,大小约为1nm。小分子化合物在生物学、化学、医学等领域具有多重功能或应用,在生物学方面可作为细胞信号分子、初级代谢产物、次级代谢产物、代谢过程中的中间体等;在化学方面可作为药物,化工原料等;在医学方面可以作为疾病诊断的关键指标,具有很高的应用价值。目前小分子化合物的常规检测方法包括物理化学分析和免疫分析。物理化学分析方法包括气相色谱(GC)、高效液相色谱(HPLC)、薄层色谱(TLC)、毛细管区带电泳(CZE)、质谱(MS)、串联质谱(MS/MS)等。免疫分析方法包括放射免疫法(RIA)、酶联免疫吸附试验(ELISA)、荧光免疫分析法(FIA)等。物理化学分析方法可以进行准确的定性和定量分析,但操作步骤复杂,检测周期长,仪器价格昂贵而且不能实现实时快速检测。免疫分析方法具有快速、特异的优点,但敏感性不够高,信息量很低。

[0003] 除物理化学分析方法外,利用生物传感器对小分子化合物进行检测也是一种行之有效的办法。其中,基因编码的小分子生物传感器大致可分为三种类型,第一类是转录因子生物传感器,第二类是核糖体开关生物传感器,第三类是基于荧光共振能量转移的生物传感器。

[0004] 转录因子是一种在转录水平上控制细胞代谢物水平的蛋白。有些转录因子已经进化出根据代谢物浓度或环境变化来调节基因表达的功能。相关研究人员根据转录因子可感应代谢物浓度的特点来设计转录因子生物传感器。目前转录因子生物传感器已应用在检测维生素、氨基酸、糖类等物质中,成为了代谢工程中应用最广泛的高通量筛选工具。然而还有大量的应用价值较高的小分子没有找到其合适的转录因子以用于生物传感器的构建。关于转录因子生物传感器的构建和应用还存在一些关键的问题,例如:转录因子生物传感器必须以细胞为载体,很难体外应用;将转录因子应用于异源宿主中并产生功能性转录因子生物传感器是比较困难的,而且转录因子传感器无法检测胞外代谢产物。

[0005] 核糖体开关是mRNA分子的调节区,具有保守的配体结合结构域和可调节下游基因翻译的可变序列。与转录因子传感器相比,核糖体开关传感器可提供更快的响应速度,因为RNA已经被转录,因此可以立即与效应器结合并执行其调节功能。核糖体开关传感器已被开发用于检测嘌呤及其衍生物、辅酶及相关化合物、氨基酸、抗生素等物质。虽然核糖体开关传感器的功能强大,但是许多保守的mRNA元件的天然配体还未被发现,而且关于核糖体开关的结构与其相应代谢物相互作用的关系尚不明确,且核糖体开关传感器也很难用于体外快速检测,所以核糖体开关传感器的发展受到了限制。

[0006] 可基因编码的荧光共振能量转移(FRET)生物传感器通常有一对供体和受体荧光团。传感器的配体结合域插入到两个荧光团之间。当传感器与目标配体结合时,配体结合域

的构象发生变化,改变了供体和受体荧光团的距离,导致荧光共振能量转移信号发生变化。基于荧光共振能量转移的生物传感器已被用于在细胞体内监测各种小分子,如糖磷酸盐、丙酮酸、辅因子、氨基酸等。荧光共振能量转移生物传感器在细胞体内应用广泛,但通常此类型的生物传感器动态变化范围不高,需要耗费大量时间精力来对其进行优化。基于上述原因,荧光共振能量转移生物传感器通常适用于监测细胞内部的代谢过程及成像,不适用于小分子化合物的高通量筛选。

[0007] 基因编码的不同类型的小分子生物传感器可以监测和筛选工程细胞中目标小分子产物,与物理化学分析方法相比,可以做到对不同类型细胞的体内或者体外的实时快速检测。但每种类型的小分子生物传感器都有其各自的优缺点,每种传感器中所利用的配体结合域也各不相同,缺乏共性。目前还没有一种小分子生物传感器构建方法可以做到系统性的快速构建一系列针对不同小分子化合物的传感器。因此,亟需开发一种简单快速、低成本、高灵敏度、高通量且能实时检测小分子化合物的方法。

### 发明内容

[0008] 本发明针对现有技术的不足,以及实现需求,提供一种小分子荧光生物传感器及其构建方法和应用。

[0009] 通过以下技术方案实现的:本发明涉及一种小分子荧光生物传感器构建方法,首先选择结合特定小分子的感应蛋白基因,然后将其克隆到底盘细菌(如大肠杆菌)的表达质粒中,在确定荧光蛋白插入位点后,将带有随机连接肽的荧光蛋白DNA序列克隆到表达质粒中,并将表达质粒转化至底盘细菌(如大肠杆菌)中进行诱导表达,随后利用特定小分子对克隆的小分子荧光生物传感器突变库进行筛选,最终筛选得到小分子荧光生物传感器,并对其进行表征及后续应用。

[0010] 本发明由此提供一种有机小分子荧光传感器的融合基因,其特征在于,将带有随机连接肽的荧光蛋白DNA序列插入到所述结合特定小分子的感应蛋白基因的N端大亚基与C端小亚基相连的铰链处,或者C端小亚基与酰基中间载体结构域(PCP)相连的连接肽处,或者在C端小亚基后插入荧光蛋白而形成。

[0011] 在具体实施方式中,所述结合特定小分子的感应蛋白基因是所述芳香基和酰基-CoA合成酶的DNA序列、非核糖体肽合成酶的腺苷结构域和酰基中间载体结构域的DNA序列,或羧酸还原酶的腺苷结构域和酰基中间载体结构域的DNA序列。

[0012] 所述的带有随机连接肽的荧光蛋白是循环排列荧光蛋白的N末端和C末端分别带有随机长度的连接肽。优选地,所述连接肽的长度为20个氨基酸以内,优选在15个氨基酸以内,更优选在10个氨基酸以内,进一步优选为5个氨基酸以内,例如1至4个氨基酸,最优选为2氨基酸;所述荧光蛋白是绿色荧光蛋白、黄色荧光蛋白、红色荧光蛋白,更具体的是,其荧光蛋白的DNA编码的氨基酸序列如SEQ ID NO.11所示,优选地其核苷酸序列如SEQ ID NO.12所示。

[0013] 在一个更具体的实施方式中,所述芳香基和酰基-CoA合成酶的DNA序列编码的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示、非核糖体肽合成酶的腺苷结构域和酰基中间载体结构域的DNA序列编码的氨基酸序列如SEQ ID NO.3或SEQ ID NO.5或SEQ ID NO.7所示,或羧酸还原酶的腺苷结构域和酰基中间载体结构域的DNA序列编码的氨基酸序列如SEQ ID NO.9所示,

优选地,所述芳香基和酰基-CoA合成酶的DNA序列如SEQ ID NO.2所示、非核糖体肽合成酶的腺苷结构域和酰基中间载体结构域的DNA序列如SEQ ID NO.4或SEQ ID NO.6或SEQ ID NO.8所示,或羧酸还原酶的腺苷结构域和酰基中间载体结构域的DNA序列如SEQ ID NO.10所示。

[0014] 在具体实施方式中,荧光蛋白有三种插入方式,第一种是在感应蛋白的N端大亚基与C端小亚基相连的铰链处插入荧光蛋白,第二种是当有酰基中间载体结构域时,在C端小亚基与酰基中间载体结构域相连的连接肽处插入荧光蛋白,第三种是当无(或移除)酰基中间载体结构域时,在感应蛋白的C端小亚基后插入荧光蛋白。其中,C端小亚基指的是芳香基和酰基-CoA合成酶、非核糖体肽合成酶和羧酸还原酶的腺苷结构域末端大概80-120个氨基酸左右组成的亚基。优选地,所述带有随机连接肽的荧光蛋白DNA序列插入到所述结合特定小分子的感应蛋白基因上的位点是在SEQ ID NO.1所示氨基酸序列的第438位亮氨酸与439位异亮氨酸之间、SEQ ID NO.3所示氨基酸序列的第532位丝氨酸与第533位丝氨酸之间、SEQ ID NO.5所示氨基酸序列的第524位脯氨酸与525位谷氨酸之间、SEQ ID NO.5所示氨基酸序列的第524位脯氨酸与组氨酸标签之间、SEQ ID NO.7所示氨基酸序列的第528位脯氨酸与第529位天门冬酰胺之间、或SEQ ID NO.9所示氨基酸序列的第651位丙氨酸与652位谷氨酸之间。

[0015] 进一步优选地,所述融合基因还包括纯化标签编码序列,例如组氨酸标签编码序列。

[0016] 本发明还提供所述的融合基因的表达质粒,优选的是适合于底盘细胞诱导表达的表达质粒,更优选地是表达质粒的出发载体是pET表达系统如pET28a、pET24a、pET17b等,或pBAD表达系统如pBAD/His、pBAD/gIII等。其中诱导表达是指底盘细菌(如大肠杆菌)在培养基中于最适生长条件下培养生长到一定浓度时,加入相应地诱导剂如异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、葡萄糖、甘油、阿拉伯糖等诱导剂,诱导剂的终浓度为0.1-0.4mM,在16 $^{\circ}$ C-20 $^{\circ}$ C进行低温诱导表达蛋白。通过低温表达有利于蛋白质的正确折叠,也有利于循环排列荧光蛋白的成熟,因此是优选操作方式。

[0017] 进而,本发明提供含有所述的表达质粒的宿主细胞,优选为细菌,更优选为大肠杆菌。

[0018] 本发明进一步提供一种有机小分子荧光传感器,其特征在于,其是所述的融合基因编码的融合蛋白。

[0019] 本发明还提供一种检测有机小分子化合物的方法,其特征在于,将所述的有机小分子荧光传感器溶于缓冲溶液中,加入ATP、MgCl<sub>2</sub>以及待测的有机小分子化合物构成反应体系,随后测定荧光强度;优选地,所述缓冲液是Tris,更具体的是100mM Tris,pH7.5;优选地,所述反应体系中各物质终浓度分别为ATP 0.5-2mM,MgCl<sub>2</sub> 1.0-3.0mM,有机小分子化合物0.05 $\mu$ M-5mM,所述有机小分子荧光传感器0.5-4 $\mu$ M。

[0020] 所述有机小分子化合物是含有羧基的有机小分子,例如苯丙氨酸、酪氨酸、脯氨酸、异亮氨酸等天然氨基酸,(2S,3S)-MeAsp、6-chloro-L-Trp等氨基酸衍生物,以及苯甲酸、香豆酸、肉桂酸等有机酸。

[0021] 优选地,所述有机小分子荧光传感器通过基因重组表达的方式获得。

[0022] 在具体实施方式中,所述方法还包括所述有机小分子荧光传感器与待测有机小分

子浓度之间的标准曲线的制作环节。更具体地,以待测有机小分子的浓度为横坐标,以所述有机小分子荧光生物传感器的荧光强度为纵坐标,进行曲线绘制,得到特定小分子与传感器荧光强度的关系图。

[0023] 本发明的优点和有益效果为:本发明通过利用腺苷结构域和酰基中间载体结构域的三维结构与催化机理,开发了具有很强通用性的小分子生物荧光传感器的构建方法,并获得一系列小分子荧光传感器,实现氨基酸、有机酸等小分子化合物的快速检测;本发明开发的小分子荧光传感器一方面构建方法简便,另一方面在用于检测小分子时检测周期短、灵敏度高、特异性强,无需对样本进行特殊处理,且无需昂贵复杂的仪器设备,因此具有成本低、应用范围广、易于实现高通量检测等优点。

### 附图说明

[0024] 图1为ANL与CAR催化的两步反应示意图;

[0025] 图2为ANL中NRPSs腺苷功能域循环模式示意图;

[0026] 图3为本发明小分子荧光生物传感器原理示意图;

[0027] 图4为本发明技术路线图;

[0028] 图5为利用本发明所涉及的方法筛选到的4-香豆酸荧光生物传感器底物浓度与传感器荧光信号强度关系图;

[0029] 图6为利用本发明所涉及的方法筛选到的L-组氨酸荧光生物传感器底物浓度与传感器荧光信号强度关系图;

[0030] 图7为利用本发明所涉及的方法筛选到的L-苯丙氨酸荧光生物传感器3-2C2底物浓度与传感器荧光信号强度关系图;

[0031] 图8为利用本发明所涉及的方法筛选到的L-苯丙氨酸荧光生物传感器3-2E6底物浓度与传感器荧光信号强度关系图;

[0032] 图9为利用本发明所涉及的方法筛选到的L-脯氨酸荧光生物传感器底物浓度与传感器荧光信号强度关系图;

[0033] 图10为利用本发明所涉及的方法筛选到的苯甲酸荧光生物传感器底物浓度与传感器荧光信号强度关系图;

### 具体实施方式

[0034] 本发明构建的有机小分子荧光生物传感器,是本发明人充分分析梳理相关已知知识,结合研究探索最终实现的。其中发明人技术原理描述如下,虽然其中有些知识为已知的知识,但其中如何利用并非现有技术。连接酶家族中的ANL腺苷形成酶家族(ANL Adenylating Enzymes)由芳香基和酰基-CoA合成酶,非核糖体肽合成酶(NRPSs)的腺苷结构域(A domain),以及萤火虫荧光素酶组成。ANL超家族以及与NRPSs相关的羧酸还原酶(Carboxylic acid reductase,CAR)的腺苷结构域(A domain)具有相似的三维结构以及相似的催化反应步骤。ANL超家族与羧酸还原酶的一级序列同源性约为20%,但是它们具有极为相似的三维结构,都是由N末端大亚基通过5-10个氨基酸的铰链与C端小亚基相连,其中绝大部分的NRPSs与CAR的腺苷结构域后还会有一个保守的酰基中间载体结构域(Peptidyl-Carrier Protein,PCP)。基于这种相似的三维结构,ANL腺苷形成酶家族与羧酸

还原酶共享了一种非常相似的催化机制,均通过两步催化反应完成底物的活化和后续反应(图1)。首先是腺苷形成反应,羧基与ATP在酶催化下形成酰基-腺苷酸,并释放出无机焦磷酸,腺苷是高能量的酸酐,这为第二步反应提供了活化能。第二步是硫酯形成反应,对于乙酰-CoA合成酶、NRPSs以及CAR的腺苷功能结构域,CoA或酰基中间载体结构域上的泛酰巯基乙胺通过硫醇进攻羧基碳,取代AMP,而在荧光素酶中,则是通过中间产物的氧化脱羧来完成的。

[0035] 研究表明,ANL以及CAR蛋白在催化的不同阶段,通过蛋白构象的变化对底物活性位点进行重新配置。研究也揭示了ANL家族可能的催化循环过程,循环过程以腺苷结构域的开放构象开始,底物和ATP在蛋白的底物结合位点结合,N端大亚基与C端小亚基彼此远离,底物进入结合口袋之后,ATP水解伴随氨酰基-AMP的形成,导致蛋白处于一个闭合的构象。随后,闭合状态中C端小亚基上的活性位点接近中间体,活化的底物被转移到酰基中间载体结构域(或CoA)上,完成第二步硫酯形成步骤。随着酰基中间载体结构域或产物的离开,腺苷功能域完成催化反应并回到开放构象,在此过程中C端小亚基发生了大约140°的位移(图2)。

[0036] 在上述分析的基础上,本发明利用ANL以及CAR蛋白在催化的不同阶段有不同的蛋白构象,即C端小亚基发生的位移变化,将对构象变化敏感的荧光蛋白插入到N端大亚基与C端小亚基相连的铰链处,或者插入到C端小亚基与酰基中间载体结构域相连的连接肽处,或者插入到C端小亚基后,来产生特异性的小分子荧光生物传感器,传感器中荧光蛋白的荧光强度会随底物浓度的变化而变化(图3)。在一个具体实施方式中,如图4所示,本发明的一种小分子荧光生物传感器构建方法,首先选择结合特定小分子的感应蛋白基因,然后将其克隆到大肠杆菌表达质粒中,在确定荧光蛋白插入位点后,将带有随机连接肽的荧光蛋白DNA序列克隆到感应蛋白所在的表达质粒中,并将表达质粒转化至大肠杆菌中形成小分子荧光生物传感器突变库,并进行诱导表达,随后利用特定小分子对克隆的小分子荧光生物传感器突变库进行筛选,最终对筛选得到的小分子荧光生物传感器进行表征及后续应用。

[0037] 为了使本技术领域的人员更好地理解本发明方案,下面结合具体实施例进一步说明本发明的技术方案。

[0038] 实施例1感应蛋白序列的确定与表达载体的构建

[0039] 步骤1:查阅文献找到结合4-香豆酸的芳香基和酰基-CoA合成酶*Nicotiana tabacum*4CL isoform 2(Nt4CL2),其氨基酸序列为SEQ ID NO.1,结合组氨酸的非核糖体肽合成酶的腺苷结构域和酰基中间载体结构域(BacC His A和PCP结构域),其氨基酸序列为SEQ ID NO.3,结合苯丙氨酸的非核糖体肽合成酶的腺苷结构域和酰基中间载体结构域(GrsA Phe A和PCP结构域),其氨基酸序列为SEQ ID NO.5,结合脯氨酸的非核糖体肽合成酶的腺苷结构域和酰基中间载体结构域(GrsB Pro A和PCP结构域),其氨基酸序列为SEQ ID NO.7,结合苯甲酸的羧酸还原酶的腺苷结构域和酰基中间载体结构域(srCAR A和PCP结构域),其氨基酸序列为SEQ ID NO.9。

[0040] 步骤2:根据步骤1各结构域的氨基酸序列分别得到其对应的核苷酸序列为SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.6、SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.10,并通过同源重组的方法将上述核苷酸序列克隆到大肠杆菌蛋白表达载体PET28a或PET24a中,构建得到传感器骨架载体PET28a-Nt4CL2、PET28a-BacC His A和PCP结构域、PET28a-GrsA Phe A和PCP结构域、



NO.28)

[0061] cp-GrsAp-F:GGCACAAGCTGGAGTACAACBNKBNKGAACCTGATTTAACTTTCGG (SEQ ID NO.29)

[0062] cp-GrsA-F:GGCACAAGCTGGAGTACAACBNKBNKCACCACCACCACCACCCTGAGAT (SEQ ID NO.30)

[0063] cp-GrsB-R:TCGGCCATGATATAGACGTTMNMNVCGGAAGAGATTTTCTGTCTA (SEQ ID NO.31)

[0064] cp-GrsB-F:GGCACAAGCTGGAGTACAACBNKBNKAATCTAGAGGGGATTGTGAA (SEQ ID NO.32)

[0065] cp-SrCAR-R:TCGGCCATGATATAGACGTTMNMNVGGCCAGCTGGGCATACAGTG (SEQ ID NO.33)

[0066] cp-SrCAR-R:GGCACAAGCTGGAGTACAACBNKBNKGAACCCAGGCAGCGAACT (SEQ ID NO.34)

[0067] 上述SEQ ID NO.24-34是本实施例中荧光小分子生物传感器表达载体构建时所用到的引物,其作用是将荧光蛋白的基因插入到实施例1中所构建的感应蛋白表达载体中,以获得完整的荧光小分子生物传感器。其中SEQ ID NO.24-34中“BNK”与“MNV”为简并引物。简并引物是指用来编码一段短肽序列的不同碱基序列的混合物。B代表C或G或T,N代表G或A或T或C,K代表G或T,M代表A或C,V代表A或G或C。

[0068] 以实施例1中构建的表达载体PET28a-Nt4CL2、PET28a-BacC His A和PCP结构域、PET28a-GrsA Phe A和PCP结构域、PET28a-GrsA Phe A结构域、PET28a-GrsB Pro A和PCP结构域、PET24a-srCAR A和PCP结构域为模板,通过PCR的方式得到带有随机荧光蛋白连接肽DNA序列的线性化感应蛋白传感器DNA片段。

[0069] 步骤3:通过同源重组的方法将荧光蛋白的DNA片段(荧光蛋白为cpEGFP荧光蛋白,氨基酸序列为SEQ ID NO.11,核苷酸序列为SEQ ID NO.12)克隆到步骤2中得到的线性化感应蛋白DNA片段中,得到完整的荧光生物传感器载体PET28a-Nt4CL2-cpEGFP、PET28a-BacC His A和PCP结构域-cpEGFP、PET28a-GrsA Phe A和PCP结构域-cpEGFP、PET28a-GrsA Phe A结构域-cpEGFP、PET28a-GrsB Pro A和PCP结构域-cpEGFP、PET24a-srCAR A和PCP结构域-cpEGFP。

[0070] 实施例3小分子荧光生物传感器的诱导表达

[0071] 步骤1:于-80冰箱中取100 $\mu$ L大肠杆菌BAPI感受态6管,冰上融化备用。

[0072] 步骤2:将实施例2中构建得到的传感器载体PET28a-Nt4CL2-cpEGFP、PET28a-BacC His A和PCP结构域-cpEGFP、PET28a-GrsA Phe A和PCP结构域-cpEGFP、PET28a-GrsA Phe A结构域-cpEGFP、PET28a-GrsB Pro A和PCP结构域-cpEGFP、PET24a-srCAR A和PCP结构域-cpEGFP质粒分别加入步骤1中大肠杆菌BAPI感受态中,于冰上静置5分钟,随后42 $^{\circ}$ C水浴锅中热激45秒,热激后加入900 $\mu$ L无抗LB培养基,37 $^{\circ}$ C,220rpm摇床中恢复培养1小时。恢复培养完成后涂平板,平板倒置放于37 $^{\circ}$ C培养箱中过夜培养。

[0073] 步骤3:将步骤2中平板上长出的转化子挑入装有150 $\mu$ L卡那霉素抗性的LB培养基的96浅孔板中,置于37 $^{\circ}$ C,800rpm摇床中过夜培养。

[0074] 步骤4:将步骤3中得到菌株以2%的接种量转接入装有1ml卡那霉素抗性的LB培养

基的96深孔板中,置于37℃,800rpm摇床中培养1-2小时,直到菌液的OD<sub>600</sub>为0.6-0.8。

[0075] 步骤5:向步骤4中的菌株中加入IPTG,使IPTG的终浓度为0.4mM。

[0076] 步骤6:将步骤5中的96深孔板置于16℃,800rpm摇床中培养48小时。

[0077] 实施例4小分子荧光生物传感器的筛选

[0078] 步骤1:将实施例3中的96深孔板放入4℃离心机中5000rpm离心10分钟,使菌体沉淀,弃上清。

[0079] 步骤2:用500μL PBS缓冲液将步骤1中孔板中的菌体重悬,放入4℃离心机中5000rpm离心10分钟,使菌体沉淀,弃上清。重复此步骤2-3次。

[0080] 步骤3:用500μLPBS缓冲液将步骤2中孔板中的菌体重悬,反复冻融8-10次,使菌体裂解。

[0081] 步骤4:将步骤3中的孔板放入4℃离心机中5000rpm离心40分钟,使细胞不溶碎片沉淀。

[0082] 步骤5:将步骤4中得到的孔板中的上清液转移至96孔荧光酶标板中。在荧光酶标仪中以激发光460nm,发射光510nm,测得上清液的初始荧光值。

[0083] 步骤6:向步骤5中的荧光酶标板中加入ATP,MgCl<sub>2</sub>以及各小分子溶液,使其终浓度分别为1mM,2.5mM,0.1-1mM。

[0084] 步骤7:将步骤6中的酶标板放入荧光酶标仪中,每1分钟测1次数值,参数同步骤5,共15分钟。

[0085] 步骤8:将步骤5中测得的初始荧光值与步骤7中测得的最终荧光值相减后除以初始荧光值,选取其中荧光强度变化幅度大于20%的菌株进行蛋白纯化验证。

[0086] 实施例5小分子荧光生物传感器的验证和表征

[0087] 步骤1:将实施例4中得到的待验证菌株重新接种于培养基中,置于37℃,220rpm摇床中过夜培养。

[0088] 步骤2:将步骤1中的菌株以2%的接种量转接入装有50mL卡纳抗性的LB培养基的摇瓶中,置于37℃,220rpm摇床中培养1-2小时,直到菌液OD<sub>600</sub>为0.6-0.8。

[0089] 步骤3:向步骤2中的菌液中加入IPTG,使IPTG的终浓度为0.2-0.4mM。

[0090] 步骤4:将步骤3中的菌株置于16℃,220rpm摇床中培养48小时。

[0091] 步骤5:将步骤4中的菌株放入4℃离心机中7500rpm离心5分钟,使菌体沉淀,弃上清。

[0092] 步骤6:用20mM Tris,500mM NaCl pH7.9缓冲液将步骤5中的菌株重悬,放入4℃离心机中7500rpm离心5分钟,使菌体沉淀,弃上清。重复此步骤2-3次。

[0093] 步骤7:用20mM Tris,500mM NaCl pH7.9缓冲液将步骤6中的菌株重悬,超声破碎使菌体裂解。

[0094] 步骤8:将步骤7中的菌株放入4℃离心机中10000rpm离心45分钟,使细胞不溶碎片沉淀。

[0095] 步骤9:利用传感器中的His标签纯化蛋白,20mM Tris,500mM NaCl,20mM咪唑pH7.9缓冲液洗杂,20mM Tris,500mM NaCl,500mM咪唑pH7.9缓冲液洗脱目标蛋白。

[0096] 步骤10:使用超滤管离心降低目标蛋白中的咪唑浓度,使其降低到0.1mM以下。

[0097] 步骤11:验证传感器是否有效,缓冲溶液为100mM Tris,pH7.5,反应体系中各物质

终浓度分别为ATP 1mM, MgCl<sub>2</sub> 2.5mM, 特定小分子溶液0.1μM-1mM, 待测传感器1-2μM。

[0098] 步骤12: 将步骤11中的反应体系转移至96孔荧光酶标板中。在荧光酶标仪中以激发光460nm, 发射光510nm测试待测传感器的荧光强度是否会随其特异性结合小分子浓度的变化而变化。

[0099] 步骤13: 分别以4-香豆酸、L-组氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、苯甲酸五种不同浓度的小分子为横坐标, 荧光小分子生物传感器的荧光强度为纵坐标, 进行曲线绘制。

[0100] 步骤14: 测序获得荧光小分子生物传感器的连接肽的氨基酸序列。4-香豆酸传感器N端连接肽为LE, C端连接肽为TR。L-组氨酸传感器N端连接肽为GG, C端连接肽PV。L-苯丙氨酸传感器3-2C2 N端连接肽CV, C端连接肽为LL。L-苯丙氨酸传感器3-2E6N端连接肽VF, C端连接肽为QS。L-脯氨酸传感器N端连接肽为PF, C端连接肽为LH。苯甲酸传感器N端连接肽为GL, C端连接肽为QR。

[0101] 通过实验得到各种小分子与对应的荧光传感器荧光强度的关系图(具体见图5至10, 其中图7、图8均为苯丙氨酸, 其区别为传感器3-2C2的构成为A domain-cpEGFP-PCP domain, 传感器3-2E6的构成为A domain-cpEGFP, 荧光蛋白处的linker不同)。如图所示, 4-香豆酸传感器在4-香豆酸浓度为0.1-10μM时, 传感器的荧光强度随4-香豆酸浓度的升高而下降, 荧光强度下降的幅度为32.8%。L-组氨酸传感器在L-组氨酸浓度为0.1-50μM时, 传感器的荧光强度随L-组氨酸浓度的升高而升高, 荧光强度升高的幅度为45.2%。L-苯丙氨酸传感器3-2C2在L-苯丙氨酸浓度为0.1-50μM时, 传感器的荧光强度随L-苯丙氨酸浓度的升高而升高, 荧光强度升高的幅度为44.6%。L-苯丙氨酸传感器3-2E6在L-苯丙氨酸浓度为0.1-50μM时, 传感器的荧光强度随L-苯丙氨酸浓度的升高而升高, 荧光强度升高的幅度为290%。L-脯氨酸传感器在L-苯丙氨酸浓度为10-500μM时, 传感器的荧光强度随L-脯氨酸浓度的升高而升高, 荧光强度升高的幅度为12.4%。苯甲酸传感器在苯甲酸浓度为0.1-25μM时, 传感器的荧光强度随苯甲酸浓度的升高而升高, 荧光强度升高的幅度为15.9%。可见小分子在一定浓度时, 传感器的荧光强度会随小分子浓度的变化而变化, 在一定范围内小分子的浓度与荧光信号强弱呈线性关系, 可以通过测量荧光强度确定小分子的浓度。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 中国科学院天津工业生物技术研究所
- [0003] <120> 一种小分子荧光传感器及其应用
- [0004] <160> 34
- [0005] <170> PatentIn Version 3.1
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 542
- [0008] <212> PRT
- [0009] <213> *Nicotiana tabacum*
- [0010] <400> 1
- [0011] MEKDTKQVDI IFRSKLPDIY IPNHLPLHSY CFENISEFSS RPCLINGANK QIYTYADVEL 60
- [0012] NSRKVAAGLH KQGIQPKDTI MILLPNSPEF VFAFIGASYL GAISTMANPL FTPAEVVKQA 120
- [0013] KASSAKIIVT QACHVNKVKD YAFENDVKII CIDSAPEGCL HFSVLTQANE HDIPEVEIQP 180
- [0014] DDVVALPYSS GTTGLPKGVM LTHKGLVTSV AQQVDGENPN LYIHSEVML CVLPLFHIYS 240
- [0015] LNSVLLCGLR VGAAILIMQK FDIVSFLELI QRYKVTIGPF VPPIVLAIK SPMVDDYDLS 300
- [0016] SVRTVMSGAA PLGKELEDTV RAKFPNAKLG QGYGMTEAGP VLAMCLAFK EPFEIKSGAC 360
- [0017] GTVVRNAEMK IVDPKTGNLS PRNQSGEICI RGDQIMKGYL NDPEATARTI DKEGWLYTGD 420
- [0018] IGYIDDDDEL FIVDRKELI KYKGFQVAPA ELEALLNHP NISDAAVVPM KDEQAGEVPV 480
- [0019] AFVVRNNGST ITEDEVKDFI SKQVIFYKRI KRVFFVDAIP KSPSGKILRK DLRAKLAAGL 540
- [0020] PN 542
- [0021] <210> 2
- [0022] <211> 1626
- [0023] <212> DNA
- [0024] <213> *Nicotiana tabacum*
- [0025] <400> 2
- [0026] atggagaagg ataccaaaca ggtggacatt atttttcgca gcaagctgcc ggatatttat 60
- [0027] attccgaacc atctgccgct gcatagctat tgctttgaga acatcagcga atttagcagc 120
- [0028] cgcccgctgt taattaacgg cgcgaaacaa cagatttata cctacgcgga tgtggaactg 180
- [0029] aacagccgca aagttgcggc gggcttacat aaacagggca ttcagccgaa agataccatt 240
- [0030] atgattctgc tgccgaacag cccggaattt gtgtttgctg ttattggcgc gagctatctg 300
- [0031] ggtgcgatta gcactatggc gaaccggtta tttaccccg cggaagtggg gaaacaggcg 360
- [0032] aaagcgagca gcgcgaaaat tattgtgacc caggcgtgcc atgtgaacaa agtgaaggat 420
- [0033] tacgcgtttg agaacgacgt gaagatcatc tgcattgata gcgcgccgga aggctgctta 480
- [0034] cattttagcg tgctgacca ggcgaaacaa catgatattc cggaagtgga aattcagccg 540
- [0035] gatgatggtg tggcgtgcc gtatagcagc ggtaccaccg gtttaccgaa aggcgttatg 600
- [0036] ctgaccata aaggcctggt gaccagcgtt gcgcagcaag ttgatggcga aaaccggaac 660
- [0037] ctgtatattc atagcgaaga tgtgatgctg tgcgtgctgc cgctgtttca tatttatagc 720
- [0038] ctgaacagcg tgctgctgtg tggtttacgt gtgggcgcgg cgattctgat tatgcagaag 780
- [0039] tttgacatcg tgagctttct ggaactgatt cagcgtata aagtgacat tggcccgttt 840
- [0040] gtgccgccta ttgtgctggc gattgcgaaa agcccgatgg tggatgatta tgatctgagc 900
- [0041] agcgtgcgta ctgttatgctc aggcgcggcg cctttaggca aagaactgga agataccgtg 960

[0042] cgcgcgaaat ttccgaacgc gaaactgggt cagggctatg gtatgaccga agcgggtcct 1020  
 [0043] gtgttagcga tgtgtctggc gtttgcgaaa gaaccgttcg aaattaaaag cggcgcgctgc 1080  
 [0044] ggtaccgttg ttcgcaacgc ggaaatgaaa attgtggatc cgaaaaccgg caatagcctg 1140  
 [0045] cctcgtaac aaagcggcga aatttgcatt cgcgcgatc agattatgaa aggctatctg 1200  
 [0046] aacgatcctg aagcaaccgc gcgcaccatt gataaagaag gctggctgta taccggcgat 1260  
 [0047] attgctata ttgacgatga tgacgagctg tttattgtgg atgcctgaa agaactgatt 1320  
 [0048] aagtataagg gctttcaggt ggcgctgcg gaattagaag cgctgctgct gaaccatccg 1380  
 [0049] aacattagcg atgcagcggg ggtgccgatg aaagatgaac aggcgggcga agtgcctggt 1440  
 [0050] gcgtttgtgg ttcgctcaaa cggcagcacc attaccgaag atgaagtga ggacttcatt 1500  
 [0051] agcaagcagg tgatTTTTTA caagcgcac aagcgcgtgt ttttcgtgga tgcgattccg 1560  
 [0052] aaaagcccga gcggcaaaat tctgcgcaaa gatctgcgtg cgaaattagc ggcgggctta 1620  
 [0053] cctaatt 1626  
 [0054] <210> 3  
 [0055] <211> 632  
 [0056] <212> PRT  
 [0057] <213> Bacillus licheniformisATCC10716  
 [0058] <400> 3  
 [0059] IKRVAEQVTA NENRKIAEID MLAEERKTL LYEFNRTNAD YPRNKTIHQL FEEQAERTPG 60  
 [0060] HTAVVFEKEE LSYKALNERS NQLAGLLREK GVKPDMIVGV MAERSVEMIV GMLAVLKAGG 120  
 [0061] AYLPIIDPEYP EDRIRYMIED SGISILLKKA DKQIDVDFTC IDMNEKGLAK DMAAENLGH 180  
 [0062] SGSSDMAYVI YTSGSTGKPK GVMVNHQSIV NTLYWRKQSY GYSTADATLQ VPSFSDSSV 240  
 [0063] EDIFTTLISG AKLVLIRDLR MNPRIIGVL RTHKATNLLA VPSFYLNLLD TIEQPLDDL 300  
 [0064] FVTVAGEGFN ESLIRQHFEK LPNVKLFNEY GPTENSVCST RGELRKDDEK VVIGRPISNH 360  
 [0065] KVIILNHNQQ LLPLGTPGEL CLSGLGLARG YLNRPDLTLE KFVNPFPAPG ESMYRTGD 420  
 [0066] RFLPDGQIEY LGRIDHQVKI RGFRIELGEI ENQLLKIEGI DAAVMARED QAGGKYLCAY 480  
 [0067] IVADKAAGVA DVRKCLLKL PDYMPVPSYFV KLDQLPLTAN GKIDRKALPE PSSTISEATY 540  
 [0068] EAPRNRTTEK LVSIWEDVLG IENIGISHNF FELGGHSLKA AALTAKLHKE MKIEVPLRQL 600  
 [0069] FETPTIKDIG DFIESMKESP YASITQAEK LE 632  
 [0070] <210> 4  
 [0071] <211> 1896  
 [0072] <212> DNA  
 [0073] <213> Bacillus licheniformisATCC10716  
 [0074] <400> 4  
 [0075] atcaaaaggg tcgctgagca agtgacggca aatgagaacc ggaaaattgc agagattgac 60  
 [0076] atgctggcgg aggaagaaag aaagacgctc ctatatgagt tcaaccggac aaacgcagat 120  
 [0077] tatccaagga ataaaacgat ccatcaatta tttgaagaac aggcggaac gacgcctggg 180  
 [0078] catactgcgg ttgtatttga aaaggaggag ctttcttaca aagcattgaa tgaaaggta 240  
 [0079] aatcagctgg cgggactgtt aagggaaaaa ggcgtcaaac ctgacatgat cgtcggcgtt 300  
 [0080] atggcggaac gttctgtgga gatgatcgtc ggaatgctgg cggtgctgaa agccggaggc 360  
 [0081] gcatacttgc cgatcgatcc cgaatatccg gaagaccgga tcaggtacat gatcgaagac 420  
 [0082] agcggcatca gcatcctgct gaaaaaggcg gacaaacaga ttgacgttga tttcacctgt 480  
 [0083] atcgatatga acgaaaaagg gctggcaaaa gacatggcgg cagagaactt agggcacacg 540

[0084]	agcggctctt cgcacatggc ttatgtcatc tatacttcag gttcgaccgg aaagccgaag	600
[0085]	ggtgtcatgg tcaaccatca atcaattgtc aatacgttt attggaggaa acaatcgtat	660
[0086]	ggctacagta cagecgatgc cacgcttcaa gtgccgtcct tttctttcga cagttctgtt	720
[0087]	gaagatattt tcacgacgct tatactctggg gcgaagctgg ttttaattag agattttacgg	780
[0088]	atgaatccgc gtgagatcat cggcgtgctg cgaacgcata aagcgacaaa cttgctggcc	840
[0089]	gttccgagct tttatctaaa cctgctcgac acgattgagc agcctttaga cgatttaaga	900
[0090]	tttgtcacgg tcgcagggga aggcttcaat gaaagtctga tccggcagca ttttgaaaag	960
[0091]	ctgccgaacg tcaaattgtt taatgaatac ggaccgacgg aaaacagcgt ttgctcaacg	1020
[0092]	cggggcgagc tgcgaaaaga tgacgaaaaa gtcgtcatcg gccggccgat cagcaaccac	1080
[0093]	aaggtttata ttttaaatca caaccagcag ctgctgccgt tgggcacgcc cgggtgaactt	1140
[0094]	tgtctgagcg gggaaggcct tgcccgcgga tacttaaaaca gaccagacct cacgcttgaa	1200
[0095]	aaatttgttc caaacccgtt tgctccaggg gaaagcatgt accggacggg ggatctcgea	1260
[0096]	agatttttgc ctgatgttca aatcgaatat ttaggaagaa tcgaccacca agtcaaaatc	1320
[0097]	cgcggattca gaatcgaact gggcgaaatc gaaaaccaat tgctgaaat cgaaggcatt	1380
[0098]	gacgcggcag cagtcattggc gcgggaagat caagccggcg gcaataacct atgcgcatat	1440
[0099]	atcgtcggg acaaagcggc aggcgttga cagctcagaa aatgcttgtt aaaggaactg	1500
[0100]	ccgattaca tgggtccgtc atactttgtc aagcttgatc aattgccgt tacggcaaac	1560
[0101]	ggcaaatcg acagaaaagc gtcctctgaa cctagcagca caatcagtga agcgacgtac	1620
[0102]	gaagcaccga ggaaccgcac agaggaagaa cttgtctcaa tctgggagga cgttttaggg	1680
[0103]	atcgaaaaca tcggaatcag ccacaatttc tttgaacttg gcggccattc cttaaaagct	1740
[0104]	gcggcattga ctgcaaaatt gcataaagaa atgaagattg aagtcccttt aagacaacta	1800
[0105]	ttcgaaacac cgacaattaa agacatcggg gattttatcg aatccatgaa agaaagcccg	1860
[0106]	tatgcgtcca tcacacaggc ggaagagaaa ctcgag	1896
[0107]	<210>	5
[0108]	<211>	523
[0109]	<212>	PRT
[0110]	<213>	Brevibacillus brevis
[0111]	<400>	5
[0112]	MLNSSKSILI HAQKNGTHE EEQYLFVNN TKAEYPRDKT IHQLFEEQVS KRPNNVAIVC	60
[0113]	ENEQLTYHEL NVKANQLARI FIEKGIGKDT LVGIMMEKSI DLFILAVL KAGGAYVPID	120
[0114]	IEYPKERIQY ILDDSQARML LTQKHLVHLI HNIQFNGQVE IFEEDTIKIR EGTNLHVPSK	180
[0115]	STDLAYVIYT SGTTGNPKGT MLEHKGISNL KVFFENSLNV TEKDRIGQFA SISFDASVWE	240
[0116]	MFMALLTGAS LYIILKDTIN DFKFEQYIN QKEITVITLP PTYVVHLDPE RILSIQTLIT	300
[0117]	AGSATSPSLV NKWKEKVTYI NAYGPTETTI CATTWATKE TIGHSVPIGA PIQNTQIYIV	360
[0118]	DENLQLKSVG EAGELCIGGE GLARGYWKRP ELTSQKFVDN PFVPGEKLYK TGDQARWLS	420
[0119]	GNIEYLGRID NQVKIRGHRV ELEEVESELL KHMYSSETAV SVHKDHQEQP YLCAYFVSEK	480
[0120]	HIPLEQLRQF SSEELPTYMI PSYFIQLDKM PLTSNGKIDR KQL	523
[0121]	<210>	6
[0122]	<211>	1569
[0123]	<212>	DNA
[0124]	<213>	Brevibacillus brevis
[0125]	<400>	6

[0126]	atgttaaaca gttctaaaag tatattgatt catgctcaaa ataaaaatgg aacgcatgaa	60
[0127]	gaggagcagt atctctttgc tgtgaacaac accaaagcgg agtatccacg tgataagacg	120
[0128]	atccatcagt tatttgaaga gcaggtagt aagagaccaa acaatgtacg cattgtatgt	180
[0129]	gaaaatgagc aacttaccta ccatgagctt aatgtgaaag ccaatcaact agcacggatt	240
[0130]	tttatagaaa aagggattgg aaaagacact cttgttgaa ttatgatgga gaaatctatc	300
[0131]	gatttattta taggcatatt agccgtttta aaagcaggtg gagcatatgt tccgattgat	360
[0132]	attgaatata ctaaggaaag aattcaatat attccttgatg atagtcaggc aagaatgcta	420
[0133]	cttaccaga agcatttgg tcatttaatt cataatattc aatttaatgg gcaagtggaa	480
[0134]	atgttgaag aagatactat caaaattaga gaaggaacta atctacatgt accaagtaaa	540
[0135]	tcaaccgatc ttgcttatgt tatttatact tctggtacaa caggcaatcc aaaaggtaca	600
[0136]	atgctggagc ataaaggaat aagtaatcta aaggtathtt tcgaaaatag tcttaacgtg	660
[0137]	actgaaaagg atagaattgg tcaatttgc agcatctctt ttgatgcatc tgtatgggag	720
[0138]	atgtttatgg ctttgtaac gggggctagc ctgtatatta tcctgaagga tacaatcaat	780
[0139]	gattttgtga agtttgaaca atacattaac caaaaggaaa tcaactgttat tacgttacca	840
[0140]	cctacctatg tagttcatct tgatccagaa cgtatthttat cgatacaaac gttattaca	900
[0141]	gcaggetcag ctacctgcc ttcttagta aacaagtga aggagaaagt aacttacata	960
[0142]	aatgcctatg gccctacgga aacaactatt tgtgcgacta catgggtagc caccaaagaa	1020
[0143]	acaataggtc attcagttcc aatcggagca ccaattcaaa atacacaaat ttatattgtc	1080
[0144]	gatgaaaatc ttcaattaaa atcggttggg gaagctggtg aattgtgtat tgggtggagaa	1140
[0145]	gggttagcaa ggggatattg gaagcgaccg gaattaactt cccagaagt cgttgataac	1200
[0146]	ccgtttgttc caggagagaa gttgtataaa acaggagatc aggcaagatg gctatctgat	1260
[0147]	ggaaatattg aatatctcgg aagaatagat aaccaggtaa agattagagg tcaccgagtt	1320
[0148]	gaactagaag aagttgagtc tattcttcta aagcatatgt atattagcga aactgcagta	1380
[0149]	agtgatcata aagatcacca agaacagccg tatttgtcgc cttatthttgt atcggaaaag	1440
[0150]	catataccac tagaacagtt aagacaattc tcatcagaag aactgccaac gtatatgatc	1500
[0151]	ccttcttatt ttatccagtt agacaaaatg ccgcttacat caaatgggaa gattgatcga	1560
[0152]	aagcagttg	1569
[0153]	<210>	7
[0154]	<211>	630
[0155]	<212>	PRT
[0156]	<213>	Brevibacillus brevis
[0157]	<400>	7
[0158]	LCVANNPHVL VQDVPLLTQK EKQHLLVELH DSITEYDPKT IHQLFTEQVE KTPEHVAVVF	60
[0159]	EDEKVTYREL HERSNQLARF LREKGVKKES IIGIMMERSV EMIVGILGIL KAGGAFVPID	120
[0160]	PEYPKERIGY MLDSVRLVLT QRHLKDKFAF TKETIVIEDP SISHELTEEI DYINESEDLF	180
[0161]	YIIYTSGETG KPKGVMLEHK NIVNLLHFTF EKTNINFSKD VLQYTTCSFD VCYQEIFSTL	240
[0162]	LSGGQLYLIR KETQRDVEQL FDLVKRENIE VLSFPVAFK FIFNEREFIN RFPTCVKHII	300
[0163]	TAGEQLVVNN EFKRYLHEHN VHLHNHYGPS ETHVTTYTI NPEAEIPELP PIGKPISNTW	360
[0164]	IYILDQEQQL QPQGIVGELY ISGANVGRGY LNNQELTAEK FFADPFRPNE RMYRTGLAR	420
[0165]	WLPDGNIEFL GRADHQVKIR GHRIELGEIE AQLLNCKGVK EAVVIDKADD KGGKYLCAVY	480
[0166]	VMEVEVNDSE LREYLKALP DYMIPFFVPL LDQLPLTPNG KIDRKSPLNL EGI VNTNAYK	540
[0167]	VVPTNELEEK LAKIWEVVLG ISQIGIQDNF FSLGGHSLKA ITLISRMNKE CNVDIPLRL	600

- [0168] FEAPTIQEIS NYINGAKKES YVAIQPVPEQ 630
- [0169] <210> 8
- [0170] <211> 1890
- [0171] <212> DNA
- [0172] <213> *Brevibacillus brevis*
- [0173] <400> 8
- [0174] acatgtgtta gtacaggacg ttctctgct tacaagcaa 60
- [0175] gaaaaacaac atttattggt agagctgcat gattcgataa cagagtatcc tgataagacg 120
- [0176] attcatcagt tatttacaga acaggtagaa aaaacaccag agcatgtggc agttgtattc 180
- [0177] gaagatgaga aagtgcacta tagagagctg catgagagat ctaatcaatt agccagattc 240
- [0178] ttaagagaaa aaggcgtaaa aaaagaaagc atcataggca ttatgatgga gcgttcagtt 300
- [0179] gaaatgattg ttgggatctt agggatttta aaagctgggt gagcttttgt gcctattgat 360
- [0180] cctgaatatc caaaagaaag aatcggtat atgttagatt ctgtacggct agtacttaca 420
- [0181] caacgccatt taaaggataa atttgctttt acgaaagaaa cgatagtaat tgaagatcca 480
- [0182] agtatttcac acgagttaac tgaagaata gattatatta atgaatcaga ggacttgttt 540
- [0183] tatattattt atacatcagg aacaacaggt aaacaaaag gggttatget agagcacaaa 600
- [0184] aacatcgta atctgcttca ttttactttc gagaaaaca atatcaactt tagtgacaaa 660
- [0185] gtattacagt atacaacatg cagttttgat gtgtgttacc aagaaatttt ttcgacgctc 720
- [0186] ttgtctggag ggcaattata tcttattagg aaagaaactc aacgcgatgt agagcaatta 780
- [0187] tttgatttag taaaacgtga aatattgaa gtattatctt ttctgtggc ttttctaaaa 840
- [0188] tttattttca atgaaagaga atttatcaat cgttttccaa cttgcgtgaa acatattatc 900
- [0189] acagcaggag aacaattagt agttaacaat gagtttaaac gttatttgca tgaacataac 960
- [0190] gtacatttac acaatcatta tgggccatca gaaacgcgatg ttgttaccac ctatactatt 1020
- [0191] aatcctgaag ctgaaattcc tgaattacca cccgataggaa aacctatctc caatacatgg 1080
- [0192] atttatattt tggatcaaga acaacaacta caaccacaag gaattgtagg agagttatat 1140
- [0193] atttcgggcg caaatgttg aagaggatat ttgaataatc aagaattaac ggcagaaaaa 1200
- [0194] ttctttgcag atcccttag gccaaacgaa cggatgtacc gaacagggga tttagcaagg 1260
- [0195] tggttgccag acggaaatat cgaattttta ggaagagccg atcatcaggt gaaaattagg 1320
- [0196] gggcatcgaa tagagcttg tgagatcgag gcacaattat taaattgtaa ggggtgtaaa 1380
- [0197] gaagctgttg ttatcgataa agcggatgat aaaggcggaa aatatttatg tgcctatggt 1440
- [0198] gttatggaag tagaagtaaa tgactctgag cttcgagaat atttggggaa agctttgcct 1500
- [0199] gattatatga tcccgtcgtt cttgttccg ttggatcagc tgccgcttac accaaacgga 1560
- [0200] aaaatagaca gaaaatctct tccgaatcta gaggggattg tgaatacaaa cgcaaaatat 1620
- [0201] gtagtaccta caaatgagct ggaagaaaaa ttggctaaaa tatgggaaga agtacttggg 1680
- [0202] atttctcaga tcggtataca agacaatttc ttttcgtag gcgggcattc tcttaaagcc 1740
- [0203] attacgctta tttcccgtat gaacaaagag tgtaatgtag acattcctct acgtttgta 1800
- [0204] tttgaagcac caaccattca gaaatctct aattatataa acggggcaaa gaaagaaagc 1860
- [0205] tatgttgcca ttcagcctgt accagaacaa 1890
- [0206] <210> 9
- [0207] <211> 788
- [0208] <212> PRT
- [0209] <213> *Segniliparus rugosus* ATCC BAA-974

[0210]	<400> 9	
[0211]	MTESQSYETR MTESQSYETR QARPAGQSLA ERVARLVAID PQAAAAVPDK AVAERATQQG	60
[0212]	LRLAQRIEAF LSGYGRPAL AQRAFEITKD PITGRAVATL LPKFETVSYR ELLERSHAIA	120
[0213]	SELANHAEAP VKAGEFIATI GFTSTDYTSL DIAGVLLGLT SVPLQTGATT DTLKAI A EET	180
[0214]	APAVFGASVE HLDNAVTTAL ATPSVRLLV FDYRQGVDED REAVEAARSR LAEAGSAVLV	240
[0215]	DTLDEVIARG RALPRVALPP ATDAGDSSL LLIYTSGSTG TPKGAMYPER NVAQFWGGIW	300
[0216]	HNAFDDGDSA PDVPDIMVNF MPLSHVAGRI GLMGTLSGG TTYFIAKSDL STFFEDYSLA	360
[0217]	RPTKLLFFVPR ICEMIYQHYQ SELDRIGAAD GSPQAEAIKT ELREKLLGGR VLTAGSGSAP	420
[0218]	MSPELTAFIE SVLQVHLVDG YGSTEAGPVW RDRKLVKPPV TEHKLIDVPE LGYFSTDSFY	480
[0219]	PRGELAIKTQ TILPGYYKRP ETAEVDFED GFYLTGDVVA EVAPEEFVYV DRRKNVLKLS	540
[0220]	QGEFVALSKL EAAYGTSPLV RQISVYSSQ RSYLLAVVVP TPEALAKYGD GEAVKSALGD	600
[0221]	SLQKIAREEG LQSYEVRDF IIETDPFTIE NGILSDAGKT LRPKVKARYG ERLEALYAQL	660
[0222]	AETQAGELRS IRVGERPV IETVQRAAAA LLGASAAEVD PEAHFSDLGG DSLSALTYSN	720
[0223]	FLHEIFQVEV PVSIVISAAN NLRVAAHIE KERSSGSDRP TFASVHGAGA TTIRASDLKL	780
[0224]	EKFLDAQT	788
[0225]	<210> 10	
[0226]	<211> 2334	
[0227]	<212> DNA	
[0228]	<213> <i>Segniliparus rugosus</i> ATCC BAA-974	
[0229]	<400> 10	
[0230]	atgaccgaaa gtcagagtta tgaacccgc caggcccgtc cggcaggtca gtcactggcc	60
[0231]	gaacgtgtgg cccgtctggt tgcaattgat ccgcaggcag ccgcagccgt tccggataaa	120
[0232]	gcagttgcag aacgtgcaac ccagcagggt ctgcgcctgg cacagcgcac tgaagcattt	180
[0233]	ctgagtgggt atggtgaccg cccggcactg gccagcgtg catttgaaat taccaaagat	240
[0234]	ccgattaccg gtcgcgcagt ggcaaccctg ctgccgaaat ttgaaaccgt gagctatcgc	300
[0235]	gaactgctgg aacgtagcca tgcaattgca agtgaactgg ccaatcatgc cgaagccccg	360
[0236]	gttaaagccg gtgagtttat tgcaaccatt ggctttacca gcaccgatta taccagtctg	420
[0237]	gatattgcag gcgtgctgct gggcctgacc agcgtgcctc tgcagaccgg cgcaaccacc	480
[0238]	gataccctga aagccattgc cgaagaaacc gcaccggccg tgtttggcgc aagtgttgaa	540
[0239]	catctggata atgccgtgac caccgcaactg gcaacccga gcgtgcgccg tctgctggtg	600
[0240]	tttgattatc gccagggcgt tgatgaagat cgcaagccg ttgaagccgc ccgtagtcgc	660
[0241]	ctggcagaag ccggtagcgc agtgctggtg gataccctgg atgaagttat tgcccgcggt	720
[0242]	cgtgcaactgc cgcgtgttgc actgccccg gcaaccgatg caggtagcga tagtctgagt	780
[0243]	ctgctgatct ataccagtgg tagtaccggt acaccgaaag gtgccatgta tccggaacgc	840
[0244]	aatgttgcaac agttttgggg cggcatttgg cataatgcat ttgatgatgg cgatagcgc	900
[0245]	ccggatgttc cggatattat ggttaatttt atgccgctga gtcattgtgg cggccgtatt	960
[0246]	ggcctgatgg gcaccctgag cagcggcggg acaacctatt ttattgaaa aagcgatctg	1020
[0247]	agcacccttt tcgaagatta tagcctggcc cgcccacca aactgttttt cgtgccgcgt	1080
[0248]	atctgcgaaa tgatctatca gcattatcag agcgaactgg atcgcattgg cgcagcagat	1140
[0249]	ggcagcccgc agccgaagc aattaagacc gaactgcgtg aaaaactgct ggggtggccgt	1200
[0250]	gttctgaccg ccggcagtggt tagtgccccg atgagcccgg aactgaccgc ctttattgaa	1260
[0251]	agcgtgctgc aggtgcatct ggtggatggt tatggtagca ccgaagccgg tccggtgtgg	1320

[0252]	cgatgatcgta aactgggtgaa accgccgggtt accgaacata aactgattga tgttccggaa	1380
[0253]	ctgggttatt ttagcaccga tagtccgat cgcggtggcg aactggcaat taagacacag	1440
[0254]	accattctgc cgggttatta taaacgccg gaaaccaccg ccgaagtgtt tgatgaagat	1500
[0255]	ggcttttatac tgaccggcga tgttgttgcc gaagtggccc cggaagaatt tgtgtatgtt	1560
[0256]	gatgcgta aaaaatgttct gaaactgagt cagggtgaat ttgttgccct gagcaaaactg	1620
[0257]	gaagccgcct atggtacaag tccgctgggtg cgtcagatta gcgtgtatgg tagtagtcag	1680
[0258]	cgtagctatac tgctggccgt tgttgttccg accccggaag cactggcaaa atatgggtgac	1740
[0259]	ggcgaagcag ttaaaagcgc actgggtgac agtctgcaga aaattgccc cgaagaaggc	1800
[0260]	ctgcagagct atgaagtcc gcgcgatttt attattgaaa ccgatccgtt taccattgaa	1860
[0261]	aatggtattc tgagtgatgc aggtaaaacc ctgcgcccga aagtgaaagc ccgttatggc	1920
[0262]	gaacgtctgg aagcactgta tgcccagctg gccgaaacc aggcaggcga actgcgcagt	1980
[0263]	attcgtgttg gcgccggcga acgtccggtt attgaaaccg tgcagcgtgc cgcgccgcc	2040
[0264]	ttactgggtg ctagcgcagc agaagttgat ccggaagcac attttagtga tctgggtg	2100
[0265]	gatagcctga gtgccctgac ctatagtaat tttctgcatg aaattttcca ggttgaagt	2160
[0266]	ccggtgagtg tgattgttag cgccccaat aatctgcga gcgttgacg ccatattgaa	2220
[0267]	aaagaacgta gcagtggtag cgatcgccc acctttgcaa gtgtgcatgg cgcaggtgcc	2280
[0268]	accaccattc gcgccagtga tctgaaactg gaaaaatttc tggatgcaca gacc	2334
[0269]	<210>	11
[0270]	<211>	241
[0271]	<212>	PRT
[0272]	<213>	人工序列cpEGFP
[0273]	<400>	11
[0274]	NVYIMADKQK NGIKANFKIR HNIEDGGVQL AYHYQQNTPI GDGPVLLPDN HYLSTQSKLS	60
[0275]	KDPNEKRDHM VLLEFVTAAG ITLGMDELYK GGTGGSMSK GEELFTGVVP ILVELDGDVN	120
[0276]	GHKFSVSGEG EGDATYGKLT LKFICTGKLV PVPWPTLVTT LTYGVQCFSR YPDHMKQHDF	180
[0277]	FKSAMPEGYI QERTIFFKDD GNYKTRAEVK FEGDTLVNRI ELKGIDFKED GNILGHKLEY	240
[0278]	N	241
[0279]	<210>	12
[0280]	<211>	723
[0281]	<212>	DNA
[0282]	<213>	人工序列cpEGFP
[0283]	<400>	12
[0284]	aacgtctata tcatggccga caagcagaag aacggcatca aggcaaaact caagatccgc	60
[0285]	cacaacatcg aggacggcgg cgtccagctc gcctaccact accagcagaa caccaccatc	120
[0286]	ggcgacggcc ccgtcctgct gcccgacaac cactacctga gcaccagtc caaactgagc	180
[0287]	aaagaccca acgagaagcg cgatcacatg gtctgctgg agttcgtaac cgccgcccgg	240
[0288]	atcactctcg gcatggacga gctgtacaag ggcggaaccg gcggaagcat ggctagcaag	300
[0289]	ggcgaggagc tgttcaccgg ggtcgtacc atcctggtcg agctggacgg cgacgtaaac	360
[0290]	ggccacaagt tcagcgtctc cggcgagggc gagggcgatg ccacctacgg caagctgacc	420
[0291]	ctgaagttca tctgcaccac cggcaagctg cccgtaccct ggcccaccct cgtcaccac	480
[0292]	ctgacctacg gcgtccagtg cttcagccgc taccaccgacc acatgaagca gcacgacttc	540
[0293]	ttcaagtccg ccatgcccga aggctacatc caggagcga ccatcttctt caaggacgac	600

- [0294] ggcaactaca agacccgcgc cgaggtaag ttcgagggcg acaccctggt caaccgcatc 660
- [0295] gagctgaagg gcatcgactt caaggaggac ggcaacatcc tggggcaciaa gctggagtac 720
- [0296] aac 723
- [0297] <210> 13
- [0298] <211> 40
- [0299] <212> DNA
- [0300] <213> 人工序列4c12-F
- [0301] <400> 13
- [0302] gatataccat gggcagcagc gagaaggata ccaaacaggt 40
- [0303] <210> 14
- [0304] <211> 47
- [0305] <212> DNA
- [0306] <213> 人工序列4c12-R
- [0307] <400> 14
- [0308] tcagtgggtg tggtgggtgt gctcgagatt aggtaagccc gccgcta 47
- [0309] <210> 15
- [0310] <211> 40
- [0311] <212> DNA
- [0312] <213> 人工序列his -N-F
- [0313] <400> 15
- [0314] gatataccat gggcagcagc atcaaaaggg tcgctgagca 40
- [0315] <210> 16
- [0316] <211> 50
- [0317] <212> DNA
- [0318] <213> 人工序列his-pcp-R
- [0319] <400> 16
- [0320] atctcagtgg tggtgggtgt ggtgctcgag tttctcttcc gcctgtgtga 50
- [0321] <210> 17
- [0322] <211> 40
- [0323] <212> DNA
- [0324] <213> 人工序列GrsAa-F
- [0325] <400> 17
- [0326] atataccatg ggcagcagca tgtaaacag ttctaaaagt 40
- [0327] <210> 18
- [0328] <211> 47
- [0329] <212> DNA
- [0330] <213> 人工序列GrsAapcp-R
- [0331] <400> 18
- [0332] tcagtgggtg tggtgggtgt gctcgagttg ctacttctt cttttac 47
- [0333] <210> 19
- [0334] <211> 40
- [0335] <212> DNA

- [0336] <213> 人工序列GrsAa-R  
[0337] <400> 19  
[0338] tgggtgggt ggtgctcgag caactgcttt cgatcaatct 40  
[0339] <210> 20  
[0340] <211> 40  
[0341] <212> DNA  
[0342] <213> 人工序列Pro-F  
[0343] <400> 20  
[0344] gatataccat ggcagcagc ttatgcgtgg caaataatcc 40  
[0345] <210> 21  
[0346] <211> 49  
[0347] <212> DNA  
[0348] <213> 人工序列Pro-R  
[0349] <400> 21  
[0350] tctcagtgg ggtgggtgg gtgctcgagt tgttctggta caggctgaa 49  
[0351] <210> 22  
[0352] <211> 40  
[0353] <212> DNA  
[0354] <213> 人工序列SrCAR-F  
[0355] <400> 22  
[0356] tttaagaagg agatatacat atgaccgaaa gtcagagtta 40  
[0357] <210> 23  
[0358] <211> 48  
[0359] <212> DNA  
[0360] <213> 人工序列  
[0361] <400> 23 SrCAR-R  
[0362] atctcagtgg tgggtgggt ggtgctcgag ggtctgtgca tccagaaa 48  
[0363] <210> 24  
[0364] <211> 46  
[0365] <212> DNA  
[0366] <213> 人工序列cp-4CL2-MF  
[0367] <223> b=c或g或t,n=g或a或t或c,k=g或t  
[0368] <400> 24  
[0369] ggcacaagct ggagtacaac bnkbnkatta agtataagg ctttca 46  
[0370] <210> 25  
[0371] <211> 46  
[0372] <212> DNA  
[0373] <213> 人工序列cp-4CL2-MR  
[0374] <223> n=g或a或t或c,m代表a或c,v=a或g或c  
[0375] <400> 25  
[0376] tcggccatga tatagacgtt mnvmnvcagt tctttcagc gatcca 46  
[0377] <210> 26

- [0378] <211> 46  
[0379] <212> DNA  
[0380] <213> 人工序列his-pcp-R  
[0381] <223> n=g或a或t或c,m代表a或c,v=a或g或c  
[0382] <400> 26  
[0383] tcggccatga tatagacggt mnvmnvgtta ggttcaggga gcgctt 46  
[0384] <210> 27  
[0385] <211> 46  
[0386] <212> DNA  
[0387] <213> 人工序列his-pcp-F  
[0388] <223> b=c或g或t,n=g或a或t或c,k=g或t  
[0389] <400> 27  
[0390] ggcacaagct ggagtacaac bnkbnkagca caatcagtga agcgac 46  
[0391] <210> 28  
[0392] <211> 47  
[0393] <212> DNA  
[0394] <213> 人工序列cp-GrsA-R  
[0395] <223> n=g或a或t或c,m代表a或c,v=a或g或c  
[0396] <400> 28  
[0397] gtcggccatg atatagacgt tmvmnvcgg caactgcttt cgatcaa 47  
[0398] <210> 29  
[0399] <211> 46  
[0400] <212> DNA  
[0401] <213> 人工序列cp-GrsAp-F  
[0402] <223> b=c或g或t,n=g或a或t或c,k=g或t  
[0403] <400> 29  
[0404] ggcacaagct ggagtacaac bnkbnkgaac ctgatttaac tttcgg 46  
[0405] <210> 30  
[0406] <211> 50  
[0407] <212> DNA  
[0408] <213> 人工序列cp-GrsA-F  
[0409] <223> b=c或g或t,n=g或a或t或c,k=g或t  
[0410] <400> 30  
[0411] ggcacaagct ggagtacaac bnkbnkcacc accaccacca ccaactgagat 50  
[0412] <210> 31  
[0413] <211> 46  
[0414] <212> DNA  
[0415] <213> 人工序列cp-GrsB-R  
[0416] <223> n=g或a或t或c,m代表a或c,v=a或g或c  
[0417] <400> 31  
[0418] tcggccatga tatagacggt mnvmnvcgga agagattttc tgtctta 46  
[0419] <210> 32

- [0420] <211> 46  
[0421] <212> DNA  
[0422] <213> 人工序列cp-GrsB-F  
[0423] <223> b=c或g或t,n=g或a或t或c,k=g或t  
[0424] <400> 32  
[0425] ggcacaagct ggagtacaac bnkbnkaatc tagaggggat tgtgaa 46  
[0426] <210> 33  
[0427] <211> 46  
[0428] <212> DNA  
[0429] <213> 人工序列cp-SrCAR-R  
[0430] <223> n=g或a或t或c,m代表a或c,v=a或g或c  
[0431] <400> 33  
[0432] tcggccatga tatagacgtt mnvmnvggcc agctgggcat acagtg 46  
[0433] <210> 34  
[0434] <211> 46  
[0435] <212> DNA  
[0436] <213> 人工序列cp-SrCAR-R  
[0437] <223> b=c或g或t,n=g或a或t或c,k=g或t  
[0438] <400> 34  
[0439] ggcacaagct ggagtacaac bnkbnkgaaa cccaggcagg cgaact 46  
[0440] 10

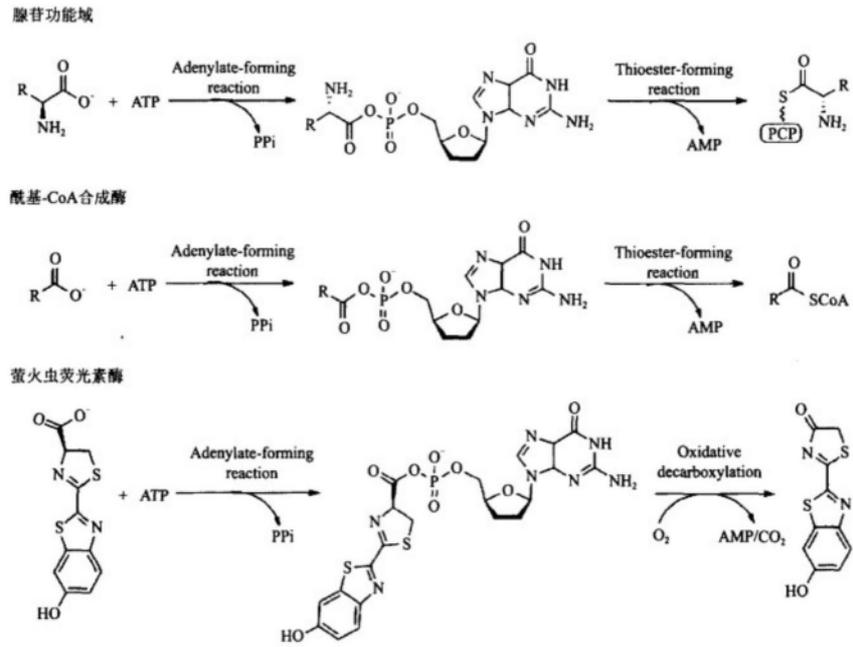


图1

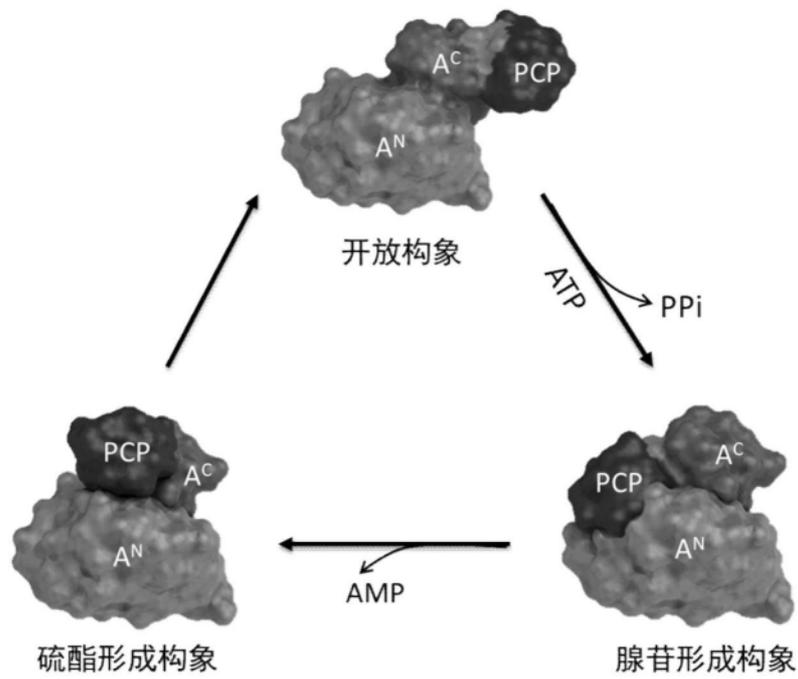


图2

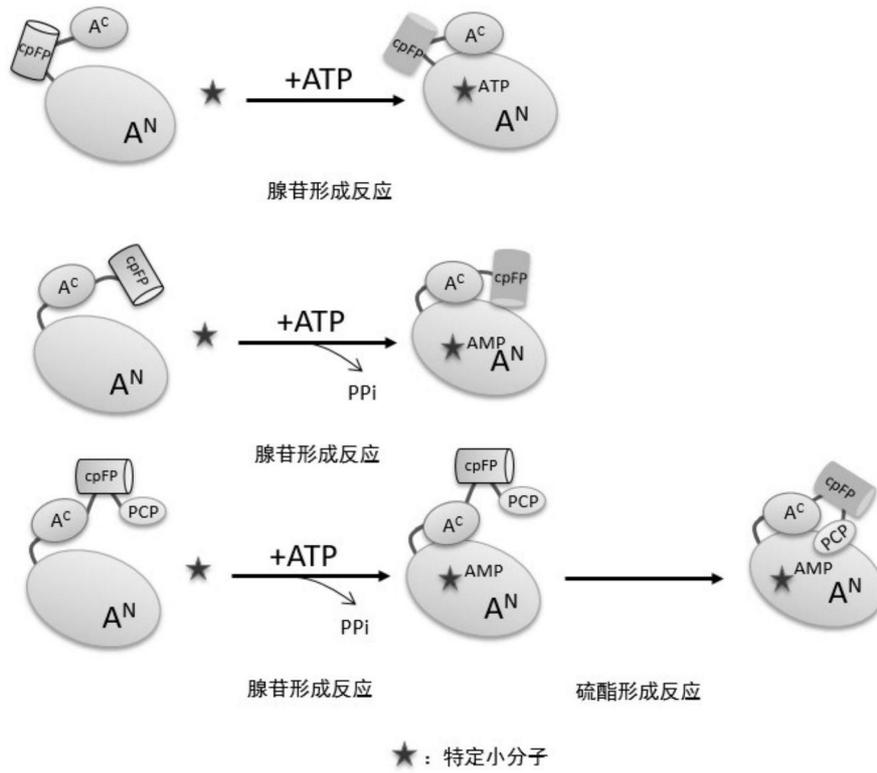


图3

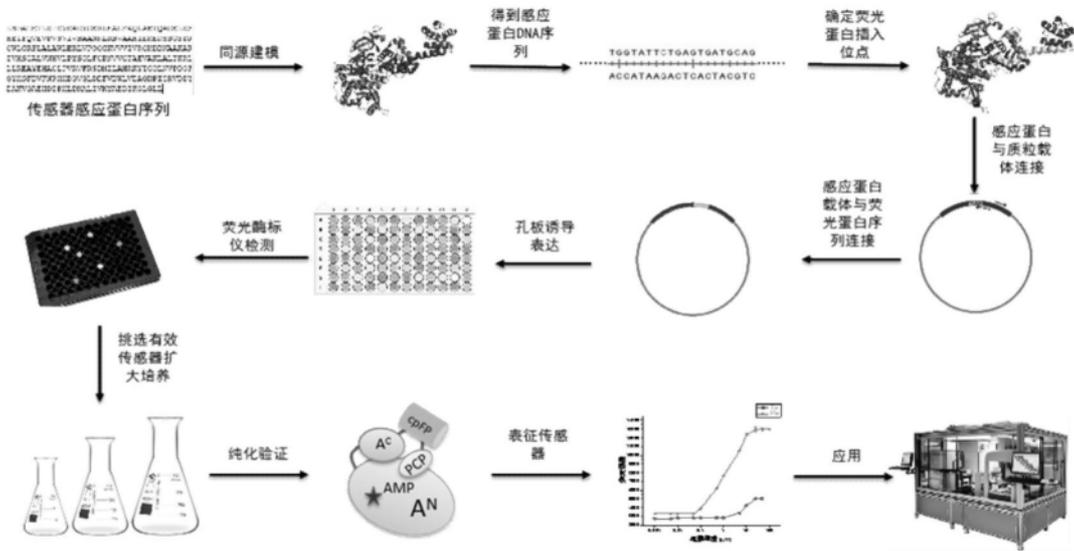


图4

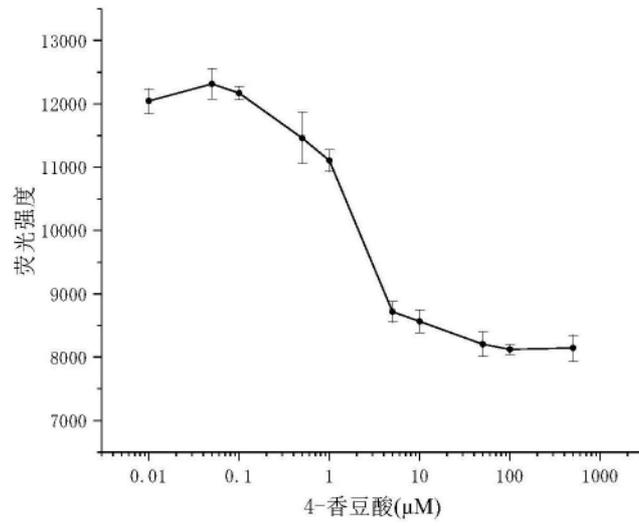


图5

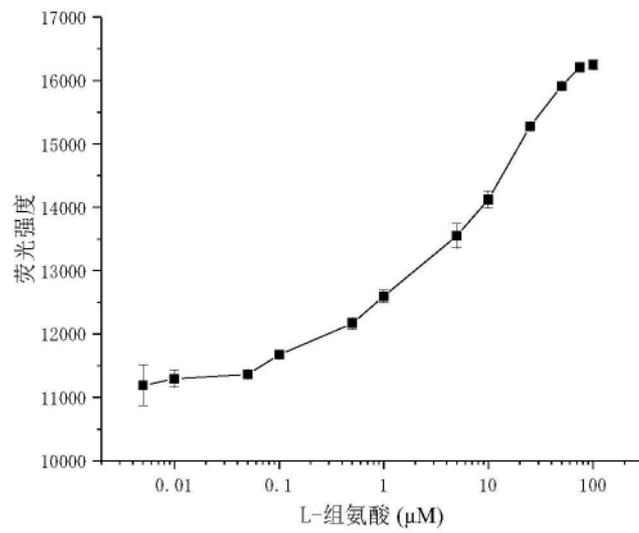


图6

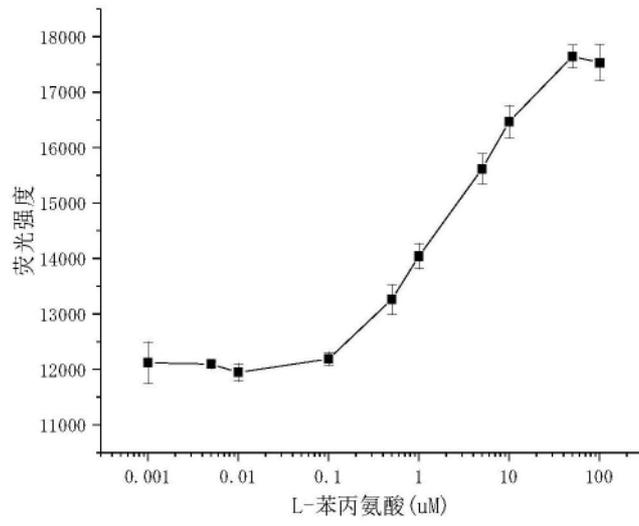


图7

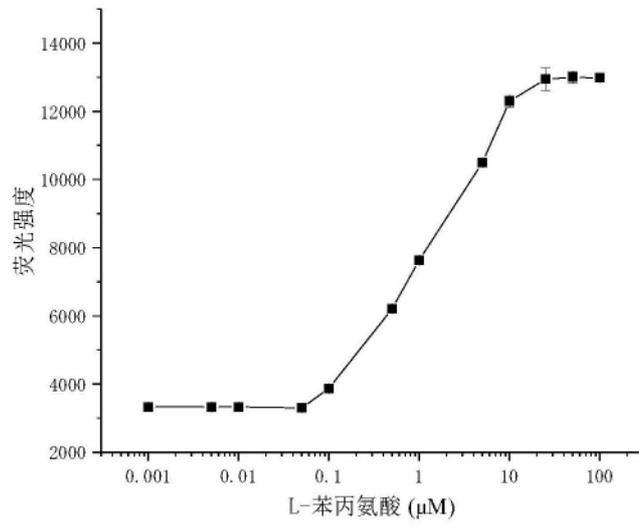


图8

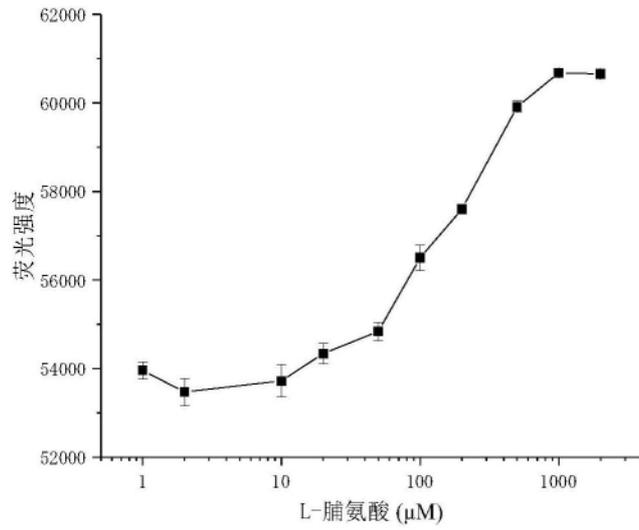


图9

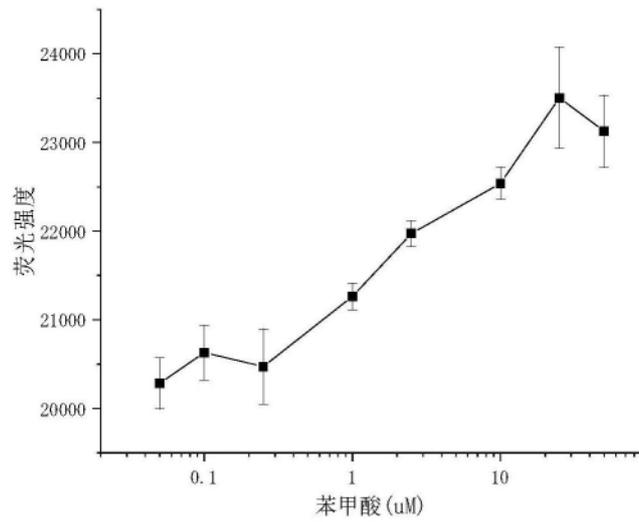


图10